

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0057809

(43) 공개일자 2020년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0134240

(22) 출원일자 2018년11월05일

심사청구일자 2018년11월05일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

이성국

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김도윤

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

제일특허법인(유)

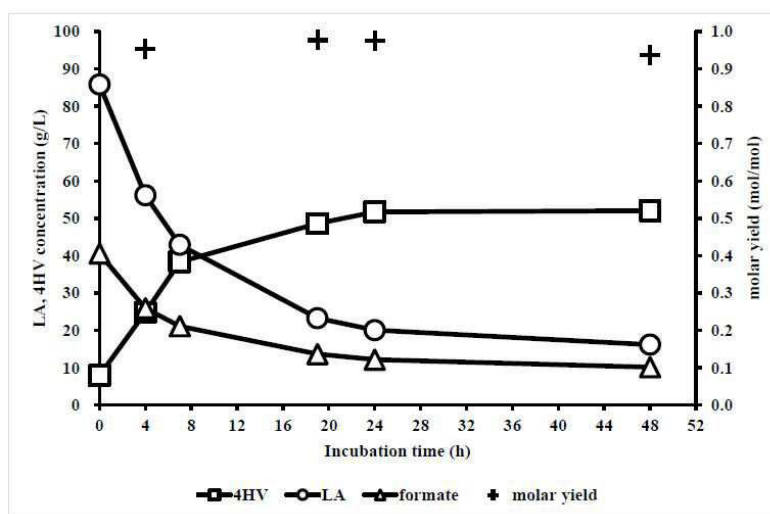
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 4-하이드록시발레르산을 생산하는 형질전환 미생물

(57) 요약

본 발명은 4-하이드록시발레르산을 생산하는 형질전환 미생물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 레불린산을 기질로 하여 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 및 포름산 탈수소효소 유전자의 과발현을 통해 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타내는 형질전환 미생물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 미생물을 레불린산 존재하에 배양하는 단계; 및 배양액에서 4-하이드록시발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 4-하이드록시발레르산의 생산방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 9/0008 (2013.01)

C12P 7/42 (2013.01)

C12Y 101/0103 (2013.01)

C12Y 102/02001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415156695

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오산업핵심기술개발

연구과제명 300 L 생물반응기 규모 바이오 감마락톤 생산기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자 및 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환 미생물은 4-하이드록시발레르산을 생산하는 것을 특징으로 하는, 형질전환 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형질전환 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는, 형질전환 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소가 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는, 형질전환 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 핵산이 서열번호 2의 염기서열을 갖는, 형질전환 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 포름산 탈수소효소가 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는, 형질전환 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 포름산 탈수소효소를 코딩하는 핵산이 서열번호 4의 염기서열을 갖는, 형질전환 미생물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 형질전환 미생물을 레블린산 존재하에 배양하는 단계; 및 배양액에서 4-하이드록시발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 4-하이드록시발레르산의 생산방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 4-하이드록시발레르산을 생산하는 형질전환 미생물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 레블린산을 기질로 하여 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 및 포름산 탈수소효소 유전자의 과발현을 통해 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타내는 형질전환 미생물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 현재 바이오 연료와 고부가가치 화합물의 생산을 위한 바이오 매스의 효율적인 이용은 지구 온난화 문제와 화석 연료 매장량의 감소로 인해 주목되고 있는 분야이다. 그 중, 감마 발레로락톤은 연료 및 탄소 기반 화학 물질 생산에 이상적인 화합물로 보고되었으며, 이는 약물 전달용 블록 공중합체 및 아크릴 화합물의 전구체로서 광범위하게 사용될 수 있다. 더욱이, 감마 발레로락톤은 증기압이 낮고 에너지 함량이 상대적으로 높기 때문에 에탄올보다 더 나은 유망한 바이오 연료로 간주된다.
- [0003] 일반적으로, 레불린산을 출발 기질로 사용하여 감마 발레로락톤을 합성하는 종래의 합성방법은 초임계 용매 또는 이산화탄소가 쓰이는 가혹한 조건에서 수행되며, 루테늄, 백금, 팔라듐, 금과 같은 다양한 금속 기반 촉매가 사용된다. 상기와 같은 방법은 높은 수소 압력에 의한 특별한 압력 장비가 필요하고, 수소 수송 및 저장에 있어 높은 비용이 드며, 잠재적인 안전 위험성과 같은 문제점이 있다(Journal of Industrial and Engineering Chemistry 43 (2016): 133-141).
- [0004] 이후에, 세포 기반 생산 시스템을 사용하여 수소화를 통해 레불린산을 4-하이드록시발레르산으로 전환하고, 락톤화를 통해 감마 발레로락톤으로 전환할 수 있는 레불린산 전환에 관한 방법이 보고되었다(Chemical reviews 107.6 (2007): 2411-2502). 그러나, 상기와 같은 방법은 감마 발레로락톤의 생산량과 수율이 여전히 낮다는 문제점이 있다.
- [0005] 따라서, 4-하이드록시발레르산을 이용하여 온화한 조건에서 수행되면서도 감마 발레로락톤의 생산량과 수율을 높일 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) He, Jian, et al. "Catalytic transfer hydrogenation of ethyl levulinate into γ -valerolactone over mesoporous Zr/B mixed oxides." Journal of Industrial and Engineering Chemistry 43 (2016): 133-141.
- (비특허문헌 0002) Corma, Avelino, Sara Iborra, and Alexandra Velty. "Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals." Chemical reviews 107.6 (2007): 2411-2502.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 대해, 본 발명은 4-하이드록시발레르산을 효과적으로 생산할 수 있는 형질전환 미생물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 미생물을 이용하여 세포내 4-하이드록시발레르산을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자 및 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 미생물을 레불린산 존재하에 배양하는 단계; 및 배양액에서 4-하이드록시발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 4-하이드록시발레르산의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 형질전환 미생물은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 및 포름산 탈수소효소 유전자의 도입을 통해 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타낸다. 상기 미생물을 이용하여 낮은 생산 단가로도 다량의 4-하이드록시발레르산을 효율적으로 생산할 수 있으며, 감마 발레로락톤 및 생분해성 폴리에스테르 등 화학제품의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 일 실시예에 따른 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 과발현하는 플라스미드 개열지도를 나타낸 것이다.

도 2는 일 실시예에 따른 포름산 탈수소효소를 과발현하는 플라스미드 개열지도를 나타낸 것이다.

도 3은 일 실시예에 따른 형질전환 미생물의 전체세포전환(whole cell biotransformation)을 통해 생산된 4-하이드록시발레르산의 생산량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 일 측면은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자 및 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 형질전환 미생물은 4-하이드록시발레르산을 생산할 수 있다. 구체적으로 상기 형질전환 미생물은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 유전자 및 포름산 탈수소효소 유전자를 발현하여 레불린산의 수소화를 통해 4-하이드록시발레르산으로 전환시킬 수 있다.

[0015] 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소는 NADH 보조인자 하나를 소비하여 레불린산을 4-하이드록시발레르산으로 전환시키는 단계를 촉매한다. 일반 미생물의 경우, 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 유전자의 발현량이 낮아 레불린산으로부터 4-하이드록시발레르산으로의 전환이 우수하지 못한 반면, 상기 형질전환 미생물은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 유전자가 과발현됨으로써 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타낼 수 있다.

[0016] 상기 포름산 탈수소효소는 레불린산 생성시 수소 공급원으로 사용되는 포름산을 이산화탄소와 물로 전환시키면서 3-하이드록시부티르산 탈수소효소에 의해 사용된 NAD를 NADH로 환원시켜주는 단계를 촉매한다. 일반 미생물의 경우, 상기 포름산 탈수소효소 유전자의 발현량이 낮아 NAD의 NADH로의 환원이 우수하지 못한 반면, 상기 형질전환 미생물은 포름산 탈수소효소 유전자가 과발현됨으로써 NAD의 NADH로의 환원을 촉진시켜 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타낼 수 있다.

[0017] 더욱이, 상기 형질전환 미생물은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소 유전자 및 포름산 탈수소효소 유전자가 모두 과발현됨으로써 레불린산으로부터 4-하이드록시발레르산으로의 전환을 현저히 향상시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 형질전환 미생물은 대장균일 수 있으며, 야생형 대장균으로서 대장균 MG1655, W3110, BL21(DE3) 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 MG1655를 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 핵산은 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 포름산 탈수소효소는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 상기 포름산 탈수소효소를 코딩하는 핵산은 서열번호 4의 염기서열을 가질 수 있다.

[0021] 상기 형질전환 미생물은 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드 및 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질전환된 것일 수 있다.

[0022] 상기 형질전환은 상기 2종의 플라스미드로 순차적으로 형질전환하거나 동시에 형질전환함으로써 수행될 수 있으며, 미생물, 구체적으로는 야생형 대장균을 상기 2종의 플라스미드로 순차적으로 형질전환할 때 사용되는 플라스미드의 순서는 크게 제한이 없다. 예를 들어, 야생형 대장균을 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질전환한 다음에 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자로 형질전환할 수 있고, 그 반대도 가능하다.

[0023] 상기 형질전환은 종래 알려진 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있으며, 구체적으로 칼슘 포스페이트법, 리포좀을 이용하는 방법, 전기천공법(electroporation), 미세주입(microinjection), 바이러스 이용법 등을 이용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드는 도 1에 도시된 개열지도를 갖는 플라스미드 pBbEGk-3HBDH일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 포름산 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드는 도 2에 도시된

개열지도를 갖는 플라스미드 pBbB6a-CbFDH일 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 측면은 상기 형질전환 미생물을 레불린산 존재하에 배양하는 단계; 및 배양액에서 4-하이드록시발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 4-하이드록시발레르산의 생산방법을 제공한다.

[0027] 상기 형질전환 미생물을 배양하기 위한 배지로는 당업계에 공지된 배양 배지를 사용할 수 있으며, 구체적으로 루리아-버타니(LB) 배지를 사용할 수 있다. 상기 배양 배지는 카나마이신, 암피실린 또는 클로람페니콜과 같은 적절한 항생제가 보충된 배지일 수 있다.

[0028] 상기 형질전환 미생물의 배양은 타겟 유전자를 발현하기 위한 유도제인 이소프로필 베타-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 존재하에서 수행될 수 있으며, 구체적으로 0.1 mM 내지 10 mM의 IPTG가 첨가될 수 있다. 특히, 상기 3-하이드록시부티르산 탈수소효소는 IPTG에 의해 발현되는 pL-lacO1 프로모터를 갖고 있는 플라스미드에 의해 발현될 수 있다. 상기와 같이 배양된 제조함 세포를 원심분리하여 수확하고 인산 칼륨 완충액(0.1 M, pH 6.0)으로 1회 세척한 후 생체전환연구에서 생체 촉매로 사용될 수 있다.

[0029] 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.

[0030] 사용된 균주 및 플라스미드

[0031] 하기 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	명칭	특성	입수처 또는 참고문헌
균주	E. coli MG1655	야생형	Blattner et al., Science 277, 5331, 1453-1474(1997)
	MG-3HBDH-CbFDH	pBbE6k-3HBDH 및 pBbB6a-CbFDH 플라스미드를 포함하는 MG1655	하기 실시예에서 제조
플라스미드	pET-22b(+)-3HBDH H144L/W184F	pBR322 ori; Amp ^r , P _{T7lac01} -3HBDH(H144L/W187F)	Yeon, Park, and Yoo. (2013). Bioresource technology, 134, 377-380
	pET-23b(+)-CbFDH	F1 ori; Amp ^r , P _{T7} -CbFDH	Choe, et al., (2014) PLoS One 9.7. e103111
	pBbE6k-3HBDH	ColE1 ori; Kan ^r , P _{pLlac01} -3HBDH	하기 실시예에서 제조
	pBbB6a-CbFDH	BBR1 ori; Amp ^r , P _{pLlac01} -CbFDH	하기 실시예에서 제조

[0032]

[0033] 실시예 1. 3HBDH 및 CbFDH 유전자가 적재된 플라스미드의 제조

[0034] 레불린산(LA)을 4-하이드록시발레르산(4HV)으로 전환시킬 수 있는 코돈 최적화된 돌연변이(H144L/W187F) 3-하이드록시부티르산 탈수소효소(3HBDH)를 연영주 박사로부터 제공받았고(Yeon, Park, and Yoo. (2013). Bioresource technology, 134, 377-380.), 코돈 최적화된 NAD 의존성 포름산 탈수소효소(CbFDH)를 김용환 교수로부터 제공받았다(Choe, et al., (2014) PLoS One 9.7. e103111).

[0035] 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, pBbE6k 플라스미드에 코돈 최적화된 돌연변이(H144L/W187F) 3-하이드록시부티르산 탈수소효소를 NdeI 제한효소 및 XhoI 제한효소를 사용하여 클로닝하였고, pBbB6a 플라스미드에 코돈 최적화된 NAD 의존성 포름산 탈수소효소를 NdeI 제한효소 및 XhoI 제한효소를 이용하여 클로닝하였다.

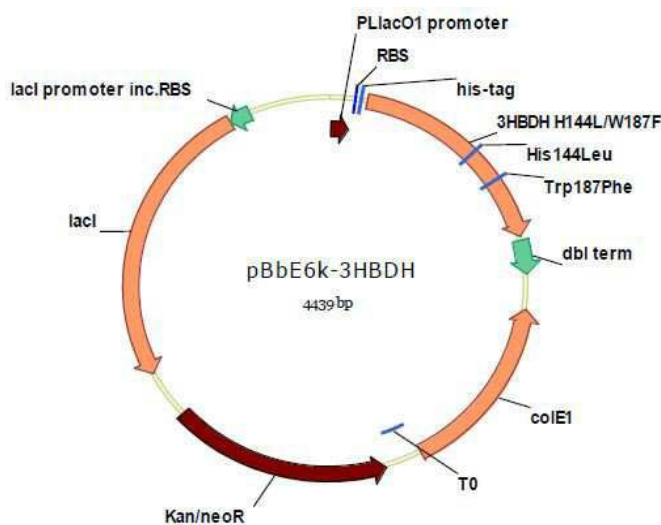
[0036] 실시예 2. 형질전환 미생물의 제조

[0037] 형질전환 미생물을 제조하기 위해, 모균주로 야생형 대장균 E. coli MG1655를 이용하였으며, 상기 실시예 1에서 제조한 pBbE6k-3HBDH 플라스미드 및 pBbB6a-CbFDH 플라스미드를 상기 대장균에 형질전환시켜 3HBDH 및 CbFDH 유전자를 과발현하는 형질전환 미생물 균주(이하 "MG-3HBDH-CbFDH"로 표기)를 제조하였다.

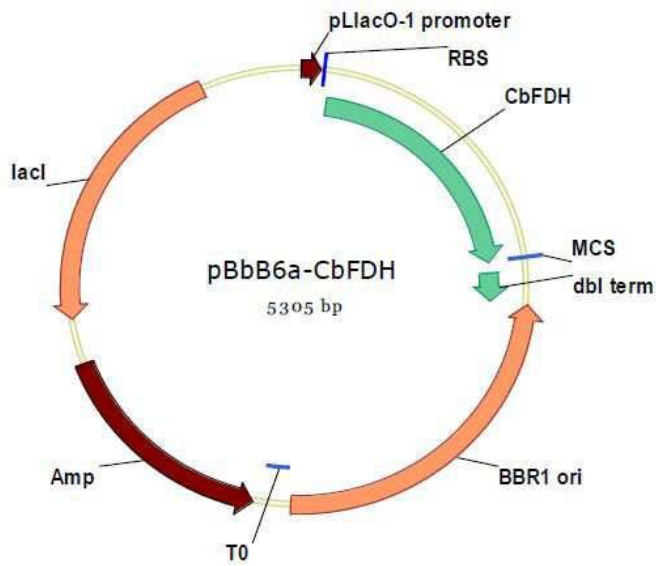
- [0038] 상기 균주를 LB 배지에 37℃ 및 200 rpm 조건으로 배양시켰으며, 필요시 배지에 카나마이신(Km) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 암피실린(Am) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 클로람페니콜(Cm) 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 보충하였다. 또한, 10 mM IPTG를 첨가하여 균주에 유전자 도입을 유도하였다.
- [0039] **실시예 3. 3HBDH 및 CbFDH 유전자 도입에 따른 4-하이드록시발레르산 생산 확인**
- [0040] 상기 실시예 1에서 제작된 플라스미드의 유전자 발현에 의해 4-하이드록시발레르산이 생산되는지 확인하기 위해 액체 크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 감소된 레불린산의 농도 및 증가된 4-하이드록시발레르산의 농도를 시간에 따라 측정하였다. 구체적인 측정 방법은 하기와 같으며, 측정 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0041] 배양된 재조합 세포를 원심분리하여 수확하고 인산 칼륨 완충액(0.1 M, pH 6.0)으로 1회 세척한 후 생체 촉매로 사용하였다. 생체 내 변형을 위한 전체세포전환 배지로 다음을 포함하는 배지를 사용하였다: 50 g CWW/L의 유도 휴식 세포, 0.1 M 인산 칼륨 완충액(pH 6.0), 100 g/L(0.86 M) 레불린산, 58.5 g/L(0.86 M) 개미산 나트륨, 0.1 mM IPTG, 1X 필터 멸균 미량 원소 용액(g/L: 2.4 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.15 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g ZnCl_2 , 0.3 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g H_3BO_3 , 0.495 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 100 mg/L 암피실린 및 5 mg/L 카나마이신. 생체전환을 pH, 온도 및 교반 속도에 대한 정밀 모니터링 및 제어 시스템을 갖춘 1.5 L 생물반응기(LiFlus GX; Hanil, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. 교반 속도는 800 rpm으로 설정하였다. 생체전환을 37℃에서 실시하였으며 정량화를 위해 샘플을 HPLC로 4시간마다 수집하였다. pH를 6.0으로 설정하고 2.5 N NaOH, 2.5 N HCl 및 2.5 N 포름산을 자동 첨가하여 pH를 조절하였다.
- [0042] 잔류 레불린산, 4-하이드록시발레르산 및 포름산을 HPLC로 측정하였다. 즉, 1 mL 배양 배지를 수집하고 실온에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 80℃에서 1시간 동안 가열하고, 16,500 g에서 30분 동안 두 번째로 원심분리하였다. 최종 샘플을 10배 희석하고, 20 μL 분취액을 0.6 mL/분 및 80℃로 SIL-20A 자동 시료 주입기(Shimadzu)가 장착된 Shimadzu HPLC 스테이션에서 분석을 수행하였다. 레불린산 및 4-하이드록시발레르산을 Zorbax SB-Aq(Agilent) 컬럼에 주입하였다. 25 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 완충액(pH 2.0)을 이동상으로 사용하여 굴절률 검출기(Shimadzu)로 분석하였다. 포름산을 HPX-87H 컬럼(Bio-rad)에 주입하였고 5 mM H_2SO_4 완충액을 이동상으로 사용하여 분석하였다. Sigma-aldrich에서 구입한 레불린산 및 포름산나트륨(sodium formate)을 표준 용액으로 사용하였고, 4-하이드록시발레르산 표준 용액은 10 N 수산화 나트륨으로 4℃에서 비누화하여 제조하였다. HPLC 데이터를 사용하여 생성물의 수율 및 생산성을 계산하였다.
- [0043] 그 결과, MG-3HBDH-CbFDH 형질전환 미생물 균주가 우수한 4-하이드록시발레르산 생산능을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

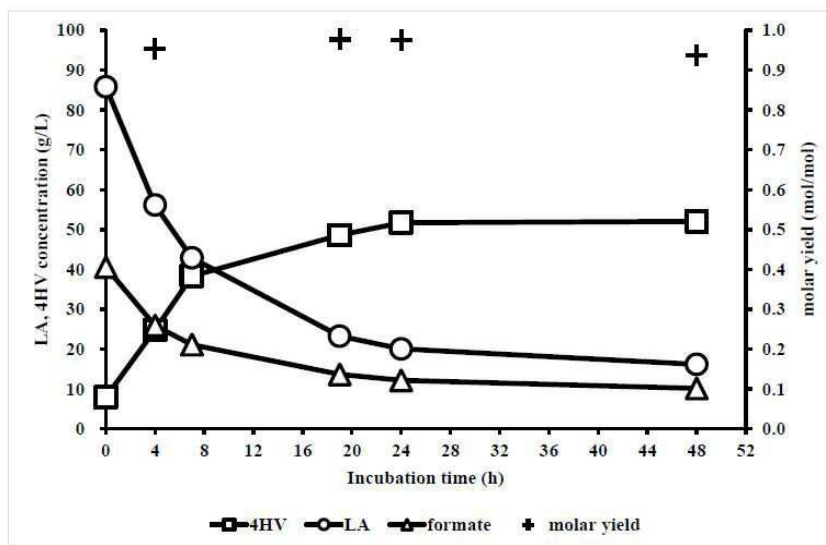
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- <120> TRANSFORMED MICROORGANISM PRODUCING 4-HYDROXYVALERIC ACID
- <130> FPD/201809-0037
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 261
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 3HBDH

<400> 1

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

1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val

20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala

65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr

85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala

100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile

115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Ala Leu

130 135 140

Gly Leu Val Ala Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His

145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys

165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu

180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile

195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln

210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Val Phe Leu Ser Ser

225	230	235	240
Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Leu Asp Gly Gly			
	245	250	255
Trp Thr Ala Arg ***			
	260		
<210>	2		
<211>	783		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	nucleotide sequence of 3HBDH		
<400>	2		
atgcttaaag gtaaaaaagc agtcgtaact ggttcacaa gcgggatagg actggcaatg			60
gcaactgagc ttgcaaaagc aggcgcagat gtagtaatta acggtttcgg tcagccagag			120
gatatcgaac gcgaacgctc aaccctcgaa tctaaatttg gcgtgaaagc gtattatctg			180
aacgcagatc tctcagatgc acaggcaacc cgggatttca ttgcaaaagc agcagaagca			240
ttgggtggtc tggacatctt agtcaataac gctggtatcc aacataccgc accgatcgaa			300
gagtttccag tggacaaatg gaacgaatt attgcattaa atttaagtgc tgtttttcat			360
ggtacggcag cagcacttcc tattatgcag aagcagggtt ggggtcgtat aattaatatt			420
gcgagcgac tcggcctggt agcatctgtc aataaatcgg catacgttgc agctaagcat			480
ggcgttggtt gtttgactaa agtgacagct ctggaaaatg caggtaaagg tataacgtgt			540
aatgcaattt gcccgggatt cgtgcgtacg ccgctggttg agaacaat cgaagcaatt			600
agtcagcaaa agggaataga catcgaagct gctgcacgtg agttgctggc agaaaaacag			660
cctagcttac aatttgttac gcccgaaacag ttaggaggag cagcagtgtt tctaagttcc			720
gctgcagcag atcagatgac aggtacaacc ctgtcgtggtg atggtgggtg gaccgcaaga			780
tga			783
<210>	3		
<211>	365		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	amino acid sequence of CbFDH		
<400>	3		

Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp

1 5 10 15

Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Cys Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn

20 25 30

Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu

35 40 45

Gly Gly Asn Ser Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile

50 55 60

Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Ile Asp

65 70 75 80

Lys Ala Lys Lys Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val

115 120 125

Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln

130 135 140

Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr

145 150 155 160

Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly

165 170 175

Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Val Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu

180 185 190

Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Asp Ala Glu Glu Lys Val Gly

195 200 205

Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile

210 215 220

Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn

225 230 235 240

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

245 250 255
Ala Arg Gly Ala Ile Cys Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Ala Leu Glu
260 265 270
Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro
275 280 285
Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala

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

<210> 4

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of CbFDH

<400> 4

atgaaaattg ttctggtgct gtatgatgcc ggcaaacatg cggccgatga agaaaaactg 60
tacggctgca ccgaaaacaa actgggtatc gcaaattggc tgaaagatca gggtcacgaa 120
ctgattacca cgagtataa agaaggcggc aacagcgtgc tggatcagca tatcccgat 180
gccgatatta tcattaccac gccgtttcac ccggcatata tcacgaaaga acgcattgat 240
aaagcgaaaa aactgaaact ggtggtttgt gcgggcgttg gttctgatca tatcgatctg 300

gattacatta accagaccgg caagaaaatt agcgttctgg aagtacggg tagcaatgtt 360
gtgtctgtgg cagaacacgt tgtgatgacc atgctggttc tggcgcgtaa ctttgttccg 420
gcgcatgaac agatcattaa tcacattgg gaagtggcag cgatcgcgaa agatgcctat 480
gatattgaag gcaaaacct cgcgacgatt ggcgccggtc gtatcggtta ccgcgttctg 540
gaacgtctgg tgccgttcaa cccgaaagaa ctgctgtatt acgattatca ggccctgccg 600
aaagatgcag aagaaaaagt tggcgcgcgt cgcgtggaaa atatcgaaga actggttgcc 660

caggcagata ttgttacgt gaacgcgccg ctgcacgcgg gcacgaaagg tctgatcaac	720
aaagaactgc tgagcaaatt caaaaaaggc gcgtggctgg ttaataccgc acgcggtgcg	780
atltgtgttg ccgaagatgt ggccgcagcg ctggaaagcg gtcagctgcg tggttatggc	840
ggtgatgtgt ggttcccga gccggcaccg aaagatcatc cgtggcgtga tatgcgcaac	900
aaatatggcg ccgtaatgc aatgaccccg cactacagcg gcaccacgt ggatgcacag	960
acccgtatg ccagggcac gaaaaacatt ctggaatctt tctttaccgg taaattcgat	1020
taccgtccgc aggatatcat tctgctgaat ggcgaaatg tgacgaaagc gtacggtaaa	1080
cacgataaaa aataa	1095