(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0108750
(43) 공개일자 2021년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0023751
(22) 출원일자 2020년02월26일
심사청구일자 2020년02월26일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박성훈
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
수만라마
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
설은희
부산광역시 금정구 금강로 225 벽산블루밍디자인시티 208동 1105호
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

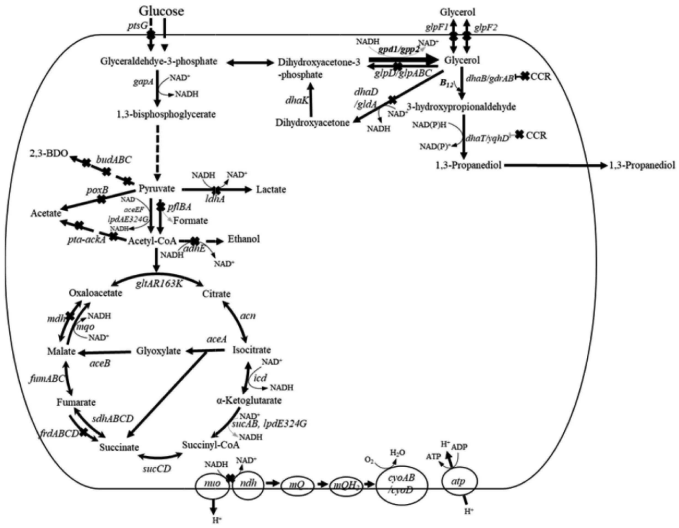
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **글루코스로부터 1,3-프로판디올를 생산하는 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주 및 이를 이용한 1,3-프로판디올의 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 1,3-프로판디올을 생산할 수 있는 신규한 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주 및 이를 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12P 7/18 (2013.01)
C12Y 101/01006 (2013.01)
C12Y 101/01202 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

ptsG 유전자가 결실된 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서,

glpK 유전자, glpD 유전자, glpA 유전자 및 dhaD 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 결실된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서,

glpF1 유전자, glpF2 유전자, ldhA 유전자, adhE 유전자, frdA 유전자, pflB 유전자, edd 유전자, eda 유전자, mgsA 유전자, pta 유전자, ackA 유전자, poxB 유전자 및 mdh 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 결실된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 4

제 1항에 있어서,

gltA 유전자 및 ldpA 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 코드하는 단백질의 하나 이상의 아미노산이 변형되도록 상기 유전자의 염기 서열이 변형된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 5

제 1항에 있어서,

nuoA 유전자, ndh 유전자, budA 유전자, budB 유전자 및 budC 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이 결실된 추가로 결실된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 6

제 1항에 있어서,

글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase)를 코드하는 유전자인 dhaB, 글리세롤 디하이드라타제 리액티바제(glycerol dehydratase reactivase)를 코드하는 유전자인 gdrA 및 gdrB, 및 1,3-프로판디올 옥시도리덕타제(1,3-propanediol oxidoreductase)를 코드하는 유전자인 dhaT가 과발현된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 7

제 1항에 있어서,

자이모모나스 모빌리스(Zymomonas mobilis) 유래의 글루코스 퍼실리테이터(glucose facilitator)를 코드하는 유전자인 glf가 도입된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 생합성 방법:

(a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 클렙시엘라 뉴모니아 균주를 배양하여 1,3-프로판디올을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 생합성된 1,3-프로판디올을 수득하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 1,3-프로판디올를 생산하는 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주 및 이를 이용한 1,3-프로판디올의 생산 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1,3- 프로판디올 (이하, “1,3-PDO”이라고도 함)은 식품, 화장품, 제약 및 섬유 산업 분야에서 폭넓게 응용되는 중요한 플랫폼 화학 물질이다. 포도당을 탄소 원으로 사용하는 재조합 대장균을 이용한 생물학적 생산은 DuPont에 의해 상업화 되었지만, E. coli는 1,3-PDO 생합성 핵심 효소인 글리세롤 탈수 효소의 활성에 필수적인 비타민 B12를 합성 할 수 없다.

[0004] 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumonia)는 1,3-PDO 모듈을 가지고 있기 때문에 글리세롤에서 자연적으로 1,3-PDO를 생산할 수 있다 (Kumar, V., Park, S., 2018. Potential and limitations of Klebsiella pneumoniae as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. Biotechnol. Adv. 36, 150-167, 2018, Celinska, E., 2012. Klebsiella spp as a 1,3-propanediol producer - the metabolic engineering approach. Crit. Rev. Biotechnol. 32, 274-288.). 또한 K. pneumoniae는 대장균이 생산할 수 없는, 고가의 GDHt 보조 효소인 코엔자임 B12를 합성 할 수 있다. 그러나 글리세롤 모듈이 없기 때문에 K. pneumoniae는 포도당에서 1,3-PDO를 자연적으로 생성하지 않는다. 결과적으로 지금까지 K. pneumoniae에 대한 대부분의 연구는 글리세롤을 탄소원으로 이용하는데 초점을 맞추고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 글루코스로부터 1,3-프로판디올을 생산할 수 있는 재조합 클렙시엘라 뉴모니아를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,

[0008] ptsG 유전자가 결실된 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주는 글루코스로부터 높은 수율로 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 재조합 균주 제작을 위한 유전자 조작 전략 및 주요 대사경로를 나타낸다.

도 2는 J2B3 균주 (흰색) 및 J2B5 균주 (검은색) 에서 rpoD, DhaB1, GdrA, GdrB, DhaT 및 DhaR의 상대적인 발현 수준을 보여준다.

도 3은 J2B3 균주 (흰색) 및 J2B5 균주 (검은색) 에서 DhaB 및 DhaT의 특이적 활성을 보여준다.

도 4는 J2B3 균주의 세포성장 및 글리세롤과 부산물의 생산을 보여준다. 세포성장(○), 포도당(◆), 글리세롤(■), 1,3-프로판디올(●), 아세트산(△)

도 5는 J2B5 균주의 세포성장 및 글리세롤과 부산물의 생산을 보여준다. 세포성장(○), 포도당(◆), 글리세롤(■), 1,3-프로판디올(●), 아세트산(△)

도 6은 K. pneumoniae에 존재하는 2 개의 트랜스포터(glpF1 및 glpF2) 유전자의 배열을 나타낸다.

도 7은 글리세롤 모듈이 없는 숙주 균주 만을 사용하여 J2B5, J2B6-1, J2B6-2, J2B6-3을 배양 시 발효 프로파일을 나타낸다. J2B5 (○), J2B6-1 (▲), J2B6-2 (●), J2B6-3 (■).

도 8은 글리세롤 모듈을 도입한 J2B5, 2B6-1, J2B6-2, J2B6-3을 배양 시 발효 프로파일을 나타낸다. J2B5 (○), J2B6-1 (△), J2B6-2 (●), J2B6-3(■).

도 9는 J2B7-1 내지 J2B7-8 균주들의 생산된 부산물의 농도를 보여준다.

도 10은 J2B7-6 균주 (●) 및 J2B7-7 균주 (○)에서 세포 성장 (A) 및 포도당 소모 프로파일 (B) 를 보여준다.

도 11은 J2B6-3, J2B7-1 내지 J2B7-8 균주들에서, 1,3-프로판디올, 글리세롤 및 부산물들의 수율을 나타낸다.

도 12는 J2B7-8, J2B8-1 내지 J2B8-4 균주들에서, 1,3-프로판디올, 글리세롤, 아세테이트 및 2,3-부탄디올의 배지 내 농도 및 수율을 나타낸다.

도 13은 J2B8-4 균주 (●), J2B9-1 균주 (□), J2B9-2 균주 (▲)들의 세포 성장, 포도당 소모, 글리세롤 및 1,3-프로판디올 생산 프로파일을 나타낸다.

도 14는 J2B84, J2B9-1, J2B9-2 균주들의 배양 배지 내, 1,3-프로판디올, 글리세롤, 아세테이트, 락테이트, 2,3-부탄디올 농도를 나타낸다.

도 15는 J2B10-2 균주의 생물 반응기 실험에서 발효 프로파일을 나타낸다. (A) J2B10-2 (plasmid pS10D1P2) 균주가 B12 공급 없이 운전 (B) 4 μM B12가 공급된 조건에서 J2B10-2 (plasmid pS10D1P2) 균주의 생물 반응기 실험의 발효 프로파일 (C) dhaB, gdrAB가 추가 발현된 J2B10-2 (plasmid pS10D1P2) 균주를 4 μM B12가 공급된 조건에서 생물 반응기 실험의 발효 프로파일 (D) dhaB, gdrAB, dhaT 가 추가 발현된 J2B10-2 (plasmid pS10D1P2) 균주를 4 μM B12가 공급된 조건에서의 생물 반응기 실험의 발효 프로파일. 세포성장(●), 포도당(▼), 글리세롤(○), 1,3-프로판디올(□), 피루브산(▲), 아세트산(◆)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) 균주를 제공한다.

[0014] 본 발명에서 사용된 용어 '클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae)'는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다.

[0016] 본 발명에서 이용한 재조합 K. pneumoniae J2B3는 본 발명자들이 글리세롤 모듈을 도입하고 글리세롤 분해 경로를 제거함으로써 제작한 재조합 미생물로서, 포도당을 원료로 사용한다 (Lama, S., Seol, E., Park, S., 2017. Metabolic engineering of Klebsiella pneumoniae J2B for the production of 1,3-propanediol from glucose. Bioresour. Technol). 이 균주는 포도당으로부터 1,3-PDO를 성공적으로 생산하였으며, 이는 비타민 배지내 B12의 보충없이 이루어졌다. 그러나 1,3-PDO 생산량은 낮았으며 많은 도전적인 문제들이 확인되었다. 첫째로, 1,3-

PDO보다는 중간체인 글리세롤이 다량 축적되었다. 글리세롤의 1,3-PDO 로의 낮은 전환은 포도당이 배양 배지에 존재할 때 발생하는 CCR (carbon catabolite repression) 의 영향이 큰 것으로 추정되었다. 즉 포도당이 존재하는 배지에서 1,3-PDO 모듈의 발현이 낮은 것으로 예상되었다. 또 다른 글리세롤 축적의 원인으로 1,3-PDO 모듈의 작동에 필요한 NADH의 불충분한 재생이 추측되었다. 둘째, 아세테이트, 젖산, 에탄올, 2,3- 부탄디올(2,3-BDO)과 같은 다양한 부산물이 과도하게 생성되어 1,3-PDO의 생산성을 저해 할뿐만 아니라 포도당에서의 수율을 심각하게 감소시켰다. 실제로, 생산하려는 대상 화합물과 관계없이 이들 부산물을 과도하게 생산하는 것은 K. pneumonia 의 잘 알려진 심각한 단점이다 (Kumar and Park, 2018). 글리세롤을 탄소원으로 사용하여도 3-HP 및 / 또는 1,3-PDO 생산 시 초산 (~ 9-10 g / L), 에탄올 (~ 2 g / L) 및 젖산 (~ 25-30 g/L) 등이 많이 축적되었다 (Huang, Y., Li, Z., Ye, Q., 2016. Transcriptional regulation of genes involved in 3-hydroxypropionic acid production in response to aeration of recombinant Klebsiella pneumoniae. Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 1129-1140.; Li, Y., Wang, X., Ge, X., Tian, P., 2016. High production of 3-hydroxypropionic acid in Klebsiella pneumoniae by systematic optimization of glycerol metabolism. Sci. Rep. 6, 26932; Ko, Y., Seol, E., Sundara Sekar, B., Kwon, S., Lee, J., Park, S., 2017. Metabolic engineering of Klebsiella pneumoniae J2B for co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol: Reduction of acetate and other by-products. Bioresour. Technol. 244, 1096-1103). 종종 이러한 부산물의 총량은 원하는 목표 제품의 생산량을 초과할 정도로 다량 생성된다.

[0018] 상기 문제점은 K. pneumonia 또는 1,3-PDO 생산에 국한되지 않는다. 이에 따라 이를 해결하기위한 다양한 노력이 이루어졌다. 예를 들어, Chen et al., (2016)(Chen, L., Ma, C., Wang, R., Yang, J., Zheng, H., 2016. Deletion of ldhA and aldH genes in Klebsiella pneumoniae to enhance 1,3-propanediol production. Biotechnol. Lett. 38, 1769-1774) 과 Li et al., (2016)은 K. pneumonia에서 에탄올, 젖산 및 / 또는 숙신산을 유도하는 경로를 제거함으로써 1,3-프로판디올의 생산에서 수율과 역가를 향상시킬 수 있었다. 마찬가지로, Ko et al., (2017)은 부산물 형성 경로를 제거하여 3-HP와 1,3-PDO의 공동 생산을 향상시킬 수 있었다. CCR을 제거하기 위한 노력에는 포스포에놀 피루베이트 (PEP) : 탄수화물 포스 포 트랜스퍼 라제 시스템 (PTS)을 통한 글루코오스 수송에 관련된 crr, ptsG 및 / 또는 ptsH 유전자의 결실 등이 있다. 대장균에서 ptsG 유전자가 결실된 후, 포도당과 자일로스가 동시에 동화되었고, 혼합 탄소원으로부터 30g / L 3-HP가 생산된 결과가 보고된 바 있다 (Jung, I.Y., Lee, J.W., Min, W.K., Park, Y.C., Seo, J.H., 2015. Simultaneous conversion of glucose and xylose to 3-hydroxypropionic acid in engineered Escherichia coli by modulation of sugar transport and glycerol synthesis. Bioresour. Technol. 198, 709-716). NADH의 요구를 충족시키기위한 노력으로는 보조 인자 재생 시스템 경로의 조작, 낮은 산화 상태를 가진 보다 환원된 탄소원의 사용, 보충 영양소(니코틴산과 같은)의 첨가 및 배양 조건의 변경이 포함된다 (Chen, X., Li, S., Liu, L., 2014. Engineering redox balance through cofactor systems. Trends Biotechnol. 32, 337-343M, Wang, Y., San, K.Y., Bennett, G.N., 2013. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 24, 994-999; Zhao, C., Zhao, Q., Li, Y., Zhang, Y., 2017. Engineering redox homeostasis to develop efficient alcohol-producing microbial cell factories. Microb. Cell Fact. 16, 115). 그 중에서도, 보조 인자 재생 시스템 경로의 조작 및 배양 조건의 변경이 효과적이었다. microaerobic 조건의 사용과 oxidative TCA cycle의 활성화는 1,4- 부탄디올과 4-하이드록시 부티르산을 포함한 NADH를 필요로 하는 대사 산물의 생산에 유리하다고 보고된 바 있다 (Choi, S., Kim, H.U., Kim, T.Y., Lee, S.Y., 2016. Systematic engineering of TCA cycle for optimal production of a four-carbon platform chemical 4-hydroxybutyric acid in Escherichia coli. Metab. Eng. 38, 264-273; Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J., Dien, S. Van, Harry Yim et al., 2011. Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. Nat Chem Biol 7, 445-452).

[0020] 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 ptsG 유전자가 결실된 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) 균주이다. 바람직하게는 glpK 유전자, glpD 유전자, glpA 유전자 및 dhaD 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 결실될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 ptsG 유전자, glpK 유전자, glpD 유전자, glpA 유전자 및 dhaD 유전자로 구성된 군으로부

터 선택되는 하나 이상이 결실된 수 있으며, 더욱 바람직하게는 ptsG 유전자, glpK 유전자, glpD 유전자, glpA 유전자 및 dhaD 유전자가 결실될 수 있다.

[0022] 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 glpF1 유전자, glpF2 유전자, ldhA 유전자, adhE 유전자, frdA 유전자, pflB 유전자, edd 유전자, eda 유전자, mgsA 유전자, pta 유전자, ackA 유전자, poxB 유전자 및 mdh 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 결실될 수 있다.

[0024] 이때, gltA 유전자 및 ldpA 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 코드하는 단백질의 하나 이상의 아미노산이 변형되도록 상기 유전자의 염기 서열이 변형될 수 있다. 바람직하게는 gltA 유전자가 코드하는 단백질의 164 번째 아미노산 잔기가 R (아르기닌(Arginine))에서 K (라이신(Lysine))로 변형된 단백질을 코드하도록 gltA 유전자가 돌연변이될 수 있다. 또한 lpdA 유전자가 상기 유전자가 코드하는 단백질의 324 번째 아미노산 잔기가 E (글루탐산(Glutamic acid)) 에서 G (글라이신(Glycine)) 로 변형된 단백질을 코드하도록 lpdA 유전자가 돌연변이될 수 있다. 또는 상기 돌연변이 2 개가 동시에 일어날 수도 있다.

[0026] 또한 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 nuoA 유전자, ndh 유전자, budA 유전자, budB 유전자 및 budC 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 결실될 수 있다.

[0028] 또한 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase)를 코드하는 유전자인 dhaB, 글리세롤 디하이드라타제 리액티바제(glycerol dehydratase reactivase)를 코드하는 유전자인 gdrA 및 gdrB, 및 1,3-프로판디올 옥시도리덕타제(1,3-propanediol oxidoreductase)를 코드하는 유전자인 dhaT가 과발현될 수 있다.

[0030] 또한 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 자이모모나스 모빌리스(Zymomonas mobilis) 유래의 글루코스 퍼실리테이터(glucose facilitator)를 코드하는 유전자인 glf가 도입된 재조합 클렙시엘라 뉴모니아일 수 있다. 이때 재조합 클렙시엘라 뉴모니아에 도입된 상기 glf는 과발현될 수 있다.

[0032] 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 하기 중 하나 이상의 특징을 가질 수 있다. 첫째, CCR을 제거하고 포도당이 존재할 때 생성된 글리세롤을 효율적으로 이용하기 위해서 ptsG 유전자가 파괴된다. 둘째, 초산, 에탄올, 젖산, 에탄올 및 개미산과 같은 다양한 부산물의 형성을 담당하는 유전자가 결실된다. 예컨대, 젖산 (lactic acid) 생성을 증가시키는 단백질을 코드하는 ldhA 유전자, 에탄올 (ethanol) 생성을 증가시키는 단백질을 코드하는 adhE 유전자, 석신산 (succinic acid) 생성을 증가시키는 단백질을 코드하는 frdA 유전자, 개미산 (formic acid) 생성을 증가시키는 단백질을 코드하는 pflBA 유전자, 초산 (acetic acid) 생성을 증가시키는 단백질을 코드하는 pta-ackA 유전자가 결실된다. 셋째, 환원성 TCA 사이클의 활성을 억제하고 산화성 TCA 사이클 흐름을 활성화시킨다. 이를 위해 NADH에 의해 덜 억제되는 몇 가지 돌연변이 TCA 사이클 효소를 사용한다. 즉, gltA 유전자 및/또는 ldpA 유전자가 돌연변이화될 수 있다. 네 번째로, 전자 전달계 사슬(ETC)에서 NADH 탈수소 효소를 암호화하고 있는 nuo 또는 ndh 유전자를 제거하여 ETC를 통한 낭비적인 NADH 산화를 감소시킨다. 본 발명에서는 총 32 개의 유전자가 수정되거나 삭제되거나 상향 조절될 수 있다. 이러한 유전자들 및 그것들이 코드하는 단백질들은 하기 표 1과 같다.

표 1

	유전자	단백질
1	*glpK*	glycerol kinase
2	*glpD*	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
3	*glpA*	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
4	*dhaD*	glycerol dehydrogenase
5	*ptsG*	PTS glucose transporter subunit IIBC
6	*glpF1*	glycerol transporter
7	*glpF2*	glycerol transporter
8	*ldhA*	ldhA, lactate dehydrogenase;
9	*adhE*	adhE, alcohol dehydrogenase
10	*frdA*	fumarate reductase
11	*pflB*	pflB, pyruvate formate lyase;
12	*edd*	phosphogluconate dehyratase
13	*eda*	2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase
14	*mgsA*	*methylglyoxal synthase*
15	*pta*	phosphoacetyl transferase
16	*ackA*	acetate kinase
17	*poxB*	pyruvate oxidase
18	*mdh*	malate dehydrogenase
19	*gltA*	citrate synthase
20	*lpdA*	dihydrolipoyl dehydrognenase (subunit of pyruvate dehydrogenase complex)
21	*nuoA*	NADH dehydrogenase I
22	*ndh*	NADH dehydrogenase II
23	*budA*	acetolactate decarboxylase
24	*budB*	acetolactate synthase
25	*budC*	butanediol dehydrogenase
26	*gpd1*	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
27	*gpp2*	glycerol-3-phosphate phosphatase 2
28	*dhaB*	glycerol dehydratase
29	*dhaT*	1,3-propanediol oxidoreductase
30	*glf*	glucose facilitator
31	*gdrA*	glycerol dehydratase reactivase
32	*gdrB*	glycerol dehydratase reactivase

[0034]

[0036] 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 클렙시엘라 뉴모니아 J2B3 균주보다 배양 시 세포 성장률이 적고, 최종 세포 농도 및 글루코스 소비율이 낮다. 또한 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 클렙시엘라 뉴모니아 J2B3 균주보다 시간 당 생산되는 1,3-프로판디올의 양이 많아, 1,3-프로판디올 생산성이 높다. 또한 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아는 클렙시엘라 뉴모니아 J2B3 균주보다 시간 당 생산되는 글리세롤 양이 적으며, 초산, 젖산, 에탄올과 같은 부산물의 시간 당 생산되는 양이 적다.

[0038] 또한 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 생합성 방법에 대한 것이다:

[0039] (a) 본 발명의 재조합 클렙시엘라 뉴모니아 균주를 배양하여 1,3-프로판디올을 생합성하는 단계; 및

[0040] (b) 상기 단계 (a)에서 생합성된 1,3-프로판디올을 수득하는 단계.

[0041] glpK 유전자는 GlpK 단백질, 즉, 글리세롤 키나제(glycerol kinase)를 코드하는 유전자이다. glpD 유전자는 GlpD 단백질, 즉 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코드하는

유전자이다. glpA 유전자는 GlpA 즉, 혐기성 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제 서브유닛 A (anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A)를 코드하는 유전자이다. dhaD 유전자는 DhaD 단백질, 즉 글리세롤 디하이드로게나제(glycerol dehydrogenase)를 코드하는 유전자이다.

[0043] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0045] <실시예 1>

[0046] <1-1> 재료 및 방법

[0047] 모든 제한 효소, 고 충실도 DNA 중합 효소 및 유전자 클로닝을 위한 기타 DNA 개질 효소는 New England Bio-Labs (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 미니 플라스미드 분리 키트, DNA 겔 추출 키트 및 게놈 DNA 분리 키트는 Cosmotech Co. Ltd. (서울) 및 Promega (미국 위스콘신 매디슨)에서 각각 구입하였다. RNA 단리 키트는 Qiagen (Mannheim, Germany)에서 구입 하였다. iScript cDNA Synthesis Kit와 SyBr green RT-PCR 마스터 믹스는 BioRad (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 올리고 뉴클레오티드 합성 및 DNA 염기 서열 분석은 마크로젠 (Macrogen Co. Ltd.) (서울, 한국)에서 진행하였다. Tryptone과 효모 추출물은 Difco (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입 하였다. 글리세롤, 포도당 및 기타 모든 화학 물질 및 효소는 본 명세서에서 달리 명시되지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0049] <1-2> 클렙시엘라 뉴모니아 재조합 균주들 및 플라스미드의 구축

[0050] 기존 균주들 및 플라스미드들을 포함하여, 하기 표 2의 재조합 균주들 및 플라스미드를 제조하여 사용하였다. 이때 유전자 재조합은 하기와 같이 수행하였다. 과발현 및 결실 플라스미드의 개발에는 대장균 DH5α를 사용하였다. 염색체 유전자 조작은 in-frame tagged deletion / insertion 방법을 사용하여 수행하였다 (Link, A.J., Phillips, D., Church, G.M., 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. 179, 6228-6237.). 간단히 설명하자면, 표적 유전자의 상류 (상류 단편, A) 및 하류 (하류 단편, B) 영역의 500 bp를 PCR 증폭시키고 중첩 PCR 방법을 사용하여 연결하였다. 이어서, 단편 AB를 NotI 및 XbaI 또는 BamHI 제한 사이트에서 pKOV 벡터로 클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 사용하여 상동성 재조합에 의해 염색체 DNA에서 표적 유전자를 결실시켰다. 마지막으로, 결실 돌연변이 균주를 PCR을 사용하여 스크리닝하고 시퀀싱으로 확인되었다. 모든 표적 유전자의 교체를 위해, 표적 유전자가 먼저 제거 된 후, 관심있는 유전자가 비슷한 인 프레임 표식 방법으로 삽입되었다.

[0051] 유전자 변이 gltA 및 lpdA를 얻기 위하여 PCR을 사용하여 먼저 이들 유전자를 특허등록된 야생균주인 K. pneumoniae J2B (수탁번호: KCCM11213P)게놈으로부터 먼저 증폭시키고 pQE80L 벡터에 클로닝 하였다. pQE80L-gltA 또는 pQE80L-lpdA의 부위 특이적 돌연변이 유발은 QuickChange II site - directed mutagenesis kit를 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 돌연변이 유발 후의 반응 혼합물을 대장균 DH5α로 형질 전환시키고, 재조합 플라스미드의 DNA 시퀀싱에 의해 돌연변이의 스크리닝을 수행하였다. 하기 표 3은 표 2의 재조합 균주들에서 사용한 유전자들의 염기서열들을 나타낸다.

[0053] 구체적인 방법들은 하기와 같다.

[0054] 클렙시엘라 뉴모니아(K.pneumoniae) J2B (KCCM11213P)를 모균주로 사용하여, J2B3 균주(J2B△glpK△glpD△glpA△dhaD)를 제작하였다. 먼저, J2B 균주의 glpK 유전자의 상류 및 하류 영역의 500bp씩 포함하는 2개의 DNA 단편을 각각 PCR로 증폭시키고 두 단편을 중첩 PCR로 서로 연결하였다. 이어서 중첩된 단편을 NotI 및 XbaI 또는 BamHI 제한 자리를 이용해 pKOV 벡터에 클로닝 하였다. 이렇게 생성된 플라스미드로 J2B균주를 형질전환한 후

항생제 마커를 이용해 스크리닝 하였고, 30 ℃ overnight 배양과 42 ℃ 배양을 순차적으로 진행함으로써 상동재조합을 통한 유전자 결실을 시도하였다. 최종 결실 균주 J2BΔglpK는 PCR을 사용하여 결실 부위의 서열 및 사이즈 확인을 통해 최종 스크리닝 되었다. 유전자 결실을 위해 도입된 플라스미드는 자당(sucrose)이 포함된 배지에 배양함으로써 큐어링 (curing)되었다. glpD, glpA, dhaD 유전자의 결실은 위와 동일한 방법으로 그리고 순차적으로 수행되었고, glpD 유전자 결실을 위해 J2B ΔglpK 균주를 모균주로, glpA 유전자 결실을 위해 J2B ΔglpKΔglpD 균주를 모균주로, dhaD 유전자 결실을 위해 J2B ΔglpKΔglpDΔdhaD 균주를 모균주로 각각 사용하여, J2B3 균주(J2B△glpK△glpD△glpA△dhaD)를 제작하였다.

[0056] 이와 동일한 방법으로 표 2의 다른 재조합 균주들을 제작하였으며, 이때 사용한 결실 플라스미드들(pKOV)의 제작을 위하여 사용한 제한 효소들 및 프라이머들은 표 4 및 5에 기재된 바와 같다.

표 2

균주	균주의 설명	소스(Source)
E. coli DH5alpha	Cloning host	Takara (제조사)
J2B3	J2B*ΔglpKΔglpDΔglpAΔdhaD*	Lama *et al.*, (2017)
J2B5	J2B3*ΔptsG*	본 발명
J2B6-1	J2B5*ΔglpF1*	본 발명
J2B6-2	J2B5*ΔglpF2*	본 발명
J2B6-3	J2B5*ΔglpF1ΔglpF2*	본 발명
J2B7-1	J2B6-3*ΔldhA*	본 발명
J2B7-2	J2B7-1*ΔadhE*	본 발명
J2B7-3	J2B7-2*ΔfrdA*	본 발명
J2B7-4	J2B7-3*ΔpflB*	본 발명
J2B7-5	J2B7-4*Δedd-eda*	본 발명
J2B7-6	J2B7-5*ΔmgsA*	본 발명
J2B7-7	J2B7-6*Δpta-ackA*	본 발명
J2B7-8	J2B7-7*Δ poxB*	본 발명
J2B8-1	J2B7-8*Δmdh*	본 발명
J2B8-2	J2B8-1*gltA::gltAR164K*	본 발명
J2B8-3	J2B8-1*lpdA::lpdAE324G*	본 발명
J2B8-4	J2B8-1*gltA::gltAR164K,lpdA::lpdAE324G*	본 발명
J2B9-1	J2B8-4*ΔnuoA*	본 발명
J2B9-2	J2B8-4*Δndh*	본 발명
J2B10-1	J2B9-2*ΔbudABC*	본 발명
J2B10-2	J2B9-2*ΔbudB*	본 발명
플라스미드들		
pS10D1P2	*gpd1gpp2* under SP10 promoter in pCDF	Lama et al., 2017
pQE80L	lacIq; ColE1-ori; His_6-N; Amp^R	Qiagen (제조사)
pQE80LK	pQE80L, Amp^R, Kan^R	본 발명
pBG	*dhaB* and *gdrAB* under tac promoter in pDK7(p15A)	Ashok et al., 2013
pD1P2G	codon optimized *glF* from *zymomonas mobilis* in pS10D1P2	본 발명
pQT	*dhaT* in pQE80LK	본 발명

[0058]

[0060] Lama et al., 2017: Lama, S., Seol, E., Park, S., 2017. Metabolic engineering of Klebsiella pneumoniae J2B for the production of 1,3-propanediol from glucose. Bioresour. Technol.

[0062] Ashok et al., 2013: Ashok S., Mohan Raj S., Ko Y., Sankaranarayanan M., Zhou S., Kumar V., Park S., 2013, Effect of puuC overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-

hydroxypropionic acid production in recombinant Klebsiella pneumoniae ΔglpKΔdhaT. Metab Eng. 15, 10-24

[0063] 상기 표 2에서 “△”는 유전자의 결실을 나타낸다. 또한 상기 표 2에서 “::”는 유전자의 염기 서열 조작을 나타낸다. 예컨대, “lpdA::lpdAE324G”는 LpdA 단백질 유전자를 코드하는 유전자에 있어서, LpdA 단백질의 324번째 아미노산 잔기가 E에서 G로 변형된 단백질을 코드하는 lpdA 유전자를 조작하고, 상기 조작된 lpdA 유전자로 기존의 lpdA 유전자를 치환했다는 의미이다.

표 3

서열 번호	설명	염기 서열
1	glpK 유전자의 염기 서열	ATGACCGACAAAAAATATATCGTTGCGCTTGACCAGGGCACTACCAGCT CCCGGGCCGTTGTGATGGATCATGATGCCAATATCGTCAGCGTCTCCCA GCGAGAATTTGAACAGATTTATCCTAAGCCAGGCTGGGTCGAACACGA CCCGATGGAAATCTGGGCTTCCCAAAGCTCGACGCTGGTCGAAGCGCT GGCCAAAGCGGATATCAACTCCGATCAGATCGCGGCCATCGGCATCAC CAATCAGCGTGAGACCGTGGTGGTGTGGGAGCGAGAGACCGGTAAAC CCATCTACAACGCTATCGTCTGGCAGTGCCGCCGTACCGCGGAGATCTG CGAGCAGCTCAAGCGTGACGGGATGGAAGAGTATATCCGCAAGGCCA CAGGCCTGGTGGTGGACCCGTACTTCTCTGGCACCAAGGTGAAATGGA TCCTCGACCATGTCGAAGGTTCCCGTGAGCGTGCGAAGCGCGGCGAGC TGCTGTTCGGCACCGTTGATACCTGGCTTATCTGGAAGATGACCCAGGG CCGCGTGCACGTCACCGACTACACCAACGCCTCGCGTACCATGCTGTTC AACATCCACGAGCTGGACTGGGACGACAAAATGCTCGACGCGCTGGA CATTCCGCGCGCCATGCTGCCGGAAGTGCGCAAGTCTTCCGAAGTGTA CGGCCAGACCAACATCGGTGGTAAAGGCGGGACCCGTATTCCTATCGC CGGGATCGCCGGTGACCAGCAGGCGGCCCTGTTCGGCCAGCTGTGCGT CAAAGAAGGGATGGCGAAAAACACCTACGGCACCGGCTGCTTTATGCT GATGAATACCGGCGAAAAAGCGGTCACCTCCACCCACGGTCTGCTGAC CACCATCGCCTGCGGCCCGCGCGGCGAGGTGAACTACGCTCTGGAAG GGGCAGTGTTTATGGCCGGCGCGTCTATTCAGTGGCTACGCGACGAGAT GAAGCTCATCAGCGATGCCTTCGACTCCGAGTACTTCGCCACCAAAGTG AAGGATACCAACGGCGTGTATGTGGTACCCGCGTTCACCGGTCTTGGCG CACCGTACTGGGACCCGTATGCCCGCGGCGCGATTTTCGGCCTCACCC GCGGCGTGAACTCCAACCACATTATCCGTGCGACGCTGGAGTCCATCGC CTTTCAGACCCGCGACGTGCTGGAAGCGATGCAGGCTGACTCTGGCAT TCGTCTGCACGCCCTGCGCGTAGACGGCGGCGCGGTGGCTAACAACTT CCTGATGCAGTTCCAGTCCGATATCCTCGGCACCCGTGTCGAGCGTCCG GAAGTACGCGAAGTGACGGCGCTGGGCGCGGCCTATCTGGCCGGTCT GGCGGTCGGTTTCTGGCAGAATCTGGATGAACTGCAGGAGAAAGCGG TGATTGAGCGCGAATTCCGCCCGGGTATTGAAACTACTGAGCGTAACTA TCGTTACAGCGGCTGGAAGAAAGCGGTGAAACGCGCGTTAGCGTGGG AAGAGCACGACGAAGCGTAA

[0065]

[0066]

2	GlpKGlpD 유전자의 염기 서열	GTGAGAGGGTAAGAACGTGGAAACCAAAGATCTGATTGTGATAGGCGG AGGCATCAACGGTGCCGGTATCGCGGCAGATGCCGCCGGGCGTGGTTT ATCCGTACTGATGCTGGAAGCGCGCGATCTCGCCTGCGCCACCTCCAGC GCCAGTTCCAAACTGATCCACGGCGGGCTACGCTACCTCGAACACTAT GAGTTCCGTCTGGTCAGCGAAGCGCTGGCCGAGCGTGAAGTGCTGTTA AAAATGGCCCCGCATATCGCCTTCCCGATGCGCTTTCGCCTACCGCATC GCCCGCATCTGCGCCCGGCATGGATGATCCGTATCGGCTTGTTTATGTAC GATCATCTGGGCAAACGCACCAGCCTCCCGGGATCCACCGGGTTGCGT TTTGGCGCAGAATCGGTACTTAAACCGGAAATTGTGCGCGGTTTCGAAT ATTCCGACTGCTGGGTCGACGATGCCCGCCTGGTGCTGGCCAACGCGC AGATGGTCGTCCGCAAAGGCGGCGAAGTGCGTACCCGCACCCGCGCTA TCTCGGCGAAACGTGAGAATGGCCTGTGGGTGGTGGAAGCGGAAGATA TTGATAGCGGTGAGAAGTTTACCTGGAAGGCGCGCGGCCTGGTCAATG CCACCGGCCCATGGGTCAAACAGTTCTTCGACGAAGGGATGCATCTGC GCTCGCCTTACGGCATCCGTCTGATCAAGGGCAGCCACATCGTGGTGCC GCGGGTGCATACCCAGAAACAGGCTTATATTCTGCAAAACGAAGATAA ACGCATAGTGTTTGTTATTCCGTGGATGGATGAGTTCTCTATCATCGGCA CGACGGACGTCGAGTATAAGGGCGATCCGAAAGCGGTGGCCATTGATG ATAAAGAGATCAACTATCTGCTGAACGTCTATAACGCGCACTTTAAAAA GACCCTCAGCCGGGACGATATCGTCTGGACCTACTCCGGCGTCCGTCCG CTGTGCGACGACGAGTCGGATTCGCCGCAGGCCATTACCCGCGACTAT ACCCTGGATATTCACGATGAGAACGGTCAGGCGCCGCTGCTGTCCGTCT TCGGCGGCAAGCTGACCACCTATCGCAAACTGGCCGAGCATGCACTGG AAAAACTGACCCCCTATTACAAAGGGATCGGCCCGGCATGGACCAAAA CCGCGGTGCTCCCCGGCGGCGATATCGGCGGCGACCGCGACGACTAC GCGGCAAAACTGCGCCGTCGCTTCCCGTTCATCAGTGAATCACTGGCCC GCCATTATGCCCGCACCTACGGGAGCAACAGCGAGTGGATCCTGAAGG AAGCCAGCGCCCTGAGCGATCTCGGGGAAGATTTCGGCCACGAGTTTT ATGAAGCCGAGCTGAAATATCTGGTTGAGCACGAGTGGGTGCGCAGCC TGGATGACGCCATCTGGCGTCGAACCAAACAGGGTATGTGGCTGACTG CCGAGCAGCAGGCGCGCATCAGCGAATGGCTGGCGCAGCATGCGGG AAAGTCTGAACTGTCGTTAGCGTCCTGA
3	GlpA 유전자의 염기 서열	ATGACGGGACGTCTTGATAGCGAGGTCATTATCATCGGCGGCGGAGCA ACCGGCGCCGGTATCGCCCGCGACTGCGCCCGGCGCGGATTACGAAC GCTGCTCATTGAGCGCCATGATATCGCCACCGGGGCGACCGGCCGGAA

[0067]

		TCATGGACTGCTGCACAGCGGCGCCCGCTACGCGGTGACCGACAACG AATCCGCCCGCGAATGCATCAGTGAGAACCGCATCCTGCGCCGCATCG CCCGCCACTGTATTGAACCGACCAATGGGCTGTTTATCACCCTGCCTGA AGATGACCTGGCATGGCAGCAAACCTTTATCGACGCCTGTCAGCAGGC TGGCATAGAGGCCACGCCGCTCTCGCCGCAGGAAGCGCTGCGCCGGG AGCCCGCCGTCAACCCGACGCTGCTGGGCGCGGTGCAGGTCCCGGAC GGTACCATCGACCCGTTTCGCCTCACCGCGGCCAATATGCTCGACGCCC GCGAACACGGCGCGCAGATCCTTACCGGCTGCGAAGTAACAGGCCTG CTGCGCCGGGGCGATCGCGTCTGCGGCGTCCAGGTATACGACCGCCAA CTTCACCAGGCCCGCACTCTGTACGCCGGGATGGTGGTTAACGCCGCC GGGATCTGGGGGCAGCGTATTGCGGAATATGCCGACCTGCGCATCACC ATGTTCCCGGCGAAGGGATCGCTGCTGATCCTCGATCATCGGATTAACA ACCTGGTGATCAACCGCTGCCGTAAGCCGGCCGACGCCGATATTCTGGT GCCCGGCGATACCATCTCGCTGATCGGCACTACCTCAATGCATATTCCTT ATGACGAAATTGACGACAACCGGGTAACAGCGGCGGAGGTCGATACC CTGCTGCGCGAAGGGGAAAAGCTGGCGCCGGTCATGGGCCGCACCCG GATCCTCCGCGCCTACTCCGGCGTCCGCCCGCTGGTGGCCAGCGATAAC GATCCCAGCGGGCGCAGCGTCAGCCGCGGCATCGTCCTGCTCGACCAT GCCCAGCGTGACGGTATGGAAGGCTTCATTACCATCACCGGCGGCAAG CTGATGACCTATCGCCTGATGGCCGAGTGGGCCACCGACGCCGTCTGTC GTAAGCTGGGAAACACCACCCCCTGTACCACGGCCGAAGCCCCGCTGC CCGGTTCACAGGAGCCAACGGAAAGTACCCTGCAAAAGATAATCTCCC TCCCCACCCCGCTGCGCGGCTCGGCCGTCTACCGTCACGGCGATCGCA CCCCGTCCTGGCTTGGCGACAGCCGCCAGCACCGTAGCCTGGTCTGCG AATGTGAAGCCGTCACTGCCGGTGAAGTGAAATACGCGGTGGAAAACC TGGCGGTCAACACCCTGCTCGACCTGCGCCGCCGCACCCGGATTGGCA TGGGGACCTGTCAGGGGGAACTCTGCGCCTGCCGCGCTGCCGGCCTG CTGCAGCGCTTTAACGTCACCACGCCCGCGCAGTCGTTAACCCAGCTCT CGGAATTTCTCAATGAACGCTGGAAGGGCGTGCAGCCCATCGCCTGGG GCGATGCGCTGCGCGAAAGCGAATTCACCCGCTGGGTCTACCTCGGCC TGTGCGGATTGCCACAGGAGCACCGGGATGAAGTTTGA
4	DhaD 유전자의 염기 서열	ATGCTAAAAGTTATTCAATCTCCAGCCAAATATCTTCAGGGTCCTGATGC TGCTGTTCTGTTCGGTCAATATGCCAAAAACCTGGCGGAGAGCTTCTTC GTCATCGCCGACGATTTCGTAATGAAGCTGGCGGGAGAGAAAGTGGTG AATGGCCTGCAGAGCCACGATATTCGCTGCCATGCGGAACGGTTTAAC

		GGTGAATGCAGCCATGCGGAAATCAACCGTCTGATGGCGATTTTGCAA AAACAGGGCTGCCGCGGCGTGGTCGGGATCGGCGGTGGTAAAACTCT CGATACCGCGAAGGCGATCGGTTACTACCAGAAGCTGCCGGTGGTGGT GATCCCGACCATCGCCTCGACCGATGCGCCAACCAGCGCGCTGTCGGT GATCTACACCGAAGCGGGCGAGTTTGAAGAGTATCTGATCTATCCGAAA AACCCGGATATGGTGGTGATGGACACGGCGATTATCGCCAAAGCGCCG GTACGCCTGCTGGTCTCCGGCATGGGCGATGCGCTCTCCACCTGGTTCG AGGCCAAAGCTTGCTACGATGCGCGCGCCACCAGCATGGCCGGAGGA CAGTCCACCGAGGCGGCGCTGAGCCTCGCCCGCCTGTGCTATGATACG CTGCTGGCGGAGGGCGAAAAGGCCCGTCTGGCGGCGCAGGCCGGGG TAGTGACCGAAGCGCTGGAGCGCATCATCGAGGCGAACACTTATCTCA GCGGCATTGGCTTTGAAAGCAGTGGCCTGGCCGCTGCCCATGCAATCC ACAACGGTTTCACCATTCTTGAAGAGTGCCATCACCTGTATCACGGTGA GAAAGTGGCCTTCGGTACCCTGGCGCAGCTGGTGCTGCAGAACAGCCC GATGGACGAGATTGAAACGGTGCTGGGCTTCTGCCAGCGCGTCGGCCT GCCGGTGACGCTCGCGCAGATGGGCGTCAAAGAGGGGATCGACGAGA AAATCGCCGCGGTGGCGAAAGCTACCTGCGCGGAAGGGGAAACCATC CATAATATGCCGTTTGCGGTGACCCCGGAGAGCGTCCATGCCGCTATCCT CACCGCCGATCTGTTAGGCCAGCAGTGGCTGGCGCGTTAA
5	PtsG 유전자의 염기서열	ATGTTTAAGAATGCATTTGCTAACCTGCAGAAGGTCGGTAAATCGCTGAT GCTGCCGGTATCCGTACTGCCTATCGCAGGTATCCTGCTGGGCGTCGGTT CCGCTAACTTCAGCTGGCTGCCAGCCGTGGTCTCCCACGTTATGGCAGA AGCAGGCGGTTCAGTTTTCGCCAATATGCCGCTGATCTTCGCTATCGGT GTGGCCCTCGGCTTCACCAATAACGACGGTGTATCCGCACTGGCTGCAG TCGTGGCTTACGGCATCATGGTGAAAACCATGGCGGTTGTTGCGCCGCT GGTGCTGCATTTACCTGCTGACGAGATTGCGGCAAAACACCTTGCTGAT ACCGGCGTGCTTGGCGGTATTATCTCCGGTGCTATCGCCGCCTACATGTT CAACCGCTTCTATCGCATCAAGCTGCCAGAATATCTCGGCTTCTTTGCG GGCAAGCGTTTTGTGCCGATTATCTCTGGTCTGGCCGCTATCTTCACCGG CGTGATCCTCTCCTTCATTTGGCCGCCGATCGGCTCCGCGATCCAAACCT TCTCCCAGTGGGCTGCTTATCAGAACCCAGTGGTGGCGTTTGGTATCTAC GGTTTCATCGAACGTTGCCTGGTGCCGTTTGGTCTGCATCACATCTGGA ACGTTCCTTTCCAGATGCAGATCGGCGAATACACCAACGCGGCTGGTC AGGTGTTCCACGGCGATATCCCGCGCTACATGGCAGGCGACCCGACGG CGGGCAAACTGTCTGGCGGCTTCCTGTTCAAAATGTATGGTCTGCCGGC

[0068]

[0069]

		AGCGGCTATCGCTATTTGGCACTCTGCTAAACCGGAAAACCGCGCCAA AGTGGGCGGTATCATGATCTCCGCCGCGCTGACCTCGTTCCTGACCGGT ATCACCGAGCCGATCGAGTTCTCGTTCATGTTCGTGGCTCCGATCCTGTA CGTTATCCATGCCATTCTGGCGGGCCTGGCGTTCCCGATCTGTATCCTGC TGGGTATGCGTGACGGTACCTCGTTCTCTCACGGCCTGATCGACTTTATC GTGCTGTCCGGTAACAGCAGCAAACTGTGGCTGTTCCCGATTGTTGGTA TCTGCTATGCGATCGTGTACTACGTCATTTTCCGTGTGCTGATTAAAGCCC TGGATCTGAAAACACCGGGTCGTGAAGACACCACCGAAGAGAGCAAA GCTGGCGCCACCAGCGAGATGGCTCCGGCTCTGGTCGCCGCTTTCGGC GGTAAAGAGAACATCACCAACCTCGACGCATGTATTACTCGTCTGCGTG TTAGCGTGGCGGATGTAGCGAAAGTTGACCAGGCTGGCCTGAAAAAAC TGGGCGCCGCTGGCGTGGTAGTGGCAGGTTCTGGCGTACAGGCCATCT TCGGTACCAAGTCCGATAACCTGAAAACTGAAATGGATGAGTACATCCG TAACAGTTAA
6	GlpF1 유전자의 염기서열	ATGAGCCAAACATCAACCTTAAAAGGCCAGTGCATCGCAGAGTTCCTC GGTACCGGGTTGTTGATCTTTTTCGGCGTTGGGTGCGTGGCTGCGCTCA AGGTCGCGGGAGCCAGCTTCGGACAATGGGAAATCAGCATCATCTGG GGTCTGGGCGTCGCCATGGCGATCTACCTGACCGCCGGGGTCTCCGGT GCGCACCTTAACCCAGCGGTGACTATCGCGCTGTGGCTGTTCGCCTGCT TCGAAGGCCGCAAAGTGGTTCCTTTTATTATTTCGCAATTCGCTGGCGC CTTTTGCGCTGCGGCATTAGTTTACGGGCTTTACTACAATCTTTTCCTCG ATTATGAAACCACCCACCATATGATTCGCGGCAGCGTGGAAAGCCTCGA TCTGGCCGGCATTTTCTCCACTTACCCGAACCCGCACATCAATTTTGTGC AGGCCTTCGCGGTAGAGATGGTGATTACCGCTATCCTGATGGGCGTCAT CCTGGCGCTGACCGACGATGGCAACGGCATACCGCGCGGCCCGCTGG CCCCTCTGCTGATTGGCCTGCTGATTGCGGTGATTGGCGCCTCCATGGG ACCGCTGACCGGCTTCGCCATGAACCCGGCGCGTGACATCGGCCCGAA AGCCTTCGCCTGGCTGGCGGGGTGGGGTGACGTCGCCTTCACCGGCG GCAAAGATATTCCTTATTTCCTGGTGCCGCTGTGCGCACCGGTGGTCGG CGCGGCGCTGGGCGCATTCAGCTATCGTAAGCTGATTGGCCGTCACCTG CCTTGCGACACCTGCGTGGAGGAAGAGCAACAGAGCCCCTCCTCTTCC ACCGCTCAACATAAAGCTTCGCTGTAA
7	GlpF2 유전자의 염기서	ATGAACCAGACTTCTACCTTAACCGGGCAGTGCGTGGCCGAGTTTCTTG GCACCGGATTGCTCATTTTCTTCGGCGCGGGCTGCGTCGCTGCGCTGC GGGTCGCCGGGGCCAGCTTTGGTCAGTGGGAGATCAGTATTATCTGGG

	열	GCCTTGGCGTCGCCATGGCCATCTACCTGACGGCCGGTGTCTCCGGCGC GCACCTTAATCCGGCGGTGACCATTGCCCTGTGGCTGTTCGCCTGTTTT GAACGCCGCAAGGTGCTGCCGTTTATTGTTGCCCAGACGGCCGGGGCC TTCTGCGCCGCCGCGCTGGTGTATGGGCTCTATCGCCAGCTGTTTCTCGA TCTTGAACAGAGTCAGCATATCGTGCGCGGCACTGCCGCCAGTCTTAAC CTGGCCGGGGTCTTTTCCACGTACCCGCATCCACATATCACTTTTATACA AGCGTTTGCCGTGGAGACCACTATCACGGCAATCCTGATGGCGATGATC ATGGCCCTGACCGACGACGGCAACGGAATTCCGCGCGGGCCGCTGGC GCCGTTGCTGATTGGCTTGCTGATCGCCGTGATCGGCGCGTCGATGGGG CCGCTAACCGGCTTTGCGCTGAATCCGGCGCGCGACTTCGGCCCAAAA CTGTTTACCAGTCTGGCCGGGTGGGGCTCGATCGCCTTTACCGGTGGGC TGGCGATCCCTTACTTTCTGGTGCCGCTGCTGGCGCCGGTGGTGGGGG CGATTATCGGGGCGTTTTTGTATCGCAAGCTTATCGGCCGCCATCTGCCG TGCGAATGCGGTATCGATGAGTAA
8	LdhA 유전자의 염기서열	ATGAAAATCGCGGTTTATAGTACGAAGCAGTACGATAAAAAGTACCTGC AGCACGTTAATGATGCATACGGCTTTGAACTGGAATTCTTCGATTTCCTG CTGACAGCGAAGACTGCCAAAACCGCCAACGGTTGCGAAGCGGTATGT ATCTTCGTCAATGACGACGGCAGCCGCCCGGTGCTGGAAGAGCTGAAG GCCCACGGGGTGAAATATATCGCCCTGCGCTGCGCCGGGTTTAACAAC GTCGACCTTGAGGCGGCAAAGGAGCTTGGCCTGCGCGTCGTGCGCGTT CCAGCTTACTCTCCGGAAGCGGTCGCTGAGCATGCGATCGGTATGATGA TGTCGCTCAACCGCCGCATCCACCGCGCTTACCAGCGTACCCGCGATGC CAATTTCTCCCTCGAAGGCCTCACCGGCTTCACCATGTACGGCAAAACC GCCGGGGTGATCGGCACCGGGAAAATTGGCGTAGCGATGTTGCGGATC CTCAAAGGCTTCGGCATGCGCCTGCTGGCGTTCGACCCGTACCCAAGC GCCGCCGCGCTGGAGCTGGGGGTGGAATATGTTGACCTCGCCACGCTG TACAAGGAATCGGACGTGATCTCCCTGCACTGTCCGCTGACCGACGAA AACTACCACCTGCTCAATCGCGAAGCCTTCGATCAGATGAAAGACGGG GTGATGGTGATCAACACCAGCCGCGGCGCCCTGATCGACTCTCAGGCG GCCATCGACGCCCTGAAGCACCAGAAAATTGGCGCGCTGGGGCTGGA CGTTTATGAGAACGAACGCGATCTGTTCTTTGAAGACAAATCCAACGAC GTGATCCAGGACGATGTCTTCCGCCGCCTCTCCGCCTGCCATAACGTGC TGTTTACCGGCCACCAGGCGTTCCTCACCGCCGAGGCGCTGATCAGCA TTTCGGAGACCACTCTGGGTAACCTGCAGCAGGTCGCCAACGGCGAA ACCTGTCCGAACGCCATCGTCTGA

[0070]

[0071]

9	AdhE 유전자의 염기서열	ATGGCTGTTACTAATATCGCTGAACTGAACGCGCTTGTTGAGCGTGTCA AGAAAGCCCAGCGTGAATATGCCAGTTTCACTCAAGAACAAGTCGACA AAATCTTCCGCGCCGCCGCTCTGGCCGCTGCAGATGCTCGAATCCCTCT CGCCAAAATGGCCGTAGCCGAATCCGGCATGGGCATCGTTGAAGACAA AGTGATCAAAAACCACTTTGCTTCCGAATACATTTACAACGCTTATAAAG ACGAAAAAACCTGTGGCGTTCTGTCAGAAGACGACACCTTTGGCACCA TCACTATTGCTGAGCCTATCGGCATCATCTGCGGTATCGTACCGACCACT AACCCGACTTCAACAGCCATTTTCAAATCGCTCATCAGTCTGAAAACGC GTAACGCCATCATTTTCTCTCCGCACCCGCGTGCAAAAGAAGCCACCAA CAAAGCGGCTGATATCGTGCTGCAGGCTGCCATCGCGGCCGGCGCGCC GAAGGACCTGATTGGCTGGATCGATCAGCCGTCTGTAGAACTGTCTAAC GCGCTGATGCATCACCCGGACATCAACCTGATCCTGGCGACCGGTGGTC CAGGCATGGTGAAAGCAGCATACAGCTCCGGTAAACCTGCTATCGGCG TCGGCGCCGGTAACACCCCGGTAGTCATTGATGAAACCGCCGACATCA AACGTGCCGTAGCGTCCGTACTGATGTCTAAAACCTTCGATAACGGCGT GATCTGTGCTTCTGAGCAGTCCGTTGTGGTGGTTGATTCAGTCTATGACG CGGTTCGCGAACGTTTCGCCAGCCACGGCGGCTACCTGCTGCAGGGTA AAGAGCTGAAAGCCGTTCAGGACATTATCCTGAAAAATGGCGCGCTGA ACGCGGCTATCGTTGGTCAGCCAGCGGCCAAAATCGCTGAACTGGCAG GCTTCACCGTGCCGGCCACCACCAAAATTCTGATTGGTGAAGTGACCA ACGTTGACGAGAGCGAGCCGTTTGCTCACGAAAAACTGTCTCCGACGC TGGCTATGTATCGTGCAAAAGATTTCGAAGACGCGGTAGCCAAAGCAG AAAAACTGGTCGCCATGGGCGGTATCGGTCACACCTCTTGCCTGTACAC CGACCAGGACAACCAGCCGGCTCGCGTGGCTTACTTCGGCCAAATGAT GAAAACCGCGCGTATCCTGATCAACACCCCGGCTTCTCAGGGTGGTATC GGTGACCTGTACAACTTCAAACTCGCGCCTTCCCTGACTCTGGGTTGTG GTTCCTGGGGTGGTAATTCCATCTCTGAAAACGTTGGTCCGAAACACCT GATCAACAAGAAAACCGTTGCTAAGCGAGCTGAAAACATGTTGTGGCA CAAACTTCCGAAATCTATCTACTTCCGTCGTGGCTCCCTGCCAATCGCAC TGGATGAAGTGATTACCGATGGTCACAAACGCGCGCTGATCGTGACTGA CCGCTTCCTGTTCAACAACGGCTATGCCGATCAGATCACTTCCGTACTGA AAGCAGCGGGTGTTGAAACGGAAGTCTTCTTCGAAGTTGAAGCTGACC CGACGCTGACCATCGTACGTAAAGGTGCCGACCTGGCAAACTCCTTTAA ACCAGACGTGATCATCGCCCTGGGCGGCGGTTCCCCGATGGATGCGGC GAAAATCATGTGGGTTATGTACGAACATCCGGAAACCCACTTCGAAGAA

[0072]

		CTGGCGCTGCGCTTTATGGATATCCGTAAACGTATCTACAAGTTCCCGAA AATGGGCGTCAAAGCCAAGATGGTGGCGATCACTACCACTTCCGGTAC CGGTTCTGAAGTTACGCCGTTCGCCGTGGTGACCGATGACGCGACCGG TCAGAAATACCCGCTGGCAGACTACGCGCTGACCCCGGATATGGCCATT GTCGATGCCAACCTGGTGATGGATATGCCGAAATCGCTGTGTGCGTTCG GTGGTCTGGATGCGGTGACTCACGCCCTGGAAGCTTACGTTTCCGTACT GGCTTCTGAGTTCTCTGACGGCCAGGCGCTGCAGGCGCTGAAACTGCT GAAAGAGTACCTGCCGGCTTCCTATCACGAAGGTTCCAAGAACCCGGT TGCCCGTGAGCGCGTACACAGTGCCGCGACTATCGCCGGTATCGCGTTC GCTAACGCCTTCCTCGGCGTGTGTCACTCGATGGCGCACAAACTGGGCT CCCAGTTCCATATTCCGCACGGTCTGGCCAACGCCCTGCTGATCTGCAA CGTTATCCGCTATAACGCGAATGACAACCCGACCAAGCAGACCGCGTTC AGCCAGTACGACCGTCCGCAGGCTCGTCGTCGTTACGCTGAAATCGCC GATCACCTGGGCCTCTCCGCACCAGGCGACCGCACCGCAGCGAAAATC GAGAAACTGCTGGCATGGCTGGAAAGCATTAAAGCTGAGCTGGGTATT CCGAAATCTATCCGCGAAGCTGGCGTTCAGGAAGCTGACTTCCTGGCC CAGGTTGATAAACTGTCTGAAGATGCATTCGATGACCAGTGCACCGGCG CTAACCCGCGCTACCCGCTGATCTCCGAACTGAAACAGATCCTGCTGGA TACCTACTACGGCCGCGAATTCGTCGAAGGCGAAGCCGGTGCGAAAGC CGAAGTTGCCCCGGTAAAGGCTGAGAAAAAAGCGAAAAAATCCGCTT AA
10	FrdA 유전자의 염기서열	GTGCAAACTTTTCAAGCCGATCTCGCCGTAATTGGCGCCGGCGGGGCA GGCCTTCGTGCCGCTATCGCCGCCGCTCAGGCCAACCCCAACGCTAAA ATCGCCCTGATTTCTAAAGTCTATCCGATGCGCAGCCATACGGTCGCTGC AGAAGGGGGGTCCGCAGCCGTTGCCCAGGATCACGATAGCTTTGAGTA CCATTTTCACGACACCGTCGCGGGAGGCGACTGGCTGTGCGAGCAGG ATGTCGTCGACTATTTTGTTCATCACTGCCCGACGGAAATGACCCAACTG GAGCAGTGGGGATGCCCATGGAGCCGCCGCCCCGACGGCAGCGTCAA CGTCCGGCGCTTCGGTGGCATGAAAATCGAACGCACCTGGTTTGCCGC CGACAAAACCGGCTTCCACATGCTGCATACCCTCTTCCAGACCTCCCTT CAGTTTCCCCAAATTCAGCGCTTTGACGAACATTTCGTCCTTGACCTGCT GGTCGATGACGGGCAGGCCCGCGGCCTGGTGGCGATGAATATGATGGA AGGCACCCTGGTGCAGATCCGCGCTAACGCCGTGGTGCTGGCTACCGG CGGCGCCGGGCGCGTCTACCGCTACAACACCAACGGTGGCATCGTCAC CGGTGACGGGATGGGGATGGCCCTGGGCCATGGCGTGCCGCTGCGCG

		ACATGGAATTCGTTCAGTATCACCCGACCGGCCTGCCGGGCTCCGGGAT CCTGATGACCGAAGGCTGCCGCGGCGAAGGCGGGATTCTGGTCAACA AAAACGGCTACCGCTATCTGCAGGATTACGGCATGGGCCCGGAAACCC CGCTCGGCGAACCGAAGAATAAATATATGGAGCTGGGCCCACGCGACA AAGTGTCCCAGGCCTTCTGGCACGAGTGGCGGAAAGGGAACACCATC CCGACGCCGCGCGGCGACGTGGTCTACCTCGATCTCCGCCACCTCGGC GAGAAAAAACTGCTGGAGCGTCTGCCGTTTATCTGTGAACTGGCGAAA GCCTACGTCGGCGTCGATCCGGTGAAAGAGCCGATCCCGGTGCGCCCG ACCGCGCACTACACCATGGGCGGTATTGAAACCGATCAGCAGTGCGAA ACCCGAATCAAAGGGCTGTTTGCCGTGGGCGAATGCTCGTCCGTTGGC TTACATGGCGCCAACCGTCTGGGCTCCAACTCGCTGGCCGAGCTGGTG GTCTTCGGCCGCCTGGCCGGGGAGCAGGCCATGCAGCGCGCCGCTCA GGCGGGCGAGGCAAACGGCGCCGCCCTCGATGCGCAGGCTGCCGATG TGAAGCAGCGCCTGAAAGATCTCGTCAACCAGGAAGGTAACGAAAAC TGGGCGAAAATTCGCGATGAAATGGGGCTGTCGATGGAGGAAGGCTG CGGCATCTACCGCACGCCGGAGCTGATGCAGAAAACGATCGACAAGCT GGCTGAACTGCAGGAACGCTTTAAGCGCGTGCGCATTACTGATAACTC CAGCGTGTTCAATACCGATCTGCTTTACACCATTGAGCTGGGGCACGGT TTAAACGTTGCCGAATGTATGGCGCACTCGGCCATCGCCCGTAAAGAAT CGCGCGGGGCGCACCAGCGTTTGGATGAAGGCTGTACCGAACGCGAC GACGTCAACTTCCTCAAGCACACTCTCGCCTTCCGCGAGGCCGATGGC ACTACCCGTCTGGAATATGGCGATGTGAAGATCACCACGCTGCCGCCGG CAAAACGTGTCTATGGCGCAGAAGCGGACGCGGCTGAGAAGAAGGAG ACCACCCATGGCTGA
11	PflB 유전자의 염기서열	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTAGCCACAGCCTGGGAAGGTTTTGCG AAAGGTGACTGGCAGAATGAAGTCAACGTCCGTGACTTTATTCAGAAA AACTACACCCCATATGAAGGCGACGAATCCTTCCTGGCTGGCGCGACT GAAGCGACCACCAAGCTGTGGGACACCGTAATGGAAGGTGTAAAACA GGAAAACCGCACTCACGCGCCTGTTGATTTTGACACTGCCCTGGCTTCC ACCATCACCTCTCACGACGCGGGCTATATCGAGAAAGGTCTGGAAAAA ATCGTTGGTCTGCAGACCGAAGCGCCGCTGAAACGTGCGATCATCCCGT TCGGTGGTATCAAAATGGTTGAAGGTTCCTGCAAAGCGTATAATCGCGA GCTGGACCCGATGCTGAAAAAAATCTTCACAGAGTACCGTAAAACTCA CAACCAGGGCGTTTTCGACGTCTATACCCCGGACATTCTGCGCTGCCGT AAATCCGGCGTGCTGACGGGTCTGCCGGATGCTTACGGTCGTGGTCGTA

[0073]

[0074]

		TCATCGGTGACTACCGTCGCGTTGCGCTGTACGGTATCGACTTCCTGATG AAAGACAAATTCGCCCAGTTCAACTCTCTGCAAGCGAAACTGGAAAGC GGCGAAGACCTGGAAGCGACCATCCGTCTGCGTGAAGAAATCGCTGA ACAACACCGCGCACTGGGCCAGATCAAAGAGATGGCCGCTAAATATGG CTATGACATCTCCGGTCCGGCGACCACCGCTCAGGAAGCGATTCAGTG GACCTACTTCGGTTACCTGGCTGCCGTGAAATCTCAGAACGGCGCGGC AATGTCCTTCGGTCGTACCTCCAGCTTCCTGGATATCTACATCGAGCGTG ACCTGCAGGCGGGTAAAATCACCGAGCAAGACGCGCAGGAAATGGTT GACCACCTGGTCATGAAACTGCGTATGGTTCGCTTCCTGCGTACCCCGG AATATGATGAACTGTTCTCCGGCGACCCGATTTGGGCAACGGAATCCAT CGGCGGTATGGGCGTTGACGGCCGTACTCTGGTGACCAAAAACAGCTT CCGCTTCCTGAACACCCTGTACACCATGGGGCCGTCTCCGGAGCCGAA CATTACTATCCTGTGGTCTGAAAAACTGCCGCTGAGCTTCAAGAAATTC GCCGCTAAAGTGTCCATCGATACCTCTTCTCTGCAGTATGAGAACGATGA CCTGATGCGTCCGGACTTCAACAACGACGACTACGCTATCGCATGCTGC GTAAGCCCGATGGTTGTTGGTAAGCAAATGCAGTTCTTCGGCGCTCGCG CTAACCTCGCGAAAACCATGCTGTACGCTATCAACGGCGGCGTGGATG AAAAACTGAAAATGCAGGTTGGTCCGAAATCTGAACCGATCAAAGGCG ACGTCCTGAACTTCGACGAAGTAATGGATCGCATGGATCACTTCATGGA CTGGCTGGCTAAACAGTACGTCACCGCGCTGAACATCATCCACTACATG CACGACAAGTACAGCTACGAAGCCTCTCTGATGGCGCTGCACGACCGT GACGTTATCCGCACCATGGCGTGTGGTATCGCTGGTCTGTCCGTTGCTGC TGACTCCCTGTCTGCTATCAAATATGCGAAAGTTAAACCGATTCGTGACG AAGACGGTCTGGCTATCGACTTCGAAATCGAAGGCGAATACCCGCAGT TTGGTAACAACGACCCTCGCGTCGATGACATGGCCGTTGACCTGGTTGA ACGTTTCATGAAGAAAATTCAGAAACTGCACACCTACCGCAACGCTATC CCGACTCAGTCTGTTCTGACCATCACCTCTAACGTGGTGTACGGTAAGA AAACCGGTAATACCCCAGACGGTCGTCGCGCTGGCGCGCCGTTCGGTC CAGGTGCTAACCCGATGCACGGCCGTGACCAGAAAGGCGCAGTAGCC TCTCTGACCTCCGTCGCTAAACTGCCGTTTGCTTACGCGAAAGATGGTAT CTCTTATACCTTCTCTATCGTGCCGAACGCGCTGGGTAAAGACGACGAA GTTCGTAAGACCAACCTGGCGGGTCTGATGGATGGTTACTTCCATCACG AAGCGTCCATCGAAGGTGGTCAGCACCTGAACGTGAACGTCATGAACC GCGAAATGCTGCTCGACGCGATGGAAAACCCGGAAAAATATCCGCAGC TGACCATCCGTGTATCTGGCTACGCCGTACGTTTTAACTCCCTGACCAAA

[0075]

		GAACAGCAGCAGGATGTTATTACCCGTACCTTCACTCAGACCATGTAA
12	Edd 유전자의 염기서열	ATGAAAAACTGGAAAACAACAGCAGAAGCAATCCTCACCTCCGGTCCG GTTGTCCCGGTTATCGTAGTGAAAAAGCTGGAACACGCGGTACCGATG GCGAAAGCGCTGGTGGCGGGCGGCGTTCGCGTGCTGGAAGTTACCCT GCGCACCGAGTGCGCCCTGGAGGCGATCCGCGCGATTGCCAAAGAAG TTCCGGACGCGATTGTCGGCGCGGGCACGGTTACCAACGTTGAGCAGT TGAAAGCGGTAACGGAAGCCGGCGCGCAGTTCGCTATCAGCCCGGGT CTTACCGAATCCCTGCTGAAAGCGGCGACCGAAGACGGCACCATCCCG CTGATCCCGGGGATCAGCACGGTATCTGAGCTGATGCTGGGTATGCAGT ATGGCCTGAAAGAGTTTAAATTCTTCCCGGCGGAAGCCAACGGCGGCG TGAAAGCTCTGCAGGCGATTGCGGGTCCGTTCGGCCACATTCGTTTCTG CCCGACCGGCGGTATATCTCCGGCCAACTACCGTGACTACCTGGCGCTG AACAGCGTACTGTGCATCGGCGGTTCCTGGCTGGTGCCAGCCGACGCC CTCGAAGCCGGCGACTACGATCGCATCACCACCCTCGCGCGAGAAGCG GTGGAAGGCGCGAAATAA
13	Eda 유전자의 염기서열	ATGTTACGGGTAACAAATCGCATTATCGAACGGTCGCGTGACACCCGCG CGGCTTACCTCGCAAGGATTAACCAGGCCAAAACCGACACCGTGCATC GTGCGCAACTGGCCTGCGGCAATCTGGCTCACGGATTCGCGGCCTGCC AGGCTGACGACAAAGCCTCCCTGAAGAGCATGTTGCGCAACAACATTG CCATCATCACCTCCTACAACGACATGTTGTCCGCTCACCAGCCCTATGAA CACTACCCGGAGATCATCCGCAAAGCGCTGCACAGCGCCAATGCGGTC GGCCAGGTCGCCGGCGGCGTGCCGGCGATGTGCGACGGCGTAACGCA GGGGCAGGACGGGATGGAGCTTTCACTCCTGAGCCGCGAGGTGATCG CTATGTCCGCCGCCATCGGCCTGTCGCATAACATGTTCGACGGGGCCCT GTATCTCGGGGTCTGCGATAAAATTGTTCCCGGTCTGACCATGGCGGCG CTCTCATTTGGCCATCTGCCGTCGGTCTTTATTCCCTCCGGTCCGATGGC CAGCGGCCTGCCGAATAAAGAGAAGGTTCGCATTCGCCAGCTGTATGC AGAAGGGAAAGTTGACCGTATGGCGCTCCTGGAGTCCGAAGCCGCCTC TTATCACGCGCCGGGGACCTGTACTTTCTACGGAACGGCGAACACCAA CCAGATGGTGGTCGAATTTATGGGCATGCAGCTGCCGGGCTCGTCCTTT GTCCATCCGGATGCTCCGCTGCGGGAAGCACTGACCGCCGCCGCCGCG CGCCAGGTCACCCGCATGACCGGCAACGGCAATGAGTGGATGCCGCT GGGCAAAATGTTTGACGAAAAAGTGGTAGTCAACGGCATCGTGGCGCT GCTGGCGACCGGTGGCTCCACCAACCACACTATGCACCTGGTGGCGAT GGCCCGCGCGGCGGGAATTATCATTAACTGGGACGATTTCTCCGACCTG

		TCAGACGTGGTGCCGCTGCTGGCGCGCCTCTATCCCAACGGCCCGGCG GATATCAACCACTTCCAGGCGGCAGGCGGCGTTCCGGTACTGGTGCGC GAGCTGCTGAAAGGCGGCCTGCTGCATGAGGATGTTCACACCGTGGCC GGCTTTGGCCTGTCGCGCTACACCCTGGAGCCATGGCTGAATAACGGC GAGCTGGACTGGCGCGAAGGGGCGACAGCGCCATTGGACGACCAGG TCATCGCGACCTTTGAAAAACCATTCTCCCGCCACGGCGGCACCAAGG TGCTGAGCGGCAACCTGGGACGCGCGGTGATGAAAACTTCGGCGGTC CCGGTGGAGAACCAGGTGATTGAAGCGCCGGCGGTGGTATTTGAGAG CCAGCACGACGTGTTGCCGGCCTTTGAAGCGGGGCTGCTGGACAAAG ACTGCGTGGTGGTGGTCCGTCATCAGGGGCCAAAAGCGAACGGGATG CCAGAATTACATAAACTTATGCCGCCACTTGGTGTATTATTGGACCGCCG TTTCAAAATAGCGCTGGTGACCGATGGCCGACTCTCTGGCGCCTCCGGT AAAGTTCCGTCAGCCATTCACGTCACGCCTGAAGCGTATGATGGCGGCT TGCTGGCGAAAGTGCGCGATGGCGATCTTATTCGCGTGAACGGACAGA CGGGGGAACTGACGCTGCTGGTGGATGAGGCCGAACTGGCGGCGCGT CAGCCGCATATCCCTGACCTCAGCGCGTCGCGCGTGGGAACCGGTCGG GAGATGTTTGGGGCGCTGCGTGAGAAGCTCTCTGGCGCGGAGCAGGG CGCAACCTGCATCACTTTTTAA
14	MgsA 유전자의 염기서열	ATGTGGAATGAAAATATGGAACTGACAACACGTACCCTGCCTGCGCAA AAACATATCGCGCTGGTGGCTCACGATCACTGCAAAGATATGCTGATGA AATGGGTTGCTCGCCATCAGGCGCTGCTGGCGCAACATATTTTGTATGC TACCGGCACTACCGGTAATCTCGTCTCCCGGGCTACCGGCCTGGAGGTT AATGCCATGCTGAGCGGTCCGATGGGCGGCGACCAGCAGGTGGGTGC CCTCATTTCAGAAGGCAAAATCGACGTGCTGATCTTCTTCTGGGATCCG CTGAACGCCGTTCCCCACGACCCGGATGTCAAAGCGTTGCTGCGCCTG GCCACCGTCTGGAACATTCCGGTCGCCACTAACGTCTCCACCGCTGACT TTATCATCCAGTCACCGCACTTTAAACAGCCGCTCGATATTCTGATCCCG GATTATCCACGCTATCTTGCCGAGCGCCTGAAATAA
15	Pta 유전자의 염기서열	ATGTTAATTCCTACCGGTACCAGCGTAGGTCTGACCAGCGTCAGCCTCG GTGTGATCCGCGCTATGGAACGCAAAGGCGTTCGTCTGAGCGTCTTTAA ACCTATCGCCCAGCCGCGTTCCGGTGGCGATGCCCCAGACCAGACCAC CACCATCGTTCGCGCCAGCTCCTCCACCACCACCGCCGCTGAACCGCT GAAGATGAGCCATGTTGAGTCTCTGCTCTCCAGCAATCAGAAAGATGTG CTGATGGAAGAGATCATTGCCAACTACCACGCGAATACTCAGGACGCG GAAGTGGTGCTGGTGGAAGGCCTGGTACCGACCCGTAAGCATCAGTTC

[0076]

[0077]

		GCCCAGGCGCTGAACTTTGAAATCGCCAAAACGCTGAACGCTGAAATC GTCTTCGTGATGTCTCAGGGCACCGACACGCCAGAACAGCTGAACGAG CGTATCGAACTGACCCGTAACAGCTTTGGCGGCGCCAAAAATACCAGC ATCACCGGCGTTATCGTCAACAAACTGAATGCCCCTGTCGACGATCAGG GCCGTACCCGTCCTGACCTGTCGGAAATTTTCGACGACTCGTCGAAAGC AAAAATCGTGAAGATTGACCCGGCTCAGCTGCAGAAAGGCAGCACGC TGCCGGTGCTGGGCGCAGTGCCATGGAGCTTCGATCTGATCGCGACCC GCGCGATCGACATGGCGCACCATCTGAATGCGACCATCATTAACGAAG GCGATATCAATACCCGCCGCGTGAAATCCGTGACTTTCTGCGCGCGCAG CATCCCGCACATGCTGGAACACTTCCGCCCTGGTTCTCTGCTGGTTACCT CCGCAGACCGTCCTGACGTGCTGGTTGCGGCCTGCCTGGCGGCAATGA ACGGCGTGGAAATCGGCGCCATTCTGCTGACCGGCGGCTATGAAATGG ACGCGCGCATCAGCAAGCTGTGTGAACGCGCTTTCGCGACCGGCCTGC CGGTATTTATGGTCAACACCAACACCTGGCAGACCTCCCTGAGCCTGCA GAGCTTTAACCTCGAAGTACCGGTTGACGATCACGAGCGTATCGAGAA AGTTCAGGAATACGTGGCCAACTACATCAACGCCGACTGGATCGAATC GCTGACCGCGACCTCCGAGCGCAGCCGCCGTCTCTCTCCGCCAGCCTT CCGCTACCAGCTGACCGAGCTGGCGCGCAAAGCCGGCAAACGTGTCG TTCTGCCGGAAGGCGACGAACCGCGTACCGTGAAAGCGGCGGCGATT TGCGCCGAACGCGGGATCGCCACCTGTGTCCTGCTGGGTAACCCGGAT GAGATCAACCGCGTAGCCGCGGCCCAGGGCGTGGAGCTTGGCGCCGG CATTGAAATCGTCGATCCGGAAGTGGTTCGCGAAAGCTATGTGGGTCGC CTGGTCGAACTGCGTAAGAACAAAGGCATGACCGAAGCGGTCGCGCG TGAGCAGCTGGAAGACAACGTGGTTCTCGGCACCCTGATGCTGGAACA GGACGAAGTCGACGGTCTGGTATCCGGCGCGGTTCACACCACTGCCAA CACCATTCGTCCGCCGCTGCAGCTGATCAAAACCGCGCCGGGCAGCTC GCTGGTCTCCTCCGTGTTCTTCATGCTGCTGCCGGAACAGGTTTACGTTT ACGGCGACTGCGCGATCAACCCGGACCCGACCGCCGAGCAGCTGGCG GAAATCGCTATTCAGTCCGCTGAATCCGCGATTGCCTTCGGCATCGAAC CGCGCGTGGCGATGCTCTCCTACTCCACCGGTACCTCCGGCGCGGGTA GCGATGTCGAGAAAGTCCGCGAAGCGACCCGTCTGGCGCAGGAAAAA CGTCCTGACCTGATGATCGACGGCCCGCTGCAGTATGACGCCGCGGTGA TGGCTGACGTAGCGAAGTCCAAAGCGCCGAACTCACCGGTAGCTGGCC GCGCGACCGTGTTCATCTTCCCGGATCTGAACACCGGTAACACCACGTA CAAAGCGGTACAGCGCTCTGCCGACCTGATCTCCATCGGGCCGATGCT

		GCAGGGTATGCGCAAGCCGGTCAACGACCTGTCCCGTGGCGCGCTGGT AGACGATATCGTCTATACCATCGCACTGACCGCGATCCAATCGGCTCAG CAGCAGAAGTAA
16	AckA 유전자의 염기서열	ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTGAACTGCGGTAGCTCCTCTCTGAA ATTTGCTATCCTTGACGCCGTGAACGGCGACGAATATCTGTCCGGTTTAG CGGAATGCTTCCACCTGCCGGAAGCCCGTATCAAATGGAAAATGGACG GCAGCAAACAAGAAGCCGAGTTAGGCGCGGGCGCCGCGCACAGTGA AGCGCTGAACTTTATCGTTAACACTATTCTGGCACAAAAACCAGAACTG TCTGCTCAGCTGACCGCAATCGGCCACCGTATCGTACACGGCGGTGAA AAATACACCAGCTCCGTGGTGATCGACGAGTCCGTAATTCAGGGTATTA AAGACGCCGCGTCTTTCGCACCGCTGCACAACCCGGCACACCTGATCG GCATCGCTGAAGCGCTAAAATCCTTCCCGCACCTGAAAGACAAAAACG TGGCTGTATTCGATACGGCGTTCCATCAGACCATGCCGGAAGAATCCTAT CTCTACGCCCTGCCGTACAGCCTGTACAAAGAGCACGGCGTTCGTCGTT ACGGCGCGCACGGCACCAGCCACTTCTACGTGACTCAGGAAGCCGCT AAGATCCTCAACAAGCCGGTGGAAGAGCTGAACATCATCACCTGCCAC CTCGGCAACGGTGGTTCTGTTTCCGCTATCCGTAACGGTAAATGCGTTG ACACCTCCATGGGTCTGACCCCGCTGGAAGGCCTGGTGATGGGTACCC GCTCCGGTGACATCGATCCGGCCATCATCTTCCATCTGCACGACACCCT GGGCATGAGCGTTGACGCGATCAACAAAATGCTGACCAAAGAGTCCG GCCTGCTGGGTCTGACCGAAGTCACCAGCGACTGCCGCTACGTGGAAG ACAACTATCAGGAAAAAGCCGACGCTAAACGCGCAATGGACGTTTACT GCCACCGCCTGGCGAAATACATCGGTTCCTACACCGCGCTGATGGACG GCCGTCTTGACGCCGTTATTTTCACCGGTGGTATCGGTGAAAACGCCGC GATGGTGCGTGAGCTGTCGCTGGGCAAACTGGGCGTACTGGGCTTTGA AGTTGACCATGAGCGTAACCTTGCTGCCCGCTTCGGCAAGTCTGGCTTC ATCAACAAAGAAGGCACACGTCCTGCCGTGGTTATCCCGACCAACGAA GAGCTGGTCATCGCGCAAGACGCCAGCCGTCTGACCGCATAA
17	PoxB 유전자의 염기서열	ATGGAGATCATGAAGCAGACCGTGGCGGCATACATTGCCAAAACGCTG GAACAGGCCGGCGTGAAACGTATCTGGGGCGTCACCGGAGATTCCCTC AATGGATTGAGCGATAGCCTTAACCGCATGGGCACCATCGACTGGATGC CCACCCGGCACGAAGAGGTCGCCGCTTTCGCCGCTGGCGCGGAAGCG CAGCTGACCGGCGAGCTGGCGGTCTGCGCCGGCTCCTGCGGACCGGG CAACCTGCATCTGATTAACGGTTTGTTTGACTGTCATCGCAACCATGTCC CGGTGCTGGCCATCGCCGCCCACATCCCATCCAGCGAAATCGGCAGCG

[0078]

		GCTATTTTCAGGAAACCCATCCTCAGGAGCTGTTCCGCGAGTGCAGCCA TTACTGCGAACTGGTCTCCACGCCGGAGCAGATCCCGCAGGTGCTGGC AGTGGCGATGCGTAAGGCAGTGATTAACCGCGGCGTCTCGGTGGTGGT GCTACCCGGCGATGTGGCGCTGAAGGCCGCCCCGGAAAGCGCCAGCA GCCACTGGTATCATGCGCCGCTGCCGACGGTCACCCCGGCGGAAGAAG AGCTGCGCAAGCTGGCGCAGCTTATTCGCTACTCCAGCAATATCGCGCT CATGTGCGGCAGCGGTTGCGCCGGCGCCCACCAGGAACTGGTGGAGT TCGCAGCCAAAATTAAAGCCCCCATCGTCCACGCCCTGCGCGGCAAAG AGCACGTGGAGTACAACAACCCGTACGATGTGGGCATGACCGGGCTGA TTGGCTTCTCCTCTGGCTTCCACACCATGATGAACGCCGATACCCTGATC CTGCTGGGCACCCAGTTCCCCTATCGCGCCTTCTACCCAACCGACGCGA AAATTATCCAGATCGACATCAACCCCGGCAGCATCGGCGCACACAGTA AGGTCGACATGGCGCTGGTGGGCGATATTAAATCGACGCTGAAGGCGC TGCTGCCGCTGCTGGAAGAGAAAACCGATCGCCACTTCCTCGATAAGG CGCTGGAGCACTATCGCGACGCGCGAAAAGGGCTCGACGATCTGGCT AAACCCAGCGATAAAGCCATTCACCCGCAATATCTGGCGCAGCAGATC AGTCATTTTGCCGATGAAGATGCCATTTTCACCTGTGATGTCGGCACCCC GACCGTCTGGGCGGCACGCTATCTCAAAATGAATGGTAAACGCCGCCT GCTGGGCTCGTTCAACCACGGCTCAATGGCCAACGCCATGCCGCAGGC CATCGGCGCCAAGGCCACTGCGCCGGAGCGGCAGGTAGTGGCCATGT GCGGCGACGGCGGGTTCAGCATGCTGATGGGCGATTTTCTGTCGCTGG CGCAGATGAAGCTGCCGGTGAAGATTGTCATCTTTAACAACAGCGTGCT GGGCTTCGTGGCGATGGAAATGAAGGCCGGGGGCTATCTCACCGACG GTACGGAGCTCCACGATACCAACTTCGCCCGCATCGCCGAGGCCTGCG GTATCAAAGGTATACGCGTTGAAAAAGCCTCCGAGGTGGATGAAGCGC TGCAGACCGCCTTCCGCACCGACGGTCCGGTGCTGGTCGACGTCGTCG TCGCCAAAGAGGAACTGGCGATCCCGCCGCAGATCAAGCTGGAGCAG GCCAAAGGCTTTAGCCTGTATATGCTGCGGGCGATCATCAGCGGGCGC GGCGATGAGGTCATCGAACTGGCGAAAACCAACTGGCTCAGGTAA
18	Mdh 유전자의 염기서열	ATGAAAGTTGCAGTCCTTGGCGCTGCCGGTGGTATCGGCCAGGCGCTT GCCCTACTACTTAAGACCCAACTGCCTTCAGGTTCAGAGCTCTCGTTGT ACGACATCGCTCCGGTTACGCCGGGCGTGGCGGTAGATCTAAGTCATAT CCCCACAGATGTAAAAATTAAAGGATTTTCCGGTGAAGACGCTACTCCG GCGCTGGAAGGCGCGGATGTAGTGCTGATCTCCGCGGGCGTGGCGCGT AAGCCCGGCATGGATCGTTCCGACCTGTTTAATGTGAATGCGGGTATCGT

[0079]

[0080]

		GAAGAACCTCGTGCAGCAGATTGCCAAAACCTGCCCGCAGGCCTGCAT CGGCATTATCACCAACCCGGTGAATACCACTGTGGCTATCGCCGCCGAA GTACTGAAAAAAGCCGGCGTGTACGATAAAAACAAACTGTTCGGCGTT ACCACGCTGGACATCATCCGTTCCAATACCTTTGTGGCGGAGCTGAAAG GTAAATCGGCAACCGAGGTGGAAGTCCCGGTCATTGGTGGTCACTCCG GGGTCACCATTCTGCCTTTACTGTCGCAGATCCCCGGCGTCAGCTTTAG CGATCAGGAAATTGCCGACCTGACTAAACGTATTCAGAACGCCGGTACC GAAGTCGTGGAAGCGAAAGCGGGCGGCGGGTCGGCGACCTTGTCGAT GGGCCAGGCGGCTGCCCGTTTTGGTCTCTCTCTGGTTCGCGCCATGCA GGGGGAAAAAGGCGTGGTGGAGTGCGCCTACGTGGAAGGCGACGGC CACTATGCGCGTTTCTTCTCCCAGCCGCTGCTGCTGGGGAAAAACGGC GTGGAAGAGCGACAGTCTATCGGCAAACTCAGCGCCTTTGAACAGCA GGCGCTGGAGGGCATGCTGGACACCCTGAAGAAAGATATCGCGCTCG GCGAAGACTTCGTCAACAAGTAA
19	조작된 GltA 유전자의 염기서열	TTAACGCTTAATGTCGGACTGGAAATCGCGTTTGGCGTAGCCGGTATAC AGCTGACGCGGACGGGCGATCTTCATGCCATCGCTGTGCATTTCGTTCC AGTGCGCAATCCAGCCCACGGTACGCGCCATGGCGAAGATAACGGTAA ACATGGAGGACGGAATACCCATCGCTTTCAGGATGATACCGGAGTAGA AGTCGACGTTCGGATACAGTTTCTTCTCGATGAAGTACGGGTCGTTCAG CGCGATATGCTCCAGCTCCATGGCCACCTGCAGCAGGTCGTCTTTGGTG CCCAGCTCTTTCAGCACTTCATGGCAGGTTTCACGCATTACGGTGGCGC GCGGATCGTAGTTTTTGTAAACACGATGGCCGAAGCCCATCAGGCGGA AAGAGTCATTCTTGTCTTTCGCACGACGAACAAATTCCGGAATGTGCTC AACGGAGCTGATCTCTTCCAGCATTTTCAGCGCCGCTTCGTTGGCGCCA CCGTGTGCCGGTCCCCACAGGGAGGCGATGCCCGCAGCGATACAGGC GAACGGGTTAGCGCCGGAGGAGCCCGCGGTACGTACCGTGGAGGTCG ACGCGTTCTGCTCGTGATCGGCGTGCAGGATCAGAATACGATCCATCGC GCGCTCCAGCACCGGATTGACTTCATACTCTTCGCACGGTGTCGCAAAC ATCATGCGCAGGAAGTTGCCGGCGTAGGAGAGGTCGTTGCGCGGATAA ACAAACGGCTGACCGATAGAATACTTGTAACACATGGCTGCCATGGTTG GCATTTTGGACAGCAGCTTGTAGGCGGCAATCTCGCGGTGACGCGGGT TATTCACATCGAGGGAATCATGATAGAACGCCGCCAGCGCGCCGGTGAT CCCGCACATCACCGCCATCGGGTGGGAATCGCGACGGAACGCGTGGA ACAGACGGGTGATCTGCTCATGAATCATGGTGTGGCGGGTGACGGTAG TTTTGAATTCGTCATATTCGGCCTGGGTCGGCTTTTCGCCGTACAGCAG

		GATATAACAGACTTCAAGATAATTAGATTCGGTCGCTAACTGGTCGATCG GGAAGCCGCGGTGCAGCAGGATCCCCTCGTCACCATCGATAAACGTAA TTTTAGATTCACAAGAAGCCGTTGATGTGAAACCTGGGTCAAAGGTAAA TACGCCTTTTGAACCAAGACTACGAATATCAATAACATCCTGACCGAGC GTGCCTTTTAGCACATCCAGTTCAATAGCAGTGTCACCACCCAGGGTGA TTTTTGCTTTAGCATCAGACAT
20	조작된 LpdA 유전자의 염기서열	ATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCC GCAGGTTACTCTGCAGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCG TCATCGTAGAACGTTACAGCACCCTCGGTGGTGTTTGTCTGAACGTGGG TTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAA GCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCGAAAAC TGACATTGACAAGATCCGCACCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCT GACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGT TAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGGAAGG CGAAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCTATCATCGCGGC GGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTTTATCCCGCATGAAGATCCGCGC GTATGGGACTCCACCGACGCCCTGGAACTGAAATCTGTACCGAAACGC ATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAAATGGGTACCGTAT ACCATGCGCTGGGTTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGG TTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTCACCAAACGCA TCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAACCAAAGTGACTGCCGTTG AAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAAAAAGCAC CGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGC GTACCGAATGGTAAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTT GACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAACAAATGCGCACCAACGTG CCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCT GAAACACTACTTCGATCCGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAA CCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAGAAGCGAAAGAGAA AGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCG TGCTATCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACA AAGAGACCCACCGTGTTATCGGCGGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCG GCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGGCTGTGACG CTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTC CGTTGGCCTGGCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGC

[0081]

		CAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAA
21	야생형 LpdA 유전자의 염기서열	ATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCC GCAGGTTACTCTGCAGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCG TCATCGTAGAACGTTACAGCACCCTCGGTGGTGTTTGTCTGAACGTGGG TTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAA GCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCGAAAAC TGACATTGACAAGATCCGCACCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCT GACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGT TAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGGAAGG CGAAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCTATCATCGCGGC GGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTTTATCCCGCATGAAGATCCGCGC GTATGGGACTCCACCGACGCCCTGGAACTGAAATCTGTACCGAAACGC ATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAAATGGGTACCGTAT ACCATGCGCTGGGTTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGG TTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTCACCAAACGCA TCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAACCAAAGTGACTGCCGTTG AAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAAAAAGCAC CGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGC GTACCGAATGGTAAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTT GACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAACAAATGCGCACCAACGTG CCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCT GAAACACTACTTCGATCCGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTGAA CCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAGAAGCGAAAGAGAA AGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCG TGCTATCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACA AAGAGACCCACCGTGTTATCGGCGGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCG GCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGGCTGTGACG CTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTC CGTTGGCCTGGCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGC CAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAA
22	NuoA 유전자의 염기서열	ATGCTCGTCGGCGGCTGGTACCTTGGCGGTCGCGCGCGCGCGCGTAGT AAAAACACGCCGTTTGAATCGGGGATCGACTCCGTCGGTTCGGCCCGC TTACGTCTTTCTGCGAAGTTTTATCTGGTTGCCATGTTCTTCGTTATCTTCG ACGTGGAAGCCCTGTATCTCTACGCATGGTCGACCTCTATCCGCGAGAG

[0082]

[0083]

		CGGCTGGGTCGGCTTTGTGGAAGCCGCAATTTTCATTTTAGTGCTACTG GCTGGTCTGGTTTATCTCGTTCGCATCGGCGCACTGGACTGGACGCCTG CGCGTTCCCGTCGCACGCTGGTTAACCCGGAAACAGACAGTCCCACTA ACCGTCATATGCAGTAA
23	Ndh 유전자의 염기서열	ATGACTACGCCATTGAAAAAAATCGTAATTGTGGGTGGCGGCGCTGGC GGACTGGAACTGGCAACTCAGCTGGGGAGAAAGTTAGGGCGCCATAA GAAAGCGAAAATCACCCTGGTGGACCGTAACCACAGCCATCTGTGGAA GCCGCTGCTGCACGAAGTGGCCACCGGTTCTCTGGATGAAGGCGTTGA TGCGCTGAGCTATCTGGCCCATGCCCGCAACCACGGTTTCCAGTTCCAG CTGGGCTCGGTGGTCGATATCAACCGCGAAGGGAAAACCATCACCCTC GGCGAGCTGCGCAATGAAAAAGGCGAGCTGCTGGTGGCTGAGCGTAA ACTGCCGTACGACACGCTGGTCATGGCGTTGGGCAGTACCTCGAATGAT TTTAATACCCCTGGCGTAAAAGAGAACTGCATTTTCCTCGACAACCCGC ACCAGGCGCGTCGCTTCCATCAGGAAATGCTCAACCTGTTCCTTAAATA CTCTGCTAACCTCGGCGCTAACGGTAAAGTAAATATCGCCATCGTCGGC GGCGGCGCCACCGGCGTGGAGCTCTCCGCTGAGTTGCACAATGCGGT GAAACAGCTGCACAGCTACGGCTACAAAGGGCTGACCAACGAAGCGC TGAACGTCACGCTGGTCGAGGCGGGCGAGCGCATTCTGCCTGCGCTGC CGCCGCGCATTTCCGGGGCAGCGCATAATGAGCTGACTAAGCTGGGCG TACGGGTTCTGACGCAGACCATGGTCACCAGCGCGGATGCGGGCGGC CTGCACACTAAAGATGGCGAATATATTGAGGCGGATCTAATGGTCTGGG CGGCGGGGATCAAAGCGCCAGATTTCATGAAAGAGATCGGCGGCCTC GAAACCAACCGTATCAATCAGCTGGTGGTCGAGCCGACGCTGCAGACT ACCCGCGATGCGGATATTTTCGCCATCGGCGACTGCGCCTCCTGCGCCC GTCCGGAAGGCGGCTTTGTGCCTCCGCGGGCCCAGGCGGCGCACCAG ATGGCTACCTGCGCGCTGAACAACATCCTGGCGCAGATGAAAGGCAAA CCGCTGAAGGCATACACCTATAAAGACCATGGCTCGCTGGTGTCGCTGT CAAATTACTCCACCGTCGGCAGCCTGATGGGTAACCTGATGCGCGGTTC GATGATGGTAGAAGGGCGCATTGCGCGCTTCGTGTACATCTCCCTGTAC CGTATGCACCAGATTGCCCTGCATGGTTACTTCAAGACCGGCCTGATGA TGCTGGTTGGGCGCATCAACCGCATCATTCGCCCGCGCCTGAAGCTGC ACTAA
24	BudA 유전자의 염기서열	ATGAATCATTCTGCTGAATGCACCTGCGAAGAGAGTCTATGCGAAACCC TGCGGGCGTTTTCCGCGCAGCATCCCGAGAGCGTGCTCTATCAGACATC GCTCATGAGCGCCCTGCTGAGCGGGGTTTACGAAGGCAGCACCACCAT

[0084]

		CGCCGACCTGCTGAAACACGGCGATTTCGGCCTCGGCACCTTTAATGA GCTGGACGGGGAGCTGATCGCCTTCAGCAGTCAGGTCTATCAGCTGCG CGCCGACGGCAGCGCGCGCAAAGCCCAGCCGGAGCAGAAAACGCCG TTCGCGGTGATGACCTGGTTCCAGCCGCAGTACCGGAAAACCTTTGAC CATCCGGTGAGCCGCCAGCAGCTGCACGAGGTGATCGACCAGCAAATC CCCTCTGACAACCTGTTCTGCGCCCTGCGCATCGACGGCCATTTCCGCC ATGCCCATACCCGCACCGTGCCGCGCCAGACGCCGCCGTACCGGGCGA TGACCGACGTACTCGACGATCAGCCGGTGTTCCGCTTTAACCAGCGCG AAGGGGTGCTGGTCGGCTTCCGGACCCCGCAGCATATGCAGGGGATCA ACGTCGCCGGGTATCACGAGCATTTTATTACCGATGACCGCAAAGGCG GCGGTCACCTGCTGGATTACCAGCTCGACCACGGGGTGCTGACCTTCG GCGAAATTCACAAGCTGATGATCGACCTGCCCGCCGACAGCGCGTTCC TGCAGGCTAATCTGCATCCCGATAATCTCGATGCCGCCATCCGTTCCGTA GAAAGTTAA
25	BudB 유전자의 염기서열	ATGGACAAACAGTATCCGGTACGCCAGTGGGCGCACGGCGCCGATCTC GTCGTCAGTCAGCTGGAAGCACAGGGGGTACGCCAGGTGTTCGGCATC CCCGGCGCCAAAATCGACAAGGTCTTCGATTCACTGCTGGATTCCTCCA TTCGCATTATTCCGGTACGCCACGAAGCCAACGCCGCATTTATGGCCGC CGCCGTCGGACGTATTACCGGCAAAGCGGGCGTGGCGCTGGTCACCTC CGGTCCGGGTTGTTCTAACCTGATCACCGGCATGGCCACCGCGAACAG CGAAGGCGACCCGGTGGTGGCCCTGGGCGGCGCGGTAAAACGCGCC GATAAAGCCAAACAGGTCCACCAGAGTATGGATACGGTGGCGATGTTC AGCCCGGTCACCAAATACGCCGTCGAGGTGACGGCGCCGGATGCGCTG GCGGAAGTGGTCTCCAACGCCTTCCGCGCCGCCGAGCAGGGCCGGCC GGGCAGCGCGTTCGTTAGCCTGCCGCAGGATGTGGTCGATGGCCCGGT CAGCGGCAAAGTACTGCCGGCCAGCGGGGCCCCGCAGATGGGCGCC GCGCCGGATGATGCCATCGACCAGGTGGCGAAGCTTATCGCCCAGGCG AAGAACCCGATCTTCCTGCTCGGCCTGATGGCCAGCCAGCCGGAAAAC AGCAAGGCGCTGCGCCGTTTGCTGGAGACCAGCCATATTCCAGTCACC AGCACCTATCAGGCCGCCGGAGCGGTGAATCAGGATAACTTCTCTCGC TTCGCCGGCCGGGTTGGGCTGTTTAACAACCAGGCCGGGGACCGTCTG CTGCAGCTTGCCGACCTGGTGATCTGCATCGGCTACAGCCCGGTGGAAT ACGAACCGGCGATGTGGAACAGCGGCAACGCGACGCTGGTGCACATC GACGTGCTGCCCGCCTATGAAGAGCGCAACTACACCCCGGATGTCGAG CTGGTAGGCGATATCGCCGGCACTCTCAACAAGCTGGCGCAAAATATC

		GATCATCGGCTGGTGCTCTCCCCGCAGGCAGCGGAGATCCTCCGCGAC CGCCAGCACCAGCGCGAGCTGCTGGACCGCCGCGGCGCGCAGCTCAA CCAGTTTGCCCTGCATCCGCTGCGTATCGTTCGCGCCATGCAGGACATC GTCAACAGCGACGTCACGTTGACCGTGGACATGGGCAGCTTCCATATCT GGATTGCCCGCTACCTGTACAGCTTCCGCGCCCGCCAGGTGATGATCTC CAACGGCCAGCAGACCATGGGCGTCGCCCTGCCCTGGGCCATCGGCG CCTGGCTGGTCAATCCTGAGCGCAAAGTGGTCTCCGTCTCCGGCGACG GCGGCTTCCTGCAGTCGAGCATGGAGCTGGAGACCGCCGTCCGCCTGA AAGCCAACGTGCTGCACCTGATCTGGGTCGATAACGGCTACAACATGGT GGCCATTCAGGAAGAGAAAAAATACCAGCGCCTGTCCGGCGTCGAGTT TGGGCCGATGGATTTTAAAGCCTATGCCGAATCCTTCGGCGCGAAAGG GTTTGCCGTGGAAAGCGCCGAGGCGCTGGAGCCGACCCTGCGCGCGG CGATGGACGTCGACGGCCCGGCGGTAGTGGCCATCCCGGTGGATTATC GCGATAACCCGCTGCTGATGGGCCAGCTGCATCTGAGTCAGATTCTGTA A
26	BudC 유전자의 염기서열	ATGAAAAAAGTCGCACTTGTTACCGGCGCCGGCCAGGGGATTGGTAAA GCTATCGCCCTTCGTCTGGTGAAGGATGGATTTGCCGTGGCCATTGCCG ATTATAACGACGCCACCGCCAAAGCGGTCGCCTCCGAAATCAACCAGG CCGGCGGCCGCGCCATGGCGGTGAAAGTGGATGTTTCTGACCGCGACC AGGTATTTGCCGCCGTCGAACAGGCGCGCAAAACGCTGGGCGGCTTC GACGTCATCGTCAACAACGCCGGCGTGGCGCCATCCACGCCGATCGAG TCCATTACCCCGGAGATTGTCGACAAAGTCTACAACATCAACGTCAAAG GGGTGATCTGGGGCATCCAGGCAGCGGTCGAGGCCTTTAAGAAAGAG GGTCACGGCGGGAAAATCATCAACGCCTGTTCCCAGGCCGGCCACGTC GGCAACCCGGAGCTGGCGGTATATAGCTCGAGTAAATTCGCGGTACGC GGCTTAACCCAGACCGCCGCTCGCGACCTCGCGCCGCTGGGCATCACG GTCAACGGCTACTGCCCGGGGATTGTCAAAACGCCGATGTGGGCCGAA ATTGACCGCCAGGTGTCCGAAGCCGCCGGTAAACCGCTGGGCTACGGT ACCGCCGAGTTCGCCAAACGCATCACCCTCGGCCGCCTGTCCGAGCCG GAAGATGTCGCCGCCTGCGTCTCCTATCTTGCCAGCCCGGATTCTGATTA TATGACCGGTCAGTCATTGCTGATCGACGGCGGCATGGTGTTTAACTAA
27	GPD1 유전자의 염기서	ATGTCGGCTGCTGCTGATCGCCTGAATCTGACCTCGGGCCATCTGAATG CTGGTCGCAAACGCTCCTCTTCGTCGGTGTCGCTGAAAGCGGCCGAAA AACCGTTTAAAGTTACCGTCATTGGCAGCGGTAACTGGGGCACCACGA TCGCGAAAGTGGTTGCCGAAAATTGCAAAGGCTATCCGGAAGTGTTTG

[0085]

[0086]

	열	CGCCGATTGTGCAGATGTGGGTTTTCGAAGAGGAAATCAACGGCGAGA AACTGACCGAAATTATCAACACGCGCCATCAGAATGTCAAATACCTGCC GGGCATTACCCTGCCGGATAACCTGGTGGCCAATCCGGATCTGATCGAC AGCGTTAAAGATGTGGATATCATCGTTTTCAACATTCCGCACCAGTTCCT GCCGCGCATCTGCTCCCAGCTGAAAGGCCATGTGGATAGTCACGTGCGT GCGATTTCTTGTCTGAAAGGTTTTGAAGTCGGTGCCAAAGGCGTGCAG CTGCTGAGCAGCTATATTACCGAGGAACTGGGTATCCAGTGTGGCGCGC TGAGTGGTGCGAACATTGCCACCGAAGTGGCACAGGAACATTGGTCTG AGACCACGGTCGCTTATCACATCCCGAAAGATTTCCGCGGCGAAGGCA AAGATGTTGACCATAAAGTCCTGAAAGCACTGTTTCATCGTCCGTACTTC CACGTGTCAGTTATCGAAGACGTGGCCGGCATTTCGATCTGCGGTGCGC TGAAAAATGTCGTGGCCCTGGGCTGTGGTTTTGTTGAAGGCCTGGGTTG GGGCAACAATGCGTCAGCAGCTATTCAGCGCGTCGGTCTGGGCGAAAT TATCCGTTTCGGCCAGATGTTTTTCCCGGAAAGCCGTGAGGAAACCTAT TACCAGGAGTCCGCAGGTGTGGCTGATCTGATCACCACGTGCGCCGGC GGTCGCAACGTCAAAGTGGCACGTCTGATGGCTACCTCAGGCAAAGAC GCATGGGAGTGTGAAAAAGAGCTGCTGAATGGCCAGTCGGCTCAGGG TCTGATTACCTGCAAAGAAGTGCACGAGTGGCTGGAAACGTGTGGCTC TGTTGAAGATTTTCCGCTGTTCGAGGCCGTGTATCAGATCGTTTACAACA ACTACCCGATGAAAAACCTGCCGGACATGATTGAAGAACTGGACCTGC ACGAGGACTAA
28	GPP2 유전자의 염기서열	ATGCCGCTGACCACCAAACCGCTGAGCCTGAAAATCAACGCCGCCCTG TTCGATGTGGACGGCACCATTATTATTAGCCAACCGGCCATCGCGGCCT TTTGGCGTGATTTCGGCAAAGACAAGCCGTACTTTGATGCGGAGCACG TTATCCATATTAGCCACGGTTGGCGCACCTATGACGCGATTGCCAAATTT GCGCCGGATTTCGCCGACGAAGAGTACGTGAACAAACTGGAAGGCGA GATCCCGGAAAAGTATGGCGAGCATAGCATTGAAGTTCCGGGTGCCGT GAAGCTGTGCAATGCCCTGAATGCCCTGCCGAAAGAAAAATGGGCCGT TGCCACCAGCGGCACCCGTGATATGGCGAAAAAGTGGTTTGACATCCT GAAAATTAAGCGCCCGGAGTACTTCATCACCGCCAATGATGTGAAACA GGGCAAGCCGCACCCGGAACCGTATCTGAAAGGCCGTAACGGCCTGG GTTTTCCGATCAATGAGCAGGACCCGAGCAAAAGCAAGGTGGTTGTGT TCGAAGATGCGCCGGCGGGTATTGCCGCGGGTAAAGCCGCCGGCTGC AAGATCGTTGGTATTGCGACCACCTTTGATCTGGACTTCCTGAAAGAGA AGGGCTGCGACATCATTGTTAAGAACCATGAAAGCATTCGCGTGGGCG

		AGTACAATGCCGAAACCGACGAAGTGGAACTGATTTTTGATGATTATCT GTATGCCAAGGATGACCTGCTGAAGTGGTAA
29	DhaB123 유전자의 염기서열	ATGAAAAGATCAAAACGATTTGCAGTACTGGCCCAGCGCCCCGTCAAT CAGGACGGGCTGATTGGCGAGTGGCCTGAAGAGGGGCTGATCGCCAT GGACAGCCCCTTTGACCCGGTCTCTTCAGTAAAAGTGGACAACGGTCT GATCGTCGAGCTGGACGGCAAACGCCGGGACCAGTTTGACATGATCGA CCGATTTATCGCCGATTACGCGATCAACGTTGAGCGCACAGAGCAGGC AATGCGCCTGGAGGCGGTGGAAATAGCCCGCATGCTGGTGGATATTCA CGTCAGTCGGGAGGAGATCATTGCCATCACTACCGCCATCACGCCGGC CAAAGCGGTCGAGGTGATGGCGCAGATGAACGTGGTGGAGATGATGAT GGCGCTGCAGAAGATGCGTGCCCGCCGGACCCCCTCCAACCAGTGCC ACGTCACCAATCTCAAAGATAATCCGGTGCAGATTGCTGCTGACGCCGC CGAGGCCGGGATCCGCGGCTTCTCAGAACAGGAGACCACGGTCGGTA TCGCGCGCTATGCGCCGTTTAACGCCCTGGCGCTGTTGGTCGGTTCGCA GTGCGGCCGCCCCGGCGTTTTGACGCAGTGCTCGGTGGAAGAGGCCA CCGAGCTGGAGCTGGGCATGCGTGGCTTAACCAGCTACGCCGAGACG GTGTCGGTCTACGGCACCGAAGCGGTATTTACCGACGGCGATGATACTC CGTGGTCAAAGGCGTTCCTCGCCTCGGCCTACGCCTCCCGCGGGTTGA AAATGCGCTACACCTCCGGCACCGGATCCGAAGCGCTGATGGGCTATT CGGAGAGCAAGTCGATGCTCTACCTCGAATCGCGCTGCATCTTCATTAC CAAAGGCGCCGGGGTTCAGGGGCTGCAAAACGGCGCGGTGAGCTGTA TCGGCATGACCGGCGCTGTGCCGTCGGGCATTCGGGCGGTGCTGGCGG AAAACCTGATCGCCTCTATGCTCGACCTCGAAGTGGCGTCCGCCAACGA CCAGACTTTCTCCCACTCGGATATTCGCCGCACCGCGCGCACCCTGATG CAGATGCTGCCGGGCACCGACTTTATTTTCTCCGGCTACAGCGCGGTGC CGAACTACGACAACATGTTCGCCGGCTCGAACTTCGATGCGGAAGATT TTGATGATTACAACATCCTGCAGCGTGACCTGATGGTTGACGGCGGCCT GCGTCCGGTGACCGAGGCGGAAACCATTGCCATTCGCCAGAAAGCGG CGCGGGCGATCCAGGCGGTTTTCCGCGAGCTGGGGCTGCCGCCAATC GCCGACGAGGAGGTGGAGGCCGCCACCTACGCGCACGGTAGCAACG AGATGCCGCCGCGTAACGTGGTGGAGGATCTGAGTGCGGTGGAAGAG ATGATGAAGCGCAACATCACCGGCCTCGATATTGTCGGCGCGCTGAGC CGCAGCGGCTTTGAGGATATCGCCAGCAATATTCTCAATATGCTGCGCC AGCGGGTCACCGGCGATTACCTGCAGACCTCGGCCATTCTCGATCGGC AGTTCGAGGTGGTGAGTGCGGTCAACGACATCAATGACTATCAGGGGC

[0087]

[0088]

		CGGGCACCGGCTATCGCATCTCTGCCGAACGCTGGGCGGAGATCAAAA ATATTCCGGGCGTGGTTCAGCCCGACACCATTGAATAAGGCGGTATTCC TGTGCAACAGACAACCCAAATTCAGCCCTCTTTTACCCTGAAAACCCGC GAGGGCGGGGTAGCTTCTGCCGATGAACGCGCCGATGAAGTGGTGATC GGCGTCGGCCCTGCCTTCGATAAACACCAGCATCACACTCTGATCGATA TGCCCCATGGCGCGATCCTCAAAGAGCTGATTGCCGGGGTGGAAGAAG AGGGGCTTCACGCCCGGGTGGTGCGCATTCTGCGCACGTCCGACGTCT CCTTTATGGCCTGGGATGCGGCCAACCTGAGCGGCTCGGGGATCGGCA TCGGTATCCAGTCGAAGGGGACCACGGTCATCCATCAGCGCGATCTGCT GCCGCTCAGCAACCTGGAGCTGTTCTCCCAGGCGCCGCTGCTGACGCT GGAAACCTACCGGCAGATTGGCAAAAACGCCGCGCGCTATGCGCGCA AAGAGTCACCTTCGCCGGTGCCGGTGGTGAACGATCAGATGGTGCGGC CGAAATTTATGGCCAAAGCCGCGCTATTTCATATCAAAGAGACCAAACA TGTGGTGCAGGACGCCGAGCCCCTCACCCTGCACGTCGACTTAGTAAG GGAGTGACCATGAGCGAGAAAACCATGCGCGTGCAGGATTATCCGTTA GCCACCCGCTGCCCGGAGCATATCCTGACGCCTACCGGCAAACCATTG ACCGATATTACCCTCGAGAAGGTGCTCTCTGGCGAGGTGGGCCCGCAG GATGTGCGGATCTCCTGCCAGACCCTTGAGTACCAGGCGCAGATTGCC GAGCAGATGCAGCGCCATGCGGTGGCGCGCAATTTCCGCCGCGCGGC GGAGCTTATCGCCATTCCTGACGAGCGCATTCTGGCTATCTATAACGCG CTGCGCCCGTTCCGCTCCTCGCAGGCGGAGCTGCTGGCGATCGCCGAC GAGCTGGAGCACACCTGGCATGCGACAGTGAATGCCGCCTTTGTCCGG GAGTCGGCGGAAGTGTATCAGCAGCGGCATAAGCTGCGTAAAGGAAG CTAA
30	GdrAB 유전자의 염기서열	ATGCCGTTAATAGCCGGGATTGATATCGGCAACGCCACCACCGAGGTG GCGCTGGCGTCCGACGACCCGCAGGCGAGGGCGTTTGTTGCCAGCGG GATCGTCGCGACGACGGGCATGAAAGGGACGCGGGACAATATCGCCG GGACCCTCGCCGCGCTGGAGCAGGCCCTGGCGAAAACACCGTGGTCG ATGAGCGATGTCTCTCGCATCTATCTTAACGAAGCCGCGCCGGTGATTG GCGATGTGGCGATGGAGACCATCACCGAGACCATTATCACCGAATCGA CCATGATCGGTCATAACCCGCAGACGCCGGGCGGGGTGGGCGTTGGC GTGGGGACGACTATCGCCCTCGGGCGGCTGGCGACGCTGCCGGCGGC GCAGTATGCCGAGGGGTGGATCGTACTGATTGACGACGCCGTCGATTTC CTTGACGCCGTGTGGTGGCTCAATGAGGCGCTCGACCGGGGGATCAAC GTGGTGGCGGCGATCCTCAAAAAGGACGACGGCGTGCTGGTGAACAA

		CCGCCTGCGTAAAACCCTGCCGGTGGTAGATGAAGTGACGCTGCTGGA GCAGGTCCCCGAGGGGGTAATGGCGGCGGTGGAAGTGGCCGCGCCG GGCCAGGTGGTGCGGATCCTGTCGAATCCCTACGGGATCGCCACCTTCT TCGGGCTAAGCCCGGAAGAGACCCAGGCCATCGTCCCCATCGCCCGCG CCCTGATTGGCAACCGTTCAGCGGTGGTGCTCAAGACCCCGCAGGGG GATGTGCAGTCGCGGGTGATCCCGGCGGGCAACCTCTACATTAGCGGC GAAAAGCGCCGCGGAGAGGCCGATGTCGCCGAGGGCGCGGAAGCCA TCATGCAGGCGATGAGCGCCTGCGCTCCGGTACGCGACATCCGCGGCG AACCGGGCACTCACGCCGGCGGCATGCTTGAGCGGGTGCGCAAGGTA ATGGCGTCCCTGACCGACCATGAGATGAGCGCGATATACATCCAGGATC TGCTGGCGGTGGATACGTTTATTCCGCGCAAGGTGCAGGGCGGGATGG CCGGCGAGTGCGCCATGGAAAATGCCGTCGGGATGGCGGCGATGGTG AAAGCGGATCGTCTGCAAATGCAGGTTATCGCCCGCGAACTGAGCGCC CGACTGCAGACCGAGGTGGTGGTGGGCGGCGTGGAGGCCAACATGGC CATCGCCGGGGCGTTAACCACTCCCGGCTGTGCGGCGCCGCTGGCGAT CCTCGACCTCGGCGCCGGCTCGACGGATGCGGCGATCGTCAACGCGG AGGGGCAGATAACGGCGGTCCATCTCGCCGGGGCGGGGAATATGGTC AGCCTGTTGATTAAAACCGAGCTGGGCCTCGAGGATCTTTCGCTGGCG GAAGCGATAAAAAAATACCCGCTGGCCAAAGTGGAAAGCCTGTTCAGT ATTCGTCACGAGAATGGCGCGGTGGAGTTCTTTCGGGAAGCCCTCAGC CCGGCGGTGTTCGCCAAAGTGGTGTACATCAAGGAGGGCGAACTGGTG CCGATCGATAACGCCAGCCCGCTGGAAAAAATTCGTCTCGTGCGCCGG CAGGCGAAAGAGAAAGTGTTTGTCACCAACTGCCTGCGCGCGCTGCG CCAGGTCTCACCCGGCGGTTCCATTCGCGATATCGCCTTTGTGGTGCTG GTGGGCGGCTCATCGCTGGACTTTGAGATCCCGCAGCTTATCACGGAA GCCTTGTCGCACTATGGCGTGGTCGCCGGGCAGGGCAATATTCGGGGA ACAGAAGGGCCGCGCAATGCGGTCGCCACCGGGCTGCTACTGGCCGG TCAGGCGAATTAAAAGCTTTCGGCGGAAGTGTATCAGCAGCGGCATAA GCTGCGTAAAGGAAGCTAAGCGGAGGTCAGCATGTCGCTTTCACCGCC AGGCGTACGCCTGTTTTACGATCCGCGCGGGCACCATGCCGGCGCCAT CAATGAGCTGTGCTGGGGGCTGGAGGAGCAGGGGGTCCCCTGCCAGA CCATAACCTATGACGGAGGCGGTGACGCCGCTGCGCTGGGCGCCCTGG CGGCCAGAAGCTCGCCCCTGCGGGTGGGTATCGGGCTCAGCGCGTCC GGCGAGATAGCCCTCACTCATGCCCAGCTGCCGGCGGACGCGCCGCTG GCTACCGGACACGTCACCGATAGCGACGATCAACTGCGTACGCTCGGC

[0089]

		GCCAACGCCGGGCAGCTGGTTAAAGTCCTGCCGTTAAGTGAGAGAAA CTGA
31	DhaT 유전자 의 염기서열	ATGAGCTATCGTATGTTTGATTATCTGGTGCCAAACGTTAACTTTTTTGGC CCCAACGCCATTTCTGTAGTCGGCGAACGCTGCCAGCTGCTGGGGGGG AAAAAAGCCCTGCTGGTCACCGACAAAGGCCTGCGGGCAATTAAAGA TGGCGCGGTGGACAAAACCCTGCATTATCTGCGGGAGGCCGGGATCGA GGTGGCGATCTTTGACGGCGTCGAGCCGAACCCGAAAGACACCAACG TGCGCGACGGCCTCGCCGTGTTTCGCCGCGAACAGTGCGACATCATCGT CACCGTGGGCGGCGGCAGCCCGCACGATTGCGGCAAAGGCATCGGCA TCGCCGCCACCCATGAGGGCGATCTGTACCAGTATGCCGGAATCGAGA CCCTGACCAACCCGCTGCCGCCTATCGTCGCGGTCAATACCACCGCCGG CACCGCCAGCGAGGTCACCCGCCACTGCGTCCTGACCAACACCGAAA CCAAAGTGAAGTTTGTGATCGTCAGCTGGCGCAACCTGCCGTCGGTCTC TATCAACGATCCACTGCTGATGATCGGTAAACCGGCCGCCCTGACCGCG GCGACCGGGATGGATGCCCTGACCCACGCCGTAGAGGCCTATATCTCC AAAGACGCTAACCCGGTGACGGACGCCGCCGCCATGCAGGCGATCCG CCTCATCGCCCGCAACCTGCGCCAGGCCGTGGCCCTCGGCAGCAATCT GCAGGCGCGGGAAAACATGGCCTATGCCTCTCTGCTGGCCGGGATGGC TTTCAATAACGCCAACCTCGGCTACGTGCACGCCATGGCGCACCAGCT GGGCGGCCTGTACGACATGCCGCACGGCGTGGCCAACGCTGTCCTGCT GCCGCATGTGGCGCGCTACAACCTGATCGCCAACCCGGAGAAATTCGC CGATATCGCTGAACTGATGGGCGAAAATATCACCGGACTGTCCACTCTC GACGCGGCGGAAAAAGCCATCGCCGCTATCACGCGTCTGTCGATGGAT ATCGGTATTCCGCAGCATCTGCGCGATCTGGGGGTAAAAGAGGCCGAC TTCCCCTACATGGCGGAGATGGCTCTGAAAGACGGCAATGCGTTCTCG AACCCGCGTAAAGGCAACGAGCAGGAGATTGCCGCGATTTTCCGCCA GGCATTCTGA
32	GLF 유전자 의 염기서열	ATGAGCAGCGAGAGCAGCCAAGGTCTGGTTACCCGTCTGGCGCTGATT GCGGCGATTGGTGGTCTGCTGTTCGGTTATGATAGCGCGGTTATCGCGG CGATTGGCACCCCGGTGGACATCCACTTCATTGCGCCGCGTCACCTGAG CGCGACCGCGGCGGCGAGCCTGAGCGGTATGGTGGTTGTGGCGGTTCT GGTGGGCTGCGTTACCGGTAGCCTGCTGAGCGGCTGGATCGGTATTCGT TTCGGCCGTCGTGGTGGCCTGCTGATGAGCAGCATCTGCTTCGTGGCGG CGGGTTTTGGTGCGGCGCTGACCGAGAAGCTGTTTGGCACCGGTGGTA GCGCGCTGCAAATCTTCTGCTTCTTCCGTTTTCTGGCGGGTCTGGGCATT

[0090]

		GGTGTTGTGAGCACCCTGACCCCGACCTACATCGCGGAAATTGCTCCGC CGGACAAACGTGGCCAAATGGTTAGCGGTCAGCAAATGGCGATCGTGA CCGGCGCGCTGACCGGTTATATTTTCACCTGGCTGCTGGCGCACTTTGG CAGCATCGATTGGGTTAACGCGAGCGGTTGGTGCTGGAGCCCGGCGA GCGAGGGCCTGATCGGTATTGCGTTCCTGCTGCTGCTGCTGACCGCGCC GGACACCCCGCACTGGCTGGTGATGAAGGGTCGTCACAGCGAGGCGA GCAAAATTCTGGCGCGTCTGGAACCGCAGGCGGACCCGAACCTGACC ATCCAAAAGATTAAAGCGGGTTTTGACAAGGCGATGGATAAAAGCAGC GCGGGCCTGTTCGCGTTTGGTATCACCGTTGTGTTCGCGGGCGTTAGCG TGGCGGCGTTTCAGCAACTGGTTGGTATTAACGCGGTGCTGTACTATGC GCCGCAGATGTTCCAAAACCTGGGCTTTGGTGCGGACACCGCGCTGCT GCAAACCATCAGCATTGGCGTTGTGAACTTCATCTTTACCATGATTGCGA GCCGTGTTGTGGATCGTTTCGGTCGTAAGCCGCTGCTGATCTGGGGCGC GCTGGGTATGGCGGCGATGATGGCGGTTCTGGGTTGCTGCTTCTGGTTT AAAGTTGGTGGCGTGCTGCCGCTGGCGAGCGTTCTGCTGTACATTGCG GTGTTCGGCATGAGCTGGGGTCCGGTTTGCTGGGTTGTGCTGAGCGAA ATGTTTCCGAGCAGCATCAAAGGTGCTGCGATGCCGATTGCGGTGACC GGCCAGTGGCTGGCGAACATCCTGGTTAACTTCCTGTTTAAAGTGGCG GATGGCAGCCCGGCGCTGAACCAAACCTTCAACCACGGTTTTAGCTAT CTGGTGTTCGCGGCGCTGAGCATCCTGGGTGGCCTGATTGTTGCGCGTT TTGTGCCGGAAACCAAAGGTCGTAGCCTGGATGAGATTGAGGAAATGT GGCGTAGCCAAAAATAG

[0091]

표 4

Genes	Restriction enzymes Used for development of deletion plasmid (pKOV)
glpK	*BamHI and NotI*
glpD	*NotI and XbaI*
glpA	*NotI and BamHI*
dhaD	*BamHI and NotI*
ptsG	*NotI and BamHI*
glpF1	*NotI and BamHI*
glpF2	*NotI and BamHI*
ldhA	*BamHI and NotI*
adhE	*XbaI and NotI*
frdA	*NotI and XbaI*
pflB	*NotI and XbaI*
edd-eda	*NotI and BamHI*
mgsA	*NotI and XbaI*
pta-ackA	*NotI and BamHI*
poxB	*NotI and BamHI*
mdh	*NotI and XbaI*
gltA::gltAR164K	*NotI and XbaI*
lpdA::lpdAE324G	*NotI and XbaI*
nuoA	*NotI and XbaI*
ndh	*NotI and XbaI*
budABC	*NotI and BamHI*
budB	*NotI and BamHI*

[0096]

표 5

[0098]

유전자들	프라이머 서열
glpK	FP: ATTGGATCCTTATTATTTCGCAATTCGCTGGC (서열번호 33) RP: AATTGCGGCCGCGACCTTCGTCTGCGTGCTGT (서열번호 34)
glpD	FP: GGGGATCGCGGCCGCTCATTAACATGCAGCGAATC (서열번호 35) RP: CCGGTCGACTCTAGAAAGAACTCCAGGTTCAGCAT (서열번호 36)
glpA	FP: GGGATCGCGGCCGCAGGAAAATGCGCGGATTCGAG (서열번호 37) RP: TCTAGAGGATCCTGTCACGCAGTACATCCAGCAGCGGTAAC (서열번호 38)
dhaD	FP: AAAGGATCCATATGATGATTCTGGCTGAGCGGACG (서열번호 39) RP: AAAGCGGCCGCAAAAACTCCATGGCTGTAGCGCCTGCTTAAAAT (서열번호 40)
ptsG	FP: TACTAAGCGGCCGCTCTCGTTTTCCGGTATCGTCAC (서열번호 41) RP: TAGCAAGGATCCGATGCATATGGATATGGTACAC (서열번호 42)
glpF1	FP: TACTAAGCGGCCGCTCTTCGATTTCCATCTGCAACAG (서열번호 43) RP: TAGCAAGGATCCAGATAAGCCAGGTATCAAC (서열번호 44)
glpF2	FP: ATCTAAGCGGCCGCTCGTTAACGGATGTCAAAC (서열번호 45) RP: TAGTAAGGATCCAGGGGCAGATAACGGCGGTCCATCT (서열번호 46)
adhE	FP: AAATCTAGAGGCTTCGGCCTCGCGGAGAATACA (서열번호 47) RP: TATGCGGCCGCTGGATGAAAGCCAGTTTCTGA (서열번호 48)
ldhA	FP: CTACGGATCCTCGCTTCCGCCAGCCTCGGACATTTCCTG (서열번호 49) RP: AACAGCGGCCGCGTTTTCCGTCAGATCGACCTGCGCACCCTC (서열번호 50)
frdA	FP: TACTAAGCGGCCGCGATACATGTCATAGCATGGACGAT (서열번호 51) RP: AAATCTAGAACGAAAGTGCAGGTCCAGACGCCATT (서열번호 52)
pflB	FP: ATCTAAGCGGCCGCAGGTGTGGATGCCTTCTTTC (서열번호 53) RP: GAGTAGTCTAGAAATATATGACTGCCAACGG (서열번호 54)
Edd-eda	FP: TAGTATGCGGCCGCTTGGTCATCGTCAGGAAGAC (서열번호 55) RP: TAGCAAGGATCCGTAGATATCCAGGTACTGAAC (서열번호 56)
mgsA	FP: TAGATAGCGGCCGCTTAAGCAAACCGCTGAACAG (서열번호 57) RP: TAGCAATCTAGACCATCACTACGCTCAATCC (서열번호 58)
Pta-ackA	FP: GATCGCGGCCGCCTGCATCGGCAGGCTCAGCGCAAACAG (서열번호 59) RP: CTAGAGGATCCGCGGACTGAATAGCGATTTCCGCCAG (서열번호 60)
poxB	FP: ATCTAAGCGGCCGCCACCTTACCGTTATGGGTGTTTTC (서열번호 61) RP: CTGAAGGATCCAGTCTATTTCTTTGTTGGCGCACTGG (서열번호 62)
mdh	FP: TAGTTAGCGGCCGCATCCCGTTCCAGTTAGCGAC (서열번호 63) RP: TAGCAATCTAGAATCTCTCCCTGCGAGCTGAATTTC (서열번호 64)
gltA::gltAR164K	FP: TAGTTAGCGGCCGCGTCGGACATTGATATCCTC (서열번호 65) RP: GGACAGTCTAGAGGCATTAAAACATCACTAAACAACGC (서열번호 66)
lpdA::lpdAE324G	FP: TTATTAGCGGCCGCATCACCGAGCTGTCTCGTG (서열번호 67) RP: GGACAGTCTAGAGCAAAGGCACAGGAGATAACG (서열번호 68)
nuoA	FP: TAGATAGCGGCCGCAACAGCTCGGAGAGCATCAC (서열번호 69) RP: TAGCACTCTAGATTGGAGATCAAAGTTCACC (서열번호 70)
ndh	FP: GGGATCGCGGCCGCAACATGGAAGGCAAAATCGAC (서열번호 71) RP: GGTCGACTCTAGACGCACCTACGACCGTCGCCACGCTG (서열번호 72)
budABC	FP: TAGTTAAGCGGCCGCCATATTGTCTTCCATCTGGTG (서열번호 73) RP: TAGCAAGGATCCCAAACCGACCTTACTAACTGAC (서열번호 74)
budB	FP: TAGTTCCCGGGTTCAGCAGTCAGGTCTATCAG (서열번호 75) RP: TAGCAAGGATCCCGTTGATGTTGTAGACTTTGTC (서열번호 76)

[0099]

[0101] <1-3> 배양 조건

[0102] 쉐이크 플라스크 배양을 위해, 한천 LB 배지에서 세포를 ~ 10 내지 11 시간 동안 배양하여 1 차 접종물을 제조

하였다. 1 차 접종에서 세포를 신선한 modified M9 배지에 옮기고 약 10 시간 동안 배양하여 2 차 접종물을 만들었다. 주요 생산 연구는 2 차 접종물을 동일한 modified M9 배지에 접종함으로써 시작되었다. 본 발명에서 사용 된 modified M9 배지의 성분은 100 mM 인산 칼륨 완충액 (pH 7.0)을 첨가한 효모 추출물 1.0 g/L, NH4SO4 1.0 g/L 및 MgSO4 · 7H2O 0.25 g/L이다. 글루코스 10 g/L가 탄소원으로 사용되었다. 재조합 세포의 경우 필요할 때마다 스트렙토마이신 (50 μg/ml)을 플라스미드 안정성을 위하여 첨가해 주었다. 모든 균주를 배지 부피가 50 mL 인 250 mL Erlenmeyer 플라스크에서 배양하고 배양기 쉐이커에서 30 ℃ / 100 rpm으로 배양하였다. 모든 실험에서 출발 OD600은 0.05이었다.

[0103] 생물 반응기 실험은 Effendroff 생물 반응기 (서울, 한국, 1.0L 수정 M9 매체, 2.5L 용기)에서 수행되었다. 접종물은 플라스크 실험에 대하여 기재된 것과 동일한 방법으로 준비되었다. 공기 주입 속도는 0.5vvm으로 설정하고 용존 산소 (DO)를 10 %로 유지하도록 교반 속도를 조절하였다. 포도당 수준은 간헐적인 첨가에 의해 50 내지 150 mM로 유지되었다. 필요할 때마다 1 μM의 코엔자임 B12를 첨가하였다.

[0104] <1-4> mRNA의 정량

[0105] 실시간 PCR (Real Time PCR; RT-PCR) 분석을 위한 샘플은 발효 실험 도중 지수 성장 단계에서 수집되었다. RNAlater 시약 (Ambion, UK)을 첨가하여 시료의 RNA를 안정화시키고 프로토콜에서 언급한대로 처리하였다. Nucleospin® RNA 분리 키트 (MachereyNagel, Germany)를 사용하여 처리된 펠릿에서 총 RNA를 분리하였다. RNA를 UV- 분광 광도계로 정량하고 아가로스 겔에서 완전성을 확인하였다. 그런 다음 iScript cDNA Synthesis Kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 48-well StepOne 실시간 PCR 시스템 (Thermo Fisher Scientific)에서 합성 cDNA, 유전자 특이적 프라이머 및 Power SyBr® Green (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. rpoD는 대조군으로 사용되었다. 실험은 두 번 반복 수행되었으며, 상대 mRNA 정량은 ΔCT 방법 (Yim et al., 2011: Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J., Dien, S. Van, 2011. Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. Nat Chem Biol 7, 445-452)에 따라 수행되었다.

[0107] <1-5> 효소활성의 측정

[0108] DhaB 활성은 Sankaranarayanan, M., Seol, E., Kim, Y., Chauhan, A.S., Park, S., 2017. Measurement of crude-cell-extract glycerol dehydratase activity in recombinant Escherichia coli using coupled-enzyme reactions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.에 의해 기술 된 커플 효소 반응을 사용하여 세포 추출물로부터 측정하였다. DhaT 활성은 Lama, S., Ro, S.M., Seol, E., Sekar, B.S., Ainala, S.K., Thangappan, J., Song, H., Seung, D., Park, S., 2015. Characterization of 1,3-propanediol oxidoreductase (DhaT) from Klebsiella pneumoniae J2B. Biotechnol. Bioprocess Eng. 20, 971-979.에 기재된 방법에 따라 340 nm에서 NADH 감소 속도를 측정하여 결정 하였다. 글리세롤 알데히드 -3- 인산 탈수소 효소 (G3APDH) 활성은 제조사의 지침 (ScienCell Research Laboratories, CA, USA)에 따라 색도계 GAPDH 분석 키트를 사용하여 측정 하였다.

[0109] <1-6> 분석 방법들

[0110] 세포 농도는 더블 빔 분광 광도계 (Lambda 20, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 10mm 경로 길이 큐벳에서 600nm에서 흡광도 (OD 600)로 측정하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민 (BSA)을 표준으로 사용하여 Bradford 방법을 사용하여 마이크로 타이터 플레이트 판독기 (Synergy H1, Bioteck)상에서 측정하였다. 글리세롤, 포도당, 1,3-PDO 및 기타 대사 산물의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1260 infinity II, USA)를 사용하여 측정하였다. 간단히 말해서, 배양 시료를 10000 x g에서 10 분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액을 Tuffryn 막 (Acrodisc, Pall Life Sciences)을 사용하여 여과하고 300-mmx7.8-mm Aminex HPX-87H 칼럼 (Bio- Rad, USA)을 사용하여 65 ℃에서2.5 mmol / L H2SO4를 이동상으로 분리 하였다.

[0112] <실시예 2> 결과 및 검토

[0113] <2-1> ptsG 결실에 의한 CCR의 제거

[0114] 본 발명자들의 종래 연구(Lama et al., 2017)에 따르면, 1,3-PDO 모듈을 발현하는 Dha 오페론의 전사는 포도당 존재 하에서 심각하게 하향 조절되었다. cAMP-CRP 매개 CCR에 기인한 Dha 오페론의 낮은 발현은 글리세롤의

1,3-PDO 로의 전환을 제한한 것으로 예상되었다. EIIBC 단백질을 암호화하는 ptsG 유전자를 결실시킴으로써 Dha 오페론의 전사가 크게 향상되었다 (도 2). dhaB, gdrAB 및 dhaT는 4-5 배, dhaT의 positive regulator인 dhaR의 발현양은 40배까지 증가하였다. 세포 추출물에서의 DhaB와 DhaT의 효소 활성도 2 내지 3 배까지 증가하였다 (도 3). Dha 오페론을 제외하고, 당 수송과 중앙 탄소 대사를 위한 유전자도 영향을 받았다 (표 4). 특히, 비특이성 포도당 전달체인 galP, mglB, manX 및 malE의 발현은 4 내지 10 배 증가하였다. 세포질에서 글루코스의 글루코오스 -6- 인산으로의 전환을 촉매하는 글루코키나아제 (glK)의 발현 또한 약 10 배 증가되었다. 이러한 비특이적인 글루코오스 트랜스포터 및 글루코키나아제의 개선된 발현은 ptsG 결실에 의해 유발된 글루코오스 수송 속도의 감소를 상당부분 보상하는 것으로 추정되었다.

[0116] 모균주인 J2B3에 비해 ptsG가 제거 된 J2B5는 감소된 세포 성장률, 최종 세포 농도 및 포도당 소비율을 보였다 (도 4 및 도 5). 도 4 및 도 5는 ptsG 유전자의 결실의 효과를 보여주는데, 도 4는 ptsG의 결실 전을 나타내며, 도 5는 결실 후를 보여준다. 그러므로 도 4 및 도 5의 차이를 비교하면 ptsG 결실의 효과를 알 수 있다. 그러나 1,3-PDO 역가는 (J2B3의5 mM로 부터) 30 mM 까지로 증가하고 반면 글리세롤 축적량은 (J2B3의 43 mM로부터) 25 mM까지 현격하게 감소했다. 탄소를 기준으로 1,3-PDO의 수율은 50 % (0.27 -> 0.54 mol / mol glucose) 개선되었고, 글리세롤의 수율은 43 % (0.8 -> 0.4 mol / mol glucose) 감소되었다. 글리세롤과 1,3-PDO의 합산 수율도 J2B3의 0.87 (mol / mol 포도당)에서 0.95로 증가하여 활성화된 1,3-PDO 모듈이 dihydroxyacetone-3-phosphate (DHAP) 노드에서 글리세롤과 1,3-PDO 생성을 위해 더 많은 탄소를 EMP 경로로부터 끌어들인다는 것을 알 수 있었다 (도 1 참조). ptsG의 결실은 또한 초산 (40 mM 내지 25 mM까지, 도 4 및 도 5), 젖산 (11 mM 내지 3 mM) 및 에탄올 (14 mM 내지 8 mM; 데이터는 표시되지 않음) 등과 같은 부산물 형성을 감소시켰다. 이것은 초과대사(overflow metabolism)를 감소시키는 낮은 포도당 동화 속도 때문이다. 이러한 결과로부터 ptsG 결실에 따른 이점은 다음과 같이 요약된다. (i) DhaB 및 DhaT 활성의 증대, (ii) 부산물 형성 감소.

[0118] <2-2> 글리세롤 facilitator의 결실에 의한 글리세롤 분비의 감소

[0119] 글리세롤의 높은 축적에 대한 또 다른 이유는, 생성된 글리세롤은 배양 배지로 제거되고 그것의 세포로의 재 유입은 느리기 때문이다. 글리세롤 배출량을 줄일 수 있다면 1,3-PDO 로의 전환율을 높일 수 있다. 대장균에서 glpF (glp 오페론에 위치)에 의해 암호화 된 양방향 (bidirectional) facilitator 단백질은 글리세롤의 호기성 동화 작용을 담당하는 것으로 알려져 있다. K. pneumoniae에서 2 개의 트랜스포터가 존재하는 것으로 추정되었다. 하나는 호기성 glp 오페론 (glpF1로 표시) 에 존재하고 다른 하나 (glpF2로 명명)는 혐기성 dha regulon 에 존재한다 (도 6) (Heller, K.B., Lin, E.C., Wilson, T.H., 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of Escherichia coli. J Bacteriol 144, 274-278; Kumar, V., Park, S., 2018. Potential and limitations of Klebsiella pneumoniae as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. Biotechnol. Adv. 36, 150-167.). 더 나아가 글리세롤은 facilitators 의 도움없이 세포막을 통해 확산에 의해 운반되기도 한다고 알려져 있다 (Heller et al., 1980).

[0120] J2B5 균주로부터 △glpF1를 결실한 돌연변이 균주, △glpF2 를 결실한 돌연변이 균주 그리고 △glpF1 및 △glpF2를 동시에 결실한 돌연변이 균주 등 3 개의 결실 돌연변이 균주가 개발되었으며, 이들은 각각 J2B6-1, J2B6-2 및 J2B6-3으로 명명되었다. 3 개의 결실 돌연변이를 대상으로 2 번의 실험이 수행되었다.

[0122] 첫 번째 실험은 GlpF1과 GlpF2의 운반 단백질의 역할을 확인하기 위해 글리세롤 모듈이 없는 균주들인 J2B6-1, J2B6-2 및 J2B6-3 균주만을 사용하여 수행되었다. 숙주 균주는 포도당을 원료로 1,3-PDO를 생산할 수 없으나 글리세롤을 원료로는 1,3-PDO를 생산할 수 있었다. 운반 단백질이 배양 배지에서 글리세롤의 흡수를 촉진한다면, 전달 단백질의 결실 후에 1,3-PDO 생산 속도가 감소할 것이다. 글리세롤로부터의 1,3-PDO 생산은 운반 단백질, 특히 glpF1이 결실되었을 때 감소되었다 (도 7). 이것은 glpF1과 glpF2가 모두 글리세롤 섭취에 관여함을 시사한다. 그러나 모든 J2B6-x 숙주 균주에서 1,3-PDO 생산은 여전히 높고 (J2B5의 70 % 초과,), 따라서 돌연변이 균주에서의 글리세롤 섭취량 감소는 30 % 미만으로 미미하였다. 아마도 글리세롤이 운반 단백질 (들)의 도움 없이 상당량 들어갈 수 있었거나 또는 확인되지 않은 다른 facilitators가 글리세롤 수송에 기여했을 수 있다.

[0124] 두 번째 실험은 글리세롤 모듈을 J2B6-1, J2B6-2 및 J2B6-3에 각각 도입하여 진행되었다(도 8). 이 경우 균주들

은 포도당에서 1,3-PDO를 생산할 수 있게 된다. 세포 성장 및 포도당 소비율은 다음의 내림차순으로 운반 단백질이 삭제 될 때 감소되었다; J2B5> J2B6-2> J2B6-1> J2B6-3. 한편, 1,3-PDO 생산은 반대 순서로 증가했다. J2B6-3> J2B6-1> J2B6-2> J2B5. 즉, 1,3-PDO 생산량이 낮으면 글리세롤 축적량이 높다는 사실을 알 수 있다. J2B5에 비해 1,3-PDO는 ~ 14 % 향상된 반면 글리세롤 축적은 ~ 36 % 감소하였다. 그럼에도 불구하고 1,3-PDO와 글리세롤의 합계 수율은 세 가지 돌연변이 모두에서 거의 같았으며 J2B5와 유사했다.

[0126] 종합적으로, 이러한 결과는 GlpF1과 GlpF2가 글리세롤 배출을 증가시킨다는 것을 나타내며 글리세롤이 세포 내에서 합성될 때 이들 transporter의 결실은 1,3-PDO 생산에 유리하다는 것을 의미한다. 운반 단백질 결실 돌연변이에서의 세포 성장의 감소는 세포 내 높은 글리세롤 농도에 의해 유발되는 삼투압을 비롯한 여러 스트레스에 기인한다.

[0128] <2-3> 원하지 않는 부산물의 제거

[0129] J2B6-3은 초산 (20 mM), 젖산 (6 mM), 에탄올 (4 mM), 숙신산 (3 mM), 개미산 (5 mM) 및 2,3-BDO와 같은 많은 원치 않는 부산물을 축적했다 6 mM). 이들 부산물의 총 수율은 0.81 mol / mol glucose로 1,3-PDO의 0.58 mol / mol glucose보다 훨씬 높았다. ldhA, adhE, frdA, pflBA, edd-eda, mgsA, pta-ackA 및 poxB 유전자를 연속적으로 결실시킴으로써 J2B7-x 시리즈 (J2B7-1 내지 J2B7-8)의 균주가 개발되었다. ldhA, adhE, frdA, pflBA 및 pta-ackA의 결실은 젖산, 에탄올, 숙신산, 포름산 및 아세트산과 같은 상응하는 부산물의 형성을 크게 감소시키거나 거의 완전히 제거하였다 (도 9). 또한 ldhA, adhE, mgsA 및 pta-ackA의 결실에 의해 1,3-PDO 생산이 점차적으로 향상되었다. pta-ackA 결실 결과에 대해서는 특별한 논의가 필요하다. 결실 (J2B7-6) 전에, 23mM 아세테이트가 생산되었고 (0.41 몰 / 몰의 글루코스), 결실 후에 5mM (J2B7-7)이었다. 아세트산은 일반적으로 포스포 아세틸 트랜스퍼라제 / 아세테이트 키나아제 (Pta-AckA) 및 피루베이트 산화 효소 (PoxB)에 의해 촉매되는 2 개의 상이한 경로를 통해 생산된다. Pta-AckA는 지수성장 단계에서 활성화 되는 반면, PoxB는성장 후기 및 / 또는 정지 단계에서 활성화 된다 (De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., Vandamme, E., 2007. Minimizing acetate formation in E. coli fermentations. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 689-700). pta-ackA 결실 돌연변이 체에서, poxB의 추가 결실은 아세테이트 생산을 더 이상 감소시키지 않아서, poxB의 역할이 미미하다는 것을 나타낸다. 또한, J2B7-8 (poxB 및 pta-ackA 모두 결핍)에서 0.07mol / mol 글루코스의 아세테이트의 생산은 다른 효소 및 / 또는 경로가 존재한다는 것을 시사한다. 흥미롭게도, pta-ackA 결실 J2B7-7 균주는 모균주 J2B7-6 균주와 비교하여 유의하게 향상된 세포 성장 속도 및 최종 세포 농도를 보였다 (도 10). 일반적으로, E. coli 및 K. pneumoniae와 같은 미생물에서의 pta-ackA의 결실은 세포 성장(의 속도 및 정도를) 크게 감소시키고, 이는 종종 이러한 미생물의 대사 공학에서 아세테이트 형성의 감소에 의해 달성되는 장점을 상쇄시킨다. 본 발명에서는 pta-ackA의 결실이 J2B7-7의 세포 성장을 방해하는 대신 향상시키는 것이 확인되었다.

[0131] 도 9에 나타낸 일련의 결실 후, 1,3-PDO는 44 mM (J2B6-3의 31 mM)로 증가하였으며, 부산물 (글리세롤 제외)의 총 수율은 0.28 mM로 감소하였다 (0.81 mol / mol J2B6-3의 포도당) (도 11). 또한 글리세롤 생성량이 23 mM에서 ~ 8 mM로 크게 감소하여 더 많은 글리세롤이 1,3-PDO로 전환됨을 나타낸다. 글리세롤의 1,3-PDO 로의 향상된 전환은 개선된 NADH 가용성에 기인한다. 젖산 및 에탄올과 같은 많은 부산물은 글리세롤을 1,3-PDO로 전환시키는 데 사용될 수있는 NADH를 소모한다. 마지막으로, 2,3- 부탄디올 (2,3-BDO) 생산은 일련의 결실 동안 ~ 6 mM에서 ~ 12 mM로 향상되었음을 유의해야 한다. 그러나 2,3-BDO 경로의 삭제는 현 단계에서는 시도되지 않았다. Kumar, V., Durgapal, M., Sankaranarayanan, M., Somasundar, A., Rathnasingh, C., Song, H.H., Seung, D., Park, S., 2016. Effects of mutation of 2,3-butanediol formation pathway on glycerol metabolism and 1,3-propanediol production by Klebsiella pneumoniae J2B. Bioresour. Technol. 214, 432-440에 따르면, 젖산염, 에탄올 및 아세테이트와 같은 부산물에 대한 몇 가지 경로가 결실된 균주에서 2,3-BDO 경로의 추가적인 제거에 대한 결과로 대량의 피루브산 축적되고, 이로 인해 세포 성장 및 1,3-PDO 생산에 심대한 저해를 초래한다.

[0133] <2-4> TCA 사이클 및 전자전달사슬 (ETC) 의 개선

[0134] J2B7-8 균주는 여전히 상당량의 글리세롤 (~ 0.15 mol / mol glucose)과 초산 (~ 0.07 mol / mol)을 생산했다.

글리세롤의 1,3-PDO로 불완전한 전환은 NADH이 충분히 공급되지 않았기 때문일 가능성이 크다. NADH 가용성 향상은 두 가지 접근 방식으로 시도되었다. 첫째, 공급의 증가와, 둘째, 낭비되는 소비의 감소를 통한 것이다 (도 1 참조). 첫 번째 방법에서, 산화적 TCA 사이클들은 시트르산 합성효소 (gltA) 및 α-케토글루타레이트 탈수소화효소 (α-KGDH)를 NADH저해에 덜 민감한 돌연변이 효소인 GltA_R163L 및 LpdA_E354G와 대체하여 활성화시켰다 (Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J., Dien, S. Van, Harry Yim et al., 2011. Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. Nat Chem Biol 7, 445-452). 또한, 가역성 말산 탈수소 효소를 암호화하고 산소 제한 조건 하에서 TCA 사이클의 환원 작용에 기여하는 mdh 유전자 (Park, S., Cotter, P.A., Gunsalus, R.P., 1995. Regulation of malate dehydrogenase (mdh) gene expression in Escherichia coli in response to oxygen, carbon , and heme availability. J Bacteriol 177, 6652-6656)는 결실되었다. α-KGDH는 세 효소로 구성되는데, 그 중에 lpdA 에 의해 암호화되는 dihydrolipoyl 탈수소화 효소는 NADH에 의해 주로 억제된다 (Kim, Y., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2008. Dihydrolipoamide dehydrogenase mutation alters the NADH sensitivity of pyruvate dehydrogenase complex of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 190, 3851-3858.; Stokell et al., 2003). 흥미롭게도, LpdA는 대장균에서 피루베이트 탈수소 효소 복합체 (PDHc)와 공유된다. 이는 NADH에 민감하지 않은 LpdA를 사용하면 PDHc가 높은 NADH 농도에서도 더 잘 기능할 수 있음을 시사한다. PDHc가 더 잘 기능할 때 피루베이트로부터 아세테이트 또는 2,3-BDO 생산이 감소될 수 있다. frdABCD 의해 암호화되는 가역적 숙신산 탈수소 효소는 환원 TCA 사이클에 기여하고 있지만, 부산물로서 숙신산을 제거하는 연구를 수행할 때 이미 frdA를 결실시킴으로 제거하였다 (J2B7-3; 도 9). mdh가없는 J2B8-1 균주는 모균주 J2B7-8 와 유사하게 행동했다 (데이터 미도시). 그러나 1,3-PDO의 수율은 8 % (0.82에서 0.91 mol / mol의 포도당)로 향상되었다.

[0136] gltA 및 α-KGDH의 돌연변이를 위해, 세 균주, J2B8-2 (GltA_R164K), J2B8-3 (LpdA_E354G), J2B8-4 (GltA_R164K, LpdA_E354G)가 개발되었다. 세 균주 모두 1,3-PDO 역가와 수율이 다음과 같이 약간 향상되었다: J2B8-2에서 49 mM 및 0.93 mol / mol 포도당, J2B8-3에서 50 mM 및 0.93 mol / mol 포도당, J2B8-4에서 52 mM 및 0.95 mol / mol 포도당. 이와 동시에 글리세롤 생산량과 수율은 다음과 같이 감소했다: J2B8-2에서 6 mM 및 0.11 mol / mol 포도당, J2B8-3에서 6 mM 및 0.10 mol / mol 포도당, J2B8-4에서 3 mM 및 0.10 mol / mol 포도당. 또한 아세테이트 축적은 J2B8-2에서는 3mM로, J2B8-3과 J2B8-4에서는 2mM로 감소했다 (도 12). 이러한 결과는 mdh를 제거하고 GltA 및 α-KGDH (및 PDHc)를 변이시킴으로써 산화적 TCA 사이클이 더 잘 작동함을 종합적으로 제시한다. 낮은 NADH 민감성을 갖는 GltA 및 LpdA이 사용될 경우 높은 NAD(P)H 공급을 필요로 하는 4-하이드록시 부티르산 및 1,4-부탄디올의 생성도 개선된다는 결과가 이전에 보고된 바 있다.

[0138] ETC의 변화는 NADH의 낭비적인 사용을 줄이기 위해 시도되었다. E. coli와 K. pneumoniae를 포함한 많은 Enterobacter 종에서 ETC 의 첫 번째 반응인NADH의 산화는 nuo와 ndh에 의해 각각 암호화 되는 NDH-1과 NDH-II, 두 개의 막 결합 NADH 탈수소 효소에 의해 촉진된다 (Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., De Mattos, M.J.T., Neijssel, O.M., 1993. Energetic efficiency of Escherichia coli: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. J. Bacteriol. 175, 3020-3025). NDH-1 (J2B9-1로 명명됨) 또는 NDH-II (J2B9-2)가 없는 두 균주를 J2B8-4 균주에서 개발하고 그 성능을 조사하였다. 그 결과, NADH 탈수소 효소, 특히 NDH-1의 돌연변이는 세포 성장과 포도당 소비를 상당히 감소시켰다. 한편, 두 균주 모두 감소된 글리세롤 축적으로 1,3-PDO 생산의 개선을 보여주었다. 특히, NDH-II 결실 (J2B9-2) 후, 55 mM의 1,3-PDO가 1.1 mol / mol 글루코오스의 수율로 생성되었다. 글리세롤은 24 시간에서 J2B8-4에서 6 mM까지 생성되었지만, J2B9-1에서 4 mM로, J2B9-2에서 2 mM로 두 변이주 모두에서 낮아졌다(도 13). 또한 아세테이트 생산은 두 종의 ETC 돌연변이 모두에서 J2B8-4의 2 mM로부터 0.5 mM 이하로 감소되었다 (도 14). 흥미롭게도, ldhA 결실에 의해 사라진 젖산 (약 2 mM에서)이 ETC 돌연변이 체에서 다시 나타났다 (도 9 참조). 종합적으로, TCA 사이클 및 ETC의 변화는 글리세롤 및 아세테이트의 감소로 1,3-PDO 생산의 개선에 유익한 것으로 입증되었다.

[0140] <2-5> 부탄디올 생산 경로의 제거

[0141] 탄소와 에너지 대사의 광범위한 변형 후, 주요 부산물로써 2,3-BDO만이 4-6 mM 남았다. 2,3-BDO를 감소시키기 위해, J2B9-2로부터 2 개의 결실 돌연변이체인 J2B10-1 (전체 2,3-BDO 오페론이 제거됨) 및 J2B10-2 (budB 만이 제거됨)가 개발되었고, 이 균주들에 대하여 세포 성장 및 1,3-PDO 생산을 실험해보았다.

[0143] 두 돌연변이체에서 2,3-BDO 생산은 완전히 제거되었지만 세포 성장은 감소되었고 상당량의 피루브산 (2 ~ 3 mM)이 축적되어 J2B9와 같이 크게 조작된 K. pneumoniae 균주에서, 2,3-BDO 오페론의 결실은 피루베이트 (pyruvate) 노드에서 심각한 대사의 정체를 일으킨다는 사실을 다시 확인할 수 있었다 (Kumar et al., 2016). 그러나 budB가 없는 J2B10-2 균주는 모 균주인 J2B9-2에 비해 1,3- PDO 생산량이 58 mM로 향상되었고 글리세롤 축적이 감소한 것으로 나타났다. 1,3-PDO 수율은 1.24 mol / mol glucose로 본 연구에서 개발한 균주 중에서 가장 높았다. J2B3 균주와 비교했을 때 J2B10-2 균주는 거의 부산물을 생산하지 않는다는 것을 알 수 있었다(표 6). 표 6은 J2B3 및 J2B10-2 균주들 간 부산물 형성을 비교한 결과이다.

표 6

[0145]

Metabolites	J2B3 (mM)	J2B10-2 (mM)
1,3-PDO	5	58
Acetate	42	< 0.5
2,3-BDO	7	0
Ethanol	4	0
Lactate	6	2.5
Succinic acid	3	0
Formic acid	5	0
Pyruvate	0	2

[0147] J2B3 및 J2B10-2 균주들 간 부산물 형성 비교

[0149] <2-6> 생물반응기 실험

[0150] 변형된 J2B10-2 균주의 성능을 평가하기 위해 포도당 유가식 발효가 수행되었다. 1,3-PDO 생산은 24 시간에 시작하여 48 시간까지 지속되었다. 이 균주는 1,3-PDO 280 mM (21 g / L)을 생산하였다. 1.24 mol / mol 포도당의 수율과 1.15 mmol / g cell / h의 생산성을 보였다. 아세테이트 및 피루베이트와 같은 부산물은 각각 30 mM 및 38 mM 축적되었다. 80 mM의 글리세롤도 축적되었다 (도 15 A 및 도 15B). 성능, 특히 역가와 생산성은 만족스럽지 못했다.

[0152] K. pneumoniae는 코엔자임 B12의 합성을 위해 혐기성 경로를 이용하며 높은 호기성 조건에서는 B12를 잘 생산하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Keuth, S.,Bisping, B., 1994. Vitamin B12 production by Citrobacter freundii or Klebsiella pneumoniae during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1495-1449. 등).

[0154] B12 보조 효소의 영향을 조사하기 위하여 B12를 첨가하면서 생물 반응기 실험을 반복하였다. 그러나 듀폰이 개발한 E. coli 균주 (도 15 A 및 도 15B) 에서 채택한 양보다 약 10 배 적은 4 μM만을 첨가하였다. 1,3-PDO의 생산은 18 시간에 일찍 시작하여 82 시간까지 진행되었고 최종 1,3-PDO농도는 400 mM (30 g / L)로 증가했다. 수율은 1.26 mol / mol glucose이었다. 또한 글리세롤은 50mM로 감소하였고, 초산 및 피루브산은 각각 19mM 및 20mM로 감소되었다. 이 결과는 실험에 사용한 생물 반응기 조건에서 코엔자임 B12가 충분히 합성되지 않고 따라서 DhaB가 완전히 활성화 되지 않는다는 것을 나타낸다. 플라스크 실험에서, 최대 비 생산 속도는 0.85 mM 1,3-PDO / g cell / h이었다; 반면에, 생물 반응기 규모에서는 1.27 mM 1,3-PDO / g cell / h으로, 1.5 배 더 높았

다. 즉 생물반응기에서 나타나는 높은 비생산 속도를 충족시키는데 높은 GDHt 활성이 필요하였고 이를 위해 보다 충분한 B12 합성이 필요하였다고 짐작되었다. 글리세롤을 원료로 사용할 경우 K. pneumoniae는 완전 혐기성 조건에서 B12 합성 및 1,3-PDO를 최적으로 생산한다 (Ashok S., Mohan Raj S., Ko Y., Sankaranarayanan M., Zhou S., Kumar V., Park S., 2013, Effect of puuC overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant Klebsiella pneumoniae Δ glpKΔdhaT. Metab Eng. 15, 10-24). 그러나 포도당을 탄소원으로 사용하는 현재의 균주에서는 NADH가 산화적 TCA싸이클에서 재생되어야 하기 때문에 완전 혐기 조건을 사용할 수 없다. 조효소 B12는 비싸고 자연적으로 이 조효소를 합성하는 능력이 K. pneumoniae의 가장 중요한 장점으로 제시되었기 때문에 이 조효소의 요구량을 줄이거나 완전히 없애는 것이 필요하다. B12 합성 오페론의 유전자 발현 조절 (Kumar and Park, 2018) 및 배양 조건의 최적화를 포함한 추가 연구가 진행 중이다.

[0156] 코엔자임 B12를 보충 한 경우에도 1,3-PDO의 최대 비 생산 속도는 0.13 g / g cell / h로 낮았다. 전사 분석 및 효소 활성 측정에 따르면, 1,3-PDO 모듈의 발현은 글리세롤보다 포도당에서 세포를 성장시킬 때 더 낮았다 (Lama et al., 2017). 그러나 플라스크 실험에서는 1,3-PDO 모듈 효소 (GDHt 및 PDOR)의 낮은 활성은 심각한 문제가 아니었다. 1,3-PDO 모듈 효소의 활성을 향상시키기 위해, Tac 및 T5 프로모터에서 발현되는 dhaB, gdrAB 및 dhaT를 가지고 있는 플라스미드 pBG 및 pQT를 J2B10-2에 도입하였다 (표 2). 새로운 유전자 재조합 균주 J2B10-2는 유가식 생물 반응기 실험에서, 15 시간부터 일찍 1,3-PDO 생산을 시작하였고, 82 시간에 650 mM (49.45g / L)의 1,3-PDO를 생성하였다. 또한 포도당 대비 수율은 1.26 mol / mol 이었다. 가장 높은 비 생산속도는 0.78 mol / g cell / h (0.23 g / g cell / h)로 크게 증가했다 (도 15). 놀랍게도, (J2B10-2 균주에서 2,3-BDO 경로가 변형되었음에도 불구하고) 피루브산이 축적되지 않았으며, 글리세롤 (30mM) 및 아세테이트 (20mM)축적이 크게 감소되었다.

[0158] 1,3-PDO 생산량을 증가시키기 위해서는 생산 속도를 더욱 향상시키는 것이 필요하다고 판단되었다. 향상된 PDO 모듈의 속도를 충족시키려면 당으로부터 DHAP의 생산을 향상시키는 것이 필요하며 이를 위해, 포도당 수송 속도를 향상시키고자 하였다. 현재의 균주는 포도당에 의한 carbon catabolite repression을 방지하기 위해 ptsG 유전자가 결실되었고 이 때문에 당의 세포막 이송속도가 빠르지 않았다. 포도당 이송 단백질로 Zymomonas mobilis 유래의 포도당 수송 유전자 glf를 선택하였고 이 유전자를 gpd1 및 gpp2가 클로닝된 pD1P2G 플라스미드에 클로닝하였다 (표 2). Glf는 수소이온 또는 PEP의 소모 없이 독립적으로 포도당 수송속도를 효율적으로 촉진하는 것으로 알려져 있다. 새로운 재조합 J2B10-2 (dhaB, gdrAB 를 보유하는 pBG, dhaT를 보유하는 pQT 그리고 gpd1, gpp2 및 glf를 포함하는 pD1P2G 를 가지고 있는) 균주를 생물 반응기에서 배양하였다. 1,3-PDO의 생산은 포도당 대비 1.27 mol / mol의 수율, 최종 생산 농도 814 mM (62 g / L)로 증가되었다. 발효 기간은 66 시간으로 단축되었다 (그림 8). 가장 높은 생산속도 (21-51 시간)는 0.35 g / g cell / h로 현격히 향상되었다. 이는 포도당의 세포내 이송속도가 이전의 균주에서 1,3-PDO 생산을 제한했다는 것을 나타낸다. 4 가지 생물 반응기 운전의 전체 결과는 표 7에 요약되어있다.

[0160] 종합적으로 일련의 생물 반응기 실험을 통해 변형된 K. pneumoniae J2B의 성능을 조사하고 설계하고 더 우수한 균주를 만들 수 있었다. 이 생물반응기 실험들은 플라스크 규모의 실험에만 기초한 균주의 개발이 충분히 만족스럽지 않고, 생물 반응기 규모 실험에 의해 제안되고 고안되는 추가 개발이 필요하다는 것을 의미한다. 특히, 포도당 수송, 1,3-PDO 모듈의 활성 및 코엔자임 B12 첨가 등이 균주나 발효 공정 개선의 중요한 목표로 확인되었다. 생물 반응기 수준에서 수행되는 반복적인 설계 - 구축 - 실험 - 학습 (Design-Build-Test-Learn; DBTL) 사이클에 의해 포도당으로부터 1,3-PDO 생산을 위한 균주의 성능, 즉 생산량과 수율이 크게 향상되었고 효율적인 생체 촉매로서의 K. pneumoniae의 가능성이 더 잘 증명될 수 있었다 (표 7).

표 7

[0162]

Bioreactor		RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 4
Conditions*		A	B	C	D
Major product/ Glucose consumption	Cell mass (g)	5.46	5.22	5.85	7.8
	1,3-PDO (mM)	250	400	650	814
	Glycerol (mM)	80	50	30	17
	Glucose[a] (mM)	200	317	515	641
Byproduct	Acetate (mM)	30	19	20	15
	Pyruvate (mM)	38	20	-	-
Performance Index	Yield (mol/mol)	1.24	1.26	1.26	1.27
	Maximum productivity (mmol/g cell/h)	1.15	1.27	2.11	2.82

[0164] [a] Amount (mM) of glucose consumed at production phase

[0165] [b] mol 1,3-PDO/mol glucose

[0166] [*]Conditions:

[0167] A; control

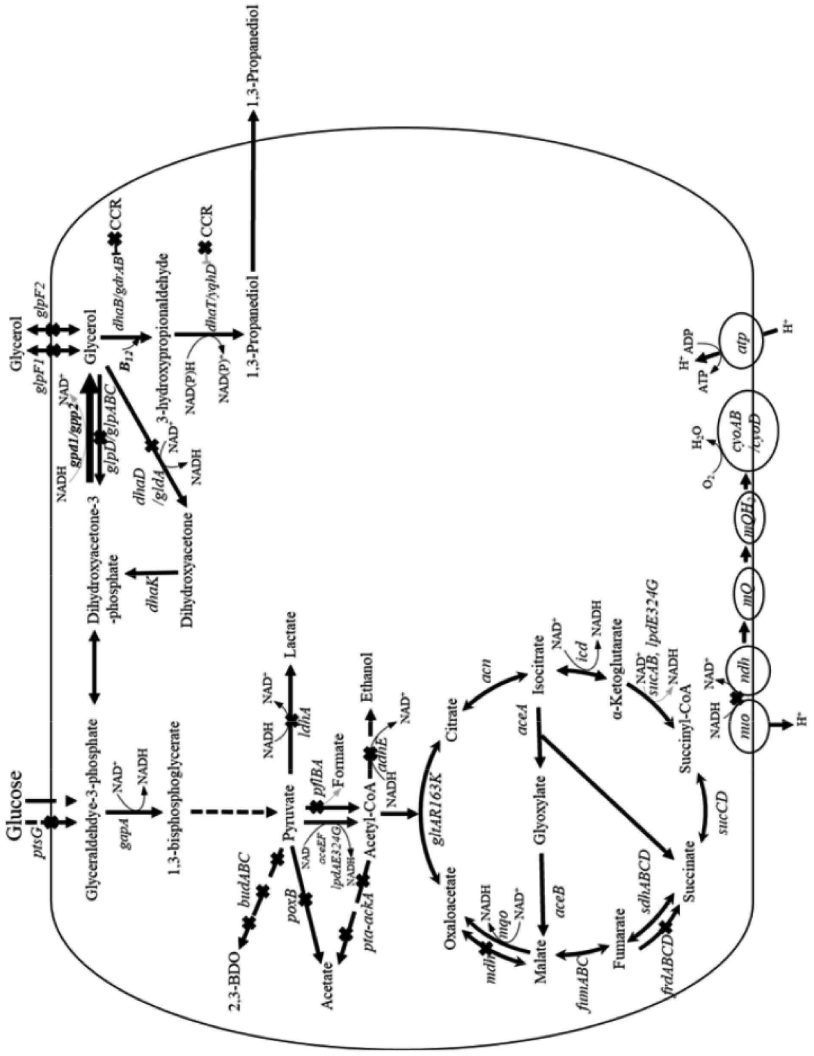
[0168] B; Supplementation of coenzyme B12

[0169] C; B plus overexpression of 1,3-PDO module (DhaB/DhaT)

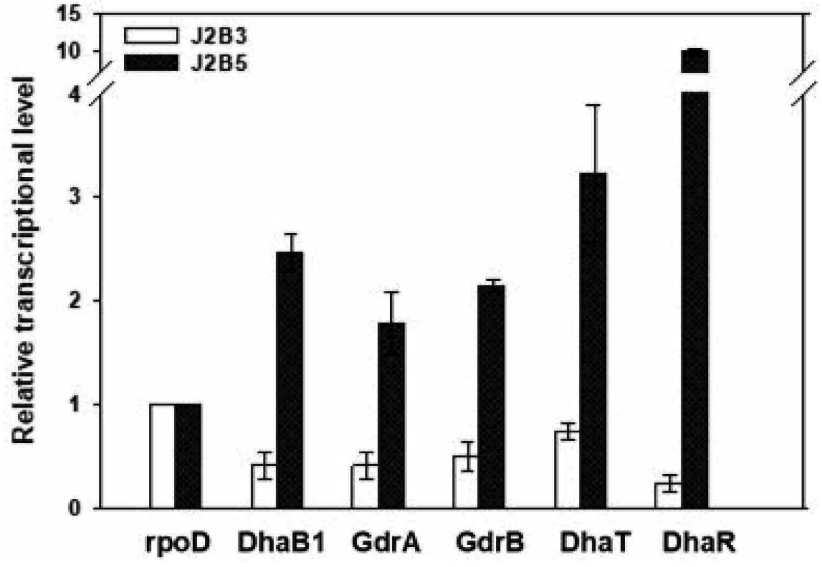
[0170] D; C plus overexpression of glucose transporter (GlF)

도면

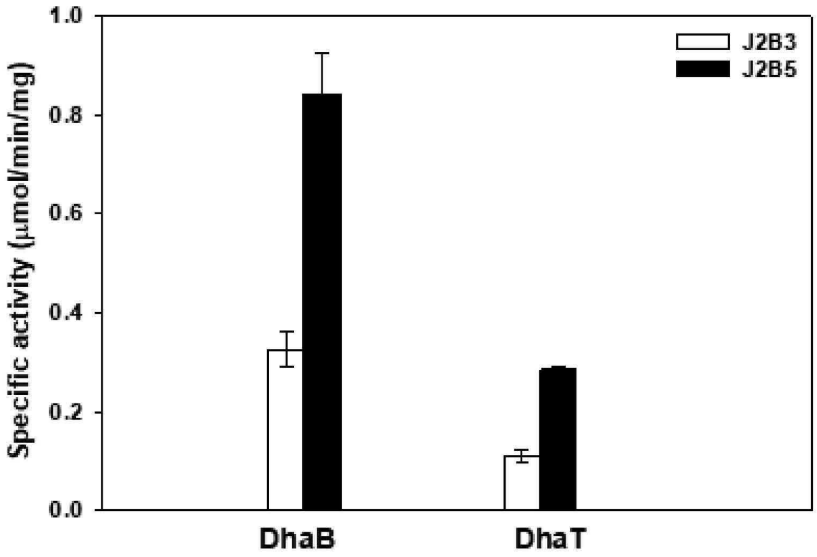
도면1


Glucose
ptsG
Glycerol
glpF1
glpF2
Glycerol
gpd1/gpp2
glpD/glpABC
dhaB/gdrAB
CCR
1,3-Propanediol
dhaT/yqhD
CCR
1,3-Propanediol
B12
3-hydroxypropionaldehyde
NAD(P)H
NAD(P)+
dhaD
/gldA
dhaK
Dihydroxyacetone
Dihydroxyacetone
-phosphate
Glyceraldehyde-3-phosphate
gapA
1,3-bisphosphoglycerate
budABC
2,3-BDO
poxB
Acetate
pta-ackA
aceEF
lpdE324G
Pyruvate
pflBA
Formate
Acetyl-CoA
Lactate
ldhA
adhE
Ethanol
glt4R163K
Citrate
acn
Isocitrate
aceA
Glyoxylate
aceB
Oxaloacetate
mdh
mqo
Malate
fumABC
Fumarate
sdhABCD
frdABCD
Succinate
sucCD
Succinyl-CoA
sucAB, lpdE324G
kcd
α-Ketoglutarate
ndh
nuo
mQ
mQH2
cyoAB
/cyoD
atp
ADP
ATP
H2O
O2
NADH
NAD+
H+

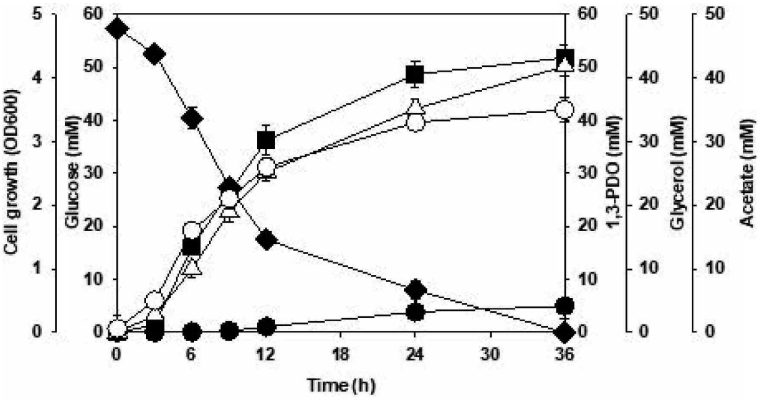
도면2


Relative transcriptional level
15
10
4
3
2
1
0
J2B3
J2B5
rpoD
DhaB1
GdrA
GdrB
DhaT
DhaR

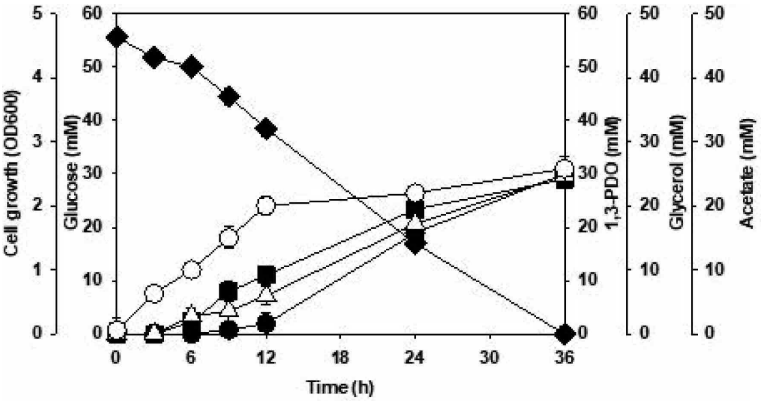
도면3


Specific activity (μmol/min/mg)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
J2B3
J2B5
DhaB
DhaT

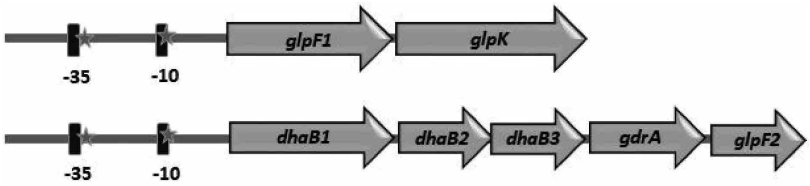
도면4


Cell growth (OD600)
Glucose (mM)
1,3-PDO (mM)
Glycerol (mM)
Acetate (mM)
Time (h)

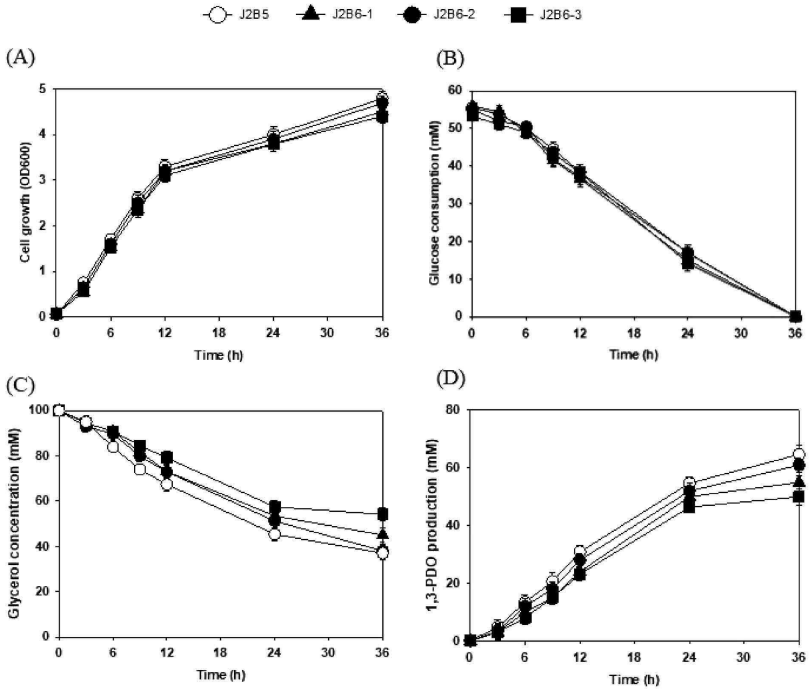
도면5


Cell growth (OD600)
Glucose (mM)
1,3-PDO (mM)
Glycerol (mM)
Acetate (mM)
Time (h)

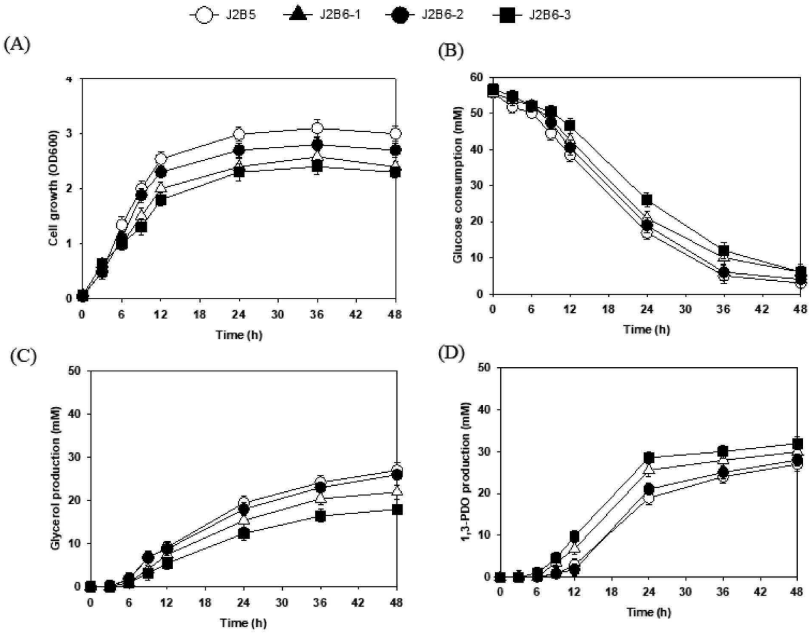
도면6


glpF1
glpK
-35
-10
dhaB1
dhaB2
dhaB3
gdrA
glpF2
-35
-10

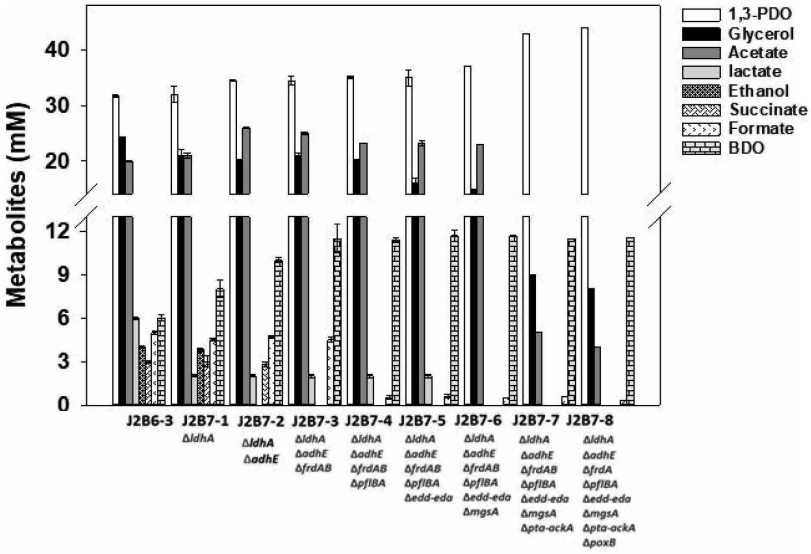
도면7


J2B5
J2B6-1
J2B6-2
J2B6-3
(A)
Cell growth (OD600)
Time (h)
(B)
Glucose consumption (mM)
Time (h)
(C)
Glycerol concentration (mM)
Time (h)
(D)
1,3-PDO production (mM)
Time (h)

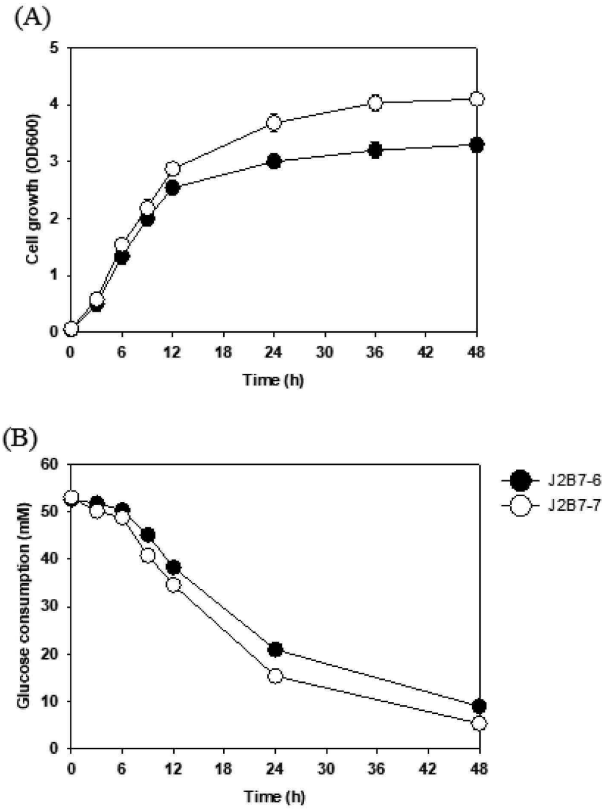
도면8


J2B5
J2B6-1
J2B6-2
J2B6-3
(A)
Cell growth (OD600)
Time (h)
(B)
Glucose consumption (mM)
Time (h)
(C)
Glycerol production (mM)
Time (h)
(D)
1,3-PDO production (mM)
Time (h)

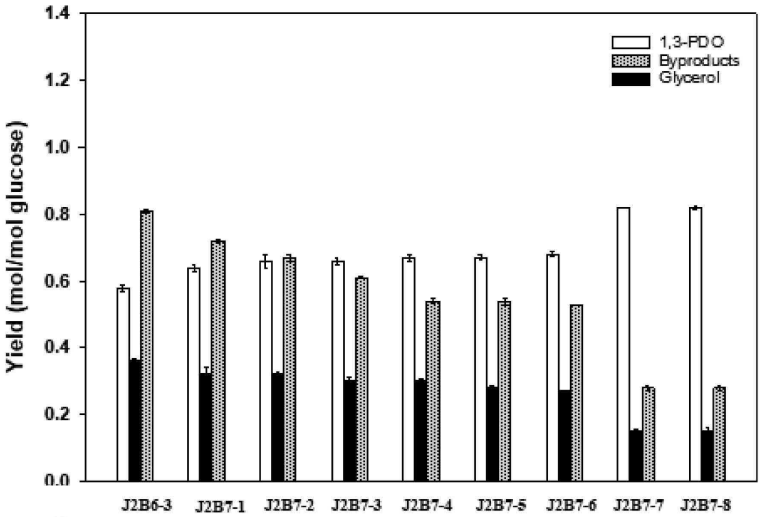
도면9


Metabolites (mM)
1,3-PDO
Glycerol
Acetate
lactate
Ethanol
Succinate
Formate
BDO
J2B6-3
J2B7-1
ΔldhA
J2B7-2
ΔldhA Δadhe
J2B7-3
ΔldhA Δadhe ΔfrdAB
J2B7-4
ΔldhA Δadhe ΔfrdAB ΔpflBA
J2B7-5
ΔldhA Δadhe ΔfrdAB ΔpflBA Δedd-eda
J2B7-6
ΔldhA Δadhe ΔfrdAB ΔpflBA Δedd-eda ΔmgsA
J2B7-7
ΔldhA Δadhe ΔfrdAB ΔpflBA Δedd-eda ΔmgsA Δpta-ackA
J2B7-8
ΔldhA Δadhe ΔfrdA ΔpflBA Δedd-eda ΔmgsA Δpta-ackA ΔpoxB

도면10

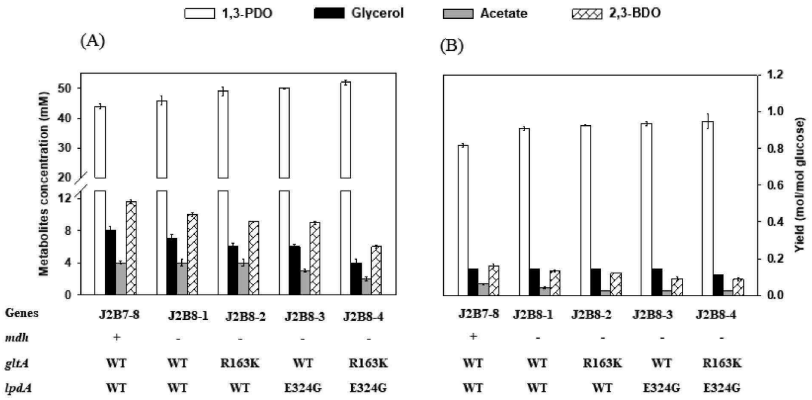

(A)
Cell growth (OD600)
Time (h)
(B)
Glucose consumption (mM)
Time (h)
J2B7-6
J2B7-7

도면11



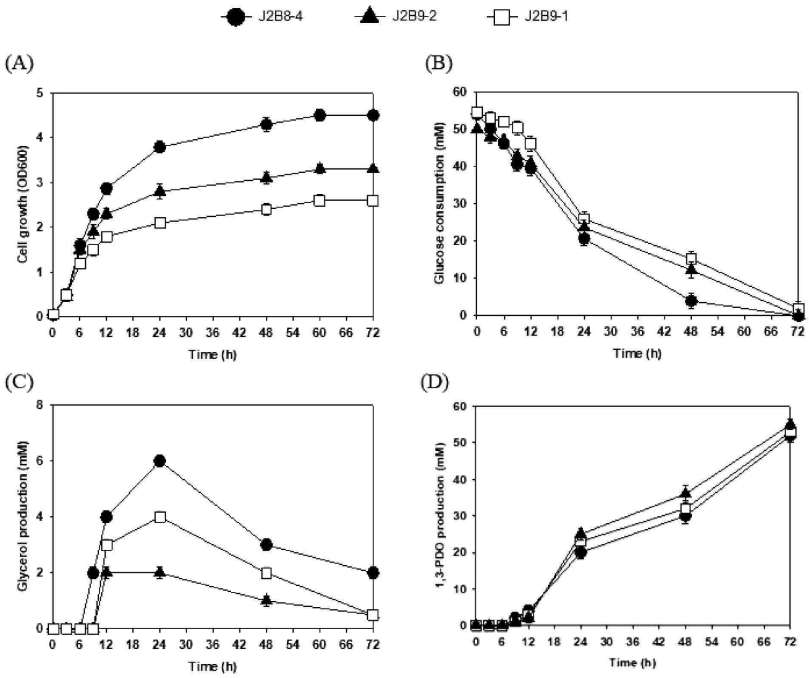
Genes	J2B6-3	J2B7-1	J2B7-2	J2B7-3	J2B7-4	J2B7-5	J2B7-6	J2B7-7	J2B7-8
ldhA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
adhE	+	+	-	-	-	-	-	-	-
frdA	+	+	+	-	-	-	-	-	-
pflB	+	+	+	+	-	-	-	-	-
edd-eda	+	+	+	+	+	-	-	-	-
mgsA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Pta-ackA	+	+	+	+	+	+	+	-	-
poxB	+	+	+	+	+	+	+	+	-

도면12

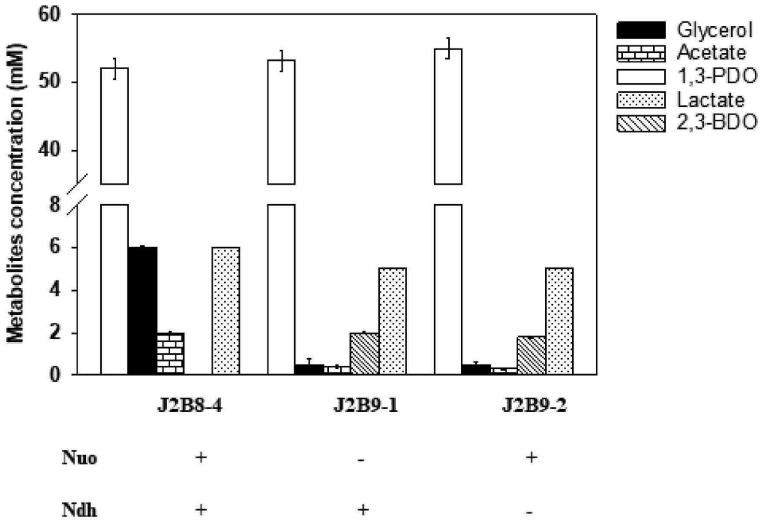


Genes	J2B7-8	J2B8-1	J2B8-2	J2B8-3	J2B8-4
mdh	+	-	-	-	-
gltA	WT	WT	R163K	WT	R163K
lpdA	WT	WT	WT	E324G	E324G

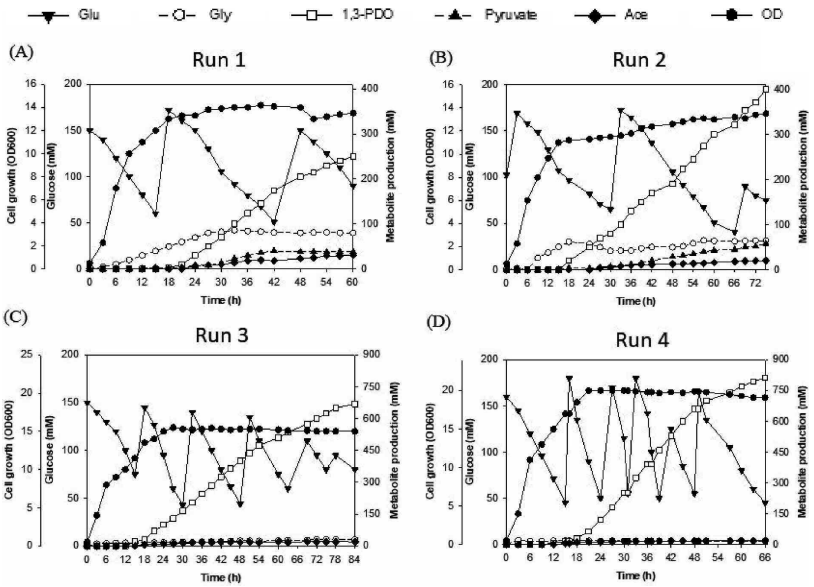
도면13


J2B8-4
J2B9-2
J2B9-1
(A)
Cell growth (OD600)
Time (h)
(B)
Glucose consumption (mM)
Time (h)
(C)
Glycerol production (mM)
Time (h)
(D)
1,3-PDO production (mM)
Time (h)

도면14


Metabolites concentration (mM)
Glycerol
Acetate
1,3-PDO
Lactate
2,3-BDO
J2B8-4
J2B9-1
J2B9-2
Nuo + - +
Ndh + + -

도면15



서 열 목 록

<110> UNIST

<120> RECOMBINANT KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAIN FOR PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM GLUCOSE AND METHOD FOR PRODUCING 1,3-PROPANEDIOL USING THE SAME

<130> DNP190099

<160> 76

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1512

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 1

atgaccgaca aaaaatatat cgttgcgctt gaccagggca ctaccagctc ccgggccgtt 60

gtgatggatc atgatgccaa tatcgtcagc gtctcccagc gagaatttga acagatttat 120

cctaagccag gctgggtcga acacgacccg atggaaatct gggcttccca aagctcgacg 180

ctggtcgaag cgctggccaa agcggatatc aactccgatc agatcgcggc catcggcatc 240

accaatcagc gtgagaccgt ggtggtgtgg gagcgagaga ccggtaaacc catctacaac 300

gctatcgtct ggcagtgccg ccgtaccgcg gagatctgcg agcagctcaa gcgtgacggg 360

atggaagagt atatccgcaa ggccacaggc ctggtggtgg acccgtactt ctctggcacc 420

aaggtgaaat ggatcctcga ccatgtcgaa ggttcccgtg agcgtgcgaa gcgcggcgag 480

ctgctgttcg gcaccgttga tacctggctt atctggaaga tgacccaggg ccgcgtgcac 540

gtcaccgact acaccaacgc ctcgcgtacc atgctgttca acatccacga gctggactgg 600

gacgacaaaa tgctcgacgc gctggacatt ccgcgcgcca tgctgccgga agtgcgcaag 660

tcttccgaag tgtacggcca gaccaacatc ggtggtaaag gcgggacccg tattcctatc 720

gccgggatcg ccggtgacca gcaggcggcc ctgttcggcc agctgtgcgt caaagaaggg 780

atggcgaaaa acacctacgg caccggctgc tttatgctga tgaataccgg cgaaaaagcg 840

gtcacctcca cccacggtct gctgaccacc atcgcctgcg gcccgcgcgg cgaggtgaac 900

tacgctctgg aaggggcagt gtttatggcc ggcgcgtcta ttcagtggct acgcgacgag 960

atgaagctca tcagcgatgc cttcgactcc gagtacttcg ccaccaaagt gaaggatacc 1020

aacggcgtgt atgtggtacc cgcgttcacc ggtcttggcg caccgtactg ggacccgtat 1080

gcccgcggcg cgattttcgg cctcacccgc ggcgtgaact ccaaccacat tatccgtgcg 1140

acgctggagt ccatcgcctt tcagacccgc gacgtgctgg aagcgatgca ggctgactct 1200

ggcattcgtc tgcacgccct gcgcgtagac ggcggcgcgg tggctaacaa cttcctgatg 1260

cagttccagt ccgatatcct cggcacccgt gtcgagcgtc cggaagtacg cgaagtgacg 1320

gcgctgggcg cggcctatct ggccggtctg gcggtcggtt tctggcagaa tctggatgaa 1380

ctgcaggaga aagcggtgat tgagcgcgaa ttccgcccgg gtattgaaac tactgagcgt 1440

aactatcgtt acagcggctg gaagaaagcg gtgaaacgcg cgttagcgtg ggaagagcac 1500

gacgaagcgt aa 1512

<210> 2

<211> 1525

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 2

gtgagagggt aagaacgtgg aaaccaaaga tctgattgtg ataggcggag gcatcaacgg 60

tgccggtatc gcggcagatg ccgccgggcg tggtttatcc gtactgatgc tggaagcgcg 120

cgatctcgcc tgcgccacct ccagcgccag ttccaaactg atccacggcg ggctacgcta 180

cctcgaacac tatgagttcc gtctggtcag cgaagcgctg gccgagcgtg aagtgctgtt 240

aaaaatggcc ccgcatatcg ccttcccgat gcgctttcgc ctaccgcatc gcccgcatct 300

gcgcccggca tggatgatcc gtatcggctt gtttatgtac gatcatctgg gcaaacgcac 360

cagcctcccg ggatccaccg ggttgcgttt tggcgcagaa tcggtactta aaccggaaat 420

tgtgcgcggt ttcgaatatt ccgactgctg ggtcgacgat gcccgcctgg tgctggccaa 480

cgcgcagatg gtcgtccgca aaggcggcga agtgcgtacc cgcacccgcg ctatctcggc 540

gaaacgtgag aatggcctgt gggtggtgga agcggaagat attgatagcg gtgagaagtt 600

tacctggaag gcgcgcggcc tggtcaatgc caccggccca tgggtcaaac agttcttcga 660

cgaagggatg catctgcgct cgccttacgg catccgtctg atcaagggca gccacatcgt 720

ggtgccgcgg gtgcataccc agaaaacaggc ttatattctg caaaacgaag ataaacgcat 780

agtgtttgtt attccgtgga tggatgagtt ctctatcatc ggcacgacgg acgtcgagta 840

taagggcgat ccgaaagcgg tggccattga tgataaagag atcaactatc tgctgaacgt 900

ctataacgcg cactttaaaa agaccctcag ccgggacgat atcgtctgga cctactccgg 960

cgtccgtccg ctgtgcgacg acgagtcgga ttcgccgcag gccattaccc gcgactatac 1020

cctggatatt cacgatgaga acggtcaggc gccgctgctg tccgtcttcg gcggcaagct 1080

gaccacctat cgcaaactgg ccgagcatgc actggaaaaa ctgacccccct attacaaagg 1140

gatcggcccg gcatggacca aaaccgcggt gctccccggc ggcgatatcg gcggcgaccg 1200

cgacgactac gcggcaaaac tgcgccgtcg cttcccgttc atcagtgaat cactggcccg 1260

ccattatgcc cgcacctacg ggagcaacag cgagtggatc ctgaaggaag ccagcgccct 1320

gagcgatctc ggggaagatt tcggccacga gttttatgaa gccgagctga aatatctggt 1380

tgagcacgag tgggtgcgca gcctggatga cgccatctgg cgtcgaacca aacagggtat 1440

gtggctgact gccgagcagc aggcgcgcat cagcgaatgg ctggcgcagc atgcgggaaa 1500

gtctgaactg tcgttagcgt cctga 1525

<210> 3

<211> 1623

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 3

atgacgggac gtcttgatag cgaggtcatt atcatcggcg gcggagcaac cggcgccggt 60

atcgcccgcg actgcgcccg gcgcggatta cgaacgctgc tcattgagcg ccatgatatc 120

gccaccgggg cgaccggccg gaatcatgga ctgctgcaca gcggcgcccg ctacgcggtg 180

accgacaacg aatccgcccg cgaatgcatc agtgagaacc gcatcctgcg ccgcatcgcc 240

cgccactgta ttgaaccgac caatgggctg tttatcaccc tgcctgaaga tgacctggca 300

tggcagcaaa cctttatcga cgcctgtcag caggctggca tagaggccac gccgctctcg 360

ccgcaggaag cgctgcgccg ggagcccgcc gtcaacccga cgctgctggg cgcggtgcag 420

gtcccggacg gtaccatcga cccgtttcgc ctcaccgcgg ccaatatgct cgacgcccgc 480

gaacacggcg cgcagatcct taccggctgc gaagtaacag gcctgctgcg ccggggcgat 540

cgcgtctgcg gcgtccaggt atacgaccgc caacttcacc aggcccgcac tctgtacgcc 600

gggatggtgg ttaacgccgc cgggatctgg gggcagcgta ttgcggaata tgccgacctg 660

cgcatcacca tgttcccggc gaagggatcg ctgctgatcc tcgatcatcg gattaacaac 720

ctggtgatca accgctgccg taagccggcc gacgccgata ttctggtgcc cggcgatacc 780

atctcgctga tcggcactac ctcaatgcat attccttatg acgaaattga cgacaaccgg 840

gtaacagcgg cggaggtcga taccctgctg cgcgaagggg aaaagctggc gccggtcatg 900

ggccgcaccc ggatcctccg cgcctactcc ggcgtccgcc cgctggtggc cagcgataac 960

gatcccagcg ggcgcagcgt cagccgcggc atcgtcctgc tcgaccatgc ccagcgtgac 1020

ggtatggaag gcttcattac catcaccggc ggcaagctga tgacctatcg cctgatggcc 1080

gagtgggcca ccgacgccgt ctgtcgtaag ctgggaaaca ccacccccctg taccacggcc 1140

gaagccccgc tgcccggttc acaggagcca acggaaagta ccctgcaaaa gataatctcc 1200

ctccccaccc cgctgcgcgg ctcggccgtc taccgtcacg gcgatcgcac cccgtcctgg 1260

cttggcgaca gccgccagca ccgtagcctg gtctgcgaat gtgaagccgt cactgccggt 1320

gaagtgaaat acgcggtgga aaacctggcg gtcaacaccc tgctcgacct gcgccgccgc 1380

acccggattg gcatggggac ctgtcagggg gaactctgcg cctgccgcgc tgccggcctg 1440

ctgcagcgct ttaacgtcac cacgcccgcg cagtcgttaa cccagctctc ggaatttctc 1500

aatgaacgct ggaagggcgt gcagcccatc gcctggggcg atgcgctgcg cgaaagcgaa 1560

ttcacccgct gggtctacct cggcctgtgc ggattgccac aggagcaccg ggatgaagtt 1620

tga 1623

<210> 4

<211> 1098

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 4

atgctaaaag ttattcaatc tccagccaaa tatcttcagg gtcctgatgc tgctgttctg 60

ttcggtcaat atgccaaaaa cctggcggag agcttcttcg tcatcgccga cgatttcgta 120

atgaagctgg cgggagagaa agtggtgaat ggcctgcaga gccacgatat tcgctgccat 180

gcggaacggt ttaacggtga atgcagccat gcggaaatca accgtctgat ggcgattttg 240

caaaaacagg gctgccgcgg cgtggtcggg atcggcggtg gtaaaactct cgataccgcg 300

aaggcgatcg gttactacca gaagctgccg gtggtggtga tcccgaccat cgcctcgacc 360

gatgcgccaa ccagcgcgct gtcggtgatc tacaccgaag cgggcgagtt tgaagagtat 420

ctgatctatc cgaaaaaccc ggatatggtg gtgatggaca cggcgattat cgccaaagcg 480

ccggtacgcc tgctggtctc cggcatgggc gatgcgctct ccacctggtt cgaggccaaa 540

gcttgctacg atgcgcgcgc caccagcatg gccggaggac agtccaccga ggcggcgctg 600

agcctcgccc gcctgtgcta tgatacgctg ctggcggagg gcgaaaaggc ccgtctggcg 660

gcgcaggccg gggtagtgac cgaagcgctg gagcgcatca tcgaggcgaa cacttatctc 720

agcggcattg gctttgaaag cagtggcctg gccgctgccc atgcaatcca caacggtttc 780

accattcttg aagagtgcca tcacctgtat cacggtgaga aagtggcctt cggtaccctg 840

gcgcagctgg tgctgcagaa cagcccgatg gacgagattg aaacggtgct gggcttctgc 900

cagcgcgtcg gcctgccggt gacgctcgcg cagatgggcg tcaaagaggg gatcgacgag 960

aaaatcgccg cggtggcgaa agctacctgc gcggaagggg aaaccatcca taatatgccg 1020

tttgcggtga ccccggagag cgtccatgcc gctatcctca ccgccgatct gttaggccag 1080

cagtggctgg cgcgttaa 1098

<210> 5

<211> 1434

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 5

atgtttaaga atgcatttgc taacctgcag aaggtcggta aatcgctgat gctgccggta 60

tccgtactgc ctatcgcagg tatcctgctg ggcgtcggtt ccgctaactt cagctggctg 120

ccagccgtgg tctcccacgt tatggcagaa gcaggcggtt cagttttcgc caatatgccg 180

ctgatcttcg ctatcggtgt ggccctcggc ttcaccaata acgacggtgt atccgcactg 240

gctgcagtcg tggcttacgg catcatggtg aaaaccatgg cggttgttgc gccgctggtg 300

ctgcatttac ctgctgacga gattgcggca aaacaccttg ctgataccgg cgtgcttggc 360

ggtattatct ccggtgctat cgccgcctac atgttcaacc gcttctatcg catcaagctg 420

ccagaatatc tcggcttctt tgcgggcaag cgttttgtgc cgattatctc tggtctggcc 480

gctatcttca ccggcgtgat cctctccttc atttggccgc cgatcggctc cgcgatccaa 540

accttctccc agtgggctgc ttatcagaac ccagtggtgg cgtttggtat ctacggtttc 600

atcgaacgtt gcctggtgcc gtttggtctg catcacatct ggaacgttcc tttccagatg 660

cagatcggcg aatacaccaa cgcggctggt caggtgttcc acggcgatat cccgcgctac 720

atggcaggcg acccgacggc gggcaaactg tctggcggct tcctgttcaa aatgtatggt 780

ctgccggcag cggctatcgc tatttggcac tctgctaaac cggaaaaccg cgccaaagtg 840

ggcggtatca tgatctccgc cgcgctgacc tcgttcctga ccggtatcac cgagccgatc 900

gagttctcgt tcatgttcgt ggctccgatc ctgtacgtta tccatgccat tctggcgggc 960

ctggcgttcc cgatctgtat cctgctgggt atgcgtgacg gtacctcgtt ctctcacggc 1020

ctgatcgact ttatcgtgct gtccggtaac agcagcaaac tgtggctgtt cccgattgtt 1080

ggtatctgct atgcgatcgt gtactacgtc attttccgtg tgctgattaa agccctggat 1140

ctgaaaacac cgggtcgtga agacaccacc gaagagagca aagctggcgc caccagcgag 1200

atggctccgg ctctggtcgc cgctttcggc ggtaaagaga acatcaccaa cctcgacgca 1260

tgtattactc gtctgcgtgt tagcgtggcg gatgtagcga aagttgacca ggctggcctg 1320

aaaaaactgg gcgccgctgg cgtggtagtg gcaggttctg gcgtacaggc catcttcggt 1380

accaagtccg ataacctgaa aactgaaatg gatgagtaca tccgtaacag ttaa 1434

<210> 6

<211> 852

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 6

atgagccaaa catcaacctt aaaaggccag tgcatcgcag agttcctcgg taccgggttg 60

ttgatctttt tcggcgttgg gtgcgtggct gcgctcaagg tcgcgggagc cagcttcgga 120

caatgggaaa tcagcatcat ctggggtctg ggcgtcgcca tggcgatcta cctgaccgcc 180

ggggtctccg gtgcgcacct taacccagcg gtgactatcg cgctgtggct gttcgcctgc 240

ttcgaaggcc gcaaagtggt tccttttatt atttcgcaat tcgctggcgc cttttgcgct 300

gcggcattag tttacgggct ttactacaat cttttcctcg attatgaaac cacccaccat 360

atgattcgcg gcagcgtgga aagcctcgat ctggccggca ttttctccac ttacccgaac 420

ccgcacatca attttgtgca ggccttcgcg gtagagatgg tgattaccgc tatcctgatg 480

ggcgtcatcc tggcgctgac cgacgatggc aacggcatac cgcgcggccc gctggcccct 540

ctgctgattg gcctgctgat tgcggtgatt ggcgcctcca tgggaccgct gaccggcttc 600

gccatgaacc cggcgcgtga catcggcccg aaagccttcg cctggctggc ggggtggggt 660

gacgtcgcct tcaccggcgg caaagatatt ccttatttcc tggtgccgct gtgcgcaccg 720

gtggtcggcg cggcgctggg cgcattcagc tatcgtaagc tgattggccg tcacctgcct 780

tgcgacacct gcgtggagga agagcaacag agcccctcct cttccaccgc tcaacataaa 840

gcttcgctgt aa 852

<210> 7

<211> 804

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 7

atgaaccaga cttctacctt aaccgggcag tgcgtggccg agtttcttgg caccggattg 60

ctcattttct tcggcgcggg ctgcgtcgct gcgctgcggg tcgccggggc cagctttggt 120

cagtgggaga tcagtattat ctggggcctt ggcgtcgcca tggccatcta cctgacggcc 180

ggtgtctccg gcgcgcacct taatccggcg gtgaccattg ccctgtggct gttcgcctgt 240

tttgaacgcc gcaaggtgct gccgtttatt gttgcccaga cggccggggc cttctgcgcc 300

gccgcgctgg tgtatgggct ctatcgccag ctgtttctcg atcttgaaca gagtcagcat 360

atcgtgcgcg gcactgccgc cagtcttaac ctggccgggg tcttttccac gtacccgcat 420

ccacatatca cttttataca agcgtttgcc gtggagacca ctatcacggc aatcctgatg 480

gcgatgatca tggccctgac cgacgacggc aacggaattc cgcgcgggcc gctggcgccg 540

ttgctgattg gcttgctgat cgccgtgatc ggcgcgtcga tggggccgct aaccggcttt 600

gcgctgaatc cggcgcgcga cttcggccca aaactgttta ccagtctggc cgggtggggc 660

tcgatcgcct ttaccggtgg gctggcgatc ccttactttc tggtgccgct gctggcgccg 720

gtggtggggg cgattatcgg ggcgtttttg tatcgcaagc ttatcggccg ccatctgccg 780

tgcgaatgcg gtatcgatga gtaa 804

<210> 8

<211> 990

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 8

atgaaaatcg cggtttatag tacgaagcag tacgataaaa agtacctgca gcacgttaat 60

gatgcatacg gctttgaact ggaattcttc gatttcctgc tgacagcgaa gactgccaaa 120

accgccaacg gttgcgaagc ggtatgtatc ttcgtcaatg acgacggcag ccgcccggtg 180

ctggaagagc tgaaggccca cggggtgaaa tatatcgccc tgcgctgcgc cgggtttaac 240

aacgtcgacc ttgaggcggc aaaggagctt ggcctgcgcg tcgtgcgcgt tccagcttac 300

tctccggaag cggtcgctga gcatgcgatc ggtatgatga tgtcgctcaa ccgccgcatc 360

caccgcgctt accagcgtac ccgcgatgcc aatttctccc tcgaaggcct caccggcttc 420

accatgtacg gcaaaaccgc cggggtgatc ggcaccggga aaattggcgt agcgatgttg 480

cggatcctca aaggcttcgg catgcgcctg ctggcgttcg acccgtaccc aagcgccgcc 540

gcgctggagc tgggggtgga atatgttgac ctcgccacgc tgtacaagga atcggacgtg 600

atctccctgc actgtccgct gaccgacgaa aactaccacc tgctcaatcg cgaagccttc 660

gatcagatga aagacggggt gatggtgatc aacaccagcc gcggcgccct gatcgactct 720

caggcggcca tcgacgccct gaagcaccag aaaattggcg cgctggggct ggacgtttat 780

gagaacgaac gcgatctgtt ctttgaagac aaatccaacg acgtgatcca ggacgatgtc 840

ttccgccgcc tctccgcctg ccataacgtg ctgtttaccg gccaccaggc gttcctcacc 900

gccgaggcgc tgatcagcat ttcggagacc actctgggta acctgcagca ggtcgccaac 960

ggcgaaacct gtccgaacgc catcgtctga 990

<210> 9

<211> 2676

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 9

atggctgtta ctaatatcgc tgaactgaac gcgcttgttg agcgtgtcaa gaaagcccag 60

cgtgaatatg ccagtttcac tcaagaacaa gtcgacaaaa tcttccgcgc cgccgctctg 120

gccgctgcag atgctcgaat ccctctcgcc aaaatggccg tagccgaatc cggcatgggc 180

atcgttgaag acaaagtgat caaaaaccac tttgcttccg aatacattta caacgcttat 240

aaagacgaaa aaacctgtgg cgttctgtca gaagacgaca cctttggcac catcactatt 300

gctgagccta tcggcatcat ctgcggtatc gtaccgacca ctaacccgac ttcaacagcc 360

attttcaaat cgctcatcag tctgaaaacg cgtaacgcca tcattttctc tccgcacccg 420

cgtgcaaaag aagccaccaa caaagcggct gatatcgtgc tgcaggctgc catcgcggcc 480

ggcgcgccga aggacctgat tggctggatc gatcagccgt ctgtagaact gtctaacgcg 540

ctgatgcatc acccggacat caacctgatc ctggcgaccg gtggtccagg catggtgaaa 600

gcagcataca gctccggtaa acctgctatc ggcgtcggcg ccggtaacac cccggtagtc 660

attgatgaaa ccgccgacat caaacgtgcc gtagcgtccg tactgatgtc taaaaccttc 720

gataacggcg tgatctgtgc ttctgagcag tccgttgtgg tggttgattc agtctatgac 780

gcggttcgcg aacgtttcgc cagccacggc ggctacctgc tgcagggtaa agagctgaaa 840

gccgttcagg acattatcct gaaaaatggc gcgctgaacg cggctatcgt tggtcagcca 900

gcggccaaaa tcgctgaact ggcaggcttc accgtgccgg ccaccaccaa aattctgatt 960

ggtgaagtga ccaacgttga cgagagcgag ccgtttgctc acgaaaaact gtctccgacg 1020

ctggctatgt atcgtgcaaa agatttcgaa gacgcggtag ccaaagcaga aaaactggtc 1080

gccatgggcg gtatcggtca cacctcttgc ctgtacaccg accaggacaa ccagccggct 1140

cgcgtggctt acttcggcca aatgatgaaa accgcgcgta tcctgatcaa cacccggct 1200

tctcagggtg gtatcggtga cctgtacaac ttcaaactcg cgccttccct gactctgggt 1260

tgtggttcct ggggtggtaa ttccatctct gaaaacgttg gtccgaaaca cctgatcaac 1320

aagaaaaccg ttgctaagcg agctgaaaac atgttgtggc acaaacttcc gaaatctatc 1380

tacttccgtc gtggctccct gccaatcgca ctggatgaag tgattaccga tggtcacaaa 1440

cgcgcgctga tcgtgactga ccgcttcctg ttcaacaacg gctatgccga tcagatcact 1500

tccgtactga aagcagcggg tgttgaaacg gaagtcttct tcgaagttga agctgacccg 1560

acgctgacca tcgtacgtaa aggtgccgac ctggcaaact cctttaaacc agacgtgatc 1620

atcgccctgg gcggcggttc cccgatggat gcggcgaaaa tcatgtgggt tatgtacgaa 1680

catccggaaa cccacttcga agaactggcg ctgcgcttta tggatatccg taaacgtatc 1740

tacaagttcc cgaaaatggg cgtcaaagcc aagatggtgg cgatcactac cacttccggt 1800

accggttctg aagttacgcc gttcgccgtg gtgaccgatg acgcgaccgg tcagaaatac 1860

ccgctggcag actacgcgct gaccccggat atggccattg tcgatgccaa cctggtgatg 1920

gatatgccga aatcgctgtg tgcgttcggt ggtctggatg cggtgactca cgccctggaa 1980

gcttacgttt ccgtactggc ttctgagttc tctgacggcc aggcgctgca ggcgctgaaa 2040

ctgctgaaag agtacctgcc ggcttcctat cacgaaggtt ccaagaaccc ggttgcccgt 2100

gagcgcgtac acagtgccgc gactatcgcc ggtatcgcgt tcgctaacgc cttcctcggc 2160

gtgtgtcact cgatggcgca caaactgggc tcccagttcc atattccgca cggtctggcc 2220

aacgccctgc tgatctgcaa cgttatccgc tataacgcga atgacaaccc gaccaagcag 2280

accgcgttca gccagtacga ccgtccgcag gctcgtcgtc gttacgctga aatcgccgat 2340

cacctgggcc tctccgcacc aggcgaccgc accgcagcga aaatcgagaa actgctggca 2400

tggctggaaa gcattaaagc tgagctgggt attccgaaat ctatccgcga agctggcgtt 2460

caggaagctg acttcctggc ccaggttgat aaactgtctg aagatgcatt cgatgaccag 2520

tgcaccggcg ctaacccgcg ctacccgctg atctccgaac tgaaacagat cctgctggat 2580

acctactacg gccgcgaatt cgtcgaaggc gaagccggtg cgaaagccga agttgccccg 2640

gtaaaggctg agaaaaaagc gaaaaaatcc gcttaa 2676

<210> 10

<211> 1791

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 10

gtgcaaactt ttcaagccga tctcgccgta attggcgccg gcggggcagg ccttcgtgcc 60

gctatcgccg ccgctcaggc caaccccaac gctaaaatcg ccctgatttc taaagtctat 120

ccgatgcgca gccatacggt cgctgcagaa ggggggtccg cagccgttgc ccaggatcac 180

gatagctttg agtaccattt tcacgacacc gtcgcgggag gcgactggct gtgcgagcag 240

gatgtcgtcg actattttgt tcatcactgc ccgacggaaa tgacccaact ggagcagtgg 300

ggatgcccat ggagccgccg ccccgacggc agcgtcaacg tccggcgctt cggtggcatg 360

aaaatcgaac gcacctggtt tgccgccgac aaaaccggct tccacatgct gcataccctc 420

ttccagacct cccttcagtt tccccaaatt cagcgctttg acgaacattt cgtccttgac 480

ctgctggtcg atgacgggca ggcccgcggc ctggtggcga tgaatatgat ggaaggcacc 540

ctggtgcaga tccgcgctaa cgccgtggtg ctggctaccg gcggcgccgg gcgcgtctac 600

cgctacaaca ccaacggtgg catcgtcacc ggtgacggga tggggatggc cctgggccat 660

ggcgtgccgc tgcgcgacat ggaattcgtt cagtatcacc cgaccggcct gccgggctcc 720

gggatcctga tgaccgaagg ctgccgcggc gaaggcggga ttctggtcaa caaaaacggc 780

taccgctatc tgcaggatta cggcatgggc ccggaaaccc cgctcggcga accgaagaat 840

aaatatatgg agctgggccc acgcgacaaa gtgtcccagg ccttctggca cgagtggcgg 900

aaagggaaca ccatcccgac gccgcgcggc gacgtggtct acctcgatct ccgccacctc 960

ggcgagaaaa aactgctgga gcgtctgccg tttatctgtg aactggcgaa agcctacgtc 1020

ggcgtcgatc cggtgaaaga gccgatcccg gtgcgcccga ccgcgcacta caccatgggc 1080

ggtattgaaa ccgatcagca gtgcgaaacc cgaatcaaag ggctgtttgc cgtgggcgaa 1140

tgctcgtccg ttggcttaca tggcgccaac cgtctgggct ccaactcgct ggccgagctg 1200

gtggtcttcg gccgcctggc cggggagcag gccatgcagc gcgccgctca ggcgggcgag 1260

gcaaacggcg ccgccctcga tgcgcaggct gccgatgtga agcagcgcct gaaagatctc 1320

gtcaaccagg aaggtaacga aaactgggcg aaaattcgcg atgaaatggg gctgtcgatg 1380

gaggaaggct gcggcatcta ccgcacgccg gagctgatgc agaaaacgat cgacaagctg 1440

gctgaactgc aggaacgctt taagcgcgtg cgcattactg ataactccag cgtgttcaat 1500

accgatctgc tttacaccat tgagctgggg cacggtttaa acgttgccga atgtatggcg 1560

cactcggcca tcgcccgtaa agaatcgcgc ggggcgcacc agcgtttgga tgaaggctgt 1620

accgaacgcg acgacgtcaa cttcctcaag cacactctcg ccttccgcga ggccgatggc 1680

actacccgtc tggaatatgg cgatgtgaag atcaccacgc tgccgccggc aaaacgtgtc 1740

tatggcgcag aagcggacgc ggctgagaag aaggagacca cccatggctg a 1791

<210> 11

<211> 2283

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 11

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttgcgaa aggtgactgg 60

cagaatgaag tcaacgtccg tgactttatt cagaaaaact acaccccata tgaaggcgac 120

gaatccttcc tggctggcgc gactgaagcg accaccaagc tgtgggacac cgtaatggaa 180

ggtgtaaaac aggaaaaccg cactcacgcg cctgttgatt ttgacactgc cctggcttcc 240

accatcacct ctcacgacgc gggctatatc gagaaaggtc tggaaaaaat cgttggtctg 300

cagaccgaag cgccgctgaa acgtgcgatc atcccgttcg gtggtatcaa aatggttgaa 360

ggttcctgca aagcgtataa tcgcgagctg gacccgatgc tgaaaaaaat cttcacagag 420

taccgtaaaa ctcacaacca gggcgttttc gacgtctata ccccggacat tctgcgctgc 480

cgtaaatccg gcgtgctgac gggtctgccg gatgcttacg gtcgtggtcg tatcatcggt 540

gactaccgtc gcgttgcgct gtacggtatc gacttcctga tgaaagacaa attcgcccag 600

ttcaactctc tgcaagcgaa actggaaagc ggcgaagacc tggaagcgac catccgtctg 660

cgtgaagaaa tcgctgaaca acaccgcgca ctgggccaga tcaaagagat ggccgctaaa 720

tatggctatg acatctccgg tccggcgacc accgctcagg aagcgattca gtggacctac 780

ttcggttacc tggctgccgt gaaatctcag aacggcgcgg caatgtcctt cggtcgtacc 840

tccagcttcc tggatatcta catcgagcgt gacctgcagg cgggtaaaat caccgagcaa 900

gacgcgcagg aaatggttga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg cttcctgcgt 960

accccggaat atgatgaact gttctccggc gacccgattt gggcaacgga atccatcggc 1020

ggtatgggcg ttgacggccg tactctggtg accaaaaaca gcttccgctt cctgaacacc 1080

ctgtacacca tggggccgtc tccggagccg aacattacta tcctgtggtc tgaaaaactg 1140

ccgctgagct tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg atacctcttc tctgcagtat 1200

gagaacgatg acctgatgcg tccggacttc aacaacgacg actacgctat cgcatgctgc 1260

gtaagcccga tggttgttgg taagcaaatg cagttcttcg gcgctcgcgc taacctcgcg 1320

aaaaccatgc tgtacgctat caacggcggc gtggatgaaa aactgaaaat gcaggttggt 1380

ccgaaatctg aaccgatcaa aggcgacgtc ctgaacttcg acgaagtaat ggatcgcatg 1440

gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacgtcaccg cgctgaacat catccactac 1500

atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttatc 1560

cgcaccatgg cgtgtggtat cgctggtctg tccgttgctg ctgactccct gtctgctatc 1620

aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc 1680

gaaggcgaat acccgcagtt tggtaacaac gaccctcgcg tcgatgacat ggccgttgac 1740

ctggttgaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgcaa cgctatcccg 1800

actcagtctg ttctgaccat cacctctaac gtggtgtacg gtaagaaaac cggtaatacc 1860

ccagacggtc gtcgcgctgg cgcgccgttc ggtccaggtg ctaacccgat gcacggccgt 1920

gaccagaaag gcgcagtagc ctctctgacc tccgtcgcta aactgccgtt tgcttacgcg 1980

aaagatggta tctcttatac cttctctatc gtgccgaacg cgctgggtaa agacgacgaa 2040

gttcgtaaga ccaacctggc gggtctgatg gatggttact tccatcacga agcgtccatc 2100

gaaggtggtc agcacctgaa cgtgaacgtc atgaaccgcg aaatgctgct cgacgcgatg 2160

gaaaacccgg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc cgtacgtttt 2220

aactccctga ccaaagaaca gcagcaggat gttattaccc gtaccttcac tcagaccatg 2280

taa 2283

<210> 12

<211> 642

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 12

atgaaaaact ggaaaacaac agcagaagca atcctcacct ccggtccggt tgtcccggtt 60

atcgtagtga aaaagctgga acacgcggta ccgatggcga aagcgctggt ggcgggcggc 120

gttcgcgtgc tggaagttac cctgcgcacc gagtgcgccc tggaggcgat ccgcgcgatt 180

gccaaagaag ttccggacgc gattgtcggc gcgggcacgg ttaccaacgt tgagcagttg 240

aaagcggtaa cggaagccgg cgcgcagttc gctatcagcc cgggtcttac cgaatccctg 300

ctgaaagcgg cgaccgaaga cggcaccatc ccgctgatcc cggggatcag cacggtatct 360

gagctgatgc tgggtatgca gtatggcctg aaagagttta aattcttccc ggcggaagcc 420

aacggcggcg tgaaagctct gcaggcgatt gcgggtccgt tcggccacat tcgtttctgc 480

ccgaccggcg gtatatctcc ggccaactac cgtgactacc tggcgctgaa cagcgtactg 540

tgcatcggcg gttcctggct ggtgccagcc gacgccctcg aagccggcga ctacgatcgc 600

atcaccaccc tcgcgcgaga agcggtggaa ggcgcgaaat aa 642

<210> 13

<211> 1800

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 13

atgttacggg taacaaatcg cattatcgaa cggtcgcgtg acacccgcgc ggcttacctc 60

gcaaggatta accaggccaa aaccgacacc gtgcatcgtg cgcaactggc ctgcggcaat 120

ctggctcacg gattcgcggc ctgccaggct gacgacaaag cctccctgaa gagcatgttg 180

cgcaacaaca ttgccatcat cacctcctac aacgacatgt tgtccgctca ccagccctat 240

gaacactacc cggagatcat ccgcaaagcg ctgcacagcg ccaatgcggt cggccaggtc 300

gccggcggcg tgccggcgat gtgcgacggc gtaacgcagg ggcaggacgg gatggagctt 360

tcactcctga gccgcgaggt gatcgctatg tccgccgcca tcggcctgtc gcataacatg 420

ttcgacgggg ccctgtatct cggggtctgc gataaaattg ttcccggtct gaccatggcg 480

gcgctctcat ttggccatct gccgtcggtc tttattccct ccggtccgat ggccagcggc 540

ctgccgaata aagagaaggt tcgcattcgc cagctgtatg cagaagggaa agttgaccgt 600

atggcgctcc tggagtccga agccgcctct tatcacgcgc cggggacctg tactttctac 660

ggaacggcga acaccaacca gatggtggtc gaatttatgg gcatgcagct gccgggctcg 720

tcctttgtcc atccggatgc tccgctgcgg gaagcactga ccgccgccgc cgcgcgccag 780

gtcacccgca tgaccggcaa cggcaatgag tggatgccgc tgggcaaaat gtttgacgaa 840

aaagtggtag tcaacggcat cgtggcgctg ctggcgaccg gtggctccac caaccacact 900

atgcacctgg tggcgatggc ccgcgcggcg ggaattatca ttaactggga cgatttctcc 960

gacctgtcag acgtggtgcc gctgctggcg cgcctctatc ccaacggccc ggcggatatc 1020

aaccacttcc aggcggcagg cggcgttccg gtactggtgc gcgagctgct gaaaggcggc 1080

ctgctgcatg aggatgttca caccgtggcc ggctttggcc tgtcgcgcta caccctggag 1140

ccatggctga ataacggcga gctggactgg cgcgaagggg cgacagcgcc attggacgac 1200

caggtcatcg cgacctttga aaaaccattc tcccgccacg gcggcaccaa ggtgctgagc 1260

ggcaacctgg gacgcgcggt gatgaaaact tcggcggtcc cggtggagaa ccaggtgatt 1320

gaagcgccgg cggtggtatt tgagagccag cacgacgtgt tgccggcctt tgaagcgggg 1380

ctgctggaca aagactgcgt ggtggtggtc cgtcatcagg ggccaaaagc gaacgggatg 1440

ccagaattac ataaacttat gccgccactt ggtgtattat tggaccgccg tttcaaaata 1500

gcgctggtga ccgatggccg actctctggc gcctccggta aagttccgtc agccattcac 1560

gtcacgcctg aagcgtatga tggcggcttg ctggcgaaag tgcgcgatgg cgatcttatt 1620

cgcgtgaacg gacagacggg ggaactgacg ctgctggtgg atgaggccga actggcggcg 1680

cgtcagccgc atatccctga cctcagcgcg tcgcgcgtgg gaaccggtcg ggagatgttt 1740

ggggcgctgc gtgagaagct ctctggcgcg gagcagggcg caacctgcat cacttttaa 1800

1800

<210> 14

<211> 474

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 14

atgtggaatg aaaatatgga actgacaaca cgtaccctgc ctgcgcaaaa acatatcgcg 60

ctggtggctc acgatcactg caaagatatg ctgatgaaat gggttgctcg ccatcaggcg 120

ctgctggcgc aacatatttt gtatgctacc ggcactaccg gtaatctcgt ctcccgggct 180

accggcctgg aggttaatgc catgctgagc ggtccgatgg gcggcgacca gcaggtgggt 240

gccctcattt cagaaggcaa aatcgacgtg ctgatcttct tctgggatcc gctgaacgcc 300

gttccccacg acccggatgt caaagcgttg ctgcgcctgg ccaccgtctg gaacattccg 360

gtcgccacta acgtctccac cgctgacttt atcatccagt caccgcactt taaacagccg 420

ctcgatattc tgatcccgga ttatccacgc tatcttgccg agcgcctgaa ataa 474

<210> 15

<211> 2133

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 15

atgttaattc ctaccggtac cagcgtaggt ctgaccagcg tcagcctcgg tgtgatccgc 60

gctatggaac gcaaaggcgt tcgtctgagc gtctttaaac ctatcgccca gccgcgttcc 120

ggtggcgatg ccccagacca gaccaccacc atcgttcgcg ccagctcctc caccaccacc 180

gccgctgaac cgctgaagat gagccatgtt gagtctctgc tctccagcaa tcagaaagat 240

gtgctgatgg aagagatcat tgccaactac cacgcgaata ctcaggacgc ggaagtggtg 300

ctggtggaag gcctggtacc gacccgtaag catcagttcg cccaggcgct gaactttgaa 360

atcgccaaaa cgctgaacgc tgaaatcgtc ttcgtgatgt ctcagggcac cgacacgcca 420

gaacagctga acgagcgtat cgaactgacc cgtaacagct ttggcggcgc caaaaatacc 480

agcatcaccg gcgttatcgt caacaaactg aatgcccctg tcgacgatca gggccgtacc 540

cgtcctgacc tgtcggaaat tttcgacgac tcgtcgaaag caaaaatcgt gaagattgac 600

ccggctcagc tgcagaaagg cagcacgctg ccggtgctgg gcgcagtgcc atggagcttc 660

gatctgatcg cgacccgcgc gatcgacatg gcgcaccatc tgaatgcgac catcattaac 720

gaaggcgata tcaatacccg ccgcgtgaaa tccgtgactt tctgcgcgcg cagcatcccg 780

cacatgctgg aacacttccg ccctggttct ctgctggtta cctccgcaga ccgtcctgac 840

gtgctggttg cggcctgcct ggcggcaatg aacggcgtgg aaatcggcgc cattctgctg 900

accggcggct atgaaatgga cgcgcgcatc agcaagctgt gtgaacgcgc tttcgcgacc 960

ggcctgccgg tatttatggt caacaccaac acctggcaga cctccctgag cctgcagagc 1020

tttaacctcg aagtaccggt tgacgatcac gagcgtatcg agaaagttca ggaatacgtg 1080

gccaactaca tcaacgccga ctggatcgaa tcgctgaccg cgacctccga gcgcagccgc 1140

cgtctctctc cgccagcctt ccgctaccag ctgaccgagc tggcgcgcaa agccggcaaa 1200

cgtgtcgttc tgccggaagg cgacgaaccg cgtaccgtga aagcggcggc gatttgcgcc 1260

gaacgcggga tcgccacctg tgtcctgctg ggtaacccgg atgagatcaa ccgcgtagcc 1320

gcggcccagg gcgtggagct tggcgccggc attgaaatcg tcgatccgga agtggttcgc 1380

gaaagctatg tgggtcgcct ggtcgaactg cgtaagaaca aaggcatgac cgaagcggtc 1440

gcgcgtgagc agctggaaga caacgtggtt ctcggcaccc tgatgctgga acaggacgaa 1500

gtcgacggtc tggtatccgg cgcggttcac accactgcca acaccattcg tccgccgctg 1560

cagctgatca aaaccgcgcc gggcagctcg ctggtctcct ccgtgttctt catgctgctg 1620

ccggaacagg tttacgttta cggcgactgc gcgatcaacc cggacccgac cgccgagcag 1680

ctggcggaaa tcgctattca gtccgctgaa tccgcgattg ccttcggcat cgaaccgcgc 1740

gtggcgatgc tctcctactc caccggtacc tccggcgcgg gtagcgatgt cgagaaagtc 1800

cgcgaagcga cccgtctggc gcaggaaaaa cgtcctgacc tgatgatcga cggcccgctg 1860

cagtatgacg ccgcggtgat ggctgacgta gcgaagtcca aagcgccgaa ctcaccggta 1920

gctggccgcg cgaccgtgtt catcttcccg gatctgaaca ccggtaacac cacgtacaaa 1980

gcggtacagc gctctgccga cctgatctcc atcgggccga tgctgcaggg tatgcgcaag 2040

ccggtcaacg acctgtcccg tggcgcgctg gtagacgata tcgtctatac catcgcactg 2100

accgcgatcc aatcggctca gcagcagaag taa 2133

<210> 16

<211> 1203

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 16

atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagct cctctctgaa atttgctatc 60

cttgacgccg tgaacggcga cgaatatctg tccggtttag cggaatgctt ccacctgccg 120

gaagcccgta tcaaatggaa aatggacggc agcaaacaag aagccgagtt aggcgcgggc 180

gccgcgcaca gtgaagcgct gaactttatc gttaacacta ttctggcaca aaaaccagaa 240

ctgtctgctc agctgaccgc aatcggccac cgtatcgtac acggcggtga aaaatacacc 300

agctccgtgg tgatcgacga gtccgtaatt cagggtatta aagacgccgc gtctttcgca 360

ccgctgcaca acccggcaca cctgatcggc atcgctgaag cgctaaaatc cttcccgcac 420

ctgaaagaca aaaacgtggc tgtattcgat acggcgttcc atcagaccat gccggaagaa 480

tcctatctct acgccctgcc gtacagcctg tacaaagagc acggcgttcg tcgttacggc 540

gcgcacggca ccagccactt ctacgtgact caggaagccg ctaagatcct caacaagccg 600

gtggaagagc tgaacatcat cacctgccac ctcggcaacg gtggttctgt ttccgctatc 660

cgtaacggta aatgcgttga cacctccatg ggtctgaccc cgctggaagg cctggtgatg 720

ggtacccgct ccggtgacat cgatccggcc atcatcttcc atctgcacga caccctgggc 780

atgagcgttg acgcgatcaa caaaatgctg accaaagagt ccggcctgct gggtctgacc 840

gaagtcacca gcgactgccg ctacgtggaa gacaactatc aggaaaaagc cgacgctaaa 900

cgcgcaatgg acgtttactg ccaccgcctg gcgaaataca tcggttccta caccgcgctg 960

atggacggcc gtcttgacgc cgttattttc accggtggta tcggtgaaaa cgccgcgatg 1020

gtgcgtgagc tgtcgctggg caaactgggc gtactgggct ttgaagttga ccatgagcgt 1080

aaccttgctg cccgcttcgg caagtctggc ttcatcaaca aagaaggcac acgtcctgcc 1140

gtggttatcc cgaccaacga agagctggtc atcgcgcaag acgccagccg tctgaccgca 1200

taa 1203

<210> 17

<211> 1728

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 17

atggagatca tgaagcagac cgtggcggca tacattgcca aaacgctgga acaggccggc 60

gtgaaacgta tctggggcgt caccggagat tccctcaatg gattgagcga tagccttaac 120

cgcatgggca ccatcgactg gatgcccacc cggcacgaag aggtcgccgc tttcgccgct 180

ggcgcggaag cgcagctgac cggcgagctg gcggtctgcg ccggctcctg cggaccgggc 240

aacctgcatc tgattaacgg tttgtttgac tgtcatcgca accatgtccc ggtgctggcc 300

atcgccgccc acatcccatc cagcgaaatc ggcagcggct attttcagga aacccatcct 360

caggagctgt tccgcgagtg cagccattac tgcgaactgg tctccacgcc ggagcagatc 420

ccgcaggtgc tggcagtggc gatgcgtaag gcagtgatta accgcggcgt ctcggtggtg 480

gtgctacccg gcgatgtggc gctgaaggcc gccccggaaa gcgccagcag ccactggtat 540

catgcgccgc tgccgacggt caccccggcg gaagaagagc tgcgcaagct ggcgcagctt 600

attcgctact ccagcaatat cgcgctcatg tgcggcagcg gttgcgccgg cgcccaccag 660

gaactggtgg agttcgcagc caaaattaaa gcccccatcg tccacgccct gcgcggcaaa 720

gagcacgtgg agtacaacaa cccgtacgat gtgggcatga ccgggctgat tggcttctcc 780

tctggcttcc acaccatgat gaacgccgat accctgatcc tgctgggcac ccagttcccc 840

tatcgcgcct tctacccaac cgacgcgaaa attatccaga tcgacatcaa ccccggcagc 900

atcggcgcac acagtaaggt cgacatggcg ctggtgggcg atattaaatc gacgctgaag 960

gcgctgctgc cgctgctgga agagaaaacc gatcgccact tcctcgataa ggcgctggag 1020

cactatcgcg acgcgcgaaa agggctcgac gatctggcta aacccagcga taaagccatt 1080

cacccgcaat atctggcgca gcagatcagt cattttgccg atgaagatgc cattttcacc 1140

tgtgatgtcg gcaccccgac cgtctgggcg gcacgctatc tcaaaatgaa tggtaaacgc 1200

cgcctgctgg gctcgttcaa ccacggctca atggccaacg ccatgccgca ggccatcggc 1260

gccaaggcca ctgcgccgga gcggcaggta gtggccatgt gcggcgacgg cgggttcagc 1320

atgctgatgg gcgatttttct gtcgctggcg cagatgaagc tgccggtgaa gattgtcatc 1380

tttaacaaca gcgtgctggg cttcgtggcg atggaaatga aggccggggg ctatctcacc 1440

gacggtacgg agctccacga taccaacttc gcccgcatcg ccgaggcctg cggtatcaaa 1500

ggtatacgcg ttgaaaaagc ctccgaggtg gatgaagcgc tgcagaccgc cttccgcacc 1560

gacggtccgg tgctggtcga cgtcgtcgtc gccaaagagg aactggcgat cccgccgcag 1620

atcaagctgg agcaggccaa aggctttagc ctgtatatgc tgcgggcgat catcagcggg 1680

cgcggcgatg aggtcatcga actggcgaaa accaactggc tcaggtaa 1728

<210> 18

<211> 939

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 18

atgaaagttg cagtccttgg cgctgccggt ggtatcggcc aggcgcttgc cctactactt 60

aagacccaac tgccttcagg ttcagagctc tcgttgtacg acatcgctcc ggttacgccg 120

ggcgtggcgg tagatctaag tcatatcccc acagatgtaa aaattaaagg attttccggt 180

gaagacgcta ctccggcgct ggaaggcgcg gatgtagtgc tgatctccgc gggcgtggcg 240

cgtaagcccg gcatggatcg ttccgacctg tttaatgtga atgcgggtat cgtgaagaac 300

ctcgtgcagc agattgccaa aacctgcccg caggcctgca tcggcattat caccaacccg 360

gtgaatacca ctgtggctat cgccgccgaa gtactgaaaa aagccggcgt gtacgataaa 420

aacaaactgt tcggcgttac cacgctggac atcatccgtt ccaatacctt tgtggcggag 480

ctgaaaggta aatcggcaac cgaggtggaa gtcccggtca ttggtggtca ctccggggtc 540

accattctgc ctttactgtc gcagatcccc ggcgtcagct ttagcgatca ggaaattgcc 600

gacctgacta aacgtattca gaacgccggt accgaagtcg tggaagcgaa agcgggcggc 660

gggtcggcga ccttgtcgat gggccaggcg gctgcccgtt ttggtctctc tctggttcgc 720

gccatgcagg gggaaaaagg cgtggtggag tgcgcctacg tggaaggcga cggccactat 780

gcgcgtttct tctcccagcc gctgctgctg gggaaaaacg gcgtggaaga gcgacagtct 840

atcggcaaac tcagcgcctt tgaacagcag gcgctggagg gcatgctgga caccctgaag 900

aaagatatcg cgctcggcga agacttcgtc aacaagtaa 939

<210> 19

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of engineered GltA gene

<400> 19

ttaacgctta atgtcggact ggaaatcgcg tttggcgtag ccggtataca gctgacgcgg 60

acgggcgatc ttcatgccat cgctgtgcat ttcgttccag tgcgcaatcc agcccacggt 120

acgcgccatg gcgaagataa cggtaaacat ggaggacgga atacccatcg ctttcaggat 180

gataccggag tagaagtcga cgttcggata cagtttcttc tcgatgaagt acgggtcgtt 240

cagcgcgata tgctccagct ccatggccac ctgcagcagg tcgtctttgg tgcccagctc 300

tttcagcact tcatggcagg tttcacgcat tacggtggcg cgcggatcgt agtttttgta 360

aacacgatgg ccgaagccca tcaggcggaa agagtcattc ttgtctttcg cacgacgaac 420

aaattccgga atgtgctcaa cggagctgat ctcttccagc attttcagcg ccgcttcgtt 480

ggcgccaccg tgtgccggtc cccacaggga ggcgatgccc gcagcgatac aggcgaacgg 540

gttagcgccg gaggagcccg cggtacgtac cgtggaggtc gacgcgttct gctcgtgatc 600

ggcgtgcagg atcagaatac gatccatcgc gcgctccagc accggattga cttcatactc 660

ttcgcacggt gtcgcaaaca tcatgcgcag gaagttgccg gcgtaggaga ggtcgttgcg 720

cggataaaca aacggctgac cgatagaata cttgtaacac atggctgcca tggttggcat 780

tttggacagc agcttgtagg cggcaatctc gcggtgacgc gggttattca catcgaggga 840

atcatgatag aacgccgcca gcgcgccggt gatcccgcac atcaccgcca tcgggtggga 900

atcgcgacgg aacgcgtgga acagacgggt gatctgctca tgaatcatgg tgtggcgggt 960

gacggtagtt ttgaattcgt catattcggc ctgggtcggc ttttcgccgt acagcaggat 1020

ataacagact tcaagataat tagattcggt cgctaactgg tcgatcggga agccgcggtg 1080

cagcaggatc ccctcgtcac catcgataaa cgtaatttta gattcacaag aagccgttga 1140

tgtgaaacct gggtcaaagg taaatacgcc ttttgaacca agactacgaa tatcaataac 1200

atcctgaccg agcgtgcctt ttagcacatc cagttcaata gcagtgtcac cacccagggt 1260

gatttttgct ttagcatcag acat 1284

<210> 20

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of engineered LpdA gene

<400> 20

atgagtactg aaatcaaaac tcaggtcgtg gtacttgggg caggccccgc aggttactct 60

gcagccttcc gttgcgctga tttaggtctg gaaaccgtca tcgtagaacg ttacagcacc 120

ctcggtggtg tttgtctgaa cgtgggttgt atcccttcta aagcgctgct gcacgtggca 180

aaagttatcg aagaagcgaa agcgctggcc gaacacggca tcgttttcgg cgaaccgaaa 240

actgacattg acaagatccg cacctggaaa gaaaaagtca tcactcagct gaccggtggt 300

ctggctggca tggccaaagg tcgtaaagtg aaggtggtta acggtctggg taaatttacc 360

ggcgctaaca ccctggaagt ggaaggcgaa aacggcaaaa ccgtgatcaa cttcgacaac 420

gctatcatcg cggcgggttc ccgtccgatt cagctgccgt ttatcccgca tgaagatccg 480

cgcgtatggg actccaccga cgccctggaa ctgaaatctg taccgaaacg catgctggtg 540

atgggcggcg gtatcatcgg tctggaaatg ggtaccgtat accatgcgct gggttcagag 600

attgacgtgg tggaaatgtt cgaccaggtt atcccggctg ccgacaaaga cgtggtgaaa 660

gtcttcacca aacgcatcag caagaaattt aacctgatgc tggaaaccaa agtgactgcc 720

gttgaagcga aagaagacgg tatttacgtt tccatggaag gtaaaaaagc accggcggaa 780

gcgcagcgtt acgacgcagt gctggtcgct atcggccgcg taccgaatgg taaaaacctc 840

gatgcaggta aagctggcgt ggaagttgac gatcgcggct tcatccgcgt tgacaaacaa 900

atgcgcacca acgtgccgca catctttgct atcggcgata tcgtcggtca gccgatgctg 960
gcgcacaaag gtgtccatga aggccacgtt gccgcagaag ttatctccgg tctgaaacac 1020
tacttcgatc cgaaagtgat cccatccatc gcctacacta aaccagaagt ggcatgggtc 1080
ggtctgaccg agaaagaagc gaaagagaaa ggcatcagct acgaaaccgc caccttcccg 1140
tgggctgctt ccggccgtgc tatcgcttct gactgcgcag atggtatgac caaactgatc 1200
ttcgacaaag agacccaccg tgttatcggc ggcgcgattg tcggcaccaa cggcggcgag 1260
ctgctgggtg agatcggcct ggctatcgag atgggctgtg acgctgaaga catcgccctg 1320

accatccacg ctcacccgac tctgcacgag tccgttggcc tggcggcgga agtgttcgaa 1380
ggcagcatca ccgacctgcc aaacgccaaa gcgaagaaaa agtaa 1425

<210> 21
<211> 1425
<212> DNA
<213> Klebsiella pneumoniae
<400> 21

atgagtactg aaatcaaaac tcaggtcgtg gtacttgggg caggccccgc aggttactct 60
gcagccttcc gttgcgctga tttaggtctg gaaaccgtca tcgtagaacg ttacagcacc 120
ctcggtggtg tttgtctgaa cgtgggttgt atcccttcta aagcgctgct gcacgtggca 180
aaagttatcg aagaagcgaa agcgctggcc gaacacggca tcgttttcgg cgaaccgaaa 240

actgacattg acaagatccg cacctggaaa gaaaaagtca tcactcagct gaccggtggt 300
ctggctggca tggccaaagg tcgtaaagtg aaggtggtta acggtctggg taaatttacc 360
ggcgctaaca ccctggaagt ggaaggcgaa aacggcaaaa ccgtgatcaa cttcgacaac 420
gctatcatcg cggcgggttc ccgtccgatt cagctgccgt ttatcccgca tgaagatccg 480
cgcgtatggg actccaccga cgccctggaa ctgaaatctg taccgaaacg catgctggtg 540
atgggcggcg gtatcatcgg tctggaaatg ggtaccgtat accatgcgct gggttcagag 600
attgacgtgg tggaaatgtt cgaccaggtt atcccggctg ccgacaaaga cgtggtgaaa 660

gtcttcacca aacgcatcag caagaaattt aacctgatgc tggaaaccaa agtgactgcc 720
gttgaagcga aagaagacgg tatttacgtt tccatggaag gtaaaaaagc accggcggaa 780
gcgcagcgtt acgacgcagt gctggtcgct atcggccgcg taccgaatgg taaaaacctc 840
gatgcaggta aagctggcgt ggaagttgac gatcgcggct tcatccgcgt tgacaaacaa 900
atgcgcacca acgtgccgca catctttgct atcggcgata tcgtcggtca gccgatgctg 960

gcgcacaaag gtgtccatga aggccacgtt gccgcagaag ttatctccgg tctgaaacac 1020

tacttcgatc cgaaagtgat cccatccatc gcctacactg aaccagaagt ggcatgggtc 1080

ggtctgaccg agaaagaagc gaaagagaaa ggcatcagct acgaaaccgc caccttcccg 1140

tgggctgctt ccggccgtgc tatcgcttct gactgcgcag atggtatgac caaactgatc 1200

ttcgacaaag agacccaccg tgttatcggc ggcgcgattg tcggcaccaa cggcggcgag 1260

ctgctgggtg agatcggcct ggctatcgag atgggctgtg acgctgaaga catcgccctg 1320

accatccacg ctcacccgac tctgcacgag tccgttggcc tggcggcgga agtgttcgaa 1380

ggcagcatca ccgacctgcc aaacgccaaa gcgaagaaaa agtaa 1425

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 22

atgctcgtcg gcggctggta ccttggcggt cgcgcgcgcg cgcgtagtaa aaacacgccg 60

tttgaatcgg ggatcgactc cgtcggttcg gcccgcttac gtctttctgc gaagttttat 120

ctggttgcca tgttcttcgt tatcttcgac gtggaagccc tgtatctcta cgcatggtcg 180

acctctatcc gcgagagcgg ctgggtcggc tttgtggaag ccgcaatttt cattttagtg 240

ctactggctg gtctggttta tctcgttcgc atcggcgcac tggactggac gcctgcgcgt 300

tcccgtcgca cgctggttaa cccggaaaca gacagtccca ctaaccgtca tatgcagtaa 360

360

<210> 23

<211> 1305

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 23

atgactacgc cattgaaaaa aatcgtaatt gtgggtggcg gcgctggcgg actggaactg 60

gcaactcagc tggggagaaa gttagggcgc cataagaaag cgaaaatcac cctggtggac 120

cgtaaccaca gccatctgtg gaagccgctg ctgcacgaag tggccaccgg ttctctggat 180

gaaggcgttg atgcgctgag ctatctggcc catgcccgca accacggttt ccagttccag 240

ctgggctcgg tggtcgatat caaccgcgaa gggaaaacca tcaccctcgg cgagctgcgc 300

aatgaaaaag gcgagctgct ggtggctgag cgtaaactgc cgtacgacac gctggtcatg 360

gcgttgggca gtacctcgaa tgattttaat acccctggcg taaaagagaa ctgcattttc 420

ctcgacaacc cgcaccaggc gcgtcgcttc catcaggaaa tgctcaacct gttccttaaa 480

tactctgcta acctcggcgc taacggtaaa gtaaatatcg ccatcgtcgg cggcggcgcc 540

accggcgtgg agctctccgc tgagttgcac aatgcggtga aacagctgca cagctacggc 600

tacaaagggc tgaccaacga agcgctgaac gtcacgctgg tcgaggcggg cgagcgcatt 660

ctgcctgcgc tgccgccgcg catttccggg gcagcgcata atgagctgac taagctgggc 720

gtacgggttc tgacgcagac catggtcacc agcgcggatg cgggcggcct gcacactaaa 780

gatggcgaat atattgaggc ggatctaatg gtctgggcgg cggggatcaa agcgccagat 840

ttcatgaaag agatcggcgg cctcgaaacc aaccgtatca atcagctggt ggtcgagccg 900

acgctgcaga ctacccgcga tgcggatatt ttcgccatcg gcgactgcgc ctcctgcgcc 960

cgtccggaag gcggctttgt gcctccgcgg gcccaggcgg cgcaccagat ggctacctgc 1020

gcgctgaaca acatcctggc gcagatgaaa ggcaaaccgc tgaaggcata cacctataaa 1080

gaccatggct cgctggtgtc gctgtcaaat tactccaccg tcggcagcct gatgggtaac 1140

ctgatgcgcg gttcgatgat ggtagaaggg cgcattgcgc gcttcgtgta catctccctg 1200

taccgtatgc accagattgc cctgcatggt tacttcaaga ccggcctgat gatgctggtt 1260

gggcgcatca accgcatcat tcgcccgcgc ctgaagctgc actaa 1305

<210> 24

<211> 780

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 24

atgaatcatt ctgctgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaaccct gcgggcgttt 60

tccgcgcagc atcccgagag cgtgctctat cagacatcgc tcatgagcgc cctgctgagc 120

ggggtttacg aaggcagcac caccatcgcc gacctgctga aacacggcga tttcggcctc 180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atcgccttca gcagtcaggt ctatcagctg 240

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg 300

acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc tttgaccatc cggtgagccg ccagcagctg 360

cacgaggtga tcgaccagca aatcccctct gacaacctgt tctgcgccct gcgcatcgac 420

ggccatttcc gccatgccca tacccgcacc gtgccgcgcc agacgccgcc gtaccgggcg 480

atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttccgcttta accagcgcga aggggtgctg 540

gtcggcttcc ggaccccgca gcatatgcag gggatcaacg tcgccgggta tcacgagcat 600

tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggt cacctgctgg attaccagct cgaccacggg 660

gtgctgacct tcggcgaaat tcacaagctg atgatcgacc tgcccgccga cagcgcgttc 720

ctgcaggcta atctgcatcc cgataatctc gatgccgcca tccgttccgt agaaagttaa 780

780

<210> 25

<211> 1680

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 25

atggacaaac agtatccggt acgccagtgg gcgcacggcg ccgatctcgt cgtcagtcag 60

ctggaagcac agggggtacg ccaggtgttc ggcatccccg gcgccaaaat cgacaaggtc 120

ttcgattcac tgctggattc ctccattcgc attattccgg tacgccacga agccaacgcc 180

gcatttatgg ccgccgccgt cggacgtatt accggcaaag cgggcgtggc gctggtcacc 240

tccggtccgg gttgttctaa cctgatcacc ggcatggcca ccgcgaacag cgaaggcgac 300

ccggtggtgg ccctgggcgg cgcggtaaaa cgcgccgata aagccaaaca ggtccaccag 360

agtatggata cggtggcgat gttcagcccg gtcaccaaat acgccgtcga ggtgacggcg 420

ccggatgcgc tggcggaagt ggtctccaac gccttccgcg ccgccgagca gggccggccg 480

ggcagcgcgt tcgttagcct gccgcaggat gtggtcgatg gcccggtcag cggcaaagta 540

ctgccggcca gcggggcccc gcagatgggc gccgcgccgg atgatgccat cgaccaggtg 600

gcgaagctta tcgcccaggc gaagaacccg atcttcctgc tcggcctgat ggccagccag 660

ccggaaaaca gcaaggcgct gcgccgtttg ctggagacca gccatattcc agtcaccagc 720

acctatcagg ccgccggagc ggtgaatcag gataacttct ctcgcttcgc cggccgggtt 780

gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc ttgccgacct ggtgatctgc 840

atcggctaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgacgctg 900

gtgcacatcg acgtgctgcc cgcctatgaa gagcgcaact acaccccgga tgtcgagctg 960

gtaggcgata tcgccggcac tctcaacaag ctggcgcaaa atatcgatca tcggctggtg 1020

ctctccccgc aggcagcgga gatcctccgc gaccgccagc accagcgcga gctgctggac 1080

cgccgcggcg cgcagctcaa ccagtttgcc ctgcatccgc tgcgtatcgt tcgcgccatg 1140

caggacatcg tcaacagcga cgtcacgttg accgtggaca tgggcagctt ccatatctgg 1200

attgcccgct acctgtacag cttccgcgcc cgccaggtga tgatctccaa cggccagcag 1260

accatgggcg tcgccctgcc ctgggccatc ggcgcctggc tggtcaatcc tgagcgcaaa 1320

gtggtctccg tctccggcga cggcggcttc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgcc 1380

gtccgcctga aagccaacgt gctgcacctg atctgggtcg ataacggcta caacatggtg 1440
gccattcagg aagagaaaaa ataccagcgc ctgtccggcg tcgagtttgg gccgatggat 1500
tttaaagcct atgccgaatc cttcggcgcg aaagggtttg ccgtggaaag cgccgaggcg 1560
ctggagccga ccctgcgcgc ggcgatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatcccg 1620
gtggattatc gcgataaccc gctgctgatg ggccagctgc atctgagtca gattctgtaa 1680
1680

<210> 26
<211> 771
<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae
<400> 26
atgaaaaaag tcgcacttgt taccggcgcc ggccagggga ttggtaaagc tatcgccctt 60
cgtctggtga aggatggatt tgccgtggcc attgccgatt ataacgacgc caccgccaaa 120
gcggtcgcct ccgaaatcaa ccaggccggc ggccgcgcca tggcggtgaa agtggatgtt 180
tctgaccgcg accaggtatt tgccgccgtc gaacaggcgc gcaaaacgct gggcggcttc 240
gacgtcatcg tcaacaacgc cggcgtggcg ccatccacgc cgatcgagtc cattaccccg 300
gagattgtcg acaaagtcta caacatcaac gtcaaagggg tgatctgggg catccaggca 360

gcggtcgagg cctttaagaa agagggtcac ggcgggaaaa tcatcaacgc ctgttcccag 420
gccggccacg tcggcaaccc ggagctggcg gtatatagct cgagtaaatt cgcggtacgc 480
ggcttaaccc agaccgccgc tcgcgacctc gcgccgctgg gcatcacggt caacggctac 540
tgcccgggga ttgtcaaaac gccgatgtgg gccgaaattg accgccaggt gtccgaagcc 600
gccggtaaac cgctgggcta cggtaccgcc gagttcgcca aacgcatcac cctcggccgc 660
ctgtccgagc cggaagatgt cgccgcctgc gtctcctatc ttgccagccc ggattctgat 720
tatatgaccg gtcagtcatt gctgatcgac ggcggcatgg tgtttaacta a 771

<210> 27
<211> 1176
<212> DNA
<213> Klebsiella pneumoniae
<400> 27
atgtcggctg ctgctgatcg cctgaatctg acctcgggcc atctgaatgc tggtcgcaaa 60

cgctcctctt cgtcggtgtc gctgaaagcg gccgaaaaac cgtttaaagt taccgtcatt 120

ggcagcggta actggggcac cacgatcgcg aaagtggttg ccgaaaattg caaaggctat 180

ccggaagtgt ttgcgccgat tgtgcagatg tgggttttcg aagaggaaat caacggcgag 240

aaactgaccg aaattatcaa cacgcgccat cagaatgtca aatacctgcc gggcattacc 300

ctgccggata acctggtggc caatccggat ctgatcgaca gcgttaaaga tgtggatatc 360

atcgttttca acattccgca ccagttcctg ccgcgcatct gctcccagct gaaaggccat 420

gtggatagtc acgtgcgtgc gatttcttgt ctgaaaggtt ttgaagtcgg tgccaaaggc 480

gtgcagctgc tgagcagcta tattaccgag gaactgggta tccagtgtgg cgcgctgagt 540

ggtgcgaaca ttgccaccga agtggcacag gaacattggt ctgagaccac ggtcgcttat 600

cacatcccga aagatttccg cggcgaaggc aaagatgttg accataaagt cctgaaagca 660

ctgtttcatc gtccgtactt ccacgtgtca gttatcgaag acgtggccgg catttcgatc 720

tgcggtgcgc tgaaaaatgt cgtggccctg ggctgtggtt ttgttgaagg cctgggttgg 780

ggcaacaatg cgtcagcagc tattcagcgc gtcggtctgg gcgaaattat ccgtttcggc 840

cagatgtttt tcccggaaag ccgtgaggaa acctattacc aggagtccgc aggtgtggct 900

gatctgatca ccacgtgcgc cggcggtcgc aacgtcaaag tggcacgtct gatggctacc 960

tcaggcaaag acgcatggga gtgtgaaaaa gagctgctga atggccagtc ggctcagggt 1020

ctgattacct gcaaagaagt gcacgagtgg ctggaaacgt gtggctctgt tgaagatttt 1080

ccgctgttcg aggccgtgta tcagatcgtt tacaacaact acccgatgaa aaacctgccg 1140

gacatgattg aagaactgga cctgcacgag gactaa 1176

<210> 28

<211> 753

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 28

atgccgctga ccaccaaacc gctgagcctg aaaatcaacg ccgccctgtt cgatgtggac 60

ggcaccatta ttattagcca accggccatc gcggcctttt ggcgtgattt cggcaaagac 120

aagccgtact ttgatgcgga gcacgttatc catattagcc acggttggcg cacctatgac 180

gcgattgcca aatttgcgcc ggatttcgcc gacgaagagt acgtgaacaa actggaaggc 240

gagatcccgg aaaagtatgg cgagcatagc attgaagttc cgggtgccgt gaagctgtgc 300

aatgccctga atgccctgcc gaaagaaaaa tgggccgttg ccaccagcgg cacccgtgat 360

atggcgaaaa agtggtttga catcctgaaa attaagcgcc cggagtactt catcaccgcc 420

aatgatgtga aacagggcaa gccgcacccg gaaccgtatc tgaaaggccg taacggcctg 480

ggttttccga tcaatgagca ggacccgagc aaaagcaagg tggttgtgtt cgaagatgcg 540

ccggcgggta ttgccgcggg taaagccgcc ggctgcaaga tcgttggtat tgcgaccacc 600

tttgatctgg acttcctgaa agagaagggc tgcgacatca ttgttaagaa ccatgaaagc 660

attcgcgtgg gcgagtacaa tgccgaaacc gacgaagtgg aactgatttt tgatgattat 720

ctgtatgcca aggatgacct gctgaagtgg taa 753

<210> 29

<211> 2693

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 29

atgaaaagat caaaacgatt tgcagtactg gcccagcgcc ccgtcaatca ggacgggctg 60

attggcgagt ggcctgaaga ggggctgatc gccatggaca gccccttga cccggtctct 120

tcagtaaaag tggacaacgg tctgatcgtc gagctggacg gcaaacgccg ggaccagttt 180

gacatgatcg accgatttat cgccgattac gcgatcaacg ttgagcgcac agagcaggca 240

atgcgcctgg aggcggtgga aatagcccgc atgctggtgg atattcacgt cagtcgggag 300

gagatcattg ccatcactac cgccatcacg ccggccaaag cggtcgaggt gatggcgcag 360

atgaacgtgg tggagatgat gatggcgctg cagaagatgc gtgcccgccg gacccctcc 420

aaccagtgcc acgtcaccaa tctcaaagat aatccggtgc agattgctgc tgacgccgcc 480

gaggccggga tccgcggctt ctcagaacag gagaccacgg tcggtatcgc gcgctatgcg 540

ccgtttaacg ccctggcgct gttggtcggt tcgcagtgcg gccgccccgg cgttttgacg 600

cagtgctcgg tggaagaggc caccgagctg gagctgggca tgcgtggctt aaccagctac 660

gccgagacgg tgtcggtcta cggcaccgaa gcggtattta ccgacggcga tgatactccg 720

tggtcaaagg cgttcctcgc ctcggcctac gcctcccgcg ggttgaaaat gcgctacacc 780

tccggcaccg gatccgaagc gctgatgggc tattcggaga gcaagtcgat gctctacctc 840

gaatcgcgct gcatcttcat taccaaaggc gccggggttc aggggctgca aaacggcgcg 900

gtgagctgta tcggcatgac cggcgctgtg ccgtcgggca ttcgggcggt gctggcggaa 960

aacctgatcg cctctatgct cgacctcgaa gtggcgtccg ccaacgacca gactttctcc 1020

cactcggata ttcgccgcac cgcgcgcacc ctgatgcaga tgctgccggg caccgacttt 1080

attttctccg gctacagcgc ggtgccgaac tacgacaaca tgttcgccgg ctcgaacttc 1140

gatgcggaag attttgatga ttacaacatc ctgcagcgtg acctgatggt tgacggcggc 1200

ctgcgtccgg tgaccgaggc ggaaaccatt gccattcgcc agaaagcggc gcgggcgatc 1260

caggcggttt tccgcgagct ggggctgccg ccaatcgccg acgaggaggt ggaggccgcc 1320

acctacgcgc acggtagcaa cgagatgccg ccgcgtaacg tggtggagga tctgagtgcg 1380

gtggaagaga tgatgaagcg caacatcacc ggcctcgata ttgtcggcgc gctgagccgc 1440

agcggctttg aggatatcgc cagcaatatt ctcaatatgc tgcgccagcg ggtcaccggc 1500

gattacctgc agacctcggc cattctcgat cggcagttcg aggtggtgag tgcggtcaac 1560

gacatcaatg actatcaggg gccgggcacc ggctatcgca tctctgccga acgctgggcg 1620

gagatcaaaa atattccggg cgtggttcag cccgacacca ttgaataagg cggtattcct 1680

gtgcaacaga caacccaaat tcagccctct tttaccctga aaacccgcga gggcggggta 1740

gcttctgccg atgaacgcgc cgatgaagtg gtgatcggcg tcggccctgc cttcgataaa 1800

caccagcatc acactctgat cgatatgccc catggcgcga tcctcaaaga gctgattgcc 1860

ggggtggaag aagaggggct tcacgcccgg gtggtgcgca ttctgcgcac gtccgacgtc 1920

tcctttatgg cctgggatgc ggccaacctg agcggctcgg ggatcggcat cggtatccag 1980

tcgaagggga ccacggtcat ccatcagcgc gatctgctgc cgctcagcaa cctggagctg 2040

ttctcccagg cgccgctgct gacgctggaa acctaccggc agattggcaa aaacgccgcg 2100

cgctatgcgc gcaaagagtc accttcgccg gtgccggtgg tgaacgatca gatggtgcgg 2160

ccgaaattta tggccaaagc cgcgctattt catatcaaag agaccaaaca tgtggtgcag 2220

gacgccgagc ccctcaccct gcacgtcgac ttagtaaggg agtgaccatg agcgagaaaa 2280

ccatgcgcgt gcaggattat ccgttagcca cccgctgccc ggagcatatc ctgacgccta 2340

ccggcaaacc attgaccgat attaccctcg agaaggtgct ctctggcgag gtgggcccgc 2400

aggatgtgcg gatctcctgc cagacccttg agtaccaggc gcagattgcc gagcagatgc 2460

agcgccatgc ggtggcgcgc aatttccgcc gcgcggcgga gcttatcgcc attcctgacg 2520

agcgcattct ggctatctat aacgcgctgc gcccgttccg ctcctcgcag gcggagctgc 2580

tggcgatcgc cgacgagctg gagcacacct ggcatgcgac agtgaatgcc gcctttgtcc 2640

gggagtcggc ggaagtgtat cagcagcggc ataagctgcg taaaggaagc taa 2693

<210> 30

<211> 2244

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 30

atgccgttaa tagccgggat tgatatcggc aacgccacca ccgaggtggc gctggcgtcc 60

gacgacccgc aggcgagggc gtttgttgcc agcgggatcg tcgcgacgac gggcatgaaa 120

gggacgcggg acaatatcgc cgggaccctc gccgcgctgg agcaggccct ggcgaaaaca 180
ccgtggtcga tgagcgatgt ctctcgcatc tatcttaacg aagccgcgcc ggtgattggc 240
gatgtggcga tggagaccat caccgagacc attatcaccg aatcgaccat gatcggtcat 300
aacccgcaga cgccgggcgg ggtgggcgtt ggcgtgggga cgactatcgc cctcgggcgg 360
ctggcgacgc tgccggcggc gcagtatgcc gaggggtgga tcgtactgat tgacgacgcc 420
gtcgatttcc ttgacgccgt gtggtggctc aatgaggcgc tcgaccgggg gatcaacgtg 480
gtggcggcga tcctcaaaaa ggacgacggc gtgctggtga acaaccgcct gcgtaaaacc 540

ctgccggtgg tagatgaagt gacgctgctg gagcaggtcc ccgaggggggt aatggcggcg 600
gtggaagtgg ccgcgccggg ccaggtggtg cggatcctgt cgaatcccta cgggatcgcc 660
accttcttcg ggctaagccc ggaagagacc caggccatcg tccccatcgc ccgcgccctg 720
attggcaacc gttcagcggt ggtgctcaag accccgcagg gggatgtgca gtcgcgggtg 780
atcccggcgg gcaacctcta cattagcggc gaaaagcgcc gcggagaggc cgatgtcgcc 840
gagggcgcgg aagccatcat gcaggcgatg agcgcctgcg ctccggtacg cgacatccgc 900
ggcgaaccgg gcactcacgc cggcggcatg cttgagcggg tgcgcaaggt aatggcgtcc 960

ctgaccgacc atgagatgag cgcgatatac atccaggatc tgctggcggt ggatacgttt 1020
attccgcgca aggtgcaggg cgggatggcc ggcgagtgcg ccatggaaaa tgccgtcggg 1080
atggcggcga tggtgaaagc ggatcgtctg caaatgcagg ttatcgcccg cgaactgagc 1140
gcccgactgc agaccgaggt ggtggtgggc ggcgtggagg ccaacatggc catcgccggg 1200
gcgttaacca ctcccggctg tgcggcgccg ctggcgatcc tcgacctcgg cgccggctcg 1260
acggatgcgg cgatcgtcaa cgcggagggg cagataacgg cggtccatct cgccgggcg 1320
gggaatatgg tcagcctgtt gattaaaacc gagctgggcc tcgaggatct ttcgctggcg 1380

gaagcgataa aaaaataccc gctggccaaa gtggaaagcc tgttcagtat tcgtcacgag 1440
aatggcgcgg tggagttctt tcgggaagcc ctcagcccgg cggtgttcgc caaagtggtg 1500
tacatcaagg agggcgaact ggtgccgatc gataacgcca gcccgctgga aaaaattcgt 1560
ctcgtgcgcc ggcaggcgaa agagaaagtg tttgtcacca actgcctgcg cgcgctgcgc 1620
caggtctcac ccggcggttc cattcgcgat atcgcctttg tggtgctggt gggcggctca 1680
tcgctggact ttgagatccc gcagcttatc acggaagcct tgtcgcacta tggcgtggtc 1740
gccgggcagg gcaatattcg gggaacagaa gggccgcgca atgcggtcgc caccgggctg 1800

ctactggccg gtcaggcgaa ttaaaagctt tcggcggaag tgtatcagca gcggcataag 1860

ctgcgtaaag gaagctaagc ggaggtcagc atgtcgcttt caccgccagg cgtacgcctg 1920

ttttacgatc cgcgcgggca ccatgccggc gccatcaatg agctgtgctg ggggctggag 1980

gagcaggggg tcccctgcca gaccataacc tatgacggag gcggtgacgc cgctgcgctg 2040

ggcgccctgg cggccagaag ctcgcccctg cgggtgggta tcgggctcag cgcgtccggc 2100

gagatagccc tcactcatgc ccagctgccg gcggacgcgc cgctggctac cggacacgtc 2160

accgatagcg acgatcaact gcgtacgctc ggcgccaacg ccgggcagct ggttaaagtc 2220

ctgccgttaa gtgagagaaa ctga 2244

<210> 31

<211> 1164

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 31

atgagctatc gtatgtttga ttatctggtg ccaaacgtta actttttttgg ccccaacgcc 60

atttctgtag tcggcgaacg ctgccagctg ctgggggggga aaaaagccct gctggtcacc 120

gacaaaggcc tgcgggcaat taaagatggc gcggtggaca aaaccctgca ttatctgcgg 180

gaggccggga tcgaggtggc gatctttgac ggcgtcgagc cgaacccgaa agacaccaac 240

gtgcgcgacg gcctcgccgt gtttcgccgc gaacagtgcg acatcatcgt caccgtgggc 300

ggcggcagcc cgcacgattg cggcaaaggc atcggcatcg ccgccaccca tgagggcgat 360

ctgtaccagt atgccggaat cgagaccctg accaacccgc tgccgcctat cgtcgcggtc 420

aataccaccg ccggcaccgc cagcgaggtc acccgccact gcgtcctgac caacaccgaa 480

accaaagtga agtttgtgat cgtcagctgg cgcaacctgc cgtcggtctc tatcaacgat 540

ccactgctga tgatcggtaa accggccgcc ctgaccgcgg cgaccgggat ggatgccctg 600

acccacgccg tagaggccta tatctccaaa gacgctaacc cggtgacgga cgccgccgcc 660

atgcaggcga tccgcctcat cgcccgcaac ctgcgccagg ccgtggccct cggcagcaat 720

ctgcaggcgc gggaaaacat ggcctatgcc tctctgctgg ccgggatggc tttcaataac 780

gccaacctcg gctacgtgca cgccatggcg caccagctgg gcggcctgta cgacatgccg 840

cacggcgtgg ccaacgctgt cctgctgccg catgtggcgc gctacaacct gatcgccaac 900

ccggagaaat tcgccgatat cgctgaactg atgggcgaaa atatcaccgg actgtccact 960

ctcgacgcgg cggaaaaagc catcgccgct atcacgcgtc tgtcgatgga tatcggtatt 1020

ccgcagcatc tgcgcgatct gggggtaaaa gaggccgact tcccctacat ggcggagatg 1080

gctctgaaag acggcaatgc gttctcgaac ccgcgtaaag gcaacgagca ggagattgcc 1140

gcgattttcc gccaggcatt ctga 1164

<210> 32

<211> 1422

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 32

atgagcagcg agagcagcca aggtctggtt acccgtctgg cgctgattgc ggcgattggt 60

ggtctgctgt tcggttatga tagcgcggtt atcgcggcga ttggcacccc ggtggacatc 120

cacttcattg cgccgcgtca cctgagcgcg accgcggcgg cgagcctgag cggtatggtg 180

gttgtggcgg ttctggtggg ctgcgttacc ggtagcctgc tgagcggctg gatcggtatt 240

cgtttcggcc gtcgtggtgg cctgctgatg agcagcatct gcttcgtggc ggcgggtttt 300

ggtgcggcgc tgaccgagaa gctgtttggc accggtggta gcgcgctgca aatcttctgc 360

ttcttccgtt ttctggcggg tctgggcatt ggtgttgtga gcaccctgac cccgacctac 420

atcgcggaaa ttgctccgcc ggacaaacgt ggccaaatgg ttagcggtca gcaaatggcg 480

atcgtgaccg gcgcgctgac cggttatatt ttcacctggc tgctggcgca ctttggcagc 540

atcgattggg ttaacgcgag cggttggtgc tggagcccgg cgagcgaggg cctgatcggt 600

attgcgttcc tgctgctgct gctgaccgcg ccggacaccc cgcactggct ggtgatgaag 660

ggtcgtcaca gcgaggcgag caaaattctg gcgcgtctgg aaccgcaggc ggacccgaac 720

ctgaccatcc aaaagattaa agcgggtttt gacaaggcga tggataaaag cagcgcgggc 780

ctgttcgcgt ttggtatcac cgttgtgttc gcgggcgtta gcgtggcggc gtttcagcaa 840

ctggttggta ttaacgcggt gctgtactat gcgccgcaga tgttccaaaa cctgggcttt 900

ggtgcggaca ccgcgctgct gcaaaccatc agcattggcg ttgtgaactt catctttacc 960

atgattgcga gccgtgttgt ggatcgtttc ggtcgtaagc cgctgctgat ctggggcgcg 1020

ctgggtatgg cggcgatgat ggcggttctg ggttgctgct tctggtttaa agttggtggc 1080

gtgctgccgc tggcgagcgt tctgctgtac attgcggtgt tcggcatgag ctggggtccg 1140

gtttgctggg ttgtgctgag cgaaatgttt ccgagcagca tcaaaggtgc tgcgatgccg 1200

attgcggtga ccggccagtg gctggcgaac atcctggtta acttcctgtt taaagtggcg 1260

gatggcagcc cggcgctgaa ccaaaccttc aaccacggtt ttagctatct ggtgttcgcg 1320

gcgctgagca tcctgggtgg cctgattgtt gcgcgttttg tgccggaaac caaaggtcgt 1380

agcctggatg agattgagga aatgtggcgt agccaaaaat ag 1422

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of glpK

<400

> 33

attggatcct tattatttcg caattcgctg gc 32

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of glpK

<400> 34

aattgcggcc gcgaccttcg tctgcgtgct gt 32

<210> 35

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpD

<400> 35

ggggatcgcg gccgctcatt aacatgcagc gaatc 35

<210> 36

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpD

<400> 36

ccggtcgact ctagaaagaa ctccaggttc agcat 35

<210> 37

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpA

<400> 37

gggatcgcgg ccgcaggaaa atgcgcggat tcgag 35

<210> 38

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpA

<400> 38

tctagaggat cctgtcacgc agtacatcca gcagcggtaa c 41

<210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for dhaD

<400> 39

aaaggatcca tatgatgatt ctggctgagc ggacg 35

<210> 40

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for dhaD

<400> 40

aaagcggccg caaaaactcc atggctgtag cgcctgctta aaat 44

<210

> 41

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ptsG

<400> 41

tactaagcgg ccgctctcgt tttccggtat cgtcac 36

<210> 42

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ptsG

<400> 42

tagcaaggat ccgatgcata tggatatggt acac 34

<210> 43

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpF1

<400> 43

tactaagcgg ccgctcttcg atttccatct gcaacag 37

<210> 44

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpF1

<400> 44

tagcaaggat ccagataagc caggtatcaa c 31

<210> 45

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpF2

<400> 45

atctaagcgg ccgctcgtta acggatgtca aac 33

<210

> 46

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for glpF2

<400> 46

tagtaaggat ccaggggcag ataacggcgg tccatct 37

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for adhE

<400> 47

aaatctagag gcttcggcct cgcggagaat aca 33

<210> 48

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for adhE

<400> 48

tatgcggccg ctggatgaaa gccagtttct ga 32

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ldhA

<400> 49

ctacggatcc tcgcttccgc cagcctcgga catttcctg 39

<210> 50

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ldhA

<400> 50

aacagcggcc gcgttttccg tcagatcgac ctgcgcaccc tc 42

<210

> 51

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for frdA

<400> 51

tactaagcgg ccgcgataca tgtcatagca tggacgat 38

<210> 52

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for frdA

<400> 52

aaatctagaa cgaaagtgca ggtccagacg ccatt 35

<210> 53

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for pflB

<400> 53

atctaagcgg ccgcaggtgt ggatgccttc tttc 34

<210> 54

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for pflB

<400> 54

gagtagtcta gaaatatatg actgccaacg g 31

<210> 55

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for Edd-eda

<400> 55

tagtatgcgg ccgcttggtc atcgtcagga agac 34

<

210> 56

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for Edd-eda

<400> 56

tagcaaggat ccgtagatat ccaggtactg aac 33

<210> 57

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for mgsA

<400> 57

tagatagcgg ccgcttaagc aaaccgctga acag 34

<210> 58

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for mgsA

<400> 58

tagcaatcta gaccatcact acgctcaatc c 31

<210> 59

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for Pta-ackA

<400> 59

gatcgcggcc gcctgcatcg gcaggctcag cgcaaacag 39

<210> 60

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for Pta-ackA

<400> 60

ctagaggatc cgcggactga atagcgattt ccgccag 37

<210> 61

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for poxB

<400> 61

atctaagcgg ccgccacctt accgttatgg gtgttttc 38

<210> 62

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for poxB

<400> 62

ctgaaggatc cagtctattt ctttgttggc gcactgg 37

<210> 63

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for mdh

<400> 63

tagttagcgg ccgcatcccg ttccagttag cgac 34

<210> 64

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for mdh

<400> 64

tagcaatcta gaatctctcc ctgcgagctg aatttc 36

<210> 65

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for gltA::gltAR164K

<400> 65

tagttagcgg ccgcgtcgga cattgatatc ctc 33

<210> 66

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for gltA::gltAR164K

<400> 66

ggacagtcta gaggcattaa aacatcacta aacaacgc 38

<210> 67

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for lpdA::lpdAE324G

<400> 67

ttattagcgg ccgcatcacc gagctgtctc gtg 33

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> primer sequence for lpdA::lpdAE324G

<400> 68

ggacagtcta gagcaaaggc acaggagata acg 33

<210> 69

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for nuoA

<400> 69

tagatagcgg ccgcaacagc tcggagagca tcac 34

<210> 70

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for nuoA

<400> 70

tagcactcta gattggagat caaagttcac c 31

<210> 71

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ndh

<400> 71

gggatcgcgg ccgcaacatg gaaggcaaaa tcgac 35

<210> 72

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for ndh

<400> 72

ggtcgactct agacgcacct acgaccgtcg ccacgctg 38

<210> 73

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for budABC

<400> 73

tagttaagcg gccgccatat tgtcttccat ctggtg 36

<210> 74

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for budABC

<400> 74

tagcaaggat cccaaaccga ccttactaac tgac 34

<210> 75

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for budB

<400> 75

tagttcccgg gttcagcagt caggtctatc ag 32

<210

> 76

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence for budB

<400> 76

tagcaaggat cccgttgatg ttgtagactt tgtc 34