



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014941
(43) 공개일자 2015년02월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7033320
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년11월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/041108
- (87) 국제공개번호 WO 2013/173437
국제공개일자 2013년11월21일
- (30) 우선권주장
 61/688,514 2012년05월16일 미국(US)
 61/776,485 2013년03월11일 미국(US)

- (71) 출원인
글리코스 바이오텍놀로지스, 인코포레이티드
미국 텍사스주 77007 휴스턴 레버쿤 스트리트 711
- (72) 발명자
캡웰, 폴
미국 텍사스주 77027 휴스턴 위커샵 레인 3806
브레도우, 세바스찬
미국 텍사스주 77025 휴스턴 웨버튼 트레이스
9502
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주양현

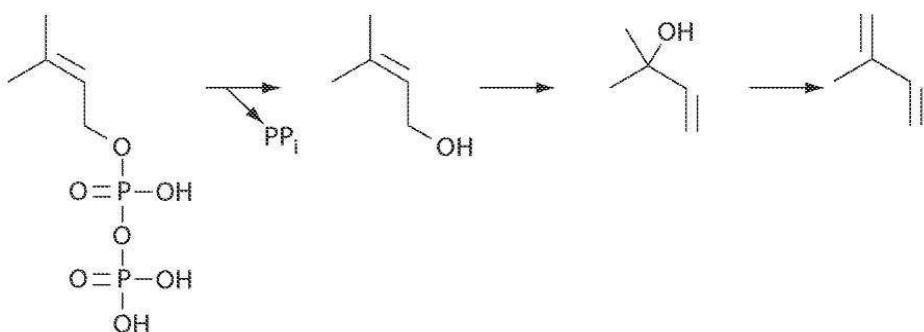
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 아이소프렌의 생산을 위한 미생물유기체 및 방법

(57) 요 약

본 발명은 3-메틸-2-뷰텐-1-올 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터 아이소프렌의 생산을 위한 신규한 생합성 경로를 제공한다. 추가적인 실시형태는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터 아이소프렌을 생산하도록 변형된 비자연적으로 생기는 미생물유기체 및 상기 미생물유기체를 사용하여 아이소프렌을 생산하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

조우, 후아이진

미국 텍사스주 77007 휴스턴 유닛 비 김슨 스트리트 4217

도네스크, 스테파니

미국 텍사스주 77494 케이티 아잘리아 메도우 레인 5119

몬티첼로, 대니얼 제이.

미국 텍사스주 77381 더 우드랜즈 노스 밀 트레이스 152

특허청구의 범위

청구항 1

아이소프렌 생합성 경로를 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체로서, 상기 아이소프렌 생합성 경로는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소; 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소; 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소; 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 아이소프렌 생합성 경로의 적어도 1종의 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하고; 상기 아이소프렌 생합성 경로는 아이소프렌을 생산하는데 충분한 수준에서 발현되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유기체는 메틸에리트리톨 포스페이트 경로의 효소 또는 메발로네이트 경로의 효소로부터 선택된 적어도 1종의 효소를 암호화하는 하나 이상의 내인성 또는 외인성 유전자를 과발현시키는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 3

제2항에 있어서, 아이소프렌으로의 전환을 위해 이용가능한 다이메틸알릴 디아포스페이트는 증가되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소는 포스파타제인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 포스파타제는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) yqkG, 바실러스 서브틸리스 yhfR 또는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) ytgC로부터 유래된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소는 터펜 합성효소(terpene synthase)인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 터펜 합성효소는 계라니올 합성효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 계라니올 합성효소는 오치룸 바실리쿰(*Ocimum basilicum*), 페릴라 시트리오도라(*Perilla citriodora*), 페릴라 프루테스чен스(*Perilla frutescens*) 또는 신나모룸 테누이파일(*Cinnamomum tenuipile*)로부터 유래된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 터펜 합성효소는 파네졸 합성효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 파네졸 합성효소는 제아 메이스(*Zea mays*) 또는 오리자 사티바(*Oryza sativa*)로부터 유래된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 12

제4항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 카스텔라니엘라 데프라그란스(*Castellaniella defragrans*)로부터 유래된 리날룰 탈수효소-이성질체화효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성을 더 포함하는 2작용성 효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 14

제1항에 있어서, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 합성효소, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 환원이성질체화효소(reductoisomerase), 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 합성효소, 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제, 2-C-메틸-D-에리트리톨-2,4-사이클로다이포스페이트 합성효소, 1-하이드록시-2-메틸-2-(E)-뷰테닐-4-다이포스페이트 합성효소, 다이메틸알릴-다이포스페이트/아이소펜테닐-다이포스페이트:NAD(P)⁺ 산화환원효소, 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된 메틸에리트리톨 포스페이트 경로의 적어도 1종의 효소를 암호화하는 하나 이상의 내인성 또는 외인성 유전자를 더 포함하는, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 15

제1항에 있어서, 아세틸-CoA 아세틸전이효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 환원효소, 메발로네이트 키나제, 포스포메발로네이트 키나제, 다이포스포메발로네이트 테카복실라제, 아이소펜테닐-다이포스페이트 이성질체화효소 및 이들의 조합으로부터 선택된 메발로네이트 경로의 적어도 1종의 효소를 암호화하는 하나 이상의 내인성 또는 외인성 유전자를 더 포함하는, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 에스캐리키아 콜라이인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소는 터펜 합성효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 터펜 합성효소는 리날룰 합성효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 리날룰 합성효소는 클라르키아 브레웨리(*Clarkia breweri*), 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 페릴라 세토엔시스(*Perilla setoyensis*), 페릴라 프루테스чен스, 악티니디아 아르구타(*Actinidia arguta*), 악티니디아 폴리가마(*Actinidia polygama*), 아르테메시아 안누아(*Artemesia annua*), 오치룸 바실리쿰 또는 멘타 아쿠아티카(*Mentha aquatica*)로부터 유래된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 터펜 합성효소는 네롤리돌 합성효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 21

제2항에 있어서, 상기 메틸에리트리톨 포스페이트 경로의 적어도 1종의 효소는 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 합성효소, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 환원이성질체화효소, 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 합성효소, 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제, 2-C-메틸-D-에리트리톨-2,4-사이클로다이포스페이트 합성효소, 1-하이드록시-2-메틸-2-(E)-뷰테닐-4-다이포스페이트 합성효소, 다이메틸알릴-다이포

스페이트/아이소펜테닐-다이포스페이트:NAD(P)⁺ 산화환원효소, 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 메틸에리트리톨 포스페이트 경로의 적어도 1종의 효소는 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 합성효소, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 환원이성질체화효소 및 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소로부터 선택된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 23

제2항에 있어서, 상기 메발로네이트 경로의 적어도 1종의 효소는 아세틸-CoA 아세틸전이효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 환원효소, 메발로네이트 키나제, 포스포메발로네이트 키나제, 다이포스포메발로네이트 데카복실라제, 아이소펜테닐-다이포스페이트 이성질체화효소 및 이들의 조합으로부터 선택된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 유기체는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하고, 선택적으로 아이소프렌으로의 전환을 위해 이용 가능한 다이메틸알릴 다이포스페이트는 증가되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 유기체는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하고, 선택적으로 아이소프렌으로의 전환을 위해 이용 가능한 다이메틸알릴 다이포스페이트는 증가되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 26

아이소프렌을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 탄소 공급원의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 탄소 공급원을 함유하는 적합한 배양 배지에서 제24항의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 상기 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하는, 아이소프렌을 생산하는 방법.

청구항 27

아이소프렌을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 탄소 공급원의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 탄소 공급원을 함유하는 적합한 배양 배지에서 제25항의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 상기 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하는, 아이소프렌을 생산하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 다이메틸알릴 다이포스페이트는 상기 유기체에 의해 과발현되고, 메틸에리트리톨 포스페이트 경로 또는 메발로네이트 경로의 적어도 1종의 효소가 상기 유기체에 의해 과발현되는 것인, 아이소프렌을 생산하는 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 다이메틸알릴 다이포스페이트는 상기 유기체에 의해 과발현되고, 메틸에리트리톨 포스페이트 경로 또는 메발로네이트 경로의 적어도 1종의 효소가 상기 유기체에 의해 과발현되는 것인, 아이소프렌을 생산하는 방법.

청구항 30

제20항에 있어서, 상기 네롤리돌 합성효소는 프라가리아 아나나사(*Fragaria ananassa*)로부터 유래된 것인, 비자연적으로 생기는 미생물유기체.

청구항 31

효소 제제로서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소; 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소; 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소; 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 아이소프렌 생합성 경로의 적어도 1종의 효소를 포함하되; 상기 효소 제제는 아이소프렌 생합성 경로의 적어도 하나의 반응을 촉매할 수 있는, 효소 제제.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 효소 제제는 아이소프렌 생합성 경로의 적어도 하나의 정제된 효소를 포함하거나 또는 아이소프렌 생합성 경로의 적어도 1종의 효소를 포함하는 세포 추출물을 포함하는 것인, 효소 제제.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 아이소프렌 생합성 경로는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소에 의한 다이메틸알릴 다이포스 페이트의 3-메틸-2-뷰텐-1-올로의 전환; 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소에 의한 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환; 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 전환을 포함하는 3단계를 포함하는 것인, 효소 제제.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 아이소프렌 생합성 경로는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소에 의한 다이메틸알릴 다이포스 페이트의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환; 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 전환을 포함하는 2단계를 포함하는 것인, 효소 제제.

청구항 35

2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체로서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성을 더 포함하는 2작용성 효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 카스텔라니엘라 데프라그란스로부터 유래된 리날룰 탈수효소-이성질체화효소인 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 39

2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체로서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소는 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현되고, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성을 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성을 둘 다 포함하는 2작용성 효소에 의해 촉매되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성은 리날룰 탈수효소-이성질체화효소에 의해 촉매되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성은 카스텔라니엘라 데프라그란스로부터 유래된 리날룰 탈수효소-이성질체화효소에 의해 촉매되는 것인, 비자연적으로 생기는 미생물 유기체.

청구항 43

아이소프렌을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 적합한 배양 배지에서 제35항 또는 제39항의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 상기 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하는, 아이소프렌을 생산하는 방법.

청구항 44

아이소프렌을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 적합한 배양 배지에서 제39항의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 상기 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하는, 아이소프렌을 생산하는 방법.

명세서**기술분야****관련출원**

[0001] 본 출원은 2013년 3월 11일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/776,485호 및 2012년 5월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/688,514호의 유익을 주장한다. 상기 출원들의 전체 교시 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 아이소프렌의 생산을 위한 비자연적으로 생기는 미생물유기체(microorganism)의 용도에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 개시내용은 상이한 알코올, 특히 3-메틸-2-뷰텐-1-올 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터 아이소프렌의 생산을 가능하게 하는 효소를 발현하도록 변형된 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 현재, 다수의 고부가가치 화학물질 또는 연료는 전형적으로 석유 및 천연 가스를 포함하는 탄화수소로부터의 열화학적 공정에 의해 제조된다. 또한 고부가가치 화학물질은 원유의 유용한 분획으로의 가공 동안 "부산물"로서 생성될 수 있다. 예를 들어, 아이소프렌은 전형적으로 원유 분획의 촉매 접촉분해(catalytic cracking) 동안 생성되었다. 그러나, 최근에 접촉분해 사용자는 원유로부터 천연 가스로 그들의 관심을 돌렸고, 이는 원유에서는 발견되지만, 천연가스에서는 발견되지 않는 4 및 5 탄소쇄 분자의 공급원을 감소시켰다.

[0006] 단쇄 탄소 분자인 아이소프렌은 다양한 화학물질에 대한 유용한 출발 물질이다. 아이소프렌은 더 고부가가치의 중합체 생성을 위한 단량체 또는 공단량체로서 사용될 수 있다. 아이소프렌을 사용하여 생산될 수 있는 화학물질의 예는 폴리아이소프렌, 폴리뷰틸렌, 스타이렌-아이소프렌-스타이렌 블록 공중합체, 및 기타를 포함한다. 아이소프렌을 사용하는 산업의 예는 합성 고무 산업이다.

[0007] 증가하는 수요, 감소하는 공급 및 아이소프렌의 다수 용도를 고려하면, 새로운 아이소프렌 생산 방법이 요망된다. 또한, 에너지 안보, 증가하는 오일 및 천연가스 가격, 및 지구 온난화 문제가 확대됨에 따라, 화학물질 생산 산업은 환경적으로 우호적인 실행을 사용하여 비재생 공급원료로부터 만들어진 화학물질을 재생 공급원료로

부터 생산된 화학물질로 대체하는 방법을 추구하고 있다.

[0008] 아이소프렌의 생물학적 생산은 1950년대 이후로 연구되었다(Sharkey, T.D. 2009. The Future of Isoprene Research. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci. 3: 106-113). 다수의 상이한 유기체가 아이소프렌을 방출하는 것으로 알려져 있지만, 지금까지 아이소프렌 생산을 위한 생화학적 경로는 소수의 식물 종에서만 밝혀졌다. 식물에서, 아이소프렌은 업록체 또는 다른 색소체에서 다이메틸알릴 다이포스페이트(또한 본 명세서에서 아이소프렌 합성효소에 의한 단일 단계에서 다이메틸알릴 파이로포스페이트(DMAPP)로서 지칭되고, 색소체 표적화 신호 서열에 의해 색소체로 향하는 핵으로 암호화된 효소임)로부터 생산되는 것으로 나타난다. 아이소프렌 합성효소는 일반적으로, 전형적으로 1밀리몰 이상인 높은 미카엘리스-멘텐 상수(Michaelis-Menten constant)(K_m)를 가지며, 따라서 효율적으로 작용하기 위해 고농도의 다이메틸알릴 다이포스페이트를 필요로 한다.

[0009] 아이소프렌을 자연적으로 생산하는 미생물(microbe)은 당업계에 공지되어 있지만(Kuzma, J., Nemecek-Marshall, M., Pollock, W.H., and R. Fall. 1995. Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. Curr. Microbiol. 30: 97-103; Wagner, W.P., Nemecek-Marshall, M., and R. Fall. 1999. Three distinct phases of isoprene formation during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Bact. 181: 4700-4703; Fall, R. and S.D. Copley. 2000. Bacterial sources and sinks of isoprene, a reactive atmospheric hydrocarbon. Env. Microbiol. 2: 123-130; Xue, J., and B.K. Ahring. 2011. Enhancing isoprene production by the genetic modification of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway in *Bacillus subtilis*. Appl. Env. Microbiol. 77: 2399-2405), 아이소프렌 생산의 메커니즘은 공지되어 있지 않고, 아이소프렌 생산 수준은 상대적으로 낮다. 몇몇 비자연적으로 생기는 미생물유기체는 아이소프렌을 생산하도록 유전자조작되되(예를 들어, 미국 특허 출원 제12/335,071호), 아이소프렌 생산은 아이소프렌 합성효소를 필요로 한다. 아이소프렌 합성효소의 효율적 작용을 위해, 다이메틸알릴 다이포스페이트의 높은 세포내 수준이 필요하지만; 그러나, 고수준의 세포내 다이메틸알릴 다이포스페이트는 또한 세포에 대해 독성이어서, 성장을 저연시키고, 아이소프렌 생산 속도 및 수율을 감소시킨다(Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. and J.D. Keasling. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nature Biotech. 21: 796-802; Withers, S.T., Gottlieb, S.S., Lieu, B., Newman, J.D., and J.D. Keasling. 2007. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. Appl. Env. Microbiol. 73: 6277-7283; Sivy, T. L., Fall, R., and T.N. Rosentiel. 2011. Evidence of isoprenoid precursor toxicity in *Bacillus subtilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 2376-2383). 아이소프렌 합성효소에 의한 DMAPP의 아이소프렌으로의 직접적인 화학적 전환과 관련된 문제는 상업적으로 적절한 양의 아이소프렌의 생물학적 생성을 위한 가능성을 제한한다.

[0010] 따라서, 아이소프렌의 더 효율적인 생물학적 생산을 위한 미생물유기체 및 방법에 대한 필요가 있다.

발명의 내용

[0011] 본 발명의 실시형태는 일반적으로 효소, 비자연적으로 생기는 미생물유기체, 및 아이소프렌의 생산방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 실시형태는 생합성 아이소프렌 경로를 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체(microbial organism), 즉, 미생물유기체를 제공한다. 미생물유기체는 생합성 경로의 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다. 효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소이고, 생합성 경로는 아이소프렌을 생산하기 위한 충분한 수준에서 발현된다. 생합성 경로는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소를 추가로 포함할 수 있다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소는 또한 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성을 갖는 2작용성 효소의 부분일 수 있다. 이러한 2작용성 효소의 예는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소이다. 미생물유기체는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소를 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 다른 실시형태에서, 생합성 아이소프렌 경로를 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물유기체가 제공되되, 미생물 유기체는 생합성 아이소프렌 경로의 효소, 즉, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다. 경로는 추가로 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소를 포함하고, 경로는 아이소프렌을 생산하기 위한 충분한 수준에서 발현된다.

[0014] 일 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소를 암호화하는 적어도 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물유기체를 제공하되, 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소는 아이소프렌을 생산하기 위한 충분량에서 발현되고, 상기 아이소프렌 생합성 경로는 3-메틸-2-뷰텐-1-올

합성효소, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소, 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 포함한다.

[0015] 다른 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소를 암호화하는 적어도 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물유기체를 제공하되, 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소는 아이소프렌을 생산하기 위한 충분량에서 발현되고, 상기 아이소프렌 생합성 경로는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 포함한다.

[0016] 추가적인 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌을 생산하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소를 암호화하는 적어도 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하되, 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소는 탄소 공급원을 함유하는 적합한 배양 배지에서 비자연적으로 생기는 미생물유기체가 탄소 공급원의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 아이소프렌을 생산하기 위한 충분량에서 발현된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 따라서 본 개시내용의 상기 인용된 특징이 상세하게는 발명의 상세한 설명, 간략하게는 상기 발명의 내용에서 이해될 수 있는 방식은 실시형태를 참조로 할 수 있으며, 이 중 일부는 첨부하는 도면에서 도시된다. 그러나, 첨부하는 도면은 단지 본 발명의 전형적인 실시형태를 도시하고, 따라서 본 발명의 범주의 제한으로서 고려되어서는 안 되며, 본 발명에 대해 다른 동등하게 효과적인 실시형태에 대한 용인일 수도 있다는 것을 주목하여야 한다.

도 1은 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소, 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 포함하는 아이소프렌 생합성 경로를 도시한 도면.

도 2는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 포함하는 아이소프렌 생합성 경로를 도시한 도면.

도 3은 카스텔라니엘라 데프라그란스(*Castellaniella defragrans*) 균주 65Phen의 리날룰 탈수효소 이성질체화효소에 대해, 인공 리보솜 결합 부위 및 아미노-말단 6-히스티딘 에피토프 태그를 포함하는 이콜라이(*E coli*)-코돈-최적화 핵산 서열(서열번호 1)을 도시한 도면.

도 4는 딸기 알코올 아실전이효소에 대해 인공 리보솜 결합 부위 및 아미노-말단의 6-히스티딘 에피토프 태그를 포함하는, 이콜라이-코돈-최적화 핵산 서열(서열번호 2)을 도시한 도면.

도 5는 루리아 베르타니(*Luria Bertani*) 브로스 중에 용해시킨 1mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스(headspace)의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 3-메틸-2-뷰텐-1-올이며, 체류 시간은 3.96분이다.

도 6은 100 μ g/ml 암페실린으로 보충한 루리아 베르타니 브로스 중의 1mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올에 대해 밤새 배양 시킨 플라스미드 pJ404-LDI를 보유하는 이콜라이 균주 BL21을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 3-메틸-2-뷰텐-1-올이고, 체류 시간은 3.96분이다. 피크 2는 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 2.96분이다. 피크 3은 아이소프렌이고, 체류 시간은 2.49분이다.

도 7은 루리아 베르타니 브로스 중에 용해시킨 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 2.96분이다.

도 8은 100 μ g/ml 암페실린으로 보충한 루리아 베르타니 브로스 중에 용해시킨 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올에 대해 밤새 배양 시킨 플라스미드 pJ404-LDI를 보유하는 이콜라이 균주 BL21을 함유하는 20밀리리터 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 2.96분이다. 피크 2는 아이소프렌이고, 체류 시간은 2.49분이다.

도 9는 진정한 아이소프렌의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 10은 피크의 아이소프렌과의 동일성을 확인하는, 실시예 1로부터의 2.49분에 피크의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 11은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) *yhfR* 유전자에 대해 인공 리보솜 결합 부위를 포함하는, 이콜라이-코돈-최적화 핵산 서열(서열번호 3)을 도시한 도면.

도 12는 딸기로부터의 FaNES1 및 혈마토코쿠스 플루비알리스(*H. pluvialis*)로부터의 *idi*를 암호화하는 합성 오

폐론에 대해, 서브클로닝을 위해 인공 결합 부위 및 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는, 이콜라이-코돈-최적화 뉴클레오타이드 서열(서열번호 4)을 도시한 도면.

도 13은 류리아 베르타니 브로스 중에 용해시킨 1mM 리날룰을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 리날룰이고, 체류 시간은 8.8분이다.

도 14는 리날룰을 검출하기 위해 사용한 것과 동일한 칼럼 조건 하에 류리아 베르타니 브로스 중에 용해시킨 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 4.8분이다.

도 15는 50 μ g/ml 카나마이신 및 100 μ M IPTG로 보충한 류리아 베르타니 브로스에서 24시간 동안 배양시킨 플라스미드 pJ401-NES1-idi를 보유하는 이콜라이 BL21을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 리날룰이고, 체류 시간은 8.8분이다. 피크 2는 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 4.8분이다. 4.75분에 피크는 2-뷰타논으로서 확인되었다.

도 16은 100 μ g/ml 암피실린 및 100 μ M IPTG로 보충한 류리아 베르타니 브로스에서 24시간 동안 배양시킨 플라스미드 pJ404-SAAT를 함유하는 이콜라이 BL21을 함유하는 20ml 바이알의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올에 대응하는 피크는 없다. 4.75분에 피크는 2-뷰타논으로서 확인되었다.

도 17은 진정한 리날룰의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 18은 피크의 리날룰과의 동일성을 확인하는, 도 15로부터의 8.8분에 피크의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 19는 진정한 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 20은 피크의 2-메틸-3-뷰텐-2-올과의 동일성을 확인하는, 도 15로부터의 4.9분에 피크의 GC/MS 분석 결과를 도시한 도면.

도 21은 플라스미드 pGA31R-mcs의 DNA 서열(서열번호 5)을 도시한 도면.

도 22는 플라스미드 pGS31R-mcs의 DNA 서열(서열번호 6)을 도시한 도면.

도 23은 후속 클로닝 단계에서 사용되는 함입된 리보솜 결합 부위 및 측첩 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는, 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*) ATCC 700802의 *mvaE* 및 *mvaS* 유전자의 이콜라이-코돈-최적화 서열(서열번호 7)을 도시한 도면.

도 24는 후속 클로닝 단계에서 사용되는 함입된 리보솜 결합 부위 및 측첩 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는, 메타노칼도코커스 잔나스키(*Methanocaldococcus jannaschii*)의 메발로네이트 키나제 유전자, 엔테로코커스 페칼리스 ATCC 700802의 포스포메발로네이트 키나제 유전자, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C의 메발로네이트 다이포스페이트 테카복실라제 유전자, 및 이콜라이 MG1655의 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소 유전자를 암호화하는 합성 오페론의 이콜라이-코돈-최적화 서열(서열번호 8)을 도시한 도면.

도 25는 플라스미드 pGB1026의 생산을 위한 클로닝 전략을 도시한 도면.

도 26은 플라스미드 pGB1033의 생산을 위한 클로닝 전략을 도시한 도면.

도 27은 플라스미드 pGB1036의 생산을 위한 클로닝 전략을 도시한 도면.

도 28은 50 μ g/ml 카나마이신, 20 μ g/ml 클로람페니콜, 및 200 μ g/ml 안하이드로테트라사이클린으로 보충한 류리아 베르타니 브로스에서 24시간 동안 배양시킨 플라스미드 pJ401-NES1-idi 및 pGB1036을 보유하는 이콜라이 BL21을 함유하는 20ml 바이알의 헤드스페이스의 1ml 샘플의 기체 크로마토그램을 도시한 도면. 피크 1은 리날룰이고, 체류 시간은 8.8분이다. 피크 2는 2-메틸-3-뷰텐-2-올이고, 체류 시간은 4.8분이다. 4.75분에 피크는 2-뷰타논으로서 확인하였다.

도 29는 600 나노미터에서의 흡광도에서 측정한 세포밀도; 발효 브로스에서 2-메틸-3-뷰텐-2-올 농도(mM); 및 0 내지 48시간의 일정한 시간에 걸쳐 온라인 질량 스펙트럼에 의해 측정한 바와 같은 발효 오프가스의 아이소프렌 함량의 그래프를 도시한 도면.

도 30은 600 나노미터에서의 흡광도에서 측정한 세포밀도; 발효 브로스에서 2-메틸-3-뷰텐-2-올 농도(mM); 및 0 내지 48시간의 일정한 시간에 걸쳐 온라인 질량 스펙트럼에 의해 측정한 바와 같은 발효 오프가스의 아이소프렌

함량의 그래프를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

앞서 언급한 일반적 설명 및 다음의 상세한 설명은 단지 예시적이고, 설명적이며, 청구된 바와 같은 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 출원에서, 단수의 사용은 복수를 포함하며, 단수의 단어는 "적어도 하나"를 의미하고, "또는"의 사용은 달리 구체적으로 언급되지 않는다면 "및/또는"을 의미한다. 더 나아가, 용어 "포함하는"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함되다"의 사용은 제한되지 않는다. 또는, "구성요소" 또는 "성분"과 같은 용어는 달리 구체적으로 언급되지 않는다면, 하나의 단위를 포함하는 구성요소 또는 성분 및 하나 이상의 단위를 포함하는 구성요소 또는 성분을 포함한다.

[0019]

본 명세서에 사용된 표제 부문은 단지 조직적 목적을 위한 것이며, 기재되는 대상의 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 특히, 특허출원, 기사, 교재 및 논문을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 본 출원에 인용된 모든 문헌 또는 문헌의 일부는 그들의 전문이 임의의 목적을 위하여 본 명세서에 참조로 명백하게 포함된다. 포함되는 문헌 및 유사한 재료 중 하나 이상이 본 출원의 해당 용어의 정의와 모순되는 방식으로 용어를 정의하는 경우, 본 출원으로 조정한다.

[0020]

본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "비자연적으로 생기는"은 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물유기체와 관련하여 사용될 때 미생물 유기체가 참조로 된 종의 야생형 균주를 포함하는, 참조로 된 종의 자연적으로 생기는 균주에서 자연적으로 발현되지 않는 적어도 하나의 유전적 변경을 가지는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 유전적 변경은, 예를 들어, 대사적 폴리펩타이드를 암호화하는 발현가능한 핵산을 도입하는 변형, 다른 핵산 부가, 핵산 결실 및/또는 미생물 유전 물질의 다른 기능적 파괴를 포함한다. 이러한 변형은, 예를 들어 참조로 된 종에 대해 이종성, 상동성 또는 이종성과 상동성 폴리펩타이드 둘 다에 대한 암호 영역 및 이들의 기능성 단편을 포함한다. 추가적인 변형은, 예를 들어, 변형이 유전자 또는 오페론의 발현을 변경시키는 비암호 조절 영역을 포함한다. 예시적인 대사 폴리펩타이드는 글라이세롤 이화(dissimilation) 또는 아이소프렌 생합성 경로 내에서 효소 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에서 정의되는 바와 같은, "아이소프렌 생합성 경로"는, 예를 들어, 유기체에 의한, 즉, 생물학적으로 아이소프렌의 생산에 연루된 일련의 하나 이상의 효소 또는 활성인 경로를 포함하되, 해당 효소 또는 활성 중 하나 이상은 유기체에 대해 외인성이다.

[0021]

대사적 변형은 그의 자연적으로 생기는 상태로부터 변경된 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비자연적으로 생기는 미생물유기체는 대사적 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 또는, 이들의 기능적 단편에 대한 유전적 변형을 가질 수 있다. 예시적인 대사적 변형이 본 명세서에 개시된다.

[0022]

본 명세서에 사용되는 바와 같은, 미생물 유기체에 관련하여 사용될 때 용어 "단리된"은 참조되는 미생물 유기체가 천연에서 발견되더라도, 적어도 하나의 성분이 실질적으로 없는 유기체를 의미하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 미생물유기체가 그의 천연 환경에서 발견된다고 해도, 일부 또는 모든 성분이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 상기 용어는 또한 미생물 유기체가 비자연적으로 생기는 환경에서 발견된다고 해도, 일부 또는 모든 성분이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 따라서, 단리된 미생물 유기체는 그것이 천연에서 발견되거나 또는 비자연적으로 생기는 환경에서 성장되거나, 저장되거나 또는 존속된다고 해도, 다른 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된다. 단리된 미생물 유기체의 구체적 예는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비자연적으로 생기는 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0023]

본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "미생물", "미생물", "미생물 유기체" 또는 "미생물유기체"는 고세균, 박테리아 또는 진핵생물류의 범위 내에 포함되는 미시적 세포로서 존재하는 임의의 유기체를 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, 용어는 원핵 또는 진핵 세포 또는 미시적 크기를 갖는 유기체를 포함하는 것으로 의도되며, 모든 종의 박테리아, 고세균 및 진정세균뿐만 아니라 진핵 미생물유기체, 예컨대 효모 및 진균을 포함한다. 상기 용어는 또한 생화학적 물질의 생산을 위해 배양될 수 있는 임의의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0024]

본 명세서에 사용되는 바와 같은 "외인성"은 참조되는 분자 또는 참조되는 활성이 숙주 미생물 유기체 내로 도입되는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 분자는, 예를 들어 암호화 핵산의 숙주 유전물질 내로 도입에 의해, 예컨대 숙주 염색체 내로 도입에 의해 또는 플라스미드와 같은 비염색체 유전물질로서 도입될 수 있다. 따라서, 암호화 핵산의 발현에 관해 사용되는 바와 같은 상기 용어는 발현가능한 형태에서의 암호화 핵산의 미생물 유기체 내로 도입을 지칭한다. 생합성 활성에 대해 사용될 때, 상기 용어는 숙주 기준 유기체 내로 도입되는 활성을 지칭한다. 공급원은, 예를 들어 숙주 미생물 유기체 내로 도입 후 참조되는 활성을 발현시키는 상동성 또는 이종성 암호화 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 참조되는 분자 또는 활성을 지칭한다.

유사하게, 암호화 핵산의 발현에 대해 사용될 때, 상기 용어는 미생물 유기체 내에 함유된 암호화 핵산의 발현을 지칭한다. 용어 "이종성"은 참조되는 종이 아닌 공급원으로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭하는 반면, "상동성"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 암호화 핵산의 외인성 발현은 이종성 또는 상동성 암호화 핵산 중 하나 또는 둘 다를 이용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체는 안정한 유전적 변경을 함유할 수 있는데, 변경의 손실 없이 5 세대 초과 동안 배양될 수 있는 미생물 유기체를 지칭한다. 일반적으로, 안정한 유전적 변경은 10세대 초과로 지속되는 변형이며, 구체적으로 안정한 변형은 약 25세대 초과로 지속될 것이고, 더 구체적으로는, 안정한 유전적 변형은 무기한을 포함하여 50세대 초과일 것이다.

[0026] 당업자는 본 명세서에 예시된 대사적 변형을 포함하는 유전적 변경이 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 적합한 숙주 유기체 및 그들의 대응하는 대사 반응 또는 원하는 대사 경로를 위한 유전자와 같은 원하는 유전 물질에 대한 적합한 공급원 유기체에 관하여 기재된다는 것을 이해할 것이다. 그러나, 매우 다양한 유기체의 완전한 게놈 시퀀싱 및 고수준의 유전체학 분야 기술을 고려하면, 당업자는 본질적으로 모든 다른 유기체에 대해 제공된 교시 및 가이드를 용이하게 적용할 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 예시된 이콜라이 대사 변경은 참조되는 종이 아닌 종으로부터 동일 또는 유사한 암호화 핵산을 함입시킴으로써 다른 종에 용이하게 적용될 수 있다. 이러한 유전적 변경은 일반적으로, 예를 들어 종 상동체의 유전적 변경, 및 특히, 오솔로그, 파라로그 또는 비-오솔로그 유전자 변위를 포함한다.

[0027] 오솔로그는 수직적 혈통(vertical descent)에 의해 관련되면서 상이한 유기체에서 실질적으로 동일 또는 동등한 기능을 초래하는 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들어, 마우스 애폴사이드 가수분해효소 및 인간 애폴사이드 가수분해효소는 애폴사이드의 가수분해의 생물학적 기능을 위해 오솔로그로 고려될 수 있다. 유전자는, 예를 들어 그들이 상동성이라는 것을 표시하는데 충분한 양의 서열 유사성을 공유할 때, 수직적 혈통에 의해 관련되거나, 또는 공통 조상으로부터의 진화에 의해 관련된다. 유전자는 또한, 그들이 암호화하는 단백질이, 서열 유사성에 필수적이지는 않지만 주된 서열 유사성이 식별가능하지 않은 정도로 그들이 공통 조상으로부터 진화되었다는 것을 나타내는데 충분한 양의 3차원 구조를 공유한다면, 오솔로그로 고려될 수 있다. 오솔로그인 유전자는 약 25% 내지 100% 아미노산 서열 동일성의 서열 유사성을 지니는 단백질을 암호화할 수 있다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질을 암호화하는 유전자는 그의 3차원 구조가 또한 유사성을 나타낸다면, 수직적 혈통에 의해 생기는 것으로 또한 고려될 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성제 및 엘라스타제를 포함하는, 효소의 세린 프로테아제 패밀리의 구성원은 공통 조상으로부터의 수직적 혈통에 의해 생기는 것으로 고려된다.

[0028] 오솔로그는, 예를 들어 진화를 통해, 구조 또는 전반적인 활성에서 벗어난 유전자 또는 그의 암호화된 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 하나의 종이 2가지 기능을 나타내는 유전자를 암호화하는 경우, 그리고 이러한 기능이 제2 종에서 별개의 유전자로 분리된 경우, 3가지 유전자 및 그들의 대응하는 산물은 오솔로그인 것으로 고려된다. 생화학적 생성물의 생산에 대해, 당업자는 도입되거나 또는 파괴되는 대사적 활성을 보유하는 오솔로그 유전자가 비자연적으로 생기는 미생물 유기체의 구성을 위해 선택되어야 한다는 것을 이해할 것이다. 별개의 활성을 나타내는 오솔로그의 예는 별개의 활성이 2 이상의 종 간에 또는 단일 종 내에서 별개의 유전자 산물로 분리되는 경우이다. 구체적 예는 2가지 유형의 세린 프로테아제 활성인 엘라스타제 단백질분해와 플라스미노겐 단백질분해의 플라스미노겐 활성제 및 엘라스타제와 별개 분자로의 분리이다. 제2 예는 마이코플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제 및 초파리 DNA 중합효소 III 활성의 분리이다. 제1 종으로부터의 DNA 중합효소는 제2 종으로부터의 엑소뉴클레아제 또는 중합효소 중 하나 또는 둘 다에 대해 오솔로그로 고려될 수 있으며, 반대의 경우도 고려된다.

[0029] 대조적으로, 파라로그는 구조 또는 혈통과 관련된 상동체이지만, 상이한 기능을 한다. 이들은, 예를 들어 유전자의 복제 다음에 진화적 분기(evolutionary)에 의해 일어나서 유사하거나 또는 흔하지만, 동일하지 않은 기능을 지니는 단백질을 생산할 수 있다. 파라로그는 동일한 종으로부터 또는 상이한 종으로부터 비롯되거나 또는 유래될 수 있다. 예를 들어, 마이크로솜 애폴사이드 가수분해효소(애폴사이드 가수분해효소 I) 및 가용성 애폴사이드 가수분해효소(애폴사이드 가수분해효소 II)는 파라로그로 고려될 수 있는데, 그들이 공통 조상으로부터 공동 진화되고, 별개의 반응을 촉매하며 동일한 종에서 별개의 기능을 갖는 2가지 별개의 효소를 나타내기 때문이다. 파라로그는 서로 상당한 서열 유사성을 지니는 동일 종으로부터의 단백질인데, 이는 그들이 상동성이거나, 또는 공통 조상으로부터 공동 진화를 통해 관련된다는 것을 시사한다. 파라로그 단백질 패밀리의 그룹은 HipA 상동체, 루시퍼라제 유전자, 웹티다제, 및 기타를 포함한다.

[0030] 비-오솔로그 유전자 변위는 상이한 종에서 참조되는 유전자 기능을 치환할 수 있는 하나의 종으로부터의 비-오

솔로그 유전자이다. 치환은, 예를 들어 상이한 종에서의 참조되는 기능에 비해 본래 종에서 실질적으로 동일 또는 유사한 기능을 수행할 수 있는 것을 포함한다. 일반적으로, 비-오솔로그 유전자 변위는 참조되는 기능을 암호화하는 알려진 유전자와 구조적으로 관련되기 때문에 식별가능할 것이지만, 덜 구조적으로 관련되지만 기능적으로 유사한 유전자 및 그의 대응하는 유전자 산물은 그럼에도 불구하고 여전히 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어의 의미 내에 속할 것이다. 기능적 유사성은 치환될 것으로 추구되는 기능을 암호화하는 유전자에 비해 비-오솔로그 유전자 산물의 활성 부위 또는 결합 영역에서 적어도 일부의 구조적 유사성을 필요로 한다. 따라서, 비-오솔로그 유전자의 예는 파라로그 또는 관련없는 유전자를 포함한다.

[0031] 따라서, 아이소프렌 생합성 경로를 갖는 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 동정하고 구성함에 있어서, 당업자는 특정 종에 대해 본 명세서에 제공되는 교시 및 가이드를 적용하여 대사적 변형의 동정이 오솔로그의 동정 및 포함 또는 불활성화를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 파라로그 및/또는 비-오솔로그 유전자 변위가 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사적 반응을 촉매하는 효소를 암호화하는 참조되는 미생물유기체에서 존재하는 정도로, 당업자는 또한 이를 진화적으로 관련된 유전자를 이용할 수 있다. 오솔로그, 파라로그 및 비-오솔로그 유전자 변위는 당업자에게 잘 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 본 명세서에서 정의되는 바와 같은, 유기체"로부터 유래된" 것으로 기재되거나 또는 특허청구된 효소 또는 유전자는 임의의 상동체, 파라고그, 실질적으로 유사한 활성을 가지는 비-오솔로그 유전자 변위를 포함한다.

[0032] 본 명세서에 개시된 미생물유기체를 배양하거나 또는 만들기 위해 이용되는 방법 및 기법은 미생물학 및 재조합 DNA 기법에서 훈련받은 당업자에게 공지되어 있다. 미생물유기체(예를 들어, 박테리아 세포)를 성장시키는 것, 단리된 DNA분자를 숙주 세포내로 수송하는 것, 단리시키는 것, 단리된 핵산 분자를 클로닝하며 시퀀싱하는 것, 특이적 유전자의 발현을 낸아웃시키는 것 등을 위한 방법 및 기법은 이러한 기법 및 방법의 예이다. 이들 방법은 본 명세서에 전문이 포함되는 표준 문헌의 다수 항목에 기재되어 있다: "Basic Methods In Molecular Biology" (Davis, et al., eds. McGraw-Hill Professional, Columbus, OH, 1986); Miller, "Experiments in Molecular Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972); Miller, "A Short Course in Bacterial Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1992); Singer and Berg, "Genes and Genomes" (University Science Books, Mill Valley, CA, 1991); "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed. (Sambrook, et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); "Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine" (Kaufman, et al., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1995); "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (Glick and Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1993); 및 Smith-Kearny, "Molecular Genetics of Escherichia coli" (The Guilford Press, New York, NY, 1989).

[0033] 아이소프렌 합성효소 효소에 의한 다이메틸알릴 디아포스페이트의 아이소프렌으로 직접적인 전환은 당업계에 공지되어 있지만, 본 발명자는 아이소프렌이 또한 카스텔라니엘라 데프라그란스 균주 65Phen으로부터 단리된 효소인 리날룰 탈수효소-이성질체화효소(실시예 1 및 실시예 2 및 도 6 및 8)를 사용하여 2종의 상이한 알코올, 즉, 3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터 생산될 수 있다는 것을 나타내었다. 일부 예에서, 산소가 없을 때 아이소프렌을 생산하는 것이 바람직할 수 있는데, 아이소프렌과 산소의 다양한 혼합물은 가연성일 수 있기 때문이다. 리날룰 탈수효소-이성질체화효소는 또한 저산소 또는 무산소 조건에서 외인성 2-메틸-3-뷰텐-2-올 또는 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 아이소프렌으로 효소적 전환을 위한 생체촉매 및 방법을 발생시킨다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 사용하는 외인성 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환이 수행될 수 있거나(실시예 9), 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 함유하는 효소 제제를 사용하는 전환이 수행될 수 있다(실시예 7). 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 사용하는 외인성 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환이 수행될 수 있거나(실시예 10), 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 함유하는 효소 제제를 사용하는 전환이 수행될 수 있다 (실시예 8).

[0034] 일 실시형태에서, 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하여, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현된다. 일 실시형태에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성을 추가로 포함하는 2작용성 효소이다. 일 실시형태에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소이다. 일 실시형태에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 카스텔라니엘라 데프라그란스로부터 유래된 리날룰 탈수효소-이성질체화효소이다.

[0035] 일 실시형태에서, 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하되, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소는 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현되고, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키기 위한 충분한 수준에서 발현된다. 일 실시형태에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성을 둘 다 포함하는 2작용성 효소에 의해 촉매된다. 일 실시형태에서 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성은 리날룰 탈수효소-이성질체화효소에 의해 촉매된다. 일 실시형태에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성은 카스텔라니엘라 데프라그란스로부터 유래된 리날룰 탈수효소-이성질체화효소에 의해 촉매된다.

[0036] 일 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌을 생산하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환시키는 조건 하에 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 적합한 배양 배지에서 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌을 생산하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환하는 조건 하에 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 적합한 배양 배지에서 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계, 및 선택적으로 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함한다.

[0037] 리날룰 탈수효소-이성질체화효소는 2 또는 3 단계에 의해 DMAP의 아이소프렌으로의 전환을 위한 신규한 생합성 경로를 발생시킨다. 2 단계 아이소프렌 생합성 경로에서, 다이메틸알릴 디아포스페이트는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소와 같은 효소에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환된 다음, 2-메틸-3-뷰텐-2-올이 아이소프렌으로 전환된다. 3 단계 아이소프렌 생합성 경로에서, 다이메틸알릴 디아포스페이트는 다이메틸알릴 디아포스페이트를 3-메틸-2-뷰텐-1-올로 전환시킬 수 있는 포스파타제 또는 터펜 합성효소(terpene synthase)에 의해 3-메틸-2-뷰텐-1-올로 전환되고, 3-메틸-2-뷰텐-1-올은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환되며, 2-메틸-3-뷰텐-2-올은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의해 아이소프렌으로 전환된다. 실시예 1 및 실시예 2에서 입증되는 바와 같이, 카스텔라니엘라 데프라그란스 리날룰 탈수효소-이성질체화효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소와 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 둘 다로서 작용한다.

[0038] 3단계 아이소프렌 생합성 경로와 2단계 아이소프렌 생합성 경로는 둘 다 검출가능한 양으로 아이소프렌을 생산하기 위한 충분한 수준에서 발현된다. 아이소프렌은, 예를 들어 기체 크로마토그래피/질량 스펙트럼에 의해 검출되고 특성규명될 수 있다.

[0039] 3단계 아이소프렌 생합성 경로

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 효소 명칭은 다음과 같이 정의된다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 전환을 촉매하는 효소이다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소는 다이메틸알릴 디아포스페이트의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환을 촉매하는 효소이다. 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소 또는 프레놀 합성효소는 다이메틸알릴 디아포스페이트의 본 명세서에서 또한 프레놀로서 지칭되는 3-메틸-2-뷰텐-1-올로의 전환을 촉매하는 효소이다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소는 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 이성질체화를 촉매하는 효소이다.

[0041] 본 발명의 일 실시형태에서, 아이소프렌 생합성 경로의 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유하는 비자연적으로 생기는 미생물유기체는 3 단계에서 다이메틸알릴 디아포스페이트를 아이소프렌으로 전환시킨다(본 명세서에 사용되는 바와 같은, "3단계 아이소프렌 생합성 경로," 도 1). 제1 단계에서, 다이메틸알릴 디아포스페이트는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소에 의해 3-메틸-2-뷰텐-1-올로 전환된다. 제2 단계에서, 3-메틸-2-뷰텐-1-올은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환된다. 제3 단계에서, 2-메틸-3-뷰텐-2-올은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의해 아이소프렌으로 전환된다.

[0042] 3 단계에서 다이메틸알릴 디아포스페이트의 아이소프렌으로의 전환을 위한 자연적으로 생기는 미생물유기체의 바람직한 실시형태에서, 제1 단계는 3-메틸-2-뷰텐-1-올 합성효소에 의해 촉매되며, 제2 및 제3 단계는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성을 둘 다 지니는 단일의 2작용성 효소에 의해 촉매된다.

[0043]

다이메틸알릴 디아포스페이트의 3-메틸-2-뷰텐-1-올(프레놀)로의 전환은 포스파타제에 의해 촉매될 수 있다. 이러한 포스파타제의 예는, 다른 공지된 포스파타제 및 예측되는 포스파타제 활성을 지니는 암호 서열, 예를 들어 이콜라이의 *ytjC* 유전자가 사용될 수도 있지만, 바실러스 서브틸리스 유전자 *yqkG(nudF)* 및 *yhfR*에 의해 암호화된 효소를 포함한다(Withers, S.T., Gottlieb, S.S., Lieu, B., Newman, J.D. and J.D. Keasling. 2007. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. Appl. Env. Microbiol. 73: 6277-6283). 이하의 표 1은 다이메틸알릴 디아포스페이트의 프레놀로의 전환에서 사용을 위한 포스파타제의 예를 제공한다.

표 1

[0044]

좌위	젠햄크 등록번호	유기체
BAA12639(YqkG)	BAA12639	바실러스 서브틸리스
CAA74541(YhfR)	CAA74541	바실러스 서브틸리스 아종 서브틸리스 균주 168
GPMB_ECOLI	POA7A2	에스케리키아 콜라이 K-12
		송아지 창자 알칼린 포스파타제
		새우 알칼린 포스파타제

[0045]

다이메틸알릴 디아포스페이트의 3-메틸-2-뷰텐-1-올로의 전환은, 예를 들어 터펜 합성효소, 예를 들어, 게라니올 합성효소 또는 파네졸 합성효소 또는 이들의 돌연변이체에 의해 촉매될 수 있다. 이하의 표 2는 다이메틸알릴 디아포스페이트의 3-메틸-2-뷰텐-1-올로의 전환에서 사용을 위한 터펜 합성효소의 예를 제공한다.

표 2

[0046]

좌위	젠햄크 등록번호	유기체
게라니올 합성효소		
AAR11765	AAR11765	오치룸 바실리쿰(<i>Ocimum basilicum</i>)
ABB30216	ABB30216	페릴라 시트리오도라(<i>Perilla citriodora</i>)
ABB30217	ABB30217	페릴라 시트리오도라
ABB30218	ABB30218	페릴라 프루테스чен스(<i>Perilla frutescens</i>)
CAE52821	CAE52821	신나모룸 테누이파일(<i>Cinnamomum tenuipile</i>)
파네솔 합성효소		
ACSS_MAIZE	Q84ZW8	제아 메이스(<i>Zea mays</i>)
ABJ16554	ABJ16554	오리자 사티바(<i>Oryza sativa</i>)

[0047]

3-메틸-2-뷰텐-1-올은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 이성질체화된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소는 가역적 반응에서 3-메틸-2-뷰텐-1-올(프레놀)을 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환시키는 효소이다. 이러한 효소의 예는 젠햄크 등록번호 FR669447인 카스텔라니엘라 데프라그란스 균주 65Phen의 리날룰 탈수효소-이성질체화효소이다. 이 효소는 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 이성질체화 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 탈수를 촉매한다(이하의 실시예 1, 및 도 6). 리날룰 탈수효소-이성질체화효소의 오솔로그, 파라로그 및 비-오솔로그 유전자 변위는 당업자에게 잘 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0048]

본 명세서에 사용되는 바와 같은, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키는 효소이다. 이러한 효소의 예는 젠햄크 등록번호 FR669447인 카스텔라니엘라 데프라그란스 균주 65Phen의 리날룰 탈수효소-이성질체화효소이다. 이 효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 탈수를 촉매할 수 있다(이하의 실시예 2, 및 도 8). 리날룰 탈수효소-이성질체화효소의 오솔로그, 파라로그 및 비-오솔로그 유전자 변위는 당업자에게 잘 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 2가지 폴리펩타이드에 대한 핵산 또는 아미노산 서열의 검사는 비교되는 서열 간의 서열 동일성 및 유사성을 나타낼 것이다. 이러한 유사성에 기반하여, 당업자는 단백질이 공통 조상으로부터의 진화를 통해 관련된다는 것을 나타내기에 유사성이 충분히 높은지 여부를 결정할 수 있다. 당업자에게 잘 공지된 알고리즘, 예컨대 Align, BLAST, Clustal W 및 기타는 원 서열 유사성 또는 동일성을 비교하고 결정하며, 또한 가중치 또는 스코어를 부여할 수 있는 서열 내 갭의 존재 또는 유의도를 결정한다. 이러한 알고리즘은 또한 당업계에 공지되어 있으며, 뉴클레오파이드 서열 유사성 또는 동일성을 결정하기 위해 유사하게 적용 가능하다. 관련성을 결정하기 위한 충분한 유사성에 대한 파라미터는 통계학

적 유사성을 계산하기 위한 잘 공지된 방법, 또는 무작위 폴리펩타이드에서 유사한 매치를 찾는 기회, 및 결정된 매치의 유의도에 기반한다. 2 이상의 서열의 컴퓨터 비교는 또한, 원한다면 당업자에 의해 시각적으로 최적화될 수 있다. 관련된 유전자 산물 또는 단백질은 높은 유사성, 예를 들어, 25% 내지 100% 서열 동일성을 갖는 것으로 예상될 수 있다. 관련없는 단백질은 충분한 크기의 데이터베이스가 스캔된다면(약 5%), 우연히 생기는 것으로 예상되는 것과 본질적으로 동일한 동일성을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열은 비교되던 서열이 관련된다고 결론내리기에 충분한 상동성을 나타낼 수도 있고, 또는 나타내지 않을 수도 있다. 데이터 세트의 크기를 고려하여 이러한 매치의 유의도를 결정하는 추가적인 통계학적 분석을 수행하여 이를 서열의 관련성을 결정할 수 있다.

[0049]

BLAST 알고리즘을 사용하여 2 이상의 서열의 관련성을 결정하기 위한 예시적인 파라미터는, 예를 들어 이하에 제시될 수 있다. 간략하게는, 아미노산 서열 정렬은 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 다음의 파라미터를 사용하여 수행될 수 있다: 매트릭스: 0 BLOSUM62; 캡 오픈: 11; 캡 익스텐션: 1; x_dropoff: 50; 예상치: 10.0; 단어 크기: 3; 필터: 켜짐. BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 다음의 파라미터를 사용하여 핵산 서열 정렬이 수행될 수 있다: 매치: 1; 미스매치: -2; 캡 오픈: 5; 캡 익스텐션: 2; x_dropoff: 50; 예상치: 10.0; 단어 크기: 11; 필터: 꺼짐. 당업자는 비교의 엄격함을 증가시키거나 또는 감소시키기 위해, 예를 들어 2 이상의 서열의 관련성을 결정하기 위해, 상기 파라미터에 대한 변형이 만들어질 수 있다는 것을 알 것이다.

[0050]

2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 효소 활성을 또한 리아퀸콜라 테르티아리카르보니스(*Aquincola tertiaricarbonis*)에서 확인되었다(Schuster, J., Schäfer, F., Hübner, N., Brandt, A., Rosell, M., Härtig, C., Harms, h., Müller, R. H. and T. Rohwerder. 2012. Bacterial degradation of *tert*-amyl alcohol proceeds via hemiterpene 2-methyl-3-buten-2-ol by employing the tertiary alcohol desaturase function of the Rieske nonheme mononuclear iron oxygenase MdpJ. *J. Bact.* 194: 972-981). 이 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소의 서열은 보고된 적이 없었다.

[0051]

2단계 아이소프렌 생합성 경로

[0052]

다른 실시형태에서, 아이소프렌 생합성 경로의 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유하는 비자연적으로 생기는 미생물유기체는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소(MBO 합성효소) 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의해 촉매되는 2단계에서 다이메틸알릴 다이포스페이트를 아이소프렌으로 전환시킨다(본 명세서에 사용되는 바와 같은 "2단계 아이소프렌 생합성 경로", 도 2).

[0053]

본 명세서에 사용되는 바와 같은, 다이메틸알릴 다이포스페이트를 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환시키는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 합성효소의 예는 일부 식물 색소체에서, 특히 엽록체에서 발견되는 자연적으로 생기는 폴리펩타이드, 및 다이메틸알릴 다이포스페이트를 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 자연적으로 전환시키는 폴리펩타이드의 유도체(돌연변이체)이다. MBO 합성효소는 폴리펩타이드를 엽록체로 보내는 아미노-말단의 색소체 표적화 서열을 부분적으로 특징으로 한다. 엽록체로 전좌(translocation) 시, 수송 웨بت아이드는 폴리펩타이드로부터 절단되어 전구체 단백질보다 분자량이 더 적은 성숙 단백질을 수득할 수 있다. 미생물 유기체에서 외인성 MBO 합성효소의 과발현에 대해, 전구체 형태보다는 천연에서 발견되는 성숙 형태와 비슷한 절단된 MBO 합성효소를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 본질적으로, 수송 웨بت아이드를 암호화하는 서열은 MBO 합성효소 암호 서열로부터 제거된다. 아이소프렌 합성효소 암호 서열을 절단하는 곳을 선택하기 위해 당업자에게 시각적 검사가 허용될 수도 있지만, 컴퓨터-기반 알고리즘, 예컨대 ChloroP 1.1은 임의의 아미노산이 수송 웨بت아이드에 속하는지를 예측하게 하는데 사용될 수 있다(Emanuelsson, O., Nielsen, H., G. von Heijne. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8: 978-984). MBO 합성효소의 예는 피누스 사비니아나(*Pinus sabiniana*)에서 발견되며, 이는 젠뱅크 등록번호 AEB53064.1이다.

[0054]

다이메틸알릴 다이포스페이트의 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환은, 예를 들어 터펜 합성효소, 예를 들어, 리날룰 합성효소(예를 들어, E.C. No. 4.2.3.25 또는 4.2.3.26) 또는 네롤리돌 합성효소 또는 이들의 돌연변이체에 의해 촉매될 수 있다. 이하의 표 3은 다이메틸알릴 다이포스페이트를 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환에서 사용을 위한 터펜 합성효소의 예를 제공한다.

표 3

좌위	젠향크 등록번호	유기체
S-리날룰 합성효소		
LIS_CLABR	Q96376	클라르키아 브레웨리(<i>Clarkia breweri</i>)
LINS_ARATH	Q84UV0	아라비돕시스 탈리아나(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
COKWV3_9LAMI	COKWV3	페릴라 세토엔시스(<i>Perilla setoyensis</i>)
COKWV5_PERFR	COKWV5	페릴라 프루테스챈스 변종 히르텔라(<i>Perilla setoyensis var. hirtella</i>)
COKWV7_PERFR	COKWV7	페릴라 프루테스챈스 변종 히르텔라
D4N3A0_9ERIC	D4N3A0	악티니디아 아르구타(<i>Actinidia arguta</i>)
D4N3A1_9ERIC	D4N3A1	악티니디아 폴리가마(<i>Actinidia polygama</i>)
R-리날룰 합성효소		
LLOS1_ARTAN	Q9SPN0	아르테메시아 안누아(<i>Artemesia annua</i>)
LLOS_OCIBA	Q5SBP3	오치룸 바실리쿰
LLOS5_ARTAN	Q9SPN1	아르테메시아 안누아
LLOS_MENAQ	Q8H2B4	멘타 아쿠아티카(<i>Mentha aquatica</i>)
Q1XBU5_SOLLC	Q1XBU5	솔라눔 리코페르시쿰(<i>Solanum lycopersicum</i>)
(3S, 6E)-네롤리돌 합성효소		
Q5UB06_MEDTR	Q5UB06	메티카고 트룬쿨라타(<i>Medicago trunculata</i>)
F8TWD1_POPTR	F8TWD1	포풀러스 트리코카파(<i>Populus trichocarpa</i>)
NES1_FRAVE	POCV96	푸라가리아 베스카(<i>Fragaria vesca</i>)
NES1_FRAAN	POCV94	프라가리아 아나나사(<i>Fragaria ananassa</i>)
NES2_FRAAN	POCV95	프라가리아 아나나사

[0056] 다이메틸알릴 디아포스페이트를 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 전환시키는 터펜 합성효소의 용도의 예는 실시예 3에서 발견된다.

[0057] 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로의 전환은 상기 기재한 바와 같은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소에 의해 촉매될 수 있다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성과 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성 둘 다를 지니는 2작용성 효소, 예컨대, 위에서 기재한 리날룰 탈수효소-이성질체화효소 일 수 있거나, 또는 상기 효소는 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소 활성 없이 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소 활성만을 암호화할 수 있다.

[0058] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 2단계 아이소프렌 생합성 경로 또는 3단계 아이소프렌 생합성 경로 중 하나에 의한 아이소프렌으로의 전환에 이용가능한 다이메틸알릴 디아포스페이트는 하나 이상의 내인성 유전자의 과발현 또는 메틸에리트리톨 포스페이트 경로의 효소: 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 합성효소, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 환원이성질체화효소(reductoisomerase), 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 합성효소, 4-다이포스포사이티딜-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제, 2-C-메틸-D-에리트리톨-2,4-사이클로다이포스페이트 합성효소, 1-하이드록시-2-메틸-2-(E)-뷰테닐-4-다이포스페이트 합성효소, 다이메틸알릴-다이포스페이트/아이소펜테닐-다이포스페이트:NAD(P)⁺ 산화환원효소, 또는 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자의 발현에 의해 증가될 수 있다. 예를 들어, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 합성효소, 1-데옥시-D-자일루로스-5-포스페이트 환원이성질체화효소, 및 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소를 암호화하는 외인성 유전자의 발현은 증가된 수준의 다이메틸알릴 디아포스페이트를 초래할 수 있고, 2단계 아이소프렌 생합성 경로 또는 3단계 아이소프렌 생합성 경로 중 하나와 함께 발현될 때, 증가된 수율의 아이소프렌을 초래한다.

[0059] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 2단계 아이소프렌 생합성 경로 또는 3단계 아이소프렌 생합성 경로 중 하나에 의한 아이소프렌으로의 전환에 이용가능한 다이메틸알릴 디아포스페이트는 아세틸-CoA 아세틸전이효소(또한 티올라제로서 알려짐), 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 환원효소, 메발로네이트 키나제, 포스포메발로네이트 키나제, 디아포스포메발로네이트 데카복실라제, 및 아이소펜

테닐 디아포스페이트 이성질체화효소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 메발로네이트 경로의 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자의 발현에 의해 증가될 수 있다. 메발로네이트 경로를 암호화하는 외인성 유전자의 과발현의 한 가지 예는 실시예 4에 기재된다.

[0060] 추가적인 실시형태에서, 본 발명은 아이소프렌을 생산하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소를 암호화하는 적어도 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체를 배양시키는 단계 및 아이소프렌을 회수하는 단계를 포함하되, 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 효소는 비자연적으로 생기는 미생물 유기체가 탄소 공급원의 적어도 일부를 아이소프렌으로 전환하는 조건 하에 탄소 공급원을 함유하는 적합한 배양 배지에서 아이소프렌을 생산하는데 충분한 양으로 발현된다. 탄소 공급원은 글라이세롤, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 또는 이들의 혼합물; 다이메틸알릴 디아포스페이트, 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 또는 2-메틸-3-뷰텐-2-올이거나 또는 이들을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 탄소 공급원은 글라이세롤, 글루코스 또는 셀룰로스 바이오매스 처리로부터 유래된 당이거나 또는 이들을 포함한다. 아이소프렌은 이하의 예에 기재된 바와 같이 회수될 수 있다.

[0061] 다른 추가적인 실시형태에서, 효소 제제는 본 발명에 따른 아이소프렌의 생산을 위해, 전체 세포(예를 들어, 본 발명의 비자연적으로 생기는 미생물 유기체) 제조 대신에 또는 추가로 사용될 수 있다. 효소 제제는 본 발명에 대응하는 효소를 포함하는 정제된 효소 및/또는 세포 추출물을 포함한다. 이러한 효소 제제는 본 발명에 따른 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 반응을 촉매할 수 있다. 일 실시형태에서, 효소 제제는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3단계 경로를 통해 아이소프렌을 생산할 수 있는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서 효소 제제는 본 명세서에 기재된 바와 같은 2 단계 경로를 통해 아이소프렌을 생산할 수 있는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 전체 세포와 효소 제제의 조합은 본 발명에 따른 아이소프렌의 생산을 촉매하기 위해 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 실시형태의 다음의 예에서, 보통의 이콜라이 균주 BL21이 예를 위해 사용될 수 있다. BL21(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies, Inc.)) 세포는 전기천공적격(electrocompetent)으로 만들어졌고, 세포를 전기천공적격으로 만드는 것에 있어서 염이 없는 LB를 사용하여 배양물을 성장시킨 것을 제외하고, 마이크로펄서 전기천공 장치 작동 설명서 및 적용 가이드(MicroPulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide)(바이오래드(Bio-Rad) 카탈로그 번호 165-2100)로부터의 프로토콜에 따라 전기천공시켰다.

[0063] 실시예 1

[0064] 3-메틸-2-뷰텐-1-올로부터 아이소프렌 생산을 위한 미생물유기체

[0065] 이 작업에는 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 외인성 유전자를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 3-메틸-2-뷰텐-1-올로부터의 아이소프렌 생산을 나타낸다.

[0066] 카스텔라니엘라 테프라그란스 균주 65Phen의 리날룰 탈수효소-이성질체화효소(LDI)의 이콜라이-코돈-최적화 서열(서열번호 1)을 사용하여 DNA2.0(캘리포니아주 먼로파크에 소재)에 의해 플라스미드 pJ404-LDI를 구성하였다. 이콜라이에서 발현을 위해 LDI 암호 서열을 코돈-최적화시키고, 합성하며 플라스미드 발현 벡터 pJexpress404 내로 삽입하였다. 얻어진 플라스미드인 pJ404-LDI를 이콜라이 BL21 전기천공적격 세포 내로 전기천공시켰다.

[0067] 딸기 아실-CoA 전이효소(SAAT)의 코돈-최적화 서열(서열번호 2)을 사용하여 DNA2.0(캘리포니아주 먼로파크에 소재)에 의해 플라스미드 pJ404-SAAT를 구성하였다. 이콜라이에서 발현을 위해 SAAT 암호 서열을 코돈-최적화시키고, 합성하며 플라스미드 발현 벡터 pJexpress404 내로 삽입하였다. 얻어진 플라스미드인 pJ404-SAAT를 이콜라이 BL21 전기천공적격 세포 내로 전기천공시켰다. pJ404-SAAT를 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0068] pJ404-LDI 또는 pJ404-SAAT 중 하나를 보유하는 BL21의 형질전환체를 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 루리아-베르타니(LB)-한천 플레이트(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립톤(Bacto Tryptone), 10g/l 염화나트륨, 15g/l 박토 한천(Bacto Agar)) 상에서 선택하였다.

[0069] LB-한천 플레이트로부터의 pJ404-LDI 또는 pJ404-SAAT를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 125ml 삼각 플라스크 중에 함유된 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 10ml의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립톤, 10g/l 염화나트륨)를 접종하였다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 600nm에서 광학밀도 0.16에 대해 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 얻어진 배양물을 회석시켰다. 50ml의 회석시킨 배양물을 300ml 삼각 플라스크에 넣었고, 600nm에서 광학밀도가 0.6에 도달될 때까지, 전형적으로 90분까지 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 인큐베이션시켰다. 이어

서 4mℓ의 얻어진 배양물을 20mℓ 기체 크로마토그래피 헤드스페이스 바이알 내로 넣었다. 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 최종 농도 1mM로 첨가하고, IPTG(아이소프로필 β-D-1-티오갈락토파라노사이드)를 0.1mM까지 첨가하여, 이 배양물을 진탕시키면서 37℃에서 추가 16시간 동안 성장시켰다.

[0070]

CTC-PAL 오토샘플러 및 FID를 구비한 애질런트(Agilent) 7890A GC 상에서 헤드스페이스 분석을 사용하여 아이소프렌을 측정하였다. 헤드스페이스 바이알(20mℓ)을 500rpm에서 2분 동안 교반시키면서 50℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1mℓ의 헤드스페이스를 50℃에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 20:1)에 주사하였다. 300℃에서 설정한 FID 검출기를 사용하여 샘플을 분석하였는 바, 이때 헬륨 운반 기체는 DB-624 30m x 530μm x 3μm 칼럼(제이엔더블유 사이언티픽(J&W Scientific))을 통해 유속이 2mℓ/분이며, 오븐 프로그램은 85℃에서 5.25분 동안이었다. 샘플 중의 아이소프렌 농도를 동일한 GC/FID 방법 하에서 분석한 아이소프렌 캘리브레이션 기체 표준으로부터 만든 캘리브레이션 곡선으로부터 계산하였다. 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 헤드스페이스 GC/MS에 의해 아이소프렌 생산물을 또한 확인하였다. 헤드스페이스 바이알을 600rpm에서 5분 동안 교반시키면서 85℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1mℓ의 헤드스페이스를 85℃에서 가열한 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 25:1)에 주사하였다. GC/MS 방법은 HP-5MS 30m x 250μm x 0.25μm 칼럼(제이엔더블유 사이언티픽)을 통해 1mℓ/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 35℃에서 4분 동안이며, 이어서 25℃/분으로 150℃까지 증가시키고, MS 공급 온도는 230℃, 및 사중극자(quadrupole) 온도는 150℃였다. 질량분석계를 스캔 모드 25 내지 160 질량 단위에서 작동시켰다. 아이소프렌 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해서뿐만 아니라 진정한 샘플에 대한 비교에 의해 확인하였다(아이소프렌 135ppm, 전식 질소 기체 중의 이산화탄소 135ppm, 텍사스주 휴斯顿에 소재한 메티슨 트라이가스(Matheson TRIGAS)).

[0071]

CTC-PAL 오토샘플러 및 FID를 구비한 애질런트 7890A GC 상에서 헤드스페이스 분석을 사용하여 3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 측정하였다. 헤드스페이스 바이알(20mℓ)을 85℃에서 인큐베이션시키고, 600rpm에서 5분 동안 교반시켰다. 이어서, 85℃에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 1mℓ의 헤드스페이스를 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 25:1) 내로 주사하였다. 350℃에서 설정한 FID 검출기를 사용하여 샘플을 분석하였는 바, 이때, 헬륨 운반기체 유속은 DB-624 30 m x 530μm x 3μm 칼럼(제이엔더블유 사이언티픽)을 통해 3mℓ/분이고, 오븐 프로그램은 90℃이며, 이어서, 20℃/분으로 230℃까지 3분 동안 증가시켰다. 샘플 중의 3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 농도를 동일한 GC/FID 방법 하에 분석한 각각의 화합물의 회석 표준으로부터 작성한 캘리브레이션 곡선으로부터 계산하였다.

[0072]

이 실시예의 결과를 도 5 및 도 6에 제시한다. 이콜라이 세포없이 1mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 LB 브로스는 3.96분에 피크를 나타내었는데, 이는 3-메틸-2-뷰텐-1-올에 대응한다(도 5). 유사하게, pJ404-SAAT를 보유하는 BL21 세포와 함께 1mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 배양물은 3.96분에 피크를 나타내는데, 이는 3-메틸-2-뷰텐-1-올에 대응하고, 추가적인 피크는 알데하이드 3-메틸-2-뷰텐-1-알(프레날, 데이터 미제시)에 대응한다. 대조적으로, pJ404-LDI를 보유하는 BL21 세포와 함께 1mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 함유하는 배양물은 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 및 아이소프렌으로 전환시켰으며, 이들은 각각 2.96분 및 2.49분에서의 피크에 대응한다. 이는 pJ404-LDI를 보유하는 이콜라이 세포가 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 이성질체화되고, 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 탈수시킨다는 것을 입증한다. 도 9는 진정한 아이소프렌 샘플의 GC/MS 분석을 제시하며; 도 10은 2.49분의 체류 시간을 지니는 피크의 GC/MS 분석을 제시하고, 진정한 아이소프렌과 동일한 단편화 패턴을 도 9에 나타낸다.

[0073]

실시예 2

[0074]

2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터 아이소프렌의 생산을 위한 미생물유기체

[0075]

이 작업에는 아이소프렌 생합성 경로의 하나 이상의 외인성 유전자를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터의 아이소프렌의 생산을 나타낸다.

[0076]

LB-한천 플레이트으로부터의 pJ404-LDI 또는 pJ404-SAAT를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 125mℓ 삼각 플라스크에 함유된 100μg/mℓ 암피실린을 함유하는 10mℓ의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립톤, 10g/l 염화나트륨)를 접종하였다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 600nm에서 광학밀도 0.16에 대해 100μg/mℓ 암피실린을 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 배양물을 회석시켰다. 50mℓ의 회석시킨 배양물을 300mℓ 삼각 플라스크에 넣었고, 600nm에서 광학밀도가 0.6에 도달될 때까지, 전형적으로 90분까지 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 4mℓ의 배양물을 20mℓ 기체 크로마토그래피 헤드스페이스 바이알 내로 넣었다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 최종 농도 1mM로 첨가

하였다. IPTG(아이소프로필 β -D-1-티오갈락토파라노사이드)를 0.1mM까지 첨가하였다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 배양물을 전탕시키면서 37°C에서 추가 16시간 동안 성장시켰다.

[0077] 아이소프렌, 3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 상기와 같이 측정하였다. 또한 아이소프렌 피크의 동일성을 실시예 1에서 상기 기재한 바와 같이 GC/MS를 사용하여 확인하였다.

[0078] 본 실시예의 결과를 도 7 및 도 8에서 제시한다. 이콜라이 세포를 생략하고 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 함유하는 LB 브로스는 2.96분에 피크를 나타내었는데, 이는 2-메틸-3-뷰텐-2-올에 대응한다(도 7). 유사하게, 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 pJ404-SAAT를 보유하는 BL21 세포를 함유하는 배양물은 2.96분에 피크를 나타내었는데, 이는 2-메틸-3-뷰텐-2-올(데이터 미제시)에 대응한다. 대조적으로, 1mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올, 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 전환시키는 pJ404-LDI를 보유하는 BL21 세포를 함유하는 배양물은 2.49분에서의 피크에 대응한다. 이는 pJ404-LDI를 보유하는 이콜라이 세포가 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 탈수시킨다는 것을 입증한다.

[0079] 실시예 3

[0080] FaNES1은 2-메틸-3-뷰텐-2-올 FROM 다이메틸알릴 다이포스페이트의 형성을 촉매한다

[0081] 이 작업예는 외인성 터펜 합성효소인 프라가리아 아나나사의 (3S,6E)-네롤리돌 합성효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 다이메틸알릴 다이포스페이트로부터의 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 생산을 나타낸다.

[0082] 플라스미드 pJ401-NES1-idi를 프라가리아 아나나사의 (3S,6E)-네롤리돌 합성효소인 *FaNES1*(젠햄크 등록번호 POCV94; Aharoni, A., Giri, A. P., Verstappen, F. W. A., Berteau, C. M., Sevenier, R., Sun, Z., Jongsma, M. A., Schwab, W. and H. J. Bouwmeester. 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. The Plant Cell 16: 3110 – 3131) 및 헤마토코쿠스 플루비알리스의 코돈-최적화 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소 유전자인 *idi*의 코돈-최적화를 사용하여 DNA2.0(캘리포니아주 먼로 파크에 소재)에 의해 구성하였다. 이콜라이에서 발현을 위해 *FaNES1*와 *idi* 암호 서열을 둘 다 코돈-최적화시키고, 합성하며 플라스미드 발현 벡터 pJexpress401 내로 삽입하였다. 얻어진 플라스미드인 pJ401-NES1-idi를 이콜라이 BL21 전기천공적격 세포 내로 전기천공시켰다. 서브클로닝을 위해 인공 리보솜 결합 부위 및 측접 제한 엔도뉴클레아제를 포함하는 코돈-최적화 서열(서열번호 4)을 도 12에 제공한다.

[0083] 네롤리돌, 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 생산을 다음과 같이 분석하였다. LB-한천 플레이트로부터 플라스미드 pJ401-NES1-idi를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 50 μ g/ml 카나마이신을 함유하는 10ml의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨)에 접종하였다. 플라스크를 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 50 μ g/ml 카나마이신 및 0.1mM IPTG를 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 배양물을 회석시켜서 600nm에서 0.4 내지 0.5에서 초기 세포 밀도를 수득하였다. 4ml의 회석시킨 배양물을 20ml GC 바이알 내로 넣고, 진탕시키면서 30°C에서 6 또는 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 6 또는 24시간에, 헤드스페이스 기체를 GC/MS-SIM에 의해 분석하였다.

[0084] 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 Select Ion Mode (SIM)에서 헤드스페이스 GC/MS에 의해 샘플을 분석하였다. 헤드스페이스 바이알(20ml)을 85°C에서 인큐베이션시키고, 600rpm에서 5분 동안 교반하였다. 이어서, 85°C에서 가열한 헤드스페이스 주사기를 사용하여 1ml의 헤드스페이스를 제거하고, GC 주입구(250°C, 분할 25:1) 내로 주사하였다. VF-624MS 60m x 250 μ m x 1.4 μ m 칼럼(제이앤더블유 사이언티픽)을 통해 1.5ml/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 90°C에서 1분 동안이며, 이어서 25°C/분으로 230°C까지 5분 동안 증가시켰다. 질량분석계를 SIM 모드에서 작동시켰다. MS 공급 온도는 230°C이고, 사중극자 온도는 150°C이며, 용매 지연은 3.55분이었다. 각 분석물의 캘리브레이션 곡선으로부터 표적 분석물의 농도를 결정하였다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올, 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 3-메틸-2-뷰텐알, 및 리날룰에 대한 캘리브레이션 표준을 농도 1, 10, 및 100ppm에서 10ml의 탈이온수 중에서 준비하였다. 각각의 캘리브레이션 표준에 대한 헤드스페이스를 동일한 GC/MS-SIM 방법을 사용하여 분석하였다. 아이소프렌을 14, 135 및 1375ppm에서 공인 가스 표준으로부터 캘리브레이션하였다. 캘리브레이션 곡선에 대한 선형 상관계수는 모든 불순물 성분에 대해 0.99 이상이었다. 도 13은 GC/MS-SIM 조건 하에 획득한 진정한 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 도 14는 GC/MS-SIM 조건 하에 획득한 진정한 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 기체 크로마토그램을 나타낸다.

[0085] 본 실시예의 결과를 도 15에 제시한다. pJ401-NES1-idi를 보유하는 BL21 세포는 1.47mg/l 리날룰(8.8분에서의 피크에 대응함) 및 0.05mg/l 2-메틸-3-뷰텐-2-올(4.8분에서의 피크에 대응함)을 생산하였다. 이는 pJ401-NES1-

idi를 보유하는 이콜라이 세포가 리날룰에 추가로 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 생산한다는 것을 입증한다. 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올에 대응하는 피크는 유사한 조건 하에 성장시킨 pJ404-SAAT를 보유하는 BL21의 대조군 배양물이 없다(도 16). 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해 확인하였다. 리날룰(도 17 및 도 18) 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올(도 19 및 도 20)에 대한 피크를 또한 진정한 샘플에 대한 체류 시간과 이온 단편화 패턴의 비교에 의해 확인하였다.

[0086] 실시예 4

[0087] FaNES1에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올 생산을 개선시키기 위한 메발로네이트 경로의 과발현

[0088] 이 작업에는 외인성 터펜 합성효소인 프라가리아 아나나사의 (3S,6E)-네롤리돌 합성효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터의 다이메틸알릴 다이포스페이트의 생산이 2-메틸-3-뷰텐-2-올로의 전환을 위해 이용가능한 다이메틸알릴 다이포스페이트의 풀을 증가시키는 이종성 메발로네이트 경로의 과발현에 의해 향상될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0089] 이종성 메발로네이트 경로를 다음과 같이 플라스미드인 pGB1036 상에서 구성하였다.

[0090] 플라스미드 pGA31R-MCS를 DNA합성에 의해 완전히 구성하였으며, 뉴클레오타이드 서열(서열번호 5)을 도 21에 제시한다.

[0091] 표준 클로닝 기법을 사용하여 pGA31R-MCS 상의 p15A 복제기점을 AvrII/SacI 단편으로서 저-복제(low-copy) pSC101 기점으로 대체함으로써 플라스미드 pGS31R-MCS를 구성하였다. 뉴클레오타이드 서열(서열번호 6)을 도 22에 제공한다.

[0092] 엔테로코커스 폐칼리스 ATCC 700802의 *mvaE* 및 *mvaS* 유전자의 코돈-최적화 서열(서열번호 7)을 사용하여 플라스미드 pJ248-*mvaES*를 구성하였다(*mvaE* 및 *mvaS*의 코돈-최적화 서열을 도 23에서 제시함). 엔테로코커스 폐칼리스 ATCC 700802의 *mvaE* 및 *mvaS* 유전자를 코돈-최적화시키고, 합성하며 플라스미드 pJ248 내로 삽입하였다. 플라스미드 구성에서 사용을 위한 측집 엔도뉴클레아제 제한 부위와 마찬가지로, 독특한 리보솜 결합 부위를 각 유전자 앞에 포함시켰다.

[0093] 코돈-최적화 합성 오폐론을 함유하는 플라스미드 pJ241-MK.PMK.MPD.IDI를 전적으로 DNA 합성에 의해 구성하였으며, 뉴클레오타이드 서열(서열번호 8)을 도 24에 제시한다. 이콜라이에서 발현을 위해 코돈-최적화된 합성 오폐론의 서열은 후속 클로닝 단계에서 사용되는 함입된 리보솜 결합 부위 및 측집 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는, 메타노칼도코커스 잔나스키의 메발로네이트 키나제 유전자, 엔테로코커스 폐칼리스 ATCC 700802의 포스포메발로네이트 키나제, 사카로마이세스 세레비시애 S288C의 메발로네이트 다이포스페이트 데카복실라제, 및 이콜라이 MG1655의 아이소펜테닐 다이포스페이트 이성질체화효소 유전자를 암호화한다.

[0094] 표준 클로닝 기법을 사용하여 KpnI/MluI DNA 단편으로서 pJ248-*mvaES*로부터의 최적화된 *mvaES* 유전자를 pGA31R-MCS 내로 클로닝함으로써 플라스미드 pGB1008을 구성하였다.

[0095] 플라스미드 pGB1026, pGB1026에 대한 클로닝 전략을 도 25에 제시한다. 이콜라이의 *pntAB* 유전자를 암호화하는 대략 3,000 염기쌍 PCR 산물을 pGB1008의 MluI 부위에 삽입함으로써 플라스미드 pGB1026을 구성하였다. *pntAB* 유전자를 암호화하는 PCR 산물을 다음의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 함께 AccuPrime Pfx 중합효소를 사용하여 MG1655의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다:

[0096] 프라이머 1: 5'- CCG TAA CTA AAC GCG AAG GGA ATA TCA TGC GAA TTG G - 3'(서열번호 9)

[0097] 프라이머 2: 5'- CTA GAG ATC TAC GCG TCA GGG TTA CAG AGC TTT C - 3'(서열번호 10)

[0098] 프라이머 1은 *pntA*의 시작 코돈 앞에 리보솜 결합 부위를 함입시킨다. 프라이머 1 및 2는 또한 인-퓨전 어드벤티지 PCR 클로닝 키트(In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit)(클론텍(Clontech))에 의한 사용을 위한 적절한 벡터-중첩 5' 서열을 포함한다. 제한 엔도뉴클레아제 MluI에 의해 선형화된 pGB1008에서와 같이, PCR 산물을 겔-정제하였다. 제조업자의 지시에 따라서, 인-퓨전 클로닝 키트 및 GC5 적격 세포를 사용하여 단편을 함께 방향이 있게 결합시켰다. 형질전환체를 선별하고, 제한 엔도뉴클레아제-분해 플라스미드 DNA의 아가로스 겔 전기영동을 통해 적절한 플라스미드를 확인하였다.

[0099] 플라스미드 pGB1033을 다음의 방법을 통해 만들었고, 도 26에서 도시한다. pGB1026을 제한 엔도뉴클레아제 NcoI 및 SphI로 분해시키고; 얻어진 8.3kb 단편을 겔 정제시켰다. pGB1026의 제2 알리퀴트를 제한 엔도뉴클레아제 MluI 및 SphI로 분해시키고; 얻어진 1.4kb 단편을 겔 정제시켰다. 플라스미드 pJ241-MK.PMK.MPD.IDI를 제한 엔

도뉴클레아제 NcoI 및 MluI로 분해시키고; 합성 오페론을 함유하는 얻어진 4.1kb를 젤 정제시켰다. NEB 쿼 결찰 키트(NEB Quick Ligation Kit)(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))를 사용하여 3분자 결찰 반응에서 단편을 함께 결찰시키고, GC5 적격 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 선별하고, 적절한 플라스미드를 제한 엔도뉴클레아제-분해 플라스미드 DNA의 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[0100] 도 27에서 도시하는 바와 같이, 표준 클로닝 기법을 사용하여 BamHI/AvrII DNA 단편으로서 pGS31R-MCS 내로 프로모터 및 종결자가 완전한 pGB1033으로부터의 2개 오페론을 클로닝함으로써 플라스미드 pGB1036을 구성하였다. NEB 쿼 결찰 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스)를 사용하여 단편을 함께 결찰시키고, GC5 적격 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 선별하고, 적절한 플라스미드를 제한 엔도뉴클레아제-분해 플라스미드 DNA의 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[0101] 플라스미드 pGB1036 및 pJ401-NES1-idi를 전기천공법에 의해 이콜라이 BL21 전기천공적격 세포 내로 공동 형질전환시켰다.

[0102] 네롤리돌, 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 생산을 다음과 같이 분석하였다. LB-한천 플레이트로부터 플라스미드 pJ401-NES1-idi 및 pGB1036을 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 50 μ g/ml 카나마이신 및 37 μ g/ml 클로람페니콜을 함유하는 10ml의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨)를 접종시켰다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 50 μ g/ml 카나마이신, 20 μ g/ml 클로람페니콜, 200 μ g/ml 안하이드로테트라사이클린, 및 0.1mM IPTG를 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 배양물을 희석시켜서 600nm에서 초기 세포 밀도 0.4 내지 0.5를 수득하였다. 4ml의 희석 배양물을 20ml GC 바이알에 넣었고, 진탕시키면서 30°C에서 6 또는 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 6 또는 24시간에, 실시예 3에 기재한 바와 같이 헤드스페이스 기체를 GC/MS-SIM에 의해 분석하였다.

[0103] 이 실시예의 결과를 도 28에 제시한다. pJ401-NES1-idi 및 pGB1036을 보유하는 BL21 세포는 대략 4.05mg/l 리날룰(8.8분에서의 피크에 대응함) 및 0.38mg/l 2-메틸-3-뷰텐-2-올(4.8분에서의 피크에 대응함)을 생산하였다. 이는 pJ401-NES1-idi 및 pGB1036을 보유하는 이콜라이 세포가 pJ401-NES1-idi만을 보유하는 세포보다 7배 더 많은 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 생산한다는 것을 입증한다.

[0104] 실시예 5

[0105] 2-메틸-3-뷰텐-2-올 비에 대해 리날리올을 변경시키는 FaNES1 돌연변이

[0106] 이 작업에는 FaNES1 내로 돌연변이의 도입은 생산되는 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 양과 비교하여 생산되는 리날룰의 양을 변경시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0107] 부위 지정 돌연변이유발 또는 완전한 유전자 합성을 사용하여 특이적 아미노산 치환을 야생형 FaNES1 아미노산 서열 내로 도입하였다. 표 4는 돌연변이체 효소 및 관련된 돌연변이의 명칭을 제시한다. 표 4 및 본 실시예에 제시하는 아미노산 넘버링은 젠뱅크 등록번호 POCV94에서 보고된 바와 같은 야생형 FaNES1 효소에서의 아미노산 위치에 대응한다.

표 4

효소 명칭	도입된 돌연변이(들)
NES1v2	I266F, S374F 및 I490F
NES1#1	I266F
NES1#2	S374F
NES1#3	I490F
NES1#4	G375D
NES1#5	I266F 및 S374F
NES1#6	I266F 및 I490F
NES1#7	S374F 및 I490F
NES1#8	L413F
NES1#9	I490K
NES1#10	I490Y

[0109] FaNES1 및 혈마토코쿠스 플루비알리스 *idi* 유전자의 코돈-최적화 서열을 사용하여 플라스미드 pJ401-NES1v2-idi로부터 NESv2를 생산하였다. 구성 동안, 3개 아미노산 돌연변이를 도입하고, 위치 266에서 아이소류신을 페닐알

라닌(I266F)으로, 위치 374에서 세린을 페닐알라닌(S374F)으로, 그리고 위치 490에서 아이소류신을 페닐알라닌(I490F)으로 전환시켰다.

[0110] 주형으로서 플라스미드 pJ401-NES1v2-idi를 사용하여 표준 부위 지정 돌연변이유발 기법을 통해 NES1#1 내지 NES1#10의 FaNES1 돌연변이체를 만들었다. 부위-지정 돌연변이를 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다. 확인한 돌연변이체를 이콜라이 BL21 전기천공적격 세포 내로 전기천공시켰다. 각각의 개개 돌연변이체에 대한 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 생산을 실시예 3에 기재한 방법에 따라 분석하였으며, 배양 시간은 30°C에서 6시간 동안이었다. 결과를 표 5에 제시한다.

표 5

FaNES1 변종 효소	리날룰(mg/ℓ)	2-메틸-3-뷰텐-2-올(mg/ℓ)
야생형	0.54	0.02
NESv2		
NES#1		
NES#2		
NES#3		
NES#4		
NES#5		
NES#6		
NES#7		
NES#8	0.05	
NES#9		
NES#10		

[0112] 다이메틸알릴 디아포스페이트의 공급을 증가시키는 것은 야생형 FaNES1에 의한 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 생산을 증가시키는 것으로 나타났기 때문에(실시예 4), FaNES1 변종을 암호화하는 플라스미드의 서브세트를 BL21 전기천공적격 세포 내로 pGB1036와 공동 형질전환시켰다. 리날룰 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 생산하는 변종 효소의 능력을 실시예 3에 제시한 방법에 따라 분석하고, 30°C에서 24시간 인큐베이션시켰다. 결과를 표 6에 제시한다.

표 6

FaNES1 변종 효소*	Lin* (mg/ℓ)	232-MB* (mg/ℓ)
야생형	4.05	0.38
NES1#1	-	0.04
NES1#3	0.08	0.04
NES1#8	0.79	0.05
NES1#9	XX	XX
NES1#10	XX	XX

* pGB1036에 의해 제공된 향상된 다이메틸알릴 디아포스페이트 농도에 의해 수행한 생체내 분석; Lin = 리날룰; 232-MB = 2-메틸-3-뷰텐-2-올.

[0114] 실시예 6

[0115] 다이메틸알릴 디아포스페이트로부터 아이소프렌의 생산을 위한 미생물유기체

[0116] 이 실시예는 포스파타제, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 이성질체화효소, 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올 탈수효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의해 아이소프렌을 생산할 수 있음을 입증한다.

[0117] 바실러스 서브틸리스의 *yhfR* 유전자를 이콜라이에서의 발현을 위해 코돈-최적화시키고, 합성하여 플라스미드 pJex404 내로 삽입하여 pJex404-yhfR을 생산하였다. 리보솜 결합 부위를 포함하는 코돈-최적화 *yhfR* 서열(서열 번호 3)을 도 11에 제시한다. 리보솜 결합 부위 및 *yhfR* 암호 서열은 다음의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)에 의해 증폭시켰다:

[0118] 5'- GGG CAA GTA ACT CGA TTA AAG AGG AGA AAA TAT AAT GAC GGC AG -3'(서열번호 11)

- [0119] 5'- GCC CTT GGG GCT CGA GTT ATT TGA TGA AAC CGC TCA GAT GG -3'(서열번호 12).
- [0120] 효소 XhoI에 의한 엔도뉴클레아제 제한에 의해 플라스미드 pJ404-LDI를 선형화하였다. *yhfR* 암호 서열 및 XhoI-분해 pJ404-LDI를 함유하는 PCR 산물은 표준 실험 기법을 사용하여 젤 정제한 아가로스였다. 인-퓨전 어드벤티지 PCR 클로닝 키트(캘리포니아주 마운틴뷰에 소재한 클론텍 래버러토리즈 인코포레이티드(Clontech Laboratories, Inc.))를 사용하여 단편을 함께 결합시키고, 이어서, 제조업자의 지시에 따라서 화학적으로 적격인 이콜라이 GC5 세포(시그마-알드리치 코포레이션 엘엘씨(Sigma-Aldrich Co. LLC)로부터 입수 가능한 젠 초이스(Gene Choice)) 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 선별하고, 제한 엔도뉴클레아제-분해된 플라스미드 DNA의 아가로스 젤을 통해 적절한 플라스미드를 확인하였다. 이어서, 적절한 플라스미드를 전기천공적격 이콜라이 BL21 내로 형질전환시켰다. 얻어진 플라스미드를 pJ404-LDI.yhfR로 명명하였다.
- [0121] 플라스미드 pJ404-LDI.yhfR을 보유하는 BL21에 의한 아이소프렌의 생산을 다음과 같이 분석할 수 있다. LB-한천 플레이트로부터 pJ404-LDI.yhfR 또는 pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 125mL 삼각 플라스크에 함유된 20g/ℓ 글라이세롤 및 100µg/mL 암피실린을 함유하는 10mL의 LB 브로스(10g/ℓ 효모 추출물, 5g/ℓ 박토 트립تون, 10g/ℓ 염화나트륨)를 접종시킨다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션시킨다. 16시간 후, 600nm에서 광학밀도 0.16으로 20g/ℓ 글라이세롤 및 100µg/mL 암피실린을 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 배양물을 회석시킨다. 50mL의 회석시킨 배양물을 300mL 삼각 플라스크에 넣고, 600nm에서 광학밀도가 대략 0.6에 도달될 때까지, 전형적으로 90분까지 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 4mL의 배양물을 20mL 기체 크로마토그래피 헤드스페이스 바이알에 넣는다. IPTG(아이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드)를 0.1mM로 첨가한다. 배양물을 진탕시키면서 37℃에서 16시간 동안 성장시킨다.
- [0122] 아이소프렌, 3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 상기와 같이 측정한다. 아이소프렌 피크의 동일성을 상기 기재한 바와 같은 GC/MS를 사용하여 확인할 수 있다.
- [0123] 실시예 7
- [0124] 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환
- [0125] 이 작업에는 효소 제제에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터의 아이소프렌의 생산을 나타낸다.
- [0126] pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 형질전환체를 100µg/mL 암피실린을 함유하는 르리아-베르타니(LB)-한천 플레이트 (10g/ℓ 효모 추출물, 5g/ℓ 박토 트립تون, 10g/ℓ 염화나트륨, 15g/ℓ 박토 한천) 상에서 선택하였다.
- [0127] LB-한천 플레이트로부터 pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 125mL 삼각 플라스크에 함유된 100µg/mL 암피실린을 함유하는 10mL의 LB 브로스(10g/ℓ 효모 추출물, 5g/ℓ 박토 트립تون, 10g/ℓ 염화나트륨)를 접종시켰다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 얻어진 배양물을 600nm에서 광학밀도 0.16으로 100µg/mL 암피실린을 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 회석시킨다. IPTG(아이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드)를 최종 농도 1.0 mM로 첨가하고, 배양물을 진탕시키면서 37℃에서 추가 4시간 동안 성장시켰을 때, 50mL의 회석시킨 배양물을 300mL 삼각 플라스크에 넣고, 600nm에서 광학밀도가 대략 0.6에 도달될 때까지, 전형적으로 90분까지 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 인큐ベ이션시켰다.
- [0128] 원심분리에 의해(6,500rpm, 10분, 4℃) 액체 배양물로부터 세포를 수집하고, 펠릿의 중량을 결정하였다. 펠릿을 세포 펠릿의 그램 당 5mL의 실온 노바겐 버그버스터 마스터 믹스(Novagen BugBuster Master Mix)(EMD 밀리포어(EMD Millipore))에서 재현탁시키고, 실온에서 20분 동안 느린 설정에서 회전 믹서를 사용하여 인큐베이션시켰다. 불용성 세포 파편을 원심분리에 의해 제거하고(16,000xg, 20분, 4℃), 상청액을 신선한 튜브에 옮겼다.
- [0129] 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환을 다음과 같이 수행하였다. 다양한 농도에서 완충제(50mM 트리스(Tris) pH 7.8, 2mM 다이티오토레톨) 및 기질(2-메틸-3-뷰텐-2-올)을 얼음 상의 20mL 헤드스페이스에서 합쳤다. LDI-추출물(0.15mL)의 첨가에 의해 반응을 개시하였으며, 최종 반응 용적은 1mL였다. 바이알을 37℃-진탕 인큐베이터에 옮기고, 1 내지 6시간 인큐베이션시켰다. 85℃로 5분 동안 가열시킴으로써 반응을 중단시켰다.
- [0130] 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 헤드스페이스 GC/MS에 의해 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 생산물을 정량화시켰다. 헤드스페이스 바이알을 600rpm에서 5분 동안 교반시키면서 85℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1mL의 헤드스페이스 기체를 85℃에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 20:1) 내로 주사하였다. VF-624ms 60m x 250µm x 1.4µm 칼럼

(제이엔더블유 사이언티픽)을 통해 1.5mL/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 90°C에서 1분 동안이며, 이어서 25°C/분으로 2분 동안 230°C까지 증가시키고, MS 공급 온도는 230°C이며, 사중극자 온도는 150°C였다. 질량분석계를 20 내지 160 질량 단위의 스캔 모드에서 작동시켰다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해서뿐만 아니라 진정한 샘플(2-메틸-3-뷰텐-2-올, 시그마 알드리치; 135ppmv 아이소프렌, 건식 질소 기체 중의 135ppmv 이산화탄소, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)에 대한 비교에 의해 확인하였다. 결과를 다음의 2개 표에서 제시한다.

인큐베이션 시간(Hr)	2-메틸-3-뷰텐-2-올	아이소프렌
0 (효소 추출물 없음)	10mM	N.D.
1	10mM	169.2
3	10mM	505.0
6	10mM	846.2

주의: N.D. 검출되지 않음(not detected).

인큐베이션 시간(Hr)	2-메틸-3-뷰텐-2-올	아이소프렌
3	0 mM	N.D.
3	0.5 mM	56.6
3	5 mM	356.4
3	50 mM	706.6

[0131]

[0132] 결과는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소가 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 효율적으로 전환시킨다는 것을 나타낸다.

[0133] 실시예 8

[0134] 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환

[0135] 이 작업에는 효소 제제에 의한 3-메틸-2-뷰텐-1-올로부터의 아이소프렌의 생산을 나타낸다.

[0136] pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 형질전환체를 100µg/mL 암피실린을 함유하는 루리아-베르타니(LB)-한천 플레이트 (10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨, 15g/l 박토 한천) 상에서 선택하였다.

[0137] LB-한천 플레이트로부터의 pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 125mL 삼각 플라스크에 함유된 100µg/mL 암피실린을 함유하는 10mL의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨)를 접종시켰다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 얻어진 배양물을 600nm에서 광학밀도 0.16으로 100µg/mL 암피실린을 함유하는 신선한 LB 브로스를 사용하여 회석시켰다. 600nm에서 광학밀도가 대략 0.6에 도달될 때까지, 전형적으로 90분까지, 50mL의 회석시킨 배양물을 300mL 삼각 플라스크에 넣어 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 인큐베이션시키고, IPTG(아이소프로필 β-D-1-티오갈락토파라노사이드)를 최종 농도 1.0mM로 첨가한 때에, 이 배양물을 진탕시키면서 37°C에서 추가 4시간 동안 성장시켰다.

[0138] 원심분리에 의해(6,500rpm, 10분, 4°C) 액체 배양물로부터 세포를 수집하고, 펠릿의 중량을 결정하였다. 펠릿을 세포 펠릿의 그램 당 5mL의 실온 노바겐 버그버스터 마스터 믹스(Novagen BugBuster Master Mix)(EMD 밀리포어(EMD Millipore))에서 재현탁시키고, 실온에서 20분 동안 느린 설정에서 회전 믹서를 사용하여 인큐베이션시켰다. 불용성 세포 파편을 원심분리에 의해 제거하고(16,000xg, 20분, 4°C), 상청액을 신선한 튜브에 옮겼다.

[0139] 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 아이소프렌으로의 효소적 전환을 다음과 같이 수행하였다. 다양한 농도에서 완충제(50mM Tris pH 7.8, 2mM 다이티오토레톨) 및 기질(3-메틸-2-뷰텐-1-올)을 얼음 상의 20mL 헤드스페이스에서 합쳤다. LDI-추출물(0.15mL)의 첨가에 의해 반응을 개시하였으며, 최종 반응 용적은 1mL였다. 바이알을 37°C-진탕 인큐베이터에 옮기고, 1 내지 6시간 인큐베이션시켰다. 85°C로 5분 동안 가열시킴으로써 반응을 중단시켰다.

[0140] 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 헤드스페이스 GC/MS에 의해 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 생산물을 정량화시켰다. 헤드스페이스 바이알을 600rpm에서 5분 동안 교반시키면서 85°C에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1mL의 헤드스페이스 기체를 85°C에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250°C, 분할 20:1) 내로 주사하였다. VF-624ms 60m x

250 μm x 1.4 μm 칼럼(제이엔더블유 사이언티픽)을 통해 1.5ml/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 90°C에서 1분 동안이며, 이어서 25°C/분으로 2분 동안 230°C까지 증가시키고, MS 공급 온도는 230°C이며, 사중극자 온도는 150°C였다. 질량분석계를 20 내지 160 질량 단위의 스캔 모드에서 작동시켰다. 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해서뿐만 아니라 진정한 샘플(3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올, 시그마 알드리치; 135ppmv 아이소프렌, 건식 질소 기체 중의 135ppmv 이산화탄소, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)에 대한 비교에 의해 확인하였다. 결과를 다음의 표 7 및 표 8에서 제시한다.

표 7

인큐베이션 시간(Hr)	3-메틸-2-뷰텐-1-올	2-메틸-3-뷰텐-2-올	아이소프렌
0(효소 추출물 없음)	10mM	N.D.	N.D.
1	10mM	0.31	2.35
3	10mM	0.49	3.8
6	10mM	0.72	6.85

주의: N.D., 검출되지 않음.

표 8

인큐베이션 시간(Hr)	3-메틸-2-뷰텐-1-올	2-메틸-3-뷰텐-2-올	아이소프렌
3	0 mM	N.D.	N.D.
3	0.5 mM	N.D.	N.D.
3	5 mM	0.26	2.16
3	50 mM	3.04	8.67

[0143] 결과는 리날룰 탈수효소-이성질체화효소가 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌으로 효율적으로 전환시킨다는 것을 나타낸다.

[0144] 실시예 9

[0145] 2-메틸-3-뷰텐-2-올의 아이소프렌으로의 전환을 위한 전세포(WHOLE CELL) 생체촉매

[0146] 이 작업에는 리날룰 탈수효소 이성질체화효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 2-메틸-3-뷰텐-2-올로부터의 아이소프렌의 생산을 나타낸다.

[0147] pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 형질전환제를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린을 함유하는 루리아-베르타니(LB)-한천 플레이트(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨, 15g/l 박토 한천) 상에서 선택하였다.

[0148] LB-한천 플레이트로부터 pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 250ml 삼각 플라스크에 함유된 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린을 함유하는 50ml의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨)를 접종시켰다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 얻어진 배양물을 사용하여 60g/l 글라이세롤, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린, 1mM IPTG, 및 5mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올로 보충한 450ml의 MM32 배지를 함유하는 바이오리액터(Q+, 싸토리우스(Sartorius))를 접종시켰다.

[0149] MM32 배지를 다음과 같이 준비하였다. 대략 800 밀리리터의 증류수에 다음의 화학물질을 첨가함으로써 1가 양이온 용액을 준비하였다: 0.66g ($\text{NH}_4\text{}_2\text{SO}_4$, 1.2g Na_2HPO_4 , 0.25g K_2SO_4 , 및 1밀리리터의 1000 \times 미량영양소 용액(이하). 증류수를 사용하여 용적을 990밀리리터로 만들었다. 용액을 오토클레이브에 의해 멸균시켰다.

[0150] 대략 800 밀리리터의 증류수에 다음의 화학물질을 첨가함으로써 1000 \times 미량영양소 용액을 준비한다: 0.173 g 아셀렌산 나트륨, 0.004g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_24 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.025g H_3BO_3 , 0.007 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.003g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.016g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 및 0.003 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 3몰 염산에 의해 pH를 3.0으로 조절하여 화학물질을 완전히 용해시키고, 증류수를 사용하여 용적을 1리터로 만들었다. 1000 \times 미량영양소 용액을 멸균여과시켰다.

[0151] 대략 800 밀리리터의 증류수에 다음의 화학물질을 첨가함으로써 100 2가 양이온을 준비하였다: 40 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 및 0.3 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 용액을 오토클레이브에 의해 멸균시켰다.

- [0152] 10밀리리터 멸균의, 100× 2가 양이온 용액을 990 밀리리터의 멸균 1가 양이온 용액에 무균성으로 첨가하고, 혼합함으로써 MM32 배지를 준비하였다.
- [0153] 바이오리액터를 37℃에서 작동시켰다. pH를 7.0으로 설정하고, 9% 수산화암모늄으로 조절하였다. 기류를 100ml/분으로 설정하였다. 교반을 550rpm에서 설정하였다. 2ml 샘플을 바이오리액터 0-, 2-, 4-, 6-, 24-, 30- 및 48시간 시점으로부터 회수하였다. 600nm에서 세포 밀도를 측정하기 위해, 그리고 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 정량화하기 위해 이들 샘플을 사용하였다. 아이소프렌 생산을 질량 분석기를 사용하여 연속적으로 모니터링하였다.
- [0154] 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 정량화하였다. 다양한 시점으로부터의 배양물의 1ml 샘플을 20ml 헤드스페이스 바이알에 넣었다. 헤드스페이스 바이알을 600rpm에서 5분 동안 교반시키면서 85℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1ml의 헤드스페이스 기체를 85℃에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 20:1) 내로 주사하였다. GC/MS 방법은 VF-624ms 60m x 250 μ m x 1.4 μ m 칼럼(제이앤더블유 사이언티픽)을 통해 1.5ml/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 90℃에서 1분 동안이며, 이어서 25℃/분으로 2분 동안 230℃까지 증가시키고, MS 공급 온도는 230℃이며, 사중극자 온도는 150℃였다. 질량분석계를 20 내지 160 질량 단위의 스캔 모드에서 작동시켰다. 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해서뿐만 아니라 진정한 샘플(3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올, 시그마 알드리치; 135ppmv 아이소프렌, 건식 질소 기체 중의 135ppmv 이산화탄소, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)에 대한 비교에 의해 확인하였다.
- [0155] 0.5 l 바이오리액터로부터의 밸효 오프가스를 하이든(Hiden) HPR-20 질량분석계(영국에 소재한 하이든 아날리tical(Hiden Analytical))를 사용하여 온라인 기체 질량 분석기에 의해 N₂, CO₂, H₂, O₂ 및 아이소프렌 함량에 대해 모니터링하였다. 하이든 HPR-20 질량분석계를 캘리브레이션하기 위해 사용한 공인 아이소프렌 기체 혼합물(1375ppmv 아이소프렌, 1375ppmv 이산화탄소, 및 건식 질소 기체, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)로부터 상대적 오프-가스 아이소프렌 농도를 결정하였다.
- [0156] 본 실험 결과를 도 29에 제시한다. pJ404-LDI를 보유하는 BL21 세포는 연장된 기간의 시간에 걸쳐 5mM 2-메틸-3-뷰텐-2-올을 아이소프렌으로 효율적으로 전환시킨다. 2-메틸-3-뷰텐-2-올이 소모됨에 따라, 아이소프렌 생산 속도는 감소된다.
- [0157] 실시예 10
- [0158] 3-메틸-2-뷰텐-1-올의 아이소프렌으로의 전환을 위한 전세포 생체촉매
- [0159] 이 작업에는 리날룰 탈수효소 이성질체화효소를 발현시키는 비자연적으로 생기는 미생물유기체에 의한 3-메틸-2-뷰텐-1-올로부터의 아이소프렌의 생산을 나타낸다.
- [0160] pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 형질전환체를 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 루리아-베르타니(LB)-한천 플레이트(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨, 15g/l 박토 한천) 상에서 선택하였다.
- [0161] LB-한천 플레이트로부터의 pJ404-LDI를 보유하는 BL21의 단일 콜로니를 사용하여 250ml 삼각 플라스크에 함유된 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 50ml의 LB 브로스(10g/l 효모 추출물, 5g/l 박토 트립تون, 10g/l 염화나트륨)를 접종시켰다. 플라스크를 회전 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 16시간 후, 얻어진 배양물을 사용하여 60g/l 글라이세롤, 100 μ g/ml 암피실린, 1mM IPTG, 및 30mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올로 보충한 450ml의 MM32 배지를 함유하는 바이오리액터(Q+, 싸토리우스(Sartorius))를 접종시켰다(실시예 9). 바이오리액터를 37℃에서 작동시켰다. pH를 7.0으로 설정하고, 9% 수산화암모늄으로 조절하였다. 기류를 100ml/분으로 설정하였다. 교반을 550rpm에서 설정하였다. 2ml 샘플을 바이오리액터 0-, 2-, 4-, 6-, 24-, 30- 및 48시간 시점으로부터 회수하였다. 600nm에서 세포 밀도를 측정하기 위해 그리고 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 정량화하기 위해 이들 샘플을 사용하였다. 아이소프렌 생산을 질량 분석기를 사용하여 연속적으로 모니터링하였다.
- [0162] 5975C MSD 및 CTC-PAL 오토샘플러를 구비한 애질런트 7890A GC를 사용하여 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 정량화하였다. 다양한 시점으로부터의 배양물의 1ml 샘플을 20ml 헤드스페이스 바이알에 넣었다. 헤드스페이스 바이알을 600rpm에서 5분 동안 교반시키면서 85℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 1ml의 헤드스페이스 기체를 85℃에서 가열시킨 헤드스페이스 주사기를 사용하여 제거하고, GC 주입구(250℃, 분할 20:1) 내로 주사하였다. GC/MS 방법은 VF-624ms 60m x 250 μ m x 1.4 μ m 칼럼(제이앤더블유 사이언티픽)을 통해 1.5ml/분에서 운반기체로서 헬륨을 사용하고, 오븐 프로그램은 90℃에서 1분 동안이며, 이어서 25℃/분으로 2분 동안 230℃까지 증가시키고, MS

공급 온도는 230°C이며, 사중극자 온도는 150°C였다. 질량분석계를 20 내지 160 질량 단위의 스캔 모드에서 작동시켰다. 3-메틸-2-뷰텐-1-올, 2-메틸-3-뷰텐-2-올 및 아이소프렌 피크를 NIST 11 MS 라이브러리에 의해서뿐만 아니라 진정한 샘플(3-메틸-2-뷰텐-1-올 및 2-메틸-3-뷰텐-2-올, 시그마 알드리치; 135ppmv 아이소프렌, 건식 질소 기체 중의 135ppmv 이산화탄소, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)에 대한 비교에 의해 확인하였다.

[0163]

0.5 ℥ 바이오리액터로부터의 발효 오프가스를 하이든 HPR-20 질량분석계(영국에 소재한 하이든 아날리티컬)를 사용하여 온라인 기체 질량 분석기에 의해 N₂, CO₂, H₂, O₂ 및 아이소프렌 함량에 대해 모니터링하였다. 하이든 HPR-20 질량분석계를 캘리브레이션하기 위해 사용한 공인 아이소프렌 기체 혼합물(1375ppmv 아이소프렌, 1375ppmv 이산화탄소, 및 건식 질소 기체, 텍사스주 휴스턴에 소재한 메티슨 트라이가스)로부터 상대적 오프-가스 아이소프렌 농도를 결정하였다.

[0164]

본 실험 결과를 도 30에 제시한다. pJ404-LDI를 보유하는 BL21 세포는 연장된 시간의 시간에 걸쳐 30mM 3-메틸-2-뷰텐-1-올을 아이소프렌으로 효율적으로 전환시킨다.

[0165]

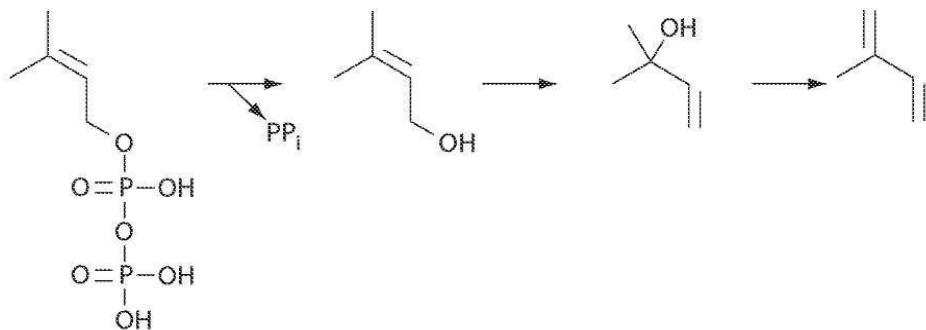
본 명세서에 언급된 특허 및 과학적 문헌은 당업자가 이용 가능한 지식을 확립한다. 본 명세서에 인용된 모든 미국 특허 및 공개 또는 미공개 미국 특허 출원은 참조로서 포함된다. 본 명세서에 인용된 모든 공개된 외국 특허 및 특허 출원은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 본 명세서에 인용된 모든 다른 공개된 참고문헌, 문헌, 웹사본 및 과학적 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0166]

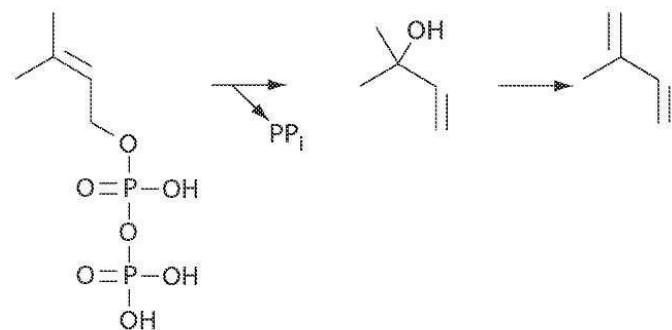
앞서 언급한 것이 본 발명의 실시형태와 관련되지만, 본 발명의 다른 실시형태 및 추가적인 실시형태가 그의 기본적 범주로부터 벗어나는 일 없이 고안될 수 있고, 이의 범주는 다음의 특허청구범위에 의해 결정된다.

도면

도면1



도면2



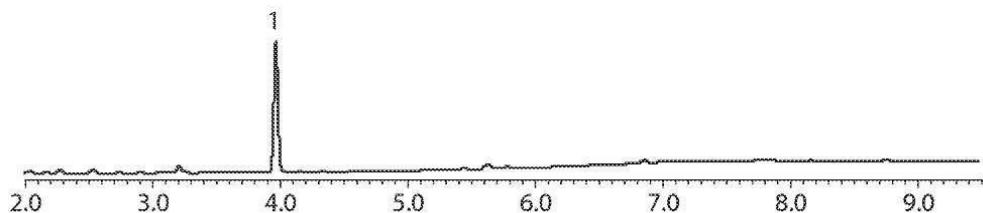
도면3

AGGAGGTAAAACATATGCACCACCATCATCACCAACATGCCCTTACGGTTGAAAACCACCGCCAT
 CGTGTCCGCTGCCGCTTGCAGGTTCCGTCGCCACCGCGTGCAGCGGAGCTGCCGCCA
 GGCGTCTGGCACCACCGAAGATTACTCGCAACAAGCAAACAGCGGTACGCCGGATG
 TGATGGCACAACGGCTACATGAACATACATTGACTCATGCCCTACAGCGTGGTTG
 CAGCTTGAGCGTGGGAGTTGAAGCATAACGCCAACCGTCAATTAAAGTATAGCATTGCGTTC
 TATGCATAACGGTCTGGCGTGGTGCACGATTGACCCGAAGCTGCGTGCCTGGCAGGTACG
 ATCTGGATATCGCGGTGTCTAAATGAAGTGAAGCGTGGGGTACTGGGAAGAGGATGG
 TTTTGGCACCACCGACCGATCGAGAAAGAGAACATCATGTACAAAGGTACCTGAACCTGATGTAT
 GCCCTGTATCAGCTGGTGCACGGTAGCCGTCACGAGGCAGAGCACGCCACCTGACCCGTA
 TCATCCATGACGAGATTGCCCTAACCGTTCGCCGGCATCGTATGTGAACCGGACAATTACTT
 TGTCCAGTGTAAACAGCGTCCGTAACCGTGTGGTTATGACCGTCTGCACGGCACTGAT
 TATCGCGCAGCCACCCGTGCTTGGTTGATTTCATTCAAGAACGACTGACGCCGGAGCGCG
 GTGCATTCTACCTGTCTTACCCCCGAAAGCGGTGCTTAAGCCGTGATTAGCGCGTATAC
 CACTGCATGGACGCTGCCATGGTTACGGCATGGATCCGGCTTAGCGAGCGCTACTATCCG
 CGCTTCAAACAGACCTTCGTTGAAGTGTACGACGAGGGCGTAAAGCCGGGTTCGTGAACCG
 CCGGTACCGACGACGCCGACGGTGGCGTGGGTCTGGCGAGCGCGTTACGCTGTTGGCACG
 TGAGATGGCGATCGCAACTGTTGATCAGCTGTAATCTGGAACCGCCTGCCAAACCG
 AGCATTGTCAGCGCTCCCTGCTTATGAACACCCCTGGCTCCCTGCTGTTGATGAGCTGCTGT
 TCCGGCTAAAGTTCATGCAGGTTTGGTGCCTGCGTATGCCGCCACCGCAGCGAAGCT
 GGCGGGCAAGTAACCGAG (서열 번호 1)

도면4

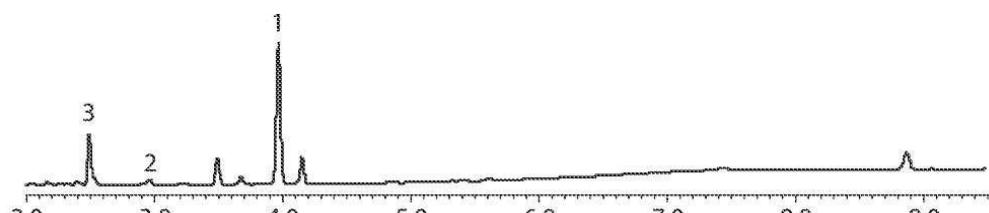
AGGAGGTAAAACATATGCATCATCACCAACACCCACATGGAAAAGATCGAGGTAAAGCATTAACAG
 CAAACATACGATTAAACCGAGCAGCAGCTCCACCCGTTGCAGCCGTATAAGCTGACCCCTGCTG
 GACCAACTGACCCACCGGCATACGCTCCAATCGTCTTTCTATCGATTACGGATCAGACT
 TCAATCTGCCGAGCGCTGGCAGACCTGCGTAAGCCCTGCGAAACCTGACTCTGTATT
 CCCGCTGAGCGGTGCTGTGAAGAATAACTTGTACATTGACGACTTCGCGCTCGTAAGATTGAGTGT
 CTGGAGCGCGTGTCAATTGTGATATGACGGACTTCCTGCGCTCGTAAGATTGAGTGT
 ACGAGTCGTGCCATTAAGCCTTAGCATGGAAGCCATTAGCGACGAGCGTTACCGTTGCT
 GGGTGTCAAGTCAACGTGTTGATAGCGGTATCGCGATCGGTGTTTCCGTTCTCATAAACTG
 ATCGACGGCGGACCGCGACTGCTTCTGAAATCCTGGGGTGCCTTCCGCGGTTGCCGCG
 AGAATATCATCCACCCGAGCGTGGAGCGAGGCGGACTGCTGTTCCCGCGATGATTGCC
 GGAGAAATATGTTGATCAGATGGAAGCCCTGTTGCGGGTAAAGGTTGCGACCCGTCG
 TTTGTCTTGGTGTAAAGCGATCAGCAGCATCCAGGACGAGGCAAAGTCTGAATCGGTGCTA
 AGCCGCTCCCGTGTGCACGCGTCACCGGCTTCTGTTGGAAGCACCTGATGCGGCAAGCGTGC
 TCTGACCTCTGGCACCACCTCGACGCCCTGAGCATTGCGCACAGGCCGTTATCTGCGTACC
 CGCATGAACATGGAAACTGTGCTGGACAAATGCGACCGCAACTGTTGGTGGCGCAGGCTA
 TTCTGGAGTTGAGCCACACCACCCGGAGATCAGCGATCTGAAGCTGCGATCTGGTGAACCTT
 GTTGAATGGCAGCGTTAAACAAATGCAATGGTATTACTTCGAAACGTTAAAGTAAAGAGGGC
 TATGGCGTATGTTGTAATCTGGATTTCAGCGTACGATGAGCAGCATGGAGCCGGCACCGG
 ATATCTACCTGTTAGCAGCTGGACGAACCTCTTAAACCGCTGGACTTGGTTGGGTGCTAC
 CAGCTGGATCGGTGTCGAGGTAAGATCGAGAGCGCCAGCTGCAAATTCAATTCTGGTGCCT
 ACCCAATGTTGCTGGTATCGAGGCTGGGTGAACCTGGAAGAAGAGAAAATGCCATGCTGG
 AACAAAGACCCGCAATTCTGGCCTGGCTAGCCGAAAACCTGATTTAACTCGAG
 (서열 번호 2)

도면5



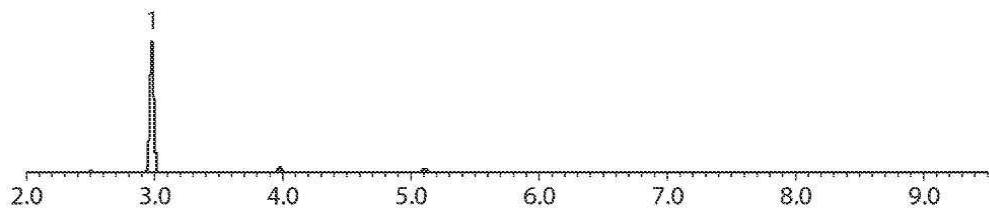
LB 배지 중의 3-메틸-2-뷰텐-1-올

도면6



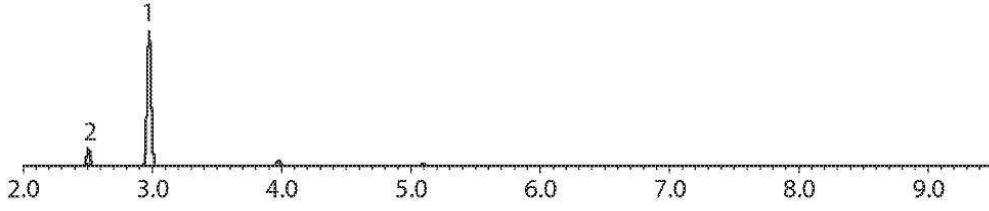
3-메틸-2-뷰텐-1-올 + BL21 (pJ404-LDI)

도면7



LB 배지 중의 2-메틸-3-뷰텐-2-올

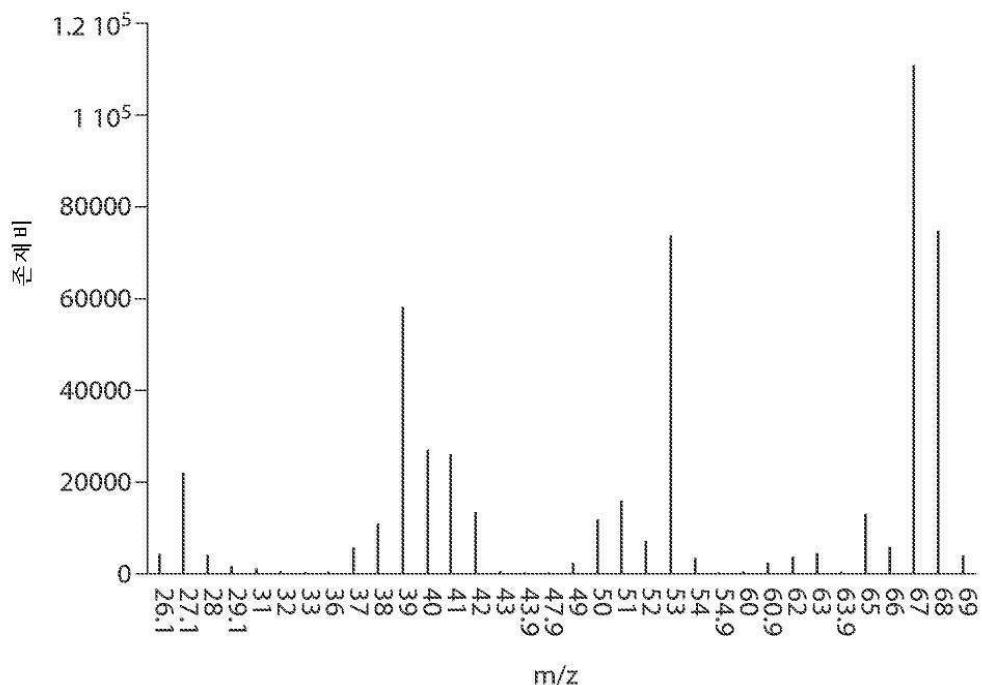
도면8



2-메틸-3-뷰텐-2-올 + BL21 (pJ404-LDI)

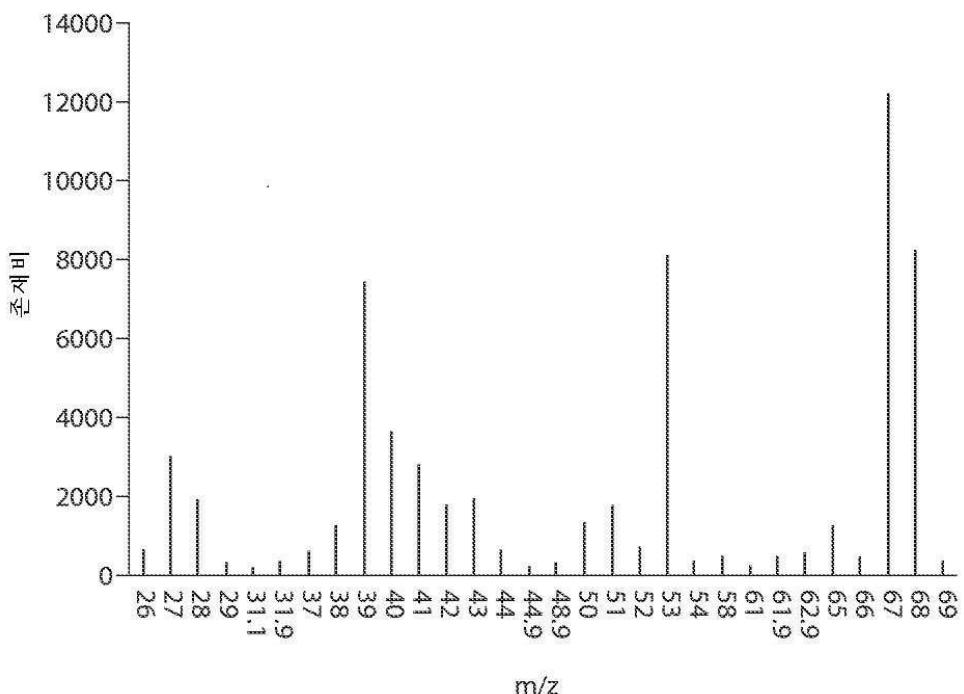
도면9

진정한 아이 소프렌



도면10

2.49분 채류 시간에서의 피크



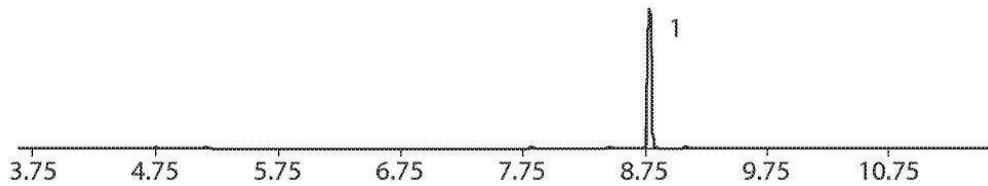
도면11

ATTAAGAGGAGAAAATAATGACGGCAGTATGCCTGGTCCGCCACGGCAAACCGATTGAAACCTGCAACAGAAA
 TGCCAGGGTAAACCGATATCCCGTGAATGCGACGGCGAACGTCAGGCCGTGAAACGGGTGAATACGTCAAAGA
 CTTTAGCTGGACATCATTGTTACAGCCCGCTGAAGCGCACAAGCGTACGGCTGAGATCATCAATGAATACCTGC
 ATCTGCCATCGTGAATGGACGACTTAAAGAGCGATTATGGCGATGCTGAGGGTATGCCGTGGAGGAGCGC
 ACCAAGCGTTATCCGACAACATTATCCGAACATGGAGACTCTGGAAGAGCTGACGGACCGTTGATGGCGGTCT
 GGCAAAAGTCAATCAGGCATAACCGAACAAAAGGTGCTGATCGTGCACATGGTGCGCAATTACCGCCTGCTGA
 CGGAGATTCTGGTGGTGAACCGGAGCTGCAAAGCACCGCTGGTCAATGCGTGTGCAATATTGAATTGCG
 GAAGAAAAGTGGCGTATCAAAGACTACAACATTAACTCTGAGCGGTTCATCAAATAA (서열번호 3)

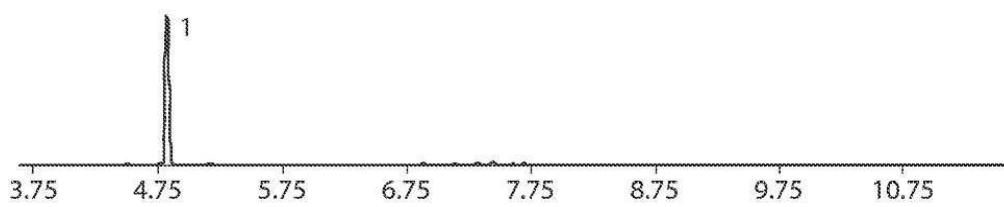
도면12

GGTACCTTAATTATAAGGAGGTAAAACATATGAACGTTGAAACCAAACACCGCGCACGATGGGTGACATT
 GTACAACATAGCCAGAAACTGAACTGCTGAAAACCGTCTCGCTAACGTCGAGCTGGACGCACTGAAAGGCTT
 GAACATGATTGACCGGTGAGCGTTGGTATCGACTACAATTTCAGCGTGGAGATTGACGAGATTCTGCACAAGC
 AGATGAGCATCGTCAGCGCGCGTGAAGACTTGCACGAGCTTGGCTGCGCTTCCGCTCTGCGCCAGCATGGCTAT
 TTCGTCAGAGGATGTTCAACAATTCAAGGACTCGAAAGGTACGTTCAACAGGTGCTGGGTGAGGACATCAA
 GGGCCTGATGAGCCTGTACGAGGCCACTGGCACCGAGGGCGAGGACATTGGTGAAGCGGAGAAGTTCA
 CGGCCACTTGTGAAACGAGCCTGAGCCACCTGGATCATCGTGTGCGTATTGTGGCGAATACCTTGGCGCAAT
 CGCACCACAAAAGCTGGCGCTTCATGGCACGTAACCTTCGTTACGAGCCAAGCTACTAATAGCTGGCTGAA
 TCTGTTGAAAGAGGTGCCAAGACGGACTTCATATGGTGCCTCTGCACCAAAATGAGATTGTTAGATGTCCA
 AATGGTGGAAAGAGCTGGCCTGGCAAAGAGCTGAAGTTCGCCCCGTGACCAGCCGCTGAAGTGGTACATTGGAGC
 ATGGCGTGCCTGACCGATCCGAAACTGAGCGAAGAGCGTGGTGGCTGACGAAGCCAATCAGCTTGTGTTACTGAT
 TGACGATATCTTGACGTTACGGCACGCTGGACCGACCTGATCTGTTACCGAGGCCGTTAATCGTTGGAGATCA
 CGCGATCGACCACCTGCTGACTATATGAAGATTGTTAAGGATTGACGATATGACCAATGAGTTAGCAGC
 AAGGTCTATCTGAAACATGGCTGGAACCCGCTGCAAAGCCTGAAACATCAGCTGGCGAGGTTGTGTAACGCA
 CCTGAGGCCAAGTGGTTGCGAGCGTAAGCTGCCAAAAGCGAAGAGTATTGAGAATGGTATTGTGAGCAGCG
 GTGTTAATGTGGTCTGGTCACATGTTTCTGCTGGTCAAACATCACCGCAATCTGCGAGCTGCTGAAAC
 GAAACTCCGGCATCATTAGCTAGCGCTGCATCTGCGCTGTGGATGATTGGTAGCGCGAAGGAGGAGAA
 TCAAGACGTAACGATGGTAGCTATGTCGTTGCTACCTGGAAGAACACGAAGGTTGCGACGATCGAAGAACGCG
 AGAAAACCATCAACATGATTAGCGATGAGTGGAGAAGATTGAAATCGCGAGTTGCTGAGCCGAAACCGTCCCAGCA
 AGCTTCACCTGGCGACCTGGCACGTATGATCCCGTGTACTCCTACGACGTTAATCAGTGCCTGCC
 TTCCCTGAAAGACTATATGAAGCTGATGCTGTACGAAACCGTCAGCATGTCGATGAGGAATAAAATTGCTGCGTAG
 CCTGCTGCGTGGCCTGACCCACTTCCCGTGTGAACCTGCCCAACAACCGCTGCGCCCATGCCGCTGCAAT
 TTCGTCGCCAGCATGCTGCTGGCGAAGATCGTACCGACCATGCGTGGTCTAGTACGTTGGCGGGCGGT
 CAATCCCAAGATGAACTGATGCTGAAAGACGAATGCAATTCTGGTCGATGCCGATGACAACATCACCGG
 CATGTGAGCAAACACTGCTGTTCTGCTGCTGCTGCAACCGTGCATTCTCTGTTCTGTT
 ATGACCAAGGGTGCCTGCTGCGACACGTCAGGCCAGCAAGATTACCTTCCGCTGTTGGACCAATACGTGC
 TGTTCACATCCGCTGACGGCCAGACCCGGATGAAAGTGGATCAGCTGCGCAAGTGGCTGATGGCACGGTCCGG
 TGCAAAAGCGCGGCAATTGTAAGCTGGAACATGAACTGGGTATCCGGCACACCGAGCTGCCGCAAGTGCATT
 GTTCCCTGACCCGCTGCATTATTGCTGCCGATGTTGCGTGGCGCAACCGAACAC
 GAAATGGATTACATTGTCATCCGTGTAACGTCAGGACCGAATCCGGATGAGTGGACGAAGTTGTTA
 TGTCACGCAAGAAGAACTGCGCCAGATGATGCAACCGATAACGGTCTGCAATGGTCCCCGTGGTTGCAATT
 CTGCGCGTCTGGACGTTGGTGGCGATCTGGACGCAACTGAAACACCGATAAACACGAAGACTGGGGCACC
 GTCCATCACATCAACGAAGCATAACCATGG (서열번호 4)

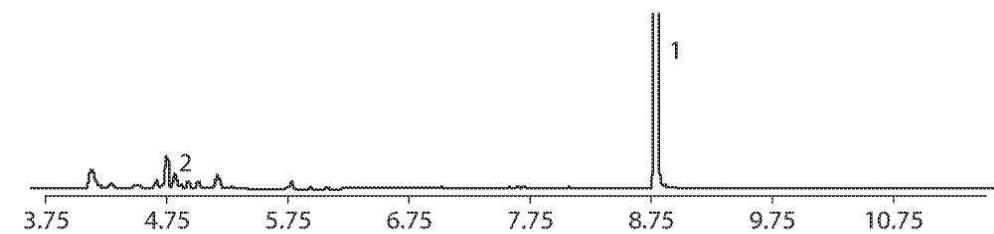
도면13



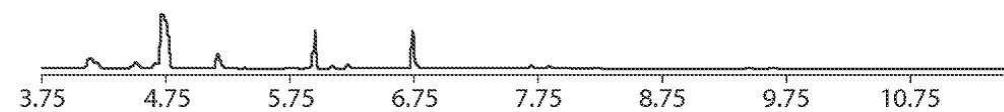
도면14



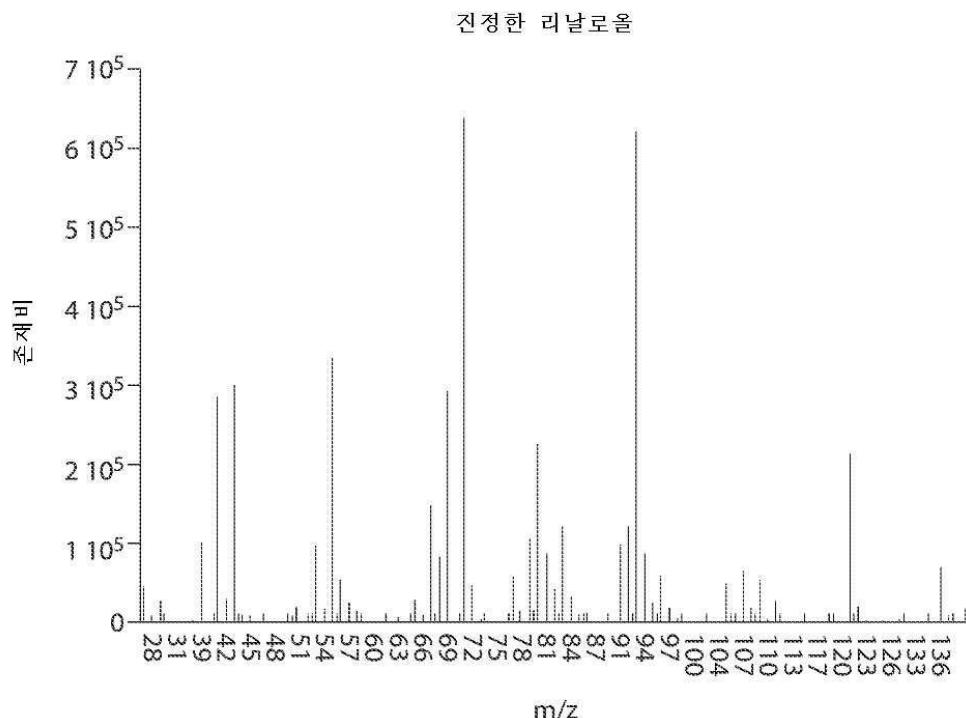
도면15



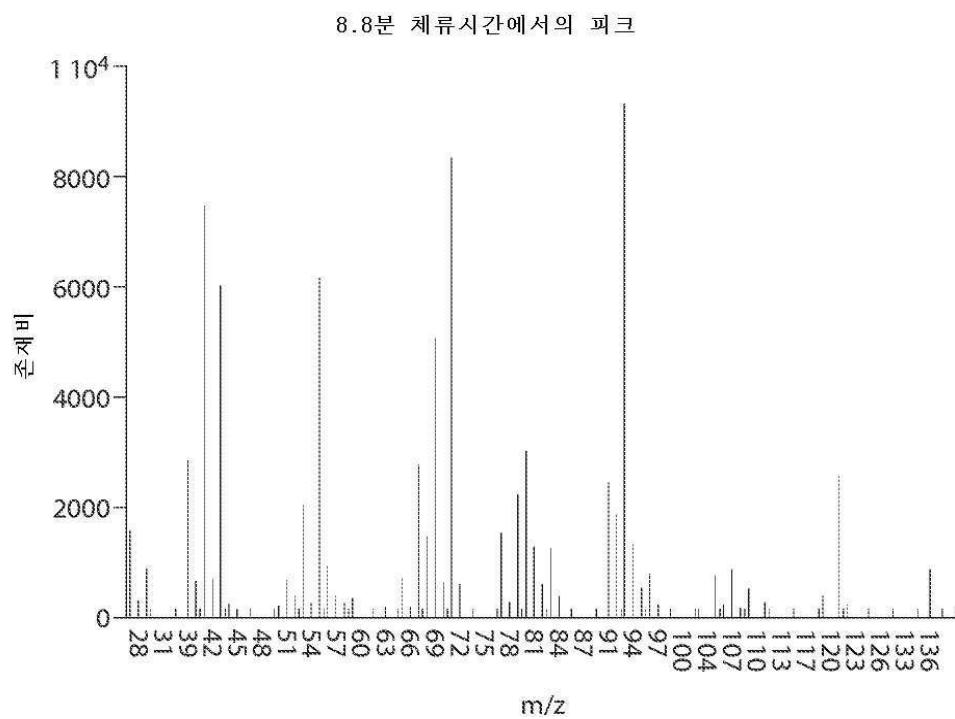
도면16



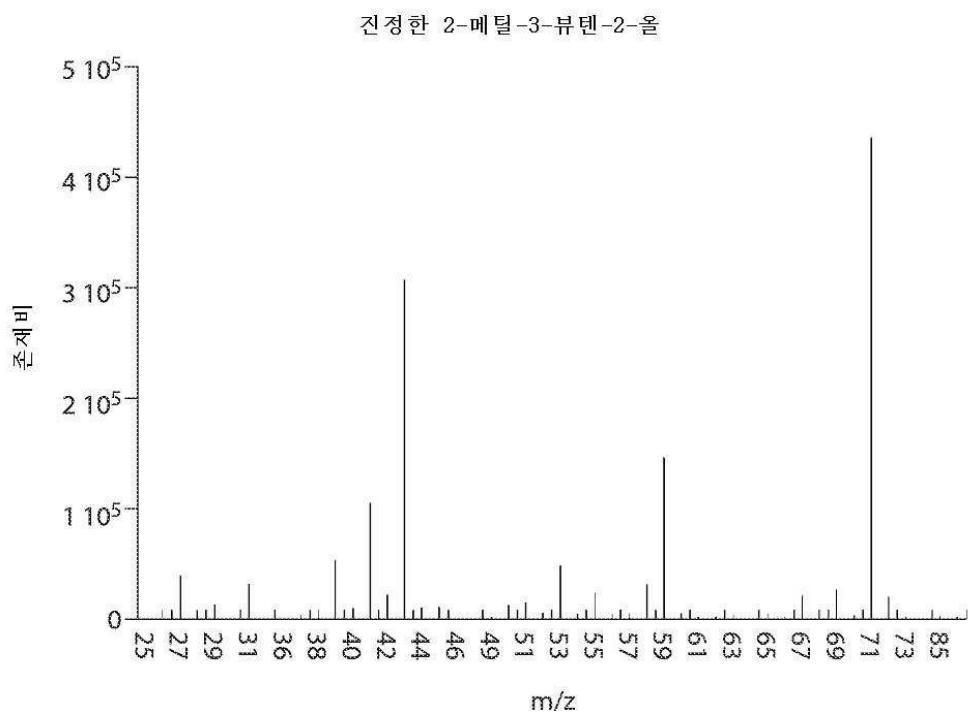
도면17



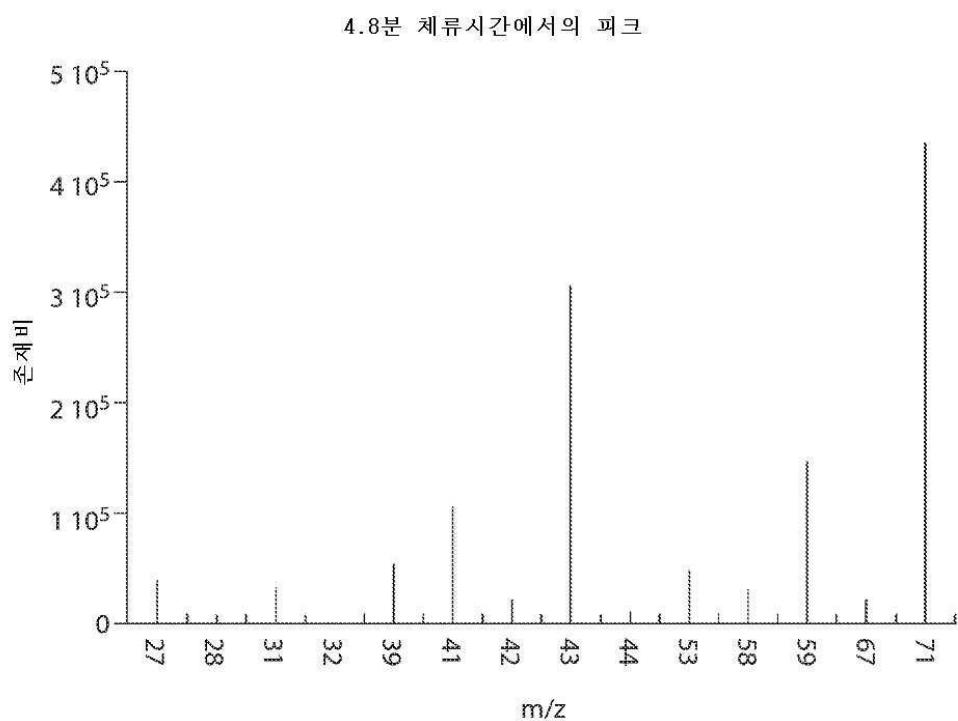
도면18



도면19



도면20



도면21

GGATCCTCCCTATCA GTGATAGAGATTGACATCCCTATCA GTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGC ACTG
 ACCGGTACCTTGAATTCCCCACCGTAGATCTAGATGTACACCATGGCTAGAGGCATCAAATAAACGAAAGG
 CTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTATCTGTTGTTGCGGTAGAGCTCTCCTGAGTAGGACAATCCCG
 CCCTAGACCTAGGC GTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
 GGGGATAACGCAGGAAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAACCGCTAGCGGAGTG
 TATACTGGCTTACTATGTGGCACTGATGAGGGTGTCA GTGAAGTGCTTATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACC
 GGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCGCTACTGACTCGCTACGCTCGGTGTTGAC
 TGCGCGAGCGGAAATGGCTACGAACGGGGCGAGATTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAAGTG
 AGAGGGCGCGCAAAGCGTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACAAGCATCAGGAAATCTGACGCTCAAATCAG
 TGGTGGGAAACCGGACAGGACTATAAGATAACAGGCGTTCGGCTCCCTCGTGCCTCCTGTTCC
 TGCCTTCGTTTACCGGTGTCATCCGCTGTTATGGCGCGTTGTCATTCACGCCGACACTCAGTTCCGG
 TAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGACTGTATGCAGAACCCCGTTCA GTGCCAGCGCTGCCCTATCCGGTAAC TA
 TCGCTTGAAGTCCAACCGGAAAGACATGCAAAGCACCAGTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGAGGAGTTA
 GTCTTGAAGTCACTGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTGGTACTGCCCTCCAAGCCAGTTACC
 TCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTCGAAAACGCCCTGCAAGCGGTTTTTCGTTTCA GAGCAAG
 AGATTACCGCAGACCAAAACGATCTAACAGAAGATCATCTTAAAGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
 GTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTACCTTCGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGATCGGCAAACAAAC
 CACCGCTGGTAGGGTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGAAAAAGGATCTOAAGAAGATCCT
 TGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAGAACACTACGTTAAAGGATTTGGTACTGACTAGTGCTTGG
 ATTCTCACCAATAAAACGCCCGCGCAACCGAGCGTCTGAAACAACTCAGATGGAGTTCTGAGGTCAATTACTG
 GATCTATCAACAGGATCCAAGCAGCTCGATATCAAAATTAGGCCCGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTA
 TTCAATTAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGCGCATGATGAACTGTAATGCCAGGGCATCGCACCT
 TGTCGCTTGCCTATAATATTGCCCCTCGTAAACAGGGGATGGCTGAGACAAAAACATATTCTCAATAAACCC
 TTAGGAAATAGGCCAGTTTACCGTAAACGCCACATCTGCCGAATATATGCTAGAAACTGCCGAAATCTG
 CGTCTGTTACCGTAAACGCCACATCTGCCGAATATATGCTAGAAACTGCCGAAATCTGCTGGTATTCACTCC
 GCGATGAAAAGCTTCA GTTTGCTCATGGAAAACGGTAAACAGGGTAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCG
 TCTTTCATTGCCATACGGAACTCCGGATGAGCATTCACTCAGGGGGCAAGAATGTGAATAAGGCCGATAAAACTT
 GTGCTTATTCTTACGGCTTAAAGGCCGTAATATCAGCTGAACTGGTCTGGTATAGGTACATTGAGCAA
 CTGACTGAAATGCCCTAAATGTTTACGATGGCATATGGGATATATCAAGGGTGTATATCCAGTGA
 TCCATTAGCTTCTTAGCTCTGAAAATCTCGATAACTAAAAATGCCCGTAGTGTCTTATTCATTATG
 GTGAAAGTGGAAACCTTACGTCGGATCAACGCTCATTTGCCAGATATCGACGTCGTATCAAACCTGTC
 GCACTCTAGGCTACTCAGACTAGAAAGCTTAAGACCCACTTCACTTAAAGTTGCTTCTAATCCGAGATGA
 TCAATTCAAGGCCGATAAGAAGGCTGGCTGCACTTGGTGTCAAATAATTGATAGCTTGTGTAATAATGGC
 GCCATACTATCAGTACTAGGTGTTCCCTTCTCTTACGGGACTTGTGATGCTCTGATCTTCAATACGCAACCTAA
 AGTAAAATGCCCAACGGCTGAGTCATATAATGCTCTAGTGA AAAACCTGTTGGCATAAAAGGCTAATT
 GATTTTCGAGAGTTCTACACTGTTTCTGAGGCCGTTACCTAAATGTAATTGCTTCTGCTCCATCGGATGACTTAGT
 AAAGCACATCTAAACTTACGCTTAACTGCTAAAGGCCGTTAATTTTACATGCCAATACAATGAGT
 ATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGGCTAAGGCCGCTGAGCAAAGGCCGTTAATTTTACATGCCAATACAATGAGT
 GCTGCTCTACACCTAGCTTCTGGCGAGTTACGGGTTGTTAACCTTCGATTCCGACCTCATTAAGCAGCTCTAAT
 GCGCTGTTAATCACTTTACTTTATCTAACATGTGAAATACGGGGGGGATTTCATGGATATGTTCTTCT
 GCGAGAACAGGCCATTTAAACTCTCTCAAAATTATGATCTATTATACAGAAAATTTCTGAAAGCAAAT
 AAATTTTTATGATTCCCTGACAATTCCGCTAACCTACATTAATTGCGTGCCTACTGCCGCTTT

(서열번호 5)

도면22

GGATCCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACGTGAC
 CGGTACCTTGAATTCCCACCGTAGATCTAGATGTACACCCTGGGCTAGAGGCATCAAATAACGAAAGGCTCA
 GTGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTATCTGTGTTGTCGGTGAACCCCTCTCTGACTAGTAGGACAATCCGCCGCCCTAG
 ACCTAGGGTACGGGTTTGCAGGGCTGAAAGGCTATTTCTCCAGAATGCCATGATTCCCCAACGGGAGGCGTACTGGCTCCCG
 TCAGGTTGCCGGCTGAAAGGCTATTTCTCCAGAATGCCATGATTCCCCAACGGGAGGCGTACTGGCTCCCG
 TGGTGTGGCAGCTTGATTGATAAGCAGCATCGCCTTTCAGGCTGTATGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGT
 TGTCTCAGGTGTTCAATTCTAGTTCTAGGTTCTACTGGTTCACTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTT
 CATCTGTTACATTGTCGATCTGTTCTAGGTAACAGCTTAAATGACCAAAGCTGTTAGGCTGATCTATCTAT
 CTTTTTACACCGGTTTGCATGGACAGCTTCTGTTGATACGGTGAACAGCTTGTACTCTTGTACTTTG
 TTTGTTAGTCTGATGCTCACTGATAGATAACAGGCATAAGAACCTCAGATCTCCCGTATTAACCCAGTATGTC
 TCTAGTGTTGTTGTTGCTGAGCCATGAGAACGAACCATGAGATCATGCTACTTGTACTGTCACTCAAAA
 ATTTGCCCTAAAAGGGCTGAATTGGTCAAGCTTAAAGCATGCTGAGTTCTCTAGTCCCTAACGGTAA
 GGAATCTGATGTTAGGTTGGTATTGTCACCTTCAATTCTGTTCTGCTCAAGTTCGGTTACGGAGATCC
 ATTTGCTCTAGTCAACTGTTCAACGGGAAATCAACGCTATCAGTGGCCGGCTCGCTTACCAACCCAAATTCTATATTG
 TGAAAGTGTAAAATCTTACTTATTGGTTCAAAACCCATTGGTTAACGCTTTAAACTCATGGTACTTATTGCAAG
 CATTAAACATGAACCTTAAATCATCAAGGCTAATCTATATTGCTTGTGAGTTCTTGTGTTAGTTCTTAAAT
 AACCAACTCATAAATCTCATAGAGTATTGTTCAAAGACTTAACTGTTCTCAGGATATAATTGTAATTGTTA
 ACTGGAAAAGATAAGGCAATCTCTTCAACTAAAACCTAACTCTAATTCTGCTGAGAACTTGGCATAGTTGTC
 CTGGAAAATCTCAAGCCTTCAACGGGAAACTTGGTATTCTGCTGAGACCTTCTGTTGCTTCTGTTAGGT
 AATACACCAAAAGCATTTCCCTACTGATGTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATAACGGTCT
 TCCCTGTAAGGTTTCAATGTTGGGTTGAGTAGTGCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTCATGCTCCGTTAAGTC
 ATAGCGACTATCGTAGGTTCAATTGCTGAAACACTAATTGACATACATCTAATTGGTCTAGGTGATT
 TCACTATACCAATTGAGATGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCTTCCGGGAGATCTGGGTATCTGTAATT
 GCTAGACCTTGTGGAAAATTCTGTAATTCTGCTGAGACCCCTCTGTAATTCTGCTGAGACCTTGTGTT
 TTATATTCAAGTGGTATAATTATAGAATAAAAGAATAAAAAGATAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTA
 AACTCACTTTAGTCAAGTCCGAGTATTACAAAAGATGTCGAAACGCTTGTGCTCTCTACAAAAGACACCTT
 AAAACCTAAAGGCTTAAAGTAGCACCCTCGAAGGCTGGGAAATCGCTGAATATTCTTGTCTCGGACCATCAGGC
 ACCTGAGTCGCTGTCTTCTGACATTCACTGCTGCGCTACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGTAATGGCACTA
 CAGGGCCTTATGGATTGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCGTCACGGCTTCTCAGGGGTTT
 ATGGGGCTGCTGCTATGTTGCTATCTGACTTTCTGCTGAGCAGTTCTGCCCTCTGATTTCCAGTCTGAC
 TTCGGATTATCCGTGACAGGTCAATTGACTGGCTAATGCAACCGAGTAAAGCAGGGTATCATCAACAGGCTTACCC
 TCTTACTGTCCTAGTCTGGATTCTCACCATAAAAAACCCCGCCGAAACCGAGCGTCTGAAACAAATCCAGATG
 GAGTTCTGAGGTCAATTACTGGATCTACACAGGAGTCAGGCTCAGGCTGATATCAAATTACGCCCGCCCTGCCACTC
 ATCGCAGTACTGGTAACTCATGCAATTAGGCAATTGCAAGGCACTGAGGCTATGAGACAGGCTGATGAAACCTG
 AGCGCATCAGCACCTTGTGGCTTCTGCTGATAATTGCCCCATCTGAAAACGGGGCGAAGAAGTGTG
 CCACGTTAAACTCAAAACTGGTAAACTCACCCAGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAACCCATTAGG
 GAAATAGGCCAGGTTTCAACGTAACACGCCACATCTGCAATTGTTGAGAAACTGCGGAAATCTGCTGGTAT
 TCACTCCAGGCGATGAAAACCTGTTGCTCATGCAAGGCTGTAACAGGCTGAAACACTATCCCATATCACCA
 GCTCACCGTTTCTGCACTGGGATGAGGATTCTGAGGCTGATGAAACAGGCTGATGAAATAAGGCCG
 AAACCTGCTTATTTCTTACGGCTTTAAAAGGCCGTAATATCAGCTGAAACGGTCTGGTTATAGGTACATTG
 GCAACTGACTGAAATGCTAAATGTTTACGATGCCATTGGGATATCAACGGGTTATATCCAGTGTATT
 TCTCATTATTAGCTCTTACGCTGAAATCTGATAACTCAGTCAAATAACGCCGGTAGTGATCTTATTCTATT
 GTGAAAGTGGAAACCTCTACGTCGCGGATCAACGCTCATTTGCTCATGCGAGATCTGCGTACCAACCTG
 ACTCTAGGCTACTCAGCTACTAGAAGCTTAAAGCCACTTCAATTAAAGTTGTTCTAATCCGAGATG
 TCAAAGGCCAATAAGAGGCTGGCTGCACTTGGTGTGAAATAATTGCAAGCTGCTGCTAATAATGGGG
 GATATCTACGTTAGGGTCTTCCCTTCTTACGGACTTGTGATCTTCAATACGCAACCTAAAGTAAA
 GCCCCACAGCGCTGAGTGAATATAATGCAATTCTACTGAAACCTGTTGGCATAAAAAGGCTAATGATTTC
 AGTTTCATACTGTTTCTGAGGCGCTGACCTAAAGTACTTTGCTCATCGCGATGACTTACTAAAGC
 ACATCTAGGCTTATTACGTTAAAGGCTTCTGCACTTGGTGTGAAATAATTGCAAGCTGCTG
 ACATCTCAATGGCTAAGGGCTGAGCAAAGCCGTTATTGTTACATGCCAATACAATG
 CTTCTGGGCGAGTTACGGGTGTTAACCTCTGATTCCGACCTCATTAAGCAGCTAATGCGCTG
 CTTTATCTAATCTAACATGTAATACGGGCGGGATTCTGGATATGTTCTTCTGCGAGAAC
 ACAATTGCGCTAACCTAACATTGCGTTGCGCTACTGCCCGTTT (서열번호 6)

도면23

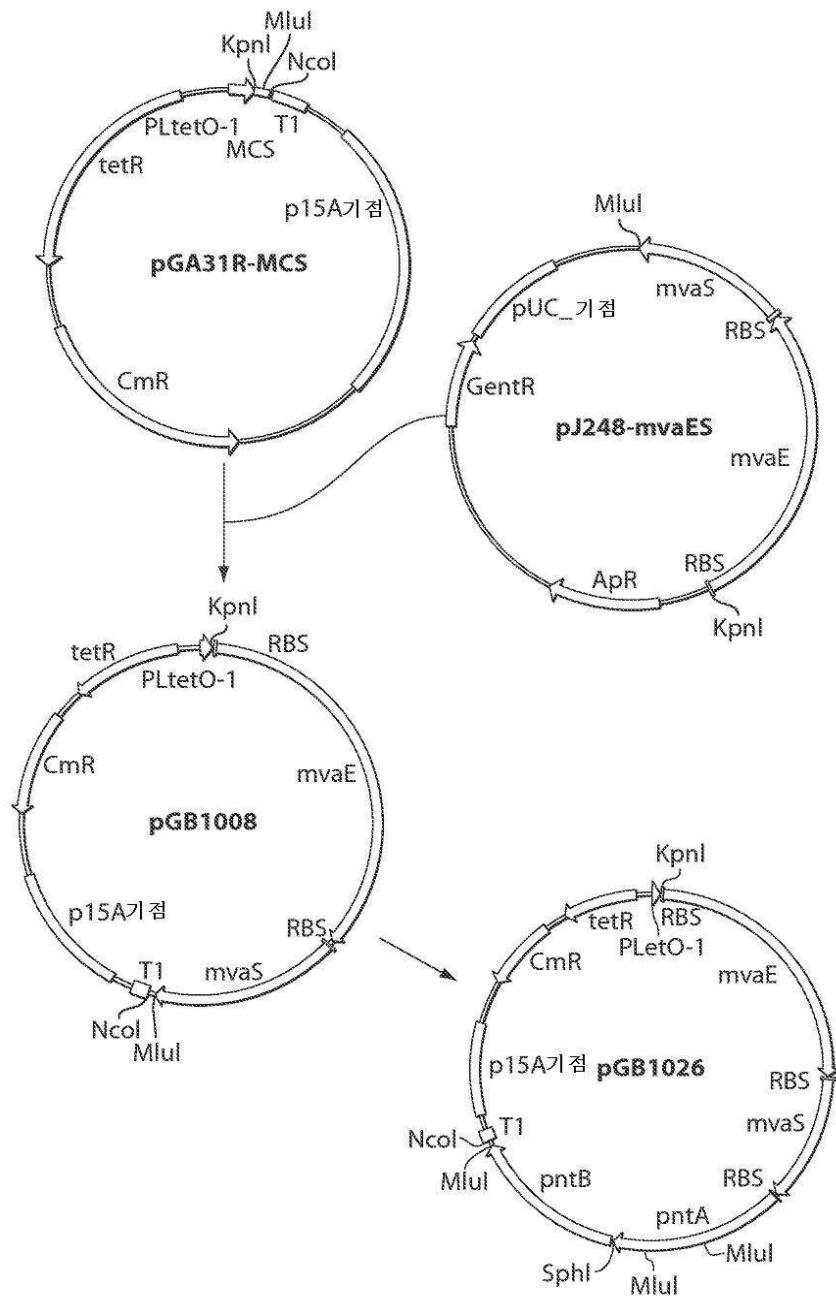
GGTACCATTAAGAGGAGAAAATAATGAAACTGTAGTAATCATCGACGCCCTCGCACGCCAATCGCAAGTAT
 AAGGGTTCTCTGAGCCAAGTTAGCCAGTCGATCTGGCACCCATGTCAAGCACCAGTTGCTGAAGCGTCATTCCAC
 CATCAGCGAGGAATTGATCAGGTATCTCGGTAACTCGTCAAGCCGCAATGGTCAGAACCCCTGCGCTCAGA
 TTGCGATTAACCTGGCTTGAGGCCAGAGATCCCGCTATGACGGTGAATGAGGTTTGCGCAGCGGTATGAAGGGG
 GTTATCTGGCAAACAGCTGATCCAGTTGGGTGAGGCCAGGTACTGATTCGGGTGATCGAAAACATGAGCCA
 GGCGCCAAAATTGCAACCGTTAACATGAAACTGAAAGCTATGACGCCCGTTCACGATGATGACGCCGTC
 TGACCGATGCGGTCAGCGGATGGGCTGACTGCGGAGAAATGCGGAGAACGACACGTCACTCGTGAA
 GAACAAGGACAGTTGGCTGAGCGGACCGCTGGTGAAGAACGAGATGAGGGTATCCGCTTAATTCTAGCGTGAAAAGCTGG
 CGGCCGTTGGAGGTGAGCGGACCGCTGGTGAAGAACGAGATGAGGGTATCCGCTTAATTCTAGCGTGAAAAGCTGG
 GTACTCTGAAAACCGTTTCAAAGAGGACGGTACGGTACGGCTACGGCTGCGCTACTGGCGATTATCGTGACGCCGTC
 AGTGGGTATCGATCCGGCATATATGGGTATCAGCCGATTAAGGCAATTGAGAAATTGCTGGCCGTAACCGCTGA
 CCACGGAGGAGATTGATCTGTACGAGATTAACGAGGCGTTGAGCAACTAGCATCGTGTGCAGCGTAGGTTGGCC
 CTGCCGAGGAGAAAAGTAAACATTACGGTGGCGGTATCAGCTGGGTGATCGAATCGGCCACGGCGCTCGTCT
 GCTGACCTCCCTGAGCTACCAACTGAAATCAGAAGGAGAAAATCGCGTGTGCCAGCGTGCATTGGCGTGGCC
 TGGGTCTGGCATGCTGGAACTCGCAAACAGAAGAAGAATTCACTGTTTACAAATGAGGCCGGAGGAGCGT
 TTGGCCAGCCTGCTGAATGAGGGTACGATTAGCGCGGATACCAAGAAGAATTGAAAACACCGCGCTGAGCAGCCA
 GATTGCTAATCATGAGGAGACAGATCAGGAAACCGAAGTGGCGATGGGTGCGCTGACCTGACGGTT
 ATGAAACCGATTACTGGTGGCATGAGGAGACAGATCAGGAAACCGAAGAACCCTAGGGTATTGAGGACTGAGCAACGGTGC
 GCTCAGGGCTTAAACCGTCAATCAGCAGCGTCTGATCGCTGGCCAATTGCTTTATGATGTCAGGAGACCCGGA
 GTCTTGATGACAAGCTGCAAGTACGTGAGGCGGAAGTTTCAACAGGCGGAGCTGAGCTATCGAGCATCGTCA
 AGCGCGGTGGTGTGCGTGCACCTGCAATACCGCACGTTGATGAGAGCTTGTAGCGTGGACTTCTGGTGGAC
 GTGAAGGACGCGATGGGTGCAATATCGTTAATGCAATGCTGGAGGGTGTGGCGGAACCTTCTGCGAATGGTGC
 AGAACAAAAGATTCTGTCAGCATTGAGCAACTACGCCACCGAATCGTAGTTACGATGAAAACCGCGATTCCAG
 TGTCTGCTGAGCAAGGGTAGCAATGGTGTGAAATGCCGAGAAAATTGCTGGCCAGCGCTACCGAGCGCTG
 GACCCGTATCGCGGTTACCCACATAAGGGTATCATGAATTGCAAGCGGTGTTCTGGCCACGGGCAATGA
 CACCCGTGCGGTGAGCGCTTCTGGCACGCACTGCTGTTAAAGAGGCCGTTACCGGCCGCTGACCTCGTGGACCC
 TGGATGGTGGAGCAACTGATCGCGGAGATCAGCGTCTGGTGGCACTGCCACCGTGGTGTGCGACCAAAGTCTTG
 CGGAAGTCCCAGGGCAGCGGACCTGCTGGCTTACCGATGCGAAGGAGCTGTCGGCTGGTGTGCTGTGCG
 TTGGCGCAAAACCTGGCGCACTGCGTGGCATCTGGCGTGGAGGGTATTCAAAGAGTCAATGGCGTTGCAAGCGC
 GTAGCTGGCAATGACGGTGGTGAACCGGAAAGAAGTGGAGCGGTGCCAACAGCTGAGCGCAGAACGACC
 ATGAACCAAGACCGCGAATGGCAATTCTGAATGAGATCTGCGCAAGCAATGAGAGGAGATAAAATATGACCATCGG
 CATCGACAAAATCAGCTTCTCGTCCCACCGTACTACATCGATATGACTCGCTGGCAGAAGCTGTAACGTTGACC
 CGGGTAAATTCCACATGGCATTGCCAGGATCAGATGGCAGTTAATCGATTTCGCAAGGATATCGTACCTTTCGCG
 GCCAACCGGCTGAGGCATCTGACCAAAGAGGATAAAAGAGGCCATTGACATGGTATCGTGGTACCGGAATCTAG
 CATTGATGAATCAAAGCAGCAGCGTGTCTGCACTGCGTCTGATGGTATTCAACCTTTCGCGCGTTCTTICGAAA
 TCAAAGAAGCGTCTACGGCGCAACCGCGGGTTGAGCTGGTAAACACCGTGGCACTGCAACCCAGACAAAAAG
 GTGTTGGTGTGGCGCGAGACATCCGAAGTACGGCTGAAACAGCGTGGCGAACCCAGGGCGCTGGCAGT
 GGCAGTGCCTGGTGGCGAGCGAACCCCGCATCTGGCTGGTGAAGAAGATAATGATGTTGACTCAGGATATCTACG
 ACTTCTGGCGTCCGACGGGCATCGTACCCGATGGGACGGTCCACTGCGAAGCAGACTACATTCAAGAGCTT
 GCACAAAGTCTGGGATGAAACACAAAAGCGCACGGGTTGGACTTCGCGGACTATGACGCCATTGGCGTTTCACTCCC
 GTATACGAAGATGGCAAAAAGGCACTGCTGGCAAGATTAGCGACCAAACCGAGGCTGAGCAAGAGCGTATCTTGG
 CCCGTTATGAAAGAGAGCATTGCTATTCTGCCCGTGGGTAATCTGTATACGGGCAGCGTGTATCTGGCGTTGATT
 AGCCTGCTGGAGAACCGGACCGACGCGTACCGCAGGTAATCAGATTGGTCTGTTTCCTATGGTAGCGGTGCGGTGGC
 GGAGTTTTACGGCGAGCTGGTGGCGGGTTACCAAATCATTGCAAAGGAAACCCATCTGGCGCTGTTGGAC
 ATGCCACGGAACGTGACGATTGAGAATATGAGGCGATGTTCGCGAACCCCTGGATACCGATATTGACCAAGACCCCTG
 CAGGATGAACTGAAGTACTCTATTAGGCCATCAACACACCGTGCAGCTACCGTAACAAACCGCTG

(서열번호 7)

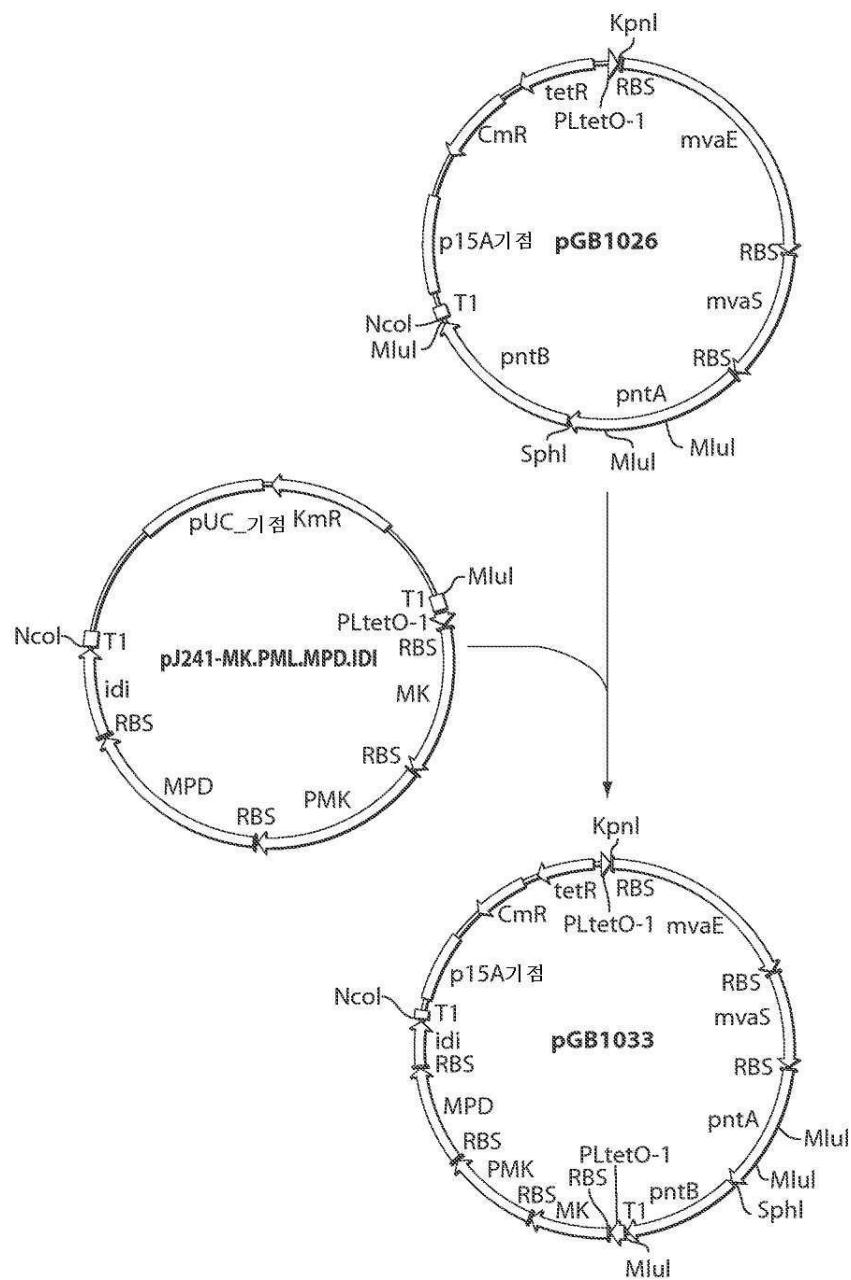
도면24

ACCGGTGCTAGAGGCATCAAATAAAAGAAAGGCTAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTATCTGTTGTTGTCG
 GTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAATCCGCCCTAGATCTAGATTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCC
 CTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCTGTACAGAAGGAGATATACATATGATCATCG
 AAACCCCCTCCAAGTAATCCTGTCGGAGCAGCGGTTGTTATGGTTACCGTGCCTACAGCATGGCAATTGAT
 CTGACCGACCAATTGAGATCAAGAAAGCAAGGAGCAAATCATCTGAATCTGAACCATCTGAACAAATCGCT
 GGGTCTGAATCTGAACGAAATCAAGAATATCAATCGAACAAATTGGCAGCTCAAGTATTGTCGCTATCA
 AGAACACCCTGGACTACCTGAATATCGAACCGAAAAGCTGGTTAAGATCAACATCAGCTCCAAATCCGATTAGC
 TGTGGCTGGTTCTAGGGCAGCATTACGATCGGACGTTAAAGGGTTCTGGCTTACAATTAAGAGTTGAA
 AGACGACAAATCGCAAGCTGGCTACATGGTGAAGGAAATCAGGTAACGATCCACGGGATACCGAACGCA
 CTATTACGTACAAGGTTCTGAAATCAAGAATAACAAATCCGAAATCAAGGTGAGTTGAGGAATTCTG
 AAGAACTGAAATTCTGATCGTTATCGCAGAAACGCAAGAAGAAACCGCCAAATTGTCGAGAACAGTCCAAA
 AATCGAGAACAAAGATGAGATTTCAAGGAATCGATAAGTATTGACGAGGGCTGAAGAGATAAGAATAAGAGG
 ACTTTGGTAAGTGTGATGACCAAAATCACGAGCTGCTGAAGAGCTAACATTAGCACCCGAAGCTGGACCCATC
 GTTGATATGGCAACCGTTTGGCTTCTGGCTACATGGTGAAGGAAATCAGGCTGGGGCTGGTGGTTGCGTCAATTCTG
 TAACGAAGAGAAAGAAAAGGAACGCTGAAAGAGCTGAACAAAGAGACGTCAGCATTTCAACTCTGTATGATGA
 ATTGAAAGAGAACATACCATGATCGAACTAACATCCCGAACATTGTCATCGCCGGCAGATGCACTGGTT
 GAGCGGGTCAACCGGGATTATTGTCGCGTGGACAGTTCCTCACGGTCACGGTAGAGAACACCGATGAGGG
 CAGCATCCAGCGCGCAATAACGAGCTGCGGATTCTGGGACCCGTCGAATGGTGAACCTGGTACTGGATATCC
 GTGAAAATCCGTTTCACTACGTTCTGGCTTATTCACCTGACCGAGAAGTATGCAAAAGACGATAAGGAACCTG
 AGCTCTCACACCTGAAAGTGGACAGCGAGCTGGATTGAGCAACCGCCAAATACGGTTGGCAGCAGGGTGC
 AGTCACCGTGTACCGTGAAGGCTGAACCTGAAATATCTTACATCTGGCTCTGGAAAAGAGGAATCTTAAGCTGT
 CGCGCTGGCACCTGCGAGCTGGGATTCACGAGTGGCTAACAGAAGGCTGCGACCGAGACTCTGACCGATCTCTGGTATG
 GCATTTAGCACTTTGACCACTGAGTGGCTAACAGAAGGCTGCGACCGAGACTCTGACCGATCTCTGGTATG
 CTGGCGGAGCTGATGATTTCCCTGAAAGTCCGAAACATTGCGTCTGCTGATTGGCTGGACGGGTTGCGCTG
 CGAGCACCTCTGACCTGTTGATGCGTCAACCACTCTAAAGAGAACAAAGGGCTATGAGCAATTCTGATG
 AAATCCGTCGTCGAAACCATGATTAACCGTTTCAATACCGCAAGATTAGCTGATTCAAAAACAGATCAC
 CAAGAACCGTCAACTGTTGGCAGAACCTGAGCAGCTGACGGCGTTGATTGAGTACCAAGCTGAACCTGGCA
 GTGACCTGGCGAGAGCTATACTGGTGGCTAAAGCAGGGTGTCTGGCGGACTGCGTATTGTTATCTTC
 CGCCAGAACGCTGGTATCTGCGCTGATGACCGCGTGGAGAAGGAGCCATCACGCCGTGCCGTTGACGTTA
 CACCTATGGTCAGAAAGATGCAAGAGAACACGAGAGAACGCTTAAGAGGAGCTAAAAAAATGACCGTCTACAC
 CGCCAGCGTACCCGACCGTAAACCTGGTGAAGTACTGGGTTAAACCTGATACCAAGCTGAACCTGGCA
 CGAACAGCAGCATCGCTTACCGTCCACCGAGCTGACCGTACCGCAGCTACTGCCGGAGTTC
 GAACCTGACACCCGTGGCTGAACGGCAACCGCATAGCATGGACAACGACGCTACGCAAACACTGCGTGC
 GCGCAATTGCGAAAGAAATGGAATCTAAAGATGCAAGCCTGCCTACCGTACGCCAGTGGAGCTGCACATTG
 GCGAGAACAAATTCCGACGGCGCAGCGCTGGCAAGCTGCGCAGGTTGCGACACTGGTACGGCCATCG
 AAATTGTCACATTGCCCAATCCACCTGGAGATTCTCGCATCGTAAAGGCAGGGCAGGCCGTGCCGTC
 TCTGTTGGCGTTATGTCGCTGGAAATGGCAAGGGCGAGGACGGTACCGATTGATGGCTGTCAGATTGCG
 ATACAGCAGCGATTGGCGAAATAGGGCTGGCTCTGGTCTGCGCATACAGAAGGACGTGAGCAGCACCA
 GGTATGCAACTGACGGTGCCTACCGAGCTGTTAACAGAGCGATTGAGCACGTCGTTCCGAAGCGTTGCAAGT
 CATGCGAACAGCGATGTCAGAGAACACTTGTCTACGTTGCGAAAGAAACCATGATGGACTCCAATAGCTCCAC
 CGACCTGTCGATTCTTCCCGCATCTCTATATGAAACGATACGAGCAAACCGATCATCTCTGGTGTACACG
 ATCAATCAGTTTATGGCGAAACCTTGTGCGCATACCCCTGATGGGCTCGAACCGCAGTCTGACTACCTG
 AGAAAACGAAAGAACAGCTGTTGCGCTTATTCACAAACTGTTGGCAGCGTGGGGGTTGGGACAAAAGTTCA
 CGGAACAGCTGGAGGATTAAACCCAGATTGAGAGCAGCAATTACCGCTGTAATTGGATCTGGAGCTG
 AAAGGACGTCGCGCGTGTATTCTGACCCAAGTTGGTTCTGCCCGCAAGAAAGAACGAGTCTGATG
 AACCGGCTGCCAAGGAGTAGGAAGGAGATAAAAATGCAAAACCGAACACGTAATCTGCTGAACGCCACAAGG
 TCCCGACGGTACGCTGGAGAAATGCAACCCCACACCGCTGACGACCCGTTGACCTGGCTTTAGCTCTGGCTG
 TTCAACGCAAAAGGTCAACTGCTGGTACCCGCCGTGACTGAGCAAGAAGGCGTGGGGGTTGCTGGACTAATAG
 CGTGTGGGTACCCGCACTGGTGAAGCAATGAGGAGCGAGCTGATTGTCCTGCTTATGAAATTGGGTG
 AAATCACCCCGCTGAAAGCATTATCCGACTTCCGTTACCGTGCACCGATCGAGCGGTATCGTAAAG
 GTTGTCGGCTTTCGGCAGCTACGACCGAGCGCTGCAAATCAACGACGACGAGGAGTGGACTACCGAG
 TGATCTGGCCGACGTTCTGATGCCATGGCAGTGGCACCCCGTGGGCTTTCTCCGTTGATGGTACGAGG
 ACCGTGAGGCGCGTAAACGTTGAGCGCTTACCCACTGAAGTAAACATGGGCTAGAGGCATCAAATAAC
 AGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTCGTTATCTGTTGTTGCGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCG
 CGCCCTAGACCTAG (서열 번호 8)

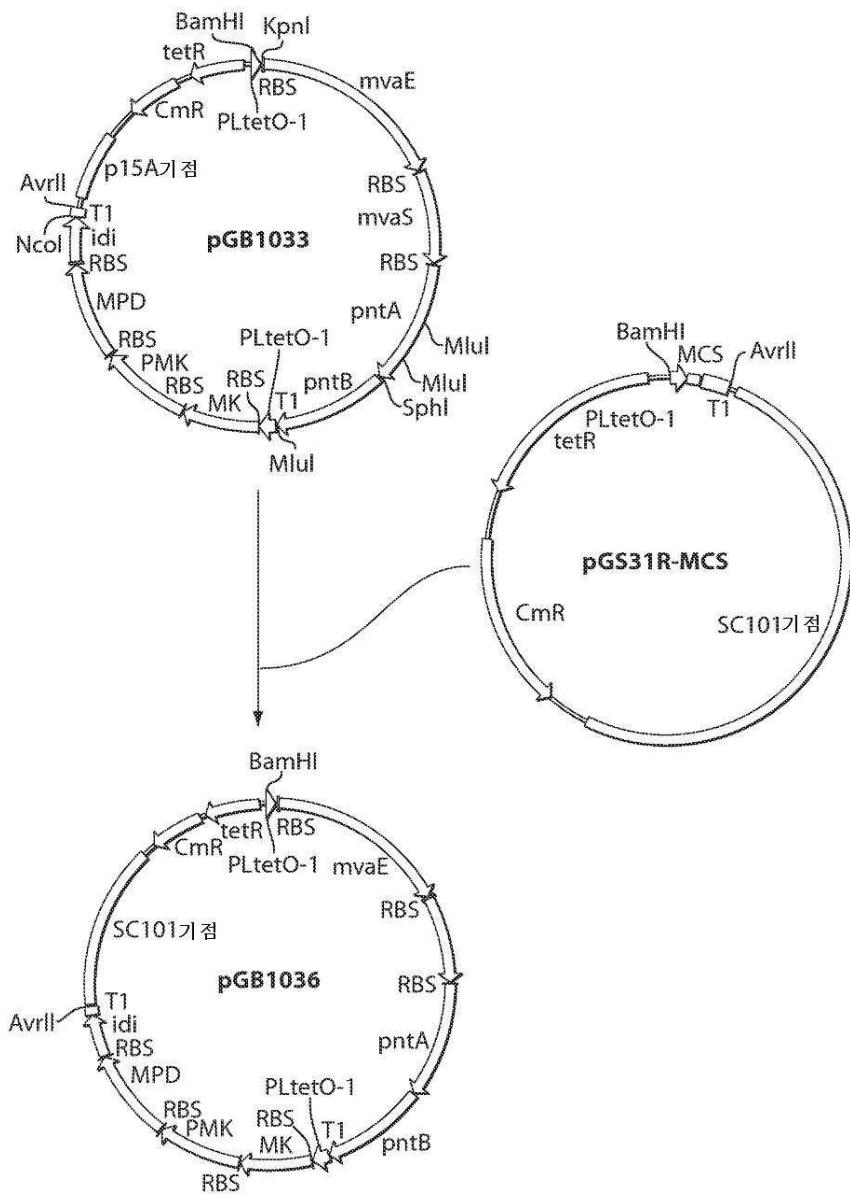
도면25



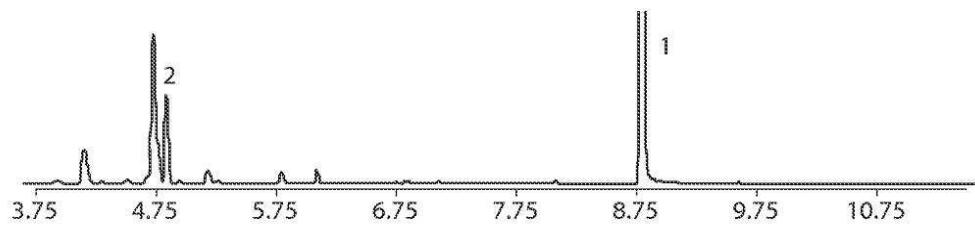
도면26



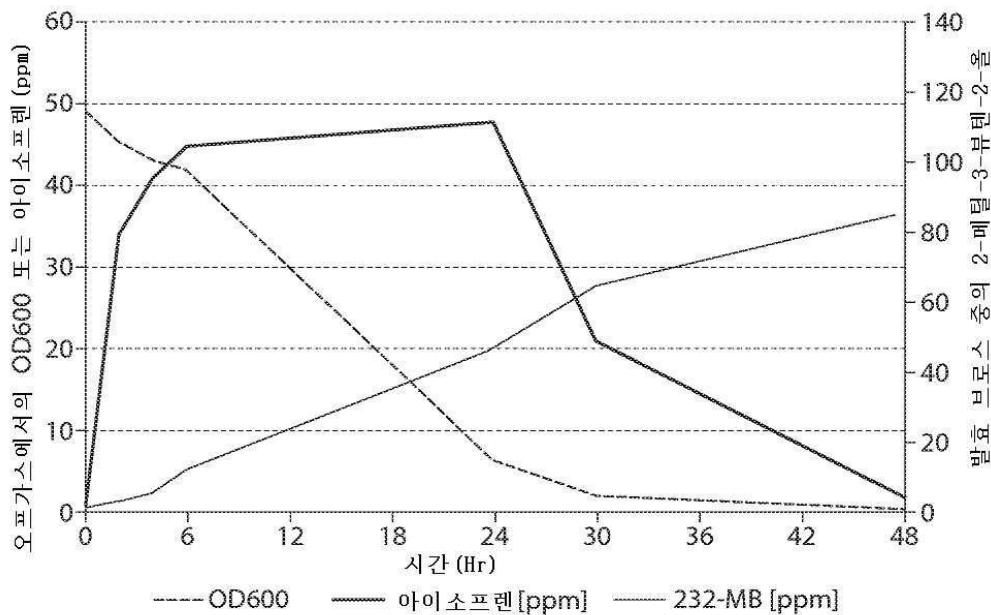
도면27



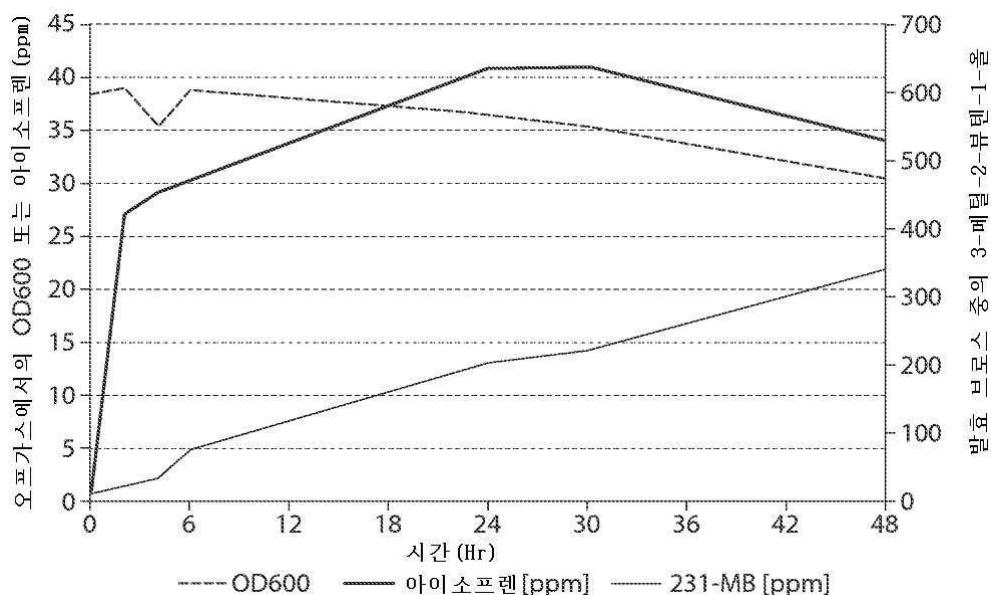
도면28



도면29



도면30



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GLYCOS BIOTECHNOLOGIES, INC.

<120> MICROORGANISMS AND PROCESSES FOR THE PRODUCTION OF ISOPRENE

<130> WO/2013/173437

<140> PCT/US2013/41108

<141> 2013-05-15

<150> 61/776,485

<151> 2013-03-11

<150> 61/688,514

<151> 2012-05-16

<160> 13

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1235

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 1

aggaggtaaa acatatgcac caccatcatc accacatgctt 60

ccatcggttc cgctgcggcg ttgctggcag gtttccgtcc gccaccgcgt gcccggcgc 120

tgccgccagg ccgtctggcg accaccgaag attacttcgc gcaacaagcg aaacaggcgg 180

tgacgcccga tgtgtatggca caactggct acatgaacta cattgacttc atcagcccgt 240

tctacagccg tgggtgcagc tttgaagcgt gggagttgaa gcatacgccg caacgcgtca 300

ttaagtatag cattgcgttc tatgcatacg gtcgtgcgtc ggtgcactg attgaccgaa 360

agctgcgtgc cctggcaggt cacgatctgg atatcgccgt gtctaaatg aagtgcaga 420

gtgtttgggg tgactggaa gaggatggtt ttggcaccga cccgatcgag aaagagaaca 480

tcatgtacaa aggtcatctg aacctgatgt atggcctgtt tcagctgggt acgggttagcc 540

gtcgctacga ggcagagcac ggcacccctga cccgtatcat ccatgacgag attggcccta 600

atccgttgcg cggcatcgta tggtaaccgg acaattactt tggccgtgt aacagcgtcg 660

cgtacttgag cctgtgggtt tatgaccgtc tgcacggcac tgattatcgcc gcagccaccc 720

gtgcttgggtt ggatttcatt cagaaggacc tggatcgaccc ggagcgcgggt gcattctacc 780

tgtcttacca cccggaaagc ggtgctgtta agccgtggat tagcgcgtat accactgcata 840

ggacgcgtggc catggttcac ggcatggatc cggcggttag cgagcgtac tatccgcgt 900

tcaaacagac ctgcgttcaa gtgtacgacg agggccgtaa agccgggtt cgtgaaaccg 960

ccggtaaccga cgacgcccac ggtggcgtgg gtctggcagc cgccgttacg ctgttgg 1020

cacgtgagat gggcgatcag caactgtttg atcagctgtc gaatcatctg gaaccgcctg 1080

ccaaaccgag cattgtcagc gcgtccctgc gttatgaaca ccctggctcc ctgctgttg	1140
atgagctgct gttcctggct aaagttcatg cagggttgg tgcgctgctg cgtatgccgc	1200
caccggcagc gaagctggcg ggcaagtaac tcgag	1235
<210> 2	
<211> 1400	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 2	
aggaggtaaa acatatgcat catcaccacc accacatgga aaagatcgag gtaagcatta	60
acagcaaaca tacgattaaa ccgagcacga gctccacccc gttgcagccg tataagctga	120
ccctgctgga ccaactgacc ccacccggcat acgtcccaat cgtcttttc tatccgatta	180
cggatcacga cttaaatctg ccgcagacgc tggcagacct gcgtcaagcc ctgtccgaaa	240
ccctgactct gtattaccg ctgagcggtc gtgtgaagaa taacttgtac attgacgact	300
tgcgaagaggg cggtccgtac ctggaagcgc gtgtcaattt tgatatgacg gacttcctgc	360

gcctgcgtaa gattgagtgt ttgaacgagt tcgtgccat taagccgtt agcatggaag	420
ccattagcga cgagcggtac ccgttgcgtgg gtgttcaagt caacgtttc gatagcggtt	480
tgcgcgtcg ttttcggtt ttcataaacat tgcgtacgg cggcaccgcg gactgcttcc	540
tgaatctgt gggtgccgtt ttccgcgtt gcccgcgaaa tatcatccac ccgagccgt	600
gcgaggccgc actgctgttc ccaccgcgc atgatttgcg ggagaatatat gtgtatcaga	660
tggaaaggccct gtggttcgcg ggtaaaaagg ttgcgaccgg tcgctttgtc ttgggttta	720
aggcgatcag cagcatccag gacgaggcaa agtctgaatc ggtgcctaag ccgtcccggt	780

tgcacgcgtt caccggctt ctgtggaaac acctgattgc ggcaagccgt gctctgaccc	840
ctggcaccac ctgcacgcgc ctgagcattt cggcacaggc cgttaatctg cgtacccgca	900
tgaacatgga aactgtgtc gacaatgcg cccgcacact gttttgggtgg ggcgcaggcta	960
ttctggagtt gagccacacc accccggaga tcagcgatct gaagctgtgc gatctgggtga	1020
acttggtaaa tggcagcggtt aaacaatgca atggtgatca ctgcgaaacg ttiaaggtaa	1080
aagagggtcta tggccgtatg tgtgaatatc tggatttca gcgtacgatg agcagcatgg	1140
agccggcacc ggatatctac ctgttagca gctggacgaa ctcttttaac ccgtggact	1200

ttggttgggg tcgtaccagc tggatcggtt tcgcaggtaa gatcgagagc gccagctgca	1260
---	------

aattcattat tctggtgct acccaatgtg gctctggat cgaggcttgg gtgaacctgg	1320
aagaagagaa aatggccatg ctggaacaag acccgattt cctggcgctg gctagcccga	1380
aacactttat ttaactcgag	1400
<210> 3	
<211> 602	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 3	
attaaagagg agaaaatata atgacggcag tatgccttgt ccggcacggc gaaaccgatt	60
ggaacctgca acagaaatgc cagggtaaaa ccgatatccc gctgaatgct acggcgaaac	120
gtcaggcccg tgaaacgggt gaatacgtca aagacttttag ctggacatc attgttacca	180
gccccgtgaa gcgcgccaag cgtacggctg agatcatcaa tgaatacctg catctgccga	240
tgcgttgaat ggacgacttt aaagagcgcg attatggca tgctgagggt atgcgttgg	300
aggagcgcac caagcgttat ccggacaaca ttatccgaa catggagact ctggaagagc	360
tgacggaccg tttgatggc ggtctggcaa aagtcaatca ggcatacccg aacaaaaagg	420
tgctgatcgt tgcacatggt gccgcaattc acgcgtctgac gacggagatt tctggtggtg	480
accggagct gcaaaggcacc cgtctggtca atgcgttgcgtt gtcgaatatt gaatttgcgg	540
aagaaaagtgcgttatcaaa gactacaaca ttaactccca tctgagcgggt ttcatcaaat	600
aa	602
<210> 4	
<211> 2494	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 4	
ggtagccat ttaatataag gaggtaaaac atatgaacgt tgaaacccaa cacacgcga	60
cgtatgggtga cattttgtca caacatagcc agaaactgga actgctgaaa accgtcctgc	120
gtaacgtcgc tgagctggac gcactggaag gcttgaacat gattgacgcg gtgcagcggtt	180
tgggtatcga ctacaattt cagcgtgaga ttgacgagat tctgcacaag cagatgagca	240

tcgtcagcgc gcgtgacgac ttgcacgagg ttgcgtcgcttccgtctg ctgcgccagc	300
atggctattt cgtcccagag gatgtttca acaattcaa ggactcgaaa ggtacgttca	360
aacaggtgct gggtgaggac atcaagggcc tggatggcgt gtacgaggcg agccaactgg	420
gcaccgaggc cgaggacatt ctgggtgaag cggagaagtt cagcggccac ttgctaaaa	480
cgagcctgag ccacctggat catcatcgta tcgttattgt ggcaataacc ttgcgcaatc	540
cgcaccacaa aagcctggcg ctttcatgg cacgttaactt ttgcgttacg agccaagcta	600
ctaatacgatcg gctgaatctg ttgaaagagg tcgcacaagac ggacttcaat atggcgct	660
ctctgcacca aaatgagatt gttcagatgt ccaaattgtg gaaagagctg ggcctggcca	720
aagagctgaa gttcgccgt gaccagccgc tgaagtggta cattggagc atggcggtcc	780
tgaccgatcc gaaactgagc gaagagctg ttagagctgac gaagccaatc agctttgttt	840
acttgattga cgatatctt gacgttacg gcacgctgga cgacctgatc ctgttaccg	900
aggccgttaa tcgttggag atcacggcga tcgaccactt gcctgactat atgaagattt	960
gttttaaggc attgtacgt atgaccaatg agtttagcag caaggtctat ctgaaacatg	1020
gttggAACCC gctgcaaaatca gctggcgag ctgtgttacgcattcctgg	1080
tgcaggccaa gtgggttgcg agcgtaaagc tgccaaaaag cgaagagttt ttaagaatgt	1140
gtatttgtgag cagcgggtt aatgtggtgc tgggtcacat gttttccig ctgggtcaaa	1200
acatcacccg caaatctgtc gagctgctga acgaaactcc ggcgatcatt agctctagcg	1260
ctgcgatcct gcgcctgtgg gatgatgttgg gttagcgcga ggacgagaat caagacggta	1320
acgatggtag ctatgttgcg tgcgttacgttgg aagaacacgaa agttgcagc atcgaagaag	1380
cgcgcgagaa aaccatcaac atgattagcg atgagtggaa gaagttgaat cgcgagttgc	1440
ttagccccgaa cccgttccca gcaagttca ccctggcgag cctgaacctg gcacgttatgat	1500
tcccgctgat gtactcctac gacggtaatc agtgcctgcc ttccctgaaa gatgtatgt	1560
agctgatgtc gtacgaaacc gttagcatgt gatgaggaat aaaattatgc tgcgttagct	1620
gctgcgtggc ctgacccact ttccgcgtgt gaactccgtt caacaaccgt cgtgcgcctt	1680
tgcggcctg caatttcgtc cgcgcagcat gcagctgctg gccgaagatc gtaccgacca	1740
catgcgtggt gctagtagt gggccggcgg tcaatccaa gatgactga tgctgaaaga	1800
cgaatgcatt ctggtcgtat cggatgacaa catcacccgt catgtgagca aactggatgt	1860
tctataagttt ctggccgacc agccggcggt tctgtgtcac cgtgcattct ctgttttct	1920
gttcgtatgac cagggtcgcc tgctgtgtca gcaacgtgcc cgcagcaaga ttaccccttcc	1980
gtctgtttgg accaatacgt gctgttcaaa tccgcgtgcac ggccagaccc cggatgaagt	2040
ggatcagctg tcgcaagtgg ctgtatggc ac gttccgggt gcaaagcgg cggcaattcg	2100

taagctggaa catgaactgg gtatccggc acaccagctg ccggcaagtg catttcgttt
cctgacccgc ctgcattatt gtgctgccga tgttcagccg gcgccaaccc aatcagccct 2160
2220

gtggggcgaa cacgaaatgg attacattct gttcatccgt gctaacgtga ccctggcgcc
gaatccggat gaagtggacg aagttcgta tgtcacgcag gaagaactgc gccagatgat
gcaaccggat aacggtctgc aatggtcccc gtggttcgc attatcgctg cgcgttcct 2280
2340
2400
2460
2494

<210> 5

<211> 3228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 5

ggatccccc tatcagtgtat agagatgtac atccatatca gtgatagaga tactgagcac
atcagcagga cgcaactgacc ggtacccitg aattccccac gcgttagatct cttagatgtac 60
120
accatgggct agaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg gcccttcgt
tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gccctagacc
taggcgttcg gctcgccga gcggatcatcg ctcaactaaa ggccgtataa cggttatcca 180
300
cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa agggcagcaa aaggccagga
accgtaaaaa cgcgctagcg gagtgatac tggctacta tggccact gatgagggtg 360
420

tcaagtgaagt gcttcatgt gcaggagaaa aaaggctgca ccggcggtc agcagaatat
gtgatacagg atatattccg cttcctcgct cactgactcg ctacgctcg tcgttcgact 480
540
gcggcgagcg gaaatggctt acgaacgggg cggagatttc ctgaaagatg ccaggaagat
acttaacagg gaagtggagag ggccgcccga aagccgttt tccataggct ccgccccct
gacaaggcatc acgaaatctg acgctcaat cagtgggtgc gaaacccgac aggactataa 600
660
720
agataaccagg cgtttcccc tggcggtcc ctgcgtcgct ctccgttcc tgccttcgg
tttaccggtg tcattccgtc gttatggccg cgtttgtctc attccacgccc tgacactcag 780
840

ttccgggtag gcagttcgct ccaagctgga ctgtatgcac gaacccccc ttcatgtccga
ccgctgcgcc ttatccgta actatcgct tgagtccaaac ccggaaagac atgcaaaagc
accactggca gcagccactg gtaattgatt tagaggagtt agtcttgaag tcatgcggcc 900
960
1020

gttaaggcta aactgaaagg acaagtttg gtgactgcgc tcctccaagc cagttacctc ggttcaaaga gttggtagct cagagaacct tcgaaaaacc gccctgcaag gcggttttt cgtttcaga gcaagagatt acgcgcagac caaaacgatc tcaagaagat catttatta agtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtattgg tatctgcgct ctgctgaagc	1080 1140 1200 1260
 cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtgtttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccttgcat ctttctacg gggctgacg ctcagtgaa cggaaaactca cgttaaggga tttggtcat gactagtgtct tggattctca ccaataaaaa acgcccggcg gcaaccgagc gttctgaaca aatccagatg gagttctgag gtcatctactg gatctatcaa caggagtcca agcgagctcg atatcaaatt acgcccccc ctgccactca tcgcagact gttgttaattc attaaggcatt ctgcccacat ggaagccatc acagacggca tgatgaacct gaatgccag	1320 1380 1440 1500 1560 1620 1680
 cgccatcagc accttgtcgc cttgcgtata atattgccc atcgtaaaaa cggggcgaa gaagttgtcc atattggcca cgttaaatc aaaactggtg aaactcaccc agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaacc tttagggaaa taggcccagg tttcaccgt acacgccaca tcttgcgaat atatgtgttag aaactgccgg aaatcgctgt ggtattcact ccagagcgat gaaaacgtt cagttgcgc atggaaaacg gtgtacaag ggtgaacact atcccatatc accagctcac cgtcttcat tgccatacgg aactccggat gagcattcat caggcggcga agaatgtgaa taaaggccgg ataaaacttg tgcttatttt tctttacggt	1740 1800 1860 1920 1980 2040 2100
 ctttaaaaag gccgtaatat ccagctgaac ggtctggta taggtacatt gagcaactga ctgaaatgcc tcaaaatgtt cttacgaig ccattggat atatcaacgg tggtatatcc agtgatttt ttctccattt tagttcctt agctcctgaa aatctcgata actcaaaaaa tacgccccgt agtgatctt ttcattatg gtgaaagttt gaaaccttta cgtgccgatc aacgtctcat ttccggcaga tatcgacgatc gtcatcaaac ctgtcgccca ctctaggcta ctcagctact agaaagctt agacccactt tcacattaa gtttttttcaatcccgag atgatcaattt caaggccgaa taagaaggct ggctctgcac ctgggtgatc aaataattcg	2160 2220 2280 2340 2400 2460 2520
 atagcttgtc gtaataatgg cggcatacta tcagtagtag gtgtttccct ttcttctta gcgacttgcat gctcttgcac ttccaaatcg caacctaaag taaaatgcc cacagcgctg agtgcataata atgcatttc tagtggaaaaa cttgttggc ataaaaaggc taattgattt tcgagagttt catactgttt ttctgttaggc cgtgtaccta aatgtacttt tgctccatcg cgatgactta gtaaagcaca tctaaaactt ttagccttacgtaaaaaa atcttgccag cttcccccctt ctaaaggcga aaagttagt gttgcctat ctaacatctc aatggctaag	2580 2640 2700 2760 2820 2880

gcgtcgagca aagcccgctt atttttaca tgccaataca atgtaggctg ctctacacct 2940

agcttctggg cgagtttacg gggttgtaaa cttcgattc cgacccattt aagcagctct 3000
 aatgcgctgt taatcactt acttttatct aatctaaca tgtgaatacg gggcgggatt 3060
 tcatggatat gtttcttct gcgagaacca gccatattt aactttctc tcaaatttat 3120
 gaatctatta tacagaaaaa tttcctgaa agcaaataaa tttttatga tttccctgaa 3180
 caattcgcgc taacttacat taattgcgtt ggcctcactg cccgcttt 3228

<210> 6

<211> 4236

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 6

ggatcctccc tatcagtgtat agagatgtac atccstatca gtgatagaga tactgagcac 60
 atcagcagga cgcactgacc ggtaccttg aattccccac gcgtagatct ctagatgtac 120
 accatgggct agaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaagacgtg gcccttcgt 180
 tttatctgtt gtttgcgtt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gccctagacc 240
 tagggtaacgg gtttgcgtc ccgcaaacgg gctgtctgg ttgtgttagt ttgttatcag 300
 aatcgcatat ccggcttcag gtttgcggc taaaagcgtt atttcttca gaattgccat 360
 gatTTTCC ccacgggagg cgtcactggc tccctgttg tcggcagctt tgattcgata 420

agcagcatcg cctgtttcag gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtaac aagttgtctc 480
 aggtgttcaa ttcatgttc tagttgtttt gtttactgg tttcacctgt tctattaggt 540
 gttacatgct gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacacgc tttaatgca 600
 cccaaaactc gtaaaagctc tgatgtatct atcttttta caccgtttc atctgtcat 660
 atggacagt tttcccttga tatctaacgg tgaacagttt ttctactttt ttgtgttagt 720
 cttgtatgtt cactgtataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatTTAC 780
 cagttatgttc tcttagtgtgg ttctgtttt ttgcgtgagc catgagaacg aaccatttag 840

atcatgttta ctttgcgtt cactaaaaa tttgcctca aaactggta gctgaatttt 900
 tgcatgtttaaa gcatcgta gtgttttct tagtccgtt cgttagttagg aatctgtatgt 960
 aatgggttgtt ggtatTTGT caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa gttcggttac 1020
 gagatccatt tgtctatcta gttcaacttg gaaaatcaac gtatcgtcg ggcggcctcg 1080

cttatcaacc accaatttca tattgctgta agtgttaaa tcittactta ttggttcaa	1140
aacccattgg ttaagcctt taaactcatg gtagttattt tcaagcatta acatgaactt	1200
aaattcatca aggctaact ctatattgc ctttgagtt ttctttgtg tttagttttt	1260
taataaccac tcataaatcc tcatagaga tttgtttca aaagacttaa catgtccag	1320
attatatttt atgaatttt ttaactgaa aagataaggc aatatcttt cactaaaaac	1380
taattctaat tttcgcttg agaacttgcc atagttgtc cactggaaaa tctcaagcc	1440
tttaaccaa ggattcctga ttcccacagt tctcgcatc agctctctgg ttgctttagc	1500
taatacacca taagcattt ccctactgat gttcatcatc tgagcgtatt gttataagt	1560
gaacgatacc gtccgttctt tccttgtagg gtttcaatc gtggggttga gttaggccac	1620
acagcataaa attagcttgg tttcatgctc cgtaagtca tagcgactaa tcgctagttc	1680
atttgcttg aaaacaacta attcagacat acatctcaat tggcttaggt gattttatc	1740
actataccaa ttgagatggg cttagtcaatg ataattacta gtcctttcc cgggagatct	1800
gggtatctgt aaattctgct agaccttgc tggaaaactt gtaaattctg cttagaccctc	1860
tgttaattcc gctagaccc ttgtgtttt tttgtttat attcaagtgg ttataattta	1920
tagaataaaag aaagaataaa aaaagataaa aagaatagat cccagccctg tgataactc	1980
actactttag tcagttccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt ttgctctct	2040
acaaaaacaga ccttaaaacc ctaaaggctt aagtagcacc ctgcgaagct cgggcaaatc	2100
gctgaatatt cctttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt ttcgtgaca	2160
ttcagttcgc tgcgctcacg gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgcc	2220
ttttatggat tcatgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagccgtc acgggcttct	2280
cagggcggtt tatggcggtt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgtt gttcagcagt	2340
tcctgccctc tgattttcca gtctgaccac ttggattat cccgtgacag gtcattcaga	2400
ctggctaattg cacccagtaa ggcagcggtt tcatcaacag gcttacccgt ctactgtcc	2460
ctagtgcttg gattctcacc aataaaaaac gcccggcggc aaccgagcgt tctgaacaaa	2520
tccagatgga gttctgaggt cattactgga tctatcaaca ggagtccaaag cgagctcgat	2580
atcaaattac gccccccct gccactcatc gcagactgt tgtaattcat taagcattct	2640
gcccacatgg aagccatcac agacggcatg atgaacctga atgccagcg gcatcagcac	2700
cttgcgcct tgcgtataat attgcccatt cgtaaaacg gggcgaaga agttgtccat	2760
atggccacg ttaaatcaa aactggtaa actcacccag ggattggctg agacgaaaaa	2820
catattctca ataaaccctt tagggaaata ggcagggtt tcaccgtAAC acgccacatc	2880

ttgcgtat atgtgttagaa actgcccggaa atcgctgtgg tattcactcc agagcgatga 2940
 aaacgttca gtttgctcat ggaaaacgggt gtaacaagggt tgaacactat cccatatcac 3000
 cagctcacccg tcttcatttgc ccatacgaa ctccggatga gcattcatca ggccggcaag 3060
 aatgtgaata aaggccggat aaaacttgttgc ttattttc ttacggctt taaaaaggc 3120
 cgtaaatatcc agctgaacgg tctggttata ggtacattga gcaactgact gaaatgcctc 3180
 aaaaatgttct ttacgtgcc attggatata atcaacgggt gtatattccag tgatttttt 3240
 ctccatttttta gcttccttag ctctgaaaaa tctcgataac tcaaaaaata cggccggtag 3300
 tgatcttatt tcattatgtt gaaagtggaa accttttacg tgccgatcaa cgctcttattt 3360
 tcgcccagata tcgacgtcgt catcaaacct gtcgcgcact ctaggctact cagctactag 3420
 aaagcttaag acccacttcc acatctaatttgc ttattttcta atccgcagat gatcaattca 3480
 aggccgaata agaaggctgg ctctgcacctt tggtgtatcaa ataattcgat agcttgcgt 3540
 aataatggcg gcataactatc agtagtaggt gttccctt cttctttagc gacttgatgc 3600
 tcttgcattt ccaatacgca acctaaagta aatggccca cagcgctgag tgcataataat 3660
 gcattctcta gtgaaaaacc ttgttggcat aaaaaggctt attgattttc gagagttca 3720
 tactttttt ctgttaggccg tgtacctaaa tgtacttttgc ctccatcgat atgacttagt 3780
 aaagcacatc taaaactttt agccttattt cgtaaaaat cttggccagct ttccccttct 3840
 aaaggccaaa agtgagtagtgc ttgcctatct aacatctaa tggctaaggc gtcgagcaaa 3900
 gccccgttat ttttacatgc ccaatacatg gtaggctgtt ctacacccatg cttctggcg 3960
 agtttacggg ttgtttaacc ttgcatttgc accttattaa gcagctctaa tggctgttgc 4020
 atcactttac ttttacatgc tcttaacatg tgaatacggtt ggggatttc atggatatgt 4080
 ttctttctgc gagaaccaggc catatttaaa ctcttccttc aaattttatgc atctattata 4140
 cagaaaaattt tccctgaaag caaataaattt ttttatgatt tccctcgaca attcgcgcta 4200
 acttacatttta attgcgttgc gtcactgccc cgcttt 4236
 <210> 7
 <211> 3611
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 7
 ggttaccatttta aagaggagaa aatataatgtt aactgtgtt aatcatcgatc gcccgtcgca 60

cgccaatcgg caagtataag ggttctctga gccaaatgg cgccatcgat ctggcaccc	120
atgtcacgac ccagttgtg aagcgtcatt ccaccatcg cgagggaaatt gatcaggta	180
tcttcgttaa cgtcctgcaa gccggcaatg gtcaaaaaccc tgccgtcag attgcatta	240
actctggcgtt gagccacgag atcccgcta tgacggtgaa tgagggttgt ggcagcggt	300
tgaaggcggt tatcttgca aaacagctga tccagttggg tgaggccgag gtactgattt	360
cgggtgttat cgaaaacatg agccaggcgc caaaaatttgc acgttttac tatgaaactg	420
aaagctatga cgccgcgtt tccagcatga tgtacgacgg tctgaccgtat gcgttcagcg	480
gtcaggcgat gggcctgact gcccggaaatg tggcggagaa gtaccacgtc actcgtgaag	540
aacaagacca gtttagcgtg cattccacgc tgaaagcggc gcaagcacaa gcagaggta	600
tcttcgcaga cgaaatcgcg ccgttgagg tgagccgcac gctggttgag aaagatgagg	660
gtatccgccct taattctacg gtggaaaaacg tgggtactct gaaaaccgtt ttcaaagagg	720
acggtaggt tacggccggt aacgcgagca ccatcaatga tggtgccgagc gccctgatta	780
tcgcaagcca ggagtacgca gaggctcactg gtctggcgtt cctggcgatt atccgtgaca	840
gcgttgaagt gggatcgat ccggcatata tgggtatcgat cccgatataa gcaattcaga	900
aattgctggc ccgttaaccag ctgaccacgg aggagattga tctgtacgat attaacgagg	960
cgtttgcgc aactagcatc gtgtgcgcg gtggatggc ccgtccggag gagaagttt	1020
acatttacgg tggcggtatc agttgggtc atgcaatcgcc gcccacggc gctcgtctgc	1080
tgacctccct gagctaccaa ctgaatcaga aggagaagaa atacggcggtt gccagcctgt	1140
cgattggcggtt tggccatgc tggcaacacg tccgcaacag aagaagaattt	1200
cacgttttta ccaaatttgcg ccggaggagc gtttggccag cctgtcaat gagggtcaga	1260
ttagcgccga taccaagaaa gaatttggaa acaccgcgtt gggcggccatc attgtcaatc	1320
acatgattga gaaccagatc agcgaaaccg aagtgcgtt ggggttggc ctgcacccgt	1380
cggttgcgtt aaccgattac ctgggtccga tggcaaccga agaaccttagc gtattgcag	1440
cactgagcaa cggtgcaag atcgctcagg gttcaaaaac ggtcaatcg cagcgtctga	1500
tgcggtggcca aattgtcttt tatgtatgtgg cagacccgga gtccttgcgtt gacaagctgc	1560
aagtacgtga ggcggaaatgtt ttccaaacagg cggagctgag ctatccgagc atcgtaagc	1620
gcgggtgtgg tctgcgtgac ctgcaatacc gcacgtttga tgagagctt gttagcgtgg	1680
actttctgtt ggacgtgaag gacgcgtatgg gtgcataat cgttaatgcg atgctggagg	1740
gtgtggcgga actgtttcgc gaatgggtcg cagaacaaaa gattctgttc agcattttga	1800
gcaactacgc caccgaatcg gtagttacga tgaaaaccgc gattccagtg tctcgtctga	1860

gcaagggtag caatggtcgt gaaatgcccg agaaaattgt gctggccagc cgctacgcga	1920
gcctggaccc gtatcgcccg gttaccacaca ataagggtat catgaatggc attgaagcgg	1980
tgcgttctggc cacgggcaat gacacccgtg cggtgagcgc ttccctgccac gcatttgctg	2040
ttaaagaggg ccgttaccag ggctgacct cgtggaccct ggatggtag caactgatcg	2100
gcgagatcag cgttccgttgc actggtggcca ccgtgggtgg tgcgaccaaa gtcttgccga	2160
agtcccaggc ggcagcggac ctgctggctg ttaccgatgc gaaggagctg tcccgctgg	2220
ttgctgctgt cggtttggcg caaaacctgg cggcactgctg tgccctggtg agcgagggtaa	2280
ttcaaaaagg tcacatggcg ttgcaagcgc gtagcctggc aatgacggtc ggtgcaaccg	2340
gcaaagaagt ggaggcggc gcacaacacgc tgaagcgcca aaagaccatg aaccaagacc	2400
gcgcaatggc aattctgaat gatctgcgcgca agcaatgaga ggagataaaa tatatgacca	2460
tgcgcattcga caaaatcagc ttcttcgtcc caccgtacta catcgatatg actgcgtgg	2520
cagaagctcg taacgttgac ccgggtaaat tccacattgg cattggccag gatcagatgg	2580
cagttaatcc gatttcgcag gatatcgta ctttgcggc caacgcggct gaggcgttcc	2640
tgaccaaaaga ggataaaagag gccattgaca tggtagctgt gggtagggaa tctagatttg	2700
atgaatccaa agcagcagcc gttgttctgc accgtctgtat gggatccaa ctttcgcgc	2760
gttctttcga aatcaaagaa gcgtgttacg ggcacacggc ggggttgcag ctggctaaaa	2820
accacgttgc actgcaccca gacaaaaagg tgggtttgtt ggcggcagac atcgcgaagt	2880
acggcctgaa cagcgggtggc gaaccaacgc agggcgctgg tgcaatggcg atgctggctg	2940
cgagcgaacc gcgcattctg ggcgtgaaag aagataatgt gatgttact caggatatct	3000
acgacttctg ggcgtccgacg ggcacatccgt acccgatgtt ggacggtcca ctgtcgaacg	3060
agacttacat tcagagctt gcacaagtct gggatgaaca caaaaagcgc acgggtttgg	3120
acttcgcggc ctatgacgcc ttggcgttt acatccgttacgatg ggcacaaaagg	3180
cactgctggc caagatttgc gaccaaacgg aggctgagca agagcgtatc ttggccgtt	3240
atgaagagag cattgtctat tctcgcccg tggtaatct gtatcgggc agccgtatc	3300
tgggtttgtat tagcctgtgt gagaacgcga ccacgtgtac cgccgttaat cagattggc	3360
tgttttccta tggtagcggt ggcgtggcg agttttcac gggcggctg gtggcggtt	3420
acccaaaatca tttgcacaaag gaaacccatc tggcgctgtt ggacaaatgc acggaactga	3480
gcattgcaga atatgaggcg atgttcgcgg aaaccctggta taccgatatt gaccagaccc	3540
tggaggatga actgaagtac tctattagcg ccatcaacaa caccgtgcgt agctaccgtt	3600

actaaacgcg t	3611
<210> 8	
<211> 4174	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 8	
acgcgtgcta gaggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gccttcgtt	60
ttatctgttg ttgtcggtg aacgctctcc tgtagtaggac aaatccgccc ccctagatct	120
ctagattccc tatcagtgtat agagattgac atccatatca gtgatagaga tactgagcac	180
atcagcagga cgcactgacc tgtacagaag gagatataca tatgtatcatc gaaacccat	240
ccaaagtaat cctgttcggc gaggcacgcgg ttgttatgg ttaccgtgcc atcagcatgg	300
caattgatct gaccagcacc attgagatca agggaaacgca agaggacgaa atcatcctga	360
atctgaacga tctgaacaaa tcgctgggtc tgaatctgaa cgaaatcaag aatatcaatc	420
cgaacaattt tggcgacttc aagtattgtc tgtgcgtat caagaacacc ctggactacc	480
tgaatatcga accgaaaact ggtttaaga tcaacatcag ctccaaaatc ccgatttagct	540
gtggcctggg ttctagcgcg agcattacga tcggcacgt taaagcgggt tctggcttct	600
acaataaaga gttgaaagac gacgaaatcg cgaagctggg ctacatgggtt gagaaggaaa	660
tccagggtaa agcatccatc acggataccga gcactattac gtacaaaggt attctggaaa	720
tcaagaataa caaattccgc aaaatcaaag gtgagttcga ggaatttctg aagaactgca	780
aatttctgat cgtttatgcg gagaaacgca agaagaaaac cgccgaattt gtgaacgaag	840
tgcacaaaat cgagaacaaa gatgagatt tcaaggaat cgataaagtg attgacgagg	900
cgctgaagat taagaataaa gaggacttg gtaagttgtat gaccaaaaat cacgagctgc	960
tgaagaagct gaacattagc accccgaagc tggaccgcattt cgatggattt ggcaaccgtt	1020
ttggccttcgg tgctaaactg accggcgctg gcggtgggtt ttgcgtcatt atcctggta	1080
acgaagagaa agaaaaggaa ctgctgaaag agctgaacaa agaggacgta cgcatttca	1140
actgtcgat gatgaatttga agaaggagat ataccatgtat cgaagtaact accccaggca	1200
aactgttcat cgccggcgag tatgcagtgg ttgagccggg tcacccggcg attattgtcg	1260
cggtgccatc gttcgatcgt gtcacgttag aagaaaccac cgatgaggc agcatccaga	1320
cgccgcata cagcagccctg ccgattcggtt ggacccgtcg caatggtaa ctggtaactgg	1380
atatccgtga aaatccgttc cattacgttc tggccgcattt tcacctgacc gagaagtatg	1440

cacaagaaca gaataaggaa ctgagcttct accacctgaa agtgaccagc gagctggatt	1500
cgagcaacgg ccgcaaatac ggtttggca gcagcgggtgc agtcaccgtc ggtacggta aggccctgaa tatctttac gatctgggtc tggaaaacga ggaaatctt aagctgtccg cgctggcgca cctggcagt caggtaatg gttagtgcgg tgacatcgca ggcgttgg acggtgtgctg gatcgcatc accactttg accacgattt ggtcaaccag aaggtcgcga ccgagactct gaccgatctg ctggctatgg actggccgga gctgatgatt ttccctctga aagtccccgaa acaattgcgt ctgctgattt gctggacggg ttgcctgcg agcacctctg acctgggttga tcgcgtacac cagtctaaag aagagaaaca agcggcgtat gagcaattcc	1560 1620 1680 1740 1800 1860 1920
tgtatgaaatc ccgtctgtgt gtcgaaacca tgattaacgg ttcaataacc ggcagatt gcgtgattca aaaacagatc accaagaacc gtcaactgtt ggcagaactg agcagcctga cgggcgttgtt cattgaaacc gaggcgtga aaaacttggt tgacctggcg gagagctata cgggtgcgc taaaagcagc ggtgctgggt gcccgcactg cggattgtt atttccgc agaagtctgg tattctgcgc ctgatgaccg cgtggagaa ggacggcatc acggcgtgc cggtgcacgt ttacacctat ggtcagaaag aatgaaaga gaaacacgag agcaagcggt aaaggaggtt taaaaaatgaa cctgtacac cgccagcgtc accgcaccag taaacatcg	1980 2040 2100 2160 2220 2280 2340
gacgttgaag tactgggta aacgtgatac caagctgaac ttggcgcacga acagcagcat cagcgttacc ctgtcccagg acgatctgcg tacgctgacg agcgcagcta ctgcgcgg gttcgaacgt gacaccctgt ggctgaacgg cgaaccgcatac agcattgaca acgaacgtac gcaaaactgc ctgcgcgacc tgcgcattt ggcggaaatgaaatcta aagatgcaag cctgcctacc ctgagccagt ggaagctgca cattgtgacg gagaacaattt ttccgcacgg ggcaggcctg gcaagctcg ccgcaggctt tgcagcactg gtcagcgcac tgcgaaatt gtaccaattt ccgcaatcca cctcgagat ttctcgcatc gtcgtaaag gcagcggcag	2400 2460 2520 2580 2640 2700 2760
cgccctgccgc tctctgtttt gcggttatgt tgcctggaa atggcaagg ccgaggacgg tcacgattcg atggctgtcc agattgccga cagcagcgt tggccgaaa tgaaggcgt cggtctggtc gtgtccgaca tcaagaagga cgtgagcagc acccagggtt tgcaactgac ggtcgttacc agcgagctgt tcaaagagcg cattgagcac gtcgttccga agcgttgc agtcatgcgc aaagcgatcg tagagaaaga ctggctacg ttgcgaaag aaaccatgat ggactccaaat agcttccacg cgacgtgtt ggattttt ccgcgcgtt tctatatgaa cgatacgacgaa acgcgttca tctcctgggtt tcacacgtt aatcgatggt atggcgaaac	2820 2880 2940 3000 3060 3120 3180

cattgtcgca tacaccctcg atgcgggtcc gaacgcagtc ctgtactacc tggcagaaaa 3240
 cgaaaggcaag ctgttcgct tcatttacaa actgtttggc agcgtgccgg gttgggacaa 3300
 aaagttcacg acggaacacgc tggaggcatt taaccaccag ttcgagagca gcaatttcac 3360
 cgctcgtgaa ttggatctgg agctgcaaaa ggacgtggcg cgtgttattc tgacccaagt 3420
 tggttctggc ccgcaagaaa cgaacgagtc tctgtatcgat gcgaaaaccc gcctgccgaa 3480
 ggagtaggaa ggagatataa aaatgcaaac cgaacacgta atcctgctga acgcacaagg 3540
 cgtcccgacg ggtacgctgg agaaatatgc agcccacacc gctgacaccc gcttgacac 3600

ggcttttagc tcttggctgt tcaacgcaaa aggtcaactg ctggttaccc gccgtgcact 3660
 gagcaagaag gcggtggccgg gtgtctggac taatagcgtg tgccgtcacc cgcaactgg 3720
 taaaaagcaat gaggacgcag tgattcgtcg ttgtcggtat gaattgggtg tcgaaatcac 3780
 cccgcctgaa agcatttacg cggacttccg ttaccgtgcc accgatccga gcggtatcgt 3840
 taaaaacgaa gtttgcgg tctttgcggc acgtacgacc agcgcgctgc aaatcaacga 3900
 cgacgagggt atggactacc agtgggtgtga tctggccgac gttctgcatg gcatcgatgc 3960
 cacccccgtgg gcctttctc cgtggatggt gatgcaggcg accaaccgtg aggcgctaa 4020

acgtttgagc gcgttcaccc aactgaagta accatggct agaggcatca aataaaacga 4080
 aaggctcagt cgaaagactg ggccttcgt ttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc 4140
 ctgagtagga caaatccgcc gccctagacc tagg 4174

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

ccgttaactaa acgcgaaggg aatatcatgc gaattgg 37

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

ctagagatct acgcgtcagg gttacagagc tttc	34
<210> 11	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400> 11	
ggccaagtaa ctgcattaaa gaggagaaaa tataatgacg gcag	44
<210> 12	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400> 12	
gcccttgggg ctcgagttat ttgatgaaac cgctcagatg g	41
<210> 13	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
6xHis tag	
<400> 13	
His His His His His	
1	5