



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0041615
(43) 공개일자 2020년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0121905

(22) 출원일자 2018년10월12일

심사청구일자 2018년10월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55 강남테시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남테시앙포레아파트)

뉴엔 데이 너 덩

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 일반대학원 (서천동)

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27 907동 402호

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 9 항

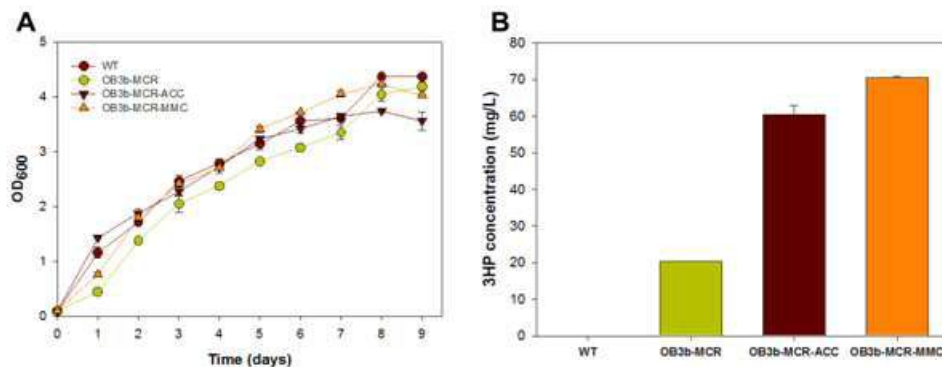
(54) 발명의 명칭 3-하이드록시프로피온산 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된, 3-하이드록시 프로피온산(3-Hydroxypropionic acid) 생산용 형질전환 메탄자화균; 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법; 및 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 형질전환 메탄자화균은 C1 탄소원으로부터 3-하이드록시프로피온산을 높은 수율로 생산할 수 있는바, 친환경적이고 경제적으로 3-하이드록시프로피온산의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/1018 (2013.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12P 7/42 (2013.01)

C12Y 102/01075 (2013.01)

C12Y 201/03001 (2013.01)

C12Y 604/01002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064882

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된, 3-하이드록시 프로피온산(3-Hydroxypropionic acid) 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 말로닐-CoA 환원 효소를 코딩하는 유전자(*mcr*)는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카르복실화 효소를 코딩하는 유전자(*acc*)는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소를 코딩하는 유전자(*mmc*)는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로셀머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarimum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노븀 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*), 메틸로마이크로븀(*Methyloimicrobium*) 속 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus*) 균주인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로시너스 트리코스포륨(*Methylosinus trichosporium*) OB3b인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 3-하이드록시 프로피온산 생산능이 없는 야생형에 비해 3-하이드록시 프로피온산 생산능이 향상된 것인, 형질전환 메탄자화균.

청구항 8

C1 탄소원을 포함하는 배양액에 제1항 내지 제7항의 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 3-하이드록시 프로피온산의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 배양액으로부터 3-하이드록시 프로피온산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 3-하이드록시 프로피온산의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된, 3-하이드록시 프로피온산(3-Hydroxypropionic acid) 생산용 형질전환 메탄자화균; 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법; 및 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄가스는 천연가스와 셰일가스의 주성분이며, 온실효과를 일으키는 원인 물질로 알려져 있다. 석유로 대표되는 액체 탄화수소와는 달리, 메탄은 그 자체로는 기체이기 때문에 고부가 가치의 다른 물질로의 전환이 어렵고, 연료로서의 사용 또한 어렵다고 평가된다.

[0004] 한편, 메탄자화균(Methanotrophic bacteria)은 이러한 메탄을 유일한 에너지원으로 생육할 수 있는 미생물로, 1906년에 Sohngen에 의해 처음으로 분리되었다. 메탄자화균은 메탄 모노옥시게나아제(monooxygenases, MMO)라는 효소를 갖고 있어 상온, 상압 하에서 용이하게 메탄을 메탄올로 전환할 수 있다. 메탄자화균에서 메탄으로부터 탄소화합물의 생합성은 리블로오스 일인산 회로(ribulose monophosphate cycle; RuMP cycle)와 세린 회로(serine cycle)에 의해 진행되고, 일반적으로 type I의 메탄자화균은 리블로오스 일인산 회로를, type II의 메탄자화균은 세린 회로를 이용하여 바이오매스를 합성한다고 알려져 있다(J Microbiol Biotechnol. Hwang IY et al., 2014 Dec 28; 24(12):1597-605). 메탄자화균이 갖는 이러한 생리학적 특성을 이용하여, 메탄을 고부가가치 유기화합물로 전환시키는 것과 동시에, 유해한 메탄가스를 절감하고 에너지원으로 활용하려는 노력이 계속되어 왔다. 3-하이드록시프로피온산(3-Hydroxypropionic acid, 3HP)은 상업적으로 중요한 화합물의 합성을 위한 플랫폼 물질로 사용되며, 구체적으로 아크릴산, 아크릴 에스테르, 메틸 아크릴레이트, 아크릴아미드, 에틸 3-하이드록시프로피온산, 말론산, 프로피오락톤, 아크릴로니트릴, 1,3-프로판디올 등을 생산하는데 사용된다. 또한, 3-하이드록시프로피온산은 생분해성 고분자 합성에도 사용되며, 나아가 초흡수성 폴리머, 플라스틱 및 페인트 등의 분야에도 유용하게 사용될 수 있다. 다만, 주로 화석 연료 기반의 자원으로부터 화학 공정을 거쳐 생산되는 바 비용이 많이 들고, 환경 친화적이지 못하다는 문제점을 내포하고 있다. 이에 따라 최근에는 생물학적 방법을 통한 3-하이드록시프로피온산의 합성이 더욱 주목을 받고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 3-하이드록시프로피온산을 생산하기 위한 방법으로, 보다 환경 친화적이고, 에너지 소비를 절감할 수 있는 바이오매스를 활용한 방법에 대해 예의 연구 노력한 결과, 메탄을 탄소원으로 이용 가능한 형질전환 메탄자화균을 통해 보다 친환경적이고 경제적으로 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있는 방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된, 3-하이드록시 프로피온산(3-Hydroxypropionic acid) 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 사용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된, 3-하이드록시 프로피온산(3-Hydroxypropionic acid) 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 발명자들은 3-하이드록시프로피온산을 생산하기 위한 보다 환경 친화적이고 경제적인 방법으로, 메탄 등 바이오매스를 활용한 방법에 대해 예의 연구 노력한 결과, 놀랍게도 본 발명의 형질전환 메탄자화균을 이용할 경우 3-하이드록시프로피온산의 생산이 가능함을 확인하였다. 메탄을 탄소원으로 사용하는 메탄자화균을 통한 3-하이드록시프로피온산의 생산은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명을 통해 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어 "3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP)"은 C₃H₆O₃의 화학식을 갖는 분자량 90.078의 화합물로, 아크릴산, 아크릴 에스테르, 메틸 아크릴레이트, 아크릴아미드, 에틸 3-하이드록시프로피온산, 말론산, 프로피오락톤, 아크릴로니트릴, 1,3-프로판디올 등 상업적으로 중요한 화합물의 합성을 위한 플랫폼 물질로 알려져 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "메탄자화균(methanotroph)"은 메탄을 주 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다. 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 본 발명의 목적상 메탄을 탄소원으로 사용하여, 피루브산을 출발물질로 숙시닐-CoA와 숙신산 세미알데히드를 거쳐 최종적으로 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있는한 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 메탄, 메탄올, 메틸아민 등 C₁ 화합물을 에너지원으로 사용하는 메틸자화균(methylotroph) 중에서 메탄을 함께 사용할 수 있는 균주 또한 본 발명의 메탄자화균에 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0017] 상기 메탄자화균은 메탄 등 C₁ 화합물을 에너지원으로 사용할 수 있는 것인한 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로쉴머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넨 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노뎀 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*), 메틸아시디미크로븀 속(*Methylacidimicrobium*), 메틸로마이크로븀(*Methylomicrobium*) 속 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus*) 균주일 수 있으며, 구체적으로 메틸로시너스 트리코스포륨(*Methylosinus trichosporium*) OB3b일 수 있다.
- [0018] 이러한 메탄자화균을 이용한 바이오전환 공정의 경우, 비교적 저렴한 메탄을 탄소원으로 사용할 수 있어 경제적

으로 유리하며, 대기 중의 메탄을 사용 가능하다는 점에서 온실가스의 방출 예방 등 환경적인 면에서도 장점이 있다. 또한, 기존에 포도당(glucose)을 이용한 공정 대비 산소의 손실이 없어 최종 생산 물질의 수율 또한 높다.

- [0019] 본 발명에서 용어 "형질전환 메탄자화균"은 상기 메탄자화균의 유전자를 제거하거나 또는 도입하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다.
- [0020] 구체적으로, 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase); 아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase) 및/또는 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase) 활성이 강화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 3-하이드록시프로피온산 생산능이 없는 야생형에 비해 3-하이드록시프로피온산 생산능이 현저히 향상된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "말로닐-CoA 환원 효소(malonyl-CoA reductase)"는 말로닐 CoA를 말로닉 세미알데히드로 전환시키고, 나아가 이로부터 3-하이드록시피온산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0022] 상기 말로닐-CoA 환원 효소를 코딩하는 유전자(*mcr*)는 클로로프렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 말로닐-CoA 환원 효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 용어 "아세틸-CoA 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase)"는 메탄으로부터 합성된 아세틸-CoA로부터 말로닐-CoA를 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0024] 상기 아세틸-CoA 카르복실화 효소를 코딩하는 유전자(*acc*)는 메틸로시너스 트리코스포름(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 아세틸-CoA 카르복실화 효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소(Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase)"는 아세틸-CoA 및 옥살로아세테이트를 말로닐-CoA 및 피루브산으로 전환하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0026] 상기 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소를 코딩하는 유전자(*mmc*)는 프로피오니박테룸 프레우덴레이치(*Propionibacterium freudenreichii*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에서는, *C. aurantiacus* 유래의 *mcr* 유전자를 메탄자화균 메틸로시너스 트리코스포름 OB3b 내에서 과발현시킨 결과, 약 20mg/L의 3-하이드록시피온산이 생산됨을 확인하였으며, 추가로 말로닐-CoA의 세포 내 농도를 향상시키기 위해 *M. trichosporium* OB3b 유래 *acc* 유전자 및 *P. freudenreichii* 유래 *mmc* 유전자를 과발현시킨 형질전환 균주에서 각각 약 60 mg/L 및 70mg/L의 수율로 3-하이드록시피온산이 생산됨을 확인하였다.
- [0028] 전술한 각각의 효소 또는 단백질은 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는한, 각 효소 또는 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할수 있는데, 상기 각 효소 또는 단백질의 활성을 나타내는 한, 상기 각 효소 또는 단백질의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로, 실질적으로 각 효소 또는 단백질과 동일하거나 상응하는 활성을 가지는 아미노산 서열의 경우도 본 발명의 범주에 포함됨은 당업자에게 자명하다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "약화 또는 불활성화"는 효소 또는 단백질의 활성이 야생형 또는 그 내재적 활성에 비해 감소 또는 전혀 발현이 되지 않거나, 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 상기 효소 또는 단백질의 활성 약화 또는 불활성화는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 해당 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 결실, 상기 뉴클레오티드의 발현이 감소하도록 발현 조절 서

열의 변형, 상기 단백질의 활성이 약화되도록 염색체상의 상기 뉴클레오티드 서열의 변형, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 방법에 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은 세균 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에서 용어 "강화"는 효소 또는 단백질의 활성이 야생형 또는 그 내재적 활성에 비해 증가되는 것을 의미한다. 상기 효소 또는 단백질의 활성 강화는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0031] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 3-하이드록시프로피온산 제조방법을 제공하는 것이다. 상기 말로닐-CoA 환원 효소, 아세틸-CoA 카르복실화 효소, 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소, 약화 또는 불활성화, 강화, 3-하이드록시프로피온산 및 형질전환 메탄자화균은 전술한 바와 같다.

[0032] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나뉠 수 있다. 본 발명의 형질전환 메탄자화균의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0033] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환 메탄자화균으로부터 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 메탄자화균의 배양에 사용되는 것으로 알려진 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 사용할 수 있고, 메탄자화균에 따라 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 적절히 조절한 배지를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 형질전환 메탄자화균의 배양 온도는 15℃ 내지 45℃, 구체적으로 20℃ 내지 40℃, 보다 구체적으로 25℃ 내지 35℃일 수 있으며, 메탄과 균주의 원활한 접촉을 위해, 150rpm 내지 300rpm, 구체적으로 180rpm 내지 270rpm, 보다 구체적으로 200rpm 내지 250rpm으로 교반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 3-하이드록시프로피온산의 제조방법은 상기 형질전환 메탄자화균을 C1 탄소원을 포함하는 배양액에 배양하는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 3-하이드록시프로피온산을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 3-하이드록시프로피온산 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.

[0037] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 형질전환 메탄자화균을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 말로닐-CoA 환원 효소, 아세틸-CoA 카르복실화 효소, 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소, 약화 또는 불활성화, 강화, 3-하이드록시프로피온산, 형질전환 메탄자화균은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 C1 탄소원으로부터 3-하이드록시프로피온산을 수율로 생산할 수 있는바, 친환경적이고 경제적으로 3-하이드록시프로피온산의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 *M. trichosporium* OB3b에서 3-하이드록시프로피온산을 생산하기 위한 대사공학 경로를 나타낸 것이다.

도 2의 a는 *M. trichosporium* OB3b 야생형 및 형질전환 메탄자화균(OB3b-MCR)의 성장을 OD₆₀₀ 값으로 나타낸 것이다.

도 2의 b는 *M. trichosporium* OB3b 야생형 및 형질전환 메탄자화균(OB3b-MCR)에서 시간에 따른 3-하이드록시프로피온산 생산량을 나타낸 것이다.

도 3의 A는 형질전환 메탄자화균 OB3b-MCR 및 OB3b-MCR-ACC 균주의 성장을 OD₆₀₀ 값으로 나타낸 것이다.

도 3의 B는 형질전환 메탄자화균 OB3b-MCR 및 OB3b-MCR-ACC 균주의 성장 8일째 3-하이드록시프로피온산 생산량을 나타낸 것이다.

도 4의 A는 *M. trichosporium* OB3b 야생형 및 형질전환 메탄자화균(OB3b-MCR-ACC, OB3b-MCR-MMC)의 성장을 OD₆₀₀ 값으로 나타낸 것이다.

도 4의 B는 *M. trichosporium* OB3b 야생형 및 형질전환 메탄자화균(OB3b-MCR-ACC, OB3b-MCR-MMC)의 성장 8일째 3-하이드록시프로피온산 생산량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0045] 실험예 1: 재료 및 방법

[0047] 1-1: 균주 및 배양 조건

[0048] *M. trichosporium* OB3b(NCIMB 11131)은 이전 연구(Hwang et al., 2015)에서 기술된 바와 같이, 5 μM의 CuSO₄를 포함한 NMS(nitrate mineral salt)배지에서 배양하였다. *M. trichosporium* OB3b 세포를 50ml의 NMS 배지가 들어있고 스크류 캡으로 밀봉된 500ml 배플 플라스크(baffled flask)에서 30℃, 및 230 rpm으로 교반하며 배양하였다. 기밀식 주사기(gas-tight syringe)를 사용한 가스 교환에 의해 최종 농도 30%(v/v) 메탄을 공급하였으며, 헤드 스페이스를 매일 새것으로 교환하였다. 세포 배양의 광학 밀도는 1cm 경로 길이의 1.5 ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광 광도계에서 측정하였다. 50 μg/ml의 최종 농도를 갖는 카나마이신(Km)을 재조합 플라스미드를 함유하는 *M. trichosporium* OB3b 및 대장균 모두의 선별하는 데에 사용하였다.

[0050] 1-2: 유전적 변형을 위한 재료 및 도구

[0051] 본 발명의 프라이머는 Macrogen(Seoul, Korea)에서 합성하였으며, 이는 아래 표 1에 나타내었다. 리보솜 결합 부위는 굵은 글씨, Gibson Assembly 위치는 소문자로 나타내었다.

[0052] [표 1]

프라이머	서열	서열번호
CaMCR-F	ttcacacaggaacagctATGAGCGGAACAGGACGACT	4
CaMCR-R	gcatcttcccgaacaactaTTACACGGTAATCGCCCGTC	5
pAWP89-F	TAGTTGTCGGGAAGATGCGT	6
pAWP89-R	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA	7
ACC-CT subunit beta-F	ggaacaaaagctgggtac ATTAAGCACTATCATATAA ATTAAGAGGAGGTAATCAAT GAACTGGTATTCG AATGT	8
ACC-CT subunit beta-R	cgagggggggcccggtacTCAGGCGGCGCGCCGAGG CG	9
Biotin carboxyl carrier-F	tcgataagcttgatcgATGGCGCGCAAAGCTCCG	10
Biotin carboxyl carrier-R	gatcccccgggctgcaggCTATTCGATCACGATGAGGG G	11
Biotin carboxylase subunit-F	atagcctgcagccggggATGTTGACAAGATCCTCAT	12
Biotin carboxylase subunit-R	gccgctctagaactagtTCAGAAGGTCGGCTCTATGC	13
CT subunit alpha-F	gaccttctgacactagttATGCGTTTCTATCTCGACTT	14
CT subunit alpha-R	accgcggtggcgccgctTCAGATCTTGCCTCCGATCG	15
ACC-4 subunit-F	cgggcgattaccgtgtaa ATTAAGCACTATCATATAAA T	16
ACC-4 subunit-R	gcatcttcccgaacaactaTCAGATCTTGCCTCCGATCG	17
pAWP89-MCR-R	TTACACGGTAATCGCCCGTC	18

[0053]

[0054]

C. aurantiacus OK-70-fl(DSM 636) 및 *M. trichosporium* OB3b(NCIMB 1113) 균주의 게놈 DNA를 Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)로 분리하였다. Gibson assembly master mix는 NEB(England)에서 구입하였다. PCR은 Lamp Pfu polymerase(BioFACT, Korea)를 사용하여 수행하였다. 번역 개시율(translation initiation rate, TIR)을 최대화 하기 위한 합성 리보솜 결합 위치의 설계는 리보솜 결합 위치 계산기를 사용하여 수행하였다(Salis et al., 2009).

[0056]

실험예 2: 3-하이드록시 프로피온산 생합성 경로의 클로닝

[0058]

본 발명의 모든 플라스미드는 Gibson Assembly를 사용하여 제조하였으며, 이는 아래의 표 2에 나타내었다.

[0059]

[표 2]

Name	Relevant features/genotype
Plasmids	
pAWP89-MCR	P _{trc} -MCR
pAWP89-MCR-ACC	P _{trc} -MCR-ACC
Strains	
OB3b-MCR	pAWP89-MCR
OB3b-MCR-ACC	pAWP89-MCR-ACC

[0060]

[0061]

역 PCR은 pAWP89-F 및 pAWP89-R(Puri et al., 2015)에 의한 선형 벡터 pAWP89; 및 pAWP89-F 및 pAWP89-MCR-R에 의한 선형 벡터 pAWP89-MCR에 각각 사용되었다. *C. aurantiacus*의 MCR 유전자를 게놈 DNA로부터 증폭시키고, Gibson Assembly에 의해 선형 벡터 pAWP89로 조립하여 플라스미드 pAWP89-MCR을 제조하였다. 또한, *M. trichosporium* OB3b의 ACC 유전자를 게놈 DNA로부터 증폭시키고, Gibson Assembly에 의해 선형 벡터 pAWP89-MCR에 연결하여 플라스미드 pAWP89-MCR-ACC를 제조하였다.

[0063] 실험예 3: *M. trichosporium* OB3b로의 플라스미드 접합

[0065] *E. coli*로부터 *M. trichosporium* OB3b로의 플라스미드 접합(conjugation)은 Martin(1994)에 의해 개발된 방법에 기초하였다. 약 0.2의 OD₆₀₀에서 *M. trichosporium* OB3b의 희분식 배양을 사용하였으며, 수령자 *M. trichosporium* OB3b 50ml 및 도입될 플라스미드를 포함하는 공여자 *E. coli* S17-1 10ml를 NMS로 세척하였다. 이후, 이들을 47mm 멸균 니트로셀룰로스 필터(0.2 μm의 공극 크기)에 수집하였다. 필터를 0.02% (w/v) 프로테오스-펩톤(proteose-peptone)을 포함한 NMS 한천 배지에 놓고, 메탄(대기 중 50 %)의 존재하에 30℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 접합 플레이트로부터의 세포를 10mL NMS 배지에 재현탁시키고, 7000g에서 5분 동안 원심분리하여 농축시켰다. 세포 펠렛은 단일한 콜로니가 나타날 때까지 메탄/공기(1:1, v/v)와 함께 2-3 주 동안 항온 배양한 후, 1mL NMS에 재현탁하고, 100 μl의 분취량을 선택적 한천에 도말하였다.

[0067] 실험예 4: 진탕 플라스크 배양

[0069] *M. trichosporium* OB3b 재조합 균주의 배양을 위해 스크류 캡으로 밀봉된 500ml 배플 플라스크(baffled flask)에서 50ml의 균주 배양을 시작하여 600 nm에서 최종 광학 밀도 0.1 (OD 600)을 얻는 전 배양액을 접종하였다. 기밀식 주사기를 사용한 가스 교환에 의해 최종 농도 30%(v/v)의 메탄을 공급하고, 헤드 스페이스를 매일 새것으로 교환하였다. 상기 균주는 5 μM CuSO₄를 함유하는 NMS 배지에서 230rpm 오비탈 진탕으로 30℃에서 배양하였다. 세포 질량과 3-하이드록시 프로피온산의 농도를 측정하기 위해 주기적으로 시료를 채취하였다.

[0071] 실험예 5: 분석 방법

[0073] 500mL 플라스크 배양물의 배양 배지로부터 상층액을 수득하였다. 3-하이드록시 프로피온산의 양은 RI 검출기 및 Aminex HPX-87H 유기산 컬럼(300mm X 7.8mm; Bio-Rad)을 갖는 HPLC(Jasco Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 황산(0.005M)을 60℃에서 유속 0.7mL/분으로 이동상으로 사용하였다. 모든 용액은 사용하기 전 0.2 μm 멤브레인을 통해 여과하였다. 5개의 다른 농도의 순수한 3-하이드록시 프로피온산에 대한 표준 곡선을 작성하였다.

[0075] 실시예 1: 말로닐-CoA로부터 3-하이드록시 프로피온산으로의 경로 재구성

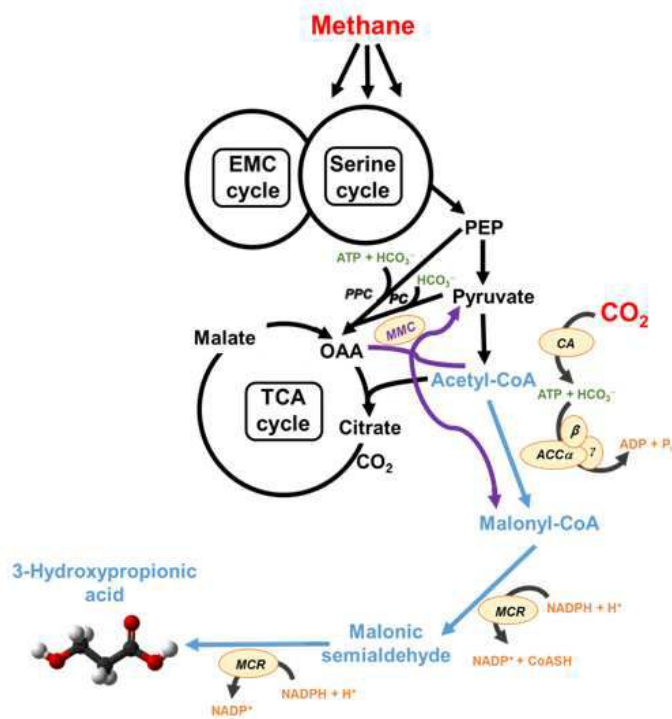
[0077] *M. trichosporium* OB3b에서 말로닐-CoA 경로를 통한 3-하이드록시 프로피온산 생산을 위해, *S. cerevisiae*(Chen et al., 2014, Kildegaard et al., 2016) 및 대장균(Rathnasingh et al., 2012)에서 효율적으로 이중성 발현을 보인, *C. aurantiacus* 유래의 이중 기능성 MCR(malonyl-CoA reductase)을 코딩하는 유전자를 발현시키고자 하였다. 상기 유전자를 *C. aurantiacus*의 게놈 DNA로부터 증폭시켜 *M. trichosporium* OB3b에서 발현되는 강력한 Ptac 프로모터(Puri et al., 2015)의 조절하에 pAWP89에 클로닝하였다. 균주를 제작한 후, 3-하이드록시 프로피온산의 축적 여부를 평가하였다. 진탕 플라스크 배양 결과, MCR을 발현시킨 균주에서 3-하이드록시 프로피온산의 최종 역가는 20mg/L이고, 야생형 *M. trichosporium* OB3b는 3-하이드록시 프로피온산을 전혀 축적할 수 없음을 확인하였다(도 2의 b). 한편, 야생형과 재조합 균주(OB3b-MCR)의 세포 성장에는 차이가 없었는바, 이는 MCR 경로는 3-하이드록시 프로피온산의 생산을 위해 더욱 최적화된 것임을 나타내는 결과이다(도 2의 a).

[0079] 실시예 2: 아세틸-CoA 카르복실화 효소 과발현 및 전구체 수준의 향상에 따른 3-하이드록시 프로피온산 생산 증가 확인

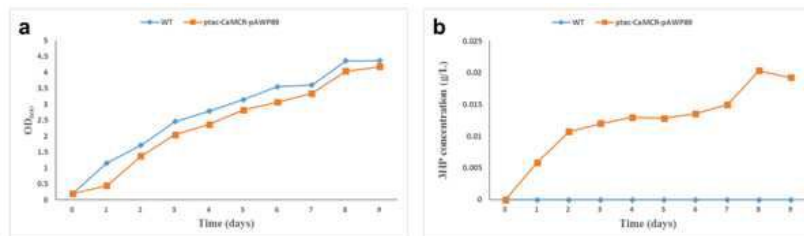
- [0081] 말로닐-CoA는 MCR를 통해 3-하이드록시 프로피온산을 합성하기 위해 사용되는 직접적인 기질인바, 말로닐-CoA의 이용 가능성은 *M. trichosporium* OB3b에서의 3-하이드록시 프로피온산의 합성을 제한할 수 있다. 이에, 말로닐-CoA의 세포 내 농도를 향상시키기 위해 아세틸-CoA 카르복실화 효소를 코딩하는 내인성 유전자(*acc*)를 pAWP89-MCR 플라스미드에서 Ptac 프로모터의 조절하에 *mcr* 유전자와 함께 과발현시켰다.
- [0082] 그 결과 도 3으로부터 알 수 있듯이, 두 재조합 균주의 세포 성장에는 큰 차이가 없는 반면(도 3의 a), 3-하이드록시 프로피온산 생산은 OB3b-MCR과 비교하여 OB3b-MCR-ACC 균주에서 약 3배 가량 증가한 것을 확인하였다(도 3의 b).
- [0084] **실시예 3: 메틸말로닐-CoA 카르복실전달효소 과발현에 따른 3-하이드록시 프로피온산 생산 증가 확인**
- [0086] 말로닐-CoA의 세포 내 농도를 향상시키기 위해, 아세틸-CoA 및 옥살로 아세테이트(oxaloacetate)를 말로닐-CoA 및 피루브산으로의 전환을 촉매하는 *P. freudenreichii* 유래의 *mmc* 유전자를 pAWP89-MCR 플라스미드에서 Ptac 프로모터의 조절하에 *mcr* 유전자와 함께 과발현시켰다.
- [0087] 그 결과, 두 재조합 균주의 세포 성장에는 큰 차이가 없는 반면(도 4의 A), *mmc* 유전자가 추가로 과발현된 *M. trichosporium* OB3b 균주(OB3b-MCR-MMC)에서 3-하이드록시 프로피온산 생산량은 약 70mg/L로, OB3b-MCR과 비교하여 약 3.5배 이상 증가한 것을 확인하였다(도 4의 B). 또한, 이는 상기 실시예 2에서 제조한 형질전환 균주 OB3b-MCR-ACC의 생산량 약 60mg/L와 비교하여서도 더 높은 수준을 나타냄을 확인하였다.
- [0089] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

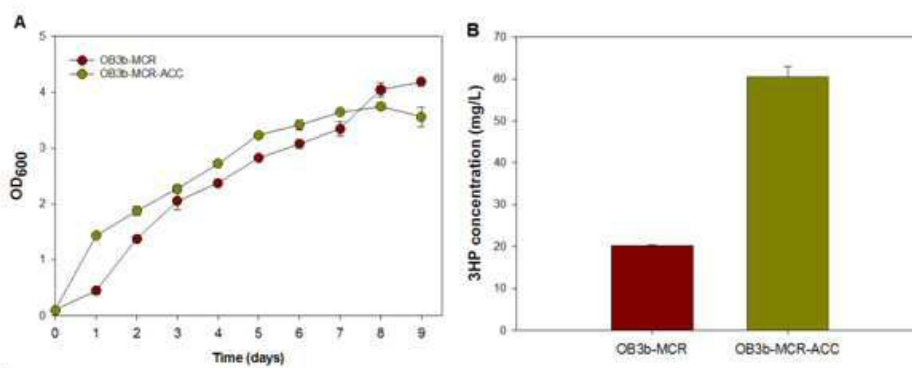
도면1



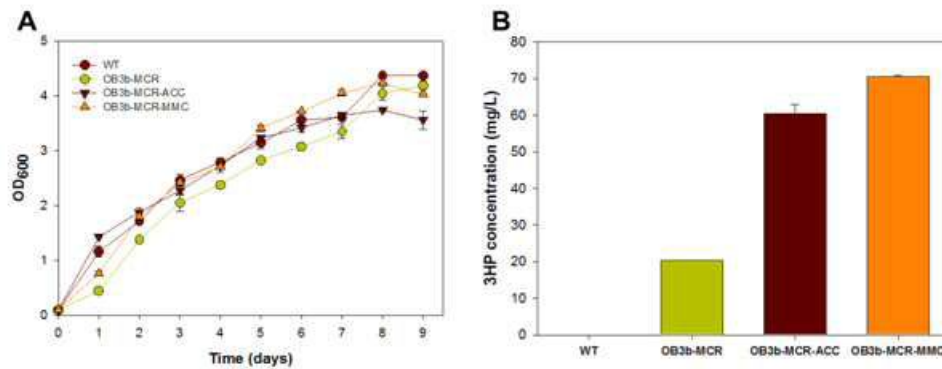
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transformed methanotrophs for producing 3-Hydroxypropionic acid and uses thereof
- <130> KPA180480-KR
- <160> 18
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 3663
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Chloroflexus aurantiacus
- <400> 1

```

atgagcggaa caggacgact cgcgggcaag atcgcgctca tcacgggcgg cgcgggcaat      60
atcggtcgg agctcacg cgcttctc gcggaggcg cgacggcat catctcggc      120

cgcaatcgcg cgaagctcac ggcgtcgcg gagcgcatgc aggcggaggc gggcgtccc      180
gcgaagcgca tcgacctga ggtcatggac ggctcgacc cggtcgcggt ccgcgcgggc      240
atcgaggcga tcgtcgcg ccatggccag atcgacatcc tcgtcaataa tgcgggctcg      300
gcgggcgcgc agcggcct cgcgagatc ccgtcacgg aggcggagct cgcccgggc      360
gcggaggaga cgctccatgc gtcgatcg aatctctcg gcatgggctg gcatctcatg      420
cgcatcgcg cgccgatat gccggtcg tcggcggtca tcaatgttc gacgatcttc      480
tcgcgcgg agtattatg ccgcatccg tatgtcacg cgaaggcg gctcaatgc      540

ctctcgagc tcgggcgcg cgagctcg gcgcgcgg tccggtcaa tacgatcttc      600

```

ccgggcccga tcgagtcgga ccgcatccgc acggtcttcc agcgcatgga ccagctcaag	660
ggccgcccgg agggcgacac ggcgcatcat ttctcaata cgatgcgcct ctgccgcgcg	720
aatgaccagg gcgcgctcga gcgccgttc ccgtcggtcg gcgacgtcgc ggacgcggcg	780
gtcttctctg cgtcggcgga gtcggcggcg ctctcgggcg agacgacga ggtcacgcat	840
ggcatggagc tcccggcgtg ctccgagacg tcgtctctcg cgcgcacgga cctccgcacg	900
atcgacgcgt cgggcccgcac gacgtcatc tgcgcgggcg accagatcga ggaggtcatg	960
gcgctcacgg gcatgctccg cacgtgcggc tcggaggcca tcatcggtt ccgctcggcg	1020
gcggcgctcg cgcagttcga gcaggcggtc aatgagtcgc gccgcctcgc gggcgcgagc	1080
ttcacccgc cgatgcgcct cccgtcgcac ccgcgcgacc cggcgacgat cgacgcggtc	1140
ttcgactggg gcgcggcgga gaatacgggc ggcatccatg cggcggtcat cctccggcg	1200
acgtcgcatg agccggcgcc gtgcgtcatc gaggtcgacg acgagcgcgt cctcaatttc	1260
ctcgcggacg agatcacggg cacgatcgtc atcgctcgc gcctcgcgcg ctattggcag	1320
tcgcagcgcc tcacgccggg cgcgcgcgcg cgggcccgc gcgtcatctt cctctcgaat	1380
ggcgcgagc agaatggcaa tgtctatggc cgcattcagt cggcgcgat cggccagctc	1440
atccgcgtct ggcccatga ggccgagctc gactatcagc gcgcgtcggc ggccggcgac	1500
catgtctcc cgcgggtctg ggccaatcag atcgctcgtc tcgcgaatcg ctgctcgag	1560
ggcctcgagt tcgctgcgc gtggacggcg cagctctcc attcgacgc ccatatcaat	1620
gagatcacgc tcaatatccc ggccaatc tcggcgacga cggcgcgcg ctcggcgtcg	1680
gtcggtggg cggagtcgt catcggtc catctcgga aggtcgct catcacggc	1740
ggctcggcg gcatcggcg ccagatcggc cgcctctcg cgtctcggg cgcgcgcgtc	1800
atgctcgcgg cgcgcgacc ccataagctc gagcagatgc agcgatgat ccagtcggag	1860
ctcgcggagg tcggctatac ggacgtcgag gaccgcgtcc atatcgccc gggctcgcac	1920
gtctcgtcgg aggcgcagct cgcggacctc gtcgagcga cgtctcggc gttcggcacg	1980
gtcgactatc tcatcaataa tgcgggcacg cggggcgtcg aggagatggt catcgacatg	2040
ccggtcgagg gctggcgcca tacgtcttc gcgaatctca tctgaatta ttcgtcatg	2100
cgcaagctcg cgcgctcat gaagaagcag ggctcgggtc atatcctcaa tgtctcgtcg	2160
tatttcggcg gcgagaagga cgcggcgatc ccgtatccga atcgcgcgga ctatcggtc	2220
tcgaaggcgg gccagcgcgc gatggcggag gtcttcgcgc gcttctcgg cccggagatc	2280
cagatcaatg cgatcgccc gggcccggtc gagggcgacc gcctccgcgg cacggcgag	2340
cggccgggc tcttcgcgc cgcgcgcgc ctcatctcg agaataagcg cctcaatgag	2400
ctccatcgcg cgctcatcg ggccgcgcgc acggacgagc gctcgatgca tgagctcgtc	2460

gagctcctcc tcccgaatga cgtcgcggcg ctcgagcaga atccggcggc gccgacggcg 2520
ctccgcgagc tcgcgcggcg cttccgctcg gagggcgacc cggcggcgtc gtcgtcgtcg 2580
gcgctcctca atcgctcgat cgcggcgaag ctctcgcgc gcctccataa tggcggctat 2640

gtcctcccgg cggacatctt cgcaatctc ccgaatccgc cggacccgtt cttcacgcgc 2700
gcgcagatcg accgcgagcg gcgcaaggtc cgcgacggca tcatgggcat gctctatctc 2760
cagcgcatgc cgacggagtt cgacgtcgcg atggcgacgg tctattatct cgcggaccgc 2820
aatgtctcgg gcgagacgtt ccatccgtcg ggcgccctcc gctatgagcg cacgccgacg 2880
ggcggcgagc tcttcggcct cccgtcgcg gagcgctcg cggagctcgt cggctcgacg 2940
gtctatctca tcggcgagca tctcacggag catctcaatc tctcgcgcg cgcgtatctc 3000
gagcgctatg gcgcgcgcca ggtcgtcatg atcgtcgaga cggagacggg cgcggagacg 3060

atgcgccgcc tctccatga ccatgtcgag gcgggcgcc tcatgacgat cgtcgcgggc 3120
gaccagatcg aggcggcgat cgaccaggcg atcacgcgt atggccgcc ggcccggtc 3180
gtctgcacgc cgttcgccc gctcccgacg gtcccgtcg tcggccgcaa ggactcggac 3240
tggctcagcg tctctcgga ggcgagttc gcggagctct gcgagcatca gctcacgcat 3300
catttcgcg tcgcgcgcaa gatcgcgtc tcggacggcg cgtcgtcgc gctcgtcacg 3360
ccggagacga cggcgacgtc gacgacggag cagttcgcg tcgcgaattt catcaagacg 3420
acgtccatg cgttcacggc gacgatcggc gtcgagtcgg agcgcacggc gcagcgcac 3480

ctcatcaatc aggtcgacct cacgcgccg gcgcgcgcgg aggagccgcg cgacccgcat 3540
gagcgccagc aggagctcga gcgcttcac gaggcgtcc tctcgtcac ggccgcgtc 3600
ccgccggagg cggacacgcg ctatgcgggc cgcattcatc gcggacgggc gattaccgtg 3660
taa 3663

<210> 2
<211> 3898
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Methylosinus trichosporium OB3b
<400> 2

atgaactggt attcgaatgt cgttcgccg aagatcaaag cctcatcaa gcgcgaggcg 60

cccgagaacg cctgggtcaa atgcccggag agcggccagc tcgtgttcca caaggacata 120
gaggacaatc tctatgtcat tccgggctcg ggtatcaca tgcgcatccc cgtcgaggcg 180
cggctcgcca gcctcttcga cgaggcgag cacgaattgc tgccgacgcc ggaggttcg 240

gccgatccgc tgaattccg cgacatcaag cgctatgtcg acaagatcaa agagtatcgg	300
ttgaagaccg gccatatcga cgcggtgacg ctggccttcg gcaagctcga ggacgcgcg	360
gtcacggtcg cgggtgcagga ttctgacttc atgggcggct cgctcggcat ggcggcgggc	420
gaggcgatcg tcaccggcat gacccatgcg ctggagaagc gcacgccatt catcatcttc	480
accgcctcgg gggcgcgcg catgcaggag ggcatgttct cgctgatgca gatgccgcgc	540
accacggtcg cgggtgcgcg gctgcgcgag gcgcgcttgc cttatatcgt cgtgctcacc	600
aatccgacca cgggcggcgt caccgcctcc tatgcatgc tgggcgacat tcacatcgcc	660
gagccccggc cgatcatcgg ctctgcggcg gcgcgcgtca tcgagcagac gattcgcgag	720
aagctgccgc agggttttca gcgcgccgaa tatctgcgcg accatggcat ggtcgacatg	780
gtcgtgccgc gccccgagat gcgcgcgaca ttggcgcggc tctgcgctct gctgacaaa	840
gcgcctcggc gcgccgcctg agtaccgggc cccccctga ggtcgacggt atcgataagc	900
ttgatatcga gtactactca accaaaccag caagaaggag gttatatatg gcgcgcaaag	960
ctccgacgcg acgcaccccc ccagccaaac cgagagtcgc cgccgccgcg gagacgggcg	1020
tcgacgccgc gctgctgcgc gagatcgcca agctgctcgg cgagagcgat ctacccgaaa	1080
tcgaggtcca gaaaggcgat ctgcgcataa gggcggcgcg catgccggcg ccggcgccgg	1140
cgatcgccca tggcgcgatc gcgctgccgc cctatgccgc gcagccttat gcgccccct	1200
atgctgcgcc gccgcgcgcg gccaaagccg ccgcgccgcg gccggcgagc catgccgacg	1260
cgctgaaatc gccgatggtc ggcaccgcct atctgcgccc gagccccgac gcgcggccct	1320
tcatagaggt cggtcgcgc gtcaccgcgg gcgataagct gctgctcatc gaggcgatga	1380
agacattcaa cgacatcgtc gcgcccaagg gcggcgtcgt caccgccatt ctggtggagg	1440
acggacagcc ggtcgaatat ggcgagcccc tcatcgtgat cgaatagcct gcagcccg	1500
gtatcgtaga tctacactaa taaagaagga ggtacataat gttcgacaag atcctcatcg	1560
ccaatcgcg cgagatcgcg ctctgcatcc tgcgcgcgc caaggagctc ggcatcgcca	1620
cggtcgccgt gcattcgacg gcggacgcgg atgcgatgca tgtgaagctc gccgacgaat	1680
ccgtctgcat cggaccgcg gcggcgcgcg actcctatct caacattccc tcgctgctct	1740
cggcctgcga gatcaccggc gccgacgcg tgcacccggg ctatggcttc ctctcggaga	1800
acgccggttt cgccgagatc gtggccgagc acgggctgac ctctatcggg ccgaaggccg	1860
agcacatccg gctgatgggc gacaagatcg aggccaaggc gacggcgcg gcctcggca	1920
ttccgtgcgt gccgggctcg gacggccga tcgccgacga gatcgaaggc gcgcgcgtcg	1980
ccgcgaagat cggctatccg gtgctggtga aagcggcctc gggcggcggc ggacgcggca	2040
tgaaggctgc gcgcaacgac accgagctcg ccatcgccat tcccactgcg gcacccgagg	2100

caaaggccgc cticggcgac gacacggtct atctcgagaa atatctcgag aagccgcgcc	2160
acatcgaaat ccaggtgttc ggcgacggca agggcgagc catccatctc ggcgagcgcg	2220
attgctcgct tcagcgtcgc caccaaaaag tgtgggagga aagcccgtcg cccgcgctca	2280
acgacgagca gcgcgccgag atcggcgagg tctgcgccgc ggcgatgcgc gaattgaaat	2340
atgccggcgc cggcacgata gaattcctct atgagaatgg cgccttctat ttcacgaga	2400
tgaacacgcg catccaggtc gagcatccgg tgaccgagge ggtgaccggc gtcgatctcg	2460
tcagcgagca aatccgggtc gcggccggct cgcgctgtc gatgcggcag gaagacatct	2520
ggttctgggg ccatgcgata gagtgccgcg tcaacgccga gcaccgtcg agctttcggc	2580
cctcgcccgg gcgcatcgcc tattatcacc cgccggggcg cgtcggcgtg cgcgtcgatt	2640
catcgcccta tcagggttac acgatccgc cgaactatga ctcgctgac ggcaagctga	2700
tcgtgatgg ccgcaatgc accgagggcg tgatgcgctt gcggcgcgcg ctcgacgaat	2760
tcacgtcga cggcatcgac acgacattgc cgttgttccg cacgctggtg cgcaacgccg	2820
atgtgcagaa cggagtctat gacatccact ggctcgagca ttttctggcg acgggcggca	2880
tagagccgac ctctgacac tagttggaat ataataaaaa cactaatcaa aaaggaggtc	2940
cacaatgcgt ttctatctcg acttcgaaaa gcccgtcgcc gagctcgaga ccaaggtcga	3000
ggagctgcgc gctctcgctt ccaagggcga cggcgtgtcg atcggcgagg agctgggcaa	3060
gctcgaggcc aaggccgccaggcgctcgc cgaatcttac gccactttga cgccctggca	3120
gaagatccag gtgcgcgcc atccgcagcg gccgcatctt tccgattatg tgcgccagct	3180
gttcgacgag ttcacgccgc tcgccggcga tcgcgccttc ggcgaggatt tggctatcgt	3240
cggcggcttt gcgcgctttc gcggcgagcc ggtctgcac atgggccagg agaagggtc	3300
ggacacgtcg agtcggctcg agcataattt cggcatggcg cggccggagg gctatcgaa	3360
ggcggcgcgg ctgatggagc tcgccgaccg cttcggcctg ccggtcgtct cgttggtcga	3420
caccgcgggc gccttcccgg gcatagacgc cgaggagcgc ggccaggccg aggccatcgc	3480
ccgctcgacc gaagtgtcgc tgcgctcgg cgttcccaat gtcgccgtgg tgggtgggga	3540
ggcgggctcc ggcggcgcca tcgccatcgc cacctgcaac aagtgctga tgctggagca	3600
cgccgtgtac acggtggcct cggccgagge ttggcctcg atcctgtggc gcgacgccac	3660
caaggcgag gatcgggcca ccagcatgaa gatcaccgcg caggacctgc tcaaattcgg	3720
catcatcgac gtcatcgtcg ccgagccgc gggcggcgcg catcgcgagc cgcaggccgc	3780
ggtgacggcg gtcggcgagg cgatcgacca tgcgctcgcc ggcctcgaa acctgtcgcg	3840

ggcgcagatc atcgacgccc gcgcggaaaa atttctgtcg atcggacgca agatctga 3898

<210> 3

<211> 3760

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Propionibacterium freudenreichii

<400> 3

atgagtcgcg gagaaattga ggtctcggag ccgcgcgagg tcggcatcac ggagctcgtc 60

ctccgcgacg cgcacatgct gctcatggcg acgcgcgcatg cgatggagga catggtcggc 120

gcgtgcgcgg acatcgacgc ggcgggctat tggtcggtcg agtgcctggg gcgcgcgacg 180

tatgactcgt gcatccgctt cctcaatgag gacccgtggg agcgcctccg cacgttccgc 240

aagctcatgc cgaattcgcg cctccagatg ctctccgcg gccagaatct cctcggctat 300

cgccattata atgacgaggt cgtcgaccgc ttcgtcgaca agtcggcgga gaatggcatg 360

gagctcttcc gcgtcttcga cgcatgaat gacccgcgca atatggcgca tgcgatggcg 420

gcggtcaaga aggcgggcaa gcatgcgcag ggcacgatct gctatacgat ctgcgccgtc 480

catacggtcg agggctatgt caagtcgcg ggccagctcc tcgacatggg cgcggactcg 540

atcgcgctca aggacatggc ggcgtctctc aagccgcagc cggcgatatga catcatcaag 600

gcgatcaagg acacgtatgg ccagaagacg cagatcaatc tccattgcca ttcgacgacg 660

ggcgtcacgg aggtctcgt catgaaggcg atcgaggcgg gcgtcgacgt cgtcgacacg 720

gcgatctcgt cgatgtcgt cgcccggggc cataatccga cggagtcggt cgccggagatg 780

ctcgagggca cgggctatgc gacgaatctc gactatgacc gcctccataa gatccgcgac 840

catttcaagg cgatccgccc gaagtataag aagttcgagt cgaagacgct cgtcgacacg 900

tcgatcttca agtcgcagat cccgggcggc atgctctcga atatggagtc gcagctccgc 960

gcgcaggcgg cgaggacaa gatggacgag gtcattgcgg aggtcccgcg cgtccgcaag 1020

gcggcgggct tcccgcgct cgtcagccg tcgtcgcaga tcgtcggcac gcaggcggtc 1080

ttcaatgtca tgatggcgga gtataagcgc atgacggcg agttcgcgga catcatgctc 1140

ggctattatg gcgcgtcgcc ggcggaccgc gacccgaagg tcgtcaagct cgcggaggag 1200

cagtcgggca agaagccgat cacgcagcgc ccggcggacc tcctcccgcg ggagtgggag 1260

gagcagtcga aggaggcggc ggcgtcaag ggcttcaatg gcacggacga ggacgtctc 1320

acgtatgcgc tcttcccga ggtcgcgccg gtcttcttcg agcatcgcg ggaggggccc 1380

cattcggtcg cgctcacgga cgcgcagctc aaggcggagg cggaggcgga cgagaagtcg 1440

ctcgcggctcg cgggcccggc cacgtataat gtcaatgtcg gcggcacggt ccgcgaggtc	1500
acggtccagc aggcgtgagg atgattgcca atcatggcgg agaataataa tctcaagctc	1560
gcgtcgacga tggaggggccg cgtcgagcag ctgcgggagc agcggccaggt catcgaggcg	1620
ggcggcggcg agcggccggt cgagaagcag cattcgagg gcaagcagac ggcgcgcgag	1680
cgcctcaata atctctcga ccgcattcg ttgcagagg tcggcgcgtt ccgaagcat	1740
cgcacgacgc tcttcggcat ggacaaggcg gtcgtcccgg cggacggcgt cgtcacgggc	1800
cgcggcacga tcttcggccg ccgggtccat gcggcgtcgc aggacttcac ggtcatgggc	1860
ggctcggcgg gcgagacgca gtcgacgaag gtcgtcgaga cgatggagca ggcgctctc	1920
acgggcacgc cgttcctctt cttctatgac tcgggcggcg cgcgcatcca ggagggcac	1980
gactcgtct cgggctatgg caagatgtt ttgcgaatg tcaagctctc gggcgtcgtc	2040
ccgcagatcg cgatcatcg gggcccgtgc gcgggcggcg cgtcgtatc gccggcgtc	2100
acggacttca tcatcatgac gaagaaggcg catatgttca tcacgggcc gcaggtcac	2160
aagtcggtca cgggcgagga cgtcacggcg gacgagctcg gcggcgcgga ggcgcatatg	2220
gcgatctcgg gcaatatcca ttctgtcgcg gaggacgacg acgcggcgga gtcctcgcg	2280
aagaagctcc tctcgttctt ccgcagaat aataggagg aggcgtcgtt cgtcaatccg	2340
aataatgacg tctcgccgaa tacggagctc cgcgacatcg tcccgatcga cggcaagaag	2400
ggctatgacg tccgcgacgt catcgcaag atcgtcgact ggggcgacta tctcgaggtc	2460
aaggcgggct atgcgacgaa tctcgtcacg gcgttcgcgc gcgtcaatgg ccgctcggtc	2520
ggcatcgtcg cgaatcagcc gtcggtcatg tcgggctgcc tcgacatcaa tgcgtcggac	2580
aaggcggcgg agttcgtcaa ttctgtcgac tcgttcaata tcccgtcgt ccagctcgtc	2640
gacgtcccgg gtttctctcc gggcgtccag caggagtatg gcggcatcat ccgcatggc	2700
gcgaagatgc tctatgcgta ttcgaggcg acggtcccga agatcacggt cgtcctccgc	2760
aaggcgtatg gcggctcgta tctcgcgatg tgcaatcgcg acctcggcgc ggacgcggtc	2820
tatgcgtggc cgtcgcgga gatcgcggtc atgggcgagg agggcgcggc gaatgtcatc	2880
ttccgcaagg agatcaaggc ggcggacgac ccggacgca tgcgcgga gaagatcgag	2940
gagtatcaga atgcgttcaa tacccgtat gtcgcggcgg cgcgcggcca ggtcgacgac	3000
gtcatcgacc cggcgacac gcgccgaag atcgctcgg cgctcgagat gtatcgacg	3060
aagcgccaga cgcggccggc gaagaagcat ggcaatttcc cgtgctgagc gaggagagaa	3120
attatggcgg acgaggagga gaaggacctc atgatcgca cgctcaataa gcgcgtcgcg	3180

tcgctcgagt cggagctcgg ctcgctccag tcggacacgc agggcggtcac ggaggacgtc 3240
ctcacggcga tctcggcggc ggtcgcggcg tatctcgga atgacggctc ggcggaggtc 3300
gtccatttcg cggcgtcgcc gaattgggtc cgcgagggcc gccgcgcgt ccagaatcat 3360
tcgatccgt gatccgggag taactcacat gaagctcaag gtcacgtca atggcacggc 3420
glatgacgtc gacgtcgac tcgacaagtc gcatgagaat ccgatgggca cgatcctctt 3480
cggcggcggc acggggcggc cggcggcgcc gcgcgcggcg ggcggcgcgg gcgcgggcaa 3540
ggcgggcgag ggcgagatcc cggcgccgct cgcgggcacg gtctcgaaga tcctcgtcaa 3600

ggaggcgac acggtcaagg cgggccagac gtcctcgtc ctcaggcga tgaagatgga 3660
gacggagatc aatgcgccga cggacggcaa gtcgagaag gtcctcgtca aggagcgcga 3720
cgcggtccag ggcggccagg gtctcatcaa gatcggctga 3760

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaMCR-F

<400> 4

ttcacacagg aaacagctat gagcggaaca ggacgact 38

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaMCR-R

<400> 5

gcattttccc gacaactatt acacgtaat cggccgtc 38

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pAWP89-F

<400> 6

tagttgtcgg gaagatgcgt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pAWP89-R

<400> 7

agctgtttcc tgtgtgaata 20

<210> 8

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACC-CT subunit beta-F

<400> 8

ggaacaaaag ctgggtacat taagcactat catataaatt aagaggaggt aatcaatgaa 60

ctgggtattcg aatgt 75

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACC-CT subunit beta-R

<400> 9

cgagggggggg cccggtactc aggcggcgcg ccgaggcg 38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin carboxyl carrier-F

<400> 10

tcgataagct tgatatcgat ggcgcgcaaa gctccg 36

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin carboxyl carrier-R

<400> 11

gatcccccg gctgcaggct attcgatcac gatgagggg	39
<210> 12	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Biotin carboxylase subunit-F	
<400> 12	
atagcctgca gcccggggat gttcgacaag atcctcat	38
<210> 13	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Biotin carboxylase subunit-R	
<400> 13	
gccgctctag aactagtgtc agaaggtcgg ctctatgc	38
<210> 14	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CT subunit alpha-F	
<400> 14	
gaccttctga cactagtatt gcgtttctat ctcgactt	38
<210> 15	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CT subunit alpha-R	
<400> 15	
accgcggtgg cggccgcttc agatcttgcg tccgatcg	38
<210> 16	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> ACC-4 subunit-F

<400> 16

cgggcgatta ccgtgtaa taagcactat catataaatt 40

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACC-4 subunit-R

<400> 17

gcattctccc gacaactatc agatcttgcg tccgatcg 38

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pAWP89-MCR-R

<400> 18

ttacacggtg atcgcccgtc 20