(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0111106
(43) 공개일자 2021년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0026211
(22) 출원일자 2020년03월02일
심사청구일자 2020년03월02일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박진병
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10 여의도자이아파트 401동 902호
이정후
경기도 김포시 사우로 59-8(사우동)
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 16 항

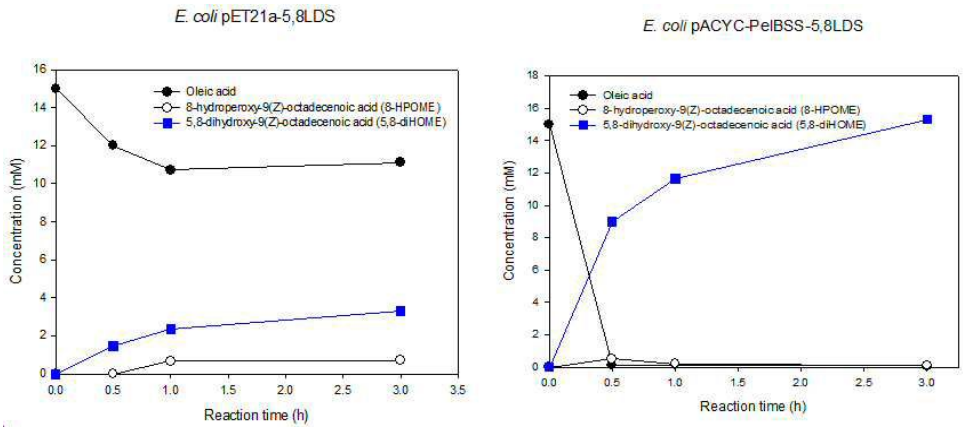
(54) 발명의 명칭 **페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소를 이용한 디하이드록시 지방산의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소(Diol synthase)를 이용한 디하이드록시 지방산의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체에 불포화 지방산을 처리하여 디하이드록시 지방산을 제조하는 방법 및 상기 제조를 위한 형질전환체에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소는 종래의 세포질에 존재하는 다이올 합성효소보다 동일한 시간에 많은 양의 디하이드록시지방산을 제조할 수 있으므로, 디하이드록시 지방산을 사용하고 있는 화학물질, 연료, 플라스틱, 락톤, 향료, 계면 활성제 및 가소제 등을 제조하는데 필요한 비용 및 단가를 절감할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Y 113/1106 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2020R1A2B5B03002376
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 지방산 유래 고부가 소재 생합성을 위한 산화효소 활성 향상 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 다이올 합성효소(Diol synthase)를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 형질전환체에 불포화 지방산을 처리하여 디하이드록시 지방산을 제조하는 단계를 포함하는,

디하이드록시 지방산의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 페리플라즘에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다이올 합성효소는 신호서열이 결합된 형태로 발현되어 페리플라즘으로 분비된 후 신호서열이 제거되는 것인, 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 신호서열은 PelB 신호서열인 것인, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 불포화 지방산에서 디하이드록시 지방산 제조시, 중간체인 하이드로퍼옥시 지방산의 농도가 낮게 유지되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 불포화 지방산은 올레산, 리놀레산 또는 리놀렌산인 것인, 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 디하이드록시 지방산은 5,8-디하이드록시-9-옥타데세노익산(5,8-dihydroxy-9-octadecenoic acid), 5,8-디하이드록시-9,12-옥타데카디에노익산(5,8-dihydroxy-9,12-octadecadienoic acid) 또는 5,8-디하이드록시-9,12,15-옥타데카트라이에노익산 (5,8-dihydroxy-9,12,15-octadecatrienoic acid)인 것인, 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 다이올 합성효소는 5,8-다이올 합성효소인 것인, 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 다이올 합성효소는 아스퍼질러스 니둘란스(Aspergillus nidulans) 유래 다이올 합성효소인 것인, 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아스퍼질러스 니둘란스 유래 다이올 합성효소는 서열번호 5로 표시되는 것인, 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 형질전환체는 다이올 합성효소를 코딩하는 유전자 및 신호서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 도입하여 수득되는 것인, 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 다이올 합성효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 것이고, 신호서열을 코딩하는 유전자는 서열번호 7로 표시되는 것인, 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 형질전환체는 재조합 대장균인 것인, 제조방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 형질전환체를 불포화 지방산을 포함하는 배지에서 배양하여 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 15

다이올 합성효소를 코딩하는 유전자 및 신호서열을 코딩하는 유전자를 포함하는, 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체.

청구항 16

제15항의 형질전환체를 포함하는 디하이드록시 지방산 제조용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소(Diol synthase)를 이용한 디하이드록시 지방산의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체에 불포화 지방산을 처리하여 디하이드록시 지방산을 제조하는 방법 및 상기 제조를 위한 형질전환체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 디하이드록시 지방산은 광범위한 식물 병원성 박테리아 및 곰팡이에 대하여 항균 활성을 가지며, 표면 장력을 감소시킬 수 있어, 폴리우레탄 경질 폼 및 스킨 케어 제품의 제조에 사용된다. 또한, 디하이드록시 지방산은 모

노하이드록시 지방산에 비하여 우수한 계면활성제인 것으로 알려져 있다.

[0005] 이처럼 다양한 분야에서 사용되고 있는 디하이드록시 지방산을 제조하기 위하여 보통 다이올 합성효소(diol synthase)를 포함하는 생물 촉매를 이용하고 있다 (Biotechnol Lett. (2015) 37:131-137, Appl Microbiol Biotechnol. (2014) 98:7447-7456). Diol synthase는 불포화 지방산에 산소분자를 가하여 디하이드록시 지방산을 비가역적으로 생성하는 효소를 말한다(도 1 및 2). 예를 들어, 아스퍼질러스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*) 유래 diol synthase를 대장균의 세포질에 발현시켜 재조합 대장균 (*Escherichia coli*) 기반 생촉매를 구축하고, 이를 이용하여 올레산으로부터 43%의 수율로 약 5.2 g/L의 5,8-diHOME를 제조할 수 있음이 알려져 있다 (Biotechnol Lett. (2015) 37:131-137).

[0007] 그러나, 디하이드록시 지방산을 제조하기 위한 diol synthase를 세포질에 발현하는 생물 촉매의 문제점은 중간체, 예컨대 5,8-diHOME를 생산할 때 생성되는 중간체인 8-hydroperoxy-9(Z)-octadecenoic acid (8-HPOME)(도 1)가 효소와 미생물에 대한 독성이 매우 높아 목표산물인 5,8-diHOME를 빠른 속도/고농도로 생산하기가 어렵다는 점에 있다. 그러므로, 디하이드록시 지방산을 빠른 속도/고농도로 생산하기 위해서는 중간체인 8-HPOME의 세포 내 농도를 낮게 유지할 수 있는 새로운 생촉매 시스템을 개발하는 것이 중요하다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 중간체인 8-HPOME의 세포 내 농도를 낮게 유지하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, diol synthase를 페리플라즘으로 분비시켜 페리플라즘에서 지방산 생물전환을 진행할 경우, 세포 내 중간체 농도가 낮게 유지되어 세포 독성을 방지할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은, 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소(Diol synthase)를 이용한 디하이드록시 지방산의 제조방법을 제공하는 것이다. 구체적으로, (a) 다이올 합성효소(Diol synthase)를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 형질전환체에 불포화 지방산을 처리하여 디하이드록시 지방산을 제조하는 단계를 포함하는, 디하이드록시 지방산의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 상기 디하이드록시 지방산의 제조방법에 이용될 수 있는, 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 상기 형질전환체를 포함하는, 디하이드록시 지방산 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소(Diol synthase)를 이용한 디하이드록시 지방산의 제조방법을 제공한다.

[0018] 구체적으로, (a) 다이올 합성효소(Diol synthase)를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 형질전환체에 불포화 지방산을 처리하여 디하이드록시 지방산을 제조하는 단계를 포함하는, 디하이드록시 지방산의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0020] 본 발명에서는, 기존에 알려진 불포화 지방산으로부터 디하이드록시 지방산을 제조하는 방법에서 다이올 합성효소를 이용하는 데에 있어서 중간체(intermediate)의 독성에 따른 문제점을 해결하고자 하였다. 구체적으로는, 중간체, 예컨대 올레산으로부터 5,8-diHOME를 생산할 때 생성되는 중간체인 8-HPOME와 같은 물질은 효소와 미생물에 대한 독성이 매우 높은데, 이의 농도를 낮게 유지하고자 생물전환 반응을 페리플라즘에서 수행되도록 한 데에 특징이 있다. 다시 말해, 기존의 세포질에서 수행되는 생물전환 반응에서 나타나는 문제점을 해결한 데에 핵심적 특징이 있다.

[0021] 상기와 같은 본 발명의 목적상, 상기 다이올 합성효소는 형질전환체에서 발현되어 페리플라즘으로 분비되는데, 이러한 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비시키는 방법은 상기 다이올 합성효소가 페리플라즘에서 불포화 지방산을 디하이드록시 지방산으로 변환시킬 수 있는 효소활성을 나타내는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 신호서열을 사용하는 방법이 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 신호서열의 일종인 PelB 신호서열이 다이올 합성효소와 결합된 형태로 세포 내에서 발현되어 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비시키는 방법을 사용하였다.

[0022] 상기 PelB 신호서열은 PelB를 페리플라즘으로 분비시키는 서열로서, 일반적인 분비 경로를 이용하는 분비서열 중 하나이다 (Journal of Bacteriology 169 (1987) 4379-4383). 본 발명에 있어서, 상기 PelB 신호서열은 다이올 합성효소와 융합된 형태로 세포질에서 발현되고 세포 내막을 통과하면서 잘려지게 되어, 페리플라즘에서는 PelB 신호서열이 제거된 형태로 다이올 합성효소가 존재하게 된다. 즉, 본 발명에서 상기 다이올 합성효소는 신호서열이 결합된 형태로 발현되어 페리플라즘으로 분비된 후 신호서열이 제거되는 것일 수 있다.

[0023] 상기 용어 "페리플라즘(periplasm)"은 세포내막과 세포외막 사이의 공간에 존재하는 젤(gel)과 유사한 물질로 이루어진 부분을 말한다. 대장균(*E. coli*)은 세포내막(inner membrane)과 외막(outer membrane)의 2개의 막으로 둘러싸여 있으며, 이 2개의 막을 기준으로 세포내막의 내부 공간은 세포질(cytoplasm), 세포내막과 세포외막 사이의 공간은 페리플라즘(periplasm), 세포외막의 외부 공간은 세포외 영역(extracellular space)으로 분류한다.

[0025] 본 발명에서 사용된 용어 “다이올 합성효소(diol synthase)”는 불포화 지방산에 산소분자를 가하여 디하이드록시 지방산을 비가역적으로 생성하는 효소를 의미한다. 구체적으로 상기 다이올 합성효소는 5,8-다이올 합성효소일 수 있다. 또한, 상기 다이올 합성효소는, 불포화 지방산으로부터 중간체인 하이드로퍼옥시 지방산을 거쳐 디하이드록시 지방산을 생성할 수 있다.

[0026] 상기 다이올 합성효소는 상기와 같은 효소 활성을 나타내는 한 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로는 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 클라바투스(*Aspergillus clavatus*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 글로메렐라 신굴레이트(*Glomerella cingulate*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 균주로부터 유래된 것을 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 유래 다이올 합성효소일 수 있다. 상기 아스퍼질러스 니둘란스 유래 다이올 합성효소는 서열번호 5로 표시되는 것일 수 있다.

[0027] 상기 다이올 합성효소는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 불포화 지방산은 분자 내에 이중결합을 갖고 있는 지방산으로, 포화지방산에 비해 화학적으로 불안정하고, 산화되기 쉬우며, 융점이 낮다. 체내에서 합성되지 않은 필수지방산도 포함되어 있고, 영양적으로 중요한 지방산이다. 상기 불포화 지방산은 상기 다이올 합성효소에 의하여 디하이드록시 지방산으로 생물전환될 수 있는 한 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로는 탄소수 18개의 불포화 지방산일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 불포화 지방산은 올레산, 리놀레산 또는 리놀레산일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명에서 디하이드록시 지방산은 상기 불포화 지방산으로부터 생성되는 본 발명의 최종 산물로서, 역시 이에 제한되지는 않으나, 탄소수 18개의 디하이드록시 지방산일 수 있다. 보다 구체적으로는, 5,8-디하이드록시-9-옥타데세노익산(5,8-dihydroxy-9-octadecenoic acid), 5,8-디하이드록시-9,12-옥타데카디에노익산(5,8-

dihydroxy-9,12-octadecadienoic acid) 또는 5,8-디하이드록시-9,12,15-옥타데카트라이에노익산 (5,8-dihydroxy-9,12,15-octadecatrienoic acid) 일 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어 "형질전환체"는 본 발명의 다이올 합성효소를 코딩하는 유전자 및 신호서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 도입하여 수득되는 것일 수 있으며, 본 발명의 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 다이올 합성효소를 코딩하는 유전자 및 신호서열을 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 6 및 7로 표시되는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환체를 위한 숙주세포는 상기 발현벡터를 도입하여 상기 다이올 합성효소를 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지는 않으나, 대장균, 코리네박테리움, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 구체적으로, 대장균일 수 있고, 보다 구체적으로, 대장균 BL21(DE3)일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 본 발명의 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소를 제조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지는 않으나, $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 발현벡터는 적절한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전자 삽입물을 포함하고, 상기 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 본 발명에서는 대장균으로부터 다이올 합성효소의 배출을 촉진하기 위해, PelB 신호서열을 사용하였다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비하는 형질전환체를 제조한 이후에, 이를 이용하여 올레산을 5,8-디하이드록시-9-옥타데세노익산으로, 리놀레산을 5,8-디하이드록시-9,12-옥타데카디에노익산으로 생물전환한 결과, 다이올 합성효소가 세포질에 존재하는 형질전환체에 비하여 훨씬 우수한 속도 및 농도로 디하이드록시 지방산이 생성됨을 확인하였다(도 3 및 도 4). 아울러, 독성을 가지는 중간체인 8-하이드로퍼옥시-9-옥타데세노익산 및 8-하이드로퍼옥시-9,12-옥타데카디에노익산은 현저하게 낮은 수준으로 존재함을 확인하였다. 이를 통하여 페리플라즘에서 반응이 일어날 경우에 현저히 우수한 디하이드록시 지방산 생산 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0038] 상기 발현벡터는 PelB 신호서열과 다이올 합성효소 유전자를 결합시킨 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 본 발명에서 제공하는 다이올 합성효소를 제조할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 구체적으로 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[0039] 본 발명에서 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드를 구성하는 염기서열은 다이올 합성효소를 대량을 제조하는 효소활성을 나타낼 수 있는 단백질을 코딩할 수 있는 한, 상기 염기서열과 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드의 범주에 포함될 수 있는데, 구체적으로 80 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 보다 구체적으로 90 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으며, 가장 구체적으로, 95 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 형질전환체에 상기 불포화 지방산을 처리하는 방법은 이에 제한되지는 않으나, 상기 형질전환체를 불포화 지방산을 포함하는 배지에서 배양하여 수행하는 것일 수 있다. 상기 형질전환체에서 제조되는 다이올 합성효소는 형질전환체의 내부에서 제조되고, 제조된 효소가 페리플라즘으로 이동하여 효소활성을 나타낼 수 있다.

[0042] 상기 배양은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소를 발현시켜서 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[0043] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족시킬 수 있다.

[0045] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 제공한다. 구체적으로 다이올 합성효소를 코딩하는 유전자 및 신호서열을 코딩하는 유전자를 포함하는, 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 형질전환체를 제공할 수 있다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 포함하는 디하이드록시 지방산 제조용 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 형질전환체, 페리플라즘 분비, 디하이드록시 지방산 제조 등에 대해서는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에서 제공하는 페리플라즘으로 분비되는 다이올 합성효소는 종래의 세포질에 존재하는 다이올 합성효소보다 동일한 시간에 많은 양의 디하이드록시지방산을 제조할 수 있으므로, 디하이드록시 지방산을 사용하고 있는 화학물질, 연료, 플라스틱, 락톤, 향료, 계면 활성제 및 가소제 등을 제조하는데 필요한 비용 및 단가를 절감할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명에서 제공하는 다이올 합성효소가 올레산으로부터 8-하이드로퍼옥시-9-옥타데세노익산 및 5,8-디하이드록시-9-옥타데세노익산을 생산하는 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 다이올 합성효소가 리놀레산으로부터 8-하이드로퍼옥시-9,12-옥타데카디에노익산 및 5,8-디하이드록시-9,12-옥타데카디에노익산을 생산하는 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 다이올 합성효소가 세포질에 존재하는 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-5,8LDS)(A) 또는 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-PelB-5,8LDS)(B)을 이용하여 올레산 기질에 따른 디하이드록시 지방산 생산 반응을 비교한 도이다.

도 4는 다이올 합성효소가 세포질에 존재하는 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-5,8LDS)(A) 또는 다이올 합성효소를 페리플라즘으로 분비할 수 있는 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-PelB-5,8LDS)(B)을 이용하여 리놀레산 기질에 따른 디하이드록시 지방산 생산 반응을 비교한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1: 다이올 합성효소(Diol synthase)를 페리플라즘으로 분비하는 형질전환체 제조**

[0056] **실시예 1-1: Diol synthase를 포함하는 재조합 발현벡터 제작**

[0058] Diol synthase를 페리플라즘으로 분비하는 형질전환체를 제조하기 위하여, 먼저 페리플라즘으로 분비되기 위한 diol synthase 발현 벡터를 제작하고 이후 신호서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하고자 하였다.

[0060] 먼저, 페리플라즘으로 분비되는 diol synthase 발현 벡터를 제작하기 위하여, 문헌(Biotechnol Lett (2015) 37:131?137)에 보고된 pET21a-5,8LDS(*Aspergillus nidulans* 유래의 diol synthase를 대장균 세포질에 발현)를 기초로 하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하여 diol synthase 유전자를 증폭시켰다. 이후 증폭된 유전자를 pET26b 벡터에 삽입하여 pET26b-5,8LDS를 구축하였다.

[0062] 구체적으로, 5' - CCG GCG ATG GCC ATG GGT GAA GAC AAA GAA ACA AA-3' (서열번호 1, NcoⅠ) 및 5' - GGT GGT GGT GCT CGA GAA AAT CTT CCT TCA GTT GGG GCA-3' (서열번호 2, XhoⅠ)를 프라이머로 이용하여 pET21a-5,8LDS로부터 diol synthase 유전자를 증폭한 후, pET26b 벡터에 삽입하여 pET26b-5,8LDS를 구축하였다.

[0064] 상기 pET26b 벡터에는 페리플라즘으로 분비할 수 있는 PelB signal sequence (PelBSS)가 포함되어 있는바, 이를 증폭하여 벡터에 삽입하고자 하였다. 구체적으로, 5' -AGG AGA TAT ACC ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC G-3' (서열번호 3, NcoⅠ)와 5' -ATG CGG CCG CAA GCT TTA GTG GTG GTG GTG GTG G-3' (서열번호 4, Hind III)를 프라이머로 이용하여, pET26b-5,8LDS로부터 PelB signal sequence (PelBSS)를 포함하는 PelBSS-5,8LDS-His tag 부분을 PCR로 증폭한 후 pACYCduet 벡터에 삽입하여 pACYC-PelBSS-5,8LDS를 제작하였다.

[0066] **실시예 1-2: 재조합 발현벡터를 포함하는 형질전환체의 제조**

[0068] Diol synthase가 세포질에 존재하는 대장균 형질전환체와 페리플라즘으로 분비할 수 있는 대장균 형질전환체를 각각 제작하기 위하여, 실시예 1-1에서 구축한pET21a-5,8LDS와 pACYC-PelBSS-5,8LDS로 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)을 형질전환시켜 *E. coli* pET21a-5,8LDS와 *E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS를 제작하였다.

[0070] **실시예 2: Diol synthase를 페리플라즘으로 분비하는 형질전환체를 이용한 지방산 생물전환**

[0072] **실시예 2-1: 올레산 생물전환**

[0074] 상기 제작된 diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 형질전환체 (*E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS)가 세포질에 존재하는 형질전환체 (*E. coli* pET21a-5,8LDS)에 비해 지방산 생물전환 활성이 증가되었는지 확인하기 위하여, 먼저 불포화 지방산의 일종인 올레산으로 전세포 생물전환을 수행하였다.

[0076] 형질전환체를 이용한 지방산 생물전환을 위해서, diol synthase를 발현하는 재조합 대장균을 16 ℃에서 150rpm, TB 배지에서 배양 하였다. 0.6의 OD600에서 0.1mM IPTG 로 타겟 유전자 발현을 유발한 후 18 - 20 시간에 생물전환을 시작하였다. 15mM 올레산 및 10% (v/v) DMSO(Dimethyl sulfoxide) 을 배양액에 첨가한 다음, 진탕배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 250 rpm 및 40 ℃의 조건으로 수행하였다.

[0078] 그 결과, diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 대장균 형질전환체(*E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS)가 세포질에 존재하는 대장균 형질전환체(*E. coli* pET21a-5,8LDS)에 비하여 올레산으로부터 5,8-디하이드록시-9-옥타데세노익산 (5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid, 5,8-diHOME)을 4배 이상 빠른 속도로 생산하였으며, 5,8-diHOME의 최종 농도도 4배 이상 높았다(도 3).

[0079] 또한, 중간체인 8-하이드로퍼옥시-9-옥타데세노익산(8-hydroperoxy-9(Z)-octadecenoic acid, 8-HPOME)의 농도를 살펴보면, diol synthase가 세포질에 존재하는 대장균 형질전환체(*E. coli* pET21a-5,8LDS)에 비하여 diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 대장균 형질전환체(*E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS)에서는 현저하게 낮은 수준인 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 이러한 결과를 통하여, diol synthase의 발현/분비 위치가 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 (recombinant *E. coli*-based biocatalysts)의 지방산 생물전환 속도에 매우 중요한 것임을 알 수 있었다. 즉, 페리플라즘에서 반응이 일어날 경우에 현저히 우수한 디하이드록시 지방산 생산 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0083] **실시예 2-2: 리놀레산 생물전환**

[0085] 상기 실시예 2-1을 통하여 올레산 생물전환에 있어서 diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 형질전환체의 우수한 효과를 확인하였는바, 다른 지방산에서도 동일한 효과를 내는지 확인하고자 하였다. 구체적으로는 다른 불포화 지방산의 일종인 리놀레산에서도 이를 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 형질전환체를 이용한 지방산 생물전환을 위해서, diol synthase를 발현하는 재조합 대장균을 16 ℃에서 150rpm, TB 배지에서 배양 하였다. 0.6의 OD_{600}에서 0.1mM IPTG 로 타켓 유전자 발현을 유발한 후 18 - 20 시간에 생물전환을 시작하였다. 15mM 리놀레산 및 10% (v/v) DMSO(Dimethyl sulfoxide) 을 배양액에 첨가한 다음, 진탕배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 250 rpm 및 40 ℃의 조건으로 수행하였다.

[0089] 그 결과, diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 대장균 형질전환체(*E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS)가 세포질에 존재하는 대장균 형질전환체(*E. coli* pET21a-5,8LDS)에 비하여 리놀레산으로부터 5,8-디하이드록시-9,12-옥타데카디에노익산(5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid)을 3배 이상 빠른 속도로 생산하였으며, 최종 농도도 3배 이상 높았다(도 4).

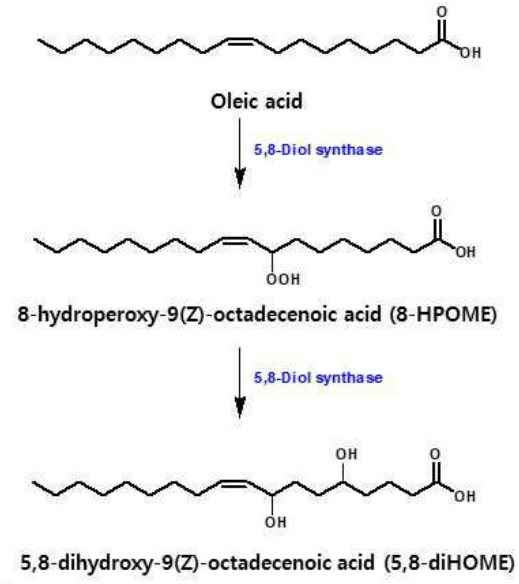
[0090] 또한, 중간체인 8-하이드로퍼옥시-9,12-옥타데카디에노익산 (8-hydroperoxy-9,12-octadecadienoic acid)의 농도를 살펴보면, diol synthase가 세포질에 존재하는 대장균 형질전환체(*E. coli* pET21a-5,8LDS)에 비하여 diol synthase가 페리플라즘으로 분비되는 대장균 형질전환체(*E. coli* pACYC-PelBSS-5,8LDS)에서는 현저하게 낮은 수준인 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 이러한 결과를 통하여, diol synthase의 발현/분비 위치가 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 (recombinant *E. coli*-based biocatalysts)의 지방산 생물전환 속도에 매우 중요한 것임을 알 수 있었다. 즉, 페리플라즘에서 반응이 일어날 경우에 현저히 우수한 디하이드록시 지방산 생산 효과를 가짐을 알 수 있었다.

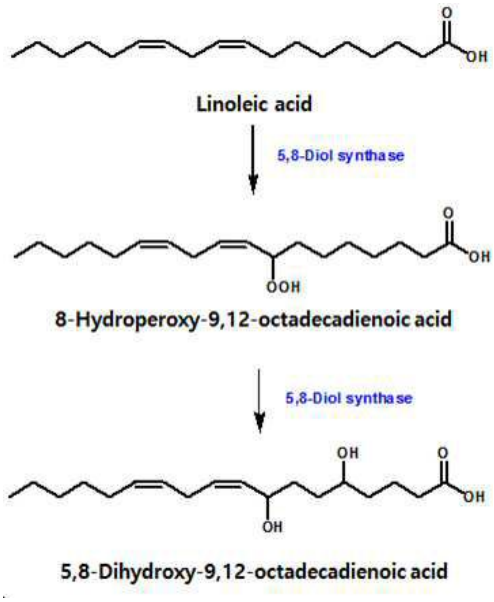
[0094] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

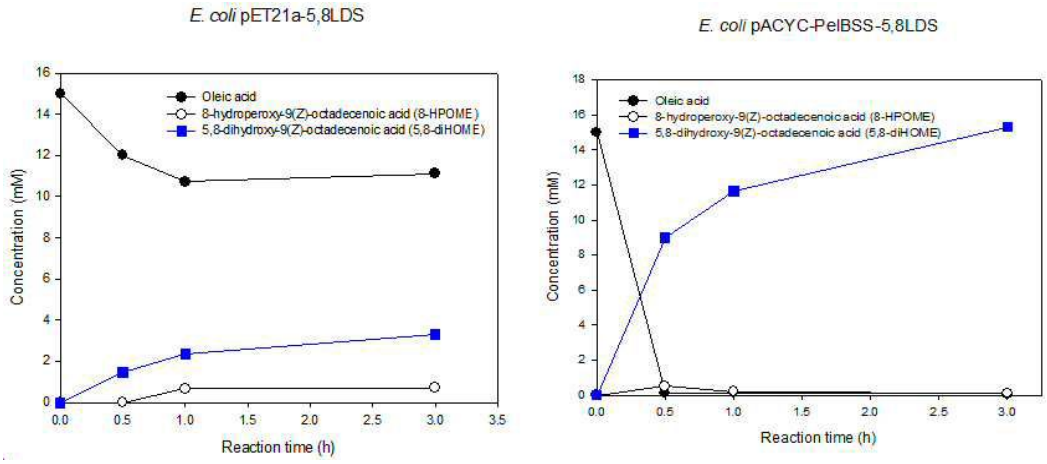
도면1


Oleic acid
5,8-Diol synthase
8-hydroperoxy-9(Z)-octadecenoic acid (8-HPOME)
5,8-Diol synthase
5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid (5,8-diHOME)

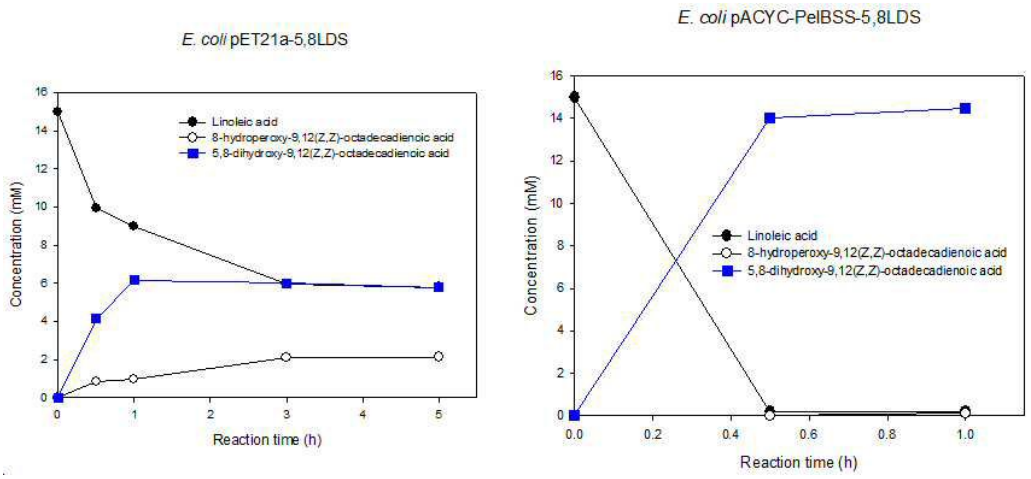
도면2


Linoleic acid
5,8-Diol synthase
8-Hydroperoxy-9,12-octadecadienoic acid
5,8-Diol synthase
5,8-Dihydroxy-9,12-octadecadienoic acid

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Method for producing dihydroxy fatty acids using diol synthase acting in periplasm

<130> KPA191714-KR

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NcoI primer

<400> 1

ccggcgatgg ccatgggtga agacaaagaa acaaa 35

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XhoI primer

<400> 2

ggtggtggtg ctcgagaaaa tcttccttca gttggggca 39

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NcoI primer

<400> 3

aggagatata ccatgaaata cctgctgccg accg 34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HindIIII primer

<400> 4

atgcggccgc aagctttagt ggtggtggtg gtgg 34

<210> 5

<211> 1081

<212

> PRT

<213> Aspergillus sp.

<400> 5

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

Ile Ser Gln Val Glu Asn Val Val Ala Ala Ser Leu Arg Pro Leu Pro
20 25 30

Thr Ala Thr Gly Asp Gly Thr Tyr Val Ala Glu Ser Thr Gln Thr Gly
35 40 45

Leu Ala Lys Asp Leu Ser His Val Asp Leu Lys Asp Val Arg Thr Leu
50 55 60

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

130 135 140
Leu Gly Ala Ala Gly Ser Ala Tyr Ala Arg Ser Val Arg Pro Lys Thr
145 150 155 160
Met Gln Ser Pro Ser Leu Pro Asp Pro Glu Thr Ile Phe Asp Cys Leu
165 170 175
Leu Arg Arg Lys Glu Tyr Arg Glu His Pro Asn Lys Ile Ser Ser Val
180 185 190
Leu Phe Tyr Leu Ala Ser Ile Ile Ile His Asp Leu Phe Gln Thr Asp
195 200 205

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

275 280 285
Phe Thr Lys Pro Asp Glu Ser Asn Val Asp Glu Tyr Ala Lys Tyr Asp

290 295 300

Asn Asn Leu Phe Gln Thr Gly Arg Leu Val Thr Cys Gly Leu Tyr Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Asp Ser Thr Trp Ser Leu Asp Pro Arg Met Glu Met Lys Asp Gly

340 345 350

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

355 360 365

Glu Phe Asn Val Val Tyr Arg Trp His Ala Cys Ile Ser Lys Arg Asp

370 375 380

Glu Lys Trp Thr Glu Asp Phe His Arg Glu Ile Met Pro Gly Val Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Phe Glu Lys Ser Val Glu Asp Cys Ala Gly Ala Phe Gly Ala Ser His

450 455 460

Val Pro Ala Ile Phe Lys Ser Val Glu Ala Leu Gly Ile Met Gln Ala

465 470 475 480

Arg Arg Trp Asn Leu Gly Thr Leu Asn Glu Phe Arg Gln Tyr Phe Asn

485 490 495

Leu Ala Pro His Lys Thr Phe Glu Asp Ile Asn Ser Asp Pro Tyr Ile

500 505 510

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

515 520 525

Tyr Pro Gly Val Val Val Glu Glu Ala Lys Asp Ser Met Val Pro Gly

530 535 540

Ser Gly Leu Cys Thr Asn Phe Thr Ile Ser Arg Ala Ile Leu Ser Asp

545 550 555 560

Ala Val Ala Leu Val Arg Gly Asp Arg Phe Tyr Thr Val Asp Tyr Thr

565 570 575

Pro Lys His Leu Thr Asn Trp Ala Tyr Asn Glu Ile Gln Pro Asn Asn

580 585 590

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

595 600 605

Pro Asn His Phe Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Ala His Phe Pro Leu Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Lys Tyr Ser Trp Glu Lys Pro Ser Arg Ile Ser His Pro Ile Phe Ile

645 650 655

Ser Ser His Ala Ala Cys Met Ser Ile Leu Glu Asn Gln Glu Thr Phe

660 665 670

Lys Val Thr Trp Gly Arg Lys Ile Glu Phe Leu Met Gln Arg Asp Lys

675 680 685

His Gln Tyr Gly Lys Asp Phe Met Leu Ser Gly Asp Arg Pro Pro Asn

690 695 700

Ala Ala Ser Arg Lys Met Met Gly Ser Ala Leu Tyr Arg Asp Glu Trp

705 710 715 720

Glu Ala Glu Val Lys Asn Phe Tyr Glu Gln Thr Thr Leu Lys Leu Leu

725 730 735

His Lys Asn Ser Tyr Lys Leu Ala Gly Val Asn Gln Val Asp Ile Val

740 745 750

Arg Asp Val Ala Asn Leu Ala Gln Val His Phe Cys Ser Ser Val Phe

755 760 765

Ser Leu Pro Leu Lys Thr Asp Ser Asn Pro Arg Gly Ile Phe Ala Glu

770 775 780

Ser Glu Leu Tyr Lys Ile Met Ala Ala Val Phe Thr Ala Ile Phe Tyr

785 790 795 800

Asp Ala Asp Ile Gly Lys Ser Phe Glu Leu Asn Gln Ala Ala Arg Thr
805 810 815
Val Thr Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr Met Ala Asn Val Glu Ile Ile
820 825 830
Ala Lys Thr Gly Leu Ile Ala Asn Leu Val Asn Arg Leu His Arg Arg
835 840 845
Asp Val Leu Ser Glu Tyr Gly Ile His Met Ile Gln Arg Leu Leu Asp

850 855 860
Ser Gly Leu Pro Ala Thr Glu Ile Val Trp Thr His Ile Leu Pro Thr
865 870 875 880
Ala Gly Gly Met Val Ala Asn Gln Ala Gln Leu Phe Ser Gln Cys Leu
885 890 895
Asp Tyr Tyr Leu Ser Glu Glu Gly Ser Gly His Leu Pro Glu Ile Asn
900 905 910
Arg Leu Ala Lys Glu Asn Thr Pro Glu Ala Asp Glu Leu Leu Thr Arg
915 920 925

Tyr Phe Met Glu Gly Ala Arg Leu Arg Ser Ser Val Ala Leu Pro Arg
930 935 940
Val Ala Ala Gln Pro Thr Val Val Glu Asp Asn Gly Glu Lys Leu Thr
945 950 955 960
Ile Lys Ala Gly Gln Val Val Met Cys Asn Leu Val Ser Ala Cys Met
965 970 975
Asp Pro Thr Ala Phe Pro Asp Pro Glu Lys Val Lys Leu Asp Arg Asp
980 985 990
Met Asn Leu Tyr Ala His Phe Gly Phe Gly Pro His Lys Cys Leu Gly

995 1000 1005
Leu Asp Leu Cys Lys Thr Gly Leu Ser Thr Met Leu Lys Val Leu Gly
1010 1015 1020
Arg Leu Asp Asn Leu Arg Arg Ala Pro Gly Ala Gln Gly Gln Leu Lys
1025 1030 1035 1040
Lys Leu Ser Gly Pro Gly Gly Ile Ala Lys Tyr Met Asn Glu Asp Gln
1045 1050 1055

Ser Gly Phe Thr Pro Phe Pro Ser Thr Met Lys Ile Gln Trp Asp Gly
1060 1065 1070

Glu Leu Pro Gln Leu Lys Glu Asp Phe
1075 1080

<210> 6

<211> 3243

<212> DNA

<213> Aspergillus sp.

<400> 6

atgggtgaag acaaagaaac aaatatcctc gccggcctcg gaaacaccat ttcccaagta 60

gaaaacgttg ttgcggcatc gttacgacct ttgccaacgg caacgggtga tggaacctac 120

gttgccgaat ccactcagac gggcttggcc aaagatctga gccatgtcga cctcaaggat 180

gtccgcacac tcgccgaagt cgtcaagagt gcggctacgg gagagccggt tgatgacaag 240

cagtatatca tggaaagagt gattcagtta gctgctggct taccatcgac atctcgcaac 300

gctgcagagc taaccaagtc atttttgaac atgctgtgga atgacttgga acatccacca 360

gtttcttatc taggagctga ttctatgcac cgcaaagccg acggctcggg taataatcgt 420

ttctggcctc aacttggcgc tgctggtagc gcgtacgcaa gatctgttcg gcccaagacg 480

atgcagtctc catccctgcc cgatcctgag actattttcg attgcctgct ccgccggaaa 540

gagtacaggg agcatcctaa taagatatca agcgttctat tctacctcgc ttcaatcatt 600

attcatgacc tattccagac agaccctaaa gataattccg tgtccaagac atcgtcatat 660

ttggacctct caccttgta tggcaataat caagacgagc agaaccttgt tcgtacgttc 720

aaggatggaa agcttaagcc agattgtttc gctaccaagc gagtgttggg ctttcctccc 780

ggcgtcggcg ttctactgat catgttcaac cgcttccaca actatgtggt tgatcaattg 840

gcggcgatca acgaatgcgg ccgattcacc aaacctgacg agtccaacgt tgacgagtat 900

gctaaatacg ataacaatct cttccaaacc gggcgactgg tgacttgtgg gttgtacgca 960

aatattatcc taaaagatta tgtccgaacg attttgaata taaaccggac agatagcacc 1020

tggagtttgg accccagaat ggaaatgaag gatggtttat taggtgaagc agcagcaatg 1080

gcaaccggga accaggtgtc agccgaattt aatgtcgtgt accggtggca cgcttgcatt 1140

tctaagcgcg atgaaaaatg gacagaggat tttcaccgtg aaatcatgcc gggagtggat 1200

ccaagcacac tatcgatgca agattttgtc gcgggtcttg gacggtggca ggcaggactc 1260

ccacaagagc cacttgagcg cccattctct ggcttacagc gtaagccgga cggtgcattc 1320

aacgacgatg acctggttaa tctgtttgag aagagtgttg aagactgcgc aggtgcattt 1380

ggtgcgtctc acgttccagc catcttcaag agcgttgaag ctctcgggat aatgcaggct 1440

cggagatgga acttgggaac gctcaatgag ttccgccaat atttcaatct ggctcctcat 1500

aagacctttg aggatatcaa ctccgatccg tacattgcgg atcagctcaa gcggctgtat 1560

gatcatccag atcttgtgga gatttaccct ggtgttgttg tggaagaagc caaagactcc 1620

atggtccctg gaagcggcct ttgcacgaac ttcactatat ccagggcaat cctttcggat 1680

gcggtggcat tggttcgcgg tgatagattt tacactgtcg actacactcc gaagcacctt 1740

acgaattggg cctacaacga gattcagcct aacaacgccg tcgatcaagg tcaggtattc 1800

tacaagctgg ttcttcgcgc attcccaaac cattttgatg gaaattctat ctatgctcat 1860

ttccccctg tcgttccctc ggaaaatgag aaaatattga agagccttgg ggttgccgag 1920

aagtatagct gggaaaagcc cagtcgtatc tctcatccga ttttcatcag ctctcatgcc 1980

gcgtgcatgt ccatcctcga aaatcaagaa acgttcaagg tgacttgggg taggaagatt 2040

gagttcctta tgcaacgcga taagcaccaa tacgggaagg acttcatgct gtctggagac 2100

cggccaccca acgctgcatc gcgcaagatg atgggttccg ccttgtatcg cgatgaatgg 2160

gaggctgagg tcaaaacttt ctacgagcaa acaactctaa aactcttgca taagaactcc 2220

tacaaacttg cgggcgttaa ccaagtcgat atcgttcgtg atgtggccaa tctcgcccaa 2280

gtccacttct gctctagcgt cttctcattg ccactgaaaa cagactctaa tcctaggggt 2340

atcttcgcag agtcggaact gtacaagata atggctgcag ttttcactgc catcttctac 2400

gacgcagata ttgggaaatc gttcgagcta aaccaggccg cccgtactgt aacgcagcag 2460

ctgggccagc taactatggc caacgtcgag atcatagcca aaaccggctt gatcgctaac 2520

ctcgtgaacc gccttcaccg gcgcgacgtg cttagcgaat atggcatcca tatgatccag 2580

cgtctactgg atagtggtct cccagcgaca gagattgtat ggactcatat ccttcctacg 2640

gccggtggaa tggtggcaaa ccaagcacaa ctgttttcgc aatgtctgga ctattatctc 2700

tcggaagagg gctctgggca tcttcctgag atcaaccgac tggccaagga aaataccccg 2760

gaagctgatg agctacttac acgctatttc atggaaggtg ctcggctacg gtcatccgtt 2820

gccctgcctc gagtagctgc gcagcccacg gtcgtagaag acaatggcga aaaactcacc 2880

atcaaagctg gccaggtcgt tatgtgtaac ctggtctctg cgtgcatgga tcctactgcc 2940

tttccagatc cagagaaggt caaacttgac cgtgacatga acttatacgc ccactttggc 3000

tttgggcccc acaagtgttt gggcttagac ctatgcaaga cagggctgag cacgatgcta 3060

aaagtacttg gacgcttgga caatctccgt cgtgctcctg gagcgcaggg acagttgaag 3120

aagctttctg gacctggcgg gatcgctaag tatatgaatg aggatcaaag cggcttcact 3180

ccctttcccgt caactatgaa gatccaatgg gacggcgaat tgccccaact gaaggaagat 3240

ttt 3243

<210> 7

<211> 63

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 7

aaatacctgc tgccgaccgc tgctgctggt ctgctgctcc tcgctgccca gccggcgatg 60

gcc 63