(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0042016
(43) 공개일자 2018년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *B01D 53/84* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/69* (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
B01D 53/84 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0134549
(22) 출원일자 2016년10월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
삼성전자주식회사
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)
(72) 발명자
이진숙
서울특별시 성북구 한천로 509, 106동 904호 (석관동, 코오롱아파트)
정유경
경기도 화성시 동탄반석로 160, B동 2002호 (반송동)
박진환
경기도 수원시 영통구 영통로 111, 302동 204호 (망포동, 엘지동수원자이아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

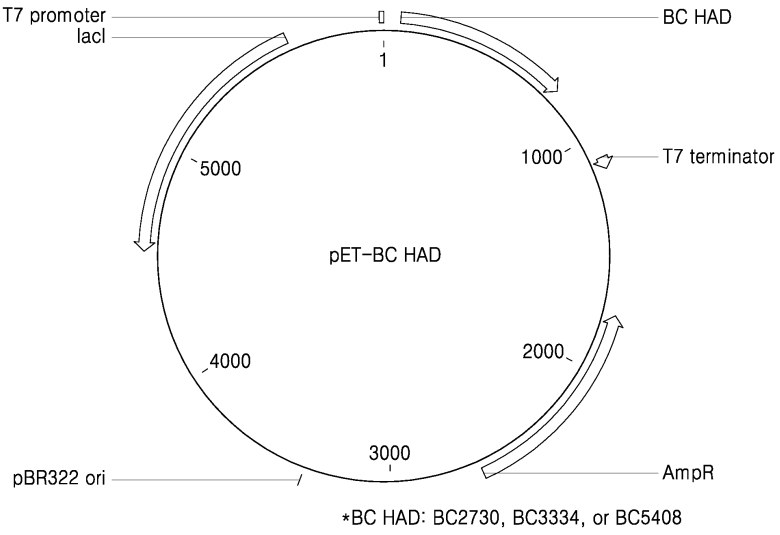
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **2-할로산 데할로게나제의 활성을 증가시키는 유전적 변형을 포함하는 재조합 미생물, 및 그를 이용한 시료 중 플루오르화된 메탄의 농도를 감소시키는 방법**

(57) 요 약

2-할로산 데할로게나제의 활성을 증가시키는 유전적 변형을 포함하는 재조합 미생물, 상기 재조합 미생물을 포함하는 시료 중 플루오로화 메탄의 농도를 감소시키는데 사용하기 위한 조성물 및 시료 중 플루오로화 메탄의 농도를 감소시키는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/69 (2013.01)
C12N 9/14 (2013.01)
C12Y 308/01002 (2013.01)
B01D 2255/804 (2013.01)
B01D 2257/2027 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유전적 변형은 상기 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자의 카피 수를 증가시키는 유전적 변형인 것인 미생물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 Bacillus 속, Pseudomonas 속, Azotobacter 속, Agrobacterium 속, 및 Escherichia 속 유래의 2-할로산 데할로게나제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 미생물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 Bacillus cereus, Bacillus megaterium, 및 Bacillus thuringiensis로 이루어진 군으로부터 선택된 균주로부터 유래된 것인 미생물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 EC 3.8.1.2에 속하는 것인 미생물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 아미노산 서열과 각각 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드인 것인 미생물.

청구항 7

청구항 2에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 및 12의 뉴클레오티드 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 것인 미생물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, Escherichia 속, Bacillus 속, 또는 잔토박터(Xanthobacter) 속에 속하는 것인 미생물.

청구항 9

2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 포함하는, 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 유전적 변형은 상기 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자의 카피 수를 증가시키는 유전적 변형인 것인 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 EC 3.8.1.2에 속하는 것인 조성물.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 감소는 상기 단백질이 CHnF4-n(n은 0 내지 3의 정수)의 C-F 결합을 절단하거나, CHnF4-n를 다른 물지로 전환하거나, CHnF4-n를 세포 내에 축적하여 이루어지는 것을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 시료는 액체 또는 기체 상태인 것인 조성물.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 에스케리키아 속, Bacillus 속 또는 잔토박터(Xanthobacter) 속에 속하는 것인 조성물.

청구항 15

2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료와 접촉시켜 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는 단계;를 포함하는, 시료 중 CHnF4-n의 농도를 감소시키는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 유전적 변형은 상기 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자의 카피 수를 증가시키는 유전적 변형인 것인 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 2-할로산 데할로게나제는 EC 3.8.1.2에 속하는 것인 방법.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 수행되는 것인 방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 접촉은 상기 재조합 미생물을 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료와 접촉시키면서 배양 또는 인큐베이션하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

청구항 15에 있어서, 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 재조합 미생물이 증식하는 조건에서 배양하는 것은 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 2-할로산 데할로게나제의 활성을 증가시키는 유전적 변형을 포함하는 재조합 미생물, 상기 재조합 미생물을 포함하는 시료 중 플루오로화 메탄의 농도를 감소시키는데 사용하기 위한 조성물 및 시료 중 플루오로화 메탄의 농도를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지구의 온난화를 가속시키는 온실가스의 배출은 심각한 환경 문제 중의 하나이며 이를 규제하고 방지하기 위해서 온실가스 배출량에 대한 규제가 강화되고 있다. 이 중 퍼플루오로카본(perfluorocarbons: PFCs), 히드로플루오로카본(hydrofluorocarbons: HFCs), 설퍼 헥사플루오리드(sulfur hexafluoride: SF_6)와 같은 불화가스 (F-가스)는 절대 배출량은 낮으나 반감기가 길고 지구온난화 계수가 월등히 높아 더욱 심각한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. F-가스의 주요 배출원인 반도체 및 전자 산업 분야 등에서 F-가스의 발생량은 온실가스 배출 할당량을 초과하여 증가 추세에 있고 이에 따라 온실가스 분해 및 배출권 구입에 필요한 비용 부담이 매년 증가하고 있는 상황이다.

[0003] 하지만, 기존의 F-가스 분해는 열분해 또는 촉매열산화 공정을 이용하고 있으나 제한된 분해율 및 2차 유해물질 배출, 고비용 등의 한계가 존재한다. 이를 해결하기 위해 미생물 생촉매를 이용한 생물학적 F-가스 분해 공정의 도입으로 기존의 화학적 분해 공정의 한계를 극복하고 보다 경제적이고 친환경적인 F-가스의 처리가 가능할 것으로 보인다.

[0004] 2-할로산 데할로게나제는 2-할로산+H_2O ⇔ 2-히드록시산+할리드의 화학 반응을 촉매하는 것이다. 따라서, 이 효소의 두 개의 기질은 2-할로산과 H_2O이고, 두 개 산물은 2-히드록시산 및 할리드이다. 이 효소는 탄소-할리드 화합물 중의 할리드 결합에 작용하는 히드롤라제의 패밀리에 속하는 것일 수 있다.

[0005] 그러나, 상기한 종래 기술에 의하더라도 플루오로화된 메탄에 작용하는 2-할로산 데할로게나제의 활성을 증가시키는 유전적 변형을 포함한 미생물, 그를 이용한 시료 중 플루오로화된 메탄의 농도를 감소시키기 위한 조성물 및 방법에 대하여는 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 포함하는, 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료와 접촉시켜 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는 단계;를 포함하는, 시료 중 CHnF4-n의 농도를 감소시키는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 명세서에서 사용된 용어 "활성 증가 (increase in activity)", 또는 "증가된 활성 (increased activity)"은 세포, 단백질, 또는 효소의 활성의 검출가능한증가를 나타낸다. "활성 증가 (increase in activity)", 또는 "증가된 활성 (increased activity)"은 주어진 유전적 변형 (genetic modification)을 갖지 않은 세포, 단백질, 또는 효소 (예, 본래 또는 "야생형 (wild-type)" 세포, 단백질, 또는 효소)와 같은, 동일한 타입의 비교 세포, 단백질, 또는 효소의 수준 보다 더 높은 변형된 (예, 유전적으로 조작된) 세포, 단백질, 또는 효소의 활성을 나타낸다. "세포의 활성"이란 세포의 특정 단백질 또는 효소의 활성을 나타낸다. 예를 들면, 상기 변형된 또는 조작된 세포, 단백질, 또는 효소의 활성은 동일 타입의 조작되지 않은 세포, 단백질, 또는 효소, 예를 들면, 야생형 세포, 단백질, 또는 효소의 활성보다 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 또는 약 100% 이상 증가된 것일 수 있다. 세포 중 특정 단백질 또는 효소의 활성은 모세포, 예를 들면, 조작되지 않은 세포 중의 동일 단백질 또는 효소의 활성보다 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 또는 약 100% 이상 증가된 것일 수 있다. 단백질 또는 효소의 증가된 활성을 갖는 세포는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0010] 효소 또는 폴리펩티드의 활성 증가는 발현 증가 또는 비활성 (specific activity)의 증가에 의하여 얻을 수 있다. 상기 발현 증가는 효소 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 세포에 도입되거나 카피 수가 증가되거나, 또는 상기 폴리뉴클레오티드의 조절 영역의 변이에 의한 것일 수 있다. 상기 유전자가 도입되는 미생물은 내재적으로 상기 유전자를 포함하는 것, 또는 포함하고 있지 않은 것일 수 있다. 상기 유전자는 그의 발현을 가능하게 하는 조절 서열, 예를 들면, 프로모터, 인핸서, 폴리 아데닐화 부위, 또는 그 조합과 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 외부에서 도입되거나 또는 카피 수가 증가되는 폴리뉴클레오티드는 내인성 (endogenous) 또는 외인성 (exogenous)일 수 있다. 상기 내인성 유전자는 미생물 내부에 포함된 유전물질 상에 존재하던 유전자를 말한다. 외인성 유전자는 외부로부터 세포 내로 도입되는 유전자를 의미하며, 도입되는 유전자는 도입되는 숙주세포에 대해 동종 (homologous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. "이종성 (heterologous)"은 천연 (native)이 아닌 외인성 (foreign)을 의미할 수 있다.

[0011] 용어 "카피 수 증가 (copy number increase)"는 상기 유전자의 도입 또는 증폭에 의한 것일 수 있으며, 조작되지 않은 세포에 존재하지 않는 유전자를 유전적 조작에 의해 갖게 되는 경우도 포함한다. 상기 유전자의 도입은 벡터와 같은 비히클을 매개하여 이루어질 수 있다. 상기 도입은 상기 유전자가 게놈에 통합되지 않은 임시적 (transient) 도입이거나 게놈에 삽입되는 것일 수 있다. 상기 도입은 예를 들면, 목적하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 벡터를 상기 세포로 도입한 후, 상기 벡터가 세포 내에서 복제되거나 상기 폴리뉴클레오티드가 게놈으로 통합됨으로써 이루어질 수 있다.

[0012] 상기 유전자의 도입은 형질전환, 형질도입(transfection), 전기천공 (electroporation)과 같은 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 상기 유전자는 운반체(vehicle)를 통하여 도입되거나, 그 자체로서 도입될 수 있다. 본 명세서에 있어서, "운반체"란 연결되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 포함한다. 특정한 유전자의 도입을 매개하는 핵산 서열이라는 관점에서, 본 명세서에서 운반체는, 벡터, 핵산 구조체, 및 카세트와 상호교환 가능하게 사용될 수 있는 것으로 해석된다. 벡터에는 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 유래 벡터 등이 포함된다. 플라스미드란 추가의 DNA가 연결될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 고리를 포함한다. 벡터에는 예를 들면, 플라스미드 발현벡터, 바이러스 발현벡터, 예를 들면, 복제결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 연관 바이러스, 또는 그 조합이 포함될 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 사용되는 유전자의 조작은 당업계에 공지된 분자생물학적 방법에 의할 수 있다.

[0014] 용어 "모세포 (parent cell)"는 본래 세포 (original cell), 예를 들면, 조작된 미생물에 대하여 동일 타입의 유전적으로 조작되지 않은 세포를 나타낸다. 특정한 유전적 변형에 대하여, 상기 "모세포"는 상기 특정 유전적 변형을 갖지 않은 세포이지만, 다른 상황에 대하여는 동일한 것일 수 있다. 따라서, 상기 모세포는 주어진 단백질 (예를 들면, 2-할로산 데할로게나제와 약 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 단백질)의 증가된 활성을 갖는 유전적으로 조작된 미생물을 생산하는데 출발 물질 (starting material)로 사용된 세포일 수 있다. 동일한 비교가 다른 유전적 변형에도 적용된다.

[0015] 본 명세서에서 사용된 용어 "유전자"는 특정 단백질을 발현하는 핵산 단편을 의미하며, 5'-비코딩 서열(5'-non coding sequence) 및/또는 3'-비코딩 서열(3'-non coding sequence)의 조절 서열(regulatory sequence)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0016] 본 명세서에 있어서 핵산 또는 폴리펩티드의 "서열 동일성 (sequence identity)"은 특정 비교 영역에서 양 서열을 최대한 일치되도록 얼라인시킨 후 서열간의 염기 또는 아미노산 잔기의 동일한 정도를 의미한다. 서열 동일성은 특정 비교 영역에서 2개의 서열을 최적으로 얼라인하여 비교함으로써 측정되는 값으로서, 비교 영역 내에서 서열의 일부는 대조 서열 (reference sequence)과 비교하여 부가 또는 삭제되어 있을 수 있다. 서열 동일성 백분율은 예를 들면, 비교 영역 전체에서 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하는 단계, 두 서열 모두에서 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드가 나타나는 위치의 갯수를 결정하여 일치된 (matched) 위치의 갯수를 수득하는 단계, 상기 일치된 위치의 갯수를 비교 범위 내의 위치의 총 갯수 (즉, 범위 크기)로 나누는 단계, 및 상기 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 수득하는 단계에 의해 계산될 수 있다. 상기 서열 동일성의 퍼센트는 공지의 서열 비교 프로그램을 사용하여 결정될 수 있으며, 상기 프로그램의 일례로 BLASTN(NCBI), BLASTP(NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc) 등을 들 수 있다.

[0017] 여러 종의 동일하거나 유사한 기능이나 활성을 가지는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 확인하는데 있어서 여러 수준의 서열 동일성을 사용할 수 있다. 예를 들어, 50%이상, 55%이상, 60%이상, 65%이상, 70%이상, 75%이상, 80%이상, 85%이상, 90%이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상, 99%이상 또는 100% 등을 포함하는 서열 동일성이다.

[0018] 본 명세서에서 사용된 용어 "유전적 변형 (genetic modification)"이란 세포의 유전물질의 구성 또는 구조를 인위적으로 변경시키는 것을 포함한다.

[0019] 본 명세서에 있어서, %은 달리 언급이 없으면 w/w%를 나타낸다.

[0020] 일 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 제공한다.

[0021] 2-할로산 데할로게나제는 2-할로산+H_2O ⇔ 2-히드록시산+할리드의 화학 반응을 촉매하는 것이다. 따라서, 이 효소의 두 개의 기질은 2-할로산과 H_2O이고, 두 개 산물은 2-히드록시산 및 할리드이다. 이 효소는 탄소-할리드 화합물 중의 할리드 결합에 작용하는 히드롤라제의 패밀리에 속하는 것일 수 있다.그러나, 상기 재조합 미생물

이 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는데 있어서 이러한 특정한 기작에 한정되는 것으로 반드시 해석되는 것은 아니다. 상기 2-할로산 데할로게나제는 EC 3.8.1.2에 속하는 것일 수 있다. 상기 2-할로산 데할로게나제는 외래 또는 내재적인 것일 수 있다. 상기 2-할로산 데할로게나제는 Bacillus 속, Pseudomonas 속, Azotobacter 속, Agrobacterium 속, 및 Escherichia 속 유래의 2-할로산 데할로게나제로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 2-할로산 데할로게나제는 Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, 및 Bacillus megaterium으로 이루어진 군으로부터 선택된 균주로부터 유래된 것일 수 있다.

[0022] 상기 2-할로산 데할로게나제는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 및 11의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드인 것일 수 있다.

[0023] 상기 미생물에 있어서, 상기 유전적 변형은 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 유전적 변형은 2-할로산 데할로게나제 유전자의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. 상기 유전적 변형은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 및 11의 아미노산 서열과 각각 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 중 하나 이상의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. 상기 유전자는 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 및 12의 뉴클레오티드 서열과 각각 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 것일 수 있다. 상기 유전적 변형은 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자가 도입된 것, 예를 들면 벡터와 같은 비히클을 통하여 도입된 것일 수 있다. 상기 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자는 염색체 내 또는 염색체 외에 존재할 수 있다. 도입된 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자는 복수 개, 예를 들면, 2이상, 5이상, 10이상, 10이상, 50이상, 100이상, 또는 1000이상일 수 있다.

[0024] 상기 미생물은 Escherichia 속, Bacillus 속, 잔토박터(Xanthobacter) 속, Pseudomonas 속, Azotobacter 속, 또는 Agrobacterium 속에 속하는 것일 수 있다. 상기 미생물은 대장균, 또는 X.아우토트로피쿠스일 수 있다.

[0025] 상기 미생물은 ArgU를 코딩하는 유전자 및 ProL을 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다. ArgU를 코딩하는 유전자는 아르기닌 코돈 AGA 및 AGG를 인식하는 tRNA를 코딩한다. ProL을 코딩하는 유전자는 프롤린 코돈 CCC를 인식하는 tRNA를 코딩한다. 상기 미생물은 ArgU를 코딩하는 유전자 및 ProL을 코딩하는 유전자를 모두 더 포함하고 있는 BL21-CodonPlus(DE3)-RP일 수 있다.

[0026] 상기 미생물은 ArgU를 코딩하는 유전자, ileY를 코딩하는 유전자 및 ileW를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다. ileY를 코딩하는 유전자는 이소루신 코돈 AUA를 인식하는 tRNA를 코딩한다. ileW을 코딩하는 유전자는 루신 코돈 CUA를 인식하는 tRNA를 코딩한다. 상기 미생물은 ArgU를 코딩하는 유전자, ileY를 코딩하는 유전자 및 ileW를 코딩하는 유전자를 모두 더 포함하고 있는 BL21-CodonPlus-RIL 또는 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL일 수 있다.

[0027] 상기 재조합 미생물은 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)(이하 "플루오로화 메탄"이라고도 한다.)의 농도를 감소시킬 수 있다. 상기 감소는 상기 플루오로화 메탄의 C-F 또는 C-H 결합에 상기 단백질이 작용하여 탄소에 히드록실기를 도입하거나, 상기 플루오로화 메탄을 미생물의 세포 내에 축적하는 것에 의하여 이루어지는 것일 수 있다. 또한, 상기 감소는 CHnF4-n의 C-F 결합을 절단하거나, CHnF4-n를 다른 물질로 전환하거나, CHnF4-n를 세포 내에 축적하여 이루어지는 것을 포함하는 것일 수 있다. 상기 시료는 액체 또는 기체 상태인 것일 수 있다. 상기 시료는 공장 폐수 또는 폐기체일 수 있다. 상기 시료는 상기 플루오로화 메탄을 포함하는 것이면 어느 것이나 포함된다. 상기 플루오로화 메탄은 CF_4, CHF_3, CH_2F_2, CH_3F, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 다른 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 포함하는, 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 조성물에 있어서, 상기 재조합 미생물, 시료 및 플루오로화 메탄에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0030] 상기 조성물에 있어서, 용어 "감소"는 시료 중의 플루오로화 메탄 농도를 감소시키는 것으로서, 완전하게 제거하는 것을 포함한다. 상기 시료는 기체 또는 액체일 수 있다. 상기 시료는 상기 미생물이 포함되지 않는 것일 수 있다. 상기 조성물은 배지 또는 배양물에 대한 상기 플루오로화 메탄의 용해도를 증가시키는 물질을 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 시료와 접촉시킴으로써 시료 중의 플루오로화 메탄의 농도를 감소시키는 것일 수 있다. 상기 접촉은 액체 또는 고체상에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 접촉은 예를 들면 배지 중에 배양되는 미생물의 배

양물과 상기 시료를 접촉시킴으로써 이루어질 수 있다. 상기 배양은 미생물을 증식하는 조건하에서 이루어질 수 있다. 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 상기 재조합 미생물을 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료와 접촉시키면서 배양 또는 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 재조합 미생물이 증식하는 조건에서 배양하는 것은 포함한다.

[0032] 다른 양상은 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물을 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료와 접촉시켜 시료 중 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수)의 농도를 감소시키는 단계;를 포함하는, 시료 중 CHnF4-n의 농도를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0033] 상기 방법에 있어서, 상기 재조합 미생물 및 CHnF4-n (n은 0 내지 3의 정수) 함유 시료에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0034] 상기 방법에 있어서, 상기 접촉은 액체 또는 고체상에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 접촉은 예를 들면 배지 중에 배양되는 미생물의 배양물과 상기 시료를 접촉시킴으로써 이루어질 수 있다. 상기 배양은 미생물이 증식하는 조건하에서 이루어질 수 있다. 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 상기 미생물의 생육 단계가 지수기(exponential phase), 또는 정체기(stationary phase)인 때에 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배양은 호기 또는 혐기 조건에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 접촉은 밀폐된 용기 중에서 재조합 미생물이 생존가능한 조건에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 생존가능한 조건은 재조합 미생물이 증식가능한 조건 또는 휴지 상태(resting sate)로 있게 하는 조건일 수 있다.

[0035] 상기 방법에 있어서, 상기 시료는 액체 또는 기체 상태일 수 있다. 상기 시료는 공장 폐수 또는 폐기체일 수 있다. 상기 시료는 상기 미생물의 배양물에 수동적으로 접촉되는 것뿐만 아니라, 능동적으로 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 시료는 예를 들면, 상기 미생물의 배양액 중에 스파르징(sparging)하는 것일 수 있다. 즉, 시료를 배지 또는 배양액을 통하여 불어넣는 것일 수 있다. 상기 스파르징은 배지 또는 배양액의 하부로부터 상부로 불어넣는 것일 수 있다. 상기 스파르징은 상기 시료의 방울을 만들면서 주입하는 것일 수 있다.

[0036] 상기 방법에 있어서, 상기 접촉은 배치(batch) 또는 연속적으로 수행될 수 있다. 상기 접촉은 예를 들면, 상기 감소시키는 단계에서 얻어진 접촉된 시료를 신선한 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase: HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 포함하는 재조합 미생물과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 신선한 미생물과의 접촉은 2회 이상, 예를 들면, 2, 3, 5, 또는 10 회 이상 이루어질 수 있다. 상기 접촉은 시료 중의 플루오로화 메탄의 원하는 감소된 농도가 달성될 때까지의 시간 동안 지속되거나, 반복될 수 있다.

[0037] 다른 양상은 미생물에 2-할로산 데할로게나제(2-haloacid dehalogenase:HAD)의 활성을 증가시키는 유전적 변형(genetic modification)을 도입하는 단계를 포함하는, 미생물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 미생물에 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 미생물을 제조하는 방법일 수 있다. 2-할로산 데할로게나제를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계는 상기 유전자를 포함하는 비히클을 상기 미생물에 도입하는 것일 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 유전적 변형은 상기 유전자를 증폭하는 것, 상기 유전자의 조절 서열을 조작하는 것, 또는 상기 유전자 자체의 서열을 조작하는 것을 포함하는 것일 수 있다. 상기 조작은 뉴클레오티드의 삽입, 치환, 전환 또는 부가인 것일 수 있다.

[0038] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물에 ArgU를 코딩하는 유전자 및 ProL을 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 카피 수를 증가시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 미생물에 ArgU를 코딩하는 유전자, ileY를 코딩하는 유전자 및 ileW를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 카피 수를 증가시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0039] 일 양상에 따른 재조합 미생물은 시료 중 CHnF4-n를 제거하는데 사용될 수 있다.

[0040] 다른 양상에 따른 조성물은 시료 중 CHnF4-n의 농도를 감소시키는 사용될 수 있다.

[0041] 다른 양상에 따른 시료 중 CHnF4-n의 농도를 감소시키는 방법은 시료 중 CHnF4-n의 농도를 효율적으로 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1는 pET-BC HAD 벡터의 벡터 지도를 나타낸다.

도 2는 pET-BG HAD 벡터의 벡터 지도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 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.

[0044] **실시예 1: Bacillus 균주를 이용한 CF4 분해**

[0045] Bacillus cereus (KCTC 3624)와 Bacillus megaterium (DSM 32) 균주를 LB 배지에 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 세포 농도 OD_{600}= 3.0이 될 때까지 배양하여 이 세포액 10ml을 60ml 혈청 병에 첨가하고 밀봉하였다. 상기 LB 배지는 증류수 1L 당 트립톤(tryptone) 10 g, 효모 추출물 (yeast extract) 5 g, 및 NaCl 10 g을 포함한다.

[0046] 다음으로, 기체 상의 CF4를 혈청변의 헤드스페이스 내 1000ppm이 되도록 주사기를 사용하여 혈청병의 캡의 탄성 재질(rubber stopper)을 통하여 주입하였다. 그 후, 상기 혈청병을 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 5일 동안 인큐베이션하였다. 실험은 3배수 (triplicate)로 하였다.

[0047] 인큐베이션 후 혈청병 중 배지가 포함되지 않은 헤드스페이스 중의 기체를 1.0ml 헤드스페이스용 주사기를 사용하여 0.5ml를 채취하여, GC(Agilent 7890, Palo Alto, CA, USA)에 주입하였다. 주입된 CF_4는 CP-PoraBOND Q 칼럼(25m length, 0.32mm i.d., 5um film thickness, Agilent)을 통해 분리되었고, 질량 분석(mass spectrometry)(Agilent 5973, Palo Alto, CA, USA)를 통해 CF_4 농도 변화를 분석하였다. 운반 기체는 헬륨을 사용하였고 1.5ml/min 속도로 칼럼에 흘려 보냈다. 기체 크로마토그라피(GC) 조건은 주입구 온도 250℃, 초기 온도 40℃에 2분간 유지하고, 290℃까지 20℃/min으로 승온시켰다. 질량 분석 조건은 70eV의 이온화 에너지, interface 온도 280℃, ion source 온도 230℃, 및 quadrupole 온도 150℃였다.

[0048] 표 1은 B. cereus 와 B. megaterium 균주를 상기한 조건과 동일하게 배양한 경우 시료 중 CF_4 잔량을 나타낸다. 표 1에 나타낸 바와 같이 B. cereus 와 B. megaterium 균주 배양액은 LB 배지만 함유하는 대조군에 비하여 헤드스페이스 중의 CF_4의 농도가 각각 6.63%, 및 9.33% 감소하였다.

표 1

[0049]

균주	CF4 잔량(%)
대조군 (배지)	100.00
B. cereus	93.37
B. megaterium	90.67

[0050] **실시예 2: Bacillus cereus 유래 HAD 유전자 도입 재조합 대장균의 제작 및 이를 이용한 CF4 분해**

[0051] **1. Bacillus cereus 유래 HAD 유전자 (BC HAD) 증폭 및 대장균에 도입**

[0052] B. cereus (KCTC 3624)를 LB 배지 중에서 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 밤새 배양한 후, 총 DNA 추출 키트(total DNA extraction kit)(Invitrogen Biotechnology)를 사용한 방법으로 게놈 DNA를 분리하고, 이 게놈 DNA를 주형으로 하고, 표 2에 개시된 뉴클레오티드 서열의 프라이머 세트로 하여 PCR을 수행하여, BC2730, BC3334, 및 BC5408 유전자를 각각 증폭하여 얻었다. 증폭된 BC HAD 유전자는 제한효소 NcoI 및 HindIII를 사용하여 절단된 pETDuet-1 (Novagen, Cat. No. 71146-3)와 InFusion Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.)를 통해 연결하여 pET-BC HAD 벡터 3종을 제조하였다. 도 1는 pET-BC HAD 벡터의 벡터 지도를 나타낸다. BC2730, BC3334, 및 BC5408는 각각 서열번호 1, 3, 및 5의 아미노산 서열을 각각 갖고 그 유전자는 서열번호 2, 4, 및 6의 뉴클레오티드 서열을 각각 갖는다.

[0053] 다음으로, 제작된 pET-BC HAD 벡터 3종, pET-BC2730, pET-BC3334, 및 pET-BC5408을 각각 대장균 BL21에 열 충격(heat shock) 방법으로 도입하고, 암피실린 100㎍/mL이 포함된 LB 평판 배지에 배양하여, 암피실린 내성을 보이는 균주를 선별하였다. 최종적으로 선별된 균주 3종을 재조합 대장균 BL21/pET-BC2730, BL21/pET-BC3334, 및 BL21/pET-BC5408으로 명명하였다.

표 2

[0054]

BC HAD 유전자	프라이머 서열(서열번호)
BC2730	포워드: 서열번호 13 리버스: 서열번호 14
BC3334	포워드: 서열번호 15 리버스: 서열번호 16
BC5408	포워드: 서열번호 17 리버스: 서열번호 18

[0055] **2. BC HAD 유전자 도입된 대장균에 의한 퍼플루오로메탄의 분해**

[0056] 본 절에서는 (1)절에서 제작된 재조합 대장균 BL21/pET-BC HAD 균주 3종이 시료 중 CF_4를 제거하는데 미치는 효과를 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 대장균 BL21/pET-BC2730, BL21/pET-BC3334, 또는 BL21/pET-BC5408 균주를 TB 배지에서 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 배양하여 OD_{600}=0.5 정도에서 IPTG 0.2mM을 첨가한 후, 20℃에서 230rpm으로 교반하면서 밤새 배양하였다. 이 세포를 수확하고, 세포 농도 OD_{600}= 3.0이 되도록 LB 배지 중에 현탁하였다. 이 세포액 10ml을 60ml 혈청 병에 첨가하고 밀봉하였다. 상기 LB 배지는 실시예 1에 기재한 조성과 동일하다

[0058] 다음으로, 기체 상의 CF4를 헤드스페이스 내 1000ppm이 되도록 주사기를 사용하여 혈청병의 캡의 탄성 재질(rubber stopper)을 통하여 주입하였다. 그 후, 상기 혈청병을 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 4일 동안 배양하였다. 실험은 3배수 (triplicate)로 하였다. 배양 후 혈청병 중 헤드스페이스 중의 CF_4를 실시예 1에 기술된 조건과 동일하게 하여 분석하였다.

[0059] 표 3은 재조합 대장균 BL21/pET-BC HAD 균주를 상기한 조건과 동일하게 배양한 경우 시료 중 CF_4 잔량을 나타낸다. 표 3에 나타낸 바와 같이 BC HAD (BC2730, BC3334, 또는 BC5408)가 도입된 재조합 대장균 균주는 공벡터가 도입된 대조군에 비하여 헤드스페이스 중의 CF_4의 농도가 각각 1.69%, 5.67% 및 5.44% 감소하였다.

표 3

[0060]

재조합 균주	CF_4 잔량(%)
대조군 (공벡터)	100.00
BC2730	98.31
BC3334	94.33
BC5408	94.56

[0061] **실시예 3: Bacillus megaterium 유래 HAD 유전자 도입 재조합 대장균의 제작 및 이를 이용한 CF4 분해**

[0062] **1. Bacillus megaterium 유래 HAD 유전자(BG HAD) 증폭 및 대장균에 도입**

[0063] B. megaterium (DSM 32)을 LB 배지 중에서 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 밤새 배양한 후, 총 DNA 추출 키트(total DNA extraction kit)(Invitrogen Biotechnology)를 사용한 방법으로 게놈 DNA를 분리하고, 이 게놈 DNA를 주형으로 하고, 표 4에 기재된 뉴클레오티드 서열의 프라이머 세트로 하여 PCR을 수행하여, BG04_670, BG04_3297, 및 BG04_3843 유전자를 증폭하여 얻었다. BG04_670, BG04_3297, 및 BG04_3843은 각각 서열번호 7, 9, 및 11의 아미노산 서열을 각각 갖고 그 유전자는 서열번호 8, 10, 및 12의 뉴클레오티드 서열을 각각 갖는다. 증폭된 BG HAD 유전자는 제한효소 NcoI 및 XhoI를 사용하여 절단된 pET28a (Novagen, Cat. No. 69864-3)와 InFusion Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.)를 통해 연결하여 pET-BG HAD 벡터 3종을 제조하였다. 도 2는 pET-BG HAD 벡터의 벡터 지도를 나타낸다.

[0064] 다음으로, 제작된 pET-BG HAD 벡터 3종, pET-BG04_670, pET-BG04_3297, pET-BG04_3843 을 각각 대장균 BL21에 열 충격(heat shock) 방법으로 도입하고, 카나마이신 50㎍/mL이 포함된 LB 평판 배지에 배양하여, 카나마이신 내성을 보이는 균주를 선별하였다. 최종적으로 선별된 균주 3종을 재조합 대장균 BL21/pET-BG04_670,

BL21/pET-BG04_3297, 및 BL21/pET-BG04_3843으로 명명하였다.

표 4

[0065]

BG HAD 유전자	프라이머 서열(서열번호)
BG04_670	포워드: 서열번호 19 리버스: 서열번호 20
BG04_3297	포워드: 서열번호 21 리버스: 서열번호 22
BG04_3843	포워드: 서열번호 23 리버스: 서열번호 24

[0066] **2. BG HAD 유전자 도입된 대장균에 의한 퍼플루오로메탄의 분해**

[0067] 본 절에서는 (1)절에서 제작된 재조합 대장균 BL21/pET-BG HAD 균주 3종이 시료 중 CF_4를 제거하는데 미치는 효과를 확인하였다.

[0068] 구체적으로, 대장균 BL21/pET-BG04_670, BL21/pET-BG04_3297, 또는 BL21/pET-BG04_5408 균주를 TB 배지에서 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 배양하여 OD_{600}=0.5 정도에서 IPTG 0.2mM을 첨가한 후, 20℃에서 230rpm으로 교반하면서 밤새 배양하였다. 이 세포를 수확하고, 세포 농도 OD_{600}= 3.0이 되도록 LB 배지 중에 현탁하였다. 이 세포액 10ml을 60ml 혈청 병에 첨가하고 밀봉하였다. 상기 LB 배지는 실시예 1에 기재한 조성과 동일하다

[0069] 다음으로, 기체 상의 CF4를 헤드스페이스 내 1000ppm이 되도록 주사기를 사용하여 혈청병의 캡의 탄성 재질(rubber stopper)을 통하여 주입하였다. 그 후, 상기 혈청병을 30℃에서 230rpm으로 교반하면서 4일 동안 배양하였다. 실험은 3배수 (triplicate)로 하였다. 배양 후 혈청병 중 헤드스페이스 중의 CF_4 를 실시예 1에 기술된 조건과 동일하게 하여 분석하였다.

[0070] 표 5는 재조합 대장균 BL21/pET-BG HAD 균주를 상기한 조건과 동일하게 배양한 경우 시료 중 CF_4 잔량을 나타낸다. 표 5에 나타낸 바와 같이 BG HAD (BG04_670, BG04_3297, 또는 BG04_3843)가 도입된 재조합 대장균 균주는 공벡터가 도입된 대조군에 비하여 헤드스페이스 중의 CF_4의 농도가 각각 6.01%, 8.55% 및 8.95% 감소하였다.

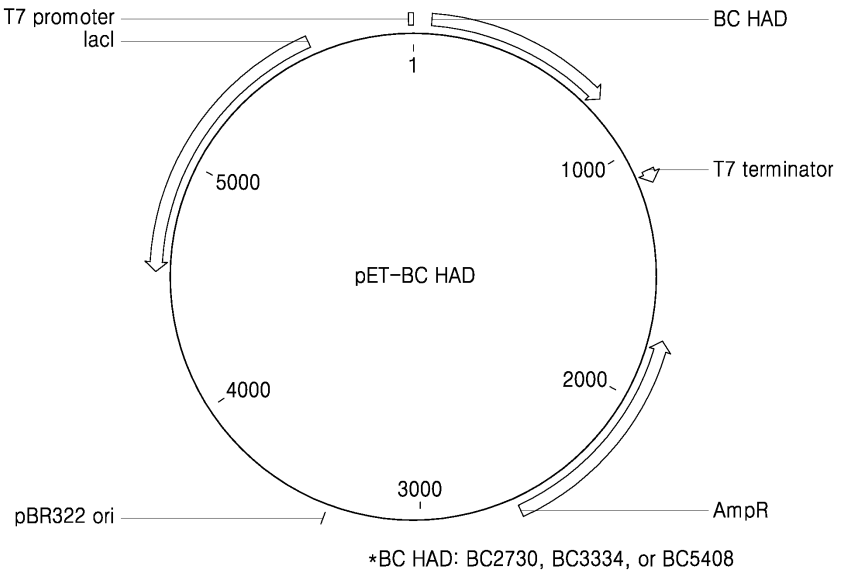
표 5

[0071]

재조합 균주	CF_4 잔량(%)
대조군 (공벡터)	100.00
BG04_670	93.99
BG04_3297	91.45
BG04_3843	91.05

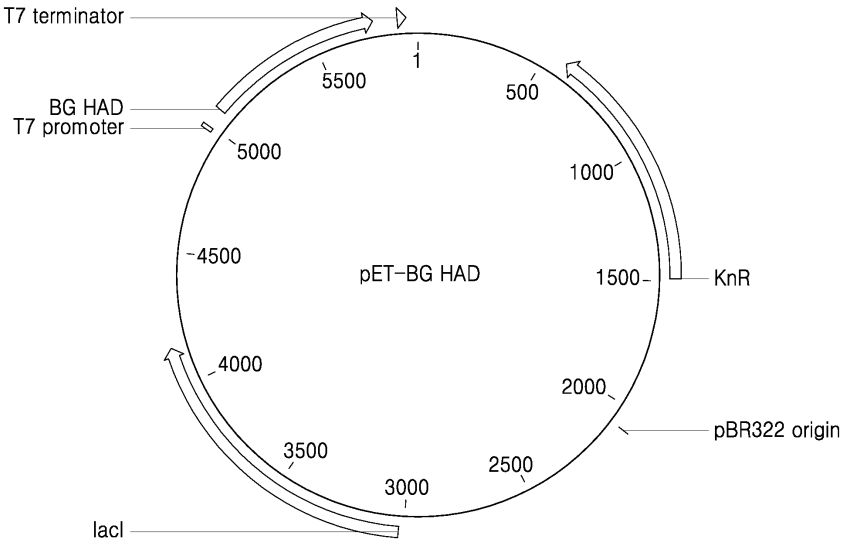
도면

도면1



*BC HAD: BC2730, BC3334, or BC5408

도면2



*BG HAD: BG04_670, BG04_3297, or BG04_3843

서 열 목 록

<110> Samsung Electronics Co., Ltd.

<120> Microorganism including genetic modification that increases activity of 2-haloacid dehalogenase and method for reducing concentration of fluorinated methane in sample

<130> PN114712KR

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 231

<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 1

Met Met Gly Tyr Lys Ala Met Leu Phe Asp Leu Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10 15

Asp Arg Asp Lys Ala Val Glu Ala Leu Phe Leu Ile Val Leu Glu Lys
20 25 30

Cys Tyr Glu Asn Val Asp Gly Ala Ala Lys Ser Asn Met Leu Gln Lys
35 40 45

Phe Lys Glu Tyr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly Ile Ser Asn Lys Thr Thr
50 55 60

Val Leu Glu Ser Leu Phe Asp Glu Phe Thr Pro Arg Tyr Arg Leu Pro
65 70 75 80

Arg Asn Tyr Ile Gln Asp Phe Trp Asn Asn Asn Phe Pro Arg Cys Phe
85 90 95

Ser Ile Asp Gln Asn Thr Ile His Phe Leu Asn Gln Ile Lys Lys His
100 105 110

Cys Lys Val Gly Ile Ile Thr Asn Gly Ser Thr Gln Arg Gln Lys Ala
115 120 125

Lys Ile Phe Asn Thr Asn Leu Asn Lys Tyr Phe Glu Thr Ile Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Glu Val Gly Phe Ser Lys Pro Asp Lys Arg Ile Phe Glu Leu
145 150 155 160

Ala Leu Asn Lys Leu Asn Leu Gln Pro Glu Asn Thr Leu Phe Val Gly
165 170 175

Asp Asp Leu Glu Lys Asp Ile Ala Gly Pro Gln Asn Ala Asn Ile Lys
180 185 190

Gly Val Trp Phe Asn Pro Gln Lys Ile Lys Asn Thr Thr Lys Ile Gln
195 200 205

Pro Tyr Ala Glu Ile Asn Thr Leu Asp Ser Leu Leu Ser Tyr Val Thr

210 215 220

Pro Gln Tyr Phe Tyr Asn Lys

225 230

<210> 2

<211> 696

<212> DNA

<213> Bacillus cereus

<400> 2

atgatgggtt ataaagcgat gctgtttgat ttagatgata cattacttga tagggataaa 60

gcagtagagg cattattttt aattgtttta gaaaagtgtt atgaaaatgt agatggtgcg 120

gctaaaagca acatgttaca gaaattcaaa gaatacgata aaagagaata tggtataagt 180

aataaaacga cagttttaga atcattgttt gatgaattca cgccaaggta tagattgcca 240

cgcaattaca tccaagattt ttggaataat aatttcccta gatgtttttc aatagaccaa 300

aatactattc atttcttaaa tcaaataaag aagcactgta aagttggaat tataacaaat 360

ggctcaactc agaggcaaaa agctaaaata tttaacacga atttaaataa gtattttgaa 420

acaatcatta tttctgaaga agtgggattt agtaaacctg ataaacgtat attcgaacta 480

gcattaaata agttaaattt acaaccggaa aatactttat tcgttgggga tgacttagaa 540

aaggatattg ctggtcctca aaatgcaaat ataaaaggtg tgtggtttaa ccctcagaaa 600

atcaagaata ctaccaaaat acaaccatat gccgagatta acactttgga tagtttgtta 660

agttatgtta ctccacaata tttttataac aagtaa 696

<210> 3

<211> 236

<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 3

Met Lys Tyr Lys Val Ile Leu Phe Asp Val Asp Asp Thr Leu Leu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Pro Thr Gly Tyr Asn Asp Tyr Leu Ala Ser Tyr Lys Glu Ile

35 40 45

Ser Asn Gly Leu Trp Arg Asp Leu Glu Asn Lys Met Ile Thr Leu Ser

50 55 60

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

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

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

<210> 4
<211> 711
<212> DNA
<213> Bacillus cereus
<400> 4

atgaaataca aagttatatt attcgacgta gatgatacat tattagattt ccctgaaacg 60
gaaagacacg cattacataa tgcgtttgta cagtttgata tgcctacagg gtataatgat 120
tatcttgcaa gctataaaga gattagtaat ggattatgga gagatttaga aaataaaatg 180

attacgctaa gtgaattagc agtagatcga tttagacaat tatttgcact tcataatata 240

gacgtagatg cacagcaatt tagtgatgta taccttgaaa atttagggaa ggaagtacat 300

cttatagaag gcgcagtaca attatgtgaa aatctacaag attgcaagtt aggtattatt 360

acgaatggat atacgaaggt gcaacaatca agaatcggaa attcaccttt atgtaatttc 420

tttgatcaca ttattatttc tgaagaagtt ggtcatcaaa aaccagcacg tgagattttt 480

gattatgcgt ttgagaagtt tgggattact gataaatcaa gcgtactaat ggttggagat 540

tcgttaactt ctgatatgaa aggcggagaa gattacggca ttgatacgtg ttggtataat 600

ccgagtttga aagaaaacgg gacagatgtt aacccgactt atgaagtgga gagtctgctc 660

caaattttag aaattgtaga agtggcggaa gaaaaggtag cttcatttta a 711

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 5

Met Lys Lys Tyr Lys Thr Leu Leu Phe Asp Val Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10 15

Asp Phe Gln Lys Ala Glu Lys Val Ala Leu Arg Val Leu Phe Glu Glu
20 25 30

Lys Gly Ile Pro Leu Thr Asp Glu Ile Glu Ala Arg Tyr Lys Lys Ile
35 40 45

Asn Lys Gly Leu Trp Asp Ala Phe Glu Lys Gly Glu Leu Ser Arg Asn
50 55 60

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

Glu Val Asn Gly Ile Leu Phe Glu Asn Asn Tyr Arg Asn Tyr Leu Glu
85 90 95

Glu Gly Asn Gln Leu Met Gln Gly Ala Phe Glu Phe Ile Asn Gln Ile
100 105 110

Gln Gly Glu Tyr Glu Leu Tyr Ile Val Thr Asn Gly Val Ser Lys Thr
115 120 125

Gln Asp Lys Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu His Ser Leu Phe Lys Asp
130 135 140

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

180 185 190
Ala Gly Ile Asp Thr Cys Trp Phe Asn Pro Glu Arg Lys Leu Asn Asp
195 200 205
Ser Gly Ile Ile Pro Thr Tyr Glu Val His Asn Phe Glu Glu Leu Glu
210 215 220
Ala Leu Leu Lys Gln His Val
225 230

<210> 6
<211> 696
<212> DNA
<213> Bacillus cereus
<400> 6

atgaaaaaat ataaaacatt gctatttgat gtagatgata cattattaga tttccaaaag 60

gctgaaaaag tggctttacg ggtgcttttt gaagagaagg gaatcccttt aacagacgag 120
atagaggctc gttataaaaa gataaataaa ggtctttggg atgcttttga aaaaggtgaa 180
ctatcacgca atgaagttgt aaatacacga ttctctctgt tgtttaaaga gtatggagaa 240
gaagtaaatg gaatattatt cgaaaataat tatcgtaact acttagaaga aggaaatcaa 300
ctcatgcaag gtgcatttga atttataaat caaattcaag gggagtatga attgtatata 360
gtgacaaatg gtgtttctaa gacgcaagat aaacgtttgc gcaatgcagg gttacattca 420
ttatttaaag atgtctttgt ttcggaagat acaggttttc aaaaaccgat gaaagagtat 480

tttgattatg tttttgaacg gattcctaac tttgcacctg aagaagggct gattattggg 540
gattcattaa gcgctgatat taaaggtgga tatgtagcgg gaattgatac ttgttggttt 600
aatccagaaa ggaaattaaa tgatagtggg attataccga catatgaagt gcataatttt 660
gaggagttag aagcgttatt gaagcagcat gtgtaa 696

<210> 7
<211> 247
<212> PRT

<213> Bacillus megaterium

<400> 7

Met Gln Lys Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Asp Asp Thr Leu Val His
1 5 10 15

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

Gln Glu Trp Phe Glu Asn Leu Thr Lys Glu Glu Ile Lys Gln Lys Gln
35 40 45

Leu Glu Ile Asp Leu Lys Ser Ile Glu Lys His Gly Leu His Ser Ser
50 55 60

Arg Phe Pro Glu Ser Leu Val Ala Thr Tyr Leu Phe Phe Ser Glu Gln
65 70 75 80

Asn His Gln Asp Ile His Glu Asp Arg Val Gln Arg Val Lys Lys Ile
85 90 95

Gly Gln Ser Val Phe Glu Val Pro Ile Glu Pro Leu Pro Asn Met Tyr
100 105 110

Glu Val Leu Asp Lys Leu Lys Glu Gln Gly His Asp Leu Tyr Leu His
115 120 125

Thr Gly Gly Asp Glu Glu Asn Gln Gly Arg Lys Ile Val Gln Leu Glu
130 135 140

Leu Ala Lys Tyr Phe Glu Lys Arg Val Phe Ile Ser Glu Gln Lys Asp
145 150 155 160

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

Lys Thr Trp Met Ile Gly Asn Ser Leu Lys Thr Asp Ile Arg Pro Ala
180 185 190

Val Glu Ala Gly Ile His Ala Ile His Val Pro Ser Glu Leu Glu Trp
195 200 205

Ser Tyr Asn Gln Val Lys Ile Asp Val Ala Pro Lys Gly Lys Leu Ile
210 215 220

Thr Val Asn Ser Leu Leu Glu Val Pro Glu Ile Ile Gln Lys His Ala

225 230 235 240

Gln Glu Thr Val Val Ser Thr

245

<210> 8

<211> 744

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<400> 8

atgcagaagc aaaccctact ttttaattta gacgatacgc ttgttcactg taataaatat 60

tttagagaca ccataaatgc ttttgtggct caattgcagg aatggtttga gaatctgact 120

aaggaagaaa taaaacaaaa gcagttagag atagatttaa aaagtatcga aaagcatggc 180

cttcactctt cccgatttcc agaatcatta gtagctactt atttattttt tagtgaacaa 240

aatcatcaag atatccatga agatagagtc caaagagtca aaaaaattgg tcaaagtgta 300

tttgaagtac cgatagagcc tttgccaaat atgtatgaag tattagataa gcttaaagaa 360

caaggacatg atctctactt acacacaggt ggagacgagg aaaatcaagg tagaaaaatt 420

gttcagctag agctagctaa atactttgaa aaaagggtat ttatttctga acaaaaagat 480

acagctgcat taaaagaaat actaaaccaa attaagtacg atccaaaaaa gacttggatg 540

attggcaatt cattaaaaac cgatataaga ccggcagtag aagctggaat acatgcgatt 600

cacgtacctt ctgaactgga gtggagctac aaccaagtta aaattgatgt tgcgccaaaa 660

ggtaaattga taaccgttaa ttcgttgctg gaagttccag aaatcattca aaagcatgct 720

caagaaacgg ttgtgtccac ctaa 744

<210> 9

<211> 219

<212> PRT

<213> Bacillus megaterium

<400> 9

Met Lys Phe Lys Thr Ile Leu Phe Asp Ala Tyr Gly Thr Leu Phe Asp

1 5 10 15

Val His Thr Val Ile Glu Thr Cys Asp Lys Leu Tyr Pro Glu Arg Gly

20 25 30

Glu Ser Ile Ser His Leu Trp Arg Leu Lys Gln Ile Glu Tyr Ala Met

35 40 45

Gln Tyr Gln Leu Met Gly Arg Tyr Val Asp Phe Tyr Thr Leu Thr Asn
50 55 60

Gln Ser Leu Lys Tyr Ala Ala Glu Ala Asn Asp Ile Asp Leu Thr Glu
65 70 75 80

His Glu Glu Lys Met Leu Met Ser Ala Tyr Met Lys Leu Asn Val Tyr
85 90 95

Asp Glu Val Lys Glu Val Leu Ala Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Arg
100 105 110

Leu Ala Ile Phe Thr Asn Gly Pro Lys His Met Ile Asp Pro Leu Val
115 120 125

Ser Tyr His Asn Met Asn His Leu Phe Glu Asp Val Ile Ser Val Asp
130 135 140

Glu Ile Lys Gln Tyr Lys Pro Thr Met Ala Ser Tyr His Tyr Ala Lys
145 150 155 160

Asn Lys Met Asn Ala Lys Arg Glu Glu Val Leu Phe Leu Ser Ser Asn
165 170 175

Thr Trp Asp Ile Ala Gly Ala Lys Asn Tyr Gly Phe Ala Thr Ala Trp
180 185 190

Val Asn Arg Lys Gly Asn Val Ala Glu His Lys Glu Leu Gln Pro Asn
195 200 205

Val Ile Ile Lys Ser Leu Asn Gln Leu Ile Lys
210 215

<210> 10

<211> 660

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<400> 10

atgaaattta aaacgatttt atttgatgca tatggaacgc tgtttgatgt acataccgtt 60

attgaaacgt gtgataagct gtatccggag cggggagaaa gtattagcca tttatggcgt 120

ttgaagcaaa ttgaatatgc aatgcaatat cagctgatgg gacgatacgt tgacttttat 180

acattaacaa atcaatccct aaaatatgca gcagaagcaa atgatattga tttaacggaa 240

catgaagaaa aaatgctgat gagtgcttac atgaagctga atgtctacga tgaggtcaaa 300

gaggtgctcg cctatttaaa agaaaaagga tatcgtctgg ctatttttac gaatggtcct 360

aagcacatga ttgatccgct tgtttcttat cacaacatga atcatttatt tgaagacgtt 420

atttccgtag acgaaatcaa acagtacaag cctacgatgg caagctatca ctatgcaaaa 480

aataaaatga acgcaaaaag agaagaagta ttatttttgt catcgaatac atgggatatt 540

gccggtgcta aaaactacgg gttcgcaacg gcttgggtca accgaaaagg aaatgtagct 600

gaacataaag aattgcagcc aaacgtaatc attaaaagct taaatcagct tattaaataa 660

660

<210> 11

<211> 238

<212> PRT

<213> Bacillus megaterium

<400> 11

Met Lys Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Phe Asp Ile Asp Asn Thr Leu Leu
1 5 10 15

Asp Phe Asn Ala Ala Glu Glu Gln Ala Leu Gln Leu Leu Phe Ala Asn
20 25 30

His Asp Ile Pro Leu Thr Glu Glu Ser Lys Lys Arg Tyr Ser Leu Ile
35 40 45

Asn Gln Gly Leu Trp Thr Ala Phe Glu Glu Asn Lys Ile Ser Arg Glu
50 55 60

Gln Val Val Asn Thr Arg Phe Ser Thr Leu Cys Lys Glu Tyr Gly Ile
65 70 75 80

Glu Lys Asp Gly Lys Leu Leu Glu Ala Glu Tyr Arg Thr Tyr Leu Asn
85 90 95

Asn Gly His Gln Leu Ile Asp Gly Ala Phe Glu Val Ile Lys Asn Leu
100 105 110

Ser Cys His Tyr Glu Leu Tyr Val Val Thr Asn Gly Val Ser Ala Thr
115 120 125

Gln Tyr Lys Arg Leu Gln Asp Ser Gly Leu Tyr Pro Tyr Phe Lys Glu
130 135 140

Val Phe Val Ser Glu Asp Thr Gly Phe Gln Lys Pro Met Lys Glu Tyr
145 150 155 160

Phe Asp Tyr Val Phe Ser Arg Ile Thr Glu Leu Ser Val His Glu Thr

165 170 175

Leu Ile Ile Gly Asp Ser Leu Ser Ala Asp Ile Gln Gly Gly Gln Leu

180 185 190

Ala Gly Ile Asp Thr Cys Trp Phe Asn Pro Gln Lys Lys Lys Asn Asp

195 200 205

Thr Asn Trp Asn Ser Thr His Glu Ile Gly Arg Leu Gln Glu Leu Tyr

210 215 220

Ile Leu Leu Asn Val Asn Asn Glu Val Ala Ser Val Gln Val

225 230 235

<210> 12

<211> 717

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<400> 12

atgaaaacat accgaacgct tctatttgac attgataata cgcttttaga ttttaacgca 60

gccgaagagc aggctttaca gcttcttttt gctaaccacg atattccgtt gactgaggaa 120

agcaaaaaac gttatagttt gataaaccag gggttatgga cagcttttga agaaaataaa 180

ataagccgtg agcaagttgt aaatactcgc ttttctactc tatgtaaaga atatggaata 240

gaaaaagacg gaaagctact tgaagcagag taccgaacgt atttgaacaa tggccatcag 300

ctaattgacg gagcatttga ggtaattaaa aacctgagct gtcactatga gttatatgtt 360

gttacaaatg gcgtatcggc tacgcaatat aaacgccttc aggactcagg tctatatcct 420

tattttaaag aagtatttgt ttcagaagat acgggctttc aaaagcctat gaaggaatat 480

tttgattatg ttttttcacg tataacagag ttgtccgtac atgaaacatt aattattgga 540

gattctttga gtgcagacat tcaaggcggg cagctagccg gtattgatac gtgttggttt 600

aatccgcaga aaaaaaagaa tgatacaaat tggaattcta cccatgaaat aggaaggctt 660

caagagcttt atattctgct gaacgtaaat aatgaagtag cttcggtaca agtgtaa 717

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

aagaaggaga tataccatga tgggttataa agcgatgc 38

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gcattatgcg gccgcaagct ttacttgtta taaaaatatt g 41

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

aagaaggaga tataccatga aatacaaagt tatattattc 40

<210> 16

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gcattatgcg gccgcaagct ttaaaatgaa gctacctttt c 41

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

aagaaggaga tataccatga aaaaatataa aacattgc 38

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gcattatgcg gccgcaagct ttacacatgc tgcttcaata 40

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aagaaggaga tataccatgc agaagcaaac cctactt 37

<210> 20

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

gtggtggtgg tggtgctcga ttaggtggac acaaccgttt c 41

<210> 21

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

aagaaggaga tataccatga aatttaaaac gatttta 37

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gtggtggtgg tggtgctcga ttatttaata agctgattta 40

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

aagaaggaga tataccatga aaacataccg aacgct 36

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

gtggtggtgg tggtgctcga ttacacttgt accgaagcta c 41