



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0053741
(43) 공개일자 2010년05월24일

(51) Int. Cl.

C12P 1/06 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0112502

(22) 출원일자 2008년11월13일

심사청구일자 2008년11월13일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤여준

서울시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호

박성렬

전라남도 광양시 마동 송보과인빌뷰 아파트 102동 701호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

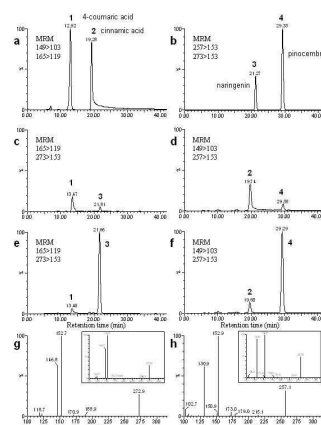
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 방선균에서의 페닐프로파노이드 화합물의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 페닐프로파노이드(phenylpropanoid)의 생합성 경로에 관여하는 효소를 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*)에서 발현시켜 플라바논(flavanones) 또는 스틸벤(stilbens)을 생산하는 변이주에 관한 것이다. 보다 자세히는 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) 유래 4-쿠마릭산/시나믹산 CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase, ScCCL)와 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 유래 찰콘 합성효소(chalcone synthase)를 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 발현시킨 결과, 나린제닌(naringenin)과 피노셉브린(pinocembrin)이 라세믹 형태로 생산되었다. 각각의 유전자 앞에 프로모터를 위치시키고 스트렙토마이세스 베네주엘라가 선호하는 코돈을 사용하여 발현한 결과 플라바논의 생산량이 증가되었다. 또한 메디카고 사티바(*Medicago sativa*) 유래 찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase) 유전자(msCHI_{op})를 ScCCL-atCHS_{op} 유전자에 첨가해줌으로써 (2S)-플라바논을 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 생산해 내었다. ScCCL 유전자와 합성코돈을 최적화시킨 아라키스 하이포게아(*Arachis hypogaea*) 유래 스틸벤 합성효소(stilbene synthase, STS)유전자(ahSTS_{op})를 발현하는 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 발현하기 위해 4-쿠마릭산(4-coumaric acid)이나 시나믹산(cinnamic acid)을 넣어주었더니 스틸벤의 일종인 레스베라트롤(resveratrol)과 피노실빈(pinocylvin)이 성공적으로 생산되었다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

윤진아

충남 천안시 성정동 선경아파트 3동 802호

백지혜

서울시 송파구 문정2동 웨미리아아파트 220동 604호

박제원

경기도 고양시 일산서구 대화동 대화마을 일신건영
602동 1405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 F10703007A220000110

부처명 국토해양부(한국해양수산기술진흥원)

연구사업명 수산특정연구개발사업

연구과제명 수산용 항생제 대체를 위한 녹차 활성성분 플라보노이드의 미생물 생산

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2007년 09월 20일 ~ 2008년 09월 19일

특허청구의 범위

청구항 1

4-쿠마릭산/시나믹산 CoA 리가아제 유전자 *ScCCL*과 찰콘 합성효소 유전자 *atCHS*를 포함하며 각각의 유전자 앞에 프로모터가 부가된 재조합 벡터로 방선균을 형질전환하여 플라바논을 생산하는 것을 특징으로 하는, 페닐프로파노이드 화합물의 생산방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 방선균은 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

방선균을 4-쿠마릭산/시나믹산 CoA 리가아제 유전자 *ScCCL*과 스틸벤 합성효소 유전자 *ahSTS*를 포함하며 각각의 유전자 앞에 프로모터가 부가된 재조합 벡터로 형질 전환시켜 스틸벤을 생산하는 것을 특징으로 하는, 페닐프로파노이드 화합물의 생산방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 방선균은 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*)인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 효소를 포함하는 벡터로 스트렙토마이세스 베네주엘라를 형질전환하여 폴리케타이드 플라바논과 스틸벤을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플라보노이드(flavonoids)와 스틸벤은 페닐프로파노이드 경로에서 생겨나는 폴리케타이드(polyketide)의 일종이다(Schroder 1997; Weisshaar and Jenkins 1998). 이들은 꽃의 색소를 생산하거나 병원균의 공격으로부터 방어 작용을 하는 등 여러 가지 기능을 수행하고 있다(Dixon and Paiva 1995; Springob et al. 2003). 최근 이들의 약물효과를 연구한 결과, 이들이 갖는 항암, 항산화, 항균 및 항염 효과로 인해 의약품으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되었다(Harborne and Williams 2000; Wolter and Stein 2002).

[0003] 플라보노이드와 스틸벤의 생합성은 페닐프로파노이드 경로에서 출발하는데 4-쿠마릭산(4-coumaric acid)이나 시나믹산(cinnamic acid)이 사용되어 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase; 이하 "4CL"과 혼용함)에 의해 각각 4-쿠마로일-CoA(4-coumaroyl-CoA)나 시나모일-CoA(cinnamoyl-CoA)가 만들어진다(도 1). 그 후 타입 III 폴리케타이드 합성효소인 찰콘 합성효소(chalcone synthase; 이하 "CHS"와 혼용함)가 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA를 말로닐-CoA 세 분자와의 축합반응을 통해 플라본 찰콘(flavone chalcones)을 형성한다(Austin and Noel 2003). 이 플라본 찰콘은 찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase; 이하 "CHI"와 혼용함)나 알칼리 조건의 비효소반응을 통해 플라바논(flavanones)으로 변환된다(Mol et al. 1985). 스틸벤 합성효소(Stilbene synthase; 이하 "STS"와 혼용함)는 찰콘 합성효소와 같은 기질을 사용하지만 고리의 폴딩에서 차이를 내어 스틸벤을 합성한다(Tropf et al. 1995)(도 1).

[0004] 의약적으로 중요한 많은 식물유래 이차 대사산물의 확보 방법은 계절이나 지역적 요소에 의해 제한되며 추출과정의 복잡성으로 인해 순수분리 또한 어렵다. 또한 이 물질들의 유기 합성시에는 극한 반응조건이나 독성 화학물질이 이용되기 때문에 미생물을 이용한 생합성 방법이 대량생산에 있어 현실적인 접근방법이 될 수 있다 (Harborne et al. 1975). 최근에 대장균(Hwang et al. 2003; Watts et al. 2004; Miyahisa et al. 2006; Watts et al. 2006; Katsuyama et al. 2007)이나 효모(Jiang et al. 2005; Yan et al. 2005; Leonard et al. 2005; Becker et al. 2003)에서 플라보노이드와 스틸벤이 생산된 예들이 보고되었다.

[0005] 스트렙토마이세스는 다양한 생물활성을 갖는 다양한 폴리케타이드를 생산해내는 숙주로서, 복잡한 구조 또는 아로마틱 구조를 갖는 폴리케타이드를 생산해내었다는 보고(Brawner et al 1991; Pfeifer and Khosla 2001)는 있지만, 플라보노이드와 스틸벤과 같은 식물 특이적인 폴리케타이드를 생산해 낸 보고는 아직 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명은 유용한 생리활성을 나타내는 식물 특이적 폴리케타이드 화합물인 플라보노이드 또는 스틸벤을 방선균에서 생산하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0007] 플라보노이드와 스틸벤은 약리학적 효과 및 건강기능성 효과를 갖는 식물유래 이차 대사산물이다. 본 발명에서는 플라바논과 스틸벤의 생합성에 관련된 유전자를 피크로마이신 폴리케타이드 합성효소(pikromycin polyketide synthase) 유전자가 제거된 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 발현시켰다.

[0008] 본 발명은 스트렙토마이세스 코엘리콜라 유래의 4CL 유전자 (*ScCCL*, GenBank accession no. AL939119)와 아라비도시스 탈리아나 유래의 CHS 유전자 (*atCHS*, GenBank accession no. AF112086)가 포함된 재조합 벡터로 방선균을 형질전환하여 플라바논을 생산하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 상기 프로모터가 *ermE** 프로모터인 것을 특징으로 하는 페닐프로파노이드 생산 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 상기 방선균이 스트렙토마이세스 베네주엘라인 것을 특징으로 하는 플라바논의 생산 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 상기 찰콘 합성효소 유전자 *atCHS*가 스트렙토마이세스 종에 맞추어 코돈 최적화된 것임을 특징으로 하는 플라바논의 생산 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 상기 재조합 벡터에 프로모터가 부가된 메디카고 사티바 유래의 찰콘 아이소머라제 유전자(*msCHI*, GenBank accession no. M91079)가 부가되어 (2S)-플라바논을 생산하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 *ScCCL*과 프로모터가 부가된 아라키아 하이포케아 유래의 스틸벤 합성효소 유전자 *ahSTS*(GenBank accession no. AB027606)의 재조합 벡터로 방선균을 형질전환시켜 스틸벤의 생산 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 프로모터가 *ermE** 프로모터인 것을 특징으로 하는 스틸벤 생산 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 상기 방선균주가 스트렙토마이세스 베네주엘라인 것을 특징으로 하는 스틸벤 생산 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 상기 *ahSTS*가 스트렙토마이세스 종에 맞추어 코돈 최적화된 것임을 특징으로 하는 스틸벤의 생산 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 효소를 스트렙토마이세스 베네주엘라의 변이주에서 발현시켜 플라바논과 스틸벤을 생산하는 과정을 제시하고 있다. 본 발명자들은 *ScCCL*과 *atCHS* 유전자를 하나의 *ermE** 프로모터 조절 하에 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이주 DHS2001에서 발현시킨 결과, 첨가해준 1.2mM 4-쿠마릭산과 시나믹산으로부터 0.2mg/l의 나린제닌과 0.4mg/l의 피노셉트린을 라세믹 형태로 생산해내었다. 본 발명은 폴리페놀(polyphenol) 물질을 스트렙토마이세스에서 생산해 낸 최초의 보고이며, 이를 통해 스트렙토마이세스 베네주엘라를 식물유래 페닐프로파노이드 생산 숙주로 이용할 수 있음을 밝혔다. 그러나, 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 생산된 플라바논의 최초 수율은 대장균(Miyahisa et al. 2005; Watts et al. 2004; Leonard et al. 2007)이나 효모(Jiang et al. 2005; Yan et al. 2005)에 비하여 비교적 낮았다. 그리하여, 본

발명자들은 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이주에서 플라바논의 생산을 늘리고자 다음과 같은 전략을 취했다.

[0018] 첫째, 스트렙토마이세스 코엘리콜라 유래의 4CL 유전자(*ScCCL*)와 아라비돕시스 탈리아나 유래 CHS 유전자(*atCHS*) 앞에 프로모터를 부가하였다. 그 결과, 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이주에서 플라바논의 생산은 5-6배 정도 증가하였다.

[0019] 둘째, 상기 *atCHS* 유전자를 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 사용되는 코돈으로 최적화하는 것으로서, 이를 통해 추가적으로 3배의 생산증가를 이루었다.

[0020] 다양한 폴리프로파노이드 계열 화합물을 생산하기 위해서는 (2S)-플라바논의 생합성이 반드시 필요하다. 코돈을 최적화한 *msCHI* 유전자(*msCHI_{op}*)를 *ScCCL-atCHS_{op}* 발현벡터에 첨가하고 각각의 유전자 앞에 프로모터를 부가해줌으로써 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001에서 (2S)-플라바논을 생산하였다. 그러나 그 수율은 1/10로 감소하였다.

[0021] 또한 *ScCCL*과 코돈을 최적화시킨 아라키스 하이포게아 유래의 STS 유전자(*ahSTS_{op}*)를 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001에서 발현하고 4-쿠마릭산과 시나믹산을 첨가해준 결과, 스틸벤의 일종인 0.4mg/l의 레스베라트롤과 0.6mg/l의 피노실빈이 각각 성공적으로 생산되었다. 이 결과들로부터 유용한 식물특이적 폴리케타이드 화합물들을 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 만들어 낼 수 있음이 입증되었다.

효 과

[0022] 본 발명에 의하면 약리학적 효과 및 건강기능성 효과를 갖는 식물의 이차 대사산물인 플라바논과 스틸벤을 방선균주, 좀더 자세히는 스트렙토마이세스 베네주엘라로부터 생산할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 제조합 균주를 이용하여 다양한 약학 조성물, 식품 조성물을 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명의 실시예를 들어 본 발명의 구성을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 본 발명이 실시예의 기재범위로 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하다.

[0024] 재료와 방법

[0025] 실시예 1: 균주, 플라스미드 및 배양조건

[0026] 서브클로닝(subcloning)에 대장균 DH5 α와 플라스미드 리트머스 28(Litmus 28, New England Biolabs 제품)을 이용하였다. 발현벡터 pSE34는 하이 카피의 대장균-스트렙토마이세스 셔틀벡터로써, *ermE** 프로모터(*P_{ermE*}*)와 티오스트렙톤(thiostrepton) 저항성 마커를 가진다(Yoon et al. 2002). 돌연변이주 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001(Jung et al. 2006)은 플라보노이드와 스틸벤 생합성 유전자의 이중숙주 발현에 이용되었다. 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이종은 SPA 고체배지(0.1% 효모 추출물, 0.1% 쇠고기 추출물, 0.2% 트립토즈, 1% 글루코스, 황화철 미량과 1.5% 아가) 상에서 유지되었고, 원형질체(protoplast)의 제조를 위하여 SGGP 액체배지에 배양하였다(Kieser et al. 2000). 대장균은 플라스미드 선별을 위해 암피실린(ampicillin, 50μg/ml)이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. 플라바논 또는 스틸벤 생산을 위해 플라보노이드 또는 스틸벤 생합성 유전자를 발현하는 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이종을 티오스트렙톤(50μg/ml)이 포함되고 103g/l 대신 250g/l의 수크로스가 함유된 변형 R2YE 액체배지 5ml에서 30℃에서 66시간 동안 배양하였다.

[0027] 실시예 2: 발현 벡터 및 돌연변이체 구축

[0028] 플라보노이드 또는 스틸벤 생합성 유전자들은 pSE34 벡터에 클로닝되었다(도 2). 먼저 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001 돌연변이주 내에서 플라보노이드 생합성 유전자를 발현하는 벡터를 구축하기 위해, 스트렙토마이세스 코엘리콜라의 게놈 DNA로부터 정방향 프라이머 5'AAAGGATCCAGGAGGTCTCGCGTGTTCGCCACGCGAGTA-3'(밀줄은 *Bam*HI 제한효소 절단부위, 리보솜 결합부위는 이탈렉체, 개시코돈은 진한 글씨)와 역방향 프라이머 5'-

AAAAAGCTTAATTAAGTAGTTTCATCGCGCTCCCTGAG-3' (*Hind*III-*Pac*I-*Spe*I 제한효소 절단부위는 밑줄)를 이용하여 증폭하여 *ScCCL* DNA 조각을 확보하였다. 제한효소 절단부위와 리보솜 결합부위 AGGAGG(Ross et al. 2004)를 갖는 *atCHS* DNA 조각은 제노텍(대전, 한국)에서 제조되었다. *atCHS* 조각은 리보솜 결합부위 위쪽으로 *Spe*I 제한효소 절단부위를 포함하고, 종결 코돈 아래쪽에 *Pac*I-*Sna*BI 부위를 포함한다. The *ScCCL* PCR 산물은 *Bam*HI-*Hind*III로 절단한 후 pSE34에 클로닝되었고, *Spe*I-*Sna*BI로 절단한 *atCHS* DNA 조각은 Litmus 28에 연결되었다. 이어서 Litmus28로부터 분리된 *atCHS*의 *Spe*I-*Pac*I 조각은 *ScCCL*을 함유하는 pSE34의 *Spe*I-*Pac*I 부위에 연결하여 플라스미드 pCL-*atCHS* (P_{ermE^*} -*ScCCL*-*atCHS*)을 제조하였다. 플라스미드 pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*(P_{ermE^*} -*ScCCL*- P_{ermE^*} -*atCHS*)는 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001 돌연변이체에서 플라바논의 생산량을 높이기 위하여 각 유전자 앞에 P_{ermE^*} 을 위치시켜 제작하였다. 0.3kb의 P_{ermE^*} 조각은 pSE34로부터 PCR을 통해 증폭하였다. 정방향 프라이머는 5'-AAACTAGTAGAGCTCGGTACAGCCCG-3'(밑줄은 *Spe*I 제한효소 절단부위)이고, 역방향 프라이머는 5'-AAATCTAGATACCAACCGGCACGATTG-3'(밑줄은 *Xba*I 제한효소 절단부위)이다. P_{ermE^*} 의 PCR 산물은 *Spe*I-*Xba*I으로 절단되어 *Spe*I으로 절단된 *atCHS*를 포함하는 Litmus28 내로 클론되었다. P_{ermE^*} 의 방향성은 제한효소 절단 조각 분석으로 확인하였다. 얻어진 플라스미드에서 분리한 *Spe*I-*Pac*I 조각(P_{ermE^*} -*atCHS*)은 *ScCCL*을 포함하는 pSE34에 연결되어 pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*를 형성하였다. *atCHS*의 발현을 증가시키기 위하여, *atCHS*의 코돈을 발현 숙주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에 맞추어 디자인하였다. 코돈 최적화(Codon optimization) 및 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)의 디자인은 선행 논문에서 따라 수행하였다(Hoover and Lubkowski 2002). 리보솜 결합 부위의 위쪽에 *Spe*I 부위를 포함하고 종결코돈 아래쪽에 *Xba*I-*Hind*III-*Kpn*I 부위를 포함하는, 코돈 최적화된 *atCHS* DNA 조각(*atCHS*_{op})은 제노텍에서 제조하였다. 제한효소 *Spe*I-*Kpn*I으로 절단된 *atCHS*_{op} 조각은 *Spe*I-*Xba*I으로 절단한 P_{ermE^*} PCR 산물과 함께 Litmus28의 *Spe*I-*Kpn*I 부위에 삽입되었다. P_{ermE^*} 의 방향성은 제한효소 절단 조각 분석으로 다시 확인하였다. 그 결과 얻어진 플라스미드는 *Spe*I-*Hind*III로 절단하고 삽입된 (P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}) 조각은 *ScCCL*을 함유하는 pSE34에 클론되어 pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op} (P_{ermE^*} -*ScCCL*- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op})을 얻었다.

[0029] 다음은 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이체 내에서 다른 식물종 유래 CHS의 활성을 비교하기 위하여 페투니아 하이브리다(*Petunia hybrida*) 유래 코돈 최적화된 CHS(phCHS_{op}, GenBank accession no. AF233638)를 제조(제노텍)하고, pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op} 발현벡터와 동일한 방법으로 pSE34에 클로닝하여 pCL- P_{ermE^*} -phCHS_{op} (P_{ermE^*} -*ScCCL*- P_{ermE^*} -phCHS_{op})를 제조하였다.

[0030] 그 다음으로는 천연 (2S)-플라바논을 방선균주 내에서 생합성하기 위하여 pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}- P_{ermE^*} -msCHI_{op} (P_{ermE^*} -*ScCCL*- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}- P_{ermE^*} -msCHI_{op})을 구축하였다. 리보솜 결합부위 위쪽에 *Spe*I 제한 효소 절단 부위와 종결코돈 아래쪽에 *Hind*III 제한 효소 절단 부위를 가진, 코돈 최적화된 메디카고 사티바 유래 CHI 유전자(msCHI_{op}, GenBank accession no. M91079)를 제노텍에서 제조하였다. 제한 효소 *Spe*I-*Hind*III로 절단된 msCHI_{op} DNA 조각은 *Spe*I-*Xba*I으로 절단된 P_{ermE^*} PCR 산물과 함께 Litmus28 내의 *Spe*I-*Hind*III 부위로 클로닝되었다. P_{ermE^*} 의 방향성은 제한효소 절단 조각 분석으로 확인하였다. 얻어진 플라스미드의 *Spe*I-*Hind*III 조각(P_{ermE^*} -msCHI_{op})은 P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}를 함유한 리트머스 Litmus28의 *Xba*I-*Hind*III 부위에 연결되었다. P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}- P_{ermE^*} -msCHI_{op} 유전자 세트는 *Spe*I-*Hind*III 조각으로 *ScCCL*을 함유한 pSE34로 이동되었다.

[0031] 마지막으로, 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이체에서 스틸벤(레스베라트롤 또는 피노실빈)을 생산하기 위하여 아라키스 하이포게아 유래 스틸벤 합성효소를 코딩하는 STS DNA 조각(ahSTS, GenBank accession no. AB027606)의 코돈을 최적화하여 디자인하였다(Hoover and Lubkowski 2002). 코돈 최적화된 합성 ahSTS_{op} DNA는 제노텍사에서 제조하였으며, pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}와 같은 방식으로 pSE34에 클로닝되어 pCL- P_{ermE^*} -ahSTS_{op} (P_{ermE^*} -*ScCCL*- P_{ermE^*} -ahSTS_{op})를 완성하였다. 모든 PCR 산물과 합성 유전자들은 염기서열을 분석하여 확인하였다. 완성된 발현 벡터 pCL-*atCHS*, pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*, pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}, pCL- P_{ermE^*} -phCHS_{op}, pCL- P_{ermE^*} -*atCHS*_{op}- P_{ermE^*} -msCHI_{op} 또는 pCL- P_{ermE^*} -ahSTS_{op}는 스트렙토마이세스 베네주엘라 돌연변이주 DHS2001로 형질전환하였다.

[0032] 실시예 3: 페닐프로파노익산의 생전환(Bioconversion of phenylpropanoic acids)

[0033] 각 발현 벡터가 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001을 이틀간 5mL R2YE 배지에서 사전 배양한 후 5mL의 변형 R2YE 변형배지(1:100)에 재접종하였다. 48시간 배양 후 1.2mM 4-쿠마릭산 또는 시나믹산을 가하고 18시간 동안 30℃에서 추가 배양한 후 추출하였다.

[0034] 실시예 4: 플라바논 및 스틸벤 추출 및 분석

[0035] 스트렙토마이세스 베네주엘레 형질전환체 DHS2001/pCL-atCHS, pCL-P_{ermE*}-atCHS, pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op} 또는 pCL-P_{ermE*}-phCHS_{op}의 배양액(5ml)을 NaOH를 이용하여 pH를 9.0으로 맞추어 찰콘을 해당 라세믹 플라바논인 나린제닌과 피노셉브린으로 변환하였다. 혼합물은 30분 동안 실온에 두었다가 동량의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 스트렙토마이세스 베네주엘레 형질전환체 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op}-P_{ermE*}-msCHI_{op} 또는 pCL-P_{ermE*}-ahSTS_{op}는 pH를 조정하지 않고 동량의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기상(organic phase)은 증류하여 건조시켰고, 잔유물은 30μL의 메탄올에 용해시켰고, 이 용액의 일부에 대해서는 양이온 모드에서 Phenomenex Synergi Polar-RP 컬럼(150 × 4.6mm, 4μm)으로 LC-ESI-MS/MS(liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, Waters/Micromass Quattro micro/MS)를 수행하였다. 분석물질들은 250μL/min의 속도로 흘러주며, 0.1% (v/v) 포름산 수용액을 A로 하고 80% (v/v) 아세트나이트릴 내 0.1% (v/v) 포름산 용액을 B로 하였을 때, B를 40% ~ 65%로 12분, 75% B까지 13분, 80% B까지 5분, 80% B 농도를 유지하며 5분, 그 후 40% B로 15분간 용출하였다.

[0036] 정량은 MS/MS에서 MRM(multiple reactions monitoring) 모드로 수행하였다. 이것은 양이온화된 분자이온이 선택된 분석물질에 특이적인 해당 조각(산물) 이온으로 전환되는 것을 탐지하기 위하여 두 개의 질량 이온(mass ions)을 선택함으로써 수행되었다: 나린제닌, 273 > 153; 피노셉브린 257 > 153; 레스베라트롤 229 > 135; 피노실빈 213 > 135. 나린제닌, 피노셉브린 및 레스베라트롤의 표준물질은 시그마-알드리치에서 구입하였다. 피노실빈 표준물질은 이상국 교수(이화여대)로부터 입수하였다. 플라바논과 스틸벤 생산량은 세 번의 배양과 추출을 평균하여 계산하였다.

[0037] 결과 1: 이중 숙주 내 플라바논 생산

[0038] 플라바논과 스틸벤의 생합성 경로는 도 1에 묘사되어 있다. 플라바논의 생합성유전자인 ScCCL과 atCHS가 pSE34 벡터에 클로닝되었으며, 그 결과 만들어진 pCL-atCHS(도 2a)를 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001에 넣어 형질전환시켰다. 이렇게 해서 만들어진 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001/pCL-atCHS를 변형 R2YE 배지에서 키우면서 시간에 따른 세포의 생장과 플라바논의 생산을 조사하였다(도 3).

[0039] 48시간 사전 배양 후에 0.6 mM 4-쿠마릭산 또는 시나믹산을 배지에 첨가해 준 후 24시간 동안 더 키웠다. 도 3에서 보듯이 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001/pCL-atCHS내에서 플라바논의 생산량은 배양 66시간 후에 최고조에 이르렀다.

[0040] 전구체의 첨가시점과 농도를 결정하기 위해 0, 24, 48시간에 4-쿠마릭산과 시나믹산의 농도를 다양하게 변화시켜 주었다 (0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 and 3.6 mM). 최종적으로 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001/pCL-atCHS 내에서 플라바논의 최대 생산량은 1.2mM의 4-쿠마릭산 또는 시나믹산을 48시간 동안 배양한 배지에 첨가해 주었을 때 얻어졌다(결과 제시 안함).

[0041] 이 결과에 근거하여 1.2 mM의 4-쿠마릭산 또는 시나믹산을 48시간 동안 배양한 배지에 첨가해 준 후 18시간 동안 스트렙토마이세스 베네주엘레 DHS2001/pCL-atCHS를 더 배양하였다. 그 결과, 약 0.2mg/l의 나린제닌과 0.4mg/l의 피노셉브린이 만들어졌으며 이는 LC-ESI-MS/MS로 확인하였다(표 1, 도 4c 및 d). 반면에 공벡터를 넣어주었을 경우에는 플라바논이 만들어지지 않았다(결과 제시 안함).

[0042] 21.8분과 29.6분에 용출된 물질의 분자 이온 [M+H]⁺ 은 m/z 273 와 257의 값을 나타내었으며(도 4c 및 d), 그로부터 절단된 이온은 m/z 153의 값을 나타내었는데(도 4g 및 h), 이는 각각 나린제닌과 피노셉브린에 해당하는 값이다. 나린제닌과 피노셉브린 표준물질의 경우 정제 시간(도 4b)과 MS/MS에서 절단형태(도 4g 및 h의 작은 그림)가 동일함을 확인하였다. 카페익산(caffeic acid)을 전구물질로 사용했을 경우에 예상되었던 플라바논인 에리오티톨(eriodictyol)은 만들어지지 않았다. 이는 ScCCL이 카페익산에 대해서 낮은 활성을 갖는다는 종전의

보고(Kaneko et al. 2003)와 일치하는 결과이다.

표 1

[0043]

균주	나린제닌(mg/ℓ)	피노셉브린(mg/ℓ)
DHS2001/pCL-atCHS	0.2	0.4
DHS2001/pCL-P _{ermE*} -atCHS	1.2	2.0
DHS2001/pCL-P _{ermE*} -atCHS _{op}	4.0	6.0
DHS2001/pCL-P _{ermE*} -phCHS _{op}	<0.1	<0.1
	레스베라트롤(mg/ℓ)	피노실빈(mg/ℓ)
DHS2001/pCL-P _{ermE*} -ahSTS _{op}	0.4	0.6

[0044]

결과 2: 플라바논 생산에 있어 프로모터 추가가 미치는 영향

[0045]

이중 숙주에서 하나의 프로모터만으로도 전체 생합성 경로를 발현시킬 수 있다는 보고가 있지만(Martin et al. 2003; Wenzel and Muller 2005), 최근의 연구에 의하면 RBS와 T7프로모터를 각각의 플라보노이드 생합성 유전자 앞쪽에 위치시키면 대장균에서 플라보노이드의 생산성이 크게 증가한다는 보고가 있다(Hwang et al. 2003). 따라서 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 나린제닌과 피노셉브린의 생산량을 늘리기 위해 pCL-P_{ermE*}-atCHS를 제작하여 *ScCCL*과 *atCHS* 각각의 유전자가 *ermE** 프로모터에 의해 조절되도록 하였다(도 2b).

[0046]

그 결과, DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS과 DHS2001/pCL-atCHS에서의 생산성을 비교해 보았을 때 나린제닌과 피노셉브린이 각각 6배와 5배가 증가한 1.2mg/l과 2.0mg/l라는 생산량을 보였다(표 1). 이 결과는 각 유전자의 앞에 위치하는 *ermE** 프로모터의 역할이 중요함을 말해주고 있다.

[0047]

결과 3: 코돈 최적화를 통한 플라바논의 생산량 증가

[0048]

많은 연구를 통해 코돈의 변화와 유전자 발현의 수준이 상관관계가 있음이 밝혀졌다(Gouy and Gautier 1982; Martin et al. 2003). 아라비돕시스 탈리아나와 스트렙토마이세스 베네주엘라 사이에서 주로 사용되는 코돈의 차이로 인해 스트렙토마이세스 베네주엘라에서 *atCHS* 유전자를 적절하게 발현하는데에 제약이 따를 수 있다. 이에 *atCHS* 유전자를 스트렙토마이세스 베네주엘라가 사용하는 코돈에 맞게 변형시켜 유전자 발현을 증가시켰다. 약 20%의 뉴클레오티드가 변형되었으며 G와C함량이 54%에서 68%로 높아졌다. 플라스미드 pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op} (그림 2c)를 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001내에서 발현시켜 코돈 최적화 전의 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS과 비교해볼 때 약 3배 증가한 나린제닌(4.0mg/l)과 피노셉브린(6.0mg/l)을 얻었다(표 1, 도 4e 및 f).

[0049]

결과 4: 다른 식물종 유래 찰콘 합성효소 활성비교

[0050]

다른 식물종 유래의 찰콘 합성효소의 활성을 비교하기 위해 페투니아 하이브리다 유래의 *CHS*의 코돈을 최적화하여 *ScCCL*을 포함하는 pSE34 벡터에 클로닝하였다(그림 2d). 그 결과 만들어진 pCL-phCHS_{op} 플라스미드로 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001을 형질전환시켰다. 표 1과 같이 페투니아 하이브리다 유래 CHS (DHS2001/pCL-phCHS_{op})의 경우 0.1mg/l 이하의 나린제닌과 피노셉브린이 생산되었는데, 이는 코딩 최적화 전의 DHS2001/pCL-atCHS와 비교했을 때 생산된 플라바논의 생산이 3%도 안되었다.

[0051]

결과 5: 찰콘 아이소머라제(CHI)에 의한 (2S)-플라바논의 이중숙주 내 생산

[0052]

알칼리 조건에서 비효소적 방법을 통해 플라바논 찰콘으로부터 만들어진 플라바논은 (2R)-형태와 자연상태의 (2S)-형태가 섞여있는 라세믹 혼합물이다. 이 플라보노이드가 다음단계의 물질 즉 플라바놀(flavanols)과 플라본(flavones)으로 생합성되는데 쓰이기 위해서는 (2S)의 형태를 가져야 하기 때문에 CHI를 ScCCL, CHS와 함께 스트렙토마이세스 베네주엘라 내에서 발현시키는 것이 필요하다. 대장균에서 메디카고 사티바 유래의 CHI가 페투니아 하이브리드 유래의 CHI 보다 활성이 높다는 보고가 있기 때문에 (Leonard et al. 2007), 메디카고 사티바 유래의 CHI의 코돈을 최적화시켜 (msCHI_{op}) ScCCL 및 atCHS 유전자와 함께 발현시켰으며, 이때 각 유전자는 ermE* 프로모터에 의해 조절되게 하였다(도 2e). 그러나, 그 결과 생성된 플라바논은 1/10로 감소하였다(결과 제시 안함). ScCCL-atCHS-msCHI을 발현하는 스트렙토마이세스 베네주엘라(DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op}-P_{ermE*}-msCHI_{op})에서 플라바논의 생산성이 감소하였는지는 명확하지 않지만 대장균에서도 비슷한 사례가 보고되어 있다 (Hwang et al. 2003).

표 2

Amino acids	Most abundant codon	
	Native atCHS	Codon-optimized atCHS
Ser	TCT	TCC
Pro	CCT	CCG
Arg	CGT	CGC
Ala	GCT	GCC
Gly	GGT	GGC
Termination	TAA	TGA

[0053]

[0054]

결과 6: 스틸벤의 이중숙주 내 생산

[0055]

스티벤 생합성에 필요한 유전자인 ScCCL과 코돈이 최적화된 STS (ahSTS_{op})를 pSE34벡터에 클로닝하여 pCL-ahSTS_{op} (Fig. 2f)를 제작하였으며 이를 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001에 넣었다. 1.2mM 4-쿠마릭산 또는 시나믹산(도 5a)을 전구체로 사용하였을 경우 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001/pCL-ahSTS_{op}내에서 레스베라트롤과 피노실빈이 만들어졌으며 이는 LC-ESI-MS/MS로 확인하였다 (도 5c, d, e 및 f). 공백터를 넣어 형질 전환시킨 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001에서는 레스베라트롤과 피노실빈이 만들어지지 않았다 (결과 제시 안함). 21.8분과 29.6분에 용출된 물질(도 4c 및 d)의 분자 이온[M+H]⁺은 각각 m/z 229와 213의 값을 나타내었으며, 그로부터 절단된 이온은 m/z 135의 값을 나타내었다(도 5c 및 d). 레스베라트롤과 피노실빈의 표준물질로 정제 시간과 MS/MS 스펙트럼을 비교해 본 결과 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001/pCL-ahSTS_{op}에서 생산된 물질은 레스베라트롤과 피노실빈임이 입증되었다. 레스베라트롤과 피노실빈의 수율은 각각 약 0.4 mg/l과 0.6 mg/l이었다(표 1). 4-쿠마릭산이 시나믹산에 비해 플라보노이드인 피노셉트린과 스틸벤인 피노실빈으로 전환되는 수율이 낮은 것은 ScCCL이 4-쿠마릭산의 경우보다 시나믹산일 경우 1.7배 높은 기질 효율을 보이기 때문이다(Kaneko et al. 2003).

도면의 간단한 설명

[0056]

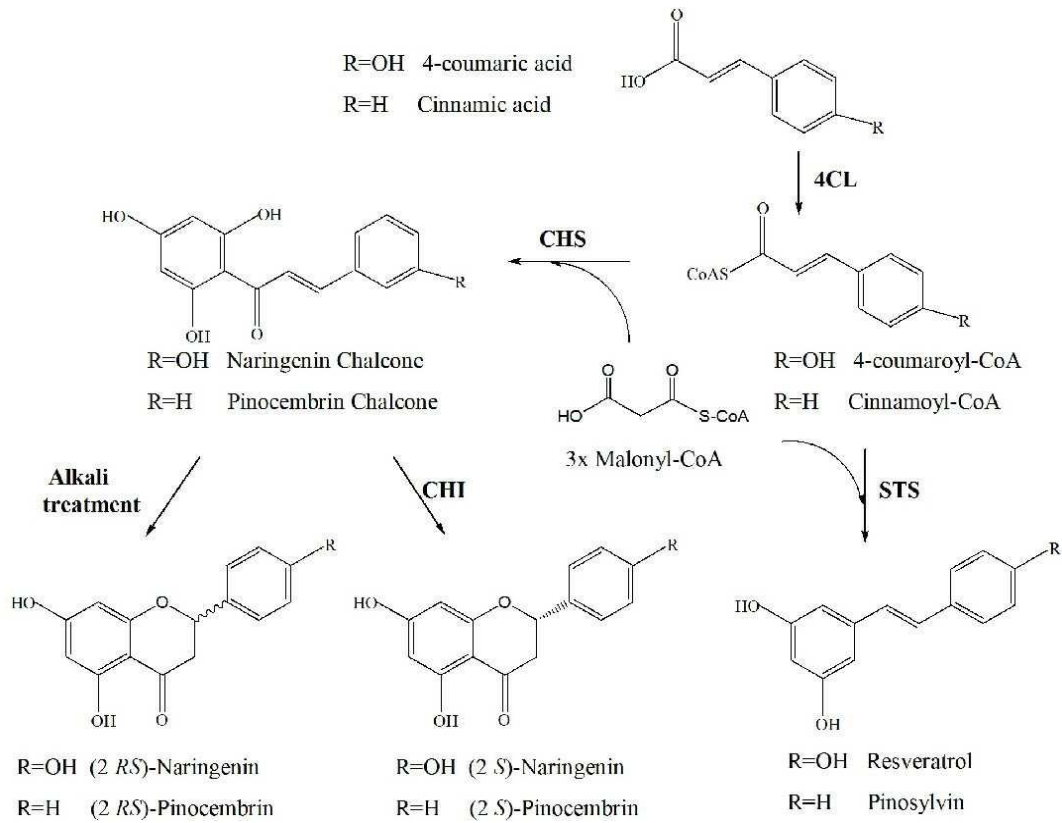
도 1은 스트렙토마이세스 베네주엘라 내에서 조작된 플라보노이드 및 스틸벤 생합성 경로를 나타낸 도면이다. 기질인 4-쿠마릭산 및 시나믹산은 발현 플라스미드를 포함하는 재조합 스트렙토마이세스 베네주엘라 DHS2001

돌연변이체의 배양액 내에 직접 가하였다.

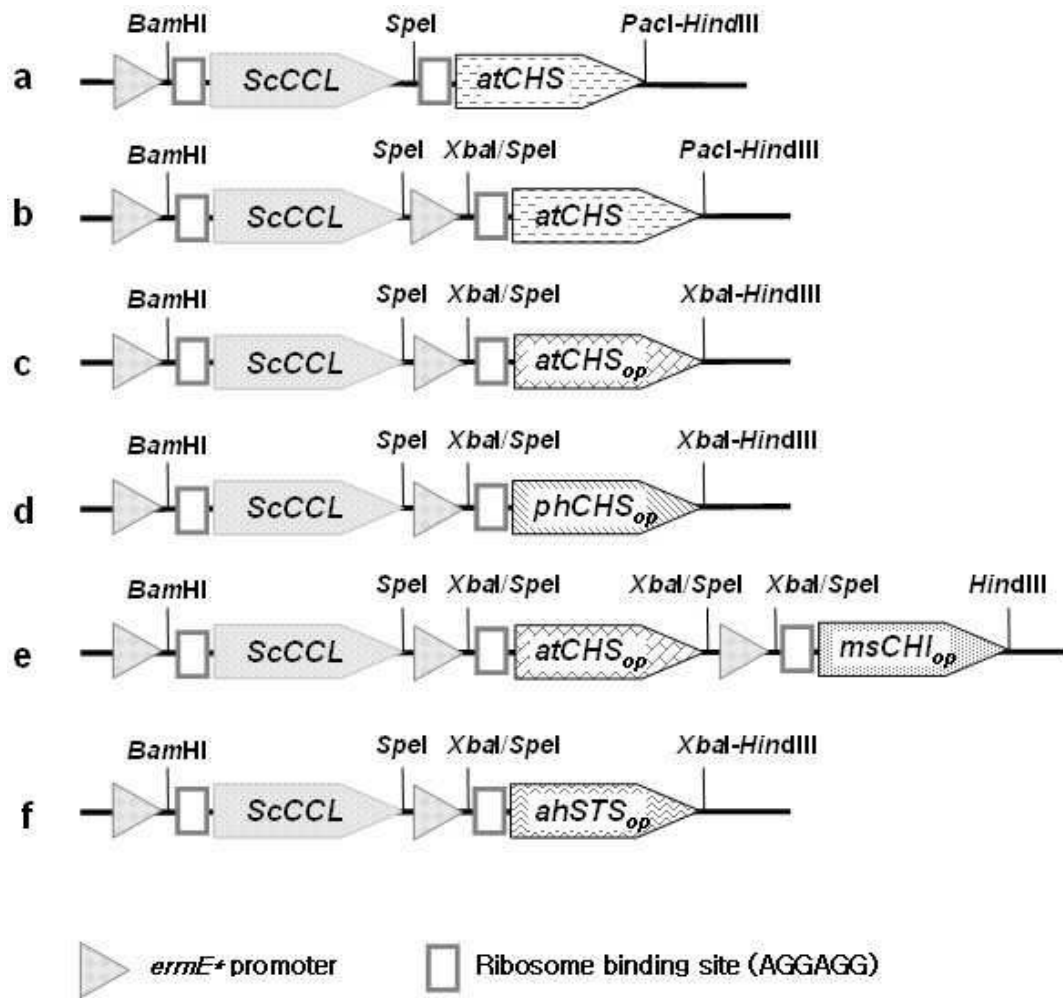
- [0057] 4CL, 4-쿠마릭산/시나믹산:CoA 리가아제;
- [0058] CHS, 찰콘 합성효소;
- [0059] CHI, 찰콘 아이소머라제;
- [0060] STS, 스틸벤 합성효소.
- [0061] 도 2는 플라바논 및 스틸벤 합성효소를 포함하는 발현 플라스미드의 구조이다.
- [0062] **a** pCL-atCHS, **b** pCL-P_{ermE*}-atCHS, **c** pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op}, **d** pCL-P_{ermE*}-phCHS_{op}, **e** pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op}-P_{ermE*}-msCHI_{op}, **f** pCL-ahSTS_{op}.
- [0063] *ScCCL*, 스트렙토마이세스 코엘리콜라 유래 4-쿠마릭산/시나믹산:CoA 리가아제를 코딩하는 유전자;
- [0064] *atCHS*, 아라비둡시스 탈리아나 유래 찰콘 합성효소를 코딩하는 유전자(**a**, **b**, **c** 및 **e**) 또는 *phCHS*, 페투니아 하 이브리다 유래 찰콘 합성효소를 코딩하는 유전자(**d**);
- [0065] *msCHI*, 메디카고 사티바 유래 찰콘 아이소머라제 코딩 유전자;
- [0066] *ahSTS*, 아라키스 하이포게아 유래 스틸벤 합성효소 코딩 유전자
- [0067] 도 3은 플라바논 생합성에 있어서 생장 및 생산을 나타내는 도면이다. 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-atCHS를 0.6mM 4-쿠마릭산(밝은 네모 도형) 및 시나믹산(밝은 원 도형)을 가한 5ml 변형 R2YE 액 상배지에서 배양하여 생장 상태를 600nm 흡광도 측정으로 모니터링한 것이다. 나린제닌(검은 막대)과 피노셉브린(회색 막대)의 생산량은 그래프에 나타난 배양시간에 DHS2001/pCL-atCHS의 배양액을 추출하여 결정하였다. 화살표는 4-쿠마릭산과 시나믹산의 첨가시간을 나타낸다.
- [0068] 도 4a는 4-쿠마릭산(피크 1) 및 시나믹산(피크 2) 표준물질의 ESI-MS-MS 분석결과, 4b는 나린제닌(피크 3) 및 피노셉브린(피크 4) 표준물질의 ESI-MS-MS 분석결과, 4c와 4e는 각각 4-쿠마릭산을 가한 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-atCHS 및 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op}, 4d 및 4f는 각각 시나믹산을 가한 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-atCHS 및 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-atCHS_{op} 추출물을 LC-ESI-MS 분석한 결과이다. 4g와 4h는 각각 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-atCHS로부터 추출한 나린제닌 및 피노셉브린의 ESI-MS/MS 스펙트럼, g와 h의 삽입도는 각각 표준물질과 피노셉브린 표준물질의 ESI-MS/MS 스펙트럼이다.
- [0069] 도 5a는 4-쿠마릭산(피크 1) 및 시나믹산(피크 2) 표준물질을 LC-ESI-MS 분석한 결과, b는 레스베라트롤(피크 5) 및 피노실빈(피크 6) 표준물질을 LC-ESI-MS 분석한 것이다. c와 d는 각각 4-쿠마릭산과 시나믹산을 가한 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-ahSTS_{op}의 추출물을 LC-ESI-MS 분석한 결과이다. e와 f는 각각 스트렙토마이세스 베네주엘라 변이체 DHS2001/pCL-P_{ermE*}-ahSTS_{op}로부터 추출한 레스베라트롤과 피노실빈에 대한 ESI-MS/MS 스펙트럼, e와 f의 삽입도는 각각 레스베라트롤과 피노실빈 표준물질의 ESI-MS/MS 스펙트럼이다.

도면

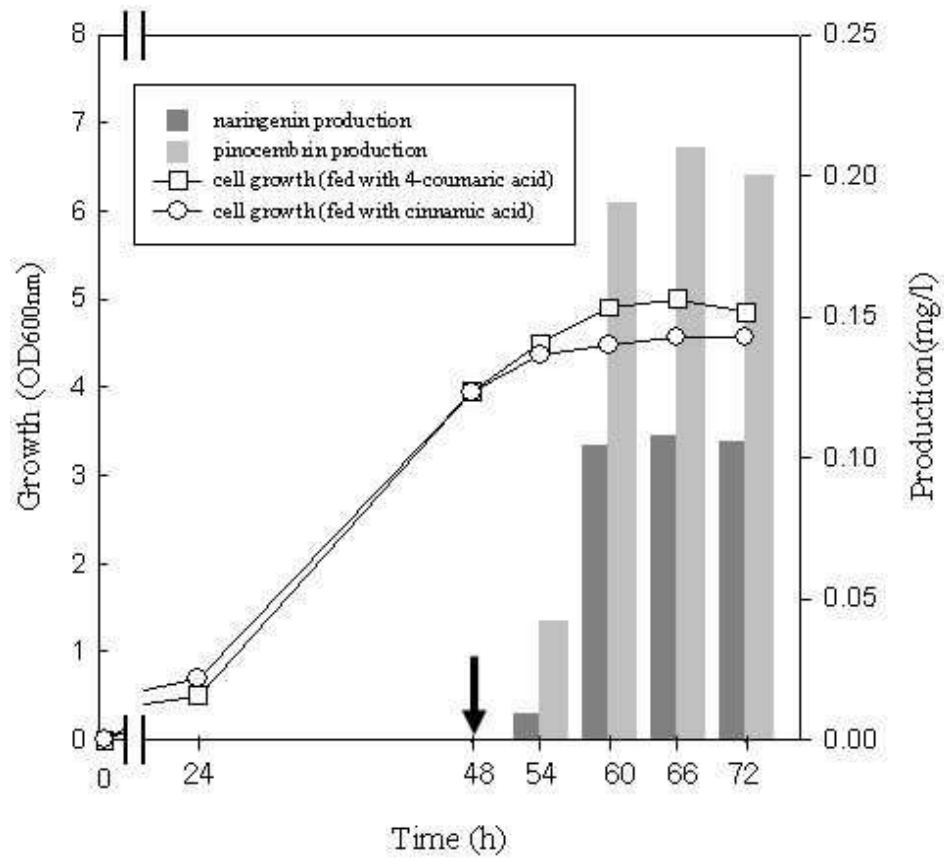
도면1



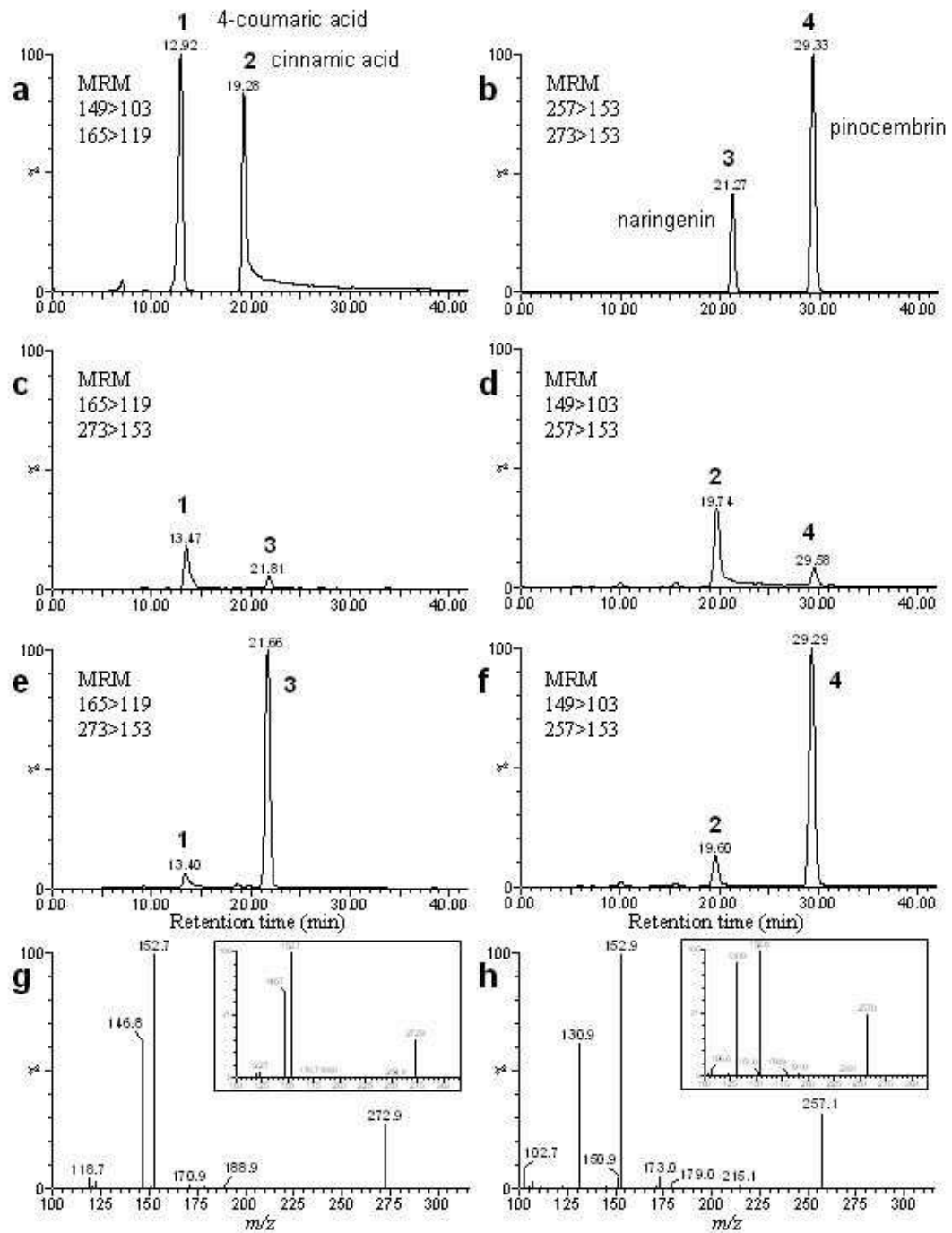
도면2



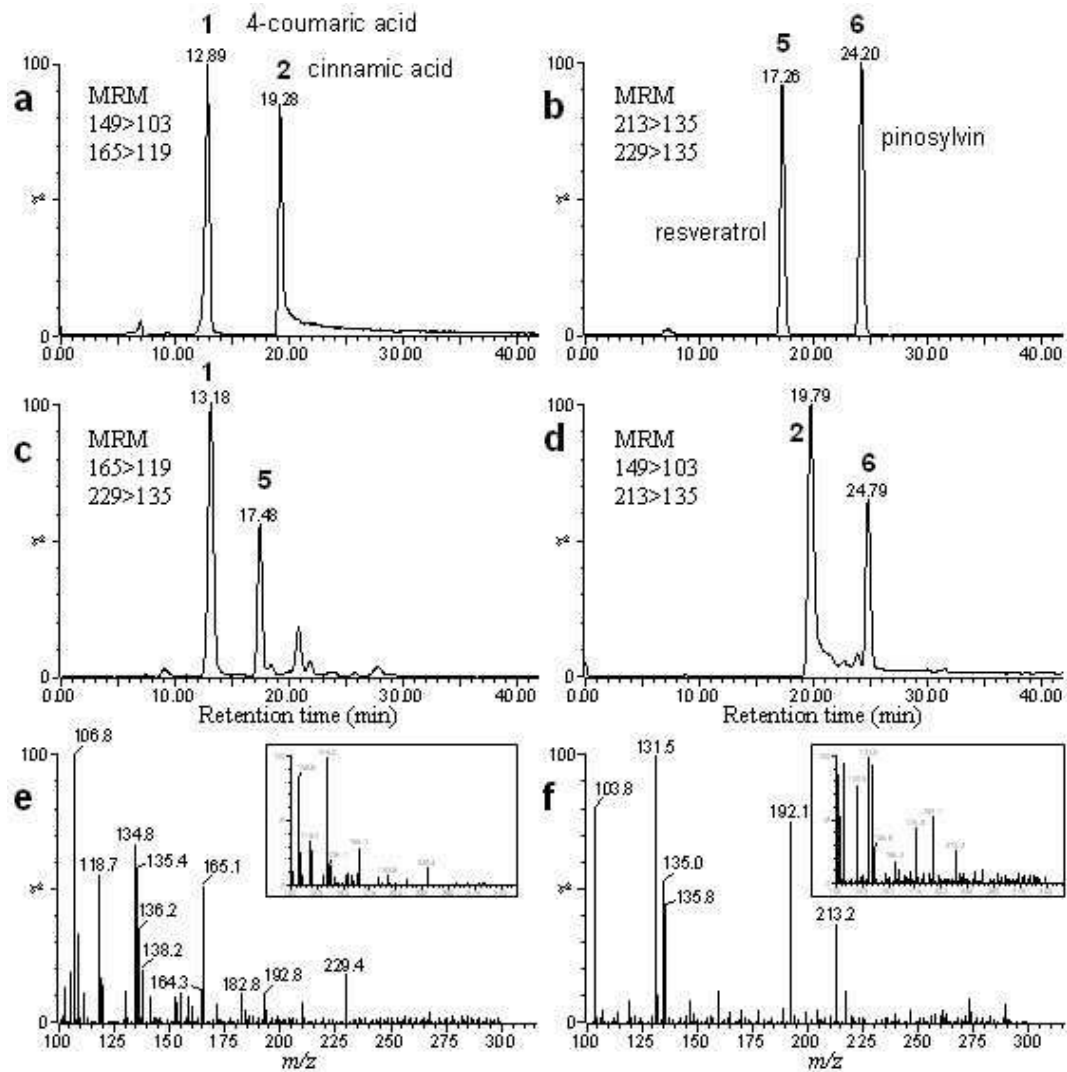
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Producing method for phenylpropanoid compounds in actinomycetes

- <130> Ewha-YYJ-0811

- <160> 8

- <170> Kopatent In 1.71

- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

aaaactagtg agctcggtac cagcccg

27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

aaatctagat accaaccggc acgattg

27

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

aaaggatcca ggaggtctcg cgtgtccgc cagcgagta

39

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

aaaaagctta attaactagt tcatcgcggc tccctgag 38

<210> 5
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> codon-optimized chalcone synthase from Arabidopsis thaliana

<400> 5
 aggaggtctc gcatggtcat ggccggcgcc tcctccctcg acgagatccg ccaggcccag 60
 cgcgccgacg gcccggccgg catcctcgcc atcggcaccg ccaaccgga gaaccacgtc 120
 ctccaggcgg agtaccgga ctactacttc cgcatcacca actccgagca catgaccgac 180
 ctcaaggaga agttcaagcg catgtgcgac aagtcacca tccgcaagcg ccacatgcac 240
 ctaccgagg agttctcaa ggagaaccg cacatgtgcg cctacatggc cccgtccctc 300
 gacaccgcc aggacatcgt cgtcgtcgag gtcccgaagc tcggcaagga ggccgccgtc 360
 aaggccatca aggagtgggg ccagccgaag tccaagatca cccacgtcgt ctctgcacc 420
 acctccggcg tcgacatgcc gggcgccgac taccagctca ccaagctcct cggcctccgc 480
 ccgtccgtca agcgctcat gatgtaccag cagggctgct tcgccggcgg caccgtcctc 540
 cgcatcgcca aggacctgcg cgagaacaac cgcggcgcc gcgtcctcgt cgtctgctcc 600
 gagatcaccg ccgtcacctt ccgcgcccg tccgacaccc acctcgactc cctcgtcggc 660
 caggccctct tctccgacgg cgccgccgcc ctcatcgtcg gtcgcgaccc ggacacctcc 720
 gtcggcgaga agccgatctt cgagatggtc tccgcccc agaccatcct cccgactcc 780
 gacggcgcca tcgacggcca cctccgcgag gtcggcctca ccttccacct cctcaaggac 840

gtccggggcc tcattctcaa gaacatcgtc aagtcctcg acgaggcctt caagccgctc 900

ggcatctccg actggaactc cctcttctgg atcgccacc cgggcggccc ggccatcctc 960

gaccaggtcg agatcaagct cggcctcaag gaggagaaga tgcgcgccac ccgccacgtc 1020

ctctccgagt acggcaacat gtcctccgcc tgcgtctctt tcattctcga cgagatgcgc 1080

cgcaagtcgg ccaaggacgg cgtcgccacc accggcgagg gcctcgagtg gggcgtcctc 1140

ttcggcttcg gcccgggcct caccgtcgag accgtcgtcc tccactccgt cccgctctga 1200

1200

<210> 6
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> codon-optimized chalcone synthase from Petunia hybrida

<400> 6
 aggaggtctc gcatggtcac cgtcgaggag taccgcaagg cccagcgcgc cgagggcccg 60

gccaccgtca tggccatcgg caccgccacc ccgaccaact gcgtcgacca gtccacctac 120

ccggactact acttccgcat caccaactcc gagcacaaga ccgacctcaa ggagaagtgc 180

aagcgcatgt gcgagaagtc catgatcaag aagcgctaca tgcacctcac cgaggagatc 240

ctcaaggaga acccgcccat gtgcgagtac atggccccgt ccctcgacgc ccgccaggac 300

atcgtcgtcg tcgaggcccc gaagctcggc aaggaggccg cccagaaggc catcaaggag 360

tggggccagc cgaagtccaa gateaccac ctcgtcttct gcaccacctc cggcgtcgac 420

atgccgggct gcgactacca gctcaccaag ctctctgggc tccgcccgtc cgtcaagcgc 480

ctcatgatgt accagcaggg ctgcttcgcc ggccggcaccg tctccgcct cgccaaggac 540

ctcgccgaga acaacaaggg cgcccgctc ctgctgtct gctccgagat caccgcccgc 600

accttcgcg gcccgaaacga caccacctic gactccctcg tcggccaggc cctcttcggc 660

gacggcgccg gcgccatcat catcggtcc gaccgatcc cgggcgtcga gcgccgctc 720

ttcgagctcg tctccgccgc ccagaccctc ctcccgact ccacggcgc catcgacggc 780

cacctccgcg aggtcggcct cacttccac ctctcaagg acgtcccggg cctcatctc 840

aagaacatcg agaagtcct cgaggaggcc ttccgccgc tctcatctc cgactggaac 900

tccctcttct ggatgccca cccggcggc ccggccatcc tcgaccaggt cgagatcaag 960

ctcgccctca agccggagaa gctcaaggcc acccgcaacg tctctccaa ctacggcaac 1020

atgtctccg cctgcgtcct ctccatctc gacgagatgc gcaaggctc cgccaaggag 1080

ggcctcgga ccaccggcga ggcctcgag tggggcgtcc tcttcggctt cggcccgggc 1140

ctcacgtcg agaccgtct cctccactcc gtcgccact ga 1182

<210> 7
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> codon-optimized chalcone isomerase from *Medicago sativa*

<400> 7
 aggaggtctc gcatggccgc ctccatcacc gccatcaccg tcgagaacct cgagtaccgc 60

gccgtcgtea cctccccggt caccggcaag tctacttcc tcggcggcgc cggcgagcgc 120

ggcctcacca tcgagggcaa ctccatcaag ttcaccgcca tcggcgtcta cctcgaggac 180

atcgccgtcg cctccctcgc cgccaagtgg aagggaagt cctccgagga gctcctcgag	240
accctcgact tctaccgga catcatctcc ggcccgttcg agaagctcat ccgcggtcc	300
aagatccgag agctctccgg cccggagtac tccgcaagg tcatggagaa ctgcgtcgcc	360
cacctcaagt ccgtcggcac ctacggcgac gccgaggccg aggccatgca gaagtctgcc	420
gaggccttca agccggtcaa cttcccgccg ggccgctccg tcttctaccg ccagtccccg	480
gacggcatcc tcggcctctc cttctccccg gacacctcca tcccgagaa ggaggccgcc	540
ctcatcgaga acaaggccgt ctctccgcc gtctcgaga ccatgatcgg cgagcacgcc	600
gtctccccgg acctcaagcg ctgcctcgcc gccgcctcc cgccctct caacgagggc	660
gccttcaaga tcggcaactg a	681

<210> 8
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> codon-optimized stilbene synthase from Arachis hypogaea

<400> 8 aggaggtctc gcatggtctc cgtctccggc atccgcaagg tccagcgcgc cgaggccccg	60
gccaccgtcc tcgccatcgg caccgccaac ccgccgaact gcgtcgacca gtccacctac	120
gccgactact acttccgct caccactcc gagcacatga ccgacctcaa gaagaagttc	180
cagcgcatct gcgagcgcac ccagatcaag aaccgccaca tgtacctcac cgaggagatc	240
ctcaaggaga acccgaacat gtgcgcctac aaggccccgt ccctcgacgc ccgagaggac	300
atgatgatcc gcgaggtccc gcgcgtcggc aaggaggccg ccaccaaggc catcaaggag	360

tggggccagc cgaatgtccaa gatcacccac ctcatcttct gcaccacctc cggcgtcgcc	420
ctcccgggcg tcgactacga gtcctcgtc ctctcggcc tcgaccgctc cgtcaagcg	480
tacatgatgt accaccaggg ctgcttcgcc ggcggcacccg tcctccgctt cgccaaggac	540
ctcgccgaga acaacaagga cgcccgctc ctcatcttct gctccgagaa cacctccgtc	600
accttcgcg gcccgctcga gaccgacatg gactccctcg tcggccaggc cctcttcgcc	660
gacggcgccg ccgcatcat catcggtcc gaccgggtcc cggaggctga gaaccgctc	720
ttcgagatcg tctccaccga ccagcagctc gtcccgaact cccacggcgc catcgcggc	780
ctctccgcg aggtcggctt caccttctac ctcaacaagt ccgtcccga catcatctc	840
cagaacatca acgagccct ctccaaggcc ttgaccgc tcggcatctc cgactacaac	900
tccatcttct ggatgcccc cccggcggc cgcgcatcc tcgaccaggt cgaggagaag	960
gtcaacctca agccggagaa gatgaaggcc acccgcgacg tctctccaa ctacggcaac	1020
atgtctccg cctgcgtctt ctcatcatg gacctcatgc gcaagaagtc cctcgaggcc	1080
ggcctcaaga ccaccggcga gggcctcgac tggggcgctc tcttcggctt cggcccgggc	1140
ctcaccatcg agaccgtcgt cctccgctcc atggccatct ga	1182