(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0137754
(43) 공개일자 2020년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0064587
(22) 출원일자 2019년05월31일
심사청구일자 2019년05월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호 (잠실동, 리센츠아파트)
석지호
서울특별시 성동구 독서당로 375, 104동 1403호 (응봉동, 신동아아파트)
고영진
강원도 춘천시 춘주로 176-22, 105동 201호 (퇴계동, 퇴계동쌍용스윗닷홈)
(74) 대리인
이처영, 장제환

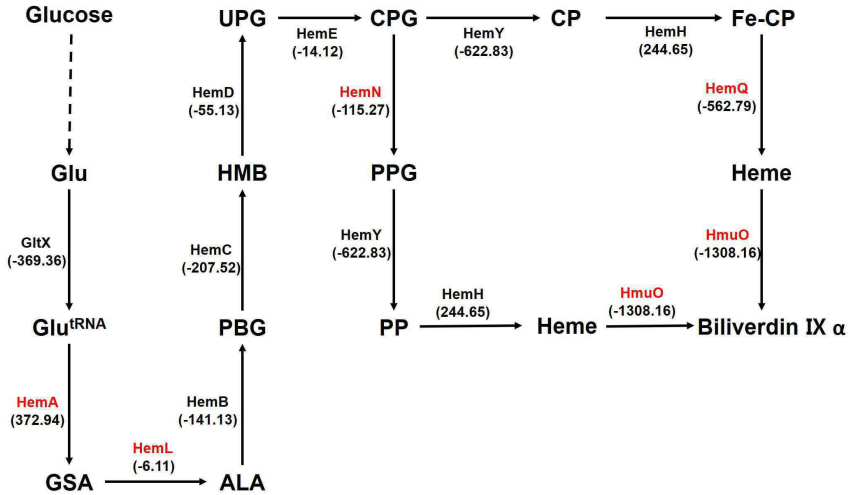
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 및 이를 이용한 빌리버딘 9 알파의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 빌리버딘 9 알파의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 재조합 균주를 이용하면, 부가적인 질소원 첨가가 없이 글루코스만을 활용하여 빌리버딘 9 알파를 친환경적으로 합성할 수 있어, 기존의 환경오염 문제가 있었던 합성방법인 화학적 처리에 의한 빌리버딘 9 알파 합성을 대체할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/0083 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 9/90 (2013.01)
C12P 17/10 (2013.01)
C12Y 102/0107 (2013.01)
C12Y 114/99003 (2013.01)
C12Y 401/00 (2013.01)
C12Y 504/03008 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018003704
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원(3억초과~5억이하)
연구과제명 식물 광호흡 기작 모방 신규 Porphyrin 생합성경로 연구 기반 코리네박테리움을 통한 태양전지 유기소재 Zinc-Porphyrin 생산 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

글루타밀티알엔에이리덕테이즈를 코딩하는 유전자 HemA, 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈를 코딩하는 유전자 HemL 및 철코프로포르피린3디카복실레이즈를 코딩하는 유전자 HemQ가 증폭되어 있고, 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주.

청구항 2

제1항의 재조합 코리네박테리움 속 균주에서, 헴옥시게네이즈를 코딩하는 유전자 HmuO가 추가로 증폭되어 있고, 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, HemA 유전자 및 HemL 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 HemQ를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주.

청구항 4

제2항에 있어서, HemA 유전자 및 HemL 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 HemQ 유전자 및 HmuO 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 있는 특징으로 하는 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 HemQ 유전자와 HmuO 유전자는 hemQO의 형태로 재조합 벡터에 의해 도입되는 것을 특징으로 하는 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 헴의 제조방법:

(a) 제1항의 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 헴을 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 헴을 수득하는 단계.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 빌리버딘 9알파의 제조방법:

(a) 제2항의 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 빌리버딘 9알파를 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 빌리버딘 9알파를 수득하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 빌리버딘 9 알파의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 글루타밀티알엔에이리덕테이즈를 코딩하는 유전자 HemA, 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈를 코딩하는 유전자 HemL 및 철코프로포르피린3디카복실레이즈를 코딩하는 유전자 HemQ가 증폭되어 있고, 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주에서, 헴옥시게네이즈를 코딩하는 유전자 HmuO가 추가로 증폭되어 있고, 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 빌리버딘 9 알파의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 빌리버딘(biliverdin)은 초식동물의 담즙에 함유되어 있는 녹색 담즙 색소로, 적혈구의 헤모글로빈이 가수분해를 해서 헤모와 글로빈으로 분해해 망내계세포로 개환한 녹색의 빌리루빈이 산화되어 빌리버딘이 생성된다.

[0003] 빌리버딘은 간 질환 환자의 혈액에서 발견되며, 순환계 조직에 빌리버딘이나 빌리루빈이 추척되어 황달이 발생하게 된다. 빌리버딘은 일반적으로 헴(heme)의 분해시에 발생하는 단순부산물로 예갸지나, 빌리버딘과 다른 담즙색소가 생리적인 역할을 한다는 증거가 있다(Bulmer, AC *et al.*, *Mutation Research.* 658:28~41, 2008).

[0004] 빌리버딘 같은 담즙색소는 항돌연변이 및 항산화 성질을 가지므로, 유용한 생리적 기능을 수행할 수 있으며, 빌리버딘과 빌리루빈은 퍼옥시라디칼의 강력한 제거제로 알려져 있다(Bulmer, AC *et al.*, *Mutation Research.*, 658:28~41, 2008). 이들은 돌연변이 유발 물질인 다환 방향족 탄화수소, 헤테로사이클릭아민 및 산화제의 영향을 억제하는 것으로 확인되었으며, 일부 연구에 따르면 체내에 빌리루빈과 빌리버딘의 농도가 높은 사람들은 암 및 심혈관 질환의 빈도가 낮았다. 빌리버딘은 많은 다른 tetrapyrrolic 염료뿐만 아니라 HIV-1 프로테아제 억제제로 작용할뿐만 아니라 천식에서 유익한 효과를 나타낼 수 있다고 제안되어 왔다(McPhee, F. *et al.*, The Biochemical Journal. 320 (Pt 2): 681~6, 1996; Ohrui, T *et al.*, The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 199: 193~6, 2003).

[0005] 최근 빌리버딘 9 알파가 항산화제 의약품, 광유전학 전구체, 색소 전구체 등 다양한 분야에서 필요성이 증가함에 따라 수요량이 증가하는 추세이다. 기존 빌리버딘 9 알파의 경우 포유류의 담즙에서 추출한 빌리루빈을 화학적 산화 방법을 통해 추출하여 왔으나, 이러한 방법은 동물유래 원료사용에 따른 문제를 초래할 뿐만 아니라 불순물을 함유하고 있어, 환경 오염 등의 문제가 있었으며, 대장균의 발효에 의한 빌리버딘 9 알파에 대한 생산 기술은 지속적인 질소원의 첨가가 필요하며 합성 수율이 높지 않은 단점이 있었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 빌리버딘 9 알파를 동물유래 원료의 오염 염려 없이 높은 수율로 생산하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 코리네박테리움 글루타믹쿰을 사용하여 빌리버딘 9 알파를 생산하는 대사경로의 속도결정에 관여하는 유전자들을 선택하여 과발현시키는 경우, 미생물의 대사부담이 최소화되고, 질소원의 첨가 없이 고수율로 빌버리디 9 알파를 생산할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주를 이용한 빌리버딘 9 알파의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주를 이용한 헴의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루타밀티알엔에이리덕테이즈를 코딩하는 유전자 HemA, 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈를 코딩하는 유전자 HemL 및 철코프로포르피린3디카복실레이즈를 코딩하

는 유전자 HemQ가 증폭되어 있고, 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주에서, 헴옥시게네이즈를 코딩하는 유전자 HmuO가 추가로 증폭되어 있고, 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 상기 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 헴을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 헴을 수득하는 단계를 포함하는 헴의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (a) 상기 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 빌리버딘 9알파를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 빌리버딘 9알파를 수득하는 단계를 포함하는 빌리버딘 9알파의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 재조합 균주를 이용하면, 부가적인 질소원 첨가가 없이 글루코스만을 활용하여 빌리버딘 9 알파를 친환경적으로 합성할 수 있어, 기존의 환경오염 문제가 있었던 합성방법인 화학적 처리에 의한 빌리버딘 9 알파 합성을 대체할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 코리네박테리움 글루타믹쿰에서 가능한 빌리버딘 9 알파의 생산을 위한 생합성 경로 및 관련 효소를 나타낸 것으로, 붉은색은 과발현시킨 효소를 나타내며, 괄호 안은 각 관련 효소들의 깁스 자유 에너지를 나타낸 것이다.

도 2는 코리네박테리움 글루타믹쿰 과발현 재조합 벡터(pMT1-*tac*)의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 3은 코리네박테리움 글루타믹쿰 과발현 재조합 벡터(pMTZ)의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 4는 코리네박테리움 글루타믹쿰 HemN, HemQ, HmuO 과발현 재조합 벡터(pMTZ-hemN, pMTZ-hemQ, pMTZ-hmuO)의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 5는 코리네박테리움 글루타믹쿰 과발현 재조합 벡터(pEKEx2)와 코리네박테리움 글루타믹쿰 hemAL 과발현 재조합 벡터(pEKEx2-hemAL)의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 6은 코리네박테리움 글루타믹쿰 HemALQ, HemALO, HemQO 및 HemOQ 과발현 재조합 벡터(pEKEx2-hemALQ, pEKEx2-hemALO, pMTZ-hemQO 및 pMTZ-hemOQ)의 구조와 이를 기반으로 만든 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주(BVMOD1, BVMOD2, BVMOD3, BVMOD4)의 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주(KZ, ALZ, ALN, ALQ)의 헴 생합성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주 ALO의 포르피린 부산물인 유로포르피린 3, 프로토포르피린 9, 코프로포르피린 3 및 헴과 빌리버딘 9 알파의 생합성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주(BVMOD1, BVMOD2, BVMOD3, BVMOD4)의 헴 및 빌리버딘 9 알파의 생합성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주 BVMOD3의 유가 배양식 발효를 통해 빌리버딘 9 알파의 생합성한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명에서는 코리네박테리움 글루타믹쿰을 이용하여 빌리버딘 9 알파를 고수율로 생합성하는 방법을 개발하였으며, 인비트로 열역학적 계산을 통해 선택된 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주 유래의 글루타밀티알엔에이리덕테이즈(HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈(HemL) 및 철코프로포르피린3디카복실레이즈(HemQ)를 과발현하는 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주를 제작하였다. 상기 재조합 균주는 빌리버딘 9 알파의 전구체인 헴을 효율적으로 합성하였다.

[0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 글루타밀티알엔에이리덕테이즈를 코딩하는 유전자 HemA, 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈를 코딩하는 유전자 HemL 및 철코프로포르피린3디카복실레이즈를 코딩하는 유전

자 HemQ가 증폭되어 있고, 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 상기 HemA 유전자 및 상기 HemL 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 HemQ를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0020] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 헴을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 헴을 수득하는 단계를 포함하는 헴의 제조방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서는 추가적인, 인비트로 열역학적 계산을 통해 코프로포르피린 3 경로가 기존 프로토포르피린 9 관련 경로보다 열역학적으로 안정적임을 확인하였고, 그 비교를 위해 프로토포르피린 9 관련 유전자인 코프로포르피리노겐3옥시데이즈(HemN)과 코프로포르피린 3 관련 유전자인 철코프로포르피린3디카복실레이즈(HemQ)를 각각 HemA, HemL과 함께 과발현하는 재조합 균주를 제작하였다. HemA, HemL 및 HemN을 과발현한 균주는 HemA 및 HemL을 과발현한 균주보다 낮은 헴 합성량을 보였으나 HemA, HemL 및 HemQ을 과발현한 균주는 더 높은 헴 합성량을 나타내었다. 따라서, 헴옥시게네이즈(HmuO)를 글루타밀티알엔에이리덕테이즈(HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈(HemL)와 함께 과발현하는 재조합 균주를 제작하고, 상기 재조합 균주가 빌리버딘 9 알파를 생합성하는 것을 확인하였다.

[0022] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 헴 생합성능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 균주에서, 헴옥시게네이즈를 코딩하는 유전자 HmuO가 추가로 증폭되어 있고, 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 HemA 유전자 및 HemL 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 HemQ 유전자 및 HmuO 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 있는 특징으로 할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 양태에서는 글루타밀티알엔에이리덕테이즈, 글루타메이트-1-세미알데하이드아미노트렌스퍼레이즈, 철코프로포르피린3디카복실레이즈, 헴옥시게네이즈를 함께 발현하여 모듈 최적화를 통해 가장 빌리버딘 9 알파 합성 수율이 높은 균주를 확인하였고, 5-L 유가배양식 발효를 통해 가장 높은 빌리버딘 9 알파 수율을 달성하였다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 HemQ 유전자와 HmuO 유전자는 hemQO의 형태로 재조합 벡터에 의해 도입되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 빌리버딘 9 알파 생산능을 갖는 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주는 부가적인 질소원 첨가가 없이 글루코스만을 활용하여 빌리버딘 9 알파를 친환경적으로 합성하며, 이에 따라 기존의 화학적 처리에 의한 빌리버딘 9 알파 합성을 대체할 수 있는 생물학적 생산 균주이다.

[0027] 본 발명은 또다른 관점에서, (a) 상기 빌리버딘 9 알파 생성능을 가지는 재조합 코리네박테리움 속 균주를 배양하여, 빌리버딘 9알파를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 빌리버딘 9알파를 수득하는 단계를 포함하는 빌리버딘 9알파의 제조방법에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 부가적인 질소원을 첨가하지 않고도 빌리버딘을 합성할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일양태에서는 hemQO 유전자와 hemAL유전자가 도입되어 있는 재조합 균주(BVMOD 균주)를 유가식 배양으로 재조합 균주를 배양하였을 때, 72시간 배양 시에, 70mg/L의 빌리버딘 9알파를 생성하는 것을 확인하였다.

[0030] 또한 본 발명에 따라 개발된 빌리버딘 9 알파 생산 재조합 균주는 빌리버딘 9 알파 자체 외에도, 그를 전구체로 하는 빌리루빈, 파이코에리트로빌린, 파이코시아노빌린과 같은 유용한 물질들을 생산하는 공정에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다(도 8 참조).

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0032] **실시예 1: 코리네박테리움 글루타믹쿰 내 빌리버딘 9 알파 합성 경로에 관련 유전자의 열역학적 안정성 분석**

[0033] 코리네박테리움 글루타믹쿰에서 L-글루타메이트로부터 빌리버딘 9 알파를 생성하는 생합성 경로에 관여하는 유전자의 열역학적 안정성에 대하여 in vitro 분석을 수행하였다.

[0034] 분석은 MetaCyC (https://metacyc.org/) 프로그램을 활용하여 25℃, pH 7.3 및 0.25M 이온 세기하에서 분석하였다. 각 반응에 대한 깁스 자유 에너지의 변화량은 생성물의 깁스 에너지의 총 합에서 기질의 깁스 에너지의

총 합을 빼서 계산하였으며, kcal/mol 단위로 주어진 값은 kJ/mol 로 변환하였다(1 kcal/mol = 4.184 kJ/mol).

[0035] 그 결과를 도 1에 나타내었으며, 도 1에서 괄호 안은 각 효소들이 관여하는 반응의 깁스 자유 에너지 변화량을 나타낸다. 깁스 자유 에너지 변화량이 양의 값일 경우 열역학적으로 불안정한 비자발적인 반응이다. 깁스 자유 에너지 변화량이 음의 값일 경우 열역학적으로 안정한 자발적인 반응을 나타낸다. 이 중 가장 높은 양의 값인 HemA 유전자가 관여하는 구간은 빌리버딘 생합성 경로 상의 가장 불안정한 비자발적인 반응으로 예측되며 이는 빌리버딘 생합성 향상에 있어 가장 주요한 구간임을 의미한다.

[0036] **실시예 2: 열역학적 안정성 분석 결과 기반 목표 유전자 *hemA, hemL* 유전자가 삽입된 재조합 벡터 구축**

[0037] 실시예 1의 결과를 기반으로 hemA 유전자를 과발현하는 재조합 벡터 구축을 수행하였다. 이전 선행 연구 (등록번호:10-1780767)에서, *hemA, hemL* 유전자의 동시 과발현의 효과는 입증된 바 있어, 두 유전자 모두 pEKEx2 벡터로 도입하고자 다음과 같은 재조합 벡터 구축 실험을 진행하였다. 우선, hemA와 hemL 유전자는 pMT-tac hemAL (출원번호:10-20170061713)를 template로 ALF, ALR (서열번호7, 8)를 이용하여 PCR을 통해 확보되었다. pEKEx2-hemAL 벡터 (도 5)를 구축하기 위해, 증폭된 hemAL 유전자는 5'에 접착 말단을 형성하는 제한효소 *Pst I* 과 3'에 제한효소 *Sal I* 으로 절단하여 동일한 제한효소로 절단된 pEKEx2 벡터로 삽입되었다.

[0038] **실시예 3: 코리네박테리움 글루타믹쿰 형질전환용 과발현 재조합 벡터 구축**

[0039] 코리네박테리움 글루타믹쿰 형질전환용 재조합 벡터인 pMT-tac (등록번호: 10-1756338에서 제작)에서 kanamycin 저항성 유전자를 제거하기 위해 5'에 접착 말단을 형성하는 제한효소 *Sal I* 과 3'에 제한효소 *SnaB I* 으로 절단하였다. 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주 내에서 양립 가능한 두 벡터를 활용하기 위해 기존 벡터에 zeocin 저항성 유전자를 도입하였다.

[0040] Zeocin 유전자(서열번호 6)를 프라이머 ZF, ZR (서열번호 9,10)을 이용하여 PCR을 통해 확보한 후 상기 제한효소로 절단하고 pMT-tac에 삽입하여, Zeocin 유전자를 가지는 재조합 벡터 pMTZ를 제작하였다(도 3). 상기 제작한 pMTZ 재조합 벡터가 pEKEx2 벡터와 함께 사용할 수 있는지 확인하기 위해 pEKEx2 벡터와 pEKEx2-hemAL(도 5)와 각각 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주(KCTC 3017)에 형질전환시키고, 각 균주는 KZ 및 ALZ로 명명하였다.

[0041]

표 1

[0042] 본 발명에서 사용한 프라이머 서열

프라이머명	프라이머 서열	서열번호
ALF	AATCTGCAGAAGGAGATATACATGACCAAGAAGCTTTTAGCGC	7
ALR	ACTGTCGACTCACAACTTCGCAAACACCC	8
ZF	CCCGTCGACGTTGACAATTAATCATCGGCATAG	9
ZR	ATTACGTAGTGTCAGTCCTGCTCCTC	10
NF	GGGATCGATATGTCAGTTTTTGGTGTGTATATTC	11
NR	CCCGCGGCCGCTTAGTCTTCTTCACTAAGCAAAATG	12
QF	CCCATCGATATGAGCGAGCTCGATATTAAACAG	13
QR	CCAGCGGCCGCTTAAGGAAGAACCTTAATCAGATCTGCAATG	14
OF	GCGATCGATATGACAAGCATTATTGCAAGC	15
OR	GGGGGATCCTTAAGCAAGAGCCTGAAAAACTTGCTGATT	16
ALQF	GCCGGATCCAAGGAGATATAGATGAGCGAGCTCGATATTAAACAG	17
ALQR	CGCGGTACCTTAAGGAAGAACCTTAATCAGATCTGC	18
ALOF	CCCGGATCCAAGGAGATATAGATGACAAGCATTATTGCAAGCAACAG	19
ALOR	CCCGGTACCTTAAGCAAGAGCCTGAAAAACTTGCTG	20
QOF	CCCGCGGCCGCAAGGAGATATAGATGACAAGCATTATTGCAAGCAA	21
QOR	GAGGCGGCCGCTTAAGCAAGAGCCTGAAAAACTTG	22
OQF	CCCGGATCCAAGGAGATATAGATGAGCGAGCTCGATATTAAACAGC	23
OQR	GGGGCGGCCGCTTAAGGAAGAACCTTAATCAGATCTGCAATGT	24

[0043] **실시예 4: 코리네박테리움 글루타믹쿰 유래 *hemN, hemQ* 유전자로 형질전환된 재조합 균주 제작**

[0044] 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 hemN 유전자 및 hemQ 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다.

[0045] 실시예 1에서 제작한 코리네박테리움 글루타믹쿰 과발현 재조합 벡터 pMTZ 에 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주로부터 유래한 *hemN* 유전자(서열번호 5) 및 *hemQ* 유전자(서열번호 3)를 클로닝하기 위하여, 염기서열을 참고로 하여 각각 Cla1과 Not1, Cla과 Not1 제한효소 서열을 포함하는 프라이머 NF(서열번호 11), NR(서열번호 12), QF(서열번호 13) 및 QR(서열번호 14)의 프라이머를 합성하였다. 이후 코리네박테리움 글루타믹쿰 ATCC 13032 gDNA를 template로 NF, NR, QF 및 QR 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 각각 *hemN* 유전자 및 *hemQ* 유전자를 확보하였다.

[0046] 상기 pMTZ 벡터와 상기 수득한 hemN 유전자 및 hemQ 유전자를 포함하는 PCR 산물을 각각 제한효소 처리하여 라이게이션 반응을 진행하였고 이후 대장균 DH5a 균주에 형질전환하였으며, 구축된 재조합 벡터는 각각 pMTZ-hemN, pMTZ-hemQ라 명명하였다(도 4). pMTZ-hemN과 pMTZ-hemQ는 각각 pEKEx2-hemAL 벡터와 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰(KCTC 3017)로 형질전환하였다. 형질전환된 코리네박테리움 글루타믹쿰 KCTC 3017 균주는 각각 ALN 및 ALQ로 명명하였다.

[0047] **실시예 5: 재조합 균주의 헴 생산량 비교**

[0048] 실시예 3에서 제작한 재조합 균주인 KZ 균주 및 ALZ 균주와 실시예 4에서 제작한 ALN 균주 및 ALQ 균주에서의 헴 생산량을 분석하였다.

[0049] 각 균주는 100ml의 CGXⅡ 배지 (멸균 증류수 1L 당 20 g $(NH_4)_2SO_4$, 5 g urea, 1 g KH_2PO_4, 1 g K2HPO$_4$, 42 g 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), 0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg $CaCl_2$, 10 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.31 mg $CuSO_4.5H_2O$, 0.02 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 mg biotin)를 포함하는 500ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 150 rpm의 조건으로 60시간 배양하였다.

[0050] 생산된 헴의 농도는 400nm의 파장의 UV-디텍터 분석장비를 포함한 역상 HPLC (Waters Corporation, USA)를 통하여 분석되었으며 조건은 다음과 같다. 분석은 C18 컬럼을 이용하여 Gradient 조건으로 진행되었으며 20% Solvent A(1:9 메탄올:아세토나이트릴)와 80% Solvent B(0.5% 트라이플로오로아세트산를 포함한 멸균증류수, pH2.6으로 적정) 용매비율로 시작하여 40분 동안 95% Solvent A, 5% Sovent B로 끝나도록 농도구배를 주었다.

[0051] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, hemA 유전자, hemL 유전자 및 hemQ 유전자로 형질전환된 ALQ 균주가 가장 높은 헴 생합성능을 가지는 것을 확인하였다.

[0052] **실시예 6:코리네박테리움 글루타믹쿰 유래 *hmuO* 유전자로 형질전환된 재조합 균주의 제작**

[0053] 실시예 3에서 제작한 재조합 벡터 pMTZ에 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주로부터 유래한 *hmuO*의 유전자(서열번호 4)를 클로닝하기 위하여, 염기서열을 참고로 하여 Cla1과 Not1 제한효소 서열을 포함하는 OF 프라이머(서열번호 15), OR 프라이머(서열번호 16)를 합성하였다. 이후 코리네박테리움 글루타믹쿰 ATCC 13032 gDNA를 template로 OF 및 OR 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 유전자를 확보하였다.

[0054] 상기 pMTZ 벡터와 *hmuO* 유전자를 포함하는 PCR 산물을 제한효소 처리하여 라이게이션 반응을 진행하였고, 이후 대장균 DH5a에 형질전환하고, 구축된 재조합 벡터는 pMTZ-hmuO라 명명하였다(도 4). pMTZ-hmuO와 pEKEx2-hemAL 벡터를 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주(KCTC 3017)로 형질 전환하였다. 형질전환된 코리네박테리움 글루타믹쿰 KCTC 3017 균주를 ALO로 명명하였다.

[0055] **실시예 7: ALO 균주의 빌리버딘 및 기타 포르피린 생산능 확인**

[0056] 실시예 6에서 제작한 ALO 균주의 빌리버딘 및 기타 포르피린 생산량을 확인하였다. 형질전환체는 100ml의 CGXⅡ 배지를 포함한 500ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 150 rpm의 조건으로 60시간 배양하였다.

[0057] 생산된 헴과 포르피린 부산물의 농도는 400nm의 파장의 UV-디텍터 분석장비를 포함한 역상 HPLC (Waters Corporation, USA)를 통하여 분석되었으며 조건은 다음과 같다. 분석은 C18 컬럼을 이용하여 Gradient 조건으로 진행되었으며 20% Solvent A(1:9 메탄올:아세토나이트릴)와 80% Solvent B(0.5% 트라이플로오로아세트산를 포함한 멸균증류수, pH2.6으로 적정) 용매비율로 시작하여 40분 동안 95% Solvent A, 5% Sovent B로 끝나도록 농도구배를 주었다.

[0058] 생산된 빌리버딘의 농도는 376nm의 파장의 UV-디텍터 분석장비를 포함한 역상 HPLC (Waters Corporation, USA)를 통하여 분석되었으며 조건은 다음과 같다. 분석은 C18 컬럼을 이용하여 Gradient 조건으로 진행되었으며

25% Solvent C(메탄올)와 75% Solvent D(1M의 암모늄아세트산, pH 5.16) 용매비율로 시작하여 8분 동안 95% Solvent C, 5% Sovent D로 끝나도록 농도구배를 주었고, 2분 동안 농도구배 없이 95:5 비율로 유지해주었으며, 다시 8분동안 25% Solvent C, 75% Sovent D로 끝나도록 농도구배를 주었다.

[0059] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 균주 ALO는 포르피린 부산물인 유로포르피린 3, 코프로포르피린 3 및 헴을 생산하였으며, 빌리버딘 9에 대하여 높은 생성능을 나타내었다. 프로토포르피린 9은 생성시키지 않는 것으로 나타났다.

[0060] **실시예 8: 빌리버딘 생산 최적화를 위한 벡터 모듈화**

[0061] 코리네박테리움 글루타믹쿰 재조합 벡터 pEKEx2-hemAL(도 5)에 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주로부터 유래한 *hemQ* 유전자(서열번호 3) 및 *hmuO*유전자(서열번호 4)를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고하여, 각각 유전자 앞에 리보솜 결합 부위를 삽입한 후 BamH1과 Kpn1 제한효소 서열을 포함하는 프라이머인 ALQF(서열번호 17), ALQR(서열번호 18), ALOF(서열번호 19) 및 ALOR(서열번호 20)를 합성하고, 이후 코리네박테리움 글루타믹쿰 ATCC 13032 gDNA를 template로 상기 ALQF, ALQR, ALOF 및 ALOR 프라이머를 이용하여, PCR을 수행하여 유전자를 확보하였다.

[0062] pEKEx2-hemAL 벡터와 *hemQ*유전자 및 *hmuO* 유전자를 포함하는 PCR 산물을 각각 제한효소 처리하여 라이게이션 반응을 진행하고, 대장균 DH5a 균주에 형질 전환하였다. 구축된 재조합 벡터는 각각 pEKEx2-hemALQ, pEKEx2-hemALO라 명명하였다(도 6). 각 벡터는 실시예 6에서 제작한 pMTZ-hmuO 벡터와 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주 (KCTC 3017)로 형질전환하였다. 형질전환된 코리네박테리움 글루타믹쿰 KCTC 3017 균주는 각각 BVMOD1 및 BVMOD2라 명명하였다.

[0063] 한편, 코리네박테리움 글루타믹쿰 과발현 재조합 벡터 pMTZ에 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주로부터 유래한 *hemQO* 유전자를 클로닝하기 위해, *hemQ* 유전자(서열번호 3)의 경우 Cla1과 Not1 제한효소 서열을 포함하는 프라이머 QF 및 QR 프라이머를 합성하였다. *hmuO*유전자(서열번호 4)의 염기서열을 참고로 하여 hmuO의 경우 유전자 앞에 리보솜 결합 부위를 삽입한 후 Not1과 Not1 제한효소 서열을 포함하여 프라이머 QOF(서열번호 21) 및 QOR (서열번호 22)을 합성하였다. 이후 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 유전자를 확보하였다.

[0064] 실시예 3에서 제작한 pMTZ 벡터와 *hemQO* 유전자를 제한효소 처리하여 라이게이션 반응을 진행하였고 이후 대장균 DH5a 균주에 형질전환하였다. 구축된 재조합 벡터는 pMTZ-hemQO라 명명하였다(도 6c 참조). pMTZ-hemQO는 pEKEx2-hemAL 벡터와 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주(KCTC 3017)로 형질전환하였다. 형질전환된 코리네박테리움 글루타믹쿰 KCTC 3017 균주는 BVMOD3로 명명하였다.

[0065] 상기 재조합 벡터 pMTZ에 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주로부터 유래한 *hemOQ* 유전자를 클로닝하기 위해 *hmuO* 유전자(서열번호 4)의 경우 Cla1과 BamH1 제한효소 서열을 포함하여 프라이머 OF 및 OR 프라이머를 합성하였다. *hemQ* 유전자(서열번호 3)의 경우 유전자 앞에 리보솜 결합 부위를 삽입한 후 BamH1과 Not1 제한효소 서열을 포함하는 프라이머 OQF(서열번호 23) 및 OQR(서열번호 24) 프라이머를 합성하였다. 이후 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 유전자를 확보하였다.

[0066] 실시예 3에서 제작한 pMTZ 벡터와 *hemOQ* 유전자를 제한효소 처리하여 라이게이션반응을 진행하였고 이후 에스세리시아 콜라이 (*Escherichia coli*) DH5a 균주에 형질 전환하였다. 구축된 재조합 벡터는 pMTZ-hemOQ라 명명하였다. pMTZ-hemQO는 pEKEx2-hemAL 벡터와 함께 코리네박테리움 글루타믹쿰(KCTC 3017)로 형질전환하였다. 형질전환된 코리네박테리움 글루타믹쿰 KCTC 3017 균주는 BVMOD4로 명명하였다.

[0067] **실시예 9: 모듈화된 재조합 균주의 빌리버딘 생산능 비교**

[0068] 실시예 8에서 확보한 BVMODD1, BVMOD2, BVMOD3 및 BVMOD4 균주의 빌리버딘 생산능을 비교하였다. 각 형질전환체는 100ml의 CGXⅡ 배지(상기동일)를 포함한 500ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 150 rpm의 조건으로 60시간 배양하였다.

[0069] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, BVMODD1, BVMOD2, BVMOD3 및 BVMOD4 균주 모두에서 헴과 빌리버딘 생성능이 확인되었으며, 빌리버딘의 경우, BVMODD1, BVMOD2 및 BVMOD3 균주에서 높은 생성능을 나타내었고, BVMOD3 균주가 가장 높은 빌리버딘 생성능을 나타내었다. BVMOD4 균주의 경우는 헴 생성이 월등하였으며, 빌리버딘 생성율은 다른 균주에 비하여 상대적으로 낮았다.

[0070] **실시예 9: 유가 배양식 발효를 통한 빌리버딘 생산**

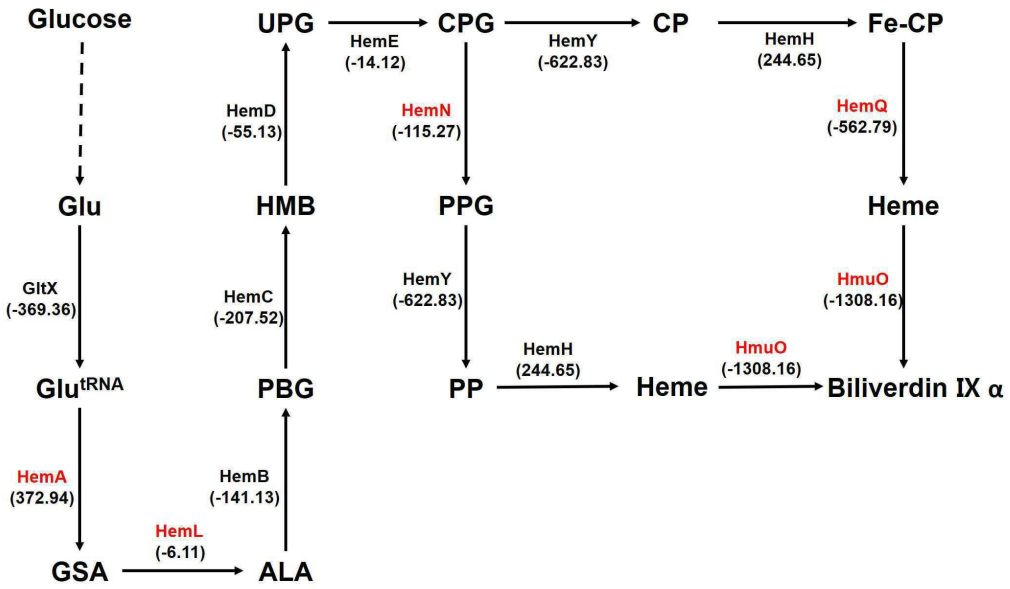
[0071] 실시예 8에서 가장 높은 빌리버딘 생산능을 보인 BVMOD3 균주를 선택하여 5-L 배양기에서 유가 배양식 발효를 진행하였다. BVMOD3 균주는 초기 1.8L의 CGXⅡ 배지를 사용하여 30℃, 1.8 vvm, 600 rpm의 조건으로 배양하였다. 균주의 생장은 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 글루코스는 글루코스 분석 키트(Sigma aldrich)를 이용하여 분석하였다. 초기 글루코스는 80g/L로 시작하였으며 글루코스 농도가 15g/L보다 낮아질 경우 글루코스 50% 용액을 첨가하였다.

[0072] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 유가식 배양으로 재조합 균주를 배양하였을 때, 72시간 배양 시에, 70mg/L의 빌리버딘 9알파를 생성하는 것을 확인하였다.

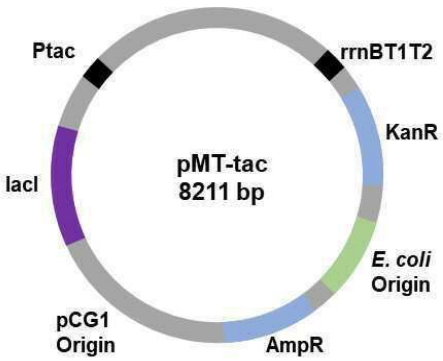
[0073] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

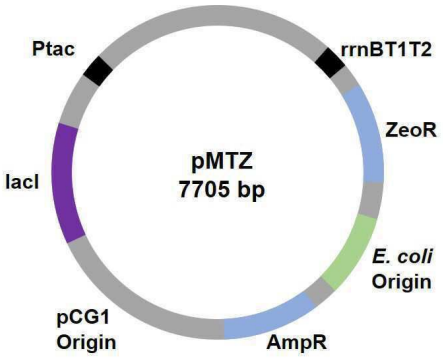
도면1



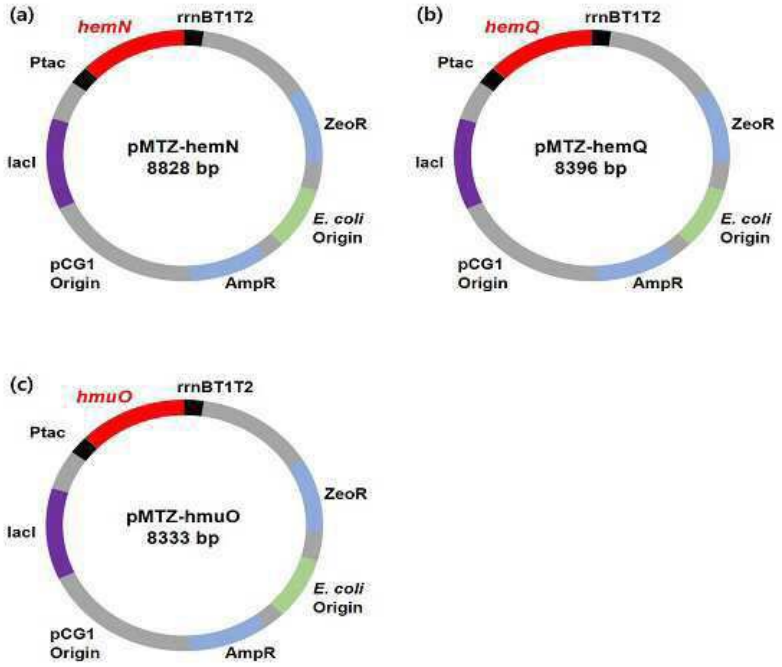
도면2



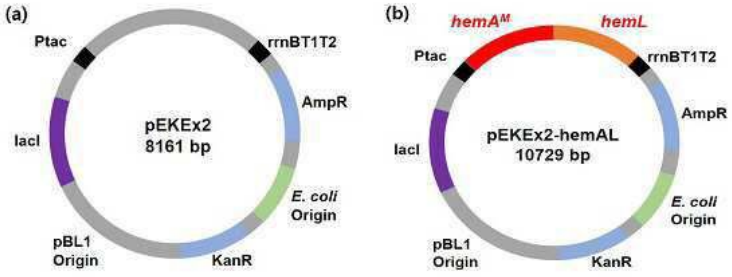
도면3


Ptac
rrnBT1T2
ZeoR
lacI
pMTZ
7705 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR

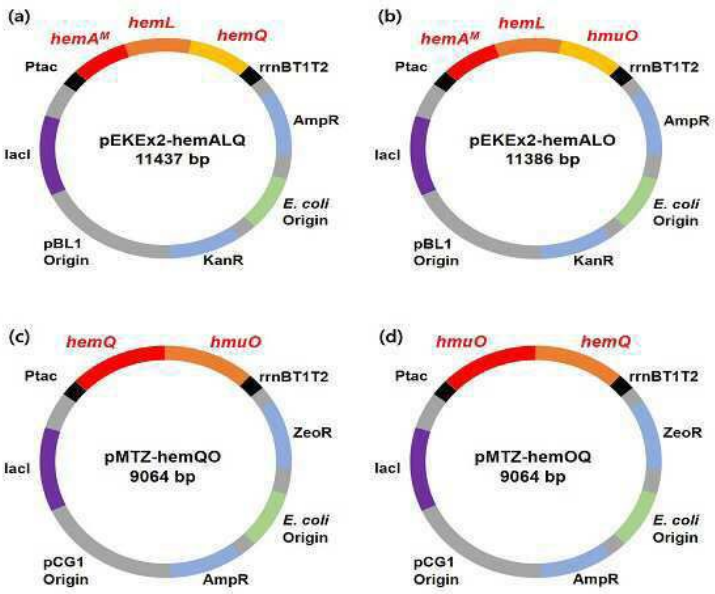
도면4


(a)
hemN
rrnBT1T2
Ptac
ZeoR
lacI
pMTZ-hemN
8828 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR
(b)
hemQ
rrnBT1T2
Ptac
ZeoR
lacI
pMTZ-hemQ
8396 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR
(c)
hmuO
rrnBT1T2
Ptac
ZeoR
lacI
pMTZ-hmuO
8333 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR

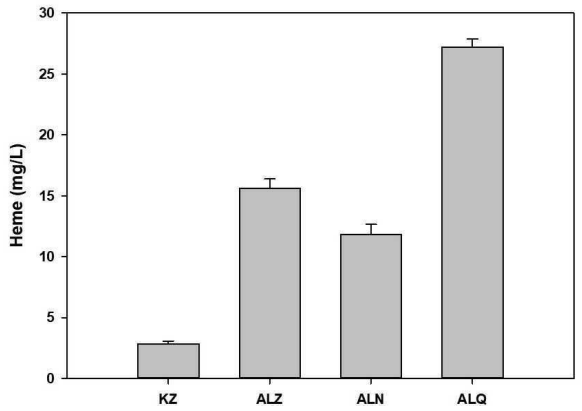
도면5


(a)
Ptac
rrnBT1T2
AmpR
lacI
pEKEx2
8161 bp
E. coli
Origin
pBL1
Origin
KanR
(b)
hemA^M
hemL
Ptac
rrnBT1T2
AmpR
lacI
pEKEx2-hemAL
10729 bp
E. coli
Origin
pBL1
Origin
KanR

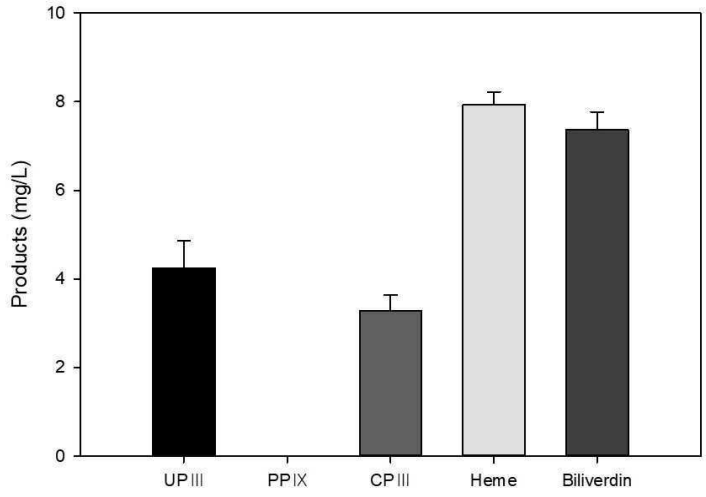
도면6


(a)
hemA^M
hemL
hemQ
Ptac
rrnBT1T2
AmpR
lacI
pEKEx2-hemALQ
11437 bp
E. coli
Origin
pBL1
Origin
KanR
(b)
hemA^M
hemL
hmuO
Ptac
rrnBT1T2
AmpR
lacI
pEKEx2-hemALO
11386 bp
E. coli
Origin
pBL1
Origin
KanR
(c)
hemQ
hmuO
Ptac
rrnBT1T2
ZeoR
lacI
pMTZ-hemQO
9064 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR
(d)
hmuO
hemQ
Ptac
rrnBT1T2
ZeoR
lacI
pMTZ-hemOQ
9064 bp
E. coli
Origin
pCG1
Origin
AmpR

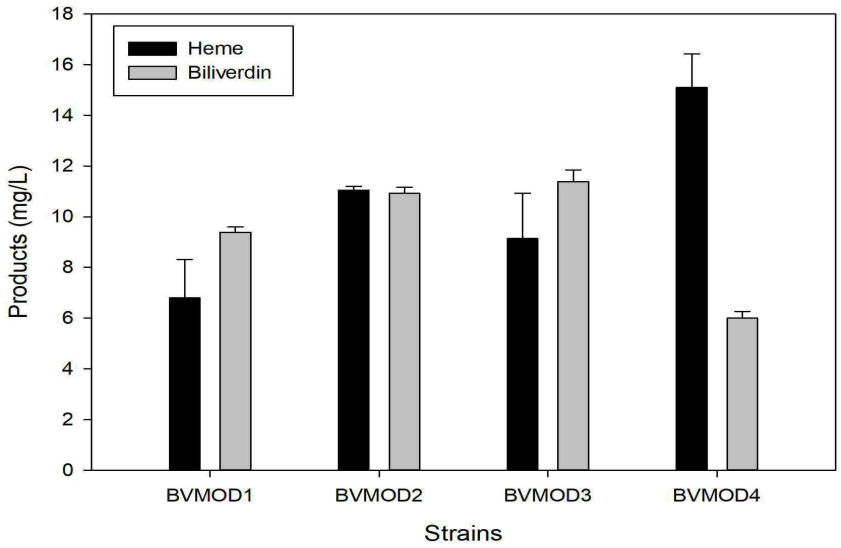
도면7


Heme (mg/L)
30
25
20
15
10
5
0
KZ
ALZ
ALN
ALQ

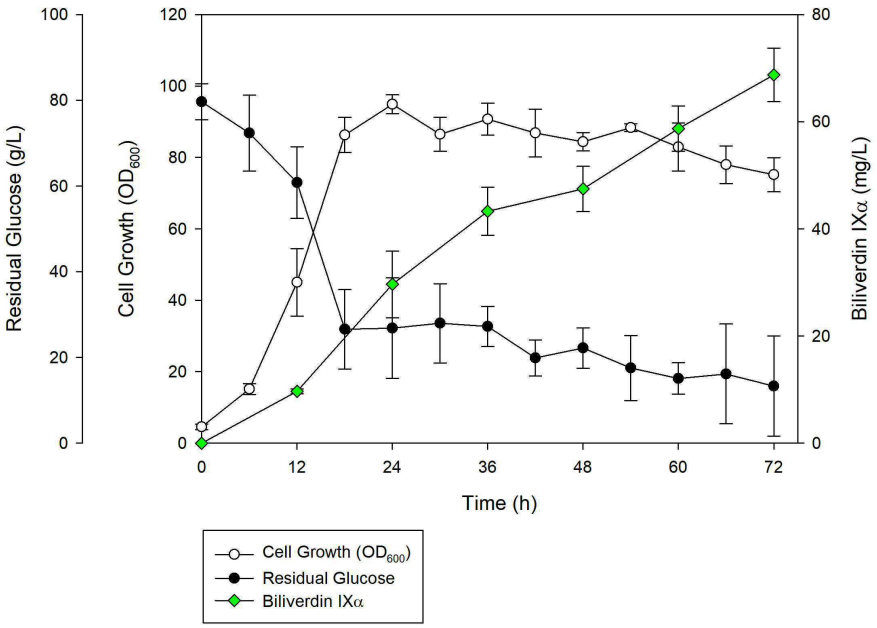
도면8


Products (mg/L)
10
8
6
4
2
0
UPIII
PPIX
CPIII
Heme
Biliverdin

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Recombinant Corynebacterium Producing Biliverdin IXa and Method for Preparing Biliverdin IXa Using the Same

<130> P19-B062

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1263

<212> DNA

<213> hemA

<400> 1

atgaccaaga agcttttagc gctcggtatt aaccataaaa cggcacctgt atcgctgcga 60

gaacgcgtaa cgttttcgcc ggacacgctt gatcaggcgc tggacagcct gcttgcgcag 120

ccaatggtgc agggcggggt cgtgctgtca acctgtaacc gtacagagct gtatctgagc 180

gtggaagagc aggataacct gcaagaagcg ctgatccgct ggttatgcga ttaccataac 240

ctgaacgagg acgatctgcg caacagtctg tactggcatc aggacaatga cgccgtcagc 300

cacctgatgc gcgtcgccag cggtctggat tcactggtgc tgggcgaacc gcaaatcctc 360

ggtcaggtga aaaaagcgtt tgcggattcg caaaaaggcc accttaacgc cagcgcgctg 420

gagcgaatgt ttcagaagtc tttttccgtc gctaagcgag tgcggactga aaccgatatc 480

ggcgctagcg ccgtctccgt cgcgtttgcc gcctgtacgc tcgcccgcca aatctttgaa 540

tcgctctcga cggtcaccgt actgttagtt ggcgcgggcg aaaccattga actggtggcg 600

cgtcacctgc gcgagcataa agtacaaaag atgattatcg ccaaccgaac ccgcgagcgc 660

gcgcaagccc tggcggatga ggtaggcgct gaggttatct cgctcagcga tatcgacgcc 720

cgtttgcagg atgccgatat tattatcagt tcgaccgcca gcccgctgcc gattatcggt 780

aaaggcatgg tggagcgcgc attaaaaagc cgtcgcaacc agccgatgct gctggtggat 840

attgccgtac cgcgcgacgt tgaaccggaa gtcggcaaac tggcgaacgc ttatctttat 900

agcgtcgatg atttacagag catcatttcg cataatctgg cgcagcgtca ggctgcggca 960

gtagaagcgg aaacgattgt tgagcaggaa gccagcgagt ttatggcctg gctacgcgcc 1020

caggggggca gcgagaccat tcgggaatac cgtagtcagt cggagcagat tcgtgacgaa 1080

ctgactacca aagcgctgtc ggcccttcaa cagggcggtg atgcgcaagc catcttgcag 1140

gatctggcat ggaaactgac caaccgcctg attcatgcgc caacgaaatc acttcaacag 1200

gctgcccgtg acggggatga cgaacgcctg aatattctgc gcgacagcct cgggctggag 1260

tag 1263

<210> 2

<211> 1281

<212> DNA

<213> hemL

<400> 2

atgagtaagt ctgaaaatct ttacagcgca gcgcgcgagc tgatccctgg cggtgtgaac 60

tcccctgttc gcgcctttac tggcgtgggc ggcactccac tgtttatcga aaaagcggac 120
ggcgcttatc tgtacgatgt tgatggcaaa gcctatatcg attatgtcgg ttcctggggg 180
ccgatggtgc tgggccataa ccatccggca atccgcaatg ccgtgattga agccgccgag 240
cgtggtttaa gctttggtgc accaaccgaa atggaagtga aaatggcgca actggtgact 300
gaactggtcc cgaccatgga tatggtgcgc atggtgaact ccggcaccga ggcgacgatg 360
agcgccatcc gcctggcccg tggttttacc ggtcgcgaca aaattattaa atttgaaggt 420
tgttaccacg gtcacgctga ctgcctgctg gtgaaagccg gttctggcgc actcacgtta 480

ggccagccaa actcgccggg cgttccggca gatttcgcca aacatacctt aacctgtact 540
tataacgatc tggcttctgt acgcgccgcg tttgagcaat acccgcaaga gattgcctgt 600
attatcgtcg agccggtggc aggcaatatg aactgcgttc caccgctgcc agagttcctg 660
ccaggtctgc gtgcgctgtg cgacgaattt ggcgcattgc tgatcatcga tgaagtaatg 720
accggcttcc gcgtggcact ggctggcgca caggattatt acggtgtgga accggatctc 780
acctgcctgg gcaaaatcat cggcggtgga atgccggtag gcgcattcgg tggtcgtcgt 840
gatgtaatgg atgcgctggc cccgacgggt ccggtctatc aggcgggtac gctttccggt 900

aacccaattg cgatggcagc gggtttcgcc tgtctgaatg aagtcgcgca gccgggcgtt 960
cacgaaacgt tggatgagct gacatcacgt ctggcagaag gtctgctgga agcggcagaa 1020
gaagccggaa ttccgctggt cgttaaccac gttggcggca tgttcggtat tttctttacc 1080
gacgccgagt ccgtgacgtg ctatcaggat gtgatggcct gtgacgtgga acgctttaag 1140
cgtttcttcc atatgatgct ggacgaaggt gtttacctgg caccgtcagc gtttgaagcg 1200
ggctttatgt ccgtggcgca cagcatggaa gatatcaata acaccatcga tgctgcacgt 1260
cgggtgtttg cgaagttgtg a 1281

<210> 3
<211> 699
<212> DNA
<213> hemQ
<400> 3
atgagcgagc tcgatattaa acagctcaac aaactgcagc gctactctca gtgggcggtg 60
ttccgtgcta ttcctggagc gctcgatgat gatcgcacag aagtcactga ccaagcagcc 120
aagttctttg ccgaccttga agcagaaggc aaagtcactg tccgtggcat ttacaacgcc 180
tccggcctgc gcgcagacgc tgactacatg atctggtggc acgcagaaga attcgaagac 240

attcagaagg ccttcgctga tttccgccgc accaccattt tgggtcaggt ttctgaggtc 300

ttctggatcg gaaacgctct ccaccgtcca tctgagttca acaaggctca cttgccttca 360

ttcatcatgg gtgaagaagc aaaggactgg atcactgttt acccgttcgt gcgcagctac 420

gactggtaca tcatggagcc cttgaagcgt tcccgcattc tccgcgagca cggacaagct 480

gctgtggaat tcccagatgt tcgtgccaac actgtgccgg ctttcgcact gggtgactac 540

gaatgggtgc tggctttcga ggctgatgag ttgcaccgca ttgtcgattt gatgcacaag 600

atgcgttaca ccgaggctcg cctccacgtc cgtgaggagc tgccatttat ttctggacag 660

cgcgtcgaca ttgcagatct gattaaggtt cttccttaa 699

<210> 4

<211> 648

<212> DNA

<213> hmuO

<400> 4

atgacaagca ttattgcaag caacagcgac ctatcggagg cgctgcgcac ccacactgcg 60

caggcccatg aagaggccga gcactcaacg tttatgaatg atctgctcac cgggaagctc 120

gatgcgcagg catttatcaa gttgcaggag caatcatggt tgttctacac cgctttggaa 180

gctgcagctc gtgcatgtgc agaggattcc cgtgcggctg gtctgctgga cccacgcctc 240

gagcgcaagg aaacgttgga agctgatctg gataagctgc acgaaaacac cacctggcgt 300

gacaacgtca cggccactgc agcgacagcg tcttatgtgg aacgtcttga aagcatcgaa 360

gcggccaagg atttccctcg tttggttgct catcactatg tccgctacct gggtgatttg 420

tccggtgggc aggttattgc acgtctggtg aacagggaat atggagtttc ggaagaggcg 480

ttgagcttct actgctttga agatcttggc aagctcaaac cgtacaagga taattaccgt 540

gcagagcttg atgctttgga attaacagca gaggagcgtg ctgcgttgct ggatgaagca 600

tctgatgcgt tcaggtttaa tcagcaagtt tttcaggctc ttgcttaa 648

<210> 5

<211> 1143

<212> DNA

<213> hemN

<400> 5

atgtcagttt ttggtgtgta tattcatgtg ccgttttgtt caactcggtg cggttattgc 60

gatttcaaca cctatactgc tggggaatta ggtagtactg caggcccgga cacctatctt 120

gactcgttgg aagttgagtt ggagatggct gtggcttcgc tggataatcc tcggcaggcg 180

gaaactatct ttattggcgg gggtaccccg tcgttgattg gtgcggacgg tttggccagg 240

gttttggggg ctgtgcgcaa tacttttggc attgcggatg gtgcggaagt caccacggag 300

tccaatccgg agtctacctc gcctgagttt ttcgatggcc tgcgtgaggc gggctacaac 360

aggatttcgt tagggatgca gtcggcgtcg tcaagcgttt tgaaggtgct ggaccgcacg 420

cacaccccag ggcgcccggt ggcggcggcc aaggaggcac gtgaggcggg gtttgagcat 480

gtcaatttgg acatgattta tggcacgccg acagagaccg atgatgatgt ccgcaagacg 540

ctggatgcgg tgctcgaagc gaacgtggat cacgtgtctg cctattcctt gatcgtggaa 600

gatggcacgg cgatggcgcg caaggtgcgc aagggcgagc tgccagcgcc ggacgaggat 660

gtctacgctg atcgttttga gcttatcgac gctcgcctgc gctcagctgg tttcgattgg 720

tacgaggtgt ccaactgggc gaaacccggc ggagaatgca agcacaacat gggctattgg 780

gtcgacggcg actggtgggg cgcgggcccg ggcgcgcact cgcacatcgg cgaccgccgc 840

ttctacaaca tcaagcaccc agcgcgttac tccgcgcaga ttgcggccgg cgagctgccc 900

attaaggaaa cagagcggct gacggcggaa gatcaccaca ccgagcgcgt catgcttggt 960

ttgcgcctga aacaaggcgt gccgctgaac cttttcgcac ccgcagcgcg cccggtcatc 1020

gaccgtcata tcgcaggggg cctgctgcac gtcaatgcgc tgggcaacct ggcggtgacc 1080

gatgcgggac gtttgcttgc cgacggcatc atcgccgaca ttttgcttag tgaagaagac 1140

taa 1143

<210> 6

<211> 375

<212> DNA

<213> Zeocin

<400> 6

atggccaagt tgaccagtgc cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc 60

gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggt 120

gtggtccggg acgacgtgac cctgttcatc agcgcggtcc aggaccaggt ggtgccggac 180

aacaccctgg cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 240

gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag 300

ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc 360

gaggagcagg actga 375

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aatctgcaga aggagatata catgaccaag aagcttttag cgc 43

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

actgtcgact cacaacttcg caaacaccc 29

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cccgtcgacg ttgacaatta atcatcggca tag 33

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

attacgtagt gtcagtcctg ctcctc 26

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gggatcgata tgtcagtttt tggtgtgtat attc 34

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

cccgcggccg cttagtcttc ttcactaagc aaaatg 36

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cccatcgata tgagcgagct cgatattaaa cag 33

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

ccagcggccg cttaaggaag aaccttaatc agatctgcaa tg 42

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gcgatcgata tgacaagcat tattgcaagc 30

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gggggatcct taagcaagag cctgaaaaac ttgctgatt 39

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

gccggatcca aggagatata gatgagcgag ctcgatatta aacag 45

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

cgcggtacct taaggaagaa ccttaatcag atctgc 36

<210> 19

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

cccggatcca aggagatata gatgacaagc attattgcaa gcaacag 47

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

cccggtacct taagcaagag cctgaaaaac ttgctg 36

<210> 21

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

cccgcggccg caaggagata tagatgacaa gcattattgc aagcaa 46

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gaggcggccg cttaagcaag agcctgaaaa acttg 35

<210> 23

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

cccggatcca aggagatata gatgagcgag ctcgatatta aacagc 46

<210> 24

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

ggggcggccg cttaaggaag aaccttaatc agatctgcaa tgt 43