



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0055890
(43) 공개일자 2014년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0129937
(22) 출원일자 2012년11월16일
심사청구일자 2012년11월16일
(30) 우선권주장
1020120120128 2012년10월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
한국해양연구원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이경조
서울 마포구 백범로 35, 생명과학과 (신수동, 서강대학교)
김유라
서울 은평구 응암로25길 16-6, (응암동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박원미

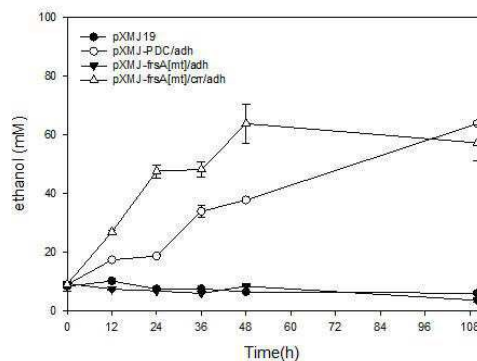
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 FrsA를 발현하는 균주 및 이를 이용한 에탄올 생산방법

(57) 요약

본원은 FrsA 단백질을 발현하는 균주 및 이를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것이다. 본원의 FrsA는 기질인 파이루베이트에 대해 높은 PDC 효소 활성을 가지므로 에탄올 생산과정에 이용할 수 있다. 또한, 숙주 세포내 안정성을 증진시킨 FrsA 돌연변이를 IIA^{Glc}와 함께 과발현할 경우, 기존의 자이모모나스 모빌리스 유래의 PDC를 이용한 경우보다 안정성 증가로 인해 에탄올 생산에 보다 효율적으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도8d



(72) 발명자

이정기

대전 유성구 엑스포로 448, 504동 501호 (전민동, 엑스포아파트)

차선진

경기 안산시 상록구 해양로 16, 905동 1001호 (사동, 안산고잔9차푸르지오)

이규호

서울 마포구 백범로 35, 생명과학과 (신수동, 서강대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0092822

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-도약연구지원사업(전략)

연구과제명 식품안전성 향상을 위한 식중독균의 위해인자 검출, 추적, 평가 및 제어 기반 기술 개발

기 여 율 3/5

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201255005.01

부처명 국토해양부

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 생물막 형성의 단계별 조절체계 규명 및 항생물막 기법 개발

기 여 율 2/5

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

frsA 유전자로 형질전환된 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *frsA* 유전자가 서열번호 1, 서열번호 5 또는 서열번호 7 의 서열인 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 균주는 *에스체리키아 콜라이* (*Escherichia coli*), *코리네박테리움 글루타미쿰* (*Corynebacterium glutamicum*), *에르위니아 크리산트헤미* (*Erwinia chrysanthemi*), *자이모모나스 모빌리스* (*Zymomonas mobilis*), *클렙시엘라* (*Klebsiella* spp), *박실러스 스테아로써모필루스* (*Bacillus stearothermophilus*), *클루베로마이세스* (*Kluveromyces* spp.), *파키솔렌 타노필루스* (*Pachysolen tanophilus*), *유산균*, *클로스트리디움* (*Clostridium* spp.), *칸디다 셰하테* (*Candida shehatae*), *효모균*으로는 *사카로마이세스 서레비시에* (*Saccharomyces seravisiae*), 또는 *피키아 스티피티스* (*Pichia stipitis*)로 구성되는 균으로부터 선택되는 것인 균주.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 균주는 *에스체리키아 콜라이* 또는 *코코리네박테리움 글루타미쿰*인, 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 알콜 데하이드로지나제 유전자로 추가로 형질전환된 균주.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균주는 IIA^{Glc} 유전자로 추가로 형질전환된 균주.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 IIA^{Glc} 유전자는 서열번호 3의 서열을 가지는 것인, 균주.

청구항 8

서열번호 2의 서열을 기준으로 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환되거나, 또는 서열번호 2의 서열을 기준으로 2번째부터 19번째 아미노산이 결실되고 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된, FrsA 단백질.

청구항 9

제 8 항에 따른 상기 각 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 각 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 각각 서열번호 5 및 서열번호 7의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제 9 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 12

제 11 항에 따른 벡터를 포함하는 균주.

청구항 13

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항 또는 제 12 항에 따른 균주를 이용하는 것을 특징으로하는, 바이오에탄올 생산방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 방법은 상기 미생물을 탄소원과 접촉하는 단계 및 상기 미생물을 발효 조건에서 배양하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올 생산방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서 상기 탄소원은 녹말, 셀룰로스, 헤미 셀룰로스, 오탄당 및 육탄당으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 생산방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상기 탄소원은 락토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스 및 만노스로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 생산방법.

청구항 17

제 13 항에 있어서, 상기 균주는 대장균 또는 코리네박테리움 글루타미쿰인, 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 FrsA를 발현하는 에탄올 생산 균주 및 이를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 대부분의 나라에서 전적으로 수입에 의존해야만 하는 오일은 환경 문제와도 맞물려 대체 에너지를 찾으려는 노력으로 이어져왔으며, 그 중 하나가 바로 미생물을 이용하여 바이오메스를 에탄올로 전환하는 것이다.
- [0003] 그러나, 미생물을 이용한 에탄올의 생산은 생산비용에 비해 생산효율은 낮아 보다 경제적인 공정으로의 개선이 필요하다. 상기 공정에 대한 측면은 크게 글루코스 공급원으로서의 바이오메스를 미생물에서 사용될 수 있는 형태로 전환하는 것과 더불어 세포내에서의 효율적인 에탄올 생산을 위해 당 대사에 관여하는 효소를 발굴하고 이를 개선하기 위한 방향으로 진행되고 있다.
- [0004] 미생물을 이용한 에탄올 생산 공정에서는 사카로마이세스 서레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*) 또는 대장균 (*Escherichia coli*) 등을 이용하여 육탄당 또는 오탄당과 같은 당을 발효하여 에탄올로 전환한다.
- [0005] 이러한 미생물은 효율적인 에탄올 생산을 위해 유전적으로 변형되는 경우가 많은데 이를 통해 외부에서 유래된, 에탄올 생산에 관여하는 효소를 발현하게 된다. 그 대표적인 효소로서 파이루베이트 데카르복실라제(PDC)와 알콜데하이드로지나제(ADH)가 있으며, 대장균을 숙주 세포로 이용할 경우 파이루베이트를 에탄올로 전환하기 위해 자이모모나스 모빌리스 유래의 파이루베이트 데카르복실라제 및 알콜 데하이드로지나제와 같은 효소가 이용되었다.
- [0006] 이들 효소는 세포내에서의 에탄올 생산효율을 높여서 전처리에 많은 비용이 드는 바이오메스의 사용량을 감소시킬 수 있다. 따라서, 이들 효소의 활성 개선은 어 전체 공정의 비용 감소에 있어 중요한 역할을 할 것이다.
- [0007] 이와 관련하여, US 공개특허공보 제2009/0155871호는 광 반응성 프로모터, 자이모모나스 모빌리스 유래의 PDC 코딩 서열 및 ADH 코딩서열을 포함하는 핵산 컨스트럭트 및 이를 시아노박테리움에 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있고,
- [0008] 대한민국 공개특허공보 제2011-0007981호는 신규한 알콜 탈수소효소 및 이를 미생물에 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있고,
- [0009] 대한민국 공개특허공보 제2011-0082141호는 글리세롤 생산능을 저감시킨 균주에 사카로마이세스 세레비지에 유래의 PDC 및 ADH 유전자를 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있다.
- [0010] 그러나, 본원발명과 같이 비브리오 불니피쿠스 유래의 FrsA를 PDC로 이용하여 숙주의 에탄올 생산능력을 증진시킨 예는 보고된 바 없으며, 새로운 생산 균주에 대한 개발 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본원의 목적은 당대사에 관여하는 FrsA의 생화학적 특성을 규명하고 이를 에탄올 생산에 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 한 양태에서 본원은 비브리오 불니피쿠스 유래의 *frsA* 유전자 또는 그 변이체로 형질전환된 균주를 제공한다.
- [0013] 본원은 또한 *frsA* 유전자가, 서열번호 2의 야생형 FrsA 아미노산 서열 또는 상기 서열의 131번째의 시스테인이 알라닌으로 치환된 아미노산 서열 (서열번호 6), 또는 상기 서열의 131번째의 시스테인이 알라닌으로 치환되고, 서열번호 2의 서열을 기준으로 아미노산잔기 2 내지 19번째가 결실된 서열 (서열번호 8)의 아미노산 서열을 코딩하는 것인 균주를 제공한다.
- [0014] 본원은 또한 상기 균주가 박테리아 또는 효모인 균주를 제공한다.
- [0015] 본원은 또한, 상기 균주가 *E.coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus stearothermophilus*, *Kluveromyces spp.*, *Pachysolen tanophilus*, *Lactic acid bacteria*, *Clostridium spp.*, *Thermococcus spp.*, *Thermococcus onnurineus*, *Candida shehatae*,

Saccharomyces eravisiae 및 *Pichia stipitis* 로 구성되는 군으로부터 선택되는 균주를 제공한다.

- [0016] 본원은 또한 상기 균주가 *E.coli* 또는 *Corynebacterium glutamicum*인 균주를 제공한다.
- [0017] 본원은 알콜 데하이드로지나제 유전자로 추가로 형질전환된 균주를 제공한다.
- [0018] 본원은 또한 IIA^{Glc} 유전자로 추가로 형질전환된 균주를 제공한다.
- [0019] 다른 양태에서 본원은 또한 상기 균주를 이용한 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.
- [0020] 본원에서 상기 방법은 본원의 FrsA를 발현하는 미생물을 제공하는 단계; 상기 미생물을 탄소원과 접촉하는 단계; 및 상기 미생물을 발효 조건에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.
- [0021] 본원은 또한 상기 탄소원이 녹말, 셀룰로스, 헤미 셀룰로스, 오탄당, 및 옥탄당으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.
- [0022] 본원은 또한 상기 탄소원이 락토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스 및 만노스로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.
- [0023] 본원은 또한, 상기 발효 조건이 산소 또는 pH 조건의 조절을 통하여 수행되는, 생산방법을 제공한다.
- [0024] 본원은 또한, 상기 산소 조건이 혐기 또는 조건무산소 조건인 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본원의 비브리오 불니피쿠스 유래의 FrsA는 기질인 파이루베이트에 대해 높은 PDC 효소 활성을 가지므로 에탄올 생산과정에 이용할 수 있다. 또한, 숙주 세포내 안정성을 증진시킨 FrsA 돌연변이를 IIA^{Glc}와 함께 과발현할 경우, 기존의 자이모모나스 모빌리스 유래의 PDC를 이용한 경우보다, 숙주가 더 높은 에탄올 생산능력을 갖게 하므로, 바이오에탄올 생산에 더 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1a는 재조합 FrsA를 이용한 파이루베이트의 분해 활성을 나타내는 그래프이다. 0 내지 50nM 범위의 다양한 농도의 FrsA의 존재 하에서 파이루베이트(1mM)를 반응 혼합물에 첨가하여 반응시켰다. 5분 반응 후 남아있는 파이루베이트의 농도를 측정하여 3회 반복 실험 결과의 평균값을 나타냈다.
- 도 1b는 FrsA에 의한 파이루베이트의 아세트알데하이드로의 전환 실험결과를 나타내는 것으로, 파이루베이트 (5mM)를 50mM 포스페이트 완충 D₂O에 첨가하여 2 μM FrsA의 존재 또는 부재하에서 반응시키고 이 반응 혼합물을 ¹H-NMR로 분석하였다. [약어: A, 아세트알데하이드; AH, 수화된 아세트알데하이드; PYR, 파이루베이트; TMS, 테트라메틸실란. 아세트알데하이드에 대한 스탠다드 ¹H-NMR 스펙트럼은 도 4c에 있다]
- 도 1c는 FrsA의 파이루베이트 분해 과정에서 생성된 아세트알데하이드 및 CO₂의 농도를 나타낸다. 상기 아세트알데하이드 및 CO₂의 농도는 1nM FrsA 및 0 내지 1.0 mM 범위의 다양한 농도의 파이루베이트를 포함하는 반응 혼합물에서 측정하였다. 각 반응 혼합물에서 생산된 아세트알데하이드 및 CO₂는 각각 X축 및 Y 축에 표시하였으며, 이어서 선형회귀 분석을 하였다.
- 도 1d 및 도 1e는 야생형 및 돌연변이 *frsA*를 포함하는 박테리아(LBS-글루코스 배지에서 호기성 또는 혐기성 조건에서 배양)에서 각각 파이루베이트 및 아세트알데하이드의 농도를 나타내며, 상기 박테리아는 광범위한 숙주 범위를 갖는 벡터 pRK415를 포함한다. 실험에 사용한 각 화합물의 양은 3회 실험값의 평균값 및 표준편차로 나타냈다. 별표는 p-value < 0.0001 (Student t-test)이다.

도 2는 정제된 재조합 FrsA 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 3은 야생형(검은색 원) 및 FrsA 결손 돌연변이(흰색 원) 대장균의 아세트알데하이드 생산 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 α-케토티레이트와 FrsA 반응 혼합물의 500MHz ¹H-NMR 스펙트럼이다 [약어: KB, α-케토티

레이트; TMS, 테트라메틸실란].

도 4b는 α -케토글루타레이트와 FrsA 반응 혼합물의 500MHz ^1H -NMR 스펙트럼과 순수한 아세트알데하이드의 500MHz ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다 [약어: KG, -케토글루타레이트; TMS, 테트라메틸실란].

도 4c는 순수한 아세트알데하이드의 500MHz ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다[약어: A(아세트알데하이드: 2.24 및 9.68 ppm) 및 HA(수화아세트알데하이드: 1.33 및 5.25ppm), HDO (중수)].

도 5는 비브리오 볼니피쿠스의 FrsA와 그 오솔로그(ortholog)의 아미노산 서열을 정렬한 결과이다. 비브리오 볼니피쿠스의 FrsA 서열을 ClustalW 프로그램을 사용하여 GenBank의 FrsA 오솔로그와 비교하였다. 동일 및 유사한 아미노산 잔기는 각각 청색 별표 및 초록색 점으로 표시하였다. 촉매에 관여하는 잔기(R53, D203 및 R272)는 적색으로 표시하였다. 아미노산 잔기는 NCBI 데이터베이스에서 획득하였다[약어: *V.v* (*Vibrio vulnificus*; NP_759330.1); *V.p* (*Vibrio parahaemolyticus*;

EED26191); *V.c* (*Vibrio cholerae*; NP_231907); *E.c* (*Escherichia coli*; AP_000892); *S.f* (*Shigella flexneri*; NP_706239); *S.e* (*Salmonella enterica*; YP_001571692); 및 *Y.p* (*Yersinia pestis*; AAM84545)].

도 6은 FrsA가 촉매하는 반응의 pH 의존성을 나타내는 실험결과이다. 재조합 FrsA를 pH 4 내지 9의 다양한 범위로 적정화된 반응 혼합물에 추가하여 효소 반응속도계수 알콜 데하이드로지나제(ADH) 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 파이루베이트의 아세트알데하이드로의 전환과 관련된 k_{cat} 및 k_{cat}/K_m 상응하는 pH 조건하에서 수행한 ADH 반응의 표준커브로 결정하였다.

도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 다양한 유전자 컨스트럭트를 가지는 FrsA 발현 플라스미드(pXMJ-*pdh/adh*, pXMJ-*frsA/adh*, pXMJ-*frsA/crr/adh*)를 대장균 K12에 도입하고, 각 플라스미드가 도입된 균주 별 시간의 경과에 따른 에탄올 생산량을 도시화한 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 다양한 유전자 컨스트럭트를 가지는 FrsA 발현 플라스미드(pXMJ-*pdh/adh*, pXMJ-*frsA/adh*, pXMJ-*frsA/crr/adh*)를 대장균 K12에 도입하고, 각 플라스미드가 도입된 균주의 배양 중 MES 버퍼를 첨가하여 pH를 조절한 경우, 에탄올 생산량이 증가되었음을 보여주는 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 다양한 유전자 컨스트럭트를 가지는 FrsA 발현 플라스미드(pXMJ-*pdh/adh*, pXMJ-*frsA/adh*, pXMJ-*frsA/crr/adh*)를 코리네박테리움 글루타미쿰에 도입하고, 각 플라스미드가 도입된 균주 별 시간의 경과에 따른 에탄올 생산량을 도시화한 그래프이다.

도 8b는 야생형 FrsA와 FrsA[mt] 돌연변이 단백질의 아미노산 서열을 정렬한 결과로서, 돌연변이 FrsA[mt] 단백질은 야생형 FrsA 단백질의 아미노 말단으로부터 2번째 아미노산부터 19번째 아미노산까지가 결실되고, 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 것이다.

도 8c는 FrsA[mt] 돌연변이 단백질의 안정성이 비교 실험된 SDS-PAGE 결과로서, 돌연변이 FrsA[mt](*frsA[mt]/adh*, *frsA[mt]/crr/adh*,)를 제작하여 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 발현시킨 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 8d는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 다양한 유전자 컨스트럭트를 가지는 FrsA[mt] 돌연변이 단백질을 발현하는 플라스미드(pXMJ-*pdh/adh*, pXMJ-*frsA[mt]/adh*, pXMJ-*frsA[mt]/crr/adh*)를 코리네박테리움 글루타미쿰에 도입하고, 각 플라스미드가 도입된 균주 별 시간의 경과에 따른 에탄올 생산량을 도시화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본원에서는 FrsA의 생화학적 기능을 규명하였다. 글루코스는 대사과정에서 파이루베이트로 이화되며, 파이루베이트를 기점으로 하여 호흡과 발효 과정으로 갈라진다. FrsA (Fermentation Respiration Switch) 단백질은 발효/호흡의 갈림길에서 그 방향을 결정하는 스위치 역할을 하며, 당대사를 발효 쪽으로 전환한다.

[0028] 본원에서는 생화학적 실험을 통하여 FrsA가 코팩터의 도움없이 파이루베이트의 탈카르복실화 반응을 촉매하여 이를 아세트알데하이드와 이산화탄소로 이화한다는 것을 밝혔다. 또한 이 과정에서 IIA^{Glc} 단백질이 FrsA의 효소 활성을 증가시키는 것을 발견하였다.

[0029] 또한, 본원에서는 FrsA와 IIA^{Glc} 를 미생물에서 과발현하여 숙주의 에탄올 생산능을 촉진시킬 수 있음을 규명하였

다.

- [0030] 또한, 본원에서는 돌연변이 FrsA와 IIA^{Glc} 를 미생물에서 과발현하여 숙주의 에탄올 생산능을 더욱 촉진시킬 수 있음을 알아내었다.
- [0031] 이에, 한 양태에서 본원은 FrsA 유전자 및 단백질을 제공한다. FrsA 유전자 및 단백질은 야생형 및 이와 생물학적 동등성을 갖는 변이체를 포함한다. 핵산 수준에서의 변이는 아미노산의 변이를 수반하거나 수반하지 않을 수 있으며, 아미노산 수준에서 변이를 수반하는 경우, 생물학적 동등성을 갖는 한 다양한 아미노산 변이체가 본원에 포함된다. 한 구현예에서 상기 유전자 및 단백질은 비브리오 불니피쿠스 유래의 것이다. 다른 구현예에서 상기 유전자 및 단백질은 각각 서열번호 1 및 2의 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 서열번호의 서열에 치환이 있으나 생물학적 동등성을 갖는 핵산 수준 및 단백질 수준에서의 서열변이체도 포함하는 것이다. 한 구현예에서, 상기 FrsA는 서열번호 2의 서열 중 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 돌연변이 단백질을 코딩하는 돌연변이 *frsA* 유전자 서열을 가질 수 있으며, 상기 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 *frsA* 유전자 및 단백질 서열은 각각 서열번호 5 및 6으로 나타낸다.
- [0032] 한 구현예에서 상기 서열번호 2의 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 1의 서열로 표시하였으나, 이로 한정하는 것은 아니며, 하나의 아미노산을 코딩하는 여러 개의 코돈의 존재로 인한 핵산 서열의 변이도 본원에 포함된다.
- [0033] 본원은 나아가 비브리오 불니피쿠스 유래의 *frsA* 유전자로 형질전환된 균주를 제공한다. 한 구현예에서 상기 *frsA* 유전자는 서열번호 1의 서열일 수 있으며, 서열번호 2의 서열 중 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 돌연변이 단백질을 코딩하는 돌연변이 *frsA* 유전자 서열일 수 있다.
- [0034] 상기 *frsA* 유전자 또는 돌연변이 *frsA* 유전자를 포함하는 이의 등가물로 형질전환된 균주는 FrsA 단백질을 발현하며, 목적하는 바에 따라 발현을 조절하여 과량으로 또는 원하는 시기에 맞추어 발현하게 할 수 있다.
- [0035] 상기 균주는 에탄올 생산을 위해 알콜 데하이드로지나제 (Alcohol dehydrogenase, ADH) 유전자 및/또는 IIA^{Glc} 유전자로 추가로 형질 전환될 수 있다.
- [0036] ADH 유전자로는 다양한 기원의 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 사카로마이세스 세레비지에 유래의 GenBank 접근번호, NM_001183340, NM_001182812, NM_001181122가 사용될 수 있으며 이들로 제한하는 것은 아니다.
- [0037] IIA^{Glc} 단백질은 *crr* 유전자에 의해 코딩되는 글루코스-특이적 수송자(glucose-specific transporter)로 알려져 있다. 이것은 타겟 단백질에 결합하여 그 타겟 단백질의 활성을 조절하는 능력이 있는데, 그 타겟 단백질의 하나가 본원에서 특성을 규명한 FrsA이다. 본 발명자는 IIA^{Glc} 를 FrsA와 추가로 발현하는 경우 FrsA의 효소활성을 약 2배로 증가시킬 수 있음을 알아내었다. 한 구현예에서 상기 IIA^{Glc} 는 비브리오 불니피쿠스 유래의 것으로 예를 들면 그 유전자 및 단백질 서열은 각각 서열번호 3 및 4로 표시된다.
- [0038] ADH 및/또는 IIA^{Glc} 는 상술한 바와 같은 방식으로 FrsA의 활성을 촉진하기 위하여 미생물에 도입되어 사용될 수 있다.
- [0039] 본원의 *frsA* 유전자는 숙주 미생물로서, 육탄당, 오탄당 및 락토스를 포함하는 다양한 기질을 탄소원으로 이용하는 박테리아 또는 효모에 도입되어 에탄올의 생산에 사용될 수 있다.
- [0040] 상기 미생물로서는 혐기성(anaerobic) 및 조건무산소성(facultative anaerobic) 환경에서 자랄 수 있는 박테리아 또는 효모가 사용될 수 있다. 혐기성은 산소가 없는 환경에서 발육할 수 있으며, 산소가 증식하면 오히려 생육이 곤란해지는 성질을 가리키며, 조건무산소성은 통성혐기성이라고도 하며, 산소 호흡을 주로 하지만 무산소 환경에서도 증식할 수 있는 균학적 성질을 가리킨다.
- [0041] 이와 같은 통성혐기성 균으로, 예를 들면, 에스체리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 에르위니아 크리산트헤미(*Erwinia chrysanthemi*), 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 클렙시엘라 (*Klebsiella spp.*), 박실러스 스테아로써모필루스 (*Bacillus stearothermophilus*), 클루베로마이세스 (*Kluyveromyces spp.*), 파키솔렌 타노필루스 (*Pachysolen*

tanophilus), 유산균, 클로스트리디움 (*Clostridium spp.*), 칸디다 셰하테 (*Candida shehatae*), 효모균으로는 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces seravisiae*), 또는 피키아 스티피티스 (*Pichia stipitis*)가 사용될 수 있으나 이들로 제한하는 것은 아니다.

[0042] 또한 고세균 (Archaea)이 사용될 수 있으며, 유리알케오타 (*Euryarchaeota*), 하이퍼써모필 (*Hyperthermophiles*), 써모코커스 (*Thermococcus spp.*), 또는 파이로코커스 (*Pyrococcus spp.*), 써모코커스 온누리네우스 (*Thermococcus onnurineus NA1*)가 사용될 수 있다. 유산균은 예를 들면 스트렙토코커스 (*Streptococcus spp.*), 락토박실러스 (*Lactobacillus spp.*) 및 락토코커스 (*Lactococcus spp.*), 또는 류코노스탁(*Leuconostoc spp.*)를 포함한다.

[0043] 본원의 FrsA가 도입되어 에탄올 생산에 사용할 수 있는 미생물은 온도, pH 범위, 알콜내성, 삼투내성, 성장속도, 생산량, 특이성, 생산효율, 유전적 안정성 및 억제제 내성과 같은 항목에서 특정 조건을 만족하여야 하며, 당업자라면 목적하는 바에 따라 적절한 균주를 선택할 수 있을 것이다. 한 구현예에서는 *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Zymomonas mobilis*가 사용된다. 다른 구현예에서는 *Thermococcus onnurineus NA1*이 사용된다. 또 다른 구현예에서는 *Corynebacterium glutamicum*이 사용된다.

[0044] 본원의 *frsA* 유전자를 미생물에 도입하기 위한 클로닝 벡터 및 이러한 벡터의 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 FrsA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 PCR과 같은 당업계의 통상적인 방법을 이용하여 획득하고 이를 통상적으로 이용되는 벡터, 예컨대 pQE30, pGEM-T, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pH79, pUC19 또는 pET와 같은 발현벡터에 삽입한 다음, 상술한 미생물을 포함하는 적합한 숙주 세포에 형질전환시킨다. 에탄올 생산을 위해서는 이들 형질전환 미생물에서 FrsA 단백질을 과량으로 발현시킬 수 있다.

[0045] 본원의 *frsA* 유전자는 박테리아의 유전체에 혼입되어 존재하거나 또는 플라스미드에 포함되어 유전체와 독립적으로 존재할 수 있다. 한 구현예에서는 안정적 발현을 위해 유전체에 혼입되어 존재한다.

[0046] 본원의 *frsA* 유전자는 또한 오페론의 형태로 박테리아에 도입될 수 있다. 오페론은 *frsA*의 유전자 및 세포내에서의 발현 및 조절을 위해 조절서열을 포함하는 것으로, 조절서열은 프로모터, 인듀서, 오퍼레이터 및 라이보소말 결합부위를 포함한다. 이러한 오페론에 포함된 조절서열의 예로는 미국특허 제 5,000,000호에 기술된 것을 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0047] 발현된 FrsA 단백질을 정제하여 인비트로에서 사용하는 경우, 단백질은 당업계에 공지된 다양한 정제 방법에 따라 정제할 수 있다. 예를 들어, 배양된 형질전환 세포를 파쇄하여 얻은 조추출물을 다양한 크로마토그래피에 적용하여 FrsA 단백질을 정제할 수 있다.

[0048] 본원의 표 1에 기재된 바와 같이 본원의 FrsA는 기존의 알려진 PDC인 자이모모나스(*Zymomonas*) 유래의 것과 비교하여 유사한 Km값을 가지나, 약 8배의 Kcat 및 Kcat/km 값을 가져 매우 우수한 촉매효율을 갖는 것으로 평가할 수 있다. 사카로마이세스 세레비시에의 그것과 비교해서는 Kcat 및 Kcat/km 값이 각각 약 19배 및 약 110배 높다.

[0049] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 FrsA 유전자 또는 돌연변이 유전자를 포함하는 균주를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.

[0050] 바이오에탄올은 바이오에너지의 한 종류로 바이오매스를 활용하여, 당 발효과정을 통하여 생산되는 에탄올이다. 본원에 따른 FrsA 또는 그 변이체는 균주에 도입시 당의 발효를 통해 에탄올을 고효율로 생산할 수 있다.

[0051] 본원의 바이오에탄올 생산에 사용되는 균주는 앞서 언급한 바와 같이, ADH 이외에 IIA^{Glc}를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 본원에 따른 FrsA를 발현하는 미생물을 제공하는 단계; 상기 미생물을 탄소원과 접촉하는 단계; 및 상기 미생물을 발효 조건에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.

[0052] 바이오에탄올의 생산을 위한 미생물의 배양에 사용되는 배지, 온도 조건 및 사용가능한 탄소원 등은 사용하는 미생물의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 당업계의 기술로부터 용이하게 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면 대장균의 경우 Peterson & Ingram et. al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125: 36372 (2008)를 참조할 수 있다.

[0053] 본원의 FrsA를 발현하는 미생물, 즉 형질전환 균주에 대하여는 이미 언급한 바와 같다.

[0054] 본원의 방법에 사용되는 탄소원으로서 바이오에탄올을 생산할 수 있는 한, 크게 제한되는 것은 없다.

예를 들면 바이오매스 유래의 것이 사용될 수 있다. 바이오매스는 연료 및 연료의 제조에 사용할 수 있는 살아 있거나 최근에 죽은 식물을 의미한다.

[0055] 바이오매스는 탄수화물과 비-탄수화물의 2가지로 구성되어 있다. 탄수화물은 다시 셀룰로스, 즉, β -1,4 결합된 글루코스 단위체로 구성된 선형 폴리머와 헤미셀룰로스, 즉, β -1,4 결합된 자일로스 주쇄와 아라비노스, 갈락토스, 만노스 및 글루쿠론산의 분지로 구성되는 복합 분지형 폴리머로 분류될 수 있다. 비탄수화물 물질은 가교된 페닐프로판노이드 구조의 리그닌이다. 이러한 리그노셀룰로스와 같은 바이오매스가 본원의 방법에 사용될 수 있으며, 본원의 균주와 접촉하기 전에 공지된 처리방법, 예를 들면 W02009/071996에 기재된 방법을 사용하여 처리될 수 있다.

[0056] 또한, 본원의 방법에는 탄소원으로서 락토스 및 바이오매스에 존재하는 주당인 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스 및 만노스가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0057] 상기 발효는 산소 또는 pH 조건의 조절을 통하여 수행될 수 있다. 산소조건 의 조절 즉 혐기(anaerobic) 또는 조건무산소(facultative anaerobic) 조건 및 pH 조건은 배양을 목적으로 하는 미생물의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들면 Lin et al, 의 Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 627642에 기재된 것을 참조할 수 있다.

[0058] 상기 혐기 또는 조건무산소 조건에서 배양가능한 미생물은, 예를 들면, *에스체리키아 콜라이* (*Escherichia coli*), *코리네박테리움 글루타미쿰* (*Corynebacterium glutamicum*), *에르위니아 크리스탄트헤미*(*Erwinia chrysanthemi*), *자이모모나스 모빌리스* (*Zymomonas mobilis*), *클렙시엘라* (*Klebsiella spp*), *박실러스 스테아로씨모필루스* (*Bacillus stearothermophilus*), *클루베로마이세스* (*Kluveromyces spp.*), *파키솔렌 타노필루스* (*Pachysolen tanophilus*), *유산균*, *클로스트리디움* (*Clostridium spp.*), *칸디다 셰하타에* (*Candida shehatae*), *효모균*으로는 *사카로마이세스 서레비시에* (*Saccharomyces seravisiae*), 또는 *피키아 스티피티스* (*Pichia stipitis*)를 들 수 있다.

[0059] 본 발명의 형질전환 균주를 배양하는 방법은 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다. 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명의 범주가 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 실시예 1 단백질의 발현 및 정제

[0062] 1-1 *frsA* 클로닝 및 정제

[0063] 비브리오 불니피쿠스(3)로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [FrsAexp-FK (5'-GGGGTACCCGAATATGTCAGAAGAAGTCAGC-3'; 밑줄친 부분-KpnI 절단부위) 및 FrsAexp-RH (5'-CCCAAGCTTGTACCTTAAGAGTTCATCTTCCAGC-3'; 밑줄 친 부분-HindIII 절단부위)]를 사용하여 *frsA* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 PCR로 1,255-bp DNA 단편을 증폭하였다.

[0064] 이어 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 KpnI 및 HindIII로 절단한 후 발현벡터인 pQE30 (Qiagen)에 클로닝하여 pQE-*frsA*를 수득하였다. 이 발현벡터를 포함하는 *E. coli* JM109 (Promega)를 0.2 mM의 아이소프로필씨오--D-갈락토사이드를 포함하는 배지에서 배양한 후 Ni^{2+} -니트릴로트리아세트산 친화성 컬럼 및 크기배제 크로마토그래피(Qiagen, USA)를 제조자의 지시대로 사용하여 재조합 FrsA 단백질을 정제하였다.

[0065] 대장균 FrsA의 클로닝의 경우, *E. coli* K-12의 *frsA* 서열에 특이적인 하기의 프라이머를 사용하여 증폭하였다: ECFrsAexp-FB (5'-CGGGATCCATGACACAGGCAAACCTGAG-3' ; 밑줄친 부분 BamHI 부위) 및 ECFrsAexp-RH: 5'-CCCAAGCTTGTCTATCTCTGTGTGATGC-3' ; 밑줄친 부분 HindIII 부위). *E. coli* FrsA도 상술한 바와 같은 과정을 거쳐 Ni^{2+} -니트릴로트리아세트산 친화성 컬럼 및 크기배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 정제한 단백질은 소듐도세실설페이트-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하고 코마시브릴란트로 염색하였다. 도 2의 사진을

참고하면, 47 kDa의 FrsA 단백질을 젤 상에서 확인할 수 있다. FrsA 단백질이 다량체를 형성하는지 여부를 확인하기 위하여 상기에서 제조, 정제된 FrsA 단백질을 제조자의 지시대로 젤 여과 크로마토그래피(Sigma)에 적용하여 단백질을 1mM DTT 및 300mM NaCl을 포함하는 10mM 소듐포스페이트 완충액(pH 8.0)으로 용출하였다. 예상 분자량은 47 kDa이며, 이는 FrsA가 용액 중에서 단량체로 존재하는 것을 나타낸다.

[0066] 1-2 IIA^{Glc} 클로닝 및 정제

[0067] 비브리오 불니피쿠스 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 Crrex-F (5'-CGGGATCCGACACAATGGGCTCTGTTGAC-3'; 밀줄친부분 BamHI) 및 Crrex-R (5'-AACTGCAGTAGTAATTACTTAGTTACGCG-3'; 밀줄 친 부분 PstI)를 사용하여 IIA^{Glc}를 코딩하는 522-bp의 *crr* 유전자의 완전한 해독들을 증폭하였다. 증폭된 *crr* DNA를 그 양 말단에 위치한 BamHI 및 PstI 부위로 잘라 pQE30 발현벡터 (Qiagen)에 클로닝하여 pQE-*crr*를 구축하였다. 인산화된 재조합 IIA^{Glc} 단백질 및 비인산화된 재조합 IIA^{Glc}은 *E. coli* JM109 내에서 각각 1.0 mM 포스포에놀파이루베이트 또는 1.0% 글루코스를 포함하는 배지에서 과발현시키고 Ni²⁺-니트릴로트리아세트산 친화성 컬럼 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0068] 1-3 FrsA의 부위특이적 돌연변이

[0069] 서열번호 1의 아미노산 서열 131번째 시스테인이 알라닌으로 치환된 서열을 포함하는 프라이머를 사용하여 오버랩익스텐션(4) 방법으로 FrsA의 상기 부위에 돌연변이를 도입하였다. FrsA C131A를 코딩하는 DNA를 증폭하기 위해, 두 세트의 프라이머 FrsAexp-FK/FrsA FrsA C131AR (5'-GTAACCTGCGATGCTGAAGCCAAGGATGc-3')/ FrsA C131AF (5'-GCATCCTGGCTTACAGCATCGCAGGTTAC-3')를 사용하였다. 이어서 상기 프라이머로 수득한 두 가지의 PCR 산물을 주형으로 사용하여 FrsAexp-FK 및 FrsAexp-RH를 프라이머로 하여 2차 PCR을 수행하였다. 돌연변이를 포함하는 수득한 *frsA* DNA를 KpnI와 HindIII로 절단한 후 역시 KpnI/HindIII로 자른 pQE30에 라이게이션하여 pQE-*frsA*C131A를 구축하였다. 구축된 플라스미드의 서열은 염기서열 분석으로 확인하였다.

[0070] 1-4 frsA가 결손된 비브리오 불니피쿠스 돌연변이체 제조

[0071] 비브리오 불니피쿠스 MO624/030의 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [*frsA*-up F (5'-ACATGCATGCAATAATCGTTTGGCGAGCTCGATACCC-3'; 밀줄 친 부분- SphI 절단 부위) 및 *frsA*-up R (5'-GCTCTAGATCGGCATGTATTGAGTCAATGCCGAGG-3'; 밀줄 친 부분 XbaI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 *frsA* 업스트림 부위를 포함하는 838bp DNA를 증폭하였다. 이어 상기 단편을 pBluescript SK II(+)(Promega)에 클로닝하여 pSK*frsA*up를 수득하였다.

[0072] *frsA* 유전자의 다운스트림 부위를 포함하는 1,118-bp DNA 단편을 위와 같은 유전체를 주형으로 *frsA*-downF (5'-GCTCTAGAAGGGGATCCGGTCTCGCCATATTCGGA-3'; 밀줄 친 부위 XbaI 절단 부위) 및 *frsA*-downR (5'-GGACTAGTATCCGCTCGAGTGAGCAACATTGGCC-3'; 밀줄 친 부위 SpeI 절단 부위) 프라이머로 하여 PCR로 증폭한 후 pSK*frsA*up에 클로닝하여 pSK*frsA*up/down을 수득하였다. 이어 이를 SphI과 SpeI으로 절단하여 1,956-bp DNA 단편을 수이사이드(suicide) 벡터인 pDM4(5)에 클로닝하여 pDM4-*frsA*를 구축하였다. *E. coli* pDM4-*frsA*를 포함하는 SM10*pir* strain(6)를 비브리오 불니피쿠스 MO624/030와 컨주게이트시키고, 컨주게이트 완료체는 씨오설페이트 사이트레이트 바일 수크로스 배지(7)에서 선별하였다. 이어 선별된 콜로니는 *frsA*-upF와 *frsA*-downR를 프라이머로 사용하여 PCR로 결실을 확인하였으며, *frsA* 돌연변이체는 SM201로 명명하였다.

[0073] 실시예 2 FrsA의 생화학적 분석을 통한 특성 규명

[0074] 2-1 반응속도 상수 측정

[0075] FrsA 효소 분석은 1 mM 디씨오쓰레이틀 및 다양한 농도의 파이루베이트를 포함하는 50mM 소듐 포스페이트 용액(pH 7.0)을 사용하여 수행하였다. 파이루베이트로부터 생산된 아세트알데하이드를 측정하기 위해, 2 mM NADH 및 3.7 U의 이스트 알콜 데하이드로지나제(ADH)(Sigma)를 FrsA 반응혼합물에 포함하였다 (8). 야생형 *E. coli*와 *frsA* 돌연변이체 (9)의 세포 용해물은 0.005 내지 1mg의 양으로 사용하였다. 상술한 방법으로 생산된 아세트알데하이드 반응은 FrsA (1nM)을 첨가하여 개시하였으며, 37°C에서 5분간 반응을 진행하고, 50mM 포타슘

하이드로젠 프탈레이트 완충액(pH3.0)을 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응혼합물에 남아있는 잔여 NADH는 340nm에서 분광광도법으로 측정하였다. CO₂ 측정을 위해서, FrsA 효소 반응은 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에서 수행하였다. 반응물 용액 중에 용해된 이산화탄소는 반응물 용액을 10mM 칼슘하이드록사이드로 처리한 후 분광광도법으로 정량하였다 (10). 세포 용해물 또는 반응 혼합물 중의 파이루베이트 및 아세트알데하이드의 농도는 각각 파이루베이트 분석 키트 (BioVision) 및 아세트알데하이드 UV-방법 키트 (Roche)를 사용자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 아세트알데하이드 UV-방법 키트의 감도를 높이기 위해, 반응 혼합물을, 추가로 색소 (1.0% Tween 20 용액 50ml 중에 40 mg 아이오도니트로테트라졸리움 클로라이드 및 10mg 페나젠 메조셀레이트)로 처리하고, 이어서 490nm에서 분광광도법으로 측정하였다 (11). 결과는 도 3 및 표 1에 기재되어 있다.

[0076] K_m 및 K_{cat} 값은 다음과 같이 계산하였다. 각 기질 농도(S) 별로 1분간 얻은 흡광도 결과 값으로 부터 반응 산물 농도를 mM 단위로 계산한 후 기질 농도별 초기 반응속도(V_0)를 각각 구하였다(이때 단위는 $mM_{(product)}/sec/mg_{(enzyme)}$). S와 V_0 에 역수를 취하여 얻은 값을 각각 X축과 Y축으로 하여 Lineweaver-Burk plot을 그린 후 linear regression으로 $Y=aX+b$ 의 수식을 얻었다 (이때 X절편의 역수가 K_m 이고, Y절편의 역수가 V_{max} 임). 계산된 V_{max} ($mM_{(product)}/sec/mg_{(enzyme)}$)에서 효소의 단위 무게를 mM 농도 값으로 바꾸어 계산하여 sec^{-1} 단위의 K_{cat} 을 계산하였다.

[0077] 이스트 및 자이모모나스 유래의 PDC 반응속도는 기본적으로 FrsA와 동일하게 측정하였다. 즉, 상술한 바와 같은 ADH/NADH 커플드 분석 방법을 사용하였으며 반응액 MES, pH 6.0, 5 mM MgCl₂ 및 1 mM 티아민 파이로포스페이트에서 25℃ 조건으로 수행하였다. 자이모모나스의 경우 반응시작 전 효소를 다음과 같은 조성의 완충액(0.1 M 소듐 시트레이트 완충액, pH 6.0, 20 mM Mg²⁺, 1.5 mM 티아민 파이로포스페이트)에서 전처리한 후 반응액에 105 μ mol 소듐 시트레이트 완충액, pH 6.0, 21 μ M MgSO₄, 18 μ M 소듐 파이루베이트, 0.19 μ M NADH, 3.7 U 이스트 알콜 데하이드로나제를 첨가하여 반응을 시작하였으며, 분석은 위와 동일하게 수행하였다.

[0078] 2-3 NMR 분광법

[0079] 5mM 파이루베이트, α -케토글루타레이트, 또는 α -케토부티레이트를 용액 (95% D₂O 중에 50mM 소듐 포스페이트 및 1mM 디씨오쓰레이톨)에 첨가하였다. 이어 반응 혼합물을 2 μ M FrsA의 존재 또는 부재하에서 20℃에서 90분간 반응하였다. 이어 반응 혼합물을 얼음에서 2시간 동안 둔 후, NMR 실험을 수행하였다. 분광은 Bruker DRX500 spectrometer를 사용하여 500MHz의 1H 공명진동수에서 측정하였다. 결과는 도 4에 나타나 있다.

[0080] 2-4 FrsA 효소의 특성

[0081] A. FrsA의 파이루베이트 탈카르복실화반응 활성

[0082] 파이루베이트를 포함하는 반응물에 실시예 1에서 제조한 FrsA를 첨가한 경우, 파이루베이트의 농도가 감소하였다 (도 1a 참조). 1H NMR 스펙트럼을 통해 이러한 파이루베이트 농도의 감소는 아세트알데하이드의 증가로 이어졌음을 규명하였다 (도 1b 참조). FrsA의 존재하에 다양한 농도의 파이루베이트를 포함하는 반응 혼합물 분석결과도 이와 일치하는 것으로 아세트알데하이드와 이산화탄소가 1:1 비로의 생성됨을 보여준다 (도 1c). FrsA에 포함된 오염물에 의한 결과를 배제하기 위해 실시예 1에서 제조한 *frsA* 결손 돌연변이체와 야생형 대장균의 파쇄물을 파이루베이트를 포함하는 용액에 추가한 결과 농도 의존적으로 아세트알데하이드가 증가한 야생형과 달리 돌연변이체에서는 아세트알데하이드가 검출되지 않았다 (도 3 참조). 이는 FrsA가 파이루베이트에 대한 이화 기능을 갖는다는 것을 입증하는 것이다.

[0083] B. 기질특이성

[0084] 나아가 기질 특이성을 입증하기 위해 파이루베이트 이외에 다른 다양한 기질인 아세테이트, 락테이트, 옥살로아세테이트, α -케토글루타레이트, 및 α -케토부티레이트를 포함하는 반응물에서 위와 동일한 실험을 수행하였다. 그러나, NMR 결과 이러한 기질을 사용한 경우에는 이산화탄소가 생성되지 않았다 (도 4a, 도 4b 및 도 4c 참조).

[0085] C. 세포내에서의 활성

[0086] 이어서 세포내에서의 FrsA의 활성을 확인하기 위하여, 글루코스의 존재하에서 배양한 비브리오 볼니피쿠스의 세포내 파이루베이트의 농도와 실시예 1에서 제작한 *frsA* 결손 돌연변이체의 것을 비교한 결과, 혐기성 배양조건에서 후자의 파이루베이트 농도가 약 3배 더 높았다. 반면 호기성 조건에서의 농도는 두 경우가 유사하였다 (도 1d 참조). 이는 *frsA*의 결손이 발효대사 과정에서 파이루베이트 사용에 문제를 가져왔음을 의미한다. 아세트알데하이드의 농도 모니터링 결과도 위와 일치하였다. 즉, 혐기성 조건에서 배양한 *frsA* 결손 돌연변이체의 아세트알데하이드의 농도가 야생형과 비교하여 약 3배 낮았다 (도 1e). 그러나, 광범위한 숙주 적응성을 갖는 박테리 *frsA* 유전자를 넣어 *frsA* 결손변이체에 전달한 결과, 파이루베이트와 아세트알데하이드의 농도가 야생형 수준으로 회복되었다 (도 1d 및 도 1e 참조). 호기성 조건에서는 야생형과 돌연변이체의 차이가 없었는데, 이는 산소가 풍부한 조건에서는 FrsA의 발현이 감소되었기 때문으로 생각된다.

[0087] 이러한 결과는 FrsA가 비산소성 파이루베이트 탈카르복실화 반응(decarboxylation)을 촉매하여 이를 아세트알데하이드와 이산화탄소로 분해한다는 것을 나타낸다. 반응속도 분석에 의하면 FrsA는 효율이 좋은 효소로 표 1에 기재된 것과 같이 k_{cat} 및 k_{cat}/K_m 의 값이 $1,372 \text{ 11s}^{-1}$ 및 $3,518 \text{ 183s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 로 높은 촉매 활성을 가지며 기존의 PDC (pyruvate dehydrogenase complex)와 비교시 약 8배가 높고, IIA^{Glc} 첨가시 약 17배가 더 높다 (표 1 참조). 따라서 FrsA의 효소 활성은 발효를 촉진할 수 있는 생리적 기능을 충족한다.

[0088] [표 1]

Summary of the kinetic parameters obtained for FrsA ^a and PDC			
	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ mM ⁻¹)
FrsA^a			
Wildtype	0.39 ± 0.02	1,372 ± 11	3,518 ± 183
Wildtype			
+ dephospho-IIA ^{Glc}	0.39 ± 0.03	2,980 ± 158	7,641 ± 713 ^b
+ phospho-IIA ^{Glc}	0.39 ± 0.01	1,311 ± 48	3,362 ± 150 ^b
PDC			
<i>Zymomonas mobilis</i> ¹²	0.40	180	450
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹³	2.29	73	32

^a Averages and standard deviations were derived from at least two independent assays.^a

^b Estimation of the parameters was not applicable in these mutated recombinant proteins due to the absence of enzymatic reaction.

[0089]

[0090] 실시예 3 FrsA 발현 플라스미드의 제조 및 이를 이용한 에탄올 생산

[0091] 3-1 발현 플라스미드 구축

[0092] pXMJ-*pdhB*/adB 클로닝

[0093] 자이모모나스 모빌리스 ZM4 (ATCC)로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [ZmPDC FPstI

[0094] (5'-GATCCTGCAGAAAGGAGGACAACCATGAGTTACTGTCTCGGTAC-3'; 밑줄 친 부분- PstI 절단 부위) 및 ZmPDC RXbaI (5'-GATCTCTAGACTAGAGGAGCTTGTAAACAG-3'; 밑줄 친 부분-XbaI 절단 부위)]를 사용하여 PCR 반응을 수행하여 *pdhB* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는, 1,721-bp DNA 단편을 증폭하였다. 이어 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 PstI 및 XbaI로 절단 한 후 발현벡터인 pXMJ19(M. Jakoby *et al.* 1999. Construction and application of new Corynebacterium glutamicum vectors. Biotechnology Techniques. 13:437441))에 클로닝하여 pXMJ-*pdhB*를 획득하였다. 이후 pXMJ-*pdhB*/adB를 클로닝 하기 위하여 자이모모나스 모빌리스 ZM4로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [ZmadhB FK (5'-GGGGTACCAAGGAGGACAACCTAGCTATGGCTTCTTCACTTTTATATCC-3'; 밑줄친 부분- KpnI 절단 부위) 및 ZmadhB RE

[0095] (5'-CGGAATTCTTAGAAAGCGCTCAGGAAGAGTTC-3'; 밀줄 친 부분-EcoRI 절단 부위)]를 이용하여 PCR을 수행하여 *adhB* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 1,171-bp DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 KpnI 및 EcoRI 부위에서 절단 후 pXMJ-*pdC* 플라스미드에 클로닝하여 pXMJ-*pdC/adhB* 를 획득하였다.

[0096] pXMJ-*frsA/crr/adhB* 클로닝

[0097] 비브리오 볼니피쿠스 (Wright, A. C., Simpson, L. M., Oliver, J. D. & Morris, J. G., Jr. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 58, 1769-73 (1990))로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [VvfrsAFP(5'-AACTGCAGAAAGGAGGACAACCCGAATATGTCAGAAGAAGTCAGC-3'; 밀줄 친 부분- *pstI* 절단 부위) 및 VvfrsA RX (5'-GCTCTAGAGATTTGTCACCTTAAGAGTTCATC-3'; 밀줄 친 부분-XbaI 절단부위)]를 사용하여 PCR로 *frsA* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 1,264-bp DNA 단편을 증폭하였다. 이어 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 PstI 및 XbaI 부위에서 절단한 후 발현벡터인 pXMJ19에 클로닝하여 pXMJ-*frsA* 를 획득하였다. 이후 pXMJ-*frsA/crr*을 클로닝하기 위하여 비브리오 볼니피쿠스로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머

[0098] [VvrrFBamHI(5'-CTAGGGATCCAAAGGAGGACAACCGACACAATGGGTCTGTTTGACAAAC-3'; 밀줄친 부분- BamHI 절단부위) 및 VvrrRKpnI(5'-GGGGTACCGTAGTAATTACTTAGTTACGCGTAG-3'; 밀줄 친 부분-KpnI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 *crr* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 524-bp DNA 단편을 증폭하였다. 이 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 BamHI 및 KpnI 부위에서 절단한 후 pXMJ-*frsA* 플라스미드에 클로닝하여 pXMJ-*frsA/crr*을 획득하였다. 자이모모나스 모빌리스 ZM4로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [ZmadhB FK (5'-GGGGTACCAAGGAGGACAACCTAGCTATGGCTTCTCAACTTTTATATTCC-3'; 밀줄친 부분- KpnI 절단 부위) 및 ZmadhB RE (5'-CGGAATTCTTAGAAAGCGCTCAGGAAGAGTTC-3'; 밀줄 친 부분-EcoRI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 *adhB* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 1,171-bp DNA 단편을 증폭하고 이의 양 말단에 존재하는 KpnI 및 EcoRI 부위에서 절단한 후 pXMJ-*frsA/crr* 플라스미드에 클로닝하여 최종적으로 pXMJ-*frsA/crr/adhB* 플라스미드를 얻었다.

[0099] pXMJ-*frsA[mt]/crr/adhB* 클로닝

[0100] 실시예 1-3에서 제작된 131번째 시스테인이 알라닌으로 치환된 *frsA*가 클로닝된 pQE-*frsA*C131A 플라스미드를 주형으로, 두 개의 프라이머 [VvfrsA[mt] FP(5'-AACTGCAGAAAGGAGGACAACCTAGCTATGGCCATAGAAACCTCGGCATTG-3'; 밀줄 친 부분- *pstI* 절단 부위) 및 VvfrsA RX (5'-GCTCTAGAGATTTGTCACCTTAAGAGTTCATC-3'; 밀줄 친 부분-XbaI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 1,210-bp의 *frsA* DNA 단편을 증폭하였다. 이어 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 PstI 및 XbaI 부위에서 절단한 후 발현벡터인 pXMJ19에 클로닝하여 pXMJ-*frsA[mt]*를 획득하였다. 이후 pXMJ-*frsA[mt]/crr*을 클로닝하기 위하여, 비브리오 볼니피쿠스로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머

[0101] [VvrrFBamHI (5'-CTAGGGATCCAAAGGAGGACAACCGACACAATGGGTCTGTTTGACAAAC-3'; 밀줄 친 부분- BamHI 절단 부위) 및 VvrrRKpnI (5'-GGGGTACCGTAGTAATTACTTAGTTACGCGTAG-3'; 밀줄 친 부분-KpnI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 *crr* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 524-bp DNA 단편을 증폭하였다. 이 증폭된 단편을 이의 양 말단에 존재하는 BamHI 및 KpnI 부위에서 절단한 후 pXMJ-*frsA[mt]* 플라스미드에 클로닝하여 pXMJ-*frsA[mt]/crr*을 획득하였다.

[0102] 자이모모나스 모빌리스 ZM4로부터 추출한 유전체를 주형으로, 두 개의 프라이머 [ZmadhB FK (5'-GGGGTACCAAGGAGGACAACCTAGCTATGGCTTCTCAACTTTTATATTCC-3'; 밀줄 친 부분- KpnI 절단 부위) 및 ZmadhB RE (5'-CGGAATTCTTAGAAAGCGCTCAGGAAGAGTTC-3'; 밀줄 친 부분-EcoRI 절단 부위)]를 사용하여 PCR로 *adhB* 유전자의 모든 코딩서열을 포함하는 1,171-bp DNA 단편을 증폭하고 이의 양 말단에 존재하는 KpnI 및 EcoRI 부위에서 절단한 후 pXMJ-*frsA[mt]/crr* 플라스미드에 클로닝하여 최종 pXMJ-*frsA[mt]/crr/adhB* 플라스미드를 얻었다.

[0103] 3-2 대장균을 이용한 에탄올 생산

[0104] 대장균 내 FrsA/IIA^{Glc} 과발현

[0105] 실시예 3-1에서 구축한 각 플라스미드를 도입한 *E. coli* K12(*Escherichia coli* K-12 F-prime factors, old and new. Bacteriological Reviews. 36:587-607)를 에탄올 생산용 배지 (LB, 10% glucose)에서 37, 정치상

태로 배양하였다. *E. coli* K12는 pH의 급격한 저하를 막기 위해 0시간과 12시간일 때 최종 100mM의 MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 완충액으로 처리하였다(100mM MES, 5% 글루코스가 첨가된 LB배지에 대장균을 12시간 배양 후 100mM의 MES를 추가로 첨가하여 pH를 높여주었다). 모든 배양배지에는 4 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가되었다.

[0106] 한편, 배지 내 에탄올 생산량을 분석하기 위하여, 시간별로 채취한 배양 샘플에서 균을 제거한 상등액을 얻어 다음과 같이 ADH 분석을 수행하였다. 구체적으로, 990 µl의 ADH 반응 완충액 (glycine 500mM, hydrazine sulfate 75mM, sodium pyrophosphate tetrabasic 75mM, 3.7 unit ADH, 5mM NAD⁺, pH 9.0)에 10 µl의 시료를 섞어준 후 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 반응으로 생성된 NADH를 340nm에서 분광광도법으로 측정하여 얻어진 값에 에탄올 검량선에 대입하여 각 시료의 에탄올 농도를 계산하였다. 상기 결과를 도 7a에 나타내었다.

[0107] 그 결과, 대장균 내에서 FrsA를 과발현시(pXMJ-*frsA/adh*) 에탄올 생산량에 변화가 없었으며, FrsA와 IIA^{Glc}를 과발현시킬 경우(pXMJ-*frsA/crr/adh*) 에탄올 생산량은 대조군 대비 310% 증가하였다. FrsA/IIA^{Glc}의 과발현(pXMJ-*frsA/crr/adh*)에 의한 에탄올 생산량은 파이루베이트 디카르복실라아제(PDC)가 과발현된 경우(pXMJ-*pdh/adh*)의 에탄올 생산량 대비 42%로 나타났다.

[0108] 배지 내 pH 조절을 통한 에탄올 생산의 증진

[0109] FrsA/IIA^{Glc}의 과발현(pXMJ-*frsA/crr/adh*)에 의한 에탄올 생산량은 MES 완충액 첨가를 통하여 배지 내 pH를 조절할 경우, pH를 조절하지 않는 조건에 비해 254% 증가하였다. 또한, 이때의 생산량은 pH 조절시 대조군 대비 138% 증가한 것이며, PDC 과발현(pXMJ-*pdh/adh*)의 에탄올 생산량 대비 40%이다(도 7b).

[0110] 이 같은 결과로부터 본원의 FrsA는 에탄올 생산에서 필요한 PDC의 기능을 대체할 수 있는 새로운 PDC 효소이며, 배지 내 pH 조절을 통해 에탄올 생산량을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0111] **3-3 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용한 에탄올 생산**

[0112] 코리네박테리움 글루타미쿰 내 FrsA/IIA^{Glc} 과발현을 이용한 에탄올 생산

[0113] 3-1에서 구축한 각 플라스미드를 도입한 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032를 에탄올 생산용 배지 (LB, 10% glucose)에서 30°C 100rpm 진탕 조건으로 배양하였다. 모든 배양배지에는 10 µg/ml의 클로람페니콜이 첨가되었다. 한편, 배지 내 에탄올 생산량을 분석하기 위하여, 시간별로 채취한 배양 샘플에서 균을 제거한 상등액을 얻어 3-2에서와 동일한 방법으로 ADH 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 8a에 나타내었다.

[0114] 그 결과, 박테리아 내 FrsA 과발현시(pXMJ-*frsA/adh*)에는 대조군과 비교하여 에탄올 생산량에 변화가 없으며, FrsA/IIA^{Glc}의 과발현시(pXMJ-*frsA/crr/adh*)에는 대조군 대비 312% (108h 기준 496%) 증가하였다.

[0115] FrsA[mt] 돌연변이를 이용한 에탄올 생산

[0116] 실시예 3-1에서와 같이 숙주세포 내 안정성을 증진시키기 위한 돌연변이 FrsA[mt]를 제작하였다. 도 8b에 나타난 바와 같이, 돌연변이 FrsA[mt]는 야생형 FrsA 단백질의 아미노말단으로부터 2번째에서 19번째 아미노산이 결실되었고 131번째 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 것이다. 도 8c는 FrsA[mt] 돌연변이 단백질의 안정성이 비교실험된 SDS-PAGE 결과로서, *C. glutamicum* 내 과발현시킨 FrsA 양을 비교한 결과 FrsA[mt]의 안정성이 증가함이 관찰되었다.

[0117] FrsA[mt] 돌연변이 단백질 발현하는 다양한 유전자 컨스트럭트를 가지는 플라스미드(pXMJ-*pdh/adh*, pXMJ-*frsA[mt]/adh*, pXMJ-*frsA[mt]/crr/adh*)를 구축하여 코리네박테리움 글루타미쿰에 도입하고, 실시예 3-2에서와 같은 방법으로 각 플라스미드가 도입된 균주 별 시간의 경과에 따른 에탄올 생산량을 살펴보았다.

[0118] 도 8d를 참고하면, FrsA[mt]/IIA^{Glc}의 과발현(pXMJ-*frsA[mt]/crr/adh*)에 의한 에탄올 생산량은 대조군 대비 985% (108h 기준 949%) 증가한 양이며, 또한 야생형 FrsA/IIA^{Glc}의 과발현시(미도시)의 211% (108h 기준 191%)

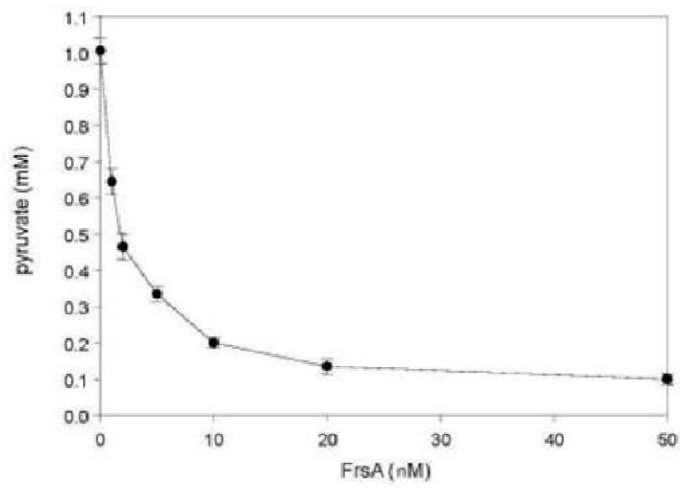
증가한 양이다. PDC 과발현시(pXMJ-*pdh/adh*)와 비교해서는 169% (108h 기준 89.79%) 증가하였다.

- [0119] 따라서, FrsA를 이용하여 에탄올을 생산할 경우 코리네박테리움 글루타미쿰을 숙주세포로 유용하게 이용할 수 있다. 또한, FrsA[mt] 돌연변이 단백질은 야생형 FrsA보다 세포내 안정성이 우수하여 균주에서 에탄올 생산에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0120] <참조문헌>
- [0121] 1. LIN, Y. & S. TANAKA. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 62742 (2006).
- [0122] 2. DIEN, B.S., M.A.COTTA & T.W. JEFFRIES. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 25866 (2003).
- [0123] 3. Wright, A. C., Simpson, L. M., Oliver, J. D. & Morris, J. G., Jr. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 58, 1769-73 (1990).
- [0124] 4. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).
- [0125] 5. Anand, Rishi D. et al. Restriction digestion monitors facilitate plasmid construction and PCR cloning. *BioTechniques* 36:982-985 (2004).
- [0126] 6. Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria*. *Nat Biotechnol* 1, 784-791 (1983).
- [0127] 7. Park, K.J. et al. Isolation and characterization of *rpoS* from a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*: role of S in survival of exponential-phase cells under oxidative stress. *J Bacteriol* 186, 3304-12 (2004).
- [0128] 8. Ullrich, J. Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid acrbboxylase, EC 4.1.1.1) assay of thiamine pyrophosphate. *Methods Enzymol.* 18, 109-115 (1970).
- [0129] 9. Koo, B.M. et al. A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIA^{Glc} in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279, 31613-21 (2004).
- [0130] 10. Gu, W., Bousfield, D.W. & Tripp, C.P. Formation of calcium carbonate particles by direct contact of Ca(OH)₂ powders with supercritical CO₂. *J Mater Chem* 16, 3312-3317 (2006).
- [0131] 11. Hinman, L.M. & Blass, J.P. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. *J Biol Chem* 256, 6583-6 (1981).
- [0132] 12. Stephenson, M.P. & Dawes, E.A. Pyruvic acid and formic acid metabolism in *Sarcina ventriculi* and the role of ferredoxin. *J Gen Microbiol* 69, 331-43 (1971).
- [0133] 13. Erecinska, M. & Silver, I.A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-76 (2001).

도면

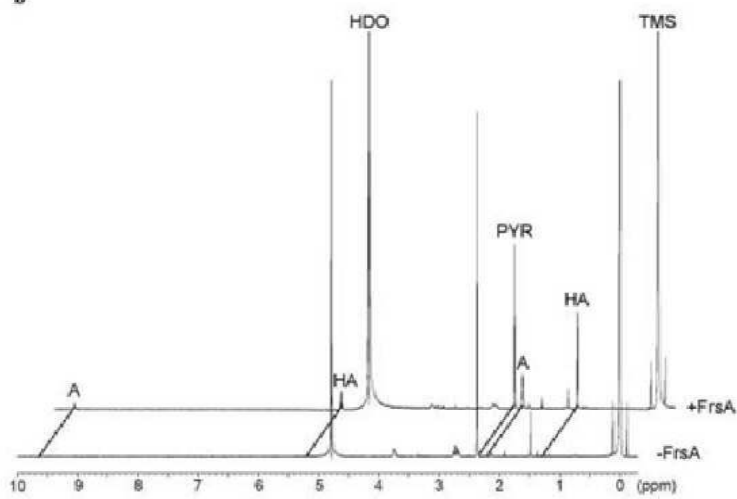
도면1a

a



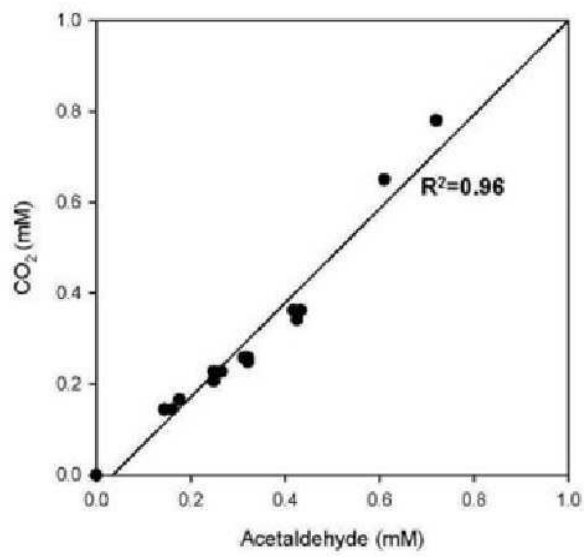
도면1b

b



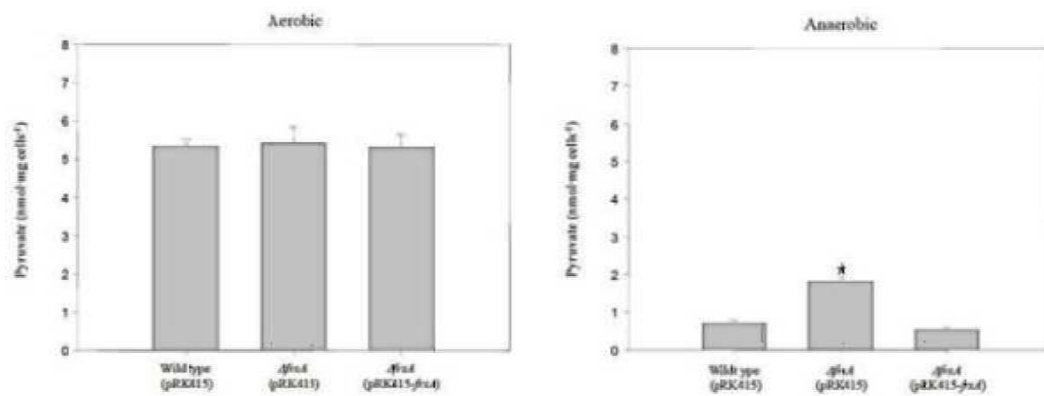
도면1c

c



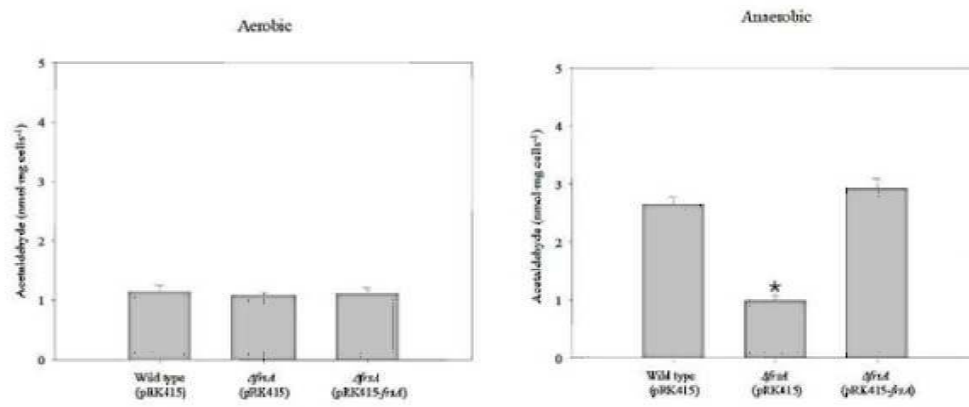
도면1d

d

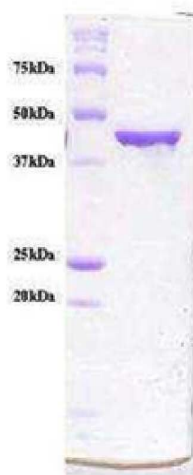


도면1e

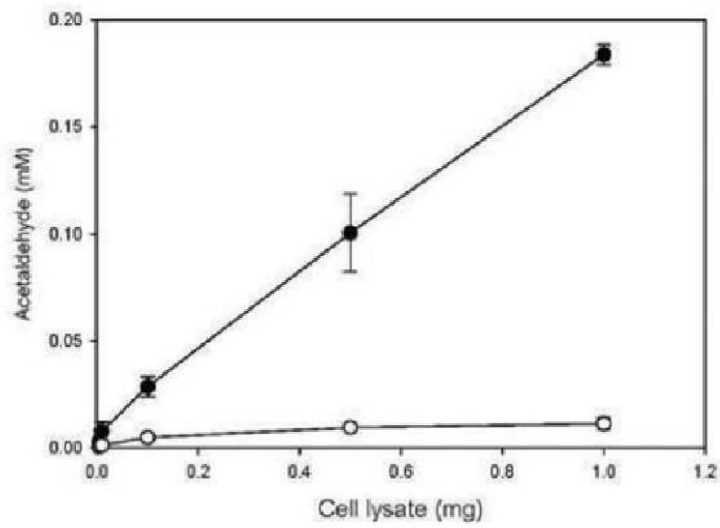
e



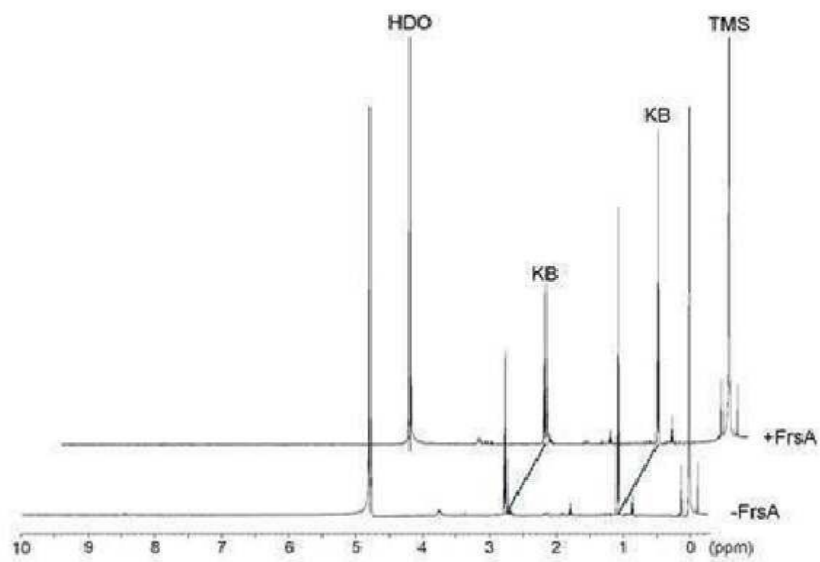
도면2



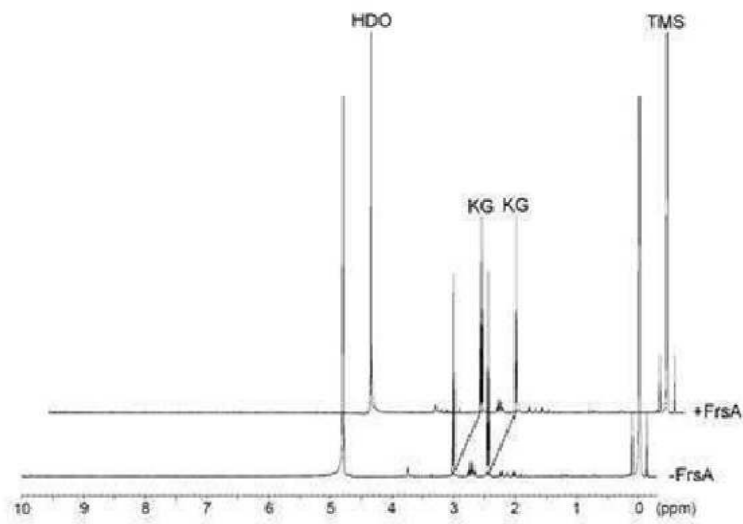
도면3



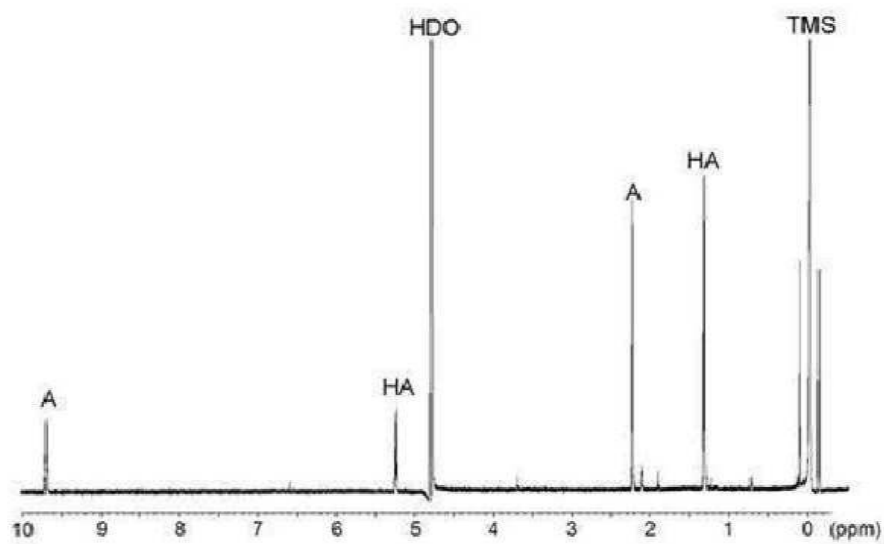
도면4a



도면4b



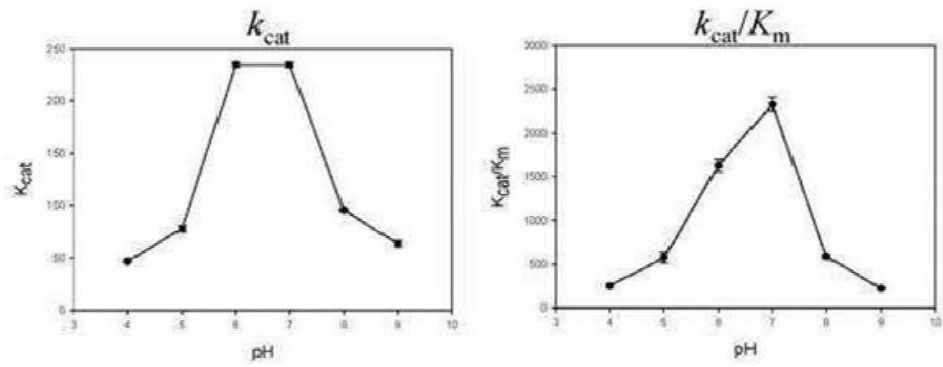
도면4c



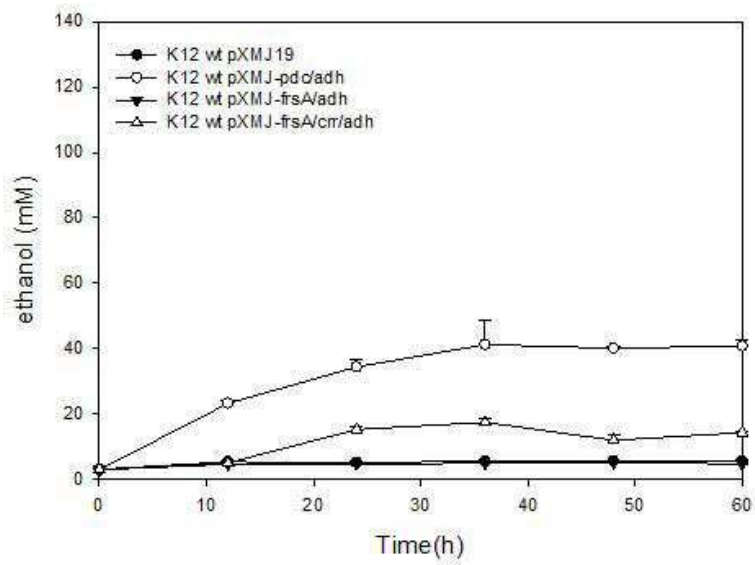
도면5

		10 53
V. v	---MSRKYVKNLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
V. p	---MSRKYVKNLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
V. c	---MSRKYVKNLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
S. c	-----HTQANLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
S. f	-----HTQANLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
S. s	-----HTQANLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
S. p	-----HTQANLSEKTLFQNRKQAKETTSALQVKNPTQ--SLGRIKIRKGEFVDELRLLQAWQGVDP	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	100	
V. v	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
V. p	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
V. c	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
S. u	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
S. f	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
S. s	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
S. p	ISQEQVLAIAISSEKSTDEQWLDVYVYHPRWATYMTALQNHQNEHSETHETAEALTSASLCT	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	150	
V. v	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
V. p	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
V. c	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
S. c	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
S. f	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
S. s	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
S. p	SIAGVPHLKHNLACQAVLAKAYLEAKKRYIIEQLTEPKG-KITAKHLT-NTQKNSHVVIVS	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	200 202	250
V. v	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
V. p	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
V. c	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
S. c	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
S. f	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
S. s	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
S. p	AGLSEKQTMKLESLKLAHNDIAKUTVMDVQVSSVLTSDVSRIGQAVNELPSIIVVSSSVGL	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	272 300	
V. v	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
V. p	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
V. c	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
S. c	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
S. f	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
S. s	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
S. p	IGTRGQANVAYLAFLEKQKIKACVILQAPTHDIFASQELQKPKHYLEVLAHMGVVDIYSLQY	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	350 400	
V. v	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
V. p	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
V. c	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
S. c	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
S. f	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
S. s	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
S. p	MAKELKVGGLSEKTKVPLAMSLQGVSPYSINQVAFSTTKRKKISSNTITQTEGLDLAKKLESLR	
	**** * 2 2 *** * 2 2 * 2 2 * 2 2 * 2 2 *	
	NCBI accession number	
V. vulnificus	AA099937	
V. parahaemolyticus	EF026131	
V. cholerae	AF_231907	
E. coli	AF_070932	
S. flexneri	AF_736233	
S. enterica	AF_031571632	
V. parahaemolyticus	AA099937	

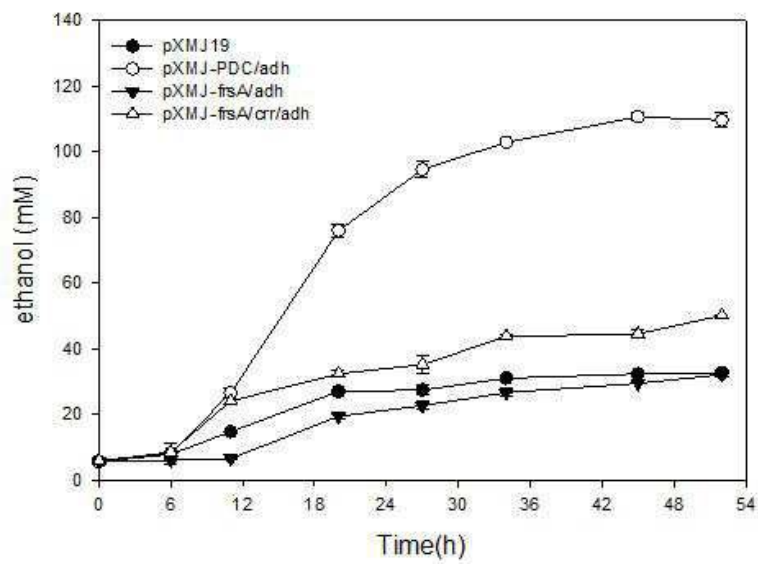
도면6



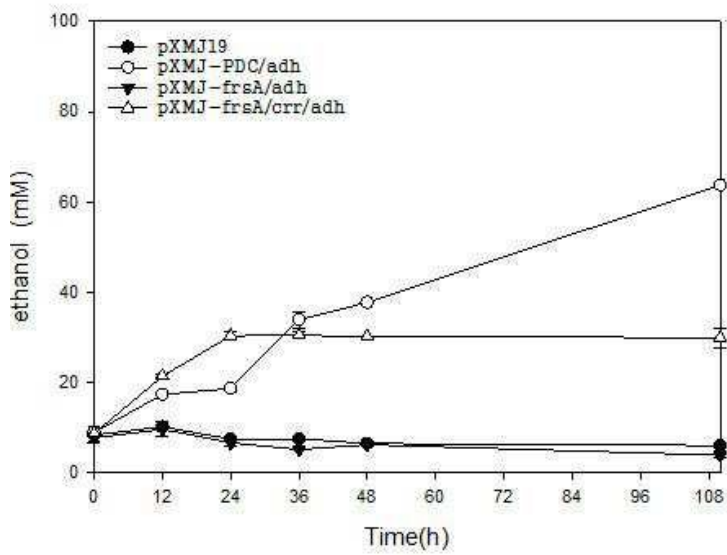
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

Wt-FrsA	MSEVSKNLSETLFVKHKQAI ETSALTQVMPTSQSLDEI KEKNQFSWYRNLRRLQNVNQ
FrsA _{mt}	-----MAI ETSALTQVMPTSQSLDEI KEKNQFSWYRNLRRLQNVNQ

Wt-FrsA	GVDPISQEQVLARI ASSKHSRTDEQNLOTVMGVHSGNNAVENTRLGMEHQKRAGEMTNEA
FrsA _{mt}	GVDPISQEQVLARI ASSKHSRTDEQNLOTVMGVHSGNNAVENTRLGMEHQKRAGEMTNEA

Wt-FrsA	ASSALFSASLCYSIAGYPHLKSDNLAIQAQVLANSAYLEAAKSKYIIKQLEIPFEKGKI
FrsA _{mt}	ASSALFSASLAYSIAGYPHLKSDNLAIQAQVLANSAYLEAAKSKYIIKQLEIPFEKGKI

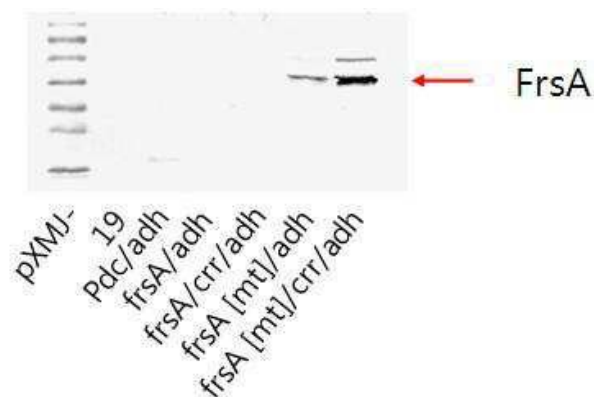
Wt-FrsA	TAHLHLTNTDKPHPVVIVSAGLDSLQTMNRLFRDHLAKHDIAMLTVDMPSTGVYSSKYPL
FrsA _{mt}	TAHLHLTNTDKPHPVVIVSAGLDSLQTMNRLFRDHLAKHDIAMLTVDMPSTGVYSSKYPL

Wt-FrsA	TEDVSRHLHQAVLNELFSI PVVDHHRVGLI GFRFGGNAMVRLSFLEQERI KACVILGAPIH
FrsA _{mt}	TEDVSRHLHQAVLNELFSI PVVDHHRVGLI GFRFGGNAMVRLSFLEQERI KACVILGAPIH

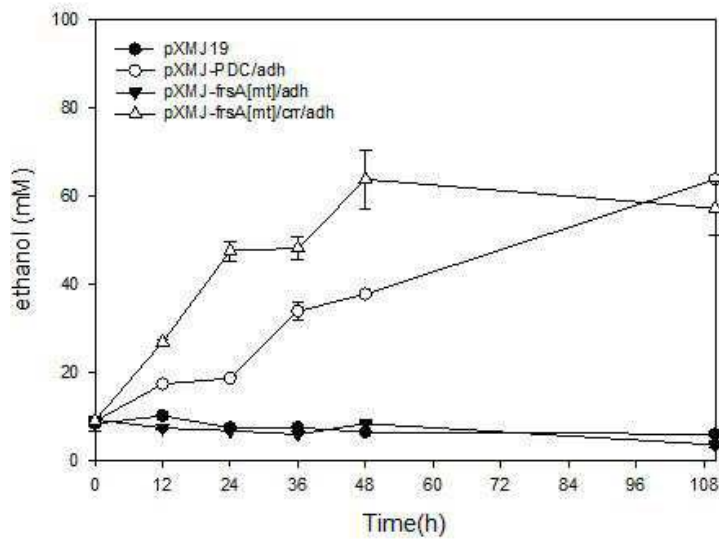
Wt-FrsA	DIFASPKLQMPKMYLDVLASRLGKSVVDIVSLGQMAANSLKVQGFLSSRKTKEPILA
FrsA _{mt}	DIFASPKLQMPKMYLDVLASRLGKSVVDIVSLGQMAANSLKVQGFLSSRKTKEPILA

Wt-FrsA	MSLEGDPVSPVSDNQMVAFSTVGKAKKI SSKTITQGVESLQDLAI KMLEDELLR
FrsA _{mt}	MSLEGDPVSPVSDNQMVAFSTVGKAKKI SSKTITQGVESLQDLAI KMLEDELLR

도면8c



도면8d



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
Korea Institute of Ocean Science & Technology
- <120> Strains expressing FrsA protein and methods of producing ethanol
using the same
- <130> DP201210011P
- <150> 10-2012-0120128
- <151> 2012-10-29
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1248
- <212> DNA
- <213> Vibrio vulnificus
- <220><221> misc_feature
- <222> (1)..(1248)
- <223> FrsA wild type gene
- <400> 1

atgtcagaag aagtcagcaa aaacctgtca gaaacgtat ttgtcaaaca taagcaagcc

60

aaagaaacct cggcattgac tcaatacatg ccgaccagcc aatccttact tgatgaaatt 120
aaagagaaga atgggttttc ttggtatcgc aaccttcgtc gcttgcaatg ggtgtggcaa 180
ggtgtcgatc ctattgagca agaacaagta ttggctcgta ttgcctcttc caaacattca 240
cgcactgatg agcaatggct cgatacggtg atgggatatc acagtggtaa ctgggcttat 300
gaatggacga ggctcggat ggagcatcaa aaacgtgccg gtgagatgac gaatgaagca 360
gcatcggag cgctcttctc cgcaccttg tgttacagca tcgcaggta cccacacctc 420
aagagcgata atttggccat tcaagcccag gtattggcca acagcgctta tcttgaagcc 480

gcgaaaaaaa gcaatacat catcaagcag ctcgagatcc catttgagaa agggaagatc 540
accgcgcatt tgcatctgac caatacggac aaaccgcac ctgtggttat tgtgagtgcg 600
ggattagaca gcttgcaaac agacatgtgg cgtctatttc gagatcacct tgccaagcac 660
gatattgcca tgttgacagt agacatgcca tcggtggggc acagctcaaa ataccatta 720
acggaggatt acagtgcct tcaccaagcg gtgttgaacg agcttttctc tattccttat 780
gtcgatcac atcgagtggg ttgatcggc ttctgttttg gcggtaacgc catggtgagg 840
ctctcgtttc ttgagcaaga aaagatcaaa gcgtgcgtca tcttaggcgc acctattcat 900

gatatttttg cctccccaca gaaattgcag caaatgccga agatgtatct cgatgtctta 960
gcctcgcgtt taggtaagag tgtggtagat atttacagct tatcggggca aatggccgcg 1020
tggtcactga aagtacaagg ctttttgagc agtcgtaaaa ccaagggtgcc tatcttggcg 1080
atgagcttag aaggggatcc ggtctcgcca tattcggata atcagatggt tgcttttttt 1140
agcacttatg gaaaagcgaa gaaaatcagt tccaaaacaa ttacacaagg atatgagcaa 1200
tcctcgatt tagcgataaa gtggctggaa gatgaactct taaggtga 1248

<210> 2
<211> 415
<212> PRT

<213> Vibro vulnificus
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(415)
<223> FrsA wild type protein
<400> 2

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

Ser Gln Ser Leu Leu Asp Glu Ile Lys Glu Lys Asn Gly Phe Ser Trp
35 40 45

Tyr Arg Asn Leu Arg Arg Leu Gln Trp Val Trp Gln Gly Val Asp Pro

50 55 60

Ile Glu Gln Glu Gln Val Leu Ala Arg Ile Ala Ser Ser Lys His Ser
65 70 75 80

Arg Thr Asp Glu Gln Trp Leu Asp Thr Val Met Gly Tyr His Ser Gly
85 90 95

Asn Trp Ala Tyr Glu Trp Thr Arg Leu Gly Met Glu His Gln Lys Arg
100 105 110

Ala Gly Glu Met Thr Asn Glu Ala Ala Ser Glu Ala Leu Phe Ser Ala
115 120 125

Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Ala Gly Tyr Pro His Leu Lys Ser Asp Asn
130 135 140

Leu Ala Ile Gln Ala Gln Val Leu Ala Asn Ser Ala Tyr Leu Glu Ala
145 150 155 160

Ala Lys Lys Ser Lys Tyr Ile Ile Lys Gln Leu Glu Ile Pro Phe Glu
165 170 175

Lys Gly Lys Ile Thr Ala His Leu His Leu Thr Asn Thr Asp Lys Pro
180 185 190

His Pro Val Val Ile Val Ser Ala Gly Leu Asp Ser Leu Gln Thr Asp

195 200 205

Met Trp Arg Leu Phe Arg Asp His Leu Ala Lys His Asp Ile Ala Met
210 215 220

Leu Thr Val Asp Met Pro Ser Val Gly Tyr Ser Ser Lys Tyr Pro Leu
225 230 235 240

Thr Glu Asp Tyr Ser Arg Leu His Gln Ala Val Leu Asn Glu Leu Phe
245 250 255

Ser Ile Pro Tyr Val Asp His His Arg Val Gly Leu Ile Gly Phe Arg
260 265 270

Phe Gly Gly Asn Ala Met Val Arg Leu Ser Phe Leu Glu Gln Glu Arg

275 280 285
 Ile Lys Ala Cys Val Ile Leu Gly Ala Pro Ile His Asp Ile Phe Ala
 290 295 300
 Ser Pro Gln Lys Leu Gln Gln Met Pro Lys Met Tyr Leu Asp Val Leu
 305 310 315 320
 Ala Ser Arg Leu Gly Lys Ser Val Val Asp Ile Tyr Ser Leu Ser Gly
 325 330 335
 Gln Met Ala Ala Trp Ser Leu Lys Val Gln Gly Phe Leu Ser Ser Arg

340 345 350
 Lys Thr Lys Val Pro Ile Leu Ala Met Ser Leu Glu Gly Asp Pro Val
 355 360 365
 Ser Pro Tyr Ser Asp Asn Gln Met Val Ala Phe Phe Ser Thr Tyr Gly
 370 375 380
 Lys Ala Lys Lys Ile Ser Ser Lys Thr Ile Thr Gln Gly Tyr Glu Gln
 385 390 395 400
 Ser Leu Asp Leu Ala Ile Lys Trp Leu Glu Asp Glu Leu Leu Arg
 405 410 415

<210> 3
 <211> 510
 <212> DNA
 <213> Vibrio vulnificus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(510)
 <223> IIAGlc gene
 <400> 3

atgggtctgt ttgacaaact taagaagcct gtatctgatg acagcgctag cgccggtgca 60
 atcgaaatta tcgcaccttt gtctggtag atcgtgaaca tcgaagatgt gccagatgtt 120
 gtttttctg agaagatcgt tggtagcgt attgctatca aaccaacagg caacaaaatg 180
 gtagctcctg taaacggtag tatcggtgaa atctttgaaa ctaaccacgc attctctatc 240
 gtagctgacg atgggtgtga actgtttgtt cacttcggtg tcgacacagt tgaactaaaa 300
 ggcaaggct tcaactcgtat cgctgaagaa ggtcaaacgt ttaaagctgg cgacactgta 360
 attgaattcg atcttgctct tcttgaagag aaagcgaagt caacactaac tccagtgtt 420

atctctaaca tggacgaaat caaagagctg aataagcttt ctggttctgt tgttgttggt 480
gaaacaccag ttctacgcgt aactaagtaa 510

<210> 4

<211> 169

<212> PRT

<213> Vibrio vulnificus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(169)

<223> IIAGlc

<400> 4

Met Gly Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Leu Val Ser Asp Asp Ser Ala

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

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

145	150	155	160
Glu	Thr	Pro	Val
Leu	Arg	Val	Thr
Lys			
165			

<210> 5

<211> 1248

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene encoding FrsA with substitution at 131 from Cystein to Alanine

<220><221> misc_feature

<222> (391)..(393)

<223> Cys to Ala substitution

<400> 5

atgtcagaag aagtcagcaa aaacctgtca gaaacgtat ttgtcaaaca taagcaagcc 60

aaagaaacct cggcattgac tcaatacatg ccgaccagcc aatccttact tgatgaaatt 120

aaagagaaga atggtttttc ttggtatcgc aaccttcgtc gcttgcaatg ggtgtggcaa 180

ggtgtcgatc ctattgagca agaacaagta ttggctcgta ttgcctcttc caaacattca 240

cgcaactgatg agcaatggct cgatacggtg atgggatatc acagtggtaa ctgggcttat 300

gaatggacga ggctcgggat ggagcatcaa aaacgtgccg gtgagatgac gaatgaagca 360

gcatcggaag cgctcttctc cgcatccttg gcgtacagca tcgcaggtta cccacacctc 420

aagagcgata atttggccat tcaagcccag gtattggcca acagcgctta tcttgaagcc 480

gcgaaaaaaaa gcaatacat catcaagcag ctcgagatcc catttgagaa agggaagatc 540

accgcgcatt tgcatctgac caatacggac aaaccgcac ctgtggttat tgtgagtgcg 600

ggattagaca gcttgcaaac agacatgtgg cgtctatttc gagatcacct tgccaagcac 660

gatattgcca tgttgacagt agacatgcca tcgggtgggt acagctcaaa ataccatta 720

acggaggatt acagtgcct tcaccaagcg gtgttgaacg agcttttctc tattccttat 780

gtcgatcatc atcgagtggg ttgtatcggc ttctgttttg gcggtaacgc catggtgagg 840

ctctcgtttc ttgagcaaga aaagatcaaa gcgtgcgtca tcttaggcgc acctattcat 900

gatatttttg cctccccaca gaaattgcag caaatgccga agatgtatct cgatgtctta 960

gcctcgcgtt taggtaagag tgtggtagat atttacagct tatcggggca aatggccgcg 1020

tggtcactga aagtacaagg ctttttgagc agtcgtaaaa ccaagggtcc tatcttgccg 1080

atgagcttag aaggggatcc ggtctcgcca tattcggata atcagatggt tgcttttttt 1140

agcacttatg gaaaagcgaa gaaaatcagt tccaaaacaa ttacacaagg atatgagcaa 1200

tccctcgatt tagcgataaa gtggctggaa gatgaactct taaggtga 1248

<210> 6

<211> 415
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FrsA with substitution at 131 from Cystein to Alanine

<220><221> VARIANT

<222> (131)
 <223> Cys to Ala substitution
 <400> 6

Met Ser Glu Glu Val Ser Lys Asn Leu Ser Glu Thr Leu Phe Val Lys
 1 5 10 15

His Lys Gln Ala Ile Glu Thr Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Met Pro Thr
 20 25 30

Ser Gln Ser Leu Leu Asp Glu Ile Lys Glu Lys Asn Gly Phe Ser Trp
 35 40 45

Tyr Arg Asn Leu Arg Arg Leu Gln Trp Val Trp Gln Gly Val Asp Pro

50 55 60
 Ile Glu Gln Glu Gln Val Leu Ala Arg Ile Ala Ser Ser Lys His Ser
 65 70 75 80

Arg Thr Asp Glu Gln Trp Leu Asp Thr Val Met Gly Tyr His Ser Gly
 85 90 95

Asn Trp Ala Tyr Glu Trp Thr Arg Leu Gly Met Glu His Gln Lys Arg
 100 105 110

Ala Gly Glu Met Thr Asn Glu Ala Ala Ser Glu Ala Leu Phe Ser Ala
 115 120 125

Ser Leu Ala Tyr Ser Ile Ala Gly Tyr Pro His Leu Lys Ser Asp Asn
 130 135 140

Leu Ala Ile Gln Ala Gln Val Leu Ala Asn Ser Ala Tyr Leu Glu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys Lys Ser Lys Tyr Ile Ile Lys Gln Leu Glu Ile Pro Phe Glu
 165 170 175

Lys Gly Lys Ile Thr Ala His Leu His Leu Thr Asn Thr Asp Lys Pro
 180 185 190

His Pro Val Val Ile Val Ser Ala Gly Leu Asp Ser Leu Gln Thr Asp

195 200 205
Met Trp Arg Leu Phe Arg Asp His Leu Ala Lys His Asp Ile Ala Met
210 215 220
Leu Thr Val Asp Met Pro Ser Val Gly Tyr Ser Ser Lys Tyr Pro Leu
225 230 235 240
Thr Glu Asp Tyr Ser Arg Leu His Gln Ala Val Leu Asn Glu Leu Phe
245 250 255
Ser Ile Pro Tyr Val Asp His His Arg Val Gly Leu Ile Gly Phe Arg
260 265 270

Phe Gly Gly Asn Ala Met Val Arg Leu Ser Phe Leu Glu Gln Glu Arg
275 280 285
Ile Lys Ala Cys Val Ile Leu Gly Ala Pro Ile His Asp Ile Phe Ala
290 295 300
Ser Pro Gln Lys Leu Gln Gln Met Pro Lys Met Tyr Leu Asp Val Leu
305 310 315 320
Ala Ser Arg Leu Gly Lys Ser Val Val Asp Ile Tyr Ser Leu Ser Gly
325 330 335
Gln Met Ala Ala Trp Ser Leu Lys Val Gln Gly Phe Leu Ser Ser Arg

340 345 350
Lys Thr Lys Val Pro Ile Leu Ala Met Ser Leu Glu Gly Asp Pro Val
355 360 365
Ser Pro Tyr Ser Asp Asn Gln Met Val Ala Phe Phe Ser Thr Tyr Gly
370 375 380
Lys Ala Lys Lys Ile Ser Ser Lys Thr Ile Thr Gln Gly Tyr Glu Gln
385 390 395 400
Ser Leu Asp Leu Ala Ile Lys Trp Leu Glu Asp Glu Leu Leu Arg
405 410 415

<210> 7
<211> 1194
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> frsA mutant gene with deletion from 2-19 aa and substitution at
131 aa (Cystein to Alanine) compred to wild type gene

<400> 7

atggccatag aaacctcggc attgactcaa tacatgccga ccagccaatc cttacttgat	60
gaaattaaag agaagaatgg tttttcttgg tatcgcaacc ttcgtcgctt gcaatgggtg	120
tggcaaggtg tcgatactat tgagcaagaa caagtattgg ctctgtattgc ctcttccaaa	180
cattcacgca ctgatgagca atggctcgat acggtgatgg gatacacag tggtaactgg	240
gcttatgaat ggacgaggct cggtatggag catcaaaaac gtgccggtga gatgacgaat	300
gaagcagcat cggaagcgtt cttctccgca tccttggctt acagcatcgc aggttaccca	360
cacctcaaga gcgataattt ggccattcaa gccaggtat tggccaacag cgcttatctt	420
gaagccgca aaaaaagcaa atacatcatc aagcagctcg agatcccatt tgagaaaggg	480
aagatcacgc cgcatttgca tctgaccaat acggacaaac cgcacacctg ggttattgtg	540
agtgcgggat tagacagctt gcaaacagac atgtggcgtc tatttcgaga tcaccttgcc	600
aagcacgata ttgcatgtt gacagtagac atgccatcgg tggggtacag ctcaaaatac	660
ccattaacgg aggattacag tcgccttcac caagcgtgtg tgaacgagct tttctctatt	720
ccttatgtcg atcatcatcg agtgggtttg atcggtttc gttttggcgg taacgccatg	780
gtgaggtctt cgtttcttga gcaagaaagg atcaaagcgt gcgtcatctt aggcgcacct	840
attcatgata tttttgcctc cccacagaaa ttgcagcaaa tgccgaagat gtatctcgat	900
gtcttagcct cgcgtttagg taagagtgtg gtagatatct acagcttatc ggggcaaatg	960
gccgcgtggt cactgaaagt acaaggcttt ttgagcagtc gtaaaaccaa ggtgcctatc	1020
ttggcgatga gcttagaagg ggatccggtc tcgcatatt cggataatca gatggttgct	1080
ttttttagca cttatggaaa agcgaagaaa atcagttcca aaacaattac acaaggatat	1140
gagcaatccc tcgatttagc gataaagtgg ctggaagatg aactcttaag gtga	1194

<210> 8

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FrsA with substitution at 131 from Cystein to Alanine and
deletion from 2-18 compared to wild type

<400> 8

Met Ala Ile Glu Thr Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Met Pro Thr Ser Gln

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Asp Glu Ile Lys Glu Lys Asn Gly Phe Ser Trp Tyr Arg

 20 25 30
 Asn Leu Arg Arg Leu Gln Trp Val Trp Gln Gly Val Asp Pro Ile Glu
 35 40 45
 Gln Glu Gln Val Leu Ala Arg Ile Ala Ser Ser Lys His Ser Arg Thr
 50 55 60
 Asp Glu Gln Trp Leu Asp Thr Val Met Gly Tyr His Ser Gly Asn Trp
 65 70 75 80
 Ala Tyr Glu Trp Thr Arg Leu Gly Met Glu His Gln Lys Arg Ala Gly
 85 90 95

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

 165 170 175
 Val Val Ile Val Ser Ala Gly Leu Asp Ser Leu Gln Thr Asp Met Trp
 180 185 190
 Arg Leu Phe Arg Asp His Leu Ala Lys His Asp Ile Ala Met Leu Thr
 195 200 205
 Val Asp Met Pro Ser Val Gly Tyr Ser Ser Lys Tyr Pro Leu Thr Glu
 210 215 220
 Asp Tyr Ser Arg Leu His Gln Ala Val Leu Asn Glu Leu Phe Ser Ile
 225 230 235 240

 Pro Tyr Val Asp His His Arg Val Gly Leu Ile Gly Phe Arg Phe Gly
 245 250 255

Gly Asn Ala Met Val Arg Leu Ser Phe Leu Glu Gln Glu Arg Ile Lys
 260 265 270
 Ala Cys Val Ile Leu Gly Ala Pro Ile His Asp Ile Phe Ala Ser Pro
 275 280 285
 Gln Lys Leu Gln Gln Met Pro Lys Met Tyr Leu Asp Val Leu Ala Ser
 290 295 300
 Arg Leu Gly Lys Ser Val Val Asp Ile Tyr Ser Leu Ser Gly Gln Met

 305 310 315 320
 Ala Ala Trp Ser Leu Lys Val Gln Gly Phe Leu Ser Ser Arg Lys Thr
 325 330 335
 Lys Val Pro Ile Leu Ala Met Ser Leu Glu Gly Asp Pro Val Ser Pro
 340 345 350
 Tyr Ser Asp Asn Gln Met Val Ala Phe Phe Ser Thr Tyr Gly Lys Ala
 355 360 365
 Lys Lys Ile Ser Ser Lys Thr Ile Thr Gln Gly Tyr Glu Gln Ser Leu
 370 375 380

 Asp Leu Ala Ile Lys Trp Leu Glu Asp Glu Leu Leu Arg
 385 390 395