



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0141447

(43) 공개일자 2015년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) C07C 403/00 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0070176

(22) 출원일자 2014년06월10일

심사청구일자 2014년06월10일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김진우

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(평거동, 들말대경아파트)

최옥희

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(들말대경아파트)

이용상

경상남도 창원시 마산합포구 자산북3길 23, 903호
(자산동, 영승아파트)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

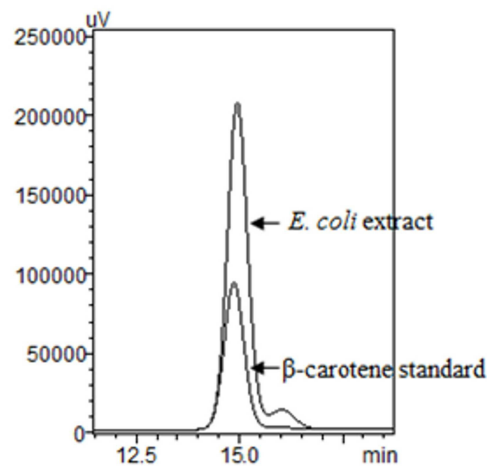
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 베타-카로틴의 고효율 생산 방법 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 화합물의 생산 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 베타-카로틴의 고효율 생산 방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 판토에아나나티스 PA13(*Pantoea ananatis* PA13)에서 유래한 베타-카로틴의 생합성 유전자를 이용한 베타-카로틴 고효율 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008144

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 벼이삭 세균의 병원 유전체 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로모터에 작동가능하게 연결된 베타-카로틴 생합성 유전자를 포함하는 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 베타-카로틴 생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 베타-카로틴 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 파이토엔 탈포화효소(CrtI)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 라이코펜 사이클라제(CrtY)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오타이드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한 효소 인식부위는 존재하지 않는, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 lac 프로모터, tac 그로모터, P_{BAD} 프로모터, 또는 trc 프로모터인, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CrtE를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 기재되는 핵산서열을 가진, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CrtB를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열을 가진, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 CrtI를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3로 기재되는 핵산서열을 가진, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 CrtY를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 4로 기재되는 핵산서열을 가진, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트는 서열번호 19로 기재되는 핵산서열을 가진, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 8

제1항의 유전자 컨스트럭트로 베타-카로틴 미생산 숙주세포를 형질전환시켜 제조된 베타-카로틴 생성 비인간 형질전환체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 베타-카로틴 미생 산 숙주세포는 그람양성 또는 그람음성 세균인, 베타-카로틴 생성 비인간 형질전환체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 그람음성 세균은 대장균 또는 슈도모나스, 베타-카로틴 생성 비인간 형질전환체.

청구항 11

제9항의 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 및

배양된 상기 비인간 형질전환체로부터 베타-카로틴을 회수하는 베타-카로틴 회수단계를 포함하는 베타-카로틴의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 화합물의 생산 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 beta-carotene의 고효율 생산 방법 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로테노이드(Carotenoid) 화합물 중에서 비타민(vitamin) A로서의 역가가 가장 높은 베타-카로틴(β caroten e)은 식품, 의약품 및 화장품 등의 착색제 및 첨가제로서 오래전부터 사용되고 있으며 현재는 강력한 항암 효과, 대사과정에서 레티놀의 주공급원으로 보고되어 건강식품으로서 그 중요성이 크게 인식되고 있다. 그러나, 현재 산업적으로 이용되고 있는 대부분의 베타-카로틴은 화학합성품으로 최근 인간의 건강에 대한 관심의 증대로 인하여 천연물에 대한 욕구가 증대하고 있기 때문에 천연산 베타-카로틴을 얻을 수 있다면 시장에서 상품으로서의 가치가 매우 높을 것이다.

[0003] *Pantoea ananatis* PA13유래 생합성 유전자에 관련하여 종래의 논문이 존재하며(Yoon *et al.*, *Biotechnol Prog.*, 23(3):599-605, Misawa N *et al.*, *J Bacteriol.*, 172(12):6704-12, 1990), Yoon *et al.*의 논문에는 *crtY*를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 대장균 등 베타-카로틴 생합성 능력이 없는 숙주세포에 도입하여 베타-카로틴을 생산하는 방법과 관련하여 개시되어 있다. 미국 등록특허 제6,372,479호는 베타-카로틴의 생산을 위한 *Fusarium sporotrichioides* 형질전환 균주(NRRL 30157, NRRL 30158, 및 NRRL 30159)에 관한 내용이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 판토에아나나티스 PA13(*Pantoea ananatis* PA13)에서 유래한 베타-카로틴의 생합성 유전자를 이용한 β -카로틴의 고효율 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일관점에 따르면, 프로모터에 작동가능하게 연결된 베타-카로틴 생합성 유전자를 포함하는 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 베타-카로틴 생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 베타-카로틴 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 파이트엔 탈포화효소(CrtI)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 라이코펜 사이클라제(CrtY)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오타이드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한효소 인식부위는 존재하지 않는, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트가

제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 유전자 컨스트럭트로 베타-카로틴 미생산 숙주세포를 형질전환시켜 제조된 베타-카로틴 생성 비인간 형질전환체가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 배양된 상기 비인간 형질전환체로부터 베타-카로틴을 회수하는 베타-카로틴 회수단계를 포함하는 베타-카로틴의 생산방법이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 베타-카로틴의 *Pantoea ananatis* PA13 유래의 생합성 관련 유전자를 이용함으로써 베타-카로틴의 생산에 필요한 비용은 최소화 동시에 제조 및 분리과정을 단순화하는데 적용할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 *Pantoea ananatis* PA13 균주의 베타-카로틴 생합성 유전자 재조합과 생합성 경로 모델을 나타낸 개요도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 사용된 클로닝 벡터 pBBR1MCS-5의 유전적 지도(A)와 상기 클로닝 벡터에 베타-카로틴 생합성 유전자를 삽입하여 제조된 재조합 플라스미드 벡터 pYS76의 유전적 지도(B) 이미지이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 베타-카로틴 재조합 플라스미드 pYS76에서 *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY* 유전자 지도와 RT-PCR 결과. 1-3은 PCR 증폭에 사용한 주형의 종류를 나타낸 그래프이다. 1, pYS76; 2, 전체 RNA; 3, cDNA

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 베타-카로틴 생합성 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 벡터 pYS76로 형질전환된 대장균의 콜로니 및 원심분리된 세포체에서 베타-카로틴이 생성되었음을 나타내는 사진으로, 좌측은 대조군인 pBBR1MCS-5로 형질전환된 대장균의 콜로니 및 원심분리된 세포체를 나타내는 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 HPLC를 이용한 베타-카로틴의 분석결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 일관점에 따르면, 프로모터에 작동가능하게 연결된 베타-카로틴 생합성 유전자를 포함하는 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 베타-카로틴 생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 파이로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 베타-카로틴 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 파이토엔 탈포화효소(CrtI)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 라이코펜 사이클라제(CrtY)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오티드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한효소 인식부위는 존재하지 않는, 베타-카로틴 생산용 유전자 컨스트럭트가 제공된다.

[0011] 상기 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 프로모터는 lac 프로모터, tac 그로모터, P_{BAD} 프로모터, 또는 trc 프로모터일 수 있다.

[0012] 상기 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 CrtE를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있고, 상기 CrtB를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있으며, 상기 CrtI를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있고, 상기 CrtY를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있다.

[0013] 상기 유전자 컨스트럭트는 서열번호 19로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 유전자 컨스트럭트로 베타-카로틴 미생산 숙주세포를 형질전환시켜 제조된 베타-카로틴 생성 비인간 형질전환체가 제공된다.

[0015] 상기 베타-카로틴 미생산 숙주세포는 그람양성 또는 그람음성 세균일 수 있고, 상기 그람음성 세균은 대장균 또는 슈도모나스일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 배양된 상기 비인간 형질전환

체로부터 베타-카로틴을 회수하는 베타-카로틴 회수단계를 포함하는 베타-카로틴의 생산방법이 제공된다.

[0017] 이하, 실시예 및 제조예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0018] **실시예 1: 형질전환 벡터 제작**

[0019] 본 발명에서 사용한 베타-카로틴 생합성 관련 유전자는 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) PA13로부터 유래한 제라닐제라닐 파이로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 유전자(*crtE*, 서열번호 1), 베타-카로틴 합성효소(CrtB)를 암호화하는 유전자(*crtB*, 서열번호 2), 파이토엔 탈포화효소(CrtI)를 암호화하는 유전자(*crtI*, 서열번호 3) 및 라이코펜 사이클라제(CrtY)를 암호화하는 유전자(*crtY*, 서열번호 4)이다(도 1). 판토에아 아나나티스 PA13 균주의 카로티노이드 생합성 오페론은 도 1에 도시된 바와 같이, *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB* 및 *crtZ*의 순서로 구성되어 있다. 이중 *crtX* 및 *crtZ*의 경우 각각 제아잔틴으로부터 제아잔틴-베타-D-글루코사이드를 생성하는 제아잔틴 글루코실트랜스퍼라제 및 베타-카로틴으로부터 제아잔틴을 생성하는 베타-카로틴 하이드록실라제를 각각 암호화하는 유전자로서, 베타-카로틴 생합성에는 불필요한 유전자이기 때문에, 이를 제거하였으며, 유전자의 순서 역시 원래 판토에아 아나나티스 게놈 내에 존재하는 오페론 내의 순서가 아닌 *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY*의 순서로 변경하였다. 구체적으로, 909 bp 크기의 *crtE* 유전자(서열번호 1)를 *Pantoea ananatis* PA13 균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 프라이머 CAR1(서열번호 5)와 CAR2(서열번호 6)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 특히, 프라이머 CAR1에는 제한효소 *XhoI* 인식부위와 *lac* 프로모터를 순서대로 두었다. 마찬가지로 930 bp 크기의 *crtB* 유전자(서열번호 2)를 프라이머 CAR3(서열번호 7)와 CAR4(서열번호 8)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 1,479 bp 크기의 *crtI* 유전자(서열번호 3)를 프라이머 CAR5(서열번호 9)와 CAR6(서열번호 10)을 사용하여 PCR 증폭하였다. 1,149 bp 크기의 *crtY* 유전자(서열번호 4)를 프라이머 CAR7(서열번호 11)과 CAR8(서열번호 12)을 사용하여 PCR 증폭하였다. 특히, CAR3, CAR5 및 CAR6 프라이머에 각각 *crtB*, *crtI* 및 *crtY* 유전자의 ribosome binding site(RBS)를 포함하였고, CAR2와 CAR3, CAR4와 CAR5, 그리고 CAR6과 CAR7 프라이머들은 각각 상보적 상동성 부위를 가지면서 중첩되도록 제작하였다(표 2). DNA 증폭을 위해 Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs)를 사용하였다. *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY* 유전자의 PCR 증폭된 DNA는 전기영동 후 아가로스 겔로부터 분리 정제하였고 두 번째 PCR 증폭을 위해 사용하였는데, 이때에는 프라이머와 주형 DNA를 따로 첨가하지 않고 *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY* PCR 증폭된 DNA를 사용하여 PCR을 시행하였다. 이렇게 얻어진 PCR 증폭 산물은 약 4.5 kb 크기의 것으로, splicing overlap extension(SOE) 절편에 해당한다(Kim *et al.*, *PLOS ONE* 8(2): e56682, 2013). 이후 상기 SOE 절편은 전기영동 후 아가로스 겔로부터 순수 정제한 다음 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)에 클로닝하였다. 제한효소 *XhoI*과 *SacI*(pGEM-T Easy의 MCS부분에 존재)을 이용하여 절단한 후, DNA 정제하였고 동일한 제한효소로 절단한 클로닝 벡터 pBBR1MCS-5에 클로닝함으로써 재조합 플라스미드 벡터를 제조하였으며, 이를 pYS76으로 명명하였다(도 3). 이후, 형질전환된 플라스미드 벡터 pYS76은 대장균 DH5 α 에 형질 전환하였다. 이 상기 유전자가 각기 클로닝된 벡터로부터 *lac* 프로모터 부분을 포함하여 유전자 배열순서는 *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY* 순이다(도 2). 대장균 균주로는 SURE, XL1-Blue, Top10, BL21(DE3), DH5 α 및 DH10B 등이 이용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 베타-카로틴을 합성하는데 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자들은 다음 표 1과 같다. 상기 표 1의 유전자 클로닝에 사용된 프라이머 서열은 표 2와 같다.

표 1

[0020] 베타-카로틴을 합성하는데 관여하는데 효소들을 코딩하는 유전자

유전자	효소명	(GenBank 등록번호-유전자번호)	서열번호
<i>crtE</i>	판토에아 아나나티스(<i>Pantoea ananatis</i>) PA13 유래의 제라닐제라닐 파이로포스페이트 합성효소 (geranylgeranyl pyrophosphate synthetase; CrtE)	(CP003086.1-PAGR_p225)	1
<i>crtB</i>	<i>Pantoea ananatis</i> PA13 유래의 베타-카로틴 합성효소 (β -carotene synthase; CrtB)	(CP003086.1-PAGR_p230)	2
<i>crtI</i>	<i>Pantoea ananatis</i> PA13 유래의 파이토엔 탈포화효소 (phytoene desaturase; CrtI)	(CP003086.1-PAGR_p228)	3
<i>crtY</i>	<i>Pantoea ananatis</i> PA13 유래의 라이코펜 사이클라제 (lycopene cyclase; CrtY)	(CP003086.1-PAGR_p227)	4

표 2

[0021] crtE 유전자, crtB 유전자, crtI 유전자 및 crtY 유전자를 PCR 증폭하기 위해 사용된 프라이머

프라이머	염기서열	유전자	서열번호
CAR1	5' -GGCCTCGAGCTGAAACAGGAAACAGCTATGACGGTCTGCGCAAAA-3'	crtE	5
CAR2	5' -ATCAGATCCTCCAGCATCAAACCTGCTTTAACTGACGGCAGCGAGTTT-3'		6
CAR3	5' -AGCAGGTTTGATGCTGGAGGATCTGATATGAATAATCCGTCGTTACTC-3'	crtB	7
CAR4	5' -GTAGTCGCTCTTTAACGATGAGTCGTCATTACAGAGCGGCGCTGCCAGAG-3'		8
CAR5	5' -ATGACGACTCATCGTTAAAGAGCGACTACATGAAACCAACTACGGTAATT -3'	crtI	9
CAR6	5' -AGCCGCTCCCACTTAAGACAGGCTGACCGTCAAAATCAGATCCTCCAGCAT -3'		10
CAR7	5' -CGGTCAGCCTGTCTTAAGTGGGAGCGGCTATGCAACCGCATTATGATCTG -3'	crtY	11
CAR8	5' -AATTTCTCCGGTAGAGACGTCTGGCAGCATTAAACGATGAGTCGCATAAT -3'		12

[0022] ※ 밑줄은 상보적 상동성을 갖는 overlap되는 부위를 나타낸다. CAR2와 CAR3, CAR4와 CAR5, 그리고 CAR6과 CAR7이 각각 상보적 상동성을 갖고 중첩된다. 굵은 글씨체는 XhoI 제한효소 인식부위를 나타낸다.

[0023] 실시예2: RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

[0024] 본 발명에서 베타-카로틴 생합성 유전자를 클로닝한 재조합 플라스미드의 4개 crtE-crtB-crtI-crtY 유전자가 하나의 오페론(operon)을 구성하는지 여부와 전사(transcription) 과정이 제대로 이루어지는지 여부를 확인하기 위해 RT-PCR 검정을 실시하였다. 플라스미드 pYS76로 형질전환된 대장균으로부터 mRNA를 분리하였고 분리된 mRNA를 주형으로 하여 crtE-crtB-crtI-crtY에 상응하는 cDNA(complementary DNA)인 RT1을 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다(도 3). PCR 증폭을 위한 주형으로는, 재조합 플라스미드 pYS76, 전체 RNA 및 cDNA (RT1)을 각각 사용하였다. 257 bp 크기의 PCR1 증폭 산물을 프라이머 PCR1-F와 PCR4-R을 사용하여 PCR 증폭을 시행하였다. 마찬가지로 126 bp 크기의 PCR2 증폭 산물을 프라이머 PCR5-F와 PCR3-R을 사용하여 PCR 증폭을 시행하였다. 149 bp 크기의 PCR3 PCR 증폭 산물을 프라이머 PCR4-F와 PCR2-R을 사용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 증폭산물 PCR1, PCR2 및 PCR3는 재조합 플라스미드 pYS76와 cDNA(RT1)를 주형으로 하였을 때만 증폭산물이 생성되었지만, 전체 RNA를 주형으로 사용한 PCR 증폭 반응에서는 생성되지 않았다. 따라서, 베타-카로틴을 생합성하기 위해 재조합한 재조합 플라스미드 pYS76의 4개 유전자 crtE-crtB-crtI-crtY는 하나의 오페론으로 존재하며, 하나의 mRNA로 전사가 이루어짐을 알 수 있었다(도 3). RT-PCR에 사용된 프라이머 서열은 표 3과 같다.

표 3

[0025] RT-PCR에 사용된 프라이머

프라이머	염기서열	유전자 (크기)	서열번호
PCR1-F	5'-ATCTTCATCTTGCCAGTGAG-3'	PCR1 (257 bp)	13
PCR1-R	5'-AATAACATCGTCACAATGGC-3'		14
PCR2-F	5'-TGCGCATCTCTGGCAGCGCC-3'	PCR2 (126 bp)	15
PCR2-R	5'-GCGTTGTTCAAGCAGTAAGAC-3'		16
PCR3-F	5'-CATTCCTGGCGTCATCGGCT-3'	PCR3 (149 bp)	17
PCR3-R	5'-CAGGTTGCTGCTGCTGAAGA-3'		18

[0026] 실시예3: 대장균 배양 및 베타-카로틴 생산

[0027] 본 발명에서 베타-카로틴의 생산을 위해 대장균(Escherichia coli) strain DH5α(제조사: Stratagene)를 사용하였으며, 제조된 재조합 플라스미드 벡터 pYS76와 클로닝용 벡터 pBBR1MCS-5를 각각 DH5α에 전기천공법을 이용하여 형질전환시킨 다음 37℃의 온도 조건에서 배양하였다. 전기천공법에는 Biorad사의 Gene pulser를 사용하였다. 형질전환된 대장균을 LB 한천배지에 접종하고, 37℃에서 48 시간 동안 정지 배양하였다. 배지에는 겐타마이신(gentamycin) 25 µg/ml을 첨가하였다. 재조합 플라스미드 벡터 pYS76로 형질전환된 대장균의 콜로니가 선명

한 노란색을 보였고, 대조구 벡터(pBBR1MCS-5)로 형질전환된 대장균은 콜로니의 색이 변하지 않았다. 이 결과는 pYS76로 형질전환된 대장균은 베타-카로틴을 생성하였음을 알 수 있다(도 3). 제조된 재조합 플라스미드 벡터 pYS76와 클로닝용 벡터 pBBR1MCS-5으로 각각 형질전환된 대장균을 LB 5 ml 배지에 접종하고, 37℃에서 24 시간 동안 250 rpm으로 진탕하면서 배양하였다. 형질 전환된 플라스미드에 항생제인 겐타마이신(gentamycin) 25 µg/ml을 첨가하였다(도 4). 배양 후 대장균 1 ml를 각각 취하여 마이크로튜브에 옮긴 후 4℃, 10,000 rpm에서 원심분리하였고 상등액은 제거하였다. 재조합 플라스미드 벡터 pYS76로 형질전환된 대장균의 콜로니가 선명한 노란색을 보였고, 대조구 벡터로 형질전환된 대장균은 콜로니의 색이 변하지 않았다. 이는 pYS76로 형질전환된 대장균은 베타-카로틴을 생성하였음을 확인하였다(도 4).

표 4

베타-카로틴 생합성 유전자 컨스트럭트(서열번호 19)

```
CTCGAGCTGAAACAGGAAACAGCTATGACGGTCTGCGCAAAAAACACGTTTCATCTCACTCGCGATGCTGCGGAGCAGTTACTGGCTGATATT
GATCGACGCCTTGATCAGTTATTGCCCGTGGAGGGAGAACGGGATGTTGTGGGTGCCGCGATGCGTGAAGGTGCGCTGGCACCGGGAAAAACGT
ATTGCCCCCATGTTGCTGTGCTGACGCGCCGCGATCTGGGTTGCGCTGTGACCCATGACGGATTACTGGATTGGCCGTGTGCGGTGGAAATG
GTCCACGCGGCTTCGCTGATCCTTGACGATATGCCCTGCATGGACGATGCGAAGCTGCGGCGCGGACGCCCTACCATTCATTCTCATTACGGA
GAGCATGTGGCAATACTGGCGCGGTTGCCCTGTGAGTAAAGCCTTTGGCGTAATTGCCGATGACAGATGGCCTCACGCCGTGGCAAAAAAT
CGGGCGGTTTCTGAACCTGTCAAACGCCATCGGCATGCAAGGATTGGTTCAGGGTCAGTTCAAGGACCTGTCTGAAGGGGATTAAGCCGCGCAGC
GCTGAAGCTATTTTGATGACGAATCACTTTAAACCAGCACGCTGTTTGTGCCTCCATGACAGATGGCCTCGATTGTTGCGAATGCCTCCAGC
GAAGCGGTGATTGCCTGCATCGTTTTCCTTGTATCTTGGTCAGGCATTTCAACTGCTGGACGATTGACCGATGGCATGACCGACACCGGT
AAAGATAGCAATCAGGACGCGCGTAAATCGACGCTGGTCAATCTGTTAGGCCCGAGGGCGGTTGAAGAACGCTCTGAGACAACATCTTCATCTT
GCCAGTGAGCATCTCTGCGGCTGCCAACACGGGCACGCCACTCAACATTTTATTAGGCCTGGTTTGACAAAAAACTCGTGCCGTCAGT
TAAAGCAGGTTTGATGCTGGAGGATCTGATATGAATAATCCGTCGTTACTCAATCATGCGGTCGAAACGATGGCAGTTGGCTCGAAAAGTTT
GCGACAGCCTCAAAGTTATTGTATGCAAAAACCCGGCGCAGCGTACTGATGCTCTACGCCCTGGTGCCGCAATTGTGACGATGTTATTGACGAT
CAGACGCTGGGCTTCAGGCCCGGCAGCCAGCCTTACAAACGCCGCAACACGCTGATGCAACTTGAGATGAAAACGCCGCGCAGGCTTATGCA
GGATCGCAGATGCACGAACCGCGGTTTGGCGCTTTTCAGGAAGTGGCTATGGCCCATGATATCGCCCGGCTTACGCGTTTGATCATCTGGAA
GGCTTCGCCATGGATGTACGGAAGCGCAATACAGCCAACGACGATACGCTGCGCTATTGCTATCAGGTTGACGCGGTTGTCGGCTTGATG
ATGGCGCAATCATGGCGTACGGGATAACGCCACGCTGGACCGCGCTGTGACCTTGGGTGGCATTTCACTTGACCAATATTGCTCGCGAT
ATTGTGGACGATGCACATGCGGCGCGCTGTATCTGCGGCAAGCTGGCTGGAGCATGAAGGCTCTGAACAAGAGAATTATGCGGCACCTGAA
AACGTCAGGCGCTGAGCGGTATCGCCGCTGTTTGGTGCAAGGAGCAACCTTACTATTGTCTGCCACAGCGGCGCTGGCTGGGTGGCCC
CTGCTTCGGCCTGGGCAATCGCTACGGCGAAGCAGGTTTACCGGAAATAGGTGTCAAAGTTGAACAGGCGGTCAGCAAGCCTGGGATCAG
CGGAGTCAACGACCGCGCGGAAAAATTAACGCTGCTGCTGGCGGCTCTGGTACGCGCTTACTTCCCGGATGCGGGCTCATCTCCCGCG
CCTGCGCATCTCTGGCAGCGCCGCTCTGAATGACGACTCATCGTTAAAGAGCGACTACATGCTCGCAGAAGACTTCTCACTTTATCTGCAC
GCGCCTGTGTACGGATTGCTCACTGGCGCTGAAGGTGCGGCGTACTATGTGTTGGCGCGGTCGCGCATTTAGGCAACCGCAACCTC
GACTGGACGCTTGAGGGGCAAAACTACGCGACCGTATTTTGTAGTACCTTGAGCAGCATTACATGCCTGGCTTACGGAGTCAGCTGGTCACG
CACCAGATGTTTACGCGCTTGTATTTTCGCGACCGCTTAATGCTATCAGGGCTCAGCCTTTTCTGTGGAGCCGCTTCTACCCAGAGCGCC
TGGTTTCGGCCCGCATAAACGCGATAAAACCATTAATCTCTACCTGCTCGGCGCAGGCACGCATCCCGCGCAGGCATTCTGGCGTCATC
GGCTCGGCAAAAGCGACAGCAGGTTTGTATGCTGGAGGATCTGATTTGACGGTCAGCCTGTCTTAAGTGGGAGCGGCTATGTTAATTGCCCGT
TTTTATGCGGGAACCTACGCTGACCGATCGGTACGTATTCTGAGCGGCAAGCCGCTGTTCCGGTATTAGCAGCATTGAAGCCATTATG
ACGACTCATCGTTAA
```

표 4에 나타난 베타-카로틴 생합성 유전자 컨스트럭트에서 기울기 글씨는 *Xho*I 제한효소 인식부위를 나타내고 밑줄은 각각 *lacZ* 프로모터의 리보솜 부착부위(*lacZ* RBS), *crtB*의 리보솜 부착부위로 예상되는 부위(*crtB* RBS), *crtI*의 리보솜 부착부위로 예상되는 부위(*crtI* RBS) 및 *crtY*의 리보솜 부착부위로 예상되는 부위(*crtY* RBS)이며 굵은 글씨체는 각 유전자 *crtE*, *crtB*, *crtI* 및 *crtY*의 시작 코돈과 종료 코돈을 나타낸다.

실시예 4: 베타-카로틴의 분리

본 발명의 실시예에 따라 형질전환된 대장균 strain DH5α 1 ml를 LB 50 ml 배지에 접종하고, 겐타마이신(gentamycin) 25 µg/ml을 첨가하여 37℃에서 24시간 동안 250 rpm으로 진탕하면서 배양하였다. 베타-카로틴의 분리를 위해 배양한 세포를 4℃, 10,000 rpm에서 원심 분리 후, 아세톤(acetone) 3 ml로 색이 완전히 빠질 때까지 반복적으로 추출하였다. 추출된 용액을 원심 분리한 후 상등액을 필터링(0.45 µm pore size GHP membrane)하여 분석에 이용하였다.

실시예 5: 베타-카로틴의 분석

베타-카로틴 분석을 위하여 상기 일실시예에 따라 준비된 20 µl의 샘플을 이용해 HPLC분석을 수행하였으며 A 용매[60% 아세토나이트릴(acetonitrile), 38 % 에틸아세테이트(ethyl acetate), 2 % 아세트산(acetic acid)]와 B 용매(100% 메탄올(methanol))을 이동상으로 C18 Shim-pack GIS-DOS 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 µm; Shimadzu)을 고정상으로 하여 1.5 ml/min의 유속으로 분석하였다. 베타-카로틴은 Photodiode Array (PDA) Detector를 이용하

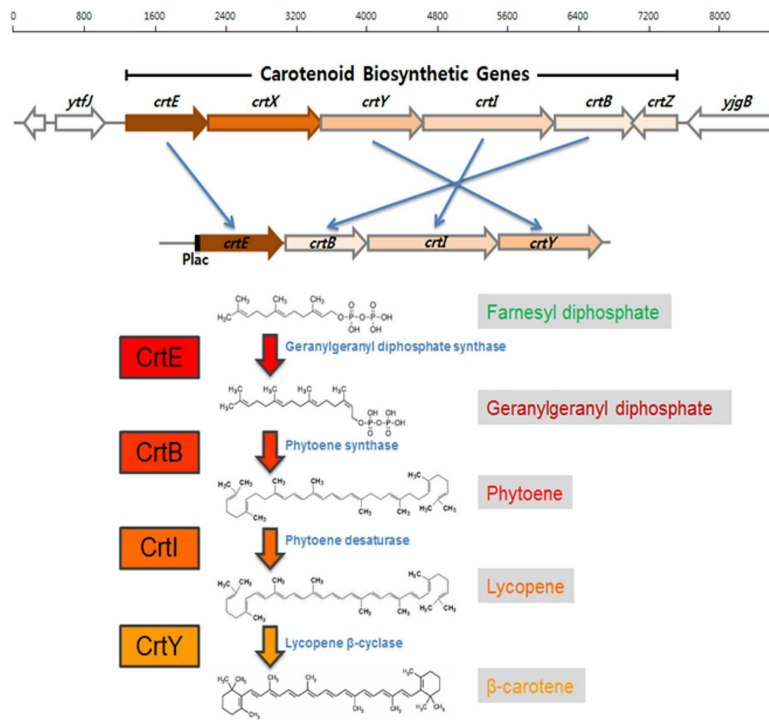
여 450 nm에서 측정하였다(도 5).

[0034]

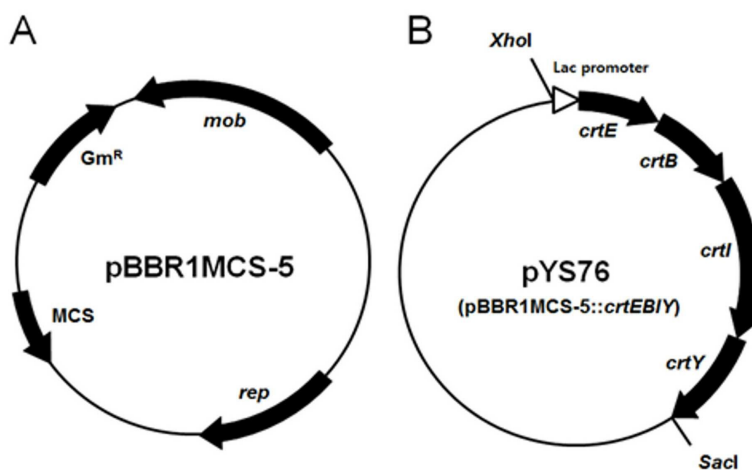
본 발명은 상기 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

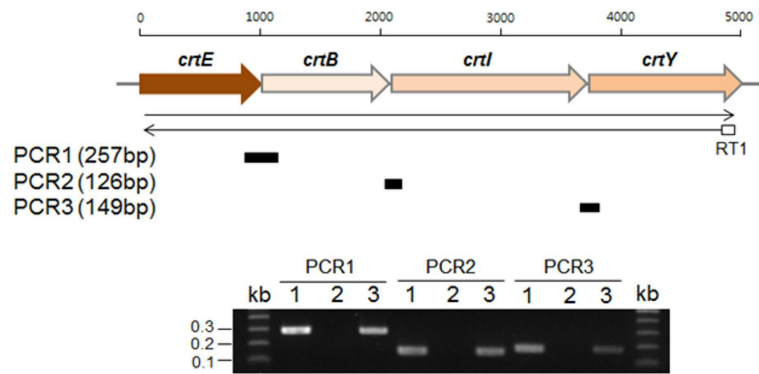
도면1



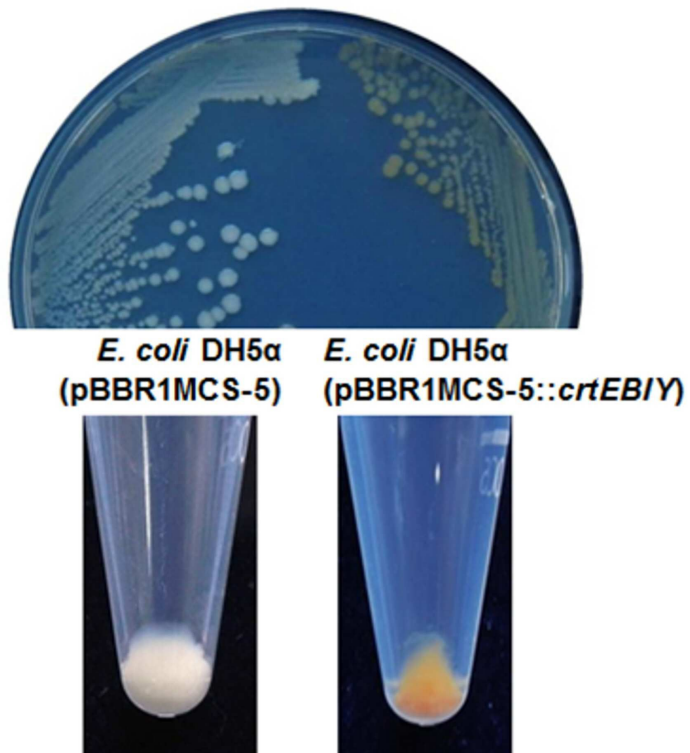
도면2



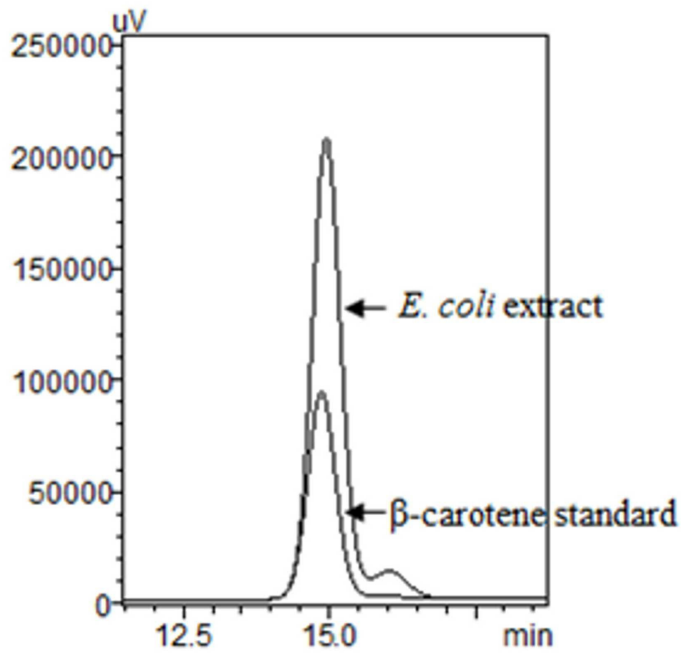
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> High efficient production method of beta-carotene and use thereof
- <130> PD14-1248
- <160> 19
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 909
- <212> DNA
- <213> Pantoea ananatis
- <400> 1

atgacgggtct ggcgaaaaaa acacgttcat ctcaactcgcg atgctgcgga gcagttactg	60
gctgatattg atcgacgcct tgatcagtta ttgcccggtgg agggagaacg ggatgttgtg	120
ggtgccgcga tgcgtgaagg tgcgctggca ccgggaaaac gtattcgccc catgttgctg	180
ttgctgaccg cccgcgatct gggttgcgct gtcagccatg acggattact ggatttggcc	240
tgtgccgttg aaatgggtcca cgcggttcg ctgatccttg acgatatgcc ctgcatggac	300
gatgcgaagc tgcggcgcgg acgccctacc attcattctc attacggaga gcatgtggca	360

atactggcgg cggttgcctt gctgagtaaa gcctttggcg taattgccga tgcagatggc 420
ctcacgccgc tggcaaaaaa tcgggcggtt tctgaactgt caaacgccat cggcatgcaa 480
ggattggttc agggtcagtt caaggacctg tctgaagggg ataagccgcg cagcgtgaa 540
gctatittga tgacgaatca cttaaaaacc agcacgctgt tttgtgcctc catgcagatg 600

gcctcgattg ttgcgaatgc ctccagcgaa gcgcgtgatt gcctgcatcg tttttactt 660
gatcttggtc aggcatattca actgctggac gatttgaccg atggcatgac cgacaccggt 720
aaagatagca atcaggacgc cggtaaatcg acgctggta atctgttagg cccgagggcg 780
gttgaagaac gtctgagaca acatcttcat cttgccagt agcatctctc tgcggcctgc 840
caacacgggc acgccactca acattttatt caggcctggt ttgacaaaaa actcgctgcc 900
gtcagttaa 909

<210> 2
<211> 930
<212> DNA

<213> Pantoea ananatis
<400> 2

atgaataatc cgtcgttact caatcatcgc gtcgaaacga tggcagttgg ctgaaaaagt 60
tttgcgacag cctcaaagtt atttgatgca aaaacccggc gcagcgtact gatgctctac 120
gcctggtgcc gccatttga cgatgttatt gacgatcaga cgctgggctt ccaggcccg 180
cagccagcct tacaacgcc cgaacaacgt ctgatgcaac ttgagatgaa aacgcgccag 240
gcctatgcag gatcgagat gcacgaaccg gcgtttgcgg cttttcagga agtggctatg 300
gccccatgata tcgccccggc ttacgcgttt gatcatctgg aaggcttcgc catggatgta 360

cgcgaagcgc aatacagcca actggacgat acgctgcgct attgctatca cgttgacggc 420
gttgtcggtc tgatgatggc gcaaatcatg ggcgtacggg ataacgccac gctggaccgc 480
gcctgtgacc ttgggctggc atttcagttg accaatattg ctccgatat tgtggacgat 540
gcacatgcgg gccctgtta tctgccggca agctggctgg agcatgaagg tctgaacaaa 600
gagaattatg cggcacctga aaaccgtcag gcgctgagcc gtatcgcccg tcgtttggtg 660
caggaagcag aaccttacta tttgtctgcc acagcgggcc tggctgggtt gccctgcgt 720
tcggcctggg caatcgctac ggcaagcag gtttaccgga aaataggtgt caaagttgaa 780

caggccggtc agcaagcctg ggatcagcgg cagtcaacga ccacgccga aaaattaacg 840
ctgctgctgg ccgctctgg tcaggccctt acttcccga tgcgggctca tcctcccgc 900
cctgcgcac tctggcagcg cccgctctag 930

<210> 3

<211> 1479

<212> DNA

<213> *Pantoea ananatis*

<400> 3

atgaaaccaa ctacggaat tggcgcaggc ttcggtggcc tggcactggc aattcgtcta 60
caggctgcgg ggatccccgt cttactgttt gaacaacgtg ataaaccggg cggcgggct 120
tatgtctacg aggatcaggg gtttaccttt gatgcaggcc cgacggttat caccgatccc 180

agtccattg aagaactgtt tgcactggca ggaaacagt taaaagagta tgtcgaactg 240
ctgccgggta cgccgtttta ccgcctgtgt tgggagtcag ggaaggtctt taattacgat 300
aacgatcaaa cccggctcga agcgcagatt cagcagttta atccccgca tgtcgaaggt 360
tattgtcagt ttctggacta ttcacgcgcg gtgtttaag aaggctatct gaagctcggc 420
actgtccctt tttatcgtt cagagacatg cttcgcgcgc cactcaact ggcgaaactg 480
caggcatgga gaagcgttta cagtaagggt gccagttaca tcgaagatga acatctgcgc 540
caggcgtttt cttccactc gctgttgggt ggccggcaatc ccttcgccac ctcattcatt 600

tatacgttga tacacgcgct ggaacgtgag tggggcgtct gggttccgcg tggcggcacc 660
ggcgcattag ttcaggggat gataaagctg tttcaggatc tgggtggcga actcgtgtta 720
aacgccagag tcagccatat ggaaacgaca ggaacaaga ttgaagccgt gcatttagag 780
gacggtcgca ggttcttgac gcaagccgtc gcgtcaaag cagatgtggt tcatacctat 840
cgcgacctgt taagccgca ccctgccgcg gtttaagcagt ccaacaaact gcagactaag 900
cgtatgagta actctctgtt tgtgctctat tttggtttga atcaccatca tgatcagctc 960
gcgcatcaca cggtttgttt cggcccgcgt taccgcgaac tgattgacga gatttttaat 1020

catgatggcc tcgcagaaga cttctcactt tatctgcacg cgccctgtgt cacggattcg 1080
tactggcgc ctgaaggttg cggcagttac tatgtgttgg cgccggtgcc gcatttaggc 1140
accgcaacc tcgactggac ggttgagggg ccaaaactac gcgaccgtat ttttgagtac 1200
cttgagcagc attacatgcc tggcttacgg agtcagctgg tcacgcaccg gatgtttacg 1260
ccgtttgatt ttgcgcacca gcttaatgcc tatcagggtc cagccttttc tgtggagccc 1320
gttcttacc agagcgcctg gtttcggcgc cataaccgcg ataaaacat tactaatctc 1380
tacctggctg gcgcaggcac gcatcccgcc gcaggcattc ctggcgtcat cggctcggca 1440

aaagcgacag caggtttgat gctggaggat ctgatttga 1479

<210> 4

<211> 1149

<212> DNA

<213> *Pantoea ananatis*

<400> 4

atgcaaccgc attatgatct gattctcgtg ggggctggac tcgcaatgg cttatcggc 60
ctgctcttc agcagcagca acctgatatg cgtattttgc ttatcgacgc cgcaccccag 120
gcggcgggga atcatacgtg gtcatttcac cacgatgatt tgactgagag ccaacatcgc 180
tggatagctc cgctggtggt tcatcactgg ccgactatc aggtgcgctt tcccacacgc 240
cgtcgtaagc tgaacagcgg ctacttctgt attacttctc agcgtttcgc tgaggtttta 300

cagcgacagt ttgccccga cttgtggatg gataccgcgg tcgcagaggt taatgcggaa 360
tctgttcggt tgaaaaaggg tcaggttatc ggtgcacgcg cggtgattga cggcggggt 420
tatgcggcaa actcagcact gagcgtgggc ttccaggcgt ttattggcca ggaatggcga 480
ttgagccaac cgcatggttt atcgtctccc attatcatgg atgccacggt cgtacagcaa 540
aatggttate gcttcgtgta cagcctgccg ctctcgccga ccagattgtt aattgaagac 600
acgcactata tcgataatgc gacattagat cctgaacgcg cgcggcaaaa tatttgcgac 660
tatgccgcgc aacagggttg gcagcttcag acattgctgc gtgaagaaca gggcgcctta 720

cccatcacc tgctgggcaa tgccgaggca ttctggcagc agcgccccct ggcctgtagt 780
ggattacgtg ccggtctgtt ccacctacc accggctatt cactgccgct ggcggttgcc 840
gtggccgacc gcctgagcgc acttgatgtc ttacgtcgg cctcaattca ccaggccatt 900
acgcattttg cccgcgagcg ctggcagcag cagcgctttt ttgcgatgtt gaatcgcatg 960
ctgttttttag ccggaccgcg cgattcacgc tggcgggtta tgcagcggtt ttatggttta 1020
cctgaagatt taattgcccg tttttatgcg ggaaaactca cgctgaccga tcggctacgt 1080
attctgagcg gcaagccgcc tgttccggtta ttagcagcat tgcaagccat tatgacgact 1140

catcgtaa 1149

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR1

<400> 5

ggcctcgagc tgaacagga aacagctatg acggtctgcg caaaa 45

<210> 6

<211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CAR2
 <400> 6
 atcagatcct ccagcatcaa acctgcttta actgacggca gcgagttt 48
 <210> 7
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> CAR3
 <400> 7
 agcaggtttg atgctggagg atctgatatg aataatccgt cgttactc 48
 <210> 8
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CAR4
 <400> 8
 gtagtcgctc tttacgatg agtcgtcatt cagagcgggc gctgccagag 50
 <210> 9
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CAR5
 <400> 9
 atgacgactc atcgttaaag agcgactaca tgaaaccaac tacggtaatt 50
 <210> 10
 <211> 50

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CAR6
 <400> 10

agccgctccc acttaagaca ggctgaccgt caaatcagat cctccagcat	50
<210> 11	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CAR7	
<400> 11	
cggtcagcct gtcttaagtg ggagcggcta tgcaaccgca ttatgatctg	50
<210> 12	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CAR8	
<400> 12	
aatttctccg gtagagacgt ctggcagcat taacgatgag tcgtcataat	50
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR1-F	
<400> 13	
atcttcatct tgccagtgag	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR1-R	
<400> 14	
aataacatcg tcacaatggc	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR2-F	

<400>	15	
tgcgcacatctc tggcagcgcc		20
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR2-R	
<400>	16	
gcgttggttca agcagtaaga c		21
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR3-F	
<400>	17	
cattcctggc gtcacggct		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR3-R	
<400>	18	
caggttgctg ctgctgaaga		20
<210>	19	
<211>	4576	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Gene construct for synthesizing beta-carotene	
<400>	19	
ctcgagctga aacaggaaac agctatgacg gtctgcgcaa aaaaacacgt tcattctcact		60
cgcgatgctg cggagcagtt actggctgat attgatcgac gccttgatca gttattgccc		120
gtggaggag aacgggatgt tgtgggtgcc gcgatgctg aaggtgcgct ggcaccggga		180
aaacgtattc gcccattgtt gctgttgctg accgcccgcg atctgggttg cgctgtcagc		240

catgacggat tactggattt ggctgtgcg gtggaatgg tccacgcgc ttcgtgatc	300
cttgacgata tgccttgcac ggacgatgcg aagctgcggc gcggacgccc taccattcat	360
tctcattacg gagagcatgt ggcaatactg gcggcgggtg ccttgctgag taaagccttt	420
ggcgtaattg ccgatgcaga tggcctcagc ccgctggcaa aaaatcgggc ggtttctgaa	480
ctgtcaaacg ccatcgcat gcaaggattg gttcagggtc agttcaagga cctgtctgaa	540
ggggataagc cgcgcagcgc tgaagctatt ttgatgacga atcacttta aaccagcacg	600
ctgttttggt cctccatgca gatggcctcg attgttgca atgcctccag cgaagcgcgt	660
gattgcctgc atcgtttttc acttgatctt ggtcaggcat ttcaactgct ggacgatttg	720
accgatggca tgaccgacac cggtaaagat agcaatcagg acgccggtaa atcgacgtg	780
gtcaatctgt taggcccagc ggcggttgaa gaacgtctga gacaacatct tcatcttgcc	840
agtgagcatc tctctgcggc ctgccaacac gggcacgcca ctcaacattt tattcaggcc	900
tggtttgaca aaaaactcgc tgccgtcagt taaagcaggt ttgatgctgg aggatctgat	960
atgaataatc cgtcgttact caatcatgcg gtcgaaacga tggcagttgg ctcgaaaagt	1020
tttgcgacag cctcaaagt atttgatgca aaaacccggc gcagcgtact gatgctctac	1080
gcctggtgcc gccattgtga cgatgttatt gacgatcaga cgctgggctt ccaggcccgg	1140
cagccagcct tacaacgcc cgaacaacgt ctgatgcaac ttgagatgaa aacgcgccag	1200
gcctatgcag gatcgcatg gcacgaaccg gcgtttgcgg cttttcagga agtggctatg	1260
gccatgata tcgccccggc ttacgcgttt gatcatctgg aaggcttcgc catggatgta	1320
cgcgaagcgc aatacagcca actggacgat acgtgcgct attgctatca cgttgcaggc	1380
gttgtcggtc tgatgatggc gcaaatcatg ggcgtacggg ataacgccac gctggaccgc	1440
gcctgtgacc ttgggctggc atttcagttg accaatattg ctcgcgatat tgtggacgat	1500
gcacatgcgg gccgtgtta tctgccggca agctggctgg agcatgaagg tctgaacaaa	1560
gagaattatg cggcacctga aaaccgtcag gcgctgagcc gtatcgcccg tcgtttggtg	1620
caggaagcag aaccttacta ttgtctgcc acagcgggcc tggctgggtt gccctgcgt	1680
tcggcctggg caatcgctac ggcaagcag gtttaccgga aaataggtgt caaagttgaa	1740
caggccggtc agcaagcctg ggatcagcgg cagtcaacga ccacgccga aaaattaacg	1800
ctgctgctgg ccgctctgg tcaggccctt acttcccgga tgcgggctca tcttcccgc	1860
cctgcgcata tctggcagcg cccgctctga atgacgactc atcgttaaag agcgactaca	1920
tgaaccaaac tacggttaatt ggtgcaggct tcggtggcct ggactggca attcgtctac	1980

aggctgcggg gatccccgtc ttactgcttg aacaacgtga taaacccggc ggtcgggctt	2040
atgtctacga ggatcagggg tttaaccttg atgcaggccc gacggttate accgatccca	2100
gtgccattga agaactgttt gcactggcag gaaaacagtt aaaagagtat gtcgaactgc	2160
tgccggttac gccgttttac cgctgtgtt gggagtcagg gaaggctttt aattacgata	2220
acgatcaaac ccggctcgaa gcgcagattc agcagtttaa tccccgcgat gtcgaaggtt	2280
atcgtcagtt tctggactat tcacgcgcgg tgtttaaaga aggctatctg aagctcggta	2340
ctgtcccttt ttatcgttc agagacatgc ttcgcgccgc acctcaactg gcgaaactgc	2400
aggcatggag aagcgtttac agtaaggttg ccagttacat cgaagatgaa catctgcgcc	2460
aggcgttttc ttccactcg ctgttggtgg gcggcaatcc cttcgccacc tcatccattt	2520
atacgttgat acacgcgctg gaacgtgagt ggggcgctctg gtttccgct ggccggcacg	2580
gcgcattagt tcaggggatg ataaagctgt ttcaggatct gggtagcgaa ctctgtttaa	2640
acgccagagt cagccatatg gaaacgacag gaaacaagat tgaagccgtg catttagagg	2700
acggtcgcag gttcctgacg caagccgtcg cgtcaaatgc agatgtggtt catacctatc	2760
gcgacctgtt aagccagcac cctgccgcgg ttaagcagtc caacaaactg cagactaagc	2820
gtatgagtaa ctctctgttt gtgctctatt ttggtttgaa tcaccatcat gatcagctcg	2880
cgcatcacac ggtttgttcc ggcccgcgtt acccggaact gattgacgag atttttaatc	2940
atgatggcct cgcagaagac ttctcacttt atctgcacgc gccctgtgtc acggattcgt	3000
cactggcgcc tgaaggttgc ggcagttact atgtgttggc gccggtgccg catttaggca	3060
ccgcgaacct cgactggacg gttgaggggc caaaactacg cgaccgtatt tttgagtacc	3120
ttgagcagca ttacatgcct ggcttacgga gtcagctggt cacgcaccgg atgtttacgc	3180
cgttgatttt tcgcgaccag cttaatgcct atcagggctc agccttttct gtggagcccg	3240
ttcttaccca gagegcctgg tttcgccgcg ataaccgcga taaaaccatt actaatctct	3300
acctggctcg cgcaggcacg catccggcgc caggcattcc tggcgtcatc ggctcggcaa	3360
aagcgacagc aggtttgatg ctggaggatc tgatttgacg gtcagcctgt cttaaagtggg	3420
agcggctatg caaccgcatt atgatctgat tctctggtggg gctggactcg cgaatggcct	3480
tatcgccctg cgtcttcagc agcagcaacc tgatatgctt attttgctta tcgacccgc	3540
acccagcgcg ggcgggaatc atacgtggtc atttcaccac gatgatttga ctgagagcca	3600
acatcgctgg atagctccgc tgggtgttca tcaactggccc gactatcagg tgcgctttcc	3660
cacacgccgt cgtaagctga acagcggcta cttctgtatt acttctcagc gtttcgctga	3720
ggttttacag cgacagttag gcccgcaatt gtggatggat accgcggtcg cagaggttta	3780
tgcggaatct gttcggttga aaaaggttca ggttatcggt gcacgcgcgg tgattgacgg	3840

gcgggggttat gcggcaaact cagcactgag cgtgggcttc caggcgttta ttggccagga	3900
atggcgattg agccaaccgc atggtttatc gtctccatt atcatggatg ccacggtcga	3960
tcagcaaaat ggttatcgct tcgtgtacag cctgccgctc tcgccgacca gattgttaat	4020
tgaagacacg cactatatcg ataatgcgac attagatcct gaacgcgcgc ggcaaaatat	4080
ttgcgactat gccgcgaac agggttggca gcttcagaca ttgctgcgtg aagaacaggg	4140
cgccttacc atcacctgt cgggcaatgc cgaggcattc tggcagcagc gcccctggc	4200
ctgtagtgga ttacgtgccg gtctgttcca tcctaccacc ggctattcac tgcgctggc	4260
ggttgccgtg gccgaccgcc tgagcgact tgatgtcttt acgtcgccct caattcacca	4320
ggccattacg catTTTgccc gcgagcgtg gcagcagcag cgcttttttc gcatgttgaa	4380
tcgcatgctg ttttagccg gaccgcgcga ttacgctgg cgggttatgc agcgttttta	4440
tggtttacct gaagatttaa ttgccggtt ttatgcggga aaactcacgc tgaccgatcg	4500
gctacgtatt ctgagcggca agccgcctgt tccgtatta gcagcattgc aagccattat	4560
gacgactcat cgttaa	4576