



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0018212

(43) 공개일자 2016년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/60 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0102497

(22) 출원일자 2014년08월08일

심사청구일자 2014년08월08일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김선원

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

왕충룡

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

(74) 대리인

두호특허법인

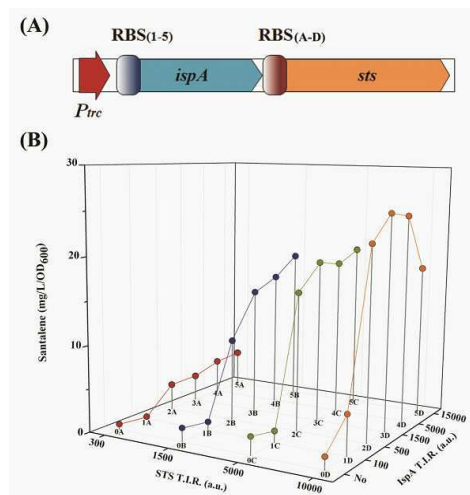
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 α -산탈렌의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 제1유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 제2유전자가 도입된 에세리키아 속 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 α -산탈렌의 생산 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 제1유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 제2유전자가 도입된 에세리키아 속 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 배양하는 단계는 친유성 물질을 포함하는 배지에서 수행되는 것인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 3

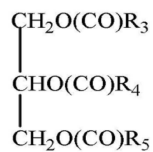
청구항 2에 있어서, 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물; 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합인, α -산탈렌의 생산 방법:

[화학식 1]



(식 중, R1 및 R2는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),

[화학식 2]



(식 중, R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 파이토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 배지 대 친유성 물질의 부피비는 1:0.2-3.0인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제1유전자는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 제2유전자는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *E. coli* (NA-IS_{3b}) (KCTC12648BP)인, α -산탈렌의 생산 방법.

청구항 9

파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 제1유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 제2유전자가 도입된 에세리키아 속 미생물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 에세리키아 속 미생물은 이소펜테닐 파이로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP) 및 디메틸알릴 파이로포스페이트(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)를 생산하는 MEP 경로를 갖는, 미생물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 유전자가 도입되는 에세리키아 속 미생물은 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue 및 BW25113로 이루어진 군에서 선택되는 대장균인, 미생물.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 제1유전자는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인, 미생물.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 제2유전자는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인, 미생물.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 제1유전자의 번역 개시 속도(translation initiation rate)가 100 내지 15,000au이고, 상기 제2유전자의 번역 개시 속도는 300 내지 20,000au인, 미생물.

청구항 15

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 MVA(mevalonate) 경로 상의 유전자가 더 도입된 것인, 미생물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 MVA 경로 상의 유전자는 서열번호 3의 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자(mvaE), 서열번호 4의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자(mvaS), 서열번호 5의

스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자(mvaK1), 서열번호 6의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자(mvaK2) 및 서열번호 7의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자(mvaD) 및 서열번호 8의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제를 코딩하는 유전자(idi)인, 미생물.

청구항 17

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 *E. coli* (NA-IS_{3b}) (KCTC12648BP)인, 미생물.

청구항 18

청구항 9에 있어서, 상기 에세리키아 속 미생물은 서열번호 9로 표시되는 트립토판아미나제(tryptophanase, tnaA)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된, 미생물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미생물을 이용하여 α -산탈렌을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 백단향 오일은 기분 좋은 나무향으로 화장품 첨가소재로 폭넓게 활용된다. 피부암에 대한 치료효능을 갖고도 있다. 전통적으로 백단향 오일은 생육속도가 느린 향기나무인 matured Indian sandalwood (*Santalum album* L.)의 heartwood에서 증기 추출을 통해서 얻어진다. 이런 재래적인 추출 방식은 낮은 생산 수율과 귀중한 백단향 나무의 과도한 벌목의 문제를 유발한다. 증가하는 상기의 고부가 백단향 오일의 수요를 충족시키기 위해서는 경제적인 대량생산 생물공정 기술의 개발이 필요하다.

[0003] α -santalene은 천연 백단향 오일의 50% 이상을 차지하는 α -santalol의 전구체이다. 이 물질의 구성 단위 물질은 isopentenyl pyrophosphate (IPP)와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)으로 mevalonate (MVA) pathway 또는 the 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway를 통해서 만들어진다. IPP와 DMAPP는 Farnesyl pyrophosphate (FPP) synthase에 의해 중합되어 FPP가 되고, 이것은 sesquiterpene synthase들에 의해서 재배열과 고리화의 과정을 거쳐서 α -santalene과 같은 다양한 sesquiterpenes을 생성한다(도 1).

[0004] 대사 공학과 합성 생물학에서의 진보는 미생물 숙주에서 터페노이드와 같은 천연 화합물을 대량생산하는 것을 가능하게 했다. 하지만 생합성 경로에서의 대사 균형의 붕괴는 독성 또는 저해 중간대사산물의 축적과 숙주 미생물의 대사 부담을 유발한다. 예를 들면 효모의 MVA 경로가 도입된 재조합 대장균에서 대사불균형에 의한 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)의 축적은 생육 저해를 유발한다. 이것은 HMG-CoA reductase의 활성조절 또는 다른 종의 유전자로 대체해서 해결을 할 수 있다. 숙주 미생물의 생육저해를 유발하는 IPP, DMAPP and/or FPP의 세포 내 축적은 MVA 경로를 통해 대량 생합성 된 상기 대사물질들이 terpene olefin으로 원활한 전환이 되지 않기 때문이다.

[0005] 따라서 터페노이드 생합성 경로의 대사균형을 맞추기 위해서 오페론을 구성하는 다수의 유전자들의 발현을 Ribosome binding sites (RBS) 또는 other RNA regulators들의 조작을 통해서 정교하게 조절을 하는 것이 요구된다.

[0006] 한국공개특허 제2004-32349호에는 고농도의 트리터페노이드를 함유하는 미소화 리포좀 및 그 제조방법이 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2004-32349호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 미생물을 이용하여 α -산탈렌을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 제1유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 제2유전자가 도입된 에세리키아 속 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 α -산탈렌의 생산 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따른 에세리키아 속 미생물은 상기 파네실 파이로포스페이트(FPP) 신타제를 코딩하는 유전자로 형질 전환되어 파네실 파이로포스페이트 신타제를 발현하므로, IPP로부터 FPP를 생산할 수 있다. 그리고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자로 형질전환되어 α -산탈렌 신타제를 발현하므로, FPP로부터 α -산탈렌을 생산할 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 파네실 파이로포스페이트를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 또한, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0013] 상기 유전자가 도입되는 모균주는 야생형 에세리키아 속 미생물 또는 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 야생형 에세리키아 속 미생물은 MEP(2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) 경로를 가지고 있어, 이소펜테닐 파이로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP)와 디메틸알릴 파이로포스페이트(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)를 생산할 수 있다.

[0014] 형질전환된 에세리키아 속 미생물은 내재적 MEP 경로 상의 유전자, 외래 MVA(mevalonate) 경로 상의 유전자, 또는 이들의 조합이 도입된 것일 수 있다. MVA 경로 상의 유전자는 아세틸-CoA로부터 IPP를 생산하는데 관여하는 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자일 수 있다.

[0015] 야생형 에세리키아 속 미생물은 예를 들면, 대장균일 수 있다. 상기 대장균은 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0016] 상기 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 수행될 수 있다.

[0017] 친유성 물질이 포함된 배지 상에서 α -산탈렌 생산능을 가진 미생물을 배양하면 친유성 물질이 미생물과 접촉하여 그 주위를 둘러싸게 되고, 소수성을 띄는 α -산탈렌은 주위의 친유성 물질과의 상호 인력에 따라 친유성 물질상으로 흡수되게 됨으로써 α -산탈렌을 효과적으로 수득할 수 있다.

[0018] 상기 친유성 물질은 소수성인 α -산탈렌과 소수성 상호 작용을 할 수 있도록 친유성을 가지는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 탄소수 8 내지 50의 유기 화합물일 수 있다.

[0019] 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물, 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합일 수 있다:

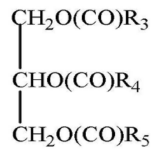
[0020] [화학식 1]

[0021] R1(CO)OR2

[0022] (식 중, R1 및 R2는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),

[0023]

[화학식 2]



[0024]

[0025]

(식 중, R₃, R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).

[0026]

탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물은 직쇄 알칸, 분지 알칸, 시클릭알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 알칸 화합물은 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알칸 화합물일 수 있다.

[0027]

직쇄 알칸은 탄소수 8 (옥탄), 10 (데칸), 12 (도데칸), 14 (테트라데칸), 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0028]

분지 알칸은 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 분지 알칸은 테르펜 화합물의 포화된 유사체(analogue)일 수 있다. 예를 들면, 피토스쿠알란일 수 있다.

[0029]

직쇄 알칸, 분지 알칸, 및 시클릭 알칸의 조합은 미네랄 오일일 수 있다. 미네랄 오일은 비식물성 원료(미네랄) 유래의 탄소 수 15 내지 40의 알칸의 혼합물일 수 있다. 탄소수 15 내지 40의 알칸은 탄소수 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40의 알칸의 2 이상의 혼합물일 수 있다.

[0030]

미네랄 오일은 경량 미네랄 오일 또는 중량 미네랄 오일일 수 있다.

[0031]

경량 미네랄 오일(light mineral oil)은 일반적으로 밀도가 880~920kg/m³이며 20℃에서 비중이 820~860 kg/m³, 40℃에서 유동성 점도가 14~18cst를 가지는 물질이다.

[0032]

중량 미네랄 오일(heavy mineral oil)은 일반적으로 밀도가 920kg/m³이며 20℃에서 비중이 860~900 kg/m³, 40℃에서 유동성 점도가 65~85cst인 물질이다.

[0033]

화학식 1의 화합물에서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다. R₁과 R₂는 각각 독립적으로 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다.

[0034]

R₁과 R₂는 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다. R₁이 탄소수 13의 직쇄 알킬이고 R₂가 이소프로필일 수 있다.

[0035]

또한, R₁이 에틸헥틸기이고 R₂가 세틸일 수 있다.

[0036]

화학식 2의 화합물에서, R₃, R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다.

[0037]

R₃, R₄, 및 R₅는 각각 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다. 상기 화합물은 예를 들면, R₃, R₄, 및 R₅가 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다.

[0038]

친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸

에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [0039] 친유성 물질은 생산되는 α -산탈렌을 안정화시키는 것뿐만 아니라, 미생물에 의한 α -산탈렌의 생산성을 증가시킬 수 있다.
- [0040] 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 이루어질 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지 또는 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다.
- [0041] 배지의 탄소원으로는 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤, 글루코스 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 예를 들면, 글리세롤이 탄소원으로 사용될 수 있다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 미네랄은 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0042] 배양이 발효조에서 이루어지는 경우 글루코스를 배지의 탄소원으로 사용하는 것이 좋다. 시험관 배양의 경우에는 글리세롤을 배지의 탄소원으로 사용하는 것이 좋다.
- [0043] 미생물 배양 배지 내 상기 탄소원, 질소원 및 미네랄 각각은 예를 들면, 리터당 10 내지 100 g, 5 내지 40 g 및 0.5 내지 4 g 을 이용할 수 있다.
- [0044] 상기의 통상의 배양 배지에 첨가되는 비타민은 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 비타민은 통상의 배양 배지에 상기에서 언급된 탄소원, 질소원, 미네랄 등과 함께 첨가되거나, 멸균하여 준비된 배지에 별도로 첨가될 수 있다.
- [0045] 배양은 통상의 대장균 배양 조건으로 수행될 수 있다. 배양은 예를 들어 약 15-45℃, 예를 들면, 15-44℃, 15-43℃, 15-42℃, 15-41℃, 15-40℃, 15-39℃, 15-38℃, 15-37℃, 15-36℃, 15-35℃, 15-34℃, 15-33℃, 15-32℃, 15-31℃, 15-30℃, 20-45℃, 20-44℃, 20-43℃, 20-42℃, 20-41℃, 20-40℃, 20-39℃, 20-38℃, 20-37℃, 20-36℃, 20-35℃, 20-34℃, 20-33℃, 20-32℃, 20-31℃, 20-30℃, 25-45℃, 25-44℃, 25-43℃, 25-42℃, 25-41℃, 25-40℃, 25-39℃, 25-38℃, 25-37℃, 25-36℃, 25-35℃, 25-34℃, 25-33℃, 25-32℃, 25-31℃, 25-30℃, 27-45℃, 27-44℃, 27-43℃, 27-42℃, 27-41℃, 27-40℃, 27-39℃, 27-38℃, 27-37℃, 27-36℃, 27-35℃, 27-34℃, 27-33℃, 27-32℃, 27-31℃ 또는 27-30℃에서 수행될 수 있다.
- [0046] 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [0047] 배양의 일 예에 있어서, 배양은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 글리세롤은 배지 중의 유일한 탄소원일 수 있다. 0.5-5.0(w/v), 예를 들면, 0.5-4.5(w/v), 0.5-4.0(w/v), 0.5-3.5(w/v), 0.5-3.0(w/v), 0.5-2.5(w/v), 0.5-2.0(w/v), 1-5.0(w/v), 1-4.5(w/v), 1-4.0(w/v), 1-3.5(w/v), 1-3.0(w/v) 또는 1-2.5(w/v)의 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배지는 글리세롤 및 아라비노스가 첨가된 YT 배지일 수 있다. YT 배지는 1.6중량% 트립톤, 1중량% 효모 추출물 및 0.5 중량% NaCl을 포함할 수 있다.
- [0048] 배양은 친유성 물질 존재 하의 배양 배지에서, 예를 들면 배지 표면에 친유성 물질인 도데칸 상(dodecane phase)을 위치시킨 상태로 수행될 수 있다. 배양은 교반되는 상태에서 수행될 수 있다.
- [0049] 교반되는 경우, 100 내지 300rpm, 예를 들면, 100 내지 280rpm, 100 내지 260rpm, 100 내지 240rpm, 100 내지 220rpm, 100 내지 200rpm, 100 내지 180rpm, 100 내지 160rpm, 100 내지 140rpm, 100 내지 120rpm, 120 내지 300rpm, 120 내지 280rpm, 120 내지 260rpm, 120 내지 240rpm, 120 내지 220rpm, 120 내지 200rpm, 120 내지 180rpm, 120 내지 160rpm, 120 내지 140rpm, 150 내지 300rpm, 150 내지 280rpm, 150 내지 260rpm, 150 내지 240rpm, 150 내지 220rpm, 150 내지 200rpm, 150 내지 180rpm, 140 내지 160rpm, 200 내지 300rpm, 200 내지 280rpm, 200 내지 260rpm, 200 내지 240rpm, 200 내지 220rpm, 또는 150 rpm으로 교반될 수 있다.
- [0050] 교반되는 경우, 상기 친유성 물질, 예컨대 도데칸은 배지 중에서 분산되어 세포와 접촉된다. 친유성 물질은 배지 중에 분산됨으로써 미생물과 접촉하는 면적이 넓어져 배양 중 α -산탈렌을 효율적으로 세포로부터 분리되게 하여 안정화 및/또는 용해시킬 수 있다.
- [0051] 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상 없이 상기 기술한 α -산탈렌을 생산하는 미생물을 배양시켰을 때, α -산탈렌 생

산은 일정 시점에서 최고치를 나타내고 그 이후에 감소할 수 있다. 이는 미생물 성장의 정체 상태 동안 추가적인 α -산탈렌 합성이 중단되는 반면, 세포 내에서 그의 산화적 분해가 일어나기 때문일 수 있다.

[0052] 친유성 물질, 예컨대 데케인 상의 존재 하에 배양 배지에서 상기 미생물을 배양시키게 되면 생산된 α -산탈렌이 세포 내에서 분해되기 전에 친유성 물질, 예컨대 데케인 상에 흡수되게 되어 α -산탈렌 생산량을 향상시킬 수 있다.

[0053] 상기 친유성 물질, 예컨대 데케인 상은 에세리키아 속 미생물의 세포 성장에 영향을 미치지 않고, 소수성 α -산탈렌의 추출을 위해 소수성이고, 낮은 휘발성을 갖는 것일 수 있다.

[0054] 배지 대 친유성 물질의 부피비는 특정 범위의 비로 한정되지 않고, 예컨대, 배지 대 친유성 물질의 부피비가 1:0.1-3.0, 1:0.2-3.0, 1:0.5-3.0, 1:1.0-3.0, 1:1.5-3.0, 1:2.0-3.0, 1:2.5-3.0, 1:0.2-2.5, 1:0.2-2.0, 1:0.2-1.5, 1:0.2-1.0, 1:0.2-0.5, 1:0.5-2.5, 1:0.5-2.0, 1:0.5-1.5, 1:0.5-1.0, 1:0.8-2.5, 1:0.8-2.0, 1:0.8-1.5, 1:0.8-1.2, 1:0.8-1.0 등이 가능하다.

[0055] 일 구체예에 따르면 상기 배양하는 단계에서 상기 배지는 약 2.0% 농도의 글리세롤을 포함하고, 상기 에세리키아 속 미생물은 대장균 DH5 α 또는 MG1655이고, 상기 배양하는 단계는 배양액 약 7 ml, 약 29℃에서 배양시키는 것일 수 있다.

[0056] 상기 방법은 또한, 친유성 물질 상으로부터 α -산탈렌을 분리하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 이온교환 크로마토그래피, HPLC 등의 방법에 의하여 분리될 수 있다. 구체적으로, 균체를 회수한 후에 아세톤 등의 용매를 이용한 추출 후에 고순도의 제품을 얻기 위해서는 HPLC 또는 결정화 작업등을 통한 분리정제가 진행될 수 있다.

[0057] 바람직하게, 본 발명에 따른 상기 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자는 α -산탈렌의 생산량을 극대화할 수 있도록, 번역 개시 속도(translation initiation rate)가 특정 범위를 갖도록 조절된 것일 수 있다.

[0058] 예를 들면, 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 100 내지 15,000au이고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 300 내지 20,000au일 수 있다. 보다 바람직하게는 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 500 내지 5,000au이고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 10,000 내지 20,000au일 수 있다.

[0059] 번역 개시 속도의 조절은 상기 각 유전자의 리보솜 결합 부위(ribosome binding site)의 서열을 변경함으로써 조절할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 에세리키아 속 미생물은 외래 MVA 경로 상의 유전자가 더 도입된 것일 수 있다.

[0061] 예를 들면, 서열번호 3의 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 HMG-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자(mvaE), 서열번호 4의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자(mvaS), 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자(mvaK1), 서열번호 6의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자(mvaK2) 및 서열번호 7의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자(mvaD) 및 서열번호 8의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제를 코딩하는 유전자(idi)로 더 형질전환 될 수 있다.

[0062] 외래 MVA 경로 상의 유전자가 더 도입되면 IPP의 생산량이 증가한다. 증가된 IPP는 파네실 파이로포스페이트 신타제에 의해 FPP로 전환되고, FPP는 α -산탈렌 신타제에 의해 α -산탈렌으로 전환되는 바, 이에 따라 α -산탈렌이 현저히 증가한다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 에세리키아 속 미생물은 한국생명공학연구원 생명자원센터(KCTC)에 2014년 8월 8일자로 기탁된 *E. coli* (NA-IS₃₀) (KCTC12648BP)일 수 있다. 상기 균주는 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자 및 MVA 경로 상의 서열번호 3 내지 8로 표시되는 유전자가 도입된 균주로서, α -산탈렌을 현저히 높은 효율로 생산할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에 따른 에세리키아 속 미생물은 트립토판아제(tryptophanase, tnaA)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.

[0065] 본 명세서에 있어서, 용어 "감쇄(attenuation)"는 대상 유전자의 발현이 모균주에 비하여 감소한 것을

나타낸다. 용어 "결실(deletion)"은 대상 유전자의 발현이 상실된 것을 나타낸다.

- [0066] 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다. 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 조절 부의 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다.
- [0067] 트립토판나아제는 L-트립토판을 인돌로 전환하는 효소로서, 트립토판나아제를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실되면 인돌 생산성이 감소하게 된다.
- [0068] 본 발명의 발명자들은 인돌의 생산성과 α -산탈렌의 생산성이 반비례 관계에 있는 것에 착안하여 트립토판나아제(tryptophanase, tnaA)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실시키는 것을 고안한 것으로서, 이에 의해 인돌 생산능이 감소하게 되면 α -산탈렌의 생산능이 더욱 증가하게 된다. 뿐만 아니라, 이에 의해 분변 냄새의 원인 물질인 인돌이 향기 물질인 α -산탈렌에 불순물로 혼입되는 것을 방지할 수 있다.
- [0069] 트립토판나아제(tryptophanase, tnaA)를 코딩하는 유전자는 서열번호 9로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자(ispA) 및 α -산탈렌 신타제(sts)를 코딩하는 유전자로 형질전환된 에세리키아 속 미생물을 제공한다.
- [0071] 모균주는 야생형 에세리키아 속 미생물 또는 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 야생형 에세리키아 속 미생물은 MEP(2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) 경로를 가지고 있어, 이소펜테닐 파이로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP)와 디메틸알릴 파이로포스페이트(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)를 생산할 수 있다.
- [0072] 형질전환된 에세리키아 속 미생물은 내재적 MEP 경로 상의 유전자, 외래 MVA(mevalonate) 경로 상의 유전자, 또는 이들의 조합이 도입된 것일 수 있다. MVA 경로 상의 유전자는 아세틸-CoA로부터 IPP를 생산하는데 관여하는 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0073] 야생형 에세리키아 속 미생물은 예를 들면, 대장균일 수 있다. 상기 대장균은 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0074] 본 발명에 따른 파네실 파이로포스페이트를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0075] 바람직하게, 본 발명에 따른 상기 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자 및 α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자는 α -산탈렌의 생산량을 극대화할 수 있도록, 번역 개시 속도(translation initiation rate)가 특정 범위를 갖도록 조절된 것일 수 있다.
- [0076] 예를 들면, 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 100 내지 15,000au이고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 300 내지 20,000au일 수 있다. 보다 바람직하게는 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 500 내지 5,000au이고, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 유전자의 번역 개시 속도가 10,000 내지 20,000au일 수 있다.
- [0077] 번역 개시 속도의 조절은 상기 각 유전자의 리보솜 결합 부위(ribosome binding site)의 서열을 변경함으로써 조절할 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명의 미생물은 α -산탈렌 생산능의 개선을 위해 전술한 서열번호 3 내지 8의 외래 MVA 경로 상의 유전자가 더 도입된 것일 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 에세리키아 속 미생물은 한국생명공학연구원 생명자원센터(KCTC)에 2014년 8월 8일자로 기탁된 *E. coli* (NA-IS₃₀) (KCTC12648BP)일 수 있다. 상기 균주는 파네실 파이로포스페이트 신타제를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자, α -산탈렌 신타제를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자 및 MVA 경로 상의 서열번호 3 내지 8로 표시되는 유전자가 도입된 균주로서, α -산탈렌을 현저히 높은 효율로 생산할 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명의 에세리키아 속 미생물은 α -산탈렌 생산능을 더욱 극대화하기 위해 전술한 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 갖는 트립토판나아제(tryptophanase, tnaA)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.

다.

발명의 효과

[0081] 본 발명은 에세리키아 속 균주로부터 균주 생육 저해 없이 α -산탈렌을 용이하게 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 α -산탈렌의 생합성 경로를 개략적으로 도시한 것이다.

도 2는 FPP synthase (IspA) 와 α -santalene synthase (STS) 유전자로 구성된 산탈렌 생합성 오페론 모식도 (A), FPP synthase (IspA) 와 α -santalene synthase (STS) 유전자의 상이한 RBS 세기 조합으로 구축된 산탈렌 생합성 플라스미드와 MVA 경로 플라스미드 (pSNA)를 도입한 재조합 대장균들의 48시간 배양에서 얻어진 산탈렌 균체비 생산성을 나타낸 것이다.

도 3은 MVA 경로 플라스미드와 *ispA-sts* 유전자의 RBS 세기 조합이 3D인 산탈렌 생합성 플라스미드가 도입된 재조합 대장균 배양시료의 GC(A)와 GC-MS 분석결과(B)를 나타낸 것으로, GC 크로마토그램 피크 중 1번은 α -산탈렌, 2번은 α -bergamotene, 3번은 farnesol, 4번은 indole의 피크이다.

도 4는 *ispA* 유전자와 STS 유전자의 RBS 세기 변화에 따른 발현량을 SDS-PAGE를 통해 확인한 것이다. Con은 유전자가 없는 공벡터로 형질전환된 대조 균주를 나타낸다.

도 5는 산탈렌 생산성과 인돌 생산성의 관계를 나타낸 것이다.

도 6은 야생형(wild type, WT) 대장균과 TnaA 결손(*tnaA*⁻) 대장균에서의 인돌 생성 유무에 대한 발색을 통한 정성적인 분석(A)과 GC를 통한 정량적인 분석(B) 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 TnaA 결손 산탈렌 생산 재조합 대장균(*tnaA*⁻ SN-IS3D)의 균체 생육 (파란색 선)과 산탈렌 생산(붉은색 선) 정도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

실시예

1. 재료 및 방법

(1) 균주 및 배양 조건

[0087] 유전자 클로닝 작업을 위해서 *E. coli* DH5 α (Invitrogen) 균주를 2YT medium (16 g tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g sodium chloride per 1 L)에서 37°C와 250 rpm의 조건에서 진탕 배양하였다.

[0088] 산탈렌 생합성 관련 플라스미드들을 갖는 재조합 *E. coli* DH5 α 를 종균배양하고, 생산배지인 2% (v/v) glycerol 과 100 μ M IPTG를 포함하는 5 mL의 2YT medium 에 2 mL의 decane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 overlay 하고, 초기 OD600가 0.1이 되게 접종하고, 29°C와 250 rpm의 조건 하에서 산탈렌 생산을 위한 진탕배양을 하였다. MVA 하부경로 플라스미드인 pSSN12Didi를 갖는 재조합 대장균의 배양은 다양한 농도의 mevalonate 첨가 하에서 진행하였다.

표 1

플라스미드	특성
pTrc99A (Genbank 허가 번호 M22744, 서열번호 10)	P _{trc} 프로모터 발현 벡터, pBR322 origin, <i>lacI</i> ^d , <i>Amp</i> ^r

pT-ispA _x	ispA _x (x = 1, 2, 3, 4, and 5 of RBS)를 포함하는 pTrc99A 벡터
pT-STs _y	sts _y (y = A,B,C,D of RBS)를 포함하는 pTrc99A 벡터
pT-IS _{xy}	ispA _x (x = 0, 1, 2, 3, 4, 5; x가 0인 경우 ispA를 포함하지 않은 것임) 및 sts _y (y = A, B, C, D)를 포함하는 pTrc99A 벡터
pSNA	pSTV28 벡터(서열번호 11); lacZ; Cm ^r ; <i>E. faecalis</i> 유래 mvaE 및 mvaS; <i>S. pneumonia</i> 유래 mvaK1, mvaK2 및 mvaD; <i>E. coli</i> 유래 idi를 포함하는 P _{lac} 발현 벡터
pSSN12Didi	pSTV28 벡터; lacZ; Cm ^r ; <i>S. pneumonia</i> 유래 mvaK1, mvaK2 및 mvaD; <i>E. coli</i> 유래 idi를 포함하는 P _{lac} 발현 벡터

표 2

[0090]

효소명	유전자	유전자 서열 (Genbank 허가번호)
엔테로코커스 패칼리스 (<i>Enterococcus faecalis</i>) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제	mvaE	서열번호 3(AF290092)
엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제	mvaS	서열번호 4(AF290092)
스트렙토코커스 뉴모니에 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) 유래의 메발로네이트 키나제	mvaK1	서열번호 5(AF290099)
스트렙토코커스 뉴모니에 유래의 포스포메발로네이트 키나제	mvaK2	서열번호 6(AF290099)
스트렙토코커스 뉴모니에 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제	mvaD	서열번호 7(AF290099)
대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트(IPP) 이소머라제	Idi	서열번호 8(U00096)

표 3

[0091]

균주	특성
<i>E. coli</i> DH 5 α	F ⁻ , λ ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, φ80, dlac ZΔ15, ΔlacZYA-argF) U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), supE44
<i>E. coli</i> NA-IS _{xy}	pT-IS _{xy} 및 pSNA를 포함하는 <i>E. coli</i> DH 5 α
<i>E. coli</i> SN-IS _{xy}	pT-IS _{xy} 및 pSSN12Didi를 포함하는 <i>E. coli</i> DH 5 α
<i>E. coli</i> tnaA ⁻	tnaA가 결실된 <i>E. coli</i> DH 5 α
<i>E. coli</i> tnaA ⁻ NA-IS _{xy}	pT-IS _{xy} and pSNA를 포함하는 <i>E. coli</i> tnaA ⁻

표 4

[0092]

프라이머	서열	서열번호
IspA_1-F	GGAATTCtcacATGGACTTCCGCAGC	12
IspA_2-F	GGAATTCagccctaaggaaccaatATGGACTTCCGCAGC	13
IspA_3-F	GGAATTCataaggtaaaggtATGGACTTCCGCAGC	14
IspA_4-F	GGAATTCtgagggttaactaATGGACTTCCGCAGC	15
IspA_5-F	GGAATTCagggggtaaagATGGACTTCCGCAGC	16
IspA-R	GGGATCCTTATTATTACGCTGGATGTAG	17
STS_A-F	CGGATCCgcgagtcctccatccaaATGTCAACTCAACAAGTTTCATC	18
STS_B-F	CGGATCCttaagtaaccgatcATGTCAACTCAACAAGTTTCATC	19
STS_C-F	CGGATCCcaagtaggtcgccatATGTCAACTCAACAAGTTTCATC	20
STS_D-F	CGGATCCagaggtaataaaccATGTCAACTCAACAAGTTTCATC	21
STS-R	GCGTCGACTTAATCGTCAAGCTTAACGGG	22
tnaA-F	TGAAGAAGTTGGTCCGAATAACGTG	23

tnaA-R	CTTGTATTCTGCTTCACGCTGCTT	24
cysG-F	TTGTCGGCGGTGGTGATGTC	25
cysG-R	ATGCGGTGAACGTGTGAATAAACG	26

(2) α-산탈렌 합성 오페론의 제조

DMAPP와 IPP로부터 α-santalene 생합성을 하기 위해서 *E. coli*의 FPP synthase (IspA)를 코딩하는 유전자(서열번호 1)와 *Clausena lansium*의 α-santalene synthase (STS)를 코딩하는 유전자(서열번호 2)로 구성된 α-santalene synthesis operon를 구축하였다.

대장균의 genomic DNA를 주형으로 *ispA* 유전자를 PCR 클로닝을 하고, 이 때에 PCR primers로 RBS 세기가 다른 forward primers로 *ispA*_1-F, *ispA*_2-F, *ispA*_3-F, *ispA*_4-F, *ispA*_5-F와 reverse primer로 *ispA*-R을 사용하였다.

*Clausena lansium*의 α-santalene synthase (STS) 유전자도 PCR 클로닝을 하였고, 이 때에 PCR primers로 RBS 세기가 다른 forward primers로 *sts*_A-F, *sts*_B-F, *sts*_C-F, *sts*_D-F와 reverse primer로 *sts*-R을 사용하였다. RBS 세기가 다른 5개의 *ispA* 유전자 조각들(*ispA*_(1-5))과 4개의 *sts* 유전자 조각들(*ispA*_(A-D))을 PTrc99A 발현벡터의 *EcoRI*-*Bam*HI과 *Bam*HI-*Sal*II의 제한효소 부위에 각각 삽입해서 24종의 α-santalene synthesis operons IS_{xy} (*IspA*의 RBS 세기 표시, x = 0, 1, 2, 3, 4, 5와 STS의 RBS 세기표시, y = A, B, C, D)를 구축하였다. 이들 오페론은 IPTG-inducible *trc* promoter에 의해서 발현된다.

(3) α-산탈렌의 정제 및 정량

배지에 데케인을 도포하는 2상 배양에서 생산된 산탈렌 분석을 위해서 데케인 층을 gas chromatography (GC)와 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 분석을 실시하였다. GC 분석은 19091N-133 HP-Innowax column (30 m; internal diameter, 0.25 mm; film thickness, 250 ㎖)이 장착된 GC/FID (Agilent Technologies 7890A)를 이용하였다. 컬럼 오븐 온도는 초기 80℃에서 1 min, 그리고 10℃/min의 속도로 250℃까지 올리고 1분 동안 유지하였다. 이동상 기체로 질소를 39 psi의 압력으로 흘려주고, detector temperature는 260℃로 유지하였다. GC-MS 분석은 GCMS-QP2010 Ultra (SHIMADU, Tokyo, Japan)를 사용하였고 이동상 기체로는 helium을 이용하였다.

(4) 메발로네이트와 이소프레닐 파이로포스페이트의 측정

메발로네이트는 배양액을 산성화시켜서 메발로노락톤으로 전환시킨 후에 분석을 하였다. 상세하게는 필터로 여과한 배양액을 3 M HCl로 pH 2로 조정하고, 45℃에서 1 시간 반응시킨 후에 무수 Na₂SO₄를 가하여 중화하고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 상기 과정을 통해 처리된 시료는 19091N-133 HP-Innowax column (30 m; internal diameter, 0.25 mm; film thickness, 250 ㎖)이 장착된 GC/FID (Agilent Technologies 7890A)를 이용하여 메발로네이트 정량 분석을 하였다. 분석 온도는 초기에 180℃에서 1 min 동안 유지하고, 2.5℃/min의 속도로 200℃까지 증가시킨 후에 2 min 동안 유지하였다. 또한 검출기의 온도는 260℃로 유지하였다.

세포 내 이소프레닐 파이로포스페이트 분석을 위해서 균체를 초음파 분쇄하고 isopropanol/100 mM NH₄HCO₃ (1:1 v/v, pH 7.8) 용매로 추출하였다. 추출된 분석 시료를 ACQUITY UPLCTM system (Waters, Milford, MA)과 negative ion mode로 작동하는 Waters Q-TOF Premier (Micromass MS Technologies, Manchester, UK)을 이용하여 정량분석을 진행하였다.

(5) 배양액 중의 인돌 분석

인돌의 정성분석은 배양액과 Kovac's reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 혼합한 후에 배양액 상층부의 알코올 층의 색이 적자색으로 변하는 것으로 인돌 생성을 확인하였다. 배양액 중의 인돌 정량분석은 2상 배양에서 데케인 층을 회수해서 GC와 GC-MS를 이용해서 분석하였다.

(6) 정량 PCR 분석

RNeasyTM mini Kit (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용해서 대장균으로부터 total RNA 분리하였다. 분리한 RNA 시료를 RNase-Free DNase Set (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용해서 DNase digestion을 함으로써 잔존하는 DNA들을 모두 제거하였다. Rotor-GeneTM SYBRTM Green RT-PCR Kit (Qiagen, Seoul, Korea)를 이용해서 Rotor-gene Q cyclor (Qiagen, Seoul, Korea)에서 Reverse transcription 과 Quantitative PCR 을 수행하였다. 대조구로 housekeeping gene 인 *cysG* 를 이용해서 목표 유전자들의 전사량을 분석하였다.

2. 결과

(1) 대장균에서의 α-산탈렌 고생산을 위한 *ispA* 와 *sts* 유전자들의 RBS 세기 조합 최적화

대장균에서 α-santalene 을 생산하기 위해서 FPP synthase (IspA) 와 α-santalene synthase (STS)를 코딩하는 유전자를 IPTG-inducible *trc* promoter에 의해 발현되는 단일 오페론으로 구축하였다(도 2 (A)).

E. coli DH5 α 숙주에 상기 오페론과 acetyl-CoA로부터 DMAPP and IPP를 생합성 공급하는 MVA 경로 플라스미드 (pSNA)를 함께 도입하고 산탈렌 생산을 유도하였다(도 2 (A)).

재조합 균주에서 산탈렌이 생산되는 것을 확인하였고, 산탈렌의 균체비생산성(mg/L/OD600)은 *ispA* 유전자의 RBS 로 3번 (번역 개시 속도 1500au)과 *sts* 유전자의 RBS로 D번 (번역 개시 속도 10,000au)를 사용했을 때에 25.1 mgL⁻¹OD⁻¹로 극대화가 되었다. 상기 재조합 균주는 *E. coli* (NA-IS_{3D})로 명명하였다. 해당 균주는 한국생명공학연구원 생명자원센터(KCTC)에 2014년 8월 8일자로 기탁하였다(KCTC12648BP).

이 균주의 비생산성은 *ispA* 유전자 없이 *sts* 유전자만 A번 (번역 개시 속도 300au) RBS로 발현시키는 플라스미드로 형질전환된 재조합 균주 (NA-IS_{0A})에 비해서 약 40배 이상 증가하였다.

(2) 재조합 균주 배양 시료의 GC와 GC-MS 분석 결과

상기 재조합 균주의 배양시료에서 α-산탈렌이 생산되는 것을 확인하기 위해 GC와 GC-MS 분석을 수행하였고, 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3을 참조하면, 배양시료에 아주 미량의 α-산탈렌 유도체들인 α-bergamotene, β-santalene, α-exo-bergamotene의 존재를 확인하였다. 도 3에서 1번은 α-산탈렌, 2번은 α-bergamotene, 3번은 farnesol, 4번은 indole의 피크를 나타낸다.

상기 화합물 중에서 α-산탈렌이 차지하는 비율은 90%로 매우 높은 비중을 차지하고 있다. 또한 MVA 경로와 IspA만을 과발현시켰을 때에 다량 생성되는 farnesol은 상기의 산탈렌 생산 균주에서는 미량만이 생성이 되었다.

(3) 유전자 *ispA* 와 *sts* 의 RBS 세기 증가에 따른 해당 단백질의 발현량 변화 확인

E. coli (NA-IS_{3D})에서 유전자 *ispA* 와 *sts* 의 RBS 세기 증가에 따른 해당 단백질의 발현량 증가를 SDS-PAGE를 통하여 검증하였다(도 4).

도 4 (A)는 IspA 단백질의 RBS 세기에 따른 발현량, 도4 (B)는 sts 단백질의 RBS 세기에 따른 발현량을 나타낸 것이고, Con은 유전자를 포함하지 않는 공벡터로 형질전환된 대조구를 나타낸다.

이를 참조하면, *ispA*, *sts* 유전자의 RBS 세기가 증가할수록, 해당 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

(4) α-산탈렌과 인돌 생산성과의 관계 확인

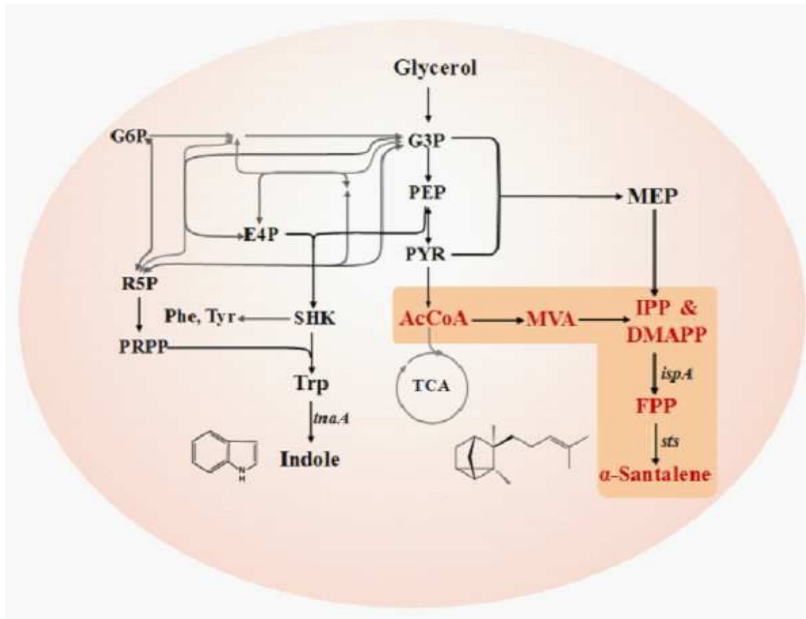
- [0121] *E. coli* (NA-IS_{3D}) 배양 시료에서 GC/GC-MS 분석을 통해서 대장균의 대사 부산물인 인돌의 생성이 관찰되었다 (도 3). 인돌의 생성과 산탈렌의 생산과의 관계를 조사하기 위해서 다양한 산탈렌 생산성을 갖는 재조합 균주들에서의 인돌 생산량을 측정하고 두 물질간의 상관관계를 그래프로 표시하였다(도 5).
- [0122] 도 5에서 붉은색 점들로 표시된 산탈렌 생산성이 높은 경우에는 인돌의 생산이 적게 관찰되었고, 반대로 파란색 점들로 표시된 산탈렌 생산성이 낮은 경우에는 인돌의 생성이 높게 관찰되어서, 두 물질의 생산은 서로 반비례 관계에 있는 것으로 파악되었다.
- [0123] 또한 인돌은 사람의 분변 냄새의 원인물질로 향기물질인 산탈렌 생산과정의 불순물로 혼입되는 것은 바람직하지 않기 때문에 인돌 생성을 차단하기 위해서 *tnaA*를 코딩하는 유전자(서열번호 9)를 결손시켰다.
- [0124] 도 6에 나타낸 바와 같이 인돌 생성 유무에 대한 발색반응에서 야생형 대장균은 인돌의 존재로 붉은색을 나타내었고, GC를 통한 정량분석에서도 60 mg/L 이상의 인돌 생성이 관찰되었다. 그러나, TnaA 결손(*tnaA*⁻) 대장균에서의 인돌 생성은 전혀 없는 것으로 확인되었다.
- [0125] TnaA 결손(*tnaA*⁻) 대장균에 MVA 경로 플라스미드(pSNA)와 산탈렌 생합성 플라스미드(pT-IS_{3D}, RBS 3번의 IspA와 RBS D번의 STS를 갖는 pTrc99A 발현벡터)를 도입해서 형질전환시킨 재조합 대장균(*tnaA*⁻ NA-IS_{3D})의 배양 결과도 도 7에 표시하였다.
- [0126] 도 7에서 파란색 선은 균체 생육 정도를, 붉은색 선은 산탈렌 생산 정도를 나타내는 것으로서, 인돌 생성은 관찰되지 않았고, 산탈렌 생산량은 기존 재조합 대장균(NA-IS_{3D})에 비해서 약 1.5배 증가한 600 mg mg L⁻¹를 얻을 수 있었다.

수탁번호

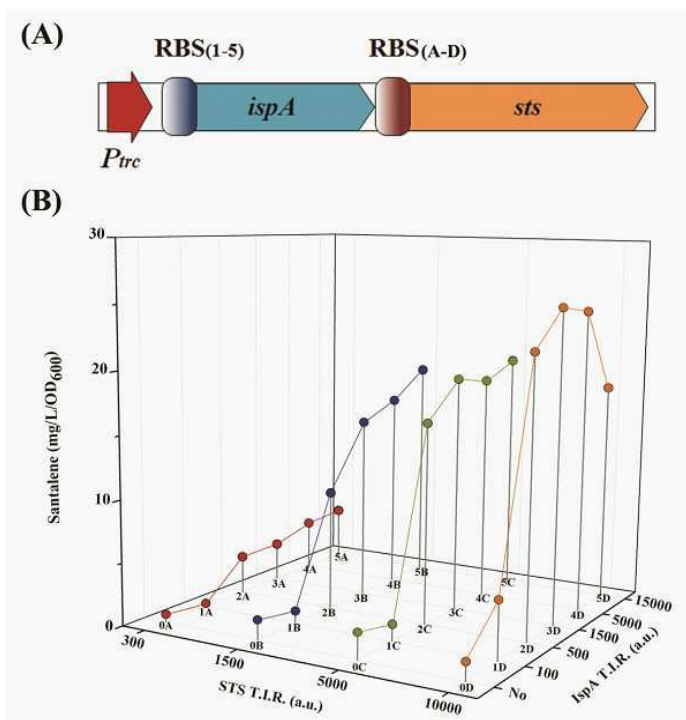
- [0127]
- 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- 수탁번호 : KCTC12648BP
- 수탁일자 : 20140808

도면

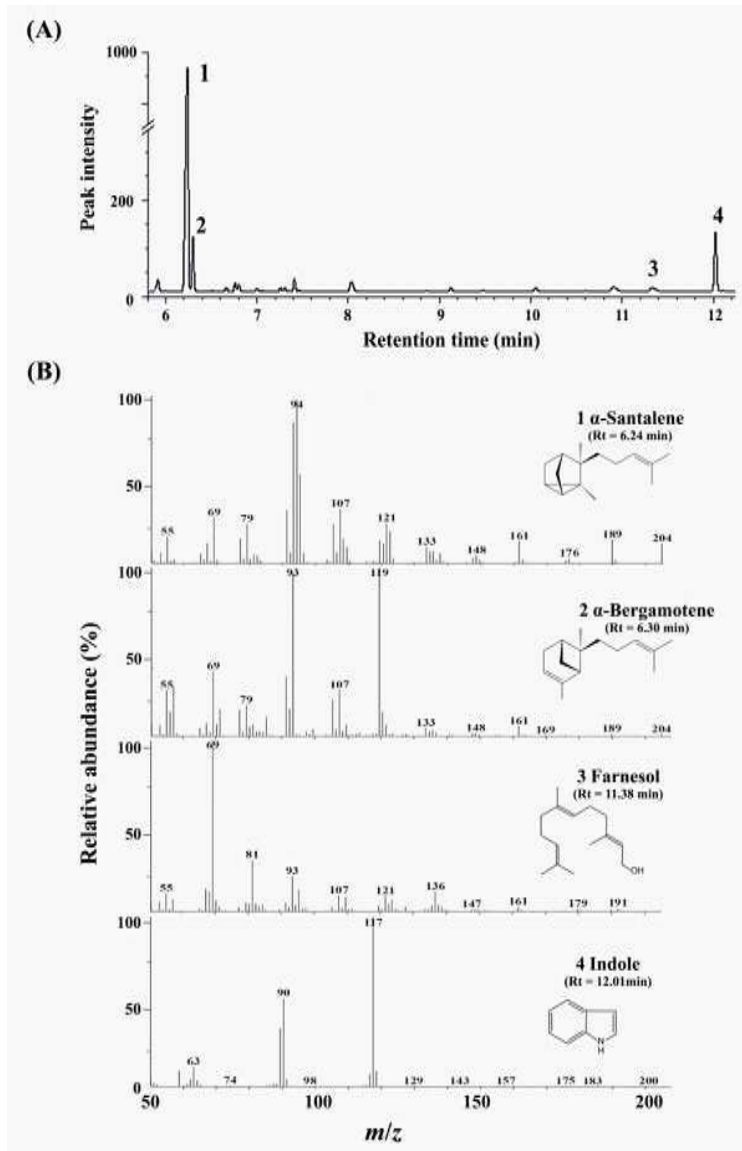
도면1



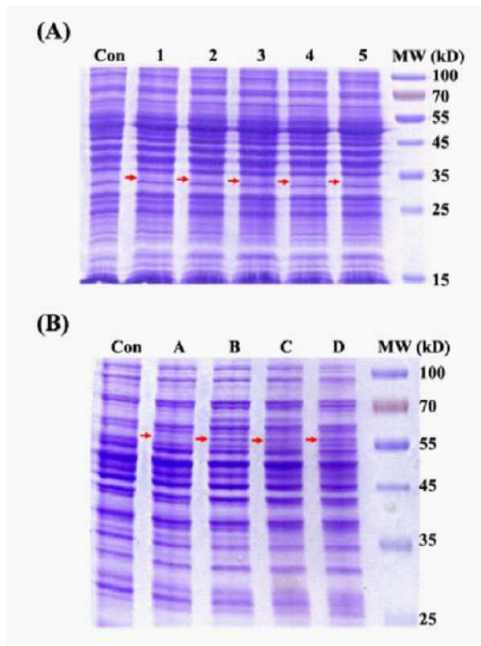
도면2



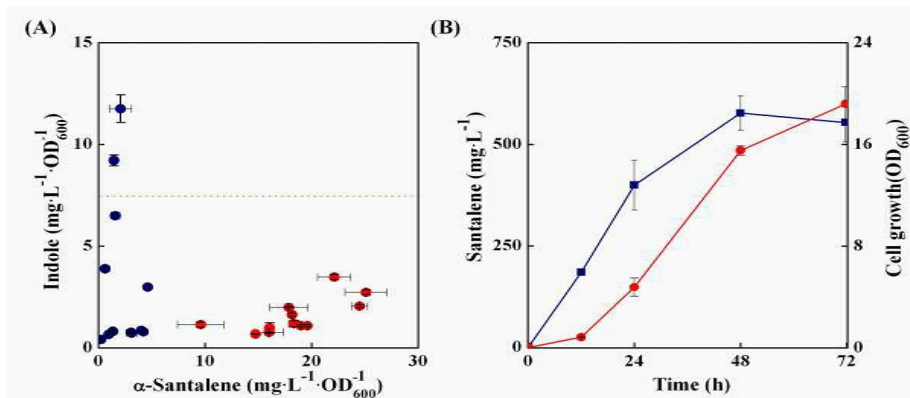
도면3



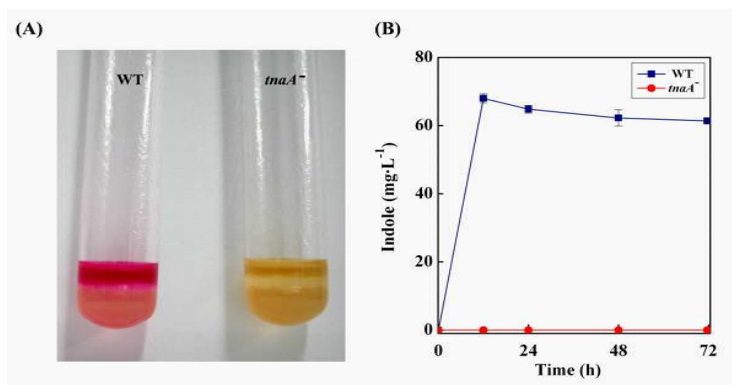
도면4



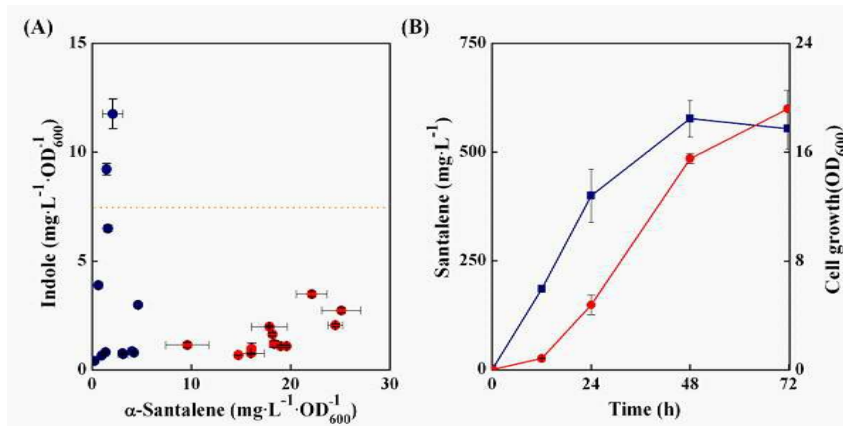
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> Gyeongsang National University Office of Academy and Industry Collaboration
- <120> Method of producing alpha santalene
- <130> P2014-382
- <160> 26
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 900
- <212> DNA
- <213> eschericia coli
- <400> 1

atggactttc cgcagcaact cgaagcctgc gttaagcagg ccaaccaggc gctgagccgt 60
 tttatcgccc cactgccctt tcagaacact cccgtggctc aaaccatgca gtatggcgca 120
 ttattaggtg gtaagcgctt gcgaccttc ctggtttatg ccaccggtca tatgttcggc 180

gttagcacia acacgttgga cgcacccgct gccgccgttg agtgtatcca cgcttactca 240
 ttaattcatg atgatttacc ggcaatggat gatgacgac tgcgtcgagg tttgccaacc 300
 tgccatgtga agtttggcga agcaaagcgc attctcgctg gcgacgcttt acaaagcgtg 360
 gcgttctcga ttttaagcga tgccgatatg ccggaagtgt cggaccgca cagaatttcg 420
 atgatttctg aactggcgag cgccagtgtt attgccgaa tgtgcggtgg tcaggcatta 480
 gatttagacg cggaaggcaa acacgtacct ctggacgcgc ttgagcgat tcatcgatcat 540
 aaaaccggcg cattgattcg cgccgccgtt cgccttggtg cattaagcgc cggagataaa 600

ggacgtcgtg ctctgccggt actcgacaag tatgcagaga gcatcgccct tgccttcag 660
 gttcaggatg acatcctgga tgtggtggga gatactgcaa cgttgggaaa acgccagggt 720

gccgaccagc aacttggtaa aagtacctac cctgcacttc tgggtcttga gcaagcccgg	780
aagaaagccc gggatctgat cgacgatgcc cgtcagtcgc tgaacaact ggctgaacag	840
tcactcgata cctcggcact ggaagcgcta gcggactaca tcaccagcg taataataa	900
	900
<210> 2	
<211> 1656	
<212> DNA	
<213> Clausena lansium	
<400> 2	
atgtcaactc aacaagtttc atcagagaac attgttcgta acgtgcgaa tttccatcct	60
aatatatggg gaaaccatctt cctcacatgt cttctcaga cgattgatag ttggactcaa	120
cagcaccaca aagaactgaa agaagagggtg aggaaaatga tgggtgtctga tgcaataaaa	180
cctgcccaga gattgcgctt gattgatact gtccaaaggc taggtgtggc ttaccacttt	240
gaaaaggaga ttgatgatgc attggagaaa ataggtcatg acccttttga tgataaagat	300
gatctctaca ttgtctctct ttgttttcga ttgtgaggc agcatggaat taagatatca	360
tgatgatgtt ttgagaagtt taaagatgac gatggaaaat tcaaggcatc attgatgaat	420
gatgttcaag gcatgctaag tttatatgag gcagcacacc tagccattca cggagaagat	480
attttagatg aagcaattgt tttcacgacc actcacctta agtcaacggt atctaattct	540
cctgtaaact ctacttttgc tgaacaaata cgtcattctc tcagagtcc tctccgtaaa	600
gctgtaccta gggttagatc gaggtatttc ttggatatct attcaagaga tgatttgcac	660
gataaaactt tgcctaattt cgcaaagtta gactttaata tactacaagc aatgcaccag	720
aaggaagcaa gtgagatgac caggtgtgtg agagattttg acttccttaa aaagctgcct	780
tatataagag acagagtcgt ggagctatat ttttgattc tgggtggagt gtcttatcag	840
cccaaattca gactggttag aatttttttg tccaaaataa tatgccttga gaccctcgta	900
gatgatacat ttgacgccta cgggtacttt gacgagctcg caatctttac tgaagcagtt	960
acaagatggg accttgcca cagagatgca ctaccagaat acatgaaatt catcttcaag	1020
acactcattg atgtctacag tgaagctgag caagaactgg caaaggaagg gagatcatal	1080
agcatacact atgcaatagc atcgttccaa gaactagtta tgaagtactt ctgcgaagcc	1140
aagtgggtta ataaaggta tgttccgagc ctggacgatt ataaatcagt ttcattaaga	1200
agtatcggtt tttaccgat agcggtagct tccttcgttt tcatgggtga tattgcaact	1260
aaggaggctt ttgaatggga aatgaataac cctaagatca taatagccgc agaaacgatt	1320

ttcagattcc tggatgacat agcaggccat aggtttgagc aaaagagaga acatagtcca	1380
tcagctattg aatgctacaa gaatcaacat ggagtgtctg aggaagaggc agttaaagcg	1440
ttgtcgtagg aagttgctaa tagttggaaa gatataaatg aggagctgct tctcaaccca	1500
atggctattc ctttacctct gcttcagggtg attcttgatc tctcacgttc ggccgatttt	1560
atgtacggta atgctcaaga tcgcttcacg cattcaacga tgatgaaaga ccaagttgat	1620
ttggtgctga aggaccccggt taagcttgac gattaa	1656
<210> 3	
<211> 2412	
<212> DNA	
<213> Enterococcus faecalis	
<400> 3	
atgaaaacag tagttattat tgatgcatta cgaacaccaa ttggaaaata taaaggcagc	60
ttaagtcaag taagtgccgt agacttagga acacatgtta caacacaact tttaaaaaga	120
cattccacta tttctgaaga aattgatcaa gtaatctttg gaaatgtttt acaagctgga	180
aatggccaaa atcccgccagc acaaatagca ataacacagcg gtttatctca tgaaattccc	240
gcaatgacag ttaatgaggt ctgcggatca ggaatgaagg ccgttatttt ggcgaaacaa	300
ttgattcaat taggagaagc ggaagtttta attgctggcg ggattgagaa tatgtcccaa	360
gcacctaata tacaacgatt taattacgaa acagaaagct atgatgcgcc tttttctagt	420
atgatgtacg atgggttaac ggatgccttt agtgggtcaag caatgggctt aactgctgaa	480
aatgtggccg aaaagtatca tgtaactaga gaagagcaag atcaattttc tgtacattca	540
caattaaaag cagctcaagc acaagcagaa gggatattcg ctgacgaaat agccccatta	600
gaagtatcag gaacgcttgt ggagaaagat gaagggttc gccctaattc gagcgttgag	660
aagctaggaa cgcttaaaac agtttttaaa gaagacggta ctgtaacagc agggaatgca	720
tcaaccatta atgatggggc ttctgctttg attattgctt cacaagaata tgccgaagca	780
cacggtcttc cttatttagc tattattcga gacagtgtgg aagtcggtat tgatccagcc	840
tatatgggaa tttcgccgat taaagccatt caaaaactgt tagcgcgcaa tcaacttact	900
acggaagaaa ttgatctgta tgaaatcaac gaagcatttg cagcaacttc aatcgtggtc	960
caaagagaac tggctttacc agaggaaaag gtcaacattt atggtggcgg tatttcatta	1020
ggtcatgcga ttggtgccac aggtgctcgt ttattaacga gtttaagtta tcaattaaat	1080
caaaaagaaa agaaatatgg agtggcttct ttatgtatcg gcggtggctt aggactcgct	1140
atgtacttag agagacctca gcaaaaaaaaa aacagccgat tttatcaaat gagtcttgag	1200

gaacgcctgg cttctcttct taatgaaggc cagatttctg ctgatacaaa aaaagaattt 1260
 gaaaaatacg ctttatcttc gcagattgcc aatcatatga ttgaaaatca aatcagtga 1320
 acagaagtgc cgatgggctg ttgcttacat ttaacagtgg acgaaactga ttatttgta 1380
 ccaatggcga cagaagagcc ctacagtatt gcggctttga gtaatgggtc aaaaatagca 1440
 caaggattta aaacagtga tcaacaacgt ttaatgcgtg gacaaatcgt tttttacgat 1500
 gttgcagacg ccgagtcatt gattgatgaa ctacaagtaa gagaaacgga aatttttcaa 1560

caagcagagt taagttatcc atctatcgtt aaacgcggcg gcggcttaag agatttgcaa 1620
 tatcgtgctt ttgatgaatc attgtatct gtcgactttt tagtagatgt taaggatgca 1680
 atgggggcaa atatcggtta cgctatgttg gaagggtggt ccgagttgtt ccgtgaatgg 1740
 tttgcggagc aaaagatttt attcagtatt ttaagtaatt atgccacgga gtcggttgtt 1800
 acgatgaaaa cggtatttcc agtttcacgt ttaagtaagg ggagcaatgg ccgggaaatt 1860
 gctgaaaaaa ttgttttagc ttcacgtat gcttcattag atccttatcg ggcagtcacg 1920
 cataacaaag ggatcatgaa tggcattgaa gctgtcgttt tagctacagg aaatgatata 1980

cgcgctgtta gcgcttcttg tcatgctttt gcggtgaagg aaggctgcta ccaaggtttg 2040
 actagttgga cgctggatgg cgaacaacta attggtgaaa tttcagttcc gcttgcttta 2100
 gccacggttg gcggtgccac aaaagtctta cctaaatctc aagcagctgc tgatttgta 2160
 gcagtgacgg atgcaaaaga actaagtcga gtagtagcgg ctgttggttt ggcacaaaat 2220
 ttagcggcgt tacgggcctt agtctctgaa ggaattcaaa aaggacacat ggctctacaa 2280
 gcacgttctt tagcgatgac ggtcggagct actggtaaag aagttgaggc agtcgctcaa 2340
 caattaaac gtcaaaaaac gatgaaccaa gaccgagcct tggctatttt aaatgattta 2400

agaaaacaat aa 2412

<210> 4

<211> 1152

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<400> 4

atgacaattg ggattgataa aattagtttt tttgtgcccc cttattatat tgatatgacg 60
 gcactggctg aagccagaaa tgtagaccct ggaaaatttc atattggtat tgggcaagac 120
 caaatggcgg tgaaccaat cagccaagat attgtgacat ttgcagccaa tgccgcagaa 180
 gcgatcttga ccaaagaaga taaagaggcc attgatatgg tgattgtcgg gactgagtc 240
 agtatcgatg agtcaaaagc ggccgcagtt gtcttacatc gtttaatggg gattcaacct 300

ttcgtcgcct ctttcgaat caaggaagct tgttacggag caacagcagg cttacagtta	360
gctaagaatc acgtagcctt acatccagat aaaaaagtct tgggttagc agcagatatt	420
gcaaaatatt gattaaattc tggcggtag cctacacaag gagctggggc ggttgcaatg	480
ttagttgcta gtgaaccgag catcttggct ttaaaaggagg ataattgat gctgacgcaa	540
gatatctatg acttttggcg tccaacaggc catccgtatc ctatggtcga tggtcctttg	600
tcaaacgaaa cctacatcca atcttttggc caagtctggg atgaacataa aaaaagaacc	660
ggtcttgatt ttgcagatta tgatgcttta gcgttcata ttccttacac aaaaatgggc	720
aaaaagcct tattagcaaa aatctccgac caaactgaag cagaacagga acgaatttta	780
gcccgttatg aagaagcat catctatagt cgtcgcgtag gaaacttgta tacgggttca	840
ctttatctgg gactcatttc ctttttagaa aatgcaacga ctttaaccgc aggcaatcaa	900
attgggttat tcagttatgg ttctgggtgct gtcgctgaat ttttactgg tgaattagta	960
gctgggttatc aaaatcattt acaaaaagaa actcatttag cactgctaga taatcggaca	1020
gaactttcta tcgctgaata tgaagccatg ttgcagaaa ctttagacac agatattgat	1080
caaacgttag aagatgaatt aaaatatagt atttctgcta ttaataatac cgttcgctct	1140
tatcgaaact aa	1152
<210> 5	
<211> 879	
<212> DNA	
<213> Streptococcus pneumoniae	
<400> 5	
atgacaaaaa aagttgggtg cggtcaggca catagtaaga taattttaat aggggaacat	60
gcggtcgttt acggttatcc tgccatttcc ctgcctcttt tggagggtga ggtgacctgt	120
aaggtagttt ctgcagagag tccttggcgc ctttatgagg aggatacctt gtccatggcg	180
gtttatgcct cactggagta ttgggatatc acagaagcct gcgttcgttg tgagattgac	240
tcggctatcc ctgagaaacg ggggatgggt tcgtcagcgg ctatcagcat agcggccatt	300
cgtgcggtat ttgactacta tcaggctgat ctgcctcatg atgtactaga aatcttggtc	360
aatcgagctg agatgattgc ccatatgaat cctagtgggt tggatgctaa gacctgtctc	420
agtgaccaac ctattcgctt tatcaagaac gtaggattta cagaacttga gatggattta	480
tccgcctatt tgggtattgc cgatacgggt gtttatggtc atactcgtga agccatccaa	540
gtggttcaaa ataagggcaa ggatgcctta ccgtttttgc atgccttggg agaattaacc	600
cagcaagcag aagttgcgat ttcacaaaaa tatgctgaag gactgggact aatcttcagt	660

caagctcatt tacatctaaa agaaattgga gtcagtagcc ctgaggcaga ctttttggtt 720

gaaacggctc ttagctatgg tgctctgggt gccaatga gcggtgggtg gctaggaggt 780

tgtatcatag ccttggtaac caatttgacg caccacaaag aactagcaga aagattagaa 840

gagaaaggag ctgttcagac atggatagag agcctgtaa 879

<210> 6

<211> 1011

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

atgattgctg ttaaaacttg cggaaaactc tattgggcag gtgaatatgc tatttttagag 60

ccagggcagt tagctttgat aaaggatatt cccatctata tgagggtga gattgctttt 120

tctgacagct accgatctta ttcagatatg ttgtatttcg cagtggactt aaggcccaat 180

cctgactaca gcttgattca agaaacgatt gctttgatgg gagacttcct cgctgttcgc 240

ggtcagaatt taagaccttt ttcctaaaa atctgtggca aaatggaacg agaagggaaa 300

aagtttggtc taggttctag tggcagcgtc gttgtcttgg ttgtcaaggc tttactggct 360

ctctataatc tttcggttga tcagaatctc ttgttcaagc tgactagcgc tgtcttgctc 420

aagcgaggag acaatgggtc catgggcgac cttgcctgta ttgtggcaga ggatttggtt 480

ctttaccagt catttgatcg ccagaaggcg gctgcttggg tagaagaaga aaacttggcg 540

acagtcttgg agcgtgattg gggatttttt atctcacaag tgaaccaaac tttagaatgt 600

gatttcttag tgggatggac caaggaagtg gctgtatcga gtcacatggt ccagcaaadc 660

aagcaaaata tcaatcaaaa ttttttaagt tctcaaaag aaacggtggt ttttttggtc 720

gaagccttgg agcaggggaa agccgaaaaa gttatcgagc aagtagaagt agccagcaag 780

cttttagaag gcttgagtac agatatttac acgcctttgc ttagacagtt gaaagaagcc 840

agtcaagatt tgcaggccgt tgccaagagt agtgggtgctg gtggtggtga ctgtggcatc 900

gccctgagtt ttgatgcgca atcttctcga aacactttaa aaaatcgttg ggccgatctg 960

gggattgagc tcttatatca agaaaggata ggacatgacg acaaatcgta a 1011

<210> 7

<211> 954

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

atggatagag agcctgtaac agtacgttcc tacgcaaata ttgctattat caaatattgg	60
ggaaagaaaa aagaaaaaga gatggcgcct gctactagca gtatttctct aactttggaa	120
aatatgtata cagagacgac cttgtcgctt ttaccagcca atgtaacagc tgacgaattt	180
tacatcaatg gtcagctaca aaatgaggtc gagcatgcc aagatgagtaa gattattgac	240
cgttatcgtc cagctgggta gggctttgtc cgtatcgata ctcaaaacaa tatgcctacg	300
gcagcgggcc tgcctcaag ttctagtggg ttgtccgccc tggtaaggc ttgtaatgct	360
tatttcaagc ttggattgga tagaagtcag ttggcacagg aagccaaatt tgcctcaggc	420
tcttcttctc ggagttttta tggaccacta ggagcctggg ataaggatag tggagaaatt	480
tacctgtag agacagactt gaaactagct atgattatgt tgggtgctaga ggacaagaaa	540
aaaccaatct ctacccgtga cgggatgaaa ctttgtgtgg aaacctcgac gacttttgac	600
gactgggttc gtcagtctga gaaggactat caggatatgc tgatttatct caaggaaaat	660
gattttgcc aagattggaga attaacggag aaaaatgctc tggctatgca tgctacgaca	720
aagactgcta gtccagcctt ttcttatctg acggatgcct cttatgaggc tatggccttt	780
gttccgcagc ttcgtgagaa aggagaggcc tgctacttta ccatggatgc tggcceaat	840
gttaaggctc tctgtcagga gaaagacttg gagcatttgt cagaaatttt cggtcagcgt	900
tatcgcttga ttgtgtcaaa aacaaaggat ttgagtcaag atgattgctg ttaa	954
<210> 8	
<211> 549	
<212> DNA	
<213> eschericia coli	
<400> 8	
atgcaaacgg aacacgtcat tttattgaat gcacaggag ttccacggg tacgtggaa	60
aagtatgccg cacacacggc agacaccgc ttacatctcg cgttctccag ttggctgttt	120
aatgccaag gacaattatt agttaccgc cgcgcactga gcaaaaaagc atggcctggc	180
gtgtggacta actcggtttg tgggcacca caactgggag aaagcaacga agacgcagt	240
atccgccgtt gccgttatga gcttggcgtg gaaattacgc ctctgaatc tatctatcct	300
gactttcgct accgcgccac cgatccgagt ggcatgttg aaaatgaagt gtgtccgta	360
tttgccgcac gcaccactag tgcgttacag atcaatgatg atgaagtgat ggattatcaa	420
tgggtgtgatt tagcagatgt attacacggg attgatgcca cgccgtgggc gttcagtcg	480
tggatggtga tgcaggcgac aaatcgcgaa gccagaaaac gattatctgc atttaccag	540
cttaaataa	549

<210> 9

<211> 1416

<212> DNA

<213> eschericia coli

<400> 9

atggaaaact ttaaacaatct ccctgaaccg ttccgcattc gtgttattga gccagtaaaa	60
cgtaccactc gcgcttatcg tgaagaggca attattaaat ccggtatgaa cccgttcctg	120
ctggatagcg aagatgtttt tatcgattta ctgaccgaca gcggcaccgg ggcggtgacg	180
cagagcatgc aggcctgcgat gatgcgcggc gacgaagcct acagcggcag tcgtagctac	240
tatgcgttag ccgagtcagt gaaaaatatac ttggtttatc aatacaccat tccgactcac	300
cagggccgtg gcgcagagca aatctatatt ccggtactga ttaaaaaacg cgagcaggaa	360
aaaggcctgg atcgagcaa aatggtggcg ttctctaact atttctttga taccacgcag	420
ggccatagcc agatcaacgg ctgtaccgtg cgtaacgtct atatcaaaga agccttcgat	480
acgggcgtgc gttacgactt taaaggcaac tttagacctg agggattaga acgcggtatt	540
gaagaagtig gtccgaataa cgtgccgtat atcgttgcaa ccatcaccag taactctgca	600
ggtggtcagc cggtttact ggcaaaactta aaagcgatgt acagcatcgc gaagaaatac	660
gatattccgg tggtaatgga ctccgcgcgc ttgctgaaa acgcctatct catcaagcag	720
cgtgaagcag aatacaaaga ctggaccatc gagcagatca cccgcgaaac ctacaaatat	780
gccgatatgc tggcgatgic cgccaagaaa gatgcgatgg tgccgatggg cggcctgctg	840
tgcattgaaag acgacagctt ctttgatgtg tacaccgagt gcagaacctt ttgcgtggtg	900
caggaaaggct tcccacata tggcggcctg gaaggcggcg cgatggagcg tctggcggta	960
ggtctgtatg acggcatgaa tctcgactgg ctggcttata gtatcgcgca ggtacagtat	1020
ctggtcgatg gtctggaaga gattggcgtt gtctgccagc aggcgggcgg tcacgcggca	1080
ttcgttgatg ccggtaaact gttgccgat atcccgcag accagttccc ggcacaggcg	1140
ctggcctgcg agctgtataa agtcgccggt atccgtgcgg tagaaattgg ctctttcctg	1200
ttaggccgag atccgaaaac cggtaaaca ctgccatgcc cggctgaact gctgcgttta	1260
accattccgc gcgcaacata tactcaaaca catatggact tcattattga agcctttaaa	1320
catgtgaaag agaacgcggc gaatattaaa ggattaacct ttacgtacga accgaaagta	1380
ttcgtcact tcaccgaaa acttaaagaa gtttaa	1416

<210> 10

<211> 4176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTrc99A

<400> 10

gtctcactgg tgaaaagaaa aaccaccctg gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc	60
gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag	120
tgagcgcaac gcaattaatg tgagtttagc cgaattgac tggtttgaca gcttatcatc	180
gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggtatggct	240
gtgcaggctg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc gttctggata	300
atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca	360
attaatcatc cggtcgtat aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga	420
aacagaccat ggaattcgag ctcggtaccc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat	480
gcaagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaatcag	540
aacgcagaag cggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtgttccac	600
ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggtctc	660
cccatgagag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac	720
tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg	780
ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg	840
ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg	900
tttctacaaa ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga	960
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac	1020
atttccgtgt cgcccttatt ccttttttgc cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc	1080
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca	1140
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc	1200
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggg attatcccggt gttgacgccg	1260
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac	1320
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca	1380
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg	1440
agctaacgcg ttttttgcaac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac	1500
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct acagcaatgg	1560
caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat	1620
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg	1680

ctggctgggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg	1740
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc	1800
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgtgagat aggtgcctca ctgattaagc	1860
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt	1920
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt	1980
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa ggatcttctt	2040
gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag	2100
cgggtggttg tttccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca	2160
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca	2220
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg	2280
ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg	2340
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct	2400
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga	2460
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc	2520
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg	2580
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg	2640
cggccttttt acggttctcg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt	2700
tatccccga tctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc	2760
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggagag cgctgatgc	2820
ggtatcttct ccttacgcat ctgtcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta	2880
caatctgtct tgatgccga tagttaagcc agtatacact ccgtatcgc tacgtgactg	2940
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct	3000
gctcccgga tccgttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag	3060
gttttcaccg tcataccga aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgcg cgaaggcgaa	3120
gcggcatgca ttacgttga caccatcgaa tggtgcaaaa ccttcgcgg tatggcatga	3180
tagcggccgg aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacga	3240
gtcgcagagt atccgggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc	3300
cacgtttctg cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	3360
cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc	3420

tccagtctgg ccctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcg cgattaaatc tcgcgccgat	3480
caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa	3540
gcggcgggtg acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgtg	3600
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttccggc gttatttctt	3660
gatgtctctg accagacacc catcaacagt attattttct cccatgaaga cggtagcgca	3720
ctgggcgtgg agcatctggt cgcatgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggccca	3780
ttaagttctg tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat	3840
caaattcagc cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg tttcaacaa	3900
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggt cccactgcga tgctggttgc caacgatcag	3960
atggcgttgg gcgcaatgcg cgccattacc gagtccgggc tcgcggttgg tgcggatata	4020
tcggtagtgg gatacgacga taccgaagac agtcatgtt atatcccgcc gttaccacc	4080
atcaaacagg attttcgct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct	4140
cagggccagg cggtagagg caatcagctg ttgccc	4176
<210> 11	
<211> 2999	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pSTV28 vector	
<400> 11	
gcgtgggtat ggtggcaggc cccgtggccg ggggactgtt gggcgtgcc ggcacgtgc	60
ctacgagttg catgataaag aagacagtca taagtgcggc gacgatagtc atgccccgcg	120
cccaccggaa ggagctaccg gacagcgggt cggactgttg taactcagaa taagaaatga	180
ggcgcgtcat ggcgttccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta	240
atgcagctgg cagcagaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa	300
tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggtcgtat	360
gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta	420
cgaattcgag ctcggtaccc ggggatcttc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg	480
cactggccgt cgttttacia cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc	540
gccttgcagc acatccccct ttcccgagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc	600
gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatgagc ttatcgatga taagctgtca	660
aacatgagaa ttacaactta tatcgtatgg ggctgacttc aggtgctaca tttgaagaga	720

taaattgcac tgaatctag aaatatatta tctgattaat aagatgatct tcttgagatc	780
gttttggctc gcgcgtaatc tcttgctctg aaaacgaaaa aaccgccttg cagggcggtt	840
tttcgaaggt tctctgagct accaactctt tgaaccgagg taactggctt ggaggagcgc	900
agtcacaaaa acttgctctt tcagtttagc ctttaaccggc gcatgacttc aagactaact	960
cctctaaatc aattaccagt ggctgctgcc agtggctgctt ttgcatgtct ttcggggttg	1020
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg actgaacggg gggttcgtgc	1080
atacagtcca gcttggagcg aactgcctac ccggaactga gtgtcaggcg tggaaatgaga	1140
caaacgcggc cataacagcg gaatgacacc ggtaaaccga aaggcaggaa caggagagcg	1200
cacgagggag ccgccagggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac	1260
cactgatttg agcgtcagat ttcgtgatgc ttgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac	1320
ggctttgccc cgccctctc acttccctgt taagtatctt cctggcatct tccaggaaat	1380
ctccgccccg ttcgtaagcc atttccgctc gccgcagtcg aacgaccgag cgtagcgagt	1440
cagtgcgca ggaagcgga tatatctgt atcacatatt ctgctgacgc accggtgcag	1500
cctttttct cctgccacat gaagcacttc actgacaccc tcatcagtgc caacatagta	1560
agccagtata cactccgcta gcctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt acgcaccacc	1620
ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagaaacag aagccactgg agcacctcaa	1680
aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccgacgcac tttgcgccga	1740
ataaatacct gtgacggaag atcacttcgc agaataaata aatcctggtg tcctgttga	1800
taccgggaag ccctgggcca acttttggcg aaaatgagac gttgatcggc acgtaagagg	1860
ttccaacttt caccataatg aaataagatc actaccgggc gtattttttg agttatcgag	1920
attttcagga gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaaatc actggatata ccaccgttga	1980
tatatccaa tggcatcgta aagaacattt tgaggcattt cagtcagttg ctcaatgtac	2040
ctataaccag accgttcagc tggatattac ggccttttta aagaccgtaa agaaaaataa	2100
gcacaagttt tatccggcct ttattcacat tcttgcccgc ctgatgaatg ctcatccgga	2160
atttctgatg gcaatgaaag acggtgagct ggtgatatgg gatagtgttc acccttgta	2220
caccgttttc catgagcaaa ctgaaacgtt ttcacgctc tggagtgaat accacgacga	2280
tttccggcag tttctacaca tatattcgca agatgtggcg tgttacggtg aaaacctggc	2340
ctatttcctt aaagggttta ttgagaatat gtttttcgtc tcagccaatc cctgggtgag	2400
tttcaccagt tttgatatta acgtggccaa tatggacaac ttcttcgccc ccgttttcac	2460

catgggcaaa tattatacgc aaggcgacaa ggtgctgatg ccgctggcga ttcaggttca 2520

tcatgccgtc tgtgatggct tccatgtcgg cagaatgctt aatgaattac aacagtactg 2580

cgatgagtg cagggcgggg cgtaattttt ttaaggcagt tattggtgcc cttaaagccc 2640

tgggtgctacg cctgaataag tgataataag cggatgaatg gcagaaattc gaaagcaaat 2700

tcgacccgggt cgtcgggttca gggcagggtc gttaaatagc cgcttatgtc tattgctggt 2760

ttaccggttt attgactacc ggaagcagtg tgaccgtgtg cttctcaaat gcctgaggcc 2820

agtttgctca ggctctcccc gtggaggtaa taattgacga tatgatcatt tattctgcct 2880

cccagagcct gataaaaacg gtttagcgtt cgtaataca gatgtagggtg ttccacaggg 2940

tagccagcag catcctgcga tgcagatccg gaacataatg gtgcaggcgc cttgtttcg 2999

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 12

ggaattctcc acatggactt tccgcagc 28

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 13

ggaattcagc cctaaggaac caatatggac tttccgcagc 40

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 14

ggaattcata aggtaaaggt atggactttc cgcagc 36

<210> 15

<211> 36

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	15	
	ggaattctgg aggttaacta atggactttc cgcagc	36
<210>	16	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	16	
	ggaattcagg gggtaaagat ggactttccg cagc	34
<210>	17	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	17	
	gggatcctta tttattacgc tggatgtag	29
<210>	18	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	18	
	cggatccgcg agtcccatcc aaatgtcaac tcaacaagtt tcatc	45
<210>	19	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	19	
	cggatcctta agtaaccga tcatgtcaac tcaacaagtt tcatc	45

<210>	20	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	20	
cggatcccaa gtaggtcgcc atatgtcaac tcaacaagtt tcatac		45
<210>	21	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	21	
cggatccaga ggtaataaac catgtcaact caacaagttt catc		44
<210>	22	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	22	
gcgtcgactt aatcgtaag cttaacggg		29
<210>	23	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	23	
tgaagaagtt ggtccgaata acgtg		25
<210>	24	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	24	

ctttgtattc tgcttcacgc tgctt

25

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 25

ttgtcggcgg tggatgatgc

20

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 26

atgcggtgaa ctgtggaata aacg

24