



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월02일
 (11) 등록번호 10-1466614
 (24) 등록일자 2014년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07C 231/22 (2006.01) C07C 215/76 (2006.01)
 C12N 9/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0012562
 (22) 출원일자 2013년02월04일
 심사청구일자 2013년02월04일
 (65) 공개번호 10-2014-0100000
 (43) 공개일자 2014년08월14일
 (56) 선행기술조사문헌
 US7364881 B1
 US6797497 B1
 논문 Applied and Environmental Microbiology,
 Vol. 66, pp.2965-2971, 2000
 논문 European Journal of Biochemistry, Vol.
 267, pp. 1110-1116, 2000

(73) 특허권자
 한국화학연구원
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
 (72) 발명자
 송재광
 대전 유성구 배울1로 35, 405동 1701호 (관평동,
 쌍용스윗닷홈)
 이혁
 서울 강남구 압구정로 113, 24동 1008호 (압구정
 동, 미성아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

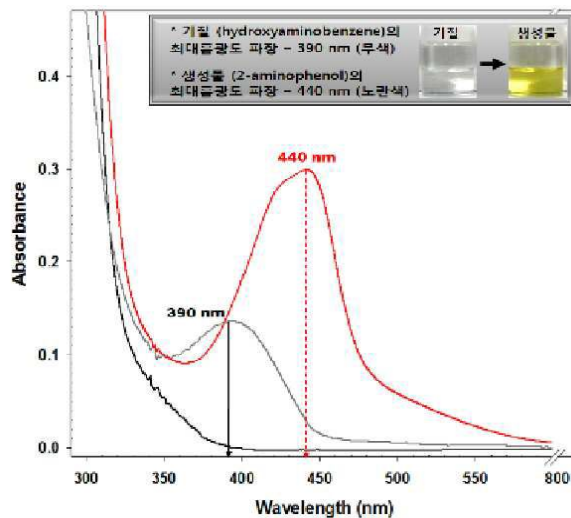
심사관 : 이선화

(54) 발명의 명칭 **메타게놈 유래의 하이드록실아미노벤젠류 미타아제를 이용하여 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 메타게놈으로부터 분리한 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류 미타아제를 이용하여 다양한 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 방법은 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질로 사용될 수 있는 다양한 아미노페놀 유도체를 제조하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박아름

경남 창원시 진해구 진해대로874번길 5-22, (석동)

이지영

대전 서구 대덕대로 150, 115동 1201호 (갈마동, 큰마을아파트)

최지은

대전광역시 유성구 신성동 엘림빌라 202호

권민아

세종 장군면 전원마을1길 35-11,

이승환

대전 유성구 유성대로821번길 4-11, 202호 (장대동, 이현빌라)

허정녕

대전 서구 둔산북로 160, 7동 1106호 (둔산동, 한마루삼성아파트)

김범태

대전 유성구 계룡로 92, 102동 1502호 (봉명동, 유성CJ나인파크)

송봉근

대전 유성구 가정로 43, 103동 1203호 (신성동, 삼성한울아파트)

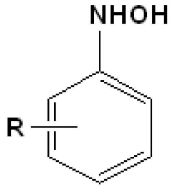
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 20120005995
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 미래기반기술개발사업
 연구과제명 메타게놈 라이브러리로부터 유용 효소 발굴과 이용 기술 확립을 통한 효소 탐색 통합시스템의 유효성 검증
 기여율 20/100
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2012.06.01 ~ 2013.07.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 M10866020003-08N6602-00310
 부처명 과학기술부
 연구관리전문기관 한국과학재단
 연구사업명 바이오연구개발사업
 연구과제명 효소 다양성 및 탐색 효율성 극대화를 위한 메타게놈 라이브러리 구축 핵심 신기술 개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2008.08.01 ~ 2009.07.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 SI-1205
 부처명 기획예산처
 연구관리전문기관 산업기술연구회
 연구사업명 정부출연 일반사업
 연구과제명 생명통합정보시스템 활용 독창적 신약개발협동연구사업
 기여율 20/100
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 SI-1101
 부처명 기획예산처
 연구관리전문기관 한국화학연구원
 연구사업명 정부출연 일반사업
 연구과제명 화학산업용 바이오촉매 활용기술 기반구축
 기여율 20/100
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 KK-1204-A0
 부처명 산업기술연구회
 연구관리전문기관 산업기술연구회
 연구사업명 기관고유사업
 연구과제명 셀룰로오스기반 기능성 화학소재 개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31
-

특허청구의 범위

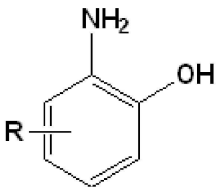
청구항 1

하기 화학식 1의 화합물을 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 (hydroxylaminobenzene mutase) 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법:

<화학식 1>



<화학식 2>

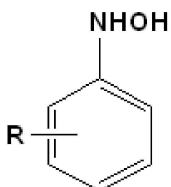


상기 식에서, R은 수소, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

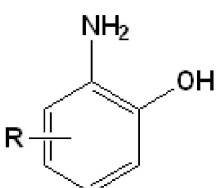
청구항 2

- 1) 하기 화학식 1의 화합물을 용매에 용해시키는 단계;
 - 2) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydroxylaminobenzene mutase)를 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및
 - 3) 생성된 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 분리하는 단계
- 를 포함하는, 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법:

<화학식 1>



<화학식 2>



상기 식에서, R은 제1항에서 정의한 바와 같다.

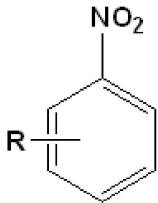
청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 2의 아미노페놀 유도체가 2-아미노페놀, 2-아미노-5-클로로페놀, 2-아미노-5-브로모페놀, 2-아미노-5-아이오도페놀, 2-아미노-5-플루오로페놀, 2-아미노-5-메틸페놀, 2-아미노-5-(t-부틸)페놀, 4-아미노-3-하이드록시벤조니트릴, 2-아미노-5-(트리플루오로메틸)페놀, 메틸 4-아미노-3-하이드록시벤조에이트, 2-아미노-4-메틸페놀, 2-아미노-6-메틸페놀 또는 3-아미노-[1,1'-바이페닐]-4-올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 3의 화합물을 용매에 용해시키고 $Sb(III)Cl_3$ 및 $NaBH_4$ 의 존재하에 질소 가스 하에서 반응시켜 제조된 것을 특징으로 하는 방법:

<화학식 3>

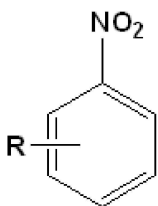


상기 식에서, R은 제1항에서 정의한 바와 같다.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 3의 화합물을 니트로리덕타아제로 처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

<화학식 3>



상기 식에서, R은 제1항에서 정의한 바와 같다.

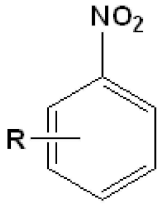
청구항 6

제2항에 있어서, 상기 단계 2)의 반응이 25 내지 45°C에서 1시간 이상 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

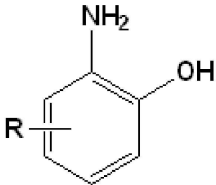
청구항 7

하기 화학식 3의 화합물을 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류타아제 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법:

<화학식 3>



<화학식 2>

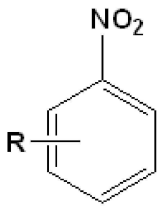


상기 식에서, R은 수소, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

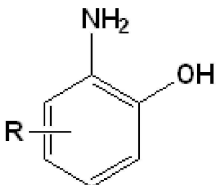
청구항 8

- 1) 하기 화학식 3의 화합물을 용매에 용해시키는 단계;
 - 2) 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류 미타아제를 동시에 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및
 - 3) 생성된 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 분리하는 단계
- 를 포함하는, 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법:

<화학식 3>



<화학식 2>

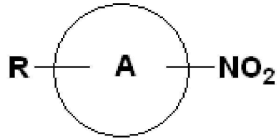


상기 식에서, R은 제7항에서 정의한 바와 같다.

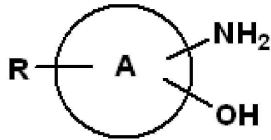
청구항 9

하기 화학식 4의 화합물을 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류 미타아제 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법:

<화학식 4>



<화학식 5>

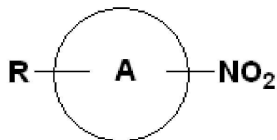


상기 식에서, A는 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로 원자를 하나 이상 포함하는 5원 내지 11원의 모노헤테로사이클이고, R은 수소, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

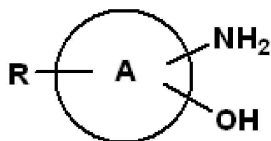
청구항 10

- 1) 하기 화학식 4의 화합물을 용매에 용해시키는 단계;
- 2) 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류 미타아제를 동시에 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및
- 3) 생성된 하기 화학식 5의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법:

<화학식 4>



<화학식 5>



상기 식에서, A 및 R은 제9항에서 정의한 바와 같다.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 고리 A가 티오펜, 피리딘, 피리미딘, 퓨란, 피롤, 피라졸 또는 다이아졸인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

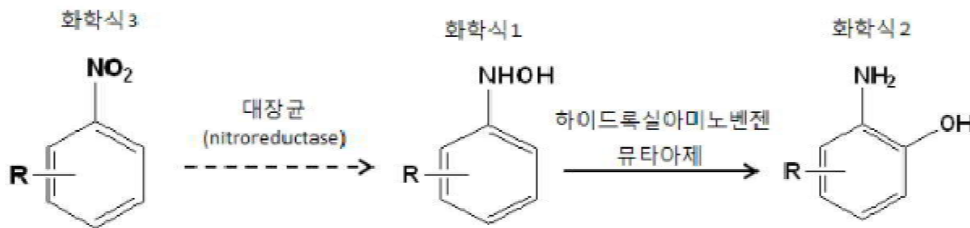
기술분야

[0001] 본 발명은 아미노페놀 유도체의 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 메타게놈으로부터 분리한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 이용하여 다양한 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(Hydroxylaminobenzene mutase)는 하기 반응식 1과 같이 하이드록실아미노벤젠(hydroxylaminobenzene)이 2-아미노페놀(2-aminophenol)로 전환되는 과정을 촉매하는 역할을 할 뿐만 아니라, 다수의 하이드록실아미노 화합물에서 하이드록실기의 자리를 바꾸어주는 역할을 하는 자리옮김효소(mutase)이다.

[0003] <반응식 1>



[0004] [0005] 상기 반응식에서 보는 바와 같이, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제에 의하여 벤젠 고리의 하이드록실아미노 관능기로부터 산소 원자가 벤젠 고리 내 옆자리로 옮겨져 새로운 하이드록실기가 생성되며, 본래 자리에는 아미노기가 남게 된다. 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 가장 간단한 기질인 하이드록실아미노벤젠 이외에도, 다양한 치환된 고리형 탄소 화합물을 기질로 하여 그에 상응하는 아미노페놀류의 화합물을 생성할 수 있다.

[0006] 진술한 바와 같은 하이드록실아미노 화합물에서 하이드록실기를 자리옮김하는 효소 반응은 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질의 제조에 유용할 것으로 기대된다.

[0007] 식품, 의약, 화장품 등의 중간체 또는 최종 목표물질을 제조함에 있어서, 종래 자리옮김 반응들은 복잡한 여러 단계의 화학 반응을 거쳐야 하므로 경제적 또는 환경적으로 높은 비용이 소모되나, 효소 또는 효소를 포함한 미생물을 촉매로 이용하는 경우 상기 반응을 보다 경제적이고 친환경적으로 개선할 수 있다. 생명체에서 유래한 효소는 초정밀성, 반응 특이성, 우수한 선택성을 포함하는 고효율의 촉매 특성을 가지고 있기 때문에 다양한 산업에 이용이 확대되고 있을 뿐 아니라, 기능면에서는 산화환원, 전이, 가수분해, 이탈 및 부가, 이성화 반응 등을 촉매하는 일반적인 기능은 물론이고 고온, 고압, 유기용매 하의 반응 등 기존의 특수한 조건에서 전환반응을 수행하지 않아도 되므로 산업적 적용범위와 활용가치가 무한하다 할 수 있다.

[0008] 이에 종래 하이드록실아미노벤젠으로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 이용하여 아미노페놀 화합물을 제조하는 방법이 보고된바 있다(미국 특허 7,364,881 및 6,797,497호 참조).

[0009] 한편, 메타게놈(metagenome)은 자연계에 존재하는 모든 미생물로부터 회수한 유전체를 통칭한다. 메타게놈은 특정한 미생물이 아니라, 토양미생물로부터 직접 추출하는 유전자원이기 때문에, 실험실에서 배양가능한 미생물에서 얻을 수 있는 유전자원보다도 월등하게 다양한 유전자원을 획득할 수 있고, 이러한 다양한 유전자원으로부터 종래의 단백질보다 우수한 특성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 검출할 수도 있다는 장점이 있다.

[0010] 따라서, 본 발명자들은 다양한 미생물이 존재하는 환경에 구축된 메타게놈 라이브러리부터 신규 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 분리하였고, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제가 다양한 아미노페놀 유도체를 생산하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

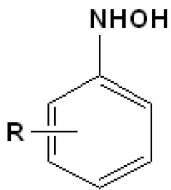
해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 메타계놈으로부터 분리한 신규 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 이용하여 다양한 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

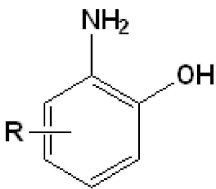
[0012] 상기 목적에 따라, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydroxylaminobenzene mutase) 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0013] <화학식 1>



[0014]

[0015] <화학식 2>



[0016]

[0017] 상기 식에서, R은 본원에서 정의한 바와 같다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 아미노페놀 유도체 제조 방법은 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질로 사용될 수 있는 다양한 아미노페놀 유도체를 제조하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 하이드록실아미노벤젠에서 2-아미노페놀로 전환되는 화학반응용액의 흡광도 변화를 이용한 고속 탐색법을 예시한 것이다.

도 2는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(*habM*) 유전자가 삽입된 pET21a/HabM 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)가 삽입된 pET21a/NBNR 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

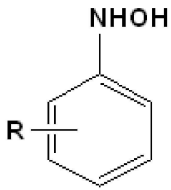
도 4는 *habM* 유전자와 *nbnr* 유전자가 삽입된 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydroxylaminobenzene mutase) 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법

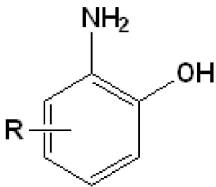
을 제공한다:

[0021] <화학식 1>



[0022]

[0023] <화학식 2>



[0024]

[0025] 상기 식에서, R은 수소, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

[0026] 본 발명의 아미노페놀 유도체의 제조 방법에서 촉매로 사용된 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 효소는 다양한 자연환경에서 채취한 토양 시료를 이용하여 구축한 메타게놈 라이브러리(metagenome library)로부터 얻어진 것이다. 구체적으로, 메타게놈 라이브러리를 구축하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 Epicentre사의 게놈 DNA 라이브러리 생산 방법 등을 참조하여 수행될 수 있으며, 상기 구축된 메타게놈 라이브러리로부터 고속탐색법(high throughput screening; HTS), 즉, 96-웰 플레이트를 기반으로 하는 활성 탐색법을 통해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발굴할 수 있다. 이후, 상기 유전자 부위의 염기서열 분석 및 종래 알려진 서열과의 상동성 분석을 통해, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있다.

[0027] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 종래 알려진 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 매우 낮은 서열 상동성을 나타낸다. 구체적으로, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 기존에 알려진 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 효소들과 최대 47%의 상동성을 나타내며, 낮게는 35% 정도의 상동성을 보인다. 예컨대, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 47%, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) HS12/pNB2, 노보스핀고븀 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) DSM 12444 및 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 46%, 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*) ATCC 12478 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 43%, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) ZWL73 및 코마모나스 종(*Comamonas* sp.) CNB-1 유래의 p-하이드록실아미노클로로벤젠 뮤타아제와 42%, 및 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis* str.) MC2 155 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 35%의 상동성을 나타낸다.

[0028] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 제조하기 위하여, 먼저 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조한다. 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다. 상기 재조합 벡터는 숙주 내에서 복제가능하여야 하며, 바람직하게는 프로모터 및 전사종결서열 등의 발현에 필요한 구성을 가질 수 있다. 재조합 벡터의 제조에 사용될 수 있는 벡터의 예로는, pET21a(+), pET22b(+), pET28b(+), pETDuet(+), pHCE19T(II), pQE30, pKK223-3, pColdIV 벡터 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0029] 또한, 프로모터는, 숙주에서 발현할 수 있는 것이면 어느 것이나 사용가능하고, 예를 들면, HCE 프로모터, T5 프로모터, T7 프로모터, Tac 프로모터, araBAD 프로모터, lac O cspA 프로모터 등을 사용할 수 있다. 또한, 재조합 벡터는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체 밖으로의 분비를 목적으로 한 분비 신호 등을 코딩하는 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 니트로벤젠을 하이드록실아미노벤젠으로 전환시키는 과정을 촉매하는 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 코딩하는 유전자(*nbnr*)를 포함할 수 있다. 상기 유전자를 포함함으로써 니트로벤젠으로부터 하이드록실아미노벤젠을 거쳐 2-아미노페놀을 제조할 수 있다.
- [0031] 이후, 상기 재조합 벡터를 적합한 숙주에 도입하여 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체를 배양한 후, 상기 배양물로부터 본 발명의 아미노페놀 유도체의 제조 방법에 사용되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 분리한다.
- [0032] 상기 숙주의 예로는 에세리키아(*Escherichia*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 알칼리케네스(*Alcaligenes*)속, 코마모나스(*Comamonas*)속, 버크홀데리아(*Burkholderia*)속, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)속, 플라보박테리움(*Flabobacterium*)속, 비브리오(*Vibrio*)속, 엔테로박터(*Enterobacter*)속, 리조비움(*Rhizobium*)속, 글루코노박터(*Gluconobacter*)속, 아시네토박터(*Acinetobacter*)속, 모라셀라(*Moraxella*)속, 니트로조모나스(*Nitrosomonas*)속, 아에로모나스(*Aeromonas*)속, 파라코커스(*Paracoccus*)속, 바실루스(*Bacillus*)속, 클로스트리디움(*Clostridium*)속, 락토바실루스(*Lactobacillus*)속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*)속, 아르트로박터(*Arthrobacter*)속, 아크로모박터(*Achromobacter*)속, 미크로코커스(*Micrococcus*)속, 마이코박테리움(*Mycobacterium*)속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 악티노마이세스(*Actinomyces*)속, 노카르디아(*Nocardia*)속, 메틸로박테리움(*Methylobacterium*)속 등의 각종 세균을 들 수 있다. 또한, 상기 세균 이외에, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 칸디다(*Candida*)속 등의 효모와 각종 곰팡이 등을 들 수 있다.
- [0033] 상기 형질전환체의 배양은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 또한 상기 배양은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양 등 통상의 미생물의 배양에 사용되는 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 형질전환체가 대장균인 경우 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB 배지, M9 배지 등에서 25~37℃의 범위에서 호기적으로 8~72시간 배양함으로써 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 균체 내에 축적시킨 다음 회수할 수 있다. 배양 배지에 사용될 수 있는 탄소원의 예로는 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 들 수 있으며, 질소원의 예로는 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물 유래의 것을 들 수 있다. 또한, 무기물의 예로는 인산제1칼륨, 인산제2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가할 수 있다. 또한, 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 벡터가 사용되는 경우, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가할 수 있다. 예를 들면, 이소프로필-β-D-티오갈락토포피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.
- [0034] 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 수득 및 정제는, 배양물을 원심분리하여 균체 또는 상등액을 회수한 후, 균체파쇄, 추출, 친화성 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다. 상기 수득한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 통상의 방법, 예를 들면 SDS-PAGE, 웨스턴블로팅 등에 의해 확인될 수 있다. 또한, 균체로부터의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 회수는, 통상 행하여지고 있는 클로로포름 등의 유기용매에 의한 추출이 가장 간편하기는 하나, 유기 용매를 사용하기 어려운 환경에서는 SDS 등의 계면활성제에 의한 처리, 리소자임 등의 효소에 의한 처리, EDTA, 차아염소산나트륨, 암모니아 등의 약제에 의한 처리에 의해서 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 이외의 균체 성분을 제거하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 회수하는 방법을 사용할 수도 있다.

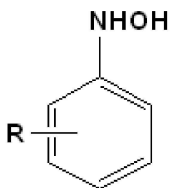
[0035] 본 발명의 방법에서, 화학식 1의 화합물의 구체적인 예로는 N-(4-클로로페닐)하이드록실아민, N-(4-브로모페닐)하이드록실아민, N-(4-플루오로페닐)하이드록실아민, N-(4-아이오도페닐)하이드록실아민, N-(p-토실)하이드록실아민, N-(4-(t-부틸)페닐)하이드록실아민, 4-(하이드록시아미노)벤조니트릴, N-(4-(트리플루오로메틸)페닐)하이드록실아민, 메틸-4-(하이드록시아미노)벤조에이트, N-(m-토실)하이드록실아민, N-([1,1'-바이페닐]-3-일)하이드록실아민 등을 들 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 방법에 따라 제조되는 화학식 2의 아미노페놀 유도체의 예로는 2-아미노페놀, 2-아미노-5-클로로페놀, 2-아미노-5-브로모페놀, 2-아미노-5-아이오도페놀, 2-아미노-5-플루오로페놀, 2-아미노-5-메틸페놀, 2-아미노-5-(t-부틸)페놀, 4-아미노-3-하이드록시벤조니트릴, 2-아미노-5-(트리플루오로메틸)페놀, 메틸 4-아미노-3-하이드록시벤조에이트, 2-아미노-4-메틸페놀, 2-아미노-6-메틸페놀, 3-아미노-[1,1'-바이페닐]-4-올 등을 들 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명은 상기 분리된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 대신에, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발현하는 형질전환체를 배양하여 수득한 배양물 자체를 아미노페놀 유도체의 제조에 사용할 수 있다. 또 다른 방법으로, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발현하는 형질전환체를 직접 아미노페놀 유도체의 제조에 사용할 수 있다. 상기 배양물 내에는 형질전환체로부터 발현된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제가 함유되어 있고, 상기 형질전환체는 반응 중 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발현할 수 있으므로, 분리된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 대신에 아미노페놀 유도체의 제조에 사용될 수 있다.

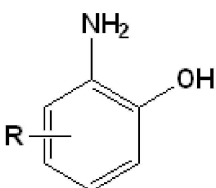
[0038] 따라서, 본 발명은 1) 하기 화학식 1의 화합물을 용매에 용해시키는 단계; 2) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydroxylaminobenzene mutase)를 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및 3) 생성된 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 분리하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0039] <화학식 1>



[0040]

[0041] <화학식 2>



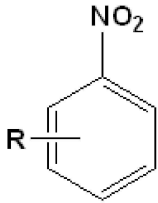
[0042]

[0043] 상기 식에서, R은 전술한 바와 같다.

[0044] 본 발명의 방법에서, 상기 화학식 2의 아미노페놀 유도체는 화학식 1의 하이드록실아미노벤젠 유도체 화합물을 용매, 바람직하게는 에탄올에 용해시키고, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(HabM)를 발현하는 형질전환체, 바람직하게는 대장균(*E. coli*)을 완충용액, 바람직하게는 Tris-HCl(50 mM)[pH 8.0]과 함께 가한 후 1시간 이상 동안, 바람직하게는 1 내지 6시간 동안 25 내지 45°C에서 교반하면서 전환반응을 수행하고, 반응 종료 후 상기 혼합물을 감압농축하고 추출, 여과 및 분리함으로써 수득될 수 있다.

[0045] 본 발명의 방법에 사용되는 화학식 1의 화합물은 상업적으로 이용가능한 물질을 사용하거나, 하기 화학식 3의 화합물을 출발물질로 하여 제조될 수 있다.

[0046] <화학식 3>



[0047]

[0048] 상기 식에서, R은 수소, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

[0049] 구체적으로, 상기 화학식 1의 화합물은 화학식 3의 화합물을 용매, 바람직하게는 메탄올에 용해시키고, Sb(III)Cl₃ 및 NaBH₄의 존재 하에 질소 가스 하에서 5 내지 30분간 전환반응시키고, 추출, 건조, 감압농축 및 분리하여 수득될 수 있다.

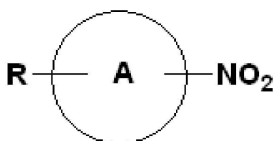
[0050] 또한, 상기 화학식 1의 화합물은 상기 화학식 3의 화합물을 니트로리덕타아제 효소로 처리하여 제조될 수 있다.

[0051] 한편, 본 발명은 화학식 3의 화합물을 출발물질로 하여 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은 상기 화학식 3의 화합물을 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 촉매 하에서 반응시켜 상기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 것을 특징으로 한다. 상기 방법에 사용되는 니트로리덕타아제는 상업적으로 이용가능한 것을 사용하거나, 니트로리덕타아제를 발현하는 균주로부터 분리할 수 있다. 또한, 상기 니트로리덕타아제 효소 대신에 니트로리덕타아제를 발현하는 균주 및 이로부터 얻은 균주 배양액 등을 사용할 수도 있으며, 니트로리덕타아제를 코딩하는 유전자를 유전공학적으로 도입한 형질전환체, 예를 들어 니트로리덕타아제를 함유하는 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체 및 이로부터 얻은 균주 배양액을 사용할 수도 있다. 하나의 구체예에서, 니트로리덕타아제 및 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 각각 코딩하는 유전자를 도입한 형질전환체, 이로부터 얻은 균주 배양액, 또는 상기 균주로부터 분리한 니트로리덕타아제 및 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 상기 방법에 사용할 수 있다.

[0052] 이에 본 발명은 1) 상기 화학식 3의 화합물을 용매에 용해시키는 단계; 2) 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 동시에 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및 3) 생성된 상기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 분리하는 단계를 포함하는, 상기 화학식 2의 아미노페놀 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

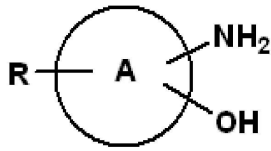
[0053] 나아가, 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 화학식 1의 화합물 이외에도, 하기 화학식 4의 화합물을 출발물질로 하여 하기 화학식 5의 화합물을 생성하는 방법에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 하기 화학식 4의 화합물을 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 촉매 하에서 반응시켜 하기 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다:

[0054] <화학식 4>



[0055]

[0056] <화학식 5>



[0057]

[0058]

상기 식에서, A는 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로 원자를 하나 이상 포함하는 5원 내지 11원의 모노 또는 바이헤테로사이클이고, R은 수소, 하이드록시, 할로겐, 시아노, 니트로, 카보닐, 아마이드, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -CF₃, -CO₂CH₃ 또는 페닐이다.

[0059]

상기 화학식 4의 화합물에서, 고리 A의 예는 티오펜, 피리딘, 피리미딘, 퓨란, 피롤, 피라졸, 다이아졸, 인돌, 인다졸, 벤조퓨란, 벤조티오펜, 벤조이미다졸 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0060]

또한, 본 발명은 상기 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류타아제 촉매 대신에 상기 효소를 동시에 발현하는 형질전환체를 이용하여 화학식 5의 화합물을 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명은 1) 상기 화학식 4의 화합물을 용매에 용해시키는 단계; 2) 니트로리덕타아제 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠류타아제를 동시에 발현하는 형질전환체를 완충용액과 함께 상기 용매에 첨가하여 반응시키는 단계; 및 3) 생성된 상기 화학식 5의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 상기 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0061]

이하 본 발명을 실시예를 들어 설명하고자 하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0062]

실시예 1: 메타게놈 라이브러리의 제작

[0063]

국내외의 다양한 지역에서 채취한 토양으로부터 메타게놈 라이브러리를 하기와 같이 제조하였다.

[0064]

<1-1> 메타게놈 DNA의 분리 및 정제

[0065]

하기 표 1에 열거된 다양한 지역으로부터 채취한 토양을 1.4 mm 직경의 메쉬를 통과시켜 토양 내에 함유된 불필요한 입자와 불순물을 제거하였다. 상기 토양 시료 5 g을 15 mL 완충용액[100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM 인산염 나트륨(sodium-phosphate), pH 8.0, 1.5 M NaCl 및 1% CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)]에 현탁하였다. 상기 현탁액에 단백질 분해효소(proteinase K; 100 mg/mL) 100 μL를 첨가하고 37°C 진탕 배양기에서 100 rpm의 속도로 20분간 진탕하였다. 여기에 1.5 mL의 20% SDS를 첨가하고 잘 흔들어 섞어준 후, 이 혼합물을 65°C 항온 수조에서 30분마다 한번씩 섞어주면서 2시간 동안 유지하였다. 이후 7,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상기 분리한 상등액에 상등액과 동일한 부피의 클로로포름/이소아밀알콜(24:1)을 첨가하여 섞어준 후 7,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA가 포함된 상등액을 새로운 용기로 옮겼다. 여기에 상등액 부피의 0.6배에 해당하는 이소프로판올을 첨가하여 섞어준 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었다. 상기 DNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 원심분리로 에탄올을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. 상기 침전물을 공기 중에서 건조시킨 다음, TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) 1.0 mL에 용해시켰다. 상기 수득한 메타게놈 DNA를 4°C에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후 보관하였다. 상기 메타게놈 DNA의 크기 분포를 PFGE(pulsed field gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였다. 채취 지역에 따라 토양 시료 1 g 당 약 0.8 내지 2.0 μg의 메타게놈 DNA가 회수되었으며, 분리된 DNA는 20 내지 100 kb 정도의 크기 분포를 갖는 것으로 나타났다.

[0066]

<1-2> 메타게놈 라이브러리의 제작

[0067] 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989)]에 기재된 통상적인 분자생물학적 방법과 시약 제조사의 지침에 따라 하기와 같이 메타게놈 라이브러리를 제작하였다.

[0068] 구체적으로, 실시예 <1-1>에서 수득한 메타게놈 DNA를 저융점 아가로스 겔(low melting point agarose gel)에서 전기영동하여, 20 kb 이상의 DNA를 포함하는 아가로스 겔 조각을 회수하였다. 회수된 겔 조각에 겔레이즈(GeLase, Epicentre, 미국)를 처리하여 DNA를 정제함으로써 추후 과정에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있는 휴믹산(humic acid) 등의 불순물을 제거하였다. DNA 조각의 양 말단을 DNA 말단 보수효소(end-repair enzyme)로 처리하여 평활성 말단(blunt end)을 갖는 20 kb 이상의 메타게놈 DNA를 얻은 다음, 이를 *Eco72I*로 처리한 포스미드 벡터 pEpiFOS-5(Epicentre, 미국)에 라이게이션하였다. 상기 라이게이션 혼합물을 상업적인 패키징 시스템(packagene extract, Epicentre, USA)을 이용하여 대장균에 도입한 후, 50 µg/mL의 클로람페니콜이 첨가된 LB 한천 배지에서 형질전환체들을 선별하였다.

[0069] 상기 선별된 형질전환된 대장균을 배양하여 메타게놈(metagenome) 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리의 질을 검사하기 위해, 무작위로 선택한 형질전환체들로부터 재조합 플라스미드를 추출하고 제한효소 *BamHI*으로 처리한 후 전기영동으로 확인한 결과, 모두 재조합 플라스미드가 포함되어 있었으며, 삽입된 메타게놈의 평균 크기는 약 30 kb로 분석되었다.

[0070] 한편, 상기 실험실에서 제작한 메타게놈 라이브러리 외에 공시된 국내 자원 센터의 메타게놈 라이브러리를 분양받아 메타게놈 라이브러리를 제작하는데 사용하였다.

[0071] 상기 실험실에서 제작한 라이브러리 및 분양받은 라이브러리의 정보를 각각 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

제조한 메타게놈 DNA 분리 시료	벡터 정보		메타게놈 삽입 DNA (평균 kb)
강화도 장화리 갯벌	pEPI-FOS5	8.1 kb (Cm ^R)	31 kb
대천 용두해수욕장			30~40 kb
전남 부안군 새만금 간척지 갯벌			35 kb
북극기지연안퇴적물			35 kb
충북 괴산, 음성 발토양			35 kb
충남 아산, 공주 전남 순천 논토양			35 kb
제주도 오름 토양			35 kb
제주도 한림항 토양			35Kb
제주도 용두암, 마라도 토양			35Kb
제주도 천지연 폭포 토양			35Kb
제주도 한라산 영실 토양			35Kb
대전 매립장 (목재 폐기물)			35Kb
주유소			35Kb
유류 오염지 (서해안)			30~40 kb
한국화학연구원 토양			1.6~4 kb
대전 계룡산 수통골 토양			40 kb
상주 낙동강 유역 토양	40 kb		
총 31 Gb 메타게놈 유전정보			

표 2

분양받은 메타게놈 DNA 분리 시료	벡터 정보		메타게놈 삽입 DNA (평균 kb)
군산 하천흙	pUC19	2.7 kb (Amp ^R)	3~6 kb
관악산 소나무 뿌리토양	pBlueylisis	5.4 kb (Tet ^R)	3~7 kb
시화호 토양	pCC1BAC	8.1 kb (Cm ^R)	10~20 kb
충주시 충주호	pBACe3.6	11.6 kb (Cm ^R)	13~15 kb

아산시 둔포호	pBACe3.6	15 kb
청주시 대청호	pBACe3.6	12~14 kb
퇴비	pCC2FOS	40 kb
경북청송발토양		
경북청송발토양		
경북영양식물근권-역제 토양		
인제군 점봉산 진동계곡 초지 및 산림 토양		
인제군 점봉산 진동계곡 초지 및 산림 토양		
부산 강서구 대저동 식물근권 토양		
중국 북경시 혐기성 암모니아 산화반응 조 슬러지		
중국 북경시 혐기성 암모니아 산화반응 조 슬러지		
낙동강 을숙도 유역 오염토양		
낙동강 을숙도 유역 오염토양		
총 6.8 Gb 메타게놈 유전정보		

[0074]

[0075] 실시예 2: 고속 탐색법(high throughput screening)을 이용한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 탐색

[0076] 실시예 1에서 수득한 메타게놈 라이브러리로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 하기와 같이 탐색하였다.

[0077] 구체적으로, 메타게놈 라이브러리를 구성하는 대장균 형질전환체들을 LB 한천 배지 상에서 수백 개에서 수천 개 단위의 묶음 형태로 모아서 TE 완충용액 또는 증류수 1 mL에 현탁하여 수집하였다. 각각의 묶음을 LB 배양액에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후, 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포 침전물을 회수하였다. 상기 침전물을 50 mM Tris-Cl 완충용액(pH 8.0)에 현탁하였다.

[0078] 이후, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균을 하이드록실아미노벤젠(기질)으로부터 2-아미노페놀(생성물)로 전환되는 화학 반응용액의 흡광도 변화를 이용한 고효율 스크리닝에 의해 확인하였다. 50 mM 4-플루오르니트로벤젠, 4-클로로니트로벤젠, 4-브로모니트로벤젠, 4-플루오르니트로벤젠 및 니트로벤젠의 총 5종의 화합물을 최종 0.5 mM이 되도록 100% 에탄올, 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)과 1:1:88의 비율로 혼합하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 탐색용 반응용액을 제조하였다. 상기 반응용액을 200 µL씩 96-웰 플레이트의 웰에 분주하고, 여기에 상기 현탁된 세포 침전물 50 µL를 첨가하였다. 상기 96-웰 플레이트를 37°C에서 3시간 정치한 후, 60°C에서 3시간 정도 정치하면서 간헐적으로 흔들어서 섞어주었다. 상기 반응용액의 최대흡광도 파장을 300~800 nm 범위에서 UV-VIS 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 상기 측정 결과를 도 1에 나타내었다.

[0079] 상기 측정 결과, 하이드록실아미노벤젠(기질)은 390 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고(무색), 2-아미노페놀(생성물)은 440 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다(노란색). 한편, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균의 경우, 대장균 내에 내재되어 있는 니트로리덕타아제(nitroreductase) 효소군에 의해 니트로기가 하이드록시아미노기로 환원되고, 대장균 내에서 발견된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제에 의해 하이드록시아미노기에서 하이드록시기가 옆자리로 자리옮김하여 2-아미노페놀로 전환됨으로써 반응 용액이 무색에서 노란색으로 변화된다. 따라서, 반응용액이 440 nm에서 흡광도가 높아지는 것을 통해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균을 검출할 수 있다. 이러한 과정을 통해 노란색을 나타내는 웰의 대장균 수집시료(코드M9_P97)를 수득하였다.

[0080] 위와 같은 결과의 재현성을 확인하기 위해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 함유하고 있을 것으로 예상되는 상기 대장균 시료를 LB 한천 배지에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하여 콜로니를 형성시킨 후, 최초 수집한 개수 이상의 대장균 콜로니에 대하여 전술한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 탐색 반응을 반복 수행하였다

[0081] 그 결과 메타게놈 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)를 발현하고 있는 대장균(*E. coli* M9_P97_26)을 확보하였다.

[0082] 실시예 3: 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 염기서열 및 상동성 분석

[0083]

[0084] 실시예 2에서 수득한 대장균으로부터 하기와 같이 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 서열을 결정하였다.

[0085]

구체적으로, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 나타내는 클론(코드 M9_P97_26)을 LB 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 12시간 진탕배양한 후, 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포를 침전시켰다. 세포 침전물에 제1용액[50 mM 글루코스, 25 mM Tris-Cl(pH8.0), 10 mM EDTA] 200 μL를 넣고 완전히 풀어질 때까지 섞어주었다. 그리고 여기에 제2용액[0.2N NaOH, 1% SDS] 400 μL을 더 넣고 섞어준 후, 제3용액[5M 아세트산칼륨] 300 μL을 넣어 4°C에 15분 방치하였다. 상기 혼합물을 원심분리(14,000rpm, 4°C, 15분)한 후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 상기 상층액에 이소프로판올 540 μL를 넣어 섞은 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 상층액을 완전히 제거한 후, 침전물을 상온에서 건조하였다. 그 DNA 침전물에 TE 완충용액 500 μL을 넣어 녹인 후, EtOH 1 mL를 추가하여 4°C에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세척된 포스미드 DNA를 상온에서 충분히 건조하였다. 상기 DNA를 TE 완충액 25 μL를 이용하여 상온에서 10분간 녹인 후, 희석한 RiboShredder Rnase Blend(RiboShredder™) 1 μL를 첨가하여 37°C에서 30분간 방치함으로써 DNA 분해물질을 제거하고, 이를 -20°C에 보관하였다.

[0086]

상기 분리한 포스미드 DNA를 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 시료의 순도를 확인하고, 포스미드 DNA에 삽입된 메타게놈 유래의 DNA의 염기서열을 샷건법(shotgun sequencing)으로 결정하였다. 메타게놈 유래의 DNA는 대략 33,600 여개의 염기쌍 정보로 이루어져 있었으며, 이 정보로부터 DNA 분석 소프트웨어(DNASTAR, GeneDoc) 및 유전자 데이터베이스(NCBI GenBank, EMBL)를 이용하여 목적하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자 서열을 확인하였다.

[0087]

상기 분석 결과, 본 발명에 따른 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 서열번호 2의 염기서열(459 bp)을 가지며, 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열(152개)을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩함을 알 수 있었다

[0088]

또한 그 외의 신규 단백질 및 효소 50여개를 코딩하는 것으로 예측되는 신규 유전자를 포함하여 다양한 프로모터 부위가 존재하였으며, 포스미드에 삽입된 전체 DNA 염기서열은 서열번호 3에 나타내었다.

[0089]

상기 결정된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 아미노산 서열을 GenBank의 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) 프로그램 등을 이용하여 분석하였다. 상기 분석 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0090]

미생물	단백질 데이터베이스 ID	유전자의 예상 산물 (데이터베이스 등록 내용에 따름.)	분자량 Da (아미노산 잔기의 개수)	유사도M9_P97 HabM 기준) ^a
새만금 간척지 갯벌 Metagenome M9_P97			16149 (152)	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	AAB94123	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	16955 (164)	47
<i>Pseudomonas putida</i> HS12/pNB2	AAK26516	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	16879 (164)	46
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	ABD25862	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14653 (141)	46
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	ABQ74893	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14080 (133)	46
<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478	ZP04747333	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	13923 (133)	43
<i>Pseudomonas putida</i> ZWL73	ABA55816	p-하이드록실아미노클로로벤젠 뮤타아제	15952 (150)	42
<i>Comamonas</i> sp. CNB-1	YP001967718	p-하이드록실아미노클로로벤젠 뮤타아제	15952 (150)	42

<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	AAB94122	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14610 (135)	40
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155	ABK70538	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	15870 (147)	35

[0091] ^a 유사도 스코어(%)는 EMBL-EBI 웹사이트(<http://www.ebi.ac.uk>) 상의 ClustalW 프로그램을 이용하여 계산되었음.

[0092] 상기 표에서 보는 바와 같이, 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 기존에 밝혀진 서열 정보들 중에서 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45 유래의 추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(AAB94123)와 서열상으로 가장 유사하였지만 그 유사성이 47%에 불과하였다. 상기 결과는 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제가 아미노산 서열 측면에서 매우 독특하다는 것을 보여준다.

[0093] **실시예 4: 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)가 삽입된 다양한 발현벡터 및 이를 포함하는 형질전환체의 제조**

[0094] <4-1> 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)가 삽입된 다양한 발현벡터의 제조

[0095] 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 포함하는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다.

[0096] 먼저, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 증폭시키기 위하여, 실시예 3에서 분리한 포스미드 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 4 및 5의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 구체적으로, PCR은 LA Taq DNA 중합효소(5 U / μL), 10x 완충액(PCR 완충액), dNTP Mix (2.5 mM), 각 프라이머(10 pmol) 및 증류수를 혼합하여 수행하였고, 94°C에서 최초 1분간 DNA를 변성시킨 후, 주형 DNA 변성(denaturation; 94°C에서 30초), 프라이머 결합(annealing; 58°C에서 40초), DNA 중합 신장(polymerization; 68°C에서 2분)의 3단계 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 정치하여 DNA 중합을 완료하고, 온도를 4°C로 내려 반응을 종결시켰다.

[0097] 상기 PCR 산물 4 μL에 Topo 벡터(Invitrogen) 1 μL 및 제조사에서 제공된 라이게이션(ligation) 반응용액 1 μL를 넣고 상온에서 20분간 반응시켰다. 그리고 나서, 컴피턴트 세포(competent cell)로서 대장균 TOP10 세포(Invitrogen)를 넣고 4°C에 20분 동안 방치한 다음, 42°C에서 열 충격(Heat shock)을 가하고, 얼음 위에서 30초간 반응시킨 후, 250 μL의 SOC 배지를 넣고 37°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후 항생제와 LacZ를 이용한 선별을 위해 상기 세포를 X-Gal(40 μL)이 도말된 LB 아가 배지에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포침전물을 회수하였다. 상기 세포 침전물로부터 DNA 정제 키트(Promega)를 이용하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자가 삽입된 Topo 벡터를 수득하였다.

[0098] 이후, *habM* 유전자를 클로닝하기 위하여, 상기 Topo 벡터를 *EcoRI* 및 *SalI*으로 37°C에서 2시간 동안 처리하여 절단하였다. 상기 절단된 유전자를 동일한 제한효소로 처리한 pET21a+ 벡터(Novagen)에 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 16°C에서 3~6시간 동안 라이게이션(ligation)시켜 pET21a/*HabM* 발현벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pET21a/*HabM* 발현 벡터의 개열지도를 도 2에 나타내었다.

[0099] 한편, 대장균 이외의 세균에서 니트로벤젠으로부터 N-하이드록시벤젠아민으로 전환하는 활성을 보유한 효소를 확보하여 반응 특성을 조사하고자, 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45의 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 선정하였다. 이 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)를 포함하는 DNA를 확보하기 위하여, DNA 합성서비스 회사에 해당 유전자의 정보를 제공 및 의뢰하였다(Bioneer사의 유전자 합성 서비스). 상기 합성된 *nbnr* 유전자를 함유한 DNA를 주형으로 서열번호 6 및 7의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용한 PCR 과정에 의해 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)를 증폭시켰다.

- [0100] 상기 PCR 산물을 전술한 pET21a/HabM 발현 벡터의 제조 방법과 동일하게 Topo 벡터에 삽입하고, 대장균에 형질 전환시킨 후 이로부터 Topo 벡터에 삽입된 *nbnr* 유전자를 얻었다. 그리고 나서, pET21a 벡터와 라이게이션시켜 pET21a/NBNR 발현 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pET21a/NBNR 발현 벡터의 개열지도를 도 3에 나타내었다.
- [0101] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠류 유전자(*habM*)와 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)를 동시에 발현할 수 있는 발현 벡터를 제조하기 위하여, 전술한 방법과 유사하게 *habM* 및 *nbnr* 유전자를 pETDuet 벡터 (Novagen)에 삽입하였다. *nbnr* 유전자를 pETDuet 벡터의 MCS1 자리에 클로닝하기 위해 *nbnr* 유전자를 *EcoRI* 및 *SaI*I를 이용하여 37°C에서 2시간 동안 절단시킨 후 젤 정제(Gel purification)를 실시하였다. 동시에 *habM* 유전자를 pETDuet 벡터의 MCS2 자리에 클로닝하기 위해 *habM* 유전자를 *NdeI* 및 *KpnI*을 이용하여 37°C에서 2시간 동안 절단시킨 후 젤 정제(Gel purification)를 실시하였다. 상기 절단된 유전자들을 동일한 제한효소로 처리한 pETDuet 벡터에 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 16°C에서 3~6시간 동안 라이게이션(ligation)시켜 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pETDuet/NBNR-HabM 발현 벡터의 개열지도를 도 4에 나타내었다.
- [0102] <4-2> 하이드록실아미노벤젠류 유전자(*HabM*) 효소를 발현하는 균주의 제조
- [0103] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠류 유전자를 발현시키기 위해, 실시예 <4-1>에서 제조된 pET21a/HabM 발현 벡터 1 μL를 BL21(DE3) 세포(RBC)와 1초간 섞어준 후 10분간 4°C에서 방치하여 상기 세포를 형질전환시켰다. 이후, 상기 형질전환된 세포를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양한 균주를 200 mL의 LB 액체 배지에서 37°C에서 OD₆₀₀ = 0.6까지 배양한 다음, IPTG 0.1 mM이 첨가된 LB 액체 배지에서 4시간 더 배양하였다. 이러한 과정으로 하이드록실아미노벤젠류 유전자 효소를 발현하는 균주를 제조하였다.
- [0104] 또한, 실시예 <4-1>에서 제조된 pET21a/NBNR 발현 벡터 및 pETDuet/NBNR-HabM 발현 벡터의 형질전환체를 전술한 방법과 같이 제조하였다. 구체적으로, 각 E-튜브에 담긴 BL21(DE3) 세포(RBC)에 pET21a/NBNR 발현벡터 DNA와 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터 DNA를 각각 1 μL씩 넣고 1초간 섞어준 후 10분간 4°C에서 방치하여 각 세포를 형질전환시킨 다음, 상기 형질전환된 세포를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양한 균주를 200 mL의 LB 액체 배지에서 37°C에서 OD₆₀₀ = 0.6까지 배양한 다음, IPTG 0.1 mM이 첨가된 LB 액체 배지에서 4시간 더 배양하였다. 이러한 과정으로 pET21a/NBNR 발현벡터 DNA로 니트로벤젠 니트로리덕타아제를 발현하는 균주와 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터 DNA로 니트로벤젠 니트로리덕타아제와 하이드록실아미노벤젠류 유전자 효소를 동시에 발현하는 균주를 제조하였다.
- [0105] 실시예 5: 하이드록실아미노벤젠류 유전자(*HabM*)의 발현 확인
- [0106] <5-1> pET21a/HabM 발현 벡터의 형질전환체를 이용한 발현 확인
- [0107] 실시예 4에서 제조된 *HabM*을 발현하는 형질전환체로부터의 *HabM* 효소의 발현을 세포와 기질 간의 반응을 통해 확인하였다. 세포와 기질 간의 반응을 위해 각각의 세포 침전물을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에 OD₆₀₀ 60 또는 100으로 현탁하여 준비하였다. 기질로서 니트로벤젠(sigma)을 100 mM이 되도록 아세트니트릴에 녹여 준비한 후 기질의 최종 농도를 1 mM이 되도록 넣어 반응시켰다.
- [0108] 기질, 100% EtOH 및 50 mM Tris-HCl[pH 8.0]의 순으로 넣은 후 실시예 4에서 제조된 하이드록실아미노벤젠류 유전자를 발현하는 형질전환체(OD₆₀₀ 60 또는 100)를 최종 OD₆₀₀이 8 또는 10이 되도록 넣어 37°C 진탕 배양기에서 24시간 동안 반응시켰다. 세포로부터 발현된 *HabM*과 기질 간의 반응 결과를 색 변화로서 스캔(Scan), UV-

VIS 분광광도계(spectrophotometer) 및 LC 분석을 이용하여 확인하였다.

- [0109] 스캔을 이용한 반응 확인 결과, HabM과 기질이 반응하기 전보다 반응한 후에 갈색이 강해진 것으로 나타났다.
- [0110] 또한, HabM과 하이드록실아민(NHOH) 기질의 반응으로 생성되는 갈색을 정량화하기 위해 UV-VIS 분광광도계를 이용하였다. 스펙트럼은 230-800 nm 범위에서 측정하였다. 상기 측정 결과, 세포와 기질이 반응 후 pET21a/HabM 벡터를 갖는 세포에서 434 nm에서 피크가 확인되었다. 상기 피크는 기질인 니트로벤젠이 대장균에 존재하는 니트로리덕타아제와 반응하여 하이드록실아민(NHOH)을 생성하고, 상기 하이드록실아민이 HabM과 반응하여 2-아미노페놀을 생성하기 때문에 나타나는 것으로 판단되었다.
- [0111] 나아가, 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솜(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 LC 크로마토그래피(FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시킨 다음, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 반응 샘플의 경우 pET21a/HabM을 갖는 세포를 1 mM 니트로벤젠(NB) 및 1 mM 하이드록실아미노벤젠(NHOH)과 각각 반응시켜 분석하였고, 대조군의 경우 상기 세포를 사용하지 않았다.
- [0112] 상기 분석 결과, 니트로벤젠(NB), 하이드록실아미노벤젠(NHOH) 및 2-아미노페놀(2-AP)이 동일 시간대에 검출되는 것을 알 수 있었다. 니트로벤젠은 4분에 검출되었고, 2-아미노페놀은 3.6분에서 검출되었다. 세포와 반응한 샘플을 분석하여 감소된 니트로벤젠의 양으로부터 HabM의 전환율을 측정할 수 있었다. 측정 결과, pET21a/HabM을 갖는 세포에서 니트로벤젠의 잔량이 상당히 적음을 알 수 있었고, HabM과 하이드록실아미노벤젠(NHOH)이 반응하여 2-아미노페놀을 생성함으로 확인할 수 있었다.
- [0113] <5-2> pET21a/NBNR 발현 벡터 및 pETDuet/NBNR-HabM의 형질전환체를 이용한 발현 확인
- [0114] 실시예 4에서 제조된 니트로벤젠 니트로리덕타아제를 발현하는 형질전환체와 니트로벤젠 니트로리덕타아제와 하이드록실아미노벤젠 유사아제 효소를 동시에 발현하는 형질전환체로부터의 HabM 효소의 발현을 세포와 기질 간의 반응을 통해 확인하였다.
- [0115] 세포와 기질 간의 반응을 위해 각각의 세포 침전물을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에 OD₆₀₀ 60 또는 100으로 현탁하여 준비하였다. 기질로서 니트로벤젠(sigma)을 100 mM이 되도록 아세트니트릴에 녹여 준비한 후 기질의 최종 농도를 1 mM이 되도록 넣어 반응하였다. 기질, 100% EtOH 및 50 mM Tris-HCl[pH 8.0]의 순으로 넣은 후 실시예 4에서 제조된 형질전환체(OD₆₀₀ 60 또는 100)를 최종 OD₆₀₀이 8 또는 10이 되도록 넣어 37°C 진탕 배양 기에서 24시간 동안 반응시켰다.
- [0116] 세포로부터 발현된 HabM과 기질 간의 반응 결과를 색 변화로서 스캔(Scan), UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer) 및 LC 분석을 이용하여 확인하였다.
- [0117] 스캔을 이용한 반응 확인 결과, 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 발현하는 균주(pET21a/NBNR)로 반응한 경우 색의 변화가 없고, 니트로벤젠 니트로리덕타아제와 하이드록실아미노벤젠 유사아제 효소를 동시에 발현하는 균주 형질전환체로 반응한 경우 HabM의 발현으로 인해 기질과 반응하기 전보다 반응한 후에 갈색이 강해진 것으로 나타났다.
- [0118] 또한, HabM과 하이드록실아민(NHOH) 기질의 반응으로 생성되는 갈색을 정량화하기 위해 UV-VIS 분광광도계를 이용하였다. 스펙트럼은 230-800 nm 범위에서 측정하였다. 상기 측정 결과, 세포와 기질이 반응 후 pET21a/NBNR-HabM 벡터를 갖는 세포에서 434 nm에서 피크가 확인되었다. 상기 피크는 기질인 니트로벤젠이 대장균에 존재하는 니트로리덕타아제와 반응하여 하이드록실아민(NHOH)을 생성하고, 상기 하이드록실아민이 HabM과 반응하여 2-아미노페놀을 생성하기 때문에 나타나는 것으로 판단되었다.
- [0119] 나아가, 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솜(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 LC 크로마토그래피(FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시킨

다음, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 반응 샘플의 경우 pET21a/NBNR-HabM을 갖는 세포를 1 mM 니트로벤젠(NB) 및 1 mM 하이드록시아미노벤젠(NHOH)과 각각 반응시켜 분석하였고, 대조군의 경우 상기 세포를 사용하지 않았다.

[0120] 상기 분석 결과, 니트로벤젠(NB), 하이드록시아미노벤젠(NHOH) 및 2-아미노페놀(2-AP)이 동일 시간대에 검출되는 것을 알 수 있었다. 니트로벤젠은 4분에 검출되었고, 2-아미노페놀은 3.6분에서 검출되었다. 세포와 반응한 샘플을 분석하여 감소된 니트로벤젠의 양으로부터 HabM의 전환율을 측정할 수 있었다. 측정 결과, pET21a/NBNR-HabM을 갖는 세포에서 니트로벤젠의 잔량이 상당히 적음을 알 수 있었고, HabM과 하이드록시아미노벤젠(NHOH)이 반응하여 2-아미노페놀을 생성함으로써 확인할 수 있었다.

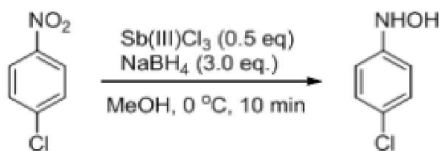
[0121] **실시예 6: 하이드록시아미노벤젠 뮤타아제(HabM)의 활성 측정**

[0122] 본 발명의 HabM의 활성을 측정하기 위해, 하이드록시아미노벤젠으로부터 2-아미노페놀로의 물질 전환 반응을 수행하였다. 실시예 4에서 제조된 형질전환체를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 12시간 진탕배양한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포침전물을 회수하였다. 이를 세포침전물의 농도가 OD₆₀₀에서 20이 되도록 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 현탁하여 물질전환반응 효소를 준비하였다.

[0123] 물질전환 반응용액은 50 mM 니트로벤젠(또는 하이드록시아미노벤젠, 4-플루오로니트로벤젠)을 최종 0.5 mM이 되도록 100% 에탄올, 50 mM Tris 완충용액 (pH 8.0)과 1 대 1 대 88의 비율로 혼합하여 4.5 mL을 제조하였다. 여기에 상기 대장균 세포침전물 0.5 mL을 첨가하여 총 5 mL의 부피로 물질전환반응을 시작하였다. 37°C에서 3시간 정치반응함으로써 대장균의 세포 안에 내재되어 있는 니트로리덕타아제 효소군에 의해 니트로기가 하이드록시아미노기로 환원되는 1차 전환이 일어나고, 연이어 60°C에서 3시간 정치반응하면 대장균내에서 단독발현된 HabM에 의해 하이드록시아미노기에서 하이드록시기가 옆자리로 자리옮김하여 2-아미노페놀로 전환됨으로써 반응용액이 무색에서 노란색으로 바뀌었다. 이 반응 상등액을 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솅(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 액체 크로마토그래피(LC; FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시키고 나서, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 상기 분석 결과, 생성된 2-아미노페놀의 양을 기준으로 니트로벤젠으로부터 2-아미노페놀로의 전환율은 pET21a+/HabM 제조한 대장균 세포가 3시간 동안 56%의 전환율을 보였으며, 다른 부산물은 전혀 관찰되지 않았다.

[0124] **실시예 7: 다양한 하이드록시아미노벤젠의 제조**

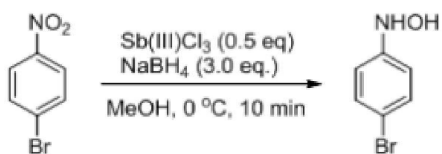
[0125] <7-1> N-(4-클로로페닐)하이드록시아민의 제조



[0126] 250 mL 둥근바닥 플라스크에 1-클로로-4-니트로벤젠(20.0 mmol, 3.15 g)과 메탄올(80 mL)을 넣고 상온에서 용해시켰다. 상기 용액을 0°C로 냉각한 후, Sb(III)Cl₃(10.0 mmol, 2.28 g) 및 NaBH₄(60.0 mmol, 2.27 g)을 넣고 N₂ 하에서 10분 동안 교반시켰다. 반응 종료 후 1N HCl로 pH를 6으로 조정하고, 에틸 아세테이트(100 mL, 5회)로 추출한 후 MgSO₄로 건조하고 감압 농축하였다. 그 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH=99:1)를 이용하여 연한 노란색의 고체 상태의 표제 화합물(431 mg, 수율: 15%)을 수득하였다.

[0128] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 2H), 6.93 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 2H), 6.76 (s, 1H), 5.25 (s, 1H)

[0129] <7-2> N-(4-브로모페닐)하이드록실아민의 제조

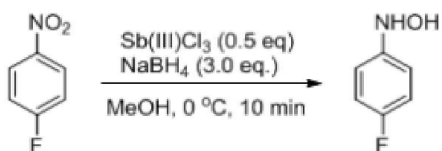


[0130]

[0131] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 1-브로모-4-니트로벤젠(20.0 mmol, 4.04 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(451 mg, 수율: 12%)을 수득하였다.

[0132] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.88 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 6.75 (s, 1H), 5.20 (s, 1H)

[0133] <7-3> N-(4-플루오로페닐)하이드록실아민의 제조

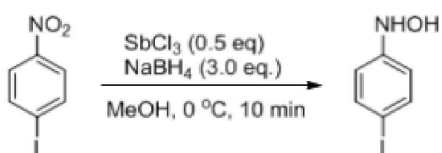


[0134]

[0135] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 1-플루오로-4-니트로벤젠(20.0 mmol, 2.82 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(254 mg, 수율: 10%)을 수득하였다.

[0136] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99-6.95 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 5.35 (s, 1H)

[0137] <7-4> N-(4-아이오도페닐)하이드록실아민의 제조



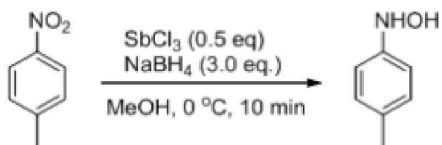
[0138]

[0139] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 1-아이오도-4-니트로벤젠(20.0 mmol, 4.98 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(611 mg, 수율: 13%)을 수득하였다.

[0140] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 6.77 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 5.24 (s, 1H)

[0141]

[0142] <7-5> N-(p-토실)하이드록실아민의 제조

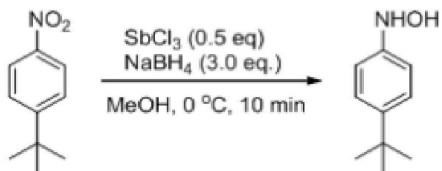


[0143]

[0144] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 4-니트로톨루엔(20.0 mmol, 2.74 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(246 mg, 수율: 10%)을 수득하였다.

[0145] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.09 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.91 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.71 (s, 1H), 5.33 (s, 1H)

[0146] <7-6> N-(4-(t-부틸)페닐)하이드록시아민의 제조

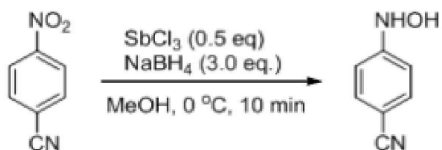


[0147]

[0148] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 1-(t-부틸)-4-니트로벤젠(20.0 mmol, 3.58 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(364 mg, 수율: 11%)을 수득하였다.

[0149] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.95 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 1.30 (s, 9H)

[0150] <7-7> 4-(하이드록시아미노)벤조니트릴의 제조

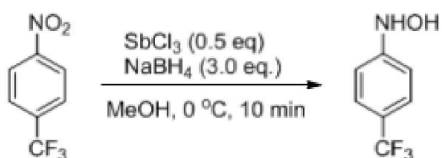


[0151]

[0152] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 4-니트로벤조니트릴(20.0 mmol, 2.96 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(241 mg, 수율: 9%)을 수득하였다.

[0153] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.01 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 5.39 (s, 1H)

[0154] <7-8> N-(4-(트리플루오로메틸)페닐)하이드록시아민의 제조

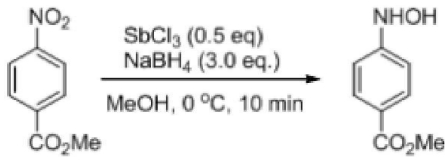


[0155]

[0156] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 4-니트로벤조트리플루오라이드(20.0 mmol, 3.82 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(354 mg, 수율: 10%)을 수득하였다.

[0157] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 7.05 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.27 (s, 1H)

[0158] <7-9> 메틸-4-(하이드록시아미노)벤조에이트의 제조

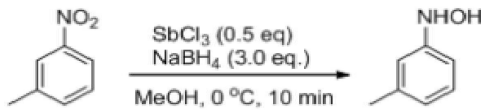


[0159]

[0160] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 메틸 4-니트로벤조에이트(20.0 mmol, 3.62 g)를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(334 mg, 수율: 10%)을 수득하였다.

[0161] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, J = 8.4Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.7Hz, 2H), 5.33 (s, 1H), 3.88 (s, 3H)

[0162] <7-10> N-(m-토실)하이드록실아민의 제조

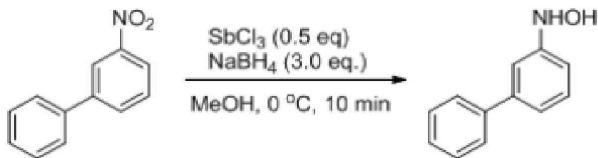


[0163]

[0164] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 3-니트로톨루엔(20.0 mmol, 2.74 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(197 mg, 수율: 8%)을 수득하였다.

[0165] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (t, J = 7.6Hz, 1H), 6.83-6.79 (m, 3H)

[0166] <7-11> N-([1,1'-바이페닐]-3-일)하이드록실아민의 제조



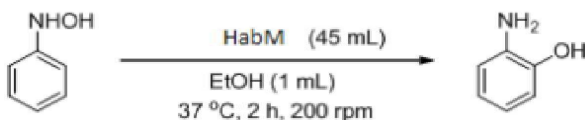
[0167]

[0168] 상기 실시예 <7-1>에서 1-클로로-4-니트로벤젠 대신에 3-니트로-1,1'-바이페닐(20.0 mmol, 3.98 g)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <7-1>의 과정을 반복하여 연한 노란색 고체 상태의 표제 화합물(482 mg, 수율: 13%)을 수득하였다.

[0169] ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.59 (d, J = 7.5Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.4Hz, 2H), 7.38-7.33 (m, 2H), 7.24-7.20 (m, 2H), 6.99 (d, J = 7.9Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 5.37 (s, 1H)

[0170] 실시예 8: 다양한 아미노페놀 유도체의 제조(출발물질: 하이드록실아미노벤젠)

[0171] <8-1> 2-아미노페놀의 제조



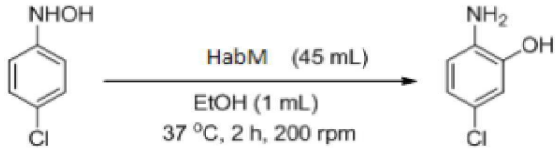
[0172]

[0173] 50 mL 바이알에서 N-페닐하이드록실아민(0.75 mmol, 82 mg)을 에탄올(1 mL)에 용해시켰다. 여기에 실시예 <4-2>에서 얻은 HabM 발현 균주 3g을 Tris-HCl(45 mL)[pH 8.0]와 함께 넣은 후 2시간 동안 37°C에서 200 rpm으로 교반하였다. 반응 종료 후 상기 혼합물을 500 mL 둥근 바닥 플라스크로 옮긴 후 감압농축시켰다. 농축 후 얻어

진 잔류물에 에틸아세테이트(200 mL)를 넣고 12시간 동안 교반한 뒤 여과 및 감압농축시켰다. 그후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc/CH₂Cl₂= 1 : 19)로 분리하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(60 mg, 수율: 73%)을 수득하였다.

[0174] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.80-6.69 (m, 4H)

[0175] <8-2> 2-아미노-5-클로로페놀의 제조

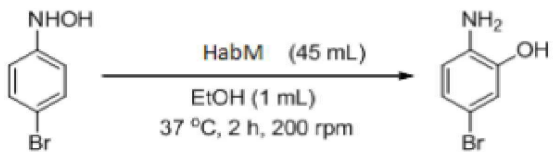


[0176]

[0177] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-1>에서 제조한 N-(4-클로로페닐)하이드록실아민 (0.75 mmol, 108 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(98 mg, 수율: 91%)을 수득하였다.

[0178] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.76 (d, J = 6.7Hz, 2H), 6.67 (d, J = 8.9Hz, 1H)

[0179] <8-3> 2-아미노-5-브로모페놀의 제조

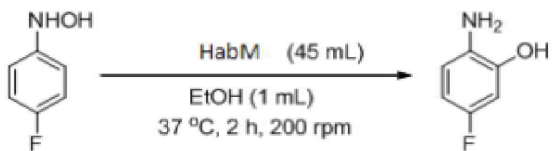


[0180]

[0181] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-2>에서 제조된 N-(4-브로모페닐)하이드록실아민 (0.75 mmol, 141 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(124 mg, 수율: 88%)을 수득하였다.

[0182] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (d, J = 8.4Hz, 2H), 6.60 (d, J = 7.9Hz, 1H)

[0183] <8-4> 2-아미노-5-플루오로페놀의 제조

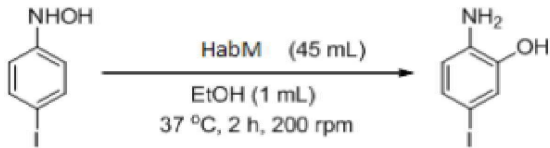


[0184]

[0185] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-3>에서 제조된 N-(4-플루오로페닐)하이드록실아민(0.75 mmol, 176 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(75 mg, 수율: 79%)을 수득하였다.

[0186] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.77-6.72 (m, 1H), 6.57-6.46 (m, 2H)

[0187] <8-5> 2-아미노-5-아이오도페놀의 제조

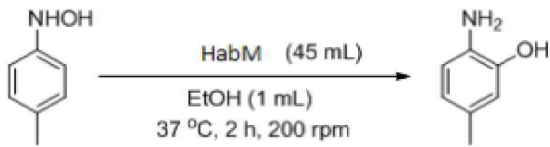


[0188]

[0189] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-4>에서 제조된 N-(4-아이오도페닐)하이드록실아민(0.75 mmol, 176 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(153 mg, 수율: 87%)을 수득하였다.

[0190] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.08-7.03 (m, 2H), 6.51 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H)

[0191] <8-6> 2-아미노-5-메틸페놀의 제조

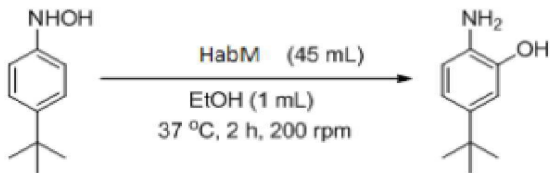


[0192]

[0193] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-5>에서 제조된 N-(p-토실)하이드록실아민(0.75 mmol, 92 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(77 mg, 수율: 83%)을 수득하였다.

[0194] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.69 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 6.59 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 2.21 (s, 3H)

[0195] <8-7> 2-아미노-5-(t-부틸)페놀의 제조

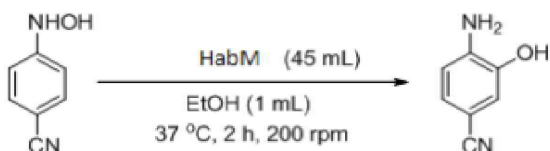


[0196]

[0197] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-6>에서 제조된 N-(4-(t-부틸)페닐)하이드록실아민(0.75 mmol, 124 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(36 mg, 수율: 29%)을 수득하였다.

[0198] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.80 (d, $J = 5.9\text{Hz}$, 2H), 6.72 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 1.26 (s, 9H)

[0199] <8-8> 4-아미노-3-하이드록시벤조니트릴의 제조

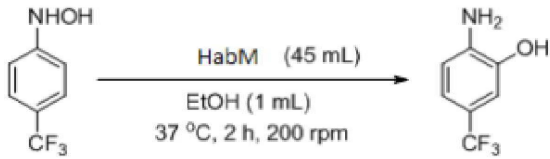


[0200]

[0201] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-7>에서 제조된 4-(하이드록시아미노)벤조니트릴(0.75 mmol, 101 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(68 mg, 수율: 68%)을 수득하였다.

[0202] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.10 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H)

[0203] <8-9> 2-아미노-5-(트리플루오로메틸)페놀의 제조

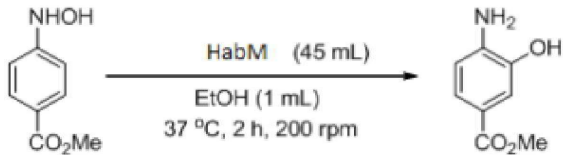


[0204]

[0205] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-8>에서 제조된 N-(4-(트리플로로메틸)페닐)하이드록실아민(0.75 mmol, 133 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(98 mg, 수율: 74%)을 수득하였다.

[0206] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.05 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H)

[0207] <8-10> 메틸 4-아미노-3-하이드록시벤조에이트의 제조

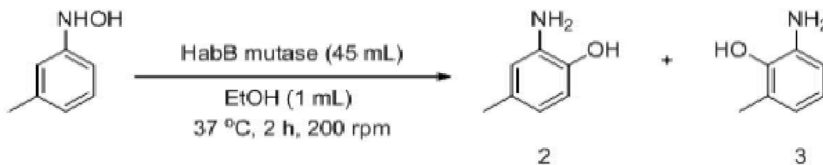


[0208]

[0209] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-9>에서 제조된 메틸-4-(하이드록시아미노)벤조에이트(0.75 mmol, 125 mg)를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(98 mg, 수율: 78%)을 수득하였다.

[0210] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H)

[0211] <8-11> 2-아미노-4-메틸페놀 및 2-아미노-6-메틸페놀의 제조



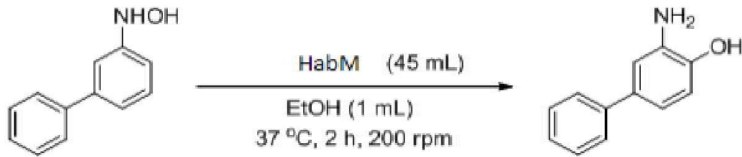
[0212]

[0213] 상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-10>에서 제조된 N-(m-토실)하이드록실아민(0.75 mmol, 92 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 2개의 표제 화합물(2-아미노-4-메틸페놀: 29 mg, 수율: 32%; 2-아미노-6-메틸페놀: 37 mg, 수율: 40%)을 수득하였다.

[0214] 2번 화합물: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.63-6.59 (m, 2H), 6.48 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 2.21 (s, 3H);

[0215] 3번 화합물: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.72-6.61 (m, 3H), 4.06 (br, 2H), 2.23 (s, 3H)

[0216] <8-12> 3-아미노-[1,1'-바이페닐]-4-올의 제조



[0217]

[0218]

상기 실시예 <8-1>에서 N-페닐하이드록실아민 대신에 실시예 <7-11>에서 제조된 N-([1,1'-바이페닐]-3-일)하이드록실아민(0.75 mmol, 139 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <8-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(75 mg, 수율: 54%)을 수득하였다.

[0219]

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.50 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.34 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.22 (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 6.75 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H)

[0220]

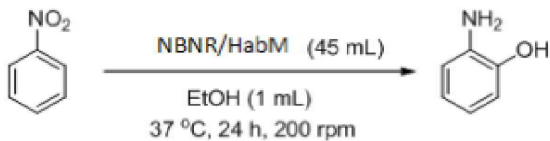
실시예 9: 다양한 아미노페놀 유도체의 제조(출발물질: 니트로벤젠)

[0221]

상기 실시예 7 및 8의 과정을 한번에 수행하기 위하여, 실시예 4에서 제조된 pETDuet/NBNR-HabM 발현 벡터로 형질전환된 대장균을 이용하여 니트로벤젠으로부터 하이드록실아민을 거쳐 아미노페놀 유도체 화합물을 제조하였다.

[0222]

<9-1> 2-아미노페놀의 제조



[0223]

[0224]

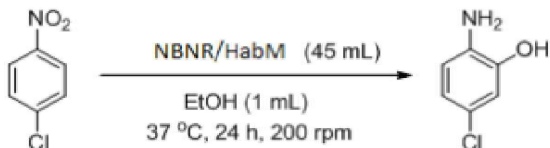
50 mL 바이알에서 니트로벤젠(0.75 mmol, 92 mg)을 에탄올(1 mL)에 용해시켰다. 여기에 니트로리덕타아제와 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 동시에 발현하는 실시예 4에서 제조된 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터로 형질전환된 대장균 6 g을 Tris-HCl(45 mL)[pH 8.0]와 함께 넣은 후, 24시간 동안 37°C에서 200 rpm으로 교반하였다. 반응 종료 후 상기 혼합물을 500 mL 둥근 바닥 플라스크로 옮긴 후 감압농축시켰다. 상기 농축시킨 잔류물에 에틸아세테이트(200 mL)를 넣고 12시간 동안 교반한 뒤 여과하여 감압농축시켰다. 이후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc/Hex=1:4)로 분리하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(57 mg, 수율: 69%)을 수득하였다.

[0225]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.80-6.69 (m, 4H)

[0226]

<9-2> 2-아미노-5-클로로페놀의 제조



[0227]

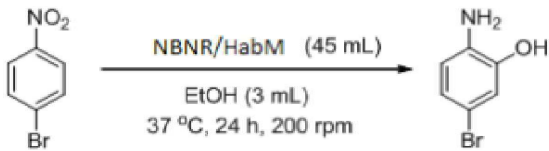
[0228]

상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1-클로로-4-니트로벤젠(0.75 mmol, 118 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(76 mg, 수율: 71%)을 수득하였다.

[0229]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.76 (d, $J = 6.7\text{Hz}$, 2H), 6.67 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 1H)

[0230] <9-3> 2-아미노-5-브로모페놀의 제조

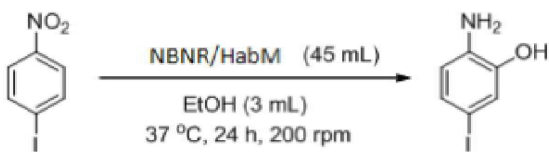


[0231]

[0232] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1-브로모-4-니트로벤젠(0.75 mmol, 152 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(87 mg, 수율: 62%)을 수득하였다.

[0233] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.60 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H)

[0234] <9-4> 2-아미노-5-아이오도페놀의 제조

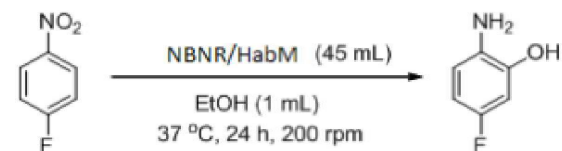


[0235]

[0236] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1-아이오도-4-니트로벤젠(0.75 mmol, 187 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(25 mg, 수율: 14%)을 수득하였다.

[0237] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.08-7.03 (m, 2H), 6.51 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H)

[0238] <9-5> 2-아미노-5-플루오로페놀의 제조

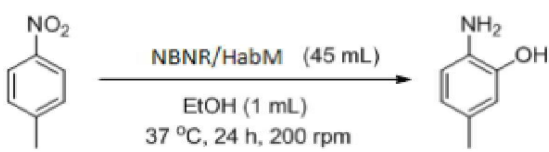


[0239]

[0240] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1-플루오로-4-니트로벤젠(0.75 mmol, 106 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(57 mg, 수율: 60%)을 수득하였다.

[0241] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.77-6.72 (m, 1H), 6.57-6.46 (m, 2H)

[0242] <9-6> 2-아미노-5-메틸페놀의 제조

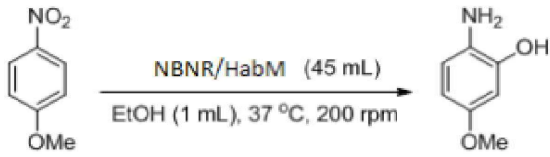


[0243]

[0244] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 4-니트로톨루엔(0.75 mmol, 103 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(55 mg, 수율: 45%)을 수득하였다.

[0245] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.69 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 6.59 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 2.21 (s, 3H)

[0246] <9-7> 2-아미노-5-메톡시페놀의 제조

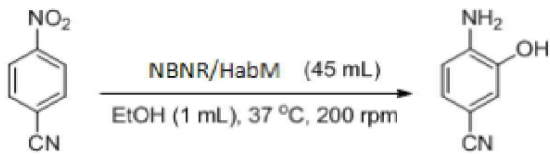


[0247]

[0248] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1-메톡시-4-니트로벤젠(0.75 mmol, 115 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(5 mg, 수율: 5%)을 수득하였다.

[0249] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)

[0250] <9-8> 4-아미노-3-하이드록시벤조니트릴의 제조

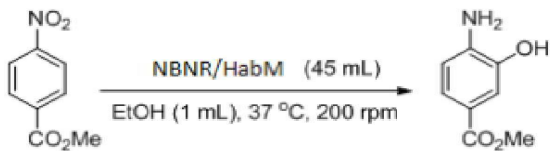


[0251]

[0252] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 4-니트로벤조니트릴(0.75 mmol, 111 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(40 mg, 수율: 40%)을 수득하였다.

[0253] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.10 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H)

[0254] <9-9> 메틸 4-아미노-3-하이드록시벤조에이트의 제조

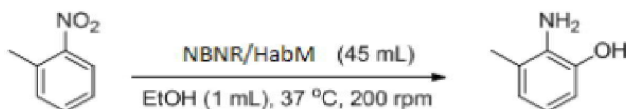


[0255]

[0256] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 메틸 4-니트로벤조에이트(0.75 mmol, 136 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(79 mg, 수율: 63%)을 수득하였다.

[0257] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H)

[0258] <9-10> 2-아미노-3-메틸페놀의 제조

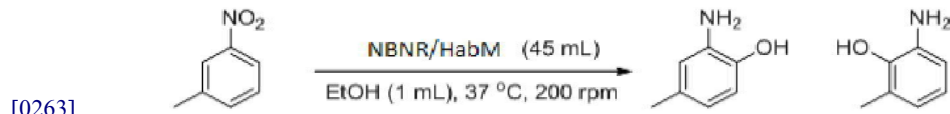


[0259]

[0260] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 2-니트로톨루엔(0.75 mmol, 103 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(11 mg, 수율: 12%)을 수득하였다.

[0261] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.71-6.67 (m, 1H), 6.62 (d, $J = 3.0\text{Hz}$, 2H), 2.20 (s, 3H)

[0262] <9-11> 2-아미노-4-메틸페놀 및 2-아미노-6-메틸페놀의 제조

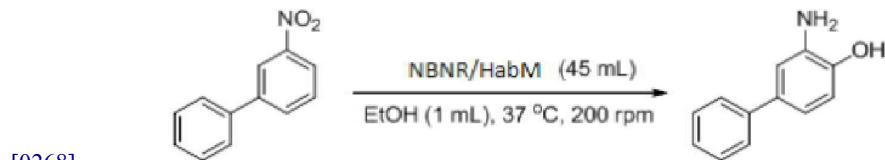


[0264] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 3-니트로톨루엔(0.75 mmol, 103 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 2개의 표제 화합물(2-아미노-4-메틸페놀: 5 mg, 수율 8%; 2-아미노-6-메틸페놀: 5 mg, 수율 8%)을 수득하였다.

[0265] 2-아미노-4-메틸페놀: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.63-6.59 (m, 2H), 6.48 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 2.21 (s, 3H);

[0266] 2-아미노-6-메틸페놀: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.72-6.61 (m, 3H), 4.06 (br, 2H), 2.23 (s, 3H)

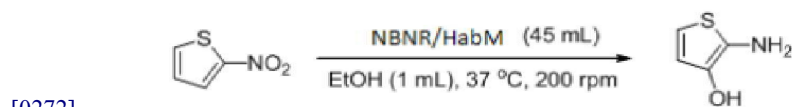
[0267] <9-12> 3-아미노-[1,1'-바이페닐]-4-올의 제조



[0269] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 3-니트로바이페닐(0.75 mmol, 149 mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색의 고체 상태의 표제 화합물(6 mg, 수율: 4%)을 수득하였다.

[0270] ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.50 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.34 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.22 (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 6.75 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H)

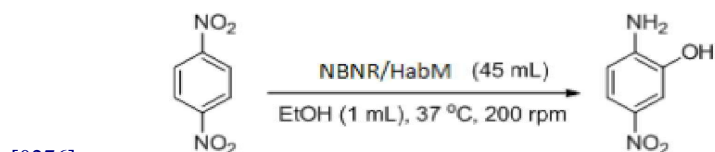
[0271] <9-13> 2-아미노티오펜-3-올의 제조



[0273] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 2-니트로티오펜(0.75 mmol, 97mg)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 갈색 고체 상태의 표제 화합물(49 mg, 수율: 57%)을 수득하였다.

[0274] ^1H NMR (300 MHz, acetone) δ 10.21 (s, 1H), 6.75-6.71 (m, 1H), 6.45-6.41 (m, 1H), 3.99 (s, 2H)

[0275] <9-14> 2-아미노-5-니트로페놀의 제조



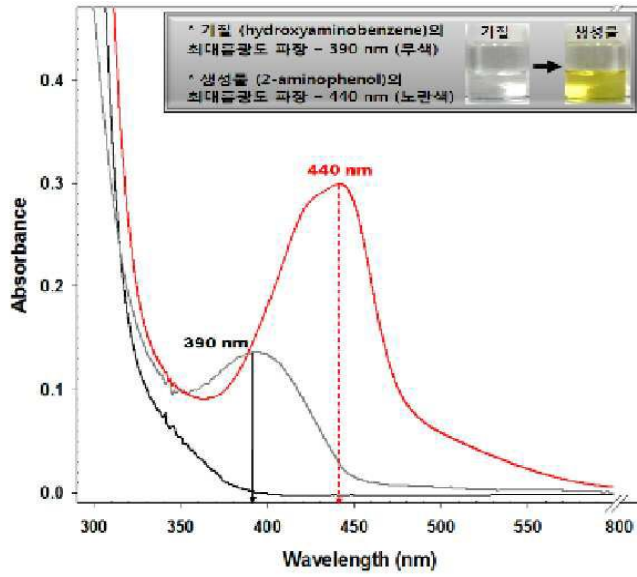
[0277] 상기 실시예 <9-1>에서 니트로벤젠 대신에 1,4-디니트로벤젠(0.75 mmol, 126 mg)을 사용하는 것을 제외하고는,

실시예 <9-1>의 과정을 반복하여 연한 주황색 고체 상태의 표제 화합물(32 mg, 수율: 27%)을 수득하였다.

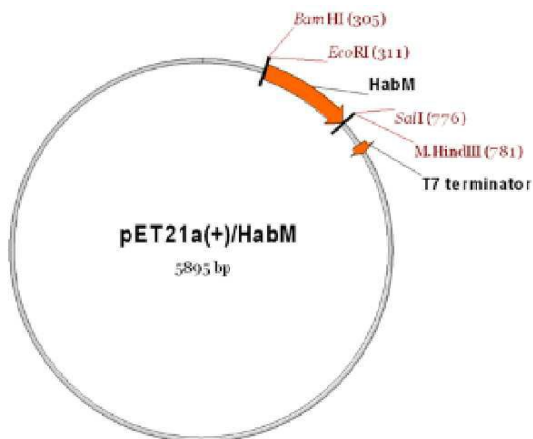
[0278] $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)

도면

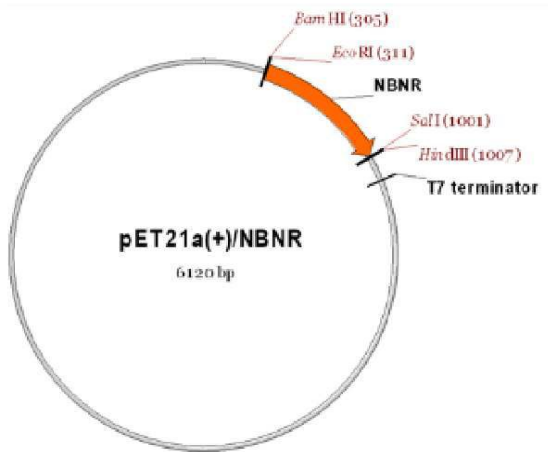
도면1



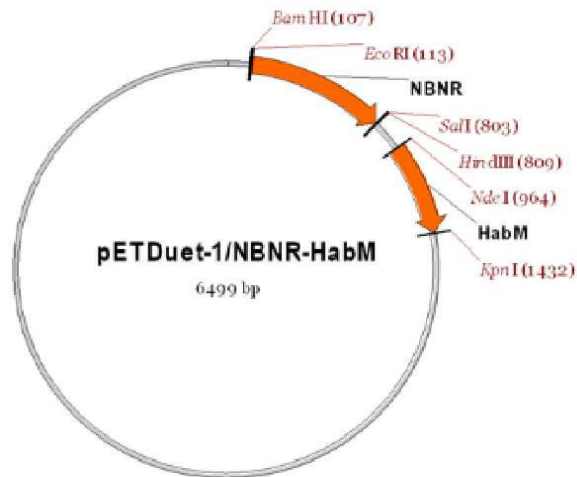
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY
- <120> METHOD OF PREPARING AMINOPHENOL DERIVATIVES USING
HYDROXYLAMINO BENZENE MUTASE ISOLATED FROM METAGENOME
- <130> FPD201212-0070
- <160> 7
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 152
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> Hydroxylaminobenzene mutase
- <400> 1

Met Asn Gln Ile Asp Ile Trp Thr Gln Ala Gln Arg Arg Leu Val Ile

1 5 10 15
 Ala Gly Met Leu Leu Phe Leu Ala Gly Leu Leu Thr Gly Phe Val Ile

 20 25 30
 Pro Leu Met Glu Asn Pro Arg Val Gly Leu Ser Ser His Leu Glu Gly
 35 40 45
 Val Ile Asn Gly Ile Phe Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val Trp Arg Arg
 50 55 60
 Ile Gly Leu Val Gly Phe Lys His Arg Ala Ala Leu Trp Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 Phe Ala Ala Ile Ala Asn Trp Leu Ala Thr Phe Leu Ala Ala Ile Trp
 85 90 95

Gly Thr Gly Gly Met Met Pro Ile Ala Ala Ser Gly Arg Ser Gly Ala
 100 105 110
 Ala Ile His Glu Thr Ile Val Gly Leu Leu Leu Ile Ser Leu Ser Ile
 115 120 125
 Ala Met Ile Ala Ala Cys Leu Phe Met Leu Ser Gly Leu Leu Ala Gly
 130 135 140
 Gln Pro Gly Thr Arg Lys Thr Asp
 145 150

- <210> 2
- <211> 459
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> Hydroxylaminobenzene mutase

<400> 2
 atgaaccaga tagatatatg gacacaggcg cagcggcgcc tggatgattgc cgggatgttg 60
 ctgtttcttg cgggctgct aaccggattc gtcattccgc tgatggagaa cccccgggtc 120
 gggctttcca gtcactcga gggcgtgac aacggcatat tcctgcttgc tctcgcgct 180
 gtgtggcgcc gtatcgggt ggtggggttt aaacaccgtg ccgactctg gctggcgatc 240
 ttcgcggcga tcgccaattg gctagcgaca tttctggctg ctatctgggg cacaggagga 300
 atgatgccta tcgcagcatc gggcgatct ggtgctgca ttcacgaaac gatcgtcggc 360

ttgttgctga ttcattatc catcgccatg atcgcgcggt gcctcttcat gctgtcgggc 420

ctcctggccg gtcagcccgg tacaagaaag acagattga 459

<210> 3

<211> 33627

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> DNA fragment derived from metagenome, which comprises a
hydroxylaminobenzene mutase gene

<400> 3

tctccatctt gcctggcatt caggttgata atatggcggg tgatcagaaa gccgctcagc 60

acgaaaaaca aatcgacgcc gaccagcca ttcgccagca acgggacaag atcccaacca 120

agcatcggaa taccgagitt cagtgtgtct tcgaacggcc gatatgctg cgcagcagc 180

acaagacaga ttgccagtgc acgcaggccg tcgagaacgt cgatttgctt cgggtcgcga 240

gtgaatgcca ggaatcagc gcagcgcctc cacaggttgc acgtgctgga agggaccggt 300

ggcatcctca ggacctttcc agccccaggt tcatgcgcaa cggtttcttg cgcattttcc 360

aaataacgga atcgacgatg taatggtgaa aattgatggc ctggtaaatg aggacggcga 420

acgggaggcc tgcgataaat ctgccacctg cggtcacgcc aatcagggcg tagacaaccg 480

tggatatgcc gatgcacacc ccgagataat gccatttgtt gggtccttgg ctgagccagg 540

acaggaatct ggaagcagcc tcaatgcccc ctttgaagcg gttggtattg aaaagccaga 600

cgaaaagtat gtactgcgcg ttgtgccaga tgttgataac cagccagccg tgcgtgatgt 660

cctcgatgag gcggtagccg acgagaaaga tcacgaagtg agagatcatg taatacgtgt 720

gggagcgtgc caggcggccc ttgcgccagg caatgaatcg ctgagcggcc caaacgctg 780

ttgaaatcag cgccgcaatg ccgacaacat ccacgagaat ctccggcatc ggcagtacc 840

ggagtctctg gaacaggaat tcatccggcg attgccacga tcgatacagg attccgtacg 900

ttggcaccag gtagaacgat atttcgaaaa ccacgggtcc tcgttcacca ggtcgcgcga 960

tttgcgccga tacgcttggc tgacccccca gctctgccgg gtgtaatgaa accactgcca 1020

atgcaaatag atagtggcga tcagccagac accggcctgc caggccaaca ggaatgtcac 1080

accaaataca agtgggtgca ggtagaagag caacagtcga ttttcgcaa tactggcacg 1140

gtcgaaggcc aggcgtgtca ttgtcgagac gacatggtga taaccagca accacaggtc 1200

ggtgataage acgacccca acaaccccg gttcatgact accaggaagc cggataagag 1260

cgcgagcaaa gccacacttc gtattaatgt cagatcgtag ttccggctgc gcagccaacc 1320

cgggtcgacc tgitctacag caacagaatt ggccacacat ccaactccgga gaaaactatc 1380
 cacgtcatga aatcaggata cttttccgct tcgggagtgg ttagaagtaa tttgtgtggc 1440
 tgccggaaga ttttgccgcc agcatccggg gcattatgac aaatcgaagc tttgcggcag 1500

 tctgtttgtc cacggacggc atcgaactt cgatcgagga ggtggcactg gctgctatcg 1560
 ccacacgact gcaaaactgc cctgaacat tcttgctaac gctaccgct gatcactttg 1620
 cgcttttgc cgccggctc gatgcgatcc acgtaatcac caggtcgacc atttgcagca 1680
 ttccgagacc ctgttcttcg agtgatgcc aggttgtaaa ggagacagca tgcccattg 1740
 tcgctttcag ttttgccgac tttttccctt tgggttgcca gcaggcaagc aggtcgttac 1800
 gaatcccgtc catgtgggta tggaaacgcgc tcatcgggcc ctgcaaggcc ggtacctcgt 1860
 cgacgtcgcg gtacgacagg cgccacatgg cgctggtccg ccggtagtag tcataaattg 1920

 cgccaatcgc cagcctggtc ctcttttccg cgactttttc gtggcaccac gtgtcaatgg 1980
 ctggcgggtg atctcggcc agccaatgtg atgtacaggc atggaacaga gactcctcgt 2040
 tgggaaagtg ccggtacaca gtcagtcgct gcacgccggc ttttttct atcgcgctga 2100
 tcgaggtgtt tttcgggccg accgtgcegt gaagcgcagc ggtcgcctcg acgatattct 2160
 gccgggttct ctctgctcg accgcccgt gcttcatctt gtattttgc tttgtcattt 2220
 aatgaacat atctgtttac tcaagtgtg acaagcaggg cggccggtt tagtattcga 2280
 caaacactac tgttactga aataatctcg cctcgatgga gattacggag tattggtatg 2340

 aaccagatag atatatggac acaggcgcag cggcgcctgg tgattgccg gatgttgctg 2400
 tttcttgccg ggetgctaac cggattcgtc attccgctga tggagaacc cgggtcggg 2460
 ctttccagtc atctcagggc cgtgatcaac ggcatattcc tgcttgctct cgccgctgtg 2520
 tggcgcgcta tcgggctggt ggggtttaaa caccgtgcc cactctggct ggcgatctc 2580
 gcggcgatcg ccaattggct agcgacattt ctggctgcta tctggggcac aggaggaatg 2640
 atgcctatcg cagcatcggg gcgatctggt gctgcgattc acgaaacgat cgtcggtttg 2700
 ttgctgattt cattatccat cgccatgatc gcggcgtgcc tcttcatgct gtcgggcctc 2760

 ctggccggtc agcccgttac aagaaagaca gattgacaat ccagaagttg catgaaaagc 2820
 agggattatg aaaacagtta aagatcgcgg ccacagcctg caccaggcct tcacgtatga 2880
 ccttttttcc ggttggagac gacaagcgaa ttggtttcaa tcggcattgc gcccagggg 2940
 cttecatgg ccaactcgtc cgccggctcc ggtctcgtcg aaccggaat tagcgaagca 3000
 tcgtgatcac cggcaccgcc agacgctgaa cctgtaaaca caaccatcat ggtgatttat 3060
 gacgaacgtc ctgtattctg gtacgcgtaa cgcctctagc tgggcatgc gcgcctgget 3120

cgcaactccgc gagcagaata ttgaatttga ggagcggata atcgatcttc gccgtccgca 3180

acggttcaag caacttgcac tggtcggcga gttctctcct ccggcggcgg tgccggttct 3240

ggtaaccgat tgcacgacta tcttcgattc gctcgcaatc atggaatacg caagtgagtc 3300

cggcgagcgc tcctgtctgc cagacgatcc actcatgcgc gcacgtgcaa gatcgtttgt 3360

ggcatggcag cactcgggat tgtctaacat ctgtccggcg ctgtcctttg aaagcgtttt 3420

ctaccggac aaacgtgcga tgaccgaaga tgagatggct gattgtcgca agctgttcgc 3480

ggcgtggag cacgaacttg cactccacga cggggaatac cttttcggtg atctgtcgt 3540

tcgggacctg gcgtggcgc caaccgtcat tcggctggat gctcacgatc ccgacttcag 3600

tacatttccg catacgaacg catggttcga gtccgtttta tcacggcagc tcgtccgca 3660

atggctcgac gaggcgtggc agctaccca catctggttt gacgattact tgccagacga 3720

ggtgtaggag tcgcatcgtg aaatttatta cggccgggaa attcagggga aaacgcgcct 3780

ggcaagcgtc tccgatcgcc agcatgaacg gcattacaac gcggttacct tggacggaca 3840

agccgtacaa gtggcacgtt aactccggcg aggaagtgtt cgttgtactt gatggtatcg 3900

tcgacatgca ttacagcat cagggaaga agggagtcac ccgaatgaac gtcggcgata 3960

tattccacgc gtctgtcggg acggcgcacg ttgcctgtcc ggtgggagag gcgcgcgtgc 4020

tggtcgttga ggcgaaggc agtgtctagc gcttctattt gatttgctcg aaacggcagt 4080

tcggttttcg caccggtttc ggacgtcca gcatgatccg gtcgatcgat caagctcgac 4140

caagatggac atcgggtatt gcgttcgatc cgttgggact gccggaagct tcccaatcc 4200

cgtgagggat tacacgatca gctggggcct gcctcccggc caaaaccgag cgtctccagc 4260

gcgtcggcca ttcgtgtct ctggataccg tcttggacag ggaacgcacg aaagaagtcc 4320

gcactgaaa gtccggcgc ccgccgtgcc acggtctcgg cccaccgccc tgcaatttct 4380

tcgctccgg caagctggct cgccgacgca gcgatcattg cgatcagcac gtgggcgcca 4440

ggggcacgtg cacccegatc cgtccagtcg gctgcttctt ggtcctctcc gagcgtcatg 4500

tgggtcagge cccgggccga cagcattgca tagtacagcg gatcaagcgg gctcaatcgc 4560

atcgatttgt cgagattggc gcgcgcgtca agcgtcgcgc ctgccatcga ttcagtcag 4620

gccttagcat acagaccctg tgcatagttc gggcaaagcg acgtcgatct ttcgagccag 4680

gactgtgccc ggtcagagtc cggttcgagc cagtaggttc gaccatcgt gaagttgacg 4740

aacggatcca gcgggtcgag atcgacgcct cgctgggcac attgccgggc cctggcgacc 4800

tcggcattca ggtcgttcgt atggcgcaga aaagcagtct ggaaatggac gaatgaaagg 4860

cctgcgtgcg cccgcgcgaa accagggctcc agttctgtcg cgcgacggaa cagctcggca 4920
gcgattgcat tgcctcccg ggtaaaacgg tagatgtgcc tcaggccgag gtggtaggcc 4980
gaccatgctt ccaggctgcc aggcaccccc agccgggctc gcgatgcctc gtgcagcggc 5040
atctggattt ccagctggct caggatgttc gcgcatatct cctcgcgcat cgcgtgaatg 5100
tcgtctacat ttccggcata gcgctgcgcc caaatgacgt cgcggcatt ggtgtgagcc 5160
agttcgacgg taaccgcgag ccgattgccg gtcaactcca ccgtgccgga aaggcagtag 5220
cggacgcccga gaagctggcc gacctgacat gggtcgatat cgtctgtgct tagccggaag 5280

gacgacgcgc gcgcaacgac gaacagccag cgcaagcgcg ccagttccgc gatcaactcg 5340
tgcggtaaagc cgtcggccag gctgctccac cgttcgtcag cccaaccag cgagaaggcc 5400
agcacagcga tagacggacg ggcaacctgg ccgggaacat ctgattgggg cagttccggc 5460
gtagtatcga cgaccagctc gcgcttgatc tggacgctgc caacgaagcg cagacctttg 5520
ccgtgaaatc tccggatgaa gcgttgagat ttgccgtcgt ctccgagcac ttgcccggca 5580
gattttatcc ggctggccag agccgagtcg ctgacaatcc ggccatcca tacgttttcg 5640
aatatctcgt ggcgcgatc gagcctttca cgatgctcga cgaggaacgc aattagcgcg 5700

aaaacctgcg gttgcacggg caaagcttcg ccgtcctgcc gaagctctgc gcgccaatg 5760
tcgagctcga aatcgccgaa tgcataaatc attggcggag attagaacag ggccgatggt 5820
aattcctcaa gatatecaca aaaaatccat atggtctcca tgcggcgcgc cgggccaatg 5880
aagacaatgc actcactggc ggtgcaatca agccgcgaag caataaccga catggtgtaa 5940
tcaaaggaga aatcccatgc cactcgtaac aatcgatgta atcaagaatg tcttcacgcc 6000
cgaccagaaa gaagcgtgta tcgaaaacgt cacggaagcc atggtcgctg tagaaggtag 6060
gaacatgcgc ccggtgacct gggttcgtat caaggagttt gaaggtggcg actgggcat 6120

cggcggccag cggctcggcg cagcggacgt ccacgccttg cagaaaggcg aggcagcctg 6180
acgttgcaaa ggagagggcc tcacgaacgc gaggccagca ggttcgggca ccggaatggt 6240
gcctgtgcct gttgcgcggg gcgaataaccg cagtgggtgt tcaaccgata tctttcaaa 6300
aggccgcaaa atcgattgat atccaagcac tcgcacttct gtgctgactt gggcgtggac 6360
gagagctaac tcctgaaaa gatgatgtat ataattggtg aaacatcagc ttcccactcg 6420
gaggtgctga gttgagaaca agcctgtccg ttgtcttcc gtggtccaat gttcaatc 6480
aaggagttag gtcgagcaaa agcgaccagc agaatttggc aagtactcct ggattgctcg 6540

gcgctgtttt cagctccgga agtcacacat tacctgcta tatcttctc cggacccc 6600
aattcctta gaatcccagt cctctcactt ttatgctcag ctagacctaa gtgagacgta 6660
actccctgat tggcgggtgt agttcaacgg tagaacatca gcttccaaa tctcggagcc 6720

aagttgacca aatcggtaac cgcttgatat ccgtggactt ctaaccaccg atttcaacga 6780
gttatttcac ccaaagtaa ccaacagatt ccagcaagct ttctgagtat gctcagtttt 6840
actctcacat ttcgaagagt tagaagtcgg gtattcgcag tgattttggc atgatctacc 6900
ctgaaagctg agatacagcg acggcgatcg tgaatgcat aaaatgcttc aatcatgatc 6960

gatctaagaa aagtactgct tggctccgacg gcagtgtatg cgaaccgat cgaggtcggc 7020
actgatgcca gtctgacccg cgagcagaaa atcgagatit tgcgcaattg ggaatatgac 7080
gcgcgtgcgc tagaagtagc agaaaaagag ggcgaatgcc cgtcagccga cccgagatgt 7140
tcgacctcat cataaatgca ttaccacaaa tcggtgcaaa gcgtgacacc gaacatactc 7200
cgccaaccaa gtgacctgaa tgaacgcaat cgctaaaccg cgatgaacta cttgctcttg 7260
attctaggcg tggctttgct gactgcgggt ggcgaggtt tgattcgagg ctctgttgct 7320
gctgctagcc gtctaggtgt atcgccgttg ctgagcggtc tggttattgt aggcttcggt 7380

acgtccatgc ctgaattagt ggtctccgta actgcagcac taaatgagca acccgacatt 7440
gctattggca acgtcgtggg cagcaacatc agtaacgtat tattgattct aggtatttgt 7500
gccctgattg cgccaatggc ggtcaagccg tcagtctctc gcagggatgc catcacggtc 7560
gtagcggcaa gcctgctgtt tctggtcttg gcgggtggca gcgcccttgg gcgtgcggat 7620
ggcctgattc tctggcgtc gctggtggct ttcttgatgt gggcctaccg gagcgaacgc 7680
ttccacgctt tgcctctgc ggatctgcac aaagccgaag ccgacgagct taccgctctg 7740
ccgaagtcag caatctggac ggttgcgata gtgatcgag gtctactgtt actaatctct 7800

gggtcacagg tgctacttaa gggagccgtc ggtattgcag agaaatttgg tatttccgag 7860
gccgtaattg gcttgacgtt ggtagcagtg ggaacatccc tcccagagct ttcgatttcg 7920
gtgatcgcg cgctgcgtcg gcatgcagat gtggccattg ggaacgtgct tggtagcaat 7980
atctttaatt tgttgggaat ccttgggtga tctgctttgc tgcaaccact tccagtccac 8040
cagagagtcc tgcaatttga ccagtgggcc atgcttggca catctgtagt gctattggta 8100
ttctgtata cggggacgcg tctcaaccgc ttggaaggcg caatacttct gattggctac 8160
ggagtttatg tcagcctgag ttttacgacg attggcgggt aatgccgaca gaacgcaggc 8220

agccaatgtc cgatgcagga cagggttctt gtcggtgcat aattatcgta gtggtgtacc 8280
ttgatattca tgcccaggcg ataatatccg tcgttcaaat gtctgacgga gccaggtgaa 8340
tgttcaagcg cgtcgcactt tttattgcaa caaaccttgc cgtcgtgctc gtgttgagca 8400
tcgtactacg ccttctgggc gtcgaccaga tctctgacga gtcgggtgct ggcataaatt 8460
atgaggcgtt gctgattctg tcggtcgtga ttggcttcgg gggtcgttc atctcgtctg 8520
cgatgtctaa atggatggcc aaacgttcca ccggtgcgca cgtcattagc agaccgagta 8580

acaatgcgga atcctggctg cttgccaccg tggaacgact cgcacgcgac gccggtatcg 8640

agactcccga ggtggccgtc tacgactcac ccgacatgaa tgcgttcgcg accggcgcca 8700

ggcgcaatag cgcactcgtc gcggtcagca ccggcctttt gcggggtatg caaaaagacg 8760

aagtcgaagg cgtgcttgca cacgaaatct cgcacgtcgc caatggcgac atgatcacgc 8820

ttgcgctcgt acagggcggt ttcaatacgt tcgtcatatt cctatctcgt attgttggtc 8880

acatcatcga tegggtcgta ctcaagaacg agcgtggcta tggatcggc tacttcgtct 8940

ccgtgattgt cgcgcagctc gtgctagggt tccttgcgag catcatcgtg atgtgggtgt 9000

cgcgccaccg ggaattccgt gccgacgcag gctccgcaaa actgaacggt aagcgcccga 9060

tgatcgatgc gtcgcgcgc ctcaaccgac gtgctcccgc acaactacc gagtctctcg 9120

aggcattcgg tatctcagga cggcacggaa aaggaatcaa gcggttggtt atgagccatc 9180

cgccgatccc ggagcgtatc gcgacacttg aagccctgta ggcggaattg ccagattgac 9240

gctagtttgc cgaacaatg caagacacgc caccgctacg atcctgcagt gccatgctgt 9300

acttgaggga ggaggcttgc ccgatcgtt ctctccgggc cccagaatcg cttagaatcc 9360

gagtactttc acgtttatgc tcaaccaagc tcaggtgaga cgtaactccc tgatttgcgg 9420

gtgtagtcca atggtagaac atcagcttcc caattctcgg agccaagtta accaacttcg 9480

taaccgcttg atttccgtgg tcttctgacc accgatatac acgagttatc tcacccaaaa 9540

ttaaccaact gattccagaa gagtttctga gtatcctcag tattactctc accgaacacc 9600

gaactcacgg ctattacact tggtcggatc aacgcgccac atgctggctg gacgatgacg 9660

tttggcgcgc cgcgaaacgc tagggcagga cttcgaagag ccccatcatt ccattgtcct 9720

cgtgttcgag gatgtggcag tgatagacgt acttgccgta gttgaccggt tcaaatcgtc 9780

cgatgatttg gacgctatca cccgggttga cgagaacagt atccttcag ccacgctcgg 9840

ctcccgttgg ctccgcgccg tttcgattca gcacctgcca ttgaatagcg tgcgcatgga 9900

aaggatgcgg gaccggcgag gtattcgtaa tctcccagat ctccgtcgca ccctttcca 9960

ccatttcgtc gacacgatct tccgagtact gcttgccggt gattagaaat acgcccggct 10020

cgtgtgacca tgacataacg aatgtgcggt cgttggctgc atcttcagtg gagagccgat 10080

tccagatttc tgcacctgc ggcaactggt catacaactg cacgtcgtcc gcaactgctg 10140

tatcgacgtc gaatcgcata atgtcgattc ctctgcctgg caaccgagc tcgcccgagc 10200

catgcattcc gccgtgatgg ccgccccca ttccacccat gccgccgtgg tttggcgagg 10260

agtcgaattg gttcataccc attgccggtc cacccatgaa cggttactt accaacaatca 10320

agcggtcacc aacttgatct gccgcaaaat cgatgacgat cgccgcacgc tccccggcgc 10380
 tgagaacgac gtggtctgcc tgcaccggct ccggtagcca gccgcatcg ctgccaacga 10440
 tggatgaatga ccggccatcg tgcagcgcaa aatcataggt tcggctgttg gaggcgttgt 10500
 acagccgtaa tigtacttgg cgtgtttcga cggtagccg gggtagctct gcgccgttga 10560
 ccagtgttgt tccgccatc atgccgaatc ctgacatgtg atcgtccgaa taggtcaaga 10620
 gccgttcgcc cgacacctcg gcctcgaaca agcggtcctg cacgaccaca ggaatatcgt 10680
 gttcgaccga aggcacttga ttccctgacc gtagctgac accgatgtcg tctgtcagaa 10740

 gaaatacacc ggccagcccg cgatagacct gttcggcggg ctgaccgtgt ggatgcgggt 10800
 gaaaccacaa cgacgcggca ggctgattca gggatgaagt gtagaggcgt gatgaattcg 10860
 cggcgaccgg ttcggttggg ccaccgtcct cagggccagg caccttgaat ccgtgccagt 10920
 gaatcgtgct catgtccgca agttcgttca ccagcgtgag aaacatctcg tctccccgcc 10980
 ttgcgcgaat gacgggcggc agttcatgc cgtttagcgc cagcatcggc gtggccagc 11040
 tcgttccagg cgctggatc gtaacgtcga cgtccggcac cgcgcgcaat gtgtatctcc 11100
 cggcccggtt ctgcgagtca ccgtcttctg ctgtgagaac agccagatgc tgaatgccg 11160

 gaagattgtc cgctgtaagg ttttctgcgg tcgtcgcgat gccatcacga tgctgcgcgt 11220
 gcatcatgtc gaacggcgta aggtccagcg ccatcagttc gagatgatgt cggaaactctg 11280
 ccgatccgtc gccattgaaa accgtctgca gatcgtggtg cagcatgccg gcgcgagcct 11340
 gggcgtatcg cagtgcgtga tcgtgctcgg ccatgtagaa agggcctccc gatgcgtgca 11400
 tgaacgagat cgggtcgcctg ccggcgtggc cgtcgagcac gccatcgtgc atatcgaggc 11460
 cgagcgcttc catcaactcg aacattgatt gaggcgagag gccggtttca ttggcgtaat 11520
 gagaaaacgc tctcggccgg tgccaggcca gcgaatcgtc ggcgtgggca ggcgtaagcg 11580

 gagcgcgcaa atgcatcggc cggctctgat tggattctgt acccgggtggc ctggaatcgc 11640
 caacaaatag accgtggtag gtatcgacag tgtgcgtcat tgcctgttga aggccattcc 11700
 cggcacccat cgagtccgg accatgtcgc caacaatcgt ggtctcaggc gtcaggacga 11760
 ctctgtgcgc atgggactga agatecgtg cagagaetac ggcaaaaagc ccgtgccag 11820
 gatcgacatc gacgcggctg cccgtggcct cgtccatgaa ataccgcca cgggtcctta 11880
 cctcgacgta ggtatgatcc gccagatcga cagtaagctc gaagcttccg tctcgcgtgt 11940
 ggccagatgc cagtacatgg ccgtctggac tcatgattc cagcgtcga tctgtcatgg 12000

 gccctttgag tgcttggccc gtgatcgtca ccgagttcgg ggttagcca cccgtcggcg 12060
 gtgcattgac cgggtttgct ccaccggacc cgcgcctcc gcaggcggaa accgttatag 12120
 cgacagcaag gtacatgatt gcgaccgcac tcgtagagcg ccgaatcggc aataagcctc 12180

tggttttcat agtattacc gcaaatgcmc gccaaataac agtcgtcggc gcggctggat 12240
 atccaccaag gtactctcgc gcgaataagt gcagatagg tacttgcaac tacggctttg 12300
 tcactgaacg gactcccagg acgcaatac gactgggtcg agtcgctgct cgaacagcga 12360
 ggtacttgat gagcgactgc ggatgtgaag caccggagg gaagacggaa caggagcgac 12420

 gtgtcctcgc cattgctctg ggctgaacg ccgcatggc ggtgatcggc ggcttggcag 12480
 ggtggattgc gcagtcacc gggctgctgg ccgatgcgct ggacatgctc tccgacgcga 12540
 ccgctatgc gattgccctg ctggccatcg gccgctctgc gttattcaa atcagagccg 12600
 cgacacttag cggaggaatc ttgctcgtgc tcggacttgg ggtccttttc gaggtgggcc 12660
 gacgtctgat ctacggggcc gagccgctga gcgaatgat gattggaacg gctatcctgt 12720
 cgctggttgt caatttgacc gtgctgcggt tgctggccc gatgagatcg ggcaagtgc 12780
 atctgcgagc aacgtggctt ttactcggg ccgacgtagt ggcaaatctt ggcgtgattt 12840

 tcgctggcct gcaaatcctg tggcgcggtg tgccgtatcc ggattacgtg atcggcactt 12900
 tgatcgtct ctacgtcgtc aaagaggcgg tagagatact gcgggatgcc cggtcagagg 12960
 cgaccaacga attcgaagat gcgcatggtg gctgtgagg cagtttgggg caagggacga 13020
 ggtctggagg ccgtggcggg cacgggcacc ttgctcgg ctttcattcg cggcagttg 13080
 atcccgtgg gtcgatgcc gcgtaacgt atgatcagc aactcgagg cgatattgag 13140
 agaatttctt cagcaatcac ctcaaatcg ctactatcc agtactctca cttttatgt 13200
 cagccagacc tgagtgagc gtaactcct gaaaagcggg ttagttcaa tggtagaaca 13260

 tcagcttccc aagctgagaa tgagggttcg attcccttca cccgtccag ctcaagtgcg 13320
 ttgagaaccg taigcgatt gatcgatag ccatcgcaa taagcctccg gacgacgtaa 13380
 atgtcatcgt cgaggttgcg atgggcgggc agcctataa gtacgaactc gataaagaag 13440
 ccgggacgtt agttgtggac cggtttctct acacacccat gagctacct ggcaattatg 13500
 gtttctccc ccacacctg tcggaggatg gcgatccat cgatgtgtg atctgcaatt 13560
 cagcacgct catgccggc tcggttatta acgtgcgtcc cgtggcgtg ctggtgatgg 13620
 aagacaatgc cggacaggat gaaaagatca ttgccgtgcc atcgccggcc ctgagccgcc 13680

 gctttgatca cattaacaat tattccgacc tgcccacat caccgtcag caggtggcgc 13740
 atttctttga gcaactacaag gacctggagc ccggcaaatg ggtgaagatc ggggactgtg 13800
 ccgatgctgc acaggcgagg gagatggtgc gccaggccat cagccgggca aagacacagt 13860
 gaccaccgg ccggccgatt tattccaga gcatgaatca tctgacagac ttgcggtgcg 13920
 actcggacga catttttga acaccaggtt gaatttctt ggcagcatt cgcaccagag 13980
 actgtggccc gactcgaatc tattttcca tgcataagg tcattcgatg attggtttcg 14040

ctgaccgtca catcgtggga ttcaagggcc ggcccgaac caattcgcaa tacaggcatt 14100

 ttcatcgtgc cgtgcttact gctgtttta agccataact caactgagat acgataccgc 14160
 ggcaattggc gagggagtag gtgtgacaag tcttagcaga agggaattca gaatattgcg 14220
 atccagcgcg gtctctgctca gcgtggtcgc actactatgt ggatgcgtca actttggtcc 14280
 aagggccgta caggctcggtc ggaacgacta caacacggta cttcgtgaca ctgccgacga 14340
 gcagctactc gccaatctgg tccgcctcag gtatcgcgac cgaccctatt ttctcgaagt 14400
 ttccaccgtc accacgcagt tctcgttcag cccacagcta tcggcgtcgg ccgcgctcgg 14460
 gccgagcaac atcgcacagg aaggcattgt gggcgggtgga gtcagttact cggaacagcc 14520

 gacgatcagc tacgtacccc tgcaaggaga cgatttcgcg cgtcgactgc ttacgccggt 14580
 gtcaatcgag gcgctggtac tccctggcaa ctcggttgg agcatcaatc ggctgttgcg 14640
 cctctgcgca cagcgcatac acggcgttcc gaatgccgtg acggcatcgg ggccgacgcc 14700
 ggatgcggcg cccgattacg cgcagtttca ccgtatttcg gcccgattac gagaacttca 14760
 attaagcggg gatctcctga tcggctacgc ccaggacgag cagaattccc cgggtctgaa 14820
 gttcagcgag cgatcatggg gcacggacgc ctatgccgag gtcacgaat tgctggggct 14880
 ttctccaagg ctgccacact acccaatttc ggtcggctcg agtggcgcaa atggcgatgg 14940

 catcatgatt cagaccgat cgctgaacgg aattctttac tacctttcgc acggggtttc 15000
 cgttcccgat acgcatcgca gccagggcct tgtgaacact acgcgacgcg cgaccgggag 15060
 cccattcgcc tggtcagaac taatgtccaa cctgtttaat gttcacgtag cgggcgcttc 15120
 gccagactcg gggcggttc gaatacccta tcgtgaccac tggttctaca tcgcgacgc 15180
 agacctgtcg tccaagtca cttttcaat gctcgcacaa ttatcgcgcc tgcaagccgg 15240
 cagtggcgaa gggtcggcgc cgctgcttac gatcccgtc agccgataac gatcctcgac 15300
 cggactaata attaggtat gcgtgttaca aagaaatggc ttgtctcgaa tccgctgtgc 15360

 agttcagcca gcgttgagat gaagcgtaac cggatgaac ccggcatcct cggcataatc 15420
 gtcggtctcg cggtgcaaga ctgcctcggc aacctggccg ccggcgccat gatcctgctc 15480
 tacaggccgt acgacgtcga agatctggtc tacgttaacg gggctgaagg gctggtaaag 15540
 cggatgaacc tgctggctac cacgatcgtg accttgaca atcaatctgt ggtcattccc 15600
 aatgcgcgaa tctggggcaa cacgattatc aatcacaccg ctcaccgagt tcggcgcgtg 15660
 cacatcaagg tgggcgtaag ttaccgcgaa gaccctgatc gtgtaatttc tgttcttaag 15720
 cggctagcgg aagaactcga ctatgtactc gataaacctg ccctaaccgt acacgtcgcc 15780

gacatggagg aatcgtcggg gccattatg atgaaacct gggcggac ggcggactac 15840
tgggtgctc gctgggacct gcctgccag atcaagaagc gttttgatgc cgagggtatc 15900
gagattccat tccccagcg cgtcgtgacg ctgaatcaga caccgtcaga gacaaattga 15960
actggtgac atactttggc gcttctgacg catttgggct tatcgaatgt gcatcaaaaa 16020
tcgattgaat attttcgac agcaaattat tgaacaacc ggagaaacat ataaattttg 16080
ctcgccggcc gaaaaaccg tgactatgtg gcatcgaccg gttgaattca cagcggaaag 16140
aagacgcagt gtttgaaca aaaaacaata gtcggccgct agcgagacgc caaatcaatc 16200

gtctgcctgg aaaaatcaaa gaagccggca aaggtgacca ggttttcgag atcaccatcg 16260
gccgagccga caccctctc tagagcctgc tgaaccgatt ggcgctggag cacaaagtca 16320
tatacacct ggcttggat attgaggaca aggtcggcgt tttcgggtag ataattatag 16380
aaggccgcaa taccgttctg aacatggaaa ccataggctt cgtctctgtc ggtaaatattg 16440
aagccgattc tgaagtccg cccggtggcc tggcttgcac cgatcctgac gcgaagattt 16500
tcgagaatag ttccgatatc gacttgctc atgattaccg ggctcgcaa attgaacgcc 16560
ccggagcggg ccaggagacc atccagctcg gctgcaccgg agatcgcaa attccgataa 16620

tagatgttgg cctgatcga tccccaggcg cgcattgccg tcgccttgag atctcgcgcc 16680
tcggtgtcgg tacggtccgt gcgaatcaag tcggtcggaa tctccattgc ccaaccgtag 16740
tcttcgttat cgattgccaa ttgagcaggt gacaacacgt tatccccgcc acccatcgcg 16800
gagacataca gtcgagcttt gcgttcaaag cccggggtcg caagctcggg tgcacgcct 16860
gagtaccagc cgagatagcc gttgtatacg ttgcgaacga catgggcgac actgccatag 16920
tactcctgga gccagggatc agccctcaat ttctccgca acttgacgag atccacgagt 16980
tcttcgcgcg tggcgcctc gttcatgtgg cgtatcgact gatcatgcac atactgaata 17040

gcgtcgggt agttctggat acgctcgacg atgaattcgt tgcccacca tgaacgatg 17100
tgcgagtgc tgggtctc cctgccttt gcatactga gaagtcggtc ttacaccctt 17160
gtaccagcga accatgtccc ggtatttctg gccctgagt gtgtagagat tcgggaatgt 17220
ctcgccctgt atcgtttccg atccatgcac atgtcgaaga tcggggaagt agacatcgat 17280
ctcatcctcg gcatcgccgt aggcttcgaa cagcacgtcg ccttttctc ctgattcatt 17340
gtgtgtcga ttcacggctt cggatcgctt ttggcgcgat cgcttgggtg gaataactct 17400
gcaacttctg tgcgacgat gggacggaat tcccagccgc gatccggcaa tttcatacaa 17460

agcgattgta aaaactacaa aaaccgggcc ttttcgggc gcggccgacg acgcgcgccg 17520
cgccgccac ggcacactcg cgggcgctca ccgacattcc ggatgttggc atgccacttg 17580
catcgaagg aaccgacgc cgcaaagcga agcgggtggc ggaaaatgat gcaagcgcgg 17640

cccaacaatg cgagccattc tcacggcagg aacacccggc ctccatggcc ctggtttcta 17700
 catcgggcgg cggctggcac aaaaggagga accatthttcc tccggctttt gccgccagcg 17760
 gtgcagaccg ttaccggaat ccgcaggatt ctgcgcttaa gagcacagcg attgacaaca 17820
 gcgaaggaga aggcattgacc atcacaatcg acagacttgg acccaaggcg cttgaactcg 17880

 gcctgtcgg cagctcgac aagaatgact atggattgtt cagacccac gcagaagcca 17940
 ccatcgagga atacggcgag gtggatcttc tcgtcaatat cccggacaag ccccgtttca 18000
 cggccggcg attatgggag gacctcaaat ttgacgtatc cactacagc gacgtcggac 18060
 gtgttgccct cgtcagcgg gatgcaaca aggaaatggct ggcgacaatc tcgaagcctt 18120
 tcacgaaagc cgaagttagg ttttcgagg cagaccgat cgactccgcg cgtgaatggg 18180
 tcaccgaca agaaagctga agtgaaaacg aaccggagga gaattcatgt tttctacga 18240
 tatgtgctt gccatcgac tcgcgctact tgaatttcg ctgcttgtgc cgtccggtcg 18300

 ctatcggcg ccgatgaaa agccggtctg ggtcctcctt tttccgctcc tttcctcct 18360
 catctggcg agcgggtcgt ggctcacgcc gattggggcc cgggtggcg gagtttactg 18420
 gctgagcttt ctgatccgg caatattttc cgcgctgctg ctatttgcgc tcgcgacgc 18480
 gtcggcaccg cccggcgcg acgatgacgt ctaccagct aacgtggcg aagaagcggc 18540
 agcggcacg gcgatcgat ttacgattt cttctggcg ttgctgattg gcgctcat 18600
 cgtcatcgcg ctgcgctatt cctgacgcc gggcggtgc tcgatcacca ccagcagga 18660
 aacattgatc ttgtgccgtt gaatgcctgg tggtcgacga ggcgatcgg atgctcggca 18720

 tggcttcttt cgcgatattc tcaagatcct gtcgggtcgc gtgcacaccg gctgaaccgt 18780
 tgatgtttca ccgccagcg aatcatgaac gagggtccta ttgcccca ggctgtcaa 18840
 attcatcgcg aaaaagatct tcggccgat ctgcaacagg aaacgctcc ggagctgat 18900
 ccaaaatcga aagaattacc ctgtgtgatg ctgcacttcc cggtcagcg attgcaaagg 18960
 cacaggctga ccacccaat ggcaagtaga gattgcctgc tctcgttata atgcggttac 19020
 gacatcttcc ccgaggtac ccgatgaaa acaaatctg ctgtattcac agcgttctc 19080
 gcgctcctgg tctccgctg ccggccaggc acatccgtgg atgtcccacc ggatacctga 19140

 tttgtcgggt cgtttgtcac gctggacgcg gcgaacggcg aggttaggc gatcgtgtc 19200
 agcgacggga ttatcgtgc gaccgtacc gcagatgaaa tgaaggcgt ggccggtccg 19260
 caaacgacc tggtcgaaat cgatggcgtc gctgttccc gctgggtcga cggccacgtg 19320
 catatttcgg ggcttggca gctattgtcg aatctcaatg tgcaggcgat gcgcaagcaa 19380
 gaaatcgtcg cggcagtcg tgacccgtt gccggagcag aagcgggccc atggattgtc 19440
 ggtcgcggtt gggacgaagg cttcttcgaa caatctgagt atcccaccg gcccgatctt 19500

gacgcggtca gcccgaaaa tccggtcttc ctcaatcgta tcggtggaca ttcggcatgg 19560

gtgaacagtc gtgcgctcga gctggccggc atcgacgcag atacgcgtga tccgcaaggt 19620
ggctcgatcg ttcgcgacgc aggcgggaaa gccaccggta tgctactgga gcaggcggag 19680
ggcttggfcc gagcagtaat gcctgatatg accacgcctg atcgtgttga ggaatacatt 19740
cgtacagccc ttgatcagta tcgacgctgg gggctcaccg gcgtccatga tgcgggtacg 19800
agcctcaccg agatcagaat cctcaagaag ctcgccggagg cgggcgaatt gcccgttcgt 19860
gtctatgcga tggcgaacgg aagtgcagca ttcgattatt acctgaaca aggaccgaa 19920
gtgggcctcg gcgacgacca cctgacgatc cggagtcca aggtctatgt cgacggtgca 19980

ttggcgctc gcggtgccga gatgagcgag ccgtataccg atgcgccgga aaccagcggg 20040
cttcacaga tgcagacga ggaactcgaat gagttcattg ccgcggccag ggcgtccggc 20100
atgcaggatga acggtcacgt gatcggatgat ctcgccgttg agcgcctgct ggacgccatt 20160
gaacggaatc atgtgacggc agaagaacgg tttcgattgg agcatgcatc gatcatctca 20220
ccggataacc tgccgcgctt tgcggaactg ggcgcgattg cctcgatgca gcctgtgttt 20280
atcggatgaat atcagcgtg gggaaacggac cgggtcgggc ggaagcgagc ggcctggatc 20340
atgccgattc gtgacctgtt ggcaagcggf gcgcgccctc ctgctagcac cgattaccg 20400

gcttcggact cggcgatcc gcggacgacg ctcaatggcc tggtaaccg gaccggattc 20460
gatggcaaac cggccggtgg ctggtatccg gacgaggctg tggacgtagc aaccgcgtta 20520
caggcgatga gttcgggcaa tgcctacgcc gcgttcagg aagattcgct cggcgcgctg 20580
accccggtc gctatgccga ctteacggta ctcgcggtcg acccgcgca agtaccgccc 20640
gggagcttg tggacatcgg tatcaccagg gccgtggttg gtggcagaac gacctggcat 20700
cggcaacaat aaacagcgac gaaatcgagt tattcgacc gaaagtaacc agctgattcc 20760
accggcttg ctgaatagcc gcagtattgt ttccacaatt gaagcggccc tttccaaaa 20820

cagaacatgc aaatttgact gtcgtatcgc ggatcgtgcc tgatgaggcg aatgacgcgg 20880
gtagcggctc tgcgattacc tgatccacac ccagaacacc cagacacca taaacatcat 20940
catcaggttt tcggtgagtg acacaaagcc aagtgggaca tcgctgttac cgccaacaca 21000
cgacatttg agttctcgc ggtcgatgta gacggcttg gcgacggaca ctgcgccgc 21060
tgtgccgatt aaaagtgcc acggggcaga tagccacgcc agcacgccgc cgatcattag 21120
cacaccgca aggtctcgg cgaacggata gaagtagccg tagcgtacgt atcgccgcgc 21180
caacaagtcg taattgagaa acatcgtgct gaatgcctcg acgtcctgaa gtttctggac 21240

gccgaggaga cacatggaga ttgcaacaaa cactccgca gtgcgcacgg tcacgaccgc 21300
 gccataggca gccagctga atgccagcgc catgagaaat gcgaccgaaa agattgcgat 21360
 gacaggccgg taggaattct cgcttcttt tctcacgta taccgagat attcgcgag 21420
 atcgtcgtag ccgccattc tctcatagcc gacaaagatt tgcggagtgc tgtcaatccc 21480
 gtgcttgcgc tggaaattcat cggctctctc tcgacgacgc agccagtgat cgttgaccct 21540
 gaaaccttcc cgtcaagca ggtttttggc ttgaggcca tacgggcaca cgtgatcgtc 21600
 catcaccatt cgatagagat cggcttgac cttgccactc aactcccag acactccttt 21660

 gcaatatcac cccatgggtc gcgttcagtc gaagcgtgac cgggctgctt tcagtgcgct 21720
 ctccacggag cgccacgagt tttcgagacc gactttgagg tcttcccagg cctgcccgct 21780
 ggattcacgc aacctggcca gtttctcgcg ggccgcctcc gaacgttttt cgagctcgtc 21840
 gatctccttg gcaatctcag ccttgcgac ggctttggcc tctttggcac gggtttcag 21900
 cgcttgact ttggcttccc attctccag tcgtgcgtcc atcttctgtt cgtaggcttg 21960
 tttttcata tcggacattc tgttctccat tgagtttggt gtttctgat tcctttccc 22020
 gatgagctag gcagccttgc gcacagcctc gaaattcgac gccgcgaagt cccagttgat 22080

 caagtgatcc aggaatacat caacataccg gttgcgttcg tcttgtaat cgagatagta 22140
 agcgtgttcc catacgtcga gcgtcaacag cggtcggttg ccgtcagcaa tcggcgtatc 22200
 cgattcccc gtgctcagga tgcgaagctt atcgtcgtcg tgaaccagcc acaccagcc 22260
 acttccaaac tggtcgagcg ccgcattctt gaactgggac ctgaactggt ccatgtcgcc 22320
 gaacgtgtcg gcgatcgag atttgagatc ggctccggc tcgctccgc cgtcgggtga 22380
 catgctgtgc cacagaaagt catgattcca tgctgggcg gcattgttga atatgtgat 22440
 atcggacctt tccgtgact tgacgatgat gtctcgtatg tccatgtcgg cgtagtcttt 22500

 gccagcaata ctctcgttca gggattcgac atagccgca tgggtccttc cgtggtgcag 22560
 atccagagtt tgcctcgaca cgtgtggctc gactgctgag cggctgtagg gtagttcggg 22620
 aacagtataa gtcatacaa tctctctggt ttagaattaa tgttcgtccg gaaacctcgg 22680
 gctcgcgtaa tccgaaata tatgcagget gcaggaccga gcgagccgg ccgctgtacg 22740
 aagttgtgtc gactcatagc gtcaccttgt catgccgga gaggttcgtg tcatcggcct 22800
 tctcacttt cgccagggt ttgctgctt cccaccagaa ttcgaagcgt cgtattccgc 22860
 tccggtccca gtactccgct tatttcggat caacgagcag aacgacaagg tcgggatctc 22920

 cggaaccatc tggaaaccag acgcgcatcg ctgctgacca gagcgagtgc gcgagaacct 22980
 ggtcggctag aaccgagct tcgccgaaa tcgacaggta cgtatcgtcg gctgcatcg 23040
 taatcccagc ctggggcgat cgaatgatct cctcgagttt ctcgtcacgc gcgcgctcg 23100

caaagtagag gacggcgtcc ttctgggtgt ctgcgatcgc catcggctgc gcgcgcaccg 23160
 cgccgtcaag tgactgagtg atgagcatgg ccgatcaaaa tcgtccaatc agggaatcca 23220
 atttgtcctt tgtcttgtca ttcatgattc tgccttcaga aaaatcaagt cacaggtgac 23280
 ggcatcgagt aaggactcgg ccgtgtcgcc gataagcagc cgatccagcc aggaccgca 23340

 gatcgatccg gcaatgacca caccgatgtc gtttgtgtct atcacctcgg cgatttccgc 23400
 ggctggatcg cctcagagta aatgcaattg atcgtcttgc agccataacc ctcgaattag 23460
 tttgtcgaag ttgccttat gtgcggactc gacctgtgt tgcagcagc ggaaatccgc 23520
 ttgcgtccc ggatgcgtca gcatagcgc catcgcagca ggaataacta cggacttac 23580
 ctgatatgtg tgatagactg gcaggagcc gtcgattgcg ctgccagat cgtttgcaaa 23640
 gtcgatgatt cgctcgtcca gcttcatgtc ctcatcctt gggtgcatcg gatccacggc 23700
 cgccattacg ttagtaccag agatgtcggc gccgtcagac ggcaacaagc aaagcggctg 23760

 ctgtgcatgt cglataaggt cccagtcggt ggtgccgaga aagagacgtt tcagccgtcc 23820
 gcgttctccc gagattctta taatcaggtc agcgcgccgaa gctgccccc ggtcagat 23880
 cgctcgtag cgtggctcgg cgtcagtggt cgttaaactg aggtcgatgc ccgcatcgtc 23940
 gaggattgcg acctggttct tgaccactt ttcgacatcc gaccggtatt cgtcttgtgc 24000
 tgttggcatg atgacgggt ccgccatccc ggcagcagc acgatcggc gccgctcgga 24060
 gaagagcacg tegacctgag ccccgaccg cgtcgcgac agtcgcgcgc gcaaaacggc 24120
 cgctttgtt tctttactg gatcgagttc aagtaaaagc ttcccgatct tcataactta 24180

 cacgatgcaa gagacatgcc ggattgcgtc gaccgcactc tttcgggcag tggcgggtt 24240
 cgtcattcgg gtgccagaaa aatggcgtca attgccggcc cggtttttc agatttacia 24300
 gattatttgt aaagattca aaaattctg catgccgtcc acgatctcgt caaagtaggt 24360
 gccgtattaa tcacatccgg tttgcaggcc atgagatgga tgcgactac atcttcaaac 24420
 tgcaatcttc gaaagtgagc aggcaaaagc cagttgatcc gcgtcaatgc gcggtgaacg 24480
 ggatcttttc ggtgacgtcc acacgatcc atcgaaagtt ttgctgccgc catagcgtgg 24540
 ggccctcgtt gcttcgttt gagtgcgggt gaggtagaga gcgcggcag cttcagtata 24600

 atcaaatgtt ctgatgggt atggccgtta gtcggatgaa atgggatggc aactgcctg 24660
 attgtgatg agaatatgga tgatctgctt tcgcttcag acatttgtcg cgaaaacgac 24720
 tattccgtgg agaccgcga gagtctcgc cggcgcgtg acctgttgtt gaagcgcag 24780
 cccgaggtcg cgattatcag cgactacgtc gacggcaatt cgacgttga cctgctggaa 24840
 cagatcgaca cctgccgggt gatggaagtt tacctcgtca gtgaaaatcg cagtatcgat 24900
 caggcgtctc gagcaatcgc tctcggagta tcagactatt ttggcaaacc tgtcgatgga 24960

gctcggctcg cactcaacct gcaatccctg agcagcgaga tcagttgcga ggccgaggct 25020

tcgatcggga aggacgcgag aggattgatg atcggatgaat caccgccgat gcagcgcctt 25080
tttcgcatga tccgcaagtg cgcccccaacc gatgtgtcag tgctcgtttc cggagagagc 25140
ggtgtcggca aggaactcgt cgccccagacc atccacagtc tcagcgcgcg ctccgcttgc 25200
gagattgtcg cggtaaactg cagcgcctatc tccaaggacc tgatggagag cgagctcttc 25260
ggtcatgcc aaggtagctt tacgggagcg gcccaggccc ataagggttt cttcgaacgg 25320
gcctcgggtg gcacattgtt cctggatgaa atctcggaaa tggacgtggg tctgcaggcg 25380
aaactcctgc gcgcgctcga aacaggcaag attcgtccgg ttggcggcga acgtgatgtc 25440

acggttgacg tccgggtcat cgcgcgacc aaccaggatc ctcacgctgc cattcaggaa 25500
gacaggctgc gggaggacct atttttcga ctggcgcaat ttccgattcg cgtcccacct 25560
ctgcgcgaac gggcgatga tategaactg ctcacaggtc attttctcgc ggctcagaac 25620
ggcgagaccg gtatcgacaa aacgattgac gacgatgttc gcgattgttt cgcactgtac 25680
cagtggccgg ggaacgttcg tgagcttaag aataccgtcg tccagagtca tatcctggcc 25740
ggcaacgtca tcggaaccgg agatatcccc gacaatatcc ggacaggaag cactcttgg 25800
gagggcttgg tttcgcctgc tgcaggggct ccgatttccg aagtcgagcg gagccacatc 25860

cttaagacgc tcgagaaatt cgatggtgac aagaagaaag catcggagtc actcgggata 25920
agcctcaaaa ccctttacaa ccgcctcaac gagtacgaag aagacgcata atgaccacc 25980
cgccggtgta aaccccgctg tgccttcttc atgctttgtc ggtatgacct cgatacttga 26040
ccgacaggea ctattatgaa tgacaagagc agccattct gctggatgac cgatatgttg 26100
aactggacgg cgcgagatat ccggggccga cccgtcggcc acgtttcgga cataatcgtc 26160
gattctgcc aaggtcgtat tgacctctg cacatacggc tgaaagagcg ccctgggaag 26220
gaagacagtc gaatcacggt cccttggctc gcgatttcat gtatttccgg ggcgcaaaag 26280

gatatttga ttgcagcgcg cagggatacg ctgcggaggc tcggaaccg ccaggcatcc 26340
ggttcggaaa cctagcgagg cgttttgtcg ccagggagcg ggagcgcag catcacgttt 26400
ctggccacat cagcgggtca cgcatgtcca taaggatggc gatgcggatc tcgaaactcat 26460
tgacgtcaat acgacgagca gcaaaaggct aaggatatcg tcgagcactg ccgcctcggc 26520
acacagttt attatgagga gaaggaccag cagcgcgtag aaaacttcta cggggttaat 26580
ccgttcgcgc gaccatcggc gccgcctgcc aggcgcttgt tgcgaaatcga gtcagttgtt 26640
caattgaagt agcgctttcg agacgcggtg caacatatg ggctccccac caaacatatt 26700

ctcggctgcg gctttctcga gcagttgtgc gtcttctctgc catcgcttca ggatttttcg 26760
 tttttgatct gtggtcaggc gctcgttctc aagcacggcc tctggcgtct cgaaagctgc 26820
 ggccgggtct ttgagtgcac gatcaaaatc catgtcaaac tcccagttcg caatcagagt 26880
 tctcaagagc ctaacgcctc tccggacaaa gaacaaaccg gctggcaggg tttggagcag 26940
 gcggttagat catgccatcc atcgatcccg gtgtcccggg gaaatcgcg acaacaaag 27000
 cagtaggtcc atagcgagtc gctgactatc gcatggcaca aggaggactg aaagatgcta 27060
 cagggtttc tgagtatctt cagtattagc ctacataca cgacggcaaa tgaatgagct 27120

cgtagcagct ttttcttag taaagtcaat tagatagcgg aaaaatttt accagtgagc 27180
 cactgatcag aacggcgatt gcggccatcg cgacaatgcg cttgatcttc gaatgcctt 27240
 ccatacgtg ttccatagtg ccgtgagctt tctgtgccg tccgtgcagc cagatcattg 27300
 cgcaggcaac gatcacgaat acgatattca gatagaaggt atagtcgagt gcgaaccgag 27360
 tgacttcgcc tatttctcgg ccgctctcgg gcacgatgtc gagcgtcgtg aatgatatgt 27420
 gcatgaccag tgctgttagc acaactga tcagcataat ccccgata tacaagcga 27480
 ctgccagcc atagtaactg gcgttgatca tgacgagcgg cgggaccatc aggtccgagt 27540

agataaatcc catgatgccg gcgaacagga cccattgcc ataaagtacc gtcgcgaggg 27600
 gaatatttc catggaacca atgaacgtcg ctgcagcgac aaacggcgct acgattgcat 27660
 tctggacagc gatcaaccag tccggaattt tccggccgc atcgatcaga aagatgcct 27720
 cccagaccga agccggaatc agcacggcca cgaaccggc gatcgtgaag ccgatcaaga 27780
 tttccgcca gaccattgc cagtcggata cgaaacgatg gccgacgaga ttccagccac 27840
 ttgcggatcg caatcgctcg cccaatcga aatcacctc ttcgtcgtcg gcaccttct 27900
 cgaccaattg gcgtgcgtct tcaatccag cgcggggata ggtgagcga atcagaatgc 27960

tgctgattgc aatgagaatc aagccgcca tgatctcggc gacgagaaat tgccagccga 28020
 gaaatatcaa gatcaggatg ccgagttcaa tgacgaggtt cgttgaagca aacatgaacg 28080
 caacggcggc gacaaaatgc gccctttca tcacgagggc tcgcgctgcg gcgagcggc 28140
 caaatgagca ggacgacgag gctgcgcca aggcagtggc cagcgagatg cttcgaat 28200
 cggatttgc caggtacgtt gtaagccgac ctttcggcac aaaagcctgg atcatggcgc 28260
 taacggcata gccgagtaca aatgccacc cggccttcca gaaaaaccg attgcggtt 28320
 cagctgcgtc tgcgaattgt tgacgtaacg tcatactaac tctatcagcc taacatacag 28380

accttggca atatgaacca ccccggtata cgggggtggc tcagactatc ctgagacgaa 28440
 ttcatcag atgttcaact ttgcgacccg cttttttga acggcgcgcc ttgggacgtt 28500
 caggccaatc gtctgatcgc ttcgtcggca gggactgatt tagcccggc aaccagtgc 28560

agacagcata gatgtcggtc cgatgggctc tcccgggtgcc agtgatcgcc aggaatccca 28620
 gtgaggtgct cccgggcca cgcgcaatcg gttagactcg cctcggtgca ttggaggcg 28680
 cgtcgatagg tgcgcatccg tagaattggc cgtcatgggg tgggcgtcgg tgccgagatg 28740
 aacacttttt tticggagat caagcgacgc aaggtctttc aggttgccgt agcctatgcc 28800

 gtcgtggcat ggctcgtcgt gcaggtcgtc gatgtcgttg gcgagcccct gagtctcct 28860
 gattggttcg acacggttgt catagtctcg ctctcgtcgt gatttccggt cgcaatcgtc 28920
 atcggctggg ccttcgatct gacgcccag ggcgtcgtgc gcaccccgt acgcgagccg 28980
 gcgacccgg aggcagaagg gccattcag ctgccggct cggagccggc ctccacggac 29040
 gcggccgttg cccgctccga ccaacggccg cgcgtcctgc gtaactccgt cgccgtattg 29100
 cctttggaga atctgagccc gaaccccag gacgcatact ttgcagccgg tatccacgag 29160
 gagatcctga attacctggc gaagatcaag gatctgagcg tcatcgcccg cacttccgtc 29220

 aagaaatag cgggctccga taagtccatc gccgaaatcg cggccgaact cggcgtcggc 29280
 acggtcatgg aaggcagcgt ccgctacgc gccgaccgcg tgcgctgac ggcacagctc 29340
 attgacgcc cgaccgaaga gcatctgtgg tcggaagtct acgagcggca acttgccgat 29400
 gttttcgcca tccaggcgga tatcgagag cacattgctg gagcactcaa agccgagctt 29460
 tcggctactg agaaggaag cattgagacg ctgccgaaa cgggatggc cgacgcgat 29520
 gcgctttatc tgcaatcgca ggcgtgttc gcacagggag ataccgcat tgccggcagc 29580
 acgccccc acattcgttc ggagatcaa tcgcggttg atcgggtgat cgcactggat 29640

 ccgaatttg cgaatgccta tgcgtgaaa gactccttt atgcgatac gagaatttac 29700
 gatccgatcg atcagaaaga ctggcttgag cgtcgcgcc agatcaaaaa agccgtgac 29760
 acgaatgcc agaaggcgat cgcgctcagc gacagcattg gctcgcgta ttttgcgctg 29820
 gcattgcacg agcagctcac ctggcgcgcc acggaggccc acgcatacta tcaaaaggcg 29880
 ctgagcctgc ggccgaatga ctgaaatc ctcggttgg actccgtcct gaagtgtct 29940
 gccgacgagt tcgaggatgc gatacgctg ggcgacaaag ccattcgtc cgatcccggc 30000
 aatgcctggg tcaacgcgtt tctcggaat acgcttcgat ccgcccggca gcaccgcgaa 30060

 tccatcgcgc ttcacgagaa agcagctcgg gagaatccc cctcgtcgat gcctatctg 30120
 ctccgggcca tacctgagca cgcgtcgggt gaagatgcca aggcctttca ggcgttaagg 30180
 attgccgaag agctgatgcc ggcccaggcc gtggccggag tacgcccggca tattgcttac 30240
 ggctacacga acgtgggtcg ggaggaggaa gaaaagcggc tctggaacga agtcgagcag 30300
 acgatgggcg accgattcca cgatccgtc ctccgggtct ggattaaccg aatcaaagga 30360
 gaccgggccc gcgccctgga agcgtcgcga cagacagtgg gcgagccgca ataccggcag 30420

gaaatctttc tgcgcacatt cctgaagcag aacaactggc acgaccctgt tctcgacgag 30480

 cccgagttcg cgaatattacg tagccggctg gcgatgacat agctgctcca cgatccttgc 30540
 tgttacctgg ttcattgggt tttctcttgc atategaccg cgatctcctt tetacgctgc 30600
 gttgattcgc ttggaattcc ggtcctctcg ctccatgct caccgagcgg cagaggagcg 30660
 cttgcttgcg gagaagcggg tgcgatcaa tggcaggaca tcagcttccc aatcacctgc 30720
 gccagataga ccattgacgt aaccgcttga tctccgcggt tcgatgacca cgggattcaa 30780
 cgtgttagat cacccaaaaa tatccagctg attccagcag actttctgac tatgctcagt 30840
 tctggcctca ctttcagttg cgcaattaca ctaagtcaat catgaatagc tagctgatga 30900

 cgtctgcat cacagccttg tcatctgcca cggaaacttt agaccgattt ggcgtccgaa 30960
 gagccgcaac gcaaccttgc ttgaggttac tgctgagca tggcccgcct cacatgcctt 31020
 taaaacactg attttgetaa agtagtattt cctgagattg aacgggatcg ggtccaatgc 31080
 aataccgatt cggcagtttt gtgctcgata cagcgcggta ttcgttgac aacaacggcc 31140
 gcaaagtcga ccttgagccc caggtactct cgttgctcga gtacctgata gaaaatcgtg 31200
 atcgtgttgt gtcccgcacc gagttactcg ataaggtatt tggctgccga atcgtcaccg 31260
 acaatgcatt gacagttcgt attcatgcgg cccggcaggc agttggcgat acggcgaagg 31320

 cgcaatccgt tattgacagc atccagggcg gtggttaccg tttcgtggcg caagtaaaag 31380
 cggaatctcg tgtttctca ctgtttgatc gtgcgacgga tgccgatgct gcgctca 31440
 gtccgtcaac tctgtcagtt gaacagccga cgattgtctgt gttgccgttt gaagtattgg 31500
 gaaccggtga ttccgacgcg atcattaaa agggcctcgt tcatgatgic atgacgcgga 31560
 ttgcacgttc gcgcacgat ttcgtcattg cgcgcggcac agccttcag tttccagcg 31620
 ggaagcaaga cgtcaggaa gtcggggcgg cgtcggcgt tcgctatgic gtgcagggtg 31680
 cggcgcagat tttcgaaac aagattcgcg tatccgtcgc gctagccagc accacgacca 31740

 cccaggaggt cgggtcctgg caatatgaca ggaagctcgg cgatgtgctc gtcattcagg 31800
 acgaaattgc cagcctgacg gtcgcggcag tcgaaaacga ggtgcagaaa caggagatgc 31860
 tgcgctccac gcttatgccg tctcgaatc tcgatgatg gagtgctat caccgtggct 31920
 taagccacat gtaccgcttc cgggtgaagg attgacaccg cgccgaggtc tctttcggc 31980
 gtgcgatcga cctcagacca aacgtgccac gtcctgatgc cgggttgtcg ttcgtcaatt 32040
 acgagcgcgc gtacctgaac cttgacgaca accgggtcaa ctcgctgccc cacgccttcg 32100
 actacgcgca ccaggcgctt gaagtcgacc cgagcgatcc gatggggcac tgggcactta 32160

gccgggcata ttttcttgca ggcaacctcg agacggcacg cgagtcctgt ggatcggcaa 32220
 ttgacctcaa tcccagctat gccactgctc aatatttcca aggcctggatc gcgatgcaac 32280
 tcggcgatca tgcgttttgc gtcgaaagaa ccgacctcgc gcagcgcctg agtccgtatg 32340
 acccgtcat ttacggtatg cagggcgtat cagcgatgag tcttgcgttg ttggatcggc 32400
 acggggaagc gttagaaaga atcaacaagg cgttggacca tccggacatg cactaccagg 32460
 cgcatgcaat ggccgccgcc atttttgcaac tgggtggcaa gcgtgatttg gcgcgtcgcg 32520
 aattacagaa agtctgggcc gtcaatccag actacgatac tgaagagttt ttctcgggtg 32580

atgccttcca gaatgatgac gacgttcagc gcatcaccca ggcttcgag aaaaccaagc 32640
 gcaactccta accagaatgc cacagcggcg acacagcgtc gcgcaaattc actgaatctt 32700
 cacctcgcct taacttcccg gctgataccg cgtgctatct ctattcgtgc ctgacttggc 32760
 aatgaatgcc gattcagat ccagatccac tccggccgga ccggatggtt caacaaggag 32820
 gtggtaaaga catgttcaat gacttaagga aagatcgaat ctgccacgca caaccgtggc 32880
 gcaaggagga agcaatgagg aaggttaaca aaatgctgtt gggcatgatc gggatggtcc 32940
 tggctgtctt tggaggcatg gccaacgcgg caggccccgg aaacaacatc gcgatcaggt 33000

tgggtggatc gcaagattca ttttcaagca gtggtgtatt ttctcaatac ggaataacag 33060
 gccctgaatc gttttgttgg aacttcgaca tgatcgatat caagaccgga aatactatcg 33120
 ggtacgcgac ggattgcggt cgcgatcatc gtgtggtggg tgaaggatgg caggtgctgg 33180
 gaacgacgat ctccatttt ccgggaggca ccgtcgcctc acgagtgtac accacagtcc 33240
 agccggttac gcacggatca ccgctattca cacacatcac cggcgcctg ccgctcgaag 33300
 gcacaaacaa cgtgatctac ggtgacggca actttcaaag cgcgaaagc acagtacggt 33360
 tttcgggaac cggtgatttc agtcaaatgg acccggttta cggcgggtga atcaacatcg 33420

actgcatatt caccctggac atcagcactg ggaattaatc gacctcctc getgcaccaa 33480
 cgacctatc caaggccact cattgagtgg ccttgctatt tccattactc aaattttcac 33540
 gatcctgtga tcgaccagcc cgggttcgcg gagttactca gccagctggc gatgacatag 33600
 ctgctccgta atctcttccg ctatgcg 33627

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for amplification of habM

<400> 4

cccatatgat gaaccagat agatatatgg 30

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplification of habM

<400> 5

ccggtacctc aatctgtctt tcttgtacc 29

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for amplification of nbnr

<400> 6

cggaattcat gccgaccagc cggttcat 28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplification of nbnr

<400> 7

acgtcgacct attcgtggac gaaggtgg 28