



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월24일

(11) 등록번호 10-2677413

(24) 등록일자 2024년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/16 (2006.01) C12P 7/64 (2022.01)(52) CPC특허분류
C12N 9/16 (2013.01)
C12P 7/6409 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2019-7032078

(22) 출원일자(국제) 2018년04월03일

심사청구일자 2021년03월22일

(85) 번역문제출일자 2019년10월29일

(65) 공개번호 10-2019-0141683

(43) 공개일자 2019년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/025970

(87) 국제공개번호 WO 2018/187389

국제공개일자 2018년10월11일

(30) 우선권주장

62/481,078 2017년04월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150113973 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

게노마티카 인코포레이티드

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 넥서스 센터
드라이브 4757

(72) 발명자

바우티스타, 안젤리카, 자발라

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

박, 민, 선

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 23 항

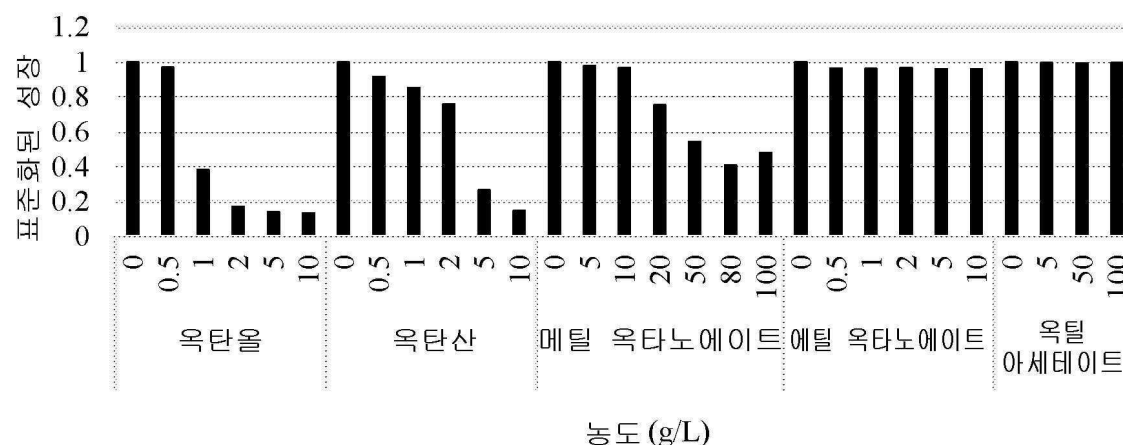
심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제 변이체

(57) 요약

본 개시내용은 예를 들어, 8개 탄소 및 10개 탄소 지방산 및 지방산 유도체를 포함하는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성을 갖는 조작된 식물 아실-ACP 티오에스테라제에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성을 갖는 조작된 식물 아실-ACP 티오에스테라제를 포함하는 재조합 숙주 세포에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 중쇄 지방산 및 유도체의 독성을 감소시키고 이의 생산을 개선시키기 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 7/6436 (2022.01)

C12Y 301/02014 (2013.01)

(72) 발명자

라모스-솔리스, 알마, 잇젤

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

토레스 다 코스타, 베르나도, 모우라

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

베로우지안, 베나즈

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

트럼버, 도날드, 이.

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

포포바, 에마누엘라

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

후, 치준

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

데 카르다이레, 스테판, 브렐리

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
600 게이트웨이 블러바드

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체로서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체가 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고, 하나 이상의 3, 4, 6, 14, 15, 17, 22, 23, 37, 44, 45, 50, 54, 56, 64, 67, 110, 111, 114, 129, 132, 137, 158, 162, 165, 176, 178, 179, 185, 186, 196, 197, 198, 203, 210, 213, 217, 225, 227, 236, 240, 244, 245, 248, 254, 256, 258, 266, 278, 282, 292, 293, 294, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 316, 321, 325, 322 및 328 위치에 상응하는 아미노산 위치에서 적어도 하나의 치환 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체가 C8 지방산 유도체, C10 지방산 유도체, 또는 C8 및 C10 지방산 유도체 둘 모두의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 적어도 하나의 치환 돌연변이는 P3K, D4H, D4M, D4R, S6R, T14G, T14R, V15L, V15W, V17A, V17C, P22R, D23H, D23R, D37H, D37R, D37P, T44G, T44I, V45S, V50W, S54R, S56C, S56K, T64P, T64R, T67L, H76L, L91M, D93H, D93R, C102I, V110L, I111T, Q114K, I129V, R132W, G137C, R158Q, A162E, M165T, L176V, Y178P, E179H, E179R, V185A, P186G, D196V, S197N, D198W, K203R, D210H, D210R, Q213H, Q213R, T217R, V225L, Q227G, G236T, E240H, E240R, E240V, T244M, T244R, E245H, E245R, E248H, S254G, A256C, A256R, E258T, E258V, D266H, D266R, S278K, S278V, S278T, V282S, L292F, E293H, E293R, D294H, A297D, A297T, A297V, I298C, I298V, V299L, N300K, N300L, N300W, G301C, A302T, I316R, I316T, T321R, S322K, N325K, 또는 S328K을 더 포함하는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 또는 서열번호 59에 상응하는 아미노산 서열을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1을 갖는 티오에스테라제와 비교하여 전체적으로 증가된 순 양 전하(net positive charge)를 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 4를 갖는 변이체 티오에스테라제와 비교하여 전체적으로 증가된 순 양전하를 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 또는 서열번호 46에 상응하는 아미노산 서열을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 8

청구항 4에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 15와 비교하여 증가된 양성 표면 전하(positive surface charge)를 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 또는 서열번호 51에 상응하는 아미노산 서열을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 10

청구항 4에 있어서,

- (a) 상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49와 비교하여 개선된 용해도를 갖거나;
- (b) 상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49의 아미노산 2와 40 사이에 절단 돌연변이를 갖거나; 또는
- (c) 상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 또는 서열번호 59에 상응하는 아미노산 서열을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 것인, 조작된 티오에스테라제 변이체.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에서 정의된 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 재조합 숙주 세포는 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 생화학적 경로를 암호화하는 하나 이상의 이중성 유전자를 포함하는, 재조합 숙주 세포.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 제2 지방산 유도체가 상기 제1 지방산 유도체보다 높은 최소 억제 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 가지며, 상기 제2 지방산 유도체의 존재가 상기 제1 지방산 유도체의 MIC를 증가시키는, 재조합 숙주 세포.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

(i) 상기 생화학적 경로가

- a. 카복실산 리덕타제,
- b. 카복실산 리덕타제 및 알코올 데하이드로게나제,
- c. 카복실산 리덕타제 및 알코올-O-아세틸 트랜스퍼라제,
- d. 카복실산 리덕타제, 및 알코올 데하이드로게나제, 및 알코올-O-아세틸 트랜스퍼라제,
- e. 에스테르 신타제,
- f. 에스테르 신타제 및 지방 아실 CoA 신타제,
- g. 아실 CoA 리덕타제,
- h. 아실 CoA 리덕타제 및 아실 CoA 신테타제,
- i. 아실 CoA 리덕타제 및 알코올 O-아세틸 트랜스퍼라제,
- j. 아실 CoA 리덕타제, 알코올 O-아세틸 트랜스퍼라제, 및 아실 CoA 신테타제,
- k. O-메틸 트랜스퍼라제,
- l. 아실 ACP 리덕타제,
- m. 아실 ACP 리덕타제 및 알데하이드 데카보닐라제,
- n. 아실 ACP 리덕타제 및 알데하이드 산화성 데포밀라제,
- o. 아실 ACP 리덕타제 및 알코올 O-아세틸 트랜스퍼라제,
- p. 아실 ACP 리덕타제, 알코올-O-아세틸 트랜스퍼라제, 및 알코올 데하이드로게나제,
- q. OleA 단백질,
- r. OleA, C, 및 D 단백질,
- s. OleA 단백질 및 지방 아실 CoA 신테타제, 또는
- t. OleA, C, 및 D 단백질 및 지방 아실 CoA 신테타제 중 하나를 포함하고,

(ii) 상기 제1 지방산 유도체가 지방산이고, 상기 제2 지방산 유도체가 지방산 알킬 에스테르이며, 상기 생화학적 경로가 에스테르 신타제 및 지방 아실-CoA 신테타제를 포함하거나,

(iii) 상기 제1 지방산 유도체가 지방산이고 상기 제2 지방산 유도체가 지방산 메틸 에스테르 또는 지방산 에틸 에스테르로부터 선택되는 지방산 알킬 에스테르이거나, 또는

(iv) 상기 제1 지방산 유도체가 지방 알코올이고, 상기 제2 지방산 유도체가 지방 알코올 아세테이트이며, 상기 생화학적 경로가 카복실산 리덕타제 및 알코올-O-아세틸 트랜스퍼라제를 포함하는, 재조합 숙주 세포.

청구항 16

상업적 역가로 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위한 방법으로서, 상기 방법이:

중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 적합한 조건하에서 탄소원의 존재하에 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에서 정의된 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 재조합 숙주 세포가 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 생화학적 경로를 암호화하는 하나 이상의 이중성 유전자를 포함하는, 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 제2 지방산 유도체가 상기 제1 지방산 유도체보다 높은 최소 억제 농도(MIC)를 가지며, 상기 제2 지방산 유도체의 존재가 상기 제1 지방산 유도체의 MIC를 증가시키는, 방법.

청구항 19

청구항 16에 있어서,

배양물로부터 중쇄 지방산 유도체를 회수하거나 재조합 숙주 세포로부터 중쇄 지방산 유도체를 분리하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 20

청구항 17에 있어서,

상기 생화학적 경로는 에스테르 신타제 및 지방 아실 CoA 신테타제를 포함하고, 상기 중쇄 지방산 유도체는 중쇄 지방산 에스테르를 포함하는, 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 중쇄 지방산 에스테르는 중쇄 지방산 메틸 에스테르 및/또는 중쇄 지방산 에틸 에스테르인, 방법.

청구항 22

적어도 3.6의 C10 지방산 유도체에 대한 C8 지방산 유도체의 비율(C8/C10)을 갖는 청구항 16의 방법에 의해 생산된 중쇄 지방산 유도체의 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 C10 지방산 유도체에 대한 C8 지방산 유도체의 비율이 7.7인, 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 2017년 4월 3일자로 출원된 미국 가특허 출원 USSN 62/481,078의 우선권을 주장하며, 상기 출원은 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 본 개시내용은 중쇄 길이의 지방산 및 지방산 유도체의 생산에 유용한 분자 도구에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 중쇄 길이의 지방산 및 지방산 유도체에 미생물에 대한 관용성을 부여하는 유전자에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로, 예를 들어, 8개 탄소 및 10개 탄소 지방산 및 지방산 유도체를 포함하는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성 및/또는 선택성을 갖는 신규한 조작된 티오에스테라제 변이체, 및 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 또한 조작된 티오에스테라제 변이체, 이들의 암호화 폴리뉴클레오타이드 및 관련 세포 배양물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 추가로, 조작된 티오에스테라제 변이체를 발현하는 숙주 세포를 사용하여 중쇄 지방산 유도체를 생산하는 방법 및 생물학적으로 생산된 중쇄 지방산 유도체의 조성물이 포함된다.

배경 기술

- [0005] 중쇄 지방산(MCFA)-유래된 생성물의 생산에 큰 관심이 있다. 중쇄 지방산 및 중쇄 지방산 유도체는 예를 들어, 바이오연료, 윤활제 및 그리스(grease), 금속 가공액, 코팅 및 접착제, 화장료 및 퍼스널 케어, 향수, 식품 및 영양물, 약제, 플라스틱 및 고무, 및 화학 산업을 위한 기타 공급원료로서 많은 산업 분야에 적용되고 있다.
- [0006] 산업에서의 이들의 가치 이외에도, 중쇄 지방산은식이 보충제 및 약효식품으로서 가치있는 적용분야를 찾고 있다(참조: 예를 들어, Stig Bengmark (2013) *Nutrients* 5(1): 162-207). 실제로, 중쇄 지방산 및 이들의 유도체는 항미생물 성질을 나타내며(참조: 예를 들어, Nobmann et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;128(3):440-445; B W Petschow, et al., (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(2):302-306), 체지방 축적을 억제하고 대사 증후군을 예방하며(참조: 예를 들어, Takeuchi H., et al. (2008) *Asia Pac J Clin Nutr.* 17 Suppl 1 :320-3; Koji Nagao (2010) *Pharmacological Research* 61:208-212). Omura Y., et al. (2011) *Acupunct Electrother Res.* 36(1-2): 19-64), 임상적 관련 농도에서 항발작 효과를 갖는다(참조: 예를 들어, Chang et al., (2013) *Neuropharmacology* 2013; 69: 105-14; Wlaz et al., (2015) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 57: 110-16).
- [0007] 많은 유용한 적용분야를 고려할 때, 중쇄 지방산에 대한 수요가 과거 몇년 동안 증가 추세인 것은 놀랍지 않다. 불행하게도, 중쇄 지방산의 공급은 항상 식물(팜 오일)로부터 또는 화학적 합성으로부터 장쇄의 유리 지방산(FFA) 생성물의 생산과 관련이 있으며, 여기서, 중간 길이 쇠는 총 지방 아실 중의 20% 미만을 나타내는 숄더(shoulder)로서 생산된다(참조: 예를 들어, Kostik, V. et al. (2013) *J. Hyg. Eng. Des.* 4: 112-116). 이것은 중쇄 지방산의 공급물이 매우 휘발성이고 불안정하게 한다. 따라서, 이들 화합물의 신뢰할 수 있고 안정하

며 재생가능한 공급물을 제공할 수 있는 방법이 당업계에 필요하다.

[0008] 중쇄 지방산의 현재 공급원에 대한 대안은 미생물 발효와 같은 생물학적 시스템을 사용한 이들의 생산이다. 그러나, 생물학적 시스템에 의한 유리 지방산의 생산은 2개의 주요 도전 과제를 제시한다. 첫째, 이것은 흔히 티오에스테라제에 의존하는데, 이는 숙주 유기체에 의해 생성되는 알킬 티오에스테르 분자 상에 작용한다. 중쇄 알킬 티오에스테르에 대해 활성인 가용 티오에스테라제는 차선의 촉매 활성을 갖거나, 이들의 특이성이 너무 광범위하여 일정 범위의 알킬 티오에스테르 쇠 길이에 걸쳐 작용한다. 둘째, 중쇄 지방족 화합물은 흔히 미생물 세포에 매우 독성이어서, 이는 높은 수준으로 이들의 생산을 방해한다. 추가로, 중쇄 아실 화합물의 독성은 고도의 활성 티오에스테라제의 선택 및 조작에 불리할 수 있다. 따라서, 생물학적 시스템이 중쇄 지방산의 대안적인 공급물을 제공하기 위해, 중쇄 알킬 티오에스테라제에 대한 보다 높은 활성 및 선택성의 개선된 티오에스테라제를 갖고, 중쇄 지방족 화합물에 대해 개선된 관용성을 보여주는 생물학적 시스템이 필요하다.

[0009] 다행스립게도, 후속되는 개시내용으로부터 명백하 바와 같이, 본 발명은 이들 및 다른 필요사항을 제공한다.

발명의 내용

[0010] 개시내용의 하나의 양상은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체를 제공한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 개시내용은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 청구항 1의 조작된 티오에스테라제 변이체로서, 여기서, 상기 조작된 티오에스테라제 변이체는 C8 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 위치에서 적어도 하나의 치환 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 갖는다: 3, 4, 6, 14, 15, 17, 22, 37, 44, 45, 50, 54, 56, 64, 67, 73, 76, 91, 99, 102, 110, 111, 114, 129, 132, 137, 158, 162, 165, 176, 178, 185, 186, 196, 197, 198, 203, 213, 217, 225, 227, 236, 244, 254, 256, 258, 278, 282, 292, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 316, 321, 및 322. 조작된 티오에스테라제의 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 치환 돌연변이는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다: (a) 아미노산 위치 3에서 라이신; (b) 아미노산 위치 4에서 메티오닌; (c) 아미노산 위치 6에서 아르기닌; (d) 아미노산 위치 14에서 글라이신 또는 아르기닌; (e) 아미노산 위치 15에서 류신 또는 트립토판; (f) 아미노산 위치 17에서 알라닌 또는 시스테인; (g) 아미노산 위치 22에서 아르기닌; (h) 아미노산 위치 37에서 프롤린; (i) 아미노산 위치 44에서 글라이신 또는 이소류신; (j) 위치 45에서 세린; (k) 아미노산 위치 50에서 트립토판; (l) 아미노산 위치 54에서 아르기닌; (m) 아미노산 위치 56에서 라이신 또는 시스테인; (n) 아미노산 위치 64에서 아르기닌 또는 프롤린; (o) 아미노산 위치 67에서 류신; (p) 아미노산 위치 73에서 발린; (q) 아미노산 위치 76에서 페닐알라닌 또는 류신 또는 티로신; (r) 아미노산 위치 91에서 메티오닌; (s) 아미노산 위치 99에서 라이신 또는 프롤린; (t) 아미노산 위치 102에서 이소류신; (u) 아미노산 위치 110에서 류신; (v) 아미노산 위치 111에서 트레오닌; (w) 아미노산 위치 114에서 라이신; (x) 아미노산 위치 129에서 발린; (y) 아미노산 위치 132에서 트립토판; (z) 아미노산 위치 137에서 시스테인; (aa) 아미노산 위치 158에서 글루타민; (bb) 아미노산 위치 162에서 글루탐산; (cc) 아미노산 위치 176에서 발린; (dd) 아미노산 위치 178에서 프롤린; (ee) 아미노산 위치 185에서 알라닌; (ff) 아미노산 위치 186에서 글라이신; (gg) 아미노산 위치 196에서 발린; (hh) 아미노산 위치 197에서 아스파라긴; (ii) 아미노산 위치 198에서 트립토판; (jj) 아미노산 위치 203에서 아르기닌; (kk) 아미노산 위치 213에서 히스티딘 또는 아르기닌; (ll) 아미노산 위치 217에서 아르기닌; (mm) 아미노산 위치 225에서 류신; (nn) 아미노산 위치 227에서 글라이신; (oo) 아미노산 위치 236에서 트레오닌; (pp) 아미노산 위치 244에서 메티오닌 또는 아르기닌; (qq) 아미노산 위치 254에서 글라이신; (rr) 아미노산 위치 256에서 시스테인 또는 아르기닌; (ss) 아미노산 위치 258에서 트레오닌 또는 발린; (tt) 아미노산 위치 278에서 라이신 또는 발린; (uu) 아미노산 위치 282에서 세린 또는 발린; (vv) 아미노산 위치 292에서 페닐알라닌; (ww) 아미노산 위치 297에서 트레오닌 또는 아스파르트산 또는 발린; (xx) 아미노산 위치 298에서 발린 또는 시스테인; (yy) 아미노산 위치 299에서 류신; (zz) 아미노산 위치 300에서 라이신 또는 트립토판 또는 류신; (aaa) 아미노산 위치 301에서 시스테인; (bbb) 아미노산 위치 302에서 트레오닌; (ccc) 아미노산 위치 316에서 아르기닌; (ddd) 아미노산 위치 321에서 아르기닌; 및 (eee) 아미노산 위치 322에서 라이신.

[0011] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호

30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58 및 서열번호 59로부터 선택되는 구성이다.

[0012] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1을 갖는 티오에스테라제와 비교하여 전체적으로 증가된 순 양전하(net positive charge)를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 4를 갖는 변이체 티오에스테라제와 비교하여 전체적으로 증가된 순 양전하를 갖는다.

[0013] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 및 서열번호 46로부터 선택된다.

[0014] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 15와 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

[0015] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 개선된 용해도를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49와 비교하여 개선된 용해도를 갖는다.

[0016] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49의 아미노산 2 내지 40의 절단 돌연변이를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58 및 서열번호 59로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

[0017] 하나의 구현예에서, 상기 변이체 티오에스테라제는 C10 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는다. 하나의 구현예에서, 변이체 티오에스테라제는 C8 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는다.

[0018] 하나의 양상에서, 개시내용은 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 생화학적 경로를 암호화하는 하나 이상의 이중성 유전자를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 최소 억제 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 가지며, 여기서, 제2 지방산 유도체의 존재는 제1 지방산 유도체의 MIC를 증가시킨다.

[0019] 하나의 구현예에서, 생화학적 경로는 다음 중 하나를 포함한다: 카복실산 리덕타제, 카복실산 리덕타제 및 알코올 데하이드로게나제, 카복실산 리덕타제 및 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제, 카복실산 리덕타제, 및 알코올 데하이드로게나제, 및 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제, 에스테르 신타제, 에스테르 신타제 및 지방 아실 CoA 신테타제, 아실 CoA 리덕타제, 아실 CoA 리덕타제 및 아실 CoA 신테타제, 아실 CoA 리덕타제 및 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제, 아실 CoA 리덕타제, 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제, 및 아실 CoA 신테타제, 0-메틸 트랜스퍼라제, 아실 ACP 리덕타제, 아실 ACP 리덕타제 및 알데하이드 데카보닐라제, 아실 ACP 리덕타제 및 알데하이드 산화성 데포밀라제, 아실 ACP 리덕타제 및 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제, 아실 ACP 리덕타제, 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제, 및 알코올 데하이드로게나제, OleA 단백질, OleA, C, 및 D 단백질, OleA 단백질 및 지방 아실 CoA 신테타제, 또는 OleA, C, 및 D 단백질 및 지방 아실 CoA 신테타제.

[0020] 하나의 구현예에서, 제1 지방산 유도체는 지방산이며, 제2 지방산 유도체는 지방산 알킬 에스테르이며, 생화학적 경로는 에스테르 신타제 및 지방 아실-CoA 신테타제를 포함한다.

[0021] 하나의 구현예에서, 지방산 알킬 에스테르는 지방산 메틸 에스테르 또는 지방산 에틸 에스테르이다.

[0022] 하나의 구현예에서, 제1 지방산 유도체는 지방 알코올이며, 제2 지방산 유도체는 지방 알코올 아세테이트이며, 생화학적 경로는 카복실산 리덕타제 및 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제를 포함한다.

[0023] 하나의 구현예에서, 제1 지방산 유도체 및 제2 지방산 유도체는 중쇄 지방산 유도체이다.

[0024] 하나의 구현예에서, 재조합 숙주 세포는 추가로 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함한다.

[0025] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 위치에서 적어도 하나의 치환 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 변이체 티오에스테라제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다: 3, 4, 6, 14, 15, 17, 22, 37, 44, 45, 50,

54, 56, 64, 67, 73, 76, 91, 99, 102, 110, 111, 114, 129, 132, 137, 158, 162, 165, 176, 178, 185, 186, 196, 197, 198, 203, 213, 217, 225, 227, 236, 244, 254, 256, 258, 278, 282, 292, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 316, 321, 및 322.

[0026] 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 치환 돌연변이는 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다: (a) 아미노산 위치 3에서 라이신; (b) 아미노산 위치 4에서 메티오닌; (c) 아미노산 위치 6에서 아르기닌; (d) 아미노산 위치 14에서 글라이신 또는 아르기닌; (e) 아미노산 위치 15에서 류신 또는 트립토판; (f) 아미노산 위치 17에서 알라닌 또는 시스테인; (g) 아미노산 위치 22에서 아르기닌; (h) 아미노산 위치 37에서 프롤린; (i) 아미노산 위치 44에서 글라이신 또는 이소류신; (j) 위치 45에서 세린; (k) 아미노산 위치 50에서 트립토판; (l) 아미노산 위치 54에서 아르기닌; (m) 아미노산 위치 56에서 라이신 또는 시스테인; (n) 아미노산 위치 64에서 아르기닌 또는 프롤린; (o) 아미노산 위치 67에서 류신; (p) 위치 73에서 발린; (q) 아미노산 위치 76에서 페닐알라닌 또는 류신 또는 타이로신; (r) 아미노산 위치 91에서 메티오닌; (s) 아미노산 위치 99에서 라이신 또는 프롤린; (t) 아미노산 위치 102에서 이소류신; (u) 아미노산 위치 110에서 류신; (v) 위치 111에서 트레오닌; (w) 위치 114에서 라이신; (x) 아미노산 위치 129에서 발린; (y) 아미노산 위치 132에서 트립토판; (z) 아미노산 위치 137에서 시스테인; (aa) 아미노산 위치 158에서 글루타민; (bb) 아미노산 위치 162에서 글루탐산; (cc) 아미노산 위치 176에서 발린; (dd) 아미노산 위치 178에서 프롤린; (ee) 아미노산 위치 185에서 알라닌; (ff) 아미노산 위치 186에서 글라이신; (gg) 아미노산 위치 196에서 발린; (hh) 아미노산 위치 197에서 아스파라긴; (ii) 아미노산 위치 198에서 트립토판; (jj) 아미노산 위치 203에서 아르기닌; (kk) 아미노산 위치 213에서 히스티딘 또는 아르기닌; (ll) 아미노산 위치 217에서 아르기닌; (mm) 아미노산 위치 225에서 류신; (nn) 아미노산 위치 227에서 글라이신; (oo) 아미노산 위치 236에서 트레오닌; (pp) 아미노산 위치 244에서 메티오닌 또는 아르기닌; (qq) 아미노산 위치 254에서 글라이신; (rr) 아미노산 위치 256에서 시스테인 또는 아르기닌; (ss) 아미노산 위치 258에서 트레오닌 또는 발린; (tt) 아미노산 위치 278에서 라이신 또는 발린; (uu) 아미노산 위치 282에서 세린 또는 발린; (vv) 아미노산 위치 292에서 페닐알라닌; (ww) 아미노산 위치 297에서 트레오닌 또는 아스파르트산 또는 발린; (xx) 아미노산 위치 298에서 발린 또는 시스테인; (yy) 아미노산 위치 299에서 류신; (zz) 아미노산 위치 300에서 라이신 또는 트립토판 또는 류신; (aaa) 아미노산 위치 301에서 시스테인; (bbb) 아미노산 위치 302에서 트레오닌; (ccc) 아미노산 위치 316에서 아르기닌; (ddd) 아미노산 위치 321에서 아르기닌; 및 (eee) 아미노산 위치 322에서 라이신.

[0027] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58 및 서열번호 59로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

[0028] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 4와 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 및 서열번호 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

[0029] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 15와 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

[0030] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 개선된 용해도를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49와 비교하여 개선된 용해도를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49의 아미노산 2 내지 40의 절단 돌연변이를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열

번호 58 및 서열번호 59로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.

- [0031] 또 다른 양상에서, 개시내용은 상업적 역가로 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은: 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 적합한 조건에서 탄소원의 존재하에 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 재조합 숙주 세포는 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 생화학적 경로를 암호화하는 하나 이상의 이중성 유전자를 포함하고, 여기서, 상기 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 최소 억제 농도 (MIC)를 가지며, 제2 지방산 유도체의 존재는 제1 지방산 유도체의 MIC를 증가시킨다.
- [0032] 하나의 구현예에서, 제1 지방산 유도체는 중쇄 지방산이고 제2 지방산 유도체는 중쇄 지방산 알킬 에스테르이고 생화학적 경로는 에스테르 신타제 및 지방 아실-CoA 신테타제를 포함한다.
- [0033] 하나의 구현예에서, 지방산 알킬 에스테르는 중쇄 지방산 메틸 에스테르 또는 중쇄 지방산 에틸 에스테르이다.
- [0034] 하나의 구현예에서, 제1 지방산 유도체는 중쇄 지방 알코올이고 제2 지방산 유도체는 중쇄 지방 알코올 아세테이트이고 생화학적 경로는 카복실산 리덕타제 및 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제를 포함한다.
- [0035] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 위치에서 적어도 하나의 치환 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 갖는다: 3, 4, 6, 14, 15, 17, 22, 37, 44, 45, 50, 54, 56, 64, 67, 73, 76, 91, 99, 102, 110, 111, 114, 129, 132, 137, 158, 162, 165, 176, 178, 185, 186, 196, 197, 198, 203, 213, 217, 225, 227, 236, 244, 254, 256, 258, 278, 282, 292, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 316, 321, 및 322. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 치환 돌연변이는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다: (a) 아미노산 위치 3에서 라이신; (b) 아미노산 위치 4에서 메티오닌; (c) 아미노산 위치 6에서 아르기닌; (d) 아미노산 위치 14에서 글라이신 또는 아르기닌; (e) 아미노산 위치 15에서 류신 또는 트립토판; (f) 아미노산 위치 17에서 알라닌 또는 시스테인; (g) 아미노산 위치 22에서 아르기닌; (h) 아미노산 위치 37에서 프롤린; (i) 아미노산 위치 44에서 글라이신 또는 이소류신; (j) 위치 45에서 세린; (k) 아미노산 위치 50에서 트립토판; (l) 아미노산 위치 54에서 아르기닌; (m) 아미노산 위치 56에서 라이신 또는 시스테인; (n) 아미노산 위치 64에서 아르기닌 또는 프롤린; (o) 아미노산 위치 67에서 류신; (p) 아미노산 위치 73에서 발린; (q) 아미노산 위치 76에서 페닐알라닌 또는 류신 또는 티로신; (r) 아미노산 위치 91에서 메티오닌; (s) 아미노산 위치 99에서 라이신 또는 프롤린; (t) 아미노산 위치 102에서 이소류신; (u) 아미노산 위치 110에서 류신; (v) 아미노산 위치 111에서 트레오닌; (w) 아미노산 위치 114에서 라이신; (x) 아미노산 위치 129에서 발린; (y) 아미노산 위치 132에서 트립토판; (z) 아미노산 위치 137에서 시스테인; (aa) 아미노산 위치 158에서 글루타민; (bb) 아미노산 위치 162에서 글루탐산; (cc) 아미노산 위치 176에서 발린; (dd) 아미노산 위치 178에서 프롤린; (ee) 아미노산 위치 185에서 알라닌; (ff) 아미노산 위치 186에서 글라이신; (gg) 아미노산 위치 196에서 발린; (hh) 아미노산 위치 197에서 아스파라긴; (ii) 아미노산 위치 198에서 트립토판; (jj) 아미노산 위치 203에서 아르기닌; (kk) 아미노산 위치 213에서 히스티딘 또는 아르기닌; (ll) 아미노산 위치 217에서 아르기닌; (mm) 아미노산 위치 225에서 류신; (nn) 아미노산 위치 227에서 글라이신; (oo) 아미노산 위치 236에서 트레오닌; (pp) 아미노산 위치 244에서 메티오닌 또는 아르기닌; (qq) 아미노산 위치 254에서 글라이신; (rr) 아미노산 위치 256에서 시스테인 또는 아르기닌; (ss) 아미노산 위치 258에서 트레오닌 또는 발린; (tt) 아미노산 위치 278에서 라이신 또는 발린; (uu) 아미노산 위치 282에서 세린 또는 발린; (vv) 아미노산 위치 292에서 페닐알라닌; (ww) 아미노산 위치 297에서 트레오닌 또는 아스파르트산 또는 발린; (xx) 아미노산 위치 298에서 발린 또는 시스테인; (yy) 아미노산 위치 299에서 류신; (zz) 아미노산 위치 300에서 라이신 또는 트립토판 또는 류신; (aaa) 아미노산 위치 301에서 시스테인; (bbb) 아미노산 위치 302에서 트레오닌; (ccc) 아미노산 위치 316에서 아르기닌; (ddd) 아미노산 위치 321에서 아르기닌; 및 (eee) 아미노산 위치 322에서 라이신.
- [0036] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58 및 서열번호 59로 이루어진 그룹으로부터 선택되는

구성이다.

- [0037] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 1과 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다.
- [0038] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 4와 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 및 서열번호 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.
- [0039] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 15와 비교하여 증가된 양성 표면 전하를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.
- [0040] 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 개선된 용해도를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49와 비교하여 개선된 용해도를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 49의 아미노산 2 내지 40의 절단 돌연변이를 갖는다. 하나의 구현예에서, 조작된 티오에스테라제 변이체는 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58 및 서열번호 59로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구성이다.
- [0041] 또 다른 양상에서, 개시내용은 적어도 3.6의 C10 지방산 유도체에 대한 C8 지방산 유도체의 비율(C8/C10)을 갖는 중쇄 지방산 유도체의 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, C10 지방산 유도체에 대한 C8 지방산 유도체의 비율은 7.7이다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 상이한 C8 지방족 화합물에 대한 최소 억제 농도(MIC) 곡선을 도해한다.

도 2는 상이한 중쇄 지방족 화합물의 분배 계수($\log P_{wo}$)를 도해한다.

도 3은 옥틸 아세테이트의 존재하에 1-옥탄올 독성으로부터의 보호를 나타남을 도해한다. 1-옥탄올에 노출되는 경우, 이. 콜라이(*E. coli*) 세포의 생존능은 5시간 노출시킨 후 완전히 상실되었다. 그러나, 옥틸 아세테이트가 또한 50 g/L(이. 콜라이 세포의 비-독성 농도)로 첨가되는 경우, 세포 생존능은 최대 10 g/L의 1-옥탄올의 존재하에 20% 미만으로 감소하였다.

도 4는 중쇄 지방 알코올의 생성 및 이들의 지방 아세테이트 에스테르로의 아세틸화를 위한 경로를 도해한다. R: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$, 여기서, $n = 1, 2, 3, 4$ 또는 5; FFA: 유리 지방산; FALD: 지방 알데하이드; FALC: 지방 알코올; FACE: 지방 알코올 아세테이트 에스테르; ACP: 아실 캐리어 단백질; AAR: 아실-ACP 리덕타제; ADH: 알데하이드/알코올 탈하이드로게나제; TE: 티오에스테라제; ACR: 아실-CoA 리덕타제; CAR: 카복실산 리덕타제; AAT: α -알코올 아세틸 트랜스퍼라제.

도 5는 알코올 아세틸트랜스퍼라제의 발현에 의한 중쇄 지방 알코올 (FALC) 화합물의 개선된 관용성 및 생산을 나타내는 상이한 측정을 도해한다. 도 5a는 FALC-생산 균주(sRG.674)가 탄소원으로서 글루코스를 갖는 최소 염배지 상에서 성장할 수 없음을 도해한다. 대조적으로, 균주 sJN.209에서 α -알코올 아세틸 트랜스퍼라제(AAT)의 발현을 갖는 동일한 배지 상에서 성장 억제 없이. 도 5b는 FALC-생산 균주(sRG.674) 및 AAT 발현 균주, sJN.209에 의해 생산된 총 지방 중 (FAS)의 수준을 도해한다. 도 5c는 FALC-생산 균주(sRG.674) 및 AAT 발현 균주, sJN.209에 의해 생산된 지방 중의 수준 및 조성물의 비교를 도해한다.

도 6은 유리 지방산의 에스테르화를 위한 경로를 도해한다. R: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$, 여기서, $n = 1, 2, 3, 4$ 또는 5; FFA: 유리 지방산; FAEE: 지방산 에틸 에스테르; TE: 티오에스테라제; ES: 에스테르 신타제.

도 7은 단지 중쇄 길이 지방산 생합성 경로를 발현하는 균주와 비교하여, 중쇄 알킬 에스테르 생합성 경로를 발현하는 균주에 의해 중쇄 지방산 유도체의 개선된 생존능 및 생산을 지적하는 상이한 측정을 도해한다. 균주 sRS.786은 중쇄 길이 티오에스테라제(chFatB2)를 발현하도록 조작되고 단지 유리 지방산(FFA)을 생산한다. 균주 Stpay.179는 sRS.786과 동종동계이고 또한 지방 아실 CoA 신타제 및 에스테르 신타제를 발현하고 배지 내 단쇄 알코올(예를 들어, 메탄올, 에탄올 등과 같은)이 제공되는 경우 중간 길이 지방 알킬 에스테르를

생산한다.

균주 sRS.786 및 Stpay.179는 탄소원으로서 글루코스를 갖는 최소 염 배지에서 성장시켰다. 추가로, 에탄올은 발효 수행 과정 동안에 공급하여 알코올의 농도를 약 2 g/L로 유지한다. **도 7a:** 유일하게 FFA를 생산하는 균주 (sRS.786)는 IPTG가 중쇄 길이 아실-ACP 티오에스테라제의 발현을 유도하기 위해 첨가된지 대략 10시간 후 성장 및 글루코스 소비를 중단하였다. 대조적으로, 에스테르화 경로를 발현하는 균주 Stpay.179는 IPTG 유도 후 성장을 계속할 수 있었다. **도 7b:** 균주 sRS.786은 IPTG가 중쇄 길이 아실-ACP 티오에스테라제의 발현을 유도하기 위해 첨가된지 대략 10시간 후 중쇄 지방산 중 (FAS)의 생산을 중단하였고 궁극적으로 단지 약 5 g의 C8 + C10을 생산한다. 대조적으로, 균주 Stpay.179는 전체 발효 수행 전반에 걸쳐 계속 성장하고 FAS를 생산하고, 궁극적으로 84 g/kg 초과와 총 지방산 중을 생산한다. **도 7c:** 에스테르화 경로를 발현하는 균주 Stpay.179는 성장하여 84 g/kg 초과와 총 지방산 중(이의 93%는 C8-C10 FFA였다)의 역가를 생산할 수 있었다.

도 8은 플라스미드 pIR.108을 도해한다.

도 9는 실시예 6에 기재된 서열번호 1의 모델을 구축하기 위해 사용되는 구조 기반 서열 정렬을 도해한다.

도 10은 서열번호 1의 3D 구조에 대한 최종 전장 모델을 도해한다. 표면 잔기는 볼 및 스틱으로써 나타낸다.

도 11은 다양한 FatB2 절단물의 용해도(1 = 전체 세포 분획, 2 = 가용성 분획)를 평가하기 위한 웨스턴-블롯.

도 12는 실시예 8의 조건 하에서 배양되는 경우 균주 sRG.825 및 sDH.377을 사용한 중쇄 길이 지방 알코올 아세테이트 생산의 특징적인 최종 생성물 조성물을 도해한다.

도 13은 실시예 11의 조건 하에서 배양되는 경우 균주 sAZ918을 사용한 중쇄 길이 지방산 에틸 에스테르 생산의 특징적인 최종 생성물 조성물을 도해한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본원 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 구성 요소를 기재하는 것과 관련하여 단수 관사, 예를 들어, "a" 및 "an" 및 "the" 및 유사 문구는 본원에서, 달리 지적되지 않거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 경우, 단수 및 복수 둘 다를 포괄하는 것으로 해석되어야만 한다. 따라서, 예를 들어, "숙주 세포"에 대한 언급은 2개 이상의 상기 숙주 세포를 포함하고, "핵산 서열"에 대한 언급은 1개 이상의 핵산 서열을 포함하고, "효소"에 대한 언급은 1개 이상의 효소 등을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은 "약"은 당업자에 의해 이해되고 이것이 사용되는 문맥에 따라 어느 정도로 다양할 수 있다. 주어진 당업자에게 명백하지 않은 용어가 사용된다면, 용어 "약"이 사용되는 문맥에서, "약"은 특정 용어의 최대 + 또는 -10%를 의미할 것이다.

임의의 및 모든 목적에 대해, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 기재된 모든 범위는 임의의 및 모든 가능한 서브범위 및 이의 서브범위의 조합을 포괄한다. 추가로, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1 내지 3개 원자를 갖는 그룹은 1, 2, 또는 3개 원자를 갖는 그룹을 언급한다. 유사하게, 1 내지 5개 원자를 갖는 그룹은 1, 2, 3, 4, 또는 5개 원자를 갖는 그룹 등을 언급한다.

달리 한정되지 않는 경우, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 특히, 상기 개시내용은 재조합 유전학, 유기 화학, 발효 및 생화학 분야의 통상적인 기술을 사용한다. 분자 생물학 및 유전학에서 일반적인 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Lackie, *Dictionary of Cell and Molecular Biology*, Elsevier (5th ed. 2013))을 포함한다. 생화학에서 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Lehninger *Principles of Biochemistry* Sixth edition, David L. Nelson and Michael M. Cox eds. W.H. Freeman (2012))을 포함한다. 발효의 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: *Principles of Fermentation Technology*, 3rd Edition by Peter F Stanbury, Allan Whitaker and Stephen J Hall. Butterworth-Heinemann (2016))을 포함한다. 유기 화학의 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Favre, Henri A. and Powell, Warren H. *Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Name 2013*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2013; *Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques*, Stephane Caron ed., John Wiley and Sons Inc. (2011); *Organic Chemistry*,

9th Edition - Francis Carey and Robert Giuliano, McGraw Hill (2013))을 포함한다.

- [0048] 본원 기재 전반에 걸친 서열 승인 번호는 미국의 국립 보건 연구소가 운영하는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 의해 제공된 데이터베이스(이는 본원에서 "NCBI 승인 번호" 또는 대안적으로 "GenBank 승인 번호" 또는 대안적으로 단순히 "승인 번호"로서 확인된다), 및 기관 (Swiss Institute of Bioinformatics)에 의해 제공된 UniProt Knowledgebase(UniProtKB) 및 Swiss-Prot 데이터베이스(이는 "UniProtKB 승인 번호"로서 확인된다)로부터 취득된다.
- [0049] 효소 분류(EC) 번호는 위원회(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB))에 의해 확립되고, 이의 설명은 월드 와이드 웹 상의 IUBMB 효소 명명법 웹사이트 상에서 이용 가능하다. EC 번호는 이들이 촉매하는 반응에 따라 효소를 분류한다. 예를 들어, 티오에스테라제 효소 활성은 E.C. 3.1.2.1-3.1.2.27 및 3.1.2.하에 분류된다. 특정 분류는 상이한 기질에 대한 상이한 티오에스테라제의 활성을 기반으로 한다.
- [0050] 예를 들어, 일부 예시적 구현예에서, 아실-아실 캐리어 단백질 티오에스테르(Acyl-ACP) 및 아실-조효소 A 티오에스테르(Acyl-CoA)와 같은 C6-C18 알킬 티오에스테르의 티오에스테르 결합의 가수분해를 촉매하는 티오에스테라제는 E.C. 3.1.2.- 내지 3.1.2.14 하에 분류된다. 티오에스테라제는 대부분의 원핵세포 및 대부분의 식물 및 조류의 엽록체에 존재한다. 티오에스테라제의 관능기는 한 종에서 다음 종까지 대부분의 원핵세포에 보존된다. 따라서, 상이한 미생물 종은 E.C. 3.1.2.1-3.1.2.27 및 3.1.2.-하에 분류되는 동일한 티오에스테라제 효소 활성을 수행할 수 있다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지방산"은 화학식 RCOOH를 갖는 지방족 카복실산을 언급하고, 여기서, R은 적어도 4개의 탄소, 전형적으로 약 4 내지 약 28개 탄소 원자를 갖는 지방족 그룹이다. 지방족 R 그룹은 포화 또는 불포화되거나, 측쇄 또는 비측쇄화된 것일 수 있다. 불포화 "지방산"은 단일불포화 또는 다중불포화될 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 "지방산" 또는 "지방산들"은 지방산 생합성 공정을 통해, 지방산 베타-산화의 역반응을 통해, 세포 내에서 생산되거나 이들은 세포에 공급될 수 있다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 지방산 생합성은 일반적으로 아실-ACP의 말로닐-CoA 의존성 합성이고, 베타-산화의 역반응은 아실-CoA를 유도한다. 세포에 공급된 지방산은 아실-CoA로 전환된다.
- [0053] 지방산 생합성 및 분해는 원핵세포, 단일 세포, 진핵 세포, 고등 진핵 세포 및 고세균을 포함하는 모든 생명 형태에서 일어난다. 본원에 기재된 도구 및 방법은 지방산 합성, 분해 또는 알킬 티오에스테르를 천연적으로 생산하는 임의의 유기체에서의 공급 중 어느 하나 이상을 통해 유래된 중쇄 지방산 유도체의 생산에 유용하다.
- [0054] 본원에 기재된 바와 같은 용어 "중쇄 지방산" 또는 균등하게 "중쇄 길이 지방산"은 6 내지 10개 탄소의 탄소쇄 길이를 갖는 지방산을 언급한다. 따라서, 일부 예시적 구현예에서, "중쇄 지방산"은 6개 탄소의 탄소쇄 길이, 7개 탄소의 탄소쇄 길이, 8개 탄소의 탄소쇄 길이, 9개 탄소의 탄소쇄 길이, 또는 10개 탄소의 탄소쇄 길이를 갖는 지방산이다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지방산 유도체"는 지방산으로부터 유래된 생성물을 언급한다. 따라서, "지방산 유도체"는 상기 정의된 바와 같은 "지방산" 및 "중쇄 지방산"을 포함한다. 일반적으로, "지방산 유도체"는 아실-ACP 또는 아실-ACP 유도체를 포함하는 말로닐-CoA 유래된 화합물을 포함한다. "지방산 유도체"는 또한 아실-CoA 또는 아실-CoA 유도체와 같은 말로닐-CoA 유래된 화합물을 포함한다. 따라서, "지방산 유도체"는 티오에스테라제 반응을 포함하는 대사 경로로부터 유래된 분자/화합물을 포함한다. 예시적인 지방산 유도체는 지방산, 지방산 에스테르(예를 들어, 왁스, 지방산 에스테르, 지방산 메틸 에스테르(FAME), 지방산 에틸 에스테르(FAEE)), 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE), 지방 아민, 지방 알데하이드, 지방 알코올, 탄화수소, 예를 들어, 알칸, 알켄 등, 케톤, 말단 올레핀, 내부 올레핀, 3-하이드록시 지방산 유도체, 이관능성 지방산 유도체(예를 들어, ω -하이드록시 지방산, 1,3 지방-디올, α , ω -디올, α , ω -3-하이드록시 트리올, ω -하이드록시 FAME, ω -OH FAEE 등), 및 상기 언급된 지방산 유도체 각각의 불포화 화합물을 포함하는, 불포화 지방산 유도체를 포함한다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같은 표현 "지방산 유도체 조성물"은 지방산 유도체의 조성물, 예를 들어, 유기체에 의해 생산되는 지방산 조성물을 언급한다. "지방산 유도체 조성물"은 단일 지방산 유도체 종을 포함할 수 있거나 지방산 유도체 종의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 예시적 구현예에서, 지방산 유도체의 혼합물은 1개 초과 유형의 지방산 유도체 생성물(예를 들어, 지방산, 지방산 에스테르, 지방 알코올, 지방 알코올 아세테이트, 지방

알데하이드, 지방 아민, 이관능성 지방산 유도체 등)을 포함한다. 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체의 혼합물은 상이한 쇠 길이, 포화 및/또는 측쇄화 특징을 갖는 지방산 에스테르 (또는 또 다른 지방산 유도체)의 혼합물을 포함한다. 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체의 혼합물은 주로 1개 유형의 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체 조성물을 포함한다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체의 혼합물은 1개 초과 유형의 지방산 유도체 생성물, 예를 들어, 상이한 쇠 길이, 포화 및/또는 측쇄화 특징을 갖는 지방산 유도체의 혼합물을 포함한다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체의 혼합물은 지방 에스테르 및 베타-하이드록시 에스테르의 혼합물을 포함한다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체 조성물은 지방 알코올 및 지방 알데하이드의 혼합물을 포함한다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체 조성물은 FAME 및/또는 FAEE의 혼합물, 특히 중쇄 FAME 및/또는 FAEE의 혼합물을 포함한다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체 조성물은 지방 알코올 아세테이트 에스테르 (FACE)의 혼합물, 특히, 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE)의 혼합물을 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "뉴클레오타이드"는 당업계에 공지된 바와 같은 이의 통상적인 의미를 갖는다. 자연 발생 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 단량체를 언급하는 것 이외에, 용어 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 유사체, 및 아미노 변형된 뉴클레오타이드와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포괄한다. 추가로, "뉴클레오타이드"는 비-자연 발생 유사체 구조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 각각 염기를 함유하는 펩타이드 핵산의 개별 유닛은 본원에서 뉴클레오타이드로서 언급될 수 있다.

[0058] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 천연 및/또는 비-천연 및/또는 변화된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있는, 전형적으로 포스포디에스테르 연결된 리보뉴클레오타이드 (RNA) 또는 데옥시리보뉴클레오타이드(DNA)의 중합체를 언급한다. 용어 "폴리뉴클레오타이드", "핵산 서열", 및 "뉴클레오타이드 서열"은 본원에서 상호교환적으로 사용되어 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오타이드, RNA 또는 DNA를 언급한다. 이들 용어는 분자의 1차 구조를 언급하고 따라서 단일가닥, 이중가닥, 삼중가닥, 사중체화된, 부분적으로 이중가닥, 측쇄화된, 헤어핀 구조, 환형, 패들락 형태 등인 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 용어는 균등물로서, 뉴클레오타이드 유사체로부터 제조된 RNA 또는 DNA의 유사체 및 이에 제한되지 않지만 메틸화되고/되거나 캡핑된 폴리뉴클레오타이드와 같은 변형된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드, 바이러스, 염색체, EST, cDNA, mRNA, 및 rRNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 형태일 수 있고 당업계에 공지된 임의의 정제 방법을 사용하는 것 뿐만 아니라, 합성, 재조합, 생체의 생성 또는 이의 조합을 포함하는, 임의의 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 전형적으로 12개 이상의 아미노산 길이인 아미노산 잔기들의 중합체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 12개 미만 아미노산 길이인 폴리펩타이드는 본원에서 "펩타이드"로서 언급된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모사체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다. 용어 "재조합 폴리펩타이드"는 재조합 기술에 의해 생산되는 폴리펩타이드를 언급하고, 여기서, 일반적으로 발현된 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA가 적합한 발현 벡터에 삽입되고 상기 벡터는 이어서 폴리펩타이드를 생산하도록 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용된다. 일부 예시적 구현예에서, 발현된 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA는 상동성 재조합 또는 당업계에 널리 공지된 다른 수단을 통해 숙주 염색체로 삽입되고 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 생산하는 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용된다. 유사하게, 용어 "재조합 폴리뉴클레오타이드" 또는 "재조합 핵산" 또는 "재조합 DNA"는 당업자에게 공지된 재조합 기술에 의해 생산된다(참조: 예를 들어, methods described in Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 4th Edition (Cold Spring Harbor, N.Y. 2012) or Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998) and Supplements 1-115 (1987-2016)).

[0060] 용어 "아미노산"은 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 및 합성 아미노산을 언급한다. 자연 발생 아미노산은 이후 변형되는 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프로린, γ -카복시글루타메이트 및 O-포스포세린 뿐만 아니라 유전자 코드에 의해 암호화된 것들이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조를 갖는, 즉 수소, 카복실 그룹, 아미노 그룹 및 R 그룹에 결합된 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폰사이드, 메티오닌 메틸 설폰을 언급한다. 상기 유사체는 변형된 R 그룹(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 골격을 갖지만 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학적 구조를 보유한다. 자연적으로 암호화된 아미노산은 20개 통상의 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글라이신,

히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린) 및 피롤라이신 및 셀레노시스테인이다. 일부 예시적 구현예에서, 하기 표에 제시된 단일 문자 코드는 20 개 통상의 자연 발생 아미노산의 특정 구성을 언급하기 위해 사용된다. 단일 문자 아미노산 코드는 당업계에 널리 공지되어 있다(참조: 예를 들어, 상기 Lehninger).

아미노산	단일 문자 코드	아미노산	단일 문자 코드
글라이신	G	프롤린	P
알라닌	A	발린	V
류신	L	이소류신	I
메티오닌	M	시스테인	C
페닐알라닌	F	티로신	Y
트립토판	W	히스티딘	H
라이신	K	아르기닌	R
글루타민	Q	아스파라긴	N
글루탐산	E	아스파르트산	D
세린	S	트레오닌	T

[0061]

[0062]

2개의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열을 언급하는 경우, 2개의 서열 간의 "서열 동일성의 백분율"은 비교 윈도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 결정하고, 여기서, 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오타이드 서열 부분은 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 참조 서열(이는 첨가 또는 결실을 포함하지 않는다)과 비교하여 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 상기 "서열 동일성의 백분율"은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 매칭된 위치의 수를 산출하기 위해 2개의 서열에 존재하는 위치의 수를 결정하고, 상기 매칭된 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 총수로 나누고 서열 동일성의 백분율을 산출하기 위해 상기 결과에 100을 곱함으로써 계산된다.

[0063]

따라서, 2개 이상의 핵산 서열 또는 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 관련하여 표현 "백분율 동일성" 또는 균등하게 "퍼센트 서열 동일성"은 동일하거나, 예를 들어, 디폴트 파라미터와 함께 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용하여 또는 수동 정렬 및 가시적 조사에 의해 측정된 바와 같이 동일한(예를 들어, 비교 윈도우 또는 지정된 영역 상에서 최대 상응성을 위해 비교되고 정렬되는 경우 특정 영역 상에서 약 50% 동일성, 바람직하게 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성) 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 특정된 퍼센트를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 언급한다(참조: 예를 들어, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410) and/or the NCBI web site at ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). 2개의 핵산 또는 아미노산 서열 간의 퍼센트 서열 동일성은 또한 예를 들어, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램으로 혼입된 예를 들어, 니들맨 및 운치 알고리즘(Needleman and Wunsch algorithm)을 사용하여 결정될 수 있다(참조: Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453). 2개의 뉴클레오타이드 서열 간의 백분율 서열 동일성은 또한 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 당업자는 초기 서열 동일성 계산을 수행할 수 있고 이에 따라서 알고리즘 파라미터를 조정할 수 있다. 수행자가 하나 분자가 청구항의 상동성 제한 내에 있는지의 여부를 결정하기 위해 어떤 파라미터를 적용하여야만 하는지에 대해 확신할 수 없는 경우 사용될 수 있는 파라미터 세트는 12의 갭 페널티, 4의 갭 연장 페널티 및 5의 프레임쉬프트 페널티를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스이다. 서열 정렬의 추가의 방법은 생물공학 분야에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, Rosenberg (2005) *BMC Bioinformatics* 6:278; Altschul et al. (2005) *FEBS J.* 272(20):5101-5109).

[0064]

2개 이상의 핵산 또는 아미노산 서열은 이들이 상기 논의된 바와 같이 정렬되고 분석되고, 특정된 영역 상에서 약 50% 동일성, 바람직하게 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 공유하는 것으로 밝혀진 경우 "실질적으로 동일한" 것으로 일컬어진다. 2개의 핵산 서열 또는 폴리펩타이드 서열은 상기 기재된 바와 같이 최대 상응성을 위해 정렬될 때 2개의 서열에서 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기들의 서열이 동일한 경우 "동일한" 것으로 일컬어진다. 상기 정의는 또한 시험 서열의 상보체를 언급하거나 이에 적용될 수 있다. 동일성은 전형적으로, 적어도 약 25개 길이의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 대해, 또는 보다 바람직하게 50 내지 100 길이의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 대해 또는 소정의 서열의 전체 길이에 대해 계산된다.

[0065]

표현 "낮은 엄중도, 중간 엄중도, 높은 엄중도, 또는 매우 높은 엄중도 조건하에서 하이브리드화하는"이란 하이

브리드화 및 세척을 위한 조건을 말한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 가이드는 예를 들어, 문헌 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6.)에서 찾을 수 있다. 수성 및 비-수성 방법은 인용 문헌에 기재되어 있고 다른 방법이 사용될 수 있다. 본원에서 언급되는 특이적 하이브리드화 조건은 다음과 같다: (1) 낮은 염중도 하이브리드화 조건 - 약 45℃에서 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트 (SSC)에 이어서 적어도 50℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중에 2회 세척(세척의 온도는 낮은 염중도 조건에 대해 55℃로 증가될 수 있다); (2) 중간 염중도 하이브리드화 조건 - 약 45℃에서 6X SSC에 이어서 60℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상의 세척; (3) 높은 염중도 하이브리드화 조건 - 약 45℃에서 6X SSC에 이어서 65℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상의 세척; 및 (4) 매우 높은 염중도 하이브리드화 조건 - 65℃에서 0.5M 인산나트륨, 7% SDS에 이어서 65℃에서 0.2X SSC, 1% SDS에서 1회 이상의 세척. 매우 높은 염중도 조건 (4)는 달리 특정되지 않는 경우 바람직한 조건이다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "내인성"은 세포 내로부터 생산되는 물질, 예를 들어, 핵산, 단백질 등을 언급한다. 따라서, "내인성" 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 언급한다. 일부 예시적 구현예에서, "내인성" 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 모 세포 (또는 숙주 세포)의 게놈에 의해 암호화된다. 다른 예시적 구현예에서, "내인성" 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 모 세포 (또는 숙주 세포)에 의해 운반되는 자발적 복제 플라스미드에 의해 암호화된다. 일부 예시적 구현예에서, "내인성" 유전자는 세포가 본래에 천연으로부터 단리된 경우 세포에 존재하는 유전자이고, 즉, 유전자는 "세포에 고유"하다. 다른 예시적 구현예에서, "내인성" 유전자는 예를 들어, 대조군 및 암호화 서열의 관계를 변경함으로써 재조합 기술을 통해 변경되었다. 따라서, "이종성" 유전자는 일부 예시적 구현예에서 숙주 세포에 "내인성"일 수 있다.

[0067] 대조적으로, "외인성" 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드, 또는 다른 물질(예를 들어, 지방산 유도체, 소분자 화합물 등)은 모 세포에 의해 생산되지 않고 따라서 세포 외부로부터 세포, 세포 배양물 또는 검정에 첨가되는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 또는 다른 물질을 언급한다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "고유"는 의도적으로 도입된 돌연변이가 없는 천연 또는 핵산, 단백질, 폴리펩타이드 또는 이의 단편으로부터 단리된 핵산, 단백질, 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 형태를 언급한다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같은 용어 폴리펩타이드의 "단편"은 2개의 아미노산 잔기에서 전체 아미노산 서열에서 1개의 아미노산 잔기를 뺀 크기 범위의 전장 폴리펩타이드 또는 단백질의 보다 짧은 부분을 언급한다. 개시내용의 특정 구현예에서, 단편은 폴리펩타이드 또는 단백질의 도메인의 전체 아미노산 서열(예를 들어, 기질 결합 도메인 또는 촉매 도메인)을 언급한다.

[0070] 용어 "돌연변이유발"은 유기체의 유전학적 정보가 "돌연변이체" 또는 "변이체"를 생성하기 위해 적합한 방식으로 변화되는 공정을 언급한다. 돌연변이체 핵산 서열을 생산하기 위한 단백질 암호화 핵산 서열의 돌연변이유발은 돌연변이가 단백질을 생성한다. 돌연변이유발은 또한 비-암호화 핵산 서열 내 변화를 언급한다. 일부 예시적 구현예에서, 비-암호화 핵산 서열 내 돌연변이는 변형된 단백질 활성을 유도한다.

[0071] 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 "돌연변이"는 유전자의 핵산 위치에서 또는 폴리펩타이드 또는 단백질의 아미노산 위치(잔기)에서의 영구적 변화를 언급한다. 실제로, 용어 "돌연변이"는 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 대조군 또는 표준 폴리뉴클레오타이드 서열과 관련하여 폴리뉴클레오타이드의 서열 내 변화를 유도하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 변형을 언급한다. 일부 예시적 구현예에서, 돌연변이체 폴리뉴클레오타이드 서열은 예를 들어, 발현 목적을 위한 코돈 최적화와 관련하여 암호화된 아미노산 서열을 변화시키지 않는 변형을 언급한다. 다른 예시적 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드 서열 내 돌연변이는 암호화된 아미노산 서열을 변형시키기 위한 방식으로 코돈을 변형시킨다. 따라서, 중쇄 지방산 유도체를 생성하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 대조군 티오에스테라제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다.

[0072] 유사하게 단백질과 관련하여, 용어 "돌연변이" 또는 "돌연변이된"은 대조군 또는 참조 단백질 서열과 관련하여 단백질의 서열 내 변화를 유도하는 아미노산 서열에 대한 변형을 언급한다. 돌연변이는 하나의 아미노산의 또 다른 아미노산으로의 치환, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입 또는 결실을 언급할 수 있다. 일부 예시적 구현예에서, "돌연변이"는 아미노산의 비-천연 아미노산으로의 대체 또는 화학적으로 변형된 아미노산 잔기로의 대체이다. 다른 예시적 구현예에서, "돌연변이"는 전구체 서열에 상대적인 서열 또는 서브서열 내 절단 (예를 들어, 결실 또는 차단) 또는 하나 또는 또 다른 말단으로부터 결실에 의한 서열의 단축이다. 다른 예시적 구현예에서, 돌연변이는 단백질 내 또는 단백질의 어느 하나의 말단에서 아미노산 또는 서브서열의 첨가(예를 들

어, 전구체 단백질 서열 내 2개의 연속 아미노산 사이에 삽입되는, 스트레치 내 2개 이상의 아미노산)로 단백질의 길이를 증가 (또는 연장)시킨다. 돌연변이는 당업자에게 공지된 임의의 다수의 방법을 통해 폴리뉴클레오타이드에 도입될 수 있고, 상기 방법은, 예를 들어, 무작위 돌연변이유발, 부위-특이적 돌연변이유발, 올리고뉴클레오타이드 지시된 돌연변이유발, 유전자 서플링, 지시된 전개 기술, 조합 돌연변이유발, 화학적 합성, 부위 포화 돌연변이유발 등을 포함한다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "돌연변이체" 또는 균등하게 "변이체"는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩타이드 서열을 언급한다. 따라서, 중쇄 지방산 유도체를 생성하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체는 대조군 티오에스테라제와 비교하여 이의 폴리펩타이드 서열에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "조작된 티오에스테라제 변이체"는 서열번호 1과 비교하여 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 돌연변이체 또는 변이체 티오에스테라제를 언급하고, 여기서, 상기 티오에스테라제 변이체는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유전자"는 핵산 서열, 예를 들어, RNA 생성물 또는 단백질 생성물을 암호화하는 DNA 서열, 및 RNA 또는 단백질 생성물의 발현에 영향을 미치는 작동적으로-연결된 핵산 서열(예를 들어, 발현 제어 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 해독 제어 서열 등)을 언급한다. 용어 "유전자 생성물"은 RNA, 예를 들어, tRNA, mRNA 및/또는 특정 유전자로부터 발현된 단백질을 언급한다.

[0076] 유전자와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "발현" 또는 "발현된"은 유전자의 하나 이상의 전사 및/또는 해독 생성물(들)의 생성을 언급한다. 예시적 구현예에서, 세포 내 DNA 분자의 발현 수준은 세포 내 존재하는 상응하는 mRNA의 양 또는 세포에 의해 생성된 상기 DNA에 의해 암호화된 단백질의 양을 기준으로 결정된다. 용어 "발현된 유전자"는 전령 RNA(mRNA)로 전사되고 이어서 단백질로 해독되는 유전자, 및 예를 들어, 전달 RNA(tRNA), 리보솜 RNA(rRNA), 및 단백질로 해독되지 않는 RNA와 같은 다른 유형의 RNA로 전사되는 유전자를 언급한다.

[0077] 세포 또는 무세포 시스템에서 핵산 분자의 발현 수준은 "발현 제어 서열" 또는 균등하게 "조절 서열"에 의해 영향을 받는다. "발현 제어 서열" 또는 "조절 서열"은 당업계에 공지되어 있고 숙주 세포 내 폴리뉴클레오타이드의 발현을 제공하는, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 터미네이터, RNA 안정성에 영향을 주는 뉴클레오타이드 서열, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 등을 포함한다. 예시적 구현예에서, "발현 제어 서열"은 전사에 관여하는 세포성 단백질과 특이적으로 상호작용한다(참조: 예를 들어, Maniatis et al., *Science*, 236: 1237-1245 (1987); Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). 예시적 방법에서, 발현 제어 서열은 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된다. "작동적으로 연결된"은 폴리뉴클레오타이드 서열 및 발현 제어 서열(들)이, 적당한 분자 (예를 들어, 전사 활성화인자 단백질)가 발현 제어 서열(들)과 접촉하는 경우, 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용하기 위해 기능적으로 연결됨을 의미한다. 예시적 구현예에서, 작동적으로 연결된 프로모터는 전사 및 해독 방향 측면에서 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열의 업스트림에 위치한다. 일부 예시적 구현예에서, 작동적으로 연결된 인핸서는 선택된 폴리뉴클레오타이드의 업스트림, 이내에 또는 다운스트림에 위치할 수 있다.

[0078] 일반적으로, "최소 억제 농도" (Minimum inhibitory concentration, MIC)는 밤새 항온처리 후 미생물의 가시적 성장을 억제하는 항미생물 물질의 최저 농도이다. MIC는 고체 성장 배지의 플레이트 또는 브로쓰 희석 방법으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 브로쓰 희석을 통한 MIC를 동정하기 위해, 세균의 동일한 용량을 점진적으로 보다 낮은 약물의 농도를 함유하는 액체 배지의 웰에 배양한다. 항생제의 최소 억제 농도는 어떠한 세균도 성장하지 못하는 마지막 웰의 농도와 세균 성장을 허용하는 다음 보다 낮은 용량 사이에 있다. 본원에 사용된 바와 같은 표현 "최소 억제 농도" 또는 "MIC"는 대조군에 비해 24시간 항온처리 기간에 미생물 배양의 성장을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 언급한다. 하나의 구현예에서, 잠재적 독성 화합물, 예를 들어, 옥탄올의 "최소 억제 농도"는 다양한 농도의 잠재적 독성 화합물에서 세포, 예를 들어, 이. 콜라이의 배양물을 성장시킴에 이어서 얼마나 많은 배양 성장이 잠재적 독성 화합물의 존재하에 24시간 동안 일어났는지를 결정함으로써 측정된다. 예시적 구현예에서, 배양물의 성장은 배양물 내 세포의 총수의 척도로서 24시간 성장 후 용해된 배양물로부터 총 단백질을 측정함으로써 측정한다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같은 "변형된 활성" 또는 예를 들어, 조작된 티오에스테라제 변이체의 단백질/폴리펩타이드의 "활성의 변경된 수준"은 적당한 대조군 단백질, 예를 들어, 상응하는 모 단백질 또는 상응하는 야생형 단백질의 특징과 비교하여, 단백질/폴리펩타이드의 활성의 하나 이상의 특징에서 차이를 언급한다. 따라서, 예시적

구현예에서, 상응하는 대조군 단백질과 비교하여 "변형된 활성"을 갖는 단백질의 활성에서의 차이는 재조합 숙주 세포에서 변형된 단백질의 활성을 측정하고 그렇지 않으면 이를 동종동계 숙주 세포에서 상응하는 대조군 단백질의 동일한 활성의 측정과 비교함으로써 결정된다. 변형된 활성은 예를 들어, 단백질의 구조물에서의 변화(예를 들어, 1차 구조물에 대한 변화, 예를 들어, 기질 특이성에서 변화를 유도하는 단백질의 뉴클레오타이드 암호화 서열에 대한 변화, 관찰된 동력학적 파라미터에서의 변화, 용해도에서의 변화 등); 단백질 안정성에서의 변화(예를 들어, 단백질의 증가되거나 감소된 분해) 등의 결과일 수 있다. 일부 예시적 구현예에서, "변형된 활성"을 갖는 폴리펩타이드는 본원에 기재된 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체이다.

[0080] 예시적 구현예에서, 본원에 기재된 폴리펩타이드는 예를 들어, "개선된 수준의 활성"인 "변형된 활성"을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같은 표현 "개선된 수준의 활성"은 동일한 조건하에서 상응하는 대조군 폴리펩타이드의 생화학적 및/또는 생물학적 기능과 비교하여 보다 높은 수준의 생화학적 또는 생물학적 기능(예를 들어, DNA 결합 또는 효소적 활성)을 갖는 폴리펩타이드를 언급한다. 개선된 활성 정도는 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 200% 이상, 약 500% 이상, 약 1000% 이상 또는 상기내 임의의 범위일 수 있다.

[0081] 따라서, "개선된 활성"은 폴리펩타이드의 개선된 촉매 활성 또는 개선된 촉매 효율을 언급할 수 있고, 여기서, 촉매 효율은 예를 들어, 폴리펩타이드의 상기 효소에 의해 촉매된 반응의 반응 속도 내 증가를 언급한다. 촉매 활성/촉매 효율은 예를 들어, V_{max} (반응이 진행할 수 있는 최대 속도), K_m (미카엘리스 상수), k_{cat} (초 당 효소 분자 당 턴오버되는 기질 분자의 수) 등, 또는 k_{cat}/K_m (효소 효율의 척도)과 같은 반응의 하나 이상의 동력학 파라미터(측정 또는 계산된)를 개선시킴에 의해 개선될 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드의 "개선된 촉매 활성" 또는 "개선된 촉매 효율"은 임의의 다수의 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들어, "개선된 활성"은 역가에서의 증가(농도: g/L, 또는 mg/L, 또는 g/Kg), 조성에서의 변화(생성된 특이적 지방산 중/총 지방산 유도체 (FAS)의 양), 분자 성분의 개선된 비율(예를 들어, C8/C10 함량 또는 C10/C12 함량 등) 또는 개선된 활성의 효소를 발현하는 재조합 세포에 의해 생성된 생성물의 FOC에서의 증가(대조군에 대한 배수, 하기 참조)로서 측정될 수 있다.

[0082] 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 표현 "중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는" 또는 "중쇄 길이 지방산 유도체 화합물의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는" 또는 "중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는" 또는 "중쇄 길이의 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는" 또는 "중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는"은 동일한 조건하에서 적당한 대조군 폴리펩타이드/단백질과 비교하는 경우, 중쇄 지방산 유도체 중(6 내지 10개 탄소 길이의 알킬 쇄를 갖는 지방산 및 지방산 유도체)의 생산 증가를 유도하는 폴리펩타이드/단백질의 "개선된 활성", 예를 들어, "개선된 촉매 활성"을 언급한다.

[0083] 일부 예시적 구현예에서, "중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는" 또는 균등하게 "중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는" 폴리펩타이드/단백질은 특정 쇄 길이의 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는다. 따라서, 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 표현 "C8 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는"은 8개 탄소 지방산 유도체의 생산에서의 증가(예를 들어, % C8 FAS, 증가된 C8/C10 비율 등으로서 측정된)를 유도하는 "개선된 촉매 활성" 또는 "개선된 활성"을 갖는 폴리펩타이드/단백질을 언급한다.

[0084] 유사하게, 일부 예시적 구현예에서, "중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는" 또는 균등하게 "중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는" 폴리펩타이드/단백질은 "C10 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성"을 갖는다. 따라서, 상기 폴리펩타이드/단백질은 10개 탄소 지방산 유도체에서 생산 증가(예를 들어, %C10 FAS, 증가된 C10/C12 비율 등으로서 측정된)를 유도하는 "개선된 활성"을 갖는다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같은 표현 "대조군 초과 배수(fold over control)" 또는 균등하게 "FOC"는 조작된 변화를 갖지 않는 대조군 티오에스테라제를 포함하는 적당한 대조군 세포, 예를 들어, 동종동계 숙주 세포에서 측정된 동일한 미터법에 대한 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 세포의 측정된 특정 미터법의 비율을 언급한다. 따라서, 일반적으로, FOC는 변이체의 미터법 A/대조군의 미터법 A와 균등하다(일부 예시적 구현예에서, %C8의 FOC는 적당한 대조군, 예를 들어, 특정 변화를 함유하도록 조작되지 않은 티오에스테라제를 포함하는 동종동계 대조군의 %C8과 비교하여 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 세포에 의해 생산된 %C8을 의미한다. 따라서, 예시적 구현예에서, %C8의 1.1의 FOC를 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 재조합 세포는 대조군 티오에스테라제를 포함하는 동종동계 대조군의 %C8과 비교하여 조작된 티오에스테라제 변이체를 포함하는 세포에 의해 생산된 8개 탄소 지방산 유도체의 %에 있어서 10% 개선(증가)을 나타낸다.

- [0086] "대조군" 샘플, 예를 들어, "대조군" 뉴클레오타이드 서열, "대조군" 폴리펩타이드 서열, "대조군" 세포 등 또는 값은 시험 샘플과의 비교를 위한 참조, 일반적으로 공지된 참조로서 작용하는 샘플을 언급한다. 예를 들어, 예시적 구현예에서, 시험 샘플은 조작된 티오에스테라제 변이체에 의해 제조되는 지방산 유도체 조성물을 포함하고, 상기 대조군 샘플은 상응하거나 지정된 비-변형된/비-변이 티오에스테라제(예를 들어, 서열번호 1)에 의해 제조된 지방산 유도체 조성물을 포함한다. 당업자는 대조군이 임의의 다수의 파라미터의 평가를 위해 디자인될 수 있음을 인지할 것이다. 추가로, 당업자는 대조군이 주어진 상황에서 가치가 있음을 이해할 것이고 대조군 값과의 비교를 기준으로 데이터를 분석할 수 있다.
- [0087] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합"은 유전학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 세포, 조직 또는 유기체를 언급한다. 용어 "재조합"은 유전학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 세포, 조직 또는 상기 유전학적 변형을 갖는 유기체의 후손들 뿐만 아니라 제1 세대의 유전학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 세포, 조직 또는 유기체에 균등하게 적용된다.
- [0088] 세포와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "재조합"은 세포가 이중성 핵산 또는 단백질의 도입에 의해 변형되거나 본래의 핵산 또는 단백질의 변화에 의해 변형되거나, 세포가 그와 같이 변형된 세포로부터 유래되고 상기 유래된 세포가 변형을 포함함을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, "재조합 세포" 또는 균등하게 "재조합 숙주 세포"는 본래(비-재조합) 형태의 세포내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하도록 변형될 수 있거나, 본래의 유전자를 비정상적으로 발현하도록 변형될 수 있거나, 예를 들어, 본래의 유전자는 과발현되거나, 과소발현되거나 전혀 발현되지 않을 수 있다. 예시적 구현예에서, "재조합 세포" 또는 "재조합 숙주 세포"는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체와 같은 이중성 티오에스테라제를 발현하도록 조작된다. 재조합 세포는 세균, 바이러스 또는 진균류와 같은 미생물로부터 유래될 수 있다. 추가로, 재조합 세포는 식물 또는 동물 세포로부터 유래할 수 있다. 예시적 구현예에서, "재조합 숙주 세포" 또는 "재조합 세포"는 지방산, 지방 에스테르(예를 들어, 왁스, 지방산 에스테르, 지방 에스테르, 지방산 메틸 에스테르(FAME), 지방산 에틸 에스테르(FAEE)), 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FAce), 지방 알코올, 지방 알데하이드, 탄화수소, 지방 아민, 말단 올레핀, 내부 올레핀, 케톤, 이관능성 지방산 유도체(예를 들어, 오메가-하이드록시 지방산, 오메가-하이드록시 디올, 오메가-하이드록시 FAME, 오메가-하이드록시 FAEE) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 지방산 유도체를 생산하기 위해 사용된다. 따라서, 일부 예시적 구현예에서, "재조합 숙주 세포"는 "생산 숙주" 또는 균등하게, "생산 숙주 세포"이다. 일부 예시적 구현예에서, 재조합 세포는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 지방산 생합성 효소 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하고, 여기서, 상기 재조합 세포는 폴리뉴클레오타이드를 발현하기 위해 효과적인 조건하에서 탄소원의 존재하에 배양되는 경우 지방산 유도체 조성물을 생산한다.
- [0089] 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "재조합" 또는 균등하게 "이중성"은 폴리뉴클레오타이드가 천연 또는 자연 발생 형태의 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 변형되거나 자연 발생 변이체의 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 변형되었음을 나타낸다. 예시적 구현예에서, 재조합 폴리뉴클레오타이드 (또는 재조합 폴리뉴클레오타이드의 카피물 또는 상보체)는 이의 자연 발생 형태와는 상이하도록 사람 손으로 조작된 것이다. 따라서, 예시적 구현예에서, 재조합 폴리뉴클레오타이드는 본래 유전자의 돌연변이체 형태 또는 본래의 유전자의 자연 발생 변이체의 돌연변이체 형태이고, 여기서, 상기 돌연변이는 의도적인 인간 조작에 의해, 예를 들어, UV 조사 또는 돌연변이유발 화학물질의 사용을 통한, 돌연변이유발 올리고뉴클레오타이드를 사용한 포화 돌연변이유발에 의해 제조된다. 이러한 재조합 폴리뉴클레오타이드는 유전자로부터 천연 또는 자연 발생 변이체 형태에 대한 하나 이상의 점 돌연변이, 결실 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 유사하게, 제2 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암호화 서열)에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 "재조합" 폴리뉴클레오타이드이다. 따라서, 재조합 폴리뉴클레오타이드는 자연에서 발견되지 않는 폴리뉴클레오타이드 조합을 포함한다. 재조합 단백질(상기 논의된)은 전형적으로 재조합 폴리뉴클레오타이드로부터 발현되는 것이고 재조합 세포, 조직 및 유기체는 재조합 서열(폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드)을 포함하는 것들이다.
- [0090] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "미생물"은 일반적으로 현미경적 유기체를 언급한다. 미생물은 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 예시적 원핵세포 미생물은 예를 들어, 세균, 고세균, 시아노박테리아 등을 포함한다. 예시적 세균은 에스케리치아 콜라이이다. 예시적인 진핵세포 미생물은 예를 들어, 효모, 원생동물, 조류 등을 포함한다. 예시적인 구현예에서, "재조합 미생물"은 유전학적으로 변화되어 이중성 핵산 서열 및/또는 이중성 단백질을 발현하거나 포함하는 미생물이다.
- [0091] "생산 숙주" 또는 균등하게 "생산 숙주 세포"는 생성물을 생산하기 위해 사용되는 세포이다. 본원에 개시된 바와 같이, "생산 숙주"는 전형적으로 선택된 유전자를 발현하거나 과발현하거나, 선택된 유전자의 발현이 약화된

도록 변형된다. 따라서, "생산 숙주" 또는 "생산 숙주 세포"는 "재조합 숙주" 또는 균등하게 "재조합 숙주 세포"이다. 생산 숙주의 비제한적인 예는 식물, 동물, 인간, 세균, 효모, 시아노박테리아, 조류, 및/또는 필라멘트형 진균류 세포를 포함한다. 예시적인 "생산 숙주"는 재조합 에스테리치아 콜라이 세포이다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같은 "아실-ACP"는 아실 쇠의 카보닐 탄소와 아실 캐리어 단백질(ACP)의 포스포판테테이닐 모이어티의 설프하이드릴 그룹 사이에 형성되는 아실 티오에스테르를 언급한다. 일부 예시적 구현예에서, 아실-ACP는 완전히 포화된 아실-ACP의 합성에서 중간체이다. 다른 예시적 구현예에서, 아실-ACP는 불포화된 아실-ACP의 합성에서 중간체이다. 일부 예시적 구현예에서, 아실-ACP의 아실 그룹의 탄소 쇠는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개의 탄소를 갖는다. 다른 예시적 구현예에서, 아실-ACP의 아실 그룹의 탄소 쇠는 중쇄이고 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 탄소를 갖는다. 다른 예시적 구현예에서, 아실-ACP의 아실 그룹의 탄소 쇠는 8개 길이의 탄소이다. 여전히 다른 예시적 구현예에서, 아실-ACP의 아실 그룹의 탄소 쇠는 10개 길이의 탄소이다. 이들 아실-ACP 각각은 예를 들어, 티오에스테라제와 같은, 예를 들어, 아실-ACP를 지방산 유도체로 전환시키는 조작된 티오에스테라제 변이체와 같은 효소에 대한 기질이다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같은, 표현 "지방산 유도체 생합성 경로"는 지방산 유도체를 생성하는 생화학적 경로를 언급한다. 따라서, "지방산 유도체 생합성 경로"를 포함하는 효소는 본원에서 "지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드" 또는 균등하게 "지방산 유도체 효소"로서 언급된다. 상기 논의된 바와 같이, 용어 "지방산 유도체"는 티오에스테라제 반응을 포함하는 생화학적 경로로부터 유래된 분자/화합물을 포함한다. 따라서, 티오에스테라제 효소(예를 들어, 티오에스테라제 활성을 갖는 효소 EC 3.1.1.14)는 "지방산 유도체 생합성 펩타이드" 또는 균등하게 "지방산 유도체 효소"이다. 티오에스테라제 이외에, 지방산 유도체 생합성 경로는 목적하는 특징을 갖는 지방산 유도체를 생산하기 위해 추가의 효소를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "지방산 유도체 효소" 또는 균등하게 "지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드"는 지방산 유도체를 생성하도록 발현되거나 과발현될 수 있는 효소를 총체적으로 및 개별적으로 나타낸다. "지방산 유도체 효소" 또는 균등하게 "지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드"의 비제한적인 예는 예를 들어, 지방산 신테타제, 티오에스테라제, 아실-CoA 신테타제, 아실-CoA 리덕타제, 아실 ACP 리덕타제, 알코올 데하이드로게나제, 알코올 O-아실트랜스퍼라제, 지방 알코올-형성 아실-CoA 리덕타제, 지방산 데카복실라제, 지방 알데하이드 데카보닐라제 및/또는 산화 데포밀라제, 카복실산 리덕타제, 지방 알코올 O-아세틸 트랜스퍼라제, 에스테르 신타제 등을 포함한다. "지방산 유도체 효소" 또는 균등하게 "지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드"는 기질을 지방산 유도체로 전환시킨다. 예시적 구현예에서, 지방산 유도체 효소에 대해 적합한 기질은 지방산 유도체 효소에 의해 상이한 제2 지방산 유도체로 전환되는 제1 지방산 유도체일 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "배양물"은 생존 세포를 포함하는 액체 배지를 언급한다. 하나의 구현예에서, 배양물은 제어된 조건하에 미리 결정된 배양 배지, 예를 들어, 선택된 탄소원 및 질소를 포함하는 액체 배지에서 성장된 재조합 숙주 세포의 배양물에서 성장하는 세포를 포함한다. "배양하는" 또는 "배양"은 액체 또는 고체 배지에서 적합한 조건하에 숙주 세포 (예를 들어, 재조합 숙주 세포) 집단을 성장시킴을 언급한다. 특정 구현예에서, 배양은 기질의 최종-생성물로의 생전환을 언급한다. 배양 배지는 널리 공지되어 있고 상기 배양 배지의 개별 성분들은 상업적 공급원, 예를 들어, Difco™ 배지 및 BBL™ 배지로부터 가용하다. 비제한적인 예에서, 수성 영양 배지는 10 g/L의 펩톤 및 10 g/L의 효모 추출물을 포함하는 YP 배지와 같은, 질소, 염 및 탄소의 복합 공급원을 포함하는 "풍부 배지"이다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "역가"는 지방산 유도체, 예를 들어, 숙주 세포 배양물의 유닛 용적 당 생산되는 중쇄 지방산 유도체의 양을 언급한다. 역가는 특정 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체, 또는 예를 들어, 소정의 재조합 숙주 세포 배양물 또는 지방산 유도체 조성물에 의해 생산되는 포화되고 불포화된 중쇄 지방산 유도체의 혼합물과 같은 상이한 쇠 길이 또는 상이한 관능기의 지방산 유도체의 조합물의 양을 언급할 수 있다.

[0096] 본원에 사용된 표현 "상업적 역가들" 또는 "상업적 역가"는 지방산 유도체, 예를 들어, 상업적 생산이 경제적으로 가능하게 하는 숙주 세포 배양물의 유닛 용적 당 생성되는 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체의 양을 언급한다. 전형적으로, 상업적 역가들은 약 10 g/L (또는 균등하게 10 g/Kg) 내지 약 200 g/L 이상 사이의 범위에 있다. 따라서, 상업적 역가는 10 g/L 이상, 20 g/L 이상, 30 g/L 이상, 40 g/L 이상, 50 g/L 이상, 60 g/L 이상, 70 g/L 이상, 80 g/L 이상, 90 g/L 이상, 100 g/L 이상, 110 g/L 이상, 120 g/L 이상, 130 g/L 이상, 140 g/L 이상, 150 g/L 이상, 160 g/L 이상, 170 g/L 이상, 180 g/L 이상, 190 g/L 이상, 200 g/L 이상

이다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같은 "지방산 유도체의 수율", 예를 들어, "숙주 세포"에 의해 생산되는 중쇄 지방산 유도체 또는 다른 화합물의 수율은 투입된 탄소원이 숙주 세포에서 생성물(즉, 중쇄 지방산 유도체)로 전환되는 효율을 언급한다. 따라서, 표현 "지방산 유도체의 수율"은 소정 양의 탄소 기질로부터 생성되는 생성물의 양을 언급한다. 퍼센트 수율은 이론적 수율(탄소 또는 에너지 손실이 없는 이상적인 조건에서 합성된 생성물)의 퍼센트이다. 따라서, 퍼센트 수율 = (생성물 질량/이론적 수율의 질량) × 100. 수율은 특정 중쇄 지방산 유도체, 또는 지방산 유도체의 조합물을 언급할 수 있다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "생산성"은 유닛 시간 당 숙주 세포 배양물의 유닛 용적 당 생성되는, 중쇄 지방산 유도체, 예를 들어, 6-탄소 지방산 유도체, 8-탄소 지방산 유도체, 10-탄소 지방산 유도체 등의 양을 언급한다. 생산성은 소정의 숙주 세포 배양물에 의해 생성되는 특정 8 및/또는 10 탄소 지방산 유도체 또는 지방산 유도체 또는 다른 화합물(들)의 조합물을 언급할 수 있다. 따라서, 예시적 구현예에서, 예를 들어, 이. 콜라이와 같은 재조합 숙주 세포에서 조작된 티오에스테라제 변이체의 발현은 상응하는 대조군 티오에스테라제를 발현하는 재조합 숙주 세포 또는 다른 적당한 대조군과 비교하여 8 및/또는 10 탄소 지방산 유도체 및/또는 다른 화합물의 증가된 생산성을 유도한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "총 지방 중" 및 "총 지방산 생성물" 및 "총 지방산 유도체"는 본원에서 숙주 세포, 예를 들어, 조작된 티오에스테라제 변이체를 발현하는 숙주 세포에 의해 생산되는 지방산 유도체의 양(역가)과 관련하여 상호교환적으로 사용될 수 있다. 총 지방 중 등은 불꽃 이온화 검출과 함께 가스 크로마토그래피(GC-FID)에 의해 평가될 수 있다. 동일한 용어는 예를 들어, 총 지방산 유도체 분석을 언급하는 경우, 총 지방 에스테르, 총 지방 알코올, 총 지방 알데하이드, 총 지방 아민, 및 총 유리 지방산을 의미하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 동일한 용어는 총 지방산 메틸 에스테르, 지방산 에틸 에스테르 또는 지방 알코올 아세테이트 에스테르를 의미하기 위해 사용될 수 있다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "탄소원"은 원핵세포 또는 단순 진핵세포 성장을 위해 탄소원으로서 사용하기에 적합한 기질 또는 화합물을 언급한다. 탄소원은 중합체, 탄수화물, 산, 알코올, 알데하이드, 케톤, 아미노산, 펩타이드, 및 가스(예를 들어, CO 및 CO₂)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 형태일 수 있다. 예시적 탄소원은 모노사카라이드, 예를 들어, 글루코스, 프럭토스, 만노스, 갈락토스, 크실로스, 및 아라비노스; 올리고사카라이드, 예를 들어, 프럭토-올리고사카라이드 및 갈락토-올리고사카라이드; 폴리사카라이드, 예를 들어, 전분, 셀룰로스, 펙틴, 및 크실란; 디사카라이드, 예를 들어, 슈크로스, 말토스, 셀로비오스, 및 투라노스; 셀룰로스성 재료 및 변이체, 예를 들어, 헤미셀룰로스, 메틸 셀룰로스 및 나트륨 카복시메틸 셀룰로스; 포화되거나 불포화된 지방산, 숙시네이트, 락테이트, 및 아세테이트; 알코올, 예를 들어, 에탄올, 메탄올 및 글리세롤 또는 이의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 탄소원은 또한 광합성 생성물, 예를 들어, 글루코스일 수 있다. 특정 구현예에서, 탄소원은 바이오매스이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 글루코스이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 슈크로스이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 글리세롤이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 단순 탄소원이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 재생 탄소원이다. 다른 예에서, 탄소원은 천연 가스 또는 천연 가스의 성분, 예를 들어, 메탄, 에탄, 프로판 등이다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "바이오매스"는 이로부터 탄소원이 유래하는 임의의 생물학적 재료를 언급한다. 일부 구현예에서, 바이오매스는 생전환을 위해 적합할 수 있는 탄소원으로 프로세싱된다. 다른 구현예에서, 상기 바이오매스는 탄소원으로서의 추가의 프로세싱을 요구하지 않는다. 탄소원은 중쇄 지방산 유도체를 포함하는 조성물로 전환될 수 있다.

[0101] 바이오매스의 예시적 공급원은 식물 재료 또는 옥수수, 사탕 수수, 스위치그래스(switchgrass), 쌀, 밀, 경질 목재, 연질 목재, 팜, 대마 등으로부터 유래된 야채이다. 바이오매스의 또 다른 예시적 공급원은 대사 폐기물, 예를 들어, 동물성 물질(예를 들어, 소 비료)이다. 바이오매스의 추가의 예시적 공급원은 조류 및 다른 해양 식물, 예를 들어, 대형조류 및 켈프를 포함한다. 바이오매스는 또한 글리세롤, 발효 폐기물, 목초, 밀짚, 림버, 펄프, 하수, 쓰레기, 셀룰로스 도시 폐기물, 지방 고체 폐기물, 기름 화학 폐기물, 및 음식 잔재 (예를 들어, 비누, 오일 및 지방산)을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 산업, 농업, 임학 및 가정으로부터의 폐기물을 포함한다. 용어 "바이오매스"는 또한 탄소 공급원, 예를 들어, 탄수화물(예를 들어, 모노사카라이드, 디사카라이드 또는 폴리사카라이드)을 언급할 수 있다.

[0102] 생성물(예를 들어, 중쇄 지방산 유도체)과 관련하여, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단리된"은 세포 성분, 세포 배양 배지 또는 화학적 또는 합성 전구체로부터 분리되는 생성물을 언급한다. 본원에 기재된 방법에 의해 생산되는 중쇄 지방산 유도체는 세포질 내에서 뿐만 아니라 발효 브로쓰에서 상대적으로 불혼화성일 수 있다.

따라서, 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체는 세포의 유기상에서 수거하고 이로써 "단리된다".

[0103] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "정제한다", "정제된" 또는 "정제"는 예를 들어, 단리 또는 분리에 의해 이의 환경으로부터의 분자의 제거 또는 단리를 의미한다. "실질적으로 정제된" 분자는 이들이 연합된 다른 성분들이 적어도 약 60% 부재(예를 들어, 적어도 약 65% 부재, 적어도 약 70% 부재, 적어도 약 75% 부재, 적어도 약 80% 부재, 적어도 약 85% 부재, 적어도 약 90% 부재, 적어도 약 95% 부재, 적어도 약 96% 부재, 적어도 약 97% 부재, 적어도 약 98% 부재, 적어도 약 99% 부재)이다. 본원에 사용된 바와 같이, 이들 용어는 또한 샘플로부터 오염물의 제거를 언급한다. 예를 들어, 오염물의 제거는 샘플 중에 중쇄 지방산 유도체 또는 다른 화합물의 퍼센트의 증가를 유도할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체 또는 다른 화합물이 재조합 숙주 세포에서 생산되는 경우, 중쇄 지방산 유도체 또는 다른 화합물은 숙주 세포 바이오매스, 또는 이들이 가수분해된 경우 단백질, 핵산 및 기타 세포성 성분과 같은 이의 성분들의 제거에 의해 정제될 수 있다. 정제 후, 샘플 중 중쇄 지방산 유도체 또는 다른 화합물을 포함하는 말로닐-CoA 유래된 화합물의 퍼센트는 증가된다. 용어 "정제한다", "정제된" 및 "정제"는 절대 순도를 요구하지 않는 상대적 용도이다. 따라서, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체가 재조합 숙주 세포에서 생산되는 경우, 중쇄 지방산 유도체는 실질적으로 다른 세포 성분(예를 들어, 핵산, 폴리펩타이드, 지질, 탄수화물 또는 다른 탄화수소)으로부터 분리된다.

[0104] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약화시킨다(attenuate)"는 약화시키거나(weaken), 감소시키거나, 감쇠시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 활성은 예를 들어, 이의 활성을 감소시키기 위해 폴리펩타이드 구조를 변형시킴에 의해(예를 들어, 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 변형시킴에 의해) 약화될 수 있다.

[0105] I. 서론

[0106] 상기 논의된 바와 같이, 중쇄 지방산 (MCFA) 유도체 및 중쇄 지방산(MCFA) 유래된 생성물에 큰 관심이 있다. MCFA는 이들의 많은 선호될 수 있는 성질 때문에 가치가 있다. 실제로, MCFA는 예를 들어, 계면활성제, 접착제, 유화제, 식용 오일, 향미료, 향수, 단량체, 중합체, 천연 생성물 살충제 및 향미생물제 등의 재생 및 생분해성 성분들로서 사용된다.

[0107] 이들의 많은 용도 때문에, 산업 및 기능식품 응용에서 중쇄 지방산 유도체 화합물의 수요는 과거 몇년 동안에 증가하는 추세에 있고 계속 증가하고 있다. 그러나, 불행하게도 중쇄 지방산 유도체의 공급은 식물로부터 또는 화학적 합성으로부터 다른 보다 긴 장쇄 유리 지방산 생성물의 생성과 관련되어 있고; 따라서, 공급은 매우 휘발성이고 불안정하다.

[0108] 따라서, 당업계에서 요구되는 것은 MCFA 및 이들의 유도체를 위해 강하고 안정한 공급 체인을 제공할 수 있는 재료 및 방법이다. 다행히도, 본원의 개시내용은 중쇄 지방산 유도체에 대해 강하고, 선택적이고 안정한 공급 체인을 지지하기 위해 요구되는 도구 및 방법을 제공하여서 상기 및 다른 필요분을 제공한다.

[0109] II. 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체

[0110] A. 일반 방법

[0111] 본 개시내용은 재조합 유전학 분야에서의 통상의 기술을 사용한다. 분자 생물학 및 유전학에서 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 4th edition (Cold Spring Harbor, N.Y. 2012); Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998) and Supplements 1-115 (1987-2016))을 포함한다. 본 개시내용은 또한 생화학 분야에서의 통상의 기술을 사용한다. 생화학에서 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition, David L. Nelson and Michael M. Cox eds. W.H. Freeman (2012))을 포함한다. 본 개시내용은 또한 산업적 발효에서 통상의 기술을 사용한다. 발효에서 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Principles of Fermentation Technology, 3rd Edition by Peter F. Stanbury, Allan Whitaker and Stephen J. Hall. Butterworth-Heinemann (2016); Fermentation Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, Arnold L. Demain and A.R. Allman eds. CRC Press (2007))을 포함한다. 본 개시내용은 또한 유기 화학 분야에서의 통상의 기술을 사용한다. 유기 화학에서 일반 방법 및 용어를 기재하는 기본 텍스트는 예를 들어, 문헌(참조: Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques, Stephane Caron ed., John Wiley and Sons Inc. (2011); The Synthetic Organic Chemist's Companion, Michael C. Pirrung, John Wiley and Sons Inc. (2007); Organic Chemistry, 9th

Edition - Francis Carey and Robert Giuliano, McGraw Hill (2013))을 포함한다.

[0112] 핵산에 대해, 크기는 킬로베이스(kb) 또는 염기쌍(bp)으로 나타낸다. 평가는 전형적으로 아가로스 또는 아크릴 아미드 겔 전기영동으로부터, 서열분석된 핵산으로부터 또는 공개된 DNA 서열로부터 유래한다. 단백질에 대해, 크기는 킬로달톤(kDa) 또는 아미노산 잔기 수로 나타낸다. 단백질 크기는 겔 전기영동으로부터, 서열분석된 단백질로부터, 유래된 아미노산 서열로부터 또는 공개된 단백질 서열로부터 평가된다.

[0113] 시판되지 않는 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 문헌(참조: Van Devanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984))에 기재된 바와 같이 자동 합성기를 사용하여 문헌(참조: Beaucage & Caruthers, Tetrahedron Letts. 22: 1859-1862 (1981))에 처음 기재된 고체 상 포스포라미디트 트리에스테르 방법에 따라 화학적으로 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 문헌(참조: Pearson & Reanier, J. Chrom. 255: 137-149 (1983))에 기재된 바와 같이 고유 아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 또는 음이온-교환 HPLC에 의해 정제된다.

[0114] 클로닝된 유전자 및 합성 올리고뉴클레오타이드의 서열은 예를 들어, 문헌(참조: Wallace et al., Gene 16:21-26 (1981))의 이중 가닥 주형을 서열분석하기 위한 쇠 중결 방법을 사용한 클로닝 후 입증될 수 있다.

[0115] B. 티오에스테라제

[0116] 1. 일반사항

[0117] 티오에스테라제 또는 티오에스테르 하이드롤라제는 티오에스테르의 산 및 티올로의 가수분해를 촉매한다. 티오에스테라제(TE)는 상이한 기질에 대한 이들의 활성을 기준으로 EC 3.1.2.1 내지 EC 3.1.2.27로 분류되고 나머지 많은 것들은 분류되어 있지 않다(EC 3.1.2.-) (참조: 예를 들어, Cantu, D.C., et al. (2010) Protein Science 19: 1281-1295). TE는 다양한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 예시적인 TE는 식물 TE(참조: 예를 들어, Voelker and Davies, J. Bact., Vol., 176, No. 23, pp. 7320-27, 1994, 미국 특허 제5,667,997호, 및 미국 특허 제5,455,167호), 세균 TE(참조: 예를 들어, 미국 특허 제9,175,234호); 시아노박테리아 TE 및 조류, 포유동물, 곤충 및 진균류 공급원을 포함한다.

[0118] 특허, 아실-아실 캐리어 단백질(ACP) 티오에스테라제(TE)는 EC 번호 3.1.2.14하에 분류되고 이는 아실-ACP의 티오에스테르 결합을 선택적으로 가수분해하고 유리 지방산(FFA) 및 ACP를 방출시킨다. 따라서, 아실-ACP 티오에스테라제는 알킬 티오에스테르의 이들의 가수분해 생성물부터 비롯되는 지방산 유도체의 탄소쇄 길이를 결정하는데 중요한 역할을 한다.

[0119] 쿠페아 후케리아나(Cuphea hookeriana) (ChFatB2)로부터의 FatB2 티오에스테라제는 예시적 아실-ACP 티오에스테라제이다. ChFatB2는 중쇄 길이 지방산 유도체에 대해 천연적으로 높은 선택성을 갖는다. 그러나, 상기 식물 효소는 산업 미생물 이. 콜라이와 같은 미생물에서 발현되는 경우 낮은 활성을 갖는다. 본원에 상세히 기재된 바와 같이, 미생물에서 중쇄 길이 지방산을 생산하기 위한 낮은 능력은 이의 낮은 활성, C8 및 C10에 대한 불충분한 선택성 및 불량한 용해도 때문이다.

[0120] 쿠페아 후케리아나로부터의 야생형 ChFatB2의 폴리펩타이드/단백질 서열은 GenBank 승인 번호 AAC49269(참조: 예를 들어, Dehesh, K., et al. (1996) The Plant Journal 9(2): 167-72)를 갖는다. 본원에 기재된 ChFatB2 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 야생형 서열을 포함하고, 여기서, 야생형 단백질의 N-말단에서 식물 전좌 리더 서열을 포함하는 상기 처음 88개 아미노산은 제거되고 메티오닌(M)으로 대체되어 세균의 세포질 내 효소의 활성 형태의 생성을 촉진시킨다. 따라서, 야생형(wt) ChFatB2와 같이 본원에 기재된 야생형 ChFatB2 티오에스테라제의 아미노산 서열은 서열번호 1로서 하기에 나타낸다:

[0121] MLPDWSRLLTAITTVFVKSRRPDMHDKSKRPDMLVDSFGLESTVQDGLVFRQSFSS

[0122] IRSYEIGTDRITASITLMNHLQETSLNHCKSTGILLDGFGRGTLEMCKRDLIIVVVIKMQ

[0123] IKVNRYPAGWDTVEINTRFSRLGKIGMGRDWLISDCNTGEILVRATSAYAMMNQKT

[0124] RRLSKLPYEVHQEIVPLFVDSPIEDSLKVHKFKVKTGDSIQKGLTPGWNDLDVNO

[0125] HVSNNKYIGWILESMPTVELETQELCSLALEYRRECGRDSVLESVTAMDPSKVGVR

[0126] SQYQHLLRLEDGTAIVNGATEWRPKNAGANGAISTGKTSNGNSVS (서열번호 1)

[0127] 서열번호 1의 활성은 포화된 8-탄소(8:0) 및 포화된 10 탄소(10:0) ACP 기질에 특이적인 것으로 공지되어 있다

(참조: 예를 들어, 상기 Dehesh, K., et al. (1996)). 그러나, 불행하게도 서열번호 1에 의해 소유된 중쇄 길이의 지방산 유도체를 생산하는 능력은 중쇄 지방산 유도체의 대량 생산을 위해 불충분하다. 따라서, 중쇄 지방산 유도체의 안정하고 신뢰할 수 있는 공급에 필요에 응답하여, 예시적인 구현예에서, 서열번호 1은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 생산하기 위해 변화된다.

[0128] 따라서, 예시적인 구현예에서, 개시내용은 중쇄 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방 에스테르, 예를 들어, 중쇄 지방산 메틸 에스테르(FAME) 및 중쇄 지방산 에틸 에스테르(FAEE), 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE), 중쇄 지방 아민, 중쇄 지방 알데하이드, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 탄화수소, 중쇄 지방 케톤, 중쇄 알칸, 중쇄 말단 올레핀, 중쇄 내부 올레핀, 중쇄 하이드록시 지방산 유도체, 중쇄 이관능성 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방 이산(diacid), 중쇄 지방 디올, 불포화된 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 서열번호 1을 갖는 효소와 비교하여 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드를 제공한다.

[0129] 일부 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 서열번호 1의 조작된 TE 변이체(예를 들어, 서열번호 16 내지 서열번호 46)는 비-변이체/비-가공된 대조군 티오에스테라제, 예를 들어, 서열번호 1과 비교하여 증가된 순 양성 표면 전하를 갖는다.

[0130] 2. 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체에 대한 검정

[0131] 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체는 조작된 TE 변이체(즉, 시험 균주)를 포함하는 세균 균주에 의해 생산되는 중쇄 지방산 유도체(예를 들어, 유리 지방산(FFA), 지방산 에틸 에스테르, FAEE, 지방 알코올(FALC), 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE), 등)을 측정하고, 이들 중쇄 지방산 유도체를 이것이 포함하는 대조군 TE를 제외하고 시험 균주에 동종동계인 적당한 대조군 시험 균주에 의해 생산되는 중쇄 지방산 유도체(예를 들어, FFA, FAEE, FALC, FACE 등)의 측정값과 비교함으로써 동정된다.

[0132] 일부 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 총 역가를 측정하고 시험 균주와 대조군 균주를 비교하였다. 일부 예시적 구현예에서, 시험 균주에 의해 생산되는 특이적 중쇄 지방산 유도체(예를 들어, C8 지방산 유도체)를 포함하는 중쇄 지방산 유도체의 총 역가의 퍼센트를 측정하고, 이것이 포함하는 대조군 TE(예를 들어 서열번호 1)를 제외한 시험 균주와 동종동계인 적당한 대조군 균주에 의해 생산되는 특이적 중쇄 지방산 유도체를 포함하는 중쇄 지방산 유도체의 총 역가의 퍼센트와 비교하였다.

[0133] 예시적인 구현예에서, 플레임-이온화 검출(GC-FID)을 사용한 가스-크로마토그래피는 중쇄 지방산 유도체를 검정하기 위해 사용된다. GC-FID는 당업계에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, Adlard, E. R.; Handley, Alan J. (2001). Gas chromatographic techniques and applications. London: Sheffield Academic). 그러나, 정량 및 분석을 위한 임의의 적절한 방법은 예를 들어, 질량 분광측정기(MS), 가스 크로마토그래피-질량 분광측정기(GC-MS), 액체 크로마토그래피 질량 분광측정기(LC-MS), 박층 크로마토그래피(TLC), 등으로서 사용될 수 있다.

[0134] C. 조작된 티오에스테라제 변이체를 제조하는 방법

[0135] 조작된 TE 변이체는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다(참조: 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology, supra). 따라서, 예시적 구현예에서, 돌연변이 유발은 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 제조하는데 사용되며 이는 이어서 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성을 위해 스크리닝될 수 있다. 다른 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성에 대해 스크리닝될 수 있는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 폴리뉴클레오타이드 서열의 화학적 합성에 의해 제조된다(참조: 예를 들어, M.H. Caruthers et al. (1987) Methods in Enzymology Volume 154, Pages 287-313; Beaucage, S.L. and Iyer, R.P. (1992) Tetrahedron 48(12):2223-2311).

[0136] 돌연변이유발 방법을 당업계에 널리 공지되어 있다. 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체의 제조를 위한 예시적 돌연변이유발 기술은 예를 들어, 부위 포화 돌연변이유발을 포함한다(참조: 예를 들어, Chronopoulou EG1, Labrou NE. Curr. Protoc. Protein Sci. 2011 Feb; Chapter 26: Unit 26.6, John Wiley and Sons, Inc; Steffens, D.L. and Williams., J.G.K (2007) J Biomol Tech. 18(3): 147-149; Siloto, R.M.P and Weselake, R.J. (2012) Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 1(3): 181-189).

[0137] 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체의 제조를 위한 또 다른 예시적 돌연변이유발 기술은 전달 PCR(tPCR)을 포함한다, 예를 들어, 문헌(Erijman A., et al. (2011) J. Struct. Biol.

175(2): 171-7)을 참조한다.

- [0138] 다른 예시적 돌연변이유발 기술은 예를 들어, 오류 성향 폴리머라제 쇠 반응(PCR)을 포함한다(참조: 예를 들어, Leung et al. (1989) Technique 1: 11-15; and Caldwell et al. (1992) PCR Methods Applic. 2:28-33).
- [0139] 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체의 제조를 위한 또 다른 예시적 돌연변이유발 기술은 올리고뉴클레오타이드 지시된 돌연변이 유발(참조: 예를 들어, Reidhaar-Olson et al. (1988) Science 241 :53-57)을 사용하여 임의의 클로닝된 관심 대상의 DNA에서 부위-특이적 돌연변이를 생성하는 것을 포함한다.
- [0140] 상기된 것들과 같은 합성 또는 돌연변이유발의 임의의 방법으로부터 비롯되는 돌연변이유발된 폴리뉴클레오타이드는 이어서 적당한 벡터에 클로닝하고 돌연변이유발된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 영향받은 폴리펩타이드의 활성은 상기된 바와 같이 평가한다.
- [0141] 당업자는 본원에 기재된 프로토콜 및 과정이 변형될 수 있고 상기 변형이 개시내용의 변이에 따름을 인지할 것이다. 예를 들어, 방법 단계가 특정 순서로 기재된 경우, 단계들의 순서는 병행하여 또는 순차적으로 변형되고/되거나 수행될 수 있다.
- [0142] **III. 숙주 세포 및 숙주 세포 배양**
- [0143] 본원의 개시내용의 관점에서, 당업자는 본원에 고려된 임의의 구현예가 기재된 조작된 TE 변이체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열의 도입을 통해 유전학적으로 변형될 수 있는 임의의 숙주 세포 또는 미생물을 사용하여 수행될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본원에 기재된 재조합 미생물은 숙주 세포로서 작용하고 숙주 세포에서 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드의 발현을 촉진시키는 작동적으로 연결된 조절 서열과 함께 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0144] 적합한 숙주 세포를 제공하는 예시적 미생물은 에스케리치아(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 로도코커스(*Rhodococcus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아스퍼길러스(*Aspergillus*), 트리코더마(*Trichoderma*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 푸사리움(*Fusarium*), 휴미콜라(*Humicola*), 리조무코르(*Rhizomucor*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피키아(*Pichia*), 뮤코르(*Mucor*), 마이셀리오프토라(*Myceliophthora*), 마리노박터(*Marinobacter*), 페니실리움(*Penicillium*), 파네로카에테(*Phanerochaete*), 플레우로투스(*Pleurotus*), 트라메테스(*Trametes*), 크리소스포리움(*Chrysosporium*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스테노트로포모나스(*Stenotrophomonas*), 쉬조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 야로위아(*Yarrowia*), 또는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속으로부터의 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 그램-양성 세균 세포이다. 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 그램-음성 세균 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 이. 콜라이 세포이다. 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 바실러스 렌투스(*Bacillus lentus*) 세포, 바실러스 브레비스(*Bacillus brevis*) 세포, 바실러스 스테아로테르모필러스(*Bacillus stearothermophilus*) 세포, 바실러스 리케노포르미스(*Bacillus licheniformis*) 세포, 바실러스 알칼로필러스(*Bacillus alkalophilus*) 세포, 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*) 세포, 바실러스 시르쿨란스(*Bacillus circulans*) 세포, 바실러스 푸밀리스(*Bacillus pumilis*) 세포, 바실러스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) 세포, 바실러스 클라우시(*Bacillus clausii*) 세포, 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) 세포, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포, 또는 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 세포이다.
- [0145] 여전히 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 트리코더마 코닝기(*Trichoderma koningii*) 세포, 트리코더마 비리데(*Trichoderma viride*) 세포, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) 세포, 트리코더마 롱기브라키아툼(*Trichoderma longibrachiatum*) 세포, 아스퍼길러스 아와모리(*Aspergillus awamori*) 세포, 아스퍼길러스 푸미가테스(*Aspergillus fumigates*) 세포, 아스퍼길러스 포에티두스(*Aspergillus foetidus*) 세포, 아스퍼길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 세포, 아스퍼길러스 나이거(*Aspergillus niger*) 세포, 아스퍼길러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 세포, 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 세포, 휴미콜라 라누기노스(*Humicola lanuginosa*) 세포, 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*) 세포, 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 세포 또는 뮤코르 미케이(*Mucor michiei*) 세포이다. 여전히 다른 예시적 다른 구현예에서, 숙주 세포는 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*) 세포 또는 스트렙토마이세스 무리누스(*Streptomyces murinus*) 세포이다. 여전히 다른 구현예에서, 숙주 세포는 악티노마이세테스(*Actinomyces*) 세포이다. 일부 예시적 구현

예에서, 숙주 세포는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 세포이다.

[0146] 여전히 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 진핵 식물, 조류, 시아노박테리움, 녹색-황 박테리움(green-sulfur bacterium), 녹색-비-황 박테리움(green non-sulfur bacterium), 자주색 황 박테리움(purple sulfur bacterium), 자주색 비-황 박테리움(purple non-sulfur bacterium), 극한생물(extremophile), 효모, 진균류, 이의 조작된 유기체, 또는 합성 유기체로부터의 세포이다. 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*), 미스칸투스 기간테우스(*Miscanthus giganteus*), 제아 메이스(*Zea mays*), 보트리오크커스 브라우니(*Botryococcuse braunii*), 칼라마이도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 테르모사이네코코커스 엘롱가투스(*Thermosynechococcus elongatus*), 사이네코코커스 엘롱가투스(*Synechococcus elongatus*), 사이네코코커스 종(*Synechococcus sp.*), 사이네코시스티스 종(*Synechocystis sp.*), 클로로비움 테피둠(*Chlorobium tepidum*), 클로로플렉서스 아우란티쿠스(*Chloroflexus auranticus*), 크로마티움 비노섬(*Chromatium vinosum*), 로도스피릴리움 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*), 로도박터 카프슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도슈도모나스 팔루스리스(*Rhodopseudomonas palustris*), 클로스트리디움 이운그다홀리(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리디우테르모셀룸(*Clostridiuthermocellum*), 또는 펜실리움 크리스소게눔(*Penicillium chrysogenum*)로부터의 세포이다. 일부 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 피키아 파스토리에스(*Pichia pastories*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 또는 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)로부터 기원한다. 여전히 추가의 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 사이네코코커스 종(*Synechococcus sp.*) PCC 7002, 사이네코코커스 종(*Synechococcus sp.*) PCC 7942, 또는 사이네코시스티스 종(*Synechocystis sp.*) PCC6803으로부터의 세포이다. 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포, COS 세포, VERO 세포, BHK 세포, HeLa 세포, Cv1 세포, MDCK 세포, 293 세포, 3T3 세포, 또는 PC12 세포이다. 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 이. 콜라이 세포이다. 일부 예시적 구현예에서, 이. 콜라이 세포는 균주 B, 균주 C, 균주 K, 또는 균주 W 이. 콜라이 세포이다.

[0147] 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 다른 이종성 효소 및 본래의 효소적 경로에서 어느 것이 숙주 세포에 존재하는지에 따라, 하나의 숙주 세포로부터 또 다른 숙주 세포에 대해 상호교환적으로 사용될 수 있는 임의의 유전학적 조작 및 변화를 포함한다. 하나의 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 임의로 fadE 및/또는 fhuA 결실을 포함한다. 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 임의로 200 mg/L 초과 지방산 유도체, 1000 mg/L 초과 지방산 유도체, 1200 mg/L 초과 지방산 유도체, 1700 mg/L 초과 지방산 유도체, 2000 mg/L 초과 지방산 유도체, 또는 3000 mg/L 초과 지방산 유도체를 생산하기 위한 능력을 갖도록 조작된다. 상기 언급된 임의로 조작된 균주는 중쇄 지방산 유도체를 생산하는 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하는 경우, 중쇄 지방산 유도체의 선택적 생산을 위한 것 뿐만 아니라 중쇄 지방산 유도체를 생산하는 개선된 능력을 갖는 유용한 조작된 TE 변이체의 동정 및 특징 분석을 위해 유용하다.

[0148] 하기 본원에서 상세히 논의된 바와 같이, 일부 예시적 구현예에서, 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용되는 숙주 세포 또는 숙주 미생물은 추가로 하나 이상의 특정 지방산 유도체(들), 예를 들어, 지방 에스테르, 지방 알코올, 지방 알코올 아세테이트 에스테르, 지방산 메틸 에스테르, 지방산 에틸 에스테르, 지방 아민, 지방 알데하이드, 이관능성 지방산 유도체, 이산, 알칸, 알켄 또는 올레핀, 케톤 등의 생산을 증가시킬 수 있는 효소적 활성을 갖는 유전자를 발현한다.

[0149] 예를 들어, entD 유전자는 포스포판테테이닐 트랜스퍼라제를 암호화한다. 본래의 이. 콜라이 entD, 포스포판테테이닐 트랜스퍼라제의 과발현은 이는 apo-CarB로부터의 CarB의 holo-CarB로의 개선된 활성화를 가능하게 하여 유리 지방산의 지방 알데하이드(이는 이어서 지방 알데하이드 리덕타제에 의해 지방 알코올로 전환될 수 있다)로의 holo-CarB에 의한 개선된 전환을 가능하게 함으로써 CarB와 같은 카복실산 리덕타제를 발현하는 세포에 대한 임의의 유전학적 변형이다. 예를 들어, 미국 특허 제9,340,801호를 참조한다.

[0150] 예시적 구현예에서, 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용되는 숙주 세포 또는 숙주 미생물은 지방 에스테르의 생산을 위한 에스테르 신타제 활성(E.C. 2.3.1.75)을 추가로 발현한다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 지방 알코올의 생산을 위한 아실-ACP 리덕타제(AAR) (E.C. 1.2.1.80) 활성 및/또는 알코올 데하이드로게나제 활성(E.C. 1.1.1.1.) 및/또는 지방 알코올 아실-CoA 리덕타제(FAR)(E.C. 1.1.1.*) 활성 및/또는 카복실산 리덕타제(CAR) (EC 1.2.99.6) 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 지방 알데하이드의 생산을 위해 아실-ACP 리덕타제(AAR) (E.C. 1.2.1.80) 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 알칸 및 알켄의 생산을 위해 아실-ACP 리덕타제(AAR) (E.C. 1.2.1.80) 활성 및 데카보닐라제 또는

지방 알데하이드 산화 탈포밀화 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 지방 알코올의 생산을 위해 아실-CoA 리덕타제(E.C. 1.2.1.50) 활성, 및 아실-CoA 신테타제 (FadD) (E.C. 2.3.1.86) 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 지방 에스테르의 생산을 위해 에스테르 신타제 활성(E.C. 2.3.1.75) 및 아실-CoA 신테타제(FadD) (E.C. 2.3.1.86) 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 케톤의 생산을 위해 O1eA 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 내부 올레핀의 생산을 위해 O1eBCD 활성을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 지방 알코올의 생산을 위해 아실-ACP 리덕타제(AAR) (E.C. 1.2.1.80) 활성 및 알코올 데하이드로게나제 활성(E.C. 1.1.1.1.)을 갖는다. 또 다른 예시적 구현예에서, 숙주 세포는 말단 올레핀을 제조하기 위해 데카복실라제 활성을 갖는다. 미생물 및 미생물 세포에서 효소적 활성의 발현은 예를 들어, 하기 미국 특허 제9,133,406호; 제9,340,801호; 제9,200,299호; 제9,068,201호; 제8,999,686호; 제8,658,404호; 제8,597,922호; 제8,535,916호; 제8,530,221호; 제8,372,610호; 제8,323,924호; 제8,313,934호; 제8,283,143호; 제8,268,599호; 제8,183,028호; 제8,110,670호; 제8,110,093호; 및 제8,097,439호에 교시되어 있다.

[0151] 일부 예시적 구현예에서, 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포 또는 미생물은 하나 이상의 특정 지방산 유도체(들), 예를 들어, 지방 에스테르, 지방산 메틸 에스테르, 지방산 에틸 에스테르, 지방 알코올, 지방 알코올 아세테이트 에스테르, 지방 아민, 지방 아미드, 지방 알데하이드, 이관능성 지방산 유도체, 이산 등을 생산하기 위해 상향조절되거나 과발현된 특정 본래의 효소 활성을 포함한다.

[0152] 일부 예시적 구현예에서, 재조합 숙주 세포는 중쇄 지방 에스테르, 예를 들어, 중쇄 지방산 메틸 에스테르(FAME) 또는 중쇄 지방산 에틸 에스테르(FAEE), 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE), 중쇄 지방 알코올(FALC), 중쇄 지방 아민, 중쇄 지방 알데하이드, 중쇄 이관능성 지방산 유도체, 중쇄 이산, 중쇄 알칸, 중쇄 올레핀 등을 생산한다.

[0153] 중쇄 지방산 유도체는 전형적으로 배양 배지로부터 회수되고/되거나 숙주 세포로부터 단리된다. 하나의 예시적 구현예에서, 지방산 유도체는 배양 배지(세포외)로부터 회수한다. 또 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체는 숙주 세포(세포내)로부터 단리된다. 또 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체 또는 비-지방산 화합물은 배양 배지로부터 회수하고 숙주 세포로부터 단리한다.

[0154] 숙주 세포에 의해 생산되는 지방산 유도체 조성물은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 불꽃 이온화 검출과 함께 가스-크로마토그래피(GC-FID)를 사용하여 분석하여 지방산 유도체 조성물의 성분의 쇠 길이 및 포화 정도 뿐만 아니라 특정 지방산 유도체의 분포를 결정할 수 있다. 유사하게, 다른 화합물은 당업계에 널리 공지된 방법을 통해 분석할 수 있다.

[0155] IV. 재조합 숙주 세포 및 배양물을 제조하는 방법

[0156] 당업계에 공지된 방법을 사용하여 숙주 세포를 조작하여 지방산 유도체 및/또는 지방산 유도체 조성물 또는 다른 화합물을 생산할 수 있다. 예시적 방법은 예를 들어, 벡터, 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은, 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터의 사용을 포함한다. 당업자는 다양한 바이러스 및 비-바이러스 벡터가 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0157] 일부 예시적 구현예에서, 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 (또는 유전자) 서열은 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 재조합 벡터에 의해 숙주 세포로 제공된다. 일부 예시적 구현예에서, 프로모터는 발육적으로 조절되거나, 기관 특이적이거나, 조직 특이적이거나, 유도성이거나, 구성적이거나, 세포 특이적 프로모터이다. 일부 예시적 구현예에서, 프로모터는 락토스 또는 이소프로필티오갈락토시드(IPTG)의 첨가에 의해 유도될 수 있다.

[0158] 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 제조되고 단리되면, 다양한 방법을 사용하여 발현 카세트, 벡터 및 다른 DNA 작제물을 작제할 수 있다. 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 다른 지방산 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트는 다양한 방식으로 작제될 수 있다. 당업자는 숙주 세포에서 발현 작제물을 성공적으로 형질전환하고, 선택하고 증식시키기 위해, 발현 작제물/벡터 상에 존재해야만 하는 유전학적 요소를 잘 알고 있다. 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 것들과 같은 폴리뉴클레오타이드 서열의 조작을 위한

기술, 예를 들어, 핵산 서열을 발현 벡터에 서브클로닝, 프로브 표지화, DNA 하이브리드화 등은 일반적으로 예를 들어, 문헌(참조: Sambrook, et al., supra; Current Protocols in Molecular Biology, supra.)에 기재되어 있다.

[0159] 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 서열번호 3, 서열번호 16 내지 서열번호 46 등) 및/또는 이중성 DNA 서열, 예를 들어, 프로모터 서열에 연결된 다른 지방산 생합성 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 작제물은 다양한 벡터에 삽입될 수 있다. 일부 예시적 구현예에서, 선택된 벡터는 세균, 예를 들어, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)의 형질 전환에 유용한 발현 벡터이다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스, 코스미드, 인공 염색체, 핵산 단편 등일 수 있다. 상기 벡터는 당업자에게 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 용이하게 작제된다(참조: 예를 들어, 상기 Sambrook et al.). 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터는 이어서 표적 숙주 세포에 형질감염/형질전환될 수 있다. 이어서, 성공적으로 형질전환된 세포는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 적합한 마커 유전자의 존재를 기준으로 선택된다.

[0160] 다수의 재조합 벡터는 세균 및 다른 미생물의 안전한 형질전환/형질감염에 사용하기 위해 당업자에게 가용하다(참조: 예를 들어, 상기 Sambrook, et al.). 적당한 벡터는 당업자에 의해 용이하게 선택된다. 예시적 구현예에서, 공지된 벡터를 사용하여 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 작제물을 생성한다.

[0161] 전형적으로, 형질전환 벡터는 하나 이상의 돌연변이체 및/또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 프로모터 서열 및 선택가능한 마커에 작동적으로 연결된 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 형질전환 벡터는 또한 전형적으로 전사 개시 시작 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 프로세싱 신호, 전사 종결 부위 및/또는 적절하게 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0162] 따라서, 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 이외에, 본원에 개시된 바와 같이 제조된 발현 작제물이 추가의 요소를 포함할 수 있다. 예시적 구현예에서, 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 작제물은 또한 이중성 단백질의 발현이 증진될 수 있도록 인핸서 서열을 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 인핸서는 전형적으로 전사 시작 부위 5'에서 발견되고, 이들은 흔히 암호화 서열에 대해 5' 또는 3'로의 정배향 또는 역배향으로 삽입될 수 있다.

[0163] 상기 주지된 바와 같이, 형질전환/발현 벡터는 전형적으로 형질전환체의 사전 동정을 가능하게 하는, 선택가능하고/하거나 스크리닝될 수 있는 유전자를 포함한다. 예시적인 선택가능한 마커 유전자는 항생제 내성(예를 들어, 카나마이신, 앰피실린 등에 대한 내성)을 암호화하는 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적 스크리닝 가능한 마커는 예를 들어, 재조합 단백질의 C-말단에서 도입된 6개 아미노산 히스티딘 태그를 포함한다.

[0164] 예시적 구현예에서, 선택가능하거나 스크리닝될 수 있는 마커 유전자는 관심 대상의 특정 유전자로서 또는 이에 추가로 사용하여 형질전환체를 동정하는 능력을 제공하거나 증진시킨다. 다양한 선택가능한 마커 유전자는 당업계에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, 상기 Sambrook et al.).

[0165] 일부 예시적 구현예에서, 발현 벡터는 추가로 해독 후 개시 해독 생성물로부터 제거되는, 발현된 이중성 핵산의 암호화 서열에 연결된 서열을 포함한다. 하나의 예시적인 구현예에서, 해독 후 제거된 서열은 단백질의 세포내 또는 세포외 막으로의 또는 막을 통한 수송을 촉진시켜 단백질의 세포 내부 및/또는 외부의 격실로의 수송을 촉진시킨다. 예시적 구현예에서, 해독 후 제거된 서열은 세포내 단백질용해 분해로부터 순수 단백질을 보호한다. 하나의 예시적 구현예에서, 선택된 암호화 서열의 엽스트림과 판독 프레임내 리더 펩타이드 서열을 암호화하는 핵산 분절은 숙주 세포에서 암호화 서열의 재조합 발현에 사용된다.

[0166] 또 다른 예시적 구현예에서, 발현 작제물은 세균 복제 오리진, 예를 들어, ColE1 오리진을 포함한다. 여전히 또 다른 예시적 구현예에서, 발현 작제물/벡터는 세균 선택가능한 마커, 예를 들어, 앰피실린, 테트라사이클린, 하이그로마이신, 네오마이신 또는 클로르암페니콜 내성 유전자를 포함한다.

[0167] 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 발현 작제물은 전형적으로 벡터 작제를 촉진시키기 위해 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함한다. 예시적 제한 엔도뉴클레아제 인지 부위는 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 NotI, AatII, SacII, PmeI HindIII, PstI, EcoRI, 및 BamHI에 대한 인지 부위를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0168] 변형 가능하게 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 이중성 DNA 서열, 예를 들어, 프로모터 서열, 마커 서열에 연결된 다른 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열; 정제 모이어티; 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 커플링된 분비 서열; 표적화 서열 등의 DNA 작제물을 사용하여 세포를 형질전환시키고 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 재조합 숙주 세포를 생성한다. 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 작제물을 사용한 형질전환을 위해 예시적인 숙주 세포는 상기 섹션 III에서 상세히 논의되고 있다.
- [0169] 적당한 형질전환 기술은 당업자에 의해 용이하게 선택된다. 당업자에게 가용한 예시적인 형질전환/형질감염 방법은 예를 들어, 전기천공, 염화칼슘 형질전환 등을 포함하고, 상기 방법은 당업자에게 널리 공지되고 있다(참조: 예를 들어, 상기 Sambrook). 따라서, 개방 판독 프레임 암호화 단백질 및 작동적으로 연결된 조절 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 재조합 숙주 세포의 염색체에 통합되거나, 재조합 숙주 세포에 거주한 하나 이상의 플라스미드 발현 시스템에 혼입되거나 둘 다에 혼입될 수 있다.
- [0170] 본원에 기재된 발현 벡터는 전형적으로 숙주 세포 내 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 위해 적합한 형태로, 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 지방산 유도체 생합성 경로 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 발현 벡터의 디자인은 예를 들어, 형질전환될 숙주 세포의 선택, 요구되는 폴리펩타이드의 발현 수준 등과 같은 인자들에 의존할 수 있다.
- [0171] **V. 재조합 숙주 세포의 평가**
- [0172] 예시적 구현예에서, 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드의 활성은 재조합 숙주 세포를 배양하고 예를 들어 지방산 유도체 조성물(예를 들어, 중쇄 지방 에스테르, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 지방 알데하이드 등) 또는 재조합 숙주 세포에 의해 생산되는 다른 화합물의 특징을 측정함으로써 결정된다. 예시적인 구현예에서, 지방산 유도체 또는 다른 화합물의 조성물, 역가, 수율 및/또는 생산성을 분석한다.
- [0173] 조작된 TE 변이체 폴리펩타이드 및 이의 단편은 통상의 방법을 사용한 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 것에 대해 검증될 수 있다(참조: 예를 들어, 하기 본원의 실시예 4).
- [0174] **IV. 재조합 숙주 세포로부터 유래된 생성물**
- [0175] 재조합 숙주 세포에 의해 중쇄 지방산 유도체의 생산을 증가시키기 위한 전략은 예를 들어, 생산 숙주에서 본래의 지방산 생합성 유전자의 과발현 및/또는 동일하거나 상이한 유기체 기원의 이중성 지방산 생합성 유전자의 발현에 의한 지방산 생합성 경로를 통한 유입을 증가시킴을 포함한다.
- [0176] 따라서, 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 재조합 숙주 세포는 조작된 TE 변이체 이외에 하나 이상의 "지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드" 또는 균등하게 "지방산 유도체 효소"를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 조작된다. 바이오매스-유래된 당을 목적하는 생성물로 전환시키기 위해 미생물을 사용하여 지방산 유도체 화합물(예를 들어, 지방산 에스테르, 알칸, 올레핀, 지방 케톤, 지방 알코올, 지방 알코올 아세테이트 에스테르 등)을 생산하기 위해 지방산 유도체 생합성 경로의 대사 조작은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 제9,133,406호; 제9,340,801호; 제9,200,299호; 제9,068,201호; 제8,999,686호; 제8,658,404호; 제8,597,922호; 제8,535,916호; 제8,530,221호; 제8,372,610호; 제8,323,924호; 제8,313,934호; 제8,283,143호; 제8,268,599호; 제8,183,028호; 제8,110,670호; 제8,110,093호; 및 제8,097,439호를 참조한다. 대사적으로 조작된 균주는 대량 생산 생물반응기에서 배양될 수 있으며, 수득한 생성물은 통상적인 화학적 및 생화학적 조작 기술을 사용하여 정제한다.
- [0177] 당업자에 널리 공지된 바와 같이, 티오에스테라제는 알킬 티오에스테르의 유리 지방산(FFA)으로의 가수분해를 촉매한다. 따라서, 티오에스테라제는 지방산 및 지방산 유도체의 아실 쇠 길이의 분포를 결정하는데 역할을 수행한다(참조: 예를 들어, Dehesh (1996) *supra*, PNAS (1995) 92(23): 10639-10643). 따라서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 재조합 숙주 세포는 전형적으로 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체(예를 들어, 서열번호 3 및 표 7에 기재된 것들)를 포함한다. 일부 예시적 구현예에서, 상기 재조합 숙주 세포는 조작된 TE 변이체를 포함하지 않는 적당한 대조군 숙주 세포, 예를 들어, 조작된 TE 변이체 대신, 대조군 티오에스테라제 (예를 들어, 서열번호 1)를 갖는 동종동계 대조군 숙주 세포와 비교하여 중쇄 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 지방산, FAEE, FAME, FACE, 등의 증가된 양을 제공한다.

- [0178] 따라서, 일부 구현예에서, 지방산을 포함하는 지방산 유도체 조성물은 티오에스테라제를 발현하기에 효과적인 조건하에서 탄소원의 존재하에 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다.
- [0179] 일부 구현예에서, TE를 발현하기에 효과적인 조건하에서 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양함으로써 생산된 실질적으로 모든 지방산 유도체는 세포 외적으로 생성된다. 따라서, 일부 예시적 구현예에서, 생산된 지방산 유도체는 배양 배지로부터 회수된다. 일부 예시적 구현예에서, 회수된 지방산 유도체 조성물은 지방산 유도체 조성물의 성분의 쇠 길이 및 포화도 뿐만 아니라 특정 지방산 유도체의 분포를 결정하고 정량하기 위해, 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법, 예를 들어, GC FID를 사용하여 분석한다.
- [0180] 다른 구현예에서, 재조합 숙주 세포는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 돌연변이체 또는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 다른 지방산 유도체 생합성 효소 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 추가의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 조작된 TE 변이체의 작용에 의해 생산된 제1 중쇄 지방산 유도체(예를 들어, 중쇄 지방산, 중쇄 지방 알코올 등)는 하나 이상의 지방산 유도체 생합성 효소에 의해, 제2 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 에스테르, 중쇄 지방 알데하이드, 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르, 탄화수소, 예를 들어, 직쇄 알칸, 직쇄 알켄 등으로 전환된다.
- [0181] 표 1은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 촉진시키기 위해, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에 재조합 숙주 세포에서 발현될 수 있는 예시적인 지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드의 목록을 제공한다.
- [0182] [표 1]

[0183] 지방산 유도체 효소의 유전자 명칭

유전자 명칭	공급원 유기체	효소명	승인 #	EC 번호	예시적 용도
1. 지방산 생산 증가/생성물 생산 증가					
accA	에스케리키아 콜라이 (<i>Escherichia coli</i>) (이, 콜라이), 락토코시 (<i>Lactococci</i>)	아세틸-CoA 카복실라제, 서브유닛 A (카복실트랜스퍼라제 알파)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	말로닐-CoA 생산을 증가시킨다
accB	이, 콜라이, 락토코시	아세틸-CoA 카복실라제, 서브유닛 B (BCCP: 비오틴 카복실 캐리어 단백질)	NP_417721	6.4.1.2	말로닐-CoA 생산을 증가시킨다
accC	이, 콜라이, 락토코시	아세틸-CoA 카복실라제, 서브유닛 C (비오틴 카복실라제)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	말로닐-CoA 생산을 증가시킨다
accD	이, 콜라이, 락토코시	아세틸-CoA 카복실라제, 서브유닛 D (카복실트랜스퍼라제 베타)	NP_416819	6.4.1.2	말로닐-CoA 생산을 증가시킨다
fadD	이, 콜라이 W3110	아실-CoA 신테타제	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	지방산 생산을 증가시킨다
fabA	이, 콜라이 K12	B-하이드록시메카노일 테오에스테르 탈수화물/이소머라제	NP_415474	4.2.1.60	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabB	이, 콜라이	3-옥소아실-[아실-캐리어-단백질]신테타제 I	BAA16180	2.3.1.41	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabD	이, 콜라이 K12	[아실-캐리어-단백질] S-말로닐트랜스퍼라제	AAC74176	2.3.1.39	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
[fabF]	이, 콜라이 K12	3-옥소아실-[아실-캐리어-	AAC74179	2.3.1.179	지방

[0184]

		단백질]신테타제 II			아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabG	이, 콜라이 K12	3-옥소아실-[아실-캐리어-단백질]리덕타제	AAC74177	1.1.1.100	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabH	이, 콜라이 K12	3-옥소아실-[아실-캐리어-단백질]신테타제 III	AAC74175	2.3.1.180	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabI	이, 콜라이 K12	에노일-[아실-캐리어-단백질]리덕타제	NP_415804	1.3.1.9	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabR	이, 콜라이 K12	전사 리프레서	NP_418398	부재	불포화 지방산 생산을 조절한다
fabV	비브리오 콜레라(<i>Vibrio cholerae</i>)	에노일-[아실-캐리어-단백질]리덕타제	YP_001217283	1.3.1.9	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fabZ	이, 콜라이 K12	(3R)-하이드록시미리스톨 아실 캐리어 단백질 테하이드라타제	NP_414722	4.2.1.-	지방 아실-ACP/CoA 생산을 증가시킨다
fadE	이, 콜라이 K13	아실-CoA 테하이드로게나제	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	지방산 분해를 감소시킨다
fadD	이, 콜라이 K12	아실-CoA 신테타제	NP_416319	6.2.1.3	지방산 분해를 감소시킨다

[0185]

fadA	이, 콜라이 K12	3-케토아실-CoA 티올라제	YP_02627	2.3.1.16	지방산 분해를 감소시킨다
fadB	이, 콜라이 K12	에노일-CoA 하이드라타제, 3-OH 아실-CoA 에피머라제/데하이드로게나제	NP_418288	4.2.1.17, 5.1.2.3, 1.1.1.35	지방산 분해를 감소시킨다
fadR	이, 콜라이	전사 조절 단백질	NP_415705	부재	지방산 분해를 차단하거나 역행시킨다
2. 쇠 길이 조절					
faB1	움벨룰라리아 칼리포르니카 (<i>Umbellularia californica</i>)	티오에스테라제	Q41635	3.1.2.14	C12:0 쇠 길이
faB2	쿠페아 후케리아나 (<i>Cuphea hookeriana</i>)	티오에스테라제	AAC49269	3.1.2.14	C8:0-C10:0 쇠 길이
3. 포화 수준 조절					
Sfa	이, 콜라이	fabA 의 서프레스	AAN79592, AAC44390	부재	단일불포화 지방산을 증가시킨다
fabA	이, 콜라이 K12	β-하이드록시데카노일 티오에스테르 데하이드라타제/이소머라제	NP_415474	4.2.1.60	불포화 지방산을 생산한다
GnsA	이, 콜라이	secG 널 (null) 돌연변이의 억제제	ABD18647.1	부재	불포화 지방산 에스테르를 증가시킨다
GnsB	이, 콜라이	secG 널 (null) 돌연변이의 억제제	AAC74076.1	부재	불포화 지방산

[0186]

					에스테르 를 증가시킨 다
fabB	이.콜라이	3-옥소아실-[아실-케리어- 단백질]신타아제 I	BAA16180	2.3.1.41	불포화 지방산 생산을 조절한다
des	바실러스 서브틸리스 (<i>Bacillus subtilis</i>)	D5 지방 아실 데사투라제	O34653	1.14.19	불포화 지방산 생산을 조절한다
4. 에스테르 생산					
	림노박터 종 (<i>Limnobacter sp.</i>) MED 105	에스테르 신타아제	ZP_019159 78	2.3.1.75	에스테르 생산
AT3G51970	아라비도프시스 탈리아나 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	장쇄 알코올 O- 지방- 아실트랜스퍼라제	NP_190765	2.3.1.26	에스테르 생산
EL01	피키아 안구스타 (<i>Pichia angusta</i>)	지방산 어룡가제	BAD98251	2.3.1-	매우 장쇄 지방산을 생산한다
plsC	사카로마이세스 세레비지에 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	아실트랜스퍼라제	AAA16514	2.3.1.51	에스테르 생산
DAGAT/DG AT	아라비도프시스 탈리아나 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제	AAF19262	2.3.1.20	에스테르 생산
hWS	호모 사피엔스 (<i>Homo sapiens</i>)	아실-CoA 왁스 알코올 아실트랜스퍼라제	AAX48018	2.3.1.20	에스테르 생산
aft1	악시네토박터 종(<i>Acinetobacter sp.</i>) ADP1	이기능성 왁스 에스테르 신타아제/아실-CoA: 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제	AAO17391	2.3.1.20	에스테르 생산

[0187]

ES9	마리노박터 하이드로카보노클라 스티쿠스 (<i>Marinobacter hydrocarbonoclastic us</i>)	왁스 에스테르 신타제	AB021021	2.3.1.20	에스테르 생산
mWS	시몬드시아 키넨시스 (<i>Simmondsia chinensis</i>)	왁스 에스테르 신타제	AAD38041	2.3.1.-	에스테르 생산
5. 지방 알코올 생산					
BrnFAR	봄빅스모리 (<i>Bombyxmori</i>)	FAR (지방 알코올 형성 아실-CoA 리덕타제)	BAC9425	1.2.1.50, 1.2.1.84	아실-CoA 를 지방 알코올로 전환시킨다
Acr1	악시네토박터 종 (<i>Acinetobacter sp.</i>) <i>ADP1</i>	아실-CoA 리덕타제	YP_04786 9	1.2.1.42, 1.2.1.50	지방 아실- CoA 를 지방 알데하이드 로 환원시킨다
AdhE2	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)	아실-CoA 리덕타제	AAK0937 9	1.2.1.84	지방 아실- CoA 를 지방 알코올로 환원시킨다
Ald	클로스트리디움 베이어인키 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)	아실-CoA 리덕타제	AAT66436	1.2.1.80	지방 아실- CoA 를 지방 알데하이드 로 환원시킨다
EutE	살모넬라 타이피무리움 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	아실-CoA 리덕타제	AAA8020 9	1.2.1.80	지방 아실- CoA 를 지방 알데하이드 로 환원시킨다
yqhD	이.콜리 W3110	알코올	AP_00356	1.1.1.-	지방

[0188]

		데하이드로게나제	2		알데하이드를 지방알코올로 감소시키고; 지방알코올 생산을 증가시킨다
alrA	악시노박터 sp. <i>ADP1</i>	알코올 데하이드로게나제	CAG7025 2	1.1.1.-	지방 알데하이드를 지방 알코올로 환원시킨다
GTNG_186 5	게오바실러스씨모데 니트리피칸스 NG80- 2	장쇄-알데하이드 데하이드로게나제	YP_00112 5970	1.2.1.3	지방 알데하이드를 지방 알코올로 환원시킨다
AAR	시네키크커스 엘롱가투스 (<i>Synechococcus elongatus</i>)	아실-ACP 리덕타제	YP_40061 1	1.2.1.42	지방 아실- ACP/CoA 를 지방 알데하이드 로 환원시킨다
carB	마이코박테리움 스메그마티스 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	카복실산 리덕타제 단백질	YP_88997 2	6.2.1.3, 1.2.1.42	지방산을 지방 알데하이드 로 환원시킨다
FadD	이.콜라이 K12	아실-CoA 신데타제	NP_41631 9	6.2.1.3	지방산을 지방 아실- CoA 로 활성화시킨 다
atoB	에르위니아카로토보 라 (<i>Erwinia carotovora</i>)	아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제	YP_04938 8	2.3.1.9	부탄올의 생산
hbd	부티리브리오피브 리소헨스(<i>Butyrivibrio</i>	베타- 하이드록시부티릴-	BAD5142 4	1.1.1.157	부탄올의 생산

[0189]

	fibrisohens)	CoA 데하이드로게나제			
CPE0095	클로스트리디움 퍼프린겐스(<i>Clostridium perfringens</i>)	크로토나세부티릴-CoA 데하이드로게나제	BA879801	4.2.1.55	부탄올의 생산
bcd	클로스트리디움 베이어인키 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)	부티릴-CoA 데하이드로게나제	AAM1458 3	1.3.99.2	부탄올의 생산
ALDH	클로스트리디움 베이어인키 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)	조효소 A-아실화 알데하이드 데하이드로게나제	AAT66436	1.2.1.3	부탄올의 생산
AdhE	이.콜라이 CFT073	알데하이드 알코올 데하이드로게나제	AAN8017 2	1.1.1.1, 1.2.1.10	부탄올의 생산
6. 지방 알코올 아세틸 에스테르 생산					
Atf1	사카로마이세스 세레비지에	알코올 O- 아세틸트랜스퍼라제	P40353	2.3.1.84	알킬 아세테이트 생산
acr1	약시노박터 종 ADP1	아실-CoA 리덕타제	YP_04786 9	1.2.1.42, 1.2.1.50	알킬 아세테이트 생산
yqhD	이.콜라이 K12	알코올 데하이드로게 나제	AP_00356 2	1.1.-.-	알킬 아세테이트 생산
AAT	프라가리아 엑스 아나나사 (<i>Fragaria x ananassa</i>)	알코올 O- 아실트랜스퍼라제	AAG1313 0	2.3.1.84	알킬 아세테이트 생산
FaAAT2	프라가리아 엑스 아나나사	알코올 O- 아실트랜스퍼라제	AEM4383 0.1	2.3.1.84	알킬 아세테이트 생산
SAAT	에프.엑스 아나나사 씨브이.엘산타 (<i>F. x ananassa cv. Elsanta</i>)	알코올 O- 아실트랜스퍼라제	AAG1313 0.1	2.3.1.84	알킬 아세테이트 생산
PhcFAT	페투니아 (<i>Petunia</i>)	알코올 O- 아실트랜스퍼라제	ABG7594 2.1	2.3.1.84	알킬 아세테이트 생산

[0190]

7. 말단 올레핀 생산					
OleT	에오트갈리코커스 (<i>Jeotgalicoccus sp</i>)	중 지방산 데카복실라제	HQ709266	1.11.2. 4	데카복실레이 트 지방산
8. 생성물 배출					
AtMRP 5	아라비도프시스 탈리아나	아라비도프시스 탈리아나 다중약물 내성 연관된	NP_171908	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AmiS2	로도코커스 종 (<i>Rhodococcus sp</i>)	ABC 수송체 AmiS2	JC5491	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AtPGP 1	아라비도프시스 탈리아나	아라비도프시스 탈리아나 피 당단백질 I	NP_181228	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AcrA	칸디다투스 프로토클라미디아모에보필라 (<i>Candidatus Protochlamydiaamoebophila</i>) UWE25	추정 다중약물- 유출 수송 단백질 acrA	CAF23274	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AcrB	칸디다투스 프로토클라미디아모에보필라 UWE25	가능한 다중약물 유출 수송 단백질 acrB	CAF23275	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
TolC	프란시스엘라돌라렌시스 아종 노비시다(<i>Francisellatular ensis subsp. Novicida</i>)	외막 단백질 [세포 외피 생물신생]	ABD59001	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AcrE	쉬겔라손네이 (<i>Shigella sonnei</i>) Ss046	격막 형성 및 세포 막 투과성에 영향 을 미치는 막관통 단백질	YP_312213	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
AcrF	이. 콜라이	아크리플라빈 내성 단백질 F	P24181	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
tII161 9	써모시네키코커스 엘롱가투스 (<i>Thermosynechococcus elongatus</i>) [BP-1]	다중약물 유출 수송체	NP_682409 .1	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
tII013 9	써모시네키코커스 엘롱가투스 [BP-1]	다중약물 유출 수송체	NP_680930 .1	부재	생성물 배출량을 변형시킨다
9. 발효					
umuD	쉬겔라손네이	DNA 폴리머라제	YP_310132	3.4.21.	생산 효율을

[0191]

	(<i>Shigella sonnei</i>) Ss046	V, 서브유닛		-	증가시킨다
umuC	이.콜라이	DNA 폴리머라제 V, 서브유닛	ABC42261	2.7.7.7	생산 효율을 증가시킨다
pntA, pntB	쉬겔라플렉스네리 (<i>Shigella flexneri</i>)	NADH:NADPH 트랜스하이드로게 나제(알파 및 베타 서브유닛)	P07001, P0AB70	1.6.1.2	생산 효율을 증가시킨다
10. 기타					
fabK	스트렙토코커스 뉴모니아 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	트랜스-2-에노일- ACP 리덕타제 II	AAF98273	1.3.1.9	지방산 생합성에 기여한다
fabL	바실리스 리케니포르미스 (<i>Bacillus licheniformis</i>) DSM 13	에노일-(아실 캐리어 단백질)리덕타제	AAU39821	1.3.1.9	지방산 생합성에 기여한다
fabM	스트렙토코커스 뮤탄스 (<i>Streptococcus mutans</i>)	트랜스-2, 시스-3- 데세노일-ACP 이소머라제	DAA05501	4.2.1.1 7	지방산 생합성에 기여한다

[0192]

[0193]

중쇄 지방산 유도체의 생산

[0194]

상기 논의된 바와 같이, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 조작된 TE 변이체를 포함하지 않는 적당한 대조군 숙주 세포, 예를 들어, 대조군 TE(예를 들어, 서열번호 1)를 갖는 동종동계 대조군 숙주 세포와 비교하여 중쇄 지방산의 증가된 양을 생산한다.

[0195]

하기에 상세히 논의된 다른 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 특정 유형의 지방산 유도체의 생산을 촉진시키는 추가의 지방산 유도체 생합성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0196]

지방 알데하이드의 생산

[0197]

일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제("CAR")를 포함하고, 따라서 상기 재조합 숙주 세포는 지방 알데하이드 및 지방 알코올을 합성한다(참조, 예를 들어, 제9,340,801호).

[0198]

따라서, 일부 예시적 구현예에서, 지방 알데하이드는 예를 들어, 카복실산 리덕타제(CAR) 활성과 같은 지방 알데하이드 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 재조합 숙주 세포에서 발현하거나 과발현시킴에 의해 생산된다. 예시적인 카복실산 리덕타제(CAR) 폴리펩타이드 및 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, FadD9 (EC 6.2.1.-, UniProtKB Q50631, GenBank NP_217106), CarA (GenBank ABK75684), CarB (GenBank YP889972) 및 예를 들어, 미국 특허 제8,097,439호 및 미국 특허 제9,340,801호에 개시된 관련 폴리펩타이드를 포함한다.

[0199]

일부 예시적 구현예에서, 재조합 숙주 세포에 의해 생산된 지방 알데하이드는 이어서 지방 알코올 또는 탄화수소로 전환된다. 따라서, 일부 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 아실-CoA 리덕타제("FAR" 또는 "ACR") 활성을 추가로 포함하고 따라서, 재조합 숙주 세포는 지방 알데하이드 및 지방 알코올을 합성한다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제8,658,404호, 미국 특허 제8,268,599호, 미국 특허 출원 공개 공보 제2015/0361454호).

[0200]

일부 구현예에서, 재조합 숙주 세포에 의해 생산되는 지방 알데하이드는 예를 들어, 알데하이드 리덕타제 또는 알코올 데하이드로게나제와 같은 본래의 또는 이종성 지방 알코올 생합성 폴리펩타이드의 활성을 통해 지방 알코올로 전환된다(참조: 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 공보 제2011/0250663호). 따라서, 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 알데하이드 리덕타제 활성, 또는 균등하게, 알코올 데하이드로게나제 활성(EC 1.1.1.1)을 포함하고 따라서 재조합 숙주 세포는 지방 알코올을 합성한다. 예시적 지방 알코올 생합성 유전자는 예를 들어, 알코올 데하이드로게나제, 예를 들어, 아세니토박터 종(*Acenitobacter* sp.) M-1의 AlrA 또는 AlrA 동족체; 및 내인성 이.콜라이 알코올 데하이드로게나제, 예를 들어, DkgA (NP.sub.-417485), DkgB (NP.sub.-414743), YjgB, (AAC77226), YdjL (AAC74846), YdjJ (NP.sub.-416288), AdhP (NP.sub.-415995), YhdH (NP.sub.-417719), YahK

(NP.sub.-414859), YphC (AAC75598), 및 YqhD (Q46856)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0201] 지방 아민의 생산

[0202] 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하고 지방 알데하이드(예를 들어, 상기 본원에 기재된 바와 같이)를 생산하는 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 알데하이드를 지방 아민으로 전환시키는 아미노트랜스퍼라제 또는 아민 데하이드로게나제 활성을 갖는 이중성 생합성 효소를 포함하도록 변형된다(참조: 예를 들어, PCT 공개 공보 WO 2015/085271).

[0203] 지방 알코올의 생산

[0204] 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 알코올 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 따라서 지방 알코올은 재조합 숙주 세포에 의해 생성된다. 따라서, 예시적 구현예에서, 중쇄 지방 알코올을 포함하는, 예를 들어, 옥탄올을 포함하는 조성물은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 및 지방 알코올 생합성 효소를 발현시키기에 효과적인 조건하에서 탄소원의 존재하에 재조합 숙주 세포를 배양함으로써 생산된다.

[0205] 따라서, 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제(CAR) 활성 및 알코올 데하이드로게나제 활성을 포함하고 따라서, 상기 재조합 숙주 세포는 중쇄 지방 알코올, 예를 들어, 옥탄올을 합성한다(참조, 예를 들어, 미국 특허 제9,340,801호).

[0206] 일부 예시적 구현예에서, 숙주 세포에 존재하는 알데하이드 리덕타제/알코올 데하이드로게나제와 같은 본래의 지방 알데하이드 생합성 폴리펩타이드는 중쇄 지방 알데하이드를 중쇄 지방 알코올로 전환시킨다. 다른 예시적 구현예에서, 본래의 지방 알데하이드 리덕타제/알코올 데하이드로게나제는 중쇄 지방 알데하이드를 중쇄 지방 알코올로 전환시키기 위해 과발현된다. 다른 예시적 구현예에서, 이중성 알데하이드 리덕타제/알코올 데하이드로게나제는 재조합 숙주 세포에 도입되고 중쇄 지방 알데하이드를 중쇄 지방 알코올로 전환시키기 위해 발현되거나 과발현된다. 중쇄 지방 알데하이드를 중쇄 지방 알코올로 전환시키기 위해 유용한 예시적인 알데하이드 리덕타제/알코올 데하이드로게나제 폴리펩타이드는 상기 본원 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO 2007/136762; WO 2010/062480; 미국 특허 제8,110,670호; 미국 특허 제9,068,201호에 기재되어 있다.

[0207] 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 상기 재조합 숙주 세포가 단순 탄소원을 갖는 발효 브로쓰에서 성장하는 경우, 1,3 지방 디올을 생산하도록, 카복실산 리덕타제(EC 6.2.1.3 또는 EC 1.2.1.42) 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 다른 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 카복실산 리덕타제(EC 6.2.1.3 또는 EC 1.2.1.42)를 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드 및 알코올 데하이드로게나제(EC 1.1.1.) 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 재조합 숙주 세포는 단순 탄소원을 갖는 발효 브로쓰에서 성장하는 경우, 중쇄 1,3 지방 디올과 같은 1,3 지방 디올을 생산한다(참조: 예를 들어, WO 2016/01430).

[0208] 지방 알코올 아세테이트 에스테르의 생산

[0209] 일부 구현예에서, 세포에서 또는 세포에 공급되는 일부 구현예에서 생성된 지방 알코올은 재조합 세포에 의해 추가로 프로세싱되어 지방 알코올 아세테이트(FACE)를 제공한다. 예시적 구현예에서, 알코올 0-아세틸트랜스퍼라제(EC 2.8.1.14) 효소는 지방 알코올을 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE)로 프로세싱한다(참조: 예를 들어, Gabriel M Rodriguez, et al. (2014) Nature Chemical Biology 10, 259-265; Jyun-Liang Lin and Ian Wheeldon (2014) PLoS One. 2014; 9(8): PMID: PMC4122449).

[0210] 예시적인 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제는 효모 Aft1 예를 들어, GenBank 승인 번호 AY242062; GenBank 승인 번호 AY242063이고, 예를 들어, 문헌(Kevin J. Verstrepen K.J., et al (2003) Appl Environ Microbiol. 2003 Sep; 69(9): 5228-5237)을 참조한다.

[0211] 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 알데하이드 및 지방 알코올을 생산하기에 충분한 카복실산 리덕타제 활성(EC 1.2.99.6)을 포함하고, 추가로 지방 알코올을 지방 알코올 아세테이트 에스테르를 전환시키는 지방 알코올 0-아

세틸 트랜스퍼라제 활성을 포함한다.

- [0212] 추가의 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제 활성(EC 1.2.99.6)을 포함하고 이는 제1의 지방산 유도체의 생산을 유도하고 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 지방 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 MIC를 갖는다.
- [0213] 추가의 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제 활성(EC 1.2.99.6)을 포함하고 이는 제1의 지방산 유도체의 생산을 유도하고 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 지방 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 LogP를 갖는다.
- [0214] 추가의 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제 활성(EC 1.2.99.6)을 포함하고 이는 제1의 지방산 유도체의 생산을 유도하고 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 지방 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체의 존재는 제1 지방산 유도체의 MIC에서의 증가를 유도한다.
- [0215] 추가의 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 카복실산 리덕타제 활성(EC 1.2.99.6)을 포함하고 이는 제1의 지방산 유도체의 생산을 유도하고 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 지방 알코올 0-아세틸 트랜스퍼라제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체 보다 독성이 적다.
- [0216] **지방 에스테르의 생산**
- [0217] 일부 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 에스테르 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 따라서, 중쇄 지방 에스테르는 재조합 숙주 세포에 의해 생성된다.
- [0218] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지방 에스테르" 또는 균등하게 "지방산 에스테르"는 지방산으로부터 제조된 임의의 에스테르를 언급한다. 예시적인 구현예에서, 지방 에스테르는 "A 측면" 및 "B 측면"을 함유한다. 본원에 사용된 바와 같은, 에스테르의 "A 측면"은 에스테르의 카복실레이트 산소에 부착된 탄소쇄를 언급한다. 본원에 사용된 바와 같은, 에스테르의 "B 측면"은 에스테르의 모 카복실레이트를 포함하는 탄소 쇄를 언급한다. 지방 에스테르가 지방산 유도체 생합성 경로로부터 유래된 구현예에서, A 측면은 알코올에 의해 기여되고 B 측면은 지방산 또는 알킬 티오에스테르에 의해 기여된다.
- [0219] 임의의 알코올을 사용하여 지방 에스테르의 A 측면을 형성할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 알코올은 지방산 유도체 생합성 경로로부터 유래한다. 다른 예시적 구현예에서, 알코올은 비-지방산 유도체 생합성 경로를 통해 생산되고, 예를 들어, 알코올은 외인성으로 제공되고, 예를 들어, 알코올은 발효 브로쓰에 공급된다.
- [0220] A 측면 또는 B 측면을 포함하는 탄소 쇄는 임의의 길이를 가질 수 있다. 그러나, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 지방산 유도체 생합성 경로가 지방산 에스테르의 A 측면 및/또는 B 측면을 제공하는 예시적 구현예에서, A 측면 및/또는 B 측면은 중쇄 지방산 유도체이고 따라서 길이가 6, 7, 8, 9 또는 10개 탄소인 탄소쇄 길이를 갖는다. 따라서, 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 지방산 유도체 생합성 경로는 에스테르의 A 측면을 제공하고 따라서, 지방 에스테르의 A 측면은 6, 7, 8, 9 또는 10개 탄소 길이이다. 다른 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 지방산 유도체 생합성 경로는 에스테르의 B 측면을 제공하고, 따라서, 지방 에스테르의 B 측면은 6, 7, 8, 9 또는 10개 탄소 길이이다.
- [0221] 하나의 예시적인 구현예에서, 지방 에스테르는 지방산 메틸 에스테르, 예를 들어, 메틸 옥타노에이트이고, 여기서, B 측면은 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 지방산 생합성 경로에 의해 제공되고 에스테르의 A 측면은 1개 탄소 길이이다. 따라서, 예시적인 구현예에서, 지방산 에스테르는 메틸 옥타노에이트이다. 하나의 예시적 구현예에서, A 측면은 지방산 0-메틸트랜스퍼라제(FAMT) (EC 2.1.1.15) 효소의 작용을 통해 제공된다(참조: 예를 들어, Applied and Environmental Microbiology 77(22): 8052-8061).
- [0222] 또 다른 예시적인 구현예에서, 지방 에스테르는 지방산 에틸 에스테르이고, 여기서, B 측면은 중쇄 지방산 유도

체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 지방산 생합성 경로에 의해 제공되고 에스테르의 A 측면은 2개 탄소 길이다.

[0223] 하나의 예시적 구현예에서, A 측면은 직쇄이다. 또 다른 예시적 구현예에서, A 측면은 측쇄이다. 하나의 예시적 구현예에서, B 측면은 직쇄이다. 또 다른 예시적 구현예에서, B 측면은 측쇄이다. 측쇄는 하나 이상의 분기점을 가질 수 있다. 하나의 예시적 구현예에서, A 측면은 포화된다. 또 다른 예시적 구현예에서, A 측면은 불포화된다. 하나의 예시적 구현예에서, B 측면은 포화된다. 또 다른 예시적 구현예에서, B 측면은 불포화된다.

[0224] 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 에스테르 신타제 활성(EC 3.1.1.67)을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 에스테르 신타제는 당업계에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 공보 WO 2011/038134).

[0225] 일부 예시적인 구현예에서, 지방산 에스테르는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체, 및 아실-CoA 신테타제(fadD) 효소 및 에스테르 신타제 효소를 포함하는 재조합 숙주 세포에 의해 생산된다(참조: 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 공보 WO/2011/038134; 국제 특허 출원 공개 공보 WO 2007/136762; 미국 특허 제8,110,670호).

[0226] 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 에스테르(예를 들어, FAME 또는 FAEE)를 생성하기에 충분한 에스테르 신타제 활성(EC 3.1.1.67)을 포함한다.

[0227] 추가의 구현예에서, 제1 지방산 유도체의 생산을 유도하는 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 에스테르 신타제 활성을 포함한다.

[0228] 추가의 구현예에서, 제1 지방산 유도체의 생산을 유도하는 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 에스테르 신타제 활성을 추가로 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 MIC를 갖는다.

[0229] 추가의 구현예에서, 제1 지방산 유도체의 생산을 유도하는 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 에스테르 신타제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 높은 분배 계수(LogP)를 갖는다.

[0230] 추가의 구현예에서, 제1 지방산 유도체의 생산을 유도하는 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 추가로 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 에스테르 신타제 활성을 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체의 존재는 제1 지방산 유도체의 MIC에서의 증가를 유도한다.

[0231] 추가의 구현예에서, 제1 지방산 유도체의 생산을 유도하는 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 제1 지방산 유도체를 제2 지방산 유도체로 전환시키는 에스테르 신타제 활성을 추가로 포함하고, 여기서, 제2 지방산 유도체는 제1 지방산 유도체보다 독성이 적다.

[0232] 탄화수소의 생산

[0233] 일부 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 지방 알데하이드 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드(EC 6.4.1.2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 탄화수소 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드, 예를 들어, 데카보닐라제(EC 4.1.99.5), 산화성 데포닐라제 또는 지방산 데카복실라제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 따라서 재조합 숙주 세포는 탄화수소의 증진된 생산을 나타낸다(참조: 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 공보 2011/0124071). 따라서, 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포는 탄화수소, 예를 들어, 알칸 또는 알켄(예를 들어, 말단 올레핀 또는 내부 올레핀) 또는 케톤을 생산한다.

[0234] 일부 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 포함하는 재조합 숙주 세포에 의해 생산된 지방 알데하이드는 탄화수소를 형성하도록 탄소 원자를 제거하는 탈카보닐화에 의해 전환된다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제8,110,670호 및 WO 2009/140695).

[0235] 다른 예시적 구현예에서, 재조합 숙주 세포에 의해 생산된 지방산은 말단 올레핀을 형성하도록 탄소 원자를 제

거하는 탈카복실화에 의해 전환된다. 따라서, 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하는 것 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 예를 들어, 미국 특허 제8,597,922호에 개시된 바와 같이 데카복실라제 활성을 갖는 폴리펩타이드와 같은 탄화수소 생합성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하거나 과발현한다.

[0236] 다른 예시적 구현예에서, 알킬 티오에스테르 중간체는 내부 올레핀 또는 케톤을 형성하기 위해 효소적 탈카복실화 응축에 의해 전환된다. 따라서, 일부 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하는 것 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 예를 들어, OleA 활성을 가져 케톤을 생성시키는 폴리펩타이드와 같은 탄화수소 생합성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하거나 과발현한다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제9,200,299호). 다른 예시적인 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하는 것 이외에, 재조합 숙주 세포는 추가로 예를 들어, OleA 활성을 가져 내부 올레핀을 생성하는 폴리펩타이드와 함께 OleCD 또는 OleBCD와 같은 탄화수소 생합성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하거나 과발현한다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제9,200,299호).

[0237] 일부 예시적인 탄화수소 생합성 폴리펩타이드는 하기 표 2에 나타낸다.

[0238] [표 2]

[0239] 예시적인 탄화수소 생합성 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드.

단백질 명칭	서열
데카복실라제 (ADC) 또는 산화성 데포밀라제	시네코커스 열풍가투스 PCC7942. YP. sub.-400610 (Synpcc7942. Sub.--1593)
아실-ACP 리덕타제 (AAR)	시네코커스 열풍가투스 PCC7942 YP-400611 (Synpcc7942_1594)
데카보닐라제 (ADC) 또는 산화성 데포밀라제	프로클로로코커스 마리누스 CCMP1986 PMM0532
아실-ACP 리덕타제 (AAR)	프로클로로코커스 마리누스 CCMP1986 PMM0533 (NP_892651)

[0240]

[0241] 오메가(ω)-하이드록실화된 지방산 유도체의 생산

[0242] 일부 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재조합 숙주 세포는 ω -하이드록실라제 활성을 갖는 폴리펩타이드(EC 1.14.15.3)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예시적 구현예에서, 변형된 ω -하이드록실라제는 변형된 시토크롬 P450 모노옥시게나제(P450) 효소적 활성을 갖고 생체내 탄화수소 채 w-위치의 하이드록실화를 효율적으로 촉매한다. 따라서, 재조합 미생물은 재 생 공급원료로부터의 탄소원의 존재하에 발효 브로쓰에 성장하는 경우 생체내 중쇄 오메가-하이드록실화된(ω -하이드록실화된) 지방산 유도체를 생산한다(참조: 예를 들어, PCT 출원 공개 공보 WO 2014/201474).

[0243] 다른 예시적 구현예에서, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체 이외에, 재 조합 숙주 세포는 추가로 알칸 하이드록실라제, 예를 들어, alkA, CYP153A-리덕타제 또는 CYP153A-리덕타제 하 이브리드 융합 폴리펩타이드 변이체(참조: 예를 들어, WO 2015/195697)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포 함하여, 상기 재조합 숙주 세포는 오메가-하이드록실화된- (ω -하이드록실화된) 및 이관능성 지방산 유도체, 및 ω -하이드록실화된 지방산, ω -하이드록실화된 지방 에스테르, α, ω -이산, α, ω -디에스테르, α, ω -디올 및 알칸 하이드록실라제, 예를 들어, AlkA, CYP153 또는 CYP153A-리덕타제 하이브리드 융합 폴리펩타이드 변이체 및 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하기 위해 효과적인 조건하 에서 탄소원을 함유하는 배지에서 배양되는 경우 마크롤락톤 및 마크로사이클릭 케톤과 같은 이로부터 유래된 화학물질을 포함하는 조성물을 생성한다.

[0244] V. 재조합 숙주 세포의 배양 및 발효

[0245] 본원에 사용된 바와 같은 발효는 광범위하게 재조합 숙주 세포에 의한 유기 재료의 표적 물질로의 전환을 언급 한다. 예를 들어, 이것은 탄소원을 포함하는 배지에서 재조합 숙주 세포의 배양물을 증식시킴에 의해 재조합 숙주 세포에 의한 탄소원의, 예를 들어, 중쇄 지방산, 중쇄 지방산 에스테르, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 지방 알 코올 아세테이트 등으로의 전환을 포함한다. 예를 들어, 지방산, 지방 에스테르, 지방 알코올, 지방 알코올 아

세테이트 등과 같은 표적 물질의 생산을 허용하는 조건은 숙주 세포가 지방산 유도체 조성물과 같은 목적하는 생성물을 생산하도록 하는 임의의 조건이다. 적합한 조건은 예를 들어, 전형적인 발효 조건을 포함하고, 예를 들어, 문헌(상기 참조: Principles of Fermentation Technology, 3rd Edition (2016) supra; Fermentation Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, (2007))을 참조한다.

[0246] 발효 조건은 온도 범위, pH 수준, 통기 수준, 공급 속도 및 배지 조성을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 널리 공지된 많은 파라미터를 포함할 수 있다. 개별적으로 및 조합적으로 이들 조건 각각은 숙주 세포가 성장하도록 한다. 발효는 호기성, 혐기성 또는 이의 변화(예를 들어, 미세-호기성)일 수 있다. 예시적인 배양 배지는 브로쓰(액체) 또는 겔(고체)를 포함한다. 일반적으로, 상기 배지는 숙주 세포에 의해 직접적으로 대사될 수 있는 탄소원 (예를 들어, 재생 공급원료로부터 유래된 단순 탄소원)을 포함한다. 추가로, 효소는 동원 (예를 들어, 전분 또는 셀룰로스의 발효될 수 있는 당으로의 탈중합) 및 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위한 탄소원의 후속적 대사를 촉진시키기 위해 배지에 사용될 수 있다.

[0247] 소규모 생산을 위해, 중쇄 지방산 유도체 조성물을 생산하도록 조작된 숙주 세포는 예를 들어, 약 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, 1 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 25 mL, 50 mL, 75 mL, 100 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 5 L, 또는 10 L의 배지에서 성장시킬 수 있고; 발효시킬 수 있고; 특이적 효소 활성화(예를 들어, 티오에스테라제(TE), 카복실산 리덕타제(CAR), 알코올 데하이드로게나제(ADH), 지방 아실 CoA/ACP 리덕타제(FAR), 아실-CoA 리덕타제(ACR), 아세틸 CoA 카복실라제(ACC) 및/또는 아실 ACP/CoA 리덕타제(AAR) 효소적 활성화)을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 같은 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현하도록 유도될 수 있다. 대량 생산을 위해, 조작된 숙주 세포는 약 10 L, 100 L, 1000 L, 10,000 L, 100,000 L, 1,000,000 L 이상의 용적 배치를 갖는 배양물에서 성장시키고; 발효시키고, 임의의 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현하도록 유도될 수 있다.

[0248] 본원에 기재된 지방산 유도체 조성물은 흔히 재조합 숙주 세포 배양물의 세포의 환경에서 발견될 수 있고 배양 배지로부터 용이하게 분리될 수 있다. 중쇄 지방산, 중쇄 지방산 에스테르, 중쇄 지방 알데하이드, 중쇄 지방 케톤, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 지방 알코올 아세테이트 등과 같은 중쇄 지방산 유도체는 재조합 숙주 세포에 의해 분비되거나 세포의 환경으로 수송되거나 수동적으로 재조합 숙주 세포 배양물의 세포의 환경으로 전달될 수 있다. 중쇄 지방산 유도체 조성물은 원심분리를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 재조합 숙주 세포 배양물로부터 분리될 수 있다.

[0249] 생산 숙주 세로서 사용하기 위해 적합한 예시적인 미생물은 예를 들어, 세균, 시아노박테리아, 효모, 조류, 필라멘트 진균류 등을 포함한다. 지방산 유도체 조성물을 생산하기 위해, 생산 숙주 세포 (또는 균등하게 숙주 세포)는 비가공되거나 본래의 숙주 세포에 비해 변형된 지방산 생합성 경로를 포함하도록 조작되고, 예를 들어, 상기 논의된 바와 같고 미국 특허 출원 공개 공보 제2015/0064782호에 기재된 바와 같이 조작된다. 변형된 지방산 생합성 경로를 포함하도록 조작된 생산 숙주는 글루코스 또는 다른 재생 공급원료를 지방산 유도체로 효율적으로 전환시킬 수 있다. 다양한 화합물들의 생산을 위해 고밀도 발효를 위한 프로토콜 및 과정이 확립되었다 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제8,372,610호; 제8,323,924호; 제8,313,934호; 제8,283,143호; 제8,268,599호; 제8,183,028호; 제8,110,670호; 제8,110,093호; 및 제8,097,439호).

[0250] 일부 예시적인 구현예에서, 생산 숙주 세포는 약 20 g/L 내지 약 900 g/L의 개시 농도의 탄소원(예를 들어, 단순 탄소원)을 포함하는 배양 배지(예를 들어, 발효 배지)에서 배양된다. 다른 구현예에서, 배양 배지는 약 2 g/L 내지 약 10 g/L; 약 10 g/L 내지 약 20 g/L; 약 20 g/L 내지 약 30 g/L; 약 30 g/L 내지 약 40 g/L; 또는 약 40 g/L 내지 약 50 g/L의 개시 농도의 탄소원을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지 내 가용한 탄소원의 수준은 발효 진행 동안에 모니터링될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 배지 내 초기 탄소원의 수준이 약 0.5 g/L 미만인 경우 보충 탄소원을 배양 배지에 첨가함을 포함한다.

[0251] 일부 예시적 구현예에서, 보충 탄소원은 배지 내 탄소원의 수준이 약 0.4 g/L 미만, 약 0.3 g/L 미만, 약 0.2 g/L 미만, 또는 약 0.1 g/L 미만인 경우 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 보충 탄소원은 약 1 g/L 내지 약 25 g/L의 탄소원 수준을 유지하기 위해 첨가된다. 일부 구현예에서, 보충 탄소원은 약 2 g/L 이상(예를 들어, 약 2 g/L 이상, 약 3 g/L 이상, 약 4 g/L 이상)의 탄소원 수준을 유지하기 위해 첨가된다. 특정 구현예에서, 보충 탄소원은 약 5 g/L 이하(예를 들어, 약 5 g/L 이하, 약 4 g/L 이하, 약 3 g/L 이하)의 탄소원 수준을 유지하기 위해 첨가된다. 일부 구현예에서, 보충 탄소원은 약 2 g/L 내지 약 5 g/L, 약 5 g/L 내지 약 10 g/L, 또는 약 10 g/L 내지 약 25 g/L의 탄소원 수준을 유지하기 위해 첨가된다.

[0252] 하나의 예시적 구현예에서, 발효를 위한 탄소원은 재생 공급원료로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 탄소원은 글

루코스이다. 다른 구현예에서, 탄소원은 글리세롤이다. 다른 가능한 탄소원은 프럭토스, 만노스, 갈락토스, 크실로스, 아라비노스, 전분, 셀룰로스, 헤비셀룰로스, 펙틴, 크실란, 슈크로스, 말토스, 셀로비오스, 투라노스, 아세트산, 에탄, 에탄올, 메탄, 메탄올, 포름산, 및 이산화탄소; 셀룰로스 물질 및 변이체, 예를 들어, 헤미셀룰로스, 메틸 셀룰로스 및 나트륨 카복시메틸 셀룰로스; 포화 또는 불포화 지방산, 숙시네이트, 락테이트, 및 아세테이트; 알코올, 예를 들어, 에탄올, 메탄올 및 글리세롤 또는 이의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 탄소원은 옥수수, 사탕 수수, 수수, 비트, 스위치 그래스, 목초, 짚, 림버, 펄프, 오물, 쓰레기, 셀룰로스 도시 폐기물, 플루-가스(flu-gas), syn-가스(syn-gas), 또는 이산화탄소로부터 유래한다. 단순 탄소원은 또한 광합성 생성물, 예를 들어, 글루코스 또는 슈크로스일 수 있다. 하나의 구현예에서, 탄소원은 폐기물, 예를 들어, 글리세롤, 플루-가스, 또는 syn-가스로부터; 또는 바이오매스와 같은 유기 재료의 재형성으로부터; 또는 천연 가스로부터 또는 메탄으로부터, 또는 이들 재료의 syn-가스의 재형성으로부터; 또는 광합성적으로 고정된 이산화탄소로부터 유래하고, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체는 광합성적으로 성장하고 탄소원으로서 CO₂를 사용하는 재조합 시아노박테리아 또는 조류에 의해 생산될 수 있다. 일부 예시적 구현예에서, 탄소원은 바이오매스로부터 유래한다. 바이오매스의 예시적 공급원은 식물 재료 또는 야채, 예를 들어, 옥수수, 사탕 수수 또는 스위치그래스이다. 바이오매스의 또 다른 예시적 공급원은 대사 폐기물, 예를 들어, 동물성 물질(예를 들어, 소 비료)이다. 바이오매스의 추가의 예시적 공급원은 조류 및 다른 해양 식물을 포함한다. 바이오매스는 또한 산업, 농업, 임업 및 가정으로부터의 폐기물을 포함하고, 이는 발효 폐기물, 목초, 짚, 림버, 오물, 쓰레기, 셀룰로스 도시 폐기물, 지방 고체 폐기물 및 식품 잔재를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0253] 일부 예시적 구현예에서, 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산, 중쇄 지방 에스테르, 중쇄 지방 알코올 등은 약 0.5 g/L 내지 약 40 g/L의 농도로 생산된다. 일부 구현예에서, 지방산 유도체는 약 1 g/L 이상(예를 들어, 약 1 g/L 이상, 약 10 g/L 이상, 약 20 g/L 이상, 약 50 g/L 이상, 약 100 g/L 이상)의 농도로 생산된다. 일부 구현예에서, 지방산 유도체는 약 1 g/L 내지 약 170 g/L, 약 1 g/L 내지 약 10 g/L, 약 40 g/L 내지 약 170 g/L, 약 100 g/L 내지 약 170 g/L, 약 10 g/L 내지 약 100 g/L, 약 1 g/L 내지 약 40 g/L, 약 40 g/L 내지 약 100 g/L, 또는 약 1 g/L 내지 약 100 g/L의 농도로 생산된다.

[0254] 다른 예시적 구현예에서, 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체는 약 25 mg/L, 약 50 mg/L, 약 75 mg/L, 약 100 mg/L, 약 125 mg/L, 약 150 mg/L, 약 175 mg/L, 약 200 mg/L, 약 225 mg/L, 약 250 mg/L, 약 275 mg/L, 약 300 mg/L, 약 325 mg/L, 약 350 mg/L, 약 375 mg/L, 약 400 mg/L, 약 425 mg/L, 약 450 mg/L, 약 475 mg/L, 약 500 mg/L, 약 525 mg/L, 약 550 mg/L, 약 575 mg/L, 약 600 mg/L, 약 625 mg/L, 약 650 mg/L, 약 675 mg/L, 약 700 mg/L, 약 725 mg/L, 약 750 mg/L, 약 775 mg/L, 약 800 mg/L, 약 825 mg/L, 약 850 mg/L, 약 875 mg/L, 약 900 mg/L, 약 925 mg/L, 약 950 mg/L, 약 975 mg/L, 약 1000 mg/L, 약 1050 mg/L, 약 1075 mg/L, 약 1100 mg/L, 약 1125 mg/L, 약 1150 mg/L, 약 1175 mg/L, 약 1200 mg/L, 약 1225 mg/L, 약 1250 mg/L, 약 1275 mg/L, 약 1300 mg/L, 약 1325 mg/L, 약 1350 mg/L, 약 1375 mg/L, 약 1400 mg/L, 약 1425 mg/L, 약 1450 mg/L, 약 1475 mg/L, 약 1500 mg/L, 약 1525 mg/L, 약 1550 mg/L, 약 1575 mg/L, 약 1600 mg/L, 약 1625 mg/L, 약 1650 mg/L, 약 1675 mg/L, 약 1700 mg/L, 약 1725 mg/L, 약 1750 mg/L, 약 1775 mg/L, 약 1800 mg/L, 약 1825 mg/L, 약 1850 mg/L, 약 1875 mg/L, 약 1900 mg/L, 약 1925 mg/L, 약 1950 mg/L, 약 1975 mg/L, 약 2000 mg/L (2 g/L), 3 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, 100 g/L 또는 이전의 값의 임의의 2개에 의해 제한되는 범위의 역가로 생산된다. 다른 구현예에서, 지방산 유도체 또는 다른 화합물은 100 g/L 초과, 200 g/L 초과, 또는 300 g/L 초과 역가로 생산된다. 예시적 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 재조합 숙주 세포에 의해 생산된 지방산 유도체 또는 다른 화합물의 역가는 5 g/L 내지 200 g/L, 10 g/L 내지 150 g/L, 20 g/L 내지 120 g/L 및 30 g/L 내지 100 g/L이다. 역가는 소정의 재조합 숙주 세포 배양에 의해 생산되는, 특정 지방산 유도체 또는 지방산 유도체의 조합물 또는 또 다른 화합물 또는 다른 화합물의 조합물을 언급할 수 있다. 예시적 구현예에서, 재조합 숙주 세포, 예를 들어, 이. 콜라이에서 조작된 TE 변이체의 발현은 상응하는 야생형 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 숙주 세포와 비교하여 보다 높은 역가의 생산을 유도한다. 하나의 구현예에서, 보다 높은 역가는 적어도 약 5 g/L 내지 약 200 g/L의 범위이다.

[0255] 다른 예시적 구현예에서, 본원의 개시내용의 방법에 따라 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체를 생산하도록 조작된 숙주 세포는 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 6%, 적어도 약 7%, 적어도 약 8%, 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20 %, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%, 적어도 약 26%, 적어

도 약 27%, 적어도 약 28%, 적어도 약 29%, 또는 적어도 약 30% 또는 이전의 값의 임의의 2개에 의해 제한된 범위의 수율을 갖는다. 다른 구현예에서, 지방산 유도체 또는 유도체들 또는 다른 화합물(들)은 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과 수율로 생산된다. 대안적으로, 또는 추가로, 상기 수율은 약 30% 이하, 약 27% 이하, 약 25% 이하, 또는 약 22% 이하이다. 또 다른 구현예에서, 상기 수율은 약 50% 이하, 약 45% 이하, 또는 약 35% 이하이다. 또 다른 구현예에서, 상기 수율은 약 95% 이하, 또는 90% 이하, 또는 85% 이하, 또는 80% 이하, 또는 75% 이하, 또는 70% 이하, 또는 65% 이하, 또는 60% 이하, 또는 55% 이하, 또는 50% 이하이다. 따라서, 상기 수율은 상기 종점의 임의의 2개의 값에 의해 결합될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 재조합 숙주 세포에 의해 생산되는 중쇄 지방산 유도체, 예를 들어, 8 및/또는 10개 탄소 지방산 유도체의 수율은 약 5% 내지 약 15%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 15% 내지 약 27%, 약 18% 내지 약 22%, 약 20% 내지 약 28%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 100% 내지 약 200%, 약 200% 내지 약 300%, 약 300% 내지 약 400%, 약 400% 내지 약 500%, 약 500% 내지 약 600%, 약 600% 내지 약 700%, 또는 약 700% 내지 약 800%일 수 있다. 수율은 특정 중쇄 지방산 유도체, 또는 지방산 유도체의 조합물을 언급할 수 있다. 하나의 구현예에서, 보다 높은 수율은 이론치 수율의 약 10% 내지 약 800%의 범위이다. 추가로, 상기 수율은 또한 사용되는 공급원료에 의존한다.

[0256] 일부 예시적인 구현예에서, 개시내용의 방법에 따라 지방산 유도체, 예를 들어, 중쇄 지방산 유도체를 생산하기 위해 조작된 숙주 세포의 생산성은 적어도 100 mg/L/시간, 적어도 200 mg/L/시간, 적어도 300 mg/L/시간, 적어도 400 mg/L/시간, 적어도 500 mg/L/시간, 적어도 600 mg/L/시간, 적어도 700 mg/L/시간, 적어도 800 mg/L/시간, 적어도 900 mg/L/시간, 적어도 1000 mg/L/시간, 적어도 1100 mg/L/시간, 적어도 1200 mg/L/시간, 적어도 1300 mg/L/시간, 적어도 1400 mg/L/시간, 적어도 1500 mg/L/시간, 적어도 1600 mg/L/시간, 적어도 1700 mg/L/시간, 적어도 1800 mg/L/시간, 적어도 1900 mg/L/시간, 적어도 2000 mg/L/시간, 적어도 2100 mg/L/시간, 적어도 2200 mg/L/시간, 적어도 2300 mg/L/시간, 적어도 2400 mg/L/시간, 2500 mg/L/시간, 또는 10 g/L/시간 정도로 높다(세포 매쓰에 의존하여). 예를 들어, 개시내용의 방법에 따라 재조합 숙주 세포에 의해 생산된 지방산 유도체 또는 유도체들 또는 다른 화합물(들)을 포함하는 말로닐-CoA 유래된 화합물의 생산성은 500 mg/L/시간 내지 2500 mg/L/시간, 또는 700 mg/L/시간 내지 2000 mg/L/시간일 수 있다. 생산성은 소정의 숙주 세포 배양물에 의해 생성되는 특정 8 및/또는 10개 탄소 지방산 유도체 또는 소정의 숙주 세포 배양에 의해 생성된 지방산 유도체 또는 다른 화합물(들)의 조합물을 언급할 수 있다. 예를 들어, 이. 콜라이와 같은 재조합 숙주 세포에서 조작된 TE 변이체의 발현은 상응하는 야생형 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 숙주 세포와 비교하여, 8 및/또는 10개 탄소 지방산 유도체 또는 다른 화합물의 증가된 생산성을 유도한다. 예시적인 구현예에서, 보다 높은 생산성은 약 0.3 g/L/h 내지 약 3 g/L/h 내지 약 10 g/L/h 내지 약 100 g/L/h 내지 약 1000 g/L/h의 범위이다.

[0257] VI. 단리

[0258] 바이오생성물, 예를 들어, 상기 논의된 바와 같이 재조합 숙주 세포를 사용하여 생산되는 본원에 기재된 바와 같이 중쇄 지방산 유도체를 포함하는 조성물은 전형적으로 당업계에 공지된 방법에 의해 발효 브로쓰로부터 단리된다. 예시적인 구현예에서, 재조합 숙주 세포를 사용하여 생산되는 상기 논의된 바와 같은 중쇄 지방산 유도체를 포함하는 조성물은 중력 침강, 원심분리 또는 기울여 따르기에 의해 발효 브로쓰로부터 단리된다.

[0259] VII. 중쇄 지방산 유도체의 조성물 및 제형

[0260] 바이오생성물, 예를 들어, 상기 상세히 논의된 바와 같이 재조합 숙주 세포를 사용하여 생산된 중쇄 지방산 및 중쇄 지방산 유도체들을 포함하는 조성물은 재생 공급원으로부터 (예를 들어, 재생 공급 원료로부터 유래된 단순 탄소원으로부터) 생산되고 이와 같이 재료의 새로운 조성물이다. 이들 새로운 바이오생성물은 이원 탄소-동위원소 핑거프린팅 또는 ^{14}C 데이팅을 기준으로 석유 탄소로부터 유래된 유기 화합물로부터 구분될 수 있다. 추가로, 생물근원 탄소의 특이적 공급원(예를 들어, 글루코스 대 글리세롤)은 당업계에 공지된 방법에 의한 이원 탄소-동위원소 핑거프린팅에 의해 결정될 수 있다(참조: 예를 들어, 미국 특허 제7,169,588호, WO 2016/011430 A1, 등).

[0261] 추가로, 하기에 나타낸 바와 같이, 바이오생성물의 조성물은 유기체로부터 생산된 천연의 지방산 유도체의 특유의 조성물을 정의한다. 중쇄 지방산 유도체 내에서 이례적으로 높은 이들 특유의 조성물은 이들 가치있는 중쇄 길이 생성물의 신규하고 특유한 공급원을 제공한다.

- [0262] 하기의 실시예에는 본 발명을 설명하기 위해 제공되지만 이에 제한되지 않는다.
- [0263] **실시예**
- [0264] 하기의 특정 실시예에는 본 개시내용을 설명하기 위한 것이며 청구항의 범위를 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다.
- [0265] **실시예 1**
- [0266] 하기의 실시예에는 중쇄 길이의 지방산 유도체 화합물에 대한 화학적 변형이 비변형된 중쇄 길이의 지방산 유도체 화합물의 존재하에 성장하는 경우, 미생물이 경험하는 독성에 비해 중쇄 지방산 유도체 화합물에 대해 미생물이 경험한 독성을 감소시킴을 설명한다.
- [0267] 상기 본원에서 논의된 바와 같이, 생물학적 시스템(예를 들어, 미생물 세포의 발효)을 사용한 중쇄 길이의 지방산 유도체 화합물(들)의 생산은 중쇄 길이의 지방산/지방족 화합물의 선택적 생산을 위해 바람직한 경로이다. 불행하게도, 중쇄 지방산 유도체 화합물(들)은 미생물 세포에 대해 고도로 독성일 수 있으며, 이 독성은 발효를 통한 상업적 규모로 중쇄 길이의 지방산 유도체 화합물의 생산에 대한 장벽이다.
- [0268] 본 실시예에서, 변형 또는 비-변형에서만 차이가 있는 관련 화합물은 각 화합물의 최소 억제 농도(MIC) (배양물의 50%를 사멸시키기에 충분한 화합물의 농도)를 결정함으로써 독성에 대해 평가하였다. 독성이 덜한 화합물(즉, 비교적 높은 MIC)은 발효에 의해 생산되기에 보다 용이한 화합물이다.
- [0269] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)(이. 콜라이, *E.coli*) 세포 배양물을 다양한 농도의 이들 화합물에서 성장시키고, 이들의 성장은 배양물 중에 총 세포 수의 척도로서 24시간 성장 후 용해된 배양물로부터의 총 단백질을 측정함으로써 결정하였다.
- [0270] 특히, 이. 콜라이 세포 배양물은 옥탄올, 옥탄산, 메틸 옥타노에이트 및 옥틸락테이트의 존재하에 성장시켰다. 그 결과는 도 1에 나타낸다.
- [0271] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 중쇄 산, 옥탄산 및 중쇄 알코올, 옥탄올은 1 내지 5 g/L의 MIC를 갖는다. 대조적으로, 이들 중쇄 알코올 및 산의 에스테르, 옥실 아세테이트 및 메틸 옥타노에이트, 에틸 옥타노에이트(나타내지 않음)는 상응하는 비변형된 알코올 및 산보다 10 내지 100배 높은 MIC를 갖는다. 따라서, 이. 콜라이는 비변형된 화합물과 비교하여 화학적으로 변형된 화합물의 10 내지 100배 높은 농도를 견딜 수 있다.
- [0272] 따라서, 상기 실시예는 중쇄 지방족 알코올 및 산의 에스테르는 산업 발효 공정에 의해 고농도로 제조되며 관용성일 수 있음을 입증한다. 추가로, 상기 실시예는 독성 분자와 연관된 관능기(들)를 변형시키거나, 그 분자량을 약간 증가시킴으로써 주어진쇄 길이를 갖는 지방족 화합물의 독성을 유의적으로 감소시킬 수 있음을 입증한다.
- [0273] **실시예 2**
- [0274] 하기의 실시예는 중쇄 지방산 유도체 화합물의 독성과 분배 계수 (LogP)의 상호관계를 설명한다.
- [0275] 실시예 1에 나타낸 바와 같이, 중쇄 지방 알코올의 에스테르 및 중쇄 지방산의 에스테르는 상응하는 중쇄 지방 알코올 및 중쇄 지방산보다 독성이 덜하다(보다 높은 MIC를 갖는다).
- [0276] 많은 수용성 화합물은 낮은 분배 계수(LogP)를 갖는다. LogP는 물과 옥탄올 사이에서 화합물의 분배의 척도이다(참조: 예를 들어, 아세트산, 락트산, 피루브산, 1,3 프로판 디올, 아미노산 등과 같은 낮은 LogP를 갖는 화합물은 미생물, 예를 들어, 이. 콜라이에 의해 생산될 수 있고 고농도에서 관용성일 수 있다. 따라서, 덜 소수성 (또는 균등하게 보다 친수성)임에 따라서 보다 낮은 LogP를 갖는 화합물은 덜 독성일 것으로 결론지을 수 있다. 이것이 사실인지를 평가하기 위해, 본원 발명자들은 도 1에 개시된 화합물(즉, 옥탄올, 옥탄산, 옥틸 아세테이트 및 메틸 옥타노에이트)의 logP를 측정하였다.
- [0277] 놀랍게도, 도 2가 보여주는 바와 같이, 중쇄 지방족 화합물의 경우, LogP의 함수로서 독성은 예상과는 반대이다. 즉, 낮은 logP를 갖는 화합물 옥탄올 및 옥탄산은 높은 독성(즉, 낮은 MIC)을 갖는다. 높은 logP를 갖는 화합물 옥틸 아세테이트, 메틸 옥타노에이트, 및 에틸 옥타노에이트는 보다 낮은 독성(높은 MIC)을 갖는다.
- [0278] 따라서, 본 실시예는 낮은 LogP를 갖는 독성의 중쇄 지방족 화합물의 보다 높은 logP₅₀를 갖는 화합물로의 변형이 이. 콜라이와 같은 산업 미생물에 독성인 중쇄 지방족 화합물의 독성을 감소시키기 위해 유용한 방법임을 입증

한다.

[0279] 실시예 3

[0280] 하기의 실시예는 독성 중쇄 지방족 화합물의 독성이 덜한 유도체로의 전환을 촉매하는 신규 생화학적 경로의 발현은 미생물이 독성 화합물에 대한 경로를 관용성하도록 하여 높은 수준의 이의 유도체를 생성하도록 할 수 있음을 설명한다.

[0281] 실시예 1 및 2에서 상기 논의된 바와 같이, 중쇄 지방산 유도체 화합물, 예를 들어, 지방 알코올 및 지방산은 숙주 세포에 독성이지만 약간 더 높은 분자량 및 높은 logP 유도체는 그렇지 않다. 따라서, 본원 발명자들은 보다 독성인 화합물을 생체내 독성이 덜한 화합물로 생화학적으로 전환시킴으로써 세포를 사멸시키지 않고 미생물 내에서 보다 독성인 화합물을 생산할 수 있음을 추론했다. 이어서, 독성이 덜한 화합물이 생산되고 높은 수준에서 관용성일 수 있다. 이들 독성이 덜한 화합물은 일단 생성되면 단리되어 직접적으로 사용될 수 있거나, 단리되어 화학적으로 보다 독성인 화합물로 전환될 수 있다.

[0282] 하기에 나타난 바와 같이, 예를 들어, 단쇄 산 또는 알코올과의 에스테르화에 의한 것과 같이, 독성 중쇄 지방산 유도체의 관능기를 변형시키기 위해 세포를 조작하는 것은, 비-에스테르화된 화합물에 대한 세포의 독성 반응을 제거하고 조작된 세포가 독성 화합물에 대한 높은 생산 생화학적 경로의 발현이 생존할 수 있게 한다. 이것은 신규하고 선택적인 공정이 이들의 억제 수준을 훨씬 초과하는 농도로 이들 중쇄 길이의 지방산 유도체를 생산할 수 있게 한다.

[0283] 추가로, 에스테르화된 중쇄 지방산 및/또는 에스테르화된 중쇄 지방 알코올의 변형을 제공하기 위한 에스테르화에 의한 중쇄 지방산 및/또는 중쇄 지방 알코올의 변형은 추출제로서 작용함으로써 생합성 경로에서 중쇄 중간체의 독성을 추가로 감소시킨다.

[0284] 추출제로서 에스테르화된 중쇄 지방산 유도체

[0285] 도 3에서, 옥틸 아세테이트의 존재가 세포를 1-옥탄올 독성으로부터 보호할 수 있는지의 여부를 시험하도록 설계된 실험 결과를 나타낸다. 도 3으로부터 명백한 바와 같이, .5 그램/리터(g/L)의 농도에서 1-옥탄올에 5시간 노출시킨 후, 이. 콜라이의 생존능은 완전히 상실되었다. 그러나, 흥미롭게도, 옥틸 아세테이트가 또한 50 g/L(이. 콜라이 세포에 대해 비-독성 농도)로 첨가된 경우, 세포 생존능은 대조군 수준의 100%로 유지되었고, 세포가 .5 g/L의 농도에서 1-옥탄올에 노출된 경우, 및 심지어 1 g/L의 농도에서 1-옥탄올에 노출된 경우라도 유지되었다. 세포가 10 g/L의 농도(1-옥탄올에 대해 관찰된 MIC를 훨씬 초과하는)에서 1-옥탄올에 노출된 경우, 생존능은 20% 미만으로 감소하였다.

[0286] 지방 알코올 아세틸 트랜스퍼라제를 발현시킴에 의한 중쇄 지방 알코올에 대한 조작 관용성

[0287] 상기 논의되고 보여준 바와 같이, 중쇄(C6 내지 C10) 지방 알코올의 미생물 생산은 이들의 독성에 의해 제한된다. 이들 중쇄 지방산 유도체 화합물에 대한 관용성을 증가시키는 유전학적 및 생화학적 기전을 동정하기 위한 많은 노력이 있어왔다(참조: 예를 들어, Lennen and Pfleger, 2013; Royce et al., 2015; Tan, et al., 2016; Tan, et al., 2017). 그러나, 지금까지, 상업적 역가 (예를 들어, 약 10 g/l 내지 200 g/l 또는 그 보다 높은 농도)의 생산을 가능하게 하는 어떠한 해결책도 밝혀지지 않았다.

[0288] 실시예 1에서, 본원 발명자들은 중쇄 지방 알코올 아세테이트가 배양 배지에 첨가되는 경우 상응하는 중쇄 길이의 지방 알코올보다 독성이 덜하다는 것을 입증하였다. 하기 기술된 실험에서, 본원 발명자들은 세포 내부에서 중쇄 길이의 지방 알코올을 생산하기 위한 경로의 발현이 세포독성이어서 불량한 세포 성장을 유발하고 이들 세포에 의한 중쇄 알코올의 제한된 생산을 유발함을 입증한다. 본원 발명자들은 추가로 상기 동일한 균주가 추가로 조작되어 중쇄 알코올을 알코올 아세테이트 에스테르로 전환시키는 생화학적 경로를 발현하는 경우, 상기 세포가 잘 성장하고 상당한 양의 지방 알코올 아세테이트를 생산함을 보여준다. 따라서, 상기 세포에서 합성된 중쇄 길이의 지방 알코올의 이들의 알코올 아세테이트로의 생화학적 전환은 중간체 중쇄 지방 알코올의 독성을 제거하고 지방 알코올 아세테이트의 고수준의 생산을 가능하게 한다. 이것은 추가로 중쇄 길이의 알코올-0-아세틸 트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자들이 세포내 생성된 중쇄 지방 알코올에 대해 내성을 부여함을 입증한다(도 4).

[0289] 세포는 다양한 생화학적 경로를 통해 지방 알코올을 생산하도록 조작될 수 있다(예를 들어, 도 4 참조). 이들 생화학적 경로는 세포 내 지방산 티오에스테르를 지방산을 생성하도록 가수분해하는 티오에스테라제(TE) (참조: 예를 들어, PCT/US1998/011697, 미국 특허 제9,765,368호, PCT/US2010/04049), 지방산의 지방 알데하이드로의

ATP 및 NAD(P)H 환원을 촉매하는 카복실산 리덕타제, 및 지방 알데하이드의 지방 알코올로의 NAD(P)H 의존성 환원을 촉매하는 알코올 데하이드로게나제(대부분의 세포는 상기 반응을 촉매하기 위해 세포내에서 충분한 알코올 데하이드로게나제 활성을 갖지만, 이들 또는 유사한 효소의 과발현은 지방 알데하이드가 축적되지 않도록 하는 것을 보장할 수 있음을 주지한다: 참조: 예를 들어, WO 2010/062480)를 포함하는 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 지방 알코올을 생성하도록 조작될 수 있는 다른 경로는 지방 아실 티오에스테르의 지방 알데하이드로의 환원을 촉매하는 지방 아실 리덕타제를 포함한다(참조: 예를 들어, Kim et al, 2015).

[0290] 지방 알코올의 아세틸화는 예를 들어, 알코올의 아세틸 조효소 A (CoA) 의존성 아세틸화를 촉매하는, 알코올-O-아세틸 트랜스퍼라제(EC 2.3.1.84)의 발현에 의해 성취될 수 있다(도 4). 알코올 아세틸트랜스퍼라제(AAT)는 다양하고 적합한 AAT는 식물 AAT(예를 들어, 딸기 SAAT 또는 FaAAT2, 페투니아(Petunia) PhcFATB2, 등과 같은), 효모 ATF(사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae) ATF1)(참조: 예를 들어, PCT/US2014/053587) 등의 계열로부터 선택될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에서, 본원 발명자들은 지방 알코올을 생산하도록 조작된 이. 콜라이 세포 내에서 에스. 세레비지에 ATF1을 발현하는 효과를 보여준다.

[0291] 아세틸화 경로를 발현하는 것에 이득이 있는지를 결정하기 위해, 중쇄 지방 알코올의 생합성에 대한 경로를 발현하는 균주의 생존능은 (독성) 중쇄 지방 알코올을 지방 알코올 아세테이트(독성이 덜한)로 전환시키는 ATF를 발현하는 동종동계 균주의 생존능과 비교하였다. 상기 평가에서, 균주 sRG.674는 지방 알코올 중을 생산하고, 여기서, 생산된 총 지방 중(FAS)의 85 내지 90%는 8개 또는 10개 탄소 길이(C8 + C10 지방 알코올(C8 + C10 FALC))이다. 균주 sJN.209는 에스. 세레비지에 atf1 유전자가 지방 알코올(FALC) 경로를 발현하는 플라스미드에 첨가된 것을 제외하고는 sRG.674와 동종동계이다.

[0292] [표 3]

[0293] 중쇄 지방 알코올(FALC) 또는 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE)를 생산하는 균주.

균주명	기재사항	발현된 경로 효소
sRG.674	FALC 생산자	조작된 티오에스테라제 변이체, CarB, AkrA
sJN.209	FACE 생산자	조작된 티오에스테라제 변이체, CarB, AkrA, ATF1

[0294]

[0295] 균주 sRG.674 및 sJN.209는 최대 소비율로 탄소 공급원 공급물로서 글루코스를 갖는 최소 염 배지를 사용하여, 실시예 9 및 10에 기재된 바와 같이 5 L 생물반응기에서 성장시켰다(도 5). 심지어 FALC 경로의 발현 및 중쇄 화합물의 생산을 유도하는 IPTG의 첨가 전에도, 상기 FALC-생산 균주(sRG.674)는 성장할 수 없었다(도 5a). 이론에 국한되는 것 없이, FALC 생산 균주가 성장 불능은 중쇄 FALC 합성에 관여하는 효소의 항상성 저수준의 발현 및 C8 및 C10 FALC의 억제 농도의 조기 생성으로 인한 것으로 여겨진다. 대조적으로, 균주 sJN.209에서 AAT의 발현과 함께, 상기 성장 억제는 관찰되지 않았고, 대신 완전한 72시간 발효를 위해 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE)의 완전한 성장 및 생성이 관찰되었다.

[0296] 생성된 지방 중의 수준 및 조성물의 비교(도 5b 및 도 5c)는 추가로 아세틸 트랜스퍼라제 유전자가 세포 내 중쇄 길이의 지방 알코올을 독성이 덜한 화합물 지방 알코올 아세테이트로 전환시킴으로써 일시적이지만 고수준의 중쇄 길이의 지방 알코올을 생산할 수 있게 하는 강력한 능력을 입증한다.

[0297] 중쇄 유리 지방 지방산에 대한 관용성을 위한 조작

[0298] 중쇄 지방 알코올과 유사하게, 중쇄 유리 지방산은 미생물 세포에 독성이다(참조: 예를 들어, 도 1). 본원에서, 본 발명자들은 상기 화합물의 생산이 유리 지방산을 독성이 덜한 알킬 에스테르, 예컨대 지방산 메틸(FAME) 또는 에틸 에스테르(FAEE)로 전환시키는 능력을 갖는 세포를 제공함으로써 크게 개선될 수 있음을 보여준다.

[0299] 중쇄 FFA의 에스테르화는 조효소 A(CoA) 및 아실 조효소 A(아실-CoA)의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 의존성 합성을 촉매하는 지방 아실-CoA 신테타제(예를 들어, 이. 콜라이로부터 FadD와 같은), 및 티오에스테르, 예컨대 아실-CoA(지방 아실-CoA 신테타제의 생성물 또는 β-산화 또는 역 β-산화 경로 내 중간체)의 알코올분해를 촉매하는 에스테르 신타제의 발현을 통해 성취될 수 있다(도 6).

[0300] 중쇄 FFA의 에스테르화는 또한 중쇄 길이의 아실 ACP (또한 알킬 티오에스테르임)의 직접적인 알코올분해를 촉

매하는 중쇄 길이의 선택적 에스테르 신타제(예를 들어, ?)의 발현을 통해 성취될 수 있다.

[0301] 에스테르 합성 경로를 발현하는 이득은 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제를 발현하도록 조작된 균주에 의해 생성된 중쇄 지방산 유도체 및 생존능을, 또한 아실 CoA 신테타제 및 에스테르 신타제를 발현하는 동종동계 균주의 것과 비교함으로써 입증되었다.

[0302] 균주 sRS.786은 중쇄 길이의 티오에스테라제(서열번호 49)를 발현하도록 조작되었고 대부분 C8 및 C10 FFA인 FFA를 생산한다(도 7c). 균주 Stpay.179는 sRS.786과 동종동계이지만 또한 지방 아실 CoA 신테타제 및 에스테르 신타제를 발현한다. Stpay.179는 예를 들어, 메탄올, 에탄올 등과 같이, 배지 내 단쇄 알코올이 제공된 경우 중간 길이의 지방 알킬 에스테르를 생산한다(도 7c).

[0303] [표 4]

[0304] 중쇄 지방산(FFA) 또는 지방 알킬 에스테르를 생산하는 균주

균주명	기재사항	발현된 경로 효소
sRS.786	FFA 생산자	조작된 티오에스테라제 변이체
Stpay.179	지방 알킬 에스테르	조작된 티오에스테라제 변이체, 아실 CoA 신테타제, 에스테르 신타제

[0305]

[0306] 균주 sRS.786 및 Stpay.179는 14g/h의 속도로 공급되는 탄소원으로서 글루코스를 갖는 최소 염 배지를 사용하여, 하기 실시예 11 및 12에 기재된 바와 같이 5 L 생물반응기 유가식 배치에서 성장시켰다. 추가로, 에탄올(도 7) 또는 메탄올(나타내지 않음)은 발효 과정 동안에 공급하여 약 2 g/L의 알코올 농도를 유지하였다.

[0307] 유일하게 FFA를 생산하는 균주(sRS.786)는 중쇄 길이의 아실-ACP 티오에스테라제(서열번호 49)의 발현을 유도하기 위한 IPTG의 첨가 대략 10시간 후 성장 및 글루코스 소비를 정지하였고, 약 5 g의 C8 + C10 FFA를 생산하였다. 대조적으로, 에스테르화 경로를 발현하는 균주 Stpay.179는 성장하여 84 g/kg 초과인 총 지방산 중(이의 93%는 C8-C10 FFA였다)의 역가를 생산할 수 있다(도 7b 및 도 7c). 유사한 결과는 에탄올 또는 메탄올이 에스테르 합성을 위해 보충된 알코올로서 사용된 경우 관찰되었다.

[0308] 이들 데이터는 독성 세포내 중쇄 유리 지방산의, 독성이 덜한 알킬 에스테르(예를 들어, 지방산 메틸 또는 지방산 에틸 에스테르)로의 전환을 촉매하는 에스테르 합성 경로의 발현이 중쇄 길이의 지방산 유도체의 고수준의 생산을 가능하게 한다. 이들 데이터는 추가로 에스테르 합성 경로의 발현이 이의 독성을 제거함으로써 중쇄 길이의 선택적 티오에스테라제의 고수준의 발현을 가능하게 함을 보여준다.

[0309] 실시예 4

[0310] 하기의 실시예는 단일 아미노산 치환을 함유하고 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위한 개선된 활성 및/또는 선택성을 갖는, 조작된 티오에스테라제 변이체를 설명한다.

[0311] 생물공학을 사용한 중쇄(C6 내지 C10) 길이의 지방산 유도체의 생산은 현재, 가용한 티오에스테라제(TE)의 활성 및 선택성에 의해 부분적으로 제한된다. 가용한 가장 활성이고 선택적 TE 중 하나는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소인 쿠파 후커리아나(*Cuphae hookeriana*) 티오에스테라제 chFatB2이다.

[0312] 그러나, 불행하게도, 상기 효소는 많은 제한을 갖는 것으로 밝혀졌다. 미생물 내 가용성 단백질로서 불량하게 발현되고 이의 특이적 활성은 낮고, C8 티오에스테르 보다는 C10 티오에스테르에 대한 가수분해에 대해 보다 선택적이다. 개선된 활성, 선택성 및 용해도를 갖는 새로운 TE를 생성하기 위해, 본 발명자들은 서열번호 1에서 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 신규 조작된 TE 변이체를 유도할 수 있는 아미노산 치환을 동정하기 위해 광범위한 조작을 위한 노력에 착수했다. 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 그러한 TE 변이체는 개선된 촉매 활성, 개선된 선택성 및/또는 개선된 용해도 중 하나 이상을 통해 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 달성할 수 있다.

[0313] 서열번호 1은 328개 아미노산(6560개의 가능한 단일 아미노산 변이체)을 갖고 합리적인 효소 조작 노력을 지지할 수 있는 3차원 결정 구조에 대해 보고된 바 없다. 본원 발명자들은 먼저 서열번호 1의 모 서열의 것과 비교하여 효소 활성 및/또는 중쇄 길이의 선택성에서 유의적 증가를 입증하는 조작된 TE 변이체를 유도하는 서열번호

호 1에 대한 단일 돌연변이를 동정하고 조작하기 위한 노력에 착수했다.

[0314] 상기 돌연변이를 평가하기 위해, 선택된 단일 아미노산 치환을 갖는 신규 조작된 TE를 암호화하는 유전자를 이. 콜라이에서 발현시키고 지방산 유도체의 TE 의존성 생산을 지지하는 조건하에서 성장시켰다. 이어서, 상기 균주에 의해 생산된 중쇄 지방산유도체의 양 및 조성을 정량하고 이것이 서열번호 1을 갖는 효소를 발현하는 것을 제외하고는 동일한 대조군 균주에 의해 생산된 중쇄 지방산 유도체의 양 및 조성과 비교하였다.

[0315] 본래에 유리 지방산을 생산하지 않는 이. 콜라이는 이중성 TE를 발현하도록 조작된 경우 유리 지방산을 생산할 수 있으며, 이들 지방산의 양 및 조성은 직접적으로 발현된 TE의 활성 및 선택성과 상호관련되어 있다(참조: 예를 들어, 상기 Yuan et al., (1995); 국제 특허 출원 공개 공보 W02007136762; 국제 특허 출원 공개 공보 W02008119082).

[0316] 실시예 1 내지 3에서 상기 논의된 바와 같이, 중쇄 길이의 지방산 및 중쇄 길이의 지방 알코올의 생산은 이. 콜라이와 같은 미생물에 독성이다. 조작된 TE를 평가하기 위해 사용된 숙주 이. 콜라이가 잠재적으로 독성 수준의 중쇄 길이의 지방산을 생산하는 조작된 TE에 관용성일 수 있도록 보장하기 위해, 사용된 이. 콜라이는 또한 이들의 지방 알코올 아세테이트로의 전환에 영향을 미침에 의해 중쇄 길이의 지방산에 대한 세포 관용성을 증가시키는 유전자를 발현하도록 조작하여 상기 조작된 세포에 의해 생산된 지방 알코올 아세테이트의 수준 및 조성 이 발현된 TE의 활성 및 선택성과 직접 상호관련되도록 하였다.

[0317] 대조군 평가 균주의 생성.

[0318] 서열번호 1의 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 이. 콜라이에서 최적의 해독을 위해 합성되었고 서열번호 60 으로서 나타낸다. 상기 유전자는 pACYC 기반 플라스미드(Genbank Accession X06403)에 클로닝하였고, 이는 카나마이신에 대해 내성을 부여하여 상기 유전자가 Ptrc 프로모터의 전사 제어하에 있도록 하였고(참조: 예를 들어, Camsund et al. Journal of Biological Engineering 2014, 8:4), 이는 이소프로필티오갈락토사이드(IPTG)의 존재하에 유도된다. 수득한 플라스미드, pIR.108(도 8)은 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고(참조: 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 공보 W02010062480) 실시예 3에서 상기 기재되고 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올 아세테이트(FACE)로의 생화학적 전환에 함께 영향을 주는 유전자 carB, alrA, 및 aftA1을 발현하는 Ptrc 제어된 오페론을 함유하는 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이에 형질전환시켰다.

[0319] 높은 활성 및 특이성을 갖는 조작된 TE가 효과적으로 시험될 수 있도록 보장하기 위해, 여러 대조군 평가 균주를 사용하였고 이의 각각은 지방산 유도체의 생산에 대해 상이한 능력을 갖는데, 즉, 이들은 지방산 경로를 통해 상이한 수준의 탄소 유입을 지지하도록 조작되었다(표 5). 추가로, 일부 경우에, 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 신규 조작된 TE 변이체를 서열번호 1 대신 대조군 TE로서 사용하여 고도 활성의 개선된 조작된 TE 변이체를 동정하였다. 예를 들어, 단일 아미노산 치환을 갖는 TE는 온건한 지방산 유입을 갖도록 조작된 균주에서 발현되는 서열번호 1과 비교하였다. 일단 신규한 고도의 활성 TE 변이체가 개발되면, 온건한 지방산 유입의 균주에서 발현되는 서열번호 1은 대조군으로 작용하기에는 더 이상 충분하지 않았다. 대신, 다중 아미노산 치환을 갖고 높은 지방산 능력을 갖는 균주에서 발현되는 신규 고도 활성의 조작된 TE 변이체를 대조군으로서 사용하였다. 이 모두와 함께, 본원 발명자들은 각각의 TE 변이체의 수행능 개선이 최상으로 정량화되고 동정되도록 보장하기 위해 신규 조작된 TE 변이체의 평가를 지지하는 5개의 상이한 TE 및 균주를 사용하였다. 지방산 유도체의 생산을 위해 다양한 능력을 갖는 대조군 기본 균주의 목록은 표 5에 나타낸다. 표 6은 야생형 서열(서열번호 1)에 상대적으로 대조군 TE의 수행능을 보여준다.

[0320] [표 5]

[0321] 지방산 유도체의 생산을 위해 상이한 능력을 갖는 대조군 기본 균주의 기재

	대조군 기본 균주				
	sAZ303	sJN.032	sven.449	sAZ746	sCB.243
FAS 생합성 능력* (mg/L)	200-1000	200-1200	200-1700	200-2000	200-3000

[0322]

[0323] * "조작된 TE 변이체의 상대적 수행능을 정량하는"에서 아래에 기술된 HTP 스크리닝에서 FAS 역가(mg/L)의 범위

는 각각의 균주에서 조작된 알킬 티오에스테르로의 유입 수준에 의존한다.

[표 6]

조작된 티오에스테라제 변이체 대조군 및 야생형 서열(서열번호 1)에 대한 수행능.

대조군 TE	총 FAS FOC	총 FAS FOC의 %C8 FAS	%C8/%C10 FOC
서열번호 1 (야생형)	1.0	1.0	1.0
서열번호 4	1.42	1.22	1.78
서열번호 9	1.87	1.25	2.04
서열번호 15	1.54	1.45	3.48
서열번호 49	2.79	1.53	2.07
서열번호 55	2.23	2.90	25.43

서열번호 1과 비교하여 개선된 활성을 갖는 조작된 TE의 동정.

표 7에 기재된 조작된 TE를 발현하는 균주는 각각 중쇄 지방산의 생산에 영향을 미치는 이들의 특유한 조작된 TE를 암호화하는 유전자, 및 중쇄 지방산의 중쇄 지방 알코올 아세테이트로의 전환에 영향을 주는 CarB, AlrA, 및 Aft1을 암호화하는 유전자의 발현을 유도하는 조건하에서 성장시켰다. 수득한 지방산 유래된 생성물은 추출하고 정량하고 이어서 동일한 조건하에 성장된 서열번호 1(표 6)을 발현하는 대조군 평가 균주 1에 의해 생산된 지방산 유도체 생성물과 비교하였다. 수득한 지방산 유도체의 성장 및 분석을 위한 상세한 방법은 아래에 기재되어 있다.

표 7은 (1) 활성, 즉 배양에 의해 생산되는 총 지방산 유래된 생성물, (2) C8 선택성, 즉, 배양에 의해 생산된 총 FAS의 % C8 FAS, 및 (3) 대조군에 대한 배수(FOC)로서 보고된 수행능과 함께 C10 생성물(%C8 FAS/%C10 FAS)과 비교하여 C8에 대한 선택성에 대해 개선된 수행능을 갖는 조작된 TE를 기재한다. 표 7에 나타난 단일 돌연변이는 서열번호 1에 상대적이다. 따라서, 예를 들어, P3K는 서열번호 1의 아미노산 위치 3에서 치환 돌연변이(프롤린에서 라이신으로)를 나타낸다.

[표 7]

총 FAS, 총 FAS의 % C8 FAS 및/또는 %C8 FAS/%C10 FAS를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 조작된 티오에스테라제 변이체. FOC: 대조군에 대한 배수(fold over the control).

서열번호	총 FAS FOC	총 FAS FOC의 % C8 FAS	총 FAS FOC의 % C10 FAS	% C8/% C10 FOC	대조군 TE	스크리닝 균주
P3K	0.77	1.07	0.90	1.19	서열번호 1	sAZ303
D4M	1.22	1.10	0.86	1.28	서열번호 1	sAZ303
S6R	0.82	1.02	0.97	1.04	서열번호 1	sAZ303
T14G	0.81	1.02	0.97	1.05	서열번호 1	sAZ303
T14R	1.18	1.05	0.93	1.13	서열번호 1	sAZ303
V15L	0.81	1.05	0.92	1.13	서열번호 1	sAZ303
V15W	1.20	1.06	0.92	1.14	서열번호 1	sAZ303
V17A	0.79	1.02	0.97	1.05	서열번호 1	sAZ303
V17C	1.26	1.08	0.89	1.22	서열번호 1	sAZ303
P22R	0.79	1.02	0.96	1.06	서열번호 1	sAZ303
D37P	0.78	1.01	0.98	1.03	서열번호 1	sAZ303
T44G	0.90	1.05	0.93	1.13	서열번호 1	sAZ303
T44I	0.83	1.09	0.87	1.26	서열번호 1	sAZ303
V45S	0.66	1.03	0.95	1.09	서열번호 1	sAZ303
V50W	0.91	1.05	0.92	1.13	서열번호 1	sAZ303
S54R	0.84	1.10	0.83	1.33	서열번호 1	sAZ303
S56C	1.23	0.90	1.15	0.78	서열번호 1	sAZ303
S56K	1.10	1.07	0.89	1.21	서열번호 1	sAZ303
T64P	1.14	1.05	0.94	1.11	서열번호 1	sAZ303
T64R	0.84	0.96	1.06	0.91	서열번호 1	sAZ303
T67L	0.98	1.08	0.88	1.22	서열번호 1	sAZ303
L73V	0.79	1.06	0.90	1.18	서열번호 1	sAZ303
H76F	0.82	1.10	0.82	1.33	서열번호 1	sAZ303
H76L	1.42	1.10	0.86	1.28	서열번호 1	sAZ303
H76Y	0.65	1.10	0.85	1.29	서열번호 1	sAZ303
L91M	0.90	0.96	1.06	0.91	서열번호 1	sAZ303
L99K	0.96	1.06	0.90	1.18	서열번호 1	sAZ303
L99P	1.01	1.07	0.90	1.19	서열번호 1	sAZ303
C102I	0.80	1.03	0.95	1.09	서열번호 1	sAZ303
V110L	0.81	1.08	0.88	1.22	서열번호 1	sAZ303
I111T	0.94	0.82	1.24	0.66	서열번호 1	sAZ303
Q114K	1.06	1.06	0.91	1.16	서열번호 1	sAZ303
I129V	0.79	0.98	1.03	0.95	서열번호 1	sAZ303
R132W	1.43	1.05	0.92	1.14	서열번호 1	sAZ303
G137C	0.94	1.08	0.93	1.22	서열번호 1	sAZ303
R158Q	0.79	1.03	0.96	1.07	서열번호 1	sAZ303
A162E	0.90	1.07	0.89	1.21	서열번호 1	sAZ303
M165T	1.20	1.04	0.95	1.09	서열번호 1	sAZ303
L176V	1.06	0.99	1.01	0.99	서열번호 1	sAZ303
Y178P	1.21	1.00	1.01	1.00	서열번호 1	sAZ303

[0332]

V185A	0.88	1.10	0.86	1.28	서열번호 1	sAZ303
P186G	0.93	1.07	0.89	1.20	서열번호 1	sAZ303
D196V	1.09	1.07	0.89	1.20	서열번호 1	sAZ303
S197N	1.10	1.03	0.95	1.08	서열번호 1	sAZ303
D198W	0.77	1.09	0.85	1.28	서열번호 1	sAZ303
K203R	0.82	1.07	0.88	1.22	서열번호 1	sAZ303
Q213H	0.94	1.04	0.95	1.10	서열번호 1	sAZ303
Q213R	0.99	1.04	0.94	1.11	서열번호 1	sAZ303
T217R	0.80	1.04	0.93	1.12	서열번호 1	sAZ303
V225L	0.69	1.08	0.85	1.27	서열번호 1	sAZ303
Q227G	0.94	0.95	1.07	0.89	서열번호 1	sAZ303
G236T	1.04	1.05	0.93	1.12	서열번호 1	sAZ303
T244M	0.67	0.94	1.06	0.88	서열번호 1	sAZ303
T244R	0.79	1.05	0.92	1.14	서열번호 1	sAZ303
S254G	0.80	0.99	1.02	0.96	서열번호 1	sAZ303
A256C	0.83	1.01	0.98	1.03	서열번호 1	sAZ303
E258T	0.41	1.08	0.79	1.37	서열번호 1	sAZ303
E258V	0.52	1.07	0.84	1.27	서열번호 1	sAZ303
S278K	0.83	1.03	0.94	1.10	서열번호 1	sAZ303
S278T	1.10	1.05	0.93	1.13	서열번호 1	sAZ303
V282S	0.79	1.01	0.99	1.02	서열번호 1	sAZ303
V282V	0.97	0.99	1.01	0.98	서열번호 1	sAZ303
L292F	0.73	1.05	0.92	1.14	서열번호 1	sAZ303
A297D	0.88	1.09	0.87	1.26	서열번호 1	sAZ303
A297T	1.01	1.05	0.93	1.13	서열번호 1	sAZ303
A297V	1.16	0.98	1.03	0.95	서열번호 1	sAZ303
I298C	0.49	1.02	0.90	1.14	서열번호 1	sAZ303
I298V	0.88	1.07	0.90	1.19	서열번호 1	sAZ303
V299L	1.02	1.07	0.89	1.19	서열번호 1	sAZ303
N300K	0.73	1.29	0.60	2.15	서열번호 1	sAZ303
N300L	1.15	1.07	0.90	1.18	서열번호 1	sAZ303
N300W	0.95	1.16	0.76	1.52	서열번호 1	sAZ303
G301C	0.45	0.86	1.19	0.72	서열번호 1	sAZ303
A302T	0.85	0.94	1.08	0.87	서열번호 1	sAZ303
I316R	1.04	1.00	1.01	0.99	서열번호 1	sAZ303
T321R	1.00	0.99	1.01	0.97	서열번호 1	sAZ303
S322K	0.79	1.01	0.99	1.02	서열번호 1	sAZ303
서열번호 2	1.96	1.03	0.96	1.06	서열번호 1	sAZ303
서열번호 3	1.85	1.03	0.96	1.08	서열번호 1	sAZ303
서열번호 4	1.42	1.22	0.69	1.78	서열번호 1	sAZ303
서열번호 5	1.85	1.06	0.91	1.16	서열번호 1	sAZ303
서열번호 6	1.82	1.04	0.94	1.11	서열번호 1	sAZ303
서열번호 7	1.27	1.18	0.76	1.54	서열번호 1	sAZ303
서열번호 8	1.80	1.05	0.94	1.11	서열번호 1	sAZ303
서열번호 9	1.87	1.25	0.61	2.04	서열번호 1	sAZ303

[0333]

서열번호 10	0.82	1.16	0.80	1.45	서열번호 4	sJN.032
서열번호 11	0.94	1.15	0.87	1.27	서열번호 4	sJN.032
서열번호 12	0.77	1.18	0.91	1.17	서열번호 4	sJN.032
서열번호 13	0.37	1.36	0.32	4.17	서열번호 9	sven.449
서열번호 14	0.42	1.31	0.41	3.18	서열번호 9	sven.449
서열번호 15	0.83	1.17	0.68	1.70	서열번호 9	sven.449
서열번호 16	0.81	1.35	0.00	-	서열번호 4	sJN.032
서열번호 17	1.15	1.25	1.22	1.03	서열번호 4	sJN.032
서열번호 18	1.27	1.24	0.61	2.03	서열번호 4	sJN.032
서열번호 19	1.27	1.24	2.69	0.46	서열번호 4	sJN.032
서열번호 20	1.15	1.24	0.51	2.45	서열번호 4	sJN.032
서열번호 21	1.00	1.21	0.56	2.16	서열번호 4	sJN.032
서열번호 22	0.83	1.19	1.71	0.70	서열번호 4	sJN.032
서열번호 23	1.28	1.19	0.62	1.93	서열번호 4	sJN.032
서열번호 24	1.15	1.19	0.62	1.92	서열번호 4	sJN.032
서열번호 25	1.25	1.19	1.29	0.92	서열번호 4	sJN.032
서열번호 26	1.03	1.19	0.00	-	서열번호 4	sJN.032
서열번호 27	1.23	1.18	0.00	-	서열번호 4	sJN.032
서열번호 28	1.01	1.18	1.53	0.77	서열번호 4	sJN.032
서열번호 29	1.06	1.18	1.02	1.16	서열번호 4	sJN.032
서열번호 30	1.09	1.17	0.78	1.50	서열번호 4	sJN.032
서열번호 31	1.12	1.16	1.76	0.66	서열번호 4	sJN.032
서열번호 32	0.94	1.16	1.02	1.14	서열번호 4	sJN.032
서열번호 33	1.20	1.16	0.98	1.18	서열번호 4	sJN.032
서열번호 34	1.21	1.15	1.00	1.15	서열번호 4	sJN.032
서열번호 35	1.10	1.15	0.61	1.88	서열번호 4	sJN.032
서열번호 36	1.23	1.14	0.62	1.83	서열번호 4	sJN.032
서열번호 37	0.87	1.14	0.80	1.41	서열번호 4	sJN.032
서열번호 38	1.38	1.13	0.48	2.37	서열번호 4	sJN.032
서열번호 39	0.95	1.12	0.98	1.15	서열번호 4	sJN.032
서열번호 40	1.16	1.12	0.84	1.33	서열번호 4	sJN.032
서열번호 41	0.73	1.12	2.69	0.42	서열번호 4	sJN.032
서열번호 42	0.97	1.11	0.82	1.35	서열번호 4	sJN.032
서열번호 43	0.75	1.11	1.02	1.09	서열번호 4	sJN.032
서열번호 44	0.98	1.11	0.48	2.32	서열번호 4	sJN.032
서열번호 45	0.97	1.11	0.97	1.14	서열번호 4	sJN.032
서열번호 46	1.05	1.11	2.26	0.49	서열번호 4	sJN.032
서열번호 47	0.75	1.07	0.77	0.66	서열번호 15	sAZ746
서열번호 48	1.74	1.09	0.71	0.72	서열번호 15	sAZ746
서열번호 49	1.81	1.05	0.83	0.59	서열번호 15	sAZ746
서열번호 50	1.79	1.10	0.67	0.78	서열번호 15	sAZ746
서열번호 51	1.60	1.05	0.85	0.58	서열번호 15	sAZ746
서열번호 52	1.00	1.60	0.52	3.10	서열번호 49	sCB.243
서열번호 53	1.00	1.40	0.27	5.20	서열번호 49	sCB.243

[0334]

서열번호 54	1.10	1.70	0.53	3.20	서열번호 49	sCB.243
서열번호 55	0.80	1.90	0.15	12.30	서열번호 49	sCB.243
서열번호 56	0.90	1.60	0.19	8.40	서열번호 49	sCB.243
서열번호 57	1.10	1.80	0.60	3.00	서열번호 49	sCB.243
서열번호 58	1.00	1.30	0.15	8.60	서열번호 49	sCB.243
서열번호 59	1.00	1.50	0.24	6.20	서열번호 49	sCB.243

[0335]

[0336]

조작된 TE 변이체의 상대적 수행능 정량

[0337]

각각 조작된 TE 변이체의 수행능을 정량하기 위해, 변이체를 발현하는 세포의 배양물은 TE, CarB, AlrA, 및 Atf1의 발현을 지지하는 조건하에서 성장시키고, 수득한 지방산 유도체를 추출하고 아래 기재된 바와 같이 불꽃 이온화 검출과 함께 가스 크로마토그래피(GC/FID)에 의해 정량하였다.

[0338]

수득한 지방산 유도체(지방산, 지방 알코올, 및 지방 알코올 아세테이트)의 조성 및 양을 결정하고 이어서 대조군 TE를 발현하는 대조군 평가 균주에 의한 동일한 조건하에서 생성된 지방산 유도체와 비교하였다. 간략하게, 각각의 균주의 단일 콜로니는 적절한 향생제(들)를 함유하는 200 μ L 루리아 버타니 브로쓰(Luria Bertani

broth)를 함유하는 96-웰 플레이트의 웰에 접종하였다. 40 μ L의 상기 배양물을 사용하여 96-깊은 웰 플레이트 내 360 μ L의 동일한 배지에 접종하고, 이는 32°C에서 4시간 동안 진탕시켰다. 40 μ L의 상기 배양물을 사용하여 최종 96-깊은 웰 플레이트 내 360 μ L의 생산 배지(표 8)에 접종하였다. 이들 배양물에 60 μ L 헥사데칸으로 오버레이하고, 2시간 동안 32°C에서 진탕시키고, IPTG를 첨가하여(1 mM 까지) TE, CarB, AlrA, 및 Atf1의 발현을 유도하고, 추가로 20시간 동안 계속 진탕시키고, 이후 배양물은 아래 기재된 바와 같이 평가하였다.

[표 8] 생산 배지

성분	용적
멸균수	669.05 mL
1M CaCl ₂	0.1 mL
50% 글루코스 (0.5 g/L)	70 mL
5X 염 1/2 N (2.5 g/L)	200 mL
NH ₄ Cl (100 g/L, 100X)	2.5 mL
2M Bis-Tris, pH 7.0	50 mL
10% 트리톤	1.25 mL
TM2 (미량 무기물 부재 철)	3 mL
10 g/L 시트르산철	1 mL
1M MgSO ₄	1 mL
티아민 (10 mg/mL)	0.1 mL
카나마이신 (50 mg/mL)	1 mL
스펙티노마이신 (100 mg/mL)	1 mL
총계	1000

지방산 유도체(FAS) 샘플 프랩 및 정량

400 μ L의 부틸 아세테이트(내부 분석학적 표준물로서 500 mg/L 운테칸올을 함유하는)를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 열 밀봉하고, 2000 rpm에서 15분 동안 진탕시키고, 실온에서 4500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 100 μ L의 상부 유기층을 100 μ L의 N,O-비스(트리메틸실릴)트리플루오로아세트아미드(BSTFA)를 함유하는 96-웰 플레이트로 옮겼다(참조: 예를 들어, Stalling DL, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1968 May 23;31(4):616-22). 플레이트를 밀봉하고 불꽃 이온화 검출과 함께 가스 크로마토그래피(GC-FID)로 평가하였다.

대조군 평가 균주는 조작된 TE 변이체를 발현하는 균주에 대한 "내부 플레이트 대조군"으로서 각각의 플레이트에 포함시켰다. 조작된 TE 변이체의 상대적 수행능을 결정하기 위해, 지방산 유도체(발현된 TE 및 다운스트림 전환 효소 CarB, AlrA, 및 Atf1의 작용으로부터 비롯되는 이들 생성물: 지방산, 지방 알데하이드, 지방 알코올, 및 지방 알코올 아세테이트) 또는 특이적 지방산 유도체(예를 들어, 특이적 쇠 길이, 즉, C8 또는 C10)의 총량을 정량하고 이어서 동일한 플레이트로부터 및 대조군에 대한 배수(FOC)로서 보고된 대조군 평가 균주에 대한 동일한 파라미터와 비교하였다. 예를 들어, 돌연변이체 A의 FOC 총 FAS 역가는 돌연변이체 A의 추출물에서 동정된 모든 지방산 종의 총 역가에 부가하고 이를 내부 대조군 평가 균주의 총 FAS 역가로 나누어 결정하였다. 대조군에 비해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체는 보고된 파라미터에 대해 1.0 초과 FOC를 보여준다. 돌연변이체 A의 FOC 총 FAS는 돌연변이체 A의 추출물에서 동정된 C8 쇠 길이를 갖는 모든 지방산 종의 총 농도에 부가하고 이를 내부 대조군 평가 균주에 대해 동정된 C8의 쇠 길이를 갖는 모든 지방산 종의 총 농도로 나누어 결정하였다. 단일 아미노산 치환을 함유하는 조작된 티오에스테라제 변이체에 대해, 히트(hit)를 동정하기 위해 사용되는 1차 매트릭스는 하기와 같았다: a) 개선된 FOC 총 FAS, b) 총 FAS의 개선된 FOC %C8 FAS, 및/또는 c) 개선된 %C8/%C10.

(상기) 표 7에 나타난 돌연변이는 놀랍게도, 상당히 a) FOC 총 FAS를 개선하고; b) 총 FAS의 FOC %C8 FAS를 개

선하는 능력을 갖는 것으로서 동정되었다. 따라서, 표 7에 열거된 돌연변이를 함유하는 조작된 티오에스테라제(TE) 변이체는 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 신규 조작된 TE 변이체를 나타낸다. 특히, 표 7에 나타난 조작된 TE 변이체는 C8 및 또는 C10 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 신규 TE 변이체를 나타낸다.

[0345] 실시예 5

[0346] TE 변이체는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 신규 TE를 생성시키는 다중 아미노산 치환을 함유하도록 조작하였다. 상기 변이체는 본래의 티오에스테라제 효소(서열번호 1) 그리고 단일 아미노산 치환을 갖는 조작된 TE 변이체보다 개선된 활성 및 선택성을 가졌다(실시예 4, 표 7).

[0347] 실시예 4와 유사하게, 다중 아미노산 치환을 갖는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 유전자를 합성하고 IPTG의 존재하에 성장한 경우 이들의 발현에 영향을 미치는 발현 벡터에 클로닝하였다. 이들은 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고(참조, 예를 들어, W02010062480) 실시예 3에서 상기 기재되고 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올 아세테이트(FACE)로의 생화학적 전환에 함께 영향을 주는 유전자 carB, alrA, 및 aftA1을 발현하는 Ptrc 제어된 오페론을 함유하는 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이 균주에 형질전환시켰다. 다중 아미노산 치환을 갖는 조작된 TE는, TE가 발현되는 것을 제외하고는 동일한 특이적 대조군 평가 균주와 비교하였다.

[0348] 표 7은 다중 아미노산 치환을 갖고 열거된 대조군 평가 균주 및 TE와 비교하여, 중쇄 지방산 유도체(FAS)의 생산을 위해 개선된 활성 및 중쇄 길이의 지방산 유도체(서열번호 2 내지 서열번호 15)를 생산하기 위해 개선된 선택성을 입증하는 신규 조작된 TE를 열거한다. 따라서, 신규 조작된 TE 각각, 이들의 개별 돌연변이, 및 돌연변이의 이들의 특유한 조합은 신규 조작된 TE가 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제이기 때문에 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 유용한 도구이다.

[0349] 실시예 6

[0350] 하기의 실시예는 표면 전하에서의 증가 및 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체를 설명한다. 3차원 모델링을 사용하여 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제 변이체/돌연변이체를 조작하였다.

[0351] 일부 구현예에서, 서열번호 1은 이. 콜라이에서 과발현되는 경우 독성인 것으로 나타난다. 이론에 국한되는 것 없이, 서열번호 1은 세포 내 농도에서 불안정하거나 용이하게 응집될 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 단백질의 잠재적 독성을 감소시키고자 하는 노력에서, 3차원 모델은 계산적으로 구성하고 이를 사용하여 서열번호 1의 표면에 대한 변화를 조작하였다.

[0352] 상기 실시예에서, 서열번호 1의 3차원 분자 모델은 다른 아실-ACP 티오에스테라제의 x-선 결정 구조를 주형화함으로써 계산적으로 구성하였다. 상기 모델에 기초하여, 순 표면 전하를 변화시킬 것으로 예측된 서열번호 1 효소의 특이적 잔기들을 동정하였다. 특히, 음전하 잔기(Asp 또는 Glu)를 효소 표면 상의 양전하 잔기(Arg 또는 His)로 돌연변이시켜 순 표면 전하를 +15에서 +25로 변형시켰다. 표 7에 나타난 바와 같이, 증가된 표면 전하를 갖는 수득한 조작된 TE 변이체는 보다 높은 백분율의 C8 지방산 유도체를 생성한다. 따라서, 조작된 변이체는 중쇄 지방산 유도체의 생산에 대해 개선된 활성을 갖는다.

[0353] 서열번호 1 티오에스테라제의 3-D 모델링. 서열번호 1의 실험적 3D 구조가 가용하지 않았기 때문에, 효소의 상동성 기반 3D 모델은 단계 1 내지 5에서 아래 기재된 바와 같이 계산적으로 구성하였다.

[0354] (1) 공지된 구조의 상동성 티오에스테라제의 동정

[0355] 단백질 데이터 뱅크(PDB)는 생물학적 거대분자의 구조적 데이터의 단일의 세계 기록 보관소이다(참조: Berman, H.M. et al, Nucl. Acids Res. (2000) 28 (1): 235-242). PDB 단백질 데이터뱅크는 월드 와이드 웹(rcsb.org/pdb/home/home.do) 상에서 가용하다. PDB 데이터뱅크를 사용하여 티오에스테라제의 3개의 분리된 x-선 결정 구조물을 동정하였다. 특히, 동정된 티오에스테라제의 3개의 분리된 구조물은 다음과 같았다: 1) 단백질 데이터 뱅크 확인 번호(PDB ID)를 갖는 박테리오테스 테타이오타마이코론으로부터 아실-ACP 티오에스테라제: 2ESS) 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) (PDB ID:20WN)으로부터의 올레일 티오에스테라제, 및 3) 스피로소마 린구알레 기원의 아실-ACP 티오에스테라제(PDB ID: 4GAK). 서열 번호 1과 전체적으로 약 25%의 서열 동일성을 보여주는 이들 구조물은 주형으로서 사용하였다.

[0356] (2) 주형 구조물로의 쿼리 서열(query sequence)의 정렬

- [0357] PDB(2ESS, 20WN 및 4GAK)에 동정된 티오에스테라제의 3개의 분리된 3D 구조물 및 이들의 서열은 월드 와이드 웹 (prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php) 상에서 가용한 PROMALS3D 다중 서열 및 구조 정렬 서버(참조: 예를 들어, J.Pe and N.V.Grishin (2007) Bioinformatics. 23(7): 802-808; J. Pei et al., (2008) Nucl. Acids Res. 36 (7): 2295-2300)를 사용하여 정렬시켰다. 2ESS, 20WN 및 4GAK의 서열 및 구조물을 정렬 시킨 후, 서열번호 1의 쿼리 서열을 MMFFT 버전 7을 사용한 기존의 구조 기반 서열 정렬에 정렬시켰다(참조: 예를 들어, Katoh, K., et al. (2013) Mol. Biol. Evol. Apr; 30(4): 772-780). 소프트웨어는 월드 와이드 웹 (mafft.cbrc.jp/alignment/software) 상에서 가용하다. 서열번호 1, 및 PDB (2ESS, 20WN 및 4GAK)에서 동정된 아실-ACP 티오에스테라제의 정렬은 도 9에 나타낸다.
- [0358] **(3) 서열번호 1 티오에스테라제의 상동성 3D 구조 모델의 구축**
- [0359] 아미노산 37 내지 310에 대한 상동성 모델은 상기 단계 2에 기재된 3개 모두의 주형, 2ESS, 20WN 및 4GAK, 및 구조-기반 정렬을 사용한 MODELLER 소프트웨어(참조: 예를 들어, B. Webb, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32, 2014)에 의해 구축하였다. 추가의 구조적 개량은 MODELLER 빌트-인 개량 모드에 의해 수행하였다. 상기 개량은 VTFM 최적화 및 MD 개량 모듈을 사용한 모든 디폴트 파라미터와 함께 수행하였다. MODELLER 소프트웨어 및 다운로드에 대한 정보는 월드 와이드 웹(salilab.org/modeller) 상에서 가용하다.
- [0360] **(4) N- 및 C-말단 도메인의 ab initio 모델의 구축**
- [0361] 도 9에 나타낸 바와 같이, 이들 실험에 사용되는 서열번호 1 티오에스테라제는 주형 x-선 결정 구조(N-말단에서 36개 아미노산 및 C-말단에서 18개 아미노산)에 포함되지 않는 N- 및 C-말단 잔기를 갖는다. 따라서, 이들 부분에 대한 상동성 기반 모델을 구축하기 위한 적절한 주형이 없다. 따라서, N-말단과 C-말단 둘 다에 대한 ab initio 모델(참조: 예를 들어, J. Lee et al., (2009) Ab Initio Protein Structure Prediction pgs. 3-25 In: From Protein Structure to Function with Bioinformatics, D.J. Rigden (ed.) Springer)은 ROBETTA 서버에 의해 구축하였다(참조: 예를 들어, Kim, D.E., et al. (2004) Nucleic Acids Res. Jul 1 ; 32(Web Server issue): W526-W531; 월드 와이드 웹에서 가용: robetta.org).
- [0362] **(5) 서열번호 1 티오에스테라제 및 조작된 TE 변이체에 대한 전장 모델의 구축**
- [0363] 전장 모델은 3개의 주형을 사용한 MODELLER 소프트웨어를 사용하여 만들었다: 주요 부분 상동성 모델, N-말단 ab initio 모델, 및 C-말단 ab initio 모델.
- [0364] 야생형 대조군에 비해 아미노산 치환체들 P3K, L176V, D196V, K203R, V282S(서열번호 4)를 갖는 개선된 조작된 TE 변이체는 중쇄 길이의 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 입증하였다(실시예 5, 표 7). 따라서, 서열번호 1의 모델은 실질적으로 5개 변이체 잔기들을 치환하고 다시 MODELLER 빌트-인 개량 모드로 구조적 개량을 수행함으로써 서열번호 4로 리모델링하였다. 표면 잔기는 이어서 최종 모델을 기준으로 한정하였다(도 10).
- [0365] 모델링된 표면 전하가 증가된 조작된 TE 변이체의 생성.
- [0366] 상기 기재된 서열번호 4에 대한 3D 구조적 모델을 기반으로, 12개 아스파르트레이트(D) 및 글루타민(E) 잔기들은 음전하를 서열번호 4의 표면에 기여하기 위해 모델링하였다. 이어서, 이들 12개 잔기들의 다양한 양성 내지 음성 치환을 갖는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 유전자를 합성하고, 실시예 4 및 5에 기재된 바와 같이, 대조군 TE(서열번호 4)와 비교하여 중쇄 길이의 지방산 유도체의 개선된 생산에 대해 평가하였다.
- [0367] 표 7은 서열번호 4와 비교하여 모델링된 표면 전하의 증가를 유도하는 아미노산 치환을 갖고 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 TE 변이체(서열번호 16 내지 서열번호 46) 세트를 기재한다. 따라서, 서열번호 16 내지 서열번호 46으로서 표 7에 열거된 TE는 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 유용한 신규 조작된 TE 변이체이다. 추가로, 모델링된 표면 전하를 증가시키는 아미노산 치환을 갖는 조작된 변이체 TE는 모델링된 표면 전하에서 조작된 증가를 갖지 않는 TE와 비교하여 중쇄 길이의 지방산 유도체의 개선된 생산을 위해 유용하다.
- [0368] 모델링된 표면 전하가 증가된 다중 조작된 돌연변이 및 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위한 활성 및/또는 선택성을 증가시키는 다중 조작된 돌연변이를 함유하는 신규 티오에스테라제의 생성.
- [0369] 상기된 바와 같은 3-D 모델링에 의해 동정된 티오에스테라제 표면 전하를 증가시킬 것으로 예측되고 중쇄 길이의 지방산 유도체(표 7)의 개선된 생산을 유도하는 아미노산 치환은, 상응하는 대조군에 비해 중쇄 지방산 유도

체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖고(실시예 6, 표 7) 서열번호 15를 갖는 조작된 TE 변이체와 조합하였다.

[0370] 실시예 5와 유사하게, 다중 아미노산 치환을 갖는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 유전자를 합성하고 IPTG의 존재하에 성장한 경우 이들의 발현에 영향을 미치는 발현 벡터에 클로닝하였다. 이들은 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고(참조: 예를 들어, WO2010062480) 실시예 3에서 상기 기재되고 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올 아세테이트(FACE)로의 생화학적 전환에 함께 영향을 주는 유전자 carB, alrA, 및 aftA1을 발현하는 Ptrc 제어된 오펜론을 함유하는 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이 균주에 형질전환시켰다. 다중 아미노산 치환을 갖는 조작된 TE는 단지 차이가 발현된 TE가 대조군 TE 서열번호 15일뿐인 대조군 평가 균주와 비교하였다. 표 7은 대조군(서열번호 15)에 비해 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 본 실시예로부터 유래된 조작된 TE 변이체(서열번호 47 내지 서열번호 51) 세트를 기재한다. 표 7에 열거된 TE는 이들이 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제이기 때문에 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 유용한 신규 조작된 TE 변이체이다.

[0371] **실시예 7**

[0372] 하기의 실시예는 용해도에서의 증가 및 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 N-말단이 절단된 조작된 TE 변이체를 설명한다.

[0373] 식물 FatB-유사 티오에스테라제는 소포체로부터 색소체로의 이들의 전달을 매개하는 신호 펩타이드를 갖는다. 이들 효소는 신호 펩타이드의 프로세싱 후 남아있는 N-말단 소수성 영역을 함유하는 것으로 공지되어 있다. 상기 영역은 티오에스테라제의 틸라코이드 막으로의 연합에 관여하는 것으로 여겨진다. 이, 콜라이와 같은 미생물에서 발현되는 경우, 상기된 야생형(서열번호 1) 및 신규 조작된 TE 변이체는 불용성이고 세포 용해 및 원심 분리시 막 펠렛과 연합되어 있다. 낮은 효소 용해도는 많은 효소가 막과 연합될 수 있거나 불량하게 폴딩되고 불활성임을 시사하였다.

[0374] 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 용해도 및 활성을 갖는 신규 조작된 TE 변이체를 생산하기 위해, 서열번호 49를 갖는 폴리펩타이드는 효소의 불량한 용해도에 관여할 것으로 의심되는 주요 소수성 잔기를 함유하도록 모델화된 영역인 아미노산 2와 40 사이에 절단부를 갖도록 조작하였다. 이어서, 이들 조작된 TE 변이체의 용해도 및 활성은 아미노산 2와 40 사이에서 절단을 갖지 않은 동일한 아미노산 서열의 대조군 TE와 비교하여 평가하였다.

[0375] 아미노산 2와 40 사이에 절단을 갖는 조작된 TE 변이체의 용해도 평가.

[0376] 서열번호 49의 아미노산 2와 40 사이의 결실을 갖는 조작된 TE 변이체를 암호화하는 유전자를 합성하였고 중간 카피물 pACYC 기반 발현 플라스미드(Gen Bank 승인 X06403) 내에서 Ptrc 프로모터의 제어하에 클로닝하였다. 이어서, 이들 플라스미드를 이. 콜라이에 형질전환시키고 대조군 TE(서열번호 49)의 발현을 지시하는 플라스미드를 함유하는 동일한 균주와 비교하여 증가된 용해도의 TE 변이체의 발현을 지시하는 이들의 능력에 대해 평가하였다. 아미노산 2와 40 사이에 절단을 갖는 조작된 TE 변이체를 발현하는 균주와 대조군 TE(서열번호 49)를 발현하는 균주 간의 유일한 차이는 발현되는 TE의 서열이었다. 대조군 및 절단된 TE를 발현하는 수득된 균주는 각각, 실시예 4에 기재된 바와 같이, TE를 암호화하는 유전자의 발현을 유도하는 조건하에 96-웰 플레이트에서 성장시켰다. 세포는 원심분리에 의해 수확하였고 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, 및 1 mg/mL의 리소솜을 함유하는, 50 μ L의 50 mM Tris-HCl(pH 7.8) 중에 재현탁시켰다. 샘플은 25°C, 1500 rpm에서 항온처리하였다. 20분 후, 10 μ L의 DNase I의 1 mg/mL 용액 및 10 μ L의 1M MgSO4를 각각의 샘플에 첨가하였다. 이어서, 샘플을 1500 rpm에서 추가로 20분 동안 진탕시켰다. 수득한 전체 세포 용해물(WCL)을 10분 동안 4500 rpm에서 원심분리하여 용액 분획(상등액)으로부터 불용성 분획(펠렛)을 분리하였다.

[0377] TE의 C-말단에 지시된 항체를 사용한 웨스턴 블롯을 사용하여 WCL의 가용성 분획에서 대조군 및 조작된 TE 절단된 변이체의 존재를 추적하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 대조군 폴리펩타이드(서열번호 49를 갖는 티오에스테라제)는 WCL에서 가시적이지만(이것이 숙주 세포에서 발현됨을 지적하는) 이것은 가용성 분획에 존재하지 않아 낮은 용해도를 나타낸다. 대조적으로, 조작된 절단된 TE 변이체는 WCL 및 가용성 분획 둘 다에서 발견되고, TE 변이체 모두는 가용성 분획에서 TE의 존재의 유의적 증가를 보여준다.

[0378] 이것은 미생물내에서 발현되는 경우 불용성인 서열번호 1과 같은 식물 FatB 유사 티오에스테라제의 용해도는 효소의 N-말단에서 절단된 조작된 변이체를 발현시킴에 의해 개선될 수 있음을 입증한다. 이것은 추가로 조작된 절단된 변이체는 대조군 TE(서열번호 49)와 같은 상기 절단을 갖지 않는 TE와 비교하여, 이. 콜라이에서 발현되는 경우 증가된 용해도를 가짐을 보여준다.

[0379] 지방산 유도체의 성장 및 생산.

[0380] 불량한 용해성 중쇄 길이의 TE의 용해도의 증가는 세포에 존재하는 보다 활성의 중쇄 길이의 TE를 유도함에 따라서 중쇄 지방산 생산의 증가를 유도해야만 한다.

[0381] 조작된 TE 절단된 변이체의 상대적 활성을 평가하기 위해, 각각의 효소는 유전자가 실시예 4에 기재된 바와 같이 이소프로필티오갈락토시드(IPTG)의 존재하에 유도되는 Ptrc 프로모터(Camsund et al, supra)의 전사 제어하에 있도록 벡터에 클로닝하였다. 이들은 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올 아세테이트(FACE)로의 생화학적 전환을 위해 유전자 carB, alrA, 및 aftA1을 발현하는 (실시예 3에 기재된) Ptrc 제어된 오페론을 함유하는 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이 기반 균주에 형질전환시켰다. 조작된 이. 콜라이 기반은 이들보다 가용성인 조작된 TE 변이체의 예상된 높은 활성을 수용하는 지방산 유도체의 생산에 대한 높은 능력에 대해 디자인되었다.

[0382] 각각의 조작된 절단된 티오에스테라제의 수행능은 대조군 TE(서열번호 49)를 발현하는 대조군 평가 균주와 비교하였다. 조작된 절단된 TE 변이체를 발현하는 평가 균주와 대조군 TE(서열번호 49)를 발현하는 대조군 평가 균주 간의 유일한 차이는 발현되는 TE를 암호화하는 유전자의 서열이었다. 균주들 각각은 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르의 생산을 위해 성장시키고 수득한 중쇄 지방산 유래된 생성물은 실시예 4에 기재된 바와 같이 추출하고 정량하였다.

[0383] 각의 조작된 절단된 TE 변이체의 활성은 수득한 지방산 유도체 생성물을 실시예 4에 기재된 바와 같은 대조군 평가 균주(서열번호 49를 발현하는)에 의해 생성된 것들과 비교하여 평가하였다.

[0384] 표 7은 (1) 용해도(도 11) 및 (2) 내부 대조군에 대한 배수(FOC)로서 보고된 수행능과 함께 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위한 활성에 대해 개선된 수행능을 갖는 조작된 절단된 TE 변이체(서열번호 52 내지 서열번호 59)를 열거한다. 따라서, 절단된 돌연변이체는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제 변이체이다.

[0385] 증가된 용해도를 갖는 조작된 절단된 TE 변이체의 개선된 활성을 추가로 입증하기 위해, 서열번호 55 및 서열번호 56을 발현하는 균주는 실시예 9에 기재된 바와 같이 5 L 생물반응기에서 성장시키고 동일한 조건하에서 성장된, TE 서열번호 49를 발현하는 대조군 평가 균주와 비교하였다. 표 9는 72시간 시점에서 대조군에 대한 배수(FOC)로서 보고된 이들 균주의 수행능을 기재한다. 서열번호 55 및 서열번호 56은 이러한 보다 큰 규모에서 개선된 활성(FAS FOC) 및 선택성(%C8 FAS 및 %C8/%C10 FOC)을 보여준다.

[0386] [표 9]

[0387] 5 L 생물반응기에서 성장한 경우 중쇄 길이의 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 생체내 활성을 보여주는 조작된 절단된 TE 변이체.

서열 번호	FAS FOC	%C8 FAS FOC	%C8/%C10 FOC	주형	대조군 TE	스크리닝 균주
서열 번호 49	1.0	1.0	1.0	pAZ338	-	sCB.243
서열 번호 55	1.4	1.3	2.1	pAZ338	서열 번호 49	sCB.243
서열 번호 56	1.3	1.3	2.0	pAZ338	서열 번호 49	sCB.243

[0388]

[0389] 실시예 8

[0390] 하기의 실시예는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 유전학적으로 변형된 미생물을 사용하여 지방산 유도체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 공정을 설명한다. 상기 공정에 의해 생성된 지방산 유도체의 조성물은 중쇄 지방산, 중쇄 지방 알코올, 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE), 중쇄 지방산 메틸 에스테르(FAME), 중쇄 지방산 에틸 에스테르(FAEE), 및 다른 중쇄 지방산 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0391] 종자 배양 확장 생성.

[0392] 선택된 조작된 이. 콜라이 균주의 동결된 세포 बैं크 바이얼을 사용하여 적당한 항생제(들)를 함유하는 125 mL의

홈이 있는(baffled) 진탕 플라스크 내 20 mL의 LB 브로쓰에 접종하였다. 상기 진탕 플라스크는 대략 6시간 동안 32℃에서 회전 진탕기에서 항온처리하고 이어서 1.25 mL의 브로쓰(1% v/v)를 500 mL의 홈이 있는 삼각 진탕 플라스크 중에 125 mL의 최소 배지(2 g/L NH_4Cl , 0.5 g/L NaCl , 0.3 g/L KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 20 g/L 글루코스, 1 mL/L의 미량 무기물 용액(2 g/L의 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L의 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.9 g/L의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L의 H_3BO_3 , 및 10 mL/L의 농축 염산), 10 mg/L의 구연산철, 100 mM의 Bis-Tris 완충액(pH 7.0), 및 적당한 항생제(들)로 옮기고, 32℃에서 배지 진탕기 상에서 항온처리하였다.

[0393] 생물반응기 배양 프로토콜.

[0394] 상기된 75 mL(5% v/v)의 배지 용액을 사용하여 처음에 1.5 L의 멸균된 생물반응기 발효 배지를 함유하는 5 L Biostat Aplus 생물반응기(Sartorius BBI)에 접종하였다. 상기 배지는 2 g/L의 KH_2PO_4 , 0.5 g/L의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.2 g/L의 MgSO_4 7수화물, 10 g/L의 멸균 여과된 글루코스, 80 mg/L의 구연산철, 1 mL/L의 이전에 기재된 미량 무기물 용액, 0.25 mL/L의 비타민 용액 (0.42 g/L의 리보플라빈, 5.4 g/L의 판토텐산, 6 g/L의 니아신, 1.4 g/L의 피리독신, 0.06 g/L의 비오틴, 및 0.04 g/L의 엽산), 1 g/L NaCl , 1 g/L 시트르산, 140 mg/L CaCl_2 2수화물, 10 mg/L ZnCl_2 , 및 적당한 항생제(들)로 구성하였다. 배양물의 pH는 28% w/v 암모니아수를 사용하여 6.9 내지 7.2 사이로 유지하고, 배양 온도는 특정 생성물에 따라 33 내지 35℃로 하고, 통기 속도는 0.75 lpm(0.5 v/v/m)이고, DO 제어기 및 산소 보충으로 캐스케이딩되는 진탕 루프를 사용하는, 용존 산소 농도(dissolved oxygen tension)는 포화의 30%였다. 발효는 실리콘 에멀전 기반 소포체(Dow Corning 1430)의 자동 첨가에 의해 제어하였다.

[0395] 약 50% w/w 글루코스(600 g/L)로 구성된 영양물 공급은 초기 배지에서 글루코스가 완전히 고갈되는 경우(접종 후 대략 7시간) 개시하고 DOstat 제어기 전략을 사용하여 10 g/L/h의 속도로 요구시 공급하였다(각각의 공급물량은 1시간 지속시간을 갖는다). 중쇄 지방산 유도체의 생산에 관여하는 유전자들은 최종 농도 1 mM까지 이소프로필티오갈락토시드(IPTG)의 첨가에 의해 유도하였다. 생물반응기 작동은 약 72시간 경과된 발효 시간에서 종료하였다. 발효 브로쓰의 샘플은 발효 공정 전반에 걸쳐 탱킹하였다.

[0396] 브로쓰 조성물의 분석.

[0397] 발효 브로쓰의 샘플에 존재하는 지방산 유도체는 단일 작동에서 통상적인 GC-FID를 사용하여 추출하고 분리하였다. 상기 목적을 위해, 0.5 mL의 각각의 균일한 발효 브로쓰 샘플은 15 mL 팔콘 튜브에 분취하였다. 샘플의 매쓰를 기록하고 500 ppm의 내부 표준물(C11 FAME 또는 C9/C11/C15 FALC)과 함께 5.0 mL의 부틸 아세테이트를 브로쓰에 첨가하여 10배 추출을 성취하였다. 샘플을 30분 동안 2500 rpm에서 기계적으로 진탕시키고 25℃에서 4500 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 50 μL 의 추출물(상부 층)을 GC 바이얼로 옮기고 50 μL 의 BSTFA w/10% TCMS로 유도체화하고, 이어서 약 15초 동안 볼텍싱하였다. 이어서, 샘플을 Agilent DB 1 칼럼, 10 m x 180 μm x 0.2 μm 를 사용한 통상적인 GC-FID 시스템에서 전개하여 추출된 샘플 중에 모든 지방산 유도체를 분리하였다. 각각의 지방산 유도체의 농도는 g/Kg으로 기록한다.

[0398] **실시예 9**

[0399] 하기의 실시예는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 유전학적으로 변형된 미생물을 사용하여 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르를 생산하기 위해 사용될 수 있는 공정을 설명한다. 상기 공정에 의해 생산되는 지방산 유도체의 조성물은 중쇄 지방산, 중쇄 지방 알코올 및 중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르(FACE)를 포함할 수 있고 아실 쇠는 6 내지 12개 탄소이다. 5 L 생물반응기에서 중쇄 지방산 알코올 아세테이트 에스테르의 생산은 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0400] 본 실시예에서, 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 큰 능력을 함유한 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이 균주를 사용하였다. 이들 균주는 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올 아세테이트(FACE)로의 생화학적 전환을 위해 유전자 *carB*, *alrA*, 및 *aftA1*(실시예 3에 기재된)을 발현하는 오페론 뿐만 아니라 중쇄 지방산의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제를 함유하였다. 서열번호 9를 갖는 조작된 티오에스테라제는 균주 sRG.825에서 발현하였고, 서열번호 49를 갖는 조작된 티오에스테라제는 균주 sDH.377에서 발현하였다. 조작된 티오에스테라제를 암호화하는 유전자들, *carB*, *alrA*, 및 *aftA1*은 모두 유도성(Ptrc) 프로모터의 전사 제어하에 있고, 약 24시간 경과된 발효 시간에 이소프로필티오갈락토시드(IPTG)를 생물반응기에 첨가함으로써 활성화되었다. 생물반응기 작동은 약 72시간 경과된 발효 시간에 종료하

고, 발효 브로쓰를 수거하고 실시예 8에 기재된 바와 같이 분석하였다. 결과는 표 10 및 도 12에 나타낸다.

[표 10]

중쇄 지방 알코올 아세테이트 또는 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위해 조작된 대표적인 균주에 의해 생산된 총 지방산 중(FAS) 농도.

균주	총 FAS (g/Kg)	브로쓰 내 지방산 유도체
sRG.825	65	중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르
sDH.377	60	중쇄 지방 알코올 아세테이트 에스테르
sAZ918	60	중쇄 지방산 에틸 에스테르

실시예 10

하기의 실시예는 지방산 유도체를 생산하기 위해 개선된 능력을 갖는 유전학적으로 변형된 미생물을 사용한 중쇄 지방 알코올을 생산하기 위해 사용될 수 있는 공정을 설명한다. 상기 공정에 의해 생산되는 지방산 유도체의 조성물은 지방산, 지방 알데하이드 및 지방 알코올을 포함할 수 있고 이때 아실 쇠는 6 내지 12개 탄소이다. 5 L 생물반응기에서 중쇄 지방 알코올의 생산은 염색체로부터 유전자 EntD를 과발현하도록 조작되고, 중쇄 티오에스테라제, 및 유리 지방산(FFA)의 지방 알코올(FALC)로의 생화학적 전환을 위해 유전자 *carB* 및 *alrA*를 발현하는 오페론을 함유하는 이. 콜라이 균주를 사용하여, 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 티오에스테라제를 암호화하는 유전자들, *carB* 및 *alrA*는 모두 약 7시간 경과된 발효 시간에 이소프로필티오갈락토시드(IPTG)를 생물반응기에 첨가함으로써 활성화되는 유도성(Ptrc) 프로모터의 전사 제어하에 있다. 중쇄 지방 알코올은 이. 콜라이에 고도로 독성이고, 따라서, 5 L 생물반응기에서 생산 동안에 이들 화합물의 축적은 억제 농도에 도달한 후(1 g/L 미만, 실시예 3 참조) 곧 성장 및 생산을 멈추었다.

실시예 11

하기의 실시예는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제 변이체를 포함하는 유전학적으로 변형된 미생물을 사용하여 중쇄 지방산 알킬 에스테르를 생산하기 위한 방법을 설명한다. 상기 공정에 의해 생산되는 지방산 유도체의 조성물은 중쇄 지방산, 중쇄 지방산 메틸 에스테르(FAME) 및/또는 중쇄 지방산 에틸 에스테르(FAEE)를 포함할 수 있고 이때 아실 쇠는 6 내지 12개 탄소이다.

본 실시예는 중쇄 지방산 유도체의 생산에 대해 높은 능력을 함유하도록 조작된 MG1655로부터 유래된 이. 콜라이 균주(sAZ918)를 사용한 지방산 에틸 에스테르(FAEE)의 생산을 설명한다. 상기 균주는 유리 지방산(FFA)의 지방산 알킬 에스테르(FAME 또는 FAEE)로의 생화학적 전환을 위해 아실 CoA 신테타제 및 에스테르 신타제(실시예 3에 기재된)를 발현하는 오페론 뿐만 아니라 중쇄 지방산의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 조작된 티오에스테라제(서열번호 49)를 함유하였다. 조작된 티오에스테라제, 아실 CoA 신테타제 및 에스테르 신타제는 모두 이소프로필티오갈락토사이드(IPTG)의 첨가에 의해 활성화되는, 유도성(Ptrc) 프로모터의 전사 제어하에 있었다.

5 L 생물반응기에서 중쇄 지방산 에틸 에스테르의 생산은 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였지만, 에탄올이 영양물 공급에 첨가되었다. 종자 배양과 함께 5 L 생물반응기의 접종 후, 47.5% w/w 글루코스 및 50 mL/L의 에탄올로 구성된 영양물 공급은 초기 배지에서 글루코스가 완전히 고갈되는 경우(접종 후 대략 7시간) 개시하고 pHstat 제어기 전략을 사용하여 10 g/L/h의 속도로 요구시 공급하였다(각각의 공급물 샷은 1시간 지속시간을 갖는다). 최소 진탕 속도는 상기 파라미터 값이 바이오필름이 용존 산소 프로브를 코팅하는 것을 방지하고 낮은 오류의 신호 판독을 유도하도록 성취되면 1200 rpm에 고정시켰다. 추가의 에탄올은 잔류 농도가 10 g/L 미만으로 하강하는 경우 배양물에 첨가하였다. 균주의 에틸 옥타노에이트 생산 경로는 IPTG를 1 mM의 최종 농도로 첨가함으로써 약 24시간 경과된 발효 시간에서 유도하였다. 생물반응기 작동은 약 72시간 경과된 발효 시간에서 종료하였다. 발효 브로쓰를 수거하고 실시예 8에 기재된 바와 같이 분석하였다.

결과는 도 13에 나타낸다.

실시예 12

하기의 실시예는 중쇄 지방산 유도체의 생산을 위해 개선된 활성을 갖는 티오에스테라제를 포함하는 유전학적으로 변형된 미생물을 사용하여 중쇄 지방산을 생산하기 위한 공정을 설명한다. 상기 공정에 의해 생산되는 지방산의 조성물은 중쇄 지방산을 포함하고 이때 아실 쇠는 6 내지 12개 탄소이다. 본 실시예에서, 5 L 생물반응기

내에서 중쇄 지방산의 생산은 약 13시간 경과된 발효 시간에서 이소프로필티오갈락토사이드(IPTG)를 생물반응기에 첨가하여 활성화되는 유도성(Ptrc) 프로모터의 전사 제어하에서 중쇄 티오에스테라제를 과발현하도록 조작된 이. 콜라이 균주를 사용하여, 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다. 중쇄 지방산은 이. 콜라이에 고도로 독성이고, 따라서, 5 L 생물반응기에서 생산 동안에 이들 화합물의 축적은 억제 농도에 도달한 후(5 g/L 미만, 실시예 3 참조) 곧 성장 및 생산을 멈추었다.

[0413] **첨부서류 A: 서열**

서열번호 1

```

1   MLPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMDHRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71  ETLNMHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRY   PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMMNQKT   RRLSKLPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHKFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPKSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS

```

서열번호 2

```

1   MLPDWSRLLT   AITTVFASKS   RPDMDHRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71  ETLNMHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRY   PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMMNQKT   RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHBFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLCLEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPKSKV
281 GSRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS

```

서열번호 3

```

1   MLKPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMDHRKSK   RPDMLVPSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71  ETLNMHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRY   PAWGDIVEVN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMMNQKT   RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHBFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPKSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS

```

서열번호 4

```

1   MLKPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMDHRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71  ETLNMHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVV   IKMQIKVNRY   PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMMNQKT   RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEVSDLK
VHBFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPKSKV
281 GSRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVS

```

서열번호 5

```

1   MLPDWSRLLT   AITTVFVKSK   RPDMDHRKSK   RPDMLVDSFG   LESTVQDGLV   FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71  ETLNMHLQET   SLNHCKSTGI   LLDGFGRTLE   MCKRDLIWVL   IKMQIKVNRY   PAWGDIVEVN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC   NTGEILVRAT   SAYAMMNQKT   RRLSKVPYEV   HQEIVPLFVD   SPVIEDSDLK
VHBFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW   NDLDVNQHVS   NVKYIGWILE   SMPTEVLETQ   ELCSLALEYR   RECGRDSVLE
SVTAMDPKSKV
281 GVRSQYQHLL   RLEDGTAIVN   GATEWRPKNA   GANGAISTGK   TSNGNSVX

```

[0414]

서열번호 6

1 MLK**D**WSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS**Y**
 EIGTDRTASI
 71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**LE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VE**V**N
 TRFSRLGKIG
 141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**PYEV HQEIVPLFVD SPVIEDSDLK
 VHKFKVK**T**GD
 211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELC**S**LAL**E**YR RECGRDSVLE
 SVTAMDP**S**SKV
 281 G**V**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSV**K**

서열번호 7

1 M**L**PDW**R**RLLT AIT**T**LVFKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS**Y**
 EIGTDRTASI
 71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**LE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
 TRFSRLGKIG
 141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
 VHKFKVK**T**GD
 211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELC**S**LAL**E**YR RECGRDSVLE
 SVTAMDP**S**SKV
 281 G**V**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**T**STGK **T**KNGNSV**K**

서열번호 8

1 ML**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS**Y**
 EIGTDRTASI
 71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**LE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
 TRFSRLGKIG
 141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**PYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
 VHKFKVK**T**GD
 211 SIQKGLTPGW NDLDVN**Q**HVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELC**S**LAL**E**YR RECGRDSVLE
 SVTAMDP**S**SKV
 281 G**V**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSV**S**

서열번호 9

1 M**L**PDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSFSIRS**Y**
 EIG**P**DRTASI
 71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T****K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
 TRFSRLGKIG
 141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
 V**H**R**F**KVK**T**GD
 211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELC**S**LAL**E**YR RECGRDSVLE
 SVTAMDP**S**SKV
 281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNGNSV**S**

서열번호 10

1 ML**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSFSIRS**Y**
 EIG**P**DRTASI
 71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T****K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
 TRFSRLGKIG
 141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKLPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
 V**H**R**F**KVK**T**GD
 211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELC**S**LAL**E**YR RECGRDSVLE
 SVTAMDP**S**SKV
 281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNGNSV**S**

서열번호 11

1 ML**K**DWSRLLT AITTVF**C**KSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSF**C**IRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**LE MCKRDLIW**V**L IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSK**V**PYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GVR**S**QYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 12

1 MLPDWSRLLT AITTVF**C**KSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSF**S**IRSY
EIG**P**DRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIW**V**L IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSK**V**PYEV HQEIV**G**LFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 13

1 MLPDWSRLLT AIT**R**VFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY
EIG**P**DRTASI
71 ETLMN**L**LQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SI**H**KGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIV**N** GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNG**K**SVS

서열번호 14

1 MLP**M**SRLLT AITTVF**C**KSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY
EIG**P**DRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**D**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 G**S**RSQYQHLL RLEDGTAIV**N** GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSNG**K**SVS

서열번호 15

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**KSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSF**S**IRSY
EIG**P**DRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGR**T**KE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGD**T**VEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQE**I****A**PLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SI**H**KGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGKSVS

서열번호 16

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDHMHDRKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 17

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 18

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYRV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILV SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 19

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 20

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

[0417]

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 21

1 MLK**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLV**H**SFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS
EIGTDRTASI
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LL**H**GFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**FPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGR**R**SVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 22

1 MLK**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS
EIGTDRTASI
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**FPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 23

1 MLK**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLV**R**SFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS
EIGTDRTASI
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LL**H**GFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**FPY**H**V HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGR**H**SVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 24

1 MLK**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS
EIGTDRTASI
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LL**R**GFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**FPY**R**V HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWIL**R** SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 25

1 MLK**K**DWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLV**R**SFG LESTVQDGLV FRQSFSIRS
EIGTDRTASI
71 ETLNMHLQET SLNHCKSTGI LL**H**GFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSK**V**FPYEV HQEIVPLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTG**H**
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 26

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 27

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPHMHDRKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 28

1 MLKRWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 29

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLHTQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 30

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 31

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHREFKVKTG
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 32

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHREFKVKTG
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 33

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHREFKVKTG
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 34

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHREFKVKTG
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 35

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHREFKVKTG
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

[0420]

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 36

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLNMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 37

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVHSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLNMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLRDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 38

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLNMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 39

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLNMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTRVLETQ ELCSLALEYR RECGRHSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 40

1 MLKHWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHDKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLNMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRILE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

[0421]

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 41

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLHTQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 42

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEHGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 43

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPRMDHRKSK RPDMLVRSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLHDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 44

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYRV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILH SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLBDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 45

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPDMDHRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGTDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDIVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYHV HQEIVPLFVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKITGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTHVLETQ ELCSLALEYR RECGRBSVLE
SVTAMDPSKV

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 46

1 MLKDWSRLLT AITTVFVKSK RPRMHDRKSK RPDMLVDSFG LESTVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGIDRTASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLRGFGRTLE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKVPYEV HQEIVPLEVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIQKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRRSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGAISTGK TSNGNSVS

서열번호 47

1 MLPDWSRLLT AITTVFAKSK RPHMHDRKSK RPDMLVHSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGPDRLASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQEIAPLEVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

서열번호 48

1 MLPDWSRLLT AITTVFAKSK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGPDRLASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQEIAPLEVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

서열번호 49

1 MLPDWSRLLT AITTVFAKSK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGPDRLASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQEIAPLEVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILR SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGARSTGK TSNGNSVS

서열번호 50

1 MLPDWSRLLT AITTVFAKSK RPHMHDRKSK RPDMLVDSFG LESGVQDGLV FRQSFSIRSY
EIGPDRLASI
71 ETLMNHLQET SLNHCKSTGI LLHGFGRTKE MCKRDLIWVV IKMQIKVNRY PAWGDVEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMMNQKT RRLSKLPYEV HQEIAPLEVD SPVIEVSDLK
VHRFKVKTGD
211 SIHKGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWILE SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV

281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSGNSVS

서열번호 51

1 MLPDWSRLLT AITTVF**A**KSK RPDMDRKS RPDMLVDSFG LES**G**VQDGLV FRQSFSSIRSY
EIG**P**DR**L**ASI
71 ETLNHLQET SLNHCKSTGI LLDGFGRT**K**E MCKRDLIWVV IKMQIKVNRV PAWGDTEIN
TRFSRLGKIG
141 MGRDWLISDC NTGEILVRAT SAYAMNQKT RRLSKLPYEV HQEI**A**PLFVD SPVIE**V**SDLK
VH**R**FKVKTGD
211 SI**H**KGLTPGW NDLDVNQHVS NVKYIGWIL**R** SMPTEVLETQ ELCSLALEYR RECGRDSVLE
SVTAMDPSKV
281 GSRSQYQHLL RLEDGTAIVN GATEWRPKNA GANGA**R**STGK TSGNSVS

서열번호 52

1 MTTVF**A**KSKR P**H**MHDRKSKR PDMLVDSFGL ES**G**VQDGLVF RQSFSSIRSYE IGP**P**DR**L**ASIE
TLMNHLQETS
71 LNHCKSTGIL LDGFGRT**K**EM CKRDLIWVVI KMQIKVNRYP AWGDTEINT RFSRLGKIGM
GRDWLISDCN
141 TGEILVRATS AYAMNQKTR RLSKLPYEVH QEI**A**PLFVDS PVIE**V**SDLKV H**R**FKVKTGDS
I**H**KGLTPGWN
211 DLDVNQHVS N VKYIGWIL**R**S MPTEVLETQE LCLALEYRR ECGRDSVLES VTAMDPSKVG
SRSQYQHLLR
281 LEDGTAIVNG ATEWRPKNAG ANGA**R**STGKT SNGNSVS

서열번호 53

1 MF**A**KSKRP**H**M HDRKSKRPDM LVDSFGLES**G** VQDGLVFRQS FSIRSYEIG**P** DR**L**ASIEITLM
NHLQETSLNH
71 CKSTGILLDG FGRT**K**EMCKR DLIWVVIKMQ IKVNRYPAWG DTVEINTRES RLKGIMGRD
WLISDCNTGE
141 ILVRATSAYA MNQKTRRLS KLPYEVHQEI **A**PLFVDSPVI E**V**SDLKVH**R**F KVKTGDSI**H**K
GLTPGWNDLD
211 VNQHVS NVKY IGWIL**R**SMPTE EVLETQELCS LALEYRRECGR RDSVLESVTA MDPKSKV**S**RS
QYQHLLRLED
281 GTAVNGATE WRPKNAGANG **A**RSTGKTSNG NSVS

서열번호 54

1 M**A**KSKRP**H**MH DRKSKRPDML VDSFGLES**G**V QDGLVFRQSF SIRSYEIG**P**D R**L**ASIEITLMN
HLQETSLNHC
71 KSTGILLDGF GRT**K**EMCKRD LIWVVIKMQI KVNRYPAWG TVEINTRFSR LGKIGMGRDW
LISDCNTGEI
141 LVRATSAYAM MNQKTRRLSK LPYEVHQEI**A** PLFVDSPVIE **V**SDLKVH**R**FK VKTGDSTI**H**KG
LTPGWNDLDV
211 NQHVS NVKYI GWIL**R**SMPTE VLETQELCSL ALEYRRECGR DSVLESVTAM DPSKVG**S**RSQ
YQHLLRLEDG
281 TAIVNGATEW RPKNAGANGA **R**STGKTSNGN SVS

서열번호 55

1 MHDRKSKRPD MLVDSFGLES **G**VQDGLVFRQ SFSIRSYEIG **P**DR**L**ASIEITL MNHLQETSLN
HCKSTGILLD
71 GFGRT**K**EMCK RDLIWVVIKM QIKVNRYPAW GDTVEINTRF SRLGKIGMGR DWLISDCNTG
EILVRATSAY
141 AMMNQKTRRL SKLPYEVHQE **I****A**PLFVDSPV IE**V**SDLKVH**R** FKVKTGDSI**H** KGLTPGWNDL
DVNQHVS NVK
211 YIGWIL**R**SMP TEVLETQELC SLALEYRREC GRDSVLESVT AMDPSKVG**S**R SQYQHLLRLE
DGTAVNGAT
281 EWRPKNAGAN GA**R**STGKTSN GNSVS

서열번호 56

1 MRPDMLVDSF GLESGVQDGL VFRQSFSIRS YEIGPDRLAS IETLMNHLQE TSLNHCKSTG
ILLDGFGRTK
71 EMCKRDLIIV VIKMQIKVNR YPAWGDIVEI NTRFSRLGKI GMGRDWLISD CNTGEILVRA
TSAYAMNQK
141 TRRLSKLPYE VHQEIALPLFV DSPVIEVSDL KVHRFKVKTG DSIHKGLTPG WNDLDVNQHV
SNVKYIGWIL
211 RSMPTVEVLET QELCSLALEY RRECGRDSVL ESVTAMDFSK VGSRSQYQHL LRLEDGTAIV
NGATEWRPKN
281 AGANGARSTG KTSNGNSVS

서열번호 57

1 MDMLVDSFGL ESGVQDGLVF RQSFSIRSYE IGPDRLASIE TLMNHLQETS LNHCKSTGIL
LDGFGRTKEM
71 CKRDLIWVVI KMQIKVNRYP AWGDIVEINT RFSRLGKIGM GRDWLISDCN TGEILVRATS
AYAMNQKTR
141 RLSKLPYEVH QEIALPLFVDS PVIEVSDLKV HRFKVTGDS IHKGLTPGWN DLDVNQHVSN
VKYIGWILRS
211 MPTEVLETQE LCSLALEYRR ECGRDSVLES VTAMDFSKVG SRSQYQHLLR LEDGTAIVNG
ATEWRPKNAG
281 ANGARSTGKT SNGNSVS

서열번호 58

1 MLVDSFGLES QVQDGLVFRQ SFSIRSYEIG PDRLASIETL MNHLQETSLN HCKSTGILLD
FGGRTKEMCK
71 RDLIWVVIKM QIKVNRYPAW GDIVEINTRF SRLGKIGMGR DWLISDCNTG EILVRATSAY
AMNQKTRRL
141 SKLPYEVHQE IAPLFVDSPV IEVSDLKVHR FKVTGDSIH KGLTPGWNDL DVNQHVSINVK
YIGWILRSMP
211 TEVLETQELC SLALEYRREC GRDSVLESVT AMPDFSKVGSR SQYQHLLRLE DGTAINVNGAT
EWRPKNAGAN
281 GARSTGKTSN GNSVS

서열번호 59

1 MVDSFGLES QDGLVFRQS FSIRSYEIG PDRLASIETL NHLQETSLNH CKSTGILLDG
FGGRTKEMCKR
71 DLIWVVIKMQ IKVNRYPAWG DIVEINTRFS RLKIGMGRD WLISDCNTGE ILVRATSAYA
MMNQKTRRLS
141 KLPYEVHQEI APLFVDSFVI EVSDLKVHRF KVKTGDSIHK GLTPGWNDLD VNQHVSINVKY
IGWILRSMP
211 EVLETQELCS LALEYRREC RDSVLESVTA MDPSKVGSR SQYQHLLRLED GTAINVGATE
WRPKNAGANG
281 ARSTGKTSNG NSVS

서열번호 60

1 ATGCTCCCG ATTGCTCCG CCGTCTGACA GCTATCACCA CGGTGTTGT TAAGTCGAAA CGGCCGGACA TGCATGATAG
81 AAAAAGCAAG CGACCAGACA TGTTAGTCGA TTCTTTCGGA TTGGAGAGTA CTGTACAAGA TGGCCTTGTG TTTGTCAGT
161 CATTCTCCAT ACGCAGCTAT GAAATTGGTA CAGACCGTAC GCGCTCGATC GAGACGCTGA TGAACCACT COAGGAAACC
241 TCTCTGAATC ATTGCAAAAG TACTGGCATT TTACTGGATG GTTTTGGCG CACATTGGAA ATGTGTAAC GGGACCTTAT
321 CTGGGTGTG ATAAAGATGC AAATTAAGT GAACCGTTAC CTTGCTGGG GAGATACGGT AGAGATCAAT ACCCGCTTTT
401 CAAGACTGGG CAAAATTGGT ATGGGCCGAG ACTGGCTCAT AAGCGATTGC AACACTGGT AAATCTTAGT TCGTGAACA
481 TCGCTTATG CGATGATGAA TCAGAAGACC CGCCGGCTGT CGAAATTGCC GTACGAGGTG CACCAAGAAA TTGTCCCACT
561 TTTCTTGAT TCTCCGTAA TCGAAGACAG TGATCTGAAA GTGCATAAGT TTAAGTCAA AACGGGGGAC AGCATTGAGA
641 AGGGATTAA CCGCGCTGG AAGCATCTGG ATGTTAATCA GCACGTGICA AAGCTAAAT ATATAGGTG GATTCTGGAG
721 TCGATGCCA CTGAATCTCT GGAAGACAAA GAATGTTGT CCGTTGCCCT GGAATACCT CGGAGTACG GCGTGAATC
801 TTTTTAGAA AGCGTGACG CAATGGACCC GAGTAAAGTA GCGTTTGGCT CACATATCA ACATCTGCTC AGATTGGAG
881 ACGGTACCG GATTGTGAAT GGAGTACTG AATGGCGACC AAAGAACGCC GCGCAATG GTGCGATATC CACAGGGAAA
961 ACGAGCAACG GCAATTGGT CTCTTAA

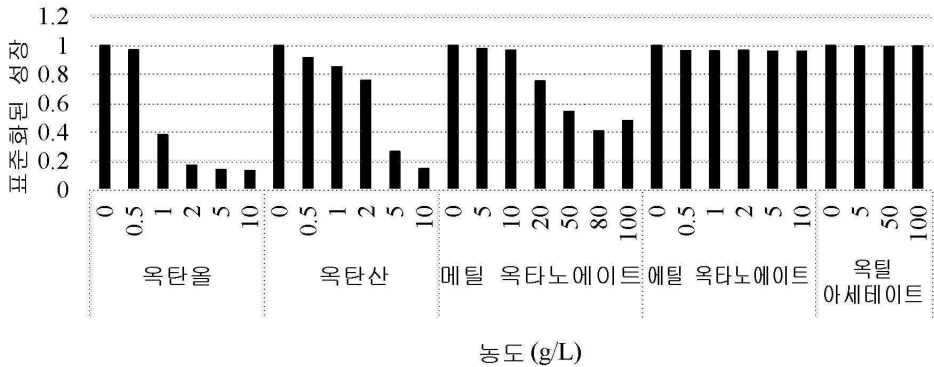
[0425]

[0426]

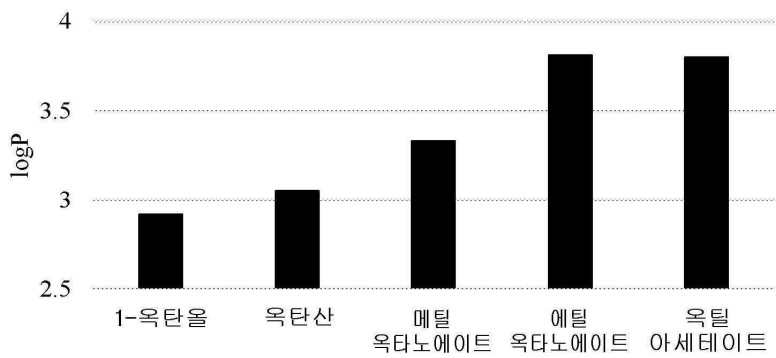
당업자에게 명백한 바와 같이, 본 개시내용의 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 상기 양상 및 구현예의 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있다.

도면

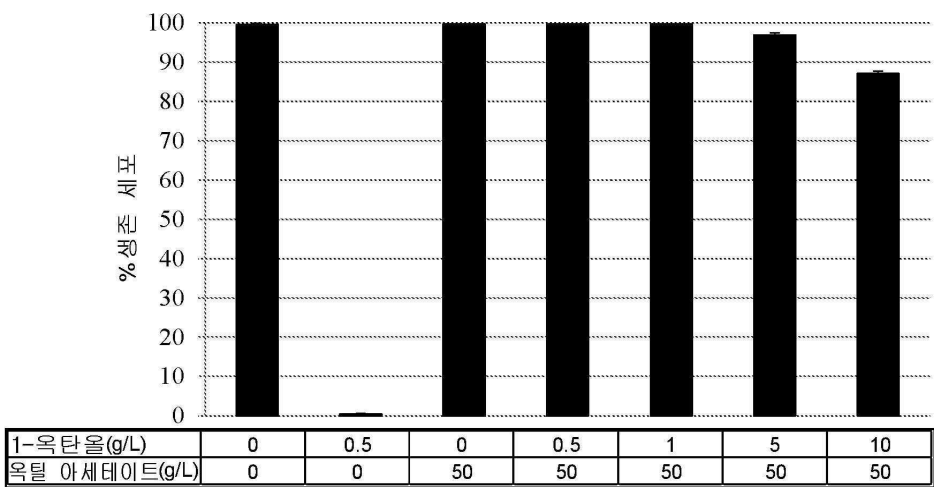
도면1



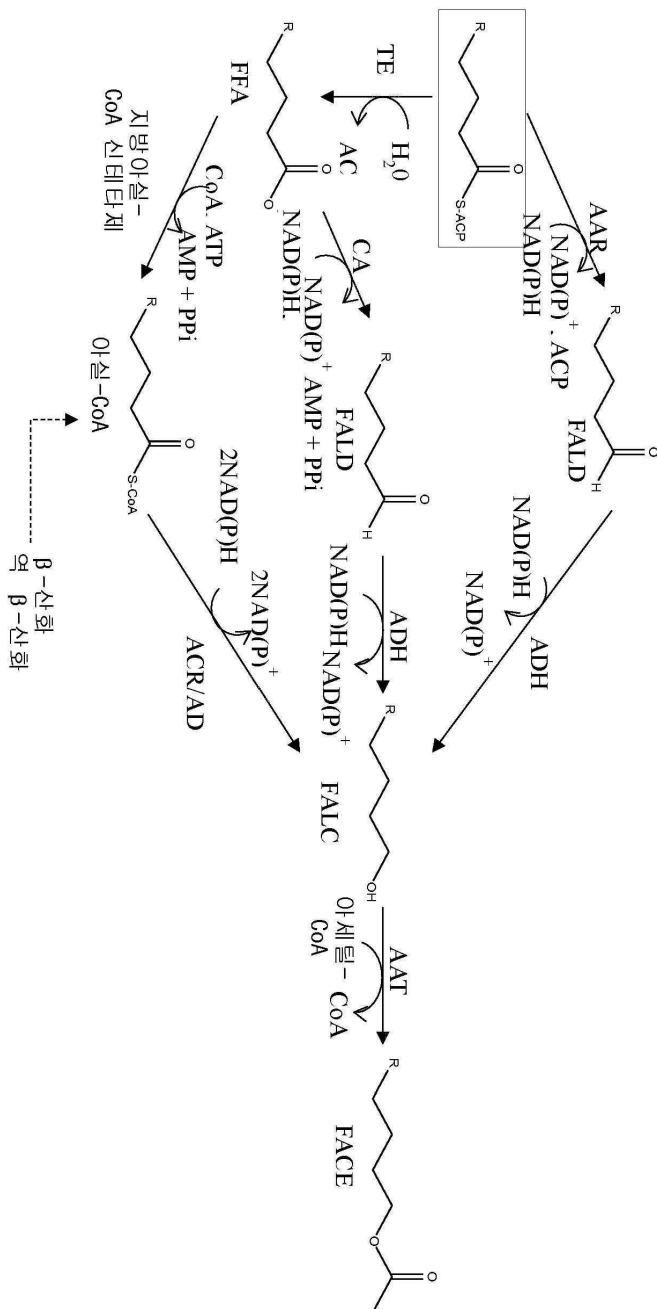
도면2



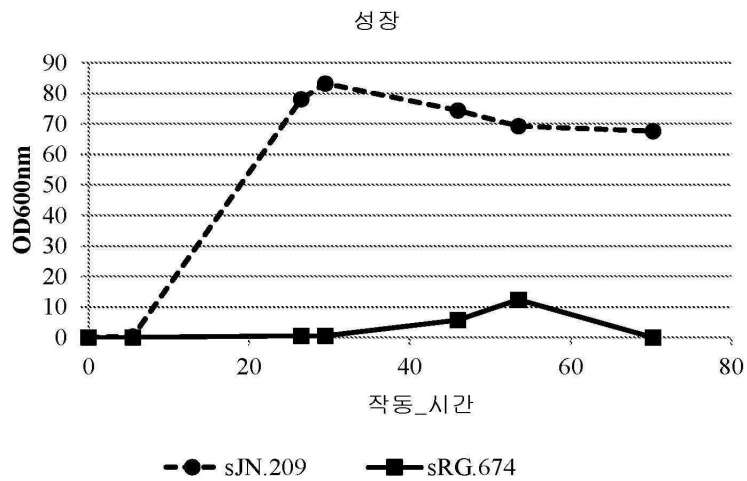
도면3



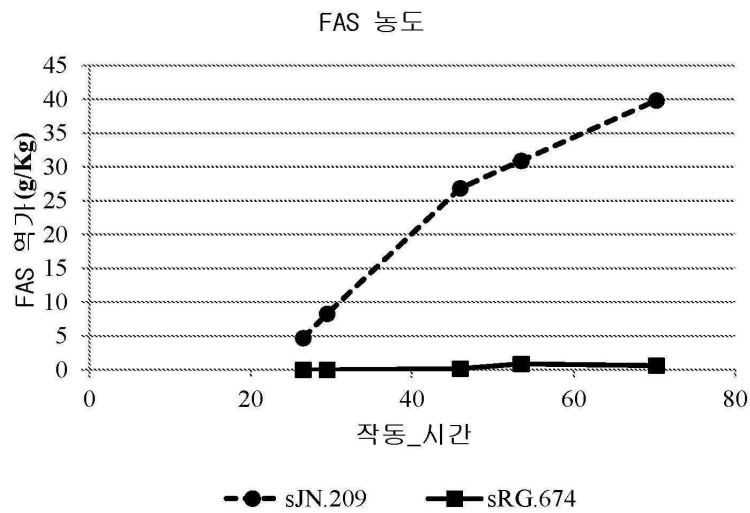
도면4



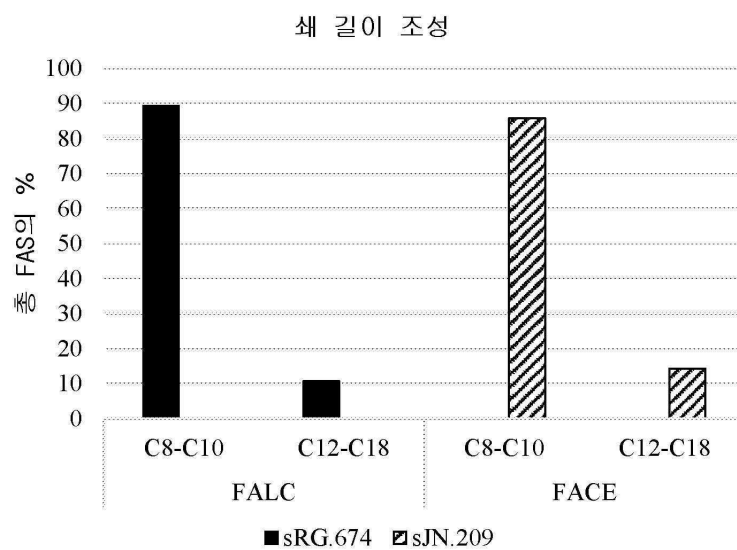
도면5a



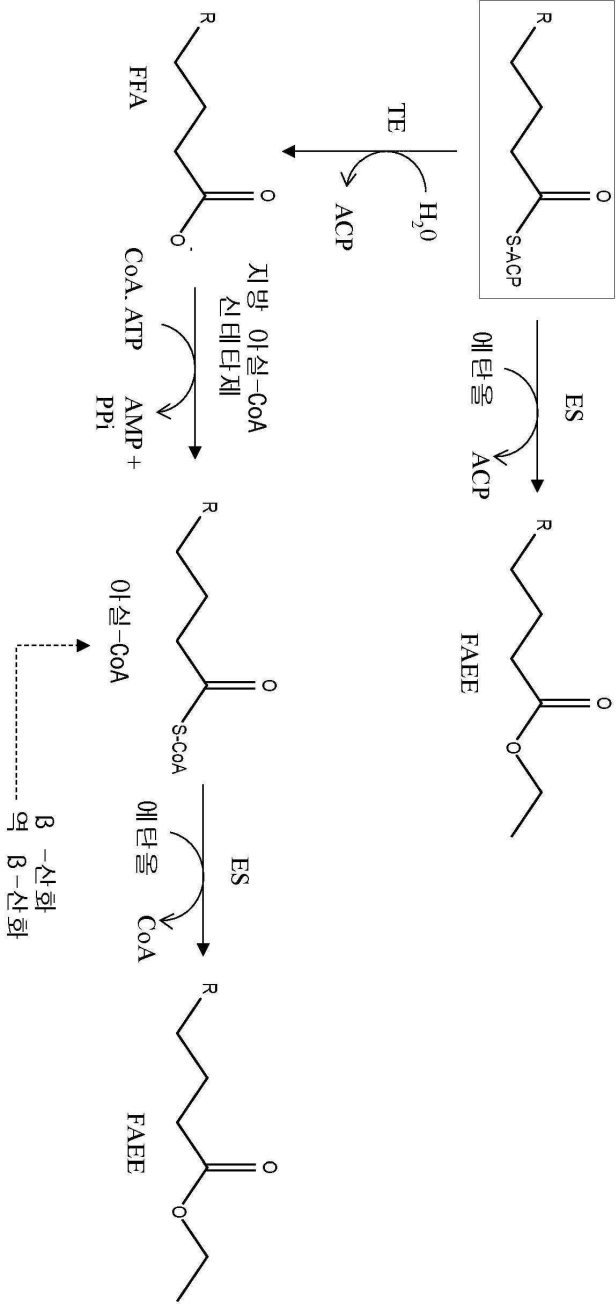
도면5b



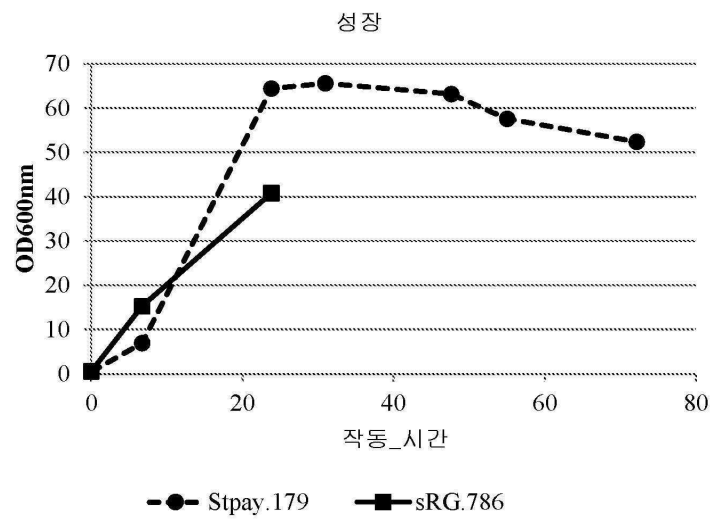
도면5c



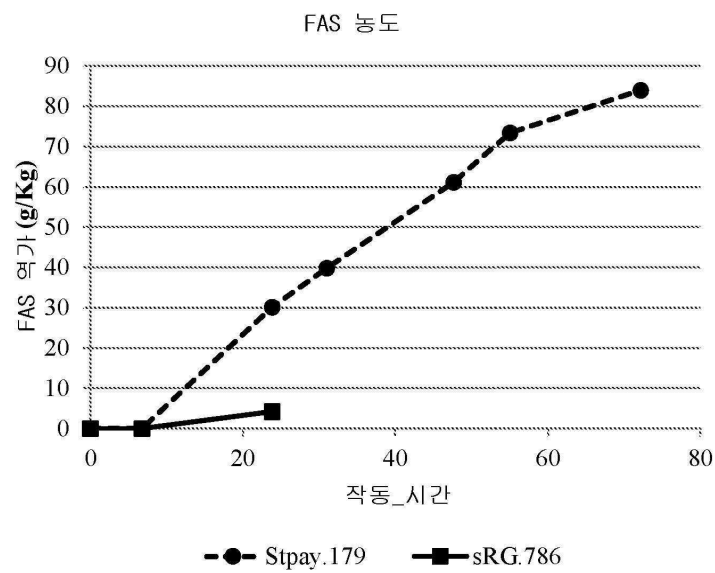
도면6



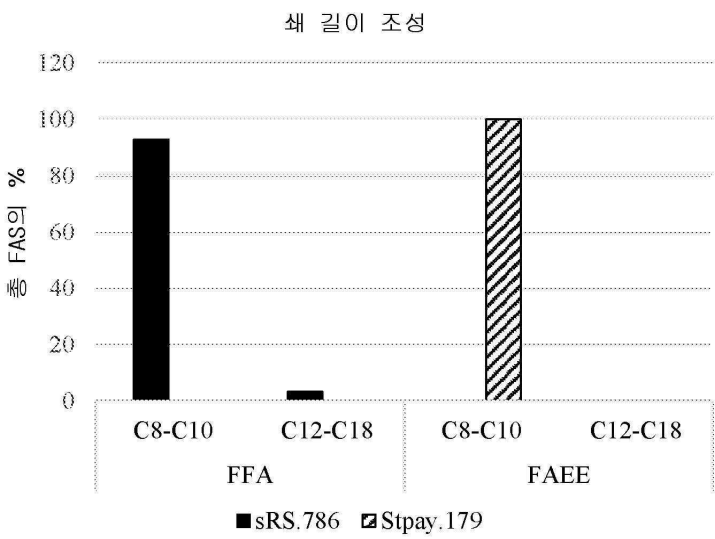
도면7a



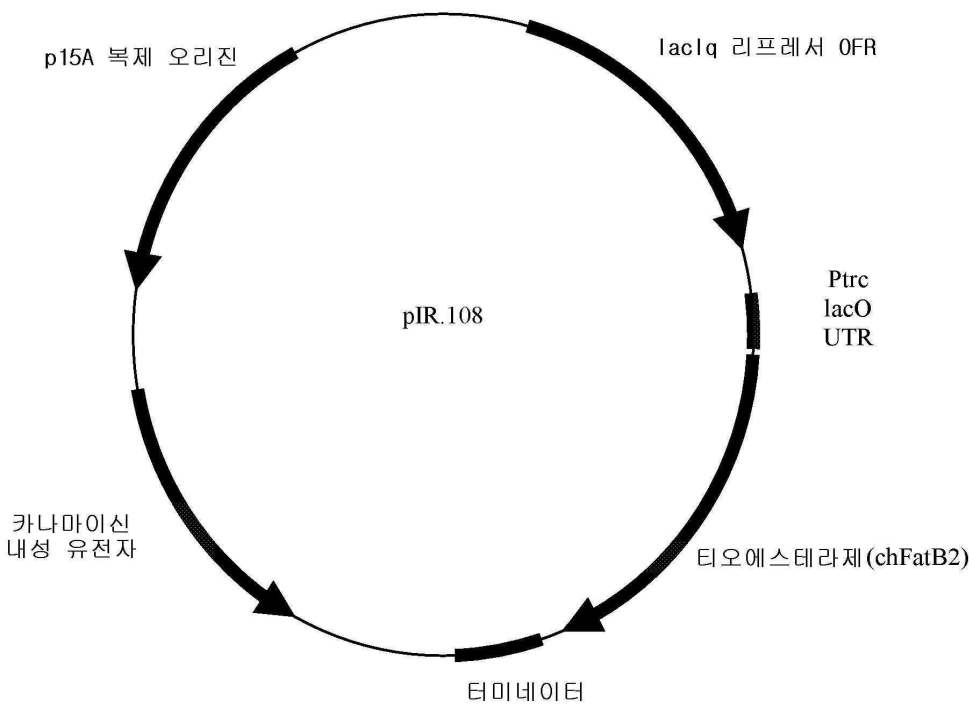
도면7b



도면7c



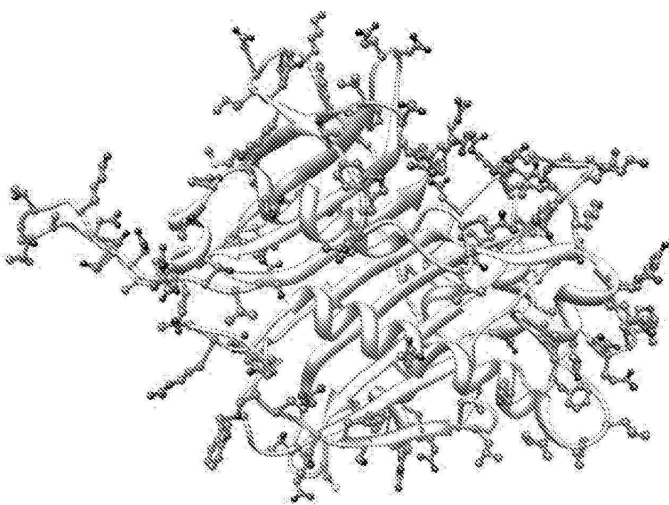
도면8



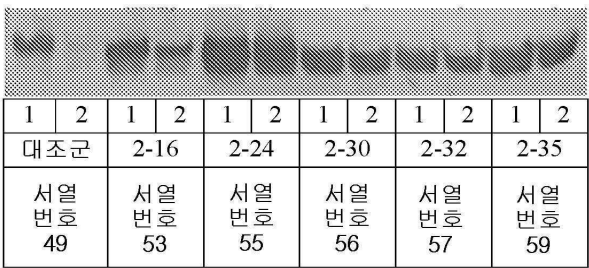
도면9



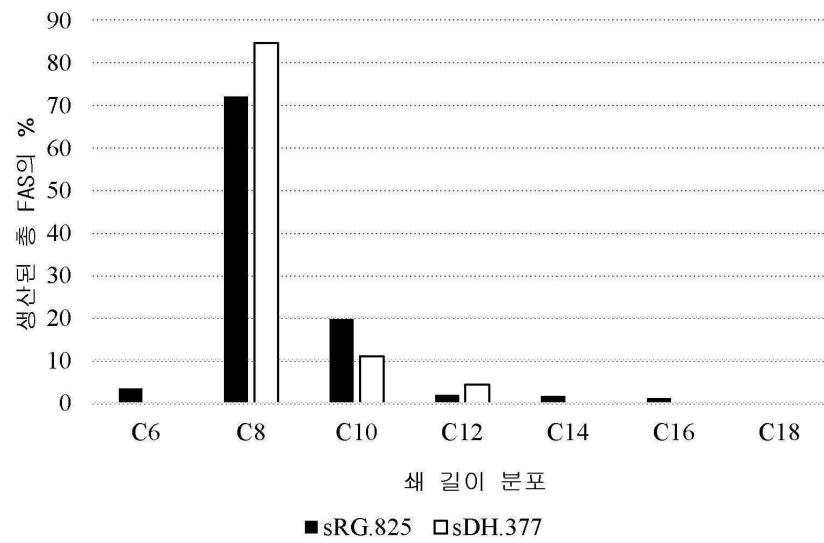
도면10



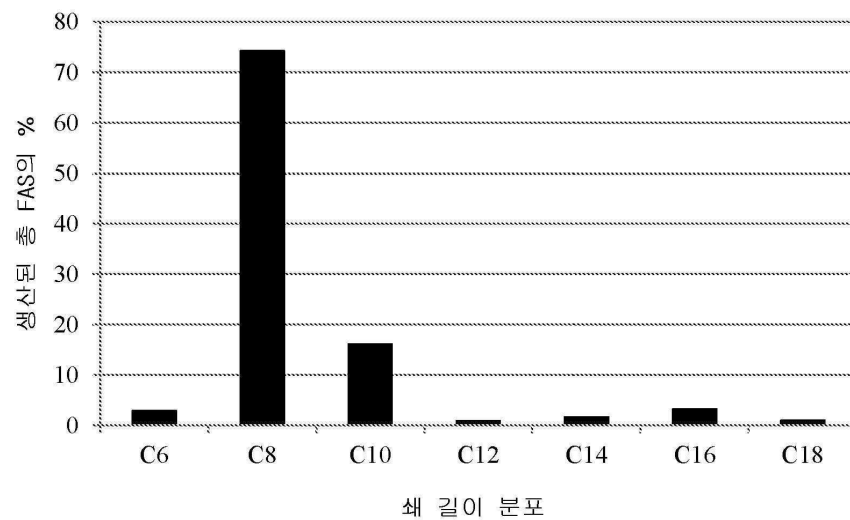
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> GENOMATICA, INC.
- <120> Thioesterase Variants Having Improved Activity For The Production Of Medium-Chain Fatty Acid Derivatives
- <130> FPA13589/C
- <150> 62/481,078
- <151> 2017-04-03
- <160> 60
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 328
- <212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 1

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

Val Ile Glu Asp Ser Asp Leu Lys Val His Lys Phe Lys Val Lys Thr

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 2
 Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

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

100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190
 Val Ile Glu Asp Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Cys
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 3

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 3

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Pro Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Val Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

Val Ile Glu Asp Ser Asp Leu Lys Val His Lys Phe Lys Val Lys Thr

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270

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

 <210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana

 <400>
 4
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 5

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 5

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Leu Ile Lys
100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Val Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190

Val Ile Glu Asp Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Lys
325

<210> 6

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 6

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125
 Val Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175

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

 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Lys

325

<210> 7

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 7

Met Leu Pro Asp Trp Arg Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Leu Phe
1 5 10 15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Lys Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Thr Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320
Thr Lys Asn Gly Asn Ser Val Lys

325

<210> 8

<211> 328

<212> PRT

<213> *Cuphea hookeriana*

<400> 8

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130

135

140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145

150

155

160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165

170

175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180

185

190

Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Lys Phe Lys Val Lys Thr

195

200

205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210

215

220

Val Asn Gly His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225

230

235

240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245

250

255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val

260

265

270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His

275

280

285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290

295

300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305

310

315

320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 9

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 9

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325

<210> 10
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 10

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

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

Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325
<210> 11
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 11
Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1	5	10	15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro			
	20	25	30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly			
	35	40	45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Cys Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr			
	50	55	60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr			
65	70	75	80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly			
	85	90	95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Leu Ile Lys			
	100	105	110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu			
	115	120	125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp			
	130	135	140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr			
145	150	155	160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val			
	165	170	175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro			
	180	185	190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr			
	195	200	205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp			
	210	215	220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu			
225	230	235	240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala			
	245	250	255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 12
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 12

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Cys Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro

50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Leu Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

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

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

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

325

<210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana

<400

> 13

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Arg Val Phe
 1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
35 40 45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn Leu Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Trp Gly Ala Thr Glu
290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Lys Ser Val Ser
325

<210> 14

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 14

Met Leu Pro Met Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Cys Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95

Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190
 Val Ile Glu Asp Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Trp Gly Ala Thr Glu
 290 295 300

 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Lys Ser Val Ser
 325
 <210> 15
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 15
 Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20	25	30	
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly			
35	40	45	
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro			
50	55	60	
Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr			
65	70	75	80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly			
85	90	95	
Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys			
100	105	110	
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu			
115	120	125	
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp			
130	135	140	
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr			
145	150	155	160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu			
165	170	175	
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro			
180	185	190	
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr			
195	200	205	
Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp			
210	215	220	
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu			
225	230	235	240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala			
245	250	255	
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val			
260	265	270	

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

Thr Ser Asn Gly Lys Ser Val Ser
 325

<210> 16
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 16

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190

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

 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325

 <210> 17

 <211>
 328

 <212> PRT

 <213> Cuphea hookeriana

 <400> 17

 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30

Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 18
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 18
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

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

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

 145 150 155 160

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

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Val
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu His Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 19
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 19

Met Leu Lys His Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

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

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

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

 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

 325
 <210> 20
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 20
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110

 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 21

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 21

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50

55

60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65

70

75

80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85

90

95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100

105

110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115

120

125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130

135

140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145

150

155

160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165

170

175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180

185

190

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

195

200

205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210

215

220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225

230

235

240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245

250

255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val

260

265

270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275

280

285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 22
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400>
 > 22
 Met Leu Lys Arg Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140

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

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190

Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Val Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 23

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 23

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160

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

 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg His Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325
<210> 24
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 24
Met Leu Lys Arg Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Arg Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175
Pro Tyr Arg Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

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

245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 25

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 25

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60

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

 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190

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

 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 26

<211>

328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 26

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

	195							200						205									
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp																							
210								215							220								
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu																							
225								230							235								
Ser Met Pro Thr His Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala																							
	245							250						255									
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val																							
	260							265						270									
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His																							
	275							280						285									
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu																							
290								295							300								
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys																							
305								310							315								
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser																							
	325																						
<210>	27																						
<211>	328																						
<212>	PRT																						
<213>	Cuphea hookeriana																						
<400>	27																						
Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe																							

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

65	70	75	80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly			
	85	90	95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys			
	100	105	110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu			
	115	120	125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp			
	130	135	140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr			
145	150	155	160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val			
	165	170	175
Pro Tyr His Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro			
	180	185	190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr			
	195	200	205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp			
	210	215	220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu			
225	230	235	240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala			
	245	250	255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val			
	260	265	270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His			
	275	280	285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu			
290	295	300	
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys			
305	310	315	320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 28

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 28

Met Leu Lys Arg Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr His Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205
 Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240

 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 29
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 29
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110

 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

 180 185 190
 Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu His Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255

 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 30

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 30

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285

Leu Leu Arg Leu His Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325

<210> 31

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400>

> 31

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30

Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly

	85	90	95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys			
	100	105	110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu			
	115	120	125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp			
	130	135	140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr			
145	150	155	160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val			
	165	170	175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro			
	180	185	190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr			
	195	200	205
Gly His Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp			
	210	215	220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu			
225	230	235	240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala			
	245	250	255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val			
	260	265	270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His			
	275	280	285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu			
	290	295	300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys			
305	310	315	320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser			
	325		
<210>	32		

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 32

Met Leu Lys Arg Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Arg Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Arg Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 33

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr His Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190

Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg His Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 34

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 34

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Arg Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr His Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg His Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 35
 <211>
 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 35
 Met Leu Lys His Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
 50 55 60
 Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Arg Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

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

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

 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325

 <210> 36
 <211> 328
 <212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 36

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

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

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

145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 37
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 37
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

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

 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Arg Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325
<210> 38
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana

<400> 38

Met Leu Lys His Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 39

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 39

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190
 Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Arg Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg His Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu His Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 40
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400

> 40

Met Leu Lys His Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Arg Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu His

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325

<210> 41
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 41

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15

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

85 90 95
 Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175

Pro Tyr His Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190

Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu His Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 42
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 42

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1	5	10	15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro			
	20	25	30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly			
	35	40	45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr			
	50	55	60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr			
65	70	75	80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly			
	85	90	95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys			
	100	105	110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu			
	115	120	125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp			
	130	135	140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr			
145	150	155	160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val			
	165	170	175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro			
	180	185	190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr			
	195	200	205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp			
	210	215	220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu His			
225	230	235	240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala			
	245	250	255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu His Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 43
<211> 328
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 43

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Val Lys Ser Lys Arg Pro Arg Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

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

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

 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu His Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 44
 <211>
 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 44
 Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30
Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly
35 40 45
Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
50 55 60
Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80
Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
85 90 95
Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110
Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125
Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140
Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val
165 170 175
Pro Tyr Arg Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu His
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285
Leu Leu Arg Leu Arg Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 45

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 45

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

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

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

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr His Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr His Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val

260 265 270

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His

275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu

290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ile Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 46

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 46

Met Leu Lys Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys Arg Pro Arg Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Thr Val Gln Asp Gly

35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Thr

50 55 60

Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Arg Gly Phe Gly

85 90 95

Arg Thr Leu Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys

100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu

115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp

130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Val

165 170 175

Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Val Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asp Ser Ile Gln Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp

210 215 220

Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu

225 230 235 240

Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala

245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Arg Ser Val Leu Glu Ser Val

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

 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 47
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 47
 Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30
 Asp Met Leu Val His Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly

 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
 50 55 60
 Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110

 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
165 170 175
Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
180 185 190
Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
195 200 205
Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
210 215 220
Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg
225 230 235 240
Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
260 265 270
Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285
Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300
Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320
Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 48

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 48

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15
Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30
 Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro

 50 55 60
 Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125

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

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

Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
290 295 300

Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
325

<210> 49

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400>

> 49

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
1 5 10 15

Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
35 40 45

Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
50 55 60

Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
85 90 95

Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
100 105 110

Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
115 120 125

Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
130 135 140

Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr

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

 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

325

<210> 50

<211> 328

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 50

Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe

1 5 10 15

Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro

20 25 30

Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
 50 55 60
 Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu His Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu
 165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190
 Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300

 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 51
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 51
 Met Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu Leu Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro
 20 25 30

 Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly
 35 40 45
 Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro
 50 55 60
 Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly
 85 90 95
 Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys
 100 105 110
 Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu
 115 120 125
 Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp
 130 135 140
 Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu

165 170 175
 Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro
 180 185 190
 Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 210 215 220
 Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His
 275 280 285
 Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu
 290 295 300
 Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 325
 <210> 52
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 52
 Met Thr Thr Val Phe Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg
 1 5 10 15
 Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser
 20 25 30
 Gly Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser

35 40 45
 Tyr Glu Ile Gly Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn
 50 55 60
 His Leu Gln Glu Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Gly Phe Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile
 85 90 95
 Trp Val Val Ile Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp
 100 105 110
 Gly Asp Thr Val Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile
 115 120 125
 Gly Met Gly Arg Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile
 130 135 140
 Leu Val Arg Ala Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Ser Lys Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu
 165 170 175
 Phe Val Asp Ser Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg
 180 185 190
 Phe Lys Val Lys Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly
 195 200 205
 Trp Asn Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile
 210 215 220
 Gly Trp Ile Leu Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Leu Cys Ser Leu Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser
 245 250 255
 Val Leu Glu Ser Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg
 260 265 270
 Ser Gln Tyr Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val
 275 280 285

Asn Gly Ala Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala
 290 295 300
 Arg Ser Thr Gly Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 305 310 315
 <210> 53
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 53
 Met Phe Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys
 1 5 10 15
 Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln
 20 25 30
 Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile
 35 40 45
 Gly Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln
 50 55 60
 Glu Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Phe Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val
 85 90 95
 Ile Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr
 100 105 110
 Val Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly
 115 120 125
 Arg Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg
 130 135 140
 Ala Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160
 Lys Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp
 165 170 175
 Ser Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val

180 185 190
 Lys Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp
 195 200 205
 Leu Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile
 210 215 220

 Leu Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser
 225 230 235 240
 Leu Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu
 245 250 255
 Ser Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr
 260 265 270
 Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala
 275 280 285
 Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr

 290 295 300
 Gly Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 305 310
 <210> 54
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Cuphea hookeriana
 <400> 54
 Met Ala Lys Ser Lys Arg Pro His Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Pro Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp
 20 25 30
 Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly

 35 40 45
 Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe
 65 70 75 80

Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile
85 90 95
Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val
100 105 110
Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg
115 120 125
Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala
130 135 140
Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys
145 150 155 160
Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser
165 170 175
Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys
180 185 190
Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu
195 200 205
Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu
210 215 220
Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu
225 230 235 240
Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser
245 250 255
Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln
260 265 270
His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr
275 280 285
Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly
290 295 300
Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
305 310
<210> 55
<211> 305

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400

> 55

Met His Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Ser Phe

1 5 10 15

Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe

20 25 30

Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu

35 40 45

Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser

50 55 60

Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys

65 70 75 80

Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg

85 90 95

Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg

100 105 110

Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn

115 120 125

Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn

130 135 140

Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu

145 150 155 160

Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu

165 170 175

Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly

180 185 190

Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn

195 200 205

Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu

210 215 220

Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys
 225 230 235 240
 Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys
 245 250 255
 Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly
 260 265 270
 Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly
 275 280 285

Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val
 290 295 300

Ser

305

<210> 56

<211> 299

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 56

Met Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val
 1 5 10 15

Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu
 20 25 30

Ile Gly Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu
 35 40 45

Gln Glu Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp
 50 55 60

Gly Phe Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val
 65 70 75 80

Val Ile Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp
 85 90 95

Thr Val Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met
 100 105 110

Gly Arg Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val

115 120 125
 Arg Ala Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu
 130 135 140
 Ser Lys Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val
 145 150 155 160
 Asp Ser Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys
 165 170 175
 Val Lys Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn

180 185 190
 Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp
 195 200 205
 Ile Leu Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys
 210 215 220
 Ser Leu Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu
 225 230 235 240
 Glu Ser Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln
 245 250 255

Tyr Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly
 260 265 270
 Ala Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser
 275 280 285
 Thr Gly Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
 290 295

<210> 57

<211> 297

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 57

Met Asp Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp
 1 5 10 15

Gly Leu Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly
 20 25 30

Pro Asp Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu
 35 40 45
 Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe
 50 55 60
 Gly Arg Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile
 65 70 75 80
 Lys Met Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val
 85 90 95
 Glu Ile Asn Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg
 100 105 110
 Asp Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala
 115 120 125
 Thr Ser Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys
 130 135 140
 Leu Pro Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser
 145 150 155 160
 Pro Val Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu
 180 185 190
 Asp Val Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu
 195 200 205
 Arg Ser Met Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu
 210 215 220
 Ala Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Ala Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln
 245 250 255
 His Leu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr
 260 265 270
 Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly
 275 280 285

Lys Thr Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser

290

295

<210> 58

<211> 295

<212> PRT

<213> Cuphea hookeriana

<400> 58

Met Leu Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly Leu

1

5

10

15

Val Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro Asp

20

25

30

Arg Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ser

35

40

45

Leu Asn His Cys Lys Ser Thr Gly Ile Leu Leu Asp Gly Phe Gly Arg

50

55

60

Thr Lys Glu Met Cys Lys Arg Asp Leu Ile Trp Val Val Ile Lys Met

65

70

75

80

Gln Ile Lys Val Asn Arg Tyr Pro Ala Trp Gly Asp Thr Val Glu Ile

85

90

95

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

100

105

110

Leu Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr Ser

115

120

125

Ala Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu Pro

130

135

140

Tyr Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro Val

145

150

155

160

Ile Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr Gly

165

170

175

Asp Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp Val

180

185

190

Asn Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg Ser

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

Arg Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys Thr
275 280 285
Ser Asn Gly Asn Ser Val Ser
290 295

<210> 59
<211> 294
<212> PRT
<213> Cuphea hookeriana
<400> 59

Met Val Asp Ser Phe Gly Leu Glu Ser Gly Val Gln Asp Gly Leu Val
1 5 10 15
Phe Arg Gln Ser Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Pro Asp Arg
20 25 30

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

Thr Arg Phe Ser Arg Leu Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Asp Trp Leu

100 105 110

Ile Ser Asp Cys Asn Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr Ser Ala

115 120 125

Tyr Ala Met Met Asn Gln Lys Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu Pro Tyr

130 135 140

Glu Val His Gln Glu Ile Ala Pro Leu Phe Val Asp Ser Pro Val Ile

145 150 155 160

Glu Val Ser Asp Leu Lys Val His Arg Phe Lys Val Lys Thr Gly Asp

165 170 175

Ser Ile His Lys Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Leu Asp Val Asn

180 185 190

Gln His Val Ser Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Arg Ser Met

195 200 205

Pro Thr Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Glu

210 215 220

Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Glu Ser Val Thr Ala

225 230 235 240

Met Asp Pro Ser Lys Val Gly Ser Arg Ser Gln Tyr Gln His Leu Leu

245 250 255

Arg Leu Glu Asp Gly Thr Ala Ile Val Asn Gly Ala Thr Glu Trp Arg

260 265 270

Pro Lys Asn Ala Gly Ala Asn Gly Ala Arg Ser Thr Gly Lys Thr Ser

275 280 285

Asn Gly Asn Ser Val Ser

290

<210> 60

<211> 987

<212> DNA

<213> Cuphea hookeriana

<400> 60

atgtccccc attggtccc cctgctgaca gctatcacca cgggttttgt taagtcgaaa	60
cggccggaca tgcatgatag aaaaagcaag cgaccagaca tgtagtcga ttctttcgga	120
ttggagagta ctgtacaaga tggccttggt tttcgtcagt cattctccat acgcagctat	180
gaaattggta cagaccgtac cgcgtcgatc gagacgtga tgaaccacct ccaggaaacc	240
tctctgaatc attgcaaaag tactggcatt ttactggatg gttttgggcg cacattggaa	300
atgtgtaaac gggaccttat ctgggttggtc ataaagatgc aaattaaagt gaaccgttac	360
cctgcctggg gagatacggg agagatcaat acccgctttt caagactggg caaaattggt	420
atgggcccag actggctcat aagcgattgc aacactggtg aaatcttagt tcgtgcaaca	480
tccgcttatg cgatgatgaa tcagaagacc cgccggctgt cgaaattgcc gtacgaggtg	540
caccaagaaa ttgtcccat tttcgttgat tctccggtaa tcgaagacag tgatctgaaa	600
gtgcataagt ttaaagtcaa aacggggggac agcattcaga agggattaac ccccggtggt	660
aacgatctgg atgttaatca gcacgtgtca aacgtaaaat atataggttg gattctggag	720
tccatgccta ctgaagtcct ggagacacaa gaattgtgtt cgcttgccct ggaataccgt	780
cgcgagtgcg ggcgtgactc tgtttttagaa agcgtgacgg caatggacct gagtaaagta	840
ggcgttcgct cacagtatca acatctgctc agattggagg acggtaccgc gatttgtaat	900
ggagctactg aatggcgacc aaagaacgcc ggcgcaaatg gtgcgataac cacagggaaa	960
acgagcaacg gcaattcggg ctcttaa	987