



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0158748
(43) 공개일자 2023년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/36 (2006.01)
C12P 7/625 (2022.01) C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
C12N 1/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0058250
(22) 출원일자 2022년05월12일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남테시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남테시앙포레아파트)
이옥경
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동 402호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)
(74) 대리인
위병갑

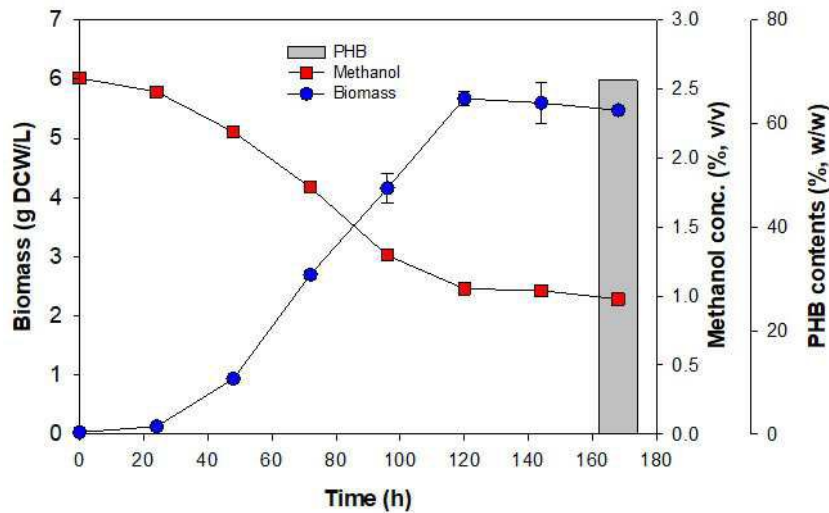
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 메탄올 내성이 강화된 적응진화 메틸로시스티스 속 신규 균주 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 고농도의 메탄올 조건하에서도 빠른 성장 속도 및 그에 따른 증가된 폴리하이드록시부티레이트 생합성 능력을 갖는 균주를 선별하기 위한 적응진화 배양을 통해 유전자 조작 없이 수득된, 모균주 메틸로시스티스 속 OK1에 비해 증가된 성장 속도 및 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 갖는 메탄올 내성이 강화된 적응진화 신규 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5에 대한 것이다. 또한 본 발명의 신규균주를 이용한 폴리하이드록시부티레이트 생산 방법 및 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12P 7/625 (2022.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157126
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCCM13166P로 기탁된 메틸로시스티스 속(*Methylocystis* sp.) OK1_M5 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 상기 균주는 유전자 조작 없이 적응진화에 의해 획득된 것인, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1으로 표시되는 16S rRNA 유전자를 갖는 것인, 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 메탄올 내성이 강화된 것인, 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 폴리하이드록시부티레이트 생산능이 강화된 것인, 균주.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주, 이의 배양액 또는 과쇄물에서 폴리하이드록시부티레이트를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 플라스틱의 생산 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 균주, 이의 배양액 또는 과쇄물을 유효성분으로 포함하는 생분해성 플라스틱 생산용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄올 내성이 강화된 적응진화 메틸로시스티스 속 신규 균주 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로는 고농도 메탄올에 내성을 갖는 메탄산화균, 메틸로시스티스 속(*Methylocystis* sp.) OK1_M5 균주에 관한 것으로서, 적응진화를 통해 고농도 메탄올에 대한 저항을 가진 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 개발하였고, 개발된 균주의 성장능력 및 메탄올 유래 폴리하이드록시부티레이트(Polyhydroxybutyrate; PHB) 생산 능력을 조사하였다. 0.5% 이상의 메탄올 조건하에서 성장을 멈춘 모균주 메틸로시스티스 속 OK1 균주와 달리, 본 발명의 적응진화된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 5.5%(v/v) 이상의 고농도 메탄올 조건하에서도 성장에 문제가 없음을 확인하였고, 상기 적응진화된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 메탄 또는 메탄올로부터 고수율의 폴리하이드록시부티레이트 생산에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 메탄(methane)은 온실가스의 주요 성분이지만 다른 한편으로 바이오 가스와 천연가스의 주요 성분으로 풍부하고

저렴한 차세대 탄소 자원으로 평가받고 하다. 저가 탄소원의 고부가가치화를 위하여 메탄 전환 기술의 개발이 요구되고 있으며, 메탄자화균을 활용한 메탄의 생물학적 전환이 새로운 대안으로 제안되고 있다. 메탄자화균은 상온·상압의 조건에서 메탄을 유기산, 알코올 및 생분해성 플라스틱 등의 고부가가치 산물로 전환할 수 있어, 미국, 유럽, 중국 그리고 우리나라 등에서 활발한 연구가 진행 중이다. 그러나, 메탄의 기체-액체 물질 전달 속도로 인한 생산성에 한계가 있다.

[0003] 메탄올(methanol)은 전세계에서 널리 활용하고 있는 C1 탄소로, 산업 생명공학을 위한 이상적인 대체 탄소원으로 평가되고 있다. 메탄자화균은 메탄을 산화하여 메탄올을 생성하는 미생물로서 기존 메탄의 낮은 물질전달계수로 인한 생산성 한계를 메탄올로 대체한다면 생산성을 극복할 수 있을 것이다.

[0004] 특히, 유형 II 메탄자화균은 메탄으로부터 생분해성 폴리머인 폴리하이드록시부티레이트(Polyhydroxybutyrate; PHB)를 생산하는 것으로 알려져 있으며, 메탄을 탄소원으로 제공할 경우 폴리하이드록시부티레이트의 생산성은 건조세포 대비 35-45% 가량이다.

[0005] 한편, 폴리하이드록시부티레이트(Polyhydroxybutyrate; PHB)는 최초로 발견된 폴리하이드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoates; PHA)이며 가장 광범위하게 연구되고 있는 바이오 플라스틱이다. PHB는 다양한 미생물에 의해 탄소원 및 에너지원으로 축적되는 세포 저장물질이며, 3-하이드록시부티레이트(3-hydroxybutyrate; 3HB)로 구성된 폴리에스테르의 일종이다.

[0006] PHB는 기존의 석유화학 플라스틱을 대체할 생분해성 플라스틱으로 각광받고 있지만 높은 생산 단가 때문에 상용화가 제한되고 있고 기존의 석유화학 플라스틱에 비해 경제성이 떨어지는 편이다. 이러한 PHB의 생산단가를 낮추기 위해서 많은 연구가 진행되어 왔지만 아직까지 상업화는 힘든 실정이다.

[0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 메탄올을 탄소원으로 이용하여 폴리하이드록시부티레이트(polyhydroxybutyrate; PHB)를 보다 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 메틸로시스티스 속 OK1 균주를 수개월동안 메탄올 조건하에서 배양하여 메탄올 내성이 강화된 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 수득하였고, 상기 OK1_M5 균주가 메탄올 유래의 폴리하이드록시부티레이트(polyhydroxybutyrate; PHB)를 건조 중량 대비 65% 이상 생산하는 것을 확인하였다.

[0008] 본 발명에서는 메탄올 내성이 강화된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주의 유전체와 모균주의 유전체를 비교·분석하였다. 또한, 세포 성장 및 폴리하이드록시부티레이트 생산능력은 5% 메탄올 함유 NMS 배지가 첨가된 배플 셰이킹 플라스크 배양을 통해 메틸로시스티스 속 OK1_M5 개선된 발효 성능을 조사하였다.

[0009] 본 발명은 최근 온실가스 배출과 폐플라스틱 이슈를 동시에 해결할 수 있는 새로운 기술이 될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 10-2011-00222021

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 유전자 조작 없이 적응진화에 의해 수득되고, 고농도 메탄올 조건하에서 성장속도 및 폴리하이드록시부티레이트 생산능이 향상된 신규 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 고농도 메탄올 조건하에서 적응진화에 의해 수득된 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 이용하여 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 아울러, 본 발명의 목적은 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주 또는 이의 배양액 또는 과채물을 유효성분을 포함하는 생분해성 폴리머 생산용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 고농도 메탄올 조건하에서 유전자 조작 없이 적응진화에 의해 수득되고, 모균주에 비해 성장속도 및

폴리하이드록시부티레이트 생산능이 증가된, 기탁번호 KCCM13166P로 기탁된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "모균주"는 적응진화를 거치기 이전의 메틸로시스티스 속 OK1(기탁번호 KCTC 14644BP)를 의미한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 균주는 유전자 조작 없이 적응진화에 의해 수득된 균주이다. 원하는 특성을 갖는 균주를 개발하기 위해, 형질전환 등을 통한 유전자 조작이 활발하게 이용되나, 인간의 건강이나 생활에 영향을 미치는 영역에서 유전자 조작 균주를 포함한 유전자 조작 개체가 이용되는 것에 대한 우려나 제한이 존재한다. 인위적인 유전자 조작 없이, 원하는 특성이나 활성을 갖는 균주를 수득하기 위해 자연적으로 발생하는 진화 과정을 이용할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 용어 "적응진화(adaptive evolution)"는 자연적인 진화 과정의 유도를 통해, 즉, 유전자 조작 없이, 원하는 특성이나 형질을 갖는 개체의 선택에 유리한 조건에서 배양하여 진화를 유도하는 방식에 의해 원하는 특성을 갖는 개체를 선별하는 방법을 의미한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 갖는 균주이다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 균주는 모균주에 비해 증가된 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가질 수 있다.

[0020] 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 고농도 메탄올 조건하에서 성장속도가 빠른 균주를 선별하기 위해, NMS 배지에 탄소원으로 메탄올을 제공, 메탄올 농도를 순차적으로 증가시키면서 배양하여, 성장속도가 빠른 균주로 진화하도록 유도하는 것에 의해 수득되고, 폴리하이드록시부티레이트 생산능의 증가에 근거하여 선별된 것이다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리하이드록시부티레이트"은 미생물에 의해 합성되는 생분해성 플라스틱을 의미한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태는 빠른 성장속도를 갖도록 유도하는 적응진화에 의해 선별된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 고농도 메탄올 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에서, 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 배양하는 단계는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 배지를 이용하여 수행될 수 있다. 배양 방법 및 조건은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 선택될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 방법은 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주의 배양물로부터 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균체를 회수하는 단계, 상기 균체를 동결건조 및 추출에 의해 폴리하이드록시부티레이트를 추출하는 단계, 추출된 폴리하이드록시부티레이트를 용매를 이용하여 침전, 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0025] 아울러, 본 발명은 기탁번호 KCCM13166P로 기탁된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물에서 폴리하이드록시부티레이트를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 폴리머 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따라 고농도 메탄올 조건하에서 적응진화를 통해, 유전자 조작 없이 선별된, 모균주에 비해 성장속도 및 폴리하이드록시부티레이트 생산능이 향상된 균주는 유전자 조작에 대한 거부감 없이 안전하게 이용될 수 있는 폴리하이드록시부티레이트의 제조를 가능하게 하여, 저가의 메탄올 유래 생분해성 플라스틱을 고효율로 생산할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 메탄올 내성이 강화된 균주를 선별하기 위한 적응진화 배양기의 모식도를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 메탄 및 1~5 %(v/v) 메탄올 조건하에서 모균주와 적응진화 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5의 세포 농도를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 메탄 및 1~5 %(v/v) 메탄올 조건하에서 모균주와 적응진화 균주 메틸로

시스티스 속 OK1_M5의 폴리하이드록시부티레이트 생산성 비교를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 3 %(v/v) 메탄올 조건하에서 메틸로시스티스 속 OK1_M5의 메탄올 소비량, 바이오매스 및 폴리하이드록시부티레이트 생산성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0029] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0030] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 모든 기술 용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0033] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCCM13166P로 기탁된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어, "메틸로시스티스 속 OK1_M5"는, 모균주 메틸로시스티스 속 OK1(기탁번호 KCTC 14644BP)로부터 유래되고, 메탄올 농도를 순차적으로 증가시켜 메탄올 내성이 강화된 적응진화 균주로서, 2022년 4월 28일자로 한국미생물보존센터에 기탁하고, 기탁번호 KCCM13166P를 부여받은 균주를 의미한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 본 발명자들은 고농도 메탄올에 대한 내성을 갖는 메탄산화균의 개발 및 폴리하이드록시부티레이트 생산에 적합한 균주를 발굴하기 위하여, NMS 배지에서 메탄올을 탄소원으로 제공하고 메탄올 농도를 저농도(0.5%, v/v)에서 고농도(5.5%, v/v)로 순차적으로 증가시켜 메탄올 내성이 강화된 적응진화 메탄산화균인 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 획득하는데 성공하였다.
- [0037] 상기 균주는 표 1에 기재된 서열번호 1으로 기재된 16S rRNA 유전자를 갖는다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "16S rRNA"란, 16S 리보솜 RNA(16S ribosomal RNA)를 의미하여, 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 동정할 수 있다. 상기 rRNA 서열은 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면, 타 종간에는 다양성이 나타나므로 생물 동정에 사용된다. 또한 보고된 적이 없는 생물의 동정 및 분류에 특히 유용하게 사용된다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 16S rRNA 유전자를 증폭시켜 염기서열을 결정한 후 모균주인 메틸로시스티스 속 OK1의 염기서열과 비교·분석한 결과, 1299번째 뉴클레오타이드 G가 A로 치환됨을 확인하였다.
- [0041] 또한, 상기 균주는 메탄올로부터 생분해성 플라스틱인 폴리하이드록시부티레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)를 합성하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시 양태로서, 본 발명은 상기 메틸로시스티스 속 OK1_M5(기탁번호 KCCM13166P) 균주, 또는 상기 균주의 건조 균체를 포함하는 메탄 유래 폴리하이드록시부티레이트를 제공한다.

[0044] 이하, 본 발명은 실시 예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1. 메탄올 내성이 강화된 적응진화 균주의 선별

[0047] 메탄올 내성이 강화된 적응진화 균주의 선별을 위하여, 모균주 메틸로시스티스 속 OK1(기탁번호 KCTC 14644B P)를 NMS 배지(nitrate-mineral-salt medium, 1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g KNO_3 , 0.2g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.0000038g Fe-EDTA, 0.0000005g $NaMo \cdot 4H_2O$ per liter); 1ml of trace elements solution(500mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 400mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20mg $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 50mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 15mg H_3BO_3 , 250mg EDTA per liter), 2ml of phosphate stock solution(26g KH_2PO_4 , 62g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ per liter), 2ml of vitamin stock(1×)(2mg biotin, 2mg folic acid, 5mg thimine HCl, 5mg Ca pantothenate, 0.1mg vitamin B12, 5mg riboflavin, 5mg nicotinamide per liter) and 2uM copper)가 담긴 배플 шей킹 플라스크에 접종한 후, 탄소원으로 0.1% 메탄올을 공급하고, 30℃, 230 rpm에서 3일간 배양하였다. 액체 배지에 메탄산화균이 충분히 자랄때까지 메탄올 농도를 고정하고, 미생물 성장 능력이 향상되면, 메탄올 농도를 0.5%씩 순차적으로 높이는 방식으로 수개월에 걸쳐 적응진화를 실시하였고 계대 배양 주기는 주 1회였다(도 1). 수개월의 노력 끝에 고농도인 메탄올 5.5% 조건 하에서도 메탄올에 의한 성장 저해를 받지 않고 성장 가능한 적응진화 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 수득하였다.

[0049] 실시예 2. 적응진화 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5의 유전체 분석

[0050] 상기 실시예 1에서 적응진화시킨 메탄산화균의 유전체 분석을 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 유전체 시퀀싱은 Macrogen(서울, 한국)에서 수행하였다. 먼저, Illumina HiSeq 2500 플랫폼 기반의 드래프트 게놈 시퀀싱(2×151 nt, 1.6Gb)을 사용하여 드래프트 게놈을 얻었다. 그 후, PacBio RS II 플랫폼을 사용하여 최종 게놈 서열을 얻었다. 이를 메틸로시스티스 속 OK1(기탁번호 KCTC 14644BP)의 게놈 서열 분석 결과와 비교·분석하여 유전체 내 적응진화를 통해 돌연변이된 부분을 조사하였다.

표 1

[0052]

서열번호	명칭	서열
서열번호 1	16s rRNA	CAACTTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGCTGTAGCAATACAGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCTTTCGGTTTCGGAATAACTCAGGAAACTTGAGCTAATACCGGATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATTGCCAAAGATCGGCCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGTGTGGTAATGGCGCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCCAGGGACGATAATGACGGTACCTGGATAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCGCGGTAAACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGATCTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGAACCTGCCTTTGATACTGGAGGTCTCGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCCCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCACGCGCTAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGGAGCTTGCTCTTCAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCTTTTGACATGTCCGGTATGGTGTGTCAGAGATGACTTCCTTCCCGCAAGGGGCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTGGGCACTCTAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACAGGCTGGGTACACACGTGTACAATGGCGGTGACAATGGGAGGCGAAGGGGCGACCCCTTAGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCGCACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGCGTTTCGCCAACCGCAAGGGGCGAGCGACACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

서열번호 2	PLP-dependent transferase	ATGGCCATCGAATCAAAACATCTGAAACCCTTGCGCTTCATGCAGGCTGGCGCGCGGATAAGTCTAC CGGCGCCGTGCGCGTCCCGATTATCAGACGACGTCTACCAGTTCGCGGACGCCGAGCAGCCGCCA ATCTTTTCGCGTTGAAGGAGCTCGGGCCGATCTATACGCGCATCGGCAATCGCAGCACCAGCTTCTG GAAGCGCGCTCGCGCGCTCGAAGGCGGCGTCCGCGCTGGCGCTTTCTCCGGACAGGCGGCTC GGCCTTCGCGATCCAGAACATCGCGGTGTGCGGACAATGTGGTCTCTCCACCGGTCTTTACGGCG GCACCTGGAATCTCTTCGCAATACCTGAAGGACCAGGGATCGAGGTGCGCTTCGTGATCCGACC GACCCGAGAATTTCCGCGCGCGACGGACGAGCGCACCCGCGCTATTACGCGGAGACGCTCCCCAA TCCGAAGCTCGAAGTGTTCGATCGCGAAGTGGCGCGATCGGTGCGCAATATGGCATCCCGCTCA TCATGGACAATACGGCGCGCGCTTCTCGCACGCCCTTCGATCACGGCGCGCGATCGTCGTCTAT TCCACGACGAAATATCTCGGCGGGACGGCACGTGATCGGCGCGCATCATCGACGGCGGCAATTT CGATTGGGAGAAGTTCCCGCGCGCCAGCGCGGCTCAACACGCTGATCCGAGCTATACGGCGCTG TGTGGTTCGAGGCGGTGAAGCCACTCGGCCCATCGCTATATCATCAAGGCGCGCACGACGTGCTG CGCATCTCGGCTCCGCGCCCTCGCCCTTCAACGCGTTTCTTACACTGAGGAATCGAGCCCTCAC GCTGCGCATGGAGCGCATGTGTGAGCAATGCGCAAAAGTCCGCGATTTTCTCGGCGAGCGCGGCAAG TCACGAAAGTCATCTACCCTCGCATCAGAGCGCGAAACGCGCGCCGCGCGGATAAATATCTCAAG GGCGGCTATGGCGCGCTCATCGGCTTCGAGCTCAAGGGCGCGCGGACGAGGGCGCGGTTTCATCGA CGCGCTGGAGATGTCTATCAGTCCGCAACATCGCGCAGCGCGCAGCCTCGGATCCATCCGCCAA CGACTACGCAATTCGAGCTCGGCGAAGAAGCGAGCTCGCGAGCGCGTGACGCCCGGCTATGTGCGG CTCTCGATCGGTCTCGAGCATATCAACGATATTCTCGCGATCTGGACAAGGGGTGAAAGCGCGGG CGTTTGA
서열번호 3	IS5 family transposase	ATGTCTCCGGTTCGCAACCGTATCCGTCTGATGTCAGCGACGAAGAATGGTCCCTGGTTGCGCGTA TCTGACGCTGATGGACGAGGGCGCTCCGCAACGTGAGCATTTGCTTCGTGAGCTTTTCAACGGCCTGC GCTACGTTCTGCGTTACGGCATAGCATGGCGCGCATGCCAACGATCTGCCGCCCTGGTCCGAGTG TATCAGCAATCGCAGCGTGGCTGGCGGCGGCGGTGTTCAAGAGCTTGGCGAGGACCTGCGCGCTT GTTGCGCGTCCGCTCCGCTCGCGCGGAGGAGCAACCGCGCGCATATCGACAGCCGACGCTGCGCT CTACGCCGAAAGCGGTCCACGGGCGGCTATGACGGCGCAAGCGCAAGCGCGGCTCCAAGCTGCAC ATGGCGGTGACACGCTGGGCACTTGTGCGCTGACGTTACGCCGCGAATGTGACGACGCCGCGC CGAGGTCCGCAAGCTCGCGCGCTGTGACGAGCGCCACCGCGGAGAGCGTCGAGCTTATTTATGTG ATCAAGGTTATACCGGCGAGAAAGCGCGGAGGCGGCCAAAGCGCAGGCGCTCGAACTCTCGCTGGT AAACTCTCCGAAGCGAAAAAGGCTTCTGTGCTGTTGCCAAACGCTGGGTTGTCGAACGATCTTCGC TTGGGCGACCCGATGACGCGGCTGGTCAAGACTACGAACGCTACGCCGACACACTCGTGGCCTCC ACGTGTCGCTTTGCGCTCGCTCATGCTCAAACGCGCAGCGACTTCATAATACAGAGTACATAA
서열번호 4	transposase 1	ATGAAGAAGAGCGGTTACGGAAGAGCAGATCATCGGGATTTGCGGGAGCAGGAAGCGGGCGCGAA GGTCGCGGATCTGCGCGCAACACGCGGTTTCGGAAGCGACGCTCTACAATTGGAAGGTCAAATTCG GCGCATGGAAGCTTTCGGAAGCGAAGCGTCTGAAGGCGTGGAGGAGGAGAATGCAAGCTGAAGAAG CTGCTGGCGGATCAGATGCTGGAAGCGGCGCGCTCCGGGAGCTTCTGGGAAAA
서열번호 5	IS21 family transposase 1	ATGCCAGCGGAGCGGATTACGATGCGCCAGGCGCGTGAGATTATTCGACTGAAGTCTCGTGATTTC GGCGCACGAGATTTCCCGGCGGCTCGGCATGCGCGGCTCGACGGTGCGGGAGGCGCTCAAGCGCGCGG AGAGCGCGGGCTCTCTGGCGGTTGCCGAGGGAATGACCGAGCATGCGCTCGAGGCGCGCTCTAC GCCAATCGGCGCAGCAAGCGCGGTCTCGGCGCATTGAGGAGCCGACTGGGCTGGCGTCATCGGA GTTGAAGCGCAAGCAGTTACCTTGATGATTTTGTGGGACGAATACACCGCCGCAATCCGGGCGGCT ATAGCTACTCGCGTTCTGCGAACTTATCGCGCTTCGAAAAGACCTGTGCGGTACGATGCGGCAG ACGATGCGCGCGGCAACGGCTGTTGTCGATTACGCTGGCGACGCGGTTCTGTGTCATTGATCG GCTTACCGGCGAGATCCGATGGCGCAGATTTTCGTGCGGTGCTGGGGCGTCGAGCTTCACATTTCG CCAAGGCGAGCTGGACGCGAGCGCTTCCGACTGGATCGACGCCACGTCGCGCGCGCTCGAGGCGATC GGCGCGTCCCGCAGCTCATCGTGCGGACAACGCCAAAACCGCCATCGTCAAAGCCTGCTTCTACGA CCCGCAGGTCAATCGCACCTACCGGACATGGCGATGCAATTACGAGACGCGCTTTTGCGGCGCGAC CCAGAAAGCGCGGACAAAGCGAAGGTGCAATCCGCGGTGCTGATTGCAACGCTGGTCTACTCGGC AGAGTGCGCCGCGGACCTTTTACAGTCTGCGGAGGTCAACGCGCGATCGCCGAGATGCTCAAAAA TCTCAACGAGGAGCGGCCCTCCGCCGCTTGCGGTCACCCGCGGCCAATTGTTCAAGAGATCGACC GCCCGGCGTGAAGCTCTGCCAATCGAGCCCTATGAATATAGCGAATGGCGTTCGCGCGCGTCCGC ATCGATTATCAGTCGAGATCGACGCGCACTATTACTCCGTGCCCTATCGCTTCGCCCGGGCGGAGGT CGAGGCGCGGCTGACCGTCCGCGGCGTCGAGATTTTGTGAAGGCGAGCGCATCGCGTCCATTGTC GGATGAGCGCAACGCAAGCACACGACAATCCCGAGCATGCCCTCCAGCCATCGACGCTATGCG GGCTGGACGATCGAGCGATTTCGCGAGGACGCCGAAAGATCGGCCGCGGACAGCGCGCTCTCGGA GCAGATTTTGGAGGCGAGGCCCATCCGAGCAGGCTATCGGGCTGTCTCGGCGTGTCCGTCTCG CCGGCTCGTATGGGATCGAGCGCTCGAGGCGCAGCGCAACGCGCATCGCGATCGGCGCAAGACC TATGGCTCGATCAAATCCATCTCGACAACAAGTTCGATCGGAAGCCCGCGCCAAAGCGCGCGCGGA CGCGCCCCGATCTCCATCAAAACATCCGTGGCCGCGCTATTATCATTAG

서열번호 6	IS21 family transposase 2	TTGCTCAAACATCCGACGCTCGACCAGCTCCACGCTCTCGGCCTTTACGGAATGGCCAAGGCCTTCGC CGAACTCGCTGAGGCGCCTGAAGCGAATGGACTCGACCGCAACGACTGGCTCGCCCTACTGCTGGATC GGGAAGCCTCCCTTCGGCGCGACAAACGGGTGACGCGCGGGTGGCGCCGCCAGGCTCCGTCAACAG GCCAGCGTCGAAGACGTCGACTATCGACCCGCGCGGGCTCGACCGAACTCTGTTCCAAAAGCTCGC CGAAGGCCAGTGGATCGACGCCACGACAATTTGGCCCTGGTCCGAGCGGGACCGGGAAGAGTT GGCTCGCCTGCGCAATTGGCCAGAGGCCTGCCGCGACAATCGTCCGTCTATCACCCTGGCCG AAGCTCTGCGAGGAATGGCCCTCGCGCGCGGATGGGCGCCATCCGCGCTTGCTCAAAATCCCTTGG TCGCGCCGATCTCTTGATCCTCGACGACTTCGGCCTCGAGCCGCTCGACGCTGGCGCCGCCACGATC TCCTGGAATCCTCGAGGAACGCTACGGGCGTCGATCGACGATCGTACCTCCCAGCTTCCTGTGACA GCCTGGCACGACGTCATTGGAGACCCAACTACGCCGACGCGGTTCTGGACCGCCTCGTTCACAACGC GCATCGTATCGAACTCGCGCGGAAAGCTTACGCCGACGCGCGGCAAAACAGGCCAAATCGGCTTGA
--------	---------------------------	---

- [0054] 상기 균주의 16S rRNA는 서열번호 1으로 기재하였으며, 상기 분석한 균주의 염기서열을 모균주인 메틸로시스티스 속 OK1과 비교한 결과 1299번째 뉴클레오티드 G가 A로 치환되었다.
- [0055] 또한, 상기 균주의 피리독살 인산염 의존성 전이효소(Pyridoxal phosphate-dependent transferase) 서열번호 2로 기재하였으며, 상기 분석한 균주의 염기서열을 모균주인 메틸로시스티스 속 OK1과 비교한 결과 877번째 뉴클레오티드 A가 C로 치환되어 아미노산 티로신이 프롤린으로 치환되었다.
- [0056] 또한, 상기 균주의 IS5 패밀리 트랜스포사제 (IS5 family transposase) 서열번호 3으로 기재하였으며, 상기 유전자의 염기서열을 모균주와 비교한 결과 407번째 뉴클레오티드 T가 A로, 481번째 뉴클레오티드 A가 G로 치환되었다.
- [0057] 또한, 상기 균주의 트랜스포사제(transposase) 서열번호 4로 기재하였으며, 상기 유전자의 염기서열을 모균주와 비교한 결과 91번째 뉴클레오티드 T가 C로, 128번째 뉴클레오티드 C가 T로 치환되었다.
- [0058] 또한, 상기 균주의 IS21 패밀리 트랜스포사제 1(IS21 family transposase 1)서열번호 5으로 기재하였으며, 상기 유전자의 염기서열을 모균주와 비교한 결과 1081번째 뉴클레오티드 T가 C로, 1089번째 뉴클레오티드 G가 C로, 1109번째 뉴클레오티드 A가 G로, 1125번째 뉴클레오티드 CGA가 TTG로, 1131번째 뉴클레오티드 A가 G로, 1155번째 뉴클레오티드 A가 G로, 1170번째 뉴클레오티드 C가 A로, 1185번째 뉴클레오티드 C가 A로, 1213번째 뉴클레오티드 A가 C로, 1254번째 뉴클레오티드 T가 C로, 1361번째 뉴클레오티드 T가 C로, 1462번째 뉴클레오티드 C가 T로 치환되었다.
- [0059] 또한, 상기 균주의 IS21 패밀리 트랜스포사제 1(IS21 family transposase 1)서열번호 5으로 기재하였으며, 상기 유전자의 염기서열을 모균주와 비교한 결과 35번째 뉴클레오티드 GC가 CT로, 60번째 뉴클레오티드 A가 G로 치환되었다.
- [0060] 상기 결과를 토대로, 본 발명에서 수득한 적응진화 균주는 모균주와 표현형이 일정부분 상이함을 확인하였다.
- [0061] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 "메틸로시스티스 속 OK1_M5"으로 명명하고, 이를 2022년 4월 28일자로 한국중균협회 미생물보존센터에 기탁하여 기탁번호 KCCM13166P를 부여받았다.
- [0063] **실시예 3. 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주의 세포 성장 곡선 및 폴리하이드록시부티레이트의 생합성 평가**
- [0064] 상기 실시예 1에서 수득하고, 실시예 2에서 유전체의 일부 돌연변이가 확인된 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주를 NMS 배지에서 메탄 또는 메탄올을 탄소원으로 제공한 후, 세포 성장 곡선을 비교하였다. 그 결과 도 2와 같이 메탄 및 메탄올 제공하에서 메틸로시스티스 속 OK1_M5(기탁번호 KCCM13166P) 균주의 성장 속도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 반면, 모균주인 메틸로시스티스 속 OK1은 메탄에서는 성장하지만, 메탄올 조건하에서는 성장저해를 받는 것을 확인하였다(도).
- [0065] 또한, 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주의 메탄 또는 메탄올 유래 폴리하이드록시부티레이트 생합성 능력을 평가하기 위해, NMS 배지에 탄소원으로 메탄 또는 메탄올을 제공하여 배양하고, 세포를 회수한 후 동결건조를 실시하였다. 건조 세포 50mg을 이용하여 메탄올분해(methanolysis)를 수행한 후, 클로로포름 층을 분리하여 GC-MS 분석을 실시하였다. 그 결과 도 3과 같이, 메탄 조건하에서 배양한 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 건조 세포 중량의 35%의 폴리하이드록시부티레이트를 생산하여 모균주인 OK1과 비슷한 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 나타내었다. 반면, 메탄올 조건하에서 배양한 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 메탄올 농도와 관계없이 50% 이

상의 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 보였다. 이는 메탄과 달리 메탄올은 물질 전달 제한 이슈가 없어 탄소 원으로 공급된 메탄올이 대부분 바이오매스 또는 폴리하이드록시부티레이트로 전환되기 때문이다. 3% 메탄올 조건하에서 배양한 메틸로시스티스 속 OK1_M5 균주는 약 16g/L이 메탄올을 소비하였고, 메탄올 1g당 0.34 g DCW의 바이오매스를 얻었으며, 바이오매스 건조 중량의 68.3%의 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 것을 확인하였다(도 4).

[0067] 결과적으로, 본 발명의 메틸로시스티스 속 OK1_M5(기탁번호 KCCM13166P) 균주는 메탄 또는 메탄올로부터 생분해성 플라스틱 소재인 폴리하이드록시부티레이트를 생산할 수 있음을 시사하는 것이며, 이는 본 발명의 적응진화 균주 메틸로시스티스 속 OK1_M5를 이용하여 메탄 및 메탄올 유래 폴리하이드록시부티레이트 생산용 플랫폼 균주로서 활용 가능성을 시사하는 것이다.

[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0071]

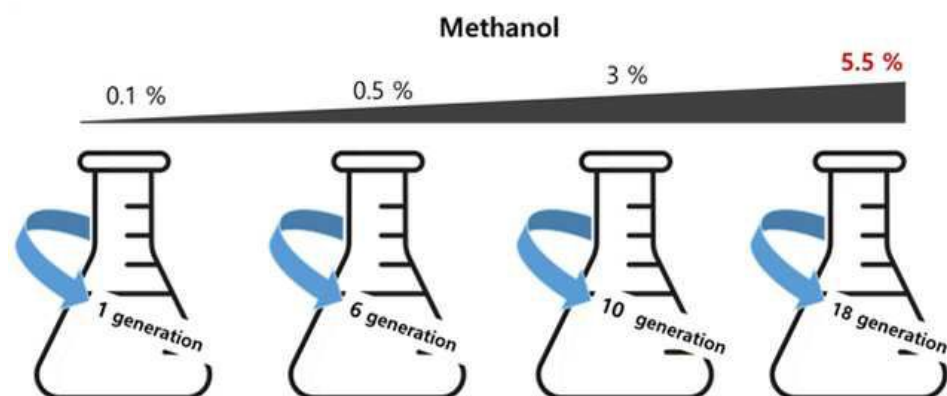
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13166P

수탁일자 : 20220428

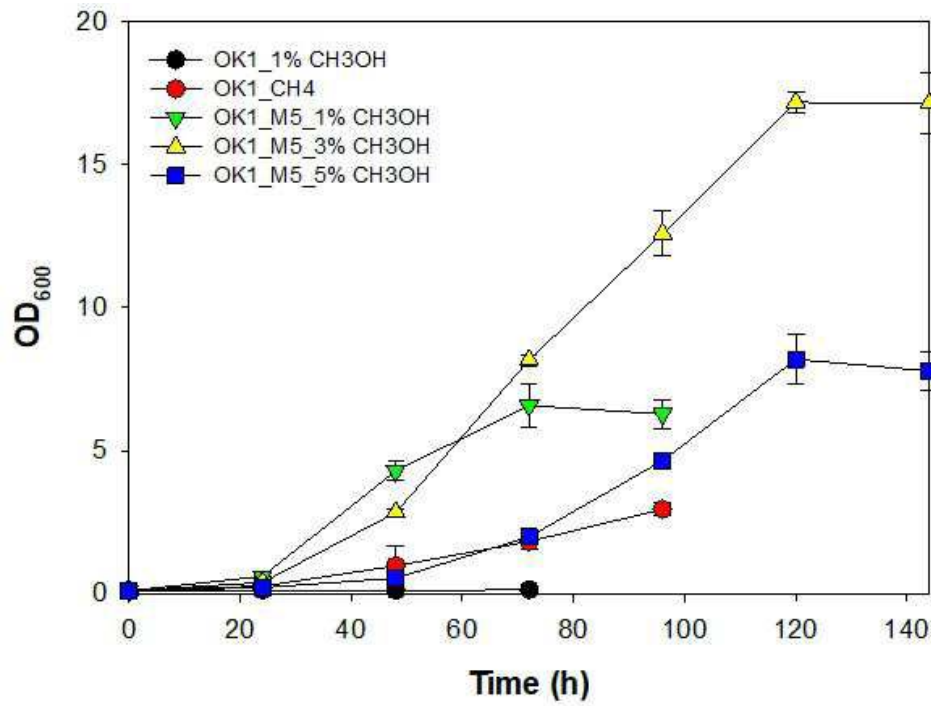
도면

도면1

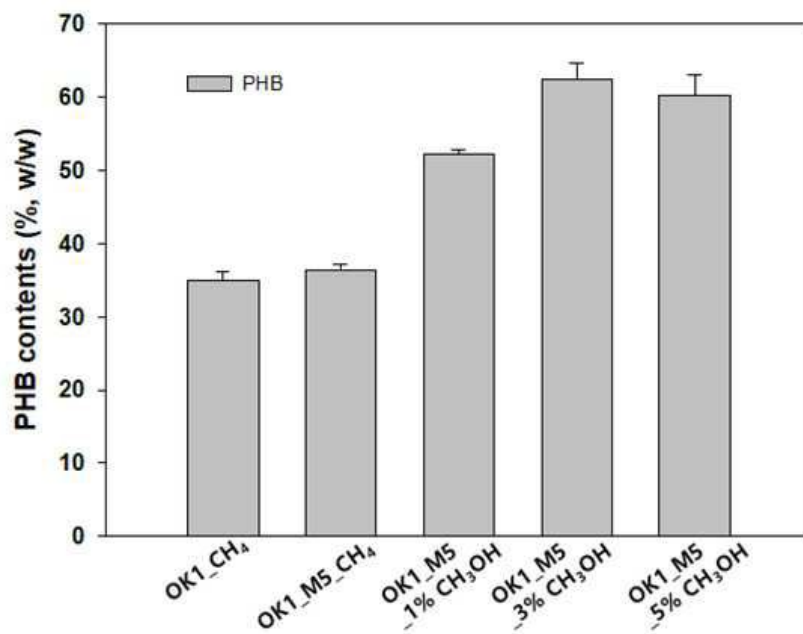


메탄올 내성 강화를 위한 적응진화 균주 제작

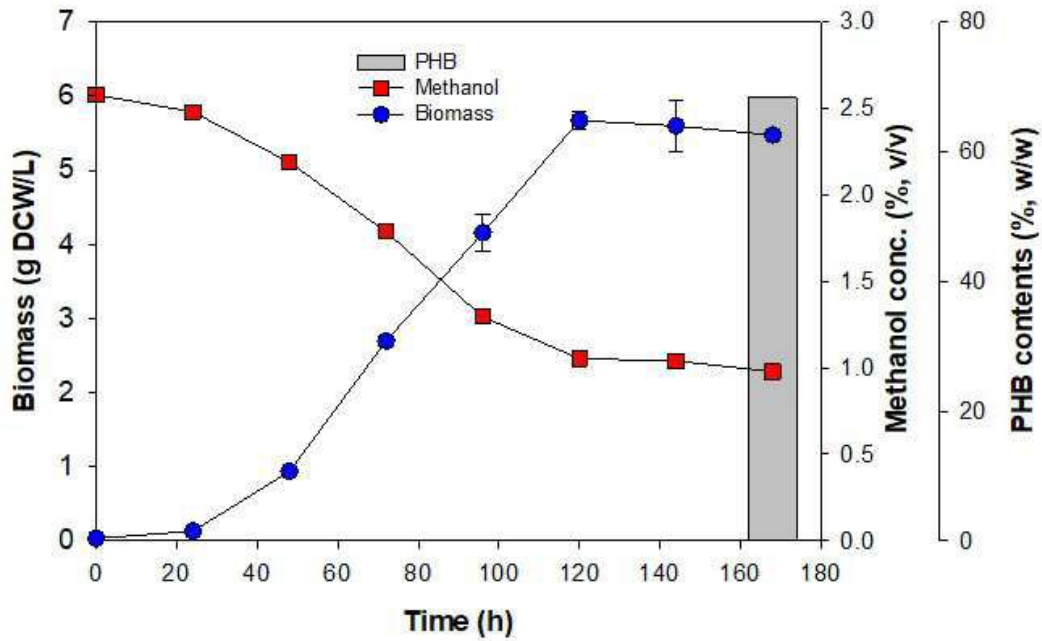
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel strain of the *Methylocystis* sp. with enhanced methanol tolerance and use thereof

<130> PN2205-249

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1433

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16s rRNA

<400> 1

caacttgaga gtttgatcct ggctcagaac gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa 60

gtcgaacgct gtagcaatac agagtggcag acgggtgagt aacgcgtggg aacgtgcctt 120

tcggttcgga ataactcagg gaaacttgag ctaataccgg atacgccctt cgggggaaag 180

atttattgcc gaaagatcgg cccgcgtccg attagctagt tgggtgtgta atggcgaccc 240

aaggcgacga tcggtagctg gtctgagagg atgatcagcc aactgggac tgagacacgg 300

cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattggac aatgggcgca agcctgatcc 360

agccatgccg cgtgagtgat gaaggcccta gggttgtaaa gctctttcgc caggacgat	420
aatgacggta cctggataag aagccccggc taacttcgtg ccagcagccg cggtaatacg	480
aagggggcta gcgttgttcg gaatcactgg gcgtaaagcg cacgtaggcg gatctttaag	540
tcaggggtga aatccccgagg ctcaacctcg gaactgcctt tgatactgga ggtctcgagt	600
tcgggagagg tgagtggaac tgcgagtgtg gaggtgaaat tcgtagatat tcgcaagaac	660
accagtggcg aaggcggctc actggcccga tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga	720
gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatggatgct agccgttggg	780
gagcttgcct ttcagtggcg cagctaacgc ttttaagcatc ccgctgggg agtacggtcg	840
caagattaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc atgtggttta	900
attcgaagca acgcgcagaa cttaccagc ttttgacatg tccggtatgg tcgtcagaga	960
tgacttcctt cccgcaaggg gccggaacac aggtgctgca tggtgtcgt cagctcgtgt	1020
cgtgagatgt ttgggcactc tagggggact gccggtgata agccgcgagg aaggtgggga	1080
tgacgtcaag tcctcatggc cttacaggc tgggctacac acgtgctaca atggcggatga	1140
caatgggagg cgaagggcg acccttagca aatctcaaaa agccgtctca gttcggattg	1200
cactctgcaa ctgagtga tgaaggatga atcgctagta atcgagatc agcacctgc	1260
ggtgaatacg ttcccggcc ttgtacacac cggcgtcgc accatgggag ttggttttac	1320
ccgaaggcgt ttcgccaacc gcaagggggc aggcgaccac ggtagggtca gcgactgggg	1380
tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcgctg gatcacctcc ttt	1433
<210> 2	
<211> 1299	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PLP-dependent transferase	
<400> 2	
atggccatcg aatcaaaaca tcctgaaacc cttgccttc atgcaggctg gcgcgcggat	60
aagtctaccg gcgccgtcgc cgtcccgatt tatcagacga cgtcctacca gttccgcgac	120
gccgagcacg ccgccaatct tttcgcgttg aaggagctcg ggccgatcta tacgcgcatc	180
ggcaatccga cgaccgacgt tctggaagcg cgcctcgccg cgctcgaagg cggcgtcgcc	240
gcgctggcgc tttcctccgg acaggcggcc tcggccttcg cgatccagaa catcgcgct	300
gtcggcgaca atgtggtctc ctccaccggt ctttacggcg gcacctggaa tctcttcgcc	360
aataacctga aggaccaggg gatcgagggtg cgcttcgtcg atccgaccga ccccgagaat	420

ttccgccg cgacggacga ggcacccgc gcctattacg ccgagacgct ccccaatccg	480
aagctcgaag tgittccgat cgcggaagtg gcggcgatcg gtcggaata tggcatcccg	540
ctcatcatgg acaatacggc ggcccgctt ctgcacgcc ctttcgatca cggcgcgcg	600
atcgctgtct attccacgac gaaatatctc ggccggcacg gcacgtcgat cggcgcgcc	660
atcatcgacg gggcaattt cgattgggag aagtccccg cgcccgacc ggcgtcaac	720
acgcctgac cgagctatca cggcgctgtg tgggtcagg cggtgaagcc actcgcccc	780
atcgctata tcatcaaggc gcgcacgacg ctgctgcg atctcggctc cgcgccctcg	840
cccttcaacg cgtttcttac actgcaggga atcgagcccc tcacgtgac catggagcgc	900
catgtgagca atgcgaaaa ggtcgccgat tttctcgcc agcgcgcgga agtcacgaaa	960
gtcatctacc cctcgatca gagcgcgaa acgcgcgcc gcgccgataa atatctcaag	1020
ggcggtatg gcgcgtcat cggcttcgag ctcaaggcg gcgcggacgc agggcgcggt	1080
ttcatcgacg cgctggagat gttctatcac gtcgcaaca tcggcgacgc gcgcagcctc	1140
gcgatccatc ccgcaacgac tacgattcg cagctcggcg aagaagcgca gtcgcgagc	1200
ggcgtgacgc ccggctatgt gcggctctcg atcggtctcg agcatatcaa cgatattctc	1260
gccgatctgg acaaggggt gaaagcgcg gcggtttga	1299
<210> 3	
<211> 813	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IS5 family transposase	
<400> 3	
atgtctccg ttgcgaaacc gtatccgtct gatgtcagc acgaagaatg gtccctggtt	60
gcgccgtatc tgacgtgat ggacgaggc gtcgcaac gtcagcattt gcttcgtgag	120
cttttcaacg gcctgcgcta cgttctgctg tacggcatag catggcgcg catgccaac	180
gatctgccg cctggctcgc agtgtatcag caatcgacg gctggctggc ggccggcgtg	240
ttcgaagagc ttgcgcagga cctgcgcgcc ttgttgcg tgcctccgg tcgcgccgag	300
gagccaaccg cggcgatcat gcacagcgc acgtgcgct ctacccgga aagcggtcca	360
cgggcgggt atgacggcg caagcgcaag cgcgggtcca agctgcacat ggccgtcgac	420
acgtggggc acttgctggc gctgcacgtt acgccgga atgtcgacg ccgcgccgag	480
gtcggcaagc tcgcccgcg tgtgcaggac gccaccggcg agagcgtcga gcttatttat	540
gtcgatcaag gttataccgg cgagaaagcc gccgagcg ccaaagcgga ggccgtcgaa	600

ctctgcgtgg tcaaactctc cgaagcgaaa aaaggcttcg tgctgttgcc caaacgctgg 660
gttgtcgaac gatccttcgc ttgggcgacc cgatgcaggc ggctgggtcaa agactacgaa 720
cgctacgccg acacactcgc tggcctccac gtcgtcgctt tcgcctgcct catgctcaaa 780
cgcgcagccg acttcataat acagagtaca taa 813

<210> 4

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> transposase 1

<400> 4

atgaagaaga agcggttcac ggaagagcag atcatcgga ttttgcggga gcaggaagcg 60
ggcgcgaagg tcgcgatct ggccgcgaaa cacgcggttt cggaagcgac gctctacaat 120
tggaaggtca aattcggcgg catggacgtt tcggaagcga agcgtctgaa ggcgctggag 180
gaggagaatg caaagctgaa gaagctgctg gcggatcaga tgctggaagc ggcggcgctc 240
cgggagcttc tgggaaaa 258

<210> 5

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IS21 family transposase 1

<400> 5

atgccagcgg agcggattac gatgcgccag gcgcgtgaga ttattcgact gaagtcctcg 60
tcgatttcgg cgcacagat ttcccggcgg ctcggcacgc cgcgctcgac ggtgcgggag 120
gcgctcaagc gcgcggagag cgccgggctc tctggccgt tgcggaggg aatgaccgac 180
gatgcgctcg agcggcgct ctacccaat cgcgcgagca agcgcggtca tcggcgatt 240
gaggagccgg actgggctgg cgtgcatcgc gatttgaagc gcaagcacgt taccttgatg 300
atattgtggg acgaatacac cgccgcaaat ccgggcggct atagctactc gcggttctgc 360

gaactttatc gcgccttcga aaagacctg tcggtgacga tgcggcagac gcatgccgcc 420
ggcgaacggc tggtcgtcga ttacgtggc gacggcgctt ctgtcgtcat tgatcggtt 480
accggcgaga tccgcatggc gcagattttc gtcgcggtgc tgggggcgct gagcttcaca 540
ttcgccaagg cgagctggac gcagacgctt cccgactgga tcgacgcca cgtcggcgcg 600
ctcgaggcga tcggcggcgt ccgcagctc atcgtgccgg acaacgcaa aaccgccatc 660

gtcaaagcct gcttctacga cccgcaggtc aatcgcacct acgccgacat ggcgatgcat	720
tacgagacgg cgcttttgcc ggcgcgaccc agaaagccgc gcgacaaggc gaaggtcgaa	780
tccgcgggtgc tgattgtcga acgctggcta ctccggcagag tgcgccgcgc gaccttttac	840
agtctggcgg aggtcaacgc ggcgatcgcc gagatgtca aaaatctcaa cgaggagcgg	900
ccctccgcc ggcttgccgt caccgccgc caattgttcg aagagatcga ccgcccggcg	960
ctgaagcctc tgccaatcga gccctatgaa tatagcgaat ggcgctcgcg ccgcgtcggc	1020
atcgattatc acgtcgagat cgacgcgcac tattactccg tgcctatcg cttcgcccgg	1080
gcggaggctc aggcgcggct gaccgtccgc ggcgctcgaga tttttgcaa gggcgagcgc	1140
atcgccgtcc atttgccgat gagcggcaaa cgcaagcaca cgacaattcc cgagcacatg	1200
ccctccagcc atcgacgcta tgcgggctgg acgatcgagc gcattcgca ggacgccga	1260
aagatcggcc cggcgacagc cgcgctctgc gagcagatit tggaggcgag gcccatccc	1320
gagcagggtc atcgggcttg tctcggcgtc gtccgtctcg ccggctcgta tgggatcgag	1380
cgcgctgagg ccgcagccga acgcgccatc gcgatcggcg ccaagaccta tggctcgatc	1440
aaatccatcc tcgacaacaa gttcgatcgg aagcccgcg caaagcgcg cgccggacgcg	1500
gccccgatcc tccatcaaaa catccgtggc ccgcgtatt atcattag	1548
<210> 6	
<211> 1433	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IS21 family transposase 2	
<400> 6	
caacttgaga gtttgatcct ggctcagaac gaacgtggc ggacggccta acacatgcaa	60
gtcgaacgt gtagcaatac agatggcag acgggtgagt aacgcgtggg aacgtgcctt	120
tcggttcgga ataactcagg gaaacttgag ctaataccgg atacgccctt cgggggaaag	180
atttattgcc gaaagatcgg ccgcgtccg attagctagt tgggttggtg atggcgacc	240
aaggcgacga tcggtagctg gtctgagagg atgatcagcc aactgggac tgagacacgg	300
cccagactcc tacgggaggg agcagtgggg aatattggac aatgggcgca agcctgatcc	360
agccatgccg cgtgagtgat gaagcccta gggttgtaaa gctctttcgc cagggacgat	420
aatgacggta cctggataag aagccccggc taacttcgtg ccagcagccg cggtaatag	480
aagggggcta gcgttgctg gaatcactgg gcgtaaagcg cacgtaggcg gatctttaag	540
tcaggggtga aatcccagg ctcaacctcg gaactgcctt tgatactgga ggtctcgagt	600

tcgggagagg tgagtggaac tgcgagtgtg gaggtgaaat tcgtagatat tcgcaagaac	660
accagtggcg aaggcggctc actggcccga tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga	720
gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatggatgct agccgttggg	780
gagcttgctc ttcagtggcg cagctaacgc tttagcatc ccgcctgggg agtacggtcg	840
caagattaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc atgtggttta	900
attcgaagca acgcgcagaa ccttaccagc tttgacatg tccggtatgg tcgtcagaga	960
tgacttcctt cccgcaaggg gccggaacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt	1020
cgtgagatgt ttgggcactc tagggggact gccggtgata agccgcgagg aaggtgggga	1080
tgacgtcaag tcctcatggc ccttacaggc tgggctacac acgtgctaca atggcgggtga	1140
caatgggagg cgaaggggcg acccttagca aatctcaaaa agccgtctca gttcggattg	1200
cactctgcaa ctcgagtgca tgaaggtgga atcgctagta atcgcagatc agcacgctgc	1260
ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcgc accatgggag ttggttttac	1320
ccgaaggcgt ttgcgaacc gcaagggggc aggcgaccac ggtagggtca gcgactgggg	1380
tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg gatcacctcc ttt	1433