



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051889
(43) 공개일자 2020년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) *C12P 7/18* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0134521

(22) 출원일자 2018년11월05일

심사청구일자 2018년11월05일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호

나정결

서울특별시 마포구 모래내로1길 20 KCC상암스튜디오380 1526호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

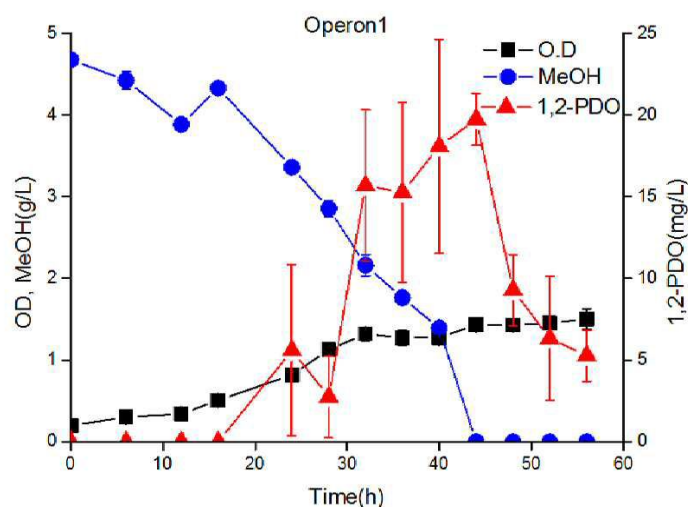
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 메틸영양세균을 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물 및 그의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 메틸영양세균을 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물 및 그의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하지 못하는 메틸영양세균에 생합성 경로를 구축하여 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하므로, 이를 효과적으로 1,2-프로필렌글라이콜의 생산에 이용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Y 101/01006 (2013.01)

C12Y 101/01077 (2013.01)

C12Y 101/01078 (2013.01)

C12Y 101/01283 (2013.01)

C12Y 402/03003 (2013.01)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담동, 삼익아파트)

서교연

충청북도 청주시 서원구 사운로 93 (두산위브더제니스) A-1703

조속형

경기도 고양시 덕양구 백양로 126, 1108동 901호

하선영

경기도 부천시 소사구 안곡로85번길 6, B동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064929

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸글리옥살 합성효소(methylglyoxal synthase; mgsA)를 코딩하는 핵산 서열 및 글리세롤 탈수소효소(glycerol dehydrogenase; gldA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 메틸글리옥살 환원효소(methylglyoxal reductase) 및 락트알데히드 환원효소(lactaldehyde reductase; fucO)를 각각 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

메틸글리옥살 합성효소(methylglyoxal synthase; mgsA)를 코딩하는 핵산 서열 및 글리세롤 탈수소효소(glycerol dehydrogenase; gldA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균(Methylophaga).

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 메틸글리옥살 환원효소(methylglyoxal reductase)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 메틸영양세균.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 락트알데히드 환원효소(lactaldehyde reductase; fucO)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 메틸영양세균.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(Methylobacterium extorquens), 메틸로박테리움 수오미엔스(Methylobacterium suomiense), 메틸로박테리움 플래타니(Methylobacterium platani), 메틸로박테리움 어드헤시BUM(Methylobacterium adhaesivum), 메틸로박테리움 솔라이(Methylobacterium soli) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(Methylobacterium chloromethanicum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 메틸영양세균.

청구항 6

메틸글리옥살 합성효소(methylglyoxal synthase; mgsA)를 코딩하는 핵산 서열 및 글리세롤 탈수소효소(glycerol dehydrogenase; gldA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균을 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 메틸글리옥살 환원효소(methylglyoxal reductase)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 락트알데히드 환원효소(lactaldehyde reductase; fucO)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(Methylobacterium extorquens), 메틸로박테리움 수오미엔스(Methylobacterium suomiense), 메틸로박테리움 플래타니(Methylobacterium platani), 메틸로박테리움 어드헤시BUM(Methylobacterium adhaesivum), 메틸로박테리움 솔라이(Methylobacterium soli) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(Methylobacterium chloromethanicum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인

것인, 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법:

메틸글리옥살 합성효소(methylglyoxal synthase; mgsA)를 코딩하는 핵산 서열 및 글리세롤 탈수소효소(glycerol dehydrogenase; gldA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 메틸영양세균(Methylotroph)을 형질전환하는 형질전환 단계; 및

상기 형질전환된 메틸영양세균을 배양하는 배양 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 메틸글리옥살 환원효소(methylglyoxal reductase)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 락탈알데히드 환원효소(lactaldehyde reductase; fucO)를 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것인, 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(Methylobacterium extorquens), 메틸로박테리움 수오미엔스(Methylobacterium suomiense), 메틸로박테리움 플라타니(Methylobacterium platani), 메틸로박테리움 어드헤시붐(Methylobacterium adhaesivum), 메틸로박테리움 솔라이(Methylobacterium soli) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(Methylobacterium chloromethanicum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메틸영양세균을 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물 및 그의 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 자체적으로 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하지 못하는 메틸영양세균에 생합성 경로를 구축하여 메탄올을 탄소원으로 하여 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1,2-프로필렌글라이콜(propanediol; PDO)은 동결방지, 폴리에스테르 레진(polyester resin), 약제(pharmaceuticals), 화장품(cosmetics), 세제(detergent) 등 다양한 분야의 구성 요소(building block)로 이용되는 물질이다. 이러한 높은 활용가능성으로 인해 미국에서만 연간 1조 lb 이상 판매되며 전세계적으로 수요는 3조 lb/yr 이상으로 추정된다.

[0003] 한편, 대부분의 1,2-PDO는 석유화학공정을 통해서 생산된다. 수증기 분해(Steam cracking) 생산물인 프로필렌(propylene)이 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)로 전환되고 가수분해를 거쳐 최종적으로 1,2-PDO를 생산하기까지 유해한 중간물질과 부산물이 생산된다. 이러한 공정을 보다 지속가능하고 친환경적인 바이오 공정으로 대체하기 위해 다양한 미생물을 이용한 1,2-PDO 생산 시도가 이루어졌다.

[0004] 대표적인 예로는 대장균(Escherichia coli), 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum), 사카로아미스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 클로스트리디움 썬모사카롤리티쿰(Clostridium thermosaccharolyticum) 등이 있고 대부분 글루코스(glucose)나 글리세롤(glycerol) 등 당(sugar)을 기질로 이용하였다.

[0005] 당은 그 가격이 계속 상승하고 있으며 식량문제를 야기시킨다는 단점으로 당을 대체할 수 있는 원료에 대한 요구와 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 메탄올은 메탄이 주성분인 셰일가스나 바이오 가스에서 합성 가능한 물질로 이전부터 주목받아 왔으며 당 대비 저렴한 가격으로 경제적이고, 수용액에서 용해도는 무한대에 가까운 정도로 크다.

[0006] 또한 메탄올은 독성을 지니기 때문에 발효 공정상 발생할 수 있는 다른 미생물에 의한 오염을 줄일 수 있으며, 미네랄 배지에 공급되어 기질로 사용되기 때문에 다운스트리밍 공정에서의 비용을 줄일 수 있다. 따라서 메탄올을 탄소원으로 사용할 수 있는 메틸영양세균(methylotroph)을 이용하여 1,2-PDO를 생산하는 균주를 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 메틸로박테리움 엑스토르켄스에 외래 유전자를 도입하여 1,2-프로필렌글라이콜 생합성 경로를 구축한 결과 1,2-프로필렌글라이콜이 생산되는 것을 확인하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하고, 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 18로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균(Methylotroph)을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균을 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법이다:

[0012] 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 메틸영양세균(Methylotroph)을 형질전환하는 형질전환 단계; 및

[0013] 상기 형질전환된 메틸영양세균을 배양하는 배양 단계.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 1,2-프로필렌글라이콜 생합성 경로가 관련 유전자의 도입으로 유도된 메틸영양세균의 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 메틸영양세균을 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물 및 그의 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 메탄올을 탄소원으로 하여 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하는 방법을 나타낸다.

[0016] 본 발명자들은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(Methylobacterium extorquens)에 외래 유전자를 도입하여 1,2-프로필렌글라이콜 생합성 경로를 구축한 결과 1,2-프로필렌글라이콜이 생산되는 것을 확인하였다.

[0017] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0018] 본 발명의 일 양태는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하고, 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 18로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 재조합 벡터이다.

[0019] 서열번호 2는 디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate; DHAP)를 메틸글리옥살(methylglyoxal; MG)로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 합성효소(synthase)인 mgsA 코딩 핵산 서열이고, 서열번호 5는 하이드록시아세톤을 1,2-PDO로 전환하는 효소인 글리세롤 탈수소효소(dehydrogenase)인 gldA 코딩 핵산 서열이므로, MG를 하이드록시아세톤으로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 환원효소(reductase)를 코딩하는 서열번호 3으로 표시되는 ydjG 코딩 핵산 서열 또는 서열번호 4로 표시되는 yqhD 코딩 핵산 서열을 추가적으로 포함하게 되는 경우 상기 재조합 벡터를 이용하여 하이드록시아세톤 경로를 발현시킬 수 있고, 서열번호 18로 표시되는 락트알데히드를 1,2-PDO로 전환하는 효소인 락트알데히드 환원효소인 fucO 코딩 핵산 서열을 추가적으로 포함하게 되는 경우 상기 재조합 벡터를 이용하여 L-락트알데히드 경로를 발현시킬 수 있다.

[0020] 상기 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9,

pUC6, pBD9, pH79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ △z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0021] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0022] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL^λ 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0023] 본 발명의 일 예에서, 재조합 벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다.
- [0024] 상기 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 원핵세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0027] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0028] 상기 재조합 벡터는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균(*Methylotroph*)이다.
- [0030] 본 명세서상의 용어 "메틸영양세균"은 메탄이나 메탄올과 같은 환원성 일원자 탄소분자를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다.
- [0031] 상기 재조합 벡터는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 재조합 벡터는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 재조합 벡터는 서열번호 18로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는

것은 아니다.

- [0034] 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*), 메틸로박테리움 수오미엔스(*Methylobacterium suomiense*), 메틸로박테리움 플라타니(*Methylobacterium platani*), 메틸로박테리움 어드헤시붐(*Methylobacterium adhaesivum*), 메틸로박테리움 솔라이(*Methylobacterium soli*) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(*Methylobacterium chloromethanicum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 메틸영양세균을 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물이다.
- [0036] 상기 재조합 벡터는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 재조합 벡터는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 재조합 벡터는 서열번호 18로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스, 메틸로박테리움 수오미엔스, 메틸로박테리움 플라타니, 메틸로박테리움 어드헤시붐, 메틸로박테리움 솔라이 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 1,2-프로필렌글라이콜의 생산 방법이다:
- [0041] 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열 및 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 메틸영양세균(*Methylotroph*)을 형질전환하는 형질전환 단계; 및
- [0042] 상기 형질전환된 메틸영양세균을 배양하는 배양 단계.
- [0043] 상기 재조합 벡터는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 재조합 벡터는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 재조합 벡터는 서열번호 18로 표시되는 핵산 서열을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 메틸영양세균은 메틸로박테리움 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*), 메틸로박테리움 수오미엔스(*Methylobacterium suomiense*), 메틸로박테리움 플라타니(*Methylobacterium platani*), 메틸로박테리움 어드헤시붐(*Methylobacterium adhaesivum*), 메틸로박테리움 솔라이(*Methylobacterium soli*) 및 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(*Methylobacterium chloromethanicum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명은 메틸영양세균을 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산용 조성물 및 그의 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하지 못하는 메틸영양세균에 생합성 경로를 구축하여 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하므로, 이를 효과적으로 1,2-프로필렌글라이콜의 생산에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 본 발명의 1,2-PDO 생합성 경로를 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 도입 유전자 없이 벡터만으로 형질도입한 메틸로박테리움 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*) AM1로부터의 1,2-프로필렌글라이콜 생산량을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 메틸로박테리움 엑스토르켄스 AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA로부터의 1,2-프로필렌글라이콜 생산량을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 메틸로박테리움 엑스토르켄스 AM1::pMEV::mgsA::ydhG::gldA로부터의 1,2-프로필렌글라이콜 생

산량을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 메틸로박테리움 엑스토르켄스 AM1::pMEV::mgsA::gldA::fuc0로부터의 1,2-프로필렌글라이콜 생 산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위 한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 1,2-프로필렌글라이콜 생합성 경로 구축

제조합 호스트(Host)로는 메탄올을 탄소원으로 이용 가능하며 대사 작용이 알려져 있고 유전자 조작 틀이 개발 되어 있는 메틸로박테리움 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*) AM1을 사용하였다. *M. extorquens* AM1 wild type은 1,2-PDO를 생산하지 못해 외래 유전자를 도입하여 1,2-PDO 생합성 경로를 도 1과 같이 구축하였다. 파란색으로 표시한 화살표가 도입한 경로를 나타낸다.

1,2-PDO 생산경로는 하이드록시아세톤(hydroxyacetone)을 거치는 경로와 L-락트알데히드(lactaldehyde)를 거치 는 경로 두 가지 종류가 있다. 어느 경로가 더 1,2-PDO 생산에 적합한지 확인하기 위해 하이드록시아세톤을 거 치는 경로를 지닌 제조합 균주 2종과 L- 락트알데히드를 거치는 경로를 지닌 제조합 균주 1종 그리고 대조군 (control) 균주 1종(*M. extorquens* AM1::pMEV)을 제작하였다.

실시예 2: 하이드록시아세톤 경로를 지닌 제조합 균주의 제조

하이드록시아세톤을 거치는 경로는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래의 디하이드록시아세톤 포스페 이트(dihydroxyacetone phosphate; DHAP)를 메틸글리옥살(methylglyoxal; MG)로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 합성효소(synthase)를 코딩하는 mgsA 유전자, 대장균(*Escherichia coli*) 유래의 MG를 하이드록시아세톤으로 전 환하는 효소인 메틸글리옥살 환원효소(reductase)를 코딩하는 yqhD 또는 ydjG 유전자, 대장균 유래의 하이드록 시아세톤을 1,2-PDO로 전환하는 효소인 글리세롤 탈수소효소(dehydrogenase)를 코딩하는 gldA 유전자를 pMEV 벡 터에 도입하고 이 벡터를 이용하여 과발현하였다. 개발한 균주 2종은 *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA 및 *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::ydjG::gldA이다.

관련 벡터의 서열정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

서열 번호	1
명칭	pMEV 벡터 핵산 서열

서열	gacccctttccgacgctcaccgggctgggtgccccgcgcgctgggctggcggcgctctatggccctgcaaacgcccagaaacgcgctcgaagccg tgtgcgagacaccgcggccgcccggcttgtggatacctgcggaaaaacttggccctcactgacagatgagggcgagcgttgacacttgaggggc cgactcaccggcgccggcttgacagatgaggggcaggctcgatttcggccggcgacgtggagctggccagcctcgaaatcggcgaaaacgcct gattttacgcgagtttccacagatgatgtggacaagcctggggataagtgcctgcggtatgacacttgagggcgcgactactgacagatga ggggcgcgatccttgacacttgaggggcagagtgtgacagatgagggcgcacctatgacatttgaggggctgtccacaggcagaaaatccag catttgcaagggttccgcccgttttccggccaccgctaacctgtcttttaacctgttttaaccaatatattataaaccttgttttaaccagg gctgcgcccctgtgcgcgtgaccgcgcacgcgaaggggggtgcccccttctcgaacctcccggcccgtaacgggggctcccatccccca ggggctgcgcccctcgccgcgaacggcctcaccacaaaatggcagccaagctgaccacttctgcgctcgcccttccggctggctgggtttat gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctgcggtatcatgacgaccagctactgaccccgtagaaaagatcaaggatcttcttgagat ccttttttctgcgcgtaatctgctgttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtgggtttgtttgcgggatcaagagctaccaactcttt tccgaaggtaacctggcttcagcagagcgagataccacaaatctgtccttctagttagccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcac cgctacataacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgtgcccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggttgagctcaagacgatagtta ccggataggcgacgagcgtcgggctgaacggggggttctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcg tgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaaaggcgaggtatccggtaagcggcagggctcggaacgagagcgacgacgagggagc ttccagggggaacgcctggatctttatagtcctgtcggggttccgacactctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcg agcctatggaaaaacgcagcaacgcggccttttacgggttctggccttttctgtggcctttgtctcacatgtcttctctgcgttatccctga ttctgtggataaacgtagcatgctgtgacgacaacggtgcatgggtcccggccccgggtcaagacgatgccaatagcttgcgacactacgcttg gcacttttagaattgccttatcgtcctgataagaaatgtccgaccagctaaagacatcgcgctcaatcaagcctagaaaaataggcgaaggga cgctaatgggccccttcacacagaggagagacagcgaattctggtaacctctagactatcgactagtggtaacctctgcagaagcttccggagctc ttaagccagccccgctgctcccggcatccgcttacagataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccccttctgtttatacaagccctccagg ggagatcgctggatccttagatctaggcctgaatcgccccactcagccagaaaagttagggagccacggttgatcagagactttgtttaggtg gaccagttagtgattttgaacttttctgttccacggaaacggtctgcgttgcgggaagatgcgtgatctgatcctcaactcagcaaaagtctg attttatcaacaaagccgctcccgtcaagtacgctaatgctctgcccagtgtaacaacaaataaccaattctgatagaaaaactcatcgag catcaaatgaaactgcaatttatctatcaggttatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccgagggc agttccataggatggcaagatcctggatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttccctcgtcaaaaataagg ttatcaagtgagaaatcacatgagtacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgcatttcttccagacttgttcaacaggccagcc attacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaacaaaccgttatctatcgtgatgcgctgagcgagacgaaatacgcatcgctgttaaaag gacaattacaacacaggaatcgaatgcaaccggcgacggaacactgcccagcgcatcaacaatttttccactgaatcaggatattcttctaatacc tggaaatgctgttttccggggatcgagtggtgagttaacctgcatcatcaggagtagggataaaatgcttgatggtaggaagaggcataaatc cgtcagccagttagtctgacctctcatctgtaacatcattgcaacgctacctttgcatgtttcagaacaaactctggcgcatcgggcttcc catacaatcgatagattgtcgacctgatgcccagacattatcgcgagccatttataccatataaatcagcatccatgttggaaattaatcgc ggcctcgagcaagacgtttcccgtgaaataggctcataaacccccttctgtattactgtttatgtaagcagacagttttatgttcatgatgat atttttatcttgtcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggcttccccccccccctgcaggctccgacacggggatggatggcgtt cccgatcatggtcctgcttgccttccgggtggcatcggaatgccggcgctgcaagcaatgttgtccaggcaggtggatgaggaacgtcaggggcagc tgcaaggctcactggcgcgctcaccagcctgacctcgctgagccactcctctcagggcgatctcgggcttctataaacaacgtggaaac gggtgggcatggattgcaaggcgtgcccctctacttgccttgccttgcggcgctgcgtcgcgggcttggagcggcgaggggcaacgagccgatcg ctgatcgtggaacgataggcctatgccatcggggtcaaggcgacttccggcaagctatacgcccctagaattgtcaatttttaactcctctgttt atcggcagttcgttagagcgcgccgtgctgcccagcgatctgagcgaagcaagtgctcgagcagtgcccgttcttctgaaatgccagttaa gcgctggctgctgaacccccagccggaactgacccacaaaggcctagcgtttgcaatgcaccaggtcatcatgaccaggcgctgttccaccag gcccgtgctcgcaactcttcgaggcttcgcccagctgctcgccgcaacttcttccgcccgggtggaatccgatccgcacatgaggcggaaggttt ccagcttgagcgggtacggctcccgtgagcgtgaaatagtcgaacatccgtcgggccgtcgccgacagcttgccgtacttctcccatagaa ttcgtgtagtggctcgcaacacagcacgacgatttcctcgctgcatcaggactggcaacgggacgttttcttggccaggttcaggacgaggaa gcccgtcgagcagcgacacagcttccaggtgcccacgcggtcgagcgtgaagcccatcgccgtcgcccttgaggcgacagggcatcttccgct tcgtgtaataccggccatgatcgaccagcccaggtcctggcaagctcgtagaacgtgaaggtgatcggtcgcgatagggtgaggttgcgct tactccaacacctgctgccacaccagttcgtcatcgtcgcccgcagctcgacgcccgtgtaggtgatcttccagctccttgtgacgtggaat gaccttgttttgacgagcctcgcgcgggattttcttgttgcgctgggtgaacagggcgagagcgggccgtgtcgtttggcatcgctcgcatcgtgt ccggccacggcgcaatcgaacaaggaaagctgcatttccttgatctgctgcttctgtgtttcagcaacgcggcctgcttggcctcgctgacc tgttttgccaggtcctcgccggcggttttctgcttcttggtcgtcatagtctcgcgtgtcgatggatcgacttcgcaaacctgcccctc ctgttcgagacgacgcaacgctccacggcgccgatggcggggcaggggagggggagccagttgcacgtgtcgccctcgatcttggccgtag cttgcgtggaccatcgagccgacggactggaaggtttcgcgggcgccacgctgacggtgaggttgcggttgcgcatcctcgccggaat cccgcgtcgatcagttcttgcctgtatgcttccggtcaaacgtccgatctatcaccctccttgcgggatgccccgactcacgcccgggcaat gtgcccttatctgatttgaccgcctggtgcttgggtccagataatccaccttatcggaatgaagtcggtcccgtagaccgttggccgt ccttctcgtacttggatccgaatcttgcctgcacgaataccagctccggaagtcgctcttcttgatggagcgcatggggagctgcttggca atcacgcgacccccggccgttttagcggttaaaaaagtcatggcttgcctcgggcggaaccagcccatcatgaccttgcgaagctcgtcct gcttctcttgatcttcgccagcaggcgagggatcgtggcatcaccgaaccgcccgtgcgagggtcgtcggtgagccagagtttcagcaggccg cccaggcgccaggtcgccattgatcgggccagctcgcgagctgctcatagtcacgacgcccgtgattttagccctggccgacggccag caggtaggcctacaggtcatgcccggcgccgcccctttctcaatcgctcttcttctgttgcgagcagtagaccttgataggtgggtgc ccttctggttggcttgggttcatcagccatccgcttgcctcatctgttacgcccgggtagccggccagcctcgagagcaggtatcccgttg agcaccgcccaggtgcaataggagcagtgagaaggaacaccgctcgcggtgggctacttacctatcctgccgggtgacgcccgttggat acaccaaggaaagtctacacgaacctttggcaaaatcctgtatctgtgcgaaaaaggatggataccgaaaaatcgctaatgacccga agcaggggttatgcagcggaagatccgtc
----	--

[0059]

관련 유전자의 서열정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

서열 번호	명칭	서열
2	mgsA 코딩 산 서열	ATGAAAATGCTTTGATCGCGCATGACAAGAAAAACAGGATATGGTCAATTTACGACTGCCTATCGGGATATTTAAAGAA TCATGATCTATACGCAACCGGAACACAGGGTTGAAAATTCATGAGGCGACAGGTCTTCAAATGAACGTTTTCAATCCGGCC CTTAGGGGGAGACCAGCAAATCGGTGCACTGATCGCTGCCAATGCACTCGATCTTGTATTTTTTGCAGCGACCCGCTGACC GCGCAGCCGCATGAACCGGATGTCGCGCATTAATCCGTTTATGTGATGTGATTCCATTCCGCTCGCCACAAATATGGGTAC TGGGAAATTTCTGTGCGCACACTTGATGAAGGTGTTTTCAATTCGCTGACCTTCTTCGGGGAGAAGAGCCGAATGTATAA
3	ydjG 코딩 산 서열	ATGAAAAAGATACCTTTAGGCACAAACGGATATTACGCTTTCGCGAATGGGGTTGGGGACATGGGCCATTGGCGCGGTCTGC ATGGAATGGCGATCTCGATCGGCAAAATATGATTGATACGATTCTTGAAGCCCATCGTTGTGGCATTAAATCTGATTGATACTG CGCCAGGAATATAACTTTGGCAATAGTGAAGTTATCGTCGGTCAGGCGTTAAAAAACTGCCCGTGAACAGGTGTGACTAGAA ACCAAATGCGGCATTGTCTGGGAACGAAAAGAGTTTATTAACAAGTTGGCGATCGGCAGTTGTATAAAAACTTTCCCC GGAATCTATCCGCGAAGAGGTAGCAGCGAGCTTGCAACGCTCTGGGTATTGATTACATCGATATCTACATGACGCACTGGCAGT CGGTGCGGCCATTTTTTACGCGCATCGCTGAAACTGTGCGAGTGCTTAATGAGTTAAAGTCTGAAGGGAAAATTCGCGCTATA GGCGCTGCTAACGTCGATGCTGACCATATCCGCGAGTATCTGCAATATGGTGAATGGATATTATTAGGCGAAAATACAGTAT CCTCGACCGGGCAATGAAAAACGAACGCTGCCACTATGTCGTGATAATGGCATTGTGGTTACAGGTTTATTTCCCGCTAGAGC AGGGATTGTTGACCGGCACCATCTACTCGTATTACGTTCCGGGCGGCGCTCGGGCAAAATAAGTCTGGTTCCAGCGTGAAAA ATGCTGAAAGTATTGATATGCTTGAACAGTGGCAGCCACTTTGTGCTCGTTATCAGTCAAAATCCCACTCTGGCACTGGC GTGGATATTAACAGAGTATTAACTCCATTCTAGTGGGGCTACTGCACCGGAACAGGTACGCGAAAATGTGCGGCGAC TGAATATCAACTTATCGGATGCAGACGCAACATTGATGAGGGAATGGCAGAGGCCCTGGAGCGTTAA
4	yqhD 코딩 산 서열	ATGAACAACCTTAATCTGCACACCCCAACCCGATTCTGTTTGGTAAAGCGCAATCGCTGGTTTACGCAACAAATTCCTCA CGATGCTCGGTATTGATTACCTACGGCGGCGCAGCGTGAAAAAACCGCGTTCTCGATCAAGTTCTGGATGCCCTGAAAG GCATGGACGTGCTGGAATTTGGCGGTATTGAGCCAAACCCGCTTATGAAACGCTGATGAACGCCGTGAAACTGGTTCCGCGAA CAGAAAGTGACTTTCTGTGCGGTTGGCGCGGTTCTGTACTGGACGCGACCAAAATTTATCGCCGAGCGGCTAACTATCC GGAAAATATCGATCCGTGGCACAATCTGCAACGGGCGGTAAGAGATTAAAGCGCCATCCGATGGGCTGTGTGCTGACGC TGCCAGCAACCGGTTCAAGTCCAAACGCGAGGCGGTTGATCTCCCGTAAACACAGGCGACAGAGGCGGTTCCATTCTGCGC CATGTTACGCGGTATTGCGCGTCTGATCCGTTTATACCTACACCCTGCCGCGCGTCAGGTGGCTAACGGCGTAGTGGA CGCCTTTGTACACACCGTGGAAACAGTATGTTACCAACCGGTTGATGCCAAAATTCAGGACCGTTTCGAGAAGGCATTTTGC TGACGCTAATCGAAGATGGTCCGAAAGCCCTGAAAGAGCCAGAAAATACGATGTGCGCGCCAAACGTCATGTGGGCGGCGACT CAGGCGCTGAACGTTTATTGCGCGTGGCGTACCGCAGGACTGGGCAACGCATATGCTGGGCGACGAACTGACTGCGATGCA CGGTCTGGATCAGCGCAAACTGGCTATCGTCCTGCCTGCACTGTGGAATGAAAAACGCGATACCAAGCGCGCTAAGCTGC TGCAATATGCTGAACGCGTCTGGAACATCACTGAAGGTTCCGATGATGAGCGTATTGACGCGCGGATTGCCGAACCCGCAAT TTCTTTGAGCAATTAGGCGTGCCGACCCACCTCTCCGACTACGGTCTGGACGCGAGCTCCATCCCGGCTTTGCTGAAAAAAT GGAAGAGCAGCGCATGACCAACTGGGCGAAAATCATGACATTACGTTGGATGTCAGCGCGCTATATACGAAGCCGCCGCT AA
5	gldA 코딩 산 서열	ATGGACCGCATTATTCAATCACCGGGTAAATACATCCAGGGCGCTGATGTGATTAATCGTCTGGGCGAATACCTGAAGCCGCT GGCAGAACGCTGGTTAGTGGTGGGTGACAAATTTGTTTTAGGTTTGTCTCAATCCACTGTCGAGAAAAGCTTTAAAGATGCTG GACTGGTAGTAGAAATGCGCGCTTTGGCGGTGAATGTTGCGAAAATGAGATCGACCGCTCTCGTGGCATCGCGGAGACTGCG CAGTGTGGCGCAATTTCTCGGTATCGGTGGCGGAAAAACCTCGATACTGCCAAAGCACTGGCACATTTTCATGGGTGTTCCGGT AGCGATCGCACCAGCTATCGCTCTACCGATGCACCGTGCAGCGCATTGTCTGTTATCTACACCGATGAGGGTGAGTTTGACC GCTATCTGCTGTGCGAAATAACCGCAATATGTCATTGTCGACACCAAAATCGTCGCTGGCGCACCTGCACGCTGTTAGCG GCGGGTATCGCGATGCGCTGGCAACCTGGTTTGAAGCGCGTGCCTGCTCTGATGCGCGCGACACCATTGGCGGGCGGCAA GTGACCCAGGCTGCGCTGGCACTGGCTGAACGTGTGCTAACACCCCTGCTGGAAGAAGGCGAAAAAGCGATGCTGTGCTGCCG AACAGCATGTAGTACTCCGCGCTGGAGCGCGTGATTGAAGCGAACACCTATTGAGCGGTGTTGGTTTTGAAAGTGGTGGT CTGGCTGCGGCGCACGAGTGCATAACCGCTGACCGCTATCCCGGACGCGCATCACTATTATCACGCTGAAAAAGTGGCATT CGGTACGCTGACGCGAGCTGGTTCTGAAAAATGCGCGGTGGAGGAAATCGAAACCGTAGCTGCCCTTAGCCATGCGGTAGGTT TGCCAATAACTCTCGCTCACTGGATATTAAGAAGATGTCCCGCGGAAAATGCGAATTGTGGCAGAAGCGGCATGTGCAGAA GGTGAACCAATTCACAACATGCTGGCGCGCGACGCCAGATCAGGTTTACGCGCTCTGCTGGTAGCCGACAGTACGGTCA GCGTTTCTGCAAGAGTGGGAATAA

균주 제작은 Infusion 효소를 이용하여 클로닝(Multi-insert Cloning)하였으며 제한효소로는 EcoRI과 SacI을 이용하였다. *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA 클로닝에 사용한 프라이머는 서열번호 6 내지 11, *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::ydjG::gldA 클로닝에 사용한 프라이머는 서열번호 12 내지 17로, 하기 표 3과 같다. 밑줄 친 서열은 리보솜 결합부위(ribosome binding site; RBS)이다.

표 3

서열 번호	명칭	서열
6	정방향 프라이머 1	GAGAGACAGCGAATTCGCCGAGGGGAATCCCAAAGGCCAGGTATTTATGAAAATTGCTTTGATCGC
7	역방향 프라이머 1	TGGGTCTATTGGGAGTTATACATTCGGCTCTTCTCCC
8	정방향 프라이머 2	CTCCCAATAGACCCAAAGCGGTAGAGAAATGAACAACTTTAATCTGCACACCC
9	역방향 프라이머 2	TTGCGCTTAGTTGCCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATA
10	정방향 프라이머 3	GGCAACTAAGCGCAAAGATCGAGGTAATAAATGGACCGCATTATTCAATCA

11	역방향 프라이머 3	CGGGGCTGGCTTAAGAGCTCTTATCCCACTCTTGCAGGAA
12	정방향 프라이머 1	GAGAGACAGCGAATTCCCGCGAGGGAATCCCAAAGGCCAGGTATTTATGAAAATTGCTTTGATCGC
13	역방향 프라이머 1	CTATATGGTATCCTTTTTTTTCCGATTATACATTCGGCTCTTCTC
14	정방향 프라이머 2	TCGGAAAAAAGGATACCATATATGAAAAAGATACCTTTAGGCACAAC
15	역방향 프라이머 2	TTTTTTTTTCTCCCTACTGCGAGCCTTAACGCTCCAGGGCCTC
16	정방향 프라이머 3	GGCTCGCAGTAGGGAGAAAAAAGGGGGCGAGGTATATTATGGACCGCATTATTCAATCA
17	역방향 프라이머 3	CGGGGCTGGCTTAAGAGCTCTTATCCCACTCTTGCAGGAA

실시예 3: L-락트알데히드 경로를 지닌 재조합 균주의 제조

L-락트알데히드를 거치는 경로는 디하이드록시아세톤 포스페이트를 메틸글리옥살로 전환하는 효소인 메틸글리옥살 합성효소를 코딩하는 *mgsA* 유전자, MG를 L-락트알데히드로 전환하는 효소인 글리세롤 탈수소효소를 코딩하는 *gldA* 유전자, 대장균 유래의 L-락트알데히드를 1,2-PDO로 전환하는 효소인 락트알데히드 환원효소를 코딩하는 *fucO* 유전자를 pMEV 벡터에 도입하고 이 벡터를 이용하여 과발현하였다. 개발한 균주 1종은 *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::gldA::fucO와 같다.

관련 유전자의 서열정보는 하기 표 4와 같다.

표 4

서열 번호	명칭	서열
18	fucO 코딩 핵산 서열	ATGATGGCTAACAGAATGATTCTGAACGAAACGGCATGGTTTGGTCGGGTGCTGTTGGGGCTTTAACCGATGAGGTGAAACGCCGTGGTTATCAGAAGGCGCTGATCGTCACCGATAAAACGCTGGTGCAATGCGGCGTGGTGGCGAAAAGTGACCGATAAGATGGATGCTGCAGGGCTGGCATGGGCGATTACGACGCGTAGTGCCCAACCAACAATTACTGTCGTCAAAGAAGGGCTCGGTGTAATCCAGAATAGCGGCGCGGATTACCTGATCGCTATTGGTGGTGGTTCTCCACAGGATACTTGTAAAGCGATTGGCATTATCAGCAACAACCCGGAGTTTGCCGATGTGCGTAGCCTGGAAGGGCTTTCCCGACCAATAAACCCAGTGATCCGATTCTGGCAATTCCTACCACAGCAGGTACTGCGGCAGAGTGACCATTAACCTACGTGATCACTGACGAGAGAGAAACGGCGCAAGTTTGTTCGCTTGATCCGCATGATATCCCGCAGGTGGCGTTTATTGACGCTGACATGATGGATGGTATGCCTCCAGCGCTGAAAGCTGCGACGGGTGTCGATGCGCTCACTCATGCTATTGAGGGGTATATTACCGTGCGCGTGGGCGCTAACCGATGCACTGCACATTAAGCGATTGAAATCATTGCTGGGCGCTGCGAGGATCGGTTGCTGGTGATAAGGATGCGCGAGAGAAATGGCGCTCGGGCAGTATGTTGCGGGTATGGGCTTCTCGAATGTTGGGTAGGGTTGGTGCATGGTATGGCGCATCCACTGGGCGCGTTTATAACACTCCACACGGTGTGCGAACGCCATCCTGTTACCGCATGTCATGCGTTATAACGCTGACTTTACCGGTGAGAAGTACCGCGATATCGCGCGCTTATGGGCGTGAAAGTGAAGGTATGAGCCTGGAAGAGGCGCGTAATGCCGCTGTTGAAGCGGTGTTGCTCTCAACCGTGATGTCGGTATCCCGCCACATTTGCGTGATGTTGGTGTACGCAAGGAAGACATTCGGGCACTGGCGAGGCGGCACTGGATGATGTTGTACCGGTGGCAACCCGCGTGAAGCAACGCTTGAGGATATTGTAGAGCTTTACCATACCGCTGTTAA

균주 제작은 Infusion 효소를 이용하여 클로닝(Multi-insert Cloning)하였으며 제한효소로는 EcoRI과 SacI을 이용하였다. 클로닝에 사용한 프라이머는 하기 표 5와 같다. 밑줄 친 서열은 리보솜 결합부위이다.

표 5

서열 번호	명칭	서열
19	정방향 프라이머 1	GAGAGACAGCGAATTCCCGCGAGGGAATCCCAAAGGCCAGGTATTTATGAAAATTGCTTTGATCGC
20	역방향 프라이머 1	TGGGAATGTACGCGTTTATACATTTCGGCTCTTCTC
21	정방향 프라이머 2	ACGCGTACATTCCTCAAGTCAAAGGAGGTATAGTTATGGACCGCATTATTCAATCA
22	역방향 프라이머 2	CTTTATTGTAATCTTATCCCACTCTTGCAGGAA
23	정방향 프라이머 3	GATTACGAATAAAGGAGGTTTTTTATGATGGCTAACAGAATGATTCTG
24	역방향 프라이머 3	CGGGGCTGGCTTAAGAGCTCTTACCGGCGGTATGGTAAAG

실시예 4: 재조합 균주를 이용한 1,2-프로필렌글라이콜 생산량 확인

실시예 2 및 3에서 제조한 균주들은 500 ml 배플 플라스크에 100 ml의 NMS 배지를 포함하고 30℃, rpm 200의 조건으로 배양하였다. 배지의 조성은 하기 표 6과 같다.

표 6

[0072]

NMS 스탁 용액 조성	Adding amount for ml/1L
MeOH	125mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O Stock	1g
KNO ₃ Stock	1g
CaCl ₂ · 2H ₂ O Stock	0.228g
3.8% (w/v) solution Fe-EDTA	0.0038g
0.1% (w/v) NaMo · H ₂ O	0.0006g
FeSO ₄ · H ₂ O	0.0005g
ZnSO ₄ · H ₂ O	0.0004g
MnCl ₂ · H ₂ O	0.00002g
CoCl ₂ · H ₂ O	0.00005g
NiCl ₂ · H ₂ O	0.00001g
H ₃ BO ₃ (boric acid)	0.000015g
EDTA	0.00025g
KH ₂ PO ₄	0.26g
Na ₂ HPO ₄ · (H ₂ O)	0.62g
Biotin	0.02mg
Folic acid	0.02mg
Thiamine HCl	0.05mg
Ca pantothenate	0.05mg
Vitamin B12	0.001mg
Riboflavin	0.05mg
Nicotiamide	0.05mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	2.5mg

[0073]

M. extorquens AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA(이하 Operon1), *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::ydgG::gldA(이하 Operon2), *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::gldA::fucO(이하 Operon3)의 균주를 배양하여 1,2-프로필렌글라이콜의 생산량을 확인하였다. 대조균은 도입 유전자 없이 벡터만 삽입한 *M. extorquens* AM1::pMEV를 이용하였다.

[0074]

표 7, 도 2 내지 5에서 확인할 수 있듯이, 1,2-PDO 생합성 경로를 삽입한 재조합 균주 3종 모두 1,2-PDO를 생산하였음을 확인하였다.

표 7

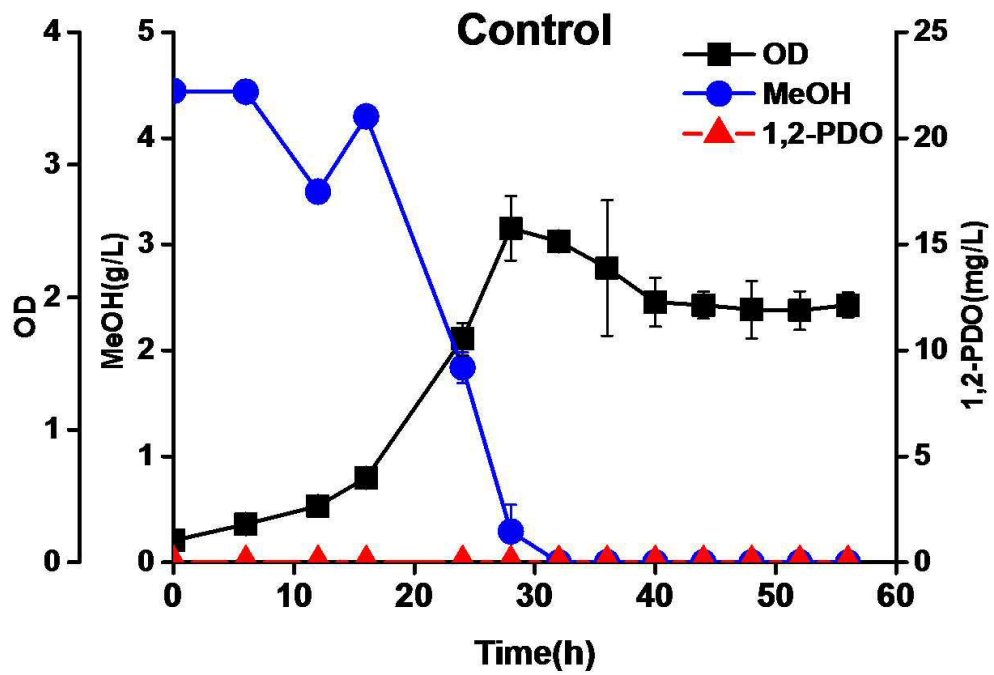
[0075]

	MeOH 소모량	1,2-PDO 생산량
대조균	4.4 g	0 mg
Operon1	4.7 g	19.7 mg
Operon2	4.4 g	0.7 mg
Operon3	4.6 g	1.9 mg

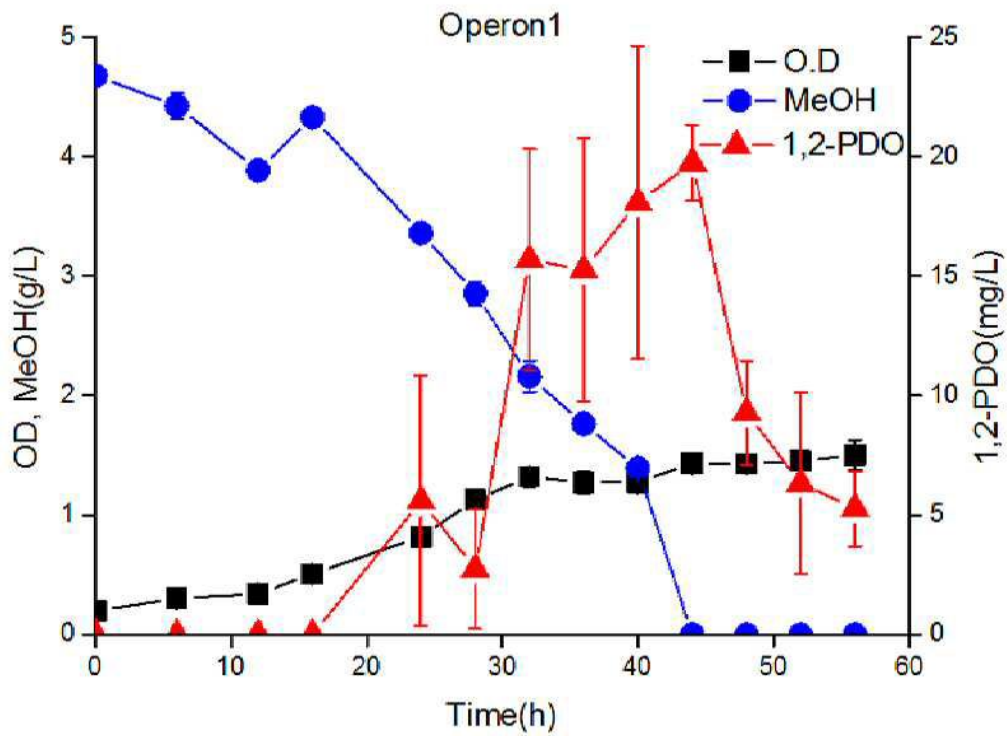
[0076]

특히 *M. extorquens* AM1::pMEV::mgsA::yqhD::gldA 균주가 19.7 mg/L로 가장 높은 1,2-PDO 생산량을 보였으며 최대 1,2-PDO 생산량은 24.6 mg/L이었다.

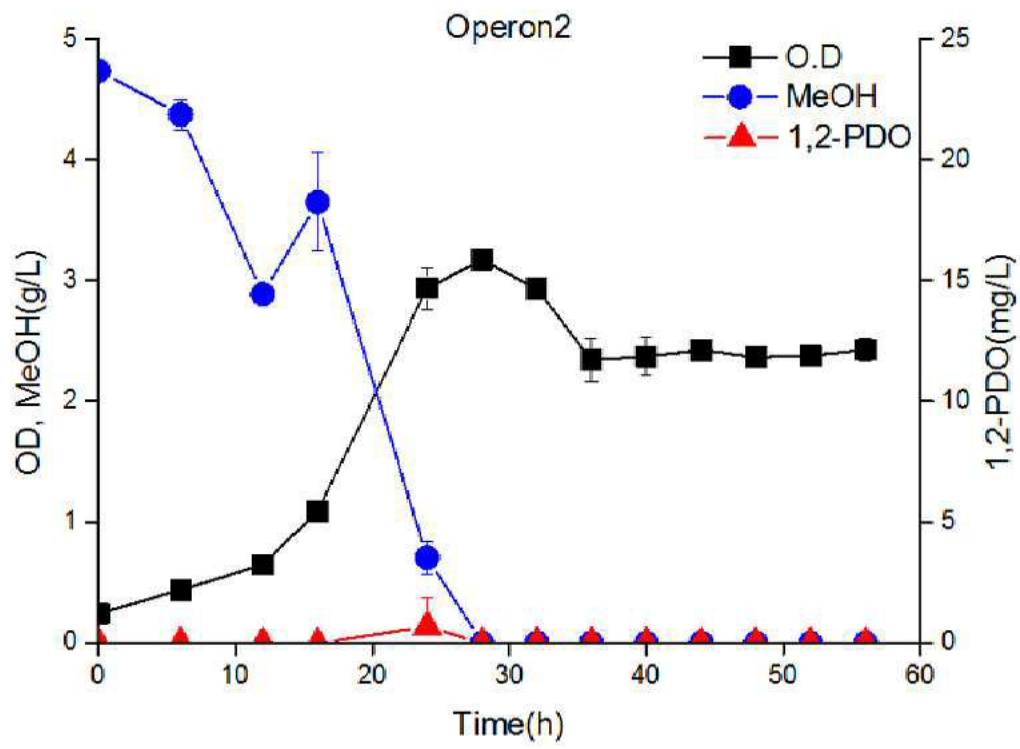
도면2



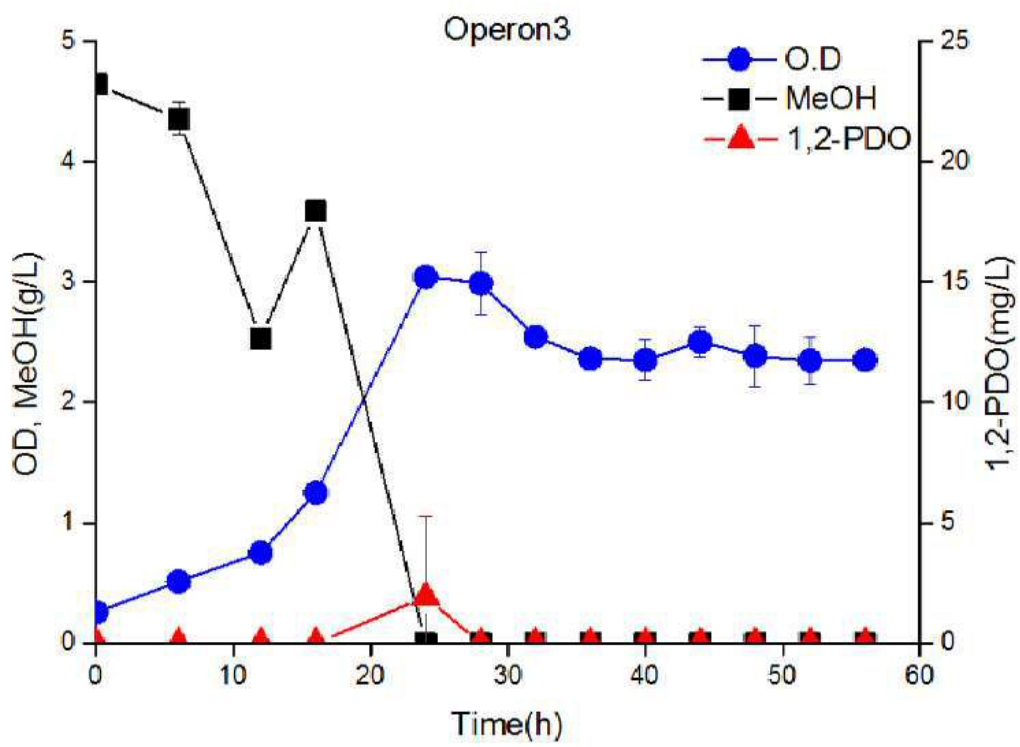
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
 <120> Composition for 1,2-propylene glycol production using
 methylotroph and method for producing thereof
 <130> PN180360
 <160> 24
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 5730
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial sequences
 <400> 1

gaccctttcc gacgctcacc gggctgggtg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg	60
gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc	120
gttgtggata cctcgcgga aacttggccc tctctgacag atgaggggcg gacgttgaca	180
cttgaggggc cgactcacc ggccggcgtg tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc	240
cgccgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt	300
tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgaggg	360
gcgcgactac tgacagatga gggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca	420
gatgaggggc gcacctattg acatttgagg gctgtccac aggcagaaaa tccagcattt	480
gcaagggttt cgcgccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac	540
caatatattat aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc	600
cgaagggggg tgccccctt tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc	660
ccccaggggc tgcgccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agccaagctg	720
accatttctg cgctcgcccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg	780
tgagcgtggg tctcgcggtg tcatctcagc accagtactg acccgtaga aaagatcaaa	840
ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca	900
ccgtaccag cggtgggttg ttgcccggat caagagctac caactcttt tccgaaggta	960
actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc	1020
caccacttca agaactctgt agcaccgct acatacctg ctctgctaata cctgttacca	1080
gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta	1140
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag	1200

cgaacgacct acaccgaact gagataccia cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt	1260
cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc	1320
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac	1380
ctctgacttg agcgtcgatt ttttgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac	1440
gccagcaacg cgcccttttt acggttctcg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc	1500
tttcttgcgt tatccccga tttctgtgat aaccgtagca tgcgttgacg acaacggtgc	1560
gatgggtccc ggccccggtc aagacgatgc caatacgttg cgacactacg ccttggcact	1620
tttagaattg ctttatcgtc ctgataagaa atgtccgacc agctaaagac atcgcgcca	1680
atcaaagcct agaaaatata ggcgaaggga cgctaattggg cccctcacac agaggagaga	1740
cagcgaattc tggtaacctc tagactatcg actagtgggt acctctgcag aagcttccgg	1800
agctcttaag ccagccccgc tgctcccggc atccgcttac agataaaacg aaaggtcag	1860
tcgaaagact gggcctttcg ttttatacaa gcctccagg ggagatgcgt ggatccttag	1920
atctaggcct gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga	1980
gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct	2040
gcgttgtcgg gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagttcg atttattcaa	2100
caaagccgc gtcccgtaaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca	2160
attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caattttatc atatcaggat	2220
tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc	2280
agttccatag gatggcaaga tcctggatc ggtctcgat tccgactcgt ccaacatcaa	2340
tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag	2400
tgacactga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat tttttccag acttgttcaa	2460
caggccagcc attacgtcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaacg ttattcattc	2520
gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaacag	2580
gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatatct tcacctgaat	2640
caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttccggg gatcgagtg gtgagtaacc	2700
atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca	2760
gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgcatgtt	2820
tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt	2880
gcccacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta	2940
atcgcgccct cgagcaagac gtttcccggtt gaatatggct cataacaccc ctgtattac	3000

tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt	3060
aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttccccccc cccctgcag gtccgacacg	3120
gggatggatg gcgttcccga tcatggteet gcttgcttcg ggtggcatcg gaatgccggc	3180
gctgcaagca atgttgtcca ggcaggtgga tgaggaacgt caggggcagc tgcaaggctc	3240
actggcggcg ctaccacgcc tgacctgat cgtcggaccc ctctcttca cggcgatcta	3300
tgcggcttct ataacaacgt ggaacgggtg ggcatggatt gcaggcgctg ccctctactt	3360
gctctgcctg ccggcgctgc gtcgcgggct ttggagcggc gcagggaac gagccgatcg	3420
ctgatcgtgg aaacgatagg cctatgcat gcgggtcaag gcgacttccg gcaagctata	3480
cgcgccctag aattgtcaat tttaatcttc tgtttatcgg cagttcgtag agcgcgccgt	3540
gcgtcccag cgatactgag cgaagcaagt gcgtcgagca gtgcccgtt gtctctgaaa	3600
tgccagtaaa gcgttggtg ctgaaccccc agccggaact gacccacaa ggccctagcg	3660
tttgcaatgc accaggctat cattgacca ggcgtgttcc accaggccgc tgcctcgcaa	3720
ctcttcgcag gcttcgccga cctgtctcgc ccacttcttc acgcgggtgg aatccgatcc	3780
gcacatgagg cggaaggttt ccagcttgag cgggtacggc tcccgggtgc agctgaaata	3840
gtcgaacatc cgtcgggccc tcggcgacag ctgcggtac ttctccata tgaatttcgt	3900
gtagtggtcg ccagcaaaca gcacacgat ttctctctcg atcaggacct ggcaacggga	3960
cgttttcttg ccacggtcca ggacgcggaa gcggtgcagc agcgacaccg attccaggtg	4020
cccaacgcgg tcggacgtga agcccatcgc cgtcgcctgt aggcgcgaca ggcattcttc	4080
ggccttcgtg taataccggc cattgatcga ccagcccagg tccctggcaaa gctcgtagaa	4140
cgtgaaggtg atcggctcgc cgataggggt gcgcttcgcg tactccaaca cctgctgcca	4200
caccagttcg tcatcgtcgc ccgcagctc gacgccgtg taggtgatct tcacgtcctt	4260
gttgacgtgg aaaaatgacct tgttttgcag cgcctcgcgc gggattttct tgttgcgcgt	4320
ggtgaacagg gcagagcggg ccgtgtcgtt tggcatcgtc cgcacgtgt ccggccacgg	4380
cgcaatatcg aacaaggaaa gctgcatttc ctgatctgc tgcctcgtgt gtttcagcaa	4440
cgcggcctgc ttggcctcgc tgacctgttt tgccaggtcc tcgccggcgg tttttcgctt	4500
cttggctcgc atagtctctc gcgtgtcat ggtcatcgac ttcgccaac ctgccctc	4560
ctgttcgaga cgacgcgaac gctccacggc ggccgatggc gcgggcaggg cagggggagc	4620
cagttgcacg ctgtcgcgt cgatcttggc cgtagcttgc tggaccatcg agccgacgga	4680
ctggaaggtt tcgcggggcg cacgcatgac ggtgcggctt gcgatggtt cggcatcctc	4740

ggcggaaaac cccgcgtcga tcagttcttg cctgtatgcc ttccgggtcaa acgtccgatt 4800
cattcacctt ccttgcggga ttgccccgac tcacgccggg gcaatgtgcc cttattcctg 4860
atttgaccgg cctgggtgctt tgggtgtccag ataatccacc ttatcggcaa tgaagtcggt 4920
cccgtagacc gtctggccgt ccttctcgta cttggtattc cgaatcttgc cctgcacgaa 4980
taccagctcc gcgaagtcgc tcttcttgat ggagcgcgat gggacgtgct tggcaatcac 5040
gcgcaccccc cggccgtttt agcggctaaa aaagtcatgg ctctgccctc gggcggacca 5100
cgcccatcat gaccttgcca agctcgtcct gcttctcttc gatcttcgcc agcagggcga 5160

ggatcgtggc atcacgaac cgcgccgtgc gcgggtcgtc ggtgagccag agtttcagca 5220
ggccgcccag gcggcccagg tcgccattga tgcgggccag ctgcgggacg tgctcatagt 5280
ccacgacgcc cgtgattttg tagccctggc cgacggccag caggtaggcc tacaggtca 5340
tgccggccgc cgcgcctttt tectcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg cagtacacct 5400
tgataggtgg gctgcccttc ctggttggct tggtttcatc agccatccgc ttgccctcat 5460
ctgttacgcc ggcggtagcc ggccagcctc gcagagcagg attcccgttg agcaccgcca 5520
ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaac acccgctcgc ggggtgggcct acttcaccta 5580

tcctgcccgg ctgacgccgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc ctttgcaaaa 5640
atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaaa aatcgctata atgaccccga 5700
agcaggggta tgcagcgga aagatccgtc 5730

<210> 2

<211> 414

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

atgaaaattg ctttgatcgc gcatgacaag aaaaaacagg atatggttca atttacgact 60
gcctatcggg atatttttaa gaatcatgat ctatacgcaa ccggaaccac aggggtgaaa 120
attcatgagg cgacaggtct tcaaattgaa cgttttcaat ccggcccttt agggggagac 180

cagcaaatcg gtgcactgat cgctgccaat gactcgcac ttgtcathtt ttgcgcgac 240
ccgtgaccg cgcagccgca tgaaccggat gtctcgcat taatccgttt atgtgatgtg 300
tattccattc cgtcgcacc aaatatgggt actgcggaaa ttcttgtgcg cacacttgat 360
gaagtggttt tcgaattccg tgaccttctt cggggagaag agccgaatgt ataa 414

<210> 3

<211> 981

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atgaaaaaga taccttttagg cacaacggat attacgcttt cgcgaaatggg gttggggaca 60

tgggccattg gcggcgggcc tgcatggaat ggcgatctcg atcggcaaat atgtattgat 120

acgattcttg aagcccatcg ttgtggcatt aatctgattg atactgcgcc aggatataac 180

tttggcaata gtgaagttat cgtcgggtcag gcgttaaaaa aactgccccg tgaacaggtt 240

glagtagaaa ccaaatgcgg cattgtcttg gaacgaaaag gaagtttatt caacaaagtt 300

ggcgatcgcc agttgtataa aaacctttcc ccggaatcta tccgcaaga ggtagcagcg 360

agcttgcaac gtctgggtat tgattacatc gatatctaca tgacgcactg gcagtcggtg 420

ccgccatttt ttacgccgat cgctgaaact gtcgcagtgc ttaatgagtt aaagtctgaa 480

gggaaaattc gcgctatagg cgctgctaac gtcgatgctg accatatccg cgagtatctg 540

caatatggtg aactggatat tattcaggcg aaatacagta tcctcgaccg ggcaatggaa 600

aacgaactgc tgccactatg tcgtgataat ggcattgttg ttcaggttta ttccccgcta 660

gagcagggat tgttgaccgg caccatcact cgtgattacg ttccgggagg cgctcgggca 720

aataaagtct ggttccagcg tgaaaacatg ctgaaagtga ttgatatgct tgaacagtgg 780

cagccacttt gtgctcgta tcagtgcaca attcccactc tggcactggc gtggatatta 840

aaacagagtg atttaatctc cattcttagt ggggctactg caccggaaca ggtacgcgaa 900

aatgtcgcgg cactgaatat caacttatcg gatgcagacg caacattgat gagggaaatg 960

gcagaggccc tggagcgta a 981

<210> 4

<211> 1164

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

atgaacaact ttaatctgca caccceaac cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60

ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120

gtgaaaaaaa cggcggttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180

gaatttggcg gtattgagcc aaaccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240

gttcgcgaac agaaagtac tttcctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc 300

accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccggaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360

caaacggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420

gcaaccggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag	480
caggcggttc attctgccca tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc	540
tacaccctgc cggcgctca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg	600
gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt	660
ttgctgacgc taatcgaaga tggccgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg	720
cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta	780
ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cacgaactga ctgcgatgca cggctcggat	840
cacgcgcaaa cactggctat cgtctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag	900
cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat	960
gagcgatttg acgccgcgat tgccgaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg	1020
accacacctt ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg	1080
gaagagcacg gcatgaccca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttga tgtagccgc	1140
cgatatatac aagccgcccc ctaa	1164
<210> 5	
<211> 1104	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 5	
atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgctgatgt gattaatcgt	60
ctgggcgaat acctgaagcc gctggcagaa cgttggttag tggtaggtga caaatttgtt	120
ttaggttttg ctcaatccac tgctgagaaa agctttaaag atgctggact ggtagtagaa	180
attgcgccgt ttggcggtag atgttcgcaa aatgagatcg accgtctgcg tggcatcgcg	240
gagactgcgc agtgtggcgc aattctcggg atcggtaggc gaaaaaccct cgatactgcc	300
aaagcactgg cacatttcat ggggtgtccg gtagcgatcg caccgactat cgcctctacc	360
gatgcaccgt gcagcgcatg gtctgttata tacaccgatg agggtagagt tgaccgctat	420
ctgctgttgc caaataacct gaatatgggc attgtcgaca ccaaaatcgt cgctggcgca	480
cctgcacgtc tgttagcggc gggatatcgc gatgcgctgg caacctggtt tgaagcgcgt	540
gcctgtcttc gtagcggcgc gaccacatg gcgggcggca agtgcacca ggctgcgctg	600
gcactggctg aactgtgcta caacacctg ctggaagaag gcgaaaaagc gatgcttgct	660
gccgaacagc atgtagtac tccggcgtg gagcgcgtga ttgaagcgaa cacctatttg	720
agcgggtgtg gttttgaaag tgggtgtctg gctgcggcgc acgcagtga taacggcctg	780

accgctatcc cggacgcgca tcactattat cacggtgaaa aagtggcatt cggtagctg 840
acgcagctgg ttctggaaaa tgcgccgtg gaggaaatcg aaaccgtagc tgccttagc 900
catgcggtag gtttgcaat aactctcgt caactggata ttaaagaaga tgtcccgcg 960
aaaatgcgaa ttgtggcaga agcggcatgt gcagaagggtg aaaccattca caacatgcct 1020
ggcggcgcga cgccagatca ggtttacgcc gctctgctgg tagccgacca gtacggtcag 1080
cgtttcctgc aagagtggga ataa 1104

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 6

gagagacagc gaattccgc gaggaattc ccaaaggcca ggtatattat gaaaattgct 60

ttgatcgc 68

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 7

tgggtctatt gggagttata cattcggctc ttctccc 37

<210> 8

<211> 54

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 8

ctcccaatag acccaaaggc ggtagagaaa tgaacaactt taatctgcac accc 54

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400>	9	
ttgcgcttag ttgccttagc gggcggcttc gtatata		37
<210>	10	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	10	
ggcaactaag cgcaaagatc gaggtataa atggaccgca ttattcaatc a		51
<210>	11	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	11	
cggggctggc ttaagagctc ttattccac tcttcagga a		41
<210>	12	
<211>	68	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	12	
gagagacagc gaattccgc gaggaattc ccaaaggcca ggtatattat gaaaattgct		60
ttgatcgc		68
<210>	13	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	13	
ctatatggtat tcttttttt tccgattata cattcggtc ttctc		45
<210>	14	
<211>	49	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 14

tcggaaaaaa aaggatacca tatatgaaaa agataccttt aggcacaac 49

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 15

tttttttttc tcctaactgc gagccttaac gctccagggc etc 43

<210> 16

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 16

ggctcgcagt agggagaaaa aaaaaaaggg ggcgaggtat attatggacc gcattattca 60

atca 64

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 17

cggggctggc ttaagagctc ttattccac tcttcagga a 41

<210> 18

<211> 1152

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 18

atgatggcta acagaatgat tctgaacgaa acggcatggt ttggtcgggg tgctgttggg 60

gctttaaccg atgaggtgaa acgccgtggt tatcagaagg cgctgatcgt caccgataaa	120
acgctggtgc aatgcggcgt ggtggcgaaa gtgaccgata agatggatgc tgcagggctg	180
gcatgggcga ttacgacgg cgtagtgcc aaccaacaa ttactgtcgt caaagaagg	240
ctcgggtgat tccagaatag cggcgcggat tacctgatcg ctattggtgg tggttctcca	300
caggatactt gtaaagcgat tggcattatc agcaacaacc cggagtttgc cgatgtgcgt	360
agcctggaag ggctttcccc gaccaataaa cccagtgtac cgattctggc aattcctacc	420
acagcaggta ctgcggcaga agtgaccatt aactacgtga tcactgacga agagaaacgg	480
cgcaagtttg ttgctgtga tccgatgat atccgcagg tggcgtttat tgacgtgac	540
atgatggatg gtatgcctcc agcgtgaaa gctgcgacgg gtgtcgatgc gctcactcat	600
gctattgagg ggtatattac ccgtggcgcg tgggcgctaa ccgatgcact gcacattaaa	660
gcgattgaaa tcattgtcgg ggcgctgcga ggatcggttg ctggtgataa ggatgccgga	720
gaagaaatgg cgctcgggca gtatgttcg ggtatgggct tctcgaatgt tgggttaggg	780
ttggtgcatg gtatggcgca tccactgggc gcgttttata acactccaca cgggtgtgcg	840
aacgccatcc tgttaccga tgtcatcgt tataacgtg actttaccgg tgagaagtac	900
cgcgatatcg cgcgcgttat gggcgtgaaa gtggaaggta tgagcctgga agaggcgcgt	960
aatgccgtg ttgaagcgtt gtttgcctc aaccgtgatg tcggtattcc gccacatttg	1020
cgtgatgttg gtgtacgaa ggaagacatt ccggcactgg cgcaggcggc actggatgat	1080
gtttgtaccg gtggcaacct gcgtgaagca acgcttgagg atattgtaga gctttacat	1140
accgcctggt aa	1152

<210> 19

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 19

gagagacagc gaattccgc gaggaattc ccaaaggcca ggtattttat gaaaattgct	60
---	----

ttgatcgc	68
----------	----

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400>	20	
tggaatgta cggtttata cattcggtc ttctc		35
<210>	21	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	21	
acgcgtacat tccaagtca aaggaggtat agttatggac cgcattattc aatca		55
<210>	22	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	22	
cctttattcg taatcttatt cccactcttg caggaa		36
<210>	23	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	23	
gattacgaat aaaggaggtt tttttatgat ggctaacaga atgattctg		49
<210>	24	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial sequences	
<400>	24	
cgggctggc ttaagagctc ttaccaggcg gtatggtaaa g		41