(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0089897
(43) 공개일자 2021년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0003024
(22) 출원일자 2020년01월09일
심사청구일자 2020년01월09일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김예은
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

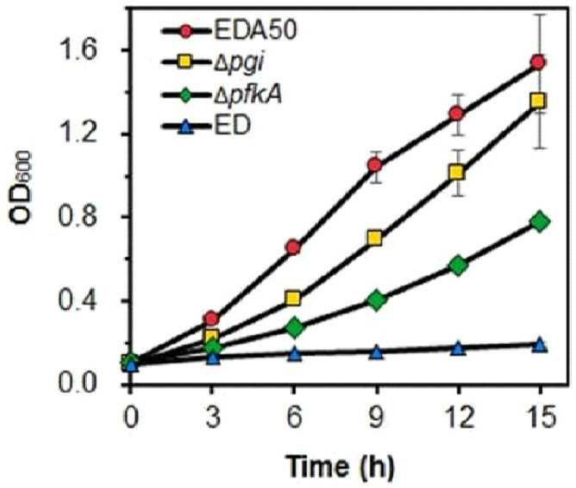
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **엠덴-마이어호프-파르나스 경로가 불활성화된 형질전환 대장균 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 엠덴-마이어호프-파르나스 경로가 불활성화된 형질전환 대장균 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형질전환된 대장균은 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 상태에서 *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며, *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된 것으로서, 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 우수한 성장율을 나타내며, 상기 형질전환된 대장균을 성장시킨 후, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 과발현시킬 경우, 히드록시높은 NADPH를 요구하는 3-히드록시프로피온산 또는 라이코펜의 생산 수율을 높일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 형질전환된 대장균은 글루코스로부터 3-히드록시프로피온산 또는 라이코펜을 고수율로 생산하는 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/1022 (2013.01)
C12P 5/026 (2013.01)
C12P 7/42 (2013.01)
C12Y 202/01002 (2013.01)

(72) 발명자
김창희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
조경현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
유영신
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
최은미
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711086620
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	순환형 PPP와 활성화된 EDP를 가진 대장균 제작과 3HP 생산 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 85번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 CRP 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 85번째 아미노산이 세린(serine, S)으로 치환된 것인, CRP 변이체.

청구항 3

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열 중 247번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 transaldolase B 변이체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 247번째 아미노산이 발린(valine, V)으로 치환된 것인, transaldolase B 변이체.

청구항 5

i) *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실되고,

ii) *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며,

iii) *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된, 형질전환 대장균.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 *gntR* 유전자 돌연변이는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 중 422번째 염기인 사이토신(cytosine)이 아데닌(adenine)으로 치환된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 *galR* 유전자 돌연변이는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열 중 812번째 염기인 구아닌(guanin)이 아데닌(adenine)으로 치환된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 형질전환 대장균은 *ugd-gnd-wbbl-2*, *ptsG*, *crp*, *talB* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자가 추가적으로 돌연변이된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 *ugd-gnd-wbbl-2* 유전자 돌연변이는 *ugd-gnd-wbbl-2* 유전자가 결실된 것인, 형질전환 대장균

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 *ptsG* 유전자 돌연변이는 *ptsG* 유전자가 결실되거나, 외래 유전자가 삽입된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 외래 유전자가 삽입된 ptsG 유전자 돌연변이는 서열번호 14로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 형질전환 대장균.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 *crp* 유전자 돌연변이는 서열번호 9로 표시되는 염기서열 중 253번째 염기인 구아닌(guanin)이 티민(thymine)으로 치환된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 *talB* 유전자 돌연변이는 서열번호 11으로 표시되는 염기서열 중 740번째 염기인 사이토신(cytosine)이 티민(thymine)으로 치환된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 14

제5항의 형질전환 대장균에 accDABC 유전자 및 mcrC 및 mcrN 유전자가 도입된, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 형질전환 대장균.

청구항 15

i) 제5항의 형질전환 대장균에 accDABC 유전자를 포함하는 발현벡터, mcrC 및 mcrN 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계;

ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계;

iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및

iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 3-히드록시프로피온산의 생산방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 배양은 글루코스 존재 하에 형질전환 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것인, 3-히드록시프로피온산의 생산방법.

청구항 17

제5항의 형질전환 대장균에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 형질전환 대장균.

청구항 18

i) 제5항의 형질전환 대장균에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계;

ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계;

iii) IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및

iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는, 라이코펜의 생산방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 라이코펜의 생산방법은 i) 단계에서 *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인, 라이코펜의 생산방법.

청구항 20

i) 야생형 대장균의 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 결실시키는 단계; 및

ii) 상기 대장균을 글루코스 최소 배지에서 적어도 30회 이상 계대배양하는 단계를 포함하는, 야생형 대장균으로부터 엠덴-마이어호프-파르나스 경로(embden-meyerhof-parnas pathway)가 불활성화되고, 글루코스를 이용할 수 있는 진화된 대장균 균주를 제조하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 글루코스 최소 배지가 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 5 g/L 글루코스가 첨가된 M9 최소 배지인 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

청구항 22

제20항의 방법으로 제조된, 진화된 대장균 균주.

청구항 23

제22항의 진화된 대장균 균주에 accDABC 유전자 및 mcrC 및 mcrN 유전자가 도입된, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 형질전환 대장균.

청구항 24

i) 제22항의 진화된 대장균 균주에 accDABC 유전자를 포함하는 발현벡터, mcrC 및 mcrN 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계;

ii) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계;

iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; 및

iv) 상기 형질전환된 대장균으로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 3-히드록시프로피온산의 생산방법.

청구항 25

제22항의 진화된 대장균 균주에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 형질전환 대장균.

청구항 26

i) 제22항의 진화된 대장균 균주에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계;

ii) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계;

iii) IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; 및

iv) 상기 형질전환된 대장균으로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는, 라이코펜의 생산방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 라이코펜의 생산방법은 i) 단계에서 *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인, 라이코펜의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엠덴-마이어호프-파르나스 경로가 불활성화된 형질전환 대장균 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 플라스틱은 강하고 가볍고 쉽게 분해되지 않아 산업용 소재, 일회용 재료까지 다양하게 사용되고 있지만, 플라스틱 폐기물에 의한 환경오염 등으로 인해 난분해성 플라스틱 사용에 대한 규제가 점점 심화되고 있다. 이러한 플라스틱에 의한 환경 오염 문제를 해결하기 위해, 재활용, 매립 및 소각이라는 방법이 사용되고 있으나, 이러한 방법으로는 환경 문제를 완전히 해결할 수가 없어 분해 가능한 플라스틱의 필요성이 대두되고 있다.

[0003] 생분해성 플라스틱이란 자연계에서 박테리아 등의 유기물에 의해 그 물리적 화학적 구조가 면화되는 소위 썩는 플라스틱을 말한다. 생분해성 플라스틱의 종류로는 폴리히드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, PHA), 폴리락트산(poly lactic acid, PLA), 폴리글리콜라이드(polyglycolic acid, PG) 등이 있으며, 식품 및 화학제품 첨가제, 의약용재료, 분해성 포장재에 사용될 수 있다(Martin Koller, *et al.*, *ISSN* 1580-2949. MTAEC9, 47(1)5(2013)).

[0004] 그 중, 폴리히드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, 이하 PHA)는 미생물이 질소, 산소, 인, 마그네슘 등의 성장에 필요한 원소가 부족한 상태에서 탄소원이 풍부하게 존재할 때 에너지 및 환원능의 저장을 위하여 미생물 내부에 축적하는 녹말이나 글리코겐과 같은 생물학적 기능을 가진 천연 폴리에스터 물질이다. 폴리히드록시알카노에이트는 생분해성 및 생체적합성이 있기 때문에, 기존의 합성 플라스틱을 대체할 물질로 인식되고 있다.

[0005] PHA는 생산하는 미생물의 종류나 공급되는 화학물질의 종류, 배양조건 등에 의해 150종 이상의 단량체 구성이 가능한 것으로 알려져 있다. 가장 대표적인 예는 3-히드록시부티레이트(3HB) 호모폴리에스테르이고, 이는 미생물에 의한 분해가 양호하지만, 극도로 부서지기 쉬운 성질을 갖고 있기 때문에 미생물 분해성 플라스틱으로서 실용 범위가 적다.

[0006] PHA의 단위체가 되는 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 이하 3-HP) 또는 그 염은 고분자 코팅제의 가교 결합제, 금속 윤활제 및 직물에 대한 정전기 방지제로 주로 사용하고 있고, 유기합성에서 중요한 빌딩 블록(building block)으로 쓰일 수 있다. 3-HP를 전구체로 하여 합성되는 핵심 화합물로는 1,3-프로판디올, 아크릴릭 에시드(acrylic acid), 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate), 아크릴아미드(acrylamide), 에틸 3-HP, 말로닉 에시드(malonic acid), 프로피로락톤(propiolactone) 및 아크릴로니트릴(acrylonitrile) 등이 있다. 3-HP는 상기와 같이 다양한 물질의 합성을 위한 전구체로 활용되고 있고, 다양한 응용분야를 갖는데, 세계 시장의 규모가 연간 3.63 백만 톤 정도이다.

[0007] 현재까지, 3-HP는 글리세롤을 기질로 하여 3-HP를 합성하는 방법이 대부분이며, 글리세롤 외에 글루코스나 자일로스로부터 3-HP를 생합성하는 방법에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

[0008] 한편, 라이코펜(Lycopene)은 1 kg의 토마토에서 0.02 g 정도 얻어지며, 토마토, 수박, 포도 등에 붉은 색소의 본체를 이루고 있는 극성이 대단히 낮은 지용성 물질로 강력한 항산화, 항암 작용을 한다. 라이코펜의 수요가 점차 증대되고 있으며, 천연물에서 직접 추출하는 방법, 유기 화학합성 방법에 의해 생산되고 있으며, 최근 미생물을 이용한 생산방법에 대한 연구가 활발하다.

[0009] 특히, 미생물 배양을 통한 발효 방법의 경우 라이코펜을 생산하지 않는 균주에 라이코펜 생합성 관련 유전자를 도입하여 라이코펜을 생산하는 방법으로써, 라이코펜을 포함한 카로티노이드 생합성에 관련되는 유전자를 가지고 있지 않은 야생형 대장균에 crtE, crtI 및 crtB 유전자와 같은 라이코펜 생합성 유전자를 도입하여 라이코펜을 생산하는 재조합 대장균이 개발된 바 있다.

[0010] 그러나, 상기 재조합 대장균으로부터 생산된 라이코펜의 수율은 매우 낮기 때문에 경제적인 생산 공정의 개발이 쉽지 않고, 글리세롤을 기질로 하여 라이코펜을 생합성 하는 방법이 대부분이다.

[0011] 한편, 일반적으로 대장균은 엠덴-마이어호프-파르나스 경로(EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS pathway, EMPP), 엔트너-듀도로프 경로(Entner-Doudoroff pathway, EDP) 및 오탄당 인산 경로(Pentose Phosphate pathway, PPP)의 3가

지의 대사경로가 존재한다. 주로 EMPP를 통해 글루코스 대사가 일어난다. 이때, EMPP를 통해 대사되는 글루코스 한 분자는 2개의 피루베이트(pyruvate), 2개의 ATP, 2개의 NADH를 생성하고 10개의 효소적 단계를 거친다. 반면, EDP를 통해 글루코스가 대사될 경우, 글루코스 한 분자는 2개의 피루베이트, 1개의 ATP, 1개의 NADH 및 1개의 NADPH를 생성하고 5개의 효소적 단계를 거친다. 특히, 산업적으로 사용되는 대장균에서 EDP를 통해 글루코스가 대사될 경우, 보다 적은 효소적 단계를 거치므로 비용을 절감할 수 있으며, 보다 많은 NADPH를 생성하므로 테르페노이드 생합성 시 탄소, 산화 및 환원 전구체 모두에게 최적의 합성여건을 제공한다는 점에서 이점이 있다.

[0012] 이러한 이점으로 인해, EMPP를 불활성화시키고, EDP 및 PPP를 활성화시키기 위해, *pgi* 유전자를 결실시켜 EMPP를 불활성화시키는 연구가 수행된 바 있으나, 과도한 NADPH 생성으로 인해 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 야생형 대장균보다 18% 정도 성장이 감소된다는 문제점이 있다. 또한, pfkA 유전자를 결실시켜 EMPP를 불활성화시키는 연구가 수행된 바 있으나, 이 경우, Pfk-I의 동질효소인 Pfk-II가 존재하여 EMPP를 통해 대사가 일어나고, 이로 인해 pfkA 유전자를 결실시킨 대장균은 *pgi* 유전자를 결실시킨 대장균보다 낮은 성장 속도를 나타내었다. 이에, *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 결실시켜 완전히 EMPP를 불활성화시키는 연구가 수행된 바 있으나, *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 결실시킨 대장균의 경우 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 성장하지 못했다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Martin Koller, et al., ISSN 1580-2949. MTAEC9, 47(1)5(2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 이에 본 발명자들은 글루코스로부터 3-히드록시프로피온산 또는 라이코펜을 고수율로 생산하는 형질전환 대장균을 개발하기 위해, i) *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실되고, ii) *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며, iii) *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된, 형질전환 대장균이 EMPP가 불활성화됨에도 불구하고, 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 성장 속도가 현저하게 증가되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 85번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 CRP 변이체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열 중 247번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 transaldolase B 변이체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면은, i) *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실되고, ii) *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며, iii) *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된, 형질전환 대장균을 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 대장균에 *accDABC* 유전자 및 *mcrC* 및 *mcrN* 유전자가 도입된, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 상기 형질전환 대장균에 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 대장균에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 상기 형질전환 대장균에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터, IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; iii) IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는 라이코펜을 생산하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 야생형 대장균의 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 결실시키는 단계; 및 ii) 상기 대장균을 글루코스 최소 배지에서 적어도 30회 이상 계대배양하는 단계를 포함하는, 야생형 대장균으로부터 엠덴-마이어호프-파르나스 경로(embden-meyerhof-parnas pathway)가 불활성화되고, 글루코스를 이용할 수 있는 진화된 대장균 균주를 제조하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 방법으로 제조된, 진화된 대장균 균주를 제공한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *accDABC* 유전자 및 *mcrC* 및 *mcrN* 유전자가 도입된, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환된 대장균로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는 3-히드록시프로피온산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터, IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; iii) IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환된 대장균 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환된 대장균으로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는 라이코펜을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 형질전환된 대장균은 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 상태에서 *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며, *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된 것으로서, 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 우수한 성장율을 나타내며, 상기 형질전환된 대장균을 성장시킨 후, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 과발현시킬 경우, 높은 NADPH를 요구하는 3-히드록시프로피온산 또는 라이코펜의 생산 수율을 높일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 형질전환된 대장균은 글루코스로부터 3-히드록시프로피온산 또는 라이코펜을 고수율로 생산하는 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 *pgi* 유전자가 결실된 균주(△*pgi*), *pfkA* 유전자가 결실된 균주(△*pfkA*), *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 균주(ED) 및 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 균주를 적응진화시킨 균주(EDA50)의 성장율을 비교한 도면이다.

도 2는 EDA50 균주의 콜로니로부터 단리한 iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주의 성장율을 나타낸 도면이다.

도 3은 EDA50 균주의 콜로니로부터 단리한 iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주의 유전자 돌연변이를 분석한 도면이다.

도 4는 EDA50 균주에서 발견된 유전자 돌연변이 *gntR*, galR, *ugd-gnd-wbbL-2*, *crp* 및 *talB* 유전자를 각각 모균주의 유전자로 치환시킨 후, 이들의 성장율을 비교한 도면이다.

도 5는 EDA50 균주에서 발견된 유전자 돌연변이 *ptsG* 유전자를 모균주의 유전자로 치환시킨 후, 성장율을 비교한 도면이다.

도 6은 EDA50 균주에서 발견된 6개의 유전자 돌연변이를 단일 또는 조합하여 ED 균주를 형질전환시킨 후, 이들의 성장율을 비교한 도면이다.

도 7은 *gnd* 유전자에 의해 암호화되는 효소인 6-포스포글루코네이트 탈수소효소를 통한 PPP 경로 또는 GntR에 의해 발현이 하향 조절되는 *edd* 및 *eda* 유전자에 의해 암호화된 효소를 통한 EDP 경로를 통한 글루코스의 대사 경로를 나타낸 도면이다.

도 8은 ED균주, EDA50 균주, EDA50 균주의 *gntR* 유전자를 전체 결실시킨 균주(EDA50_△*gntR*), EDA50 균주의 *gntR* 유전자 돌연변이를 모균주의 *gntR* 유전자로 치환시킨 균주(EDA50_gn^{wt}) 및 EDA50_gn^{wt} 균주에 *edd* 및 *eda* 유전자를 발현시킨 균주(EDA50_gn^{wt}-pEdd-Eda)의 성장율을 비교한 도면이다.

도 9는 GalR에 의해 발현이 하향 조절되는 비-PTS 글루코스 수송체인 GalP를 통한 글루코스 흡수 경로를 나타낸 도면이다.

도 10은 ED균주, EDA50 균주, EDA50 균주의 *galR* 유전자를 전체 결실시킨 균주(EDA50_△*galR*), EDA50 균주의 *galR* 유전자 돌연변이를 모균주의 *galR* 유전자로 치환시킨 균주(EDA50_ga^{wt}) 및 EDA50_ga^{wt} 균주에 *galP* 유전자를 발현시킨 균주(EDA50_ga^{wt}-pGalP)의 성장율을 비교한 도면이다.

도 11은 EDA50 균주, 모균주의 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자로 치환시킨 균주(EDA50_ug^{wt}) 및 EDA50_ug^{wt} 균주에 *gnd* 유전자를 결실시킨 균주(EDA50_ug^{wt}-△*gnd*)의 성장율을 비교한 도면이다.

도 12는 글루코스로부터 3-히드록시프로피온산(hydroxypropionate, 3-HP)을 효율적으로 생산하기 위한 합성 경로를 나타낸 도면이다.

도 13은 아세틸-CoA 카복실라제(ACC) 및 C. aurantiacus에서 유래된 말로닐-CoA 환원효소 돌연변이체(MCR, mcrC*-mcrN)를 발현시킨 모균주(MG1655), ED 균주 및 EDA50 균주의 3-HP 생산량을 나타낸 도면이다.

도 14는 아세틸-CoA 카복실라제(ACC) 및 C. aurantiacus에서 유래된 말로닐-CoA 환원효소 돌연변이체(MCR, mcrC*-mcrN)를 발현시킨 EDA50 균주에서 *gnd* 유전자 또는 *gnd* 및 *gntR* 유전자를 발현시킨 균주의 3-HP 생산량을 나타낸 도면이다.

도 15는 라이코펜 생합성 효소가 도입된 야생형 대장균(MG1655), ED 균주, △pfkA 균주, △pgi 균주 및 EDA50 균주의 라이코펜 생산량을 나타낸 도면이다.

도 16은 라이코펜 생합성 효소가 도입된 야생형 대장균(MG1655), ED 균주, △pfkA 균주, △pgi 균주 및 EDA50 균주의 라이코펜 생산량을 육안으로 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 일 측면은, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 중 85번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 CRP 변이체를 제공한다. 상기 85번째 아미노산이 세린(serine, S)으로 치환될 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열 중 247번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)이 다른 아미노산으로 치환된 transaldolase B 변이체를 제공한다. 상기 247번째 아미노산이 발린(valine, V)으로 치환될 수 있다.

[0032] 본 발명은 또 다른 측면은, i) *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실되고, ii) *gntR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *edd* 및 *eda* 유전자가 도입되며, iii) *galR* 유전자가 돌연변이되거나; 또는 *galP* 유전자가 도입된, 형질전환 대장균을 제공한다.

[0033] 본 발명에서 사용하는 용어 "*pfkA* 유전자"란 대장균의 6-phosphofructokinase 1을 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *pfkA* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 6-phosphofructokinase 1을 암호화하는 유전자일 수 있으며, 상기 *pfkA* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 6-phosphofructokinase 1은 해당 작용의 가장 중요한 조절 효소 중 하나로서, 과당-6-인산(fructose 6-phosphate) 및 ATP를 과당-1,6-이인산(fructose 1,6-bisphosphate) 및 ADP로 전환시키는 단계를 촉진시킨다.

[0034] 본 발명에서 사용하는 용어 "*pfkB* 유전자"란 대장균의 6-phosphofructokinase 2를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *pfkA* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 6-phosphofructokinase 2를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 상기 *pfkB* 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있

다. 상기 6-phosphofructokinase 2는 해당 분해 및 포도당 생성 속도를 조절하는 간접적인 역할을 한다. 구체적으로, 과당-6- 인산으로부터 중요한 알로스테릭(allosteric) 조절제인 과당-2,6-이인산(Fru-2,6-P2)의 형성 및 분해를 촉매한다. 상기 Fru-2,6-P2는 해당 과정에서 phosphofructokinase 1을 활성화시키고, 글루코겐 생성에서 과당-1,6-이인산분해효소(Fructose-1, 6-diphosphatase)를 억제하여 해당과정의 분해 속도 결정에 기여한다.

[0035] 본 발명에서 사용하는 용어 "*edd* 유전자"란, 대장균의 phosphogluconate dehydratase를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *edd* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 phosphogluconate dehydratase를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용하는 용어 "*eda* 유전자"란, 대장균의 KHG/KDPG aldolase를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *eda* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 KHG/KDPG aldolase를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 KHG/KDPG aldolase는 ED(Entner-Doudoroff) 경로를 통한 포도당 분해에 관여한다.

[0037] 본 발명에서 사용하는 용어 "*galR* 유전자"란, 대장균의 DNA-binding transcriptional dual regulator GalR (이하, GalR)을 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *galR* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 GalR을 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 GalR은 갈라토스를 이용할 수 없을 때, 갈락토스 대사에 대한 유전자를 하향 조절하는 DNA-결합 전사 억제제이다. 또한, 상기 GalR의 레귤론(regulon)으로 GalP(galactose proton symporter)를 암호화하는 *galP* 유전자가 포함된다.

[0038] 상기 *galR* 유전자 돌연변이는 GalR의 아미노산 서열 중 271번째 아미노산인 글리신(glycine, G)을 코딩하는 코돈이 아스파르트산(aspartic acid, D)을 코딩하는 코돈으로 치환되는 것일 수 있으며, 바람직하게는, 상기 *galR* 유전자 돌연변이는 서열번호 6의 염기서열 중 812번째 염기인 구아닌(guanin)이 아데닌(adenine)으로 치환된 것(g812a)일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용하는 용어 "*galP* 유전자"란, 대장균의 GalP(galactose proton symporter)을 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *galP* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 GalP을 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0040] 상기 형질전환 대장균은 *ugd-gnd-wbbl-2*, *ptsG*, *crp*, *talB* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자가 추가적으로 돌연변이된 것일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용하는 용어 "*ugd-gnd-wbbl-2* 유전자"란, *ugd*, *gnd* 및 *wbbl-2* 유전자 영역을 의미한다. 상기 상기 *ugd-gnd-wbbl-2* 유전자 돌연변이는 *ugd-gnd-wbbl-2* 유전자가 결실된 것일 수 있다.

[0042] 상기 *gnd* 유전자는 대장균의 6-phosphogluconate dehydrogenase를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *gnd* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 6-phosphogluconate dehydrogenase를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 6-phosphogluconate dehydrogenase는 산화적 PPP 경로(pentose phosphate pathway)에 관여하는 효소 중 하나이다.

[0043] 본 발명에서 사용하는 용어 "*crp* 유전자"란, 대장균의 cAMP-activated global transcriptional regulator CRP(이하, CRP)를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *crp* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 CRP를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0044] 상기 *crp* 유전자 돌연변이는 CRP의 아미노산 서열 중 85번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)을 코딩하는 코돈이 세린(serine, S)을 코딩하는 코돈으로 치환되는 것일 수 있으며, 바람직하게는, 상기 *crp* 유전자 돌연변이는 서열번호 9의 염기서열 중 253번째 염기인 구아닌(guanin)이 티민(thymine)으로 치환된 것(g253t)일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용하는 용어 "*talB* 유전자"란, 대장균의 transaldolase B를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *talB* 유전자는 *E. coli* K-12 substr. MG1655 균주의 transaldolase B를 암호화하는 유전자일 수 있으며, 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 transaldolase B는 PPP 경로(pentose phosphate pathway)에서 대사 산물의 균형에 관여하는 중요 효소이다.

[0046] 상기 *talB* 유전자 돌연변이는 transaldolase B의 아미노산 서열 중 247번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)을 코딩하는 코돈이 발린(valine, V)을 코딩하는 코돈으로 치환되는 것일 수 있으며, 바람직하게는, 상기 *talB* 유전자 돌연변이는 서열번호 10의 염기서열 중 740번째 염기인 사이토신(cytosine)이 티민(thymine)으로 치환된

것(c740t)일 수 있다.

[0047] 본 발명에서 사용하는 용어 "*ptsG* 유전자"란, 대장균에서 PTS 효소 IICBGlc를 암호화하는 유전자를 의미한다. 상기 PTS 효소 IICBGlc는 포스포트랜스퍼라제 시스템의 효소 II; PEP-당 포스포트랜스퍼라제 효소 II; 및 PTS 퍼미아제로도 불린다.

[0048] 상기 *ptsG* 유전자 돌연변이는 *ptsG* 유전자가 결실되거나, 외래 유전자가 삽입된 것일 수 있다. 상기, 외래 유전자가 삽입된 *ptsG* 유전자 돌연변이는 서열번호 14로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 외래 유전자가 삽입된 *ptsG* 유전자 돌연변이는 서열번호 13으로 표시되는 염기서열로 이루어진 *ptsG* 유전자의 819번째부터 서열번호 15로 표시되는 염기서열로 이루어진 1195bp의 IS-element mediated insertion 염기 및 CTAA로 이루어진 4bp의 염기가 삽입된 것일 수 있다. 또한, 야생형 PtsG의 경우 478개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 발현되지만, 상기 외래 유전자가 삽입된 *ptsG* 유전자 돌연변이의 경우, 309개의 아미노산으로 이루어진 PtsG 단백질이 발현되며, 273번째 아미노산 이후부터 야생형 PtsG 단백질과 아미노산 서열이 상이하다.

[0049] 상기 형질전환 대장균의 일 구체예로서, 상기 형질전환 대장균은 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실되고, i) *gntR* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있으며, ii) *gntR* 유전자 및 *galR* 유전자가 돌연변이된 것일 수 있고, iii) *gntR* 및 *galR* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있으며, iv) *gntR*, *galR* 및 *ptsG* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있으며, v) *gntR*, *galR* 및 *crp* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있고, vi) *gntR*, *galR*, *crp* 및 *talB* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있으며, vii) *gntR*, *galR*, *crp* 및 *ptsG* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있고, viii) *gntR*, *galR*, *crp*, *ptsG*, *talB* 유전자가 돌연변이되고, *ugd-gnd-wbbl-2*가 결실된 것일 수 있다(도 5).

[0050] 본 발명에서 사용한 용어 "형질전환"이란, 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 대장균 내에서 상기 목적 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 대장균 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다.

[0051] 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 대장균에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 대장균에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[0052] 본 발명에서 사용하는 용어 "발현벡터"란, 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 이종 핵산 서열의 발현을 지시하거나 제어하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 의미한다. 상기 벡터는 선형(linear) 핵산, 플라스미드, 파지미드(phagemids), 코스미드(cosmids), RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 상기 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 및 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란, 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0054] 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, $CaCl_2$ 완충액을 사용한 활성화 세포(competent cell)를 만든 후 열충격(예를 들면, 42℃) 방법에 의해 발현벡터를 숙주세포 내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염, 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기천공법 등에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 대장균에 *accDABC* 유전자 및 *mcrC* 및 *mcrN* 유전자가 도입된, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0056] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 상기 형질전환 대장균에 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0057] 상기 *accDABC* 유전자, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자의 기능을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0058]

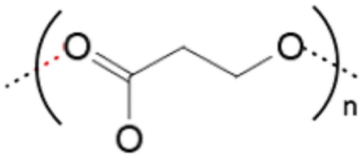
분류	유전자	단백질	반응
ACC (Acetyl-CoA carboxylase)	accD	Acetyl-CoA carboxytransferase	ATP + acetyl-CoA + hydrogencarbonate = ADP + phosphate + malonyl-CoA
	accA	Acetyl-CoA carboxylase	
	accB	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	
	accC	Acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, biotin carboxylation subunit	
MCR (malonyl-CoA reductase)	mcrC	Malonyl-CoA reductase	malonate semialdehyde + CoA + NADP+ = malonyl-CoA + NADPH + H+
	mcrN	Malonic semialdehyde reductase	3-hydroxypropionic acid + NADP+ <=> malonate semialdehyde + NADPH + H+

[0059] 상기 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터(pACC) 및 *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터(pMCR)에 사용된 벡터의 종류는 플라스미드 벡터일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 pACC는 서열번호 16으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 pMCR 서열번호 17로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0060] 상기 배양은 글루코스 존재 하에 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0061] 상기 3-히드록시프로피온산은 하기 화학식 1과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0062] [화학식 1]

[0063] 

[0064] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 대장균에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 형질전환 대장균을 제공한다. 상기 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자의 기능을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0065]

유전자	단백질	반응
ipiHp1	isopentenyl-diphosphate isomerase (IPP isomerase)	isopentenyl diphosphate <=> dimethylallyl diphosphate (IPP <=> DMAPP)
crtE	geranylgeranyl diphosphate synthase(GGPP synthase)	farnesyl diphosphate + isopentenyl diphosphate <=> diphosphate + geranylgeranyl diphosphate (FPP + IPP <=> GGPP + PPi)
crtB	phytoene synthase	2 geranylgeranyl diphosphate <=> phytoene + 2 diphosphate(2 GGPP + phytoene + 2 PPi)
crtI	phytoene desaturase	phytoene <=> lycopene

[0066] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 대장균에 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; iii) IPTG를 처리한 후, 상기 형질전환 대장균 배양하는 단계; 및 iv) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는 라이코펜을 생산하는 방법을 제공한다.

[0067] 상기 라이코펜 생산방법은 i) 단계에서 *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계를 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[0068] 상기 *crtE*, *crtI*, *crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터(pAC-LYC04)는 pA15 플라스미드 기반으로 라이코펜 생합성 효소(Pcons-crtE, crtB 및 crtI, Ptrc-ipiHp1)를 가지며, 클로람페니콜 저항성을 가진다. 상기 pAC-LYC04는 서열번호 18로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0069] 상기 배양은 글루코스 존재 하에 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0070] 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 대장균의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있다. 구체적으로는 본 발명의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[0071] 탄소원의 예로는 글리세롤, 수크로오스 또는 글루코스가 포함될 수 있고, 수크로오스를 다량으로 포함한 당밀 또한 탄소원으로 이용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원이 다양하게 이용될 수 있다. 바람직하게는 글루코스 일 수 있다.

[0072] 질소원의 예로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액 또는 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄 또는 질산암모늄과 같은 무기질소원이 포함될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[0073] 상기 배지에는 인원으로서 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 또는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산 철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[0074] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.

[0075] 배양물의 온도는 일반적으로 20℃ 내지 40℃, 25℃ 내지 37℃ 또는 37℃일 수 있으나, 목적하는 목적에 따라 제한 없이 변경될 수 있다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량에 도달할 때까지 계속 할 수 있으며, 10시간 내지 100시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0076] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 야생형 대장균의 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 결실시키는 단계; 및 ii) 상기 대장균을 글루코스 최소 배지에서 적어도 30회 이상 계대배양하는 단계를 포함하는, 야생형 대장균으로부터 엠덴-마이어호프-파르나스 경로(embden-meyerhof-parnas pathway)가 불활성화되고, 글루코스를 이용할 수 있는 진화된 대장균 균주를 제조하는 방법을 제공한다.

[0077] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 방법으로 제조된, 진화된 대장균 균주를 제공한다.

[0078] 상기 ii) 단계에서 계대배양 횟수는 적어도 30회 이상일 수 있으며, 바람직하게는, 상기 ii) 단계에서 계대배양 횟수는 30회, 35회, 40회, 45회 또는 50회 이상일 수 있다. 또한, 배양일수를 기준으로는, 상기 ii) 단계에서 대장균을 글루코스 최소 배지에서 적어도 70일 이상 배양시킬 수 있다. 바람직하게는, 상기 ii) 단계에서 대장균을 글루코스 최소 배지에서 70일, 80일, 90일, 100일, 110일, 120일, 130일 또는 140일 이상 배양시킬 수 있다.

[0079] 상기 글루코스 최소 배지는 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 5 g/L 글루코스가 첨가된 M9 최소 배지일 수 있다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에서는, *pfkA* 유전자 및 *pfkB* 유전자가 결실된 대장균(이하, ED균주)을 순차적 전달(sequential transfer)에 의해 적응시켰다. 그 후, LB 배지에서 밤새 배양한 ED 균주를 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 5 g/L 글루코스가 첨가된 M9 최소 배지(BioShop Canada Inc., Burlington, Canada)에 옮기고, 37℃ 온도 및 200 rpm 조건에서 배양하였다. 600nm 파장에서 O.D 값이 약 1.0이 되었을 때, ED 균주를 계대배양하였다. 이 과정을 50회 반복하였다.

[0081] 초기 ED 균주는 글루코스가 유일한 탄소 공급원인 최소 배지에서 거의 성장할 수 없었다. 이에 적응 진화를 이용하여 결과적으로 5 g/L 글루코스를 포함하는 M9 최소 배지에서 *pfkAB* 돌연변이체를 50회 계대배양하여 글루코스에서 잘 자라는 균주들을 선별하였다. 그 중 가장 빠른 성장속도를 보이는 진화된 대장균 균주(EDA50)를 선별하였다.

[0082] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *accDABC* 유전자 및 *mcrC* 및 *mcrN* 유전자가 도입된 3-히드록시프로피온산을 생산하는 진화된 대장균 균주를 제공한다.

[0083] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터 및 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 진화된 대장균 균주를 배양하는 단계; iii) 테트라사이클린 및 IPTG를 처리한 후, 상기 진화된 대장균 균주를 배양하는 단계; 및 iv) 상기 진화된 대장균 균주로부터 생산되는 3-히드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 3-히드록시프로피온산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0084] 상기 배양은 글루코스 존재 하에 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0085] 이때, 상기 *accDABC* 유전자를 포함하는 발현벡터, *mcrC* 및 *mcrN* 유전자를 포함하는 발현벡터는 상술한 바와 동일하다.

[0086] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자가 도입된, 라이코펜을 생산하는 진화된 대장균 균주를 제공한다.

[0087] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 진화된 대장균 균주에 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 진화된 대장균 균주를 배양하는 단계; iii) IPTG를 처리한 후, 상기 진화된 대장균 균주를 배양하는 단계; 및 iv) 상기 진화된 대장균 균주로부터 생산되는 라이코펜을 수득하는 단계를 포함하는 라이코펜을 생산하는 방법을 제공한다.

[0088] 상기 라이코펜 생산방법은 i) 단계에서 *gnd* 및 *gntR* 유전자를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계를 추가적으로 더 포함할 수 있다. 상기 배양은 글루코스 존재 하에 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0089] 이때, 상기 *crtE, crtI, crtB* 및 *ipiHp1* 유전자를 포함하는 발현벡터는 상술한 바와 동일하다.

[0090] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0091] **실험예 1. 화학물질, 균주, 배지 준비**

[0092] 특별한 지시가 없는 한, 본 발명에서 사용된 화학물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0093] 또한, 본 발명에서 야생형 대장균 MG1655 균주를 모균주로서 사용하였으며, 적응진화된 돌연변이체 균주를 제작하였다. 또한, DH10B 균주를 발현 플라스미드의 제작 및 플라스미드 증폭을 위해 사용하였다.

[0094] 상기 균주들은 기본적으로, λ-RED 재조합 시스템 상에 기초한 상동 재조합에 의해 유전자 녹-아웃(knock-out)을 수행하였으며, 이는 FRT(Flp recognition target) 녹-인(knock-in) 및 플립파제-기반 경화(flippase-based curing)에 의해 측부에 있는 카나마이신 내성(Km^R) 카세트에 의해 매개되었다. 상기 균주를 항생제 민감성에 대해 스크리닝하였다.

[0095] 또한, 상기 균주들은 tetA-기반 이중 선별 시스템과 결합된 올리고뉴클레오티드-매개 게놈 편집에 의해 점 돌연변이화 하였다. 구체적으로, tetA 카세트를 표적 부위에 삽입하고, 표적 돌연변이를 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 삽입 부위의 업스트림 및 다운스트림에 상응하는 50 bp 정도의 짧은 올리고뉴클레오티드로 대체하였다. 상기 tetA-기반 이중 선별 시스템과 결합된 올리고뉴클레오티드-매개 게놈 편집에 의해 점 돌연변이화된 균주를 50 μM의 $NiCl_2$를 사용하여 음성선택(negative selection)을 통해 분리하였다.

[0096] 배지는 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 2 g/L 또는 5 g/L 글루코스가 보충된 M9 최소 배지를 사용하였다. 기본 배지로서 LB 배지를 사용하였다. 필요한 경우 적절하게 항생제를 사용하였으며, 항생제는 다음의 농도와 같이 사용하였다: 암피실린(100 mg/L), 카나마이신(50 mg/L) 또는 클로람페니콜(30 mg/L).

[0097] **실험예 2. 프라이머 제작**

[0098] 본 발명에서 사용한 모든 플라스미드는 BioBrick 플라스미드로부터 유래하였다. 플라스미드 클로닝에 사용한 프라이머를 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 3

Primer	Sequence (5'-3')	Sequence Number
pfkA delFP	GTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCATTAATACAGTTTTTT CGCGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	20
pfkA delRP	CTTCCGGCAACAGATTTCATTTTGCATTCCAAAGTTCAGAGGTA GTCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	21
pfkA seqFP	ATTATCCATCAGGACCCCTGTTCCG	22
pfkA seqRP	CGGAAGAAATCCGCCTCATATTGCT	23
pfkB delFP	ACTTTCCGCTGATTCGGTGCCAGACTGAAATCAGCCTATAGGAG GAAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	24
pfkB delRP	ATTCCCCCAATGCTGGGGGAATGTTTTTGTTAGCGGGAAAGGTA AGCGTAATTCCGGGGATCCGTCGACC	25
pfkB seqFP	TCGAAAGGTTTTTTAGCGCTGGCA	26
pfkB seqRP	TGGGTAAGCCCCGAAACCAG	27
gntR_H1_P1	GTCCGTGTTAAACTAAGAGAATCTATCTCTTTTGTACCTTCAGG ACGATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	28
gntR_H2_P4	CCATGCCTTAAGTGTATAAGTGTGAGCTACTTCAAATTTGTGGG CTTAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC	29
gntR seqFP	GCCTTTTTGCAGGCTTCCTC	30
gntR seqRP	CCCGATACGCCCATCAAGAC	31
galR-tetA_P1	CGTTCTCAATGATAATGGTATTGATGTACCGGGTGAGATTTCGT TAATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	32
galR_H2_P4	CAGACCATCGAAGAATTACTGGCGCTGGAATTGCTTTAACTGCG GTTAGTATTCCGGGGATCCGTCGACC	33
galR-FP	TAATGAAACAAATGCCCGGT	34
galR-RP	TGCCGGAAGTGAAGGCAGGT	35
galR seqFP	GGCTCACATTCCCACGATG	36
galR seqRP	GGGCGATGTCTTTACCCAG	37
ugd-gnd-wbbL delFP	TAATCAGCATCCCGGTAGGCTTCATTTTTATCTAATGTGGCATT AAAGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	38
ugd-gnd-wbbL delRP	GAAATGACTGAGTCAGCCGAGAAGAATTTCCCCGCTTATTCGCA CCTTCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	39
ugd-gnd-wbbL FP	TAATCAGCATCCCGGTAGGC	40
ugd-gnd-wbbL RP	GAAATGACTGAGTCAGCCGAG	41
wbbL_2 insFP	TTATTAAAGTATAAATAGCTTATCCATGCTTATATGCTTACGGC TTTATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	42
wbbL_2 insRP	TTTTATCAAATCGCAACTTTGATCGAATTTCATCAGTTTTTCACC CGTAAATTCCGGGGATCCGTCGACC	43
wbbL_2_kanR zzB insFP	GTGTATACCTTATCTGCCACATCCTTAAGCTCTTCTGCCATTCGG TTAGAGATAATGACGTCGGTTCATGCTCTCAGAATTAACTTAAC	44
ugd seqRP	CATCATTACCCTAACTGACGG	45
crp_H1_P4	GGCGTTATCTGGCTCTGGAGAAAGCTTATAACAGAGGATAACC GCGCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	46
crp_H2_P1	CTACCAGGTAACGCGCCACTCCGACGGGATTAACGAGTGCCGT AAACGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	47
crp-FP	TTGATGTACTGCATGTATGC	48
crp-RP	ATGGCGCGCTACCAGGTAAC	49

[0099]

표 4

[0100]

Primer	Sequence (5'-3')	Sequence Number
crp seqFP	ATAGCCCCTTCCCAGGTAG	50
crp seqRP	CAGGAACGAGGGAGAAGAG	51
talB_H1_P1	AGACCGGTTACATCCCCCTAACAAGCTGTTTAAAGAGAAATAC TATCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
talB_H2_P4	CTTCAGAAGAGGTAGCGTGACCGACTTCCCGGTCACGCTAAGA ATGATTACAATTCCGGGGATCCGTCGACC	53
talB-FP	AAAGCAAAACGCCTGATCAA	54
talB-RP	GCGCAGGGATGCCTTTATCC	55
talB seqFP	CTGGCGATAACCGTCTTGTC	56
talB seqRP	CCTGCTCATCGGGGATTAAG	57
EcoRI RBS eddEc FP	CCCCCGAATTCTGACAACTCAATTTCAGGAGCCTTTATGAATCC ACAACTACTGCGCGTAACAAATCGAATCATTG	58
BamHI edaEc RP	CCCGGATCCTTACAGCTTAGCGCCTTCTAC	59
BglII RBS galPEc FP	CCAGATCTAAAAATAACCATATTGGAGGGCATC	60
XhoI galPEc RP	CCCCCTCGAGTTAATCGTGAGCGCCTATTTC	61
gnd_H1_P1	AGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTA TGTAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	62
gnd_H2_P4	GTGCAATATACGCCGGGCCTCAATTTTATTGTTGGTTAAATCAG ATTAATATTCCGGGGATCCGTCGACC	63
gnd seqFP_2	GATTTGATGACCATAACCGC	64
gnd seqRP_2	GTCAGTGGGAGAGATCTCAC	65
EcoRI-BglII-gnd FP	CCCCCCGAATTCAAAAGATCTTGATCACACCTGACAGGAGT	66
XhoI-BamHI gnd RP	GGGGGGCTCGAGTTTGGATCCTTAATCCAGCCATTCGGTATGG	67
EcoRI BglII gntR FP	CCCCCCGAATTCAAAAGATCTCTGGACGGAAGTCCAGGCCATA AACATGAAAAAGAAAAGACCCGTACTTC	68
XhoI-BamHI gntR RP	GGGGGGCTCGAGTTTGGATCCTTAAATAGATCCGCCCGGTG	69
fabI(S241F)_km SOE P1	TGTGGGTAACTCTGCGGCATTCCTGTGCTCCGATCTCTCTGCCG GTATCTTCGGTGAAGTGGTCCACGTTGACGGCGGTTTCAGCATT GCTGCAATGAACG	70
fabI(S241F)_km SOE P2	GGTCGACGGATCCCCGGAATTTATTTCAGTTCGAGTTCGTTCAT T	71
fabI(S241F)_km SOE P3	AATGAACGAACTCGAACTGAAATAAATTCCGGGGATCCGTCGA CC	72
fabI(S241F)_km SOE P4	AACAGAGATAACGGGCGGCAGAACGCCGCCCATCTTTACCAAC AGAACGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	73
(Km)P4-fabIp_HR	TTAATTCTCATGTTTGACAGCCTGCTCCGGTCGGACCTGG	74
fabI seqRP	ACCTTTGCGGCTTCCGGGAC	75

[0101] 상기 프라이머들은 Macrogen Inc.(Seoul, Korea)에서 합성하였다. PCR 반응을 위해 Pfu-X DNA 중합효소를 사용하여 플라스미드 제작을 완료하였으며, 사용된 모든 제한 효소는 Fermentas(Vilnius, Lithuania)로부터 구입하였다. 플라스미드를 단리하기 위해, LaboPass plasmid miniprep kit(Cosmo Genentech, Korea)를 사용하였다. DNA 정제(Cat. No. 103-102) 및 젤 추출 키트(Cat. No. 102-102)를 GeneAll Biotechnology(Seoul, Korea)로부터 구입하였다.

[0102] **실시예 1. pfkA 및 pfkB 유전자가 결실된 대장균(ED) 제작 및 적응진화 유도**

[0103] 야생형 대장균(MG1655)은 *pfkA* 및 *pfkB*에 의해 각각 암호화되는 2개의 Pfk 동질효소인 Pfk-I 및 Pfk-II를 갖기 때문에, *pfkA* 및 *pfkB* 유전자를 이중 결실시켜 EMPP가 완전히 불활성화된 대장균을 제작하였으며, 이를 "ED" 균주라고 명명하였다. *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 대장균을 순차적 전달(sequential transfer)에 의해 적응시켰다.

[0104] 구체적으로, 상기 ED 균주는 λ-Red 재조합 시스템을 이용하여 제조하였으며, 제조과정을 도 1에 개략적으로 나타내었다. 먼저, 야생형 대장균에 pSIM5 플라스미드를 전기천공법으로 형질전환하였다. 그 후, *pfkA* 유전자 삭제를 위해, pKD13 플라스미드(서열번호 19)를 주형으로 양 말단에 *pfkA* 유전자 상부 및 하부의 상동 서열을 가지는 카나마이신 카세트(pfkA delFP 및 pfkA delRP)를 콜로니 PCR 증폭하였다. 상기 콜로니 PCR은 1단계 95℃ 3분 30초, 2단계 95℃ 30초, 3단계 56℃ 내지 68℃ 30초 및 4단계 72℃ 2분 30초으로 수행하였다, 상기 2단계에서 4단계를 25회 반복하였다.

[0105] 그 후, 야생형 대장균에 증폭시킨 *pfkA* 유전자의 상부 및 하부 상동 서열을 가지는 카나마이신 카세트를 전기천

공법으로 형질전환하였다. 상기 형질전환된 균주는 염색체에 카나마이신 카세트가 치환되어 *pfkA* 유전자를 소실되게 하였다. 이때, 클로람페니콜 및 카나마이신 저항성 유전자의 제거가 필요하므로, 이를 위해 pCP20 플라스미드(Nova lifetech Inc, PVT6006)를 전기천공법으로 형질전환시키고 암피실린이 함유된 LB-아가-플레이트 배지에 스트리킹(streaking)하였다. 얻어진 형질전환된 균주를 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에 스트리킹한 뒤 42℃ 온도에서 하루 동안 소실(curing) 과정을 거쳤다. 그 후, 콜로니들을 카나마이신 LB-아가-플레이트, 클로람페니콜 LB-아가-플레이트, 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에 각각 순서대로 접종하여 30℃ 온도에서 하루 동안 배양한 후, 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에서만 자라는 형질전환된 균주를 선발하였다. 최종 선별된 균주의 게놈 DNA(genomic DNA)를 PCR 및 시퀀싱(sequencing)을 통해 pfkA 유전자가 삭제된 것을 확인하였다. *pfkA* 유전자 삭제 과정에 사용된 프라이머 및 플라스미드를 하기 표 5 및 표 6에 나타내었다.

표 5

[0106]

프라이머	서열정보	서열번호
pfkA delFP	GTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCATTAATACAGTTTTTTCGCGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	20
pfkA delRP	CTTCCGGCAACAGATTTCATTTTGCATTCCAAAGTTCAGAGGTAGTCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	21
pfkA seqFP	ATTATCCATCAGGACCCCTGTTCCG	22
pfkA seqRP	CGGAAGAAATCCGCCTCATATTGCT	23

표 6

[0107]

플라스미드	특징	참조
pSIM5	λ-Red 재조합효소(recombinase) 발현 플라스미드; 온도 민감성 복제	Datta et al 2006
pKD13	유전자 파괴(gene disruption)용 주형 플라스미드. 카나마이신 내성 유전자가 FRT 부위의 측면에 있음. pir+ E.coli를 필요로 하는 oriR6K-gamma origin.	Datsenko and Wanner2000
pCP20	효모의 Flp 재조합효소를 가지며, 클로람페니콜 또는 암피실린 저항유전자를 가짐; 온도 민감성 복제	Cherepanov and Wackernagel 1995

[0108] 또한, *pfkA* 유전자 삭제 방법과 동일한 방법으로, 상기 표 6의 플라스미드 및 하기 표 7의 프라이머를 이용하여 상기 형질전환된 균주의 *pfkB* 유전자를 삭제하였다.

표 7

[0109]

프라이머	서열정보	서열번호
pfkB delFP	ACTTTCCGCTGATTCGGTGCCAGACTGAAATCAGCCTATAGGAGGAAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	24
pfkB delRP	ATTCCCCCAATGCTGGGGGAATGTTTTTGTTAGCGGGAAAGGTAAGCGTAATTCCGGGGATCCGTCGACC	25
pfkB seqFP	TCGAAAGGTTTTTTAGCGCTGGCA	26
pfkB seqRP	TGGGTAAGCCCCGAAACCAG	27

[0110] 또한, 대조군으로 사용하기 위한 *pgi* 유전자가 결실된 대장균(pgi)은 *pfkA* 유전자 삭제 방법과 동일한 방법으로 상기 표 6의 플라스미드 및 하기 표 8의 프라이머를 이용하여 *pgi* 유전자를 삭제하였다.

표 8

[0111]

프라이머	서열정보	서열번호
pgi delFP	ATGAAAAACATCAATCCAACGCAGACCGCTGCCTGGCAGGCACTACAGAATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	76
pgi delRP	ACCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAATCAGACCATTGGTCGAGCTATCGTATTCCGGGGATCCGTCGACC	77
pgi seqFP	AGGTGTTATCACAGGACTGG	78
pgi seqRP	AAGCAATTAATCTGCGTATT	79

[0112] 그 후, LB 배지에서 밤새 배양한 ED 균주를 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 5 g/L 글루코스가 첨가된 M9 최소 배지(BioShop Canada Inc., Burlington, Canada)에 옮기고, 37℃ 온도 및 200 rpm 조건에서 배양하였다. 600nm 파장에서 O.D값이 약 1.0이 되었을 때, 균주를 계대배양하였다. 이 과정을 50회 반복하였다. ED 균주는 글루코스가 유일한 탄소 공급원인 최소 배지에서 거의 성장할 수 없었다. 이에 적응 진화를 이용하여 결과적으로 5 g/L 글루코스를 포함하는 M9 최소 배지에서 pfkAB 돌연변이체를 50회 계대배양하여 글루코스에서 잘 자라는 균주들을 선별하였다. 그 중 가장 빠른 성장속도를 보이는 진화된 대장균 균주를 "EDA50" 균주로 명명하였다.

[0113] EDA50 균주는 완전히 불활성화된 EMPP를 가진 대장균 균주로서, EDA50 균주를 *pfkA* 유전자가 결실된 대장균(pfkA) 또는 *pgi* 유전자가 결실된 대장균(pgi)과 5g/L 글루코스를 포함하는 M9 최소 배지에서 배양하였다.

[0114] 상기 배양은 아가-플레이트로부터 단일 콜로니를 3 ㎖의 LB 배지에서 200 rpm, 37℃ 온도에서 접종하였다. 밤새 성장한 균주를 4 ㎖의 글루코스 최소 M9 배지에 1:10 비율로 다시 접종하였다. 9시간 동안 각 균주들을 성장시킨 후에, 600nm 파장에서 초기 O.D값이 약 0.1 되도록 균주를 250 ㎖ 진탕 플라스크에 25 ㎖의 M9 배지에 접종한 후, 200 rpm, 37℃ 온도에서 배양하였다. O.D값을 분광광도계(Libra S22)를 이용하여 측정하여 생장곡선을 완성하였다.

[0115] 그 결과, EDA50 균주가 *pfkA* 유전자가 결실된 대장균(pfkA) 또는 *pgi* 유전자가 결실된 대장균(pgi)과 같은 EMPP가 부분적으로 차단된 다른 돌연변이 균주보다 빠르게 성장하였다(도 1).

[0116] **실시예 2. 적응진화된 균주(EDA50)의 유전자 돌연변이 분석**

[0117] EDA50 균주의 게놈(genome)을 분석하고 모균주인 MG1655 균주와 비교하였다. EDA50 균주를 단리할 때, 96-웰 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200 TECAN, Austria)를 이용하여 EDA50 균주와 비슷한 성장을 나타내는 4개의 다른 돌연변이체를 함께 단리하고 각각 iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주로 지정하였다(도 2). 구체적으로, 진화된 EDA50, iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주의 게놈을 DNA 분리 키트(GeneAll Biotechnology Co., Korea)를 사용하여 분리하였다. 그 후, Illumintha HiSeq 2000 서열분석기(Macrogen Inc., Korea)를 사용하여 차세대 서열분석으로 EDA50, iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주의 서열을 분석하였다. 이때, 대장균 MG1655(NC_000913.3)의 게놈 서열을 기준으로 사용하였으며, ED 균주 및 EDA50, iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주에서 특정 영역의 PCR 증폭물의 DNA 서열분석을 통해 돌연변이 발생을 확인하였다. 돌연변이 빈도를 분석하기 위해, EDA50에서 발견된 돌연변이는 iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4와 다시 PCR 증폭 및 DNA 서열분석을 하였다.

[0118] 그 결과, EDA50 균주에서 6개의 유전자 돌연변이가 확인되었다(표 9).

표 9

[0119]

Gene	Gene product	Class	Nucleotide		Protein	
			Mutation (position[a])	Codon	Size (a.a)	Change
gntR	gluconate repressor protein	regulator	C422A (3578305)	GCG>GAG	331	A141E
galR	galactose repressor protein	regulator	G812A (2977410)	GGC>GAC	343	G271D
ugd-	UDP-glucose 6-dehydrogenase	metabolic			388	
gnd-	6-phosphogluconate dehydrogenase	metabolic	Δ2312bp (2099438..)	-	468	-
wbbL-1	interrupted rhamnosyltransferase	-			-	
ptsG	glucose-specific PTS enzyme IIBC component	transporter	+1199bp (1158687..)	-	477	-
crp	cAMP response protein	regulator	G253T (3486372)	GCA>TCA	210	A85S
talB	transaldolase B	metabolic	C740T (8977)	GCA>GTA	317	A247V

[0120] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, *gntR*, *galR*, *ugd-gnd-wbbL-2* 및 *ptsG* 유전자에서의 돌연변이가 5개의 EDA50, iEDA50-1, iEDA50-2, iEDA50-3 및 iEDA50-4 균주에서 검출되었으며, *crp* 유전자에서의 돌연변이는 EDA50 및

iEDA50-3 균주에서 검출되었고, *talB* 유전자에서의 돌연변이는 EDA50 균주에서만 검출되었다(도 3).

[0121] **실시예 3. 유전자 돌연변이가 균주의 성장에 미치는 영향 확인**

[0122] 상기 실시예 2에서 검출된 각각의 유전자 돌연변이가 EDA50 균주의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, EDA50 균주의 각각의 유전자 돌연변이를 야생형 대장균(MG1655)의 유전자로 복원하여 각각의 유전자 돌연변이가 성장에 미치는 영향을 파악하였으며, 이를 EDA50 균주와 비교하였다.

[0123] 먼저, EDA50에서 각각의 돌연변이된 유전자는 하기와 같이 표기하였다. 상기 *gntR* 유전자는 gn, *galR* 유전자는 ga, *crp* 유전자는 cr, *talB* 유전자는 ta, *ptsG* 유전자는 pt 및 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자는 ug로 표기하였다. gntR, galR, *crp*, *talB*, *ptsG* 또는 ugd-gnd-wbbL-2 유전자 돌연변이의 단일 회복을 갖는 균주들을 각각 EDA50_gn^{wt}, EDA50_ga^{wt}, EDA50_cr^{wt}, EDA50_ta^{wt}, EDA50_pt^{wt} 및 EDA50_ug^{wt} 균주로 명명하였다. 상기 λ-Red 재조합 시스템과 tetA 이중 선별(tetA dual selection) 방법을 이용하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *gntR*, *galR*, *crp*, *talB* 또는 *ptsG* 유전자를 각각 야생형 대장균의 *gntR*, *galR*, *crp*, *talB* 또는 *ptsG* 유전자로 치환하였다.

[0124] 구체적으로, 먼저, EDA50 균주에 pSIM5 플라스미드를 전기천공법으로 형질전환하였다. 그 후, 형질전환된 EDA50 균주의 돌연변이된 *gntR* 유전자를 야생형 대장균의 *gntR* 유전자 치환하기 위해, 양 말단 영역에 *gntR* 유전자의 상부 및 하부 서열과 상동인 서열을 가진 테트라사이클린 카세트(delFP 및 delRP)와 야생형 대장균의 *gntR* 유전자 단말(dsDNA, FP 및 RP)을 각각 p3-BCD2-tetA를 가진 대장균 및 야생형 대장균을 주형으로 콜로니 PCR하였다. 상기 콜로니 PCR은 1단계 95℃ 3분 30초, 2단계 95℃ 30초, 3단계 56℃ 내지 68℃ 30초 및 4단계 72℃ 2분 30초으로 수행하였다, 상기 2단계에서 4단계를 25회 반복하였다.

[0125] 그 후, Ni-음성선별(Ni negative selection)하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *gntR* 유전자가 야생형 대장균의 *gntR* 유전자로 치환된 균주를 선별하였다. Ni 음성선별된 균주를 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에 스트리킹한 후, 42℃에서 하루 동안 소실과정을 거쳤다. 그 후, 콜로니들을 테트라사이클린 LB-아가-플레이트, 클로람페니콜 LB-아가-플레이트, 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에 각각 순서대로 접종하여 42℃ 온도에서 하루 동안 배양한 후, 항생제가 없는 LB-아가-플레이트에서만 자라는 EDA50_gn^{wt} 균주를 최종적으로 선발하였다. 최종적으로, EDA50 균주의 돌연변이된 *gntR* 유자가 야생형 대장균의 *gnt*R 유전자로 치환된 것을 PCR 및 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0126] *gntR* 유전자 치환 과정에 사용된 프라이머 및 플라스미드를 하기 표 10 및 표 11에 나타내었다.

표 10

[0127]

프라이머	서열정보	서열번호
gntR_H1_P1 (gntR delFP)	GTCCGTGTTAAACTAAGAGAATCTATCTCTTTTGTACCTTCAGGACGATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	28
gntR_H2_P4 (gntR delRP)	CCATGCCTTAAGTGTATAAGTGTGAGCTACTTCAAATTTGTGGGCTTAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC	29
gntR_seqFP (gntR_FP)	GCCTTTTTGCAGGCTTCCTC	30
gntR_seqRP (gntR_RP)	CCCGATACGCCCATCAAGAC	31

표 11

[0128]

플라스미드	특징	참조
pSIM5	λ-Red 재조합효소(recombinase) 발현 플라스미드; 온도 민감성 복제	Datta et al 2006
p3-BCD2-tetA	테트라사이클린 내성 유전자; Ni2+/테트라사이클린 역수송체	Ryu and Chandran2017

[0129] 또한, *gntR* 유전자 치환 방법과 동일한 방법으로, 상기 표 11의 플라스미드 및 하기 표 12의 프라이머를 이용하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *galR* 유전자가 야생형 대장균의 *galR* 유전자로 치환된 EDA50_ga^{wt} 균주를 제조하였다.

표 12

[0130]

프라이머	서열정보	서열번호
galR-tetA_P1 (galR delFP)	CGTTCTCAATGATAATGGTATTGATGTACCGGGTGAGATTTCGTTAATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	32
galR_H2_P4 (galR delRP)	CAGACCATCGAAGAATTACTGGCGCTGGAATTGCTTTAACTGCGGTTAGTATTCCGGGGATCCGTCGACC	33
galR-FP	TAATGAAACAAATGCCCGGT	34
galR-RP	TGCCGGAAGTGAAGGCAGGT	35

[0131] 나아가, *gntR* 유전자 치환 방법과 동일한 방법으로, 상기 표 11의 플라스미드 및 하기 표 13의 프라이머를 이용하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *crp* 유전자가 야생형 대장균의 *crp* 유전자로 치환된 EDA50_cr^{wt} 균주를 제조하였다.

표 13

[0132]

프라이머	서열정보	서열번호
crp_H1_P4 (crp delFP)	CTACCAGGTAACGCGCCACTCCGACGGGATTAACGAGTGCCGTAAACGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	46
crp_H2_P1 (crp delRP)	GGCGTTATCTGGCTCTGGAGAAAGCTTATAACAGAGGATAACCGCGCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	47
crp_seqFP (crp FP)	ATAGCCCCTTCCCAGGTAG	50
crp-RP(crp RP)	ATGGCGCGCTACCAGGTAAC	51

[0133] 또한, *gntR* 유전자 치환 방법과 동일한 방법으로, 상기 표 11의 플라스미드 및 하기 표 14의 프라이머를 이용하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *talB* 유전자가 야생형 대장균의 *talB* 유전자로 치환된 EDA50_ta^{wt} 균주를 제조하였다.

표 14

[0134]

프라이머	서열정보	서열번호
talB_H1_P1 (talB delFP)	AGACCGGTTACATCCCCCTAACAAGCTGTTTAAAGAGAAATACTATCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
talB_H2_P4 (talB delRP)	CTTCAGAAGAGGTAGCGTGACCGACTTCCCGGTCACGCTAAGAATGATTACAATTCCGGGGATCCGTCGACC	53
talB-FP	AAAGCAAAACGCCTGATCAA	54
talB-RP	GCGCAGGGATGCCTTTATCC	55

[0135] 또한, *gntR* 유전자 치환 방법과 동일한 방법으로, 상기 표 11의 플라스미드 및 하기 표 15의 프라이머를 이용하여 EDA50 균주의 돌연변이된 *ptsG* 유전자가 야생형 대장균의 *ptsG* 유전자로 치환된 EDA50_pt^{wt} 균주를 제조하였다.

[0136] 이때, 상기 표 11의 플라스미드 및 하기 표 15의 프라이머를 이용하였다.

표 15

[0137]

프라이머	서열정보	서열번호
ptsG-H1-P1	CACGCGTGAGAACGTAAAAAAAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	80
ptsG-H2-P4	GTAAAAAAGGCAGCCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCCAACGTCTTACGGAATTCCGGGGATCCGTCGACC	81
ptsG seqFP	ATAACTTCGCCCGTCTGTTT	82
ptsG seqRP	ATGTTCACCAGCTATCGGTT	83

[0138] 나아가, EDA50 균주의 돌연변이된 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자가 야생형 대장균의 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자로 치환된 EDA50_ug^{wt} 균주를 제조하기 위해, 먼저 유전자 단말(dsDNA) 제작 주형으로 사용할 균주를 제작하였다. 상기 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 돌연변이 대장균 제작을 위한 형질전환법에서 명시된 것과 동일한 방법으로 야생형 대장균(MG1655)을 모균주로 수행되었다. PCR 주형으로 사용되므로 카나마이신 양성 선별까지만 진행하여 PCR으로 확인하였다. 이때, 상기 유전자 단말 제작 주형으로 사용할 균주를 제작하는 과정에 사용된 프라이머 및 플라스미드를 하기 표 16 및 표 17에 나타내었다.

표 16

[0139]

프라이머	서열정보	서열번호
wbbL_2 insFP	TTATTAAAGTATAAATAGCTTATCCATGCTTATATGCTTACGGCTTTATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	42
wbbL_2 insRP	TTTTATCAAATCGCAACTTTGATCGAATTTCATCAGTTTTTCACCCGTAAATTCCGGGGATCCGTCGACC	43
ugd-gnd-wbbL FP	TAATCAGCATCCCGGTAGGC	40
ugd-gnd-wbbL RP	GAAATGACTGAGTCAGCCGAG	41

표 17

[0140]

플라스미드	특징	참조
pSIM5	λ-Red 재조합효소(recombinase) 발현 플라스미드; 온도 민감성 복제	Datta et al 2006
pKD13	유전자 파괴(gene disruption)용 주형 플라스미드. 카나마이신 내성 유전자가 FRT 부위의 측면에 있음. pir+ E.coli를 필요로 하는 oriR6K-gamma origin.	Datsenko and Wanner2000

[0141] 그 후, EDA50 균주의 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 영역 돌연변이를 복구하기 위해, 위에서 제작한 주형 균주를 사용하여 ugd-gnd-wbbL FP와 ugd-gnd-wbbL RP으로 PCR 증폭하여 제작된 dsDNA를 카나마이신 카세트로 사용하여 형질전환을 수행하였다. 상기 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 돌연변이 대장균 제작을 위한 형질전환법에서 명시된 것과 동일한 방법으로 EDA50 균주을 모균주로 수행되었다. 이때, 상기 표 6의 플라스미드 및 하기 표 18의 프라이머를 이용하였다.

표 18

[0142]

프라이머	서열정보	서열번호
ugd-gnd-wbbL FP	TAATCAGCATCCCGGTAGGC	40
ugd-gnd-wbbL RP	GAAATGACTGAGTCAGCCGAG	41
gnd seqFP_2	GATTTGATGACCATAACCGC	64
gnd seqRP_2	GTCAGTGGGAGAGATCTCAC	65

[0143] 이때, 배양은 아가-플레이트로부터 단일 콜로니를 3 ㎖의 LB 배지에서 200 rpm, 37℃ 온도에서 접종하였다. 밤새 성장한 균주를 4 ㎖의 글루코스 최소 M9 배지에 1:10 비율로 다시 접종하였다. 9시간 동안 각 균주들을 성장시킨 후에, 600nm 파장에서 초기 O.D값이 약 0.1 되도록 균주를 250 ㎖ 진탕 플라스크에 25 ㎖의 M9 배지에 접종한 후, 200 rpm, 37℃ 온도에서 배양하였다. O.D값은 분광광도계(Libra S22)를 이용하여 측정하였다.

[0144] 5개의 돌연변이체 중에서, *gntR, galR* 또는 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이의 단일 회복을 갖는 EDA50_gn^{wt}, EDA50_ga^{wt} 및 EDA50_ug^{wt} 균주는 EDA50에 비해 각각 순서대로 50%, 40% 및 30%까지 세포 성장의 현저한 감소를 나타냈다. 한편, *crp* 또는 *talB* 유전자 돌연변이의 단일 회복을 갖는 EDA50_cr^{wt} 및 EDA50_ta^{wt} 균주는 10% 미만의 세포 성장의 감소를 나타냈다(도 4).

[0145] 한편, EDA50_pt^{wt} 균주의 생장속도를 EDA50 균주와 비교하였다. 구체적으로, 먼저 각 균주의 성장속도는 하기의 방법으로 측정하였다. 배양은 아가-플레이트(agar plate)로부터 단일 콜로니를 96-웰-플레이트(96 Well Clear

Round Bottom 2 ㎖ Polypropylene Deep Well Plate)상에서 400 ㎕의 LB 배지에 200 rpm, 37℃ 온도에서 접종하였다. 12시간 동안 성장한 균주를 400 ㎕의 2 g/L 글루코스 최소 M9 배지에 1:10 비율로 다시 접종하였다. 12시간 동안 각 균주들을 성장시킨 후에, 균주를 96-웰-마이크로플레이트 상의 200 ㎕의 2 g/L 글루코스 최소 M9 배지에 1:50 비율로 접종하여 37℃에서 배양하였다. 마이크로 플레이트 리더(Infinite M200)에서 선형 진탕하였고(amplitude 3mm) 600nm 파장에서 O.D값을 10분 주기로 16시간 동안 측정하였다. 생장속도(μ)는 대수증식기에서 $\{\ln(OD600)_{t2} - \ln(OD600)_{t1}\}/(t2-t1)$에 의해 계산되었다. *ptsG* 유전자의 돌연변이 단일 회복을 갖는 EDA50_pt^{wt}는 EDA50에 비해 23%의 세포 성장의 현저한 감소를 나타냈다(도 5).

[0146] 이를 통해, *gntR*, *galR*, *ptsG* 및 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이가 글루코스를 포함하는 최소 배지에서 EDA50 균주의 세포 성장 향상에 기여하는 것을 확인하였다.

[0147] 또한, *gntR*, *galR*, *ptsG*, *crp*, *talB* 및 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이의 영향을 비교하기 위해, 이들 *gntR*, *galR*, *ptsG*, *crp*, *talB* 및 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이의 단일 또는 조합을 비진화된 균주 ED 균주에 도입하고, 이의 성장율을 EDA50 균주의 성장율과 비교하였다.

[0148] 상기 실시예 1에서 제조한 ED 균주에 *gntR*, *galR*, *crp*, *talB* 유전자를 EDA50 균주의 돌연변이된 *gntR*, *galR*, *crp*, *talB* 유전자로 치환하였다. 구체적인 방법은 상기 *gntR*, *galR*, *crp*, *talB* 돌연변이가 회복된 EDA50 균주 제작을 위한 형질전환방법과 동일하다. 다만, 돌연변이 도입을 위해 돌연변이 유전자 단말(FP, RP)을 야생형 대장균이 아닌 EDA50 균주를 주형으로 콜로니 PCR하여 제작하였다. 또한, 모균주는 EDA50 균주가 아닌 ED 균주를 이용하였다.

[0149] 구체적으로, 먼저 각 균주의 성장속도는 하기의 방법으로 측정하였다. 배양은 아가-플레이트(agar plate)로부터 단일 콜로니를 96-웰-플레이트(96 Well Clear Round Bottom 2mL Polypropylene Deep Well Plate)상에서 400 ㎕의 LB 배지에 200 rpm, 37℃ 온도에서 접종하였다. 12시간 동안 성장한 균주를 400 ㎕의 5 g/L 글루코스 최소 M9 배지에 1:10 비율로 다시 접종하였다. 12시간 동안 각 균주들을 성장시킨 후에, 균주를 96-웰-마이크로플레이트 상의 200 ㎕의 5 g/L 글루코스 최소 M9 배지에 1:50 비율로 접종하여 37℃에서 배양하였다. 마이크로 플레이트 리더(Infinite M200)에서 선형 진탕하였고(amplitude 3mm) 600nm 파장에서 O.D값을 10분 주기로 16시간 동안 측정하였다. 생장속도(μ)는 대수증식기에서 $\{\ln(OD600)_{t2} - \ln(OD600)_{t1}\}/(t2-t1)$ 에 의해 계산되었다.

[0150] 그 결과, *gntR*, *galR* 또는 *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이를 갖는 ED_gn*, ED_ga* 및 ED_ug* 균주의 성장율은 EDA50 균주의 성장율보다 현저하게 낮았다. 특히, *ugd-gnd-wbbL-2* 유전자 돌연변이를 갖는 ED_ug* 균주의 성장율은 ED균주보다 낮았다.

[0151] 또한, *gntR*, *galR*, *ugd-gnd-wbbL-2*, *ptsG*, *crp*, *talB* 유전자 돌연변이를 모두 갖는 ED_gn*ga*ug*cr*ta*pt* 균주는 EDA50 균주의 95% 정도의 성장율 나타냈다(도 6).

[0152] **실시예 4. gntR, galR 또는 ugd-gnd-wbbL-2 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화 확인**

[0153] **실시예 4.1. gntR 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화 확인**

[0154] *gntR* 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화를 확인하기 위해, EDA50 균주의 *gntR* 유전자를 결실시키고 이를 EDA50_△*gntR*로 명명하였다. 상기 EDA50_△*gntR* 균주와 실시예 3에서 제조한 EDA50_gn^{wt} 균주와 성장율을 비교하였다.

[0155] *gntR* 유전자 결실은 상기 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 돌연변이 대장균 제작을 위한 형질전환법에서 명시된 것과 동일한 방법으로 EDA50을 모균주로 수행하였다. 이때, 상기 표 10과 동일한 프라이머 및 표 6과 동일한 플라스미드를 이용하였다. 그 결과, *gntR* 유전자의 결실은 EDA50 균주의 성장에 영향을 미치지 않은 반면, 이러한 *gntR* 유전자 돌연변이를 모균주의 유전자로 복원시킨 EDA50_gn^{wt} 균주에서는 성장율이 현저한 감소하였다.

[0156] 한편, *gntR* 유전자에 의해 암호화되는 GntR은 D-글루코네이트 부재시, 글루코네이트 대사에 관여하는 유전자 발현을 억제하는 DNA-결합 전사 억제제이다. 글루코네이트는 GntK(Gluconokinase)에 의해 인산화되어 6PG(6-phosphogluconate dehydrogenase)를 생성하며, 이는 EDP의 Edd 및 Eda에 의해 G3P 및 PYR로 추가로 대사된다. *gntR* 유전자를 결실시킴으로써 글루코네이트(gluconate) 없이 *edd* 및 *eda* 유전자의 발현된다는 점에서 상기 결과는 EDA50_△*gntR* 균주에서 *edd* 및 *eda* 유전자가 발현되었을 수 있기에, EDA50_gn^{wt} 균주의 플라스미드에서 내인성 *edd-eda* 유전자를 발현시켜 성장율을 확인하였다(도 7). EDA50_gn^{wt} 균주의 플라스미드에서 내인성 *edd-eda*

유전자를 발현시킨 균주를 "EDA50_gn^{wt}-pEdd-Eda”로 명명하였다.

[0157] 구체적으로, pBbA6c-*edd-eda* 플라스미드를 제작하기 위해, pBbA6c-*rfp* 벡터에서 적색 형광 단백질(RFP)을 암호화하는 유전자를 EcoRI 및 BamHI로 절단시켰다. EcoRI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 및 BamHI 부위를 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 대장균 MG1655 게놈 DNA로부터 *edd-eda* 유전자를 증폭하였다. 그 후, *edd-eda* 유전자를 EcoRI 및 BamHI로 절단시킨 후 정제된 *edd-eda* 유전자 단편을 상기 준비해둔 pBbA6c 벡터에 삽입시켰다. pBbA6c-*edd-eda* 플라스미드를 이용하여 EDA50_gn^{wt} 균주를 형질전환 시켰다. 상기 배양은 아가-플레이트로부터 단일 콜로니를 3 ㎖의 LB 배지에서 200 rpm, 37℃ 온도에서 접종하였다. 밤새 성장한 균주를 4 ㎖의 글루코스 최소 M9 배지에 1:10 비율로 다시 접종하였고 벡터 발현을 위해 6.25 μM의 IPTG를 처리하였다. 9시간 동안 각 균주들을 성장시킨 후에, 600 nm 파장에서 초기 O.D값이 약 0.1 되도록 균주를 250 ㎖ 진탕 플라스크에 25 ㎖의 M9 배지에 접종한 후 6.25 μM의 IPTG를 처리하고, 200 rpm, 37℃ 온도에서 배양하였다. O.D값을 분광광도계(Libra S22)를 이용하여 측정하였다.

[0158] 그 결과, EDA50_gn^{wt}-pEdd-Eda 균주의 성장율이 EDA50 균주의 성장율의 90% 수준까지 증가하였다. 이를 통해, *edd-eda* 유전자의 플라스미드를 기반으로 하는 발현이 EDA50_gn^{wt} 균주에서 GntR에 의해 억제된 *edd-eda* 유전자를 기능적으로 대체할 수 있는 것을 확인하였다(도 8).

[0159] **실시예 4.2. galR 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화 확인**

[0160] *galR* 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화를 확인하기 위해, EDA50 균주의 *galR* 유전자를 결실시키고 이를 각각 EDA50_△*galR*로 명명하였다. 상기 EDA50_△*galR* 균주와 실시예 3에서 제조한 EDA50_ga^{wt} 균주와 성장율을 비교하였다.

[0161] 구체적으로, galR 유전자 결실은 상기 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 돌연변이 대장균 제작을 위한 형질전환법에서 명시된 것과 동일한 방법으로 EDA50을 모균주로 수행하였다. 이때, 상기 표 12와 동일한 프라이머 및 표 6과 동일한 플라스미드를 이용하였다. 그 결과, *galR* 유전자의 결실은 EDA50 균주의 성장에 영향을 미치지 않은 반면, 이러한 *galR* 유전자 돌연변이를 모균주의 유전자로 복원시킨 EDA50_ga^{wt} 균주에서는 성장율이 유의미하게 감소하였다.

[0162] 한편, *galR* 유전자에 의해 암호화되는 GalR은 갈락토스를 이용할 수 없을 때 갈락토스 대사 관련 유전자를 하향 조절하는 조절 인자이다. GalR의 레귤론(regulon)은 갈락토스 퍼미아제(galactose permease)를 암호화하는 *galP* 유전자가 포함되며, *galP* 유전자에 의해 암호화되는 GalP는 글루코스에 대한 활성을 나타낸다(도 9). 이러한 관점에서 상기 결과는 EDA50_△*galR* 균주에서 *galP* 유전자가 발현되었을 수 있기에, EDA50_ga^{wt} 균주의 플라스미드에서 내인성 *galP* 유전자를 발현시켜 성장율을 확인하였다.

[0163] 구체적으로, pBbA6c-*galP* 플라스미드를 제작하기 위해, pBbS6k-*rfp* 벡터에서 적색 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 BglII 및 XhoI으로 절단시켰다. BglII 부위를 포함하는 정방향 프라이머 및 XhoI 부위를 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 대장균 MG1655 게놈 DNA로부터 대장균 *galP* 유전자를 증폭하였다. 그 후, *galP* 유전자를 BglII 및 XhoI으로 시킨 후, 정제된 *galP* 유전자 단편을 상기 준비해둔 pBbS6k 벡터에 삽입시켰다. pBbA6c-*galP* 플라스미드를 이용하여 EDA50_ga^{wt} 균주를 형질전환 시킨 후, 실시예 4.1과 동일한 방법으로 배양하였다.

[0164] 그 결과, EDA50_ga^{wt} 균주의 플라스미드에서 내인성 *galP* 유전자를 발현시킬 경우, EDA50 균주와 유사한 정도의 성장율을 보였다. 이를 통해, *galP* 유전자의 플라스미드를 기반으로 하는 발현이 EDA50_ga^{wt} 균주에서 GalR에 의해 억제된 *galP* 유전자를 기능적으로 대체할 수 있는 것을 확인하였다(도 10).

[0165] **실시예 4.3. ugd-gnd-wbbL-2 유전자 돌연변이에 의한 기능 변화 확인**

[0166] *ugd* 및 *gnd* 유전자를 갖는 *ugd-gnd-wbbL-2* 영역의 결실에 의한 기능 변화를 확인하기 위해, 결실된 *ugd-gnd-wbbL-2* 영역을 EDA50의 염색체에 재도입하였다. 이를 EDA50_ug^{wt}로 명명하였다. 나아가, *ugd-gnd-wbbL-2* 영역 전부가 아닌 *gnd* 유전자 파쇄를 EDA50_ug^{wt} 균주의 염색체에 재도입하였다. 이를 EDA50_ug^{wt}*_gnd* 로 명명하였다. 상기 EDA50_ug^{wt}*_gnd* 균주, EDA50_ug^{wt} 균주 및 실시예 1에서 제조한 EDA50 균주와 성장율을 비교하였다.

[0167] 상기 실시예 3에서 제조한 EDA50_ug^{wt} 균주를 실시예 1에서 *pfkA* 및 *pfkB* 유전자가 결실된 돌연변이 대장균 제작을 위한 형질전환법에서 명시된 것과 동일한 방법으로 하기 표 19에 개시된 프라이머 및 표 4의 플라스미드를 이용해 EDA50_ug^{wt} 균주에서 gnd 유전자가 결실된 EDA50_ug^{wt}_*gnd* 균주를 제작하였다.

표 19

[0168]

프라이머	서열정보	서열번호
gnd_H1_P1 (gnd delFP)	AGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	62
gnd_H2_P4 (gnd delRF)	GTGCAATATACGCCGGGCCTCAATTTTATTGTTGGTTAAATCAGATTAATATTCCGGG GATCCGTCGACC	63
gnd seqFP_2	GATTTGATGACCATAACCGC	64
gnd seqRP_2	GTCAGTGGGAGAGATCTCAC	65

[0169] 구체적으로, pBbS5a-*gnd* 플라스미드를 제작하기 위해, pBbS5a-rfp 벡터에서 적색 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 EcoRI 및 XhoI으로 절단시켰다. EcoRI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 및 XhoI 프라이머를 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 야생형 대장균(MG1655)의 게놈 DNA로부터 *gnd* 유전자를 증폭하였다. 그 후, *gnd* 유전자를 EcoRI 및 XhoI으로 절단시킨 후, 정제된 *gnd* 유전자 단편을 상기 준비해둔 pBbS5a 벡터에 삽입하였다. pBbA5a-*gnd* 플라스미드를 이용하여 EDA50_ug^{wt} 균주를 형질전환 시킨 후, 실시예 4.1과 동일한 방법으로 배양하였다.

[0170] 그 결과, EDA50_ug^{wt} 균주는 EDA50 균주에 비해 성장율이 감소하였다. 반면, EDA50_ug^{wt}_*gnd* 균주는 EDA50 균주와 유사한 정도의 성장율을 보였다(도 11).

[0171] **실시예 5. EDA50 균주를 이용한 3-히드록시프로피온산 생산**

[0172] EDA50 균주를 상업적으로 이용하기 위해, EDA50 균주에 높은 NADPH를 요구하는 3-히드록시프로피온산(hydroxypropionate, 3-HP) 생산을 위한 기구(machineries)를 도입하였다. 3-HP는 다양한 고부가 가치 화합물로 추가로 변형되도록 하는 플랫폼 화학물질이다. 1 몰(mol)의 글루코스로부터 2 몰의 3-HP가 4몰의 NADPH를 소비하여 이론적으로 생산될 수 있다.

[0173] 먼저, 3-HP 생산을 위해, 낮은 말로닐-CoA 가용성으로 인한 제한 요소를 제거하기 위해, 아세틸-CoA 카복실라제(ACC)는 과발현되도록 하고, 내인성 에노일-[아세틸-캐리어-단백질] 환원 효소가 온도-감응성이 되도록 하는 부위-지정 돌연변이를 도입시켜 지방산 합성에 의한 말로닐-CoA 소비를 감소시켰다(도 12).

[0174] 구체적으로, pMCR 플라스미드(서열번호 17)를 제작하기 위해, pCDF- mcrC*-mcrN 벡터에 EcoRI 및 XhoI를 처리하여 *Chloroflexus aurantiacus*로부터 3개의 돌연변이(N391V/K557W/S565N)를 포함하는 절단된 C-말단 도메인 및 말로닐-CoA 환원효소의 N-말단 도메인을 암호화하는 유전자를 포함하는 mcrC*-mcrN 유전자 단편을 추출하였다. pBbS6k-*rfp* 벡터에서 적색 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 BglII 및 XhoI으로 절단시켰다. 상기 mcrC*-mcrN 유전자 단편을 상기 준비해둔 pBbS6k 벡터에 삽입시켰다. pMCR 플라스미드를 이용하여 야생형 대장균(MG1655), ED 균주 및 EDA50 균주를 각각 형질전환 시켰다.

[0175] 또한, pACC 플라스미드(서열번호 16)를 제작하기 위해, pBbA2k-accDABC 벡터에 BglII 및 XhoI 처리하여 아세틸-CoA 아세틸 CoA 카복실트랜스퍼라제(ACC) 복합체를 암호화하는 accDABC 유전자 단편을 추출하였다. pBbS6k-*rfp* 벡터에서 적색 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 BglII 및 XhoI으로 절단시켰다. 겔-용리 후, pBbA6c 백본을 용리한 accDABC 단편과 연결하였다. 상기 accDABC 유전자 단편을 상기 준비해둔 pBbS6k 벡터에 삽입시켰다. pACC 플라스미드를 이용하여 야생형 대장균(MG1655), ED 균주 및 EDA50 균주를 각각 형질전환 시켰다.

[0176] 그 후, pMCR 플라스미드 및 pACC 플라스미드로 형질전환시킨 야생형 대장균(MG1655), ED 균주 및 EDA50 균주를 이용해 3-HP 생산을 위해, 아가-플레이트로부터 단일 콜로니를 3 ㎖의 LB 배지에 접종한 후, 200 rpm, 37℃ 온도에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양한 균주를 20 g/L 글루코스, 1.0 g/L 효모 추출물, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ 및 미량 원소가 보충된 M9 배지에 1:20 비율로로 접종하고, 30℃ 및 200 rpm 조건에서 9시간 동안 배양하

였다. 이때, 미량 원소 용액의 조성은 다음과 같다: 1리터 당 2.4 g의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.3 g의 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.15 g의 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 g의 $ZnCl_2$, 0.3 g의 $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$, 0.075 g의 H_3BO_3, 및 0.495 g의 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. *mcrC*-*mcrN* 및 *accDABC*의 발현을 위해 50 μM의 IPTG 및 100 nM의 테트라사이클린. 유도제를 첨가한 직후, 온도를 37℃로 증가시켰다.

[0177] 3-HP의 분석은 배양배지를 13,200×g에서 30분 동안 원심분리한 후, 상청액을 80℃ 온도에서 1시간 동안 열처리하였다. 그 후, 13,200×g에서 30분 동안 다시 원심분리한 후, 수득한 상청액을 분석에 사용하였다. HPLC(high-performance liquid chromatography)로 3-HP 농도를 측정하였다. 배지를 20배 희석한 후, 이동상으로서 5.41 mM H_2SO_4를 사용하여 35℃ 온도에서 300 mm X 7.8 mm Aminex HPX-87H(Bio-Rad, USA) 컬럼에 희석시킨 배지 20 ㎕를 주입하였다.

[0178] 예상한 바와 같이, EDA50 균주에 3-HP 생산을 위한 기구를 도입하는 것만으로는 ED 균주에 비해 3-HP 생산이 크게 향상되지는 않았다. 구체적으로, IPTG 처리하고 48시간 후, EDA50 균주는 1.34 g/L의 3-HP를 생산한 반면, ED 균주는 0.83 g/L의 3-HP를 생산하였다. EDA50 균주가 ED 균주보다 1.6배 더 높은 3-HP 역가를 생성하였지만, 이들 사이에 바이오매스 축적에 큰 차이가 있다는 것을 고려하면 배수-증가(fold-increase)는 미미했다(도 13).

[0179] **실시예 6. EDA50 균주를 이용한 높은 NADPH 조건에서의 3-히드록시프로피온산 생산**

[0180] 높은 NADPH 조건을 형성하기 위해, 상기 pMCR 플라스미드 및 pACC 플라스미드로 형질전환시킨 균주에 상기 실시예 4.3에서 제조한 IPTG-유도성 프로모터 및 *gnd* 유전자를 포함하는 pBbS5a-*gnd* 플라스미드 또는 IPTG-유도성 프로모터, *gnd* 유전자 및 *gntR* 유전자를 포함하는 pBbS5a-*gnd*-*gntR* 플라스미드로 형질전환시켰다. 이때, pMCR 플라스미드(서열번호 17) 및 pACC 플라스미드(서열번호 16)로 형질전환시킨 EDA50 균주를 대조군으로 설정하였다.

[0181] pBbS5a-*gnd*-*gntR*을 제작하기 위해, BglII 부위를 포함하는 정방향 프라이머 및 XhoI를 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 야생형 대장균(MG1655)의 게놈 DNA로부터 대장균 *gntR* 유전자를 증폭하였다. 그 후, *gntR* 유전자를 BglII 및 XhoI으로 시킨 후, *gntR* 유전자 단편을 pBbS5a-*gnd* 벡터에 삽입시켰다.

[0182] 형질전환시킨 EDA50 균주들을 실시예 5와 동일한 방법으로 접종 및 9시간 배양한 후, pBbS5a-*gnd* 및 pBbS5a-*gnd*-*gntR* 플라스미드 및 *mcrC*-*mcrN* 및 *accDABC*의 발현을 위해 50 μM의 IPTG 및 100 nM의 테트라사이클린. 유도제를 첨가한 직후, 온도를 37℃로 증가시켰다. 그 후, 상기와 동일한 방법으로 3-HP를 분석하였다.

[0183] 그 결과, pBbS5a-*gnd* 로 형질전환시킨 EDA50 균주(EDA50 pGnd)에서 IPTG 유도 48시간 후 3-HP 역가 1.99 g/L에서 상당히 향상되었다. 또한, pBbS5a-*gnd*-*gntR*로 형질전환시킨 EDA50 균주(EDA50 pGnd-GntR)에서 IPTG 유도 48시간 후 2.65 g/L의 3-HP가 생성되었고, 이는 동일한 pMCR 플라스미드 및 pACC 플라스미드로 형질전환시킨 ED 균주 및 모균주보다 각각 3.2 배 및 3.34 배 더 높았다(도 14). 이를 통해, 균주의 성장 후, 3-HP 생산을 위해 *gnd* 유전자 및 *gntR* 유전자를 조건부로 발현시킬 경우, 더 많은 NADPH를 공급하여 3-HP 생산량을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0184] **실시예 7. EDA50 균주를 이용한 라이코펜 생산**

[0185] EDA50 균주를 상업적으로 이용하기 위해, EDA50 균주에 높은 NADPH를 요구하는 라이코펜(Lycopene) 생산을 위한 기구(machineries)를 도입하였다. 먼저, 라이코펜 생산을 위해, 하기 표 20에 기재된 바와 같은 라이코펜 생합성 효소를 가진 pAC-LYC04 플라스미드(서열번호 18)를 EDA50 균주들에 전기천공법으로 형질전환하였다.

표 20

[0186]

플라스미드	특성	참고
pAC-LYC04	라이코펜 생합성 효소(Pcons-crtE, crtB and crtI, Ptrc-ipiHp1)를 가지며, 클로람페니콜 저항성을 가짐. pA15 origin	Kim and Keasling, 2001

[0187] 그 후, 야생형 대장균(MH1655), ED 균주, △pfkA 균주, △pgi 균주 및 EDA50 균주를 이용하여 라이코펜을 생산하기 위해, 아가 플레이트로부터 각각의 단일 콜로니를 5 ㎖ LB 배지에 각각 접종하였다. 9시간 동안 배양한 후, 250 ㎖ 진탕 플라스크에서 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 및 5 g/L 글루코스가 보충된 50 ㎖의 M9 최소 배지에 균주를 1:10으로 희석하였다. 밤새 성장한 균주를 150 ㎖ 시럼병(serum bottle) 중의 30 ㎖의 신선한 M9 최소 배지에 옮겼다. 이때, 초기 O.D값(600nm)을 약 0.2로 조정하였다. 질소 가스를 플러싱(flushing)하고 밀봉하여

M9 최소 배지 중의 산소를 비웠다. 필요한 경우, 50 mM의 질산 나트륨을 첨가하였다. 전체 배양 동안 200 rpm 및 37℃ 온도에서 균주를 성장시켰다. 분광광도계(Libra S22)를 이용하여 600nm 파장에서 O.D값을 측정하였다.

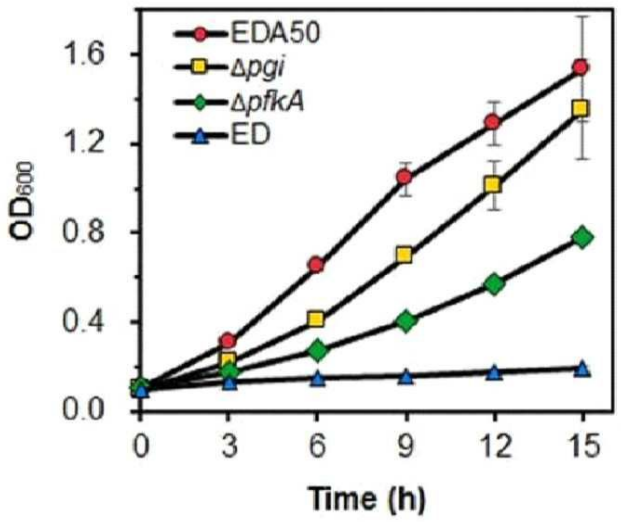
[0188] 라이코펜 생산을 위해, 아가 플레이트로부터 단일 콜로니를 200 rpm 및 37℃ 온도에서 적절한 항생제가 포함된 5 ㎖의 LB 배지에 접종하였다. 밤새 성장시킨 균주를 적절한 항생제가 포함된 50 ㎖의 LB 배지에 옮기고 9시간 동안 성장시켰다. 이어서, 상기 배양물을 적절한 항생제와 함께 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 4 g/L 글루코스 및 100 mM 포타슘 포스페이트 완충액 (pH 7.0)으로 보충된 50 ㎖의 M9 배지에 1:10으로 희석하였다. 배양 시작 시에, 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 라이코펜 합성에 관여하는 효소의 발현을 유도하였다.

[0189] 그 후, 상기 2 ㎖의 배양물을 13,200×g에서 1분간 원심분리하여 균주를 수확하였다. 1 ㎖의 아세톤을 첨가한 후, 볼텍싱한 후 55℃ 온도에서 15분 동안 가열하여 라이코펜을 추출하였다. 이어서, 13,200×g에서 3분 동안 원심분리한 후 수득한 500 ㎕의 상청액을 동일 부피의 정제수와 혼합하였다. 분광광도계(Libra S22)를 사용하여 474 nm 파장에서(A454) 흡광도를 측정하고 라이코펜의 농도를 표준 라이코펜 용액의 A454와 비교하여 추정하였다.

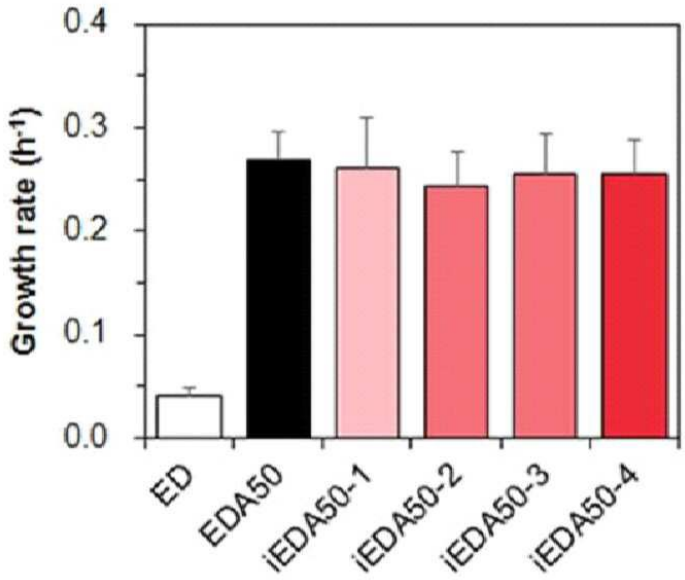
[0190] 그 결과, 야생형 대장균(MG1655)에 비해 ED 균주 및 △pfkA 균주의 경우, 라이코펜 생산량이 감소하였으며, △pgi 균주의 경우 조금 증가하였다. 반면, EDA50 균주의 경우, 야생형 대장균에 비해 2배 이상 라이코펜 생산량이 증가하였으며, 육안상으로도 EDA50 균주를 배양한 배지가 제일 붉게 관찰되었다(도 15 및 도 16).

도면

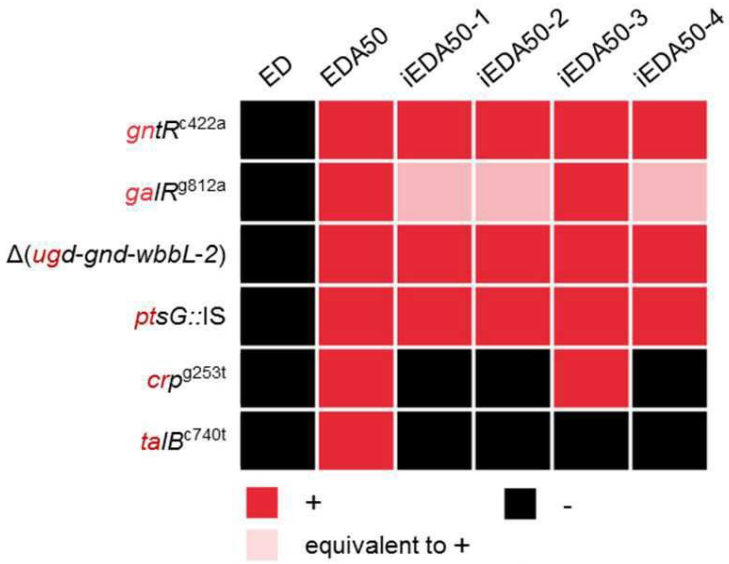
도면1



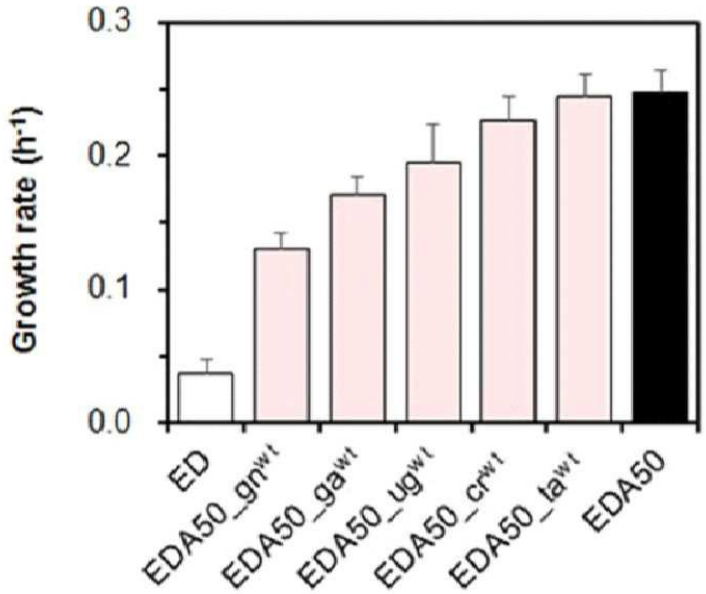
도면2


Growth rate (h^{-1})
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ED
EDA50
iEDA50-1
iEDA50-2
iEDA50-3
iEDA50-4

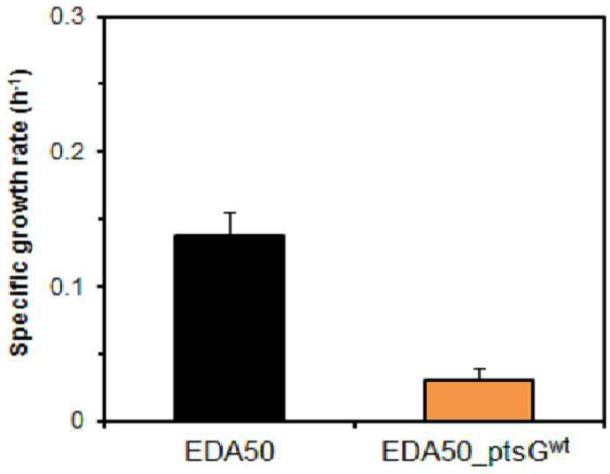
도면3


ED
EDA50
iEDA50-1
iEDA50-2
iEDA50-3
iEDA50-4
gntR c422a
galR g812a
Δ(ugd-gnd-wbbL-2)
ptsG::IS
crp g253t
talB c740t
+
-
equivalent to +

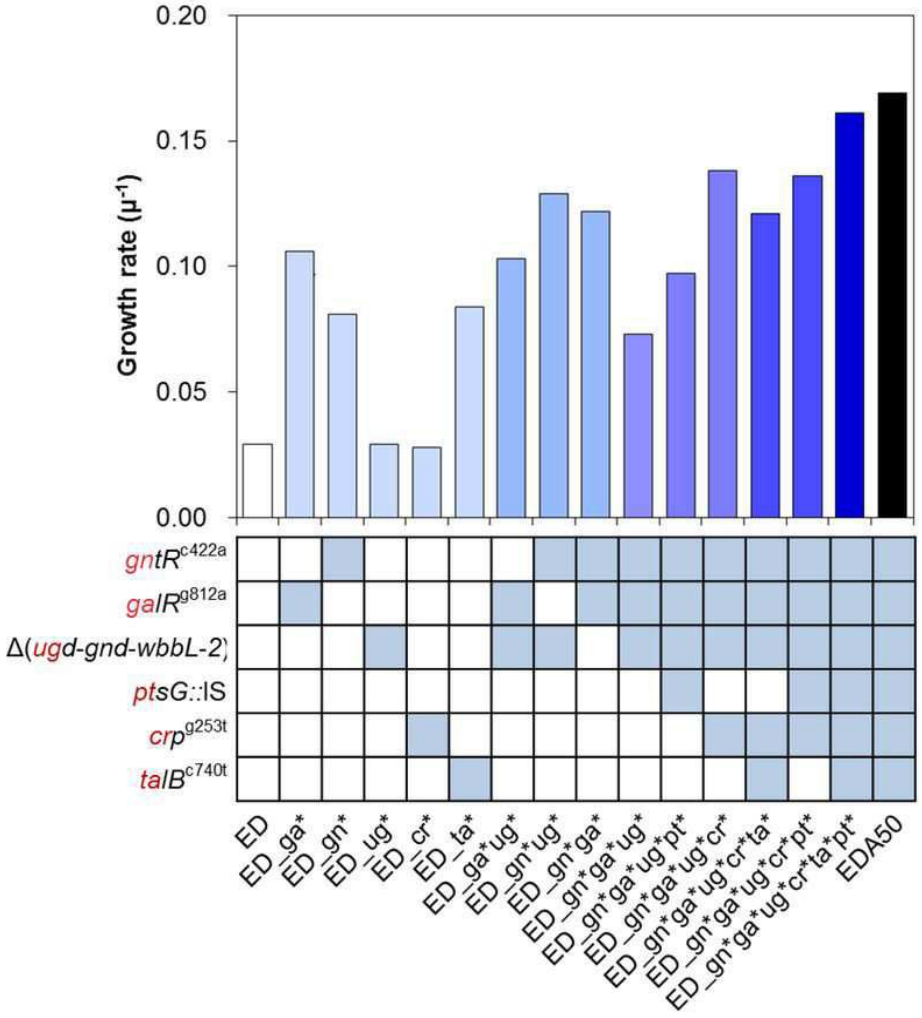
도면4


Growth rate (h-1)
0.3
0.2
0.1
0.0
ED
EDA50_gnwt
EDA50_gawt
EDA50_ugwt
EDA50_crwt
EDA50_tawt
EDA50

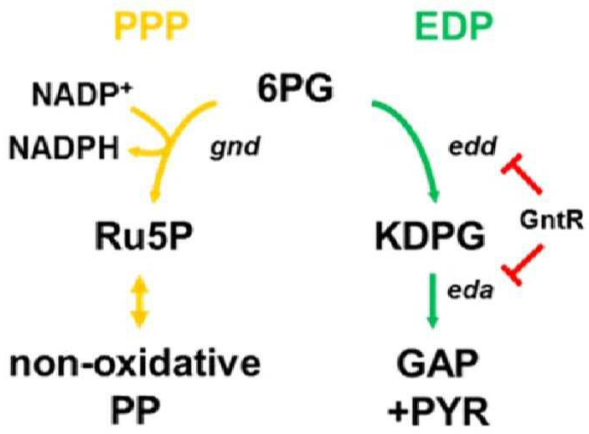
도면5


Specific growth rate (h-1)
0.3
0.2
0.1
0
EDA50
EDA50_ptsGwt

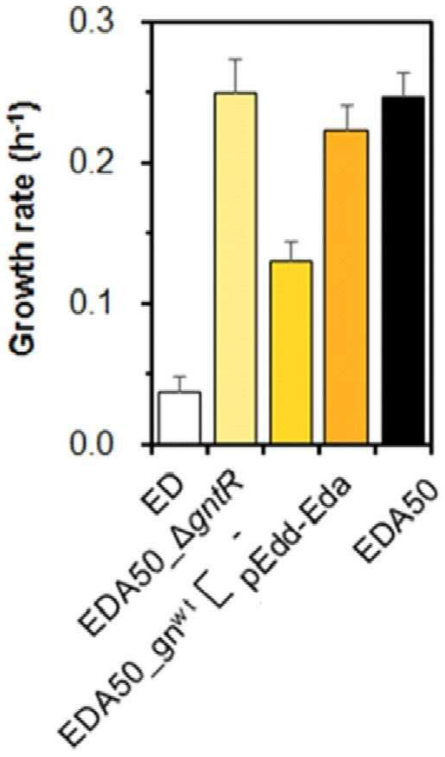
도면6


0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Growth rate (μ-1)
gntRc422a
galRg812a
Δ(ugd-gnd-wbbL-2)
ptsG::IS
crpg253t
talBc740t
ED
ED_ga*
ED_gn*
ED_ug*
ED_cr*
ED_ta*
ED_ga*ug*
ED_gn*ug*
ED_gn*ga*
ED_gn*ga*ug*
ED_gn*ga*ug*pt*
ED_gn*ga*ug*cr*
ED_gn*ga*ug*cr*ta*
ED_gn*ga*ug*cr*pt*
ED_gn*ga*ug*cr*ta*pt*
EDA50

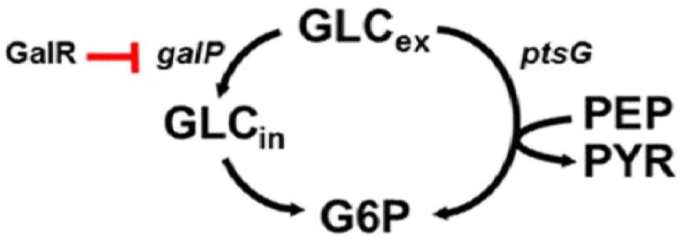
도면7


PPP
EDP
NADP+
NADPH
6PG
gnd
edd
GntR
Ru5P
KDPG
eda
non-oxidative
PP
GAP
+PYR

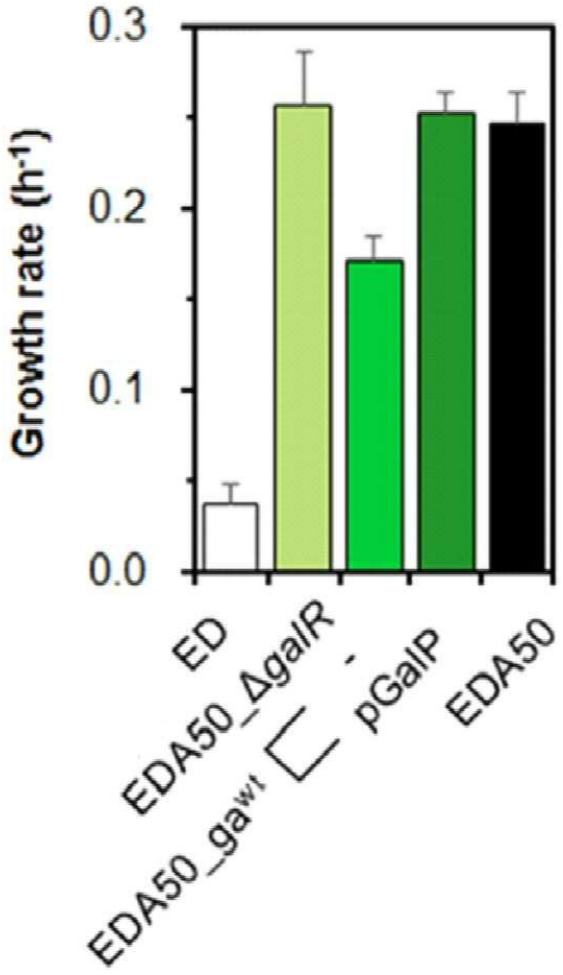
도면8


0.3
0.2
0.1
0.0
Growth rate (h-1)
ED
EDA50_ΔgntR
EDA50_gnwI
pEdd-Eda
EDA50

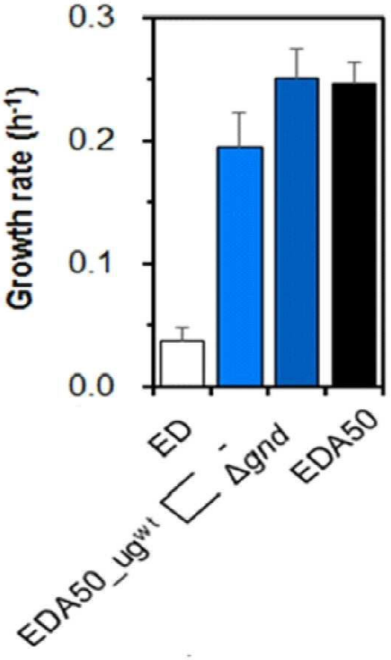
도면9


GalR
galP
GLCex
ptsG
GLCin
PEP
PYR
G6P

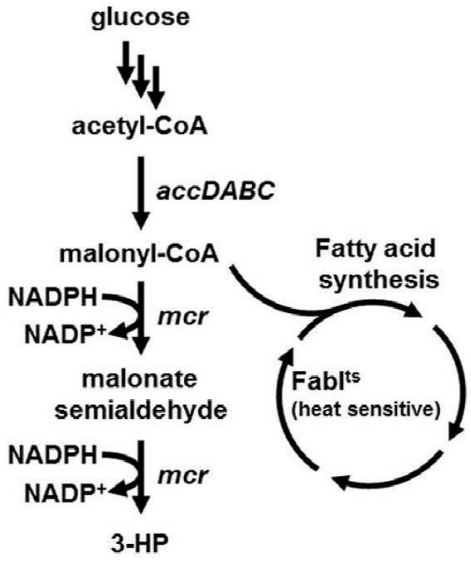
도면10


0.3
0.2
0.1
0.0
Growth rate (h-1)
ED
EDA50_ΔgalR
EDA50_gawt
-
pGalP
EDA50

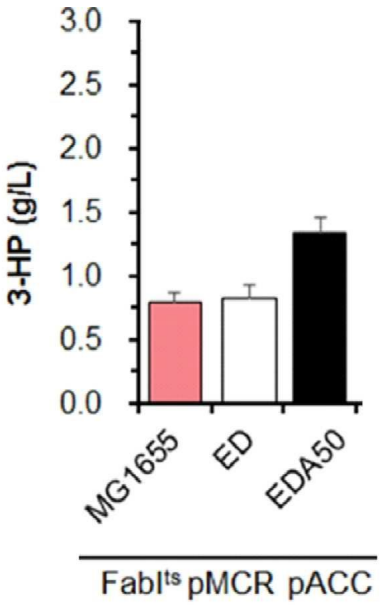
도면11


0.3
0.2
0.1
0.0
Growth rate (h-1)
ED
EDA50_ugwt
-
Δgnd
EDA50

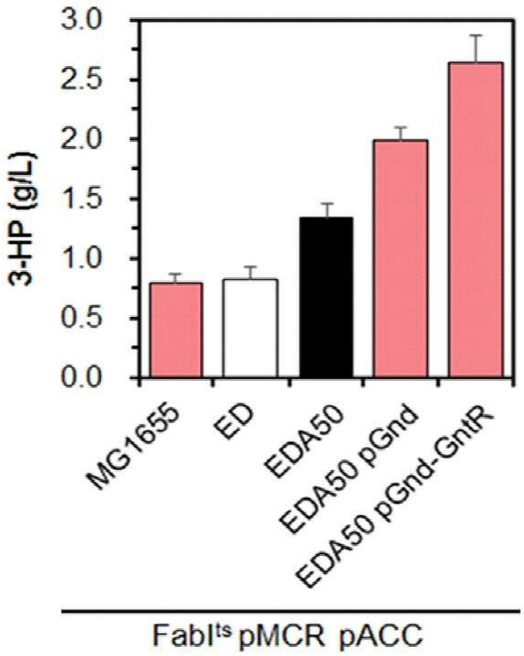
도면12


glucose
acetyl-CoA
accDABC
malonyl-CoA
Fatty acid synthesis
NADPH
NADP+
mcr
malonate semialdehyde
FabIts (heat sensitive)
NADPH
NADP+
mcr
3-HP

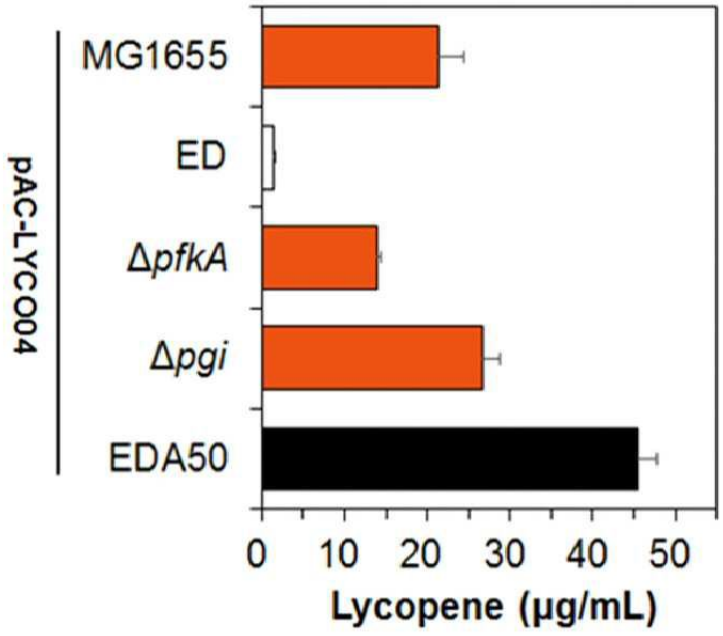
도면13


3-HP (g/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MG1655
ED
EDA50
FabIts pMCR pACC

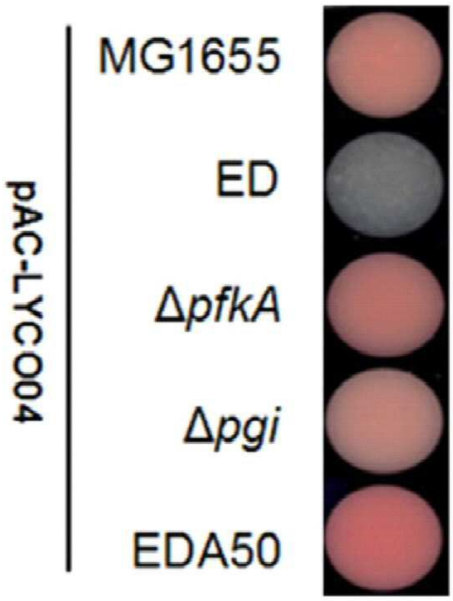
도면14


3-HP (g/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MG1655
ED
EDA50
EDA50 pGnd
EDA50 pGnd-GntR
FabI^ts pMCR pACC

도면15


pAC-LYC004
MG1655
ED
ΔpfkA
Δpgi
EDA50
0
10
20
30
40
50
Lycopene (μg/mL)

도면16



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> TRANSFORMED ESCHERICHIA COLI WITH INACTIVATED EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS PATHWAY AND USES THEREOF

<130> FPD/201901-0028

<160> 83

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 963

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atgattaaga aaatcggtgt gttgacaagc ggcggtgatg cgccaggcat gaacgccgca 60

attcgcgggg ttgttcgttc tgcgctgaca gaaggtctgg aagtaatggg tatttatgac 120

ggctatctgg gtctgtatga agaccgtatg gtacagctag accgttacag cgtgtctgac 180

atgatcaacc gtggcggtac gttcctcggt tctgcgcgtt tcccggaatt ccgcgacgag 240

aacatccgcg ccgtggctat cgaaaacctg aaaaaacgtg gtatcgacgc gctggtggtt 300

atcggcggtg acggttccta catgggtgca atgcgtctga ccgaaatggg cttcccgtgc 360

atcggtctgc cgggcactat cgacaacgac atcaaaggca ctgactacac tatcggtttc 420

ttcactgcgc tgagcaccgt tgtagaagcg atcgaccgtc tgcgtgacac ctcttcttct 480

caccagcgta tttccgtggt ggaagtgatg ggccgttatt gtggagatct gacgttggct 540

gcggccattg ccggtggctg tgaattcgtt gtggttccgg aagttgaatt cagccgtgaa 600

gacctggtaa acgaaatcaa agcgggtatc gcgaaaggta aaaaacacgc gatcgtggcg 660

attaccgaac atatgtgtga tgttgacgaa ctggcgcatt tcatcgagaa agaaaccggt 720

cgtgaaaccc gcgcaactgt gctgggccac atccagcgcg gtggttctcc ggtgccttac 780

gaccgtattc tggcttcccg tatgggcgct tacgctatcg atctgctgct ggcaggttac 840

ggcggtcgtt gtgtaggtat ccagaacgaa cagctggttc accacgacat catcgacgct 900

atcgaaaaca tgaagcgtcc gttcaaaggt gactggctgg actgcgcgaa aaaactgtat 960

taa 963

<210> 2

<211> 930

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

atggtacgta tctatacgtt gacacttgcg ccctctctcg atagcgcaac aattaccccg 60

caaatttatc ccgaaggaaa actgcgctgt accgcaccgg tgttcgaacc cgggggcggc 120

ggcatcaacg tcgcccgcgc cattgcccat cttggaggca gtgccacagc gatcttcccg 180

gcgggtggcg cgaccggcga acacctggtt tcactgttgg cggatgaaaa tgtccccgtc 240

gctactgtag aagccaaaga ctggacccgg cagaatttac acgtacatgt ggaagcaagc 300

ggtgagcagt atcgttttgt tatgccaggc gcggcattaa atgaagatga gtttcgccag 360

cttgaagagc aagttctgga aattgaatcc ggggccatcc tggtcataag cggaagcctg 420

ccgccaggtg tgaagctgga aaaattaacc caactgattt ccgctgcgca aaaacaaggg 480

atccgctgca tcgtcgacag ttctggcgaa gcgttaagtg cagcactggc aattggtaac 540

atcgagttgg ttaagcctaa ccaaaaagaa ctcagtgcgc tggtgaatcg cgaactcacc 600

cagccggacg atgtccgcaa agccgcgcag gaaatcgtta atagcggcaa ggccaaacgg 660

gttgtcgttt ccctgggtcc acaaggagcg ctgggtgttg atagtgaaaa ctgtattcag 720

gtggtgccac caccggtgaa aagccagagt accgttggcg ctggtgacag catggtcggc 780

gcgatgacac tgaaactggc agaaaatgcc tctcttgaag agatggttcg ttttggcgta 840

gctgcgggga gtgcagccac actcaatcag ggaacacgtc tgtgctccca tgacgatacg 900

caaaaaattt acgcttacct ttcccgctaa 930

<210> 3

<211> 996

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atgaaaaaga aaagacccgt acttcaggat gtggctgacc gtgtaggcgt gaccaaaatg 60

acggtcagcc gttttttacg caacccggag caggtttccg tcgctctacg cggcaagatt 120

gccgcggctc ttgatgaact gggctatatt cccaatcgtg cgcccgatat cctctctaac 180

gccaccagcc gggcgattgg cgtcctgtta ccttctctca ccaaccaggt tttcgcggaa 240

gtattacgcg gaatcgaaag cgtcaccgac gcgcacggtt atcagaccat gctggcgcac 300

tacggttata aaccggaaat ggagcaagaa cgcctcgaat ccatgctctc ctggaatatc 360

gacggcctga tcctcaccga acgtacccac acgccgcgca ccttaaagat gattgaagtg 420

gcgggtattc ccgtggtgga actgatggac agcaagtcgc catgccttga tatcgccgtc 480

ggttttgata actttgaagc agcacgccag atgaccactg ccattattgc tcgcgggcat 540

cgccacattg cctatctcgg cgcacgtctc gacgaacgta ctatcatcaa acagaaggga 600

tacgaacagg cgatgctgga tgcaggcctg gtgccatata gcgtgatggt tgagcaatct 660

tcttcttact cttccggtat tgaactgatt cgccaggcgc ggcgggaata tccgcagctg 720

gatggcgtgt tctgtacgaa tgatgacctg gcggtcggcg cggcgtttga atgtcagcgt 780

ctggggttaa aagttcctga cgatatggcg attgccggtt tccacggtca tgacattggt 840

caggtgatgg agccacgact tgcgagcgtg ctgacgccgc gtgagcggat gggcagtatt 900

ggcgctgaac gcctgctggc gcgtattcgt ggcgaatctg tgacaccgaa aatgttagat 960

ttaggtttca ccttgtcacc gggcggatct atttaa 996

<210> 4

<211> 1812

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

atgaatccac aattgttacg cgtaacaaat cgaatcattg aacgttcgcg cgagactcgc 60

tctgcttatc tcgcccggat agaacaagcg aaaacttcga ccgttcatcg ttcgcagttg 120

gcatgcggta acctggcaca cggtttcgct gcctgccagc cagaagacaa agcctctttg 180

aaaagcatgt tgcgtaacaa tatcgccatc atcacctcct ataacgacat gctctccgcg 240

caccagcctt atgaacacta tccagaaatc attcgtaaag ccctgcatga agcgaatgcg 300

gttggtcagg ttgcgggcgg tgttccggcg atgtgtgatg gtgtcaccca ggggcaggat 360

ggaatggaat tgtcgctgct aagccgcgaa gtgatagcga tgtctgcggc ggtggggctg 420

tcccataaca tgtttgatgg tgctctgttc ctcggtgtgt gcgacaagat tgtcccgggt 480

ctgacgatgg cagccctgtc gtttggtcat ttgcctgcgg tgtttgtgcc gtctggaccg 540

atggcaagcg gtttgccaaa taaagaaaaa gtgcgtattc gccagcttta tgccgaaggt 600

aaagtggacc gcatggcctt actggagtca gaagccgcgt cttaccatgc gccgggaaca 660

tgtactttct acggtactgc caacaccaac cagatggtgg tggagtttat ggggatgcag 720

ttgccaggct cttcttttgt tcatccggat tctccgctgc gcgatgcttt gaccgccgca 780

gctgcgcgtc aggttacacg catgaccggt aatggtaatg aatggatgcc gatcggtaag 840

atgatcgatg agaaagtggt ggtgaacggt atcgttgcac tgctggcgac cggtggttcc 900

actaaccaca ccatgcacct ggtggcgatg gcgcgcgcgg ccggtattca gattaactgg 960

gatgacttct ctgacctttc tgatgttgta ccgctgatgg cacgtctcta cccgaacggt 1020

ccggccgata ttaaccactt ccaggcggca ggtggcgtac cggttctggt gcgtgaactg 1080

ctcaaagcag gcctgctgca tgaagatgtc aatacggtgg caggttttgg tctgtctcgt 1140

tataccttg aaccatggct gaataatggt gaactggact ggcgggaagg ggcggaaaaa 1200

tcactcgaca gcaatgtgat cgcttccttc gaacaacctt tctctcatca tggtgggaca 1260

aaagtgttaa gcggtaacct gggccgtgcg gttatgaaaa cctctgccgt gccggttgag 1320

aaccaggtga ttgaagcgcc agcggttgtt tttgaaagcc agcatgacgt tatgccggcc 1380

tttgaagcgg gtttgctgga ccgcgattgt gtcgttgttg tccgtcatca ggggccaaaa 1440

gcgaacggaa tgccagaatt acataaactc atgccgccac ttggtgtatt attggaccgg 1500

tgtttcaaaa ttgcgttagt taccgatgga cgactctccg gcgcttcagg taaagtgccg 1560

tcagctatcc acgtaacacc agaagcctac gatggcgggc tgctggcaaa agtgcgcgac 1620

ggggacatca ttcgtgtgaa tggacagaca ggcgaactga cgctgctggt agacgaagcg 1680

gaactggctg ctcgcgaacc gcacattcct gacctgagcg cgtcacgcgt gggaacagga 1740

cgtgaattat tcagcgcctt gcgtgaaaaa ctgtccggtg ccgaacaggg cgcaacctgt 1800

atcacttttt aa 1812

<210> 5

<211> 642

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

atgaaaaact ggaaaacaag tgcagaatca atcctgacca ccggcccggt tgtaccggtt 60

atcgtggtaa aaaaactgga acacgcggtg ccgatggcaa aagcgttggt tgctggtggg 120

gtgcgcgttc tggaagtgac tctgcgtacc gagtgtgcag ttgacgctat ccgtgctatc 180

gccaaagaag tgcctgaagc gattgtgggt gccggtacgg tgctgaatcc acagcagctg 240

gcagaagtca ctgaagcggg tgcacagttc gcaattagcc cgggtctgac cgagccgctg 300

ctgaaagctg ctaccgaagg gactattcct ctgattccgg ggatcagcac tgtttccgaa 360

ctgatgctgg gtatggacta cggtttgaaa gagttcaaat tcttcccggc tgaagctaac 420

ggcggcgtga aagccctgca ggcgatcgcg ggtccgttct cccaggtccg tttctgcccg 480

acgggtggta tttctccggc taactaccgt gactacctgg cgctgaaaag cgtgctgtgc 540

atcggtggtt cctggctggt tccggcagat gcgctggaag cgggcgatta cgaccgcatt 600

actaagctgg cgcgtgaagc tgtagaaggc gctaagctgt aa 642

<210> 6

<211> 1032

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

atggcgacca taaaggatgt agcccgactg gcaggcgttt cagtcgccac cgtttcccgc 60

gtcattaata attcacccaa agccagcgaa gcttcccggc tggctgtgca tagtgcaatg 120

gagtctctta gctatcaccc gaacgccaac gcccgtgcgc tggcgcagca gaccactgaa 180

acggtcggtc tggtcgttgg tgatgtttcc gatccgtttt tcggtgcaat ggtgaaagcg 240

gtcgaacagg tggcttatca caccggtaat tttttattga ttggcaacgg ttaccacaac 300

gaacaaaaag agcgtcaggc cattgagcaa ctgatccgcc atcgctgtgc tgcgttggtc 360

gtccatgcca aaatgatccc ggatgctgat ttagcctcat taatgaaaca aatgcccggt 420

atggtgctga tcaaccgtat cctgcctggc tttgaaaacc gttgtattgc tctggacgat 480

cgttacggtg cctggctggc aacgcgtcat ttaattcagc aaggtcatac ccgcattggt 540

tatctgtgct ctaaccactc tatttctgac gccgaagatc gtctgcaagg gtattacgat 600

gcccttgctg aaagtggtat tgcggccaat gaccggctgg tgacatttgg cgaaccagac 660

gaaagcggcg gcgaacaggc aatgaccgag cttttgggac gaggaagaaa tttcactgcg 720

gtagcctgtt ataacgattc aatggcggcg ggtgcgatgg gcgttctcaa tgataatggt 780

attgatgtac cgggtgagat ttcgttaatt ggctttgatg atgtgctggt gtcacgctat 840

gtgcgtccgc gcctgaccac cgtgcgttac ccaatcgtga cgatggcgac ccaggctgcc 900

gaactggctt tggcgctggc ggataatcgc cctctcccgg aaatcactaa tgtctttagt 960

ccgacgctgg tacgtcgtca ttcagtgtca actccgtcgc tggaggcaag tcatcatgca 1020

accagcgact aa 1032

<210> 7

<211> 1395

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 7

atgcctgacg ctaaaaaaca ggggcggtca aacaaggcaa tgacgttttt cgtctgcttc 60

cttgccgctc tggcgggatt actctttggc ctggatatcg gtgtaattgc tggcgcactg 120

ccgtttattg cagatgaatt ccagattact tcgcacacgc aagaatgggt cgtaagctcc 180

atgatgttcg gtgcggcagt cggtgcggtg ggcagcggct ggctctcctt taaactcggg 240

cgcaaaaaga gcctgatgat cggcgcaatt ttgtttgttg ccggttcgct gttctctgcg 300

gctgcgccaa acgttgaagt actgattctt tcccgcgttc tactggggct ggcggtgggt 360

gtggcctctt ataccgcacc gctgtacctc tctgaaattg cgccggaaaa aattcgtggc 420

agtatgatct cgatgtatca gttgatgatc actatcggga tcctcggtgc ttatctttct 480

gataccgcct tcagctacac cggtgcatgg cgctggatgc tgggtgtgat tatcatcccg 540

gcaattttgc tgctgattgg tgtcttcttc ctgccagaca gcccacgttg gtttgccgcc 600

aaacgccgtt ttgttgatgc cgaacgcgtg ctgctacgcc tgcgtgacac cagcgcggaa 660

gcgaaacgcg aactggatga aatccgtgaa agtttgcagg ttaaacagag tggctgggcg 720

ctgtttaaag agaacagcaa cttccgccgc gcggtgttcc ttggcgtact gttgcaggta 780

atgcagcaat tcaccgggat gaacgtcatc atgtattacg cgccgaaaat cttcgaactg 840

gcgggttata ccaacactac cgagcaaatg tgggggaccg tgattgtcgg cctgaccaac 900

gtacttgcca cctttatcgc aatcggcctt gttgaccgct ggggacgtaa accaacgcta 960

acgctgggct tcctggtgat ggctgctggc atgggcgtac tcggtacaat gatgcatatc 1020

ggtattcact ctccgtcggc gcagtatttc gccatcgcca tgctgctgat gtttattgtc 1080

ggttttgcca tgagtgccgg tccgctgatt tgggtactgt gctccgaaat tcagccgctg 1140

aaaggccgcg attttggcat cacctgctcc actgccacca actggattgc caacatgatc 1200

gttggcgcaa cgttcctgac catgctcaac acgctgggta acgccaacac cttctgggtg 1260

tatgcggctc tgaacgtact gtttatcctg ctgacattgt ggctggtacc ggaaaccaaa 1320

cacgtttcgc tggaacatat tgaacgtaat ctgatgaaag gtcgtaaact gcgcgaaata 1380

ggcgctcacg attaa 1395

<210> 8

<211> 1407

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

atgtccaagc aacagatcgg cgtagtcggt atggcagtga tgggacgcaa ccttgcgctc 60

aacatcgaaa gccgtggtta taccgtctct attttcaacc gttcccgtga gaagacggaa 120

gaagtgattg ccgaaaatcc aggcaagaaa ctggttcctt actatacggt gaaagagttt 180

gtcgaatctc tggaaacgcc tcgtcgcatc ctgttaatgg tgaaagcagg tgcaggcacg 240

gatgctgcta ttgattccct caaaccatat ctcgataaag gagacatcat cattgatggt 300

ggtaacacct tcttccagga cactattcgt cgtaatcgtg agctttcagc agagggcttt 360

aacttcatcg gtaccggtgt ttctggcggt gaagaggggg cgctgaaagg tccttctatt 420

atgcctggtg gccagaaaga agcctatgaa ttggtagcac cgatcctgac caaaatcgcc 480

gccgtagctg aagacggtga accatgcgtt acctatattg gtgccgatgg cgcaggtcac 540

tatgtgaaga tggttcacaa cggtattgaa tacggcgata tgcagctgat tgctgaagcc 600

tattctctgc ttaaaggtgg cctgaacctc accaacgaag aactggcgca gacctttacc 660

gagtggaata acggtgaact gagcagttac ctgatcgaca tcaccaaaga tatcttcacc 720

aaaaaagatg aagacggtaa ctacctggtt gatgtgatcc tggatgaagc ggctaacaaa 780

ggtaccggta aatggaccag ccagagcgcg ctggatctcg gcgaaccgct gtcgctgatt 840

accgagtctg tgtttgcacg ttatatctct tctctgaaag atcagcgtgt tgccgcatct 900

aaagttctct ctggtccgca agcacagcca gcaggcgaca aggctgagtt catcgaaaaa 960

gttcgtcgtg cgctgtatct gggcaaaatc gtttcttacg cccagggctt ctctcagctg 1020

cgtgctgcgt ctgaagagta caactgggat ctgaactacg gcgaaatcgc gaagattttc 1080

cgtgctggct gcatcatccg tgcgcagttc ctgcagaaaa tcaccgatgc ttatgccgaa 1140

aatccacaga tcgctaacct gttgctggct ccgtacttca agcaaattgc cgatgactac 1200

cagcaggcgc tgcgtgatgt cgttgcttat gcagtacaga acggtattcc ggttccgacc 1260

ttctccgcag cggttgccta ttacgacagc taccgtgctg ctgttctgcc tgcgaacctg 1320

atccaggcac agcgtgacta ttttggtgcg catacttata agcgtattga taaagaaggt 1380

gtgttccata ccgaatggct ggattaa 1407

<210> 9

<211> 633

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 9

atggtgcttg gcaaaccgca aacagacccg actctcgaat ggttcttgtc tcattgccac 60

attcataagt acccatccaa gagcacgctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg 120

tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg 180

atcctctcct atctgaatca gggtgatttt attggcgaac tgggcctgtt tgaagagggc 240

caggaacgta gcgcatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac 300

aaaaaatttc gccaattgat tcaggtaaac ccggacattc tgatgcgttt gtctgcacag 360

atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcgtt cctcgacgtg 420

acgggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac 480

ccggacggta tgcaaatcaa aattacccgt caggaaattg gtcagattgt cggctgttct 540

cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac 600

ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa 633

<210> 10

<211> 210

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

Met Val Leu Gly Lys Pro Gln Thr Asp Pro Thr Leu Glu Trp Phe Leu
1 5 10 15

Ser His Cys His Ile His Lys Tyr Pro Ser Lys Ser Thr Leu Ile His
20 25 30

Gln Gly Glu Lys Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr Ile Val Lys Gly Ser Val
35 40 45

Ala Val Leu Ile Lys Asp Glu Glu Gly Lys Glu Met Ile Leu Ser Tyr
50 55 60

Leu Asn Gln Gly Asp Phe Ile Gly Glu Leu Gly Leu Phe Glu Glu Gly
65 70 75 80

Gln Glu Arg Ser Ala Trp Val Arg Ala Lys Thr Ala Cys Glu Val Ala
85 90 95

Glu Ile Ser Tyr Lys Lys Phe Arg Gln Leu Ile Gln Val Asn Pro Asp
100 105 110
Ile Leu Met Arg Leu Ser Ala Gln Met Ala Arg Arg Leu Gln Val Thr
115 120 125
Ser Glu Lys Val Gly Asn Leu Ala Phe Leu Asp Val Thr Gly Arg Ile

130 135 140
Ala Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Lys Gln Pro Asp Ala Met Thr His
145 150 155 160
Pro Asp Gly Met Gln Ile Lys Ile Thr Arg Gln Glu Ile Gly Gln Ile
165 170 175
Val Gly Cys Ser Arg Glu Thr Val Gly Arg Ile Leu Lys Met Leu Glu
180 185 190
Asp Gln Asn Leu Ile Ser Ala His Gly Lys Thr Ile Val Val Tyr Gly
195 200 205

Thr Arg
210

<210> 11
<211> 954
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<400> 11

atgacggaca aattgacctc ccttcgtcag tacaccaccg tagtggccga cactggggac 60
atcgcggcaa tgaagctgta tcaaccgcag gatgccacaa ccaacccttc tctcattctt 120
aacgcagcgc agattccgga ataccgtaag ttgattgatg atgctgtcgc ctgggcgaaa 180
cagcagagca acgatcgcgc gcagcagatc gtggacgcga ccgacaaact ggcagtaaat 240
attggtctgg aaatcctgaa actggttccg ggccgtatct caactgaagt tgatgcgcgt 300
ctttcctatg acaccgaagc gtcaattgcg aaagcaaaac gcctgatcaa actctacaac 360

gatgctggta ttagcaacga tcgtattctg atcaaactgg cttctacctg gcagggtatc 420
cgtgctgcag aacagctgga aaaagaaggc atcaactgta acctgaccct gctgttctcc 480
ttcgctcagg ctcgtgcttg tgcggaagcg ggcgtgttcc tgatctcgcc gtttgttggc 540
cgtattcttg actggtacaa agcgaatacc gataagaaag agtacgctcc ggcagaagat 600
ccgggcgtgg tttctgtatc tgaaatctac cagtactaca aagagcacgg ttatgaaacc 660

gtggttatgg gcgcaagctt ccgtaacatc ggcgaaattc tggaactggc aggctgcgac 720

cgtctgacca tcgcaccggc actgctgaaa gagctggcgg agagcgaagg ggctatcgaa 780

cgtaaactgt cttacaccgg cgaagtgaaa gcgcgtccgg cgcgtatcac tgagtccgag 840

ttcctgtggc agcacaacca ggatccaatg gcagtagata aactggcgga aggtatccgt 900

aagtttgcta ttgaccagga aaaactggaa aaaatgatcg gcgatctgct gtaa 954

<210> 12

<211> 317

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

Met Thr Asp Lys Leu Thr Ser Leu Arg Gln Tyr Thr Thr Val Val Ala
1 5 10 15

Asp Thr Gly Asp Ile Ala Ala Met Lys Leu Tyr Gln Pro Gln Asp Ala
20 25 30

Thr Thr Asn Pro Ser Leu Ile Leu Asn Ala Ala Gln Ile Pro Glu Tyr
35 40 45

Arg Lys Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Trp Ala Lys Gln Gln Ser Asn
50 55 60

Asp Arg Ala Gln Gln Ile Val Asp Ala Thr Asp Lys Leu Ala Val Asn
65 70 75 80

Ile Gly Leu Glu Ile Leu Lys Leu Val Pro Gly Arg Ile Ser Thr Glu
85 90 95

Val Asp Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Thr Glu Ala Ser Ile Ala Lys Ala
100 105 110

Lys Arg Leu Ile Lys Leu Tyr Asn Asp Ala Gly Ile Ser Asn Asp Arg
115 120 125

Ile Leu Ile Lys Leu Ala Ser Thr Trp Gln Gly Ile Arg Ala Ala Glu
130 135 140

Gln Leu Glu Lys Glu Gly Ile Asn Cys Asn Leu Thr Leu Leu Phe Ser
145 150 155 160

Phe Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ala Glu Ala Gly Val Phe Leu Ile Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr Glu Thr Val Val Met Gly

210 215 220

Ala Ser Phe Arg Asn Ile Gly Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Cys Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Pro Ala Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu Trp Gln His Asn Gln Asp

275 280 285

Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Glu Gly Ile Arg Lys Phe Ala Ile

290 295 300

Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly Asp Leu Leu

305 310 315

<210> 13

<211> 1434

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 13

atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggtcggta aatcgctgat gctgccggta 60

tccgtactgc ctatcgcagg tattctgctg ggcgtcggtt ccgcgaattt cagctggctg 120

cccgccgttg tatcgcatgt tatggcagaa gcaggcggtt ccgtctttgc aaacatgcca 180

ctgatttttg cgatcggtgt cgccctcggc tttaccaata acgatggcgt atccgcgctg 240

gccgcagttg ttgcctatgg catcatggtt aaaaccatgg ccgtggttgc gccactggta 300

ctgcatttac ctgctgaaga aatcgcctct aaacacctgg cggatactgg cgtactcgga 360

gggattatct ccggtgcgat cgcagcgtac atgtttaacc gtttctaccg tattaagctg 420

cctgagtatc ttggcttctt tgccggtaaa cgctttgtgc cgatcatttc tggcctggct 480

gccatcttta ctggcgttgt gctgtccttc atttggccgc cgattggttc tgcaatccag 540

accttctctc agtgggctgc ttaccagaac ccggtagttg cgtttggcat ttacggtttc 600

atcgaacgtt gcctggtacc gtttggtctg caccacatct ggaacgtacc tttccagatg 660

cagattggtg aatacaccaa cgcagcaggt caggttttcc acggcgacat tccgcgttat 720

atggcgggtg acccgactgc gggtaaactg tctggtggct tcctgttcaa aatgtacggt 780

ctgccagctg ccgcaattgc tatctggcac tctgctaaac cagaaaaccg cgcgaaagtg 840

ggcggtatta tgatctccgc ggcgctgacc tcgttcctga ccggtatcac cgagccgatc 900

gagttctcct tcatgttcgt tgcgccgatc ctgtacatca tccacgcgat tctggcaggc 960

ctggcattcc caatctgtat tcttctgggg atgcgtgacg gtacgtcgtt ctcgcacggt 1020

ctgatcgact tcatcgttct gtctggtaac agcagcaaac tgtggctgtt cccgatcgtc 1080

ggtatcggtt atgcgattgt ttactacacc atcttccgcg tgctgattaa agcactggat 1140

ctgaaaacgc cgggtcgtga agacgcgact gaagatgcaa aagcgacagg taccagcgaa 1200

atggcaccgg ctctggttgc tgcatttggt ggtaaagaaa acattactaa cctcgacgca 1260

tgtattaccc gtctgcgcgt cagcgttgct gatgtgtcta aagtggatca ggccggcctg 1320

aagaaactgg gcgcagcggg cgtagtggtt gctggttctg gtgttcaggc gattttcggt 1380

actaaatccg ataacctgaa aaccgagatg gatgagtaca tccgtaacca ctaa 1434

<210> 14

<211> 2633

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant ptsG gene

<400> 14

atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggtcggta aatcgctgat gctgccggta 60

tccgtactgc ctatcgcagg tattctgctg ggcgtcggtt ccgcgaattt cagctggctg 120

cccgccgttg tatcgcatgt tatggcagaa gcaggcggtt ccgtctttgc aaacatgcca 180

ctgatttttg cgatcggtgt cgccctcggc tttaccaata acgatggcgt atccgcgctg 240

gccgcagttg ttgcctatgg catcatggtt aaaaccatgg ccgtggttgc gccactggta 300

ctgcatttac ctgctgaaga aatcgcctct aaacacctgg cggatactgg cgtactcgga 360

gggattatct ccggtgcgat cgcagcgtac atgtttaacc gtttctaccg tattaagctg 420

cctgagtatc ttggcttctt tgccggtaaa cgctttgtgc cgatcatttc tggcctggct 480

gccatcttta ctggcgttgt gctgtccttc atttggccgc cgattggttc tgcaatccag 540

accttctctc agtgggctgc ttaccagaac ccggtagttg cgtttggcat ttacggtttc 600

atcgaacgtt gcctggtacc gtttggtctg caccacatct ggaacgtacc tttccagatg 660

cagattggtg aatacaccaa cgcagcaggt caggttttcc acggcgacat tccgcgttat 720

atggcgggtg acccgactgc gggtaaactg tctggtggct tcctgttcaa aatgtacggt 780

ctgccagctg ccgcaattgc tatctggcac tctgctaagg aaggtgcgaa caagtccctg 840

atatgagatc atgtttgtca tctggagcca tagaacaggg ttcatcatga gtcatcaact 900

taccttcgcc gacagtgaat tcagcagtaa gcgccgtcag accagaaaag agattttctt 960

gtcccgcatg gagcagattc tgccatggca aaacatggtg gaagtcatcg agccgtttta 1020

ccccaaggct ggtaatggcc ggcgacctta tccgctggaa accatgctac gcattcactg 1080

catgcagcat tggtacaacc tgagcgatgg cgcgatggaa gatgctctgt acgaaatcgc 1140

ctccatgcgt ctgtttgccc ggttatccct ggatagcgcc ttgccggacc gcaccaccat 1200

catgaatttc cgccacctgc tggagcagca tcaactggcc cgccaattgt tcaagaccat 1260

caatcgctgg ctggccgaag caggcgtcat gatgactcaa ggcaccttgg tcgatgccac 1320

catcattgag gcacccagct cgaccaagaa caaagagcag caacgcgatc cggagatgca 1380

tcagaccaag aaaggcaatc agtggcactt tggcatgaag gcccacattg gtgtcgatgc 1440

caagagtggc ctgacccaca gcctggtcac caccgcggcc aacgagcatg acctcaatca 1500

gctgggtaat ctgctgcatg gagaggagca atttgtctca gccgatgccg gctaccaagg 1560

ggcgccacag cgcgaggagc tggccgaggt ggatgtggac tggctgatcg ccgagcgccc 1620

cggcaaggta agaaccttga aacagcatcc acgcaagaac aaaacggcca tcaacatcga 1680

atacatgaaa gccagcatcc gggccagggt ggagcaccca tttcgcatca tcaagcgaca 1740

gttcggcttc gtgaaagcca gatacaaggg gttgctgaaa aacgataacc aactggcgat 1800

gttattcacg ctggccaacc tgtttcgggc ggaccaaatg atacgtcagt gggagagatc 1860

tcactaaaaa ctggggataa cgccttaaat ggcgaagaaa cggtctaaat aggctgattc 1920

aaggcattta cgggagaaaa aatcggctca aacatgaaga aatgaaatga ctgagtcagc 1980

cgagaagaat ttccccgctt attcgcacct tccctaaacc agaaaaccgc gcgaaagtgg 2040

gcggtattat gatctccgcg gcgctgacct cgttcctgac cggtatcacc gagccgatcg 2100

agttctcctt catgttcgtt gcgccgatcc tgtacatcat ccacgcgatt ctggcaggcc 2160

tggcattccc aatctgtatt cttctgggga tgcgtgacgg tacgtcgttc tcgcacggtc 2220

tgatcgactt catcgttctg tctggtaaca gcagcaaact gtggctgttc ccgatcgtcg 2280

gtatcggtta tgcgattgtt tactacacca tcttccgcgt gctgattaaa gcactggatc 2340

tgaaaacgcc gggtcgtgaa gacgcgactg aagatgcaaa agcgacaggt accagcgaaa 2400

tggcaccggc tctggttgct gcatttggtg gtaaagaaaa cattactaac ctcgacgcat 2460

gtattacccg tctgcgcgtc agcgttgctg atgtgtctaa agtggatcag gccggcctga 2520

agaaactggg cgcagcgggc gtagtggttg ctggttctgg tgttcaggcg attttcggta 2580

ctaaatccga taacctgaaa accgagatgg atgagtacat ccgtaaccac taa 2633

<210> 15

<211> 1195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS-element mediated insertion

<400> 15

ggaaggtgcg aacaagtccc tgatatgaga tcatgtttgt catctggagc catagaacag 60

ggttcatcat gagtcatcaa cttaccttcg ccgacagtga attcagcagt aagcgccgtc 120

agaccagaaa agagattttc ttgtcccgca tggagcagat tctgccatgg caaaacatgg 180

tggaagtcat cgagccgttt taccccaagg ctggtaatgg ccggcgacct tatccgctgg 240

aaaccatgct acgcattcac tgcatgcagc attggtacaa cctgagcgat ggcgcgatgg 300

aagatgctct gtacgaaatc gcctccatgc gtctgtttgc ccggttatcc ctggatagcg 360

ccttgccgga ccgcaccacc atcatgaatt tccgccacct gctggagcag catcaactgg 420

cccgccaatt gttcaagacc atcaatcgct ggctggccga agcaggcgtc atgatgactc 480

aaggcacctt ggtcgatgcc accatcattg aggcacccag ctcgaccaag aacaaagagc 540

agcaacgcga tccggagatg catcagacca agaaaggcaa tcagtggcac tttggcatga 600

aggcccacat tggtgtcgat gccaagagtg gcctgaccca cagcctggtc accaccgcgg 660

ccaacgagca tgacctcaat cagctgggta atctgctgca tggagaggag caatttgtct 720

cagccgatgc cggctaccaa ggggcgccac agcgcgagga gctggccgag gtggatgtgg 780

actggctgat cgccgagcgc cccggcaagg taagaacctt gaaacagcat ccacgcaaga 840

acaaaacggc catcaacatc gaatacatga aagccagcat ccgggccagg gtggagcacc 900

catttcgcat catcaagcga cagttcggct tcgtgaaagc cagatacaag gggttgctga 960

aaaacgataa ccaactggcg atgttattca cgctggccaa cctgtttcgg gcggaccaaa 1020

tgatacgtca gtgggagaga tctcactaaa aactggggat aacgccttaa atggcgaaga 1080

aacggtctaa ataggctgat tcaaggcatt tacgggagaa aaaatcggct caaacatgaa 1140

gaaatgaaat gactgagtca gccgagaaga atttccccgc ttattcgcac cttcc 1195

<210> 16

<211> 7250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pACC

<400> 16

gacgtcggtg cctaatgagt gagctaactt acattaattg cgttgcgctc actgcccgct 60

ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 120

ggcggtttgc gtattgggcg ccagggtggt ttttcttttc accagtgaga cgggcaacag 180

ctgattgccc ttcaccgcct ggccctgaga gagttgcagc aagcggtcca cgctggtttg 240

ccccagcagg cgaaaatcct gtttgatggt ggttaacggc gggatataac atgagctgtc 300

ttcggtatcg tcgtatccca ctaccgagat gtccgcacca acgcgcagcc cggactcggt 360

aatggcgcgc attgcgccca gcgccatctg atcgttggca accagcatcg cagtgggaac 420

gatgccctca ttcagcattt gcatggtttg ttgaaaaccg gacatggcac tccagtcgcc 480

ttcccgttcc gctatcggct gaatttgatt gcgagtgaga tatttatgcc agccagccag 540

acgcagacgc gccgagacag aacttaatgg gcccgctaac agcgcgattt gctggtgacc 600

caatgcgacc agatgctcca cgcccagtcg cgtaccgtct tcatgggaga aaataatact 660

gttgatgggt gtctggtcag agacatcaag aaataacgcc ggaacattag tgcaggcagc 720

ttccacagca atggcatcct ggtcatccag cggatagtta atgatcagcc cactgacgcg 780

ttgcgcgaga agattgtgca ccgccgcttt acaggcttcg acgccgcttc gttctaccat 840

cgacaccacc acgctggcac ccagttgatc ggcgcgagat ttaatcgccg cgacaatttg 900

cgacggcgcg tgcagggcca gactggaggt ggcaacgcca atcagcaacg actgtttgcc 960

cgccagttgt tgtgccacgc ggttgggaat gtaattcagc tccgccatcg ccgcttccac 1020

tttttcccgc gttttcgcag aaacgtggct ggcctggttc accacgcggg aaacggtctg 1080

ataagagaca ccggcatact ctgcgacatc gtataacgtt actggtttca cattcaccac 1140

cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc 1200

gatggtgtcc gggatctcga cgctctccct tatgcgactc ctgcattagg aagcagccca 1260

gtagtaggtt gaggccgttg agcaccgccg ccgcaaggaa tggtgcatgc aaggagatgg 1320

cgcccaacag tcccccggcc acggggcctg ccaccatacc cacgccgaaa caagcgctca 1380

tgagcccgaa gtggcgagcc cgatcttccc catcggtgat gtcggcgata taggcgccag 1440

caaccgcacc tgtggcgccg gtgatgccgg ccacgatgcg tccggcgtag aggatcgaga 1500

attgtgagcg gataacaatt gacattgtga gcggataaca agatactgag cacatcagca 1560

ggacgcactg accgaattca aaagatcttt taagaaggag atatacatat gagctggatt 1620

gaacgaatta aaagcaacat tactcccacc cgcaaggcga gcattcctga aggggtgtgg 1680

actaagtgtg atagctgcgg tcaggtttta taccgcgctg agctggaacg taatcttgag 1740

gtctgtccga agtgtgacca tcacatgcgt atgacagcgc gtaatcgcct gcatagcctg 1800

ttagatgaag gaagccttgt ggagctgggt agcgagcttg agccgaaaga tgtgctgaag 1860

tttcgtgact ccaagaagta taaagaccgt ctggcatctg cgcagaaaga aaccggcgaa 1920

aaagatgcgc tggtggtgat gaaaggcact ctgtatggaa tgccggttgt cgctgcggca 1980

ttcgagttcg cctttatggg cggttcaatg gggtctgttg tgggtgcacg tttcgtgcgt 2040

gccgttgagc aggcgctgga agataactgc ccgctgatct gcttctccgc ctctggtggc 2100

gcacgtatgc aggaagcact gatgtcgctg atgcagatgg cgaaaacctc tgcggcactg 2160

gcaaaaatgc aggagcgcgg cttgccgtac atctccgtgc tgaccgaccc gacgatgggc 2220

ggtgtttctg caagtttcgc catgctgggc gatctcaaca tcgctgaacc gaaagcgtta 2280

atcggctttg ccggtccgcg tgttatcgaa cagaccgttc gcgaaaaact gccgcctgga 2340

ttccagcgca gtgaattcct gatcgagaaa ggcgcgatcg acatgatcgt ccgtcgtccg 2400

gaaatgcgcc tgaaactggc gagcattctg gcgaagttga tgaatctgcc agcgccgaat 2460

cctgaagcgc cgcgtgaagg cgtagtggta cccccggtac cggatcagga acctgaggcc 2520

tgaggatctt ttaagaagga gatatacata tgagtctgaa tttccttgat tttgaacagc 2580

cgattgcaga gctggaagcg aaaatcgatt ctctgactgc ggttagccgt caggatgaga 2640

aactggatat taacatcgat gaagaagtgc atcgtctgcg tgaaaaaagc gtagaactga 2700

cacgtaaaat cttcgccgat ctcggtgcat ggcagattgc gcaactggca cgccatccac 2760

agcgtcctta taccctggat tacgttcgcc tggcatttga tgaatttgac gaactggctg 2820

gcgaccgcgc gtatgcagac gataaagcta tcgtcggtgg tatcgcccgt ctcgatggtc 2880

gtccggtgat gatcattggt catcaaaaag gtcgtgaaac caaagaaaaa attcgccgta 2940

actttggtat gccagcgcca gaaggttacc gcaaagcact gcgtctgatg caaatggctg 3000

aacgctttaa gatgcctatc atcaccttta tcgacacccc gggggcttat cctggcgtgg 3060

gcgcagaaga gcgtggtcag tctgaagcca ttgcacgcaa cctgcgtgaa atgtctcgcc 3120

tcggcgtacc ggtagtttgt acggttatcg gtgaaggtgg ttctggcggt gcgctggcga 3180

ttggcgtggg cgataaagtg aatatgctgc aatacagcac ctattccgtt atctcgccgg 3240

aaggttgtgc gtccattctg tggaagagcg ccgacaaagc gccgctggcg gctgaagcga 3300

tgggtatcat tgctccgcgt ctgaaagaac tgaaactgat cgactccatc atcccggaac 3360

cactgggtgg tgctcaccgt aacccggaag cgatggcggc atcgttgaaa gcgcaactgc 3420

tggcggatct ggccgatctc gacgtgttaa gcactgaaga tttaaaaaat cgtcgttatc 3480

agcgcctgat gagctacggt tacgcgtaag gatcttttaa gaaggagata tacatatgga 3540

tattcgtaag attaaaaaac tgatcgagct ggttgaagaa tcaggcatct ccgaactgga 3600

aatttctgaa ggcgaagagt cagtacgcat tagccgtgca gctcctgccg caagtttccc 3660

tgtgatgcaa caagcttacg ctgcaccaat gatgcagcag ccagctcaat ctaacgcagc 3720

cgctccggcg accgttcctt ccatggaagc gccagcagca gcggaaatca gtggtcacat 3780

cgtacgttcc ccgatggttg gtactttcta ccgcacccca agcccggacg caaaagcgtt 3840

catcgaagtg ggtcagaaag tcaacgtggg cgataccctg tgcatcgttg aagccatgaa 3900

aatgatgaac cagatcgaag cggacaaatc cggtaccgtg aaagcaattc tggtcgaaag 3960

tggacaaccg gtagaatttg acgagccgct ggtcgtcatc gagtaaggat cttttaagaa 4020

ggagatatac atatgctgga taaaattgtt attgccaacc gcggcgagat tgcattgcgt 4080

attcttcgtg cctgtaaaga actgggcatc aagactgtcg ctgtgcactc cagcgcggat 4140

cgcgatctaa aacacgtatt actggcagat gaaacggtct gtattggccc tgctccgtca 4200

gtaaaaagtt atctgaacat cccggcaatc atcagcgccg ctgaaatcac cggcgcagta 4260

gcaatccatc cgggttacgg cttcctctcc gagaacgcca actttgccga gcaggttgaa 4320

cgctccggct ttatcttcat tggcccgaaa gcagaaacca ttcgcctgat gggcgacaaa 4380

gtatccgcaa tcgcggcgat gaaaaaagcg ggcgtccctt gcgtaccggg ttctgacggc 4440

ccgctgggcg acgatatgga taaaaaccgt gccattgcta aacgcattgg ttatccggtg 4500

attatcaaag cctccggcgg cggcggcggt cgcggtatgc gcgtagtgcg cggcgacgct 4560

gaactggcac aatccatctc catgacccgt gcggaagcga aagctgcttt cagcaacgat 4620

atggtttaca tggagaaata cctggaaaat cctcgccacg tcgagattca ggtactggct 4680

gacggtcagg gcaacgctat ctatctggcg gaacgtgact gctccatgca acgccgccac 4740

cagaaagtgg tcgaagaagc gccagcaccg ggcattaccc cggaactgcg tcgctacatc 4800

ggcgaacgtt gcgctaaagc gtgtgttgat atcggctatc gcggtgcagg tactttcgag 4860

ttcctgttcg aaaacggcga gttctatttc atcgaaatga acacccgtat tcaggtagaa 4920

cacccggtta cagaaatgat caccggcgtt gacctgatca aagaacagct gcgtatcgct 4980

gccggtcaac cgctgtcgat caagcaagaa gaagttcacg ttcgcggcca tgcggtggaa 5040

tgtcgtatca acgccgaaga tccgaacacc ttcctgccaa gtccgggcaa aatcacccgt 5100

ttccacgcac ctggcggttt tggcgtacgt tgggagtctc atatctacgc gggctacacc 5160

gtaccgccgt actatgactc aatgatcggt aagctgattt gctacggtga aaaccgtgac 5220

gtggcgattg cccgcatgaa gaatgcgctg caggagctga tcatcgacgg tatcaaaacc 5280
aacgttgatc tgcagatccg catcatgaat gacgagaact tccagcatgg tggcactaac 5340
atccactatc tggagaaaaa actcggtctt caggaaaaat aaggatccaa actcgagtaa 5400
ggatctccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggcc tttcgtttta 5460
tctgttgttt gtcggtgaac gctctctact agagtcacac tggctcacct tcgggtgggc 5520
ctttctgcgt ttatacctag ggatatattc cgcttcctcg ctcactgact cgctacgctc 5580
ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc ttacgaacgg ggcggagatt tcctggaaga 5640

tgccaggaag atacttaaca gggaagtgag agggccgcgg caaagccgtt tttccatagg 5700
ctccgccccc ctgacaagca tcacgaaatc tgacgctcaa atcagtggtg gcgaaacccg 5760
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggcggct ccctcgtgcg ctctcctgtt 5820
cctgcctttc ggtttaccgg tgtcattccg ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg 5880
cctgacactc agttccgggt aggcagttcg ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc 5940
cgttcagtcc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggaaag 6000
acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac tggtaattga tttagaggag ttagtcttga 6060

agtcatgcgc cggttaaggc taaactgaaa ggacaagttt tggtgactgc gctcctccaa 6120
gccagttacc tcggttcaaa gagttggtag ctcagagaac cttcgaaaaa ccgccctgca 6180
aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag 6240
atcatcttat taatcagata aaatatttct agatttcagt gcaatttatc tcttcaaatg 6300
tagcacctga agtcagcccc atacgatata agttgttact agtgcttgga ttctcaccaa 6360
taaaaaacgc ccggcggcaa ccgagcgttc tgaacaaatc cagatggagt tctgaggtca 6420
ttactggatc tatcaacagg agtccaagcg agctcgatat caaattacgc cccgccctgc 6480

cactcatcgc agtactgttg taattcatta agcattctgc cgacatggaa gccatcacaa 6540
acggcatgat gaacctgaat cgccagcggc atcagcacct tgtcgccttg cgtataatat 6600
ttgcccatgg tgaaaacggg ggcgaagaag ttgtccatat tggccacgtt taaatcaaaa 6660
ctggtgaaac tcacccaggg attggctgag acgaaaaaca tattctcaat aaaacccttta 6720
gggaaatagg ccaggttttc accgtaacac gccacatctt gcgaatatat gtgtagaaac 6780
tgccggaaat cgtcgtggta ttcactccag agcgatgaaa acgtttcagt ttgctcatgg 6840
aaaacggtgt aacaagggtg aacactatcc catatcacca gctcaccgtc tttcattgcc 6900

atacgaaatt ccggatgagc attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa ggccggataa 6960

aacttgtgct tatttttctt tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag ctgaacggtc 7020

tggttatagg tacattgagc aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt acgatgccat 7080

tgggatatat caacggtggt atatccagtg atttttttct ccattttagc ttccttagct 7140

cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc attatggtga 7200

aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccagatatc 7250

<210> 17

<211> 6528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pMCR

<400> 17

gacgtcttaa gacccacttt cacatttaag ttgtttttct aatccgcata tgatcaattc 60

aaggccgaat aagaaggctg gctctgcacc ttggtgatca aataattcga tagcttgtcg 120

taataatggc ggcatactat cagtagtagg tgtttccctt tcttctttag cgacttgatg 180

ctcttgatct tccaatacgc aacctaaagt aaaatgcccc acagcgctga gtgcatataa 240

tgcattctct agtgaaaaac cttgttggca taaaaaggct aattgatttt cgagagtttc 300

atactgtttt tctgtaggcc gtgtacctaa atgtactttt gctccatcgc gatgacttag 360

taaagcacat ctaaaacttt tagcgttatt acgtaaaaaa tcttgccagc tttccccttc 420

taaagggcaa aagtgagtat ggtgcctatc taacatctca atggctaagg cgtcgagcaa 480

agcccgctta ttttttacat gccaatacaa tgtaggctgc tctacaccta gcttctgggc 540

gagtttacgg gttgttaaac cttcgattcc gacctcatta agcagctcta atgcgctgtt 600

aatcacttta cttttatcta atctagacat cattaattcc taatttttgt tgacactcta 660

tcgttgatag agttatttta ccactcccta tcagtgatag agaaaagaat tcgagctcgg 720

cgcgcctgca ggtcgacaag cttgaaaaca aaaaaaggag gaaaaattat gagcgccacc 780

accggtgccc gtagcgcgag cgtgggttgg gcggaaagcc tgatcggcct gcacctgggt 840

aaagtggcgc tgattaccgg cggtagcgcg ggtatcggcg gtcagatcgg ccgcctgctg 900

gccctgagcg gcgcgcgtgt gatgctggcg gcccgcgacc gtcacaaact ggagcagatg 960

caggccatga tccagagcga gctggcggaa gtgggctaca ccgacgtgga agaccgtgtg 1020

cacatcgcgc cgggttgcga cgtgagcagc gaggcccagc tggcggacct ggtggaacgt 1080

accctgagcg ccttcggcac cgtggactac ctgatcaaca acgccggcat cgcgggtgtg 1140

gaggaaatgg tgatcgacat gccggtggag ggttggcgcc acaccctgtt cgcgaacctg 1200

atcagcaact acagcctgat gcgtaagctg gccccgctga tgaagaaaca gggcagcggt 1260
tacatcctga acgtgagcag ctacttcggc ggtgaaaaag acgccgccat cccgtacccg 1320
aaccgcgcgg actacgcggt gagcaaggcc ggtcagcgtg cgatggccga ggtgttcgcc 1380
cgtttcctgg gtccggaaat ccagatcaac gccatcgcgc cgggtccggt ggagggtgac 1440
cgcctgcgtg gcaccggcga gcgtccgggc ctgttcgccc gccgtgcgcg cctgatcctg 1500
gagaacaaac gtctgaacga actgcacgcc gccctgatcg ccgccgcacg taccgacgag 1560
cgcagcatgc acgaactggt ggagctgctg ctgccgaacg acgtggccgc gctggaacag 1620

aacccggccg caccgaccgc cctgcgtgag ctggcgcgcc gtttccgtag cgaaggcgac 1680
ccggccgcca gcagcagcag cgccctgctg aaccgcagca tcgcggccaa gctgctggcc 1740
cgtctgcaca acggcggtta cgtgctgccg gccgacatct tcgccaacct gccgaacccg 1800
ccggacccgt tcttcacccg cgcccagatc gaccgtgagg cccgtaaagt gcgtgacggc 1860
atcatgggta tgctgtacct gcaacgcatg ccgaccgagt tcgacgtggc gatggccacc 1920
gtgtactacc tggccgaccg tgtggtgagc ggtgaaacct tccacccgag cggcggtctg 1980
cgttacgaac gcaccccgac cggcggtgaa ctgttcggtc tgccgagccc ggagcgcctg 2040

gccgaactgg tgggtagcac cgtgtacctg atcggcgagc acctgaccga acacctgaac 2100
ctgctggccc gtgcgtacct ggagcgttac ggcgcccgtc aggtggtgat gatcgtggaa 2160
accgaaaccg gtgccgaaac catgcgccgt ctgctgcacg accacgtgga agcgggtcgc 2220
ctgatgacca tcgtggccgg cgaccagatc gaagccgcga tcgaccaggc catcacccgt 2280
tacggccgtc cgggcccggt ggtgtgcacc ccgttccgcc cgctgccgac cgtgccgctg 2340
gttggccgta aggacagcga ctggagcacc gtgctgagcg aggcggagtt cgccgagctg 2400
tgcgaacacc agctgaccca ccacttccgt gtggcccgct ggatcgccct gagcgacggc 2460

gcccgcctgg cgctggtgac cccggaaacc accgccacca gcaccaccga acagttcgcc 2520
ctggcgaact tcatcaaaac caccctgcac gccttcaccg ccaccatcgg tgtggagagc 2580
gaacgtaccg cccagcgcat cctgatcaac caggtggacc tgacccgccg tgcccgtgcg 2640
gaggaaccgc gcgacccgca cgagcgtcag caggagctgg aacgcttcat cgaagccgtg 2700
ctgctggtga ccgcgccgct gccgccggag gcggacaccc gttacgcggg ccgcatccac 2760
cgcggtcgtg ccatcaccgt gtaacatatg aacaactaca aaaggaggat aaaacatgag 2820
cggcaccggt cgcctggccg gcaagatcgc cctgatcacc ggcggtgccg gtaacatcgg 2880

tagcgagctg acccgccgtt tcctggcgga aggtgccacc gtgatcatca gcggccgtaa 2940

ccgcgccaag ctgaccgccc tggcggaacg catgcaggcg gaagcgggcg tgccggccaa 3000

acgtatcgac ctggaagtga tggacggtag cgacccggtg gcggtgcgtg ccggcatcga 3060

agccatcgtg gcgcgtcacg gtcagatcga catcctggtg aacaacgccg gcagcgccgg 3120

tgcgcagcgc cgtctggccg agatcccgct gaccgaagcg gaactgggtc cgggcgccga 3180

ggaaaccctg cacgccagca tcgcgaacct gctgggcatg ggttggcacc tgatgcgtat 3240

cgcggcgccg cacatgccgg tgggcagcgc ggtgatcaac gtgagcacca tcttcagccg 3300

cgccgaatac tacggtcgta tcccgtacgt gaccccgaag gcggccctga acgccctgag 3360

ccagctggcc gcgcgcgagc tgggcgcccg cggtatccgt gtgaacacca tctttccggg 3420

cccgatcgaa agcgaccgca tccgtaccgt gttccagcgc atggaccagc tgaaaggccg 3480

tccggagggt gacaccgccc accacttcct gaacaccatg cgtctgtgcc gtgccaacga 3540

ccagggcgcg ctggagcgcc gtttcccgag cgtgggtgac gtggcggacg ccgcggtgtt 3600

cctggccagc gcggaaagcg ccgcgctgag cggtgaaacc atcgaagtga cccacggcat 3660

ggagctgccg gcgtgcagcg aaaccagcct gctggcgcgt accgacctgc gcaccatcga 3720

cgccagcggt cgcaccaccc tgatctgcgc cggcgaccag atcgaggaag tgatggccct 3780

gaccggtatg ctgcgtacct gcggtagcga ggtgatcatc ggtttccgta gcgccgcggc 3840

cctggcccag ttcgagcagg ccgtgaacga aagccgccgt ctggccggcg cggacttcac 3900

cccgccgatc gccctgccgc tggacccgcg cgacccggcc accatcgacg ccgtgttcga 3960

ctgggcgggc gagaacaccg gcggtatcca cgcggccgtg atcctgccgg ccaccagcca 4020

cgaaccggcc ccgtgcgtga tcgaggtgga cgacgaacgt gtgctgaact tcctggccga 4080

cgaaatcacc ggcaccatcg tgatcgccag ccgcctggcg cgttactggc agagccagcg 4140

cctgacgccg ggcgcccgcg cccgcggccc gcgtgtgatc ttcctgagca acggcgccga 4200

ccagaacggc aacgtgtacg gtcgcatcca gagcgcggcc atcggtcagc tgatccgcgt 4260

gtggcgtcac gaggccgaac tggactacca gcgtgcgagc gcggccggcg accacgtgct 4320

gccgccggtg tgggccaacc agatcgtgcg tttcgcgaac cgcagcctgg agggcctgga 4380

gttcgcctgc gcctggaccg cccagctgct gcacagccag cgccacatca acgagatcac 4440

cctgaacatc ccggccaaca tctaagattc ggccggccac gcgatcgctg acgtcggtac 4500

cctcgagtaa ggatctccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggcc 4560

tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctctact agagtcacac tggctcacct 4620

tcgggtgggc ctttctgcgt ttatacctag ggcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4680

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4740

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 4800

cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4860

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct 4920

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 4980

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 5040

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 5100

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 5160

aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 5220

tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 5280

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 5340

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 5400

ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 5460

actagtgctt ggattctcac caataaaaaa cgcccggcgg caaccgagcg ttctgaacaa 5520

atccagatgg agttctgagg tcattactgg atctatcaac aggagtccaa gcgagctctc 5580

gaaccccaga gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 5640

gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggt cagcccattc gccgccaagc 5700

tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggtccgc cacacccagc 5760

cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 5820

gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 5880

aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 5940

ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 6000

caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 6060

tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcc caatagcagc 6120

cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg 6180

gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg 6240

gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 6300

cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgga 6360

gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc tgtctcttga 6420

tcagatcatg atcccctgcg ccatcagatc cttggcggca agaaagccat ccagtttact 6480

ttgcagggct tcccaacctt accagagggc gccccagctg gcaattcc 6528

<210> 18

<211> 9476

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pAC-LYC04

<400> 18

gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60

gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggtctggtt 120

ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180

tatatcaacg gtggtatatc cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240

aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300

ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc 360

ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420

ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480

gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540

acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600

ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660

aaggctgcac cggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgctc 720

actgactcgc tacgctcggt cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780

ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840

agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaatc 900

agtggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccct ggcggctccc 960

tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggt ttaccggtgt cattccgctg ttatggccgc 1020

gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac 1080

tgtatgcacg aaccccccgt tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 1140

gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt 1200

agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg 1260

tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt 1320

cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc 1380

aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca 1440

atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc 1500

atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct 1560

aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg 1620

tcaccctgga tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg 1680

atatcgtcca ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt 1740

tgatgcaatt tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc 1800

cagtcctgct cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac 1860

ccgtcctgtg gatctaaagg cacagcgtct catgcttcgc acaatgtaaa actgcttcag 1920

aacctggcga gagctatccg cgcggtctac ggttaactga tactaaaaga caattcagcg 1980

ggtaaccttg caatggtgag tggcagtaaa gcgggcgttt cgcctcatcg cgaaatagaa 2040

gtaatgagac aatccattga cgatcacctg gctggcctgt tacctgaaac cgacagccag 2100

gatatcgtca gccttgcgat gcgtgaaggc gtcatggcac ccggtaaacg gatccgtccg 2160

ctgctgatgc tgctggccgc ccgcgacctc cgctaccagg gcagtatgcc tacgctgctc 2220

gatctcgcct gcgccgttga actgacccat accgcgtcgc tgatgctcga cgacatgccc 2280

tgcatggaca acgccgagct gcgccgcggt cagcccacta cccacaaaaa atttggtgag 2340

agcgtggcga tccttgcctc cgttgggctg ctctctaaag cctttggtct gatcgccgcc 2400

accggcgatc tgccgggggа gaggcgtgcc caggcggtca acgagctctc taccgccgtg 2460

ggcgtgcagg gcctggtact ggggcagttt cgcgatctta acgatgccgc cctcgaccgt 2520

acccctgacg ctatcctcag caccaaccac ctcaagaccg gcattctgtt cagcgcgatg 2580

ctgcagatcg tcgccattgc ttccgcctcg tcgccgagca cgcgagagac gctgcacgcc 2640

ttcgccctcg acttcggcca ggcgtttcaa ctgctggacg atctgcgtga cgatcacccg 2700

gaaaccggta aagatcgcaa taaggacgcg ggaaaatcga cgctggtcaa ccggctgggc 2760

gcagacgcgg cccggcaaaa gctgcgcgag catattgatt ccgccgacaa acacctcact 2820

tttgcctgtc cgcagggcgg cgccatccga cagtttatgc atctgtggtt tggccatcac 2880

cttgccgact ggtcaccggt catgaaaatc gcctgatacc gccctttgg gttcaagcag 2940

tacataacga tggaaccaca ttacaggagt agtgatgaat gaaggacgag cgccttgttc 3000

agcgtaagaa cgatcatctg gatatcgttc tcgacccccg tcgcgccgta actcaggcta 3060

gcgcaggttt tgagcgctgg cgctttaccc actgcgccct gccagagctg aattttagcg 3120

acatcacgct ggaaaccacc ttcctgaatc ggcagctaca ggctccgctg ctgatcagct 3180

ccatgaccgg cggcgttgag cgctcgcgcc atatcaaccg ccacctcgcc gaggcggcgc 3240

aggtgctaaa aattgcgatg ggggtgggct cccagcgcgt cgccattgag agcgacgcgg 3300

gcttagggct ggataaaacc ctgcggcagc tggctccgga cgtgccgctg ctggcgaacc 3360

tcggcgcggc gcagctgacc ggcagaaaag gtattgatta cgcccgacgg gccgtggaga 3420

tgatcgaggc ggatgcgctg attgtgcacc taaacccgct gcaggaggcg ctacagcccg 3480
gcggcgatcg cgactggcgc ggacggctgg cggctattga aactctggtc cgcgagctgc 3540
ccgttccgct ggtggtgaaa gaggtgggag ccggtatctc ccgaaccgtg gccgggcagc 3600
tgatcgatgc cggcgttacc gtgattgacg tcgcgggcgc gggcggcacc agctgggccg 3660
ccgttgaagg cgagcgggcg gccaccgagc agcagcgcag cgtggccaac gtctttgccg 3720
actgggggat ccccaccgct gaggcgctgg ttgacattgc cgaggcctgg ccgcagatgc 3780
cccttattgc ctcgggaatg cgggctgggc tatttcaccc taccactggc tattcgctgc 3840

cgctggcggt ggcccttgcc gacgcgattg ccgacagccc gcggctgggc agcgttccgc 3900
tctatcagct cacccggcag tttgccgaac gccactggcg caggcaggga ttcttccgcc 3960
tgctgaaccg gatgcttttc ctggccgggc gcgaggagaa ccgctggcgg gtgatgcagc 4020
gcttttatgg gctgccggag cccaccgtag agcgctttta cgccggtcgg ctctctctct 4080
ttgataaggc ccgcattttg acgggcaagc caccggttcc gctgggcgaa gcctggcggg 4140
cggcgctgaa ccattttcct gacagacgag ataaaggatg aaaaaaaccg ttgtgattgg 4200
cgcaggcttt ggtggcctgg cgctggcgat tcgcctgcag gcggcaggga tcccaaccgt 4260

actgctggag cagcgggaca agcccggcgg tcgggcctac gtctggcatg accagggctt 4320
tacctttgac gccgggccga cggtgatcac cgatcctacc gcgcttgagg cgctgttcac 4380
cctggccggc aggcgcatgg aggattacgt caggctgctg ccggtaaaac ccttctaccg 4440
actctgctgg gagtccggga agaccctcga ctatgctaac gacagcgccg agcttgaggc 4500
gcagattacc cagttcaacc cccgcgacgt cgagggctac cggcgctttc tggcttactc 4560
ccaggcggta ttccaggagg gatatttgcg cctcggcagc gtgccgttcc tctcttttcg 4620
cgacatgctg cgcgccgggc cgcagctgct taagctccag gcgtggcaga gcgtctacca 4680

gtcggtttcg cgctttattg aggatgagca tctgcggcag gccttctcgt tccactccct 4740
gctggtaggc ggcaacccct tcaccacctc gtccatctac accctgatcc acgcccttga 4800
gcgggagtgg ggggtctggt tccctgaggg cggcaccggg gcgctggtga acggcatggt 4860
gaagctgttt accgatctgg gcggggagat cgaactcaac gcccgggtcg aagagctggt 4920
ggtggccgat aaccgcgtaa gccaggtccg gctggcggat ggtcggatct ttgacaccga 4980
cgccgtagcc tcgaacgctg acgtggtgaa cacctataaa aagctgctcg gccaccatcc 5040
ggtggggcag aagcgggcgg cagcgctgga gcgcaagagc atgagcaact cgctgtttgt 5100

gctctacttc ggcctgaacc agcctcattc ccagctggcg caccatacca tctgttttgg 5160

tccccgctac cgggagctga tcgacgagat ctttaccggc agcgcgctgg cggatgactt 5220

ctcgctctac ctgcactcgc cctgcgtgac cgatccctcg ctcgcgcctc ccggctgcgc 5280

cagcttctac gtgctggccc cggtgccgca tcttggcaac gcgccgctgg actgggcgca 5340

ggaggggccg aagctgcgcg accgcatctt tgactacctt gaagagcgct atatgcccgg 5400

cctgcgtagc cagctggtga cccagcggat ctttaccccg gcagacttcc acgacacgct 5460

ggatgcgcat ctgggatcgg ccttctccat cgagccgctg ctgacccaaa gcgcctggtt 5520

ccgcccgcac aaccgcgaca gcgacattgc caacctctac ctggtgggcg caggtactca 5580

ccctggggcg ggcattcctg gcgtagtggc ctcggcgaaa gccaccgcca gcctgatgat 5640

tgaggatctg caatgagcca accgccgctg cttgaccacg ccacgcagac catggccaac 5700

ggctcgaaaa gttttgccac cgctgcgaag ctgttcgacc cggccacccg ccgtagcgtg 5760

ctgatgctct acacctggtg ccgccactgc gatgacgtca ttgacgacca gacccacggc 5820

ttcgccagcg aggccgcggc ggaggaggag gccacccagc gcctggcccg gctgcgcacg 5880

ctgaccctgg cggcgtttga aggggccgag atgcaggatc cggccttcgc tgcctttcag 5940

gaggtggcgc tgacccacgg tattacgccc cgcatggcgc tcgatcacct cgacggcttt 6000

gcgatggacg tggctcagac ccgctatgtc acctttgagg atacgctgcg ctactgctat 6060

cacgtggcgg gcgtggtggg tctgatgatg gccagggtga tgggcgtgcg ggatgagcgg 6120

gtgctggatc gcgcctgcga tctggggctg gccttccagc tgacgaatat cgcccgggat 6180

attattgacg atgcggctat tgaccgctgc tatctgcccg ccgagtggct gcaggatgcc 6240

gggctgaccc cggagaacta tgccgcgcgg gagaatcggg ccgcgctggc gcgggtggcg 6300

gagcggctta ttgatgccgc agagccgtac tacatctcct cccaggccgg gctacacgat 6360

ctgccgccgc gctgcgcctg ggcgatcgcc accgcccgca gcgtctaccg ggagatcggt 6420

attaaggtaa aagcggcggg aggcagcgcc tgggatcgcc gccagcacac cagcaaaggt 6480

gaaaaaattg ccatgctgat ggcggcaccg gggcaggtta ttcgggcgaa gacgacgagg 6540

gtgacgccgc gtccggccgg tctttggcag cgtcccgttt aggcgggcgg ccatgacgtt 6600

cacgcaggat cgcctgtagg tcggcaggct tgcgggcgta aataaaaccg aaggagacgc 6660

agccctcccg gccgcgcacc gcgtggtgca ggcggtgggc gacgtagagc cgcttcaggt 6720

agccccggcg cgggatcccg cctcgccgtg ctgtccggtc tcaacctgat ccgccagaat 6780

cgagccaacg ggatcggcca gcacgaattc ggtatgcgga gagtgtttgg caaaccatgc 6840

ctgcaagcca cccagcgtgc cgccggagcc aacgcctact accacggcat caaccctgcc 6900

tgccagctgg tcgaacagct ccggtgcggt ggtggtggcg tgcgccagcg ggttggccgg 6960

gttagagaac tgatcaatat agtaagcacc cggcgtctcc tctgccaggc ggcgggcgta 7020

gtcctgatag tactccgggt ggcccttttgt cacgtcggag cgggtcaggc gcacatcaac 7080

acccagcgca cgcaggtggt agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcaccgg 7140

cgccacaggt gcggttgctg gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc 7200

tcgccacttc gggctcatga gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc 7260

cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cggtgctcaa 7320

cggcctcaac ctactactgg gctgcttcct aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg 7380

accgatgccc ttgagagcct tcaacccagt cagctccttc cggtgggcgc ggggcatgac 7440

tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc 7500

agcgctctgg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct 7560

gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgcacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctggtcccgc 7620

caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcggccg acgcgctggg 7680

ctacgtcttg ctggcgttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct 7740

cgcttccggc ggcatcggga tgcccgcgtt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga 7800

cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct cgcggctctt accagcctaa cttcgatcac 7860

tggaccgctg atcgtcacgg cgatttatgc cgcctcggcg agcacatgga acgggttggc 7920

atggattgta ggcgccgccc tataccttgt ctgcctcccc gcgttgcgtc gcggtgcatg 7980

gagccgggcc acctcgacct gaatggaagc cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact 8040

ccaagaattg gagccaatca attcttgcgg agaactgtga atgcgcaaac caacccttgg 8100

cagaacatat ccatcgcgtc cgccatctcc agcagccgca cgcggcgcat ctcgggcagc 8160

gttgggtcct ggccacgggt gcgcatgatc gtgctcctgt cgttgaggac ccggctaggc 8220

tggcggggtt gccttactgg ttagcagaat gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc 8280

gactgctgct gcaaaacgtc tgcgacctga gcaacaacat gaatggtctt cggtttccgt 8340

gtttcgtaaa gtctggaaac gcggaagtcc cctacgtgct gctgaagttg cccgcaacag 8400

agagtggaac caaccggtga taccacgata ctatgactga gagtcaacgc catgagcggc 8460

ctcatttctt attctgagtt acaacagtcc gcaccgctgt ccggtagctc cttccggtgg 8520

gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta 8580

ggacaggtgc cggcagcgcc caacagtccc ccggccacgg ggcctgccac catacccacg 8640

ccgaaacaag cgccctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 8700

ccctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgctaac cgtttttatc aggctctggg 8760

aggcagaata aatgatcata tcgtcaatta ttacctccac ggggagagcc tgagcaaact 8820

ggcctcaggc atttgagaag cacacggtca cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtaa 8880

accagcaata gacataagcg gctatttaac gaccctgccc tgaaccgacg accgggtcga 8940

atttgctttc gaatttctgc cattcatccg cttattatca cttattcagg cgtagcacca 9000

ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg ccccgccctg ccactcatcg 9060

cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca gacggcatga 9120

tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtcgcctt gcgtataata tttgcccatg 9180

gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata ttggccacgt ttaaatcaaa actggtgaaa 9240

ctcacccagg gattggctga gacgaaaaac atattctcaa taaacccttt agggaaatag 9300

gccaggtttt caccgtaaca cgccacatct tgcgaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa 9360

tcgtcgtggt attcactcca gagcgatgaa aacgtttcag tttgctcatg gaaaacggtg 9420

taacaagggt gaacactatc ccatatcacc agctcaccgt ctttcattgc catacg 9476

<210> 19

<211> 3434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKD13

<400> 19

agattgcagc attacacgtc ttgagcgatt gtgtaggctg gagctgcttc gaagttccta 60

tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaacttcaa gatcccctta ttagaagaac 120

tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc 180

acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca agctcttcag caatatcacg ggtagccaac 240

gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag 300

cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc 360

tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga 420

tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc 480

tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc 540

cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaaggtg agatgacagg 600

agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc ttcccgcttc agtgacaacg 660

tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg 720

tcctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc 780

tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca 840

tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca 900

atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct tgatcagatc ttgatcccct gcgccatcag 960

atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac cttaccagag 1020

ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgccca gtctagctat 1080

cgccatgtaa gcccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt ttcccttgtc 1140

cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg actggctttc 1200

tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcggca gcgtgagctt 1260

caaaagcgct ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgaac tgcaggtcga 1320

cggatccccg gaattaattc tcatgtttga cagcttatca ctgatcagtg aattaatggc 1380

gatgacgcat cctcacgata atatccgggt aggcgcaatc actttcgtct ctactccgtt 1440

acaaagcgag gctgggtatt tcccggcctt tctgttatcc gaaatccact gaaagcacag 1500

cggctggctg aggagataaa taataaacga ggggctgtat gcacaaagca tcttctgttg 1560

agttaagaac gagtatcgag atggcacata gccttgctca aattggaatc aggtttgtgc 1620

caataccagt agaaacagac gaagaagcta gctttgcact ggattgcgag gctttgccat 1680

ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagaggc 1740

tctaagggct tctcagtgcg ttacatccct ggcttgttgt ccacaaccgt taaaccttaa 1800

aagctttaaa agccttatat attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta 1860

tttaagttgc tgatttatat taattttatt gttcaaacat gagagcttag tacgtgaaac 1920

atgagagctt agtacgttag ccatgagagc ttagtacgtt agccatgagg gtttagttcg 1980

ttaaacatga gagcttagta cgttaaacat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt 2040

agtacgtact atcaacaggt tgaactgcgg atcttgcggc cgcaaaaatt aaaaatgaag 2100

ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 2160

cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 2220

cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 2280

accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 2340

ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 2400

ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 2460

tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca 2520

acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg 2580

tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc 2640

actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 2700

ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 2760

aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 2820

ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 2880

cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 2940

aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 3000

actcatactc ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 3060

cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 3120

ccgaaaagtg ccacctgcat cgatggcccc ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga 3180

gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt 3240

cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctcctgagta ggacaaatcc gccgggagcg 3300

gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga gggtggcggg caggacgccc gccataaact 3360

gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gccttttgc gtggccagtg 3420

ccaagcttgc atgc 3434

<210> 20

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkA delFP

<400> 20

gtaaaggaat ctgccttttt ccgaaatcat taatacagtt ttttcgcgca gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 21

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkA delRP

<400> 21

cttccggcaa cagatttcat tttgcattcc aaagttcaga ggtagtcatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkA seqFP

<400> 22

attatccatc aggacccctg ttccg 25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkA seqRP

<400> 23

cggaagaaat ccgcctcata ttgct 25

<210> 24

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkB delFP

<400> 24

actttccgct gattcggtgc cagactgaaa tcagcctata ggaggaaatg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 25

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkB delRP

<400> 25

attccccccaa tgctggggga atgtttttgt tagcgggaaa ggtaagcgta attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkB seqFP

<400> 26

tcgaaaggtt ttttagcgct ggca 24

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkB seqRP

<400> 27

tgggtaagcc ccgaaaccag 20

<210> 28

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gntR_H1_P1

<400> 28

gtccgtgtta aactaagaga atctatctct tttgtacctt caggacgatg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 29

<211> 70

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> gntR_H2_P4

<400> 29

ccatgcctta agtgtataag tgtgagctac ttcaaatttg tgggcttaaa attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gntR_seqFP

<400> 30

gccttttgc aggcttcctc 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gntR_seqRP

<400> 31

cccgatacgc ccatcaagac 20

<210> 32

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR-tetA_P1

<400> 32

cgttctcaat gataatggta ttgatgtacc gggtgagatt tcgttaattg gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 33

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR_H2_P4

<400> 33

cagaccatcg aagaattact ggcgctggaa ttgctttaac tgcggttagt attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR-FP

<400> 34

taatgaaaca aatgcccggt 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR-RP

<400> 35

tgccggaagt gaaggcaggt 20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR_seqFP

<400> 36

ggctcacatt cccacgatg 19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR_seqRP

<400> 37

gggcgatgtc tttacccag 19

<210> 38

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ugd-gnd-wbbL delFP

<400> 38

taatcagcat cccggtaggc ttcattttta tctaatgtgg cattaaagtg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 39

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ugd-gnd-wbbL delRP

<400> 39

gaaatgactg agtcagccga gaagaatttc cccgcttatt cgcaccttcc gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ugd-gnd-wbbL FP

<400> 40

taatcagcat cccggtaggc 20

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ugd-gnd-wbbL RP

<400> 41

gaaatgactg agtcagccga g 21

<210> 42

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> wbbL_2 insFP

<400> 42

ttattaaagt ataaatagct tatccatgct tatatgctta cggctttata gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 43

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> wbbL_2 insRP

<400> 43

ttttatcaaa tcgcaacttt gatcgaattt catcagtttt tcacccgtaa attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 44

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> wbbL_2_kanR zzB_insFP

<400> 44

gtgtatacct tatctgccac atccttaagc tcttctgcca ttcggttaga gataatgacg 60

tcggttcatg ctctcagaat taacttaac 89

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ugd seqRP

<400> 45

catcattacc ctaactgacg g 21

<210> 46

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crp_H1_P4

<400> 46

ggcgttatct ggctctggag aaagcttata acagaggata accgcgcatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 47

<211> 71

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> crp_H2_P1

<400> 47

ctaccaggta acgcgccact ccgacgggat taacgagtgc cgtaaacgac gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crp-FP

<400> 48

ttgatgtact gcatgtatgc 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crp-RP

<400

> 49

atggcgcgct accaggtaac 20

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crp_seqFP

<400> 50

atagcccctt cccaggtag 19

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crp_seqRP

<400> 51

caggaacgag ggagaagag 19

<210> 52

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB_H1_P1

<400> 52

agaccggtta catcccccta acaagctgtt taaagagaaa tactatcatg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 53

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB_H2_P4

<400> 53

cttcagaaga ggtagcgtga ccgacttccc ggtcacgcta agaatgatta caattccggg 60

gatccgtcga cc 72

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB-FP

<400> 54

aaagcaaaac gcctgatcaa 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB-RP

<400> 55

gcgcagggat gcctttatcc 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB_seqFP

<400> 56

ctggcgataa ccgtcttgtc 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> talB_seqRP

<400> 57

cctgctcatc ggggattaag 20

<210> 58

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EcoRI_RBS_eddEc FP

<400> 58

cccccgaatt ctgacaactc aatttcagga gcctttatga atccacaact actgcgcgta 60

acaaatcgaa tcattg 76

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BamHI_edaEc RP

<400> 59

cccggatcct tacagcttag cgccttctac 30

<210> 60

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BglII_RBS_galPEc FP

<400> 60

ccagatctaa aaataaccat attggagggc atc 33

<210> 61

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XhoI_galPEc RP

<400> 61

ccccctcgag ttaatcgtga gcgcctattt c 31

<210> 62

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gnd_H1_P1

<400> 62

aggccgcgag cattcagcgc ggtgatcaca cctgacagga gtatgtaatg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 63

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gnd_H2_P4

<400> 63

gtgcaatata cgccgggcct caattttatt gttggttaaa tcagattaat attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gnd seqFP_2

<400> 64

gatttgatga ccataaccgc 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gnd seqRP_2

<400> 65

gtcagtggga gagatctcac 20

<210> 66

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EcoRI-BglII-gnd FP

<400> 66

cccccgaat tcaaaagatc ttgatcacac ctgacaggag t 41

<210> 67

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XhoI-BamHI gnd RP

<400> 67

gggggctcg agtttggatc cttaatccag ccattcggta tgg 43

<210> 68

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EcoRI_BglII gntR FP

<400> 68

cccccgaat tcaaaagatc tctggacgga agtccaggcc ataaacatga aaaagaaaag 60

acccgtactt c 71

<210> 69

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XhoI-BamHI gntR RP

<400> 69

gggggctcg agtttggatc cttaaataga tccgcccggt g 41

<210> 70

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabI(S241F)_km SOE P1

<400> 70

tgtgggtaac tctgcggcat tcctgtgctc cgatctctct gccggtatct tcggtgaagt 60

ggtccacgtt gacggcggtt tcagcattgc tgcaatgaac g 101

<210> 71

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabI(S241F)_km SOE P2

<400> 71

ggtcgacgga tccccggaat ttatttcagt tcgagttcgt tcatt 45

<210> 72

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabI(S241F)_km SOE P3

<400> 72

aatgaacgaa ctcgaactga ataaaattcc ggggatccgt cgacc 45

<210> 73

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabI(S241F)_km SOE P4

<400> 73

aacagagata acgggcggca gaacgccgcc catctttacc aacagaacga gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 74

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> (Km)P4-fabIp_HR

<400> 74

ttaattctca tgtttgacag cctgctccgg tcggacctgg 40

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabI seqRP

<400> 75

acctttgcgg cttccgggac 20

<210> 76

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pgi delFP

<400> 76

atgaaaaaca tcaatccaac gcagaccgct gcctggcagg cactacagaa tgtaggctgg 60

agctgcttc 69

<210> 77

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pgi delRP

<400> 77

accgcgccac gctttatagc ggttaatcag accattggtc gagctatcgt attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pgi seqFP

<400> 78

aggtgttatc acaggactgg 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pgi seqRP

<400> 79

aagcaattaa tctgcgtatt 20

<210> 80

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptsG-H1-P1

<400> 80

cacgcgtgag aacgtaaaaa aagcacccat actcaggagc actctcaatt gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 81

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptsG-H2-P4

<400> 81

gtaaaaaagg cagccatctg gctgccttag tctccccaac gtcttacgga attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptsG seqFP

<400> 82

ataacttcgc ccgtctgttt 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptsG seqRP

<400> 83

atgttcacca gctatcggtt 20