

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2009-0050793 2009년05월20일
(51) Int. Cl.	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내	(72) 발명자 박우준 서울 성북구 길음동 길음뉴타운 대우푸르지오 22 1동 504호 송진환 서울 마포구 아현동 645-12 201호 (8/4)	(74) 대리인 김선애
(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01) 10-2007-0117417 2007년11월16일 2007년11월16일		

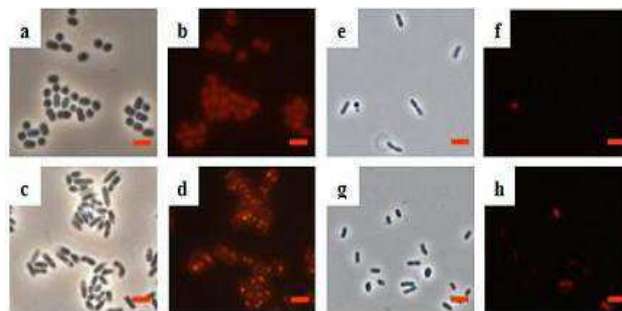
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 식물성 폐유를 이용하여 생분해성 플라스틱을 생산하는 슈도모나스속 균주 DR 2

(57) 요약

본 발명은 식물성 기름을 분해하여 생분해성 플라스틱인 폴리히드록시알카노에이트(PHA)를 생산하는 균주 *Pseudomonas* sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P) 및 이 균주를 이용한 PHA 생산방법을 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물성 기름을 기질로 이용하여 PHA의 생산 비용을 낮추고 튀김 기름 등으로 사용되고 남은 식물성 폐기름을 재활용하여 오염원을 줄이는 이중적 효과를 거둘 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

식물성 기름을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P).

청구항 2

폴리히드록시알카노에이트(PHA)를 생산하는 균주 *Pseudomonas* sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P).

청구항 3

- (a) 제1항 기재의 균주를 배양배지를 이용하여 배양하는 균주 배양단계;
- (b) 상기 배양된 균주를 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 축적배지를 이용하여 균주의 폴리히드록시알카노에이트(PHA)를 축적시키는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 축적단계; 및
- (c) 상기 축적단계에서 축적된 폴리히드록시알카노에이트(PHA)를 균주로부터 분리하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 분리단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 생산방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 배양배지는 인성분과 질소원을 제한시킨 배지(MMSB)인 것을 특징으로 하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 배양배지는 질소원 7.6 mM 및 인산 20 mM을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 생산방법.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 균주는 식물성 기름을 기질로 배양하는 것을 특징으로 하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물성 기름은 식물성 폐유인 것을 특징으로 하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 생산방법.

청구항 8

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 PHA는 옥타노에이트, 데카노에이트 및 도데카노에이트를 포함하는 3-히드록시알카노에이트 모노머로 구성되는 것을 특징으로 하는 히드록시알카로에이트(PHA) 생산방법.

청구항 9

Pseudomonas sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P)을 식물성 기름을 기질로 배양하여 미디움 체인 령스 폴리히드록시알카노에이트(medium chain length polyhydroxyalkanoate)를 생성시키고 이를 정제함을 특징으로 하는 MCL-PHA(medium chain length polyhydroxyalkanoate) 생산방법.

청구항 10

Pseudomonas sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P)에서 유래된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 PHA 생합성 유전자인 *phaC*.

청구항 11

제10항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 12

제11항의 재조합 벡터를 포함하는 대장균을 이용하여 PHA를 생산하는 방법.

청구항 13

식물성 기름에서 배양한 후 배지 속의 지질을 제거한 상태에서 균주를 나일 블루 A로 염색하는 단계를 포함하는 폴리히드록시알카노에이트(PHA) 과립자 확인방법.

청구항 14

서열번호 5의 염기서열을 갖는 16S rRNA 유전자를 포함하고 식물성 기름을 분해하는 *Eeterobacter* sp. CR1.

청구항 15

서열번호 6의 염기서열을 갖는 16S rRNA 유전자를 포함하고 식물성 기름을 분해하는 *Rhodococcus* sp. CR2.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 식물성 폐유를 이용하여 생분해성 플라스틱을 생산하는 슈도모나스속 균주 DR2에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 저렴한 식물성 폐유를 기질로 재활용하여 생분해성 플라스틱인 폴리히드록시알카노에이트(PHA)를 생산하는 슈도모나스 균주 DR2 및 이 균주를 이용한 PHA 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 통상적인 플라스틱 물질은 전형적으로 공지된 합성수단에 의해 석유화학원으로부터 생성된다. 이러한 합성 플라스틱은 가볍고 내구성이 뛰어난 반면 사용 후 폐기된 후 수십년이 지난 뒤에도 분해되지 않고 토양과 하천을 오염시키는 등 심각한 환경오염 문제를 일으키고 있다.
- <3> 근래에는 이런 합성 플라스틱을 대체할 수 있는 환경친화적인 생분해성 플라스틱이 개발되고 있다. 현재 전 세계적으로 지방족 폴리에스테르(Aliphatic Polyester), 폴리락타이드(Polylactide) 및 폴리히드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoate, 이하 PHA라고 함)가 생분해성 고분자 물질로 개발 중에 있다.
- <4> 상기 PHA는 미생물의 체내에 에너지 저장물의 형태로 축적되는 폴리에스테르로서, 그중의 하나인 PHB(polyhydroxybutyrate)가 1925년 레모이그네(Lemoigne)에 의해 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)으로부터 처음으로 발견되었다. PHB는 영국의 ICI사와 오스트리아의 Chimie Linz사에 의해 포도당, 설탕 등으로부터 상업적으로 생산되고 있으며, 이보다 물성이 우수한 P(HB-co-HV)(polyhydroxybutyrate-co-valerate) 공중합체는 포도당과 프로피온산의 혼합기질로부터 ICI 사에 의해 생산되고 있지만 현재의 높은 제조원가로는 기존의 비분해성 플라스틱을 대체하기가 어려운 실정이므로 제조원가를 절감하는 공정에 대한 연구가 진행되고 있다.
- <5> 대한민국 특허공개공보 제2002-0022508호에는 음식물 쓰레기 발효액의 유기산을 탄소원으로 사용하여 PHA를 생산하는 기술이 개시되어 있다. 상기 기술은 기질의 가격이 높은 당류를 미생물 기질로 사용하여 생산원가를 높이고, 유기산을 음식물 발효액과 같은 값싼 기질로 대체한다고 하나 실용화 단계에서 미생물 기질로써 안정적인 공급되지 않는 단점이 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 생분해성 플라스틱인 PHA를 저렴한 비용으로 효율적으로 생산할 수 있는 신규의 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <7> 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 저렴한 비용으로 효율적으로 생분해성 플라스틱인 PHA를 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- <8> 본 발명의 또 다른 목적은 식물성 기름을 분해할 수 있는 균주들을 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명자들은 식물성 기름을 분해할 수 있는 슈도모나스속 균주를 분리하여 이 균주가 식물성 폐유를 기질로 PHA를 생산하는 것을 최초로 규명하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- <11> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 PHA를 생산하는 신균주 *Pseudomonas* sp. DR2(기탁번호: KACC 91331P)를 제공한다.
- <12> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 균주를 배양배지를 이용하여 배양하는 균주 배양단계; (b) 상기 배양된 균주를 PHA 축적배지를 이용하여 균주의 PHA를 축적시키는 PHA 축적단계; (c) 상기 축적단계에서 축적된 PHA를 균주로부터 분리하는 PHA 분리단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 PHA 생산방법을 제공한다.
- <13> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- <14> 식물성 기름을 분해하여 PHA를 생산하는 미생물을 분리하기 위해, 먼저 식물성 기름을 분해할 수 있는 세균들을 집식배양법(enrichment cultivation)을 사용하여 농토양에서 분리하였다.
- <15> 이들 세균에 질소원과 인이 제한된 배지에서 식물성 기름을 단일 탄소원으로 공급하였을 때, 식물성 기름을 가장 잘 분해하면서 동시에 많은 양의 PHA를 생산하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주의 1500 bp의 16s rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 슈도모나스(*Pseudomonas*)속에 속하는 것을 확인하고 *Pseudomonas* sp. DR2로 명명하고 기탁번호 KACC 91331P로 기탁하였다.
- <16> 상기 본 발명에 의한 세균은 그 질량의 37.34%의 PHA를 식물성 기름으로부터 생성하여 축적하였다. 상기 세균에 의해 생성된 PHA는 3개의 주요한 3-히드록시알카노에이트(모노머)(3-hydroxyalkanoate(monomer))로 구성되었는데, 옥타노에이트(octanoate)가 37.75%, 데카노에이트(decanoate)가 36.74%, 도데카노에이트(dodecanoate)가 11.36%였다.
- <17> PHA의 생산에 많은 연구가 되어왔던 *Ralstonia eutropha* H16과 *Chromobacterium violaceum*과 *Pseudomonas* sp. KT2440와 본 발명에 의한 분리된 균주 DR2를 비교하여 배양한 결과, 식물성 기름을 이용하였을 때 본 발명에 의한 균주 DR2에서 더욱 많은 PHA가 생산되었다.
- <18> 한편 본 발명에 의한 균주 DR2는 다양한 PHA를 생산하는 데 이용되는 기질인 아세테이트(acetate)와 부틸레이트(butyrate)를 이용하여서는 PHA를 생산하지 못했다.
- <19> 상기 DR2 균주에서 PHA 합성효소 유전자 보유가 확인되어, 그 유전자의 391bp의 염기서열(서열번호 1)이 분석되었다. 슈도모나스는 일반적으로 끈적이는 고분자 형태인 Medium-Chain-Length(MCL) PHA를 합성하는 효소들이 알려져 있다. DR2 균주에서 PHA 합성 유전자의 염기서열을 분석해 보았을 때, *Pseudomonas* sp. KBOS 03 phaC1과 93%의 염기서열 동일성(identity)을 보여주었다. 본 발명에 의한 DR2 균주에서 폐 튀김기름으로부터 23.52%의 MCL-PHA가 생산되었다.

효과

- <20> 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 *Pseudomonas* sp. DR2은 식물성 폐유를 재활용해서 생분해성 플라스틱을 생산하는데 매우 유용한 균주이다. 저렴한 미생물 기질로써 식물성 폐유와 옥수수 기름을 통해 PHA를 생산하는 본 발명에 의한 방식으로 PHA의 생산 가격을 획기적으로 낮출 수 있고 식물성 폐유를 재활용하여 오염원을 줄이는 이중적 효과를 도모할 수 있다. 나아가 식물성 폐유는 지속적으로 발생하고 수집됨으로써 본 발명에 의하면 PHA 생산을 위한 미생물 기질에 대한 공급안정성이 보장되는 효과도 도모할 수 있다.
- <21> 따라서 본 발명은 환경친화적인 생분해성 PHA 생산 분야 등에서 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <22> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<23> **실험 방법 및 재료**

<24> **균주 분리와 분리 균주의 배양 조건**

<25> 고려대학교 덕소농장의 논토양에서 채취한 토양 샘플(sample)을 탄소원으로써 식물성 기름인 옥수수유를 1%로 넣어준 MSB 배지 (minimal salt basal medium)에서 220 rpm으로 2 일 동안 실온에서 배양한 후 멸균된 같은 배지에 같은 조건으로 1/100 희석하여 2일 동안 배양하였다. 토양에서 분리된 식물성 기름 분해 균주는 증식 속도를 광학밀도 600(optical density 600)으로 측정하였다.

<26> 배양조건은 목적에 따라 LuriaBertani (LB) broth 또는 MSB에서 30° C에서 220 rpm으로 배양하였으며 실험 목적에 따라 다양한 탄소원으로 실험하였는데 농도는 아래와 같이 일정하게 주었다; 옥수수 기름(corn oil, 1%), 폐유(waste fried oil, 1%), 디젤(diesel, 1%), 글루코오스(glucose, 0.4%), 구연산 나트륨(sodium citrate, 10 mM), 아세트산 나트륨(sodium acetate, 0.8%, pH 7.0), 부틸레이트 나트륨(sodium butyrate, 0.8%, pH 7), 팔미트산염(palmitate, 0.4%), 글리세롤(glycerol, 0.8%).

<27> PHA 생산을 위해서는 MSB 배지 조성 중 인산(인산 칼륨과 인산 나트륨)의 농도를 반으로 줄인 20 mM로 사용하였고 질소원(황산 암모늄)은 7.6 mM로 매우 제한된 농도를 사용한 배지로 구성하였고 이를 MMSB로 명명하였다. PHA를 생산하기 위해 충분한 시간으로 모든 생산 조건을 72 시간을 기준으로 배양하였고, PHA 생산 및 식물성 기름에서 증식 속도를 비교하기 위해 기존에 많은 연구가 실시되었던 *Ralstonia eutropha* H16 (ATCC 17699)와 *Chromobacterium violaceum* (KACC 11542, ATCC 12472)이 사용되었다.

<28> **16s rRNA 유전자와 PHA 합성 유전자의 부분적인 염기 서열 분석**

<29> 원핵생물의 분류를 위해서 27F 프라이머 (5' -AGAGTTTGATCTMTGGCTCAG-3' ; 서열번호 2) 와 1492R 프라이머 (5' -GGTTACCTTGTACGACTT-3' ; 서열번호 3)를 사용하여 PCR을 통해서 16s rRNA 유전자를 증폭하였다. 또한 PHA 합성효소(PHA synthase) 유전자를 확인하기 위해서, PHA의 합성 유전자의 일부를 PCR을 통해서 증폭하기 위해 기존에 발표된 phaCDP-F2 (5' -GTSTTCRTSRTSWCTGGCGCAACCC-3'; 서열번호 4) 와 phaCDP-R3 (5' -AGGTAGTTGTYGACSMRTAGTKTCCA-3' ; 서열번호 5) 프라이머 한 쌍을 이용해 확인하였다. 증폭된 유전자는 바이오닉스(Bionics)에 의뢰하여 염기 분석을 실시하였고 NCBI 데이터베이스를 이용해 토양에서 분리한 균주의 속과 PHA의 특성을 결정하였다. 분리된 4개 균주의 16s rRNA 유전자 염기서열은 Gen Bank에 각각 식물성 기름을 분리하는 균주로 등록되었다 [CR1 균주 (EU181264), CR2 균주 (EU181263), DR1 균주 (EF520734), DR2 균주 (EU181265)]. 각 균주의 16s rRNA 유전자 염기서열에 대해 본 명세서에서는 CR1 균주에 서열번호 6, CR2 균주에 서열번호 7, DR1 균주에 서열번호 8, DR2 균주에 서열번호 9를 부여하였다.

<30> **PHA 축적하는 세균의 염색**

<31> PHA를 축적할 수 있는 조건의 배양액인 MMSB (질소원 7.6 mM, 인산 20 mM)에서 220 rpm으로 72시간 배양한 후 축적된 PHA를 염색하기 위해서 나일 블루 A(Nile blue A)를 에탄올에 녹여 1% 농도의 에탄올 용액을 만들어 거름종이 (여과지 Whatman No.1)에 걸러서 보관하고 사용할 때마다 거름종이로 걸러서 사용하였다. 배양상태에서 세균을 염색하기 위해서 디메틸 술폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 녹여서 최종농도 0.5 µg/ml로 배지에 첨가시켜준 후 PHA 염색을 할 수 있었다. 하지만 나일 블루 A는 지질에 염색되는 염료로써 식물성 기름이 첨가된 배지에서 한천이나 액체 배지 내에서 함께 넣어서 염색할 수 없다. 식물성 기름에서 길러진 균주는 원심분리를 통해서 배지와 균주를 분리한 후 PBS(phosphate buffered saline, pH7.2)로 두 번 씻어준 후 최종적으로 깨끗한 균주만을 확보한 뒤 슬라이드 글라스에 열처리 또는 상온에서 균주를 고정하였다. 고정된 균주에 1% 나일 블루 A 에탄올 용액을 균주 전체에 골고루 뿌려준 후 에탄올이 완전히 날아갈 때까지 기다렸다. 염색이 모두 끝나면 균주 관찰에 방해되는 염료를 씻어주기 위해서 100% 아세트산이나 100% 에탄올로 씻은 후 깨끗한 물로 아세트산이나 에탄올을 완전히 씻어서 말렸다. 염색이 완료된 균주는 형광현미경의 550nm 형광필터를 통해서 균주 내부에 축적되어진 과립형 PHA를 확인할 수 있었다. 특히, 나일 블루 A는 에탄올 용액상태에서 자연적으로 나일 블루, 핑크 또는 레드로 산화되는데 산화된 형태의 염료가 PHA를 염색하는데 보다 효과적이다.

<32> **PHA 추출과 구성성분 분석**

<33> 다양한 탄소원으로 배양한 균주는 원심분리를 통해서 배양액과 분리시킨 후 PBS로 두 번 씻어주었다. 배양액이 완전히 제거된 깨끗한 균주를 12시간 이상 -80°C에서 보관한 후 24시간 동결건조시킨다. 뜨거운 클로로포름(chloroform)으로 세균에 축적되어 있는 PHA를 녹여서 추출할 수 있는데 Pyrex Soxhlet을 이용하여 9시간 동안 수행하면 필터를 통해서 PHA와 약간의 지질이 클로로포름(chloroform)에 녹아서 건조된 균에서 추출하여 분리시

킬 수 있었다. 추출된 PHA는 농축기를 이용해 30~60분 가량 농축하여 10 ml로 농축하고 100 ml의 회전하는 차가운 메탄올에 한 방울씩 떨어뜨려 일반 지질과 고분자인 PHA를 분리시켰다. 고분자인 PHA는 메탄올에 섞이면서 결정화되고 침전되었다. PHA 분리 순도를 높여주기 위하여 외부 먼지를 방지한 후 상온에서 12시간 방치하여 PHA만 완전히 침전되도록 유도하였다. 침전된 PHA를 획득함으로써 PHA를 얻을 수 있고 추출 과정을 반복할수록 PHA의 순도는 높아진다.

<34> 얻어진 PHA의 조성을 확인하기 위하여 GC/MS (gas chromatography - mass spectrometer)를 이용하는데 파이렉스 튜브(pyrex tube)에 PHA를 넣고 황산(sulfuric acid)과 메탄올(methanol)을 3:17로 섞은 후 혼합 용액을 1 ml을 넣고 1 ml의 클로로포름(chloroform)을 넣은 후 볼텍스(vortex)로 PHA를 강하게 섞은 후 100℃ 끓는 물에 3시간 동안 중탕하였다. PHA의 폴리에스테르(polyester) 구조가 끊어지고 메틸에스테르(methyl ester)로 모노머(monomer)가 만들어지면 황산마그네슘으로 탈수시킨 1 µl 시료(sample)를 GC/MS로 구성성분을 확인하였다. GC/MS 분석을 위한 조건은 다음과 같다; Agilent 회사의 컬럼 중 HP-5MS를 사용하였고, 주입기 온도는 250℃로 시료를 기화시킨 후 오븐에 장착된 컬럼 내 초기 온도는 80℃에서 8분 동안 유지한 후 분당 8℃로 오븐 온도를 상승시켜 150℃까지 이르면 분당 2℃로 오븐 온도를 상승시켜 176℃까지 온도를 올려준다. 컬럼과 시료의 안정화를 위해 176℃에서 1분간 유지시킨 후 280℃로 5분간 유지하여 컬럼을 세척하여 다시 초기 온도 80℃로 냉각시켜 다음 시료 분석을 준비한다. 1 µl의 시료 클로로 포름에 녹여서 주입되었고 이동상 기체로 분당 34.1 ml의 부피의 헬륨으로 분리하였다. 검출기는 질량검출기 (Mass Selective Detector)를 이용하여 정성/정량 분석하였다. 검출기 온도는 300℃에서 검출하였으며 정량을 위해서 질량 검출기를 적어도 6시간 가동하여 안정적인 진공 상태 유지시켰다.

<35> 식물성 기름인 옥수수유와 식물성 폐유의 구성 분석

<36> 식물성 기름의 구성 성분을 조사하기 위해서 sigma-Aldrich 회사에서 제공되는 “애플리케이션 노트 132(application note 132)”의 실험 방식대로 식물성 기름의 지방산을 분석하였다. 20~50 mg의 기름 샘플을 1ml 메탄올 염산(methanolic HCl)과 1 ml 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)과 1 ml 2,2-디메톡시프로판(2,2-Dimethoxypropane; 2,2-DMP)를 섞어서 3시간 동안 100℃ 물에 중탕하여 식힌 후 1 ml의 물과 1 ml의 DCM을 추가적으로 넣어서 볼텍스(vortex)를 이용하여 강하게 흔들어준 후 원심분리를 통해서 상분리를 시킨 후 지방산이 녹아있는 유기층만 획득하여 황산마그네슘으로 탈수한 뒤 PHA 분석 조건과 동일한 조건에서 GC/MS로 분석하였다. 지방산 정성 분석을 위해 FAME (Fatty Acid Methyl Ester)를 표준 용액으로 이용하였다.

<37> 실시예 1. 논토양으로부터 식물성 기름을 분해하는 균주 분리

<38> 식물성 기름을 분해하는 균주는 고려대학교 덕소 농장의 논토양에서 옥수수 기름을 단일 탄소원으로 이용하여 집식배양(enrichment cultivation)을 통해 분리되었다. 식물성 기름을 분리할 수 있는 균주를 확보하기 위해 단일 탄소원으로 옥수수 기름을 보충한 MSB (minimal salt basal media) 액체배지에서 상온 (23~25℃)에서 220 rpm으로 흔들려주어 산소를 공급해주는 상태에서 진탕 배양하여 균을 분리하였다. 상기 논토양에서 확보된 4개의 균주는 각각 CR1, CR2, DR1, DR2로 명명하고 1500bp의 16s rRNA 유전자의 염기서열을 분석해 대략 400에서 1400 bp까지의 유전자 서열을 밝혔다. 상기 4개의 균주의 NCBI 데이터베이스의 16s rRNA 유전자의 염기서열을 BLAST 프로그램을 통해서 비교분석하였다. 각 염기서열을 통해 각 균주의 속명을 확인했다. 분석된 DR2 균주의 염기서열은 *Pseudomonas fluorescens*와 *Pseudomonas jessenii*와 100% 동일하며, CR1 균주는 *Enterobacteriaceae bacterium* p4f-1와 CR2 균주는 *Rhodococcus erythropolis* strain LAM18와 DR1 균주는 *Acinetobacter calcoaceticus*와 각각 100%, 100%, 99%가 같은 동일성(identity)을 보여주었다.

<39> 실시예 2. DR2 균주의 PHA 합성효소 유전자의 염기서열 분석과 특성

<40> 4개의 균주에서 PHA 합성효소 유전자 보유를 확인하기 위해 디제너레이트 PCR(degenerate PCR)을 해 보았다. 증폭된 DNA를 염색하여 0.8 % 아가로스겔(agarose gel) 상에서 그 크기를 확인하였다. 그 결과 DR2 균주에서 PHA 합성효소 유전자가 증폭 및 발견되었고 그 중 391 bp의 염기서열(서열번호 1)이 분석되었다(도 2). PHA 합성효소 유전자의 부분적인 염기서열 분석은 *Pseudomonas* sp. KBOS 03 phaC1의 염기서열과 93%로, *Pseudomonas fluorescens* phaC1의 염기서열과 90%, *Pseudomonas aureofaciens* phaC1의 염기서열과 89%의 동일성(identity)을 보여주었다. *Pseudomonas* sp. DR2 균주의 PHA 합성효소 유전자(PHA synthase gene)는 끈적거리는 성질을 가진 PHA의 한 종류인 medium chain length PHA (MCL-PHA)을 합성하는 유전자 phaC임을 확인하였다.

<41> 실시예 3. PHA 생산 균주의 선발 및 *Pseudomonas* sp. DR2 균주가 옥수수 기름으로부터 생산하는 PHA의 특성

<42> 분리된 균주 중 세균내에 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, PHA)를 축적할 수 있는 균주를 선정

하기 위해 인과 질소원이 각각 20 mM과 7.6 mM로 제한된 MMSB (modified minimal salt basal media)에 옥수수 기름이나 포도당과 구연산염을 단일 탄소원으로 보충하여 72시간 진탕배양시켜 세균 내 PHA가 축적되는지 확인해 보았다.

<43> 생산된 PHA를 염색하여 관찰하기 위해 지방염색능이 있는 형광염료인 나일 블루 A(Nile blue A)를 에탄올에 녹여 1% 용액을 만들어 염색하였고 축적된 과립형의 PHA는 550 nm 필터를 통해서 형광현미경으로 확인할 수 있었다.

<44> 미생물 내에서 축적되는 PHA 과립자는 나일 블루(Nile blue A)와 산화된 형태인 나일 핑크(Nile pink)나 나일 레드(Nile red)로 염색된다. 기존의 PHA 염색방법은 한천 배지 내에서 콜로니(colony)를 염색하는 방식과 액체 배지에서 배양하면서 염색하거나 배양한 후 염색하는 방법이 있었다. 하지만 옥수수 기름을 탄소원으로 사용하는 경우에는 나일 블루 A가 옥수수 기름에 먼저 염색되므로 배지 내에서 균주 내 축적된 PHA를 염색할 수 없었다. 나일 블루 A가 지질에 잘 결합되는 염료이기 때문에 옥수수 기름으로 배양한 후 배지 속의 지질을 완전히 제거한 상태에서 균주를 염색했을 때 축적된 PHA 과립자를 확인하였다. 그 결과를 도 1a에 나타내었다. CR1(도 1a의 e, f)와 CR2(도 1a의 g, h) 균주는 나일 블루 A 염색에서도 PHA 염색이 되지 않았다. DR1(도 1a의 a, b)과 DR2(도 1b의 c, d) 균주는 한천 배지에서 염색이 되어 550nm의 자외선에서 연분은 색의 콜로니로 확인할 수 있었다. 하지만 DR1 균주는 현미경을 통해 염색된 과립자를 확인할 수 없었고 동결건조한 균주에서도 PHA를 추출할 수 없었다(도 1a의 a, b). DR2 균주는 형광현미경을 통해서 PHA 과립자가 균주 내에 축적되어 있음을 볼 수 있었고 추출을 통해서도 확인하였다(도 1a의 c, d).

<45> 도 1b는 식물성 기름을 분해하면서 자라는 세균의 증식속도를 나타내는 도면이다. PHA를 축적할 수 있는 배지인 MMSB (modified minimal salt basal broth) 에 1%의 옥수수 기름을 첨가하여 시간에 따라 증식 속도를 측정하였다. 논토양에서 분리된 DR1 균주(흰색 동그라미)와 DR2 균주(흰색 마름모)와 CR1 균주(검은색 동그라미)와 CR2 균주(흰색 삼각형) 4균주 모두 증식 속도를 측정했다. DR1균주가 증식 속도는 가장 빨랐으나 PHA가 합성되는 조건인 72시간까지 배양했을 때 DR2 균주가 가장 잘 자랐고 질량도 가장 높았다.

<46> 표 1은 본 발명에 의한 *Pseudomonas* sp. DR2 균주에 의해 다양한 기질로부터 생산된 PHA의 조성을 나타낸 것이다. 기질의 농도는 0.4% 글루코오스(glucose), 10 mM 구연산 나트륨(sodium citrate), 0.8% 글리세롤(glycerol), 0.8% 아세트산 나트륨(sodium acetate, pH 7.0), 0.8% 부틸레이트 나트륨(sodium butyrate, pH 7.0), 0.4% 팔미트산염(palmitate), 1% 옥수수 기름(corn oil)으로 72시간 배양되었다.

표 1

	PHA ^a % (w/w)	CDW ^b (g/l)	3-히드록시알카노에이트, 메틸에스테르 (3-hydroxyalkanoate, methyl esters ^c (%))						
			3HB ^d	3HHx ^e	3HO ^f	3HD ^g	3HDD ^h	3HTD ⁱ	3HHxD ^j
글루코오스	5.02	0.89		-	13.20	39.68	42.25	4.87	-
구연산염	3.29	0.84		-	7.740	41.14	51.12	-	-
글리세롤	3.59	0.75		-	11.64	34.42	20.8	33.14	-
아세테이트*	-	0.78		-	-	42.09	57.91	-	-
부틸레이트*	-	0.83		-	-	43.03	56.97	-	-
팔미트산염*	4.93	0.76		3.40	18.71	35.6	36.97	-	5.33
옥수수 기름	37.34	0.96		4.61	37.75	36.74	11.36	7.50	2.04
글루코오스*	-	-	2.33	-	12.89	38.76	41.26	4.76	-
옥수수 기름*	-	-	0.90	5.24	39.63	34.13	11.37	6.53	2.20

<48> ^a polyhydroxyalkanoate (폴리 히드록시 지방산), ^b cellular dry weight (세균 건조 중량), ^c GC area % (기체 크로마토그래피 적분 값); ^d 3-hydroxybutyrate, ^e 3-hydroxyhexanoate, ^f 3-hydroxyoctanoate, ^g 3-hydroxydecanoate, ^h 3-hydroxydodecanoate, ⁱ 3-hydroxytetradecanoate, ^j 3-hydroxyhexanoate; *PHA를 추출하지 않고 균주 자체로 3-hydroxyalkanoate (PHA monomer) 분석

<49> *Pseudomonas* sp. DR2 균주는 72 시간 동안 옥수수 기름으로 배양했을 때 균주 무게의 37.34%의 MCL-PHA를 균 내에 축적하였다(표 1). 72 시간 동안 옥수수 기름으로 배양한 DR2 균주가 생산한 MCL-PHA의 주요 성분은 3-

HO(37.75%, 3-hydroxyoctanoate)와 3-HD(36.74%, 3-hydroxydecanoate)와 3-HDD(11.36%, 3-hydroxydodecanoate)였고, 그 밖의 성분의 3-히드록시알카노에이트[3-HB(3-hydroxybutyrate), 3-HHx(3-hydroxyhexanoate), 3-HTD와 3-HHD(3-hydroxyhexadecanoate)]가 총 PHA의 14.15%를 차지하였다(표 1). DR2 균주가 생산한 MCL-PHA는 끈적끈적하고 아교질의 특성을 지녔다. 나일 블루 A 염색의 특성상 지질이 포함된 배지 내에서 PHA를 축적한 균주를 직접 염색할 수 없고, 특히 왁스와 같은 지질을 균 내에 축적하는 균주에 대해서는 나일 블루 A 염색에서 주의해야 한다.

<50> 실시예 4. *Pseudomonas* sp. DR2 다양한 기질을 통한 PHA 생산 조사

<51> 다양한 기질을 이용하여 *Pseudomonas* sp. DR2가 생산하는 PHA의 조성을 조사하였다(표 1). 다양한 기질을 통해 축적된 PHA의 과립자는 형광 현미경을 통해서 확인되었고(도 3), 추출된 PHA의 조성과 PHA가 축적되지 않아 추출되지 않은 기질은 균주 자체의 PHA 모노머(PHA monomer)인 3-히드록시알카노에이트(3-hydroxyalkanoate) 분석을 시행하였다. 분석은 GC/MS를 통해 양이 측정되었다(표 1).

<52> 기질의 최종 농도는 다음과 같다. 글루코오스(glucose)은 5.05%, 구연산염(citrate)은 3.29%, 글리세롤(glycerol)은 3.59%, 팔미트산염(palmitate)은 4.93%, 옥수수 기름(corn oil)은 37.34%, 폐 식용유(waste fried oil)는 23.52%이었다.

<53> 도 3은 탄소원의 종류에 따라 *Pseudomonas* sp. DR2 균주 속에 축적되는 PHA에 대한 영향을 알아보기 위해, 각각 다른 종류의 탄소원에서 축적된 PHA를 염색하여 확인한 사진이다. 형광현미경 사진(550 nm 필터)으로 PHA가 축적되어진 모습을 확인하였다. PHA 과립자는 1% 나일 블루 A(Nile blue A) 에탄올 용액에 녹여서 염색되었다. 특히, 나일 블루 A 에탄올 용액은 자발적으로 산화되면서 나일 핑크(Nile pink)가 되는데 붉은 색 계열의 나일 핑크나 나일 레드(Nile red)는 세균 속에 축적된 PHA 과립을 더욱 선명하게 볼 수 있게 염색시킨다. *Pseudomonas* sp. DR2 균주를 PHA를 합성할 수 있는 조건인 MMSB 배지에서 다양한 탄소원을 공급한 후 72시간 동안 진탕배양한 후 나일 블루 A로 염색하여 형광현미경으로 확인하였다. 상기 형광사진으로 확인했을 때 글루코오스, 옥수수 기름, 튀김 후 폐유로부터 PHA 과립자가 선명하게 염색되어 관찰되었다.

<54> 팔미트산(palmitic acid)과 글루코오스와 구연산염에서 배양된 DR2 균주가 축적한 PHA의 대부분은 3-히드록시데카노에이트(3-HD)와 3-히드록시도데카노에이트(3-HDD)였다. 글리세롤에서 배양한 DR2는 3-히드록시데카노에이트(3-HD)와 3-히드록시도데카노에이트(3-HDD)와 3-테트라데카노에이트(3-HTD)가 주성분이었다(표 1). *Pseudomonas* sp. DR2는 옥수수 기름을 이용해 균주 무게의 37.34%까지 MCL-PHA를 축적하였고 식물성 폐유를 이용해서 균주 무게의 23.52%까지 축적하였다. 특히, PHA를 생산하기 위해 많이 사용되었던 아세트산(acetic acid)과 부티르산(butyric acid)에서 PHA가 추출되지 않았다.

<55> 실시예 5. 대표적인 PHA 생산 균주와 DR2 균주의 옥수수 기름을 이용한 PHA 생산 및 증식속도 비교

<56> *Ralstonia eutropha* H16와 *Chromobacterium violaceum*은 short-chain-length PHA(이하, SCL-PHA)의 대표적인 생산 균주이고, *Pseudomonas putida* KT2440 모델 균주는 MCL-PHA를 생산하는 대표적인 균주이다. *Ralstonia eutropha* H16는 폴리히드록시부틸레이트(polyhydroxybutyrate, PHB)를, *Chromobacterium violaceum*은 폴리히드록시발러레이트(polyhydroxyvalerate, PHV)를 생산하는 대표적인 PHA 생산 균주이다.

<57> 도 4는 폴리히드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate)를 생산하기 위해 산업적으로 응용되고 있는 *Ralstonia eutropha* H16과 기존에 많이 연구된 *Chromobacterium violaceum*를 옥수수 기름과 식물성 폐유를 기질로 하여 배양하였을 때 PHA 생산을 비교하기 위해 *Ralstonia eutropha* H16과 *Chromobacterium violaceum*이 *Pseudomonas* sp. DR2 균주와 비교해서 옥수수 기름을 이용해서 자라는 증식 속도를 측정한 결과를 나타내는 도면이다. 각각의 균주들은 PHA를 생산하는 조건의 배지인 MMSB에 1%의 옥수수 기름을 단일 탄소원으로 사용하여 배양하였다. 도 4와 같이 옥수수 기름을 탄소원으로 사용하여 증식하는 속도를 비교했을 때, DR2 균주가 다른 두 균주와 비교해서 비슷하게 증식하는 것을 확인할 수 있었으나 *Pseudomonas putida* KT2440 균주는 옥수수 기름에서 전혀 자라지 않았다. *R. eutropha* H16이 가장 빨리 자라고 DR2 균주의 증식 속도가 두 번째로 빠르긴 했으나 PHA를 충분히 축적할 수 있는 시간인 72 시간을 기준일 때 DR2 균주의 질량이 가장 높았다(도 4).

<58> 표 2는 배양액에 1%의 옥수수 기름을 단일 탄소원으로 사용하여 30℃에서 72 시간 동안 균주들을 배양한 후 옥수수 기름으로부터 생산된 PHA 조성을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 PHA를 생산하는 양에 있어서도 *R. eutropha* H16는 균주 질량의 20.70%, *C. violaceum*은 균주 질량의 1.55%를 생산하였고 DR2 균주는 37.34%로 더 많이 생산하였다. 나아가 *R. eutropha* H16과 *C. violaceum*가 옥수수 기름을 이용하여 생산한 PHA는 모두 SCL-PHA인 PHB였고, DR2는 MCL-PHA였다. 따라서 본 발명에 의한 *Pseudomonas* sp.

DR2 균주는 옥수수 기름을 이용하여 PHA를 생산하는 데 효율적이라 할 수 있다.

표 2

<59>

	PHA ^a % (w/w)	CDW ^b (g/l)	3-히드록시알카노에이트, 메틸 에스테르 ^c (%) (3-hydroxyalkanoate, methyl esters ^c (%))						
			3HB ^d	3HHx ^e	3HO ^f	3HD ^g	3HDD ^h	3HTD ⁱ	3HHxD ^j
Strain DR2	37.34	0.96		4.61	37.75	36.74	11.36	7.50	2.04
<i>C. violaceum</i> ^k	1.55	0.89	100	-	-	-	-	-	-
<i>R. eutropha</i> ^l H16 ^l	20.70	0.98	100	-	-	-	-	-	-

<60>

^a polyhydroxyalkanoate (폴리히드록시 지방산), ^b cellular dry weight (세균 건조 중량), ^c GC area % (기체 크로마토그래피 적분값), ^d 3-hydroxybutyrate, ^e 3-hydroxyhexanoate, ^f 3-hydroxyoctanoate, ^g 3-hydroxydecanoate, ^h 3-hydroxydodecanoate, ⁱ 3-hydroxytetradecanoate, ^j 3-hydroxyhexanoate, ^k *chromobacterium violaceum*, ^l *Ralstonia eutropha* H16.

<61>

실시예 6. *Pseudomonas* sp. DR2의 식물성 폐유와 옥수수 기름의 이용도

<62>

옥수수 기름과 식물성 폐유의 지방산 조성은 기체 크로마토그래피 질량 검출기(GC/MSD)와 기체 크로마토그래피 이온 검출기(GC/FID)를 이용하여 정성분석되었고 FAME (fatty acid methyl ester)을 표준 용액으로 이용하여 정량하였다. 옥수수 기름은 54.36%의 리놀레산(C18:2), 27.10%의 올레산(C18:1), 15.28%의 팔미트산(C16:0), 2.16%의 스테아르산(C18:0), 1.10%의 다른 지방산으로 구성되어 있다. 산패된 식물성 폐유는 58.98%의 리놀레산(C18:2), 21.07%의 팔미트산(C16:0), 19.27%의 올레산(C18:1), 0.41%의 cis-10-pentadecenoic(C15:1), 0.27%의 mysteric(C14:0)로 구성되어 있다.

<63>

도 5는 옥수수 기름과 식물성 폐유에 포함된 지방산의 이용률을 확인하기 위해, *Pseudomonas* sp. DR2 균주를 옥수수 기름과 식물성 폐유에 10¹⁰개의 균주를 접종한 후 6시간 단위로 균주가 사용하지 못한 기름의 지방산 성분과 양을 GC/MS로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. *Pseudomonas* sp. DR2균주는 옥수수 기름과 식물성 폐유의 지방산을 비슷한 비율로 이용하였다. 균주를 완전히 제거한 상층액에서 분석한 결과 옥수수 기름에서는 팔미트산(palmitic acid)을 비교적 더 많이 사용하고 올레산(oleic acid)과 리놀레산(linoleic acid)은 비슷한 비율로 사용된다. 하지만 절대적인 양으로 비교했을 때 리놀레산(linoleic acid)이 PHA를 구성하는 주성분이 되었다. 식물성 폐유에서는 팔미트산(palmitic acid)과 올레산(oleic acid)과 리놀레산(linoleic acid) 모두 비슷한 비율로 사용되었다. 옥수수 기름과 같이 식물성 폐유에서도 리놀레산(linoleic acid)이 PHA를 생산하는 주성분이었다 (도 5).

<64>

세균의 합성에 의한 MCL-PHA는 현재 생산 및 이용되고 있는 SCL-PHA와 성질이 다르게 끈적거리고 야고질의 중합체로써 친환경 접착제로써 잠재적인 실용성을 가지고 있으며 SCL-PHA와의 결합을 통해 SCL-PHA가 지니지 못한 특성과 단점을 보완할 수 있다. 하지만 PHA의 생산은 미생물 기질로 포도당과 같은 당류에 의지하므로 원가가 비싸고 특정한 지역에서 만이 대량 생산될 수 있는 특성이 있다. 본 발명은 이런 단점을 보완하기 위해 지방산을 이용하여 PHA의 생산 비용을 낮추고 튀김 기름 등으로 사용되고 남은 식물성 폐기물을 재활용하여 오염원을 줄이는 이중적 효과를 거둔다. 미생물 기질은 PHA의 생산비용의 약 40%를 차지하기 때문에 PHA의 실용화를 위해 PHA 기질의 비용을 낮추는 것은 필수적이다. 따라서 본 발명에 의한 식물성 폐유를 기질로 이용한 기술은 PHA 생산의 실용화를 더욱 촉진시킬 것으로 기대된다.

<65>

<66>

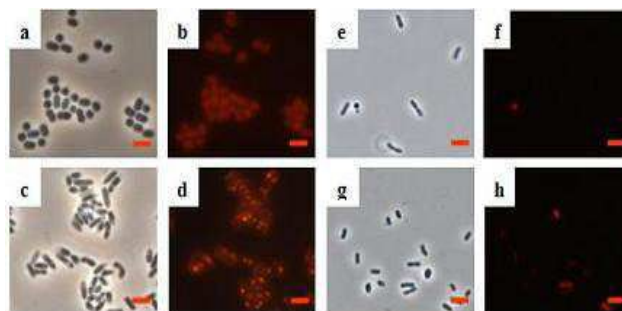
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

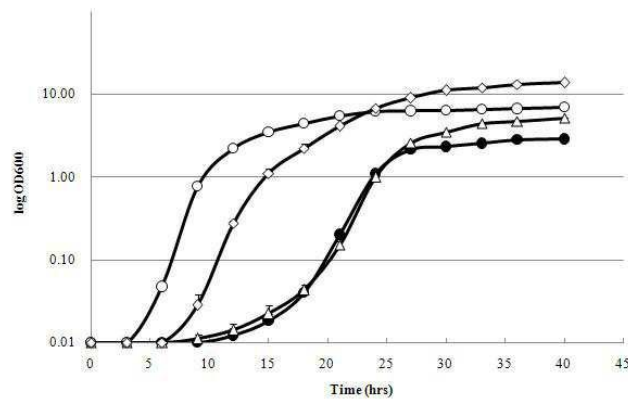
- <67> 도 1a는 식물성 기름을 분해할 수 있는 균주의 PHA 합성을 알아보기 위해 CR1, CR2, DR1, DR2의 각 균주를 염색한 사진이다. (a) DR1 균주의 위상차 광학 사진, (b) DR1의 형광 사진, (c) DR2 균주의 위상차 광학 사진, (d) DR2의 형광 사진, (e) CR1 균주의 위상차 광학 사진, (f) CR1의 형광 사진, (g) CR2 균주의 위상차 광학 사진, (h) CR2의 형광 사진.
- <68> 도 1b는 PHA를 축적할 수 있는 배지인 MMSB (modified minimal salt basal broth) 에 1%의 옥수수 기름을 첨가하여 시간에 따라 세균의 증식 속도를 측정하여, 식물성 기름을 분해하면서 자라는 세균의 증식속도를 나타내는 도면이다. DR1 균주; 흰색 동그라미, DR2 균주 ; 흰색 마름모, CR1 균주; 검은색 동그라미, CR2 균주; 흰색 삼각형.
- <69> 도 2는 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)를 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction, 중합효소 연쇄 반응)을 통해서 폴리히드록시알카노에이트 합성효소 *phaC*(polyhydroxyalkanoate synthase *phaC*)의 일부분을 증폭한 후 증폭된 유전자의 크기를 알아보는 전기영동사진이다. 100 bp DNA Ladder; Lane 1, *E. coli* (negative control); Lane 2, *Pseudomonas putida* KT2440 (positive control); Lane 3, strain DR1; Lane 4, strain DR2; Lane 5, strain CR1; Lane 6, strain CR2; Lane 7.
- <70> 도 3은 탄소원의 종류에 따라 *Pseudomonas* sp. DR2 균주 속에 축적되는 PHA에 대한 영향을 알아보기 위해, 각각 다른 종류의 탄소원에서 축적된 PHA를 염색하여 확인한 사진이다. 10mM 의 구연산염에서 진탕 배양한 (a) 광학 위상차 사진과 (b) 형광사진이고 0.4%의 글루코오스에서 진탕 배양한 (c) 광학 위상차 사진과 (d) 형광사진이고, 0.8%의 아세트산염 (pH7.0)에서 진탕 배양한 (e) 광학 위상차 사진과 (f) 형광사진이고, 0.8%의 부틸레이트 (pH 7.0)에서 진탕 배양한 (g) 광학 위상차 사진과 (h) 형광사진이고, 0.4%의 팔미테이트에서 진탕 배양한 (i) 광학 위상차 사진과 (j) 형광사진이고, 0.8%의 글리세롤에서 진탕 배양한 (k) 광학 위상차 사진과 (l) 형광사진이고, 1%의 옥수수 기름에서 진탕 배양한 (m) 광학 위상차 사진과 (n) 형광사진이고, 1%의 튀김후 산패된 기름에서 진탕 배양한 (o) 광학 위상차 사진과 (p) 형광사진이다.
- <71> 도 4는 폴리히드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate)를 생산하기 위해 산업적으로 응용되고 있는 *Ralstonia eutropha* H16과 기존에 많이 연구된 *Chromobacterium violaceum*를 옥수수 기름과 식물성 폐유를 이용하여 배양한 PHA 생산을 비교하기 위해 *Ralstonia eutropha* H16과 *Chromobacterium violaceum*이 *Pseudomonas* sp. DR2 균주와 비교해서 옥수수 기름을 이용해서 자라는 균주의 증식 속도를 측정한 결과를 나타내는 도면이다. *Chromobacterium violaceum*은 검은색 마름모로, *Ralstonia eutropha* H16은 검은색 사각형으로, *Pseudomonas* sp. DR2는 흰색 동그라미로, *Pseudomonas putida* KT2440는 검은색 삼각형으로 표시하였다.
- <72> 도 5는 옥수수 기름과 식물성 폐유에 포함된 지방산의 이용률을 확인하기 위해, *Pseudomonas* sp. DR2 균주를 옥수수 기름과 식물성 폐유에 10^{10} 개의 균주를 접종한 후 6시간 단위로 균주가 사용하지 못한 기름의 지방산 성분과 양을 GC/MS로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 5의 a에서 검정 마름모는 팔미트산, 흰색 동그라미는 리놀레산, 흰색 삼각형은 올레산이고, 도 5의 b에서 검정 마름모는 팔미트산, 흰색 동그라미는 리놀레산, 흰색 삼각형은 올레산이다.

도면

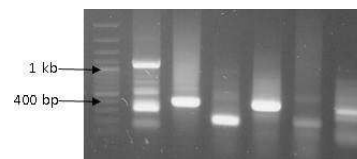
도면1a



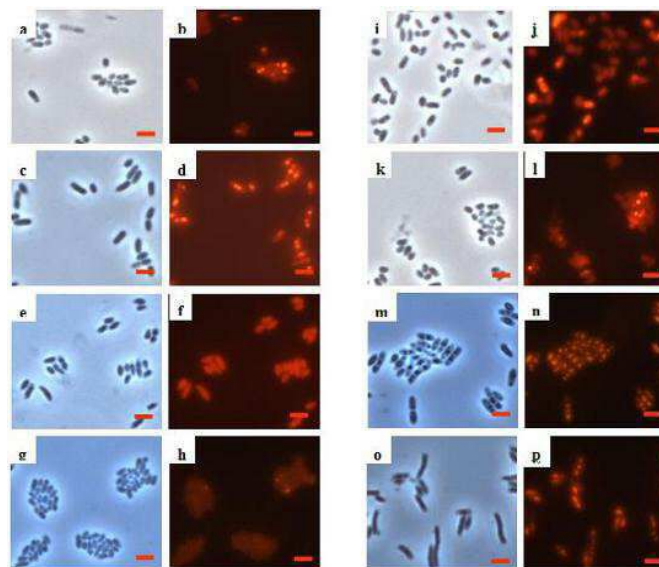
도면1b



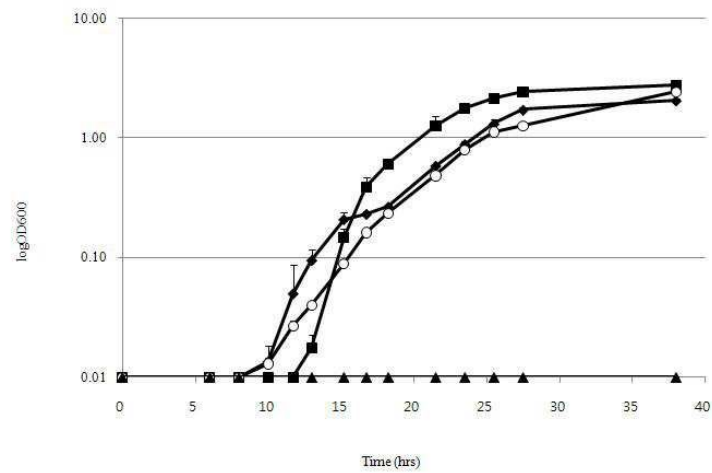
도면2



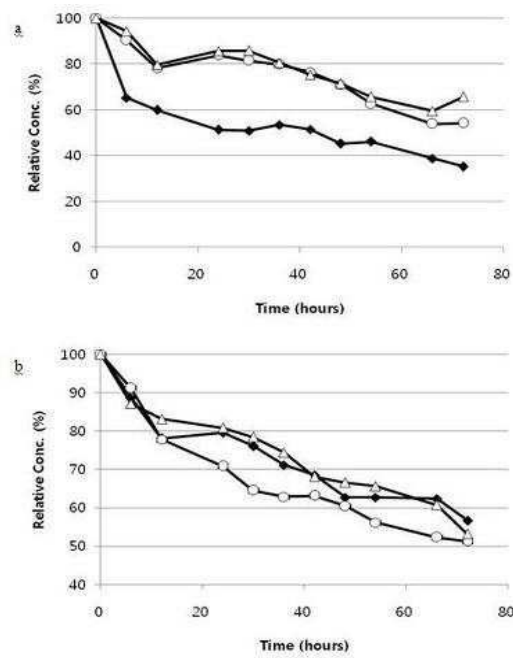
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> Pseudomonas sp. DR2 using waste vegetable oil for polyhydroxyalkanoate production
- <130> P11-071005-01
- <160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 391

<212> DNA

<213> Pseudomonas sp. strain DR2

<400> 1

tgtgctggcg caaccgcacc aaggcgcagc gcgagtgggg cctgtcgact tacatcgatg 60

cgctgaaaga agcggtcgac gtggtcaccg cgatcaccgg cagcaaagac atcaaatgc 120

tcggcgcttg ctccggcggc attacctgca cggccctgct cggccattac gccgccatcg 180

gcgagaacaa ggtcaacgcc ctgacccttc tggtcagcgt gctcgacacc accttggaca 240

gcgacgtcgc cctgttcgtc gacgagcaga ccttgagac cgccaagcgc cactcgtatc 300

aggccggcgt gctcgaaggc aaggacatgg ccaaggtctt cgcgtggatg cggccgaacg 360

atctgatctg gacctactgc gtcaacaact a 391

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 2

agagtttgat cmiggctcag 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 3
ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 4
gtsttcttsr tswsctggcg caaccc 26

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 5
aggtagtgtg ygacsmmrta gktcca 26

<210> 6
<211> 383
<212> DNA
<213> Enterobacter sp. CR1

<400> 6
gcgcacgcag gcggtctgtc aagtcggatg tgaaatcccc gggctcaacc tgggaactgc 60

attcgaaact ggcaggctag agtctttag aggggggtag aattccaggt gtagcggtag 120

aatgcgtaga gatctggagg aataccggtg gcgaaggcgg cccctggac aaagactgac 180

gctcaggatgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccttgtagt ccacgccgta 240
aacgatgtcg atttggaggt tgttcccttg aggagtggct tccggagcta acgcgttaaa 300
tcgaccgcct ggggagtacg gccgcaaggt taaaactcaa atgaattgac gggggcccg 360
acaagcgggtg gagcatgtgg ttt 383

<210> 7
<211> 550
<212> DNA
<213> Rhodococcus sp. CR2

<400> 7
gagttcgtag gcggtttgtc gcgtcgtttg tgaaaaccag cagctcaact gctggcttgc 60
aggcgatacg ggcagacttg agtactgcag gggagactgg aattcctggt gtagcggatga 120
aatgcgcaga tatcaggagg aacaccgggt gcgaaggcgg gtctctgggc agtaactgac 180
gctgaggaac gaaagcgtgg gtagcgaaca ggattagata ccttgtagt ccacgccgta 240
aacggtgggc gctaggtgtg ggttcccttc acggaatccg tgccgtagct aacgcattaa 300
gcgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggccccg 360
cacaagcggc ggagcatgtg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggtttg 420
acatataccg gaaagctgca gagatgtggc ccccttgtg gtcggtatac aggtggtgca 480
tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc 540
tatcttatgt 550

<210> 8
<211> 1499
<212> DNA
<213> Acinetobacter sp. DR1

<400> 8

agagtttgat cctggctcag attgaacgct ggccggcaggc ttaacacatg caagtcgagc	60
ggagagaggt agcttgctac tgatcttagc ggccggacggg tgagtaatgc ttaggaatct	120
gcctattagt gggggacaac atttcgaaag gaatgctaata accgcatacg tcctacggga	180
gaaagcaggg gatcttcgga ccttgcgcta atagatgagc ctaagtcgga ttagctagtt	240
ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat ctgtagcggg tctgagagga tgatccgcca	300
cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca	360
atgggcggaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggccttat ggttgtaaag	420
cactttaagc gaggaggagg ctactttagt taatacctag agatagtga cgttactcg	480
agaataagca ccggctaact ctgtgccagc agccgcggta atacagaggg tgcaagcgtt	540
aatcggtttt actgggcgta aagcgcgcgt aggcggctaa ttaagtcaa tgtgaaatcc	600
ccgagcttaa cttggaatt gcattcgata ctggttagct agagtgtggg agaggatggt	660
agaattccag gtgtagcggg gaaatgcgta gagatctgga ggaataccga tggcgaaggc	720
agccatctgg cctaactctg acgctgaggt gcgaaagcat ggggagcaaa caggattaga	780
taccctggta gtccatgccg taaacgatgt ctactagccg ttggggcctt tgaggttta	840
gtggcgagc taacgcgata agtagaccgc ctggggagta cggtcgcaag actaaaactc	900
aatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tgagcatgt ggtttaattc gatgcaacgc	960
gaagaacctt acctggcctt gacatagtaa gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg	1020
ggaacttaca tacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta	1080
agtcccga cagcgcaac cttttcctt atttgccagc gagtaatgtc gggaacttta	1140
aggatactgc cagtgcacaa ctggaggaag gcggggacga cgtcaagtca tcatggccct	1200

tacggccacg gccacacacg tgctacaatg gtcggtacaa agggttgcta cctagcgata	1260
ggatgctaata ttcaaaaagc cgatcgtagt ccggattgga gtcgcaact cgactccatg	1320
aagtcggaac cgctagtaat cgcggatcag aatgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt	1380
gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt tgttgacca gaagtagcta gcctaactgc	1440
aaagaggcg gttaccacgg tgtggccgat gactggggtg aagtcgtaac aagtaacc	1499
<210> 9	
<211> 537	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas sp. DR2	
<400> 9	
agcgcgcgta gggtgttgt taagttgat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg	60
catccaaaac tggcaagcta gagtatggta gaggggtgtg gaatttcctg ttagcggtg	120
aatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcaaggcg accacctgga ctgatactga	180
cactgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt	240
aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag tggcgcagct aacgcattaa	300
gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggccccg	360
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggccttg	420
acatccaatg aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaacattgag acaggtgctg	480
catggtgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac gagcgca	537