



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156570
(43) 공개일자 2024년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) C07K 14/34 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C07K 14/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0137471(분할)
(22) 출원일자 2024년10월10일
심사청구일자 2024년10월10일
(62) 원출원 특허 10-2021-0059751
원출원일자 2021년05월10일
심사청구일자 2021년05월10일
(30) 우선권주장
1020210018908 2021년02월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
한성욱
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호
(잠실동, 리센즈)
고영진
강원도 춘천시 동내면 거두택지길26번길 9-13,
201호
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 8 항

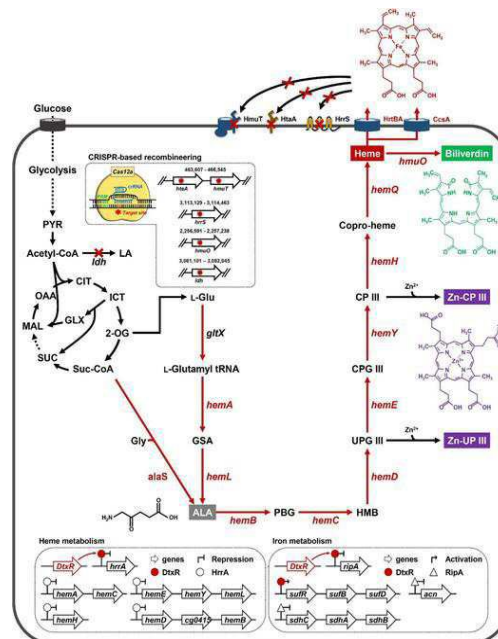
(54) 발명의 명칭 **헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법**

(57) 요약

본 발명은 헴 (heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III), 우로포르피린 III (uroporphyrin III), 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III), 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III

(뒷면에 계속)

대표도 - 도12



III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 재조합 미생물의 포르피린 생산능 향상 효과를 통해 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성을 위한 C4 및 C5 경로 관련 유전자의 도입, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자의 도입 및 전사조절인자의 도입을 통한 시너지 효과를 처음 입증하였으며, 또한 종래 재조합 미생물에서 외부에 단백질을 도입하여 세포의 생산을 유도한 것과 달리 최초로 상기 미생물의 세포벽을 개량하는 전략을 통해 헴의 세포의 분비를 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 재조합 미생물은 상기와 같은 대사공학적 전략을 통해 포르피린 계열 물질의 생산능력이 강화되어 높은 생산능을 나타내는바, 본 발명의 재조합 미생물을 이용하면 고부가가치의 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘을 경제적이고 효율적으로 생산할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 1/38 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 9/90 (2013.01)
C12P 9/00 (2013.01)
C12Y 102/0107 (2013.01)
C12Y 504/03008 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114847
과제번호	2018R1A2B200370413
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원(3억초과~5억이하)
연구과제명	식물 광호흡 기작 모방 신규 Porphyrin 생합성경로 연구 기반 코리네박테리움을 통한 태양전지 유기소재Zinc-Porphyrin 생산 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ), 헴 수송단백질 A(heme regulated transporter A, HrtA) 및 헴 수송 단백질 B(HrtB)를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및

막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외부비능이 향상된 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)인 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA)는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL)는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS)는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR)는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY)는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH)는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ)는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 헴 수송단백질 A (heme regulated transporter A, HrtA)는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 헴 수송 단백질 B (HrtB)는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS)는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA)은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; 및

상기 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는; 것인 재조합 미생물.

청구항 4

글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이스 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이스 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatease, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ), 헴 수송단백질 A(heme regulated transporter A, HrtA) 및 헴 수송 단백질 B(HrtB)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계; 및

막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)를 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계;를 포함하는, 헴(Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물의 제조방법.

청구항 5

제 1항의 재조합 미생물을 배양하여, 배양액 내 헴 (Heme)을 축적하는 단계;

상기 헴이 축적된 배양액을 수득하는 단계; 및

배양액 내 축적된 헴을 정제하는 단계;를 포함하는 헴의 생산 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 배지는 5 내지 100mg/L 농도의 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 포함된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 배지는 질소원으로 트립톤 (Tryptone)이 포함된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 배양은 유가식 배양인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헴 (heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III), 우로포르피린 III (uroporphyrin III), 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III), 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘과 같은 포르피린 (porphyrin)은 네 개의 피롤 (pyrrole)이 메틴 (methine) 그룹으로 연결된 이종고리식 거대유기화합물 (heterocyclic macrocycle organic compound)이다. 헴 및 포르피린 유사체들은 숙시닐-코에이 (succinyl-CoA)와

글리신 (glycine)의 중합반응에 의한 경로 (C4 경로) 또는 글루타메이트 (glutamate)를 출발물질로 하여 ATP, NADPH 조효소를 사용하는 경로 (C5 경로)를 통하여 생체 내에서 합성된다. 이 두 경로에 대한 선호도는 종에 따라 다르며, 구체적으로 C4 경로의 경우 5-아미노레불린산 합성효소 (5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)의 작용, C5 경로의 경우 글루타메이트로부터 글루타밀-tRNA 합성효소 (glutamyl-tRNA synthetase; GltX), 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA) 및 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이스 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL)의 작용에 의한 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성으로부터 헴 대사경로가 시작된다. 2분자의 5-아미노레불린산은 포르포빌리노겐 합성효소 (porphobilinogen synthase, HemB)가 촉매하는 축합 (condensation) 반응을 통해 포르포빌리노겐 (porphobilinogen, PBG)으로 합성되고, 4분자의 포르포빌리노겐은 포르포빌리노겐 디아미네이즈 (porphobilinogen deaminase, HemC)의 촉매 작용을 통해 1-하이드록시메틸빌란 (1-hydroxymethylbilane, HMB)으로 합성된다. 1-하이드록시메틸빌란은 우로포르피리노겐 III 합성효소 (uroporphyrinogen III synthase, HemD)에 의해 고리화되어 포르피린의 기본 골격인 우로포르피리노겐 III (uroporphyrinogen III)로 합성된다.

[0003] 이후 우로포르피리노겐 III로부터 헴이 합성되는 방식은 종에 따라 세 가지 경로를 통해 진행된다. 첫 번째는 네 가지 효소 반응으로 구성된 프로토포르피린 IX 의존성 경로 (protoporphyrin IX-dependent pathway)로 생물학 및 생화학 분야에서 잘 알려져 있으며 주로 프로테오박테리아 (Proteobacteria) 및 진핵생물에서 발견된다. 두 번째는 황산염 환원 세균 (sulfate reducing bacteria)와 고세균 (archaea)에서 발견되는 원시 헴 경로로, 6가지 효소 반응을 통해 헴을 합성한다. 마지막은 네 가지 효소 반응으로 구성된 코프로포르피린 III 의존성 경로 (coproporphyrin III-dependent pathway)로, 최근에 발견된 방선균 (actinobacteria)과 후벽균 (firmicutes)에서 발견된다. 코프로포르피린 III 의존성 경로와 프로토포르피린 IX 의존성 경로에서 우로포르피리노겐 III를 코프로포르피리노겐 III (coproporphyrinogen III, CPG III)로 전환시키는 반응은 우로포르피리노겐 III 디카복실레이스 (uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)에 의해 진행된다. 코프로포르피린 III 의존성 경로에서는 코프로포르피리노겐 III (coproporphyrinogen III)가 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY)에 의해 코프로포르피린 III (coproporphyrin III)로 전환된다. 이어서 코프로포르피린 III로부터 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH)에 의해 철이온 첨가로 코프로-헴 (coproheme)이 합성되고, 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ)에 의해 코프로-헴은 최종적으로 헴으로 전환된다. 빌리버딘은 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)에 의해 헴이 분해되어 형성된다.

[0004] 헴은 호흡, 산소 전달, 광합성, 전자전달과 관련된 생명체의 필수 보조인자로 식품 산업에서 유기 철 보충제뿐만 아니라 의료 분야의 급성 간헐성 포르피린증 (acute intermittent porphyria)에 대한 생체 이용 및 제약 화합물로 널리 사용되고 있다. 또한 헴은 최근 식품 산업에서 인공육의 주요 원료로 활발히 사용되고 있다.

[0005] 아연 포르피린 유도체는 최근 빛을 수확하여 태양 에너지를 전기 에너지로 변환하는 태양전지의 광감응제로 이용되거나 인터페이스 (interface)에서 다단계 반응을 촉매하는 촉매제로 주목받고 있다. 전자 및 물리 화학적 응용 외에도 아연 포르피린은 항종양 및 항균활성에 대한 광감응제로 광역학치료 (photodynamic therapy)에서 이용되고 있다.

[0006] 빌리버딘은 항산화 성질을 가져 유용한 생리적 기능을 수행할 수 있으며, 퍼옥시라디칼의 강력한 제거제로 알려져 있다. 빌리버딘은 돌연변이 유발 물질인 다환 방향족 탄화수소, 헤테로사이클릭아민 및 산화제의 영향을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 일부 연구에 따르면 체내에 빌리버딘의 농도가 높은 사람들은 암 및 심혈관 질환의 빈도가 낮다고 보고된바 있다.

[0007] 종래 헴 생합성을 향상시키기 위한 연구로는 대장균을 통해 수행된 바 있으며 C5 경로, 프로토포르피린 IX 의존성 경로를 포함하는 헴 생합성 경로 강화를 통해 헴 생산을 증대시킨 결과가 보고되어 있다. 또한 헴 및 다른 포르피린 계열 물질의 생산을 증대시키기 위한 재조합 균주 및 이의 생산 효과가 일부 보고되고 있으나, 포르피린 및 이의 유사체를 보다 효율적으로 고생산하고 세포외 분비능을 더욱 증대시킨 재조합 미생물 및 최적화된 방법에 대한 연구개발이 추가적으로 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-2168039

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명자들은 L-글루탐산 (L-glutamic acid) 생성능을 갖는 미생물을 이용하여 헴을 포함한 다양한 포르피린의 생산능이 향상된 재조합 미생물을 개발하고자 연구 노력한 결과, 헴의 전구물질인 5-아미노레불린산을 과생산하는 C4 및 C5 경로 유전자, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자 및 전사조절인자의 도입, 해당 미생물의 세포벽 개량 전략을 적용함으로써 헴을 비롯한 포르피린 및 이의 유사체의 생산능력 및 이의 외분비가 향상된 재조합 미생물을 제조하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 이에, 본 발명은 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (Coproporphyrin III) 및 우로포르피린 III (Uroporphyrin III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물의 제조방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 헴의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 빌리버딘의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0019] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이스 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이스 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이스 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이스 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자가 도입된, 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일구현예로, 상기 재조합 미생물은 추가적으로 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이스 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

- [0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 재조합 미생물은 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및 HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자가 도입된, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자가 도입된, 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일구현예로, 상기 제조방법은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III

oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일구현예로, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 코리네박테리움 글루타믹움 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtA, HrtAB 및 HmuO는 각각 서열번호 1 내지 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 HrrS, HtaA 및 HmuT은 각각 서열번호 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 헴 (Heme)의 생산방법을 제공한다.

[0034] (a) 상기 재조합 미생물을 철 이온 (Fe^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 헴을 생성시키는 단계; 및

[0035] (b) 상기 생성된 헴을 추출 및 수득하는 단계.

[0036] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계 (a)에서 배지 내에 5 내지 100mg/L 농도의 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 포함될 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서 배지는 질소원으로 트립톤 (Tryptone)이 포함된 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 배양은 유가식 발효 공정으로 이루어지는 것일 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III)의 생산방법을 제공한다.

[0040] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[0041] (b) 상기 생성된 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[0042] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III)의 생산방법을 제공한다.

[0043] (a) 상기 재조합 미생물을 아연 이온 (Zn^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[0044] (b) 상기 생성된 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[0045] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산방법을 제공한다.

[0046] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 빌리버딘을 생성시키는 단계; 및

[0047] (b) 상기 생성된 빌리버딘을 추출 및 수득하는 단계.

발명의 효과

[0048] 본 발명에서는 재조합 미생물의 포르피린 생산능 향상 효과를 통해 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성을 위한 C4 및 C5 경로 관련 유전자의 도입, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자의 도입 및 전사조절인자의 도입을 통한 시너지 효과를 처음 입증하였으며, 또한 종래 재조합 미생물에서 외분비 단백질을 도입하여 세포의 생산을 유도한 것과 달리 최초로 상기 미생물의 세포벽을 개량하는 전략을 통해 헴의 세포외 분비를 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 재조합 미생물은 상기와 같은 대사공학 전략을 통해 포르피린 계열 물질의 생산능력이 강화되어 높은 생산능을 나타내는데, 본 발명의 재조합 미생물을 이용하면 고부가가치의 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘을 경제적이고 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 각각 야생형 코리네박테리움 글루타믹움 (WT), S, AL 및 ALS 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 세포 성

장 (Cell growth), 글루코오스 (Glucose), 글루타메이트 (Glutamate) 및 글리신 (Glycine) 소비량과 함께 헴 (Heme), 5-아미노레블린산 (ALA), 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산량을 측정한 결과이다.

도 2는 *hemY*, *hemH*, *hemQ* 및/또는 *dtxR* 유전자가 도입된 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 헴 생산 및 mRNA 발현수준을 측정한 결과를 나타낸 것으로, 도 2a는 ALS, ALS-Y, ALS-H, ALS-Q, ALS-HQ 및 ALS-YHQ 재조합 균주에서 각각 헴, 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산량을 측정한 결과이고, 도 2b는 ALSdt, ALSdt-Y, ALSdt-H, ALSdt-Q, ALSdt-HQ, ALSdt-YHQ 재조합 균주에서 각각 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III의 생산량을 측정한 결과이며, 도 2c는 각각 ALS-H 및 ALSdt-H에서 mRNA 발현수준을 측정한 결과이다.

도 3은 세포벽 개량 전략이 적용된 재조합 균주에서 헴 생산을 측정한 결과로서, 도 3a는 본 발명에 따른 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 세포벽 개량 전략을 그림으로 도시한 것이고, 도 3b는 ALSdt-YHQ, ALSdt-YHQBA, ALSdt-YHQcA, $\Delta S::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SA::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SAT::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 각각 세포 성장과 함께 총 헴 (Total heme), 외분비 헴 (Secreted heme), 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III 생산 수준을 측정한 결과이다.

도 4는 ALSdt-YHQ, ALSdt-YHQBA, ALSdt-YHQcA, $\Delta S::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SA::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SAT::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 총 우로포르피린 III (Total UP III) 및 외분비된 우로포르피린 III (Secreted UP III) 수준을 각각 측정한 결과이다.

도 5는 질소원을 최적화하기 위하여 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 재조합 균주를 상이한 질소원이 포함된 각 mCGXII-Y10 배지 (mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca)에서 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 세포 내외의 헴 생산 수준을 측정한 결과이다.

도 6은 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA2$ 균주를 각각 mCGXII 배지, mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지 (mCGXII + ETB) 및 mCGXII-Tr 배지에서 유가식 발효공정으로 배양하면서 세포 성장 및 글루코오스 소비와 함께 세포 내외의 헴 생산 수준을 측정한 결과이다.

도 7은 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 와 $\Delta SATO::ALSdtE-YHQBA$ 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 세포 내외의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III 생산 수준을 측정한 결과이다.

8은 ALSdtE, $\Delta Ldh::ALSdtE$, ALSdtE-BA 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 각각 세포 내외의 총 아연-포르피린 (ZnPP), 아연-코프로포르피린 III (Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-UP III)의 생산 수준을 측정한 결과이다.

도 9는 에탐부톨 농도를 최적화하기 위하여 ALSdtE 균주를 에탐부톨이 다양한 농도 (5, 25, 50, 100mg/L)로 첨가된 조건에서 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 세포 내외의 아연-포르피린, 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산 수준을 측정한 결과이다.

도 10은 ALSdtE 균주를 유가식 발효공정으로 배양하면서 세포 성장 및 글루코오스 소비와 함께 세포 내외의 아연-포르피린 (Zn-porphyrin) 수준을 측정한 결과이다.

도 11은 ALSdtE-YHQ 및 ALSdtE-YHQO 재조합 균주를 CGXII 배지에서 플라스크 배양한 후 헴, 코프로포르피린 III 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산 수준을 각각 측정한 결과이다.

도 12는 본 발명에 따른 재조합 미생물에 대한 대사공학 전략을 종합하여 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명자들은 L-글루탐산 (L-glutamic acid) 생성능을 갖는 미생물에 헴의 전구물질인 5-아미노레블린산을 과생산하는 C4 및 C5 경로 유전자, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자 및 전사조절인자의 도입, 해당 미생물의 세포벽 개량 전략을 적용함으로써 헴 및 다양한 포르피린의 생산능력 및 이의 외분비 능력이 향상된 재조합 미생물을 제조하였다.

[0051] 이에, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이스 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이스 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레블린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디

프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자가 도입된, 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 추가적으로 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산능력이 향상된 재조합 미생물은 하기 재조합 미생물을 모두 포함한다.
- [0054] i) HemA, HemL 및 AlaS를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0055] ii) HemA, HemL, AlaS 및 DtxR를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0056] iii) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemE를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0057] iv) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemY를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0058] v) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemH를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0059] vi) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0060] vii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemH 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;
- [0061] viii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물; 및
- [0062] ix) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물.
- [0063] 또한, 본 발명은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 하기의 재조합 미생물은 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산능력이 향상되고, 세포벽의 헴 결합능이 감소되어 헴 외분비능이 향상된 것일 수 있다.
- [0065] i) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물;
- [0066] ii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS 및 HtaA를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물;
- [0067] iii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물; 및
- [0068] iv) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물.
- [0069] 본 발명에 있어서, 바람직하게 상기 재조합 미생물은 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및 HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈

(Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자가 도입된, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[0071] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자가 도입된, 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[0072] 본 발명에서, 상기 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtA, HrtB 및 HmuO는 각각 서열번호 1 내지 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한 상기 HrrS, HtaA 및 HmuT은 각각 서열번호 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 각 단백질들은 서열번호 1 내지 11, 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0074] 본 발명에서, 상기 제조방법은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0076] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelataze, HemH), 과산화수소의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0077] 본 발명에서 사용되는 용어, "재조합 미생물"은 유전자재조합 기술로 도입된 유전자재조합 DNA에 의하여 유전물질이 재조합된 미생물을 말한다. 상기 유전자재조합 DNA는 어떤 세포 내에서 복제 가능한 DNA (운반체)와 이중

의 DNA를 효소 등을 이용하여 시험관 안에서 결합시켜 제작한 DNA를 말한다.

- [0078] 본 발명에 있어서, 바람직하게 제조할 미생물은 글루탐산 생성능을 가지는 미생물을 유전자재조합 기술을 통해 포르피린 계열 물질, 바람직하게 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및/또는 빌리버딘의 생산능이 향상된 것일 수 있고, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 바람직하게 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [0079] 본 발명에서 사용되는 용어, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [0080] 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커 (linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션 (ligation)할 수 있다.
- [0081] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 재조합 벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다. 이후 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 형질전환 또는 트랜스펙션 (transfection) 될 수 있다.
- [0082] 본 발명에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게되는 것을 의미한다. 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적인 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [0083] 상기 "형질전환" 또는 "트랜스펙션"은 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산 (DNA 또는 RNA)을 도입하는데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예컨대 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, DEAE-텍스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션 (lipofection) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.
- [0084] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포일 수 있고, 바람직하게 상기 원핵 숙주세포는 *C. glutamicum* ATCC 13826, *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* 13059, *C. glutamicum* ATCC 14067, *C. glutamicum* ATCC 13761, *C. glutamicum* ATCC 13058, *C. glutamicum* ATCC 13745 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, *E.coli* DH5 α , *E.coli* JM101, *E.coli* TOP10, *E.coli* K12, *E.coli* W3110, *E.coli* X1776, *E.coli* XL1-Blue (Stratagene), *E.coli* B, *E.coli* BL21 등과 같은 *E.coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종 (species) 및 속 (genera)에 포함되는 균주가 사용될 수 있다.
- [0086] 본 발명에서, 숙주세포에서 상기 유전자의 발현 억제는 CRISPR 기술을 이용하여 표적 유전자의 발현을 억제함으로써 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 CRISPR용 재조합 벡터를 이용할 수 있고, 더욱 바람직하게는

pJYS1_Peftu 및 pJYS2_crtYf의 공지된 벡터를 이용할 수 있으나, 유전자의 발현 억제 방법이 이것으로 제한되는 것은 아니며 당업자가 공지된 기술을 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

- [0087] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 다양한 재조합 균주를 배양한 후 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 또는 빌리버딘 (Biliverdin) 각각을 추출함으로써 생산량을 측정 및 비교하였고, 상기 각 물질의 가장 높은 생산량을 달성하기 위한 배양 조건, 예컨대 배지 내 질소원, 배양방법 및 에탐부톨의 농도를 최적화하였다.
- [0088] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 헴 (Heme)의 생산방법을 제공한다.
- [0089] (a) 상기 재조합 미생물을 철 이온 (Fe^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 헴을 생성시키는 단계; 및
- [0090] (b) 상기 생성된 헴을 추출 및 수득하는 단계.
- [0091] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III)의 생산방법을 제공한다.
- [0092] (a) 상기 재조합 미생물을 아연 이온 (Zn^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및
- [0093] (b) 상기 생성된 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 각 (a) 단계에서 배지는 바람직하게 CGXII 배지에 효모 추출물이 첨가된 mCGXII-Y10 배지일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 mCGXII-Y10 배지에 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , 트립톤 및 카제인 가수분해물이 각각 첨가된 mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지일 수 있으며, 가장 바람직하게는 트립톤이 첨가된 mCGXII-Tr일 수 있다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 각 (a) 단계에서 배지는 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 첨가된 것일 수 있으며, 에탐부톨은 바람직하게 5 내지 100mg/L, 더욱 바람직하게 5 내지 50mg/L, 더더욱 바람직하게는 10 내지 25mg/L, 가장 바람직하게는 25mg/L의 농도로 포함될 수 있다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 재조합 미생물, 바람직하게 재조합 코리넨박테리움 글루타믹쿰의 성장이 가능한 조건에서 특별한 제한 없이 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 유가식 발효 공정으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명에서 사용되는 용어, "유가식 발효"란 미생물의 배양방법 중 액체배양의 한 종류로서 기질의 공급방식에 따라 분류되는 유가식 배양방법이다. 구체적으로, 배지를 간헐적으로 공급하는 배양법으로써 배양액 중의 기질 농도를 임의로 제어할 수 있다. 기질은 적당한 속도로 첨가되며 유출이 없기 때문에 공급되는 기질의 양과 미생물에 의한 소비량 사이에 균형을 유지함으로써 기질을 자유롭게 제어할 수 있다. 본 발명에서, 상기 발효 공정은 30℃, 250 ~ 600rpm에서 수행되었고, 배양 종료시까지 pH 7.0이 유지되도록 하였으며, 공기 유입 속도와 최소 용존 산소는 각각 2vvm과 20% 공기 포화도로 유지하고 공기포화도 수준이 70%에 도달했을 때 배지가 공급되도록 하는 방법으로 수행되었으나, 구체적인 공정이 상기 조건으로 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III)의 생산방법을 제공한다.
- [0099] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및
- [0100] (b) 상기 생성된 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.
- [0101] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산방법을 제공한다.
- [0102] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 빌리버딘을 생성시키는 단계; 및
- [0103] (b) 상기 생성된 빌리버딘을 추출 및 수득하는 단계.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 헴을 포함한 세포 내 포르피린의 추출은 각각 아세톤-산 처리 방법을 통해 수행될 수 있고, 바람직하게 상기 아세톤-산 처리 방법의 산은 염화수소 (HCl)일 수 있으며, 더욱 바람직하게 아세톤-산 처리방법은 99% 아세톤과 1.6M 염화수소 (HCl) 혼합물이 95 : 5 비율로 혼합된 혼합물일 수 있다.

[0106] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0108] [실시예]

[0109] 실시예 1. *AlaS*, *DtxR*, *HemE*, *HemY*, *HemH*, *HemQ*, *HrtBA*, *HmuO*, *CcsA* 유전자의 확보

[0110] 본 발명의 실시예에서, *AlaS* 유전자는 로도박터 캡슐라투스 (*Rhodobacter capsulatus*)의 genomic DNA에서 확보하였고, *DtxR*, *HemE*, *HemY*, *HemH*, *HemQ*, *HrtB*, *HrtA*, *HmuO* 및 *CcsA* 유전자는 모두 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)의 genomic DNA로부터 확보하였다. 또한, *lacI*에 의해 발현이 조절되고 고발현 *tac* 프로모터를 가지는 pMT-*tac* 또는 pEKEx2 벡터로 상기 각 유전자들을 클로닝하기 위하여, 벡터의 해당 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 각각 디자인하였으며, 합성된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 상기 각 유전자에 특이적으로 합성된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0111]

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호
<i>alaS_F</i>	ATAGTCGACAAGGAGATATAGATGGACTACAATCTCGCGC	17
<i>alaS_R</i>	ATAGGATCCTCAGGCAGAGGCC	18
<i>dtxR_F</i>	ATAGGATCCAAGGAGATATAGATGAAGGATCTGG	19
<i>dtxR_R</i>	ATAGAGCTCTTAGCCCTCAACCTTTTCTACG	20
<i>hemE_F</i>	AAAAGGTTGAGGGCTAAGAGCTAAGGAGATATAGATGTGGCTTCTTTTCTAAATTGGGA	21
<i>hemE_R</i>	CGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAAGAATGAATGATGGAGACGGCT	22
<i>hemY_F</i>	ATAGGATCCATGCGTTTTGCCATCATCG	23
<i>hemY_R</i>	ATAGGTACCTTATCCCAGCAACCTGTGTAC	24
<i>hemY_F2</i>	TCACACAGGAGATATCATATCGATGCGTTTTGCCATCATCG	25
<i>hemY_R2</i>	ATTTCATGTATATCTCCTTATCGTTATCCCAGCAACCTGTGTAC	26
<i>hemH_F</i>	CCCATCGATAAGGAGATATACATGAATGAACGCACATCGGATGC	27
<i>hemH_R</i>	AAAGGATCCCTAGTTGGCAGCTGGCGC	28
<i>hemQ_F</i>	CACGGATCCATGAGCGAGCTCGATATTAACAGC	29
<i>hemQ_R</i>	CCAGCGGCGCTTAAGGAAGAACCTTAATCAGATCTGCAATG	30
<i>hrtB_F</i>	TCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGTTTCAAGGACTAAAAGAAC	31
<i>hrtA_R</i>	GCCAAAACAGGCGGCCGTACAGGGTGTGGGGTGTGA	32
<i>ccsA_F</i>	TCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGTTGCCCGTAAACCAACG	33
<i>ccsA_R</i>	GCCAAAACAGGCGGCCGCTTAGTTCAGTCCGGCGTA	34
<i>cmR_F</i>	CACCCACACCTGTAGCGGCCGCTGTTTGGCGG	35
<i>cmR_R</i>	ACTAGGAGAAGTTAATAAATACAATTACGCCCGCCCTGC	36
<i>hmuO_F</i>	GTTCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGACAAGCATTATTGCAAGCAACA	37
<i>hmuO_R</i>	CCGCCAAAACAGGCGGCCGCTTAAGCAAGAGCCTGAAAACTTGC	38

[0113] PCR 수행 결과, 1230bp의 *AlaS* 유전자, 687bp의 *DtxR* 유전자, 1125bp의 *HemE* 유전자, 1347bp의 *HemY* 유전자, 1113bp의 *HemH* 유전자, 699bp의 *HemQ* 유전자, 1680bp의 *HrtBA* 유전자, 648bp의 *HmuO* 및 1026bp의 *CcsA* 유전자를 각각 확보하였다. 상기 각 유전자들이 암호화하는 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 3 내지 12로 나타내었다.

[0115] 실시예 2. 확보된 유전자 및 *HemA*, *HemL*을 각각 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물 제작

[0116] 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 확보된 유전자인 *AlaS*, *DtxR*, *HemE*, *HemY*, *HemH*, *HemQ*, *HrtBA*, *HmuO* 및 *CcsA*에 더하여 *HemA* 및 *HemL* 유전자를 단일 또는 조합으로 포함하는 재조합 벡터를 제조하고, 상기 벡터를 도입한 재조합 미생물을 제작하고자 하였다.

[0117] 상기 각 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 구축하기 위한 목표 유전자, 벡터, 프라이머, 제한효소 부위 및 클로

닝 방법은 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 2

타겟 벡터	도입 유전자	엑셉터 벡터	프라이머	제한효소	클로닝 방법
pX2-S	<i>alaS</i>	pEKEx2	<i>alaS_F</i>	<i>SalI</i>	T4 DNA Ligation
pX2-ALS		pX2-AL	<i>alaS_R</i>	<i>BamHI</i>	
pX2-ALSDt	<i>dtxR</i>	pX2-ALS	<i>dtxR_F</i>	<i>BamHI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>dtxR_R</i>	<i>SacI</i>	
pX2-ALSDtE	<i>hemE</i>	pX2-ALSDt	<i>hemE_F</i>	<i>SacI</i>	Gibson assembly
			<i>hemE_FR</i>		
pMTZ-Y	<i>hemY</i>	pMTZ	<i>hemY_F</i>	<i>BamHI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>hemY_R</i>	<i>KpnI</i>	
pMTZ-H	<i>hemH</i>	pMTZ	<i>hemH_F</i>	<i>ClaI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>hemH_R</i>	<i>BamHI</i>	
pMTZ-Q	<i>hemQ</i>	pMTZ and	<i>hemQ_F</i>	<i>BamHI</i>	T4 DNA Ligation
pMTZ-HQ		pMTZ-HQ	<i>hemQ_R</i>	<i>NotI</i>	
pMTZ-YHQ	<i>hemY</i>	pMTZ-HQ	<i>hemY_F2</i>	<i>ClaI</i>	Gibson assembly
			<i>hemY_R2</i>		
pMTC-YHQ	<i>CmR</i>	pMTZ-YHQ	<i>cmR_F</i>	<i>NotI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>cmR_R</i>	<i>SnaBI</i>	
pMTZ-YHQBA	<i>hrtBA</i>	pMTZ-YHQ	<i>hrtB_F</i>	<i>NotI</i>	Gibson assembly
			<i>hrtB_R</i>		
pMTZ-YHQcA	<i>ccsA</i>	pMTZ-YHQ	<i>ccsA_F</i>	<i>NotI</i>	Gibson assembly
			<i>ccsA_R</i>		
pMTC-YHQBA	<i>CmR</i>	pMTZ-YHQBA	<i>cmR_F</i>	<i>NotI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>cmR_R</i>	<i>SnaBI</i>	
pMTC-YHQO	<i>hmuO</i>	pMTC-YHQ	<i>hmuO_F</i>	<i>NotI</i>	T4 DNA Ligation
			<i>hmuO_R</i>	<i>SnaBI</i>	
pMTC-HrtBA	<i>hrtBA</i>	pMTC	<i>hrtB_F</i>		Gibson assembly
			<i>hrtA_R</i>		
pJYS2_empty	pJYS2 fragment 1		<i>JYS2_F</i>		Gibson assembly
			<i>JYS2_R</i>		
	pJYS2 fragment 2		<i>JYS2_F2</i>		
			<i>JYS2_R2</i>		
pJYS2_hrrS	crRNA	pJYS2_empty	<i>hrrS_F</i>	<i>BamHI</i>	Gibson assembly
	Of <i>hrrS</i>		<i>hrrS_R</i>		
pJYS2_htaA	crRNA	pJYS2_empty	<i>htaA_F</i>	<i>BamHI</i>	Gibson assembly
	Of <i>htaA</i>		<i>htaA_R</i>		
pJYS2_hmuT	crRNA	pJYS2_empty	<i>hmuT_F</i>	<i>BamHI</i>	Gibson assembly
	Of <i>hmuT</i>		<i>hmuT_R</i>		
pJYS2_hmuO	crRNA	pJYS2_empty	<i>hmuO_F</i>	<i>BamHI</i>	Gibson assembly
	Of <i>hmuO</i>		<i>hmuO_R</i>		
pJYS2_ldh	crRNA_	pJYS2_empty	<i>ldh_F</i>		Gibson assembly
	<i>ldh</i>		<i>ldh_R</i>		

상기 유전자 클로닝에서, 대장균의 배양은 5g/L 효모 추출물, 10g/L 트립톤 및 10g/L NaCl로 구성된 LB 배지를 사용하였다. 또한, 코리네박테리움 균주의 유전자 클로닝을 위한 배양은 3.7g/L BHI 배지, 9.1g/L 솔비톨 및 20g/L 글루코오스로 구성된 BHISG 배지에서 수행하였다. T4 DNA 라이게이션 (ligation)을 위해서는 적절한 제한 효소 (New England Biolab)를 이용하여 삽입 DNA와 벡터 DNA를 절단한 다음, 혼합물 형태에서 T4 DNA ligase (Enzymomics)로 연결하였다. Gibson assembly는 삽입 DNA를 DpnI로 처리하고 벡터 DNA는 적절한 제한효소를 이용하여 절단한 후 혼합물 형태에서 Gibson assembly 키트 (New England Biolab)를 이용해 연결하였다. 재조합 벡터를 구축하기 위한 모든 실험은 제조업체의 지침에 따라 수행되었으며, 직접 제작하거나 공지된 본 실시예에

서 사용된 모든 재조합 벡터를 하기 표 3에 정리하여 나타내었다. 이후 상기에서 구축된 재조합 벡터를 대장균 또는 코리네박테리움 글루타미쿰으로 도입하여 균주를 형질전환시켰으며, 이를 통해 제조된 모든 재조합 미생물을 하기 표 4에 나타내었다.

표 3

재조합 벡터	특성	참조
pEKEx2	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> 셔틀 벡터 (shuttle vector), P _{tac} , lacI, Kan ^R , pBL1 ori	(Ko et al., 2018)
pX2-AL	<i>Salmonella typhimurium</i> 유래 <i>hemA</i> ^M 유전자 및 <i>E. coli</i> 유래 <i>hemL</i> 유전자 전달용 pEKEx2	(Seok et al., 2019)
pX2-S	<i>Rhodobacter capsulatus</i> 유래 <i>alaS</i> 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALS	<i>hemA</i> ^M , <i>hemL</i> 및 <i>alaS</i> 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALSDt	<i>hemA</i> ^M , <i>hemL</i> , <i>alaS</i> 및 <i>dtxR</i> 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALSDtE	<i>hemA</i> ^M , <i>hemL</i> , <i>alaS</i> , <i>dtxR</i> 및 <i>hemE</i> 유전자 전달용 pEKEx2	-
pMTZ	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> 셔틀 벡터, P _{tac} , Amp ^R , Zeo ^R , pCG1 ori	(Seok et al., 2019)
pMTZ-Y	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-H	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemH</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-Q	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemQ</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-HQ	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemH</i> 및 <i>hemQ</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQ	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> , <i>hemH</i> 및 <i>hemQ</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQBA	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> , <i>hemH</i> , <i>hemQ</i> , <i>hrtB</i> 및 <i>hrtA</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQcA	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> , <i>hemH</i> , <i>hemQ</i> 및 <i>ccsA</i> 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTC	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> 셔틀 벡터, P _{tac} , Amp ^R , Cm ^R , pCG1 ori	-
pMTC-YHQBA	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> , <i>hemH</i> , <i>hemQ</i> , <i>hrtB</i> 및 <i>hrtA</i> 유전자 전달용 pMTC	-
pMTC-YHQO	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hemY</i> , <i>hemH</i> , <i>hemQ</i> 및 <i>hmuO</i> 유전자 전달용 pMTC	-
pMTC-HrtBA	<i>C. glutamicum</i> 유래 <i>hrtB</i> 및 <i>hrtA</i> 유전자 전달용 pMTC	-
pJYS1Peftu	pBL1ts oriVC.glu. Knr pSC101 oriVE. coli PlacM-FnCpf1 Peftu-RecT	Addgene: 85546
pJYS2_crtYf	rep oriVC.glu. Spr pMB1 oriVE. coli Pj23119-crRNA targeting crtYf This	Addgene:85544
pJYS2_empty	pJYS2_crtYf deleting the crRNA of the <i>crtYf</i> gene for pJYS2 derivatives	-
pJYS2_hrrS	<i>hrrS</i> 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_htaA	<i>htaA</i> 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_hmuT	<i>hmuT</i> 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_hmuO	<i>hmuO</i> 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_ldh	<i>ldh</i> 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-

표 4

재조합 미생물	특성	참조
코리네박테리움 유래		
ATCC 13032	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1445
ATCC 13826	L-glutamate 생산 균주	KCTC 3017
ATCC 13059	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1447
ATCC 14067	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1738
13032 AL	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032, pX2 <i>hemAL</i>	-
13826 AL	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13826, pX2 <i>hemAL</i>	(Ko et al., 2018)
13059 AL	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13059, pX2 <i>hemAL</i>	-

14067 AL (AL)	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2 <i>hemAL</i>	-
S	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-S	-
ALS	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-ALS	-
ALSdt	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-ALSdt	-
ALSdtE	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-ALSdtE	-
ALS-Y	pMTZ-Y가 도입된 ALS	-
ALS-H	pMTZ-H가 도입된 ALS	-
ALS-Q	pMTZ-Q가 도입된 ALS	-
ALS-HQ	pMTZ-HQ가 도입된 ALS	-
ALS-YHQ	pMTZ-YHQ가 도입된 ALS	-
ALSdtE	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-ALSdt	-
ALSdt-Y	pMTZ-Y가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-H	pMTZ-H가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-Q	pMTZ-Q가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-HQ	pMTZ-HQ가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-YHQ	pMTZ-YHQ가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-YHQBA	pMTZ-YHQBA가 도입된 ALSdt	-
ALSdt-YHQcA	pMTZ-YHQcA가 도입된 ALSdt	-
ALSdtE	<i>C. glutamicum</i> ATCC 14067, pX2-ALSdtE	-
ALSdtE-YHQBA	pMTZ-YHQBA가 도입된 ALSdtE	-
ALSdtE-YHQBA2	pMTC-YHQBA가 도입된 ALSdtE	-
ALSdtE-YHQO	pMTC-YHQO가 도입된 ALSdtE	-
ALSdtE-BA	pMTC-HrtBA가 도입된 ALSdtE	-
ΔS	ATCC14067의 <i>hrrS</i> 녹아웃 (knockout) 변이체	-
ΔSA	ΔS의 <i>htaA</i> 녹아웃 변이체	-
ΔSAT	ΔSA의 <i>hmuT</i> 녹아웃 변이체	-
ΔSATO	ΔSAT의 <i>hmuO</i> 녹아웃 변이체	-
ΔS::ALSdt-YHQBA	pX2-ALSdt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔS	-
ΔSA::ALSdt-YHQBA	pX2-ALSdt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSA	-
ΔSAT::ALSdt-YHQBA	pX2-ALSdt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA	pX2-ALSdtE 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA(c)	pX2-ALSdtE 및 pMTC-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSATO::ALSdtE-YHQBA	pX2-ALSdtE 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSATO	-
ΔLdh	ATCC14067의 <i>ldh</i> 녹아웃 변이체	-
ΔLdh::ALSdtE	pX2-ALSdtE 및 pMTC가 도입된 ΔLdh	-
ΔLdh::ALSdtE-BA	pX2-ALSdtE 및 pMTC-HrtBA가 도입된 ΔLdh	-

[0125] 실시예 3. CRISPR 기술을 이용한 재조합 미생물의 세포벽 단백질 및 헴 분해 단백질 발현 억제

[0126] 본 발명자들은 CRISPR 기술을 이용하여 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 미생물의 세포벽 단백질 및 헴 분해 단백질의 발현을 억제시키고자 하였다.

[0127] 이를 위해, 표적 유전자의 crRNA-Spacer 서열을 합성하였으며, ssODNs (single-stranded oligodeoxynucleotides) 합성을 위한 프라이머 정보는 상기 표 1에 나타내었다. 또한 CRISPR용 재조합 벡터를 구축하기 위한 목표 유전자 Spacer 서열, 벡터, 프라이머, 제한 효소 부위 및 클로닝 방법은 상기 표 2에서 확인할 수 있다. CRISPR 시스템을 도입하기 위한 pJYS1_Peftu 및 pJYS2_crtYf 벡터는 Addgene (미국)에서 구입하였고, CRISPR용 재조합 벡터의 구축 전에 상기 pJYS2_crtYf 벡터에서 crtYf 유전자의 Spacer 서열을 제거하였다. 구체적으로는 crtYf 유전자의 crRNA-Spacer 서열을 제외한 벡터 서열을 두개의 PCR 단편으로 확보한 후 Gibson assembly를 통해 연결하여 pJYS2_empty 벡터를 생성하였다. 상기 방법으로 구축된 모든 재조합 벡터는 상기 표 3에 나타내었다.

[0128] 한편, HrrS, HtaA, HmuT, HmuO 및 Ldh 유전자의 crRNA-Spacer 서열 및 PAM 부위는 CRISPR RGEN tool Cas-Designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)를 이용해 설계하였으며, 사용된 CRISPR 기술용 프라이머 정보를 하기 표 5에 나타내었다. 또한 HrrS, HtaA, HmuT, Ldh 유전자가 암호화하는 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 13 내지 16으로 나타내었다.

표 5

[0129]

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호
crRNA		
hrrS_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATACAGCCTCGCTG	39
hrrS_R	TTTATTTAAATGGATCCCCACAACCAGCAGCGAGGCTGTATCTACAA	40
htaA_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGGCAATCGTTCC	41
htaA_R	TTTATTTAAATGGATCGATGTAATTGCGGAACGATTGCCATCTACAAC	42
hmuT_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGACGCACCCTTA	43
hmuT_R	TTTATTTAAATGGATCGACTACGGATGTAAGGGTGCGTCATCTACAAC	44
hmuO_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATTGAATGATCTGC	45
hmuO_R	TTTATTTAAATGGATCCTTCCCGGTGAGCAGATCATTCAATCTACAAC	46
ldh_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGGCTGCGCCGGC	47
ldh_R	TTTATTTAAATGGATCTTGTCAATTGTGCGGCGCAGCCATCTACAAC	48
Lagging strand		
Lagging_hrrS	CGGAAGCAGCCAGCCCCACAACCAGCAGCTAGGCTGTCAAAATGTGGATACTGTTGCGA	49
Lagging_htaA	GCCACGCCGGTTTGGATGTAATTGCGGAATTATTGCCTAAATCCCCAGTTCAGGGAGCC	50
Lagging_hmuT	AGGCCAAGCTAGCGGCGAGGACTACGGATTAAAGGGTGCGTCGAAAAGCGTTATTTCATG	51
Lagging_hmuO	ATGCCTGCGCATCGAGCTTCCCGGTGAGCTAATCATTCTATAAACGTTGAGTGCTCGGCC	52
Lagging_ldh1	ACGCAGCCATGGTTGTCATTTGTGCCGGCTAAGCCCCAAGCCAGGCGAGACCCGCCTC	53
Lagging_ldh2	ATGGTTGTCATTTGTGCCGGCGCAGCCAGTAGCCAGGCGAGACCCGCCTCCAGCTGGT	54
Lagging_ldh3	ACGCAGCCATGGTTGTCATATGAGCAGGATAAGCCCCAAGCCAGGCGAGACCCGCCTC	55
Sequencing		
hrrS_seq1	ATGCAGTCAAGCCTAGATCG	56
hrrS_seq2	CGTTGACGTTCCGCAGCAAT	57
htaA_seq1	ATGAACTTGCACCTCGTATGCGGA	58
htaA_seq2	GCAACCAAATCCACAACCTAGCTGCG	59
hmuT_seq1	CCCGCTAACCAAAACAGCCAGTTCC	60
hmuT_seq2	CCATCAGCATCCGTCAAAGACACAG	61
hmuO_seq1	ATGACAAGCATTATTGCAAGCAACA	62
hmuO_seq2	GGACATAGTGATGAGCAACCAACG	63
pJYS2_seq_F	CACGCTGTCGGCAGAGAA	64
pJYS2_seq_R	TCACACCGCATATGAAGCTTAAGAGTTTGTAGAAACG	65
pJYS1_seq_F	GAGATCCTGTCTCCGTGTG	66
pJYS1_seq_R	GGTCCTTCTTGATCTGCTCG	67
ldhseq1	GCAACAATGACGGCGAGA	68
ldhseq2	GGAGCTTTCGCAGGTGAA	69
etc.		
JYS2_F	TAATGGATCCATTTAAATAAAACGAAAGGC	70
JYS2_R	GGCAAATAGGCAGGATTGAT	71
JYS2_F2	TTATTTAAATGGATCCATTATACCTAGGACTG	72
JYS2_R2	ATCAATCCTGCCTATTGCG	73

[0131]

CRISPR 기술을 이용한 유전체 편집은 공지된 방법을 참고하여 하기 과정에 따라 수행하였다. 구체적으로, 극저온 (-80℃)에서 보관한 Competent 상태의 코리네박테리움 균주를 10분 동안 천천히 해동시켰다. 이어서 pJYS1_eftu (1μg 이상), pJYS2_목표 유전자 (1μg 이상) 및 ssODNs (9μg 이상)를 80μl의 Competent 세포에 주입하였다. 이후 20분 동안 얼음에서 대기한 다음, 세포를 미리 냉각된 0.2cm 큐벳 (Bio-Rad, USA)으로 옮기고, 2.5kV의 전압과 200Ω의 저항값으로 전기천공법을 수행하였다. 이후 세포가 들어있는 큐벳에 솔비톨과 글루코오스가 함유된 BHI (Brain-heart infusion) 배지 (BHISG) 1ml를 즉시 넣은 후 46℃에서 6분 동안 열 충격 처리를 하였다. 이어서 30℃에서 2-3시간 동안 세포를 회복시킨 후, 카나마이신 (25mg/L)과 스펙티노마이신 (200mg/L)이 함유된 BHISG 배지 한천 플레이트에 접종하고 30℃에서 2-3일 동안 배양하였다.

[0132]

이후 재조합 미생물의 유전자 편집 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 colony PCR을 수행하였다. 이를 위해, 한 개의 콜로니를 확보한 후 상기 표 5에 기재된 시퀀싱 (Sequencing) 프라이머를 이용해 PCR을 수행하여 게놈 상

의 유전자를 확보하였다. PCR 산물의 염기서열은 코스모젠텍이나 마크로젠사에 분석을 의뢰하여 유전자 편집 여부를 확인하였으며, 그 결과 각 재조합 미생물에서 목표 유전자의 편집 효율을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

표적 유전자	표적 균주	crRNA	Lagging strand		Colony Forming Unit	편집효율
			크기 (bp)	DNA (ug)		
<i>hrrS</i>	WT	crRNA_hrrS	59	9.05	2.28×10^3	8/8
<i>htaA</i>	WT	crRNA_htaA	59	9.05	2.31×10^3	4/4
<i>htaA</i>	S	crRNA_htaA	59	9.05	2.25×10^2	2/2
<i>hmuT</i>	WT	crRNA_hmuT	59	12.6	6.09×10^3	2/2
<i>hmuT</i>	SA	crRNA_hmuT	59	12.6	1.15×10^4	2/2
<i>hmuO</i>	SAT	crRNA_hmuO	59	9.05	4.75×10^2	0/8
<i>hmuO</i>	SAT	crRNA_hmuO	59	18.13	2.75×10^2	2/5
<i>hmuO</i>	SAT	crRNA_hmuO	59	45.33	2.0×10^2	2/5
<i>hmuO</i>	SAT	crRNA_hmuO	59	90.66	1.25×10^2	3/3
<i>ldh</i>	WT	crRNA_ldh1	1	59	1.30×10^2	0/20
<i>ldh</i>	WT	crRNA_ldh2	2	59	6.25×10	0/20
<i>ldh</i>	WT	crRNA_ldh3	3	59	3.75×10	2/3

이어서 CRISPR용 재조합 벡터가 제거된 균주를 얻기 위해 플라스미드 제거 (Curing)를 하기 3단계로 수행하였다. 1단계, 콜로니를 5ml의 BHISG가 들어있는 50ml 튜브에 접종하고 37℃에서 24시간 이상 배양하였다. 2단계, 상기 세포 배양액 일부를 BHISG 배지 한천 플레이트에 스트리킹하고 37℃에서 24시간 이상 배양하였다. 3단계, 상기 1단계를 반복 수행할 경우 재조합 벡터가 모두 완전히 제거되었다.

실시에 4. 재조합 코리네박테리움의 헵, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산을 위한 배양 및 분석방법

4-1. 배지 및 배양방법

목적 산물의 생산을 위한 본 배양은 42g/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), 40g/L 포도당, 20g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5g/L 요소, 2g/L 효모 추출물, 1g/L KH_2PO_4 , 1g/L K_2HPO_4 , 250mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg/L CaCl_2 , 1mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.31mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 200 $\mu\text{g/L}$ 비오틴, 100 $\mu\text{g/L}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 20 $\mu\text{g/L}$ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 이 포함된 변형된 CGXII 배지 (mCGXII 배지)에서 수행되었다. 단, 빌리버딘 생산을 위한 본 배양 시에는 나머지 조성은 동일하되 효모 추출물을 첨가하지 않은 CGXII 배지를 이용하였다.

또한, 질소 공급원의 최적화를 위해 하기와 같은 배지들을 테스트하였다. mCGXII-Y10 배지는 mCGXII 배지에 8g/L 효모 추출물을 첨가하여 제조하였다. mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca는 각각 mCGXII-Y10 배지에 10g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , 트립톤 및 카제인 가수분해물을 첨가하여 제조하였다. 유가식 발효를 위해, mCGXII 배지 및 mCGXII-Tr 배지에서는 42g/L MOPS를 제외하였다. 카나마이신 (25mg/L), 암피실린 (대장균의 경우 50mg/L), 클로람페니콜 (대장균의 경우 33mg/L, 코리네박테리움 글루타믹쿰의 경우 5mg/L), 스펙티노마이신 (대장균의 경우 50mg/L, 코리네박테리움 글루타믹쿰의 경우 200mg/L) 및/또는 제오신 (25mg/L)을 경우에 따라 배지에 첨가하였다. 또한 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드 (Isopropyl β -D-1-

thiogalactopyranoside, IPTG) (1mM) 및 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20mg/L)를 플라스크 배양 8시간 및 12시간에 각각 첨가하고 유가식 발효를 진행하였다. 필요한 경우 10mg/L 에탐부톨 (ethambutol)을 첨가하였다. 유가식 발효를 위한 유입 용액 (Feeding solution)은 500g/L 글루코오스, 10g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10g/L 효모 추출물, 2g/L KH_2PO_4 및 2g/L K_2HPO_4 로 구성되었다. 아연-포르피린 생산을 위한 에탐부톨 농도 최적화 실험은 5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L의 에탐부톨이 첨가된 mCGXII-Tr 배지에서 수행하였다.

[0141] 플라스크 배양은 하기 과정에 따라 수행되었다. 구체적으로, 극저온에서 보관된 모든 야생형 및 재조합 코리네박테리움을 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였다. 전배양된 세포를 50mL의 mCGXII 배지 또는 질소 공급원 최적화 배지 (mCGXII-Y10, mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지)가 포함된 250mL 진탕 플라스크 (baffled flask)에 광학밀도 (Optical density, OD) 600 파장값 1의 농도로 접종하였다. 이후 30℃, 200rpm에서 48시간 동안 진탕 배양하여 본 배양을 진행하였다. 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산을 위한 배양 실험은 mCGXII-Tr 배지로 수행하였으며 이외 조건은 상기 조건과 동일하게 수행하였다.

[0142] 유가식 발효는 하기와 같이 수행되었다. 극저온에서 보관된 모든 야생형 및 재조합 코리네박테리움을 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였다. 첫 번째로 전 배양된 세포는 200mL의 BHISG 배지를 포함하는 1000mL 진탕 플라스크에 접종하여 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였고, 두 번째로 전배양된 세포는 2L mCGXII 배지 또는 mCGXII-Tr 배지를 함유하는 6L 발효기에 광학밀도 600 파장값 2의 농도로 접종하였다. 발효는 30℃, 250~600rpm 조건에서 수행되었으며, 28% NH_4OH 와 6M H_2SO_4 를 사용하여 pH 7.0 조건을 배양 종료 시까지 유지하였다. 공기 유입 속도와 최소 용존 산소는 각각 2vvm과 20% 공기 포화도로 유지되도록 하였고, 생성된 거품은 Antifoam 204 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 제거하였다. 유입 용액은 공기포화도 수준이 70%에 도달했을 때 자동 공급되었다. 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산을 위한 유가식 발효 실험은 mCGXII-Tr 배지로 수행하였으며 이외 조건은 상기 조건과 동일하게 수행하였다.

[0144] 4-2. 세포 성장 및 헴, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산 분석

[0145] 세포 성장은 UV-vis 분광 광도계 (Mecasys Co., Ltd.)를 사용하여 광학밀도 600 파장값에서 측정하였고, 글루코오스 농도는 제조사의 지침에 따라 포도당 분석 키트 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다.

[0146] 세포 내 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘 측정을 위한 전처리과정은 하기 과정에 따라 수행되었다. 구체적으로, 배양액 1mL을 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하고 상층액을 분리하여 세포만을 확보한 후 세포 펠렛에 산성 아세톤 완충액 1mL(99% 아세톤 : 1.6M HCl = 95 : 5 비율)을 첨가하여 세포 내 포르피린을 추출하였다. 이어서 상기 샘플을 약 30초 동안 볼텍싱 (Vortexing)한 다음, 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 세포 추출에서 얻은 상층액은 1:1 비율로 0.1N NaOH와 혼합하여 중화하였다. 세포 외 헴, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 측정은 세포 배양액의 상층액을 0.1N NaOH와 1:1 비율로 혼합한 후 측정하였다.

[0147] 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 정량 분석은 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템 (Waters Corporation)을 이용하여 실시하였다. 세포 내 아미노산 농도 측정을 위해 Fastprep 24 (MP biomedical, USA)를 사용한 Bead beating으로 세포 펠렛을 파쇄되었다. 상등액 및 추출된 세포 내부 샘플은 AccQ-Tag 아미노산 분석 키트 (Waters)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 유도체화 한 후 HPLC 시스템으로 분석하였다.

[0149] 4-3. mRNA 발현수준 분석

[0150] 재조합 코리네박테리움 균주의 mRNA 발현수준은 하기 과정에 따라 수행하였다. ALS, ALS-H 및 ALSdt-H 재조합 코리네박테리움의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위해 상기 실시예 4의 플라스크 배양과 동일한 조건으로 실험을 진행하였고, 16시간 배양 후 샘플을 회수하였다. 총 RNA는 Hybrid-R prep kit (GeneAll)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하였으며, 상기 추출된 RNA에 대하여 M-MLV 역전사 효소 (Bioneer)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다. 상기 합성된 cDNA에 대하여 제조업체의 지침에 따라 HiPi Real-Time PCR 2x

Master Mix (SYBR green)를 이용해 CFX connect Real-Time PCR (Bio-Rad) 기기를 이용하여 mRNA 수준을 측정하였으며, $\Delta \Delta C_t$ 방법으로 상대적 mRNA 수준을 분석하였다. 이때, 16S rRNA를 내부 표준 물질로 사용하였다. 본 mRNA 발현 분석에 사용된 모든 프라이머는 서열 정보는 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0151]

프라이머	Sequence (5'→3')	서열번호
RT hemA F	GGAATACGATCAGCGAGCTT	74
RT hemA R	CTCGTGGCATGGACAAATCC	75
RT hemB F	CGATGACCTGCTGATTATGG	76
RT hemB R	GCCTGAGCAACAGCCATCTG	77
RT hemC F	GATGCTGTGATGCTCGCCTA	78
RT hemC R	GCGGACGGTTTCAGTGTCTG	79
RT hemD F	CGTGAAGTTCTGGGCAACGC	80
RT hemD R	CTTCGCTTCAATGCAGATGC	81
RT hemE F	GTTGCCTGAGTACAAGAAGG	82
RT hemE R	CAACGGCACCACAATGTCAG	83
RT hemH F	CCTTGACCTGTGTGAATAC	84
RT hemH R	TTGGTTCAGGATTCCTACGC	85
RT hemL F	GCGGTTACACTCAGCGTTCC	86
RT hemL R	TAGTGTCTGAGTCTGAGCG	87
RT hemQ F	GCACAGTGTGGCAGCAACA	88
RT hemQ R	TGGGTGAAGAAGCAAGGAC	89
RT hemY F	AGGTGGAGTGTGGGTATTC	90
RT hemY R	GCGAAGACACCACAGTATCG	91
RT sdhA F	ACCACATGAACCTGGTCTCC	92
RT sdhA R	TGGTAGGTGAACGCCCTTGAC	93
RT sdhB F	GAGCTGCTTGACCACGTAAG	94
RT sdhB R	CAGGCTTATCTGGTCAGCG	95
RT sdhC F	GGTGGCTTCGTCTTGTTC	96
RT sdhC R	TCCGATCTCAGCAGGAAGT	97
RT narG F	CCAGCAGATTTTCCTTCAGG	98
RT narG R	CATACACTTCCACGAGCAG	99
RT narH F	ATAAATGGGAAGCGGTTGG	100
RT narH R	CACGGCTCGTAGTAATCATC	101
RT narK F	GGATTTGATCTCTCAGCAGG	102
RT narK R	GACCAATTTGCGGGTTCCAA	103
RT sufB F	AACTATGGTTGGCAGGACTC	104
RT sufB R	GCTGCTGAAGCATCCATTCT	105
RT sufD F	ATTTCCCTACGCCGTCTTCG	106
RT sufD R	CAGTCGAGCATCGTCCTTTG	107
RT acn F	CATGGAGAAGCTGCCGTACT	108
RT acn R	GGTGAAGTGGATTTCGATGC	109

[0153]

실시예 5. 헴 합성 경로 관련 유전자가 도입된 재조합 코리네박테리움 균주의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 수준 측정 및 분석

[0154]

본 발명자들은 본 실시예에서 확보한 재조합 코리네박테리움 균주들의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산량을 측정 및 비교 분석하기 위해, 먼저 야생형 코리네박테리움 글루타믹움 (WT), S (*alaS* 유전자 도입), AL (*hemA* 및 *hemL* 유전자 도입) 및 ALS (*hemA*, *hemL* 및 *alaS* 유전자 도입) 재조합 균주에서 헴 생산 수준을 측정하였다.

[0155]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 야생형 균주와 비교할 때 상기 3 종류의 재조합 균주에서 전구물질인 글루탐산 (Glutamate)과 글리신 (Glycine)의 소모와 함께 헴 (Heme) 생산 및 중간물질인 5-아미노레불린산 (ALA), 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산이 증가하는 것으로 나타났다. 더욱이, 그중에서도

C4 경로와 C5 경로를 통합한 ALS 재조합 균주에서 5-아미노레불린산의 생산이 현저히 증가하였으며, 헴 및 다른 전구물질들도 가장 높은 수준으로 생산이 증가하는 것을 확인하였다.

[0156] 상기 결과에 근거하여, 본 발명자들은 ALS 재조합 균주에 코프로포르피린 III 의존성 경로에 관여하는 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (HemH) 및 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (HemQ)를 각각 암호화하는 유전자 및 디프테리아 독신 리프레서 (DtxR)를 암호화하는 유전자를 단일 또는 조합하여 추가적으로 도입한 하기 재조합 균주들에서 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 수준을 측정하고자 하였다.

[0157] 먼저, ALS 재조합 균주에 *hemY*, *hemH* 및 *hemQ* 유전자를 각각 또는 조합하여 도입한 재조합 균주 (ALS-Y, ALS-H, ALS-Q, ALS-HQ 및 ALS-YHQ)에서 상기 물질들의 생산을 측정하였다. 그 결과, 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 ALS-Q 재조합 균주의 경우에만 ALS 균주 보다 약간 증가된 헴 (Heme) 생산을 나타내었을뿐, 다른 재조합 균주들에서는 헴 생산 및 전구물질인 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산이 감소하였다.

[0158] 다음으로, 상기 재조합 균주들에서 *dtxR* 유전자가 함께 도입된 균주 (ALS-dtY, ALSdt-H, ALSdt-Q, ALSdt-HQ 및 ALSdt-YHQ)의 생산능력을 분석하였다. 그 결과, 도 2b에서 볼 수 있는 바와 같이 HemY, HemH 및 HemQ가 동시에 과발현과 함께 DtxR의 과발현이 성공적으로 헴 생산을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 도 2c의 mRNA 발현 수준 측정 결과를 통해, 디프테리아 독신 리프레서가 헴 생산 과정 중 발생하는 저해 요소를 해소해주는 것을 알 수 있었다.

[0160] 실시예 6. 세포벽이 개량된 재조합 코리네박테리움 균주의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 및 외분비 수준 측정 및 분석

[0161] 본 발명자들은 상기 재조합 코리네박테리움 균주에서 헴 생산량이 현저히 증가되는 것을 확인하였는바, 헴이 세포 외부로도 높은 수준으로 분비되는지를 검증하고자 하였다. 이를 위해 하기 방법에 따라 코리네박테리움 균주에서 세포벽에 대한 헴 결합 테스트를 수행하였다.

[0162] 구체적으로, 극저온에서 보관된 각 코리네박테리움 균주를 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL BHISG 배지 또는 10mg/L의 에탐부톨이 보충된 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전 배양하였다. 이후 전 배양된 세포를 1mL의 mCGXII 배지를 포함하는 1.5mL 튜브에 광학밀도 600 파장값 5의 농도로 접종하였다. 접종 즉시 10mg/L 헤민 (hemin)을 튜브에 넣고 10초 동안 볼텍싱하여 혼합한 후 세포를 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 상등액과 세포 펠렛은 앞서 언급한 전처리 방법과 동일한 방식으로 수행한 후 HPLC로 분석하여 헤민의 소재를 확인하였다. 그 결과, 하기 표 8에서 볼 수 있는 바와 야생형 코리네박테리움 균주의 경우 세포 내에서 생성되어 외부로 분비되는 헴의 86.91%가 세포벽에 결합하는 것을 확인하였다.

[0163] 이에 본 발명자들은 도 3a에 도시된 바와 같이 코리네박테리움 균주의 세포벽 단백질과 헴의 결합을 저해하고자 하였으며, 이를 위해 상기 실시예 3에 기재된 바에 따라 ΔS (*hrrS* 유전자 녹아웃), ΔSA (*hrrS* 및 *htaA* 유전자 녹아웃), 및 ΔSAT (*hrrS*, *htaA* 및 *hmuT* 유전자 녹아웃) 재조합 균주를 제조하고, 상기 방법과 동일하게 상기 재조합 균주들에서 헴의 세포벽 결합율을 측정하였다. 그 결과, 하기 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이 ΔSAT 재조합 코리네박테리움 균주에서 헴의 세포벽 결합율이 가장 낮게 측정되었으며, 더욱이 배지에 에탐부톨을 첨가한 후 배양하였을 때 상기 결합율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

표 8

균주	DCW ($g\ l^{-1}$)	세포벽 결합 헴 ($mg\ g_{DCW}^{-1}$)	결합/비결합 비율 ^a (%)
WT	1.71	4.28 ± 0.05	86.91
ΔS	1.58	4.22 ± 0.20	83.45
ΔSA	1.51	3.93 ± 0.29	75.26
ΔSAT	1.49	3.41 ± 0.35	72.51
WT (ETB)	1.48	3.27 ± 0.12	44.89
ΔSAT (ETB)	1.45	2.70 ± 0.12	36.83

[0165] ^a 세포벽 결합/비결합 비율: [세포벽 결합 헴]/[세포벽 결합 헴 + 비결합 헴] x 100

[0167] 상기 결과에 근거하여, 본 발명자들은 상기 실시예 5에서 헴 생산을 가장 성공적으로 증가시킨 ALSdt-YHQ 재조합 균주를 기준으로 하여 헴 외분비 단백질인 HrtBA를 과발현하도록 형질전환된 ALSdt-YHQBA (ALSdt-YHQ 균주에 hrtBA 도입) 균주에서 헴의 외분비 (secreted heme) 수준을 분석하였다. 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 HrtBA의 과발현에 의해 헴의 외분비가 증가하였으며, 에탐부톨이 포함된 배지에서 배양한 경우 헴의 세포의 생산이 더욱 증가한 것으로 나타났다. 이에 더하여, 상기 ALSdt-YHQBA 재조합 균주에 세포벽 단백질 발현을 함께 저해시킨 재조합 균주 ($\Delta S::ALSdt-YHQBA$, $\Delta SA::ALSdt-YHQBA$ 및 $\Delta SAT::ALSdt-YHQBA$)의 경우 헴의 세포 외분비가 더욱 증가하였고, 역시 에탐부톨이 포함된 배지에서 그 수준이 더 증진되는 것을 확인하였다.

[0168] 한편, 특이하게도 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 헴 외분비 단백질을 과발현시킨 재조합 균주에 에탐부톨 첨가에 배양한 경우, 헴 외분비 증대와 함께 우로포르피린 III의 외분비 증대가 확인되었다. 이러한 결과를 개선하기 위해, 본 발명자들은 $\Delta SAT::ALSdt-YHQBA$ 재조합 균주에 추가로 hemE 유전자를 도입하여 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (HemE)를 과발현하는 재조합 균주 ($\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$)를 제조하였고, 상기 재조합 균주의 경우 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 에탐부톨 첨가 하에 배양 시 우로포르피리노겐 III의 외분비가 거의 증대되지 않으면서 가장 높은 헴의 세포의 생산능을 갖는 것을 확인하였다.

[0170] 실시예 7. 재조합 코리네박테리움 균주의 배양 조건 최적화

[0171] 먼저, 본 발명자들은 상기 실시예 6의 결과에서 확인된 헴의 세포의 생산능이 가장 높은 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주를 이용하여, 헴 생산을 가장 효율적으로 높일 수 있는 최적의 배지 내 질소 공급원을 테스트하고자 하였다. 이를 위해 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 mCGXII 배지에 효모 추출물을 첨가한 mCGXII-Y10 배지 및 상기 mCGXII-Y10에 각각 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , 트립톤 및 카제인 가수분해물을 첨가한 mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지를 이용하여 상기 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주와 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA2$ 균주 (클로람페니콜 항생제 저항성 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주)를 배양하였다. 그 결과, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 mCGXII-Tr 배지 조건에서 배양한 경우 상기 재조합 균주에 의한 헴 생산이 가장 높게 측정되었다. 따라서 상기 결과를 통해 트립톤이 본 발명에 따른 재조합 균주의 헴 생산능을 높일 수 있는 가장 최적의 질소원임을 알 수 있었다.

[0172] 나아가 본 발명자들은 각각 mCGXII 배지, mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지 (mCGXII + ETB), mCGXII-Tr 배지를 이용하여 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주와 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA2$ 균주를 48시간 동안 유가식 배양을 진행하면서 글루코오스 (Glucose) 소비, 균주 성장 (Cell growth), 헴 외분비 및 총 헴 생산량을 배양 시간에 따라 측정하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA2$ 균주를 mCGXII-Tr 배지에서 유가식 발효시킨 경우 각각 mCGXII 배지 및 mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지에서 유가식 발효시킨 경우 보다 더 높은 헴 생산량이 달성되었으며, 더욱이 가장 높은 헴의 세포의 생산량을 확인하였다.

[0173] 이에 더하여, 본 발명자들은 추가적으로 생성된 헴의 분해를 억제하기 위해 상기 재조합 균주에서 추가적으로 hmuO 유전자를 녹아웃시켜 HmuO 단백질의 발현이 억제된 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주를 제조하고 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주와 각각 플라스크 배양한 후 헴 생산 수준을 측정하였다. 그 결과, 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이 hmuO 유전자가 함께 녹아웃된 $\Delta SAT::ALSdtE-YHQBA$ 균주의 경우 총 헴 생산량 및 세포 성장이 모두 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 HmuO 단백질의 발현 억제는 헴 생산과 세포 성장에 부정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0175] 실시예 8. 재조합 코리네박테리움 균주의 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III 생산 측정 및 분석

[0176] 다음으로, 본 발명자들은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산능이 증대된 재조합 코리네박테리움 균주를 얻고자 하였다. 이를 위해, ALSdtE 재조합 균주 및 상기 균주에서 포르피린의 생산량을 증가시키기 위하여 L-젖산 탈수소효소 (L-lactate dehydrogenase)를 암호화하는 ldh 유전자를 녹아웃시킨 $\Delta Ldh::ALSdtE$ 균주 및 헴 외분비 단백질인 HrtBA의 발현을 증가시킨 ALSdtE-BA 균주를 mCGXY10-Tr 배지에서 각각 플라스크 배양하고 아연-코프로포르피린 III (Zn-CP III)와 아연-우로포르피린 III (Zn-UP III)의 생산 및 외분비량을 측정하였

다.

[0177] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 ALSdtE 균주를 배양한 경우 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났으며, $\Delta Ldh::ALSdtE$ 및 ALSdtE-BA 균주에서 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산과 외분비가 증가하지 않은 것을 확인하였다.

[0178] 나아가 상기 ALSdtE 균주에서 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산 및 분비를 효과적으로 높일 수 있는 에탐부톨의 최적 농도를 선정하고자 하였다. 이를 위해, mCGXII-Tr 배지에 에탐부톨을 다양한 농도 (5, 25, 50, 100mg/L)로 첨가하여 배양한 후 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III의 생산량을 측정하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 에탐부톨을 25mg/L 농도로 첨가하여 배양한 경우 가장 높은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산량을 확인하였다. 또한, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이 ALSdtE 균주를 mCGXII-Tr 배지를 이용하여 유가식 발효공정을 진행한 결과 가장 높은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산량을 달성하였다.

[0180] 실시예 9. 재조합 코리네박테리움 균주의 빌리버딘 생산 측정 및 분석

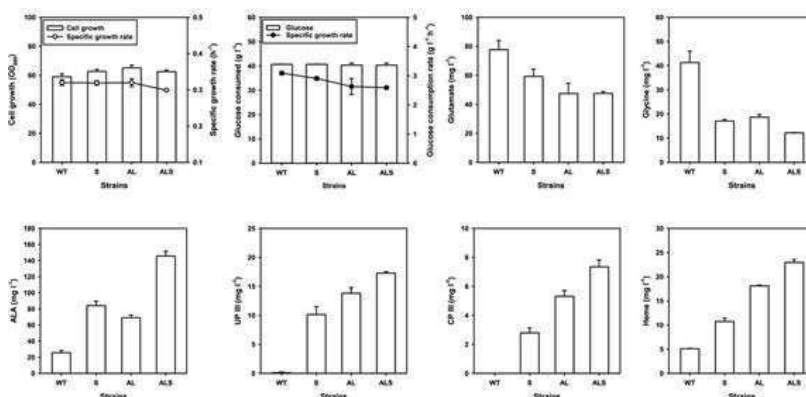
[0181] 본 발명자들은 마지막으로 재조합 코리네박테리움 균주의 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능을 증대시키고자 하였다. 이를 위해 상기 실시예 7에서 확인한 결과에 근거하여 헴의 세포외 생산능이 가장 높은 $\Delta SAT::ALSdtE$ -YHQBA 재조합 균주에서 세포벽 단백질들과 헴 외분비 단백질인 HrtBA의 발현을 증가시키지 않은 ALSdtE-YHQ 균주에 추가적으로 *hmuO* 유전자를 도입하여 헴 분해를 통한 빌리버딘 생성에 관여하는 HmuO 단백질을 과발현하는 ALSdtE-YHQO 균주를 제작하였다. 이후 ALSdtE-YHQ 및 ALSdtE-YHQO 균주를 CGXII 배지에서 배양한 후 빌리버딘 생산량을 측정하였다.

[0182] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이 ALSdtE-YHQ 균주의 경우 빌리버딘이 전혀 생성되지 않은 반면, HmuO 단백질을 과발현하는 ALSdtE-YHQO 균주에서 빌리버딘의 생산량이 현저히 증가된 것을 확인하였다.

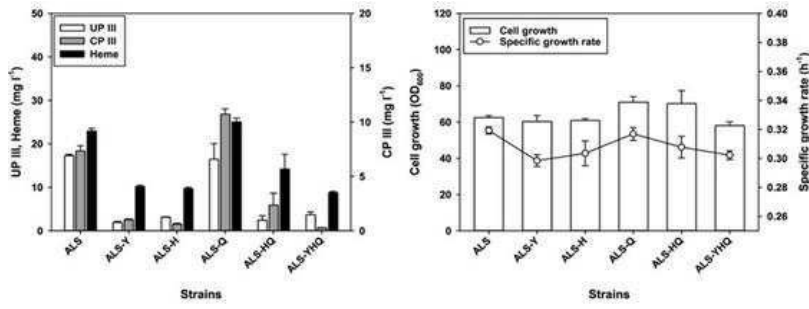
[0184] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

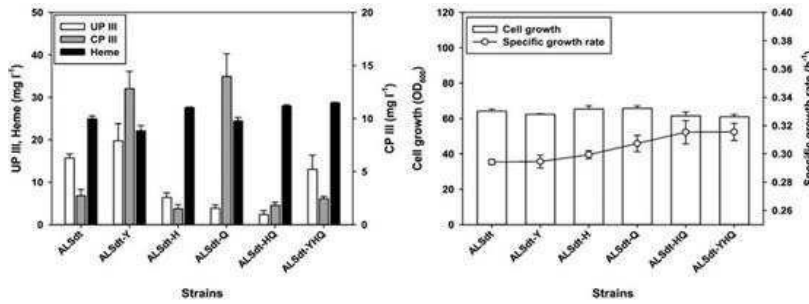
도면1



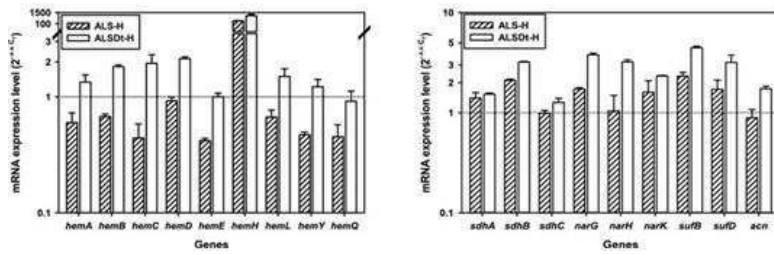
도면2a



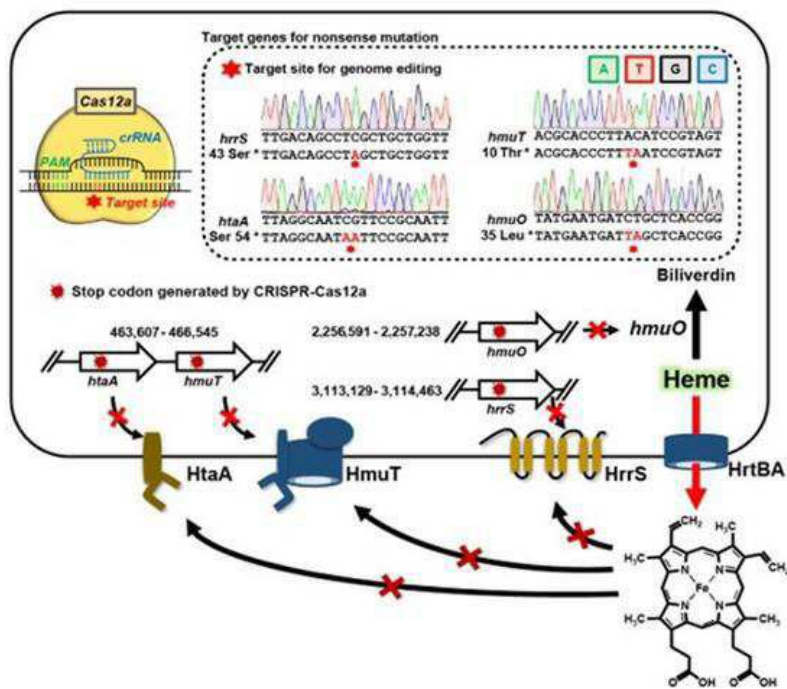
도면2b



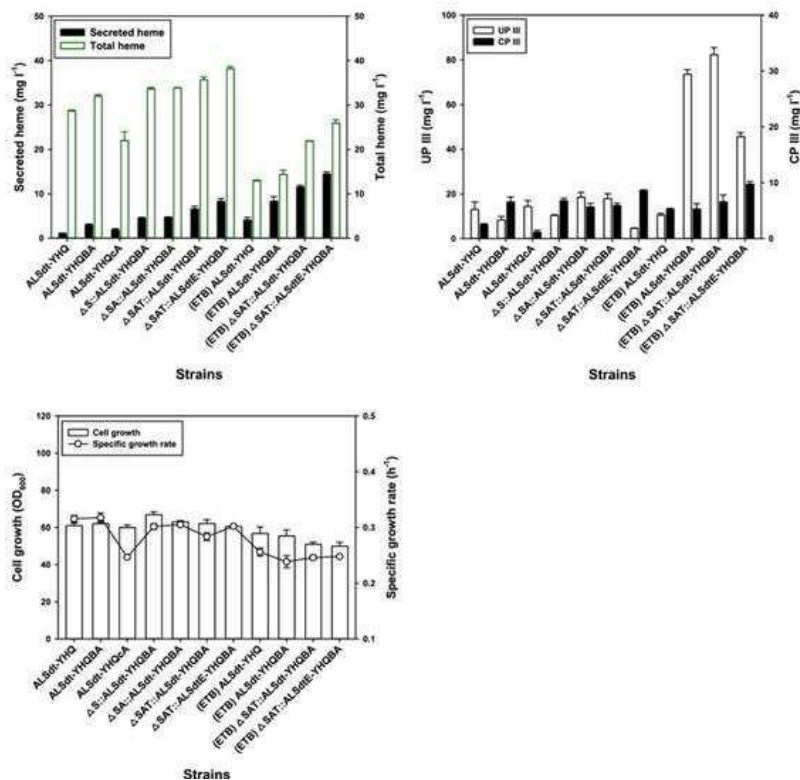
도면2c



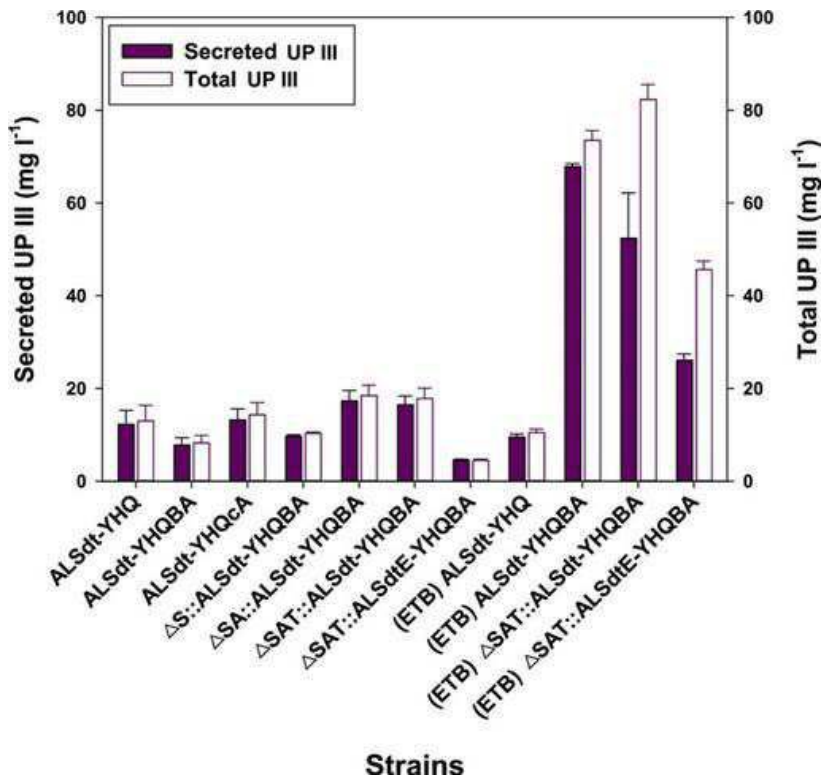
도면3a



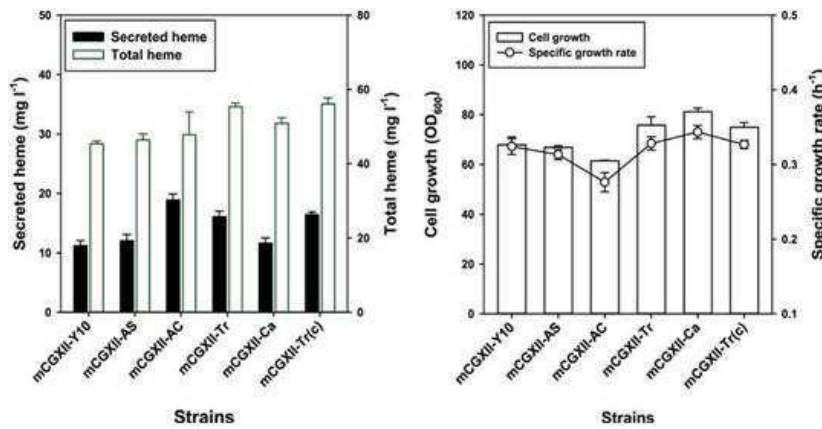
도면 3b



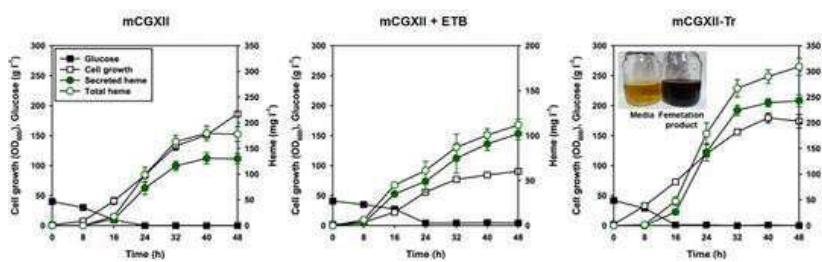
도면4



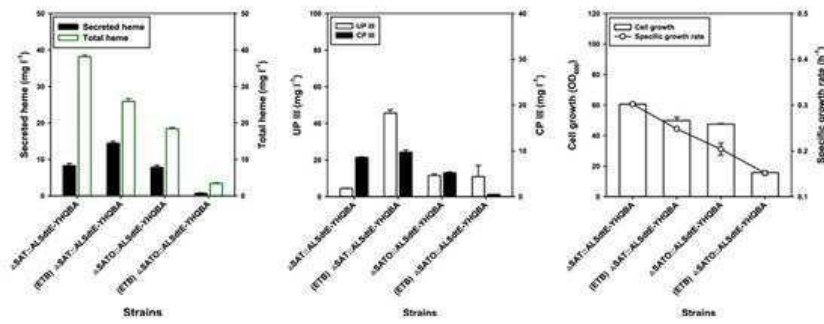
도면5



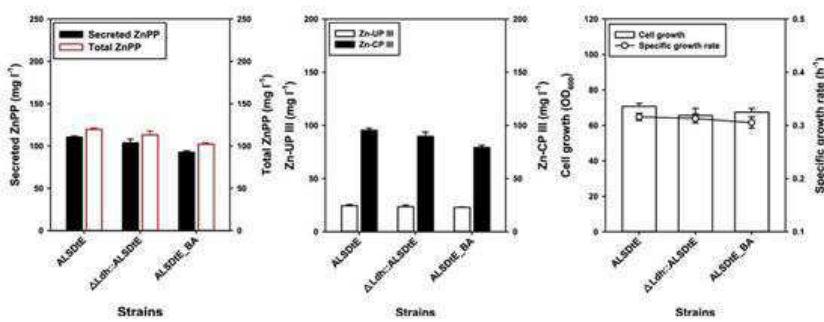
도면6



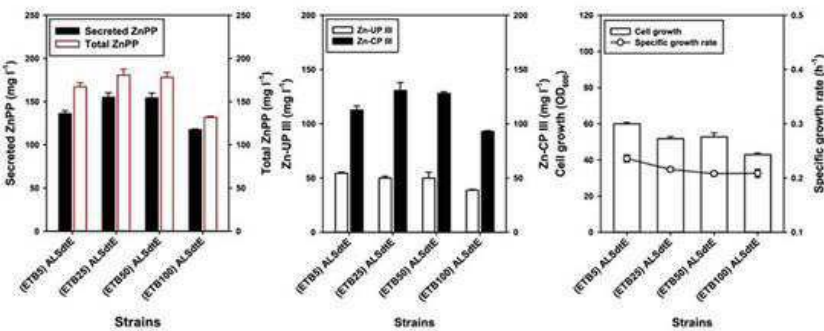
도면7



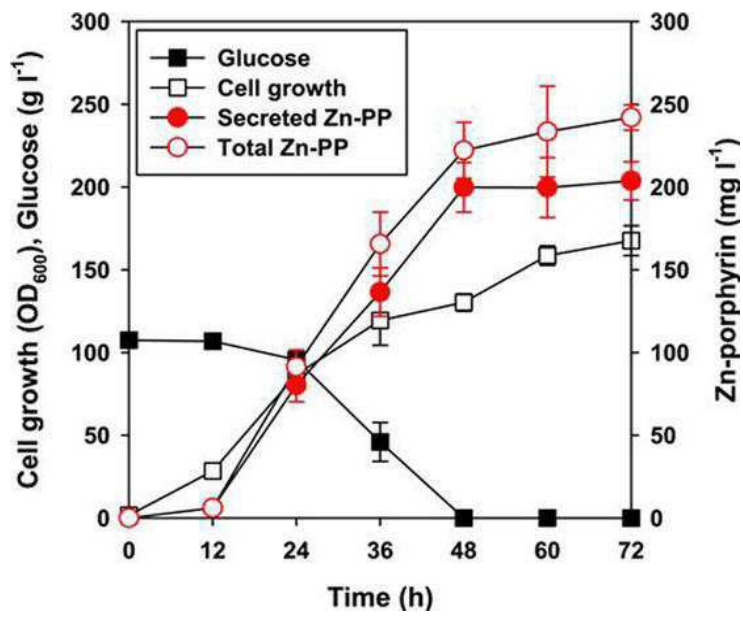
도면8



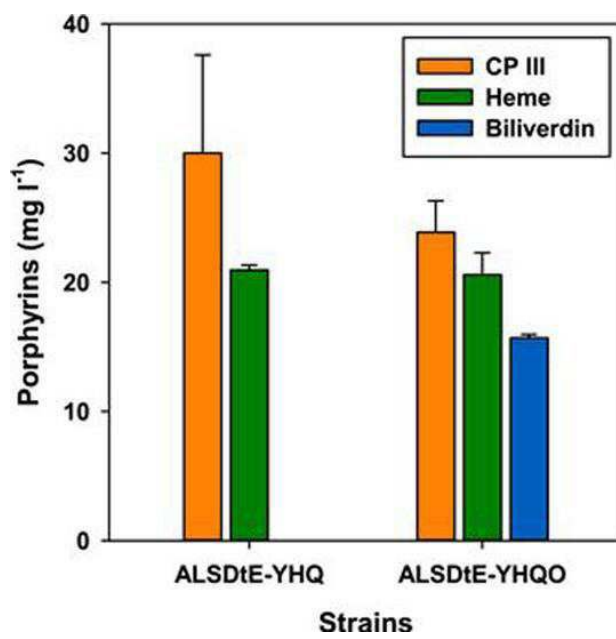
도면9



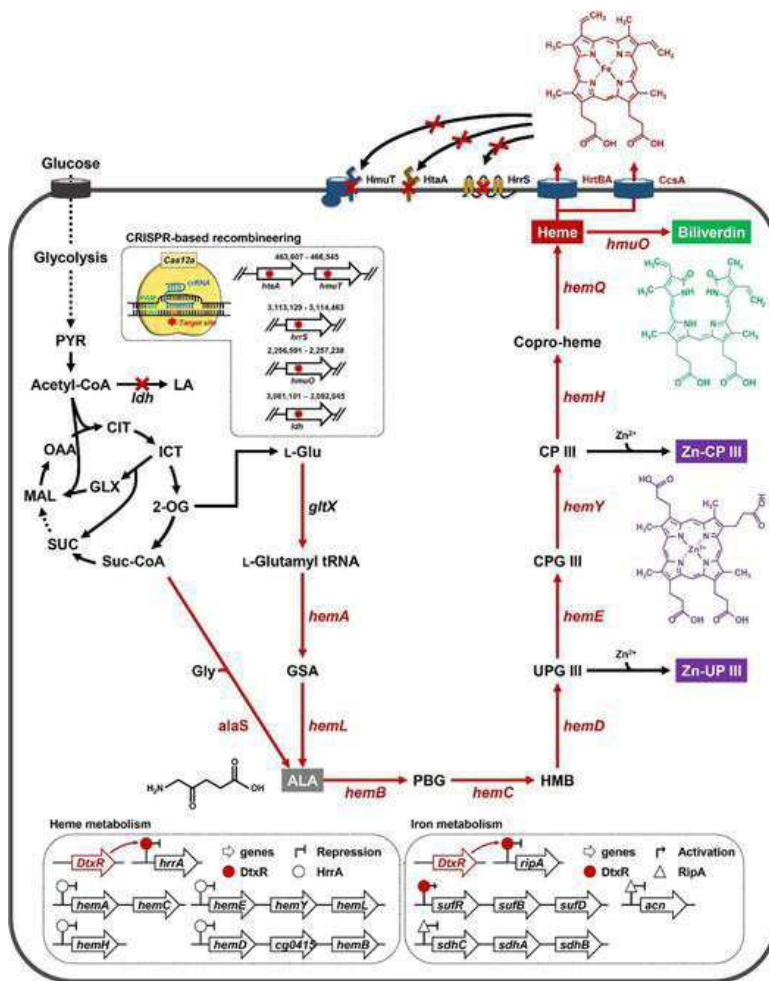
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Recombinant microorganism having enhanced productivity of heme, coproporphyrin III, uroporphyrin III, Zn-coproporphyrin III, Zn-uroporphyrin III and biliverdin, and method of producing heme, coproporphyrin III, uroporphyrin III, Zn-coproporphyrin III, Zn-uroporphyrin III and biliverdin using the same
- <130> PN2407-332
- <150> KR 10-2021-0018908
- <151> 2021-02-10
- <160> 109
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 420
 <212> PRT
 <213> HemA
 <400> 1

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

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

      130          135          140
Gln Lys Ser Phe Ser Val Ala Lys Arg Val Arg Thr Glu Thr Asp Ile
  145          150          155          160
Gly Ala Ser Ala Val Ser Val Ala Phe Ala Ala Cys Thr Leu Ala Arg
      165          170          175
Gln Ile Phe Glu Ser Leu Ser Thr Val Thr Val Leu Leu Val Gly Ala
      180          185          190
Gly Glu Thr Ile Glu Leu Val Ala Arg His Leu Arg Glu His Lys Val
      195          200          205

Gln Lys Met Ile Ile Ala Asn Arg Thr Arg Glu Arg Ala Gln Ala Leu
  210          215          220
```

Ala Asp Glu Val Gly Ala Glu Val Ile Ser Leu Ser Asp Ile Asp Ala
225 230 235 240
Arg Leu Gln Asp Ala Asp Ile Ile Ile Ser Ser Thr Ala Ser Pro Leu
245 250 255
Pro Ile Ile Gly Lys Gly Met Val Glu Arg Ala Leu Lys Ser Arg Arg
260 265 270
Asn Gln Pro Met Leu Leu Val Asp Ile Ala Val Pro Arg Asp Val Glu
275 280 285
Pro Glu Val Gly Lys Leu Ala Asn Ala Tyr Leu Tyr Ser Val Asp Asp
290 295 300
Leu Gln Ser Ile Ile Ser His Asn Leu Ala Gln Arg Gln Ala Ala Ala
305 310 315 320
Val Glu Ala Glu Thr Ile Val Glu Gln Glu Ala Ser Glu Phe Met Ala
325 330 335
Trp Leu Arg Ala Gln Gly Ala Ser Glu Thr Ile Arg Glu Tyr Arg Ser
340 345 350
Gln Ser Glu Gln Ile Arg Asp Glu Leu Thr Thr Lys Ala Leu Ser Ala
355 360 365
Leu Gln Gln Gly Gly Asp Ala Gln Ala Ile Leu Gln Asp Leu Ala Trp
370 375 380
Lys Leu Thr Asn Arg Leu Ile His Ala Pro Thr Lys Ser Leu Gln Gln
385 390 395 400
Ala Ala Arg Asp Gly Asp Asp Glu Arg Leu Asn Ile Leu Arg Asp Ser
405 410 415
Leu Gly Leu Glu

420

<210> 2

<211> 426

<212> PRT

<213> HemL

<400> 2

Met Ser Lys Ser Glu Asn Leu Tyr Ser Ala Ala Arg Glu Leu Ile Pro

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

 50 55 60
 Gly His Asn His Pro Ala Ile Arg Asn Ala Val Ile Glu Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 Arg Gly Leu Ser Phe Gly Ala Pro Thr Glu Met Glu Val Lys Met Ala
 85 90 95
 Gln Leu Val Thr Glu Leu Val Pro Thr Met Asp Met Val Arg Met Val
 100 105 110
 Asn Ser Gly Thr Glu Ala Thr Met Ser Ala Ile Arg Leu Ala Arg Gly
 115 120 125

 Phe Thr Gly Arg Asp Lys Ile Ile Lys Phe Glu Gly Cys Tyr His Gly
 130 135 140
 His Ala Asp Cys Leu Leu Val Lys Ala Gly Ser Gly Ala Leu Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Asn Ser Pro Gly Val Pro Ala Asp Phe Ala Lys His Thr
 165 170 175
 Leu Thr Cys Thr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Glu
 180 185 190
 Gln Tyr Pro Gln Glu Ile Ala Cys Ile Ile Val Glu Pro Val Ala Gly

 195 200 205
 Asn Met Asn Cys Val Pro Pro Leu Pro Glu Phe Leu Pro Gly Leu Arg
 210 215 220
 Ala Leu Cys Asp Glu Phe Gly Ala Leu Leu Ile Ile Asp Glu Val Met
 225 230 235 240
 Thr Gly Phe Arg Val Ala Leu Ala Gly Ala Gln Asp Tyr Tyr Gly Val
 245 250 255
 Glu Pro Asp Leu Thr Cys Leu Gly Lys Ile Ile Gly Gly Gly Met Pro

260 265 270
 Val Gly Ala Phe Gly Gly Arg Arg Asp Val Met Asp Ala Leu Ala Pro
 275 280 285
 Thr Gly Pro Val Tyr Gln Ala Gly Thr Leu Ser Gly Asn Pro Ile Ala
 290 295 300
 Met Ala Ala Gly Phe Ala Cys Leu Asn Glu Val Ala Gln Pro Gly Val
 305 310 315 320
 His Glu Thr Leu Asp Glu Leu Thr Ser Arg Leu Ala Glu Gly Leu Leu
 325 330 335
 Glu Ala Ala Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Val Asn His Val Gly
 340 345 350
 Gly Met Phe Gly Ile Phe Phe Thr Asp Ala Glu Ser Val Thr Cys Tyr
 355 360 365
 Gln Asp Val Met Ala Cys Asp Val Glu Arg Phe Lys Arg Phe Phe His
 370 375 380
 Met Met Leu Asp Glu Gly Val Tyr Leu Ala Pro Ser Ala Phe Glu Ala
 385 390 395 400
 Gly Phe Met Ser Val Ala His Ser Met Glu Asp Ile Asn Asn Thr Ile
 405 410 415
 Asp Ala Ala Arg Arg Val Phe Ala Lys Leu
 420 425
 <210> 3
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> AlaS
 <400> 3
 Met Asp Tyr Asn Leu Ala Leu Asp Lys Ala Ile Gln Lys Leu His Asp
 1 5 10 15
 Glu Gly Arg Tyr Arg Thr Phe Ile Asp Ile Glu Arg Glu Lys Gly Ala
 20 25 30
 Phe Pro Lys Ala Gln Trp Asn Arg Pro Asp Gly Gly Lys Gln Asp Ile

35 40 45
 Thr Val Trp Cys Gly Asn Asp Tyr Leu Gly Met Gly Gln His Pro Val
 50 55 60
 Val Leu Ala Ala Met His Glu Ala Leu Glu Ala Val Gly Ala Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Thr Arg Asn Ile Ser Gly Thr Thr Ala Tyr His Arg Arg Leu
 85 90 95
 Glu Ala Glu Ile Ala Asp Leu His Gln Lys Glu Ala Ala Leu Val Phe
 100 105 110
 Ser Ser Ala Tyr Asn Ala Asn Asp Ala Thr Leu Ser Thr Leu Arg Val
 115 120 125
 Leu Phe Pro Gly Leu Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Leu Asn His Ala Ser
 130 135 140
 Met Ile Glu Gly Ile Lys Arg Asn Ala Gly Pro Lys Arg Ile Phe Arg
 145 150 155 160
 His Asn Asp Val Ala His Leu Arg Glu Leu Ile Ala Ala Asp Asp Pro
 165 170 175
 Ala Ala Pro Lys Leu Ile Ala Phe Glu Ser Val Tyr Ser Met Asp Gly
 180 185 190
 Asp Phe Gly Pro Ile Lys Glu Ile Cys Asp Ile Ala Glu Glu Phe Gly
 195 200 205
 Ala Leu Thr Tyr Ile Asp Glu Val His Ala Val Gly Met Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Arg Gly Ala Gly Val Ala Glu Arg Asp Gly Leu Met His Arg Ile Asp
 225 230 235 240
 Ile Phe Asn Gly Thr Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Val Phe Gly Gly Tyr
 245 250 255
 Ile Ala Ala Ser Ala Arg Met Val Asp Ala Val Arg Ser Tyr Ala Pro
 260 265 270
 Gly Phe Ile Phe Ser Thr Ser Leu Pro Pro Ala Ile Ala Ala Gly Ala
 275 280 285

Gln Ala Ser Ile Ala Phe Leu Lys Thr Ala Glu Gly Gln Lys Leu Arg
 290 295 300
 Asp Ala Gln Gln Met His Ala Lys Val Leu Lys Met Arg Leu Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Met Pro Ile Ile Asp His Gly Ser His Ile Val Pro Val Val
 325 330 335
 Ile Gly Asp Pro Val His Thr Lys Ala Val Ser Asp Met Leu Leu Ser
 340 345 350
 Asp Tyr Gly Val Tyr Val Gln Pro Ile Asn Phe Pro Thr Val Pro Arg
 355 360 365
 Gly Thr Glu Arg Leu Arg Phe Thr Pro Ser Pro Val His Asp Leu Lys
 370 375 380
 Gln Ile Asp Gly Leu Val His Ala Met Asp Leu Leu Trp Ala Arg Cys
 385 390 395 400
 Ala Leu Asn Arg Ala Glu Ala Ser Ala

405

<210> 4
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> DtxR
 <400> 4

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

85 90 95
 Val His Asp Glu Ala Cys Arg Trp Glu His Val Met Ser Asp Glu Val
 100 105 110
 Glu Arg Arg Leu Val Glu Val Leu Asp Asp Val His Arg Ser Pro Phe
 115 120 125

 Gly Asn Pro Ile Pro Gly Leu Gly Glu Ile Gly Leu Asp Gln Ala Asp
 130 135 140
 Glu Pro Asp Ser Gly Val Arg Ala Ile Asp Leu Pro Leu Gly Glu Asn
 145 150 155 160
 Leu Lys Ala Arg Ile Val Gln Leu Asn Glu Ile Leu Gln Val Asp Leu
 165 170 175
 Glu Gln Phe Gln Ala Leu Thr Asp Ala Gly Val Glu Ile Gly Thr Glu
 180 185 190
 Val Asp Ile Ile Asn Glu Gln Gly Arg Val Val Ile Thr His Asn Gly

 195 200 205
 Ser Ser Val Glu Leu Ile Asp Asp Leu Ala His Ala Val Arg Val Glu
 210 215 220
 Lys Val Glu Gly
 225
 <210> 5
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> HemE
 <400> 5
 Met Trp Leu Leu Phe Leu Asn Trp Asp Lys Trp Gly Lys Ile Glu Arg
 1 5 10 15
 Met Ser Ala Leu Thr Ile Pro Ala Ala Arg Arg Thr Leu Asn Asn Ala
 20 25 30

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

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

305					310								315								320			
Gly	Arg	Ala	Pro	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Arg	Ile	Lys	Ala	Glu	Ala									
				325								330								335				
Gln	Thr	Ala	Val	Asp	Ala	Gly	His	Ala	Thr	Gly	His	Ile	Phe	Asn	Leu									
				340								345								350				
Gly	His	Gly	Val	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Ala	Glu	Asp	Ile	Thr	Glu	Ala									
				355								360								365				
Val	Ser	Ile	Ile	His	Ser																			
370																								
<210>	6																							
<211>	448																							
<212>	PRT																							
<213>	HemY																							
<400>	6																							
Met	Arg	Phe	Ala	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala									
1				5				10				15												
Tyr	Glu	Ile	His	Lys	Ala	Asp	Pro	Thr	Ala	Gln	Ile	Asp	Val	Leu	Glu									
				20				25				30												
Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Gly	Gly	Lys	Leu	Phe	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Ser									
				35				40				45												
Gly	Pro	Thr	Asp	Ile	Gly	Ala	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp									
				50				55				60												
Ala	Val	Glu	Phe	Phe	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala	Asp	Ser	Leu	Val	Ser									
65				70				75				80												
Pro	Ser	Ala	Ala	Lys	Ser	Gln	Tyr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	His	Ala									
				85				90				95												
Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Gly	Ile	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gly									
				100				105				110												
Ala	Gln	Asp	Thr	Ala	Phe	Asp	Trp	Thr	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile	Ser	Val									
				115				120				125												
Gly	Ala	Leu	Val	Arg	Arg	Gln	Tyr	Gly	Asp	Glu	Ile	Val	Asp	Thr	Val									
130				135				140																

Val Ser Ser Leu Leu Gly Gly Val Tyr Ser Ser Thr Ala Asp Asp Leu

145 150 155 160

Gly Val Arg Ala Ser Val Pro Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asp Gln Leu

165 170 175

Ala Glu Ala Gly Glu Pro Val Thr Leu Ser Ala Ala Val Lys Ala Val

180 185 190

Glu Ala Gln Arg Glu Ala Ala Lys Thr Thr Ser Glu Thr Arg Pro Val

195 200 205

Phe Gln Thr Phe Lys Gly Gly Tyr Ala Glu Leu Tyr Glu Ala Leu Ala

210 215 220

Glu Gln Cys Gly Ala Asp Ile His Leu Asp Ser Phe Val Ser Ala Ile

225 230 235 240

Thr Lys Asp Gly Glu Gly Phe Ala Ile Lys Gly Gly Gly Glu Gly Thr

245 250 255

Tyr Asp Lys Val Ile Leu Ala Val Pro Ala Pro Thr Ala Ala Val Leu

260 265 270

Leu Arg Asp Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro His Leu Arg Ala Ile Lys

275 280 285

Leu Ala Ser Ser Ala Val Val Gly Met Arg Phe Asp Ser Ser Glu Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Thr Ala Lys Ala Phe Thr Phe Ser Ser Lys Lys Trp Pro His Leu Glu

325 330 335

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

340 345 350

Glu Ala Ser Ala Arg Met Asp Glu Asp Leu Leu Val Asp Ala Ala Leu

355 360 365

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

370 375 380

Gly Glu Ile Phe Val Gln Arg Trp Phe Gly Gly Leu Pro Ala Tyr Gly

385 390 395 400
 Val Asp His Ile Ala Thr Val Ser Ala Ala Arg Ala Glu Ile Ala Ala
 405 410 415
 Val Pro Gly Val Glu Ala Ile Gly Ala Trp Ala Gly Gly Val Gly Val
 420 425 430
 Pro Ala Val Ile Ala Asp Ala Gln Ala Ala Val His Arg Leu Leu Gly

 435 440 445
 <210> 7
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> HemH
 <400> 7
 Met Asn Glu Arg Thr Ser Asp Ala Phe Asp Ala Leu Leu Val Leu Ser
 1 5 10 15
 Phe Gly Gly Pro Glu Gly His Glu Glu Val Arg Pro Phe Leu Glu Asn
 20 25 30
 Val Thr His Gly Arg Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu Asp Glu Val Ala
 35 40 45
 Val His Tyr His His Phe Gly Gly Ile Ser Pro Ile Asn Ala Leu Asn

 50 55 60
 Arg Glu Ile Ile Ala Asn Val Glu Lys Glu Leu Ala Ser Arg Asp His
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Val Tyr Phe Gly Asn Arg Asn Trp Lys Pro Phe Asp Asn
 85 90 95
 Glu Ala Ala Glu Gln Met Ala Asp Asp Gly Val Lys Asn Ala Leu Val
 100 105 110
 Leu Ala Thr Ser Ala Trp Gly Gly Tyr Ser Gly Cys Arg Gln Tyr Gln
 115 120 125

 Glu Asp Ile Gln Gly Met Ile Lys His Leu Glu Ser Gln Gly Gln Ser
 130 135 140
 Ile Thr Phe Thr Lys Leu Arg Gln Phe Tyr Asp His Pro Arg Phe Val
 145 150 155 160

Ser Thr Met Ala Gln Leu Val Gln Asp Ser Tyr Ala Lys Leu Pro Asp
165 170 175

Glu Leu Arg Asp Glu Ala Arg Leu Val Phe Thr Ala His Ser Ile Pro
180 185 190

Leu Thr Ala Asp Asn Ala Ala Gly Thr Pro Glu Asp Gly Ser Leu Tyr
195 200 205

Ser Thr Gln Val Lys Glu Ala Ser Ala Leu Ile Ala Glu Ala Val Gly
210 215 220

Val Ser Asp Phe Asp Val Val Trp Gln Ser Arg Ser Gly Ser Pro His
225 230 235 240

Thr Pro Trp Leu Glu Pro Asp Ile Val Asp His Ala Val Glu Leu Asn
245 250 255

Glu Lys Gly Gln Lys Ala Leu Val Val Cys Pro Val Gly Phe Ile Ser
260 265 270

Asp His Met Glu Val Ile Trp Asp Leu Asp Ser Glu Leu Met Glu Glu
275 280 285

Ala Glu Lys Arg Asn Met Val Val Glu Arg Val Ala Thr Val Gly Pro
290 295 300

Thr Asp Glu Phe Ala Ala Leu Val Val Asp Leu Ile Glu Glu Ala Glu
305 310 315 320

Leu Lys Arg Val Ile Glu Arg Leu Gly Lys Leu Pro Ala Arg Gly Ser
325 330 335

Ser Val Asn Gly Ala Pro Cys Gly Asp Gly Cys Cys Gly Thr Ala Lys
340 345 350

His Lys Thr Ala Arg Val Asn Pro Asn Ala Arg Ser Ala Ala Pro Ala
355 360 365

Ala Asn
370

<210> 8

<211> 232

<212> PRT

<213> HemQ

<400> 8

Met Ser Glu Leu Asp Ile Lys Gln Leu Asn Lys Leu Gln Arg Tyr Ser
1 5 10 15

Gln Trp Ala Val Phe Arg Ala Ile Pro Gly Ala Leu Asp Asp Asp Arg
20 25 30

Thr Glu Val Thr Asp Gln Ala Ala Lys Phe Phe Ala Asp Leu Glu Ala
35 40 45

Glu Gly Lys Val Thr Val Arg Gly Ile Tyr Asn Ala Ser Gly Leu Arg
50 55 60

Ala Asp Ala Asp Tyr Met Ile Trp Trp His Ala Glu Glu Phe Glu Asp
65 70 75 80

Ile Gln Lys Ala Phe Ala Asp Phe Arg Arg Thr Thr Ile Leu Gly Gln
85 90 95

Val Ser Glu Val Phe Trp Ile Gly Asn Ala Leu His Arg Pro Ser Glu

100 105 110

Phe Asn Lys Ala His Leu Pro Ser Phe Ile Met Gly Glu Glu Ala Lys
115 120 125

Asp Trp Ile Thr Val Tyr Pro Phe Val Arg Ser Tyr Asp Trp Tyr Ile
130 135 140

Met Glu Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu Arg Glu His Gly Gln Ala
145 150 155 160

Ala Val Glu Phe Pro Asp Val Arg Ala Asn Thr Val Pro Ala Phe Ala
165 170 175

Leu Gly Asp Tyr Glu Trp Val Leu Ala Phe Glu Ala Asp Glu Leu His
180 185 190

Arg Ile Val Asp Leu Met His Lys Met Arg Tyr Thr Glu Ala Arg Leu
195 200 205

His Val Arg Glu Glu Leu Pro Phe Ile Ser Gly Gln Arg Val Asp Ile
210 215 220

Ala Asp Leu Ile Lys Val Leu Pro

225 230

<210> 9

<211> 230

<212> PRT

<213> HrtA

<400> 9

Met Thr Leu His Val Ser Asn Leu Asn Leu Thr Val Ala Asp Gly Ser

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

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

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

210						215						220					
Leu	Thr	Pro	His	Thr	Leu												
225						230											
<210>	10																
<211>	319																
<212>	PRT																
<213>	HrtB																
<400>	10																
Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	Lys	Gly	Arg	Thr	Leu		
1	5						10						15				
Leu	Ile	Thr	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Val	Thr	Phe	Leu		
	20						25						30				
Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Gly	His	Gln	Ser	Val	Ser	Ala	Leu	Lys		
	35						40						45				
Tyr	Leu	Ala	Gly	Asp	Asn	Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Ser	Thr		
	50						55						60				
Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Ser	Asp	Gln	Ala	Val	Ala	Gln	Leu	Glu		
65	70						75						80				
Asp	Glu	Gly	Ala	Gln	Met	Leu	Trp	Gln	Val	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	Asp		
	85						90						95				
Thr	Pro	Thr	Met	Leu	Leu	Asn	Ser	Pro	Asp	Leu	Ala	Pro	Gly	Glu	Val		
	100						105						110				
Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Leu	Ala	Asp	Ser	Glu	Leu	Ala	Thr	Ala	His	Asp		
	115						120						125				
Val	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asp	His	Leu	Pro	Val	Val		
130	135						140										
Leu	Met	Asn	Thr	Ser	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Arg	Gly	Val		
145	150						155						160				
Thr	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Phe	Ala	Ser	Asp	Val	Ala	Pro	Pro	Ser	Asp		
	165						170						175				
Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Trp	Asn	Ala	Ser	Ala	Ser	Tyr		
	180						185						190				

Gln Gly Glu Gln Met Ser Leu Asn Leu Met Ile Val Met Leu Tyr Val

195 200 205

Ile Ser Ala Leu Val Leu Gly Ala Phe Phe Thr Val Trp Thr Ile Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Leu Ile Ala Asp Ala Leu Gly Gln Ala Ile Ile Val Leu Gly Ile

245 250 255

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

260 265 270

Gly Val Ala Met Pro Val Val Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Phe Pro

275 280 285

Ala Leu Ile Leu Ala Ala Ala Gly Leu Ile Gly Ala Ala Ile Ser Leu

290 295 300

Gly Pro Ile Leu Arg Val Glu Pro Arg Ser Ala Leu Met Asn Ala

305 310 315

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> HmuO

<400> 11

Met Thr Ser Ile Ile Ala Ser Asn Ser Asp Leu Ser Glu Ala Leu Arg

1 5 10 15

Thr His Thr Ala Gln Ala His Glu Glu Ala Glu His Ser Thr Phe Met

20 25 30

Asn Asp Leu Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Gln Ala Phe Ile Lys Leu

35 40 45

Gln Glu Gln Ser Trp Leu Phe Tyr Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Arg

50 55 60

Ala Cys Ala Glu Asp Ser Arg Ala Ala Gly Leu Leu Asp Pro Arg Leu

65 70 75 80

Glu Arg Lys Glu Thr Leu Glu Ala Asp Leu Asp Lys Leu His Glu Asn

85 90 95

Thr Thr Trp Arg Asp Asn Val Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ser Tyr

100 105 110

Val Glu Arg Leu Glu Ser Ile Glu Ala Ala Lys Asp Phe Pro Arg Leu

115 120 125

Val Ala His His Tyr Val Arg Tyr Leu Gly Asp Leu Ser Gly Gly Gln

130 135 140

Val Ile Ala Arg Leu Val Asn Arg Glu Tyr Gly Val Ser Glu Glu Ala

145 150 155 160

Leu Ser Phe Tyr Cys Phe Glu Asp Leu Gly Lys Leu Lys Pro Tyr Lys

165 170 175

Asp Asn Tyr Arg Ala Glu Leu Asp Ala Leu Glu Leu Thr Ala Glu Glu

180 185 190

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

195 200 205

Gln Val Phe Gln Ala Leu Ala

210 215

<210> 12

<211> 337

<212> PRT

<213> CcsA

<400> 12

Met Leu Pro Val Asn Gln Thr Tyr Ala Gln Phe Ser Asp Thr Ala Phe

1 5 10 15

Val Ser Ala Tyr Ile Ile Tyr Val Leu Ala Leu Ile Leu Ser Leu Val

20 25 30

Tyr Tyr Val Lys Gln Gln Gly Thr Ile Asp Ala Arg Arg Glu Gln Thr

35 40 45

Arg Val Ser Glu Leu Val Gly Ala Gly Gly Ser Ala Asp Val Asp Thr

50 55 60

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

65						70						75						80
Ala	Lys	Arg	Glu	Glu	Thr	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Asn	Met	Thr	Gln	Ser			
					85						90						95	
Leu	Met	Trp	Leu	Gly	Val	Met	Val	His	Leu	Val	Ser	Val	Val	Met	Arg			
					100						105						110	
Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Arg	Phe	Pro	Phe	Gly	Asn	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ile			
					115						120						125	
Leu	Met	Val	Thr	Leu	Phe	Ala	Met	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln			
					130						135						140	
Arg	Pro	Gln	Phe	Arg	Val	Val	Trp	Pro	Trp	Ile	Leu	Thr	Pro	Met	Leu			
					145						150						155	
Ala	Leu	Leu	Phe	Tyr	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu	Tyr	Ser	Asp	Ala	Ala	Pro			
					165						170						175	
Val	Val	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Phe	Trp	Phe	Pro	Ile	His	Val	Ser	Ser			
					180						185						190	
Val	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ser	Leu			
					195						200						205	
Leu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Met	Trp	Gln	Pro	Lys	Gly	Lys	Glu	Lys	Gly	Phe			
					210						215						220	
Phe	Gly	Ala	Val	Ala	Lys	Pro	Leu	Pro	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Asp	Asn			
					225						230						235	
Leu	Ala	Tyr	Lys	Thr	Ala	Ile	Trp	Thr	Val	Pro	Ile	Phe	Gly	Leu	Gly			
					245						250						255	
Ile	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Trp	Ala	Glu	Ala	Ala	Trp	Gly	Arg	Phe	Trp			
					260						265						270	
Gly	Trp	Asp	Pro	Lys	Glu	Thr	Val	Ser	Phe	Ile	Thr	Trp	Val	Leu	Tyr			
					275						280						285	
Ala	Gly	Tyr	Leu	His	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Gly	Trp	Arg	Asn	Thr	Asn			
					290						295						300	
Ala	Ala	Trp	Ile	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Met	Ile	Phe	Asn	Leu			
					305						310						315	
					310						315						320	

Phe Phe Ile Asn Met Val Val Ser Gly Leu His Ser Tyr Ala Gly Leu

325 330 335

Asn

<210> 13

<211> 444

<212> PRT

<213> HrrS

<400> 13

Met Gln Ser Ser Leu Asp Arg Val Ser Glu Thr Gly Arg Asn Glu Leu

1 5 10 15

Asp Val Glu Thr Leu Val Lys Lys Gly Asn Gln Pro Gly Ala Thr Ser

20 25 30

Tyr Arg Asn Ser Ile His Ile Leu Thr Ala Ser Leu Leu Val Val Gly

35 40 45

Leu Gly Ala Ser Ala Arg Leu Thr Leu Pro Met Phe Ala Leu Ser Cys

50 55 60

Val Leu Leu Phe Val Trp Gly Phe Leu Tyr Phe Tyr Gly Ser Thr Lys

65 70 75 80

Arg Val Asp Leu Arg His Gly Met Gln Leu Gly Trp Leu Phe Val Leu

85 90 95

Thr Leu Val Trp Ile Phe Met Val Pro Ile Val Pro Val Ser Ile Tyr

100 105 110

Leu Leu Phe Pro Leu Phe Phe Leu Tyr Leu Gln Val Met Pro Asp Val

115 120 125

Arg Gly Ile Ile Ala Ile Leu Gly Ala Thr Ala Ile Ala Ile Ala Ser

130 135 140

Gln Tyr Ser Val Gly Leu Thr Phe Gly Gly Val Met Gly Pro Val Val

145 150 155 160

Ser Ala Ile Val Thr Val Ala Ile Asp Tyr Ala Phe Arg Thr Leu Trp

165 170 175

Arg Val Asn Asn Glu Lys Gln Glu Leu Ile Asp Gln Leu Ile Glu Thr

180 185 190
 Arg Ser Gln Leu Ala Val Thr Glu Arg Asn Ala Gly Ile Ala Ala Glu
 195 200 205
 Arg Gln Arg Ile Ala His Glu Ile His Asp Thr Val Ala Gln Gly Leu
 210 215 220
 Ser Ser Ile Gln Met Leu Leu His Val Ser Glu Gln Glu Ile Leu Val

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

 Ser Val Asp Gly Asp Val Arg Gln Leu Pro Met Lys Thr Glu Ala Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Arg Ile Ala Gln Gly Ala Ile Gly Asn Val Ala Lys His Ser
 325 330 335
 Glu Ala Lys Asn Cys His Val Thr Leu Thr Tyr Glu Asp Thr Glu Val
 340 345 350
 Arg Leu Asp Val Val Asp Asp Gly Val Gly Phe Glu Pro Ser Glu Val
 355 360 365
 Ser Ser Thr Pro Ala Gly Leu Gly His Ile Gly Leu Thr Ala Leu Gln

 370 375 380
 Gln Arg Ala Met Glu Leu His Gly Glu Val Ile Val Glu Ser Ala Tyr
 385 390 395 400
 Gly Gln Gly Thr Ala Val Ser Ala Ala Leu Pro Val Glu Pro Pro Glu
 405 410 415
 Gly Phe Val Gly Ala Pro Val Leu Ala Asp Ser Asp Ser Ser Ala Thr
 420 425 430
 Gly Glu Val Glu Leu Ser Ser Pro Thr Asp Asp Glu

435 440

<210> 14
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> HtaA
 <400> 14

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

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

130 135 140
 Glu Phe Lys Gly Thr Thr Tyr Asp Asp Ile Gly Glu Tyr Ile Ile Ser
 145 150 155 160
 Asp Asp Ile Val Leu Ala Asp Val Ser Leu Asn Ser Ala Ala Asp Phe
 165 170 175
 Ser Gln Asp Ser Ile Asp Leu Ser Gly Thr Thr Ala Leu Thr Ala Ala
 180 185 190
 Gly Ala Gln Ala Phe Gly Gly Phe Tyr Glu Thr Gly Asp Ala Leu Asp

195 200 205
 Pro Thr Gly Gly Ser Leu Thr Ile Ser Ser Thr Thr Thr Thr Pro Ser
 210 215 220
 Thr Gly Thr Thr Ser Thr Ser Ala Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Asp
 225 230 235 240
 Cys Ser Ser Gly Ala Leu Gly Val Val Thr Thr Gly Thr Asn Asp Gly
 245 250 255
 Met Leu Gly Thr Ile Gln Glu Val Asn Asn Thr Phe Ala Ile Trp Asn
 260 265 270
 Asn Leu Ile Val Asn Thr Glu Arg Met Phe Cys Asn Ile Asp Thr Leu
 275 280 285
 Lys Ala Arg Phe Asp Thr Asp Asp Ser Ser Asp Ser Ala Thr Ser Ala
 290 295 300
 Thr Ser Gly Thr Thr Ala Ser Thr Gly Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Ala Ser Thr Ala Ser Gly Thr Pro
 325 330 335
 Gly Thr Ser Gly Thr Ser Gly Thr Ser Gly Thr Ala Ala Thr Val Ala
 340 345 350
 Gly Thr Thr Pro Thr Asp Asn Gly Val Cys Thr Ala Ser Gly Ser Leu
 355 360 365
 Gly Val Thr Gln Ala Ser Ser Gln Trp Gly Val Lys Ala Ser Phe Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Ile Arg Gly Ser Ile Ala Asn Gly Ser Trp Thr Leu Asn Gly
 385 390 395 400
 Val Gly Phe Asp Asn Gln Gln Phe Gln Phe Ser Gly Asn Ser Gly Ala
 405 410 415
 Val Asp Ala Glu Asn Lys Thr Gly Ser Ile Asn Phe Pro Gly Ser Ile
 420 425 430
 His Phe Thr Gly His Gly Gly Ile Leu Asp Met Gln Ile Ala Asn Ile
 435 440 445

Glu Ile Ser Phe Asn Gly Asn Ser Gly Glu Leu Ile Ala Asp Val Val
450 455 460

Ser Ser Asp Met Asp Gly Asn Ser Thr Asn Tyr Gly Arg Thr Val Val
465 470 475 480

Gly Thr Leu Asn Phe Ser Ala Leu Asn Val Ser Ala Thr Glu Ala Ser
485 490 495

Gly Ser Ala Ser Val Ser Leu Ser Gln Ser Gly Ser Gln Ala Phe Ala
500 505 510

Asp Phe Tyr Thr Pro Gly Thr Gln Leu Asp Pro Ile Ser Phe Ser Ala
515 520 525

Thr Leu Gly Gly Glu Ala Ser Cys Ala Thr Gly Ser Thr Ser Thr Thr
530 535 540

Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asn Thr Glu Gly Val Ala Gly
545 550 555 560

Glu Glu Ser Thr Thr Pro Ala Asn Gln Asn Ser Gln Phe Gln Ile Arg
565 570 575

Gln Ala Ala Ala Asp Ser Thr Gly Leu Asp Thr Thr Thr Thr Met Leu
580 585 590

Leu Ile Leu Ala Ala Phe Val Val Ala Gly Gly Ser Met Thr Arg Phe
595 600 605

Thr Val Gly Asn Pro Thr Gly Lys
610 615

<210> 15
<211> 359
<212> PRT
<213> HmuT
<400> 15

Met Asn Asn Ala Phe Arg Arg Thr Leu Thr Ser Val Val Leu Ala Ala
1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Thr Ala Cys Ala Ser Trp Asp Ser Pro Thr Ala Ser
20 25 30

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

35 40 45
 Asp Pro Arg Thr Phe Thr Gly Leu Ser Ile Val Glu Asp Ile Gly Asp
 50 55 60
 Val Val Pro Val Thr Asp Asn Ala Ser Pro Ala Leu Pro Val Ser Leu
 65 70 75 80

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

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

 Val Asp Glu Leu Thr Pro Glu Asp Pro Leu Lys Met Val Phe Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ala Arg Gly Thr Gly Gly Val Phe Phe Ile Leu Gly Asp Ala Tyr Gly
 245 250 255
 Gly Arg Asp Leu Ile Glu Gly Leu Gly Gly Val Asp Met Ala Ala Glu
 260 265 270
 Lys Gly Ile Met Asp Leu Ala Pro Ala Asn Ala Glu Ala Leu Ala Glu
 275 280 285

Leu Asn Pro Asp Val Phe Val Met Met Ser Glu Gly Leu Val Ser Thr

290

295

300

Gly Gly Ile Asp Gly Leu Met Glu Arg Pro Gly Ile Ala Gln Thr Thr

305

310

315

320

Ala Gly Gln Asn Gln Arg Val Leu Ala Leu Pro Asp Gly Gln Ser Leu

325

330

335

Ala Phe Gly Ala Gln Thr Gly Glu Leu Leu Leu Arg Ala Ser Arg Glu

340

345

350

Leu Tyr Val Gln Gly Gly Glu

355

<210> 16

<211>

314

<212> PRT

<213> Ldh

<400> 16

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

1

5

10

15

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

20

25

30

His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Val

35

40

45

Lys Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser Arg Thr Arg Val

50

55

60

Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala Met Val Val Ile

65

70

75

80

Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Val

85

90

95

Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly Asp Val Met Asp

100

105

110

Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile

115

120

125

Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu Trp Asn Arg Val

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His Ala Tyr Ile Ile

165 170 175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser Ser Ala Thr Ile

180 185 190

Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp Pro Glu Leu Glu

195 200 205

Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp Ala Ala Tyr His

210 215 220

Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Met Gly Leu

225 230 235 240

Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp Val Ala Val Pro

245 250 255

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

260 265 270

Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg Arg Val Val Glu

275 280 285

Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys His Ser Ala Asn

290 295 300

Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe

305 310

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alaS_F

<400> 17

atagtcgaca aggagatata gatggactac aatctcgcgc

40

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alaS_R

<400> 18

ataggatcct caggcagagg cc 22

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dtxR_F

<400> 19

ataggatcca aggagatata gatgaaggat ctgg 34

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dtxR_R

<400> 20

atagagctct tagccctcaa ccttttctac g 31

<210> 21

<211>

> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemE_F

<400> 21

aaaaggttga gggctaagag ctaaggagat atagatgtgg cttcttttcc taaattggga 60

60

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemE_R

<400> 22
cgacggccag tgaattcgag ctcttaagaa tgaatgatgg agacggct 48
<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hemY_F
<400> 23
ataggatcca tgcgttttgc catcatcg 28
<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hemY_R
<400> 24
ataggtacct tatcccagca acctgtgtac 30
<210> 25
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hemY_F2
<400> 25
tcacacagga gatatcatat cgatgcgttt tgccatcatc g 41
<210> 26
<211>
> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hemY_R2
<400> 26
attcatgtat atctccttat cgttatccca gcaacctgtg tac 43
<210> 27
<211> 44
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemH_F

<400> 27

cccatcgata aggagatata catgaatgaa cgcacatcgg atgc 44

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemH_R

<400> 28

aaaggatccc tagttggcag ctggcgc 27

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemQ_F

<400> 29

cacggatcca tgagcgagct cgatattaaa cagc 34

<210> 30

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hemQ_R

<400> 30

ccagcggccg ctttaaggaag aaccttaatc agatctgcaa tg 42

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hrtB_F

<400> 31

tcttccttaa gcggccaagg agatatacat gtttcaagga ctaaaagaac 50

<210> 32

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hrtA_R
 <400> 32
 gccaaaacag gcggccgcta cagggtgtgg ggtgtga 37
 <210> 33
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ccsA_F
 <400> 33
 tcttccttaa gcggccaagg agatatacat gttgcccgta aaccaaacg 49
 <210> 34
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ccsA_R
 <400> 34
 gccaaaacag gcggccgctt agttcagtcc ggcgta 36
 <210> 35
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cmR_F
 <400> 35
 caccacacac cctgtagcgg ccgcctgttt tggcgg 36
 <210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cmR_R
 <400> 36
 actaggagaa gttaataaat acaattacgc cccgccctgc 40

<210> 37
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hmuO_F
 <400> 37
 gttcttcctt aagcggccaa ggagatatac atgacaagca ttattgcaag caaca 55

<210> 38
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hmuO_R
 <400> 38
 ccgccaaaac aggcggccgc ttaagcaaga gcctgaaaaa cttgc 45

<210> 39
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hrrS_F
 <400> 39
 ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatacag cctcgctg 48

<210> 40
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hrrS_R
 <400> 40
 tttatttaaa tggatcccca caaccagcag cgaggctgta tctacaa 47

<210> 41
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> htaA_F

<400> 41
ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatggca atcggtcc 48

<210> 42
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> htaA_R
<400> 42
tttatttaaa tggatcgatg taattgcgga acgattgccca tctacaac 48

<210> 43
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hmuT_F
<400> 43
ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatgacg caccctta 48

<210> 44
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hmuT_R
<400> 44
tttatttaaa tggatcgact acggatgtaa gggatgcgtca tctacaac 48

<210> 45
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hmuO_F
<400> 45
ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagattgaa tgatctgc 48

<210> 46
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> hmuO_R
 <400> 46
 tttatttaaa tggatccttc ccggtgagca gatcattcaa tctacaac 48

<210> 47
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ldh_F
 <400> 47
 ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatggct gcgccggc 48
 <210> 48
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ldh_R
 <400> 48
 tttatttaaa tggatcttgt catttgtgcc ggccgagcca tctacaac 48
 <210> 49
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_hrrS
 <400> 49
 cggaagcacc cagccccaca accagcagct aggctgtcaa aatgtggata ctgttgcga 59
 <210> 50
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_htaA
 <400> 50
 gccacgccg tttggatgta attgcggaat tattgcctaa atccccagtt cagggagcc 59
 <210> 51
 <211> 59

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_hmuT
 <400> 51
 aggccaagct agcggcgagg actacggatt aaagggtgcg tcgaaaagcg ttattcatg 59
 <210> 52
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_hmu0
 <400> 52
 atgcctgctc atcgagcttc ccggtgagct aatcattcat aaacgttgag tgctcggcc 59
 <210> 53
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_ldh1
 <400> 53
 acgcagccat ggttgtcatt tgtgccggt aagcccaaaa gccaggcgag acccgctc 59
 <210> 54
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_ldh2
 <400> 54
 atggttgtca ttgtgccgg cgcagcccag tagccaggcg agaccgcct ccagctggt 59
 <210> 55
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lagging_ldh3
 <400> 55
 acgcagccat ggttgtcata tgagcaggat aagcccacaa gccaggcgag acccgctc 59

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hrrS_seq1
 <400> 56
 atgcagtcaa gcctagatcg 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hrrS_seq2
 <400> 57
 cgttgacgtt ccgcagcaat 20
 <210> 58
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> htaA_seq1
 <400> 58
 atgaaacttg cacctcgat gcgga 25

 <210> 59
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> htaA_seq2
 <400> 59
 gcaaccaaat ccacaactag ctgcg 25
 <210> 60
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hmuT_seq1
 <400> 60

cccgctaacc aaaacagcca gttcc	25
<210> 61	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hmuT_seq2	
<400> 61	
ccatcagcat ccgtcaaaga cacag	25
<210> 62	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hmuO_seq1	
<400> 62	
atgacaagca ttattgcaag caaca	25
<210> 63	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hmuO_seq2	
<400> 63	
ggacatagtg atgagcaacc aaacg	25
<210> 64	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pJYS2_seq_F	
<400> 64	
cacgctgtcg gcagagaa	18
<210> 65	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> pJYS2_seq_R
 <400> 65
 tcacaccgca tatgaagctt aagagtttgt agaaacg 37
 <210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pJYS1_seq_F
 <400> 66
 gagatcctgt cctccgtgtg 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pJYS1_seq_R
 <400> 67
 ggtccttctt gatctgctcg 20
 <210> 68
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ldhseq1
 <400> 68
 gcaacaatga cggcgaga 18
 <210> 69
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ldhseq2
 <400> 69
 ggagctttcg caggtgaa 18
 <210> 70
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JYS2_F

<400> 70

taatggatcc atttaaataa aacgaaaggc

30

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JYS2_R

<400> 71

ggcaaataagg caggattgat

20

<210> 72

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JYS2_F2

<400> 72

ttatttaaatt ggatccatta tacctaggac tg

32

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JYS2_R2

<400> 73

atcaatcctg cctatttgcc

20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT hemA F

<400> 74

ggaatacgat cagcgagctt

20

<210> 75

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemA R
 <400> 75
 ctcgtggcat ggacaaatcc 20
 <210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemB F
 <400> 76
 cgatgacctg ctgattatgg 20

 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemB R
 <400> 77
 gcctgagcaa cagccatctg 20
 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemC F
 <400> 78
 gatgctgtga tgctgccta 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemC R
 <400> 79

gcggacggtt tcagtgtcgt	20
<210> 80	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT hemD F	
<400> 80	
cgtgaagttc tgggcaacgc	20
<210> 81	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT hemD R	
<400> 81	
cttcgcttca atgcagatgc	20
<210> 82	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT hemE F	
<400> 82	
gttgctgag tacaagaagg	20
<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT hemE R	
<400> 83	
caacggcacc acaatgtcag	20
<210> 84	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> RT hemH F

<400> 84

ccttgacctg tgtggaatac 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT hemH R

<400> 85

ttggttcagg attcctacgc 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT hemL F

<400> 86

gcggttacac tcagcggttc 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT hemL R

<400> 87

tagtgtcaga agtctgagcg 20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT hemQ F

<400> 88

gcacagtgtt ggcacgaaca 20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemQ R
 <400> 89
 tgggtgaaga agcaaaggac 20
 <210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemY F
 <400> 90
 aggtggagtg atgggtattc 20
 <210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT hemY R
 <400> 91
 gcgaagacac cacagtatcg 20

 <210> 92
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhA F
 <400> 92
 accacatgaa cctggtctcc 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhA R
 <400> 93
 tggtaggtga acgccttgac 20
 <210> 94

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhB F
 <400> 94
 gagctgcttg accacgtaaa 20

<210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhB R
 <400> 95
 caggcttatt ctggtcagcg 20

<210> 96
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhC F
 <400> 96
 ggtggcttcg ttcttgttca 20

<210> 97
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT sdhC R
 <400> 97
 tccgatctca cgcaggaact 20

<210> 98
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT narG F
 <400> 98

ccagcagatt ttccttcagg	20
<210> 99	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT narG R	
<400> 99	
catacacttt ccacgagcag	20
<210> 100	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT narH F	
<400> 100	
ataaatggga aggcggttgg	20
<210> 101	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT narH R	
<400> 101	
cacggctcgt agtaatcatc	20
<210> 102	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT narK F	
<400> 102	
ggatttgatc tctcagcagg	20
<210> 103	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT narK R	

<400> 103
gaccaatttg cgggttccaa 20

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RT sufB F

<400> 104
aactatggtt ggcacgactc 20

<210> 105
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RT sufB R

<400> 105
gctgctgaag catccattct 20

<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RT sufD F

<400> 106
atttcctac gccgtcttcg 20

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> RT sufD R

<400> 107
cagtcgagca tcgtcctttg 20

<210> 108
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT acn F

<400> 108

catggagaag ctgccgtact

20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT acn R

<400> 109

ggtgaactgg atttcgatgc

20