



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월10일

(11) 등록번호 10-2518841

(24) 등록일자 2023년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 23/00 (2006.01) C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 23/00 (2013.01)

C07K 14/245 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0153276

(22) 출원일자 2021년11월09일

심사청구일자 2021년11월09일

(56) 선행기술조사문헌

JP2010505414 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김선원

세종특별자치시 고운북3길 17(고운동)

박지빈

부산광역시 금정구 중앙대로1685번길 24, 108동 604호(부곡동, 경남한신아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 13 항

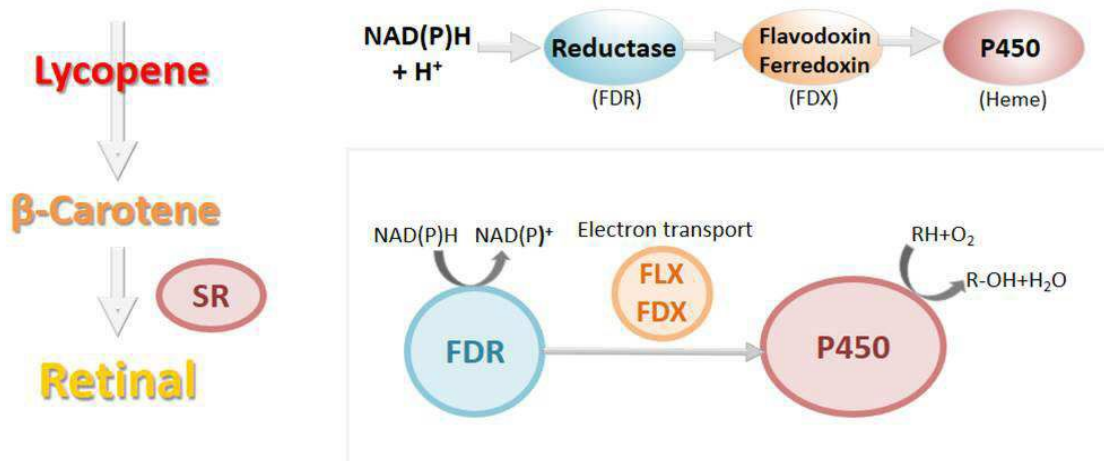
심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 레티노이드 제조용 조성물 및 이를 이용한 레티노이드의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 레티노이드 제조용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 NADH 또는 NADPH, 베타-카로틴 산화 효소 (Beta-Carotene Oxygenase), 플라보독신 또는 페레독신, 및 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소; 또는 이들을 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물 또는 분쇄물;을 포함함으로써, 환원 전자 공급 대사를 확장하여 시토크롬 P450 시스템의 활성 증대를 통해 레티노이드 생산성을 향상하고 저비용 원료 생산 기반을 마련함으로써 레티노이드 생산의 경제성과 효율성을 제고할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/001 (2013.01)
C12N 9/0069 (2013.01)
C12N 9/0095 (2013.01)
C12N 9/0097 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/1229 (2013.01)

(72) 발명자

정성희

경상남도 김해시 상동면 여차로699번길 11-1

권문혁

경상남도 진주시 사들로 157, 106동 2102호(충무공
동, 진주혁신도시센텀리버파크)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130014445 A*

KR1020140147982 A

국립농업과학원, “시스템합성생물학적 접근을 통
한 터페노이드 생산 대사공학 기반 구축”,
2013.02. 발행*

KR1020160019480 A*

KR1020190113851 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395067863

과제번호 PJ015664012021

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)

연구과제명 농생명 합성생물학 기반 기능성 당 및 레티노이드 대량생산용 농업 미생물 세포공장
개발(1주관)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711137640

과제번호 2021R1A5A8029490

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 향노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

NADH 또는 NADPH, 베타-카로틴 산화 효소(Beta-Carotene Oxygenase), 및 플라보독신 또는 페레독신, 또는 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물 또는 분쇄물;을 포함하고, 상기 미생물은 플라보독신 또는 페레독신, 또는 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어, 이를 과발현하는 것인 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 베타-카로틴 산화 효소는 서열번호 1의 서열을 포함하는 베타-카로틴 모노옥시게나제(BCMO, Beta-Carotene 15,15'-MonoOxygenase)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 플라보독신은 서열번호 2의 서열을 포함하는 플라보독신 1(flavodoxin 1, fldA) 또는 서열번호 3의 서열을 포함하는 플라보독신 2(flavodoxin 2, fldB)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 페레독신은 서열번호 4의 서열을 포함하는 환원된 페레독신(reduced ferredoxin, fdx)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소는 서열번호 5의 서열을 포함하는 플라보독신/페레독신-NADP(+) 환원 효소(flavodoxin/ferredoxin-NADP(+) reductase, Fpr) 또는 서열번호 6의 서열을 포함하는 피루브산-플라보독신 산화 환원 효소(pyruvate-flavodoxin oxidoreductase, YdbK)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 에세리키아 속(*Escherichia*) 미생물인. 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 메발로네이트(mevalonate, MVA) 합성 경로 또는 베타-카로틴(beta-carotene) 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 메발로네이트 합성 경로의 효소는 서열번호 18의 서열을 포함하는 아세틸-CoA 아세틸 트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제(acetyl-CoA acetyltransferase/HMG-CoA reductase, mvaE), 서열번호 19의 서열을 포함하는 HMG-CoA 신타제(HMG-CoA synthase, mvaS), 서열번호 20의 서열을 포함하는 메발로네이트 키나제(mevalonate kinase, mvaK1), 서열번호 21의 서열을 포함하는 포스포메발로네이트 키나제(phosphomevalonate kinase, mvaK2), 서열번호 22의 서열을 포함하는 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제(diphosphomevalonate decarboxylase, mvaD) 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제(isopentenylidiphosphate isomerase, idi)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 베타-카로틴 합성 경로의 효소는 서열번호 48의 서열을 포함하는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, crtE), 서열번호 49의 서열을 포함하는 피토엔 신타제(phytoene synthase, crtB), 서열번호 50의 서열을 포함하는 피토엔 데히드로게나제(Phytoene dehydrogenase, crtI), 라이코펜-베타-시클라제(Lycopene beta-cyclase, crtY), 및 서열번호 52의 서열을 포함하는 IPP 이소포머라제(isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase, ipiHP1)인, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 ackA(acetate kinase), pta(phosphate acetyltransferase/phosphate propionyltransferase), adhE(aldehyde-alcohol dehydrogenase), ldhA(lactate dehydrogenase A), atoDA(acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase), dld(D-lactate dehydrogenase, poxB(pyruvate dehydrogenase) 및 pps(phosphoenolpyruvate synthase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나가 감쇄 또는 결실된, 베타-카로틴의 레티노이드로의 전환용 조성물.

청구항 11

베타-카로틴(β -carotene)을 청구항 1 내지 10 중 어느 하나의 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 레티노이드의 제조 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 반응은 상기 미생물 내에서 수행되는 것인, 레티노이드의 제조 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 미생물을 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는, 레티노이드의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레티노이드 제조용 조성물 및 이를 이용한 레티노이드의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 레티노이드는 비타민 A와 화학적으로 관련된 친지질성 이소프레노이드 분자의 클래스이다. 레티노이드는

레티놀, 레티날, 레티노산, 또는 레티닐 아세테이트로 구성된다. 이들은 시력보호, 성장 및 발달, 그리고 면역의 3가지 기본적 생리 기능을 유지하기 위해 필요하며 특정 암의 위험을 감소시킨다고 알려져 있다. 레티노이드는 최근 수년간 피부 탄력 증가에 의한 주름 개선 및 피부 질환 개선을 위한 의약품 및 기능성 화장품 원료로서 주목 받으며 이에 따라 산업적 요구가 급속히 높아지고 있으며 세계적으로 약 43억달러의 시장을 형성할 것으로 추정된다.

[0004] 베타카로틴에서 레티날을 생산하는 시토크롬 P450 효소인 베타카로틴 모노옥시게나제(Beta-Carotene 15,15'-MonoOxygenase: BCMO)의 주요 효소 반응인 monooxygenation 반응에는 산소 분자(O_2)와 NADPH(또는 NADH)의 환원 물질들이 필요하며 산소 분자의 한 원자는 산화되는 기질과 결합하며 다른 한 원자는 물로 환원된다. 세균 등 미생물이나 미토콘드리아의 시토크롬 P450 효소들은 flavodoxin, ferredoxin 및 flavodoxin reductase, ferredoxin reductase로 이루어진 two-component shuttle 시스템을 전자 전달 파트너로 사용한다.

[0005] 이전 종래 기술에서, 미생물을 이용한 레티노이드 생산 향상 연구가 진행되었지만 레티노이드는 반응성 있는 콘쥬게이트된 이중 결합을 포함하고 있어 화학적으로 매우 불안정하고, 열, 산소 및 빛에 의해 쉽게 산화되고 이성체화되어 생산 효율이 낮은 문제점이 있다. 레티노이드를 산업적 생산에 실제로 활용하기 위해서는 생산 효율을 향상하여 경제적으로 대량생산 할 수 있는 추가적인 연구가 요구된다. 따라서, 시토크롬 P450 시스템의 활성 증대로 레티노이드 전환 효율을 증가하여 생산성을 향상시키는 생명공학적인 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2202606호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생산 효율이 증가된 레티노이드 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 생산 효율이 증가된 레티노이드의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. NADH 또는 NADPH, 베타-카로틴 산화 효소(Beta-Carotene Oxygenase), 플라보독신 또는 페레독신, 및 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소; 또는 이들을 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물 또는 분쇄물;을 포함하는 레티노이드 제조용 조성물.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 베타-카로틴 산화 효소는 서열번호 1의 서열을 포함하는 베타-카로틴 모노옥시게나제(BCMO, Beta-Carotene 15,15'-MonoOxygenase)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 플라보독신은 서열번호 2의 서열을 포함하는 플라보독신 1(flavodoxin 1, fldA) 또는 서열번호 3의 서열을 포함하는 플라보독신 2(flavodoxin 2, fldB)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 페레독신은 서열번호 4의 서열을 포함하는 환원된 페레독신(reduced ferredoxin, fdx)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0015] 5. 위 1에 있어서, 상기 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소는 서열번호 5의 서열을 포함하는 플라보독신/페레독신-NADP(+) 환원 효소(flavodoxin/ferredoxin-NADP(+) reductase, Fpr) 또는 서열번호 6의 서열을 포함하는 피루브산-플라보독신 산화 환원 효소(pyruvate-flavodoxin oxidoreductase, YdbK)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0016] 6. 위 1에 있어서, 상기 미생물은 에세리키아 속(*Escherichia*) 미생물인. 레티노이드 제조용 조성물.

[0017] 7. 위 1에 있어서, 상기 미생물은 메발로네이트(mevalonate, MVA) 합성 경로 또는 베타-카로틴(beta-carotene) 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는, 레티노이드 제조용 조성물.

[0018] 8. 위 7에 있어서, 상기 메발로네이트 합성 경로의 효소는 서열번호 18의 서열을 포함하는 아세틸-CoA 아세틸트

란스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제(acetyl-CoA acetyltransferase/HMG-CoA reductase, mvaE), 서열번호 19의 서열을 포함하는 HMG-CoA 신타제(HMG-CoA synthase mvaS), 서열번호 20의 서열을 포함하는 메발로네이트 키나제(mevalonate kinase, mvaK1), 서열번호 21의 서열을 포함하는 포스포메발로네이트 키나제(phosphomevalonate kinase, mvaK2), 서열번호 22의 서열을 포함하는 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제(diphosphomevalonate decarboxylase, mvaD) 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제(isopentenylidiphosphate isomerase, idi)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0019] 9. 위 7에 있어서, 상기 베타-카로틴 합성 경로의 효소는 서열번호 48의 서열을 포함하는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, crtE), 서열번호 49의 서열을 포함하는 피토엔 신타제(phytoene synthase, crtB), 서열번호 50의 서열을 포함하는 피토엔 데히드로게나제(Phytoene dehydrogenase, crtI), 라이코펜 베타-시클라제(lycopene beta-cyclase, crtY) 및 서열번호 52의 서열을 포함하는 IPP 이소포머라제(isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase, ipiHP1)인, 레티노이드 제조용 조성물.

[0020] 10. 위 1에 있어서, 상기 미생물은 ackA(acetate kinase), pta(phosphate acetyltransferase/phosphate propionyltransferase), adhE(aldehyde-alcohol dehydrogenase), ldhA(lactate dehydrogenase A), atoDA(acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase), dld(D-lactate dehydrogenase, poxB(pyruvate dehydrogenase) 및 pps(phosphoenolpyruvate synthase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나가 감쇄 또는 결실된, 레티노이드 제조용 조성물.

[0021] 11. 베타-카로틴(beta-carotene)을 위 1 내지 10 중 어느 하나의 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 레티노이드의 제조 방법.

[0022] 12. 위 11에 있어서, 상기 조성물은 상기 미생물을 포함하는 것이고, 상기 반응은 상기 미생물 내에서 수행되는 것인, 레티노이드의 제조 방법.

[0023] 13. 위 11에 있어서, 상기 조성물은 상기 미생물을 포함하는 것이고, 상기 미생물을 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는, 레티노이드의 제조 방법.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 환원 전자 공급 대사를 확장하여 시토크롬 P450 시스템의 활성 증대를 통해 레티노이드 생산성을 향상하고 저비용 원료 생산 기반을 마련함으로써 레티노이드 생산의 경제성과 효율성을 제고할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 레티날 합성 과정과 이에 관여하는 전자 전달 시스템을 도식화한 것이다.

도 2는 레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트를 포함하는 레티노이드의 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석 프로파일이다.

도 3은 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.

도 4는 SBL1 균주 제작과정을 도식화로 나타낸 것이다.

도 5는 SBL7 균주 제작과정을 도식화로 나타낸 것이다.

도 6은 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fAyK, 및 pB2-fByK가 도입된 레티노이드 생산 균주 MG1655의 세포 성장을 나타낸다.

도 7은 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fAyK, 및 pB2-fByK가 도입된 레티노이드 생산 균주 MG1655의 레티노이드 생산량을 나타낸다.

도 8은 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fAyK, 및 pB2-fByK가 도입된 레티노이드 생산 균주 AceCo의 세포 성장을 나타낸다.

도 9는 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fAyK, 및 pB2-fByK가 도입된 레티노이드 생산 균주 AceCo의 레티노이드 생산량을 나타낸다.

도 10은 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fx, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fxfr, pB2-fAyK, pB2-fByK, 및

pB2-fxyK가 도입된 레티노이드 생산 균주 SBL7의 세포 성장을 나타낸다.

도 11은 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fx, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fxfr, pB2-fAyK, pB2-fByK, 및 pB2-fxyK가 도입된 레티노이드 생산 균주 SBL7의 레티노이드 생산량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 레티노이드 제조용 조성물을 제공한다.
- [0031] 레티노이드 제조용 조성물은 NADH 또는 NADPH, 베타-카로틴 산화 효소(Beta-Carotene Oxygenase), 플라보독신 또는 페레독신, 및 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소; 또는 이들을 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물 또는 분쇄물;을 포함한다.
- [0032] 레티노이드는 비타민 A(레티놀)의 골격이 있는 화합물 또는 레티놀의 활성체인 레티노인산(all trans 및 9-cis)과 같은 효과 또는 유사한 작용을 하여 레티노인산 수용체에 결합하는 화합물일 수 있다. 레티노이드는 예를 들면, 레티날, 레티놀, 레티닐팔미테이트, 레티노익산 또는 레티닐아세테이트일 수 있고, 구체적으로 레티날일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 베타-카로틴 산화 효소는 비타민 A(레티놀)의 전구체인 베타-카로틴으로부터 두 분자의 레티날을 생성하는 반응에 대해 촉매 작용을 하는 효소이다. 베타-카로틴 산화 효소는 예를 들면, 베타-카로틴 모노옥시게나제(BCMO, Beta-Carotene 15,15'-MonoOxygenase)일 수 있다. 베타-카로틴 모노옥시게나제는 서열번호 1의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 플라보독신은 전자 전달 효소로, 전자 전달 효소는 생체 내 산화 또는 환원 반응에 관여하는 효소에 보조 인자인 NAD, NADP 등을 통하여 추진력(driving force)으로 사용되는 전자 또는 수소 이온 등을 제공하는 효소를 의미한다. 플라보독신은 베타-카로틴으로부터 두 분자의 레티날을 생성하는 반응에 전자 전달 파트너로 이용된다. 플라보독신은 플라보독신 1(flavodoxin 1, fldA) 또는 플라보독신 2(flavodoxin 2, fldB)일 수 있다. 플라보독신 1은 서열번호 2의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 플라보독신 2는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 페레독신은 전자 전달 효소로, 베타-카로틴으로부터 두 분자의 레티날을 생성하는 반응에 전자 전달 파트너로 이용된다. 페레독신은 환원된 페레독신(reduced ferredoxin, fdx)일 수 있다. 환원된 페레독신은 서열번호 4의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소는 전자 전달 효소로, 베타-카로틴으로부터 두 분자의 레티날을 생성하는 반응에 전자 전달 파트너로 이용된다. 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소는 플라보독신/페레독신-NADP(+) 환원 효소(flavodoxin/ferredoxin-NADP(+) reductase, Fpr) 또는 피부르산-플라보독신 산화 환원 효소(pyruvate-flavodoxin oxidoreductase, YdbK)일 수 있다. 플라보독신/페레독신-NADP(+) 환원 효소는 서열번호 5의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 피부르산-플라보독신 산화 환원 효소는 서열번호 6의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 이들을 발현하는 미생물은 내재적으로 또는 외인적으로 이들을 발현하는 것일 수 있다. 이들을 외인적으로 발현하는 미생물은 상기 NADH 또는 NADPH, 베타-카로틴 산화 효소(Beta-Carotene Oxygenase), 플라보독신 또는 페레독신, 및 플라보독신 또는 페레독신의 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다. 유전자의 도입은 당 분야에 공지된 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스 등의 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터 등을 제한 없이 사용하여 수행된 것일 수 있다.
- [0038] 미생물은 원핵 세포, 진핵 세포, 또는 분리된 동물 세포로 액체 배지에서 배양될 수 있는 것일 수 있다. 상기 미생물은 예를 들면, 박테리아, 곰팡이, 또는 이들의 조합일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 또는 이들의 조합일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 에세리키아 (*Escherichia*) 속일 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실러스 속, 코리네박테리움 속, 유산균 또는 이들의 조합일 수 있다. 곰팡이는 효모, 클루베로마이세스, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 미생물은 천연 또는 외래 유전자가 도입된 것일 수 있다. 외래 유전자는 MEP 또는 MVA 경로의 하나 이상의 유전자와 같은 레티노이드 생산에 관련된 유전자일 수 있다.
- [0039] 미생물은 에세리키아 속(*Escherichia*) 미생물일 수 있고, 구체적으로 에세리키아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*)일 수 있고, 보다 구체적으로 에세리키아 콜라이 MG1655 균주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0040] 미생물의 배양물은 배양 후 미생물을 포함한 배지, 배양 후 미생물은 분리된 배지 또는 배양 중 미생물이 분비한 물질 등을 포함하는 것일 수 있다. 배지는 고체 배지 또는 액체 배지일 수 있다. 미생물의 분쇄물은 sonication 등을 통한 미생물의 분쇄물로서, 상기 미생물 내의 상기 단백질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 미생물은 메발로네이트(mevalonate, MVA) 합성 경로 또는 베타-카로틴(beta-carotene) 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.
- [0042] 메발로네이트 합성 경로 또는 베타-카로틴 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 미생물의 경우, 베타-카로틴의 전구체인 메발로네이트 또는 라이코펜이나 베타-카로틴의 생산 효율이 향상되어 해당 미생물을 레티노이드 제조용 조성물로 이용할 때 우수한 수율로 레티노이드를 수득할 수 있다.
- [0043] 미생물은 메발로네이트 합성 경로 또는 베타-카로틴 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 내재적으로 또는 외인적으로 발현하는 것일 수 있다. 이들을 외인적으로 발현하는 미생물은 메발로네이트 합성 경로 또는 베타-카로틴 합성 경로의 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다. 유전자의 도입은 당 분야에 공지된 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스 등의 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터 등을 제한 없이 사용하여 수행된 것일 수 있다.
- [0044] 메발로네이트 합성 경로의 효소는 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제(acetyl-CoA acetyltransferase/HMG-CoA reductase, mvaE), HMG-CoA 신타제(HMG-CoA synthase, mvaS), 메발로네이트 키나제(mevalonate kinase, mvaK1), 포스포메발로네이트 키나제(phosphomevalonate kinase, mvaK2), 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제(diphosphomevalonate decarboxylase, mvaD) 및 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제(isopentenyl diphosphate isomerase, idi)일 수 있다.
- [0045] 상기 mvaE는 서열번호 18의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mvaS는 서열번호 19의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mvaK1은 서열번호 20의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mvaK2는 서열번호 21의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mvaD는 서열번호 22의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 idi는 서열번호 23의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 mvaE는 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) 유래일 수 있다. 상기 mvaS는 엔테로코커스 패칼리스 유래일 수 있다. 상기 mvaK1은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 유래일 수 있다. 상기 mvaK2는 스트렙토코커스 뉴모니아 유래일 수 있다. 상기 mvaD는 스트렙토코커스 뉴모니아 유래일 수 있다. 상기 idi는 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 유래일 수 있다.
- [0047] 베타-카로틴 합성 경로의 효소는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, crtE), 피토엔 신타제(phytoene synthase, crtB), 피토엔 데히드로게나제(Phytoene dehydrogenase, crtI), 라이코펜 베타-시클라제(lycopene beta-cyclase, crtY) 및 IPP 이소포머라제(isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase, ipiHP1)일 수 있다.
- [0048] 상기 crtE는 서열번호 48의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 crtB는 서열번호 49의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 crtI는 서열번호 50의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 ipiHP1은 서열번호 52의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 crtE는 판토에아 아글루메란스(*Pantoea agglomerans*) 유래일 수 있다. 상기 crtB는 판토에아 아글루메란스 유래일 수 있다. 상기 crtI는 판토에아 아글루메란스 유래일 수 있다. 상기 crtY는 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 유래일 수 있다. 상기 ipiHP1은 헤마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 유래일 수 있다.
- [0050] 미생물은 발효 부산물 생성 효소를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 레티노이드 생산 반응 중에 발효에 의한 부산물로 아세트이트, 알코올, 락테이트, 아세트아세트이트, 포스포에놀피루브산 등이 생성될 수 있는데, 이에 의해 메발로네이트 합성 경로의 전구 물질인 아세틸-CoA가 소모되고 레티노이드 생산 효율이 감소하게 된다. 발효 부산물 생성 효소를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실되는 경우 전구 물질인 아세틸-CoA의 불필요한 소모를 막고, 레티노이드 생산성을 극대화할 수 있다.
- [0051] 발효 부산물 생성 효소는 ackA(acetate kinase), pta(phosphate acetyltransferase/phosphate propionyltransferase), adhE(aldehyde-alcohol dehydrogenase), ldhA(lactate dehydrogenase A), atoDA(acyl

CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase), dld(D-lactate dehydrogenase, poxB(pyruvate dehydrogenase) 및 pps(phosphoenolpyruvate synthase)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0052] 상기 ackA는 아세테이트 생성에 관여하는 아세테이트 키나제(acetate kinase)일 수 있다. 상기 pta는 아세테이트 생성에 관여하는 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제/포스페이트 프로피오닐트랜스퍼라제(phosphate acetyltransferase/phosphate propionyltransferase)일 수 있다. 상기 adhE는 알코올 생성에 관여하는 알데하이드-알코올 디하이드로게나제(aldehyde-alcohol dehydrogenase)일 수 있다. 상기 ldhA는 락테이트 생성에 관여하는 락테이트 디하이드로게나아제 A(lactate dehydrogenase A)일 수 있다. 상기 atoDA는 아세토아세테이트 생성에 관여하는 아실 CoA:아세테이트/3-케토산 CoA 트랜스퍼라제(acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase)일 수 있다. 상기 dld는 락테이트 생성에 관여하는 D-락테이트 디하이드로게나제(D-lactate dehydrogenase)일 수 있다. 상기 poxB는 아세테이트 생성에 관여하는 피부르산 디하이드로게나제(pyruvate dehydrogenase)일 수 있다. 상기 pps는 포스포에놀피부르산 생성에 관여하는 포스포에놀피부르산 신타제(phosphoenolpyruvate synthase)일 수 있다.

[0054] 본 발명은 레티노이드의 제조 방법을 제공한다.

[0055] 레티노이드의 제조 방법은 베타-카로틴(beta-carotene)을 상기 레티노이드 제조용 조성물과 반응시키는 단계를 포함한다.

[0056] 베타-카로틴, 레티노이드 및 레티노이드 제조용 조성물은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 베타-카로틴을 상기 레티노이드 제조용 조성물과 반응시키는 경우 베타-카로틴으로부터 두 분자의 레티날을 생성하는 반응이 활성화되어 우수한 수율로 레티노이드를 제조할 수 있다.

[0058] 레티노이드 제조용 조성물이 상기 미생물을 포함하는 경우, 베타-카로틴과 레티노이드 제조용 조성물의 반응은 상기 미생물 내에서 수행되는 것일 수 있다.

[0059] 미생물은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 레티노이드 제조용 조성물이 상기 미생물을 포함하는 경우, 상기 미생물을 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0061] 탄소원은 예를 들면, 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0064] 실시예

[0065] 재료 및 방법

[0066] 1. 실험 균주 및 재료

[0067] 실험에 이용된 미생물은 ATCC (American Type Culture Collection), 및 KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)에서 구입하였으며, 표 1에 정리하였다. 유전자 클로닝에는 DH5 α 대장균 균주를 이용하였고, 목적 물질 생산에는 표 1에 열거된 MG1655, AceCo, 그리고 SBL7 대장균 균주들을 사용하였다. 발현 벡터로는 표 2에 열거된 pTrc99A, pSTV28, 그리고 pBBR1MCS2을 사용하였다. 제한 효소 및 기타 효소는 New England Biolabs (미국) 제품을 사용하였다. 또한 PCR을 수행하기 위해서는 Pfu-X DNA polymerase는 Solgent (한국), Phusion DNA polymerase는 Thermo Scientific (미국) 제품을 사용하였다. DNA size maker는 Invitrogen (미국) 제품을 사용하였다. L(+)-arabinose는 Sigma (미국), glycerol은 Amresco (미국), dodecane은 Honeywell (미국) 제품을 사용하였다. 그 외 시약들은 Sigma의 제품을 사용하였다.

표 1

대장균 균주	설명
DH5 α	F ⁻ f80d <i>lacZ</i> DM15D(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE441</i> ⁻ <i>thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96 relA1</i>
MG1655	F ⁻ λ - <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>
AceCo	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, atoDA</i>

SBL7	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta(::PcTrc-EFAES-ter)$, <i>adhE(::PcTrc-SN12Didi-ter)</i> , <i>ldhA(::PcTrc-LYCm4-ter)</i> , <i>atoDA(::PcTrc-LYCm4-ter)</i> , <i>dld(::PcTrc-LYCm4-ter)</i> , <i>poxB(::PcTrc-LYCm4-ter)</i> , <i>pps(::PcTrc-LYCm4-ter)</i>
------	--

표 2

[0070]

플라스미드	설명	정보 또는 참고문헌 (Genbank 허가 번호)
pTrc99A	pMB1 origin, trc promoter, lacIq, and bla	(U13872.1)
pSTV28	p15A origin, lac promoter, lacZ, and cat	(M22744)
pBBR1MCS2	Broad-host-range, Kmr ^r ; lacPOZ mobRP	Kovach et al. 1995

[0072]

미생물 배양을 위한 배지의 제조는 각 균주 분양 기관의 권장 배지 조성 및 Difco manual (11th edition, Difco; BD Science, 미국)에 따랐다. 배지 제조에 사용된 시약은 BD Science (미국) 및 Sigma로부터 구입하였다. 배양 중의 균체량은 spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, 일본)를 사용하여 600 nm에서 OD (optical density)를 측정한 결과로 나타내었으며, pH는 pH meter B-212 (HORIBA, 일본)을 이용하여 측정하였다.

[0073]

유전자 클로닝에는 플라스미드 유지를 위한 항생제로 ampicillin, chloramphenicol, kanamycin을 사용하였으며, 각각 100 µg/mL, 50 µg/mL, 50 µg/mL 농도로 사용하였다.

[0074]

2. 레티노이드의 추출 및 분석

[0075]

레티노이드는 다음의 방법으로 분석하였다. 레티노이드 배양에 첨가한 dodecane 층만을 취하여 HPLC 정량 분석을 실시하였다. 레티노이드의 분석 시스템은 SHIMADZU LC-20A series with UV/Vis detector (Shimadzu, Kyoto, 일본)을 이용하였으며 분석 칼럼은 Symmetry C18 (250x4.6, 5 µm) with Symmetry guard C18 (15x4.6, 5 µm)을 사용하였다. 이동상은 메탄올: 아세트니트릴 혼합 용액(95:5, v/v)으로 총 15분간 분석하였다. 유속은 1.5 mL/min으로 하였으며 검출 파장은 각각 레티날은 370 nm, 레티놀과 레티닐 아세테이트는 340 nm에서 측정하였고, 시료 주입량은 20 µL, 오븐 온도는 40° C로 분석하였다. 레티노이드 표준 시료는 에탄올에 녹여 사용하였다. 표준시간의 피크 머무름 시간은 도 2와 같이 레티놀 약 3.2분, 레티날 약 3.4분, 레티닐 아세테이트는 약 4.0분이며, 분석 결과는 분석된 피크의 면적을 표준 시료의 피크 면적으로 계산한 검량선에 대입하고 회석 배수를 환산하여 계산하였다.

[0077]

플라스미드, 균주 개발 및 배양 방법

[0078]

1. 시토크롬 P450 시스템 기반의 플라스미드 구축

[0079]

시토크롬 P450 시스템에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자는 표 3과 같다. 유전자 클로닝에 사용된 프라이머 서열 및 제한 효소는 표 4와 같다. 유전자들은 표 4에 열거된 프라이머를 사용하고, 해당 유전자를 포함하고 있는 MG1655 균주의 염색체 DNA를 주형으로 한, 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 표 4에 열거된 제한 효소를 사용하여 각각 벡터에 도입하여, 벡터 pB2-fA, pB2-fB, pB2-fx, pB2-fr, pB2-yK, pB2-fAfr, pB2-fBfr, pB2-fxfr, pB2-fAyK, pB2-fByK, pB2-fyK를 구축하였다.

표 3

[0080]

효소명	유전자	아미노산 서열 (Genbank 허가번호)
플라보독신 1	<i>fldA</i>	서열번호 2 NP_415210.1
플라보독신 2	<i>fldB</i>	서열번호 3 NP_417371.1
reduced 페레독신	<i>fdx</i>	서열번호 4 NP_417020.1
플라보독신/페레독신-NADP(+) 리덕타제	<i>fpr</i>	서열번호 5 NP_418359.1
피루브산-플라보독신 옥시도리덕타제	<i>ydbK</i>	서열번호 6 NP_415896.1

표 4

Vector	Insert			제한 효소	구축 벡터
	유전자	프라이머 서열			
pBBR1MCS2	<i>fldA</i>	Fwd Rev	서열번호 7 서열번호 8	XbaI SacI	pB2-fA
pBBR1MCS2	<i>fldB</i>	Fwd Rev	서열번호 9 서열번호 10	BamHI XbaI	pB2-fB
pBBR1MCS2	<i>fdx</i>	FwdRev	서열번호 11 서열번호 12	XbaI SacI	pB2-fx
pBBR1MCS2	<i>fpr</i>	FwdRev	서열번호 13 서열번호 14	KpnI SalI	pB2-fr
pBBR1MCS2	<i>ydbK</i>	FwdRev	서열번호 15 서열번호 16	SalI XbaI	pB2-yK
pB2-fA	<i>fpr</i>	FwdRev	서열번호 13 서열번호 14	KpnI SalI	pB2-fAfr
pB2-fB	<i>fpr</i>	FwdRev	서열번호 13 서열번호 14	KpnI SalI	pB2-fBfr
pB2-fx	<i>fpr</i>	FwdRev	서열번호 13 서열번호 14	KpnI SalI	pB2-fxfr
pB2-fA	<i>ydbK</i>	FwdRev	서열번호 15 서열번호 16	SalI XbaI	pB2-fAyK
pB2-fB	<i>ydbK</i>	Fwd Rev	서열번호 15 서열번호 17	SalI HindIII	pB2-fByK
pB2-fx	<i>ydbK</i>	FwdRev	서열번호 15 서열번호 16	SalI XbaI	pB2-fxyK

2. 라이코펜 생산 효율이 향상된 균주의 개발

본 실시예에서는 레티노이드 생산 향상을 위하여 베타-카로틴 전구체인 라이코펜 생산성이 향상된 대장균 MG1655 균주 제작과 관련된 내용을 포함하고 있다.

본 실시예에서는 라이코펜 생산 효율을 향상시키고자 MG1655 균주에 발효 부산물인 유기산 및 알코올류의 생성에 관여하는 유전자를 결손과 동시에 외래 mevalonate (MVA) 경로와 라이코펜 생합성 경로를 대장균 염색체 내에 다중으로 삽입하고 또한, 대장균 염색체 상의 이소프레노이드 생합성 유전자 발현량 증가를 위해 율속 제한 유전자들의 본래의 promoter를 항상 발현되도록 변형한 강력한 *trc* promoter로 교체하여 최종 SBL7 균주를 제작하였다.

2-1. 대장균 염색체 내 외래 MVA 상/하부경로 도입 균주 제작

SBL7 균주의 제작 과정을 상세히 기술하면, 우선 도 3의 MVA 경로에서 mevalonate를 기준으로 acetyl-CoA에서 mevalonate까지의 상부 경로와 mevalonate에서 IPP를 거쳐 DMAPP까지 합성되는 하부 경로로 나누어 외래 MVA 경로의 고효율 유전자원을 이용하여 대장균 MG1655 균주 염색체 내에 삽입하였다.

Mevalonate 상부 경로를 이루는 유전자는 *Enterococcus faecalis* PCI1326 유래의 *mvaE* (서열번호 18)와 *mvaS* (서열번호 19)로 두 유전자를 대장균 내에 삽입할 수 있도록 pTFKC(DPB) 벡터(한국공개특허 제2018-0124777호)에 표 5의 PCR 프라이머를 이용하여 클로닝해 pTFKC(DPB)-EFAES를 구축하였다 (표 6).

MVA 경로 상부 경로 삽입 위치는 acetate 생성에 관여하는 acetate kinase인 *ackA* 유전자와 phosphate acetyltransferase/phosphate propionyltransferase인 *pta* 유전자를 동시에 결손하며 삽입하였다. 유전자 결손에는 λ recombinase를 이용한 homologous recombination 방법을 이용하였다. 제조된 MVA 상부 경로 삽입 균주를 APTOP이라 명명하였으며, 표 7에 나타내었다. 이때 프로모터의 경우 항상 발현되도록 변형한 *trc* promoter와 terminator를 포함하므로 삽입한 상부 경로는 PcTrc-EFAES-ter라 표기하였다.

MVA 하부 경로는 *Streptococcus pneumoniae*의 *mvaK1* (서열번호 20), *mvaK2* (서열번호 21), *mvaD* (서열번호 2

2)와 *Escherichia coli*의 *idi* (서열번호 23) 유전자로 이루어져 있으며, 4종의 유전자를 대장균 내에 삽입할 수 있도록 표 5의 프라이머를 이용하여 상기의 유전자를 증폭해 pTFCC(DPB) 벡터(한국공개특허 제2018-0124777호)에 클로닝하여 pTFCC(DPB)-SN12Didi를 구축하였다 (표 6). MVA 하부 경로는 *adhE* 유전자 결손과 동시에 삽입하였으며, 유전자에 따른 삽입하고자 하는 대장균 염색체에 50 bp의 상동성을 가지는 표 5의 프라이머를 사용하여 삽입하였다. 유전자 결손에는 λ recombinase를 이용한 homologous recombination 방법을 이용하였다. 이를 통하여 MVA 하부 경로 삽입 균주를 구축하였다. 또한 삽입 시 프로모터의 경우 항상 발현되도록 변형한 *trc* promoter와 terminator를 포함하므로 삽입한 상부 경로는 PcTrc-SN12Didi-ter라 표기하였다. 이를 메발로네이트 하부 경로 삽입 균주로 선택하고 aEBOTTOM이라 명명하였다 (표 7).

[0091] 상기의 각각 구축된 MVA 상/하부 경로를 삽입한 균주를 P1 형질도입 방법을 통해 MVA 전체 경로를 가지는 대장균을 개발하였으며, 이는 SBL1이라 명명하였다 (도 4, 표 7).

표 5

[0092]

MVA경로	프라이머	서열번호	MVA경로	프라이머	서열번호
상부 경로	EFAES-F	24	하부 경로	IS <i>adhE</i> -Ptrc-F	36
	EFAES-R	25		KO <i>adhE</i> -R	37
	IS <i>ackA</i> -pta-Ptrc-F	26		IS <i>atoDA</i> -Ptrc-F	38
	KO <i>ackA</i> -pta-R	27		KO <i>atoDA</i> -R	39
	KO <i>ackA</i> -ptaCF-F	28		KO <i>poxBCF</i> -F	40
	KO <i>ackA</i> -ptaCF-R	29		KO <i>poxBCF</i> -R	41
하부 경로	SN12Didi-F	30		KO <i>ldhACF</i> -F	42
	SN12Didi-R	31		KO <i>ldhACF</i> -R	43
	IS <i>poxB</i> -Ptrc-F	32		KO <i>adhECF</i> -F	44
	KO <i>poxB</i> -R	33		KO <i>adhECF</i> -R	45
	IS <i>ldhA</i> -Ptrc-F	34		KO <i>atoDACF</i> -F	46
	KO <i>ldhA</i> -R	35		KO <i>atoDACF</i> -R	47

표 6

[0094]

플라스미드	설명
pTFKC(DPB)-EFAES	pTFKC(DPB) containing <i>mvaE</i> and <i>mvaS</i> of <i>Enterococcus faecalis</i> PC11326
pTFCC(DPB)-SN12Didi	pTFCC(DPB) containing <i>mvaK1</i> , <i>mvak2</i> and <i>mvaD</i> of <i>S. pneumonia</i> , and <i>idi</i> of <i>E. coli</i>

표 7

[0096]

균주	설명
APT0P	MG1655 Δ <i>ackA</i> -pta(::PcTrc-EFAES-ter)
aEBOTTOM	MG1655 Δ <i>adhE</i> (::PcTrc-SN12Didi-ter)
SBL1	MG1655 Δ <i>ackA</i> -pta(::PcTrc-EFAES-ter), <i>adhE</i> (::PcTrc-SN12Didi-ter)

[0098]

2-2. 대장균 염색체 내 라이코펜 생합성 오페론 다중 삽입 균주 제작

[0099]

라이코펜 생합성 경로인 *Pantoea agglomerans*의 *crtE* (서열번호 48), *crtB* (서열번호 49), *crtI* (서열번호 50) 유전자와 *Haematococcus pluvialis*의 *ipHP1* (서열번호 52) 유전자, 총 4종의 유전자를 대장균 내에 삽입할 수 있도록 pBFKC 벡터(한국공개특허 제2018-0124777호)에 클로닝하여 pBFKC-LYCM4를 구축하였다 (표 8). 구축한 플라스미드를 주형으로 하여 각각의 유전자에 따른 삽입하고자 하는 대장균 염색체에 50 bp의 상동성을 가지는 표 9의 프라이머를 이용하여 삽입하였다. 대장균 염색체 내에 라이코펜 생합성 오페론을 삽입하는 유전자는 acetate, lactate 생성을 차단하기 위해 *poxB*, *ldhA*, *dld* 유전자를 선정하였으며, pyruvate 보존을 위해 *pps* 유전자, acetyl-CoA 보존을 위해 *atoD*, *atoA* 유전자 선정하였다. 따라서 MG1655 균주에서 상기의 유전자들을 λ recombinase를 이용한 homologous recombination 방법으로 결손하며 *trc* promoter가 포함된 라이코펜 생합성 오페론을 삽입하였다. 그 결과 라이코펜 생합성 오페론이 삽입된 총 5종의 균주가 구축되었으며, 이는 MG1655 Δ

MG1655 Δ Δ Δ B (::Ptrc-LYCm4-ter), MG1655 Δ 라고 명명하였다.

[0100] 다음으로 대장균 염색체에 외래 MVA 전체 경로가 삽입된 SBL1 균주에 라이코펜 생합성 오페론이 *ldhA*, *atoDA*, *dld*, *poxB*, *pps* 유전자 위치에 삽입된 균주들로부터 라이코펜 오페론을 P1 transduction을 통해 SBL1 균주에 순차적으로 다중 삽입하여, 이를 SBL7이라 명명하였다 (도 5, 표 10).

표 8

플라스미드	설명
pBFKC-LYCm4	pBFKC containing <i>crtE</i> , <i>crtB</i> and <i>crtI</i> of <i>P. agglomerans</i> , and <i>ipiHP1</i> of <i>H. pluvialis</i>

표 9

프라이머	서열번호	프라이머	서열번호
LYCm4-F	53	KO pps-R	64
LYCm4-R	54	KO poxB-F	65
IS poxB-Ptrc-F	55	KO poxB-R	66
KO poxB-R	56	KO ldhA-F	67
IS ldhA-Ptrc-F	57	KO ldhA-R	68
KO ldhA-R	58	KO dld-F	69
IS dld-Ptrc-F	59	KO dld-R	70
KO dld-R	60	KO atoDA-F	71
IS atoDA-Ptrc-F	61	KO atoDA-R	72
KO atoDA-R	62	KO pps-F	73
IS pps-Ptrc-F	63	KO pps-R	74

표 10

균주	설명
SBL7	SBL1 Δ <i>ldhA</i> (::Ptrc-LYCm4-ter), <i>atoDA</i> (::Ptrc-LYCm4-ter), <i>dld</i> (::Ptrc-LYCm4-ter), <i>poxB</i> (::Ptrc-LYCm4-ter), <i>pps</i> (::Ptrc-LYCm4-ter)

[0106] 이상의 결과에서 라이코펜 생합성 오페론의 염색체 내 다중 삽입과 이를 통해 라이코펜 생산성을 갖는 대장균이 개발되었다. 이 대장균은 균주 자체만으로 라이코펜 생산능을 가지므로 플라스미드의 도입 없이 안정적으로 라이코펜을 생산할 수 있다.

[0107] 2-3. 시토크롬 P450 시스템 기반의 플라스미드 도입 균주 제작

[0108] 위 2-1에서 제작한 재조합 플라스미드를 레티노이드 생산 플라스미드 pT-DHBSR과 MVA 경로 발현 플라스미드 pS-NA(PCT공개특허 제 2013-019051호)를 포함한 *E. coli* MG1655, AceCo (한국공개특허 제2017-0089426호), 그리고 위 2-2에서 제작한 SBL7 균주에 형질 전환하여 대장균 형질 전환체를 제작한다.

[0109] 재조합 서플 벡터를 MG1655 (pT-DHBSR/pS-NA), AceCo (pT-DHBSR/pS-NA), 그리고 SBL7 (pT-DHBSR/pS-NA) 균주에 형질 전환하기 위하여 수용성 세포(competent cell)를 제작한다. MG1655 (pT-DHBSR/pS-NA), AceCo (pT-DHBSR/pS-NA), 그리고 SBL7 (pT-DHBSR/pS-NA) 균주를 ampicillin과 chloramphenicol 항생제를 포함한 5 ml의 LB 배지에 접종하고, 온도 30℃에서 OD600, 2-3까지 중균 배양한다. Ampicillin과 chloramphenicol 항생제를 포함한 5 ml의 새 LB 배지에 OD600, 0.1이 되도록 접종 후 30℃에서 3시간 배양한다. 수용성 세포를 만들기 위해 상기 배양액을 얼음에서 5분 간 냉각한 후에 온도 4℃, 5000 rpm에서 5분 간 원심 분리해서 상층액을 제거하고, 1 ml의 세척 완충액 (0.5 M sucrose, 10% glycerol)으로 2회 세척한다. 세척한 균체를 0.1 ml의 세척 완충액에 현탁해서 수용성 세포를 얻는다.

[0110] 상기 얻어진 수용성 세포 100 μl에 재조합 플라스미드를 100 ng/μl 넣고 섞은 뒤 혼합액을 electroporation cuvette (2 mm 간격)에 넣고, 25 μF, 200 Ω, 2,500 V 조건에서 electroporation을 수행한다. Electroporation 한 후에 LB 배지를 1 ml 첨가하고 37℃에서 1시간 배양한다. Electroporation으로 재조합 플라스미드를 도입한 세포 시료를 ampicillin, chloramphenicol, 그리고 kanamycin 항생제를 포함한 LB 고체 평판 배지에 100 μl

도말하여 형질 전환체를 얻는다.

[0111] 2-4. 레티노이드 배양 방법 및 결과

[0112] 상기 구축한 형질전환체를 ampicillin, chloramphenicol, 그리고 kanamycin 항생제를 포함한 5 ml의 2YT 배지에 접종하고, 온도 37℃에서 OD₆₀₀, 2-3까지 종균배양한다. Ampicillin, chloramphenicol, 그리고 kanamycin 항생제를 포함한 5 ml의 새 2YT 배지에 탄소원으로 2%(w/v) glycerol 및 0.2%(w/v) L(+)-arabinose를 첨가한 후 OD₆₀₀, 0.1이 되도록 접종 후 5 ml의 dodecane을 overlay하여 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 30℃ 250 rpm으로 72시간 배양하여 레티노이드 생산성을 확인하였다.

[0113] MG1655 균주에 시토크롬 P450 시스템 기반의 플라스미드를 도입하여 시토크롬 P450 시스템을 활성화한 레티노이드 배양 결과는 표 11과 도 6 및 도 7에 나타내었다. 상세히 설명하면, 균체 성장은 모든 균주에서 비슷하게 나타났으며, 레티노이드 생산량은 *fpr* 유전자를 과발현한 경우 322 mg/L로 기존의 pT-DHBSR과 pS-NA를 함유한 MG1655 균주가 190 mg/L를 생산한 것에 비해 약 1.7배 증가하였다. 다양한 조합으로 과발현한 결과 *fldB-fpr*과 *fldA-ydbK* 유전자를 과발현한 경우 각각 288 mg/L, 294 mg/L로 레티노이드 생산량이 증가하였다.

표 11

[0114]

균주 (72hr)	MG1655 (pT-DHBSR/pS-NA)								
	None	pB2-fA	pB2-fB	pB2-fr	pB2-yK	pB2-fAfr	pB2-fBfr	pB2-fAyK	pB2-fByK
균체 성장량 (OD ₆₀₀)	16.7 ±0.4	19.4 ±0.5	18.3 ±0.3	19.2 ±0.2	17.0 ±0.4	16.8 ±0.3	16.0 ±0.2	18.4 ±1.8	15.8 ±0.1
총레티노이 드 (mg/L)	190	193	236	322	192	201	288	294	184

[0115] AceCo 균주에 시토크롬 P450 시스템 기반의 플라스미드를 도입하여 시토크롬 P450 시스템을 활성화한 레티노이드 배양 결과는 표 12와 도 8 및 도 9에 나타내었다. 상세히 설명하면, 균체 성장은 모든 균주에서 비슷하게 나타났으며, *fldA*, *fldB*, *fpr*, 그리고 *ydbK* 유전자를 과발현한 경우 배양 72시간에 기존의 pT-DHBSR과 pS-NA를 함유한 AceCo 균주가 101 mg/L를 생산한 것에 비해 레티노이드 생산량이 모두 증가하여 각각 196 mg/L, 230 mg/L, 243 mg/L, 그리고 211 mg/L를 생산하였다. 다양한 조합으로 과발현한 결과 *fldA-fpr*, *fldB-fpr*, *fldA-ydbK*, 그리고 *fldB-ydbK* 유전자를 과발현한 경우 각각 212 mg/L, 256 mg/L, 216 mg/L, 212 mg/L로 레티노이드 생산량이 모두 증가하였다.

표 12

[0116]

균주 (72hr)	AceCo (pT-DHBSR/pS-NA)								
	None	pB2-fA	pB2-fB	pB2-fr	pB2-yK	pB2-fAfr	pB2-fBfr	pB2-fAyK	pB2-fByK
균체 성장량 (OD ₆₀₀)	15.5 ±0.1	17.1± 0.6	16.4± 1.0	16.5± 1.3	16.5± 0.1	16.2± 0.6	17.1± 2.3	16.8± 0.5	15.8± 0.8
총레티노이 드 (mg/L)	101	196	230	243	211	212	256	216	212

[0117] SBL7 균주에 시토크롬 P450 시스템 기반의 플라스미드를 도입하여 시토크롬 P450 시스템을 활성화한 레티노이드 배양 결과는 표 13과 도 10 및 도 11에 나타내었다. 상세히 설명하면, 균체 성장은 모든 균주에서 비슷하게 나타났으며, *fldA*, *fldB*, 그리고 *fdx* 유전자를 과발현한 경우 72시간에 기존의 pT-DHBSR과 pS-NA를 함유한 SBL7 균주가 310 mg/L를 생산한 것에 비해 레티노이드 생산량이 증가하여 각각 471 mg/L, 467 mg/L, 그리고 422 mg/L를 생산하였다. 다양한 조합으로 과발현한 결과, *fldB-fpr*과 *fldB-ydbK* 유전자를 과발현한 경우 각각 481 mg/L, 475 mg/L로 레티노이드 생산량이 증가하였다. 특히 *fldB-fpr* 유전자를 과발현한 경우 481 mg/L로 가장 높은 레티노이드 생산성을 보였으며 기존의 pT-DHBSR과 pS-NA를 함유한 SBL7 균주에 비해 생산량이 약 1.6배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

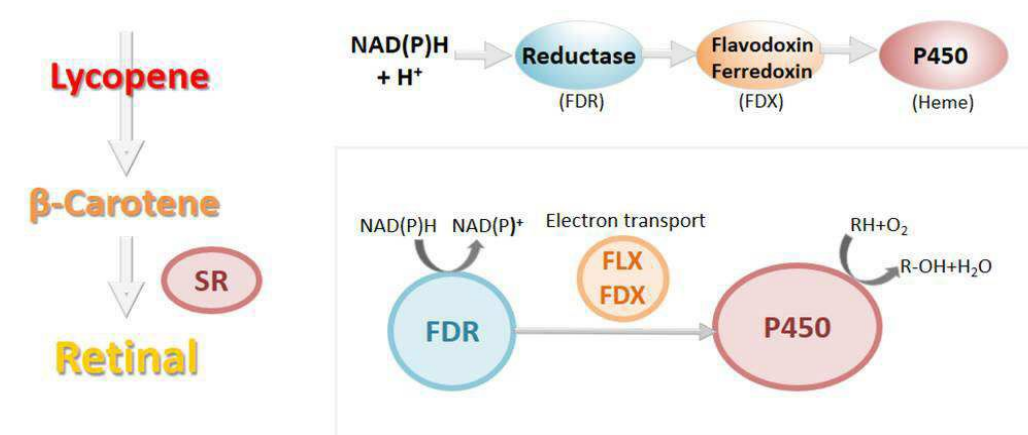
표 13

균주 (72hr)	SBL7 (pT-DHBSR/pS-NA)											
	None	pB2-f A	pB2-f B	pB2-f x	pB2-f r	pB2-y K	pB2-f Afr	pB2-f Bfr	pB2-f xfr	pB2-f AyK	pB2-f ByK	pB2-f xyK
균체 성장량 (OD ₆₀₀)	18.1 ±0.1	18.1 ± 0.1	19.0 ± 0.0	17.8 ± 0.1	16.2 ± 0.1	16.4 ± 0.0	16.2 ± 0.0	17.9 ± 0.6	19.0 ± 0.4	18.4 ± 0.6	18.1 ± 0.5	17.7 ± 0.1
총레티노 이드 (mg/L)	310	471	467	422	241	287	248	481	380	319	475	339

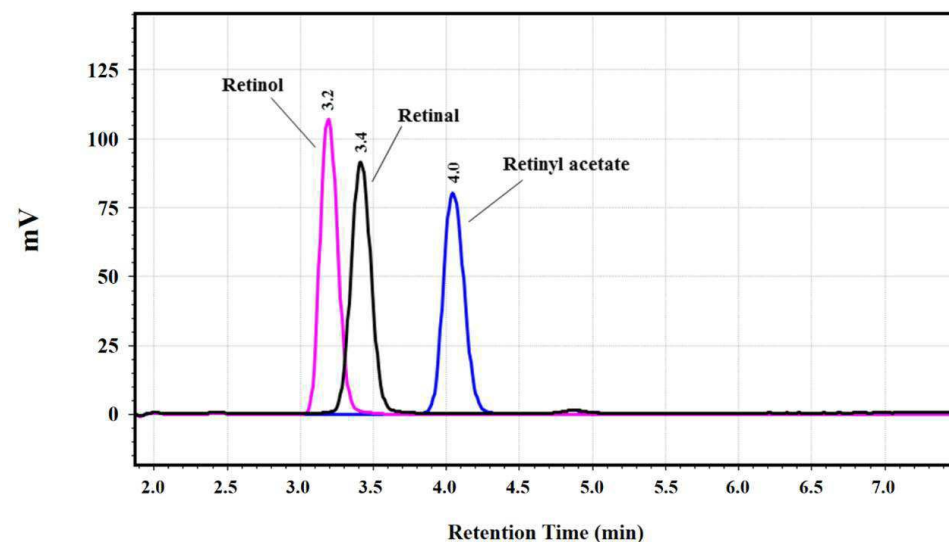
[0119] 상기 결과들을 바탕으로 MG1655, AceCo, 그리고 SBL7 각각의 균주에서 *fldA*, *fldB*, *fdx*, *fpr*, 그리고 *ydbK* 유전자를 단일 또는 조합으로 과발현한 경우 레티노이드 생산량에 미치는 영향은 다르게 나타났지만 이러한 시토크롬 P450 시스템의 효율 증대로 인하여 레티노이드 생산성이 향상되어 긍정적인 효과를 확인할 수 있었다.

도면

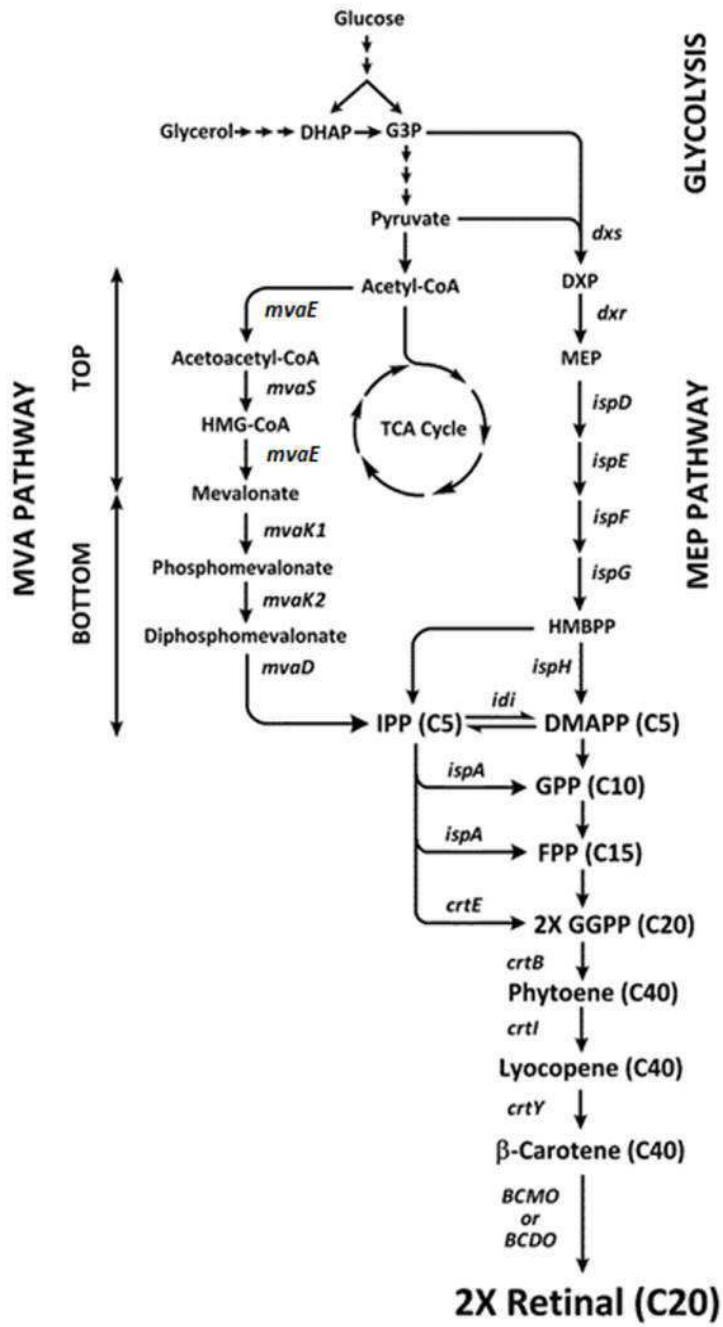
도면1



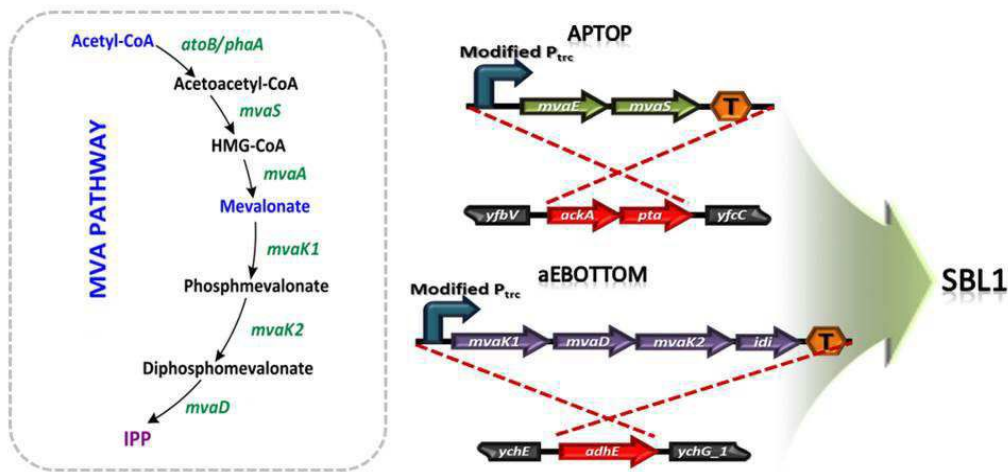
도면2



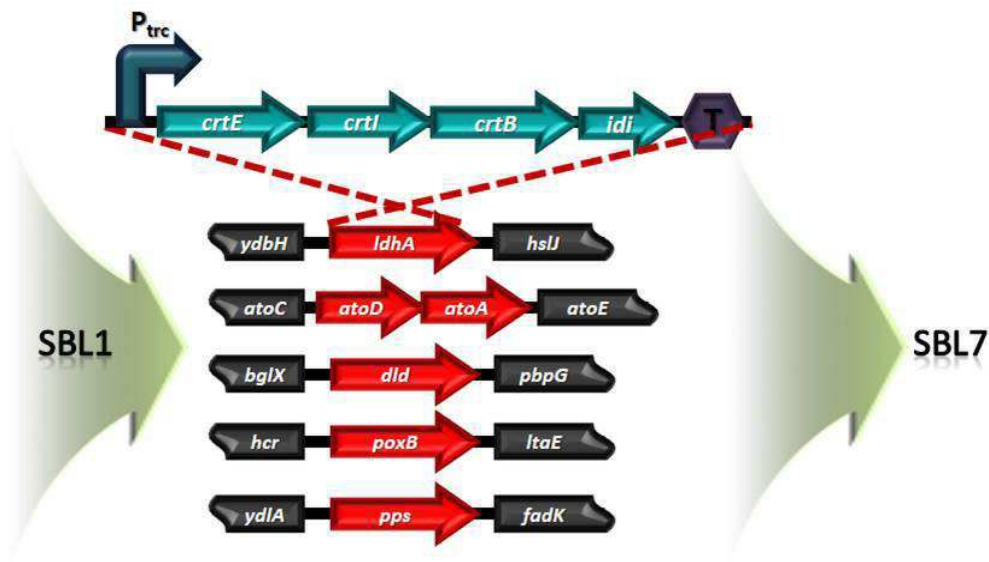
도면3



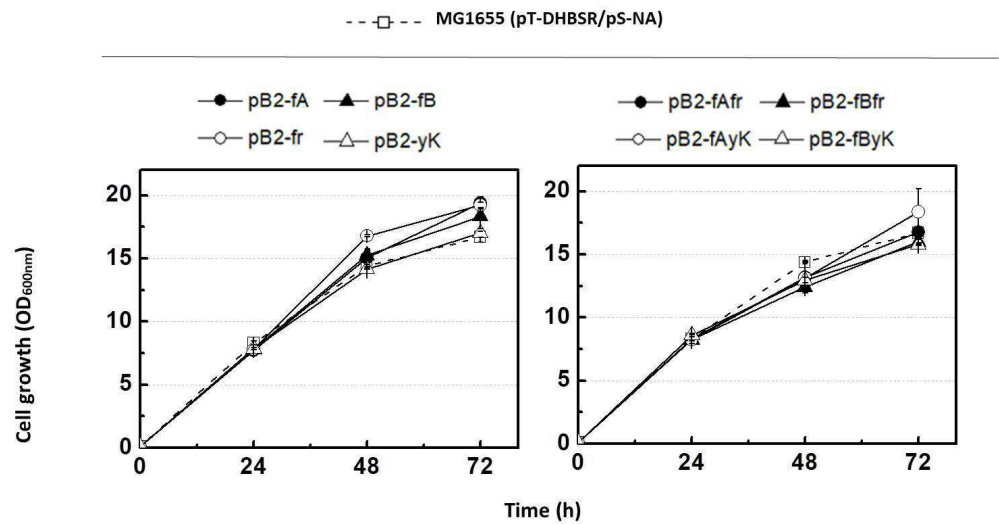
도면4



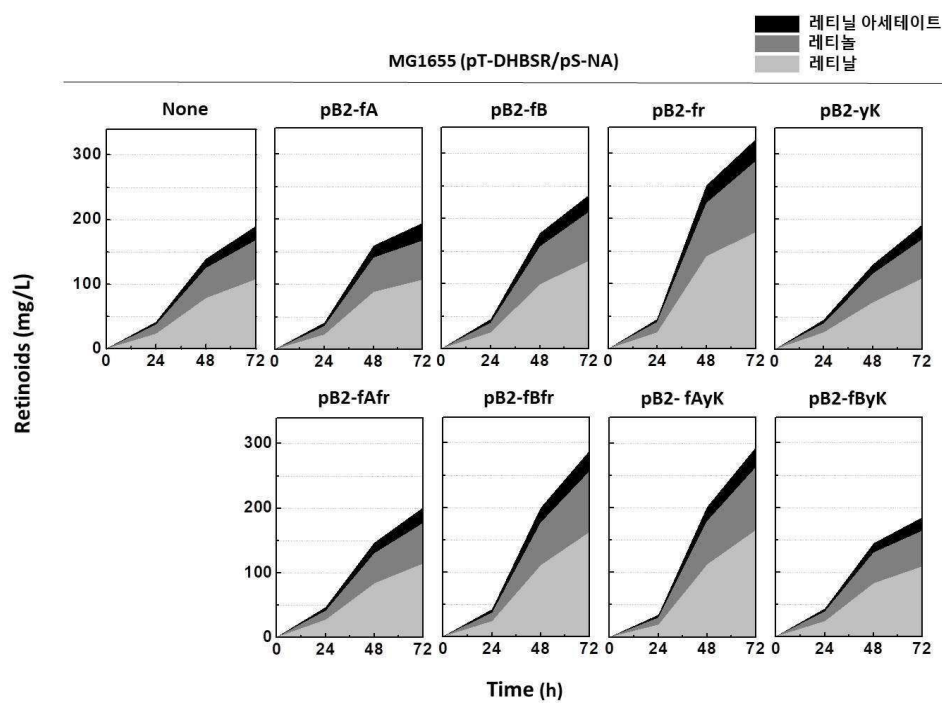
도면5



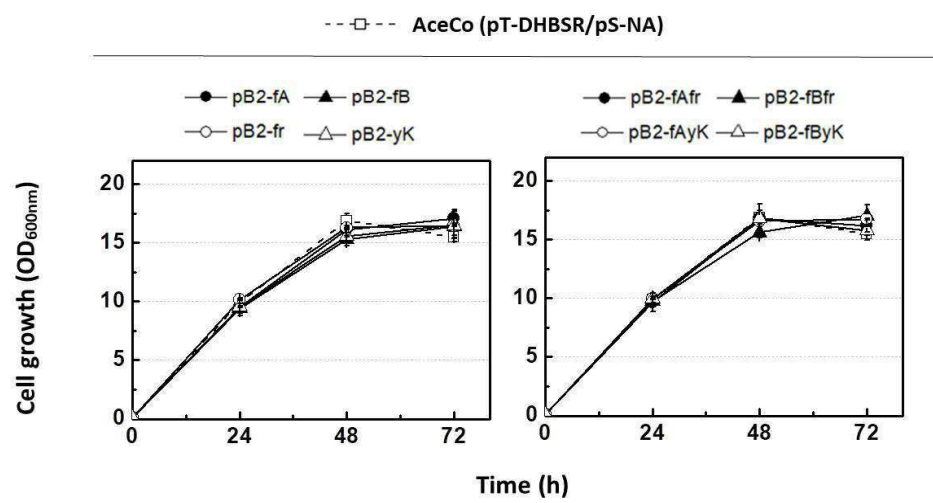
도면6



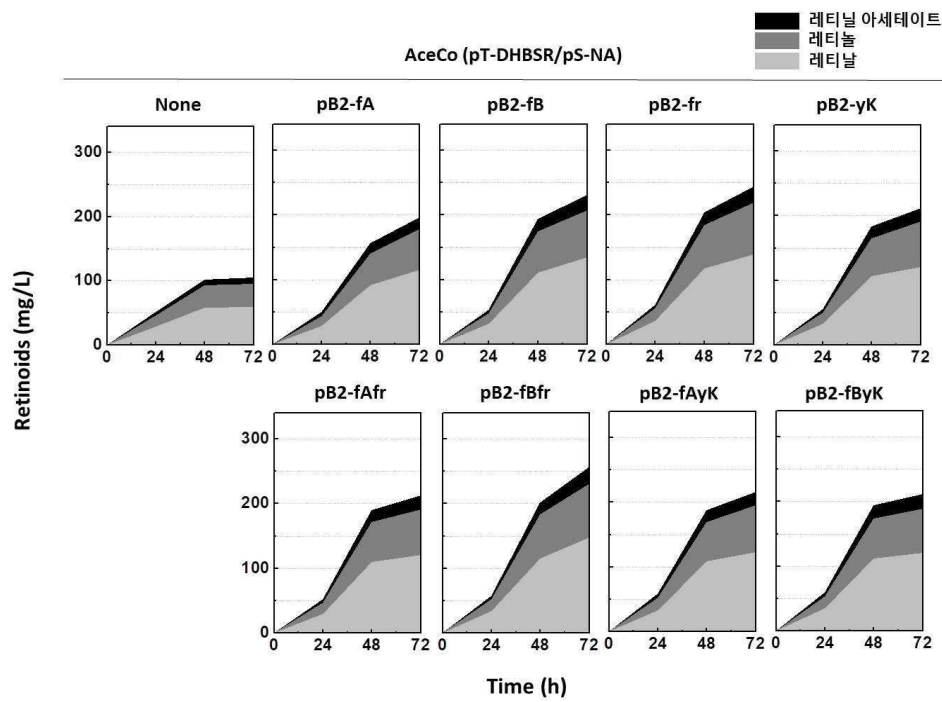
도면7



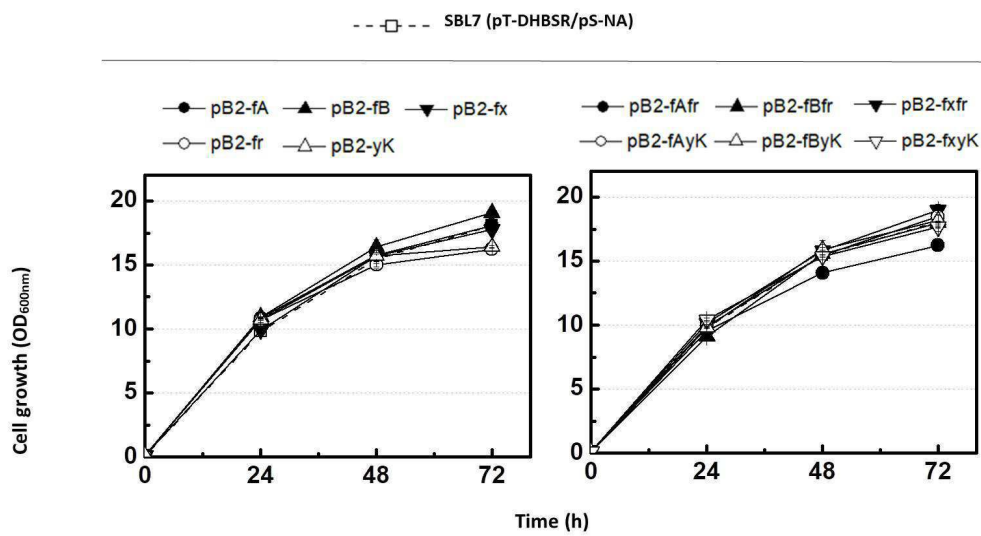
도면8



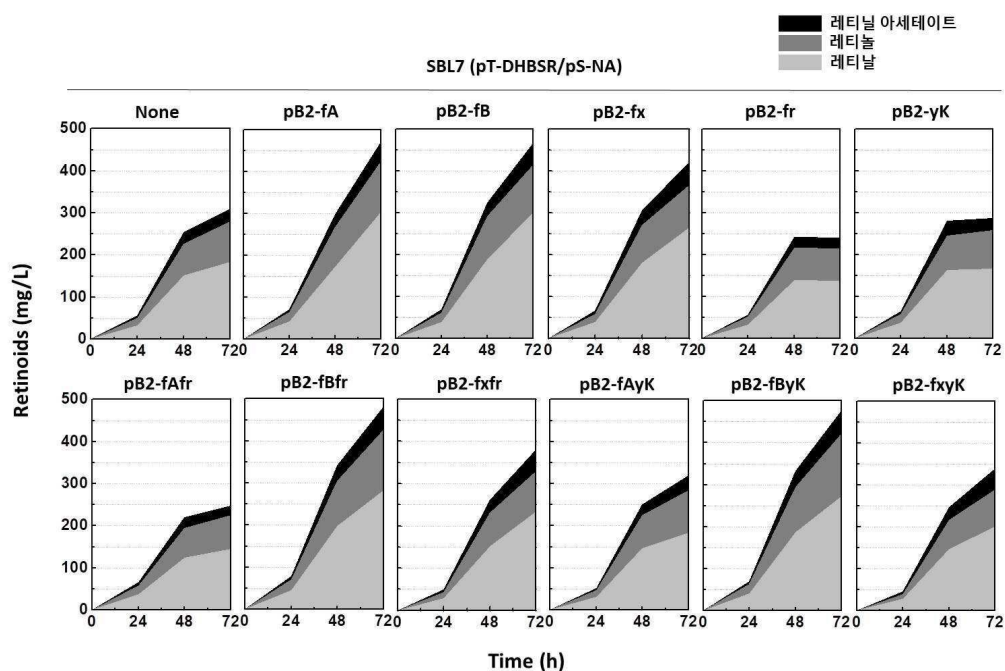
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition and method for preparing retinoids

<130> 21P06094

<160> 74

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 275

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> unculturedmarine bacterium 66A03 SR

<400> 1

Met Gly Leu Met Leu Ile Asp Trp Cys Ala Leu Ala Leu Val Val Phe

1 5 10 15

Ile Gly Leu Pro His Gly Ala Leu Asp Ala Ala Ile Ser Phe Ser Met

20 25 30

Ile Ser Ser Ala Lys Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Leu Leu Ala Thr Ala Phe Phe Leu Ile Trp Tyr Gln Leu Pro

50 55 60

Ala Phe Ser Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ile Ser Ile Ile His Phe Gly
65 70 75 80
Met Ala Asp Phe Asn Ala Ser Pro Ser Lys Leu Lys Trp Pro His Ile
85 90 95
Ile Ala His Gly Gly Val Val Thr Val Trp Leu Pro Leu Ile Gln Lys
100 105 110
Asn Glu Val Thr Lys Leu Phe Ser Ile Leu Thr Asn Gly Pro Thr Pro
115 120 125
Ile Leu Trp Asp Ile Leu Leu Ile Phe Phe Leu Cys Trp Ser Ile Gly
130 135 140
Val Cys Leu His Thr Tyr Glu Thr Leu Arg Ser Lys His Tyr Asn Ile
145 150 155 160
Ala Phe Glu Leu Ile Gly Leu Ile Phe Leu Ala Trp Tyr Ala Pro Pro
165 170 175
Leu Val Thr Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Phe Ile His Ser Arg Arg His
180 185 190
Phe Ser Phe Val Trp Lys Gln Leu Gln His Met Ser Ser Lys Lys Met
195 200 205
Met Ile Gly Ser Ala Ile Ile Leu Ser Cys Thr Ser Trp Leu Ile Gly
210 215 220
Gly Gly Ile Tyr Phe Phe Leu Asn Ser Lys Met Ile Ala Ser Glu Ala
225 230 235 240
Ala Leu Gln Thr Val Phe Ile Gly Leu Ala Ala Leu Thr Val Pro His
245 250 255
Met Ile Leu Ile Asp Phe Ile Phe Arg Pro His Ser Ser Arg Ile Lys
260 265 270
Ile Lys Asn
275
<210> 2
<211> 176
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Ala Ile Thr Gly Ile Phe Phe Gly Ser Asp Thr Gly Asn Thr Glu

1 5 10 15

Asn Ile Ala Lys Met Ile Gln Lys Gln Leu Gly Lys Asp Val Ala Asp

20 25 30

Val His Asp Ile Ala Lys Ser Ser Lys Glu Asp Leu Glu Ala Tyr Asp

35 40 45

Ile Leu Leu Leu Gly Ile Pro Thr Trp Tyr Tyr Gly Glu Ala Gln Cys

50 55 60

Asp Trp Asp Asp Phe Phe Pro Thr Leu Glu Glu Ile Asp Phe Asn Gly

65 70 75 80

Lys Leu Val Ala Leu Phe Gly Cys Gly Asp Gln Glu Asp Tyr Ala Glu

85 90 95

Tyr Phe Cys Asp Ala Leu Gly Thr Ile Arg Asp Ile Ile Glu Pro Arg

100 105 110

Gly Ala Thr Ile Val Gly His Trp Pro Thr Ala Gly Tyr His Phe Glu

115 120 125

Ala Ser Lys Gly Leu Ala Asp Asp Asp His Phe Val Gly Leu Ala Ile

130 135 140

Asp Glu Asp Arg Gln Pro Glu Leu Thr Ala Glu Arg Val Glu Lys Trp

145 150 155 160

Val Lys Gln Ile Ser Glu Glu Leu His Leu Asp Glu Ile Leu Asn Ala

165 170 175

<210> 3

<211> 173

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Asn Met Gly Leu Phe Tyr Gly Ser Ser Thr Cys Tyr Thr Glu Met

1 5 10 15

Ala Ala Glu Lys Ile Arg Asp Ile Ile Gly Pro Glu Leu Val Thr Leu

20 25 30

His Asn Leu Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Met Glu Gln Tyr Asp Val

35 40 45

Leu Ile Leu Gly Ile Pro Thr Trp Asp Phe Gly Glu Ile Gln Glu Asp

50 55 60

Trp Glu Ala Val Trp Asp Gln Leu Asp Asp Leu Asn Leu Glu Gly Lys

65 70 75 80

Ile Val Ala Leu Tyr Gly Leu Gly Asp Gln Leu Gly Tyr Gly Glu Trp

85 90 95

Phe Leu Asp Ala Leu Gly Met Leu His Asp Lys Leu Ser Thr Lys Gly

100 105 110

Val Lys Phe Val Gly Tyr Trp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Phe Thr Ser

115 120 125

Pro Lys Pro Val Ile Ala Asp Gly Gln Leu Phe Val Gly Leu Ala Leu

130 135 140

Asp Glu Thr Asn Gln Tyr Asp Leu Ser Asp Glu Arg Ile Gln Ser Trp

145 150 155 160

Cys Glu Gln Ile Leu Asn Glu Met Ala Glu His Tyr Ala

165 170

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Pro Lys Ile Val Ile Leu Pro His Gln Asp Leu Cys Pro Asp Gly

1 5 10 15

Ala Val Leu Glu Ala Asn Ser Gly Glu Thr Ile Leu Asp Ala Ala Leu

20 25 30

Arg Asn Gly Ile Glu Ile Glu His Ala Cys Glu Lys Ser Cys Ala Cys

35 40 45

Thr Thr Cys His Cys Ile Val Arg Glu Gly Phe Asp Ser Leu Pro Glu

50 55 60

Ser Ser Glu Gln Glu Asp Asp Met Leu Asp Lys Ala Trp Gly Leu Glu

65					70					75					80	
Pro	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Cys	Gln	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Glu	Asp	Leu	
				85				90				95				
Val	Val	Glu	Ile	Pro	Arg	Tyr	Thr	Ile	Asn	His	Ala	Arg	Glu	His		
				100				105				110				
<210>	5															
<211>	248															
<212>	PRT															
<213>	Escherichia coli															
<400>	5															
Met	Ala	Asp	Trp	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Thr	Lys	Val	Gln	Asn	Trp	Thr	
1					5				10				15			
Asp	Ala	Leu	Phe	Ser	Leu	Thr	Val	His	Ala	Pro	Val	Leu	Pro	Phe	Thr	
				20				25				30				
Ala	Gly	Gln	Phe	Thr	Lys	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Asp	Gly	Glu	Arg	Val	
				35				40				45				
Gln	Arg	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Val	Asn	Ser	Pro	Asp	Asn	Pro	Asp	Leu	Glu	
50				55				60								
Phe	Tyr	Leu	Val	Thr	Val	Pro	Asp	Gly	Lys	Leu	Ser	Pro	Arg	Leu	Ala	
65					70				75				80			
Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Glu	Val	Gln	Val	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Gly	
				85				90				95				
Phe	Phe	Val	Leu	Asp	Glu	Val	Pro	His	Cys	Glu	Thr	Leu	Trp	Met	Leu	
				100				105				110				
Ala	Thr	Gly	Thr	Ala	Ile	Gly	Pro	Tyr	Leu	Ser	Ile	Leu	Gln	Leu	Gly	
				115				120				125				
Lys	Asp	Leu	Asp	Arg	Phe	Lys	Asn	Leu	Val	Leu	Val	His	Ala	Ala	Arg	
130				135				140								
Tyr	Ala	Ala	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Leu	Met	Gln	Glu	Leu	Glu	Lys	
145					150				155				160			
Arg	Tyr	Glu	Gly	Lys	Leu	Arg	Ile	Gln	Thr	Val	Val	Ser	Arg	Glu	Thr	

165 170 175
Ala Ala Gly Ser Leu Thr Gly Arg Ile Pro Ala Leu Ile Glu Ser Gly
180 185 190
Glu Leu Glu Ser Thr Ile Gly Leu Pro Met Asn Lys Glu Thr Ser His
195 200 205
Val Met Leu Cys Gly Asn Pro Gln Met Val Arg Asp Thr Gln Gln Leu
210 215 220
Leu Lys Glu Thr Arg Gln Met Thr Lys His Leu Arg Arg Arg Pro Gly
225 230 235 240

His Met Thr Ala Glu His Tyr Trp

245

<210> 6

<211> 1174

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 6

Met Ile Thr Ile Asp Gly Asn Gly Ala Val Ala Ser Val Ala Phe Arg
1 5 10 15
Thr Ser Glu Val Ile Ala Ile Tyr Pro Ile Thr Pro Ser Ser Thr Met
20 25 30
Ala Glu Gln Ala Asp Ala Trp Ala Gly Asn Gly Leu Lys Asn Val Trp
35 40 45

Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Glu Met Gln Ser Glu Ala Gly Ala Ile
50 55 60
Ala Thr Val His Gly Ala Leu Gln Thr Gly Ala Leu Ser Thr Ser Phe
65 70 75 80
Thr Ser Ser Gln Gly Leu Leu Leu Met Ile Pro Thr Leu Tyr Lys Leu
85 90 95
Ala Gly Glu Leu Thr Pro Phe Val Leu His Val Ala Ala Arg Thr Val
100 105 110
Ala Thr His Ala Leu Ser Ile Phe Gly Asp His Ser Asp Val Met Ala

115

120

125

Val Arg Gln Thr Gly Cys Ala Met Leu Cys Ala Ala Asn Val Gln Glu
130 135 140

Ala Gln Asp Phe Ala Leu Ile Ser Gln Ile Ala Thr Leu Lys Ser Arg
145 150 155 160

Val Pro Phe Ile His Phe Phe Asp Gly Phe Arg Thr Ser His Glu Ile
165 170 175

Asn Lys Ile Val Pro Leu Ala Asp Asp Thr Ile Leu Asp Leu Met Pro
180 185 190

Gln Val Glu Ile Asp Ala His Arg Ala Arg Ala Leu Asn Pro Glu His
195 200 205

Pro Val Ile Arg Gly Thr Ser Ala Asn Pro Asp Thr Tyr Phe Gln Ser
210 215 220

Arg Glu Ala Thr Asn Pro Trp Tyr Asn Ala Val Tyr Asp His Val Glu
225 230 235 240

Gln Ala Met Asn Asp Phe Ser Ala Ala Thr Gly Arg Gln Tyr Gln Pro
245 250 255

Phe Glu Tyr Tyr Gly His Pro Gln Ala Glu Arg Val Ile Ile Leu Met
260 265 270

Gly Ser Ala Ile Gly Thr Cys Glu Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr
275 280 285

Arg Gly Glu Lys Val Gly Val Leu Lys Val Arg Leu Tyr Arg Pro Phe
290 295 300

Ser Ala Lys His Leu Leu Gln Ala Leu Pro Gly Ser Val Arg Ser Val
305 310 315 320

Ala Val Leu Asp Arg Thr Lys Glu Pro Gly Ala Gln Ala Glu Pro Leu
325 330 335

Tyr Leu Asp Val Met Thr Ala Leu Ala Glu Ala Phe Asn Asn Gly Glu
340 345 350

Arg Glu Thr Leu Pro Arg Val Ile Gly Gly Arg Tyr Gly Leu Ser Ser
355 360 365

Lys Glu Phe Gly Pro Asp Cys Val Leu Ala Val Phe Ala Glu Leu Asn
370 375 380

Ala Ala Lys Pro Lys Ala Arg Phe Thr Val Gly Ile Tyr Asp Asp Val
385 390 395 400
Thr Asn Leu Ser Leu Pro Leu Pro Glu Asn Thr Leu Pro Asn Ser Ala
405 410 415
Lys Leu Glu Ala Leu Phe Tyr Gly Leu Gly Ser Asp Gly Ser Val Ser
420 425 430
Ala Thr Lys Asn Asn Ile Lys Ile Ile Gly Asn Ser Thr Pro Trp Tyr
435 440 445
Ala Gln Gly Tyr Phe Val Tyr Asp Ser Lys Lys Ala Gly Gly Leu Thr
450 455 460
Val Ser His Leu Arg Val Ser Glu Gln Pro Ile Arg Ser Ala Tyr Leu
465 470 475 480
Ile Ser Gln Ala Asp Phe Val Gly Cys His Gln Leu Gln Phe Ile Asp
485 490 495
Lys Tyr Gln Met Ala Glu Arg Leu Lys Pro Gly Gly Ile Phe Leu Leu
500 505 510
Asn Thr Pro Tyr Ser Ala Asp Glu Val Trp Ser Arg Leu Pro Gln Glu
515 520 525
Val Gln Ala Val Leu Asn Gln Lys Lys Ala Arg Phe Tyr Val Ile Asn
530 535 540
Ala Ala Lys Ile Ala Arg Glu Cys Gly Leu Ala Ala Arg Ile Asn Thr
545 550 555 560
Val Met Gln Met Ala Phe Phe His Leu Thr Gln Ile Leu Pro Gly Asp
565 570 575
Ser Ala Leu Ala Glu Leu Gln Gly Ala Ile Ala Lys Ser Tyr Ser Ser
580 585 590
Lys Gly Gln Asp Leu Val Glu Arg Asn Trp Gln Ala Leu Ala Leu Ala
595 600 605
Arg Glu Ser Val Glu Glu Val Pro Leu Gln Pro Val Asn Pro His Ser
610 615 620
Ala Asn Arg Pro Pro Val Val Ser Asp Ala Ala Pro Asp Phe Val Lys

625 630 635 640
 Thr Val Thr Ala Ala Met Leu Ala Gly Leu Gly Asp Ala Leu Pro Val
 645 650 655
 Ser Ala Leu Pro Pro Asp Gly Thr Trp Pro Met Gly Thr Thr Arg Trp
 660 665 670
 Glu Lys Arg Asn Ile Ala Glu Glu Ile Pro Ile Trp Lys Glu Glu Leu
 675 680 685
 Cys Thr Gln Cys Asn His Cys Val Ala Ala Cys Pro His Ser Ala Ile

 690 695 700
 Arg Ala Lys Val Val Pro Pro Glu Ala Met Glu Asn Ala Pro Ala Ser
 705 710 715 720
 Leu His Ser Leu Asp Val Lys Ser Arg Asp Met Arg Gly Gln Lys Tyr
 725 730 735
 Val Leu Gln Val Ala Pro Glu Asp Cys Thr Gly Cys Asn Leu Cys Val
 740 745 750
 Glu Val Cys Pro Ala Lys Asp Arg Gln Asn Pro Glu Ile Lys Ala Ile
 755 760 765

 Asn Met Met Ser Arg Leu Glu His Val Glu Glu Glu Lys Ile Asn Tyr
 770 775 780
 Asp Phe Phe Leu Asn Leu Pro Glu Ile Asp Arg Ser Lys Leu Glu Arg
 785 790 795 800
 Ile Asp Ile Arg Thr Ser Gln Leu Ile Thr Pro Leu Phe Glu Tyr Ser
 805 810 815
 Gly Ala Cys Ser Gly Cys Gly Glu Thr Pro Tyr Ile Lys Leu Leu Thr
 820 825 830
 Gln Leu Tyr Gly Asp Arg Met Leu Ile Ala Asn Ala Thr Gly Cys Ser

 835 840 845
 Ser Ile Tyr Gly Gly Asn Leu Pro Ser Thr Pro Tyr Thr Thr Asp Ala
 850 855 860
 Asn Gly Arg Gly Pro Ala Trp Ala Asn Ser Leu Phe Glu Asp Asn Ala
 865 870 875 880
 Glu Phe Gly Leu Gly Phe Arg Leu Thr Val Asp Gln His Arg Val Arg

885	890	895	
Val Leu Arg Leu Leu Asp Gln Phe Ala Asp Lys Ile Pro Ala Glu Leu			
900	905	910	
Leu Thr Ala Leu Lys Ser Asp Ala Thr Pro Glu Val Arg Arg Glu Gln			
915	920	925	
Val Ala Ala Leu Arg Gln Gln Leu Asn Asp Val Ala Glu Ala His Glu			
930	935	940	
Leu Leu Arg Asp Ala Asp Ala Leu Val Glu Lys Ser Ile Trp Leu Ile			
945	950	955	960
Gly Gly Asp Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Gly Phe Gly Gly Leu Asp His			
965	970	975	
Val Leu Ser Leu Thr Glu Asn Val Asn Ile Leu Val Leu Asp Thr Gln			
980	985	990	
Cys Tyr Ser Asn Thr Gly Gly Gln Ala Ser Lys Ala Thr Pro Leu Gly			
995	1000	1005	
Ala Val Thr Lys Phe Gly Glu His Gly Lys Arg Lys Ala Arg Lys Asp			
1010	1015	1020	
Leu Gly Val Ser Met Met Met Tyr Gly His Val Tyr Val Ala Gln Ile			
1025	1030	1035	1040
Ser Leu Gly Ala Gln Leu Asn Gln Thr Val Lys Ala Ile Gln Glu Ala			
1045	1050	1055	
Glu Ala Tyr Pro Gly Pro Ser Leu Ile Ile Ala Tyr Ser Pro Cys Glu			
1060	1065	1070	
Glu His Gly Tyr Asp Leu Ala Leu Ser His Asp Gln Met Arg Gln Leu			
1075	1080	1085	
Thr Ala Thr Gly Phe Trp Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Pro Arg Arg Ala			
1090	1095	1100	
Asp Glu Gly Lys Leu Pro Leu Ala Leu Asp Ser Arg Pro Pro Ser Glu			
1105	1110	1115	1120
Ala Pro Glu Glu Thr Leu Leu His Glu Gln Arg Phe Arg Arg Leu Asn			
1125	1130	1135	

Ser Gln Gln Pro Glu Val Ala Glu Gln Leu Trp Lys Asp Ala Ala Ala

1140 1145 1150

Asp Leu Gln Lys Arg Tyr Asp Phe Leu Ala Gln Met Ala Gly Lys Ala

1155 1160 1165

Glu Lys Ser Asn Thr Asp

1170

<210> 7

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FldA-Fwd

<400> 7

attctagaag gaggtataaa atatggctat cactggcatc tttttc 46

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FldA-Rev

<400> 8

atgagctctt aggcattgag aatttcgtcg a 31

<210> 9

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FldB-Fwd

<400> 9

atggatccag gaggtataaa atatgaatat gggtcttttt tacggttcc 49

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FldB-Rev

<400> 10

attctagatt aggcgtaatg ctctgccatt	30
<210> 11	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fdx-Fwd	
<400> 11	
attctagaag gaggtaataa atatgccaaa gattgttatt ttgcc	45
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fdx-Rev	
<400> 12	
atgagctctt aatgctcacg cgcatgg	27
<210> 13	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fpr-Fwd	
<400> 13	
atggtaccag gaggtaataa atatggctga ttgggtaaca ggc	43
<210> 14	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fpr-Rev	
<400> 14	
atgtcgactt accagtaatg ctccgctgtc	30
<210> 15	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> YdbK-Fwd
 <400> 15
 atgtcgacag gaggtataa atatgattac tattgacggt aatggcg 47
 <210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YdbK1-Rev
 <400> 16
 attctagatt aatcggtgtt gcttttttcc g 31
 <210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YdbK2-Rev
 <400> 17
 ataagctttt aatcggtgtt gcttttttcc g 31
 <210> 18
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Enterococcus faecalis
 <400> 18
 Leu Lys Thr Val Val Ile Ile Asp Ala Leu Arg Thr Pro Ile Gly Lys
 1 5 10 15
 Tyr Lys Gly Ser Leu Ser Gln Val Ser Ala Val Asp Leu Gly Thr His
 20 25 30
 Val Thr Thr Gln Leu Leu Lys Arg His Ser Thr Ile Ser Glu Glu Ile
 35 40 45
 Asp Gln Val Ile Phe Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Asn Gly Gln Asn
 50 55 60
 Pro Ala Arg Gln Ile Ala Ile Asn Ser Gly Leu Ser His Glu Ile Pro
 65 70 75 80
 Ala Met Thr Val Asn Glu Val Cys Gly Ser Gly Met Lys Ala Val Ile

85 90 95
 Leu Ala Lys Gln Leu Ile Gln Leu Gly Glu Ala Glu Val Leu Ile Ala

 100 105 110
 Gly Gly Ile Glu Asn Met Ser Gln Ala Pro Lys Leu Gln Arg Phe Asn
 115 120 125
 Tyr Glu Thr Glu Ser Tyr Asp Ala Pro Phe Ser Ser Met Met Tyr Asp
 130 135 140
 Gly Leu Thr Asp Ala Phe Ser Gly Gln Ala Met Gly Leu Thr Ala Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Ala Glu Lys Tyr His Val Thr Arg Glu Glu Gln Asp Gln Phe
 165 170 175

 Ser Val His Ser Gln Leu Lys Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Gly Ile
 180 185 190
 Phe Ala Asp Glu Ile Ala Pro Leu Glu Val Ser Gly Thr Leu Val Glu
 195 200 205
 Lys Asp Glu Gly Ile Arg Pro Asn Ser Ser Val Glu Lys Leu Gly Thr
 210 215 220
 Leu Lys Thr Val Phe Lys Glu Asp Gly Thr Val Thr Ala Gly Asn Ala
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Asn Asp Gly Ala Ser Ala Leu Ile Ile Ala Ser Gln Glu

 245 250 255
 Tyr Ala Glu Ala His Gly Leu Pro Tyr Leu Ala Ile Ile Arg Asp Ser
 260 265 270
 Val Glu Val Gly Ile Asp Pro Ala Tyr Met Gly Ile Ser Pro Ile Lys
 275 280 285
 Ala Ile Gln Lys Leu Leu Ala Arg Asn Gln Leu Thr Thr Glu Glu Ile
 290 295 300
 Asp Leu Tyr Glu Ile Asn Glu Ala Phe Ala Ala Thr Ser Ile Val Val
 305 310 315 320

 Gln Arg Glu Leu Ala Leu Pro Glu Glu Lys Val Asn Ile Tyr Gly Gly
 325 330 335

Gly Ile Ser Leu Gly His Ala Ile Gly Ala Thr Gly Ala Arg Leu Leu
 340 345 350
 Thr Ser Leu Ser Tyr Gln Leu Asn Gln Lys Glu Lys Lys Tyr Gly Val
 355 360 365
 Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Leu Gly Leu Ala Met Leu Leu Glu
 370 375 380
 Arg Pro Gln Gln Lys Lys Asn Ser Arg Phe Tyr Gln Met Ser Pro Glu

 385 390 395 400
 Glu Arg Leu Ala Ser Leu Leu Asn Glu Gly Gln Ile Ser Ala Asp Thr
 405 410 415
 Lys Lys Glu Phe Glu Asn Thr Ala Leu Ser Ser Gln Ile Ala Asn His
 420 425 430
 Met Ile Glu Asn Gln Ile Ser Glu Thr Glu Val Pro Met Gly Val Gly
 435 440 445
 Leu His Leu Thr Val Asp Glu Thr Asp Tyr Leu Val Pro Met Ala Thr
 450 455 460

 Glu Glu Pro Ser Val Ile Ala Ala Leu Ser Asn Gly Ala Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Gln Gly Phe Lys Thr Val Asn Gln Gln Arg Leu Met Arg Gly Gln Ile
 485 490 495
 Val Phe Tyr Asp Val Ala Asp Ala Glu Ser Leu Ile Asp Glu Leu Gln
 500 505 510
 Val Arg Glu Thr Glu Ile Phe Gln Gln Ala Glu Leu Ser Tyr Pro Ser
 515 520 525
 Ile Val Lys Arg Gly Gly Gly Leu Arg Asp Leu Gln Tyr Arg Ala Phe

 530 535 540
 Asp Glu Ser Phe Val Ser Val Asp Phe Leu Val Asp Val Lys Asp Ala
 545 550 555 560
 Met Gly Ala Asn Ile Val Asn Ala Met Leu Glu Gly Val Ala Glu Leu
 565 570 575
 Phe Arg Glu Trp Phe Ala Glu Gln Lys Ile Leu Phe Ser Ile Leu Ser
 580 585 590

Asn Tyr Ala Thr Glu Ser Val Val Thr Met Lys Thr Ala Ile Pro Val
595 600 605

Ser Arg Leu Ser Lys Gly Ser Asn Gly Arg Glu Ile Ala Glu Lys Ile
610 615 620

Val Leu Ala Ser Arg Tyr Ala Ser Leu Asp Pro Tyr Arg Ala Val Thr
625 630 635 640

His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly Ile Glu Ala Val Val Leu Ala Thr
645 650 655

Gly Asn Asp Thr Arg Ala Val Ser Ala Ser Cys His Ala Phe Ala Val
660 665 670

Lys Glu Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Thr Ser Trp Thr Leu Asp Gly Glu

675 680 685

Gln Leu Ile Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Ala Leu Ala Thr Val Gly
690 695 700

Gly Ala Thr Lys Val Leu Pro Lys Ser Gln Ala Ala Ala Asp Leu Leu
705 710 715 720

Ala Val Thr Asp Ala Lys Glu Leu Ser Arg Val Val Ala Ala Val Gly
725 730 735

Leu Ala Gln Asn Leu Ala Ala Leu Arg Ala Leu Val Ser Glu Gly Ile
740 745 750

Gln Lys Gly His Met Ala Leu Gln Ala Arg Ser Leu Ala Met Thr Val
755 760 765

Gly Ala Thr Gly Lys Glu Val Glu Ala Val Ala Gln Gln Leu Lys Arg
770 775 780

Gln Lys Thr Met Asn Gln Asp Arg Ala Leu Ala Ile Leu Asn Asp Leu
785 790 795 800

Arg Lys Gln

<210> 19

<211> 383

<212> PRT

<213> Enterococcus faecalis

<400> 19

Met Thr Ile Gly Ile Asp Lys Ile Ser Phe Phe Val Pro Pro Tyr Tyr

1 5 10 15
Ile Asp Met Thr Ala Leu Ala Glu Ala Arg Asn Val Asp Pro Gly Lys
20 25 30
Phe His Ile Gly Ile Gly Gln Asp Gln Met Ala Val Asn Pro Ile Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Val Thr Phe Ala Ala Asn Ala Ala Glu Ala Ile Leu Thr
50 55 60
Lys Glu Asp Lys Glu Ala Ile Asp Met Val Ile Val Gly Thr Glu Ser
65 70 75 80

Ser Ile Asp Glu Ser Lys Ala Ala Ala Val Val Leu His Arg Leu Met
85 90 95
Gly Ile Gln Pro Phe Ala Arg Ser Phe Glu Ile Lys Glu Ala Cys Tyr
100 105 110
Gly Ala Thr Ala Gly Leu Gln Leu Ala Lys Asn His Val Ala Leu His
115 120 125
Pro Asp Lys Lys Val Leu Val Val Ala Ala Asp Ile Ala Lys Tyr Gly
130 135 140
Leu Asn Ser Gly Gly Glu Pro Thr Gln Gly Ala Gly Ala Val Ala Met

145 150 155 160
Leu Val Ala Ser Glu Pro Arg Ile Leu Ala Leu Lys Glu Asp Asn Val
165 170 175
Met Leu Thr Gln Asp Ile Tyr Asp Phe Trp Arg Pro Thr Gly His Pro
180 185 190
Tyr Pro Met Val Asp Gly Pro Leu Ser Asn Glu Thr Tyr Ile Gln Ser
195 200 205
Phe Ala Gln Val Trp Asp Glu His Lys Lys Arg Thr Gly Leu Asp Phe
210 215 220

Ala Asp Tyr Asp Ala Leu Ala Phe His Ile Pro Tyr Thr Lys Met Gly
225 230 235 240

Lys Lys Ala Leu Leu Ala Lys Ile Ser Asp Gln Thr Glu Ala Glu Gln
 245 250 255
 Glu Arg Ile Leu Ala Arg Tyr Glu Glu Ser Ile Ile Tyr Ser Arg Arg
 260 265 270
 Val Gly Asn Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Tyr Leu Gly Leu Ile Ser Leu
 275 280 285
 Leu Glu Asn Ala Thr Thr Leu Thr Ala Gly Asn Gln Ile Gly Leu Phe
 290 295 300
 Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Val Ala Glu Phe Phe Thr Gly Glu Leu Val
 305 310 315 320
 Ala Gly Tyr Gln Asn His Leu Gln Lys Glu Thr His Leu Ala Leu Leu
 325 330 335
 Asp Asn Arg Thr Glu Leu Ser Ile Ala Glu Tyr Glu Ala Met Phe Ala
 340 345 350
 Glu Thr Leu Asp Thr Asp Ile Asp Gln Thr Leu Glu Asp Glu Leu Lys
 355 360 365
 Tyr Ser Ile Ser Ala Ile Asn Asn Thr Val Arg Ser Tyr Arg Asn
 370 375 380
 <210> 20
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 20
 Met Thr Lys Lys Val Gly Val Gly Gln Ala His Ser Lys Ile Ile Leu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu His Ala Val Val Tyr Gly Tyr Pro Ala Ile Ser Leu Pro
 20 25 30
 Leu Leu Glu Val Glu Val Thr Cys Lys Val Val Pro Ala Glu Ser Pro
 35 40 45
 Trp Arg Leu Tyr Glu Glu Asp Thr Leu Ser Met Ala Val Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Leu Glu Tyr Leu Asn Ile Thr Glu Ala Cys Ile Arg Cys Glu Ile Asp

65 70 75 80
 Ser Ala Ile Pro Glu Lys Arg Gly Met Gly Ser Ser Ala Ala Ile Ser
 85 90 95
 Ile Ala Ala Ile Arg Ala Val Phe Asp Tyr Tyr Gln Ala Asp Leu Pro
 100 105 110

 His Asp Val Leu Glu Ile Leu Val Asn Arg Ala Glu Met Ile Ala His
 115 120 125
 Met Asn Pro Ser Gly Leu Asp Ala Lys Thr Cys Leu Ser Asp Gln Pro
 130 135 140
 Ile Arg Phe Ile Lys Asn Val Gly Phe Thr Glu Leu Glu Met Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Ala Tyr Leu Val Ile Ala Asp Thr Gly Val Tyr Gly His Thr Arg
 165 170 175
 Glu Ala Ile Gln Val Val Gln Asn Lys Gly Lys Asp Ala Leu Pro Phe

 180 185 190
 Leu His Ala Leu Gly Glu Leu Thr Gln Gln Ala Glu Val Ala Ile Ser
 195 200 205
 Gln Lys Asp Ala Glu Gly Leu Gly Gln Ile Leu Ser Gln Ala His Leu
 210 215 220
 His Leu Lys Glu Ile Gly Val Ser Ser Pro Glu Ala Asp Phe Leu Val
 225 230 235 240
 Glu Thr Thr Leu Ser His Gly Ala Leu Gly Ala Lys Met Ser Gly Gly
 245 250 255

 Gly Leu Gly Gly Cys Ile Ile Ala Leu Val Thr Asn Leu Thr His Ala
 260 265 270
 Gln Glu Leu Ala Glu Arg Leu Glu Glu Lys Gly Ala Val Gln Thr Trp
 275 280 285
 Ile Glu Ser Leu
 290
 <210> 21
 <211> 336
 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 21

Met Ile Ala Val Lys Thr Cys Gly Lys Leu Tyr Trp Ala Gly Glu Tyr

1 5 10 15

Ala Ile Leu Glu Pro Gly Gln Leu Ala Leu Ile Lys Asp Ile Pro Ile

20 25 30

Tyr Met Arg Ala Glu Ile Ala Phe Ser Asp Ser Tyr Arg Ile Tyr Ser

35 40 45

Asp Met Phe Asp Phe Ala Val Asp Leu Arg Pro Asn Pro Asp Tyr Ser

50 55 60

Leu Ile Gln Glu Thr Ile Ala Leu Met Gly Asp Phe Leu Ala Val Arg

65 70 75 80

Gly Gln Asn Leu Arg Pro Phe Ser Leu Lys Ile Cys Gly Lys Met Glu

85 90 95

Arg Glu Gly Lys Lys Phe Gly Leu Gly Ser Ser Gly Ser Val Val Val

100 105 110

Leu Val Val Lys Ala Leu Leu Ala Leu Tyr Asn Leu Ser Val Asp Gln

115 120 125

Asn Leu Leu Phe Lys Leu Thr Ser Ala Val Leu Leu Lys Arg Gly Asp

130 135 140

Asn Gly Ser Met Gly Asp Leu Ala Cys Ile Val Ala Glu Asp Leu Val

145 150 155 160

Leu Tyr Gln Ser Phe Asp Arg Gln Lys Ala Ala Ala Trp Leu Glu Glu

165 170 175

Glu Asn Leu Ala Thr Val Leu Glu Arg Asp Trp Gly Phe Phe Ile Ser

180 185 190

Gln Val Lys Pro Thr Leu Glu Cys Asp Phe Leu Val Gly Trp Thr Lys

195 200 205

Glu Val Ala Val Ser Ser His Met Val Gln Gln Ile Lys Gln Asn Ile

210 215 220

Asn Gln Asn Phe Leu Ser Ser Ser Lys Glu Thr Val Val Ser Leu Val

225 230 235 240
 Glu Ala Leu Glu Gln Gly Lys Ala Glu Lys Val Ile Glu Gln Val Glu
 245 250 255
 Val Ala Ser Lys Leu Leu Glu Gly Leu Ser Thr Asp Ile Tyr Thr Pro
 260 265 270
 Leu Leu Arg Gln Leu Lys Glu Ala Ser Gln Asp Leu Gln Ala Val Ala
 275 280 285
 Lys Ser Ser Gly Ala Gly Gly Gly Asp Cys Gly Ile Ala Leu Ser Phe
 290 295 300
 Asp Ala Gln Ser Ser Arg Asn Thr Leu Lys Asn Arg Trp Ala Asp Leu

 305 310 315 320
 Gly Ile Glu Leu Leu Tyr Gln Glu Arg Ile Gly His Asp Asp Lys Ser
 325 330 335
 <210> 22
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 22
 Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Lys Glu Lys Glu Met Val Pro Ala Thr
 20 25 30

 Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Thr Leu
 35 40 45
 Ser Pro Leu Pro Ala Asn Val Thr Ala Asp Glu Phe Tyr Ile Asn Gly
 50 55 60
 Gln Leu Gln Asn Glu Val Glu His Ala Lys Met Ser Lys Ile Ile Asp
 65 70 75 80
 Arg Tyr Arg Pro Ala Gly Glu Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn
 85 90 95
 Asn Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser

100 105 110
 Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Tyr Phe Lys Leu Gly Leu Asp Arg
 115 120 125
 Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 130 135 140
 Ser Phe Tyr Gly Pro Leu Gly Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Glu Ile
 145 150 155 160
 Tyr Pro Val Glu Thr Asp Leu Lys Leu Ala Met Ile Met Leu Val Leu
 165 170 175

 Glu Asp Lys Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys
 180 185 190
 Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Asp Asp Trp Val Arg Gln Ser Glu Lys
 195 200 205
 Asp Tyr Gln Asp Met Leu Ile Tyr Leu Lys Glu Asn Asp Phe Ala Lys
 210 215 220
 Ile Gly Glu Leu Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr
 225 230 235 240
 Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu

 245 250 255
 Ala Met Ala Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Lys Gly Glu Ala Cys Tyr
 260 265 270
 Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Phe Cys Gln Glu Lys
 275 280 285
 Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ile
 290 295 300
 Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Gln Asp Asp Cys Cys
 305 310 315

<210> 23

<211> 182

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 23

Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
1 5 10 15
Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
20 25 30
Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
35 40 45
Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn
50 55 60
Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
65 70 75 80
Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
85 90 95
Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
100 105 110
Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
115 120 125
Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
130 135 140
Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro
145 150 155 160
Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser
165 170 175
Ala Phe Thr Gln Leu Lys
180

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EFAES-F

<400> 24

gccccgggta ggaacagac catggagttg aaaac

<210> 25

35

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EFAES-R
 <400> 25
 cgccctgcagg ttagtttcga taagagcgaa cgg 33
 <210> 26
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS ackA-pta-Ptrc-F
 <400> 26
 tggctccctg acgttttttt agccacgtat caattatagg tacttccatg gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 27
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO ackA-pta-R
 <400> 27
 gcagcgcaaa gctgcggatg atgacgagat tactgctgct gtgcagactg tgtaggctgg 60
 agctgcttcg 70
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KOackA-ptaCF-F
 <400> 28
 tgtcatcatg cgctacgtc 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> K0ackA-ptacF-R
 <400> 29
 cagttaagca agataatcag 20
 <210> 30
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SN12Didi-F
 <400> 30
 gcgaattcag gaggtataa tatgacaaa aaagttggtg tcggtc 46
 <210> 31
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SN12Didi-R
 <400> 31
 cgctgcagg ttatttaagc tgggtaaatg cagataatc 39
 <210> 32
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS poxB-Ptrc-F
 <400> 32
 gatgaactaa acttgttacc gttatcacat tcaggagatg gagaaccatg gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 33
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO poxB -R
 <400> 33
 ccttattatg acgggaaatg ccaccctttt taccttagcc agtttgtttt ttaggctgg 60
 agctgcttcg 70

<210> 34
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS ldhA-Ptrc-F
 <400> 34
 atttttagta gcttaaagt gattcaacat cactggagaa agtcttatga gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 35
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO ldhA-R
 <400> 35
 ctccctgga atgcaggga gcggcaagat taaaccagtt cgctcgggca ttaggctgg 60
 agctgcttcg 70
 <210> 36
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS adhE-Ptrc-F
 <400> 36
 cgagcagatg atttactaaa aaagtttaac attatcagga gagcattatg gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 37
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO adhE-R
 <400> 37
 ccgtttatgt tgccagacag cgctactgat taagcggatt ttttcgcttt ttaggctgg 60
 agctgcttcg 70
 <210> 38

<211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS atoDA-Ptrc-F5
 <400> 38
 ctattgcctg actgtaccca caacgggtgta tgcaagaggg ataaaaaatg gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 39
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO atoDA-R
 <400> 39
 acgcgtcata aaacgcgata tgcgaccaat cataaatcac cccgttgcgt tgtaggctgg 60
 agctgcttcg 70

 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KOpoxBCF-F
 <400> 40
 ttacgtactg gcctgctcct gc 22
 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KOpoxBCF-R
 <400> 41
 gtcgggtaac ggtatcactg cg 22
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KOldhACF-F

<400> 42
tcatcagcag cgtcaacggc 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> K0ldhACF-R

<400> 43
cgctgggtcac gggcttaccg 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> K0adhECF-F

<400> 44
ccgcactgac tataactctcg 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> K0adhECF-R

<400> 45
tgatcggcat tgcccagaag 20

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> K0atoDACF-F

<400> 46
ctggcgaggt aaaaacagcc cc 22

<210> 47
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KOatoDACF-R

<400> 47

aagcgcgatac acgaatgtta gc

22

<210> 48

<211> 307

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> pantoea agglomerans crtE

<400> 48

Met Val Ser Gly Ser Lys Ala Gly Val Ser Pro His Arg Glu Ile Glu

1	5	10	15
Val Met Arg Gln Ser Ile Asp Asp His Leu Ala Gly Leu Leu Pro Glu			
20	25	30	
Thr Asp Ser Gln Asp Ile Val Ser Leu Ala Met Arg Glu Gly Val Met			
35	40	45	
Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Leu Leu Met Leu Leu Ala Ala Arg			
50	55	60	
Asp Leu Arg Tyr Gln Gly Ser Met Pro Thr Leu Leu Asp Leu Ala Cys			
65	70	75	80

Ala Val Glu Leu Thr His Thr Ala Ser Leu Met Leu Asp Asp Met Pro			
85	90	95	
Cys Met Asp Asn Ala Glu Leu Arg Arg Gly Gln Pro Thr Thr His Lys			
100	105	110	
Lys Phe Gly Glu Ser Val Ala Ile Leu Ala Ser Val Gly Leu Leu Ser			
115	120	125	
Lys Ala Phe Gly Leu Ile Ala Ala Thr Gly Asp Leu Pro Gly Glu Arg			
130	135	140	
Arg Ala Gln Ala Val Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val Gly Val Gln Gly			

145	150	155	160
Leu Val Leu Gly Gln Phe Arg Asp Leu Asn Asp Ala Ala Leu Asp Arg			
165	170	175	

Thr Pro Asp Ala Ile Leu Ser Thr Asn His Leu Lys Thr Gly Ile Leu
180 185 190

Phe Ser Ala Met Leu Gln Ile Val Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Pro
195 200 205

Ser Thr Arg Glu Thr Leu His Ala Phe Ala Leu Asp Phe Gly Gln Ala
210 215 220

Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Arg Asp Asp His Pro Glu Thr Gly Lys
225 230 235 240

Asp Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Arg Leu Gly
245 250 255

Ala Asp Ala Ala Arg Gln Lys Leu Arg Glu His Ile Asp Ser Ala Asp
260 265 270

Lys His Leu Thr Phe Ala Cys Pro Gln Gly Gly Ala Ile Arg Gln Phe
275 280 285

Met His Leu Trp Phe Gly His His Leu Ala Asp Trp Ser Pro Val Met
290 295 300

Lys Ile Ala
305

<210> 49
<211> 309
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> pantoea agglomerans crtB
<400> 49

Met Ser Gln Pro Pro Leu Leu Asp His Ala Thr Gln Thr Met Ala Asn
1 5 10 15

Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ala Lys Leu Phe Asp Pro Ala Thr
20 25 30

Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Thr Trp Cys Arg His Cys Asp Asp
35 40 45

Val Ile Asp Asp Gln Thr His Gly Phe Ala Ser Glu Ala Ala Ala Glu
50 55 60

Glu Glu Ala Thr Gln Arg Leu Ala Arg Leu Arg Thr Leu Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Glu Gly Ala Glu Met Gln Asp Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln
 85 90 95
 Glu Val Ala Leu Thr His Gly Ile Thr Pro Arg Met Ala Leu Asp His
 100 105 110

 Leu Asp Gly Phe Ala Met Asp Val Ala Gln Thr Arg Tyr Val Thr Phe
 115 120 125
 Glu Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu
 130 135 140
 Met Met Ala Arg Val Met Gly Val Arg Asp Glu Arg Val Leu Asp Arg
 145 150 155 160
 Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp
 165 170 175
 Ile Ile Asp Asp Ala Ala Ile Asp Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Glu Trp

 180 185 190
 Leu Gln Asp Ala Gly Leu Thr Pro Glu Asn Tyr Ala Ala Arg Glu Asn
 195 200 205
 Arg Ala Ala Leu Ala Arg Val Ala Glu Arg Leu Ile Asp Ala Ala Glu
 210 215 220
 Pro Tyr Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Gly Leu His Asp Leu Pro Pro Arg
 225 230 235 240
 Cys Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Arg Ser Val Tyr Arg Glu Ile Gly
 245 250 255

 Ile Lys Val Lys Ala Ala Gly Gly Ser Ala Trp Asp Arg Arg Gln His
 260 265 270
 Thr Ser Lys Gly Glu Lys Ile Ala Met Leu Met Ala Ala Pro Gly Gln
 275 280 285
 Val Ile Arg Ala Lys Thr Thr Arg Val Thr Pro Arg Pro Ala Gly Leu
 290 295 300
 Trp Gln Arg Pro Val
 305

<210> 50

<211> 492

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> pantoea agglomerans crtI

<400>

50

Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Thr Val Leu Leu Glu Gln

20 25 30

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Trp His Asp Gln Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Thr Ala Leu Glu

50 55 60

Ala Leu Phe Thr Leu Ala Gly Arg Arg Met Glu Asp Tyr Val Arg Leu

65 70 75 80

Leu Pro Val Lys Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Thr

85 90 95

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Ala Glu Leu Glu Ala Gln Ile Thr Gln

100 105 110

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Ala Tyr Ser

115 120 125

Gln Ala Val Phe Gln Glu Gly Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Val Pro Phe

130 135 140

Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Gly Pro Gln Leu Leu Lys Leu

145 150 155 160

Gln Ala Trp Gln Ser Val Tyr Gln Ser Val Ser Arg Phe Ile Glu Asp

165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly

180 185 190

Asn Pro Phe Thr Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu

195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val

210

215

220

Asn Gly Met Val Lys Leu Phe Thr Asp Leu Gly Gly Glu Ile Glu Leu

225

230

235

240

Asn Ala Arg Val Glu Glu Leu Val Val Ala Asp Asn Arg Val Ser Gln

245

250

255

Val Arg Leu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Asp Thr Asp Ala Val Ala Ser

260

265

270

Asn Ala Asp Val Val Asn Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Gly His His Pro

275

280

285

Val Gly Gln Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu Arg Lys Ser Met Ser Asn

290

295

300

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn Gln Pro His Ser Gln Leu

305

310

315

320

Ala His His Thr Ile Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

325

330

335

Glu Ile Phe Thr Gly Ser Ala Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu

340

345

350

His Ser Pro Cys Val Thr Asp Pro Ser Leu Ala Pro Pro Gly Cys Ala

355

360

365

Ser Phe Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Asn Ala Pro Leu

370

375

380

Asp Trp Ala Gln Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Asp Tyr

385

390

395

400

Leu Glu Glu Arg Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln

405

410

415

Arg Ile Phe Thr Pro Ala Asp Phe His Asp Thr Leu Asp Ala His Leu

420

425

430

Gly Ser Ala Phe Ser Ile Glu Pro Leu Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe

435

440

445

Arg Pro His Asn Arg Asp Ser Asp Ile Ala Asn Leu Tyr Leu Val Gly

450 455 460
 Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Val Ala Ser Ala
 465 470 475 480
 Lys Ala Thr Ala Ser Leu Met Ile Glu Asp Leu Gln
 485 490
 <210> 51
 <211> 305
 <212> PRT
 <
 213> Unknown
 <220><223> pantoea agglomerans crtY
 <400> 51
 Met Leu Arg Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr His Ile Pro Arg Val Asn
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Gln Pro Ser Cys Ala His Ala Arg Leu Gln Phe Lys Leu
 20 25 30
 Arg Ser Met Gln Met Thr Leu Met Gln Pro Ser Ile Ser Ala Asn Leu
 35 40 45
 Ser Arg Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp
 50 55 60

 Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile
 65 70 75 80
 Leu Val Asp Val Glu Asp Asn Ile Thr Gly His Ala Ser Lys Leu Glu
 85 90 95
 Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala
 100 105 110
 Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln
 115 120 125
 Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys

 130 135 140
 Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro Asp Glu Val Asp Gln Leu
 145 150 155 160
 Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys Ala Ala Ala Ile

165 170 175
 Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu Pro Ala
 180 185 190
 Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val
 195 200 205

 Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp
 210 215 220
 Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met
 245 250 255
 Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile
 260 265 270
 Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu

 275 280 285
 Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr Val His His Ile Asn Glu
 290 295 300
 Ala
 305
 <210> 52
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis
 <400> 52
 Met Leu Arg Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr His Ile Pro Arg Val Asn
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Gln Pro Ser Cys Ala His Ala Arg Leu Gln Phe Lys Leu
 20 25 30

 Arg Ser Met Gln Met Thr Leu Met Gln Pro Ser Ile Ser Ala Asn Leu
 35 40 45
 Ser Arg Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp
 50 55 60

Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile
65 70 75 80
Leu Val Asp Val Glu Asp Asn Ile Thr Gly His Ala Ser Lys Leu Glu
85 90 95
Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala
100 105 110
Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln
115 120 125
Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys
130 135 140
Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro Asp Glu Val Asp Gln Leu
145 150 155 160
Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys Ala Ala Ala Ile
165 170 175
Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu Pro Ala
180 185 190
Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val
195 200 205
Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp
210 215 220
Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp
225 230 235 240
Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met
245 250 255
Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile
260 265 270
Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu
275 280 285
Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr Val His His Ile Asn Glu
290 295 300
Ala
305

<210> 53
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LYCm4-F
 <400> 53
 cgtacatgtg ttgacagct tatcatcgac tgc 33
 <210> 54
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LYCm4-R
 <400> 54
 gctgatatcg ggttattgtc tcatgagcgg 30
 <210> 55
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IS poxB-Ptrc-F
 <400> 55
 gatgaactaa acttggtacc gttatcacat tcaggagatg gagaaccatg gtttgacagc 60
 ttatcatcga ctgc 74
 <210> 56
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KO poxB -R
 <400> 56
 ccttattatg acgggaaatg ccaccctttt taccttagcc agtttgtttt tgtaggctgg 60
 agctgcttcg 70
 <210> 57
 <211> 74
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS ldhA-Ptrc-F

<400> 57

attttttagta gcttaaagt gattcaacat cactggagaa agtcttatga gtttgacagc 60

ttatcatcga ctgc 74

<210> 58

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO ldhA-R

<400> 58

ctcccttgga atgcagggga gcggcaagat taaaccagtt cgctcgggca ttaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 59

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS dld-Ptrc-F

<400> 59

cgctattcta gtttgtata ttttttcgcc accacaagga gtggaaaatg gtttgacagc 60

atcatcgact gctt 74

<210> 60

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO dld-R

<400> 60

ggatggcgat actctgccat ccgtaatfff tactccactt cctgccagtt ttaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 61

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS atoDA-Ptrc-F

<400> 61

ctattgcctg actgtaccca caacgggtgta tgcaagaggg ataaaaaatg gtttgacagc 60

ttatcatcga ctgc 74

<210> 62

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO atoDA-R

<400> 62

acgcgtcata aaacgcgata tgcgaccaat cataaatcac cccgttgcgt tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 63

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS pps-Ptrc-F

<400> 63

agaaatgtgt ttctcaaacc gttcatttat cacaaaagga ttgttcgatg gtttgacagc 60

ttatcatcga ctgc 74

<210> 64

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO pps-R

<400> 64

cggcgactaa acgccgccgg ggatttattt tattttctca gttcagccag tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KOpoxBCF-F

<400> 65
ttacgtactg gcctgctcct gc 22
<210> 66
<211> 22
<212> DNA
<213>
Artificial Sequence
<220><223> KOpoxBCF-R
<400> 66
gtcgggtaac ggtatcactg cg 22
<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> KOldhACF-F
<400> 67
tcatcagcag cgtcaacggc 20
<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> KOldhACF-R
<400> 68
cgctgggtcac gggettaccg 20
<210> 69
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> KOldlCF-F
<400> 69
cagactcacc gcgattccta ctg 23
<210> 70
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> KOlddCF-R
 <400> 70
 cggtaaagtg atgcctgtgc c 21
 <210> 71
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K0atoDACF-F
 <400> 71
 ctggcgaggt aaaaacagcc cc 22

 <210> 72
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K0atoDACF-R
 <400> 72
 aagcgcgatc acgaatgtta gc 22
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K0ppsCF-F
 <400> 73
 gcagatttgc gcaacgctgg 20
 <210> 74
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K0ppsCF-R
 <400> 74
 ctgccgtatg gatgaggctg g 21