(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월13일
(11) 등록번호 10-2277385
(24) 등록일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) *C10L 1/02* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/79 (2013.01)
C10L 1/026 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0072995
(22) 출원일자 2020년06월16일
심사청구일자 2020년06월16일
(56) 선행기술조사문헌
Appl Environ Microbiol, 2011 Nov;77(22):8052-61.
chemistry and biology, Volume 22, Issue 11, 19 November 2015, Pages 1480-1490.
Mol Biotechnol (2015) 57:606-624.

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이철균
서울특별시 서초구 나루터로4길 49, 334동 601호
강미진
인천광역시 남동구 선수촌로 75, 102동 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한윤호

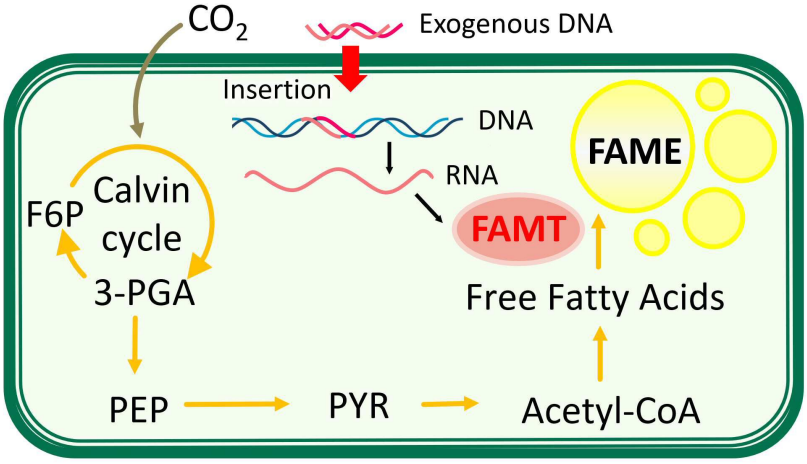
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 **FAMT 유전자를 이용한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 외래 FAMT 유전자를 미세조류인 시네코시스티스의 유전체 내에 삽입하여 형질전환된 미세조류가 바이오디젤을 효율적으로 생산함에 따라 경제성이 우수한 FAMT 유전자를 이용한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



3-PGA: 3-Phospho-D-glycerate; F6P: fructose 6-phosphate; PEP: Phosphoenol pyruvate; PYR: Pyruvate; OAA: oxoacetate; Acyl-ACP: Acyl-acyl carrier protein; FAMT: fatty acid methyltransferase; FAME: fatty acid methyl ester

(52) CPC특허분류
C12N 9/1007 (2013.01)
C12P 7/649 (2013.01)
C12Y 201/01 (2013.01)
C12Y 201/01015 (2013.01)
(72) 발명자
홍성주
인천광역시 미추홀구 용정공원로 33, 123동 205호

유단비
경기도 부천시 원종로107번길 14-12, 201동 604호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016M1A5A1027462
과제번호 NRF-2016M1A5A1027462
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업
연구과제명 유용 해양미세조류 게놈스케일 인실리코 모델구축 및 타겟 시뮬레이션
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인하대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A2B2002954
과제번호 NRF-2017R1A2B2002954
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자사업
연구과제명 미세조류 기반 Green fuel cell factory 개발
기 여 율 2/2
과제수행기관명 인하대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트가 유전체 내 삽입되어 세포 내에서 바이오디젤을 생산하는, 형질전환 미세조류 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 남조류인, 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 남조류는 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.)인 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드가 상동 재조합에 의해 유전체 내 삽입되는, 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트는 항생제 내성 유전자를 추가로 포함하는, 균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항생제 내성 유전자는 젠타마이신(gentamycin) 저항성 유전자인, 균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 JHAMT는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 균주.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 FAMT는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 균주.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2 또는 4로 기재되는 핵산 서열로 구성되는, 균주.

청구항 10

제1항에 있어서,

에스테르 교환반응 처리 없이 세포 배양과 동시에 직접 바이오디젤을 생산하는, 균주.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 형질전환 미세조류 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 및

상기 배양단계에서 생산된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계를 포함하는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 바이오디젤 정제단계는 배양단계에서 배양된 세포에 유기용매 및 증류수를 혼합한 혼합물을 첨가하여 지질층을 수득함으로써 수행되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 혼합물은 클로로포름 7 내지 9, 메탄올 3 내지 5 및 증류수 2 내지 4의 비율로 제조되는, 생산방법.

청구항 14

FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 시네코시스티스 속 균주의 유전체 내에 삽입하여 형질전환 균주를 제조하는 단계: 및

상기 유전자 컨스트럭트가 상동 재조합에 의해 유전체 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 바이오디젤을 생산하는 형질전환 시네코시스티스 속 균주의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 FAMT 유전자 삽입을 통한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지구 온난화로 인해 2016년 7월은 기상관측 이래'가장 무더웠던 달'로 기록되었으며, 전 세계적으로 가뭄과 폭염, 슈퍼태풍 등 기상이변이 발생하여 심각한 생존 위기에 직면하였다. 또한, 지구의 이산화탄소 농도가 기후변화의 임계점인 400 ppm을 넘어서면서 향후 지구가 회복하기 힘든 상황에 빠질 것이라고 경고하고 있다. 이처럼 지구 온난화로부터 인류가 위협당하면서 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 이산화탄소를 줄이기 위해 노력 중인데 예컨대, 광합성 생물체는 태양으로부터 공급되는 빛에너지를 이용하여 이산화탄소를 탄수화물로 환원하는 능력을 지니고 있다. 광합성 생물체를 적절히 이용하면 대기 혹은 배기가스 중에 함유된 이산화탄소를 생체물질로 전환하게 되고, 생산된 바이오매스는 연료, 사료, 퇴비, 정밀화학제품, 건강식품 등 유용물질을 생산하는 데 원료로서 재활용될 수 있다.

[0003] 한편, 남조류(blue-green algae)는 빠른 대사속도와 저광도, 저영양 조건에서 생장, 생존이 가능하며, 형질전환을 위한 유전자 조작이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한 엽록체의 기원으로 진핵미세조류도 남조류의 광합성 기작과 지방산 대사를 포함한 탄소대사를 이용하기 때문에 남조류에 대한 바이오디젤 생산 연구는 진핵미세조류에 바로 적용이 가능한 모델시스템으로 사용가능하다. 이와 관련하여 한국 공개특허 제2013-0014091호는 미세조류로부터 바이오디젤용 원료유를 추출하는 방법 및 이를 이용한 바이오디젤 생산방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나 상기 선행기술의 경우, 추출공정이 복잡하고 생산수율이 높지 않아 경제성이 떨어지는 문제점이 있다.

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 외래 FAMT 유전자를 미세조류인 시네코시스티스의 유전체 내에 삽입하여 상기 미세조류가 바이오디젤을 효율적으로 생산함에 따라 경제성이 우수한 FAMT 유전자를 이용한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트가 유전체 내 삽입되어 세포 내에서 바이오디젤을 생산하는, 형질전환 미세조류 균주가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 형질전환 시네코시스티스 속 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 및 상기 배양단계에서 생산된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계를 포함하는, 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 시네코시스티스 속 균주의 유전체 내에 삽입하여 형질전환 균주를 제조하는 단계: 및 상기 유전자 컨스트럭트가 상동 재조합에 의해 유전체 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 바이오디젤을 생산하는 형질전환 시네코시스티스 속 균주의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

[0009] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 FAMT 유전자를 이용한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법은 상기 FAMT 유전자가 유전체 내 삽입된 남조류가 바이오디젤인 FAME(fatty acid methyl ester)를 직접 세포 내에서 효율적으로 생산하는 효과를 구현할 수 있다. 이에 따라 후처리 과정을 줄임으로 바이오디젤의 경제성 확보에 큰 도움을 줄 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 FAMT 유전자 삽입을 통해 바이오디젤인 FAME가 생산되는 대사경로를 개략적으로 나타내는 개요도이다.

도 2는 본 발명의 FAMT 유전자에 항생제 저항성 유전자(GmR)와 유전체 삽입을 위한 상동재조합 영역에 대한 재조합 DNA 조각이 pTOP V2 벡터에 삽입된 벡터의 모식도이다.

도 3은 본 발명의 FAMT 유전자가 도입된 형질전환 균주의 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 겔 사진이다. *FAMT 1137 bp , JHAMT 912 bp

도 4는 본 발명의 FAMT 유전자가 도입된 형질전환 균주의 단백질 발현을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 겔사진이다. *FAMT 41.6kDa, JHAMT 33.3kDa

도 5는 FAMT 또는 JHAMT 도입에 따른 지방산의 함량과 성분을 GC로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 유전자 도입이 없는 야생형은 음성대조군(WT, negative control)으로 사용하였고 FAMT 유전자가 도입된 형질전환체에 의해 생산된 FAME 결과(OFC), JHAMT 유전자가 도입된 형질전환체에 의해 생산된 FAME 결과(OJC)이다. 생성된 FAME의 분석을 위해 FAME mix를 양성대조군으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **용어의 정의:**

[0012] 본 문서에서 사용되는 용어 "바이오디젤(bio-diesel)"은 식물성 기름이나 동물성 지방을 원료로 하여 만든 바이오연료로 바이오에탄올과 함께 가장 널리 사용된다. 보통 메탄올을 이용해 3가의 지방산에 글리세롤이 결합한 트라이글리세리드로부터 글리세롤을 분리한 다음, 지방산에스터를 만들어 내는 에스테르 교환방법을 통하여 만든다. 이때 만든 바이오디젤이 바로 지방산 메틸에스테르(FAME)이다.

[0013] 본 문서에서 사용되는 용어 "남조류(blue-green algae)"는 광합성을 하는 미생물로써 여름철 갈수기에 저수지

수질이 약화될 때 수 일 내에 저수지 전체를 덮을 만큼 성장한다. 유성생식을 하지 않아 세균류와 같이 이분열로 증식하여서 분열생물이라고도 불린다. 시아노박테리아(cyanobacteria; 청녹색세균 또는 남색세균)라고 불리기도 하는데 식물성 플랑크톤으로서 서식범위가 매우 넓고, 최근 수자원의 부영양화와 함께 수화현상을 형성하는 Anabaena, Microcystis나 곰팡이 냄새 물질을 생산하는 Anabaena, Phormidium, Oscillatoria 등의 번식이 문제시 되고 있다. 남조류는 지구의 탄소 및 질소 순환에서 필수불가결한 역할을 하며, 광범위한 서식환경(niches)에 분포되어 있으며 매우 다양한 범위의 환경 조건에 대한 뛰어난 내성으로 인해 극지방 및 고산지대를 포함하는 가능한 거의 모든 환경에서 발견되고 있다.

[0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "FAMT(fatty acid methyltransferase)"는 박테리아에서 지방산 메틸 에스테르(fatty acid methyl esters)를 생성하기 위해 1차 대사로부터 생성물을 전환시키는데 필요한 생체 촉매(biocatalysts)를 의미한다.

[0015] 본 문서에서 사용되는 용어 "JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)"는 S-adenosyl-l-methionine(SAM)에서 JH 산의 카르복실기로 메틸 그룹을 옮겨 알라타체(corpora allata)에서 활성 JH를 생성하는 효소이다.

[0016] **발명의 상세한 설명:**

[0017] 본 발명의 일 관점에 따르면, FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트가 유전체 내 삽입되어 세포 내에서 바이오디젤을 생산하는, 형질전환 미세조류 균주가 제공된다.

[0018] 상기 형질전환 미세조류 균주에 있어서, 상기 미세조류는 남조류일 수 있고 상기 남조류는 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.)일 수 있으며 상기 폴리뉴클레오타이드가 상동 재조합에 의해 유전체 내 삽입될 수 있다.

[0019] 상기 형질전환 미세조류 균주에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 항생제 내성 유전자를 추가로 포함할 수 있고 상기 항생제 내성 유전자는 젠타마이신(gentamycin) 저항성 유전자일 수 있다.

[0020] 상기 형질전환 미세조류 균주에 있어서, 상기 JHAMT는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있고 상기 FAMT는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있으며 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2(JHAMT) 또는 4 (FAMT)로 기재되는 핵산 서열로 구성될 수 있으며 에스테르 교환반응 처리 없이 세포 배양과 동시에 직접 바이오디젤을 생산할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 형질전환 시네코시스티스 속 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 및 상기 배양단계에서 생산된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계를 포함하는, 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.

[0022] 상기 생산방법에 있어서, 상기 바이오디젤 정제단계는 배양단계에서 배양된 세포를 수득한 후 유기용매 및 증류수를 혼합한 혼합물을 첨가하여 지질층을 수득함으로써 수행될 수 있고 상기 혼합물은 클로로포름 7 내지 9, 메탄올 3 내지 5 및 증류수 2 내지 4의 비율로 제조될 수 있다. 상기 비율은 부피비일 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, FAMT(fatty acid methyltransferase) 또는 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 시네코시스티스 속 균주의 유전체 내에 삽입하여 형질전환 균주를 제조하는 단계: 및 상기 유전자 컨스트럭트가 상동 재조합에 의해 유전체 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 바이오디젤을 생산하는 형질전환 시네코시스티스 속 균주의 제조방법이 제공된다.

[0024] 일반적으로 미세조류로부터 바이오디젤을 생산하기 위해서는 세포 수확 후 비누화(saponification) 및 에스테르 교환반응(transestrification) 과정을 거쳐 FAME(fatty acid methyl ester) 형태로 전환하므로 이에 따른 추가적인 공정, 비용 및 인력이 소요된다. 하지만 세포 내에서 이산화탄소를 바이오디젤로 바로 사용가능한 FAME 형태로 직접 생산된다면 후처리 과정을 줄임으로 바이오디젤의 경제성 확보에 큰 도움을 줄 수 있다.

[0025] 이와 관련하여 2011년, Walnut Creek, CA의 Athanasios Lykidis 교수 연구팀은 대장균에 *Mycobacterium marinum* 유래의 FAMT(fatty acid methyltransferase) 도입한 결과 상기 FAMT가 C8:0부터 C12:0 길이의 지방산에 활성을 가지며, FAME 생산량은 ~16 mg/L인 것으로 나타났다. 이후 미국 캘리포니아 대학의 James U. Bowie 교수 연구팀은 대장균에 *Drosophila melanogaster* 유래의 C12:0부터 C16:0 길이의 지방산에 활성을 가진 Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase(JHAMT) 발현 유전자를 도입하였고, 0.56 g/L의 FAME를

생산하였다.

[0026] 본 발명자들은 바이오디젤 생산에 대한 경제성 향상을 위해 예의노력한 결과 형질전환 시스템을 통하여 외래 FAMT 유전자를 남조류인 시네코시스티스의 유전체(genome) 내에 삽입하여 세포 내 직접 바이오디젤인 FAME를 생산이 가능한 형질전환 미세조류 균주(*Synechocystis sp.* PCC6803)를 개발하였다. 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 형질전환 균주는 FAME가 세포에서 직접 생산되어 생산 후 에스테르 교환반응(transestrification) 처리 없이 세포 배양과 동시에 직접 바이오디젤(FAME)를 생산하기 때문에 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0028] **실시예 1: 서열번호 확보**

[0029] 미세조류는 광합성을 통해 이산화탄소를 화학적 에너지인 글루코오즈로 전환한다. 이후 해당과정을 거쳐 탄수화물, 단백질, 지방산, 핵산과 같이 세포를 구성하는 물질을 생산하게 된다. 상기 해당과정에서 acetyl-coA를 통해 생산되는 지방산은 지질로 전환되어 세포막을 구성하게 된다. 이때 생산되는 지방산에 FAMT 단백질을 이용하면 지방산이 FAME로 세포내에서 전환이 이루어지게 된다(도 1). 본 발명자들은 NCBI의 자료와 종래 참고문헌을 활용하여, 메틸 에스테르(methyl ester)기를 지방산에 추가할 수 있는 효소인 FAMT 단백질 2종의 아미노산 서열을 확보하였다. 서열번호 1은 *Drosophila melanogaster*의 JHAMT(Juvenile Hormone Acid O-Methyltransferase)에 대한 아미노산 서열이며, 서열번호 2는 JHAMT의 아미노산 서열을 이용하여 시네코시스티스 균주에 적합한 코돈으로 최적화한 염기서열이다. 서열번호 3은 *Arabidopsis thalina*의 FAMT(fatty acid methyltransferase)에 대한 아미노산 서열이며, 서열번호 4는 FAMT의 아미노산 서열을 이용하여 시네코시스티스 균주에 적합한 코돈으로 최적화한 염기서열이다.

[0030] **실시예 2: 게놈(genomic) DNA 추출**

[0031] 본 발명자들은 남조류 시네코시스티스의 돌연변이종(*Synechocystis sp.* PCC6803) 제조를 위해 시네코시스티스의 게놈 DNA를 추출하였다. 구체적으로 회수한 남조류 세포에 STE buffer(200 ㎕) 및 라이소자임(lysozyme, 20 mg/mL)을 첨가 후 37℃에서 2시간 반응시켜 세포벽을 제거하였고 10%의 SDS 5 ㎕를 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 proteinase K 20 ㎕를 첨가하여 60℃에서 2시간 동안 반응시켜 단백질을 제거하였다. 그 후, 200 ㎕ Tris buffer 및 400 ㎕ 페놀(phenol)을 첨가하였으며 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였고 상기 원심분리한 300 ㎕ 상등액을 새로운 마이크로원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 담고 같은 부피의 phenol:chloroform:IAA를 첨가한 후 다시 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 이어서, 200 ㎕ 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후 DNA 침전을 위해 상등액의 1/10 부피의 3 M 초산나트륨(sodium acetate) pH 5.0과 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 혼합하였고 짧게 원심분리한 후 상등액을 버리고 70% 에탄올을 이용하여 침전된 DNA를 세척(washing)하였으며 70% 에탄올을 제거한 후 펠렛(pellet)을 상온에서 건조시켰다. 마지막으로 상기 건조된 펠렛에 50 ㎕ TE buffer를 첨가한 후 4℃ 냉동고에 보관하였다.

[0032] **실시예 3: Overlap-extension PCR**

[0033] 본 발명자들은 표적 DNA 인서트(insert)를 제조하기 위해 overlap-extension PCR을 수행하였다. 구체적으로 Overlap-extension PCR은 각각의 인서트들을 연결하여 하나의 큰 카세트를 제작하기 위해 수행하였다.

[0034] *slr*2030과 *slr*2031은 미세조류 내 상동 재조합(homologous recombination)을 위한 플랫폼(platform)으로 사용이 되었다. *slr*2030과 *slr*2031 사이에 젠타마이신 저항성 유전자(Gentamicin resistance gene, Gm), psbA2 promoter(Gm/P) 및 외래유전자 JHAMT 또는 FAMT를 삽입하였다. 또한, 단백질 발현 확인 및 정제를 위하여 DmJHAMT와 AtFAMT 유전자에 6X his-tag을 첨가하였다.

[0035] 상기 각 인서트들을 연결하기 위해서 말단과 앞부분에 그 다음 인서트의 20 bp를 추가하여 프라이머를 디자인하였다. 또한 PCR 조건은 Pfu polymerase 0.5 ㎕, 버퍼 10 ㎕, dNTP 4 ㎕, 각 포워드 및 리버스 프라이머(서열번호 5 내지 14) 0.5 ㎕, 주형 DNA(Synechocystis 게놈 DNA) 50 ng과 나머지는 증류수로 최종 부피 50 ㎕를 이용하였고 PCR 반응은 PrimeSTAR HS DNA polymerase(Takara, Japan)를 사용하여 98℃에서 10초, 60℃에서 5초, 72℃에서 1분(1 min/ kb)으로 30번 반복하였다. 상기 재조합 DNA 인서트를 양쪽 말단부위가 평활 말단(blunt end)인 pTOP V2 벡터(Enzynomics, KOREA)에 라이게이즈(ligase)를 이용하여 결찰(ligation)한 후 시네코시스티스에 형질전환하였다(도 2). 상기 PCR 분석 및 본 발명에서 사용한 프라이머에 관한 정보를 하기 표 1에 요약하였

다.

표 1

[0036] 프라이머 핵산서열 정보

프라이머	핵산서열(5'-->3')	서열번호
1F	TTTCTCATTGCCCGTCAACC	5
1R	TACACTCGAGCGATGAAGCATTAGCAATGGCGGGAGACAG	6
2F	CTGTCTCCCGCCATTGCTAATGCTTCATCGCTCGAGTGTA	7
2R	TGGTGATGGTGATGATGCATATGGTTATAATTCCTTATGT	8
3F	ACATAAGGAATTATAACCATATGCATCATCACCATCACCA	9
3-1R (FAMT)	AGAAAAATTAACGGGGTTTTTTATTTGCGAGTTAGGGAGA	10
3-2R (JHAMT)	AGAAAAATTAACGGGGTTTTTCAGTTAATGCCCTTAACTA	11
4-1F (FAMT)	TCTCCCTAACTCGCAAATAAAAAACCCCGTTAATTTTTCT	12
4-2F (JHAMT)	TAGTTAAGGGCATTAACTGAAAAACCCCGTTAATTTTTCT	13
4R	AGTGGAAGAATCCAATGTGA	14
FAMT-F	ATGCATCATCACCATCACCACTCTCCTTCTCGAGATAGTC	15
FAMT-R	TTTGCGAGTTAGGGAGACTACAATCACTAACGTCATGTTT	16
JHAMT-F	ATGCATCATCACCATCACCACAACCAAGCATCTCTGTATC	17
JHAMT-R	GTTAATGCCCTTAACTAAATTCTGGTGGGTCGGTTCCAGA	18

[0037] **실시예 4: RNA 추출**

[0038] 본 발명자들은 RNA 추출을 위해 형질전환 균주인 *Synechocystis sp.* PCC 6803의 세포 배양 1 ml을 원심분리하였고 펠렛만을 수득하였다. 그 후 상기 펠렛을 400 ㎕ STE 버퍼에 풀어준 후, 500 ㎕ acid hot phenol을 첨가하여 65℃에서 10분간 반응시켰으며 잘 혼합해준 다음 4℃ 및 13,000 rpm조건으로 15분간 원심분리 하였다. 그 후 상등액을 새로운 마이크로원심분리 튜브에 옮겨 상온에서 5분간 방치하였고 500 ㎕ TRIzol을 첨가하여 혼합한 후 다시 상온에서 5분간 방치하였다. 이어서 250 ㎕ 클로로포름(TRIzol 양의 절반)을 첨가하여 상온에서 3분간 방치하였고 다시 4℃ 및 13,000 rpm조건으로 15분간 원심분리하였으며 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후 RNA 침전을 위해 상기 상등액의 1/10 부피의 3M 초산나트륨 pH 5.5 및 3배 부피의 100% 에탄올을 첨가하고 혼합하였다. 이어서 -80℃에서 30분간 방치 후 4℃ 및 13,000 rpm조건으로 15분간 원심분리하였고 상등액을 버리고 RNA를 세척하기 위해 1 ml 75% 에탄올을 첨가하고 5분간 4℃에 방치한 후 다시 4℃ 및 13,000 rpm조건으로 10분간 원심분리하였으며 상등액을 제거한 후 펠렛을 진공건조로 건조시켰다. 마지막으로 상기 건조된 펠렛은 50 ㎕ RNAse-free water를 첨가하고 -80℃에 보관하였다.

[0039] **실시예 5: RT-PCR**

[0040] 본 발명에서 수행한 RT-PCR 조건은 PrimeScript 1 step enzyme mix 2 ㎕, 2X 1 step buffer 25 ㎕, 상기 표 1의 각 포워드 및 리버스 프라이머 1 ㎕(서열번호 15 내지 18), 주형 RNA 50 ng과 나머지는 증류수로 최종 부피 50 ㎕를 채웠고 PCR 제품은 PrimeScript One Step RT-PCR kit ver.2(Takara, Japan)를 사용하였다. 또한 반응 조건은 50℃에서 30분, 94℃에서 2분으로 수행한 후 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분 (1 min/ kb)으로 30번 반복하였고 아가로즈 겔에서 PCR 산물을 확인하였다.

[0041] **실시예 6: 형질전환 균주 배양**

[0042] 본 발명의 시네코시스티스는 선모(pilus)를 가지고 있어 외부 DNA를 세포 내로 삽입시키는 것이 용이한 자연 형질전환체(natural transformant)로 알려져 있다. 본 발명자들은 상기 시네코시스티스가 자연적인 수용성 세포(competent cell)이기 때문에 앞서 제작된 플라스미드를 배양액에 섞어 30℃에서 5시간 배양하였다. 그 후 1.5% 고체 배지위에 0.75% 한천이 섞인 시네코시스티스 배양액을 부어 굳힌 후 낮은 광도(≤ 10 μmol $m^{-2} s^{-1}$)의 30℃ 배양기에서 배양하였다. 또한 항생제(항생제 최종농도의 1/8 농도로 처리)는 세포가 자란 3 - 4일 후 1.5% 한천 배지를 들고 플레이트 바닥에 주입하였고 그 후 한 달간 고체배지를 관찰하여 자라있는 콜로니를 항생제를 포함하는 새 BG-11 고체배지로 옮겨주었으며 상기 RT-PCR을 이용하여 재조합 DNA가 염색체 상에 삽입되었음을 확인하였다(도 3).

[0043] **실시예 7: 단백질 추출 및 정량**

[0044] 본 발명자들은 형질전환 균주의 단백질 추출 및 정량을 위해 *Synechocystis sp*. PCC 6803의 세포 배양 5 ml을 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 펠렛만을 수득하였다. 그 후 2 ml PBS 버퍼로 2번 세척하여 배지성분을 제거한 다음 200 ㎕ PBS로 상기 펠렛을 풀어주었고 글래스 비드를 충분히 넣고, bead가 가라앉고 배양액이 2-3 mm 정도 남게 10분간 볼텍싱하였다. 이 때 30초간 볼텍싱을 하고 30초는 얼음에 넣어 열을 식혀주었고 100 ㎕ PBS 버퍼를 첨가하여 원심분리를 통해 조단백질(crude protein)인 상등액만을 튜브로 옮겼다. 단백질 정량은 브래드포드 분석법(Bradford assay)을 이용하여 표준곡선(Standard curve)은 BSA로 구간은 0.2-0.9 mg/ml로 수행하였으며 5X 염색 시약을 희석한 후, 시약 5 ml에 정량할 단백질 샘플들을 100 ㎕를 넣고 5분간 반응시킨 다음 흡광도 595 nm에서 측정하였다.

[0045] **실시예 8: 웨스턴 블랏 분석**

[0046] 본 발명자들은 웨스턴 블랏 분석을 위해 상기 정량한 단백질(20-30 ㎍)을 로딩(loading)하여 100 V의 조건으로 60분간 SDS-PAGE(30:0.8) 겔에서 분리하였다(버퍼: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS). 또한 전기영동은 SDS-PAGE 겔에서 PVDF membrane으로 90 V에서 90분간 수행하였고(버퍼: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% 메탄올) TBS(200 mM Tris-base, 1.37 M NaCl pH 7.6)에 0.1% Tween 20을 첨가한 5% 탈지유를 이용하여 차단을 수행하였으며 TBS(0.1% Tween 20 첨가)로 15분간 3번 세척하였다. 이어서 1차 6X-His 단일클론 항체를 1:1000으로 차단용액으로 희석하여 4℃에서 밤새 배양하였고 TBS(0.1% Tween 20 첨가)로 20분간 3번 세척하였다. 그 후, 2차 m-IgGk BP-HRP 항체도 1:1000으로 블록 솔루션으로 희석하였고 TBS(0.1% Tween 20 첨가)으로 20분간 3번 세척하였으며 ECL 용액을 처리한 후 감광함으로써, 화학발광 이미지를 수득하였다.

[0047] 그 결과, 본 발명의 FAMT(41.6 kDa) 및 JHAMT(33.3 kDa) 단백질의 발현을 확인하였다(도 4).

[0048] **실시예 9: JHAMT 및 FAMT 형질전환 균주의 FAME 분석**

[0049] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 FAMT 형질전환 균주의 균체의 FAME을 조사하였다. 구체적으로, 광에너지와 이산화탄소, 포도당을 이용할 수 있는 혼합영양 조건(mixotrophic condition)에서 250 ㎖ 삼각플라스크(erlenmeyer flask)를 이용하여 배양 부피 100 ㎖로 세포배양을 수행하였다. 또한 광원은 피코빌리단백질(phycobiliprotein)의 흡수파장을 포함하고 있는 오파장 램프를 사용하였으며, 광도는 30 μmol $m^{-2}s^{-1}$로 유지하였다. 아울러 대조군인 야생형 *Synechocystis sp*. PCC6803 및 형질전환 균주 모두 세포 최적의 성장온도인 30℃에서 배양하였다.

[0050] 형질전환 균주에서 FAME이 생성되었는지 알아보기 위해 야생형 및 형질전환 균주 모두 동결건조를 하였다. 상기 동결건조 시킨 세포에서 지질을 추출하기 위해 Chloroform:Methanol:DW = 8:4:3(Folch method)의 비율로 상온에서 한 시간 반응하여 추출하였다. 지질층을 얻은 후, 질소 가스(nitrogen gas)를 이용해 농축하고 1 ml n-Hexane을 첨가하여 녹여준다. 층 분리가 되면, 상등액 0.9 ml에 internal stanrdard ($C_{17:0}$) 0.1 ml을 GC vial에 넣고 FID(Flame Ionization Detector)가 장착된 가스 크로마토그래피(GC-Mass, model YL6500GC, 영린기기)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼(column)은 두께 0.2 μm, 내부직경 0.25 μm, 길이가 30 m인 모세관 칼럼(HP-INNOWAX)을 사용하였고 운반기체는 헬륨을 사용하였으며 하기 표 2의 조건으로 분석하였다. 이 때 양성대조군(Positive control)로써 FAME mix를 이용하였다.

표 2

[0051] 가스 크로마토그래피 분석 조건

분류	조건
운반속도	8 mL/min
초기온도	140℃
초기 정체시간	2 min
승온속도	4℃/min
최종온도	240℃
지속시간	35분

[0052] 그 결과, FAME 피크가 나타나지 않은 대조군과 비교하여 FAMT 형질전환 균주는 팔미트산(16:0)에서 피크가 나타났고 JHAMT 형질전환 균주는 팔미톨레산(16:1)에서 FAME peak가 나타나는 것을 확인하였다(도 5). 상기 결과는 FAMT 유전자가 삽입된 본 발명의 형질전환 균주가 세포 내에서 FAMT 혹은 JHAMT 효소 작용을 통해 바이오디젤인

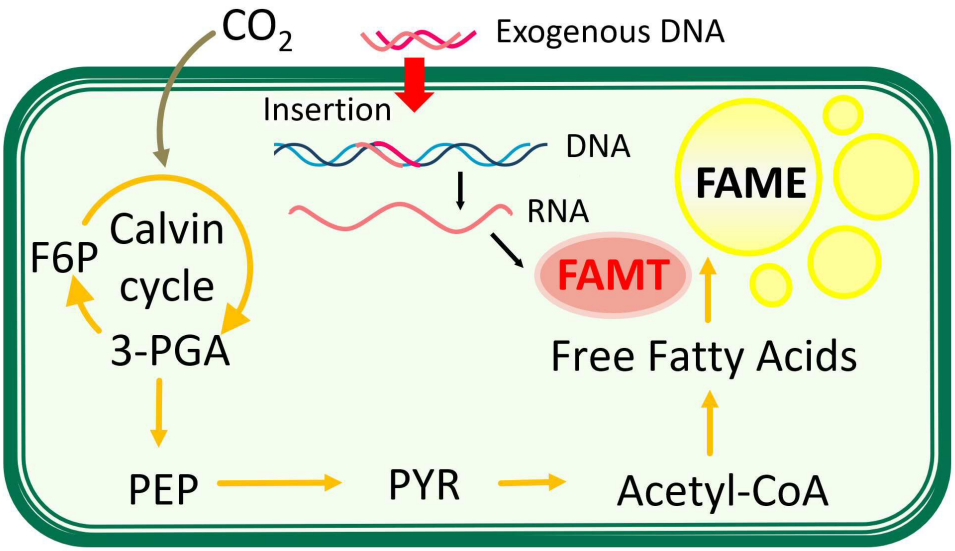
FAME 성분을 생산할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0053] 결론적으로, 본 발명의 FAMT 유전자를 이용한 남조류 세포 내 바이오디젤 생산방법은 야생형과 비교하여 에스테르 교환반응 수행 없이도 바이오디젤 생산 수율이 증가하였으므로 바이오디젤의 산업적 생산에 경제성 확보를 위해 활용 가능하다.

[0054] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

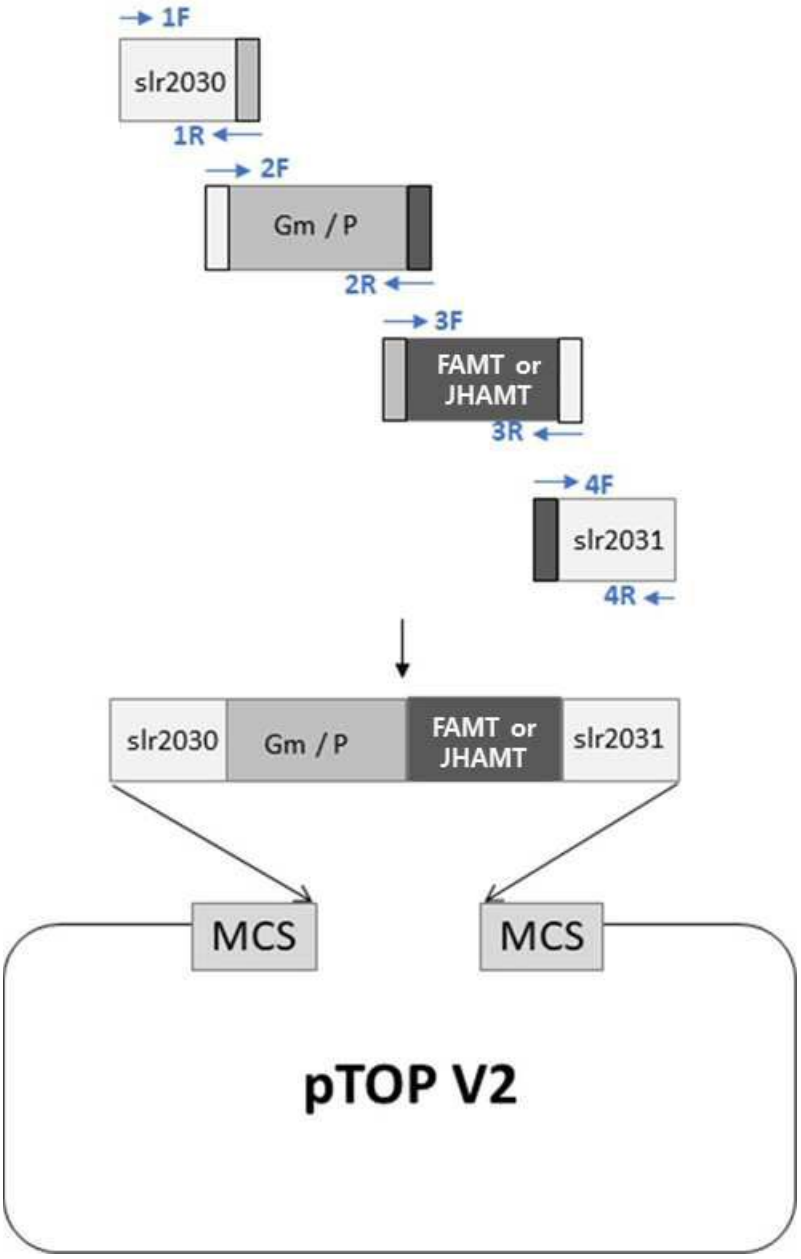
도면

도면1

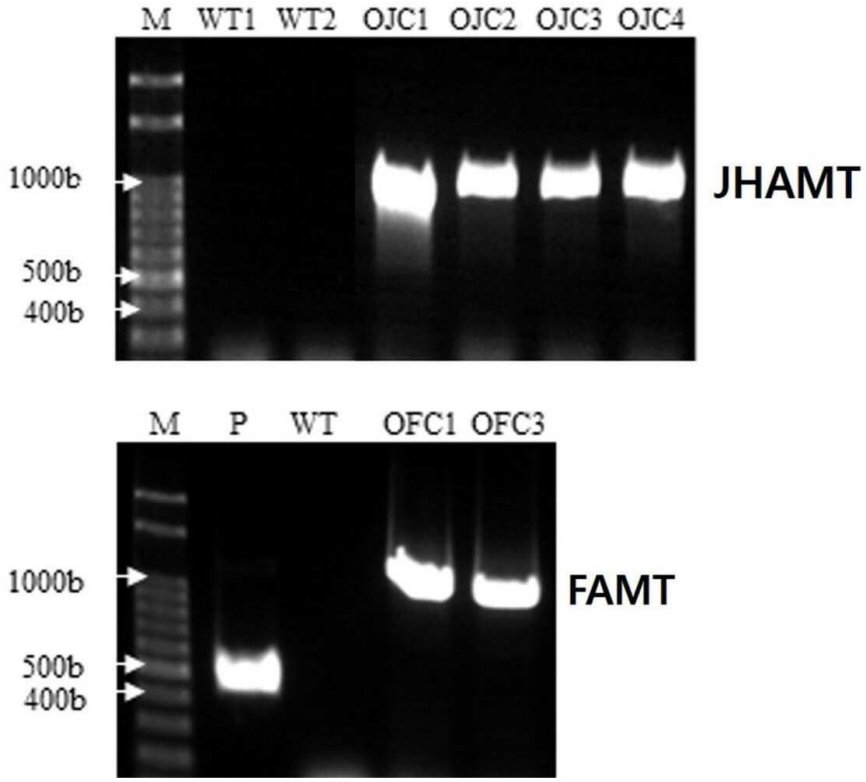


3-PGA: 3-Phospho-D-glycerate; F6P: fructose 6-phosphate; PEP: Phosphoenol pyruvate; PYR: Pyruvate; OAA: oxoacetate; Acyl-ACP: Acyl-acyl carrier protein; FAMT: fatty acid methyltransferase; FAME: fatty acid methyl ester

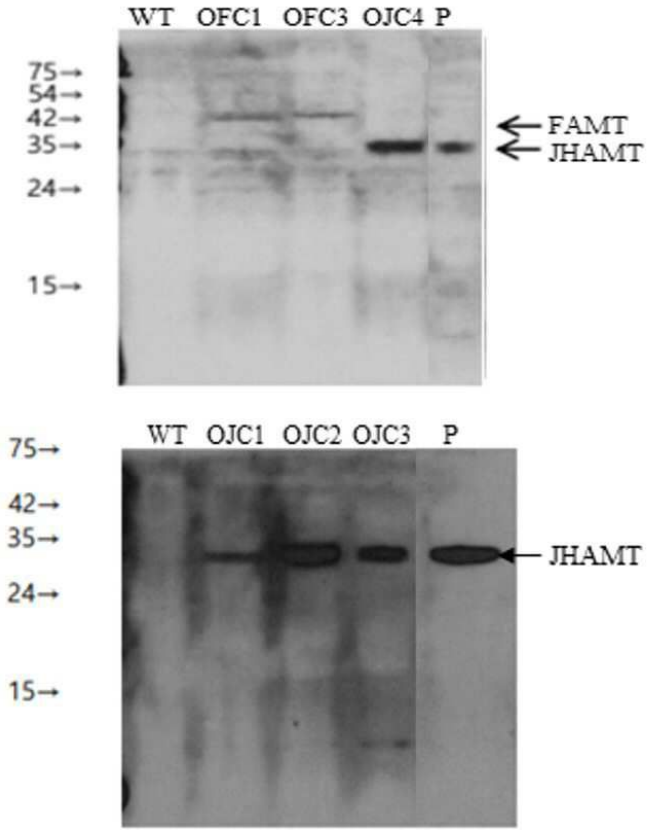
도면2


1F
slr2030
1R
2F
Gm / P
2R
3F
FAMT or JHAMT
3R
4F
slr2031
4R
slr2030
Gm / P
FAMT or JHAMT
slr2031
MCS
MCS
pTOP V2

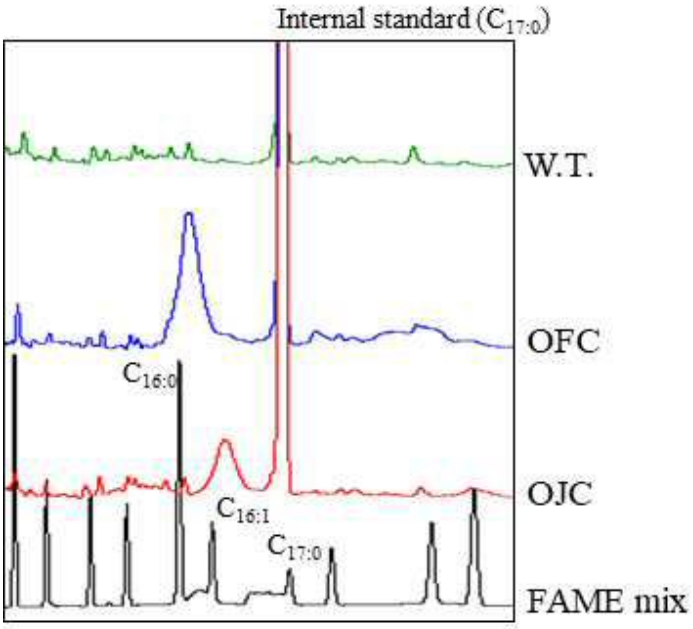
도면3


M WT1 WT2 OJC1 OJC2 OJC3 OJC4
1000b
500b
400b
JHAMT
M P WT OFC1 OFC3
1000b
500b
400b
FAMT

도면4


WT OFC1 OFC3 OJC4 P
75→
54→
42→
35→
24→
15→
FAMT
JHAMT
WT OJC1 OJC2 OJC3 P
75→
42→
35→
24→
15→
JHAMT

도면5



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Method for producing biodiesel in blue-green algae cells using FAMT gene

<130> PD20-5933

<160> 18

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 1

Met Asn Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Lys Asn
1 5 10 15

Asp Ala Ser Phe Val Ile Asp Asn Tyr Leu Arg Leu Ile Lys Trp Lys
20 25 30

Pro Asn Ala Asn Ile Leu Asp Ile Gly Ser Gly Asp Gly Asn Val Ile
35 40 45

Phe Glu Leu Leu Leu Pro Lys Ile Pro Lys His Phe Ala Lys Phe Val
50 55 60

Gly Thr Asp Ile Ser Glu Glu Met Val Leu Phe Ala Lys Asn Gln Cys
65 70 75 80
Asn Asp Pro Lys Ile Asp Phe Leu Gln Met Asp Ile Ser Ala Thr Ile
85 90 95
Pro Pro Glu Phe His Glu Tyr Phe Asp His Ile Phe Ser Phe Tyr Cys

100 105 110
Leu His Trp Val Val Glu Gln Arg Gln Ala Met Lys Asn Ile Phe Asp
115 120 125
Met Leu Lys Pro Gly Gly Glu Met Leu Leu Thr Phe Leu Ala Ser Asn
130 135 140
Pro Ile Tyr Asp Ile Tyr Glu Arg Met Ala Lys Ser Asn Lys Trp Gly
145 150 155 160
Pro Tyr Met Asn Asn Leu Lys Lys Tyr Ile Ser Pro Tyr His His Ser
165 170 175

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

245 250 255
Asp Asn Glu Glu Lys Ile His Val Pro Tyr Lys Leu Phe Val Thr Phe
260 265 270
Ala Ser Lys Pro Val
275

<210> 2
<211> 912
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 2

atgcatcatc accatcacca caaccaagca tctctgtatc agcatgctaa tcaggtgcag 60

cgccatgatg caaaactcat cttggatgaa tttgctagta ctatgcagtg gcggtccgac 120

ggtgaggacg ccctcttgga cgttggtagc ggcagtggaa atgttctgat ggatttcgtg 180

aagcccctgt tgccgattcg gggacaacta gttggaacgg acattagctc tcaaatggta 240

cactatgcga gcaagcacta ccaacgggag gaacgaaccc ggttccaagt tttagatatt 300

ggctgcgaac gtttacccga ggaactaagc gggcggttcg accatgttac gtcttttat 360

tgcctacact gggtccaaaa cctgaaggga gccctgggaa acatctataa tttgttaaag 420

cccgaaggcg gtgactgttt gttagcattt ctcgcttcca atcctgtgta cgaagtgtac 480

aaaattctca aaactaatga taagtggtcc acttatatgc aagacgttga gaattttatc 540

agtcctctcc attattcttt aaacccaggg gaagaattta gtcagttgct caatgacgtt 600

ggatttgttc agcataatgt ggagattcgg aatgaagtat ttgtctacga aggggtacgt 660

accctgaaag ataacgttaa agccatctgc ccgttcctgg agcgtatgcc cgccgatcta 720

cacgaacagt tcttagacga tttcatcgac atcgtaattt ccatgaatct ccagcaagga 780

gagaataatg aagatcagaa gtttctctcc ccgtataagc tagtagtcgc atacgcacga 840

aaaacacccg aatttgtaaa taatgttttt ctggaaccga cccaccagaa tttagttaag 900

ggcattaact ga 912

<210> 3

<211> 372

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Ser Pro Ser Arg Asp Ser Leu Val Asp Ala Leu Lys Met Lys Gly
1 5 10 15

Gly Thr Gly Asp His Ser Tyr Ala Thr Asn Ser His Tyr Gln Arg Ser
20 25 30

Val Phe Tyr Glu Ile Gln Pro Leu Val Ile Glu Asn Val Arg Glu Met
35 40 45

Leu Leu Lys Asn Gly Phe Pro Gly Cys Ile Lys Val Ala Asp Leu Gly
50 55 60

Cys Ser Thr Gly Gln Asn Thr Val Leu Ala Met Ser Ala Ile Ala Tyr

65 70 75 80

Thr Ile Met Glu Ser Tyr Gln Gln Met Ser Lys Asn Pro Pro Glu Ile

85 90 95

Asp Cys Tyr Leu Asn Asp Leu Pro Glu Asn Asp Phe Asn Thr Thr Phe

100 105 110

Lys Leu Phe His Ser Phe Gln Glu Lys Leu Lys Pro Glu Val Lys Gly

115 120 125

Lys Trp Phe Val Ser Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Ser Arg Leu Phe

130 135 140

Pro Arg Lys Ser Leu His Phe Val His Ser Ala Phe Ser Ile His Trp

145 150 155 160

Leu Ser Arg Ile Pro Asp Gly Leu Glu Ser Asn Thr Lys Ser Ile His

165 170 175

Ile Lys Tyr Pro Tyr Pro Ser Asn Val Tyr Lys Ser Tyr Leu Asn Gln

180 185 190

Phe Lys Ile Asp Phe Ser Leu Phe Leu Lys Met Arg Ser Glu Glu Val

195 200 205

Val His Asn Gly His Met Val Leu Thr Phe Val Gly Arg Lys Val Ser

210 215 220

Asp Thr Leu Ser Lys Asp Cys Phe Gln Val Trp Ser Leu Leu Ser Asp

225 230 235 240

Cys Leu Leu Asp Leu Ala Ser Glu Gly Phe Val Asn Asp Ser Met Val

245 250 255

Lys Ser Phe Asn Met Pro Phe Tyr Asn Pro Asn Glu Glu Glu Val Arg

260 265 270

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

275 280 285

Phe Asp His Val Val Pro Tyr Lys Ile Asp Arg Glu Glu Glu Asp Glu

290 295 300

Glu Gln Ser Leu Gln Leu Glu Ala Gly Ile Lys His Ala Ser Trp Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Glu Pro Val Phe Asn Lys Tyr Ala His Tyr Met Ala Lys Tyr Leu

340 345 350

Ser Val Ser Asn His Arg Arg Asn Met Thr Leu Val Ile Val Val Ser

355 360 365

Leu Thr Arg Lys

370

<210> 4

<211> 1137

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

atgcatcatc accatcacca ctctccttct cgagatagtc tagtcgatgc attaaagatg 60

aaaggtggaa cgggagatca tagttatgcc acgaacagtc attaccagcg aagtgtattc 120

tatgaaatcc aaccgctcgt aatcgagaat gtccgcgaaa tgctgctaaa gaacgggttc 180

ccagggtgta ttaaagtggc ggatttagga tgtagtacgg ggcagaacac ggtcctggcc 240

atgagcgcga ttgcttatac tattatggag tcttatcagc aaatgagcaa gaatcccccg 300

gagattgact gctacttaaa cgacctgcca gaaaatgatt tcaacacaac ctttaagcta 360

ttccacagct ttcaggaaaa gctgaaaccc gaagtgaagg gaaaatggtt tgtcagtggc 420

gttcctgggt ctttctactc ccggctgttt cctcgtaagt ccctacattt cgtgcattct 480

gcgtttagca tccactggct ctcccgcatc ccggacggcc tcgaaagcaa tacaaagagt 540

atccatatca agtacccata cccttctaac gtgtacaaga gctacttgaa ccaatttaag 600

atcgatttct ctctgttcct gaaaatgcgc agtgaggagg tagtacataa tgggcacatg 660

gttctgactt tcgtcggacg gaaagtgagt gacaccctgt ccaaagactg ctttcaagta 720

tggagcctgc tgagcgattg tctcctcgat ctggcctccg aaggctttgt caatgatagc 780

atggtgaaaa gtttcaatat gccttttttat aaccctaatg aagaagaggt acgagagttc 840

atcctgaagg agggaagttt cgagatcaca aaaattgaaa agtttgatca cgtagtaccc 900

tacaagattg accgtgaaga ggaggacgaa gagcagagtt tacagttaga agctgggatt 960

aaacacgcga gctgggcgcg gtgcatcacc gaaccgctac tcgtggcaca ttttggagac 1020

gcgatcatcg agcctgtttt caacaagtac gcacattata tggcaaagta tctgagcgtg 1080

tccaatcatc gacgaaacat gacgttagtg attgtagtct ccctaactcg caaataa 1137

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1F

<400> 5

tttctcattg cccgtcaacc 20

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1R

<400> 6

tacactcgag cgatgaagca ttagcaatgg cgggagacag 40

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F

<400> 7

ctgtctcccg ccattgctaa tgcttcatcg ctcgagtgta 40

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2R

<400> 8

tggtgatggt gatgatgcat atggttataa ttccttatgt 40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F

<400> 9

acataaggaa ttataaccat atgcatcatc accatcacca 40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3-1R FAMT

<400> 10

agaaaaatta acggggtttt ttatttgcga gttagggaga 40

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3-2R JHAMT

<400> 11

agaaaaatta acggggtttt tcagttaatg cccttaacta 40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4-1F FAMT

<400> 12

tctccctaac tcgcaaataa aaaaccccgt taatttttct 40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4-2F JHAMT

<400> 13

tagttaaggg cattaactga aaaaccccgt taatttttct 40

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4R

<400> 14

agtggaagaa tccaatgtga 20

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAMT-F

<400> 15

atgcatcatc accatcacca ctctccttct cgagatagtc 40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAMT-R

<400> 16

tttgcgagtt agggagacta caatcactaa cgtcatgttt 40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JHAMT-F

<400> 17

atgcatcatc accatcacca caaccaagca tctctgtatc 40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JHAMT-R

<400> 18

gttaatgccc ttaactaaat tctggtgggt cggttccaga 40