



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0076396  
(43) 공개일자 2009년07월13일

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0002317

(22) 출원일자 2008년01월08일

심사청구일자 2008년01월08일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김선원

경남 사천시 사남면 월성리 푸르지오아파트  
102-102

이은경

경남 진주시 대안동 2-4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

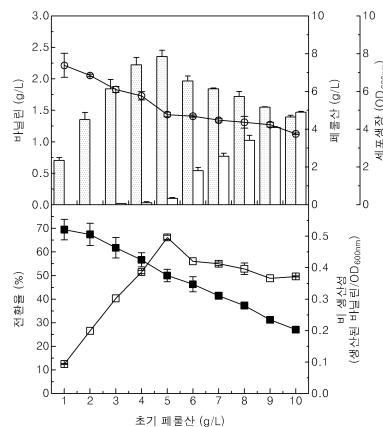
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 바닐린 내성 대장균 균주 및 상기 균주 및 흡착제 수지를이용한 바닐린 생산 증진 방법

### (57) 요약

본 발명은 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하며, 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가함으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 돌연변이 균주 및 본 발명의 대장균 돌연변이 균주를 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, NTG 돌연변이 유발에 의해 대장균의 바닐린 내성을 증가시키고, 또한 흡착제 수지를 이용함으로써 바닐린 생산성을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

**이숙희**

경남 마산시 내서읍 중리 동신아파트 105-203

**윤상활**

충남 부여군 부여읍 동남리 268-2 신안빌라 B동  
202호

---

**류희경**

경남 남해군 설천면 모천리 666-1번지

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하며, 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가함으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 돌연변이 균주.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 돌연변이 균주는 수탁번호 KCTC 11232BP인 DH5  $\alpha$ /NTGVR1-pTAHEF인 것을 특징으로 하는 대장균 돌연변이 균주.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 내성은 바닐린 농도 0.5-3.0 g/L에서 생육이 가능한 것을 특징으로 하는 대장균 돌연변이 균주.

### 청구항 4

- a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 대장균 돌연변이 균주를 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및
- b) 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 단계 a)에서 상기 배양을 흡착제 수지의 존재하에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 흡착제 수지는 중성 수지인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중성 수지는 XAD-2 수지인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 흡착제 수지의 농도는 10% (w/v) 내지 70% (w/v)인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가된 대장균 돌연변이 균주 DH5  $\alpha$ /NTGVR1.

## 명 세 서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

<1> 본 발명은 바닐린 내성 대장균 균주 및 상기 균주 및 흡착제 수지를 이용한 바닐린 생산 증진 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 본 발명은 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가함으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 돌연변이 균주 및 상기 대장균 돌연변이 균주를 이용한 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법에 관한 것이다.

#### 배 경 기 술

<2> 바닐린 (3-메톡시-4-히드록시벤즈알데히드)은 특히 식품뿐만 아니라, 약학, 음료 및 향료 산업에 가장 널리 이용되는 방향족 분자 중의 하나이다. 더욱이, 바닐린은 향균 및 항산화 성질을 가지고 있다. 오늘날, 바닐린의 매년 세계적인 소비는 12,000 톤 이상이며, 이 중에서 천연 바닐린은 단지 약 50톤이며, 나머지는 화학 합성에 의해 제공된다. 천연 바닐린의 수요가 바닐라 포드(vanilla pod) 추출에 의해 충당될 수 없으므로, 생물공학적

인 방법을 이용한 바닐린 생산이 대안적인 방법으로 연구되어 왔다. 천연 바닐린은 합성 바닐린이 US\$ 15/kg인 것과 대조적으로 US\$ 1,200/kg 내지 US\$ 4,000/kg으로 매우 비싸다. 유계놀, 이소유계놀 및 페룰산 같은 천연 물질의 바닐린으로의 미생물 전환이 연구되었으나, 페룰산이 바닐린의 적당한 전구체로서 고려된다.

- <3> 페룰산은 식물계에서 가장 풍부한 히드록실신남산이며, 주로 세포벽에 있다. 이는 리그닌 및 기타 생물중합체에 공유 결합되어 있다. 농업 폐기물은 바닐린의 생산에 이용되는 페룰산의 높은 비율을 포함한다. 생물전환에서, 페룰산은 먼저 *fcs* 유전자에 의해 코딩되는 페룰로일-CoA 합성효소에 의해 페룰로일-CoA로 활성화된 후, CoA 티오에스테르가 이어서 수화되며, *ech* 유전자에 의해 코딩되는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제에 의해 바닐린 및 아세틸-CoA로 절단된다.
- <4> 수많은 미생물, 예를 들면, 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 (Achterholt et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2000**, *54*, 799-807), 델프트아 아시도보란스 (*Delftia acidovorans*)(Peng et al., *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 1417-1427), 바실러스 서틸리스 (*Bacillus subtilis*)(Plaggenborg et al., *FEMS Microbiol Lett* **2001**, *205*, 9-16), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)(Plaggenborg et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, *61*, 528-535), 스펅고모나스 파우시모빌리스 (*Sphingomonas paucimobilis*)(Masai et al., *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 4416-4424), 스트렙토마이세스 세토니아이 (*Streptomyces setonii*)(Sutherland et al., *Can J Microbiol* **1983**, *29*, 1253-1257) 및 로도코커스 종 (*Rhodococcus* sp.)(Plaggenborg et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 745-755)이 페룰산으로부터 바닐린의 생산에 대해 제안되어 왔다. 그러나, 생산된 바닐린은 기타 형태로 신속하게 전환되거나 또는 탄소 및 에너지 소스로서 이용된다. 10.0 g/L 이상의 바닐린 생산이 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 및 스트렙토마이세스 세토니아이 (*Streptomyces setonii*)와 같은 방선균에 대해 기록되었으나, 발효 및 다운스트림 공정은 상기 미생물에 대해 비용이 비싸다. 그러므로, 대장균이 바닐린 생산에 대한 최상의 선택으로서 고려되는데, 이는 대장균은 바닐린 분해 경로가 없으며, 잘 개발된 발효 및 다운스트림 공정 때문이다 (Kim et al., *Biotechnol Bioprocess Eng* **1999**, *4*, 170-175). 바닐린은 향균 특성을 나타내므로, 바닐린의 만족스러운 생산은 대사적으로 조작된 대장균을 이용하여 초기 연구에서 실현되지 못하였다 (Yoon et al., *Biotechnol Bioprocess Eng* **2005**, *10*, 378-384; Yoon et al., *Biotechnol Lett* **2005**, *27*, 1829-1832).
- <5> 한국공개특허 제2001-0085827호에는 탄소원으로부터 바닐린 및 그 유도체를 제조하는 방법에 있어서, a) 탄소원을 재조합 미생물로 바닐린산으로 전환하는 단계; 및 b) 바닐린산을 바닐린으로 환원하는 단계를 포함하는 바닐린 및 그 유도체의 제조 방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 NTG 돌연변이 유발에 의해 생성된 바닐린 내성 돌연변이체와는 상이하다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <6> 상기와 같은 종래 기술을 바탕으로, 바닐린 생산을 연구하던 중, 본 발명자들은 NTG (*N*-메틸-*N'*-니트로-*N'*-니트로소구아니딘) 돌연변이 유발에 의해 생성된 바닐린 내성 돌연변이체 및 식품 등급의 흡착제 수지를 이용함으로써 고농도의 페룰산의 바닐린으로의 생물전환을 달성할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

### 과제 해결수단

- <7> 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 NTG 돌연변이 유발에 의해 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가함으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 돌연변이 균주를 제공한다.
- <8> 또한, 본 발명은 상기 대장균 돌연변이 균주를 이용하여 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하며, 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가함으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 돌연변이 균주를 제공한다.
- <10> 본 발명에서는 대장균에 NTG (*N*-메틸-*N'*-니트로-*N'*-니트로소구아니딘) 돌연변이 유발을 이용하여 바닐린 내성 돌연변이체를 제조하였고,
- <11> 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하는, 이전에 본 발명가에 의해 제조된 pTAHEF (Yoon et al., 2005

Biotechnol. Lett. 27, 1829-1832)를 도입하여 바닐린 생산 재조합 돌연변이주를 완성하였다. 페룰산으로부터 페룰로일-CoA 합성효소 및 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제와 같은 효소의 작용에 의해 생성된 바닐린은, 바닐린 자체의 항균 활성에 의하여 대장균의 생육을 저해하고 그에 따라 바닐린의 생산을 저해한다. 따라서, 상기 항균활성에 대한 저항성을 갖는 돌연변이 균주를 개발하기 위해 NTG 돌연변이 유발을 이용하였다. NTG 돌연변이 유발은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 이용하여 수행할 수 있으며, 예를 들면, 대장균 세포 현탁액을 NTG 용액과 혼합한 후, 30℃에서 20분 동안 인큐베이션함으로써 수행할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- <12> 상기 NTG 돌연변이 유발에 의해 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가하고, pTAHEF를 포함함으로써 바닐린 생산성이 증가된 재조합 대장균 돌연변이 균주인 대장균 DH5  $\alpha$ /NTGVR1-pTAHEF를 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자 은행에 2007년 11월12일 기탁하였다 (수탁번호 KCTC 11232BP).
- <13> 본 발명의 일 구현예에 따른 대장균 돌연변이 균주에서, 상기 바닐린 내성은 바닐린 농도 0.5-3.0 g/L에서 대장균 돌연변이 균주가 생육이 가능할 수 있다. 하기 실시예 2에서 알 수 있는 바와 같이, 3.0 g/L의 바닐린 농도에서는 10시간의 비교적 장기간의 지연 기간을 거친 후, 급격하게 세포가 성장하였다. 그러나, 3.0 g/L 초과인 바닐린 농도에서는 본 발명의 대장균 세포가 거의 성장하지 못하였다. 또한, 실시예 2에서 알 수 있는 바와 같이, 일반적인 대장균 DH5  $\alpha$ 의 세포 성장은 3.0 g/L의 바닐린 농도에서는 완전히 저해됨을 알 수 있다.
- <14> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 본 발명의 대장균 돌연변이 균주를 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및 b) 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다.
- <15> 본 발명의 바닐린 생산 방법은 본 발명의 대장균 돌연변이 균주를 페룰산 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 상기 대장균 돌연변이 균주는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하며, NTG (*N*-메틸-*N'*-니트로-*N'*-니트로소구아니딘) 돌연변이 유발에 의해 바닐린 내성이 증가된 돌연변이체를 말하며, 바람직하게는 수탁번호 KCTC 11232BP인 균주이다.
- <16> 기질로서 첨가되는 페룰산의 농도는 1.0-10.0 g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- <17> 본 발명의 대장균 돌연변이 균주는 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 배양할 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지 및 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다. 탄소원으로는 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 글리세롤이다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 및 이들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 미네랄은 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 및 이들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택된 것을 사용할 수 있다.
- <18> 미생물 배양 배지 내 상기 탄소원, 질소원 및 미네랄 각각은 리터당 10 내지 100 g, 5 내지 40 g 및 0.5 내지 4 g 을 이용할 수 있다.
- <19> 상기의 통상의 배양 배지에 첨가되는 비타민은 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 및 이들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택될 수 있다. 비타민은 통상의 배양 배지에 상기에서 언급한 탄소원, 질소원, 미네랄 등의 배지와 동시에 첨가하거나, 멸균하여 준비된 배지에 첨가할 수 있다.
- <20> 배양은 통상의 대장균 배양 조건으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 약 15-45℃에서 약 10-72 시간 동안 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- <21> 또한, 본 발명에 따른 미생물은 당업계에 공지된 통상적인 물리화학적 돌연변이 방법 등에 의해 이와 동등한 활성을 가지거나 또는 이보다 우수한 활성을 가지도록 개선 또는 개량될 수 있다.
- <22> 본 발명의 바닐린 생산 방법은 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함한다. 페룰산의 존재하에 본 발명의 대장균 돌연변이 균주를 배양하면 페룰산의 바닐린으로의 전환에 관여하는 효소의 활성에 의해 바닐린이 생성된다. 이렇게 생성된 바닐린은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용하여 배양물로부터 회수할 수 있다.
- <23> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 단계 a)에서 상기 배양을 흡착제 수지의 존재하에서 수행할 수 있다. 페

를산에 의해 전환된 바닐린은 바닐린 생산을 저해하므로, 흡착제 수지를 이용하여 흡착함으로써 바닐린 생산을 증가시킬 수 있다. 바람직하게는, 상기 흡착제 수지는 Amberlite™ XAD-2, Amberlite™ XAD-7 및 Amberlite™ XAD-16과 같은 중성 수지이며, 더욱 바람직하게는 Amberlite™ XAD-2 수지이다. 상기 흡착제 수지는 Lewatit™ OC 1062 또는 OC 1064를 이용할 수도 있다.

<24> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 흡착제 수지의 농도는 10-70% (w/v)일 수 있다. 흡착제 수지의 농도가 상기 범위를 벗어나면 바닐린 생산 효율이 감소하기 때문이다. 바람직하게는, 상기 흡착제 수지의 농도는 약 50% (w/v)이다.

<25> 본 발명은 또한, 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가된 대장균 돌연변이 균주 DH5 α/NTGVR1을 제공한다. 대장균 DH5 α/NTGVR1은 NTG 돌연변이 유발에 의해 바닐린 내성이 야생형 균주에 비해 증가된 균주로서, 수탁번호 KCTC 11232BP인 DH5 α/NTGVR1-pTAHEF로부터 pTAHEF를 벡터를 제거함으로써 용이하게 얻어질 수 있다. 상기 벡터의 제거는 상기 벡터 중에 앰피실린 선택 마커가 포함되어 있기 때문에, 이 선택 압력인 앰피실린이 없는 배양 조건에서 배양함으로써, 상기 벡터는 상기 균주로부터 제거되며, 그 결과가 모균주인 DH5 α/NTGVR1를 용이하게 얻을 수 있다.

## 효 과

<26> 본 발명에 따르면, NTG 돌연변이 유발에 의해 대장균의 바닐린 내성을 증가시키고, 또한 흡착제 수지를 이용함으로써 바닐린 생산성을 증가시킬 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### <28> 실시예

#### <29> 재료 및 방법

#### <30> 박테리아 균주 및 배양 조건

<31> 대장균 DH5 α ( $F^- \phi 80d lacZ \Delta M15 \Delta (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K^-, m_K^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$ )를 바닐린 생산 및 NTG 돌연변이 유발에 대해 이용하였다. 대장균을 필요시 100  $\mu$ g/mL의 앰피실린을 포함하는 2YT 배지 (16 g/L 트립톤, 10 g/L 효모 추출액, 및 5 g/L 염화나트륨)에서 배양하였다. 2YT 배지에 페룰산 (Sigma, USA) 또는 바닐린 (Sigma, USA)을 첨가하고, NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절하였다. 모든 실험에서 신선하게 키운 세포 현탁액을 초기 OD<sub>600nm</sub>이 0.1이 되도록 2YT 배지에 첨가하였다. 20 mL의 작용 부피를 100 mL 플라스크에 이용하고, 이를 180 rpm 및 37℃에서 진탕 수조에서 인큐베이션하였다. 상이한 시간 간격으로, 분취량을 플라스크로부터 취하여 페룰산 및 바닐린의 농도, 및 세포 성장 (OD<sub>600nm</sub>)을 측정하였다. 플라스미드 pTAHEF를 (Yoon et al., 2005 Biotechnol Lett 27, 1829-1832)에 기재된 바와 같이 구축하였다. 간단하게, 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 (DSM 9991)의 게놈 DNA로부터 수득된 *ech* (서열번호 1) 및 *fcs* (서열번호 2)를 포함하는 DNA 단편을 *NheI* 및 *BamHI*를 이용하여 pDAHEF (Yoon et al., Biotechnology and Bioprocess Engineering 2005, 10:1-1)로부터 잘라내고, pTrc99A (NCBI Genbank 허가번호 M22744: 서열번호 3)의 *NcoI* 및 *BamHI* 자리에 도입하여 pTAHEF를 수득하였다 (도 1). 도 1은 pTAHEF 벡터의 제조과정을 나타내는 도면이다. 형질전환 및 기타 표준 분자생물학 기술은 (Sambrook et al, 2001 Molecular Cloning, 3rd Ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York)에 기재된 바와 같이 수행하였다.

#### <32> NTG 돌연변이 유발

<33> 1 mg/mL의 NTG (Aldrich, USA) 스톡 용액을 아세톤 중에 용해함으로써 제조하고, 사용시까지 -80℃에 저장하였다. 대장균 DH5 α를 진탕 조건하에 37℃에서 2YT 배지에서 OD<sub>600nm</sub> 1.0까지 키웠다. 세포를 원심분리에 의해 회수하고, 0.1 M 소듐 시트레이트 완충액 (pH 5.5)으로 2회 세정하고, 동일한 완충액에 재현탁하였다. 아세톤 중의 NTG 스톡 용액을 동일한 0.1 M 소듐 시트레이트 완충액으로 희석하고, 최종 농도 1  $\mu$ g/mL이 되도록 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포 현탁액을 NTG 용액과 부드럽게 혼합한 후, 30℃에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 상기 세포 현탁액을 얼음에 냉각한 후, 4℃에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 수득하였다. 상

기 수득된 세포 펠렛을 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.0)으로 2회 세정한 후, 최종적으로 동일한 완충액에서 재현탁하였다. 상기 회석된 세포 현탁액을 2.0 g/L 바닐린을 포함하는 LB (Luria-Bertani) 한천 플레이트에 도말하고, 37°C에서 인큐베이션하였다. 한천 플레이트 상에 처음 나타난 큰 콜로니를 바닐린 생산에 이용하였다.

<34> **바닐린 흡착을 위한 XAD-2 수지의 적용**

<35> XAD-2 수지를 Aldrich (USA)로부터 구입하였다. XAD-2 수지는 소수성 물질로 교차 결합된 폴리스티렌 (polystyrene)으로 20~60 mesh의 크기를 지닌 구슬 형태이며, 물에 녹지 않는다. 이용 전에, 상기 수지를 오토 클레이브하고, 건조한 후, 메탄올에 적셨다. 상기 수지를 이어서 멸균 증류수로 철저히 세정하여 잔류 메탄올을 제거하고, 이어서 멸균 2YT 배지로 세정하였다. 상기 처리된 수지를 이어서 상이한 농도의 페룰산을 포함하는 2YT 배지에 첨가하여 바닐린 생산에 대한 수지의 영향을 관찰하였다. 흡착된 바닐린의 정량화를 위해, 상기 수지를 배양 브로쓰로부터 원심분리에 의해 분리하고, 상기 수지에 흡착된 바닐린을 에탄올로 3회 추출하였다. 그 후에, 어떤 바닐린도 상기 수지로부터 탈착되지 않았다.

<36> **바닐린 및 페룰산의 분석**

<37> 바닐린 및 페룰산 (배양 브로쓰 및 XAD-2 수지로부터 추출된)을 Sentry guard 칼럼 (20x4.6 mm, Waters, USA)을 갖는 Symmetry C18 칼럼 (250x .6 mm, 5  $\mu$ m, Waters, USA)을 이용하여 역상 HPLC 분석에 의해 분석하였다. Shimadzu HPLC 시스템 모델 10Avp (Shimadzu, Japan)을 상기 분석에 이용하고, 크로마토그래피 조건은 이전 보고를 따랐다 (Yoon et al., 2005 Biotechnol Lett 27, 1829-1832; 및 Gasson et al., *J Biol Chem* 1998, 273, 4163-4170). 회석된 배양 브로쓰 또는 상기 흡착제 수지로부터의 에탄올 추출물을 1 mL/min의 유속으로 다상 구배 (multiphasic gradient)에 의해 pH 6.0으로 조정된 용매 A의 20 mM 인산나트륨, 및 용매 B의 메탄올로 용출하였다. 용매 B의 비율은 0 분에 0% (v/v)에서 7분에 50% (v/v)로 증가한 후, 10분에 45% (v/v)로, 최종적으로 20분에 0% (v/v)로 감소하였다. 전형적인 대략의 체류 시간은 페룰산에 대해 12분이며, 바닐린에 대해 13분이었다. 상기 용출된 화합물은 260 nm 및 40°C에서 검출되었으며, 에탄올에 용해된 페룰산 및 바닐린 (Sigma, USA)에 대한 표준 피크와 비교하여 동정하였다.

<38> **실시예 1: 바닐린 생산에 대한 페룰산 농도의 효과**

<39> 바닐린 생산에 대한 다양한 농도의 페룰산의 효과를 pTAHEF를 갖는 대장균 DH5  $\alpha$ 에서 연구하였다 (도 2). 상기 pTAHEF를 갖는 대장균 DH5  $\alpha$ 를 DH5  $\alpha$ -pTAHEF로 명명하였다. 생체변환을 위해 초기에 첨가된 페룰산의 농도는 1, 2, 3, 4 및 5.0 g/L 이었다. 1.0 g/L의 초기 페룰산 농도에 대해, 바닐린 생산은 48시간에 단지 0.5 g/L 이었다. 1.0 g/L의 가장 높은 바닐린 생산은 페룰산의 초기 농도가 2.0 g/L일 때 달성되었다. 양자의 경우에, 초기에 첨가된 페룰산은 거의 소진되었다. 그러나, 2.0 g/L 이상으로 페룰산의 농도를 증가시키면 바닐린 생산을 증가시키지 않고, 바닐린 생산, 페룰산 소비 및 세포 성장의 감소가 관찰되었다. 4.0 및 5.0 g/L의 페룰산의 초기 첨가에 대해 많은 양의 페룰산이 배양물에 남아 있었다. 상기 결과는 최적 초기 페룰산 농도는 세포 성장에 거의 영향을 주지 않으면서 바닐린으로의 최대 생물전환을 위해 2.0 g/L라는 것을 제시한다. 세포 성장이 5.0 g/L의 초기 페룰산 농도에서 가장 낮았지만, 이의 비 생산성 (생산된 바닐린/OD<sub>600nm</sub>)은 가장 높았다. 1.0 g/L에서 관찰된 가장 낮은 비 생산성은 페룰산 제한으로 인해 의심되었다. 전환 수율은 5.0 g/L의 페룰산에서 42%로서 가장 낮은 반면, 기타 초기 농도의 페룰산에서는 유사하였다. 가장 낮은 전환 수율은 고농도의 페룰산에서 페룰산의 비효율적인 이용을 나타낸다. 2.0 g/L 이상의 초기 페룰산 농도에서 바닐린 생산의 감소는 세포 성장에 대한 생산된 바닐린뿐만 아니라 초기에 첨가된 페룰산의 독성에 의해 야기될 수 있다고 생각된다.

<40> **실시예 2: 세포 성장에 대한 바닐린 및 페룰산 농도의 효과**

<41> 바닐린 및 페룰산에 의한 세포 성장 저해를 조사하기 위해, 대장균 DH5  $\alpha$ 를 24시간 동안 다양한 농도의 페룰산 및 바닐린의 존재하에 키웠다 (도 3). 대장균 DH5  $\alpha$ 의 세포 성장은 2.0 g/L 이상의 바닐린에서 완전히 저해되었다. 2.0 g/L의 바닐린 농도에서, 세포 성장은 처음 10시간 동안 현저하게 억제되었다. 2.0 g/L 미만의 바닐린에서, 전체적인 세포 성장에서 인지할만한 감소는 없는 반면, 세포 성장 속도는 현저하게 감소하였다. 대장균의 세포 성장이 페룰산에 의해 덜 영향을 받지만, 세포 성장 및 속도는 초기 페룰산 농도의 증가와 함께 점차적으로 감소하였다. 현저한 세포 성장 저해는 10.0 g/L의 페룰산 농도에서 관찰되었다. 상기 결과는 바닐린이 페룰산보다 현저하게 독성이라는 것을 나타낸다.

<42> 바닐린 독성을 극복하고, 더 높은 바닐린 생산을 달성하기 위해, 대장균 DH5  $\alpha$ 의 바닐린 내성 돌연변이 균주를 NTG 돌연변이 유발에 의해 생성하였으며, 이를 NTGVR1으로 명명하였다. 바닐린 내성 돌연변이 균주 NTGVR1의 세포 성장을 2.0 g/L의 바닐린을 포함하는 LB 한천 플레이트 상에서 이의 야생형 균주 대장균 DH5  $\alpha$ 와 비교하였다

(도 4a). NTGVR1은 LB 한천 플레이트에서 2.0 g/L의 바닐린의 존재하에 잘 자랄 수 있는 반면, 이의 야생형 균주 대장균 DH5  $\alpha$ 는 거의 자라지 못하였다. NTGVR1 돌연변이 균주의 바닐린 내성을 다양한 농도의 바닐린의 존재하에 조사하였다 (도 4b). NTGVR1의 최종 세포 성장은 임의의 현저한 감소없이 2.0 g/L 이하의 초기 바닐린 농도에서 영향을 받지 않았다. 3.0 g/L의 바닐린에서, NTGVR1의 최종 세포 성장은 10 시간의 비교적 장기간의 지연 기간에 대해 영향을 받았으며, 그 후에 세포 성장이 가파르게 증가하였다. 다른 한편으로는, 대장균 DH5  $\alpha$ 의 세포 성장은 3.0 g/L의 바닐린에서 완전히 저해되었다 (도 3). 그리하여 바닐린 내성 NTGVR1은 페룰산으로부터 바닐린의 생산에서 야생형 대장균 DH5  $\alpha$ 보다 더욱 잘 작용할 수 있다. 상기 대장균 DH5  $\alpha$  NTGVR1에 pTAHEF를 도입한 바닐린 생산 제조법 돌연변이 균주 DH5  $\alpha$ /NTGVR1-pTAHEF를 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자 은행에 2007년 11월 12일 기탁하였다 (수탁번호 KCTC 11232BP).

<43> **실시예 3: 바닐린 내성 NTGVR1-pTAHEF 돌연변이 균주로부터 바닐린 생산**

<44> 다양한 농도의 초기에 첨가된 페룰산에서 바닐린 생산 및 세포 성장은 pTAHEF를 갖는 NTGVR1-pTAHEF 돌연변이 균주를 이용함으로써 관찰하였다 (도 5). 바닐린 생산은 5.0g/L까지 초기 페룰산 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 2.3 g/L의 가장 높은 바닐린 생산은 5.0 g/L의 초기 페룰산 농도에서 수득되었는데, 이는 도 2에서 동일한 페룰산 농도에서 관찰된 야생형 균주의 0.7 g/L의 바닐린과 비교하여 3배 이상 높았다. 5.0 g/L 이상의 페룰산에서, 바닐린 생산의 점차적인 감소 및 잔류 페룰산의 증가가 페룰산 농도가 증가함에 따라 관찰되었다. 페룰산은 초기에 첨가된 페룰산의 농도가 5 g/L 이하에서 NTGVR1-pTAHEF에 의해 거의 소비되었다. NTGVR1-pTAHEF 성장이 대장균 DH5  $\alpha$ -pTAHEF의 세포 성장 패턴처럼 바닐린 생산 및 초기 페룰산의 증가에 따라 감소하였지만, 5 g/L의 초기 페룰산에서, NTGVR1-pTAHEF의 세포 성장은 대장균 DH5  $\alpha$ -pTAHEF의 것보다 1.8배 높은 OD<sub>600nm</sub> 4.7이었다. 5 g/L까지 초기 페룰산 농도의 증가에 따라 비 생산성이 점차 증가하였으며, 가장 높은 생산성은 5.0 g/L의 페룰산에서 0.49이었으며, 이는 도 2에서 5.0 g/L의 페룰산에서 0.28의 대장균 DH5  $\alpha$ -pTAHEF의 가장 높은 생산성보다 훨씬 높았다. NTGVR1-pTAHEF의 가장 높은 전환 수율은 도 2에서 야생형 균주의 54.5%와 비교하여 69.0%로서 현저하게 개선되었다. 상기 결과는 NTGVR1-pTAHEF이 바닐린 독성에 잘 견딜 수 있으며, 대장균 DH5  $\alpha$ -pTAHEF의 야생형 균주와 비교하여 효율적으로 페룰산을 소비하여, 증가된 바닐린 생산을 초래할 수 있음을 제시한다.

<45> **실시예 4: 바닐린 생산에 대한 XAD-2 수지 첨가의 효과**

<46> 폴리스티렌 수지 XAD-2를 이용하여 NTGVR1-pTAHEF 돌연변이 균주로부터 바닐린의 생산을 증가시켰다. 예비적 연구에 의하여, XAD-2 수지가 상이한 흡착율 (수지에 흡착된 바닐린 또는 페룰산의 양(g)/수지양(g)의 백분율)로 바닐린 및 페룰산을 흡착할 수 있다는 것을 발견하였다. 바닐린은 페룰산의 52% (w/w)보다 훨씬 높은 97% (w/w)로 XAD-2 수지에 흡착되었다 (데이터 미제시). 바닐린의 부재하에 XAD-2 수지에 초기에 흡착된 페룰산은 배양 동안 생산된 바닐린에 의해 수지로부터 점차적으로 치환될 것이다. 도 5에서, 잔류 페룰산의 제한 및 생산된 바닐린의 독성은 5.0 g/L의 초기 페룰산에서 단지 2.3 g/L의 바닐린 생산과 관련된다. 다른 한편으로는, 5.0 g/L 이상의 초기 페룰산에서, 페룰산 제한이 제거되었지만, 페룰산의 높은 초기 농도는 배양물에서 독성을 야기하였다. 상기 해석에 기초하여, XAD-2 수지가 바닐린 생산을 증가시키기 위해 흡착에 의해 바닐린 및 페룰산의 독성을 제거할 수 있을 것으로 생각된다.

<47> 그러므로, 바닐린 생산에 대한 XAD-2 수지 양을 최적화하기 위해, NTGVR1-pTAHEF를 10, 20, 30, 40 및 50% (w/v)의 수지 농도로 보충된, 높은 초기 페룰산 10.0 g/L를 갖는 2YT에서 48시간 동안 키웠다 (도 6). XAD-2 수지에 의한 바닐린 및 페룰산의 흡착은 수지 농도에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 바닐린 및 페룰산 흡착 정도는 수지 농도의 증가와 함께 증가되었으며, 가장 높은 흡착은 50% (w/v)의 XAD-2 수지에 대해 관찰되었다. 상기 바닐린 생산은 NTGVR1-pTAHEF 돌연변이 균주에 의해 수지가 없는 것과 비교하여 모든 농도의 XAD-2 수지의 존재하에 증가되었다. 이는 바닐린 및 페룰산 저해가 XAD-2 수지에 의해 완화될 수 있으므로, 바닐린 생산이 증가될 수 있다는 것을 제시하였다. 2.9 g/L의 가장 높은 바닐린 생산은 50% (w/v)의 XAD-2 수지에 대해 수득되었으며, 이는 이전의 보고 (Yoon et al., Biotechnol Lett 2005, 27, 1829-1832)에서 1.1 g/L의 바닐린 및 대사적으로 조작된 대장균으로부터 바닐린 생산에 대한 (Overhage et al., Appl Environ Microbiol 2003, 69, 6569-6576) 보고에서 0.3 g/L의 바닐린보다 현저하게 높았다. 바닐린 전환 수율 및 비 생산성 양자는 XAD-2 수지의 증가량에 따라 증가하였다. 50% 수지의 존재하에, 바닐린 전환 수율 및 비 생산성은 수지가 없는 10 g/L의 초기 페룰산에서 수득된 것과 비교하여 현저하게 증가되었다 (도 6). 고농도의 XAD-2 수지의 존재하에, 배양 배지 중의 유리 페룰산 양은 낮아질 것이다. 유리 페룰산의 양이 높아질 때, 덜 효율적으로 이용될 것이며, 도 5에 보여준 바와 같이 전환 수율이 낮아질 것이다.

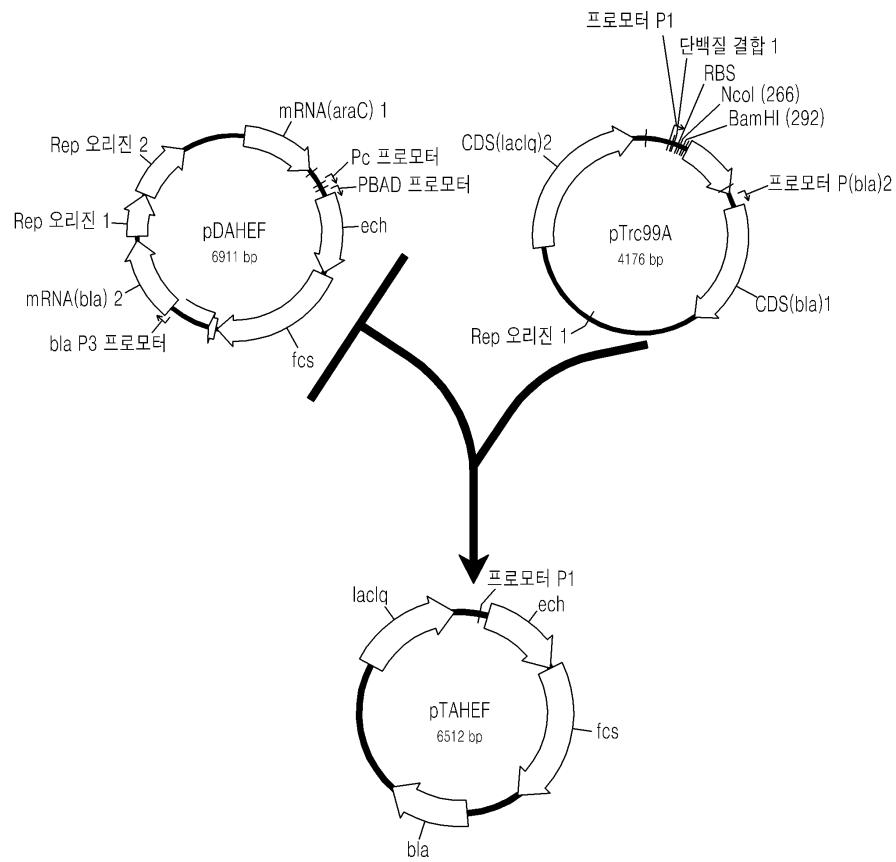
<48> 더 낮은 세포 성장에 대한 원인을 조사하면서, 세포의 대부분 (약 70%)은 XAD-2 수지에 결합 (흡착)된 채로 남아 있어, 배양 배지 중에 더 낮은 세포수 ( $OD_{600nm}$ , 2.2)를 초래한다는 것을 발견하였다. 영양분 유용성 및 교반은 세포 성장에 영향을 주지 않았는데, 이는 정상 및 수지 처리된 2YT 배지 사이 및 상이한 작용 부피 사이에 성장 차이가 없었기 때문이다. 그러므로, 도 6에 표시된 세포 성장은 수지에 흡착되지 않은 액체상 세포를 단지 보여준다. 흡착된 세포를 고려한 보상된 세포 성장은 50% (w/v) 수지의 배양물에서  $OD_{600nm}$ 이 5.3이며, 이는 수지를 이용하지 않은 세포 성장보다 높았다.

### 도면의 간단한 설명

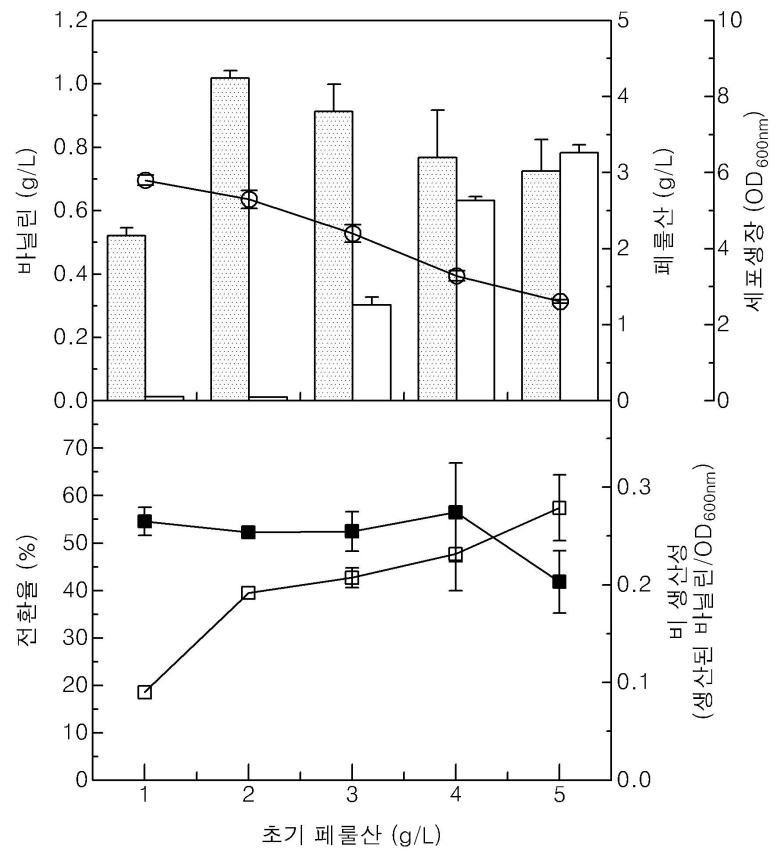
- <49> 도 1은 pTAHEF 벡터의 제조과정을 나타내는 도면이다.
- <50> 도 2는 초기에 첨가된 다양한 농도의 페룰산에서 pTAHEF를 갖는 대장균 DH5  $\alpha$ 의 바닐린 생산을 보여준다. 배양을 37°C에서 48 시간 동안 진탕 조건하에 2YT 배지에서 수행하였다. 바닐린, 페룰산, 세포 성장, 전환 수율, 및 비 생산성을 각각 채운 막대, 빈 막대, 빈 원, 채운 사각형 및 빈 사각형으로 나타낸다. 전환 수율 및 비 생산성은 각각 소비된 페룰산의 양(g/L)으로 나눈 생산된 바닐린의 양 (g/L), 및 세포 성장 ( $OD_{600nm}$ )으로 나눈 생산된 바닐린의 양 (g/L)으로서 계산하였다.
- <51> 도 3은 상이한 농도의 바닐린 (A) 및 페룰산 (B)의 존재하에 대장균 DH5  $\alpha$ 의 세포 성장의 저해를 보여준다. 배양을 37°C에서 24시간 동안 진탕 조건하에 2YT 배지에서 수행하였다. 각 기호는 상이한 바닐린 또는 페룰산 농도 (g/L)를 나타낸다: ■, 0; ●, 0.5; ▲, 1; ▼, 2; ◆, 3; ◀, 4; ▶, 5; ●, 10. 바닐린 및 페룰산은 각각 채운 및 빈 기호로서 나타낸다.
- <52> 도 4는 바닐린이 NTGVR1 돌연변이 균주의 성장에 미치는 영향을 나타내는 도면이다. (4a) 0.2% (w/v) 바닐린을 포함하는 LB 한천 플레이트 상에서 야생형 대장균 DH5  $\alpha$  및 NTGVR1 돌연변이 균주의 생존능. 한천 플레이트를 48시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. (4b) 37°C에서 24시간 동안 진탕 조건하에 2YT 배지에서, 다양한 초기 바닐린 농도에서 NTGVR1-pTAHEF의 세포 성장. 각 기호는 상이한 바닐린 농도 (g/L)를 나타낸다: ■, 0; ●, 0.5; ▲, 1; ▼, 2; ◆, 3; ◀, 4; ▶, 5; ●, 10.
- <53> 도 5는 초기에 첨가된 다양한 농도의 페룰산에서 pTAHEF를 갖는 NTGVR1-pTAHEF의 바닐린 생산을 보여준다. 배양을 37°C에서 48시간 동안 진탕 조건하에 2YT 배지에서 수행하였다. 바닐린, 페룰산, 세포 성장, 전환 수율, 및 비 생산성을 각각 채운 막대, 빈 막대, 빈 원, 채운 사각형 및 빈 사각형으로 나타낸다.
- <54> 도 6은 pTAHEF를 갖는 NTGVR1-pTAHEF의 바닐린 생산 및 세포 성장에 대한 XAD-2 수지의 효과를 보여준다. 배양을 37°C에서 48시간 동안 진탕 조건하에 10.0 g/L의 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 수행하였다. 바닐린 및 페룰산은 각각 채운 막대 및 빈 막대로 나타낸다. 채운 막대 및 빈 막대의 사선 부분은 XAD-2 수지에 부착된 바닐린 또는 페룰산을 나타낸다. 채운 막대 및 빈 막대의 비-사선 부분은 배양 배지에서 유리의 비흡착된 바닐린 및 페룰산을 나타낸다. 세포 성장, 전환 수율 및 비 생산성은 각각 빈 원, 채운 사각형 및 빈 사각형으로 나타낸다.

도면

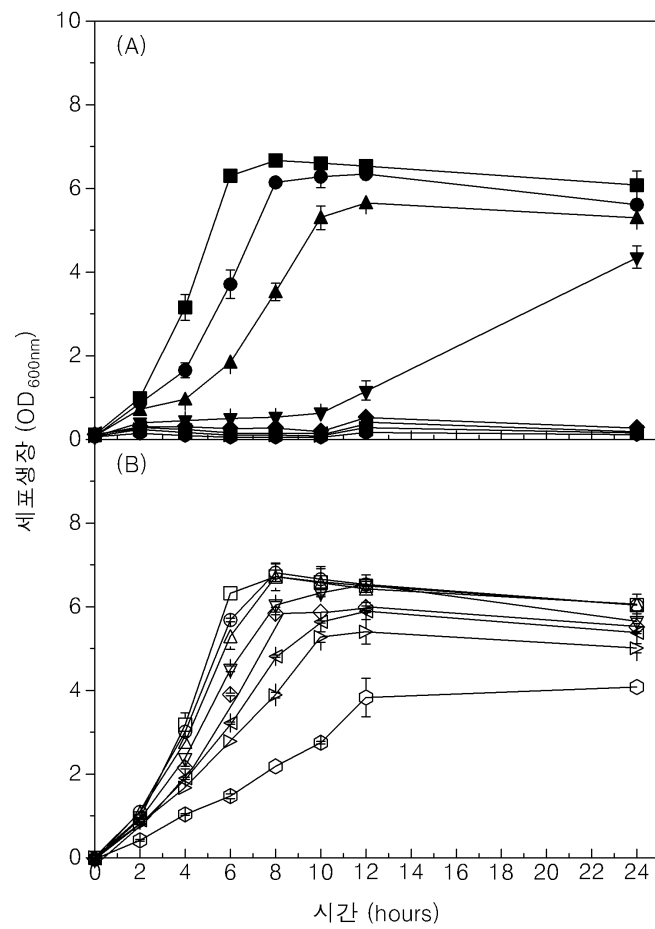
도면1



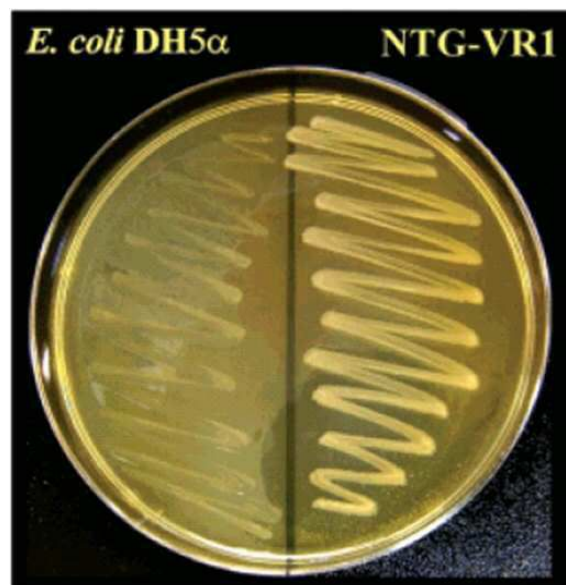
도면2



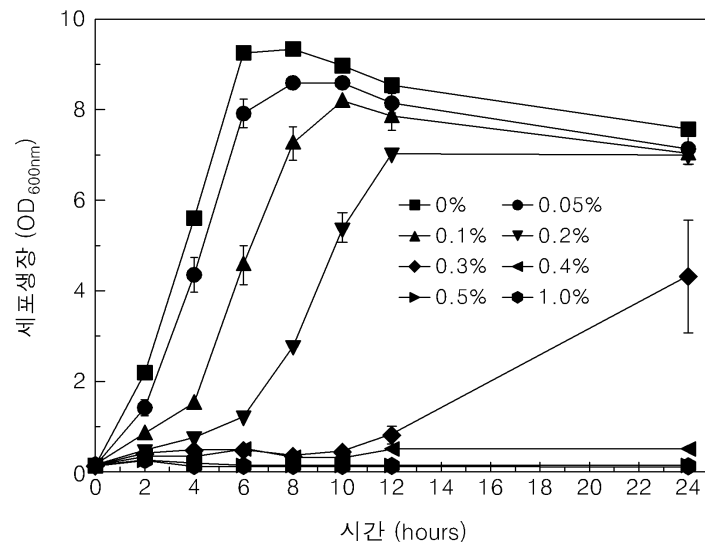
도면3



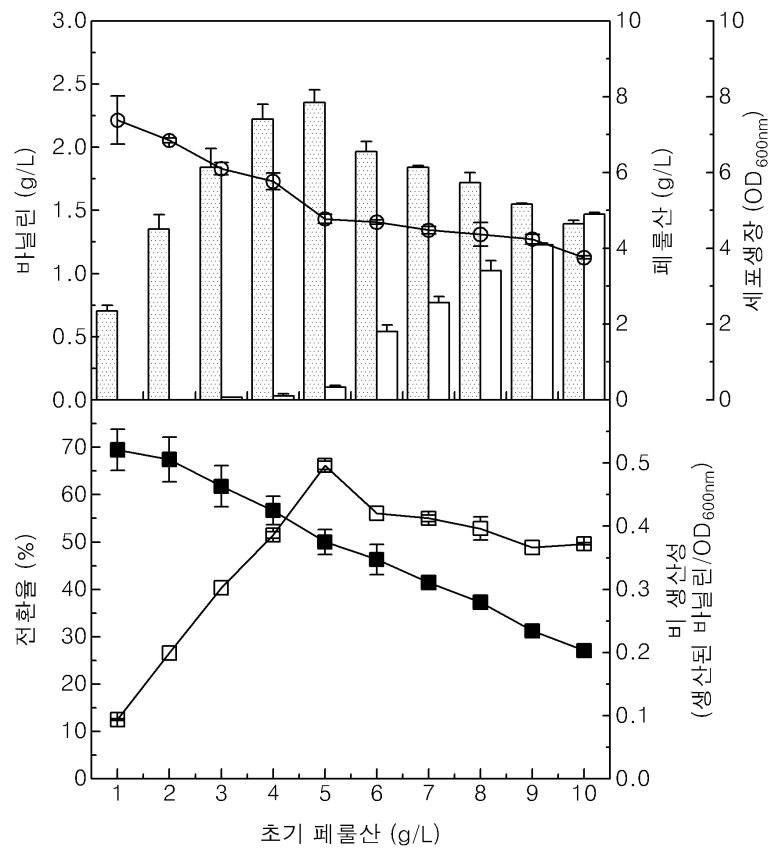
도면4a



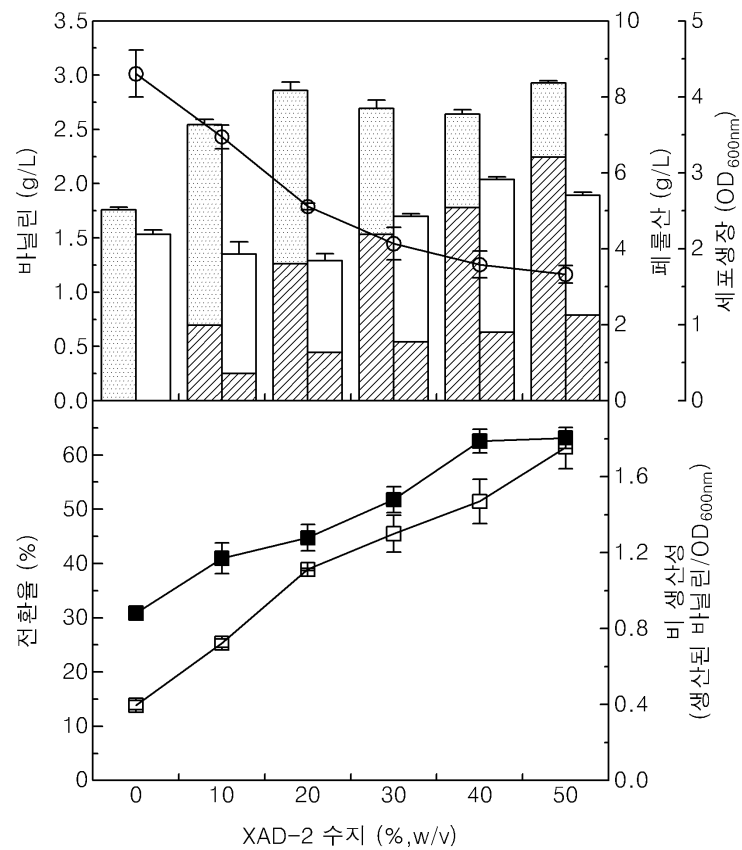
도면4b



도면5



## 도면6



## 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Vanillin resistant E. coli strain and method for enhancing vanillin production using the strain and adsorbent resin
- <130> PN075381
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 864
- <212> DNA
- <213> Amycolatopsis sp.HR167 (DSM 9991)
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(864)
- <223> ech gene

<400> 1  
atgagcacag cggtcggcaa cgggagggtc cggacggagc cgtggggcga gacggttctg 60  
  
gtggagtctg acgaaggcat cgcctgggtc atgctcaacc ggccggacaa gcgcaacgcc 120  
  
atgaacccca cctgaacga cgagatggtg cgggtgctgg accacctgga gggcgacgac 180  
  
cgctgccgag tcttggtgct gaccggcgcg ggcgagtcgt tctccgcggg catggacctc 240  
  
aaggagtact tccgcgaggt cgaccccacc ggcagcaccg ccgtgcagat caaggtgcgg 300  
  
cgggccagcg cggagtggca gtggaagcgg ctggcgaact ggagcaagcc gacgatcgcg 360  
  
atggtcaacg gctggtgctt cggcggcgcg ttcacccgcg tggcggcctg cgacctggcc 420  
  
ttcgccgacg aggacgcgcg gtccgggctg tccgaggtca actggggcat cccgccgggc 480  
  
ggcgtggtca gccgggcgct ggcggcgacc gtccgcgagc gcgacgcgct gtactacatc 540  
  
atgaccggtg agcccttcga cggcccgccg cgcgcggaga tgcgcctggt caacgaggcg 600  
  
ctgcccgccg accggctgcg ggagcgcacc cgcgaggtgg cgtgaagct cgcgtcgatg 660  
  
aaccaggtgg tctgcacgc ggccaagacc ggtacaaga tcgccagga gatgccctgg 720  
  
gagcaggccg aggactacct ctacccaag ctcgaccagt ccagttcgc cgacaaggcg 780  
  
ggcggccgcg ccaaggggct gaccagttc ctcgaccaga agtcctaccg gcccggcctg 840  
  
agcgccttcg acccgagaa gtag 864

<210> 2  
<211> 1476  
<212> DNA  
<213> Amycolatopsis sp. HR167 (DSM 9991)

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (1)..(1476)

<223> fcs gene

<400> 2

|                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------|------|
| gtgcgcaacc agggctctggg ctcttgccg gtgcgccg ccaggatgag cccgcacgcg  | 60   |
| acagccgtcc ggcacggcgg gacggcgtg acctacccg agctgtccc cgcgtcgcg    | 120  |
| cggctcgcca acgggctcgc ggccgccggg gtccgcccc gcgaccgggt ggcctacctc | 180  |
| gggccgaacc acccggccta cctggagacc ctgttcgct gcgggcaggc cggcgcggtg | 240  |
| ttcgtccgc tgaacttccg gctggcgct ccggaactgg accacgcgt gcccgactcc   | 300  |
| ggcgcgtcgg tccttatcca caccgggag caccggaga cggtcgcgc gctcgcgcc    | 360  |
| ggccggtgc tgcggtgcc cgcggcgag ctggacccg cggacgacga gccgccgac     | 420  |
| ctgccgtcg gctcgacga cgtgtgcct ctgatgtaca cctcgggcag caccggacgc   | 480  |
| cccaaggcgc cgatgtcac ccacggcaac ctacactgga actgcgtcaa cgtcctggtg | 540  |
| gagaccgacc tggcgagcga cgaggggca ctggtcgcc gcccgctgtt ccacgccgc   | 600  |
| gcgctcggca tggltgtcct gccacccct ctcaaggcg gcacggtgat cctgcactcc  | 660  |
| gcgttcgacc ccggcgccgt gctgtccgc gtggaacagg agcgggtcac gctcgtgtc  | 720  |
| ggcgtgcca cgatgtacca ggcgatgcc gcgcacccg ggtggcgag gcccgacctg    | 780  |
| tccagcctgc ggacctgt gtgcggcgc gcgccgtgc ccgccacct gccagccgc      | 840  |
| tacctgacc gcgggtcgc gttcgtcag ggtacggca tgaccgagc cgcgccggc      | 900  |
| gtgctggtc tcgaccgc gcacgtcgc gagaagatc gtcgcccg ggtgccctc        | 960  |
| ttcttcaccg acgtgcggct ggccggccc tccggcgagc cggtcgcc gccgggagaag  | 1020 |

ggcgagatcg tggtcagcgg gcccaacgtg atgaagggt actggggcag gccggaggcg 1080

accgccgagg tgctgcgcga cgggtggttc cactccggcg acgtggccac cgtggacggc 1140

gacgggtact tccacgtcgt cgaccggctc aaggacatga tcatctccgg cggcgagaac 1200

atctaccgga ccgaggtgga gaacgagctg tacggctacc cgggtgtgga ggcgtgcgcc 1260

gtgatcgcg tgccggaccc gcgctggggc gaggtgggca aggcggctgt cgtgcccgcc 1320

gacgggagcc gcatcgacgg cgacgagctg ctggcctggc tgcgcaccgg gctggccggg 1380

tacaaggtgc ccaagtcggt cgagttcacc gaccggctgc ccacgaccgg ctccggcaag 1440

atctcaagg gcgaggtccg ccgccgttc ggtga 1476

<210> 3  
 <211> 4176  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> pTrc99A cloning vector

<400> 3  
 gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaattatc 180

tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtagccgg ggtatctcta 300

gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 360

tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcgcca 420

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gtagcgcggt ggtccacct gacccatgc cgaactcaga agtgaaacgc ctagcgccg    | 480  |
| atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaacga  | 540  |
| aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gttgtcggg gaacgtctc   | 600  |
| ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgaggg  | 660  |
| tggcgggcag gacgcccc ataaactgcc aggcatacaa ttaagcagaa ggccatcctg   | 720  |
| acggatggcc ttttgcgtt tctacaaact cttttgttt attttctaa atacattcaa    | 780  |
| atatgtatcc gctcatgaga caataacct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga  | 840  |
| agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttatcc ctttttgcg gcattttgcc   | 900  |
| ttctgtttt tgctaccca gaaacgtgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg    | 960  |
| gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc | 1020 |
| gccccgaaga acgtttcca atgatgagca ctttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat  | 1080 |
| tatcccggtg tgacgccggg caagagcaac tcggtcggc catacactat tctcagaatg  | 1140 |
| acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag  | 1200 |
| aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa | 1260 |
| cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa catgggggat catgtaactc  | 1320 |
| gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca | 1380 |
| cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gaaaactatt aactggcgaa ctacttactc | 1440 |
| tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc  | 1500 |
| tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg  | 1560 |
| ggtctcggg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctccgt 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 agcgtcagac cccgtagaaa  | 1860 |
| agatcaaagg atcttcttga gatccttttt tctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaa   | 1920 |
| aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc  | 1980 |
| cgaaggtaac tggttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt  | 2040 |
| agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatcc  | 2100 |
| tgttaccagt ggtcgtgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac  | 2160 |
| gatatgtacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca | 2220 |
| gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg  | 2280 |
| ccacgttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag  | 2340 |
| gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt  | 2400 |
| ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat | 2460 |
| ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctggc cttttgctgg ccttttgctc  | 2520 |
| acatgttctt tctgcgtta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt   | 2580 |
| gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcaggaag   | 2640 |
| cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccga  | 2700 |
| tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gttaagccag tataactec   | 2760 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| getatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc   | 2820 |
| gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg  | 2880 |
| gagctgcatg tgcagaggt ttccaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa   | 2940 |
| ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc  | 3000 |
| tttcgcggtg tggcatgata gcgcccgaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa   | 3060 |
| ccagtaacgt tatacgaatg cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttccgc   | 3120 |
| gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgctg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg | 3180 |
| gcggagctga attacattcc caaccgctg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg   | 3240 |
| ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgcgcgcg    | 3300 |
| attaaatctc ggcggatca actgggtgcc agcgtggtgg tgcgatggt agaacgaagc    | 3360 |
| ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcgtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg   | 3420 |
| atcattaact atccgtgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat   | 3480 |
| gttcggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca tcaacagtat tatttctcc     | 3540 |
| catgaagacg gtacgcgact ggcgtggag catctggtcg catgggtca ccagcaaac     | 3600 |
| gcgctgttag cgggcccatt aagtctgtc tcggcgctc tgcgtctggc tggctggcat    | 3660 |
| aaatatctca ctgcaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc   | 3720 |
| atgtccggtt ttcaacaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg   | 3780 |
| ctggttgcca acgatcagat ggcgtgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg   | 3840 |
| cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat  | 3900 |
| atcccgcgt caaccacat caaacaggat ttccgctgc tggggcaaac cagcgtggac     | 3960 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaaggga atcagctgtt gcccgctca   | 4020 |
| ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgctctcc ccgcgcgttg  | 4080 |
| gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg | 4140 |
| caacgcaatt aatgtgagtt agcgcaatt gatctg                            | 4176 |