(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0011602
(43) 공개일자 2013년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0072880
(22) 출원일자 2011년07월22일
심사청구일자 2011년07월22일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수 기자촌아파트 201-1601호 (방이동)
이선희
서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)
전은영
서울특별시 중구 퇴계로90길 59-8, C동 402호 (신당동, 동남빌라)
(74) 대리인
양부현

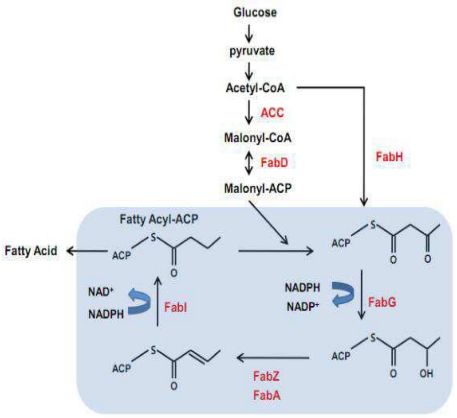
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **긴사슬 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 긴사슬(long-chain) 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, (a) *fabG*(β-케토아실-[아실-전송-단백질] 리덕테이즈), *fabZ*(β-하이드로아실-[아실-전송-단백질] 다히아드레이즈), *fabI*(β-에노일-[아실-전송-단백질] 리덕테이즈) 또는 *fabH*(β-케토아실-[아실-전송-단백질] 신타아제Ⅲ)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및 *fabH*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계.에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공할 수 있으며, 글루코오즈를 하이드로카본으로 전환시키는 지방산 신장 단계의 재조합 대장균을 제공한다. 또한 본 발명은 하나 이상의 유전자 조합에 따라 미생물의 지방산 생합성 대사산물의 생산을 증대 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0028809
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기후변화대응 기초,원천기술개발사업
연구과제명	바이오매스를 이용한 C3-C6 화합물 대체연료 생산 원천기술 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2009.09.30 ~ 2015.09.29

특허청구의 범위

청구항 1

다음을 포함하는 긴사슬(long-chain) 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) *fabG*(β-케토아실-[아실-전송-단백질] 리덕테이즈), *fabZ*(β-하이드로아실-[아실-전송-단백질] 다히아드레이즈), *fabI*(β-에노일-[아실-전송-단백질] 리덕테이즈) 또는 *fabH*(β-케토아실-[아실-전송-단백질] 신타아제Ⅲ)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및 *fabH*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *fabB*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *fabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 *fabZ*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 *fabI*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabZ* 유전자의 서열, 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabI* 유전자의 서열 , 전사 터미네이터 서열을 포함하는

것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabI* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabI* 유전자의 서열, *fabH* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 12

제 6 항 내지 제 11 항에 있어서, 상기 프로모터는 lac 프로모터임을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 13

제 6 항 내지 제 11 항에 있어서, 상기 전사 터미네이터는 rrrB 터미네이터인 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 대장균을 형질전환시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 15

상기 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 형질전환된 대장균.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 긴사슬 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올(Bioethanol), 바이오디젤(Biodiesel), 바이오가스(Biohydrogen) 및

바이오부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있다. 그러나 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가 되고 있다. 이에 따라 긴사슬 지방산(long chain fatty acid)을 대사산물로 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

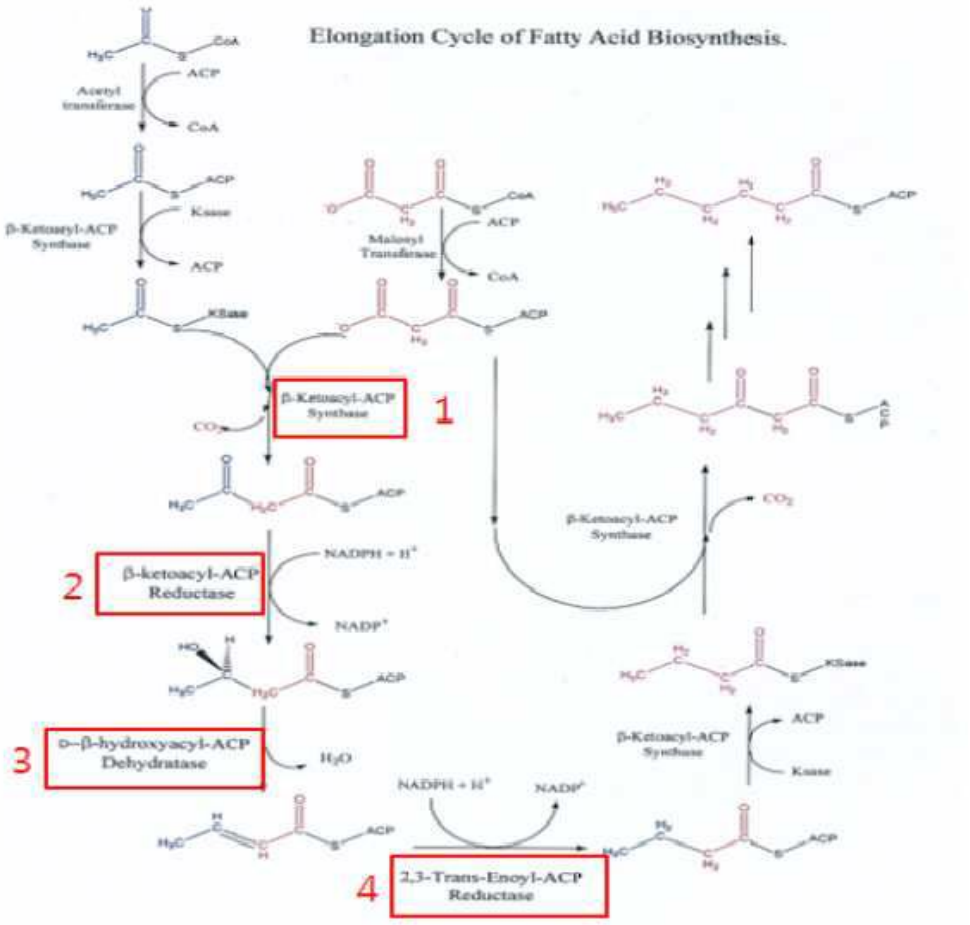
[0003] 본 발명은 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase), β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈(β-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase), β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-enoyl-[acyl carrier protein] reductase) 또는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthaseⅢ)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 긴 사슬 지방산 함량 증진을 위한 형질전환 대장균 및 제조방법에 관한 것이다.

[0004] 미생물의 지방산 경로 대사흐름에서 지방산 생산의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 대장균은 효소 생산 시스템은 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다. 대장균은 다루기 쉬운 미생물로 성장력이 좋으며 경로 조절이 쉬운 것으로 알려져 있다.

[0005] 본 발명은 대장균의 지방산 생합성 신장 단계에 필수적으로 관여하는 효소들을 과발현함으로써 지방산 생합성(fatty acid biosynthesis: FAS)의 신장 순환을 활발하도록 대사 흐름을 향상시키고 긴 사슬의 지방산을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0006] 박테리아, 그중 대장균은 지방산 합성의 Ⅱ형 타입로 분리될 수 있다. 이들의 지방산 생합성 신장의 첫 번째 단계는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ (KASⅢ, *fabH*)에 의해 촉매 되어지는 아실-CoA 기질과 함께 말로닐-[아실운반단백질]의 농도에 의한 카르복실을 제거(decarboxylative)하는 것이다. 차후의 지방산 대사에서 신장 단계는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ와 아실-CoA 기질보다 아실-[아실운반단백질]의 활용에 따라 다르게 촉매 되어진다.

[0007] β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ의 첫 반응은 말로닐-[아실운반단백질]와 아세틸-CoA의 농축이다. 이는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ 효소 중에 독특한 것으로 아세틸-CoA가 공여자로 사용되고 아세틸-CoA [아실운반단백질] 트랜스아실레이즈 활성을 가지게 해준다. β-케토아실-[아실운반단백질]신타아제Ⅲ, *fabH* 유전자는 아세틸-CoA에서 CO_2와 H_2O가 제외되면서 아세토아실-[아실운반단백질]로 지방산이 합성되어지며 또한 말로닐-[아실운반단백질]로부터 β-케토아실-[아실운반단백질]로 만들어져 지방산 회로로 유도된다.



[0008]

[0009] β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ는 식물과 박테리아에서 지방산 생합성의 시작에 중심적 역할을 한다. 지방산 타입 (type)을 결정하는 역할을 하고 식물에서는 유전자 조작으로 오일의 구성을 바꿀 수 있었다. 대장균과 같은 대부분의 박테리아와 식물들은 직쇄 지방산(straight-chain fatty acids: SCFAs)를 생산한다. β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ에 의한 반응은 위의 그림에서 1번에 해당한다.

[0010] β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ에 의한 축합반응 이후 신장단계에 들어가게 되며 신장은 순환(cycle)되면서 긴 사슬의 지방산을 합성하게 된다. 한 순환 당 두 개의 환원 반응과 한 개의 탈수 반응으로 아세토아세틸-ACP는 아실-ACP로 전환되어 지방산을 생산하게 된다. 지방산 생합성 순환은 한번 순환에 두 개의 탄소단위를 만들며 첫 번째 순환은 아세틸-CoA(C2)에서 부틸그룹(C4)으로 확장되며 다음 순환은 헥사닐(C6), 오타닐(C8)의 순으로 되며 최종 탄소길이가 C16 또은 C18까지 계속 순환되어진다.

[0011] 첫 번째 환원반응에서 β-케토그룹은 알코올로 환원되어서 β-하이드로아실-[아실운반단백질]을 생산한다. 이 반응을 촉매하는 효소는 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈로 *fabG* 유전자가 이 효소를 암호화한다. β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈에 의한 촉매과정에서 NADPH는 NADP으로 산화되며 공동인자로 이용된다. 이 효소에 의한 반응은 위의 그림 2번에 해당한다.

[0012] 탈수 단계는 *fabA* 및 *fabZ*의 두 개의 유전자가 암호화하는 β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈에 의해 촉매되고 크로토닐-ACP를 생성한다. 본 발명에서는 *fabZ* 유전자만 과발현 하였는데 이는 대장균은 *fabA* 유전자를 가지고 있고 이도 스스로 발현을 하므로 같은 효소를 과발현 하는데 한 유전자만 선택하여 과발현 하였다. 이 이중결합은 트랜스 위치를 하고 있다. β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈에 의한 반응은 위의 그림 3번에 해당한다.

[0013] 두 번째 환원반응은 *fabI* 유전자가 암호화는 β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈에 의해 촉매되고 이 반응에서도 NADPH가 보조효소로 이용된다. 이 효소에 의한 반응은 위의 그림 4번에 해당한다. β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ와 함께 과발현 되면 지방산 합성을 저해하며 특히 긴 사슬의 지방산들의 합성에 저해를 가져 오는 것으로 Richard J. Heath and Charles O. Rock (1996). Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia*

coli. J. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 271, 18331836에서 언급되었다.

[0014] β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ는 지방산 생합성 초기와 지방산 생산의 타입을 결정하기 위한 원인이 되는 것은 N. Smirnova and KA Reynolds (2001), Branched-chain fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*, Journal of Industrial *Microbio Biotechnol* 27, 246251에서 보고되었으며 이 효소를 위한 특별한 기질 생산 혹은 많은 생산을 위해 조직 안에 유전자 조작이 제안되었다. David I. Chan and Hans J. Vogel (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem. J.* 430, 119.에서는 지방산 생합성에 관련된 효소들의 기능과 구조에 대해 보고되었다. 또한 지방산 신장과 관련하여 순환에 관련된 *fabG, fabZ* 및 *fabI* 유전자들의 작용들에서도 보고되었다. 그러나 이 관련 유전자들이 함께 과발현 되었을 때 지방산 생합성 증진과 사슬의 길이 변화에 미치는 영향에 대해서는 연구가 조금 미흡하다.

[0015] 본 발명에서는 미생물 내 지방산 생합성의 경로에서 지방산 생합성의 신장 단계의 순환에 관련된 유전자를 대장균에 차례로 삽입하여 유전자 조작으로 긴 사슬의 지방산 함량을 증진하고자 하였다. 재조합된 대장균은 재생가능한 바이오매스로써 사용되며 유용한 지방산 유도체를 생산할 수 있다. 대량생산을 위한 발효와 최적 탄소원을 첨가해주어 당으로부터 생산되는 지방산이 최대 효율을 얻고자 하였다.

[0016] 따라서, 본 발명에서는 대장균의 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 신장 단계에서 긴사슬 지방산 함량 증대 및 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 생물학적 대사 네트워크를 이해와 유전자 삽입의 유전자 조작을 통해 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

[0017] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 긴사슬(long-chain) 지방산 생합성 경로를 과발현 시킬 수 있는 형질전환 대장균의 제조방법 개발을 위하여 노력하였고 그 결과 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase), β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈(β-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase), β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-enoyl-[acyl carrier protein] reductase) 또는 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthaseⅢ)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 하나의 발현 벡터에 삽입시키고 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 방법을 개발해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0019] 따라서 본 발명의 목적은 긴사슬 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 긴사슬 지방산 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.

[0021] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 긴사슬(long-chain) 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다:

[0023] (a) *fabG*(β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈), *fabZ*(β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈), *fabI*(β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈) 또는 *fabH*(β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽

입시키는 단계; 및

[0024] (b) 상기 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및/또는 *fabH*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

[0025] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및/또는 *fabH* 유전자로 대장균을 형질전환 시키는 경우 기초물질이 두 가지 경로를 통하여 지방산 회로로 유도되게 해주므로 매우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현 됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0026] 본 발명의 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase)는 아세틸-[아실운반단백질](acyl-carrier-protein: ACP)를 β-하이드로아실-[아실운반단백질]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabG* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.

[0027] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 β-케토아실-[아실운반단백질] 리덕테이즈를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 상기 β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈(β-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase)는 β-하이드로아실-[아실운반단백질](β-hydroxyacyl-[ACP])을 크로토닐-[아실운반단백질](crotonyl-ACP)로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabZ* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.

[0029] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 서열목록 *E. coli* K-12 MG1655의 β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 β-하이드로아실-[아실운반단백질] 디하이드레이즈를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈(β-enoyl-[acyl carrier protein] reductase)는 크로토닐-[아실운반단백질](crotonyl-ACP)를 부티릴-[아실운반단백질](butyryl-ACP)로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabI* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.

[0031] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 β-에노일-[아실운반단백질] 리덕테이즈를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시될 수 있다.

[0032] 본 발명의 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ(β-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthaseⅢ)는 말로닐-[아실운반단백질]을 β-케토아실-[아실운반단백질]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabH* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.

[0033] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 β-케토아실-[아실운반단백질] 신타아제Ⅲ를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.

[0034] 상기에서 기술한, (a) 내지 (b)의 지방산 생합성 과정에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 발현 조절서열에 작동 가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동 가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0035] 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현할 수 있도록 구축된다. 일반적으로,

발현 벡터는 프로모터-유전자-전사 종결서열의 발현 컨스트럭트를 포함한다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터에 포함되는 프로모터는 강력한 발현능력을 가지는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0037] 바람직하게는, 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0038] 상기 발현벡터는 *lacI* 유전자를 추가적으로 포함한다. *lacII* 유전자는 구조 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드의 발현을 유도하기 위하여, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), 페닐-Gal(Phenyl-β-D-galactose), ONPG(orthonitrophenol) 및 알로락토오즈(allolactose)를 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드의 발현을 유도하기 위해 IPTG를 첨가하였다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현벡터는 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및 *fabH*로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상의 뉴클레오타이드 서열 전체를 포함할 수도 있다. 그러나, 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다. 발명의 실시예에서는 발현벡터 pTrc99A를 사용하였다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 발현벡터란 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터일 수 있다.

[0042] 상기 플라스미드로는 대장균에서 복제 및 발현이 가능한 운반체라면 당업계에 공지된 그 어떠한 것이라도 사용할 수 있다.

[0043] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS24'이라 명명하였다.

[0044] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS25'이라 명명하였다.

[0045] 보다 바람직하게는. 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabI* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS26'이라 명명하였다.

[0046] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS27'이라 명명하였다.

[0047] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabI* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS28'이라 명명하였다.

[0048] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabG* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabI* 유전자의 서열, *fabH* 유전자의 서열 및 전사 터미네이터 서열을 포함하며, '*E.coli* SGJS29'이라 명명하였다.

[0049] 바람직하게는, 본 발명에서 제조되는 발현벡터의 프로모터는 trc 프로모터이다.

[0050] 또한, 상기 전사 터미네이터는 바람직하게는, rrrB 터미네이터이다.

[0051] 본 발명의 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및 *fabH* 유전자를 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, $CaCl_2$ 완충액을 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 발현벡터를 숙주세포내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기침공법(electroporation) 등에 의해 숙주 세포 내로 도입할 수 있다.
형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0052] 지방산 생합성 경로를 과발현 하도록 형질전환 시킬 숙주세포 대장균으로는 산업 미생물로 적용가능하고 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정한다. 박테리아 그람 음성인 대장균(*Escherichia coli*) 속별 특징을 확인 및 비교하여 가장 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정할 수 있다. 상기 에세리키아 속 미생물은 박테리아 그람 음성형 대

장균인 *Escherichia coli*이며, 예를 들어 MG1655, W3110, DH5α, XL1-Blue 및 BL21이 포함된다. 바람직하게는 대장균 K-12 MG1655이다.

[0053] 본 발명의 헥사데카노산(hexadecanoic acid) 및 옥타데카노산(octadecanoic acid)의 생산 증대를 위한 에세리키아 속 미생물은 내재적으로 지방산 생합성 경로를 가지고 있는 것이나, 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 유전자 즉 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 및/또는 *fabH* 유전자가 추가적으로 도입되고, 상기 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 증폭, 즉 과발현 되는 균주이다. 이와 관련하여, 용어 '증폭'은 예를 들어 강력한 프로모터를 사용하거나 활성이 높은 적절한 효소를 암호화하는 유전자를 사용하고 임의로 이들 수단을 함께 사용하여 유전자(들)의 카피수를 증가시킴으로써, 적합한 DNA에 의해 암호화되는 하나 이상의 효소의 세포내 활성을 미생물 내에서 증가시키는 것을 기술한다.

[0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 형질전환 대장균을 제공한다.

[0055] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 긴사슬 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0058] (b) 본 발명은 글루코오즈를 하이드로카본으로 전환시키는 지방산 신장 단계의 재조합 대장균을 제공한다.

[0059] (c) 본 발명은 하나 이상의 유전자 조합에 따라 미생물의 긴사슬 지방산 생합성 대사산물의 생산을 증대 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 대장균 생체 내에서 글루코오즈(glycose)에서부터 지방산 신장 순환(cycle)을 포함하여 긴사슬 지방산이 생산되기까지 지방산 생합성 경로(fatty acid synthesis pathway)를 보여주는 도식이다.

도 2는 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabG* 유전자가 삽입되어있는 pJS14 구조의 도식화이다.

도 3은 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabZ* 유전자가 삽입되어있는 pJS15 구조의 도식화이다.

도 4는 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabI* 유전자가 삽입되어있는 pJS16 구조의 도식화이다.

도 5는 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabG* 및 *fabZ* 유전자가 삽입되어있는 pJS17 구조의 도식화이다.

도 6은 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabG, fabZ* 및 *fabI* 유전자가 삽입되어있는 pJS18 구조의 도식화이다.

도 7은 대장균과 같은 박테리아용 발현벡터, pTrc99A에 *fabG, fabZ, fabI* 및 *fabH* 유전자가 삽입되어있는 pJS19 구조의 도식화이다.

도 8은 도 2 내지 도 7의 지방산 신장과 관련된 유전자들이 발현벡터 pTrc99A에 삽입하는 재조합 대장균의 제조과정을 도식화를 보여준다.

도 9는 본 발명의 초기 재조합 대장균(*E. coli* SGJS24, *E. coli* SGJS25, *E. coli* SGJS26, *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29)과 야생종 (wild type) 대장균을 플라스크 배양하였을 때의 생장곡선을 나타낸 결과이다.

도 10은 LB배지에 글루코오즈 0%, 0.5%, 1% 또는 2% 함량에 따른 *E. coli* SGJS29의 생장성(OD) 및 지방산별 함

량을 나타낸 결과이다.

도 11은 다양한 탄소원 첨가에 따른 야생종 *E. coli*, *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29의 지방산의 증진을 나타낸 결과이다. (A) LB 배지, (B) LB 배지+글루코오즈 2%, (C) LB 배지+글리세롤(glycerol) 2%, (D) LB 배지+자일로즈(xylose) 2%, (E) LB 배지+슈크로즈(sucrose) 2%, (F) LB 배지+아라비노즈(arabinose) 2%를 나타낸다.

도 12는 야생형 *E. coli*, *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29가 2% 글리세롤이 포함된 3 L LB 배지에서 발효에 의한 생장곡선 결과이다.

도 13은 *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29의 IPTG 처리 후, 6시간 또는 12시간 배양 시 세포 내 긴 사슬 지방산들(미리스트산, 팔미트산, 스테아르산 및 바크센산) 함량의 증진과 길이변화에 대한 결과이다.

도 14는 *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29의 IPTG 처리 후, 6시간 또는 12시간 배양 시 지방산별 생산량을 비교한 결과이다. (A) 미리스트산(C14:tetradecanoic acid), (B) 팔미트산(C16:hexadecanoic acid), (C) 스테아르산(C18:octadecanoic acid), (D) 바크센산(C18:11-octadecenoic acid)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실시예1: 재조합 대장균의 제작**

[0063] *fabG, fabZ, fabI 및 fabH의 유전자 증폭*

[0064] 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655의 염색체를 주형으로 하여 지방산생합성 과정의 β-케토아실-[아실운반단백질]리덕테이즈, β-하이드로아실-[아실운반단백질]디하이드레이즈, β-에노일-[아실운반단백질]리덕테이즈 및 β-케토아실-[아실운반단백질]신타아제Ⅲ는 지방산 신장에 관련된 필수적인 효소이며 이들을 각각 암호화하는 *fabG, fabZ, fabI* 및 *fabH*의 유전자서열(genebank, NCBI)을 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, TaKaRa, 일본) 방법을 통해 클로닝 하였다 (표 1 및 표 2).

[0065]

표 1

[0066]

유전자	효소
fabG	β-ketoacyl (acyl carrier protein) reductase
fabZ	β-hydroxyacyl (acyl carrier protein) dehydrase
fabI	β-enoyl (acyl carrier protein) reductase
fabH	β-ketoacyl (acyl carrier protein) synthaseⅢ

표 2

[0067]

유전자		프라이머 서열	제한 효소
fabG	F	5’-GAATTCGGAAAATCATGAATTTTGAAGGAA-3’	EcoR I
	R	5’-GAGCTCTTADGDGTAACCGTAGCTCATC-3’	Sac I
fabZ	F	5’-GAGCTCGGAAGAGTATCTTGACTACTAAC-3’	Sac I
	R	5’-GGATCCTCAGGCCTCCCGGCTACGAGC-3’	BamH I
fabI	F	5’-TCTAGAAAGGATTAAAGCTATGGGTTTTCT-3’	XbI
	R	5’-TCTAGATTATTTCAGTTCGAGTTCGTTCAT-3’	SalI
fabH	F	5‘-GGATCCCCGAAAAGTGACTGAGCGTACA-3'	BamHI
	R	5‘-TCTAGACTAGAAACGAACCAGCGCGGAG-3'	XbaI

[0068] 표 1의 유전자는 지방산 신장에 관련된 효소들을 암호화하는 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다.

[0069] 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCI, 0.1% 트리톤 X-100, 2 mM $MgSO_4$, Taq DNA 중합효소 (TaKaRa, 일본)) 아래에서 95℃/5분(변성), 61℃/1분(어닐링), 72℃/1분(증폭)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 61℃/30초(어닐링), 72℃/1분(증폭)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 완전한 증폭을 위해 95℃/1분(변성), 61℃/1분(어닐링), 72℃/5분(증폭) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다.

[0070] *재조합 플라스미드 제조*

[0071] 상기 증폭된 유전자는 pGEM-T 이지 벡터(TaKaRa, 일본)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM::*fabG*, pGEM::*fabZ*, pGEM::*fabI* 및 pGEM::*fabH*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드를 대장균(*E. coli* AG1 컴프턴트 세포, Stratagene, 캐나다)에 형질전환 하여 균주를 제조하였다. 재조합 플라스미드인 pGEM::*fabG*, pGEM::*fabZ*, pGEM::*fabI* 및 pGEM-T::*fabH*와 대장균 발현벡터인 pTrc99A를 표 2에 열거된 제한효소들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤, pTrc99A 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(TaKaRa, 일본)를 이용, 16℃에서 반응 후, 라이게이션 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* AG1 컴프턴트 세포, stratagene, 캐나다)에 형질전환 시킨 후 플라즈미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기 영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0072] pTrc99A 벡터에 타겟 유전자들을 도입하여 제조된 재조합 플라스미드는 pJS14, pJS15, pJS16, pJS17, pJS18 및 pJS19라 명명하였다. 도 2 내지 도7은 본 발명에서 만들어진 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

[0073] pSJ14, pSJ15 및 pJS16은 *fabG*, *fabZ*, *fabI* 유전자가 pTrc99A 벡터에 각각 삽입되어 제조되었다. pJS17은 pJS14에 pJS15로부터 *fabZ* 유전자가 삽입되어 제조되었다. pJS18은 pSJ17에 pJS16의 *fabI* 유전자가 포함되어 제조되었으며 pJS19는 pJS18에 *fabH* 유전자가 삽입되어 제조되었다. 도 8은 상기 벡터의 제조 과정을 나타낸 도면이다.

[0074] *대장균 형질전환체*

[0075] 본 발명에서는 형질전환 대장균의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0076] 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 30 ㎕ (0.1%)의 야생종 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655 배양액을 시험관에 들어있는 3 ㎖의 LB(10 g/ℓ 트립톤, 10 g/ℓ NaCl, 5 g/ℓ 효모추출물)배지에 접종하여 배양하였다. 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 ㎚ 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 ㎖의 배양액은 12000 rpm으로 1분동안 원심분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수득한 세포를 10% 글리세롤 1 ㎖로 1회 세척한 후, 다시 12000 rpm으로 1분동안 원심분리하여 상등액과 세포로 분리하였다. 세포은 10% 글리세롤 80 ㎕로 현탁하였다. 세포현탁액에 1-3 ㎕의 재조합 플라즈미드 (pJS14, pJS15, pJS16, pJS17, pJS18 및 pJS19)를 첨가하였다.

[0077] 상기의 플라즈미드가 들어있는 분주된 80 ㎕의 액체는 전기천공법 (electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette, 미국)에 담아 Gene pulser Xcell(BIO-RAD, 미국)로 전기 충격(1800v, 25uF, 200Ω)을 주입하였다. 미리 준비해둔 1 ㎖ LB(10 g/ℓ 트립톤, 10 g/ℓ NaCl, 5 g/ℓ 효모추출물)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양한다. 배양된 형질전환체는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 아가 배지(10 g/ℓ 트립톤, 10 g/ℓ NaCl, 5 g/ℓ 효모추출물, 아가 20 g/ℓ)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37℃ 인큐베이터에서 배양한다. 이를 통해 재조합 플라스미드들을 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655 균주에 형질전환한 재조합 균주 6종을 제조하였다(표 3).

표 3

[0078]

개발균주	-
E. coli SGJS24	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabG*
E. coli SGJS25	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabZ*
E. coli SGJS26	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabI*
E. coli SGJS27	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabG::fabZ*
E. coli SGJS28	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabG::fabZ::fabI*
E. coli SGJS29	*Escherichia coli* K12 MG1655::pTrc99A::*fabG::fabZ::fabI::fabH*

[0079] *재조합 대장균들의 배지와 배양조건*

[0080] 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 균주에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB배지(앰피실린 50 ㎍/㎖ 포함)에 16시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 ㎚에서 0.6-1.0이 되었을 때 전체 배양액에 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균 액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0081] 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 ㎕을 10 ㎖ 튜브에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖의 LB에 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 삼각플라스크에 암페실린 (50 ㎍/㎖)이 첨가된 200 ㎖의 LB (10 g/ℓ 트립톤, 10 g/ℓ NaCl, 5 g/ℓ 효모추출물)배지에 0.5%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 야생종은 앰피실린이 들어있지 않은 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 및 효소의 발현을 위해 배양액의 흡광도가 600 ㎚ 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, 미국)를 첨가(배지의 최종농도 1 mM/㎖)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0082] **실시예2: 초기 재조합 대장균의 세포내 지방산 (fatty acid) 측정**

[0083] 상기 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 6시간과 21시간에서 샘플을 얻었다. 6시간은 배양초기의 지방산 생산량과 IPTG의 영향을 보기 위함이고 21시간에서 샘플을 얻는 이유는 세포 양이 충분해 졌을 때 유전자 조작만으로 지방산의 생산력을 분석하기 위해서 세포 내에 있는 지방산(fatty acid)를 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다:

[0084] 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ㎖를 4500 rpm으로 10분동안 원심분리 한 후에 세포를 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification)단계로 저장된 재조합 세포들을 1 ㎖의 용액 1(NaOH 45g, MeOH 150 ㎖, 탈염증류수 150 ㎖)을 넣고 5-10초간 볼텍스 하였다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 후 다시 5-10초 동안 볼텍스 해준 후 다시 100℃, 25분 반응시켜 준 뒤 열을 식혔다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation)단계로, 2 ㎖을 용액 2(6N HCl 325 ㎖, MeOH 275 ㎖)를 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주었다. 네 번째 단계는 추출(extraction)단계로, 1.25 ㎖의 용액 3(헥산:메틸 텔트-부틸 이스터=1:1)을 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 버린다. 다섯 번째 단계는 GC/MS로 분석을 용이하게 하기위해 세척 단계로 앞 단계의 남은 상층액에 3 ㎖의 용액 4(NaOH 10.8 g, ddW 900 ㎖)를 첨가하여 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0085] 본 발명에서 사용한 CG/MS는 5975 시리즈 MSD(휴렛팩커드(HP), 독일) 및 Agilent 7890A(휴렛팩커드(HP), 독일)이며 HP-5 컬럼(30 m×0.32 ㎜, 필름두께 0.25)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건은 분석하기 위한 GC 온도 조건은 40℃/5분, 220℃까지 3℃/분, 250℃까지 3℃/분 및 250℃/5분이었으며 MS 계면온도는 160℃이다.

[0086] 초기 개발 균주들의 생장은 야생형 *E. coli*와 거의 비슷하게 성장하는 것을 확인하였다(도 9). 여러 유전자의 과발현 및 재조합 플라스미드의 삽입으로 인해 재조합 대장균의 생장저해는 없었다. 재조합 대장균 중에서 *E. coli* SGJS24의 생장이 24시간에서 가장 높았으며 *E. coli* SGJS27의 생장이 가장 낮았다.

[0087] 표 4에 따르면, 헥사데카노산(hexadecanoic acid, C16)의 함량을 비교하면, *E. coli* SGJS24, *E. coli* SGJS26

및 *E. coli* SGJS28은 6시간보다 21시간에서 감소하였고 *E. coli* SGJS25, *E. coli* SGJS27 및 *E. coli* SGJS29는 증가하였다. IPTG 첨가 후 6시간에서 헥사데카노산의 함량은 *E. coli* SGJS28에서 가장 높고 21시간에서는 *E. coli* SGJS29에서 가장 높았다. 옥타데카노산(Octadecanoic acid, C18)의 함량은 *E. coli* SGJS27을 제외하고 배양시간이 길어질수록 함량이 줄어들었다. 옥타데카노산은 *E. coli* SGJS29가 6시간에서 다른 재조합 대장균보다 많이 생산한 것을 나타내었다. DCW 는 세포건중량(Dry Cell Wight)를 나타내며, [a]DWC는 IPTG 첨가후 6시간 후의 세포건중량, [b]DWC는 IPTG 첨가후 21시간 후의 세포건중량을 말한다.

표 4

[0088]

재조합 대장균	지방산별 함량(mg/L)								DCW (g/L)[a]	DCW (g/L)[b]
	헥사데카노산				옥타데카노산					
	6시간	21시간	mg/g DCW[a]	mg/g DCW[b]	6시간	21시간	mg/ DCW[a]	mg/ DCW[b]		
야생형 *E. coli* K12 MG1655	104.0 ±1.2	122.3 ±1.3	130	74	42.8 ±0.1	36.6 ±0.2	54	22	0.80	1.63
E. coli SGJS24	123.3 ±1.5	101.2 ±1.2	152	57	54.5 ±0.5	36.2 ±0.3	67	20	0.81	1.77
E. coli SGJS25	119.3 ±1.7	133.4 ±1.9	140	83	63.9 ±0.7	47.2 ±0.3	75	30	0.85	1.60
E. coli SGJS26	127.7 ±0.5	107.3 ±0.8	150	77	65.3 ±0.5	46.9 ±0.5	77	34	0.85	1.39
E. coli SGJS27	106.9 ±0.7	121.0 ±0.9	134	92	58.8 ±0.8	62.0 ±0.7	74	47	0.80	1.32
E. coli SGJS28	154.4 ±3.1	110.9 ±2.5	182	69	74.4 ±1.2	31.0 ±0.2	88	19	0.85	1.60
E. coli SGJS29	111.7 ±2.0	154.4 ±2.7	131	101	119.0 ±1.5	60.4 ±0.9	140	39	0.85	1.53

[0089] 재조합 대장균들의 헥사데카노산 및 옥타데카노산을 합한 총 지방산의 함량을 야생형 *E. coli* 비교한 결과를 표 5에 나타내었다. 하나의 유전자가 과발현된 *E. coli* SGJS24, *E. coli* SGJS25 및 *E. coli* SGJS26보다 2개 이상의 여러 유전자들이 과발현 된 *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29의 긴 사슬의 지방산 헥사데카노산 및 옥타데카노산의 생산력이 높았다. IPTG 첨가 후 6시간에서는 모든 재조합 균주들의 지방산 함량은 야생형 *E. coli* 보다 증가하였다. 그러나 *E. coli* SGJS24, *E. coli* SGJS27 및 *E. coli* SGJS 28은 지방산 함량이 감소되었다. IPTG 첨가 후 6시간에서, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29는 유전자 조작을 통해 지방산(헥사데카노산 및 옥타데카노산) 생산이 야생형 *E. coli*보다 각각 약 1.6배로 증진되었다. 배양 24시간에서는 *E. coli* SGJS29의 지방산 생산이 약 1.4배로 가장 많이 증진되었다.

표 5

[0090]

재조합 대장균	총 지방산 함량(mg/L)			
	6 시간	상대값	21 시간	상대값
야생형 *E. coli* K-12 MG1655	146.8	1.0	158.9	1.0
E. coli SGJS24	177.8	1.2	137.4	0.9
E. coli SGJS25	183.2	1.3	180.6	1.1
E. coli SGJS26	193.0	1.3	154.2	0.9
E. coli SGJS27	165.7	1.1	183.0	1.2
E. coli SGJS28	228.8	1.6	141.9	0.9
E. coli SGJS29	230.7	1.6	214.8	1.4

[0091] 재조합 대장균의 이런한 결과를 보인 이유는 *fabG* 유전자가 암호화하는 β-케토아실-[아실운반단백질]리덕테이즈만 과발현 되었을 때(*E. coli* SGJS24) 가장 성장은 좋았으나 배양이 길어질수록 야생종보다 지방산 함량이 낮았다. *fabG* 유전자는 NADPH 의존적으로 NADPH를 첨가해 주지 않으면 배양시간이 길어질수록 세포 내 NADPH의

함량이 줄어 이 유전자에 의한 지방산 생산 증진이 잘 이루어 지지 않았을 것이라 보여진다.

[0092] *fabZ* 유전자가 단독으로 혹은 다른 유전자와 함께 과발현된 *E. coli* SGJS25 및 *E. coli* SGJS27은 지방산의 함량이 증가하였다. 특히 *E. coli* SGJS27가 21 시간에서 지방산 생산량이 증가한 것은 *fabG*의 유전자에 의한 β-케토아실-[아실운반단백질]리덕테이즈 영향보다는 *fabZ*의 유전자가 암호화하는 β-하이드로아실-[아실운반단백질]디하이드레이즈의 영향이 더 크다고 보인다. *fabZ* 유전자는 공동인자(cofactor)가 필요하지 않다. *fabZ* 유전자의 과발현은 지방산 신장(elongation)에서 지방산 함량을 증가시키는 역할을 할뿐만 아니라 지방산 사슬(chain)에 영향을 주지 않음을 보인다.

[0093] *E. coli* SGJS26 및 *E. coli* SGJS28은 *fabI* 유전자가 과발현된 재조합 균주로 지방산 신장에 저해를 주어 배양시간이 줄어들수록 지방산의 함량을 줄어들었다. *E. coli* SGJS27과는 반대로 *E. coli* SGJS28가 배양 초기에서 지방산 생산량이 많이 증가했지만 21시간에서 야생종보다도 더 지방산 함량이 낮아졌다. *fabI* 유전자가 암호하는 β-에노일-[아실운반단백질]리덕테이즈의 과발현은 지방산 사슬을 합성하는데 방해를 일으키며 신장을 위해서는 *fabG*와 마찬가지로 공동인자가 있어야 한다. *fabH* 유전자를 포함한 *E. coli* SGJS29는 배양초기에 옥타데카노산의 함량이 가장 높으며 21시간에서는 헥사데카노산의 함량은 높아지고 옥타데카노산의 함량은 감소하였다.

[0094] **실시예3: 글루코오즈 함량에 따른 긴 사슬 지방산 생산의 영향**

[0095] 재조합 대장균은 글루코오즈 글루코오즈로부터 지방산이 생산되는 지방산 생합성 경로를 거친다(도 1). 이 지방산 생합성 경로에 포함된 유전자 중 지방산 생산 신장 단계와 관련된 효소들을 과발현 시켰으므로 글루코오즈 및 글루코오즈 함량에 따른 지방산 생산의 증진 실험을 하였다. 상기 '초기 재조합 대장균의 세포내 지방산(fatty acid) 측정'에서 사용되어진 배지에 글루코오즈 0.5%, 1%, 2%가 첨가시켜 주었다. LB배지에서 가장 많이 지방산이 증진된 *E. coli* SGJS29 균주를 이용하였다. 도 10에 글루코오즈 함량에 따른 생장력 및 지방산 측정결과를 나타내었다. LB배지에 글루코오즈 0.5%, 1%, 2% 포함된 배지와 글루코오즈가 포함되지 않은 배지에서의 *E. coli* SGJS29 생장력 차이는 없었다. 글루코오즈 첨가 시 첨가되지 않은 배지에서 자란 균주보다 초기 생장속도가 빠르게 성장하였고 최종적으로 21시간 배양 후에는 첨가하지 않은 배지들과 최종생장 OD값이 거의 같았다. 초기생장에 글루코오즈를 성장에 사용하고 성장과 동시에 세포내에 지방산 생산에 사용하는 것으로 추측된다. 그러나 글루코오즈가 첨가된 배지들에서 지방산 생산량이 증진되었다. 특히, 글루코오즈의 첨가량이 많은 2% 에서 헥사데카노산의 함량이 가장 높았다.

[0096]

[0097] **실시예4: 다양한 탄소원의 첨가에 의한 긴 사슬 지방산의 증진**

[0098] 글루코오즈 뿐만 아니라 지방산의 함량 증진의 최적 탄소원을 찾기 위해 탄소원으로 글리세롤(glycerol), 자일로즈(xylose), 수크로즈(sucrose) 및 아라비노즈(arabinose) 2%를 LB배지에 첨가하여 지방산 함량을 증가하도록 하였다. 배양은 상기 '*재조합 대장균들의 배지와 배양조건*'과 같은 조건으로 실시하였다. 탄소원 실험에는 2개 이상의 유전자들이 과발현된 *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29 균주가 유전자 조작으로 인해 초기지방산 함량이 높았으므로 이들을 사용하였다.

[0099] 탄소원 별 성장은 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서보다 초기 성장은 빠르나 성장 6시간 이후에는 성장이 거의 멈추었다. 글리세롤을 첨가한 배지에서 균주들의 성장력이 가장 좋았으며 자일로즈에서 가장 낮았다 (도 11). 탄소원을 포함하지 않은 LB 배지에서 생장한 균주들에게서 측정되지 않았던 테트라데카노산(tetradecanoic acid, C14)도 분석되었다. 테트라데카노산가 탄소원이 첨가된 배지들에서만 측정된 것은 탄소원으로 인해 생장력이 높아지고 총 지방산 함량이 증가에 의한 것이라 보여진다. 테트라데카노산는 수크로즈와 아라비노즈가 포함된 배지에서 생장한 모든 종에서 분석되었고 글루코오즈 배지에서는 *E. coli* SGJS28에서, 글리세롤 배지에서는 *E. coli* SGJS27에서 각각 측정되었다. 2%의 글루코오즈 및 글리세롤이 포함된 배지에서 성장한 균주에서 생산된 헥사데카노산 및 총 지방산의 함량이 높았으나 야생형 *E. coli*의 지방산도 함께 높아졌다. 이와는 반대로 자일로즈, 수크로즈 및 아라비노즈 2%를 첨가한 LB배지에서 생장한 재조합 균주들은 야생형 *E. coli*에 비해 지방산 함량이 높았다. 수크로즈를 제외한 탄소원에 의해서 *E. coli* SGJS27 및 *E. coli* SGJS28의 지방산 함량은 *E. coli* SGJS29보다 높았다.

표 6

[0100]

탄소원	재조합 대장균	지방산 함량 (mg/L)				
		테트라데카노산	헥사데카노산	옥타데카노산	총 함량	
LB	야생형*E.coli* K12MG1655	N.D.	120.3		36.6	156.9
	E. coli SGJS27	N.D.	112.0		28.6	140.6
	E. coli SGJS28	N.D.	129.3		44.2	173.5
	E. coli SGJS29	N.D.	92.6		25.9	118.4
LB + 글루코오즈 2%	야생형*E.coli* K12MG1655	N.D.	195.0		44.1	239.1
	E. coli SGJS27	N.D.	198.4		49.3	247.7
	E. coli SGJS28	12.3	199.8		37.1	249.2
	E. coli SGJS29	N.D.	150.6		46.8	197.4
LB + 글리세롤 2%	야생형*E.coli* K12MG1655	9.1	161.2		34.0	204.3
	E. coli SGJS27	20.7	252.3		48.7	321.7
	E. coli SGJS28	N.D.	178.3		54.3	232.6
	E. coli SGJS29	N.D.	176.5		47.9	224.4
LB + 자일로즈2 %	야생형*E.coli* K12MG1655	N.D.	103.0		25.4	128.4
	E. coli SGJS27	N.D.	161.2		38.9	200.1
	E. coli SGJS28	N.D.	163.6		36.7	200.3
	E. coli SGJS29	N.D.	118.7		41.8	160.5
LB + 수크로즈 2%	야생형*E.coli* K12MG1655	9.5	115.4		23.2	148.1
	E. coli SGJS27	10.3	205.0		46.1	265.4
	E. coli SGJS28	14.3	201.7		37.0	257.0
	E. coli SGJS29	18.4	229.2		47.0	276.2
LB + 아라비노즈 2%	야생형*E.coli* K12MG1655	N.D.	132.0		29.0.	161.0
	E. coli SGJS27	15.1	227.3		48.0	275.4
	E. coli SGJS28	12.6	225.1		58.4	290.1
	E. coli SGJS29	13.4	154.2		52.7	220.3

[0101] **실시예5: 발효(Large scale fermentation)**

[0102] 본 발명에서 개발된 균주들이 상업적으로 사용가능하려면 대량생산을 하고자 한다면 안정적이며 고효율 저비용으로 운영하되 지방산 생산량도 증진되어야 한다. 실시예4에서 확인한 최적 탄소원인 글리세롤을 첨가해 주어 발효실험을 실시하였다. 5 L 발효조에 3 L의 LB배지에 앰피실린 및 2% 글리세롤을 첨가하였다. 발효 동안 온도는 30℃, 교반은 150 rpm으로 운영하였으며 80% 인산(phosphoric acid) 및 50% 암모니아로 pH 6.4-pH 6.6을 유지하였다.

[0103] 도 12는 24시간 3 L LB 배지의 발효 동안 야생종 대장균과 재조합 대장균 *E. coli* SGJS27, *E. coli* SGJS28 및 *E. coli* SGJS29의 생장곡선을 나타내었다. 플라스크 배양에서보다 발효 실험 시 재조합 대장균과 야생종 대장균의 생장의 차이가 더 컸다.

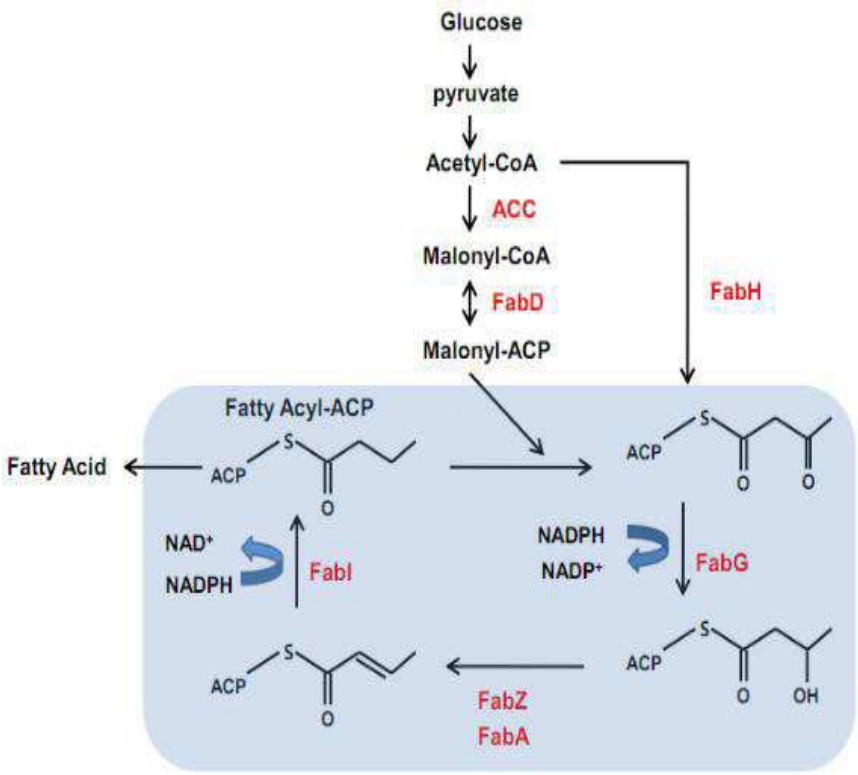
[0104] 도 13 및 도 14는 개발균주의 발효에 의한 긴 사슬 지방산별 생산량을 비교하여 보여주고 있다. 분석한 긴 사슬 중에 가장 짧은 미리스트산(myristic acid, C14:teradecanoic acid)는 배양시간이 길어질수록 증가하였다. 특히 *fabI*와 *fabH* 유전자가 모두 포함된 *E. coli* SGJS29에서 가장 많이 증가하였다. 팔미트산(Palmitic acid, C16:hexadecanoic acid)는 *E. coli* SGJS27 및 *E. coli* SGJS28에서는 증가하였지만 *E. coli* SGJS29에서는 감소하였다. 스테아르(stearic acid, C18:octadecanoic acid)는 플라스크 배양과는 달리 발효로 거의 생산이 되지 않았고 바크센산(Vaccenic acid, C18:11-octadecanoic acid)는 세 균주 모두 발효 동안 시간이 흐를수록 생산량이 적어지는 것을 확인하였다.

[0105] 발효의 결과에 의해 *fabG*와 *fabZ* 유전자의 과발현은 지방산 생산도 증가하며 사슬길이에 많은 영향을 미치지 않았다. 그러나 *fabI*와 *fabH* 유전자는 지방산 총생산량도 적어졌으며 지방산 길이도 짧아지는 것에 영향을 주는 것을 확인하였다. 실시예 2의 플라스크 생산 실험에서는 이 유전자들이 암호화하는 효소들에 의한 영향이 뚜렷하지 못했으나 같은 배양 조건을 유지시켜 주며 대용량으로 실험한 발효에서는 그 양상이 뚜렷하게 나타났다.

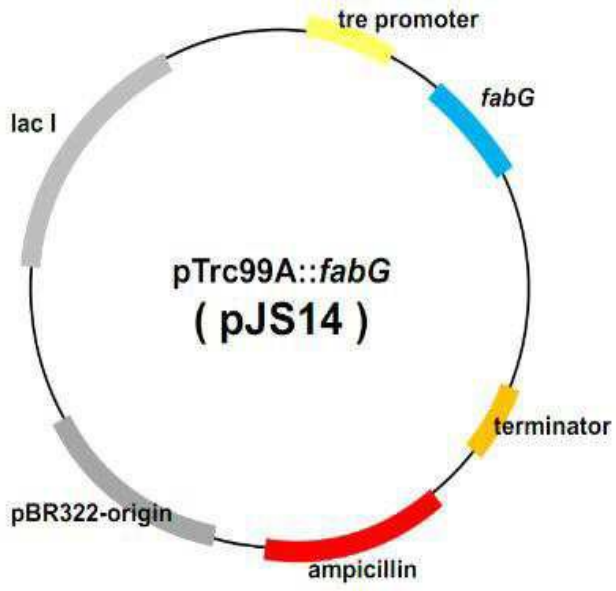
[0106] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

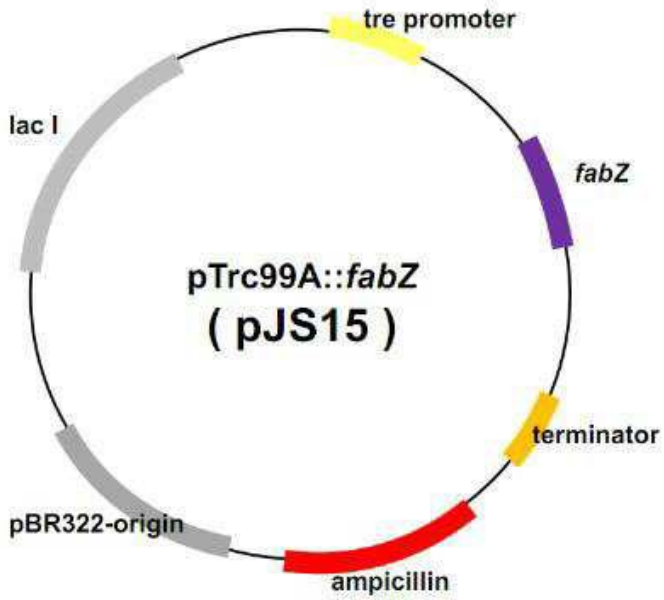
도면1



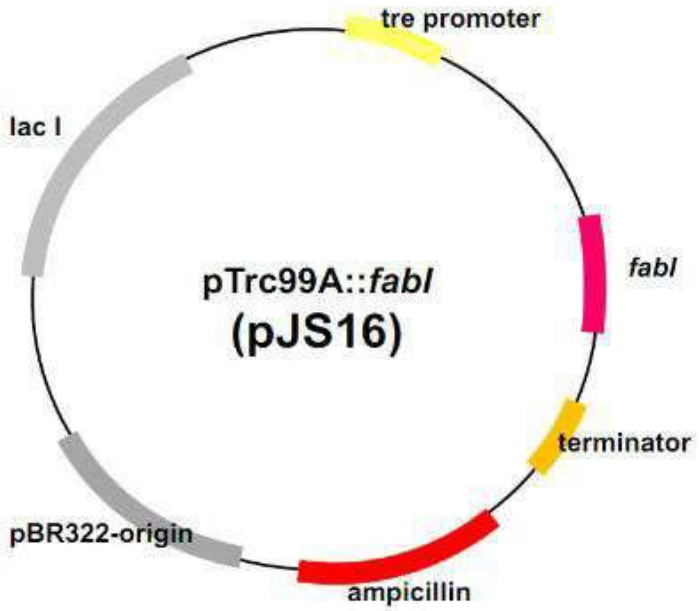
도면2


tre promoter
fabG
lac I
pTrc99A::fabG
(pJS14)
terminator
pBR322-origin
ampicillin

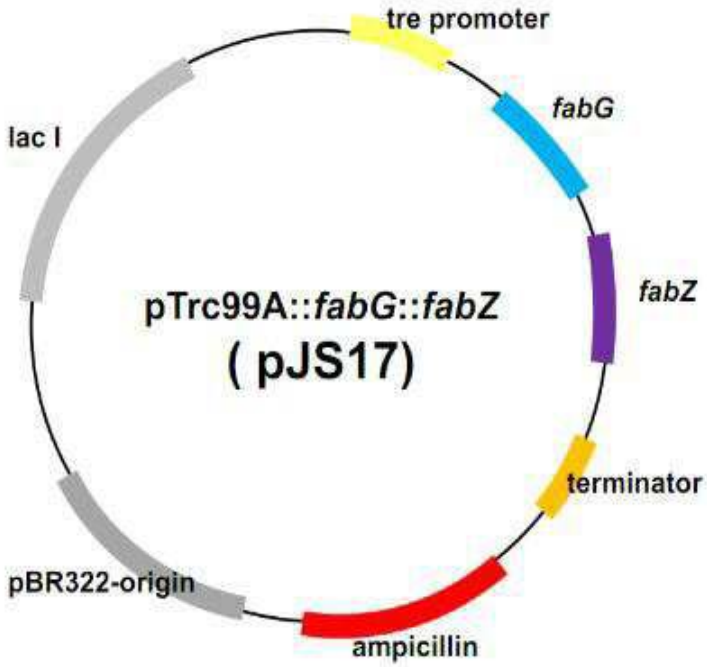
도면3


tre promoter
lac I
fabZ
pTrc99A::fabZ
(pJS15)
terminator
pBR322-origin
ampicillin

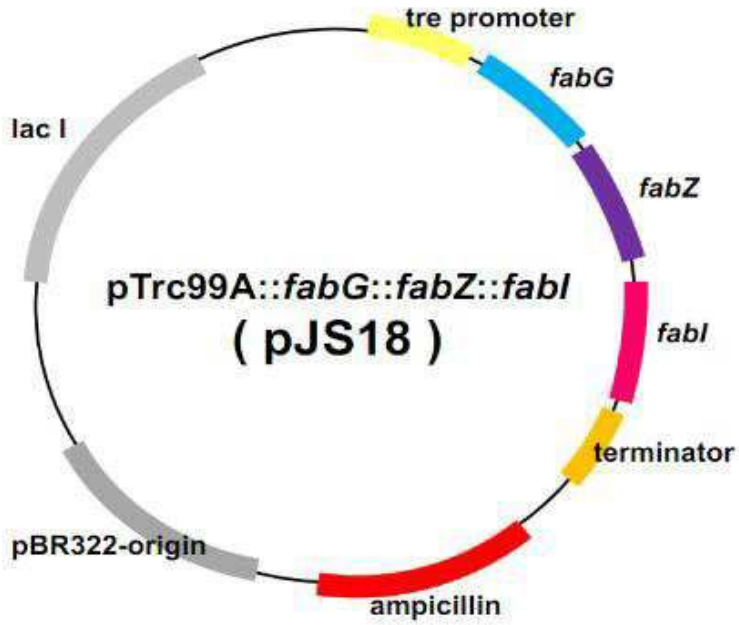
도면4


tre promoter
lac I
fabI
pTrc99A::fabI
(pJS16)
terminator
pBR322-origin
ampicillin

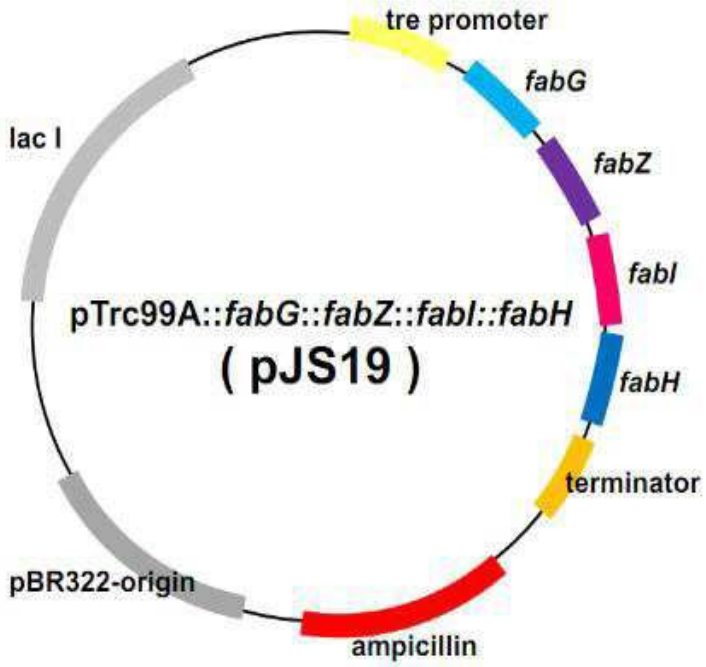
도면5


tre promoter
fabG
lac I
fabZ
pTrc99A::fabG::fabZ
(pJS17)
terminator
pBR322-origin
ampicillin

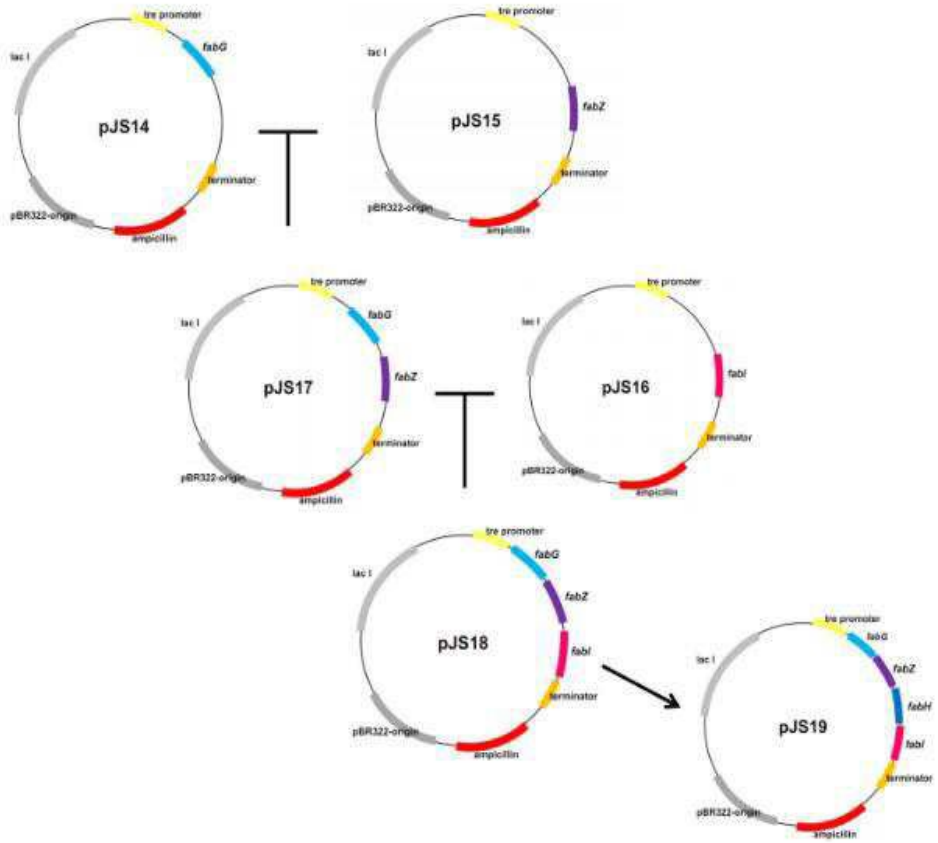
도면6


tre promoter
fabG
fabZ
fabI
terminator
ampicillin
pBR322-origin
lac I
pTrc99A::fabG::fabZ::fabI
(pJS18)

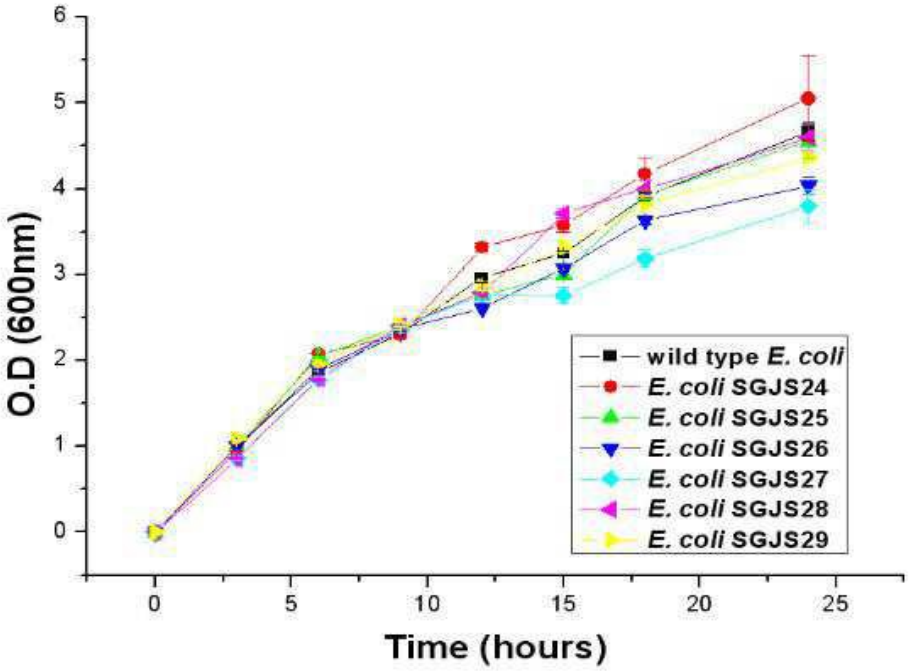
도면7


tre promoter
fabG
fabZ
fabI
fabH
terminator
ampicillin
pBR322-origin
lac I
pTrc99A::fabG::fabZ::fabI::fabH
(pJS19)

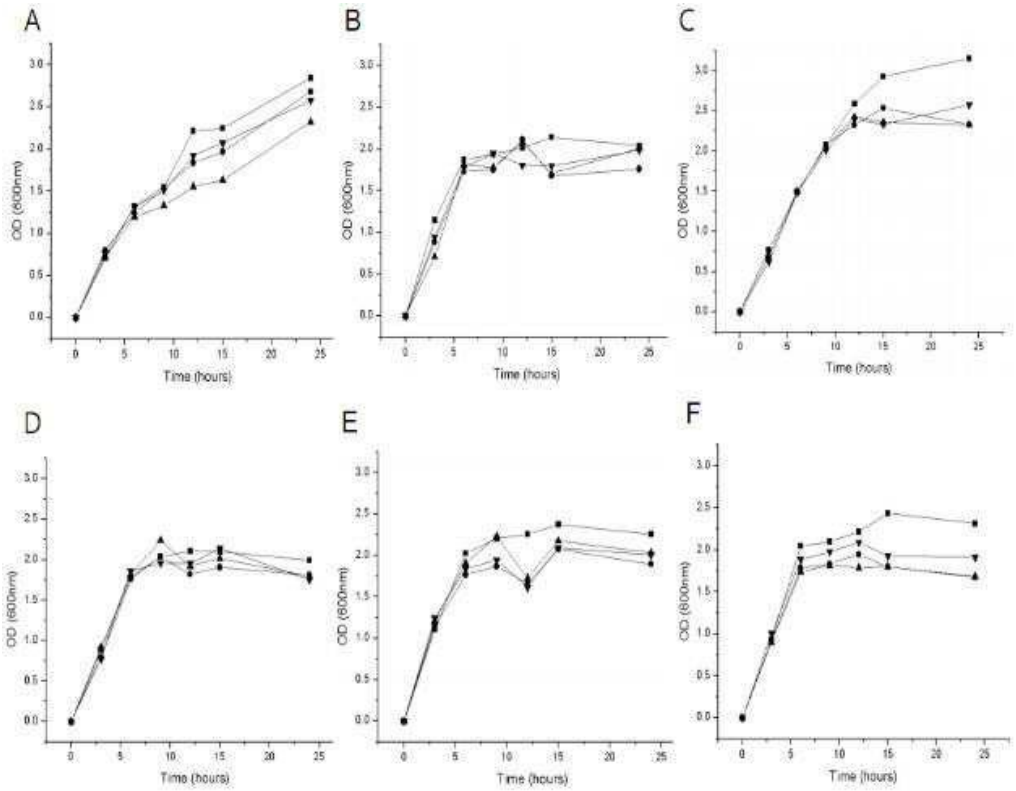
도면8


tre promoter
lac I
fabG
fabZ
fabI
fabH
terminator
pBR322-origin
ampicillin
pJS14
pJS15
pJS16
pJS17
pJS18
pJS19

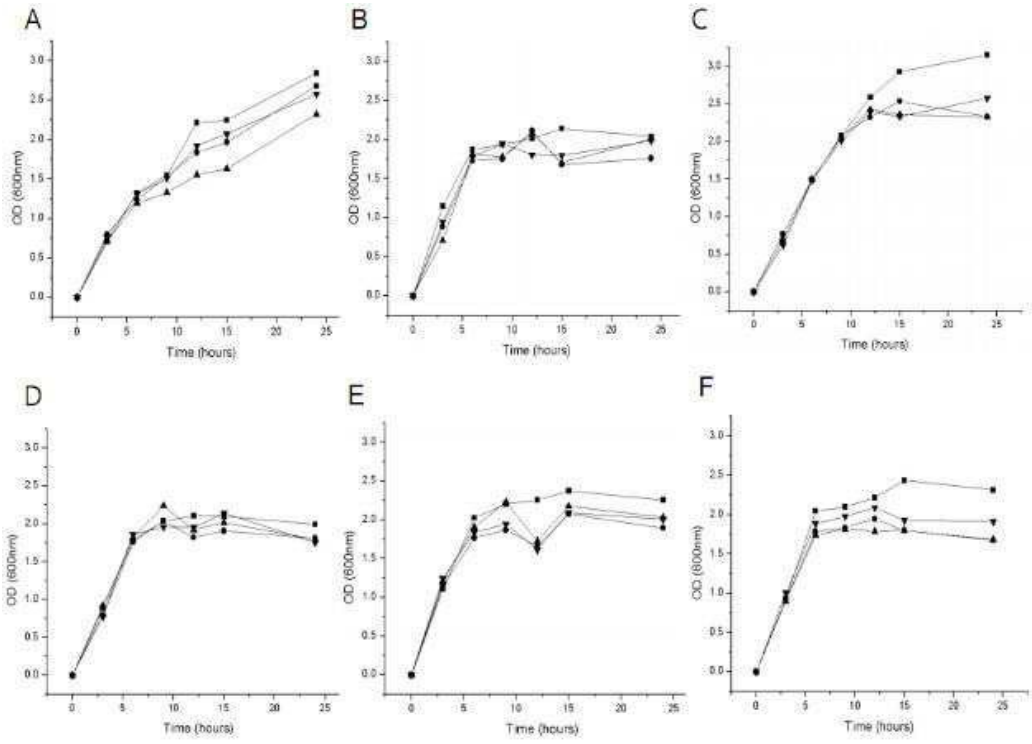
도면9


O.D (600nm)
Time (hours)
0
1
2
3
4
5
6
0
5
10
15
20
25
wild type E. coli
E. coli SGJS24
E. coli SGJS25
E. coli SGJS26
E. coli SGJS27
E. coli SGJS28
E. coli SGJS29

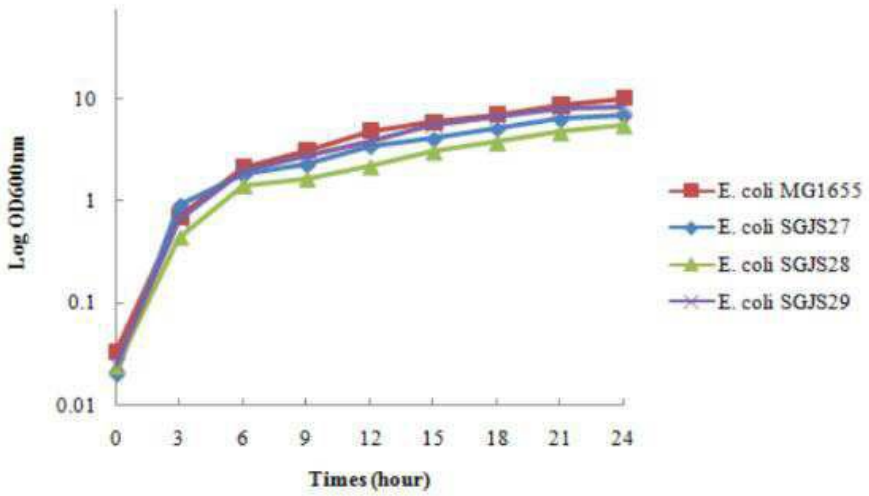
도면10



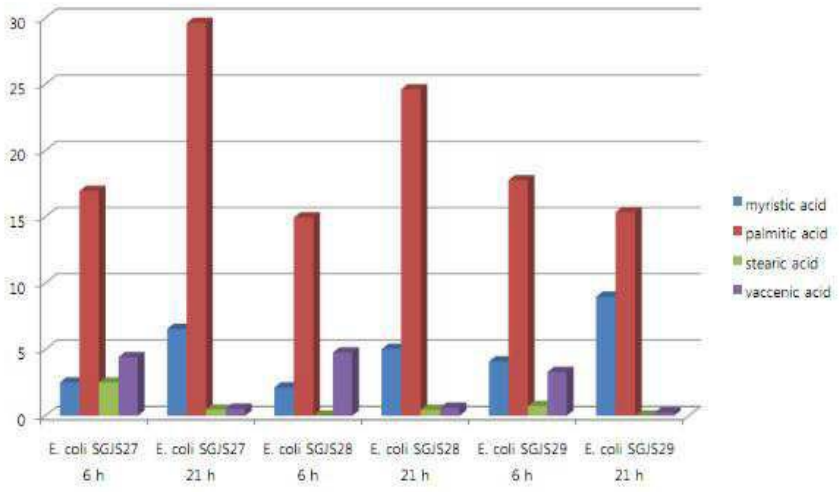
도면11



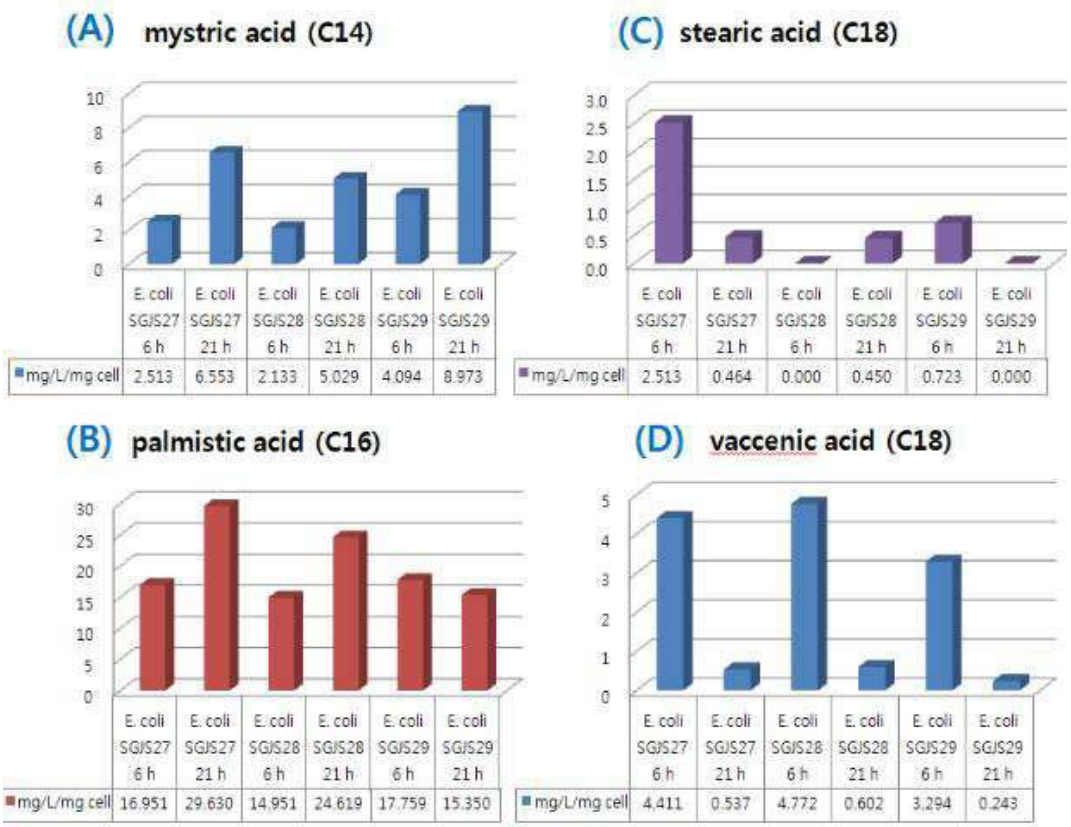
도면12


Log OD600nm
10
1
0.1
0.01
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Times (hour)
E. coli MG1655
E. coli SGJS27
E. coli SGJS28
E. coli SGJS29

도면13


30
25
20
15
10
5
0
E. coli SGJS27 6 h
E. coli SGJS27 21 h
E. coli SGJS28 6 h
E. coli SGJS28 21 h
E. coli SGJS29 6 h
E. coli SGJS29 21 h
myristic acid
palmitic acid
stearic acid
vaccenic acid

도면14



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Method for Preparing Transformed E.coli for Over-expression of Fatty Acid

<130> PN090526

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> fabG

<400> 1

atgaattttg aaggaaaaat cgcactggta accggtgcaa gccgcggaat tggccgcgca 60

attgctgaaa cgctcgcagc ccgtggcgcg aaagttattg gcactgcgac cagtgaaaat 120

ggcgctcagg cgatcagtga ttatttaggt gccaacggca aaggtctgat gttgaatgtg 180

accgacccgg catctatcga atctgttctg gaaaaaattc gcgcagaatt tggtgaagtg 240

gatatcctgg tcaataatgc cggtatcact cgtgataacc tgttaatgcg aatgaaagat 300

gaagagtgga acgatattat cgaaaccaac ctttcatctg ttttccgtct gtcaaaagcg 360

gtaatgcgcg ctatgatgaa aaagcgtcat ggtcgtatta tcactatcgg ttctgtggtt 420

ggtaccatgg gaaatggcgg tcaggccaac tacgctgcgg cgaaagcggg cttgatcggc 480

ttcagtaaat cactggcgcg cgaagttgcg tcacgcggta ttactgtaaa cgttgttgct 540

ccgggcttta ttgaaacgga catgacacgt gcgctgagcg atgaccagcg tgcgggtatc 600

ctggcgcagg ttcctgcggg tcgcctcggc ggcgcacagg aaatcgccaa cgcggttgca 660

ttcctggcat ccgacgaagc agcttacatc acgggtgaaa ctttgcatgt gaacggcggg 720

atgtacatgg tctga 735

<210> 2

<211> 456

<212> DNA

<213> fabZ

<400> 2

ttgactacta acactcatac tctgcagatt gaagagattt tagaacttct gccgcaccgt 60

ttcccgttct tactggtgga tcgcgtgctg gattttgaag aaggtcgttt tctgcgcgca 120

gtaaaaaatg tctctgtcaa tgagccattc ttccagggcc atttccctgg aaaaccgatt 180

ttcccgggtg tgctgattct ggaagcaatg gcacaggcaa caggtattct ggcgtttaaa 240

agcgtaggaa aactggaacc gggtgagctg tactacttcg ctggtattga cgaagcgcgc 300

ttcaagcgcc cggtcgtgcc tggcgatcaa atgatcatgg aagtcacttt cgaaaaaacg 360

cgccgcggcc tgacccgttt taaaggggtt gctctggtcg atggtaaagt agtttgcgaa 420

gcaacgatga tgtgtgctcg tagccgggag gcctga 456

<210> 3

<211> 789

<212> DNA

<213> fabI

<400> 3

atgggttttc tttccggtaa gcgcattctg gtaaccggtg ttgccagcaa actatccatc 60

gcctacggta tcgctcaggc gatgcaccgc gaaggagctg aactggcatt cacctaccag 120

aacgacaaac tgaaaggccg cgtagaagaa tttgccgctc aattgggttc tgacatcgtt 180

ctgcagtgcg atgttgcaga agatgccagc atcgacacca tgttcgctga actggggaaa 240

gtttggccga aatttgacgg tttcgtacac tctattggtt ttgcacctgg cgatcagctg 300

gatggtgact atgttaacgc cgttacccgt gaaggcttca aaattgccca cgacatcagc 360

tcctacagct tcgttgcaat ggcaaaagct tgccgctcca tgctgaatcc gggttctgcc 420

ctgctgaccc tttcctacct tggcgctgag cgcgctatcc cgaactacaa cgttatgggt 480

ctggcaaaag cgtctctgga agcgaacgtg cgctatatgg cgaacgcgat gggtccggaa 540

ggtgtgcgtg ttaacgccat ctctgctggt ccgatccgta ctctggcggc ctccggtatc 600

aaagacttcc gcaaaatgct ggctcattgc gaagccgtta ccccgattcg ccgtaccgtt 660

actattgaag atgtgggtaa ctctgcggca ttcctgtgct ccgatctctc tgccggtatc 720

tccggtgaag tggtccacgt tgacggcggt ttcagcattg ctgcaatgaa cgaactcgaa 780

ctgaaataa 789

<210> 4

<211> 954

<212> DNA

<213> fabH

<400> 4

atgtatacga agattattgg tactggcagc tatctgcccg aacaagtgcg gacaaacgcc 60

gatttggaaa aaatggtgga cacctctgac gagtggattg tcactcgtac cggtatccgc 120

gaacgccaca ttgccgcgcc aaacgaaacc gtttcaacca tgggctttga agcggcgaca 180

cgcgcaattg agatggcggg cattgagaaa gaccagattg gcctgatcgt tgtggcaacg 240

acttctgcta cgcacgcttt cccgagcgca gcttgtcaga ttcaaagcat gttgggcatt 300

aaaggttgcc cggcatttga cgttgcagca gcctgcgcag gtttcaccta tgcattaagc 360

gtagccgatc aatacgtgaa atctggggcg gtgaagtatg ctctggtcgt cggttccgat 420

gtactggcgc gcacctgcga tccaaccgat cgtgggacta ttattatttt tggcgatggc 480

gcgggcgctg cggtgctggc tgcctctgaa gagccgggaa tcatttccac ccatctgcat 540

gccgacggta gttatggtga attgctgacg ctgccaaacg ccgaccgcgt gaatccagag 600

aattcaattc atctgacgat ggcgggcaac gaagtcttca aggttgcggt aacggaactg 660

gcgcacatcg ttgatgagac gctggcggcg aataatcttg accgttctca actggactgg 720

ctggttccgc atcaggctaa cctgcgtatt atcagtgcaa cggcgaaaaa actcggtatg 780

tctatggata atgtcgtggt gacgctggat cgccacggta atacctctgc ggcctctgtc 840

ccgtgcgcgc tggatgaagc tgtacgcgac gggcgcatta agccggggca gttggttctg 900

cttgaagcct ttggcggtgg attcacctgg ggctccgcgc tggttcgttt ctag 954