



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월15일
(11) 등록번호 10-1686214
(24) 등록일자 2016년12월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0042 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0089300
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일
(56) 선행기술조사문헌
Microbial Biotechnology. Vol. 6, 페이지
694-707 (2013.08.14.)*
Nature. Vol. 502, 페이지 571-574
(2013.09.29.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 남구 문수로409번길 23, 202동 601호
(신정동, 문수로아이파크2단지)
찬드란 사데쉬 프라부
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 308동
1706호(울산과학기술대학교 유니스트 기숙사)
함대환
경기도 성남시 분당구 수내로 206, 315동 106호
(수내동, 푸른마을 아파트)
(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

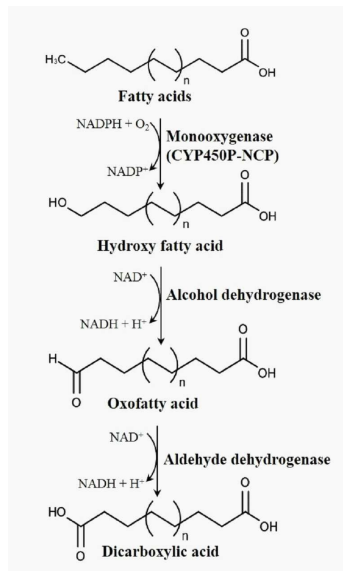
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 대장균에서 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산할 수 있는 변이 대장균, 이의 제조방법, 및 상기 변이 대장균을 이용하여 디카르복실산을 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법에 따르면 대장균에서도 다양한 식물유 등과 같은 지방산으로부터 디카르복실산을 우수한 수율로 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0069 (2013.01)

C12N 9/0071 (2013.01)

C12P 7/44 (2013.01)

C12Y 106/02004 (2013.01)

C12N 2500/33 (2013.01)

C12N 2500/60 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395041389

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 경상대학교산학협력단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 식물 유전자를 이용한 다양한 사슬길이 지방산 합성 대장균 제작 및 응용

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 후, 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 결합 유전자(*CYP-NCP*), *ADH1*, *ALD5* 및 *AIkL* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및

(2) 상기 변이 대장균을 배양하고, 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C_{16:1}, C₁₈ 및 C_{18:1}로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하고,

상기 *CYP-NCP* 결합 유전자, *ADH1*, *ALD5* 및 *AIkL* 유전자가 각각 서열번호 16, 19, 18 및 17로 표시되는 염기서열로 구성되는 것인, 대장균에서 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발현 벡터가 도 2에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (2)가 5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아, 인산 완충액, 항생제, 트윈80, 미량원소 용액 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (2)가 25 내지 37℃의 온도에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (2)가 글리세롤, 글루코스 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 보조 기질(co-substrate)의 부재 하에 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃되고, *CYP-NCP* 결합 유전자, *ADH1*, *ALD5* 및 *AIkL* 유전자를 발현하여 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 변이 대장균으로서,

상기 CYP-NCP 결합 유전자, ADH1, ALD5 및 A1kL 유전자가 각각 서열번호 16, 19, 18 및 17로 표시되는 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장균에서 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법, 및 디카르복실산을 생산하는 변이 대장균에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] C₁₂ 이상의 장쇄 지방산인 α, ω-디카르복실산(LDCA)은 향수, 점착제, 폴리아미드, 폴리에스테르 및 윤활제 등의 제조시 원료로 널리 사용되고 있다. LDCA는 대부분 화학 전환 공정을 통해 석유로부터 생산되어 왔는데, 상기 화학 전환 공정은 석유 자원 고갈에 따른 자원 확보의 위험성을 가지고 있다. 또한 지구 온난화의 주범이 되는 이산화탄소 등의 온실가스를 배출한다. 이에 따라, 재생 가능한 피드-스톡(feed-stock)에서 유래한 지방산을 이용하여 LCDCA와 같은 화합물을 생산하는 방법에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0003] 오메가 산화(ω-oxidation)는 미생물에서 디카르복실산을 생산하기 위해 필수적인 대사경로로서, 지방산 산화에 있어 베타 산화와 달리 진핵세포만 가지고 있다(Angela Cintolesi et al., Syst Biol Med., 5, 575-585(2013)).

[0004] 오메가 산화의 첫 단계는 지방산 사슬말단의 시토크롬 P450 모노옥시게나제(cytochrome P450 monooxygenase)(CYP450)와 NADPH 시토크롬 P450 환원효소(NADPH cytochrome P450 reductase)(NCP)에 의해 매개되는 오메가수산화 지방산(ω-hydroxy fatty acid)의 생성이다. 이어, 오메가수산화 지방산은 알코올 탈수소효소에 의해 매개되는 산소 지방산(oxofatty acid) 생성을 거쳐 알데하이드 탈수소 효소에 의해 매개되는 디카르복실산 생성 단계를 거칠 수 있다.

[0005] 상기 CYP450 중 CYP153A는 마린노박터 아쿠아에올레이(Marinobacter aquaeolei)에서 유래된 것으로서, C₁₀₋₂₀의 포화 지방산 및 C_{16:1-18:1}의 불포화 지방산과 같은 다양한 범위의 지방산에 활성을 나타내며, 63-93%의 높은 오메가수산화지방산으로의 기질 전환율을 나타낸다(Honda Malca S et al., Chem Commun(Camb), 48, 5115-7(2012)).

[0006] 또한, 상기 NCP는 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium)에서 유래된 것으로서, 문헌(Scheps D et al., Microb Biotechnol., 6, 694-707 (2013))에 따르면, NCP를 CYP153A와 결합시키는 경우, C₁₂ 지방산에서 C₁₂의 오메가수산화 지방산으로의 사슬 끝 위치 선택성이 95% 이상 증가된다.

[0007] 본 발명자들은 지방산으로부터 바로 디카르복실산(DCA)을 생산할 수 있도록, 오메가 산화와 관련된 이중 유전자(heterologous genes)를 포함하는 재조합 벡터로 대장균을 형질 전환시켜 α, ω-디카르복실산, 특히 C₁₂ 및 C₁₄ 디카르복실산을 생산해 내는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Angela Cintolesi et al., Syst Biol Med., 5, 575-585 (2013)

(비특허문헌 0002) Honda Malca S et al., Chem Commun(Camb), 48, 5115-7 (2012)

(비특허문헌 0003) Scheeps D et al., Microb Biotechnol., 6, 694-707 (2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 변이 대장균으로부터 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이 대장균을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은,
- [0012] (1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 후, 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 결합 유전자(*CYP-NCP*), *ADH1*, *ALD5* 및 *AlkL* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및
- [0013] (2) 상기 변이 대장균을 배양하고, 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , $C_{16:1}$, C_{18} 및 $C_{18:1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는, 대장균에서 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0014] 상기 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃되고, *CYP-NCP* 결합 유전자, *ADH1*, *ALD5* 및 *AlkL* 유전자를 발현하여 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 변이 대장균을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 방법을 이용하면, 진핵 세포만의 특징인 오메가 산화를 원핵세포인 대장균에서 가능하도록 함으로써, 대장균에서도 상이한 길이의 지방산으로 구성된 다양한 식물유로부터 α , ω -디카르복실산을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 변이 대장균에서 오메가 산화를 통해 지방산으로부터 디카르복실산을 생성하는 과정을 나타내는 개요도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 변이 대장균 제조를 위한 재조합 플라스미드의 개열지도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 변이 대장균의 단백질 발현 유무를 확인한 SDS-PAGE 겔 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4 및 5는 본 발명의 변이 대장균의 생체 변환 시 보조 기질 첨가 유무에 따른 디카르복실산 생성량을 각각 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 변이 대장균의 생체 변환 시 온도에 따른 디카르복실산 생성량을 각각 나타낸 것이다.
- 도 7 및 8은 본 발명의 변이 대장균의 생체 변환 시 티오우레아의 존재 여부 및 ALA 첨가 유무에 따른 디카르복실산 생성량을 각각 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 변이 대장균의 생체 변환 시 티오우레아 첨가 유무에 따른 디카르복실산 생성량을 각각 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 변이 대장균에서 생산된 디카르복실산의 기체 크로마토그래피(GC) 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 (1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 후, 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 결합 유전자(*CYP-NCP*), *ADH1*, *ALD5* 및 *AlkL* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및 (2) 상기 변이 대장균을 배양하고 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , $C_{16:1}$, C_{18} 및 $C_{18:1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는, 대장균에서 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 방법에서, 단계 1은 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃시킨 후, *CYP-NCP*, *ADH1*, *ALD5* 및 *AlkL* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계이다.
- [0019] 본 발명에서 호스트 세포는 원핵 세포, 바람직하게는 야생형(wild-type) 대장균, 예를 들면 MG1655 (Blattner 등 Science 277, 5331, 1453-1474 (1997))를 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 상기 호스트 세포, 즉 대장균의 베타 산화 과정을 불활성시키기 위하여, 상기 대장균에서 아실 CoA 탈수소 효소를 암호화하는 유전자인 *fadE*를 분리한 후 제거한다. 또한, 세포 내부에 다량의 지방 아실 CoA가 존재할 경우 베타 산화와 관련된 유전자의 억제자로 작용하는 *fadR* 유전자의 기능을 억제하기 위하여, 상기 *fadR* 유전자를 분리한 후 닉 아웃시킨다. 따라서, 본 발명에서 사용가능한 바람직한 대장균은 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃된 야생형 대장균 MG1655일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 "닉 아웃"은 특정 효소의 활성이 불활성되거나 제거되어 해당 효소의 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다.
- [0022] 상기 단계에서, 야생형 대장균에서 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃시키는 방법은 당업계에 알려진 유전자 닉 아웃 방법을 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 단계에서 *CYP-NCP*, *ADH1*, *ALD5* 및 *AlkL* 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조한다. 상기 발현 벡터의 개열 지도는 도 2에 나타난 바와 같다.
- [0024] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)]에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0025] 상기 *CYP-NCP* 유전자는 시토크롬 P450 모노옥시게나제 및 시토크롬 450 환원효소의 융합 단백질을 암호화한다. 구체적으로 상기 *CYP-NCP*는 마리노박터 아쿠아에올레이 유래의 모노옥시게나제인 CYP153A와 바실러스 마가테리움 유래의 NCP의 도메인 결합을 통해 제조된 융합 단백질을 코딩하는 유전자로서, 대장균에서 지방산을 오메가 수산화 지방산으로 전환시킨다.
- [0026] 도 1에는 오메가 산화를 통해 지방산으로부터 디카르복실산을 생산하는 과정이 도시되어 있다.
- [0027] 상기 *CYP-NCP* 유전자는 문헌[Scheps D et al., Microb. Biotechnol., 6, 694-707 (2013)]에 기재된 방식에 따라 제조될 수 있으며, 구체적으로 서열번호 16의 염기서열로 표시될 수 있다.
- [0028] 상기 *ADH1* 유전자는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 알코올 탈수소 효소를 코딩하는 유전자로서, 예를 들어 서열번호 19의 염기서열로 표시될 수 있다. 상기 *ADH1* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 *CYP-NCP* 유전자에 의해 전환된 오메가수산화 지방산을 옥시 지방산으로 전환시킬 수 있다.
- [0029] 상기 *ALD5* 유전자는 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래의 알데하이드탈수소 효소를 코딩하는 유전자로서, 예를 들어 서열번호 18의 염기서열로 표시될 수 있다. 상기 *ALD5* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 *ADH1* 유전자에 의해 전환된 옥시 지방산을 디카르복실산으로 전환시킬 수 있다.
- [0030] 상기 *AlkL* 유전자는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 알칸 트랜스포터를 코딩하는 유전자로서, 예를 들어 서열번호 17의 염기서열로 표시될 수 있다. 상기 *AlkL* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 전환된 디카르복실산을 세포 외부로 수송할 수 있다.

- [0031] 본 발명에서 사용하는 발현 벡터는 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [0032] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: Bglbrick vector, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 디카복실산 생합성에 이용될 특정 유전자를 대장균 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 Bglbrick vector를 사용할 수 있다.
- [0033] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0034] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터 서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'→3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 발현벡터에는 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 삽입시키는 것이 대장균의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.
- [0036] 상기 CYP-NCP, ADH1, ALD5 및 A1kL 유전자를 포함하는 발현 벡터는 이후 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 녹아웃된 대장균의 내부로 도입시켜 형질전환된 변이 대장균을 제조할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. *et al.*, Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 본 발명에서는 형질 전환 균주의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서 전기 천공에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 방법에서, 단계 2는 상기 변이 대장균을 배양한 후, 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C_{16:1}, C₁₈ 및 C_{18:1}로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계이다.
- [0039] 상기 변이 대장균을 배양하기 위한 배지로는 당업계에 공지된 대장균 배양 배지를 사용할 수 있으며, 예컨대, 루리아-버타니(LB) 배지를 사용할 수 있다. 상기 배양 배지는 카나마이신, 암피실린 또는 클로람페니콜과 같은 적절한 항생제가 보충된 배지일 수 있다.
- [0040] 상기 변이 대장균의 배양은 발현 유도제인 이소프로필 베타-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 존재 하에서 실시될 수 있으며, 이는 OD 600에서 0.5와 0.6사이에서 첨가된다.
- [0041] 상기 단계 2에서, 변이 대장균의 배양 시에는 5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아, 인산 완충액, 항생제 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 5-아미노레불린산을 첨가할 수 있으며, 상기 5-아미노레불린산을 첨가함으로써 헴(Heme)의 전구체로서 작용하여 모노옥시제네이스 활성을 높여줌으로써 디카복실산의 생산 수율을 향상시킬 수 있다. 상기 5-아미노레불린산은 전체 배지 부피를 기준으로 0.25 mM의 양으로 첨가될 수 있다. 또한 티오우레아를 첨가함으로써 모노옥시제네이스에서 발생할 수 있는 세포에 독성을 가진 과산화수소를 산화시킴으로써 순화하는 역할을 한다.
- [0042] 상기 단계 2에서, 휴지단계의 세포를 수확 시에는 상기의 배양액을 4℃에서 15분간 12,000g에서 원심분리한 후 펠렛만을 모아 0.1M, pH7.4의 포타슘인산완충액에 2번 세척한 후 재현탁하는 것을 포함한다.
- [0043] 상기 단계 2에서, 지방산의 디카복실산으로의 생체변환에 사용할 수화된 휴지기의 세포를 생체변환 배지에 현탁시킴에 있어서, 생체변환 배지는 포타슘 인산 완충액, 항생제, 트윈80, 미량원소 용액 및 이의 조합에서 이

루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 0.1M, pH7.4의 포타슘인산버퍼에 50 g_{cww}/L의 휴지기의 세포들을 재현탁시킨 후 지방산을 효과적으로 녹일 수 있는 세제인 트윈 80을 0.5% 첨가하고 기질이 되는 지방산(C₁₂, C₁₄ 등)을 1 g/L만큼 첨가한 후 1X 농도 만큼의 필터살균한 미량원소 용액(g/L: 2.4 g FeCl₃·6H₂O, 0.3g CoCl₂·6H₂O, 0.15g CuCl₂·2H₂O, 0.3g ZnCl₂, 0.3g Na₂Mo₄·2H₂O, 0.075g H₃BO₃, 및 0.495g MnCl₂·4H₂O)을 첨가할 수 있다.

[0044] 상기 지방산은 긴 사슬 지방산으로서, 예를 들어 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ 및 C₁₈의 포화 지방산 및 C_{16:1} 및 C_{18:1}의 불포화 지방산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 지방산은 본 발명의 방법을 거쳐 헥사데칸디온산, 테트라데칸디온산 등과 같은 디카르복실산으로 전환될 수 있다.

[0045] 상기 지방산의 디카르복실산으로의 생체 변환 시 온도는 25 내지 37℃ 교반은 200rpm, 바람직하게는 30℃, 200rpm에서 수행되는 것이 디카르복실산의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 변환은 글리세롤, 글루코스 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 보조 기질(co-substrate)의 부재 하에서 이루어지는 것이 디카르복실산 생산 수율 면에서 바람직하다.

[0047] 상기 변이 대장균 내에서 생합성된 디카르복실산을 분리하는 단계는 당업계에서 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(B. Aurousseau et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 34(3):127-129(1957)).

[0048] 또한, 본 발명은 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 녹아웃되고, *CYP-NCP* 결합 유전자, *ADH1*, *ALD5* 및 *AIKL* 유전자를 발현하여 오메가 산화를 통해 디카르복실산을 생산하는 변이 대장균을 제공한다.

[0049] 본 발명의 대장균의 제조에 이용되는 대장균 및 *CYP-NCP* 결합 유전자, *ADH1*, *ALD5* 및 *AIKL* 유전자는 상기 제조 방법과 관련하여 상술한 바와 같다.

[0050] 본 발명에 따르면, 야생형 원핵 세포, 예컨대 대장균에는 없는 대사 과정인 오메가 산화 시스템을 대장균에 도입시켜, 대장균에서도 지방산을 디카르복실산으로 전환시켜 디카르복실산을 제조해 낼 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 대장균에서도 다양한 식물유 등과 같은 지방산으로부터 디카르복실산을 우수한 수율로 제조할 수 있다.

[0051] [실시예]

[0052] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<재료 및 입수처>

[0054] 모균주로 야생형 대장균 MG1655를 이용하였으며(Blattner 등, Science 277, 5331, 1453-1474 (1997)), 대장균 (DH10B) 균주를 클로닝에 이용하였다.

[0055] Bglbrick 플라스미드(pBbA6C 및 pBbE6K; A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)를 랩 스톡(lab stock)에서 추출하여 발현 컨스트럭트 제작에 이용하였다 (Lee et al., J Biol Eng, 5:12 (2011)).

[0056] 다른 플라스미드들, 예컨대 λ-Red 재조합 발현 플라스미드용 pSIM5 플라스미드(Datsenko and Wanner et al., PNAS, 97, 6640-6645 (2000)); cI 억제제(repressor) 및 온도 민감성 레플리케이션에 의해 조절되는 효모 FLP 재조합 유전자용 pCP20 플라스미드(Cherepanov and Wackernagel, Gene, 158(1):9-14 (1995)); 및 유전자 disruption용 주형 플라스미드로 pKD13 (Datsenko and Wanner et al., PNAS, 97, 6640-6645 (2000)), 및 FRT 부위에 의해 플랭킹되는 내성 유전자는 각각의 랩 세포 스톡에서 입수하였다.

[0057] 지방산 및 DCA를 포함하는 모든 물질은 시그마 알드리치사에서 입수하였으며, 제한 효소, 및 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.) 및 Phusion high-Fidelity DNA 폴리머라제(Thermo scientific)를 클로닝 및 플라스미드 컨스트럭션에 이용하였다. 올리고뉴클레오티드는 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 대장균들은 카나마이신 50 µg/mL, 암피실린 100 µg/mL 또는 클로람페니콜 30 µg/mL과 같은 적절한 항생제가 보충된 LB 배지에서 37℃에서 성장시켰다.

[0058] 또한, 하기 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 나타내었으며, 발현 벡터의 제조에 사용된 프라이머 및 사용된 유전자의 서열을 각각 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 1

	명칭	특성	임수처 또는 참고문헌
균주	<i>E. coli</i> MG1655	야생형	Blattner 등 Science 277, 5331, 1453-1474 (1997)
	MG- Δ fadE Δ fadR	fadE와 fadR 유전자가 제거된 MG1655	하기 실시예에서 제조
플라스미드	pBbA6C-RFP	p15a origin; pLacO1 Promoter; Cm ^r	Taek Soon Lee et al., Journal of Biological Engineering 5:12, 10.1186/1754-1611-5-12(2011)
	pBbA6C-Omega	pBbA6C-RFP의 RFP유전자를 제거 후 오메가 산화 관련 유전자 및 추가적인 RBS와 프로모터를 삽입한 플라스미드	하기 실시예에서 제조

[0059]

표 2

	명칭	서열	서열번호
프라이머	FadR_del_F	TCTGGTATGATGAGTCCAACCTTTGTTTGTCTGTTATGGAAATCTCACTGTGTAGGCTGGA GCTGCTTC	1
	FadR_del_R	AACAACAAAAACCCCTCGTTTGAGGGGTTTGTCTTTAAACGGAAGGGAATCCGGGGATC CGTCGACC	2
	FadE_del_F	CCATATCATCACAAGTGGTCAGACCTCCTACAAGTAAGGGGCTTTTCGTTGTGTAGGCTGGA GCTGCTTC	3
	FadE_del_R	TTACGCGGCTTCAACTTTCGCACTTTCTCCGGCAACTTTACCGGCTTCGATTCCGGGGATC CGTCGACC	4
	Maq_F	ATAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAACACTGCCAGAAC	5
	Maq_R	CTGTTTCAGTGCTAGGTGAAGGAATGCTGCCGCCGCTGCCGCCGCTGCCGCC ACTGTTCGGTGTGAGTTTACCATCAACCTGGAA	6
	NCP_F	GCGGCAGCATTCCTTACCTAGCACTGAACAGTCTGCTAAAAAAGTACGCA AAAAGGCAGAAAACGCTATAATACGCCGCTGC	7
	NCP_R	ATTCTCGAGCGATATCGATCGTTATTACCCAGCCACACGCTTTTG	8
	A1kL_F	GGTCGATCGTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTTTTTCTAATTATAAAGTAATCGCGATG CCG	9
	A1kL_R	ATCTCGAGTTATTAGAAAACATATGACGCACCAA	10
	ADH1_F	TTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTATCCCAGAACTCA	11
	ADH1_R	CTTACTCGAGTTATTAGAAAGTGTCACCAACGT	12
	ALD5_F	ATACATATGTCTTTGCCAGTCGTACCAA	13
	ALD5_R	GTGTATATCTCCTTCTTAAAGATCCTTAAGTGAGCTTAATTCTAACAG	14
	ALD_F	AGGCCTCGAGAAATTGTGAGCGGATAACAATTGAC	15

[0060]

표 3

유전자 명칭	시퀀스	서열번호
CYP153A and NCP 진환서열: 링커 링커 앞부분: CY P153A 링커 뒷부분: NCP	atgccaacactgcccagaacatttgacgacattcagtcgccactgattaacgccacctcca gggtggcgccgatgcagaggcaaattcaggagctgaattcttaatgagcgccaagaggaa gaccttcggccacgcccaccgatgccgaattcgttgaaacaccatccggagcttaac acgttggcccttgaggacatcgatgcagcaatcgtttttataccggcagggtcagtggc gcccctatttcaaacggttgcgtgatgaggcgccggtccattaccagaagaacagcccttt cgccccccttcgtcggttaactcggttgaagacatcctgttcgtggataagagtcacgac ctgttttcggcgagccgcaaatcattctcggtgacctccggaggggctgtcggtggaaa tgttcataagcgalggatccgcgaacacagatgtgcagcgagctcggtgcaggagtagt ggcaccgaaaaacctgaaggagatggaggggctgatccgatcagcaccggcgatgtgtt gacagcctgctacagacaaacctttaactgggtacctgctgtttccaaggaaactcacag ggcgatgctggcgagcgttctggattttcttaccgaggaaccccaagctgggtgagtg gtcgacagaaatggcaggtgcagcatcgccaccggcgagggtttgccgatgaaaatgcc atgtttgacgacggcgagacatggcccggtttcttcaggctttggcgggacaaggagg cgcccgcgagcagcgaggagcccggtttcgatttgatcagcctgttgacagcaacaa agaaacgaaagacctgatcaatcgcccgatggagtttatcggttaatttgacgtcgtcata gtcgccggcaacgatcagcgcgcaactcgatgagtggtggcctgggtggccatgaacgaat tcccagggaatttgaaaaattgaaggcaaacccgagtgatccgaacatgggtgcgga aatcatcgctggcaaacccgcttggcctatatcgccggaatcgccaagcaggatgtcgaa ctggcgccgagacatcaagaagggtgatcgagttgtcatgtgtacgcttcgggttaacc gggacgagcgcaaatttgacaaacccgatcagttcatcattgatcgcaaggacgcacgaaa ccacatgtcgttcggctatgggttcacgttgcatgggcaacgcttggctgaactgcaa ctgcgcactccttcgggaagaaatctcaagcgttttgacaacatcgaagtcgtcggaagc ccgagcgggtgcagttcaacttcgtcgccgggttatccaggttgatggtcaaatgacacc gaacagtggcgcgagcgccgagcgcgagcagcattccttcacctagcactgaacagtct gctaaaaaagtacgcaaaaaggcagaaaaaggcagaaacgctcataatccgcctgtctt gtgtataacggttcaaatatgggaacagctgaaggaaacggcgctgatttagcagatatg caatgagcaaggatttgacaccgaggtcgcaacgcttgattcacacggcgaaatcttcc ggcggaaggagctgtataattgtaacggctcttataacggtcatcgccctgataacgca aagcaatttgtcgactggttagaccaagcgttcgtgatgaagtaaaaggcgttcgctact ccgtatltggatgcggcgataaaactgggctactacgtatcaaaaagtgcctgtttat cgatgaacgcttcgcttaaaaggcgagaaaaacatcgctgaccgctggaagcagatgca agcgacgacttgaaggacacatgaagaatggcggtgaacatatgtggagtgacgtagcag cctactttaacctcgacattgaaaaacagtgaagataataaatctactcttcaacttcaatt tgtcgacagcgcccggtatgccgttcggaanaatgcacgggtgcgttttcaacgaacgtc gtagcaagcaaaagacttcaacagccagcgagtgacgaagcagcgacacttgaatgtg aacttcaaaaagaagcttcttatacaagaaggagatcatltagggttatcttcgcgaacta tgaaggatagtaaacctgttaacgcaaggctcgccctagatgcatacagcaaatccgt ctgggaagcagaagaagaaaaattagctcatltgccactcgctaaaacagtatccgtagaag agcttctgcaatagtggaagcttcaagatcctgttacgcgcagcgagcttcgccaatggc tgtcaaacgggttcgcccgcgcataaagttagagcttgaagccttgttgaaaagcaagcc tacaagaacaagtgctggcgaacgcttatacaatgcttgaactgcttgaaaaatccccgg cgtgtgaatgaattcagcgaatttatcgcccttcgccaaagcatacgcccgcgtattat ctogatttctcatcactcgttcgatgaaaaacaagcaagcatcacggtcagcgtgtctc tcaggagaagcgtggagcggtatggagaataaaaggaattgcgtcgaactatcttgccg agctcgaagaaggagatagcattacgtgctttatttcacacccagtcagaatttacgt gccaaaagacctgaacgcgcttatcatggtcggaacgggaacagcgctcgccgctt agaggctttgtgcaggcgcgcaaacagctaaaagaacaaggacagtcacttggagaagcac atttatacttcggcttcggttcacctcatgaagactatctgtatcaagaagagcttgaaaa cgcccaagcgaaggcatcattacgttcataaccgttttttcgcatgccaatcagccg aaaacatacgttcagcacgtaatggaacaagacggcaagaaatgattgaactcttgatc aaggagcgacttctatatltggcgagcgggaagccaaatggcactcgccgttgaagcaac gcttatgaaaagctatgctgacgttcaccaagtgagtgaagcagacgctcgcttatggctg cagcagctagaagaaaaaggccgatcgcgaanaagcgtgtgggctgggttaa	16
Alkane transporter (Atkl)	atgagtttttctaattataaagtaaatcgcatgccggtgttggttgcataattttgttttgg ggcgccgacctgcattggcggaatgaaaaatatacgcggaataatcgctggctataatcagg tgactgggtcgctagcttcaatttttcaaggtctatgtgggtgaggagcttggcgatcta aatgttggagggggggctttgccaaatgctgatgaagtattggtaatgatacaacactta cgtttgatatcgcttattttgttagctcaaatatagcgtggattttttgttgggggtgcc agctagggtcaaatttcaaggtgagaaatcaatcctcgtgggaagagtcagtgaaagt gattacggccctgcaattctttcgttcaatatcattacgataagctttgagcgactttatc catatgttggggttggtgttggtcggtgctattttttgataaaaccgacggtgctttgag ttcgtttgatattaaagataaatggcgccctgcttttcagggtggccttagatagacctt ggtaactcatggatgctaaattcagatgtgcgttatattcctttcaaaacggagctcacag gtactcttggcccggttctgttttctactaaaattgaggttgatcctttcatctcagctct tggtcgctcataatgttttc	17
Aldehyde dehydrogenase (Ald)	atgtctttgccagtcgtcaccaaactcactactcctaagggtctctcctacaaccaacat taggtttgttcatcaacaacgagttcgttgttccaaaatccaagcaaaccttcgaagcttt ctcccttccaccgaagagaagatcacggatgtctacgaagcttttagccgaagatgtcgac gttgcgtccgaagcagcttacggcgctaccacaacgactggcccttgggtctccagaac aaagagccaagatcttgcacaagtggcgagcttggtcgaagaacacgccgagaccttggc ccagatcgaaacctgggacaacggttaagtcttgcagaacgccagagcgatctcggtatc	18

Press(2001)]의 방법에 따라, 마리노박터 아쿠아에올레이(DSM 11845) 유래의 모노옥시게나제(CYP153A), 바실러스 마가테리움(KCCM 11745) 유래의 NADPH:시토크롬 P450 환원효소(NCP), 사카로마이세스 세레비지에(KCTC 7296) 유래의 알코올 탈수소효소(ADH1), 및 칸디다 트로피칼리스(ATCC 20336) 유래의 알데하이드 탈수소 효소(ALD5)의 DNA를 Phusion high-Fidelity DNA 폴리머라제(Thermo scientific)를 이용하여 증폭시켰다. pGEM-BI(바이오니아, 한국)에 클로닝된 슈도모나스 푸티다-알칸 트랜스포터(AIkL) 유전자는 바이오니아(한국)에서 합성하였다.

[0072] 구체적으로, 문헌(Scheps D *et al.*, Microb Biotechnol 6, 694-707 (2013))을 참조하여, CYP153A와 NCP 도메인을 결합시켜 CYP-NCP 결합 유전자를 제조하였다. CYP153A의 경우 서열번호 5 및 6의 Maq_F/Maq_R 프라이머, 그리고, NCP의 경우 서열번호 7 및 8의 NCP_F/NCP_R 프라이머를 각각 이용하여 증폭시켰으며, 상기 2개의 유전자를 98℃에서 2분 후, 98℃에서 20초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 60초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 오버랩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 통해 연결시켰다. 이때 상기 CYP153A와 NCP 사이에는 3XGGS 탠덤 부위(tandem region)를 링커로서 삽입하였다.

[0073] 상기에서 수득한 융합 유전자 CYP-NCP를 pBbA6C 플라스미드(Lee *et al.*, J Biol Eng, 5:12 (2011), A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)의 Bg/II 및 XhoI 부위에 클로닝하여 pBbA6C-FP 플라스미드를 제조하였다.

[0074] AikL은 서열번호 9 및 10의 AikL_F/AikL_R 프라이머를 이용하여 98℃에서 2분 후, 98℃에서 2분 후, 98℃에서 20초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 15초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 PCR에 의해 증폭시켰다. 이어, 제한효소 PvuI 및 XhoI를 이용하여 상기에서 제조한 pBbA6C-FP 플라스미드를 절단하고, 상기 증폭된 AikL를 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.)를 이용하여 라이게이션시켜 pBbA6C-FP/AikL 플라스미드를 제조하였다.

[0075] 한편, 알코올 탈수소효소를 암호화하는 ADH1 유전자를 서열번호 11 및 12의 ADH1_F/ADH1_R 프라이머를 이용하여 98℃에서 2분 후, 98℃에서 20초, 57℃에서 30초 및 72℃에서 20초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 PCR에 의해 증폭시켰으며, 알데하이드 탈수소효소를 암호화하는 ALD5 유전자를 서열번호 13 및 14의 ALD5_F/ALD5_R 프라이머를 이용하여 98℃에서 2분 후, 98℃에서 20초, 58℃에서 30초 및 72℃에서 30초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 2개의 유전자를 98℃에서 2분 후, 98℃에서 20초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 50초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 오버랩 연장 PCR에 의해 연결시킨 후, pBbE6K 플라스미드(Lee *et al.*, 2011, A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)의 NdeI/XhoI 부위에 삽입하였다. 이어, 서열번호 15 및 12의 ALD_F/ADH1_R 프라이머를 이용하여 상기 pBbE6K로부터 ADH-ALD를 증폭시킨 후, XhoI을 이용하여 절단하였다.

[0076] 마지막으로, XhoI을 이용하여 상기에서 제조한 pBbA6C-FP/AikL 플라스미드를 절단하고, 여기에 상기 ALD-ADH 산물을 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.)를 이용하여 라이게이션시켜 "pBbA6C- ω " 플라스미드를 제조하였다. 상기 플라스미드의 개열지도를 도 2에 나타내었다.

[0077] (1-3) 오메가 산화를 수행하는 변이 대장균의 제작

[0078] 상기 1-1에서 제조한 *fadE* 유전자가 제거된 MG1655 (MG- $\Delta fadE$) 균주, 또는 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655(MG- $\Delta fadE \Delta fadR$) 균주를, 상기 1-2에서 제조한 pBbA6C- ω 플라스미드를 이용하여 전기 천공법으로 형질 전환시켰으며, 상기 형질전환된 균주를 각각 E ω 및 RE ω 로 지칭하였다.

[0079]

[0080] **실험예 1: 제작된 균주에서의 단백질 발현 확인**

[0081] 상기 실시예에서 제조된 변이 대장균 RE ω 에서 단백질 발현이 제대로 수행되는지 여부를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels) 전기영동을 통해 하기와 같이 분석하였다.

[0082] 먼저, 상기 변이 대장균 RE ω 를 O.D.(optical density) 600에서 0.5까지 키운 후, 0.1 mM의 IPTG를 이용하여 발현을 유도시켰다. 이어, 25℃에서 16시간 배양시키고, 상기 세포들을 수집하여 로딩 버퍼를 투입한 후, 상기 혼합물을 95℃에서 20분 동안 가열하였다. 전체 세포 용해물(lysates) 시료를 Laemmli 방법을 통해 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels)로 전기영동하였다. 단백질 밴드는 쿠마시 블루 R-250(Coomassie brilliant blue R-250)을 이용하여 염색하여 단백질 발현 유무를 확인하였다. 이때, 각 유전자

의 분자량은 online ExPasy tool을 이용하여 분석하였다. SDS-PAGE 겔 사진을 도 3에 나타내었다.

[0083] 도 3에서 M은 마커, 라인 1 및 2는 각각 변이 대장균 및 야생형 대장균(대조군)의 총 분획을 나타내는 것이고, a는 *CYP-NCP* 융합 단백질(120 kD)이, b는 알데하이드탈수소효소(*ALD1*, 54 kD)가, c는 알코올 탈수소효소(*ADH5*, 37 kD)가, 그리고 d는 알칸 트랜스포터(*AIK1*, 25 kD)가 발현됨을 보여주어 변이 대장균 RE ω 에서 단백질 발현이 정상적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

[0084] 실험예 2: 지방산의 디카르복실산으로의 변환

[0085] (2-1) 휴지기 세포 상태의 대장균 준비

[0086] 상기 실시예에서 제조한 변이 대장균(E ω 및 RE ω)의 단일 콜로니를 5 ml의 LB 배지에서 37℃ 및 200rpm의 교반 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양된 500 L의 변이 균주 배양액을 50 ml의 LB 배지에 접종 후 37℃ 및 200rpm의 교반 조건에서 재배양하였다. 이어, 상기 배양물을 1L의 LB 배지에 1:100의 비율로 접종시키고, O.D. 600에서 0.5-0.6에 이르렀을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도시켰다.

[0087] 그 후 환원 헤마틴의 전구체인 0.25 mM의 5-아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)을 투입하고 25℃ 및 200 rpm의 조건에서 20시간 동안 배양하였다. 이 후, 25℃ 및 12,000g 조건에서 15분 동안 원심 분리시켜 세포들을 회수하고, 인산칼륨 완충액(0.1M, pH 7.4)으로 2번 세척하였다.

[0088] (2-2) 변이 대장균에서의 오메가 산화를 이용한 디카르복실산의 생성량 측정

[0089] 상기 2-1에서 얻어진 휴지기 상태의 E ω 및 RE ω 대장균(50 g_{cell}/L)을 0.1 M의 인산칼륨 완충액(pH 7.4)에 재현 탁시킨 후 1 g/L의 C₁₂ 지방산 및 C₁₄ 지방산을 각각 넣어 주었다. 그리고 1X 농도의 필터 여과된 미량 원소 수용 액(g/L: 2.4 g FeCl₃·6H₂O, 0.3g CoCl₂·6H₂O, 0.15g CuCl₂·2H₂O, 0.3g ZnCl₂, 0.3g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.075gH₃BO₃, 및 0.495g MnCl₂·4H₂O)(Zhou L et al., Curr. Microbiol., 62, 981-989(2011)), 및 30 μ g/mL 클로람페니콜을 첨 가하였다. 또한 지방산의 용해를 위하여 0.5%의 TWEEN80을 넣어 주었다.

[0090] 상기 혼합 용액을 30℃ 및 200 rpm 조건의 셰이킹 배양기에서 교반 배양시킨 후 가스크로마토그래피(gas chromatography)/불꽃이온화검출기(flame ionization detector)(GC/FID)를 이용하여 디카르복실산의 생성량을 측정하였다.

[0091] 지방산 1 g/L에서 생성되는 디카르복실산의 양을 측정한 결과, 본 발명의 변이 대장균 RE ω 는 C₁₄ 지방산을 넣어 주었을 경우 16시간 정도 후에 약 300 mg/L (307.69 mg/L)의 C₁₄ 디카르복실산이 생성됨을 확인하였고, C₁₂ 지방 산을 넣어주었을 경우, 16시간 정도 후에 150 mg/L(149.92 mg/L)의 C₁₂ 디카르복실산이 생성됨을 확인하였다.

[0092] 실험예 3: 디카르복실산 생산에 영향을 미치는 인자 확인

[0093] (3-1) 디카르복실산 생산에 대한 보조 기질, 온도 및 세포 농도의 영향

[0094] 상기 실험예 2-2의 변환 시, 보조 기질 유무, 온도 및 세포 농도에 따라 생산되는 디카르복실산의 양이 변화되 는지 확인하고자 하였다. 변환은 셰이킹 배양기(30℃ 및 200 rpm)에서 수행되었으며, 시료를 수집한 후 GC/FID 를 이용하여 생산물을 정량화하였다.

[0095] 먼저, 보조 기질의 영향을 확인하기 위하여, 상기 실험예 2-2에서 변환 시에 보조 기질로서 1% (w/v) 글리세롤 및 0.4%(w/v) D-글루코스를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 디카르복실산 함량을 4시간 마다 측정하여 그 결과를 각각 도 4 및 5에 나타내었다.

[0096] 도 4 및 5에서 보는 바와 같이, 보조 기질을 첨가하지 않는 경우가 보조 기질을 첨가한 경우에 비해 2배 이상 향상된 수율을 나타내었다. 게다가, 보조 기질을 첨가하여 48시간 동안 변환시킨 변이 대장균 RE ω 의 디카르복 실산 생산수율과 비교하여, 보조 기질을 첨가하지 않고 24시간 동안 변환시킨 변이 대장균이 약 2배 향상된 생

산수율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

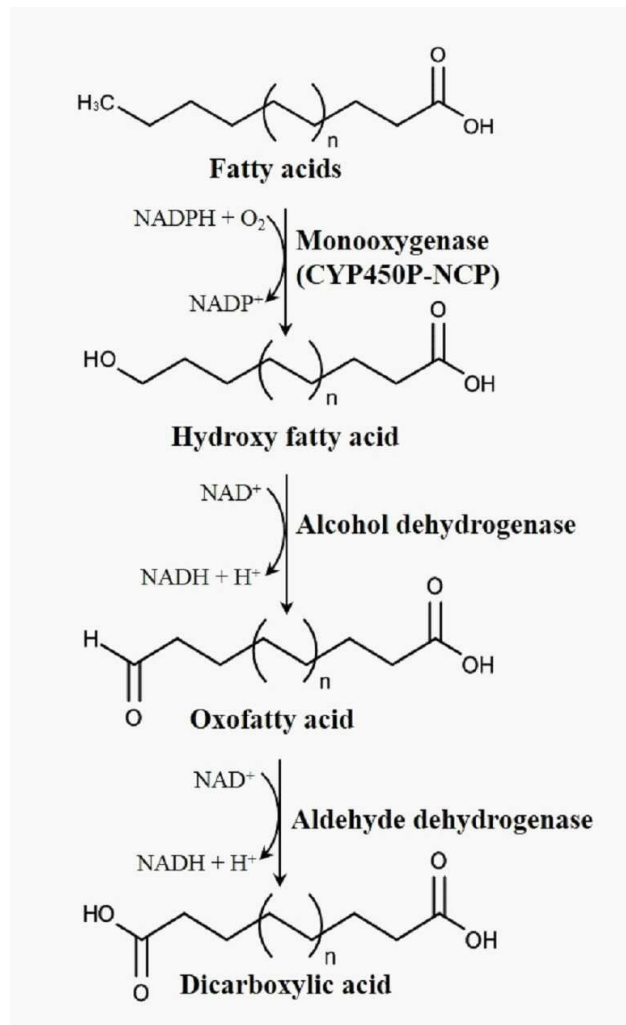
- [0097] 가장 바람직한 변환 조건(즉, 변환을 12시간 동안 수행하는 경우)에서 측정된 C₁₂ 디카르복실산의 함량은 158 mg/L이고, C₁₄ 디카르복실산의 함량은 410 mg/L으로 나타났다.
- [0098] 또한, 온도의 영향을 확인하기 위하여, 상기 실험에 2에서 변환 시에 RE ω 균주를 25℃, 30℃ 및 37℃의 온도에서 변환시켰다. 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, 30℃에서 변환시키는 것이 디카르복실산 생산 수율 면에서 바람직함을 알 수 있었다. 도 6에 개시된 데이터는 3번의 실험의 평균으로 나타내었으며, 에러바는 표준편차(standard deviation)를 나타낸다.
- [0099] (3-2)디카르복실산 생산에 대한 5-아미노레불린산 및 티오우레아의 영향
- [0100] 헤미(haeme) 프로코저인 5-아미노레불산(ALA)이 변이 대장균 RE ω 의 디카르복실산 생산 수율 향상에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 0.25 mM ALA를 0.1mM IPTG와 함께 첨가하여 변이 대장균 RE ω 에 이중 유전자 도입을 유도하고, 이후 변환을 수행하였다. 티오우레아의 존재 하에서의 ALA 첨가 유무에 따른 디카르복실산 생산량 결과를 도 7에 나타내었으며, 티오우레아 부재 하에서의 ALA 첨가 유무에 따른 디카르복실산 생산량 결과를 도 8에 나타내었다. 도 7 및 8에 개시된 데이터는 3번의 실험의 평균으로 나타내었으며, 에러바는 표준편차를 나타낸다.
- [0101] 그 결과, RE ω 변이 대장균의 변환 시에는 ALA를 첨가하는 것이, ALA를 첨가하지 않는 경우에 비해 디카르복실산 생산 수율에 상당한 영향을 미쳤다($P < 0.01$). 이는 CYP153A와 같은 모노옥시게나제 효소를 함유하는 헤미 프로코저는 ALA 보충을 통해 티오우레아의 존재 또는 부재에 관계 없이 높은 생산 수율을 나타냄을 알 수 있다.
- [0102] 또한, 티오우레아를 최종 농도 1 mM가 되도록 생체 변환 배지(Doi *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol, 98(2), 629-639 (2014))에 첨가한 후, 생체 변환을 수행하여 디카르복실산 생산량을 측정하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 개시된 데이터는 3번의 실험의 평균으로 나타내었으며, 에러바는 표준편차를 나타낸다.
- [0103] 도 9에서 보는 바와 같이, 티오우레아를 첨가한 경우, RE ω 에서 C₁₄ 디카르복실산의 생산 수율은 크게 증가되었으나($P < 0.01$), C₁₂ 디카르복실산의 생산 수율에는 크게 영향을 미치지 못하였다($P > 0.05$).
- [0104] (3-3) GC/FID에 의한 생산물 분석
- [0105] 상기 방법들에서 변이 대장균의 오메가 디카르복실산(도데칸디온산 및 테트라데카논산)의 생성량을 정량하기 위하여 다음과 같이 수행하였다.
- [0106] 먼저, 원심분리를 이용하여 얻은 무-세포 상청액을 HCl을 이용하여 산성화하고, 내부 표준으로서 동일한 양의 1 g/L C₁₉ 함유-에틸 아세테이트로 추출하였다. 이어, 유기층을 모아 2회 불텍싱하고, (트리메틸실릴)디아조메탄 용액(TMS)을 이용하여 유도체화하였다. 상기에서 얻어진 실릴화된 유도체를 분석하고, FID와 캐필러리 컬럼(Supelco-Nukol, 15m x 0.53mm ID, 0.50m film)이 설치된 GC(Agilent 7890A, USA)로 정량화하였다.
- [0107] 온도 프로그램은 120℃에서 2분간으로 하였으며, 선형 온도 구배(linear temperature gradient)는 10℃/분에서 220℃까지 하였다. 생체 변환 산물의 농도를 칼리브레이션 커브(calibration curves)($R^2 > 0.99$)에 기초하여 측정하였다. 질량 선택적 검출기(Mass selective detector, Agilent, 5975C, USA)는 70 eV에서 전자 충격 이온화(electron impact ionization)를 통해 획득하였다.
- [0108] RE ω 에서 생산된 디카르복실산의 기체 크로마토그래피 분석 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0109] 그 결과, 상기 웨이킹 배양 시험에서, E ω 및 RE ω 둘 다 각각 C₁₂ 지방산 및 C₁₄ 지방산으로부터 도데칸디온산

(C₁₂ 디카르복실산; C₁₂-DCA) 및 테트라데칸디온(C₁₄ 디카르복실산; C₁₄-DCA)을 합성하는 것을 알 수 있었다.

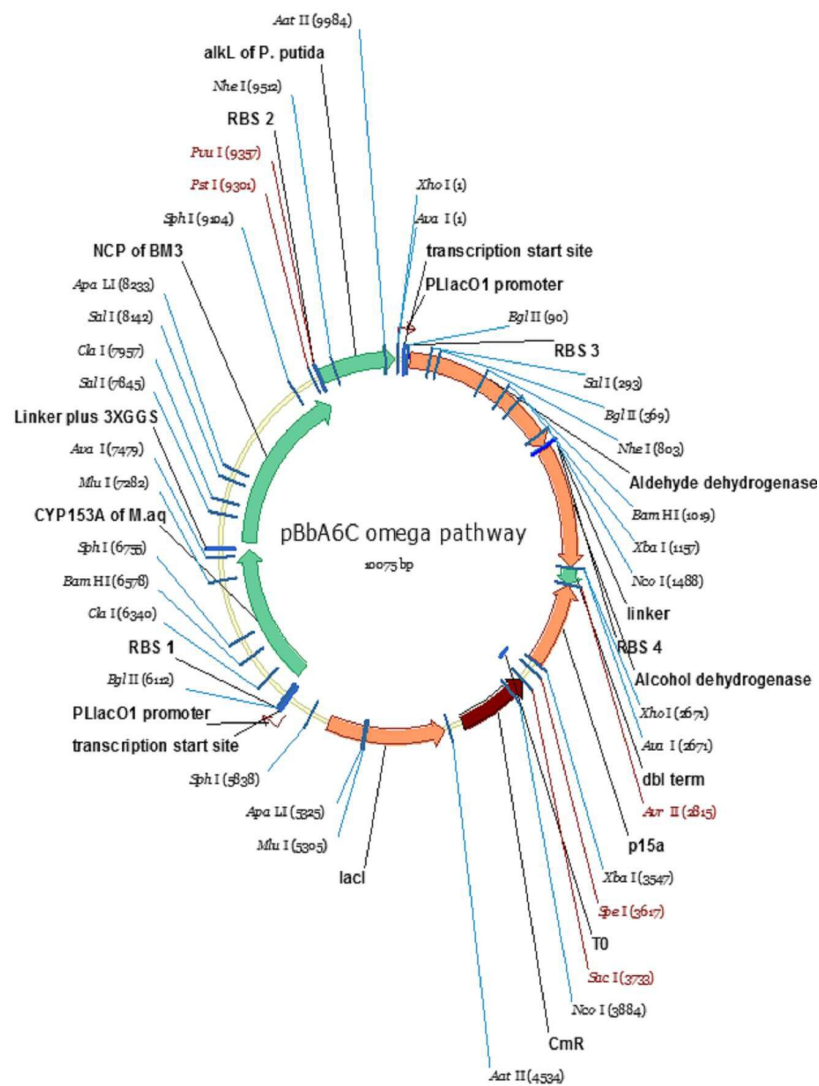
- [0110] RE ω 변이 대장균에서는 48시간 변환 후 생산된 C₁₂-DCA 및 C₁₄-DCA 최대량은 각각 75.53 mg/L 및 157.24 mg/L이었다. 특히, RE ω 변이 대장균은 E ω 변이 대장균에 비해 48시간 변환 후 생산된 C₁₂-DCA 및 C₁₄-DCA 생산량이 각각 142.08% 및 204.37%나 높게 나타났다. 이것은 야생형 MG1655 대장균에서 *fadR* 유전자를 결실시키는 것이, 지방산 수송 역할을 하는 *fadL/D* 유전자 발현을 증가시켜 세포에서 지방산 수송을 촉진시켜 준 것으로 생각된다.
- [0111] 또한, C₁₂-DCA의 경우 RE ω 변이 대장균에서 전환 효율이 14.76%로 나타났다. 반면, C₁₄-DCA의 경우 생산 효율이 18.04%로 나타났다. 생산 수율과 시간 사이의 선형 관계가 명확하게 관찰되었다. RE ω 변이 대장균은 E ω 보다 빨리 변환을 시작하였으며, C₁₂-DCA보다 C₁₄-DCA를 더 많은 양으로 생산하였다.
- [0112] 한편, 보조 기질(글리세롤 및 글루코스)을 이용하고 CYP153A/AIkL 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 변이 대장균에서 지방산을 변환시키면 오메가 수산화 지방산을 합성할 수 있다. 그러나, 본 발명에서는 베어-빌리거 모노옥시게나제/에스테라제(BaeyerVilliger monooxygenase/Esterase)에 의해서 디카르복실산을 합성하기 위해 보조 기질을 첨가하지 않았다. 게다가, 변환되는 동안 글루코스를 첨가하지 않은 경우의 최대 생산물 형성 비율 및 최대 생산물 농도가 더 높게 나타났다. 이는 탄소원 및 에너지원으로 이용되는 글루코스가 올레인산(oleic acid)을 10-하이드록시스테아린산(10-hydroxystearic acid)으로 전환시키는 데 도움을 주지 못함을 의미한다 (Jeon *et al.*, *Process Biochemistry*, 47(6), 941-947 (2012)).
- [0113] 글리세린 및 글루코스는 알칸 분해를 유도하고, C. 트로피칼리스 및 Y. 리폴리티카 균주에서는 디카르복실산 생산 효소 도입을 억제시킨다(Schindler *et al.*, 1990, Seghezzi *et al.*, 1992, Nazarko, *et al.* 2004). 배지에 글루코스가 단독으로 첨가되었을 때, 모든 균주는 C₁₂-DCA 및 C₁₄-DCA를 생산하지 않았다. 글루코스는 올레이트(oleate)의 존재 및 부재 시 둘다 레굴론(regulon) 유전자의 발현을 강하게 억제시킨다. 따라서, 본 발명에서 변이 대장균의 지방산 변환 시에는 임의의 보조 기질 없이 수행되는 것이 바람직하다.

도면

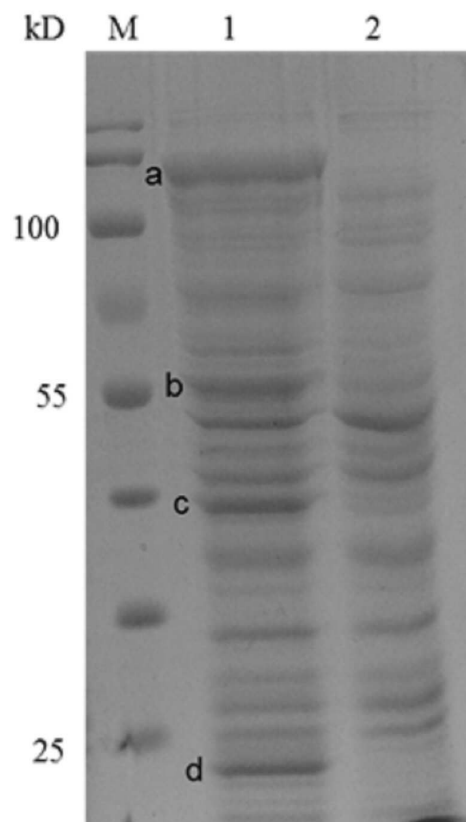
도면1



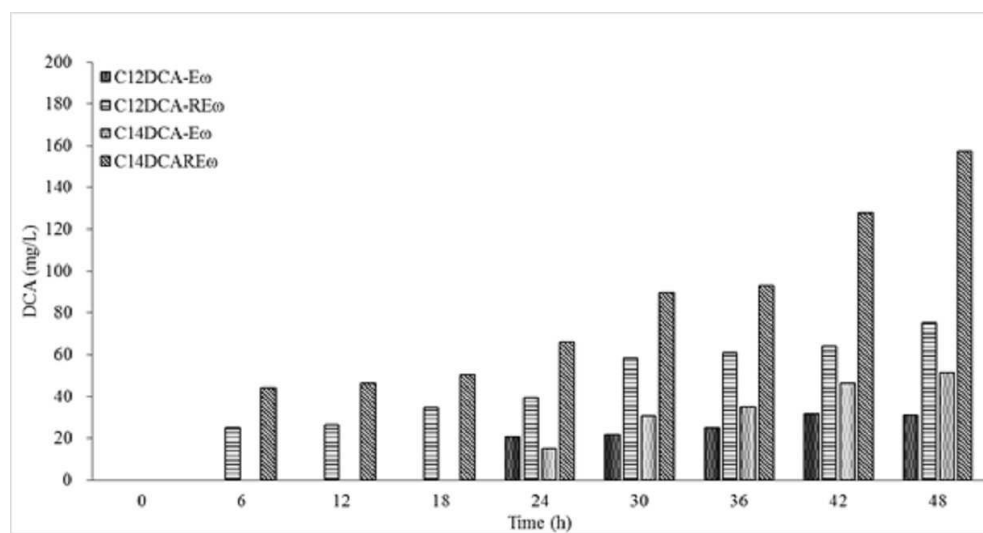
도면2



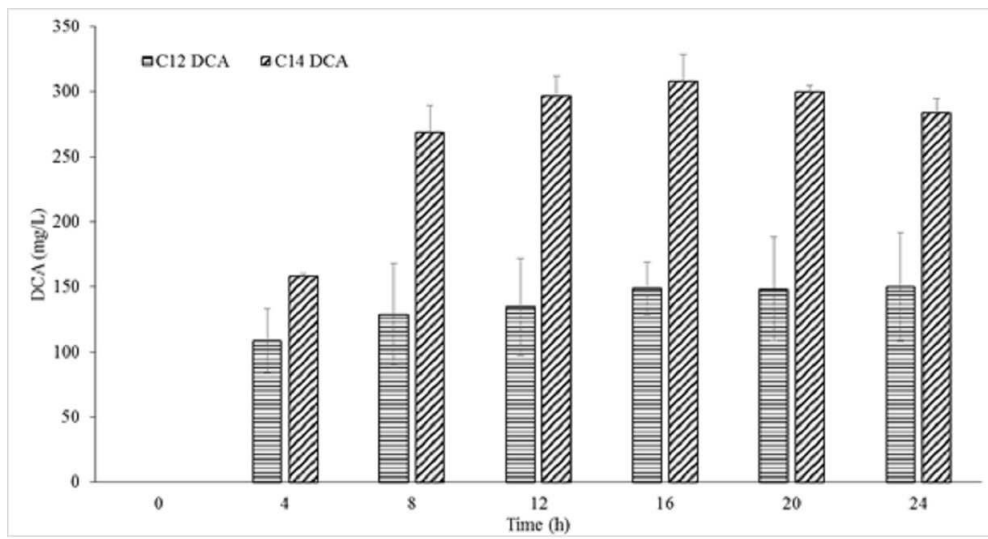
도면3



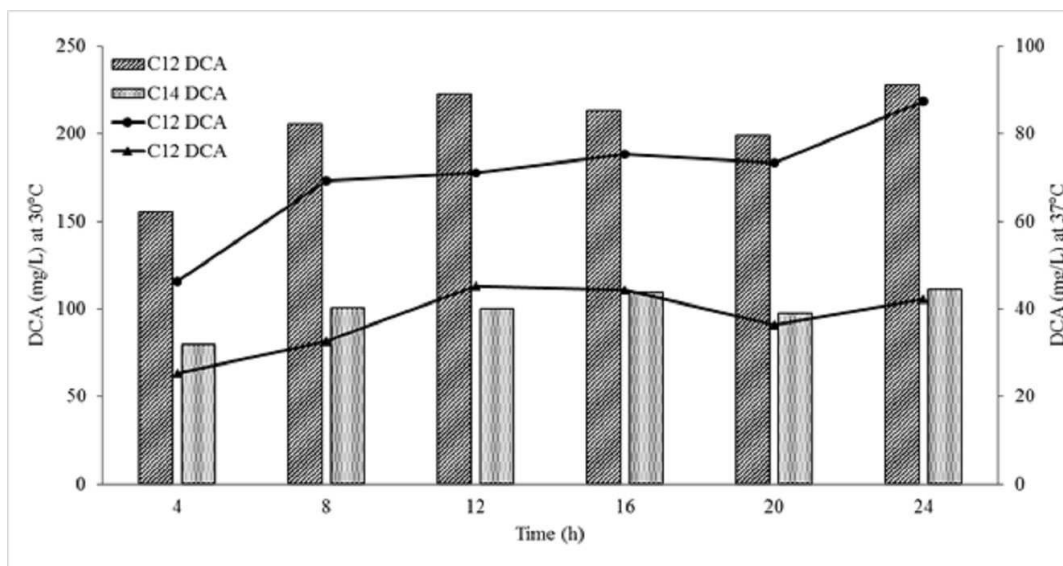
도면4



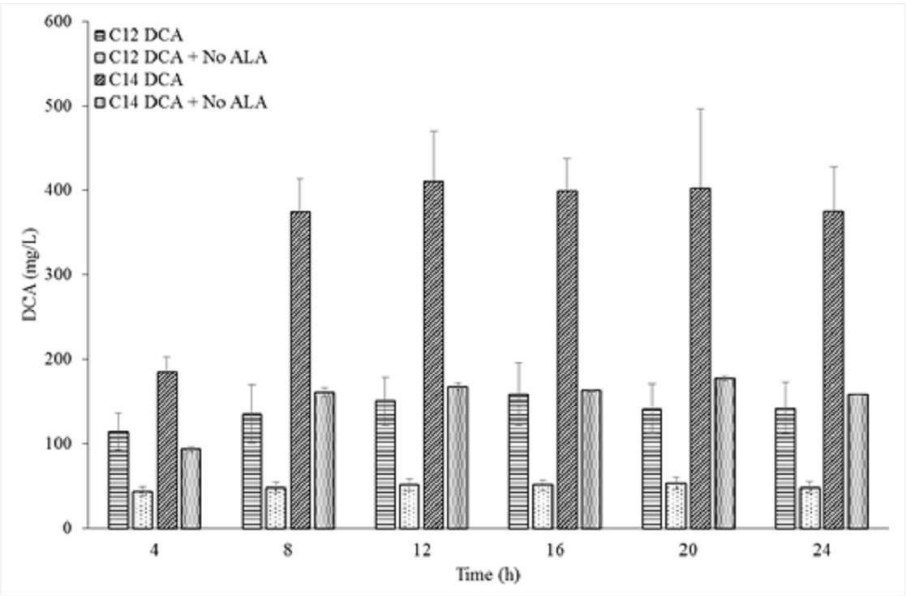
도면5



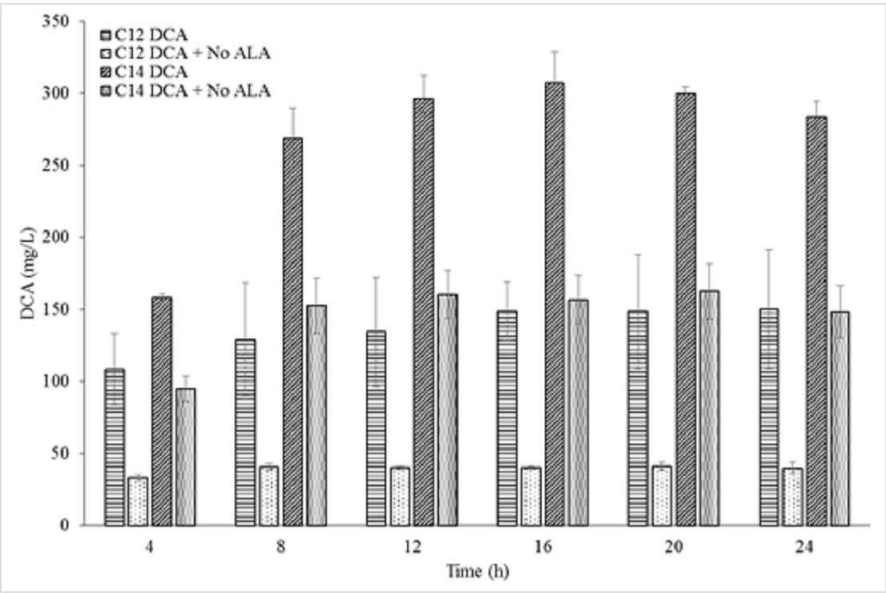
도면6



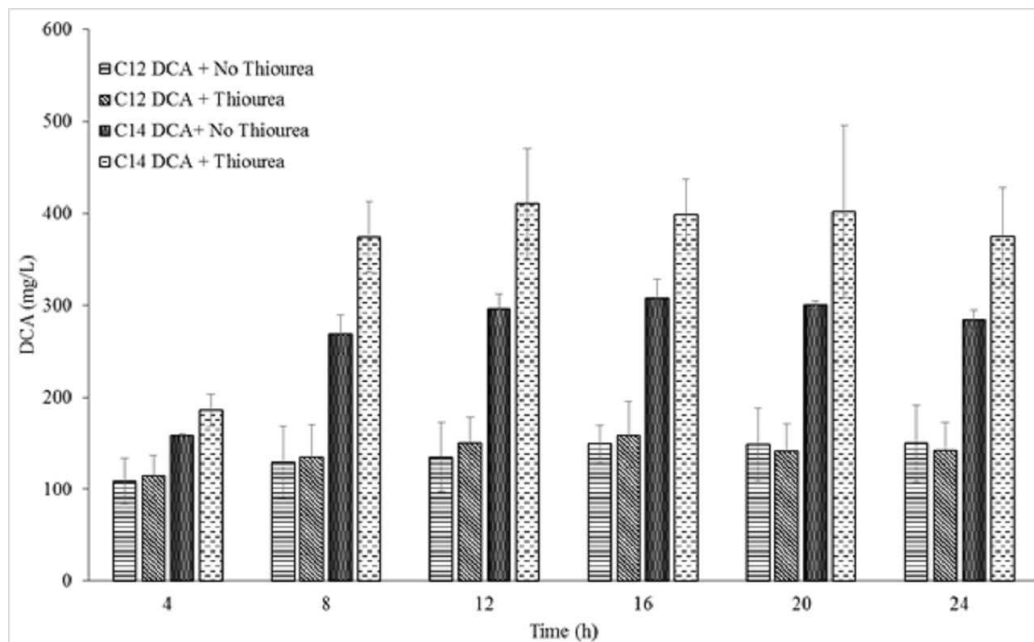
도면7



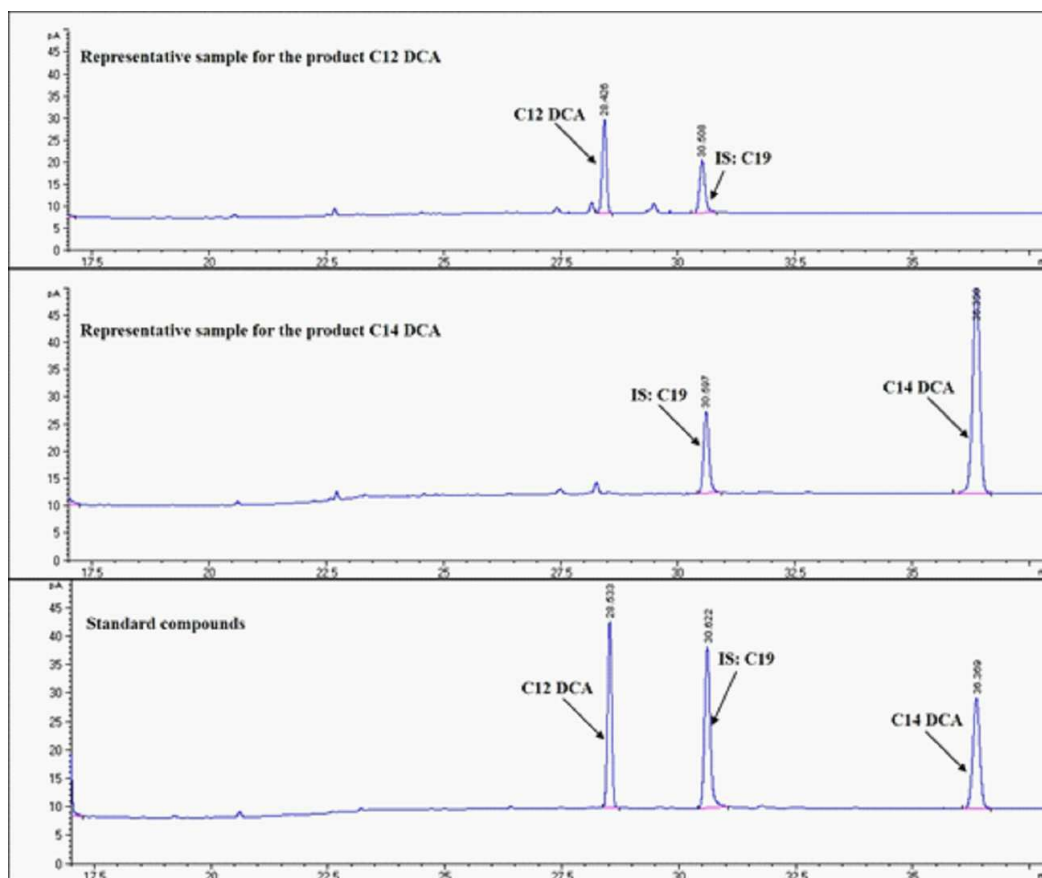
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION

<120> METHOD FOR PRODUCING DICARBOXYLIC ACID BY OMEGA OXIDATION IN

MUTANT ESCHERICHIA COLI

<130> FPD201505-0128

<160> 19

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR_del_F

<400> 1

tctggtatga tgagtccaac ttgttttgc tgtgttatgg aaatctcact gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 2

<

211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR_del_R

<400> 2

aacaacaaaa aaccctcgt ttgaggggtt tgctctttaa acggaaggga attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadE_del_F

<400> 3

ccatatcatc acaagtggtc agacctccta caagtaaggg gcttttcgtt gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadE_del_R

<400> 4
ttacgcggct tcaactttcc gcactttctc cggcaacttt accggcttcg attccgggga 60
tccgtcgacc 70
<210> 5
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Maq_F
<400> 5
atagatcttt taagaaggag atatacatat gccaacactg cccagaac 48
<210> 6
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Maq_R
<400> 6
ctgttcagtg ctaggtgaag gaatgctgcc gccgtgccg ccgtgccgc cactgttcgg 60
tgtcagtttg accatcaacc tggaa 85
<210> 7
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> NCP_F
<400> 7
gcggcagcat tccttcacct agcactgaac agtctgctaa aaaagtacgc aaaaaggcag 60
aaaacgctat aatagccgcg tgc 83
<210> 8
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> NCP_R
<400> 8
attctcgagc gatatcgatc gttattaccc agccacacg tcttttg 47

<210> 9
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AlkL_F
 <400> 9
 ggtcgatcgt ttaagaagga gatatacata tgagtttttc taattataaa gtaatcgca 60
 tgccg 65
 <210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AlkL_R
 <400> 10
 atctcgagtt attagaaaac atatgacgca ccaa 34
 <210> 11
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADH1_F
 <400> 11
 tttaagaagg agatatacac atgtctatcc cagaaactca 40
 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADH1_R
 <400> 12
 cttactcgag ttatttagaa gtgtcaacaa cgt 33
 <210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALD5_F

<400>	13	
atacatatgt ctttgccagt cgtcaccaa		29
<210>	14	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ALD5_R	
<400>	14	
gtgtatatct ctttcttaaa agatccttaa gtgagcttaa ttctaacag		49
<210>	15	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ALD_F	
<400>	15	
aggcctcgag aattgtgagc ggataacaat tgac		34
<210>	16	
<211>	3223	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CYP-NCP	
<400>	16	
atgccaaac tgcccagaac atttgacgac attcagtcce gactgattaa cgccacctec		60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg		120
aagaccttcg gccacgccg accgatgcc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt		180
aacacgctgg ccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag		240
tggcgcgctt atttcaaagc gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc		300
cctttcgcc cttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tctgttcgt ggataagagt		360
cacgacctgt ttccgcca gccgcaaatc attctcgttg accctccgga ggggctgtcg		420
gtggaaatgt tcatagcgt ggatccgccc aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag		480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc		540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa cctttaact gggtacctgc tgtttccaag		600

gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggtttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgg cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaac ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaat catccgctgg caaacgccg tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcgccag accatcaaga agggtagatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggtatg gggttaccg ttgcattggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcac cttcggaag aaatactcaa gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaactgac accgaacagt ggccgagcgc gcggcagcgg cggcagcatt	1440
ccttcaccta gcactgaaca gtctgctaaa aaagtacgca aaaaggcaga aaaaggcaga	1500
aaacgtcat aatacgcccg tcttgtgct atacggttca aatatggga cagctgaagg	1560
aacggcgcgt gatttagcag atattgcaat gagcaaagga tttgcaccgc aggtcgaac	1620
gcttgattca cagccggaa atcttccgcg cgaaggagct gtattaattg taacggcgtc	1680
ttataacggt catccgctg ataacgaaa gcaatttgc gactggttag accaagcgtc	1740
tgctgatgaa gtaaaaggcg ttcgtactc cgtatttga tgcggcgata aaaactgggc	1800
tactacgtat caaaagtgc ctgctttat cgatgaaacg cttgccgcta aaggggcaga	1860
aaacatcgct gaccgcggtg aagcagatgc aagcgacgac tttgaaggca catatgaaga	1920
atggcgtgaa catatgtgga gtgacgtagc agcctacttt aacctcgaca ttgaaaacag	1980
tgaagataat aaatctactc ttctacttca atttgtcgac agcggcggc atatgccgt	2040
tgcgaaaatg cacggtgcgt tttcaacgaa cgtcgtagca agcaaagaac ttcaacagcc	2100
aggcagtgca cgaagcacgc gacatctga aattgaactt ccaaaagaag cttcttatca	2160
agaaggagat catttaggtg ttattcctcg caactatgaa ggaatagtaa accgtgtaac	2220
agcaaggttc ggcttagatg catcacagca aatccgtctg gaagcagaag aagaaaaatt	2280
agctcatttg cactcgcta aaacagtatc cgtagaagag cttctgcaat acgtggagct	2340
tcaagatcct gttacgcga cgcagcttcg cgcaatggct gctaaaacgg tctgcccgcc	2400
gcataaagta gagcttgaag ccttgcttga aaagcaagcc tacaagaac aagtgtggc	2460

aaaacgttta acaatgcttg aactgcttga aaaatacccg gcgtgtgaaa tgaaattcag 2520
 cgaatttata gcccttctgc caagcatacg cccgcgtat tactcgattt cttcatcacc 2580

 tcgtgtcgat gaaaaacaag caagcatcac ggtcagcggt gtctcaggag aagcgtggag 2640
 cggatatgga gaatataaag gaattgcgtc gaactatctt gccgagctgc aagaaggaga 2700
 tacgattacg tgctttatct ccacaccgca gtcagaattt acgctgccaa aagaccctga 2760
 aacgcgcgtt atcatggctg gaccgggaac aggcgtcgcg ccgtttagag gctttgtgca 2820
 ggcgcgcaaa cagctaaaag aacaaggaca gtcacttggga gaagcacatt tatacttcgg 2880
 ctgccgttca cctcatgaag actatctgta tcaagaagag cttgaaaacg cccaaagcga 2940
 aggcatacatt acgcttcata ccgctttttc tcgcatgcc aatcagccga aaacatacgt 3000

 tcagcacgta atggaacaag acggcaagaa attgattgaa cttcttgatc aaggagcgca 3060
 cttctatatt tgcggagacg gaagccaaat ggcaactgcc gttgaagcaa cgcttatgaa 3120
 aagctatgct gacgttcacc aagtgagtga agcagacgct cgcttatggc tgcagcagct 3180
 agaagaaaaa ggccgatacg caaaagacgt gtgggctggg taa 3223

 <210> 17
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida
 <400> 17

 atgagttttt ctaattataa agtaatcgcg atgccggtgt tgggtgctaa ttttgttttg 60
 ggggcggcca ctgcatgggc gaatgaaaat tatccggcga aatctgctgg ctataatcag 120

 ggtgactggg tcgctagctt caatttttct aaggctctatg tgggtgagga gcttggcgat 180
 ctaaagtgtg gagggggggc tttgccaaat gctgatgtaa gtattggtaa tgatacaaca 240
 cttacgtttg atatcgcta tttgttagc tcaaatatag cgggtggattt tttgttggg 300
 gtgccagcta gggctaaatt tcaaggtagg aaatcaatct cctcgtggg aagagtcagt 360
 gaagttgatt acggccctgc aattctttcg cttcaatata attacgatag ctttgagcga 420
 ctttatccat atgttggggg tgggtgttgg cgggtgctat ttttgataa aaccgacggt 480
 gcttttagatt cgtttgatat taaggataaa tgggcgcctg cttttcaggt tggccttaga 540

 tatgaccttg gtaactcatg gatgctaaat tcagatgtgc gttatattcc tttcaaacg 600
 gacgtcacag gtactcttgg cccggttcct gtttctacta aaattgaggt tgatccttc 660
 attctcagtc ttggtgcgtc atatgttttc 690

 <210> 18

<211> 1479

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 18

atgtctttgc cagtcgtcac caaactcact actcctaagg gtctctccta caaccaacca 60

ttaggtttgt tcatcaacaa cgagttcggt gttccaaaat ccaagcaaac cticgaagtc 120

ttctccctt ccaccgaaga gaagatcacc gatgtctacg aagcttttagc cgaagatgtc 180

gacgttgctg ccgaagcagc ttacccgcc taccacaacg actgggcctt tgggtgtcca 240

gaacaaagag ccaagatctt gctcaagttg gccgacttgg tcgaagaaca cgccgagacc 300

ttggcccaga tcgaaacctg ggacaacggt aagtccttgc agaacgccag aggcgatatc 360

ggattcactg ccgcttactt tagatcctgt ggtggatggg ccgacaagaa caccggtgac 420

aacatcaaca ccggtggcac ccaccttact tacaccaga ggtccatt ggtgtgtggt 480

caaatcatcc ctggaacgc aagtacctg atggccagtt ggaagcttgg tcccgtatc 540

gctaccggtg gtaccactgt gcttaaatca gctgaagcta cccattagc tgtctgttac 600

ctcgcccaat tgttagttga agccggtctt ccaaagggtg tcgttaacat tgtttccggt 660

ttcggtacca ctgccggtc cgctatcgt agccatccaa agatcgaca ggtcgccttt 720

actggttcca ccaacaccgg taagatcatc atgaagttgg ctgcggagtc caacttgaag 780

aaggtcactt tggaaattggg tggtaagtcc ccacacattg ttttcaacga cgctgacttg 840

gaccgcgccg tcagctactt ggttgctgcc attttcagta actccggcga gacctgtgct 900

gccggatccc gtgtcttggg gcaatccggt gtctacgacg aagttgttgc taagttcaag 960

aaggcgccg aggccgttaa agttggtgac ccattcgacg aagaacctt catgggttcc 1020

caagtcaacg aagtccaatt gtctagaatc ttgcaatata tcgagctggg taaggaacaa 1080

ggtgccactg ttgtcaccgg tgggtgtaga gccggggaca agggttactt cgtcaagcca 1140

actattttcg ccgacgttca caaggacatg actatcgtca aggaagaaat ctttggctct 1200

gttgtctccg tcgtcaaatt cgataccatt gaagaagcta tcgctttggc taacgactec 1260

gaatacgggt tggccgctgg tatccacacc actaacatca gcaccggtgt caccgtcgt 1320

aacagaatca agtccggtac tgtctgggtc aacacttaca atgacttgca ccccatggtt 1380

ccattcggtg gtttcggcgc ttctggtatc ggcagagaaa tgggtgcaga agtcatgaag 1440

gaatacaccg aagttaaggc tgtagaatt aagctcact 1479

<210> 19

<211> 1044

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 19

atgtctatcc cagaaactca aaaaggtgtt atcttctacg aatcccacgg taaattggaa	60
cacaaggata ttccagttcc aaagccaaag gccaacgaat tgttgatcaa cgtaagtac	120
tctggtgtct gtcacaccga cttgcacgct tggcacggtg actggccatt gccagttaag	180
ctaccattag tcggtggta cgaaggtgcc ggtgtcgttg tcggcatggg tgaaaacgtt	240
aagggtgga agatcggta ctacgccggt atcaaatggt tgaacggttc ttgtatggcc	300
tgtgaatact gtgaattggg taacgaatcc aactgtctc acgtgactt gtctggttac	360
accacgacg gtcttttcca acaatagct accgtgacg ctgttcaagc cgctcacatt	420
cctcaaggta ccgacttggc ccaagtcgcc cccatcttgt gtgtggtat caccgtctac	480
aaggcttga agtctgctaa cttgatggcc ggtcattggg ttgccatttc cgtgtctgcc	540
ggtggtctag gtcttttggc tgttcaatac gccaaggcta tgggttacag agtcttgggt	600
attgacggtg gtgaaggtaa ggaagaatta ttcagatcca tcggtggtga agtcttcatt	660
gacttcacta aggaaaagga cattgtcggg gctgttctaa aggccactga cgtgtgtgct	720
cacggtgtca tcaacgtttc cgtttccgaa gccgtattg aagcttctac cagatacgtt	780
agagctaacg gtaccaccgt tttggtcggg atgccagctg gtgccaagtg ttgttctgat	840
gtcttcaacc aagtcgtcaa gtccatctct attgttgggt cttacgtcgg taacagagcc	900
gacaccagag aagctttgga cttcttcgcc agaggtttgg tcaagtctcc aatcaagggt	960
gtcggcttgt ctaccttgcc agaaatttac gaaaagatgg aaaagggtca aatcgttggt	1020
agatacgttg ttgacacttc taaa	1044