



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0129762

(43) 공개일자 2023년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

C12N 15/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0026769

(22) 출원일자 2022년03월02일

심사청구일자 2022년03월02일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남테시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남테시앙포레아파트)

리 타이 킨 호아

경기도 수원시 영통구 매영로415번길 42-22 103호

마이 호 안 등

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17 201호(서천동, 진영빌라 4동)

(74) 대리인

위병갑

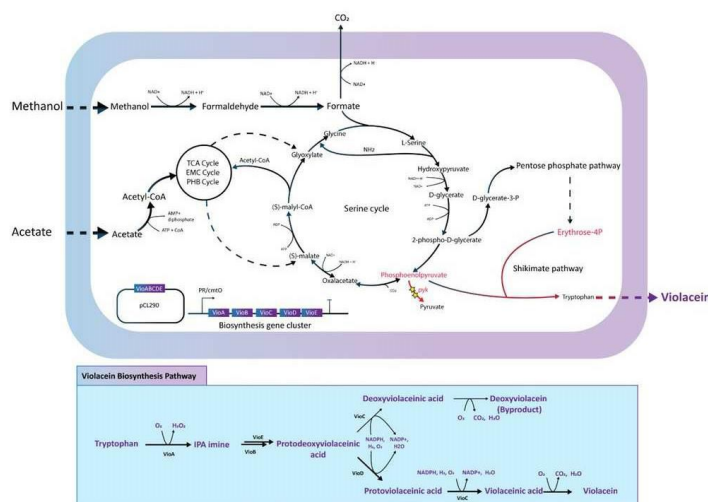
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 바이오라세인 생산능이 증대된 형질전환 메탄올자화균 및 이를 이용한 바이오라세인 생산방법

(57) 요약

본 발명은 바이오라세인 생산능이 증대된 형질전환 메탄올자화균 및 이를 이용한 바이오라세인 생산방법에 관한 것으로, 저렴한 공급원료인 메탄올과 아세트산을 이용하여 바이오라세인의 생산비용을 절감하였으며, 친환경적이고 안전한 천연 합성 착색제를 제공하여 화학적 합성 착색제를 대체할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류
C12P 17/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129694
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

vioABCDE 클러스터를 암호화하는 유전자가 발현되도록 형질전환된 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환 메탄올 자화균은,

P_R 프로모터를 암호화하는 유전자가 발현되도록 형질전환된 것인, 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형질전환 메탄올자화균은,

pyk 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고;

니트릴라제(nitrilase)를 코딩하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고;

중금속 유출 관련 단백질을 코딩하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되는 것인, 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 vioABCDE 클러스터는,

*Chromobacterium violaceum*에서 유래한 것인, 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 pyk 유전자는 서열번호 9이고, 니트릴라제(nitrilase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 11이며, 중금속 유출 관련 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13인 것인, 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 중금속은 아연, 카드뮴 또는 코발트인 것인, 바이오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균.

청구항 7

메탄올과 아세테이트를 이용하여 제1항의 균주를 배양하는 단계 (a); 및
배지에 이소프로필벤조산을 첨가하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오라세인의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 메탄올은,
10 내지 25 g/L인 것인, 바이오라세인의 생산방법.

청구항 9

제7항에 있어서,
상기 아세테이트는,
0.35 내지 2 g/L인 것인, 바이오라세인의 생산방법.

청구항 10

제7항에 있어서,
상기 이소프로필벤조산은,
5 내지 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것인, 바이오라세인의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오라세인 생산능이 증대된 형질전환 메탄올자화균 및 이를 이용한 바이오라세인 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품, 의약품, 섬유, 화장품 등의 다양한 산업 분야는 합성 착색제에 과도하게 의존하는 경향이 있다. 환경 오염, 건강 등 안전에 대한 우려가 커지면서 합성 착색제를 대체하고자 하는 시도가 다양하게 이루어지고 있다. 일 예로 미생물 유래 착색제 또는 안료는 환경 문제를 유발하지 않아 안전하며, 항산화 또는 항암 활성 등의 유익한 생체 활성을 나타내는 경우가 있어 최근 이에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0003] 바이오라세인(violacein)은 *Chromobacterium violaceum* 등의 그람 음성 박테리아에 의해 자연적으로 생성되는 트립토판 유래 2차 대사산물이다. 바이오라세인의 생합성은 5개의 효소 인코딩 유전자(vioA, vioB, vioC, vioD, vioE)로 구성되는 vio오페론에 의한다. 생합성 경로는 2개의 트립토판 분자가 플라빈 의존성 L-트립토판 산화효소(vioA)에 의해 촉매되는 2개의 인돌-3-피루브산 이민(indole-3-pyruvic acid imine) 분자로 전환되는 것으로 시작된다. 인돌-3-피루브산 이민은 2-이미노-3-(인돌-3-yl) 프로파노에이트 다이머라제(2-imino-3-(indol-3-yl) propanoate dimerase, vioB) 및 프로데옥시바이오라세인(prodeoxyviolacein) 합성효소(vioE)에 의해 프로토테옥시바이오라세인산(protodeoxyviolacein acid)으로 전환된다. 이어서 프로토테옥시바이오라세인 모노옥시게나아제(vioD) 및 바이오라세인 합성효소(vioC)와 반응하여 바이오라세인과 부산물인 데옥시바이오라세인을 각각 생산한다(Fang et al., High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway, Microbial Cell Factories, 14, Article number:8(2015)).

[0004] 그러나 바이오라세인은 생산성이 낮으며, 박테리아의 병원성, 대규모 미생물 배양의 어려움 등의 문제가 있어 산업적 규모의 바이오라세인 생산이 어렵고, 합성 배지의 높은 비용 또한 산업화의 장벽으로 꼽힌다. 이에 바이

오라세인 생산을 개선하기 위한 연구개발이 지속적으로 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 본 발명은 *Methylobacterium extorquens* AM1이 적절한 프로모터 하에서 바이오오라세인 생합성을 담당하는 표적 유전자의 이중 과발현에 의해 메탄올을 바이오오라세인으로 전환할 수 있는 생체촉매(biocatalyst)로서의 활용 가능성을 확인하여 그 방법을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2006904 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 메탄올자화균(methylotroph)인 *Methylobacterium extorquens* AM1 균주를 대사공학적으로 개량하여 바이오오라세인을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 vioABCDE 클러스터를 암호화하는 유전자가 발현되도록 형질전환된 바이오오라세인 생산용 형질전환 메탄올자화균을 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 메탄올 자화균은, 바람직하게는 P_R 프로모터를 암호화하는 유전자가 발현되도록 형질전환된 것이 좋다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 메탄올자화균은, 바람직하게는 pyk 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고; 니트릴라제(nitrilase)를 코딩하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고; 중금속 유출 관련 단백질을 코딩하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되는 것이 좋다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 vioABCDE 클러스터는, 바람직하게는 *Chromobacterium violaceum*에서 유래한 것이 좋다.

[0012] 본 발명에 있어서, 바람직하게는, 상기 pyk 유전자는 서열번호 9이고, 니트릴라제(nitrilase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 11이며, 중금속 유출 관련 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13인 것이 좋다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 중금속은, 더욱 바람직하게는, 아연, 카드뮴 또는 코발트인 것이 좋다.

[0014] 또한, 본 발명은 메탄올과 아세테이트를 이용하여 제1항의 균주를 배양하는 단계 (a); 및 배지에 이소프로필벤조산을 첨가하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오오라세인의 생산방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 메탄올은, 바람직하게는 10 내지 25 g/L인 것이 좋다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 아세테이트는, 바람직하게는 0.35 내지 2 g/L인 것이 좋다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 이소프로필벤조산은, 바람직하게는 5 내지 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것이 좋다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 저렴한 공급원료인 메탄올과 아세테이트를 이용하여 바이오오라세인의 생산비용을 절감하였으며, 본 발명의 생산방법에 의한 바이오오라세인은 친환경적이고 안전한 천연 합성 착색제로 제공하여 화학적 합성 착색제를 대체할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 AM1_vio/ P_R 와 AM1_vio/ P_{maxAF} 의 바이오오라세인 역가를 나타낸 도이다.

도 2는 AM1_vio/P_R와 AM1_vio/P_{mxaf}의 박테리아 성장률을 나타낸 도이다.

도 3은 AM1_vio/P_R에서 유도제 농도에 따른 바이오라세인 생산량을 비교한 도이다.

도 4는 AM1_vio/P_R에서 유도제를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이용한 경우의 바이오라세인 생산량, 메탄올 소비량, 박테리아 성장률을 나타낸 도이다.

도 5는 AM1_vio/P_R에 돌연변이를 유발하는 과정과 돌연변이가 유발된 균주(E1-E15)의 바이오라세인 생산을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명에 따른 바이오라세인 생산 과정을 나타낸 도이다.

도 7은 속도제한효소 과발현에 따른 바이오라세인 생산량을 비교한 도이다.

도 8은 AM1_E7, AM1_E7_GEM, AM1_E7_GER의 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 AM1_E7 균주를 다양한 농도의 메탄올에서 배양함에 따른 박테리아 성장률(A)과 바이오라세인 생산량(B)을 나타낸 도이다.

도 10은 아세테이트 농도에 따른 박테리아 성장률(A)과 바이오라세인 생산량(B)을 나타낸 도이다.

도 11은 AM1_E7 균주를 메탄올과 아세테이트를 모두 이용하여 배양함에 따른 박테리아 성장률(A), 바이오라세인 생산량(B), 메탄올과 아세테이트의 소비량(C), 생산된 바이오라세인(D)을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0022] <준비예 1> *Methylobacterium extorquens* AM1 균주의 배양방법

[0023] 본 실험에서는 균주 배양을 위해 MC 배지를 사용하였다(Zhu et al., Bioconversion of methanol to value-added mevalonate by engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 containing an optimized mevalonate pathway. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100:2171-2182). MC 배지의 성분은 용액 A, B, C, D이며, 용액 A는 Milli-Q(EMD Millipore, Billerica, MA, USA) water에 75.68 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 18.26 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 0.22 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 혼합된 것이고, 용액 B는 Milli-Q water에 45.53 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 18 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 0.33 mM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 혼합된 것이고, 용액 C는 Milli-Q water에 0.485 mM H_3BO_3 가 혼합된 것이고, 용액 D는 NaOH에 의해 pH 6.8로 조절되었으며, Milli-Q water에 0.959 M KH_2PO_4 및 1.50 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 혼합된 것이다. MC 배지 1 L는 용액 A 100 mL, 용액 B 1 mL, 용액 C 1 mL를 Milli-Q water 878 mL와 혼합하고, 혼합용액과 용액 D를 각각 멸균한 뒤, 혼합용액에 멸균 용액 D 10 mL를 첨가하여 제조하였다.

[0024] *Methylobacterium extorquens* AM1의 야생형(Wild type) 또는 재조합 균주(engineered strains)는 스크류 캡으로 밀봉된 500 mL 베플 플라스크(baffled flask)에서 50 mL MC 배지와 함께 30 °C, 230 rpm 조건에서 배양하였다. 탄소 공급원으로 메탄올(5, 10, 15, 20, 25 g/L)이 사용되었으며, 배양을 위한 추가 탄소원으로 아세테이트(0.35, 0.7, 1, 1.5, 2 g/L)를 사용하였다. 유도제(inducer)인 이소프로필벤조산(isopropylbenzoic acid, 이하 큐메이트(cumate))은 수성 스톡(aqueous stock)에서 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 범위에 걸쳐 최적화하였다.

[0025] 세포 배양물의 광학 밀도는 분광 광도계(Beckman, Spectrophotometer, USA)와 1 cm 경로 길이의 1.5 mL 큐벳을 사용하여 측정하였다. 최종 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin을 사용하여 재조합 플라스미드를 포함하는 *Methylobacterium extorquens* AM1 및 *Escherichia coli* 균주를 선택하였다.

[0027] <실험예 1> *Methylobacterium extorquens* AM1 균주의 형질전환

[0028] *Methylobacterium extorquens* AM1와 *Chromobacterium violaceum* ACTC 12472의 게놈 DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리하였다. Gibson 어셈블리 마스터 믹스는 NEB(Hitchin, UK)에서 구매하였다. Lamp Pfu 중합효소(BioFACT, Daejeon, South Korea)를 DNA 증폭에 사용하였다. PCR 정제 키트는 GeneA11(Seoul, South Korea)에서 구매하였다. 올리고뉴클레오타이드 합성 및 DNA 시퀀싱은 Macrogen(Seoul, South Korea)에서 수행하였다.

[0029] *E. coli* DH5 α 를 사용하여 발현 플라스미드를 클로닝하였다. 발현벡터 pCL 290 및 pBRR1-MCS2는 각각 제한효소 SacI 및 EcoRI를 사용한 소화(digestion)에 의해 선형화하였다. v10ABCDE 클러스터는 *Chromobacterium violaceum* ACTC 12472의 게놈 DNA로부터 PCR을 통해 증폭된 다음 P_R 또는 P_{mxaf} 프로모터의 제어 하에 선형화 된 pCL290 플라스미드와 조립되었다. 피드백 억제 내성 돌연변이가 있는 유전자 *aroG*와 *trpE*는 각각 벡터 pTRP(D.N.Pham) 및 *Methylobacterium extorquens* AM1의 게놈 DNA로부터 증폭되었다. DNA 단편을 P_R 프로모터의 제어 하에 선형화된 pBRR1-MCS2 벡터 백본으로 조립하였다. 구축된 발현 벡터를 추출하고 *Methylobacterium extorquens* AM1에 직접 전기천공하였다.

표 1

[0031]

서열번호 1	vioA
서열번호 2	vioB
서열번호 3	vioC
서열번호 4	vioD
서열번호 5	vioE
서열번호 6	P _R 프로모터
서열번호 7	P _{mxaf} 프로모터
서열번호 8	pyk of <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1
서열번호 9	pyk of <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1_E7
서열번호 10	nitrilase of <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1
서열번호 11	nitrilase of <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1_E7
서열번호 12	Heavy metal efflux pump CzcA of <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1
서열번호 13	Heavy metal efflux pump CzcA <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1_E7

[0033] 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 재조합 균주의 총 RNA를 추출(Nguyen et al., Metabolic role of pyrophosphate-linked phosphofructokinase *pfk* for C1 assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1, Microbial Cell Factories 19, Article number:131(2020))하고, cDNA 주형은 RevertAid First Strand cDNA 합성 키트(Thermo Scientific, Waltham, USA)를 사용하여 약 200ng의 총 RNA로부터 합성되었다. RT-qPCR은 GoTaq qPCR Master Mix(Promega, Madison, USA)를 사용하여 CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Biorad, Hercules, USA)에 의해 수행되었다. RT-PCR 산물은 전기영동하였다.

표 2

[0035]

Strain	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host	Invitrogen
AM1_WT	Wild-type <i>M. extorquens</i> AM1	DMSZ
AM1_vio/P _{mxaf}	<i>M. extorquens</i> AM1 containing pCL290/P _{mxaf}	
AM1_vio/P _R	<i>M. extorquens</i> AM1 containing pCL290/P _R	
AM1_E7	EMS-treated AM1_vio/P _R	
AM1_E7_GEM	AM1_E7 containing pMC2_GEM	

AM1_E7_GER	AM1_E7 containing pMC2_GER	
Plasmids	Characteristics	Source
pTRP	pAW89 vector harbouring <i>aroG</i> ^{fbr} and <i>trpE</i> ^{fbr}	(D.N. Pham, unpublished)
pCL290	<i>M. extorquens</i> AM1 expression vector(P _R , kan ^R)	(Chubiz et al., 2013)
pBRR1_MCS2	A broad-host-range expression vector(P _R , gen ^R)	Addgene
pCL290_vio/P _{mxaf}	pCL290 vector with promoter P _{mxaf}	
pMC2_GEM	Expression vector pBRR1-MCS2 containing <i>aroG</i> and <i>trpE</i> from AM1_E7	
pMC2_GER	Expression vector pBRR1-MCS2 containing <i>aroG</i> ^{fbr} and <i>trpE</i> ^{fbr} from pTRP	

[0037] <실험예 2> 발현 벡터와 유도제(inducer) 농도 최적화

[0038] 바이오라세인(violacein) 생산을 위해 단일 보라색 콜로니를 증식용 선택적 배지가 포함된 한천 플레이트에 옮기고, 10 ml MC 배지를 포함하는 100 ml 플라스크에 접종하고 30 °C의 회전식 진탕기에서 230 rpm으로 교반하면서 96시간 배양하였다. 탄소 공급원으로는 5 g/L의 메탄올을 사용하였다. 이후, 2 ml의 배양물을 50 ml MC 배지를 포함하는 250 ml 플라스크에 접종하였다. 균주의 시드(seed) 배양물을 30 °C의 회전식 진탕기에서 230 rpm으로 교반하면서 24시간 배양한 뒤, 유도제로 큐메이트(cumate)를 첨가하였다.

[0039] 도 1에서 보듯이, P_R 프로모터를 이용한 경우(*M. extorquens* AM1 containing pCL290/P_R), 지수 성장기에서 5 µg/ml 큐메이트(cumate)를 보충하면서 4일에 걸쳐 배양한 결과, 바이오라세인은 초기 5 g/L 메탄올로부터 7.1 mg/L의 역가(titer)로 생산되었으며, 메탄올 탈수소효소의 강력한 메탄올 유도성 프로모터로 알려진 P_{mxaf}를 이용한 경우(*M. extorquens* AM1 containing pCL290/P_{mxaf})에는 바이오라세인이 4.9 mg/L 생산되었다. 도 2에서 보듯이, 프로모터에 따른 두 재조합 균주의 성장물은 야생형(Wild-type(WT) *M. extorquens* AM1)에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0040] 한편, 유도제의 영향을 확인하기 위해, 지수 성장기에서 배양 배지에 5, 10, 15, 20 µg/ml의 큐메이트(cumate)를 각각 공급하여 바이오라세인 생산을 유도하였다. 도 3에서 보듯이, 큐메이트(cumate) 유도가 없는 경우(0 µg/ml cumate) 바이오라세인은 3.1 mg/L의 낮은 수준으로 검출되었다. 큐메이트(cumate) 유도가 없는 경우에는 P_R 프로모터의 누출 활성으로 인해 바이오라세인의 생산이 미미한 것으로 나타났다. 반면, 10 µg/ml 큐메이트(cumate)를 이용한 경우에는 바이오라세인의 역가(titer)가 최대 11.7 mg/L로 확인되었다. 도 4에서 보듯이, 10 µg/ml 큐메이트(cumate) 유도의 경우 바이오라세인은 4일에 걸쳐 11.7 mg/L 검출되었으며, 3.15 mg(바이오라세인) /g(메탄올)의 수율로 향상되었다. 이보다 높은 농도의 유도제를 처리할 경우에는 바이오라세인의 생산이 더 이상 증가하지 않았으며(도 3), 하기 실험에서는 P_R 프로모터와 10 µg/ml 큐메이트(cumate)를 사용하였다.

[0042] <실험예 3> 무작위 돌연변이 유발

[0043] *Methylobacterium extorquens* AM1 균주에 무작위 돌연변이를 유발(genome-wide mutagenesis)하고 적응 진화(항대사물질/억제제 노출)하였다. EMS 돌연변이 유발 라이브러리는 화학 처리 후 1%의 생존율을 유지하도록 설계되었다. 보라색 콜로니의 총 라이브러리 크기를 얻은 뒤, 5MT에 노출시켰다(도 5). 상기 무작위 돌연변이는 특정 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것으로, 상기 소실은 유전자가 결실(deletion)되거나 적중(knockout)된 것을 의미한다.

[0044] 구체적으로, 프로토콜을 기반으로 수정된 ethyl methanesulfonate(EMS) 돌연변이를 유발하여 *Methylobacterium extorquens* AM1에 적용하였다. 조작된 균주를 약 5-6의 OD600으로 성장시키고 펠렛화한 뒤, 0.1M 인산나트륨 완충액(pH 7.0)으로 2회 세척하였다. 세포 펠렛을 최종 OD600이 10인 동일한 완충액 1 ml에 재현탁하였다. 이후, EMS(Sigma-Aldrich, Missouri, USA)를 최종 농도가 1.4 %(v/v)가 되도록 첨가하였다. EMS 처리된 현탁액과 대조군(50 µl의 인산염 완충액)을 30 °C, 230 rpm 교반에서 2시간 배양하였다. 배양 후, EMS를 비활성화하기 위해

대조군 및 돌연변이화된 세포를 각각 펠렛화하고 5 % (v/v) 티오황산나트륨으로 2회 세척하였다. 세포 펠렛을 인산염 완충액에 재현탁한 뒤, 한천 플레이트에 도말하기 전에 연속으로 희석하였다. EMS 돌연변이 후, 나머지 보라색 콜로니는 회복을 위해 4일간 선택적 최소 배지에서 배양하였다. 이후 회수된 세포를 L-트립토판 억제제인 5-메틸 트립토판(5MT)에 노출시키고, 각 계대 배양에서 농도를 0.1에서 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시켰다. 5MT는 트립토판의 유사체이며 대장균에서 트립토판 풀을 풍부하게 하는데 사용된다. 이후, 두 번째 EMS 돌연변이 유발 단계는 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5MT에 내성이 있는 세포에서 유사하게 수행한 뒤, 나머지 강한 보라색 콜로니를 계대배양하였다.

[0045] 바이오라세인 생산 균주를 스크리닝하기 위해 *Methylobacterium extorquens* AM1의 돌연변이체 및 대조군 균주를 0.5 % (v/v) 메탄올을 단독 탄소원으로 함유하는 선택적 한천 배지에서 4일간 배양하였다. 돌연변이는 선명한 보라색을 기반으로 선택하였으며, 보라색 콜로니 분리를 위해 새로운 선택적 한천 배지로 옮기고 96시간 5 g/L 메탄올 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카나마이신(kanamycin)을 포함하는 액체 배지에서 성장시켰다. 이후 선택 배지에 남아있는 보라색 착색 콜로니를 수집하여 조사하였다.

[0046] 도 5에서 보듯이, 약간의 성장 결함을 보이는 일부 돌연변이 균주와 달리, E6, E7, E8, E14, E15 돌연변이 균주는 EMS 처리 후 대조군에 비해 안정적인 성장을 유지하였다.

[0047] 특히, E7 돌연변이 균주는 가장 많은 바이오라세인을 생산하였는데, E7 돌연변이 균주는 4일간 5 g/L 메탄올에서 배양할 경우 초기 조작된 균주에 비해 2배 더 많은 25 mg/L의 바이오라세인을 생산하였다(도 7). E7 돌연변이 균주를 확인하기 위해 전체 게놈 시퀀싱(whole genome sequencing)을 수행하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 Promega Wizard DNA 정제 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. Qubit dsDNA 고감도 분석을 사용하여 DNA를 정량화하고, DNA 시퀀싱은 Illumina HiSeq-2000 시퀀싱 플랫폼(Macrogen, Korea)을 사용하여 수행하였다. Paired-end reads data는 트리모매틱에 의해 트리밍, 조립되었으며, 미니맵2에 의해 게놈 서열에 맵핑되었다(NCBI, NC_012988.1, NC_012989.1, NC_012987.1, NC_012811.1). Freebayes는 돌연변이를 식별하는데 사용되었다.

[0048] 599개의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)을 확인하였으며, 이 중 28 %가 아미노산 치환을 유발하는 것으로 나타났다. 확인된 유전자 외에도 여러 추정 도메인과 가상 단백질이 치환되었다. 그러나 shikimate 경로와 vio 유전자 클러스터를 포함하는 발현 벡터의 서열에서는 SNP가 확인되지 않았다.

[0049] 한편, 탄수화물과 에너지 대사에 관여하는 표적 유전자와 막 단백질에서 여러 SNP가 관찰되었다. 구체적으로, 해당과정에서 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate, PEP)과 ADP를 피루브산(pyruvate)과 ATP로 전환하는 것을 촉매하는 피루브산 키나아제를 코딩하는 pyk 유전자(서열번호 8)에서 30개의 SNP가 확인되었으며, 돌연변이 된 pyk 유전자는 서열번호 9와 같다(도 6).

[0050] 이러한 돌연변이는 PEP에서 피루브산(pyruvate)으로의 전환율을 감소시키고, EYP(erythrose-4-phosphate)와의 촉합을 통해 PEP가 shikimate 경로로 더 흐를 수 있도록 하였다. 또한, L-트립토판으로부터의 옥신 생합성에 관여하는 것으로 추정되는 니트릴라제(nitrilase, 서열번호 10)에서 69개의 SNP가 확인되었으며, 돌연변이 된 니트릴라제는 서열번호 11과 같다. 이는 L-트립토판 풀과 바이오라세인 생합성 사이의 경쟁을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 막 관련 단백질, 특히 펩티도글리칸 생합성, 아연, 카드뮴 또는 코발트와 같은 중금속 유출에 관련된 단백질에서 여러 치환이 발생하였다. 중금속 유출 관련 단백질(Heavy metal efflux pump CzcA, 서열번호 12)에서 132개의 SNP가 확인되었으며, 돌연변이 된 중금속 유출 관련 단백질은 서열번호 13과 같다. 이러한 치환은 세포 투과성을 조절하고 바이오라세인의 생산을 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0052] <실험예 4> 속도제한효소 과발현에 따른 바이오라세인 생산

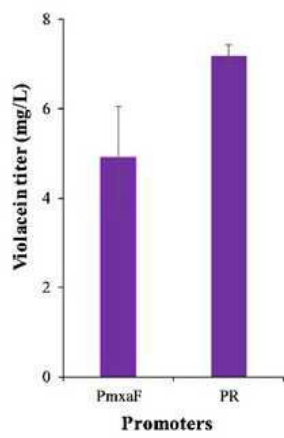
[0053] 본 실험은 속도제한효소 인코딩 유전자의 과발현이 바이오라세인의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 보고된 유전자 서열에 따르면, *Methylobacterium extorquens* AM1에서 트립토판 오페론 전사(trpR)의 억제 인자와 트립토판(tnaA)의 분해 경로를 인코딩하는 알려진 유전자는 없으며, 무작위 돌연변이 유발 결과는 shikimate 경로와 관련된 유전적 변화를 나타내지 않았다.

[0054] 숙주 균주에서 피드백 억제 메커니즘을 받지 않는 *aroG*(3-deoxy-d-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase, DAHPS) 및 *trpE*(anthranilate synthase, AS)를 인코딩하는 두 개의 기본 서열과, *E. coli*에서 피드백 내성 DAHPS 및 AS를 인코딩하는 *aroG^{fbr}*, *trpE^{fbr}*를 과발현하여 비교하였다. P_R 프로모터 하에 두 번째 발현 벡터인 pBRR1_MCS2를 사용하여 과발현하였다(표 1).

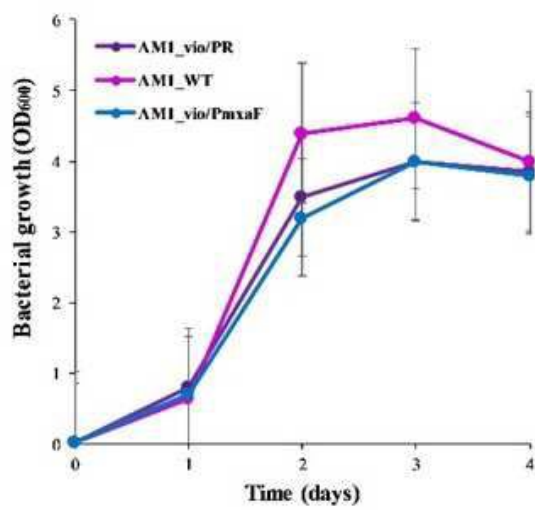
- [0055] 도 7에서 보듯이, 모든 균주에서 바이오라세인 생산량은 4일, 8일 사이에 증가하였으나, 모주(parental strain)인 AM1_E7과는 큰 차이가 없었다. 한편, AM1_E7_GEM에서는 8일차에 24 mg/L의 바이오라세인이 생산되었으며, 이는 8일차에 35 mg/L 바이오라세인이 검출된 AM1_E7과 AM1_E7_GER에 비해 적은 양이었다. 이에 따라, *aroG*, *trpE*의 과발현이 shikimate 경로에 대한 알로스테릭(allosteric) 피드백 억제를 유발할 가능성을 확인해주었다. 한편, AM1_E7_GER 균주는, *aroG*^{fbr}, *trpE*^{fbr} 과발현에 따라 AM1_E7 균주에 비해 바이오라세인 생산량이 증가하지 않았다. 도 8에 AM1_E7, AM1_E7_GEM, AM1_E7_GER의 RT-PCR 결과를 나타내었다.
- [0056] 한편, 본 실험에 따라, pBBRI-MCS2의 약한 발현 수준이 중추 대사에서 shikimate 경로로, 또는 shikimate 경로에서 L-트립토판으로의 탄소 플럭스를 충분히 증가시키지 못하는 것으로 나타났으며, 이에 바이오라세인 생산량을 증대시키기 위한 추가 탄소 공급원을 설정하였다.
- [0058] <실험예 5> 바이오라세인의 생산량 증대
- [0059] *Methylobacterium extorquens* AM1_E7을 메탄올과 아세테이트를 이용한 세 가지 경우로 배양하여 메탄올과 아세테이트가 바이오라세인 생산에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0060] *Methylobacterium extorquens* AM1_E7 균주를 10, 15, 20, 25 g/L의 메탄올 농도에서 8일간 배양하였다. 도 9에서 보듯이, 10, 15 g/L의 메탄올에서 약 67.8 mg/L의 바이오라세인이 생산되는 것을 확인하였다. 한편, 20 g/L 이상의 고농도 메탄올은 바이오라세인 생산을 오히려 저해하는 것으로 나타났다. 이에 따라, 메탄올 10 g/L를 바이오라세인 생산을 위한 최적의 농도로 설정하고, *Methylobacterium extorquens* AM1_E7 균주를 10 g/L 메탄올 및 0.35, 0.7, 1, 1.5, 2 g/L 아세테이트를 포함하는 공동 기질에서 각각 배양하였다. 도 10에서 보듯이, 0.35 g/L 아세테이트를 이용한 경우가 균주의 성장과 바이오라세인 생산량에 있어서 최적의 조건인 것으로 확인되었다.
- [0061] 도 11에 0.35 g/L 아세테이트를 포함하는 경우의 박테리아 성장률(도 11A), 바이오라세인 생산량(도 11B), 메탄올과 아세테이트의 소비량(도 11C), 생산된 바이오라세인(도 11D)을 나타내었다.
- [0062] 도 11B에서 보듯이, 메탄올과 아세테이트를 모두 이용한 경우, 바이오라세인 역가(titer)가 최대 118 mg/L에 도달하였으며, 이는 메탄올을 단독으로 이용한 경우(68 mg/L)의 약 2배, 아세테이트를 단독으로 이용한 경우(24 mg/L)의 약 5배 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 바이오라세인 건조중량에 따른 수율은, 메탄올과 아세테이트를 모두 이용한 경우에 0.072 g/g DCW로, 메탄올을 단독으로 이용한 경우(0.03 g/g DCW)와 아세테이트를 단독으로 이용한 경우(0.03 g/g DCW)에 비해 높은 것으로 나타났다.
- [0063] 도 11C에서 보듯이, 아세테이트 존재 하에서 메탄올은 4일 이내에 빠르게 소비되며, 이는 메탄올 산화를 담당하는 유전자의 상향 조절에 의해 설명될 수 있다.
- [0064] 도 11D에 각 조건에 따라 생산된 바이오라세인을 나타내었다. 메탄올과 아세테이트를 모두 포함하는 경우(M+A)에는 바이오라세인의 생산량이 많아, 메탄올(M)만 이용한 경우와 아세테이트(A)만 이용한 경우에 비해 색이 짙은 것을 확인할 수 있다.
- [0065] 한편, *Methylobacterium extorquens* AM1_E7 균주를 15, 20, 25, 30 g/L의 메탄올과 0.35 g/L 아세테이트를 이용하여 배양하였으나 더 이상의 바이오라세인의 생산량 증대는 확인되지 않았으며, 높은 농도의 메탄올에서는 *Methylobacterium extorquens* AM1_E7 균주의 성장이 억제되는 것으로 나타났다.

도면

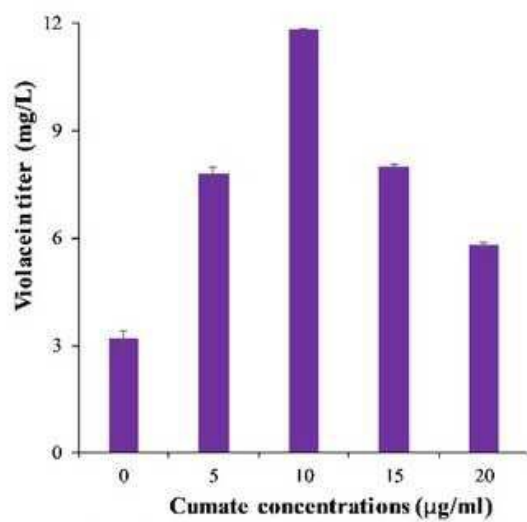
도면1



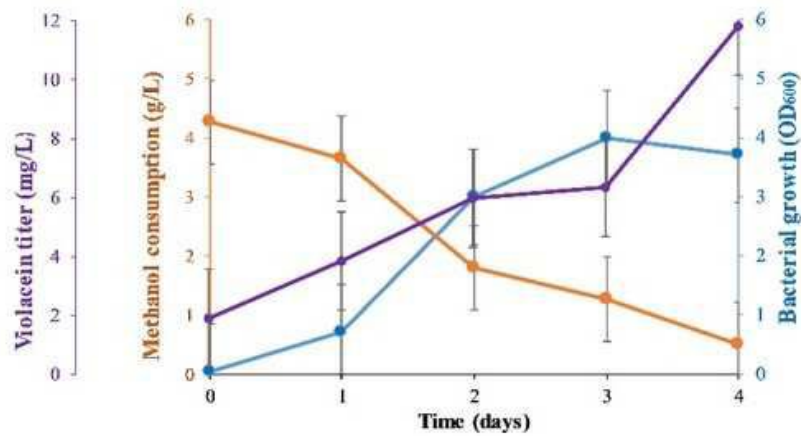
도면2



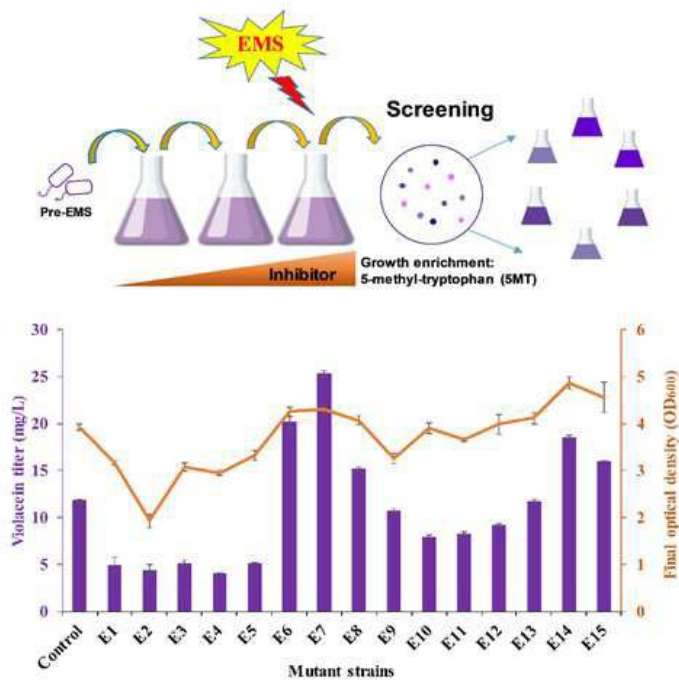
도면3



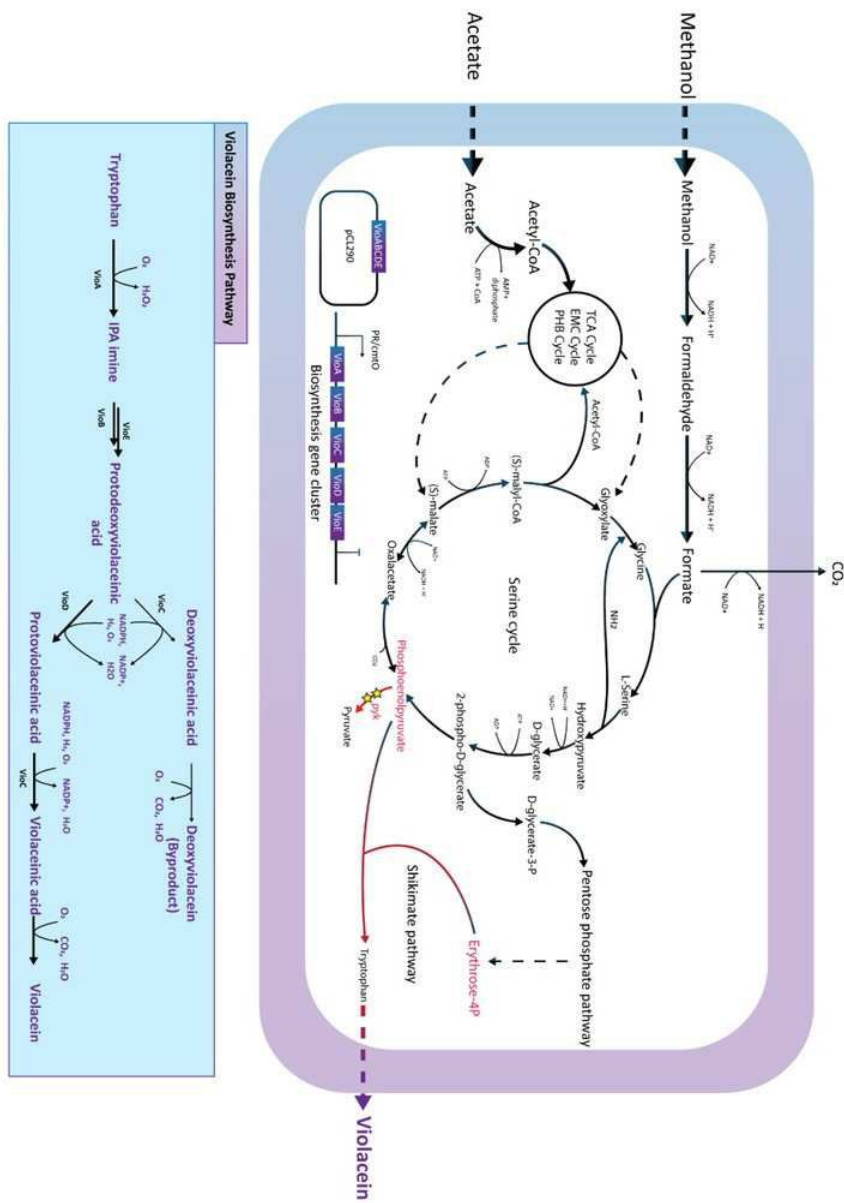
도면4



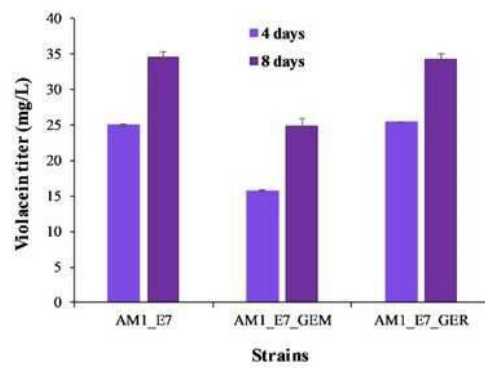
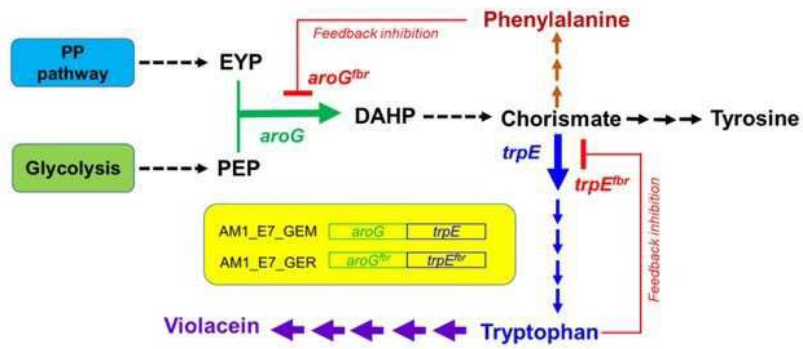
도면5



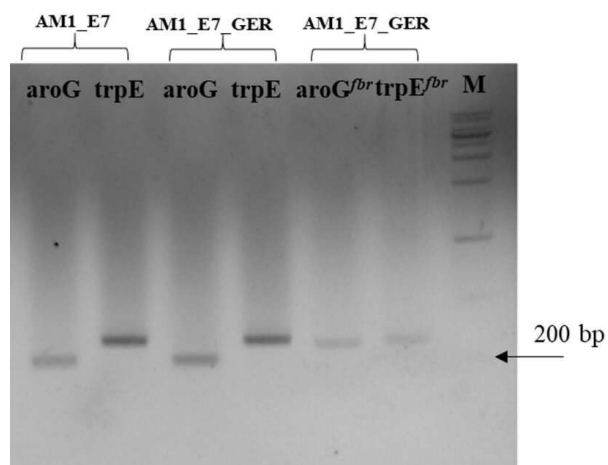
도면6



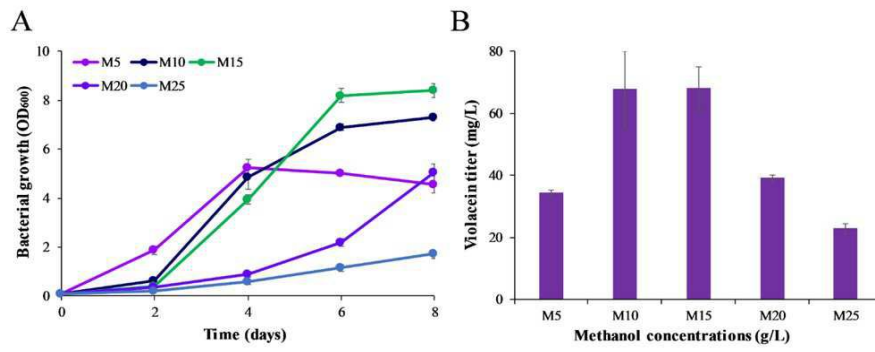
도면7



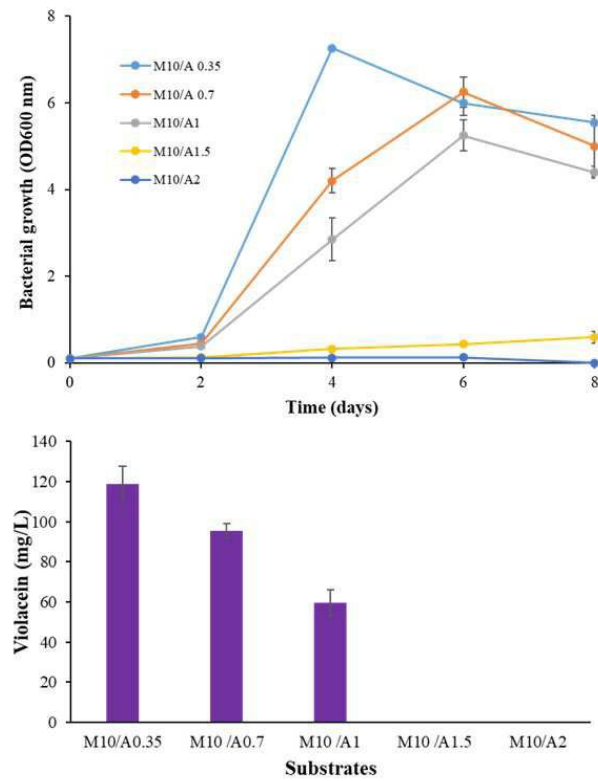
도면8



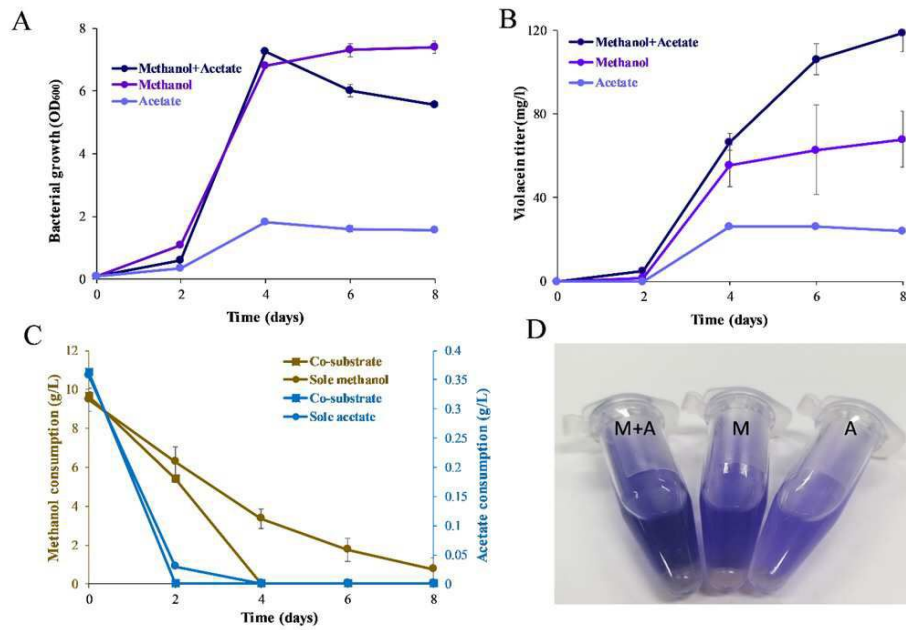
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Transformed methylotroph for increased violacein producing ability and violacein production method using the same

<130> PN2112-644

<160> 13

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1257

<212> DNA

<213> *Chromobacterium violaceum*

<400> 1

atgaagcatt cttccgatat ctgcattgtc ggcgccggca tcagcggcct gacctgcgcc 60

agccatctgc tcgattcgcc cgttgccgc ggctgtcgc tgcgcatctt cgacatgcag 120

caggaggcgg gcggccgcat ccgctcgaag atgctggatg gcaaggcttc gatagagctg 180

ggcgcggggc gatactcccc gcagctgcac ccgatttcc agagcgcgat gcagcattac 240

agccagaaga gcgaggtgta tccgttcacc cagttgaaat tcaagagcca tgtccagcag 300

aagctgaagc gggcgaatgaa cgagttgtcg cccaggctga aagagcatgg caaggaatcc 360

tttctccagt tcgtcagccg ctaccagggc catgacagcg cggtgggcat gatccgctcc 420

atgggctacg acgcgctgtt cctgcccgcac atctcggcgg agatggccta cgacatcgtc 480

ggcaagcacc cggaaatcca gagcgtgacc gataacgacg ccaaccagtg gttcgcgcg	540
gaaacgggct ttgcgggcct gatccagggc atcaaggcca aggtcaagc tgccggcgcg	600
cgcttcagcc tgggttacg gctgctgtcg gtgaggacgg acggcgacgg ctacctgtg	660
caactggcgg gcgacgacgg ctggaagctg gaacaccgga cccgccatct gatcctggcc	720
attctccgt cgcgcatggc cgggctcaat gtcgacttcc ccgaggcgtg gagcgcgcg	780
cgctacggct cgctgccgt gttcaagggt ttcctcacct acggcgagcc atggtggctg	840
gactacaagc tggacgacca ggtgctgac gtcgacaacc cgctgcgcaa gatctacttc	900
aaggcgaca agtacctgtt cttctacacc gacagcgaga tggccaatta ctggcgcggc	960
tgctggcggc aaggagagga cggctacctg gagcagatcc gcacccatct ggccagcgcg	1020
ctgggcatcg ttgcgagcg cattccccag ccctcgccc atgtgcacaa gtattggcg	1080
catggcgtgg agttctgccg cgacagcgat atcgaccatc cgtccgcgt cagccaccgc	1140
gacagcgga tcatcgctg ttgcgacgcc tacaccgagc actgcggctg gatggagggc	1200
ggcctgtca gcgcccgga agccagccgt ctgctgtgc agcgcatcgc cgcgtga	1257
<210> 2	
<211> 2997	
<212> DNA	
<213> Chromobacterium violaceum	
<400> 2	
atgagcattc tggattttcc acgcatccat ttccgcggct gggcgcggt caacgcgcc	60
accgccaacc gcgatccga tggccacatc gacatggcca gcaatacgt ggccatggcc	120
ggcgaaccgt tcgacctgc gcgccatccg accgagttcc accgccacct gcggtcgtg	180
gggcccgtt tcggcctgga cggccgggct gaccggaag ggccgttcag cctggccgag	240
ggctacaacg cggccggcaa caaccattc tctgggaga acgccaccgt cagccacgtg	300
cagtgggatt gcggcgaagc ggaccgcggc gacggcctgg tcggcgcaa gctggcgctg	360
tgggggcatt acaacgacta cctgcgcacc accttaacc gcgcgcgtg ggtggacagc	420
gacccaccc gccgagacg ggcgcagatc tacgccgggc agttcacgat cagcccgcc	480
ggcgccggac cgggcacgcc ctggctgttc accgccgaca tcgacgacag ccacggcgcg	540
cgctggacgc gcggcgcca catcgccgag cgcggcgccc atttcctgga cgaggagttc	600
ggcctggcgc ggtgtttcca gttctcggtg cccaaagacc atccgcactt cctgttcac	660
ccggggccgt tcgattccga agcctggcgc aggtgcagc tggcgctgga ggacgacgac	720
gtgctcggcc tgacggtgca gtacgcgtg ttcaatatgt cgacgccgc gcaaccaac	780

tcgccggtgt tccacgacat ggtcggcgtg gtcggcctgt ggcggcgcgg tgaactggcc	840
agctacccgg cgggccggct gctgcgtccg cgccagcccg ggctgggcga tctgacgctg	900
cgcgtaagcg gggccgcgtt ggcgtgaat ctggcctgcg ccattccgtt ctccaccgg	960
gcggcgcagc cgtccgcgcc ggacaggctg acgcccgatc tcggggccaa gctgccgttg	1020
ggcgacctgc tgcctgcgca cgaggacggc gcgttgctgg cgcgggtgcc gcaggcgctg	1080
taccaggatt actggacgaa ccacggcatc gtcgacctgc cgctgctgcg cgagccagct	1140
ggctcgtga cgctgtccag cgagttggcc gaattggcgc agcaggactg ggtcacgcag	1200
tccgacgct ccaatcttta cctggaagcg ccggaccgcc gccacggccg cttctttccg	1260
gaaaacatcg cgctgcgcag ctatttccgc ggcgaggccc gcgcgcgctt ggacattccc	1320
caccggatcg aggggatggg tctggtcggc gtggagtgc gccaggacgg catttccact	1380
gaatggcagc tgaccggcct gcgccctggc ccggcgcgca tcgtgctcga cgacggcgcg	1440
gaggcgatca cgctgcgggt gctgccggac gactgggcgc tggacgacgc gacggaggag	1500
gaggtcgatt acgctttcct gtaccgccac gtgatggcct attacgagct ggtctaccg	1560
ttcatgtccg acaaggtgtt cagcctggcc gaccgctgca agtgcgagac ctacgccagg	1620
ctgatgtggc agatgtcgca tccgcagaac cggaacaaga gctactacat gccagcacc	1680
cgcgagctgt cggcgcccaa ggccaggctg ttctcaagt atctggtcca tgtcagggc	1740
caggccaggc tgcaggcgcc gccgccggct gggccggcgc gcatcgagag caaagcccag	1800
ctggcggccg agctgcgcaa ggcgtggat ctggagctgt cggtagtct gcagtacctg	1860
tacgcgcct attccattcc caattacgcc cagggccagc agcgggtgcg cgacggcgcg	1920
tggacggcgg agcagctgca gctggcctgc ggcggcggcg accggcgccg cgacggcggc	1980
atccgcgccg cgctgtgga gatcgccac gaggagatga tccattacct ggtggtcaac	2040
aatctgctga tggcgtggg cgagccgttc tacgccggcg tgcgctgat gggcgaggcg	2100
gcgcggcagg cgttcggcct ggacaccgaa ttgcgctgg agccgttttc cgaatcgacg	2160
ctggcgcgt tgcctcggtt ggaatggcgg cacttcattc ccgcgccggg caaatccatc	2220
gccgactgct acgcccctat ccgctggcc ttctctgac tgccgatct ctccggcggc	2280
gaggccggca agcgcggcgg cgagcaccac ctgttctca acgagctgac caaccgcgc	2340
catccggctt accagctgga ggtgttcgac cgcgacagcg cgctgttcgg catcgcttc	2400
gtcaccgagc agggcgaggc cggcgcgctg gactcgccgc attacgagca ttgcatttc	2460
cagcggctgc gcgagctgct gggccggatc atggcgagc ccgcgccgtt cgagccggcc	2520

ttgccggcgc tgcgcaaccc ggtgctggac gaggcgacag gctgccagcg cgtggcggac	2580
agacgggccc gcgcgttgat ggcgctgtac cagggcgtgt acgagctgat gttcgcgatg	2640
atggcgacgc acttcgcggt caagccgctg ggcagcctca ggcgctcgcg gctgatgaac	2700
gcggcgatcg acctgatgac cggcctgctc aggccgctgt cctgcgcgct gatgaacttg	2760
ccgtcgggca tcgccggacg caccgccggg ccgccgctgc cggggccggt ggataccgcg	2820
agctacgacg actacgcgct gggttgccgg atgctggcgc ggcgctgcga ggcctgctg	2880
gagcaggcgt cgatgctgga gccgggctgg ctccccgacg cgcaaatgga actgctggat	2940
ttctaccgcc ggcagatgct ggatttggct tgtggaaagc tttctagaga ggcctga	2997
<210> 3	
<211> 1290	
<212> DNA	
<213> Chromobacterium violaceum	
<400> 3	
atgaaaagag caatcatagt cggaggcggg ctgccggcg ggtgaccgc catctacctg	60
gcgaagcgcg gctacgaggt ccacgtggtg gaaaagcgcg gcgacccgct gcaggacctg	120
tcttcctacg tggatgtggt cagctcgcg gcgataggcg tcagcatgac cgtgcgcggc	180
atcaagtccg tgctggcgcg cggcattccg cgcgcggagc tggacgcctg cggcgaaccc	240
atcgtggcga tggcgcttct ggtcggcgcg cagtaccgga tgcgggagct caagccgctg	300
gaggatttcc gcccgtgtc gctgaaccgc gcggcgcttc agaagctgct gaacaagtac	360
gccaacctgg ccggcgctcg ctactacttc gagcacaagt gcctggacgt ggacctggac	420
ggcaagtccg tgctgatcca gggcaaggac ggtcagccgc agcgcttgca gggcgatatg	480
atcatcgcg cgcagcgcg gcaactcgcg gtgcggcagg cgatgcagag cgggttgcg	540
cgcttcgaat tccagcagac tttcttccg caccgctaca agacgtggt gctgccggac	600
gcccaggcgc tgggctaccg caaggacacg ctgtatttct tcggcatgga ctccggcgcg	660
ctgttcgccc gccgcgcgc caccatccc gacggcagcg tcagcatcgc ggtctgcctg	720
ccgtacagcg gcagccccag cctgaccacc accgacgagc cgacgatgcg cgccttttc	780
gaccgttact tcggcggcct gccgcgggac gcgcgcgacg agatgctgcg ccagttcctg	840
gccaaagcca gcaacgacct gatcaacgtc cgtccagca ccttccacta caagggcaat	900
gtgtgctgc tggcgacgc cgcacacgc accgcgctt tcctcgcca gggcatgaac	960
atggcgctgg aggacgcgcg cacttcgtc gagctgctgg accgccacca gggcgaccag	1020
gacaaggcct ttcccgagtt caccgagctg cgcaaggtgc agcccgacgc gatgcaggac	1080

atggcgcgcg ccaactacga cgtgctcagc tgcaccaatc ccatcttctt catgcgggcc	1140
cgctacaccc gctacatgca tagcaagttt cccggccttt acccgccgga catggcggag	1200
aagctgtact tcacgtccga gccgtacgac agactgcagc agatccagag aaaacagaac	1260
gtttggtaca agatagggag ggtcaactga	1290
<210> 4	
<211> 1122	
<212> DNA	
<213> Chromobacterium violaceum	
<400> 4	
atgaagattc tggatcatcg cgcggggccc gccggcctgg tgttcgccag ccaactgaaa	60
caggcgctc cgtgtgggc gatagacatc gtcgaaaaga acgacgagca ggaagtgtg	120
ggctggggcg tgggtgtgcc cgccgggccc gccagcatc cgccaatcc gctgtcctac	180
ctggacgcgc cggagaggct gaatccgag ttcttgaag acttcaagct ggtccaccac	240
aacgagccca gcctgatgag caccggcgtg ctgctgtgcg gcgtggagcg ccgcggcctg	300
gtgcacgcct tgcgcgacaa gtgccgctcg cagggcacgc ccatccgctt cgaatcgccg	360
ctgctggagc atggcgagct gccgttgcc gactacgacc tgggtggtgct ggccaacggc	420
gtcaatcaca agaccgcccc ctaccgag gcgctggcgc cgcaggtgga ctacggccgc	480
aacaagtaca tctggtacgg caccagccag ctgttcgacc agatgaactt ggtgttcgc	540
accacggca aggacatctt catgcccac gcctacaagt attcgacac gatgagcacc	600
ttcatcgtcg agtgcagcga ggagacctat gcccgcgccc gcctgggcga gatgtcgaa	660
gaggcgtcgg ccgaatacgt cgccaagggtg ttccaggccg agctgggcgg ccacggcctg	720
gtgagccagc ccggcctcgg ctggcgcaac ttcatgaccc tgagccacga ccgctgccac	780
gacggcaagc tgggtgtgct gggcgacgcg ctgcagtcgc gccacttctc catcgccac	840
ggcaccacga tggcgggtgt ggtggcgag ctgctgtgga aggcgtgtg caccgaggac	900
ggcgtgccgg ccgcgtgaa gcgcttcgag gagcgcgcg tgccgctgtt ccagctgttc	960
cgcggccatg ccgacaacag ccgggtcttg ttcgagacgg tggaggagcg catgcacctg	1020
tccagcgccg agttcgtgca gagcttcgac gcgcgccgca agtcgctgcc gccgatgccg	1080
gaagcgctgg cgcagaacct gcgctacgcg ctgcaacgct ga	1122
<210> 5	
<211> 576	
<212> DNA	

<213> Chromobacterium violaceum

<400> 5

atggaaaacc gggaaccgcc gctgctgccg gcgcgctgga gcagcgcta tgtgtcttac 60
tggagtcgga tgtgtccgga tgaccagctg acgtccggct actgtctggt cgactacgag 120
cgcgacatct gtcggataga cggcctgttc aatccctggt cggagcgca caccgctac 180
cggctgtgga tgtccgaggt cggcaacgcc gccagcggcc gcacctggaa gcagaaggtg 240
gcctacggcc gcgagcggac ccccttgggc gagcagctgt gcgagcgtcc gctggacgac 300

gagaccggcc cgttcgccga gctgttctctg ccgcgcgacg tgctgcgccg gctgggcgcc 360
cgccatatcg gccccgcgt ggtgctgggc agggaggccg acggctggcg ctaccagct 420
ccgggtaagg ggccgtccac gctgtacctg gacgccgca cggcgagcc gctgaggatg 480
gtgaccgggg atgaggcgtc gcgcgcgtcg ctgcgcgact tcccaacgt cagcaggcc 540
gagattcccc acgccgtctt cgccccaag cgctag 576

<210> 6

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR promoter

<400> 6

caacaactta taccatggcc taaaaaagg caaacaatgg tacttgacga ctcacacaa 60

caattgtagt tgiagattgt aaacaacag acaatctggt ctgtttgt 108

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmxAF promoter

<400> 7

tcccgttgg tcggccgct tcgcgagggc ccgttgacga caacggtgcg atgggtcccg 60
gccccgtca agacgatgcc aatacgttgc gacactacgc cttggcactt ttagaattgc 120
cttatcgtcc tgataagaaa tgtccgacca gctaaagaca tcgcgtccaa tcaaagccta 180
gaaaatatag gcgaaggac gctaataagt ctttcataag accgcgcaa tctaaaaata 240

tccttagatt cacgatgcgg cacttcggat gacttcgag cgagcctgga acctcagaaa 300

aacgtctgag agataccgcg aggccgaaag gcgaggcggt tcagcgagga gacgcaggat 360

gagcaggttt gtgacatcag tctcggcctt ggcg 394

<210> 8

<211> 1428

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pyk of Methylobacterium extorquens AM1

<400> 8

atggccgagc gaaccatgcg tcgtcaccgc tacgccaaga tcgtcgccac cgtcggcccc 60

gcgaccagca cgccggagat gctgaaggcc ctgtttctcg ccggcgctga caccttcgcg 120

ctcaacttca gccacggggg acaggccgac cagccccggg ttacgcccgc catccgcgcg 180

ctagaggccg aggttgggag gcccatcgcc atcctgcagg acctgcaggg cccgaagatc 240

cgcgtcggca ccgtgcggga cggccgcctc gatctcacgg cgggcgagcg cgtgcgcttc 300

gtgctcgaag gctcgggaag cggcaaggat gcgatccac tgcatcacc cgagatcttc 360

gccgcgctcg tgccgggcca agatctgttg atcgacgacg gccgcgtgcg cgtgcgctc 420

gtcggcatcg aggccgcat gatcaggcc gaggtcatca cgggcggggc cgtctcgaac 480

cgcaaggcg tgaacctgcc cggtagctg ctggacctct cgccactgac tgagaaggac 540

cgtgccgacc ttgccttcgg gcttgagctc ggcgctgact ggatcgcgct ctcttcgtg 600

cagaagccgt ccgacgtgct tgaggcgct acgctgatcg gtgaccgggc cggcatcatg 660

acgaaggctc agaagccgca ggcgctggag cggatcgagg acatcatccg gctctcggac 720

gccgtgatgg tggcccgcg cgatctgggc gtcgagatcc cgcacgagga cgtaccggct 780

cgccagaagg aattgatccg cgcatgccgg ttggcggtta agccggtcgt ggtggcgaca 840

caaatgctcg actcgatggt caacgcgcc gccgccgccc gccgccgagc gtcggacgtc 900

gccacggcca tctacgacgg ggccgatgcg gtgatgcttt cggcgagatc ggccaccggc 960

cgctatccga tcgaggccgt ggcatgatg gaccgcatca tccgcagcgt ggagggacac 1020

aagctctatc actcgatcat cgccgccctg gagccgggag aggaggagac accgccccat 1080

gcggtcgca ccgccactgc caccctgcc gagccgctcc atgccagtgc gatcgctgcc 1140

tacacggaga gtgttacgac ggccgctcgc gttgctcga agcggccgag cgtgccgac 1200

ctggccctca cccgaacat cgacacctc cgccgcctta gcctgctctg gggagccac 1260

agtgtccaca cggatgatgt cgactcctac gaggaaatga ccaccaaggc gtgcatcac 1320

gcgcaggaag agggctttgc caagcccaac gacatcgctg tcgccgccgc cggcattccg 1380

ttccacacca ccggcaacac caacaacatc cgctgatcc agatctga 1428

<210> 9

<211> 1428

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pyk of Methylobacterium extorquens AM1_E7

<400> 9

atggcgcgagc gaaccatgcg tcgtcatcgc tacccaaga tcgtcgccac cgtcggccccg 60

gcgaccaaca cgccggagat gctgaaggcc ctgtttctcg ccggcgctga caccttccgc 120

ctcaacttca gccacggggg acaggccgac cagccccggg ttacgccgc catccgcgcg 180

ctagaggccg aggtcgggcg gcccatcggc atcctgcagg acctgcaggg cccgaagatc 240

cgcgctcgga ccgtgcggga cggccgcctc gatctcacgg cgggcgagcg cgtgcgttc 300

gtgctcgaag actcgaagg cggcaaggat gcgatccac tgcatcacc cgagatcttc 360

gccgccgtcg tgccgggcca ggatctgttg atcgacgac gccgcgtgcg cgtgcgcgtc 420

gttggcatcg aggcgccat gatcgaggcc gaggtcgtca cgggcggggc cgtctcgaac 480

cgcaaggcg tgaacctgcc cggtagcgtg ctgcacctt cgccactgac tgagaaggac 540

cgtgccgacc tcgccttcgg gctcgagctc ggcttgact ggatcgcgt ctccttcgtg 600

cagacgccgt ccgactgtg tgaggcgct gcgtgatcg gggaccgggc cggcatcatg 660

acgaaggctc agaagccgca ggcgctggag cggatcgagg acatcatccg gctctcggac 720

gccgtgatgg tggcccgcg cgatctgggc gtcgagatc cgcacgagga cgtaccggct 780

cgccagaagg aattgatccg cgcatgccgg ttggcggtga agccggctgt ggtggcgaca 840

cagatgctcg actgatgt caacgcgcct gcgccgacc gcgccgagc gtcggacgtc 900

gccacggcca tctacgacgg ggccgatgcg gtgatgttt cggcgagtc ggccaccggc 960

cgctatccga tcgaggccgt ggcatgatg gaccgcatc tccgcagcgt ggagggacac 1020

aagctctatc actgatcat cgcggccctg gagccggcg aggaggagac gccgccccat 1080

gcggtcgga cgcaccgc caccctgcc gaggcgtcc atgccagcg aatcgtggcc 1140

tacacggaga gtggtacgac ggccgctcg gtgtctcga agcggccggc cgtgccgatc 1200

ctggccctca cccgaacat cgacacctc cgcgcctca gctgtctg gggagccac 1260

agcgtccga ccaatgatg cgactcctac gaggagatga ccgcaaggc gtgcatcac 1320

gcgcaggacg agggctttgc caagctaac gacatcgtc tcgtcgccg cggcatcccc 1380

ttccacacca ctggcaaac caacaacatc cgctgatcc agatctga 1428

<210> 10

<211> 1077

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nitrilase of Methylobacterium extorquens AM1

<400> 10

atgtcagaga accggatcgt gcgggccgcc gccgtccagg tcgcgccgga cctcgaccgg	60
ccggacggca ccttgagcgg cgtgctcaac gccatcgacg atgccgccgc caaggcgccg	120
cgcttcattg tcttcccca gacctctgtg ccctactacc cgtacttctc cttcgtgctg	180
ccgccggccc tgcaggcccc ggagcacctg aagctctacg agcgccgccg cactgtcccc	240
ggccccctga cccaggcggg cgccgccgca gcccgccgcc accggcgccg ggtgggtgctc	300
ggcgtgaacg agcgcgacca cggctccctc tacaacacgc agctgatctt cgacgcggac	360
ggcagcctgg cgtgaagcg ccgcaagatc accccgacct accacgagcg catgatctgg	420
ggtcaggcgg acggcgccgg cctcgccgtc gtggagaccg cggtcggccg cgtcggcgcg	480
ctgcctgct gggagcacta caaccgctc gcccgctacg cgtcatggc gcgccacgaa	540
gagatccacg cgcccagtt cccgggctcg ctgctcgcc agatcttcgc cgaccagatg	600
gaggtgacca tccgtcacca tgccctggag gcggcctgct tcgtgggtcaa cgccacgggc	660
tggtcaccg acgagcaggt ggccgaggtc tgcccgagc agcgccctgc cgccgcctgc	720
cgccggcgga actgcaccgc catcatctcg cctgagggca agcacctcgc ggaccgcctc	780
gggcccggcg aaggcatcct gatcgccgac atggacctcg cgtgggtgac caagcgcaag	840
cggatgatgg actcggtcgg ccactacgcc cgccccgagc tctcagcct cctccacgac	900
gaccgtccgg cctattctgt gcaccagccg atccgttccc agaccgttcc cggagcctc	960
gacctgagc agcagccccg ttccgacgag ccttctctcg atcccgccgg ccgtggcggg	1020
cctggtcggg atgccgacgg agcgccctgat caacgcgttg cagtccctacg gcgttag	1077

<210> 11

<211> 1077

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nitrilase of Methylobacterium extorquens AM1_E7

<400> 11

atgtcagaga accggatcgt gcgggccgcc gccgtccaga tcgcgccgga cctcgaccgg	60
ccggacggca ccttgagcgg tgtgctcaac gccatcgacg aggccgccgc caaggcgccg	120
cgcttcattg tcttcccca gacctctgtg ccctactacc cgtacttctc cttcgtgctg	180

ccgccggccc tgcaggcgcg ggagcacctc aagctctacg agcggcgccc taccgttccg	240
ggcccaactga cccaggcggg cgcggccgcg ggcggcgccc acggcgccgt gatcgtgctg	300
ggtgtcaacg agcgcgatca cggctcgctc tacaacacac agctgatctt cgacgcggac	360
ggcagcctga agctcaagcg ccgcaagatc acgcccacct accacgagcg catgatctgg	420
ggtcaggcg acggcgccgg cctcgacgtc gtggagacgg ccgtcgcccg cgtcggggcg	480
ctcgctgct gggagcacta caaccgctc gcccgctacg ccctgatggc cgcacagag	540
gagatccacg ccgccagtt tccgggctcc ctggttggtc agatcttcgc cgagcagatg	600
gaggtgacga tccgtcacca cgcgtggag ggcgcctgct tcgtggtcaa cgccaccggc	660
tggctcaccg acgagcaggt ggcgcaggtc tgccggacg agcgctgcg cggcgctgc	720
cggggcggca actgcactgc catcgtctcg cccgaggga agcacctgc cgacccctc	780
ggccccggcg agggcatcct cgtcgccgac atggacctcg cgctggtgac caagcgcaag	840
cggatgatgg actcggtcgg tcactacgcg cgcgccgagc ttctcagcct ctccacgac	900
aaccgtccgg cctcgttcgt gcaccagcg atccgttccc agtcggttc cggagcctc	960
gacctgagc agcagcccg tccgacgag cctacctcg gtgcgccgg tcgtggcggg	1020
cctggtcggg atgccgacgg agcgctgat caacgcgttg cagtctacg gcgttag	1077
<210> 12	
<211> 3150	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Heavy metal efflux pump CzcA of Methylobacterium extorquens AM1	
<400> 12	
atgttcaccg tctcgtcag ccagtcggtc cgcaaccgccc tgctcgtcct cgcgtcggc	60
gcggtgctgg tgctgtacgg cgccttcacc gccaccaagc tgccgggtcga cgtcttccc	120
gacctcaaca agccaccgt caccgtcatg accgagcgcg aagggtacgc gcctcaggag	180
gtcgagcagc tcgtcaccta tccatcgag acccggtatga acgggttgcc ggggtgcacc	240
cgcgtgcgt cggctcggg ggtcgggctc tcgatcacct acgtcagatt cgactggggc	300
accgacatct accgcaatcg ccagcaggtt gccgagcggc tgcgtctggt gcaggaccag	360
ctgccccgcg gcgtgacccc ggtcatgggg ccgatctcgt ccatcatggg ccagatcctg	420
ctggtggcgg tgacgggcga gaccgcgacc ccgatgcagg tgcgcgaggt cgccgacttc	480
accatccggc cccggtgct gacctcccg ggctggcg aggtcatccc catcgggggc	540
gaggtgcgcc agttccgggt cagcccaaac ccggcgcgga tgcgcgcgt cggggtgacg	600

aacgcccagc tggagacggc gctcgcgcag ttcggcacca acgccggcgg cggttcacc	660
gaccagaacg cccgcgagta cctgatccgg aacatcggcc ggaccatgag cctcgacgac	720
ctgcgcaacc tcgtggtcgc cacggtcgcc gacgccccgg tctacctgcg ccaactcgcc	780
gaggtgtcct tcgcccgaa ggtgaagcgg ggcgatgccg gctacatggc caagcccgcg	840
gtcatcgtct cggtcgagaa gcagcccgac gtcgacacgg tgcggctgac ccgcagcatc	900
gagaccgccc tgaaggaact caaccgacc ctgcccggcg gcatcaaggc cgaccaggtc	960
ttgttcggc aggccgactt catcgagact tcgatccga acgtcgagcg cgtcctcgtc	1020
gaggccgtgc tgggtgtggc cctggtgctg ttgccttcc tcttgaacgt gcgcaccacc	1080
gcgatctcgc tgctggccat cccggtttcg gtgctgacga ccgctctggt gttccacctg	1140
ttcggcctgt ccatcaacac gatgacgctc ggggggctcg ccatcgccat cggcgagctc	1200
gtcgacgacg cgggtgtcga cgtcgagaac atctaccgac ggctcggcga gaatcggaag	1260
gcgggcaacc ctaggagcac cttcgagggtg gtggtctcgg cctcgaacga ggtccgctcc	1320
ggcatcgtct acgcgacgt gatcatcatc ctggtcttcg tgccgtgtt cgcgtctca	1380
ggcatcgagg gccggtctt cgcgccctg ggcgagcct acatcatctc catcctggcg	1440
agcctgctca cctccatcac cctgacgccc gtgctggcgt cctggctgct gccggggctc	1500
cggaacctgg aggagcacga cagccgcttg ctgaagctgc tcaagcgcgg caacgccgcc	1560
ctgctcgggg tggttttccg gcataagggc ctgctggtcg gcaccgtcgc ggcccggtg	1620
gccgcccgcg gcatcgccc ctggaacttg ccgcgcct tcctgccgc gttcaacgag	1680
ggctcgttca cggtcagcat gacctcaac ccgggcatct cgctcgccga gagcaaccgg	1740
gtcgggctga tcgcgaaaa actgtctctg gagattccgg gcgtgaaggc ggtcggccgc	1800
cggaccggcc ggccgagct cgacgaacac gccgaggggg tgcatctctc cgagatcgac	1860
gtgcacctgg acgatgggt gaagcgtecg aagcaggcgc tcgtcgccga catcccgggg	1920
cgcctcgggt ccctgccgtt ggcggtcaac gtcggccagc cgatctcgca ccggctcgac	1980
cacatgtct cgggcgtccg cgctgagatc gcgtcaagg tgttcggcga cgacctcgac	2040
gccctcgcc ggttggcgaa cggcctgagg gaccgcctcg ccaagatccc ggggctcgcc	2100
gacctgcagg tcgagcgga ggtccgcatc ccgcagctgg aggtgcgcgt cgactacacc	2160
cgggcgggcc tctacggggt ccagccgcc gcggtcgtcg agcagatcag ccgcctctcg	2220
aacggcgggg tggtctcgac ggtcgtcgac ggcgtgcgcc gcttcgacgt ggtgctgcgc	2280
ctgtcggaga accggcgac gacggtggc ctcggtgacc tgctgctgga gacgccctcg	2340
ggctgggtgc cggcgcgcca ggtcgggac atccgcgaga cggacgggcc gaaccagatc	2400
ctgcgcgaga acgcccgcg ccgcatctg gtccaggcca acaccaggc cgagagcgac	2460

atggccacga tcgtggcggc gatccgcgag gcggtggccc aggagccgat gccgcccggc 2520
 ttcttcacca gcctggaggg caccctccag gcgcaggagg aggcgagccg gaccatcgcg 2580

gcgctctccg gcctgtcctt ggcgtgtgtc ttgccatcc tctacagccg ctaccgctcg 2640
 gccgcgtgg cgctcatcat catgggcaac gtgccgctcg cctgatcgg ctcggtggcg 2700
 gccctgtggc tggtcgggca gccgtctcgc gtgcgctcga tgatcggtt catcacgtg 2760
 accggcatcg cgcccccaa cggcatcctc aagatcagcc actacctgaa cctgtcgctg 2820
 cacgagggcg tgccgttcgg gcccgaaactc gtctgtgcgc gcagcttgga acggctgacc 2880
 ccggtgctga tgacggcgct ctcggccggc gtggcgctgt tgccgtgct ctacgacgcg 2940
 gcgagcccg gcaaggagat cctgcacccg gtgcgggtga cgatcttcgg cggcctgac 3000

agcgcgacgt tgctcgacac ctctctgacc ccgtctctgt tctgcgctt cggccgcagg 3060
 ccgcttgagc ggctgcgtgc gctgcacgcc gaggcgcgg cctaccatc cccggacggc 3120
 gcgccccgc gcccgccga ggcctactga 3150

<210> 13
 <211> 3150
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy metal efflux pump CzcA Methylobacterium extorquens AM1_E7
 <400> 13

atgttcaccg tctctgtcag ccagtcggtc cgcaaccgcc tgctcgtcct cgcgtcggc 60
 gcggtgctgg tgctgtacgg cgccttcacc gccaccaagc tgccgggtcga cgtcttcccg 120

gacctcaaca agcccaccgt caccgtcatg accgagcgcg aagggtacgc gcctcaggag 180
 gtgcgacgag tcgtcaccta tcccatcgag acccggtatga acgggctgcc gggcgtgacc 240
 cgcgtgcgct cggctctcggg ggtcgggctc tcgatcacct acgtcgagtt cgactggggc 300
 accgacatct accgcaaccg ccagcagatc gccgagcgcc tgagcctggt gcaggatcag 360
 ctgccgcgcg gcgtgacccc ggtgatgggg ccgatctcgt ccatcatggg ccagatcctg 420
 ctggtggcgg tgaccagcga gaccgcgagc ccgatgcagg tgcgcgaggt cgcggacttc 480
 accatccggc cccggctcct gaccatcccg ggcgtggcgc aggtcatccc catcgggggc 540

gaggtgcgcc agttccgggt cagcccgaac ccggccgcca tgcggtcgct cggcgtgacg 600
 aacgcccagc ttgagacggc gctggcgcag ttccggacca acgcccggcg cggcttcacc 660
 gaccagcact cccgcgagta cctcatccgg aacatcggcc ggacatgag cctcgacgac 720
 ctgcgcaacc tcgtggtcac gacggtcgcc gatacgccgg tctacctgcg ccaactcgcc 780

gaggtgtcct tcgcggcccg ggtgaagcgc ggcgacgccg gctacatggc caagccctcg	840
gtcatcgtct cggtcgagaa gcagcccgac gtcgacaccg tgcgcctcat ccgcagcatc	900
gagacggcgt tgaaggagct caaccgaac ctgcccggcg gcatcaaggc cgaccaagtc	960
ctgtttcggc aggccgactt catcgagacc tcgatccgca acgtcgagcg cgtccitcatg	1020
gaggccgtgc tcgtggtggc gctggtgctg ttgccttcc tcttgaacgt gcgcaccacc	1080
gcgatctcgc tgctggccat cccggtttcg gtgctgacga ccgctctggt gttccacctg	1140
ttcggcctgt ccatcaacac gatgacgctc ggggggctcg ccatcgccat cggcgagctc	1200
gtcgacgacg cggtggtcga cgtcgagaac atctaccgac ggctcggcga gaatcggaag	1260
gcgggcaacc ctaggagcac cttcgagggt gtggtctcgg cctcgaacga ggtccgctcc	1320
ggcatcgtct acgcgacgct gatcatcatc ctggtcttcg tgccgctgtt cgcgctctca	1380
ggcatcgagg gccggtctt cgcgccccctg gggcaggcct acatcatctc catcctggcg	1440
agcctgctca cctccatcac cctgacgccc gtgctggcgt cctggctgct gccggggctc	1500
cggaacctgg aggagcacga cagccgcttg ctgaagctgc tcaagcgcg caacgccgcc	1560
ctgctcgagg tggttttccg gcataagggc ctgctggtcg gcaccgtcgc ggccgcggtg	1620
gccgcgcgcg gcatcgccg ctggaacttg ccgcgcgcct tcccgccgc gttcaacgag	1680
ggctcgttca cggtaacat gaccttcaac ccggggatct cgctcgccga gagcaaccgg	1740
gtcgggctga tcgccgagaa gctgctctc gacatcccgg gcgtgaaggc ggtcggccgc	1800
cggaccgggc gggccgagct cgacgagcac gccgagggcg tccactctc cgagatcgac	1860
gtgcacctgg acgatgggt gaagcgccg aaggaggcgc tcgtcgccga catccgtggg	1920
cgctcgcg ccctgccgtt ggcggtcaac gtcgccagc ccatctcgca ccggctcgac	1980
cacatgctct cggcgctgcg ggccgagatc gcgctgaagg tcttcggcga ggacctcgac	2040
gccctcgcc ggggtggcga cggcctgagg gaccgcctcg ccaagatccc ggggctcgcc	2100
gacctgcagg tcgagcgga ggttcgcatc ccgcagctgg aggtgcgct cgactacacc	2160
cgggcggccc tctacggcgt gcagccggcc gccgtcgtcg agcagatcag ccgcctctcg	2220
aacgggcggg tcgtctcgac ggtggtcgac ggctccgcc gcttcgacgt ggtgctgcgc	2280
ctgtccgaga accggcgga gacggcgggc cttggcgacc tgctgctgga gacgccctcg	2340
ggttgggtgc cggcgcgga ggtcgccgac atccgcgaga cggacgggcc gaaccagatc	2400
ctgcgcgaga acgcccccg ccgcatctg gtccaggcca acaccacggc cgagagcgac	2460
atggccacga tcgtggcggc gatccgcgag gcggtggccc aggagccgat gccgcccggc	2520
ttcttcacca gcctggaggg cacttccag gcgcaggagg aggcgagccg gaccatcggt	2580

gcgctctccg cgctgtcctt ggcgtcgtc ttcccatcc tctacagccg ctaccgtcg	2640
gccgcgtcg cctcatcat catgggcaac gtgccgtcg cgctgacgg ctcggtcgcg	2700
gtcctgtggc tggtcgggca gccgtctcg gtggcgtcga tgatcggtt catcacgtg	2760
accggcatcg cggcccgcaa cggcatcctg aagatcagcc actacctgaa cctgtcgtg	2820
cacgagggtg tcccgttcgg acccgacctc gtggtccgcg gcagcctgga gcggtgacc	2880
ccggtgttga tgacggccct gtcggcgggc gtcgccctgg tgccgtgct ctacgacgcg	2940
gcgagcccg gcaaggagat cctgcacccg gtcgcggtga cgatcttcgg cgggcttacc	3000
agcgcgacgc tgctcgacac ctctctgacc ccgtcctgt tctgcgtt cggccgcaag	3060
ccgcttgagc ggctgcgagc cctccacgc gaggcgccgg cccacccatc cccggacggc	3120
gcgccccgc ggccggccga ggcctactga	3150