(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월13일
(11) 등록번호 10-1726886
(24) 등록일자 2017년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/75 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7012802
(22) 출원일자(국제) 2009년11월09일
심사청구일자 2014년11월10일
(85) 번역문제출일자 2011년06월03일
(65) 공개번호 10-2011-0093847
(43) 공개일자 2011년08월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/064825
(87) 국제공개번호 WO 2010/052319
국제공개일자 2010년05월14일
(30) 우선권주장
08019492.1 2008년11월07일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
Russian Journal of Genetics. Vol 44, No 4, 페이지 399-404 (2008)
Cell. Vol 111, 페이지 747-756, (2002)

(73) 특허권자
디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1
(72) 발명자
레흐만 마틴
독일 79639 그렌짜흐-비흘렌 칸트스트라쎄 4비
한스 마이클
독일 79650 쇼프하임 프리츠-히그-에라스무스-스트라쎄 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **리보플라빈의 개선된 생산**

(57) 요 약

본 발명은 리보플라빈 생합성 유전자를 함유하는 오페론(rib 오페론)에서의 개질, 특히 상응하는 리보플라빈 생합성 유전자(rib 오페론)의 업스트림의 리더 서열(rib 리더)의 개질을 통한 리보플라빈(이는 또한 본원에서 비타민 B2로 언급된다)의 개선된 생물공학적 생산 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 개질된 서열을 갖는 유전자 조작된 미생물, 상기 개질된 서열/미생물의 생성 방법 및 리보플라빈의 생산을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaAtaaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

(72) 발명자

호흐만 한스-피터

독일 79539 뢰라흐 오베러 바젤블릭 8

라우데르트 디에트마르

독일 79650 쇼프하임 발터-부르트쉰-스트라쎄 24

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 서열 번호:42에 따른 뉴클레오타이드 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드, 및

(e) (a)에 정의된 폴리뉴클레오타이드의 상보성 가닥인 폴리뉴클레오타이드

로 구성된 군에서 선택되되, 상기 폴리뉴클레오타이드가 RFN 요소의 3' 단부와 *rib* 리더의 3' 단부 사이에 위치된 5' 측면 영역 및 터미네이터를 포함한 *rib* 리더의 3' 단부에 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적이 비-개질된 *rib* 리더에 비해 5% 이상 증가되고,

상기 하나 이상의 돌연변이가 서열번호:42의 뉴클레오타이드 231 내지 263, 뉴클레오타이드 250 내지 257, 뉴클레오타이드 231 내지 238, 뉴클레오타이드 239 내지 263, 뉴클레오타이드 166 내지 263 및 뉴클레오타이드 136 내지 263 중에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실을 의미하는, 개질된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

폴리뉴클레오타이드가 서열 번호:42에 제시된 G39A, G40A, G41A, C85T 및 G121A의 치환, 및 이의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 *ribO* 돌연변이로 구성된, 개질된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

(a) 서열 번호:65, 67, 68, 69, 70 또는 71에 따른 개질된 뉴클레오타이드 서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드, 및

(d) (a)에 정의된 폴리뉴클레오타이드의 상보성 가닥인 폴리뉴클레오타이드

로 구성된 군에서 선택되되, 상기 폴리뉴클레오타이드가 개질된 또는 돌연변이된 서열로서 지칭되고, 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적이 적합한 숙주 세포로 도입시 상응하는 비-개질된 서열을 갖는 세포에 비해 5% 이상 증가된, 개질된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항의 개질된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 리보플라빈-생산 미생물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 있어서,

리보플라빈을 생산하기 위한, 개질된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제 4 항에 따른 미생물의 이용을 포함하는, 리보플라빈의 생산 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 미생물에 도입하는 단계를 포함하는, 리보플라빈-생산 미생물에서 리보플라빈 생합성 유전자로부터 전장 mRNA 전사체를 생산하는 방법.

청구항 8

제 4 항에 있어서,

리보플라빈을 생산하기 위한, 리보플라빈-생산 미생물.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

반응 혼합물로부터 생산된 리보플라빈을 단리 또는 정제함을 포함하는, 리보플라빈의 생산 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리보플라빈 생합성 유전자를 함유하는 오페론(*rib* 오페론)에서의 개질, 특히 상응하는 리보플라빈 생합성 유전자(*rib* 오페론)의 업스트림의 리더 서열(*rib* 리더)의 개질을 통한 리보플라빈(이는 또한 본원에서 비타민 B2로 언급된다)의 개선된 생물공학적 생산 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 개질된 서열을 갖는 유전자 조작된 미생물, 상기 개질된 서열/미생물의 생성 방법 및 리보플라빈의 생산을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리보플라빈은 모든 식물 및 많은 미생물에 의해 합성되지만 고등 동물에서는 생성되지 않는다. 리보플라빈은 기본 대사에 필수적인데, 이것이 탄수화물의 효소적 산화에 필요한 조효소, 예를 들면 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드 및 플라빈 모노뉴클레오타이드의 전구체이기 때문이다. 고등 동물에서, 불충분한 리보플라빈 공급은 모발의 손실, 피부 염증, 시력 악화 및 성장 장애를 야기할 수 있다.

[0003] 리보플라빈의 생합성은 구아노신 트라이포스페이트(GTP) 및 리불로스-5-포스페이트로부터 출발한다. 다양한 공급원, 예를 들면 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 에레오테시움 애쉬바이(*Ereothecium ashbyii*), 애쉬바이아 고시피(*Ashbya gossypii*), 칸디다 플라레리(*Candida flareri*), 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 리보플라빈의 생합성에 관련된 유전자는 공지되어 있다(예를 들면 유럽 특허 제405370호 또는 [Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th Edition, 2007, Chapter Vitamins] 참조).

[0004] 리보플라빈 생산 (미)생물의 한 예로서 바실러스 섭틸리스에서 상황에 대해 살펴보면, 리보플라빈 생합성에 관련된 유전자는 *ribG* (*ribD*), *ribB* (*ribE*), *ribA*, 및 *ribH*를 포함한다. *ribA* 유전자는 2가지의 효소 활성, 즉, 리보플라빈 생합성의 첫번째 단계를 촉매하는 GTP 사이클로하이드롤라제 II, 및 리불로스-5-포스페이트에서

3,4-다이하이드록시-2-부탄온-4-포스페이트(DHBP)로의 전환을 촉매하는 3,4-다이하이드록시-2-부탄온-4-포스페이트 합성효소(DHBPS)를 암호화한다. 탈아민화효소 및 환원효소는 오페론의 첫번째 유전자인 *ribG* (*ribD*)에 의해 암호화된다. 리보플라빈 생합성에서 끝에서 두번째 단계는 *ribH*의 유전자 생성물인 루마진 신타제에 의해 촉매된다. 경로의 마지막 단계를 촉매하는 리보플라빈 신타제는 오페론의 2번째 유전자인 *ribB* (*ribD*)에 의해 암호화된다. *rib* 오페론의 3' 단부에 위치한 *ribT*의 기능은 현재 밝혀지지 않았지만, 이의 유전자 생성물은 리보플라빈 생합성에 요구되지 않는다.

[0005] *rib* 프로모터(P_{nib})에서 나온 리보플라빈 오페론의 전사는 오페론의 첫번째 유전자인 *ribG*의 전사 출발 코돈과 번역 출발 코돈 사이의 *rib* 오페론의 5' 영역에 위치한 거의 300개의 뉴클레오타이드의 번역되지 않은 조절 리더 영역(이후로는 *rib* 리더라 불린다)을 비롯한 리보스위치(riboswitch)에 의해 제어된다. 바실러스 섭틸리스를 이용한 연구로부터, 하기와 같은 *rib* 리더 내부의 3개 이상의 서로 다른 부분이 *rib* 오페론의 전사 조절에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다: (i) *rho*-독립적 종결 또는 감쇠 구조의 특징인 역반복(inverted repeat) 및 이에 이은 폴리-T 스트레치를 포함하는 *rib* 리더의 3'-단부에 위치한 *rho*-독립적 터미네이터[Kil et al., Mol. Gen. Genet. 233, 483-486, 1992]; [Mironov et al., Mol. Biol. 24, 256-261, 1990]; (ii) 안티터미네이터로서 작용하는 것으로 제안된 터미네이터의 5'-절반에서의 역반복[Mironov et al., Cell 111, 747-756, 2002]; (iii) 안티터미네이터가 터미네이터와 염기쌍을 형성하는 것을 방지하는 안티-안티터미네이터로서 작용하고 항종결 구조의 형성을 방해하는 것으로 추정되는 서로 역 상보적인, 터미네이터의 중간 부분에 위치한 2개의 요소(Mironov et al., Cell 111(5):747-56, 2002). 생체외 전사 연구에 의해 터미네이터의 기능이 전사 분석에서 FMN의 존재에 의존하는 것으로 확인되었다(Winkler et al., PNAS 99(25): 15908-13, 2002). 예를 들면 서열번호:1에 개시된 바와 같은 바실러스 섭틸리스의 *rib* 오페론의 경우, 터미네이터는 서열 번호:1의 뉴클레오타이드 230 내지 263으로 구성되고, 안티터미네이터는 서열 번호:1의 뉴클레오타이드 30 내지 37로 구성되고, 안티-안티터미네이터는 서열 번호:1의 뉴클레오타이드 157 내지 164로 구성된다.

[0006] *rib* 유전자 발현에 대한 현재의 조절 모델에 따르면, *rib* 리더로부터 전사된 초기 mRNA는 하기와 같은 2가지의 양자택일적 구조를 취한다(소위 FMN 리보스위치): FMN이 *rib* 리더의 내부에 존재하는 RFN 요소(예를 들면 서열번호:1의 위치 25 내지 164의 DNA 서열 참조)에 결합하면, 안티-안티터미네이터가 안티터미네이터와 염기쌍을 형성하고, 이는 전사 종결 루프의 형성을 방해할 수 없어서 결과적으로 *rib* 유전자 전사가 조기 종결된다. FMN이 RFN 요소에 결합되어 있지 않으면, 안티터미네이터가 전사 터미네이터의 역 상보적 서열과 염기쌍을 형성하여 전장 *rib* mRNA의 리드-쓰루(read-through) 전사 및 형성을 허용한다. 이 기작은 FMN-결합된 RFN 요소 대 비결합된 형태의 비를 결정하는 세포내 FMN 농도를 전장 *rib* mRNA 생산 정도에 연결시킨다. RFN 요소는 단지 FMN에 대한 결합 부위로서 작용할 뿐 리보플라빈에 대한 결합 부위로는 작용하지 않는 것으로 보인다(Mironov et al, 2002; Winkler et al, 2002).

[0007] 따라서, 규제완화, 리보플라빈 과생산 및 배양액으로의 분비는 (i) *rib* 리더 서열로부터 전사된 초기 mRNA로 FMN이 결합하는 것을 방해하거나, (ii) 안티-안티터미네이터가 안티터미네이터와 효과적으로 염기쌍을 형성할 수 없도록 안티-안티터미네이터를 개질시키거나, (iii) 터미네이터를 개질 또는 결실시킴으로써 달성될 수 있다.

[0008] 동정된 리보플라빈-과생산 바실러스 섭틸리스 돌연변이체의 한 부류는 *rib* 리더 서열의 5'-절반의 다양한 지점에서 *ribO* 돌연변이로 표기된 단일 점 돌연변이를 함유한다(Kil et al., 1992). *ribO* 돌연변이는 RNF 요소에 위치하여 FMN 결합을 방해하거나, 또는 안티-안티터미네이터 DNA 서열에 위치한다. *rib* 유전자 발현의 최대 규제완화 및 리보플라빈 분비는 터미네이터 구조의 결실시 이루어질 것으로 예상될 수 있고, 그 이유는 이 경우 *rib* 유전자 전사의 억제가 의존하는 궁극적인 요소가 제거되기 때문이다. *ribO* 돌연변이는 추가로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 또는 프로피오니박테리움 프루덴레이키(*Propionibacterium freudenreichii*)에서 확인된다(Burges et al., Microbial Cell Factories 5:24, 2006).

[0009] *ribC* 돌연변이체로 표기된 리보플라빈-과생산 바실러스 섭틸리스 돌연변이체의 제 2 부류에서, 염색체 손상이 바실러스 섭틸리스 게놈의 147° 에서 맵핑되었다(Kreneva and Perumov, Mol. Gen. Genet. 222, 467-469, 1990). *ribC* 돌연변이체는 *ribC* 유전자에서 미스센스 돌연변이를 함유한다. *ribC* 유전자는 바실러스 섭틸리스의 플라빈 키나제/FAD 신타제를 암호화하는 것으로 보인다(Mack *et al.*, J. Bacteriol., 180:950-955, 1998). 리보플라빈 생합성을 규제완화하는 돌연변이는 *ribC* 유전자 생성물의 플라보키나제 활성을 감소시켜 결과적으로 리보플라빈 조절 시스템의 효과자 분자인 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN)의 세포내 농도를 감소시킨다.

[0010] 또한, 전통적인 돌연변이유발을 이용하여 선택된 유기체의 게놈에서 무작위 돌연변이를 갖는 돌연변이체를 생성한 후, 예를 들면 퓨린 유사체에 대한 더 높은 저항에 대해 선택한다. 다르게는, 리보플라빈 생합성에 관련된 유전자는 예를 들면 천연의 (약한) 프로모터를 강한 프로모터로 대체하거나 또는 염색체 내부의 발현 카세트를 증폭시킴으로써 과발현되었고, 여기서 상기 카세트는 예를 들면 항생제 저항 마커와 같은 증폭가능한 선택 마커 유전자와 함께 관심 유전자에 작용가능하게 연결된 단일 프로모터를 함유한다. 증폭은 염색체에 여러 카피의 발현 카세트 및 선택 마커 유전자를 생성시킨다. 또한, 리보플라빈 생산을 숙주 세포의 성장과 분리시킴으로써 리보플라빈의 배양액으로의 분비를 증가시킬 수 있다.

[0011] 전술된 접근법들은 여러 단점을 갖고 있다. 예를 들면, 단일 프로모터에 의해 구동되는 유전자의 증폭에 의해 포화 수준의 mRNA를 달성하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 또한, 숙주 세포의 염색체에 여러 카피의 발현 카세트 및 선택 마커 유전자를 생산하는 것은 안정하지 않을 수 있거나, 또는 심지어는 개별적인 유전자의 추가의 발현을 방해할 수 있다(피드백 억제).

[0012] 놀랍게도, *rib* 리더는 현재 모델에 의해 추정되는 바와 같은 *rib* 유전자 발현의 부정적 조절자로서의 이의 기능과는 별도로 전장 *rib* mRNA의 풍부함에 강한 영향을 미쳐서, 5' mRNA 안정화 작용을 나타내는 것으로 발견되었다. 특정한 돌연변이/결실의 *rib* 리더 서열로의 도입은 결과적으로 리보플라빈의 생산을 증가시켰다.

발명의 내용

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 *rib* 리더가 연속적인 *rib* 유전자의 발현에 대한 억제 효과의 완화 또는 감소를 야기하여, 결과적으로 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체가 축적되게 하는 식으로 개질된 돌연변이체 리보플라빈 생산 균주를 제공함으로써 리보플라빈 생산의 수율 및/또는 생산성을 개선시키는 것이다. 따라서, 개질된 *rib* 리더, 즉 야생형 *rib* 리더에 비해 개선된 *rib* 리더의 적합한 숙주 세포로의 도입은 연속적인 *rib* 유전자, 예를 들면 ribA의 더 높은 전사 속도, 전장 *rib* mRNA의 더 높은 안정성, 및 *rib* 오페론의 보다 많은 규제완화, 즉, 보다 규제완화된 리보플라빈 생성을 야기한다.

[0014] 특히, (i) 터미네이터 서열 또는 이의 작용성 부분 및 (ii) 터미네이터의 5' 측면(flanking) 영역을 비롯한 *rib* 리더의 3' 단부에서의 결실이 리보플라빈 생산의 수율 및/또는 생산성을 개선시키는데 특히 효과적인 것으로 발견되었다. RFN 요소의 3' 단부로부터 터미네이터의 3' 단부까지의 전체 DNA 서열이 결실된 개질된 *rib* 리더가 리보플라빈 생산 개선에 특히 유용하다.

[0015] 또한, 터미네이터 서열 또는 이의 작용성 부분을 비롯한 *rib* 리더의 3' 단부에서의 결실과 함께 *ribO* 돌연변이의 조합이 리보플라빈 생산의 수율 및/또는 생산성 개선에 특히 효과적인 것으로 발견되었다. 이는 터미네이터의 5' 측면 영역을 포함함으로써 더욱 개선될 수 있다. 예상치못하게도, (*rib* 돌연변이와 조합되지 않은) 전체 터미네이터 서열 또는 이의 작용성 부분 중 하나의 결실 또는 개질은 리보플라빈 생산에 대해 아무런 강한 효과를 갖지 않고, 이는 5' 측면 영역과 함께 터미네이터를 포함하는 더 큰 결실 또는 터미네이터 결실과 *ribO* 돌연변이의 조합과는 대조적이다. 실제로, 터미네이터 서열 또는 이의 작용성 부분 만의 결실 또는 개질은 전통적인 *ribO* 돌연변이에 비해 명확하게 리보플라빈 생산의 규제완화에 덜 효과적이었다. 하나 이상의 *ribO* 돌연변이와 조합된, RFN 요소의 3' 단부에서 터미네이터의 3' 단부까지의 전체 DNA 서열이 결실된 개질된 *rib* 리더가 리보플라빈 생산의 개선에 특히 유용하다. 이는 RFN 요소의 더 큰 부분이 결실되면, 예를 들면 RFN 요소의 3' 단부의 약 1/5이 결실되면 더욱 개선될 수 있었다.

[0016] 결론적으로, 본 발명은

[0017] (a) 서열 번호:42에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드,

[0018] (b) *rib* 리더의 활성을 갖는 (a)의 단편 또는 유도체를 포함하는 폴리뉴클레오타이드,

[0019] (c) 이의 상보적 가닥이 엄격한 조건 하에서 (a) 또는 (b)에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되고, *rib* 리더의 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드,

[0020] (d) (a) 또는 (b)에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드와 70% 이상, 예를 들면 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 동일하고, *rib* 리더의 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 및

[0021] (e) (a) 내지 (d)에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드의 상보적 가닥인 폴리뉴클레오타이드

[0022] 로 구성된 군에서 선택되는 개질되거나 돌연변이된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것으로, 여기서 상기 폴리뉴클레오타이드, 특히 서열 번호:42에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 개질/돌연변이를 포함하고, 여기서 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적이 비-개질된 *rib* 리더에 비해 5% 이상 증가되고, 또한 리보플라빈 생산의 증가를 야기하고, 상기 개질/돌연변이가 (i) 터미네이터 및 이의 5' 측면 영역을 포함하는 *rib* 리더의 3' 단부에서의 하나 이상의 돌연변이; 및 (ii) *rib* 리더의 3' 단부에서의 하나 이상의 돌연변이와 함께 하나 이상의 *ribO* 돌연변이로 구성된 군에서 선택된다.

[0023] 서열 번호:42로 개시된 비-개질된 *rib* 리더는 바실러스 섭틸리스에서 단리된 서열 번호:1로 도시된 바와 같은 비-개질된 *rib* 오페론의 일부일 수 있다. 본 발명의 *rib* 리더 서열은 천연 *rib* 프로모터와 함께 또는 구성적 프로모터, 예를 들면 서열 번호:55 또는 56에 도시된 바와 같은 P_{spo15} 또는 P_{veg}와 함께 이용될 수 있다.

[0024] *rib* 리더에 도입되고, 리더의 3' 단부의 개질과 조합되어 본원에 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더 서열을 생성하는 *ribO* 돌연변이는 [Kil et al., 1992]에 의해 정의/특징화된 바와 같은 RFN을 비롯한 *rib* 리더의 5' 단부에서의 임의의 위치에 위치하고, 본원에 정의된 바와 같은 비-개질된 *rib* 리더를 갖는 균주에 비해 개선된 리보플라빈 생산을 야기하는 임의의 돌연변이(염기 교환, 결실, 삽입)를 의미한다.

[0025] 특히, 본 발명은 3' 부분이 개질되고 추가로 [Kil et al., (1992)]에 정의된 바와 같은 것에 상응하는 하나 이상의 *ribO* 돌연변이, 또는 하나 이상, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개의 *ribO* 돌연변이, 즉 치환을 서열 번호:42에 개시된 바와 같은 위치에 상응하는 위치(이는 예를 들면 위치 31, 39, 40, 41, 55, 85, 86, 88, 93, 116, 121 및 128에서 선택된다) 상에서 추가로 함유하는 개질된 *rib* 리더에 관한 것이다. 바람직하게는 *ribO* 돌연변이는 T31G, G39A, G40A, G41A, C55T, C85T, C86T, G88A, C93T, A116C, G121A, C128G 및 이의 조합에서 선택되고, 여기서 뉴클레오타이드는 서열 번호:42에 개시된 위치에 상응한다. 5' 단부에서 천연 *rib* 프로모터를 비롯한 이런 *ribO* 돌연변이를 갖는 *rib* 리더 서열의 예는 서열 번호: 45, 46 및 47에 도시되어 있다. 이들 *ribO* 돌연변이는 또한 예를 들면 각각 서열 번호:57, 58 또는 60 및 서열 번호:59에 개시된 P_{veg} 또는 P_{spo15}와 같은 구성적 프로모터에 융합될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더는 단일 *ribO* 돌연변이를 포함하고, 예를 들면 서열 번호:42에 도시된 바와 같은 위치 39, 40, 41, 85 또는 121에 상응하는 위치 상에서의 단일 *ribO* 돌연변이를 포함하고, 보다 바람직하게는 *ribO* 돌연변이는 G39A, G40A, G41A, C85T ("RK41"로 명명됨), G121A ("RK1a"로 명명됨) 및 이의 조합에서 선택된다. 상기 *ribO* 돌연변이는 또한 본원에 정의된 바와 같은 *rib* 리더의 3' 단부에서의 돌연변이와 조합된다.

[0026] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 개질된 *rib* 리더는 *rib* 리더의 3' 단부에서의 돌연변이와 조합된 하나 이상의 *ribO* 돌연변이를 갖는다. 3개의 *ribO* 돌연변이의 조합이 바람직하고, 서열 번호:42의 위치 39, 40 및 41에 상응하는 위치에서의 돌연변이의 조합이 보다 바람직하고, "트리플 *ribO*"라 불리는 *ribO* 돌연변이 G39-G40A-G41A가 보다 더 바람직하다. *rib* 리더로 도입된 이런 트리플 *ribO* 돌연변이의 예는 서열 번호:47(천연 *rib* 프로모터 포함)에 개시되어 있다. 이들 *ribO* 돌연변이는 또한 서열 번호:57에 개시된 바와 같이, 천연의 프로모터를 대체함으로써 구성적 프로모터에 융합될 수 있다.

[0027] 상기 *ribO* 돌연변이는 또한 *rib* 리더의 3' 단부에서의 개질과 조합된다. *rib* 리더의 3' 단부에서의 이런 개질은 터미네이터 또는 이의 작용성 부분의 적어도 결실을 포함하여 결과적으로 비-개질된 *rib* 리더를 갖는 숙주 세포에 비해 적합한 숙주 세포로 도입되었을 때 리보플라빈 생산을 증가시키는 본 발명의 개질된 *rib* 리더를 생성할 수 있다. 3' 단부에서의 이런 개질은 또한 터미네이터의 5' 측면 영역, 특히 RFN 요소의 3' 단부에 상응하는 뉴클레오타이드, 예를 들면 서열 번호:42의 뉴클레오타이드 166 내지 263 또는 136 내지 263에 상응하는 뉴클레오타이드의 개질, 예를 들면 결실을 포함할 수 있다.

[0028] 바람직한 실시양태에서, 상기 개시된 바와 같은 *ribO* 돌연변이와 조합된 *rib* 리더의 3' 단부에서의 개질은 RFN 요소의 3' 단부(즉, RNF 요소의 다운스트림에 위치한 모든 서열)와 *rib* 리더의 3' 단부 사이에서 위치하고, 여기서 전체 서열이 결실되거나 이의 부분만이 결실될 수 있다. 한 특정한 실시양태에서, 터미네이터 또는 이의 적어도 작용성 부분이 상기 결실에 포함된다.

[0029] 바실러스 섭틸리스에서 단리된 터미네이터 서열의 예는 서열 번호:39에 개시되어 있고, 이는 *rib* 리더로부터 결실되어 천연 *rib* 프로모터를 포함하는 예를 들면 서열 번호:51 또는 80에 도시된 바와 같은 개질된 *rib* 리더를 야기할 수 있다. 천연 프로모터는 또한 구성적 프로모터, 예를 들면 P_{spo15} 및 P_{veg}로 대체될 수 있다(예를 들면 서열 번호:63 또는 64 참고). 따라서, 본 발명의 개질된 *rib* 리더는 서열 번호:42의 뉴클레오타이드 231 내지 263에 상응하는 뉴클레오타이드에서 결실될 수 있고, 즉, "델 터미네이터("del terminator")라 불리는 (측면 영

역이 없는) 전체 터미네이터의 결실이 상기 정의된 임의의 *rib0* 돌연변이와 조합될 수 있다.

[0030] 터미네이터의 작용성 일부의 결실은 하나 이상의 스템 루프 및/또는 이의 측면 영역의 결실을 포함할 수 있다. 상기 특정된 *rib0* 돌연변이와 조합된, 터미네이터의 작용성 부분만이 결실된 *rib* 리더 서열의 예가 서열 번호:48, 49, 50, 77, 78 및 79에 개시되어 있다. 천연 *rib* 프로모터는 또한 구성적 프로모터, 예를 들면 P_{spo15} 및 P_{veg}로 대체될 수 있다(예를 들면 서열 번호:61 또는 62 참고). 서열 번호:42에 개시된 바와 같은 바실러스 섭틸리스 *rib* 오페론을 기준 서열로 고려하면, 이런 작용성 부분 결실은 "델 스템 루프-오른쪽(del stem loop-right)"이라고 명명된 뉴클레오타이드 250 내지 257, "델 스템 루프-왼쪽(del stem loop-left)"이라고 불리는 뉴클레오타이드 231 내지 238, 또는 "델 플랭크-오른쪽(del flank-right)"이라고 불리는 뉴클레오타이드 239 내지 263에 상응하는 뉴클레오타이드의 결실을 포함할 수 있다.

[0031] 터미네이터 및 5' 측면 영역이 결실되고 상기-특정된 *rib0* 돌연변이와 조합된 개질된 *rib* 리더 서열의 예가 서열 번호:52, 53, 81 및 82에 도시되어 있다. 천연 *rib* 프로모터는 또한 구성적 프로모터, 예를 들면 P_{spo15} 및 P_{veg}로 대체될 수 있다(예를 들면 서열 번호:65 참고). 서열 번호:42에 개시된 바와 같은 바실러스 섭틸리스 *rib* 오페론을 기준 서열로 고려하면, 본 발명의 개질된 *rib* 리더는 "스위치 결실"이라 불리는 서열 번호:42의 뉴클레오타이드 166 내지 263에 상응하거나, 또는 "델 엠로175(del mro175)"라 불리는 뉴클레오타이드 136 내지 263에 상응하는 뉴클레오타이드의 결실을 함유할 수 있고, 이는 임의의 상기 *rib0* 돌연변이와 조합된다.

[0032] 본원에 개시된 바와 같은 개질된 *rib* 리더 서열은 *rib* 리더의 3' 단부에서의 돌연변이/개질과 조합된 상기 정의된 바와 같은 *rib0* 돌연변이를 갖고, 여기서, 3' 단부에서의 개질은 예를 들면 완전한 터미네이터의 결실, 터미네이터의 작용성 부분의 결실, 또는 5' 측면 영역과 함께 터미네이터의 결실에서 선택될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 일부로서, 본원에 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더 서열은 *rib* 리더의 3' 단부에서의 돌연변이/개질을 가질 수 있고, 여기서 개질은 터미네이터의 5' 측면 영역, 예를 들면 터미네이터의 60, 70, 80, 90 또는 100 업스트림, 특히 64 또는 94 뉴클레오타이드 업스트림, 바람직하게는 서열번호:42의 뉴클레오타이드 166 내지 263 또는 136 내지 263에 상응하는 뉴클레오타이드와 함께 터미네이터의 결실로부터 선택될 수 있다.

[0034] 한 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더를 갖는 숙주 세포는 [Kil et al. (1992)]에 정의된 바와 같은 공지된 *rib0* 돌연변이체, 예를 들면 *rib0* 돌연변이체 T31G, G39A, G40A, G41A, C55T, C85T, C86T, G88A, C93T, A116C, G121A, C128G 및 이의 조합(여기서 뉴클레오타이드는 서열 번호:42에서의 위치에 상응한다)과 비교하였을 때 25 mg/l 이상, 예를 들면 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 mg/l 이상, 심지어는 1 g/l 이상의 리보플라빈을 배양 배지에서 축적할 수 있다. 당분야의 숙련자는 이런 양이 배양 조건, 숙주 품종 및/또는 기질에 따라 다양하다는 것을 알고 있다.

[0035] 한 실시양태에서, 본 발명의 개질된 *rib* 리더는 전체 터미네이터의 결실, 스위치 결실 또는 델 엠로175(상기 참조)에서 선택되는 3' 단부 결실과 조합된 바실러스 섭틸리스 *rib* 오페론(서열 번호:42)에서 RK1a, RK41 또는 트리플 *rib0*에서 선택된 *rib0* 돌연변이에 상응하는 *rib0* 돌연변이를 함유한다. 바람직한 조합은 RK1a와 델 터미네이터, 스위치 결실 또는 델 엠로175이다. 또한 RK41과 델 터미네이터, 스위치 결실 또는 델 엠로175의 조합이 또한 바람직하다. 트리플 *rib0*의 델 터미네이터, 스위치 결실 또는 델 엠로175와의 조합이 또한 바람직하다. 본 발명의 개질된 *rib* 리더가 RK41과 델 터미네이터의 조합, RK41과 스위치 결실의 조합, 트리플 *rib0*와 델 엠로175의 조합을 함유하는 것이 보다 바람직하다. 상기 개시된 *rib* 리더 서열이 P_{spo15} 및 P_{veg}와 같은 구성적 프로모터에 융합된 것이 보다 더 바람직하다(예를 들면 서열 번호::67, 68, 69, 70 또는 71 참조).

[0036] 본 발명에 따른 개질된 *rib* 리더는 또한 mRNA 안정화 요소의 도입을 통한 개질을 포함할 수 있다. 이런 요소는 *rib* 유전자의 프로모터와 코딩 서열 사이에 도입될 수 있다. 이런 요소의 예는 서열 번호:43(소위 *aprE* mRNA 안정화 요소) 또는 서열 번호:44(소위 *grpE* mRNA 안정화 요소)에 도시된 것들, 및 바람직하게는 매우 엄격한 조건 하에서 이에 혼성화되는 서열을 포함한다.

[0037] 본 발명의 핵산 서열, 즉, 개질된 *rib* 리더 서열은 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터중 하나인 적절한 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 프로모터는 천연의 것이거나 또는 리보플라빈 생합성에 관련된 각각의 유전자에 원래는 천연적으로 연결되어 있지 않은 프로모터일 수 있다. 당 분야의 숙련자들은 적절한 프로모터를 선택하는 방법을 알 것이다. 유용한 프로모터의 예는 문헌에서 발견할 수 있고, 특히 유럽 특허 제405370호를 참고할 수 있다.

[0038] 따라서, 본 발명은

[0039] (a) 서열 번호:65, 67, 68, 69, 70 또는 71에 따른 (개질된) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드;

[0040] (b) 그의 상보적 가닥이 엄격한 조건 하에서 (a)에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되고 개질된 *rib* 리더의 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드;

[0041] (c) (a)에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드와 70% 이상, 예를 들면 80, 85, 90, 95 또는 98% 동일하고, 개질된 *rib* 리더의 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드; 및

[0042] (d) (a) 내지 (c)에서 정의된 폴리뉴클레오타이드의 상보적 가닥인 폴리뉴클레오타이드

[0043] 로 구성된 군에서 선택되고, 여기서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 특히 서열 번호:65, 67, 68, 69, 70 또는 71에 개시된 서열이 개질되거나 돌연변이된 서열로 언급되고, 이를 적합한 숙주 세포로 도입하였을 때 상응하는 비-개질된 서열을 갖는 세포와 비교하였을 때 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적이 5% 이상 증가되는 개질되거나 돌연변이된 폴리뉴클레오타이드(*rib* 리더 서열)에 관한 것이다.

[0044] 본원에서 이용되는 용어 "*rib* 리더 서열"은 구성적 *rib* 유전자의 발현에 영향을 미치는 번역되지 않은 조절 요소를 함유하고 하나 이상의 다운스트림 *rib* 유전자와 관련된 임의의 DNA 서열을 의미한다. 이들 조절 요소는 전형적으로 (i) DNA 서열의 3' 단부에서의 터미네이터, (ii) 안티-터미네이터, 및 (iii) 터미네이터의 RFN 결합 부위 업스트림을 포함한다. 바실러스 섭틸리스로부터 공지된 바와 같이, *rib* 리더는 오페론의 첫번째 유전자인 *ribG*의 전사 출발 코돈과 번역 출발 코돈 사이의 *rib* 오페론의 5' 영역에 위치하는 거의 300개 뉴클레오타이드를 포함한다. 바실러스 섭틸리스의 *rib* 리더에서의 터미네이터 서열은 뉴클레오타이드 231 내지 263에 위치한다(도 1 참고). 이런 *rib* 리더 서열은 또한 바실러스, 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 특히 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 스테아로테르모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 바실러스 할로두란스(*Bacillus halodurans*), 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphteriae*) 및 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 슈도모나스 아에로기노사(*Pseudomonas aeroginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 또는 슈도모니스 시링기아에(*Pseudomonas syringiae*)와 같은 다른 진정 박테리아에서 확인되어왔다(본원에 참고로 혼입되어 있는 [Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002]의 표 1 참조).

[0045] 본원에서 이용되는 용어 "RFN 요소"는 *rib* 리더 서열 내부의 매우 보존된 DNA 서열을 의미한다. mRNA로 전사된 후, RFN 요소는 FMN에 대한 결합 부위를 형성하는 5개의 헤어핀을 갖는 보존된 구조로 절첩될 수 있다. 잠재적인 RNF 요소는 비-코딩 RNA 패밀리를 나타내는 다중 서열 배열 및 공분산 모델의 콜렉션인 RFAM(Griffiths-Jones et al.: Rfam: an RNA family database. Nucleic Acids Res 2003, 31:439-441; http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/getacc?RF00050에서 이용가능)을 이용하여 확인될 수 있다. 다양한 박테리아 게놈에서의 RFN 요소의 예가 [Gelfand et al., Trends Genet. 15, 439-442, 1999]에 제공되어 있다. 서로 다른 유기체에서 나온 RFN 요소의 뉴클레오타이드 서열을 비롯한 개론이 [Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002]의 도 2에 제시되어 있다. [Mironow et al., Cell 111(5):747-56, 2002]의 정의에 따르면, 바실러스 섭틸리스의 *rib* 리더 서열 내부의 RFN 요소는 뉴클레오타이드 22 내지 165 사이에 위치한다(서열 번호:42 또는 도 1 참조). [Vitreschak et al., 2002]의 도 2에 도시된 배열의 도움을 받아, 당 분야의 숙련자들은 이런 RFN 요소를 함유하는 유기체에서 리보플라빈 생산의 증가를 야기하는 개질된 *rib* 리더를 생성할 수 있다.

[0046] 용어 "비-개질된 *rib* 리더" 또는 "비-개질된 폴리뉴클레오타이드" 및 "야생형 *rib* 리더" 또는 "야생형 폴리뉴클레오타이드"를 본원에서 상호교환되게 사용한다. 비-개질된 *rib* 리더 또는 비-개질된 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 매우 엄격한 조건 하에서 서열 번호:42에 도시된 서열에 혼성화하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, *rib* 리더의 억제 효과를 경감시키고, *rib* 유전자 mRNA의 안정성을 증가시키고, *rib* 오페론이 보다 많이 규제완화되게 하고/하거나, 주어진 미생물에서 리보플라빈의 생산을 증가시키기 위해 특이적 효과를 증가시키는 것이 바람직하다. 그런 다음, 이들 서열을 본 발명에 따른 증가된 활성을 갖는 돌연변이체 *rib* 리더를 고안하기 위한 출발점으로 이용한다. 본 발명에서 "야생형"은 천연에서 유래할 수 있는 서열뿐만 아니라 합성 서열의 변이체(이들이 본 발명의 임의의 개시에 따라 보다 활성이 될 수 있다면) 둘 모두를 포함한다. 특히, 이런 폴리뉴클레오타이드는 원핵세포 기원, 바람직하게는 박테리아 기원, 특히 그램 양성 또는 그램 음성

박테리아, 예를 들면 바실러스, 바람직하게는 바실러스 섭틸리스에서 기원한다.

[0047] 용어 "개질된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "개질된 *rib* 리더" 및 "돌연변이 폴리뉴클레오타이드" 또는 "돌연변이 *rib* 리더"는 본원에서 서로 교환가능하게 사용된다. 돌연변이/개질된 폴리뉴클레오타이드 또는 개질된 *rib* 리더는 본 발명의 교시에 따른 주어진 야생형 폴리뉴클레오타이드/*rib* 리더(상기 정의에 따른)에서 유래될 수 있고, 각각의 야생형 서열에 비해 보다 활성인(예를 들면 주어진 기질로부터 생성된 리보플라빈을 측정가능하게 증가시키거나 증가된 *rib* mRNA 안정성을 갖는) 임의의 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 범위에서, 돌연변이체가 어떻게 수득되었는지는 문제가 되지 않는다. 이런 돌연변이체는 부위-지향적 돌연변이생성, 포화 돌연변이생성, 무작위 돌연변이생성/지향적 진화, 전체 세포/유기체의 화학적 또는 UV 돌연변이생성, 및 당 분야에 공지된 다른 방법에 의해 수득될 수 있다. 이들 돌연변이체는 또한 예를 들면 합성 유전자를 고안함으로써 생성될 수 있다. *rib* 리더 서열에서의 개질, 및 *rib* 유전자의 발현에 미치는 이의 효과는 당 분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들면 이들 방법은 리포터 유전자로서 베타-갈락토시다제를 이용한 분석, 또는 야생형 *rib* 리더 서열 대신 또는 이에 추가하여 개질된 *rib* 리더 서열을 함유하는 미생물의 배양액으로 리보플라빈을 분비시키는 것을 포함한다. 각각의 mRNA 수준에 미치는 개질된 *rib* 리더의 (양성) 효과는 또한 노던 블럿(Northern blot) 또는 실시간 PCR을 통해 측정될 수 있다.

[0048] 당 분야의 숙련자들은 mRNA 안정화 요소의 도입 및/또는 천연 프로모터의 대체를 비롯한 돌연변이된/개질된 *rib* 리더 서열을 생성하는 방법을 알고 있다. 한 실시양태에서, 개질된 *rib* 리더는 mRAN 안정화 요소를 이전의 비-개질된 *rib* 리더에 도입함을 통해 생성된다. 이런 mRNA 안정화 요소의 도입에 유용한 방법의 한 예가 도 2에 도시되어 있다.

[0049] 돌연변이된/개질된 *rib* 리더 서열의 이런 생성은, 예를 들면 *rib* 유전자 발현에 대한 억제 효과가 비-개질된 *rib* 리더에 비해 완화되거나 감소되고, 이는 또한 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적을 증가시키고, 리보플라빈 생산의 효율 및/또는 수율을 증가시키는 돌연변이된 *rib* 리더를 생성하는 본원에 개시된 바와 같은 방식으로 숙주 유기체를 유전적으로 개질시킴으로써 달성될 수 있다. 따라서, 개질된 *rib* 리더를 이용함으로써 *rib* 오페론은 비-개질된 *rib* 리더를 갖는 균주에 비해 덜 조절되거나 보다 많이 규제완화된다.

[0050] 본원에서 이용되는 "개선된 활성"은 리보플라빈 생산 미생물에서 *rib* 리더의 억제 효과의 (전체적 또는 부분적) 완화 또는 감소/조절의 감소로서 이해되어야만 한다. 따라서, 본 발명의 목적에서, 증가된 활성을 갖는 개질된 *rib* 리더는 *rib* 유전자의 전사에 대해 덜 억제적 영향을 미쳐서 비-개질된 *rib* 리더에 비해 *rib* 오페론의 규제완화를 야기한다. 또한, 본원에 정의된 바와 같은 개선된 활성을 갖는 개질된 *rib* 리더는 노던 블럿 또는 실시간 PCR로 측정하였을 때 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% 이상, 또는 심지어는 500% 이상 증가된 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA의 축적을 야기한다. 이는 *rib* 리더의 최소화된 억제/규제시 리보플라빈의 생산 증가를 통해, 또는 *rib* 유전자에서 전사된 리보플라빈 생합성 효소의 농도 또는 전장 전사체의 mRNA 농도의 측정을 통해 (간접적으로) 측정가능하다. 개질된 *rib* 리더는 야생형 *rib* 유전자에 비해 *rib* 유전자 발현에 대해 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% 이상, 또는 심지어는 500% 이상 덜 억제/규제된다. 따라서, 개선된 활성을 갖는 개질된 *rib* 리더란 본원에 정의된 바와 같은 비-개질된 *rib* 리더에 비해 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% 이상, 또는 심지어는 500% 이상 증가된 규제완화 수준을 갖는 *rib* 리더를 의미한다.

[0051] 본원에서 이용되는 용어 "mRNA 안정화 요소"란 5'-비번역된 영역, 예를 들면 각각의 유전자의 전사 출발의 다운스트림에 도입되었을 때 mRNA 안정화 요소를 포함한 개별적인 유전자로부터 전사되는 mRNA에 증가된 안정성을 제공할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. mRNA 안정화 요소는 바람직하게는 1개 이상의 스템 루프를 함유하지만, 스템 루프를 전혀 함유하지 않을 수도 있다.

[0052] 바람직하게는 리보플라빈의 생산에 관련된 하나 이상의 표적 유전자에서 나온 mRNA 전사체의 증가된 안정성을 야기하는 하나 이상의 스템 루프를 형성할 수 있는 임의의 핵산 서열은 본 발명의 범위 이내이다. 반드시 루프를 형성하지는 않는 강한 리보솜 결합 부위를 통한 mRNA의 안정화 또한 가능하다.

[0053] 상기 정의된 바와 같은 mRNA 안정화 요소는 임의의 길이일 수 있지만, 바람직하게는 적어도 15개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 39 내지 87개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 바람직하게는 하나 이상의 스템 루프, 특히 1 또는 2개의 스템 루프를 포함한다. 스템은 적어도 4개의 염기 쌍, 바람직하게는 적어도 8, 10, 12, 15개의 염기쌍(미스매치 뉴클레오타이드/내부 루프 및/또는 벌지(bulge) 루프가 아마도 존재할 수 있다)으로 구성되고, 루프는 예를 들면 3 내지 30개의 결합되지 않은 뉴클레오타이드, 바람직하게는 4, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 25개 이상의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 내부 루프의 길이는 바람직하게는 2, 4, 6, 8, 10, 12개의 결합되지 않은 뉴클레오타이

드이다. 1, 2 또는 심지어 6개의 결합되지 않은 뉴클레오타이드로 구성된 하나 이상의 벌지 루프가 존재할 수 있다. 스템 루프의 계산된 열역학적 안정성(△G)은 [Zuker ,2003, Nucleic Acids Res. 31:3406-3415]에서 개발된 알고리즘에 따라 계산될 수 있다. 한 실시양태에서, 계산된 열역학 안정성은 -2.8 kcal/mol 이하이고, 바람직하게는 -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -15, -20 kcal/mol 또는 그 이하이다. 본 발명의 다른 실시양태에서, mRNA 안정화 요소는 루프를 전혀 포함하지 않을 수 있다.

[0054] *rib* mRNA 전사체의 안정성 또는 일체성은 예를 들면 [Allenby et al., Microbiology, 150, p.2619-2628 (2004)] 또는 [Sharp and Bechhofer, Mol. Microbiol. 57, 484-495 (2005)]에 개시된 바와 같은 노던 블럿 및/또는 실시간 PCR을 이용한 mRNA 반감기의 측정에 의해 측정될 수 있다. 본원에서 이용되는 mRNA 안정성 또는 일체성은, 상기 mRNA의 반감기가 야생형 *rib* 오페론으로부터 전사된, 즉 본 발명의 개질된 *rib* 리더를 함유하지 않는 mRNA의 반감기에 비해 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% 이상, 또는 심지어는 500% 이상 증가된 경우, 증가된다(또는 mRNA 분해가 감소/차단된다).

[0055] 주형 DNA는 리보플라빈 생산을 위해 사용되는 동일하거나 상이한 숙주 세포에서 유래될 수 있다. 또한, 반응을 위한 주형은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 공지되어 있거나 추측되는 균주로부터 제조된 mRNA의 역전사에 의해 수득된 cDNA일 수 있다. PCR 생성물을 서브클로닝하고, 증폭된 서열이 본원에 개시된 것과 같은 신규한 핵산 서열 또는 이의 작용성 등가물을 나타내는 것을 보증하도록 서열확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 핵산 서열은 당 분야에 잘 공지된 방법을 이용하여 완전하게 또는 부분적으로 합성될 수 있다.

[0056] 본 발명은 또한 엄격한 조건 하에서 본원에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하고 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적을 개선시킬 수 있는 폴리뉴클레오타이드(*rib* 리더 서열) 및 리보플라빈 생산을 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

[0057] 본 발명은 또한 본원에 정의된 폴리뉴클레오타이드에 70% 이상 동일하고 개질된 *rib* 리더의 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 및 리보플라빈의 생산을 위한 이의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호:42, 55, 56, 67, 68, 69, 70, 71에 도시된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보체에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일하다.

[0058] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 DNA를 증폭하거나 검출하고, 이런 *rib* 리더 서열을 또한 갖는 미생물의 관련 종 또는 계열을 확인하는데 사용될 수 있는 프라이머, 프로브 및 단편에 관한 것이다.

[0059] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 벡터로 유전자 조작된 미생물에 관한 것이다.

[0060] 본 발명은 또한 본원에 정의된 바와 같은 개질된 폴리뉴클레오타이드를 갖는 미생물을 생성하는, 즉 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA 전사체의 축적을 증가시키기 위해 적합한 미생물을 유전자 조작하는 방법, 및 리보플라빈 생산의 수율 및/또는 효율을 개선 및/또는 개량시키기 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

[0061] 본원에 개시된 바와 같은 DNA 서열의 도입은 예를 들면 숙주 세포의 염색체로의 형질감염, 컨쥬게이션 또는 형질도입에 의한 DNA 서열의 첨가 또는 삽입일 수 있다. 이런 첨가 또는 삽입은 또한 염색체 DNA 뉴클레오타이드를 제거 또는 결실시키거나 시키지 않을 수 있는 DNA 재조합에 의해 발생할 수 있다. DNA 서열을 숙주 세포, 예를 들면 미생물로 도입하는 방법은 특히 부위-특이적 도입에 의해 달성되고, 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면 [Press, N. Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.)]에 개시되어 있다.

[0062] 적합한 숙주 세포는 리보플라빈을 생산할 수 있는, 예를 들면 주어진 탄소 공급원을 리보플라빈으로 전환시키고, 비-개질된 리더 또는 이의 등가물 또는 상동체를 비롯한 비-개질된 *rib* 오페론(이는 후속적으로 본원에 개시된 바와 같이 리보플라빈 생산의 증가를 야기하는 방식으로 돌연변이된다)을 갖고 있는 미생물, 또는 상기 *rib* 오페론/*rib* 리더 또는 이의 등가물의 개질된 버젼이 도입된 미생물을 포함한다. 따라서 이런 세포는 "재조합 세포" 또는 "형질변환된 세포"라고 불린다. 이런 비-개질된 *rib* 오페론/*rib* 리더 또는 이의 등가물을 갖고 있는 적합한 미생물은 박테리아, 예를 들면 야생형이거나, 전통적인 돌연변이생성 및 선택 방법에 의해 유래된 돌연변이 균주 또는 재조합 균주인 그램 음성 및 그램 양성 박테리아에서 선택될 수 있다. RFN 요소를 갖고 있는 적합한 균주는 [Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002]의 표 1 및 도 2에 열거되어 있다. 이런 박테리아의 예는 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 데이오노코커스(*Deionococcus*), 테르무스(*Thermus*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 클로로플렉수스(*Chloroflexus*) 및 테르모모노스포라

(*Thermomonospora*)로 구성된 군에서 선택된다. 바람직하게는, 미생물 또는 숙주 세포는 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 스테아로테르모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 바실러스 할로두란스(*Bacillus halodurans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 및 스트렙토코커스 오레우스(*Streptococcus aureus*), 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*) 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 또는 덜 관련된 유기체, 예를 들면 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*), 테르모모노스포라 푸스카(*Thermomonospora fusca*), 데이오노코커스 라디오두란스(*Deionococcus radiodurans*), 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*), 테르모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*), 푸소박테리움 누클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*) 및 클로로플렉수스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로 구성된 군에서 선택된다. 바실러스 섭틸리스, 특히 바실러스 섭틸리스 1A747 또는 바실러스 섭틸리스 168이 보다 바람직하다. 예를 들면 본원에 개시된 바와 같은 바실러스 섭틸리스에서 나온 규제완화된/개질된 *rib* 리더를 이용하여 상기 언급된 다른 미생물중 하나의 천연/야생형 *rib* 리더와 대체하거나, 상기 언급된 다른 미생물의 개질된 *rib* 리더를 바실러스 섭틸리스의 *rib* 오페론의 앞쪽에 이용하는 것 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0063] 상기 개질된 *rib* 리더를 갖고 있는 이런 미생물은 또한 유전자 개질된 미생물 또는 재조합 미생물, 또는 재조합 생산된/유전자 조작된 숙주 세포로 언급된다.

[0064] 본 발명에서 이용될 수 있는 미생물은 다양한 공급원, 예를 들어, 독일 생물자원은행(DSMZ)(독일 데-38124 브라운슈베이그 인호프펜스트라쎄 7베 소재), 미국 균주 보존 센터(ATCC)(미국 버지니아주 20108 마나사스 피.오. 박스 1549 소재), 미국 농무성 균주 보존 센터(NRRL)(미국 일리노이주 페오리아 소재), NITE 생물 자원 센터(일본 292-0818 시바현 기자라주시 가주사카마타리 2-5-8 소재)(이전 명칭: 오사카 발효 연구소(IFO)(일본 532-8686 오사카시 요도가와쿠 주소-혼마치 2-초메 17-85 소재)의 배양 균주 보존 부서, 또는 바실러스 유전 보존 센터(BGSC)(미국 오하이오주 43210 콜롬버스 오하이오 주립 대학 소재)로부터 공개적으로 입수할 수 있다.

[0065] 본 발명과 관련하여, 상기 미생물은 원핵생물 국제 명명법에 의해 정의된, 동일한 생리학적 성질을 갖는 종의 동명 또는 이명도 포함함을 이해해야 한다. 본원에서 사용된 미생물 명명법은 국제 원핵생물 분류 위원회, 및 국제 미생물학회 연맹의 박테리아 및 응용 미생물 부서에 의해 공식적으로 승인된 명명법이고, 공개 문헌(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology(IJSEM))에 의해 공개되어 있다.

[0066] 본 발명은 개질로 인해 글루코스와 같은 기질로부터 리보플라빈의 수율, 생산 및/또는 효율의 증가가 야기되는 개질된 미생물에 관한 것이다. 이는 본원에 정의된 바와 같은 *rib* 리더의 활성을 증가시킴으로써, 즉 규제 수준을 감소시킴으로써 수행될 수 있다. 또한 본 발명의 미생물은 이런 개질이 리보플라빈 생산의 수율, 생산 및/또는 효율에 직접적인 영향을 미치는 한 추가의 개질을 갖고 있을 수 있다.

[0067] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 개질된 *rib* 리더, 및 예를 들면 *rib* 오페론의 천연 프로모터를 P_{spo15} 또는 P_{veg}와 같은 강한 (구성적 또는 유도성) 프로모터로 대체하는 것과 같은 추가의 개질을 갖는 미생물에 관한 것이다. 이런 강한 프로모터의 도입은 천연 프로모터의 개질된 *rib* 리더 다운스트림을 갖고 있는 미생물에 비해 적어도 50%, 75%, 100%, 200%, 250%, 300%, 350%, 500%, 또는 심지어는 1000% 이상 리보플라빈 생산을 증가시킨다. 이는 또한 하나 이상의 *rib* 유전자, 특히 *ribA*의 과발현에 의해 증가될 수 있거나, 또는 바실러스 섭틸리스 균주 RB50(예를 들면 유럽 특허 제405370호 참조)에서 실시된 바와 같이 숙주 세포에서 여러 카피의 *rib* 오페론을 도입함으로써 증가될 수 있다. 바실러스 섭틸리스 RB50에서의 리보플라빈 생산과 비교하였을 때, 강한 프로모터에 융합된 본원에 개시된 바와 같은 *rib* 리더에서 개질을 갖도록 미생물을 유전자 변형시킴으로써, 리보플라빈 생산은 적어도 100%, 200%, 250%, 500%, 또는 심지어는 750% 이상 증가될 수 있다. 강한 프로모터 및/또는 여러 커피의 *rib* 오페론의 도입과 선택적으로 조합된 본원에 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더를 갖고 있는 미생물은 또한, 예를 들면 제WO 07/051552호에 개시된 바와 같은 개질된 트랜스케톨라제 유전자의 도입과 조합된 예를 들면 유럽 특허 제1186664호에 개시된 바와 같은 바이오틴에 대한 영양요구성을 도입하고/하거나 리보플라빈의 생산으로부터 성장을 분리시킴으로써 추가로 변화될 수 있다.

[0068] 본 발명은 (i) *rib* 리더의 3' 단부에서의 개질과 함께 하나 이상의 *ribO* 돌연변이 또는 (ii) 터미네이터 및 이의 5' 측면 영역의 결실을 갖고 있는 본원에 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더를 제공하며, 여기서, 상기 개질된 *rib* 리더는 강한 프로모터, 예를 들면 P_{spo15} 또는 P_{veg}에 융합된다.

[0069] 리보플라빈 생산에 특히 바람직한 균주는 바실러스 섭틸리스이다. 보다 바람직한 균주는 *rib* 유전자의 전사를 개선시키기 위해 강한 프로모터인 P_{spo15}로 개질된 *rib* 오페론을 암호화하는 여러(n) 카피(예를 들면 약 5 내지 약 20개 카피)의 pRF69를 함유하는 바실러스 섭틸리스 RB50::$[pRF69]_n$이다(예를 들면 리보플라빈을 생산하는 균주의 구축 및 배양 조건에 대해서는 유럽 특허 제405370호 및 [Perkins et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 22:8-18, 1999]를 참고할 수 있다). 바실러스 섭틸리스 RB50 및 플라스미드 pRF69는 각각 NRRL(수탁 번호 B 18502) 및 ATCC(수탁 번호 ATCC 68338)에서 이용가능할 수 있다.

[0070] 본 발명의 추가의 목적에 따르면, 상기 정의된 바와 같은 개질된 폴리뉴클레오타이드 또는 이런 폴리뉴클레오타이드로 유전자 조작된 미생물의 리보플라빈 생산을 위한 용도가 제공된다.

[0071] 본 발명은 또한 개질된 *rib* 리더를 비롯한 (개질된) *rib* 오페론을 미생물에서 발현시키는 방법, 미생물에서 상기 정의된 바와 같은 (개질된) 폴리뉴클레오타이드를 생산하는 방법, 및 리보플라빈을 생산할 수 있는 이런 개질된 미생물의 생산 방법에 관한 것이다. 모든 이런 방법은 미생물을 변형시키는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 본원에서 사용되는 "변형"은 리보플라빈의 수율 및/또는 생산성 및 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA의 축적 둘 모두가 야생형 미생물에 비해 개선될 수 있는 방식으로 "유전적으로 변형"시키는 방법을 포함한다. 용어 "변형"은 또한 본원에 개시된 바와 같은 개질된 폴리뉴클레오타이드의 생성, 특히 *rib* 리더의 개질을 포함한다. 본원에서 사용되는 "리보플라빈의 개선된 수율"은 야생형/비-개질된 미생물, 즉 유전적으로 변형되지 않은 미생물과 비교하였을 때 적어도 50%, 75%, 100%, 200%, 250%, 300%, 350%, 500% 또는 심지어는 10000% 이상 또는 100000% 이상(상기 참조)의 증가를 의미한다.

[0072] 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된"은 살아있는 유기체에서 유전 물질의 구조의 과학적 변형을 의미한다. 이는 재조합 DNA의 생산 및 사용을 포함한다. 보다 구체적으로, 이는 자연적으로 발생하는 유기체로부터 유전자 조작되거나 개질된 유기체를 설명하기 위해 이용된다. 유전자 조작은 당 분야에 공지된 다수의 기법, 예를 들면 유전자 치환, 유전자 증폭, 유전자 붕괴, 첨가, 삽입, 결실, 형질감염, 플라스미드, 바이러스 또는 다른 벡터를 이용한 형질변환이다. 유전적으로 개질된 유기체, 예를 들면 유전자 개질된 미생물은 또한 재조합 유기체, 예를 들면 재조합 미생물이라고 불린다. 유전자 조작된 미생물은 상기 정의된 바와 같은 개질된 *rib* 리더를 갖고 있다.

[0073] 본 발명에 따르면, 리보플라빈의 수율, 생산 및/또는 생산 효율이 개선되도록 본 발명의 이런 개질된 *rib* 리더를 갖고 있는 유전자 조작된/재조합 생산된 숙주 세포(이는 또한 재조합 세포 또는 형질변환된 세포로 언급된다)가 제공된다. 숙주 세포는 주어진 탄소 공급원으로부터 리보플라빈을 생산할 수 있는 미생물, 특히 바실러스, 바람직하게는 바실러스 섭틸리스로부터 선택될 수 있다.

[0074] "형질변환된 세포" 또는 "재조합 세포"는 재조합 DNA 기법을 이용하여 손상되지 않은 전장 *rib* mRNA의 축적을 증가 및/또는 개선시키는 본 발명에 따른 핵산이 도입되는 세포(또는 이의 선조)이다. 이는 또한 하나 이상의 돌연변이가 상기 세포에 이미 존재하는 야생형 *rib* 리더에 도입되는 것을 포함한다. 적합한 숙주 세포는 리보플라빈을 생산할 수 있는, 예를 들면 주어진 탄소 공급원을 상기 정의된 바와 같은 리보플라빈으로 전환시킬 수 있는 미생물의 세포를 포함한다. 이런 발효 공정을 수행하기에 유용한 균주는 상기에 열거되어 있고, 당 분야에 공지되어 있다.

[0075] 본 발명의 핵산은 바람직하게는 단리된 형태로 제공되고, 바람직하게는 균일하게 정제된다.

[0076] 용어 "단리된"은 물질이 원래의 환경(예를 들면 천연 발생되는 경우 천연 환경)으로부터 제거됨을 의미한다. 예를 들면 살아있는 미생물에 존재하는 천연 발생 폴리뉴클레오타이드는 단리되어 있지 않지만, 천연 시스템에서 공존하는 일부 또는 모든 물질과 분리된 동일한 뉴클레오타이드는 단리되어 있다. 이런 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이런 폴리뉴클레오타이드는 조성물의 일부일 수 있고, 이런 벡터에서 여전히 단리되어 있을 수 있거나, 조성물이 천연 환경의 일부가 아닐 수 있다.

[0077] 본원에서 이용되는 용어 "유전자"는 단백질, 예를 들어, 리보플라빈 생합성에 관련된 단백질, 예를 들면, 바실러스 서브틸리스 리보플라빈 생합성 경로에서 나온 효소를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는, 염색체 DNA로부터 단리될 수 있는 핵산 분자를 지칭한다.

[0078] 유전자는 코딩 서열, 및 이로부터 유래된 폴리펩타이드의 적절한 발현 및 안정화에 중요한 비-코딩 서열, 예를 들면 유전자의 코딩 서열의 3' 단부 및 5' 단부에 위치한 비번역된 서열, 예를 들면 프로모터 영역, 조절자 영역, 터미네이터 영역을 포함할 수 있다.

[0079] 본원에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산 분자"는 DNA 분자(예를 들면, cDNA 또는 게놈 DNA) 및 RNA 분자(예를 들면, mRNA), 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA 유사체를 포함하고자 한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산은 올리고뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체(예를 들어, 이노신 또는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드)를 사용하여 합성될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 변화된 염기쌍 형성 능력 또는 뉴클레아제에 대한 증가된 내성을 나타내는 핵산을 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0080] 달리 명시하지 않은 한, 본원에서 DNA 분자를 서열분석하여 확인한 모든 뉴클레오타이드 서열은 자동화된 DNA 시퀀서를 이용하여 확인되었다. 따라서, 당업계에 공지된 바와 같이 임의의 DNA 서열이 상기 자동화된 방법에 의해 확인된 경우, 본원에서 확인된 임의의 뉴클레오타이드 서열은 일부 오차를 가질 수 있다. 자동화된 방법에 의해 확인된 뉴클레오타이드 서열은 서열분석된 DNA 분자의 실제 뉴클레오타이드 서열과 전형적으로 약 90% 이상, 더 전형적으로 약 95% 이상 내지 99.9% 이상 동일하다. 실제 서열은 당업계에 잘 공지되어 있는 수동 DNA 시퀀싱 방법을 포함하는 다른 방법들에 의해 더 정확히 확인될 수 있다.

[0081] 당업자는 착오로 확인된 염기를 확인할 수 있고 이러한 착오를 보정하는 방법을 알고 있다.

[0082] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 이들이 개질되었는지 비-개질되었는지와 무관하게 혼성화 프로브 또는 PCR 프라이머로서 이용될 수 있다. 바실러스와 밀접하게 관련되고 적합한 숙주 세포로서 상기 개시된 바와 같은 다른 미생물에서 상동성 *rib* 리더 서열의 기능 또는 활성을 개선 및/또는 개량하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드의 용도가 또한 포함된다. 본원에서 이용되는 용어 "상동성 *rib* 리더 서열"은 서로 다른 RFN 요소가 배열되어 있는 [Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002]의 도 2에 따른 서로 다른 미생물에서 나온 *rib* 리더 서열을 포함한다. 이 배열을 이용하여, 당 분야의 숙련자들은 본원에 개시된 바와 같은 열거된 미생물에서 개질된 *rib* 리더 서열을 생성시키기 위해, 바실러스 섭틸리스에서 기원한 본원에 개시된 것에 상응하는 *rib* 리더의 일부를 쉽게 확인할 수 있다.

[0083] 본 발명은 또한 엄격한 조건하에서, 바람직하게는 매우 엄격한 조건 하에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들면 서열 번호:42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82에 도시된 폴리뉴클레오타이드, 바람직하게는 서열 번호:42, 67, 68, 69, 71, 70에서 선택되는 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되는 단리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 유리하게는, 이런 폴리뉴클레오타이드는 리보플라빈을 생성할 수 있는 미생물, 특히 바실러스 섭틸리스에서 수득될 수 있다.

[0084] 본원에서 사용된 용어 "혼성화"는 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 더 바람직하게는 약 80% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 약 85 내지 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 서로에 대해 상동성인 뉴클레오타이드 서열들이 전형적으로 서로에 대해 혼성화된 상태로 유지되는 혼성화 조건 및 세척 조건을 표현하고자 한다.

[0085] 엄격한 혼성화 조건의 바람직한 비-제한적 예는 약 45℃에서 6x 염화나트륨/시트르산나트륨(SSC)에서의 혼성화 후 50℃, 바람직하게는 55℃, 더 바람직하게는 60℃, 훨씬 더 바람직하게는 65℃에서 1x SSC 및 0.1% SDS에서의 1회 이상의 세척이다.

[0086] 매우 엄격한 조건은 표지된 DNA 프로브, 예를 들면, 디곡시게닌(DIG)-표지된 DNA 프로브를 사용하여 42℃에서 수일 동안, 예를 들면, 2 내지 4일 동안 항온처리한 후, 실온에서 2x SSC 및 0.1% SDS에서 1회 이상 세척하고 65 내지 68℃에서 0.5x SSC 및 0.1% SDS 또는 0.1x SSC 및 0.1% SDS에서 1회 이상 세척하는 것을 포함한다. 구체적으로, 매우 엄격한 조건은 100 ㎍/㎖의 연어 정자 DNA를 함유하거나 함유하지 않는 디그이지하이브(DigEasyHyb) 용액(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH), 독일 68298 만하임 소재)과 같은 용액, 또는 50% 포름아미드, 5x SSC(150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 0.02% 나트륨 도데실 설페이트, 0.1% N-라우릴사코신 및 2% 블록킹 시약(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하)을 함유하는 용액 중에서 DIG-표지된 DNA 프로브(예를 들어, DIG 표지 시스템(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하)을 사용하여 제조한 프로브)를 사용하여 42℃에서 2시간 내지 4일 동안 항온처리한 후, 필터를 실온에서 2x SSC 및 0.1% SDS에서 5 내지 15분 동안 2회 세척한 다음, 65 내지 68℃에서 0.5x SSC 및 0.1% SDS 또는 0.1x SSC 및 0.1% SDS에서 15 내지 30분 동안 2회 세척하는 것을 포함한다.

[0087] 당업자는 어떤 조건이 엄격한 혼성화 조건 및 매우 엄격한 혼성화 조건을 위해 적용될 수 있는지를 인식할 것이다. 이러한 조건에 대한 추가 지침은 당업계, 예를 들어, [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols

in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N. Y.)]에서 용이하게 입수할 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열에 상응하거나 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드는 표준 합성 기법, 예를 들어, 자동화된 DNA 합성기를 이용하여 제조할 수 있다.

[0089] 용어 "상동성" 또는 "% 동일성"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 본원에서 2개의 핵산 서열의 % 동일성을 측정하기 위해 서열을 최적의 비교 목적으로 정렬(예를 들어, 제2의 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 갭(gap)이 제1 핵산 서열 내에 도입될 수 있다)하는 것으로 정의된다. 그 다음, 상응하는 위치에서의 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열의 소정의 위치에 존재하는 뉴클레오타이드가 제2 서열의 상응하는 위치에 존재하는 뉴클레오타이드와 동일한 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 2개 서열 사이의 % 동일성은 상기 서열들이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, 동일성 % = 동일한 위치의 수/총 위치의 수(즉, 겹쳐지는 위치) x 100). 바람직하게는, 상기 2개의 서열의 길이는 동일하다.

[0090] 당업자라면 누구나 2개의 서열 사이의 상동성을 측정하기 위해 여러 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다는 사실을 인식할 것이다. 예를 들어, 서열의 비교 및 2개 서열 사이의 % 동일성의 측정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 2개 아미노산 서열 사이의 % 동일성은, 블로솜(Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 이용하는, (http://www.accelrys.com에서 이용가능한) GCG 소프트웨어 팩키지의 GAP 프로그램에 혼입된 니들만(Needleman) 및 번슈(Wunsch)(J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) 알고리즘을 이용하여 측정한다. 당업자는 이러한 다양한 변수가 모두 다소 상이한 결과를 생성하지만 2개 서열의 총 % 동일성이 서로 다른 알고리즘을 이용하더라도 유의하게 변화되지 않음을 인식할 것이다.

[0091] 또 다른 실시양태에서, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 % 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스, 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 이용하여 GCG 소프트웨어 팩키지(http://www.accelrys.com에서 이용가능함)의 GAP 프로그램을 사용하여 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 % 동일성은 PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하는 ALIGN 프로그램(버젼 2.0)(http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi에서 이용가능함)에 혼입된 이. 메이어스(E. Meyers) 및 더블유. 밀러(W. Miller)(CABIOS, 4: 11-17, 1989)의 알고리즘을 사용하여 측정한다.

[0092] 본 발명의 미생물을 구축하는 유용한 방법, 즉 리보플라빈의 생산에 관련된 유전자의 5' 비번역된 영역에 개질된 *rib* 리더를 도입하는 방법은 실시예에 제시되어 있고, 여기서 본원에 개시된 개질된 *rib* 리더의 도입은 각각의 *rib* 유전자로부터 더 많은 손상되지 않은 전장 mRNA 전사체를 야기하고, 이는 또한 리보플라빈의 증가된 수율 및/또는 생산성을 야기한다. 재조합 미생물의 선택은 항생제 내성 유전자, 예를 들면 클로람페니콜, 네오마이신, 스트렙토마이신, 스펙티노마이신 등의 도입을 통해 수행될 수 있다.

[0093] 본 발명은 개질된 *rib* 리더를 갖고 있는 미생물을 이용한 리보플라빈의 발효 생산에 관한 것이다. 본원에서 사용된 용어 "리보플라빈"은 리보플라빈, 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN), 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드(FAD)뿐만 아니라, 리보플라빈, FMN 또는 FAD의 전구체, 유도체 및 염, 예를 들면, 리보플라빈-5-포스페이트 또는 나트륨 리보플라빈-5-포스페이트를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 리보플라빈, FMN 및 FAD의 전구체 및/또는 유도체는 예를 들어, DRAPP; 5-아미노-6-리보실아미노-2,4(1H,3H)-피리미딘다이온-5'-포스페이트; 2,5-다이아미노-6-리비틸아미노-4(3H)-피리미디논-5'-포스페이트; 5-아미노-6-리비틸아미노-2,4(1H,3H)-피리미딘다이온-5'-포스페이트; 5-아미노-6-리비틸아미노-2,4(1H,3H)-피리미딘다이온; 6,7-다이메틸-8-리비틸루마진(DMRL); 및 플라보단백질로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 용어 "리보플라빈" 및 "비타민 B2"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 리보플라빈의 생합성에 관여하는 유전자, 및 리보플라빈의 발효 생산, 특히 바실러스 균주를 이용한 발효 생산 방법은 공지되어 있다[예를 들어, 유럽특허 제405370호 및 문헌(Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th Edition, 2007, Chapter Vitamins) 참조]. 상기 방법은 본원에 개시된 바와 같은 개질된 *rib* 리더 서열을 포함하는 돌연변이 균주를 이용한 리보플라빈의 생산에도 적용될 수 있다.

[0094] 여러 기질이 본 발명의 방법, 즉 전술한 바와 같은 리보플라빈의 생산 방법에서 탄소 공급원으로서 사용될 수 있다. 특히 적합한 탄소 공급원은 3, 5 또는 6개의 탄소 원자로 구성된 화합물, 예를 들면, D-글루코스, 글리세롤, 농축 쥬스, 덱스트로스, 전분, 수크로스 및 리보스로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 탄소원은 D-글루코스이다. 상기 방법과 관련하여 용어 "탄소원", "기질" 및 "생성 기질"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0095] 개질된 미생물을 사용하는 상기 방법을 위해 본원에서 사용되는 배지는 리보플라빈의 생산에 적합한 임의의 배지일 수 있다. 전형적으로, 배지는 예를 들어, 염 및 기질을 포함하며 일정한 pH를 갖는 수성 배지이다. 기질이 리보플라빈으로 전환되는 배지는 생산 배지로도 지칭된다.

[0096] 본원에서 사용되는 "발효", "생산" 또는 "발효 공정"은 당업자에게 공지되어 있는 배지, 조건 및 절차를 이용한 생장 세포의 사용, 또는 적절한 기질을 리보플라빈으로 전환시키기에 적합한 조건 하에서 당업자에게 공지되어 있는 배지, 조건 및 절차를 이용하여 배양시킨 후의 비-생장 세포, 즉 소위 휴지기 세포의 사용일 수 있다.

[0097] 생성된 리보플라빈은 임의의 적절한 수단에 의해 세포로부터 회수될 수 있다. 회수는 예를 들어, 생성된 리보플라빈이 생성 배지로부터 분리될 수 있음을 의미한다. 임의로, 이렇게 생성된 발효 생성물은 추가 가공, 예를 들면 정제될 수 있다.

[0098] 미생물을 사용하는 상기 방법과 관련하여, 한 양태에서, 생장 단계는 호기성 조건 하에서 정상적으로 생장하는 데 필요한 적절한 영양분으로 보충된 수성 배지, 즉 생장 배지 중에서 수행될 수 있다. 배양은 예를 들어, 회분식, 유가배양식, 반-연속식 또는 연속식으로 수행될 수 있고, 이때 유가배양식 또는 반-연속식이 바람직하다.

[0099] 배양 기간은 예를 들어, 숙주, pH, 온도 및 사용되는 영양 배지에 따라 다를 수 있고, 예를 들어, 미생물에 따라 약 10시간 내지 약 10일, 바람직하게는 약 4 내지 약 7일, 더 바람직하게는 약 2 내지 약 6일일 수 있다. 당 분야의 숙련자는 적합한 미생물의 최적의 배양 조건을 알 것이다.

[0100] 배양은 예를 들어, 약 7.0의 pH, 바람직하게는 약 6 내지 약 8의 pH, 더 바람직하게는 약 6.5 내지 7.5의 pH에서 수행될 수 있다. 배양을 수행하기에 적합한 온도 범위는 예를 들어, 약 13 내지 약 70℃, 바람직하게는 약 35 내지 약 39℃, 더 바람직하게는 약 30 내지 약 39℃, 가장 바람직하게는 약 36 내지 약 39℃일 수 있다. 생장용 배양 배지는 통상적으로 영양분, 예를 들어, 동화가능한 탄소원, 예를 들어, D-글루코스, 글리세롤, 농축 쥬스, 덱스트로스, 전분, 수크로스 또는 리보스; 및 섭취가능한 질소원, 예를 들면, 유기 물질, 예를 들어, 펩톤, 효모 추출물 및 아미노산을 함유할 수 있다. 배지는 우레아, 옥수수 침지액 및/또는 베이커 효모를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 다양한 무기 물질, 예를 들면, 니트레이트 및 암모늄 염이 질소원으로서 사용될 수도 있다. 뿐만 아니라, 생장 배지는 통상적으로 무기 염, 예를 들어, 황산마그네슘, 황산망간, 황산칼륨 및 탄산칼슘을 함유할 수 있다. 그 후, 전술된 절차를 이용하여 수득한 세포를 전술된 바와 같은 기질의 존재 하에서 전술된 바와 본질적으로 동일한 방식, 온도 및 pH 조건 하에서 추가로 항온처리하여, 상기 세포가 상기 기질들을 원하는 표적 발효 생성물로 전환하게 할 수 있다. 항온처리는 예를 들어, 유기 질소원, 예를 들면, 펩톤, 효모 추출물, 베이커 효모, 우레아, 아미노산 및 옥수수 침지액, 또는 무기 질소원, 예를 들어, 니트레이트 및 암모늄 염을 함유하는 질소-풍부 배지 중에서 수행할 수 있고, 이때 세포는 원하는 표적 발효 생성물을 생성하면서 추가로 생장할 수 있을 것이다. 다르게는, 항온처리는 질소-부족 배지 중에서 수행될 수 있고, 이때 세포는 실질적으로 생장하지 않을 것이고 휴지기 세포 모드 또는 생물전환 모드 상태에 있을 것이다. 모든 경우, 항온처리 배지는 무기 염, 예를 들어, 황산마그네슘, 황산망간, 인산칼륨 및 염화칼슘을 함유할 수도 있다. 리보플라빈을 생산하기에 적합한 배지의 일례는 국제특허출원 공개 제WO 04/113510호에 기재되어 있고(VF-배지), 이는 바실러스에 대해 특히 유용하다.

[0101] 용어 "생산" 또는 "생산성"은 당 분야에 공지되어 있고, 주어진 시간 및 주어진 발효 체적에서 형성되는 리보플라빈의 농도를 포함한다(예를 들면 시간당 리터당 생성물 kg). 용어 "생산 효율"은 달성되고자 하는 생산의 특정 수준에 필요한 시간을 포함한다(예를 들면 세포가 발효 생성물의 특정한 생산 속도에 도달하는데 걸리는 기간). 용어 "수율"은 당 분야에서 인식되고 있고, 탄소 공급원이 생성물(즉, 리보플라빈)로 전환되는 효율을 포함한다. 이는 일반적으로 탄소 공급원 kg 당 생성물 kg으로 표기된다. 화합물의 "수율 및/또는 생산/생산성을 증가시킴"이란 주어진 시간동안 주어진 양의 배양액 중의 회수된 분자의 양, 또는 그 화합물의 유용한 회수된 분자의 양을 의미한다.

[0102] 리보플라빈의 수율/생산성을 측정하는 분석 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 이런 방법은 HPLC 또는 인디케이터 균주의 이용을 포함할 수 있지만, 이로 한정되지는 않는다(예를 들면 [Bretzel et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 19-26, 1999] 참조).

도면의 간단한 설명

[0103] 도 1은 5' 및 3' 측면 영역을 비롯한 바실러스 섭틸리스의 *rib* 리더를 보여준다. *rib* 리더는 뉴클레오타이드 위치 562 내지 857 사이에 위치한다. 도 1a는 5' 조절 요소가 볼드체(각각 "**ttgcgt**" 및 "**tataat**")로 나타나있고 서열 번호:42에 도시된 바와 같은 *rib* 리더의 첫번째 뉴클레오타이드에 상응하는 전사 출발("**A**")이 볼드체로 나타나있는 야생형 *rib* 오페론이다. 도 1b는 트리플 *ribO*, RK41 및 RK1a와 같은 *ribO* 돌연변이의 위치가 볼드체로 나타나 있는 *rib* 리더이다. 도 1c 내지 1i는 각각 플랭크-오른쪽, 터미네이터, 스템 루프-오른쪽, 스템 루프-왼쪽, 스위치 결실, 델 엠로175 및 전체 *rib* 리더의 위치가 밑줄로 표시되어 있는 *rib* 리더이다. 보다 상세한 설명에 대해서는 본문, 특히 실시예를 참고할 수 있다.

도 2는 유전자 *ribD*, *ribE*, *ribA*를 포함하는 *rib* 오페론의 5' 단부에 위치한 LFH-PCR을 통해 강한 구성적 P_{spo15} 프로모터의 다운스트림에 mRNA 안정화 요소(St)를 갖는 유전자 변형된 미생물을 구축하는 다른 단계를 보여준다. 재조합 미생물의 선택을 위해, 클로람페니콜(Cm) 항생제 내성 카세트를 이용한다. 도 2a는 천연 프로모터를 LFH-PCR을 이용하여 강한 프로모터로 대체함을 나타내고, 도 2b는 mRNA 안정화 요소의 도입을 나타낸다. 보다 많은 설명에 대해서는 실시예를 참고할 수 있다.

하기의 실시예는 단지 예시이고, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 한정하고자 하지 않는다. 모든 문헌, 특허 공보, 특허 및 공개된 특허 출원, 언급된 문헌의 내용은 본원에 참고로 혼입되어 있고, 특히 유럽 특허 제405370호, 제WO 04/106557호, 제WO 07/051552호 및 유럽 특허 제1186664호를 참조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0104] 실시예에서 언급되는 하기 배지는 국제특허출원 공개 제WO 04/106557호에 기재되어 있다: 트립토스 혈액 아가 브로쓰(TBAB) 배지, 송아지 관주-효모 추출물 브로쓰(VY) 배지, 10X 스피지젠(Spizizen) 염 및 최소 배지(MM). 추가로 하기의 배지가 사용되어 왔다:

[0105] 100X 미량 원소 용액 A: 12.5 g의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.55 g의 $CaCl_2$; 1.35 g의 $FeCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.1 g의 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0.17 g/ℓ의 $ZnCl_2$; 0.043 g의 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.06 g의 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.06 g의 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 약 1 ℓ가 되도록 H_2O, 멸균됨.

[0106] 5X 최소 염 용액: 0.057 M의 K_2SO_4; 0.31 M의 $K_2HPO_4 \cdot 5H_2O$; 0.22 M의 KH_2PO_4; 0.017 M의 Na-시트레이트 $\cdot 7H_2O$; 0.004 M의 $MgSO_4 \cdot H_2O$(pH 7.0), 멸균됨.

[0107] 100X 미량 원소 용액 B: 0.55 g의 $CaCl_2$; 0.17 g의 $ZnCl_2$; 0.043 g의 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.06 g의 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.06 g의 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 1 ℓ가 되도록 H_2O, 멸균됨.

[0108] 리보플라빈 스크리닝 배지(RSM): 200 ml의 10X 스피지젠 염; 10 ml의 100X 미량원소 용액 A; 2 ml의 50% 글루코스; 36 ml의 25% 라피노스; 10 ml의 10% 효모 추출액; 1 ℓ가 되도록 H_2O.

[0109] 스피지젠 최소 배지(SMM): 100 ml의 10X 스피지젠 염; 10 ml의 50% 글루코스; 1 ml의 40% 나트륨 글루타메이트; 10 ml의 미량 원소 용액 A; 1 ℓ가 되도록 H_2O.

[0110] 진탕 플라스크에서 리보플라빈의 생성을 하기와 같이 수행하였다: 균주를 5ml의 VY 풍부한 배지중의 냉동된 글리세롤 원액으로부터 접종하고 280 rpm으로 교반하면서 37℃에서 하룻밤동안 성장시켰다. 원심분리에 의해 세포를 수집하고 1 ml의 RSM(상기 참조)에 재현탁시켰다. 250 ㎕의 세포 현탁액을 250 ml들이 배플 진탕 플라스크중의 25ml의 RSM에 접종시켰다. 접종한 후 48시간동안 39℃에서 220 rpm으로 교반한 후, 500 ㎕의 배양액을 취하고, 리보플라빈 결정이 용해되도록 실온에서 1분동안 35 ㎕의 4 N NaOH를 샘플과 혼합하였다. 465 ㎕의 1 M 인산칼륨 완충액(pH 6.8)을 첨가하여 샘플을 중화시키고, 원심분리(5분, 13200 rpm)에 의해 펠렛화하였다. 상층액을 리보플라빈 및 2가지의 부산물인 6,7-다이메틸-8-리비틸루마진(DMRL) 및 옥소루마진의 농도 측정을 위한 HPLC 측정에 이용하였다. 또한, 제 2 배양 샘플을 취하고, 원심분리(5분, 13200 rpm)한 후, 상층액을 탄소 공급원에 대한 리보플라빈 수율을 계산하기 위해 배지 중의 잔류 글루코스 및 라피노스의 농도 측정에 이용하였다.

[0111] 진탕 플라스크 배양액에서 나온 샘플을 HPLC로 분석하였다. 자동 온도 조절 장치가 있는 오토샘플러, 다이오드 어레이 및 형광 검출기가 장착된 아질런트(Agilent) 1100 HPLC 시스템에서 크로마토그래피를 수행하였다. 4 mm LC-8DB 가드 컬럼이 장착된 슈펠코실(Supelcosil) LC-8DB-5㎛ 컬럼(150 mm x 4.6 mm)에서 분리를 수행하였다.

0.1 M 아세트산과 메탄올의 혼합물을 이동상으로 이용하였다. 2% 메탄올(5분간 일정함)에서 출발하여 15분만에 50% 메탄올까지 상승하는 구배 용출을 적용하였다. 컬럼을 20℃에서 유지시켰다. 신호를 280 nm에서의 UV로 기록하였다. 리보플라빈은 불순물(예를 들면 부산물:DMRL 및 옥소루마진)으로부터 잘 분리시키고, 15.2분에 용출시켰다. 계산은 플루카(Fluka)에서 수득된 기준 물질에 근거한다. 방법은 10 ㎍/ml 내지 1 mg/ml의 리보플라빈으로부터 보정된다.

[0112] 또한, 배양액 중의 글루코스 및 라피노스의 농도를 4원 펌프, 오토샘플러, UV 및 굴절 지수 검출기를 이용하여 아질런트 1100 시리즈 HPLC 시스템으로 분석하였다. CAPCELL PAK NH2 UG80 컬럼(4.6mm x 250mm, 5㎛)(시세이도(Shiseido) 제품) 상에서 분리를 수행하였다. 최적 컬럼 온도는 35℃였다. 이동상은 65/35 비의 아세토니트릴과 탈이온수의 혼합물이다. 유속은 1.0 ml/분이고 주입 체적은 5 ㎕로 설정되었다. 굴절 지수 신호를 모니터링하고 검출에 이용하였다. 각각의 화합물에 대한 보정 범위는 0.5 mg/ml 내지 30 mg/ml이다.

[0113] **실시예 1: 리보플라빈 영양요구 균주의 생성**

[0114] 바실러스 섭틸리스의 리보플라빈 오페론의 원래 리더 및 프로모터 서열을 조작하기 위해서, 리보플라빈 프로모터, 5' 리더 서열 및 RibD의 데아미나제 도메인을 코딩하는 *ribD*의 5' 부분(*ribG*)을 플라스미드 pUB110[Itaya et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17:4410]에서 수득한 네오마이신 저항(*neo*) 카세트로 대체하여 리보플라빈-영양요구 균주인 바실러스 섭틸리스 BS3813을 생성하였다. 바실러스 섭틸리스 168의 유도체인 바실러스 섭틸리스 균주 1A747($SP\beta^c$, 프로토트로프(prototroph))에서 유래된 게놈 DNA(*trpC2*)를 바실러스 유전 보존 센터(BGSC)(미국 오하이오주 43210 콜롬버스 오하이오 주립 대학 소재)에서 얻었다.

[0115] 균주를 구축하기 위해서, 긴 플랭킹 호몰로지 폴리머라제 연쇄 반응(Long Flanking Homology Polymerase Chain Reaction: LFH-PCR)을 이용하여 천연 P_{rib} 프로모터의 526 bp 업스트림 영역(플랭크 5') 및 *ribD* 유전자의 502 bp 3' 단부(플랭크 3')가 측면에 있는 1236bp *neo* 저항 카세트를 함유하는 DNA 단편을 생성하였다. 따라서, 3가지 DNA 단편인 플랭크 5', *neo* 저항 카세트 및 플랭크 3'을 먼저 PCR로 증폭시켰다. DNA 단편인 플랭크 5' 및 플랭크 3'을 다음과 같이 생성하였다: 1 ㎕의 10 mM dNTP, 5 ㎕의 10X 완충액 및 0.5 ㎕의 *Pfu* 폴리머라제(스트라타진(Stratagene) 제품)를 함유하는 50 ㎕ 반응 체적 중의 0.1 ㎍의 바실러스 섭틸리스 1A747 염색체 DNA에 p51(서열 번호:7)과 함께 프라이머 p50(서열 번호:6) 또는 p45(서열 번호:5)와 함께 프라이머 p44(서열 번호:4)의 100 μM 용액 1 ㎕를 첨가하였다. *neo* 저항 카세트를 함유하는 DNA 단편을 생성하기 위해서, 1 ㎕의 10 mM dNTP, 5 ㎕의 10X 완충액 및 0.5 ㎕의 *Pfu* 폴리머라제(스트라타진 제품)를 함유하는 50 ㎕ 반응 체적 중의 0.05 ㎍의 *neo* 저항 카세트를 함유하는 pUB110 DNA에 p10(서열 번호:3)과 함께 프라이머 p9(서열 번호:2)의 100 μM 용액 1 ㎕를 첨가하였다. 하기의 3가지 순차적인 단계의 35 사이클로 PCR 반응을 수행하였다: (i) 94℃에서 30초동안의 변성 단계; (ii) 52℃에서 30초동안의 어닐링 단계; (iii) 72℃에서 1분동안의 연장 단계. PCR 사이클에 앞서 95℃에서 3분동안의 변성 단계를 수행하였다. 3가지의 PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고 민일루트(MinElute) 겔 추출 키트(퀴아겐(Qiqgen) 제품)를 이용하여 겔로부터 추출하였다. 최종 LFH-PCR 반응에서, 3가지의 정제된 PCR 생성물(플랭크 5', *neo* 저항 카세트 및 플랭크 3')을 조합하였다: p51과 함께 프라이머 p45의 100 μM 용액 1 ㎕, 1 ㎕의 플랭크 5' PCR 생성물(50 ng), 1 ㎕의 플랭크 3' PCR 생성물(50 ng) 및 1 ㎕의 neo 저항 카세트(100 ng)를 첨가하여 1 ㎕의 10 mM dNTP, 5 ㎕의 10X 완충액 및 0.5 ㎕의 *Pfu* 폴리머라제(스트라타진 제품)를 함유하는 50 ㎕ 최종 반응 체적을 수득하였다. LFH-PCR 반응을 하기의 3가지 순차적인 단계의 35 사이클로 수행하였다: (i) 94℃에서 30초동안의 변성 단계; (ii) 52℃에서 30초동안의 어닐링 단계; (iii) 72℃에서 2.5분동안의 연장 단계. PCR 사이클에 앞서 95℃에서 3분동안의 변성 단계를 수행하였다. 조합된 LFH-PCR 생성물을 퀴아퀵(QiaQuick) PCR 정제 키트(퀴아겐 제품)를 이용하여 정제하였다. 정제된 LFH-PCR 생성물(2 ㎍)을 컴피튼트(competent) 바실러스 섭틸리스 1A747 세포를 형질변환시키는데 이용하였다. 네오마이신-저항(Nm^r) 형질변환체를 2 mg/l의 네오마이신 및 100 mg/l의 리보플라빈을 함유한 TBAB 플레이트 상에서 선택하였다. 생성된 리보플라빈-영양요구성 및 Nm^r BS3813 균주의 정확한 유전형을 주형 DNA로서 p10과 함께 프라이머 p45, 및 p9와 함께 프라이머 p51, 및 형질변환체의 염색체 DNA를 이용한 2가지 PCR 반응에 의해 확인하였다. DNA 단편인 플랭크 5' 및 플랭크 3'의 생성에 대해 전술된 바와 같은 표준 반응 조건을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 또한 BS3813의 *ribD* 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0116] 결실 구축체의 형질도입을, 트랜스케톨라제 유전자에서의 돌연변이를 갖는 리보플라빈-과생산 균주인 바실러스 섭틸리스 BS3534의 형질도입을 위해 BS3813의 용균물을 이용한 제WO 07/051552호(실시예 6 참조)에 개시된 방법에 따라 PBS-1 파지를 이용하여 수행하였다(BS3534의 구축에 대해서는 제WO 07/051552호를 참고할 수 있다).

BS3534는 리보플라빈-과생성 균주인 바실러스 섭틸리스 RB50에 근거하고, 이는 유럽 특허 제405370호에 상세하게 개시되어 있고, 기탁번호 NRRL B-18502로 이용가능하다. Nm^r 형질도입체를 2 mg/l의 네오마이신 및 100 mg/l의 리보플라빈을 함유한 TBAB 플레이트 상에서 선택하였다. 단리된 형질도입체의 유전형을 전술된 바와 같은 PCR에 의해 확인하였다. 생성된 균주를 BS3798로 표기하였다.

[0117] **실시예 2: 개질된 *rib* 리더 서열을 갖는 균주의 생성**

[0118] 2가지 유형의 돌연변이를 *rib* 리더에 도입하여 *rib* 유전자의 전사를 규제완화하였고, 여기서 I형을 *ribO* 돌연변이라고 칭하고, II형을 *rib* 리더의 (부분적) 결실이라 칭한다(도 1 참조).

[0119] 다음과 같은 3가지의 *ribO* 돌연변이를 생성하였다: C85T를 "RK41"이라 칭하고, G121A를 "RK1a"라 칭하고, 트리플 조합인 G39A-G40A-G41A를 "트리플 *ribO*"라 칭한다. II형 돌연변이의 경우, 하기의 부분을 *rib* 리더로부터 결실시키고, 여기서 뉴클레오타이드의 번호는 바실러스 섭틸리스에서 단리된 서열 번호:42에서의 *rib* 리더 서열을 참고한다: 뉴클레오타이드 250 내지 257의 결실(서열 번호:36)을 "델 스템 루프-오른쪽"이라 칭하고, 뉴클레오타이드 231 내지 238의 결실(서열 번호:37)을 "델 스템 루프-왼쪽"이라 칭하고, 뉴클레오타이드 239 내지 263의 결실(서열 번호:38)을 "델 플랭크-오른쪽"이라 칭하고, 뉴클레오타이드 231 내지 263의 결실(서열 번호:39)을 "델 터미네이터"라 칭하고, 뉴클레오타이드 166 내지 263의 결실(서열 번호:40)을 "스위치 결실"이라 칭하고, 뉴클레오타이드 135 내지 263의 결실(서열 번호:41)을 "델 엠로175"라 칭하고, 완전한 리더, 즉, 뉴클레오타이드 1 내지 263의 결실(서열 번호:42)을 "리더 결실"이라 칭한다. 엠로175 결실의 경우, 4개의 뉴클레오타이드(5'-ATGG-3')가 또한 삽입된다.

[0120] *rib* 프로모터와 함께 개질된 *rib* 리더 서열(서열 번호:45 내지 54)을 갖는 균주의 구축은 기본적으로 첫번째 PCR 반응에서 플랭크 5' 및 플랭크 3'으로 표기된 2개의 DNA 단편이 바실러스 섭틸리스 1A747에서 나온 염색체 DNA를 이용하여 생성되는 실시예 1에서 개시된 프로토콜/조건에 따른 2가지 PCR 반응을 통해 수행되었다. 실시예 1에서 개시된 프로토콜/조건에 따른 두번째 PCR 반응에서는, 이들 2가지 PCR 단편들이 프라이머 p45 및 p51을 이용하여 조합되었다. 첫번째 PCR 반응을 위한 각각의 프라이머쌍, 즉 원하는 돌연변이/결실(상기 참조)을 생성하는 플랭크 5'의 생성을 위한 프라이머 및 플랭크 3'의 생성을 위한 프라이머가 각각 표 1의 컬럼 2 및 3에 열거되어 있다. 퀴아퀵 PCR 정제 키트(퀴아겐 제품)을 이용한 정제 후, 2 ㎍의 정제된 전장 PCR 생성물을 이용하여 컴피튼트 바실러스 섭틸리스 BS3813 세포를 형질변환시켰다(실시예 1 참조). 세포를 SMM 플레이트에 도말하였다. 리보플라빈-프로토트로프 형질변환체를 1 ml의 0.9% NaCl 용액에 현탁시켰다. 원래의 세포 현탁액의 500배 희석액 100 ㎕를 TBAB 아가 플레이트에 도말하였다. 단일 콜로니를 신선한 TBAB 아가 플레이트, 및 2 mg/l의 Nm 및 100 mg/l의 리보플라빈이 보충된 TBAB 아가 플레이트로 이동시켰다. 정확한 형질변환체는 네오마이신에 민감하고, 따라서 TBAB 아가 플레이트에서만 성장하고, 네오마이신으로 보충된 플레이트에서는 성장하지 않았다. 또한 새로 도입된 *rib* 프로모터 및 *ribD*의 서열을 분석함으로써 유전형을 확인하였다. *rib* 리더에서의 각각의 돌연변이/결실을 함유한 새로 생성된 바실러스 섭틸리스 균주가 표 1의 컬럼 4에 표기되어 있다.

[0121] 새로 생성된 균주에서 나온 PBS-1 용균물을 제조하여 BS3798(실시예 1에서 생성됨)의 형질도입을 위해 이용하였다. 형질도입된 세포를 SMM 플레이트 상에서 선택하였다. 리보플라빈-프로토트로픽 바실러스 섭틸리스 형질도입체를 1 ml의 0.9% NaCl 용액에 현탁시켰다. 원래의 세포 현탁액의 500배 희석액 100 ㎕를 TBAB 아가 플레이트에 도말하였다. 단일 콜로니를 신선한 TBAB 아가 플레이트, 및 2 mg/l의 Nm 및 100 mg/l의 리보플라빈이 보충된 TBAB 아가 플레이트로 이동시켰다. 정확한 형질도입체는 TBAB 아가 플레이트에서만 성장하고, 따라서 네오마이신-민감성이다. 새로 형질도입된 균주를 표 1의 컬럼 5에 도시된 바와 같이 명명하였다.

[0122] [표 1]

개질된 *rib* 리더 서열을 생성하는 플랭크 5' 및 플랭크 3' 단편 각각의 구축에 이용되는 프라이머 쌍, 및 상기 PCR 단편으로 형질변환되거나 각각의 용균물로 형질도입된 생성된 균주의 표기(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

rib 리더 돌연변이의 표기	플랭크 3' 프라이머 쌍(서열 번호)	플랭크 5' 프라이머 쌍(서열 번호)	형질변환된 균주	형질도입된 균주
RK1a	p74/p51 (20/7)	p45/p75 (5/21)	BS3833	BS3839
RK41	p72/p51 (16/7)	p45/p73 (5/18)	BS3958	BS3987, BS3988, BS3989
트리플 *rib0*	p72a/p51 (17/7)	p45/p73a (5/19)	BStriple_*rib0*	
델 플랭크-오른쪽	p56/p51 (8/7)	p45/p57 (5/9)	BS3814	BS3832
델 터미네이터	p58/p51 (10/7)	p45/p59 (5/11)	BS3815	BS3821
델 스템 루프-오른쪽	p76/p51 (22/7)	p45/p77 (5/23)	BS3842	BS3846
델 스템 루프-왼쪽	p79/p51 (25/7)	p45/p78 (5/24)	BS3847	BS3859
스위치 결실	p80/p51 (26/7)	p45/p81 (5/28)	BS3867	BS3900, BS3916
델 앰로175	p80a/p51 (27/7)	p45/p81a (5/29)	BSmrol175	
리더 결실	p96/p51 (31/7)	p45/p95 (5/30)	BSleader	
형질변환된 균주: 각각의 PCR 단편을 이용한 바실러스 섭틸리스 BS3813(neo-저항성; 야생형 바실러스 섭틸리스 1A747에 근거한 B2-영양 요구성)의 형질변환 후의 바실러스 섭틸리스의 표기; 형질도입된 균주: 컬럼 4에 따른 각각의 균주의 용균물을 이용한 바실러스 섭틸리스 BS3798(neo-저항성; 바실러스 섭틸리스 RB50에 근거한 B2-영양 요구성)의 형질도입 후의 바실러스 섭틸리스의 표기. 추가의 설명에 대해서는 본문 참조.				

[0123]

[0124] 새로 생성된 균주를 전술된 바와 같은 진탕 플라스크에서 리보플라빈 생산에 대해 시험하였다. 48시간 후, 500 ㎕ 샘플의 리보플라빈을 4 N NaOH를 첨가함으로써 용해시키고, 중화시키고, 원심분리한 후, 처리된 샘플의 리보플라빈 농도를 DMRL 및 옥소루마진(DMRL의 분해 생성물)의 농도와 함께 HPLC에 의해 측정하였다. 탄소 공급원에 대한 리보플라빈 수율을 계산하기 위해, 모든 탄소 공급원의 출발 및 잔류 농도를 HPLC로 측정하였다.

[0125] 결과를 표 2에 나타낸다. 야생형 균주(1A747) 바탕값에서의 천연 *rib* 오페론은 기본적으로 임의의 리보플라빈을 배지로 분비하지 않지만, 리보플라빈 과생산에 대해 선택된 균주 바탕값(RB50)에서의 동일한 *rib* 오페론은 측정가능한 양의 리보플라빈을 분비한다. 야생형(BS3958) 및 RB50 바탕값(BS3987) 둘 모두에서 *rib0* 돌연변이인 RK41이 가장 우수한 결과를 생성하였다. 터미네이터의 결실은 예상된 결과를 생성하지 않았고, 특히 야생형 바탕값(BS3815)에서 그러하였다. 야생형 바탕값에서는 RK1a *rib0* 돌연변이체(BS3833)에서 두번째로 우수한 결과가 수득된 반면, RB50 바탕값에서는 스위치 결실(BS3900 및 BS3916)에서 두번째로 우수한 결과가 수득되었고, 이는 심지어 리더 결실 균주보다도 더 높은 수율을 나타내었다.

[0126] [표 2A]

천연 *rib* 리더를 갖는 야생형 균주 바실러스 섭틸리스 1A747에 근거하여 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0127]

균주	Rib 리더 돌연변이	수율 [%]
1A747	야생형	0.0004
BS3833	RK1a	0.0570
BS3958	RK41	0.1100
BS3814	델 플랭크-오른쪽	0.0090
BS3815	델 터미네이터	0.0103
BS3867	스위치 결실	0.0139

[0128] [표 2B]

천연 *rib* 리더를 갖는 리보플라빈-과생산 균주 바실러스 섭틸리스 RB50에 근거하여 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0129]

균주	Rib 리더 돌연변이	수율[%]
RB50	야생형 *rib* 오페론	0.46
BS3839	RK1a	1.29
BS3987	RK41	1.64
BS3832	델 플랭크-오른쪽	0.33
BS3821	델 터미네이터	0.74
BS3900, BS3916	스위치 결실	1.48
BS3846	델 스템 루프-오른쪽	0.11
BS3859	델 스템 루프-왼쪽	0.52

[0130] **실시예 3: 천연 *rib* 프로모터의 강한 구성적 프로모터에 의한 교체**

[0131] 강한 프로모터와 조합된 *rib* 리더 돌연변이의 가능한 상승작용적 효과를 평가하기 위해서, 새로 생성된 구축물(실시예 2 참조)의 원래의 *rib* 프로모터를 강한 구성적 프로모터인 P_{veg} 또는 P_{Spo15}중 하나로 대체하였다. 구축 방법은 실시예 2의 접근법과 매우 유사하였다. DNA 단편인 플랭크 3' 및 플랭크 5'의 생성을 위해, 1 ㎕의 10 mM dNTP, 5 ㎕의 10X 완충액 및 0.5 ㎕의 *Pfu* 폴리머라제(스트라타진 제품)를 함유하는 50 ㎕ 반응 체적 중의 0.1 ㎍의 바실러스 섭틸리스 1A747 염색체 DNA에 p51과 함께 프라이머 p60(서열 번호:12)(P_{veg}의 구축을 위해), 또는 p51과 함께 프라이머 p62(서열 번호:14)(P_{Spo15}의 구축을 위해) 및 p61(서열 번호:13)과 함께 프라이머 p45(P_{veg}의 구축을 위해) 또는 p63(서열 번호:15)과 함께 프라이머 p45(P_{Spo15}의 구축을 위해)의 100 μM 용액 1 ㎕를 첨가하였다. 하기의 3가지 순차적인 단계의 35 사이클로 PCR 반응을 수행하였다: (i) 94℃에서 30초동안의 변성 단계; (ii) 52℃에서 30초동안의 어닐링 단계; (iii) 72℃에서 1분동안의 연장 단계. PCR 사이클에 앞서 95℃에서 3분동안의 변성 단계를 수행하였다. 2가지의 PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고 민일루트 겔 추출 키트(퀴아겐 제품)를 이용하여 겔로부터 추출하였다. 최종 PCR 반응에서, 2가지의 정제된 PCR 생성물(플랭크 5' 및 플랭크 3')을 조합하였다; 프라이머 p45 및 p51의 100 μM 용액 1 ㎕, 1.0 ㎕의 플랭크 5' PCR 생성물(50 ng) 및 1.0 ㎕의 플랭크 3' PCR 생성물(50 ng)을 1 ㎕의 10 mM dNTP, 5 ㎕의 10X 완충액 및 0.5 ㎕의 *Pfu* 폴리머라제(스트라타진 제품)를 함유하는 50 ㎕ 최종 반응 체적과 혼합하였다. PCR 반응을 하기의 3가지 순차적인 단계의 35 사이클로 수행하였다: (i) 94℃에서 30초동안의 변성 단계; (ii) 52℃에서 30초동안의 어닐링 단계; (iii) 72℃에서 2.5분동안의 연장 단계. PCR 사이클에 앞서 95℃에서 3분동안의 변성 단계를 수행하였다. 조합된 PCR 생성물을 퀴아퀵 PCR 정제 키트(퀴아겐 제품)를 이용하여 정제하였다. 정제된 전장 PCR 생성물(2 ㎍)을 컴피튼트(competent) 바실러스 섭틸리스 BS3813 세포를 형질변환시키는데 이용하였다.

세포를 SMM 플레이트에 도말하였다. 리보플라빈-프로토트로프 바실러스 형질변환체를 1 ml의 0.9% NaCl 용액에 현탁시켰다. 원래의 세포 현택액의 500배 희석액 100 ㎕를 TBAB 아가 플레이트에 도말하였다. 단일 콜로니를 신선한 TBAB 아가 플레이트, 및 2 mg/l의 Nm 및 100 mg/l의 리보플라빈이 보충된 TBAB 아가 플레이트로 이동시켰다. 정확한 형질변환체는 TBAB 아가 플레이트에서만 성장하고, 따라서 네오마이신 민감성이다. 또한 새로 통합된 프로모터, *rib* 리더 및 *ribD*의 서열을 분석함으로써 유전형을 확인하였다. P_{veg} 구동된 *rib* 오페론을 갖는 균주를 BS3811이라 칭하고, P_{Spo15} 구동된 *rib* 오페론을 갖는 균주를 BS3817이라 칭한다.

[0132] 강한 프로모터를 리더 개질과 조합하기 위해서, 실시예 2에 개시된 PCR 반응에서 균주 1A747의 gDNA를 균주 BS3811(P_{veg} 프로모터) 및 BS3817(P_{Spo15} 프로모터)의 gDNA로 각각 대체하였다. 사용된 프라이머 쌍을 비롯한 각각의 PCR 반응의 모든 다른 조건은 동일하게 유지되었다. 최종 PCR 생성물을 BS3813으로 형질변환시키고, 수득된 형질변환체를 개시된 바와 같이 확인하였다(실시예 2 참조). 구축물 P_{spo15}_리더 결실의 경우, 표 4에 개시된 바와 같이 플랭크 5' PCR 생성물의 경우 프라이머 쌍 p45/p95를 이용하고, 플랭크 3' PCR 생성물의 경우 p96/p51을 이용하였다. 모든 다른 단계를 전술된 바와 같이 수행하였다. 하기 구축물을 제조하고, 상기 구축물로 형질변환된 생성된 바실러스 섭틸리스 균주의 명칭을 괄호 안에 표기하였다: P_{veg}_델 플랭크-오른쪽(BS3840), P_{SPo15}_델 플랭크-왼쪽(BS3831), P_{veg}_델 터미네이터(BS3844), P_{Spo15}_델 터미네이터(BS3871), P_{Spo15}_스위치 결실(BS3874), P_{Spo15}_리더 결실(BS3944), P_{veg}_RK41(BS3887), P_{veg}_RK1a(BS3953), P_{Spo15}_RK1a(BS3884), P_{veg}_트리플 *ribO*(BS3912).

[0133] PBS-1 용균물을 상기 언급된 균주로부터 제조하고 BS3798로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 SMM 플레이트 상에서 선택하였다. 리보플라빈-프로토트로프 바실러스 섭틸리스 형질변환체를 1 ml의 0.9% NaCl 용액에 현탁시켰다. 원래의 세포 현택액의 500배 희석액 100 ㎕를 TBAB 아가 플레이트에 도말하였다. 단일 콜로니를 신선한 TBAB 아가 플레이트, 및 2 mg/l의 Nm 및 100 mg/l의 리보플라빈이 보충된 TBAB 아가 플레이트로 이동시켰다. 정확한 형질변환체는 TBAB 아가 플레이트에서만 성장하고, 따라서 네오마이신 민감성이다. 하기 균주가 생성되었다: BS3953에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3970 및 BS3971; BS3884에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3905 및 BS3907; BS3887에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3903 및 BS3914; BS3912에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3981-83; BS3840에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3890; BS3844에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3880 및 BS2882; BS3817에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3850 및 BS3851; BS3944에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS5026 및 BS5041; BS3831에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3853; BS3874에서 나온 PBS-1 용균물로 형질도입된 BS3897 및 BS3956.

[0134] 균주의 대부분을 전술된 바와 같이 진탕 플라스크에서 리보플라빈 생산에 대해 시험하였다. 48시간 후, 500 ㎕ 샘플의 리보플라빈을 4 N NaOH를 첨가함으로써 용해시키고, 중화시키고, 원심분리한 후, 처리된 샘플의 리보플라빈 농도를 DMRL 및 옥소루마진의 농도와 함께 HPLC에 의해 측정하였다. 탄소 공급원에 대한 리보플라빈 수율을 계산하기 위해, 모든 탄소 공급원의 출발 및 잔류 농도를 HPLC로 측정하였다. 결과를 하기 표 3에 나타낸다.

[0135] [표 3A]

천연 *rib* 리더를 갖는 야생형 균주 바실러스 섭틸리스 1A747에 근거하여 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0136]

균주	Rib 리더 서열	수율 [%]
1A747	야생형	0.0004
BS3811	P_{veg}	0.0120
BS3817	P_{Spo15}	0.0163
BS3953	P_{veg}_RK1a	0.1600
BS3884	P_{Spo15}_RK1a	0.7706
BS3887	P_{veg}_RK41	0.3757
BS3912	P_{veg}_트리플 *ribO*	1.0900
BS3840	P_{veg}_델 플랭크-오른쪽	0.0748
BS3831	P_{Spo15}_델 플랭크-오른쪽	0.0702
BS3844	P_{veg}_델 터미네이터	0.0666
BS3871	P_{Spo15}_델 터미네이터	0.0359
BS3874	P_{Spo15}_스위치 결실	0.2823
BS3944	P_{Spo15}_리더 결실	0.1150

[0137] [표 3B]

천연 *rib* 리더를 갖는 리보플라빈-과생산 균주인 바실러스 섭틸리스 RB50에 근거하여 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0138]

균주	Rib 리더 돌연변이	수율[%]
RB50	야생형 *rib* 오페론	0.46
BS3849	P_{veg}	1.33
BS3850, BS3851	P_{Spo15}	1.57
BS3970, BS3971	P_{veg}_RK1a	2.88
BS3905, BS3907	P_{Spo15}_RK1a	3.31
BS3903, BS3914	P_{veg}_RK41	4.18
BS3981	P_{veg}_트리플 *ribO*	2.52
BS3890	P_{veg}_델 플랭크-오른쪽	1.14
BS3853	P_{Spo15}_델 플랭크-오른쪽	1.63
BS3880	P_{veg}_델 터미네이터	1.80
BS3875	P_{Spo15}_델 터미네이터	2.38
BS3897	P_{Spo15}_스위치 결실	3.76
BS5026	P_{Spo15}_리더 결실	2.16

[0139] *rib* 리더 또는 *rib* 프로모터에 대해 행해진 모든 조작은 증가된 리보플라빈 생산을 야기하였다. 실시예 2에 개시된 결과에 따르면(표 2 참조), 천연 프로모터를 더 강한 구성 프로모터로 대체하였을 때 *ribO* 돌연변이체 RK41이 또한 가장 효과적이었다. 강한 프로모터를 이용함으로써, P_{veg}를 RK41과 조합하였을 때 4.2%까지의 수율이 달성되었다. 놀랍게도, P_{Spo15}와 스위치 결실의 조합이 3.8%로 다음으로 좋은 수율을 나타내었고, 이는 2.4%

의 수율을 나타낸 P_{Spo15}와 델 터미네이터의 조합에 비해 훨씬 더 우수하다.

[0140] **실시예 4: *ribO* 돌연변이와 리더 결실의 조합, 및 천연 *rib* 프로모터의 강한 구성적 프로모터로의 대체**

[0141] 전형적인 규제완화 *ribO* 돌연변이와 리더 결실의 조합이 리보플라빈 생산을 증가시킬 수 있을지를 알아보기 위해, 실시예 2 및 3에서 생성된 돌연변이체 일부를 조합하였다. 전술된 프로토콜에 따라 구축하였다. 플랭크 5' 및 3' PCR을 위한 주형 및 프라이머 쌍이 표 4에 도시되어 있다(상세한 설명에 대해서는 실시예 1 참조). 조합 PCR 및 BS3813으로의 형질변환은 실시예 2 및 3에 개시된 바와 같이 수행되었다. 서열분석은 구축물 P_{Spo15}_트리플 *ribO*_델 엠로175 및 P_{veg}_트리플 *ribO*_델 엠로175에 2개의 추가의 돌연변이, 즉 T25G 및 C101T(여기서 번호는 서열 번호:42에 따른 것이다)가 있음을 밝혔다. 새로 생성된 구축물을 갖는 새로운 균주의 표기가 표 4, 컬럼 4에 도시되어 있다.

[0142] 새로 생성된 균주에서 나온 PBS-1 용균물을 제조하고 BS3798(실시예 1에서 생성됨)으로의 형질도입에 이용하였다. SMM 플레이트 상에서의 형질도입된 세포의 선택은 실시예 2에 개시된 바와 같이 수행되었다. 새로 형질도입된 균주를 표 4, 컬럼 5에 나타낸 바와 같이 칭하였다.

[0143] [표 4]

각각의 구성적 프로모터와 조합된 개질된 *rib* 리더 서열을 생성하는 플랭크 5' 및 플랭크 3' 단편 각각의 구축에 이용되는 프라이머 쌍, 및 상기 PCR 단편으로 형질변환되거나 각각의 용균물로 형질도입된 생성된 균주의 표기(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

rib 리더 돌연변이의 표기 (PCR 주형)	플랭크 3' 프라이머 쌍(서열 번호)	플랭크 5' 프라이머 쌍(서열 번호)	형질변환된 균주	형질도입된 균주
P_{veg}_트리플 *ribO*_델 엠로175 (BS3912)	p45 / p81a (5 / 29)	p80a / p51 (27 / 7)	BS3889	BS3908
P_{Spo15}_트리플 *ribO*_델 엠로175 (BS3889)	p45 / p63 (5 / 15)	p62 / p51 (14 / 7)	BS3923	BS3922
P_{Spo15}_RK41_델 터미네이터 (BS3871)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3954	BS3984
P_{Spo15}_RK41_스위치 결실 (BS3874)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3915	BS3964
P_{veg}_RK41_스위치 결실 (BS3887)	p45 / p81 (5 / 28)	p80 / p51 (26 / 7)	BS3920	BS3899

[0144]

[0145] 새로 생성된 균주의 리보플라빈 생산에 대한 시험을 전술된 바와 같은 진탕 플라크스 스크리닝을 통해 수행하였다. 결과는 표 5에 제시되어 있고, 이는 실시예 3에 제시된 결과(표 4 참조)에 비해 리보플라빈 생산이 추가 증가되었음을 나타낸다. *ribO* 돌연변이체 RK41 및 트리플 *ribO* 각각의 강한 프로모터 및 *rib* 리더 결실과의 조합은 진탕 플라스크 스크리닝에서 7.6% 이상의 리보플라빈 수율을 나타내었고, 반면 P_{veg} 프로모터와 *ribO* 돌연변이체 RK41의 조합은 4.2%의 수율을 달성하였으며(표 4 참조), 리더 결실 없이 가장 우수한 조합이었다. 본원에 개시된 바와 같은 특정한 리더 결실은 규제완화된(*ribO* 돌연변이, 구성적 프로모터) *rib* 리더-프로모터 조합의 수율의 거의 2배였다. "스위치 결실"을 제외하고, "델 엠로175" 또한 결실이 없는 구축물에 비해 RB50 바탕값에서 리보플라빈 수율을 예상치못하게 개선시킬 수 있었다. 터미네이터의 결실("델 터미네이터") 또한 긍정적이지만 덜 명확한 효과를 나타내었다. P_{Spo15}이 *ribD*의 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열의 바로 앞에 있는 리더 결실 구축물은 가장 좋은 트리플 구축물에 비해 3.6배나 더 작은 수율을 나타내었다(BS5026, 표 4 및 6 참고). 이들 결과는 *rib* 리더가 규제완화뿐만 아니라 또한 전장 전사체의 안정화에 필요하다고 제안한다.

[0146] [표 5]

천연 *rib* 리더를 갖는 리보플라빈 과생산 균주인 바실러스 섭틸리스 RB50에 근거하여 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

균주	Rib 리더 돌연변이	수율 [%]
RB50	야생형 *rib* 오페론	0.46
BS3908	P_{veg}_트리플 *ribO*_델 엠로175	6.79
BS3922	P_{Spo15}_트리플 *ribO*_델 엠로175	6.47
BS3984	P_{Spo15}_RK41_델 터미네이터	5.24
BS3964	P_{Spo15}_RK41_스위치 결실	7.80
BS3899	P_{veg}_RK41_스위치 결실	7.67
BS5026	P_{Spo15}_리더 결실	2.16

[0147]

[0148] **실시예 5: 천연 *rib* 리더의 mRNA 안정화 요소로의 대체**

[0149] *aprE* mRNA 안정화 요소의 DNA 서열은 2개의 PCR 생성물에 걸쳐 분포되어 있다. *aprE* mRNA 안정화 요소의 5' 단부에서 *rib* 오페론의 5' 영역을 함유하는 PCR 생성물 1을 증폭시키기 위해, 표준 PCR 조건 하에서 p143(서열 번호:33)과 함께 프라이머 p45 및 주형으로서 균주 BS3817에서 나온 염색체 DNA를 이용하였다. *aprE* mRNA 안정화 요소의 3' 단부에서 *ribD*를 함유하는 PCR 생성물 2를 증폭시키기 위해, 표준 PCR 조건 하에서 p142(서열 번호:32)와 함께 프라이머 p51 및 주형으로서 균주 BS3817에서 나온 염색체 DNA를 이용하였다. 표준 LFH-PCR 반응에서, 겔-정제된 PCR 생성물 1 및 2를 전술된 바와 같이 하나의 DNA 단편으로 조합하였다. 첫번째 2가지 PCR을 위해 프라미어 쌍 p45/p145'(서열 번호:35) 및 프라이머 쌍 p51/p144(서열 번호:34)를 이용하고 주형으로 균주 BS3817에서 나온 염색체 DNA를 이용한 후, 전술된 바와 같은 조건 하에서 프라이머 쌍 p45/p51을 이용하여 조합 PCR하여 *grpE* mRNA 안정화 요소에 동일한 방법을 적용하였다. 정제된 LFH-PCR 생성물을 리보플라빈-영양요구성 바실러스 섭틸리스 BS3813의 컴피튼트 세포(여기에서 리보플라빈 프로모터 영역 및 *ribD*의 5' 부분은 네오마이신 저항 카세트로 대체되어 있다)로 다시 형질변환시켰다. 리보플라빈-프로토트로프 형질변환체를 SMM 플레이트 상에서 선택하였다. 단리된 형질변환체를 1 ml의 0.9% NaCl 용액에 현탁시키고, 원래의 세포 현택액의 500배 희석액 100 ㎕를 TBAB 아가 플레이트에 도말하였다. 단일 콜로니를 신선한 TBAB 아가 플레이트, 및 2 mg/l의 Nm 및 100 mg/l의 리보플라빈이 보충된 TBAB 아가 플레이트로 이동시켰다. 정확한 형질변환체는 TBAB 아가 플레이트에서만 성장하고, 따라서 네오마이신 민감성이다. 또한, 새로 도입된 DNA 스트레치를 서열분석함으로써 유전형을 확인하였다. 생성된 균주는 각각 BS5193(구축물 $P_{15WaprE}$*ribD*EAHT를 갖고 있음) 및 BS5196 (구축물 $P_{15WgrpE}$*ribD*EAHT를 갖고 있음)로 표기되었다.

[0150] 균주 BS5193 및 BS5196에서 나온 PBS-1 용균물을 제조하고 BS3798(실시예 1에서 생성됨)로의 형질도입에 이용되었다. SMM 플레이트 상에서의 형질도입된 세포의 선택은 실시예 2에 개시된 바와 같이 수행되었다. 균주 BS5193에 근거한 새로 형질도입된 균주는 각각 BS5260 및 BS5262로 칭해졌고, 균주 BS5196에 근거한 새로 형질도입된 균주는 BS5244로 칭해졌다.

[0151] 리보플라빈 생산을 전술된 바와 같은 진탕 플라스크 실험에서 시험하였다. 결과를 표 6에 나타낸다.

[0152] [표 6A]

천연 *rib* 리더를 갖는 야생형 균주 바실러스 섭틸리스 1A747과 비교된, 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0153]

균주	Rib 리더 돌연변이	수율 [%]
1A747	야생형	0.0004
BS3817	P_{Spo15}	0.0163
BS3944	P_{Spo15}_리더 결실	0.1150
BS5193	P_{Spo15}_*aprE*	0.1000
BS5196	P_{Spo15}_*grpE*	0.3700

[0154] [표 6B]

천연 *rib* 리더를 갖는 리보플라빈-과생산 균주인 바실러스 섭틸리스 RB50과 비교된, 표기된 형질변환된 바실러스 섭틸리스 균주를 이용한 리보플라빈 생산. 수율은 탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공된다(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

[0155]

균주	Rib 리더 돌연변이	수율 [%]
RB50	야생형 *rib* 오페론	0.46
BS3850	P_{Spo15}	1.57
BS5026	P_{Spo15}_리더 결실	2.16
BS5260	P_{Spo15}_*aprE*	2.07
BS5244	P_{Spo15}_*grpE*	2.99

[0156] *rib* 프로모터를 P_{Spo15}와 같은 비-제어되는 구성 프로모터로 대체하면, 진탕 플라스크 스크리닝에서 리보플라빈 수율이 제어되는 야생형 *rib* 오페론에 비해 야생형 바탕값에서는 41배, RB50 바탕값에서는 3.4배 증가하였다. *rib* 리더를 제거하고, P_{Spo15} 프로머터를 *ribD*의 바로 앞에 넣으면, 리보플라빈 수율이 야생형 숙주 균주에서는 7배 증가하고, RB50 바탕값에서는 1.4배 증가한다. *rib* 리더의 *aprE* mRNA 안정화 요소로의 대체는 상기 사용된 2가지 균주 바탕값에서의 수율에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나, *rib* 리더를 *grpE* mRNA 안정화 요소로 대체하면, 리보플라빈 수율이 야생형 숙주 균주에서는 3.7배 증가하고, RB50 바탕값에서는 1.44배 증가한다.

[0157] 개질된 *rib* 오페론의 성능에 대한 숙주 균주의 영향을 확인하기 위해서, 바실러스 섭틸리스 1A747(야생형 rib 오페론), BS5193, BS5196 및 BS3944에서 나온 용균물을 또한 다른 RB50 변이체인 BS5178(*spo0A*$^{-}$, *rib*::*neo*, *ribC1*, *bpr*::*cam*, *tkt*^{mut})로 형질도입시켰다. 전술된 바와 같이 진탕 플라스크 스크리닝을 수행하였다. 새로 구축된 균주의 이름을 비롯한 결과를 하기 표 7에 나타낸다.

[0158] [표 7]

상기 개시된 바와 같은 형질도입된 바실러스 섭틸리스의 리보플라빈 생산. 수율은

탄소 공급원의 g당 리보플라빈의 g으로 제공되며 BS5240의 수율과 비교된다.

균주	Rib 리더 돌연변이	수율 [%]
BS5240	P_{Spo15}_리더 결실	100
BS5191	야생형 *rib* 오페론	40
BS5237	P_{Spo15}_*aprE*	140
BS5238	P_{Spo15}_*grpE*	270

[0159]

[0160] 새로운 균주 바탕값에서, 안정화 요소의 긍정적인 효과는 진탕 플라스크 방식으로 시험하였을 때 보다 명확하였다. 이제 *aprE* mRNA 안정화 요소 또한 리보플라빈 수율을, 리더 없이 *rib* 오페론을 갖는 균주에 비해, 40% 증가시켰다. 심지어 *grpE* mRNA 안정화 요소는 *rib* 리더가 없는 구축물에 비해 2.7배나 증가된 수율을 나타내었다.

[0161] **실시예 6: 추가의 *rib0* 돌연변이와 리더 결실 및 강한 구성적 프로모터의 조합**

[0162] *rib0* 돌연변이체인 RK41(=RK61a), RK1a 및 "트리플 *rib0*"(이는 [Kil et al., 1992]에 개시되어 있는 *rib0* 돌연변이 RK4, RK8, RK5(=RK2)의 조합이다)를 *rib* 리더에 도입한 것과 동일한 방식으로, [Kil et al., 1992]에 개시된 추가의 *rib0* 돌연변이를 다른 최적화된 *rib* 리더의 생산에 이용할 수 있다. 돌연변이의 번호는 서열 번호:42에 도시된 *rib* 리더 서열을 참고한다. 개시된 돌연변이 RK111a(G59A), RK116a(G56A), RK62a(G60A; RK82a와 동일), RK93a(C87T) 및 RK27a(C128T)를 플랭크 5' 및 플랭크 3'의 생성을 위해 이용되는 주형에 따라 강한 구성 프로모터인 P_{Spo15} 또는 P_{veg}와 함께 델 터미네이터, 스위치 결실 및 델 엠로175(상기 참조)과 조합한다. *rib0* 돌연변이처럼 효과적인 임의의 돌연변이는 개시된 프로모터 및 리더 결실을 이용하여 이런 식으로 조합될 수 있다.

[0163] 하기의 프라이머 쌍을 이용하여 *rib0* 돌연변이를 구축하였다: RK111a의 구축을 위해 프라이머 쌍 p111a_f/p111a_r(서열 번호:83 및 84), RK116a의 구축을 위해 프라이머 쌍 p116a_f/p116a_r(서열 번호:85 및 86), RK62a의 구축을 위해 프라이머 쌍 p62a_f/p62a_r(서열 번호:87 및 88), RK93a의 구축을 위해 프라이머 쌍 p93a_f/p93a_r(서열 번호:89 및 90), 및 RK27a의 구축을 위해 프라이머 쌍 p27a_f/p27a_r(서열 번호:91 및 92). 이들 프라이머를 실시예 2에 개시된 바와 같은 PCR 반응에 이용한다. 플랭크 5'의 생성을 위해, 프라이머 p45를 안티센스 프라이머와 함께 적용한다. 플랭크 3'의 생성을 위해, 센스 프라이머를 프라이머 p51과 함께 적용한다. 플랭크 5' 및 3'을 프라이머 p45 및 p51을 이용하는 제 3 PCR에서 조합한다(실시예 2 참조). 균주의 형질변환 및 형질도입을 실시예 2에 개시된 바와 같이 수행한다. 천연 프로모터의 대체를 위해 실시예 3에 따른 지시를 따르고, *rib0* 돌연변이의 리더 돌연변이와의 조합을 위해 실시예 4의 지시를 따른다.

[0164] [표 9]

이전의 실시예에서 전술된 바와 같은 PCR-계 방법에 의한 *rib0* 구축물의 생성에 필

요한 주형(상세한 설명에 대해서는 본문 참조)

rib 리더 돌연변이의 표기	플랭크 5'을 위한 주형	플랭크 3'을 위한 주형
P_{Spo15}_RK111a	BS3817	BS3817
P_{veg}_RK111a	BS3811	BS3811
P_{Spo15}_RK111a_ 스위치 결실	BS3874	BS3874
P_{veg}_RK111a_ 스위치 결실	BS3811	BS3867
P_{Spo15}_RK111a_델 터미네이터	BS3871	BS3871
P_{veg}_RK111a_델 터미네이터	BS3844	BS3844
P_{Spo15}_RK111a_델 엠로175	BS3817	BSmro175
P_{veg}_RK111a_델 엠로175	BS3811	BSmro175

[0165]

[0166] 표 9에 열거된 모든 구축물을 위한 생성된 PCR 생성물을 BS3813으로 형질변환시킨다. 실시예 2에 개시된 바와 같이 선택하고, 확인된 균주의 용균물을 BS3798의 형질도입에 이용한다. 전술된 바와 같은 플라스크 진탕 실험에서 수득된 리보플라빈의 수율은 구축물 RK41_스위치 결실 또는 트리플 *rib0*_델 엠로175에 대한 범위에 포함된다(표 5 참조). 이들 값은 실시예 5에 개시된 바와 같이 다른 균주 바탕값을 이용할 경우 더욱 증가된다.

[0167] **실시예 7: 개질된 rib 리더 서열을 갖는 바실러스 섭틸리스가 아닌 균주의 생성**

[0168] 실시예에 개시된 바와 같은 구축물을 이용하여, 리보스위치를 갖는 것으로 공지되어 있고 리보플라빈 생산에 적합한 숙주인 다른 균주에서 나온 *rib* 리더 서열에서의 상응하는 개질을 확인/생성할 수 있다.

[0169] 비-개질된 *rib* 리더의 상응하는 부분은 [Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002]의 도 2에 개시된 배열에 따라 다른 유기체에서 확인된다. 결실 돌연변이는 상기 개시된 바와 같이 생성되고, 선택적으로 *rib0* 돌연변이(바실러스 섭틸리스에서 확인된 것과 상동)와 조합된다. 당 분야의 숙련자들에게 공지된 적합한 배양 조건 하에서 리보플라빈 생산을 증가시키기 위해 구축물을 강한 프로모터 또는 전술된 바와 같은 숙주 균주의 다른 공지된 개질과 추가로 조합할 수 있다.

[0170]

도면

도면1a

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttca[ttgcgt]actttaa 540
541 aaaggatcgc[tataat]aaccaA[taaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1b

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
                                                              A
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcaG 600
    AA (triple ribO)                                  T (RK41)
601 GGtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagCccgtgacccgtgtg 660
                        A (RK1a)
661 cataagcacgcggtggattcaGtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1c

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1d

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1e

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattccggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1f

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면1g

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

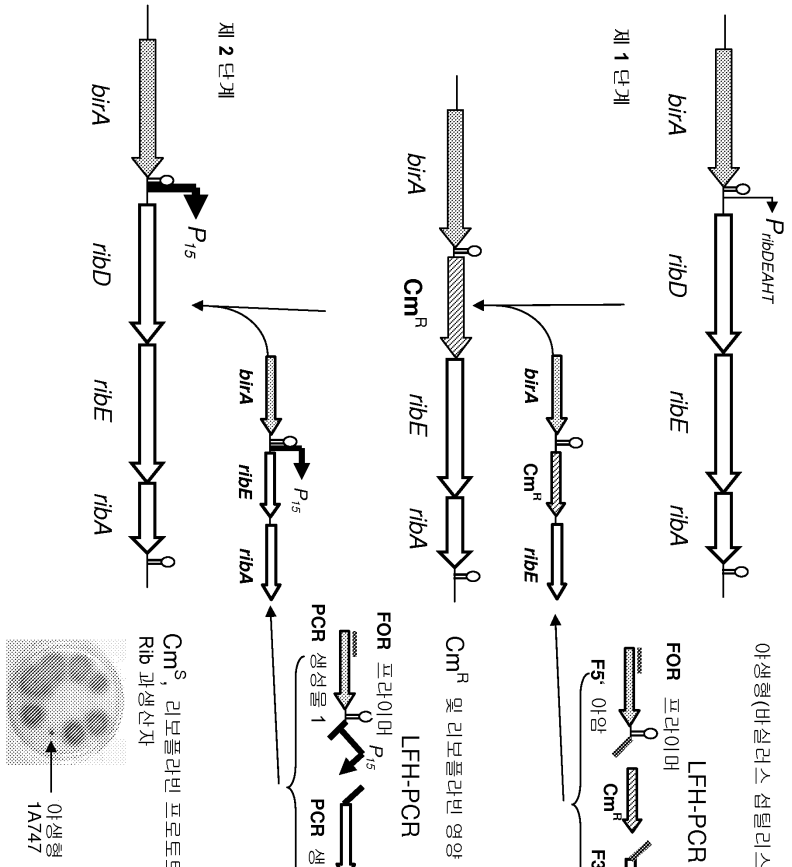
도면1h

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

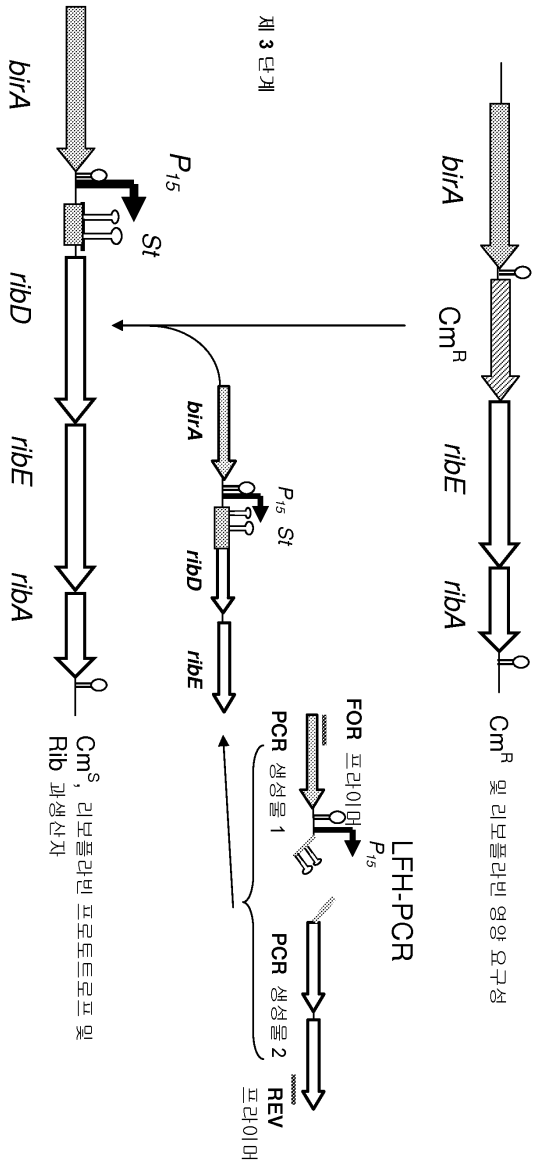
도면1i

```
1   acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggtttttattc  60
61  atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtgacccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggctttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860
```

도면2a


야생형(바실러스 섭틸리스 1A747)
birA
ribD
ribE
ribA
$P_{ribDEAHT}$
LFH-PCR
FOR 프라이머
F5' 아암
Cm^R
F3' 아암
REV 프라이머
제 1 단계
birA
Cm^R
ribE
Cm^R 및 리보플라빈 영양 요구성
LFH-PCR
FOR 프라이머
P_{15}
PCR 생성물 1
PCR 생성물 2
REV 프라이머
제 2 단계
birA
ribD
ribE
ribA
P_{15}
Cm^S, 리보플라빈 프로토트로프 및 Rib 과생산자
야생형 1A747

도면2b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Improved production of riboflavin

<130> 26251

<140> PCT/EP2009/064825

<141> 2009-11-09

<150> EP 08019492.1

<151> 2008-11-07

<160> 92

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4230

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

taaggacaaa tgaataaaga ttgtatcctt cggggcaggg tggaaatccc gaccggcggt 60

agtaaagcac atttgcttta gagcccgtga cccgtgtgca taagcacgcg gtggattcag 120

tttaagctga agccgacagt gaaagtctgg atgggagaag gatgatgagc cgctatgcaa 180

aatgtttaaa aatgcatagt gttatttcct attgcgtaaa atacctaaag ccccgaattt 240

tttataaatt cggggctttt ttgacggtaa ataacaaaag aggggaggga aacaaatgga 300

agagtattat atgaagctgg ccttagatct tgcgaagcag ggcgaaggac agaccgaatc 360

caatccgctc gtcggcgctg ttgtcgtaaa ggacggacaa attgtcggaa tgggcgccca 420

tttaaaatat ggtgaagctc atgcagaagt tcatgccatc catatggctg gagcacatgc 480

agagggtgcc gacatttacg ttacactcga accgtgcagc cattacggaa aaacaccgcc 540

atgtgcagaa ttgattatca actctggtat caaaagagtg ttcgtggcga tgagagatcc 600

taatccgctt gtggctggaa gagggatcag catgatgaaa gaagctggca ttgaggtaag 660

ggaaggcatc ctggcagacc aggcggagag gctgaatgaa aaatttctgc actttatgag 720

gacaggcctt ccgtacgtca cgctaaaagc ggctgccagc cttgacggca agatagctac 780

cagcacgggt gacagcaaat ggatcacgtc agaggctgca agacaggatg ctcagcaata 840

caggaaaaca caccaaagca ttttagtcgg agttggcaca gtgaaagccg acaatccgag 900

cttaacctgc agactgccga atgtaacaaa acagccggtt cgggtcatac ttgataccgt 960

actctcgatt cctgaggacg ctaaagtgat ttgcgatcaa atagcgccga catggatttt 1020

tacgacggca cgcgcagacg aggaaaagaa aaaacggctt tcagctttcg gagtgaacat 1080

atttacactt gaaaccgagc gcattcaaat tcctgatgtt ttgaagatcc tagcggaaga 1140

aggcatcatg tcggtgtatg tggaaggcgg ttcagctgtt cacggaagct ttgtcaaaga 1200

aggctgtttt caagaaatca tcttctattt tgcccctaaa ctaatcggag gaacgcatgc 1260

tcccagctta atctccggtg aaggttttca atcaatgaaa gatgtcccct tattacaatt 1320

cactgatata acccaaatcg gccgtgatat caaactgacg gcaaaaccga caaaggaata 1380

ggatggtgac catgtttaca ggaattatcg aagaaacagg cacaatcgaa tccatgaaaa 1440

aagcagggca tgcaatggcc ttaactatta aatgctcaaa gattttagag gatgttcatc 1500

ttggcgacag cattgcagtg aacggcattt gtctgactgt cactgatttt acaaaaaatc 1560

aattcacagt ggatgttatg cctgaaacag tcaaagctac gtcactgaat gatttaacaa 1620

aaggaagcaa agtaaatctg gaaagagcga tggcggcaaa cggccgtttc ggaggccatt 1680

tcgtctcagg ccatgtcgac ggaactgcgg aaatcacacg aattgaagag aaaagcaacg 1740

cagtttacta tgatttaaaa atggacccgt cattaacaaa aacattggtt ttaaagggat 1800

caattactgt ggatggcgtg agcttaacca tattcggcct gacagaagac acagtgacga 1860

tctccttaat accgcatacg atcagcgaaa cgatcttttc agaaaaaacg atcggctcta 1920

aagtgaatat cgaatgcgat atgatcggaa aatatatgta tcgatttttg cataaagcca 1980

atgaaaataa gacccaacaa accattacaa aagccttctt aagcgaaaac ggcttttaga 2040

gaggaagatt tgcatgtttc atccgataga agaagcactg gacgctttaa aaaaaggcga 2100

agtcatcatc gttgtagatg atgaagacag agaaaatgaa ggagactttg tggctcttgc 2160

cgagcatgca acgccggaag tcattaactt tatggcgaca catgggagag gactgatctg 2220

cacgccgctc agtgaggaaa tcgcagacag gcttgatctt caccctatgg ttgagcataa 2280

tacagactct caccacactg catttaccgt aagcatagac catcgtgaaa cgaagacagg 2340

tatcagcgct caagaaagat cttttaccgt tcaagcattg ctggacagca aatccgtgcc 2400

atctgatttt cagcgtccgg ggcacatttt tccactgatt gcgaaaaaag gaggtgtcct 2460

gaaaagagcg ggccatacag aagctgctgt tgatcttgct gaagcttgcg gatctccagg 2520

agccggcgtc atttgtgaaa ttatgaatga agacggaacg atggcgagag tgcctgagct 2580

cattgaaatt gcgaaaaagc atcaattaaa aatgatcacc attaaggatt tgattcaata 2640

ccgttacaat ctgacaacac ttgtcgagcg tgaagttgac attacgctgc ctactgattt 2700

tgggacattt aaggtttatg gatacacaaa tgaggtagat ggaaaagagc atgtcgcatt 2760

tgtgatggga gatgtgccgt tcggagaaga accggtattg gtccgggtgc attcagaatg 2820

tctcacaggt gacgtgtttg gctctcatcg ctgtgattgc ggaccgcagc tgcacgccgc 2880

gctgaaccaa attgccgcag aaggccgtgg agtgctcctg tacttgcgcc aagaaggacg 2940

aggcatcggt ttaatcaata aattaaaagc ttataagctt caggaacaag gctatgacac 3000

cgtagaagcc aatgaggcgc ttggattctt gccggatctt cgcaactatg gcatcggagc 3060

acaaatttta cgcgacctcg gtgtccggaa tatgaagctt ttgacgaata atccgcgaaa 3120

aatcgcaggc cttgaaggct acggactcag tatttcagaa agagtgccgc ttcaaatgga 3180

ggcgaaagaa cacaataaaa aatatttgca aaccaaaatg aacaagctag gtcatttact 3240

tcatttctaa tcacaaatat cacaaaaaag gatgggaatc atatgaatat catacaagga 3300

aatttagttg gtacaggtct taaaatcgga atcgtagtag gaagatttaa tgattttatt 3360

acgagcaagc tgctgagcgg agcagaagat gcgctgctca gacatggcgt agacacaaat 3420

gacattgatg tggcttgggt tccaggcgca tttgaaatac cgtttgctgc gaaaaaaatg 3480

gcggaaacaa aaaaatatga tgctattatc acattgggca ctgtcatcag aggcgcaacg 3540

acacattacg attatgtctg caatgaagct gcaaaaggca tcgcgcaagc agcaaacact 3600

actggtgtac ctgtcatctt tggaattgta acaactgaaa acatcgaaca ggctatcgag 3660

cgtgccggca caaaagcggg caacaaaggt gtagattgtg ctgtttctgc cattgaaatg 3720

gcaaatttaa accgctcatt tgaataattt gctgaaaaca gtttaaaaat atggcgaaaa 3780

tgatataatg tgagaaaacg gatcacctat tcgtatccgt taatagcaga ctggacattt 3840

tggatataga ggggttttta tgttaattcg ttataaaaaa tcgtttgaaa agattgcgat 3900

ggggcttctt tcgtttatgc cgaatgaaaa agaccttaag cagcttcagc agacaattaa 3960

ggactacgaa acggatacag accgccagct ctttctttgg aaagaggacg aggatatcgt 4020

cggagcaatc ggagtcgaaa aaaaggattc tgaggttgag atccggcata tcagtgtgaa 4080

tccttctcat cgccatcaag gaatcggaaa acagatgatg gatgctttaa agcatttatt 4140

caaaacgcaa gtactggttc caaatgaatt aacgcagagc tttttcgaac gttgtcaagg 4200

tcagcaggat caagacattt catacaataa 4230

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 2

gcttgggctg caggtcgaga tc 22

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 3

gttcaaaatg gtatgcgttt tgacac 26

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 4

gatctcgacc tgcagcccaa gcgaaataaa cttacaattt gagaaaaac 49

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 5

acatattccc gttatgcatc g 21

<210> 6

<211> 47

<

212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 6

gtgtcaaaac gcataccatt ttgaacgagt tggcacagtg aaagccg 47

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 7

ctattccttt gtcggttttg ccg 23

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 8

aatacctaaa gccccgaaga cggtaaataa caaaagagg 39

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 9

ttcggggctt taggtatttt acg 23

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 10

cctattgcgt aaaataccta aagacggtaa ataacaaaag ag 42

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 11

tttaggtatt ttacgcaata ggaaataac 29

<210> 12

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 12

taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg 60

acaaatgaat aa 72

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 13

tttgtcaaat aaaatttaaa ttagaaataa acttacaatt tgagaaaaac 50

<210> 14

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 14

taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattataa 60

ggacaaatga ataaagattg 80

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 15

caataccttt ttgtaaaatt tttagaaata aacttacaat ttgagaaaaa c 51

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 16

ccgtgacccg tgtgcataag c 21

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 17

aaatggaaat cccgaccggc ggtag 25

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 18

tatgcacacg ggtcacggac tctaaagcaa atgtgcttta c 41

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 19

ctaccgccgg tcgggatttc cattttgccc cgaaggatac aatctttatt c 51

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 20

tttaagctga agccgacagt g 21

<210> 21

<211> 37

<212> DNA

<213>

Artificial

<220><223> primer

<400> 21

tgtcggcttc agcttaaatt gaatccaccg cgtgctt 37

<210> 22

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 22

gccccgattt ttttataaat tttttgacgg taaataacaa aagagg 46

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 23

aaaaaattta taaaaaattc ggggctttag 30

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220

><223> primer

<400> 24

tttaggtatt ttacgcaata gg 22

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 25

cctattgcgt aaaataccta aatttttat aaattcgggg ctttttg 48

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 26

agtctggatg ggagaaggat ggacggtaaa taacaaaaga gg 42

<210> 27

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<

400> 27

cagtttaagc tgaagccatg ggacggtaaa taacaaaaga gg 42

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 28

catccttctc ccatccagac t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 29

ccatggcttc agcttaaact g 21

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> prime

<400> 30

ataattaaat tattacacac cctg 24

<210> 31

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 31

cagggtgtgt aataatttaa ttgacggtaa ataacaaaag agggg 45

<210> 32

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 32

ttttaagtaa gtctactctg aatttttta gacggtaaat aacaaaagag ggg 53

<210> 33

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 33

cagagtagac ttacttaaaa gactattctg caatctttat tcatttgtcc ttataa 56

<210> 34

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 34

cctgtccttc tccttacact ttgagggagg tgaacacaga cggtaaataa caaaagaggg 60

g 61

<210> 35

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 35

gtgtaaggag aaggacaggt gctgcccttc gataaaatca atctttattc atttgtcctt 60

ataa 64

<210> 36

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial

<

220><223> deletion

<400> 36

ttcggggc 8

<210> 37

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> deletion

<400> 37

gccccgaa 8

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> deletion

<400> 38

ttttttataa attcggggct ttttt 25

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> deletion

<400> 39

gccccgaatt ttttataaat tcggggcttt ttt 33

<210> 40

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> deletion

<400> 40

atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac 60

ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg gctttttt 98

<210> 41

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> deletion

<400> 41

gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg 60

catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg 120

gctttttt 128

<210> 42

<211> 263

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 42

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180

aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240

ttttataaat tcggggcttt ttt 263

<210> 43

<211> 41

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 43

acagaatagt cttttaagta agtctactct gaatttttta a 41

<210> 44

<211> 57

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 44

attttatcga agggcagcac ctgtccttct ccttacactt tgagggaggt gaacaca 57

<210> 45

<211> 328

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 45

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcaattta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300

gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 46

<211> 328

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 46

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagt ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300

gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 47

<211> 328

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 47

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaaaatgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300

gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 48

<211> 320

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 48

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300

gaatttttta taaatttttt 320

<210> 49

<211> 320

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 49

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaattttt 300

tataaattcg gggctttttt 320

<210> 50

<211> 303

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 50

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300

gaa 303

<210> 51

<211> 295

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 51

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60

aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120

ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaa 295

<210> 52
<211> 230
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis
<400> 52

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180

attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg 230

<210> 53
<211> 204
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis
<400> 53

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgg atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgtataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc atgg 204

<210> 54
<211> 65
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 54

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aacca 65

<210> 55
<211> 349
<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 55

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggctttttt 349

<210> 56

<211> 347

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 56

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaagccccg aatttttat aaattcgggg ctttttt 347

<210> 57

<211> 347

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 57

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg 120

caaaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaagccccg aatttttat aaattcgggg ctttttt 347

<210> 58

<211> 347

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 58

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaagccccg aatttttat aaattcgggg ctttttt 347

<210> 59

<211> 349

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 59

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcaattt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggctttttt 349

<210> 60

<211> 328

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 60

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcaatttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaagccccg aatttttt 328

<210> 61

<211> 324

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 61

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaagccc cgaa 324

<210> 62

<211> 322

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 62

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaagccccg aa 322

<210> 63

<211> 316

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 63

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaa 316

<210> 64

<211> 314

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 64

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300

gtaaaatacc taaa 314

<210> 65

<211> 251

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 65

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat g 251

<210> 66

<211> 86

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 66

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaatt 86

<210> 67

<211> 225

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 67

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg gatccttcgg 120

ggcaaaatgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

gtgtgtataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc catgg 225

<210> 68

<211> 223

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 68

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg 120

caaaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacccgt 180

gtgtataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagcca tgg 223

<210> 69

<211> 316

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 69

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag tccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaa 316

<210> 70

<211> 251

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 70

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag tccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg 240

ggagaaggat g 251

<210> 71

<211> 249

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 71

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120

cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgacccgt 180

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240

agaaggatg 249

<210> 72

<211> 186

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 72

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg cagaatagtc 120

ttttaagtaa gtctactctg aatttttta gacggtaaat aacaaaagag gggagggaaa 180

caaatg 186

<210> 73

<211> 203

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 73

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg attttatcga 120

agggcagcac ctgtccttct ccttacactt tgagggaggt gaacacagac ggtaaataac 180

aaaagagggg agggaaacaa atg 203

<210> 74

<211> 263

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 74

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

atttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180

aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240

ttttataaat tcggggcttt ttt 263

<210> 75

<211> 263

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 75

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagtccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180

aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240

ttttataaat tcggggcttt ttt 263

<210> 76

<211> 263

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 76

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcaaa atggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180

aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240

ttttataaat tcggggcttt ttt 263

<210> 77

<211> 263

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 77

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
ttttataaat tcggggcttt ttt 263

<210> 78
<211> 230
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis
<400> 78

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa 230

<210> 79
<211> 255
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis
<400> 79

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240

ttttataaat ttttt 255

<210> 80
<211> 255
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis
<400> 80

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180

aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa ttttttataa 240

attcggggct ttttt 255

<210> 81

<211> 165

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 81

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatg 165

<210> 82

<211> 135

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 82

ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60

tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

gtttaagctg aagcc 135

<210> 83

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 83

gtagtaaagc acatttgctt tagagc 26

<210> 84

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 84

caaatgtgct ttactactgc cggtcgggat ttccac 36

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 85

gcggtagtaa agcacatttg c 21

<210> 86

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 86

caaatgtgct ttactaccgc tggtcgggat ttccaccctg 40

<210> 87

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 87

tagtaaagca catttgcttt agagcc 26

<210> 88

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 88

gctctaaagc aaatgtgctt tactatcgcc ggtcgggatt tccac 45

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 89

gtgacccgtg tgcataagca c 21

<210> 90

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 90

tgcttatgca cacgggtcac aggctctaaa gcaaatgtgc tttac 45

<210> 91

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 91

tgaagccgac agtgaaagtc tg 22

<210> 92

<211> 41

<212> DNA

<213>

Artificial

<220><223> primer

<400> 92

gactttcact gtcggcttca acttaaactg aatccaccgc g 41