



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0077296
(43) 공개일자 2013년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/52 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0145926
(22) 출원일자 2011년12월29일
심사청구일자 2011년12월29일

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
엄영순
서울특별시 동대문구 전농동 10 전농SK아파트 11
0동 1501호
이경민
서울특별시 중구 광희동2가 250-2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

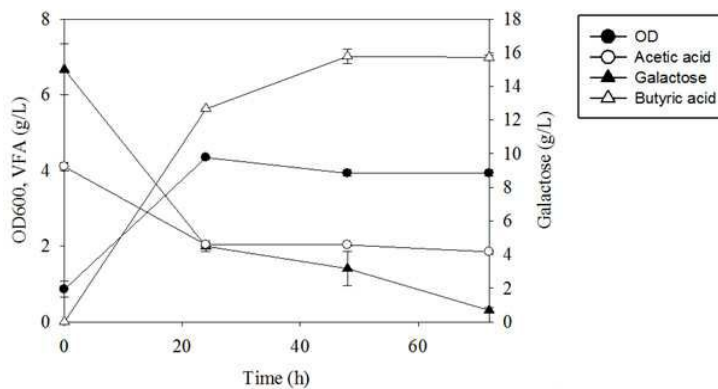
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 속 균주, 상기 균주를 이용한 부티르산 생산방법 및 상기 균주의 분리방법**

(57) 요약

해조류 바이오매스의 갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 신규한 클로스트리디움 속 균주, 상기 균주를 이용하여 해조류 바이오매스의 갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 방법 및 상기 균주를 분리하는 방법이 개시된다. 신규 균주를 이용하면 갈락토스로부터 부티르산을 효과적으로 생산할 수 있다. 특히, 해조류 바이오매스로부터 부티르산을 효과적으로 생산할 수 있다. 이를 통해 해조류 바이오매스를 이용한 화학 원료 또는 바이오 에너지 생산에 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김연제

서울특별시 중랑구 신내동 622번지 동성아파트 13
동 208호

상병인

서울특별시 성북구 돈암1동 1-3

공경택

서울특별시 마포구 상수동 370-10

특허청구의 범위

청구항 1

갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속(*Clostridium*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는,

펩톤, 고기 추출물, 효모 추출물, 갈락토스, 폴리소르베이트 (Tween 80), 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 트리암모늄 시트레이트, 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트 및 망간 설페이트 테트라하이드레이트를 포함한 mMRS 액체배지에서 3일간 37℃에서 배양하는 경우, 갈락토스의 25중량% 이상을 부티르산으로 전환시키는 성질을 갖는 클로스트리디움 속 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는

최적 성장 온도가 40℃이고 최적 성장 pH가 5.5인 클로스트리디움 속 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는 아세트산 또는 그 염, 및 락틱산 또는 그 염 중 하나 이상을 더 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는 2-(N-모르홀리노)에탄설포닉산(2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, MES) 버퍼를 처리하는 경우 부티르산 생산을 향상시키는 성질을 갖는 클로스트리디움 속 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 갈락토스는 해조류 바이오매스 유래의 갈락토스인 클로스트리디움 속 균주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주인 클로스트리디움 속 균주.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) S1 균주인 클로스트리디움 속 균주.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) S1 균주 (KCTC 12103BP)인 클로스트리디움 속 균주.

청구항 10

갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 방법으로서,

갈락토스에 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 클로스트리디움 속 균주를 처리하여 배양함으로써 갈락토스를 부티르산으로 전환시키는 것을 포함하는 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전, 또는 후에, 또는 동시에 아세트산 또는 그 염; 락틱산 또는 그 염; 2-(N-모르홀리노)에탄설포닉산(MES) 버퍼 중 하나 이상을 갈락토스에 첨가하는 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 배양은 pH 5 내지 6의 조건 하에서 수행하는 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 배양은 38 내지 42℃의 조건 하에서 수행하는 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 갈락토스는 해조류 바이오매스로부터 유래된 갈락토스인 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전에 해조류 바이오매스를 당화시켜 갈락탄을 갈락토스로 분해하는 것을 더 포함하는 갈락토스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 16

해조류 바이오매스로부터 부티르산을 생산하는 방법으로서,

해조류 바이오매스를 당화시켜 갈락탄을 갈락토스로 분해하는 단계; 및

갈락탄이 갈락토스로 분해된 해조류 바이오매스에 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 클로스트리디움 속 균주를 처리하여 배양함으로써 갈락토스를 부티르산으로 전환시키는 단계를 포함하는 해조류 바이오매스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전, 또는 후에, 또는 동시에 아세트산 또는 그 염; 락틱산 또는 그 염; 및 2-(N-모르홀리노)에탄설포닉산(MES) 버퍼 중 하나 이상을 해조류 바이오매스에 첨가하는 해조류 바이오매스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 배양은 pH 5 내지 6의 조건 하에서 수행하는 해조류 바이오매스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 배양은 38 내지 42℃의 조건 하에서 수행하는 해조류 바이오매스로부터의 부티르산 생산방법.

청구항 20

클로스트리디움 속(Clostridium) 균주를 얻는 방법으로서,

상기 클로스트리디움 속 균주는, 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주이며,

상기 방법은,

혐기성 슬러지를 열처리하여 그람 음성균을 제거하는 단계;

상기 열처리된 혐기성 슬러지를 갈락토스를 함유한 배지에 접종하여 배양시키는 단계;

상기 배양으로부터 얻어진 배양액을 부티르산 또는 그 염을 함유한 배지에 도달하여 부티르산에 저항성이 있는 콜로니들을 선별하는 단계; 및

상기 선별된 콜로니들의 부티르산 생산량을 측정하여 부티르산 생산량이 가장 높은 균주를 분리하는 단계를 포함하는 클로스트리디움 속 균주의 분리 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 클로스트리디움 속 균주는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 클로스트리디움 속 균주인 클로스트리디움 속 균주의 분리 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 배지는 갈락토스, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 효모 추출물, 암모늄 아세테이트, $MgSO_4$, $MnSO_4$ 및 1-시스테인 HCl을 포함하는 MP2 배지인 클로스트리디움 속 균주의 분리 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 클로스트리디움 속 균주에 관한 것이다. 다른 한편으로는 갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 다른 한편으로는, 갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 신규한 클로스트리디움 속 균주를 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 화석 연료 고갈과 지구 온난화 문제로 인해 지속적이고 조화로운 발전과 함께 에너지 보존 및 효율적인 환경 보존을 위한 대체 가능한 새로운 에너지의 개발에 관심이 모아지고 있다.

[0003] 바이오매스는 재생 가능한 식물로부터 생성된 유기물을 말하며 이 중에는 에너지 작물, 나무와 식품, 사료 등이 있고, 최근에는 새로운 바이오매스로서 해조류에 대한 관심이 높아지고 있다. 해양에서 대량 양식을 통해 생산되는 해조류는 육상식물처럼 심각한 식량 공급 문제를 촉발시키거나, 성장 기간이 긴 산림 자원처럼 자원을 고갈시키지 않는 자원이기 때문이다. 더욱이 해조류는 목질계에 비하여 성장 속도가 월등히 빠르며, 구성성분 면에서도 리그닌이 함유되어 있지 않아 전처리가 용이하다.

[0004] 홍조류는 해조류 중 가장 많은 탄소원을 포함하고(예컨대, 77.2 %, 우뚝가사리), 주요 탄수화물 구성성분은 갈락탄과 셀룰로스이다. 갈락탄 성분은 당화에 의해 갈락토스로 분해되고, 셀룰로스는 글루코오스로 분해된다.

[0005] 부티르산은 화학, 식품 및 의약 산업에 널리 사용되는 물질로 대표적인 생산균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)이다(한국 공개 특허 제10-2009-0103720). 그러나, 한국 공개 특허 제10-2009-0103720호에 개시된 내용은 글루코오스로부터 부티르산을 생산하는 것이다. 클로스트리디움 타이로부티리쿰은 홍조류에 포함된 갈락토스를 거의 이용하지 못하는 문제점이 있어 발효 수율이 떨어진다. 이를 극복하기 위해서는 갈락토스를 효과적으로 이용하여 부티르산을 생산하는 새로운 미생물의 개발이 절실히 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개 특허 제10-2009-0103720호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Extractive Fermentation for Buryric Acid Production from Glucose by Clostridium tyrobutylicum(Biotech. and Bioeng., Vol.82, No.1, P.93-102, Apr. 2003)
- (비특허문헌 0002) J R Turvey, J Christison, "The hydrolysis of algal galactans by enzymes from a Cytophaga species" The Biochemical journal (1967) Volume: 105, Issue: 1, Pages: 311-316
- (비특허문헌 0003) N J Kim et al., "Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli K011" Bioresource technology (2011) Volume: 102, Issue: 16, Pages: 7466-7469

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 명세서에 개시된 기술은 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 또 다른 관점에서, 본 명세서에 개시된 기술은 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또 다른 관점에서, 본 명세서에 개시된 기술은 해조류 바이오매스로부터 부티르산을 고효율로 생산하는 균주를 제공하는 것이다.
- [0011] 또 다른 관점에서, 본 명세서에 개시된 기술은 해조류 바이오매스로부터 부티르산을 고효율로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 또 다른 관점에서, 본 명세서에 개시된 기술은 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일실시예에 따른 균주는, 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속(*Clostridium*) 균주이다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 따른 부티르산 생산방법은, 갈락토스로부터 부티르산을 생산하는 방법으로서, 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속 균주를 처리하여 갈락토스를 부티르산으로 전환시키는 것을 포함하는 방법이다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 속 균주의 분리 방법은, 혐기성 슬러지를 열처리하여 그람 음성균을 제거하는 단계; 상기 열처리된 혐기성 슬러지를 갈락토스를 함유한 배지에 접종하여 배양시키는 단계; 상기 배양으로부터 얻어진 배양액을 부티르산 또는 그 염을 함유한 배지에 도말하여 부티르산에 저항성이 있는 콜로니들을 선별하는 단계; 및 상기 선별된 콜로니들의 부티르산 생산량을 측정하여 부티르산 생산량이 가장 높은 균주를 분리하는 단계를 포함하며, 상기 클로스트리디움 속 균주는, 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주인 방법이다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명을 이용하면 갈락토스로부터 부티르산을 효과적으로 생산할 수 있다. 갈락토스로부터 부티르산을 생산할 수 있으므로 주요 탄수화물 성분이 갈락탄인 해조류 바이오매스로부터 부티르산을 효과적으로 생산할 수 있다. 이를 통해 해조류 바이오매스를 이용한 화학 원료 또는 바이오 에너지 생산에 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 16S rDNA 염기서열을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 16S rDNA 영역 염기서열을 바탕으로 계통학적 관계를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 의 성장 최적 온도를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 의 성장 최적 pH를 나타내는 그래프이다.

도 5는 mMRS 배지에서의 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 성장 특성과 부티르산 생산 특성을 나타낸 그래프이다.

도 6a는 표준 시료 부티르산의 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 ¹³C가 레이블된 젓산을 첨가한 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1을 이용하여 수득된 부티르산의 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry) 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 일실시예에 따른 균주는, 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속(*Clostridium*) 균주이다.

[0019] 상기 클로스트리디움 속 균주는, 펩톤, 고기 추출물, 효모 추출물, 갈락토스, 폴리소르베이트 (Tween 80), 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 트리암모늄 시트레이트, 마그네슘 셀페이트 헵타하이드레이트 및 망간 셀페이트 테트라하이드레이트를 포함한 mMRS 액체배지에서 3일간 37℃에서 배양하는 경우, 갈락토스의 25중량% 이상, 30중량% 이상, 35중량% 이상, 40중량% 이상, 45중량% 이상 또는 50중량% 이상을 부티르산으로 전환시키는 성질을 갖는 클로스트리디움 속 균주일 수 있다. mMRS 배지는, 구체적으로, 0.5-1.5 % 펩톤, 0.5-1.5 % 고기 추출물, 0.2-0.8 % 효모 추출물, 1.5-2.5 % 갈락토스, 0.05-0.15 % 폴리소르베이트 (Tween 80), 0.15-0.25 % 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 0.15-0.25 % 트리암모늄 시트레이트, 0.005-0.015 % 마그네슘 셀페이트 헵타하이드레이트, 0.002-0.008 % 망간 셀페이트 테트라하이드레이트 및 선택적으로 0.2-0.8% 소듐 아세테이트를 포함할 수 있다. 구체적으로, mMRS 배지는 1.0 % 펩톤, 1.0 % 고기 추출물, 0.5 % 효모 추출물, 2.0 % 갈락토스, 0.1 % 폴리소르베이트 (Tween 80), 0.2 % 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 0.2 % 트리암모늄 시트레이트, 0.01 % 마그네슘 셀페이트 헵타하이드레이트, 0.005 % 망간 셀페이트 테트라하이드레이트 및 선택적으로 0.5% 소듐 아세테이트를 포함한 배지일 수 있다. 상기 클로스트리디움 속 균주는 최적 성장 온도가 40℃이고 최적 성장 pH가 5.5인 균주일 수 있다.

[0020] 상기 클로스트리디움 속 균주는 아세트산 또는 그 염, 및 락틱산 또는 그 염 중 하나 이상을 더 이용하여 부티르산을 생산하는 클로스트리디움 속 균주일 수 있다. 아세트산 또는 그 염이나 락틱산 또는 그 염을 배지에 첨가하면 클로스트리디움 속 균주에 의한 부티르산의 생산량이 더욱 향상된다. 아세트산 또는 그 염이나 락틱산 또는 그 염의 첨가량은 mMRS 액체배지 전체 부피를 기준으로 10 내지 100mM 또는 20 내지 80mM, 30 내지 70mM, 40 내지 60mM일 수 있다. 여기서 염은 산과 이온결합을 통해 염을 형성하는 모든 염기에 의한 염일 수 있다. 예컨대, 1A족 금속에 의한 염일 수 있다. 예컨대, 소듐 염 또는 포타슘 염일 수 있다. 상기 균주는 50mM의 아세트산 또는 그 염의 첨가에 따른 부티르산 생산량 증가가, 1.5배 이상, 1.8배 이상, 2.0배 이상 또는 2.2배 이상인 성질을 가질 수 있다. 한편, 상기 균주는 50mM의 락틱산 또는 그 염의 첨가에 따른 부티르산 생산량 증가가, 1.8배 이상, 2.0배 이상, 2.2배 이상 또는 2.4배 이상인 성질을 가진 균주일 수 있다.

[0021] 한편, 상기 클로스트리디움 속 균주는 2-(N-모르홀리노)에탄설포닉산(2-(N-morholino) ethanesulfonic acid, MES) 버퍼를 처리하는 경우 부티르산 생산을 향상시키는 성질을 갖는 클로스트리디움 속 균주일 수 있다. MES 첨가량은 mMRS 액체배지 전체 부피를 기준으로 50 내지 150mM 또는 70 내지 130mM, 80 내지 120mM, 90 내지 110mM이다. 구체적으로, 상기 균주는 100mM MES 처리시 부티르산 생산량 증가가, 1.5배 이상, 1.8배 이상, 2.0배 이상, 2.2배 이상 또는 2.3배 이상인 성질을 가진 균주일 수 있다.

[0022] 또한, 상기 클로스트리디움 속 균주는 아세트산 또는 그 염과 100mM MES를 동시에 처리시 부티르산 생산량 증가가, 2.0배 이상, 2.2배 이상, 2.4배 이상, 2.6배 이상 또는 2.8배 이상인 성질을 가진 균주일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 클로스트리디움 속 균주는 락틱산 또는 그 염과 100mM MES를 동시에 처리시 부티르산 생산량 증가가, 2.2배 이상, 2.4배 이상, 2.6배 이상 2.8배 이상, 3.0배 이상 또는 3.1배 이상인 성질을 가진 균주일 수 있다.

[0024] 한편, 상기 클로스트리디움 속 균주는 아세트산 또는 그 염 첨가에 의한 부티르산 생산량 증가가 2.2배 이상이고; 락틱산 또는 그 염 첨가에 의한 부티르산 생산량 증가가 2.4배 이상이며; 100mM MES 첨가시 부티르산 생산량 증가가 2.3배 이상이며; 아세트산 또는 그 염과 100mM MES 첨가시 부티르산 생산량 증가가 2.8배 이상이며,

락틱산 또는 그 염과 100mM MES 첨가시 부티르산 생산량 증가가 3.1배 이상인 성질을 가진 균주일 수 있다.

- [0025] 상기 클로스트리디움 속 균주는 해조류 바이오매스로부터 유래된 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주일 수 있다.
- [0026] 상기 해조류는 녹조류(green algae), 갈조류(brown algae) 및 홍조류(red algae)를 포함한다. 녹조류는 파래, 청각, 청태 등을 포함한다. 갈조류는 톳, 미역, 다시마, 대황, 등을 포함한다. 홍조류는, 김, 카라니긴 등을 포함한다. 바람직하게는, 상기 해조류는 홍조류이다. 홍조류는 해조류 중 가장 많은 탄소원을 포함하며, 주요 탄수화물 구성성분이 갈락탄이기 때문이다. 갈락탄은 당화에 의해 갈락토스로 분해된다.
- [0027] 상기 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)에 속하는 균주일 수 있다. 상기 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) S1 균주일 수 있다. 상기 클로스트리디움 속 균주는 미생물 기탁기관인 대한민국 생명공학연구원 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB) 내 생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에 2011년 12월 13일자로 KCTC 12103BP호로 기탁된 클로스트리디움 균주일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 따른 부티르산 생산방법은, 갈락토스 또는 갈락탄이 갈락토스로 분해된 해조류 바이오매스에 상기 언급된 클로스트리디움 속 균주 중 어느 하나를 처리하여 배양함으로써 갈락토스를 부티르산으로 전환시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 부티르산 생산방법에 있어서, 상기 배양은 pH 5 내지 6의 조건 하에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 배양은 pH 5.2 내지 5.8, 또는 pH 5.3 내지 5.7, 또는 pH 5.4 내지 5.6의 조건 하에서 수행할 수 있다. 상기 클로스트리디움 속 균주의 최적 성장 pH는 5.5이므로, pH 범위를 상기 범위 내로 조정하면 부티르산 생산 효율을 높일 수 있다.
- [0030] 상기 부티르산 생산방법에 있어서, 상기 배양은 38 내지 42℃에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 배양은 35 내지 45℃, 또는 39 내지 41℃에서 수행할 수 있다. 상기 클로스트리디움 속 균주의 최적 성장 온도는 40℃이므로, 상기 온도 범위 내에서 배양을 수행하면 부티르산 생산 효율을 높일 수 있다.
- [0031] 상기 부티르산 생산방법은, 갈락토스 또는 갈락탄이 갈락토스로 분해된 해조류 바이오매스에 클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전, 또는 후에, 또는 동시에 아세트산 또는 그 염, 및 락틱산 또는 그 염 중 하나 이상을 갈락토스에 첨가할 수 있다. 아세트산 또는 그 염이나 락틱산 또는 그 염을 첨가하면 클로스트리디움 속 균주의 부티르산 생산량을 더욱 높일 수 있다. 아세트산 또는 그 염이나 락틱산 또는 그 염의 첨가량은 mMRS 액체배지 전체 부피를 기준으로 10 내지 100mM 또는 20 내지 80mM, 30 내지 70mM, 40 내지 60mM일 수 있다. 상기 범위 내에서 부티르산 생산량이 효과적으로 높아진다.
- [0032] 상기 부티르산 생산방법은, 갈락토스 또는 갈락탄이 갈락토스로 분해된 해조류 바이오매스에 클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전, 또는 후에, 또는 동시에 2-(N-모르홀리노)에탄설포닉산(MES) 버퍼를 갈락토스에 첨가할 수 있다. MES를 처리하면 클로스트리디움 속 균주의 부티르산 생산량을 더욱 높일 수 있다. MES 첨가량은 mMRS 액체배지 전체 부피를 기준으로 50 내지 150mM 또는 70 내지 130mM, 80 내지 120mM, 90 내지 110mM일 수 있다. 이 농도 범위 내에서 부티르산 생산량이 더욱 향상될 수 있다.
- [0033] 상기 부티르산 생산방법에 있어서, 상기 갈락토스는 해조류 바이오매스로부터 유래된 갈락토스일 수 있다.
- [0034] 상기 부티르산 생산방법은, 클로스트리디움 속 균주를 처리하기 전에 해조류 바이오매스를 당화시켜 갈락탄을 갈락토스로 분해하는 것을 더 포함할 수 있다. 해조류 바이오매스를 당화시키는 방법으로는 당업계에서 통상 사용되고 있는 효소를 이용한 당화 방법을 이용할 수 있다. 예컨대, 사이토파지 종(Cytophaga species)으로부터 유래된 효소나 붉은 황산 및 붉은 염산을 이용하여 해조류 바이오매스의 갈락탄을 가수분해시킬 수 있다(J R Turvey, J Christison, "The hydrolysis of algal galactans by enzymes from a Cytophaga species" The Biochemical journal (1967) Volume: 105, Issue: 1, Pages: 311-316; N J Kim et al., "Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli K011" Bioresource technology (2011) Volume: 102, Issue: 16, Pages: 7466-7469).
- [0035] 본 발명의 일실시예에 따른 클로스트리디움 속(*Clostridium*) 균주의 분리 방법은, 혐기성 슬러지를 열처리하여 그람 음성균을 제거하는 단계; 상기 열처리된 혐기성 슬러지를 갈락토스를 함유한 배지에 접종하여 배양시키는 단계; 상기 배양으로부터 얻어진 배양액을 부티르산 또는 그 염을 함유한 배지에 도말하여 부티르산에 저항성이 있는 콜로니들을 선별하는 단계; 및 상기 선별된 콜로니들의 부티르산 생산량을 측정하여 부티르산 생산량이 가

장 높은 균주를 분리하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 클로스트리디움 속 균주는, 해조류 바이오매스의 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주일 수 있다.

[0036] 상기 균주 분리 방법에 있어서, 열처리는 80-100℃의 온도에서 10-60분간 열처리하는 것일 수 있다. 상기 온도 및 시간 범위 내에 속하면 그람 음성균을 효과적으로 제거할 수 있다.

[0037] 상기 균주 분리 방법에 있어서, 상기 갈락토스를 함유한 배지는 제한배지인 MP2 액체배지일 수 있다. MP2 배지는 갈락토스, K₂HPO₄, KH₂PO₄, 효모 추출물, 암모늄 아세테이트, MgSO₄, MnSO₄ 및 l-시스테인 HCl을 포함하는 배지일 수 있다. 구체적으로, MP2 배지는 갈락토스 15-25 g/L, K₂HPO₄ 0.3-0.7 g/L, KH₂PO₄ 0.3-0.7 g/L, 효모 추출물 0.7-1.3 g/L, 암모늄 아세테이트 1.8-2.7 g/L, MgSO₄ 0.1-0.3 g/L, MnSO₄ 0.005-0.015 g/L 및 l-시스테인 HCl 0.3-0.7 g/L 를 함유한 배지일 수 있다. 구체적으로, MP2 배지는 갈락토스 20 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, 효모 추출물 1 g/L, 암모늄 아세테이트 2.2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, MnSO₄ 0.01 g/L 및 l-시스테인 HCl 0.5 g/L 를 함유한 배지일 수 있다.

[0038] 상기 균주 분리 방법에 있어서, 상기 열처리된 혐기성 슬러지를 갈락토스를 함유한 배지에 접종하여 배양시키는 단계는 37℃에서 2-4일간 배양하는 것일 수 있다.

[0039] 상기 균주 분리 방법에 있어서, 부티르산 생산량이 가장 높은 균주를 분리하는 단계는 MP2 배지에서 37℃에서 2-4일간 배양 결과 부티르산 생산량이 가장 높은 균주를 선택하는 것을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 클로스트리디움 속 균주의 분리방법에 있어서 클로스트리디움 속 균주는, 상기 언급한 클로스트리디움 속 균주 중 어느 하나일 수 있다.

[0041] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 이는 예시적인 목적에 불과할 뿐 특허의 권리범위를 한정하는 것이 아니다.

[0042] <실시예 1: 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 균주의 분리>

[0043] 갈락토스를 이용하여 부티르산을 생산하는 미생물을 분리하기 위해 대한민국 서울시 중랑구에 위치한 폐수처리장의 혐기성 슬러지에서 혐기성 슬러지 1 g을 채집하고 이를 90℃에서 30분간 열처리하여 그람 음성균을 제거하였다. 상기 열처리된 혐기성 슬러지를 제한배지인 MP2 액체배지(Galactose 20 g, K₂HPO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, Yeast extract 1 g, Ammonium acetate 2.2 g, MgSO₄ 0.2 g, MnSO₄ 0.01 g, l-cysteine HCl 0.5 g)에 접종하여 37℃에서 3일간 증균 배양시켰다.

[0044] 증균 배양한 배양액은 20 g의 소듐 부티레이트(sodium butyrate)가 포함된 MP2 배지에 도말하여 부티르산에 저항성이 있는 콜로니들을 선발하였다. 선발된 각각의 콜로니들을 MP2 액체 배지에 접종하여 37℃에서 3일간 배양 후, 기체 크로마토그래피(Gas chromatography, GC)를 이용하여 부티르산 생산량을 측정하였다. 그 결과, 가장 많은 양의 부티르산을 생산하는 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물을 부다페스트 조약에 따른 미생물 기탁 기관인 대한민국 생명공학연구원 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB) 내 생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에 2011년 12월 13일자로 기탁번호 제KCTC 12103BP호로 기탁하였다.

[0045] <실시예 2: 균주의 동정 및 특성>

[0046] 상기 분리된 클로스트리디움 속 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 하여 동정하였다. 즉, 분리된 균주로부터 Genomic DNA Preparation Kit(Promega Co., 미국)을 사용하여 지놈 DNA(genomic DNA)를 추출한 다음, 유니버설 프라이머(universal primer) 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 서열번호: 1)와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; 서열번호: 2)로 중합 효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하여 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다. 증폭된 산물은 PCR Purification kit을 이용하여 정제한 후 마크로젠에

16S rDNA 시퀀싱을 의뢰하였다.

[0047] 신규 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 도 1 및 서열번호: 3에 나타내었다. 이러한 분리 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열은 계통학적 관계를 분석하기 위해, 상기 서열을 블라스트 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)에서 검색하였고, 네이버-조이닝 분석 (Neighbor-joining analysis) 법으로 계통수 (phylogenetic tree)를 정립하였다. 그 결과, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(Clostridium tyrobutyricum) (GenBank accession no.M59113)와 95.7% 상동성을 보이는 것을 확인하였다(도 2). 따라서, 본 발명자는 상기 S1 균주를 "클로스트리디움 타이로부티리쿰(Clostridium tyrobutyricum) S1"으로 명명하였다.

[0048] 클로스트리디움 타이로부티리쿰(Clostridium tyrobutyricum) S1으로 확정된 분리 균주는 API 50 CHL(Bio-marieux, France)을 이용하여 탄수화물 이용 능력을 확인하였다. 분리된 시료를 MRS 액체배지에 2회 계대 배양하여 활력을 높인 후, 10,000 Xg에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 0.85% 염화나트륨 수용액을 이용하여 2회 세척한 후 탁도를 4 Macfarland로 조정하였다. 2 ml의 현탁액을 5 ml의 API 50CHL medium에 첨가 후 각 큐플에 100 μ l씩 주입하였다. API 50CHL 배지는 1.0 % 펩톤, 0.5 % 효모 추출물, 0.1 % 폴리소르베이트 (Tween 80), 0.2 % 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 0.2 % 트리암모늄 시트레이트, 0.02 % 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트, 0.005 % 망간 설페이트 테트라하이드레이트 및 0.5% 소듐 아세테이트를 및 0.017 %브로모크레졸 퍼플 인디케이터(bromocresol purple indicator)를 포함한 배지이다. 완성된 kit는 혐기 배양 장치를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하며 관찰하였다. 상기 실험 결과는 하기 표 1에 나타내었다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 분리 균주는 해조류 당화액에 포함되는 D-자일로스 및 갈락토스 그리고 만노오스를 이용하여 산을 생산하는 것을 확인하였다.

표 1

[0049]

Carbohydrates	Acid production
D-xylose	+ ¹⁾
L-xylose	- ²⁾
D-galactose	+
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
Potassium gluconate	+
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

[0050] +¹⁾: 양성, -²⁾: 음성

[0051] 클로스트리디움 타이로부티리쿰(Clostridium tyrobutyricum) S1의 최적성장 온도 및 pH를 확인하기 위해 각각의 pH(5.5, 6.0, 6.5)와 온도(34, 37, 40, 43 $^{\circ}$ C)에 따른 균주성장을 관찰하였다.

[0052] 도 3 내지 4에서 나타난 바와 같이, 클로스트리디움 타이로부티리쿰 S1의 성장에 가장 적합한 온도와 pH는 40 $^{\circ}$ C, pH 5.5인 것을 알 수 있다.

[0053] <실시예 3: 클로스트리디움 타이로부티리쿰 균주들과 본 발명 균주의 갈락토스 이용 특성 비교>

[0054] 부티르산 생산에 가장 널리 이용되고, 분리 균주와 유사도가 가장 높은 클로스트리디움 타이로부티리쿰(Clostridium tyrobutyricum) 균주들을 이용하여 갈락토스가 함유된 MP2 배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 발효하여 부티르산 생산 및 균주 성장에 대해 분리 균주와 비교해보았다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0055] 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일실시예에 따른 분리 균주를 제외한 나머지 클로스트리디움 타이로부티리쿰 균주들은 갈락토스를 거의 이용하지 못했고, 부티르산도 증가하지 않는 결과가 나왔으나, 본 발명의 일실시

예에 따른 분리 균주의 경우 갈락토스를 효과적으로 이용하여 부티르산을 생산하는 것을 관찰할 수 있다.

표 2

균주	OD ₆₀₀	갈락토스 소비량 (g/L)	부티르산 생산량 (g/L)
<i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755	1.34	N.D. ¹⁾	0.67
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9582	0.39	N.D.	0.5
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9583	1.21	N.D.	0.135
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9584	1	N.D.	0.92
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 12573	1.11	N.D.	0.764
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701715	0.89	N.D.	0.284
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701753	0.67	N.D.	0.912
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701755	1.12	N.D.	0.956
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701756	0.87	N.D.	0.14
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701757	1.17	N.D.	0.968
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 701790	1.51	N.D.	1.092
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 664	0.69	N.D.	0.56
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 1460	0.89	N.D.	0.964
<i>C. tyrobutyricum</i> S1	5.79	16.04	5.24

[0057] N.D.¹⁾: almost not used

[0058] <실시예 4: 분리 균주의 부티르산 생산에 미치는 요소>

[0059] 클리스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) S1을,

[0060] 1.0 % 펩톤, 1.0 % 고기 추출물, 0.5 % 효모 추출물, 2.0 % 갈락토스, 0.1 % 폴리소르베이트 (Tween 80), 0.2 % 디포타슘 히드로젠 포스페이트, 0.2 % 트리암모늄 시트레이트, 0.01 % 마그네슘 셀레이트 헵타하이드레이트, 0.005 % 망간 셀레이트 테트라하이드레이트 및 0.5% 소듐 아세테이트를 포함한 mMRS 액체배지에서 37°C에서 3일간 발효한 결과 14.32 g/L의 갈락토스를 이용하여 6.99 g/L의 부티르산을 생산하였으나, 아세트산은 오히려 4.1 g/L에서 1.85 g/L로 줄어든 것을 확인하였다(도 5). 아세트산 및 락틱산의 첨가에 의한 부티르산 생산 증가를 관찰하기 위해 소듐 아세테이트 또는 소듐 락테이트를 각각 50 mM씩 mMRS 배지에 첨가하여 37°C에서 3일간 발효하였다. 또 유기산 생산에 있어 pH 또한 중요한 요소이므로 100 mM의 MES(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) buffer를 이용하여 분리균주의 부티르산 생산과 pH에 의한 영향을 관찰하였다. 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. Run I은 아세테이트 및 락테이트가 결여된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다. Run II는 아세테이트가 첨가된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다. Run III는 락테이트가 첨가된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다. Run IV는 아세테이트나 락테이트 없이 100mM의 MES만이 첨가된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다. Run V는 아세테이트와 100mM의 MES가 첨가된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다. Run VI는 락테이트와 100mM의 MES가 첨가된 mMRS 배지에서 배양한 결과이다.

[0061] 표 3에서 보는 바와 같이 부티르산의 생산이 50 mM의 소듐 아세테이트를 첨가했을 때 2.2배, 50 mM의 소듐 락테이트를 첨가했을 때 2.4배 증가하는 것이 관찰하였고, 100 mM MES 첨가했을 때 2.3배 증가하는 것을 확인하였다. 게다가, 50 mM 소듐 락테이트와 100 mM MES를 동시에 첨가했을 때 3.1배 높은 9.52 g/L의 부티르산이 생산되는 것을 관찰하였다(표 3).

표 3

	Run I	Run II	Run III	Run IV	Run V	Run VI
Galactose consumption (g/L)	11.9	14.32	15.46	21.31	24.05	21.95
Acetic acid consumption (g/L)	-	2.25	-	-	0.44	-

[0062]

Lactic acid consumption (g/L)	-	-	5.79	-	-	5.1
Butyric acid production (g/L)	3.12	6.99	7.45	7.20	8.84	9.52
Final pH	4.62	4.99	4.88	4.99	5.11	5.37
Yield (g/g)	0.26	0.49	0.48	0.34	0.37	0.43

[0063] Run I : mMRS without acetate and lactate

[0064] Run II : mMRS with acetate

[0065] Run III : mMRS with lactate

[0066] Run IV : mMRS without acetate and lactate (100mM MES)

[0067] Run V : mMRS with acetate (100mM MES)

[0068] Run VI : mMRS with lactate (100mM MES)

[0069] 표 3에서 보는 바와 같이 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) S1은 락틱산을 효과적으로 이용하며, 락틱산 이용시 부티르산 생산이 증가하므로 락틱산이 부티르산으로 전환되는지 보기 위해 1-[3-¹³C]락테이트를 이용하여 대사경로를 관찰하였다. 그 결과를 도 6a 내지 6b에 나타내었다.

[0070] 도 6a 내지 도 6b에서 보는 바와 같이, 표준 시료 부티르산의 GC-MS 분석 결과(도 6a)에서 나타나지 않는 ¹³C-락테이트로부터 온 90.1, 91.1 및 92.1 mass/charge 피크가 관찰되는 것으로 보아 락틱산을 이용하여 부티르산으로 전환하는 것을 확인할 수 있다.

[0071] 결론적으로 본 발명의 일실시예에 따른 균주는 기존 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주들이 이용하지 못하는 해조류 바이오매스에 존재하는 갈락토스를 효과적으로 이용하여 부티르산을 생산할 수 있으며, 부티르산 생산 선택력(product selectivity)이 거의 100%에 달하므로 해조류 바이오매스를 이용한 부티르산 생산 시 좋은 후보 균주로 사용될 수 있다.

수탁번호

[0072]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12103BP

수탁일자 : 20111213

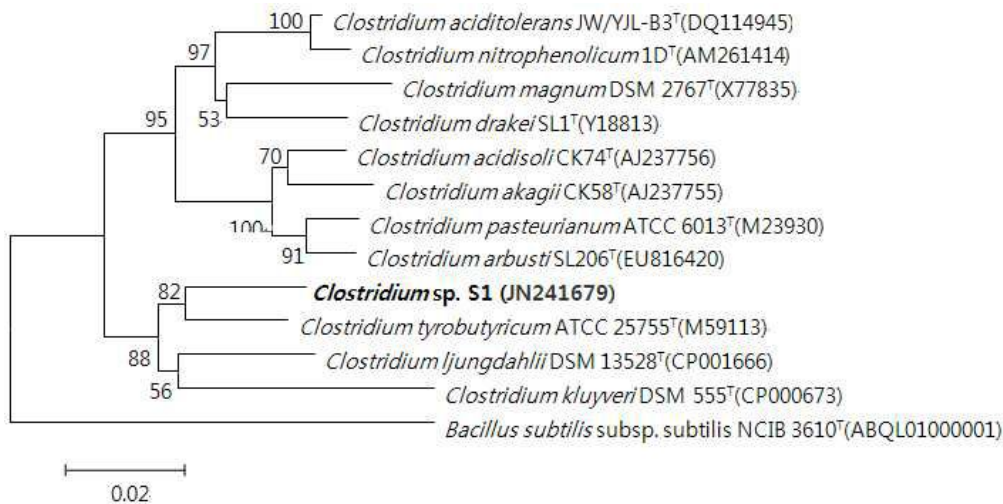
도면

도면1

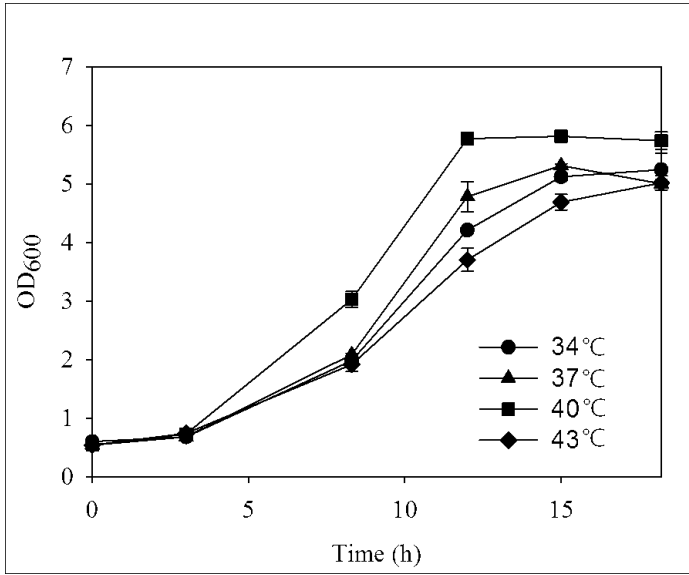
```

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGAGAGTCCCTTCGGGGACAATCTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAAAGAGGGGGATAGCCTCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAAG
ACCTGGATTCACATGGATCCGGGATGAAAGGAGAAATCCGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTGAAGAGAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGT
GAGTGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGC
GTAGGCGGATGTTTAAGTGAGATGTGAAATACCCGGGCTTAACCCGGGGGCTGCATTTCAAAGTGGACATCTGGA
GTGCAGGAGAGGAGAAATGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTGGCGAAG
GCGATTCTCTGGACTGTAAGTGCAGTGAAGGCAGAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACAGATGAGTACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGAGTTAACACATTAAGTACTC
CGCTGGGAAGTACGATCGCAAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGACTTGACATCCCTGCATAGCCTGGAGACAGGCGAAGCCCT
TCGGGGCAGGGAGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTAGGTTAAGTCTGCAACGA
GCGCAACCCCTTGTGTTAGTTGCTAACATGTAAAGATGAGCACTTAACGAGACTGCCGCGGTTAACGCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCGACACAGTGTACAATGGGCAGAACAGAGA
GATGCGAAACCGCGAGGTGGAGCCAACTAGAAAAGTGCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGAAACCCGCTGCAT
GAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGAGAGCTGGCAACACCCGAAGTCCGCGAGTCTAA
    
```

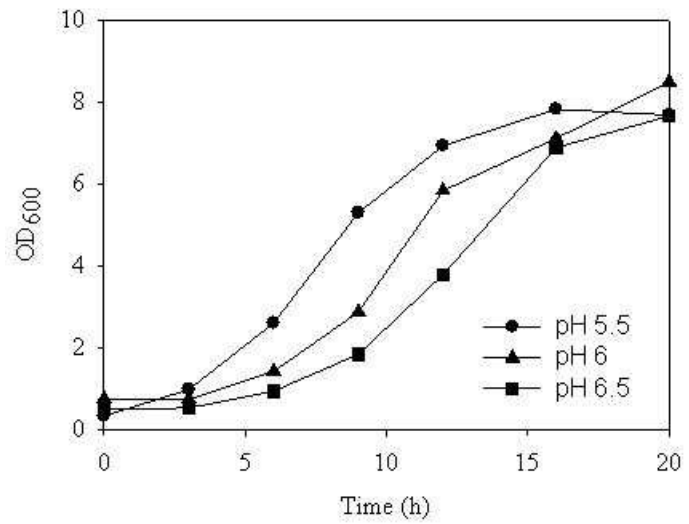
도면2



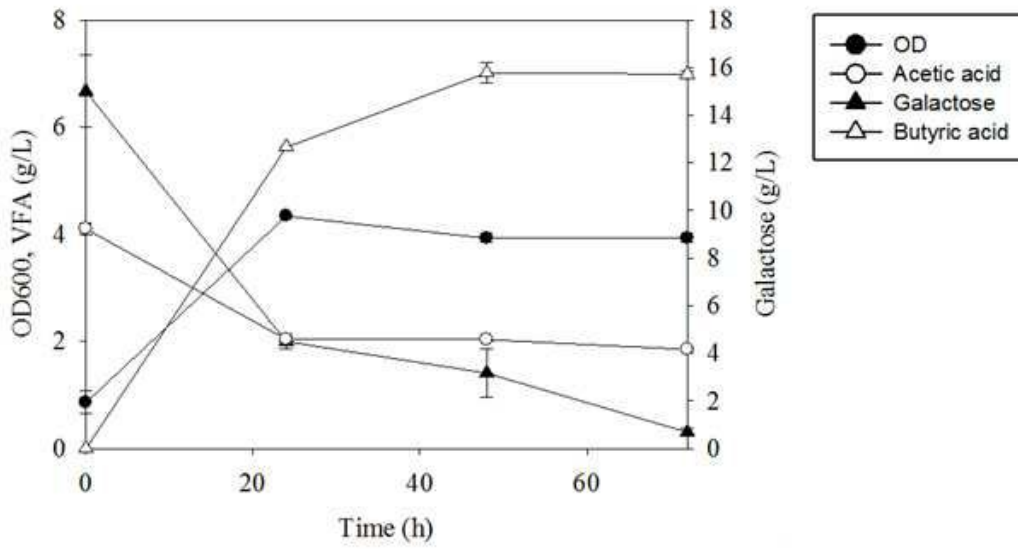
도면3



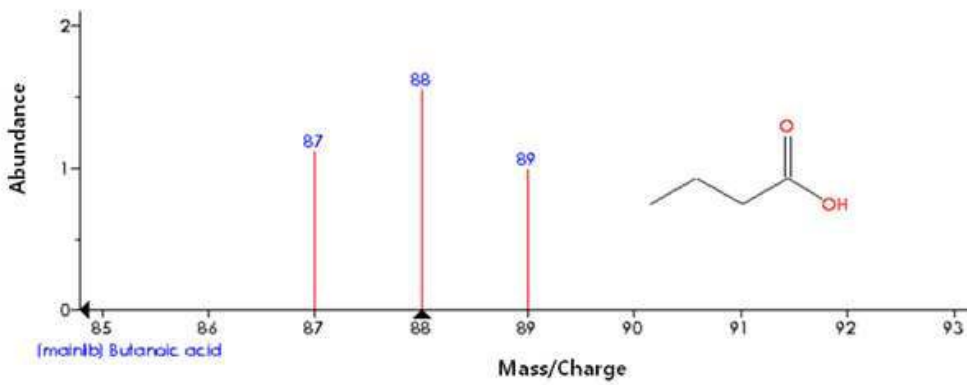
도면4



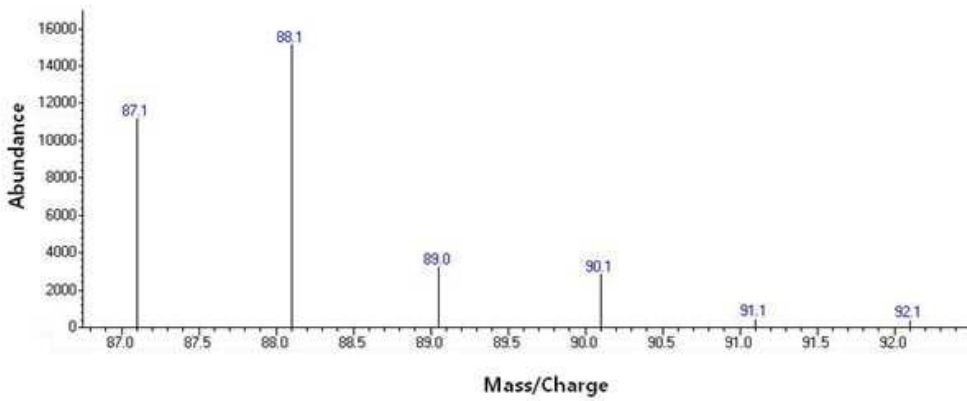
도면5



도면6a



도면6b



서열목록

<110> Korea Institute of Science and Technology

<120> Clostridium sp. strain, a method for producing butyric acid using
the Clostridium sp. strain, and a method for isolating the
Clostridium sp. strain

<130> 11p572/ind

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

agagtttgat cctggetcag 20

<210> 2

<211> 22

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tacggytacc ttggttacgac tt 22

<210> 3

<211> 1392

<212> DNA

<213> Clostridium tyrobutyricum

<400> 3

ggacgaacgc tggcggcgtg cctaacacat gcaagtcgag cgagagagtc ccttcgggga 60

caatctagcg gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctcaaaga gggggatagc 120

ctcccгааг ggagattaat accgcataag acctggattc acatggatcc gggatгааг 180

gagaaatcgg ctttgagatg gaccgcggc gcattagcta gttggtgggg taaaggccta 240

ccaaggcagc gatgcgtagc cgacctgaga gggatgatcg ccaattgga actgagagac 300

ggtccagact cctacgggag gcagcagttg ggaatattgc acaatgggcg aaagcctgat 360

gcagcaacgc cgcgtgagtг atgaaggttt tсggatcgta aagctctgtc ttctgggaag 420

ataatgacgg taccagagga ggaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcgtaata 480

cgtaggtggc gagcgttgtc cggatttact gggcgtaaag ggtgcgtagg cggatgttta	540
agtgagatgt gaaatacccg ggcttaaccc gggggctgca tttcaaactg gacatctgga	600
gtgcaggaga ggagaatgga attcctagtg tagcggtgaa atgcgtagag attaggaaga	660
acaccagtgg cgaaggcgat tctctggact gtaactgacg ctgaggcagc aaagcgtggg	720
tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagta ctaggtgtag	780
gaggtatcga ccccttctgt gccgcagtta acacattaag tactccgcct gggaagtacg	840
atcgaagat taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcagcg gagcatgtgg	900
ttaattcga agcaacgcga agaaccttac ctggacttga catcccctgc atagcctgga	960
gacaggcgaa gcccttcggg gcagggagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt	1020
cgtgagatgt taggttaagt cctgcaacga gcgcaacct tgttgtagt tgctaacatg	1080
taaagatgag cactctaacg agactgccgc ggttaacgcg gaggaagtg gggatgacgt	1140
caaatcatca tgccccttat gtccagggcg acacacgtgc tacaatgggc agaacagaga	1200
gatgcgaaac cgcgaggtgg agccaaacta gaaaactgcc ctcaattcgg attgcaggct	1260
gaaacccgcc tgcataaagt tggagttgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa	1320
tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacacatg agagctggca acaccgaag	1380
tccgcagtct aa	1392