



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042051
(43) 공개일자 2020년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) C12P 7/52 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0121904

(22) 출원일자 2018년10월12일

심사청구일자 2018년10월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55 강남테시앙포레 아파트 104동 802호(수서동, 강남테시앙포레아파트)

뉴엔 데이 투

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 하갈동(서천동)

황인엽

경기도 용인시 수지구 신봉1로172번길 8 101동 1203호(신봉동, 신봉마을 용인신봉 센트레빌 1단지)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 18 항

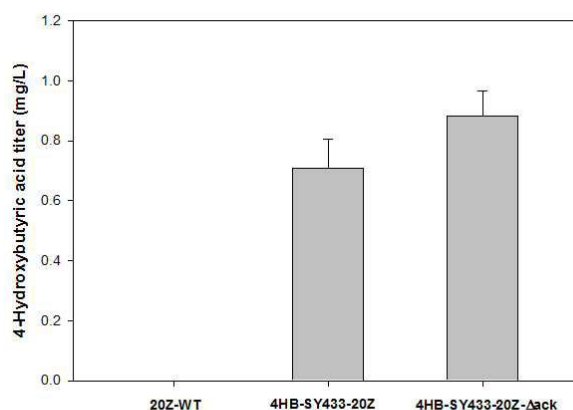
(54) 발명의 명칭 4-하이드록시부티르산 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid) 생산용 형질전환 메탄자화균; 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 4-하이드록시부티르산의 제조방법; 및 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 4-하이드록시부티르산 생산용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 형질전환 메탄자화균은 C1 탄소원으로부터 4-하이드록시부티르산을 높은 수율로 생산할 수 있는바, 친환경적이고 경제적으로 4-하이드록시부티르산의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/1217 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12P 7/52 (2013.01)
C12Y 101/01002 (2013.01)
C12Y 101/01027 (2013.01)
C12Y 101/01041 (2013.01)
C12Y 101/01042 (2013.01)
C12Y 101/01061 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase), 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase), NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(NADPH-dependent succinate semialdehyde reductase) 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid) 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 2

제1항에 있어서, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 3

제1항에 있어서, 추가로 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 것인, 형질전환 메탄자화균,

청구항 4

제3항에 있어서, 추가로 아세트산인산화효소(acetate kinase)의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 5

제1항에 있어서, 추가로 2-옥소글루타르산탈수소효소(2-Oxoglutarate dehydrogenase), 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(Phosphoenolpyruvate carboxylase) 또는 이소시트르산탈수소효소(Isocitrate dehydrogenase)의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*sucD*)는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*4hbD*)는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소를 코딩하는 유전자(*yqhD*) 서열번호 3의 염

기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 숙신산 세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*SacD*)는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 10

제3항에 있어서, 상기 젖산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*ldh*)는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 11

제4항에 있어서, 상기 아세트산인산화효소를 코딩하는 유전자(*ack*)는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 12

제5항에 있어서, 상기 2-옥소글루타르산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*sucAB*), 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 유전자(*ppc*), 이소시트르산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*icd*)는 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로셀머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노븀 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로마이크로븀 속(*Methylomicrobium*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼물라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*) 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus*) 균주인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로시너스 트리코스포리움(*Methylosinus trichosporium*) OB3b인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 야생형에 비해 4-하이드록시부티르산 생산능이 향상된 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 16

C1 탄소원을 포함하는 배양액에 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 4-하이드록시부티르산의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 배양액으로부터 4-하이드록시부티르산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 4-하이드록시부티르산의 제조방법.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 형질전환 메탄자화균을 포함하는, 4-하이드록시부티르산 생산용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid) 생산용 형질전환 메탄자화균; 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 4-하이드록시부티르산의 제조방법; 및 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 4-하이드록시부티르산 생산용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄가스는 천연가스와 셰일가스의 주성분이며, 온실효과를 일으키는 원인 물질로 알려져 있다. 석유로 대표되는 액체 탄화수소와는 달리, 메탄은 그 자체로는 기체이기 때문에 고부가 가치의 다른 물질로의 전환이 어렵고, 연료로서의 사용 또한 어렵다고 평가된다.

[0004] 한편, 메탄자화균(Methanotrophic bacteria)은 이러한 메탄을 유일한 에너지원으로 생육할 수 있는 미생물로, 1906년에 Sohngen에 의해 처음으로 분리되었다. 메탄자화균은 메탄 모노옥시게나아제(monooxygenases, MMO)라는 효소를 갖고 있어 상온, 상압 하에서 용이하게 메탄을 메탄올로 전환할 수 있다. 메탄자화균에서 메탄으로부터 탄소화합물의 생합성은 리불로오스 일인산 회로(ribulose monophosphate cycle; RuMP cycle)와 세린 회로(serine cycle)에 의해 진행되고, 일반적으로 type I의 메탄자화균은 리불로오스 일인산 회로를, type II의 메탄자화균은 세린 회로를 이용하여 바이오매스를 합성한다고 알려져 있다(J Microbiol Biotechnol. Hwang IY et al., 2014 Dec 28; 24(12):1597-605). 메탄자화균이 갖는 이러한 생리학적 특성을 이용하여, 메탄을 고부가가치 유기화합물로 전환시키는 것과 동시에, 유해한 메탄가스를 절감하고 에너지원으로 활용하려는 노력이 계속되어 왔다.

[0005] 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid, 4HB)은 감마-하이드록시부티르산(gamma-hydroxybutyric acid)로도 불리며, 자연 발생 신경전달 물질이자 향정신성 약물이다. 4-하이드록시부티르산은 기면증, 알코올 중독의 치료, 섬유근육통(fibromyalgia)의 치료 등 의약품 목적으로 사용되는 것으로 알려져 있다. 한편, 4-하이드록시부티르산은 1,4-부타디올과 같은 다양한 화합물 및 고분자의 생합성에도 사용되며, 기존에는 주로 화학 연료 기반의 자원으로부터 화학 합성을 통해 생산되었다. 그러나 이러한 화학 합성법의 경우 에너지 소모가 많고, 환경 친화적이지 못하며, 더 나아가 석유자원의 고갈이라는 문제점을 내포하고 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid)을 생산하기 위한 방법으로, 보다 환경 친화적이고, 에너지 소비를 절감할 수 있는 바이오매스를 활용한 방법에 대해 예의 연구 노력한 결과, 메탄을 탄소원으로 이용 가능한 형질전환 메탄자화균을 통해 보다 친환경적이고 경제적이며, 높은 수율로 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid)을 생산할 수 있는 방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase), 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase), NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(NADPH-dependent succinate semialdehyde reductase) 및 숙신산 세미알데히드 탈수소 효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid) 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 4-하이드록시부티르산의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 4-하이드록시부티르산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase), 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase), NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(NADPH-dependent succinate semialdehyde reductase) 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된, 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid) 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 발명자들은 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid)을 생산하기 위한 보다 환경 친화적이고 경제적인 방법으로, 메탄 등 바이오매스를 활용한 방법에 대해 예의 연구 노력한 결과, 놀랍게도 본 발명의 형질전환 메탄자화균을 이용할 경우 고수율로 4-하이드록시부티르산의 생산이 가능함을 확인하였다. 특히, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된 형질전환 메탄자화균의 경우 다른 형질전환 메탄자화균에 비해서도 현저히 높은 수준의 4-하이드록시부티르산 생산이 가능함을 확인하였다. 이와 같이 메탄자화균을 통한 고수율의 4-하이드록시부티르산(4-Hydroxybutyric acid)의 생산은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명을 통해 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "4-하이드록시부티르산(4-hydroxybutyrate, 4HB)"은 $C_4H_8O_3$ 의 화학식을 갖는 분자량 104.10의 화합물로, 감마-하이드록시부티르산(gamma-hydroxybutyric acid)로도 불리며, 자연 발생 신경전달 물질이자 항정신성 약물이다. 4-하이드록시부티르산은 기면증, 알코올 중독의 치료, 섬유근육통(fibromyalgia)의 치료 등 의료용 목적으로 사용되는 것으로 알려져 있다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "메탄자화균(methanotroph)"은 메탄을 주 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다. 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 또한 본 발명의 목적상 메탄을 탄소원으로 사용하여 피루브산을 출발물질로 숙시닐-CoA와 숙신산 세미알데히드를 거쳐 최종적으로 4-하이드록시부티르산을 생산할 수 있는한 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 메탄, 메탄올, 메틸아민 등 C1 화합물을 에너지원으로 사용하는 메틸자화균(methylotroph) 중에서 메탄을 함께 사용할 수 있는 균주 또한 본 발명의 메탄자화균에 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0018] 상기 메탄자화균은 메탄 등 C1 화합물을 에너지원으로 사용할 수 있는 것인한 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로스페라

속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로판더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로쉴머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넴 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노븀 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로마이크로븀(*Methylomicrobium*) 속, 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*) 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus*) 균주일 수 있으며, 구체적으로 메틸로시너스 트리코스포리움(*Methylosinus trichosporium*) 0B3b일 수 있다.

- [0019] 이러한 메탄자화균을 이용한 바이오 전환공정의 경우, 비교적 저렴한 메탄을 탄소원으로 사용할 수 있어 경제적으로 유리하며, 대기 중의 메탄을 사용 가능하다는 점에서 온실가스의 방출 예방 등 환경적인 면에서도 장점이 있다. 또한, 기존에 포도당(glucose)을 이용한 공정 대비 산소의 손실이 없어 최종 생산 물질의 수율 또한 높다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "형질전환 메탄자화균"은 상기 메탄자화균의 유전자를 제거하거나 또는 도입하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소로 이루어진 균으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된 메탄자화균을 의미할 수 있으며, 추가로 아세트산인산화효소 및/또는 젖산탈수소효소의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 것일 수 있다.
- [0021] 보다 구체적으로, 상기 형질전환 메탄자화균은 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화된 메탄자화균을 의미할 수 있으며, 추가로 아세트산인산화효소 및/또는 젖산탈수소효소의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 상기 형질전환 메탄자화균은 야생형에 비해 4-하이드록시부티르산 생산능이 현저히 향상된 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase)"는 TCA 회로의 중간 산물인 숙시닐-CoA(Succinyl-CoA)로부터 숙신산 세미알데히드를 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0023] 상기 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*sucD*)는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas Gingivalis*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase)"는 숙신산 세미알데히드로부터 4-하이드록시부티르산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0025] 상기 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*4hbD*)는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas Gingivalis*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(NADPH-dependent succinate semialdehyde reductase)"는 숙신산 세미알데히드로부터 4-하이드록시부티르산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0027] 상기 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소를 코딩하는 유전자(*yqhD*)는 대장균(*Escherichia coli*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "숙신산 세미알데히드 탈수소효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase)"는 TCA 회로의 중

간산물인 숙신산(Succinate)로부터 숙신산 세미알데히드를 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.

- [0029] 상기 숙신산 세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*sacD*)는 서열번호 4의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 4의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는, *sucD*-4hbD, *sucD*-yqhD 및 *sacD*-yqhD의 세가지 유전자 세트를 벡터 pAWP89에 클로닝하여 *M. alcaliphilum* 20Z 야생형 균주의 *ldh* 유전자 위치에 도입함으로써 젖산탈수소효소 활성을 불활성화시키고, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*sucD*) 및 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4hbD) 활성이 강화된 균주 4HB-PG433-20Z, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*sucD*) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(*yqhD*) 활성이 강화된 균주 4HB-SY433-20Z, 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*SacD*) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(*yqhD*) 활성이 강화된 균주 4HB-K433-20Z를 제조하여 4-하이드록시부티르산 생산량을 평가하였다.
- [0031] 그 결과, 상기 4HB-SY433-20Z 균주는 야생형뿐만 아니라 다른 형질전환 메탄자화균에 비해 높은 4-하이드록시부티르산 생산량(0.7077mg/l)을 나타냄을 확인하였다. 즉, 이는 유사한 경로로 4-하이드록시부티르산의 합성에 관여하는 다른 효소들을 활성화 시킨 경우에 비해, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소의 활성을 강화시킬 경우, 특이적으로 4-하이드록시부티르산의 생산량이 현저히 향상됨을 나타내는 결과이다.
- [0033] 또한, 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화되고, 추가로 아세트산인산화효소 및/또는 젖산탈수소효소의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 것일 수 있다. 상기 "아세트산인산화효소(acetate kinase)"는 피루브산으로부터 생성된 아세틸-CoA(Acetyl-CoA)를 아세트산염(Acetate)로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소를 의미하며, "젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)"는 피루브산을 젖산(Lactate)로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0034] 상기 젖산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*ldh*)는 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 젖산탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 아세트산인산화효소를 코딩하는 유전자(*ack*)는 서열번호 6의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 6의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 아세트산인산화효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*sucD*) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(*yqhD*) 활성이 강화되고, 젖산탈수소효소(*ldh*) 활성이 결실된 균주 4HB-SY433-20Z에서 추가로 아세트산인산화효소를 코딩하는 유전자(*ack*)를 결실시킨 4HB-SY433-20Z *ack*를 제조하여, 4-하이드록시부티르산의 생산량을 비교, 평가하였다. 그 결과, 상기 4HB-SY433-20Z *ack* 균주는 야생형뿐만 아니라 상기 4HB-SY433-20Z 보다도 높은 4-하이드록시부티르산 생산량(0.882mg/l)을 나타냄을 확인하였다.
- [0037] 본 발명에서 용어 "2-옥소글루타르산탈수소효소(2-Oxoglutarate dehydrogenase)"는 알파-케토글루타르산(alpha-ketoglutarate)의 숙시닐-CoA(Succinyl-CoA)로의 전환을 촉매하는 효소를 의미하며, 상기 2-옥소글루타르산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*sucAB*)는 서열번호 7의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 2-옥소글루타르산탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어 "포스포에놀피루브산 카르복실화효소(Phosphoenolpyruvate carboxylase)"는 포스포에놀피루브산(phosphoenol pyruvate)의 옥살로아세트산(oxaloacetic acid)으로의 전환을 촉매하는 효소를 의미하며, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 유전자(*ppc*)는 서열번호 8의 염기서열로 구성된 것일 수

있으며, 서열번호 8의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0039] 본 발명에서 용어 "이소시트르산탈수소효소(Isocitrate dehydrogenase)"는 이소시트르산(isocitrate)의 알파-케토글루타르산(alpha-ketoglutarate)으로의 전환을 가역적으로 촉매하는 효소로, 상기 이소시트르산탈수소효소를 코딩하는 유전자(*icd*)는 서열번호 9의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 서열번호 9의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 이소시트르산탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는, *M. trichosporium* OB3b를 형질전환의 숙주 균주로 사용한 OB3b-4HB-SY 균주에서의 4-하이드록시부티르산 생산을 보다 증가시키고자, *sucAB*, *ppc* 및 *icd*를 추가로 과발현시켜 각각의 4-하이드록시부티르산의 생산량을 평가한 결과, OB3b-4HB-SY2, OB3b-4HB-SY3, OB3b-4HB-SY5 균주에서 각각 7.22 mg/L, 9.13 mg/L, 10.5 mg/L의 4-하이드록시부티르산 생산량을 나타냄을 확인하였고, 특히 *icd*가 추가로 과발현된 OB3b-4HB-SY5 균주는 OB3b-4HB-SY 대비 약 150% 이상의 생산량 증가가 있음을 확인하였다.

[0041] 전술한 각각의 효소 또는 단백질은 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는한, 각 효소 또는 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할수 있는데, 상기 각 효소 또는 단백질의 활성을 나타내는 한, 상기 각 효소 또는 단백질의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로, 실질적으로 각 효소 또는 단백질과 동일하거나 상응하는 활성을 가지는 아미노산 서열의 경우도 본 발명의 범주에 포함되는 당업자에게 자명하다.

[0043] 본 발명에서 용어 "약화 또는 불활성화"는 효소 또는 단백질의 활성이 야생형 또는 그 내재적 활성에 비해 감소 또는 전혀 발현이 되지 않거나, 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 상기 효소 또는 단백질의 활성 약화 또는 불활성화는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 해당 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 결실, 상기 뉴클레오티드의 발현이 감소하도록 발현 조절 서열의 변형, 상기 단백질의 활성이 약화되도록 염색체상의 상기 뉴클레오티드 서열의 변형, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 방법에 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은 세균 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에서 용어 "강화"는 효소 또는 단백질의 활성이 야생형 또는 그 내재적 활성에 비해 증가되는 것을 의미한다. 상기 효소 또는 단백질의 활성 강화는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0045] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 4-하이드록시부티르산 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 4-하이드록시부티르산 제조방법을 제공하는 것이다. 상기 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소, 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 아세트산인산화효소, 젖산탈수소효소, 약화 또는 불활성화, 강화, 4-하이드록시부티르산, 형질전환 메탄자화균은 전술한 바와 같다.

[0046] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나눌 수 있다. 본 발명의 형질전환 메탄자화균의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0047] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환 메탄자화균으로부터 4-하이드록시부티르산을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 메탄자화균의 배양에 사용되는 것으로 알려진 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 사용할 수 있고, 메탄자화균에 따라 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 적절히 조절한 배지를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 형질전환 메

탄자화균의 배양 온도는 15℃ 내지 45℃, 구체적으로 20℃ 내지 40℃, 보다 구체적으로 25℃ 내지 35℃일 수 있으며, 메탄과 균주의 원활한 접촉을 위해, 150rpm 내지 300rpm, 구체적으로 180rpm 내지 270rpm, 보다 구체적으로 200rpm 내지 250rpm으로 교반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 4-하이드록시부티르산의 제조방법은 상기 형질전환 메탄자화균을 C1 탄소원을 포함하는 배양액에 배양하는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 배양액으로부터 4-하이드록시부티르산을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 4-하이드록시부티르산을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 4-하이드록시부티르산 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.

[0051] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 4-하이드록시부티르산 생산용 형질전환 메탄자화균을 포함하는 4-하이드록시부티르산 생산용 조성물을 제공한다.

[0052] 상기 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소, 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 아세트산인산화효소, 젖산탈수소효소, 약화 또는 불활성화, 강화, 4-하이드록시부티르산, 형질전환 메탄자화균은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0054] 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 C1 탄소원으로부터 4-하이드록시부티르산을 높은 수율로 생산할 수 있는바, 친환경적이고 경제적으로 4-하이드록시부티르산의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 *M. alcaliphilum* 20Z에서 4-하이드록시부티르산을 생산하기 위한 대사공학 경로를 나타낸 것이다.

도 2는 유전자 치환을 위한 pCM433 벡터 기반의 플라스미드를 나타낸 것이다.

도 3은 1%의 메탄올(v/v)을 포함하는 NMS 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z 야생형 및 형질전환 메탄자화균(4HB-SY433-20Z, 4HB-PG433-20Z 및 4HB-K433-20Z)의 성장을 OD₆₀₀ 값으로 나타낸 것이다.

도 4는 1%의 메탄올(v/v)을 포함하는 NMS 배지에서 형질전환 메탄자화균 *M. alcaliphilum* 20Z에서 시간에 따른 4-하이드록시부티르산 생산량을 나타낸 것이다.

도 5는 형질전환 메탄자화균 4HB-SY433-20Z 및 추가로 ack 유전자를 결실시킨 4HB-SY433-20Z ack 균주의 4-하이드록시부티르산 생산량을 비교하여 나타낸 것이다.

도 6은 형질전환 메탄자화균 4HB-SY433-20Z-ack(*M. alcaliphilum* 20Z 유래)와 OB3b-4HB-SY(*M. trichosporium* OB3b 유래)의 4-하이드록시부티르산 생산량을 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0059] 실험예 1: 재료 및 방법

[0061] 1-1: 균주 및 배양 조건

[0062] *M. alcaliphilum* 20Z 균주는 NMS(nitrate mineral salts medium) 배지를 사용하여 배양하였다(Ojala et al.,

2011). *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 50ml의 NMS 배지를 들어있고 스크류 캡으로 밀봉된 500ml 배플 플라스크 (baffled flask)에서 30℃, 230rpm으로 교반하며 배양하였다. 기밀식 주사기(gas-tight syringe)를 사용한 가스 교환에 의해 최종 농도 50%(v/v)의 메탄을 공급하였으며, 헤드 스페이스를 매일 새것으로 교환하였다. *M. alcaliphilum* 20Z 배양의 탄소 및 에너지원으로 메탄 대신 메탄올(1%)을 사용할 수 있다. 세포 배양의 광학 밀도는 1cm 경로 길이의 1.5ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광 광도계로 측정하였다. 50 µg/ml의 최종 농도를 갖는 카나마이신(Km)을 제조합 플라스미드를 갖는 메탄산화균 *M. alcaliphilum* 20Z 와 제조합 플라스미드를 갖는 대장균을 선별하는 데에 사용하였다.

1-2: 유전적 변형을 위한 재료 및 도구

본 발명의 프라이머는 Primer 3 소프트웨어를 사용하여 설계하였으며, Macrogen(Seoul, Korea)에서 합성하였다. 본 발명에서 사용된 프라이머는 아래 표 1에 나타내었으며, 리보솜 결합 부위는 굵은 글씨, Gibson Assembly 위치는 소문자로 나타내었다.

[표 1]

프라이머	서열	서열번호
Sad-k12-For	ggaacaaaagctgggtacATGACCATTACTCCGGCAACT	10
Sad-k12-Rev	cgagggggggcccggtacTCAGATCCGGTCTTTCACAC	11
YqhD-k12-For	cgccaccgcggtggagct AGCTTAAGGATAAAGAA GGTAAACATGAACA CTTTAATCTGCA	12
YqhD-k12-Rev	atagggcggaattggagctTTAGCGGGCGGCTTCGTATA	13
4HB-PG-For	ttcacacaggaacagctATGCAACTTTTCAAACCTCAA	14
4HB-PG-Rev	gcatcttcccgacaactaTTAGAGTTCCAGATTCTT	15
SucD-PG-For	ggaacaaaagctgggtacATGGAAATCAAAGAAATGGT	16
SucD-PG-Rev	cgagggggggcccggtacTTAGAGTTCCAGATTCTT	17
invert-pAWP89-For	TAGTTGTCGGGAAGATGCGT	18
invert-pAWP89-Rev	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA	19
PCM433-Ldh-20Z-For	ATGCCGCTCAGTACTTGCTT	20
PCM433-Ldh-20Z-Rev	TCAACACCAATGCGTAGGCT	21
ptac- 4HB-pCM433-For	cctacgcattggtgtgaTACCGCCTTTGAGTGAGCTG	22
ptac- 4HB-pCM433-Rev	gcaagtactgagcgcatGACTTGACGGGACGGCG	23

E. coli W3110의 게놈 DNA를 Wizard® Genomic DNA 정제 키트(Promega, USA)로 분리하였다. Gibson assembly master mix는 NEB(England)에서 구입하였다. PCR은 Lamp Pfu polymerase(BioFACT, Korea)를 사용하여 수행하였다. 번역 개시율(translation initiation rate, TIR)을 최대화 하기 위한 합성 리보솜 결합 위치의 설계는 리보솜 결합 위치 계산기를 사용하여 수행하였다(Salis et al., 2009).

실험예 2: 다양한 균주로부터 4-하이드록시부티르산 생합성 경로의 클로닝

본 발명의 모든 플라스미드는 Gibson Assembly를 사용하여 제조하였다. 역 PCR은 pAWP89-Tac-For / pAWP89-Tac-Rev 및 AP186_pCM433kanT_fwd1 / AP187_pCM433kanT_rev1(Puri et al., 2013)에 의해 선형 벡터 pAWP89 및 pCM433KanT에 각각 사용되었다. *E. coli* W3110 및 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) KCTC의 4HB 유전자를 게놈 DNA로부터 증폭시키고, Gibson Assembly에 의해 선형 벡터로 조립하였다.

실험예 3: 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20Z(*M. alcaliphilum* 20Z) 균주에서 전기천공 기반의 유전적 변형

[0076] *M. alcaliphilum* 20Z 균주의 50ml 배양액을 약 0.6의 광학 밀도에 도달할 때까지 성장시켰다. 이후, 5,000rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리하고, 50ml의 차가운 물에 재현탁하여 세포를 수득하였다. 상기 세포 펠릿을 차가운 물로 2회 세척하고, 생성된 펠릿을 증류수 100ml에 재현탁하였다. 세포 현탁액 50 μ l를 500ng의 DNA 플라스미드와 부드럽게 혼합하고, 혼합물을 차가운 1 mm 큐벳(Bio-Rad)으로 옮겼다. 전기천공은 1.3kV, 25 μ F 및 200 Ω 으로 설정된 Gene Pulser Xcell제 전기천공 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 수행하였다. 즉시, NMS 1ml를 세포에 첨가한 후, 세포 회수를 위해 0.1% 메탄올을 포함하는 180ml 혈청 병에서 10ml NMS 배지로 옮겼다. 30°C에서 밤새 교반하며 배양 후, 세포를 실온에서 10분 동안 5,000rpm으로 원심 분리하고, 1ml 배지에 재현탁하여 선택성 판(selective plate)에 도말하였다. 표지되지 않은 대립 유전자 교환을 위해, 전기 천공에 의해 pCM433KanT 기반의 벡터를 *M. alcaliphilum* 20Z에 도입하였다. 단일 크로스 오버 카나마이신 내성 *M. alcaliphilum* 20Z 클론을 2.5%의 수크로스를 포함하는 플레이트 상에 플레이팅하여 이중 크로스 오버 클론을 선별하고, PCR 콜로니 및 시퀀싱에 의해 확인하였다.

[0078] 실험예 4: 분석 방법

[0080] 500ml 플라스크 배양물의 배양 배지로부터 상층액을 수득하였다. 4-하이드록시부티르산(4HB)의 양은 UV 검출기가 있는 고성능 액체 크로마토 그래피 (HPLC, Jasco Co., Japan)를 사용하여 측정하였으며, 30°C에서 Waters Nova-Pak C18 컬럼(3.9 mm $\times$ 30 cm, 4 mm)을 사용하였다. 이동상은 0.5 mL/min에서 95:5 (v/v) 완충액/메탄올을 사용하였고(Efe et al., 2008), 상기 완충액은 pH 3에서 50mM 인산 칼륨 완충액을 사용하였다. 주입 부피는 10 mL, 검출은 215 nm(Waters 996 PAD UV)에서 수행하였다. 모든 용액은 사용하기 전 0.2 μ m 멤브레인을 통해 여과하였다.

[0082] 실시예 1: *M. alcaliphilum* 20Z로부터 3종의 형질전환 메탄자화균 제조

[0084] *sucD*-4hbD, *sucD*-yqhD 및 *sacD*-yqhD의 세가지 유전자 세트를 벡터 pAWP89에 클로닝하여 각각 4HB-PG, 4HB-SY 및 4HB-K12으로 제조하였다. 이후, *ptac* 프로모터에 의해 조절된 유전자를 젖산(lactate) 영역의 상류 및 하류를 포함하는 벡터 pCM433-kan에 클로닝하였다(도 2). 이들은 숙시닐-CoA를 숙신산 세미알데히드로 환원을 촉매하는 효소(포르피로모나스 진지발리스 유래의 *SucD*) 및 숙신산 세미알데히드를 4-하이드록시부티르산으로 환원을 촉매하는 효소(포르피로모나스 진지발리스 유래의 *4hbD* 또는 *E. coli* 유래의 *yqhD*)를 포함한다(Jim et al., 2011; Efe et al., 2008). 상기 4HB 유전자는 염색체의 상동성을 통해 *M. alcaliphilum* 20Z의 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase) 결실 위치에 도입하였다. 리보솜 결합 부위(RBS)는 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소를 코딩하는 *yqhD*의 TIR로 최적화되었다.

[0085] 그 결과, 최종적으로 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*sucD*) 및 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(*4hbD*) 활성이 강화된 균주 4HB-PG433-20Z, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*sucD*) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(*yqhD*) 활성이 강화된 균주 4HB-SY433-20Z, 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(*SacD*) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(*yqhD*) 활성이 강화된 균주 4HB-K433-20Z를 제조하였다.

[0087] 실시예 2: 형질전환 메탄자화균 *M. alcaliphilum* 20Z의 성장 및 4-하이드록시부티르산 생산 증가 여부 확인

[0089] 2-1: 야생형 및 형질전환 메탄자화균 *M. alcaliphilum* 20Z의 메탄올 포함 NMS 배지에서의 성장 확인

[0090] 상기 실시예 1-1에서 제조한 3종의 형질전환 메탄자화균이 C1 탄소원인 메탄올을 포함하는 배지에서 정상적으로 성장 가능한지 여부를 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z와 비교하여 평가하였다. 그 결과, 도 3으로부터 알 수 있듯이, 1%의 메탄올(v/v)을 포함하는 NMS 배지에서 상기 3종의 형질전환 메탄자화균은 시간 경과에 따라 야생형과 동일하거나 상응하는 수준의 광학 밀도(OD₆₀₀)를 나타내었으나, 야생형과 마찬가지로 메탄올을 탄소원으로 하여 정상적으로 성장 가능함을 확인하였다.

[0092] **2-2: 야생형 대비 형질전환 메탄자화균의 4-하이드록시부티르산의 생산 증가 확인**

[0093] 야생형 대비 상기 실시예 1-1에서 제조한 3종의 형질전환 메탄자화균의 4-하이드록시부티르산의 생산량 증가 여부를 확인하고자, 1%의 메탄올(v/v)을 포함하는 NMS 배지에서 각각의 균주를 배양하고, 4-하이드록시부티르산의 생산량을 정량적으로 비교, 평가하였다. 4-하이드록시부티르산의 정량은 UV 검출기를 이용한 HPLC를 통해 수행하였다.

[0094] 그 결과, 아래 표 2에 나타낸 바와 같이, 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z(20Z-WT)의 경우 4-하이드록시부티르산의 생산을 확인할 수 없었던 반면, 상기 3종의 형질전환 메탄자화균(4HB-SY433-20Z, 4HB-PG433-20Z, 4HB-K433-20Z)의 경우 검출 가능한 수준의 4-하이드록시부티르산을 생산하였다. 특히, 상기 형질전환 메탄자화균 중 CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(sucD) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(yqhD) 활성이 강화된 4HB-SY433-20Z는 가장 높은 4-하이드록시부티르산의 생산량(0.707 mg/l)을 나타내었다.

[0095] **[표 2]**

균주	4-하이드록시부티르산 생산량 (mg/l)
20Z-WT	ND
4HB-SY433-20Z	0.7077
4HB-PG433-20Z	0.3298
4HB-K433-20Z	0.0663
4HB-SY433-20Z Δ ack	0.882

[0096]

[0097] 즉, 이는 유사한 경로로 4-하이드록시부티르산의 합성에 관여하는 다른 효소들을 활성화 시킨 경우에 비해, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소의 활성을 강화시킬 경우, 특이적으로 4-하이드록시부티르산의 생산량이 현저히 향상됨을 나타내는 결과이다.

[0099] 나아가, 4-하이드록시부티르산의 생산량을 보다 더 증가시키고자, 상기 4HB-SY433-20Z 균주에 아세트산인산화효소를 코딩하는 *ack* 유전자를 추가로 결실시키고, 4-하이드록시부티르산의 생산량을 평가하였다. 그 결과, 상기 *ack* 유전자가 추가로 결실된 4HB-SY433-20Z *ack* 균주의 경우 4HB-SY433-20Z보다 더 높은 4-하이드록시부티르산 생산량(0.082mg/l)을 나타냄을 확인하였다.

[0100] 즉, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소, 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소, NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소 및 숙신산 세미알데히드 탈수소효소로 이루어진 균으로부터 선택되는 2 이상의 효소의 활성이 내재적 활성에 비해 강화되고, 추가로 아세트산인산화효소 및/또는 젖산탈수소효소의 활성이 내재적 활성에 비해 약화 또는 불활성화된 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 친환경적이고 경제적으로 4-하이드록시부티르산의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[0102] **실시예 3: 형질전환의 숙주 균주로 *M. trichosporium* OB3b를 사용한 경우 *M. alcaliphilum* 20Z 대비 4-하이드록시부티르산의 생산 증가 확인**

[0104] 4-하이드록시부티르산의 생산을 보다 증가시키고자, 상기 실시예 1 및 2에서 사용한 *M. alcaliphilum* 20Z가 아닌 *M. trichosporium* OB3b를 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주로 사용하여 동일한 유전자의 세트(sucD-4hbD, sucD-yqhD, and sacD-yqhD)를 강화시킬 경우 각각 4-하이드록시부티르산의 생산량을 평가하였다.

[0105] 구체적으로, 상기 세가지 유전자 세트를 벡터 pAWP89에 클로닝하여 *M. trichosporium* OB3b 야생형 균주에 도입하고, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(sucD) 및 4-하이드록시부티레이트 탈수소효소(4hbD) 활성이 강화된 균주 OB3b-4HB-PG, CoA-의존성 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(sucD) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(yqhD) 활성이 강화된 균주 OB3b-4HB-SY, 숙신산 세미알데히드 탈수소효소(SacD) 및 NADPH-의존성 숙신산 세미알데히드 환원 효소(yqhD) 활성이 강화된 균주 OB3b-4HB-K12를 제조하였다. 각각의 형질전환 메탄

자화균은 30℃에서 40%의 메탄 조건하에 500ml의 플라스크에서 교반하며 배양하였으며, 대조균으로는 공벡터 pAWP89가 도입된 형질전환 균주(OB3b WT)를 사용하였다. 이후 각각의 4-하이드록시부티르산 정량은 UV 검출기를 이용한 HPLC를 통해 수행하였다.

그 결과, 아래 표 3으로부터 알 수 있듯이, OB3b-4HB-K12 균주에서는 4-하이드록시부티르산 생산이 검출되지 않았으나, OB3b-4HB-PG는 4.36mg/L, 특히 OB3b-4HB-SY 균주에서는 6.92mg/L로 매우 높은 생산량을 나타내었다.

[표 3]

균주	4-HB 생산량 (mg/L)
OB3b WT	ND
OB3b-4HB-K12	ND
OB3b-4HB-SY	6.92
OB3b-4HB-PG	4.36

즉, 이는 상기 실시예 2에서 *M. alcaliphilum* 20Z 유래 4HB-SY433-20Z 균주의 생산량(0.7077 mg/l) 또는 4HB-SY433-20Z Δack의 생산량(0.882 mg/l) 대비 *M. trichosporium* OB3b를 숙주 균주로 동일한 유전자 세트를 도입한 OB3b-4HB-SY 균주에서의 4-하이드록시부티르산 생산량이 현저히 높은 수준임을 나타내는 것인바(도 6), 이로부터 *M. trichosporium* OB3b가 4-하이드록시부티르산의 대량 생산을 위한 메탄자화균으로 특히 적합하다는 것을 알 수 있다.

실시예 4: *M. trichosporium* OB3b를 형질전환의 숙주 균주로 사용할 경우 *ppc*, *icd*, *alc* 및 *sucAB* 유전자의 과발현을 통한 4-하이드록시부티르산 생산 최적화

상기 실시예 3에서 확인한 OB3b-4HB-SY 균주에서의 4-하이드록시부티르산 생산을 보다 증가시키고자, 2-옥소글루타르산탈수소효소(2-Oxoglutarate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*sucAB*), 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(Phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 유전자(*ppc*) 및 이소시트르산탈수소효소(Isocitrate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*icd*)를 추가로 과발현시켜 각각의 4-하이드록시부티르산의 생산량을 평가하였다.

구체적으로, 상기 유전자를 OB3b-4HB-SY 균주에서 추가로 과발현시키고자, *M. trichosporium* OB3b 유래 *sucAB*, *ppc* 또는 *icd* 유전자를 pAWP4HB-SY 내 Ptac 프로모터의 조절 하에 OB3b-4HB-SY 균주 내에 도입하여 각각이 유전자가 과발현된 균주를 OB3b-4HB-SY2, OB3b-4HB-SY3, OB3b-4HB-SY5로 명명하였다. 4-하이드록시부티르산의 정량은 상기 실시예 2 및 3과 동일하게 수행하였다.

그 결과, 아래 표 4에서 알 수 있듯이, OB3b-4HB-SY2, OB3b-4HB-SY3, OB3b-4HB-SY5 균주는 각각 7.22 mg/L, 9.13 mg/L, 10.5 mg/L의 4-하이드록시부티르산 생산량을 나타내었고, 특히 *icd* 유전자가 추가로 과발현된 OB3b-4HB-SY5 균주는 OB3b-4HB-SY 대비 약 150% 이상의 생산량 증가가 있음을 확인하였다.

[표 4]

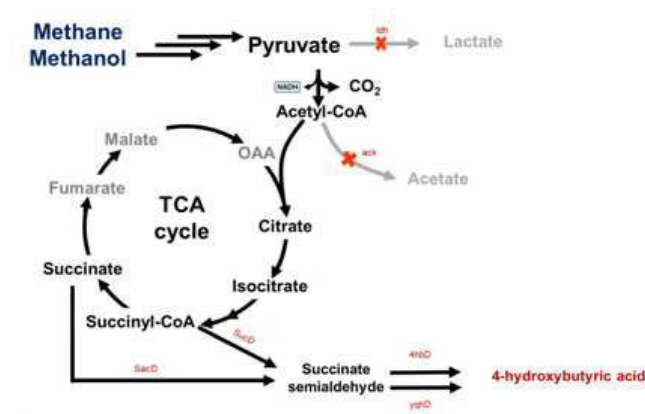
균주	4-HB 생산량 (mg/L)
OB3b-4HB-SY	6.92
OB3b-4HB-SY2	7.22
OB3b-4HB-SY3	9.13
OB3b-4HB-SY5	10.5

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범

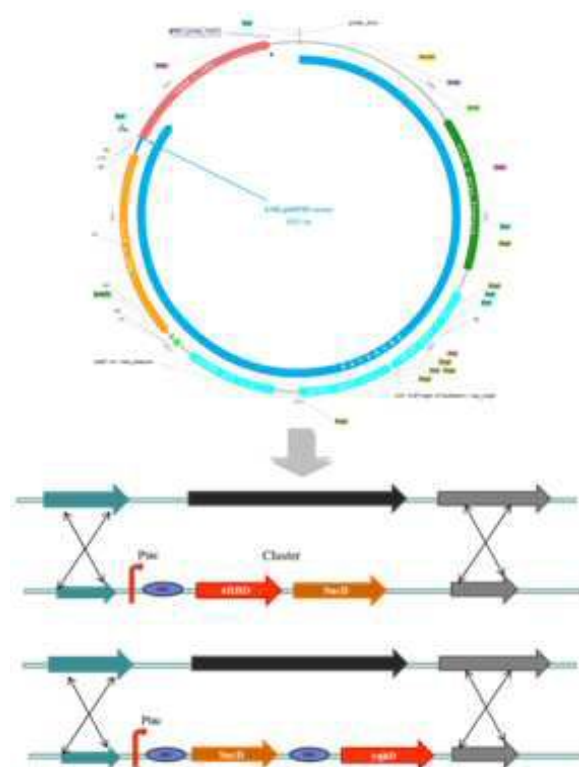
위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

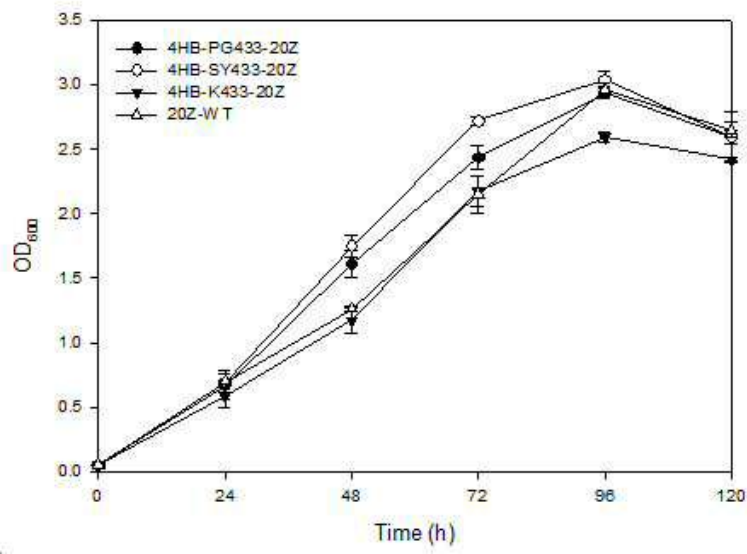
도면1



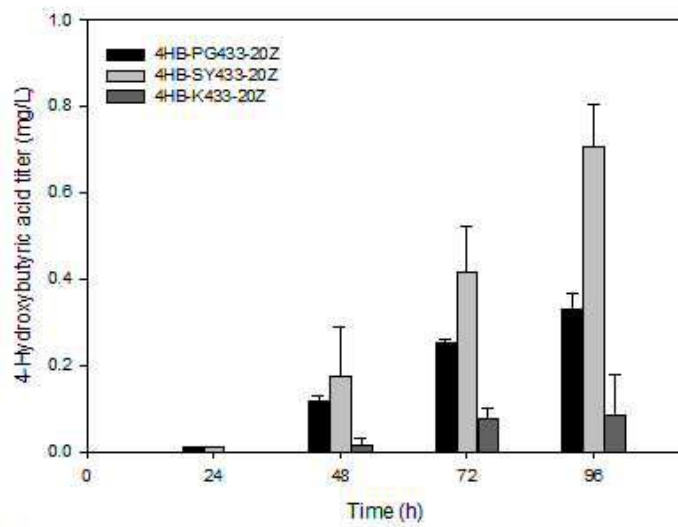
도면2



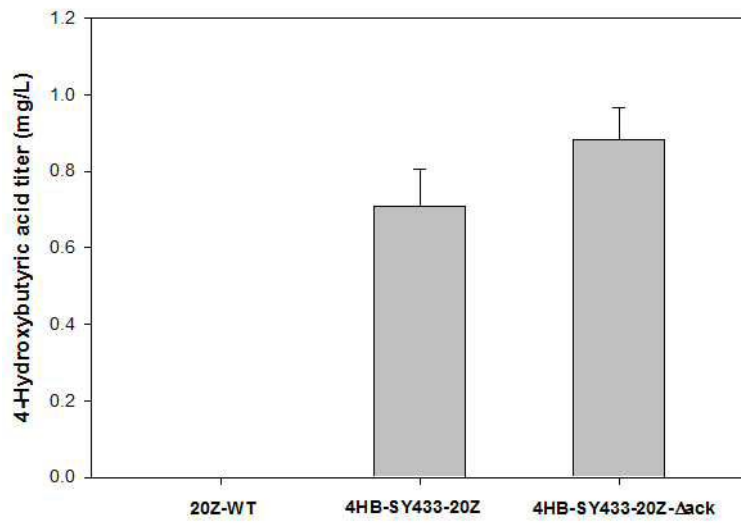
도면3



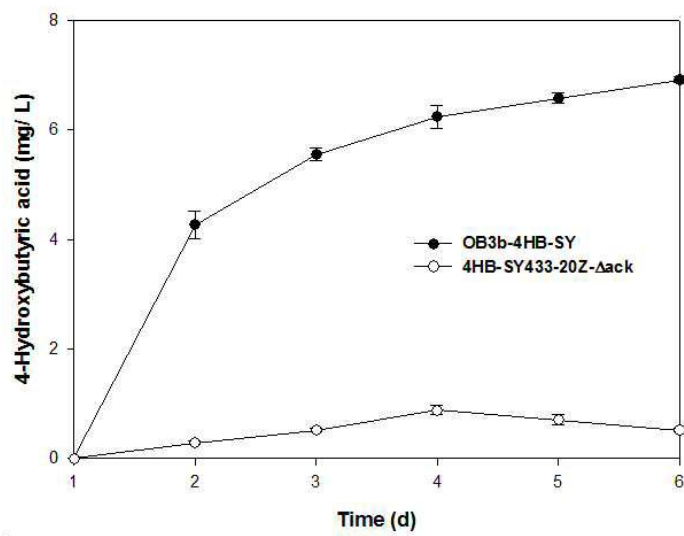
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transformed methanotrophs for producing 4-Hydroxybutyric acid and
uses thereof
- <130> KPA180479-KR
- <160> 23
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1356

<212> DNA

<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 1

atggaaatca aagaaatggt ctcggtggcc cgcaaagccc aaaaagaata tcaagccacc 60

cataatcaag aagccgtcga taatatctgc cgcgccgccg ccaaagtcac ctatgaaaat 120

gccgccatct tggccccgca agccgtcgat gaaaccggca tgggcgtcta tgaacataaa 180

gtcgccaaaa atcaaggcaa atcgaaaggc gtctgggtata atttcataa taaaaaatcg 240

gtcggcatct tgaatatcga tgaacgcacc ggcatgatcg aaatcgccaa accgatcggc 300

gtcgtcggcg ccgtcacccc gaccaccaat ccgatcgtca ccccgatgtc gaatatcatc 360

tttgccttga aaacctgcaa tgccatcatc atcgccccgc atccgcgctc gaaaaaatgc 420

tcggcccatg ccgtccgctt gatcaaagaa gccatcgccc cgtttaaatgt cccggaaggc 480

atggtccaaa tcacgaaga accgtcgatc gaaaaaaccc aagaattgat gggcgccgtc 540

gatgtcgtcg tcgccaccgg cggcatgggc atggtcaaat cggcctattc gtcgggcaaa 600

ccgtcgtttg gcgtcggcgc cggcaatgtc caagtcatcg tcgattcgaa tatcgatttt 660

gaagccgccg ccgaaaaaat catcaccggc cgcgcctttg ataatggcat catctgctcg 720

ggcgaacaat cgatcatcta taatgaagcc gataaagaag ccgtctttac cgcctttcgc 780

aatcatggcg cctatttttg cgatgaagcc gaaggcgatc gcgccccgcg cgccatcttt 840

gaaaatggcg ccatcgccaa agatgtcgtc ggccaatcgg tcgcctttat cgccaaaaaa 900

gccaatatca atatcccgga aggcaccgcg atcttggtcg tcgaagcccg cggcgtcggc 960

gccgaagatg tcactgcaa agaaaaaatg tgcccgttca tgtgcgcctt gtcgtataaa 1020

cattttgaag aaggcgtcga aatcgccccg accaatttgg ccaatgaagg caatggccat 1080

acctgcgcca tcatttcgaa taatcaagcc catatcatct tggccggctc ggaattgacc 1140

gtctcgcgca tcgtcgtcaa tgccccgtcg gccaccaccg ccggcggcca tatccaaaat 1200

ggcttggccg tcaccaatac cttgggctgc ggctcgtggg gcaataattc gatctcgga 1260

aattttacct ataaacattt gttgaatatc tcgcgcacgc cccggttgaa ttcgtcgatc 1320

catatcccg atgataaaga aatctgggaa ttgtaa 1356

<210> 2

<211> 1116

<212> DNA

<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 2

atgcaattgt ttaaattgaa atcggtcacc catcattttg atacctttgc cgaatttgcc	60
aaagaatfff gcttgggcga acgcgatttg gtcacaccca atgaatttat ctatgaaccg	120
tatatgaaag cctgccaatt gccgtgccat tttgtcatgc aagaaaaata tggccaaggc	180
gaaccgtcgg atgaaatgat gaataatatac ttggccgata tccgcaatat ccaatttgat	240
cgcgtcatcg gcatcggcgg cggcaccgtc atcgatatct cgaaattggt tgtcttgaaa	300
ggcttgaatg atgtcttgga tgcctttgat cgcaaaatcc cgttgatcaa agaaaaagaa	360
ttgatcatcg tcccgaccac ctgcggcacc ggctcggaag tcaccaatat ctcgatcgcc	420
gaaatcaaat cgcgccatac caaaatgggc ttggccgatg atgccatcgt cgccgatcat	480
gccatcatca tcccggaatt gttgaaatcg ttgccgtttc atttttatgc ctgctcggcc	540
atcgatgcct tgatccatgc catcgaatcg tatgtctcgc cgaaagcctc gccgtattcg	600
cgcttgtttt cggaagccgc ctgggataac atcttggaag tctttaaaaa aatcgccgaa	660
catggcccg aatatcgctt tgaaaaattg ggcgaaatga tcatggcctc gaattatgcc	720
ggcatcgctt ttggcaatgc cggcgtcggc gccgtccatg ccttgctgta tccgttgggc	780
ggcaattatc atgtcccgca tggcgaagcc aattatcaat tttttaccga agtctttaaa	840
gtctatcaaa aaaaaaatcc gtttggctat atcgctgaat tgaattggaa attgtcgaaa	900
atcttgaatt gccaacccga atatgtctat ccgaaattgg atgaattggt gggtctgctt	960
ttgacaaaaa aaccgttgca tgaatatggc atgaaagatg aagaagtccg cggttttgcc	1020
gaatcggtct tgaaaaccca acaacgcttg ttggccaata attatgtcga attgaccgtc	1080
gatgaaatcg aaggcatcta tagaagattg tatta	1116

<210> 3

<211> 1164

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atgaataatt ttaatttgca taccgccgacc cgcattctgt ttggcaaagg cgccatcgcc	60
ggcttgcgcg aacaaatccc gcatgatgcc cgcgtcttga tcacctatgg cggcggctcg	120
gtcaaaaaaa ccggcgtctt ggatcaagtc ttggatgcct tgaaaggcat ggatgtcttg	180
gaatttggcg gcatcgaaac gaatccggcc tatgaaacct tgatgaatgc cgtcaaatg	240
gtccgcgaac aaaaagtcac ctttttgttg gccgtcggcg gcggctcggt cttggatggc	300

accaaattta tcgccgccgc cgccaattat ccggaataa tcgatccgtg gcatacttg	360
caaaccggcg gcaaagaaat caaatcgcc atcccgatgg gctgcgtctt gaccttgccg	420
gccaccggct cggaatcgaa tgccggcgcc gtcactcgc gcaaaaccac cggcgataaa	480
caagcctttc attcggccca tgtccaaccg gtctttgccg tcttgatcc ggtctatacc	540
tataccttgc cgccgcgcca agtcgccaat ggctgcgtcg atgcctttgt ccataccgtc	600
gaacaatatg tcaccaaacc ggtcgatgcc aaaatccaag atcgctttgc cgaaggcatc	660
ttgttgacct tgatcgaa tgcccgaaa gccttgaaag aaccggaaaa ttatgatgtc	720
cgcgccaatg tcatgtgggc cgccaccaa gccttgaatg gcttgatcgg cgccggcgtc	780
ccgcaagatt gggccacca tatgttgggc catgaattga ccgccatgca tggcttggat	840
catgccccaa ccttggccat cgtcttgccg gccttgtgga atgaaaaacg cgataccaaa	900
cgcgccaat ttttgaata tgccgaacgc gtctggaata tcaccgaagg ctccgatgat	960
gaacgcatcg atcccgccat cgccgccacc cgcaattttt ttgaacaatt gggcgtcccg	1020
acccatttgt cggattatgg cttggatggc tcgtcgatcc cggccttgtt gaaaaaattg	1080
gaagaacatg gcatgacca attggcgcaa aatcatgata tcaccttgga tgtctcgcgc	1140
cgcataatg aagccgcccg ctaa	1164
<210> 4	
<211> 1389	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 4	
atgaccatta ctccggcaac gcatgcaatt tcgatcaatc cggccacggg tgaacaactt	60
tcggtgctgc cgtgggtcgg cgctgacgat atcgaaaacg cacttcagct ggcggcagca	120
ggctttcgcg actggcgcca gaccaatac gattatcgtg ctgaaaaact gcgtgatatc	180
ggtaaggctc tcgcgctcg tagcgaagaa atggcgcaaa tgatcaccg cgaatgggc	240
aaaccgatca accaggcgcg cgctgaagtg gcgaaatcgg cgaatttgtg cgactggtat	300
gcagaacatg gtccggcaat gctgaaggcg gaaccgacgc tggtggaata tcagcaggcg	360
gttattgagt atcgccggtt gggcacgatt ctggcgatta tgccgtggaa ttttcggtta	420
tggcaggtag tcgtggcg tgcttcgac atcttgcag gtaacggcta cttactaaa	480
catgcgccga atgtgatgg ctgcgcacag ctattgccc aggtgtttaa agatgcgggt	540
atccccaag gcgtgtatgg ctggctgaat gccgacaacg acggtgtctc ccagatgatt	600
aaagactcgc gcattgtcgc tgtcacggtg accgcatccg ttcgtgcggg agcggctatt	660

ggcgcacagg ctggagcggc actgaaaaaa tgcgtgctgg aactgggcgg ttcggatccg	720
tttattgtgc ttaacgatgc cgatctggaa ctggcgggtga aagcggcggt cgccggacgt	780
tatcagaata ccggacaggt gtgcgcagcg gcaaaacgct ttattatcga agaggaatt	840
gcttcggcat ttaccgaacg ttttgtggca gctgcggcag ccttgaaaat gggcgatccc	900
cgtgacgaag agaacgctct cggaccgatg gctcgttttg atttacgtga tgagctgcat	960
catcaggtagg agaaaaccct ggcgacgggt gcgcgtttgt tactgggcgg ggaagatg	1020
gctggcgtag gtaactacta tccgccgacg gttctggcga atgttaccgc ggaaatgacc	1080
gcgtttcggg aagaaatggt tggccccgtt gcgcaatca ccattgcgaa agatgcagaa	1140
catgcactgg aactggctaa tgatagcgag ttcggccttt cggcgacat tttaccacc	1200
gacgaaacgc aggcccgcca gatggcggca cgtctggaat gcggtggggt gtttatcaat	1260
ggttatttgc ccagcgacgc gcgagtggcc tttggtggcg tgaaaaagtc gggcttttgt	1320
cgtgagcttt cgcatctcgg cttacacgaa ttttgcaata tccagacggt gtggaaagac	1380
cggatctga	1389
<210> 5	
<211> 924	
<212> DNA	
<213> Methylobacterium alcaliphilum 20Z	
<400> 5	
atgaaaatag ccataatcgg agccggccat gtcggttctt cgttagccta cgcattggtg	60
ttgaagggtt tgggtaatca tttgttgtaa gtcaatcgcg atgcgaccaa agctttgggc	120
aatgccttgg atttacgca taccctggct ttttgcgaac ggccgatgca aatcgagggc	180
ggctcgttgc aagaggcggg gggctgcgat atcgtcgcga tcaccgcttc ggagccgatg	240
acaaaaggta tgacttctcg tatggaatta ggacaagcca atgtcgagtt gttcaagtcg	300
ttgattccaa tgcctggcca aaataatcct gaagctgttt ttattatcat cacgaaccgc	360
gtcgatgtga tgacttgttg ggctacgcgg gtttcggagt tgcaccttc aagaatcgtc	420
ggcatcggca cgtcgtcga ttcggcacgt ttcagaacct tattatccaa ggccgaacag	480
attcatcccg atgatttaag agcctatatt cttggcgaac acggaccgaa tcagtttccg	540
gtatttagcc atgcttcggc cggcggcgaa ccgataaccg atagtccaag gcatagagag	600
atttttgaag aggtcaacaa ggccgggttc gaggtttatc gattgaaagg ctataaccaat	660
ttcgcgattg cttcagccgc ttgcgaagtc attagaacca tcgttcacga cgaacaccga	720
acgatgccgc tcagtacttg cttcgtatgat tggcaggga tcaaagacaa ttgcttcagc	780

atccgggtcg tactgggtcg ttccggtatt atccgatatt tacagcccga cctgaacagt 840
ctggagcgcg aagctctggt gcatacggcc aaaattgttc gagctaatat cgatagttaa 900
ttgtttggag taggtgaaag gtga 924

<210> 6

<211> 1206

<212> DNA

<213> Methylobacterium alcaliphilum 20Z

<400> 6

atgacaatac caaacggcaa cattctctg atcaacagcg gcagttcctc aatcaagtat 60
cgattgattg ctctgccgca agagcaggta ctggcagacg gcttgctgga acgcatcgga 120
gaacaggaaa gcaggatcat tcatagagcc gacgattcgg gtcgtttaaa tgaaatcaag 180
cagtcggtca tcgtgccga tcatcaccaa gccttcaagg cagtcctcga gattttgggc 240
gaaaattgct cggtcgatgc aataggccac cgcgtcgtgc atggcggcga tcggttctcc 300
ggcctgcct tggtcgatga cgatacgata gcgtcgatgc gcgcactctg ccgaatagcg 360

ccgctgcata atccggttaa ctgcttggc atcgagagtt gcttggtca tttcccgggc 420
gtaccacagg tggcgttatt cgatacggca tttcacaaa cgatgccgcc ccacgcctat 480
cgttatgca ttcgggaaac ttggtatagc gattacggca tacgccgatt cggttttcac 540
ggcacctctc atcattatgt ggagagacgg gccgccgaat ttatcggtaa acctttcgat 600
cgcagccatc tgattacttt gcatttgggc aatggcgcga gcgcaacagc gattgcaaac 660
ggccgctccg tcgatacgtc gatgggggtt acgccgtgg aaggtttggt aatgggcacg 720
cgtagcggcg atttggaccg ggcaataccg ctatttgcg aacaaccga aaataccgac 780

acggacgcaa tcgaccgggc attgaaccgc gaatccgat taaaaggctt atgtggtacc 840
aacgacttaa gaaccgtgct cgaacaaaca aatgcaggcg atgaacgagc ccgcttggct 900
ctcgatctgt attgctatcg aatcaagaaa tatatcggcg cttactacgc ggtactcggc 960
gaagtcgacg ctctggtttt taccggcggc gtcggcgaaa acgcgccga agtgcgccgt 1020
ttagcctgcg aaggcctgtc gcgtctcggc atcgccattg atgaagcggc caatagcgac 1080
gtgaccggag ctatcgcca aatcgggctt gccgaaagtc gaaccggtat tctagtcatt 1140
aaaactgacg aagaattgca aattgcccg gaagccatgg ctgtgcttga taaagatcac 1200

gcatga 1206

<210> 7

<211> 4281

<212> DNA

<213> Methylosinus trichosporium OB3b

<400> 7

atggcgcgtc tcgagacgaa tggcggttcg gcgggaaacg ctccgcagcc ccgaaggaac	60
gcggctgcgc agagcgaggc tctacaagga gtcgacgccg cttatcga acatctgctc	120
acggcctatg aggcggatcc ctctcggtc ggcccggcgt ggcgcgagta tticgcgagc	180
ctcggcgcca ccggcgagcc gcgcgggccg gcggggcccgt cctgggcgcg gccgggctgg	240
ccgatgcagc cgaccgacga actcgcctct gcgctggccg gcggtgagtc ggccaagccc	300
gcgccgagca aggccggcgc cgaaaaagcg gccgcgcctt cggccgagga gcttcagcgc	360
gccgcgcgcg acagcgtgcg cgcgctgatg atgatccgcg cctatcgcat gcgcggccat	420
ctgcacgcca atctcgatcc gctcgggctc gacgagcgcc aggatagcga gcgccaggat	480
catggcgagc tgcattccgg cacctatggc ttcaccgacg aggactatga tcgcaagatc	540
ttcatcgacg gcgtgatggg catgaaatac gccagcgtct tcgagatggt ggcgatcctg	600
cgccgcacct attgcggccc catcggctat gatttcagtc atatctccaa tccggaggag	660
aaagcctgga ttcaatcccg catcgaggga ccgaagaagg agatcgcctt caccgccgaa	720
ggcaagaagg ccattctgcg caagctggtc gaggcggaag gcttcgagaa gttcctcgac	780
gtcaaataca ccggcaccaa gcgcttcggg ctgcagggct ccgaatccat cgtgccggcg	840
ctggagcaga tcatcaagcg cggcggcgcg ctgggcgcca aggagatcgt gctcggcatg	900
gccccatcgc gccgcctcaa cgtgctgtgc caggatcatgg gcaagccgca tcgcgctctg	960
ttccacgagt tcaagggcgg ctcttctctg ccggacgagg tcgagggctc gggcgacgtc	1020
aaatatcctc tcggcgctc gtcggaccga gatttcgaca acaacaaggt gcatttctcg	1080
ctcaccgcca atccgtcgca tctcgagatc gtcgatcccg tggcgctcgg aaaagtgcgc	1140
gccaaagcagg atcaatatca ttgcgccgac aatgaacgcc gctgcgtgat gccgctgctg	1200
atccatggcg acgcggcctt cgccggccag ggcgtcgtcg ccgaatgttt cgggctctcg	1260
ggcctgaagg gccatcgac cgccgggctc gtgcatttca tcatcaataa tcagatcggc	1320
ttcaccacct atccgcgcta ttgcgctcc tcgccctatc cgtccgatgt ggccaagatg	1380
gtcgaggcgc cgatcttcca tgtgaatggc gacgatccgg aggcggctgt ctacgccgcg	1440
cgctcgcca cggagttccg ccagcagttc cagaagcccg tcgtcatcga catgtggtgc	1500
tatcgccgct tcggccacaa tgaggcgac gagccgcct tcaccagcc gctgatgtac	1560
aagaagatcc ggtcgcataa gacgaccttc gatctctatg cggagaagct gatcggcgag	1620
gggctcgtca cgcgcgacga tgtcgaggcg atcaagaccg aatggcgga gcgtctcgag	1680

caggagatgg aggcggcgca atcctatcgg cccaacaagg ccgattggct cgacggccgc	1740
tgggccggcg tgaagccagg ctatcaatcc tccgaggacg agcgtcgcgg caagaccggc	1800
gtgccggtcg agacgtcgc cgcgacggc gacgagctca ccaaggttcc ggagaccttc	1860
cacatccacc gcaccatcca gcgcttcctc gattcccgcg gcgccgcgat catgagcggc	1920
gctggaatcg actgggcgac ggcggaagcg ctggcgcttcg gctcgctgct ggcggaagcg	1980
tataatgtgc gcctctcggg ccaagacagc gagcgcgga ccttctcaca gcgccattcc	2040
gtgctggtcg atcaggagga cgaatccgc tatctgccg tcgatcatct cggccagggg	2100
cagggacgct tcgaggtcat caattcgatg ctctcggaag aagcgggtgct cggcttcgaa	2160
tatggctatt cgctcgccga gccgcgctcg ctggtgctgt gggaggcgca attcgcgcat	2220
ttcgccaatg gcgcgcaggt gatcttcgat cagttcctgt cggcgggcca gcgcaaatgg	2280
ctgcgcatgt ccggcctcgt ctgctgctg ccgcatggtt atgagggcca ggggccggag	2340
cattcgctcg cgcggtcga gcgctatctg cagctctgcg ccgaggacaa tatgcaggtc	2400
gccaatgtct cgacgccggc gaattatctt cacatcctgc gccgacagct gcctcgcgac	2460
attcgcaagc ctttgggtgt gatgacgccg aaatcggtgc tgcgtcataa gcgctgcgtc	2520
tcgcgcctcg aggacatggg cgaggggacg atgttccacc gcttcatttc cgacgacgcc	2580
gagctgcac cctccgacag cttccgcctc gcgccggacg atcgcatcgc ccgcgtcatc	2640
atgtgctcgg gcaaggtcta ttatgatttg ctcgaggagc gcgaggcgcg cggcgccaat	2700
gacgtctatc tgctgcgcgt agagcagctc tacccttcc cgctgaaggg cctcgtcacc	2760
atgctgtcgc gcttcaagca ggccgatgtg ttctggtgcc aggaggagcc caagaatatg	2820
ggcgctggtt tcttcgtcga gccttatctc gaatgggtgc tgaccaggt cggcggccaa	2880
tcgaaacgcg cgcgctatat cggccggccc gcctcggcgg cgacggcggc cggcacaatg	2940
tccaagcatc aggcgcagct tcgggccttt ctggacgaag ccttttcagc gcgctctct	3000
tctttggcgg cggagtgaac atgacggaaa tccgcgttcc cacgtcgggt gaatcggta	3060
ccgaggcgac gatcgccgcg ttggttaaga aggcgggcga ggcggtcgcc gccgacgagc	3120
cgctggtcga gctcgaaacc gacaaggtga cctcagaggt caacgctccg gccgccggcg	3180
tgctcgcca gaccttgcc aaggaggcg agacggtgac gccgggggcc ctgctcgcc	3240
agatcacga tggagccggc gccgtcttcg ccccggtcc cgccccgcgc gcggcgccgg	3300
tcgcggccgc tgcgcggcg cccgaaaacc gtcgcggccg gcgccggcgc gacggcttcc	3360
gaggcgcca gccgtccgc tccccgtcc gccccaaga tcgcacgca gcagggcgtg	3420
gatctctccg gcgtcatagg ttccggcaag cagggtcaag tgctgaagga ggatgtgctg	3480
gcgctcgcg cgaggccgc gccggtcgcg ccgcccgcg cgccccctcc ccccgctcagc	3540

gcgccgccgg cgccgcgccc cgccctccgcc cccggcgacg tggagcgca ggagcgctc	3600
cgcattgtcg gcctgcgcca gaccatcgcg aggcgcctga aggaggcgca ggccaacgcc	3660
gccatgctga cgacattcaa cgaggtcgac atgtcggcgg tgatggcgt gcgcaaccgc	3720
tacaaggatc tgttcgagaa gaagcatcat gtgaagctcg gcttcattggg cttcttcgtg	3780
aaggcctgct gcaaggcgct cgaggaggtc cggcggtca acgccgagat cgacggcgcc	3840
gacgtcatct acaagcatta ttgccatata ggctggccg tgggcacgga taaggcctc	3900
gtggtgccgg tgggtgcgca cgccgaccgg ctacagctcg ccgagatcga gaaggcgatc	3960
ggcgagttag gccgcgcgc tcgcaaggc cggctcgacc tcgaggatct gtccggcggc	4020
accttcacca tctccaatgg cggcacctat ggctcgctga tgtcgacgcc gatcctaac	4080
gccccgcaat cgggcattct cggcatgcat aagatcgagg agcggccggt ggtcgtcgcc	4140
ggcaagatcg agatccggcc gatgatgtat ctgcctct cctacgacca tcgattgtc	4200
gacgggaagg aggcggtgac ctttctggtg cgggtcaagg agcagctcga ggaccggcg	4260
cgcattgttc tcgacctgta g	4281
<210> 8	
<211> 2745	
<212> DNA	
<213> Methylosinus trichosporium OB3b	
<400> 8	
atgccgcag aaccgaaggt cagccctcg acttcgccg ccgcccttc ggcgtcgcg	60
acgcgatcgg tcaaggaggc ggccgccttc ctgttcgacc agctggccgg cgtggtgaag	120
cgccatcagc cggaggtcga gccgtgctg cgcggcttcg tttctcacc cggcctgccg	180
ccggcgctgc tcggccgcgc gctgcaggcg cagggcattt ggtttcagct gctgtcgatc	240
gccgagcagg cctcggccat gcgccggaga cgcaccatcg agcgcgcaa ggcccgcat	300
gagctgctgg gctccttcgc ccatgtgctc gccgacgcc cgcgtcggg cgtcagcgcc	360
gacgacattc gcgcgcagct gcgtcgtcg cgcattcgcc cggtcattcac cgcccatcgc	420
accgaggcca agcgcgtcac cgtcctcgag aagaaccgca agatctatct tctgctcaag	480
gaattggaat cctcgcgtg gaccgaccgc gagcgcccg cgcgcatggc cggagtgagc	540
gatcagatcg agctgctctg gctcaccggc gaattgcac tcgagaagcc gaccgtcgag	600
cacgaggtcg cctggggcct gcatttcttc ggcgagaacc tcttcgatct cgcgccggag	660
atgctcgccg ctttcgagag cgcgtcggc agccattatc cgaacgagcg cttcgatgtg	720
acgccgttct tccagttcgg ctcttgatc ggccggcgatc gcgacggcaa tcccttcgtc	780

accaacgccg tgacgcgcga gacgatgac gtcaacgcgc tcgcgagcct cgattattac	840
cggcagcgcg ctctcgatct cgtccgcgtg ctgtcgatca gcgagcgctc ggtcgccatt	900
ccggcgagct ttgcgcggc gctggaggcc gagctggcgc aggtcgagga cgccgacagg	960
atcagaacgc gcaatcaggg cgaggccttc cgccaatata tcacctgcgt gctgcgcaag	1020
ctcgacgaaa ccattctcgc gacgcggggc gaagcgagcg gcaagccgcg ctacgccaac	1080
gccgatcagc tgattcacga tcttcgcgtg ctcgagcagg ggctcgccga cagccgcagc	1140
gagacgctcg ccgccgatct cgtgcggccg gtgcgccgcg ccgtcgagat cttccgcttc	1200
agcaccgtgc gtctcgatct gcgcgagaac acgactcgca ccaataatgc gctgcgcgac	1260
attcatcgcg tcaagaccgg cagggacgcg ccggatctcg aatcgcccga atggcaggcc	1320
tggctcatcg ccgagctggc gcagccgcgc aatggcgtcc cgctcgccgg tctcgcgccc	1380
gagtcgcagg acacgctcga catgttcgcg ctggtcgccg acatgcgctc gcggctcgat	1440
cgtgaagctt tcggtagctt catctctctc atgacgcatt cggtcgccga tgtgctcggc	1500
gcctatgtgc tggcgaagga aggcgggctc ttcttcgacg aggcgggcct cgagctctgc	1560
actctgcccc tegtccgct gttcgagacg atccccgacg tgcgcgcggc tccggtgatc	1620
atgcgcgaat tgctgcgtgt gccggtcgtg gcgcgcagca cgcgctggca gggcaatgtg	1680
caagaggtga tgatcggtta ttccgactcc aacaaggacg gcggcttcat ggctcgaaac	1740
tgggagctgg cgaaggcgca atcgaagttg acgcgcctcg gcgaggaatt gggcgtcgcc	1800
atgccttct tccacggccg cggcgggatcg gtgagccgcg gcggcgccg gaccggacac	1860
gccatcgccg cgcagccggc gggctcgatt cgcggccgct tcccgctcac cgagcagggc	1920
gaggtggtct cgttcaaata cgccaatcgc ggacccgcg cctatcagat ggagctgctg	1980
gcgagcagcg tcttcgcccc tgcgtgaag tccgagcgcg aggacgcgct ggcgccgcgc	2040
gcggaattcg aagacgctct cgaggctctg tccggcgccct cgctcgccgc ttatggcaag	2100
ctcgtcgccg atcccgatct cgtcgcttat ttccaggcgg cgagcccgt cgaggaaatc	2160
tcgtgctca acatcggtc gcgtccggcg cggcggttcg gcgcgcgag cctcgccgat	2220
ctgcgcgcca ttccctgggt gttcgcttg gcgcagaatc gtcacgcat caccggctgg	2280
tatggcgtcg gtcgggcct ctcgagcttc atcgaggtgc gcggcgagcg cggcctgcag	2340
ctcttgcatc gcatgttcga ggattcgcgc ctctttcggc tcattctcga cgaggtggag	2400
aagacgttg cgctcgtcga tctctcgatc gcgcggcaat atgccgggct ggtcgcgagc	2460
caagaggcgc gcaacaagat tttctcggcg atcgaggcgg aatacacct cacctcgag	2520
accgtgctgc gcatcacggc cggcggcgag atcggcgagc gtttcgccga ctatcaggcg	2580

cgctctggcgc atcgccctcgc caccatcaac gaggtcaacc gcgagcaggt ggagttgctg 2640

cgccgtttcc gcaccacgga agaggaagcg ctgaaggagg aatacaaatc ggcgctgctg 2700

ctgtcgatca gctgcatcgc cgcgggcctc ggcgccaccg gctga 2745

<210> 9

<211> 1221

<212> DNA

<213> Methylosinus trichosporium OB3b

<400> 9

atgagcaaga tcaaggtcga aaagccggtc gtcgagctcg acggcgacga gatgacgcgc 60

atcatctggg cttatatcaa ggacaagctc gtcatccctt atctcgatat cgagctgctc 120

tattacgacc tctcgattca gaaccgcgac gccaccaatg atcaggtgac ggtcgacgcc 180

gccgaggcga tcaagctgca cggcgtcggc gtcaaatgcg cgaccatcac gcccgcgaa 240

gcgcgctca aagagttcga tctcaaggaa atgtggaagt cgcccaatgg cacgatccgc 300

aatattctgg gcggggtcat ctccgtgag ccgatcatct gcaagaacgt gccgcgcctc 360

gtgccgggct ggacgcagcc gatcgtgatc ggccgtcacg ccttcggcga tcaatatcgc 420

gccgtggatt tccgcacgcc gggcaagggc cggctgacga tgaagttcga gggcgaggac 480

ggcacggtga tcgagaagga agtgttcaaa ttcccgggcg ccggcgtcgc catggcgatg 540

tacaatctcg acgactcgat ccgcgagttc gcccgccctt cgatgaatta cgcgctcaat 600

cgcaagttcc cctctatct ctccaccaag aacacgattc tgaaagccta tgacggtcgg 660

ttcaaggacc tgttccagga agtgttcgac gccgagttca aggtgaagtt ccaggcgcaa 720

ggcctcactt atgagcatcg cctgatcgac gacatggtcg cctcggcgct caaatggtcc 780

ggcggtatg tgtgggcctg caagaattac gatggcgacg tgcagtcgga cactgtggcc 840

cagggtctcg gctcgctggg gctcatgacc agcgtgctga tgacgccgga cggcaggact 900

gtcgaggcgg aggcggccca tggcacggtg actcgccatt atcgcgagca tcagaagggc 960

cacgagacct cgaccaattc gatcgccctg atcttcgctt ggacgcgcgc gctcgcgcat 1020

cgcggcaagc tcgacggcaa cgccgctctg accgttttcg cgcagactct cgaggaggtc 1080

tgcgtttcga cggtggagca gggcttcatg accaaggatc tggcgtgct ctgcggccat 1140

cgccaaaaat ggctgtcgac cacgggcttc ctcgagaaga tcgacgcaa tctgaaaacg 1200

gcgctggccg gacgtgtcta g 1221

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sad-k12-For

<400> 10

ggaacaaaag ctgggtacat gaccattact ccggcaact 39

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Sad-k12-Rev

<400> 11

cgaggggggg cccggtactc agatccggtc tttccacac 39

<210> 12

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YqhD-k12-For

<400> 12

cgccaccgcg gtggagctag cttaaggata aagaaggagg taaaacatga acaactttaa 60

tctgca 66

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YqhD-k12-Rev

<400> 13

atagggcgaa ttggagcttt agcgggcggc ttcgtata 38

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4HB-PG-For

<400> 14

ttcacacagg aaacagctat gcaacttttc aaactcaa 38

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4HB-PG-Rev

<400> 15

gcattctccc gacaactatt agagttccca gatttctt 38

<210> 16

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SucD-PG-For

<400> 16

ggaacaaaag ctgggtacat ggaaatcaaa gaaatggt 38

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SucD-PG-Rev

<400> 17

cgaggggggg cccggtactt agagttccca gatttctt 38

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> invert-pAWP89-For

<400> 18

tagttgtcgg gaagatgcgt 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> invert-pAWP89-Rev

<400> 19

agctgtttcc tgttgaata 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCM433-Ldh-20Z-For

<400> 20

atgccgctca gtacttgctt 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCM433-Ldh-20Z-Rev

<400> 21

tcaacaccaa tgcgtaggct 20

<210> 22

<211> 38

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptac- 4HB-pCM433-For

<400> 22

cctacgcatt ggtgttgata ccgcctttga gtgagctg 38

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ptac- 4HB-pCM433-Rev

<400> 23

gcaagtactg agcggcatga cttgacggga cggcg 35