

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0113020

(43) 공개일자 2022년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 1/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0016693

(22) 출원일자 2021년02월05일

심사청구일자 2021년02월05일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

이성국

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이용주

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

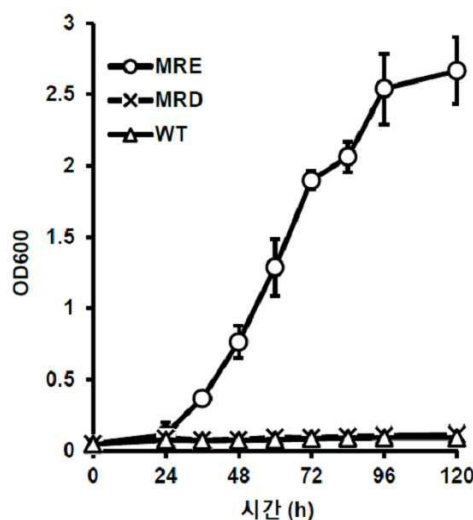
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 노난디오산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용한 노난디오산 생산방법

(57) 요약

본 발명은 노난디오산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용한 노난디오산 생산방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 대장균 균주의 유전자를 조작하여 노난산(nonanoic acid)으로부터 노난디오산(nonanedioic acid, NDA)을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 대장균을 노난산에서 빠르게 성장할 수 있게 할 뿐만 아니라 대장균으로 하여금 노난산으로부터 고부가 가치 물질인 노난디오산을 과 생산할 수 있게 한다는 점에서 기존의 노난디오산 생산 방법에 비해 현저한 이점을 제공한다. 따라서, 본 발명의 대장균은 노난디오산을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12P 7/44 (2013.01)

정현욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

박근화

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395062994

과제번호 PJ013457012020

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 화장품 원료용 디카르복실산 대량 생산 균주 및 생산공정 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

i) *fadR* 유전자가 결실되고,

ii) AcrR, FadD, DppA, Crp, e14 프로파지 및 YeaR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 돌연변이된 형질 전환 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AcrR 돌연변이는 서열번호 42로 표시되는 염기서열 중 567번째 염기인 아데닌(A)이 결실된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 FadD 돌연변이는 서열번호 43으로 표시되는 *fadD*와 *yeaY*의 유전자간 영역(*yeaY/fadD* intergenic region)의 염기서열 중 90번째 염기인 구아닌(guanin) 및 94번째 염기인 사이토신(cytosine)이 아데닌(adenine)으로 치환된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 DppA 돌연변이는 서열번호 44로 표시되는 염기서열 중 1570번째 염기에 이동성 유전인자 (mobile genetic element) IS5가 삽입된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 Crp 돌연변이는 서열번호 45로 표시되는 *crp*와 *yhfA*의 유전자간 영역(*yeaY/fadD* intergenic region)의 염기서열 중 125번째 염기에 이동성 유전인자 IS5가 삽입된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 e14 프로파지 돌연변이는 서열번호 46으로 표시되는 염기서열의 *icd-icdC* 유전자가 결실된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 YeaR 돌연변이는 서열번호 47로 표시되는 염기서열 중 115번째 염기에 이동성 유전인자 IS186가 삽입된 것인, 형질전환 대장균.

청구항 8

i) 제1항의 형질전환 대장균을 배양하는 단계; 및

ii) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는, 노난디오산의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 배양은 노난산 존재 하에 형질전환 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 것인, 노난디오산의 생산방법.

청구항 10

i) 야생형 대장균의 *fadR* 유전자를 결실시키는 단계;

ii) 상기 대장균을 노난산이 유일탄소원인 최소배지에서 10일 이상 배양시키는 단계; 및

iii) 90일 이상 반복적으로 계대배양시키는 단계를 포함하는, 노난산으로부터 노난디오산을 생산하는 대장균을 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 ii) 단계에서 노난산은 적어도 3 g/L의 농도로 존재하는 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 ii) 단계에서 최소배지가 NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 CaCl_2 가 첨가된 M9 최소배지인, 방법.

청구항 13

제10항의 방법으로 제조된, 대장균.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 대장균이 *fadR* 유전자가 결실되고, *AcrR*, *FadD*, *DppA*, *Crp*, *e14* 프로파지 및 *YeaR*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 돌연변이된 것을 특징으로 하는, 대장균.

청구항 15

i) 제13항의 대장균을 배양하는 단계; 및

ii) 상기 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는, 노난디오산의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노난디오산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용한 노난디오산 생산방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 대장균 균주의 유전자를 조작하여 노난산(nonanoic acid)으로부터 노난디오산(nonanedioic acid, NDA)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중쇄 α , ω -디카르복실산(MCDCA)은 2개의 말단 카르복실 작용기를 가진 유기 화합물(C8 내지 C14)이다. 이는 나일론 및 기타 폴리아미드, 폴리에스테르, 및 수지와 같은 다양한 제품의 생산을 위한 중합체 산업에서만 아니라 화장품 성분에 광범위하게 적용되고 있다. 현재까지, MCDCA는 주로 화학적 합성 또는 불포화 지방산의 오존 첨가 분해에 의해 생산된다. 알킬 사슬의 ω -탄소의 직접 수산화에 의해 MCDCA를 화학적으로 합성하기 위해 고체 금속 촉매가 사용된다. 그러나, 이러한 고체 금속 촉매는 낮은 효율과 불량한 선택성으로 어려움을 겪는다. 불포화 지방산의 오존 첨가 분해는 높은 선택성과 효율로 인해 MCDCA 생산을 위한 대안적인 방법이다. 그러나, 이 방법은 고에너지 투입 공정, 가혹한 반응 조건, 및 부산물 형성을 비롯한 여러 가지 한계를 지닌다.

[0003] 지방산의 MCDCA 및 그 유래의 화합물로의 생물전환은 기존의 MCDCA 생산 공정을 대체할 유망한 방법이다. 힘

(heme)-함유 사이토크롬 P450 효소를 사용한 ω -산화가 디카르복실산의 생산에 사용되었는데, 이는 이것이 지방산의 말단 알칸 사슬을 직접 수산화시키기 때문이다.

[0004] 유사하게, 높은 효율 및 위치 선택성으로 중쇄 지방산(MCFA, C_8 내지 C_{14})을 ω -산화시키기 위해 대장균으로의 *Pseudomonas putida* GPo1 ω -산화 경로 시스템의 도입이 연구되었다. *P. putida* GPo1의 ω -산화 경로 시스템은 알칸 분해 경로의 일부로 알칸 하이드록실라제(alkane hydroxylase)(AlkBGT) 시스템을 포함한다. 이 AlkBGT 시스템은 MCFA의 말단 위치의 산화에 대해 높은 특이성을 갖는다.

[0005] 한편, 노난디오산(NDA)은 플라스틱 및 여드름 약물 치료에 사용되는 9개의 탄소 사슬 길이의 디카르복실산이다. NDA는 작물과 동물 산물에서 발견되는 천연 생성물이다. 기미와 주근깨에 대한 미백 효과와 더불어 항균 및 항염증 효과로 인해 화장품에 사용하기 위한 원료로서의 NDA의 가치가 높아졌다. 따라서, 노난산의 ω -산화에 의한 NDA의 생물학적 생산은 실행 가능하고 매력적인 방법이 된다.

[0006] 대장균은 β -산화 경로를 통해 장쇄 지방산을 사용하여 성장할 수 있다. FadR은 지방산 분해(β -산화)의 억제 인자로서, 이의 결실은 β -산화를 향상시킨다. 그러나, 여러 연구에서 *fadR*-결실 대장균 균주는 MCFA를 유일한 탄소원으로 사용할 때 잘 성장하지 않는다고 보고되었다. 이러한 낮은 성장은 대장균에 대한 MCFA의 독성과 MCFA에 대한 아실-CoA 합성 효소 FadD의 낮은 기질 특이성에 기인할 수 있다.

[0007] MCDCA의 대량 생산의 경우, 전구체로서 지방산의 직접 공급이 효과적인 전략이 될 수 있지만, MCFA의 독성으로 인해, 기존 전략의 대안으로는 독성을 거의 나타내지 않는 메틸화 지방산 또는 장쇄 지방산의 전구체로서의 사용이 있다. 그러나, 이 방법은 일반적으로 지방산의 에스테르화와 모노에스테르화-카르복실산의 α , ω -DCA로의 전환을 모두 필요로 하며, 그에 따라 궁극적으로는 MCDCA의 생산에 적합하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) US 2018-0112241 A1
(특허문헌 0002) US 2020-0277634 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 대장균 균주의 유전자를 조작하여 노난산으로부터 노난디오산을 생산하는 방법을 개발하기 위해, 특정 대장균 균주를 실험실 적응 진화시킨 후 야생형 균주와 비교하여 유일한 탄소원인 노난산에서 가장 빠른 성장을 보인 대장균 돌연변이체를 얻고, 이 대장균 돌연변이체로부터 총 6개의 돌연변이를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하게 위하여, 본 발명의 일 측면은, i) *fadR* 유전자가 결실되고, ii) AcrR, FadD, DppA, Crp, e14 프로파지 및 YeaR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 돌연변이된 형질전환 대장균을 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 측면은, i) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; 및 ii) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는 노난디오산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 야생형 대장균의 *fadR* 유전자를 결실시키는 단계; ii) 상기 대장균을 노난산이 유일한탄소원인 최소배지에서 10일 이상 배양시키는 단계; 및 iii) 90일 이상 반복적으로 계대배양시키는 단계를 포함하는, 노난산으로부터 노난디오산을 생산하는 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 방법으로 제조된 대장균을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 상기 대장균을 배양하는 단계; 및 ii) 상기 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는 노난디오산을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 방법은 대장균을 노난산에서 빠르게 성장할 수 있게 할 뿐만 아니라 대장균으로 하여금 노난산으로부터 고부가 가치 물질인 노난디오산을 과 생산할 수 있게 한다는 점에서 기존의 노난디오산 생산 방법에 비해 현저한 이점을 제공한다. 따라서, 본 발명의 대장균은 노난디오산을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 M9 최소배지에서 성장시킨 대장균 야생형 MG1655(WT), *fadR*-결실 대장균(MRD), 및 MRD를 실험실 적응 진화에 적용한 후 분리된 10개의 돌연변이체(C1 내지 C10)의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 2는 M9 최소배지에서 성장시킨 대장균 야생형 MG1655(WT), *fadR*-결실 대장균(MRD), 및 MRD를 실험실 적응 진화에 적용한 후 분리된 10개의 돌연변이체 중 가장 빠른 성장을 보인 C6(MRE)의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 3a는 MRE, MRE-유래 단일 돌연변이 복원 균주, 및 MRD-Pf의 성장 곡선을 도시하고; 도 3b는 노난산에서 배양된 MRE, MRD, 및 MRD-유래 단일 돌연변이-도입 균주의 세포 생존 능력을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 MRE-BGT, MRD-BGT, 및 MRD-EB의 NDA 농도를 나타내는 그래프를 도시하고; 도 4b는 생물변환 24시간째의 MRE-BGT, MRD-BGT 및 MRD-유래 단일 돌연변이-도입 *fadE*-결실 *alkBGT* 발현 균주의 NDA 농도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명의 일 측면은, i) *fadR* 유전자가 결실되고, ii) AcrR, FadD, DppA, Crp, e14 프로파지 및 YeaR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 돌연변이된 형질전환 대장균을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 사용하는 용어 "*fadR*" 유전자는 지방산 분해(β -산화)의 억제 인자인 FadR를 암호화하는 유전자이다. 상기 FadR 및 이를 암호화하는 *fadR* 유전자는 Gene ID: 948652에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0020] 상기 효소 또는 폴리펩티드 등을 암호화하는 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은 예를 들면, Cre/loxP 재조합 시스템을 사용하여 유전자 결손을 위한 카세트를 모균주에 형질전환함으로써 수행될 수 있고, 대장균 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 일부 핵산 서열이 결실된 유전자 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열을 변형하는 방법은 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 약화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현조절 서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 아울러, 상기 효소 또는 폴리펩티드를 암호화하는, 염색체 상의 염기서열을 변형하는 방법은 상기 단백질의 활성을 더욱 약화하도록 염기서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 염기서열로 교체함으로써 수행할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 사용하는 용어 "AcrR"란, *acrAB* 유전자의 잠재적 조절 단백질로, 상기 AcrR 및 이를 암호화하는 *acrR* 유전자는 Gene ID: 945516에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 AcrR 돌연변이는 서열번호 42로 표시되는 염기서열 중 567번째 염기인 아데닌(A)이 결실된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용하는 용어 "FadD"란, 분해 또는 인지질로의 통합을 위해 외인성 장쇄 지방산의 CoA 티오에스테르로의 수송과 함께 에스테르 화를 촉매하는 단백질이다. 상기 FadD 및 이를 암호화하는 *fadD* 유전자는 Gene ID: 946327에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 FadD 돌연변이는 서열번호 43으로 표시되는 *fadD*와 *yeaY*의 유전자간 영역(*yeaY/fadD* intergenic region)의 염기서열 중 90번째 염기인 구아닌(guanine) 및 94번째 염기인 사이토신(cytosine)이 아데닌(adenine)으로 치환된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 용어 "DppA"란, 디펩타이드 수송 단백질(plasmic dipeptide transport protein)로, 상기 DppA 및 이를 암호화하는 *dppA* 유전자는 Gene ID: 948062에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 DppA 돌연변이는 서열번호 44로 표시되는 염기서열 중 1570번째 염기에 이동성 유전인자(mobile genetic element) IS5

가 삽입된 것일 수 있다. 상기 DppA 돌연변이는 서열번호 51로 표시되는 염기서열일 수 있다.

- [0024] 본 발명에서 사용하는 용어 "Crp"란, CRP-cAMP 활성화 전사 조절인자 CRP(cAMP-activated global transcriptional regulator CRP)로, 상기 Crp 및 이를 암호화하는 *crp* 유전자는 Gene ID: 947867에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 Crp 돌연변이는 서열번호 45로 표시되는 *crp*와 *yhfa*의 유전자간 영역(*yhfa/crp* intergenic region)의 염기서열 중 125번째 염기에 이동성 유전인자 IS5(서열번호 52)가 삽입된 것일 수 있다. 상기 *crp*와 *yhfa*의 유전자간 영역은 서열번호 45으로 표시되는 염기서열 일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용하는 용어 "e14 프로파지"란, 여러 유전자들을 갖고 있는 것으로, 대장균(*E. coli*) 게놈(genome)의 1195432 bp 부터 1210646 bp까지 해당한다. 상기 e14 프로파지 돌연변이는 서열번호 46으로 표시되는 염기서열의 *icd-icdC* 유전자가 결실된 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용하는 용어 "YeaR"란, 질산염에 반응하여 유도되는 것으로 보고된 알려지지 않은 기능을 가진 단백질로, 상기 YeaR 및 이를 암호화하는 *yeaR* 유전자는 Gene ID: 946317에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 YeaR 돌연변이는 서열번호 47으로 표시되는 염기서열 중 115번째 염기에 이동성 유전인자 IS186(서열번호 54)가 삽입된 것일 수 있다. 상기 YeaR 돌연변이는 서열번호 53으로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 측면은, i) 상기 형질전환 대장균을 배양하는 단계; 및 ii) 상기 형질전환 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는 노난디오산을 생산하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은 대장균에 *fadE* 유전자를 결실시키는 단계; ii) 상기 대장균에 *alkBGT* 유전자 및 IPTG-유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; iii) 상기 대장균을 배양하는 단계; iv) IPTG를 처리한 후, 상기 대장균을 배양하는 단계; 및 v) 상기 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 노난디오산을 생산하는 방법에 있어서, 상기 형질전환 대장균에 대해서는 전술한 형질전환 대장균에 대한 설명을 참조한다.
- [0030] 본 발명에서 사용하는 용어 "*fadE*" 유전자는 아실-CoA 탈수소효소를 암호화하는 유전자이다. 상기 아실-CoA 탈수소효소 및 *fadE* 유전자는 Gene ID: 949007에 개시된 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 사용하는 용어 "*alkBGT*" 유전자란, *alkB*(서열번호 48), *alkG*(서열번호 49) 및 *alkT*(서열번호 50) 3개 유전자로 이루어진 오페론으로, 알칸 모노옥시게나제를 암호화하는 유전자이다. 상기 알칸 모노옥시게나제는 중간탄소사슬길이의 탄소 말단 부분을 산화시켜 산소를 첨가하는 반응에 관여한다. 상기 *alkBGT* 유전자는 *P. putida* GPo1로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용하는 용어 "배양"이란, 상기 형질전환 대장균으로부터 노난디오산을 생산하기 위하여, 상기 형질전환 대장균을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일련의 행위를 의미할 수 있다. 본 발명에서 상기 형질전환 대장균을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 노난디오산으로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들면, 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 상기 배양은 노난산 존재 하에 형질전환 대장균을 배양하는 것일 수 있다.
- [0033] 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스를 주탄소원으로 사용하며, 이외에 자일로스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함될 수 있다.
- [0034] 상기 배양은 글루코스 존재 하에 효모를 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철,

황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0036] 통상적으로, 대장균은 약 20℃ 내지 약 37℃ 범위의 온도에서 적절한 배지 내에 배양(성장)할 수 있다. 본 발명에서 배지는, 예를 들면, 암모늄 설페이트, 및 탄소/에너지 공급원으로서의 텍스트로스를 포함하는 브로스(broth) 또는 상업적으로 제조된 통상적인 배지일 수 있다. 그밖에 정의되거나 합성된 배지도 사용할 수 있으며, 특정 미생물의 성장에 적절한 배지는 미생물학 또는 발효과학 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0037] 상기 형질전환 대장균을 통해 생산된 노난디오산은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 배양 배지로부터 분리할 수 있다. 이러한 분리 방법은 원심분리, 여과, 이온교환크로마토그래피, 가스크로마토그래피 또는 결정화일 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 가스 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 야생형 대장균의 *fadR* 유전자를 결실시키는 단계; ii) 상기 대장균을 노난산이 유일탄소원인 최소배지에서 10일 이상 배양시키는 단계; 및 iii) 90일 이상 반복적으로 계대배양시키는 단계를 포함하는, 노난산으로부터 노난디오산을 생산하는 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 i) 단계에서 야생형 대장균의 *fadE* 유전자를 결실시키는 단계가 추가적으로 더 포함될 수 있다.

[0040] 상기 ii) 단계에서 노난산은 적어도 3 g/L의 농도로 존재하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0041] 상기 ii) 단계에서 최소배지가 NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 CaCl_2 가 첨가된 M9 최소배지일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 5 g/L, NaH_2PO_4 6.78 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g/L, 및 CaCl_2 0.011 g/L가 첨가된 M9 최소배지를 사용하였다.

[0042] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 방법으로 제조된 대장균을 제공한다. 상기 대장균은 *fadR* 유전자가 결실되고, *AcrR*, *FadD*, *DppA*, *Crp*, *e14* 프로파지 및 *YeaR*의 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 돌연변이된 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 대장균은 *fadE* 유전자가 추가적으로 결실된 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 상기 대장균을 배양하는 단계; ii) 상기 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함하는 노난디오산을 생산하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은 i) 상기 대장균에 *alkBGT* 유전자 및 IPTG-유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터를 삽입시키는 단계; ii) 상기 대장균을 배양하는 단계; iii) IPTG를 처리한 후, 상기 대장균을 배양하는 단계; 및 iv) 상기 대장균으로부터 생산되는 노난디오산을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 상기 배양 방법 및 노난디오산 수득 방법은 형질전환 대장균을 이용한 노난디오산을 생산하는 방법에서 상술한 바와 동일하다.

[0046] 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.

[0047] 실험예 1. 미생물 균주 및 플라스미드

[0048] 대장균 DH10B를 플라스미드 구축에 사용하고, 대장균 MG1655 K-12(Blattner et al., Science 277, 5331, 1453-1474(1997) 참고)를 실험실 적응 진화 및 생물변환을 위한 이종 유전자 발현을 비롯한 모든 유전자 변형을 위한 모균주로 사용하였다. 구축된 균주 및 플라스미드는 하기 표 1에 나타내었다. 염색체 유전자의 결실은 λ -제조합 시스템을 이용하여 수행하였으며, 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

균주	유전자형 및 설명
WT	<i>E. coli</i> MG1655 K-12 F- λ <i>ilvG-rfb-50rph -1</i>
MRD	Δ <i>fadR</i> :FRT를 지닌 WT
MRE	유일 탄소원으로 3 g/L의 노난산을 사용하는 배지에서 성장하도록 진화된 MRD
MRD-a	<i>acrR</i> *를 지닌 MRD
MRD-Pf	<i>PfadD</i> *를 지닌 MRD
MRD-e	<i>e14</i> 프로파지 결실을 지닌 MRD

MRD-y	<i>yeaR</i> *를 지닌 MRD
MRD-Pc	<i>Pcrp</i> *를 지닌 MRD
MRD-d	<i>dppA</i> *를 지닌 MRD
MRE-a	<i>acrR</i> 이 복원된 MRE
MRE-Pf	<i>PfadD</i> 가 복원된 MRE
MRE-y	<i>yeaR</i> 이 복원된 MRE
MRE-Pc	<i>Pcrp</i> 가 복원된 MRE
MRE-d	<i>dppA</i> 가 복원된 MRE
MRD-BGT	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD
MRE-BGT	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE
MRD-EB	6개의 MRE 돌연변이, $\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD
MRD-aFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-a
MRD-PfFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-Pf
MRD-eFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-e
MRD-yFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-y
MRD-PcFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-Pc
MRD-dFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRD-d
MRE-aFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE-a
MRE-PfFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE-Pf
MRE-yFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE-y
MRE-PcFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE-Pc
MRE-dFB	$\Delta fadE$:FRT 및 A6c- <i>alkBGT</i> 를 지닌 MRE-d
플라스미드	
pBbA6c- <i>rfp</i>	p15A 레플리콘, P _{Llac0-1} 프로모터 및 <i>rfp</i> , Cm ^R 을 지님
pBbA6c- <i>alkBGT</i>	Δrfp : <i>alkBGT</i> , Cm ^R 을 지닌 A6c- <i>rfp</i>

[0050] 별표(*)는 진화된 균주인 MRE에서의 해당 돌연변이를 나타냄.

표 2

[0051]

프라이머	서열(5'-3')	목적	서열번호
<i>fadR</i> del H1 F	TCTGGTATGATGAGTCCAACCTTTGTTTTGCTGTGTTATGAAATCTCACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>fadR</i> 녹아웃	1
<i>fadR</i> del H2 R	AACAACAAAAACCCCTCGTTTGGGGGTTTGCTCTTTAAACGGAAGGGAATTCGGGGATCCGTCGACC	<i>fadR</i> 녹아웃	2
<i>fadR</i> seq F	GGGCGAGTTTGTACCACTCGG	<i>fadR</i> 시퀀싱	3
<i>fadR</i> seq R	GCGCGGCGACCGTTTCGCTG	<i>fadR</i> 시퀀싱	4
<i>fadE</i> del H1 F	CCATATCATCACAAGTGGTCAGACCTCTACAAGTAAGGGGCTTTTCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>fadE</i> 녹아웃	5
<i>fadE</i> del H2 R	TTACGCGGCTTCAACTTTCCGCACTTTCTCCGGCACTTTACCGGCTTCGATTCGGGGATCCGTCGACC	<i>fadE</i> 녹아웃	6
<i>fadE</i> seq F	AAAAGTTAGCCAGCGTTTCCGCCGC	<i>fadE</i> 시퀀싱	7
<i>fadE</i> seq R	ACGTTGGGAGATGAGACGTATCAGG	<i>fadE</i> 시퀀싱	8
<i>PfadD</i> * MAGE Oligo	ATATTAACATCATACCAGCTTGATAATTACCAACGAAAAGTTGTGAGCGCGTCACTATTTATTTTATCTTTACCGTAAGAATGC	<i>PfadD</i> 돌연변이유발	9
<i>PfadD</i> back	ATATTAACATCATACCAGCTTGATAATTACCAACGAAAAGTTGCGAGCGCGTCACTATTTATTTTATCTTTACCGTAAGAATGC	<i>PfadD</i> 야생형 돌연변이유발	10
<i>PfadD</i> * tetA H1P1 F	CTGTTTCTGCATTCTTACGGTAAAGATAAAAAATAAGTAGCAGCGCTTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>PfadD</i> 돌연변이유발	11
<i>PfadD</i> * tetA H2P4 R	TAACATAATATAACTCATCATACCAGCTTGATAATTACCAACGAAAAGATTCGGGGATCCGTCGACC	<i>PfadD</i> 돌연변이유발	12
<i>acrR</i> tetA H1P1 F	CGGCCTGATGGAAAAGTGGCTCTTTGCCCGCAATCTTTTGATCTTAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>acrR</i> 돌연변이유발	13
<i>acrR</i> tetA H2P4 R	GGCACAGGAGATACATCTCCAGTAAGATGGCAACGTAATCGCGGGCTTCTATTCGGGGATCCGTCGACC	<i>acrR</i> 돌연변이유발	14
<i>acrR</i> * MAGE Oligo	GAGATACATCTCCAGTAAGATGGCAACGTAATCGCGGGCTTCTTTTAAGATCAAAAGATTGCGGGGCAAGAGCCAGTTTCCATCAGG	<i>acrR</i> 돌연변이유발	15

<i>acrR</i> back	ATATTAACATCATACACAGCTTGATAATTACCCAACGAAAAGGTTGCGA AGCGCGTCACTATTTATTTTATCTTTACCGTAAGAATGC	<i>acrR</i> 야생형 돌연변이유발	16
<i>acrR</i> seq F	CCTGTTAGGGCTAAGCTGCC	<i>acrR</i> 시퀀싱	17
<i>acrR</i> seq R	CGCCGTGTTCTGGCATAACA	<i>acrR</i> 시퀀싱	18
e14 H1-P4	AAAGTAAATCCTGGCTCTATTATCTCTCCGCTGAGATGATGCTGCGCA ATTCCGGGGATCCGTCGACC	e14 프로파지 결실	19
e14 H2-P1	CGCCTTCCATACCTTTAACAATCAGGTCAGCCGCTTCAGTCCAACCCATA GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	e14 프로파지 결실	20
e14 MAGE oligo	TCCATACCTTTAACAATCAGGTCAGCCGCTTCAGTCCAACCCATATGGCG CAGCATCATCTCAGCGGAGAGAATAATAGAGCCAGGATTT	e14 프로파지 결실	21
e14 seq F	GTAATTCCTCTGTCTTCAGG	e14 프로파지 시퀀싱	22
e14 seq R	AACAACGGGCGGTGTATACG	e14 프로파지 시퀀싱	23
yeaR H1-P4	CACCTGCCGAATATTTCGAACGTCATCTTGATAAAGGAACGCGCCGGGG ATTCCGGGGATCCGTCGACC	yeaR 돌연변이유발	24
yeaR H2-P1	TCAGCGTAGCCGAGATATTTGACCGCCCCATGCATAACGGAAAGGCGTGG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	yeaR 돌연변이유발	25
yeaR IS186 FP	CACCTGCCGAATATTTCGAA	yeaR 돌연변이유발	26
yeaR IS186 RP	TCAGCGTAGCCGAGATATTT	yeaR 돌연변이유발	27
PyhFA/crp H1-P4	CCTGGGTCATGCTGAAGCGAGACACCAGGAGACACAAAGCGAAAGCTATG ATTCCGGGGATCCGTCGACC	PyhFA/crp 돌연변이유발	28
PyhFA/crp H2-P1	CTTTCATACATGCAGTACATCAATGTATTACTGTAGCATCCTGACTGTT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	PyhFA/crp 돌연변이유발	29
PyhFA/crp IS5 FP	CCTGGGTCATGCTGAAGCGA	PyhFA/crp 돌연변이유발	30
PyhFA/crp IS5 RP	CTTTCATACATGCAGTACA	PyhFA/crp 돌연변이유발	31
dppA H1-P4	CCGTGTTTGAACCGGTACGTAAAGAAGTTAAAGGCTATGTGGTTGATCCA ATTCCGGGGATCCGTCGACC	dppA 돌연변이유발	32
dppA H2-P1	TTGTATGGCTTTTAATTATTCGATAGAGACGTTTTTGAAGTGATGTTGC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	dppA 돌연변이유발	33
dppA IS5 FP	CCGTGTTTGAACCGGTACGT	dppA 돌연변이유발	34
dppA IS5 RP	TTGTATGGCTTTTAATTATT	dppA 돌연변이유발	35
dppA IS5 seq FP	GCCTCTGAACAAGGCTCCAA	dppA 시퀀싱	36
dppA IS5 seq RP	ACAGCGCCACCGGTATACA	dppA 시퀀싱	37
PyhFA/crp IS5 seq FP	TTATCGCCTGAGTTGCCGTC	PyhFA/crp 시퀀싱	38
PyhFA/crp IS5 seq RP	AACCATTCGAGAGTCGGGTC	PyhFA/crp 시퀀싱	39
yeaR IS186 seq FP	CTTCGCTGATATGGTGCTAA	yeaR 시퀀싱	40
yeaR IS186 seq RP	CTTCCGTTGTTGCGCACCT	yeaR 시퀀싱	41

[0052] 모든 프라이머는 마크로젠(한국)으로부터 구입하였음.

[0053] 실험예 2. 화학 물질, 효소 및 배양 조건

[0054] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스 소재)에서 구입하였다. 제한 효소 및 Phusion high-Fidelity DNA 중합 효소(Thermo Fischer Scientific) 및 DNA 리가아제(New England Biolabs)를 클로닝 및 유전자 변형에 사용하였다.

[0055] 균주는 LB(Luria-Bertani) 배지(리터당 조성: 5 g의 효모 추출물, 10 g의 펩톤, 및 10 g의 NaCl)에서 배양하였다. 실험실 적응 진화의 경우, M9 최소배지(리터당 조성: 6.78 g의 NaH_2PO_4 , 3 g의 KH_2PO_4 , 0.5 g의 NaCl, 1 g의 NH_4Cl , 0.49 g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 및 0.011 g의 CaCl_2)를 사용하였다. 배지에 0.5% Tween-80 및 3 g/L의 노난산을 보충하였다. 균주를 호기성 조건하에 37°C, 200 rpm 조건의 진탕기에서 교반하면서 배양하였다. 항생제는 암피실린(100 mg/L), 카나마이신(50 mg/L), 및 클로람페니콜(30 mg/L)을 사용하였다.

[0056] 실험예 3. 실험실 적응 진화

[0057] LB 플레이트 상의 *fadR* 유전자를 결실시킨 MRD 균주의 단일 콜로니를 3 mL의 LB broth 배지에 접종하였다.

먼저, 유일 탄소원으로 3 g/L의 노난산이 보충된 5 ml의 새로운 M9 최소배지에서 1:100으로 희석하였다. 하룻밤 동안 배양시킨 MRD 균주의 광학 밀도(OD_{600})가 2.5에 도달하였을 때, 5 ml의 동일한 M9 최소배지에서 1:100으로 희석하여 접종하여 배양하였다. 이 과정을 30회 반복하여 계대배양하였다.

[0058] 상기 계대배양이 끝나고 LB 플레이트에서 배양된 균주의 단일 콜로니를 3 ml의 LB broth 배지에 접종하고 37℃ 온도에서 16시간 동안 배양하였다. 상기 균주를 4 g/L의 글루코스가 보충된 5 ml의 M9 최소배지에서 1:100으로 희석하여 접종하였다. 24시간 배양 후, 균주를 0.5% Tween-80 및 3 g/L의 노난산이 보충된 25 ml의 새로운 M9 최소배지에서 1:25로 희석하여 접종하였다. OD_{600} 을 측정하고, OD_{600} 이 가장 높은 균주를 "MRE" 균주로 명명하였으며, 이를 추가 연구를 위해 선별하였다.

[0059] 실험예 4. 전체 게놈 시퀀싱

[0060] 게놈 DNA를 GeneAII DNA 분리 키트(쑤진올바이오테크놀로지, Cat. No. 103-102)를 제조사의 매뉴얼에 따라 MRE 균주로부터 분리하고, Illumina HiSeq 2000 플랫폼에서 차세대 시퀀싱(NGS)(한국 마크로젠)을 사용하여 시퀀싱하였다. 이때, 야생형 대장균 MG1655 균주의 게놈(NCBI 번호 NC_000913.3)을 게놈 어셈블리를 위한 기준으로 사용하였다. 모든 돌연변이는 Sanger DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다.

[0061] 실험예 5. 세포 생존 능력 측정

[0062] LB broth 배지에서 하룻밤 동안 배양시킨 균주를 새로운 M9 최소배지로 2회 세척하였다. 그 후, 8×10^7 개 세포 수가 되도록 3 g/L의 노난산이 보충된 M9 최소배지를 사용하여 96-웰 플레이트에 재분주한 후, 37℃ 및 200 rpm 조건에서 30분 동안 배양하였다. 30분 후, 배양물을 연속적으로 희석하고, LB 한천 플레이트 상에 분주하였다. 37℃ 온도에서 하룻밤 동안 배양시킨 후 개별 콜로니를 계수하였다. 이어서, 콜로니 형성 단위(CFU)를 결정하였다. 모든 처리는 데이터 재현성을 보장하기 위해 3회 반복하여 수행하였다.

[0063] 실험예 6. RNA 시퀀싱

[0064] 4 g/L의 글루코스가 보충된 M9 최소배지에서 하룻밤 동안 배양시킨 균주를 1 g/L의 노난산이 보충된 새로운 M9 최소배지에서 1:25로 희석하여 접종하고, 37℃ 및 200 rpm 조건에서 배양하였다. RNA 샘플은 OD_{600} 이 0.5에 도달했을 때 배양물로부터 준비하였다. 균주로부터 RNA를 분리하기 위해, 먼저 RNeasy Protect Bacteria Reagent(Qiagen #76506)로 처리하여 RNA를 안정화시켰다. 그 후, rRNA의 제거를 위해, RiboZero Probes(Pan-prokaryote)(Epicenter BIOTECH)를 사용하였고, RNA Clean & Concentrator(Zymo Research R1013)를 통해 순수한 RNA를 얻었다. KAPA Stranded RNA-seq Library Preparation Kit(Roche KK8400)를 사용하여 RNA 라이브러리를 구축하고, Nextseq를 시퀀싱에 사용하였다. 시퀀싱 결과 파일을 Bowtie, samtools, cufflinks로 분석하고, metasplice로 시각화하였다. 유전자 발현을 $\log_2$ 배수 변화로 계산하였으며, 여기서 4배 이상($\log_2$ 척도에서는 2배)의 유전자 발현 변화가 유의한 것으로 간주되었다. 이때, GO(Gene Ontology) term 분석을 위해, GO Consortium(<http://geneontology.org/>) 및 PANTHER를 사용하였다.

[0065] 실험예 7. 생물변환(biotransformation)

[0066] 제조합 균주 또는 MRE 균주의 단일 콜로니를 5 ml의 LB broth 배지에 접종하고, 37℃ 및 200 rpm 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음 날, 배양된 균주를 400 ml의 LB broth 배지에 접종(1:100)하고, 0.7 내지 0.8의 OD_{600} 에서 0.1 mM 농도의 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 표적 유전자의 발현을 유도하였으며, 30℃ 및 200 rpm 조건에서 16시간 동안 배양하였다.

[0067] 그 후, 상기 균주를 4℃, 2,600 Xg 조건에서 15분 동안 원심 분리하고, 0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 7.4)에 재현탁시켰다. 상기 균주를 OD_{600} 이 35가 될 때까지 농축하여 사용하였다.

[0068] 생물변환은 디메틸 설펡사이드(DMSO) 중에 96%의 노난산 스톱 용액을 1 g/L의 최종 농도가 되도록 10 ml의 0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 7.4) 및 1 X 필터 살균된 미량 원소 용액(g/L: 2.4 g의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.3 g의 $CoCl_2 \cdot H_2O$, 0.15 g의 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 g의 $ZnCl_2$, 0.3 g의 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.075 g의 H_3BO_3 , 및 0.495 g의 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$)에 첨가하여 250 ml의 진탕 플라스크에서 수행하였다. 보조기질(co-substrate)인 0.4% 글리세롤을 보충하고, 30℃ 및 200 rpm 조건의 진탕기에서 수행하였다. 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC)를 이용한 산물 정량 및 확인을 위해 샘플을 서로 다른 시점에서 수집하였다.

[0069] **실험예 8. 산물 및 데이터 분석**

[0070] 노난디오산(nonanedioic acid, NDA)의 정량 및 확인을 위해, 500 μl 의 상층액을 50 μl 의 12 N 농도의 HCl과 50 μl 의 1 g/L농도의 노나테카노에이트(Sigma-Aldrich)에 첨가하였다.

[0071] 그 후, 500 μl 의 에틸 아세테이트 및 격렬한 볼텍싱을 이용하여 노난디오산을 2회 추출하였다. 원심분리한 후, 500 μl 의 유기층을 수집하고, 이를 100 μl 의 MeOH와 50 μl 의 트리메틸실릴-디아조메탄(Sigma-Aldrich)와 혼합하였다. 불꽃 이온화 검출기(FID)와 DB-5 컬럼(30 mX0.25mm, Agilent Technologies)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 7890A)를 사용하여 노난디오산 메틸 에스테르(NDAME)를 분석하였다.

[0072] 가스 크로마토그래피 분석 시 다음과 같은 조건으로 수행하였다:

[0073] 주입 부피, 2 μl ;

[0074] 분할 비가 1:10인 270℃의 주입구;

[0075] 검출기 온도, 300℃;

[0076] 운반 가스, N_2 ;

[0077] 유속, 0.82 ml min^{-1} ;

[0078] 오븐 온도, 60℃의 초기 온도에서 2분간 유지하고, 이어서 20℃ min^{-1} 로 180℃까지 승온하여 2분간 유지하고, 20℃ min^{-1} 로 300℃까지 승온하여 6분간 유지함.

[0079] 표적 화합물의 농도는 검량선($R^2 > 0.99$)을 사용하여 결정하였다.

[0080] **실시예 1. *fadR* 유전자가 결실된 대장균(MRD) 균주 제조 및 실험실 적응 진화**

[0081] 대장균의 *fadR* 유전자의 결실은 FadA, FadD, 및 FadE와 같은 관련 효소의 발현을 상향 조절하여 그의 β -산화 경로를 탈억제하는 바, 본 실시예에서는 *fadR* 유전자가 결실된 대장균인 MRD 균주를 실험실 적응 진화시켜 노난산을 유일 탄소원으로 사용하고 더 빠르게 성장하는 돌연변이체를 얻고자 하였다.

[0082] 구체적으로, MG1655 균주에서 *fadR* 유전자가 결실된 MRD 균주를 제조하기 위해, lambda-red recombination system과 및 FLP-매개 부위-특이 재조합 시스템(FLP-mediated site-specific recombination system)을 이용하였다. 구체적으로, *fadR* 유전자와 상동성 서열을 지니고 있는 프라이머(서열번호 1 및 2) 및 주형으로서 pKD13을 이용하여 kan 카세트를 PCR 증폭하였다. lambda Red 재조합 시스템을 이용하여 pSIM5로부터 발현시킨 후, 상동성 재조합을 통해 *fadR* 유전자를 kan 카세트에 치환하여 결실시켰다. 이후, pCP20를 이용하여 치환된 kan 카세트를 F1p-FRT 재조합으로 제거하였다.

[0083] 상기 실험예 2 및 실험예 3에 기재된 바와 같이, 3 g/L의 노난산이 보충된 M9 최소배지에서 MRD 균주를 반복적으로 계대 배양함으로써 실험실 적응 진화시켰다. 구체적으로, 30회의 반복적인 계대배양(90일) 후, 10개의 단일 적응 균주(C1 내지 C10)를 무작위로 분리하였다. 상기 분리한 C1 내지 C10 균주를 실험예 5의 방법으로 3 g/L의 노난산에서의 성장 정도를 확인하였다. 이때, 대조군으로서 야생형 대장균(WT) 및 실험실 적응 진화에 적용되지 않은 MRD를 사용하였다.

[0084] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, C6(이하 MRE 균주) 균주가 10개의 균주 중에서 가장 빠른 성장을 보였다. MRE 균주는 야생형 대장균 및 MRD 균주에 비해 성장능이 크게 향상되었으며, 특히, 배양 120시간째에 OD_{600} 이 2.7에 도달하였다. 또한, 상기 야생형 대장균, MRD 균주 및 MRE 균주에 대해 3 g/L의 노난산에서의 성장 정도를 추가 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 30회의 반복적인 계대배양 후, MRE 균주는 배양 72시간만에 OD_{600} 이 1.5에 도달하였다. 반면에, 야생형 대장균과 MRD 균주는 모두 배양 120시간째까지 전혀 성장하지 못하는 것을 확인하였다. 이는 대장균 균주의 성장이 노난산에 의해 저해되었음을 암시한다.

[0085] 이를 통해, *fadR* 유전자가 결실된 MRD 균주를 실험실 적응 진화시켜 노난산 존재하에서도 빠르게 성장하는 MRE 균주를 수득하였다.

[0086] **실시예 2. MRE 균주의 돌연변이 확인**

[0087] MRE 균주에서 발생한 임의의 돌연변이를 확인하기 위해 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing,

NGS)를 수행하였다.

[0088] 그 결과, MRE 균주는 MRD 균주와 비교하여 6개의 돌연변이가 발생한 것을 확인하였다. 각 돌연변이의 정보를 하기 표 3에 나타내었다. 모든 돌연변이는 Sanger DNA 시퀀싱을 이용하여 확인하였다.

표 3

유전자	유전자 산물	서열 변화 ^a	단백질 및 뉴클레오타이드 변화 ^b
<i>acrR</i>	HTH-타입 전사 조절 인자 AcrR	ΔA	코딩(567/648 nt)
<i>crp/yhfA</i>	cAMP-활성화 광역 전사 조절 인자 CRP/OsmC 패밀리 단백질 YhfA	IS5(-)	비-코딩(-177 nt)/(-126 nt)
<i>dppA</i>	주변세포질 디펩타이드 수송 단백질	IS5(-)	코딩(1570-1573/1608 nt)
<i>fadD</i>	장쇄 지방산-CoA 리가제	C→A & G→A	비-코딩(-111 nt) & (-115 nt)
<i>icd-icdC</i>	e14 프로파지	큰 DEL	(1-15,204/15,204 nt)
<i>yeaR</i>	기능이 알려지지 않은 단백질	IS186(-)	코딩(115-120/360 nt)

[0090] DEL, 결실

[0091] ^a (-), NCBI에서 이용 가능한 MG1655의 서열(NC_000913.3)에 대해 음성됨.

[0092] ^b 비-코딩 영역에서의 돌연변이는 인접 유전자들의 시작 코돈(들)의 업스트림에 있는 위치에 의해 주석이 추가됨

[0093] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, *acrR* 유전자의 염기서열의 567번째 위치에서의 아데노신(A)이 결실된 것을 확인하였다. 상기 결실은 26개의 후속 아미노산을 53개의 상이한 아미노산으로 변경시켰다.

[0094] 또한, MRE 균주의 CRP-cAMP 조절에서 다음과 같은 2개의 돌연변이가 발생하였다: (1) *crp*와 *yhfA*의 유전자간 영역으로의 IS5의 삽입(P_{crp*}); (2) *fadD* 프로모터의 CRP-cAMP 결합 부위에서의 2개의 뉴클레오타이드 변화(P_{fadD*}).

[0095] 나아가, MRE 균주에서 다음과 같은 2개의 추가의 이동성 요소 삽입 돌연변이가 있었다: (1) 주변세포질 결합 단백질 유전자인 *dppA* 유전자의 정지 코돈으로부터 위쪽 30번째 위치에서의 IS5 삽입; (2) 주석이 없는(unannotated) 유전자 *yeaR*의 115번째 뉴클레오타이드에서의 IS186 삽입. 상기 IS5 삽입은 *dppABCD* 오페론의 중간에서 발생하여, *dppA* 프로모터로부터의 그의 전사 개시를 변경시켰다.

[0096] 마지막으로, 15.2 kbp의 은닉성 프로파지 요소(cryptic prophage element) e14 프로파지가 MRE 균주에서 결실된 것을 확인하였다.

[0097] 실시예 3. 돌연변이에 따른 노란산에서의 성장능 및 노난디오산의 생산능 비교

[0098] 실시예 2에서 확인된 돌연변이가 노란산에서의 MRE 균주의 성장에 기여하는지 분석하기 위해, 각각의 단일 돌연변이를 야생형 유전자로 복원시킨 MRE 균주 유래의 재조합 균주를 실험예 5의 방법으로 세포 성장을 분석하였다(도 3a).

[0099] 구체적으로, 각각의 단일 돌연변이를 야생형 유전자로 복원시킨 MRE 균주 유래의 재조합 균주를 제조하기 위해, lambda-red 재조합 시스템과 tetA 이중 선별 시스템(doi: 10.1371/journal.pone.0181501 참고)을 이용하였다. 구체적으로, *acrR*, *fadD*, *dppA*, *crp*, *yeaR* 유전자의 돌연변이가 바깥으로 상동성 서열을 지니고 있는 프라이머 및 주형으로 P3-BCD2-tetA를 이용하여 tetA 카세트를 PCR 증폭하였다. 사용한 각 유전자의 프라이머는 *acrR* 프라이머(서열번호 13 및 14), *fadD* 프라이머(서열번호 11 및 12), *dppA* 프라이머(서열번호 32 및 33), *crp* 프라이머(서열번호 28 및 29), *yeaR* 프라이머(서열번호 24 및 25)와 같다. lambda Red 재조합 시스템을 이용하여 pSIM5로부터 발현시킨 후, 상동성 재조합을 통해 상기 돌연변이들을 tetA 카세트로 치환하였다. 이후, lambda Red 재조합 시스템을 이용하여 야생형 서열을 가진 oligo 또는 카세트로 치환하였다. 사용한 각 유전자의 oligo는 *acrR* oligo(서열번호 16), *fadD* oligo(서열번호 10)이고 카세트 증폭시키기 위한 프라이머는 *dppA* 프라이머(서열번호 34 및 35), *crp* 프라이머(서열번호 30 및 31), *yeaR* 프라이머(서열번호 26 및 27)와 같다. 야생형로 치환된 대장균은 니켈을 사용하여 선별하였다.

[0100] 그 결과, P_{fadD*} 돌연변이가 노란산에서의 MRE 성장에 중요한 것을 확인하였다. P_{fadD*} 돌연변이가 MRE 균주에서 복원된 MRE-Pf 균주는 노란산에서 최종 OD₆₀₀이 0.1을 초과하여 성장하지 못했다. 반대로, P_{fadD*} 돌연변이를 MRD 균

주에 도입시킨 MRD-Pf 균주는 최종 OD₆₀₀이 1.0까지 도달하였다.

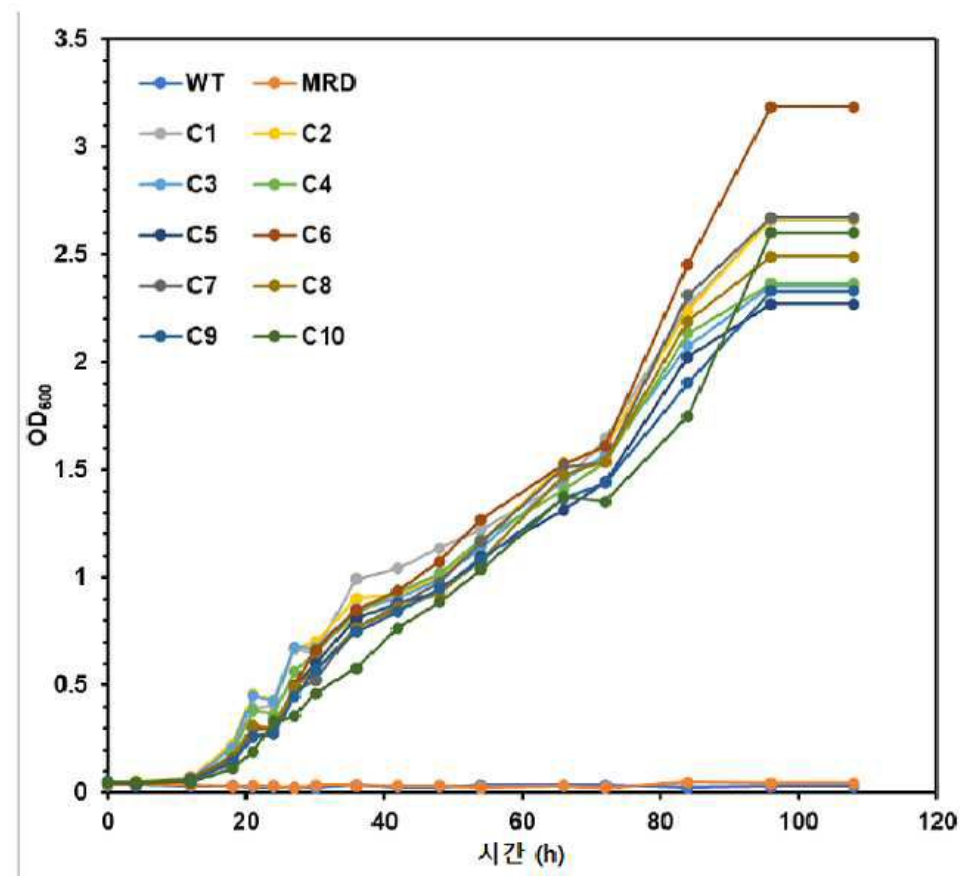
- [0101] 또한, MRE-a 균주 및 MRE-d 균주의 성장 곡선에 기초하여, *acrR* 및 *dppA* 돌연변이도 노란산에서의 MRE 균주의 성장에 기여하는 것을 확인하였다. *acrR** 돌연변이가 MRE 균주에서 복원된 MRE-a 균주 및 *dppA** 돌연변이가 MRE 균주에서 복원된 MRE-d 균주는 노란산에서 120시간째에 MRE 균주의 성장을 각각 59% 및 82%로 감소시켰다. 독성 내성 및 유리한 막 수송과 같은 다른 요인이 노란산에서의 균주 성장에 유익하다는 것을 확인하였다.
- [0102] 이를 통해, P_{fadD}* 돌연변이가 노란산에서의 균주의 성장에 중요한 돌연변이인 한편, 다른 돌연변이들도 MRE 균주의 성장에 부분적으로 기여할 수 있음을 확인하였다.
- [0103] 한편, MRE 균주의 노란산 독성 내성 관련 돌연변이를 확인하기 위해, MRD 균주에 각각의 단일 돌연변이를 도입시킨 균주를 제조하여 30분간 3 g/L의 노란산에서 배양시킨 후 콜로니 형성 단위(CFU)를 계수하여 세포 생존 능력을 평가하였다(도 3b).
- [0104] 구체적으로, 각각의 단일 돌연변이를 도입한 MRD 균주 유래의 재조합 균주를 제조하기 위해, lambda-red 재조합 시스템과 tetA 이중 선별 시스템(doi: 10.1371/journal.pone.0181501 참고)을 이용하였다. 구체적으로, *acrR*, *fadD*, *dppA*, *crp*, *yeaR*, e-프로파지의 돌연변이가 일어났던 위치 바깥으로 상동성 서열을 지니고 있는 프라이머 및 주형으로 P3-BCD2-tetA를 이용하여 tetA 카세트를 PCR 증폭하였다. 사용한 각 유전자의 프라이머는 *acrR* 프라이머(서열번호 13 및 14), *fadD* 프라이머(서열번호 11 및 12), *dppA* 프라이머(서열번호 32 및 33), *crp* 프라이머(서열번호 28 및 29), *yeaR* 프라이머(서열번호 24 및 25), *icd-icdC* 프라이머(서열번호 19 및 20)와 같다. lambda Red 재조합 시스템을 이용하여 pSIM5로부터 발현시킨 후, 상동성 재조합을 통해 상기 돌연변이들을 tetA 카세트로 치환하였다. 이후, lambda Red 재조합 시스템을 이용하여 돌연변이 서열을 가진 oligo 또는 카세트 증폭시키기 위한 프라이머는 *dppA* 프라이머(서열번호 34 및 35), *crp* 프라이머(서열번호 30 및 31), *yeaR* 프라이머(서열번호 26 및 27)와 같다. 돌연변이로 치환된 대장균은 nickel을 사용하여 선별하였다.
- [0105] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, MRD 균주에 *acrR* 돌연변이를 도입시킨 MRD-a 균주의 생존율은 MRD 균주에 비해 2.8배 증가하였다. 또한, MRD 균주에 P_{fadD}* 돌연변이를 도입시킨 MRD-Pf 균주는 MRD 균주보다 3.3배 더 높은 생존율을 보였다.
- [0106] 또한, MRD 균주의 e14 프로파지를 코딩하는 유전자를 결실시킨 MRD-e 균주는 은닉성 프로파지와 산성 스트레스 또는 과산화수소 스트레스와 같은 스트레스에 대한 균주의 반응과 밀접한 관계로 인해, 약간 증가된 노란산 독성 내성을 나타내었다.
- [0107] 이를 통해, 실험실 적응 진화가 지방산 대사를 향상 시킬 뿐만 아니라 노란산에 대한 독성 내성을 획득하도록 진행되었음을 확인하였다.
- [0108] **실시예 4. MRE 균주를 이용한 노난디오산 생산**
- [0109] MRE 균주를 이용하여 노난산으로부터 노난디오산을 생산하기 위해, β-산화 경로에 의한 노난산 분해를 방지하도록 MRE 균주에서 아실-CoA 탈수소효소 유전자(*fadE*)를 결실시킨 후에 생물변환하였다. 상기 *fadE* 유전자가 결실된 균주는 프라이머(서열번호 5 및 6)를 이용하여 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [0110] 또한, *P. putida* GPo1 유래의 AlkBGT 시스템을 이용하게 위해 *alkBGT* 유전자를 pBbA6c 플라스미드 상에서 P_{LlacO-1} 프로모터의 제어하에 발현시키고, 이를 *fade* 유전자가 결실된 MRE 균주 및 MRD 균주에 도입하여 각각 MRE-BGT 균주 및 MRD-BGT 균주를 제조하였다. 노난디오산의 생물변환은 하기 균주들을 사용하여 수행하였다: MRE-BGT, MRD-BGT, 및 MRD-EB(모든 6개의 MRE 돌연변이가 도입된 MRD-BGT). 상기 MRD-EB 균주는 MRE 균주의 *acrR**, *PfadD**, *dppA**, *crp**, e-프로파지* 및 *yeaR** 돌연변이 유전자를 모두 실시예 3과 동일한 방법으로 도입시켜 제조하였다.
- [0111] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, MRE-BGT 균주는 24시간째에 221 mg/L의 노난디오산을 생산하였으며, 이는 MRD-BGT 균주의 생산량(17.3 mg/L)보다 12.8배 더 높은 것을 확인하였다. 또한, MRD-EB 균주의 노난디오산 생산량은 MRE-BGT 균주와 비슷하였으며, 이로부터 도입된 돌연변이(모든 6개의 MRE 돌연변이)가 균주로 하여금 노난디오산의 생산량을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0112] 또한, 노난디오산 생산과 관련된 돌연변이를 분석하기 위해, 실시예 3의 MRD 균주 유래 돌연변이 균주의 *fade*

유전자를 결실시킨 후, 플라스미드 pBbA6c-*alkBGT*로 형질전환시켰다. 생성된 균주들의 노난디오산 생산량을 비교 분석하였다(도 4b).

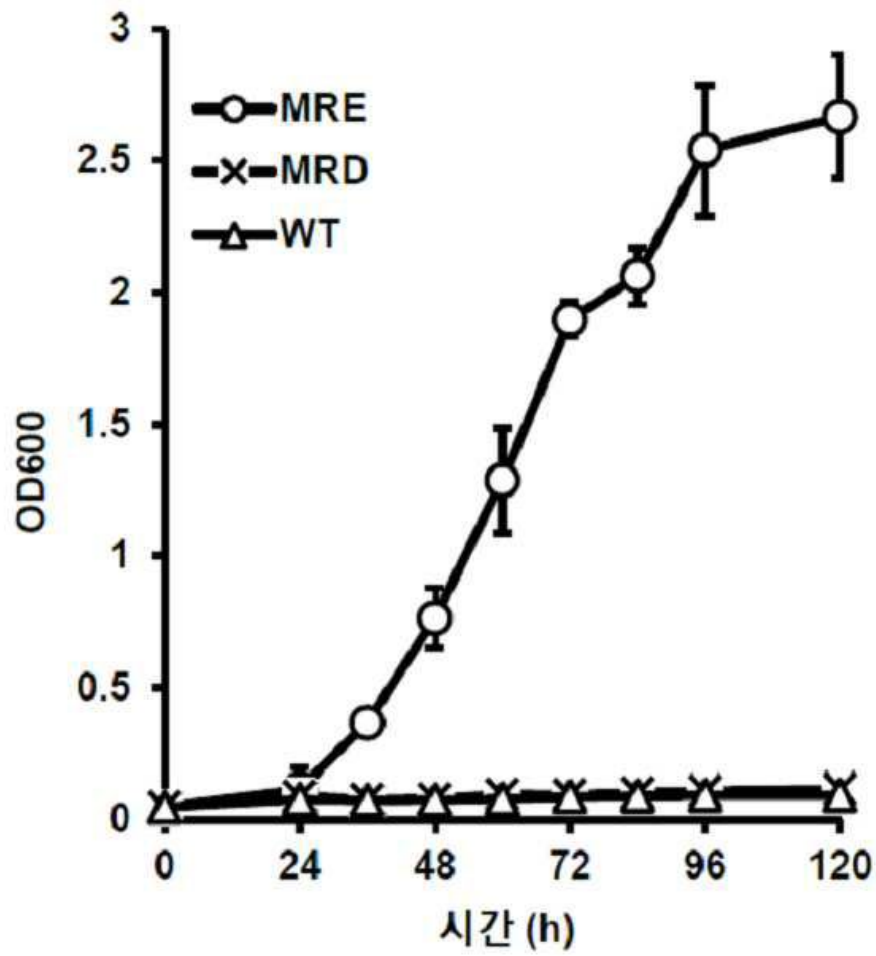
[0113] 그 결과, 각각의 단일 돌연변이를 도입시킨 균주(MRD-PcFB, MRD-eFB, MRD-dFB, MRD-PfFB, MRD-aFB 및 MRD-yFB)는 MRD-BGT 균주에 비해 노난디오산 생산량이 모두 유의미하게 증가하였다. 특히, 각각의 단일 돌연변이를 도입시킨 균주들 중에서, P_{crp^*} (*crp* 프로모터 돌연변이) 돌연변이가 도입된 MRD-PcFB 균주의 노난디오산 생산량이 MRE-BGT 균주의 노난디오산 생산량의 68.6% 정도로 크게 증가하였고, 이를 통해, P_{crp^*} 돌연변이가 노난디오산 생산에 중요한 것을 확인하였다.

도면

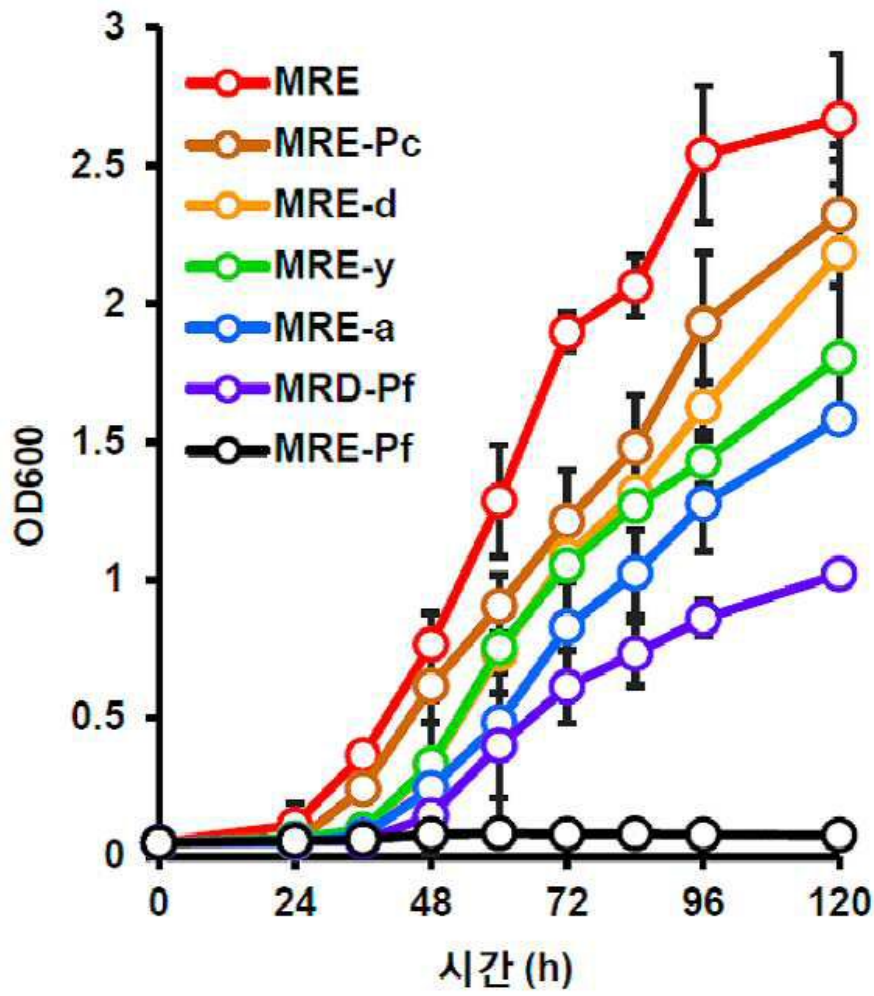
도면1



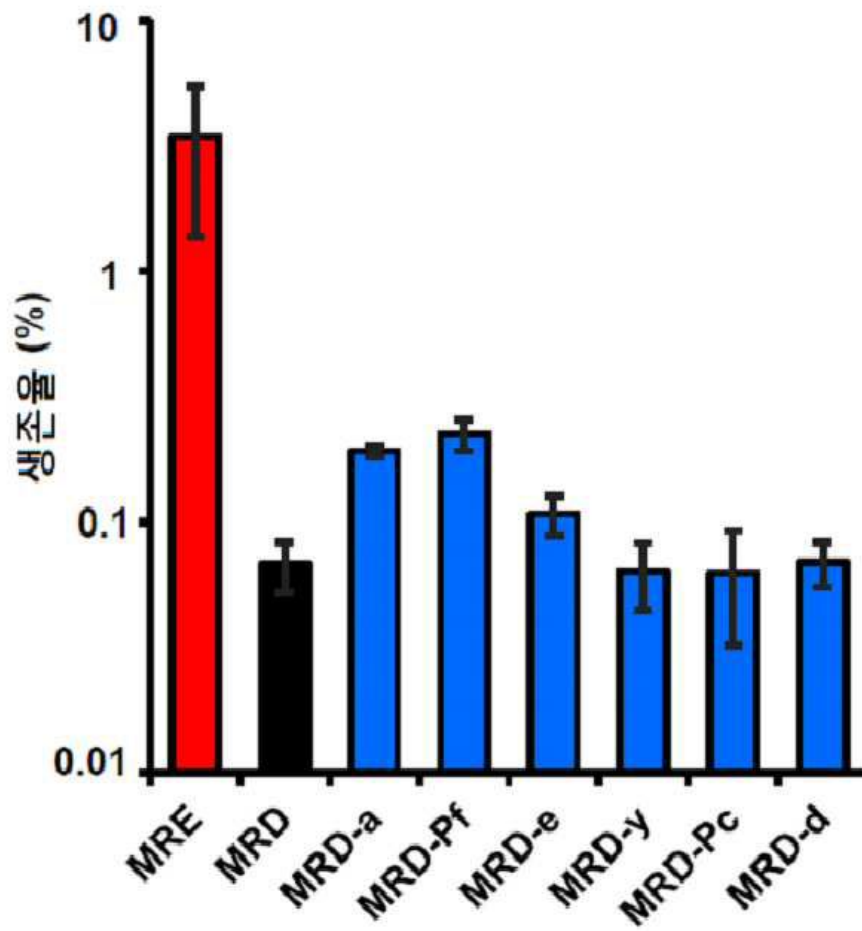
도면2



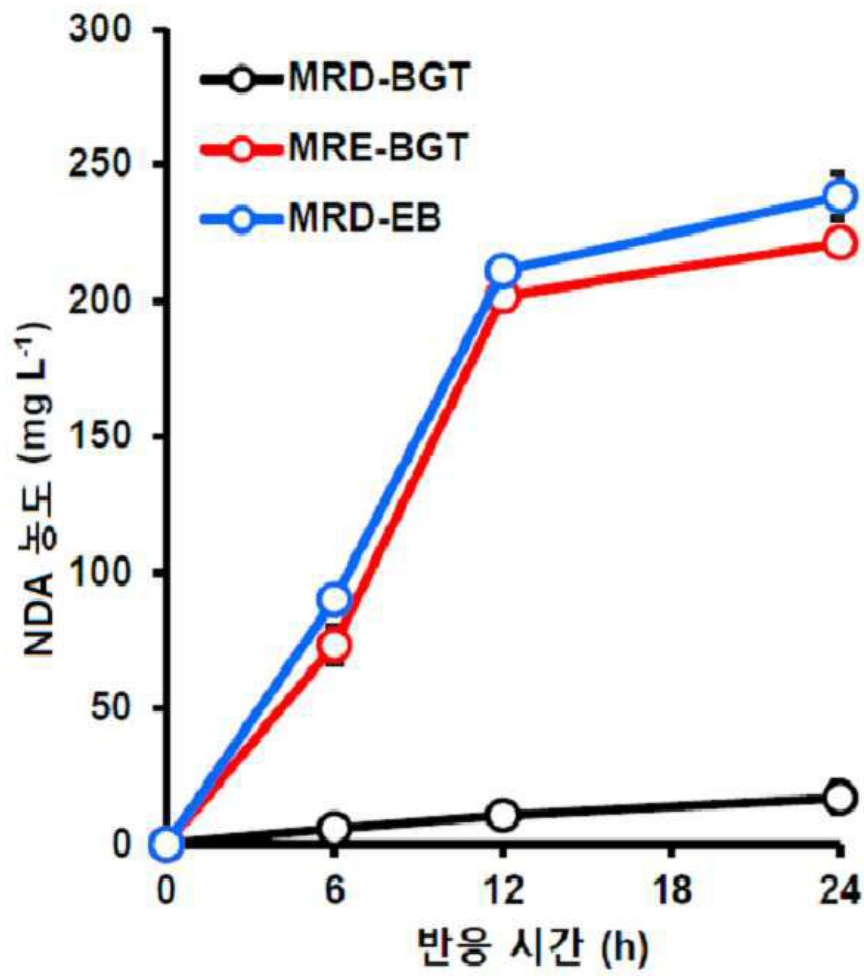
도면3a



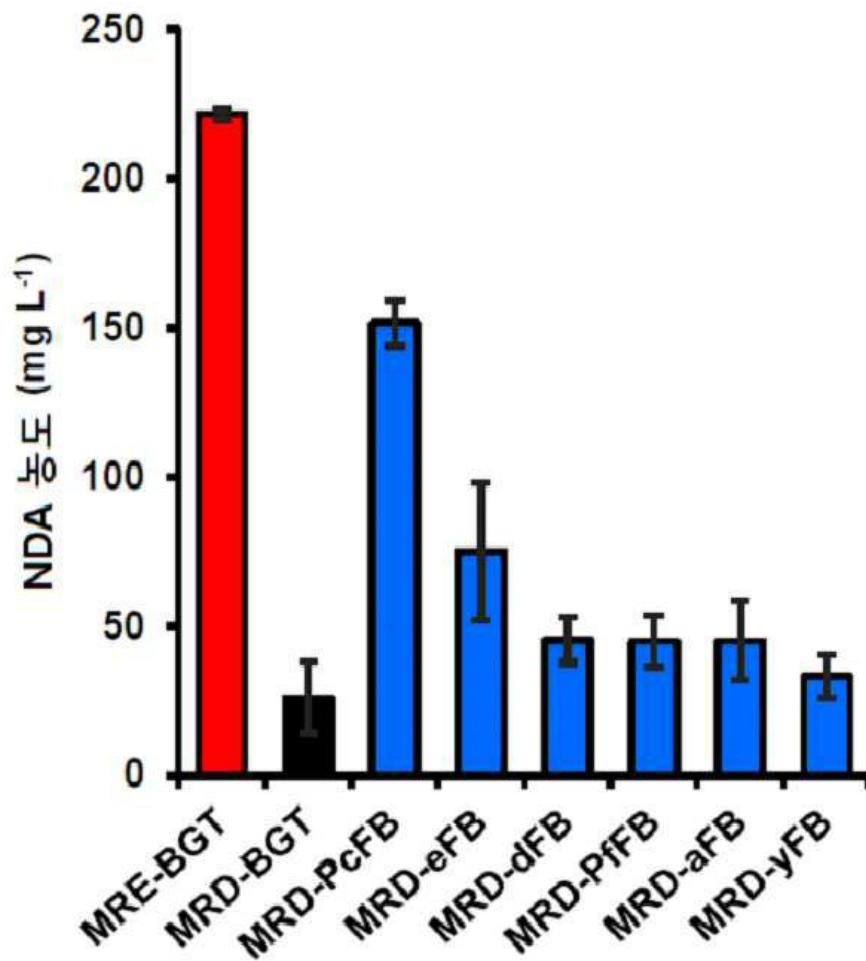
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- <120> TRANSFORMED MICROORGANISM PRODUCING NONANEDIOIC ACID AND A METHOD FOR PRODUCING NONANEDIOIC ACID USING THE SAME
- <130> FPD/202012-0001
- <160> 54
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 70
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> nucleotide sequence for primer_fadR del H1 F
- <400> 1
- tctggatatga tgagtcacaac ttgtttttgc tgtgttatgg aaatctcact gtgtaggctg

gagctgcttc	70
<210> 2	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for primer_fadR del H2 R	
<400> 2	
aacaacaaaa aaccctcgt ttgaggggtt tgctctttaa acggaaggga attccgggga	60
tccgtcgacc	70
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for primer_fadR seq F	
<400> 3	
gggcgagttt gtaccagtcg g	21
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for primer_fadR seq R	
<400> 4	
gcgcggcgac cgttcgctg	19
<210> 5	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for primer_fadE del H1 F	
<400> 5	
ccatacatc acaagtggtc agacctcta caagtaaggg gcttttcgtt gtgtaggctg	60
gagctgcttc	70
<210> 6	

<211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_fadE del H2 R
 <400> 6
 ttacgcggt tcaactttcc gcactttctc cggcaacttt accggcttcg attccgggga 60
 tccgtcgacc 70
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_fadE seq F
 <400> 7
 aaaagttagc cagcgtttcc gccgc 25

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_fadE seq R
 <400> 8
 acgttgggag atgagacgta tcagg 25
 <210> 9
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_PfadD* MAGE Oligo
 <400> 9
 atattaactc atcataccag cttgataatt acccaacgaa aagtttgtga agcgcgtcac 60
 tatttatatt tatctttacc gtaagaatgc 90

 <210> 10
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PfadD back

<400> 10

atattaactc atcataccag cttgataatt acccaacgaa aaggttgca agcgcgtcac 60

tatttatatt taictttacc gtaagaatgc 90

<210> 11

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PfadD* tetA H1P1 F

<400> 11

ctgtttctgc attcttacgg taaagataaa aataaatagt gacgcgcttc gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 12

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PfadD* tetA H2P4 R

<400> 12

taacataata ttaactcatc ataccagctt gataattacc caacgaaaag attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 13

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR tetA H1P1 F

<400> 13

cggcctgatg gaaaactggc tctttgcccc gcaatctttt gatcttaaaa gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 14

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR tetA H2P4 R

<400> 14
ggcacaggag atacatctcc agtaagatgg caacgtaatc gcgggcttct attccgggga 60
tccgtcgacc 70

<210> 15
<211> 90
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR* MAGE Oligo

<400> 15
gagatacatc tccagtaaga tggcaacgta atcgcgggct tctttttaag atcaaaagat 60
tgcggggcaa agagccagtt ttccatcagg 90

<210> 16
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR back

<400> 16
atattaactc atcataccag cttgataatt acccaacgaa aaggttgcca agcgcgtcac 60
tatttatatt tatctttacc gtaagaatgc 90

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR seq F

<400> 17
cctgttaggg ctaagctgcc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer_acrR seq R

<400> 18
cgccgtgttc tggcataaca 20

<210> 19
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_e14 H1-P4

<400> 19
 aaagtaaadc ctggctctat tattctctcc gctgagatga tgctgcgcca attccgggga 60
 tccgtcgacc 70

<210> 20
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_e14 H2-P1

<400> 20
 cgccctccat acctttaaca atcaggtcag ccgcttcagt ccaacccata gtgtaggctg 60
 gagctgcttc g 71

<210> 21
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_e14 MAGE oligo

<400> 21
 tccatacctt taacaatcag gtcagccgct tcagtccaac ccatatggcg cagcatcatc 60
 tcagcggaga gaataataga gccaggattt 90

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_e14 seq F

<400> 22
 gtaattcccc tgtcttcagg 20

<210> 23

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_e14 seq R
 <400> 23
 aacaacgggc gtgtatac 20
 <210> 24
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_yeaR H1-P4
 <400> 24
 cacctgccgg aatattcgaa cgtcatcttg ataaaggaac gcgcccgggg attccgggga 60
 tccgtcgacc 70
 <210> 25
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_yeaR H2-P1
 <400> 25
 tcagcgtagc cgagatatTT gaccgccccca tgcataacgg aaaggcgtgg gtgtaggctg 60
 gagctgcttc g 71
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_yeaR IS186 FP
 <400> 26
 cacctgccgg aatattcgaa 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_yeaR IS186 RP

<400> 27

tcagcgtagc cgagatatTT 20

<210> 28

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PyhfA/crp H1-P4

<400> 28

cctgggtcat gctgaagcga gacaccagga gacacaaagc gaaagctatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 29

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PyhfA/crp H2-P1

<400> 29

ctttgcatac atgcagtaca tcaatgtatt actgtagcat cctgactgtt gtgtaggctg 60

gagctgcttc g 71

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PyhfA/crp IS5 FP

<400> 30

cctgggtcat gctgaagcga 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PyhfA/crp IS5 RP

<400> 31

ctttgcatac atgcagtaca 20

<210> 32
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_dppA H1-P4
 <400> 32
 ccgtgtttga accggtacgt aaagaagtta aaggctatgt ggttgatcca attccgggga 60
 tccgtcgacc 70

<210> 33
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_dppA H2-P1
 <400> 33
 ttgtatggct ttttaattatt cgatagagac gttttcgaag tgatgtttgc gtgtaggctg 60
 gagctgcttc g 71

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_dppA IS5 FP
 <400> 34
 ccgtgtttga accggtacgt 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_dppA IS5 RP
 <400> 35
 ttgtatggct ttttaattatt 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_dppA IS5 seq FP

<400> 36

gcctctgaac aaggctccaa 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_dppA IS5 seq RP

<400> 37

acagcgccac cgggtatataca 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_Pyhfa/crp IS5 seq FP

<400> 38

ttatcgctg agttgccgtc 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_Pyhfa/crp IS5 seq RP

<400> 39

aaccattcga gagtgggtc 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_yeaR IS186 seq FP

<400> 40

cttcgctgat atgggtgctaa 20

<210> 41

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nucleotide sequence for primer_yeaR IS186 seq RP	
<400>	41	
ctttccgttg ttgcgcacct		20
<210>	42	
<211>	648	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nucleotide sequence for acrR	
<400>	42	
atggcacgaa aaaccaaaca agaagcgcaa gaaacgcgcc aacacatcct cgatgtggct		60
ctacgtcttt tctcacagca gggggatatca tccacctcgc tgggcgagat tgcaaaagca		120
gctggcggtta cgcgcgggtgc aatctactgg catTTTaaag acaagtcgga ttgttcagt		180
gagatctggg aactgtcaga atccaatatt ggtgaactag agcttgagta tcaggcaaaa		240
ttccctggcg atccactctc agtattaaga gagatattaa ttcattgttct tgaatccacg		300
gtgacagaag aacggcgctc attattgatg gagattatat tccacaaatg cgaatttgct		360
ggagaaatgg ctgttgtgca acaggcaciaa cgtaatctct gtctggaaag ttatgaccgt		420
atagaacaaa cgTTaaaca ttgtattgaa gcgaaaatgt tgcctgcgga tTTaatgacg		480
cgtcgcgag caattattat gcgcggctat atttccggcc tgatggaaaa ctggctcttt		540
gccccgcaat cttttgatct taaaaaagaa gccgcgatt acgttgccat cttactggag		600
atgtatctcc tgtgccccac gcttcgtaat cctgccacta acgaataa		648
<210>	43	
<211>	204	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nucleotide sequence for fadD/yeaY intergenic region	
<400>	43	
ttgcttgttt ttaaagaaaa agaaacagcg gctgggtccgc tgtttctgca ttcttacggt		60
aaagataaaa ataaatagtg acgcgcttcg caaccttttc gttgggtaat tatcaagctg		120
glatgatgag ttaatattat gttaacggca tgtatatcat ttggggttgc gatgacgacg		180

aacacgcatt ttagaggatg agaa 204

<210> 44

<211> 1608

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> nucleotide sequence for dppA

<400> 44

atgcgtattt ccttgaaaaa gtcagggatg ctgaagcttg gtctcagcct ggtggctatg 60

accgtcgag caagtgttca ggctaaaact ctggtttatt gctcagaagg atctccggaa 120

gggtttaacc cgcagctgtt tacctccggc accacctatg acgcctcttc cgtcccgtt 180

tataaccgtc tggttgaatt taaaatcggc accaccgaag tgatcccggg cctcgtgaa 240

aagtgggaag tcagcgaaga cggtaaaacc tataccttcc atctcgtaa aggtgtgaag 300

tggcagcaca ataaagaatt caaacgcagc cgtgaactga acgccgatga tgtggtgttc 360

tcgttcgac gtcagaaaaa cgcgcaaac ccgtaccata aagtttctgg cggcagctac 420

gaatacttcg aaggcatggg ctgcccagag ctgatcagtg aagtgaataa ggtggacgac 480

aacaccgttc agtttgtgt gactcgcccg gaagcgccgt tcctcgtga cctggcaatg 540

gacttcgct ctattctgtc aaaagaatat gctgatcgga tgatgaaagc cggtaacacg 600

gaaaaactgg acctcaacc aatcggaacc ggtccgttcc agttacagca gtatcaaaaa 660

gattcccgt tccgtacaa agcgtttgat ggctactggg gcaccaaacc gcagatcgat 720

acgtgggtt tcctattac ccctgacgt tccgtgcgtt acgcgaaatt gcagaagaat 780

gaatgccagg tgatgccga cccgaaccg gcagatatcg ctgcgatga gcaggataaa 840

tccatcaatc tgatggaat gccgggctg aacgtcggtt atctctcgta taacgtgcag 900

aaaaaacac tcgatgacgt gaaagttgc caggctctga cctacgcgt gaacaaagac 960

gcgatcatc aagcggttta tcagggcgcg ggcgtatcag cgaataacat gatcccgca 1020

accatgtgg gctataacga cgacgttcag gactacacct acgatcctga aaaagcgaaa 1080

gccttgctga aagaagcggg tctggaaaaa ggtttctcca tcgacctgt ggcgatgccg 1140

gtacaacgtc cgtataacc gaacgtcgc cgcgtggcgg agatgattca ggcagactgg 1200

gcgaaagtgc gcgtgcaggc caaaattgtc acctacgaat ggggtgagta cctcaagcgt 1260

gcgaaagatg gcgagcacca gacgtaatg atgggctgga ctggcgataa cggggatccg 1320

gataacttct tcgccacct gttagctgc gccgcctctg aacaaggctc caactactca 1380

aatggtgct acaaaccgtt tgaagatctg attcaaccgg cgcgtgttac cgacgaccac 1440

aataaacgcg ttgaactgta caaacaagcg caggtaggtga tgcacgatca ggctccggca 1500
ctgatcatcg ctactccac cgtgtttgaa ccggtacgta aagaagttaa aggctatgtg 1560
gttgatccat taggcaaaca tcaattcgaa aacgtctcta tcgaataa 1608

<210> 45

<211> 301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for yhfA/crp intergenic region

<400> 45

ttttgtact ccactgctc aattttctg acagagtacg cgtactaacc aaatcgcgca 60
acggaaggcg acctgggtca tgctgaagcg agacaccagg agacacaaag cgaaagctat 120
gctaaaacag tcaggatgct acagtaatac attgatgtac tgcatgtatg caaaggacgt 180
cacattaccg tgcagtacag ttgatagccc cttcccaggt agcgggaagc atatttcggc 240
aatccagaga cagcggcggtt atctggctct ggagaaagct tataacagag gataaccgcg 300

c 301

<210> 46

<211> 15204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for icd-icdC

<400> 46

catgggttgg accgaagcgg ctgacttaat tgttaaaggt atggaaggcg caatcaacgc 60
gaaaaccgta acctatgact tcgagcgtct gatggatggc gctaaactgc tgaaatgttc 120
agagtttggg gacgcgatca tcgaaaacat gtaatgccgt agtttggtta atttattaac 180
gggagcgtaa cgctcccggt gttttttgtt aggctgctaa cggttatcaa aattttatca 240

aaaaaagtta tcaaaacccc tcggtagttt tgggtaggc tggccggtca ggtggtagtt 300

ctactactag tctcccat agatattcct tagcttttta ttattgctgg cggacgctcg 360

ttaatattha aggtcttcat tgattaagac atcccaaag ttagttatgt attcactgtt 420

attaggacaa ttatgaatta ccactcctta caccgcgtca aatattgtta aattgccggt 480

tttgtatcaa ctactaccc gggactcgcc aggggacagc caacaggcat tgggtgcaat 540

caccttagcg ttcaggta tgcggaatgt aaaaaaggcc gcgagcgcg ccccttcaca 600

tacatcttta gtactgagac tgtttaacct agggaattat tatcgtatta tattgcatta	660
caactcccaa cagtgacata tgaacttcct gctttactcc acgactttaa tatttcaagg	720
ccatgtgaag aacatatttc ttgcactgcg agttcatcga gtaatccata gtaagaaaca	780
ctttttgaat ttttgtaaat gtatccgtaa agatgttttc ttcctgtttc gtattttttg	840
aagtatgagc ttttatattg atttacaata agagtctcac ctctgattt tagtaatctc	900
ttgatgctaa gaactatttt gtcgattgta tcccgacaag gaacggcaga gagaacatta	960
gagcaaagga tgaatcgta accccaatt attttgcga catcctcgaa agcaactgta	1020
tttgcatttt tataatatcg tgggacatag tcaataattt tagttttaat tcctctaata	1080
atttgcctc tticaagttg ccttttcgag tctagaaaag taacttcac aaatttactg	1140
attaattcat cagaatatct aagttttccg cagccaaaat caagggcgtg gccatttttc	1200
tcaatgcttc taatatactc gcaaagatat ctgagaggca tcgtatgagg ttttgcgca	1260
ttctctgagc gaatattaac tccgtgcata ttatagtcca aagcaagtac cattcaatta	1320
atgttatttt tagtgaaaaa ttcttttatt ttatcgccg ggatttttcc gacttgactt	1380
tcagttctgg gcttaactgt caaagcaaag ataataccac tactgagaa tgataaaatt	1440
acaaaaaga ataaagacag caaagaacct tcaacatgaa aaatatccat ttgtttgcaa	1500
aaaaagatta ttaggaagga aattaatgca attatcgaat attcaaaaaa tatccaaaaa	1560
tagtatactt tattccagaa gaggccaata taatgtttgt cttcaatttt tcttacttca	1620
gggtaataata gattgctcat tacattgtga gcttcatctt tatttaattt tctgttgact	1680
ccagctctcc gtgataacgg ttttataatt agatgcttat cccaaagata tcgcacccga	1740
agtagtttgg ctgcatgttt atgtaggtct aacgcaccgc taattaaata tgcaaaaatc	1800
gcaaaagcac aaggtaatat accaaaagat agtgcccaat taataaagct ctcatgatct	1860
ttaataggtg ggacatactt gggttggaat gttattaaag ggatgtattc gtaaataact	1920
agaagtatgc aatatattag cgtatttaag aaagttgctt tatgaagttt aggcaacatt	1980
tcattataat ttttgggggg ttccaacata ttattcacct gattcacgct ttaggatagt	2040
glaatggtaa tatttaatta agtgcattta tatacttttc agtaggttag ttacaatttt	2100
ttgtatctgt tcaggctgac ctactttcgc tgacagacaa tattgtgac agtagcacgt	2160
atcgaggagg agtagcgcta caaatttgac gctgggtgag aatctgaaat tgatagaaat	2220
gaaataatga aataatgaaa tgatgaaatg atgaaatgat gaaatgatga aatgatgaaa	2280
tgatgacaga gtgtccagtg ggcacggatg gtgtcttac acatgcttac cttaatcggt	2340

cccagtgatgc ctatagcaga tattctaaac atgtcgataa ttcattacgc ataatgtatc	2400
gaacatagaa aaaactgaag attcatctta tttgtatat actacctagc ccaacaatgt	2460
agaggttaac gaaaaatgcg ctcaccaatt tgtcatcttt tctcagcaat taattcatca	2520
ccatttaaga ttgcaccaga gaaggagcaa gatcttaaaa cgatagtga cgacaaaaaa	2580
attataattt cagttgtgag tgaacctggt tttaatatcc gattcaggaa gaatgagagt	2640
aataattcac atgaaatagt tctaacagta gcttacttg aatatattg ggcattttcc	2700
aatttctttt gggtttttac gcaagagtac tccaaatctc agaaaaataa tgatgagcac	2760
tttgatttaa caggaaaaaa taggcttaaa aagtctgatg aacttcttaa atgggcaagg	2820
aaaaacttgc aaacaacagg ttgcgaatca tggcctaaaa aatgtcccaa gccagaagca	2880
tatttacaag gaagcgaaga ctcacaagt tctagcgaga ttttctttg tgctattgct	2940
tggattcttc atcatgaaat aagtcatgtt gttttacagc atccattggt cactacagca	3000
ttctccactc aagaggagcg tgaagcagat tcacatgcta caaaatggat attaggcaac	3060
ctgtatgaat ccgtcctga attaaagaaa cgtgcacttg gattgctac ggcagtgtt	3120
tgtatacaaa gcttagaagt tgaaaattac tttgttttac aaaatacaca cccagctgca	3180
tatgagcgta tatattcgaa tatttcatgc taccctgtcg gaaatgaaga gttgattgaa	3240
gctctatgta cagtgtatgt tcaatatctt ttccatggca aaaatatcaa tgtgaatcta	3300
gatggggagt ctttttcac gattttaggt gatcttctc gtgatattc acgtcttacc	3360
agtaactgat atggctgtcc gccgctcgct taaagtggac ttttagttt ttatcatgtg	3420
cgggtgagaaa ttcaatgtgg cgttgagatg cttaaagggt cacaacgcta ctttgctcca	3480
tcctttacct cgatcatcat gataacgac ggtttgtgt tgtgttttat gaccaagtag	3540
tttttgtgtg tctaaccct gttctttata cagacgttca gataaagacc ttgtctcatg	3600
gaatgtcgca ggtgaacct cccccagtc aattcttgc aaatctctc ctttactaaa	3660
attcatcgtc aatgtattgg ctttaacctg cgctccgcgc tctgcttgtg aagtgaacg	3720
aaaaaatgc actaagtatg cactgactgc atagtcacgg cagcgggcta ctacatcgcg	3780
taaactccag ttaatcgcat tgaggcgaag agaaagagga attgcgattt tgctcccggt	3840
cttttctga atgacatgaa gatgatcat ccaaatatcg cttaaattca tacgcgaaat	3900
atcacctaac cgctgaccag taaccagcgc taacagcatg gcatttccca tgtaacgatg	3960
agtagcgctt gcgatatga agattttttt ccattcttca aggtcagcc gttgtcgggt	4020
aatttttctt cttgggtgtt tagtggctaa tgcagggtta tagccaggag gtacttctcc	4080
gtagtgtgc gcctctttga aaacatcaat caggacggag cgaactactt gtgccattct	4140
tggccgccc gcggcgatat actcatcaag caattgtgct atatctctga catcaacggc	4200

tgagatcaac ttcatctctg ctctgttctt gagcaaggat actggtttag ctttttgttt	4260
atagggtgtg agtcttatat caccactttt aagcctgtca tcctggatcg cttagatagc	4320
atctaaccag gttgacgttg tgatagcctt tcctttgctg gttgcgatcc tgtcactgat	4380
agccagaatc tgccgggttc tttgttcagc caggcgagtg ttggcctcag tggcaatagc	4440
gatagcttca gcttcgtttg ttcccaaagc atggaatttt cctgtcactg gatgcttata	4500
ccgccaatag actttattta ccttcctact ataaagcgga tataagttag ggactgaaac	4560
attattctta cgcggtctgg ctgccattac tcaaatccg ttgcaaaagt aatgagtcac	4620
ttttcttgat tacagggtgt accaactccc caactaactc ggctgtctca cgcactcgcc	4680
ataaccggcc ttgtttcatg gccggtggac aaaataaatt ctgcttagca taacgacgca	4740
atgtggacac acttggagga ttacttctgt atttttcagc agccattctt tcaagagtta	4800
acatttgaag catatgcgat cacttatta ctacactaac tgcctagtct cagcatatcg	4860
accctgcacg gtcggttagt ttctccacaa aacagagaag agcacctgtg gccacagcta	4920
tcaggatggg tcgggttatt aaccgcgtac cgggggatac tcttctctgt ttgttaaaaa	4980
gggcggtacc agaaaggact aaggaaaaaa ctggtaccgc caagactaca cacagcataa	5040
agttgtggtg tcgggtgccc ccggtgccig gcgaagggtg cacaccaggc ggggtgggtat	5100
ccacagaagg tcgattgtca gcctcaacct taaccgcgt gcgtgagcc gcattacca	5160
caacgctaag gattctctct ggttgaaaat acttagctgt tatgtgcctg tcttttcacc	5220
acttcaggct cgggtggtatg ctggagttct cacacagcca gcaagcaagg aaacttaatg	5280
aaccagtttt atgttcacgt tcgtctattt gaagacacag ccgaacagac caaaaaattt	5340
gaagaattaa tgcttaactt tctgtaccag aaaacagtta aagagtctga cgatagctgc	5400
tgcagactga ttccagaggg atatatcttc aaaagtacaa tgaactgcca acaaatcctt	5460
gatcaaacat tttcaattgc taacagtgcc ggtgttgacg caaatatatt tgtctgtaaa	5520
tttgaacaaa gcgcatgctt acttcgtctt gcttccttag ttggtaacga tttcgttcat	5580
tacgatctta cgcctaagcc catcaagctc gattcttaaa gccttaacca ttgtgtcgtg	5640
ataaacacgg ctacacttct ctccattgca tggcagaggg gtgagtgtgt tagccatgaa	5700
attcatgaac tcggttcgac caggggcttg cggcccgcaa gcttttaatg cctgttttgc	5760
taacaaaatg cgggcctcag tgectgcatt tgctctatc tgctgcaaac gtttagcgtc	5820
ttccagcaac aatgcgatca catgcttcaa attctgtca ttcatctatt ctctccactg	5880
aaatcatccg ctaacgaatc atcccgtctt tcgtacgtac cgggcgggct acttcgtggg	5940
cgctctgcct gtttgttgtt tctcttgggt acattatgta tctcaaaggt acattgtcaa	6000
glataaaaaa acctgccgaa gcaggttcat aaacattgat taggctttga ttttgtatct	6060

tcttggtttt cctgagaaaa tcacagtacc aattatagag caattaccgt tgatcttaat	6120
gtaaggctca ggccagtttg ggtttaacgc tttgagataa cgctgtgtcc catcttctat	6180
caaccttttg aaggtaggtt cacctgtatc gtgcatcaat gcaataacgt cgtcacctg	6240
gcaggcaggt acttcaggat cgacaaaaat catgtctccc gggcgggtact catcaatcat	6300
tgaatcacct attaccgcga agatataagt catttcccca cagggtacag ggcagggata	6360
cgtttctgct gtgtcctaat caacctcaga atatccaact tctttccatg ctccggcctg	6420
tacccatgat atgacaggga ctaatgtgat ttgtttatta gtgattgaaa catcaggttt	6480
ttttgtgatg ttcgttgtct ggtgttcttg atcgagccat cctacaggca ggtcgaaaca	6540
tttttcgatg tgcgtgcca tgctgtcacc gatattttta gtagcaccat ctccataaa	6600
cctgtctggtc tgggttggtc cgcatcaat catagtggca aaggaagaat tcccgccaac	6660
accatctctc agttttctgg cgtagaccg ccggatgtca tggattgttt tcataacgaa	6720
attaaaacc tttaccgtt aaggtacaag tatcttgaag gttcatttca atcatgtaat	6780
atgtacaccg gaggtacata ttgtatgaaa gcgtattggg actctttaac caaagaacag	6840
caggcgaggt tggccggaaa agttgggtca acacctggct acttacggct ggttttcaat	6900
ggctataaaa aagccagttt tgtgtctggc aaaaaacttg agcaatacac atcaggtgca	6960
attacgaaat ctgacttaag accggatatc tatccgaaag attagcagaa cactttcaat	7020
ttttaaccac agaacgatga ggctaatact gggttaagcat cactggaaaa tagaaaaaca	7080
gcctgagtgg tacttgaaa atgtcagaaa aactatcgcg gcgttgccga gtggttacgc	7140
tgaagcggct gactggctcg atgtaacaga aaacgttta ttcaaccgcc ttcgtgcaga	7200
tggcgatcag attttccgc tgggatgggc aatggtttta cagcgtgctg gtggcactca	7260
cttcattgct gatgtgtgg cgcagtctgc aaatggcgtc tttgtgtctc ttcctgacgt	7320
cgaggatgtg gacaacgcc atattaacca gcgtctgctg gaagtcattg aacagatcgg	7380
cagttattca aaacagattc gttcagcaat cgaagacggt gtagtggaac cgcattgagaa	7440
gacagcaatt aacgacgagc tgtatctctc aatttcgaag ctgcaggagc atgcagcact	7500
tgtctacaaa attttttgca tttcagaaaag taatgacgcc cgcgagtgtg cagctccggg	7560
cgctgtggcg tcgattgctt ctggttgtgg agaaactaac gcatgaacag tttacaaca	7620
cactaccgtc gctcgcaact gattgcgctt cctgtaccgg gtggaaaagc gaaggtggaa	7680
tattgctatg cagtgaatgt accagtgac agggaaattg taaccacag ctttgagag	7740
tgggctgtgg gtgatttcaa ccggcagaag gagacagtcc tttgcgaca gtttaaccgt	7800

ggttcaaaga tcactacgga gtgcccgctca gaggcattcg ttgggagccg gaaacacaac	7860
gggttatcta cctccgcgaa gggttatgagc atgaatgctt cagcccgctc gaacagtttc	7920
gtcgtaaatt cagggaata gaggtcggtc atgagcacta aattaaccgg ctatgtatgg	7980
gatggttgcg ctgcatcagg catgaagtta tccagcgtgg caattatggc cgcctggct	8040
gatttcagta atgacgaagg tgtgtgctgg ccatcaattg aaaccattgc ccgtcagatt	8100
ggcgccggga tgagtaccgt cagaacggct atcgcacggc tggaagcaga aggctggta	8160
acgcgtaagg cgcgtcgcca gggatgatgt tcatcacccc actgtgccgt ggtggatgaa	8220
tatcacgagc acgccacaga tgcgctttac accacgatgc ttaccgggat gggggcgca	8280
cgccagccac tgatgtgggc cattaccacc gccgggtaca acattgaggg gccgtgctac	8340
gacaaacggc gggaaagtc cagatgctc aacggctcgg tgccaaacga tgaactgttc	8400
gggatcatct ataccgtta tgaagtgac gactggaccg acccgaggt gctggaaaa	8460
gccaatcaa atattggcgt gtcggtttat cgcgaatgtt tgtaagtca gcagcagct	8520
gcgaaaaata acgcccgtct ggcaaacgtc tttaaaaca aacacctcaa tatctgggcg	8580
tcggcgcgtt cggcgtatgt caacctggtg agctggcaga gctgcgagga taaatcactg	8640
acccttgagc agttcgaggg gcagccgtgc attctggcct ttgacctggc gcgtaagctg	8700
gatatgaaca gcatggcgcg actttatacc cgcgagattg acggtaaaac gcattactac	8760
agtgtggccc cgcgtttctg ggtaccgtat gacacggtgt acagcgtcga gaaaaatgaa	8820
gatcgccgga cagccgaacg ctttcagaaa tgggtggaat tgggcgttct gaccgttacc	8880
gatggtgcgg aggtggatta tcgctacatc ctggaagagg ccaaagcggc gaacaaaatc	8940
agcccgttca gtgagtcacc catcgacccc ttccgggcga ccgggctgtc acatgacctt	9000
gctgatgaag acctgaacct cgtcaccatc attcagaact acaccaacat gtccgatccg	9060
atgaaagagc tggaagcggc gattgaatcg gggcgctttc atcatgacgg caatcccatc	9120
atgacctggt gtatcgcaaa cgtggtcggc aaaaccattc cgggtaacga tgatgtggtg	9180
aagcccgta aggagcagcg ggaacacaaa atcgatggtg cagttgcgt gattatggcg	9240
gttggcagag ccatgctgta cgagaaagaa gacacgtgt ctgatcacat tgagtcctac	9300
gggatccgtc cgctttaact gaggttaatta tgatcatgct gattctcgcg cctctggtgg	9360
gcgtgctggg tgcgcttttg ctggcgtatg gtgcctggct gatttatccc ccggcggtt	9420
ttgtttgtgc cgggcgcgtg tgcctgttct ggtcgtggct ggtggcgca tatctcgacc	9480
gtacacagtc gtctgtcggc ggaggtaaat agtgttcttt tcgggattat ttcaacgaaa	9540
aagtgacgca ccggtgacca cgccagcaga gctggcggat gccatcgggc tgtcgtatga	9600
cacctatacc ggaaagcaga tcagcagtc ggggctatg cgactgacgg cggttttttc	9660

ctgcgtcaga gtgctggcag agtcggctcg gatgttgccc tgcaatctgt atcacctgaa	9720
cggcagcctg aagcagagag ccaccggcga acgtctgcat aaactgatct ccacgcatcc	9780
caatggctat atgacgccgc aggagtcttg ggagctgggtg gtcacctgtc tgtgcctgag	9840
gggaaacttt tacgcctaca aagtgaaagc atttggcgaa gtggctgaac tgctgcccgt	9900
cgatccccgc tgtgtggtat atgcgctggg aaggtgtcag cgatggcctg aaggtgaccg	9960
ccgggagtggt tattcagcgc gatgacctgg tgcagtacac gacaactgac gatgcaacca	10020
gctccgggtgg tgcctgcgc gtgccgatcg cctgctcaag tgcaggtgcg gtcggtaacg	10080
ctgacgacgg tacggcatta atcctggtca cgccgggtgaa tggctctgccg tcttcgggtg	10140
tggctgacac cctgacagcg ggatttgata ctgaagagct ggaaacgtgg cgcgcccgcg	10200
tcattgagcg gtattactgg acgccgcagg gcggggctga cggggactat gtcgtctggg	10260
ctaaagaagt gcccggcatt acccgcgcat ggacataccg tcacttgatg ggaacgggaa	10320
ctgtcgggtgt gatgattgcc agcagtgacc tgattaatcc cattccgga gaatcaacgg	10380
aaacggcggc aagacaacat atcggggccac tggccccggt ggagggtctt gatttgtatg	10440
tgttcaggcc ggtggcacat acgggtggatt ttcatatccg cgtgacgccg gacacaccag	10500
aaatacgggc tgccattacc gcggagtgtc gttcgttcct gctgcgtgat ggttatccgc	10560
agggagaact caaggtatcg cgtatcagtg aggcgatttc cgggtgcgaac ggggaataca	10620
gccatcagtt gcttgaccg gtggacaata tctccattgc gaaaaacgaa ctggcggtac	10680
tggggacgat ttcatggacg tgacaaacga tgattacatc cgcctgttat cggcactgtt	10740
gccgccccgt ccggtgtggt cagccagcga tccggcgatt gccggtgcgg caccgtcatt	10800
aaccctgtgt catcagcgtg cggatgccct gatcggggag ctggatccgc gcaccaccac	10860
tgaactgata aaccgctggg agcgtctgtg cggctctgccg gatgaatgta ttccggcggg	10920
aacgcagacc cttgccagc gtcagcaacg gctggatgcg aaggttaacc tggcgggagg	10980
catcaacgag gatttttatc ttgcacagct tgcctccctg ggagaccag atgccaccat	11040
cacgcgatac gacaaaagca cttcacctg ctcatcgcc tgtactgacg cggatgaatgc	11100
gccggaatgg cggatattact ggcagggtcaa catgccagcc accaccaact ccacctggat	11160
gacatgtggc gatccctgtg attccgcact gcgtatctgg ggtgacaccg ttgtcgagt	11220
tgtgcttaac aaactctgcc cgtcgcatc ctacgtaatt tttaaatac cggagtaatc	11280
catgcatcgt atagacacga aaaccgcgca gaaggataag ttcggcgagg gtaagaacgg	11340
ttttaccctg gtaaccccc agaccggcac gcctgccacc gatctggatg atgactactt	11400
tgacatgttg caggaggaac ttgacagct ggtggaggca tccggtgcc gctggagaa	11460
ggggcggcac gaccagttac ttaccgcaat tcgcgcgtg ctgttaagcc gcaagaatcc	11520

gtttggcgat atcaaatcgg atggcactgt gcaaacggct ctcgaaaacc ttggtttggg	11580
agaaggagca aaactcaatg cagcaacggc tacattagga cgcaccggtt tcatagctat	11640
accggttatg attggtgga ttgagcaatc agtaatcatt cagtgggggt ggaatgccgc	11700
aaaagcatct gcctctgggg gggatggaaa tacagtgtga ttcccgggtg cgtttaataa	11760
tgctgtgtt gccgttgtt caaattatga caatgtcagc gcacatatca atgcagtggc	11820
aacgggggga tatacaacca ctctgttttt attacgtgc gcagctcaa cgggtagtta	11880
ttactataac tggattgcta ttgggtatta agatgaaaat atactgttg ttaaataaccg	11940
ttggtttttt tatggatggc tgtggcgtca ttccgccaga ttctaaagaa ataacggcag	12000
aacactggca gtcattatta aaatctcaag ctgaaggagg cgtgatcgat tttctgttt	12060
ttctcttc tattaagag gttatccgta ctcatgatga tgaagtcga gatgcgaact	12120
ttcaaaagca gatgcttacc tctgatgcaa ctgattttat caatagcaga cagtggcagg	12180
glaaggctgc attgggaaga cttaagaag atgagctgaa acaatataat ttgtggctgg	12240
attatctgga agcactggaa ctggttgata catccagtgc gccagatatt gaatggccta	12300
cgcctccgc agttcaggcc agatgacatc cggcgcggtg ctggtatctg ttgccgtcac	12360
cgcgtcaatg taatccagca cagcgtaaag tctggttgtt tctgcctgcg tcagtttacg	12420
tccggcctgc aatttcagtt gaatcagact aatggaagcc attgcagcat caatcagtga	12480
ctggcgctgt gcttctgccg cgtctactgc ggcgctatgc tgtgcttcag tatcggtcac	12540
ccattttca ccatccatt tatcgtatgg agataaagg gcatagtggt ttgtatttc	12600
agggtaatca cccggagctt tgatttcttt tgattctcca gttttggtgc tatagaccgt	12660
ttcacgcga tggcttgga catattccca tgagttaaaa tctgcagaac ggcagattgc	12720
ataaccagcc ttaagtgtac caggggcac taaacaggaa catgccgga tgccgacacc	12780
aacggcaaga tattcatttg aagtggaaat atattccctg gtttcacat cgtagttata	12840
aacggtaaca tcccctgcct ttgttgcaat aaggtcacta tttaatatg ctttatgcat	12900
caggctgccc tcacgatata gttaaatgca atattacgc gacgcgttgc tgaggctgcg	12960
gcacctaaac catccactga ttgtttatat gttttaaagg ttccataatc cggggctggt	13020
aatccggcat cgtttgtgtt tcctcttttg ataatgtcag tgccactatt tacccatatt	13080
tcatcaaaat agaaattaat cgttgcatca gtcacaatcg tggatctga cggtaatcca	13140
tgagcatgat cctccgttgc ataccctga atacttaaaa tagagcgacc tgtatcaatc	13200
ccccgccgt catcccagcc acgaataaac tcaccacgta aatcaggcaa tttatttgc	13260

ggataagcct ttgccagttc cgggtattct tcagcagaaa aagcggcacc attgcatttc	13320
agccagcctg ttggcggagt ggctgaaggc cacggaaccg ggacaccaac aggtaatgca	13380
gagcctttct ccaaaccaac gtttatgaaa atgaagaaat aacaagcaaa tggcatcatt	13440
cctgctttta ccagggggat ttaacatgct tattggctat gtacgcgtat caacaaatga	13500
ccagaacaca gatctacaac gtaatgcgct gaactgtgca ggatgcgagc tgatttttga	13560
agacaagata agcggcacia agtccgaaag gccgggactg aaaaaactgc tcaggacatt	13620
atcggcaggt gacactctgg ttgtctggaa gctggatcgg ctggggcgta gtatgcggca	13680
tcttgtcgtg ctggtggagg agttgcgcga acgaggcatc aactttcgta gtctgacgga	13740
ttcaattgat accagcacac caatgggacg ctttttcttt catgtgatgg gtgccctggc	13800
tgaaatggag cgtgaactga ttgttgaacg aacaaaagct ggactggaaa ctgctcgtgc	13860
acagggacga attggtggac gtcgtcccaa acttacacca gaacaatggg cacaagctgg	13920
acgattaatt gcagcaggaa ctccctcgca gaaggtggcg attatctatg atgttggtgt	13980
gtcaactttg tataagaggt ttcctgcagg ggataaataa agttaagac actttgtgta	14040
caaaagaaag taaaacaaca gcaacttgtt gcaattttat caataaaaagt agtattgtcg	14100
tgaaaaattg attaaagatt aatattatgc atgtttttga taataatgga attgaactga	14160
aagctgagtg ttcgataggt gaagaggatg gtgtttatgg tctaatectt gagtcgtggg	14220
ggccgggtga cagaaacaaa gattacaata tcgctcttga ttatatcatt gaacggttgg	14280
ttgattctgg tgtatcccaa gtcgtagat atctggcgtc atcatcagtc agaaaacata	14340
tgcattcttt ggatgaaaga aaaatccatc ctggtgaata ttttactttg attggttaata	14400
gccccgcga tatacgcttg aagatgtgtg gttatcaggc ttattttagt cgtacgggga	14460
gaaaggaaat tccttccggc aatagaacga aacgaatatt gataaatgtt ccaggatatt	14520
atagtacag tttttggcg tctataatac gtggagaact atcagagctt tcacagccta	14580
cagatgatga atcgcttctg aatatgaggg ttagtaaatt aattaagaaa acgttgagtc	14640
aaccgaggg ctccaggaaa ccagttgagg tagaaagact acaaaaagtt tatgtccgag	14700
acccgatggt aaaagcttgg attttacagc aaagtaaagg tatatgtgaa aactgtggtg	14760
aaaatgctcc gttttattta aatgatggaa acccatattt ggaagtacat catgtaattc	14820
ccctgtcttc aggtgggtgt gatacaacag ataactgtgt tgccctttgt ccgaattgcc	14880
atagagaatt gcactatagt aaaaatgcaa aagaactaat cgagatgctt tacgttaata	14940
taaaccgatt acagaaataa aattatttat taaagtcaca tttaagacgt aataccctac	15000
agggtaaaaa ttttctctga tcttaacttc tgcaaatgtt aactgctatt tttatgctaa	15060
aatgggttat caaaactcaa aaacacatgt ttataatcaa tgagttagat aatgctaag	15120

ggctaagag ttatatgcaa attagtaaaa ttatgttgct atgtcagata gttacgattt	15180
agtcacataa ctaatgctgc gccca	15204
<210> 47	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for yeaR	
<400> 47	
atgcttcaaa tccacacagaa ttatatcat acgcgctcaa cgcctttctg gaataaacia	60
actgcacctg ccggaatatt cgaacgtcat ctgataaag gaacgcgcc gggggtttac	120
ccacgccttt ccgttatgca tggggcggtc aaatatctcg gctacgctga tgaacacagt	180
gcagagcctg atcaggtgat cttatcgaa gcggggcagt ttgcggtgtt ccctccagaa	240
aagtggcaca acattgaagc catgactgac gatacttatt tcaacattga cttcttcgtg	300
gtctctgaag tctgatgga aggtgcgcaa caacggaaag tcattcataa cgggaaatga	360
	360
<210> 48	
<211> 1206	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for alkB	
<400> 48	
atgttgaaa aacatcgtgt cctggatagt gccccggaat acgtggataa aaagaaatac	60
ctgtggattc tgctacgct gtggccggcg accccgatga ttggcatctg gctggccaac	120
gaaacgggct ggggtatctt ttatggcctg gtgctgtctg tttgttacgg tgcactgccg	180
ctgctggacg caatgtttgg tgaagatttc aacaatccgc cggaagaagt ggttccgaaa	240
ctggaagg aacgttatta ccgctcctg acctatctga cggtgccgat gcattacgcg	300
gccctgattg tttccgcatg gtgggtcggc acccagccga tgtcatggct ggaaattggt	360
gcactggctc tgctcgtggg catcgtgaac ggtctggccc tgaataccgg ccatgaactg	420
ggtcacaaaa aggaacgtt cgatcgctgg atggcaaaaa ttgttctggc tgtcgtgggc	480
tatggtcatt tctttatcga acacaacaag ggccatcacc gtgacgtcgc aaccccgatg	540
gatccggcta cgagccgtat gggatgaatct atctacaagt tcagtatccg tgaaatcccg	600
ggtgcattta tccgtgcatg gggctctggaa gaacagcgtc tgtctcgtcg cggccaaagc	660

gtgtggtctt ttgacaatga aattctgcaa ccgatgatta tcaccgtgat cctgtatgca	720
gttctgctgg ctctgtttgg ccgaaaaatg ctggttttcc tgccgattca gatggcattt	780
ggttggtggc aactgacgag cgctaactat atcgaacatt acggcctgct gcgtcagaaa	840
atggaagatg gtcgctacga acatcaaaag ccgcatcaca gttggaactc caatcacatt	900
gtcagcaatc tggctgtgtt ccattctgcaa cgtcactctg accatcacgc acacccgacc	960
cgttcataat aatcgctcgg tgattttccg ggtctgccgg cactgccgac gggctacccg	1020
ggtgcgttcc tgatggccat gatccgcag tggtttcgca gtgttatgga tccgaaagtt	1080
gtcgactggg cgggcggtga tctgaataag attcaaatcg atgacagcat gcgtgaaacc	1140
tatctgaaaa agtttggcac ctcatcggcg ggtcattcat caagcacctc ggcagtggcg	1200
tcgtaa	1206
<210> 49	
<211> 522	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for alkG	
<400> 49	
atggcatcct ataagtgtcc ggactgtaac tatgtctatg atgaatctgc gggcaatgtg	60
catgaaggct tttgcccggg tacgccgtgg catctgattc cggaagattg gtgctgtccg	120
gactgcgcag tgcgtgataa actggacttt atgctgatcg aatctggcgt cggtgaaaag	180
ggcgtgacca gcacgcacac ctaccgaac ctgagcgaag tttctggtac gagtctgacc	240
gcggaagcag tggttgcacc gacgtcgctg gaaaaactgc cgagcgctga tgtcaaaggc	300
caggacctgt ataagacca accgccgctg tccgatgcac agggcggtaa agcgtatctg	360
aagtggattt gcatcacctg tggccatatt tacgatgaag cgctgggtga cgaagccgaa	420
ggctttacgc cgggcaccgc tttcgaagat attccgatg actggtgctg cccggattgt	480
ggtgcgacga aagaagatta tgtctgtat gaagaaaagt aa	522
<210> 50	
<211> 1158	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for alkT	
<400> 50	

atggctatcg ttgtggttgg tgctggtagc gctggcgta atgcggcggt ttggctgcgt 60
caatacggct ataaaggta aattcgatt tttagccgtg aaagcgtggc accgtatcaa 120
cgcccgccgc tgagcaaagc cttcctgacc agcgaaatcg ctgaatctgc ggtgccgctg 180
aagccggaag gtttttacac caacaataac attacgatca gctgaatac cccgattgtc 240
tccatcgatg tgggtcgtaa aattgttagc tctaaagacg gcaaggaata tgcatacgaa 300
aagctgatcc tggctacccc ggctagtga cgtcgccga cgtgcgaagg tagtgaactg 360

tccggcggtt gttatctgcg ttctatggaa gatgcaaaaa atctgcgtcg caagctggtc 420
gaatcagctt cgggtggtgt cctgggagggt ggcgtgattg gcctggaagt tgcaagcgcg 480
gccgtcggtc tgggtaaacg tgtgacgggt atcgaagcaa ccccgctgt catggctcgc 540
gtggttacc cggcagctgc gaacctgggt cgtgcacgcc tggaagcaga aggtatcgaa 600
tttaactga acgcaaagct gacgagcatc aaaggtcgca acggccatgt tgaacagtgc 660
gtcctggaat ctggcgaaga aattcaagcc gatctgatcg tcgtgggtat tggcgcgatc 720
ccggaactgg aactggccac cgaagccgca ctggaagttt ccaacggtgt tgtcgtggat 780

gaccagatgt gcacctcaga tacgtcgatt tacgcgatcg gtgactgtgc gatggcgctg 840
aatccgttct ggggcacgat ggtgcgcctg gaaaccattc ataacgtgt gacgcacgcg 900
cagattgttg ccagttccat ctgtggcacc agcacgccgg caccgacccc gccgcgtttt 960
tggtcggacc tgaagggtat ggcaactgcaa ggtctgggtg cactgaaaga ttatgacaag 1020
ctggttgtcg ccattaataa cgaaaccttg gaactggaag tgctggcata caaacaggaa 1080
cgctgatcg ctacggaac catcaatctg ccgaagcgtc aaggtgcctt ggcgggttca 1140
atcaaaactgc cggactaa 1158

<210> 51

<211> 2807

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for dppA(mutation)

<400> 51

atgcgtatct ccttgaaaaa gtcagggatg ctgaagcttg gtctcagcct ggtggctatg 60
accgtcgcag caagtgttca ggctaaaact ctggtttatt gctcagaagg atctccggaa 120
gggtttaacc cgcagctgtt tacctccggc accacctatg acgcctcttc cgtcccgtt 180
tataaccgtc tggttgaatt taaaatcggc accaccgaag tgatcccggg cctcgtgaa 240
aagtgggaag tcagcgaaga cggtaaaacc tataccttcc atctgcgtaa aggtgtgaag 300

tggcagcaca ataaagaatt caaacccgacg cgtgaactga acgccgatga tgtgggtgttc	360
tcgttcgatc gtcagaaaa cgcgcaaac ccgtaccata aagtttctgg cggcagctac	420
gaatacttcg aaggcatggg cttgccagag ctgatcagtg aagtgaaaa ggtggacgac	480
aacaccgttc agtttgtgt gactcgcccg gaagcgccgt tcctcgctga cctggcaatg	540
gacttcgctt ctattctgtc aaaagaatat gctgatgcga tgatgaaagc cggtaacacg	600
gaaaaactgg acctcaacc aatcggaacc ggtccgttcc agttacagca gtatcaaaaa	660
gattcccgtt tccgctacaa agcgtttgat ggctactggg gcaccaaacc gcagatcgat	720
acgtctgttt tctctattac cctgacgct tccgtgcgtt acgcgaaatt gcagaagaat	780
gaatgccagg tgatgccgta cccgaacccg gcagatatcg ctgcgatgaa gcaggataaa	840
tccatcaatc tgatggaat gccggggctg aacgtcgtt atctctcgta taacgtgcag	900
aaaaaaccac tcgatgacgt gaaagtctgc caggctctga cctacgcgt gaacaaagac	960
gcgatcatca aagcggttta tcaggcgcg ggcgtatcag cgaaaaacct gatcccgcca	1020
accatgtggg gctataacga cgacgttcag gactacacct acgatcctga aaaagcgaaa	1080
gccttgctga aagaagcggg tctggaaaaa ggtttctcca tcgacctgtg ggcgatgccg	1140
gtacaacgtc cgtataaccc gaacgtctgc cgcattggcg agatgattca ggcagactgg	1200
gcgaaagtcg gcgtgcaggc caaaattgtc acctacgaat ggggtgagta cctcaagcgt	1260
gcgaaagatg gcgagcacca gacgtaatg atgggctgga ctggcgataa cggggatccg	1320
gataacttct tcgccacct gttagctgc gccgcctctg aacaaggctc caactactca	1380
aatgggtgct acaaaccgtt tgaagatctg attcaaccgg cgcgtgctac cgacgaccac	1440
aataaacgcg ttgaactgta caaacaagcg cagggtggtga tgcacgatca ggctccggca	1500
ctgatcatcg ctactccac cgtgtttgaa ccggtacgta aagaagttaa aggctatgtg	1560
gttgatccat tagggaaggt gcgaataagc ggggaaattc ttctcggtg actcagtcac	1620
ttcatttctt catgtttgag ccgatttttt ctcccgtaaa tgccttgaat cagcctattt	1680
agaccgtttc ttcgccattt aaggcgttat ccccgatttt tagtgagatc tctcccactg	1740
acgtatcatt tggtcgccc gaaacagggt ggccagcgtg aataacatcg ccagttggtt	1800
atcgtttttc agcaaccctt tgtatctggc ttacacgaag ccgaactgtc gcttgatgat	1860
gcgaaatggg tgctccacc tggcccggt gctggcttcc atgtattcga tgttgatggc	1920
cgttttgttc ttgcgtggat gctgtttcaa ggttcttacc ttgccggggc gctcggcgat	1980
cagccagtcc acatccacct cggccagctc ctgcgcgtgt ggcccccctt ggtagccggc	2040
atcggtgag acaaattgct cctctccatg cagcagatta cccagctgat tgaggtcatg	2100
ctcgttggcc gcggtggtga ccaggctgtg ggtcaggcca ctcttggcat cgacaccaat	2160

gtgggccttc atgccaagt gccactgatt gcctttcttg gtctgatgca tctccggatc 2220
gcgttgctgc tctttgttct tggtcgagct gggcgcctca atgatggtgg catcgaccaa 2280
ggcgccttga gtcacatga cgctgcttc ggccagccag cgattgatgg tcttgaacaa 2340
ttggcgggcc agttgatgct gctccagcag gtggcggaat ttcattgatg tggcgcggtc 2400

cggcaaggcg ctatccaggg ataaccgggc aaacagacgc atggaggcga tttcgtacag 2460
agcatcttcc atcgcgccat cgctcagggt gtaccaatgc tgcattgagt gaatgcgtag 2520
catggtttcc agcggataag gtcgcccggc attaccagcc ttggggtaaa acggctcgat 2580
gacttccacc atgttttgcc atggcagaat ctgctccatg cgggacaaga aaatctcttt 2640
tctggcttga cggcgcttac tgctgaattc actgtcggcg aaggtaagtt gatgactcat 2700
gatgaacctt gtcttatggc tccagatgac aaacatgac tcatatcagg gacttgttcg 2760
caccttccct aggcaaacat cacttcgaaa acgtctctat cgaataa 2807

<210> 52

<211> 1195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for IS5

<400> 52

ggaaggtgcg aacaagtccc tgatatgaga tcatgtttgt catctggagc catagaacag 60
ggttcatcat gagtcatcaa cttaccttcg ccgacagtga attcagcagt aagcgccgtc 120
agaccagaaa agagattttc ttgtcccga tggagcagat tctgccatgg caaaacatgg 180
tggaagtcat cgagccgttt tacccaagg ctggtaatgg ccggcgacct tatccgtgg 240
aaaccatgct acgattcac tgcattgagc attggtacaa cctgagcgat ggcgcgatgg 300

aagatgctct gtacgaaatc gcctccatgc gtctgtttgc ccggttatcc ctggatagcg 360
ccttgccgga ccgaccacc atcatgaatt tccgccacct gctggagcag catcaactgg 420
cccgcaatt gttcaagacc atcaatcgtt ggtggccga agcaggcgtc atgatgactc 480
aaggcacctt ggtcgtgcc accatcattg aggcaccag ctcgaccaag aacaaagagc 540
agcaacgcga tccggagatg catcagacca agaaaggcaa tcagtggcac tttggcatga 600
aggcccatat tgggtgctgat gccaaagatg gctgaccca cagcctggtc accaccgagg 660
ccaacgagca tgacctcaat cagctgggta atctgctgca tggagaggag caatttgtct 720

cagccgatgc cggtaccaa ggggcgccac agcgcgagga gctggccgag gtggatgtgg 780
actggctgat cgccgagcgc cccgcaagg taagaacctt gaaacagcat ccacgaaga 840

acaaaacggc catcaacatc gaatacatga aagccagcat ccgggccagg gtggagcacc	900
catttcgcat catcaagcga cagttcggct tcgtgaaagc cagatacaag gggttgctga	960
aaaacgataa ccaactggcg atgttattca cgtggccaa cctgtttcgg gcggacaaaa	1020
tgatacgtca gtgggagaga tctcactaaa aactggggat aacgccttaa atggcgaaga	1080
aacggtctaa ataggctgat tcaaggcatt tacgggagaa aaaatcggct caaacatgaa	1140
gaaatgaaat gactgagtc gccgagaaga atttccccgc ttattcgac cticc	1195
<210> 53	
<211> 1709	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for yeaR(mutation)	
<400> 53	
atgcttcaa tccacagaa ttatattcat acgcgtcaa cgcctttctg gaataaaca	60
actgcacctg ccggaatatt cgaacgtcat cttgataaag gaacgcgcc gggggtttac	120
cccataagcg ctaacttaag ggttgaacca tctgaagaat gcgacgcctc ggtgcctcgt	180
taagacgatg cctcgcgttc ttcaattgcg tttttaggc tgtcaggat actgtccac	240
gaatggccac ctgtaagctc cagatgacca tttttgtat tctccacaac gagttagttc	300
ttcttttcgg atccggcact tctggggggg aaatccagcg atggctggat tatgtcgtca	360
attaaaaatg cggcgagtag attagcaa atccacgctt tcgcgagttc aggttccttt	420
gcacgcaaag catccagggtg cagcaaactt ttgagccgct taaaagccag ttcaatttgc	480
catcgcagac ggtaacaatc agccacttgc tctgtgaat attcatcttc cgtaaatgat	540
gttagcaata gcacatggcc cgctgcttcc agcgtttccg cctgaactac tcgtcctttt	600
cgacgattct cgctgagcag tcgggtttta ctgattaatg ctttttcggg aggaagtgat	660
acggcaatga gacgtgccgg aaaggagct ccggcttttt tattacctga attgcctatc	720
attacagtgg ttaccacgtt cttaccgaa tccagcccgc gcagaaaacc catcatgtca	780
aagcgattc ctctgcagt taaccagcgc aatcctcgcc agtgaaccg gacgatataa	840
tcagttctc caaaagcaag tgagcggata cattcgggac gcgaaccgaa tccccgtca	900
gcaatgcgta tctcgtctgc cgtttcgca aatcgggtcca gccgttcagc gtctctgctg	960
tcggttagct caaaatcagt gaactgacag gtataggat catatccat atgtagtgc	1020
cattcagcgc tgccgcccc gggcgactg attgctgttc catcgacaag acgcaatctc	1080
tttccgcttg tacaaccgt aactgcggcg cgtacagcaa gtgtttgtgc ggcaagtatg	1140

ccaaaccagt cggcggcatt ccgcagccgc ttcaggagag ccacgtcaga taatgttgca	1200
acgtcatgga gctgagccca tgcagtact tcacgtaatg acatcccccc ggggccgtaa	1260
gccagcccca gacgtagcag agttgcagca tcacgaattt cgcggcggcg ggttagagcc	1320
ccggcattac gtgccgaagt atccagttct tcgggcttac caatatgggc cagaattgct	1380
gaccagttat cgtgagagta attcatcggc acgttaaate atatcaggcg taataccaca	1440
acccttaagt tagcgcttat ggggtttacc cagccttcc cgttatgcat ggggcggta	1500
aatatctcgg ctacgtgat gaacacagtg cagagcctga tcaggtgatc cttatcgaag	1560
cggggcagtt tgcggtgttc cctccagaaa agtggcacia cattgaagcc atgactgacg	1620
atacttattt caacattgac ttcttcgtgg ctctgaagt cctgatggaa ggtgcgcaac	1680
aacggaaagt cattcataac gggaaatga	1709
<210> 54	
<211> 1343	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for IS186	
<400> 54	
cccataagcg ctaacttaag ggttgtggta ttacgcctga tatgatitaa cgtgccgatg	60
aattactctc acgataactg gtcagcaatt ctggcccata ttggtaagcc cgaagaactg	120
gatacttcgg cagtaatgc cggggctcta acccgccgcc gcgaaattcg tgatgtgca	180
actctgctac gtctggggct ggcttacggc cccgggggga tgtcattacg tgaagtcact	240
gcatgggctc agctccatga cgttgcaaca ttatctgacg tggctctcct gaagcggctg	300
cggaatgccg ccgactggtt tggcatactt gccgcacaaa cacttgctgt acgcgccga	360
gttacgggtt gtacaagcgg aaagagattg cgtcttctcg atggaacagc aatcagtgcg	420
cccgggggcg gcagcgctga atggcgacta catatgggat atgacctca tacctgtcag	480
ttcactgatt ttgagctaac cgacagcaga gacgtgaac ggctggaccg atttgcgcaa	540
acggcagacg agatacgc atgtgaccgg ggattcgggt cgcgtcccga atgtatccgc	600
tcacttgctt ttggagaagc tgattatctc gtccgggttc actggcgagg attgctgtg	660
ttaactgcag aaggaatgcg ctttgacatg atgggttttc tgcgcgggct ggattgcgg	720
aagaacgggt aaaccactgt aatgataggc aattcaggta ataaaaagc cggagctccc	780
tttccggcac gtctcattgc cgtatcactt cctcccagaa aagcattaat cagtaaaacc	840
cgactgctca gcgagaatcg tcgaaaagga cgagtagttc aggcggaaac gctggaagca	900

gcgggcatg tgctattgct aacatcatta ccggaagatg aatattcagc agagcaagtg	960
gctgattgtt accgtctgcg atggcaaatt gaactggctt ttaagcggct caaaagtttg	1020
ctgcacctgg atgctttgcg tgcaaaggaa cctgaactcg cgaaagcgtg gatatttgct	1080
aatctactcg ccgcattttt aattgacgac ataatccagc catcgctgga ttccccccc	1140
agaagtgccg gatccgaaaa gaagaactaa ctcgttgtgg agaataacaa aaatggcat	1200
ctggagctta caggtggcca ttctgtggac agtatccctg acagcctaca aaacgcaatt	1260
gaagaacgcg aggcatcgtc ttaacgaggc accgaggcgt cgattcttc agatggttca	1320
acccttaagt tagcgttat ggg	1343