



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월11일

(11) 등록번호 10-1577147

(24) 등록일자 2015년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/90 (2006.01) C12P 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0132350

(22) 출원일자 2014년10월01일

심사청구일자 2014년10월01일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110035805 A*

KR101318422 B1*

KR1020110041910 A*

KR101203856 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김선원

경상남도 진주시 진주대로 1317, 105동 2202호(이현하이클래스웰가아파트)

최민진

경상남도 창원시 의창구 의안로55번길 19-1, 5층 (북동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

두호특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

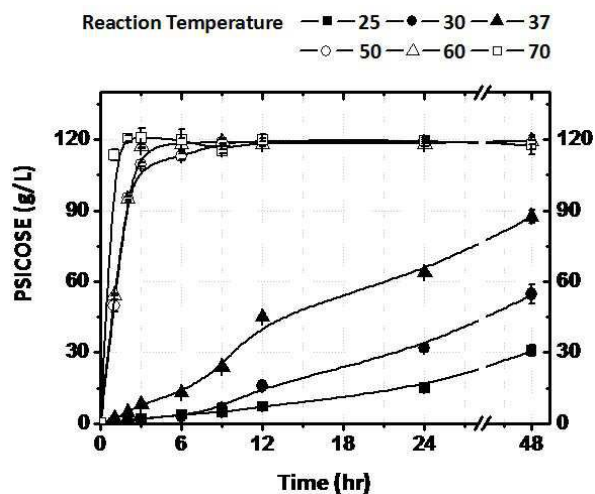
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 사이코스의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 사이코스의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기질인 과당과 그 에피머라제를 미생물 내에서 40℃ 이상의 온도로 반응시키는 단계를 포함함으로써, 사이코스의 생산량 및 생산 속도를 현저히 개선할 수 있는 사이코스의 생산 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정성희

경상남도 김해시 상동면 여차로699번길 11-1

이대윤

경상남도 진주시 진주성로188번길 9-1 (상봉동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395035688

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 사이코스 대량 생산 세포공장 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기질인 과당과 그 에피머라제를 미생물 내에서 40℃ 이상의 온도로 반응시키는 단계를 포함하고,

상기 미생물은 서열번호 1의 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자, 서열번호 6의 아미노산 서열에서 32번째 아미노산이 류신으로 치환되거나, 196번째 아미노산이 시스테인으로 치환된 아미노산 서열을 코딩하는 유전자, 서열번호 7의 클로스트리디움 볼테아(*Clostridium boltea*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자, 또는 서열번호 8의 클로스트리디움 힐레모나(*Clostridium hylemonae*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자로 형질 전환된 코리네박테리움 속이며,

상기 과당은 무기염과 과당만 포함된 배지로부터 제공되는 것인, 사이코스의 생산 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 상기 에피머라제를 내재적으로 또는 형질전환에 의해 발현시키는 것인, 사이코스의 생산 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 반응 이전에, 상기 미생물을 상기 과당이 포함되지 않은 배지에서 배양하여 상기 미생물이 휴면 세포를 갖도록 유도하는 단계를 더 포함하는, 사이코스의 생산 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 반응 이후에, 상기 미생물을 회수하여 과당의 사이코스로의 전환에 재사용하는 단계를 더 포함하는, 사이코스의 생산 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 무기염은 망간염 또는 코발트염인, 사이코스의 생산 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 반응 온도는 40℃ 내지 90℃인, 사이코스의 생산 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, 사이코스의 생산 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물을 이용하여 사이코스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사이코스 (D-psicose)는 과당 (D-fructose)의 3번 탄소의 에피머 (epimer)로써 일반 당류들처럼 감미를 가지지만 인체 내에서 대사가 되지 않아서 거의 칼로리는 제로에 가까워 당뇨 및 비만환자에게 설탕 대체 기능성 감미료로 사용될 수 있는 기능성 당이다. 또한 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제해서 복부비만을 감소시키는 기능을 가지고 있고 당뇨병과 동맥경화 치료제로 현재 연구 중에 있는 당이다.

[0003] 이처럼 사이코스는 감미료로 각광받으면서 식품 산업 분야에 있어 사이코스를 효율적으로 생산할 수 있는 방법에 대한 개발의 필요성이 점점 높아지고 있다. 사이코스는 천연물질 내에는 당밀 처리 과정 또는 포도당 이성화 반응과정 중에 매우 소량 존재하기에 기존의 사이코스 생산은 주로 화학적 과정을 거쳐 이루어졌다. 빌릭 (Bilik)등은 몰리브딕산(molybdic acid) 이온의 촉매작용을 활용하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 기술을 개발하였다. 맥도날드 (McDonald)는 1,2:4,5-디-*o*-이소프로필리덴-베타-D-프락토피라노스 (1,2:4,5-di-*o*-isopropylidene-beta-D-fructopyranose)로부터 3단계의 화학적 처리과정으로 사이코스를 생산하였다. 또한, 도너 (Doner)는 에탄올과 트리에틸아민과 함께 과당을 가열하는 방법으로 사이코스를 생산하였다. 그러나, 이들 화학적 방법에 의한 사이코스 생산은 비용이 많이 소모되는 반면 그 생산효율은 낮고 또한 부산물의 과량 발생한다는 문제점이 있다.

[0004] 생물학적 방법에 의한 사이코스 생산방법으로 이즈모리 (Ken Izumori)등은 미생물 세포반응을 활용하여 갈락시톨 (galacitol), 디-타가토스 (D-tagatose) 또는 디-탈리톨 (D-talitol) 등으로부터 사이코스를 생산할 수 있다는 것을 보였다. 그러나, 이 기질들 또한 자연계에서 비교적 희귀한 당 또는 당알코올로 그 원가가 높다는 단점이 있다.

[0005] 효소 전환방법으로는 분리미생물 슈도모나스 치코리 ST-24 (*Pseudomonas cichorii* ST-24)의 디-타가토스-3-에피머화 효소 (D-tagatose-3-epimerase)를 재조합 대장균에서 생산하고 정제하여 과당을 사이코스로 효소 전환하는 방법이 있으며, 이즈모리 등은 디-타가토스-3-에피머화 효소를 고정화시킨 반응시스템으로 약 25%의 전환율로 사이코스를 생산한 바 있다.

[0006] 이러한 종래 기술에 의하면, 과당으로부터 사이코스를 생산하기 위해서 효소를 정제하고 그 정제된 효소를 고정

화하여 사이코스 생산성을 높이는 방향으로 연구되어왔다. 이처럼 효소를 정제하는 과정에는 시간 및 비용이 많이 요구되는 것이 현실이다.

[0007] 따라서, 효소 정제의 과정을 생략하여 제조원가가 낮고 사이코스를 높은 효율로 생산할 수 있는 균주 및 이를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법이 요구되고 있다.

[0008] 한국공개특허 제2006-125971호에는 사이코스 에피머화 효소에 의한 사이코스의 생산 방법이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2006-125971호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Choi JG, Ju YH, Yeom SJ and Oh DK (2011), Improvement in the Thermostability of D-Psicose 3-Epimerase from Agrobacterium tumefaciens by Random and Site-Directed Mutagenesis, Appl Environ Microbiol 77(20):7316-20

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 사이코스의 생산량 및 생산 속도를 현저히 개선할 수 있는 사이코스의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 기질인 과당과 그 에피머라제를 미생물 내에서 40℃ 이상의 온도로 반응시키는 단계를 포함하는 사이코스의 생산 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 발명자들은 기질인 과당과 그 에피머라제와의 반응을 40℃ 이상의 온도로 수행하는 경우 사이코스의 생산량 및 생산 속도가 현저히 증가하고, 온도가 증가함에 따라 사이코스 생산량 및 생산 속도가 증가함을 발견하여 본 발명을 착안하였다.

[0014] 한편, 에피머라제 등의 효소는 일반적으로 40℃ 이상의 고온에서는 열 변성되어 활성을 잃게 되나, 본 발명은 상기 반응을 미생물 내에서 수행함으로써, 효소 상태로 외부에 노출된 경우에 비해 외부로부터 보호됨에 따라 고온에서도 변성 없이 상기 반응을 수행할 수 있다.

[0015] 반응 온도가 증가함에 따라 사이코스 생산능이 더 증가하므로, 반응 온도는 40℃ 이상이며 미생물이 열에 의해 손상되거나 단백질이나 당이 변성되지 않는 범위 내라면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 40 내지 50℃, 40 내지 60℃, 40 내지 70℃, 40 내지 80℃, 40 내지 90℃, 45 내지 60℃, 45 내지 70℃, 45 내지 80℃, 45 내지 90℃, 50 내지 70℃, 50 내지 80℃, 50 내지 90℃, 55 내지 60℃, 55 내지 70℃, 55 내지 80℃, 55 내지 90℃, 60 내지 70℃, 60 내지 80℃, 60 내지 90℃, 70 내지 80℃, 70 내지 90℃ 등일 수 있다. 상기 사이코스 생산능을 극대화한다는 측면에서 바람직하게는 하한은 50℃ 이상일 수 있고, 열 손상 및 변성의 억제 측면에서 바람직하게는 상한은 90℃ 이하 일 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어 "미생물"은 액체 배지 중에서 배양될 수 있는 세포일 수 있다.

[0017] 상기 미생물은 상기 에피머라제를 내재적으로 또는 형질전환에 의해 발현시키는 것일 수 있다. 그러한 경우, 미

생물 내에서 에피머라제가 생성되어 상기 과당과 에피머라제의 미생물 내에서의 반응에 의한 사이코스의 생산이 연속적으로 수행될 수 있다.

- [0018] 상기 미생물이 에피머라제를 코딩하는 유전자로 형질전환되어 에피머라제를 발현시키는 경우, 상기 에피머라제를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자, 또는 서열번호 2의 아나로스티페스 카캐(*Anaerostipes caccae*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0019] 아그로박테리움 튜메파시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 아나로스티페스 카캐 유래 사이코스-3-에피머라제는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0020] 에피머라제가 보다 우수한 고온 안정성을 갖는다는 측면에서 바람직하게는 에피머라제를 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0021] 상기 서열번호 5의 아미노산 서열은 아그로박테리움 튜메파시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열에서 33번 아미노산이 류신으로, 213번 아미노산이 시스테인으로 교체된 서열로, 참고문헌 1에 의해 열 안정성이 우수하다고 알려져 있다.
- [0022] 본 발명의 발명자들은 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제가 열 안정성이 우수함을 확인하였는데, 도 7을 참조해보면, 열 안정성이 높았던 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제의 경우 한 개의 아미노산이 이에 상응하는 서열을 가지고 있거나 혹은 두 개 모두를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0023] 이에, 아그로박테리움 튜메파시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제 뿐만이 아니라, 다른 균주로부터 유래한 사이코스-3-에피머라제라도 상기 아그로박테리움 튜메파시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열의 33번, 213번 아미노산에 대응되는 아미노산 서열이 열 안정성 증대에 중요한 서열임을 확인하였다.
- [0024] 이러한 아미노산 서열의 구체적인 예를 들자면, 서열번호 6의 아미노산 서열에서 32번째 아미노산이 류신으로 치환되거나, 196번째 아미노산이 시스테인으로 치환된 서열일 수 있다. 서열번호 6은 도 7의 박스로 표시한 서열을 나열한 것으로 본 발명에서 사용한 아그로박테리움 튜메파시엔스, 아나로스티페스 카캐, 클로스트리디움 볼테에, 클로스트리디움 힐레모네 유래 사이코스-3-에피머라제 아미노산 서열들(서열번호 3번, 4번, 9번, 10번)의 공통 염기 서열이다. 따라서 상기 미생물은 상기 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 마찬가지로 우수한 고온 안정성, 그리고 사이코스 생산능의 측면에서 에피머라제는 클로스트리디움 속 유래 사이코스-3-에피머라제일 수 있고, 이를 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 클로스트리디움 볼테에(*Clostridium bolteae*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자, 또는 서열번호 8의 클로스트리디움 힐레모네(*Clostridium hylemonae*) 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자일 수 있다. 고온 안정성을 극대화하는 측면에서 바람직하게는 서열번호 8의 클로스트리디움 힐레모네 유래 사이코스-3-에피머라제를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0026] 클로스트리디움 볼테에 유래 사이코스-3-에피머라제는 서열번호 9의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 클로스트리디움 힐레모네 유래 사이코스-3-에피머라제는 서열번호 10의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0027] 상기 미생물은 원핵 세포 또는 진핵 세포로 액체 배지에서 배양될 수 있으면서, 전술한 고온의 온도에서 배양이 가능한 것일 수 있다. 상기 미생물은 예를 들면, 박테리아, 곰팡이, 또는 이들의 조합일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 또는 이들의 조합일 수 있으며, 사이코스 생산성 증가의 측면에서 바람직하게는 그람 양성 박테리아일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 에세리키아(*Escherichia*) 속일 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실러스 속, 코리네박테리움 속, 액티노마이세스 속, 유산균 또는 이들의 조합일 수 있다. 곰팡이는 효모, 클루베로마이세스 속, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0028] 에세리키아 속 미생물은 대장균일 수 있고, 구체적으로 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합에 에피머라제를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 대장균은 내재적 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자 및 알로즈 대사 오페론(allose metabolic operon)으로 이루어진 하나의 영역이 불활성화된 것일 수 있다.
- [0030] 상기 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자는 예를 들면, 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있고, 6-포스포프락토키나제는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

- [0031] 상기 알로즈 대사 오페론을 구성하는 유전자는 rpiB, alsR, alsB, alsA, alsC, alsE 및 alsK로서, 이들 중 하나 이상의 유전자가 불활성화된 것일 수 있다.
- [0032] 상기 rpiB, alsR, alsB, alsA, alsC, alsE, 및 alsK 유전자는 예를 들면, 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 18 및 19의 뉴클레오티드 서열을 각각 갖는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 rpiB, alsR, alsB, alsA, alsC, alsE, 및 alsK 유전자는 서열번호 20, 21, 22, 23, 24, 25 및 26의 아미노산 서열을 각각 코딩하는 것일 수 있다.
- [0034] 용어 "불활성화"란 상기 유전자의 발현이 감소되거나 발현이 이루어지지 않는 것을 의미한다. 상기 "불활성화"는 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 상동 재조합 (homologous recombination)에 의하여 불활성화된 것일 수 있다. 상기 상동 재조합은 예를 들면, 전이인자 돌연변이 (transposon mutagenesis) 또는 P1 형질도입 (P1 transduction)에 의하여 매개된 것일 수 있다.
- [0035] 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰일 수 있고, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 에피머라제를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다.
- [0036] 코리네박테리움 속 미생물은 내재적 디-프락토오스를 디-프락토오스 1-포스페이트로 전환하면서 균체 내로 수송하는 PTS 수송 시스템인 ptsF(EII^{Fru}, fruA, NCgl1861, GI:19553141, EC 2.7.1.69) 유전자를 결손 또는 불활성화시킨 것일 수 있다.
- [0037] ptsF 유전자는 서열번호 27의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있고, 서열번호 28의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다.
- [0038] 사이코스는 D-프락토오스(D-fructose)로부터 생성되므로, 상기 유전자를 결손 또는 불활성화시키면 프락토오스의 인산화를 억제할 수 있으므로, 사이코스의 생성 효율을 현저히 개선할 수 있다.
- [0039] 또한, 코리네박테리움 속 미생물은 만니톨 2-디하이드로게나아제(mannitol 2-dehydrogenase)를 코딩하는 mt1D (NCgl10108, GI:19551360, EC 1.1.1.67) 유전자를 결손 또는 불활성화시킨 것일 수 있다.
- [0040] mt1D 유전자는 서열번호 29의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있고, 서열번호 30의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 과당과 그 에피머라제의 반응은 미생물 내에서 수행되는 것인바, 미생물을 과당을 포함하는 배지 중에서 배양할 수 있다.
- [0042] 상기 배지는 2YT 배지, LB 배지, TB 배지 등의 효모추출물과 질소원을 포함하는 영양배지일 수 있다.
- [0043] 배지에 포함되는 과당 농도는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 1%(w/v) 내지 80%(w/v)의 농도로 포함될 수 있고, 상기 범위 내에서 예컨대, 1%(w/v) 내지 35%(w/v), 10%(w/v) 내지 80%(w/v), 20%(w/v) 내지 80%(w/v), 30%(w/v) 내지 80%(w/v), 40 %(w/v) 내지 80 %(w/v) 등 일 수 있다. 바람직하게는 1%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있다.
- [0044] 또한, 포도당, 글리세롤 등을 포함하는 탄소원; 암모니아, 우레아(urea) 등을 포함하는 질소원; 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 망간, 코발트 등의 필수 금속이온; 비타민 등을 포함하는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 구명배지(defined 배지)일 수 있다.
- [0045] 상기 배양은 연속, 반연속, 또는 배치 (batch) 형식 배양일 수 있다.
- [0046] 상기 미생물은 과당을 포함하는 배지에서 균체의 탁도(600nm 흡광도에서의 측정치, 이하 OD₆₀₀)가 0.01 내지 300, 예를 들면 1 내지 300, 10 내지 300, 20 내지 300, 5 내지 300, 또는 40 내지 300이 되도록 하는 농도로 접종될 수 있다. 이렇게 고농도의 상기 효소를 포함하는 균체를 사용함으로써, 배지 중에서 고농도로 과당이 포함된 배지에서 효율적으로 과당을 사이코스로 전환할 수 있다.
- [0047] 상기 배양은 에피머라제를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하는 물질을 더 첨가하여 수행될 수 있다.
- [0048] 유전자의 발현을 유도하는 물질은 특별히 한정되지 않으며, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 물질일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 사이코스의 생산 방법이 상기 반응 이전에, 후술할 휴면 세포를 갖도록 유도하는 단계를 더 포함하는 경우, 상기 반응은 기질인 과당과 보조인자의 공급을 위한 무기염만을 포함하는 배지 중에서 수행될 수 있다.

상기 무기염은 예를 들면 망간염 또는 코발트염일 수 있다. 보다 개선된 사이코스의 생산 속도를 나타낸다는 측면에서는 코발트염이 바람직하고, 생산된 사이코스를 식품 등으로 안전하게 활용할 수 있다는 측면에서는 망간염이 바람직하다.

- [0050] 상기 미생물의 배양물은 사이코스를 포함하는데, 사이코스를 회수하는 방법은 특별히 한정되지 않고 당 분야에 공지된 방법에 의할 수 있으며, 예를 들면 원심분리, 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피 등의 방법을 들 수 있다.
- [0051] 구체적으로, 배양물을 원심분리하여 배양액을 미생물로부터 분리하고, 상기 회수 방법에 의하여 사이코스를 배양액으로부터 분리함으로써 수행될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 사이코스의 생산 방법은 상기 과당과 에피머라제의 반응 이전에, 상기 미생물을 상기 과당이 포함되지 않은 배지에서 배양하여 상기 미생물이 휴면 세포를 갖도록 유도하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 휴면 세포를 갖도록 하는 유도는 상기 미생물은 과당을 포함하지 않는 배지 중에서 정지기(stationary phase)까지 배양함으로써 수행될 수 있다.
- [0054] 본 명세서에서 휴면세포(resting cell)는 더 이상 증식하지 않는 상태의 배양 세포를 의미한다. 본 명세서에서 정지기(stationary phase)는 세포를 배양하는 경우 대수기(exponential phase)를 지나 세포의 분열 및 증식이 정지하여 세포 개체 수의 증가가 나타나지 않으며, 세포 성분의 합성과 분해가 균형을 이룬 상태를 의미한다.
- [0055] 따라서, 본 발명에 따른 휴면 세포는 성장이 완료되고, 세포 내에서 에피머라제의 발현이 충분히 이루어진 상태의 세포를 의미하는 것으로서, 미생물이 휴면 세포를 갖도록 유도되는 경우 에피머라제의 발현량이 최대치를 나타내는 바, 사이코스의 생산을 극대화할 수 있다.
- [0056] 과당을 포함하지 않은 배지는, 과당을 포함하지 않은 것을 제외하고는 전술한 과당을 포함한 배지와 동일한 배지일 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 과당과 그 에피머라제의 반응 이후에, 상기 미생물을 회수하여 다른 기질의 사이코스로의 전환에 재사용하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 과당과 그 에피머라제의 반응을 미생물 내에서 수행하는 바, 고온에 노출되어도 미생물에 의해 에피머라제가 보호되어 여전히 효소 활성을 나타내는 바, 재사용이 가능하다.
- [0059] 즉, 상기 반응 이후에 상기 미생물을 회수하여 또 다른 기질을 사이코스로의 전환에 재사용할 수 있다.
- [0060] 분리된 미생물의 생육이 유지되는 환경 중에서 반응을 수행한다면 재사용 회수는 한정되지 않고, 수백회 이상, 수천회 이상도 재사용이 가능하다.
- [0061] 미생물을 재사용하는 단계를 더 포함하는 경우 미생물이 고온에 복수회 노출되므로, 열 안정성이 높은 고온성 미생물(thermophiles)을 사용하는 것이 재사용시에 효소 활성이 높다는 점에서 바람직하다.
- [0062] 전술한 예시 중에서는 바람직하게는 코리네박테리움 속, 액티노마이세스 속일 수 있고, 보다 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰, 가장 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 전술한 에피머라제를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0063] 본 발명의 방법에 의하면 사이코스의 생산량 및 생산 속도가 현저히 개선된다.
- [0064] 본 발명의 방법에 의하면 미생물을 회수하여 과당의 사이코스로의 전환에 반복적으로 재사용이 가능하여, 공정 수율을 현저히 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체로부터 휴면세포전환반응의 반응 온도에 따른 기질인 과당으로부터의 사이코스 생산량을 측정하여 나타낸 것이다.

도 2는 사이코스-3-에피머라제를 도입한 대장균 MG1655 형질전환체로부터 휴면세포전환반응의 반응 온도에 따른 기질인 과당으로부터의 사이코스 생산량을 측정하여 나타낸 것이다.

도 3은 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰과 대장균 MG1655 형질전환체를 이용해서 60℃에서 3시간 동안 사이코스 생산 휴면세포전환반응을 한 후에 균체를 다시 회수하여 동일 반응 조건 하에서 반응을 시켜서 얻은 사이코스 생산량을 측정하여 나타낸 것이다.

도 4는 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 휴면세포전환반응에 사용되는 사이코스 생산반응 배지의 조성 변화에 따른 과당으로부터 사이코스의 생산량을 나타낸 것이다.

도 5는 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 휴면세포전환반응시에 사이코스-3-에피머라제의 유래 균주 및 사이코스 생산반응 배지 조성에 따른 사이코스의 생산량을 나타낸 것이다.

도 6은 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 휴면세포전환반응시에 사이코스-3-에피머라제의 유래 균주 및 가열 시간에 따른 사이코스의 생산량을 나타낸 것이다.

도 7은 다양한 균주 유래의 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열을 비교한 것이다.

도 8은 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰의 재사용 횟수에 따른 사이코스의 생산량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

실시예

1. 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용한 과당으로부터 사이코스를 생산하는 과정에서 온도에 따른 사이코스 생산속도 및 생산량 변화

(1) 재조합 균주의 제조

대장균-코리네박테리움 서플렉터인 pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol., 18:639-647, 2008)를 변형하여 종결자(terminator)와 lac 프로모터가 삽입된 pSGT208 서플렉터를 제작하여 사용하였다.

코리네박테리움 글루타미쿰에서 사이코스를 생산하기 위하여 사이코스-3-에피머라제는 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens str. C58; taxid:176299; GenBank NID: NC_003062, ATCC33970)의 dpe 유전자(AGR_L_260, GI:15890243, 서열번호 1)를 상기 제작한 pSGT208 서플렉터에 도입하여 사용하였다.

상세히 설명하면 서열번호 31의 프라이머 1과 서열번호 32의 프라이머 2를 이용하여 아그로박테리움 투메파시엔스 계놈으로부터 dpe 유전자를 증폭하고, 이를 제한효소 KpnI와 BamHI로 절단하여 pSGT208 서플렉터의 동일 부위로 삽입하여 사이코스-3-에피머라제를 포함하는 pS208-dpe 재조합 서플렉터를 제작하였다.

이후에, 코리네박테리움 글루타미쿰에서 사이코스-3-에피머라제의 발현량을 증대시키기 위하여 pS208-dpe에서 lac 프로모터를 pTrc99a에서 유래한 trc 프로모터로 교체하였으며, 이를 pS208cT-dpe로 명명하였다.

상기 제작한 사이코스-3-에피머라제를 포함하는 재조합 벡터 pS208-dpe, pS208cT-dpe와 이에 대한 음성 대조군인 pSGT208 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 도입하여 형질전환시키고, 이를 과당으로부터 사이코스 생산에 이용하였다. 형질전환법은 Handbook of Corynebacterium glutamicum (Lothar Eggeling 등, ISBN 0-8493-1821-1, 2005 by CRC press)에 명시된 방법을 따랐다.

(2) 재조합 균주의 배양 및 이를 이용한 사이코스의 생산

고농도의 균체를 확보하기 위해 상기 위에서 제조된 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체를 20μg/ml의 카나마이신을 포함하는 5 ml의 LB 배지(Difco)에 접종하여 30℃, 250rpm 조건으로 종배양한 후, 10g/L 포도당 및 20mg/ml의 카나마이신이 있는 최소 배지(1리터 당 1g K₂HPO₄, 10g (NH₄)₂SO₄, 0.4g MgSO₄·7H₂O, 20mg FeSO₄·7H₂O, 20mg

MnSO₄5H₂O, 50mg NaCl, 2g urea, 0.1mg biotin, 0.1mg thiamine)에 접종하여 배양하였다. 배양액은 흡이 파인 500 ml 삼각플라스크에 100ml 부피로 30℃, 180 rpm 조건에서 12 시간 배양하여 충분한 균체량과 단백질의 충분한 발현을 유도하였다.

[0077] 얻어진 상기 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 회수하여, 기질인 40%(w/v) 과당을 함유하는 상기와 동일한 최소배지에 균체농도를 40 OD₆₀₀로 재현탁한 뒤, 25, 30, 37, 50, 60 또는 70℃, 180rpm 조건에서 휴면세포전환반응을 하였다.

[0078] 과당 및 사이코스의 농도는 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 측정하였다. HPLC는 Kromasil 5NH₂ 칼럼(4.6 mm X 250 mm)을 장착한 SCL-10A(Shimadzu, 일본)를 사용하였으며, 이동상은 75% 아세토니트릴을 이용하여 1.5 mL/분으로 흘리면서 40℃에서 분리한 후 RI (Reflective Index) 검출기를 이용하여 분석하였다. 상기의 조건에서 과당의 머무름시간 (retention time)은 5.5분, 사이코스는 4.6분이었다.

[0079] 측정 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, pSGT208cT-dpe 서플렉터를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주를 40% 과당을 함유하는 배지에서 전환반응을 시킨 결과, 반응 온도가 높아질수록 사이코스의 생산 속도가 현저히 빨라지고 생산량도 증가하는 것으로 보인다. 특히 50, 60, 70℃에서 반응시킨 실험군의 경우 대략 3시간 안에 사이코스-3-에피머라제 효소의 반응평형에 도달하여 약 120g/L의 사이코스를 생산했으며, 이는 사이코스-3-에피머라제의 과당으로부터 사이코스의 전환속도 및 생산량은 온도에 의존적임을 나타내는 결과로 볼 수 있다.

[0080] 50℃를 기점으로 생산량이 급격히 증가하였는데, 이는 통상의 효소 반응에 요구되는 온도보다 현저히 높은 온도로서, 해당 온도에서 효소와 기질간의 반응의 양상이 달라진 것으로 판단된다.

[0081] 2. 대장균을 이용한 과당으로부터 사이코스를 생산하는 과정에서 온도에 따른 사이코스 생산속도 및 생산량 변화

[0082] 대한민국 특허등록번호 제 10-1106253호의 실시예 1에 기재된 방법에 따라, pTrc99A 벡터에 아그로박테리움 튜메패시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제를 도입한 pTPE 플라스미드로 형질전환된 E. coli MG1655(ΔpfkA, als2) 균주를 제조하였다.

[0083] 사이코스 분해경로를 차단하기 위해 pfkA(서열번호 11)와 als2(서열번호 14, 15, 16, 17, 18 및 19) 유전자가 결손된 대장균 MG1655를 이용하였다.

[0084] 고농도의 균체를 확보하기 위해 상기 위에서 제조된 대장균 MG1655 형질전환체를 100μg/ml의 엠포실린을 포함하는 5 ml의 LB 배지(Difco)에 접종하여 37℃, 250rpm 조건으로 증배양한 후, 10g/L 포도당 및 100μg/ml의 엠포실린이 있는 2YT 배지에 접종하여 배양 하였다. 배양액은 흡이 파인 500 ml 삼각플라스크에 100ml 부피로 37℃, 180 rpm 조건에서 12 시간 배양하여 충분한 균체량과 단백질의 충분한 발현을 유도하였다.

[0085] 얻어진 상기 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 회수하여, 기질인 40%(w/v) 과당을 함유하는 대장균 최소배지 M9 배지(1리터당 11.3g M9 minimal salts(Difco), 0.1mL 1M CaCl₂, 2mL 1M MgSO₄, 1mL 100mM MnSO₄5H₂O)에 균체농도를 40 OD₆₀₀로 재현탁한 뒤, 각각 37, 60 또는 70℃, 180rpm 조건에서 휴면세포전환반응을 하였다. 과당 및 사이코스의 농도는 상기의 실시예 1에 기술된 방법에 따라서 분석하였다. 측정 결과는 도 2에 나타내었다.

[0086] 도 2를 참조하면, pTPE 벡터를 도입한 대장균 MG1655 (ΔpfkA, als2) 균주도 역시 40% 과당을 함유하는 배지에서 전환반응을 시킨 결과, 반응 온도가 높아질수록 사이코스의 생산속도가 빨라지고 생산량도 증가하는 것으로 보인다. 특히 60, 70℃에서 반응시킨 실험군의 경우 코리네박테리움에서의 실험과 마찬가지로 약 2시간 안에 사이코스-3-에피머라제의 반응평형에 도달하여 약 120g/L의 사이코스를 생산했다.

[0087] 이는 사이코스-3-에피머라제의 과당으로부터 사이코스의 전환속도 및 생산량은 온도에 의존적임을 나타내는 결과로 다시 확인되었다.

- [0088] 대표적인 그람양성 세균인 코리네박테리움과 대표적인 그람음성세균인 대장균을 대상으로 고온에서 휴면세포 전환반응 실험을 해 본 결과, 당 전환 효소인 사이코스-3-에피머라제가 세포 안에서 극한 외부환경으로부터 보호받기 때문에 순수한 효소 상태에서 보다는 고온에서 열변성이 되지 않고 더 빠른 속도로 사이코스를 생산하는 것을 알 수 있었다. 이런 세포전환반응의 이점은 대부분의 미생물에도 적용이 될 것으로 보인다.
- [0089] **3. 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환 균체의 휴면세포전환반응에서의 균체 회수 및 재사용을 통한 과당으로부터 사이코스의 연속생산**
- [0090] 상기 실시예 1, 2의 결과에서 사이코스-3-에피머라제를 코리네박테리움과 대장균 형질전환체 내에 도입하여 50℃ 이상의 고온의 조건으로 전환반응하였을 때, 3시간 이내에 사이코스 생산량의 최대치에 도달한 이후에 더 이상 증가하지 않았다.
- [0091] 즉 사이코스 생산이 최대가 되는 반응평형에 도달한 3시간 이후에도 사이코스-3-에피머라제가 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 얼마나 잔존하는 가를 확인하기 위하여, 과당의 존재 하에서 3시간 동안 휴면세포전환반응을 통해서 사이코스 생산에 이용된 균체를 회수하여, 다시 사이코스 생산 휴면세포전환반응에 재사용하였다.
- [0092] 상기의 균체 재사용 휴면세포전환반응은 60℃ 온도에서 3회 반복하였다. 최초의 휴면세포전환반응은 R0, 앞의 반응액에서 균체를 회수해서 1차 재사용한 휴면세포전환반응은 R1, 2차 재사용한 휴면세포전환반응은 R2, 3차 재사용한 휴면세포전환반응은 R3로 표시하였다. 배양 조건 및 분석 방법은 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0093] 도 3을 참조하면, 60℃ 고온의 당 전환 반응 시에도 균체의 재사용이 가능하다. 하지만 균체를 재사용할수록 효소 활성이 일정부분 감소하는 것으로 보인다. 또한 고온에서 균체를 재사용함에 있어서 그람양성균인 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 그람음성균인 대장균 MG1655 균주보다 잔존 효소 활성이 더 높은 것을 알 수 있다.
- [0094] **4. 다양한 휴면세포전환반응 배지에서의 과당으로부터 사이코스의 생산**
- [0095] 상기 실시예 1에서 코리네박테리움 글루타미쿰에서 과당으로부터 사이코스를 생산하는 전환반응에 있어 40% Fructose를 포함한 최소 배지(1리터 당 1g K_2HPO_4 , 10g $(NH_4)_2SO_4$, 0.4g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20mg $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 50mg NaCl, 2g urea, 0.1mg biotin, 0.1mg thiamine)를 이용하였다. 이 전환반응에 사용되는 배지의 구성성분들을 최소화해서 보다 경제적이고 간편한 배지를 조제하고 실시예 1에 사용한 배지와 사이코스 생산성 비교를 수행하였다.
- [0096] 도 4를 참조하면 40% Fructose와 0.1mM $MnSO_4$ 를 포함한 phosphate buffer (pH 7) 배지, 더 간편하게는 오직 40% Fructose와 0.1mM $MnSO_4$ 만을 포함한 배지를 사용하여도 최종적으로 생산되는 사이코스 생산량에는 별다른 차이가 없었다. 상기의 양상은 반응 온도 30℃와 60℃에서 모두 동일하게 관찰되었다. 0.1mM $MnSO_4$ 는 사이코스-3-에피머레이즈의 보조인자로 첨가하지 않은 경우에는 생산량의 감소하는 결과를 얻었다.
- [0097] 상기 실시예에서 사이코스 생산 휴면세포전환반응에 사용하는 배지의 성분은 기질인 과당과 사이코스-3-에피머레이즈의 보조인자인 $MnSO_4$ 만 있으면 된다는 것을 알 수 있었다.
- [0098] **5. 다양한 균주 유래의 사이코스-3-에피머라제 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조함 코리네박테리움 글루타미쿰의 제조**
- [0099] 아네로스티페스 카케(Anaerostipes caccae DSM 14662; taxid: 411490)의 전체 유전자를 독인 DSMZ사에서 구입

하였다. 구입한 전체 게놈을 주형으로 하여 사이코스-3-에피머라제 추정 유전자(AP endonuclease; Sequence ID: gb|EDR98778.1|; GI: 167654649; 서열번호 4)를 포함하도록 서열번호 33 및 34의 프라이머 쌍을 프라이머로 하여 첫 번째 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 주형으로 하여 사이코스-3-에피머라제 유전자에 특이적으로 결합하는 서열번호 35 및 36의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하여 두 번째 PCR을 수행하였다.

[0100] 얻어진 PCR 산물을 제한 효소 BamH I 과 Xba I 을 사용하여 pS208cT-dpe(대한민국 특허출원번호 10-2013-0060703의 실시예 1에서 기술한 벡터)의 동일한 효소 부위에 삽입하여 재조합 벡터 pS208cT-AcDPE를 제조하였다.

[0101] 제작한 pS208cT-AcDPE 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 도입하여 형질전환시키고, 이를 과당으로부터 사이코스 생산에 이용하였다. 형질전환법은 Handbook of Corynebacterium glutamicum (Lothar Eggeling 등, ISBN 0-8493-1821-1, 2005 by CRC press)에 명시된 방법을 따랐다.

[0102] 얻어진 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 -80℃에 보관한 후 배양에 사용하였다.

[0103] 클로스트리디움 볼테아(Clostridium boltea ATCC BAA-613; taxid:411902)의 사이코스-3-에피머라제 추정 유전자(hypothetical protein CLOBOL_00069; Sequence ID: gb|EDP19602.1|; GI:15844190; 서열번호 9)를 포함한 플라스미드를 (주)한국야쿠르트로부터 얻었다. 사이코스-3-에피머라제 유전자에 특이적으로 결합하는 서열번호 37 및 38의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다.

[0104] 얻어진 PCR 산물을 제한 효소 Kpn I 과 Xba I 을 사용하여 pS208cT-dpe(대한민국 특허출원번호 10-2013-0060703의 실시예 1에서 기술한 벡터)의 동일한 효소 부위에 삽입하여 재조합 벡터 pS208cT-CbDPE를 제조하였다.

[0105] 제작한 재조합 벡터 pS208cT-CbDPE 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 위와 같은 방법으로 도입, 형질전환시키고, 이를 과당으로부터 사이코스 생산에 이용하였다. 얻어진 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 -80℃에 보관한 후 배양에 사용하였다.

[0106] 클로스트리디움 힐레모네(Clostridium hylemonae DSM 15053; taxid:553973)의 전체 유전자를 독일 DSMZ사에서 구입하였다. 구입한 전체 게놈을 주형으로 하여 사이코스-3-에피머라제 추정 유전자(dolichol monophosphate mannose synthase; Sequence ID:ref|WP_006442985.1|; GI:225161759; 서열번호 10)를 포함하도록 서열번호 39 및 40의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하여 첫 번째 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 주형으로 하여 사이코스-3-에피머라제 유전자에 특이적으로 결합하는 서열번호 41 및 42의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하여 두 번째 PCR을 수행하였다.

[0107] 얻어진 PCR 산물을 제한 효소 BamH I 과 Xba I 을 사용하여 pS208cT-dpe(대한민국 특허출원번호 10-2013-0060703의 실시예 1에서 기술한 벡터)의 동일한 효소 부위에 삽입하여 재조합 벡터 pS208cT-ChDPE를 제조하였다.

[0108] 제작한 pS208cT-ChDPE 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 위와 같은 방법으로 도입, 형질전환시키고, 이를 과당으로부터 사이코스 생산에 이용하였다. 얻어진 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 -80℃에 보관한 후 배양에 사용하였다.

[0109] **6. 다양한 균주 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용한 과당으로부터 사이코스 생산**

[0110] 상기 실시예 5에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체를 이용하여 고농도의 과당으로부터 사이코스 생산을 확인하였다.

[0111] 상기의 형질전환체를 카나마이신 20 μ g/ml을 포함하는 2YT배지에 접종하여 30℃, 250rpm으로 종배양한 후, 다시 형질전환체를 카나마이신 20 μ g/ml을 포함하는 2YT 배지에 접종하여 본배양하였다. 본배양은 흠이 파인 300 ml 삼각플라스크에 60ml 부피로 30℃, 180 rpm 조건에서 7시간 배양하여 충분한 균체량과 단백질의 발현을 유도하였다.

[0112] 얻어진 상기 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 회수하여, 20 μ g/ml 카나마이신, 기질인 40%(w/v)

과당과 사이코스-3-에피머라제의 주 보조인자로 알려진 망간 또는 코발트를 0.1mM 농도로 가지는 간단한 전환반응 배지를 사용하여 55℃에서 휴면세포전환반응을 진행하였다. 과당과 사이코스의 농도는 상기 실시예 1의 기술방법과 동일하게 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. (AtDPE는 기존 사용중인 아그로박테리움 투메패시엔스의 사이코스-3-에피머라제를 말한다.)

[0113] 도 5를 참조하면, 모든 다양한 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 균주에서 망간보다 코발트를 보조인자로 하였을 때, 사이코스의 생산속도가 조금 더 빨라지는 것으로 보인다.

[0114] 아나로스티페스와 아그로박테리움 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰의 사이코스 생산량은 6시간에 평형에 도달하는 것으로 보이지만, 클로스트리디움 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰의 사이코스 생산량은 망간을 보조인자로 사용하였을 때에도 3시간에 평형에 도달한 것으로 보인다.

[0115] 이로써 클로스트리디움 유래의 사이코스-3-에피머라제의 과당으로부터 사이코스 생산을 확인할 수 있을 뿐 아니라, 아그로박테리움 유래의 사이코스-3-에피머라제보다 사이코스 생산 속도가 더 빠른 것을 알 수 있다.

[0116] **7. 다양한 균주 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 고온에서의 지속적인 사이코스 생산 활성 유지**

[0117] 상기 실시예 1, 2의 결과에서 50℃ 이상의 고온 조건으로 전환 반응을 하였을 때, 3시간 이내에 모든 사이코스 생산이 이루어짐을 확인하였다. 이처럼 고온의 조건에서, 과당으로부터 사이코스의 생산이 빠르기 때문에 균체를 재 사용할 시에 오랜 시간 고온에서도 안정적인 사이코스-3-에피머라제가 필요하다. 따라서 다양한 균주 유래의 사이코스-3-에피머라제가 고온에서 어느 정도나 활성을 유지하는지 확인하였다.

[0118] 상기 실시예 1의 기술방법으로 얻은 균체를 2YT에 부유시켜 진탕배양기를 이용해 0, 3, 6, 9, 12, 24시간 동안 60℃의 열을 지속적으로 주었다. 각 시간별로 열을 준 후, 균체를 회수하여 20μg/ml 카나마이신과 0.1mM 망간과 40%(w/v) 과당만을 포함하는 간단한 전환반응 배지에 부유시켜 다시 60℃에서 3시간 동안 휴면세포전환반응을 진행하였다. 과당과 사이코스의 농도는 상기 실시예 1의 기술방법과 동일하게 측정하였다. 결과는 도 6에 나타내었다.

[0119] 도 6을 참조해보면, 기존에 사용하던 아그로박테리움 유래의 사이코스-3-에피머라제와 아나로스티페스 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은 60℃의 열을 3시간 받은 후에는 사이코스 생산을 거의 하지 못하는 것으로 보인다. 그에 반해 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은 24시간의 열을 받은 후에도 사이코스 생산을 유지하는 것으로 보여 고온 공정에서의 사이코스 생산에서 아그로박테리움 유래의 사이코스-3-에피머라제보다 유리한 것으로 생각된다.

[0120] 아그로박테리움 투메패시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제의 열안정성에 중요한 서열(참고문헌 1) 중 33번 또는 213번 아미노산이 각각 루신, 시스테인으로 교체되었을 때, 50℃에서 효소의 반 수명이 각각 3.3배, 7.2배 또는 두 개 모두 교체되었을 때 29.9배 증가한다고 알려져 있다.

[0121] 아그로박테리움 투메패시엔스 유래 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열과 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제의 아미노산 서열간의 비교는 도 7에 나타내었는데, 이를 참조하면, 열 안정성이 높았던 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제의 경우 한 개의 아미노산이 이에 상응하는 서열을 가지고 있거나 혹은 두 개 모두를 가지고 있었다.

[0122]

[0123] **8. 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균체의 휴면세포전환반응에서의 균체 회수 및 재사용을 통한 과당으로부터 사이코스의 생산**

[0124] 상기 실시예 7에서 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제가 고온에 대한 안정성이 높다는 것을 확인

하였으므로, 두 클로스트리디움 속 유래의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 제조합 균주 중 대표적으로 클로스트리디움 힐레모네의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 제조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균체의 고온에서의 휴면세포전환반응 후 균체 재사용 효과를 확인하였다.

[0125]

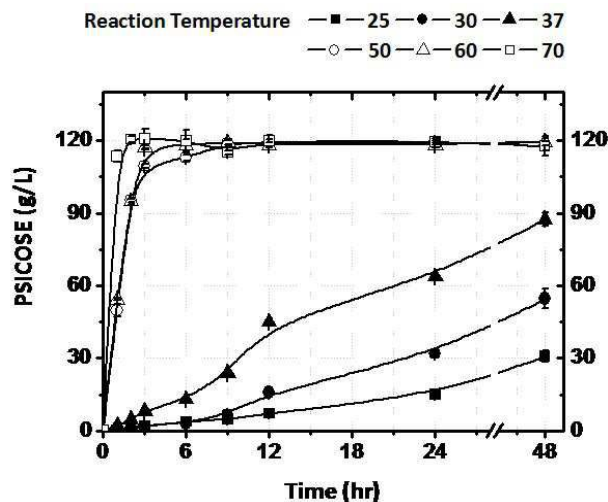
상기 실시예 3에 기술한 방법과 동일하게 얻은 균체를 60℃에서 3시간 동안 휴면세포전환반응을 시킨 후, 균체를 다시 회수하여 동일하게 휴면세포전환반응을 실시하였고 균체는 총 3번 재사용하였다(상기 실시예 3과 동일한 조건으로 실험 진행). 최초의 휴면세포전환반응은 R0, 앞의 반응액에서 균체를 회수해서 1차 재사용한 휴면세포전환반응은 R1, 2차 재사용한 휴면세포전환반응은 R2, 3차 재사용한 휴면세포전환반응은 R3로 표시하였다. 결과는 도 8에 나타내었다.

[0126]

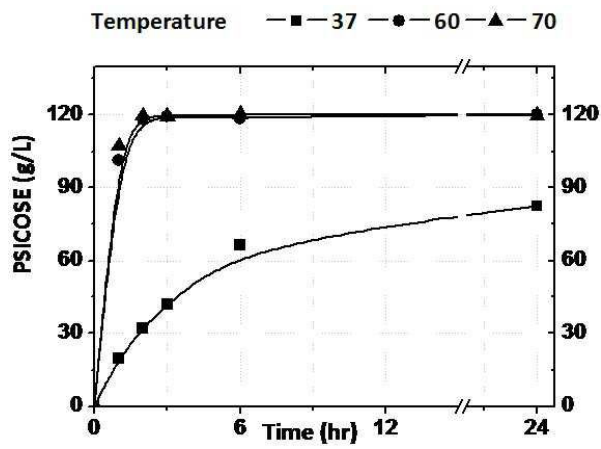
도 8을 참조해보면, 고온에서 균체를 여러 번 재사용 함에 있어서 클로스트리디움 속의 사이코스-3-에피머라제를 도입한 제조한 균체는 어떠한 사이코스 생산량 감소도 없이 일정량 유지됨을 알 수 있다. 상기 실시예 7에서의 결과와 함께 보았을 때, 효소 자체의 열 안정성이 고온에서의 지속적인 당 전환반응뿐만 아니라 균체의 재사용에 있어서도 매우 유리함을 확인할 수 있다.

도면

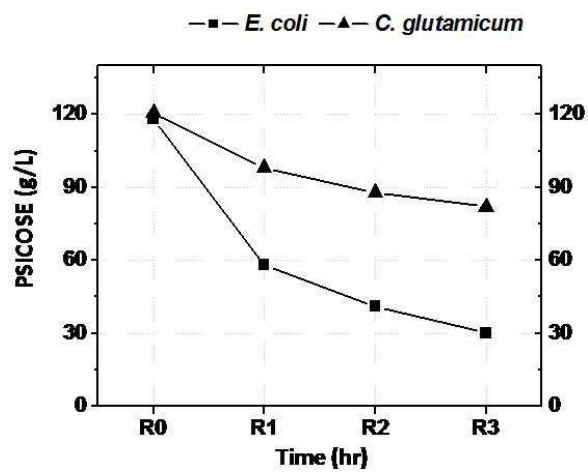
도면1



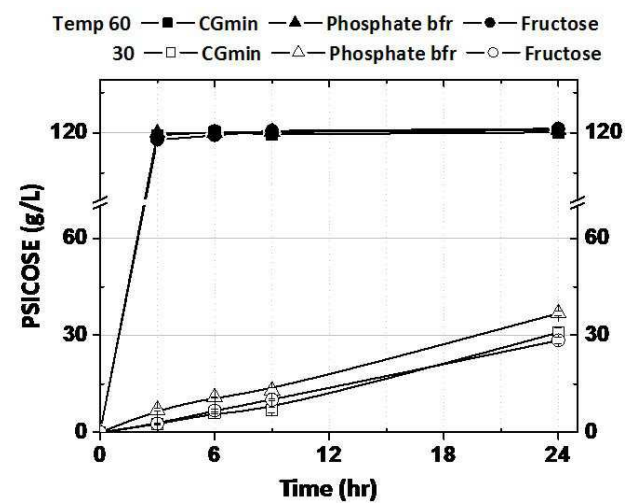
도면2



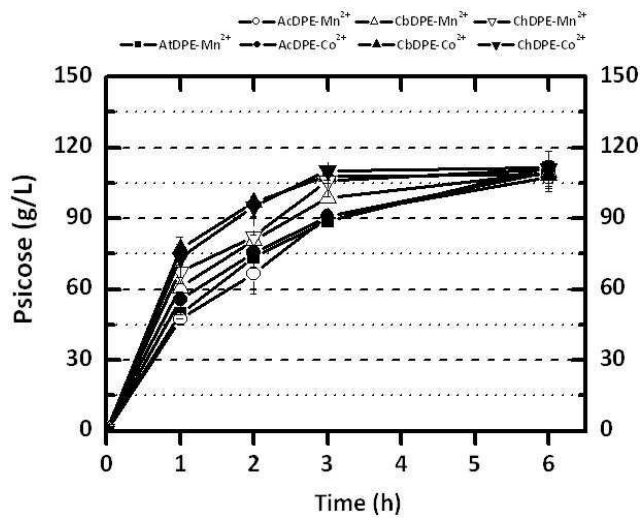
도면3



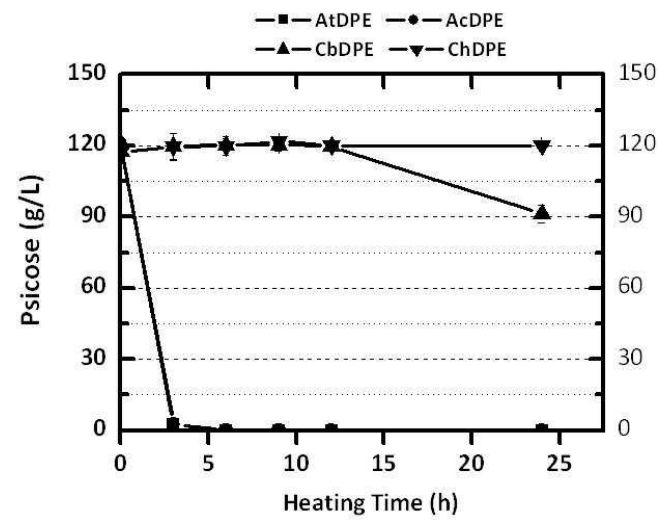
도면4



도면5



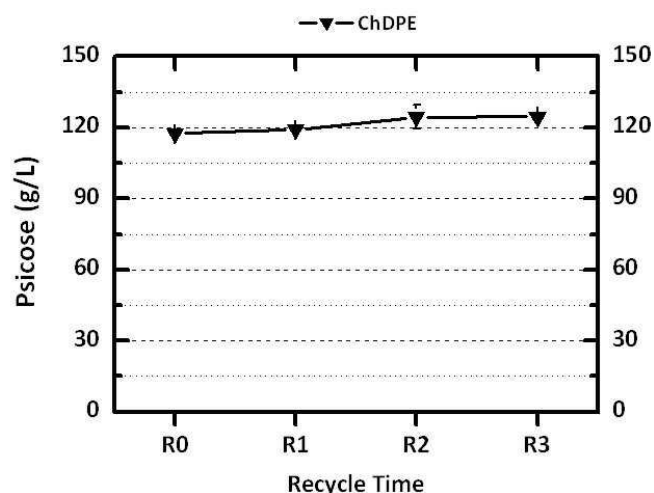
도면6



도면7

		1	I33L	50
AtDPE	(1)	--MKHGIYYSYWEHEWSAKFGPYIEKVAKLGFDIEVAHHINEY--SDA		
AcDPE	(1)	MKNKFGVDSFIWTESFSKDLWIIPKAKELGFEVIDFAISNPFTFP----		
CbDPE	(1)	--MKYGIYFAYWTKWFADYKKYMDKVSALGFDVLEISCAALRDVYTTKE		
ChDPE	(1)	--MKHGIYYAYWEQEWAAADYKRYVEKVAKLGFDILEIGAGPLPEY--AEQ		
Consensus	(1)	MKHGIYYAYWT EWSAKYKKYIEKVAKLGFDIEIAAA L EY SD		
		51		100
AtDPE	(47)	ELATIRKSAKDNGIILTAGIGPSKTKNLSSEDA AVRAAGKAFFERTLSNV		
AcDPE	(47)	-VEKVKAE LERVGIDCVCTTTLTPTETNPISPD AEIRAAGVKAMKKCVDIC		
CbDPE	(49)	QLIELREYAKEKGLVLTAGYGPTKAENLCS EDPEAVRRAMTFKDLLPKL		
ChDPE	(47)	DVKELKKCAQDNGITLTAGYGPTFNHNIGSS DAGVREEALEWYKRLFVL		
Consensus	(51)	DL ELKK AKDNGIILTAGYGPTK NL SEDAEVRAAAL FFKRLLDIL		
		101		150
AtDPE	(97)	AKLDIHTIGGALHSYWPIDYSQPV DKA GDYARGVEGINGIADFANDL-GI		
AcDPE	(96)	NELGAPILGGVNYAGWGYLT KK-PRTEEEWNWGVECMREVAEYAKQTGDV		
CbDPE	(99)	QLMDIHLGGGLYSYWPVDF TINNDKQGDRAVRNLRELSKTAEEC-DV		
ChDPE	(97)	AELDIHLIGGALYSYWPVDFAN-ADKTEDWKWSVEGMQRLAPAAAKY-DI		
Consensus	(101)	AELDIHLIGGALYSYWPVDFSN DK GDWAWGVEGMRELADFA D DI		
		151		200
AtDPE	(146)	NLCIEVLNRFENHVLNTAAEGVAFVKDVGKNNVKVMLDTFHMNIEEDSFG		
AcDPE	(145)	TICVECVNRFETHFLNIAEDAVAFCKDVGTGNVKVHLDCFHMIREEK SFA		
CbDPE	(148)	VLGMEVLNRYEGYILNTCEE AIDFVDEIGSSHVKIMLDTFHMNIEETNMA		
ChDPE	(145)	NLGMEVLNRFESHILNTAAEGVKFVEEVGMDNVKVMMLDTFHMNIEEQSIG		
Consensus	(151)	NLGMEVLNRFESHILNTAAEEAVAFVKDVGS NVKVMMLDTFHMNIEE SFA		
		201	S213C	250
AtDPE	(196)	DAIRTAG-PLLGHFHTGESNRRVPGKGRMPWHEIGLALRDINYTGAVIME		
AcDPE	(195)	GAVKTCGKEYLG YIHVNENDRGIPGTGLVPFKEFFNALVEIGYDGPLVIE		
CbDPE	(198)	DAIRKAG-DRLGHLHLGEQNRLVPGKSLP WAEIGQALRDINYQGAAVME		
ChDPE	(195)	GAIRTAG-KLLGHFHTGECNRMVPGKGRI PWREIGDALRDIGYDGTAVME		
Consensus	(201)	GAIRTAG DLLGHFHTGENNRLVPGKGRI PWKEIGNALRDINYDGAAVME		
		251		296
AtDPE	(245)	PFVKTGGTIGSDIKVWRDLSSGGADIAKMDE DARNALAFSRFVLGG-		
AcDPE	(245)	SFDPSFEELSGNCAIWRKLADTGEELAIEGLKNLKAIAAEI-----		
CbDPE	(247)	PFVMQGGTIGSEIKVWRDMVPDLSEALDRDAKGALEFCRHVFGI-		
ChDPE	(244)	PFVRMGGQVGADIKVWRDISRGADEAQLDDDARRALEFQRYMLEWK		
Consensus	(251)	PFVKS GGTIGSDIKVWRDLS GADEAALDD DAR ALEFARHVLG		

도면8



서열목록

<110> GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY OFFICE OF ACADEMY AND INDUSTRY COLLABORATION

<120> PREPARING METHOD FOR PSICOSE

<130> P2014-451

<160> 42

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 870

<212> DNA

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 1

atgaaacacg gcatctatta ttcttactgg gaacatgagt ggagcgccaa gttcgggtccc	60
tatatcgaga aggtcgccaa gctcgggttc gacatcatcg aagtcgccgc ccaccatatac	120
aacgaatata gcgacgccga actcgcgacc atcaggaaga gcgcgaaagga taacggcatc	180

atcctcaccg ccggcatcgg tccgtcgaaa accaagaacc tgtcgtcgga agatgctcgg	240
gtgcgtgcgg ccggcaaggc gttctttgaa agaacccttt cgaacgtcgc caagctcgat	300
atccacacca tcggcgccgc attgcattcc tattggccaa tcgattattc gcagcccgtc	360
gacaaggcag gcgattatgc gcgcgccgtc gagggatatca acggcattgc cgatttcgcc	420
aatgatctcg gcatcaacct gtgcatcgaa gtcctcaacc gctttgaaaa ccacgtcctc	480
aacacggcgg cggaaggcgt cgcttttggtg aaggatgtcg gcaagaacaa tgtgaaagtc	540
atgctggata ccttccat gaacatcgag gaagacagtt tcggtgacgc catccgcacg	600

gccggcccgc ttctggggca cttccatacc ggtgaaagca atcgccgct accgggcaag	660
ggcagaatgc cgtggcacga aatcggcctt gcgctgcgtg atatcaacta caccggcgcg	720
gtaatcatgg agcctttcgt caagacaggc ggacacatcg gctcgatat caaggtgtgg	780
cgcgacctga gcggtggcgc cgacatcgcg aaaatggatg aagatgcccg caatgcgctg	840
gcattctccc gcttcgttct tgggtggctaa	870

<210> 2

<211> 858

<212> DNA

<213> Anaerostipes caccae

<400> 2

atgaaaaata aattcggagt tgacagtttt atttggactg aatccttttc taaaaaagat	60
ttatggatca tcccgaaggc aaaagaactg ggatttgaag tcatcgactt tgcgatctcc	120
aaccattca cattccctgt agagaaagtg aaggcagagc tagagagagt gggaatcgac	180

tgtgtctgca ctaccacgt gacacctgaa accaatccga tttctccgga tgccgagatc 240
 cgtgcggcag gcgtaaaagc catgaaaaa tgtgtggata tctgcaacga actgggtgca 300
 ccgatcttag gcggtgtaaa ttatgcaggc tggggatatac tgacgaagaa gccaaaggacc 360
 gaggaagagt ggaactgggg cgtagagtgc atgagggaag ttgccgagta cgcaaagcaa 420
 accggagatg ttaccatctg tgtggaatgt gtcaacagat ttgaaacca cttcttaaac 480

attgcggaag atgcagtggc cttctgtaag gatgttgga caggaaatgt caaggttcac 540
 ctcgactgct tccatatgat cagagaagaa aagagctttg caggggcagt aaagacctgc 600
 ggcaaagaat atctcgata cattcatgac aatgaaaacg acagaggtat tcctggaaca 660
 gggcttgtag cgtttaaaga atttttcaat gcattagtag agatcgggta tgacggacct 720
 ttggtgatcg aatcttttga tccgagcttt gaagaactgt ccggcaactg tgcgatctgg 780
 agaaaacttg ccgatactgg agaagaactt gcgattgaag ggctgaaaaa tctgaaagcc 840
 atcgctgctg agatataa 858

<210> 3
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 3

Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
 1 5 10 15
 Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
 20 25 30
 Ile Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ala Thr Ile Arg Lys Ser Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala
 50 55 60
 Gly Ile Gly Pro Ser Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Ala Gly Lys Ala Phe Phe Glu Arg Thr Leu Ser Asn Val
 85 90 95
 Ala Lys Leu Asp Ile His Thr Ile Gly Gly Ala Leu His Ser Tyr Trp
 100 105 110
 Pro Ile Asp Tyr Ser Gln Pro Val Asp Lys Ala Gly Asp Tyr Ala Arg

115 120 125

Gly Val Glu Gly Ile Asn Gly Ile Ala Asp Phe Ala Asn Asp Leu Gly
 130 135 140

Ile Asn Leu Cys Ile Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Asn His Val Leu
 145 150 155 160

Asn Thr Ala Ala Glu Gly Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Lys Asn
 165 170 175

Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Asp
 180 185 190

Ser Phe Gly Asp Ala Ile Arg Thr Ala Gly Pro Leu Leu Gly His Phe

195 200 205

His Thr Gly Glu Ser Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro
 210 215 220

Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala
 225 230 235 240

Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp
 245 250 255

Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met
 260 265 270

Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Val Leu Gly
 275 280 285

Gly

<210> 4
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Anaerostipes caccae
 <400> 4

Met Lys Asn Lys Phe Gly Val Asp Ser Phe Ile Trp Thr Glu Ser Phe
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Asp Leu Trp Ile Ile Pro Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe
 20 25 30

Glu Val Ile Asp Phe Ala Ile Ser Asn Pro Phe Thr Phe Pro Val Glu

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

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

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

Cys Ala Ile Trp Arg Lys Leu Ala Asp Thr Gly Glu Glu Leu Ala Ile
260 265 270
Glu Gly Leu Lys Asn Leu Lys Ala Ile Ala Ala Glu Ile

275 280 285
 <210> 5
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 <400> 5
 Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
 1 5 10 15
 Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile

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

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

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

His Thr Gly Glu Cys Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro
210 215 220

Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala
225 230 235 240

Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp
245 250 255

Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met
260 265 270

Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Val Leu Gly
275 280 285

Gly

<210> 6

<211> 269

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> psicose 3-epimerase

<400> 6

Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr Trp Thr Glu Trp Ser Ala Lys

1 5 10 15
Tyr Lys Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile Ile
20 25 30

Glu Ile Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Ser Asp Asp Leu Glu Leu Lys Lys
35 40 45

Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala Gly Tyr Gly Pro Thr Lys
50 55 60

Asn Leu Ser Glu Asp Ala Glu Val Arg Ala Ala Ala Leu Phe Phe Lys
65 70 75 80

Arg Leu Leu Asp Ile Leu Ala Glu Leu Asp Ile His Ile Ile Gly Gly
85 90 95

Ala Leu Tyr Ser Tyr Trp Pro Val Asp Phe Ser Asn Asp Lys Gly Asp
100 105 110

Trp Ala Trp Gly Val Glu Gly Met Arg Glu Leu Ala Asp Phe Ala Asp
115 120 125

Asp Ile Asn Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Ser His Ile
130 135 140

Leu Asn Thr Ala Glu Glu Ala Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Ser

145 150 155 160

Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Ser
165 170 175

Phe Ala Gly Ala Ile Arg Thr Ala Gly Asp Leu Leu Gly His Phe His
180 185 190

Thr Gly Glu Asn Asn Arg Leu Val Pro Gly Lys Gly Arg Ile Pro Trp
195 200 205

Lys Glu Ile Gly Asn Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Asp Gly Ala Ala
210 215 220

Val Met Glu Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp Ile
225 230 235 240

Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Ala Asp Glu Ala Ala Leu Asp Asp
245 250 255

Asp Ala Arg Ala Leu Glu Phe Ala Arg His Val Leu Gly
260 265

<210> 7

<211> 876

<212> DNA

<213> Clostridium bolteae

<400> 7

atgaaatatg gtatttatit tgcttattgg acgaaggaat ggtttgctga ttataagaag 60

tatatggata aggtgtctgc tttggggttt gatgtcctgg aaatttcctg tgcagccctc 120

agagatgtat acacaaccaa ggaacagctg attgagctac gtgaatacgc caaagaaaaa 180

gggcttgctc taacagctgg ttatggacct actaaagcag aaaatctgtg ttcagaagac 240

ccggaggcag tgagacgggc catgacattc ttcaaggacc tgcttccaaa gctgcagtta 300

atggatatcc atatcctggg aggggggatta tttcctact ggcccgtgga ttttaccatt 360

aataatgaca agcaggggaga ccggggcagg gctgtcagga atctgaggga attgtccaaa 420

acagcggagg aatgtgacgt ggtgcttgga atggaggtac tgaaccgcta tgaggggtat 480

attcttaata cctgtgaaga ggcaattgat tttgtcgatg agattggaag cagccatgta 540

aaaatcatgc tggatacttt ccatatgaat attgaagaga caaatatggc tgatgcaatc 600

cgcaaggcgg gagacaggct gggacatctc catctgggag aacagaaccg cctggtgccg 660

ggaaaaggca gcctgccatg ggctgagata gggcaggcgc tccgtgatat taactatcag 720

ggagccgctg tcatggaacc tttgtcatg caggaggga ccatcggttc tgagataaag 780

gtatggagag acatggtgcc ggatctttct gaggaagcac tggacaggga tgcaaagggt 840

gcgctggaat tctgcaggca tgtgtttggt atctaa 876

<210> 8

<211> 870

<212> DNA

<213> Clostridium hylemonae

<400> 8

atgaacatg gtatctatta tgcatactgg gaacaagaat gggcgccga ctacaagcgc 60

tatgttgaag aggtggcaaa gcttgggttt gacattctgg agatcggcgc tgggccgctg 120

ccggaatcag cagagcagga tgtgaaggaa ctgaagaat gtgcgcagga caatgggac 180

acgctgacgg ccggatatgg tccgacgttc aaccacaata tcggttcttc agacgccggg 240

gtaaggggaag aggcgctgga atggtataag aggttatttg aagtgtggc agagcttgat 300

atccacctga tcggaggggc gctctattct tactggcctg tcgattttgc aaacgccgat 360

aaaacggaag actggaagtg gagttagag ggcatgcaga ggctggcgcc ggccgcgcc 420

aaatatgaca tcaacctggg catggaagtt ctgaaccggt ttgagagcca tatcctgaat 480

acagccgagg aaggtgtgaa gttttagag gaagtcggca tggacaacgt aaaggtcatg 540

ctggatacat tccatatgaa tatagaagag caaagcatag gcggcgcgat ccgccgggca 600

ggaaaactgc tcgggcattt ccacaccgga gaatgcaacc gcatggtgcc cgggaaggga 660

cgtattccat ggcgtgagat aggggatgct ctccgtgata tcggatatga cggaactgct 720

gtaatggagc cgttcgttcg catgggagga caggtcggcg ctgatatcaa ggtgtggaga 780

gacataagcc gtggagcaga cgaggcacag cttgacgatg acgcgcgccg tgcgctggag 840

ttccagagat atatgctgga gtggaagtaa 870

<210> 9

<211> 291

<212> PRT

<213> Clostridium bolteae

<400> 9

Met Lys Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Tyr Trp Thr Lys Glu Trp Phe Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Glu Ile Ser Cys Ala Ala Leu Arg Asp Val Tyr Thr Thr Lys Glu

35 40 45

Gln Leu Ile Glu Leu Arg Glu Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Val Leu

50 55 60

Thr Ala Gly Tyr Gly Pro Thr Lys Ala Glu Asn Leu Cys Ser Glu Asp

65 70 75 80

Pro Glu Ala Val Arg Arg Ala Met Thr Phe Phe Lys Asp Leu Leu Pro

85 90 95

Lys Leu Gln Leu Met Asp Ile His Ile Leu Gly Gly Gly Leu Tyr Ser

100 105 110

Tyr Trp Pro Val Asp Phe Thr Ile Asn Asn Asp Lys Gln Gly Asp Arg

115 120 125

Ala Arg Ala Val Arg Asn Leu Arg Glu Leu Ser Lys Thr Ala Glu Glu

130 135 140

Cys Asp Val Val Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Tyr Glu Gly Tyr

145 150 155 160

Ile Leu Asn Thr Cys Glu Glu Ala Ile Asp Phe Val Asp Glu Ile Gly

165 170 175

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

180 185 190

Glu Thr Asn Met Ala Asp Ala Ile Arg Lys Ala Gly Asp Arg Leu Gly

195 200 205

His Leu His Leu Gly Glu Gln Asn Arg Leu Val Pro Gly Lys Gly Ser

210 215 220

Leu Pro Trp Ala Glu Ile Gly Gln Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Gln

225 230 235 240

Gly Ala Ala Val Met Glu Pro Phe Val Met Gln Gly Gly Thr Ile Gly
245 250 255

Ser Glu Ile Lys Val Trp Arg Asp Met Val Pro Asp Leu Ser Glu Glu
260 265 270

Ala Leu Asp Arg Asp Ala Lys Gly Ala Leu Glu Phe Cys Arg His Val
275 280 285

Phe Gly Ile
290

<210> 10

<211> 289

<212> PRT

<213> Clostridium hylemonae

<400> 10

Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr Trp Glu Gln Glu Trp Ala Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Arg Tyr Val Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Ile Gly Ala Gly Pro Leu Pro Glu Tyr Ala Glu Gln Asp Val
35 40 45

Lys Glu Leu Lys Lys Cys Ala Gln Asp Asn Gly Ile Thr Leu Thr Ala
50 55 60

Gly Tyr Gly Pro Thr Phe Asn His Asn Ile Gly Ser Ser Asp Ala Gly
65 70 75 80

Val Arg Glu Glu Ala Leu Glu Trp Tyr Lys Arg Leu Phe Glu Val Leu
85 90 95

Ala Glu Leu Asp Ile His Leu Ile Gly Gly Ala Leu Tyr Ser Tyr Trp
100 105 110

Pro Val Asp Phe Ala Asn Ala Asp Lys Thr Glu Asp Trp Lys Trp Ser
115 120 125

Val Glu Gly Met Gln Arg Leu Ala Pro Ala Ala Ala Lys Tyr Asp Ile
130 135 140

Asn Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Ser His Ile Leu Asn

145 150 155 160
Thr Ala Glu Glu Gly Val Lys Phe Val Glu Glu Val Gly Met Asp Asn

165 170 175
Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Gln Ser

180 185 190
Ile Gly Gly Ala Ile Arg Arg Ala Gly Lys Leu Leu Gly His Phe His

195 200 205
Thr Gly Glu Cys Asn Arg Met Val Pro Gly Lys Gly Arg Ile Pro Trp

210 215 220
Arg Glu Ile Gly Asp Ala Leu Arg Asp Ile Gly Tyr Asp Gly Thr Ala

225 230 235 240

Val Met Glu Pro Phe Val Arg Met Gly Gly Gln Val Gly Ala Asp Ile

245 250 255
Lys Val Trp Arg Asp Ile Ser Arg Gly Ala Asp Glu Ala Gln Leu Asp

260 265 270
Asp Asp Ala Arg Arg Ala Leu Glu Phe Gln Arg Tyr Met Leu Glu Trp

275 280 285

Lys

<210> 11

<211> 963

<212> DNA

<213> escherichia coli

<400> 11

atgattaaga aaatcgggtgt gttgacaagc ggcgggtgatg cgccaggcat gaacgccgca 60

attcgcgggg ttgttcgttc tgcgtgaca gaaggtcttg aagtaatggg tatttatgac 120

ggctatctgg gtctgtatga agaccgtatg gtacagctag accgttacag cgtgtctgac 180

atgatcaacc gtggcgggtac gttcctcggg tctgcgcgtt tcccgaatt ccgcgacgag 240

aacatccgcg ccgtggctat cgaaaacctg aaaaaactg gtatcgacgc gctggtggtt 300

atcggcgggtg acggttccta catgggtgca atgcgtctga ccgaaatggg cttcccggtc 360

atcggtctgc cgggcactat cgacaacgac atcaaaggca ctgactacac tatcggtttc 420

ttcactgcgc tgagcaccgt tgtagaagcg atcgaccgtc tgcgtgacac ctcttcttct 480

caccagcgta tttccgtggg ggaagtgatg ggccgttatt gtggagatct gacgttggct 540

gcggccattg cgggtggctg tgaattcgtt gtggttccgg aagtgaatt cagccgtgaa 600

gacctggtaa acgaaatcaa agcgggtatc gcgaaaggta aaaaacacgc gatcgtggcg 660

attaccgaac atagtgtga tgttgacgaa ctggcgcatc tcatcgagaa agaaaccggt 720

cgtgaaaccc gcgcaactgt gctgggccac atccagcgcg gtggttctcc ggtgccttac 780

gaccgtattc tggttcccg tatgggcgct tacgctatcg atctgctgct ggcaggttac 840

ggcggtcgtt gtgtaggat ccagaacgaa cagctggttc accacgacat catcgacgct 900

atcgaaaaca tgaagcgtcc gttcaaaggt gactggctgg actgcgcgaa aaaactgtat 960

taa 963

<210> 12

<211> 320

<212> PRT

<213> eschrechia coli

<400> 12

Met Ile Lys Lys Ile Gly Val Leu Thr Ser Gly Gly Asp Ala Pro Gly

1 5 10 15

Met Asn Ala Ala Ile Arg Gly Val Val Arg Ser Ala Leu Thr Glu Gly

20 25 30

Leu Glu Val Met Gly Ile Tyr Asp Gly Tyr Leu Gly Leu Tyr Glu Asp

35 40 45

Arg Met Val Gln Leu Asp Arg Tyr Ser Val Ser Asp Met Ile Asn Arg

50 55 60

Gly Gly Thr Phe Leu Gly Ser Ala Arg Phe Pro Glu Phe Arg Asp Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Val Val Ile Gly Gly Asp Gly Ser Tyr Met Gly Ala Met Arg

100 105 110

Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Cys Ile Gly Leu Pro Gly Thr Ile Asp

115 120 125

Asn Asp Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Phe Thr Ala Leu
130 135 140

Ser Thr Val Val Glu Ala Ile Asp Arg Leu Arg Asp Thr Ser Ser Ser
145 150 155 160

His Gln Arg Ile Ser Val Val Glu Val Met Gly Arg Tyr Cys Gly Asp
165 170 175

Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Gly Cys Glu Phe Val Val Val

180 185 190
Pro Glu Val Glu Phe Ser Arg Glu Asp Leu Val Asn Glu Ile Lys Ala

195 200 205
Gly Ile Ala Lys Gly Lys Lys His Ala Ile Val Ala Ile Thr Glu His

210 215 220
Met Cys Asp Val Asp Glu Leu Ala His Phe Ile Glu Lys Glu Thr Gly

225 230 235 240
Arg Glu Thr Arg Ala Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Ser

245 250 255

Pro Val Pro Tyr Asp Arg Ile Leu Ala Ser Arg Met Gly Ala Tyr Ala
260 265 270

Ile Asp Leu Leu Leu Ala Gly Tyr Gly Gly Arg Cys Val Gly Ile Gln
275 280 285

Asn Glu Gln Leu Val His His Asp Ile Ile Asp Ala Ile Glu Asn Met
290 295 300

Lys Arg Pro Phe Lys Gly Asp Trp Leu Asp Cys Ala Lys Lys Leu Tyr
305 310 315 320

<210> 13

<211> 450

<212> DNA

<213> escherichia coli

<400> 13

atgaaaaaga ttgcatttgg ctgtgatcat gtcggtttca ttttaaaaca tgaatatgtg 60

gcacatttag ttgagcgtgg cggtgaagtg attgataaag gaacctggtc gtcagagcgt 120

actgattatc cacattacgc cagtcaagtc gcactggctg ttgctggcgg agaggttgat 180

ggcgggattt tgattttgg tactggcgtc ggtatttcga tagcggcgaa caagtttgcc 240
ggaattcgcg cggtcgtctg tagcgaacct tattccgcgc aactttcgcg gcagcataac 300
gacaccaacg tgctggcttt tggttcacga gtggttggcc tcgaactggc aaaaatgatt 360

gtggatgcgt ggctgggcgc acagtacgaa ggcggtcgtc atcaacaacg cgtggaggcg 420
attacggcaa tagagcagcg gagaaattga 450

<210> 14
<211> 891
<212> DNA
<213> escherichia coli
<400> 14

atgagccagt cagagtttga ttcagcgctt ccgaacggta tagggttagc gccttacctg 60
cgaatgaagc aggaaggaat gacagaaaat gaaagccgca tcgtggagtg gttactcaa 120
cccggtaacc tgagttgtgc acccgcaatt aaagatgtcg cagaagctct gccggtatct 180
gaagcgatga tagttaaggt atcaaagctg ctggggttta gcggttttcg taacttacgc 240

agtgcgctgg aagattatit tttcagtcga gaacaggat tgctttccga gttggctttt 300
gatgaagcgc cgcaggatgt ggtgaataag gtatttaaca tcactttacg caccattatg 360
gaaggtcagt cgatcgtcaa cgttgatgag atccaccgtg ccgcccgctt tttctatcag 420
gccagacagc gggatttga cggtgccgga ggatcaaatg ctatctgtgc tgatgtacag 480
cacaagtctt tgcgcattgg cgtacgctgt caggcctatc ctgatgctca catcatgatg 540
atgtccgctt cgttgttaca ggaaggagat gttgtgctgg tagtgacca ttcggggcga 600
accagtgatg taaaagcggc cgtagaactg gcaaaaaaga acggggcaaa gattatttgt 660

ataaaccata gctaccattc accgatatcg aaactggccg attatattat ttgctacca 720
gccccggaaa cgccgttatt aggtcgtaat gcctcggcaa gaatattaca actaactttg 780
ctggacgctt tttttgtctc tgtcgcccag ctcaacattg aacaagctaa tattaatatg 840
caaaaaaccg gcgcaattgt tgattttctc tcaccaggcg cgctgaaata a 891

<210> 15
<211> 936
<212> DNA
<213> escherichia coli
<400> 15

atgaataaat atctgaaata tttcagcggc aactcgtgg gcttaatgtt gtcaaccagc 60

gcttttgcgtg ccgccgaata tgctgtcgta ttgaaaaccc tctccaaccc attttgggta 120

gatatgaaaa aaggcattga agatgaagca aaaacactgg gcgtcagcgt tgatatTTTT 180

gcctctcctt cagaaggcga ttttcaatct caattgcagt tatttgaaga tctcagtaat 240

aaaaattaca aaggtatcgc cttcgtccca ttatcctcag tgaatctggt catgcctgtc 300

gcccgcgcat ggaaaaaagg catttatctg gttaatctcg atgaaaaaat cgacatggat 360

aatctgaaaa aagctggcgg caatgtggaa gcttttgtca ccaccgataa cgttgcgtgc 420

ggggcgaaag gcgcgtcgtt cattattgac aaattgggcg ctgaagggtg tgaagtcgca 480

atcattgagg gtaaaagccg taacgcctcc ggtgaagcgc gtcgtaatgg tgccaccgaa 540

gccttcaaaa aagcaagcca gatcaagctt gtcgccagcc agcctgccga ctgggaccgc 600

attaaagcac tggatgtcgc cactaacgtg ttgcaacgta atccgaatat taaagcgatc 660

tattgcgcga atgacacgat ggcaatgggt gttgctcagg cagtcgcaa cgccggaaaa 720

acgggaaaag tgctggctgt cggtagacat ggcatccgga aagcccgcaa aatggtggaa 780

gccggacaaa tgaccgcgac ggttgcccag aaccggcgga atatcggcgc aacgggtctg 840

aagctgatgg ttgacgtga gaaatccggc aaggttatcc cgctggataa agcaccggaa 900

tttaaaactgg tcgattcaat cctggtcact caataa 936

<210> 16

<211> 1533

<212> DNA

<213> escherichia coli

<400> 16

atggccacgc catatatatc gatggcgggg atcggcaagt cctttgttcc ggttcacgca 60

ttaaagtcgg ttaatttaac ggtttatcct ggtgaaatac atgcattact aggagaaaat 120

ggcgcgggta aatccacgct aatgaaagt ttatccggaa tacatgagcc gaccaaaggc 180

accattacca ttaataacat tagctataac aagctggatc ataaattagc ggcacaactc 240

ggtatcgga ttatttatca ggaactcagc gttattgatg aattaaccgt actggaaaat 300

ttatatattg gtcgtcatct gacgaaaaaa atctgtggcg tcaatattat cgactggcga 360

gaaatgcgtg tccgcgcgc catgatgtta ttacgcgtgg gcttgaaagt tgatctagat 420

gagaaagtgg cgaatttatc tatcagccac aagcagatgc tagaaattgc caaaacgtg 480

atgctcgatg ccaaagtcac catcatggat gaaccacct cctcactcac caataaagag 540

gtggactatc tgtttctgat catgaatcag ttgcgtaaag agggtaggc catcgtctat 600

atctgcata agttggcgga aattcgccgt atttgcgacc gctatacggg gatgaaagac 660

ggcagcagcg ttgcagcgg catagtaagc gatgtgtcaa atgacgatat cgtccgtctg 720
atggtaggcc gcgaactgca aaaccgtttt aacgcgatga aggagaatgt cagcaacctt 780

gcgcacgaaa cggtttttga ggtgcggaac gtcaccagtc gtgacagaaa aaaggtccgg 840
gatatctcat ttagcgtctg ccggggagaa atattaggct ttgccggact ggtcggttcc 900
ggacgtactg aactgatgaa ttgtctgttt ggctgtggata aacgcgctgg cggagaaaac 960
cgtcttaatg gcaaatatct ctctccacgt tcacccctgg atgccgtgaa aaaagggatg 1020
gcttacatca ctgaaagccg ccgggataac ggttttttcc ccaacttttc catcgtcag 1080
aacatggcga tcagccgcag tctgaaagac ggctggctata aaggcgcgat gggcttgttt 1140
catgaagtgt acgagcaacg taccgctgaa aatcaacgcg aactgctggc gctgaaatgt 1200

cattcggtaa accagaatat caccgaactc tccgggggaa atcagcagaa agtcctgac 1260
tccaaatggc tgtgtctgtt cccggaagtg attattttcg atgaacctac ccgcggcatc 1320
gacgttggcg cgaaagccga aatttcaaaa gtgatgcgcc aactggcgga cgacggaaaa 1380
gtcatcctga tgggtgtcat tgaactacct gaaattatca ccgtctgcga ccgcacgcc 1440
gtgttctcgc aaggacgact gacgcaaac ctgacgaatc gcgatgacat gagcgaagag 1500
gagattatgg catgggcttt accacaagag taa 1533

<210> 17
<211> 981
<212> DNA

<213> escherichia coli
<400> 17

atgggcttta ccacaagagt aaaaagcgaa gcgagcgaga agaaaccgtt caactttgcg 60
ctgttctggg ataaatacgg cacctttttt atcctggcga tcacgtctgc catctttggt 120
tcgtgtcac cagaatattt tctgaccacc aataatatta ccagattttt tgttcaaagc 180
tccgtgacgg tattgatcgg catgggcgag ttttctgcta tcctggctgc tggatcgcac 240
ctctcggttg gcgcgattct ggctgtttcc ggtatggtga ccgcaaaact gatgttgcca 300
ggtgttgacc cgtttctcgc agcgatgatt ggctgtgtac tggttggcgg cgcaactgggg 360

gcgatcaacg gctgcctggt caactggacg gggtacacc cgttcacat cacccttggc 420
accaacgcga ttttccgtgg gatcacgtg gtgatctccg atgccaactc ggtatacggc 480
ttctcatttg acttcgtgaa cttctttgcc gccagcgtaa ttgggatacc tgtccccgtt 540
atcttctcac taattgtcgc gctcatcctt tggtttctga caacgcgat gcggctcggg 600
cgcaacatct acgcaactgg cggaacaaa aattcggcgt tctattccgg gattgacgtg 660

aaattccaca tcctggtggt gtttatcatc tccggtgttt gtgcaggctc ggcaggcgtc	720
gtctcaactg cagcactcgg tgccgcagaa ccgcttgccg gtatgggttt tgaacctat	780
gccattgcc a gcgccatcat tggcggcacc agtttcttcg gcggcaagg ggcattttc	840
tctgtgggta ttggcgggtt gatcatcggc accatcaaca acggtctgaa tattttgcag	900
gtacaaacct attaccaact ggtggtgatg ggccgattaa ttatcgccgc tgcgcctt	960
gaccgtctta tcagtaagta a	981
<210> 18	
<211> 696	
<212> DNA	
<213> escherichia coli	
<400> 18	
atgaaaatct cccctcgtt aatgtgtatg gatctgctga aatttaaaga acagatcgaa	60
tttatcgaca gccatgccga ttacttccac atcgatatca tggacgggtca ctttgtcccc	120
aatctgacac tctcacgtt cttcgtaagt cagggttaaaa aactggcaac taaaccgtc	180
gactgtcatc tgatgggtgac gcggcccgag gattacattg ctcaactggc gcgtgcggga	240
gcagatttca tcactctgca tccggaaacc atcaacggcc aggcgttccg cctgattgat	300
gaaatccgcc gtcattgacat gaaagtgggg ctgataccta acccgagac gccagttgag	360
gccatgaaat actatatcca taaggccgat aaaattacgg tcatgactgt cgatcccggc	420
tttgccggac aaccgttcat tcctgaaatg ctggataaac ttgccgaact gaaggcatgg	480
cgtgaacgag aaggtctgga gtacgaaatt gaggtggacg gttcctgcaa ccaggcaact	540
tacgaaaaac tgatggcggc aggggcggat gtctttatcg tcggcacttc cggcctgtt	600
aatcatgcgg aaaatatcga cgaagcatgg agaattatga ccgcgcagat tctggctgca	660
aaaagcgagg tacagcctca tgcaaaaaca gcataa	696
<210> 19	
<211> 930	
<212> DNA	
<213> escherichia coli	
<400> 19	
atgcaaaaac agcataacgt cgtagcgggc gtggatatgg gggcaacgca tatccgcttt	60
tgtctgcgga cagcagaagg tgaacgcta cactgcgaaa aaaagcggac cgcagaagtc	120
attgctcccc gcctggtgtc gggtatcggc gaaatgattg acgagcaact caggcgcttt	180

aacgtcgcgt gtcattgtct ggtgatggga ttcccggcgc tggtcagtaa agataaacgc 240
accattatit ctacgcctaa cctgccgtta acagcggcgg atttatatga tctcgccgat 300
aagctcgaaa atacgtctgaa ttgtccggtt gagttttccc gcgacgttaa cctgcaactc 360
tcctgggacg tagtagaaaa ccgccttacg caacaactgg ttctggcggc ctatctcggt 420
acggggatgg ggttcgcagt gtgatgaac ggtgcgccgt ggacgggtgc acacggtgtg 480
gcaggcgaac tgggtcatat cccctggga gatatgaccc aacctgcgc gtgtggcaat 540
cctgggtgcc tggaaaccaa ttgtctgga atggcgctaa gacgttgta cgaacaacag 600

ccccgaaatt acccattgcg cgatcttttc gtccatgcgg aaaacgcccc ttctgtccag 660
agtctgcttg aaaacgcggc acgggccatt gccaccagca ttaatctgtt cgatcccgat 720
gcggtgatcc tgggcggtgg cgtgatggat atgccgcct tcccacgca gactctcgtt 780
gccatgaccc aaaagtacct gcgcggtcca ctgccgcatc aggtcgtgcg ctttattgcc 840
gcctcatctt ctgactttaa tggcgctcag ggtgcagcaa tattggcgca tcaacgtttt 900
ttgccacagt tctgtgctaa agcccatga 930

<210> 20

<211> 149

<212> PRT

<213> escherichia coli

<400> 20

Met Lys Lys Ile Ala Phe Gly Cys Asp His Val Gly Phe Ile Leu Lys

1 5 10 15

His Glu Ile Val Ala His Leu Val Glu Arg Gly Val Glu Val Ile Asp

20 25 30

Lys Gly Thr Trp Ser Ser Glu Arg Thr Asp Tyr Pro His Tyr Ala Ser

35 40 45

Gln Val Ala Leu Ala Val Ala Gly Gly Glu Val Asp Gly Gly Ile Leu

50 55 60

Ile Cys Gly Thr Gly Val Gly Ile Ser Ile Ala Ala Asn Lys Phe Ala

65 70 75 80

Gly Ile Arg Ala Val Val Cys Ser Glu Pro Tyr Ser Ala Gln Leu Ser

85 90 95

Arg Gln His Asn Asp Thr Asn Val Leu Ala Phe Gly Ser Arg Val Val

100 105 110

Gly Leu Glu Leu Ala Lys Met Ile Val Asp Ala Trp Leu Gly Ala Gln
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Arg His Gln Gln Arg Val Glu Ala Ile Thr Ala Ile

130 135 140

Glu Gln Arg Arg Asn

145

<210> 21

<211> 296

<212> PRT

<213> escherichia coli

<400> 21

Met Ser Gln Ser Glu Phe Asp Ser Ala Leu Pro Asn Gly Ile Gly Leu

1 5 10 15

Ala Pro Tyr Leu Arg Met Lys Gln Glu Gly Met Thr Glu Asn Glu Ser

20 25 30

Arg Ile Val Glu Trp Leu Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ser Cys Ala Pro

35 40 45

Ala Ile Lys Asp Val Ala Glu Ala Leu Ala Val Ser Glu Ala Met Ile

50 55 60

Val Lys Val Ser Lys Leu Leu Gly Phe Ser Gly Phe Arg Asn Leu Arg

65 70 75 80

Ser Ala Leu Glu Asp Tyr Phe Ser Gln Ser Glu Gln Val Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Leu Ala Phe Asp Glu Ala Pro Gln Asp Val Val Asn Lys Val Phe

100 105 110

Asn Ile Thr Leu Arg Thr Ile Met Glu Gly Gln Ser Ile Val Asn Val

115 120 125

Asp Glu Ile His Arg Ala Ala Arg Phe Phe Tyr Gln Ala Arg Gln Arg

130 135 140

Asp Leu Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ala Ile Cys Ala Asp Val Gln

145 150 155 160

His Lys Phe Leu Arg Ile Gly Val Arg Cys Gln Ala Tyr Pro Asp Ala

165 170 175
His Ile Met Met Met Ser Ala Ser Leu Leu Gln Glu Gly Asp Val Val
180 185 190

Leu Val Val Thr His Ser Gly Arg Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val
195 200 205

Glu Leu Ala Lys Lys Asn Gly Ala Lys Ile Ile Cys Ile Thr His Ser
210 215 220

Tyr His Ser Pro Ile Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Cys Ser Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Thr Pro Leu Leu Gly Arg Asn Ala Ser Ala Arg Ile Leu
245 250 255

Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Val Ser Val Ala Gln Leu Asn

260 265 270
Ile Glu Gln Ala Asn Ile Asn Met Gln Lys Thr Gly Ala Ile Val Asp
275 280 285

Phe Phe Ser Pro Gly Ala Leu Lys

290 295

<210> 22

<211> 311

<212> PRT

<213> escherichia coli

<400> 22

Met Asn Lys Tyr Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Thr Leu Val Gly Leu Met

1 5 10 15

Leu Ser Thr Ser Ala Phe Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Val Val Leu Lys

20 25 30
Thr Leu Ser Asn Pro Phe Trp Val Asp Met Lys Lys Gly Ile Glu Asp

35 40 45

Glu Ala Lys Thr Leu Gly Val Ser Val Asp Ile Phe Ala Ser Pro Ser

50 55 60

Glu Gly Asp Phe Gln Ser Gln Leu Gln Leu Phe Glu Asp Leu Ser Asn

65 70 75 80

Lys Asn Tyr Lys Gly Ile Ala Phe Ala Pro Leu Ser Ser Val Asn Leu
85 90 95

Val Met Pro Val Ala Arg Ala Trp Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Val Asn
100 105 110

Leu Asp Glu Lys Ile Asp Met Asp Asn Leu Lys Lys Ala Gly Gly Asn
115 120 125

Val Glu Ala Phe Val Thr Thr Asp Asn Val Ala Val Gly Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Ser Phe Ile Ile Asp Lys Leu Gly Ala Glu Gly Gly Glu Val Ala
145 150 155 160

Ile Ile Glu Gly Lys Ala Gly Asn Ala Ser Gly Glu Ala Arg Arg Asn

165 170 175

Gly Ala Thr Glu Ala Phe Lys Lys Ala Ser Gln Ile Lys Leu Val Ala
180 185 190

Ser Gln Pro Ala Asp Trp Asp Arg Ile Lys Ala Leu Asp Val Ala Thr
195 200 205

Asn Val Leu Gln Arg Asn Pro Asn Ile Lys Ala Ile Tyr Cys Ala Asn
210 215 220

Asp Thr Met Ala Met Gly Val Ala Gln Ala Val Ala Asn Ala Gly Lys
225 230 235 240

Thr Gly Lys Val Leu Val Val Gly Thr Asp Gly Ile Pro Glu Ala Arg
245 250 255

Lys Met Val Glu Ala Gly Gln Met Thr Ala Thr Val Ala Gln Asn Pro
260 265 270

Ala Asp Ile Gly Ala Thr Gly Leu Lys Leu Met Val Asp Ala Glu Lys
275 280 285

Ser Gly Lys Val Ile Pro Leu Asp Lys Ala Pro Glu Phe Lys Leu Val
290 295 300

Asp Ser Ile Leu Val Thr Gln

305 310

<210> 23

<211> 326
 <212> PRT
 <213> escherichia coli
 <400> 23
 Met Gly Phe Thr Thr Arg Val Lys Ser Glu Ala Ser Glu Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Phe Asn Phe Ala Leu Phe Trp Asp Lys Tyr Gly Thr Phe Phe Ile Leu
 20 25 30
 Ala Ile Ile Val Ala Ile Phe Gly Ser Leu Ser Pro Glu Tyr Phe Leu
 35 40 45
 Thr Thr Asn Asn Ile Thr Gln Ile Phe Val Gln Ser Ser Val Thr Val
 50 55 60
 Leu Ile Gly Met Gly Glu Phe Phe Ala Ile Leu Val Ala Gly Ile Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Val Gly Ala Ile Leu Ala Leu Ser Gly Met Val Thr Ala Lys
 85 90 95
 Leu Met Leu Ala Gly Val Asp Pro Phe Leu Ala Ala Met Ile Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Val Gly Gly Ala Leu Gly Ala Ile Asn Gly Cys Leu Val Asn
 115 120 125
 Trp Thr Gly Leu His Pro Phe Ile Ile Thr Leu Gly Thr Asn Ala Ile
 130 135 140
 Phe Arg Gly Ile Thr Leu Val Ile Ser Asp Ala Asn Ser Val Tyr Gly
 145 150 155 160
 Phe Ser Phe Asp Phe Val Asn Phe Phe Ala Ala Ser Val Ile Gly Ile
 165 170 175
 Pro Val Pro Val Ile Phe Ser Leu Ile Val Ala Leu Ile Leu Trp Phe
 180 185 190
 Leu Thr Thr Arg Met Arg Leu Gly Arg Asn Ile Tyr Ala Leu Gly Gly
 195 200 205
 Asn Lys Asn Ser Ala Phe Tyr Ser Gly Ile Asp Val Lys Phe His Ile
 210 215 220

Leu Val Val Phe Ile Ile Ser Gly Val Cys Ala Gly Leu Ala Gly Val
225 230 235 240

Val Ser Thr Ala Arg Leu Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ala Gly Met Gly
 245 250 255

Phe Glu Thr Tyr Ala Ile Ala Ser Ala Ile Ile Gly Gly Thr Ser Phe
 260 265 270

Phe Gly Gly Lys Gly Arg Ile Phe Ser Val Val Ile Gly Gly Leu Ile
 275 280 285

Ile Gly Thr Ile Asn Asn Gly Leu Asn Ile Leu Gln Val Gln Thr Tyr
 290 295 300

Tyr Gln Leu Val Val Met Gly Gly Leu Ile Ile Ala Ala Val Ala Leu
305 310 315 320

Asp Arg Leu Ile Ser Lys
 325

<210> 24

<211> 326

<212> PRT

<213> escherichia coli

<400> 24

Met Gly Phe Thr Thr Arg Val Lys Ser Glu Ala Ser Glu Lys Lys Pro

1 5 10 15
Phe Asn Phe Ala Leu Phe Trp Asp Lys Tyr Gly Thr Phe Phe Ile Leu

 20 25 30
Ala Ile Ile Val Ala Ile Phe Gly Ser Leu Ser Pro Glu Tyr Phe Leu

 35 40 45
Thr Thr Asn Asn Ile Thr Gln Ile Phe Val Gln Ser Ser Val Thr Val

 50 55 60
Leu Ile Gly Met Gly Glu Phe Phe Ala Ile Leu Val Ala Gly Ile Asp

65 70 75 80

Leu Ser Val Gly Ala Ile Leu Ala Leu Ser Gly Met Val Thr Ala Lys
 85 90 95

Leu Met Leu Ala Gly Val Asp Pro Phe Leu Ala Ala Met Ile Gly Gly

100	105	110	
Val Leu Val Gly Gly Ala Leu Gly Ala Ile Asn Gly Cys Leu Val Asn			
115	120	125	
Trp Thr Gly Leu His Pro Phe Ile Ile Thr Leu Gly Thr Asn Ala Ile			
130	135	140	
Phe Arg Gly Ile Thr Leu Val Ile Ser Asp Ala Asn Ser Val Tyr Gly			
145	150	155	160
Phe Ser Phe Asp Phe Val Asn Phe Phe Ala Ala Ser Val Ile Gly Ile			
165	170	175	
Pro Val Pro Val Ile Phe Ser Leu Ile Val Ala Leu Ile Leu Trp Phe			
180	185	190	
Leu Thr Thr Arg Met Arg Leu Gly Arg Asn Ile Tyr Ala Leu Gly Gly			
195	200	205	
Asn Lys Asn Ser Ala Phe Tyr Ser Gly Ile Asp Val Lys Phe His Ile			
210	215	220	
Leu Val Val Phe Ile Ile Ser Gly Val Cys Ala Gly Leu Ala Gly Val			
225	230	235	240
Val Ser Thr Ala Arg Leu Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ala Gly Met Gly			
245	250	255	
Phe Glu Thr Tyr Ala Ile Ala Ser Ala Ile Ile Gly Gly Thr Ser Phe			
260	265	270	
Phe Gly Gly Lys Gly Arg Ile Phe Ser Val Val Ile Gly Gly Leu Ile			
275	280	285	
Ile Gly Thr Ile Asn Asn Gly Leu Asn Ile Leu Gln Val Gln Thr Tyr			
290	295	300	
Tyr Gln Leu Val Val Met Gly Gly Leu Ile Ile Ala Ala Val Ala Leu			
305	310	315	320
Asp Arg Leu Ile Ser Lys			
325			
<210>	25		
<211>	309		
<212>	PRT		

<213> escherichia coli

<400> 25

Met Gln Lys Gln His Asn Val Val Ala Gly Val Asp Met Gly Ala Thr

1 5 10 15

His Ile Arg Phe Cys Leu Arg Thr Ala Glu Gly Glu Thr Leu His Cys

20 25 30

Glu Lys Lys Arg Thr Ala Glu Val Ile Ala Pro Gly Leu Val Ser Gly

35 40 45

Ile Gly Glu Met Ile Asp Glu Gln Leu Arg Arg Phe Asn Ala Arg Cys

50 55 60

His Gly Leu Val Met Gly Phe Pro Ala Leu Val Ser Lys Asp Lys Arg

65 70 75 80

Thr Ile Ile Ser Thr Pro Asn Leu Pro Leu Thr Ala Ala Asp Leu Tyr

85 90 95

Asp Leu Ala Asp Lys Leu Glu Asn Thr Leu Asn Cys Pro Val Glu Phe

100 105 110

Ser Arg Asp Val Asn Leu Gln Leu Ser Trp Asp Val Val Glu Asn Arg

115 120 125

Leu Thr Gln Gln Leu Val Leu Ala Ala Tyr Leu Gly Thr Gly Met Gly

130 135 140

Phe Ala Val Trp Met Asn Gly Ala Pro Trp Thr Gly Ala His Gly Val

145 150 155 160

Ala Gly Glu Leu Gly His Ile Pro Leu Gly Asp Met Thr Gln His Cys

165 170 175

Ala Cys Gly Asn Pro Gly Cys Leu Glu Thr Asn Cys Ser Gly Met Ala

180 185 190

Leu Arg Arg Trp Tyr Glu Gln Gln Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Arg Asp

195 200 205

Leu Phe Val His Ala Glu Asn Ala Pro Phe Val Gln Ser Leu Leu Glu

210 215 220

Asn Ala Ala Arg Ala Ile Ala Thr Ser Ile Asn Leu Phe Asp Pro Asp

225 230 235 240

Ala Val Ile Leu Gly Gly Gly Val Met Asp Met Pro Ala Phe Pro Arg

245 250 255

Glu Thr Leu Val Ala Met Thr Gln Lys Tyr Leu Arg Arg Pro Leu Pro

260 265 270

His Gln Val Val Arg Phe Ile Ala Ala Ser Ser Ser Asp Phe Asn Gly

275 280 285

Ala Gln Gly Ala Ala Ile Leu Ala His Gln Arg Phe Leu Pro Gln Phe

290 295 300

Cys Ala Lys Ala Pro

305

<210> 26

<211> 309

<212> PRT

<213> escherichia coli

<400> 26

Met Gln Lys Gln His Asn Val Val Ala Gly Val Asp Met Gly Ala Thr

1 5 10 15

His Ile Arg Phe Cys Leu Arg Thr Ala Glu Gly Glu Thr Leu His Cys

20 25 30

Glu Lys Lys Arg Thr Ala Glu Val Ile Ala Pro Gly Leu Val Ser Gly

35 40 45

Ile Gly Glu Met Ile Asp Glu Gln Leu Arg Arg Phe Asn Ala Arg Cys

50 55 60

His Gly Leu Val Met Gly Phe Pro Ala Leu Val Ser Lys Asp Lys Arg

65 70 75 80

Thr Ile Ile Ser Thr Pro Asn Leu Pro Leu Thr Ala Ala Asp Leu Tyr

85 90 95

Asp Leu Ala Asp Lys Leu Glu Asn Thr Leu Asn Cys Pro Val Glu Phe

100 105 110

Ser Arg Asp Val Asn Leu Gln Leu Ser Trp Asp Val Val Glu Asn Arg

115	120	125	
Leu Thr Gln Gln Leu Val Leu Ala Ala Tyr Leu Gly Thr Gly Met Gly			
130	135	140	
Phe Ala Val Trp Met Asn Gly Ala Pro Trp Thr Gly Ala His Gly Val			
145	150	155	160
Ala Gly Glu Leu Gly His Ile Pro Leu Gly Asp Met Thr Gln His Cys			
165	170	175	
Ala Cys Gly Asn Pro Gly Cys Leu Glu Thr Asn Cys Ser Gly Met Ala			
180	185	190	
Leu Arg Arg Trp Tyr Glu Gln Gln Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Arg Asp			
195	200	205	
Leu Phe Val His Ala Glu Asn Ala Pro Phe Val Gln Ser Leu Leu Glu			
210	215	220	
Asn Ala Ala Arg Ala Ile Ala Thr Ser Ile Asn Leu Phe Asp Pro Asp			
225	230	235	240
Ala Val Ile Leu Gly Gly Gly Val Met Asp Met Pro Ala Phe Pro Arg			
245	250	255	
Glu Thr Leu Val Ala Met Thr Gln Lys Tyr Leu Arg Arg Pro Leu Pro			
260	265	270	
His Gln Val Val Arg Phe Ile Ala Ala Ser Ser Ser Asp Phe Asn Gly			
275	280	285	
Ala Gln Gly Ala Ala Ile Leu Ala His Gln Arg Phe Leu Pro Gln Phe			
290	295	300	
Cys Ala Lys Ala Pro			
305			
<210>	27		
<211>	2067		
<212>	DNA		
<213>	corynebacterium		
<400>	27		
atgaatagcgt taaataattc ctcgcttgctc cggtctggatg tcgatttcgg cgactccac			

acggatgtca tcaacaacct tgccactgtt attttcgacg ctggccgagc ttctctcgcc 120

gacgcccttg ccaaagacgc gctggatcgt gaagcaaagt ccggcaccgg cgttcctggt 180

caagtgtcta tccccactg ccgttccgaa gccgtatctg tccctacctt gggttttgct 240

cgcttgagca aggggtgtgga cttcagcggg cctgatggcg atgccaactt ggtgttcctc 300

attgcagcac ctgctggcgg cggcaaagag cacctgaaga tcctgtccaa gcttgctcgc 360

tccttggtga agaaggattt catcaaggct ctgcaggaag ccaccaccga gcaggaaatc 420

gtcgacgttg tcgatgccgt gctcaacca gcacaaaaa ccaccagacc agctgcagct 480

ccggctgcgg cggcggttgc tgagagtggg gcggcgtcga caagcgttac tcgtatcgtg 540

gcaatcaccg catgccaac cggtatcgca cacacctaca tggtcgcgga ttccctgacg 600

caaaacgcgg aaggccgga tgatgtggaa ctggttgagg agactcaggg ctcttccgct 660

gtcaccaccg tcgatccgaa gatcatcgaa gctgccgacg ccgtcatctt cgccaccgac 720

gtgggagtta aagaccgga gcgtttcgt ggcaagccag tcattgaatc cggcgtcaag 780

cgcgcgatca atgagccagc caagatgac gacgaggcca tcgcagcctc caagaacca 840

aacccccga aggtttccgg ttccggtgtc gcggcatctg ctgaaaccac cggcgagaag 900

ctcggctggg gcaagcgcat ccagcaggca gtcatgaccg gcgtgtccta catggttcca 960

ttcttagctg ccggcggcct cctgttggt ctccgcttcg cattcggagg atacgacatg 1020

gcgaacggct ggcaagcaat cgccaccag ttctctctga ccaacctgcc aggcaacacc 1080

gtcgatgttg acggcgtggc catgacctc gagcgttcag gcttctgtt gtacttcggc 1140

gcagtcctgt tcgccaccgg ccaagcagcc atgggcttca tcgtggcagc cctgtctggc 1200

tacaccgcat acgcacttgc tggacgcccc ggcatcgcg cgggcttcgt cgggtggcgcc 1260

atctccgtca ccatcggcgc ttgcttcatt ggtggtctgg ttaccggtat cttggctggt 1320

ctcattgccc tgtggattgg ctctggaag gtgccacgcg tggcgcagtc actgatgcct 1380

gtgtcatca tcccgtact tacctcagtg gttgttggtc tcgtcatgta cctcctgctg 1440

ggtcgccac tcgcatccat catgactggt ttgcaggact ggctatcgtc aatgtccgga 1500

agctccgcca tcttgctggg tatcatcttg ggcctcatga tgtgtttcga cctcggcgga 1560

ccagtaaaca aggcagccta cctctttggt accgcaggcc tgtctaccgg cgaccaagct 1620

tccatggaaa tcatggccgc gatcatggca gctggcatgg tcccaccaat cgcgttgtcc 1680

attgctaccc tgctgcgcaa gaagctgttc accccagcag agcaagaaaa cggcaagtct 1740

tcctggctgc ttggcctggc attcgtctcc gaaggcgcca tccattcgc cgcagctgac 1800

ccattccgtg tgatcccagc aatgatggct ggcggtgcaa ccaactggtgc aatctccatg 1860
gcactgggcg tcggtctctg ggctccacac ggcggtatct tcgtggtctg ggcaatcgaa 1920
ccatgggtggg gctggctcat cgcacttgca gcaggcacca tcgtgtccac catcgttgtc 1980
atcgcaactga agcagttctg gccaaacaag gccgtcgtcg cagaagtcgc gaagcaagaa 2040
gcacaacaag cagctgtaaa cgcataa 2067

<210> 28

<211> 688

<212> PRT

<213> corynebacterium

<400> 28

Met Asn Ser Val Asn Asn Ser Ser Leu Val Arg Leu Asp Val Asp Phe

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

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

145	150	155	160
Pro Ala Ala Ala Ala Val Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ser Thr Ser Val			
165	170	175	

Thr Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Cys Pro Thr Gly Ile Ala His Thr
 180 185 190
 Tyr Met Ala Ala Asp Ser Leu Thr Gln Asn Ala Glu Gly Arg Asp Asp
 195 200 205
 Val Glu Leu Val Val Glu Thr Gln Gly Ser Ser Ala Val Thr Pro Val
 210 215 220

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

 290 295 300
 Lys Arg Ile Gln Gln Ala Val Met Thr Gly Val Ser Tyr Met Val Pro
 305 310 315 320
 Phe Val Ala Ala Gly Gly Leu Leu Leu Ala Leu Gly Phe Ala Phe Gly
 325 330 335
 Gly Tyr Asp Met Ala Asn Gly Trp Gln Ala Ile Ala Thr Gln Phe Ser
 340 345 350
 Leu Thr Asn Leu Pro Gly Asn Thr Val Asp Val Asp Gly Val Ala Met
 355 360 365

 Thr Phe Glu Arg Ser Gly Phe Leu Leu Tyr Phe Gly Ala Val Leu Phe
 370 375 380
 Ala Thr Gly Gln Ala Ala Met Gly Phe Ile Val Ala Ala Leu Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Gly Arg Pro Gly Ile Ala Pro Gly Phe
 405 410 415
 Val Gly Gly Ala Ile Ser Val Thr Ile Gly Ala Gly Phe Ile Gly Gly
 420 425 430

Leu Val Thr Gly Ile Leu Ala Gly Leu Ile Ala Leu Trp Ile Gly Ser

435 440 445
Trp Lys Val Pro Arg Val Val Gln Ser Leu Met Pro Val Val Ile Ile

450 455 460
Pro Leu Leu Thr Ser Val Val Val Gly Leu Val Met Tyr Leu Leu Leu
465 470 475 480

Gly Arg Pro Leu Ala Ser Ile Met Thr Gly Leu Gln Asp Trp Leu Ser
485 490 495

Ser Met Ser Gly Ser Ser Ala Ile Leu Leu Gly Ile Ile Leu Gly Leu
500 505 510

Met Met Cys Phe Asp Leu Gly Gly Pro Val Asn Lys Ala Ala Tyr Leu
515 520 525

Phe Gly Thr Ala Gly Leu Ser Thr Gly Asp Gln Ala Ser Met Glu Ile
530 535 540

Met Ala Ala Ile Met Ala Ala Gly Met Val Pro Pro Ile Ala Leu Ser
545 550 555 560

Ile Ala Thr Leu Leu Arg Lys Lys Leu Phe Thr Pro Ala Glu Gln Glu
565 570 575

Asn Gly Lys Ser Ser Trp Leu Leu Gly Leu Ala Phe Val Ser Glu Gly

580 585 590
Ala Ile Pro Phe Ala Ala Ala Asp Pro Phe Arg Val Ile Pro Ala Met

595 600 605
Met Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Ile Ser Met Ala Leu Gly Val

610 615 620
Gly Ser Arg Ala Pro His Gly Gly Ile Phe Val Val Trp Ala Ile Glu

625 630 635 640
Pro Trp Trp Gly Trp Leu Ile Ala Leu Ala Ala Gly Thr Ile Val Ser

645 650 655

Thr Ile Val Val Ile Ala Leu Lys Gln Phe Trp Pro Asn Lys Ala Val
660 665 670

Ala Ala Glu Val Ala Lys Gln Glu Ala Gln Gln Ala Ala Val Asn Ala

	675	680	685	
<210>	29			
<211>	1512			
<212>	DNA			
<213>	corynebacterium			
<400>	29			
	atgaacaccc cactccagct caacactgaa aacctgcagg aaatcgcttc gacttccgga			60
	gtgcagatcc cagcgttcaa ccgcgtgac gtcgccccgg gcattgtcca cttcggtgtt			120
	ggcggattcc atcgcgtca ccaagcgatg tacctcaatg aattgatgaa tgagggaag			180
	gccttggatt ggggcatcat cggcatgggt gtcatgcctt ccgatgtgcg catgcgcgat			240
	gccctggcca gccaaatca cttttatacc ctgaccacta aagctcctga tggaaactctt			300
	gatcaaaaaa tcatcggatc catcattgac tacgtgttcg ctcccagga cccagcacgg			360
	gccgttgcaa ccctgcgca ggactccatc cgcattgttt ccctcacggt gactgaaggc			420
	ggatacaaca tcgatccggc gacagaagat ttcgaccaca ccaaccctcg aatcgttgct			480
	gaccgcgaag ccctgcaggc gggcgatact tccactttgc agaccttctt tgggttgatc			540
	actgccgcat tgatttcccg aaaagaatca ggatctacgc cattaccat catgagctgc			600
	gataacatcc aaggcaacgg cgatctggct aagcgtttct tcctcgctt cgcacattcc			660
	gtgtcttctg agctcgcgca atgggtggaa aacaacgtgg ccttcccaa ctccatggtg			720
	gaccgcatca ccctgaaac caccgacggc gaccgcgatg acatcaagga aatcggtac			780
	atcgatgcgt ggccagtgg tttgaagat ttcaccaat gggctctcga ggatgccttc			840
	accaggggcc gccccgcta cgaggaggtt ggctgtcagg tcgtctcga cgtggagcct			900
	tatgaattaa tgaagctgcg cctgctcaac gcctcccacc agggactttg ctacttcggc			960
	cacttggctg gccaccacat ggtccacgac gtcattggcgg ataccgctt ccaggatttc			1020
	ctcctggctt acatggagcg cgaagccacc cctaccctca aggaacttcc aggtgtcgat			1080
	ctagatgctt atcgacgcca actcatcgcg cgattcgca acgcccgagt caaagacacc			1140
	gtaccgcgcc tgtgtgcgga atcctccgac cgcattccaa agtggctgtt gccagtcgta			1200
	cgcgaaaacc tcgcagcagg ccgcgacgtc acactttctg cagccatcgt cgcacctgg			1260
	gcgcgctacg cagaaggcac cgacgagcag ggcaacccaa taaagattgt tgaccgtttg			1320
	agtgcgcgca tccaagaaaa cgcacagga aatcgaccg atattttgtc attcatccgc			1380
	gaccgtggaa tcttcggaga cttggtcgat gctgaacat tcaccaaggc atactccgag			1440
	acactgtcct cccttcatga ccgtggcgcg gaagcaacca tcgatgcact tcttacgcag			1500

gtaactgtct aa 1512

<210> 30

<211> 503

<212> PRT

<213> corynebacterium

<400> 30

Met Asn Thr Pro Leu Gln Leu Asn Thr Glu Asn Leu Gln Glu Ile Ala

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Val Gln Ile Pro Ala Phe Asn Arg Ala Asp Val Ala

20 25 30

Pro Gly Ile Val His Phe Gly Val Gly Gly Phe His Arg Ala His Gln

35 40 45

Ala Met Tyr Leu Asn Glu Leu Met Asn Glu Gly Lys Ala Leu Asp Trp

50 55 60

Gly Ile Ile Gly Met Gly Val Met Pro Ser Asp Val Arg Met Arg Asp

65 70 75 80

Ala Leu Ala Ser Gln Asp His Leu Tyr Thr Leu Thr Thr Lys Ala Pro

85 90 95

Asp Gly Thr Leu Asp Gln Lys Ile Ile Gly Ser Ile Ile Asp Tyr Val

100 105 110

Phe Ala Pro Glu Asp Pro Ala Arg Ala Val Ala Thr Leu Ala Gln Asp

115 120 125

Ser Ile Arg Ile Val Ser Leu Thr Val Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile

130 135 140

Asp Pro Ala Thr Glu Asp Phe Asp His Thr Asn Pro Arg Ile Val Ala

145 150 155 160

Asp Arg Glu Ala Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ser Thr Leu Gln Thr Phe

165 170 175

Phe Gly Leu Ile Thr Ala Ala Leu Ile Ser Arg Lys Glu Ser Gly Ser

180 185 190

Thr Pro Phe Thr Ile Met Ser Cys Asp Asn Ile Gln Gly Asn Gly Asp

195 200 205

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

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

 325 330 335
 Phe Gln Asp Phe Leu Leu Ala Tyr Met Glu Arg Glu Ala Thr Pro Thr
 340 345 350
 Leu Lys Glu Leu Pro Gly Val Asp Leu Asp Ala Tyr Arg Arg Gln Leu
 355 360 365
 Ile Ala Arg Phe Gly Asn Ala Ala Val Lys Asp Thr Val Pro Arg Leu
 370 375 380
 Cys Ala Glu Ser Ser Asp Arg Ile Pro Lys Trp Leu Leu Pro Val Val
 385 390 395 400

 Arg Glu Asn Leu Ala Ala Gly Arg Asp Val Thr Leu Ser Ala Ala Ile
 405 410 415
 Val Ala Ser Trp Ala Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Asp Glu Gln Gly Asn
 420 425 430
 Pro Ile Lys Ile Val Asp Arg Leu Ser Glu Arg Val Gln Glu Asn Ala
 435 440 445
 Ser Gly Asn Arg Thr Asp Ile Leu Ser Phe Ile Arg Asp Arg Gly Ile
 450 455 460

Phe Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Pro Phe Thr Lys Ala Tyr Ser Glu

465 470 475 480

Thr Leu Ser Ser Leu His Asp Arg Gly Ala Glu Ala Thr Ile Asp Ala

485 490 495

Leu Leu Thr Gln Val Thr Val

500

<210> 31

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

gcaggtacca ggaggttaata aatatgaaac acggcatcta ttattcttac tgg 53

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

gctggatcct tagccaccaa gaacgaagcg gg 32

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

ccacggaact ttcggctgtt ttg 23

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

cttcgtagg tgccacaata tc 22

<210> 35

<211

> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 35

cgaggatcca ggaggttaata atatgaaaaa taaattcgga gttg 44

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 36

gtctagatta tatctcagca gcgatggc 28

<210> 37

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 37

cggtagcagg aggttaataat atgaaatag gtatttattt tgcttattgg acg 53

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 38

ctctagatta gataccaaac acatgcctgc ag 32

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 39
 cggactatct gaacgaactg acgg 24
 <210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 ctccataagc atcctcctca tcc 23

 <210> 41
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 41
 cgaggatcca ggaggttaata atatgaaaca tggtatctat tatgc 45
 <210> 42
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 42
 gtctagatta cttccactcc agcatat 27