



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0046686
(43) 공개일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C08B 37/0072 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0128200
(22) 출원일자 2018년10월25일
심사청구일자 2019년08월06일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
이상엽
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 212동 702호 (전민동, 엑스포아파트)
장유신
경상남도 사천시 서포면 중촌안길 128 (자혜리)
우지은
경상남도 사천시 숲피길 11, 102동 1403호 (동금동, 가양라프빌5차아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

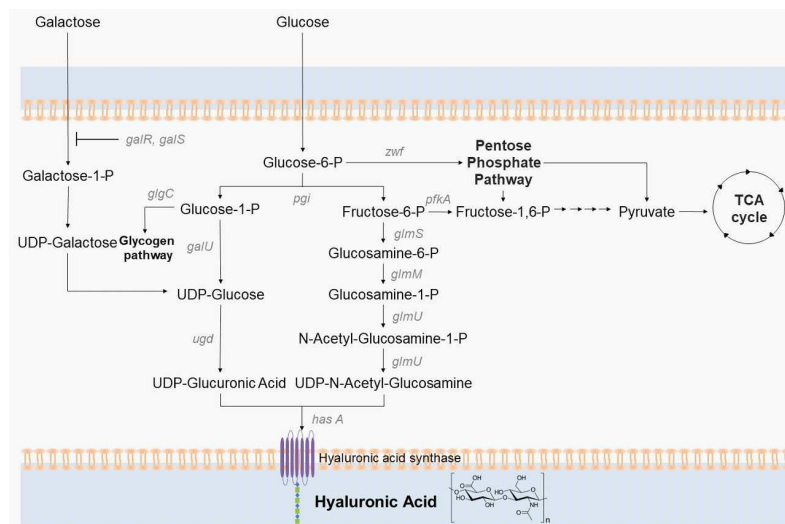
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 히알루론산 생성능이 향상된 재조합 미생물 및 이를 이용한 히알루론산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 히알루론산(Hyaluronic acid)의 생성능이 향상된 재조합 미생물 및 이를 이용한 히알루론산의 제조방법에 관한 것으로, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 재조합 미생물을 이용하는 경우, 히알루론산을 높은 수율로 생산할 수 있으므로 화장품 또는 의약품의 원료, 식품업, 의료업 등의 다양한 분야에서 유용하게 활용될 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 101/01049 (2013.01)

C12Y 203/01004 (2013.01)

C12Y 206/01016 (2013.01)

C12Y 207/00 (2013.01)

C12Y 207/01011 (2013.01)

C12Y 504/0201 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345286681

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 (2차년도) 바이오화합물 생산을 위한 클로스트리듐 플랫폼 및 발효공정 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711056313

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 거대과학연구개발사업

연구과제명 (EZBARO)바이오리파이너리를 위한 미생물 시스템대사공학 원천기술 개발(2018)

기 여 율 1/2

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2018.03.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

히알루론산(hyaluronic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 히알루론산 생성능이 향상된 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자는 *galR* 또는 *galS* 인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate)에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트(glucono-1,5-lactone-6 phosphate)로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 프럭토오스-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)에서 프럭토오스-1,6-포스페이트(fructose-1,6-phosphate)로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가적으로 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, UDP-N-아세틸 글루코사민(UDP-N-acetyl glucosamine)의 생산을 조절하는 유전자가 도입되거나 상기 유전자의 발현이 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 글루코오스-6-포스페이트에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 *zwf* 인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 프럭토오스-6-포스페이트에서 프럭토오스-1,6-포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 *pfkA* 인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 UDP-N-아세틸 글루코사민 생산을 조절하는 유전자는 *glmS*, *glmM* 또는 *glmU* 이고,

상기 *glmS* 는 L-글루타민-D-프럭토오스-6-포스페이트 아미노트랜스퍼레이즈(L-glutamine-D-fructose-6-phosphate aminotransferase)를 코딩하며,

상기 *glmU*는 N-아세틸 글루코사민-1-포스페이트 유리딜트랜스퍼라아제(N-acetyl glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase) 또는 글루코사민-1-포스페이트 아세틸트랜스퍼레이즈(glucose-1-phosphate acetyltransferase)를 코딩하고,

상기 *glmM*는 포스포글루코사민 뮤테이즈(phosphoglucosamine mutase)를 코딩하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균(*E.coli*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 락토코커스(*Lactococcus*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 효모(*yeast*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 피로콕쿠스(*Pyrococcus*) 속, 리스테리아세아에(*Listeriaceae*) 과, 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*) 속, 유박테리움(*Eubacterium*) 속 및 아세트젠(*acetogen*)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

다음 단계를 포함하는, 히알루론산의 제조방법:

- (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 배양하여 히알루론산을 생성시키는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 히알루론산을 추출 및 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히알루론산(Hyaluronic acid)의 생성능이 향상된 재조합 미생물 및 이를 이용한 히알루론산의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 히알루론산 생성능을 가지는 미생물에, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물 및 이를 배양하여 히알루론산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 히알루론산(hyaluronic acid)은 0- β -D-글루클로노실(1 $\rightarrow$ 3)-N-아세틸- β -D-글루코사미닐(1 $\rightarrow$ 4) 단위가 반복하는 구조를 가진 대표적인 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)의 일종이다. 분자에 존재하는 많은 하이드록실기(hydroxyl groups)로 인하여 수용성 물질이며 점도가 매우 높고 고탄성의 특성을 가지고 있으며 분자량은 1,000 ~ 10,000,000 Da(daltons)에 이르는 광범위한 직쇄의 고분자 다당류이다. 히알루론산은 전구체인 UDP-글루쿠론산(glucuronic acid)과 UDP-N-아세틸 글루코사민(UDP-N-acetyl glucosamine)으로 이루어지며, 히알루론산 합성 효소에 의해 각 전구체에서 UDP가 제거되면서 히알루론산이 생성된다.

[0004] 히알루론산은 세포를 서로 접촉시키며, 관절을 부드럽게 하고, 피부, 장기 또는 세포 사이를 결합하거나 지탱하는 역할을 하고, 외부 병원균(pathogen) 등의 침입으로부터 보호한다. 또한 히알루론산은 보습 효과를 가지며, 물리적 마찰에 대한 윤활 효과가 우수하여 의약품으로는 관절 윤활제와 장기 유착 방지제로 또한 성형외과에서는 필러(filler)로 사용되고 있으며, 화장품으로는 보습제로 많이 사용된다.

[0005] 히알루론산을 개발하기 위해서는 생체 조직 추출법이나 미생물 배양법이 사용되지만 최근에는 바이러스 침입, 불순물, 염증 반응 등 많은 단점으로 인해서 닭벼슬 추출법보다는 분자량과 생산성을 조절할 수 있고 고품질의 원료 수득이 가능한 미생물 배양생산법이 대세를 이루고 있다. 초기에 미생물을 통한 히알루론산 생산은 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 미생물을 통한 생산이었다. 그러나 스트렙토코커스는 병원성균으로 알려져 있고, 히알루론산 뿐만 아니라 많은 독소도 생산하기에 이를 대체할 만한 미생물의 탐색이 요구되었다. 또한, 히알루론산을 제조하는 생합성 경로가 알려지면서 이를 이용한 대사공학 연구도 활발하게 진행되기 시작하였다. 이를 통해 원래 히알루론산을 생산할 수 없지만, 다양한 실험과 연구를 통해 생산할 수 있는 능력을 가진 미생물들이 개발되었다.

- [0006] 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 경우, 원래 히알루론산을 생산할 수 없지만 스트렙토코커스와 같은 그람양성균으로 분류되면서도 비병원성균이라고 알려져 있었다. 이러한 바실러스 서브틸리스에 히알루론산 생합성 경로의 구축을 통해서, 스트렙토코커스를 대체하여 히알루론산을 생산할 수 있는 기술이 공지되었다(한국 공개특허 10-2008-0018965). 그리고 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 히알루론산을 제조하는 연구가 많이 진행된 결과, 히알루론산 생합성 경로를 구축함으로써 히알루론산 생성능을 가진 대장균이 개발되었다(Huimin Yu, Gregory Stephanopoulos, *Metabolic Engineering* vol. 10, No. 1, 2008, pp. 24-32). 그 이외에도, 락토코커스(*Lactococcus*) 속, 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 속 등과 같은 미생물도 히알루론산을 생산하기 위한 다양한 시도가 진행되었다. 그러나 단순히 히알루론산 생합성 경로를 구축하는 것뿐만 아니라, 더욱 다양한 분야에서 히알루론산의 생산 효율을 증가시키기 위한 재조합 미생물에 대한 요구가 증가되었다.
- [0007] 상기 기재한 히알루론산을 제조하는 재조합 미생물들은 보통 글루코오스(glucose)를 탄소원으로 사용한다. 글루코오스가 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate)로 전환이 되면, 글루코오스-1-포스페이트(glucose-1-phosphate)와 프럭토오스-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)가 생성되는데 이 물질들은 각각 히알루론산의 전구체인 UDP-글루쿠론산과 UDP-N-아세틸 글루코사민으로 전환된다. 글루코오스 외의 다른 물질을 탄소원으로 사용하는 경우에도 대부분 글루코오스-6-포스페이트로 전환하여 위와 같은 과정으로 통해서 히알루론산을 생산한다. 지금까지의 연구에서는, UDP-글루쿠론산 생산경로보다 UDP-N-아세틸 글루코사민 생산 경로의 흐름이 더 강하다고 알려져 있다.
- [0008] 글루코오스를 탄소원으로 사용하기 위한 다양한 대사회로가 존재하는데, 그 중 레르와르 경로(Leloir pathway)는 갈락토오스(galactose)를 UDP-글루코오스로 전환하여 탄소원으로 사용될 수 있도록 하는 경로이다. UDP-글루코오스는 UDP-글루쿠론산의 중간체로 사용될 수 있어, UDP-글루쿠론산 생산을 증가시킬 수 있는 가능성이 있다고 판단된다. 따라서, 레르와르 경로의 활성화가 히알루론산의 전구체인 UDP-글루쿠론산과 UDP-N-아세틸 글루코사민 생산 경로의 균형을 맞출 수 있는 역할을 할 수 있을 것이라고 기대된다. 이 외에도 히알루론산 전구체 생산 경로에 관여하는 유전자의 발현 조절 등을 통해 히알루론산 전구체 생산 경로의 균형을 맞출 수 있을 것이라고 기대된다.
- [0009] 이에 본 발명자들은, 레르와르 경로의 활성화 및 히알루론산의 전구체 생산 경로에 관여된 유전자의 발현 조절을 통해 히알루론산의 생성능이 향상된 재조합 미생물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout) 시킨 대장균에서 히알루론산의 생성이 현저히 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은, 히알루론산(Hyaluronic acid) 생성능이 향상된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합 미생물을 배양하여 히알루론산을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 히알루론산(Hyaluronic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 히알루론산 생성능이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 히알루론산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 히알루론산을 추출 및 수득하는 단계를 포함하는 히알루론산을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 재조합 미생물을 이용하는 경우, 히알루론산(Hyaluronic acid)을 높은 수율로 생산할 수 있고, 레르와르 경로(Leloir pathway) 및 히알루론산 전구체의 생산 조절을 통해 히알루론산 합성 과정의 중간체인 주

요 화합물의 합성을 조절할 수 있다는 장점이 있으므로 화장품 또는 의약품의 원료, 식품업, 의료업 등의 다양한 분야에서 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 대장균(*E. coli*)에서 히알루론산(hyaluronic acid)의 대사 경로에서, 히알루론산의 생산에 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자들을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 재조합 미생물 각각의 히알루론산 생산성을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0022] 본 발명에서는, 레르와르 경로(Leloir pathway)의 활성화 및 히알루론산(hyaluronic acid)의 전구체 생산 경로에 관여된 유전자의 발현 조절을 통해 히알루론산의 생성능을 향상시키기 위하여, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout) 시킨 대장균에서 히알루론산의 생성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 히알루론산 생성능을 가지는 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 히알루론산 생성능이 향상된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에서 용어 유전자의 "결실"이란 해당 유전자의 일부 또는 전체 염기를 변이, 치환 또는 삭제시키거나, 일부 염기를 도입시켜 해당 유전자가 발현되지 않도록 하거나, 발현되더라도 효소 활성을 나타내지 못하도록 하는 것을 포괄하는 개념으로, 해당 유전자의 효소가 관여하는 생합성 경로를 차단하는 모든 것을 포함한다.

[0026] 본 발명에서 용어 유전자 발현의 "억제 또는 감소"란 해당 유전자의 일부 염기를 변이, 치환 또는 삭제시키거나 일부 염기를 도입시켜 해당 유전자에 의해 발현되는 효소의 활성을 감소시키는 것을 포괄하는 개념으로, 해당 유전자의 효소가 관여하는 생합성 경로의 일부 또는 상당 부분을 차단하는 모든 것을 포함한다.

[0027] 본 발명에서 용어 "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제제물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0028] 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 재조합 벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0030] 라이게이션 후에, 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 형질전환 또는 트랜스펙션(transfection)된

다. "형질전환" 또는 "트랜스펙션"시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에서 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있다.

[0032] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0033] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본 발명에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적인 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 갈락토오스 오페론 리프레서는 레르와르 경로의 활성화에 관여할 수 있으며, 상기 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자는 대장균 유래의 *galR* 또는 *galS* 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 다른 미생물 유래의 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자라 하더라도 도입된 숙주 세포에서 발현되어 동일한 활성을 나타내는 한 제한이 없다.

[0036] 본 발명에 있어서 "레르와르 경로"는 D-갈락토오스(D-galactose)의 이화작용에 관한 물질대사 경로이다. 이는 Luis Federico Leloir의 이름에서 유래되었다. 첫 번째 단계에서는 갈락토오스 뮤타로타아제(galactose mutarotase)가 β -D-갈락토오스를 α -D-갈락토오스로 전환시키는 과정을 촉진시켜서, 경로를 활성화 한다. 다음으로, α -D-갈락토오스는 갈락토키나아제(galactokinase)에 의해 갈락토오스 1-포스페이트로 인산화된다. 세 번째 단계에서 D-갈락토오스-1-포스페이트 유리딜트랜스퍼라아제(D-galactose-1-phosphate uridylyltransferase)는 UDP-글루코오스를 유리딘 다이포스페이트(uridine diphosphate) 근원(source)으로 사용하여 갈락토오스 1-포스페이트를 UDP-갈락토오스로 전환시킨다. 마지막으로, UDP-갈락토오스 4-에피머라아제(epimerase)는 UDP-갈락토오스를 UDP-글루코오스로 전환시켜 트랜스퍼라아제 반응을 일으킨다. 또한, 포스포글루코뮤타아제(phosphoglucomutase)는 D-글루코오스 1-포스페이트를 D-글루코오스 6-포스페이트로 전환시킨다.

[0037] 본 발명에 있어서, 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate)에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트(glucono-1,5-lactone-6 phosphate)로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 프럭토오스-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)에서 프럭토오스-1,6-포스페이트(fructose-1,6-phosphate)로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가적으로 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 글루코오스-6-포스페이트에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 대장균 유래의 *zwf* 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 다른 미생물 유래의 글루코오스-6-포스페이트에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자라 하더라도 도입된 숙주 세포에서 발현되어 동일한 활성을 나타내는 한 제한이 없다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 프럭토오스-6-포스페이트에서 프럭토오스-1,6-포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 대장균 유래의 *pfkA* 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 다른 미생물 유래의 프럭토오스-6-포스페이트에서 프럭토오스-1,6-포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자라 하더라도 도입된 숙주 세포에서 발현되어 동일한 활성을 나타내는 한 제한이 없다.

[0041] 본 발명에 있어서, UDP-N-아세틸 글루코사민(UDP-N-acetyl glucosamine) 생산을 조절하는 유전자가 도입되거나

상기 유전자의 발현이 증폭되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "유전자의 도입 또는 유전자 발현의 증폭"이란 해당 유전자의 일부 염기를 변이, 치환 또는 삭제시키거나, 일부 염기를 도입시키거나, 또는 동일한 효소를 코딩하는 다른 미생물 유래의 유전자를 도입시켜 대응하는 효소의 활성을 증가시키는 것을 포괄하는 개념이다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 UDP-N-아세틸 글루코사민 생산을 조절하는 유전자는 대장균 유래의 *glmS*, *glmM* 또는 *glmU* 이고, 상기 *glmS* 는 L-글루타민-D-프럭토오스-6-포스페이트 아미노트랜스퍼레이즈(L-glutamine-D-fructose-6-phosphate aminotransferase)를 코딩하며, 상기 *glmU*는 N-아세틸 글루코사민-1-포스페이트 유리딜 트랜스퍼라아제(N-acetyl glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase) 또는 글루코사민-1-포스페이트 아세틸 트랜스퍼레이즈(glucose-1-phosphate acetyltransferase)를 코딩하고, 상기 *glmM*는 포스포글루코사민 뮤테이즈(phosphoglucosamine mutase)를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 다른 미생물 유래의 L-글루타민-D-프럭토오스-6-포스페이트 아미노트랜스퍼레이즈, N-아세틸 글루코사민-1-포스페이트 유리딜트랜스퍼라아제 또는 포스포글루코사민 뮤테이즈를 코딩하는 유전자라 하더라도 도입된 숙주 세포에서 발현되어 동일한 활성을 나타내는 한 제한이 없다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 미생물은 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 락토코커스(*Lactococcus*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 효모(*yeast*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속, 리스테리아세아에(*Listeriaceae*) 과, 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*) 속, 유박테리움(*Eubacterium*) 속 및 아세토젠(*acetogen*)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 히알루론산 합성 효소를 코딩하는 유전자의 도입을 통하여 히알루론산 생성능을 가질 수 있는 미생물이라면 제한 없이 사용 가능하다.

[0046] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 히알루론산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 히알루론산을 추출 및 수득하는 단계를 포함하는 히알루론산의 제조방법에 관한 것이다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0050] **히알루론산 생성능을 가지는 재조합 미생물의 제작**

[0051] 히알루론산 합성 효소를 코딩하는 유전자인 *hasA*는 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 35246 (한국미생물보존센터)로부터 확보하고, 이를 플라스미드에 도입하기 위하여 제한효소 *PstI*의 서열을 포함하는 정방향 프라이머 1과 역방향 프라이머 2를 합성하였다. 합성된 프라이머로 PCR을 수행하여 DNA 단편 조각을 증폭시키고, 이를 pTac15k 플라스미드 (Lab stock)에 제한효소 *PstI*를 처리하여 도입한 후, 대장균 균주 *E. coli* K12 W3110 (Lab stock)에 클로닝(cloning)하여 히알루론산을 생성할 수 있는 재조합 미생물 *E. coli* K12 W3110 pTac15k-*hasA*를 제조하였다. *hasA* 유전자의 염기서열은 서열번호 1로 나타내었다.

[0052] 정방향 프라이머 1: 서열번호 9:

[0053] 5'-ctgcagatgagaacattaaaaaacctcataactgt-3'

[0054] 역방향 프라이머 2: 서열번호 10:

[0055] 5'-ctgcagttataataattttttacgtgttccccagt-3'

실시예 2

- [0057] 갈락토오스 오페론 리프레서(galactose operon repressor)를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout)시킨 재조합 미생물의 제작
- [0058] 실시예 1에서 제작한 균주 *E. coli* K12 W3110 pTac15k-*hasA*의 레르와르 경로(Leloir pathway)의 활성화를 저해하는 *galR*, *galS* 유전자의 녹아웃을 위하여 변형된 one-step inactivation 방법을 이용하였다. *galR* 유전자 및 *galS* 유전자의 염기서열은 각각 서열번호 2 및 3으로 나타내었다.
- [0059] 아라비노스(Arabinose)에 의해 발현이 유도되는 λ -red recombinase와 IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)에 의해 발현이 유도되는 Cre-recombinase가 포함되어 있는 pCW611 플라스미드 (Lab stock)와 대장균의 chromosomal DNA에 있는 *galR* 유전자와 *galS* 유전자를 기준으로 앞, 뒤 50 bp 정도의 homologous 부분을 함께 포함하면서 Cm marker를 같이 포함하는 DNA 단편 조각을 PCR (정방향 프라이머 3과 역방향 프라이머 4)을 통해서 증폭시켜 제조한 후 재조합 미생물 *E. coli* K12 W3110 pTac15k-*hasA*에 형질전환하였다.
- [0060] 재조합 미생물의 *galR* 유전자는 λ -red recombinase에 의해 Cm marker가 포함된 DNA 단편 조각으로 치환되었고, 그 후 Cre recombinase에 의해 Cm marker 양 끝에 있던 *lox* 부분이 서로 인식되어 연결되면서 Cm marker 부분이 삭제되고, *galR* 유전자가 녹아웃되었다. *galS*도 같은 과정을 통해 녹아웃되었다(정방향 프라이머 3과 역방향 프라이머 4). *galR*, *galS* 유전자를 녹아웃시킨 재조합 미생물을 *E. coli* K12 W3110 Δ *galR* Δ *galS* pTac15k-*hasA*라 명명하였다.
- [0061] 정방향 프라이머 3: 서열번호 11:
- [0062] 5'-aaaacacgccaccccttgaaccaacggcggtttccgtaacactgaaagaatgtaagcggttacccac
- [0063] taaggtattttcgacactatagaacgcggccg-3'
- [0064] 역방향 프라이머 4: 서열번호 12:
- [0065] 5'-ttgataatgggtcaggcgcggttgattcgccgtcgccagaccatcgaagaattactggcgctggaattg
- [0066] ctttaactgcggccgcataggccactagtgga-3'
- [0067] 정방향 프라이머 5: 서열번호 13:
- [0068] 5'-cgggttacaacgtttaaacggtgcaatcatagctatcacattgttaagatactgtgaaatcactcaca
- [0069] gattgaaagcgggacactatagaacgcggccg-3'
- [0070] 역방향 프라이머 6: 서열번호 14:
- [0071] 5'-ataccgccatttggcctgacctgaatcaattcagcaggaagtgattgttatactattgcacattcgt
- [0072] tggatcacttcgccgcataggccactagtgga-3'

실시예 3

- [0074] 글루코오스-6-포스페이트에서 글루코노-1,5-락톤-6 포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 프럭토오스-6-포스페이트에서 프럭토오스-1,6-포스페이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout)시킨 재조합 미생물의 제작
- [0075] 실시예 2를 통해 제작된 재조합 미생물 *E. coli* K12 W3110 Δ *galR* Δ *galS* pTac15k-*hasA*에 *zwf*, *pfkA* 유전자의 녹아웃을 위하여 변형된 one-step inactivation 방법을 이용하였다. *zwf* 유전자 및 *pfkA* 유전자의 염기서열은 각각 서열번호 4 및 5로 나타내었다.
- [0076] Arabinose에 의해 발현이 유도되는 λ -red recombinase와 IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)에 의해 발현이 유도되는 Cre-recombinase가 포함되어 있는 플라스미드 pCW611과, 대장균의 chromosomal DNA에 있는 *zwf* 유전자와 *zwf* 유전자를 기준으로 앞, 뒤 50 bp 정도의 homologous 부분을 함께 포함하면서 Cm marker를 같이 포함하는 DNA 단편 조각을 PCR (정방향 프라이머 7과 역방향 프라이머 8)을 통해서 증폭시켜 제조한 후 재조합 미생물 *E. coli* K12 W3110 Δ *galR* Δ *galS* pTac15k-*hasA*에 형질전환하였다.

- [0077] 재조합 미생물의 *zwf* 유전자는 λ -red recombinase에 의해 Cm marker가 포함된 DNA 단편 조각으로 치환되었고, 그 후 Cre recombinase에 의해 Cm marker 양 끝에 있던 lox 부분이 서로 인식 되어 연결되면서 Cm marker 부분이 삭제되고, *zwf* 유전자가 남아있었다. *pfkA*도 위와 같은 과정을 통해 남아있었다(정방향 프라이머 9와 역방향 프라이머 10). *zwf*, *pfkA* 유전자를 남아있는 재조합 미생물을 *E. coli* K12 W3110 $\Delta galR \Delta galS \Delta pfkA \Delta zwf$ pTac15k-*hasA*라 명명하였다.
- [0078] 정방향 프라이머 7: 서열번호 15:
- [0079] 5'-cctgaaagtgtaaaaattgttctacaatctgcgaagatcatgttaccggtaaaataaacataaagga
- [0080] taagcgcatagacactatagaacgcggccg-3'
- [0081] 역방향 프라이머 8: 서열번호 16:
- [0082] 5'-aaagcagtacagtgcaccgtagaataatataagatataccctggcttaagtaccgggttagttaactt
- [0083] aaggagaatgacccgcataggccactagtgga-3'
- [0084] 정방향 프라이머 9: 서열번호 17:
- [0085] 5'-cctgataagcgaagcgcatcaggcatTTTTGCTTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCCTT
- [0086] TTTCCGAATCAGACACTATAGAACGCGGCCG-3'
- [0087] 역방향 프라이머 10: 서열번호 18:
- [0088] 5'-tcgattcacgaagtcctgtattcagtgtgacaaaatagccgccagcaagcagtcatttactgcaatc
- [0089] tcataacaggtaccgcataggccactagtgga-3'

실시예 4

- [0091] UDP-N-아세틸 글루코사민의 생산 관련 유전자들을 과발현(overexpression)시킨 재조합 미생물의 제작
- [0092] 실시예 3를 통해 제작된 재조합 미생물 *E. coli* K12 W3110 $\Delta galR \Delta galS \Delta pfkA \Delta zwf$ pTac15k-*hasA*에 UDP-N-아세틸 글루코사민의 생산 관련 유전자들을 과발현하였다. 히알루론산 전구체의 생산 경로는 본래 대장균이 가지고 있는 경로이므로 대장균 유래 유전자를 그대로 사용하기 위해 PCR을 통하여 증폭하였다. 플라스미드는 pTrc99a (Lab stock)를 사용하였고, 각 제한효소 자리에 PCR 방법으로 증폭하여 제조한 DNA 단편을 클로닝하였다.
- [0093] 히알루론산의 전구체인 UDP-N-아세틸 글루코사민 생성경로에 관련된 유전자들인 L-글루타민-D-프럭토오스-6-포스페이트 아미노트랜스퍼라아제(L-glutamine-D-fructose-6-phosphate aminotransferase)를 코딩하는 *glmS* 유전자는 N-아세틸 글루코사민-1-포스페이트 유리딜트랜스퍼라아제(N-acetyl glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase)와 글루코사민-1-포스페이트 아세틸트랜스퍼라아제(Glucose-1-P acetyltransferase) 기능을 동시에 가지는 효소를 코딩하는 *glmU* 유전자와 함께 연결되어 있었기 때문에 한번에 PCR로 증폭(정방향 프라이머 11과 역방향 프라이머 12)하여 제한효소 *Bam*HI, *Xba*I를 이용하여 클로닝하였고, 포스포글루코사민 뮤테이즈(phosphoglucosamine mutase)를 코딩하는 *glmM* 유전자(정방향 프라이머 13와 역방향 프라이머 14)는 제한효소 *Xba*I, *Hind*III를 이용하여 클로닝하였다. 그 후, 실시예 3를 통해 제작된 미생물 *E. coli* K12 W3110 $\Delta galR \Delta galS \Delta pfkA \Delta zwf$ pTac15k-*hasA* pTrc99A-*glmS*-*glmU*-*glmM*라 명명하였다. *glmS* 유전자, *glmU* 유전자 및 *glmM* 유전자의 염기서열은 각각 서열번호 6, 7 및 8로 나타내었다.
- [0094] 정방향 프라이머 11: 서열번호 19:
- [0095] 5'-ggatccaggacgcgtatgttgaataa-3'
- [0096] 역방향 프라이머 12: 서열번호 20:
- [0097] 5'-tctagaatcggttacggttagtaaa-3'
- [0098] 정방향 프라이머 13: 서열번호 21:

[0099] 5'-tctagaaggaaacaaacgctatgagtaatc-3'

[0100] 역방향 프라이머 14: 서열번호 22:

[0101] 5'-aagcttttaaacggcttttactgcatcgg-3'

실시예 5

[0103] 야생형 균주와 각 재조합 미생물의 히알루론산 생산량의 비교 실험

[0104] 야생형 대장균 균주 및 실시예 1 내지 4에서 제작한 재조합 미생물들을 배양하여 생산된 히알루론산을 분석 및 평가하였다.

[0105] 갈락토오스를 함유한 LB 배지 100 ml이 들어있는 500 ml 삼각플라스크를 멸균 후 암피실린(ampicillin) 100 µg/ml 및/또는 카나마이신(kanamycin) 50 µg/ml를 첨가하고, 야생형 대장균 균주 및 각 재조합 미생물들을 접종하여 37 °C에서 배양을 수행하였다.

[0106] 배양액에 있는 히알루론산의 농도는 탁도 분석법으로 확인하였다. 야생형 대장균 균주 및 각 재조합 미생물들의 히알루론산 생산량을 비교한 결과는 표 1에 기재하였다.

표 1

[0108]

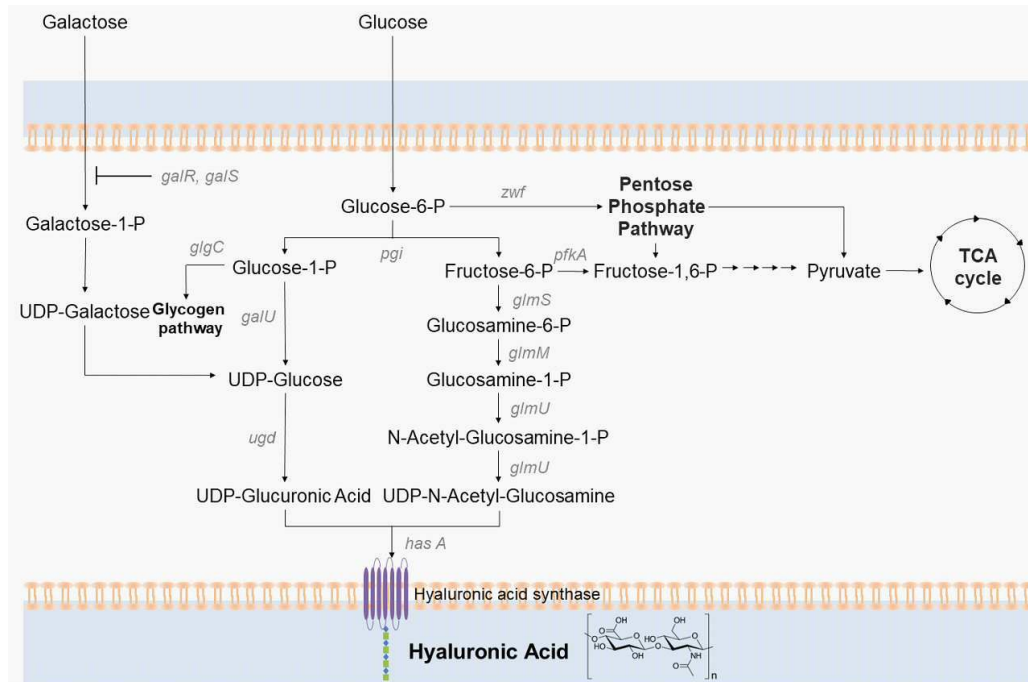
Strains	Genotype	Hyaluronic acid production	
		Titer (mg/L)	Specific productivity (mg/L/OD ₆₀₀)
Control	<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	0	0
HA01	<i>E. coli</i> K12 W3110 pTac15k- <i>hasA</i>	0	0
HA02	<i>E. coli</i> K12 W3110 $\Delta galR$ $\Delta glaS$ pTac15k- <i>hasA</i>	4.7	1.92
HA03	<i>E. coli</i> K12 W3110 $\Delta galR$ $\Delta glaS$ $\Delta pfkA$ Δzwf pTac15k- <i>hasA</i>	7.3	2.18
HA04	<i>E. coli</i> K12 W3110 $\Delta galR$ $\Delta glaS$ $\Delta pfkA$ Δzwf pTac15k- <i>hasA</i> pTrc99A- <i>glmUS-glmM</i>	5.2	2.68

[0110] 레르와르 경로를 활성화한 재조합 미생물 (HA02 균주)은 *hasA*만 대장균에 형질전환시킨 재조합 미생물 (HA01 균주)보다 4.7 mg/L의 히알루론산이 더 많이 생산되어, 레르와르 경로의 활성을 통해 기존의 히알루론산 전구체 생산 경로의 균형을 이루는데 도움이 된다는 것을 확인하였다. 그리고 경쟁적인 경로를 조절한 재조합 미생물 (HA03 균주) 또한 히알루론산 생성능을 향상시키는데 도움이 된다는 것을 확인하였다. 특히 배양 결과 중에서, 레르와르 경로가 활성화되어 있는 상태에서 히알루론산의 전구체인 UDP-N-아세틸 글루코사민 생산 경로를 강화한 재조합 미생물(HA04)의 히알루론산 specific productivity가 다른 균주들 중에서 가장 높은 2.68 mg/L/OD₆₀₀의 결과가 나타났다. 이를 통해 히알루론산 생성에 있어 대사 경로 흐름의 균형이 가장 좋았음을 확인할 수 있었다.

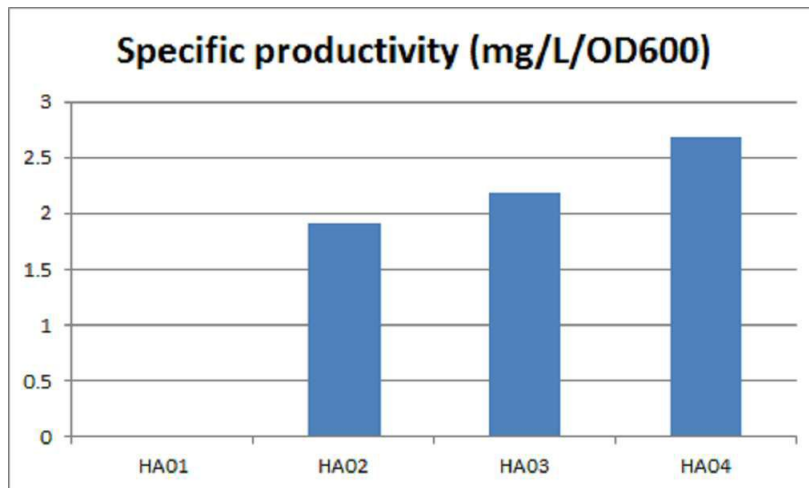
[0112] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Recombinant Microorganism Having Enhanced Productivity of
Hyaluronic acid and Method of Producing Hyaluronic acid Using the
same
- <130> P18-B201

<160> 22
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1254
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial sequence
 <400> 1

atgagaacat taaaaaacct cataactgtt gtggccttta gtatTTTTTg ggtactgttg 60

atttacgtca atgtttatct ctttgggtgct aaaggaagct tgtcaattta tggctTTTTg 120

ctgatagctt acctattagt caaaatgtcc ttatcctttt tttacaagcc atttaaggga 180

agggtgggc aatataaggt tgcagccatt attccctctt ataacgaaga tgctgagtca 240

ttgctagaga ccttaaaaaa gtgttcagcag caaacctatc ccctagcaga aatttatgtt 300

gttgacgatg gaagtgtgta tgagacaggt attaagcgca ttgaagacta tgtgcgtgac 360

actggtgacc tatcaagcaa tgtcattgtt caccggtcag aaaaaatca aggaaagcgt 420

catgcacagg cctgggcctt tgaaagatca gacgtgatg tctTTTTgac cgttgactca 480

gatacttata tctaccctga tgcttttagag gagttgttaa aaacctttta tgaccaact 540

gtttttgctg cgacgggtca ccttaatgtc agaaatagac aaaccaatct cttaacacgc 600

ttgacagata ttgctatga taatgctttt ggcgttgaac gagctgccca atccgttaca 660

ggtaatatc tcgtttgctc aggcccgctt agcgtttaca gacgcgaggt ggttggtcct 720

aacatagata gatacatcaa ccagaccttc ctgggtattc ctgtaagtat cgggtgatgac 780

agggtgctga ccaactatgc aactgattta ggaaagactg tttatcaatc cactgctaaa 840

tgtattacag atgttcctga caagatgtct acttacttga agcagcaaaa ccgctggaac 900

aagtccttct ttagagagtc cattatttct gttaagaaaa tcatgaacaa tccttttgta 960

gccctatgga ccatacttga ggtgtctatg tttatgatgc ttgtttattc tgtggtgat 1020

ttcttttagt gcaatgtcag agaatttgat tggctcaggg ttttggcctt tctggtgatt 1080

atcttcattg ttgctctttg tcgtaatat cactatatgc ttaagcacc gcgtgccttc 1140

ttgttatctc cgttttatgg ggtactgcat ttgtttgtcc tacagccctt gaaattgtat 1200

tctcttttta ctattagaaa tgctgactgg ggaacacgta aaaaattatt ataa 1254

<210> 2
 <211> 1032

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galR

<400> 2

atggcgacca taaaggatgt agcccgactg gcaggcgttt cagtcgccac cgtttccgc	60
gtcattaata attcacccaa agccagcgaa gcttcccggc tggtctgtgca tagtgcaatg	120
gagtccttta gctatcacc gaacgccaac gcccgctgcg tggcgagca gaccactgaa	180
acggtcggtc tggctgttg tgatgtttcc gatccgtttt tcggtgcaat ggtgaaagcg	240
gtcgaacagg tggcctatca caccggtaat tttttattga ttggcaacgg ttaccacaac	300
gaacaaaaag agcgtcaggc cattgagcaa ctgatccgcc atcgctgtgc tgcgttggtc	360
gtccatgcca aaatgatccc ggatgctgat ttagcctcat taatgaaaca aatgcccggt	420
atggtgctga tcaaccgtat cctgcctggc ttgaaaacc gttgtattgc tctggacgat	480
cgttacggtg cctggctggc aacgcgtcat ttaattcagc aaggctacac ccgcattggt	540
tatctgtgct ctaaccactc tatttctgac gccgaagatc gtctgcaagg gtattacgat	600
gcccttgctg aaagtgglat 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 gctgaccac cgtgcgttac ccaatcgtga cgatggcgac ccaggtgcc	900
gaactggctt tggcgctggc ggataatcgc cctctcccg aaatcactaa tgtcttagt	960
ccgacgtgg tacgtcgtca ttcagtgtca actccgtcgc tggaggcaag tcatcatgca	1020
accagcgact aa	1032

<210> 3

<211> 1041

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> galS

<400> 3

atgatcacca ttcgtgatgt agcgcgtcag gctggcgtct ctgtggcaac ggtttcccg	60
gtgctcaata acagcacgtt ggtcagtgcc gacacgcgtg aagcagtaat gaaagccgtg	120
agtgaactgg attatcgccc aaacgccaat gccagggcgc tggcaactca ggttagcgac	180

accattggcg tgggtggat ggacgtttct gatgcgtttt tcggcgcgct ggtaaaagcg	240
gtggatctgg tcgtcagca gcatcagaaa tacgtgctaa tcggcaatag ctatcatgaa	300
gcggaaaaag agcgtcacgc cattgaggtg ttaattcgcc agcgttgtaa tgcgttgatt	360
gttactcaaa aagcattgag tgacgatgaa ctggcgcaat ttatggataa cattcccgg	420
atggtgttaa tcaaccgcgt tgtgccgggg tacgccatc gttgcgtttg cctggataat	480
ctcagcgggtg cccgaatggc gacgcgatg ttgctgaata acggatcatca acgtattggt	540
tatctttctt ccagccacgg cattgaagat gacgccatgc gtaaagcagg ctggatgagt	600
gcgttgaaag agcaggatat tattccgccg gaaagctgga ttggcgcgtg tacgccggac	660
atgccgggcg gtgaggcggc gatggttgaa ctgctggggc gcaatctaca acttaccgt	720
gtatttgctt ataacgacaa tatggccgct ggcgactga cagcattaaa agataatggc	780
attgcgattc cgttacatct ctcaatcatc ggtttcgatg atattcccat cgcctgttac	840
accgaccgc aattaacgac cgtgcgttat cccattgctt caatggcgaa attagccacc	900
gaactggcct tgcagggggc agcaggcaat attgatctc gtgccagcca ctgttttatg	960
ccgacgttag tgcgtcgcca ttctgtcgca acagccaga atgcggcggc gatcactaac	1020
tcaacaaatc aggcgatgta a	1041
<210> 4	
<211> 1476	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> zwf	
<400> 4	
atggcggtaa cgaaacagc ccaggcctgt gacctggtca ttttcggcg gaaaggcgac	60
cttgccgctc gtaaattgct gccttccctg tatcaactgg aaaaagccgg tcagctcaac	120
ccggacaccc ggattatcgg cgtagggcgt gctgactggg ataaagcggc atataccaaa	180
gttgtccgcg aggcgctcga aactttcatg aaagaaacca ttgatgaagg tttatgggac	240
accctgagtg cagctctgga tttttgtaat ctcatgtca atgacactgc tgcattcagc	300
cgtctcggcg cgatgctgga tcaaaaaat cgtatcacca ttaactactt tgccatgccg	360
cccagcactt ttggcgcaat ttgcaaaggg cttggcgagg caaaactgaa tgctaaaccg	420
gcacgcgtag tcatggagaa accgctgggg acgtcgctgg cgacctcgca ggaaatcaat	480
gatcaggttg gcgaatactt cgaggagtgc caggtttacc gtatcgacca ctatcttgg	540
aaagaaacgg tgctgaacct gttggcgctg cgttttgcta actccctgtt tgtgaataac	600

tgggacaatc gcaccattga tcatgttgag attaccgtgg cagaagaagt ggggatcgaa 660
 gggcgtggg gctattttga taaagccggt cagatgcgcg acatgatcca gaaccacctg 720
 ctgcaaatc tttgcatgat tgcgatgtct ccgccgtctg acctgagcgc agacagcatc 780
 cgcatgaaa aagtgaagt actgaagtct ctgcgccgca tgcaccgctc caacgtacgc 840
 gaaaaaacg tacgcgggca atatactgcg ggcttcgccc agggcaaaaa agtgccggga 900
 tatctggaag aagagggcgc gaacaagagc agcaatacag aaactttcgt ggcgatccgc 960
 gtcgacattg ataactggcg ctgggccggt gtgccattct acctgcgtac tggtaaacgt 1020

ctgccacca aatgtttctga agtcgtggtc tatttcaaaa cacctgaact gaatctgttt 1080
 aaagaatcgt ggcaggatct gccgcagaat aaactgacta tccgtctgca acctgatgaa 1140
 ggcggtggata tccaggatct gaataaagt cctggccttg accacaaaca taacctgcaa 1200
 atcaccaagc tggatctgag ctattcagaa acctttaac agacgcatct ggcggatgcc 1260
 tatgaacgtt tgctgctgga aacctgcgt ggtattcagg cactgtttgt acgtcgcgac 1320
 gaagtggaag aagcctggaa atgggtagac tccattactg aggcgtgggc gatggacaat 1380
 gatgcgccga aaccgtatca ggccggaacc tggggaccg ttgcctcggt ggcgatgatt 1440

acccgtgatg gtcgttcctg gaatgagttt gagtaa 1476

<210> 5

<211> 963

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pfkA

<400> 5

atgattaaga aaatcgggtg gttgacaagc ggccgtgatg cgccaggcat gaacgccgca 60
 attcgcgggg ttgttcgttc tgcgtgaca gaaggtctgg aagtaatggg tatttatgac 120
 ggctatctgg gtctgtafag agaccgtatg gtacagctag accgttacag cgtgtctgac 180
 atgatcaacc gtggcggfac gttcctcggt tctgcgcgtt tcccgaatt ccgcgacgag 240
 aacatccgcg ccgtggctat cgaaaacctg aaaaaacgtg gtatcgacgc gctgggtggtt 300

atcggcgggtg acggttccta catgggtgca atgcgtctga ccgaatggg cttcccgtgc 360
 atcggctctgc cgggcaactat cgacaacgac atcaaaggca ctgactacac tatcggtttc 420
 ttcactgcgc tgagcaccgt tgtagaagcg atcgaccgtc tgcgtgacac ctcttcttct 480
 caccagccta tttccgtggt ggaagtgatg ggccgttatt gtggagatct gacgttggct 540
 gcggccattg ccgttggtct tgaattcgtt gtggttccgg aagttgaatt cagccgtgaa 600
 gacctggtaa acgaaatcaa agcgggtatc gcgaaaggta aaaaacacgc gatcgtggcg 660

attaccgaac atatgtgtga tggtgacgaa ctggcgcat tcatcgagaa agaaaccggt	720
cgtagaacc gcgcaactgt gctgggccac atccagcgcg gtggttctcc ggtgccttac	780
gaccgtattc tggttcccg tatggcgct tacgtatcg atctgctgct ggcaggttac	840
ggcggtcgtt gttaggtat ccagaacgaa cagctggttc accacgacat catcgacgt	900
atcgaaaaca tgaagcgcc gttcaaaggt gactggctgg actgcgcgaa aaaactgtat	960
taa	963
<210> 6	
<211> 1830	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> glmS	
<400> 6	
atgtgtggaa ttgttggcg gatcgcgcaa cgtgatgtag cagaaatcct tcttgaaggt	60
ttacgtgctc tggaataccg cggatatgac tctgccggtc tggccgttgt tgatgcagaa	120
ggtcatatga cccgcctgcg tcgcctcggg aaagtccaga tgctggcaca ggcagcggaa	180
gaacatcttc tgcattggcg cactgggtatt gctcacactc gctgggcgac ccacggtgaa	240
ccttcagaag tgaatgcga tccgcatgtt tctgaacaca ttgtgggtgt gcataacggc	300
atcatcgaaa accatgaacc gctgcgtgaa gagctaaaag cgcgtggcta taccttcgtt	360
tctgaaaccg acaccgaagt gattgcccac ctggtgaact gggagctgaa acaaggcggg	420
actctgcgtg aggccgttct gcgtgctatc ccgcagctgc gtggtgcgta cggtagctg	480
atcatggact cccgtcacc ggataccctg ctggcgccac gttctggttag tccgctggtg	540
attggcctgg ggatggcgga aaactttatc gttctgacc agctggcgct gttgccggtg	600
acccgtcgtt ttatcttct tgaagaggcg gatattgcgg aatcactcg ccgttcggtg	660
aacatcttcg ataaaactgg cgcggaagta aaacgtcagg atatcgaatc caatctgcaa	720
tatgacggg gcgataaagg catttaccgt cactacatgc agaaagagat ctacgaacag	780
ccgaacgca tcaaaaacac cttaccgga cgcatcagcc acggtcaggt tgatttaagc	840
gagctgggac cgaacgccga cgaactgctg tcgaaggttg agcatattca gatcctcgcc	900
tggtgtactt cttataactc cggtaggtt tcccgtact ggtttgaatc gctagcaggt	960
attccgtgcg acgtcgaat cgcctctgaa tcccgtatc gcaaatctgc cgtgcgtcgt	1020
aacagcctga tgatcacctt gtcacagtct ggcgaaaccg cggataccct ggctggcctg	1080
cgtctgtcga aagagctggg ttaccttggg tcaactggca tctgtaacgt tccgggttct	1140

tctctggtgc gcgaatccga tctggcgcta atgaccaacg cgggtacaga aatcggcgtg	1200
gcatccacta aagcattcac cactcagtta actgtgctgt tgatgctggt ggcgaagctg	1260
tctcgctga aaggtctgga tgcctccatt gaacatgaca tcgtgcatgg tctgcaggcg	1320
ctgccgagcc gtattgagca gatgctgtct caggacaaac gcattgaagc gctggcagaa	1380
gatttctctg acaaacatca cgcgctgttc ctgggccgtg gcgatcagta cccaatcgcg	1440
ctggaaggcg cattgaagtt gaaagagatc tcttacattc acgctgaagc ctacgtgct	1500
ggcgaactga aacacgggcc gctggcgcta attgatgccg atatgccggt tattgttgtt	1560
gcaccgaaca acgaattgct ggaaaaactg aaatccaaca ttgaagaagt tcgcgcgcgt	1620
ggcggtcagt tgiatgtctt cgccgatcag gatcggggtt ttgtaagtag cgataacatg	1680
cacatcatcg agatgccgca tgtggaagag gtgattgcac cgatcttcta caccgttccg	1740
ctgcagctgc tggtttacca tgtcgcgctg atcaaaggca ccgacgttga ccagccgcgt	1800
aacctggcaa aatcggttac ggttgagtaa	1830
<210> 7	
<211> 1371	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> glmU	
<400> 7	
atgttgaata atgctatgag cgtagtgatc cttgccgcag gcaaaggcac gcgcatgtat	60
tccgatcttc cgaaagtgtc gcataccctt gccgggaaag cgatggttca gcatgtcatt	120
gatgtcgcga atgaattagg cgcagcgcac gttcacctgg tgtacggtca cggcggcgat	180
ctgctaaaac aggcgctgaa agacgacaac cttaaactggg tgcttcaggc agagcagctg	240
gttacgggtc atgcaatgca gcaggccgca cctttctttg ccgatgatga agacatttta	300
atgtctctac gcgacgtgcc gctgatctct gtcgaaacac tccagcgtct gcgtgatgct	360
aaaccgcagg gtggcattgg tctgctgacg gtgaaactgg atgatccgac cggttatgga	420
cgtatcaccg gtgaaaacgg caaagttacc ggcatgtttg agcacaaga tgccaccgac	480
gagcagctgc agattcagga gatcaacacc ggcatcttga ttgccaacgg cgcagatatg	540
aaacgtggc tggcgaagct gaccaacaat aatgctcagg gcgaatacta catcaccgac	600
attattgcgc tggcgtatca ggaaggcgct gaaatcgtcg ccgttcatcc gcaacgttta	660
agcgaagtag aaggcgtgaa taaccgcctg caactctccc gtctggagcg tgtttatcag	720
tccgaacagg ctgaaaaact gctgttagca ggcgttatgc tgcgcatcc agcgcgtttt	780

gatctgcgtg gtacgctaac tcacgggcgc gatgttgaaa ttgatactaa cgttatcatc 840
gagggcaacg tgactctcgg tcatcgctg aaaattggca ccggttgcgt gattaaaaac 900
agcgtgattg gcgatgattg cgaaatcagt ccgtataccg ttgtggaaga tgcgaatctg 960
gcagcggcct gtaccattgg cccgtttgcc cgtttgcgtc ctggtgctga gttgctggaa 1020
ggtgctcacg tcggttaactt cgttgagatg aaaaaagcgc gtctgggtaa aggctcgaaa 1080

gtcggtcacg tgacttacct gggcgatgcg gaaattggcg ataacgttaa catcggcgcg 1140
ggaaccatta ccigcaacta cgatggtgcg aataaattha agaccattat cggcgacgat 1200
gtgtttgttg gttccgacac tcagctggtg gccccggtaa cagtaggcaa aggcgcgacc 1260
attgctgcgg gtacaactgt gacgcgtaat gtcggcgaaa atgcattagc tatcagccgt 1320
gtgccgcaga ctcagaaaga aggctggcgt cgtccggtaa agaaaaagtg a 1371

<210> 8

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glmM

<400> 8

atgagtaac gtaaataattt cggtagcgat gggattcgtg gtcgtgtagg gtagcgccg 60

atcacacctg attttgtct taagctgggt tggccgcgg gtaaagtgt ggcgcgccac 120
ggctcccgtg agattattat tggtaaagac acgcgtatct ctggctatat gctggagtca 180
gcaactggaag cgggtctggc ggcagcgggc cttccgcac tcttactgg cccgatgcca 240
acaccggcgg tggttatct gacgcgtacc ttccgcgcag aggccggaat tgtgatctt 300
gcatcgata acccgttcta cgataatggc attaaattct tctctatcga cggcaccaaa 360
ctgccggatg cggtagaaga ggccatcgaa gcggaaatgg aaaaggagat cagctgcgtt 420
gattcggcag aactgggtaa agccagccgt atcgttgatg ccgcgggtcg ctatatcgag 480

ttttgcaaag ccacgttccc gaacgaactt agcctcagt aactgaagat tgtggtggat 540
tgtgcaaacg gtgcgactta tcacatcgcg ccgaacgtgc tgcgcgaact gggggcgaac 600
gttatcgcta tcggttgta gccaaacggt gtaaacaatca atgccgaagt gggggctacc 660
gacgttcgcg cgtccaggc tcgtgtgctg gctgaaaaag cggatctcgg tattgccttc 720
gacggcgatg gcgatcgct gattatggtt gaccatgaag gcaataaagt cgatggcgat 780
cagatcatgt atatcatcg gcgtgaaggt ctctgtcagg gccagctcgc tgggtggcgt 840
gtgggtacat tgatgagcaa catggggctt gaactggcgc tgaacagtt aggaattcca 900

tttgcgcgcg cgaaagtggg tgaccgctac gtactggaaa aaatgcagga gaaaggctgg 960
 cgtatcgggtg cagagaattc cggtcattgtg atcctgtctgg ataaaactac taccggtgac 1020
 ggcatcgttg ctggcttgca ggtgctggcg gcgatggcac gtaaccatat gaggctgcac 1080
 gacctttgca gcggcatgaa aatgttcccg cagattctgg ttaacgtacg ttacaccgca 1140
 ggtagcggcg atccacttga gcatgagtca gttaaagccg tgaccgcaga ggttgaagct 1200
 gcgctgggca accgtggacg cgtgttctg cgtaaaccg gcaccgaacc gttaatcgc 1260
 gtgatggtgg aaggcgaaga cgaagcgcag gtgactgaat ttgcacaccg catcgccgat 1320

gcagtaaaag ccgtttaa 1338

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 1

<400> 9

ctgcagatga gaacattaaa aaacctcata actgt 35

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 2

<400> 10

ctgcagttat aataattttt tacgtgttcc ccagt 35

<210> 11

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 3

<400> 11

aaaacacgcc accccttgaa ccaacgggcg tttccgtaa cactgaaaga atgtaagcgt 60

ttaccacta aggtattttc gacactatag aacgcggccg 100

<210> 12

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 4

<400> 12

ttgataatgg tcaggcgcgg ttgattcgcc gtcgccagac catcgaagaa ttactggcgc 60

tggaattgct ttaactgcgg ccgcataggc cactagtgga 100

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 5

<400> 13

cgggttaca cgttaaacg gtgcaatcat agctatcaca ttgttaagat actgtgaaat 60

cactcacaga ttgaaagcgg gacactatag aacgcggccg 100

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 6

<400> 14

ataccgcat ttggcctgac ctgaatcaat tcagcaggaa gtgattgtta tactatttgc 60

acattcggtg gatcacttcg ccgcataggc cactagtgga 100

<210> 15

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 7

<400> 15

cctgaaagtg taaaaattgt tctacaatct gcgcaagatc atgttaccgg taaaataacc 60

ataaaggata agcgcagata gacactatag aacgcggccg 100

<210> 16

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 8

<400> 16

aaagcagtac agtgcaccgt aagaaaatta caagtatacc ctggcttaag taccgggtta 60
gttaacttaa ggagaatgac ccgcataggc cactagtgga 100

<210> 17

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 9

<400> 17

cctgataagc gaagcgcacg aggcattttt gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa 60
tctgcctttt tccgaaatca gacactatag aacgcggccg 100

<210> 18

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 10

<400> 18

tcgattcacg aagtcctgta ttcagtgtg acaaaatagc cgccagcaag cagtcattta 60
ctgcaatctc ataacaggta ccgcataggc cactagtgga 100

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 11

<400> 19

ggatccagga cgcgtatgtt gaataa 26

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 12

<400> 20

tctagaaatc ggttacggtt gagtaa 26

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 13

<400> 21

tctagaagga aaacaaacgc tatgagtaat c 31

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER 14

<400> 22

aagcttttaa acggctttta ctgcatcgg 29