



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0095370
(43) 공개일자 2013년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0016727

(22) 출원일자 2012년02월20일

심사청구일자 2012년02월20일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수,기자촌 아파트 201-1601호

김영록

경기도 수원시 영통구 영통동 988-2 살구골 동아 아파트 717-202

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

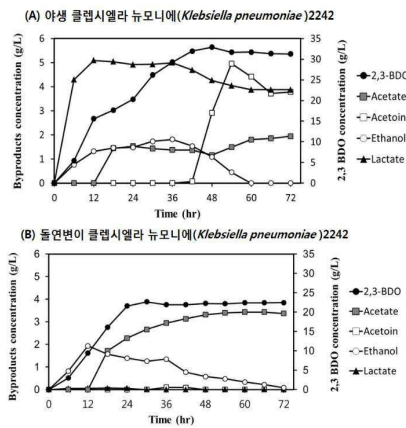
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 2,3-부탄다이올 생산을 위한 클렙시엘라 변이 균주

(57) 요약

본 발명은 *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고 비병원성을 나타내며 *wabG* 유전자를 갖는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 유사한 클렙시엘라(*Klebsiella*) 변이 균주에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 비병원성 2,3-부탄다이올 제조용 클렙시엘라는 야생종과 비교하여 유사한 성장률을 나타내면서 2,3-부탄다이올을 안정적으로 생산한다. 또한, 비병원성 2,3-부탄다이올 제조용 클렙시엘라이므로 2,3-부탄다이올 생산에 안전하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

장준호

경기도 수원시 영통구 영통동 1002-9 202호

김아영

충청남도 당진군 신평면 원머리 119-34

정성근

충청남도 서천군 마서면 송석리 603-5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035578

부처명 지식경제부

연구사업명 산업원천기술개발사업

연구과제명 2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2015.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

wabG 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고 비병원성을 나타내며 *wabG* 유전자를 갖는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 유사한 클렙시엘라(*Klebsiella*) 변이 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 클렙시엘라는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시톡카(*Klebsiella oxytoca*), 클렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 클렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*)인 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 클렙시엘라 변이 균주는 캡슐 폴리사카라이드(capsule polysaccharide)가 없는 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 동일하거나 또는 1-40% 감소된 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 글루코스(glucose) 소모량이 동일하거나 또는 1-15% 감소된 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 락테이트(lactate) 생산능이 80-100% 감소된 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 제조방법.

청구항 8

상기 제 7 항의 제조방법에 의해 생산된 2,3-부탄다이올.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산을 위한 클렙시엘라 변이 균주, 이를 이용한 2,3-부탄다이올 제조 및 이로부터 생산된 2,3-부탄다이올에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2,3-부탄다이올은 대량 화학물질(bulk chemical)의 한 종류로써 다양한 바이오 공정을 통해 얻어진다. 또한 탈수소화 반응, 에스테르화 반응 등의 화학적 전환을 통해 1,3-부타디엔, 다이아세틸, 메틸 에틸 케톤과 같은 물질로 전환이 되며, 이 물질들은 고무의 재료, 연료 첨가제, 부동액, 화장품과 의약품까지 그 응용 범위가 매우 넓은 고부가 물질로 전환되어 질 수 있다. 이러한 2,3-부탄다이올을 생산하는 대표적인 미생물로는 클렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*klebsiella oxytoca*), 엔테로박터 에어로진스(*enterobacter aerogenes*) 등이 있다. 이 중 클렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*klebsiella oxytoca*)는 많은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주들로 알려져 있으며 많은 연구가 진행 중이다. 하지만 클렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*klebsiella oxytoca*)는 기회감염성 특성을 가지고 있으며, 병원 감염의 주요 원인 균이다. 호흡기 감염을 통해 폐렴을 유발하고 균혈증, 요로감염, 상처감염을 일으킨다. 이러한 여러 가지 질병을 일으키는 클렙시엘라 종의 병원성을 제거한다면 2,3-부탄다이올 생산에 있어서 안전하게 이용할 수 있을 것이다. 클렙시엘라 종이 가지는 병원성의 주원인은 캡슐 폴리사카라이드(Capsulopolysaccharide), 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide), 편모(Fili) 등이 있다. 이 중 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide)는 외막의 구성성분 중에 하나이고 내독소를 가지며 여러 가지 화학적인 공격으로부터 클렙시엘라를 보호 하는 역할을 한다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물을 제조하기 위해 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 안전한 비병원성 클렙시엘라(*klebsiella*) 변이 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 2,3-부탄다이올을 생성하는 클렙시엘라 종의 *wabG* 유전자를 불활성화함으로써, 안전한 2,3-부탄다이올 생산용 클렙시엘라 변이 균주를 제조할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 클렙시엘라 변이 균주 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 2,3-부탄다이올 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 2,3-부탄다이올을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고 비병원성을 나타내며 *wabG* 유전자를 갖는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 유사한 클렙시엘라(*Klebsiella*) 변이 균주를 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물을 제조하기 위해 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는

안전한 비병원성 클렙시엘라(*klebsiella*) 변이 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 2,3-부탄다이올을 생성하는 클렙시엘라 종의 *wabG* 유전자를 불활성화함으로써, 안전한 2,3-부탄다이올 생산용 클렙시엘라 변이 균주를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0011] 본 발명의 기본적인 전략은 다양한 클렙시엘라에서 발견되는 *wabG*를 불활성화 시키는 것이다. *wabG*는 클렙시엘라의 외막을 구성하는 성분 중 하나인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)의 코어(core) 생합성에 관련된다.

[0012] 불활성화 대상이 되는 *wabG*는 다양한 클렙시엘라에서 발견되고 동정되었다. 하기의 실시예에서는 서열목록 제 1서열 내지 제6서열의 클렙시엘라 뉴모니에 및 클렙시엘라 옥시토카의 *wabG*가 예시되어 있으나, 이외에도 다양한 *wabG*가 본 발명에 포함된다. 예를 들어, GenBank 접근번호 JN377744 (*Klebsiella pneumoniae*), 접근번호 NC_013508(*Edwardsiella tarda*), 접근번호 A6RW62(*Botryotinia fuckeliana*), 접근번호 NC_014378(*Acetohalobium arabaticum*) 및 접근번호 JH417870(*Yokenella regensburgei*)에 개시된 *wabG*가 본 발명에서 불활성화 대상이 될 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “불활성화(inactivation)”란 유전자의 전사 또는 해독, 유전자 산물의 활성의 손상(impairment)을 초래하는 *wabG*의 지놈 열상에서의 변형(modifications)을 의미한다. 이런 유전자 변형은 *wabG* 코딩 서열의 불활성화뿐만 아니라 이의 프로모터의 불활성화도 포함될 수 있다. 효모 지놈 상에서 목적인 유전자만의 특이적 불활성화는 코딩하는 유전자의 전체 또는 하나 이상의 부분 영역에서 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 돌연변이시킴으로서 가능하다. 예를 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 이형 서열(heterogenous sequence)의 삽입은 유전자의 절단(truncation), 넌센스 돌연변이(nonsense mutation), 프레임쉬프트 돌연변이(frameshift mutation), 미스센스 돌연변이(missense mutation) 등을 초래할 수 있다. 이러한 유전자의 특이적 불활성화는 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “결실(deletion)”은 *wabG*의 기능을 상실케 하는 모든 결실변이를 포함하는 의미를 갖는다. 예를 들어, *wabG* 유전자의 결실은 *wabG* 코딩 서열의 부분 결실 또는 전체 결실을 모두 포함한다.

[0015] 이러한 *wabG* 코딩 서열의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발(mutagenesis) 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예컨대, *wabG* 코딩 서열의 결실은 PCR 돌연변이 유발법 및 카세트 돌연변이 유발법으로 실시할 수 있다 (Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

[0016] 바람직하게는, 상기 클렙시엘라는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 클렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 클렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*), 보다 바람직하게는, 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*) 또는 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)이다.

[0017] 바람직하게는, *wabG* 유전자를 불활성화한 클렙시엘라 변이 균주는 캡슐 폴리사카라이드(capsule polysaccharide)가 없다.

[0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 *wabG* 유전자가 결실된 클렙시엘라 변이 균주는 클렙시엘라 야생형과 비교하여, 균집 형태가 균일하지 않고 캡슐 폴리사카라이드가 결실된다.

[0019] 클렙시엘라의 글루코스(glucose) 대사과정에 따르면, 글루코스는 피루브산을 거쳐 2,3-부탄다이올을 생산하게 되며, 아세테이트 및 락테이트와 같은 부산물도 함께 생산된다. 효율적인 2,3-부탄다이올의 생산을 위해서는, 부산물의 생성을 감소시켜야 한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 클렙시엘라 야생형과 비교하여, 유사한 2,3-부탄다이올 생산능을 갖는다.

[0021] 본 명세서에서, 용어 “유사한”은 클렙시엘라 변이 균주의 2,3-부탄다이올 생산능이 클렙시엘라 야생종의 2,3-부탄다이올 생산능과 비교하여 0-40% 범위 내의 차이를 갖는 것을 의미한다.

[0022] 바람직하게는 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 동일하거나 또는 1-40% 감소되어 있다.

[0023] 본 명세서 용어 “2,3-부탄다이올 생산능”은 클렙시엘라 균주가 대사산물로서 2,3-부탄다이올을 생산하는 능력을 의미하며, 적합한 탄소원(예컨대, 글루코스)을 이용하여 통상적인 배양방법에 따라 클렙시엘라 균주를 배양

하는 경우, 정지기(stationary phase) 시점에서의 클렙시엘라 균주에 의해 생산되는 2,3-부탄다이올의 양을 적합한 분석기[예컨대, HPLC(High-performance liquid chromatography)]로 정량화 한 것을 의미한다.

[0024] 보다 바람직하게는, 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산능이 1-35% 감소되어 있으며, 가장 바람직하게는 1-30% 감소되어 있다. 이러한 감소의 원인은 유전자 제거에 의한 생산성 저하 및 야생형과 비교하여 상대적으로 적은 탄소 소모량으로 인해 2,3-부탄다이올의 생산이 감소된 것으로 판단된다. 이는 반복적인 배양을 통해 탄소 소모량을 높여 2,3-부탄다이올의 생산능을 증가시킬 수 있다.

[0025] 바람직하게는, 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 글루코스(glucose) 소모능이 동일하거나 또는 1-15% 감소되어 있다.

[0026] 본 명세서 용어 “글루코스 소모능”은 클렙시엘라 균주가 통상적인 배양방법에 따라 탄소원으로 글루코스를 소모하는 능력을 의미하며, 배양 초기 클렙시엘라 배양 배지 안에 첨가되는 글루코스는 클렙시엘라가 성장하면서 탄소원인 글루코스를 대사의 초기물질로 소모하게 되어, 점진적으로 감소한다. 클렙시엘라 배양 배지 내의 글루코스 양을 적합한 분석방법[예를 들어, 베네딕트법 및 DNS(Dinitrosalicylic acid)법]으로 정량화 한 것을 의미한다.

[0027] 보다 바람직하게는 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 글루코스(glucose) 소모능은 1-10% 감소되어 있다.

[0028] 바람직하게는, 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 락테이트(lactate) 생산능이 80-100% 감소되어 있다.

[0029] 본 명세서 용어 “락테이트 생산능”은 클렙시엘라 균주가 대사 부산물로서 락테이트를 생산하는 능력을 의미하며, 적합한 탄소원(예컨대, 글루코스)을 이용하여 통상적인 배양방법에 따라 클렙시엘라 균주를 배양하는 경우, 정지기(stationary phase) 시점에서의 클렙시엘라 균주에 의해 생산되는 락테이트의 양을 적합한 분석기[예컨대, HPLC(High-performance liquid chromatography)]로 정량화 한 것을 의미한다.

[0030] 보다 바람직하게는 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 야생형과 비교하여 배양 시 락테이트(lactate) 생산량이 90-100% 감소되어 있으며, 가장 바람직하게는 95-100% 감소되어 있다. 배양 시 락테이트가 많이 생산될 경우, 배지 내의 pH가 낮아져, 일정한 배양조건을 유지하기 위해, 추가적으로 염을 첨가해줘야 하므로, 배양 시 적게 생산되는 것이 이상적이다. 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주는 락테이트를 거의 생산하지 않고 2,3-부탄다이올을 생산하였다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주를 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 제조방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 방법은 상기 클렙시엘라 변이 균주를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0033] 본 발명에서의 배양은 당업계에 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 실시할 수 있다.

[0034] 예를 들어, 본 발명의 클렙시엘라를 배양하기 위해서는 배양배지에 1-5 g/L 염화나트륨, 1-5 g/L 단일수소 나트륨 인산염, 1-3 g/L 아세트산나트륨, 20-60 g/L 펩톤 및 2-10 g/L 글루코스를 포함할 수 있다. 상기 배양배지에 클렙시엘라를 접종하여 37℃에서 진탕배양한다.

[0035] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에서 이용되는 탄소원은 다양한 탄수화물이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 글루코스, 수크로스, 프럭토스, 갈락토스, 아라비노스 및 락토스이며, 가장 바람직하게는 글루코스이다. 본 발명의 방법에서 이용되는 질소원은 유기 질소원이 이용되며, 바람직하게는 효모 추출물 및 펩톤이며, 가장 바람직하게는 효모 추출물이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 비병원성 2,3-부탄다이올 생산용 클렙시엘라 변이 균주에 의해서 제조된 2,3-부탄다이올을 제공한다.

[0037] 본 발명의 클렙시엘라 변이 균주에 의해서 제조된 2,3-부탄다이올은 화학적 전환을 통해 고무의 재료, 연료 첨가제, 부동액, 화장품 및 의약품으로 응용될 수 있다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0039] (a) 본 발명은 비병원성 2,3-부탄다이올 생산용 클렙시엘라 변이 균주를 제공한다.
- [0040] (b) 본 발명의 비병원성 2,3-부탄다이올 제조용 클렙시엘라는 야생종과 비교하여 유사한 성장률을 나타내면서 2,3-부탄다이올을 안정적으로 생산한다.
- [0041] (c) 본 발명은 비병원성 2,3-부탄다이올 제조용 클렙시엘라를 이용하여 2,3-부탄다이올 생산에 안전하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 *wabG* 유전자의 제거 과정을 나타낸 도식도이다.
- 도 2는 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242, 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686 및 클렙시엘라 ATCC 43863의 *wabG* 유전자가 제거된 것을 전기영동을 통해 확인한 결과이다.
- 도 3은 클렙시엘라 야생형 및 클렙시엘라 돌연변이의 리포폴리사카라이드를 추출하여 트리신-SDS-페이지 및 실버 염색법을 통해 리포폴리사카라이드를 확인한 결과이다. 도 3의 1열은 야생형 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 결과를 나타내고, 2열은 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242, 3열은 야생형 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, 4열은 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, 5열은 야생형 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863, 6열은 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863의 결과를 나타낸다.
- 도 4는 클렙시엘라 야생형 및 클렙시엘라 돌연변이의 균집 가장자리를 광학현미경을 통해 관찰한 결과이다. 도 4의 (A)는 야생 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 현미경 결과를 나타내고, (B)는 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242, (C)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (D)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (E)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863, (F)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863의 현미경 관찰 결과를 보여준다.
- 도 5는 클렙시엘라 야생형 및 클렙시엘라 돌연변이를 인디아 잉크 및 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 광학현미경을 통해 캡슐 폴리사카라이드를 관찰한 결과이다. 도 5의 (A)는 야생 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 결과를 나타내고, (B)는 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242, (C)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (D)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (E)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863 및 (F)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863의 결과를 나타낸다.
- 도 6은 클렙시엘라 야생형 및 클렙시엘라 돌연변이의 표면 변화를 확인하기 위해 전계방사형 주사현미경을 통해 관찰한 결과를 나타낸다. 도 6의 (A)는 야생 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 결과를 나타내고, (B)는 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242, (C)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (D)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 KCTC 1686, (E)는 야생 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863, (F)는 돌연변이 클렙시엘라 옥시토카 ATCC 43863의 결과를 나타낸다.
- 도 7은 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 야생형 및 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 돌연변이의 성장률 및 글루코스 소비량을 나타낸 결과이다.
- 도 8은 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 야생형 및 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 돌연변이의 2,3-부탄다이올 생산량을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] 실시예

[0045] 실시예 1: 사용 균주

[0046] 클렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*, KCTC 2242) 및 클렙시엘라 옥시토카(*klebsiella oxytoca*, KCTC 1686 및 ATCC 43863)

[0047] 실시예 2: *wabG* 유전자 결실

[0048] 선형 유전자 제작

[0049] 양쪽에 34 bp(base pair)의 FRT(Flip-Recombinase Targets) 염기서열 및 20 bp의 클로람페니콜의 염기서열을 갖는 프라이머(표 1) 및 클로람페니콜 저항성 염기서열을 갖는 pKOV 플라스미드를 주형으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하여 FRT-클로람페니콜-FRT를 갖는 카세트(FCF)를 제작하였다. 클로람페니콜은 상동재조합이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위한 항생제저항성 단백질이고, FRT는 목표 유전자를 불활성화(knock-out) 시킨 후 클로람페니콜 유전자를 결실 해주는 역할을 한다(도 1). FCF를 제작하기 위한 중합효소연쇄반응 조건은 먼저 95℃에서 5분 반응 후 95℃ 30초, 66℃에서 55초 및 72℃에서 60초 반응을 25회 반복 하였다. 891 bp의 염기서열을 갖는 FCF를 T-벡터에 삽입 후 *wabG*의 시작 부분과 끝 부분에 상보적인 각각 50 bp 염기서열과, FRT와 상동 하는 염기서열을 가진 프라이머(표 1)로 중합효소 연쇄 반응을 하여 *wabG* 유전자 결실에 필요한 선형 유전자(WFCFW)를 제작하였다. 반응 조건은 95℃에서 5분 반응 후 95℃에서 30초, 65.2℃에서 60초 및 72℃에서 60초 반응을 25번 반복하였다. 얻어진 WFCFW는 991 bp의 염기서열을 갖는다.

표 1

[0050]

프라이머	서열
FCF 정방향	GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTCTGAGACGTTGATCGGCACGT
FCF 역방향	GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAGTTCATTGAGCGTAGCACCAGGC
WFCFW 정방향 (2242)	ATGAGTAAATTCAGGCTGGCTCTGGTGCAGCAGAGTACCGC CCGGACGGGAAGTTCCTATTCTCTAGAA
WFCFW 역방향 (2242)	TTAATTCACCAGATCCTGATAAAGAGAAAGCAGCTGGGTTGAGAG TCGCTGAAGTTCCTATACTTTCTAG
WFCFW 정방향 (1686, 43863)	ATGAGTAAATTCAGGCTGGCTCTGGTACGCCAGAAGTATCGCCCG GACGGGAAGTTCCTATTCTCTAGAA
WFCFW 역방향 (1686,43863)	TTATTTACCAAATCCTGATAGAGGGAGAGCAGCTGCGCCGA GAGACGTTGAAGTTCCTATACTTTCTAG

[0051] 상동재조합의 효율을 높이기 위한 레드 람다(*Red lambda*) 재조합

[0052] 세포 내부로 유입된 선형 유전자의 분해를 방지하고 상동재조합 효율을 높여주는 알파, 베타 및 감마 단백질을 발현하는 플라스미드인 pRedET를 사용하였다(Daiguan Yu, Hilary M. Ellis, E-Chiang Lee, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, and Donald L. Court. PNAS May 23, 2000 vol. 97 no. 11 5978-5983). 이러한 pRedET 플라스미드를 이용하여 돌연변이를 제조하기 위해 야생 클렙시엘라 종에 pRedET를 형질전환 하였다. 이를 위해서 야생 클렙시엘라 종을 37℃ 및 광학 밀도(600 nm) 에서 0.2-0.3이 될 때 까지 배양하였고, 액체 LB 배지의 총량에 0.7 mM이 되도록 에틸렌디아민사아세트산(EDTA)을 첨가하였다. 에틸렌디아민사아세트산을 첨가할 경우, 전기천공법 효율이 높아지게 된다(Fournet-Fayard, S., B. joly, and C.Forestier J. Microbiol Meth, 1995. 24: p.49-54). 배양한 클렙시엘라 종을 10% 글리세롤이 포함되어있는 차가운 멸균수로 3번 반복하여 세척하여 불순물을 제거하고 마지막 세척은 40 μ l의 차가운 멸균수에 담겨 있는 야생 클렙시엘라 종에 150 ng pRedET를 혼합하여 냉각된 전기천공법용 큐벳에 넣은 후 1.8 kV, 5 msec의 펄스를 주었다. 30℃에서 한 시간 동안 배양 후 테트라사이클린(3 μ g/ml)을 포함하는 고체 LB 배지에 도말하여 30℃에서 16시간 동안 배양하였다. 30℃의 테트라사이클린을 포함하는 LB 배지에 배양하는 이유는 pRedET 플라스미드가 테트라사이클린 저항성을 갖고며 30℃에서 복제되기 때문이다. 다음으로 알파, 베타 및 감마 단백질을 발현하기 위해 pRedET 플라스미드로 형질전환된 클렙시엘라 종을 액체 LB 배지에 넣고 600 nm 광학 밀도가 0.2-0.3 값이 될 때까지 배양하였다. 이때 액체 LB 배지의 총량에 0.5%에 해당하는 엘 아라비노스(L-arbinose)를 첨가하여 주었다. 그 후 pRedET로 형질전환 때와 마찬가지로의 과정으로 150 ng의 WFCFW와 혼합한 후 상기 언급한 조건으로 전기 천공법을 실시하였다. 37℃에서 3시간 동안 배양 후 클로람페니콜(20 μ g/ml)을 포함하는 고체 LB 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 클로람페니콜 배지에서 자란 클렙시엘라 종을 다시 클로람페니콜(20 μ g

/ml)을 포함하는 액체 배지에 배양 후 지노믹 DNA 추출 키트를 사용하여 지노믹 DNA 추출하고 증합효소 연쇄 반응을 통해 돌연변이를 확인하였다.

[0053] FRT-클로람페니콜-FRT의 결실

[0054] 돌연변이 클렙시엘라 종에 삽입되어있는 FRT-클로람페니콜-FRT의 결실을 위해 플립카아제 재조합 효소를 발현하는 707-Flpe 플라스미드(Thomas Schlake and Jurgen Bode' Biochemistry 1994, 33, 12746-12751)를 사용하였다. 야생 클렙시엘라 종에 pRedET을 형질 전환했던 방법과 동일하게 707-Flpe 플라스미드 및 WCFW가 삽입된 클렙시엘라 돌연변이종을 형질전환 하고 30℃에서 한 시간 배양 후 테트라사이클린(3 µg/ml)을 포함하는 고체 배지에 도말 하였다. 707-Flpe는 30℃에서 복제가 되기 때문에 30℃에서 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 자란 클렙시엘라 돌연변이종의 균집을 따서 항생제가 첨가되지 않은 1 ml 액체 LB 배지에 접종 후 3시간 동안 배양하였다. 배양한 돌연변이 클렙시엘라 종을 다시 37℃에서 16시간 동안 배양 하는데 이는 플립카아제 재조합 효소가 37℃에서 발현이 되기 때문이다. 배양한 클렙시엘라 돌연변이종의 일부를 클로람페니콜이 들어있는 액체 LB 배지에 배양 후 자라지 않는 것을 확인하고 지노믹 DNA 추출 키트를 이용하여 지노믹 DNA를 추출하였다. 증합효소연쇄반응을 통해 클로람페니콜 저항성 유전자가 결실 되었는지 확인 하였다(도 2).

[0055] 실시예 3: *wabG* 유전자 결실에 따른 특성 확인

[0056] 전기영동을 통한 확인

[0057] 야생종 및 *wabG* 유전자가 결실된 돌연변이종을 전기영동을 통해 확인하였다. 도 2의 1열은 사이즈 마커, 2열은 야생 *wabG* 유전자, 3열은 클로람페니콜 저항성 유전자를 형질전환 한 돌연변이 클렙시엘라 종 및 4열은 클로람페니콜 저항성 유전자를 결실한 돌연변이 클렙시엘라 종이다.

[0058] 트리신-SDS-페이지(Tricine-SDS-Page) 및 실버 염색법을 이용한 LPS 확인

[0059] 10 kda 이하의 작은 크기의 단백질을 검출 할 수 있는 트리신-SDS-페이지(Sch, H. and G. von Jagow. Analytical Biochemistry, 1987. 166(2):p.368-379) 및 5 ng 이하의 적은 양의 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide)도 염색 할 수 있는 실버 염색법(Chao-Ming Tsai, Carl E. Frasch. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 119, 115-119 (1982))을 통하여 *wabG* 유전자를 결실시, 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide; LPS)의 변화를 분석하였다. 먼저 리포폴리사카라이드 추출 키트를 사용하여 리포폴리사카라이드를 추출 후 로딩 완충제(0.1 M 트리스(pH 6.8), 2% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 20%의 수크로오스, 2% 멸균포에탄올 및 0.001% 브로모 페놀)와 혼합한 후 100℃에서 5분 동안 반응 시키고 15% SDS-tricine-PAGE로 전기영동을 하여 분리하였다. 전기영동은 20 mA 및 100 V 에서 2시간 동안 실시하였다. 그 후 실버 염색법을 통하여 리포폴리사카라이드를 관찰하였다. 도 3에서와 같이 돌연변이 클렙시엘라 종의 경우 리포폴리사카라이드의 코어 부분이 제거되었기 때문에 야생 클렙시엘라 종의 리포폴리사카라이드보다 크기가 작음을 알 수 있다(도 3).

[0060] 광학 현미경을 통한 균집 형태 차이 관찰

[0061] 리포폴리사카라이드를 제거한 돌연변이와 야생 클렙시엘라 종의 차이를 알아보기 위해 광학 현미경을 통해 균집 가장자리 부분의 형태의 차이를 알아보았다. 이를 위해 도 4에서 확인할 수 있듯이, 도 4의 (A), (C) 및 (E)는 야생 클렙시엘라 종의 가장자리는 형태 유지가 잘 되고 균일한 반면에 도 4의 (B), (D) 및 (E)는 돌연변이 클렙시엘라 종은 형태가 잘 유지되지 않고 균일하지 않음을 알 수 있다(Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Molecular Microbiology (2005) 58(4), 1054-1073). 캡슐 폴리사카라이드(Capsule polysaccharide)는 생물막을 형성할 때 균들 간에 거리가 일정 하게 해준다. 하지만 돌연변이종에서는 리포폴리사카라이드의 제거로 인해 캡슐 폴리사카라이드가 줄어들게 되어 균들끼리의 거리가 가깝게 되지만 그 거리는 일정하지 않게 된다. 이로 인하여 균집 형태가 균일 하지 않게 된다(Agladze, K., X. Wang, and T. Romeo. J.Bacteriol, 2005. 187(24): p. 8237-8246, Balestrino, D., et al. Environmental Microbiology, 2008. 10(3): p. 685-701)

[0062] 캡슐 폴리사카라이드의 염색

[0063] 리포폴리사카라이드의 제거로 인해 외막(Outer membrane)의 구성성분에 변화가 생기면서 그 주위를 둘러싸고 있는 캡슐폴리사카라이드에도 변화가 생기게 된다. 이러한 변화를 확인하기 위해 인디아 잉크(India ink) 및 크리스탈 바이올렛(Crystal violet)을 이용하여 염색하고 광학 현미경을 통해 관찰하였다. 먼저 커버 글라스 위의 야생 클렙시엘라 종 또는 돌연변이 클렙시엘라 종에 인디아 잉크로 염색하고 15분 동안 15-20℃로 건조하였다. 건조된 균을 크리스탈 바이올렛을 이용하여 염색하고 멸균수로 3번 세척한 후 건조하였다. 건조 시, 캡슐 폴리사카라이드가 파괴되는 것을 방지하기 위하여 상온에서 진행하였다. 인디아 잉크로 야생 클렙시엘라 종 및 돌연변이 클렙시엘라 종의 표면을 염색하고 크리스탈 바이올렛으로 외막의 펩티도글리칸(peptidoglycan)을 염색하면 클렙시엘라의 캡슐 폴리사카라이드가 하얗게 남게 되고 나머지 부분은 염색이 된다. 도 5의 (A), (C) 및 (E)는 야생 클렙시엘라 종에 캡슐 폴리사카라이드가 있음을 나타내며 돌연변이 클렙시엘라 종인 도 5(B), 도 5(D) 및 도 5(E)는 캡슐 폴리사카라이드가 보이지 않음을 확인 하였다.

[0064] 전계방사형 주사현미경(FE-SEM)을 이용한 표면 변화 관찰

[0065] *wabG* 유전자의 결실로 인한 돌연변이 클렙시엘라 종의 표면의 변화를 관찰하기 위해 전계방사형 주사현미경(Field Emission-Scanning Electron Microscopy; FE-SEM)을 사용하였다. 먼저 폴리카보네이트 필터(Polycarbonate filter, 0.2 μm)를 고압증기멸균기를 사용하여 120℃에서 멸균 후 건조기에서 건조하였다. 충분히 건조된 폴리카보네이트 필터를 LB 고체 배지 상에 놓고 그 위에 야생 클렙시엘라 종 또는 돌연변이 클렙시엘라 종을 5시간 동안 배양 하였다. 배양 후 폴리카보네이트 필터를 페트리디쉬(petri dish) 상에 놓은 다음 첫 번째 고정 용액으로 4℃에서 2시간 동안 반응 하였다. 고정용액의 조성은 75 mM의 라이신(Lysine), 2.5% 글루타르알데히드(Glutaraldehyde), 2% 파라포름알데히드(Paraformaldehyde) 및 0.1 M 소듐 카코딜레이트(Sodium cacodylate) 용액(pH 7.4) 이다. 그 다음, 시료에 0.1% 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 용액으로 3분 동안 반응 후 0.1% 폴리-L-라이신 용액을 제거하고 10분 동안 상온에서 건조하여 4℃에서 16시간 동안 보관 하였다. 다음으로 0.1 M 소듐 카코딜레이트(sodium cacodylate) 용액(pH 7.4)으로 시료와 반응시키고 용액을 제거 후 4℃에서 10분 동안 건조하였다. 이 과정을 3번 반복 후 4℃에서 16시간 동안 보관하였다. 다음으로 시료에 1.0 % 4산화 오스뮴(Osmium tetroxide) 및 1.5% 적혈염(Potassium ferricyanide)으로 구성된 두 번째 고정용액으로 4℃에서 2시간 처리하였다. 다음으로 10, 30, 50, 60, 70, 80 및 90% 에탄올로 각각 20분 동안 반응 시킨 다음 100% 에탄올로 3번씩 20분 동안 반응시킨 후, 헥사메틸디실라젠(Hexamethyldisilazane)으로 20분간 2번 반복 하여 처리하여 상온에서 건조하였다. 마지막으로 건조된 시료에 백금으로 코팅하여 전계방사형 주사현미경(3 kV)으로 관찰하였다(Monson, B.K., et al. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2010. 26(2): p. 133-136.). 도 6의 (A), (C) 및 (E)는 야생 클렙시엘라 종이며, 도 6의 (B), (D), (F)는 돌연변이 클렙시엘라 종이다. 도 6의 (A), (C) 및 (E)에서 캡슐 폴리사카라이드가 표면을 두껍게 감싸고 있는 반면에 도 6의 (B), (D) 및 (F)에서는 캡슐 폴리사카라이드가 표면에 존재하지 않아 거친 표면이 노출되어 있음을 알 수 있다.

[0066] 실시예 5: 2,3-부탄다이올 생산

[0067] 리포폴리사카라이드의 제거가 2,3-부탄다이올의 생산성에 영향을 주는지 알아보기 위하여 야생 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 및 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 광학 밀도에 따른 글루코스(Glucose) 소비량 및 2,3-부탄다이올의 생산성을 비교 하였다. 멸균 증류수 1L에 5 g 효모추출물, 5.25 g 2칼륨 인산염(dipotassium phosphate), 9.5 g 1칼륨 인산염(monopotassium phosphate), 6.6 g 황산암모늄(ammonium sulfate), 0.25 g 황산 마그네슘 칠수화물(magnesium sulfate heptahydrate), 0.05 g 황산제1철칠수화물(ferrous sulfate heptahydrate), 0.001 g 황산 아연 헵타수화물(zinc sulfate heptahydrate), 0.001 g 황산망간(manganese sulfate, 0.001 g 염화칼슘 이수화물(calcium chloride dihydrate) 및 80 g 글루코스(pH 6.5)를 포함하는 배지에서 72시간 동안 37℃, 170 rpm 로 진탕배양하였다. 야생종의 경우에는 배지에 암페실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하였고, 돌연변이는 암페실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 클로람페니콜(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하였다. 배양액 내의 2,3-부탄다이올의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리 (12000 rpm, 10 분)후 상등액과 세포를 분리하여 40℃에서 보관하였다. 상기 배양액로부터 분리된 상등액은 각각 1 ml씩 0.2 μm 필터

터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(HPLC) 정량 분석을 실시하였다. 액체크로마토그래피의 조건은 표 2와 같다. 본 발명에서 개발된 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 생장 곡선은 야생종 클렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242와 비교하여 비슷한 경향성을 보였으며 글루코스(Glucose) 소모량은 경향성은 비슷하였다(도 7). 분석결과 돌연변이의 경우 야생종에 비해 2,3-부탄다이올의 생산성이 30%정도 감소하였으며 이는 유전자의 결실에 의한 생산성 저하로 예상했던 수준보다 우수한 2,3-부탄다이올 생산량을 나타내었다(도 8). 또한, 반복적인 배양을 통해 탄소소모량을 높여 2,3-부탄다이올의 생산능을 높일 수 있을 것이다.

[0068] 점막을 생산하는 세포를 이용한 실험과 실제 동물실험에서 야생종과 비교하여 캡슐이 없는 돌연변이종은 상피세포에 대한 부착력 및 독성이 감소한다는 연구가 보고되었다(Struve, C. and K.A. Krogfelt, FEMS Microbiol Lett, 2003. 218:p149-154). 이러한 결과는 본 발명의 *wabG* 불활성화로 캡슐 폴리사카라이드가 제거된 돌연변이 균주는 병원성이 저하됨을 나타낸다.

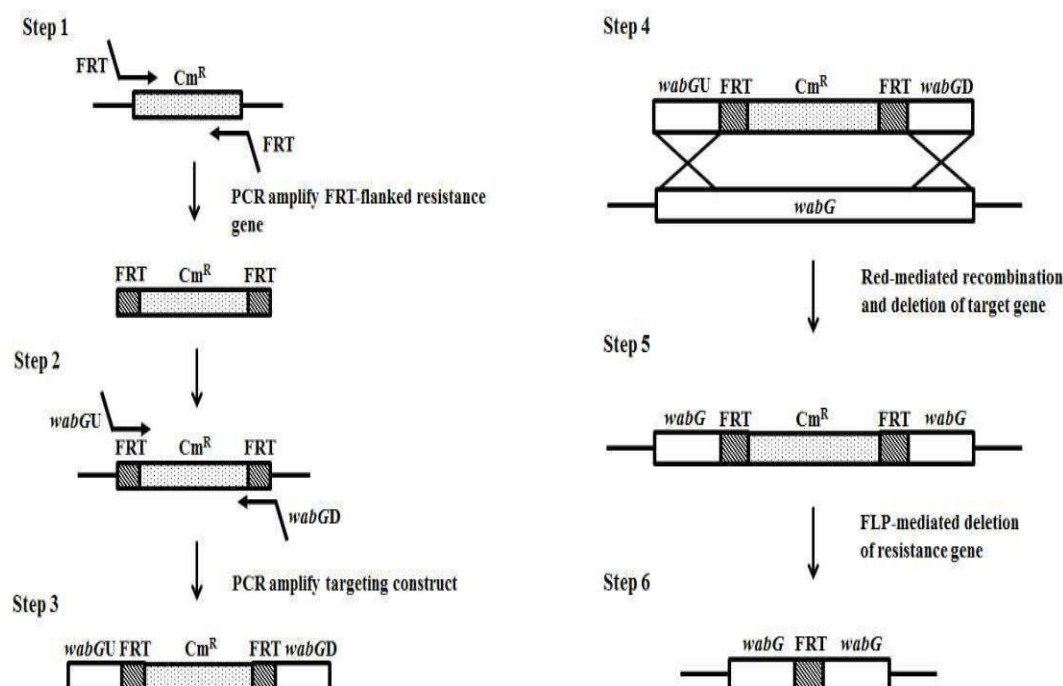
표 2

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.8 ml/min
주입부피	30 μ l
이동상	0.001 N 황산
오븐 온도	60℃
작동 시간	20분

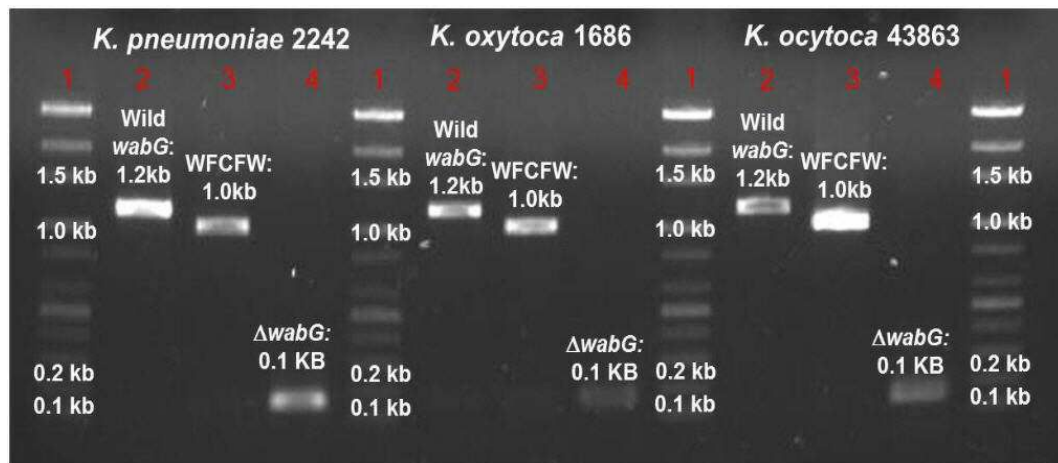
[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



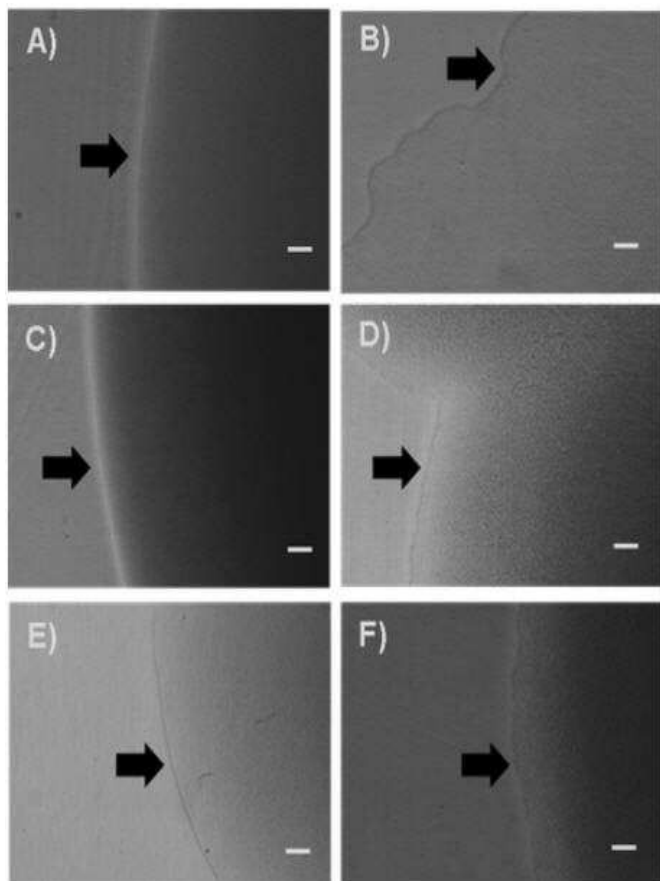
도면2



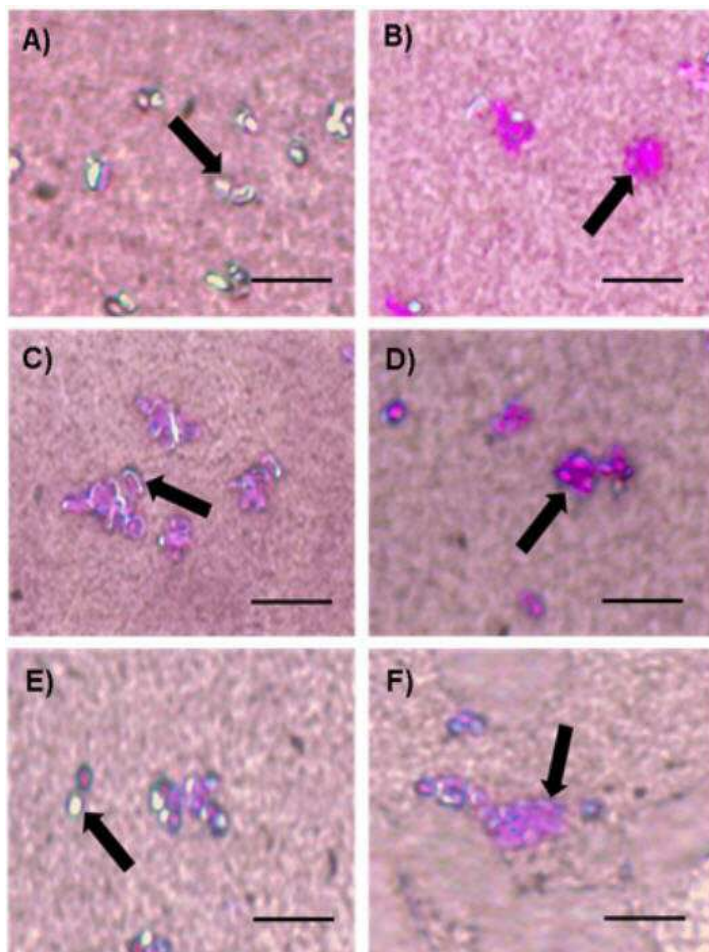
도면3



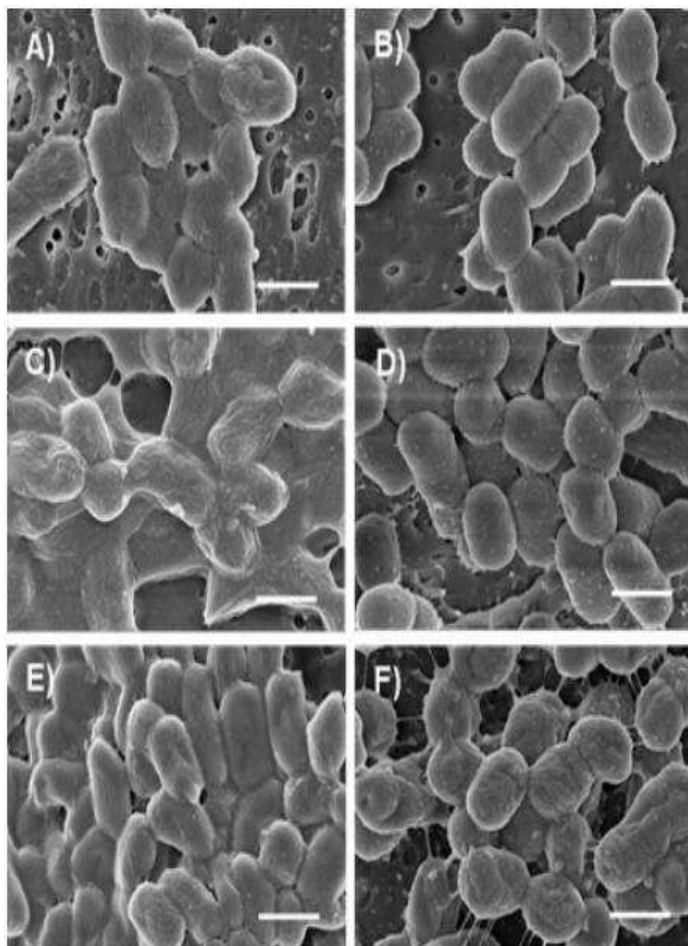
도면4



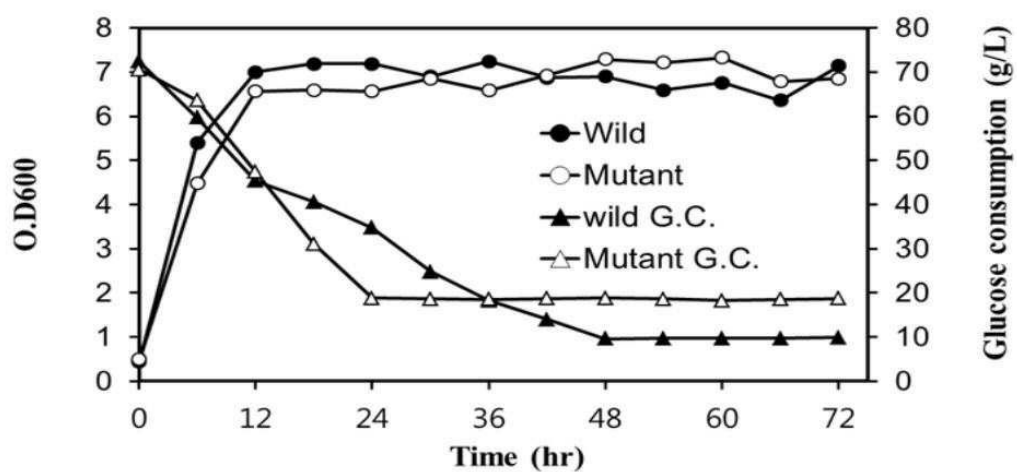
도면5



도면6

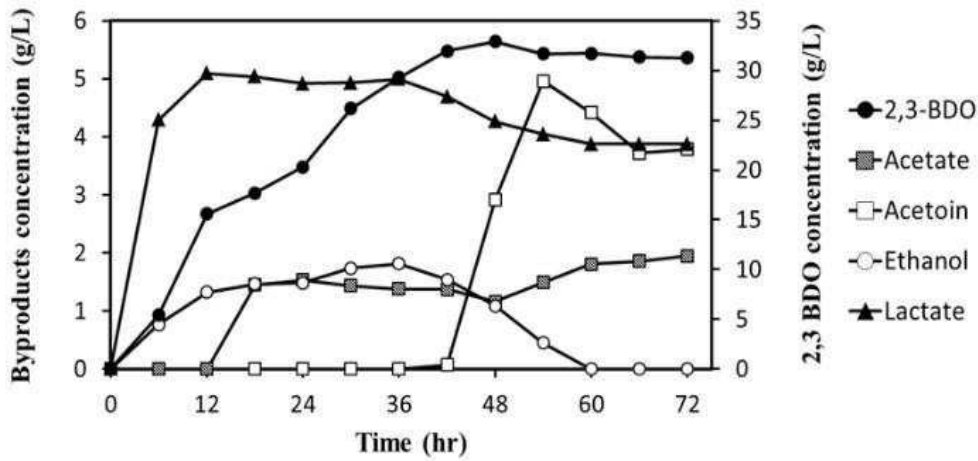


도면7

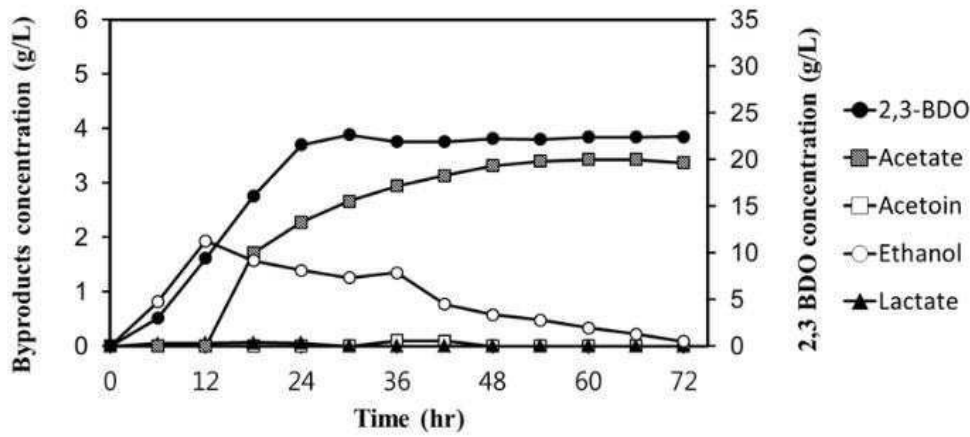


도면8

(A) 야생 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)2242



(B) 돌연변이 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)2242



서열목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Mutant Strains for Producing 2,3-butanediol

<130> PN120052

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242

<400> 1

atgagtaa at tcaggctggc tctggtgcgg cagaagtacc gcccgacgg cggcgcagaa

60

cggttgtct cccgcgcgt ggaagccctc gacagcagtc atctgcaact gaacgtcatc

120

acccggaat ggcaggggcc ggtgaaaccg gactggcaga tccatatctg taaccacgt 180

 aaatgggggc gcatcagccg cgagcgcggc ttgccaacg ccgcgcgcgc gctctggcag 240
 cgcgagtcct tcgacctggt gcagagccat gaacgtattc ccggctgcga tctctaccgc 300
 gctggcgaig gcgttcatcg ccgttggctg cagcagcgt cgcgcatitt accggcctgg 360
 aaaagccgcc tgctgttcgc cgaccgttac caccgctacg tcatgcaggc ggagcgcgag 420
 atgtatgaag actcacacct gcgcggggtg atctgcaacg ccgagatgat caagcgcgag 480
 atcatcgaag actttggcct gccggcggag aagatccacg ttatttataa cgccattgat 540
 aaccagcgt tctgcccgc ggacgaagag acctttgccg cttacgcgc caaatggcag 600

 ctaccgctgc aggcgacctg cctgatctac gtcggctccg gctttgagcg caaggggctg 660
 gcggcggcga tccgcgcat cgctcccacc gatcgctacc tgctgggtgt cggaagat 720
 aaggatcagc ctgctatca ggcgtggcg aagagcctga actgtgaagc gcgggtgcgc 780
 ttcttcggca tgcagtcgga gacattgccc ttctatcaaa tggccgatgg tctgttgcg 840
 ccgacctct acgatccgtt cccaacgtc atcctcagg caatggcctg cggtctgccg 900
 gtgatcacca ctaccggctg cggcggggcg gagtttatcg tcgacggcca caacggttac 960
 gtctgcgacg ctctggatat cccggcgcta cagcaggcgg taatggccct gccgcgcgc 1020

 gcgctgggct ccgcgaagg cgtcacgcc cgcgagcga ttatggcctg caccagcgag 1080
 cgactctcaa ccagctgct ttctctttat caggatctgg tgaattaa 1128

 <210> 2
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> Klebsiella oxytoca KCTC 1686
 <400> 2

 atgagtaaat tcaggctggc tctggtacgc cagaagtatc gcccgacgg cggcgcggag 60
 cgctttgtct cccgcgcgct ggaagccctc gacgacagcg atcttgaact gaacgtatc 120
 acccggaat ggcaggggcc ggtgaagccc gactggaaca tccacatctg caatccgcgc 180
 aaatgggggc gcatcagccg cgagcgagga ttgcccgcgc ccgccgcca gctatggcag 240

 cggaagcct tcgatctggt gcaagccac gagcgtatcc ccggctgcga cctgtaccgc 300
 gccggagacg gcgtgcaccg ccgttggctg cagcagcgt cgcgcatitt gccggctgg 360
 aaaagccgcc tgctgtttgc cgaccgttac catcgctatg tgatgcaggc cgagcgcgac 420
 atgtaccagg acgcgcacct gcgcggcgtt atctgcaacg ccgagatgat taaacgcgag 480
 attattgaag acttcggcct gccggcgga aaaatccacg ttatctataa cgctatcgat 540

aaccagcggtt ttctgccgcc gacggaagaa gcctttgtcg cgctgcgcgc caaatggaat	600
ctgccgcgcc aggcgacctg cctgatctac gtcggctccg gctttgagcg caaggggctg	660
gatgcggcga tccgcgccat cgcgccgacc aaccgctacc tgctgggtgtt gggcaaagat	720
aaagagcagg gccgctatca gcagctggcg aaaacgctga actgcgagga gcgggtgcgc	780
ttcttcggca tgcaatcgga aaccctgccg ttctatcaga tggccgacgg cctgctgctg	840
ccgacgtgt acgatccgtt tcccaacgtc attctcgaag cgatggcctg cggcctgccg	900
gtgattacga ctaccggctg cggcggcgcg gagtttattg ttcagggcag caatggctac	960
gtttgcgatg cgctggatat cccggccctg caggagtcgg ttatcgccct gccccccgg	1020
gcgttaggct ctgcgcaagg cgaacgcgcc cgcgagcgca tcatgacctg caccagcgaa	1080
cgctctctcg cgcagctgct ctccctctat caggatttgg tgaataaa	1128
<210> 3	
<211> 1128	
<212> DNA	
<213> Klebsiella oxytoca ATCC 43863	
<400> 3	
atgagtaaat tcaggctggc tctggtacgc cagaagtatc gcccggacgg cggcgcggag	60
cgctttgtct cccgcgcgct ggaagccctc gacgacagcg atcttgaact gaacgtcatc	120
acccgcgaat ggcaggggcc ggtgaagccc gagtgggaaca tccacatctg caatccgcgc	180
aaatgggggc ggatcagccg cgagcgagga ttgcccagc cgcgcccca gctgtggcag	240
cgcgaagcct tcgatctggt gcaaagccac gagcgtatcc ccggctgcga cctgtaccgc	300
gccggagacg gcgtgcaccg ccgctggctg cagcagcgct cgcgcatttt gcccggctgg	360
aaaagccgcc tgctgtttgc cgaccgtac catcgctatg tgatgcaggc cgagcgcgac	420
atgtaccagg acgcgcacct gcgcggcggtt atctgcaacg cggagatgat taaacgcgag	480
attattgaag acttcggcct gccggcgga aaaatccacg ttatctataa cgctatcgat	540
aaccagcggtt ttctgccgcc gacggaagaa gcctttgtcg cgctgcgcgc caaatggaat	600
ctgccgatcc aggcgacctg cctgatctac gtcggctccg gctttgagcg caaggggctg	660
gatgcggcga tccgcgccat cgcgccgacc aaccgctacc tgctgggtgtt gggcaaagat	720
aaagagcagg gccgctatca gcagctggcg aaaacgctga actgcgagga gcgggtgcgt	780
ttcttcggca tgcagtcgga aaccctgccg ttctatcaga tggccgacgg cctgctgctg	840
ccgacgtgt acgatccgtt tcccaacgtc attctcgaag cgatggcctg cggcctgccg	900
gtgattacga ctaccggctg cggcggcgcg gagtttattg ttcagggcag caatggctac	960

gtttgcgatg cgctggatat cccggccctg caggagtcgg ttagcgcctt gcccgcccg 1020
gcgttaggct ctgcgcaagg cgaacgcgcc cgcgagcgca tcatgacctg caccagcgaa 1080
cgtctctcgg cgcagctgct ctccctctat caggatttgg tgaataaa 1128

<210> 4

<211> 375

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae KCTC 2242

<400> 4

Met Ser Lys Phe Arg Leu Ala Leu Val Arg Gln Lys Tyr Arg Pro Asp

1 5 10 15

Gly Gly Ala Glu Arg Phe Val Ser Arg Ala Leu Glu Ala Leu Asp Ser

20 25 30

Ser His Leu Gln Leu Asn Val Ile Thr Arg Glu Trp Gln Gly Pro Val

35 40 45

Lys Pro Asp Trp Gln Ile His Ile Cys Asn Pro Arg Lys Trp Gly Arg

50 55 60

Ile Ser Arg Glu Arg Gly Phe Ala Asn Ala Ala Arg Ala Leu Trp Gln

65 70 75 80

Arg Glu Ser Phe Asp Leu Val Gln Ser His Glu Arg Ile Pro Gly Cys

85 90 95

Asp Leu Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Val His Arg Arg Trp Leu Gln Gln

100 105 110

Arg Ser Arg Ile Leu Pro Ala Trp Lys Ser Arg Leu Leu Phe Ala Asp

115 120 125

Arg Tyr His Arg Tyr Val Met Gln Ala Glu Arg Glu Met Tyr Glu Asp

130 135 140

Ser His Leu Arg Gly Val Ile Cys Asn Ala Glu Met Ile Lys Arg Glu

145 150 155 160

Ile Ile Glu Asp Phe Gly Leu Pro Ala Glu Lys Ile His Val Ile Tyr

165 170 175

Asn Ala Ile Asp Asn Gln Arg Phe Leu Pro Pro Asp Glu Glu Thr Phe

180 185 190

Ala Ala Leu Arg Ala Lys Trp Gln Leu Pro Leu Gln Ala Thr Cys Leu

195 200 205

Ile Tyr Val Gly Ser Gly Phe Glu Arg Lys Gly Leu Ala Ala Ala Ile

210 215 220

Arg Ala Ile Ala Pro Thr Asp Arg Tyr Leu Leu Val Val Gly Lys Asp

225 230 235 240

Lys Asp Gln Pro Arg Tyr Gln Ala Leu Ala Lys Ser Leu Asn Cys Glu

245 250 255

Ala Arg Val Arg Phe Phe Gly Met Gln Ser Glu Thr Leu Pro Phe Tyr

260 265 270

Gln Met Ala Asp Gly Leu Leu Leu Pro Thr Leu Tyr Asp Pro Phe Pro

275 280 285

Asn Val Ile Leu Glu Ala Met Ala Cys Gly Leu Pro Val Ile Thr Thr

290 295 300

Thr Gly Cys Gly Gly Ala Glu Phe Ile Val Asp Gly His Asn Gly Tyr

305 310 315 320

Val Cys Asp Ala Leu Asp Ile Pro Ala Leu Gln Gln Ala Val Met Ala

325 330 335

Leu Pro Ala Arg Ala Leu Gly Ser Ala Gln Gly Gly His Ala Arg Glu

340 345 350

Arg Ile Met Ala Cys Thr Ser Glu Arg Leu Ser Thr Gln Leu Leu Ser

355 360 365

Leu Tyr Gln Asp Leu Val Asn

370 375

<210> 5

<211> 375

<212> PRT

<213> Klebsiella oxytoca KCTC 1686

<400> 5

Met Ser Lys Phe Arg Leu Ala Leu Val Arg Gln Lys Tyr Arg Pro Asp

1 5 10 15

Gly Gly Ala Glu Arg Phe Val Ser Arg Ala Leu Glu Ala Leu Asp Asp

20 25 30

Ser Asp Leu Glu Leu Asn Val Ile Thr Arg Glu Trp Gln Gly Pro Val

35 40 45

Lys Pro Glu Trp Asn Ile His Ile Cys Asn Pro Arg Lys Trp Gly Arg

50 55 60

Ile Ser Arg Glu Arg Gly Phe Ala Asp Ala Ala Arg Gln Leu Trp Gln

65 70 75 80

Arg Glu Ala Phe Asp Leu Val Gln Ser His Glu Arg Ile Pro Gly Cys

85 90 95

Asp Leu Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Val His Arg Arg Trp Leu Gln Gln

100 105 110

Arg Ser Arg Ile Leu Pro Gly Trp Lys Ser Arg Leu Leu Phe Ala Asp

115 120 125

Arg Tyr His Arg Tyr Val Met Gln Ala Glu Arg Asp Met Tyr Gln Asp

130 135 140

Ala His Leu Arg Gly Val Ile Cys Asn Ala Glu Met Ile Lys Arg Glu

145 150 155 160

Ile Ile Glu Asp Phe Gly Leu Pro Ala Glu Lys Ile His Val Ile Tyr

165 170 175

Asn Ala Ile Asp Asn Gln Arg Phe Leu Pro Pro Thr Glu Glu Ala Phe

180 185 190

Val Ala Leu Arg Ala Lys Trp Asn Leu Pro Arg Gln Ala Thr Cys Leu

195 200 205

Ile Tyr Val Gly Ser Gly Phe Glu Arg Lys Gly Leu Asp Ala Ala Ile

210 215 220

Arg Ala Ile Ala Pro Thr Asn Arg Tyr Leu Leu Val Val Gly Lys Asp

225 230 235 240

Lys Glu Gln Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Ala Lys Thr Leu Asn Cys Glu

245 250 255

Glu Arg Val Arg Phe Phe Gly Met Gln Ser Glu Thr Leu Pro Phe Tyr

260 265 270
 Gln Met Ala Asp Gly Leu Leu Leu Pro Thr Leu Tyr Asp Pro Phe Pro
 275 280 285
 Asn Val Ile Leu Glu Ala Met Ala Cys Gly Leu Pro Val Ile Thr Thr
 290 295 300
 Thr Gly Cys Gly Gly Ala Glu Phe Ile Val Gln Gly Ser Asn Gly Tyr

 305 310 315 320
 Val Cys Asp Ala Leu Asp Ile Pro Ala Leu Gln Glu Ser Val Ile Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Arg Ala Leu Gly Ser Ala Gln Gly Glu Arg Ala Arg Glu
 340 345 350
 Arg Ile Met Thr Cys Thr Ser Glu Arg Leu Ser Ala Gln Leu Leu Ser
 355 360 365
 Leu Tyr Gln Asp Leu Val Lys
 370 375
 <210> 6
 <211
 > 375
 <212> PRT
 <213> Klebsiella oxytoca ATCC 43863
 <400> 6
 Met Ser Lys Phe Arg Leu Ala Leu Val Arg Gln Lys Tyr Arg Pro Asp
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Glu Arg Phe Val Ser Arg Ala Leu Glu Ala Leu Asp Asp
 20 25 30
 Ser Asp Leu Glu Leu Asn Val Ile Thr Arg Glu Trp Gln Gly Pro Val
 35 40 45
 Lys Pro Glu Trp Asn Ile His Ile Cys Asn Pro Arg Lys Trp Gly Arg

 50 55 60
 Ile Ser Arg Glu Arg Gly Phe Ala Asp Ala Ala Arg Gln Leu Trp Gln
 65 70 75 80
 Arg Glu Ala Phe Asp Leu Val Gln Ser His Glu Arg Ile Pro Gly Cys
 85 90 95

Asp Leu Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Val His Arg Arg Trp Leu Gln Gln
 100 105 110
 Arg Ser Arg Ile Leu Pro Gly Trp Lys Ser Arg Leu Leu Phe Ala Asp
 115 120 125

 Arg Tyr His Arg Tyr Val Met Gln Ala Glu Arg Asp Met Tyr Gln Asp
 130 135 140
 Ala His Leu Arg Gly Val Ile Cys Asn Ala Glu Met Ile Lys Arg Glu
 145 150 155 160
 Ile Ile Glu Asp Phe Gly Leu Pro Ala Glu Lys Ile His Val Ile Tyr
 165 170 175
 Asn Ala Ile Asp Asn Gln Arg Phe Leu Pro Pro Thr Glu Glu Ala Phe
 180 185 190
 Val Ala Leu Arg Ala Lys Trp Asn Leu Pro Ile Gln Ala Thr Cys Leu

 195 200 205
 Ile Tyr Val Gly Ser Gly Phe Glu Arg Lys Gly Leu Asp Ala Ala Ile
 210 215 220
 Arg Ala Ile Ala Pro Thr Asn Arg Tyr Leu Leu Val Val Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Lys Glu Gln Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Ala Lys Thr Leu Asn Cys Glu
 245 250 255
 Glu Arg Val Arg Phe Phe Gly Met Gln Ser Glu Thr Leu Pro Phe Tyr
 260 265 270

 Gln Met Ala Asp Gly Leu Leu Leu Pro Thr Leu Tyr Asp Pro Phe Pro
 275 280 285
 Asn Val Ile Leu Glu Ala Met Ala Cys Gly Leu Pro Val Ile Thr Thr
 290 295 300
 Thr Gly Cys Gly Gly Ala Glu Phe Ile Val Gln Gly Ser Asn Gly Tyr
 305 310 315 320
 Val Cys Asp Ala Leu Asp Ile Pro Ala Leu Gln Glu Ser Val Ser Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Arg Ala Leu Gly Ser Ala Gln Gly Glu Arg Ala Arg Glu

340	345	350
Arg Ile Met Thr Cys Thr Ser Glu Arg Leu Ser Ala Gln Leu Leu Ser		
355	360	365
Leu Tyr Gln Asp Leu Val Lys		
370	375	