



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0053453

(43) 공개일자 2022년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0046061

(22) 출원일자 2021년04월08일

심사청구일자 2021년04월08일

(30) 우선권주장

1020200137492 2020년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 106동 705호

최서영

서울특별시 송파구 토성로 37, 306동 1305호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅

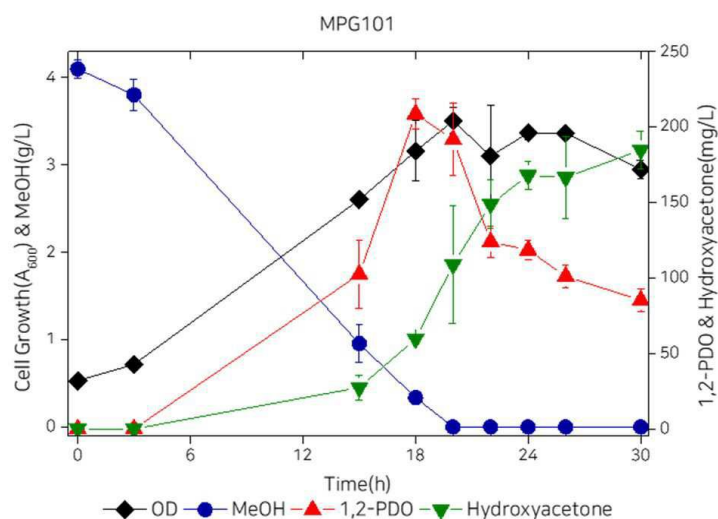
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 1,2-프로판다이올 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 메틸영양세균과 메틸영양세균의 1,2-프로판다이올 생산을 촉진하는 성분을 함유한 배지를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용하여 1,2-프로판다이올을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 배지 및 생산 방법을 이용하면 1,2-프로판다이올을 신속하고 효율적으로 대량 생산할 수 있다.

대표도 - 도5d



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

C12Y 101/01006 (2013.01)

C12Y 101/01283 (2013.01)

C12Y 402/03003 (2013.01)

C12Y 404/01005 (2013.01)

(72) 발명자

조숙형

경기도 고양시 덕양구 백양로 126, 1108동 901호

연영주

서울특별시 동작구 국사봉2마길 21, 401호

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104147

과제번호 2015M3D3A1A01064929

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발(R&D)

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서강대학교

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸영양세균;

탄소원 (carbon source)을 포함하는 제1배지; 및

탄소원 (carbon source) 및 질소원 (nitrogen source)을 포함하는 제2배지;

를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase, mgsA)를 코딩하는 핵산 서열, 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase, yqhD)를 코딩하는 핵산 서열, 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase, gldA)를 코딩하는 핵산 서열, 포몰레이즈 (formolase, fls)를 코딩하는 핵산 서열 및 디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase, dak)를 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 락토일글루타티온 분해효소(Lactoylglutathione lyase, gloA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스 (Methylobacterium extorquens), 메틸로박테리움 수오미엔스 (Methylobacterium suomiense), 메틸로박테리움 플래타니 (Methylobacterium platani), 메틸로박테리움 어드헤시BUM (Methylobacterium adhaesivum), 메틸로박테리움 솔라이 (Methylobacterium soli) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰 (Methylobacterium chloromethanicum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 탄소원 (carbon source)은 메탄올 (methanol), 아세테이트 (acetate), 에탄올 (ethanol), 에틸아민 (ethylamine), 피루베이트 (pyruvate) 및 숙시네이트 (succinate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 질소원은 KNO₃ (Potassium nitrate), 요소 (Urea), 염화암모늄 (Ammonium chloride; NH₄Cl), 효모 추출물 (Yeast extract) 및 펩톤 (Peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법:

탄소원 (carbon source)을 포함하는 제1배지에서, 메틸영양세균을 배양하는 제1배양 단계; 및

탄소원 (carbon source) 및 질소원 (nitrogen source)을 포함하는 제2배지에서, 상기 제1배양 단계에서 배양한 메틸영양세균을 배양하는 제2배양 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase, mgsA)를 코딩하는 핵산 서열, 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase, yqhD)를 코딩하는 핵산 서열, 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase, gldA)를 코딩하는 핵산 서열, 포몰레이즈 (formolase, fls)를 코딩하는 핵산 서열 및 디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase, dak)를 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 락토일글루타티온 분해효소 (Lactoylglutathione lyase, gloA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스 (Methylobacterium extorquens), 메틸로박테리움 수오미엔스 (Methylobacterium suomiense), 메틸로박테리움 플라타니 (Methylobacterium platani), 메틸로박테리움 어드헤시BUM (Methylobacterium adhaesivum), 메틸로박테리움 솔라이 (Methylobacterium soli) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰 (Methylobacterium chloromethanicum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 제1배양 단계는 5 내지 40 ℃의 온도 조건에서 수행되는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 제1배양 단계는 세균 성장 곡선 (bacterial growth curve)을 기준으로, 메틸영양세균의 증기-지수상 (Mid-exponential phase)과 초기-정지상 (Early-Stationary phase)에 도달할 때까지 수행되는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 제2배양 단계는 5 내지 40 ℃의 온도 조건에서 수행되는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 14

제7항에 있어서, 상기 제2배양 단계는 회분식 배양 (batch culture)으로서,

제2배지에 포함되는 탄소원이 고갈되지 않도록, 탄소원이 고갈된 경우, 탄소원을 제2배지와 혼합하는 탄소원 혼합 단계를 포함하는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

청구항 15

제7항에 있어서, 상기 방법은 제2배양 단계 이후,

제2배지와 pH 조절제를 혼합하는 pH 조절 단계를 더 포함하는 것인, 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 메틸영양세균; 메틸영양세균의 1,2-프로판다이올 생산을 촉진하는 성분을 함유한 2종의 배지;를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 1,2-프로판다이올을 효율적으로 대량 생산하는 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 메탄올은 천연가스, 석탄 등의 원료로 생산되며 미국, 덴마크 등을 중심으로 메탄올 수출 향상을 위한 촉매 성능 개선, 신규 촉매 개발이 진행 중이며, 이 외에도 생촉매, 인공 광합성 관련 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이탄을 포함한 세계 메탄올 생산력 증가는 1,033만톤으로 공급 과잉에 들어갈 것으로 전망되며 중장기적으로도 세일 가스를 활용한 북미의 메탄올 생산 능력이 확대될 전망이다.
- [0003] 메탄올은 생물 공학적 적용 (biotechnological applications)을 위한 탄소원으로 이용 시, 앞서 언급한 바와 같이 풍부함 (abundance)과 저렴한 가격 (low price)의 이점을 지닌다. 생물 공학적 공정 (Biotechnological processes)은 total cost에서 원료가 차지하는 비중이 높기 때문에 저렴한 원료를 사용하기 위하여 노력하며, 버가스 (bagasse), 사탕수수 당밀 (sugar cane molasses), 옥수수 전분 가수 분해물 (corn starch hydrolysates) 등이 주로 이용된다. 하지만 이와 같은 곡물 유래의 원료는 식량 문제를 피하기 어렵다. 반면에 메탄올은 앞서 언급한 원료들과 달리 식량 문제에서 자유로울 뿐만 아니라 배양 시 오염의 위험성을 줄일 수 있으며 글루코스 (glucose) 대비 높은 환원력 (reducing power)을 가지고 있어 생산물 수율 (yield)에 이점을 가진다.
- [0004] 메탄올은 2020년 6월 Methanex의 Asia Pacific 지역 기준 USD 215/ton이다. 반면에 1,2-프로판다이올 (1,2-propanediol, 1,2-PDO)은 주요 공급자 중 하나인 Dow의 Industrial grade 기준 USD 1,650/ton 이며 작년과 올해 가격인상 공지를 감안하면 꾸준한 가격 인상을 예측할 수 있다. 이처럼 메탄올은 1,2-PDO로 전환 시 약 7.7 배 높은 가격을 가지므로, 고부가화 가능하다.
- [0005] 1,2-PDO가 사용되는 대표적인 예로 불포화 폴리에스터 수지 (Unsaturated polyester resin), 부동액 (Antifreeze), 세제 (Detergent) 등을 들 수 있으며 이외에도 제약, 식품, 화장품, Functional fluid 등의 광범위한 분야에서 활용되는 물질이다. 2019년 기준 1,2-PDO 시장규모는 4.3 billion dollar 규모로 추정되고, 2025년까지 아시아태평양 지역과 중동, 아프리카의 산업성장과 더불어 그 수요량이 증가하여 2025년까지 5.8 billion dollar 규모로 성장할 것으로 기대된다.
- [0006] 1,2-PDO는 전통적으로 프로필렌 옥사이드 (propylene oxide)를 산화시켜 생산하며 이러한 석유화학 기반의 생산 공정은 고온고압일 뿐만 아니라 유독한 중간체와 부산물이 발생한다는 단점을 지닌다. 2000년대 들어 바이오 기반의 1,2-PDO 생산공정이 ADM 등에서 상용화 되고 있으나 원료로 콩이나 옥수수 같은 재생 가능한 공급원 (renewable source)이 이용되었을 뿐 공정 측면에서는 여전히 고온 고압에서 금속 촉매를 이용하고 있다.
- [0007] 미생물 기반의 1,2-PDO 생산 촉매는 상온 상압이라는 공정 측면의 이점을 지니며 다양한 탄소원을 이용 가능하다. 기존의 미생물을 이용한 1,2-PDO 연구는 크게 람노스 (Rhamnose)와 푸코스 (Fucose) 전환과 DHAP 전환으로 나뉜다. 람노스와 푸코스는 고가이기 때문에 산업적 활용이 어렵다. DHAP 전환은 그 기질로 글루코스 (Glucose), 글리세롤 (Glycerol), 자일로스 (Xylose) 등이 이용되었다는 보고는 있으나, 메탄올 (methanol)을 이용한 논문은 거의 전무하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 외래 유전자를 도입하여 1,2-프로판다이올 생합성 경로를 구축하거나, 내재된 유전자를 결실시킨 메틸로박테리움 엑스트르켄스 균주와 2종의 배지를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물을 이용한 결과, 1,2-프로판다이올의 생산이 촉진됨을 확인하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 목적은 메틸영양세균, 제1배지 및 제2배지를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 제1배양 단계 및 제2배양 단계를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 메틸영양세균; 메틸영양세균의 1,2-프로판다이올 생산을 촉진하는 성분을 함유한 2종의 배지;를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 1,2-프로판다이올을 효율적으로 대량 생산하는 생산

방법에 관한 것이다.

- [0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 일 예는 메틸영양세균; 제1배지; 및 제2배지;를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에 있어서 용어 “메틸영양세균 (methylotroph)”은 탄소원을 이용하여 물질대사하는 세균을 의미하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서 메틸영양세균은 메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase, mgsA)를 코딩하는 핵산 서열, 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase, yqhD)를 코딩하는 핵산 서열, 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase, gldA)를 코딩하는 핵산 서열, 포몰레이즈 (formolase, fls)를 코딩하는 핵산 서열 및 디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase, dak)를 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되고, 락토일글루타티온 분해효소 (Lactoylglutathione lyase, gloA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서 용어 “메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase)”는 디하이드록시아세톤 포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP)를 메틸글리옥살 (methylglyoxal, MG)로 전환하는 효소를 의미하는 것일 수 있고, 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 mgsA 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에 있어서 용어 “메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase)”는 메틸글리옥살을 하이드록시아세톤으로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase)를 의미하는 것일 수 있고, 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 yqhD 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에 있어서 용어 “글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase)”는 하이드록시아세톤을 1,2-PDO로 전환하는 효소를 의미하는 것일 수 있고, 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 gldA 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에 있어서 용어 “포몰레이즈 (formolase)”는 포름알데히드를 디하이드록시아세톤 (dihydroxyacetone, DHA)으로 전환시키는 효소를 의미하는 것일 수 있고, 서열번호 11로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 fls 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 있어서 용어 “디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase)”는 디하이드록시아세톤 (dihydroxyacetone, DHA)을 디하이드록시아세톤 포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate)로 전환시키는 효소를 의미하는 것일 수 있고, 서열번호 12으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 사카로미세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 dak1 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에 있어서 용어 “벡터 (vector)”는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 아데노관련 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 또는 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ △z1 또는 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축되는 것일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있고, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축되는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축되는 것일 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL λ 프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로

하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0025] 본 발명의 일 구체예에서, 형질전환체는 재조합 벡터를 적절한 숙주세포에 삽입됨으로써 만드는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서 숙주세포는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포 또는 곤충세포 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에 있어서 숙주세포는 원핵세포로서 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서 숙주세포는 진핵 세포로서 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포 등일 수 있으며, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 숙주 세포 내로의 운반 (도입)되기 위하여, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용하는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서 운반 (도입)은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용하는 것일 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에 있어서 재조합 벡터가 숙주 세포 내로 운반되어 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있으며, 예를 들어, 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 특정 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서 메틸영양세균은 락토일글루타티온 분해효소 (Lactoylglutathione lyase)를 코딩하는 gloA 유전자를 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서 유전자 “gloA”는 MG를 락토일글루타티온으로 전환하는 락토일글루타티온 분해효소 (Lactoylglutathione lyase)를 코딩하는 핵산 서열일 수 있고, 서열번호 17 및 18로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서, 메틸영양세균은 메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase, mgsA)를 코딩하는 핵산 서열, 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase, yqhD)를 코딩하는 핵산 서열 및 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase, gldA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되고, 락토일글루타티온 분해효소(Lactoylglutathione lyase, gloA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예에서, 메틸영양세균은 메틸글리옥살 합성효소 (methylglyoxal synthase, mgsA)를 코딩하는 핵산 서열, 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase, yqhD)를 코딩하는 핵산 서열, 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase, gldA)를 코딩하는 핵산 서열, 포몰레이즈 (formolase, fls)를 코딩하는 핵산 서열 및 디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase, dak)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되고, 락토일글루타티온 분해효소(Lactoylglutathione lyase, gloA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서 제1배지는 탄소원 (carbon source)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서 제1배지는 탄소원 (carbon source), NH₄Cl (Ammonium chloride), MgSO₄ · 7H₂O (Magnesium sulfate), K₂HPO₄ (dipotassium phosphate), NaH₂PO₄ · 2H₂O (Sodium phosphate monobasic dihydrate), Na₂EDTA · 2H₂O (EDTA disodium salt), FeSO₄ · 7H₂O (Ferrous sulfate), ZnSO₄ · 7H₂O (Zinc sulfate), CoCl₂ · 6H₂O (Cobalt

chloride), $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Manganese chloride), H_3BO_3 (Boric acid), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodium molybdate dihydrate), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (copper sulfate) 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Calcium Chloride)를 포함하는 것일 수 있다.

- [0038] 본 발명에 있어서 제1배지에 탄소원은 메탄올 (methanol), 아세테이트 (acetate), 에탄올 (ethanol), 에틸아민 (ethylamine), 피루베이트 (pyruvate) 및 숙시네이트 (succinate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 메탄올일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 탄소원의 농도는 50 내지 200 mM, 50 내지 180 mM, 50 내지 160 mM, 50 내지 140 mM, 70 내지 200 mM, 70 내지 180 mM, 70 내지 160 mM, 70 내지 140 mM, 90 내지 200 mM, 90 내지 180 mM, 90 내지 160 mM, 90 내지 140 mM, 110 내지 200 mM, 110 내지 180 mM, 110 내지 160 mM 또는 110 내지 140 mM일 수 있으며, 예를 들어, 110 내지 140 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 NH_4Cl 의 농도는 20.00 내지 40.00 mM, 20.00 내지 36.00 mM, 20.00 내지 32.00 mM, 24.00 내지 40.00 mM, 24.00 내지 36.00 mM, 24.00 내지 32.00 mM, 28.00 내지 40.00 mM, 28.00 내지 36.00 mM 또는 28.00 내지 32.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 28.00 내지 32.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.60 내지 1.00 mM, 0.60 내지 0.95 mM, 0.60 내지 0.90 mM, 0.60 내지 0.85 mM, 0.65 내지 1.00 mM, 0.65 내지 0.95 mM, 0.65 내지 0.90 mM, 0.65 내지 0.85 mM, 0.70 내지 1.00 mM, 0.70 내지 0.95 mM, 0.70 내지 0.90 mM, 0.70 내지 0.85 mM, 0.75 내지 1.00 mM, 0.75 내지 0.95 mM, 0.75 내지 0.90 mM 또는 0.75 내지 0.85 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.75 내지 0.85 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 K_2HPO_4 의 농도는 6.00 내지 14.00 mM, 6.00 내지 12.00 mM, 6.00 내지 10.00 mM, 8.00 내지 14.00 mM, 8.00 내지 12.00 mM, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 6.00 내지 14.00 mM, 6.00 내지 13.00 mM, 6.00 내지 12.00 mM, 7.00 내지 14.00 mM, 7.00 내지 13.00 mM, 7.00 내지 12.00 mM, 8.00 내지 14.00 mM, 8.00 내지 13.00 mM, 8.00 내지 12.00 mM, 9.00 내지 14.00 mM, 9.00 내지 13.00 mM, 9.00 내지 12.00 mM, 10.00 내지 14.00 mM, 10.00 내지 13.00 mM 또는 10.00 내지 12.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 10.00 내지 12.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.02000 내지 0.08000 mM, 0.02000 내지 0.07500 mM, 0.02000 내지 0.07000 mM, 0.02000 내지 0.06500 mM, 0.02000 내지 0.06000 mM, 0.03000 내지 0.08000 mM, 0.03000 내지 0.07500 mM, 0.03000 내지 0.07000 mM, 0.03000 내지 0.06500 mM, 0.03000 내지 0.06000 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.03000 내지 0.06000 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00700 내지 0.02300 mM, 0.00700 내지 0.02100 mM, 0.00700 내지 0.01900 mM, 0.00700 내지 0.01700 mM, 0.00700 내지 0.01500 mM, 0.00700 내지 0.01300 mM, 0.00800 내지 0.02300 mM, 0.00800 내지 0.02100 mM, 0.00800 내지 0.01900 mM, 0.00800 내지 0.01700 mM, 0.00800 내지 0.01500 mM 또는 0.00800 내지 0.01300 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00800 내지 0.01300 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.01000 내지 0.02000 mM, 0.01000 내지 0.01900 mM, 0.01000 내지 0.01800 mM, 0.01100 내지 0.02000 mM, 0.01100 내지 0.01900 mM, 0.01100 내지 0.01800 mM, 0.01200 내지 0.02000 mM, 0.01200 내지 0.01900 mM 또는 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.01000 내지 0.02000 mM, 0.01000 내지 0.01900 mM, 0.01000 내지 0.01800 mM, 0.01100 내지 0.02000 mM, 0.01100 내지 0.01900 mM, 0.01100 내지 0.01800 mM, 0.01200 내지 0.02000 mM, 0.01200 내지 0.01900 mM 또는 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.02000 내지 0.08000 mM, 0.02000 내지 0.07500 mM, 0.02000 내지 0.07000 mM, 0.02000 내지 0.06500 mM, 0.02000 내지 0.06000 mM, 0.03000 내지 0.08000 mM, 0.03000 내지 0.07500 mM, 0.03000 내지 0.07000 mM, 0.03000 내지 0.06500 mM, 0.03000 내지 0.06000 mM 일 수 있으며, 예를 들어, 0.03000 내지 0.06000 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 H_3BO_3 의 농도는 0.01000 내지 0.02000 mM, 0.01000 내지 0.01900 mM, 0.01000 내지 0.01800 mM, 0.01100 내지 0.02000 mM, 0.01100 내지 0.01900 mM, 0.01100 내지 0.01800 mM, 0.01200 내지 0.02000 mM, 0.01200 내지 0.01900 mM 또는 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.01200 내지 0.01800 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00100 내지 0.00200 mM, 0.00100 내지 0.00190 mM, 0.00100 내지 0.00180 mM, 0.00120 내지 0.00200 mM, 0.00120 내지 0.00190 mM, 0.00120 내지 0.00180 mM, 0.00140 내지 0.00200 mM, 0.00140 내지 0.00190 mM 또는 0.00140 내지 0.00180 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00140 내지 0.00180 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00100 내지 0.00200 mM, 0.00100 내지 0.00190 mM, 0.00100 내지 0.00180 mM, 0.00110 내지 0.00200 mM, 0.00110 내지 0.00190 mM 또는 0.00110 내지 0.00180 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00110 내지 0.00180 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에 있어서 제1배지에 포함되는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.02000 내지 0.08000 mM, 0.02000 내지 0.07500 mM, 0.02000 내지 0.07000 mM, 0.02000 내지 0.06500 mM, 0.02000 내지 0.06000 mM, 0.02000 내지 0.05500 mM, 0.02000 내지 0.05000 mM, 0.02000 내지 0.04500 mM, 0.02000 내지 0.04000 mM, 0.02000 내지 0.03500 mM 일 수 있으며, 예를 들어, 0.02000 내지 0.03500 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에서, 제1배지에 포함되는 메탄올의 농도는 110 내지 140 mM, NH_4Cl 의 농도는 28.00 내지 32.00 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.75 내지 0.85 mM, K_2HPO_4 의 농도는 8.00 내지 10.00 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 10.00 내지 12.00 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.03000 내지 0.06000 mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00800 내지 0.01300 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.01200 내지 0.01800 mM, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.01200 내지 0.01800 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.03000 내지 0.06000 mM, H_3BO_3 의 농도는 0.01200 내지 0.01800 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00140 내지 0.00180 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00110 내지 0.00180 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.02000 내지 0.03500 mM일 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서 제2배지는 탄소원 (carbon source) 및 질소원 (nitrogen source)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서 제2배지는 탄소원 (carbon source), 질소원 (nitrogen source), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnesium sulfate), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Calcium Chloride), Fe-EDTA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (copper sulfate), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Ferrous sulfate), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zinc sulfate), $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Manganese chloride), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cobalt chloride), H_3BO_3 (Boric acid), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sodium molybdate tetrahydrate), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Nickel chloride hexahydrate) EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), Biotin, Folic acid, Thiamine HCl (Thiamine hydrogen chloride), Ca pantothenate, Vitamin B12, Riboflavin 및 Nicotinamide를 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서 제2배지의 탄소원은 메탄올 (methanol), 아세테이트 (acetate), 에탄올 (ethanol), 에틸아민 (ethylamine), 피루베이트 (pyruvate) 및 숙시네이트 (succinate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 메탄올일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 탄소원의 농도는 50 내지 200 mM, 50 내지 180 mM, 50 내지 160 mM, 50 내지 140 mM, 70 내지 200 mM, 70 내지 180 mM, 70 내지 160 mM, 70 내지 140 mM, 90 내지 200 mM, 90 내지 180 mM, 90 내지 160 mM, 90 내지 140 mM, 110 내지 200 mM, 110 내지 180 mM, 110 내지 160 mM 또는 110 내지 140 mM일 수 있으며, 예를 들어, 110 내지 140 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에 있어서 질소원은 KNO_3 (Potassium nitrate)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 질소원은 요소 (Urea), 염화암모늄 (Ammonium chloride; NH_4Cl), 효모 추출물 (Yeast extract) 및 펩톤 (Peptone)으

로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, 요소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0059] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 질소원의 농도는 2.00 내지 14.00 mM, 2.00 내지 12.00 mM, 2.00 내지 10.00 mM, 4.00 내지 14.00 mM, 4.00 내지 12.00 mM, 4.00 내지 10.00 mM, 6.00 내지 14.00 mM, 6.00 내지 12.00 mM, 6.00 내지 10.00 mM, 8.00 내지 14.00 mM, 8.00 내지 12.00 mM, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 2.00 내지 6.00 mM, 2.00 내지 5.50 mM, 2.00 내지 5.00 mM, 2.00 내지 4.50 mM, 2.50 내지 6.00 mM, 2.50 내지 5.50 mM, 2.50 내지 5.00 mM, 2.50 내지 4.50 mM, 3.00 내지 6.00 mM, 3.00 내지 5.50 mM, 3.00 내지 5.00 mM 또는 3.00 내지 4.50 mM일 수 있으며, 예를 들어, 3.00 내지 4.50 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 1.00 내지 3.00 mM, 1.00 내지 2.90 mM, 1.00 내지 2.80 mM, 1.00 내지 2.70 mM, 1.00 내지 2.60 mM, 1.00 내지 2.50 mM, 1.20 내지 3.00 mM, 1.20 내지 2.90 mM, 1.20 내지 2.80 mM, 1.20 내지 2.70 mM, 1.20 내지 2.60 mM, 1.20 내지 2.50 mM, 1.40 내지 3.00 mM, 1.40 내지 2.90 mM, 1.40 내지 2.80 mM, 1.40 내지 2.70 mM, 1.40 내지 2.60 mM, 1.40 내지 2.50 mM, 1.50 내지 3.00 mM, 1.50 내지 2.90 mM, 1.50 내지 2.80 mM, 1.50 내지 2.70 mM, 1.50 내지 2.60 mM 또는 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으며, 예를 들어, 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Fe-EDTA의 농도는 0.00050 내지 0.00300 mM, 0.00050 내지 0.00290 mM, 0.00050 내지 0.00280 mM, 0.00050 내지 0.00270 mM, 0.00070 내지 0.00300 mM, 0.00070 내지 0.00290 mM, 0.00070 내지 0.00280 mM, 0.00070 내지 0.00270 mM, 0.00100 내지 0.00300 mM, 0.00100 내지 0.00290 mM, 0.00100 내지 0.00280 mM 또는 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00700 내지 0.02300 mM, 0.00700 내지 0.02100 mM, 0.00700 내지 0.01900 mM, 0.00700 내지 0.01700 mM, 0.00700 내지 0.01500 mM, 0.00700 내지 0.01300 mM, 0.00800 내지 0.02300 mM, 0.00800 내지 0.02100 mM, 0.00800 내지 0.01900 mM, 0.00800 내지 0.01700 mM, 0.00800 내지 0.01500 mM 또는 0.00800 내지 0.01300 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00800 내지 0.01300 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00050 내지 0.00300 mM, 0.00050 내지 0.00290 mM, 0.00050 내지 0.00280 mM, 0.00050 내지 0.00270 mM, 0.00070 내지 0.00300 mM, 0.00070 내지 0.00290 mM, 0.00070 내지 0.00280 mM, 0.00070 내지 0.00270 mM, 0.00100 내지 0.00300 mM, 0.00100 내지 0.00290 mM, 0.00100 내지 0.00280 mM 또는 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00050 내지 0.00300 mM, 0.00050 내지 0.00290 mM, 0.00050 내지 0.00280 mM, 0.00050 내지 0.00270 mM, 0.00070 내지 0.00300 mM, 0.00070 내지 0.00290 mM, 0.00070 내지 0.00280 mM, 0.00070 내지 0.00270 mM, 0.00100 내지 0.00300 mM, 0.00100 내지 0.00290 mM, 0.00100 내지 0.00280 mM 또는 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.000005 내지 0.000030 mM, 0.000005 내지 0.000029 mM, 0.000005 내지 0.000028 mM, 0.000005 내지 0.000027 mM, 0.000007 내지 0.000030 mM, 0.000007 내지 0.000029 mM, 0.000007 내지 0.000028 mM, 0.000007 내지 0.000027 mM, 0.000010 내지 0.000030 mM, 0.000010 내지 0.000029 mM, 0.000010 내지 0.000028 mM 또는 0.000010 내지 0.000027 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.000010 내지 0.000027 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00010 내지 0.00040 mM, 0.00010 내지 0.00035 mM, 0.00010 내지 0.00030 mM, 0.00010 내지 0.00025 mM, 0.00015 내지 0.00040 mM, 0.00015 내지 0.00035 mM, 0.00015 내지 0.00030 mM 또는 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0068] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 H_3BO_3 의 농도는 0.00010 내지 0.00040 mM, 0.00010 내지 0.00035 mM, 0.00010 내지 0.00030 mM, 0.00010 내지 0.00025 mM, 0.00015 내지 0.00040 mM, 0.00015 내지 0.00035 mM, 0.00015 내지 0.00030 mM 또는 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$ 의 농도는 0.00050 내지 0.00300 mM, 0.00050 내지 0.00290 mM, 0.00050 내지 0.00280 mM, 0.00050 내지 0.00270 mM, 0.00070 내지 0.00300 mM, 0.00070 내지 0.00290 mM, 0.00070 내지 0.00280 mM, 0.00070 내지 0.00270 mM, 0.00100 내지 0.00300 mM, 0.00100 내지 0.00290 mM, 0.00100 내지 0.00280 mM 또는 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00100 내지 0.00270 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 의 농도는 0.000005 내지 0.000030 mM, 0.000005 내지 0.000029 mM, 0.000005 내지 0.000028 mM, 0.000005 내지 0.000027 mM, 0.000007 내지 0.000030 mM, 0.000007 내지 0.000029 mM, 0.000007 내지 0.000028 mM, 0.000007 내지 0.000027 mM, 0.000010 내지 0.000030 mM, 0.000010 내지 0.000029 mM, 0.000010 내지 0.000028 mM 또는 0.000010 내지 0.000027 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.000010 내지 0.000027 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 EDTA의 농도는 0.00040 내지 0.00120 mM, 0.00040 내지 0.00110 mM, 0.00040 내지 0.00100 mM, 0.00050 내지 0.00120 mM, 0.00050 내지 0.00110 mM, 0.00050 내지 0.00100 mM, 0.00060 내지 0.00120 mM, 0.00060 내지 0.00110 mM 또는 0.00060 내지 0.00100 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00060 내지 0.00100 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Biotin의 농도는 0.000030 내지 0.000100 mM, 0.000030 내지 0.000095 mM, 0.000030 내지 0.000090 mM, 0.000040 내지 0.000100 mM, 0.000040 내지 0.000095 mM 또는 0.000040 내지 0.000090 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.000040 내지 0.000090 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Folic acid의 농도는 0.000030 내지 0.000100 mM, 0.000030 내지 0.000095 mM, 0.000030 내지 0.000090 mM, 0.000040 내지 0.000100 mM, 0.000040 내지 0.000095 mM 또는 0.000040 내지 0.000090 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.000040 내지 0.000090 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Thiamine HCl의 농도는 0.00010 내지 0.00040 mM, 0.00010 내지 0.00035 mM, 0.00010 내지 0.00030 mM, 0.00010 내지 0.00025 mM, 0.00015 내지 0.00040 mM, 0.00015 내지 0.00035 mM, 0.00015 내지 0.00030 mM 또는 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00015 내지 0.00025 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Ca pantothenate의 농도는 0.00005 내지 0.00040 mM, 0.00005 내지 0.00035 mM, 0.00005 내지 0.00030 mM, 0.00005 내지 0.00025 mM, 0.00008 내지 0.00040 mM, 0.00008 내지 0.00035 mM, 0.00008 내지 0.00030 mM 또는 0.00008 내지 0.00025 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00008 내지 0.00025 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Vitamin B12의 농도는 0.00040 내지 0.00120 mM, 0.00040 내지 0.00110 mM, 0.00040 내지 0.00100 mM, 0.00050 내지 0.00120 mM, 0.00050 내지 0.00110 mM, 0.00050 내지 0.00100 mM, 0.00060 내지 0.00120 mM, 0.00060 내지 0.00110 mM 또는 0.00060 내지 0.00100 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00060 내지 0.00100 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Riboflavin의 농도는 0.00005 내지 0.00040 mM, 0.00005 내지 0.00035 mM, 0.00005 내지 0.00030 mM, 0.00005 내지 0.00025 mM, 0.00008 내지 0.00040 mM, 0.00008 내지 0.00035 mM, 0.00008 내지 0.00030 mM 또는 0.00008 내지 0.00025 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00008 내지 0.00025 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에 있어서 제2배지에 포함되는 Nicotinamide의 농도는 0.00030 내지 0.00100 mM, 0.00030 내지 0.00080 mM, 0.00030 내지 0.00060 mM, 0.00040 내지 0.00100 mM, 0.00040 내지 0.00080 mM 또는 0.00040 내지 0.00060 mM일 수 있으며, 예를 들어, 0.00040 내지 0.00060 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명에 있어서 제2배지는 KH_2PO_4 (potassium biphosphate), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Sodium phosphate dibasic

heptahydrate)를 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0080] 본 발명에 있어서 제2배지가 KH_2PO_4 를 더 포함하는 경우, KH_2PO_4 의 농도는 1.00 내지 3.00 mM, 1.00 내지 2.90 mM, 1.00 내지 2.80 mM, 1.00 내지 2.70 mM, 1.00 내지 2.60 mM, 1.00 내지 2.50 mM, 1.20 내지 3.00 mM, 1.20 내지 2.90 mM, 1.20 내지 2.80 mM, 1.20 내지 2.70 mM, 1.20 내지 2.60 mM, 1.20 내지 2.50 mM, 1.40 내지 3.00 mM, 1.40 내지 2.90 mM, 1.40 내지 2.80 mM, 1.40 내지 2.70 mM, 1.40 내지 2.60 mM, 1.40 내지 2.50 mM, 1.50 내지 3.00 mM, 1.50 내지 2.90 mM, 1.50 내지 2.80 mM, 1.50 내지 2.70 mM, 1.50 내지 2.60 mM 또는 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으며, 예를 들어, 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 본 발명에 있어서 제2배지에 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 더 포함하는 경우, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 1.00 내지 3.00 mM, 1.00 내지 2.90 mM, 1.00 내지 2.80 mM, 1.00 내지 2.70 mM, 1.00 내지 2.60 mM, 1.00 내지 2.50 mM, 1.20 내지 3.00 mM, 1.20 내지 2.90 mM, 1.20 내지 2.80 mM, 1.20 내지 2.70 mM, 1.20 내지 2.60 mM, 1.20 내지 2.50 mM, 1.40 내지 3.00 mM, 1.40 내지 2.90 mM, 1.40 내지 2.80 mM, 1.40 내지 2.70 mM, 1.40 내지 2.60 mM, 1.40 내지 2.50 mM, 1.50 내지 3.00 mM, 1.50 내지 2.90 mM, 1.50 내지 2.80 mM, 1.50 내지 2.70 mM, 1.50 내지 2.60 mM 또는 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으며, 예를 들어, 1.50 내지 2.50 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 일 구체예에서, 제2배지는 K_2HPO_4 (Dipotassium hydrogen phosphate) 및 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodium phosphate monobasic dihydrate)를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명의 일 구체예에서, 제2배지에 포함되는 K_2HPO_4 의 농도는 6.00 내지 14.00 mM, 6.00 내지 12.00 mM, 6.00 내지 10.00 mM, 8.00 내지 14.00 mM, 8.00 내지 12.00 mM, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 8.00 내지 10.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명의 일 구체예에서, 제2배지에 포함되는 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 6.00 내지 14.00 mM, 6.00 내지 13.00 mM, 6.00 내지 12.00 mM, 7.00 내지 14.00 mM, 7.00 내지 13.00 mM, 7.00 내지 12.00 mM, 8.00 내지 14.00 mM, 8.00 내지 13.00 mM, 8.00 내지 12.00 mM, 9.00 내지 14.00 mM, 9.00 내지 13.00 mM, 9.00 내지 12.00 mM, 10.00 내지 14.00 mM, 10.00 내지 13.00 mM 또는 10.00 내지 12.00 mM일 수 있으며, 예를 들어, 10.00 내지 12.00 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0085] 본 발명의 일 실시예에서, 제2배지에 포함되는 메탄올의 농도는 110 내지 140 mM, KNO_3 의 농도는 8.00 내지 10.00 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 3.00 내지 4.50 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 1.50 내지 2.50 mM, Fe-EDTA의 농도는 0.00100 내지 0.00270 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00800 내지 0.01300 mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00100 내지 0.00270 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00100 내지 0.00270 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.000010 내지 0.000027 mM, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00015 내지 0.00025 mM, H_3BO_3 의 농도는 0.00015 내지 0.00025 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.00100 내지 0.00270 mM, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.000010 내지 0.000027 mM, EDTA의 농도는 0.00060 내지 0.00100 mM, Biotin의 농도는 0.000040 내지 0.000090 mM, Folic acid의 농도는 0.000040 내지 0.000090 mM, Thiamine HCl의 농도는 0.00015 내지 0.00025 mM, Ca pantothenate의 농도는 0.00008 내지 0.00025 mM, Vitamin B12의 농도는 0.00060 내지 0.00100 mM, Riboflavin의 농도는 0.00008 내지 0.00025 mM, Nicotinamide의 농도는 0.00040 내지 0.00060 mM, KH_2PO_4 의 농도 1.50 내지 2.50 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 1.50 내지 2.50 mM일 수 있다.
- [0086] 본 발명에 있어서 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물은 메틸영양세균의 1,2-PDO Max titer에 도달하는 시간을 감소시키거나, 또는 시간을 감소시키면서 1,2-PDO Max titer 값을 향상시킴으로써, 1,2-프로판다이올의 생산을 촉진할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 다른 일 예는 다음의 단계를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법에 관한 것이다:
- [0088] 탄소원 (carbon source)을 포함하는 제1배지에서, 메틸영양세균을 배양하는 제1배양 단계; 및
- [0089] 탄소원 (carbon source) 및 질소원 (nitrogen source)을 포함하는 제2배지에서, 상기 제1배양 단계에서 배양한 메틸영양세균을 배양하는 제2배양 단계.
- [0090] 본 발명에 있어서 제1배양 단계는 메틸영양세균의 대량 배양을 위하여, 또는 일정한 배양액 조건 하에서 일정한

메틸영양세균을 얻기 위하여 상기 메틸영양세균을 미리 배양하는 것 (전배양)을 의미할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명에 있어서 제1배양 단계는 제1배지를 이용하는 것일 수 있다.

[0092] 본 발명에 있어서 제1배양 단계는 5 내지 40 °C, 5 내지 35 °C, 10 내지 40 °C, 10 내지 35 °C, 15 내지 40 °C, 15 내지 35 °C, 20 내지 40 °C, 20 내지 35 °C, 25 내지 40 °C 또는 25 내지 35 °C의 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 25 내지 35 °C의 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 메틸영양세균의 최적 성장 온도 (optimal growth temperature)를 고려하여 적절한 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있다.

[0093] 본 발명에 있어서 제1배양 단계는 세균 성장 곡선 (bacterial growth curve)을 기준으로, 메틸영양세균이 중기-지수상 (Mid-exponential phase)과 초기-정지상 (Early-Stationary phase)에 도달할 때까지 메틸영양세균을 배양하는 것일 수 있다.

[0094] 본 발명에 있어서 제2배양 단계는 메틸영양세균이 1,2-프로판다이올을 생산 하기 위하여 메틸영양세균을 배양하는 것 (본배양)을 의미할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0095] 본 발명에 있어서 제2배양 단계는 제2배지를 이용하는 것일 수 있다.

[0096] 본 발명에 있어서 제2배양 단계는 5 내지 40 °C, 5 내지 35 °C, 10 내지 40 °C, 10 내지 35 °C, 15 내지 40 °C, 15 내지 35 °C, 20 내지 40 °C, 20 내지 35 °C, 25 내지 40 °C 또는 25 내지 35 °C의 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 25 내지 35 °C의 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 메틸영양세균의 최적 성장 온도 (optimal growth temperature)를 고려하여 적절한 온도 조건 하에서 수행되는 것일 수 있다.

[0097] 본 발명에 있어서 제2배양 단계는 회분식 배양 (batch culture)으로서, 제2배지에 포함되는 탄소원이 고갈되지 않도록, 탄소원이 고갈된 경우, 탄소원을 제2배지와 혼합하는 탄소원 혼합 단계를 포함할 수 있다.

[0098] 본 발명의 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법은 메틸영양세균이 일정한 속도로 1,2-PDO를 생산하지 않고, 세균 성장 곡선 (bacterial growth curve)을 기준으로, 중기-지수상 (Mid-exponential phase) 이후부터 빠르게 1,2-PDO를 생산한 후, 메탄올이 고갈되는 부근에서 최대 1,2-PDO titer를 나타내는 것을 고려하여, 제2배양 단계가 탄소원 혼합 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0099] 본 발명에 있어서 탄소원 혼합 단계는 제2배양 단계 전반에 걸쳐 제2배지의 탄소원이 고갈되지 않게 함으로써 1,2-PDO titer가 낮아지지 않도록 유지시킬 수 있다.

[0100] 본 발명에 있어서 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법은 제2배양 단계 이후, 제2배지와 pH 조절제를 혼합하는 pH 조절 단계를 더 포함할 수 있다.

[0101] 본 발명에 있어서 pH 조절제는 포름산 (HCOOH), 젖산 ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), 아세트산 (CH_3COOH), 프로피온산 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), 옥살산 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 및 글리콜산 (CH_2OHCOOH)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, 포름산일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0102] 또한, 본 발명에 있어서 pH 조절제는 염산 (HCl), 질산 (HNO_3), 황산 (H_2SO_4) 및 인산 (H_3PO_4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, 염산일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 또한, 본 발명에 있어서 pH 조절제는 수산화나트륨 (NaOH), 수산화칼륨 (KOH), 수산화칼슘 [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] 및 수산화바륨 [$\text{Ba}(\text{OH})_2$]으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, 수산화나트륨일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0104] pH 조절 단계는 제2배지와 pH 조절제를 혼합함으로써, 제2배양 단계에서 메틸영양세균이 생산한 1,2-PDO의 분해를 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0105] 본 발명은 메틸영양세균; 메틸영양세균의 1,2-프로판다이올 (1,2-PDO)의 생산을 촉진하는 성분을 함유한 배지를 포함하는 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 1,2-프로판다이올 생산 촉진 방법에 관한 것으

로, 본 발명의 조성물 및 생산 방법을 이용하면 1,2-프로판다이올을 신속하고 효율적으로 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0106]

도 1은 본 발명의 일 구현예에 따라 메틸글리옥살 합성효소(methylglyoxal synthase, mgsA) 및 글리세롤 탈수소 효소(glycerol dehydrogenase, gldA)를 활성화시키고, 메틸글리옥살 환원효소(methylglyoxal reductase) 또는 락탈알데히드 환원효소(lactaldehyde reductase, fucO)를 활성화시킴으로써 구축한 1,2-프로필렌글라이콜 (propanediol, PDO) 생합성 경로의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 1,2-PDO 생합성 경로의 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일 실험예에 따라 제1배양 단계 (전배양), 제2배양 단계 (본배양) 모두 제2배지 (NMS 배지)를 이용하여 MPG111 균주를 배양함으로써 1,2-프로판다이올의 생산을 측정한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실험예에 따라 MPG111 균주를 배양할 때, 제1배양 단계, 제2배양 단계 모두 제2배지를 이용한 것과, 제1배양 단계, 제2배양 단계 모두 제1배지를 이용한 것의 1,2-프로판다이올 생산량에 대한 상대 역가 (relative titer)를 나타낸 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 일 실험예에 따라 제1배양 단계는 제1배지를 사용하고, 제2배양 단계는 제2배지를 사용하여 MPG111 균주를 배양함으로써 1,2-프로판다이올의 생산을 측정한 그래프이다.

도 5b는 본 발명의 일 실험예에 따라 제1배양 단계는 제1배지를 사용하고, 제2배양 단계는 제2배지를 사용하여 MPG001 균주를 배양함으로써 1,2-프로판다이올의 생산을 측정한 그래프이다.

도 5c는 본 발명의 일 실험예에 따라 제1배양 단계는 제1배지를 사용하고, 제2배양 단계는 제2배지를 사용하여 MPG011 균주를 배양함으로써 1,2-프로판다이올의 생산을 측정한 그래프이다.

도 5d는 본 발명의 일 실험예에 따라 제1배양 단계는 제1배지를 사용하고, 제2배양 단계는 제2배지를 사용하여 MPG101 균주를 배양함으로써 1,2-프로판다이올의 생산을 측정한 그래프이다.

도 6a는 본 발명의 일 실험예에 따라, 20 °C의 온도 조건으로 전배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 6b는 본 발명의 일 실험예에 따라, 25 °C의 온도 조건으로 전배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 6c는 본 발명의 일 실험예에 따라, 30 °C의 온도 조건으로 전배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 6d는 본 발명의 일 실험예에 따라, 35 °C의 온도 조건으로 전배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 6e는 전배양 온도 30 °C Average Production_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Production_{MAX} 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 6f는 전배양 온도 30 °C Average Productivity_{atMAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Productivity_{atMAX} 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 일 실험예에 따라, 20 °C의 온도 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 일 실험예에 따라, 25 °C의 온도 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 7c는 본 발명의 일 실험예에 따라, 30 °C의 온도 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 7d는 본 발명의 일 실험예에 따라, 35 °C의 온도 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 7e는 본배양 온도 30 °C Average Production_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Production_{MAX} 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 7f는 본배양 온도 30 °C Average Productivity_{atMAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Productivity_{atMAX} 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 8a는 비교예 1의 KNO₃ (Control)를 포함하는 제2배지에서 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 8b는 실시예 2의 KNO₃ (Minimal media)를 포함하는 제2배지에서 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

다.

도 8c는 실시예 1의 요소 (Minimal media)를 포함하는 제2배지에서 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 8d는 실시예 3의 염화암모늄 (Minimal media)을 포함하는 제2배지에서 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 8e는 실시예 1 내지 3, 비교예 1 내지 3의 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 후 Average Production_{MAX}를 나타낸 그래프이다.

도 8f는 실시예 1 내지 3, 비교예 1 내지 3의 조건으로 본배양하여 1,2-PDO 생산을 측정한 후 Average Productivity_{atMAX} 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 9a는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양시 제2배지가 60 mM 메탄올을 포함하는 경우 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 9b는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양시 제2배지가 125 mM 메탄올을 포함하는 경우 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 9c는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양시 제2배지가 185 mM 메탄올을 포함하는 경우 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 9d는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양시 제2배지가 250 mM 메탄올을 포함하는 경우 1,2-PDO 생산을 측정한 그래프이다.

도 9e는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양시 제2배지에 포함되는 메탄올 농도에 따른 Production_{Max} 및 Productivity_{atMAX}의 상대값을 나타낸 그래프이다.

도 10a는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양 완료 후 아무런 pH 조절제를 제2배지에 첨가하지 않아 1,2-PDO가 분해됨을 확인한 그래프이다.

도 10b는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양 완료 후 50 mM 포름산을 제2배지에 첨가하여 1,2-PDO 분해가 억제되는 것을 확인한 그래프이다.

도 10c는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양 완료 후 25 mM 포름산 (Formic acid)을 제2배지에 첨가하여 1,2-PDO 분해가 억제되는 것을 확인한 그래프이다.

도 10d는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양 완료 후 25 mM 수산화나트륨 (Sodium hydroxide)을 제2배지에 첨가하여 1,2-PDO 분해가 억제되는 것을 확인한 그래프이다.

도 10e는 본 발명의 일 실험예에 따라, 본배양 완료 후 25 mM 염산 (Hydrochloric acid)을 제2배지에 첨가하여 1,2-PDO 분해가 억제되는 것을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0108] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0110] 제조예 1. 메틸영양세균의 1,2-프로판다이올 (1,2-PDO) 생합성 경로 구축

[0111] 제조합 호스트(Host)로는 메탄올을 탄소원으로 이용 가능하며 대사작용이 알려져 있고 유전자 조작 툴이 개발되어 있는 메틸로박테리움 엑스토르퀼렌스 (Methylobacterium extorquens) AM1 를 사용하였다. M. extorquens AM1 wild type (야생형)은 1,2-PDO를 생산하지 못하므로, 외래 유전자를 도입하여 1,2-PDO 생합성 경로를 도 1과 같이 구축하였다. 파란색으로 표시한 화살표는 외래 유전자를 도입한 경로를 나타낸 것이다.

[0112] 1,2-PDO 생산 경로는 하이드록시아세톤 (hydroxyacetone)을 거치는 경로와 L-락트알데히드 (lactaldehyde)를 거치는 경로가 있다. 하이드록시아세톤을 거치는 경로 또는 L- 락트알데히드를 거치는 경로를 지닌 재조합 균주를 제작하였다.

[0114] 1-1. 하이드록시아세톤 경로를 지닌 재조합 균주의 제조

[0115] 하이드록시아세톤을 거치는 경로는 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis) 유래의 디하이드록시아세톤 포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP)를 메틸글리옥살 (methylglyoxal, MG)로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 합성효소(synthase)를 코딩하는 mgsA 유전자, 대장균 (Escherichia coli) 유래의 MG를 하이드록시아세톤으로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 환원효소 (methylglyoxal reductase)를 코딩하는 yqhD 유전자, 대장균 유래의 하이드록시아세톤을 1,2-PDO로 전환하는 효소인 글리세롤 탈수소효소 (glycerol dehydrogenase)를 코딩하는 gldA 유전자를 pMEV 벡터에 도입하여, pMEV::mgsA::yqhD::gldA 플라스미드 벡터를 구축하였다.

[0116] pMEV 벡터의 서열정보는 서열번호 1과 같다. mgsA 유전자의 서열정보는 서열번호 2, yqhD 유전자의 서열정보는 서열번호 3, gldA 유전자의 서열정보는 서열번호 4와 같으며 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

서열 번호	명칭	서열
2	mgsA gene nucleotide sequence	ATGAAAATTGCTTTGATCGCGCATGACAAGAAAAACAGGATATGGTTCAATTTACGACTGCCTATCGGGATATTTTAAAG AATCATGATCTATACGCAACCGGAACACAGGGTTGAAAATTCATGAGGCGACAGGCTTCAAATGAACGTTTTCAATCC GGCCCTTTAGGGGAGACCAGCAAATCGGTGCACTGATCGCTGCCAATGCACTCGATCTTGTCATTTTTTGGCGGACCCG CTGACCGCGCAGCCGATGAACCGGATGTCTCGGCATTAATCCGTTTATGTGATGTGTATTCCATTCCGCTCGCCACAAT ATGGGTACTGCGGAAATCTTGTGCGCACACTTGATGAAGGTGTTTCGAATTCGGTGACCTTCTTCGGGGAGAAGAGCCG AATGTATAA
3	yqhD gene nucleotide sequence	ATGAACAACCTTAATCTGCACACCCCAACCCGCATCTGTTTGGTAAAGGCGCAATCGCTGGTTTACGCGAACAATTCCT CACGATGCTCGCGTATTGATTACCTACGCGCGCGCAGCGTGAAAAAACCGGCTTCTCGATCAAGTTCTGGATGCCCTG AAAGGCATGGACGTGCTGGAATTTGGCGGTATTGAGCCAAACCCGGCTTATGAAACGCTGATGAACGCGGTGAAACTGGTT CGCGAACAGAAAGTGACTTTCCTGCTGGCGGTGGCGGCGGTCTGTACTGGACGCGCACCAAAATTTATCGCCGACGCGCT AACTATCCGAAAATATCGATCCGTGGCACATTCTGCAACGGGCGGTAAAGAGATTAAGAGCGCCATCCCGATGGGCTGT GTGCTGACGCTGCCAGCAACCGGTTCAGAATCCAACGCGAGCGCGGTGATCTCCCGTAAAACACAGGCGACAAGCAGGCG TTCCATTCTGCCCATGTTGAGCCGATTTGCGGTGCTCGATCCGTTTATACCTACACCTGCGCCGCGGTCAGGTGGCT AACGGCGTAGTGGACGCCTTTGTACACACCGTGGAACAGTATGTTACCAACCGGTTGATGCCAAAATTCAGGACCGTTTC GCAGAAGGCATTTTGTGACGCTAATCGAAGATGGTCCGAAAGCCCTGAAAGAGCCAGAAAACTACGATGTGCGCGCCAAC GTCATGTGGGCGGCGACTCAGGCGCTGAACGTTTATTGGCGCTGGCGTACCGCAGGACTGGGCAACGCATATGCTGGGC CACGAACTGACTGCGATGCACGGTCTGGATCACGCGCAACACTGGCTATCGTCTGCCTGCACTGTGGAATGAAAAACGC GATACCAAGCGCGTAAGCTGCTGCAATATGCTGAACGCGTCTGGAACATCACTGAAGGTTCCGATGATGAGCGTATTGAC GCCGCGATTGCCGCAACCCGCAATTTCTTTGAGCAATTAGGCGTGCCGACCCACCTCTCCGACTACGGTCTGGACGGCAGC TCCATCCCGGCTTTGTGAAAAAACTGGAAGAGCACGGCATGACCAACTGGGCGAAAAATCATGACATTACGTTGGATGTC AGCCGCGGTATATACGAAGCCGCCGCTAA
4	gldA gene nucleotide sequence	ATGGACCGCATTATTAATCACCGGGTAAATACATCCAGGCGCTGATGTGATTAATCGTCTGGGCGAATACCTGAAGCCG CTGGCAGAACGCTGGTTAGTGGTGGGTGACAAATTTGTTTAGGTTTGTCTCAATCCACTGTCGAGAAAAAGCTTTAAAGAT GCTGGACTGGTAGTAGAAATTGCGCCGTTTGGCGGTGAATGTTTCGCAAAATAGATCGACCGTCTGCGTGGCATCGCGGAG ACTGCGCAGTGTGGCGCAATTCTCGGTATCGGTGGCGGAAAAACCTCGATACTGCCAAGCACTGGCACATTTATGGGT GTTCCGGTAGCGATCGACCGACTATCGCCTCTACCGATGACCGTGCAGCGCATTGTCTGTTATCTACACCGATGAGGGT GAGTTTGACCGCTATCTGCTGTTGCCAAATAACCCGAATATGGTCATTGTGACACCAAAATCGTCTGGCGCACCTGCA CGTCTGTTAGCGGCGGGTATCGGCGATGCGTGGCAACCTGGTTTGAAGCGCGTGCTGCTCTCGTAGCGGCGCGACCA ATGGCGGGCGCAAGTGCACCCAGGCTGCGTGGCACTGGCTGAAGTGTGCTACAACACCTGCTGGAAGAAGGCGAAAA GCGATGCTTGTGCGCAACAGCATGTAGTGAATCCGCGCTGGAGCGCGTGATTGAAGCGAACACCTATTGAGCGGTGTT GGTTTTGAAAGTGGTGGTCTGGCTGCGCGCACGCAAGTGCATAACGGCCTGACCGCTATCCCGGACGCGCATCACTATTAT CACGGTGAAAAAGTGGCATTCGGTACGCTGACGCGAGTGGTTCTGGAATAATGCGCGGTGGAGGAAATCGAAACCGTAGCT GCCCTTAGCCATGCGGTAGGTTTGCCAAATACTCTCGCTCAACTGGATATTAAGAAGATGTCCCGCGGAAAAATGCGAATT GTGGCAGAAGCGGCATGTGTCAGAAAGTGAAACCATTCACAACATGCCTGGCGGCGCGACGCCAGATCAGGTTTACGCCGCT CTGCTGGTAGCCGACAGTACGGTCAAGGTTTCTGCAAGAGTGGGAATAA

[0118] 균주 제작은 인퓨전 (Infusion) 효소를 이용하여 클로닝 (Multi-insert Cloning)하였으며 제한효소로는 EcoRI
과 SacI을 이용하였다. M. extorquens AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA 균주 (MPG001)의 클로닝에 사용한 프라이
머는 서열번호 5 내지 10으로, 하기 표 2와 같다. 밀줄 친 서열은 리보솜 결합부위 (ribosome binding site,
RBS)이다.

표 2

서열 번호	명칭	서열
5	RBS_F_primer_1	GAGAGACAGCGAATTCCCGCGAGGGAATCCCAAAGGCCAGGTATTTATGAAAATTGCTTTGATCGC
6	RBS_R_primer_1	TGGGTCTATTGGGAGTTATACATTCGGCTCTTCTCCC
7	RBS_F_primer_2	CTCCCAATAGACCCAAAGGCGGTAGAGAAATGAACAACCTTAATCTGCACACCC
8	RBS_R_primer_2	TTGCGCTTAGTTGCCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATA
9	RBS_F_primer_3	GGCAACTAAGCGCAAAGATCGAGGTAATAAATGGACCGCATTATTCAATCA
10	RBS_R_primer_3	CGGGGCTGGCTTAAGAGCTCTTATTCCTACTCTTGCAGGAA

1-2. DHAP 흐름을 증가시킨 재조합 균주의 제조

DHAP는 *M. extorquens* AM1의 대사산물 (metabolite)이자 앞서 삽입한 1,2-PDO 생합성 경로의 전구체로 메틸글리옥살 (Methylglyoxal, MG) 생합성에 의해 메틸글리옥살로 전환된다. *M. extorquens* AM1이 탄소원인 메탄올을 DHAP로 전환시키기 위해서는 복잡한 단계를 거쳐야 한다.

이에 보다 직접적인 DHAP 합성 경로를 도입하여 DHAP 흐름 (flux)을 증진시켰다. *M. extorquens* AM1은 풍부한 포름알데히드 (formaldehyde) 흐름을 지니므로 포름알데히드를 디하이드록시아세톤 (dihydroxyacetone, DHA)으로 전환시키는 효소 포몰레이즈 (Formolase) 및 DHA를 디하이드록시아세톤 포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate)로 전환시키는 효소 디하이드록시아세톤 인산화효소 (dihydroxyacetone kinase)를 과발현시켰다.

포몰레이즈는 새로운 탄소 동화 경로 (carbon assimilation pathway)를 가능케하는 관점에서는 논문이 보고되었지만 이처럼 특정 물질을 생산하는 목적으로 이용된 케이스는 보고된 바가 없으며 *E. coli* 이외의 균주에서 포몰레이즈를 작동시킨 전례는 없는 것으로 추정된다.

포몰레이즈를 코딩하는 유전자 *fls*는 AM1에 맞춰 코돈 최적화 (codon optimization)시켰다. 디하이드록시아세톤 인산화효소를 코딩하는 유전자는 다양하며 이 연구에서는 사카로미세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 *dak1* 유전자를 사용하였다. 기존에 구축한 플라스미드 pMEV::mgsA::yqhD::gldA에 *fls*와 *dak1*을 추가로 도입하여 새로운 플라스미드 pMEV::mgsA::yqhD::gldA::fls::dak1를 구축하였고 이 플라스미드를 지닌 *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA::fls::dak1 균주 (MPG011)를 준비하였다.

코돈 최적화된 *fls* 유전자의 서열정보는 서열번호 11, *dak1* 유전자의 서열정보는 서열번호 12와 같으며 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

서열 번호	명칭	서열
11	codon optimized fls gene nucleotide sequence	ATGGCCATGATCACGGGCGGGAGCTGGTCTGCGCACGCTGATCAAGGCGGGTGTGAGCACCTCTTTGGTCTCCAC GGTATCCACATCGACACCATCTTCCAGGCTGCTGGACCATGATGTCCGATCATCGACACCGCCACGAGGCGGCA GCCGGACATGCGGCGGAAGGCTACGCCCGCGCGGCGCAAGCTCGGCGTTCGGCTTGTGACGGCGGGCGGGCTTC ACCAACGCGGTGACCCGATCGCCAATGCCCGCACCGACCGACGCGGCTCTCTTCTTACCGGCTCGGGCGCCCTC AGGGATGACGAGACGAACACCCTCCAGGCGGGGATCGACCAGGTTCGGATGGCCGCCCTATACCAAGTGGGCCCAT CGGGTAATGGCCACCGAACACATCCCTCGGCTGGTATGACAGGCGATTTCGCGCCGCGTGAAGCGCCCCCGGGCCA GTTCTGCTCGACCTCCCGTGGGACATCCTCATGAACCAGATTGACGAAGATAGCGTCATCATCCGGACCTCGTGCTG TCTGCCACGGCGCGCACCCCGATCCCGGGACCTCGATCAGGCCCTGGCGCTGCTCCGCAAGGCCGAGCGTCCGGTT ATCGTTCTGGGAGTGAAGCCAGCGCACGGCCGAAAGACGGCCCTCTCGGCTTCGTCGGGCCACGGGCGTGCCG GTCTTCGCGACTATGAAGGCTCAGTATGTGTGCGGGCTTCGGACGCCATGCGGGGCGGCTGGTCCAGAACCTG TACAGCTTCGCTAAAGCGGACGCCGCGCCGACCTGGTGCTCATGTGGGCGCGCTTCGGCTGAACACGGGCCAC GGCAGCGCCAGCTGATCCCGACATCGGCCAGGTATCCAGGTTCGACCCGACGCTGCGAGCTGGGCCGCTGCGAG GGCATCGCGCTTGGCATCGTCGCGACGTGGGCGGCACCATCGAGGCCCTCGCGCAGGCCACCGCCAGGACGCGCG TGGCCGACCGCGGCGACTGGTGCGCAAGGTACCGACCTCGCCAGGAGCGCTACGCGTCGATCGCGCCAAGTCC TCGTCCGAGCAGCCCTGCACCCCTTCCACGCTCGCAGGTATCGCCAAGCACAGTGCAGCGGGCGGTGACGGTCTGTG GCCGACGGCGGGTGAACCTATCTGTGGTGTCCGAGGTGATGAGCGGTGTGAAGCGGGCGGCTTCTCTGCCACGGC TACCTGAACCTCATGGGCTCGGCTTCGGACCGCGCTCGGCGCCAGGTTCGCGACCTGGAGGCCGCGCGCGCACG ATCCTCGTGACCGGCGACGGCTCGTGGGCTACTCCATCGGCGAGTTCGACACCTGGTCCGGAAGCAGCTGCCGCTG ATCGTGATCATATGAACAACAGTCGTGGGGTGGACCCCTCCACTTCCAGCAGTTCGCGGTTCGGCCGAAACCGCGTG ACCGGCACGCGCTCGAGAACGGCTCGTACCACGGCGTCGCCGCGGCTTCGGCGCCGACGGCTACCAGTCGACTCG GTCGAGTCGTTACGCGCGCCCTCGCCAGGCCCTGGCCACAACCGCCCGGCTGCATCAACGTCGCGGTTCGCGCTC GACCCCATCCCGCGGAGGAGCTATCCTCATCGCATGGACCCGTTTCGCGCGACGACCGAGAACCTCTACTTCCAG TCCGCGCCTAA
12	dak1 gene nucleotide sequence	ATGTCCGCTAAATCGTTTGAAGTACAGATCCAGTCAATTCAAGTCTCAAAGGGTTGCGCTTGCTAACCCCTCCATT ACGCTGGTCCCTGAAGAAAAAATTCTCTCAGAAAGACCGATTCCGACAAGATCGCATTAATTTCTGGTGGTGGTAGT GGACATGAACCTACACACGCGGTTTCATTGGTAAGGGTATGTTGAGTGGCGCGGTGGTGGCGAAATTTTGCATCC CCTCAACAAAAACAGATTTTAAATGCAATCCGTTTAGTCAATGAAAAATGCGTCTGGCGTTTATTTGATTTGTAAGAAC TACACAGGTGATGTTTTCATTTTGGTCTGTCCGCTGAGAGAGCAAGAGCCCTGGGTATTAACGTCCGCGTTGCTGTC ATAGGTGATGATGTTGAGTTGGCAGAGAAAAAGGTGGTATGGTTGGTAGAAGAGCATTGGCAGGTACCGTTTGGTT CATAAGATTGTAGGTGCTTCGAGAAGAATATCTAGTAAGTATGGCTTAGACGGTACAGCTAAAGTGGCTAAAAAT ATCAACGACAATTGGTGACCATTTGATCTCTTTAGACCATTTGTAAGTTCTTGGCAGGAAATTCGAAAGTGAATTA AACGAAAAACAAATGGAATTGGGTATGGGTATTCATAACGAACCTGGTGTGAAAGTTTAGACCTATTCTCTTACC GAAGACTTGATCTCAAGTATATGTACCAAACTATTGGATCCAAACGATAAGGATAGAGCTTTTGTAAAGTTTGAT GAAGATGATGAAGTTGCTTGTAGTTAACAATCTCGCGGTGTTTCTAATTTTGTATAGTTCTATCACTTCCAAA ACTACGATTCTTAAAGGAAAAATACAACATAACCCCGTTCAAACAATTGCTGGCACATTGATGACCTCCTTCAAT GGTAATGGGTTGAGTATCACATTACTAAACGCCACTAAGGCTACAAGGCTTTGCAATCTGATTTGAGGAGATCAAA TCAGTACTAGACTTGTGAACGCATTACGAACGCACCGGCTGGCCAATTGCAGATTTTGAAAAGACTTTCGCCCA TCTGTTAACGATGACTTGTACATAATGAAGTAACAGCAAAAGGCCGTCGGTACCTATGACTTTGACAAGTTTGTGTAG TGGATGAAGAGTGGTGTGAACAAGTTATCAAGAGCGAACCGCACATTACGGAAGTACGAATCAAGTTGGTGATGGT GATTGTGGTTACACTTTAGTGGCAGGAGTTAAAGGCATACCGGAAACCTTGACAAGCTGTCGAAGGACTCATTATCT CAGGCGGTGCCCCAAATTTAGATTTCATTGAAGGCTCAATGGGAGGTACTTCTGGTGGTTTATATTCTATTCTTTG TCGGGTTTTTCACACGGATTAATTCAGGTTTGTAAATCAAAGGATGAACCCGTCATAAGGAAATTTGGGCTAAGTCA CTCGGAATTGCATTGGATACTTTATACAAATATACAAAGGCAAGGAAGGGATCATCCACCATGATTGATGCTTTAGAA CCATTGTTAAAGAATTTACTGCATCTAAGGATTCAATAAGGCGGTAAGGCTGCAGAGGAAGGTGCTAAATCCACT GCTACATTCGAGGCCAAATTTGGCAGAGCTTCGTATGTGCGGATTCATCTCAAGTAGAAGATCTGGTGCAGTAGGC CTATGTGAGTTTTTGAAGGGGTTCAAAGCGCCTTGTA

균주 제작은 인퓨전(Infusion) 효소를 이용하여 다중-삽입 클로닝(Multi-insert Cloning)을 하였으며 제한효소로는 SacI을 이용하였다. 각 유전자의 앞에는 프라이머를 이용해 RBS를 삽입하였으며 클로닝에 사용한 프라이머는 하기 표 4와 같다. 밑줄 친 서열은 RBS이다.

표 4

서열 번호	명칭	서열
13	RBS_F_primer_4	CCTGCAAGAGTGGGAATAAGAGCTCCTTAGACGAAAAAGGAGGTATTTTATGGCCATGATCACGGGCGGC
14	RBS_R_primer_4	GGACATTCTTTAGGCGCCGACTGGAAG
15	RBS_F_primer_5	CGGCGCCTAAAGGAATGTCCGCTAAATCGTTTGAAGT
16	RBS_R_primer_5	AGCAGCGGGCTGGCTTAAGTTACAAGGCGCTTTGAACCC

[0129] 1-3. MG로의 경쟁 경로를 결실시킨 재조합 균주의 제조

[0130] M. extorquens AM1은 MG에서 락토일글루타티온 (Lactoylglutathione)을 거쳐 락테이트 (lactate)로 흐르는 경로를 보유하고 있다. 따라서, M. extorquens AM1에서 생성된 MG는 과발현시킨 1,2-PDO 생산 경로의 하이드록시아세톤과 락테이트로 흐름이 나누어지게 된다. MG를 락토일글루타티온으로 전환시키는 효소 락토일글루타티온 분해효소 (Lactoylglutathione lyase)를 코딩하는 유전자 gloA를 결실시킴으로써 락테이트로 흐름 손실이 일어나지 않는 M. extorquens AM1ΔgloA::pMEV::mgsA::yqhD::gldA 균주 (MPG101) 및 M. extorquens AM1ΔgloA::pMEV::mgsA::yqhD::gldA::fls::dak1 균주 (MPG111)를 준비하였다.

[0131] M. extorquens AM1의 Mex_lp0359 및 Mex_lp4683 2개의 유전자가 gloA에 해당하므로 pk19mobsacB 벡터를 이용하여 Mex_lp0359 (서열번호 17) 및 Mex_lp4683 (서열번호 18)을 결실시켰고, 서열정보는 하기 표 5에 나타내었다. pk19mobsacB 벡터의 서열은 서열번호 19의 서열과 같다.

표 5

서열 번호	명칭	서열
17	Mex_lp0359nucleotide sequence	ATGGTTTCGCGTGGCGGACCTCGACCGCGCGCTCGCCTTCTACGTCGATGCCTTCGGGCTCAAGGAGGTCCGGCGCGTCGAGAATGAGAAGGGCCGCTTACCCCTCGTCTTCTCGCCGCTCCGGGGATGTCGAGCGGGCCGAGGCGACGAAATGCCGCTGATCGAGCTGACCTACAATTGGGATCCCGAGACCTATTCCGGCGGGCGCAACTTCGGGCACCTCGCCTATCAGTTCGATGACATCTACGCCTTCTGCCAGCGGTGAAGATGCGGGCGTGACCATCAACCGGCCGCCGCGACGGGTACA TGGCCTTTCGTGCGCTCGCCCGACGGCATTTCCATCGAGATCCTGCAGAAGGGCGGGCGAAGCCCCCGCAGGAGCCGTGGGCCTCCATGGAGAACACCGGAACCTGGTAG
18	Mex_lp4683nucleotide sequence	ATGGCCAAGCCCGTCCACACCATGATCCGCGTCCGCGACGAGGCGCGCTCGCGGGACTACTATGCCCGCGCCTTCGGCCTGGAGCCCGCGACCGGTCGACTTTCGGGACTTCACGCTGCTCTACCTGCGCGACCCATCCTCGCCGTCGAACTCGAACTGACCGTCAACAAGGACCGCGCCGAGCCCTACAATCTCGGCGACGGGTACGGTCACCTCGCCTTCGTGGTGGAGGATGCCGAGGCGGAGCATGCCGCTTCGAGCGCGAGGGGCTTCGGGTACGCGCGTCAAAACCCCAAGCACGGCGACACCGCGCTCGCGACCTTCTTTTCGCCACCGACCCGGACGGGTACAAGATCGAGGTGATCCAGAAGGGCGGCCGTTTCGCCTGA

[0133] 균주 제작은 Infusion 효소를 이용하여 다중-삽입 클로닝 (Multi-insert Cloning)하였다. Mex_lp0359 결실 시, 제한효소로는 HindII 및 EcoRI를 이용하였고 업스트림 (upstream)과 다운스트림 (downstream)은 하기 표 6과 같이 지정하였다.

표 6

서열 번호	명칭	서열
20	Mex_lp0359upstream	ATGAACACGGACGATTTCGCTACGATTTCGACGCGCCGATTTCGACTGGAACACGAGCCGTCGCGGGCCGATCTGTTC CGGCAGATCGACGCGCACTCTATACCACTGATTCCAACGGCTGGCTGACCTACTACAACAGCCCGCCGACAGCTTTGG GGATTCCGCCCGTGATCGGAAGGCGCGTGGTGGCGGCTTGGCGGCTGTTTCGAGGCGGACGGCGCGCCGTCGCCGAC GACCTGTGCGCGATGCGGCTCACCTCAAAGGCGCGCGCCAGTGCAGCGCGTCCAGATCGGCCTCGAACGCCGCGACGGA AGCCGGATGGCGTTCTGCTTACCCGACGGCGTTGCGCGACGGGACGGGCGCGTGGTGGGGGATGCAACATCTCCTC GCCGTGAGCGCTCAAGCTGCGGTTCCGCTCCGCGGGCGCTCCAGGGCCGGCCGACGCTTCGGGCCGCCAACTTTCG AGCATGCACAGATGTTTCGGCGTGAGCTTGCCGCGTCTGCTCGGCGATCCACCTCGTTTCGAGCGAAGCGATCCGCGGGATG TCTCCCCGGATCGCCTTGCCGCTGAGGAACGTGCCGCTGAAAAACAGGAGGAAGCCATGTGCGTGCATACCAACTGGAG CCTCGACGCGTCCAGAGCTGCGCAGCATGGCCCGGAGGGCATAACCCCTCTCCGTCATAGCCTGCGGCTCAAGCGGCC GGTGATGCGGTCTGCGCAAGCTCGCCGAACCTCGGATCACGCCAAGCTCGAGCTTTGACCGGACGGGCGCGGGGCAT CGCGCCCGGGCGCCACCCGCGGAC
21	Mex_lp0359downstream	CGTGTGCAAGTATTCCATGGCCACACCGGATGATGACAGGATGTCCGGCTATCTGGCCCGGCACGCAAAACCGCTCAACGG GCGACCGATCAGGCTCCCGCGCGGCCAGTCAGCCAGCGCGGCCAAACGGCCGTTTCGACCGCGCGCCCGCCGCGATTTCG ACCGACTGCCGTTGAATAACATCCATTTGAAAAAGCTTCTCTTGTGGCAATTGCTTGATCCAATTACGATCACTATCGC GTCTCGCAAGCTTTCCGTTAAATTATAGTGACATGGCATTGAAAAATAGAAGGCATTCCTTCGCAACTGACTTGGCGTCGA TGCATATTATAGCATTTAAGAGCTTTTGTTCGCCAAATGGCAACAGTAAGATTCGCGCGCTCCCGGCTGCGATGATCG TCGAATCGGGCATGCCGCGACCGGGAGACGGCGC

[0135] pk19mobsacB에 업스트림과 다운스트림을 삽입하기 위해 사용한 프라이머 (서열번호 22 내지 25), 업스트림과 다운스트림에서 각각 단일 재조합 (Single Recombinant)이 일어난 콜로니 (colony)를 선별하기 위해 사용한 프라이머 (서열번호 26 내지 29) 및 돌연변이 (Mutant)와 야생형 (wild)을 구별하기 위하여 수행된 PCR에 사용된 프라이머 (서열번호 30 및 31)는 하기 표 7과 같다.

표 7

[0136]

서열 번호	명칭	서열
22	STREAM_F_primer_1	GACCATGATTACGCCAAGCTTATGAACACGGACGATTTCGCC
23	STREAM_R_primer_1	CTTGCACACGGTCCGGCGGGTGGGCGCC
24	STREAM_F_primer_2	CCCGCCGACCGTGTGCAAGTATTCATGGCC
25	STREAM_R_primer_2	AAAACGACGGCCAGTGAATTCGCGCCGTCTCCCGGTGCG
26	COLONY_F_primer_1	AACCCGACAGAACACGCTTT
27	COLONY_R_primer_1	GAAGCTAGCTTATCGCGCCA
28	COLONY_F_primer_2	TTTCTGCGCGTAATCTGCTG
29	COLONY_R_primer_2	ACGATGATGGCGAGGGTG
30	PCR_F_primer_1	GGAGCCTGATGAACACGGAC
31	PCR_R_primer_1	GCAATCATGCGCCGTCTC

[0137]

단일 재조합 콜로니에 대하여 수크로즈 선택 (sucrose selection)과 카나마이신 선택 (kanamycin selection)을 거쳐 PCR을 통해 원하는 돌연변이를 최종적으로 선택하였다. Mex_1p4683 결실 시, 제한효소로는 HindII 및 EcoRI를 이용하였고 업스트림과 다운스트림은 하기 표 8과 같이 지정하였다.

표 8

[0138]

서열 번호	명칭	서열
32	Mex_1p4683upstream	GCTGGTATCTGCCGCCGCTGCCGGCAGAACCTCCGAAAGACCCATTGTGCCCCCTGTGCTTTCCGGCTTGACCGTGGACGAGATTTCGCTCCCGAGAGCGTGAGGGAACGCACGCGACCTGTGCGGTCCGGCGCGATCGCCGGATCGGGCGGGATGCGGGTCCGTTCTGAAGTGTGTGAGGGAGAACATTCGATGCGCTCAGGGGCCGCTTCGCTCTTCTCCCCCTGTTCCGGCTCGTGCTACCGTCCGGCGCGCCGATGCGCAGACGCCGCCGAGCCAGGCGCTGCCCGGCCGTGGTGATCCCGAGGTCGAGGCGCCAGGGCAAGTGCTGGGCCGGCGCTCGCCTGCGCGCGGAGCGCGAGCGGGTCGATCGGGTGCTGAGAGCCGGCGGAGCGCATGATGGCGGGCGTCCGCCGGGCGCTACCGAGGAGCGCTACGCCCTGGCGCTCGACGACGCGATGCGTCTGGAGACGACCTGCGTGGCGCCTCTTCGATCGCGTGCAGAAAGCGCTGGCCGGGCTCGAACGCTGGAGAAGGCGCCGTAGACACCCAAACGA
33	Mex_1p4683downstream	CGGCCCTCTCTCCCGGTACGGATGTTGTGTGGATGAGCGCCCATCTGGCGCAGTCCGGCCGGCGGAAAGGGTTTTTGCCGTTTACCCTTCGTC AACCTTACCGGGTGCTGTGTCGCCGCAATGATGCGCACCGCGTCCCTACCGCCGTCGATCCGAAGCCCTGCTGCCGCCGGCGACGCCGCCCTGCGCGCGCGATGCGGGGTGGCGGAGGCGCTGGCGGGGAGCGGCATGGCCGCCAACACGGTCGAGGCCATACGAGCGTGACCTGCGCCAGTTTCTGATCCATCGCGCCGCCGCTCCGCGACGCCACCATCGCCGGGTGATCGCCCTGAAGCCCCGCGACCTGCGCGCCTTCATGGCCGCGCGCGGGCCGAGGGATCGGTGGGCGCTCCCTGATGCGGATGCTGGCGGGTGTGCGCTCCTTCGCCCGCTTCTCGAACGGAGGGACACGCGACGCTCGCGCGCTCGGCCGGGTGCGCTCCCCAAGGTCGAGCGCCGCTGCGCGCCCGCTTCCATTTCGCGCGCGTGGCGATGACCGCGCCCGAGACCCGCCCGACGACGACCGCGCCCGTGGGTGCTCGCCCGGACGCGCGCGGTGATCGCCCTCTCTACGGCTCGGGCTGCGCATCTCGGAAGCCTTAGGGCTACCGCCCGGACGCGCCGATGCGGGGATCGACGAGGTGCGGGTGACGGCAAGGGTGGGAAGGTCCGCGCCGTGCCGGTGTGCGGCGGTGGCGGAGGCGGTGGCCGCTACCTGTGCTGTGCGCGCACCCCTCGATCCGAGGGGCCGCTCTTCGTCGGCGTGAAGGGCGGGCGCTCTCGCCGCGAGTGGTCCAGTACGCGTTTCCGCGCTCCGCGCGCGCTCGGCCTGCCGAGAGCGGACCCGCGACGCCCTGCGACTCCTTCGCAACCCATCTGCTCGCCCGCGGGGCGAGTGGCGGCGATCCAGGAATTGCTCGGCCACGCCCTCGCTCTGACCACGAAATCTACCAAGGTGATGCGCGCCGCTGATGAGCGCTTCGAGGACGCCATCCCCGCGCCCGCGGTGCGGCCCTCGGAACCGCCGTACCGCGTTCCGAAACCGTTGATGCAGAGCAAGGCACGAGCGCCCGATCCGGCTATGCTGTCCGGCAGGACAGGCCGTGGAGCGTAGAAATGCGTGA

[0139]

pK19mobsacB에 업스트림과 다운스트림을 삽입하기 위해 사용한 프라이머, 업스트림과 다운스트림에서 각각 단일 재조합이 일어난 콜로니를 선별하기 위해 사용한 프라이머 및 돌연변이와 야생형을 구별하는 PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 9와 같다.

표 9

[0140]

서열 번호	명칭	서열
34	STREAM_F_primer_3	GACCATGATTACGCCAAGCTTGTGTTATCTGCCCGCCG
35	STREAM_R_primer_3	GAGAGGGCCGTCGTTTGGGTGTCTACGGCG
36	STREAM_F_primer_4	ACCCAAACGACGGCCCTCTCTCCCGGTAC
37	STREAM_R_primer_4	AAAACGACGGCCAGTGAATTCACGCAATTCACGCTCCACC

38	COLONY_F_primer_3	AGATCGAGACGAGAAGCG
39	COLONY_R_primer_3	CCACACAACATCCGTACC
40	COLONY_F_primer_4	GACCATGATTACGCCAAGC
41	COLONY_R_primer_4	CCACACAACATCCGTACC
42	PCR_F_primer_2	CAGAACCTCCGAAAAGACCC
43	PCR_R_primer_2	TCCACACAACATCCGTACCG

[0142] 제조예 2. 제1배지 및 제2배지의 제조

[0143] 1,2-프로판다이올 생산 촉진용 배지를 제조하기 위하여, 하기 표 10에 나타난 성분 및 함량을 혼합하여 제1배지 (Minimal media) 및 제2배지 (NMS media)를 준비하였다.

표 10

성분	농도 (mM)	
	제1배지	제2배지
Methanol	125	125
NH ₄ Cl	30.29	-
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.04030	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00165	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.81	4.10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02041	1.60
3.8% (w/v) solution Fe-EDTA	-	0.00110
NaMoO ₄ · 4H ₂ O	-	0.00260
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01079	0.00180
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01565	0.00140
MnCl ₂ · 7H ₂ O	0.00509	0.000019
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01261	0.00021
NiCl ₂ · 6H ₂ O	-	0.000010
H ₃ BO ₃	0.01617	0.00024
EDTA	-	0.00086
KNO ₃	-	9.90
K ₂ HPO ₄	9.13	-
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	11.54	-
KH ₂ PO ₄	-	1.90
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	-	2.30
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00120	0.0100
Biotin	-	0.000082
Folic acid	-	0.000045
Thiamine HCl	-	0.00015
Ca pantothenate	-	0.00010
Vitamin B12	-	0.00074
Riboflavin	-	0.00013
Nicotiamide	-	0.00041

[0145] 실험예 1. NMS (Nitrate Mineral Salts) 배지 환경에서 재조합 균주의 1,2-PDO 생산량 확인

[0146] 3 ml의 NMS 배지 (제2배지)를 포함하는 14 ml 둥근바닥 테스트 튜브(14ml round bottom test tube)에서 30 ℃ 이 200 rpm 조건으로 제조예 1에서 제조한 MPG111, MPG001, MPG011 및 MPG101 균주를 배양하였다. 이후 균주를 100 ml의 NMS 배지 (제2배지)를 포함하는 500 ml 배플 플라스크에 접종하여 30 ℃ 및 200 rpm의 조건으로 균주

를 다시 배양하였다 (전배양).

[0147] 전배양을 마친 MPG111, MPG001, MPG011 및 MPG101 균주를 수확하여 100 ml의 NMS 배지 (제2배지)를 포함하는 500 ml 배플 플라스크에 재현탁하고 30 °C 및 200 rpm의 조건으로 균주를 배양하였다 (본배양).

[0148] 상기 전배양 및 본배양을 3회 반복하여, 1,2-PDO를 생산하였다. 3회 반복한 실험값의 평균은 표 11의 average에 나타내었고, 3회 반복한 실험값 중 최대값을 표 11의 Max에, 전체 실험데이터를 도 3a 내지 3d 및 표 11에 나타내었다.

표 11

균주		1,2-PDO (mg/L)	잔여 Methanol (g/L)	소모한 Methanol (g/L)	OD600	소요 시간 (h)
MPG111	average	58.8	0	3.5	2.44	32
	Max	61.6	0	3.5	2.47	32
MPG001	average	8.6	0.9	2.6	1.66	20
	Max	10.1	0.9	2.6	1.65	20
MPG011	average	9.8	0.8	2.7	1.62	24
	Max	10.8	1	2.5	2.08	24
MPG101	average	43.8	0	3.5	-	69
	Max	54.1	0	3.5	-	69

[0150] 1-2. Minimal 배지 환경에서 재조합 균주의 1,2-PDO 생산량 확인

[0151] 50 ml의 Minimal 배지 (제1배지)를 포함하는 250 ml 배플 플라스크에서 30 °C 및 200 rpm의 조건으로 제조에 1에서 제조한 MPG111 균주를 배양하였다 (전배양).

[0152] 전배양을 마친 MPG111 균주를 수확하여 50 ml의 Minimal 배지 (제1배지)를 포함하는 250 ml 배플 플라스크에 재현탁하고 30 °C 및 200 rpm의 조건으로 배양하여 (본배양) 1,2-PDO를 생산하였다.

[0153] 실험예 1-1에서 생산한 1,2-PDO titer 대비 실험예 1-2에서 생산한 1,2-PDO titer를 도 4에 나타내었다.

[0154] 도 4로부터 확인할 수 있듯이, 전배양 및 본배양시 모두 제1배지에서 배양된 MPG111 균주는 1,2-PDO를 생산하지 않았다. 즉, 1,2-PDO의 생산을 위해서는 Minimal 배지에서 배양하는 과정만으로는 1,2-PDO를 생산할 수 없고, 반드시 NMS 배지에서 배양하는 과정이 포함되어야 1,2-PDO를 생산할 수 있는 것으로 판단하였다.

[0155] 실험예 2. Minimal 배지 및 NMS 배지를 이용한 재조합 균주의 1,2-프로판다이올 생산량 확인

[0156] 전배양 및 본배양 단계 모두 동일한 배지를 사용하는 종래 방법을 변경하여, 전배양 (제1배양 단계)은 세포 성장 속도가 빠르고 안정적인 Minimal 배지 (제1배지)를, 본배양 (제2배양 단계)은 1,2-프로판다이올의 역가 (titer)가 우수한 NMS 배지 (제2배지)를 이용하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다.

[0157] 3 ml의 Minimal 배지 (제2배지)를 포함하는 14 ml 등근바닥 테스트 튜브에서 30 °C이 230 rpm 조건으로 제조에 1에서 제조한 MPG111, MPG001, MPG011 및 MPG101 균주를 배양하였다. 이후 균주를 50 ml의 NMS 배지 (제2배지)를 포함하는 250 ml 배플 플라스크에 접종하여 30 °C 및 230 rpm의 조건으로 균주를 다시 배양하였다 (전배양).

[0158] 전배양이 중기-지수상 (Mid-exponential phase)과 초기-정지상 (Early-Stationary phase) 초입에 도달하면, 본배양에 필요한 만큼 MPG111, MPG001, MPG011 및 MPG101 균주를 수확하여 50 ml의 NMS 배지 (제2배지)를 포함하는 250 ml 배플 플라스크에 재현탁하고 30 °C 및 230 rpm의 조건으로 균주를 배양하였다 (본배양).

[0159] 균주의 수확은 본배양시 원하는 초기 OD 값을 기점으로, 필요한 Minimal 전배양액을 채취하고 원심분리후 상등액을 제거하고 NMS 배지로 재현탁 (resuspension)함으로써 수행될 수 있다.

[0160] 상기 전배양 및 본배양을 3회 반복하여 1,2-PDO를 생산한 후, 그 결과를 도 5a 내지 5d 및 표 12에 나타내었다.

[0161] MPG111 균주의 1,2-프로판다이올 생산 결과는 5a에, MPG001 균주의 1,2-프로판다이올 생산 결과는 도 5b에, MPG011 균주의 1,2-프로판다이올 생산 결과는 도 5c에, MPG101 균주의 1,2-프로판다이올 생산 결과는 도 5d에 나타내었다.

표 12

구분		0h	3h	15h	18h	20h	22h	24h	26h	30h
PDO (mg/L)	MPG 111	0	0	62.811	137.610	87.061	70.586	63.983	56.916	51.951
	MPG 001	0	0	27.308	38.731	24.632	20.859	18.394	16.818	15.326
	MPG011	0	0	23.852	28.276	20.821	17.842	16.655	15.978	14.509
	MPG101	0	0	102.359	208.650	191.623	123.911	118.509	100.986	85.213
Methanol (g/L)	MPG 111	4.179	3.815	0.880	0.137	0	0	0	0	0
	MPG 001	4.100	3.853	1.009	0.094	0	0	0	0	0
	MPG011	4.247	3.825	0.753	0.026	0	0	0	0	0
	MPG101	4.099	3.802	0.953	0.336	0	0	0	0	0
OD	MPG 111	0.534	0.713	2.630	3.140	3.523	3.453	3.273	3.267	3.030
	MPG 001	0.488	0.680	2.617	2.607	3.223	3.390	2.847	2.970	2.777
	MPG011	0.515	0.703	2.577	2.833	3.303	2.957	2.923	2.728	2.653
	MPG101	0.530	0.717	2.603	3.160	3.507	3.103	3.367	3.362	2.950

3회 반복한 실험값의 평균은 average로, 최대값은 Max로 표 13에 나타내었다.

표 13

균주		1,2-PDO (mg/L)	잔여 Methanol (g/L)	소모한 Methanol (g/L)	OD600	소요 시간 (h)
MPG111	average	137.610	0.137	4.042	3.140	18
	Max	159.101	0.325	3.683	3.23	18
MPG001	average	38.731	0.094	4.006	2.607	18
	Max	47.352	0.114	3.914	2.290	18
MPG011	average	28.276	0.026	4.221	2.833	18
	Max	34.310	0.016	4.149	2.61	18
MPG101	average	208.650	0.336	3.763	3.160	18
	Max	219.105	0	4.216	3.35	20

전배양 및 본배양시 동일하게 NMS 배지를 사용한 표 11의 실험데이터와 전배양시 Minimal 배지 및 본배양시 NMS 배지를 사용한 표 13의 실험데이터를 비교하면 확인할 수 있듯이, MPG111 균주의 1,2-PDO average titer는 58.8 mg/L에서 137.610 mg/L로 약 +134.0% 증가하였고, Max titer는 61.6 mg/L에서 159.101 mg/L로 +158.3% 증가하였다.

MPG001 균주의 1,2-PDO average titer는 8.6 mg/L에서 38.731 mg/L로 약 +360.4% 증가하였고, Max titer는 10.1 mg/L에서 47.352 mg/L로 +368.8% 증가하였다.

MPG011 균주의 1,2-PDO average titer는 9.8 mg/L에서 28.276 mg/L로 약 +188.5% 증가하였고, Max titer는 10.8 mg/L에서 34.310 mg/L로 +217.7% 증가하였다.

MPG101 균주의 1,2-PDO average titer는 43.8 mg/L에서 208.650 mg/L로 약 +376.4% 증가하였고, Max titer는 54.1 mg/L에서 219.105 mg/L로 +305.0% 증가하였다.

또한, 전배양 및 본배양시 사용하는 배지를 변경함으로써, 배지를 변경하지 않는 것에 비하여 Max titer까지 도달하는 시간에 대하여, MPG111 균주는 32 시간에서 18 시간으로 -43.75%, MPG001 균주는 20 시간에서 18 시간으로 -10%, MPG011 균주 24 시간에서 18 시간으로 -25%, MPG101 균주는 69 시간에서 20 시간으로 -71.01% 단축되었다.

[0171] 실험예 3. MPG101 균주의 배양 조건 구체화

[0172] 3-1. 전배양 온도 조건 변화

[0173] 1,2-PDO 생산량이 가장 높은 MPG101 균주로 1,2-PDO 배양 조건을 구체화하였다. 전술한 실험예 2의 조건과 동일 하되, 전배양은 20 °C, 25 °C, 30 °C 또는 35 °C의 조건으로 수행하였고, 본배양은 30 °C의 조건으로 수행하여, 1,2-PDO를 생산한 결과를 도 6a 내지 6d에 나타내었다. 그리고, 평균 생산량 최대값 (Average Production_{MAX}) 및 평균 생산효율 최대값 (Average Productivity_{MAX})을 계산하여, 표 14에 나타내었다.

표 14

	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Average Production _{MAX} (mg/L)	139	156	177	127
Average Productivity _{MAX} (mg/L/h)	5.1	6.7	8.5	4.3

[0176] 표 14의 30 °C Average Production_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Production_{MAX} 상대값을 도 6e에 나타내었고, 30 °C Average Productivity_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Productivity_{MAX} 상대값을 도 6f에 나타내었다.

[0177] 도 6a 내지 6e 및 표 14에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO 평균 생산량 및 평균 생산효율 최대값은 전배양 온도가 30 °C인 경우 가장 높았고, 35 °C인 경우 가장 낮았다.

[0179] 3-2. 본배양 온도 조건 변화

[0180] 실험예 3-1과 달리, 전배양은 30 °C의 조건으로 수행하였고, 본배양은 20 °C, 25 °C, 30 °C 또는 35 °C의 조건 으로 수행하여, 1,2-PDO를 생산한 결과를 도 7a 내지 7d에 나타내었다. 그리고, 평균 생산량 최대값 (Average Production_{MAX}) 및 평균 생산효율 최대값 (Average Productivity_{MAX})을 계산하여, 표 15에 나타내었다.

표 15

	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Average Production _{MAX} (mg/L)	223	151	183	117
Average Productivity _{MAX} (mg/L/h)	5.2	6.4	9.2	4.3

[0182] 표 15의 30 °C Average Production_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Production_{MAX} 상대값을 도 7e에 나타내었고, 30 °C Average Productivity_{MAX}를 기준으로, 20 °C, 25 °C 및 35 °C의 Average Productivity_{MAX} 상대값을 도 7f에 나타내었다.

[0183] 도 7a 내지 7f 및 표 15에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO 평균 생산량은 본배양 온도가 20 °C인 경우 가장 높은 반면, 균주의 성장속도가 느려 생산효율이 낮았다. 그러나, 본배양 온도가 30 °C인 경우에는 균주의 성장속도가 빨라 평균 생산효율 최대값이 가장 높았다.

[0185] 3-3. 완충용액 (buffer) 또는 질소원 변화

[0186] 본배양시 제2배지의 완충용액 또는 질소원의 조성을 변화하였다.

[0187] 먼저, 기존 실험예 2의 제2배지 (KH₂PO₄ 및 Na₂HPO₄ · 7H₂O를 포함하는 NMS buffer 이용)로 1,2-PDO 생산한 것을 Control (실시예 4)로 나타내었고, Control에서 완충용량 (capacity)을 증가시키기 위해 상기 NMS buffer 대신

Minimal buffer (K_2HPO_4 및 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 포함)를 이용한 제2배지로 1,2-PDO를 생산하여 실시예 3으로 나타내었다. 완충용액 조성 변화시 제2배지에 포함된 K_2HPO_4 및 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 의 농도는 제1배지와 동일하게 설정하였다.

[0188] 다음으로, 실시예 3에서 질소원으로서 질산칼륨 (Potassium nitrate; KNO_3)을 이용하는 대신, 요소 (Urea) 또는 염화암모늄 (Ammonium chloride; NH_4Cl)으로 1,2-PDO를 생산하여 실시예 1, 2에 나타내었고, 효모 추출물 (Yeast extract) 또는 펩톤 (Peptone)으로 1,2-PDO를 생산하여 비교예 1, 2에 나타내었다. 분자식이 알려진 물질인 경우, 질소원의 양은 이온화를 고려하여 몰수를 동일하게 설정하였고, 효모 추출물 (Yeast extract) 및 펩톤 (Peptone)은 1 g/L로 설정하였다.

표 16

[0189]

	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	비교예 1	비교예 1
Nitrogen	Urea	Ammonium chloride(NH_4Cl)	Potassium nitrate (KNO_3)	Control (KNO_3)	Yeast extract	Peptone
Amount	4.95 mM	9.89 mM	9.89 mM	9.89 mM(= 1 g/L)	1 g/L	1 g/L
Buffer	Minimal	Minimal	Minimal	NMS	Minimal	Minimal

[0191] 1,2-PDO의 생산 결과를 도 8a 내지 8d에 나타내었다. 그리고, 평균 생산량 최대값 (Average Production_{MAX}) 및 평균 생산효율 최대값 (Average Productivity_{MAX})을 계산하여, 도 8e, 8f 및 표 17에 나타내었다.

표 17

[0192]

	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	비교예 1	비교예 2
Nitrogen	Urea	Ammonium chloride (NH_4Cl)	Potassium nitrate (KNO_3 , Minimal)	Control (KNO_3 , NMS)	Yeast extract	Peptone
Average Production _{MAX} (mg/L)	257	235	195	169	0	0
Average Productivity _{MAX} (mg/L/h)	10.7	9.4	8.3	7.8	0	0

[0193] 표 17의 Control의 Average Production_{MAX}를 기준으로, 질산칼륨 (Potassium nitrate; KNO_3), 요소 (urea), 염화암모늄 (Ammonium chloride; NH_4Cl), 효모 추출물 (Yeast extract) 및 펩톤 (Peptone)을 포함하는 Minimal media (실시예 1 내지 4 및 비교예 1, 2)의 Average Production_{MAX} 상대값을 도 8e에 나타내었다. 또한, Control의 Average Productivity_{MAX}를 기준으로, 실시예 1 내지 3 및 비교예 1, 2의 Average Productivity_{MAX} 상대값을 도 8f에 나타내었다.

[0194] 도 8a 내지 8f 및 표 17에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO 평균 생산량 측면에서, Urea (실시예 1)는 Control (실시예 4)에 비해 +52% 증가하여, 가장 높은 평균 생산량을 나타내었다. 또한, Control에 비해 염화암모늄 (실시예 2)은 +40%, 질산칼륨 (실시예 3)은 +15% 증가하였다. 본배양시 제2배지가 효모 추출물 및 펩톤을 포함하는 경우에는 메탄올이 일부만 소모되어, 1,2-PDO가 거의 생산되지 않았다.

[0195] 그리고, 1,2-PDO 평균 생산효율 측면에서, Urea (실시예 1)는 Control (실시예 4)에 비해 +37% 증가하여, 가장 높은 생산효율을 나타내었다. 또한, Control에 비해 염화암모늄 (실시예 2)은 +20%, 질산칼륨 (실시예 3)은 +6% 증가하였다.

[0197] 3-4. 본배양시 메탄올 농도 조건 변화

[0198] 전술한 실험예 2의 조건과 동일하되, 본배양시 제2배지의 메탄올 농도가 60 mM, 125 mM, 185 mM 또는 250 mM인 조건에서 1,2-PDO를 생산하여, 그 결과를 도 9a 내지 9d에 나타내었다. 그리고, 평균 생산량 최대값 (Average Production_{MAX}) 및 평균 생산효율 최대값 (Average Productivity_{MAX})을 계산하여, 도 9e 및 표 18에 나타내었다.

표 18

	60 mM	125 mM	185 mM	250 mM
Average Production _{MAX} (mg/L)	9	157	233	276
Average Productivity _{MAX} (mg/L/h)	0.7	7.7	6.6	6.6

[0201] 도 9a 내지 9e, 표 18에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO 평균 생산량은 본배양 배지가 250 mM의 메탄올을 포함하는 경우 가장 높았고, 평균 생산효율은 125 mM의 메탄올을 포함하는 경우에 가장 높았다.

[0202] 메탄올 농도가 60 mM에서 250 mM로 높아질수록 1,2-PDO의 생산량은 증가하였으나, 생산효율은 125 mM에서 최대치를 나타내었다. 도 9e 및 표 18에 나타낸 1,2-PDO의 생산량 및 생산효율의 상관관계를 고려하여, 군주가 생장할 수 있는 범위 내에서 메탄올 농도를 조절하는 것이 필요하다.

[0204] 실험예 4. 1,2-프로판다이올 생산 종결

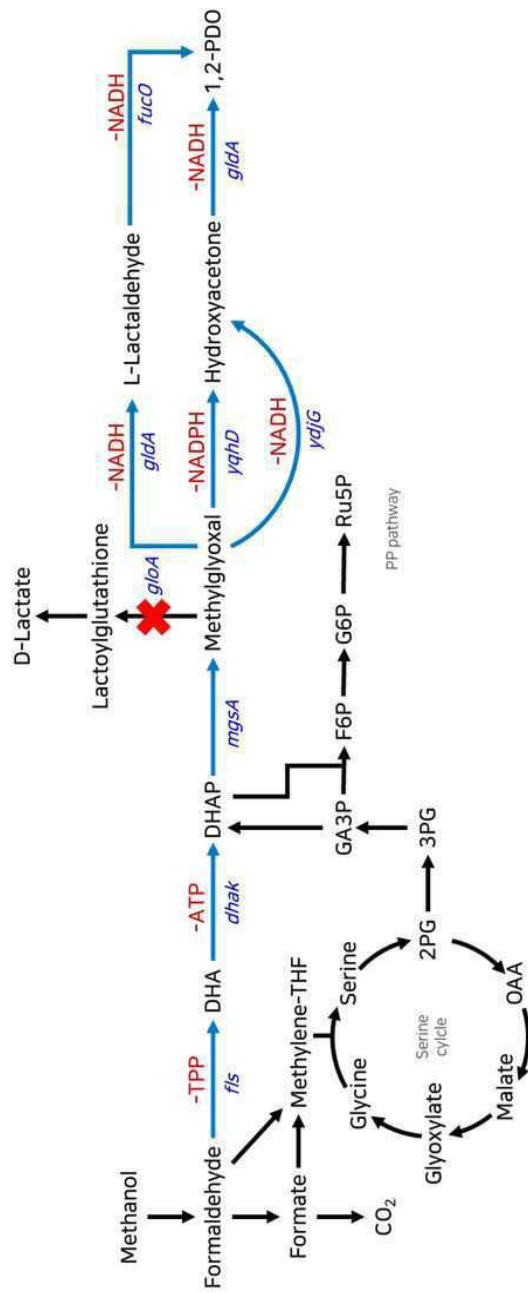
[0205] 전술한 실험예 2 및 실험예 3에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO는 최대 역가를 달성한 후 분해된다. 1,2-PDO의 분해를 방지하기 위해, 먼저 실험예 2의 실험조건과 동일하게 1,2-PDO를 생산하였다. 최대 역가를 달성한 이후 50 mM 포름산 (Formic acid)을 첨가하였다. 1,2-PDO는 분해가 억제됨을 확인하여, 그 결과를 도 10a 및 10b에 나타내었다.

[0206] 다음으로, 25 mM의 포름산, 염산 (Hydrochloric acid; HCl) 및 수산화나트륨 (Sodium hydroxide; NaOH)을 첨가하여, 마찬가지로 1,2-PDO 분해가 억제됨을 확인하여, 그 결과를 도 10c 내지 10e에 나타내었다. (Add로 나타낸 시점에 산과 염기를 첨가하였다.)

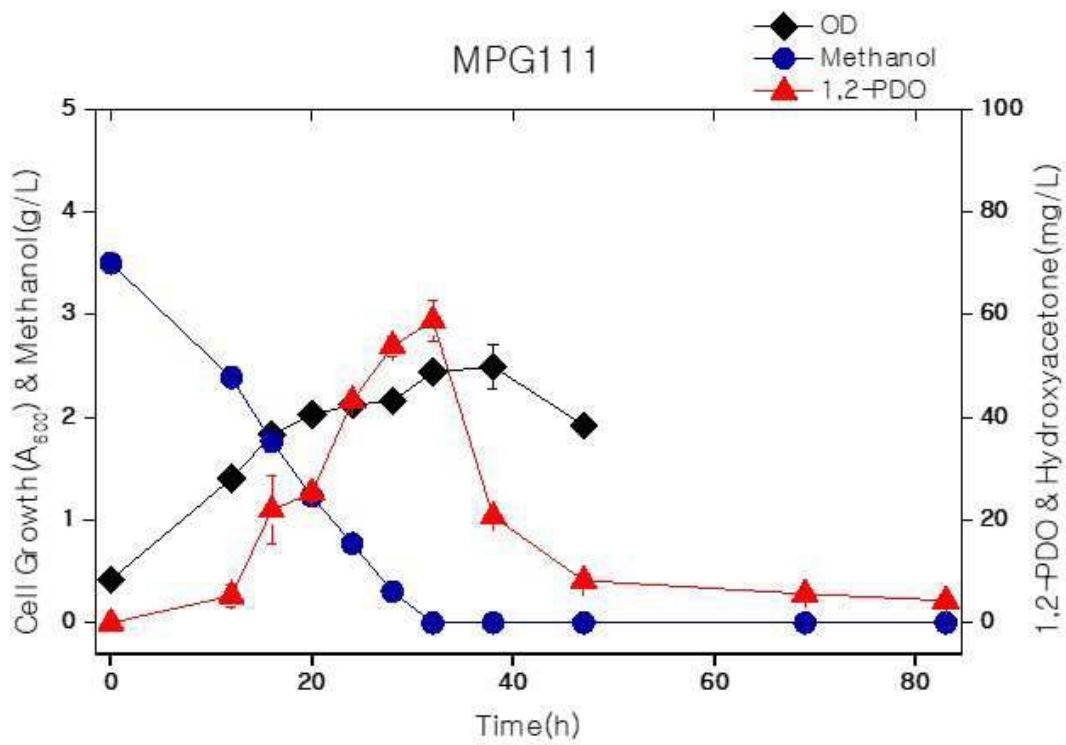
[0207] 도 10a 내지 10e에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO의 분해 종결은 pH 변화를 이용하는 것으로, 반드시 포름산과 같은 유기산에 한정되는 것이 아니라, 무기산이나 염기에 의해서도 가능하다.

[0208] 따라서, 본 발명의 1,2-PDO 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 1,2-PDO 대량 생산 방법을 이용하면 신속하고 효율적으로 1,2-프로판다이올을 대량 생산할 수 있다.

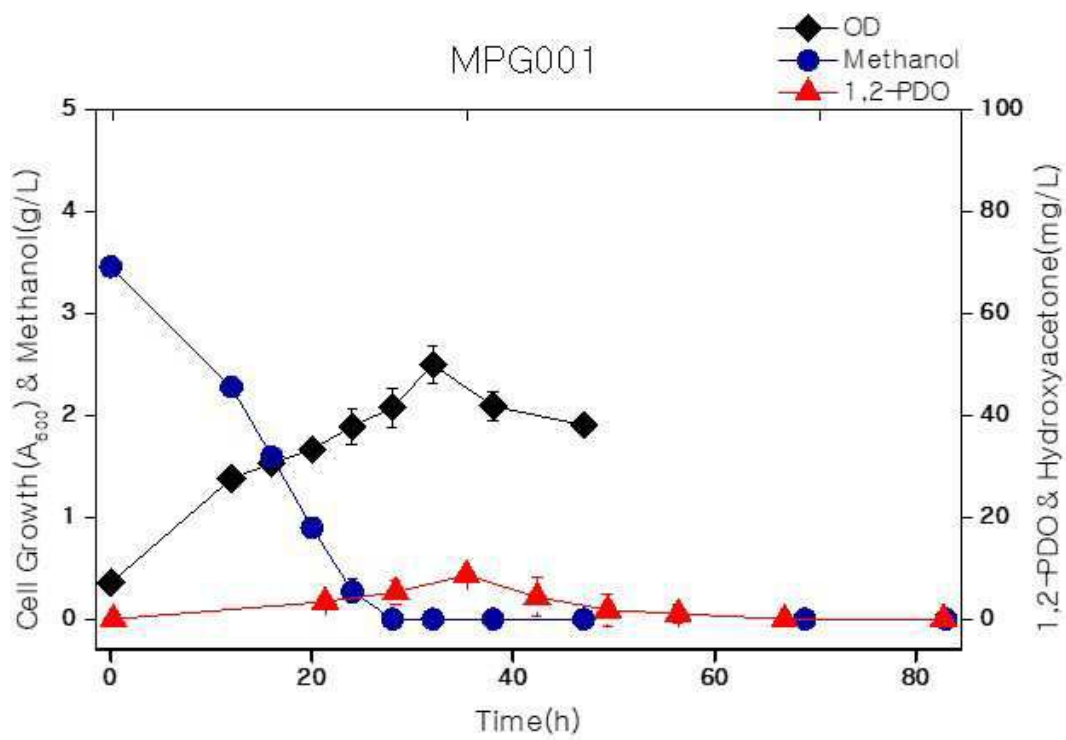
도면2



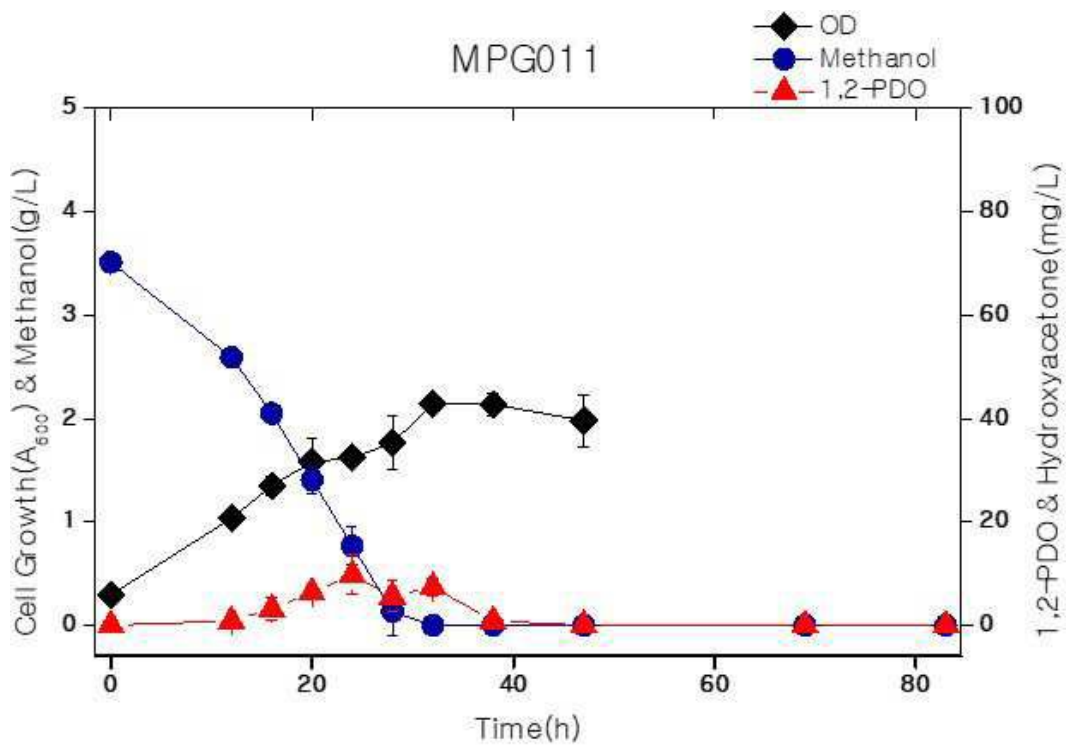
도면3a



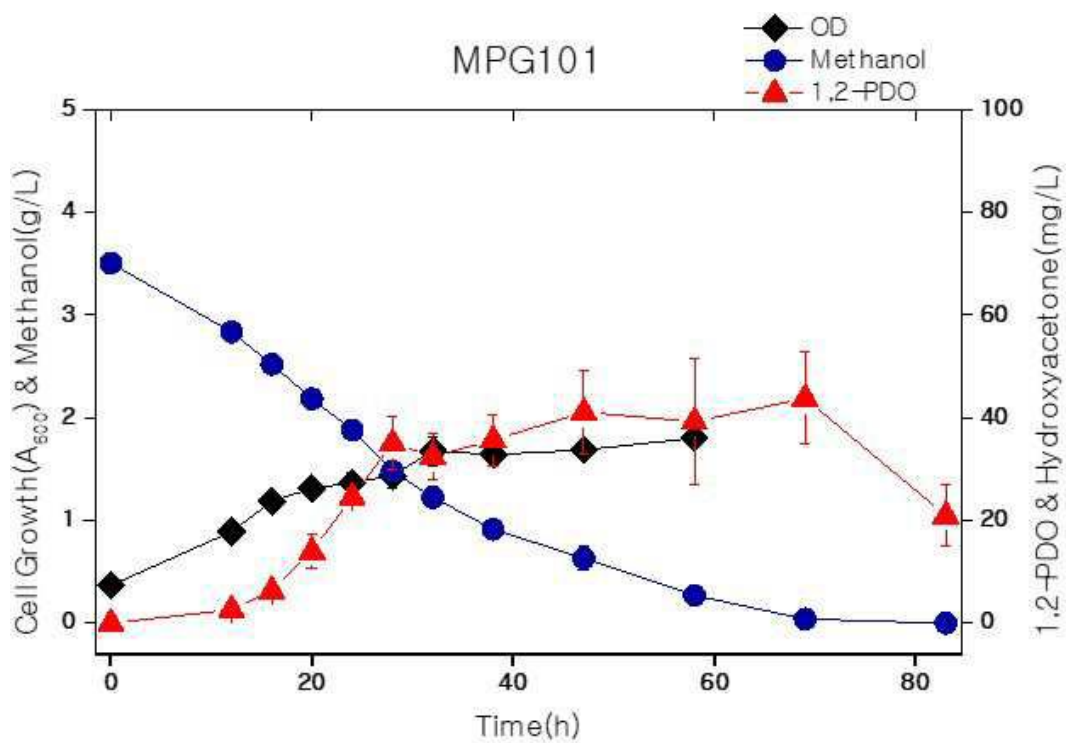
도면3b



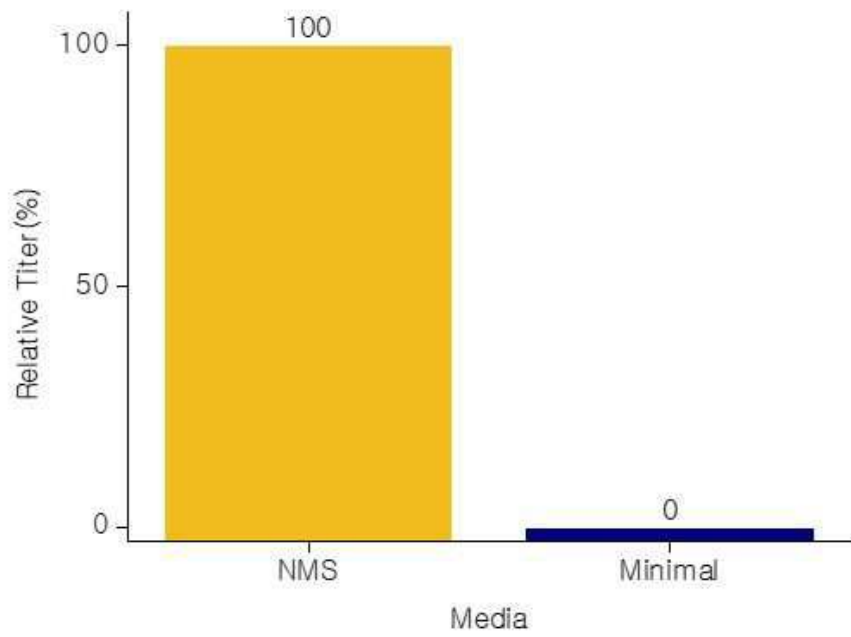
도면3c



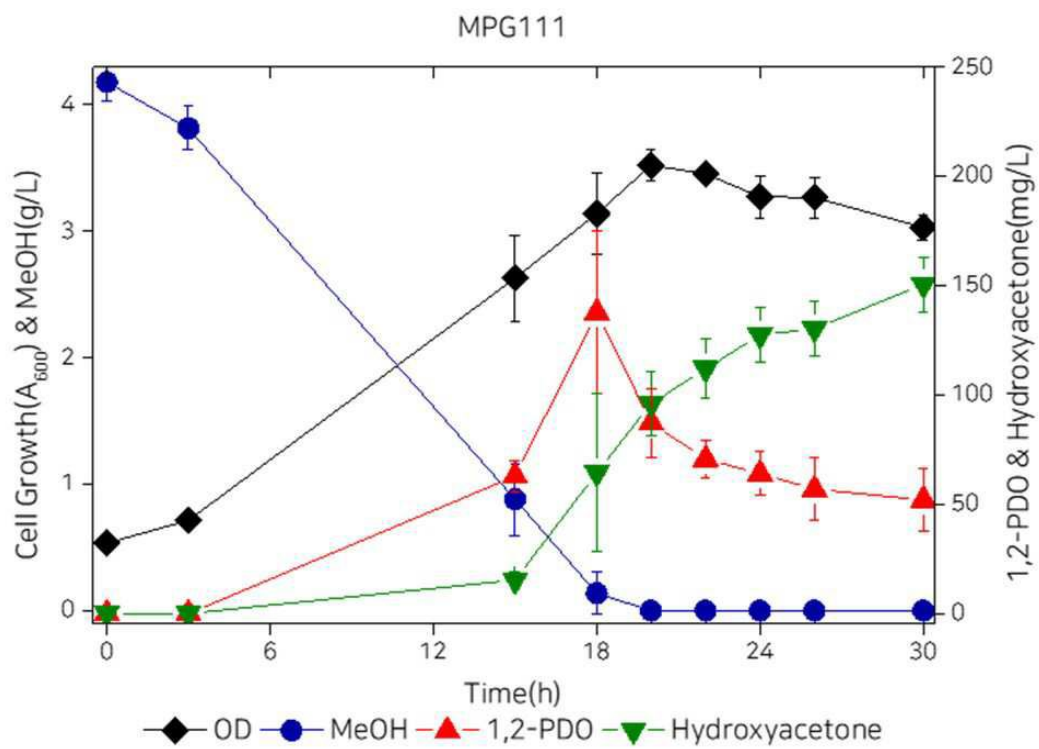
도면3d



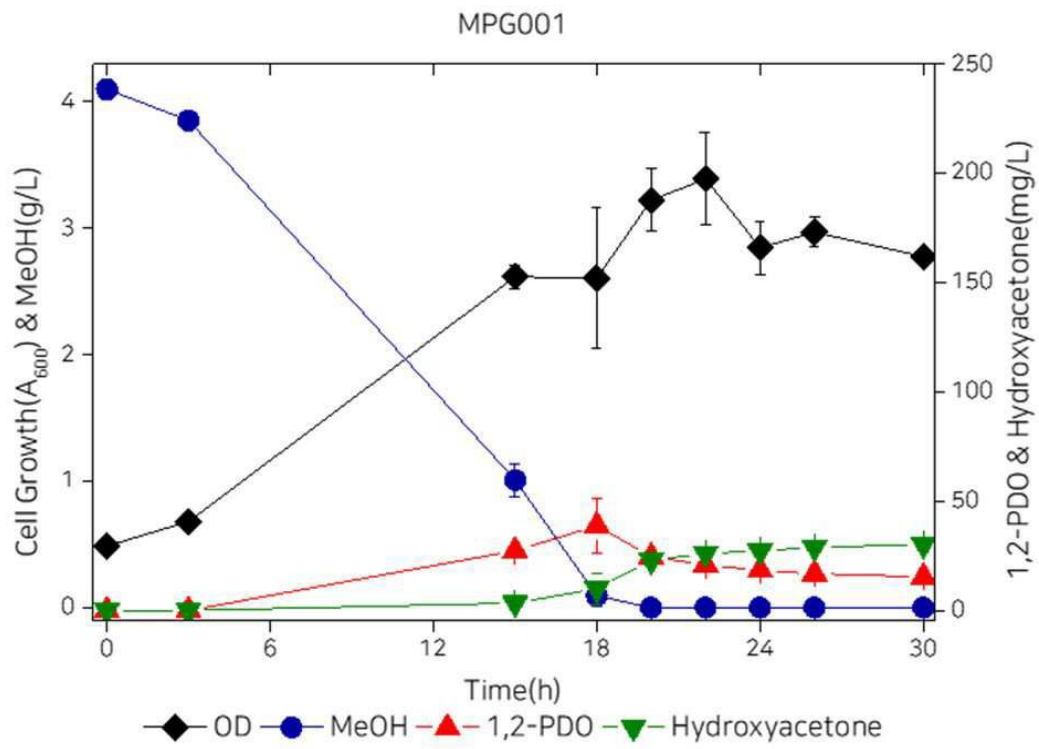
도면4



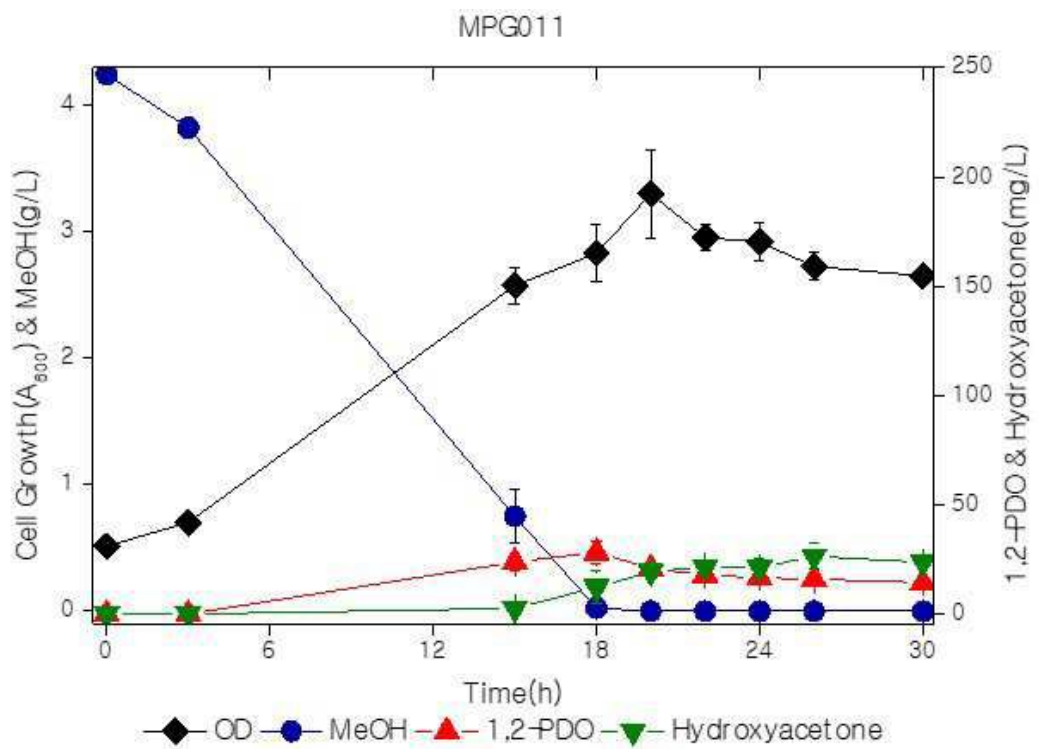
도면5a



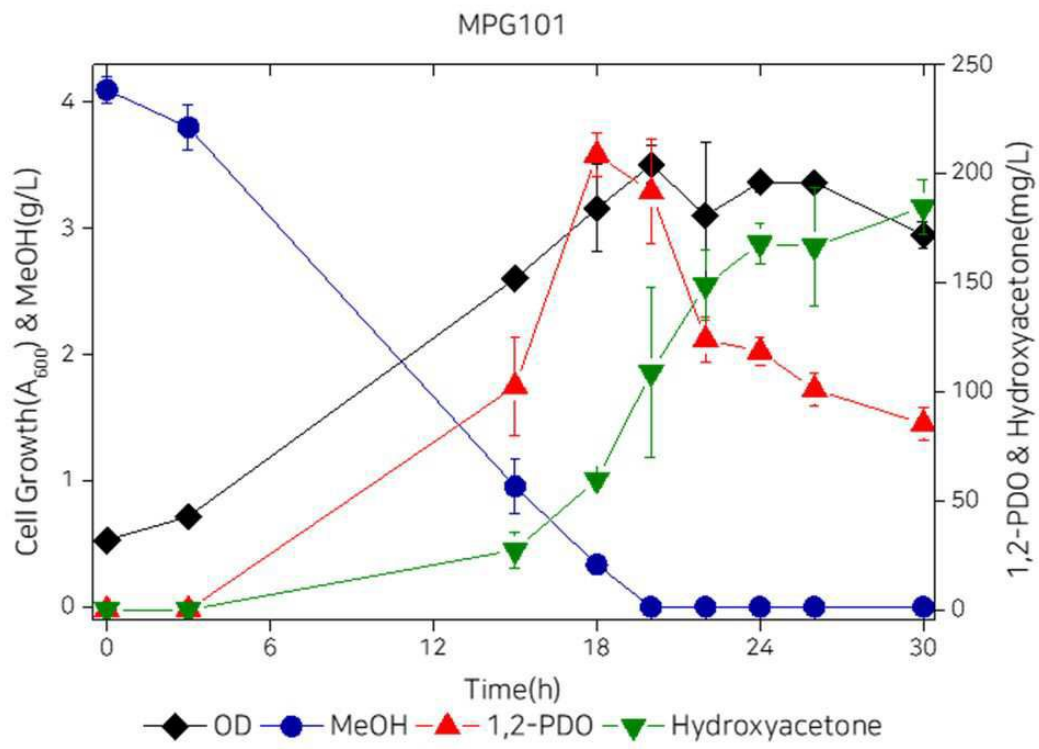
도면5b



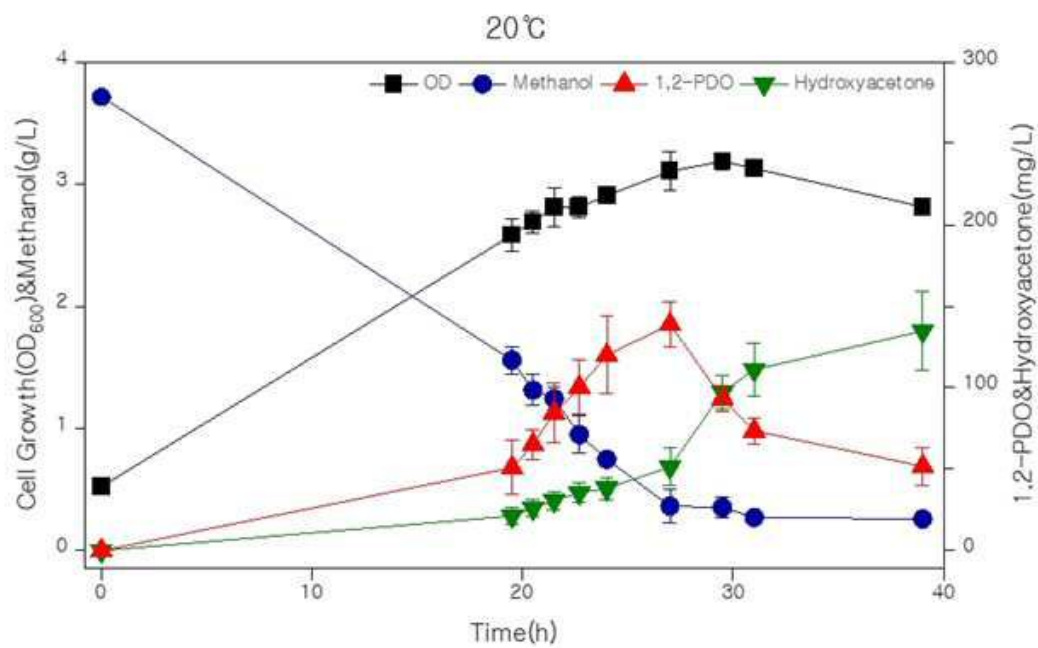
도면5c



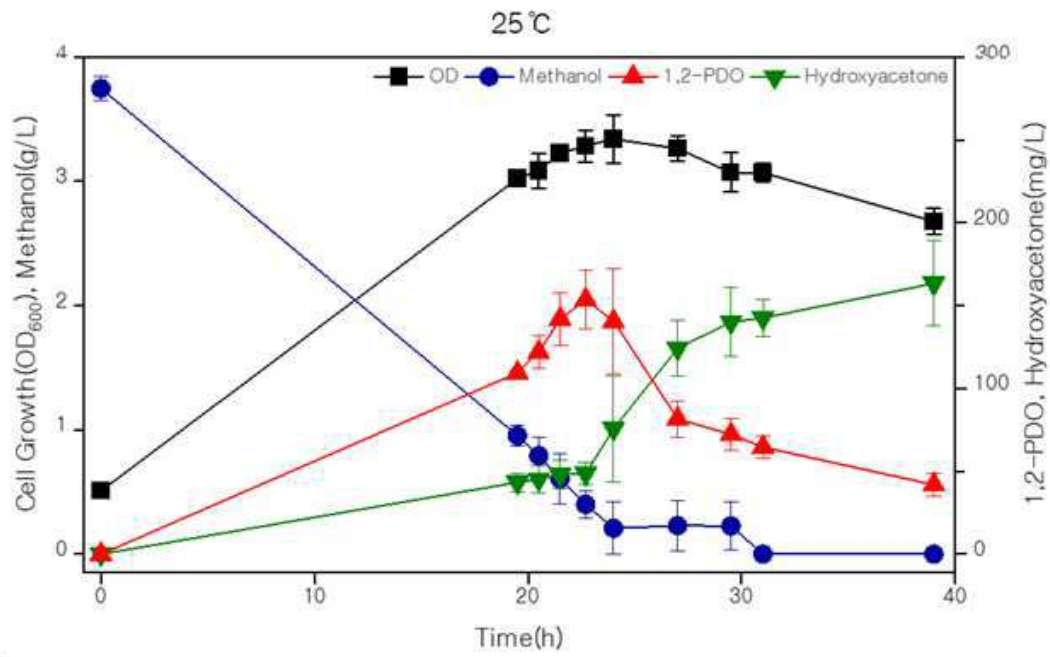
도면5d



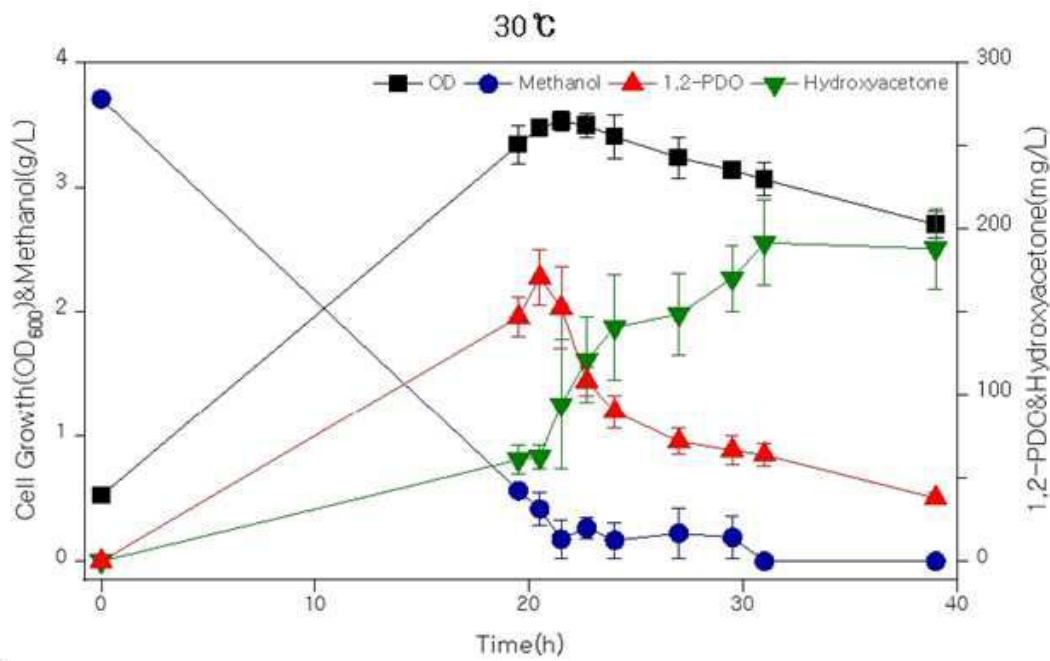
도면6a



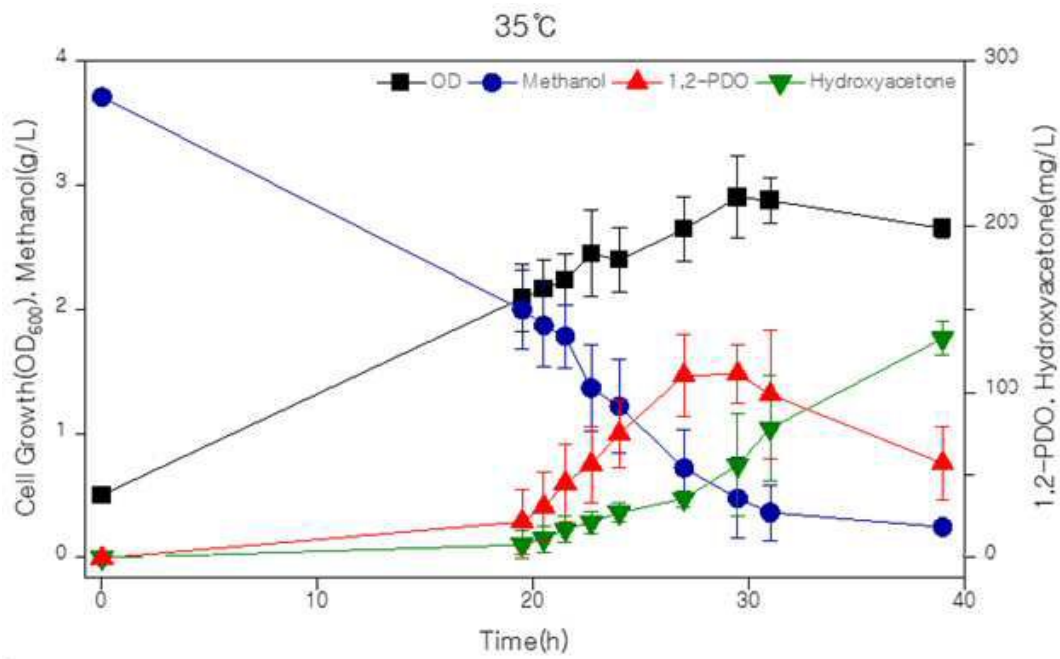
도면6b



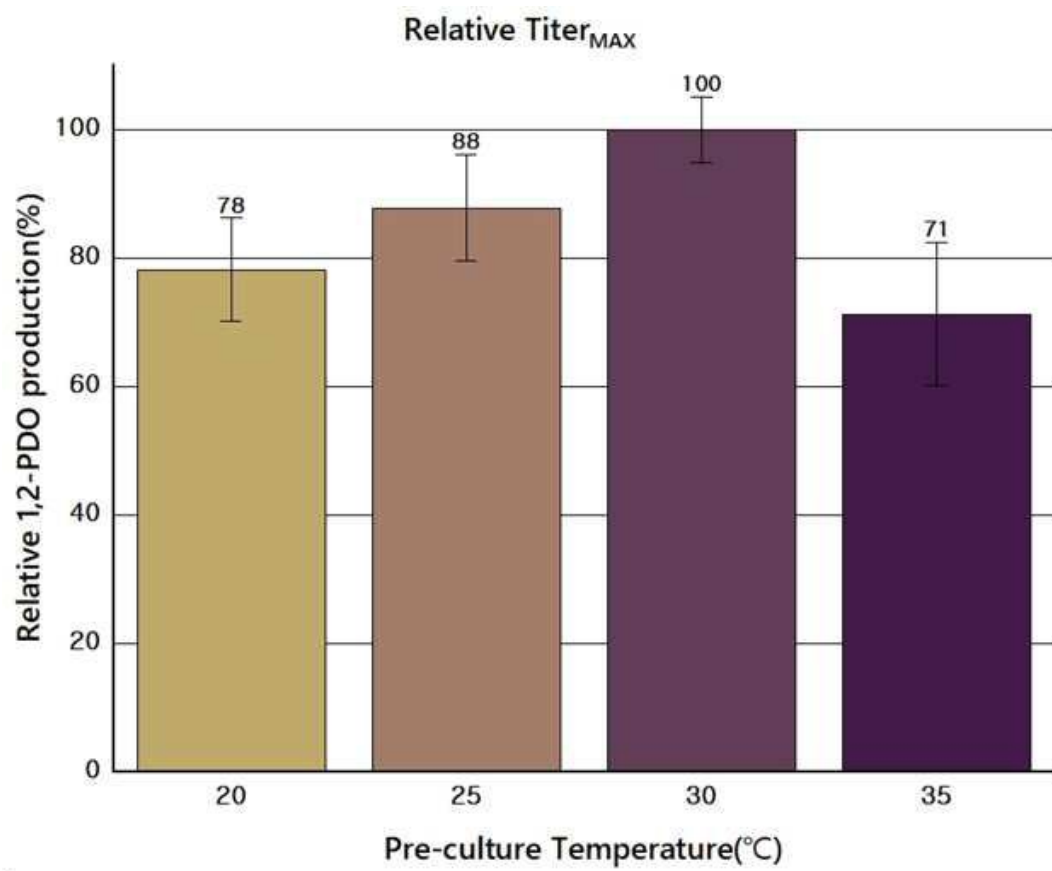
도면6c



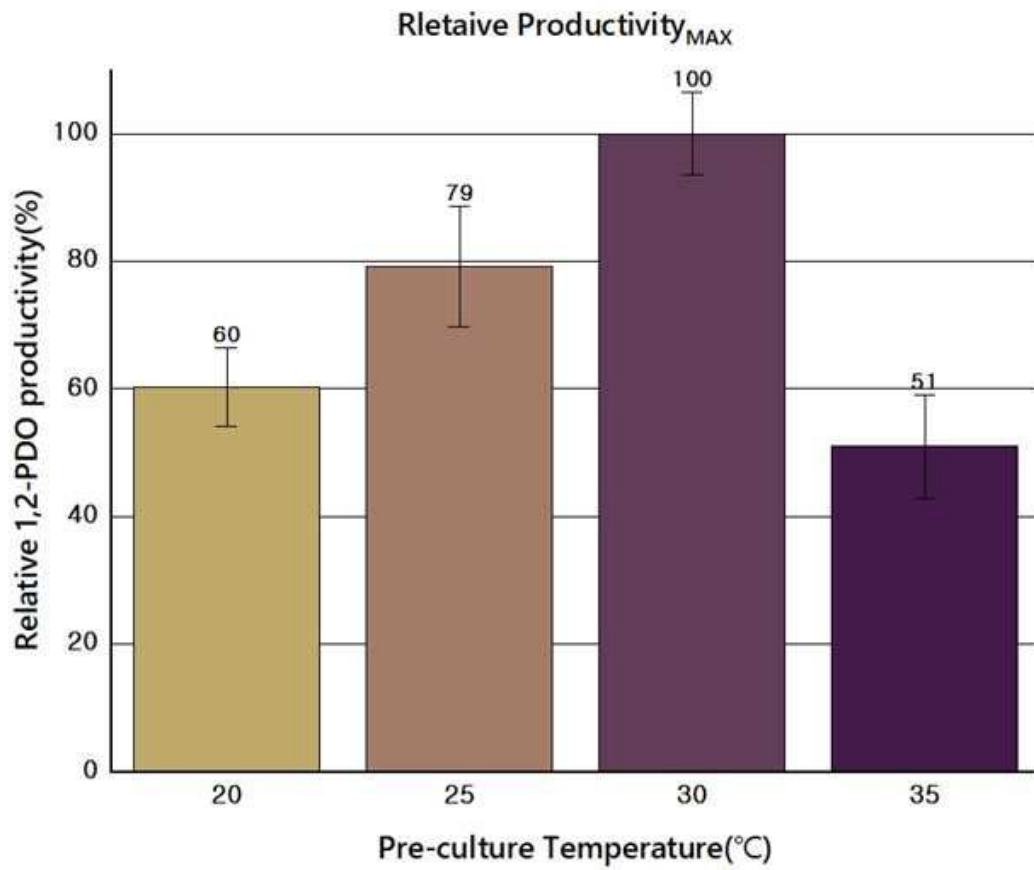
도면6d



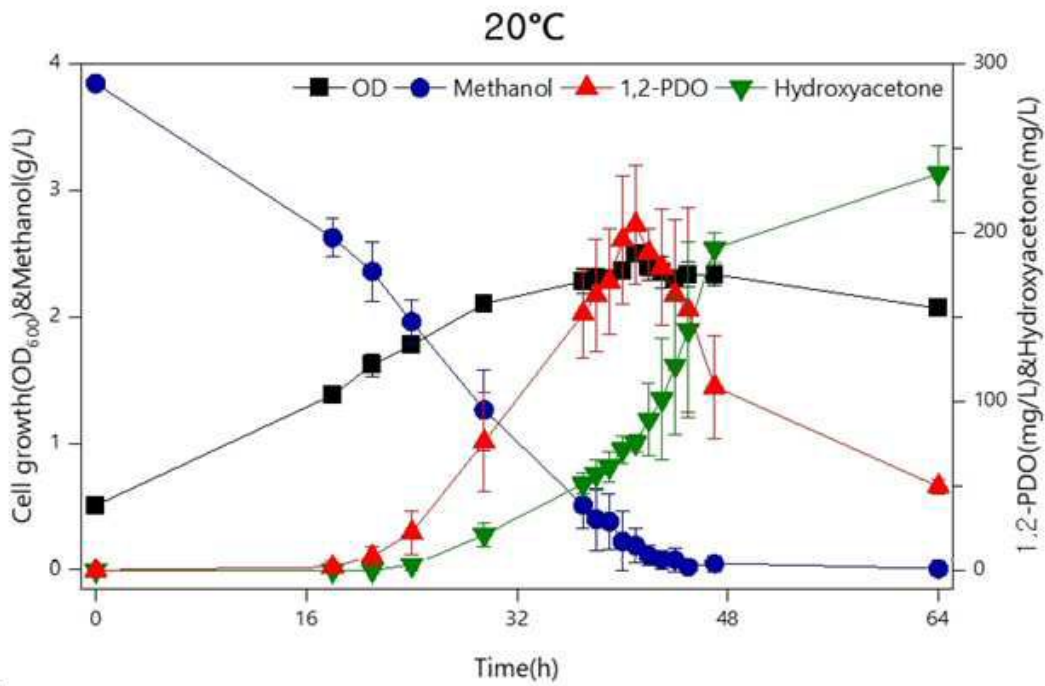
도면6e



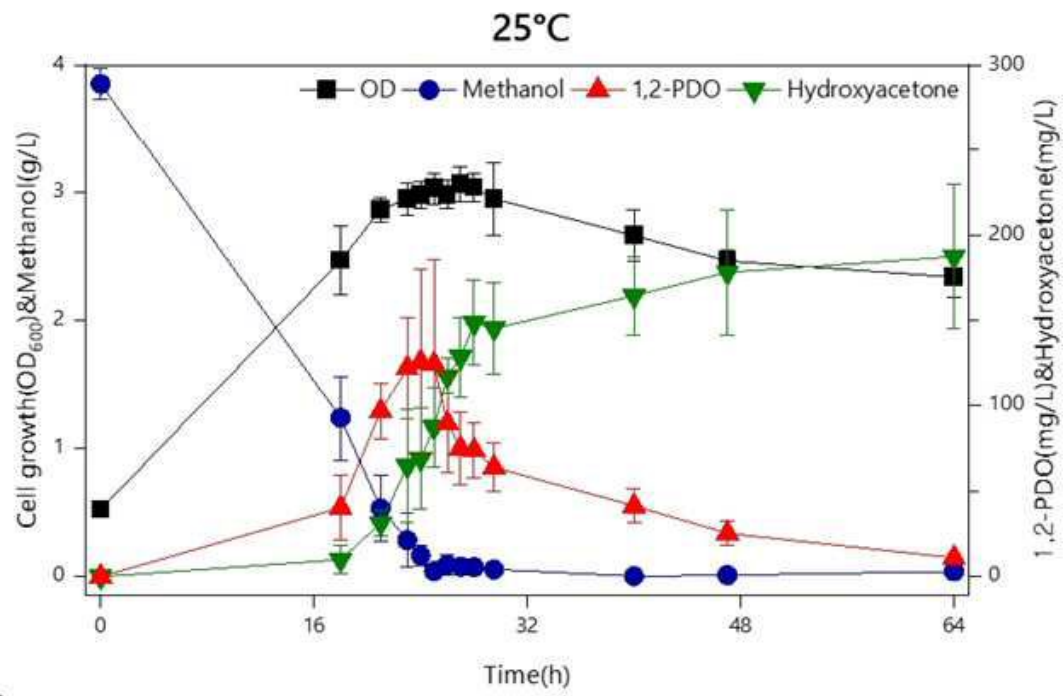
도면6f



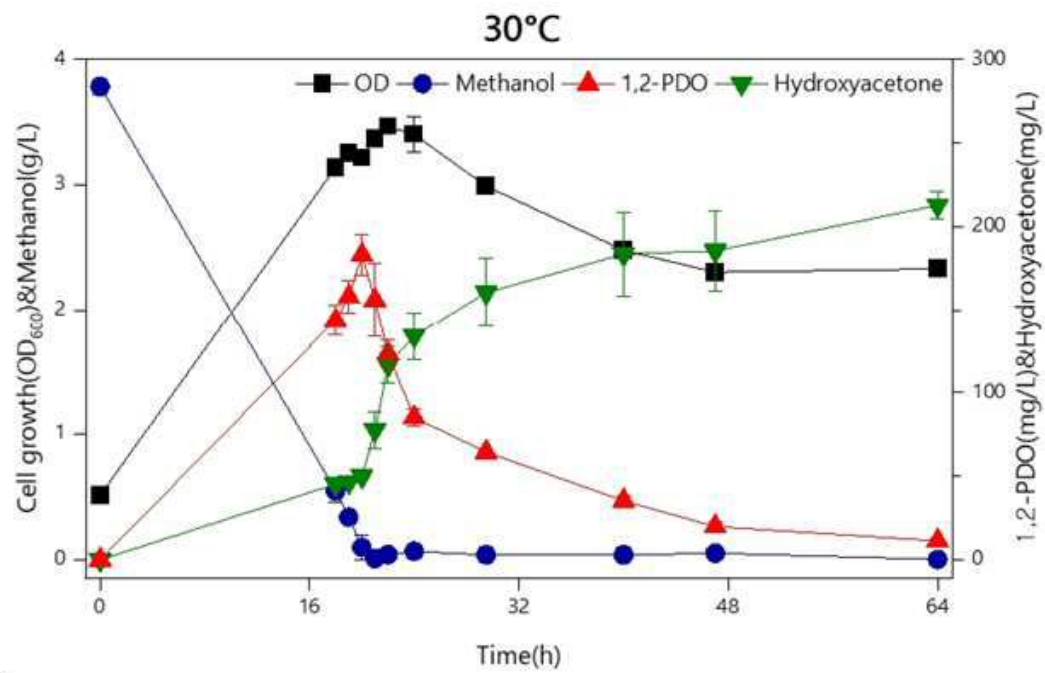
도면7a



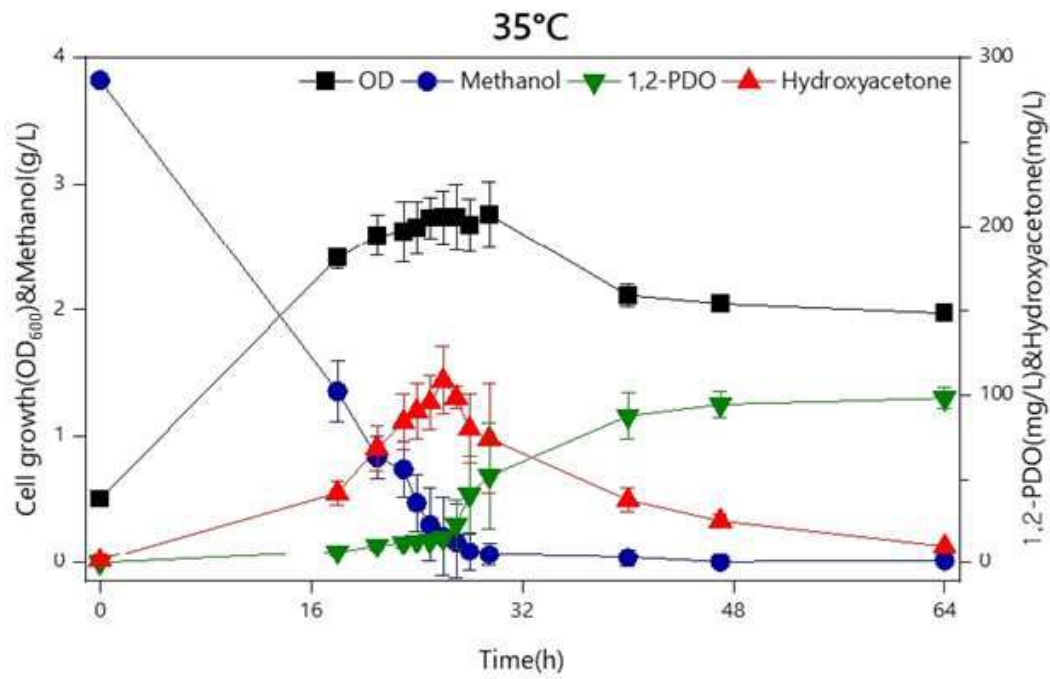
도면7b



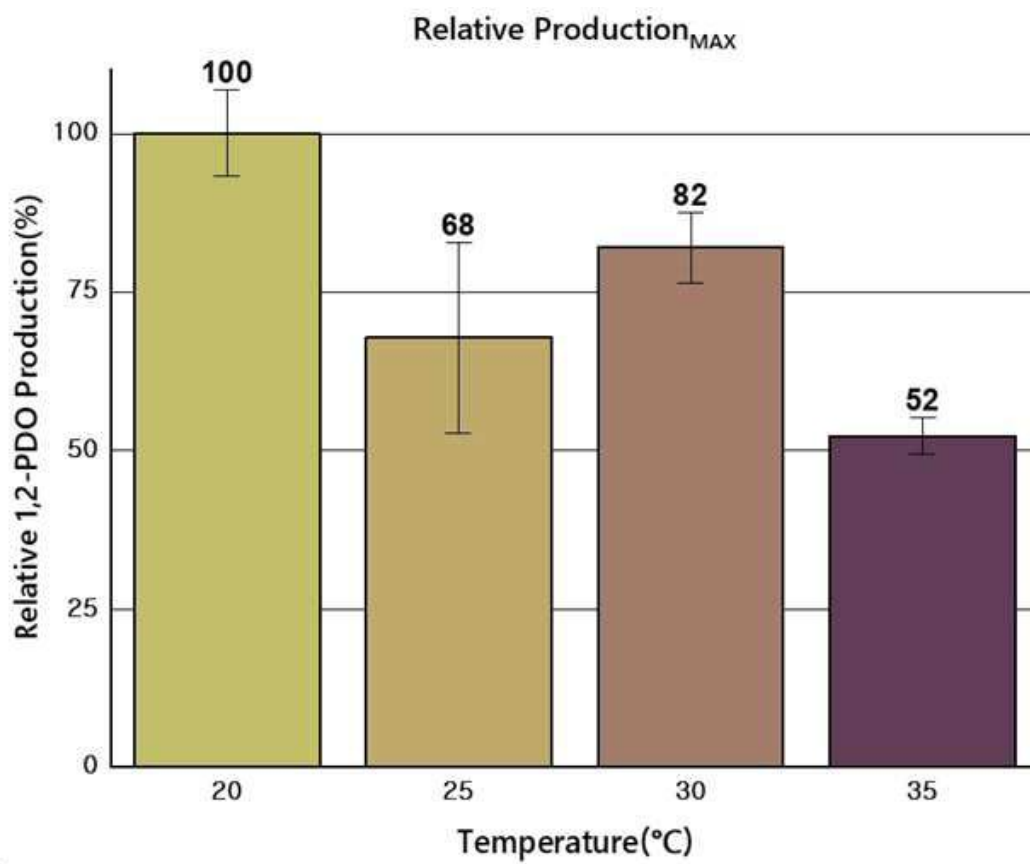
도면7c



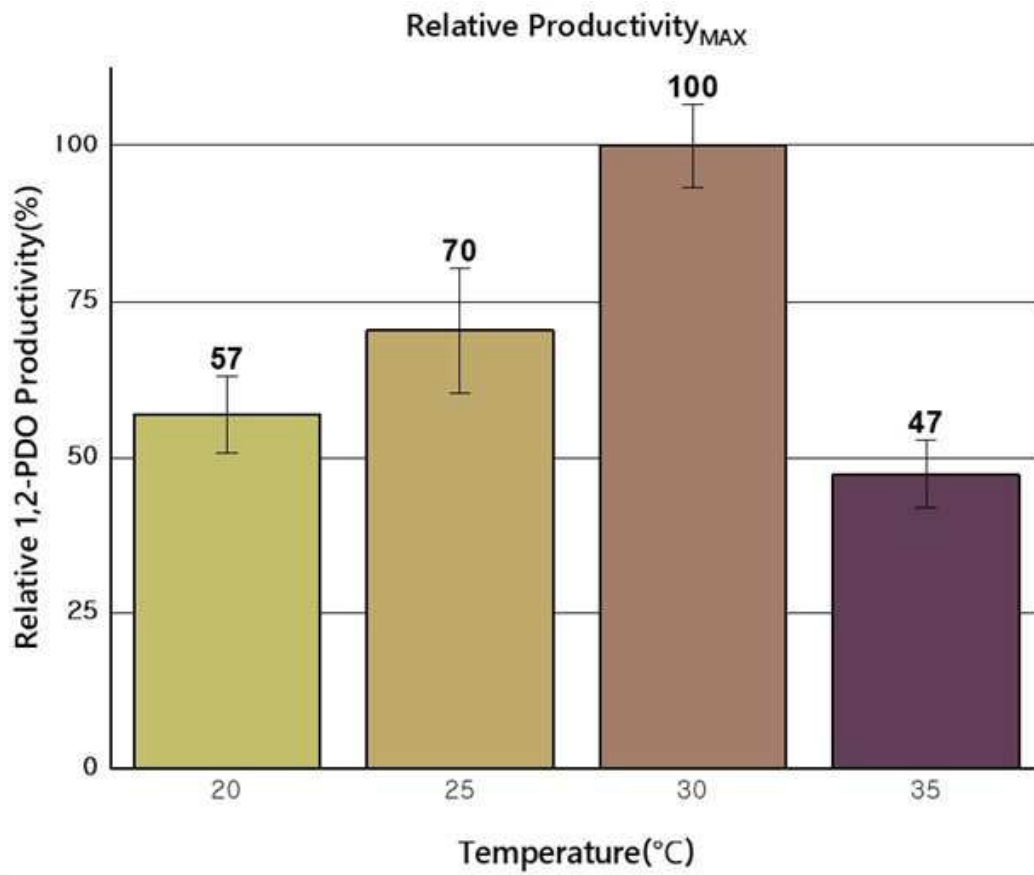
도면7d



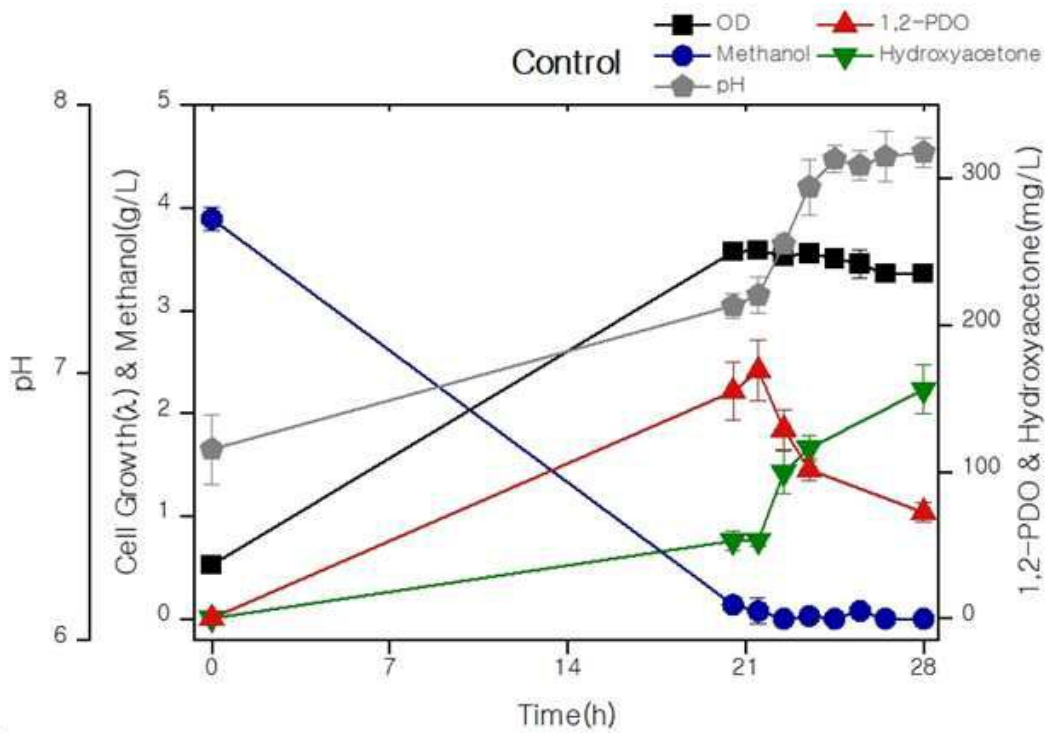
도면7e



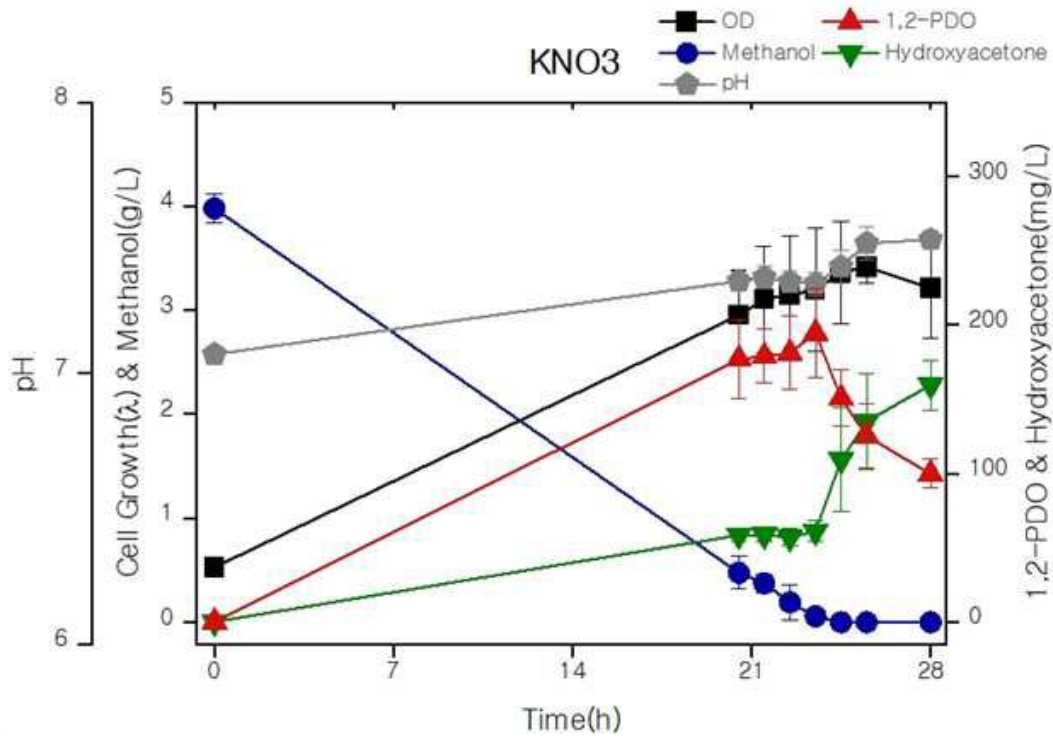
도면7f



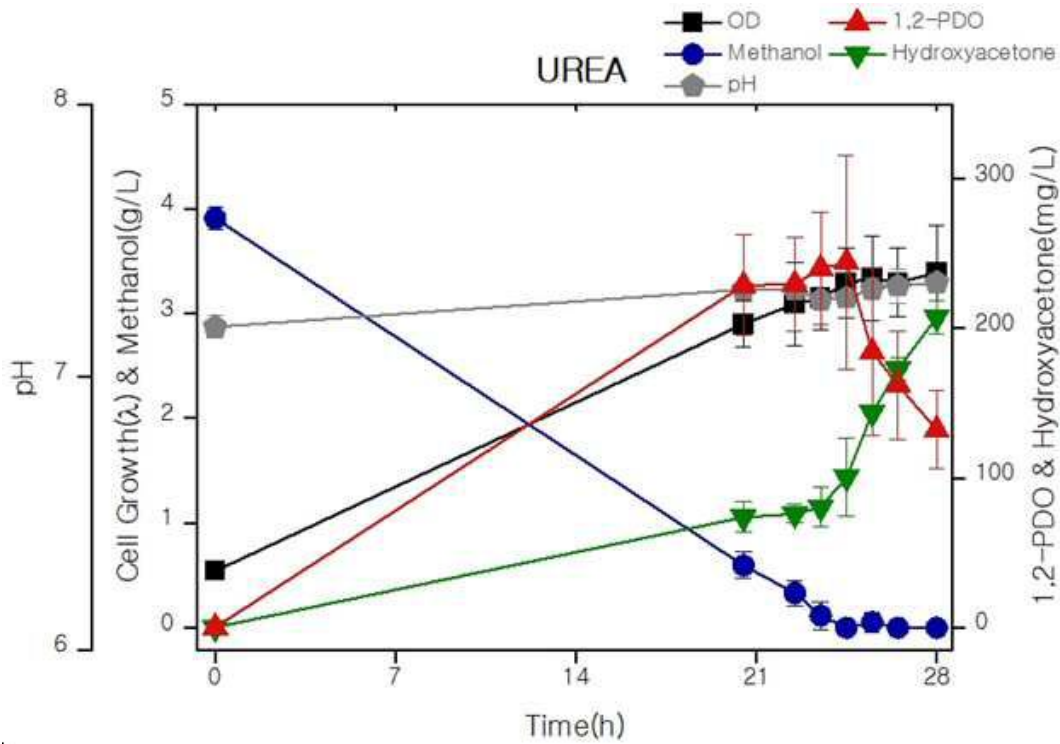
도면8a



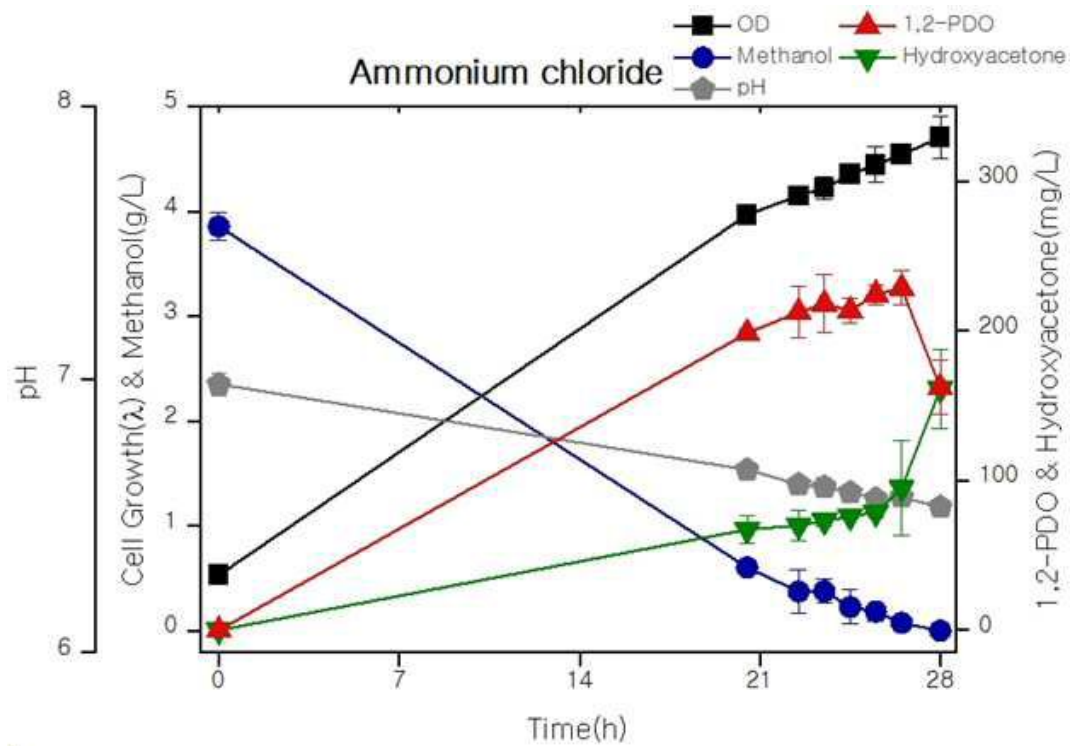
도면8b



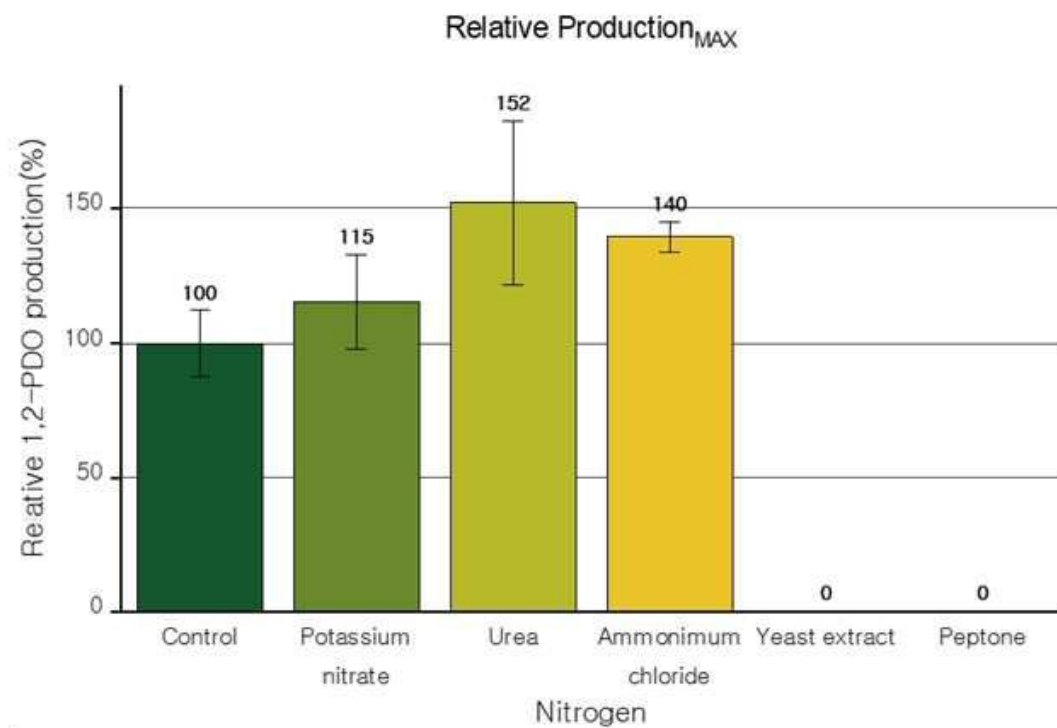
도면8c



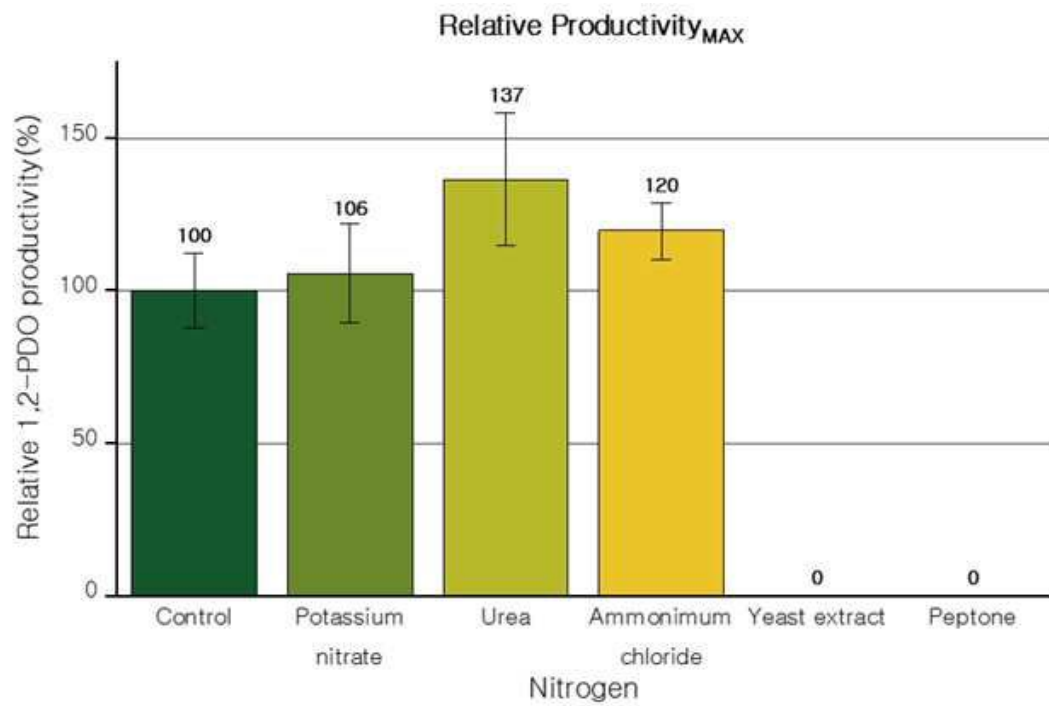
도면8d



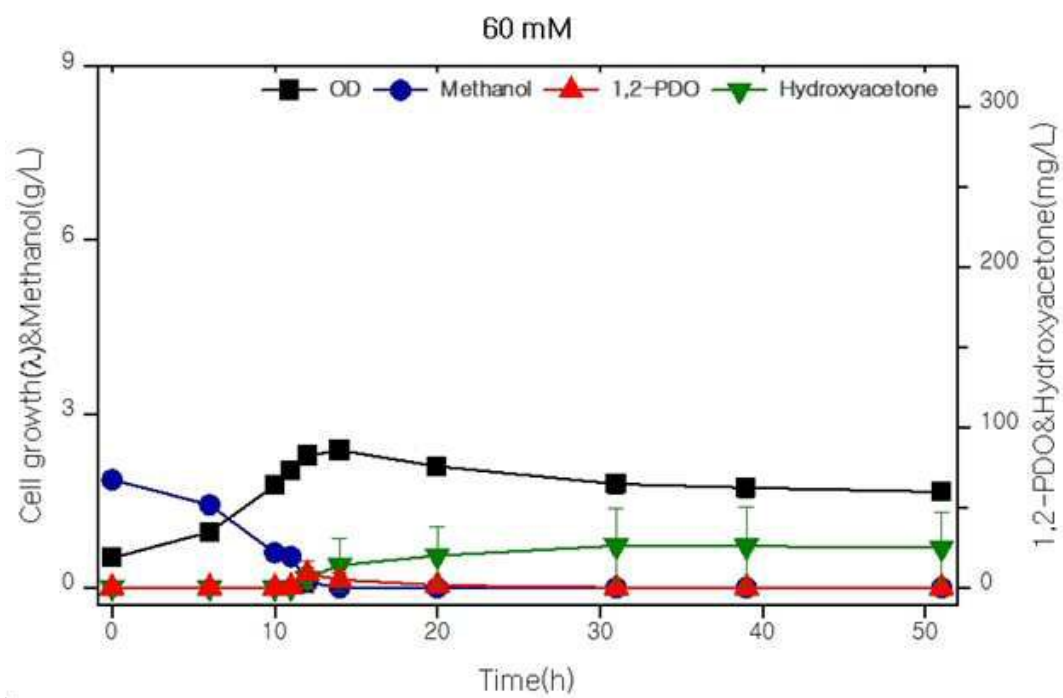
도면8e



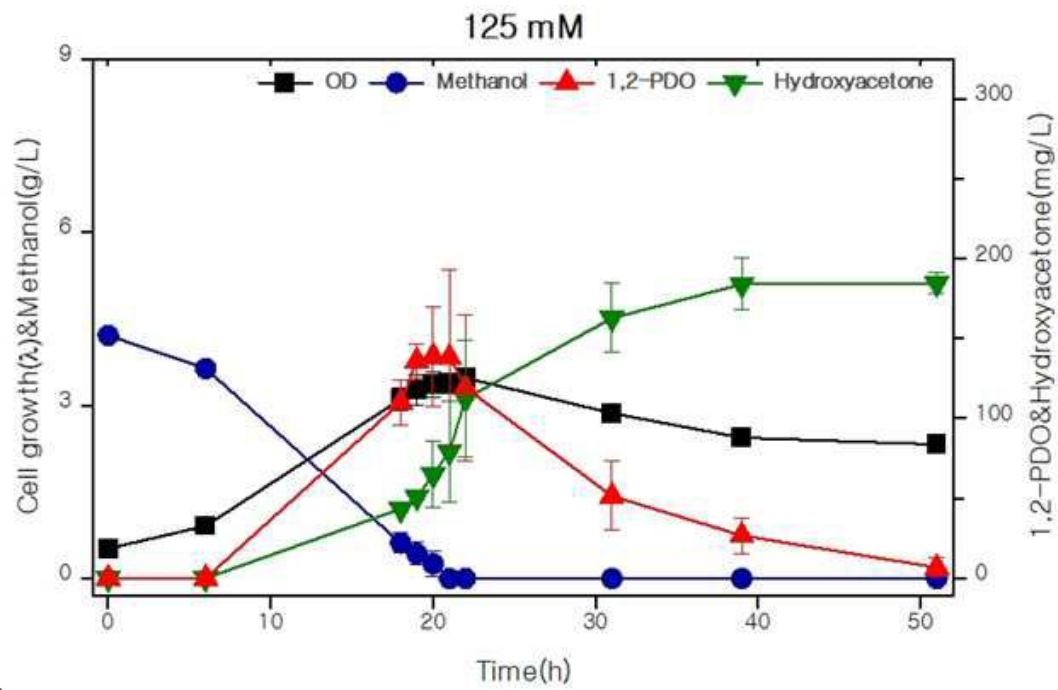
도면8f



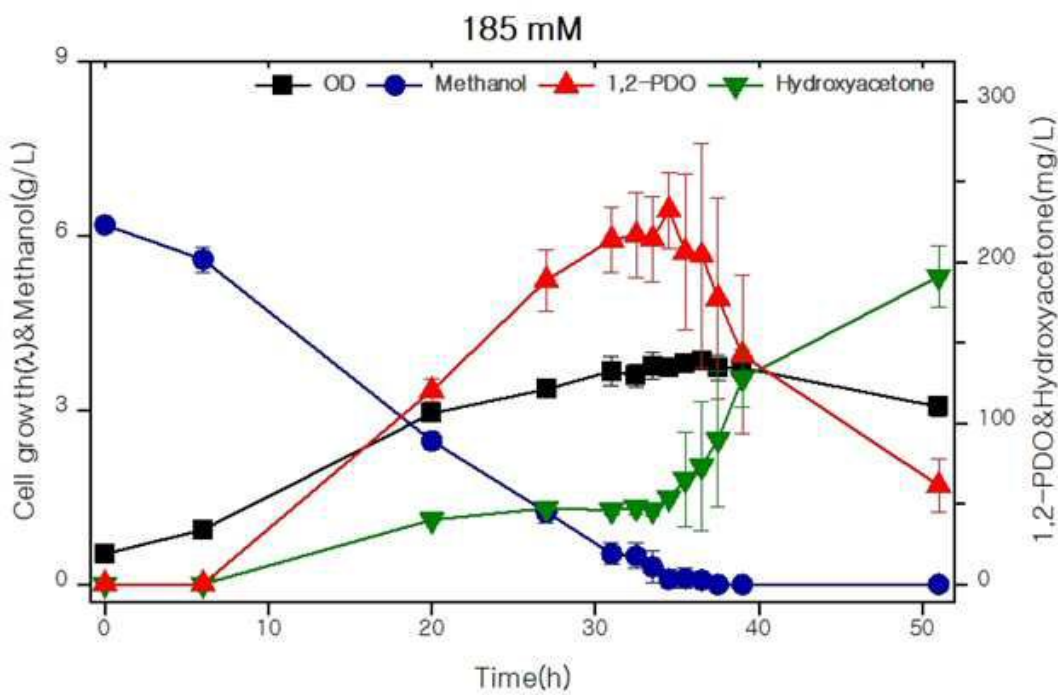
도면9a



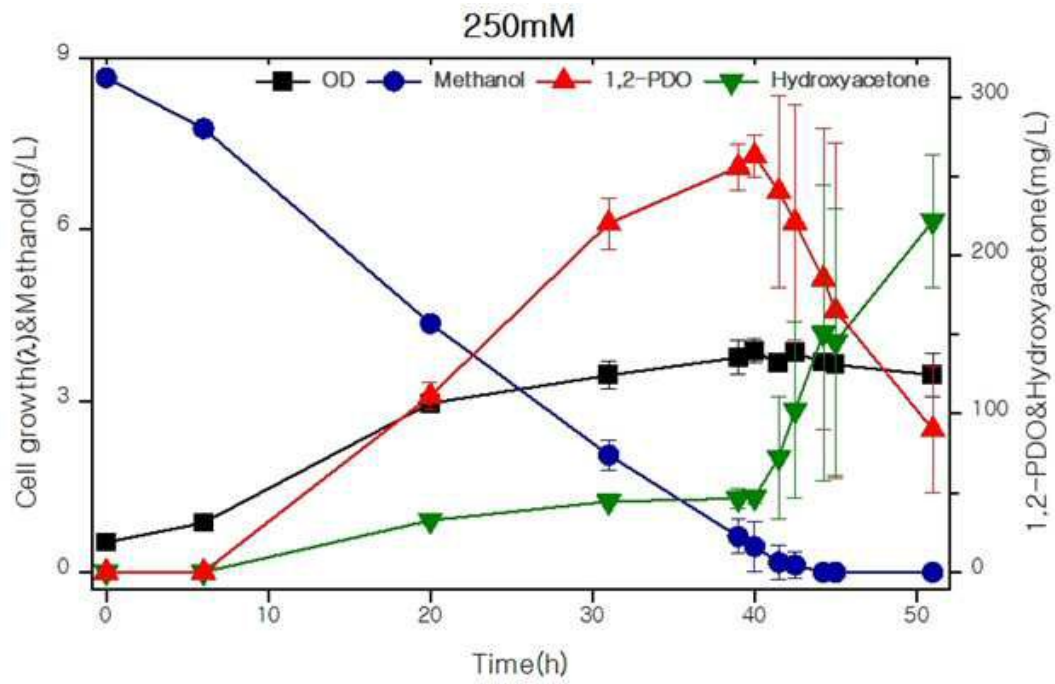
도면9b



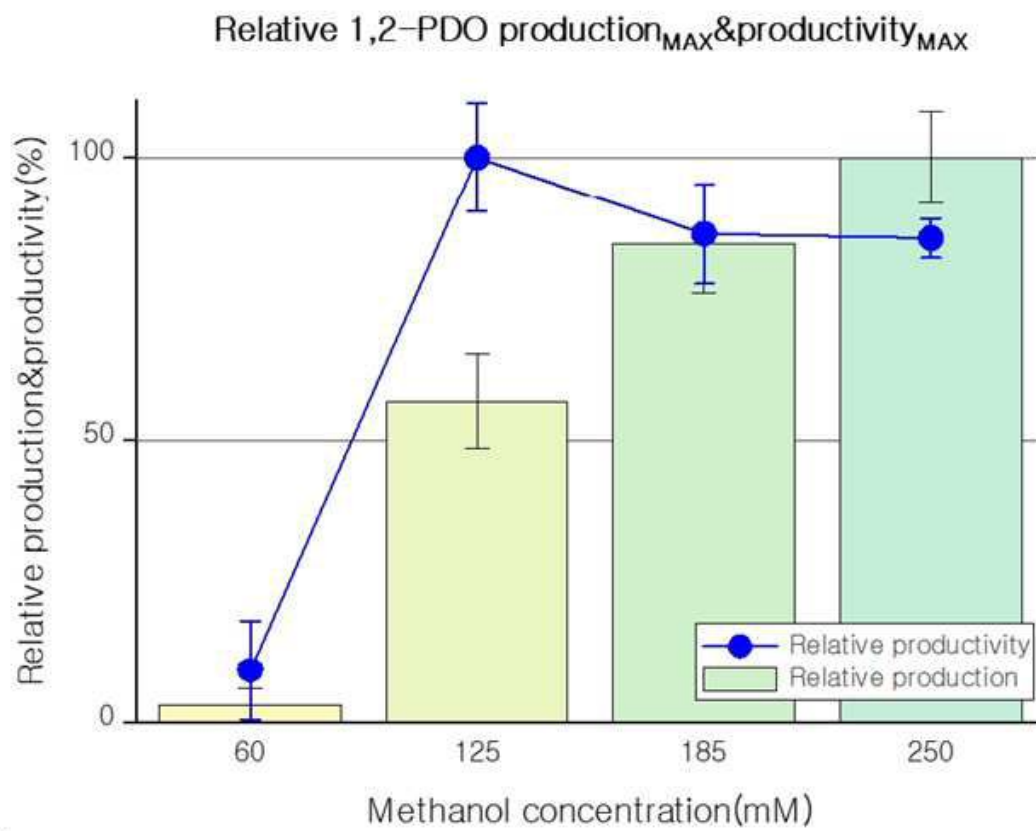
도면9c



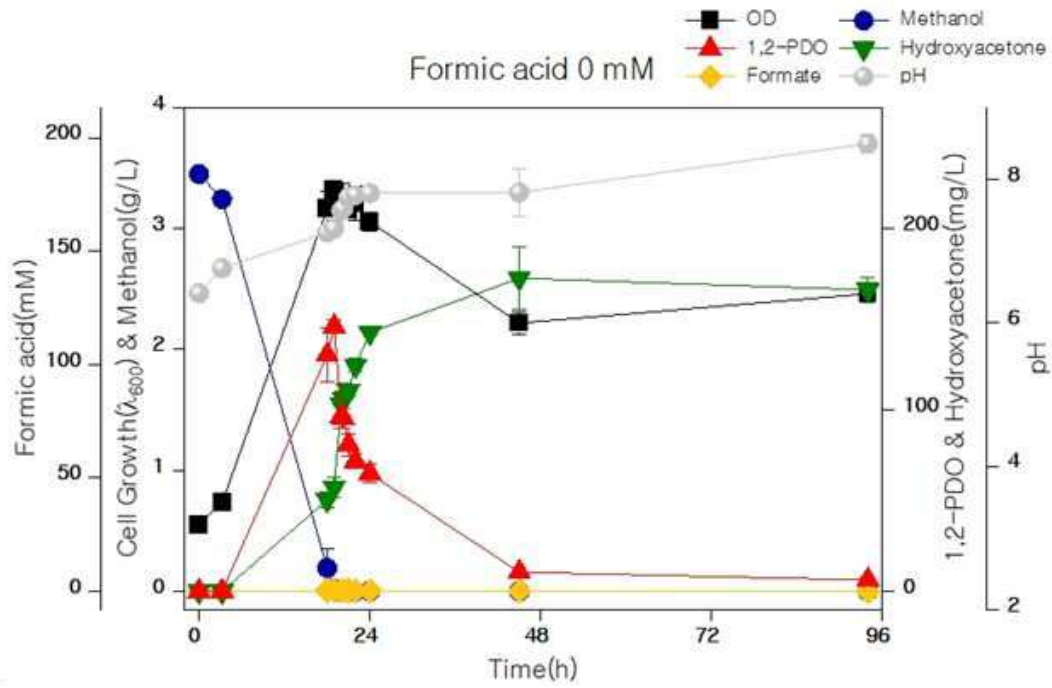
도면9d



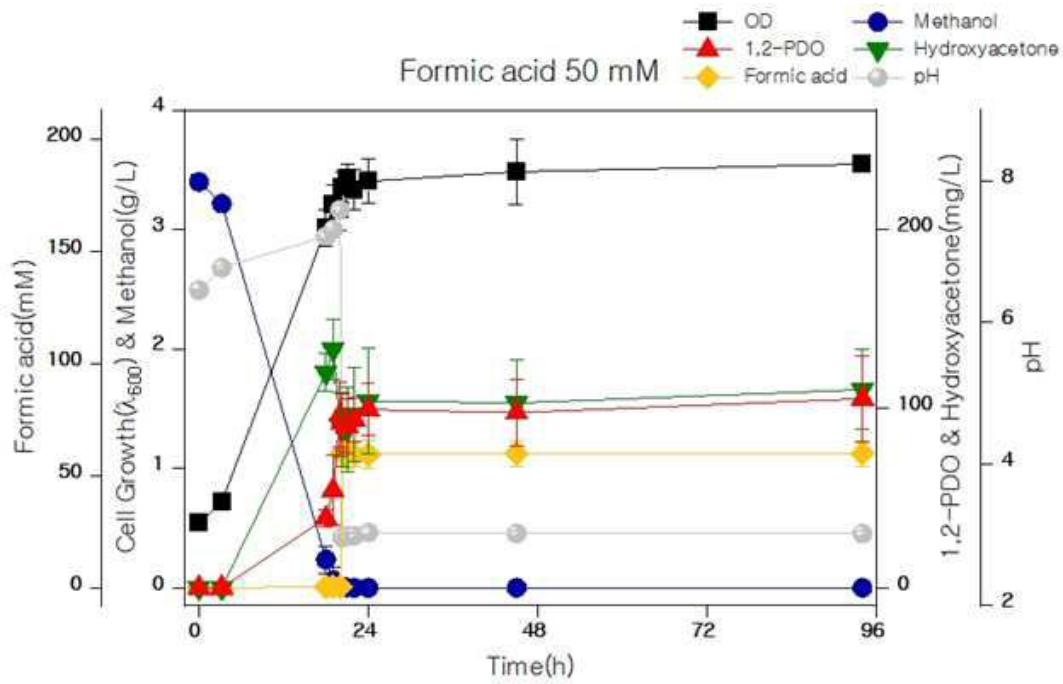
도면9e



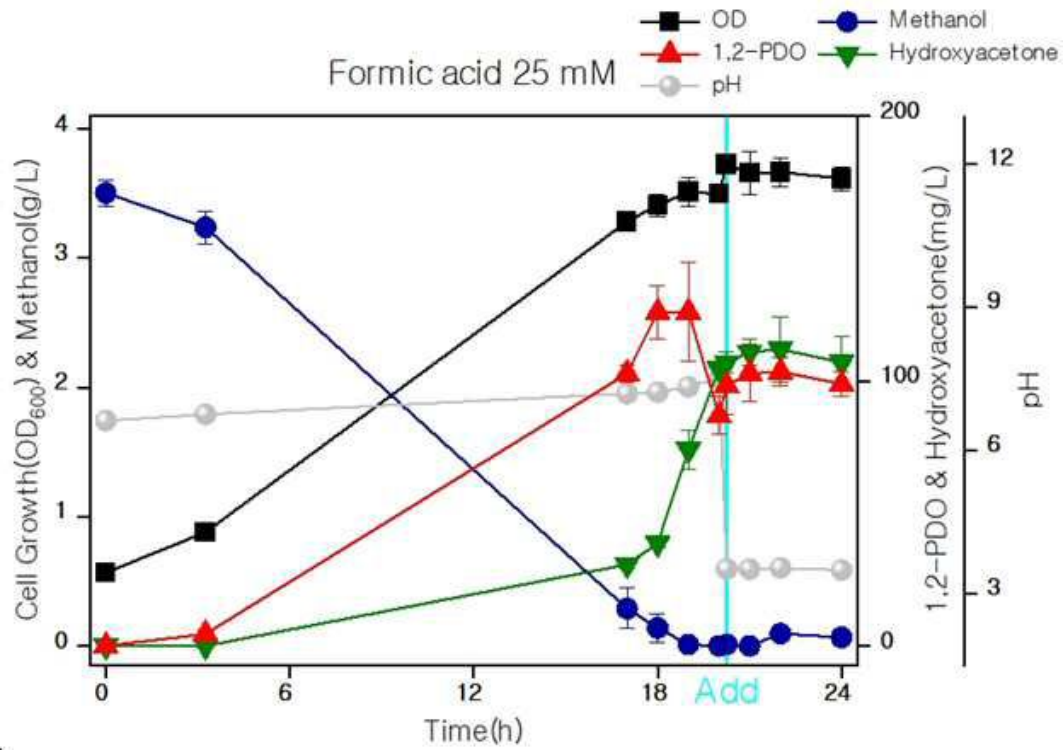
도면10a



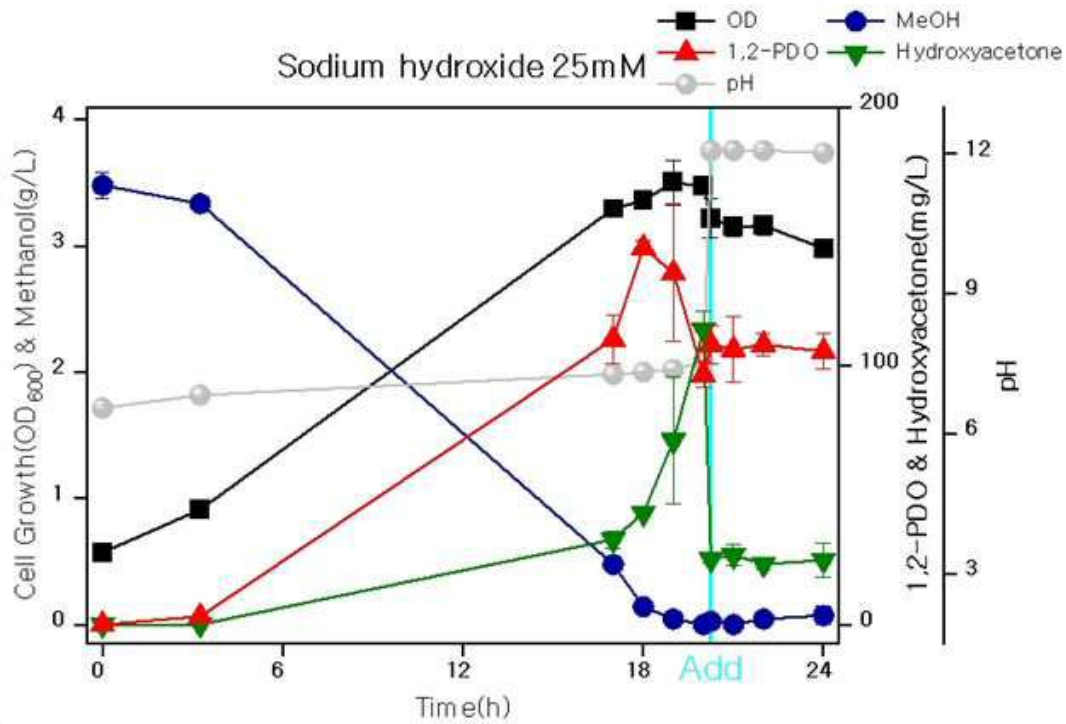
도면10b



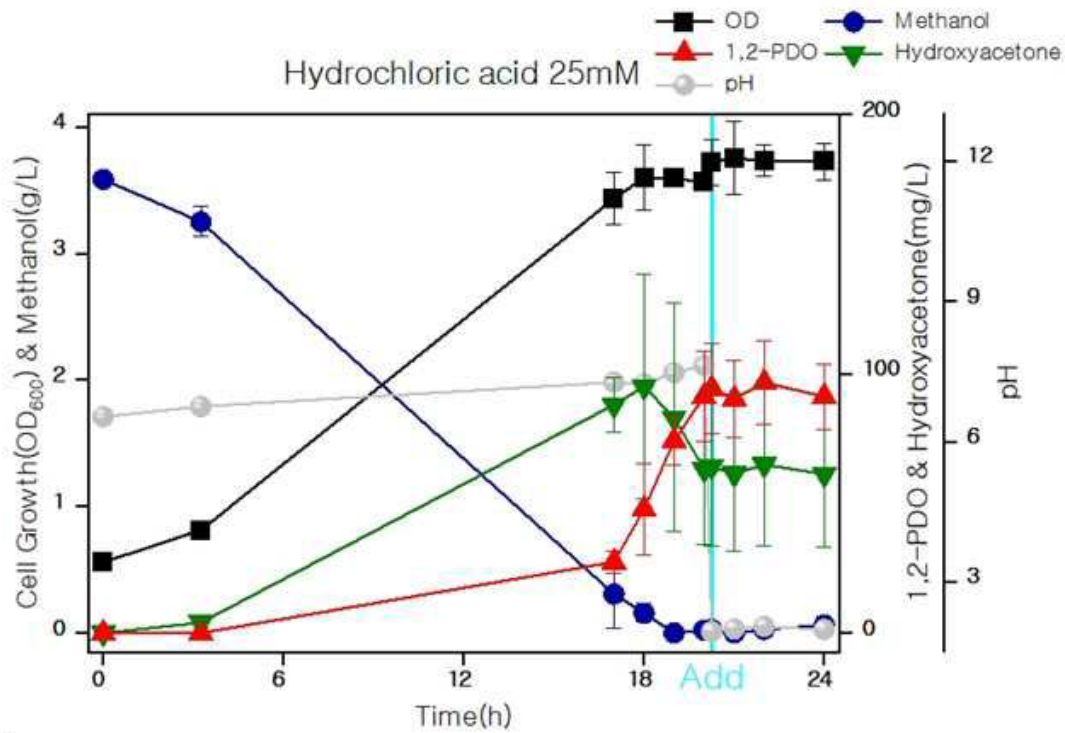
도면10c



도면10d



도면10e



서열 목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> COMPOSITION FOR PROMOTING PRODUCTION OF 1,2-PROPANEDIOL, AND
METHOD FOR PRODUCING 1,2-PROPANEDIOL USING THE SAME

<130> PN200238P

<150> KR 10-2020-0137492

<151> 2020-10-22

<160> 43

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 5730

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pMEV vector

<400> 1

gaccctttcc gacgtcacc gggctggttg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg 60

gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcggcg 120

gttgtggata cctcgcggaa aacttgccc tctactgacag atgaggggcg gacgttgaca 180

cttgaggggc cgactcacc ggcgcgcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc	240
cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt	300
tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg	360
gcgcgactac tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca	420
gatgaggggc gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt	480
gcaagggttt cgccccgtt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac	540
caatatattt aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc	600
cgaagggggg tgccccctt tctcgaacct tcccgcccg ctaacgcggg cctcccatcc	660
ccccaggggc tgcgcccc cggcgcgaac ggccctaccc caaaaatggc agccaagctg	720
accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg	780
tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc accagtactg accccgtaga aaagatcaaa	840
ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca	900
ccgctaccag cggtaggtttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta	960
actggcttca gcagagcga gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc	1020
caccacttca agaactctgt agcacgcctt acatacctcg ctctgctaata cctgttacca	1080
gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta	1140
ccggataagg cgcagcggtc gggtgaacg gggggttctg gcacacagcc cagcttggag	1200
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt	1260
cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc	1320
acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac	1380
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcgagcctt atggaaaaac	1440
gccagcaacg cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggctttttgc tcacatgttc	1500
tttctgctg tatccctga ttctgtggat aaccgtagca tgcgttgacg acaacggtgc	1560
gatgggtccc ggccccggtc aagacgatgc caatacgttg cgacactacg ccttggcact	1620
tttagaattg cttatcgtc ctgataagaa atgtccgacc agctaaagac atcgcgtcca	1680
atcaaagcct agaaaatata ggcaaggga cgtaatggg cccttcacac agaggagaga	1740
cagcgaattc tggtaacctc tagactatcg actagtgggt acctctgcag aagcttcggg	1800
agctcttaag ccagccccgc tgctcccggc atccgcttac agataaaacg aaaggctcag	1860
tcgaaagact ggccctttcg ttttatacaa gcctccagg ggagatgcgt ggatccttag	1920
atctaggcct gaatgcctcc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga	1980
gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct	2040

gcgttgcgg gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagtctg atttattcaa	2100
caaagccgcc gtcccgtaaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca	2160
attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat	2220
tatcaatacc atatctttga aaaagccgtt tctgtaata aggagaaaac tcaccgaggc	2280
agttccatag gatggcaaga tcttggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa	2340
tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcacatgag	2400
tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa	2460
caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac aaccaaaccg ttattcattc	2520
gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaacag	2580
gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac aacaatattt tcacctgaat	2640
caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttcccggt gatcgagtg gtgagtaacc	2700
atgcatcacc aggagtagcg ataaaatgct tgatggctcg aagaggcata aattccgtca	2760
gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt	2820
tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt	2880
gcccagacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta	2940
atcgcgccct cgagcaagac gtttcccggt gaatatggct cataacaccc ctgtattac	3000
tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt	3060
aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttcccccc cccctgcag gtccgacacg	3120
gggatggatg gcgttccga tcatggctct gcttgcttcg ggtggcatcg gaatgccggc	3180
gctgcaagca atgttgtcca ggcagggtgga tgaggaacgt caggggcagc tgcaaggctc	3240
actggcgggc ctaccagcc tgacctgat cgtcggaccc ctctcttca cggcgatcta	3300
tcgggttctt ataacaacgt ggaacgggtg ggcattgatt gcaggcgctg ccctctactt	3360
gctctgcctg ccggcgctgc gtcgcggtt ttggagcggc gcagggaac gagccgatcg	3420
ctgatcgtgg aaacgatagg cctatgcat gcgggtcaag gcgacttccg gcaagctata	3480
cgcgccctag aattgtcaat tttaatctc tgtttatcgg cagttcgtag agcgcgccgt	3540
gcgtcccag cgatactgag cgaagcaagt gcgtcgagca gtgcccgtt gttcctgaaa	3600
tgccagtaaa gcgtggctg ctgaaccccc agccggaact gacccacaa ggccctagcg	3660
tttgcaatgc accaggctat cattgacca ggcgtgttcc accaggccgc tgcctcgaa	3720
ctcttcgag gtttcgcca cctgctcgcg ccacttctc acgcgggtgg aatccgatcc	3780

gcacatgagg cggaaggttt ccagcttgag cgggtacggc tcccggtgcg agctgaaata	3840
gtcgaacatc cgtcgggccc tcggcgacag cttgcggtac ttctccata tgaatttcgt	3900
gtagtggtcg ccagcaaaca gcacgacgat ttctctctcg atcaggacct ggcaacggga	3960
cgttttcttg ccacggtcca ggacgcggaa gcggtgcagc agcgacaccg attccaggtg	4020
cccaacgcgg tcggacgtga agcccatcgc cgtcgctgt aggcgcgaca ggcattcctc	4080
ggccttcgtg taataccggc cattgatcga ccagcccagg tcctggcaaa gctcgtagaa	4140
cgtgaagggt atcggtcgc cgataggggt gcgcttcgcg tactccaaca cctgctgcca	4200
caccagttcg tcctcgtcgg ccgcgagctc gacgccgtg taggtgatct tcacgtcctt	4260
gttgacgtgg aaaatgacct tgttttgcag cgctcgcgc gggattttct tgttgcgct	4320
ggtgaacagg gcagagcggg ccgtgtcgtt tggcatcgtc cgcatcgtgt ccggccacgg	4380
cgcaatcgc aacaaggaaa gctgcatttc ctgatctgc tgcctcgtgt gtttcagcaa	4440
cgcggcctgc ttggcctcgc tgacctgttt tgccaggctc tcgccggcgg ttttcgctt	4500
cttggctcgc atagtctctc gcgtgtcgtt ggtcatcgac ttgccaaac ctgccctc	4560
ctgttcgaga cgacgcgaac gctccacggc ggccgatggc gcgggcaggg cagggggagc	4620
cagttgcacg ctgtcgcgt cgatcttggc cgtagcttgc tggaccatcg agccgacgga	4680
ctggaagggt tcgcggggcg cagcatgac ggtgcggctt gcgatggttt cggcatcctc	4740
ggcggaaaac cccgcgtcga tcagttcttg cctgtatgcc ttccgggtcaa acgtccgatt	4800
cattcacct ccttgcggga ttgccccgac tcacgccggg gcaatgtgcc ctattcctg	4860
atttgaccg cctgggtgct tgggtgccag ataatecacc ttatcgcaa tgaagtcggt	4920
cccgtagacc gtctggcgt ctttctctga cttggtatc cgaatcttgc cctgcacgaa	4980
taccagctcc gcgaagtgc tcttcttgat ggagcgcgtg gggacgtgct tggcaatcac	5040
gcgcaccccc cggccgtttt agcggctaaa aaagtcatgg ctctgcctc gggcggacca	5100
cgcccatcat gaccttgcca agctcgtcct gcttctcttc gatcttcgcc agcagggcga	5160
ggatcgtggc atcacggaac cgcgccgtgc gcgggtcgtc ggtgagccag agtttcagca	5220
ggccgcccag gcggcccagg tcgccattga tcggggccag ctgcgcgacg tgctcatagt	5280
ccacgacgcc cgtgattttg tagccctggc cgacggccag caggtaggcc tacaggtca	5340
tgccggccgc cgcgcctttt tctcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg cagtacacct	5400
tgatagggtg gctgcccttc ctggttggct tggtttcatc agccatccgc ttgccctcat	5460
ctgttacgcc ggcggtagcc ggccagcctc gcagagcagg attcccgtt agcaccgcca	5520

ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaac acccgctcgc ggggtgggcct acttcaccta 5580
 tcctgcccg ctgacgccgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc ctttggcaaa 5640
 atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaaa aatcgctata atgaccccg 5700
 agcagggtta tgcagcggaa aagatccgtc 5730
 <210> 2
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 2
 atgaaaattg ctttgatcgc gcatgacaag aaaaaacagg atatggttca atttacgact 60
 gcctatcggg atattttaaa gaatcatgat ctatacgcaa ccggaaccac agggttgaaa 120

 attcatgagg cgacaggctc tcaaattgaa cgttttcaat ccggcccttt agggggagac 180
 cagcaaatcg gtgcactgat cgctgccaat gcactcgatc ttgtcatttt ttgcgcgac 240
 ccgctgaccg cgcagccgca tgaaccggat gtctcggcac taatccgttt atgtgatgtg 300
 tattccattc cgctcgccac aaatatgggt actgcggaaa ttcttgtgcg cacacttgat 360
 gaaggtgttt tcgaattccg tgaccttctt cggggagaag agccgaatgt ataa 414
 <210> 3
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <400> 3
 atgaacaact ttaatctgca caccceaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgt 60

 ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120
 gtgaaaaaaa cggcgcttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180
 gaatttggcg gtattgagcc aaaccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240
 gttcgcaac agaaagtgac tttctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc 300
 accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccggaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360
 caaacggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420
 gcaaccggtt cagaatcaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag 480

 caggcgttcc attctgccc tgttcagccg gtatttgcg tgctcgatcc ggtttatacc 540
 tacaccctgc cgccgcgtca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg 600
 gaacagtatg ttaccaaac ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660

ttgctgacgc taatcgaaga tgggtccgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg	720
cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta	780
ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cacgaactga ctgcgatgca cggctctggat	840
cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag	900
cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcactgaagg ttccgatgat	960
gagcgatttg acgccgcgat tgccgaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg	1020
accacactct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg	1080
gaagagcacg gcatgaccca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttggga tgtcagccgc	1140
cgtatatacg aagccgcccg ctaa	1164
<210> 4	
<211> 1104	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 4	
atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgctgatgt gattaatcgt	60
ctgggcgaat acctgaagcc gctggcagaa cgctggtag tgggtgggtga caaatttgtt	120
ttaggttttg ctcaatccac tgctgagaaa agctttaaag atgctggact ggtagtagaa	180
attgcgccgt ttggcgggtga atgttcgcaa aatgagatcg accgtctgcg tggcatcgcg	240
gagactgcgc agtgtggcgc aattctcgggt atcgggtggcg gaaaaaccct cgatactgcc	300
aaagcactgg cacatttcatt ggggtgttccg gttagcgtcg caccgactat cgcctctacc	360
gatgcaccgt gcagcgcatg gtctgttatc tacaccgatg agggtagagt tgaccgctat	420
ctgctgttgc caaataaccc gaatatggtc attgtcgaca ccaaaatcgt cgctggcgca	480
cctgcacgtc tgttagcggc gggatatcggc gatgcgtgg caacctggtt tgaagcgcgt	540
gcctgtcttc gtagcggcgc gaccaccatg gcgggcggca agtgacacca ggctgcgtg	600
gcactggctg aactgtgcta caacaccctg ctggaagaag gcgaaaaagc gatgcttgc	660
gccgaacagc atglagtac tccggcgtg gagcgcgtga ttgaagcgaa cacctatttg	720
agcgggtgtg gttttgaaag tgggtggtctg gctgcggcgc acgcagtga taacggcctg	780
accgctatcc cggacgcgca tcactattat cacggtgaaa aagtggcatt cggtagcgtg	840
acgcagctgg ttctggaaaa tgcgccggtg gaggaaatcg aaaccgtagc tgcccttagc	900
catgcggtag gtttgccaat aactctcgt caactggata ttaaagaaga tgtcccggcg	960
aaaatgcgaa ttgtggcaga agcggcatgt gcagaagggtg aaaccattca caacatgcct	1020

ggcggcgcga cgccagatca ggtttacgcc gctctgctgg tagccgacca gtacggtcag 1080
 cgtttcctgc aagagtggga ataa 1104
 <210> 5
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 5
 gagagacagc gaattccgc gaggaattc ccaaaggcca ggtatattat gaaaattgct 60
 ttgatcgc 68
 <210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 6
 tgggtctatt gggagttata cattcggtc ttctccc 37
 <210> 7
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 7
 ctcccaatag acccaaaggc ggtagagaaa tgaacaactt taatctgcac accc 54
 <210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 8
 ttgcgcttag ttgccttagc gggcggcttc gtatata 37
 <210> 9
 <211> 51

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	9	
ggcaactaag cgcaaagatc gaggtataa atggaccgca ttattcaatc a		51
<210>	10	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	10	
cgggctggc ttaagagctc ttattccac tcttcagga a		41
<210>	11	
<211>	1728	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fls coding sequences	
<400>	11	
atggccatga tcacggcgcg gagctggc gtgcgcacgc tgatcaaggc ggggtgtcag		60
cacctctttg gtctccacgg taccacatc gacaccatct tccaggcctg cctggaccat		120
gatgtccga tcatcgacac ccgccacgag gcggcagccg gacatgcggc ggaaggctac		180
gcccgcgcg gcgccaagct cggcgtcgcg cttgtgacgg cgggcggcgg cttcaccaac		240
gcggtgacct cgatcgcaa tgccgcacc gaccgcacgc cggtcctctt cttaccggc		300
tcgggcgccc tcaggatga cgagacgaac accctccagg cggggatcga ccaggtcgcg		360
atggcgcgcc ctatcacaa gtgggcccac cgggtaatgg ccaccgaaca catccctcgg		420
ctggtcatgc aggcgattcg cgccgcgtg agcgccccc gcggcccagt tctgctcgac		480
ctcccgctgg acatcctcat gaaccagatt gacgaagata gcgtcatcat cccggacctc		540
gtgtgtctg ccacggcg gcacccgat ccgcggacc tcgatcaggc cctggcgtg		600
ctccgaagg ccgagcgtcc ggttatcgtt ctgggcagtg aggccagccg cacggcccga		660
aagacggccc tctcgccctt cgtcgcggcc acgggcgtgc cggctcttcg cgactatgaa		720
ggcctcagta tgctgtcggg gcttcggac gccatgcggg gcggcctggt ccagaacctg		780
tacagcttcg ctaaagcgga cgccgcgcc gacctggtgc tcatgctggg cgcgcgttc		840

ggcctgaaca cgggccacgg cagcggccag ctgatcccg actcggccca ggtcatccag	900
gtcgaccggg acgcgtgcga gctgggcccgt ctgcaggcca tcgcgttgg catcgtcgcc	960
gacgtgggcg gcaccatcga ggccctcgcg caggccaccg cccaggacgc ggcgtggccc	1020
gaccgcggcg actgggtgcg caaggtcacc gacctcgccc aggagcgcta cgcgtcgatc	1080
gcggccaagt cctcgtcga gcacgccctg cacccttcc acgcctcgca ggtcatcgcc	1140
aagcacgtcg acgcgggctg gacggtcgtg gccgacggcg ggctgaccta tctgtggctg	1200
tccgaggtga tgagccgtgt gaagccgggc ggcttctct gccacggcta cctgaactcc	1260
atgggcgtcg gcttcgggac cgcgtcggc gccaggtcg ccgacctgga ggccggccgg	1320
cgcacgatcc tctgaccgg cgacggctcg gtgggtact ccatcggcga gttcgacacc	1380
ctggtccgga agcagctgcc gctgatcgtg atcatcatga acaaccagtc gtggggctgg	1440
acctccact tccagcagct cgcggtcggc ccgaaccgcg tgaccggcac gcgcctcgag	1500
aacggctcgt accacggcgt cgccggggc ttcggcgccg acggctacca cgtcgactcg	1560
gtcgagtcgt tcagcggcg cctcgcccag gccctggccc acaaccgccc ggctcgatc	1620
aacgtcggg tcgcgtcga ccccatcccg ccggaggagc tcctctcat cggcatggac	1680
ccgttcgccc gcagcaccga gaacctctac ttccagtcg gcgcctaa	1728
<210> 12	
<211> 1755	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> dakl coding sequences	
<400> 12	
atgtccgcta aatcgtttga agtcacagat ccagtcaatt caagtctcaa agggtttgcc	60
cttgctaacc cctccattac gctggtcctt gaagaaaaaa ttctcttcag aaagaccgat	120
tccgacaaga tcgcattaat ttctgggtgt gtagtggac atgaacctac acacgccgt	180
ttcattggta agggatatgt gagtggcgcc gtggttggcg aaatttttgc atcccttca	240
acaaaacaga ttttaaatgc aatccgttta gtcaatgaaa atgcgtctgg cgttttattg	300
attgtgaaga actacacagg tgatgttttg cattttggtc tgtccgctga gagagcaaga	360
gccttgggta ttaactgccg cgttgctgtc ataggtgatg atgttgagc tggcagagaa	420
aagggtggta tggttggtag aagagcattg gcaggtaccg ttttggttca taagattgta	480
ggtgccttcg cagaagaata ttctagtaag tatggcttag acggtacagc taaagtggct	540
aaaattatca acgacaattt ggtgaccatt ggatcttctt tagaccattg taaagttcct	600

ggcaggaaat tcgaaagtga attaaacgaa aaacaaatgg aattgggtat gggatattcat 660
aacgaacctg gtgtgaaagt tttagacctt attccttcta ccgaagactt gatctccaag 720
tatatgctac caaaactatt ggatccaaac gataaggata gagcttttgt aaagtttgat 780
gaagatgatg aagtgtctt gttagttaac aatctcggcg gtgtttctaa tttgttatt 840
agttctatca ctccaaaac tacggatttc ttaaaggaaa attacaacat aaccccggtt 900
caaacaattg ctggcacatt gatgacctcc ttcaatggta atgggttcag tatcacatta 960

ctaaacgcca ctaaggctac aaaggctttg caatctgatt ttgaggagat caaatcagta 1020
ctagacttgt tgaacgcatt tacgaacgca ccgggctggc caattgcaga ttttgaaaag 1080
actttgccc catctgttaa cgatgacttg ttacataatg aagtaacagc aaaggccgtc 1140
ggtagctatg actttgacaa gtttgcctgag tggatgaaga gtggtgctga acaagttatc 1200
aagagcgaac cgcacattac ggaactagac aatcaagttg gtgatggtga ttgtggttac 1260
actttagtgg caggagttaa aggcatcacc gaaaaccttg acaagctgtc gaaggactca 1320
ttatctcagg cggttgccca aatttcagat ttcatgaag gctcaatggg aggtacttct 1380

ggtggtttat attctattct tttgtcgggt ttttcacacg gattaattca ggtttgtaaa 1440
tcaaaggatg aaccgcgtac taaggaaatt gtggctaagt cactcggaat tgcattggat 1500
actttataca aatatacaaa ggcaaggaag ggatcatcca ccatgattga tgctttagaa 1560
ccattcgtta aagaatttac tgcatctaag gatttcaata aggcggtaaa agctgcagag 1620
gaagtgctga aatccactgc tacattcgag gccaaatttg gcagagcttc gtatgtcggc 1680
gattcatctc aagtagaaga tcttgggtgca gtaggcctat gtgagttttt gaaggggggtt 1740
caaagcgctt tgtaa 1755

<210> 13
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> artificial primer
<400> 13

cctgcaagag tgggaataag agctccttag acgaaaaagg aggtattttt atggccatga 60
tcacgggcgg c 71

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial primer

<400> 14

ggacattcct ttaggcgccg gactggaag 29

<210> 15

<211> 37

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial primer

<400> 15

cggcgccctaa aggaatgtcc gctaaatcgt ttgaagt 37

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial primer

<400> 16

agcagcgggg ctggcttaag ttacaaggcg ctttgaaccc 40

<210> 17

<211> 422

<212> DNA

<213> Methylobacterium extorquens

<400> 17

atggttcgcg tggcggacct cgaccgcgcg ctgccttct acgtcgatgc cttcgggctc 60

aaggaggtcc ggcgcgtcga gaatgagaag ggccgcttca ccctcgtctt cctcgccgct 120

ccgggggatg tcgagcgggc cgaggcgacg aaatcgccgc tgatcgagct gacctacaat 180

tgggatcccg agacctatc cggcgggcgc aattcgggc acctgccta tcaggtcgat 240

gacatctacg ctttctgcca gcggtgaag atgcgggcgt gaccatcaac cggccgccgc 300

gcgacgggta catggccttc gtgcgtcgc ccgacggcat ttccatcgag atcctgcaga 360

aggcgggggc gaagcccccg caggagccgt gggcctccat ggagaacacc ggaacctggt 420

ag 422

<210> 18

<211> 396

<212> DNA

<213> Methylobacterium extorquens

<400> 18

atggccaagc ccgtccacac catgatccgc gtccgcgacg aggcgcgctc gcgggactac 60

tatgcccgcg ctttcggcct ggagccggcc gaccggttcg actttccgga cttcacgctg 120

ctctacctgc gcgaccatc ctgcgcgttc gaactcgaac tgacgggtcaa caaggaccgc 180

gccgagccct acaatctcgg cgacggctac ggtcacctcg ctttcgtggt ggaggatgcc 240

gaggccgagc atgcccgtt cgagcgcgag gggcttcggg tcacgccggt caaaaccctc 300

aagcacggcg acaccgcgtt cgcgaccttc tttttcgcca ccgaccgga cggctacaag 360

atcgaggtga tccagaaggg cggccgtttc gcctga 396

<210> 19

<211> 5722

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pk19mobsacB vector

<400> 19

tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc 60

aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 120

gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgcgag caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca 180

ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag 240

cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttgcatgcct 300

gcaggtcgac tctagaggat ccccggttac cgagctcgaa ttcactggcc gtcgttttac 360

aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc 420

ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc 480

gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgataagc tagcttcacg ctgccgcaag cactcagggc 540

gcaagggtg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac 600

cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa 660

agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggtt ttatggacag 720

caagcgaacc ggaattgccg gctggggcgc cctctggtta ggttgggaag ccctgcaaag 780

taaaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgac 840

aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 900

cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggtctgt 960

ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg	1020
acctgtccgg tgcctgaat gaactccaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca	1080
cgacgggctg tctttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc	1140
tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga	1200
aagtatccat catggctgat gcaatcgggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc	1260
cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc	1320
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg	1380
ccaggctcaa ggcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcatgcct	1440
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc	1500
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc	1560
ttggcggcga atgggctgac cgcttctctg tgttttacgg tatcgccgt cccgattcgc	1620
agcgcatcgc ctctatcgc ctctttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcgc	1680
tagaggatcg atccttttta acccatcaca tatactgcc gttcactatt atttagtgaa	1740
atgagatatt atgatatttt ctgaattgtg attaaaaagg caactttatg cccatgcaac	1800
agaaactata aaaaatacag agaataaaaa gaaacagata gatttttttag ttcttttaggc	1860
ccgtagtctg caaatccttt tatgatattc tatcaacaa aagaggaaaa tagaccagtt	1920
gcaatccaaa cgagagtcta atagaatgag gtcgaaaagt aaatcgcgcg ggtttgttac	1980
tgataaagca ggcaagacct aaaaatgtga aaggcgaag tgtatacttt ggcgtcaccc	2040
cttacatatt ttaggtcttt ttttatgtg cgtactaac ttgccatctt caaacaggag	2100
ggctggaaga agcagaccgc taacacagta cataaaaaag gagacatgaa cgatgaacat	2160
caaaaagttt gcaaaacaag caacagtatt aacctttact accgcactgc tggcaggagg	2220
cgcaactcaa gcgtttgcga aagaaacgaa ccaaaagcca tataaggaaa catacggcat	2280
ttcccatatt acacgcatg atatgtgca aatccctgaa cagcaaaaaa atgaaaaata	2340
tcaagtttct gaatttgatt cgtccacaat taaaaatata tcttctgcaa aaggcctgga	2400
cgtttgggac agctggccat taaaaacgc tgacggcact gtcgcaaact atcacggcta	2460
ccacatcgtc ttgcatatg ccggagatcc taaaaatgcg gatgacacat cgatttacat	2520
gttctatcaa aaagtcggcg aaacttctat tgacagctgg aaaaacgtg gccgcgtctt	2580
taaagacagc gacaaattcg atgcaaatga ttctatccta aaagacaaa cacaagaatg	2640
gtcaggttca gccacattta catctgacgg aaaaatccgt ttattctaca ctgatttctc	2700

cggtaaacat tacggcaaac aaacactgac aactgcacaa gttaacgtat cagcatcaga	2760
cagctctttg aacatcaacg gtgtagagga ttataaatca atctttgacg gtgacggaaa	2820
aacgtatcaa aatgtacagc agttcatcga tgaaggcaac tacagctcag gcgacaacca	2880
tacgtcgaga gatcctcact acgtagaaga taaaggccac aaatacttag tatttgaagc	2940
aaacactgga actgaagatg gctaccaagg cgaagaatct ttatttaaca aagcatacta	3000
tggcaaaagc acatcattct tccgtcaaga aagtcaaaaa cttctgcaaa gcgataaaaa	3060
acgcacggct gagttagcaa acggcgctct cggtatgatt gagctaaacg atgattacac	3120
actgaaaaaa gtgatgaaac cgctgattgc atctaacaca gtaacagatg aaattgaacg	3180
cgcgaaacgtc ttiaaaatga acggcaaatg gtacctgttc actgactccc gcggatcaaa	3240
aatgacgatt gacggcatta cgtctaacga tatttacatg cttggttatg tttctaattc	3300
tttaactggc ccatacaagc cgctgaacaa aactggcctt gtgttaaaaa tggatcttga	3360
tcctaacgat gtaaccttta cttactcaca ctctcgctga cctcaagcga aaggaaacaa	3420
tgtcgtgatt acaagctata tgacaaacag aggattctac gcagacaaac aatcaacgtt	3480
tgcgccgagc ttctctgta acatcaaagg caagaaaaca tctgttgtca aagacagcat	3540
ccttgaacaa ggacaattaa cagttaacaa ataaaaacgc aaaagaaaat gccgatgggt	3600
accgagcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac	3660
cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgtttc cgggacgccc tcgcggacgt	3720
gctcatagtc cagcagcccc gtgattttgt agccctggcc gacggccagc aggtaggccc	3780
acaggtcat gccggccgcc gccgcctttt cctcaatcgc tcttcgttcg tctggaaggc	3840
agtacacctt gataggctgg ctgcccttcc tggttggctt ggtttcatca gccatccgct	3900
tgccctcacc tgttacgcc gcggtagccg gccagcctcg cagagcagga ttcccgttga	3960
gcaccgccag gtgcgaataa gggacagtga agaaggaaca cccgctcgcg ggtgggccta	4020
cttcacctat cctgccccgc tgacgccgtt ggatacacca aggaaagtct acacgaaccc	4080
tttgcaaaa tctgtatat cgtgcgaaaa aggatggata taccgaaaaa atcgctataa	4140
tgaccccgaa gcagggttat gcagcggaagc agcgtgctt cctgctgtt ttgtggaata	4200
tctaccgact ggaacaggc aaatgcagga aattactgaa ctgaggggac aggcgagaga	4260
cgatgcaaaa gagctctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccg tagtgatctt	4320
atttcattat ggigaaagtt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcaa	4380
aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag	4440

tgatcttccg tcacaggtat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta	4500
ctgatttagt gtatgatggt gtttttagagg tgcctcagtg gcttctgttt ctatcagctc	4560
ctgaaaatct cgataactca aaaaatacgc ccggtagtga tcttatttca ttatggtgaa	4620
agttggaacc tcttacgtgc cgatcaacgt ctcattttcg ccaaaagtig gcccagggct	4680
tcccggatc aacagggaca ccaggattta ttattctgc gaagtgatct tccgtcacag	4740
gtatttattc ggcgcaaagt gcgtcgggtg atgctgcaa cttactgatt tagtgtatga	4800
tgggtgtttt gaggtgctcc agtggcttct gtttctatca gggctggatg atcctccagc	4860
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaaaag gatctaggtag aagatccttt	4920
ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc	4980
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct	5040
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa	5100
ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag	5160
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc	5220
tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg	5280
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca	5340
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt	5400
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaga aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg	5460
tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctgggtat ctttatagtc	5520
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	5580
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgcgtgc	5640
cttttgcctc catgttcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg	5700
cctttgagtg agctgatacc gc	5722
<210> 20	
<211> 836	
<212> DNA	
<213> Methylobacterium extorquens	
<400> 20	
atgaacacgg acgatttcgc ctacgatttc gacgcgccg attcggactg gaactacgag	60
ccgtcgcggg ccgatctgtt ccggcagatc gacgcgccac tctataccac tgattccaac	120
ggctggctga cctactacaa cgaagccgcc gcacagcttt ggggattccg ccccgatgc	180
ggcaaggcgc gctgggtgcgg cgcttggcgg ctgttcgagg cggacggcgc gccgctgccg	240

cacgacctgt cgccgatggc gctcacccctc aaaggcgcgc gcccagtgcg cggcgtccag 300

atcggcctcg aacggccgga cggaagccgg atggcggttc tgccttaccc gacggcgttg 360

cgcgacggga cgggcgcctg ggtgggggga tgcaacatcc tctcgccgt cgagcgctca 420

agcctgcgcg ttccgctccg cggggcgctc cagggccggc cgacgcttcg ggccgcccaa 480

cttgcgagca tgcacagatg ttcggcgtga gcttgccgcg tctgcctcgg cgatccacct 540

cgttcgagcg aagcgatccg cgggatgtct ccccgatcg ccttgccgcc tgaggaacgt 600

gccgcctgaa aaacaggagg aagccatgtc ggtcgatacc aactggagcc tcgacgccgt 660

ccagagcctg cgcagcatgg cccgcgaggg cataccctc tccgtcatca gcctgcggct 720

caagcggccg gtcgatgcgg tctgcgcaa gctcgccgaa ctcggcatca cgccaagct 780

cgagctttga ccggacgggc gccggggcat cgcgccggg cgcccaccg ccggac 836

<210> 21

<211> 439

<212> DNA

<213> Methylobacterium extorquens

<400> 21

cgtgtgcaag tattccatgg ccacaccgga tgatgacagg gatgtccggc tatctggccc 60

ggcacgcaaa cccgtcaacg gggcgaccga tcaggctccc gcgcggccag tcagccagcg 120

gcggccaaac ggccgttcga ccggcggcgc ccgccggatt cgaccggact gccggtgaat 180

aacatccatt tgaaaaaagc ttctcttggt gcaattgctt gatccaatta cgatcactat 240

cgcgctctcg aagctttccg ttaaattata gtgacatggc attgaaaaat agaaggcatt 300

ccttcgcaac tgacttggcg tcgatgcata ttatagcatt taagagcttt tgtttccga 360

aatggcaaca gctaagattc gccgcgtccc ggctgcgat gatcgtcgaa tcgggcatgc 420

cgcgaccggg agacggcgc 439

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial primer

<400> 22

gaccatgatt acgccaagct tatgaacacg gacgatttcg cc 42

<210> 23

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 23
 cttgcacacg gtccggcggg tgggcgcc 28
 <210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 24
 cccgccggac cgtgtgcaag tattccatgg cc 32
 <210> 25
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400>
 > 25
 aaaacgacgg ccagtgaatt cgcgccgtct cccggtcgc 39
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 26
 aaccgcgaga aacacgcttt 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 27
 gaagctagct tatcgcgcca 20

<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	28	
tttctgcgcg taatctgctg		20
<210>	29	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	29	
acgatgatgg cgagggtg		18
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	30	
ggagcctgat gaacacggac		20
<210>	31	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	31	
gcaatcatgc gccgtctc		18
<210>	32	
<211>	580	
<212>	DNA	
<213>	Methylobacterium extorquens	
<400>	32	

gctggatatct gccgcccgcg tgccggcaga acctccggaa agaccattg tcgccccctg	60
tcgtttccgg cttagacctg gacgagattc gctcccaga gcgtgaggga acgcacgcga	120
cctgtcgcgt ccggcgcgat cgccggatcg ggccgggatgc ggtgccgttc tgaagtgtg	180
tgaggagaaa cattcgatgc gctcaggggc cgcttcctc ttttccccc tgttcgggct	240
cgtgctcacg gtcggcgccg ccgatgcgca gacgccccc gagccaggcg ctgcccggcc	300
gctggtgatc ccccaggctg agggcgagcg ccagggcaag gtgctgggcc gggcgctcgc	360
ctgcggcgcg gagcgcgagc gggctgatcg ggtgctgaga gccggcccgc agcgcgatg	420
ggcggcggtc ggccggcgcg tcacggagga gcgctacgc ctggcgctcg acgacgcgat	480
gcgtctggag acgagcctgc ctgcgccctc ttgatcgcg tgcgagaagg cgctggccgg	540
gctcgaacgc ctggagaagg cgccgtagac acccaaacga	580
<210> 33	
<211> 1220	
<212> DNA	
<213> Methylobacterium extorquens	
<400> 33	
cgccctctc tccccgtac ggatgttgtg tggatgagcg cccatctggc gcagtccggc	60
cgggcggaaa gggtttttgc cgtttacctc tcgtcaacct taccgggtgc ttgctgccgg	120
caatgatcgc caccgcgtcc ctcaccgcg tcgatccga agccctgctg ccgccggcg	180
acgccccct gcgcgcggcg atgcggggct ggcgcgaggc gctggcgcg gagcggcgca	240
tggccgcaa cagggtcgag gcctacgagc gtgacctgcg ccagtttctg atccatcgcg	300
ccgcccgctc cggcacgcc accatcgccg ggtgatcgc cctgaagccc cgcgacctgc	360
gcgccttcat ggccgcgcgc cgggcccagg ggatcggtgg gcgtccctg atgcggatgc	420
tggcgggtct gcgtccttc gcccgcttc tcgaacggga gggacacggc agcgtcgcg	480
cgctcggcg ggtgcgtcc cccaaggctg agcgccgct gccgcgccg cttccattt	540
ccgccgcgt ggcatgacc gcgcccaga ccgccccga cgacgaccgc gcccgtggg	600
tgctcggcg cgacgcggcg gtgatcgcc tcctctacgg ctgggacctg cgcattcgg	660
aagccttagg gtcaccgcc gcgcagcgc cgatgccggg catcgacgag gtgcgggtga	720
cgggcaaggg tgggaaggtc cgcccgctgc cgggtgctgc ggcggtggcc gaggcggtgg	780
ccgcctacct gtcgtgtgc ccgcacccc tcgatccga ggggccgctc ttctcggcg	840
tgaagggcg gccgctctg ccgcgagtgg tcagtagc ggtttccgc ctccgcggcg	900
cgctcggcct gcccgagagc gcgacccgc acgccctgc acactcctc gcaaccatc	960

tgctcgcccg ccggggcgag ctgcgggcga tccaggaatt gctcggccac gcctcgctct	1020
cgaccacgca aatctacacc aaggtcgaatg ccggccgcct gatgagcgcc ttcgaggacg	1080
cccatccccg cgcccgcgcg ctgcgcgcct cggaaccgcc gtcaccgct tccgaaaccg	1140
ttgatgcaga gcaaggcacg agcgcccgat ccggctatgc tgtccggcag gacaggccgg	1200
 tggagcgtag aaatgcgtga	 1220
<210> 34	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> artificial primer	
<400> 34	
gaccatgatt acgccaagct tgctggtatc tgccgcgcg	39
<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> artificial primer	
<400> 35	
gagagggccg tcgtttgggt gtctacggcg	30
<210> 36	
<211> 30	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> artificial primer	
<400> 36	
acccaaacga cggccctctc tccccgtac	30
<210> 37	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> artificial primer	
<400> 37	
aaaacgacgg ccagtgaatt ctcacgcatt tctacgtcc acc	43

<210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 38
 agatcgagac gagaagcg 18

<210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 39
 ccacacaaca tccgtacc 18

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400> 40
 gaccatgatt acgccaagc 19

<210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer
 <400>
 > 41

ccacacaaca tccgtacc 18
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial primer

<400>	42	
cagaacctcc ggaaagaccc		20
<210>	43	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	artificial primer	
<400>	43	
tccacacaac atccgtaccg		20