(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0151134
(43) 공개일자 2023년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12P 7/625 (2022.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
C12N 9/0071 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0050180
(22) 출원일자 2022년04월22일
심사청구일자 2022년04월22일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남데시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남데시앙포레아파트)
이옥경
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동 402호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)
이장진
경기도 수원시 영통구 매영로 346, 667동 401호 (영통동, 신나무실 건영아파트)
(74) 대리인
위병갑

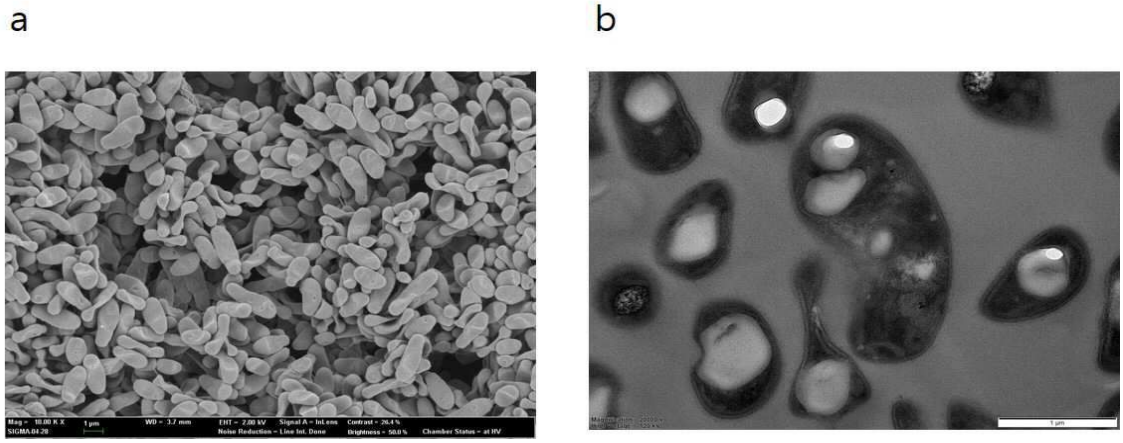
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 메틸로시너스 속 J2 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 메틸로시너스 속 J2 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 메틸로시너스 속(*Methylosinus* sp.) J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주는 저가 탄소기질인 메탄으로부터 생분해성 플라스틱 소재인 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB) 및 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 생산할 수 있으며, 고부가가치 화학물질 및 바이오연료를 생산하는 균주로 널리 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/0073 (2013.01)
C12P 7/625 (2022.01)
C12Y 114/18003 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105541
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 7로 표시되는 16S rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 8로 표시되는 미립자 메탄모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase alpha subunit, pmoA) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 9로 표시되는 가용성 메탄모노옥시게나제 수산화효소 알파 소단위체(soluble methane monooxygenase hydroxylase component alpha subunit, mmoX) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 하수슬러지, 지하수, 공업용수, 늪지, 축사, 연못 폐수 및 하수로 이루어진 군으로부터 분리된 것인, J2 균주.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 균주는 하수 슬러지로부터 분리된 것인, J2 균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 균주는 메탄으로부터 생분해성 플라스틱인 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)를 합성하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 균주는 메탄으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 합성하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 균주는 메탄으로부터 3-하이드록시부틸레이트(3-hydroxybutyrate) 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate) 공중합체를 합성하는 것을 특징으로 하는, J2 균주.

청구항 10

제1항의 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물을 유효성분을 포함하는 생분해성 폴리머 생산용 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 생분해성 폴리머는 폴리하이드록시부틸레이트 또는 PHA 공중합체를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 PHA copolymer는 3-하이드록시부틸레이트(3-hydroxybutyrate) 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate)의 공중합체 것인, 조성물.

청구항 13

제1항의 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물에서 폴리하이드록시부틸레이트 또는 PHA 공중합체를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 플라스틱 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 메틸로시너스 속 J2 균주 및 이의 용도의 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메탄은 온실가스의 주요 성분으로 대기 중 메탄은 이산화탄소보다 적지만 지구온난화 지수는 이산화탄소 대비 84배 강력하다. 지난해 대기 중 메탄 농도 1895.7ppb로 40년 측정 이래 사상 최고의 증가율을 보였으며 이는 산업화 이전보다 약 160배 높은 수치이다. 다른 한편으로, 메탄은 바이오 가스와 천연가스의 주요 성분으로 풍부하고 저렴한 차세대 탄소 자원으로 평가받고 하다. 따라서, 지구 온난화 방지 및 탄소 저감 대책, 저가 탄소원의 고부가가치화를 위하여 메탄 전환 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 기존의 메탄의 화학적 전환은 에너지 집약적인 고온, 고압 조건의 공정 작업이 필요하기 때문에 안전성의 문제와 낮은 수율, 높은 공정비용으로 인한 막대한 설비 투자비가 요구된다는 한계점을 가지고 있다.

[0004] 메탄을 유일한 탄소 및 에너지원으로 활용할 수 있는 메탄자화균을 활용한 메탄의 생물학적 전환이 새로운 대안으로 제안되고 있다. 메탄자화균은 상온·상압의 조건에서 메탄을 유기산, 알코올 등의 고부가가치 산물로 전환할 수 있어, 미국, 유럽, 중국 그리고 우리나라 등에서 활발한 연구가 진행 중이다. 그러나, 많은 연구자의 노력에도 불구하고, 1906년 Sohngen에 의해 처음 분리된 후 현재까지 학계에 보고된 메탄자화균의 종류는 60종에 불과하다.

[0005] 특히, 유형 II 메탄자화균은 메탄으로부터 생분해성 폴리머인 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)를 생산하는 것으로 알려져 있으나, 폴리하이드록시부틸레이트는 결정성이 높고 부서지기 쉬워 생분해성 플라스틱 소재로 활용되는데 한계가 있다. 이러한 단점을 개선하기 위하여, 구성 단량체를 추가로 제공하여 물성이 개선된 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 개발하려는 연구들이 활발히 진행 중이다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 메탄를 이용하여 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)와 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 보다 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 메탄가스가 지속적으로 생성되는 하수 슬러지로부터 신규 균주인 메틸로시너스 속(*Methylosinus* sp.) J2 균주를 분리·동정하였고, 상기 J2 균주가 메탄 유래의 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB) 또는 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 생산하는 것을 확인하였다.

[0007] 본 발명은 최근 폐플라스틱으로 인해 야기되는 해양오염, 플라스틱이 태양 복사에 노출될 때 발생하는 메탄 및

에틸렌과 같은 온실가스 배출 문제와 같은 환경오염 문제를 해결할 수 있는 새로운 기술이 될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물을 유효성분을 포함하는 생분해성 폴리머 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물에서 폴리하이드록시부틸레이트 또는 PHA 공중합체를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 플라스틱 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물을 유효성분을 포함하는 생분해성 폴리머 생산용 조성물을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물에서 폴리하이드록시부틸레이트 또는 PHA 공중합체를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 플라스틱 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 메틸로시너스 속(*Methylosinus* sp.) J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주는 저가 탄소원인 메탄으로부터 메탄 유래의 생분해성 플라스틱인 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)와 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 생산하고, 유기산 및 알코올 등의 화학물질 및 바이오연료 등을 생산하는 균주로 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 형태학적 특성을 전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 2a는 본 발명의 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주를 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 계통분류를 나타낸 도이다.

도 2b는 본 발명의 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주를 미립자 메탄 모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase alpha subunit, pmoA) 유전자의 염기서열을 이용한 계통분류를 나타낸 도이다.

도 2c는 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주를 가용성 메탄 모노옥시게나제 수산화효소 알파 소단위체(soluble methane monooxygenase hydroxylase component(MMOH) alpha subunit, mmoX) 유전자의 염기서열을 이용한 계통분류를 나타낸 도이다.

도 3은 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 질소원의 종류 및 구리 농도에 따른 세포 성장을 나타낸 그래프로써, 질소원으로 질산염과 암모늄 사용 시, J2 균주의 세포 성장 곡선을 나타낸 도이다.

도 4a는 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 질산염 환경에서 코발트 조건에 따른 성장 곡선을 나타낸 도이다.

도 4b는 메틸로시너스 속 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 질산염 환경에서 코발트 농도에 따른 폴리하이드록시부틸레이트 (PHB) 축적량 비교를 나타낸 도이다.

도 5a는 가스크로마토그래피 질량분석기로 분석한 크로마토그램에서 3-하이드록시부틸레이트 (3-

hydroxybutylate, 3HB)와 3-하이드록시발러레이트 (3-hydroxyvalerate, 3HV) 피크를 나타낸 도이다.

도 5b J2 균주를 이용하여 메탄으로부터 생합성된 3-HV를 질량분석기를 통해 매스 프래그멘테이션 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0017] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0018] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 모든 기술 용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0020] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(Methylosinus sp.) J2 균주를 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어, "메틸로시너스 속(Methylosinus sp.) J2 균주"는, 하수 슬러지로부터 유래되고, 종래에 보고되지 않았던 메틸로시너스 속(Methylosinus sp.)에 속하는 균주로서, 2022년 3월 3일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하고, 기탁번호 KCTC 14888BP 를 부여받은 균주를 의미한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 본 발명자들은 메탄을 유일 탄소원으로 사용하여 다양한 화학물질 및 PHB 생산에 적합한 균주를 발굴하기 위하여, 메탄가스가 지속적으로 발생하는 하수슬러지를 채취하여 새로운 유형 II 메탄자화균인 메틸로시너스 속 균주를 분리 동정하는데 성공하였다.

[0023] 상기 균주는 하수 슬러지 뿐만 아니라, 지하수, 공업용수, 늪지, 축사, 연못 폐수 및 하수로 이루어진 군에서 유래될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 분리된 균주의 형태학적 특성을 분석하기 위하여, 전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)을 통해 0.15um의 간균임을 확인하였다(도 1).

[0025] 상기 균주는 표 2에 기재된 서열 번호 서열번호 7으로 기재된 16S rRNA 유전자, 하기 서열번호 8으로 기재된 pmoA 유전자 및 하기 서열번호 9로 기재된 mmoX 유전자를 갖는다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "16S rRNA"란, 16S 리보솜 RNA(16S ribosomal RNA)를 의미하여, 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 동정할 수 있다. 상기 rRNA 서열은 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면, 타 종간에는 다양성이 나타나므로 생물 동정에 사용된다. 또한 보고된 적이 없는 생물의 동정 및 분류에 특히 유용하게 사용된다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 16S rRNA 유전자를 증폭시켜 염기서열을 결정한 후 분자 계통학적으로 분석한 결과, 메틸로시너스 속에 속하는 Methylosinus trichosporium M23과 98 %의 유사도를 보여 상기 균주가 메틸로시너스 속에 속하는 신규한 균주임을 알 수 있었다(도 2a).

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)"란, 메탄자화균에 내재되어 있는 메탄을 메탄올로 산화시키는 효소를 의미한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어, "미립자 메탄 모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase

alpha subunit, pmoA)"란, 미립자 메탄 모노옥시게나제의 세가지 소 단위체 중 하나인 알파 소단위체를 발현하는 유전자를 의미한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 균주의 pmoA 유전자를 분자계통학적으로 분석한 결과, Methylosinus trichosporium M23 균주의 pmoA 유전자와 98.89% 이상의 유사도를 나타내어 상기 균주가 메틸로시너스 속에 속하는 신규한 균주임을 알 수 있었다(도 2b).

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어, "가용성 메탄 모노옥시게나제(soluble methane monooxygenase, sMMO)"란, 메탄자화균에 내재되어 있는 메탄을 메탄올로 산화시키는 효소를 의미한다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어, "가용성 메탄 모노옥시게나제 수산화효소 알파 소단위체(soluble methane monooxygenase hydroxylase component(MMOH) alpha subunit, mmoX)"란, 가용성 메탄 모노옥시게나제 수산화효소의 소단위체 중 하나를 의미하며, 구체적으로 미립자 메탄 모노옥시게나제 수산화효소 알파 소단위체를 발현하는 유전자를 의미한다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 균주의 mmoX 유전자를 분자계통학적으로 분석한 결과, Methylosinus trichosporium I4/1 균주의 mmoX 유전자와 95.74% 이상의 유사도를 나타내어 상기 균주가 메틸로시너스 속에 속하는 신규한 균주임을 알 수 있었다(도 2c). 이에, 상기 균주를 "메틸로시너스 속(Methylosinus sp.) J2"으로 명명하고, 이를 2022년 3월 3일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 14888BP를 부여 받았다.

[0034] 또한, 상기 균주는 메탄으로부터 생분해성 플라스틱인 폴리하이드록시부틸레이트(Polyhydroxybutylate; PHB)를 합성하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 상기 균주는 메탄으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체(Polyhydroxyalkanoates copolymers; PHA copolymers)를 합성하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 상기 균주는 메탄으로부터 3-하이드록시부틸레이트 3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV)를 합성하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시 양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물을 유효성분을 포함하는 생분해성 폴리머 생산용 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시 양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14888BP 로 기탁된 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) J2 균주 또는 이의 배양액 또는 파쇄물에서 폴리하이드록시부틸레이트 또는 PHA 공중합체를 합성하는 단계를 포함하는 생분해성 플라스틱 생산 방법을 제공한다.

[0041] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시 양태로서, 본 발명은 상기 메틸로시너스 J2(기탁번호 KCTC 14888BP) 균주, 또는 상기 균주의 건조 균체를 포함하는 메탄 유래 폴리하이드록시부틸레이트와 폴리하이드록시알카노에이트 공중합체를 제공한다.

[0043] 이하, 본 발명은 실시예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. 하수 슬러지로부터 메탄자화균의 분리 및 형태학적 특징**

[0046] 하수 슬러지로부터 메탄자화균을 분리하기 위한 방법은 다음과 같다. 하수 슬러지로부터 채취한 시료를 1:10 비율로 증류수에 현탁시킨 후, 1시간 후 증류수를 whatman 필터를 이용하여 부유물을 제거하였다. 앞에서 얻은 시료를 nitrate-mineral-salt(NMS) 배지 (1g $MgSO_4.7H_2O$, 1g KNO_3, 0.2g $CaCl_2.H_2O$, 0.0000038g Fe-EDTA,0.00000005g $NaMo.4H_2O$ per liter); 1ml of trace elements solution(500mg $FeSO_4.7H_2O$, 400mg $ZnSO_4.7H_2O$, 20mg $MnCl_2.7H_2O$,50mg $CoCl_2.6H_2O$, 10mg $NiCl_2.6H_2O$, 15mg H_3BO_3, 250mg EDTA per liter), 2ml of

phosphate stock solution (26g KH_2PO_4, 62g$Na_2HPO_4.7H_2O$ per liter), 2ml of vitamin stock (1×) (2mg biotin, 2mg folic acid, 5mg thimine HCl, 5mg Ca pantothenate,0.1mg vitamin B12, 5mg riboflavin, 5mg nicotinamide per liter) and 2uM copper)가 담긴 시험관에 첨가한 후, 시험관을 고무마개와 절연테이프를 이용하여 밀봉하였다. 그 다음, 주사기를 이용하여 시험관 내 공기를 30% 제거하고, 30% 메탄가스를 주입한 후, 30℃, 230 rpm에서 3주간 배양하였다. 액체 배지에 미생물이 충분히 자라면 고체 NMS 배지에 미생물을 도말하였다. 도말된 고체 NMS 배지를 진공 데시케이터 안에 넣어 공기와 메탄의 비율을 7:3으로 유지되도록 밀봉한 후, 30℃에서 배양하였다. 3주 후, 생성된 균락을 채취하여 3 내지 5회 정도 계대 배양하여 단일 콜로니를 분리하였다.

[0047] 분리한 신규 균주 J2는 고체배지에서 크림색의 콜로니를 형성하였고, 좀 더 자세히 J2 균주의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 전자주사전자현미경을 이용하였으며, 도 1에서 나타내는 바와 같이, 메틸로시너스 속의 전형적인 형태인 막대 모양이었으며, 사이즈는 1.5 ㎛임을 확인하였다.

[0049] **실시예 2. 신규한 메틸로시너스 속 균주 J2의 동정 및 명명**

[0050] 상기 실시예 1에서 분리한 메탄자화균을 동정하기 위해 16S rRNA 유전자의 염기서열분석을 하기와 같이 실시하였다. 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 하기 표 1(균주 동정에 사용한 프라이머 정보)의 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후, 증폭한 약 1400bp의 PCR 산물을 시퀀싱(sequencing)을 통해 염기서열을 분석하였다.

표 1

[0051]

프라이머 이름	시퀀스	비고
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	서열번호 1
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	서열번호 2
A189F	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'	서열번호 3
mb682R	5'-GAASGGNGAGAAGAASGC-3'	서열번호 4
mmoX_A166F	5'-ACCAAGGARCARTTCAAG-3'	서열번호 5
mmoX_B1401R	5'-TGGCACTCRTARCGCTC-3'	서열번호 6

[0052] 상기 분석한 균주의 염기서열을 NCBI의 BLAST를 이용하여 미생물 상동성을 조사한 결과, 본 발명에서 분리한 균주의 염기서열은 메틸로시너스 트리코스포리움 속(Methylosinus trichosporium sp.) M23 균주와 98% 이상의 유사도를 나타내었다. 상기 균주의 16S rRNA염기서열의 분석 결과를 서열번호 7으로 기재하였으며, 상기 분석한 염기서열을 이용한 계통학적 결과는 neighbor-joining 방법으로 염기서열 간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(도 2a).

[0053] 또한, 상기 균주의 미립자 메탄 모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase alpha subunit, pmoA) 유전자의 염기서열을 분석하기 위해 상기 표 1의 서열번호 3 및 서열번호 4에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후, 증폭된 약 490bp의 PCR 산물을 시퀀싱(sequencing)을 통해 염기서열을 분석하였다.

[0054] 상기 분석한 균주의 염기서열을 NCBI의 BLAST를 이용하여 미생물 상동성을 조사한 결과, 상기 균주의 pmoA 유전자는 메틸로시너스 트리코스포리움 속(Methylosinus trichosporium sp.) M23 균주의 pmoA 유전자와 98.89% 이상의 유사도를 나타내었다. 상기 균주의 pmoA 유전자의 염기서열을 서열번호 8으로 기재하였으며, 상기 분석한 염기서열을 이용한 계통학적 결과는 8 neighbor-joining 방법으로 염기서열 간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(도 2b).

[0055] 또한, 메틸로시너스 속(Methylosinus sp.)에는 가용성 메탄산화효소가 보존된 경우와 이를 보존하지 않은 두 경우로 나뉜다. 이에 상기 균주의 가용성 메탄 모노옥시게나제 수산화효소 알파 소단위체(soluble methane monooxygenase hydroxylase component(MMOH) alpha subunit, mmoX) 유전자의 염기서열를 분석하기 위해 상기 표 1의 서열번호 5 및 서열번호 6에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후 약 1230bp의 증폭된 PCR 산물을 시퀀싱(sequencing)을 통해 염기서열을 분석하였다(표 2).

표 2

[0056]

서열번호	명칭	서열
서열번호 7	16s rRNA	TCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCGCAGCAATGCGTCAGTGGCAGACGG GTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCTTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAAACTTGAGCTAATACCGGATACGCC CTTCGGGGGAAAGATTTATTGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGC CCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCCAGGGACGATAATGACGGTACCTGGATAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGA TTGTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGAACTGCCTTTGATACTGGCGATCTAGAGTCCGGG AGAGGTGAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC TCACTGGCCCGGAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGGAGCTTGCTCTTCAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATCCCGC CTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCTTTTGACATGTCCGGTATGGTCGTCAGAGATGACTTCCTT CCCGCAAGGGGCCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGC CGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG GTGACAATGGGAAGCGAAGGGGTGACCCGGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA ACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGGCGTTTCGCTAACCGCAAGGAGGCAGACG ACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTG
서열번호 8	pmoA	GGGCGTGACCTTTCCGCCGCGGCGACGCAGCGTACTTACTGGGAGAACTTCAAGCTCCCGTTCGGCGCGACCT TCGCGGTTCTCGGCCTGCTGATCGGCGAGTGGATCAACCGCTACTGCAACTTCTGGGGCTGGACCTACTTCCC GATCAGCCTGGTGTTCCCGTCGGCTCTGGTGGTTCCGGCGCTGTGGCTGGACATCATCCTGCTGCTGTCGGGC TCCTATGTGATCACGGCGGTCGTGGGCTCGCTGGGCTGGGGCCTTCTGTTCTATCCGAACAACTGGCCGGCGA TCGCGGCGTTCCATCAGGCGACCGAGCAGCATGGCCAGCTGATGACCCTCGCGGATCTGATCGGCTTCCACTT CGTCCGCACGTCGATGCCGGAATATATCCGCATGGTCGAGCGCGGCACGCTGCGCACCTTCGGTAAGGACGTT GTGCCGGTGGCGG
서열번호 9	mmoX	GCGGCAGTTCGGCACTCTGCTCGACGGCCTCACCCGTCTCGGCGCCGGCAACAAGGTCCATCCCCGCTGGGGC GAGACGATGAAGGTGATCTCGAACTTCCTCGAGGTCGGCGAGTACAATGCGATCGCCGCTTCGGCGATGCTAT GGGACTCGGCCACCGCCGCGGAGCAGAAGAACGGCTATCTCGCTCAGGTGCTCGACGAGATTCGTCACACTCA TCAATGCGCCTTCATCAACCACTATTACTCCAAGCATTATCACGATCCGGCCGGCCACAATGACGCCCGTCGC ACACGCGCGATCGGCCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGTCTTCGCCGATGGCTTCATCTCCGGCGACGCCG TGGAGTGCTCGGTCAATCTGCAGCTGGTCGGCGAAGCCTGCTTCACCAATCCGCTGATCGTCGCCGTCACCGA ATGGGCCTCGGCCAATGGCGACGAGATCACGCCGACCGTGTTCCTCTCGGTGGAGACCGACGAGCTGCGTCAC ATGGCGAACGGCTATCAGACCGTGGTGTCGATCGCCAATGATCCGGCCTCGGCGAAATATCTCAACACCGATC TCAACAACGCCTTCTGGACGCAGCAGAAATATTTCACGCCCGTCCTCGGCTATCTGTTCGAATATGGCTCCAA GTTCAAGGTCGAGCCCTGGGTGAAGACCTGGAACCGCTGGGTCTATGAGGATTGGGGTGGAATCTGGATCGGC CGTCTCGGCAAATATGGCGTCGAGAGCCCGGCTTCGCTTCGCGACGCCAAGCGCGACGCCTATTGGGCGCATC ACGATCTCGCGCTCGCCGCTTATGCGCTGTGGCCGCTCGGCTTCGCGCGTCTCGCTCTGCCGGACGAGGAGGA TCAGGCGTGGTTCGAGGCCAACTATCCCGGCTGGGCGGATCACTATGGCAAGATCTTCAACGAGTGGAAGAAG CTCGGCTATGAGGATCCAAAGAGCGGCTTCATCCCCTACAAATGGCTCCTCGCGAACGGTCACGACGTTTATA TCGACCGCGTCTCGCAGGTTCCCTTCATTCCGTCGCTGGCCAAGGGCTCCGGGCTCGCTGCGCGTGCACGAGC TCAACGG

[0057] 상기 분석한 균주의 염기서열을 NCBI의 BLAST를 이용하여 미생물 상동성을 조사한 결과, 상기 균주의 mmoX 유전자는 Methylosinus trichosporium I4/1 균주의 mmoX 유전자와 95.74% 이상의 유사도를 나타내었다. 상기 균주의 mmoX 유전자의 염기서열을 서열번호 9으로 기재하였으며, 상기 분석한 염기서열을 이용한 계통학적 결과는 neighbor-joining 방법으로 염기서열 간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(도 2c).

[0058] 상기 결과를 토대로, 본 발명에서 분리한 미생물이 메탄을 메탄올로 산화하는 미생물로 널리 알려진 메탄자화균 메틸로시너스 속(Methylosinus sp.)임을 확인하였다.

[0059] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 "메틸로시너스 속(Methylosinus sp.) J2"으로 명명하고, 이를 2022년 3월 3일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 14888BP를 부여 받았다.

[0061] **실시예 3. 신규한 메틸로시너스 속 J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 생화학적 특성**

[0062] 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 신규한 메틸로시너스 속 J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 생화학적 특성으로는 본 발명의 J2 균주는 그람음성의 미생물로, 항생물질인 테트라사이클린(Tetracycline) 및 스펙티노마이신(Spectinomycin)에 대해 저항성을 가지고, 최적 배양 온도, pH 및 구리 농도는 각각 30℃, 6.5, 2μM이

었으며, 공기: 메탄의 비율이 7:3임을 확인하였다.

[0063] 또한, 질소원에 따른 J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 성장을 살펴본 결과, 질소원으로는 질산염과 암모늄을 사용하였다.

표 3

[0064]

Cell size(㎛)	1.5
세포 모양	막대모양 간균
콜로니 색깔	크림색
배양온도(oC)	25-37
최적 배양온도(oC)	30
pH	5.5-8
최적 pH	6.5
최적 구리 농도	2μM
공기 : 메탄 비율	7:3
Nitrogen source	KNO3, NH4Cl
항생제 내성	Tetracycline, Spectinomycin

[0066] **실시예 4. 본 발명의 J2 균주의 세포 성장 곡선 및 폴리하이드록시부틸레이트의 생합성 평가**

[0067] 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 분리·동정한 메틸로시너스 속 J2 균주의 질소원 종류에 따른 세포 성장을 알아보기 위해, 질산염과 암모늄 환경에서, J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 세포 성장 곡선을 비교하였다. 그 결과, 도 3과 같이 질산염 조건 하에서 J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 성장 속도가 높은 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0068] 메틸로시너스 속 J2 균주의 메탄 유래 폴리하이드록시부틸레이트 생합성 능력을 평가하기 위해, 질소원으로 질산염 및 코발트여부의 조건하에서 배지 교환없이 10일간 배양하고 (도 4a), 세포를 회수한 후 동결건조를 실시하였다. 건조 세포 50mg을 이용하여 메탄올분해(methanolysis)를 수행한 후, 클로로포름 층을 분리하여 GC-MS 분석을 실시하였다. 도 4b와 같이 질산염 조건하에서 배양한 J2 균주는 건조 세포 중량의 25% 이상의 폴리하이드록시부틸레이트를 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0070] **실시예 5. 본 발명의 J2 균주의 메탄으로부터 PHA 공중합체 생합성 확인.**

[0071] 본 발명의 J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주의 PHA 공중합체 중 3-하이드록시부릴레이트 3-하이드록시발러레이트 공중합체 생합성을 확인하기 위해, 질산염 배양조건 하에서 J2 균주에 메탄을 유일 탄소원으로 제공하고 코발트 성분을 결핍시켰다. 이는 아데노실코발라민(adenosylcobalamin)의 결핍을 야기시켜 에틸말로닐-CoA 뮤테이즈(ethylmalonyl CoA mutase), 메틸말로닐-CoA 뮤테이즈 (Methylmalonyl CoA mutase)의 활성을 저하시킴으로써 에틸말로닐-CoA(ethylmalonyl-CoA)와 메틸말로닐-CoA(Methylmalonyl- CoA)가 세포 내 축적된다. 메틸말로닐-CoA는 프로피오닐-CoA로 전환되고 이는 아세틸-CoA와 중합되어 3-케토발러릴-CoA(3-ketovaleryl-CoA)를 합성한 뒤 (R)-3-하이드록시발러릴-CoA ((R)-3-hydroxyvalerayl-CoA) 환원된 후 결과적으로 3-하이드록시부틸레이트 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 합성하고자 하였다. 도 5a에서 볼 수 있듯이, 가스크로마토그래피 질량분석기로 분석한 크로마토그램에서 J2 균주의 건조세포로부터 추출된 3-하이드록시부틸레이트 및 3-하이드록시발러레이트 피크를 확인할 수 있었고, 질량분석기를 통해 시료의 매스 프래그멘테이션 패턴을 살펴본 결과 메탄 유래 3-하이드록시발러레이트를 확인하였다(도 5b).

[0072] 결과적으로, 본 발명의 메틸로시너스 속(*Methylosinus* sp.) J2 (기탁번호 KCTC 14888BP) 균주는 메탄으로부터 PHA 공중합체를 생산할 수 있음을 시사하는 것이며, 이는 본 발명의 신규한 J2 균주가 메탄 유래 폴리하이드록시부틸레이트 및 PHA 공중합체 생산용 플랫폼 균주로서 활용 가능성을 시사하는 것이다.

[0074] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될

수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0075]

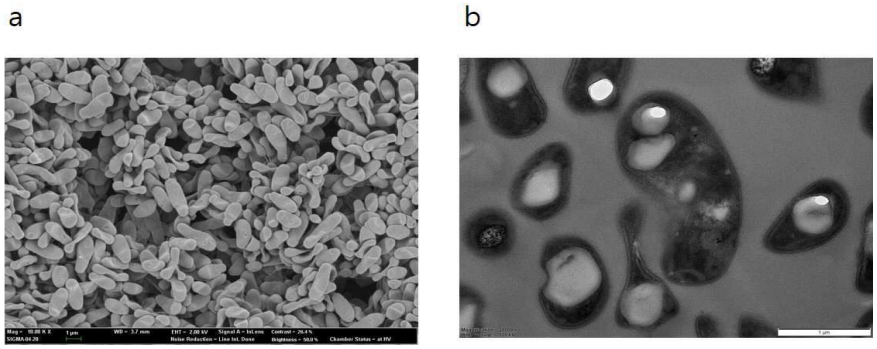
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC14888BP

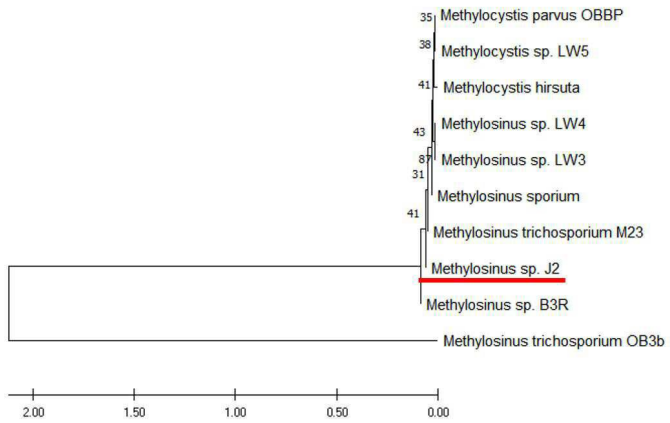
수탁일자 : 20220303

도면

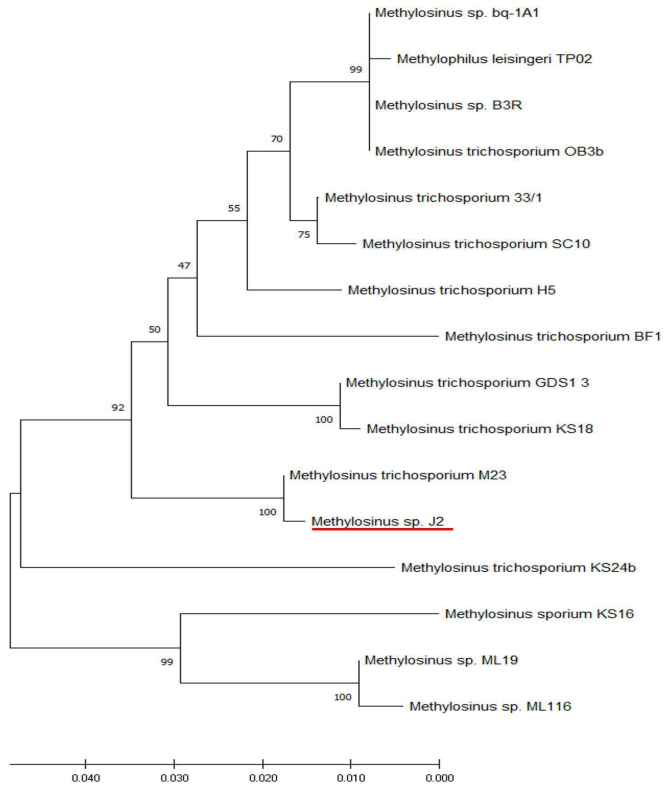
도면1



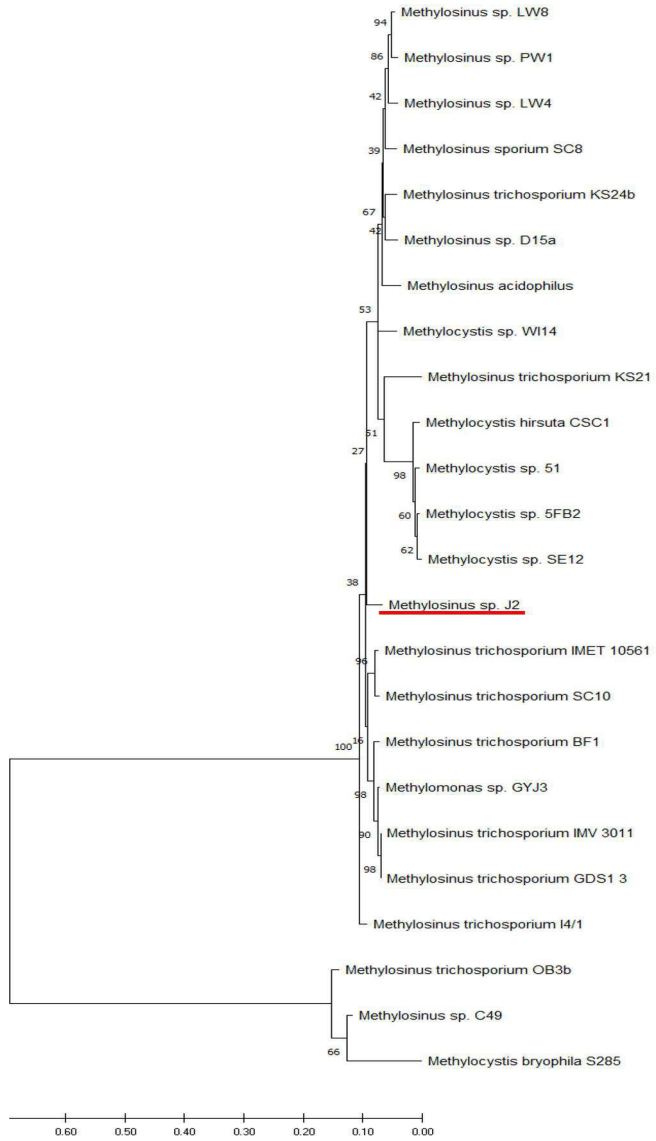
도면2a



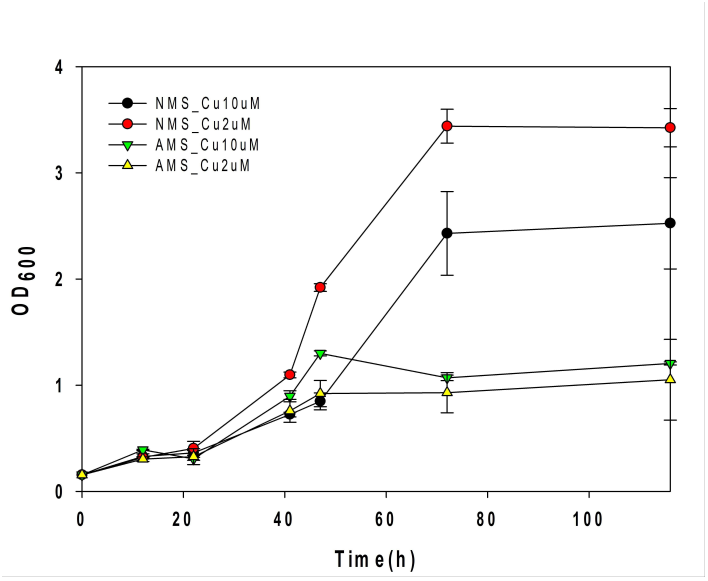
도면2b


Methylosinus sp. bq-1A1
Methylophilus leisingeri TP02
Methylosinus sp. B3R
Methylosinus trichosporium OB3b
Methylosinus trichosporium 33/1
Methylosinus trichosporium SC10
Methylosinus trichosporium H5
Methylosinus trichosporium BF1
Methylosinus trichosporium GDS1 3
Methylosinus trichosporium KS18
Methylosinus trichosporium M23
Methylosinus sp. J2
Methylosinus trichosporium KS24b
Methylosinus sporium KS16
Methylosinus sp. ML19
Methylosinus sp. ML116
99
70
55
75
47
50
92
100
100
99
100
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000

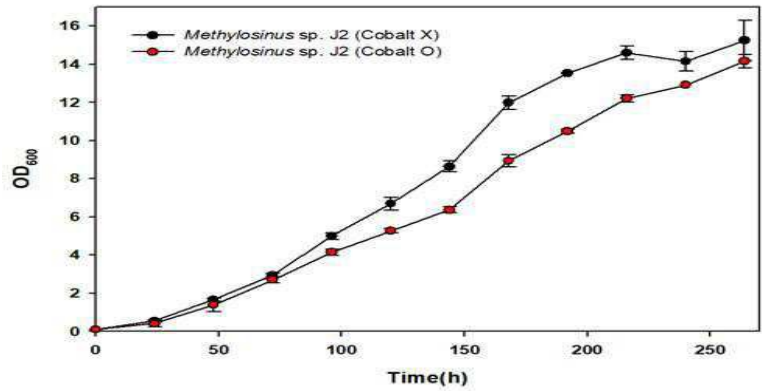
도면2c


Methylosinus sp. LW8
Methylosinus sp. PW1
Methylosinus sp. LW4
Methylosinus sporium SC8
Methylosinus trichosporium KS24b
Methylosinus sp. D15a
Methylosinus acidophilus
Methylocystis sp. WI14
Methylosinus trichosporium KS21
Methylocystis hirsuta CSC1
Methylocystis sp. 51
Methylocystis sp. 5FB2
Methylocystis sp. SE12
Methylosinus sp. J2
Methylosinus trichosporium IMET 10561
Methylosinus trichosporium SC10
Methylosinus trichosporium BF1
Methylomonas sp. GYJ3
Methylosinus trichosporium IMV 3011
Methylosinus trichosporium GDS1 3
Methylosinus trichosporium I4/1
Methylosinus trichosporium OB3b
Methylosinus sp. C49
Methylocystis bryophila S285
94
86
42
39
67
53
51
27
98
60
62
38
96
100
16
98
90
98
66
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00

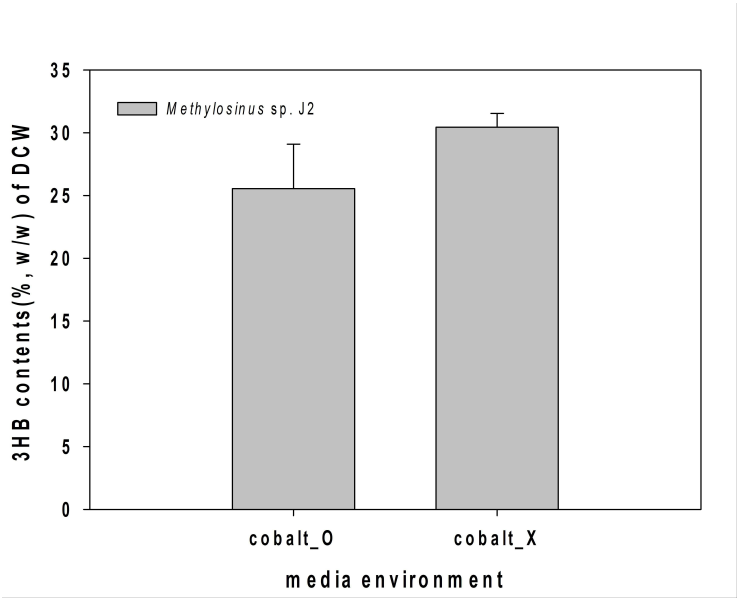
도면3



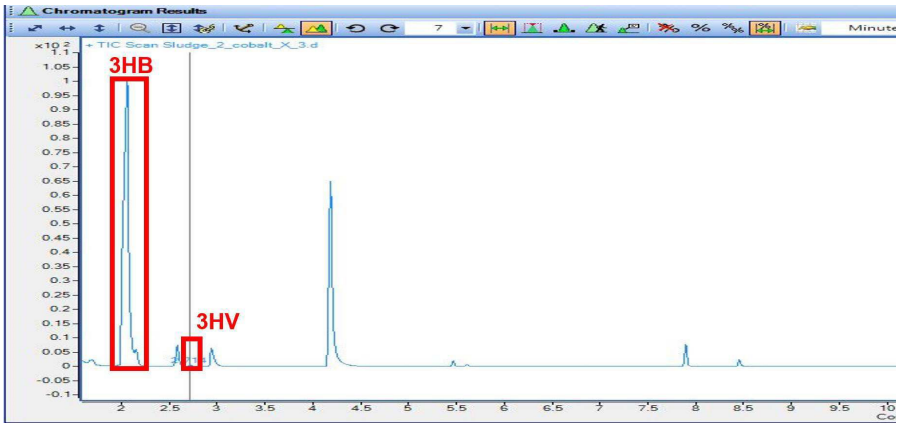
도면4a



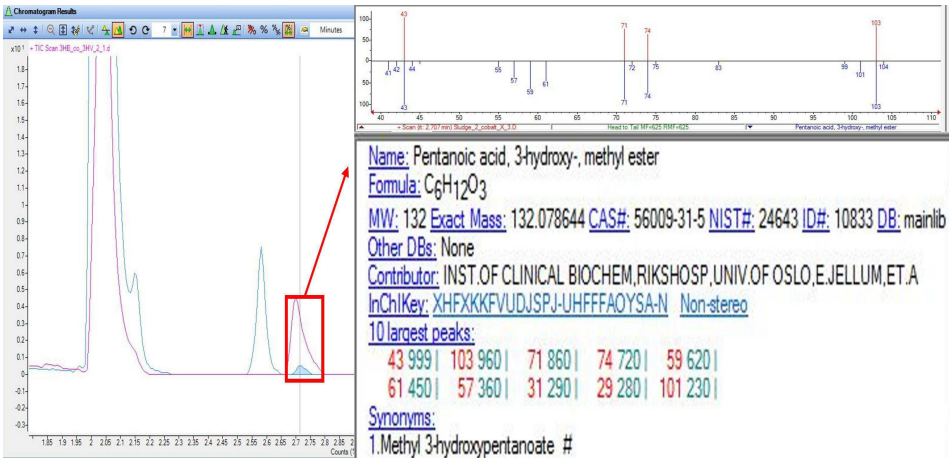
도면4b



도면5a



도면5b



서 열 목 록

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

<120> Novel Methylocinus genus J2 strain and uses thereof

<130> PN2203-184

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27F

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1492R

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A189F

<400> 3

ggngactggg acttctgg 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mb682R

<400> 4

gaasggngag aagaasgc 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmoX_A166F

<400> 5

accaaggarc arttcaag 18

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmoX_B1401R

<400> 6

tggcactcrt arcgctc 17

<210> 7

<211> 1414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16s rRNA

<400> 7

tcagaacgaa cgctggcggc aggcttaaca catgcaagtc gaacgggcgc agcaatgcgt 60

cagtggcaga cgggtgagta acgcgtggga acgtgccttt cggttcggaa taactcaggg 120

aaacttgagc taataccgga tacgcccttc gggggaaaga tttattgccg aaagatcggc 180

ccgcgtccga ttagctagtt ggtgaggtaa tggctcacca aggcgacgat cggtagctgg 240

tctgagagga tgatcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 300

gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gcctgatcca gccatgccgc gtgagtgatg 360

aaggccctag ggttgtaaag ctctttcgcc agggacgata atgacggtac ctggataaga 420

agccccggct aacttcgtgc cagcagccgc ggtaatacga agggggctag cgttgttcgg 480

aatcactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg attgttaagt caggggtgaa atcccgaggc 540

tcaacctcgg aactgccttt gatactggcg atctagagtc cgggagaggt gagtggaact 600

gcgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt cgcaagaaca ccagtggcga aggcggctca 660

ctggcccgga actgacgctg aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 720

ggtagtccac gccgtaaacg atggatgcta gccgttgggg agcttgctct tcagtggcgc 780

agctaacgct ttaagcatcc cgcctgggga gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa 840

ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac 900

cttaccagct tttgacatgt ccggtatggt cgtcagagat gacttccttc ccgcaagggg 960

ccggaacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc 1020

ccgcaacgag cgcaaccctc gcccttagtt gccatcattc agttgggcac tctaggggga 1080

ctgccggtga taagccgcga ggaaggtggg gatgacgtca agtcctcatg gcccttacag 1140

gctgggctac acacgtgcta caatggcggt gacaatggga agcgaagggg tgacccggag 1200

caaatctcca aaagccgtct cagttcggat tgcactctgc aactcgagtg catgaaggtg 1260

gaatcgctag taatcgcaga tcagcacgct gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac 1320

accgcccgtc acaccatggg agttggcttt acccgaaggc gtttcgctaa ccgcaaggag 1380

gcagacgacc acggtagggt cagcgactgg ggtg 1414

<210> 8

<211> 451

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoA

<400> 8

gggcgtgacc tttccgccgc ggcgacgcag cgtacttact gggagaactt caagctcccg 60

ttcggcgcga ccttcgcggt tctcggcctg ctgatcggcg agtggatcaa ccgctactgc 120

aacttctggg gctggaccta cttcccgatc agcctggtgt tcccgtcggc tctggtggtt 180

ccggcgctgt ggctggacat catcctgctg ctgtcgggct cctatgtgat cacggcggtc 240

gtgggctcgc tgggctgggg ccttctgttc tatccgaaca actggccggc gatcgcggcg 300

ttccatcagg cgaccgagca gcatggccag ctgatgaccc tcgcggatct gatcggcttc 360

cacttcgtcc gcacgtcgat gccggaatat atccgcatgg tcgagcgcgg cacgctgcgc 420

accttcggta aggacgttgt gccggtggcg g 451

<210> 9

<211> 1102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmoX

<400> 9

gcggcagttc ggcactctgc tcgacggcct cacccgtctc ggcgccggca acaaggtcca 60

tccccgctgg ggcgagacga tgaaggtgat ctcgaacttc ctcgaggtcg gcgagtacaa 120

tgcgatcgcc gcttcggcga tgctatggga ctcggccacc gccgcggagc agaagaacgg 180

ctatctcgct caggtgctcg acgagattcg tcacactcat caatgcgcct tcatcaacca 240

ctattactcc aagcattatc acgatccggc cggccacaat gacgcccgtc gcacacgcgc 300

gatcggcccg ctgtggaagg gcatgaagcg cgtcttcgcc gatggcttca tctccggcga 360

cgccgtggag tgctcggtca atctgcagct ggtcggcgaa gcctgcttca ccaatccgct 420

gatcgtcgcc gtcaccgaat gggcctcggc caatggcgac gagatcacgc cgaccgtgtt 480

cctctcggtg gagaccgacg agctgcgtca catggcgaac ggctatcaga ccgtggtgtc 540

gatcgccaat gatccggcct cggcgaaata tctcaacacc gatctcaaca acgccttctg 600

gacgcagcag aaatatttca cgcccgtcct cggctatctg ttcgaatatg gctccaagtt 660

caaggtcgag ccctgggtga agacctggaa ccgctgggtc tatgaggatt ggggtggaat 720

ctggatcggc cgtctcggca aatatggcgt cgagagcccg gcttcgcttc gcgacgccaa 780

gcgcgacgcc tattgggcgc atcacgatct cgcgctcgcc gcttatgcgc tgtggccgct 840

cggcttcgcg cgtctcgctc tgccggacga ggaggatcag gcgtggttcg aggccaacta 900

tcccggctgg gcggatcact atggcaagat cttcaacgag tggaagaagc tcggctatga 960

ggatccaaag agcggcttca tcccctacaa atggctcctc gcgaacggtc acgacgttta 1020

tatcgaccgc gtctcgcagg ttcccttcat tccgtcgctg gccaagggct ccgggctcgc 1080

tgcgcgtgca cgagctcaac gg 1102