



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0005170
(43) 공개일자 2014년01월14일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7014637</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2011년11월10일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년06월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/069789</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/062832
국제공개일자 2012년05월18일</p> <p>(30) 우선권주장
10306234.5 2010년11월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/412,162 2010년11월10일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
메타블릭 익스플로러
프랑스 에프-63360 세인트 보지레 바이오폴 클레르몽트 리마그네</p> <p>(72) 발명자
피그, 라이너
프랑스 에프-63450 르 크레스트 뒤 뒤 보르케 4</p> <p>(74) 대리인
양영준, 양영환</p> |
|---|--|

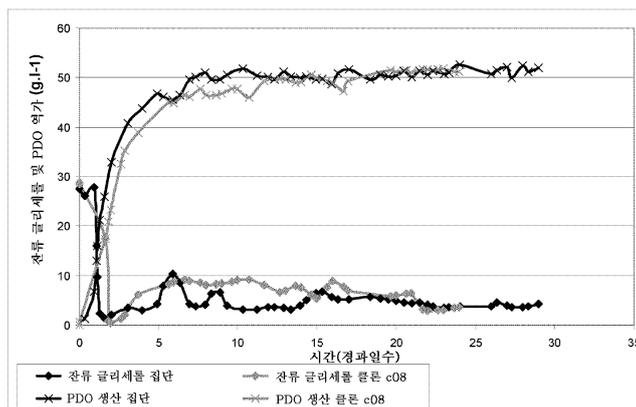
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **고농도의 글리세린을 사용하는 1,3-프로판디올 생산용 미생물**

(57) 요약

본 발명은, 표 1에 확인된 돌연변이 중에서 선택되는 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 종(*Clostridium acetobutylicum* sp.) 균주를 포함하며, 상기 돌연변이의 상대적인 비율은 특이적 유전자 중에서 선택되는 것인, 1,3-프로판디올 (PDO)의 생산에 유용한 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*) 집단에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

표 1에 확인된 돌연변이 중에서 선택되는 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 종 (*Clostridium acetobutylicum* sp.) 균주를 포함하며, 여기서 상기 돌연변이는 하기와 같은 상대적인 비율로 하기 유전자 패밀리 중에 존재하는 것인, 1,3-프로판디올 (PDO)의 생산에 유용한 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*) 집단:

유전자 패밀리 및 기능	최소 %
전사 번역 조절	12-15
수송체	10-12
가상 단백질	8-11
에너지 대사	7-10
유전자간	7-10
탄수화물 대사	5-7
막 단백질	2-5
핵산 대사	2-5
아미노산 대사	1-3
세포 분열	1-3
포자 형성	1-3
세포 부착	0-1
셀룰라제	0-1
글리세롤 대사	0-1
지질 대사	0-1
프로테아제/펩티다제	0-1
세포 이동	0-1

청구항 2

제1항에 있어서,

- 수탁 번호 I-4378하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01;
- 수탁 번호 I-4379하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c05;
- 수탁 번호 I-4380하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07

로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 균주를 포함하는 집단.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 균주가 하기 점 돌연변이:

- 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C0175, 위치 198989의 C가 T로 치환된 것으로서, 진핵성 글루코키나제 조절 인자의 상동체인 예측 당 포스페이트 이소머라제 (탄수화물 대사)를 코딩하는 것;
- 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1300, 위치 1444099의 G가 A로 치환된 것으로서, RNA 폴리머라제 시그마 인자 RPOD (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;
- 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C2670, 위치 2787387의 C가 T로 치환된 것으로서, Glu-tRNAGln 아미도트랜스퍼라제 서브유닛 A (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;
- 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C3339, 위치 3512658의 C가 T로 치환된 것으로서, ABC 수송체의 ATP아제 성분 (2개의 ATP아제 도메인)을 코딩하는 것;
- 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1610, 위치 1752341의 C가 T로 치환된 것으로서, 분지쇄 아미노산 퍼미아제 (수송체)를 코딩하는 것

중 하나 이상의 점 돌연변이로 추가로 변이된 것인 집단.

청구항 4

단일 탄소 공급원으로서 글리세린을 포함하는 배양 배지 중에서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 집단을 배양하는 단계, 및 생산된 1,3-프로판디올을 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 1,3-프로판디올의 생산 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 1,3-프로판디올을 추가로 정제하는 것인 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 배양 배지 중 글리세린 농도가 90 내지 120 g/L 글리세린으로 구성되고, 바람직하게는 약 105 g/L의 글리세린인 방법.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 글리세린이 산업용 글리세린으로 제공되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 산업용 글리세린이 바이오디젤 생산의 부산물인 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 배지가 유기 질소가 첨가되지 않은 합성 배지인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 1,3-프로판디올 생산용의 신규한 변형된 미생물에 관한 것이다. 상기 미생물은 글리세린 함량이 높고, 구체적으로는 산업용 글리세린을 고농도로 함유하는 배양 배지로부터의 성장 및 1,3-프로판디올의 생산을 위해 적합화된 것이다. 본 발명은 또한 상기 적합화된 미생물의 배양 조건 및 1,3-프로판디올의 생산 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 변형된 미생물에 의해 생산된 1,3-프로판디올 및 그의 응용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 트리메틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜이라고도 불리는 1,3-프로판디올 (PDO)은 가장 오래된 공지의 발효 생성물들 중 하나이다. 이는 원래 일찍이 1881년 오거스트 프로인트(August Freund)에 의해 클로스트리디움 파스퇴리아눔(*Clostridium pasteurianum*)을 함유하는 글리세린 발효 배양물 중에서 확인되었다. PDO는 글리세린 발효의 전형적인 생성물이고, 다른 유기 기질의 혐기성 전환에서 발견되었다. 단지 극소수의 유기체 (이들 모두는 박테리아이다)만이 PDO를 생산할 수 있다. 그러한 유기체로는 클렙시엘라(*Klebsiella*) (*K. 뉴모니아에(K. pneumoniae)*), 엔테로박터(*Enterobacter*) (*E. 아글로머란스(E. agglomerans)*) 및 시트로박터(*Citrobacter*) (*C. 프레운디아(C. freundii)*), 락토바실리(*Lactobacilli*) (*L. 브레비스(L. brevis)* 및 *L. 브크네리(L. buchneri)*) 및 *C. 부티리쿰(C. butyricum)* 및 *C. 파스퇴리아눔(C. pasteurianum)* 군으로 이루어진 클로스트리디아(*Clostridia*) 속의 엔테로박테리아를 포함한다.

[0003] 이작용성 유기 화합물로서의 PDO는 잠재적으로 많은 합성 반응에서, 특히, 폴리에스테르, 폴리에테르, 폴리우레탄, 및 특히, 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트 (PTT)를 생산하는 중축합의 단량체로서 사용될 수 있다. 이러한 구조와 반응성 특징을 통해 화장품, 직물 (의류용 섬유 또는 바닥재) 또는 플라스틱 (자동차 산업 및 포장 또는 코팅)에서 여러 가지로 응용될 수 있다.

[0004] PDO는 상이한 화학 경로에 의해 생산될 수 있지만, 그로 인해 극도의 오염 물질을 함유하는 폐기물 스트림이 생성되고, 그의 생산 비용은 높다. 따라서, 화학적으로 생산된 PDO는 석유 화학상 이용가능한 디올, 예컨대, 1,2-에탄디올, 1,2-프로판디올 및 1,4-부탄디올과는 경쟁이 불가능하다. 이러한 경쟁력을 증가시키기 위해

1995년 듀폰(DuPont)은 글루코스를 PDO로 생물학적으로 전환시키는 연구 프로그램을 시작하였다. 비록 이러한 공정이 환경 친화적이기는 하지만, i) 매우 비싼 보조인자인 비타민 B12를 사용하고, ii) 생산 균주의 불안정성에 기인하여 공정이 중단된다는 단점이 있다.

- [0005] 바이오디젤 산업에 의해 생산되는 글리세린을 대량으로 이용할 수 있기 때문에, 탄소 수율이 더 높은, 비타민-B12 무함유 연속 공정이 이로울 것이다.
- [0006] 염 및 물과 함께 혼합된, 대략 80-85%의 글리세린을 함유하는 바이오디젤 생산의 원치않는 부산물인, 글리세린으로부터 PDO가 생산될 수 있다는 것이 당업계에 알려져 있다.
- [0007] C. 부티리쿰은 회분식 및 2단계 연속 발효에서 산업용 글리세린으로부터 성장할 수 있고, PDO를 생산할 수 있는 것으로서 앞서 기술된 바 있다 (문헌 [Papanikolaou et al., 2000]). 그러나, 글리세린 최고 농도에서 수득된 최대 PDO 역가는 희석률이 0.02 h⁻¹일 때, 48.1 g·L⁻¹이었으며, 이는 생산성이 0.9 g·L⁻¹·h⁻¹임을 의미한다. 박테리아 바이오매스 생산을 증가시키는 데 도움이 되는 것으로 당업자에게 알려져 있는 유기 질소를 함유하는 고가의 화합물인 효모 추출물의 존재하에, 공급 배지 중 글리세린을 90 g·L⁻¹인 최대 농도로 사용하여 배양을 수행하였다.
- [0008] 출원 W02006/128381에는 천연 PDO 생산 유기체, 예컨대, 클렙시엘라 뉴모니아에, C. 부티리쿰 또는 C. 파스퇴리아눔을 사용하여 회분식 및 유가식 배양으로 PDO를 생산함에 있어 상기 글리세린의 용도가 개시되어 있다. 추가로, W02006/128381에서 사용된 배지는 또한 효모 추출물을 함유한다. 상기 특허 출원에 기술되어 있는 바와 같이, 도달한 최대 생산성은 0.8 내지 1.1 g·L⁻¹·h⁻¹로 구성되었다.
- [0009] "C. 아세토부틸리쿰(C. acetobutylicum) DG1 pSPD5"라고 불리는, C. 부티리쿰으로부터 비타민 B12-비의존성 글리세린-데히드라타제 및 PDO-데히드로게나제를 함유하도록 변형된 C. 아세토부틸리쿰의 성능은 문헌 [Gonzalez-Pajuelo et al., 2005]에 기술되어 있다. 상기 균주는 원래 최대 120 g·L⁻¹ 이하의 순수한 글리세린을 함유하는 공급 배지 중에서 성장하고, PDO를 생산한다. 추가로, 최대 60 g·L⁻¹의 순수한 또는 산업용 글리세린을 함유하는 공급 배지 중에서의 분석을 통해서 어떤 차이도 확인되지 않았다. 이러한 결과는 효모 추출물 존재하에서 얻은 것이었다. 또한, 60 g·L⁻¹ 초과 농도로 산업용 글리세린을 이용해서는 어떤 시험은 수행되지 않았다. 야생형 C. 부티리쿰을 변형된 미생물인 "C. 아세토부틸리쿰 DG1 pSPD5"와 비교하였을 때, 작용(behavior)은 전반적으로 유사한 것으로 관찰되었다.
- [0010] 특허 출원 PCT/EP2010/056078에서 발명자들은 산업용 글리세린을 고농도로 함유하고, 효모 추출물은 함유하지 않는 배지 중에서 성장하도록, 예컨대, 문헌 [Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)]에 기술된 것과 같은 C. 아세토부틸리쿰 DG1 pSPD5 균주를 적합화시키는 방법을 기술하였다. 생성된 균주는 최대 120 g·L⁻¹ 이하의 산업용 글리세린을 함유하는 배지 중에서, 최대 53.5 g·L⁻¹ 이하의 PDO인 역가로, 최대 0.53 g·g⁻¹ 이하인 수율로, 및 최대 2.86 g·L⁻¹·h⁻¹ 이하인 생산성으로 PDO를 생산할 수 있다.
- [0011] 본 특허 출원에서 발명자들은 예컨대, 고농도의 산업용 글리세린의 존재하에서 적합화한 후에 수득되는, PDO 생산에 유용한 적합화된 미생물의 주된 유전적 변형을 강조한다.

발명의 내용

[0012] **본 발명의 간단한 설명**

[0013] 본 발명은 표 1에 확인된 돌연변이 중에서 선택되는 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 종(*Clostridium acetobutylicum* sp.) 균주를 포함하며, 상기 돌연변이의 상대적인 비율은 하기 유전자 패밀리 중에서 선택되는 것인, 1,3-프로판디올 (PDO)의 생산에 유용한 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*) 집단에 관한 것이다:

유전자 패밀리 및 기능	최소 %
전사 번역 조절	12-15
수송체	10-12
가상 단백질	8-11
에너지 대사	7-10
유전자간	7-10
탄수화물 대사	5-7
막 단백질	2-5
핵산 대사	2-5
아미노산 대사	1-3
세포 분열	1-3
포자 형성	1-3
세포 부착	0-1
셀룰라제	0-1
글리세롤 대사	0-1
지질 대사	0-1
프로테아제/펩티다제	0-1
세포 이동	0-1

[0014]

[0015]

특히, 본 발명의 집단은

[0016]

- 수탁 번호 I-4378하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01;

[0017]

- 수탁 번호 I-4379하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c05;

[0018]

- 수탁 번호 I-4380하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07

[0019]

로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 균주를 포함한다.

[0020]

CNCM이란 파리에 위치하는 파스퇴르 연구소(Pasteur Institute)의 "콜렉씨용 나시오날 드 켈튀르 드 미크로오가니즘즈(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)"를 의미한다.

[0021]

본 발명의 특정 실시양태에서, 집단은 하기 점 돌연변이 중 하나 이상의 점 돌연변이로 추가로 변이된 상기 균주를 포함한다:

[0022]

- 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C0175, 위치 198989의 C가 T로 치환된 것으로서, 진핵성 글루코키나제 조절 인자의 상동체인 예측 당 포스페이트 이소머라제 (탄수화물 대사)를 코딩하는 것;

[0023]

- 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1300, 위치 1444099의 G가 A로 치환된 것으로서, RNA 폴리머라제 시그마 인자 RPOD (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;

[0024]

- 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C2670, 위치 2787387의 C가 T로 치환된 것으로서, Glu-tRNAGln 아미도트랜스퍼라제 서브유닛 A (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;

[0025]

- 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C3339, 위치 3512658의 C가 T로 치환된 것으로서, ABC 수송체의 ATP아제 성분 (2개의 ATP아제 도메인)을 코딩하는 것;

[0026]

- 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1610, 위치 1752341의 C가 T로 치환된 것으로서, 분지쇄 아미노산 피미아제 (수송체)를 코딩하는 것.

[0027]

본 발명은 또한 단일 탄소 공급원으로서 글리세린을 포함하는 배양 배지 중에서 본 발명에 따른 1,3-프로판디올(PDO)을 생산하는 데 유용한 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 집단을 배양하는 단계, 및 생산된 1,3-프로판디올을 상기 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 1,3-프로판디올의 생산 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

본 발명의 상세한 설명

[0029]

1,3-프로판디올 (PDO)의 생산에 유용한 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 집단

[0030]

1,3-프로판디올 (PDO)의 생산에 유용한 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 집단이란 단일 탄소 공급원으로서의 글

리세린으로부터 1,3-프로판디올을 생산하도록 유전적으로 변형된 하나 이상의 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 균주를 의미한다. 그러한 균주는 당업계에 공지되어 있고, 특히 출원 W0200104324 및 W02008052595에 개시되어 있다. 본 발명에 따른 집단은 단일 균주, 및 특히, 각각 수탁 번호 I-4378, I-4379, I-4380하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01, DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 또는 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07, 또는 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08 뿐만 아니라, 대다수가 본 발명에 따른 돌연변이를 포함하는 것인 여러 균주의 조합일 수 있다.

- [0031] 돌연변이는 모체 균주 DG1 pSPD5 PD0001VT와 비교하였을 때 확인되는, 균주 계놈 중의 뉴클레오티드 변이, 더욱 특히 SNP ("단일 뉴클레오티드 다형성")이다. 상기 균주는 W0200104324에 개시되어 있고, 이는 계놈 서열이 공개되어 있는 균주 ATCC824로부터 유래된 것이다 (문헌 [Noelling et al., 2001]).
- [0032] 돌연변이는 코딩 또는 비-코딩 서열에서 일어날 수 있다. 상기 돌연변이는 상응하는 아미노산이 변형되지 않은 것인 동의적 돌연변이, 또는 상응하는 아미노산이 변경된 것인 비-동의적 돌연변이일 수 있다. 동의적 돌연변이는 번역된 단백질의 기능에는 어떤 영향도 미치지 않지만, 돌연변이화된 서열이 조절 인자인 인자에 대한 결합 부위에 위치하는 경우, 상응하는 유전자, 또는 심지어 다른 유전자의 조절에는 영향을 미칠 수 있다. 비-동의적 돌연변이는 돌연변이화된 서열의 성질에 따라 번역된 단백질의 기능 뿐만 아니라, 조절에도 영향을 미칠 수 있다.
- [0033] 1,3-프로판디올 생산에 유용한 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 집단은 바람직하게 하기 변형 중 하나 이상인 추가의 변형을 포함하는, 상기 기탁된 균주 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0034] - 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C0175, 위치 198989의 C가 T로 치환된 것으로서, 진핵성 글루코키나제 조절 인자의 상동체인 예측 당 포스페이트 이소머라제 (탄수화물 대사)를 코딩하는 것;
- [0035] - 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1300, 위치 1444099의 G가 A로 치환된 것으로서, RNA 폴리머라제 시그마 인자 RPOD (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;
- [0036] - 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C2670, 위치 2787387의 C가 T로 치환된 것으로서, Glu-tRNAGln 아미도트랜스퍼라제 서브유닛 A (전사 및 번역 조절)를 코딩하는 것;
- [0037] - 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C3339, 위치 3512658의 C가 T로 치환된 것으로서, ABC 수송체의 ATP아제 성분 (2개의 ATP아제 도메인)을 코딩하는 것;
- [0038] - 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 계놈 중 유전자좌 CA_C1610, 위치 1752341의 C가 T로 치환된 것으로서, 분지쇄 아미노산 펩티다제 (수송체)를 코딩하는 것.
- [0039] 이는 바람직하게 상기 돌연변이 중 1, 2, 3, 4 또는 5개를 포함하는, 상기 돌연변이의 임의 조합을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 균주 집단은 최대 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 이하의 글리세린, 및 더욱 특히, 산업용 글리세린을 포함하는 배지 상에서 성장할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 균주 집단은 예컨대, 출원 W02008040387 (이 출원은 그 내용이 본원에 참고로 포함된다)에 개시되어 있는, 클로스트리디움에서의 돌연변이유발법 및/또는 유전자 치환인 표준 기법을 사용하여 획득될 수 있다.
- [0042] 당업자는 출원 W0200104324 및 W02008052595에 개시된 균주들 중 하나로부터 출발할 수 있을 뿐만 아니라, 각각 수탁 번호 I-4378, I-4379, I-4380하에 CNCM에 기탁된 균주 c01, c05 또는 c07 중 하나를 사용할 수 있으며, 추가의 돌연변이를 도입할 수 있다.
- [0043] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 집단은 돌연변이가 표 1에 확인된 것인, 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08을 포함한다. 당업자는 각각 수탁 번호 I-4378, I-4379, I-4380하에 CNCM에 기탁된 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01, DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 또는 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 중 하나로부터 출발하고, 표준 유전자 치환 및 재조합 기법을 사용하는 것인, 클로스트리디움 균주에 돌연변이를 도입하여 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08과 유사한 균주를 생성하는 방법을 알고 있다.
- [0044] **글리세린을 포함하는 배양 배지**
- [0045] "적절한 배양 배지" 또는 "배양 배지"란 클로스트리디움 균주 또는 집단의 성장 및 디올-생산을 위해 최적화된 배양 배지를 의미한다. 발효 공정은 일반적으로, 사용되는 클로스트리디움 종에 대하여 적합화되고, 글리세린

을 함유하는 것인 공지의 정의된 조성물로 이루어진 합성, 특히 무기 배양 배지를 포함하는 반응기에서 수행된다.

[0046] "합성 배지"라는 용어는 그 위에서 유기체 성장이 이루어지는 것인, 화학적으로 정의된 조성물을 포함하는 배양 배지를 의미한다. 본 발명의 배양 배지에서, 글리세린이 단일의 탄소 공급원인 것이 이롭다.

[0047] "글리세린" 및 "글리세롤"이라는 용어는 동의어이고, 이는 같은 분자를 지칭하는 것으로 본 발명에서 상호교환적으로 사용된다.

[0048] 특정 실시양태에서, 글리세린은 50% 이상의 글리세린, 바람직하게, 85% 이상의 글리세린을 포함하는 글리세린 조성물의 형태로 배지에 첨가된다.

[0049] 본 발명의 배양 배지에 사용되는 글리세린은 산업용 글리세린인 것이 이롭다. "산업용 글리세린"이란 실질적인 정제없이 산업 공정으로부터 취득된 글리세린 생성물을 의미한다. 산업용 글리세린은 또한 "미가공 글리세린"으로도 지칭될 수 있다. 산업용 글리세린은 70% 초과와 글리세린, 바람직하게, 80% 초과와 글리세린, 물 및 불순물, 예컨대, 무기염 및 지방산을 포함한다. 산업용 글리세린 중 글리세린의 최대 함량은 일반적으로 90%, 더욱 일반적으로는 약 85%이다.

[0050] 산업용 글리세린이 취득되는 산업 공정은 그 중에서도 지방 및 오일, 특히, 식물 기원의 지방 및 오일이 산업용 제품, 예컨대, 계면활성제 또는 윤활제로 공정처리되는 제조 방법을 형성한다 (제조 방법이다). 상기 제조 방법에서, 산업용 글리세린은 부산물인 것으로 간주된다.

[0051] 특정 실시양태에서, 산업용 글리세린은 바이오디젤 생산으로부터의 부산물이고, 이는 염, 물 및 일부 다른 유기 화합물, 예컨대, 지방산과 함께 약 80 내지 85%의 글리세린을 포함하는, 바이오디젤 생산으로부터 취득되는 글리세린의 공지의 불순물을 포함한다. 바이오디젤 생산으로부터 취득되는 산업용 글리세린은 추가의 정제 단계 과정을 거치지 않았다.

[0052] 바람직하게, 배양 배지는 고농도의 글리세린을 포함한다.

[0053] "글리세린 함량이 높음" 또는 "고농도의 글리세린"이라는 용어는 배양 배지 중 글리세린이 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 초과인 것을 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 농도는 90 내지 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 글리세린, 더욱 특히, 90 내지 140 g/L 의 글리세린, 바람직하게, 약 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 글리세린인 것으로 구성된다.

[0054] 바람직하게, 배양 배지는 유기 질소를 함유하지 않는 합성 배지이다.

[0055] 상기 배양 배지는 당업계에, 특히, 2010년 5월 5일 출원된 PCT/EP2010/056078, 및 2010년 5월 10일 출원된 PCT/EP2010/064825 (이들 출원은 그 내용이 본원에 참고로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0056] **미생물 배양**

[0057] 본 발명의 방법에서, 생산은 회분식, 유기식 또는 연속 공정으로 수행되는 것이 이롭다. 1,3-프로판디올 생산을 위해 산업 규모로 미생물을 배양하는 것은 당업계에 공지되어 있으며, 특히, 2010년 5월 5일 출원된 PCT/EP2010/056078, 및 2010년 5월 10일 출원된 PCT/EP2010/064825 (이들 출원은 그 내용이 본원에 참고로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0058] **1,3-프로판디올 회수**

[0059] 발효 배지로부터 1,3-프로판디올을 회수하고, 최종적으로는 그를 정제하는 것인 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 1,3-프로판디올은 증류에 의해 단리될 수 있다. 대부분의 실시양태에서, 1,3-프로판디올은 부산물, 예컨대, 아세테이트를 포함하는 발효 배지로부터 증류된 후, 공지 방법에 의해 추가로 정제된다.

[0060] 특정 정제 방법은 출원 W02009/068110 및 W0 2010/037843 (이들 출원은 그 내용이 본원에 참고로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0061] **도면**

[0062] 도 1은 최대 $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$ 이하로 접종 시점에서부터 케모스태트에서 배양하는 동안의 집단 및 클론 c08의 1,3-프로판디올 생산 및 글리세린 소비의 진화를 기술한 것이다.

- [0063] 실시예
- [0064] 실시예 1 진화된 집단으로부터의 클론 단리
- [0065] 집단 균주 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 DG1 pSPD5 PD0001VE05의 성장 플라스크 배양물로부터 출발하여, 아가 플레이트 상에서 클론 단리를 수행하였다. 플라스크 배양에 사용된 합성 배지는 탈이온수 1 L당 글리세린, 30 g; KH₂PO₄, 0.5 g; K₂HPO₄, 0.5 g; MgSO₄, 7H₂O, 0.2 g; CoCl₂ 6H₂O, 0.01 g; 아세트산, 99.8%, 2.2 ml; NH₄Cl, 1.65 g; MOPS, 23.03 g, 비오틴, 0.16 mg; *p*-아미노 벤조산, 32 mg; FeSO₄, 7H₂O, 0.028 g; 레자주린, 1 mg 및 시스테인, 0.5 g을 함유하였다. 배지의 pH는 6 N NH₄OH를 사용하여 6.5로 조정하였다.
- [0066] 아가 상에서의 단리를 위해 상이한 배지: 시판용 글리세린 또는 미가공 글리세린을 포함하는 합성 아가 배지 (상기 기술된 것과 동일) 및 탈이온수 1 L 당 시판용 또는 미가공 글리세린, 30 g; 효모 추출물, 5 g; KH₂PO₄, 0.75 g; K₂HPO₄, 0.75 g; MgSO₄, 7H₂O, 0.4 g; 아스파라긴, 2 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; NaCl, 1 g; MnSO₄, H₂O, 10 mg; FeSO₄, 7H₂O, 10 mg; MOPS, 23.03 g; 레자주린, 1 mg 및 시스테인, 15 g을 함유하는 CGM (클로스트리디아 성장 배지)을 사용하였다. 배지의 pH는 3 N NH₄OH를 사용하여 6.6으로 조정하였다.
- [0067] - 시판용 글리세린을 포함하는 합성 배지의 아가 플레이트 상에;
- [0068] - 미가공 글리세린을 포함하는 합성 배지의 아가 플레이트 상에;
- [0069] - 시판용 글리세린을 포함하는 풍부 배지의 아가 플레이트 상에;
- [0070] - 미가공 글리세린을 포함하는 풍부 배지의 아가 플레이트 상에 수행하는 것과 같은, 4가지 상이한 방식으로 세포를 플라스크 배양물로부터 플레이팅하였다 (표 2).
- [0071] 단리된 클론은 아가 플레이트 상에서의 3회 연속된 계대배양 이후 순수한 것으로 간주되었다. 이어서, 순수한 클론을 시판용 또는 미가공 글리세린을 함유하는 액상 풍부 배지로 옮겨 놓았다 (표 2). 이어서, 추가의 특징 규명을 수행할 때까지 액상 성장 배지를 -80℃에서 글리세린 20%로 보존시켰다.
- [0072] 이어서, 하기 방식으로 클론의 특징을 규명하였다:
- [0073] - 보존 후 생존력 측정: 합성 배지 상에서의 세포의 성장 속도 평가;
- [0074] - 성장 및 대사 평가: 배양 동안의 OD_{620 nm} 측정 및 합성 배지 상의 PDO/글리세린 수율 측정;
- [0075] - 유전적 평가: 균주의 유전자형을 확인하는 PCR 분석;
- [0076] - 단리된 클론의 성능과 집단의 성능을 비교하기 위한 케모스태트 배양 (실시예 2);
- [0077] - 클론의 서열 분석을 위한 gDNA 추출 (실시예 3).

표 2

집단으로부터 4개의 클론을 단리시키기 위해 사용된 합성 아가 배지 및 액상 배지.

클론 번호	단리용 아가 배지	보전 이전의 클론 배양용 액상 배지
c01	시판용 글리세린을 포함하는 합성 배지	시판용 글리세린을 포함하는 풍부 배지
c05	미가공 글리세린을 포함하는 풍부 배지	시판용 글리세린을 포함하는 풍부 배지
c07	시판용 글리세린을 포함하는 합성 배지	미가공 글리세린을 포함하는 풍부 배지
c08	시판용 글리세린을 포함하는 풍부 배지	미가공 글리세린을 포함하는 풍부 배지

- [0078]
- [0079] 실시예 2 고농도의 미가공 글리세린을 포함하는 케모스태트 배양에서의 클론 c08의 성능
- [0080] 박테리아 균주:
- [0081] (1/ pSOL1로부터 경화되고, 2/ *dhaB1*, *dhaB2* 및 *dhaT* 유전자, 즉, 1,3-프로판디올 오페론을 보유하는 플라스미

드 pSPD5로 형질전환되고, 3/ 고농도의 미가공 글리세린 상에서 진화된 균주인) C. 아세토부틸리쿰 균주 DG1 pSPD5 PD0001VE05의 단리된 클론. 단리 프로토콜은 실시예 1에 기술된 바와 같았다.

[0082] **배양 배지:**

[0083] 클로스트리디아 회분식 배양에 사용된 합성 배지는 탈이온수 1 L당 글리세린, 30 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; H_2SO_4 , 0.1 ml; NH_4Cl , 1.5 g; 비오틴, 0.16 mg; *p*-아미노 벤조산, 32 mg 및 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028 g을 함유하였다. 배지의 pH는 3 N NH_4OH 를 사용하여 6.3으로 조정하였다. 회분식 배양을 위해 시그마(Sigma)로부터 구입한 시판용 글리세린 (순도 99.5%)을 사용하였다. 연속 배양용 공급 배지는 수돗물 1 L당 미가공 글리세린, 105 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.026 g; NH_4Cl , 1.5 g; 비오틴, 0.16 mg; *p*-아미노 벤조산, 32 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g; 소포제, 0.05 ml; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 40 mg; H_3BO_3 , 2 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8 mg을 함유하였다. 이 경우에는 배지의 pH를 조정하지 않았다. 바이오디젤에 대한 에스테르 교환 공정으로부터의 미가공 글리세린은 노반스(Novance: 프랑스 브네트)로부터 공급받았고, 이는 글리세린 84.8% (w/w)인 순도를 가졌다.

[0084] **실험 설정:**

[0085] 2,000 ml의 실 사용 부피(working volume)를 사용하여 5 L짜리 생물반응기 트리톤(Tryton) (피에르 게랭 (Pierre Guerin: 프랑스))에서 연속 배양을 수행하였다. 배양물 수준을 자동 조절함으로써 배양물 부피를 2,000 ml로 일정하게 유지시켰다. 배양물을 200 RPM으로 교반하고, 온도를 35°C로 설정하고, 5.5 N NH_4OH 를 자동으로 첨가함으로써 pH 6.5로 일정하게 유지시켰다. 전 배양 기간 동안 POR 측정 (mV)은 제한되었다. 혐기성 조건을 형성하기 위해, 배설 중 멸균처리된 배지를 60°C에서 1시간 동안 멸균 O_2 -무함유 질소로 플러싱하고, 35°C에 도달할 때까지 다시 플러싱하였다 (2시간 동안 플러싱). 피로갈롤을 배치시켜 생물반응기의 가스 배출구를 산소로부터 차단하였다 (문헌 [Vasconcelos et al., 1994]). 멸균처리한 후, 공급 배지 또한 실온에 도달할 때까지 멸균 O_2 -무함유 질소로 플러싱하고, O_2 가 유입되지 못하도록 200 mbar에서 질소하에 유지시켰다.

[0086] **회분식 및 연속 배양 공정:**

[0087] 평가하는 데 사용한 공정은 특허 출원 PCT/EP2010/056078 (실시예 2)에 기술되어 있다.

[0088] 100 ml 플라스크 중 (회분식 배양을 위한 것으로 상기 기술된 것과 동일하지만, 단, 아세트산, $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 및 MOPS, $23.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 이 첨가되어 있는) 합성 배지 상에서 성장한 것으로서, 대수 증식기 종료시에 채취된 배양물을 접종물 (5% v/v)로서 사용하였다.

[0089] 먼저, 배양물을 회분식으로 성장시켰다. 초기 대수 증식기에서 본 발명자들은 시판용 글리세린의 펄스를 수행하였다: $105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 미가공 글리세린을 포함하는 합성 배지 (회분식 배양용으로 기술된 것과 동일)를 3시간 동안 정적 유량으로 첨가하였다 (즉, $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 글리세린 첨가). 이어서, 회분식으로 계속하여 성장시키고, 대수 증식기 종결 이전에 0.025 h^{-1} 의 회석률로 연속 공급을 시작하였다. 공급 배지는 $105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 미가공 글리세린을 함유하였다. 생물반응기 접종 후 8-10일 경과시 및 3회의 체류 시간 후, 회석률을 상이하게 단계별로 0.025 h^{-1} 에서 0.060 h^{-1} 로 증가시켰다: 48시간 경과 후 0.01 h^{-1} 유닛 증가 - 24시간 동안 변화없음 - 48시간 경과 후 0.01 h^{-1} 유닛 증가 - 24시간 동안 변화없음 - 48시간 경과 후 0.015 h^{-1} 유닛 증가. 그 후, 배양 안정화 다음으로 하기 기술되는 HPLC 프로토콜을 사용한 1,3-프로판디올 생산 및 글리세린 소비가 이어졌다 (도 1). 특히, 본 발명자들은 잔류 글리세린의 농도가 가능한 한 최저 농도가 될 때까지 기다렸다.

[0090] c08 클론의 전반적인 성능은 하기 표 3에 제시되어 있고, 이를 같은 조건하에 있는 집단의 성능과, 및 균주 C. 아세토부틸리쿰 DG1 pSPD5 PD0001VT, 예컨대, 문헌 [Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)]에 기술되어 있는 것의 성능과 비교하였다.

[0091] **분석 방법:**

[0092] 620 nm에서 탁도 측정법으로 세포 농도를 측정하고, 직접 측정된 세포 건조 중량과의 연관성을 보여 주었다. HPLC 분석에 의해 글리세린, 1,3-프로판디올, 에탄올, 부탄올, 아세트산 및 부티르산 농도를 측정하였다. 바이

오래드 아미넥스 HPX-87H(Biorad Aminex HPX-87H) 칼럼 상에서 분리를 수행하고, 굴절률에 의해 검출을 달성하였다. 작동 조건은 하기와 같았다: 이동상 황산 0.5 mM; 유량 0.5 ml/min, 온도, 25°C.

표 3

C. 아세트부틸리콧 DG1 pSPD5 집단 PD0001VE05 (4개의 케모스테트로부터 얻은 평균 데이터)의, 클론 c08 PD0001VE05c08의 성능. 공급 배지는 105 g.L⁻¹의 미가공 글리세린을 함유하였고, 회석률은 0.060 h⁻¹ 및 0.025 h⁻¹였다. 값은 0.060 h⁻¹의 회석률에서 3회 이상의 체류 시간 이후에 분석된 샘플의 평균값에 상응하는 값이다.

	클론 c08 PD0001VE05c08의 평균 및 표준 편차	집단 PD0001VE05의 평균 및 표준 편차	균주 PD0001VT (문헌 [Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)])의 평균 및 표준 편차
공급 글리세롤 (g.l ⁻¹)	105.49 +/- 1.07	104.21 +/- 1.36	58.54
1,3-프로판디올 (g.l ⁻¹)	51.30 +/- 0.54	50.45 +/- 1.00	29.76
Y _{1,3-PDO} (g.g ⁻¹)	0.50 +/- 0.01	0.53 +/- 0.01	0.50
Q _{1,3PDO} (q.l ⁻¹ .h ⁻¹)	3.05 +/- 0.03	3.18 +/- 0.21	1.49
회석률 (h ⁻¹)	0.059 +/- 0.001	0.063 +/- 0.004	0.05
잔류 글리세롤 (g.l ⁻¹)	3.72 +/- 1.62	4.82 +/- 1.82	0
바이오매스 (g.l ⁻¹)	1.52 +/- 0.55	2.09 +/- 0.15	1.64
아세트산 (g.l ⁻¹)	2.67 +/- 0.26	2.09 +/- 0.27	NI
부티르산 (g.l ⁻¹)	10.53 +/- 0.38	10.98 +/- 0.37	NI

Y_{1,3-PDO} : PDO 수율 (소비된 글리세롤 1 g당 g 수)

Q_{1,3PDO} : PDO 부피 생산성

NI: 정보 없음. PD0001VT 균주는 효모 추출물이 없는 배지 중에서는 성장이 불가능.

[0093]

[0094]

문헌 [Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)]로부터의 것인, 효모 추출물이 없는 배지 중에서는 성장이 불가능한 적합화되지 않는 균주 C. 아세트부틸리콧 DG1 pSPD5 PD0001VT보다 적합화된 C. 아세트부틸리콧 DG1 pSPD5 집단이 더 높은 고농도의 산업용 글리세린 상에서 성장할 수 있고, 따라서, 산업용 글리세린 상에서 보다 우수한 역가 및 생산성을 보인다는 것이 상기 결과를 통해 밝혀졌다.

[0095]

실시예 3

[0096]

계놈 DNA 추출

[0097]

퀴아젠 게노믹 키트 500G(Qiagen Genomic kit 500G) (퀴아젠, 인코퍼레이티드(Qiagen, Inc.: 미국 캘리포니아 주 발렌시아))를 사용하여 균주 PD0001VT, PD0001VE05, PD0001VE05c01, PD0001VE05c05, PD0001VE05c07 및 PD0001VE05c08로부터 계놈 DNA를 추출하였다. 간략하면, 세포를 페니실린 바이알 (70 mL) 중 (실시예 1 및 2에 기술되어 있는 것과 같은) 풍부 또는 합성 글리세린 배지 중에서 각각 혐기적으로 후기 대수기 (A₆₂₀ 1.5 내지 2.0)까지 성장시켰다. 세포 용해 기간 동안 내내 엄격한 혐기성 조건을 유지하였다. 세포를 수집하고, SET 완충제 (25% 수크로스, 0.05 M 트리스-HCl(Tris-HCl), 0.05 M EDTA) 중에서 2회에 걸쳐 세척하였다. 44 µl RNA제, 30 mg/mL 리소자임 및 100 µg/mL 프로테이나제 K를 포함하는 11 mL B1 키트 완충제 중에서 세포 펠릿을 현탁시켰다. 혼합물을 37°C에서 45 min 동안 인큐베이션시키고, 원심분리하고, 퀴아젠 DNA 정제용 키트 설명서에 따라 상청액을 사용하여 DNA를 추출하였다. 이어서, DNA를 50 µl의 10 mM 트리스-HCl (pH 8.0) 중에 현탁시켰다.

[0098]

서열 분석

[0099]

로슈 GS FLX(Roche GS FLX) 기술을 사용하여 천연 DG1 pSPD5 PD0001VT 균주 및 진화된 집단 DG1 pSPD5 PD0001VE05의 계놈의 서열을 분석하였다. 서열 분석 프로젝트는 각 균주에 대하여 하프 런 (최대 600,000개의 리드, 최대 180,000-300,000개의 실제 쌍이 형성된 말단 리드)을 사용하여 1 롱-태그(Long-Tag) 쌍이 형성된 말단 라이브러리 (8 Kb), GS FLX 티타늄(GS FLX Titanium) 시리즈 화학물을 이용한 콘티그의 서열 생성 및 스캐폴딩을 이용함으로써 유로핀스 게노믹스 MWG(Eurofins Genomics MWG)/오페론(Operon) (프랑스 레 줄리 섀텍스

91978 ZA 테 쿠흐타베프-9 에비뉴 테 라 라폰느)에 의해 수행되었다.

- [0100] 님블레젠(NimbleGen) (로슈 님블레젠 인코퍼레이티드(Roche NimbleGen Inc.: 미국 위스콘신주 53719 매디슨 S. 로사 로드 500))에 의해 개발된 비교 게놈 서열 분석 (CGS) 방법을 사용하여 진화된 집단으로부터 단리된 클론의 서열을 분석하였다. CGS 분석은 2단계로 수행되었다: 1단계에서, 천연 균주와 진화된 클론의 DNA의 비교 하이브리드화에 의해 차이가 나는 게놈 영역을 확인하였다. 2단계에서, 오직 차이가 나는 것으로 확인된 게놈 영역만을 서열 분석하여 완전하게 특징이 규명된 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP) 세트를 획득하였다.
- [0101] **SNP 분석**
- [0102] 진화된 집단의 생물 정보학 및 SNP 분석은 유로핀스 게노믹스 MWG/오페론에 의해 수행하였다. 상기 분석을 위해, 소프트웨어 gs맵퍼(gsMapper) (로슈 454, V2.3)를 사용하여 두 균주 모두의 리드 세트를 개별적으로 진뱅크 참조 서열 (클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ATCC0824>)로 지도화하였다. DG1 pSPD5 PD0001VT를 ATCC824와, DG1 pSPD5 PD0001VE05를 ATCC824와, 및 DG1 pSPD5 PD0001VT를 DG1 pSPD5 PD0001VE05와 비교하는 3개의 SNP 파일을 전송하였다. 천연 균주와 진화된 균주 사이의 독특한 SNP는 하기에 제시되어 있다. 범위가 낮고 (<25), 변이체가 빈도가 낮은 (<85%) 것은 제거하여 패밀리 군 주석화에 사용되는 KEGG 데이터베이스에 따라 17개의 패밀리 중에 분포되어 있는 160개의 독특한 SNP를 획득하였다.
- [0103] 단리된 클론의 SNP 분석은 님블레젠 (로슈)에 의해 수행하였다. 진뱅크 참조 서열 (클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ATCC0824>)를 사용하여 천연 DG1 pSPD5P D0001VT를 DG1 pSPD5 PD0001VE05C01, DG1 pSPD5 PD0001VE05c05, DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 또는 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08과 비교하는 SNP 파일을 전송하였다.
- [0104] 서열 결과는 하기 표 1에 제시되어 있으며, 표에는 하기 정보가 포함되어 있다:
- [0105] Ref출발 차이가 발생된, 참조 서열 내의 출발 위치
- [0106] RefNuc 차이가 나는 위치의 참조 뉴클레오티드 서열
- [0107] VarNuc 차이가 나는 위치의 상이한 뉴클레오티드 서열
- [0108] VarFreq 상이한 리드의 비율(%) 대 차이가 나는 위치에 전체적으로 걸쳐져 있는 리드의 총 개수
- [0109] 유형 주석이 달린 유전자내, 또는 주석이 달린 유전자 사이에서 SNP가 발견되는지, 또는 발견되지 않는지 여부에 관한 목록. 유전자내 SNP는 코딩으로 명시된다. 유전자 사이의 SNP는 유전자간으로 명시된다.
- [0110] AA 변이 코딩 SNP가 단백질의 아미노산 서열을 변이시키는지 여부에 기초하여 진행된 코딩 SNP의 카테고리화. S는 동의적 SNP (아미노산 변이가 없음)를 나타낸다. N은 비동의적 SNP (아미노산 변경)를 나타낸다. FC (프레임-변이)는 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실로 인해 발생된 단백질 번역의 변형을 나타낸다.
- [0111] ORIG_AA 상응하는 SNP 위치에 대한 참조 서열과 관련된 아미노산
- [0112] SNP_AA 상응하는 SNP 위치에 대한 시험 서열과 관련된 아미노산
- [0113] 유전자좌 태그 진뱅크로부터의 상응하는 유전자의 유전자좌 태그
- [0114] 기능 진뱅크에 기술되어 있는 바와 같은 유전자의 기능
- [0115] 패밀리 KEGG로부터의 유전자의 패밀리

1 표

침연 관주와 진화된 관주 사이의 돌연변이. 먼저, 격렬화된 침연에서 돌연변이를 찾아낸 후, 단리된 클론 중에서 각 돌연변이의 존재를 확인하였다 (마지막 4개의 열에서, 돌연변이 존재: Y, 및 돌연변이 부재: N).

Ref	Ref Nuc	Var Nuc	Var Freq	유형	AA 변이	YRIG AA	SNP AA	유전자좌	기능	패밀리	c01	c05	c07	c
15994	C	T	>99%	C	N	L	P	CA_C0009	특정 이 규명되지 않은, 고출 단백질, YRXXA B, 침턴리스 (B. subtilis)의 오프로토그	가상 단백질	Y	Y	Y	Y
21339	G	A	>99%	I				CA_C0017	1	I	Y	Y	Y	Y
25354	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0017	세일-tRNA 인테라제	진사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
29516	G	A	>99%	C	N	G	D	CA_C0020	MDR형 페미아제	수송체	Y	Y	Y	Y
31667	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0021	세일-tRNA 인테라제 (세일-tRNA 리가제)	진사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
35547	G	A	>99%	C	S	R	R	CA_C0024	막 단백질, 악티노바실러스 (Actinobacillus) 단백질 (1944168) 관련	막 단백질	Y	Y	Y	Y
43029	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0032	진사 조절 인자 TerR/AcrR-패밀리	진사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
52503	A	G	>99%	C	S	A	A	CA_C0039	DNA 분리 ATPase FtsK/SpoIIIE 패밀리 단백질, FHA 도메인 함유	세포 분열	Y	Y	Y	Y
76769	C	T	>99%	C	S	F	F	CA_C0066	ABC 수송체, ATP-결합 단백질	수송체	Y	Y	Y	Y
143022	G	A	>99%	C	S	S	S	CA_C0135	가상 단백질, CH-23 패밀리	가상 단백질	Y	Y	Y	Y
189889	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0175	예측 단 포스페이트 이소머라제, 진해성 단백질이나제 조절 인자의 상동체	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
219199	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C0193	특정이 규명되지 않은 보존 막 단백질, LPS 생합성에 영향론	막 단백질	Y	Y	Y	Y
220222	T	C	>99%	C	N	N	S	CA_C0194	세포벽 생성에 관여하는 글리코실트랜스퍼라제	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
265152	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0234	PTS 시스템, 포락토스-특이적 HBC 성분	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y

286308	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0256	나트륨계나제 폴리브렌- 셀 단백질, 알파 채 (나트륨계나제 성분 1) 유전자 nID	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
347024	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0291	용혈: 에티오피안 신타제 I (코발라민 의존성) 및 5,10 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리미터제	아미노산 대사	Y	Y	Y	Y
364263	A	G	>99%	I				I		I	Y	Y	Y	Y
454074	G	A	>99%	C	N	E	K	CA_C0390	지스타티오닌 감미-신타제	아미노산 대사	Y	Y	Y	Y
541268	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0471	GrpD 단백질 HSP-70 보조인자	전사-번역 조절	Y	Y	Y	Y
601197	A	G	>99%	I				I		I	Y	Y	Y	Y
621074	C	T	>99%	C	N	P	L	CA_C0534	포스포에놀피루베이트 신타제 (유전자 pps)	탄수화물 대사	Y	Y	Y	Y
656050	T	C	>99%	C	N	S	P	CA_C0566	말레이트 페히드록시나제	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
668495	A	G	>99%	C	S	I	I	CA_C0578	코발라민-의존성 에티오피안 신타제 I (메틸트렌스퍼라제 및 코발라민-결합 도메인)	아미노산 대사	Y	Y	Y	Y
723431	-	A	>99%	I				I		I	N	N	N	N
794841	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0688	I-아실-sn-글리세린-3- 포스페이트 아실트랜스퍼라제	글리세린 대사	Y	Y	Y	Y
817479	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0706	에도-14-에타 글루카나제 (2개의 티닌-B-유사 도메인에 포함)	셀룰라제	Y	Y	Y	Y
819542	C	T	>99%	C	N	P	L	CA_C0707	RNA 폴리머라제 시그마-54 인자	전사-번역 조절	Y	Y	Y	Y
961584	A	G	>99%	C	N	I	V	CA_C0823	예측 막 단백질	막 단백질	Y	Y	Y	Y
977563	C	T	>99%	I				I		I	Y	Y	Y	Y
978671	C	A	>99%	C	S	C	C	CA_C0850	나트륨리미터제 페릴린 단백질	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
991021	T	C	>99%	C	N	V	A	CA_C0861	ABC형 다중약물 수송 시스템, ATPase 성분	수송체	Y	Y	Y	Y
991449	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C0861	ABC형 다중약물 수송 시스템, ATPase 성분	수송체	Y	Y	Y	Y
1019710	G	A	>99%	C	N	V	.	CA_C0888	포스포글리세린 트랜스퍼라제	글리세린 대사	Y	Y	Y	Y

2114483	A	G	>99%	C	N	V	A	CA_C2003	예측 피미이제	수용제	Y	Y	Y	Y	Y
2123688	T	C	>99%	C	S	L	L	CA_C2010	예측 Fe-S 중시도리터제	에너지 대사	Y	Y	Y	Y	Y
2171503	C	T	>99%	C	N	D	N	CA_C2068	포자 형성 인자 spoIIM, 특정이 규명되지 않은 단백질	포자 형성	Y	Y	Y	Y	Y
2231570	C	-	>99%	C	FC			CA_C2137	양이온 수용 P형 ATP이제	수용제	N	N	N	N	N
2294764	G	A	>99%	C	N	T	I	CA_C2201	가상 단백질	가상 단백질	Y	Y	Y	Y	Y
2298326	C	G	>99%	C	N	S	T	CA_C2205	편모 후크-관련 단백질 FID	세포 운동성	Y	Y	Y	Y	Y
2307214	C	T	>99%	C	N	G	R	CA_C2215	편모-관련 단백질 FliY, CheC- 단백질 FliD	세포 운동성	Y	N	Y	Y	Y
2342826	G	C	>99%	C	N	P	A	CA_C2247	무위-특이적 리콜리나제, DNA 인버터제 Pin 상동체	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
2392178	C	T	>99%	C	N	V		CA_C2288	아실-단백질 신태타제, LuxE 인버터제 Pin 상동체	지질 대사	Y	Y	Y	Y	Y
2450006	C	T	>99%	C	S	P	P	CA_C2340	DNA 미스매치 수복 단백질 mutS, YSHD B, 샵리턴스 오트도토그	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
2477825	C	T	>99%	C	S	S	S	CA_C2367	예측 세포 무작 도메인 및 CHW-반부부를 포함하는, 특정이 규명되지 않은 단백질	세포 부착	Y	Y	Y	Y	Y
2499211	T	C	>99%	C	S	H	H	CA_C2385	가상 단백질	가상 단백질	Y	Y	Y	Y	Y
2595349	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2486	전사 조절 인자, MarR/DmrR 패밀린	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
2693334	C	T	>99%	C	N	E	K	CA_C2588	클린코실트렌스퍼타제	탄수화물 대사	Y	Y	Y	Y	Y
2787387	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C2670	Cit-ENNAin 아미노 트랜스퍼타제 시브유닛 A	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
2833384	T	C	>99%	C	N	I	V	CA_C2709	전사 전달 플라보단백질 알파-시브유닛	에너지 대사	Y	Y	Y	Y	Y
2836979	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2713	AT가 종부한 DNA-결합 단백질	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
2901642	C	T	>99%	C	N	V		CA_C2770	아미노산 수용제	수용제	Y	Y	Y	Y	Y
2969858	G	A	>99%	C	N	M	I	CA_C2838	예측 뉴클레오티드-결합 단백질, YteB 패밀린	전사 영역 조절	Y	Y	Y	Y	Y
3001642	G	A	>99%	C	S	L	L	CA_C2867	FoF1형 ATP 신타제 알파 시브유닛	에너지 대사	Y	Y	Y	Y	Y
3032956	T	C	>99%	C	N	H	R	CA_C2898	IFI 포자 형성 단백질 R	포자형성	Y	Y	Y	Y	Y

3140918	T	C	>99%	I					I										
3174743	G	A	>99%	C	S	D	D	CA_C3032	갈락토스-뮤턴토터제 관련 효소		단수효물 데사	Y	Y	N	Y	Y			
3251276	G	C	>99%	C	N	T	S	CA_C3099	슈도유리텔레이트-신터제, TRUA		핵산 데사	Y	Y	Y	Y	Y			
3337937	G	-	>99%	I					I			N	N	N	N	N			
3392124	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C3242	특정이 규명되지 않은 Fe-S 단백질, PHX (외투-베이트 포르메이트 리아제 활성원-단백질) 상동체		에너지 데사	Y	Y	Y	Y	Y			
3462380	C	T	>99%	C	S	N	N	CA_C3297	D-알라일-D-알라닌 카르복시펩티다제-페일리 히드롤라제, YODI B, 심털리스-오르토몬그		가상 단백질	Y	Y	Y	Y	Y			
35099372	C	T	>99%	C	S	E	E	CA_C3335	단체 알콜 데이드로게나제-페일리 효소		에너지 데사	Y	Y	Y	Y	Y			
3512698	C	T	>99%	C	S	Y	Y	CA_C3339	ABC 수송체의 ATP아제 성분 (2개의 ATP아제 도메인)		수송체	Y	Y	Y	Y	Y			
3518240	T	C	>99%	C	S	Y	Y	CA_C3345	진사 조절 인자, ActR-페일리		진사 번역 조절	Y	Y	Y	Y	Y			
3541597	T	C	>99%	C	N	I	V	CA_C3363	가상 단백질		가상 단백질	Y	Y	Y	Y	Y			
3565291	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C3387	페테이트 리아제		셀룰라제	Y	Y	Y	Y	Y			
3576985	T	C	>99%	C	N	H	R	CA_C3392	NADH-의존성 푸란올 데이드로게나제		에너지 데사	Y	Y	Y	Y	Y			
3583724	C	T	>99%	I					I			Y	Y	Y	Y	Y			
3608511	C	T	>99%	C	S	S	S	CA_C3422	광:양성자 공수송체 (가용한 크실로로스)		수송체	Y	Y	Y	Y	Y			
3614985	C	T	>99%	C	S	K	K	CA_C3428	6F ⁺ -6S 포르스테인 클러스터-함유 단백질		에너지 데사	Y	Y	Y	Y	Y			
3674358	T	C	>99%	I					I		막 단백질	Y	Y	Y	Y	Y			
3707038	T	C	>99%	C	S	L	L	CA_C3510	막 결합 메틸-수용 주화성 단백질 (HAMF 도메인 포함)		막 단백질	Y	Y	Y	Y	Y			
3747653	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C3551	Na ⁺ ABC 수송체 (ATP-결합 단백질), NATTA		수송체	Y	Y	Y	Y	Y			
3821135	C	T	>99%	C	S	N	N	CA_C3617	특정이 규명되지 않은 막 단백질, YHAG B, 심털리스-상동체		가상 단백질	Y	Y	Y	Y	Y			

3850220	A	G	>99%	C	N	I	T	CA_C3650	HD-GYP 도메인 함유 단백질	프로테아제/켈타다제	Y	Y	Y	Y
3921509	C	T	>99%	C	N	V	I	CA_C3716	Lon-유사 ATP-의존성 프로테아제	프로테아제/켈타다제	Y	Y	Y	Y
239312	G	A	98%	C	N	E	K	CA_C0214	엔도글루카나제, 아미노켈타다제 M42 페릴린	셀룰라제	Y	Y	Y	Y
244251	C	T	98%	I					I	I	Y	Y	Y	Y
2410308	G	A	98%	C	S	L	L	CA_C2306	포자 형성-특이적 시그마 인자 F	포자 형성	Y	Y	Y	Y
3656844	G	A	98%	C	N	A	T	CA_C3459	세포 분열 GTP-아제 FisZ의 상동체, 분기형	세포 분열	Y	Y	Y	Y
3823060	A	G	98%	C	N	V	A	CA_C3620	아미노산 (주형 글루타민) ABC 수송체, 주위공간 결합 단백질 성분	수송체	Y	Y	Y	Y
3838496	C	T	98%	C	N	G	R	CA_C3637	올리고펩티드 ABC 수송체, 베타아제 성분	수송체	N	N	N	N
914	G	A	97%	C	N	G	R	CA_C0001	DNA 복제 개시인자 단백질, ATP-아제	세포 분열	Y	Y	Y	Y
27240	C	T	97%	C	N	R	Q	CA_C0019	전사 조절 인자, AcrR 패밀린	전사 번역 조절	N	Y	N	Y
36341	G	A	97%	C	N	D	N	CA_C0025	테우시지타딘 트리포스페이트 페아미나제	핵산 대사	N	Y	N	N
299266	G	A	97%	C	N	D	N	CA_C0267	L-알라이트 페위드포스페나제	에너지 대사	Y	N	Y	Y
376886	G	A	97%	C	S	K	K	CA_C0322	감각 단백질, 함유 EAL-도메인 함유	전사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
474915	G	A	97%	C	N	G	D	CA_C0408	DNA 분리 ATP-아제 FtsK/SpoIIIE(3개의 ATP-아제), FHA 도메인 함유	세포 분열	Y	Y	Y	Y
599925	G	A	97%	C	N	R	K	CA_C0519	다히드론오르타제	핵산 대사	Y	Y	Y	Y
723433	G	A	97%	I					I	I	N	N	N	N
723434	GT	-	97%	I							N	N	N	N
723871	A	G	97%	C	N	I	M	CA_C0622	폴리포스페이트 키나제	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
809008	C	T	97%	C	S	L	L	CA_C0699	포자 광화학 반응 생성물 리아제, sDIB	포자 형성	Y	Y	Y	Y
846466	G	T	97%	C	N	A	S	CA_C0731	용합-뉴클레오사이드-	핵산 대사	Y	Y	Y	Y

1717948	G	A	97%	C	N	V	I	CA_C1572	다포스케이드-명 에피타라제 및 GAF 도메인	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
2004797	C	T	97%	C	N	S	N	CA_C1852	프릭토스-1,6-비스포스포타제 (YTD) B, 침털리스 오르토로그)	수용체	Y	Y	Y	Y
2134058	G	A	97%	C	S	A	A	CA_C2020	수용 단백질 몰리브도프테린 생합성 효소, MoaA, 몰리브도프테린-결합 도메인에 포함	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
2331746	G	A	97%	C	N	G	R	CA_C2237	ADP-글루코스 피로포스포릴라제	지질 대사	Y	Y	Y	Y
2391588	G	A	97%	C	N	P	L	CA_C2288	이질-단백질 침털라제, LuxE	지질 대사	Y	Y	Y	Y
2452705	C	T	97%	C	N	C	Y	CA_C2341	콜라게나제 펩틸리 프로테아제	프로테아제/제타다제	Y	Y	Y	Y
2739459	T	C	97%	C	N	I	V	CA_C2630	특정이 규명되지 않은 보존 단백질, YOMIE B, 침털리스 오르토로그	가상 단백질	Y	Y	Y	Y
2775979	C	T	97%	C	N	A	T	CA_C2660	피루베이트 카르복실라제, PYKKA	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
2813985	G	-	97%	I					I		N	N	N	N
3082247	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C2948	복제된 ATP아제 도메인 (2번째 도메인은 불활성화된 상태)을 포함하는 ABC 수송체의 ATP아제 성분	수용체	Y	Y	Y	Y
3242900	G	C	97%	C	N	V	L	CA_C3088	NrC 패밀리의 전사 조절 인자, 2개의 PAS 도메인에 포함된 ATP아제 도메인	전사 영역 조절	Y	N	N	Y
3442855	T	C	97%	C	N	M	V	CA_C3282	ABC형 다중약물/단백질/지질 수송 시스템, ATP아제 성분	수용체	Y	Y	Y	Y
3498584	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C3327	아미노산 ABC형 수송체, ATP아제 성분	수용체	Y	Y	Y	Y
3643224	G	A	97%	C	S	L	L	CA_C3447	단백질-이동화 이소머라제 DsbC/DsbG	포자 형성	Y	Y	Y	Y
3683477	-	T	97%	C	FC			CA_C3464	특정이 규명되지 않은 보존 단백질 (단위)	가상 단백질	N	N	N	N
204202	G	A	96%	C	N	G	E	CA_C0180	올리고펩티드 ABC 수송체, ATP-결합 단백질	수용체	Y	Y	Y	Y

803682	C	T	96%	C	N	T	I	CA_C0695	알트루케이트 옥시도리타제	탄수화물 대사	Y	Y	Y	Y
892875	G	A	96%	C	N	M	I	CA_C0770	글리세린 3-인산 2-단백질, 피미아제	글리세린 대사	Y	Y	Y	Y
1009389	C	T	96%	C	N	P	S	CA_C0879	ABC형 글리세린 3-인산 2-단백질, 피미아제	수용체	Y	Y	Y	Y
1690355	C	T	96%	C	S	G	G	CA_C1546	피리미딘-뉴클레오사이드 포스포릴라제	핵산 대사	Y	Y	Y	Y
1752341	C	T	96%	C	N	G	R	CA_C1610	분지쇄 아미노산 피미아제	수용체	Y	Y	Y	Y
3217481	A	C	96%	C	S	L	L	CA_C3067	에측 막 단백질	막 단백질	Y	Y	Y	Y
3238489	T	C	96%	C	S	S	S	CA_C3086	세포 부착 도메인 함유 단백질	세포 부착	Y	Y	Y	Y
447460	A	-	95%	I										
670931	G	A	95%	C	S	N	N	CA_C0578	코발라민-의존성 메티오닌 신타제 I (메틸트랜스퍼라제 및 코발라민-결합 도메인)	아미노산 대사	N	N	Y	N
994575	G	A	95%	C	N	A	T	CA_C0864	히스티딘 키나제-유사 ATP아제	권사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
3657101	A	-	95%	C	FC			CA_C3459	세포 분열 GTP아제 FtsZ의 산동체, 분기형	세포 분열	N	N	N	N
1142263	T	-	94%	C	FC			CA_C0895	에측 막 단백질	막 단백질	N	N	N	N
1823156	G	A	94%	C	S	E	E	CA_C1674	NADPH-의존성 글루타메이트 신타제의 소형 서브유닛	아미노산 대사	Y	Y	Y	Y
1989117	C	T	94%	C	N	R	K	CA_C1837	미스매치 수복 단백질 MutS, ATP아제	권사 번역 조절	Y	Y	Y	Y
3481651	G	A	94%	C	S	S	S	CA_C3311	글리코실트랜스퍼라제에 융합된 TPR-반복 도메인	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
128942	G	A	93%	C	N	E	K	CA_C0116	인산화탄소 페히드로게나제, 베타-세	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
302716	-	T	93%	C	FC			CA_C0270	가상 단백질	가상 단백질	N	N	N	N
2551103	G	A	93%	C	S	S	S	CA_C2434	HAMP 도메인을 포함하는 막 결합 히스티딘 키나제	권사 번역 조절	Y	N	Y	Y
1834077	C	T	92%	C	N	S	L	CA_C1684	TYPA/BPA형 GTP아제	에너지 대사	Y	Y	Y	Y
3927304	G	A	92%	I							Y	N	Y	Y
786649	-	T	91%	C	FC			CA_C0680	에측 막 단백질	막 단백질	N	N	N	N

2640439	C	T	91%	C	N	E	K	CA_C2532	CHW-면북부를 함유하는 단백질	세포 부착	Y	Y	Y	Y
3601904	A	-	91%	C	FC			CA_C3415	ABC형 다중약물/단백질/지질 수용 시스템, ATP아제 성분	수용체	N	N	N	N
838350	A	-	89%	C	FC			CA_C0723	전사 조절 인자, Acrr 패밀리의	전사 번역 조절	N	N	N	N
3721023	G	A	89%	C	S	S	S	CA_C3523	가상 단백질 CF-7 패밀리	가상 단백질	Y	Y	Y	Y
803924	G	A	88%	C	N	A	T	CA_C0695	알트로네이트 용시도린터제	단수화물 대사	Y	Y	Y	Y
3478420	C	T	87%	C	N	G	E	CA_C3309	예측 막 단백질	막 단백질	N	Y	N	Y
3853936	T	C	87%	C	N	N	D	CA_C3652	아세토락테이트 신터제	아미노산 대사	Y	Y	Y	Y
244464	C	T	86%	C	N	S	L	CA_C0220	가상 단백질	가상 단백질	Y	Y	Y	Y
899104	G	A	86%	C	N	M	I	CA_C0776	NCAR 뮤터제 (PurE)-관련 단백질	해산 대사	Y	N	Y	N
658665	T	-	85%	C	FC			CA_C0569	SACPA 오메몬 항종결인자 (sact)	전사 번역 조절	N	N	N	N

[0124]

[0125] 참조 문헌

1. González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, and Soucaille P. 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering* 7: 329–336.
2. González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P. and Vasconcelos I. 2006. Microbial conversion of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG (pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 96-101.
3. Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology* 183(16):4823 – 4838
4. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F and Fick M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*. 77: 191-208.
5. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P. 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *Journal of bacteriology*. 176(5): 1443-1450.

[0126]

출력본 (원본은 전자 양식임) (본 서면은 국제 출원의 일부가 아니고, 국제 출원서로서 장수에 계산되지 않는다)		
0-1	양식 PCT/RO/134(SAFE) 기탁된 미생물(들) 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시 (PCT 규칙 13bis)	
0-1-1	~을 사용하여 적성	PCT 온라인 파일링 버전 3.5.000.225 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	국제 출원 번호	
0-3	출원인 또는 대리인 파일 참조 번호	359692D29153
1	하기에 기재된 사항은 명세서	
1-1	_____ 쪽	3
1-2	_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물(들) 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	11-12
1-3	기탁에 관한 식별 표시	
1-3-1	기탁 기관의 명칭	CNCM 콜렉씨용 나시오날 드 쥘뫼르 드 마이크로오가 니즘브 프랑스 75724 파리 세텍스 15 르 드 독뫼르 루 28 앵스티뫼 파스퇴르 2010년 10월 27일 (2010/10/27) CNCM I-4378
1-3-2	기탁 기관의 주소	
1-3-3	기탁일	
1-3-4	수탁 번호	
1-5	기재된 사항이 적용되는 지정국	모든 지정국
2	하기에 기재된 사항은 명세서	
2-1	_____ 쪽	3
2-2	_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물(들) 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	13-14
2-3	기탁에 관한 식별 표시	
2-3-1	기탁 기관의 명칭	CNCM 콜렉씨용 나시오날 드 쥘뫼르 드 마이크로오가 니즘브 프랑스 75724 파리 세텍스 15 르 드 독뫼르 루 28 앵스티뫼 파스퇴르 2010년 10월 27일 (2010/10/27) CNCM I-4379
2-3-2	기탁 기관의 주소	
2-3-3	기탁일	
2-3-4	수탁 번호	
2-5	기재된 사항이 적용되는 지정국	모든 지정국
3	하기에 기재된 사항은 명세서	
3-1	_____ 쪽	3
3-2	_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물(들) 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	15-16

[0127]

3-3	기탁에 관한 식별 표시	
3-3-1	기탁 기관의 명칭	CNCM 콜렉씨용 나시오날 드 쥘뫼르 드 마이크로오가 니즘브 프랑스 75724 파리 세텍스 15 르 드 독뫼르 루 28 앵스티뫼 파스퇴르 2010년 10월 27일 (2010/10/27) CNCM I-4380
3-3-2	기탁 기관의 주소	
3-3-3	기탁일	
3-3-4	수탁 번호	
3-5	기재된 사항이 적용되는 지정국	모든 지정국
수리관청용		
0-4	본 서면을 국제 출원과 함께 수령하였다 (예 또는 아니오)	예
0-4-1	담당관	월렌틴, 마르코
국제사무국용		
0-5	본 서면을 국제사무국에서 일자로 수령하였다	
0-5-1	담당관	

[0128]

수탁번호

[0129]

기탁기관명 : 폴렉씨용 나시오날 드 켈뛰르 드 마이크로오가니즘프

수탁번호 : CNCMI4378

수탁일자 : 20101027

기탁기관명 : 폴렉씨용 나시오날 드 켈뛰르 드 마이크로오가니즘프

수탁번호 : CNCMI4379

수탁일자 : 20101027

기탁기관명 : 폴렉씨용 나시오날 드 켈뛰르 드 마이크로오가니즘프

수탁번호 : CNCMI4380

수탁일자 : 20101027

도면

도면1

