

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0138798

(43) 공개일자 2023년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/245 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C07K 14/245 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0036868

(22) 출원일자 2022년03월24일

심사청구일자 2022년03월24일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

오민규

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호

김승진

서울특별시 동대문구 안암로18가길 14, 303호

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 32 항

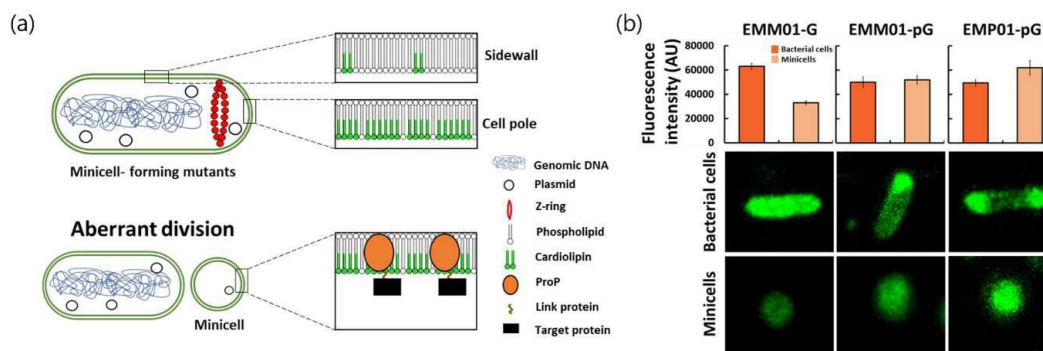
(54) 발명의 명칭 미니세포에서의 ProP-연결을 통한 표적 단백질의 집중 발현 플랫폼 및 이를 활용한 바이오제품 생산방법

(57) 요약

본 발명은 미니세포에서의 ProP-연결을 통한 표적 단백질의 집중 발현 플랫폼과 이를 활용한 바이오제품 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 모세포에서 발현된 표적 효소를 미니세포에 집중 분포시키기 위해 ProP-연결된 표적 효소를 과발현시키는 미니세포 플랫폼을 이용하여 기존보다 높은 농도의 표적 단백질을 미니세포에 포함시키도록 할 수 있고, 또한 표적 단백질 발현이 집중된 미니세포를 활용하여 박테리아 세포에서 독성 문제 때문에 생산에 한계가 있는 바이오제품의 생산량을 증가시키는 데 활용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12R 2001/19 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127087
과제번호	2018M3A9F3079662
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	방선균 시스템 재설계 기반 고부가 의약품 질 고생산 산업균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

에스케리치아 속 유래 막 단백질인 ProP(Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적단백질은 ProP 단백질의 C-말단에 링커로 연결된 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질은 에스케리치아 속 유래 세포의 극성 지역에 위치하는 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미니세포는 ProP 단백질의 발현 전 미니세포 대비 표적 단백질의 발현이 증가된 것이 특징인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 에스케리치아 속 균주는 대장균인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 링커는 (EAAAK)₃, (EAAAK)₂(GGGS)₁, (EAAAK)₁(GGGS)₂ 및 (GGGS)₃로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 링커는 (GGGS)₃인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 미니세포는 형광 단백질을 추가로 포함하는 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형광 단백질은 GFP인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 표적 단백질은 젖산 생산 효소, 독성 화학물질 관련 효소 또는 자가유도체 생산 효소인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 독성 화학물질 관련 효소는 핵산을, 옥탄올, 페닐 아세테이트 또는 부틸부티레이트 생산 효소인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 표적 단백질은 Ldh (Lactate dehydrogenase), Pdc (Pyruvate decarboxylase), AdhA (Alcohol dehydrogenase A), AdhE2 (Aldehyde-alcohol dehydrogenase), Ahr (alcohol/geraniol dehydrogenase), EHT1 (Alcohol acyl transferase), PanK (Pantothenate Kinase 1), Acs (Acetyl-coenzyme A synthetase), AtoD (Acetate CoA-transferase subunit alpha), AtoA (Acetate CoA-transferase subunit beta), LasI (Acyl-homoserine-lactone synthase), Mtn (5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase) 및 LuxS (S-ribosylhomocysteine lyase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 에스케리치아 속 유래 미니세포.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 미니세포를 포함하는 바이오제품 생산용 생물 반응기.

청구항 14

MinC (Septum site-determining protein) 와 MinD (Septum site-determining protein) 단백질을 불활성화하고, FtsA (Cell division protein FtsA)와 FtsZ (Cell division protein) 단백질과 PlsB (Glycerol-3-phosphate acyltransferase) 와 PlsC (1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase) 단백질의 활성을 강화한, 미니 세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC14862BP로 수탁된 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 에스케리치아 속 균주는 대장균인 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 균주는 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질의 활성을 추가로 불활성화시킨 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 minC 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, minD 단백질은 서열번호 2의

아미노산 서열로 이루어진 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 ftsA 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지고, ftsZ 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 plsB 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지고, plsC 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 proP (Proline/betaine transporter) 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 22

제14항에 있어서, 상기 MinC 단백질은 서열번호 8의 염기서열로 코딩되고 MinD 단백질은 서열번호 9의 염기서열로 코딩된 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 23

제14항에 있어서, 상기 FtsA 단백질은 서열번호 10의 염기서열로 코딩되고 FtsZ 단백질은 서열번호 11의 염기서열로 코딩된 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 24

제14항에 있어서, 상기 PlsB 단백질은 서열번호 12의 염기서열로 코딩되고 PlsC 단백질은 서열번호 13의 염기서열로 코딩된 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 25

제17항에 있어서, ProP (Proline/betaine transporter) 단백질은 서열번호 14의 염기서열로 코딩된 것인, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주.

청구항 26

제14항 내지 제25항 중 어느 한 항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는 바이오제품 생산방법.

청구항 27

에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커를 결합하는 단계;

상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및

에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 에스케리치아 속 균주는,

minC 및 minD 유전자를 제거하는 단계;

ftsA, ftsZ 유전자, plsB 및 plsC 유전자를 과발현시키는 단계로 제조되는 것인, ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

proP 유전자가 추가로 제거된 것인, ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 방법은 미니세포를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포.

청구항 32

에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커를 결합하는 단계;

상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및

에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 미니세포 내 표적 단백질의 집중 발현 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미니세포에서의 ProP(Proline/betaine transporter)-연결을 통한 표적 단백질의 집중 발현 플랫폼과 이를 활용한 바이오제품 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화석연료의 지속적인 사용은 기후변화와 환경적으로 곤경의 시대를 예고하는 한편, 화석연료 기반 산업의 단점

을 보완하기 위해 설계된 친환경적인 화학물질의 생물학적 생산 방법을 개발하기 위한 선구자이기도 하다. 이러한 요구를 해결하기 위해 미생물학적인 수단을 이용한 화학물질 생산은 합성 생물학 또는 대사 공학 분야에서 수행되고 있으며, 서서히 주목받고 있다. 생물학적 산업은 급속한 성장, 빠른 발현, 유전자 조작의 용이성 및 비용면에서 효율적인 제조로 알려진 산업 플랫폼 균주 대장균으로 인해, 낮은 에너지를 소비하거나 환경 친화적인 이점을 제공한다. 그러나 대장균에 의해 수행되는, 생산을 필연적으로 수반하는 성장은 제품 제한, 플라스미드/단백질 매개 대사 부담 및 스트레스 반응, 낮은 내성 및 아세테이트와 같은 원치 않는 부산물의 초래 등 결과적으로 대장균으로 인해 수행되는 제품의 합성을 손상시킨다는 한계가 있다.

[0005] 한편, 박테리아 세포의 비정상적 분열로 세포의 극성 지역에서 분리되어 생성되는 미니세포는 염색체가 없어 분열하거나 성장하지 않으나, RNA, 단백질, 플라스미드 및 기타 대사산물을 함유하고 있어 한정적인 대사기능이 가능하다. 이러한 고유적 특징 때문에, 미니세포는 주로 단백질, 핵산 등의 생물학적 활성분자를 캡슐화하여 이 동시키는 운반체로 연구되어 왔다.

[0006] 그러나, 기존 미니세포에 표적 단백질을 발현 및 보관하는 방법은, 모세포에서 표적 단백질을 발현시켜 극성 지역에 존재하는 단백질이 미니세포 분리 시 낮은 확률로 미니세포 안에 포함되도록 하는 것이어서, 주로 이렇게 표적 단백질을 함유한 미니세포는 생체 내에서 표적 전달의 운송체로 활용되었다. 따라서, 이전 연구는 주로 플라스미드와 단백질의 전달 매개체로서의 미니세포의 역할에 초점을 맞추었지만 생물학적 생산을 위한 플랫폼으로는 결코 사용할 수 없었다. 특히, 미니세포 생성 및 분리 정제 기술은 잘 알려져 있지만, 이를 통한 바이오 제품 생산은 미니세포 내에 제한적으로 존재하는 표적 효소 때문에 한계가 있어 왔다.

[0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 모세포에서 발현된 표적 효소를 미니세포에 집중 분포시키기 위해 ProP-연결된 표적 효소를 과발현시키는 미니세포 플랫폼을 개발하여 기존보다 높은 농도의 표적 단백질을 미니세포에 포함시키도록 하였으며, 또한 표적 단백질 발현이 집중된 미니세포를 활용하여 박테리아 세포에서 독성 문제 때문에 생산에 한계가 있는 바이오제품의 생산량을 증가시킨다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 에스케리치아 속 유래 막 단백질인 ProP (Proline/betaine transporter) 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된, 에스케리치아 속 유래 미니세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 미니세포를 포함하는 바이오제품 생산용 생물 반응기를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 MinC와 MinD 단백질을 불활성화하고, FtsA, FtsZ, PlsB 및 PlsC 단백질의 활성을 강화한, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 바이오제품 생산방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 방법으로 생산된 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 미니세포 내 표적 단백질의 집중 발현 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0019] 본 발명은 에스케리치아 속 유래 막 단백질인 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된, 에스케리치아 속 유래 미니세포를 제공할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 표적단백질은 ProP 단백질의 C-말단에 링커로 연결된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 ProP 단백질은 에스케리치아 속 유래 세포의 극성 지역에 위치하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 미니세포는 ProP 단백질의 발현 전 미니세포 대비 표적 단백질의 발현이 증가된 것이 특징인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 에스케리치아 속 균주는 대장균인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 링커는 (EAAAK)₃, (EAAAK)₂(GGGS)₁, (EAAAK)₁(GGGS)₂ 및 (GGGS)₃로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 링커는 (GGGS)₃인 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 미니세포는 형광 단백질을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 형광 단백질은 GFP인 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 표적 단백질은 젖산 생산 효소, 독성 화학물질 관련 효소 또는 자가유도제 생산 효소인 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 독성 화학물질 관련 효소는 헥산올, 옥탄올, 페닐 아세테이트 또는 부틸부티레이트 생산 효소인 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 표적 단백질은 Ldh, Pdc, AdhA, AdhE2, Ahr, EHT1, PanK, Acs, AtoD, AtoA, LasI, Mtn 및 LuxS로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 상기 미니세포를 포함하는 바이오제품 생산용 생물 반응기를 제공할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 MinC와 MinD 단백질을 불활성화하고, FtsA, FtsZ, PlsB 및 PlsC 단백질의 활성을 강화한, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주를 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 균주는 기탁번호 KCTC14862BP로 수탁된 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 에스케리치아 속 균주는 대장균인 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 균주는 proP 단백질의 활성을 추가로 불활성화시킨 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 MinC 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, MinD 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 FtsA 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지고, FtsZ 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 PlsB 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지고, PlsC 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 ProP 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 MinC 단백질은 서열번호 8의 염기서열로 코딩되고 MinD 단백질은

서열번호 9의 염기서열로 코딩된 것일 수 있다.

- [0043] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 FtsA 단백질은 서열번호 10의 염기서열로 코딩되고 FtsZ 단백질은 서열번호 11의 염기서열로 코딩된 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 PlsB 단백질은 서열번호 12의 염기서열로 코딩되고 PlsC 단백질은 서열번호 13의 염기서열로 코딩된 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 ProP 단백질은 서열번호 14의 염기서열로 코딩된 것일 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 바이오제품 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및
- [0049] 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 제27항에 있어서, 상기 에스케리치아 속 균주는, minC 및 minD 유전자를 제거하는 단계; 및, ftsA, ftsZ, plsB 및 plsC 유전자를 과발현시키는 단계로 제조되는 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, proP 유전자가 추가로 제거된 것일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 방법은 미니세포를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포를 제공할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 미니세포 내 표적 단백질의 집중 발현 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0057] 본 발명에 따른 모세포에서 발현된 표적 효소를 미니세포에 집중 분포시키기 위해 ProP-연결된 표적 효소를 과발현시키는 미니세포 플랫폼을 이용하여 기존보다 높은 농도의 표적 단백질을 미니세포에 포함시키도록 할 수 있고, 또한 표적 단백질 발현이 집중된 미니세포를 활용하여 박테리아 세포에서 독성 문제 때문에 생산에 한계가 있는 바이오제품의 생산량을 증가시키는 데 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 본 발명의 미니세포를 확인한 주사전자현미경(SEM) 사진이다. EMM01에서 많은 양의 미니세포가 생성되고 있음을 확인할 수 있다.
- 도 2는 표적 단백질을 농축하기 위한 미니세포 엔지니어링을 도식화한 도로, a는 실시예 1에서 제조한 미니세포 생성 돌연변이체 내에서 ProP 연결 단백질을 발현시킨 도이고, b는 ProP-연결된 GFP를 발현시킨 경우 연결된 단백질이 없는 GFP의 발현 대비 증가하는 것을 확인한 도이다.
- 도 3은 미니세포 형성 돌연변이체(EMM01)에서 효율적인 링커 단백질을 구현한 도이다.
- 도 4는 a는 ProP에 Ldh를 연결하여 젖산 생산이 개선될 수 있는지 여부를 확인한 도이고, b는 ProP와 Pdc 및 AdhA를 연결한 후의 에탄올 생산 수율 증가를 확인한 도이다.
- 도 5는 제작된(engineered) 미니세포를 이용한 독성 화합물질 생산을 확인한 도이고(a-d), e는 핵산올, 옥탄올,

페닐아세테이트 및 부틸부티레이트의 생산을 확인한 도이다.

도 6은 헥산을, 옥탄을, 페닐아세테이트 및 부틸부티레이트가 이들과 그 중간체의 독성으로 인해 박테리아 세포에서 제한된 생산을 갖는 것을 확인한 도이다.

도 7은 자가유도체가 활성화된 메틸 주기에 의해 생성되는 것을 확인하는 도이다.

도 8은 a는 자가유도체-2(autoinducer-1)를 생산하는 핵심 효소인 LasI을 ProP와 연결 후 발현시켜 M으로 명명하고, b는 자가유도체-2(autoinducer-2, AI-2)를 생산하기 위해 Mtn과 LuxS를 ProP와 연결하여 발현시키고 m으로 명명한 플랫폼을 나타낸 도이다.

도 9는 박테리아 세포와 본 발명의 미니세포에서 AHL(AI-1) 생성을 확인하고, AHL의 락톤링(lactone ring)을 검출하여 AHL의 역가를 측정하는 도이다.

도 10은 a는 미니세포와 ProP 연결 LasI이 발현되지 않은 세균 세포 모두 AHL 생성을 나타내지 못하나 본 발명의 ProP 연결 LasI를 발현하는 미니세포에서는 동일한 조건의 세균 세포에 비하여 더 높은 AHL 생산을 하는 것으로 확인한 도이고, b는 미니세포 M 또는 m의 AI 생산과 유전자 발현에 대한 후속 효과를 제어하기 위해, 박테리아 세포에서 AI 의존 유전자 회로를 설정한 도이며, c는 추가된 미니세포에 의해 AI가 합성되어 유전자 회로에서 gfp의 발현이 유도된 도이고, d는 AI-2를 사용한 실험에서도 AI-1과 유사한 경향이 있음이 확인하고 있는 도이다.

도 11은 a는 총 GFP 강도를 미니세포의 농도를 단순히 제어함으로써 정확하게 예측한 도이고, b는 수확 후 GFP 강도 변화를 관찰하기 위해 수행된 안정성 테스트에서 미니세포의 성능이 하루 후, 일주일 후 유지하는 것을 확인한 도이며, c는 미니세포의 재활용에 대하여 나타낸 도이다.

도 12는 a는 ptsH가 결실된 균주와 ptsH의 발현에 따른 성장에 대해 확인한 도이고, b는 MazF가 있는 세포가 성장 제한을 보여주는 것을 확인한 도이다.

도 13은 a는 ptsH의 경우 AI-1을 생산하는 미니세포 M을 첨가함에 따른 원활한 성장 회복과 세균 세포에 의한 작은 성장 회복을 나타낸 도이고, b는 mazF가 lasI QS 프로모터의 제어 하에서 MazF의 발현에 따른 성장의 장애를 확인한 도이다(도 13b).

도 14는 MazE 발현 여부가 미니세포의 첨가로부터 MazF의 발현에 의해 영향을 받는 성장 경향을 결정하는 것을 확인한 도이다.

도 15는 MazF에서 다양한 농도의 M과 m을 첨가한 후에 나타나는 다양한 패턴을 확인한 도이다.

도 16은 a는 성장이 조절된 균주의 비-생장물을 확인한 도이고, b는 동적 성장 조절과 세포 바이오매스 및 생산 수율과의 관계를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0061] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0063] 본 발명은 종래 미니세포가 주로 플라스미드와 단백질의 전달 매개체로서의 미니세포의 역할에 초점을 맞추고 생물학적 생산을 위한 플랫폼으로는 결코 사용할 수 없는 한계와 특히, 이를 활용한 바이오제품 생산은 미니세포 내에 제한적으로 존재하는 표적 효소 때문에 한계가 있어 왔다는 한계를 가지는 문제점을 해결하고자 안출된 것이다.
- [0064] 이에 본 발명에서는, 하나의 양태로 에스케리치아 속 균주 유래 막 단백질인 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된, 에스케리치아 속 균주 유래 미니세포를 제공하고자 한다.
- [0065] 본 발명의 다른 하나의 양태로 미니세포를 포함하는 바이오제품 생산용 생물 반응기를 제공하고자 한다.

- [0066] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로 MinC와 MinD 단백질을 불활성화하고, FtsA, FtsZ, PlsB 및 PlsC 단백질의 활성을 강화한, 미니세포 생산용 에스케리치아 속 균주를 제공하고자 한다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 바이오제품 생산방법을 제공하고자 한다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포 생산 방법을 제공하고자 한다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로 상기 방법으로 생산된 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 미니세포를 제공하고자 한다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로 에스케리치아 속 균주 유래 세포의 막 단백질 ProP 단백질에 링커를 결합하는 단계; 상기 링커에 표적 단백질을 결합하는 단계; 및 에스케리치아 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 미니세포 내 표적 단백질의 집중 발현 방법을 제공하고자 한다.
- [0072] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0074] 본 발명에서 용어, “미니세포(minicell)”는 박테리아 세포의 비정상적 분열로 세포의 극성 지역에서 분리되어 생성되는 것으로서, 염색체가 없어 분열하거나 성장하지는 않으나, RNA, 단백질, 플라스미드 및 기타 대사산물을 함유하고 있어 한정적인 대사기능이 가능한 것으로 보고된다. 이러한 고유적 특징 때문에, 미니세포는 주로 단백질, 핵산 등의 생물학적 활성분자를 캡슐화하여 이동시키는 운반체로 연구되어 왔다.
- [0075] 상기 미니세포는 에스케리치아 속 균주 유래 막 단백질인 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질이 연결된 것일 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 용어, "ProP 단백질"은 프롤린/베타인 수송 단백질로, 세포의 극성 지역에 많이 존재하는 막 단백질인 카디오리핀 층에 대부분 존재하는 것으로 알려져 있다.
- [0077] 본 발명에서 용어, "링커(linker)"는 ProP 단백질과 표적 단백질을 작동가능하게 연결하는 단백질로서, ProP 단백질의 말단, 구체적으로는 C-말단에 연결된 것일 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 링커는 ProP 단백질과 표적 단백질을 연결할 수 있는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있으며, 구체적으로는 (글루탐산-알라닌-알라닌-알라닌-라이신) 형태이거나, (글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린) 형태일 수 있으며, 보다 구체적으로는 (EAAAK)₃, (EAAAK)₂(GGGS)₁, (EAAAK)₁(GGGS)₂ 및 (GGGS)₃로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0079] 본 발명에서 용어, "표적 단백질"은 ProP 단백질에 링커로 연결하여 미니세포 내에 집중 발현하고자 하는 단백질을 의미하는 것으로, 미니세포 내 집중하여 발현하고자 하는 목적을 가진 단백질이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0080] 구체적인 일 실시예에서는 표적 단백질로 젯산 생산 효소, 독성 화학물질 관련 효소 또는 자가유도체 생산 효소를 표적 단백질로 하여 ProP 단백질에 링커로 연결함으로써, 미니세포 내에 집중 발현될 수 있도록 하였다.
- [0081] 상기 젯산 생산 효소는 젯산을 생산하는 것으로 알려진 효소를 말한다.
- [0082] 상기 독성 화학물질 관련 효소는 독성으로 인하여 세포를 이용하여 생산하기 어려운 독성을 가진 화학물질이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 구체적으로는 핵산을, 옥탄올, 페닐 아세테이트 또는 부틸부티레이트 생산 효소일 수 있다.
- [0083] 상기 자가유도체 생산 효소는 자가유도체를 생산하는 효소를 말하는 것으로서, 여기에서 자가유도체는 자가 유도체는 세포 집단 밀도의 변화에 *?반응하여 생성되는 신호 분자로서, 퀴럼 감지 박테리아 세포의 밀도가 증가함에 따라 자가 유도체의 농도도 증가하는 것으로 보고된다.
- [0084] 구체적인 일 실시예에서는 Ldh, Pdc, AdhA, AdhE2, Ahr, EHT1, PanK, Acs, AtoD, AtoA, LasI, Mtn 및 LuxS로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 표적 단백질로서 ProP 단백질에 링커를 이용하여 연결하였다.

- [0085] 상기 미니세포는 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질을 연결하여 발현시킨 것과 연결하지 않고 발현시킨 것과 비교할 때, 연결하지 않고 발현시킨 것 대비 ProP 단백질에 링커로 표적 단백질을 연결하여 발현시킨 경우가 표적 단백질의 발현이 현저히 증가된 것이 특징이다.
- [0087] 상기 미니세포는 형광 단백질을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0088] 구체적으로는 상기 형광 단백질이 GFP일 수 있으나, 형광 신호를 통하여 형광 수치를 계산할 수 있는 단백질이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0090] 상기 미니세포는 에스케리치아 속 균주 유래인 것일 수 있다.
- [0091] 상기 에스케리치아 속 균주는 PrpP 단백질을 막 단백질로서 포함하고 있는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있으며, 구체적으로는 대장균(*E. coli*)일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0092] 상기 균주의 모균주는 미니세포를 생산하기 위한 것으로서, MinC와 MinD 단백질을 불활성화하고, FtsA, FtsZ, PlsB 및 PlsC 단백질의 발현을 강화한 것일 수 있으며, 유전자의 발현 강화를 위해 유전자의 상위 영역에 강한 프로모터를 도입하거나 유전자 변이를 도입할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0093] 또한, 본 발명에서 용어, "유전자를 불활성화(gene inactivation)시키는" 것은 유전자를 전사할 수 없게 하여 이에 따라 기능할 수 없는 상태로 만드는 것을 의미한다. 예를 들면, 유전자를 결손시키는 방법, 상동재조합을 이용하여 일정한 DNA 단편을 게놈상의 유전자 내에 삽입하여 불활성화시키는 방법, T-DNA 또는 트랜스포손(transposon)으로 DNA를 표지(tagging)하여 불활성화시키는 방법, RNA, RNAi 또는 마이크로RNA(microRNA)의 안티센스(antisense)가 전사된 후에 분해시키는 안티 센스 방법이 있다.
- [0094] 상기 MinC와 MinD 단백질은 세포 분열에 중점적 역할을 하는 Z-ring 형성과 관련된 단백질로서, Z-ring 형성을 방해하기 위해 *minCD* 유전자를 제거함으로써 단백질의 활성을 불활성화하였다. 여기에서 상기 MinC와 MinD 단백질은 각각 서열번호 1의 아미노산 서열과 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 서열번호 1과 2의 아미노산 서열은 각각 서열번호 8과 9의 염기서열로 코딩된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0095] 또한, 미니세포의 생산량을 증가시키기 위해 Z-ring의 복수 생성과 격막 단백질과 생성을 통해 비정상적 세포 분열을 유도하였는데, 이를 위하여 *ftsAZ* 유전자와 *plsBC* 유전자를 과발현시킴으로써, FftsA, FtsZ, PlsB 및 PlsC 단백질의 활성을 강화하였다.
- [0096] 상기 FtsA와 FtsZ 단백질은 각각 서열번호 3과 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 이는 각각 서열번호 10과 11의 염기서열로 코딩된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, PlsB와 PlsC 단백질은 각각 서열번호 5와 6의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 이는 각각 서열번호 12와 13의 염기서열로 코딩된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 또한, 상기 균주는 ProP-연결 단백질의 순도를 높이기 위해 대장균에 존재하는 *proP* 유전자를 제거하여 ProP 단백질의 활성을 강화시킨 것일 수 있다.
- [0098] 상기 ProP 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 이는 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 상기 아미노산 또는 유전자는 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 대장균 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 아미노산 또는 유전자와 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 아미노산 서열 또는 염기서열에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0100] 상기 서열번호 1 내지 14의 서열은 상기 서열번호 1 내지 14로 기재한 아미노산 서열 또는 염기서열 뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 99%이상의 상동성을 나타내는 염기서열 또는 아미노산 서열로서 실질적으로 활성이 동일한 아미노산 서열이나 이를 코딩하는 염기서열이라면 제한 없이 포함된다. 또한 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열 또는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

- [0101] 상기 균주는 기탁번호 KCTC14862BP로 수탁된 것일 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 용어, "배양"은 상기 균주를 적당히 조절된 환경 조건에서 생 육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배 양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업 자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0104] 본 발명에서 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양 물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하 여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 발명 의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제 한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 미생물을 적당한 탄소 원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미 노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [0105] 본 발명에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토 오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트 산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등 과 같은 아미노산 등 이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사 버, 사 탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있 으 며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다 양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용 될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0106] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암 모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타 민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출 물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되 어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐- 함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황 산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노 산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구 체 는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0108] 본 발명에서, 균주의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인 산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같 은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배 지 내로 산 소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0109] 배지의 온도는 20℃ 내지 50℃ 구체적으로는 30℃ 내지 37℃일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 100 시간일 수 있 으 나, 이로 제한되 지 않는다.
- [0110] 상기 배양에 의하여 생산된 미니세포는 배지 중으로 배출되거나 미처 배출되지 못하고 세포 내에 잔류할 수 있 다.
- [0111] 상기 미니세포 생산 방법은 배양된 미생물 또는 배지에서 미니세포를 회수하는 단계를 포함할 수 있다
- [0112] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 미니세포를 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 미니세포를 수집(collect)하고 해당 미니세포에 집중 발현된 바이오 제품을 회수하는 것일 수 있다. 예를 들면, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 미니세포와 그 속에 집중 발현된 바이오제품을 회수할 수 있다.
- [0113] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수

있다. 따라서, 상기의 회수되는 미니세포와 그 속에 집중 발현된 바이오제품은 정제된 형태일 수 있다.

[0115] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0117] **실험예**

[0118] **실험예 1. 균주 및 플라스미드**

[0119] 모든 균주 및 플라스미드는 하기 표 1과 같다.

표 1

Name	Description	Reference
Strains		
DH5 α		RBC
Wildtype	K-12 MG1655	KCTC
EW	K-12 MG1655 (DE3)	KCTC
EMM	K-12 MG1655 $\Delta minCDE$	Ref
EMM01	EMM harboring pZS-fp	Ref
EMM01-G	EMM01 harboring pZA-G	This study
EMM01-pG	EMM01 harboring pZA-pG	This study
EMM01-L	EMM01 harboring pZA-L	This study
EMM01-pL	EMM01 harboring pZA-pL	This study
EMM01-E	EMM01 harboring pZA-E	This study
EMM01-pE	EMM01 harboring pZA-pE	This study
EMP	EMM $\Delta proP$	This study
EMP01	EMP harboring pZS-fp	This study
EMP01-pG	EMP01 harboring pZA-pG	This study
EMP01-pL	EMP01 harboring pZA-pL	This study
EMP01-pE	EMP01 harboring pZA-pE	This study
EMP01-pI	EMP01 harboring pZA-pI	This study
EMP01-pH	EMP01 harboring pZA-pH	This study
EMP01-pO	EMP01 harboring pZA-pO	This study
EMP01-pP	EMP01 harboring pZA-pT1	This study
EMP01-pB	EMP01 harboring pZA-pT2	This study
EMP01-M	EMP01 harboring pZA-p1	This study
EMP01-m	EMP01 harboring pZA-p2	This study
EW-pG	K-12 MG1655 (DE3) harboring pZA-pG	This study
EW-1G	K-12 MG1655 (DE3) harboring pZA1-G	This study
EW-2G	K-12 MG1655 (DE3) harboring pZA2-G	This study
EW-im	K-12 MG1655 (DE3) harboring pCDF-m	This study
EW-1m	K-12 MG1655 (DE3) harboring pZA1-m	This study
EP	K-12 MG1655 (DE3) $\Delta ptsH$	This study
EP-ip	EP harboring pCDF-p	This study
EP-1p	EP harboring pZA1-p	This study
EWE-1m	EW-1m harboring pCDF-E	This study
EWA	EW harboring pZA12-m	This study
EWA-G	EWA harboring pZS-G	This study
EWA-I	EWA harboring pZS-I and pCDF-I	This study
Plasmids		
pZA31MCS	p15A ori PLtetO-1 CmR	Expressys
pZS21MCS	pCS101 ori PLtetO-1 KanR	Expressys
pCDFDuet-1	Double T7 promoter, CloDF13 ori, SmR	Novagen

pKD4	FRT flanked resistance cassette involved vector, oriR _γ , KmR	Datsenko and Wanner
pRedET	Red recombinase expression plasmid, repA, pSC101ori, PBAD, gam, beta alpha, recA, tetR	Gene Bridge
707FLP	Flippase expression plasmid, pSC101ori, repA, cl578, FLPe, tetR	Gene Bridge
pZS-fp	pZS21MCS containing genes <i>ftsA</i> , <i>ftsZ</i> , <i>plsB</i> and <i>plsC</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZS-G	pZS21MCS containing gene <i>gfp</i>	This study
pZS-I	pZS21MCS containing genes <i>budB</i> from <i>K. pneumoniae</i> and <i>ilvDC</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-G	pZA31MCS containing gene <i>gfp</i>	This study
pZA-pG	pZA31MCS derivative encoding ProP linked GFP	This study
pZA-L	pZA31MCS containing gene <i>ldh</i> from <i>S. bovis</i>	This study
pZA-pL	pZA31MCS derivative encoding ProP linked Ldh	This study
pZA-E	pZA31MCS containing genes <i>pdh</i> from <i>Z. mobilis</i> and <i>adhA</i> from <i>L. lactis</i>	This study
pZA-pE	pZA31MCS derivative encoding ProP linked Pdh and ProP linked AdhA	This study
pZA-I	pZA31MCS containing gene <i>adhA</i> from <i>L. lactis</i>	This study
pZA-pI	pZA31MCS derivative encoding ProP linked AdhA	This study
pZA-H	pZA31MCS containing gene <i>adhE2</i> from <i>C. acetobutylicum</i>	This study
pZA-pH	pZA31MCS derivative encoding ProP linked AdhE2	This study
pZA-O	pZA31MCS containing gene <i>ahr</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-pO	pZA31MCS derivative encoding ProP linked Ahr	This study
pZA-T	pZA31MCS containing gene EHT1 from <i>S. cerevisiae</i>	This study
pZA-pT	pZA31MCS derivative encoding ProP linked EHT1	This study
pZA-pT1	pZA-pT containing genes <i>acs</i> and <i>pank</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-pT2	pZA-pT containing genes <i>atoDA</i> and <i>pank</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-1	pZA31MCS containing gene <i>lasI</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-p1	pZA31MCS derivative encoding ProP linked LasI	This study
pZA-2	pZA31MCS containing genes <i>mtn</i> and <i>luxS</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA-p2	pZA31MCS derivative encoding ProP linked Mtn and ProP linked LuxS	This study
pZA1	pZA31MCS containing gene <i>lasR</i> from <i>P. aeruginosa</i> under the control of PLtetO-1 and <i>las</i> promoter from <i>P. aeruginosa</i>	This study
pZA2	pZA31MCS containing gene <i>lsrR</i> from <i>E. coli</i> under the control of PLtetO-1 and <i>lsrR</i> promoter from <i>E. coli</i>	This study
pZA1-G	pZA1 containing gene <i>gfp</i> under the control of <i>lasR</i> promoter	This study
pZA2-G	pZA2 containing gene <i>gfp</i> under the control of <i>lsrR</i> promoter	This study
pZA1-m	pZA1 containing gene <i>mazF</i> from <i>E. coli</i> under the control of <i>lasR</i> promoter	This study
pZA1-p	pZA1 containing gene <i>ptsH</i> from <i>E. coli</i> under the control of <i>lasR</i> promoter	This study
pZA12	pZA1 containing gene <i>lsrR</i> from <i>E. coli</i> under the control of PLtetO-1 and <i>lsrR</i> promoter from <i>E. coli</i>	This study
pZA12-m	pZA12 containing gene <i>mazF</i> from <i>E. coli</i> under the control of <i>lasR</i> promoter and <i>mazE</i> from <i>E. coli</i> under the control of <i>lsrR</i>	This study
pCDF-m	pCDFDuet-1 containing <i>mazF</i> from <i>E. coli</i>	This study
pCDF-p	pCDFDuet-1 containing <i>ptsH</i> from <i>E. coli</i>	This study
pCDF-E	pCDFDuet-1 containing <i>mazE</i> from <i>E. coli</i>	This study
pCDF-I	pCDFDuet-1 containing gene <i>kivd</i> from <i>L. lactis</i> and <i>adhA</i> from <i>L. lactis</i>	This study
Minicells		
M	Minicells produced by EMP01-M	This study
m	Minicells produced by EMP01-m	This study

- [0121] *proP*는 대장균 유래
- [0122] GGGGS를 링커 단백질로 사용
- [0124] **실험예 2. 배지 및 배양 조건**
- [0125] 모든 돌연변이 균주를 Luria-Bertani (LB) 배지 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl)에서 배양하였다.
- [0127] 참고로, 분석방법은 하기의 틀을 이용하여 분석하였다:
- [0128] The optical density, HPLC, Agilent 7890B GC, Plate reader, Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM).
- [0130] **실시예**
- [0131] **실시예 1. 미니세포 생산을 위한 돌연변이체 제조**
- [0132] 미니세포 생산을 위한 돌연변이체를 제조하였다. 구체적으로, 모세포의 비정상적 분열을 유도하여 미니세포를 생산하기 위해 세포 분열에 중점적 역할을 하는 Z-링(Z-ring) 형성을 방해하기 위하여, minCD 유전자를 제거한 균주를 제작하고 이를 EMM이라고 명명하였다. 또한, 추가적으로 미니세포의 생산량을 증가시키기 위해, Z-링의 복수 생성과 격막 단백질과 생성을 통해 비정상적 세포 분열을 유도하고, 이를 위해 각각 *ftsAZ* 유전자와 *plsBC* 유전자를 과발현하였다. 이렇게 제작된 균주를 EMM01이라고 명명한 후, 주사전자현미경(SEM) 사진으로 EMM01에서 많은 양의 미니세포가 생성되고 있음을 확인하였다 (도 1).
- [0134] **실시예 2. 표적 단백질을 농축하기 위한 미니세포 엔지니어링**
- [0135] 모세포에서 발현되는 단백질을 다음의 3가지 사실에 기초하여 수행된 엔지니어링(engineering)으로 미니세포 내에 농축하였다:
- [0136] 1. 막 단백질인 ProP는 세포질 쪽으로 확장된 C-말단 도메인을 갖는다.
- [0137] 2. ProP 농도가 높은 막층인 카디올리핀(Cardiolipin)은 주로 세포 극성 부위에 위치한다.
- [0138] 3. 극지방에서 모세포가 분리되면서 미니세포가 생성된다.
- [0139] 이를 도식화하면 도 2a와 같다. 구체적으로, 도 2a에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조한 미니세포 생성 돌연변이체 내에서 ProP 연결 단백질을 발현시키면, 막 내에 대부분의 ProP 연결 단백질을 유지하는 미니세포를 생성할 수 있다고 가정하였다.
- [0140] 이러한 가정을 확인하기 위하여, 미니세포 형성 돌연변이체(EMM01)에서 효율적인 링커 단백질을 구현하기 위해 (글루탐산-알라닌-알라닌-알라닌-라이신) 형태로 이루어진 링커 단백질과 (글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린) 형태로 이루어진 링커 단백질을 혼합하여 네 개의 후보 링커 단백질인 (EAAAK)₃, (EAAAK)₂(GGGGS)₁, (EAAAK)₁(GGGGS)₂, 및 (GGGGS)₃을 구현하였고, ProP 단백질과 형광단백질을 링커 단백질을 이용하여 연결한 후 형광 수치를 비교해 보았다. 그 결과, 다양한 링커 단백질 중에서도 (G4S)₃ 링커 단백질이 가장 높은 형광 수치 (fluorescence intensity) 성능을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 3). 따라서, 이후 미니세포와 모세포 모두에 대한 GFP 형광 비교 테스트에서는 (G4S)₃ 링커 단백질을 링커로 사용하여 확인하였다.
- [0141] 한편, EMM01 균주에 형광 단백질을 발현한 것을 EMM01-G라고 명명하고 ProP-연결 형태로 형광 단백질을 발현한 것을 EMM01-pG라고 명명하였다. 추가적으로 ProP-연결 단백질의 순도를 높이기 위해 대장균에 존재하는 *proP* 유전자를 제거한 균주를 EMP01-pG라고 명명하였다. 이러한 균주에서의 형광 단백질의 세기를 비교한 결과, 도 2b에서 확인할 수 있는 바와 같이, ProP-연결된 GFP를 발현시킨 경우가 연결된 단백질이 없는 GFP의 발현 대비

57.6% 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0142] 특히, EMP01-pG에서 분리된 미니세포에서는 EMM01-G에서 분리된 미니세포에서의 형광 세기보다 87.9%나 증가한 세기를 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 형광 현미경 (LSCM) 사진을 통해서도 확인할 수 있었는데, 이로부터 발현된 형광 단백질이 미니세포에 치중되어 발현된 것을 알 수 있었고, 결국 구축된 모델이 미니세포에서 효율적으로 구현되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0144] 실시예 3. 제작된(engineered) 미니세포를 이용한 젖산 생산 확인

[0145] 상기 실시예 1 내지 2를 통해 제작된 미니세포를 이용하여 젖산 생산이 개선될 수 있는지 확인해 보았다.

[0146] 구체적으로, ProP를 이용하여 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*)의 Ldh를 표적 단백질로 연결하여 젖산 생산이 개선될 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0147] 그 결과, EMP01-pL의 젖산 생산 수율이 EMM01-L과 비교할 때 52.3% 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 4a). 이와 유사하게, ProP와 연결하기 위한 표적 단백질로서 Ldh를 자이모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)의 pdc 및 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)의 adhA로 대체하여 추가 실험을 진행해 본 결과, 여기에서도 에탄올 생산 수율이 40% 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 4b).

[0148] 이러한 결과는 미니세포에서의 농축된 단백질 발현이 성공적으로 촉진될 뿐만 아니라, 나아가 생산성의 향상을 가져오는 것임을 확인할 수 있는 바, 이는 새로운 생물반응기로서 미니세포의 확장된 역할을 시사하는 것이다.

[0150] 실시예 4. 제작된(engineered) 미니세포를 이용한 독성 화학물질 생산 확인

[0151] 생물반응기로서의 미니세포의 가능성을 확인하기 위하여, 박테리아에서 제한적으로 생산하는 것으로 알려진 독성 화학물질을 상기의 미니세포를 생산자로 하여 생산이 가능한지 확인해 보았다. 본 발명에서 제조된 (engineered) 미니세포는 기존의 박테리아와 비교할 때, 독성 화학물질에 대해 향상된 안정성과 내성을 나타내어, C8-C10 알코올과 같은 독성 화학물질에 대해 보유하는 낮은 내성 박테리아에 의해 부과되는 제한된 생산을 해결하기에 적절할 것으로 생각된다. 구체적으로는 알데하이드를 이용한 알코올 생산이나 알코올과 아실-CoA를 이용한 에스테르 생산을 상기 실시예 1 내지 2를 통해 제조된 미니세포를 이용하여 확인하였다(도 5a 내지 5d). 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, C8-C10 독성 화학물질인 헥산올, 옥탄올, 페닐 아세테이트 및 부틸 부티레이트는 이들과 그 중간체의 독성으로 인해 박테리아 세포에서 제한된 생산을 갖는 것으로 나타났다(도 6).

[0152] 반면, 미니세포를 생산할 수 있는 모세포를 이용하여 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 ahE2를 ProP와 연결하고 발현시켜 균주 EMP01-pH를 제조하고, 대장균의 ahr을 ProP와 연결하고 발현하여 균주 EMP01-pO를 제조한 후, 이러한 미니세포만을 사용하여 헥산알의 헥산올과 옥탄알의 옥탄올이 어느 정도 생산되는지를 확인해 본 결과, 도 5의 e에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각각 790mg/L 및 60mg/L로 생산되는 것을 확인할 수 있었다(도 5e).

[0153] 한편, 에스테르 생산을 위하여, 먼저 알코올을 첨가한 에스테르화를 위해 세포 내에서 CoA 풀(pool)을 증가하고, 대장균의 panK, 대장균의 acs 및 ProP 연결 EHT1을 발현하여 돌연변이 균주 EMP01-pP를 제조하였다. 충분한 아세틸-CoA 풀을 갖는 EMP01-pP로 생성된 미니세포를 정제한 후, 이를 페닐 알코올로부터 페닐 아세테이트를 생성하는데 사용하였다.

[0154] 또한, 부틸부티레이트를 생성하기 위해, 대장균 및 ProP 연결 EHT1로부터 panK 및 atoDA를 발현시켜 돌연변이 균주 EMP01-pB를 제조 후, EMP01-pB로 생성된 미니세포를 아세틸-CoA를 갖는 CoA 전이효소로 부티레이트로부터 전환되는 부티릴-CoA의 축적을 위해 부티레이트 첨가 배지에서 정제하였다. 그런 다음, 정제된 미니세포를 부틸 부티레이트 생산에 사용하였다.

[0155] 그 결과, 도 5e에서 확인할 수 있는 바와 같이, 미니세포를 사용하여 확인한 페닐아세테이트 및 부틸부티레이트의 생산은 각각 167 mg/L 및 78 mg/L의 생산 역가를 나타내는 것을 확인하였으며, 둘 다 박테리아 세포를 통해 생산할 때의 26 mg/L 및 22 mg/L 대비 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5e).

[0157] **실시예 5. 제작된(engineered) 미니세포를 이용한 자가유도체의 생산 확인**

[0158] 자가 유도체는 세포 집단 밀도의 변화에 *?*반응하여 생성되는 신호 분자로서, 퀴럼 감지 박테리아 세포의 밀도가 증가함에 따라 자가 유도체의 농도도 증가하는 것으로 보고된다.

[0159] 생물 반응기로서의 미니세포의 역할을 추가로 확인하기 위해, 자가유도체(AI)를 생성하는 박테리아 세포에 문제를 유발하는 것으로 알려진 글로벌 조절 효과를 가지는 자가 유도체(AI)를 생산해 보았다.

[0160] 먼저, 자가유도체에 대해 설명하면, 자가유도체는 활성화된 메틸 주기에 의해 생성된다(도 7). 상기 실시예에서 구현한 모델과 마찬가지로, ProP 연결 단백질을 사용하여 미니세포막에서 자가유도체 생성에 관여하는 효소를 표적 단백질로 확립하였다. 자가유도체-2(autoinducer-1)를 생산하는 핵심 효소인 LasI을 미니세포에 농축하기 위해 ProP와 연결한 후 발현시키고, 이 미니세포를 M으로 명명하였다(도 8a). S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine)이 첨가된 배지에서 박테리아 세포와 본 발명의 미니세포에서 AHL(AI-1) 생성을 확인하고, AHL의 락톤링(lactone ring)을 검출하여 AHL의 역할을 측정하였다(도 9).

[0161] 그 결과, 미니세포와 ProP 연결 LasI이 발현되지 않은 세균 세포 모두 AHL 생성을 나타내지 못한 반면, 본 발명의 ProP 연결 LasI을 발현하는 미니세포에서는 동일한 조건의 세균 세포에 비하여 2.4배 더 높은 AHL 생산을 하는 것으로 확인할 수 있었다(도 10a).

[0163] 추가로, 자가유도체-2(autoinducer-2, AI-2)를 생산하기 위해 Mtn과 LuxS를 ProP와 연결하고 미니세포를 이용한 AI-2 생산을 위해 모세포 내에서 발현시켰다. 또한, 이 미니세포를 m으로 명명하였다 (도 8b).

[0164] 자가유도체 생산 조절이 가능해지면 이러한 자가유도체로 특정 유전자 발현을 구현할 수 있다. 미니세포 M 또는 m의 AI 생산과 유전자 발현에 대한 후속 효과를 제어하기 위해, 박테리아 세포에서 AI 의존 유전자 회로를 설정하였다(도 10b). 박테리아 배양 동안 회로를 사용함으로써, 다양한 농도의 미니세포가 세포 내에서 유전자 발현의 관련 제어를 유도할 수 있다고 가정하였다. 플라스미드 센싱 AI-1을 설계하기 위해, gfp는 플라스미드 pZA1에서 lasI QS 프로모터의 제어 하에 놓였다. LasR은 시스템에서 TetR 없이 구성 Ltet0-1 프로모터의 제어 하에 발현되는 AI-1 신호 수용체이다. AI-2를 감지하는 플라스미드를 설계하기 위해 플라스미드 pZA2의 lasI QS 프로모터를 lsr QS 프로모터로, LasR을 LsrR로 교체하였다. 특히, LsrR은 AI-1과 달리 수용체(LasR) 대신 억제인자로 기능하는 데 활용되었다.

[0165] 확립된 유전자 회로가 미니세포로부터 생성된 AI에 의해 유도되는지 여부를 시험하기 위해, 플라스미드 pZA1-G를 포함하는 균주 EW-1G를 0.1gDCW/L의 미니세포 M을 배지에 첨가하여 배양하였다.

[0166] 그 결과, 추가된 미니세포에 의해 AI가 합성되어 유전자 회로에서 gfp의 발현이 유도되었다(도 10c). 이는 박테리아 세포가 유전자 회로 유도를 담당하는 AI를 합성한 미니세포가 없는 배양과 비교할 때, 24시간 배양은 GFP 형광에서 2.4배의 차이를 나타내어 유전자 회로가 완전히 기능하고 미니세포로 AI를 생산하고, 이는 세균 세포보다 우월하다는 것을 나타낸다.

[0167] 결국, AI-2를 사용한 실험에서도 AI-1과 유사한 경향이 있음이 확인된 것으로서, 이는 미니세포의 유형과 농도를 조작하여 다양한 범위의 유전자 발현을 조절할 수 있는 가능성을 시사하는 것이다(도 10d).

[0169] **실시예 6. 미니세포에서 생산되는 자가유도체의 활용 확인**

[0170] 미니세포는 성장이나 분열이 불가능하지만, 세포 대사를 유지한다. 이러한 독특한 특성은 미니세포에 공학 측면에서 박테리아 세포에 비해 몇 가지 비교 이점을 부여한다.

[0171] 첫째, 각 미니세포는 일정한 양의 단백질 발현을 가지고 있기 때문에 단순히 미니세포의 농도를 측정함으로써 전체 발현 수준을 결정할 수 있다. 예를 들어, 총 GFP 강도를 미니세포의 농도를 단순히 제어함으로써 정확하게 예측할 수 있으며(도 11a), 미니세포가 미니세포 농도에 의해 제어되고 유도된 발현 수준을 예측할 때 성능에 대한 게이지로 제공할 수 있는 가능성을 나타낸다.

[0172] 둘째, 정제 후 일정시간 보관 후에도 미니세포를 사용할 수 있어 첨가제로 사용할 수 있다. 수확 후 GFP 강도 변화를 관찰하기 위해 수행된 안정성 테스트에서 미니세포의 성능이 하루 후에 93%, 일주일 후에도 65%로 유지되고 있음을 확인하였다(도 11b).

- [0173] 마지막으로 미니세포는 재활용이 가능하다. 사용한 미니세포의 분리 및 정제를 통해 이소부탄올과 헥산올로의 생산 테스트 후 미니세포를 재사용할 수 있음을 입증하였다(도 11c).
- [0174] 이러한 미니세포의 고유 특성은 미니세포를 첨가하여 세균 세포를 조절할 수 있다. 상기 유전자 회로에서 gfp를 대체하여, 박테리아 성장을 조절하기 위해 세포 대사에 필수적인 유전자를 삽입하였다. 구체적으로는, PTS에 속하는 유전자인 ptsH를 삭제하는 모델의 경우 AI를 통해 ptsH 발현을 조절가능한 모델을 수립하였고, 궁극적으로 미니세포 농도를 기반으로 박테리아 세포의 성장을 조절하는 것을 목표로 하였다. 그 결과, 도 12a에서 확인할 수 있는 바와 같이, ptsH가 결실된 균주에서는 성장이 심각하게 제한되는 것을 확인할 수 있었으나, ptsH의 발현에 따라서는 성장이 비례적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 12a). 또한, ptsH를 las QS 프로모터의 조절하에 두었을 때는, AI-1을 생산하는 미니세포 M을 첨가함에 따라 원활한 성장 회복이 확인되었지만, 세균 세포에 의해 생산된 AI-1에서는 아주 작은 성장 회복만이 있음을 확인할 수 있었다(도 13a). 또한, 세포 사멸을 일으키는 것으로 알려진 독소 단백질 MazF의 발현이 AI에 의해 제어되는 모델을 설계하였다. 이 모델을 사용한 실험에서는 MazF가 있는 세포가 성장 제한을 경험했음을 보여주었다(도 12b). mazF가 lasI QS 프로모터의 제어 하에 놓였을 때, M이 추가된 결과는 mazF의 발현에 따른 성장의 장애를 확인하였다(도 13b).
- [0176] **실시예 7. 2개의 서로 다른 제작된 미니세포의 동시 활용 확인**
- [0177] 상기 결과로부터 미니세포 M과 m이 각각 다른 AI를 생산한다는 것과, 각 AI가 박테리아 세포 내에서 지정된 유전자 회로에 대해 완전히 기능하는 것을 확인하였다. 이로부터 상기 2개의 미니세포가 세포 성장의 동적 조절에 사용될 수 있다고 보고, 이를 확인하기 위해 AI-1 의존성 플라스미드와 AI-2 의존성 플라스미드가 박테리아 세포에 숨겨져 있고 두 유전자 회로를 미니 세포 M과 m의 추가로 동시에 조절하였다. 이러한 모델의 기능을 확인하기 위해, 박테리아 세포의 동적 성장을 조절하기 위한 MazF-MazE 독소-항독소 시스템을 활용하였다. 구체적으로, MazE 발현 여부는 미니세포의 첨가로부터 mazF의 발현에 의해 영향을 받는 성장 경향을 결정하였다(도 14). mazF를 lasI QS 프로모터의 제어 하에 두고 mazE를 lsr QS 프로모터의 제어 하에 두었을 때, 다양한 농도의 M과 m을 첨가한 후 다양한 패턴이 나타나는 것을 확인하였다(도 15). 그 결과, 성장이 조절된 균주의 비-생장물은 미니세포의 종류와 농도에 따라 큰 편차를 보이는 것을 알 수 있었다(도 16a).
- [0178] 이러한 동적 성장 조절은 세포 바이오매스 및 생산 수율에 큰 영향을 미친다. 특정 성장은 성장 조절에 따라 감소하지만 최대 광학 밀도가 상대적으로 덜 영향을 받는 모델은 높은 바이오매스 수율을 산출할 수 있다(도 16b). 또한, 성장 조절이 유효한 모델은 GFP 생산 시 수율 측면에서 효과를 보였고, 이소부탄올 생산 실험에서도 이러한 모델이 다양한 생산 수율 향상에 기여할 수 있다는 가능성을 확인하였다.
- [0180] 종합하면, 상기 결과는 표적 단백질을 ProP와 연결하여 박테리아 세포의 극성 부위에서 농축된 발현을 할 수 있도록 함으로써 미니세포로의 분리 시 표적 단백질이 미니세포 내에 농축될 수 있도록 하고, 이로써 미니세포가 생화학적 합성을 위한 생물 반응기로 작용할 수 있음을 시사한다.
- [0181] 또한, 본 발명의 미니세포를 이용하여 세균 세포보다 우수하게 독성 화학물질을 생산하고, 피루브산 기반 에탄올과 젖산염을 높은 수율로 생산하며, 헥산올, 옥탄올, 페닐 에스테르 및 부틸 부티레이트를 박테리아 세포에 비해 높은 수준으로 생산하는 것을 확인함으로써, 본 발명의 미니세포를 효소 생물반응기, 나아가 박테리아 세포에 의한 생산에 제한이 있는 것으로 알려진 화학물질의 생산을 위한 플랫폼으로 활용할 수 있음을 시사한다.
- [0182] 또한, 본 발명의 미니세포를 이용하여 자가유도체를 효과적으로 생산하고, 나아가 추가된 미니세포 농도를 기반으로 성능을 정확하게 예측할 수 있으며, 높은 안정성 및 재활용성과 같은 특성으로 본 발명의 미니세포를 박테리아 세포를 조절하는 첨가제로 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [0184] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0186]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14862

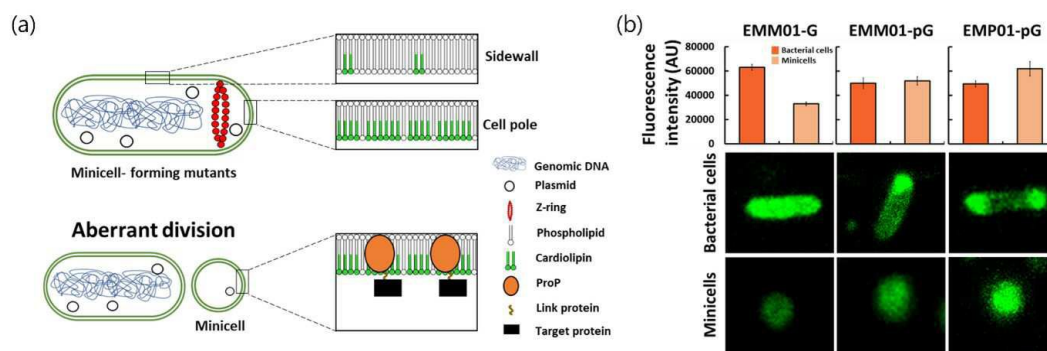
수탁일자 : 20220221

도면

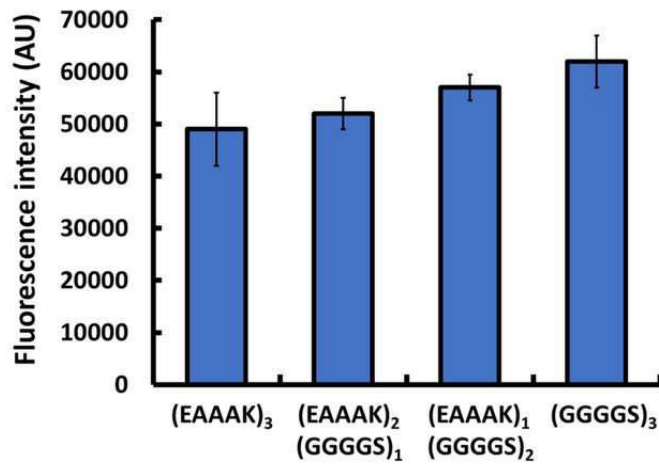
도면1



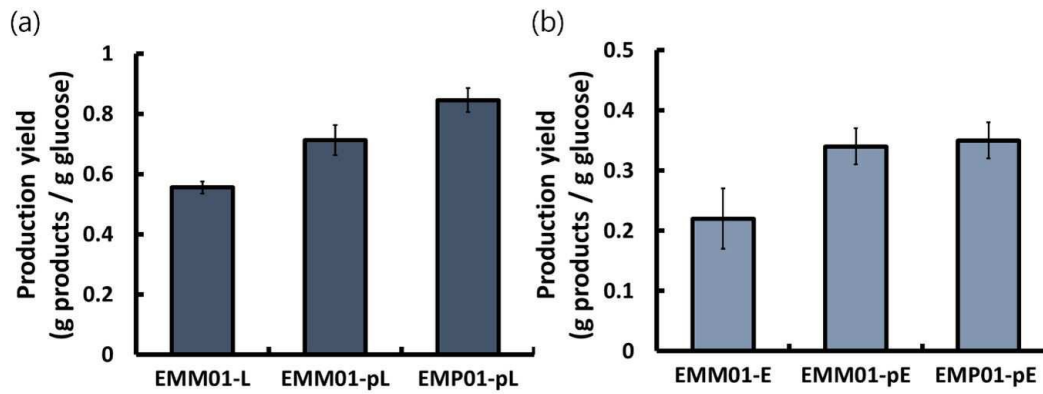
도면2



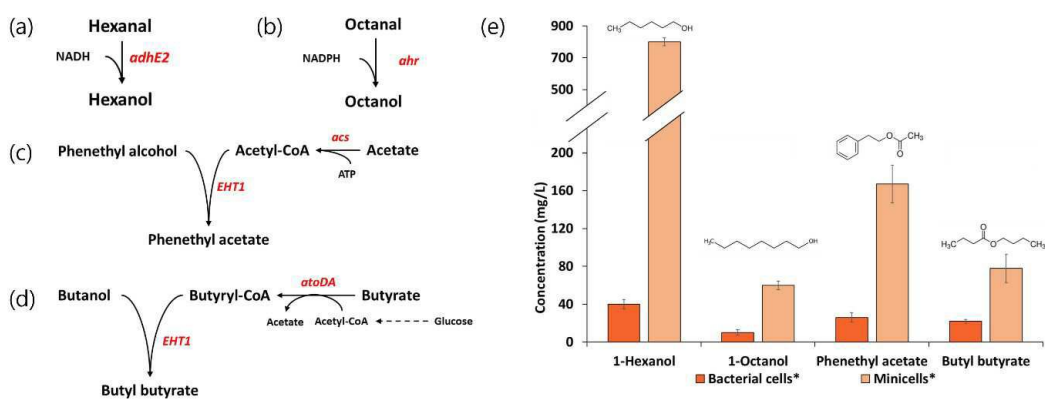
도면3



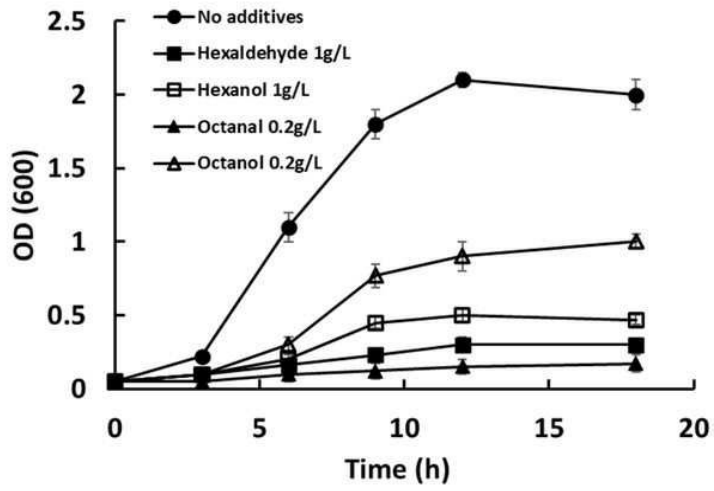
도면4



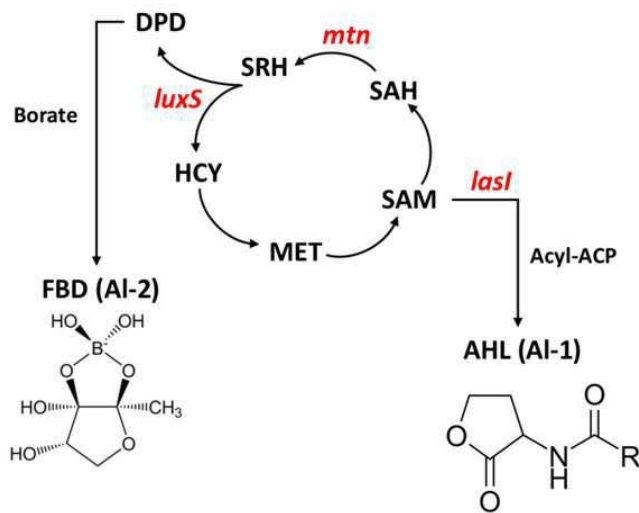
도면5



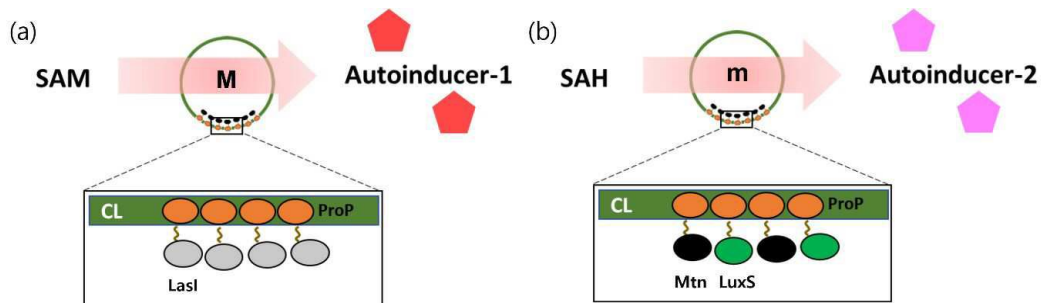
도면6



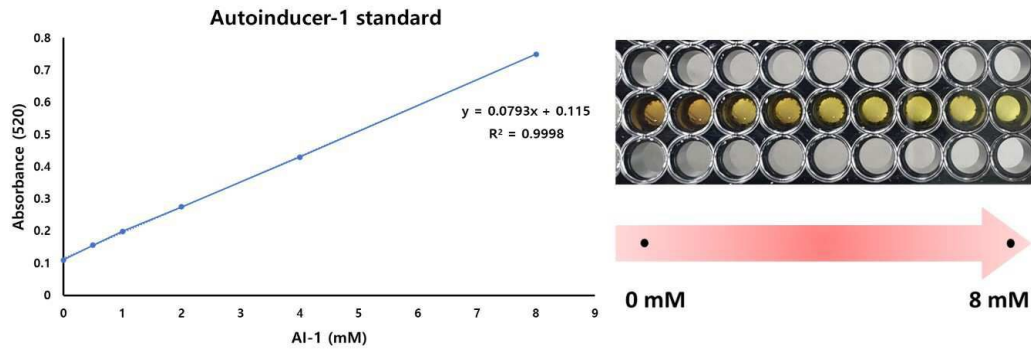
도면7



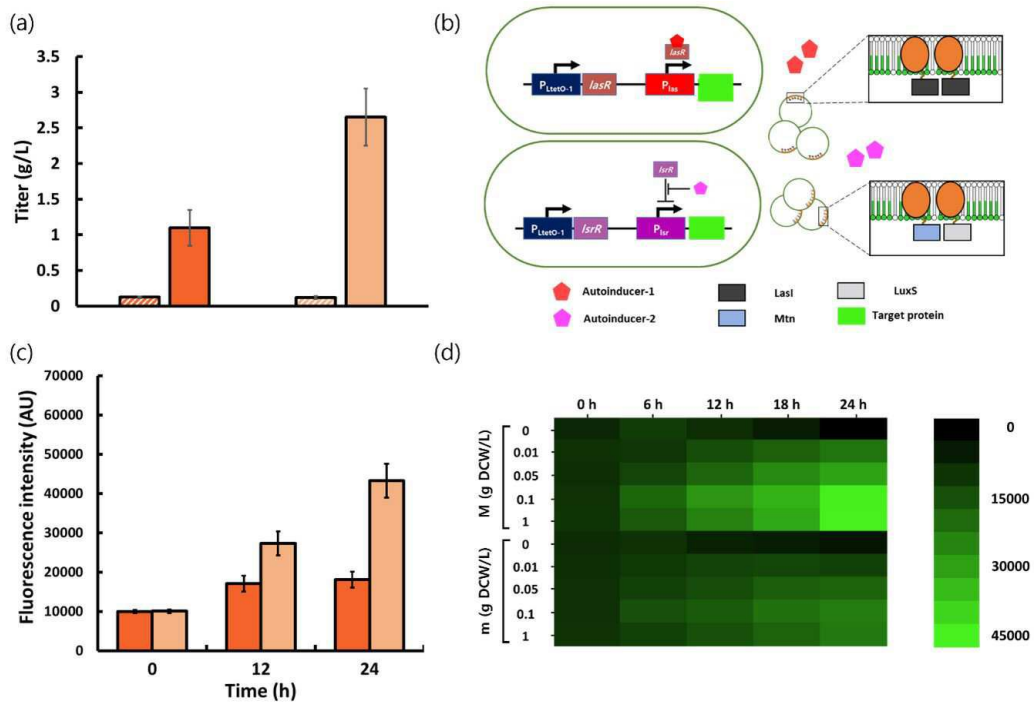
도면8



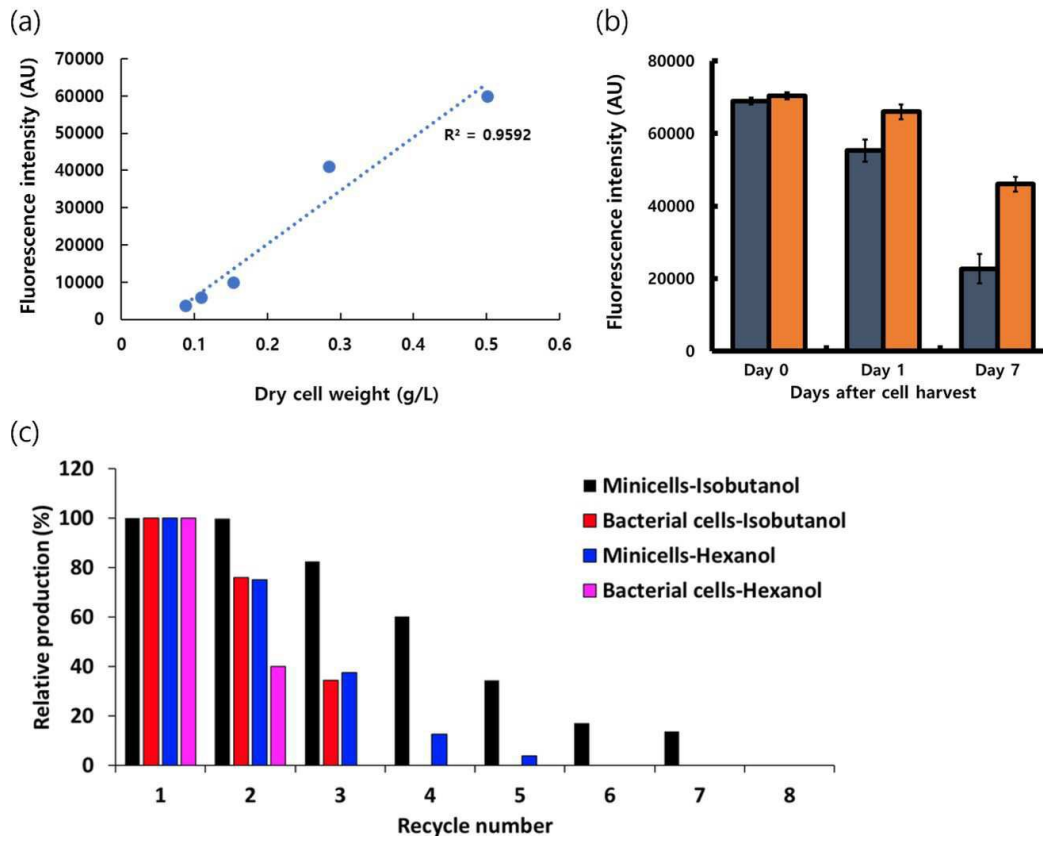
도면9



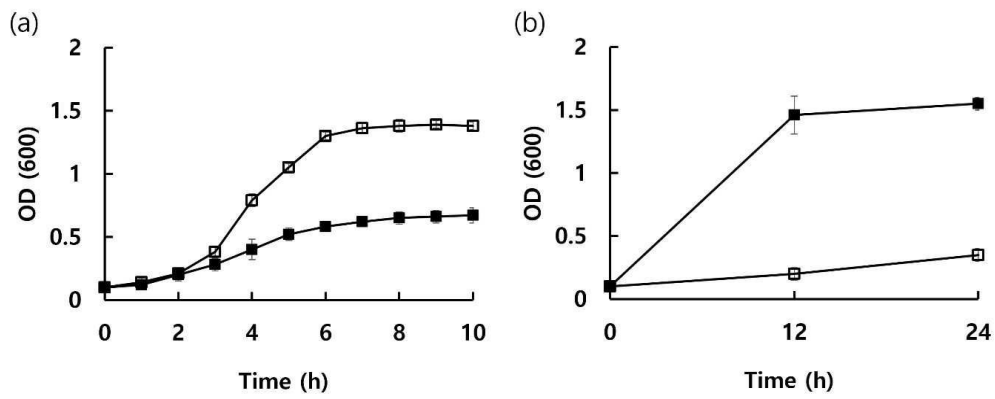
도면10



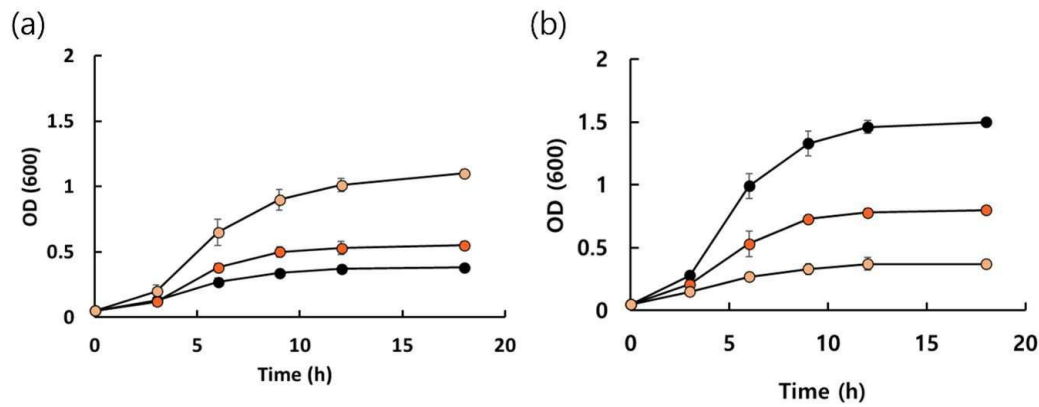
도면11



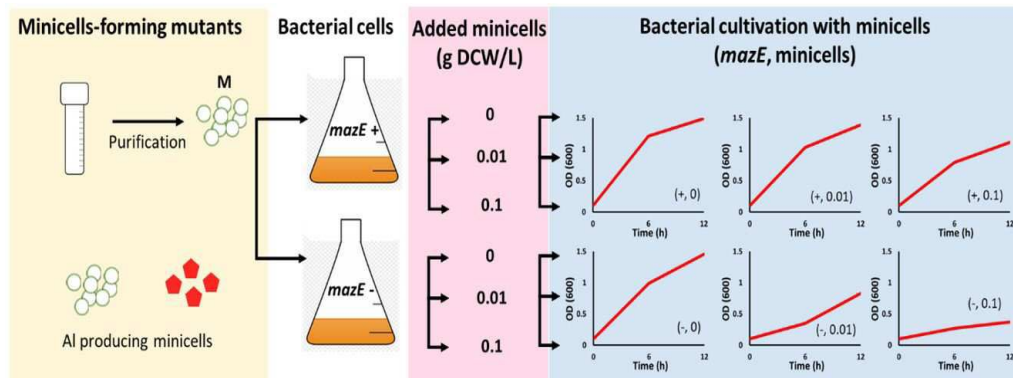
도면12



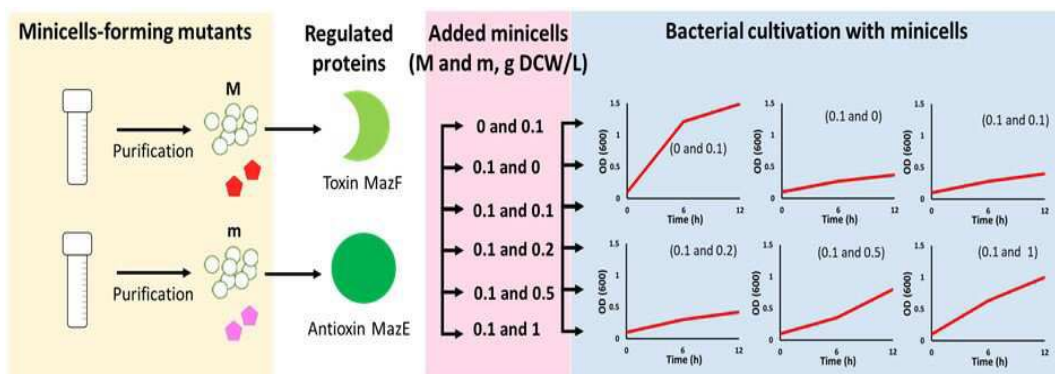
도면13



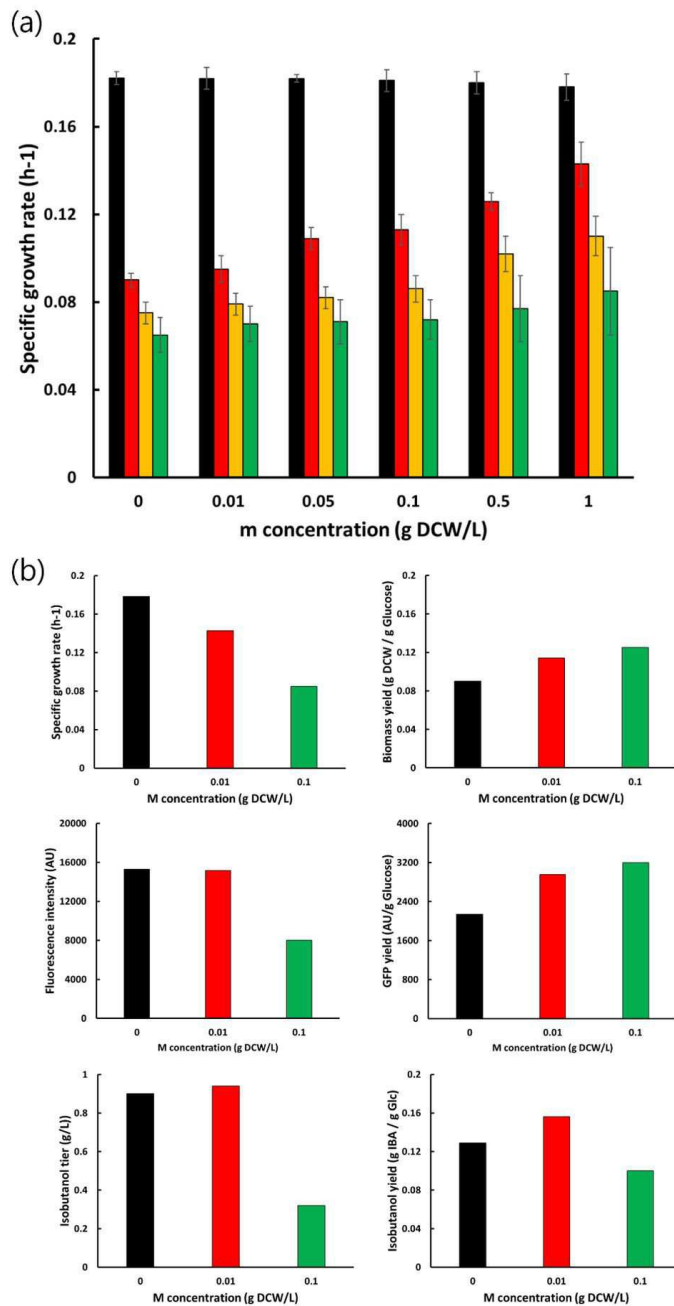
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Platform for intensive expression of target protein through
ProP-linking in minicell and its subsequent production of
bio-products
- <130> JKP-1687
- <160> 44
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MinC

<400> 1

Met Ser Asn Thr Pro Ile Glu Leu Lys Gly Ser Ser Phe Thr Leu Ser

1 5 10 15

Val Val His Leu His Glu Ala Glu Pro Lys Val Ile His Gln Ala Leu

20 25 30

Glu Asp Lys Ile Ala Gln Ala Pro Ala Phe Leu Lys His Ala Pro Val

35 40 45

Val Leu Asn Val Ser Ala Leu Glu Asp Pro Val Asn Trp Ser Ala Met

50 55 60

His Lys Ala Val Ser Ala Thr Gly Leu Arg Val Ile Gly Val Ser Gly

65 70 75 80

Cys Lys Asp Ala Gln Leu Lys Ala Glu Ile Glu Lys Met Gly Leu Pro

85 90 95

Ile Leu Thr Glu Gly Lys Glu Lys Ala Pro Arg Pro Ala Pro Thr Pro

100 105 110

Gln Ala Pro Ala Gln Asn Thr Thr Pro Val Thr Lys Thr Arg Leu Ile

115 120 125

Asp Thr Pro Val Arg Ser Gly Gln Arg Ile Tyr Ala Pro Gln Cys Asp

130 135 140

Leu Ile Val Thr Ser His Val Ser Ala Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp

145 150 155 160

Gly Asn Ile His Val Tyr Gly Met Met Arg Gly Arg Ala Leu Ala Gly

165 170 175

Ala Ser Gly Asp Arg Glu Thr Gln Ile Phe Cys Thr Asn Leu Met Ala

180 185 190

Glu Leu Val Ser Ile Ala Gly Glu Tyr Trp Leu Ser Asp Gln Ile Pro

195 200 205

Ala Glu Phe Tyr Gly Lys Ala Ala Arg Leu Gln Leu Val Glu Asn Ala

210 215 220
 Leu Thr Val Gln Pro Leu Asn

225 230
 <210> 2
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MinD
 <400> 2

Met Ala Arg Ile Ile Val Val Thr Ser Gly Lys Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Ser Ala Ala Ile Ala Thr Gly Leu Ala Gln Lys Gly Lys
 20 25 30
 Lys Thr Val Val Ile Asp Phe Asp Ile Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu
 35 40 45
 Ile Met Gly Cys Glu Arg Arg Val Val Tyr Asp Phe Val Asn Val Ile

50 55 60
 Gln Gly Asp Ala Thr Leu Asn Gln Ala Leu Ile Lys Asp Lys Arg Thr
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Tyr Ile Leu Pro Ala Ser Gln Thr Arg Asp Lys Asp Ala
 85 90 95
 Leu Thr Arg Glu Gly Val Ala Lys Val Leu Asp Asp Leu Lys Ala Met
 100 105 110
 Asp Phe Glu Phe Ile Val Cys Asp Ser Pro Ala Gly Ile Glu Thr Gly
 115 120 125

Ala Leu Met Ala Leu Tyr Phe Ala Asp Glu Ala Ile Ile Thr Thr Asn
 130 135 140
 Pro Glu Val Ser Ser Val Arg Asp Ser Asp Arg Ile Leu Gly Ile Leu
 145 150 155 160
 Ala Ser Lys Ser Arg Arg Ala Glu Asn Gly Glu Glu Pro Ile Lys Glu
 165 170 175
 His Leu Leu Leu Thr Arg Tyr Asn Pro Gly Arg Val Ser Arg Gly Asp

180 185 190
Met Leu Ser Met Glu Asp Val Leu Glu Ile Leu Arg Ile Lys Leu Val

195 200 205
Gly Val Ile Pro Glu Asp Gln Ser Val Leu Arg Ala Ser Asn Gln Gly

210 215 220
Glu Pro Val Ile Leu Asp Ile Asn Ala Asp Ala Gly Lys Ala Tyr Ala

225 230 235 240
Asp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gly Glu Glu Arg Pro Phe Arg Phe Ile

245 250 255
Glu Glu Glu Lys Lys Gly Phe Leu Lys Arg Leu Phe Gly Gly

260 265 270

<210> 3

<211> 420

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FtsA

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Asn Ile Ile Gly Val Gly Ser Cys Pro Ser Arg Gly Met Asp Lys

35 40 45

Gly Gly Val Asn Asp Leu Glu Ser Val Val Lys Cys Val Gln Arg Ala

50 55 60

Ile Asp Gln Ala Glu Leu Met Ala Asp Cys Gln Ile Ser Ser Val Tyr

65 70 75 80

Leu Ala Leu Ser Gly Lys His Ile Ser Cys Gln Asn Glu Ile Gly Met

85 90 95

Val Pro Ile Ser Glu Glu Glu Val Thr Gln Glu Asp Val Glu Asn Val

100 105 110

Val His Thr Ala Lys Ser Val Arg Val Arg Asp Glu His Arg Val Leu

115 120 125
 His Val Ile Pro Gln Glu Tyr Ala Ile Asp Tyr Gln Glu Gly Ile Lys
 130 135 140
 Asn Pro Val Gly Leu Ser Gly Val Arg Met Gln Ala Lys Val His Leu
 145 150 155 160
 Ile Thr Cys His Asn Asp Met Ala Lys Asn Ile Val Lys Ala Val Glu
 165 170 175
 Arg Cys Gly Leu Lys Val Asp Gln Leu Ile Phe Ala Gly Leu Ala Ser
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Val Leu Thr Glu Asp Glu Arg Glu Leu Gly Val Cys Val
 195 200 205
 Val Asp Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp Ile Ala Val Tyr Thr Gly Gly
 210 215 220
 Ala Leu Arg His Thr Lys Val Ile Pro Tyr Ala Gly Asn Val Val Thr
 225 230 235 240
 Ser Asp Ile Ala Tyr Ala Phe Gly Thr Pro Pro Ser Asp Ala Glu Ala
 245 250 255
 Ile Lys Val Arg His Gly Cys Ala Leu Gly Ser Ile Val Gly Lys Asp
 260 265 270
 Glu Ser Val Glu Val Pro Ser Val Gly Gly Arg Pro Pro Arg Ser Leu
 275 280 285
 Gln Arg Gln Thr Leu Ala Glu Val Ile Glu Pro Arg Tyr Thr Glu Leu
 290 295 300
 Leu Asn Leu Val Asn Glu Glu Ile Leu Gln Leu Gln Glu Lys Leu Arg
 305 310 315 320
 Gln Gln Gly Val Lys His His Leu Ala Ala Gly Ile Val Leu Thr Gly
 325 330 335
 Gly Ala Ala Gln Ile Glu Gly Leu Ala Ala Cys Ala Gln Arg Val Phe
 340 345 350
 His Thr Gln Val Arg Ile Gly Ala Pro Leu Asn Ile Thr Gly Leu Thr
 355 360 365

Asp Tyr Ala Gln Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ala Val Gly Leu Leu His
 370 375 380
 Tyr Gly Lys Glu Ser His Leu Asn Gly Glu Ala Glu Val Glu Lys Arg
 385 390 395 400
 Val Thr Ala Ser Val Gly Ser Trp Ile Lys Arg Leu Asn Ser Trp Leu
 405 410 415

Arg Lys Glu Phe
 420

<210> 4

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FtsZ

<400> 4

Met Phe Glu Pro Met Glu Leu Thr Asn Asp Ala Val Ile Lys Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Val Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ala Val Glu His Met Val Arg Glu
 20 25 30
 Arg Ile Glu Gly Val Glu Phe Phe Ala Val Asn Thr Asp Ala Gln Ala
 35 40 45

Leu Arg Lys Thr Ala Val Gly Gln Thr Ile Gln Ile Gly Ser Gly Ile
 50 55 60
 Thr Lys Gly Leu Gly Ala Gly Ala Asn Pro Glu Val Gly Arg Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Asp Glu Asp Arg Asp Ala Leu Arg Ala Ala Leu Glu Gly Ala Asp
 85 90 95
 Met Val Phe Ile Ala Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala
 100 105 110
 Ala Pro Val Val Ala Glu Val Ala Lys Asp Leu Gly Ile Leu Thr Val

115 120 125
 Ala Val Val Thr Lys Pro Phe Asn Phe Glu Gly Lys Lys Arg Met Ala
 130 135 140

Phe Ala Glu Gln Gly Ile Thr Glu Leu Ser Lys His Val Asp Ser Leu
 145 150 155 160
 Ile Thr Ile Pro Asn Asp Lys Leu Leu Lys Val Leu Gly Arg Gly Ile
 165 170 175
 Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Asn Asp Val Leu Lys Gly Ala
 180 185 190

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

 260 265 270
 Asp Glu Phe Glu Thr Val Gly Asn Thr Ile Arg Ala Phe Ala Ser Asp
 275 280 285
 Asn Ala Thr Val Val Ile Gly Thr Ser Leu Asp Pro Asp Met Asn Asp
 290 295 300
 Glu Leu Arg Val Thr Val Val Ala Thr Gly Ile Gly Met Asp Lys Arg
 305 310 315 320
 Pro Glu Ile Thr Leu Val Thr Asn Lys Gln Val Gln Gln Pro Val Met
 325 330 335

 Asp Arg Tyr Gln Gln His Gly Met Ala Pro Leu Thr Gln Glu Gln Lys
 340 345 350
 Pro Val Ala Lys Val Val Asn Asp Asn Ala Pro Gln Thr Ala Lys Glu
 355 360 365
 Pro Asp Tyr Leu Asp Ile Pro Ala Phe Leu Arg Lys Gln Ala Asp
 370 375 380
 <210> 5
 <211> 807

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PlsB

<400> 5

Met Ser Gly Trp Pro Arg Ile Tyr Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Pro Leu

1 5 10 15
Ser Ile Leu Val Lys Ser Lys Ser Ile Pro Ala Asp Pro Ala Pro Glu

20 25 30
Leu Gly Leu Asp Thr Ser Arg Pro Ile Met Tyr Val Leu Pro Tyr Asn

35 40 45
Ser Lys Ala Asp Leu Leu Thr Leu Arg Ala Gln Cys Leu Ala His Asp

50 55 60
Leu Pro Asp Pro Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Thr Leu Leu Pro

65 70 75 80

Arg Tyr Val Phe Ile His Gly Gly Pro Arg Val Phe Thr Tyr Tyr Thr
85 90 95

Pro Lys Glu Glu Ser Ile Lys Leu Phe His Asp Tyr Leu Asp Leu His
100 105 110

Arg Ser Asn Pro Asn Leu Asp Val Gln Met Val Pro Val Ser Val Met
115 120 125

Phe Gly Arg Ala Pro Gly Arg Glu Lys Gly Glu Val Asn Pro Pro Leu
130 135 140

Arg Met Leu Asn Gly Val Gln Lys Phe Phe Ala Val Leu Trp Leu Gly

145 150 155 160
Arg Asp Ser Phe Val Arg Phe Ser Pro Ser Val Ser Leu Arg Arg Met

165 170 175
Ala Asp Glu His Gly Thr Asp Lys Thr Ile Ala Gln Lys Leu Ala Arg

180 185 190
Val Ala Arg Met His Phe Ala Arg Gln Arg Leu Ala Ala Val Gly Pro

195 200 205
Arg Leu Pro Ala Arg Gln Asp Leu Phe Asn Lys Leu Leu Ala Ser Arg

210						215						220					
Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	Arg	Ser	Lys	Lys	Ile	Ser		
225						230						235					
His	Glu	Lys	Ala	Gln	Gln	Asn	Ala	Ile	Ala	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Ala		
					245						250						
Ala	Asn	Phe	Ser	Tyr	Glu	Met	Ile	Arg	Leu	Thr	Asp	Arg	Ile	Leu	Gly		
					260						265						
Phe	Thr	Trp	Asn	Arg	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ile	Asn	Val	His	Asn	Ala	Glu		
					275						280						
Arg	Val	Arg	Gln	Leu	Ala	His	Asp	Gly	His	Glu	Leu	Val	Tyr	Val	Pro		
					290						295						
Cys	His	Arg	Ser	His	Met	Asp	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Leu	Tyr		
305						310						315					
His	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	His	Ile	Ala	Ala	Gly	Ile	Asn	Leu	Asn		
					325						330						
Phe	Trp	Pro	Ala	Gly	Pro	Ile	Phe	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Phe	Phe	Ile		
					340						345						
Arg	Arg	Thr	Phe	Lys	Gly	Asn	Lys	Leu	Tyr	Ser	Thr	Val	Phe	Arg	Glu		
					355						360						
Tyr	Leu	Gly	Glu	Leu	Phe	Ser	Arg	Gly	Tyr	Ser	Val	Glu	Tyr	Phe	Val		
					370						375						
Glu	Gly	Gly	Arg	Ser	Arg	Thr	Gly	Arg	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly		
385						390						395					
Thr	Leu	Ser	Met	Thr	Ile	Gln	Ala	Met	Leu	Arg	Gly	Gly	Thr	Arg	Pro		
					405						410						
Ile	Thr	Leu	Ile	Pro	Ile	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Glu	His	Val	Met	Glu	Val		
					420						425						
Gly	Thr	Tyr	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Gly	Ala	Thr	Lys	Glu	Lys	Glu	Ser		
					435						440						
Leu	Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Asn	Leu	Gly	Gln		
					450						455						

Gly Tyr Val Asn Phe Gly Glu Pro Met Pro Leu Met Thr Tyr Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln His Val Pro Asp Trp Arg Glu Ser Ile Asp Pro Ile Glu Ala Val
 485 490 495
 Arg Pro Ala Trp Leu Thr Pro Thr Val Asn Asn Ile Ala Ala Asp Leu
 500 505 510

 Met Val Arg Ile Asn Asn Ala Gly Ala Ala Asn Ala Met Asn Leu Cys
 515 520 525
 Cys Thr Ala Leu Leu Ala Ser Arg Gln Arg Ser Leu Thr Arg Glu Gln
 530 535 540
 Leu Thr Glu Gln Leu Asn Cys Tyr Leu Asp Leu Met Arg Asn Val Pro
 545 550 555 560
 Tyr Ser Thr Asp Ser Thr Val Pro Ser Ala Ser Ala Ser Glu Leu Ile
 565 570 575
 Asp His Ala Leu Gln Met Asn Lys Phe Glu Val Glu Lys Asp Thr Ile

 580 585 590
 Gly Asp Ile Ile Ile Leu Pro Arg Glu Gln Ala Val Leu Met Thr Tyr
 595 600 605
 Tyr Arg Asn Asn Ile Ala His Met Leu Val Leu Pro Ser Leu Met Ala
 610 615 620
 Ala Ile Val Thr Gln His Arg His Ile Ser Arg Asp Val Leu Met Glu
 625 630 635 640
 His Val Asn Val Leu Tyr Pro Met Leu Lys Ala Glu Leu Phe Leu Arg
 645 650 655

 Trp Asp Arg Asp Glu Leu Pro Asp Val Ile Asp Ala Leu Ala Asn Glu
 660 665 670
 Met Gln Arg Gln Gly Leu Ile Thr Leu Gln Asp Asp Glu Leu His Ile
 675 680 685
 Asn Pro Ala His Ser Arg Thr Leu Gln Leu Leu Ala Ala Gly Ala Arg
 690 695 700
 Glu Thr Leu Gln Arg Tyr Ala Ile Thr Phe Trp Leu Leu Ser Ala Asn
 705 710 715 720

Pro Ser Ile Asn Arg Gly Thr Leu Glu Lys Glu Ser Arg Thr Val Ala

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

Ile Ser Asp Ser Gly Asp Ala Glu Pro Ala Glu Thr Met Lys Val Tyr

770 775 780

Gln Leu Leu Ala Glu Leu Ile Thr Ser Asp Val Arg Leu Thr Ile Glu

785 790 795 800

Ser Ala Thr Gln Gly Glu Gly

805

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PlsC

<400> 6

Met Leu Tyr Ile Phe Arg Leu Ile Ile Thr Val Ile Tyr Ser Ile Leu

1 5 10 15

Val Cys Val Phe Gly Ser Ile Tyr Cys Leu Phe Ser Pro Arg Asn Pro

20 25 30

Lys His Val Ala Thr Phe Gly His Met Phe Gly Arg Leu Ala Pro Leu

35 40 45

Phe Gly Leu Lys Val Glu Cys Arg Lys Pro Thr Asp Ala Glu Ser Tyr

50 55 60

Gly Asn Ala Ile Tyr Ile Ala Asn His Gln Asn Asn Tyr Asp Met Val

65 70 75 80

Thr Ala Ser Asn Ile Val Gln Pro Pro Thr Val Thr Val Gly Lys Lys

85 90 95

Ser Leu Leu Trp Ile Pro Phe Phe Gly Gln Leu Tyr Trp Leu Thr Gly

100 105 110

Asn Leu Leu Ile Asp Arg Asn Asn Arg Thr Lys Ala His Gly Thr Ile

115 120 125
Ala Glu Val Val Asn His Phe Lys Lys Arg Arg Ile Ser Ile Trp Met

130 135 140
Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Arg Gly Leu Leu Pro Phe Lys

145 150 155 160
Thr Gly Ala Phe His Ala Ala Ile Ala Ala Gly Val Pro Ile Ile Pro

165 170 175
Val Cys Val Ser Thr Thr Ser Asn Lys Ile Asn Leu Asn Arg Leu His
180 185 190

Asn Gly Leu Val Ile Val Glu Met Leu Pro Pro Ile Asp Val Ser Gln
195 200 205

Tyr Gly Lys Asp Gln Val Arg Glu Leu Ala Ala His Cys Arg Ser Ile
210 215 220

Met Glu Gln Lys Ile Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Glu
225 230 235 240

Ala Ala Gly Lys Val
245

<210> 7

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ProP

<400> 7

Met Leu Lys Arg Lys Lys Val Lys Pro Ile Thr Leu Arg Asp Val Thr
1 5 10 15

Ile Ile Asp Asp Gly Lys Leu Arg Lys Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu
20 25 30

Gly Asn Ala Met Glu Trp Phe Asp Phe Gly Val Tyr Gly Phe Val Ala
35 40 45

Tyr Ala Leu Gly Lys Val Phe Phe Pro Gly Ala Asp Pro Ser Val Gln
50 55 60

Met Val Ala Ala Leu Ala Thr Phe Ser Val Pro Phe Leu Ile Arg Pro

65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Gly Met Leu Gly Asp Lys Tyr Gly Arg Gln

85 90 95

Lys Ile Leu Ala Ile Thr Ile Val Ile Met Ser Ile Ser Thr Phe Cys

100 105 110

Ile Gly Leu Ile Pro Ser Tyr Asp Thr Ile Gly Ile Trp Ala Pro Ile

115 120 125

Leu Leu Leu Ile Cys Lys Met Ala Gln Gly Phe Ser Val Gly Gly Glu

130 135 140

Tyr Thr Gly Ala Ser Ile Phe Val Ala Glu Tyr Ser Pro Asp Arg Lys

145 150 155 160

Arg Gly Phe Met Gly Ser Trp Leu Asp Phe Gly Ser Ile Ala Gly Phe

165 170 175

Val Leu Gly Ala Gly Val Val Val Leu Ile Ser Thr Ile Val Gly Glu

180 185 190

Ala Asn Phe Leu Asp Trp Gly Trp Arg Ile Pro Phe Phe Ile Ala Leu

195 200 205

Pro Leu Gly Ile Ile Gly Leu Tyr Leu Arg His Ala Leu Glu Glu Thr

210 215 220

Pro Ala Phe Gln Gln His Val Asp Lys Leu Glu Gln Gly Asp Arg Glu

225 230 235 240

Gly Leu Gln Asp Gly Pro Lys Val Ser Phe Lys Glu Ile Ala Thr Lys

245 250 255

Tyr Trp Arg Ser Leu Leu Thr Cys Ile Gly Leu Val Ile Ala Thr Asn

260 265 270

Val Thr Tyr Tyr Met Leu Leu Thr Tyr Met Pro Ser Tyr Leu Ser His

275 280 285

Asn Leu His Tyr Ser Glu Asp His Gly Val Leu Ile Ile Ile Ala Ile

290 295 300

Met Ile Gly Met Leu Phe Val Gln Pro Val Met Gly Leu Leu Ser Asp

305 310 315 320
 Arg Phe Gly Arg Arg Pro Phe Val Leu Leu Gly Ser Val Ala Leu Phe
 325 330 335
 Val Leu Ala Ile Pro Ala Phe Ile Leu Ile Asn Ser Asn Val Ile Gly
 340 345 350
 Leu Ile Phe Ala Gly Leu Leu Met Leu Ala Val Ile Leu Asn Cys Phe

 355 360 365
 Thr Gly Val Met Ala Ser Thr Leu Pro Ala Met Phe Pro Thr His Ile
 370 375 380
 Arg Tyr Ser Ala Leu Ala Ala Ala Phe Asn Ile Ser Val Leu Val Ala
 385 390 395 400
 Gly Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Trp Leu Val Glu Ser Ser Gln Asn
 405 410 415
 Leu Met Met Pro Ala Tyr Tyr Leu Met Val Val Ala Val Val Gly Leu
 420 425 430

 Ile Thr Gly Val Thr Met Lys Glu Thr Ala Asn Arg Pro Leu Lys Gly
 435 440 445
 Ala Thr Pro Ala Ala Ser Asp Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ile Leu Val
 450 455 460
 Glu His Tyr Asp Asn Ile Glu Gln Lys Ile Asp Asp Ile Asp His Glu
 465 470 475 480
 Ile Ala Asp Leu Gln Ala Lys Arg Thr Arg Leu Val Gln Gln His Pro
 485 490 495
 Arg Ile Asp Glu

500

<210> 8

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> minC

<400> 8

atgtcaaaca cgccaatcga gcttaaaggc agtagcttca ctttatctgt ggttcatctg

60

catgaggcag aacctaaggt tatccatcag gcgctggaag acaaaatcgc tcaggccccc 120
gcatttttaa aacatgcccc cgttgtactc aacgtcagtg cactggaaga cccggtaaac 180
tggtcagcga tgcataaggc ggtttcggca accggtttgc gggttattgg cgtaagtggc 240
tgcaaagatg cgcaacttaa agccgaaatt gaaaagatgg ggctgcctat cctgacggaa 300

ggaaaggaaa aagcgccacg tccagctccc acaccgcagg ctccagcgca aaatacaacg 360
ccggtcacia aaacgcgttt aatagatacc ccggtgcgtt ccggtcagcg tatttatgct 420
ccacaatgtg atctgattgt tacaagccac gttagcgtg gggccgaatt gattgccgat 480
gggaacattc atgtctatgg catgatgcgc ggtcgtgcgc tggcaggggc aagtgtgtgac 540
cgggaaacgc aaatattttg tacgaacctg atggcggaac tgggttccat cgcaggtgaa 600
tactggctga gtgatcaaat cccagcagaa ttttatggca aagcggcgcg actgcagtta 660
gtcgaaaacg ctttgaccgt tcaaccgtta aatga 696

<210> 9

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> minD

<400> 9

atggcagcga ttattgttgt tacttcgggc aaagggggtg ttggtlaagac aacctccagc 60
gcggccatcg ccaactggtt ggcccagaag ggaaagaaaa ctgtcgtgat agattttgat 120
atcggcctgc gtaatctcga cctgattatg ggttgtgaac gccgggtcgt ttacgatttc 180
gtcaacgtca ttcagggcga tgcaacgcta aatcaggcgt taattaaaga taagcgtact 240
gaaaatctct atattctgcc ggcatcgcaa acacgcgata aagatgccct caccctgaa 300
ggggtcgcca aagtctttga tgatctgaaa gcgatggatt ttgaatttat cgtttgtgac 360

tccccggcag ggattgaaac cgggtcgtta atggcactct attttcgaga cgaagccatt 420
attaccacca acccggaagt ctctcagta cgcgactctg accgtatttt aggcatctctg 480
gcgtcgaaat cagccgcgc agaaaatggc gaagagccta ttaaagagca cctgctgtta 540
acgcgtata acccaggccg cgtaagcaga ggtgacatgc tgagcatgga agatgtgctg 600
gagatcctgc gcatcaaaact cgtcggcgtg atcccagagg atcaatcagt attgcgcgcc 660
tctaaccagg gtgaaccggt cattctcgac attaacgccg atgcgggtaa agcctacgca 720
gataccgtag aacgtctgtt gggagaagaa cgtcctttcc gtttcattga agaagagaag 780

aaaggcttcc tcaaacgctt gttcggagga taa 813

<210> 10
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ftsA
 <400> 10

atgatcaagg cgacggacag aaaactggta gtaggactgg agattggtac cgcgaaggtt 60
 gccgcttttag taggggaagt tctgcccac ggtatggtca atatcattgg cgtgggcagc 120
 tgcccgtcgc gtggtatgga taaaggcggg gtgaacgacc tcgaatccgt ggtcaagtgc 180
 gtacaacgcg ccattgacca ggcagaattg atggcagatt gtcagatctc ttcggtatat 240
 ctggcgcttt ctggttaagca catcagctgc cagaatgaaa ttggtatggt gcctatttct 300

gaagaagaag tgacgcaaga agatgtggaa aacgtcgtcc ataccgcgaa atcggtcgct 360
 gtgcgcgatg agcatcgtgt gctgcatgtg atcccgaag agtatcgat tgactatcag 420
 gaaggatca agaatccgtt aggactttcg ggctgctgga tgcaggcaaa agtgcacctg 480
 atcacatgtc acaacgatat ggcgaaaaac atcgtcaaag cggttgaacg ttgtgggctg 540
 aaagttgacc aactgatatt tgccggactg gcatcaagtt attcggattt gacggaagat 600
 gaacgtgaac tgggtgtctg cgtcgtcgat atcgggtgtg gtacaatgga tatcgccgtt 660
 tataccgggtg gggcatttgc ccacactaag gtaattcctt atgctggcaa tgtcgtgacc 720

agtgatatcg cttacgcctt tggcacgccg ccaagcgacg ccgaagcgat taaagttcgc 780
 cacggttgtg cgctgggttc catcgttggg aaagatgaga gcgtggaagt gccgagcgtg 840
 ggtggctcgc cgccacggag tctgcaacgt cagacactgg cagaggtgat cgagccgcgc 900
 tataccgagc tgctcaacct ggtcaacgaa gagatatgtc agttgcagga aaagcttcgc 960
 caacaagggg ttaaacaatca cctggcggca ggcattgtat taaccggtgg cgcagcgcag 1020
 atcgaagtc ttcagcctg tgctcagcgc gtgtttcata cgcaagtgcg tatcggcgcg 1080
 ccgctgaaca ttaccggttt aacggattat gctcaggagc cgtattatc gacggcgggtg 1140

ggattgcttc actatgggaa agagtcacat cttaacggtg aagctgaagt agaaaaacgt 1200
 gttacagcat cagttggctc gtggatcaag cgactcaata gttggctgcg aaaagagttt 1260
 taa 1263

<210> 11
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ftsZ

<400> 11

atgtttgaac caatggaact taccaatgac gcggtgatta aagtcacg cgtcggcggc 60

ggcggcggta atgctgttga acacatgggtg cgcgagcgca ttgaaggtgt tgaattcttc 120

gcggtaaata ccgatgcaca agcgtgctgt aaaacagcgg ttggacagac gattcaaatac 180

ggtagcggta tcaccaaagg actgggcgct ggcgctaatac cagaagttgg ccgcaatgcg 240

gctgatgagg atcgcgatgc attgctgtcg gcgctggaag gtgcagacat ggtctttatt 300

gctgcgggta tgggtgtgtg taccgttaca ggtgcagcac cagtcgtcgc tgaagtggca 360

aaagatttgg gtatcctgac cgttctgttc gtcactaagc ctttcaactt tgaaggcaag 420

aagcgtatgg cattcgcgga gcaggggatc actgaactgt ccaagcatgt ggactctctg 480

atcactatcc cgaacgacaa actgctgaaa gttctgggcc gcggtatctc cctgctggat 540

gcgtttggcg cagcgaacga tgtactgaaa ggcgctgtgc aaggtatcgc tgaactgatt 600

actcgtccgg gtttcatgaa cgtggacttt gcagacgtac gcaccgtaat gtctgagatg 660

ggctacgcaa tgatgggttc tggcgtggcg agcgggtgaag accgtgcgga agaagctgct 720

gaaatggcta tctcttctcc gctgctggaa gatatcgacc tgtctggcgc gcgcggcgtg 780

ctggttaaca tcacggcggg cttcgacctg cgtctggatg agttcgaaac ggtaggtaac 840

accatccgtg catttgcttc cgacaacgcg actgtggtta tcggtacttc tcttgaccgc 900

gatatgaatg acgagctcgc cgtaaccgtt gttgcgacag gtatcgcat ggacaaacgt 960

cctgaaatca ctctggtgac caataagcag gttcagcagc cagtgtgga tcgctaccag 1020

cagcatggga tggctccgct gacccaggag cagaagccgg ttgctaaagt cgtgaatgac 1080

aatgcgccgc aaactgcgaa agagccgat tatctggata tcccagcatt cctgcgtaag 1140

caagctgatt aa 1152

<210> 12

<211> 2424

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plsB

<400> 12

atgtccggct ggccacgaat ttactacaaa ttactgaatt taccattaag catcctggta 60

aaaagcaagt ctattccggc agatcctgcc ccggaactgg ggctggatac ctctcgtcca 120

attatgtacg ttttaccgta caactcgaac gcagatttgc tgacgttgcg cgcccagtgt 180

ctggcacatg acttgccctga cccgttagag ccgctggaaa tcgacggcac gctactgccg	240
cgctatgtgt tcattcacgg cgggcccggt gtgttcacct attacacgcc gaaagaagag	300
tctattaagc tgttccacga ctatctcgat ttgcaccgta gcaacccaaa tctggatgtg	360
cagatgggtgc cagtgtcggg gatgtttggg cgcgcgccgg ggctgaaaa aggcgaagtg	420
aacccgccgc tgcgtatgct taacggcgta cagaaatfff tcgctgtact gtggctcggg	480
cgcgacagtt ttgtgcgttt ctgccgtca gtttcgctgc gccgtatggc ggatgaacac	540
ggcacggata aaactatcgc tcagaaactg gcgcgcgtgg cgcgtatgca ctttgcccgt	600
caacgtctgg ctgccctagg cccacgtttg cctgctcgtc aggatctgtt taataagctg	660
ctcgctccc gcgccattgc caaagcggta gaagatgaag cgcgcagcaa aaaaatctcc	720
catgaaaaag cgcagcagaa cgcgattgca ctgatggaag agattgcggc gaatttctct	780
tacgagatga ttgcctgac tgaccgtatt ctgggcttca cctggaaccg actttaccag	840
ggcatcaacg tccataacgc tgagcgcgtt cgccagctgg cccacgacgg tcatgagctg	900
gtatatgtgc cttgccaccg cagtcacatg gactacctgc tgccttctta cgtgctgtat	960
caccaggggc tgggtccgcc gcataatgcc gccgggatca acctgaattt ctggcctgcc	1020
gggccgattt tccgccgtct gggggcggtt tttattcgcc gtacgtttaa aggcaataaa	1080
ctttattcca ccgttttccg ggagtatctc ggcgaaactgt tcagccgtgg ttattccgtc	1140
gagtacttcg tggaaggcgg tcgttcccg acggggcggt tgctggatcc gaaaactggt	1200
acgtgtcga tgaccattca ggcgatgtg cgtggcgga cgcgtccgat tacgtgatt	1260
ccgatctata tcggttatga gcacgtcatg gaagtgggta cttacgcaa agaactgcgc	1320
ggcgcgacga aagagaaaga gagcctgccg cagatgtgc gcggtttaag caagctgcgt	1380
aatctcggtc agggttacgt caacttcggt gaaccaatgc cgttgatgac ctacctaac	1440
cagcatgtac ctgactggcg tgaatctatc gatcccatcg aagcgggtgcg tccggcatgg	1500
ttaacgccga cggtaataa tattgtctgc gatctgatgg tacgattaa caacgcaggc	1560
gcggcaaacg ccatgaacct gtgtgtact gcgtactgg catcacgtca gcgtcactc	1620
accgcgagc agttaaccga gcaactcaac tgetacctgg atctgatgcg caacgtgcc	1680
tactccacgg actctaccgt tcttcagcc agcgcagcg agcttatcga tcacgcgtg	1740
caaatgaaca agtttgaagt cgagaaagac acaatcgcg acatcatcat tctgccgcg	1800
gagcaagcgg tgetgatgac ctactatcgc aacaacattg cgcataatgt ggtgctgcct	1860
tcgtgatgg cggcaatcgt caccagcat cgccacatct cccgcgacgt attgatggag	1920
cacgtcaatg tgccttacc aatgctgaaa gcggagctgt tctgcgtg ggatcgcgac	1980
gagttgccgg acgttatga tgcgtggca aatgagatgc aacgtcaggg gctgattacc	2040

ctgcaagatg atgagttgca tatcaacccg gcgcattctc gcacgctaca gctgctggcc 2100
gcaggcgcgc gcgaacgct gcaacgttat gccatcacct tctggttggt gagtgccaac 2160
ccgtcgatca accgcggtac gctggagaaa gagagccgca ccgtcgcgca acgtctctcc 2220
gtgctgcacg gcatcaacgc gccggagttc ttcgacaagg cgggtttcag ttctctggtg 2280

ctgacactgc gtgatgaagg gtatatcagc gatagcggcg atgccgaacc ggcagaaacg 2340
atgaaggttt atcagttgct ggccgagttg attacatcag acgtgcgttt gacgattgag 2400
agtgcgacgc agggcgaagg gtaa 2424

<210> 13

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plsC

<400> 13

atgctatata tctttcgtct tattattacc gtgatttaca gcatcttagt ctgtgtattc 60
ggctccattt actgcctttt cagcccgct aaccgaaac atgtggccac ctttggcat 120
atgtttggcc gtcttgcgc gctgtttggc ctgaaagttg agtgcgtaa acctacagac 180

gctgaaagct acggcaatgc tatctatac gtaaccacc agaacaacta tgacatggtg 240
acagcatcga acatcgtgca accgccgacg gtgacggtag gtaaaaagag cttgctgtgg 300
atccccctct tcgggcagtt gtactggtta accggcaact tattgatcga cagaaacaat 360
cgactaaag ctacggcac cattgcggaa gtagtgaatc acttcaaaaa acgccgtatt 420
tccatctgga tgttcccga aggaacccgc agccgtggc gcggcctgct accgttcaag 480
actggagcat ttcacgcgc aattgcggcg ggcgtccga ttattccgt gtgcgtctct 540
acaacttga ataagattaa tcttaatcga ctgcacaacg gcttggtgat tgtcgaaatg 600

ctgccgcaa ttgacgtcag tcagtatggc aaagatcagg ttcgtgagct ggctgccc 660
tgtcgttcga taatggaaca aaaaatgcc gagctcgata aagaagtcgc agaacgcgaa 720
gccgccgga aagtttaa 738

<210> 14

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> proP

<400> 14

atgctgaaaa ggaaaaaagt aaaaccgatt acccttcgtg atgtcaccat tattgatgac	60
ggtaaactgc gtaaagccat taccgcagca tctactgggta atgcaatgga atgggtcgat	120
tttggtgttt atggttttgt tgcctacgca ttaggtaaag tttttttccc gggggctgac	180
cccagcgtgc agatggttgc tgcacttgcc actttctccg ticcctttct gattcgaccg	240
cttggcggac tcttctttgg tatgttgggc gataaatatg gtcgccagaa gatcctcgct	300
atcactattg tgattatgtc gatcagtagc tctgtattg gcttaatacc gtcctacgac	360
acgattggta ttggggcacc gattctgctg ttgatctgta agatggcaca aggtttctcg	420
gtcggcgggt aatataccgg ggcgtcgata ttgttgcgg aatactcccc tgaccgtaaa	480
cgtggcttta tgggcagctg gctggacttc ggttctattg ccgggtttgt gctgggtgac	540
ggcgtgggtg tgtaatttc gaccattgtc ggcaagcga acttcctcga ttggggctgg	600
cgtattccgt tctttatcgc tctgccgtta gggattatcg ggctttacct gcgccatgcg	660
ctggaagaga ctccggcggt ccagcagcat gtcgataaac tggaacaggg cgaccgtgaa	720
ggtttgcagg atggcccgaa agtctcggtt aaagagattg ccactaaata ctggcgcagc	780
ctgttgacat gtattggtc ggtaattgcc accaacgtga cttactacat gttgctgacc	840
tatatgccg gttatttgc gcataacctg cattactccg aagaccacgg ggtgctgatt	900
attatcgcca ttatgatcgg tatgctgttt gtccagccgg tgatgggctt gctgagtgac	960
cgttttggcc gtcgtccgtt tgtgtactt ggtagtggtt ccctgtttgt gttggcgatc	1020
ccggcgctta ttctgattaa cagtaacgtc atcggcctga ttttggcgg gttactgatg	1080
ctggcggtag tcttaactg ctttacgggc gttatggctt ctaccttgcc agcgatgttc	1140
ccgacgcata tccgttacag cgcgtggcg gcggcattta atatttcggt gctgggtgcc	1200
ggtctgacgc caacgtggc ggcctggctg gtcgaaagct cgcagaatct gatgatgcct	1260
gcctattacc tgatggtagt ggcgtgggtt ggtttaatca ccggcgtaac catgaaagag	1320
acggcaaadc gtccgttgaa aggtgacgac ccggcgcggt cagatataca ggaagcgaag	1380
gaaattctcg tcgagcatta cgataatgc gagcagaaaa tcgatgatat tgaccacgag	1440
attgccgatt tgcaggcgaa acgtacccgc ctggtgcagc aacatccgcg aattgatgaa	1500
taa	1503
<210> 15	
<211> 239	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GFP	

<400> 15
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235
<210> 16

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldh

<400> 16

Met Thr Ala Thr Lys Gln His Lys Lys Val Ile Leu Val Gly Asp Gly

1 5 10 15

Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Val Asn Gln Gly Ile Ala

20 25 30

Gln Glu Leu Gly Ile Ile Glu Ile Pro Gln Leu Phe Glu Lys Ala Val

35 40 45

Gly Asp Ala Leu Asp Leu Ser His Ala Leu Ala Phe Thr Ser Pro Lys

50 55 60

Lys Ile Tyr Ala Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Val

65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp

85 90 95

Leu Val Gly Lys Asn Leu Ala Ile Asn Lys Ser Ile Val Thr Gln Val

100 105 110

Val Glu Ser Gly Phe Asn Gly Ile Phe Leu Val Ala Ala Asn Pro Val

115 120 125

Asp Val Leu Thr Tyr Ser Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Glu

130 135 140

Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Gln

145 150 155 160

Ala Leu Ala Glu Lys Leu Gly Val Asp Ala Arg Ser Val His Ala Tyr

165 170 175

Ile Met Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Val Trp Ser His Ala

180 185 190

Asn Ile Ala Gly Val Asn Leu Glu Glu Phe Leu Lys Asp Thr Gln Asn

195 200 205

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

Val Phe Ile Gly Gln Pro Ala Ile Val Gly Ala His Gly Ile Val Arg
 275 280 285
 Pro Val Asn Ile Pro Leu Asn Asp Ala Glu Gln Gln Lys Met Lys Ala
 290 295 300
 Ser Ala Asp Glu Leu Gln Ala Ile Ile Asp Glu Ala Trp Lys Asn Pro
 305 310 315 320
 Glu Phe Gln Glu Ala Ser Lys Asn
 325

<210> 17
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220

><223> Pdc

<400> 17

Met Ser Tyr Thr Val Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Arg Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15
 Gly Leu Lys His His Phe Ala Val Ala Gly Asp Tyr Asn Leu Val Leu
 20 25 30
 Leu Asp Asn Leu Leu Leu Asn Lys Asn Met Glu Gln Val Tyr Cys Cys
 35 40 45
 Asn Glu Leu Asn Cys Gly Phe Ser Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Lys
 50 55 60

Gly Ala Ala Ala Ala Val Val Thr Tyr Ser Val Gly Ala Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Phe Asp Ala Ile Gly Gly Ala Tyr Ala Glu Asn Leu Pro Val Ile Leu
 85 90 95
 Ile Ser Gly Ala Pro Asn Asn Asn Asp His Ala Ala Gly His Val Leu
 100 105 110
 His His Ala Leu Gly Lys Thr Asp Tyr His Tyr Gln Leu Glu Met Ala
 115 120 125
 Lys Asn Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Glu Ala
 130 135 140
 Pro Ala Lys Ile Asp His Val Ile Lys Thr Ala Leu Arg Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Tyr Leu Glu Ile Ala Cys Asn Thr Ala Ser Met Pro Cys Ala
 165 170 175
 Ala Pro Gly Pro Ala Ser Ala Leu Phe Asn Asp Glu Ala Ser Asp Glu
 180 185 190
 Ala Ser Leu Asn Ala Ala Val Asp Glu Thr Leu Lys Phe Ile Ala Asn
 195 200 205
 Arg Asp Lys Val Ala Val Leu Val Gly Ser Lys Leu Arg Ala Ala Gly
 210 215 220
 Ala Glu Glu Ala Ala Val Lys Phe Thr Asp Ala Leu Gly Gly Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Thr Met Ala Ala Ala Lys Ser Phe Phe Pro Glu Glu Asn Ala Asn
 245 250 255
 Tyr Ile Gly Thr Ser Trp Gly Glu Val Ser Tyr Pro Gly Val Glu Lys
 260 265 270
 Thr Met Lys Glu Ala Asp Ala Val Ile Ala Leu Ala Pro Val Phe Asn
 275 280 285
 Asp Tyr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Asp Ile Pro Asp Pro Lys Lys Leu
 290 295 300
 Val Leu Ala Glu Pro Arg Ser Val Val Val Asn Gly Ile Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Ser Val His Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Ala Gln Lys Val Ser
 325 330 335

Lys Lys Thr Gly Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ser Leu Asn Ala Gly Glu
340 345 350

Leu Lys Lys Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ser Ala Pro Leu Val Asn Ala
355 360 365

Glu Ile Ala Arg Gln Val Glu Ala Leu Leu Thr Pro Asn Thr Thr Val
370 375 380

Ile Ala Glu Thr Gly Asp Ser Trp Phe Asn Ala Gln Arg Met Lys Leu
385 390 395 400

Pro Asn Gly Ala Arg Val Glu Tyr Glu Met Gln Trp Gly His Ile Gly
405 410 415

Trp Ser Val Pro Ala Ala Phe Gly Tyr Ala Val Gly Ala Pro Glu Arg
420 425 430

Arg Asn Ile Leu Met Val Gly Asp Gly Ser Phe Gln Leu Thr Ala Gln
435 440 445

Glu Val Ala Gln Met Val Arg Leu Lys Leu Pro Val Ile Ile Phe Leu
450 455 460

Ile Asn Asn Tyr Gly Tyr Thr Ile Glu Val Met Ile His Asp Gly Pro
465 470 475 480

Tyr Asn Asn Ile Lys Asn Trp Asp Tyr Ala Gly Leu Met Glu Val Phe
485 490 495

Asn Gly Asn Gly Gly Tyr Asp Ser Gly Ala Ala Lys Gly Leu Lys Ala
500 505 510

Lys Thr Gly Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Lys Val Ala Leu Ala Asn
515 520 525

Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ile Glu Cys Phe Ile Gly Arg Glu Asp Cys
530 535 540

Thr Glu Glu Leu Val Lys Trp Gly Lys Arg Val Ala Ala Ala Asn Ser
545 550 555 560

Arg Lys Pro Val Asn Lys Leu Leu

565

<210> 18

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AdhA

<400> 18

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Thr Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220
 Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Ala Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
 225 230 235 240
 Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
 245 250 255
 Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

 260 265 270
 Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
 290 295 300
 Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
 305 310 315 320
 Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
 325 330 335

 Asp Phe Thr Lys
 340
 <210> 19
 <211> 858
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AdhE2
 <400> 19
 Met Lys Val Thr Asn Gln Lys Glu Leu Lys Gln Lys Leu Asn Glu Leu
 1 5 10 15
 Arg Glu Ala Gln Lys Lys Phe Ala Thr Tyr Thr Gln Glu Gln Val Asp
 20 25 30
 Lys Ile Phe Lys Gln Cys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Glu Arg Ile Asn
 35 40 45

 Leu Ala Lys Leu Ala Val Glu Glu Thr Gly Ile Gly Leu Val Glu Asp
 50 55 60
 Lys Ile Ile Lys Asn His Phe Ala Ala Glu Tyr Ile Tyr Asn Lys Tyr

65						70						75						80						
Lys	Asn	Glu	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	Ile	Asp	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Gly									
					85					90					95									
Ile	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Pro	Ile	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Pro									
					100					105					110									
Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Ile	Phe	Lys	Ser	Leu	Ile	Ser	Leu									
					115					120					125									
Lys	Thr	Arg	Asn	Ala	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	His	Pro	Arg	Ala	Lys	Lys									
					130					135					140									
Ser	Thr	Ile	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Ile	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	Lys	Ala									
					145					150					155					160				
Gly	Ala	Pro	Lys	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Ile	Asp	Glu	Pro	Ser	Ile	Glu									
					165					170					175									
Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Met	Ser	Glu	Ala	Asp	Ile	Ile	Leu	Ala	Thr	Gly									
					180					185					190									
Gly	Pro	Ser	Met	Val	Lys	Ala	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile									
					195					200					205									
Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ile	Asp	Glu	Ser	Ala	Asp									
					210					215					220									
Ile	Asp	Met	Ala	Val	Ser	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Lys	Thr	Tyr	Asp	Asn									
					225					230					235					240				
Gly	Val	Ile	Cys	Ala	Ser	Glu	Gln	Ser	Ile	Leu	Val	Met	Asn	Ser	Ile									
					245					250					255									
Tyr	Glu	Lys	Val	Lys	Glu	Glu	Phe	Val	Lys	Arg	Gly	Ser	Tyr	Ile	Leu									
					260					265					270									
Asn	Gln	Asn	Glu	Ile	Ala	Lys	Ile	Lys	Glu	Thr	Met	Phe	Lys	Asn	Gly									
					275					280					285									
Ala	Ile	Asn	Ala	Asp	Ile	Val	Gly	Lys	Ser	Ala	Tyr	Ile	Ile	Ala	Lys									
					290					295					300									
Met	Ala	Gly	Ile	Glu	Val	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Ile	Leu	Ile	Gly	Glu									
					305					310					315					320				
Val	Gln	Ser	Val	Glu	Lys	Ser	Glu	Leu	Phe	Ser	His	Glu	Lys	Leu	Ser									

325					330					335						
Pro	Val	Leu	Ala	Met	Tyr	Lys	Val	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	
340					345					350						
Lys	Ala	Gln	Arg	Leu	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Ser	
355					360					365						
Leu	Tyr	Ile	Asp	Ser	Gln	Asn	Asn	Lys	Asp	Lys	Val	Lys	Glu	Phe	Gly	
370					375					380						
Leu	Ala	Met	Lys	Thr	Ser	Arg	Thr	Phe	Ile	Asn	Met	Pro	Ser	Ser	Gln	
385					390					395					400	
Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ala	Ile	Ala	Pro	Ser	Phe	Thr	
405					410					415						
Leu	Gly	Cys	Gly	Thr	Trp	Gly	Gly	Asn	Ser	Val	Ser	Gln	Asn	Val	Glu	
420					425					430						
Pro	Lys	His	Leu	Leu	Asn	Ile	Lys	Ser	Val	Ala	Glu	Arg	Arg	Glu	Asn	
435					440					445						
Met	Leu	Trp	Phe	Lys	Val	Pro	Gln	Lys	Ile	Tyr	Phe	Lys	Tyr	Gly	Cys	
450					455					460						
Leu	Arg	Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp	Met	Asn	Lys	Lys	Arg	Ala	
465					470					475					480	
Phe	Ile	Val	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Gly	Tyr	Val	Asn	Lys	
485					490					495						
Ile	Thr	Lys	Val	Leu	Asp	Glu	Ile	Asp	Ile	Lys	Tyr	Ser	Ile	Phe	Thr	
500					505					510						
Asp	Ile	Lys	Ser	Asp	Pro	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Lys	Lys	Gly	Ala	Lys	
515					520					525						
Glu	Met	Leu	Asn	Phe	Glu	Pro	Asp	Thr	Ile	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	
530					535					540						
Ser	Pro	Met	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Met	His	Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Pro	
545					550					555					560	
Glu	Ala	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Ala	Ile	Asn	Phe	Met	Asp	Ile	Arg	Lys	
565					570					575						

Arg Ile Cys Asn Phe Pro Lys Leu Gly Thr Lys Ala Ile Ser Val Ala
580 585 590

Ile Pro Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ser Glu Ala Thr Pro Phe Ala Val
595 600 605

Ile Thr Asn Asp Glu Thr Gly Met Lys Tyr Pro Leu Thr Ser Tyr Glu
610 615 620

Leu Thr Pro Asn Met Ala Ile Ile Asp Thr Glu Leu Met Leu Asn Met
625 630 635 640

Pro Arg Lys Leu Thr Ala Ala Thr Gly Ile Asp Ala Leu Val His Ala
645 650 655

Ile Glu Ala Tyr Val Ser Val Met Ala Thr Asp Tyr Thr Asp Glu Leu
660 665 670

Ala Leu Arg Ala Ile Lys Met Ile Phe Lys Tyr Leu Pro Arg Ala Tyr
675 680 685

Lys Asn Gly Thr Asn Asp Ile Glu Ala Arg Glu Lys Met Ala His Ala
690 695 700

Ser Asn Ile Ala Gly Met Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly Val Cys
705 710 715 720

His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ala Met His His Val Pro His Gly
725 730 735

Ile Ala Cys Ala Val Leu Ile Glu Glu Val Ile Lys Tyr Asn Ala Thr
740 745 750

Asp Cys Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Pro Gln Tyr Lys Ser Pro Asn
755 760 765

Ala Lys Arg Lys Tyr Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Leu Asn Leu Lys Gly
770 775 780

Thr Ser Asp Thr Glu Lys Val Thr Ala Leu Ile Glu Ala Ile Ser Lys
785 790 795 800

Leu Lys Ile Asp Leu Ser Ile Pro Gln Asn Ile Ser Ala Ala Gly Ile
805 810 815

Asn Lys Lys Asp Phe Tyr Asn Thr Leu Asp Lys Met Ser Glu Leu Ala
820 825 830

Phe Asp Asp Gln Cys Thr Thr Ala Asn Pro Arg Tyr Pro Leu Ile Ser

835 840 845

Glu Leu Lys Asp Ile Tyr Ile Lys Ser Phe

850 855

<210> 20

<211> 339

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ahr

<400> 20

Met Ser Met Ile Lys Ser Tyr Ala Ala Lys Glu Ala Gly Gly Glu Leu

1 5 10 15

Glu Val Tyr Glu Tyr Asp Pro Gly Glu Leu Arg Pro Gln Asp Val Glu

20 25 30

Val Gln Val Asp Tyr Cys Gly Ile Cys His Ser Asp Leu Ser Met Ile

35 40 45

Asp Asn Glu Trp Gly Phe Ser Gln Tyr Pro Leu Val Ala Gly His Glu

50 55 60

Val Ile Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Ser Ala Ala Gln Asp Lys Gly

65 70 75 80

Leu Gln Val Gly Gln Arg Val Gly Ile Gly Trp Thr Ala Arg Ser Cys

85 90 95

Gly His Cys Asp Ala Cys Ile Ser Gly Asn Gln Ile Asn Cys Glu Gln

100 105 110

Gly Ala Val Pro Thr Ile Met Asn Arg Gly Gly Phe Ala Glu Lys Leu

115 120 125

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

130 135 140

Glu Ser Ala Gly Pro Leu Leu Cys Gly Gly Ile Thr Val Phe Lys Pro

145 150 155 160

Leu Leu Met His His Ile Thr Ala Thr Ser Arg Val Gly Val Ile Gly

165 170 175

Ile Gly Gly Leu Gly His Ile Ala Ile Lys Leu Leu His Ala Met Gly

180 185 190
Cys Glu Val Thr Ala Phe Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Gln Glu Val
195 200 205
Leu Ala Met Gly Ala Asp Lys Val Val Asn Ser Arg Asp Pro Gln Ala
210 215 220
Leu Lys Ala Leu Ala Gly Gln Phe Asp Leu Ile Ile Asn Thr Val Asn
225 230 235 240
Val Ser Leu Asp Trp Gln Pro Tyr Phe Glu Ala Leu Thr Tyr Gly Gly
245 250 255

Asn Phe His Thr Val Gly Ala Val Leu Thr Pro Leu Ser Val Pro Ala
260 265 270
Phe Thr Leu Ile Ala Gly Asp Arg Ser Val Ser Gly Ser Ala Thr Gly
275 280 285
Thr Pro Tyr Glu Leu Arg Lys Leu Met Arg Phe Ala Ala Arg Ser Lys
290 295 300
Val Ala Pro Thr Thr Glu Leu Phe Pro Met Ser Lys Ile Asn Asp Ala
305 310 315 320
Ile Gln His Val Arg Asp Gly Lys Ala Arg Tyr Arg Val Val Leu Lys

325 330 335
Ala Asp Phe

<210> 21
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EHT1
<400> 21

Met Ser Glu Val Ser Lys Trp Pro Ala Ile Asn Pro Phe His Trp Gly
1 5 10 15
Tyr Asn Gly Thr Val Ser His Ile Val Gly Glu Asn Gly Ser Ile Lys
20 25 30

Leu His Leu Lys Asp Asn Lys Glu Gln Val Asp Phe Asp Glu Phe Ala

35 40 45

Asn Lys Tyr Val Pro Thr Leu Lys Asn Gly Ala Gln Phe Lys Leu Ser

50 55 60

Pro Tyr Leu Phe Thr Gly Ile Leu Gln Thr Leu Tyr Leu Gly Ala Ala

65 70 75 80

Asp Phe Ser Lys Lys Phe Pro Val Phe Tyr Gly Arg Glu Ile Val Lys

85 90 95

Phe Ser Asp Gly Gly Val Cys Thr Ala Asp Trp Leu Ile Asp Ser Trp

100 105 110

Lys Lys Asp Tyr Glu Phe Asp Gln Ser Thr Thr Ser Phe Asp Lys Lys

115 120 125

Lys Phe Asp Lys Asp Glu Lys Ala Thr His Pro Glu Gly Trp Pro Arg

130 135 140

Leu Gln Pro Arg Thr Arg Tyr Leu Lys Asp Asn Glu Leu Glu Glu Leu

145 150 155 160

Arg Glu Val Asp Leu Pro Leu Val Val Ile Leu His Gly Leu Ala Gly

165 170 175

Gly Ser His Glu Pro Ile Ile Arg Ser Leu Ala Glu Asn Leu Ser Arg

180 185 190

Ser Gly Arg Phe Gln Val Val Val Leu Asn Thr Arg Gly Cys Ala Arg

195 200 205

Ser Lys Ile Thr Thr Arg Asn Leu Phe Thr Ala Tyr His Thr Met Asp

210 215 220

Ile Arg Glu Phe Leu Gln Arg Glu Lys Gln Arg His Pro Asp Arg Lys

225 230 235 240

Leu Tyr Ala Val Gly Cys Ser Phe Gly Ala Thr Met Leu Ala Asn Tyr

245 250 255

Leu Gly Glu Glu Gly Asp Lys Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Thr Leu

260 265 270

Cys Asn Pro Trp Asp Leu Leu Leu Ser Ala Ile Arg Met Ser Gln Asp

275 280 285
 Trp Trp Ser Arg Thr Leu Phe Ser Lys Asn Ile Ala Gln Phe Leu Thr
 290 295 300
 Arg Thr Val Gln Val Asn Met Gly Glu Leu Gly Val Pro Asn Gly Ser
 305 310 315 320
 Leu Pro Asp His Pro Pro Thr Val Lys Asn Pro Ser Phe Tyr Met Phe

 325 330 335
 Thr Pro Glu Asn Leu Ile Lys Ala Lys Ser Phe Lys Ser Thr Arg Glu
 340 345 350
 Phe Asp Glu Val Tyr Thr Ala Pro Ala Leu Gly Phe Pro Asn Ala Met
 355 360 365
 Glu Tyr Tyr Lys Ala Ala Ser Ser Ile Asn Arg Val Asp Thr Ile Arg
 370 375 380
 Val Pro Thr Leu Val Ile Asn Ser Arg Asp Asp Pro Val Val Gly Pro
 385 390 395 400

 Asp Gln Pro Tyr Ser Ile Val Glu Lys Asn Pro Arg Ile Leu Tyr Cys
 405 410 415
 Arg Thr Asp Leu Gly Gly His Leu Ala Tyr Leu Asp Lys Asp Asn Asn
 420 425 430
 Ser Trp Ala Thr Lys Ala Ile Ala Glu Phe Phe Thr Lys Phe Asp Glu
 435 440 445
 Leu Val Val
 450
 <210> 22
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PanK
 <400> 22
 Met Ser Ile Lys Glu Gln Thr Leu Met Thr Pro Tyr Leu Gln Phe Asp

 1 5 10 15
 Arg Asn Gln Trp Ala Ala Leu Arg Asp Ser Val Pro Met Thr Leu Ser

20 25 30
 Glu Asp Glu Ile Ala Arg Leu Lys Gly Ile Asn Glu Asp Leu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Val Ala Glu Ile Tyr Leu Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asn Phe
 50 55 60
 Tyr Ile Ser Ser Asn Leu Arg Arg Gln Ala Val Leu Glu Gln Phe Leu
 65 70 75 80

 Gly Thr Asn Gly Gln Arg Ile Pro Tyr Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser
 85 90 95
 Val Ala Val Gly Lys Ser Thr Thr Ala Arg Val Leu Gln Ala Leu Leu
 100 105 110
 Ser Arg Trp Pro Glu His Arg Arg Val Glu Leu Ile Thr Thr Asp Gly
 115 120 125
 Phe Leu His Pro Asn Gln Val Leu Lys Glu Arg Gly Leu Met Lys Lys
 130 135 140
 Lys Gly Phe Pro Glu Ser Tyr Asp Met His Arg Leu Val Lys Phe Val

 145 150 155 160
 Ser Asp Leu Lys Ser Gly Val Pro Asn Val Thr Ala Pro Val Tyr Ser
 165 170 175
 His Leu Ile Tyr Asp Val Ile Pro Asp Gly Asp Lys Thr Val Val Gln
 180 185 190
 Pro Asp Ile Leu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Val Leu Gln Ser Gly Met
 195 200 205
 Asp Tyr Pro His Asp Pro His His Val Phe Val Ser Asp Phe Val Asp
 210 215 220

 Phe Ser Ile Tyr Val Asp Ala Pro Glu Asp Leu Leu Gln Thr Trp Tyr
 225 230 235 240
 Ile Asn Arg Phe Leu Lys Phe Arg Glu Gly Ala Phe Thr Asp Pro Asp
 245 250 255
 Ser Tyr Phe His Asn Tyr Ala Lys Leu Thr Lys Glu Glu Ala Ile Lys
 260 265 270
 Thr Ala Met Thr Leu Trp Lys Glu Ile Asn Trp Leu Asn Leu Lys Gln

275 280 285
Asn Ile Leu Pro Thr Arg Glu Arg Ala Ser Leu Ile Leu Thr Lys Ser

290 295 300
Ala Asn His Ala Val Glu Glu Val Arg Leu Arg Lys

305 310 315

<210> 23

<211> 652

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acs

<400> 23

Met Ser Gln Ile His Lys His Thr Ile Pro Ala Asn Ile Ala Asp Arg

1 5 10 15

Cys Leu Ile Asn Pro Gln Gln Tyr Glu Ala Met Tyr Gln Gln Ser Ile

20 25 30

Asn Val Pro Asp Thr Phe Trp Gly Glu Gln Gly Lys Ile Leu Asp Trp

35 40 45

Ile Lys Pro Tyr Gln Lys Val Lys Asn Thr Ser Phe Ala Pro Gly Asn

50 55 60

Val Ser Ile Lys Trp Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Asn Leu Ala Ala Asn

65 70 75 80

Cys Leu Asp Arg His Leu Gln Glu Asn Gly Asp Arg Thr Ala Ile Ile

85 90 95

Trp Glu Gly Asp Asp Ala Ser Gln Ser Lys His Ile Ser Tyr Lys Glu

100 105 110

Leu His Arg Asp Val Cys Arg Phe Ala Asn Thr Leu Leu Glu Leu Gly

115 120 125

Ile Lys Lys Gly Asp Val Val Ala Ile Tyr Met Pro Met Val Pro Glu

130 135 140

Ala Ala Val Ala Met Leu Ala Cys Ala Arg Ile Gly Ala Val His Ser

145 150 155 160

Val Ile Phe Gly Gly Phe Ser Pro Glu Ala Val Ala Gly Arg Ile Ile

165 170 175
Asp Ser Asn Ser Arg Leu Val Ile Thr Ser Asp Glu Gly Val Arg Ala

180 185 190
Gly Arg Ser Ile Pro Leu Lys Lys Asn Val Asp Asp Ala Leu Lys Asn

195 200 205
Pro Asn Val Thr Ser Val Glu His Val Val Val Leu Lys Arg Thr Gly

210 215 220
Gly Lys Ile Asp Trp Gln Glu Gly Arg Asp Leu Trp Trp His Asp Leu

225 230 235 240
Val Glu Gln Ala Ser Asp Gln His Gln Ala Glu Glu Met Asn Ala Glu

245 250 255
Asp Pro Leu Phe Ile Leu Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys Pro Lys

260 265 270
Gly Val Leu His Thr Thr Gly Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Ala Leu Thr

275 280 285
Phe Lys Tyr Val Phe Asp Tyr His Pro Gly Asp Ile Tyr Trp Cys Thr

290 295 300
Ala Asp Val Gly Trp Val Thr Gly His Ser Tyr Leu Leu Tyr Gly Pro

305 310 315 320
Leu Ala Cys Gly Ala Thr Thr Leu Met Phe Glu Gly Val Pro Asn Trp

325 330 335
Pro Thr Pro Ala Arg Met Ala Gln Val Val Asp Lys His Gln Val Asn

340 345 350
Ile Leu Tyr Thr Ala Pro Thr Ala Ile Arg Ala Leu Met Ala Glu Gly

355 360 365
Asp Lys Ala Ile Glu Gly Thr Asp Arg Ser Ser Leu Arg Ile Leu Gly

370 375 380
Ser Val Gly Glu Pro Ile Asn Pro Glu Ala Trp Glu Trp Tyr Trp Lys

385 390 395 400
Lys Ile Gly Asn Glu Lys Cys Pro Val Val Asp Thr Trp Trp Gln Thr

405 410 415
Lys Ile Gly Asn Glu Lys Cys Pro Val Val Asp Thr Trp Trp Gln Thr

Glu Thr Gly Gly Phe Met Ile Thr Pro Leu Pro Gly Ala Thr Glu Leu
420 425 430

Lys Ala Gly Ser Ala Thr Arg Pro Phe Phe Gly Val Gln Pro Ala Leu
435 440 445

Val Asp Asn Glu Gly Asn Pro Leu Glu Gly Ala Thr Glu Gly Ser Leu
450 455 460

Val Ile Thr Asp Ser Trp Pro Gly Gln Ala Arg Thr Leu Phe Gly Asp

465 470 475 480

His Glu Arg Phe Glu Gln Thr Tyr Phe Ser Thr Phe Lys Asn Met Tyr
485 490 495

Phe Ser Gly Asp Gly Ala Arg Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ile
500 505 510

Thr Gly Arg Val Asp Asp Val Leu Asn Val Ser Gly His Arg Leu Gly
515 520 525

Thr Ala Glu Ile Glu Ser Ala Leu Val Ala His Pro Lys Ile Ala Glu
530 535 540

Ala Ala Val Val Gly Ile Pro His Asn Ile Lys Gly Gln Ala Ile Tyr
545 550 555 560

Ala Tyr Val Thr Leu Asn His Gly Glu Glu Pro Ser Pro Glu Leu Tyr
565 570 575

Ala Glu Val Arg Asn Trp Val Arg Lys Glu Ile Gly Pro Leu Ala Thr
580 585 590

Pro Asp Val Leu His Trp Thr Asp Ser Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly
595 600 605

Lys Ile Met Arg Arg Ile Leu Arg Lys Ile Ala Ala Gly Asp Thr Ser

610 615 620

Asn Leu Gly Asp Thr Ser Thr Leu Ala Asp Pro Gly Val Val Glu Lys
625 630 635 640

Leu Leu Glu Glu Lys Gln Ala Ile Ala Met Pro Ser
645 650

<210> 24

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtoD

<400> 24

Met Lys Thr Lys Leu Met Thr Leu Gln Asp Ala Thr Gly Phe Phe Arg

1 5 10 15

Asp Gly Met Thr Ile Met Val Gly Gly Phe Met Gly Ile Gly Thr Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Ala Asn Asp Thr Ala Phe Val Asp Thr Gly Ile Gly Pro Leu

50 55 60

Ile Val Asn Gly Arg Val Arg Lys Val Ile Ala Ser His Ile Gly Thr

65 70 75 80

Asn Pro Glu Thr Gly Arg Arg Met Ile Ser Gly Glu Met Asp Val Val

85 90 95

Leu Val Pro Gln Gly Thr Leu Ile Glu Gln Ile Arg Cys Gly Gly Ala

100 105 110

Gly Leu Gly Gly Phe Leu Thr Pro Thr Gly Val Gly Thr Val Val Glu

115 120 125

Glu Gly Lys Gln Thr Leu Thr Leu Asp Gly Lys Thr Trp Leu Leu Glu

130 135 140

Arg Pro Leu Arg Ala Asp Leu Ala Leu Ile Arg Ala His Arg Cys Asp

145 150 155 160

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Tyr Gln Leu Ser Ala Arg Asn Phe Asn Pro

165 170 175

Leu Ile Ala Leu Ala Ala Asp Ile Thr Leu Val Glu Pro Asp Glu Leu

180 185 190

Val Glu Thr Gly Glu Leu Gln Pro Asp His Ile Val Thr Pro Gly Ala

195 200 205

Val Ile Asp His Ile Ile Val Ser Gln Glu Ser Lys

210 215 220

<210> 25

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtoA

<400> 25

Met Asp Ala Lys Gln Arg Ile Ala Arg Arg Val Ala Gln Glu Leu Arg

1 5 10 15

Asp Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ile Gly Leu Pro Thr Met Val Ala

20 25 30

Asn Tyr Leu Pro Glu Gly Ile His Ile Thr Leu Gln Ser Glu Asn Gly

35 40 45

Phe Leu Gly Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Pro Asp Leu Val Asn

50 55 60

Ala Gly Gly Gln Pro Cys Gly Val Leu Pro Gly Ala Ala Met Phe Asp

65 70 75 80

Ser Ala Met Ser Phe Ala Leu Ile Arg Gly Gly His Ile Asp Ala Cys

85 90 95

Val Leu Gly Gly Leu Gln Val Asp Glu Glu Ala Asn Leu Ala Asn Trp

100 105 110

Val Val Pro Gly Lys Met Val Pro Gly Met Gly Gly Ala Met Asp Leu

115 120 125

Val Thr Gly Ser Arg Lys Val Ile Ile Ala Met Glu His Cys Ala Lys

130 135 140

Asp Gly Ser Ala Lys Ile Leu Arg Arg Cys Thr Met Pro Leu Thr Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Asp Gly Lys Met Trp Leu Thr Glu Ile Ala Asp Gly Cys Asp Leu

180 185 190

Ala Thr Val Arg Ala Lys Thr Glu Ala Arg Phe Glu Val Ala Ala Asp

195 200 205

 Leu Asn Thr Gln Arg Gly Asp Leu
 210 215
 <210> 26
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LasI
 <400> 26
 Met Ile Val Gln Ile Gly Arg Arg Glu Glu Phe Asp Lys Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Met His Lys Leu Arg Ala Gln Val Phe Lys Glu Arg Lys Gly
 20 25 30
 Trp Asp Val Ser Val Ile Asp Glu Met Glu Ile Asp Gly Tyr Asp Ala
 35 40 45

 Leu Ser Pro Tyr Tyr Met Leu Ile Gln Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gln
 50 55 60
 Val Phe Gly Cys Trp Arg Ile Leu Asp Thr Thr Gly Pro Tyr Met Leu
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Phe Pro Glu Leu Leu His Gly Lys Glu Ala Pro Cys Ser
 85 90 95
 Pro His Ile Trp Glu Leu Ser Arg Phe Ala Ile Asn Ser Gly Gln Lys
 100 105 110
 Gly Ser Leu Gly Phe Ser Asp Cys Thr Leu Glu Ala Met Arg Ala Leu

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

180 185 190

Leu Val Glu Gln Arg Leu Ala Val Ser

195 200

<210> 27

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mtn

<400> 27

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

1 5 10 15

Arg Asp Lys Ile Glu Asn Arg Gln Thr Ile Ser Leu Gly Gly Cys Glu

20 25 30

Ile Tyr Thr Gly Gln Leu Asn Gly Thr Glu Val Ala Leu Leu Lys Ser

35 40 45

Gly Ile Gly Lys Val Ala Ala Ala Leu Gly Ala Thr Leu Leu Leu Glu

50 55 60

His Cys Lys Pro Asp Val Ile Ile Asn Thr Gly Ser Ala Gly Gly Leu

65 70 75 80

Ala Pro Thr Leu Lys Val Gly Asp Ile Val Val Ser Asp Glu Ala Arg

85 90 95

Tyr His Asp Ala Asp Val Thr Ala Phe Gly Tyr Glu Tyr Gly Gln Leu

100 105 110

Pro Gly Cys Pro Ala Gly Phe Lys Ala Asp Asp Lys Leu Ile Ala Ala

115 120 125

Ala Glu Ala Cys Ile Ala Glu Leu Asn Leu Asn Ala Val Arg Gly Leu

130 135 140

Ile Val Ser Gly Asp Ala Phe Ile Asn Gly Ser Val Gly Leu Ala Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ile Ala His Val Cys His Asn Phe Asn Val Pro Phe Val Val Val

180 185 190

Arg Ala Ile Ser Asp Val Ala Asp Gln Gln Ser His Leu Ser Phe Asp

195 200 205

Glu Phe Leu Ala Val Ala Ala Lys Gln Ser Ser Leu Met Val Glu Ser

210 215 220

Leu Val Gln Lys Leu Ala His Gly

225 230

<210> 28

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LuxS

<400> 28

Met Pro Leu Leu Asp Ser Phe Thr Val Asp His Thr Arg Met Glu Ala

1 5 10 15

Pro Ala Val Arg Val Ala Lys Thr Met Asn Thr Pro His Gly Asp Ala

20 25 30

Ile Thr Val Phe Asp Leu Arg Phe Cys Val Pro Asn Lys Glu Val Met

35 40 45

Pro Glu Arg Gly Ile His Thr Leu Glu His Leu Phe Ala Gly Phe Met

50 55 60

Arg Asn His Leu Asn Gly Asn Gly Val Glu Ile Ile Asp Ile Ser Pro

65 70 75 80

Met Gly Cys Arg Thr Gly Phe Tyr Met Ser Leu Ile Gly Thr Pro Asp

85 90 95

Glu Gln Arg Val Ala Asp Ala Trp Lys Ala Ala Met Glu Asp Val Leu

100 105 110

Lys Val Gln Asp Gln Asn Gln Ile Pro Glu Leu Asn Val Tyr Gln Cys

115 120 125

Gly Thr Tyr Gln Met His Ser Leu Gln Glu Ala Gln Asp Ile Ala Arg

130 135 140

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

145	150	155	160
Leu Pro Lys Glu Lys Leu Gln Glu Leu His Ile			
	165	170	
<210>	29		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	linker, EAAAK		
<400>	29		
gaagctgctg ctaaa			15
<210>	30		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	linker, GGGGS		
<400>	30		
ggtggtggtg gttct			15
<210>	31		
<211>	720		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	gfp		
<400>	31		
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac			60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac			120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc			180
ctcgtgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag			240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc			300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg			360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac			420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac			480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc			540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggcccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720
 720

<210> 32
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ldh
 <400> 32

atgactgcaa ctaaacaaca caaaaaagtc atcctcgttg gtgacggtgc cgtaggttca 60
 tcttacgctt tcgcacttgt aaaccaaggt atcgctcaag aacttggtat catcgaaatt 120
 ccacaattgt tcgaaaaagc tgttggtgat gcgcttgacc ttagccacgc gcttgctttc 180
 acttcaccta aaaaaatcta cgcagctaaa tacgaagact gtgcggatgc tgaccttgta 240
 gtatcactg ctggtgctcc acaaaaacca ggtgaaactc gtcttgatct tgttggtaaa 300
 aaccttgcta tcaacaaatc tatcgttact caagttgttg aatcaggctt caatggaatc 360

ttcctttag tagcctaacce agttgacgta ttgacttact caacatggaa attctcagga 420
 ttccctaag aacgcgttat cggttcaggt acttcacttg actcagctcg tttccgtcaa 480
 gcacttgctg aaaaacttgg cgttgatgct cgttcagttc acgcctacat catgggtgaa 540
 cacggtgact cagaatttgc cgtttggtca cagcctaaca tcgccggtgt aaaccttgaa 600
 gaattcctta aagacactca aaacgttcaa gaatctgaat tggttgaatt gttcgaaggt 660
 gttcgtgatg ccgcttacac aatcatcaac aaaaaagggt ctacttacta tggtatcgcc 720
 gttgcccttg ctcgatcac taaagctatt cttgacgatg aaaatgcagt acttcattg 780

tctgtattcc aagaaggta atatggtgta agcaacgtct ttatcggta acctgcaatc 840
 gtaggtgcac acggtatcgt acgtccagtt aacatcccat tgaacgatgc tgaacaacaa 900
 aaaatgaaag ctctgctga cgaattgcaa gctatcattg atgaagcatg gaaaaaccct 960
 gaattccaag aagcttcaaa aaactaa 987

<210> 33
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pdc

<400> 33

atgagttata ctgtcggtag ctatttagcg gagcggcttg tccagattgg tctcaagcat	60
catttcgcag tcgcgggcga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct ttggaacaaa	120
aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaactgcg gtttcagtgc agaaggttat	180
gctcgtgcc aaggcgagc agcagccgtc gttacctaca gcgttggtgc gctttccgca	240
tttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttcggg ttatcctgat ctccggtgct	300
ccgaacaaca acgaccagc tgctgggtcat gtgttgcatc atgctcttgg caaaaccgac	360
tatcactatc agttggaat ggccaagaac atcacggcgc cgcctgaagc gatttacacc	420
ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgatcaaaa ctgctcttcg cgagaagaag	480
ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacact gcttccatgc cctgcgccgc tctggaccg	540
gcaagtgcac tgttcaatga cgaagccagc gacgaagcat ccttgaatgc agcggttgac	600
gaaacctga aattcatgc caaccgcgac aaagtgtccg tcctcgtcgg cagcaagctg	660
cgcgctgctg gtgctgaaga agctgctgtt aaattcaccg acgctttggg cgggtgcagtg	720
gctactatgg ctgctgccaa gagcttcttc ccagaagaaa atgccaatta cattggtacc	780
tcatggggcg aagtcagcta tccgggcgtt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcggtt	840
atcgtcttgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tatccctgat	900
cctaagaaac tggttctcgc tgaaccgcgt tctgtcgttg tcaacggcat tcgcttcccc	960
agcgttcac tgaagacta tctgacctg ttggctcaga aagtttcaa gaaaaccggt	1020
tctttggact tcttcaaat cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggtgat	1080
ccgagtgtc cggttggtcaa cgcagaaatc gcccgtcagg tcgaagctct tctgacctcg	1140
aacacgacgg ttattgtcga aaccggtgac tcttggttca atgctcagcg catgaagctc	1200
ccgaacggtg ctgcggtga atatgaaatg cagtggggtc acattggttg gtccgttctt	1260
gccgccttcg gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgca acatcctcat ggttggtgat	1320
ggttccttcc agctgacggc tcaggaagtt gctcagatgg ttgcctgaa actgccggtt	1380
atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg	1440
tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaacggt	1500
ggttatgaca gcggtgtcgc taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa	1560
gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggcccaaccc tgatcgaatg cttcatcggt	1620
cgtgaagact gcaactgaaga attggtcaaa tggggtaagc gcgttgctgc cgccaacagc	1680
cgtaagcctg ttaacaagct cctctag	1707

<210> 34

<211> 1023

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> adhA

<400> 34

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaagaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttcagc aggtgattat ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga actgatgtaa gctcgcttca agttggtgat	240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tttggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatatt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaatt	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaat ttagcaatt	540
caatatgcta aaaaatgttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa	600
ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgattatca attctggtga tgtaaatcca	660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggagcac aaagtgcaat agtttgtgct	720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaatgggt	780
gctgtggcac ttccaatcac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga	840
gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt	900
ggagcagagg gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat	960
attattgatg aaatgaaggc aggaataaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa	1020
taa	1023

<210> 35

<211> 2577

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> adhE2

<400> 35

atgaaagtta caaatcaaaa agaactaaaa caaaagctaa atgaattgag agaagcgcaa	60
aagaagtttg caacctatac tcaagagcaa gttgataaaa tttttaaca atgtgccata	120

gccgcagcta aagaaagaat aaacttagct aaattagcag tagaagaaac aggaataggt	180
cttgtagaag ataaaattat aaaaaatcat ttgcagcag aatatatata caataaatat	240
aaaaatgaaa aaacttgttg cataatagac catgacgatt ctttaggcat aacaaagggt	300
gtcgaaccaa ttggaattgt tgcagccata gtctacta ctaatccaac ttccacagca	360
attttcaaat cattaatctt tttaaaaaca agaaacgcaa tattcttttc accacatcca	420
cgtgcaaaaa aatctacaat tgctgcagca aaattaattt tagatgcagc tgttaaagca	480
ggagcaccta aaaatataat aggcctggata gatgagccat caatagaact ttctcaagat	540
ttgatgagtg aagctgatat aatattagca acaggaggct cttcaatggt taaagcggcc	600
tattcatctg gaaaacctgc aattgggtgt ggagcaggaa atacaccagc aataatagat	660
gagagtgcag atatagatat ggcagtaagc tcataattt tatcaaagac ttatgacaat	720
ggagtaatat gcgcttctga acaatcaata ttagttatga attcaatata cgaaaaaggt	780
aaagaggaat ttgtaaaacg aggatcatat atactcaatc aaaatgaaat agctaaaata	840
aaagaaacta tgtttaaaaa tggagctatt aatgctgaca tagttggaaa atctgcttat	900
ataattgcta aaatggcagg aattgaagtt cctcaaaact caaagatact tataggcgaa	960
gtacaatctg ttgaaaaag cgagctgttc tcacatgaaa aactatcacc agtacttgca	1020
atgtataaag ttaaggattt tgatgaagct ctaaaaagg cacaaggct aatagaatta	1080
ggtggaagtg gacacacgtc atctttatat atagattcac aaaacaataa ggataaagtt	1140
aaagaatttg gattagcaat gaaaacttca aggacattta ttaacatgcc ttcttcacag	1200
ggagcaagcg gagatttata caattttgcg atagcaccat catttactct tggatgcggc	1260
acttggggag gaaactctgt atcgcaaaat gtagagccta aacattttatt aaatattaaa	1320
agtgttgctg aaagaaggga aaatatgctt tggtttaaag tgccacaaaa aatatatttt	1380
aaatatggat gtcttagatt tgcattaaaa gaattaaaag atatgaataa gaaaagagcc	1440
tttatagtaa cagataaaga tctttttaaa ctgggatatg ttaataaaat aacaaaggta	1500
ctagatgaga tagatattaa atacagtata ttacagata ttaaatctga tccaactatt	1560
gattcagtaa aaaaagggtc taaagaaatg cttactttg aacctgatac tataatctct	1620
attggtgggt gatcgccaat ggatgcagca aaggttatgc acttggtata tgaatatcca	1680
gaagcagaaa ttgaaaatct agctataaac ttatggata taagaaagag aatatgcaat	1740
ttccctaaat taggtacaaa ggcgatttca gtagctattc ctacaactgc tggtagcggt	1800
tcagaggcaa caccttttgc agttataact aatgatgaaa caggaatgaa ataccttta	1860
acttcttatg aattgacccc aaacatggca ataatagata ctgaattaat gttaaatatg	1920
cctagaaaat taacagcagc aactggaata gatgcattag ttcatgctat agaagcatat	1980

gtttcggtta tggctacgga ttatactgat gaattagcct taagagcaat aaaaatgata 2040
 tttaaattatt tgcctagagc ctataaaaat gggactaacg acattgaagc aagagaaaaa 2100
 atggcacatg cctctaatat tgcggggatg gcatttgcaa atgctttctt aggtgtatgc 2160

cattcaatgg ctataaaact tggggcaatg catcacgttc cacatggaat tgcttgtgct 2220
 gtattaatag aagaagttat taaatataac gctacagact gtccaacaaa gcaaacagca 2280
 ttccctcaat ataaatctcc taatgctaag agaaaatatg ctgaaattgc agagtatttg 2340
 aatttaaagg gtactagcga taccgaaaag gtaacagcct taatagaagc tatttcaaag 2400
 ttaaagatag atttgagtat tccacaaaat ataagtgccg ctggaataaa taaaaaagat 2460
 ttttataata cgctagataa aatgtcagag cttgcttttg atgaccaatg tacaacagct 2520
 aatcctaggt atccacttat aagtgaactt aaggatatct atataaaatc attttaa 2577

<210> 36
 <211> 1020
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ahr
 <400> 36

atgtcgtatga taaaaagcta tgccgcaaaa gaagcgggcg gcgaactgga agtttatgag 60
 tacgatcccc gtgagctgag gccacaagat gttgaagtgc aggtggatta ctgcgggcatc 120
 tgccattccg atctgtcgat gatcgataac gaatggggat tttcacaata tccgctgggt 180
 gccgggcatg aggtgattgg gcgcgtgggtg gcactcggga gcgccgcgca ggataaaggt 240
 ttgcaggctg gtacgcgtgt ggggattggc tggacggcgc gtactgttgg tcaactgcgac 300
 gcctgtatta gcggtaatca gatcaactgc gagcaagggt cggtgccgac gattatgaat 360

gcgggtggct ttcccgagaa gttgcgtgcg gactggcaat gggtgattcc actgccagaa 420
 aatattgata tcgagtcgcg cgggccgctg ttgtgcggcg gtatcacggt ctttaaacca 480
 ctgttgatgc accatatcac tgctaccagc cgcgttgggg taattggtat tggcgggctg 540
 gggcatatcg ctataaaact tctgcacgca atgggatgcg aggtgacagc ctttagttct 600
 aatccggcga aagagcagga agtgcctggc atgggtgccg ataaagtgtt gaatagccgc 660
 gatccgcagg cactgaaagc actggcgggg cagtttgatc tcattatcaa caccgtcaac 720
 gtcagcctcg actggcagcc ctattttgag gcgctgacct atggcggtaa tttccatacg 780

gtcgggtcgg ttctcacgcc gctgtctgtt ccggccttta cgtaattgc gggcgatcgc 840
 agcgtctctg gtctctctac cggcacgcct tatgagctgc gtaagctgat gcgttttgcc 900

gccccgagca aggttgcgcc gaccaccgaa ctgttcccga tgtcgaaaat taacgacgcc	960
atccagcatg tgcgcgacgg taaggcgcgt taccgcgtgg tgttgaaagc cgatttttga	1020
	1020
<210> 37	
<211> 1356	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> EHT1	
<400> 37	
atgtcagaag tticcaaag gccagcaatc aaccattcc attggggata caatggtaca	60
gtttcgcata ttgtcggatg aaatggttcc attaaactcc atttaaaaga caacaaggag	120
caagttgatt ttgacgagtt cgctaacaaa tatgtcccaa cgttgaagaa tgggtgccaa	180
ttcaaattga gtccttactt gttcacaggt attttgcaaa ctttgtactt aggtgctgct	240
gatttctcta agaaatttcc tgtattctac ggccaggaaa ttgtcaaatt ctcgcatggt	300
ggagtttgca ccgtgactg gctcatagat tcatggaaaa aggattatga attcgatcaa	360
agtactacga gctttgataa aaaaaattt gataaagacg agaaggcgac acatccagaa	420
ggatggcctc gtttacaacc acgtacaagg tacctgaaag ataatgagtt ggaagaacta	480
cgaggaggttg atctaccct agtagttatt ctacatggtc ttgctgggtg tagtcatgag	540
ccgattataa gatctcttgc tgaaaacctg tctcgcagtg ggagatttca agtggtcgtc	600
ctaaatacca gaggttgtgc acgttccaaa attaccacca gaaatttatt tacagcttat	660
cacacaatgg atattcgca gtttttgca agagaaaagc aaagacatcc agatagaaaa	720
ctatacgtg tgggatgctc ttttggtgct acgatgctgg caaactatct gggagaagag	780
ggcgataaat cacctttatc cgcagctgct acttttgca atccttgga tcttctcctt	840
tcagcaatta ggatgagcca ggattgggtg tcaagaactt tattttcaa aaatattgcg	900
caattcttaa caagaacctg tcaggttaat atgggtgaat taggagttcc aaatggctct	960
ctccccgac atctccac agtcaagaat ccattttct atatgttcac gcctgaaaat	1020
ctaataaagg caaagagctt taaatcgacc cggaatttg atgaagtga cactgcgcct	1080
gctttaggct tcccaaagc tatggagtat tataaagcgg ccagctcaat aaacagagtt	1140
gatacaattc gggttcctac ccttgttatc aattccagg atgacctgt tgtcgccca	1200
gatcaacct actcaatcgt ggaaaagaat cctcgtatct tgtattgtag aaccgattta	1260
ggtggtcatt tagcttacct agataaagac aacaactcgt gggctacaa ggcaattgca	1320

gaattttttca ctaagtttga tgaattagtc gtatga 1356

<210> 38

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> panK

<400> 38

atgagtataa aagagcaaac gttaatgacg ccttacctac agtttgaccg caaccagtgg 60

gcagctctgc gtgattccgt acctatgacg ttatcggaag atgagatcgc ccgtctcaaa 120

ggtattaatg aagatctctc gttagaagaa gttgccgaga tctatttacc ttgtgcacgt 180

ttgctgaact tctatataag ctggaatctg cgccgtcagg cagttctgga acagtttctt 240

ggtaccaacg ggcaacgcat tccttacatt atcagtattg ctggcagtggt cgcggtgggg 300

aaaagtacaa ccgcccgtgt attgcaggcg ctattaagcc gttggccgga acatcgtcgt 360

gttgaactga tcactacaga tggcttctct caccctaate aggttctgaa agaactgggt 420

ctgatgaaga agaaaggctt cccggaatcg tatgatatgc atcgcttggt gaagtttggt 480

tccgatctca aatccggcgt gccaaacgtt acagcacctg ttactcaca tcttatttat 540

gatgtgatcc cggatggaga taaaacggtt gttcagcctg atattttaat tcttgaaggg 600

ttaaagtgtc tacagagcgg gatggattat ccacacgac cacaatcatgt atttgtttct 660

gattttgtcg atttttcgat atatgttgat gcaccggaag acttacttca gacatggtat 720

atcaaccgtt ttctgaaatt ccgcgaaggg gcttttaccg acccggtatc ctattttcat 780

aactacgcga aattaactaa agaagaagcg attaagactg ccatgacatt gtggaaagag 840

atcaactggc tgaacttaaa gcaaaatatt ctacctactc gtgagcgcgc cagtttaatc 900

ctgacgaaaa gtgctaatac tgcggtagaa gaggtcagac tacgcaaata a 951

<210> 39

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> acs

<400> 39

atgagccaaa ttcacaaaca caccattcct gccaacatcg cagaccgttg cctgataaac 60

cctcagcagt acgaggcgat gtatcaacaa tctattaacg tacctgatac cttctggggc 120

gaacagggaa aaattcttga ctggatcaaa ccttaccaga aggtgaaaaa cacctccttt 180

gcccccggtat atgtgtccat taaatggtac gaggacggca cgctgaatct ggccggcaaac 240
 tgccttgacc gccatctgca agaaaacggc gatcgtaccg ccatcatctg ggaaggcgac 300
 gacgccagcc agagcaaaca tatcagctat aaagagctgc accgcgacgt ctgccgcttc 360
 gccaataccg tgctcgagct gggcattaaa aaaggtgatg tggtagcgat ttatatgccg 420
 atggtgccgg aagcccggtg tgcgatgctg gcctgcgccc gcattggcgc ggtgcattcg 480
 gtgattttcg gcggctttct gccggaagcc gttgccgggc gcattattga ttccaactca 540

 cgactggtga tcacttcga cgaagggtg cgtgccgggc gcaglattcc gctgaagaaa 600
 aacgttgatg acgcgctgaa aaacccgaac gtcaccagcg tagagcatgt ggtggtactg 660
 aagcgtactg gcgggaaaaat tgactggcag gaaggcgcg accgtgggtg gcacgacctg 720
 gttgagcaag cgagcgatca gcaccaggcg gaagagatga acgccgaaga tccgctgttt 780
 attctctaca cctccggttc taccggtgaa ccaaaagggtg tgctgcatac taccggcggt 840
 tatctggtgt acgcggcgct gacctttaaa tatgtctttg attatcatcc ggggtgatatc 900
 tactggtgca ccgccgatgt gggctgggtg accggacaca gttacttgct gtacggccccg 960

 ctggcctgcg gtgcgaccac gctgatgttt gaaggcgctac ccaactggcc gacgcctgcc 1020
 cgtatggcgc aggtgggtga caagcatcag gtcaatatc tctataccgc acccagggcg 1080
 atccgcgcgc tgatggcgga aggcgataaa gcgatcgaag gcaccgaccg ttcgtcgctg 1140
 cgcatctctg gttccgtggg cgagccaatt aaccgggaag cgtgggagtg gtactggaaa 1200
 aaaatcgga acgagaaatg tccggtgggt gatacctggt ggacagaccg aaccggcggt 1260
 ttcatgatca ccccgtgcc tggcgctacc gagctgaaag ccggttcggc aacacgtccg 1320
 ttcttcggcg tgcaaccggc gctggctgat aacgaaggta acccgctgga gggggccacc 1380

 gaaggtagcc tggtaatcac cgactcctgg ccgggtcagg cgcgtacgt gtttgcgat 1440
 cacgaacgtt ttgaacagac ctacttctcc accttcaaaa atatgtatct cagcgcgac 1500
 ggcgcgctc gcgatgaaga tggctattac tggataaccg ggctgttgga cgacgtgctg 1560
 aacgtctccg gtcaccgtc ggggacggca gagattgagt cggcgctggt ggcgcatccg 1620
 aagattgccg aagccgccgt agtaggtatt ccgcacaata ttaaaggta ggcatctac 1680
 gcctacgtca cgcttaatca cggggaggaa ccgtcaccag aactgtacgc agaagtcgc 1740
 aactgggtgc gtaaagagat tggcccgtg gcgacgccag acgtgctgca ctggaccgac 1800

 tccctgccta aaacccgctc cggcaaaatt atgcgccgta ttctgcgca aattgcggcg 1860
 ggcgatacca gcaacctggg cgatacctcg acgttgccg atcctggcgt agtcgagaag 1920
 ctgcttgaag agaagcaggc tatcgcatg ccacgtaa 1959

<210> 40

<211> 663
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> atod
 <400> 40

atgaaaacaa aattgatgac attacaagac gccaccggct tctttcgtga cggcatgacc 60
 atcatggtgg gcggatttat ggggattggc actccatccc gccitggttga agcattactg 120
 gaatctggtg ttcgcgacct gacattgata gccaatgata ccgcgtttgt tgataccggc 180

atcgggtccgc tcatcgtaaa tggctcgagtc cgcaaagtga ttgcttcaca tatcggcacc 240
 aaccgggaaa caggctggcg catgatattt ggtgagatgg acgtcgttct ggtgccgcaa 300
 ggtacgctaa tcgagcaaat tcgctgtggt ggagctggac ttggtggttt tctcacccca 360
 acgggtgtcg gcaccgtcgt agaggaaggc aaacagacac tgacactcga cggtaaaacc 420
 tggctgctcg aacgcccact gcgcgccgac ctggcgctaa ttcgcgctca tcgttgcgac 480
 aacttggca acctgacct tcaacttagc gcccgcaact ttaacccctt gatagccctt 540
 gcggctgata tcacgtggtt agagccagat gaactggtcg aaaccggcga gctgcaacct 600

gaccatattg tcacccctgg tgccgttatt gaccacatca tcgtttcaca ggagagcaaa 660
 taa 663

<210> 41
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> atoA
 <400> 41

atggatgcga aacaacgtat tgcgcgccgt gtggcgcaag agcttcgtga tggtagacatc 60
 gttaacttag ggatcggttt acccacaatg gtcgccaatt attaccgga gggatttcat 120
 atcactctgc aatcggaata cggtcttcctc ggtttaggcc cggtcacgac agcgcatcca 180
 gatctggtga acgtggcgg gcaaccgtgc ggtgttttac ccggtgcagc catgtttgat 240

agcgccatgt catttgcgtt aatccgtggc ggtcatattg atgcctgcgt gctcggcggc 300
 ttgcaagtag acgaagaagc aaacctcgcg aactgggtag tgcctgggaa aatggtgccc 360
 ggtatgggtg gcgcgatgga tctggtgacc gggtcgcgca aagtatcat cgccatggaa 420
 cattgcgcca aagatgggtc agcaaaaatt ttgcgccgt gcaccatgcc actcactgcg 480
 caacatgcgg tgcatatgct ggttactgaa ctggctgtct ttcgttttat tgacggcaaa 540

atgtggctca ccgaaattgc cgacgggtgt gatttagcca ccgtgcgtgc caaaacagaa 600
gctcggtttg aagtcgccgc cgatctgaat acgcaacggg gtgatttatg a 651

<210> 42
<211> 606
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> lasI
<400> 42

atgatcggtc agatcggtcg tctgaagaa ttgataaaa aactgctggg tgaaatgcac 60
aaactgcgtg cgcaggtttt caaagaacgt aaaggttggg atgtttctgt tattgatgaa 120
atggaattg atggttatga tgctctgagc ccgtattata tgctgatcca ggaagatacc 180
ccggaagcgc aggttttcgg ttgctggcgt atcctggata ccaccggccc gtacatgctg 240
aaaaacacct tcccgaact gctgcacggt aaagaagcgc cgtgcagccc gcacatctgg 300
gaactgtctc gtttcgcaat caactctggt cagaaagggt ctctgggttt cagcgattgt 360

accctggaag cgatgcgtgc tctggcgcgt tatagcctgc agaacgatat tcagaccctg 420
gttaccgtta ccaccgttgg tgttgaaaaa atgatgatcc gtgcgggcct ggatgtttct 480
cgtttcggtc cgcacttgaa aatcggtatt gaacgtgctg ttgcgctgcg tattgaactg 540
aacgcgaaaa ccagatcgc gctgtacggt ggtgttctgg ttgaacagcg tctggcggtt 600
agctaa 606

<210> 43
<211> 699
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mtn
<400> 43

atgaaaatcg gcatcattgg tgcaatggaa gaagaagtta cgctgctgcg tgacaaaatc 60

gaaaaccgtc aaactatcag tctcggcggg tgcgaaatct ataccggcca actgaatgga 120
accgaggttg cgtttctgaa atcgggcacg ggtaaagtcg ctgcggcgct ggggtgccact 180
ttgctgttgg aacactgcaa gccagatgtg attattaaca ccggttctgc cgggtggcctg 240
gcaccaacgt tgaaagtggg cgatatcgtt gtctcggacg aagcacgtta tcacgacgcg 300
gatgtcacgg catttggtta tgaatacggt cagttaccag gctgtccggc aggctttaaa 360
gctgacgata aactgatcgc tgccgctgag gcctgcattg ccgaactgaa tcttaacgct 420

gtacgtggcc tgattgttag cggcgacgct ttcataacg gttctgttgg tctggcgaaa	480
atccgccaca acttcccaca ggccattgct gtagagatgg aagcgacggc aatcgcccat	540
gtctgccaca atttcaacgt cccgtttgtt gtcgtacgcg ccatctccga cgtggccgat	600
caacagtctc atcttagctt cgatgagttc ctggctgttg ccgctaaaca gtccagcctg	660
atggttgagt cactggtgca gaaacttgca catggctaa	699
<210> 44	
<211> 516	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> luxS	
<400> 44	
atgccgttgt tagatagctt cacagtcgat catacccgga tggaaagcgc tgcagttcgg	60
gtggcgaaaa caatgaacac cccgcatggc gacgcaatca ccgtgttcga tctgcgttc	120
tgcgtgccga acaaagaagt gatgccagaa agagggatcc ataccctgga gcacctgttt	180
gctgggttta tgcgtaacca tcttaacggt aatggtgtag agattatcga tatctcgcca	240
atgggctgcc gcaccggttt ttatatgagt ctgattggtg cgccagatga gcagcgtgtt	300
gctgatgcct ggaaagcggc aatggaagac gtgctgaaag tgcaggatca gaatcagatc	360
ccggaactga acgtctacca gtgtggcact taccagatgc actcgttgca ggaagcgag	420
gatattgcgc gtagcattct ggaacgtgac gtacgcatca acagcaacga agaactggca	480
ctgccgaaag agaagttgca ggaactgcac atctag	516