



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0008151  
(43) 공개일자 2017년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/63 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/63 (2013.01)  
C12P 7/42 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0075640  
(22) 출원일자 2016년06월17일  
심사청구일자 없음  
(30) 우선권주장  
1020150099352 2015년07월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
에스케이이노베이션 주식회사  
서울특별시 종로구 종로 26 (서린동)  
(72) 발명자  
서영빈  
서울특별시 마포구 월드컵북로30길 9-22, 106동  
701호 (성산동, 성산월드타운대림아파트)  
이기성  
대전광역시 서구 월평동로 83, 101동 808호 (월평  
동, 다모아아파트)  
(74) 대리인  
이처영, 장제환

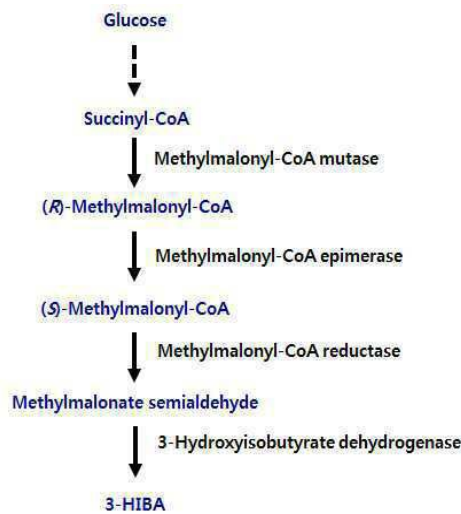
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈 코딩 유전자를 함유하는 미생물 변이체 및 이의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 메틸말로네이트 세미알데하이드(methylmalonate semialdehyde)로 전환하는 활성을 가지는 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈 코딩 유전자를 함유하는 미생물 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 아키아 (Archaea)계 유래 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈를 코딩하는 유전자가 도입된 미생물 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*C12Y 101/01031* (2013.01)

*C12Y 102/01075* (2013.01)

*C12Y 504/99001* (2013.01)

*C12Y 504/99002* (2013.01)

(72) 발명자

**박재연**

서울특별시 중구 만리재로33길 21, 103동 1102호  
(만리동1가, LIG서울역리가)

**박중민**

서울특별시 용산구 백범로 341, 103동 1401호 (원  
효로1가, 리첸시아 용산)

**박우찬**

세종특별자치시 보듬3로 74, 1206동 303호 (아  
름동, 범지기마을12단지)

**이종주**

대전광역시 유성구 지족로 343, 204동 1601호 (지  
족동, 반석마을2단지아파트)

**이혜성**

대전광역시 서구 한밭대로 701, 1203호 (월평동,  
갤러리빌 렉스)

**강경현**

대전광역시 유성구 엑스포로 325 (주)SK  
대덕기술원Bio Lab (원촌동)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

탄소원으로부터 숙시닐-CoA 생성능을 가지는 미생물에서 다음의 효소를 코딩하는 유전자를 함유하고 3-HIBA (3-hydroxyisobutyric acid) 생성능을 가지는 미생물 변이체에 있어서,

(i) 메틸말로닐-CoA 뮤테아제 (methylmalonyl-CoA mutase);

(ii) 메틸말로닐-CoA 에피머라제 (methylmalonyl-CoA epimerase);

(iii) 메틸말로닐-CoA 리덕테아제 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR); 및

(iv) 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제 (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase),

상기 (iii)의 효소는 말로닐-CoA 리덕테아제 (malonyl-CoA reductase, MCR) 활성을 가진 효소 중 메틸말로닐-CoA 리덕테아제 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR) 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 미생물 변이체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (iii)의 효소는 말로닐-CoA 리덕테아제 활성을 가진 효소 중 메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환하는 단일 관능성 (monofunctional)의 메틸말로닐-CoA 리덕테아제 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 미생물 변이체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 말로닐-CoA 리덕테아제 활성을 가진 효소 중 메틸말로닐-CoA 리덕테아제 활성을 나타내는 효소는 아키아 (Archaea)계 유래인 것을 특징으로 하는 미생물 변이체.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (iii)의 효소는 *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*, *Sulfolobales archaeon Acd1* 및 *Sulfolobus acidocaldarius Ron12/I*로 이루어진 군에서 선택된 아키아계 유래인 것을 특징으로 하는 미생물 변이체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (iii)의 효소는 서열번호 23 (IKVLGDAYDAKTIVKEVTRILSEVKRNVPGTM-DELTLSATTHRIA)으로 표시되는 서열과 60% 이상의 상동성 또는 80% 이상의 유사성을 나타내는 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 미생물 변이체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (iii)의 효소는 서열번호 3 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열 중 어느 하나와 60% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 미생물 변이체.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

상기 (iii)의 효소는 서열번호 3 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열 중 어느 하나의 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 미생물 변이체.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 미생물 변이체를 배양하여 3-HIBA를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 3-HIBA를 회수하는 단계를 포함하는 3-HIBA의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 메틸말로네이트 세미알데하이드(methylmalonate semialdehyde)로 전환하는 활성을 가지는 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 코딩 유전자를 함유하는 미생물 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 아키아 (Archaea)계 유래 메틸말로닐-CoA 리덕테이스를 코딩하는 유전자가 도입된 미생물 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 메타크릴산 및/또는 메틸메타크릴산 (또는 메틸메타크릴레이트)은 코팅, 투명플라스틱, 접착제와 같은 중합체 제조에 사용 가능한 물질이다. 메타크릴산을 생합성하기 위한 공정 개발 및 이의 적용이 진행중이다. 예를 들어, Evonik사는 합성가스 예를 들어, 암모니아, 메탄, 아세톤, 메탄올로부터 2-HIBA (2-hydroxybutyric acid)를 거쳐 (2-HIBA의 탈수 반응후 에스터화반응) 메틸메타크릴산을 합성하는 공정을 개발하였다.

[0003] 이러한 메타크릴산 및/또는 메틸메타크릴산 (또는 메틸메타크릴레이트)으로 전환될 수 있는 생물적 중간체는 2-HIBA 뿐 아니라, 이타콘산 (itaconic acid), 이소부티릭산 (isobutyric acid), 이소부틸렌 (isobutylene), 3-HIBA 등으로 알려져 있다.

[0004] 메틸메타크릴산의 생물학적 합성과 관련하여, 미국등록특허 제8865439호는 탄소원으로부터 3-HIBA를 거쳐 메틸메타크릴산을 생물학적으로 합성하는 경로 및 경로에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 미생물을 개시하고 있다.

[0005] 메틸메타크릴산의 생물학적 합성 경로 중, 가장 높은 이론 수율을 확보 예상 가능한 3-HIBA를 도 1에서와 같이 글루코스로부터 생물적으로 효율적으로 제조하기 위해서는 메틸말로닐-CoA 리덕테이스가 필수적으로 필요한 것으로 알려져 있다. 그러나, 메틸말로닐-CoA 리덕테이스는 아직 자연계 상태에서 발견되지 않은 효소이다.

[0006] 따라서, 3-HIBA의 생합성을 위한 도 1에 따른 대사 경로를 구축하기 위해서는 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 메틸말로네이트 세미알데하이드(methylmalonate semialdehyde)로 전환하는 효소인 메틸말로닐-CoA 리덕테이스의 탐색이 가장 필요한 상황이다.

[0007] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 말로닐-CoA를 말로네이트 세미알데하이드로 전환하는 효소 (MCR) 중에서 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 활성을 나타내는 효소 및 그 유전자를 선별하고, 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명의 목적은 MMCR (methylmalonyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 3-HIBA (3-hydroxyisobutyric acid) 생성능을 가지는 미생물 변이체 및 이의 용도를 제공하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탄소원으로부터 숙시닐-CoA 생성능을 가지는 미생물에서 다음의 효소를 코딩하는 유전자를 함유하고 3-HIBA (3-hydroxyisobutyric acid) 생성능을 가지는 미생물 변이체에 있어서,

[0010] (i) 메틸말로닐-CoA 뮤테이스 (methylmalonyl-CoA mutase);

[0011] (ii) 메틸말로닐-CoA 에피머라제 (methylmalonyl-CoA epimerase);

[0012] (iii) 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR); 및

[0013] (iv) 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제 (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase), 상기 (iii)의 효소는 말로닐-CoA 리덕테이스 (malonyl-CoA reductase, MCR) 활성을 가진 효소 중 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR) 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 미생물 변이체를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 미생물 변이체를 배양하여 3-HIBA를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 3-HIBA를 회수하는 단계를 포함하는 3-HIBA의 제조방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0015] 자연계에 MMCR이 존재하지 않기 때문에 포도당을 포함한 탄소원으로부터 3-HIBA를 생산하기 위해서는 대사경로를 우회할 수 밖에 없었으나, MCR 활성을 가진 효소 중 MMCR 활성을 나타내는 효소를 사용함으로써 빠른 대사경로로 3-HIBA를 제조할 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 3-HIBA는 미생물에서 MAA (Methacrylic acid) 및/또는 MMA (Methylmethacrylic acid)를 제조하는데 사용될 수 있으며, 이는 기존의 화학공정으로부터 제조되던 MAA (Methacrylic acid) 또는 MMA (Methylmethacrylic acid)와 달리 HCN, ACN, 폼아마이드 등 유해 물질이 수반되지 않아 친환경적이면서도, 경제적이란 장점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0016] 도 1은 글루코스로부터 3-HIBA를 제조하기 위한 대사경로를 도시한 것이다.
- 도 2는 MMCR 후보 유전자들을 PCR을 이용하여 복제한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 MMCR 후보 유전자들을 ligation하여 벡터에 삽입한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 MMCR 후보 유전자들이 형질전환된 균주를 배양하여 각 효소의 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 반응 기질로 하였을 때 MMCR 후보의 역가 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 메틸말로닐-CoA를 반응 기질로 하였을 때 반응산물을 MS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 3-HIBA 생산 균주 배양액을 HPLC로 분석하여 3-HIBA 생산을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 일 관점에서, 본 발명은 탄소원으로부터 숙시닐-CoA 생성능을 가지는 미생물에서 다음의 효소를 코딩하는 유전자를 함유하고 3-HIBA (3-hydroxyisobutyric acid) 생성능을 가지는 미생물 변이체에 있어서, (i) 메틸말로닐

-CoA 뮤테이스 (methylmalonyl-CoA mutase); (ii) 메틸말로닐-CoA 에피머라제 (methylmalonyl-CoA epimerase); (iii) 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR); 및 (iv) 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제 (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase), 상기 (iii)의 효소는 말로닐-CoA 리덕테이스 (malonyl-CoA reductase, MCR) 활성을 가진 효소 중 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR) 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 미생물 변이체에 관한 것이다.

- [0019] 본 발명에서 (iii)의 효소는 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 활성을 나타내는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환하는 단일 관능성 (monofunctional) 이거나, 메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환하는 것 뿐 아니라, 메틸말로네이트 세미알데하이드를 3-HIBA로 전환하는 공정에도 관여하는 이관능성 (bifunctional)일 수 있으며, 바람직하게 단일 관능성일 수 있다.
- [0020] 효소 중 (i) 메틸말로닐-CoA 뮤테이스 (methylmalonyl-CoA mutase)는 탄소원으로부터 제조된 숙시닐-CoA를 (R)-메틸말로닐-CoA로 전환에 관여하고, (ii) 메틸말로닐-CoA 에피머라제는 (R)-메틸말로닐-CoA를 (S)-메틸말로닐-CoA로의 전환에 관여하며, (iii) 메틸말로닐-CoA 리덕테이스는 (S)-메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환하는데 관여하며, (iv) 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제는 메틸말로네이트 세미알데하이드를 3-HIBA로 전환하는데 관여하는 효소이다. 구체적 경로는 도 1에 나타낸 바와 같다.
- [0021] "3-HIBA (3-히드록시이소부티르산, 3-hydroxyisobutyric acid)"는 C<sub>4</sub>-카르복실산을 의미하며, 산 형태 (3-히드록시이소부티르산), 염기 형태 (3-히드록시이소부티레이트) 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있으며, (R) 및 (S) 입체이성질체를 모두 포함할 수 있다. 3-HIBA는 MAA (Methacrylic acid) 및/또는 MMA (Methylmethacrylic acid)를 제조하기 위한 중간 물질로 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 3-HIBA 제조 과정에서, 자연계에 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 메틸말로네이트 세미알데하이드 (methylmalonate semialdehyde)로 전환하는 효소인 메틸말로닐-CoA 리덕테이스가 존재하지 않기 때문에, 포도당을 포함한 탄소원으로부터 3-HIBA를 제조하기 위해서는 isobutyric acid, 2-methyl-1,3-propanediol 등의 중간체를 거쳐 생합성하는 방식으로 대사경로를 우회할 수 밖에 없었다(Karsten Lang, Katja Buehler and Andreas Schmid, Multistep Synthesis of (S)-3-Hydroxyisobutyric acid from glucose using *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 B83 T7 catalytic biofilms, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 357(8), 1919-1927 (2015)).
- [0023] 그러나, 본 발명은 MCR 중 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)를 메틸말로네이트 세미알데하이드 (methylmalonate semialdehyde)로 직접 전환하는 효소 즉, 메틸말로닐-CoA 리덕테이스 (methylmalonyl-CoA reductase, MMCR) 기능이 있는 효소를 확인함으로써, 빠른 대사경로를 통해 3-HIBA를 제조할 수 있도록 하였다.
- [0024] 이 때, 상기 효소는 아키아 (Archaea)계 유래 메틸말로닐-CoA 리덕테이스일 수 있다. 본 출원의 발명자들은 MMCR과 기질은 다르지만 기능적으로는 유사한 말로닐코에이 리덕테이스 (MCR)로부터 여러 효소를 탐색하여 그 중 메틸말로닐-CoA도 기질로 사용할 수 있는 효소를 선별하였다. 또한, 메틸말로닐-CoA와 반응시킨 후 cofactor로 사용되는 NADH와 NADPH의 양의 변화를 흡광도로 측정함으로써 메틸말로닐-CoA와 반응성이 있는 효소를 탐색하였다.
- [0025] 그 결과, 하나의 실시예에서, 상기 메틸말로닐-CoA를 반응기질로 하여 반응성이 있는 효소는 예를 들어 *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*, *Sulfolobales archaeon Acd1* 및 *Sulfolobus acidocaldarius* Ron12/I로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아키아계 유래 메틸말로닐-CoA 리덕테이스일 수 있다.
- [0026] 이 때, 상기 메틸말로닐-CoA를 반응기질로 하여 반응성이 있는 효소의 서열을 분석한 결과, 서열번호 23의 서열과 60% 이상의 상동성 또는 80% 이상의 유사성이 있는 서열을 포함함을 알 수 있었다.
- [0027] 이를 바탕으로, 하나의 실시예에서 상기 효소는 서열번호 23으로 표시되는 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 나타내는 서열을 가질 수 있다.
- [0028] 또 하나의 실시예에서, 상기 효소는 서열번호 23으로 표시되는 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 유사성을 나타내는 서열을 가질 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 "상동성"또는 은 두 개의 비교대상 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 모이티 사이의 동일성 퍼센트를 의미한다. 또한 "유사성"은 비교창(comparison window)을 통해 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드

서열에 기반하여 서열이 기능적 또는 구조적으로 동일한 정도를 의미한다. 서열 상동성 또는 유사성은 표준 소프트웨어를 사용, 예를 들면 BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877, 1993)에 기초하여 개발된 BLASTN 이나 BLASTX라 불리는 프로그램에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.

[0030] 상기 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈는 서열번호 3 내지 5로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 바람직하게 90% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 나타내는 서열을 가질 수 있다.

[0031] 경우에 따라서, 본 발명에 따른 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈는 3-HIBA의 제조 효율을 높이기 위해 당업계에 알려진 공지 기술을 적용하여 변이시킬 수도 있다.

[0032] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 미생물 변이체에 (v) 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드라타아제 (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 메틸메타크릴산(Methylmethacrylic acid) 생성능을 가지는 미생물 변이체에 관한 것이다. 상기 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드라타아제는 3-HIBA를 메틸메타크릴산으로 전환하는데 관여하는 효소이다.

[0033] 본 발명에서 사용된 효소 메틸말로닐-CoA 리덕테이즈 이외에도, 메틸말로닐-CoA 뮤테이즈, 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 및 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제 코딩 유전자의 유래 및 서열은 다음과 같다.

[0034] [표 1] 3-HIBA로 전환 하는데 관여하는 효소 후보군

Enzyme	Gene name	Sequence ID	Source	서열번호
메틸말로닐-CoA 뮤테이즈	MCM	Msed_0638, Msed_2055	<i>Metallosphaera sedula</i>	7, 8
메틸말로닐-CoA 에피머라제	MCE	Msed_0639	<i>Metallosphaera sedula</i>	9
3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제	3-HIBADH	G-9075	<i>Pseudomonas putida</i>	10

[0035]

[0036] "미생물"은 아키아, 박테리아 또는 진핵생물의 도메인에 포함되는 임의의 생물체를 포함할 수 있고, 임의의 종류의 원핵생물 또는 진핵생물 예를 들어, 아키아, 박테리아, 효모 또는 진균류 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, *E. coli*, 사카로마이세스 세레비지애 (*S. cerevisiae*), 칸디다 블랑키이 (*C. blankii*) 또는 칸디다 루고사 (*C. rugosa*) 등이 사용될 수 있다.

[0037] 상기 효소 코딩 유전자는 외인성으로, "외인성"은 숙주 미생물에 아키아 (Archaea)계 유래 MMCR (methylmalonyl-CoA reductase)을 코딩하는 유전자가 도입되는 것을 의미한다. 상기 도입은 예를 들어 플라스미드와 같은 물질 즉, 염색체 또는 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해 MMCR 코딩 유전자를 숙주 미생물의 유전물질에 도입함으로써 이루어질 수 있다.

[0038] 사용될 수 있는 탄소원의 예로는 포도당(glucose), 과당(fructose), 자당(sucrose), 유당(lactose), 맥아당(maltose), 전분(starch) 및 셀룰로스(cellulose)와 같은 탄수화물(carbohydrate), 대두유(soybean oil), 해바라기유(regular sunflower oil), 피마자유(castor oil), 코코넛유(coconut oil)와 같은 지방, 팔미트산(palmitic acid), 스테아린산(stearic acid) 및 리놀레산(linoleic acid)과 같은 지방산, 글리세롤(glycerol) 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산(organic acids) 등이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[0039] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 미생물 변이체를 배양하는 단계를 포함하는 3-HIBA의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 미생물 변이체를 배양하는 단계를 포함하는 메틸메타크릴산의 제조방법에 관한 것이다.

[0040] 상기 미생물 변이체는 약 20-45°C의 온도에서 탄소원의 존재하에 배양될 수 있으며, 공지의 방법에 따라 예를 들어, (i) 단당류 포함 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 수크로스, 락토스, 프럭토스, 말토스, 당밀, 전분 또는 셀룰로스, (ii) 오일 및 지방, 예를 들어 대두유, 해바라기 오일, 땅콩유 또는 코코넛 지방, (iii) 지방산, 예를 들어 팔미트산, 스테아르산 또는 리놀산, (iv) 알콜, 예를 들어 글리세롤 또는 메탄올, (v) 아미노산, 예를 들어 L-글루타메이트 또는 L-발린 (vi) 유기산, 예를 들어 아세트산 등을 단독 또는 혼합으로 사용하여 배양할 수 있다. 경우에 따라서, 공지의 질소원, 인 공급원, 성장을 위해 요구되는 금속염, 전구체 또는 pH 조절제 등

이 포함될 수 있다.

[0041] 배양되어 발현된 3-HIBA 또는 메틸메타크릴산을 분리 및 회수할 수 있으며, 배양액을 필터에 통과시키거나, 원심분리기 또는 침강 장치를 사용하여 배양액과 발현된 3-HIBA 또는 메틸메타크릴산을 분리할 수 있으며, 추가적 삼투 또는 정제방법을 이용하여 순수한 3-HIBA 또는 메틸메타크릴산을 회수할 수 있다.

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0043] [실시예 1] MMCR 탐색

[0044] Uniprot을 이용하여 MMCR과 기질은 다르지만 말로닐-CoA (malonyl-CoA)를 말로네이트 세미알데하이드 (malonate semialdehyde)로 전환할 수 있어 기능적으로는 유사한 MCR (malonyl-CoA reductase)로부터 여러 효소를 스크리닝하였다. 그 중 메틸말로닐-CoA (methylmalonyl-CoA)도 기질로 사용할 수 있는 효소를 선별하고 그 산물을 파악하는 방식을 이용하여 MMCR (methylmalonyl-CoA reductase)을 탐색하였다. MMCR의 후보군은 기존에 구조가 알려진 *Sulfolobus tokodaii* 유래 MCR을 BLAST 서치하여 유사한 단백질 서열을 가진 효소들을 선정하였다. Uniprot을 통해 위와 같은 과정을 거쳐 효소를 선정한 결과, MMCR 기능을 하는 2 종의 MCR과 4종의 아스파테이트 세미알데히드 디하이드로게나아제 (Aspartate-semialdehyde dehydrogenase)를 확보하였다 (표 2).

[0045] [표 2] MMCR 후보군

Gene name	Sequence ID	Organism	Enzyme	서열번호
MCRst	Q96YK1	<i>Sulfolobus tokodaii</i> (strain DSM 16993)	Malonyl-CoA reductase	1
MCRms	A4YEN2	<i>Metallosphaera sedula</i> (strain ATCC 51363)	Malonyl-CoA reductase	2
ASDcc	E6N6I3_9ARCH	<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	3
ASDsar	GI:519043079	<i>Sulfolobales archaeon Acd1</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	4
ASDsac1	MIIGV1_9CREN	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> Ron12/I	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	5
ASDsac2	MIJ171_9CREN	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> Ron12/I	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	6

[0046]

[0047] 표 2의 MMCR 후보 유전자들을 표 3의 primer를 합성하여 98℃에서 10초, 55℃에서 5초 72℃에서 1분간 30 cycle을 반응시키는 PCR을 이용하여 복제하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이후, T4 DNA ligase를 사용하여 pET21b vector에 삽입하였다 (도 3). 원하는 구조물 (construct)이 만들어진 것을 도 3을 통해 확인한 후, 해당 구조물 들은 발현용 균주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 균주를 제작하였다.

[0048] [표 3] 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열	서열번호
MCRstF	ATGAGCTCATGAGAAGAACCTTTGAAA	서열번호 11
MCRstR	TTCTCGAGTACTTTTCGATGTAACC	서열번호 12
MCRmsF	ATGAGCTCATGAGAAGAACCTTTGAAA	서열번호 13
MCRmsR	TTCTCGAGTTATCTCTTATCAATGTA	서열번호 14
ASDccF	ATGAGCTCATGAAAACCTTACTCCGTC	서열번호 15
ASDccR	TTCTCGAGTCATTCGCCTAACAACCA	서열번호 16
ASDsarF	ATGAGCTCATGAGAAGAACCTTTGAAG	서열번호 17
ASDsarR	TTCTCGAGTACTTAGGGATGTAACC	서열번호 18
ASDsac1F	ATGACGTCATGAGAAGAGTCTTGAAA	서열번호 19
ASDsac1R	TTCTCGAGTCAATCCATGTAACCCTT	서열번호 20
ASDsac2F	ATGAGCTCATGAGAAGAGTTTACAAA	서열번호 21
ASDsac2R	TTCTCGAGTCAGATGTACTTTCTGTT	서열번호 22

[0049]

[0050] 제작된 균주 (형질전환체)는 LBA 배지에서 37 ° C, 200 rpm에서 배양하였으며, 600 nm에서의 OD값이 0.5~0.8사이에 도달하였을 때 1 mM의 이소프로필 1-티오-β-갈락토시드(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, IPTG)를 첨가한 후 16 ° C에서 overnight 배양을 실시하여 표 1의 MCR 각각을 발현시켰다. 각각의 발현 결과는 도 4에 나타내었다.

[0051] 배양한 배양액은 원심 분리하여 상등액을 제거한 뒤, 세포를 모아 sonicator로 파쇄한 후 원심 분리하여 상등액을 모아 효소액을 준비하였다. 각 효소의 농도를 Pierce BCA kit를 이용하여 37°C에서 30분간 발색반응 시킨 후 Microplate spectrophotometer 기기로 562 nm에서 흡광도를 측정하는 방식으로 정량 분석한 결과를 표 4에 나타내었다.

[0052] [표 4] 배양한 형질전환체 세포 내 단백질 농도 정량 결과

Sample	A562	Conc. (ug/ml)	Dilution Factor (*5)
pET21b	0.659	573.674	2868.37
ASDcc	0.636	548.696	2743.48
MCRms	0.682	598.652	2993.26
ASDsar	0.742	663.812	3319.06
ASDsac1	0.741	662.726	3313.63
ASDsac2	0.699	617.114	3085.57
MCRst	0.718	637.748	3188.74

[0053]

[0054] 수득한 효소액을 표 5에 따른 구성성분을 포함하고, 메틸말로닐-CoA를 기질로 하여 반응시킨 후 cofactor로 사용되는 NADH와 NADPH 양의 변화를 Microplate spectrophotometer로 365 nm에서의 흡광도로 측정함으로써, 메틸말로닐-CoA와 반응성이 있는지 여부를 1차적으로 탐색하였다.

[0055] [표 5]

Reagent	Stock Conc.	Working Conc.	Volume ( $\mu$ l)
Tris-HCl (pH 7)	100 mM	50 mM	100
NAD(P)H	4 mM	0.4 mM	20
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	2 mM	40
Cell extract	2x dilution		20
Methylmalonyl-CoA	3.0 mM*	0.3 mM	20

[0056]

[0057] 단백질 사용량 대비 NADH, NADPH가 소모되는 속도를 activity로 계산하였으며, 그 결과 NADH를 cofactor로 사용하였을 때 ASDcc, ASDsar, ASDsac1에서 메틸말로닐-CoA와 반응성이 보임을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0058] [실시예 2] 메틸말로네이트 세미알데하이드 생산

[0059] 1차적으로 선별한 효소 중 가장 우수한 성능을 보인 ASDsac1의 메틸말로네이트 세미알데하이드 생산능을 확인하기 위하여 0.5 g/L의 메틸말로닐-CoA와 반응을 실시하였으며, 반응물을 MS로 분석한 결과, ASDsac1의 반응물에서 도 6과 같이 메틸말로네이트 세미알데하이드가 제조되는 것을 확인하였다.

[0060] [실시예 3] 대장균에서의 3-HIBA생산 균주 제작

[0061] 메틸말로네이트 세미알데하이드가 제조되는 것을 확인한 ASDsac1를 대장균에서 최적 발현되도록 코돈 최적화 (codon optimization) tool () 을 이용하여 최적화하였으며, 도 1과 같이 대장균에서 3-HIBA를 생산하는 균주 제작에 이용하였다([표 6]).

[0062] 표 6의 대장균에서 3-HIBA 생산 경로 유전자들을 표 7의 프라이머를 합성하여 98℃에서 10초, 55℃에서 5초 72℃에서 1분간 30 cycle을 반응시키는 PCR을 이용하여 복제하였으며, T4 DNA ligase를 사용하여 pET21b, pET26b 벡터에 각각 삽입하였다. 원하는 구조물 (construct)이 만들어진 것을 확인한 후, 해당 구조물 들은 발현용 균주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 균주를 제작하였다.

[0063] [표 6] ASDsac1 유전자를 포함한 대장균에서 3-HIBA생산 균주 설계

	pET21b(Amp <sup>R</sup> )			pET26b(Kan <sup>R</sup> )	
	메틸말로-CoA 뮤테이즈 $\alpha$ (EC:5.4.99.2)	메틸말로-CoA 뮤테이즈 $\beta$ (EC:5.4.99.2)	메틸말로닐 CoA 에피머라제 (EC:5.1.99.1)	MMCR	3-하이드록시 이소부티레이트 디하이드로 케나아제 (EC 1.1.1.31)
1	Control (Only vectors)				
2	<i>E. coli</i> (GI:42945)		<i>P. freudenreichii</i> (GI:22022367)	<i>S. acidocaldarius</i>	<i>E. coli</i> (GI: 331077966)
3	<i>P. freudenreichii</i> (GI:45834)	<i>P. freudenreichii</i> (GI:581476)	<i>P. freudenreichii</i> (GI:22022367)	<i>S. acidocaldarius</i>	<i>E. coli</i> (GI: 331077966)

[0064]

[0065] [표 7] 대장균에서 3-HIBA생산 경로 유전자 클로닝을 위한 프라이머

유전자	프라이머 서열
F ASD <sub>sacI</sub>	AGCT <b>GAGCTC</b> ATGCGTCGCGTTCTGAAAGCAGCGA (서열번호 24)
R ASD <sub>sacI</sub>	TCGA <b>CTCGAG</b> TCAATCCATATAACCCCTTCTCCACA (서열번호 25)
F PME	CTA <b>GCTAGC</b> ATGAGTAATGAGGATCTTTTCACTGTATCG (서열번호 26)
R PME	CCG <b>CTCGAG</b> TCAGTTCTTCGGTACTGGGTG (서열번호 27)
F PMMa	CCC <b>AAGCTT</b> ATGAGCACTCTGCCCCGTTTTG (서열번호 28)
R PMMa	ATAAGAAT <b>GCGGCCGC</b> CTAGGCATCGAGCGAAGCCC (서열번호 29)
F PMMb	CCC <b>AAGCTT</b> ATGAGCAGCACGGATCAGGGG (서열번호 30)
R PMMb	ATAAGAAT <b>GCGGCCGC</b> TCACTTCGCGACTCCCAAGATATC (서열번호 31)
F EMM	AT <b>GAGCTC</b> ATGTCTAACGTGCAGGA (서열번호 32)
R EMM	CCG <b>CTCGAG</b> ATCATGATGCTGGCTTATCAGATTCAG (서열번호 33)
F HIBADH	AT <b>GAGCTC</b> ATGAAAACGGGATCTGA (서열번호 34)
R HIBADH	TT <b>CTCGAG</b> TCATGATTCGCTCCCG (서열번호 35)
BglIII T7 Ter	GGA <b>AGATCT</b> CAAAAAACCCTCAAGACCCGTTTA (서열번호 36)
EcoNI T7 Pro	GCATT <b>CCTGCATTAGG</b> TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG (서열번호 37)
SgrAI T7 Ter	CCGG <b>CACCGGCG</b> CAAAAAACCCTCAAGACCCGTTTA (서열번호 38)
SphI T7 Pro	CATG <b>GCATGC</b> TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG (서열번호 39)
SphI T7 Ter	CATG <b>GCATGC</b> CAAAAAACCCTCAAGACCCGTTTA (서열번호 40)
BglIII T7 Pro	GGA <b>AGATCT</b> TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG (서열번호 41)

[0066]

[0067] [실시예 4] 대장균에서의 3-HIBA생산 발효

[0068] 실시예 3에서 제조한 제조합 대장균의 배양을 위해 250ml 플라스크에 30ml 2xM9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl)최소배지를 넣고 추가적으로 글루코즈(10g/L), Trace metal solution 100x (EDTA 5 g /L, FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.83 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 84 mg/L, CuCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 13 mg/L, CoCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 10 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 mg/L, MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 1.6 mg/L) 600ul, 비타민12(Vitamin12) 60ug/1, 바이오틴(Biotin) 1mg/ml, 다이아민 (Thiamin) 1mg/ml, MgSo<sub>4</sub> 0.25g/L, Kanamycin 50ug/ml, Ampicillin 100ug/ml 를 넣은 다음 37℃ 배양기에서 배양하여 흡광도(OD, optical density)=0.8에서 0.1mM IPTG로 발현을 유도하였다.

[0069] IPTG 첨가 후에는 배양온도를 30℃로 바꾸고 3-HIBA 생산 위한 기질로 Sodium succinate를 5g/L 추가적으로 넣어준 후, 200rpm에서 72시간 동안 추가 배양 하였다. 배양 중에는 72시간째에 배양액 중 일부를 취하여 흡광도 (OD) 및 3-HIBA 생산을 확인하였다.

[0070] [실시예 5] 3-HIBA 분석

[0071] 실시예 4에서 배양한 72시간 배양액은 centrifuge (13,000rpm 10min, 4℃) 하여 cell을 제거하였다. Cell이 제

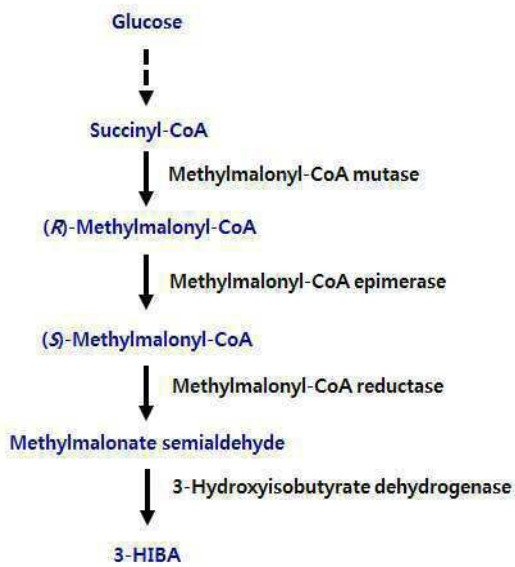
거된 상층액 Sample 40ml은 동결건조기(ilShinBioBase, Korea)를 사용한 동결건조 방법으로 24시간 건조 후 2ml distilled water에 녹여 약 13배 농축된 3ml HPLC sample을 만들었다.

[0072] 주입 부피가 10  $\mu$ l인 Agilent 1200 HPLC system (Agilent, USA)을 사용하여 샘플을 분석하였다. HPLC에서 Hyper Carb Column (150 mm X 4.6mm) (Thermo, USA)을 30 $^{\circ}$ C로 유지하고 1ml min $^{-1}$ 의 유량으로 DIW(0.1% Sulfuric acid, ACN(0.1% Sulfuric acid) 이동상을 사용하여 DAD detector (Agilent, USA)로 분석하였다.

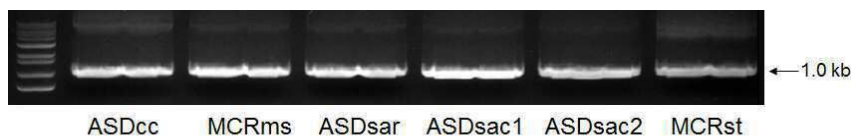
[0073] 분석을 통해 실시예 3에서 제작한 2,3 번 균주 72시간 배양액을 13배 농축시 3-HIBA가 69, 21 ppm의 양으로 생산됨을 도 7과 같이 확인하였다.

도면

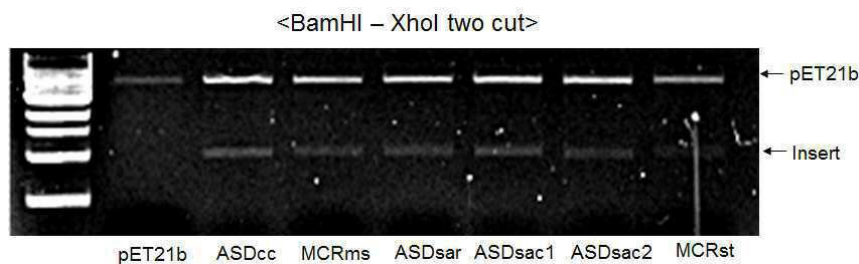
도면1



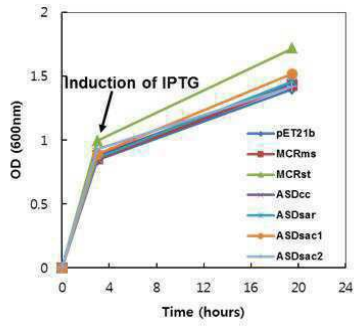
도면2



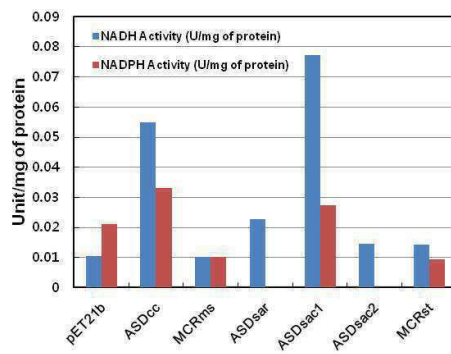
도면3



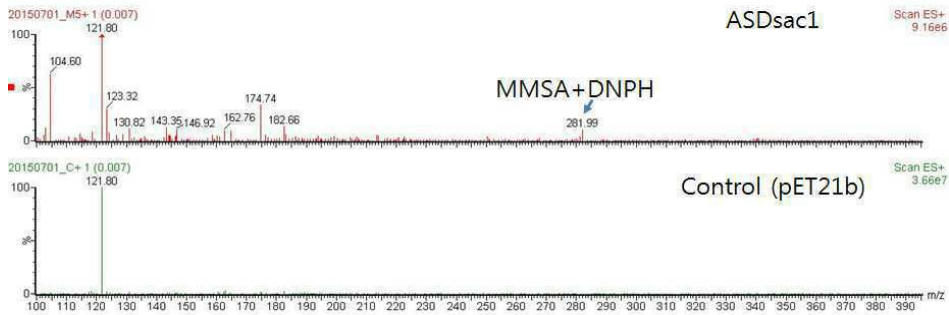
도면4



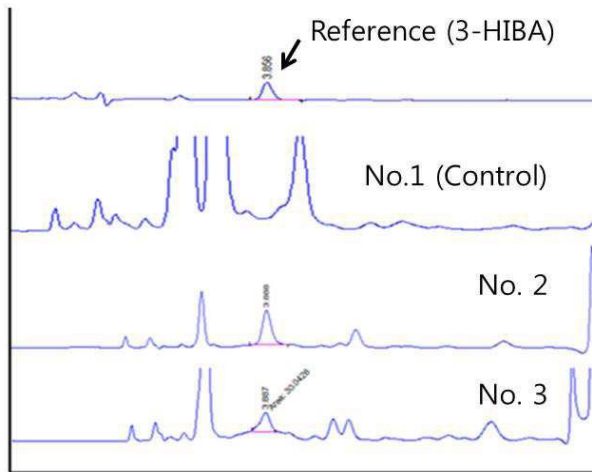
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Sk Innovation Co.,Ltd.
- <120> Mutant Microorganism Comprising Gene Coding Methylmalonyl-CoA Reductase and Use Thereof
- <130> 159
- <150> KR 15/099,352
- <151> 2015-07-13
- <160> 41
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 359
- <212> PRT
- <213> Sulfolobus tokodaii
- <400> 1

Met Ile Leu Met Arg Arg Thr Leu Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Val Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ser Asn His Pro Tyr  
 20 25 30  
 Ile Lys Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Gly Ser Val Gly Lys Pro Tyr  
 35 40 45  
 Gly Glu Val Val Arg Trp Gln Thr Val Gly Gln Val Pro Lys Glu Ile  
 50 55 60  
 Ala Asp Met Glu Ile Lys Pro Thr Asp Pro Lys Leu Met Asp Asp Val



Gln Val Asn Lys Arg Met Ile Arg Leu Val Ser Leu Ile His Asn Thr  
 325 330 335

Val Arg Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ile Leu Ala Ala Glu Leu Leu Val  
 340 345 350

Glu Lys Gly Tyr Ile Glu Lys  
 355

<210> 2

<211> 357

<212> PRT

<213> Metallosphaera sedula

<400> 2

Met Arg Arg Thr Leu Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ala Thr Gly Leu Val

1 5 10 15

Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ala Asp His Pro Tyr Ile Lys Pro  
 20 25 30

Thr Tyr Leu Ala Gly Lys Gly Ser Val Gly Lys Pro Tyr Gly Glu Ile  
 35 40 45

Val Arg Trp Gln Thr Val Gly Asn Val Pro Lys Glu Val Ala Asn Gln  
 50 55 60

Glu Val Lys Pro Thr Asp Pro Lys Leu Met Asp Asp Val Asp Ile Ile  
 65 70 75 80

Phe Ser Pro Leu Pro Gln Gly Ala Ala Gly Pro Val Glu Glu Gln Phe  
 85 90 95

Ala Lys Leu Gly Phe Asn Val Ile Ser Asn Ser Pro Asp His Arg Phe  
 100 105 110

Asp Met Asp Val Pro Met Ile Ile Pro Glu Val Asn Pro His Thr Val  
 115 120 125

Thr Leu Ile Asp Glu Gln Arg Lys Arg Arg Asp Trp Lys Gly Phe Ile  
 130 135 140

Val Thr Thr Pro Leu Cys Thr Ala Gln Gly Ala Ala Ile Pro Leu Thr  
 145 150 155 160

Pro Ile Tyr Gln Asn Phe Lys Met Ser Gly Val Met Ile Thr Thr Met



Gln His Tyr Ile Arg Met Leu Tyr Arg His Pro Trp Phe Arg Ile Thr  
 20 25 30

Ala Leu Thr Gly Lys Glu Ser Val Gly Arg Lys Tyr Val Glu Ala Val  
 35 40 45

Arg Gly Glu Ala Pro Glu Pro Pro Lys Glu Ile Ala Glu Met Glu Val  
 50 55 60

Leu Pro Thr Asp Pro Lys Lys Val Asp Ala Asp Phe Val Phe Ser Cys  
 65 70 75 80

Leu Pro Thr Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Pro Lys Phe Ala Glu Ala  
 85 90 95

Gly Phe Pro Val Phe Ser Asp Ala Ala Ala Tyr Arg Met Glu Glu Asp  
 100 105 110

Val Pro Leu Ile Val Pro Glu Ile Asn His Asp His Leu Asn Met Val  
 115 120 125

His Ile Gln Arg Lys Lys Arg Gly Trp Glu Gly Tyr Ile Val Thr Thr  
 130 135 140

Pro Asn Cys Thr Thr Val Gly Leu Val Leu Pro Leu Gln Pro Leu Lys  
 145 150 155 160

Gln His Leu Gly Val Lys Lys Val Ile Val Thr Thr Met Gln Ala Val  
 165 170 175

Ser Gly Ala Gly Tyr Pro Gly Val Ala Ser Leu Ser Ile Leu Gly Asn  
 180 185 190

Val Ile Pro Tyr Ile Ser Gly Glu Glu Arg Lys Val Glu Thr Glu Thr  
 195 200 205

Ala Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Gly Asp Gly Arg Phe Thr His Asp Ser  
 210 215 220

Val Glu Val His Ala Thr Cys Thr Arg Val Pro Thr Leu Asp Gly His  
 225 230 235 240

Met Glu Ser Ile Tyr Leu Glu Thr Ala Lys Pro Ala Asp Glu Glu Thr  
 245 250 255

Val Ala Glu Leu Leu Ala Glu Tyr Val Ser Leu Pro Gln Glu Leu Asn  
 260 265 270

Leu Pro Thr Ala Pro Ala Arg Pro Ile Val Val Arg Arg Glu Leu Asp  
 275 280 285  
 Arg Pro Gln Thr Arg Ile Asp Val Asp Ala Gly Thr Val Pro Gly Met  
 290 295 300  
 Ser Val Ser Val Gly Arg Ile Arg Val Asn Gly Glu Lys Val Arg Phe  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Leu Ser His Asn Leu Ile Arg Gly Ala Ala Gly Gly Thr Ile  
 325 330 335  
 Leu Thr Ala Glu Leu Ala Arg His Met Gly Leu Leu Gly Glu  
 340 345 350

<210> 4  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> Sulfolobales archaeon Acd1  
 <400> 4

Met Arg Arg Thr Leu Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ala Thr Gly Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ser Gln His Pro Tyr Ile Lys Pro  
 20 25 30  
 Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Gly Ser Val Gly Lys Ala Tyr Ser Glu Val  
 35 40 45  
 Val Arg Trp Gln Thr Val Gly Gln Val Pro Lys Glu Val Ala Asp Met  
 50 55 60  
 Pro Val Leu Pro Thr Asp Val Asn Glu Ile Lys Lys Ala Gly Val Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Val Phe Ser Pro Leu Pro Gln Gly Ala Ala Gly Pro Val Glu Glu  
 85 90 95  
 Glu Phe Ala Lys Ala Gly Phe Pro Val Ile Ser Asn Ser Pro Asp His  
 100 105 110  
 Arg Phe Asp Pro Asp Val Pro Leu Met Ile Pro Glu Val Asn Gly His  
 115 120 125

Thr Ala Ser Leu Ile Asp Glu Gln Lys Lys Arg Arg Asp Trp Ser Gly  
 130 135 140  
 Phe Ile Val Thr Thr Pro Leu Cys Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Pro Ile Tyr Arg Asp Phe Arg Val Asp Ser Val Phe Ile Thr  
 165 170 175  
 Thr Met Gln Ser Leu Ser Gly Glu Gly Tyr Pro Gly Val Ala Ser Leu  
 180 185 190  
 Asp Val Val Asp Asn Ile Lys Val Leu Gly Asp Ala Tyr Asp Ala Lys  
 195 200 205  
 Thr Val Lys Glu Val Thr Arg Ile Leu Ser Glu Val Lys Arg Asn Val  
 210 215 220  
 Pro Gly Thr Met Asp Glu Leu Thr Leu Ser Ala Thr Thr His Arg Ile  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Ile His Gly His Tyr Glu Val Met Tyr Val Thr Phe Lys Glu  
 245 250 255  
 Asp Val Lys Val Glu Lys Val Lys Glu Thr Leu Ala Asn Phe Lys Gly  
 260 265 270  
 Glu Pro Gln Asp Met Lys Leu Pro Thr Ala Pro Ser Arg Pro Ile Leu  
 275 280 285  
 Ile Thr Glu Leu Asp Asn Arg Pro Gln Pro Tyr Phe Asp Arg Trp Ala  
 290 295 300  
 Gly Asp Val Pro Gly Met Ser Val Val Val Gly Arg Leu Lys Gln Val  
 305 310 315 320  
 Asn Asn Arg Thr Val Arg Leu Val Ser Leu Ile His Asn Thr Val Arg  
 325 330 335  
 Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ile Leu Val Ala Glu Tyr Leu Ile Glu Lys  
 340 345 350  
 Gly Tyr Ile Pro Lys  
 355  
 <210> 5  
 <211> 354

<212> PRT  
 <213> Sulfolobus acidocaldarius Ron12/1  
 <400> 5  
 Met Arg Arg Val Leu Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ser Thr Gly Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ala Asn His Pro Tyr Ile Lys Val  
 20 25 30  
 Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Gly Ser Val Gly Lys Pro Tyr Gly Glu Val  
 35 40 45  
 Val Arg Trp Gln Thr Ile Gly Gln Ile Pro Lys Glu Val Ala Asn Met  
 50 55 60  
 Glu Ile Lys Pro Thr Asp Pro Lys Leu Met Asp Asp Val Asp Leu Val  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Pro Leu Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Val Glu Glu Glu Phe  
 85 90 95  
 Ala Lys His Gly Phe Lys Val Ile Ser Asp Ser Pro Asp His Arg Phe  
 100 105 110  
 Glu Pro Asp Ile Pro Leu Leu Ile Pro Glu Ile Asn Pro His Thr Ile  
 115 120 125  
 Thr Leu Ile Asp Glu Gln Arg Lys Lys Arg Asp Trp Lys Gly Phe Ile  
 130 135 140  
 Val Thr Thr Pro Leu Cys Ala Ala Gln Gly Val Leu Leu Pro Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Ile Tyr Gln Asn Phe Lys Val Asp Ser Val Phe Ile Thr Thr Met  
 165 170 175  
 Gln Ala Val Ser Gly Glu Gly Tyr Pro Gly Val Ala Ser Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Ile Asp Asn Ile Lys Val Leu Gly Glu Asn Tyr Asp Asn Lys Leu Ile  
 195 200 205  
 Lys Glu Val His Arg Val Leu Ser Glu Thr Lys Arg Asn Val Asn Asp  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Asp Val Thr Leu Ser Ala Thr Thr His Arg Val Ala Thr

225                    230                    235                    240  
 Ile His Gly His Tyr Glu Ile Ile Tyr Val Thr Phe Lys Glu Asp Val  
                                  245                    250                    255

Asn Val Glu Lys Val Arg Glu Ala Met Asp Asn Phe Lys Gly Glu Pro  
                                  260                    265                    270

Gln Asn Leu Lys Leu Pro Thr Ala Pro Ser Lys Pro Ile Ile Leu Thr  
                                  275                    280                    285

Asn Glu Asp Ser Arg Pro Gln Val Tyr Phe Asp Arg Trp Ala Gly Glu  
                                  290                    295                    300

Ile Pro Gly Met Ser Val Val Val Gly Arg Leu Ser Gln Val Asn Arg  
 305                    310                    315                    320

Arg Ala Ile Arg Phe Ala Ser Leu Ile His Asn Thr Val Arg Gly Ala

                                 325                    330                    335  
 Ala Gly Gly Gly Ile Leu Ala Thr Glu Phe Leu Val Glu Lys Gly Tyr  
                                  340                    345                    350

Met Asp

<210> 6

<211> 352

<212> PRT

<213> Sulfolobus acidocaldarius Ron12/I

<400> 6

Met Arg Arg Val Tyr Lys Ala Ala Ile Leu Gly Ser Thr Gly Leu Val  
 1                    5                    10                    15

Gly Ile Glu Tyr Val Arg Met Leu Ala Asn His Pro Tyr Ile Lys Pro  
                                  20                    25                    30

Thr Tyr Leu Ala Gly Arg Gly Ser Val Gly Lys Pro Tyr Gly Glu Val  
                                  35                    40                    45

Val Arg Trp Gln Thr Ile Gly Gln Ile Pro Lys Glu Ile Ala Asn Gln  
                                  50                    55                    60

Glu Ile Arg Pro Thr Asp Pro Lys Gln Met Asp Asp Val Asp Leu Val  
 65                    70                    75                    80





Leu Lys Glu Tyr Ile Ala Arg Lys Asn Tyr Ile Tyr Pro Pro Glu Pro  
 195 200 205  
 Ser Met Arg Tyr Ala Ile Asp Ile Ile Glu Tyr Ser Tyr Lys Asn Ile  
 210 215 220  
 Pro Lys Trp His Pro Ile Ser Ile Ser Gly Tyr His Ile Arg Glu Ala  
 225 230 235 240  
  
 Gly Ala Asp Ala Val Leu Glu Val Ala Phe Thr Leu Ala Asp Gly Ile  
 245 250 255  
 Glu Tyr Val Arg Arg Thr Ala Glu Arg Gly Ile Pro Val Asp Asp Phe  
 260 265 270  
 Ala Pro Thr Leu Ser Phe Phe Phe Ala Gly Tyr Thr Asn Leu Phe Glu  
 275 280 285  
 Glu Val Ala Lys Phe Arg Ala Ala Arg Arg Met Trp Ala Lys Ile Met  
 290 295 300  
 Arg Asp Met Phe Asn Ala Lys Lys Ala Asp Ser Met Thr Leu Lys Phe  
  
 305 310 315 320  
 His Thr Gln Thr Gly Gly Ala Glu Leu Thr Ala Gln Gln Pro Glu Ile  
 325 330 335  
 Asn Ile Ile Arg Thr Thr Ile Gln Ala Leu Ala Ala Ala Leu Gly Gly  
 340 345 350  
 Thr Gln Ser Leu His Val Asn Ser Tyr Asp Glu Ala Val Ala Leu Pro  
 355 360 365  
 Ser Glu Lys Ala Ala Lys Ile Ala Ile Arg Val Gln Gln Ile Val Ala  
 370 375 380  
  
 Tyr Glu Ser Gly Ser Thr Glu Thr Val Asp Pro Leu Ala Gly Ser Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Val Glu Trp Leu Thr Asp Glu Ile Glu Glu Arg Ala Trp Lys Ile  
 405 410 415  
 Ile Glu Arg Val Glu Gly Met Gly Gly Met Met Lys Ala Val Glu Arg  
 420 425 430  
 Gly Phe Pro Gln Ala Glu Ile Ala Glu Ser Ala Tyr Arg Leu Gln Lys  
 435 440 445

Lys Ile Glu Glu Gly Glu Met Ile Arg Val Gly Val Asn Met Ser Tyr

450 455 460

Glu Pro Asp Trp Ile Gly Thr Thr Glu Val Phe Arg Val Asn Pro Glu

465 470 475 480

Ile Arg Glu Arg Val Leu Thr Arg Leu Lys Lys Tyr Arg Ser Glu Arg

485 490 495

Asp Gln Met Lys Val Arg Asp Ser Leu Asn Ala Leu Arg Lys Ala Ala

500 505 510

Glu Asn Pro Ser Val Asn Leu Phe Pro Tyr Val Leu Asp Ala Ile Lys

515 520 525

Lys Gly Cys Thr Val Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Arg Glu Ile Trp

530 535 540

Gly Glu Tyr Lys Glu Pro Ile Ile Phe

545 550

<210> 8

<211> 155

<212> PRT

<213> Metallosphaera sedula

<400> 8

Met Arg Glu Tyr Leu Asn Tyr Leu Asn Leu Arg Asp Met Ile Leu Leu

1 5 10 15

Met Asp Lys Arg Ile Lys Val Val Val Ala Lys Leu Gly Leu Asp Gly

20 25 30

His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Arg Ala Leu Lys Asp Ala Gly

35 40 45

Met Glu Val Val Tyr Thr Gly Leu Arg Gln Thr Pro Glu Gln Ile Val

50 55 60

Arg Thr Ala Ile Gln Glu Asp Ala Asp Val Ile Gly Ile Ser Ile Leu

65 70 75 80

Ser Gly Ala His Leu Glu Leu Met Pro Lys Ile Val Glu Ala Leu Lys

85 90 95

Lys Ala Gly Leu Asp Asp Val Gly Leu Val Leu Gly Gly Val Ile Pro

100 105 110

Pro Glu Asp Ile Pro Lys Leu Lys Ala Met Gly Val Asp Asp Val Phe

115 120 125

Leu Pro Gly Thr Ser Leu Lys Glu Ile Ala Gln Arg Val Ser Lys Leu

130 135 140

Ala Ser Thr Lys Arg Gly Ile Lys Val Glu Gly

145 150 155

<210> 9

<211> 140

<212> PRT

<213> Metallosphaera sedula

<400> 9

Met Glu Thr Leu Asp Ile Asp His Val Gly Val Ala Val Glu Asn Leu

1 5 10 15

Glu Glu Ala Ile Lys Leu Tyr Thr Glu Lys Met Gly Met Lys Leu Val

20 25 30

His Arg Glu Asp Leu Pro Asp Arg Gly Ile Lys Val Ala Phe Leu Thr

35 40 45

Gly Asn Glu Gly Thr Thr Ala Val Glu Leu Met Glu Pro Met Asn His

50 55 60

Glu Asp Pro Asn Asn Thr Val Ala Lys Phe Leu Lys Thr Arg Gly Gln

65 70 75 80

Gly Met His His Leu Ala Val Lys Val Lys Asp Ile Asn Ser Ser Leu

85 90 95

Arg Asp Leu Glu Gly Lys Gly Leu Thr Leu Ile Asp Lys Asn Gly Arg

100 105 110

Lys Gly Ala Arg Gly His Leu Val Ala Phe Val His Pro Lys Ser Val

115 120 125

Met Gly Leu Leu Leu Glu Leu Val Gln Glu Thr His

130 135 140

<210> 10

<211> 295

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 10

Met Arg Ile Ala Phe Ile Gly Leu Gly Asn Met Gly Ala Pro Met Ala

1 5 10 15

Arg Asn Leu Ile Lys Ala Gly His Gln Leu Asn Leu Phe Asp Leu Asn

20 25 30

Lys Thr Val Leu Ala Glu Leu Ala Glu Leu Gly Gly Gln Ile Ser Pro

35 40 45

Ser Pro Lys Asp Ala Ala Ala Asn Ser Glu Leu Val Ile Thr Met Leu

50 55 60

Pro Ala Ala Ala His Val Arg Ser Val Tyr Leu Asn Asp Asp Gly Val

65 70 75 80

Leu Ala Gly Ile Arg Pro Gly Thr Pro Thr Val Asp Cys Ser Thr Ile

85 90 95

Asp Pro Gln Thr Ala Arg Asp Val Ser Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly

100 105 110

Val Asp Met Gly Asp Ala Pro Val Ser Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala

115 120 125

Ala Gly Thr Leu Thr Phe Met Val Gly Ala Ser Ala Glu Leu Phe Ala

130 135 140

Ser Leu Lys Pro Val Leu Glu Gln Met Gly Arg Asn Ile Val His Cys

145 150 155 160

Gly Glu Val Gly Thr Gly Gln Ile Ala Lys Ile Cys Asn Asn Leu Leu

165 170 175

Leu Gly Ile Ser Met Ile Gly Val Ser Glu Ala Met Ala Leu Gly Asn

180 185 190

Ala Leu Gly Ile Asp Thr Lys Val Leu Ala Gly Ile Ile Asn Ser Ser

195 200 205

Thr Gly Arg Cys Trp Ser Ser Asp Thr Tyr Asn Pro Trp Pro Gly Ile



<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MCRmsR Primer  
 <400> 14  
 ttctcgagtt atctcttatac aatgta 26  
 <210> 15  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ASDccF Primer  
 <400> 15  
 atgagctcat gaaaacttac tccgtc 26  
  
 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ASDccR Primer  
 <400> 16  
 ttctcgagtc attcgcctaa caacca 26  
 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ASDsarF Primer  
 <400> 17  
 atgagctcat gagaagaact ttgaag 26  
 <210> 18  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ASDsarR Primer  
 <400> 18

ttctcgagtt acttaggat gtaacc	26
<210> 19	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ASDsac1F Primer	
<400> 19	
atgacgtcat gagaagagtc ttgaaa	26
<210> 20	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ASDsac1R Primer	
<400> 20	
ttctcgagtc aatccatgta accctt	26
<210> 21	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ASDsac2F Primer	
<400> 21	
atgagctcat gagaagagtt taaaa	26
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ASDsac2R Primer	
<400> 22	
ttctcgagtc agatgtactt tctggt	26
<210> 23	
<211> 44	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Conserved Domain between ASDsac1 and ASDsar	

<400> 23

Ile Lys Val Leu Gly Asp Ala Tyr Asp Ala Lys Thr Val Lys Glu Val

1 5 10 15  
 Thr Arg Ile Leu Ser Glu Val Lys Arg Asn Val Pro Gly Thr Met Asp  
 20 25 30  
 Glu Leu Thr Leu Ser Ala Thr Thr His Arg Ile Ala  
 35 40

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

agctgagctc atgcgtcgcg ttctgaaagc agcga 35

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 25

tcgactcgag tcaatccata taacccttct ccaca 35

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 26

ctagctagca tgagtaatga ggatcttttc atctgtatcg 40

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27	
ccgctcgagt cagttcttcg ggtactgggt g	31
<210> 28	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 28	
cccaagctta tgagcactct gccccgtttt g	31
<210> 29	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 29	
ataagaatgc ggccgcctag gcatcgagcg aagccc	36
<210> 30	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 30	
cccaagctta tgagcagcac ggatcagggg	30
<210> 31	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 31	
ataagaatgc ggccgctcac ttcgcgactc ccaagatac	40
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 32  
 atgagctcat gtctaactg cagga 25  
 <210> 33  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 33  
 ccgctcgaga tcatgatgct ggcttatcag attcag 36  
  
 <210> 34  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 34  
 atgagctcat gaaaacggga tctga 25  
 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 35  
 ttctcgagtc atgatttcgc tcccg 25  
 <210> 36  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 36  
 ggaagatctc aaaaaacccc tcaagaccg tta 34  
  
 <210> 37

<211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 37  
 gcattcctgc attagggttaa tacgactcac tataggggaa ttgtg 45  
 <210> 38  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 38  
 ccggcaccgg cgcaaaaaac ccctcaagac cgttta 37  
 <210> 39  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 39  
 catggcatgc ttaatacgac tcaatatagg ggaattgtg 39  
  
 <210> 40  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 40  
 catggcatgc caaaaaaccc ctcaagacc gtta 35  
 <210> 41  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 41  
 ggaagatcct taatacgact cactataggg gaattgtg 38