



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월18일  
(11) 등록번호 10-2180340  
(24) 등록일자 2020년11월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 7/00 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)  
C12P 7/06 (2006.01) C12P 7/24 (2006.01)  
C12P 7/40 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)  
C12P 7/46 (2006.01) C12P 7/54 (2006.01)  
C12P 7/62 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7031243
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월08일  
심사청구일자 2018년04월17일
- (85) 번역문제출일자 2014년11월06일
- (65) 공개번호 10-2015-0016231
- (43) 공개일자 2015년02월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/059608
- (87) 국제공개번호 WO 2013/167663  
국제공개일자 2013년11월14일
- (30) 우선권주장  
10 2012 207 921.1 2012년05월11일 독일(DE)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2008115080 A1\*  
US20110189742 A1\*  
US08110670 B2\*  
US20090203098 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
에보닉 오퍼레이션즈 게엠베하  
독일 45128 에센 렐링하우저 스트라쎄 1-11
- (72) 발명자  
하스, 토마스  
독일 48161 뮌스테르 바켄캄프 9  
비트만, 에바 마리아  
독일 83301 트라운레우트 툴시테르 베크 22
- (74) 대리인  
양영준, 윤중복

전체 청구항 수 : 총 9 항

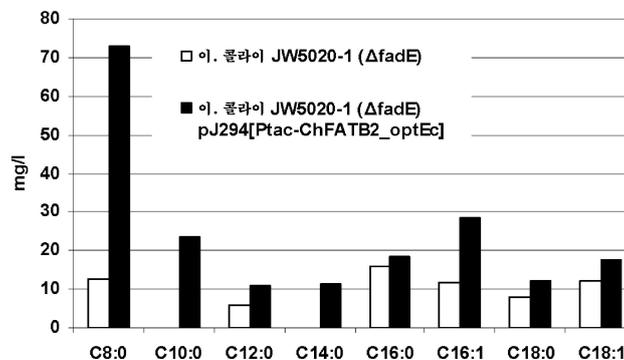
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 합성 가스를 이용한 다단계 합성 방법

(57) 요약

본 발명은 A) CO<sub>2</sub> 및 CO로부터 선택된 적어도 하나의 탄소원을 포함하는 탄소원을 제1 미생물로 아세테이트 및/또는 에탄올로 전환시키는 단계, B) 제1 미생물로부터 아세테이트를 제거하는 단계, C) 아세테이트를 제2 미생물에 의해 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소로 전환시키는 단계, 및 임의로는, D) 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 정제하는 단계를 포함하는, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 제거하는 방법에 관한 것이다.

대표도



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

A) 아세트산생성(acetogenic) 미생물인 제1 미생물을 사용하여 CO<sub>2</sub> 및 CO로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 탄소원을 반응시켜 아세테이트 및/또는 에탄올을 제공하는 단계,

B) 제1 미생물로부터 아세테이트 및/또는 에탄올을 분리해내는 단계,

C) 이. 콜라이(*E. coli*), 와이. 리폴리티카(*Y. lipolytica*) 및 클로스트리디움 클루이베리(*Clostridium kluyveri*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 미생물을 사용하여 방법 단계 B)에서 분리된 아세테이트 및/또는 에탄올을 반응시켜, 8 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 카르복실산, 히드록시카르복실산 및 카르복실산 에스테르로부터 선택되는, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 제공하는 단계, 및 임의로는,

D) 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 정제하는 단계

를 포함하고,

방법 단계 A)에서의 탄소원은 방법 단계 A)에서 미생물에 대해 이용가능한 모든 탄소원을 기준으로 90 중량% 이상의 CO<sub>2</sub> 및/또는 CO를 포함하는 것인,

1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소의 제조 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 방법 단계 A)에서의 탄소원이 합성 가스를 포함하거나, 또는 합성 가스로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 미생물이 클로스트리디움 오토테노게눔(*Clostridium autothenogenum*) DSMZ 19630, 클로스트리디움 라그스다홀레이(*Clostridium ragsdahlei*) ATCC 번호 BAA-622, 클로스트리디움 오토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 무렐라(*Moorella*) 종 HUC22-1, 무렐라 썬모아세티쿰(*Moorella thermoacetica*), 무렐라 썬모오토트로피카(*Moorella thermoautotrophica*), 루미코쿠스 프로дук투스(*Rumicoccus productus*), 아세토아나에로븀(*Acetoanaerobium*), 옥소박테르 페니기이(*Oxobacter pfennigii*), 메타노사르시나 바르케리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*), 카르복시도테르무스(*Carboxydotherrmus*), 데술포토마쿨룸 쿠즈네트소비이(*Desulphotomaculum kutznetsovii*), 피로코쿠스(*Pyrococcus*), 펩토스트렙토코쿠스(*Peptostreptococcus*), 부티리박테리움 메틸로트로피쿰(*Butyribacterium methylotrophicum*) ATCC 33266, 클로스트리디움 포르미코아세티쿰(*Clostridium formicoaceticum*), 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*), 락토바실러스 델브루키이(*Laktobacillus delbrukii*), 프로피오니박테리움 아시도프르프리오니시(*Propionibacterium acidoprprionici*), 프로프리오니스페라 아르보리스(*Propionispora arboris*), 아나에로비에르스피릴룸 속시니프로두센스(*Anaerobierspirillum succiniproducens*), 박테리오이데스 아밀로필루스(*Bacterioides amylophilus*), 박테리오이데스 루미니콜라(*Bacterioides ruminicola*), 썬모아나에로박테르 키부이(*Thermoanaerobacter kivui*), 아세토박테리움 우디이(*Acetobacterium woodii*), 아세토아나에로비움 노테라(*Acetoanaerobium notera*), 클로스트리디움 아세티쿰(*Clostridium aceticum*), 부티리박테리움 메틸로트로피쿰(*Butyribacterium methylotrophicum*), 무렐라 썬모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 유박테리움 리모숨(*Eubacterium limosum*), 펩토스트렙토코쿠스 프로дук투스(*Peptostreptococcus productus*), 클로스트리디움 룡달리이(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리디움(*Clostridium*) ATCC 29797 및 클로스트리디움 카르복시디보란스(*Clostridium carboxidivorans*)를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 방법 단계 B)에서, 제1 미생물을 침강, 원심분리 또는 여과에 의해 아세테이트 및/또는 에탄올을 포함하는 배지로부터 제거하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, 방법 단계 B)에서, 아세테이트를 추출에 의해, 또는 계내 추출에 의해, 또는 알킬아민을 포함하는 추출제로 제거하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 알킬아민이 트리헥실아민, 트리옥틸아민, 트리데실아민, 트리카프릴아민 및 트리도데실아민으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 방법 단계 C)에서, 아세테이트 및/또는 에탄올을 반응시켜 지방산을 제공하고, 제2 미생물은 그의 야생형과 비교하여 하나 이상의 티오에스테라제(thioesterase) 활성이 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 있어서, 방법 단계 C)에서, 아세테이트 및/또는 에탄올을 반응시켜 히드록시카르복실산을 제공하거나, 또는 오메가-히드록시카르복실산을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제1항 또는 제2항에 있어서, 방법 단계 C)에서 형성된 이산화탄소를 방법 단계 A)의 방법으로 회송시키는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 발명의 분야
- [0002] 본 발명은
- [0003] A) 제1 미생물을 사용하여 CO<sub>2</sub> 및 CO로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 탄소원을 반응시켜 아세테이트 및/또는 에탄올을 제공하는 단계,
- [0004] B) 제1 미생물로부터 아세테이트 및/또는 에탄올을 분리해내는 단계,
- [0005] C) 제2 미생물을 사용하여 아세테이트 및/또는 에탄올을 반응시켜 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 제공하는 단계, 및 임의로는,
- [0006] D) 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 정제하는 단계
- [0007] 를 포함하는, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0008] 종래 기술
- [0009] 미생물학적 공정에서 유기 화합물의 합성을 위한 탄소원으로서 CO<sub>2</sub>를 사용하는 것이 종종 문헌에서 기술된다.
- [0010] 일반적으로, 종래 기술은 재조합 세포에서 상이한 생물들로부터의 2개의 보충적인 대사 경로를 지도화하하려 시도하고, 그의도움으로 유기 물질이 합성될 수 있다.
- [0011] 이때, 성질을 결합시키려는 상이한 생물들이 적소로부터의 매우 고도의 특수한 생물을 구성하고, 따라서 이와 연관된 장점들 모두의 합을 하나의 세포 내에서 합칠 수 있는 것이 매우 어렵다는 문제가 발생한다. 추가적으로, 이러한 생물들의 유전학적 접근성의 결여가 원하는 조작을 저해한다.
- [0012] CO<sub>2</sub>를 탄소원으로서 사용하기 위한 별법적인 방법은 발효 파라미터의 특정한 선택을 통해 CO<sub>2</sub>를 고정할 수 있는 것으로 공지된 미생물에 영향을 미쳐서, 상기 미생물은 원하는 간단한 유기 물질, 예를 들어, 에탄올, n-부탄올 또는 2,3-부탄디올을 증가된 정도로 합성한다.
- [0013] W0200068407은 에탄올 생산을 위한 아세트산생성(acetogenic) 박테리아의 용도를 기술하고, W02012024522는 부탄디올 생산을 위한 아세트산생성 박테리아의 용도를 기술한다.
- [0014] 모든 기술된 방법들은 수율이 낮고 단일 세포 유형의 사용이 발효 조건에 어떠한 융통성도 허용하지 않는다는 단점이 있다.
- [0015] 본 발명의 목적은 적어도 종래 기술의 단점을 극복할 수 있는 방법을 제공하는 것이었다.

**발명의 내용**

- [0016] 발명의 설명
- [0017] 놀랍게도, CO<sub>2</sub> 및/또는 CO로부터의 아세테이트 생산이 추가적인 아세테이트 프로세싱으로부터 분리된 하기에 기술된 다단계 방법이 가장 간단한 방식으로 종래 기술의 단점을 극복할 수 있었다는 것이 발견되었다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 제1항 및 기타 종속항에 기술된 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 한 장점은 CO<sub>2</sub>/CO 혼합물이 다양한 공급원, 예컨대 천연 가스 및 바이오가스, 석탄, 오일 및 또한 식물 잔여물로부터 또한 생산될 수 있는 본질적으로 더욱 유리한 원료라는 것이다.
- [0020] 본 발명에 따른 방법의 추가적인 장점은 높은 탄소 수율이다. 이는 형성된 CO<sub>2</sub>를 재순환시킴으로써 가능해진다. 이는 CO<sub>2</sub>가 제1 단계에서 다시 반응되어 아세트산을 제공할 수 있기 때문이다.
- [0021] 추가적인 장점은 사용된 발효 조건에 관한 더 큰 융통성에 있는데, 이는 본 발명에 따른 방법 단계 C)에서의 실제 생산을 위해 아세테이트에서의 탄소 고정을 위한 것과 상이한 생물이 사용되기 때문이다.
- [0022] 본 발명의 추가적인 장점은 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 방법 단계 C)에서 탄소원으로서 사용함으로써 방법 단계 C)에서 당이 사용되는 것과 상이한 생성물 조성이 발생할 수 있다는 것이다.
- [0023] 본 발명은
- [0024] A) 제1 미생물을 사용하여 CO<sub>2</sub> 및 CO로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 탄소원을 반응시켜 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 제공하는 단계,
- [0025] B) 제1 미생물로부터 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 분리해내는 단계,
- [0026] C) 제2 미생물을 사용하여 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 반응시켜 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 제공하는 단계, 및 임의로는,
- [0027] D) 1개 이상의 산소 원자를 바람직하게는 3개 이상, 특히 4개 이상의 탄소 원자와 함께 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 정제하는 단계
- [0028] 를 포함하는, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소의 제조 방법을 제공한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0029] 본 발명과 관련하여, "아세테이트"라는 용어는 아세트산 및 또한 그의 염 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다; 이는 미생물이 수성 배지에서 작용하고 따라서 항상 염과 산 사이의 평형이 있기 때문에 자동적으로 발생한다.
- [0030] 본 발명과 관련하여, "제2 미생물"이라는 용어는 방법 단계 A)로부터의 "제1 미생물"과 상이한 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 달리 언급되지 않는 한, 언급된 백분율 (%) 모두는 질량 백분율이다
- [0032] 본 발명에 따른 방법에서, 방법 단계 A)에서, 이산화탄소 및/또는 일산화탄소를 포함하는 탄소원으로부터 제1 미생물에 의해 아세테이트 및/또는 에탄올이 형성된다; 이러한 표현은 아세테이트 및/또는 에탄올이 적어도 부분적으로 이산화탄소 및/또는 일산화탄소로부터 형성되는 경우를 포함한다.
- [0033] 이산화탄소 및/또는 일산화탄소 기질의 공급원과 관련하여, CO 및/또는 CO<sub>2</sub>를 탄소원으로서 제공하기 위해 다수의 가능한 공급원이 존재한다는 것이 명백하다. 실제로, 사용될 수 있는 본 발명의 탄소원이 미생물에 충분한 양의 탄소를 공급하여 이들이 아세테이트 및/또는 에탄올을 형성하게 할 수 있는 임의의 가스 또는 임의의 가스 혼합물이라는 것이 명확하다.
- [0034] 본 발명에 따른 방법에서, 탄소원이 폐 가스(waste gas), 예를 들어, 합성 가스, 연도 가스, 정유 폐 가스, 효모 발효 또는 클로스트리디움 발효의 결과로서 형성된 가스, 셀룰로스-함유 물질의 가스화 또는 탄소 가스화로부터의 폐 가스에 의해 제공되는 것이 바람직하다.
- [0035] 이와 관련하여, 이산화탄소 및/또는 일산화탄소의 적어도 일부가 본 발명에 따른 방법의 방법 단계 C)의 부산물을 구성하는 것이 특히 바람직하다. 이는 탄소 수율이 전체 공정에 걸쳐 100%라는 기술적인 효과가 있다.
- [0036] 이러한 폐 가스는 반드시 상이한 공정의 2차 현상으로서 형성될 필요는 없지만, 본 발명에 따른 방법에서 사용하기 위해 특별히 생산될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 방법의 바람직한 실시양태에서, 탄소원은 합성 가스이다.
- [0038] 합성 가스는, 예를 들어, 탄소 가스화의 부산물로부터 제공될 수 있다. 따라서, 폐기물인 물질을 미생물이 유용한 원료로 전환시킨다.
- [0039] 대안적으로, 본 발명에 따른 방법을 위해 광범위하게 입수가 가능한 비용-효과적인 농업 원료의 가스화에 의해 합성 가스가 제공될 수 있다.
- [0040] 거의 모든 형태의 식물이 이러한 목적을 위해 이용될 수 있기 때문에, 합성 가스로 전환될 수 있는 원료의 수 많은 예가 있다. 바람직한 원료는 다년생 목초 예컨대 미스칸투스 시넨시스(Miscanthus sinensis), 곡물 잔여물, 가공 폐기물 예컨대 톱밥을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0041] 일반적으로, 합성 가스는 건조 바이오매스(biomass)로부터 가스화 기구에서 주로 열분해, 부분적인 산화 및 증기 개질(steam reformation)에 의해 수득되고, 이때 주요 생성물은 CO, H<sub>2</sub> 및 CO<sub>2</sub>이다.
- [0042] 일반적으로, 생성물 수율을 최적화하고 타르 형성을 피하기 위해 생성물 가스 중 일부가 가공된다. 석회 및/또는 백운석을 사용하여 바람직하지 않은 타르를 합성 가스 및 CO로 크래킹(cracking)시킬 수 있다. 이러한 공정들이 예를 들어 문헌 [Reed, 1981 (Reed, T.B., 1981, Biomass gasification: principles and technology, Noves Data Corporation, Park Ridge, NJ.)]에 상세하게 기술되어 있다.
- [0043] 상이한 공급원들의 혼합물을 탄소원으로서 사용하는 것이 또한 가능하다.
- [0044] 일반적으로, 본 발명에 따른 방법에서, 방법 단계 A)에서의 탄소원이 50 중량% 이상, 바람직하게는 70 중량% 이상, 특히 바람직하게는 90 중량% 이상의 CO<sub>2</sub> 및/또는 CO를 포함하는 것이 바람직하고, 이때 중량%는 방법 단계 A)에서 미생물에 대해 이용가능한 모든 탄소원을 지칭한다.
- [0045] 방법 단계 A)에서, 환원제, 바람직하게는 수소가 이산화탄소 및/또는 일산화탄소와 함께 반응 내로 전달되는 것이 바람직하다.
- [0046] 결과적으로, 본 발명에 따른 바람직한 방법은 방법 단계 A)에서의 탄소원이 합성 가스를 포함하고, 특히 합성 가스로 이루어진 것을 특징으로 한다.

- [0047] CO<sub>2</sub> 및/또는 CO를 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트로 전환시키는 미생물, 뿐만 아니라 방법 단계 A)에서 사용될 수 있는 적절한 방법 및 공정 조건은 오랫동안 공지되어 있었다. 이같은 방법들이, 예를 들어, 하기에 기술되어 있다:
- [0048] WO9800558, WO2000014052, WO2010115054,
- [0049] 문헌 [Demler et al. Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Feb; 108(2): 470-4],
- [0050] [Younesia et al. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 27, Issue 2, pages 110-119],
- [0051] [Morinaga et al. The production of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by an anaerobic bacterium. *Journal of Biotechnology*, Volume 14, Issue 2, pages 187-194],
- [0052] [Li Production of acetic acid from synthesis gas with mixed acetogenic microorganisms] (ISSN 0493644938),
- [0053] [Schmidt et al. Production of acetic acid from hydrogen and carbon dioxide by *clostridium* species ATCC 2979. *Chemical Engineering Communications*, 45:1-6, 61-73],
- [0054] [Sim et al. Optimization of acetic acid production from synthesis gas by chemolithotrophic bacterium - *Clostridium aceticum* using a statistical approach. *Bioresour Technol.* 2008 May; 99(8):2724-35],
- [0055] [Vega et al. Study of gaseous substrate fermentations CO conversion to acetate 1 Batch culture and 2 continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* Volume 34, Issue 6, pages 774 and 785, September 1989],
- [0056] [Cotter et al. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2009), 32(3), 369-380], 및
- [0057] [Andreesen et al. Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*. Effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from carbon dioxide. *Journal of Bacteriology* (1973), 114(2), 743-51].
- [0058] 방법 단계 A)를 디자인하기 위한 다수의 실현가능한 선택권이 이로부터 당업자에게 제공되고, 이들 모두는 잘 작용된다.
- [0059] 이와 관련하여 아세트산생성 박테리아가 특히 적절하다. 아세트산생성 박테리아의 군은 혐기성 원핵생물에 속하고, 이는 CO<sub>2</sub>를 최종 전자 어셉터(acceptor)로 이용할 수 있고, 그렇게 해서 아세테이트 및/또는 에탄올을 형성할 수 있다. 현재, 21가지 상이한 속이 아세트산생성원(acetogen)에 포함되고 (문헌 [Drake et al., 2006]), 이 중 일부는 또한 클로스트리디움이다 (문헌 [Drake & Kuesel, 2005]). 이들은 이산화탄소 및 또한 일산화탄소를 에너지 공급원으로서의 탄소 및 수소로서 이용할 수 있다 (문헌 [Wood, 1991]). 또한, 알콜, 알데히드, 카르복실산, 및 다수의 헥소스가 또한 탄소원으로서 사용될 수 있다 (문헌 [Drake et al., 2004]). 아세테이트 형성에 이르는 환원성 대사 경로는 아세틸-CoA 경로 또는 우드-룽달(Wood-Ljungdahl) 경로로 지칭된다.
- [0060] 결과적으로, 본 발명에 따른 방법의 방법 단계 A)에서, 아세트산생성 박테리아가 제1 미생물로서 사용된다. 클로스트리디움 오토테노게눔(*Clostridium autothenogenum*) DSMZ 19630, 클로스트리디움 라그스다홀레이(*Clostridium ragsdalei*) ATCC 번호 BAA-622, 클로스트리디움 오토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 무렐라(*Moorella*) 종 HUC22-1, 무렐라 써모아세티쿰(*Moorella thermoaceticum*), 무렐라 써모오토트로피카(*Moorella thermoautotrophica*), 루미코쿠스 프로독투스(*Rumicoccus productus*), 아세토아나에로븀(*Acetoanaerobum*), 옥소박테르 페니기이(*Oxobacter pfennigii*), 메타노사르시나 바르케리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*), 카르복시도테르무스(*Carboxydotherrmus*), 데술포토마쿨룸 쿠즈네트소비이(*Desulphotomaculum kuznetsovii*), 피로코쿠스(*Pyrococcus*), 펩토스트렙토코쿠스(*Peptostreptococcus*), 부티리박테리움 메틸로트로피쿰(*Butyribacterium methylophilicum*) ATCC 33266, 클로스트리디움 포르미코아세티쿰(*Clostridium formicoaceticum*), 클로스트리

다음 부티리쿰(*Clostridium butyricum*), 락토바실루스 델브루키이(*Laktobacillus delbrukii*), 프로피오니박테리움 아시도프르프리오니시(*Propionibacterium acidoprprionici*), 프로프리오니스페라 아르보리스(*Propionispera arboris*), 아나에로비에르스피릴룸 숙시니프로두센스(*Anaerobierspirillum succiniproducens*), 박테리오이데스 아밀로필루스(*Bacterioides amylophilus*), 박테리오이데스 루미니콜라(*Bacterioides ruminicola*), 썬모아나에로박테르 키부이(*Thermoanaerobacter kivui*), 아세트박테리움 우디이(*Acetobacterium woodii*), 아세트아나에로비움 노테라(*Acetoanaerobium notera*), 클로스트리디움 아세티쿰(*Clostridium aceticum*), 부티리박테리움 메틸로트로피쿰(*Butyribacterium methylotrophicum*), 무렐라 썬모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 유박테리움 리모숨(*Eubacterium limosum*), 펩토스트렙토코쿠스 프로독투스(*Peptostreptococcus productus*), 클로스트리디움 룡달리이(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리디움(*Clostridium*) ATCC 29797 및 클로스트리디움 카르복시디보란스(*Clostridium carboxidivorans*), 특히 ATCC BAA-624를 포함하는 균으로부터 선택된 아세트산생성 박테리아를 사용하는 것이 특히 바람직하다. 특히 적절한 박테리아는 클로스트리디움 카르복시디보란스, 특히 "P7" 및 "P11"과 같은 균주이다. 예를 들어 US 2007/0275447 및 US 2008/0057554에 이같은 세포가 기술되어 있다.

[0061] 추가적인 특히 적절한 박테리아는 클로스트리디움 룡달리이, 특히 클로스트리디움 룡달리이 PETC, 클로스트리디움 룡달리이 ERI2, 클로스트리디움 룡달리이 C01 및 클로스트리디움 룡달리이 O-52를 포함하는 균으로부터 선택된 균주이고, 이들은 WO 98/00558 및 WO 00/68407, 및 또한 ATCC 49587, ATCC 55988 및 ATCC 55989에 기술되어 있다.

[0062] 본 발명에 따른 방법의 특히 바람직한 실시양태에서, 방법 단계 A)에서, 에탄올이 형성되고, 사용된 미생물은 알칼리바쿨룸 바치(*Alkalibaculum bacchi*) ATCC BAA-1772, 무렐라 종 HUC22-1, 클로스트리디움 룡달리이, 클로스트리디움 라그스다홀레이, 또는 클로스트리디움 오토에타노게눔이다. 방법 단계 A)를 수행하기 위한 상응하는 지침을 예를 들어 하기에서 확인할 수 있다:

[0063] 문헌 [Saxena et al. Effect of trace metals on ethanol production from 합성 가스 by the ethanologenic acetogen *Clostridium ragsdalei*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Volume 38, Number 4 (2011), 513-521],

[0064] [Younesi et al. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium *Clostridium ljungdahlii*. Biochemical Engineering Journal Volume 27, Issue 2, 15 December 2005, pages 110-119],

[0065] [Sakai et al. Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1. Biotechnology Letters Volume 26, Number 20 (2004), 1607-1612] 및

[0066] [Abrini et al. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Archives of Microbiology Volume 161, Number 4 (1994), 345-351].

[0067] 바람직하게는, 혐기성 조건 하에 방법 단계 A)가 수행된다.

[0068] 본 발명에 따른 방법의 방법 단계 B)에서, 방법 단계 A)에서 형성된 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트가 제1 미생물로부터 분리된다.

[0069] 가장 간단한 경우에, 예를 들어, 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 포함하는 배지로부터 고체로서 침강, 원심분리 또는 여과와 같은 공지된 방법에 의해 미생물이 제거되고, 임의적으로는 나머지 액체 상이 직접적으로 방법 단계 C)로 통과된다. 직접적인 도입은 방법 단계 A)로부터의 추가적으로 여전히 존재하는 임의의 배지 성분, 예를 들어, 비타민, 미량 원소 또는 유도제가 방법 단계 C)에서 제2 미생물에게 마찬가지로 이용가능하다는 장점이 있고, 따라서 바람직하다. 이와 관련하여, 방법 단계 C)로 도입하기 전에, 예를 들어 존재하는 물의 적어도 일부를 제거하는 것에 의해, 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트의 농도를 증가시키는 것이 유리할 수 있고, 따라서 바람직하다. 유사하게, 아세테이트 자체가 추출에 의해, 특히 계내 추출에 의해 방법 단계 A)에서의 미생물로부터 제거될 수 있다. 적절한 추출 방법이 당업자에게, 예를 들어 EP2294206, WO2000014052, US 4405717, 문헌 [Katikaneni et al. Purification of Fermentation-Derived Acetic Acid By Liquid-Liquid Extraction and Esterification. Ind. Eng. Chem. Res. 2002, 41, 2745-2752], 및 [Huh et al. Selective extraction of acetic acid from the fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. Biotechnol Lett. 2004 Oct; 26(20):1581-4]로부터 공지되어 있다.

[0070] 예를 들어 WO2000014052의 8-17면의 <A. The modified solvent and solvent/co-solvent mixture> 하에 적절한

추출제가 기술되어 있다.

- [0071] 추출에 의해 아세테이트를 분리시키는 경우, 바람직하게 존재하는 추출제는 특히 알킬아민 또는 저-비점 용매 예컨대 MTBE 또는 에틸 아세테이트이고, 이때 알킬아민은 바람직하게는 탄소 원자가 16개 이상인 것, 바람직하게는 트리알킬아민, 특히 바람직하게는 트리헥실아민, 트리옥틸아민, 트리데실아민, 트리카프릴아민, 트리도데실아민을 포함하는 군으로부터 선택된 트리알킬아민이다. 트리알킬아민을 포함하는 이러한 추출제들이 방법 단계 B)에서의 계내 추출과 함께 바람직하게 사용된다. 이는 제1 미생물이 손상되지 않는다는 기술적인 효과 및 방법 단계 B)가 추가적으로 바람직한 역류 방법으로 수행될 수 있다는 추가적인 장점이 있다.
- [0072] 특히, 방법 단계 B)에서 사용된 추출제는 트리옥틸아민 및 2-에틸-1-헥산올의 혼합물이고, 이들은 바람직하게는 동일한 양으로 사용된다.
- [0073] 상세한 방법 지침을 위해, EP2294206 및 이에 기술된 방법 단계 A) 및 B)를 참조할 수 있다.
- [0074] 방법 단계 C)에서, 제2 미생물을 사용하여 아세테이트 및/또는 에탄올, 특히 아세테이트를 반응시켜, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소를 제공한다.
- [0075] 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소는 바람직하게는 카르복실산, 디카르복실산, 히드록시카르복실산, 카르복실산 에스테르, 히드록시카르복실산 에스테르, 알콜, 알데히드, 케톤이고, 이들은 특히 4개 내지 32개, 바람직하게는 6개 내지 20개, 특히 바람직하게는 8개 내지 12개의 탄소 원자가 있다. 카르복실산, 히드록시카르복실산 및 카르복실산 에스테르가 특히 바람직하다.
- [0076] 제2 미생물은 바람직하게는 효모 또는 박테리아이다.
- [0077] 바람직하게는 제2 미생물은 특히 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소의 수율과 관련하여 유전적으로 최적화된 유전자 조작 균주이다.
- [0078] 특정 표적 분자에 대해 적절한 제2 미생물 및 적용될 공정 조건이 종래 기술로부터 당업자에게 공지되어 있다.
- [0079] 따라서,
- [0080] W02011127409, W02009111672 및 W02010062480는 지방 알콜의 제조를 위한 적절한 제2 미생물 및 방법을 기술하고,
- [0081] W02012017083은 지방산 에틸 에스테르의 제조에 대한 것이며,
- [0082] W02011157848, W02011059745, W0 2009140695, W02007106903 및 W02009124694는 지방산의 제조에 대한 것이고,
- [0083] W02010126891은 알콜, 지방산 및 지방산 에스테르의 제조에 대한 것이고,
- [0084] W02010118410, W02010021711 및 W02010022090은 지방산 에스테르의 제조에 대한 것이고,
- [0085] W02010042664 및 W0 2009140695는 지방산 알데히드의 제조에 대한 것이고,
- [0086] W02012038390, W02007077568 및 W02011153317은 디카르복실산의 제조에 대한 것이며,
- [0087] W02011008232, W0 2009156214, W02007141208, W02004003213, GB2473755 및 EP11191923.9는 히드록시카르복실산의 제조에 대한 것이다.
- [0088] 본 발명에 따른 방법의 바람직한 별법에서, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소는 지방산, 특히 4개 내지 32개, 바람직하게는 6개 내지 20개, 특히 바람직하게는 8개 내지 12개의 탄소 원자가 있는 선형 포화 지방산이다. 이와 관련하여, 제2 미생물은 특히 그의 야생형과 비교하여 하나 이상의 티오에스테라제(thioesterase) 활성이 증가된 미생물이다. "그의 야생형과 비교하여 증가된 활성"이라는 용어는 이러한 증가된 활성이 있도록 미생물이 유전자 변형되었다는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 바람직하게는, 이는 티오에스테라제의 과발현 또는 외인성 티오에스테라제의 발현을 의미하는 것으로 이해된다. 이와 관련하여 바람직한 티오에스테라제는 아실-ACP-티오에스테라제, 바람직하게는 EC 3.1.2.14 또는 EC 3.1.2.22 또는 아실-CoA-티오에스테라제, 바람직하게는 EC 3.1.2.2, EC 3.1.2.18, EC 3.1.2.19, EC 3.1.2.20 또는 EC 3.1.2.22로부터 선택된다. 본 발명에 따른 별법에서 사용되는 바람직한 제2 미생물이 W02010118410, W02010075483, W02008119082 및 W02007136762에 개시되어 있고, 이러한 미생물 및 이러한 티오에스테라제에 관하여 이러한 문헌들의 개시내용을 특별히 참조한다.
- [0089] 본 발명에 따른 방법의 특히 바람직한 실시양태에서, 지방산은 옥탄산 및/또는 데칸산이고, 티오에스테라제는

쿠페아 후케리아나(*Cuphea hookeriana*)로부터의 *fatB2*의 유전자 생성물이다.

- [0090] 본 발명에 따른 방법의 바람직한 별법에서, 1개 이상의 산소 원자를 함유하는 1개 이상의 기로 치환된 탄화수소는 히드록시카르복실산, 특히 오메가-히드록시카르복실산 또는 히드록시이소부티르산, 특히 3-히드록시이소부티르산이다. 히드록시이소부티르산과 관련하여, 제2 미생물은 특히 W02009156214, W02007141208, W02009135074 및 EP11191923.9에 개시된 미생물이고, 이와 관련하여 이러한 문서들의 개시 내용을 특별히 참조한다. 오메가-히드록시카르복실산과 관련하여, 제2 미생물은 특히 W02011008232에 개시된 미생물이고, 이와 관련하여 이러한 문서의 개시 내용을 특별히 참조한다.
- [0091] 방법 단계 C)에서 생산된 이산화탄소는 방법 단계 A)의 방법으로 회송되고, 따라서 탄소원으로서 이용가능한 것이 본 발명에 따라 바람직하다. 이는 탄소 수율이 100%라는 기술적인 효과가 있다.
- [0092] 하기에 열거된 실시예는 전체 명세서 및 청구항로부터 적용 범주가 명백한 본 발명을 실시예에서 상술된 실시양태에 제한하려는 어떠한 의도도 없이 본 발명을 예를 들어 설명한다.
- [0093] 하기의 도면은 실시예의 구성 요소이다:
- [0094] 도 1: 합성 가스로부터 미생물에 의해 제조된 아세테이트로부터의 이. 콜라이(*E. coli*)에서의 지방산 생산
- [0095] 실시예
- [0096] 실시예 1: 방법 단계 A) 아세테이트 및 에탄올 형성
- [0097] 클로스트리디움 카르복시디보란스 DSMZ 15243의 생(live) 배양물을 1 ℓ 혐기성 용기에 1 ℓ의 탈이온화 증류수 내의 1 g의 효모 추출물, 19 g의 MES, 30 ml의 무기 염 용액, 10 ml의 미량 원소 용액, 10 ml의 비타민 용액으로 이루어진 허스트(Hurst)의 200 ml의 변형 PETC 배지 내에 충전하였다. pH를 0.5 M NaOH로 pH 5.9로 조정하였다. 무기 염 용액은 리터 당 80 g의 염화나트륨, 100 g의 염화암모늄, 10 g의 염화칼륨, 10 g의 모노인산칼륨, 20 g의 황산마그네슘, 4 g의 염화칼슘으로 이루어졌다. 비타민 용액은 리터 당 0.01 g의 피리독신, 0.005 g의 티아민, 0.005 g의 리보플라빈, 0.005 g의 칼슘 판토텐네이트, 0.005 g의 티옥트산, 0.005 g의 (파라)아미노벤조산, 0.005 g의 니코틴산, 0.005 g의 비타민 B12, 0.002 g의 비오틴, 0.002 g의 엽산, 0.01 g의 MESNA로 이루어졌다. 미량 원소 용액은 리터 당 2 g의 니트릴로아세트산, 1 g의 황산망간, 0.8 g의 황산암모늄철, 0.2 g의 염화코발트, 0.2 g의 황산아연, 0.02 g의 염화구리(II), 0.02 g의 염화니켈, 0.02 g의 몰리브덴산나트륨, 0.02 g의 셀렌산나트륨, 0.02 g의 텅스텐산나트륨으로 이루어졌다.
- [0098] 배지를 20분 동안 비등시킨 후, 순수 질소로 20분 동안 가스 처리하였다. 그 후, 이를 20분 동안 121°C에서 오토클레이빙(autoclaving)하였다. 냉각 후, 배지에 1 바의 초대기압(superatmospheric pressure)으로 50% CO<sub>2</sub>, 45% H<sub>2</sub> 및 5% CO<sub>2</sub>의 가스 혼합물을 3× 충전하였다. 그 후, 압력을 0.8 바의 초대기압으로 조정하였다. 접종 직전에, 1.5 ml의 각 경우의 아황산나트륨/시스테인 히드로클로라이드의 4% 강도 용액을 무균성 혐기 조건 하에 환원제로서 첨가하였다.
- [0099] 배양물을 100 rpm (5 cm 편심률)으로 37°C에서 배양하였다. 각 경우에, 72시간 후에, 배양물을 접종에 의해 새로운 배지로 옮겼다.
- [0100] 이같은 48시간 배양물로부터 생성물 제조용 접종원을 제거하였다.
- [0101] 이러한 목적을 위해, 2 ℓ 교반 용기인 인포스 HT(Infors HT)로부터의 랩포스(Labfos) 2에 비타민 용액이 없는 900 ml의 상기 기술된 변형 PETC 배지 (MESNA 제외)를 충전하고, 20분 동안 질소로 가스 처리하였다. 그 후, 용기를 121°C에서 20분 동안 오토클레이빙하였다. 그 후, 비타민 용액을 무균성 혐기 조건 하에 첨가하였다.
- [0102] 전체 발효 동안 pH를 0.5 M NaOH 및 0.5 M HCl로 5.9로 제어하였다.
- [0103] 가스 혼합물을 웨스트팔 메스- 운트 레겔테크닉(Westphal Mess- und Regeltechnik)으로부터의 WMR 4000 가스 혼합 스테이션을 사용하여 80% CO 및 20% CO<sub>2</sub>로 조정하였다. 5 ℓ/h로 가스 처리를 일정하게 수행하였다.
- [0104] 교반기 속도를 일정한 400 rpm으로 설정하였고, 이는 0.2 W/ℓ의 파워 입력에 상응하였다.
- [0105] 접종 직전에, 7.5 ml의 각 경우의 아황산나트륨/시스테인 히드로클로라이드의 4% 강도 용액을 무균성 혐기 조건 하에 환원제로서 첨가하였다.
- [0106] 접종원은 10%였고, 가스화를 시작하고 나서 30분 후에 마찬가지로 무균성 혐기 조건 하에 이를 첨가하였다. 출

발 OD<sub>600</sub>은 0.055였다.

- [0107] 수직도관 튜브를 통해, 0 / 14.4 / 16.8 / 20.8 / 24.2 / 38.7 h 후에 주사기를 사용하여 3 ml의 샘플을 취하였다.
- [0108] 아세트산, 에탄올, 부티르산 및 부탄올의 농도를 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 결정하였다. 아미넥스 (Aminex) HPX-87H 칼럼이 정지상으로서 사용되었다. 사용된 용리제는 0.6 ml/분의 일정한 유속의 5 mM 황산이었다. 칼럼 온도는 40°C였다. 에탄올 및 부탄올의 검출은 굴절률 검출기에 의해 수행하였고, 아세트산 및 부티르산은 210 nm의 파장에서 다이오드 어레이 검출기를 사용하여 검출하였다. 규정된 농도의 직선형 검정선을 참조하여 피크 면적을 통해 물질 농도를 결정하였다.
- [0109] 38.7시간 후에, 0 mM 부탄올, 1.42 mM 부티레이트, 3.33 mM 에탄올 및 54.26 mM 아세테이트가 측정되었다. 이는 91.95%의 아세테이트 분율에 상응한다.
- [0110] 실시예 2: 방법 단계 B) 아세테이트 분리
- [0111] 세포를 분리해낸 후, 아세트산을 첨가하여 발효 브로스(broth)의 pH를 3.0 미만의 pH로 감소시켰다. 그 후, 1:1 비의 1-옥탄올 내의 트리-n-옥틸아민 용액을 발효 브로스에 첨가하고, 25°C에서 2시간까지 1000 rpm 이상의 교반기 속도로 발효 브로스와 혼합하였다. 이어서, 원심분리로 상 분리를 수행하였다. 그 후, 아세트산을 120 °C 및 500 mbar의 초대기압에서 유기 상으로부터 증류시켰다. 증류액의 아세트산 함량을 HPLC로 결정하고, 추가적인 발효에서 상응하는 농도로 용액을 사용하였다 (실시예 3 및 4 및 6 참조).
- [0112] 실시예 3: 재조합 이. 콜라이에서의 C8 및 C10 지방산을 제공하는 아세테이트의 반응
- [0113] <Yale CGSC, The Coli Genetic Stock Center>로부터 입수가 가능한 이. 콜라이 균주 JW5020-1 ( $\Delta$ fadE)을 접종 바늘을 사용하여 냉동 배양물로부터 5 g의 효모 추출물, 10 g의 펩톤, 0.5 g의 염화나트륨 및 15 g의 한천-한천 pH 7로 이루어진 LB 한천 플레이트 상으로 스트리킹(streaking)하였다. 이. 콜라이 균주 ( $\Delta$ fadE) pJ294 [Ptac-ChFATB2\_optEc]를 접종 바늘을 사용하여 냉동 배양물로부터 100 mg/ml 앰피실린을 추가적으로 함유하는 LB 플레이트 상으로 스트리킹하였다. 플레이트들을 37°C에서 철야로 인큐베이션하였다.
- [0114] 이. 콜라이 균주 JW5020-1 ( $\Delta$ fadE) pJ294 [Ptac-ChFATB2\_optEc]는 쿠페아 후케리아나로부터의 *fatB2* 유전자용 발현 벡터로 형질전환되었다. 상기 언급된 벡터를 생산하기 위해, 이러한 유전자를 에셰리키아 콜라이 (*Escherichia coli*)에서의 발현에 대해 코돈-최적화시켰다. 유전자를 *tac* 프로모터와 함께 합성하였고, 동시에 프로모터 상류의 제한 부위 및 종료자 하류의 제한 부위를 도입하였다. 합성된 DNA 단편 P<sub>tac-ChFatB2</sub> (서열 1)를 제한 엔도뉴클레아제(endonucleases) *Bam*HI 및 *Not*I로 소화시키고, 상응하게 절단된 벡터 pJ294 (DNA2.0 인크(DNA2.0 Inc.), 미국 캘리포니아주 멘로 파크) 내로 결찰시켰다. 최종 이. 콜라이 발현 벡터를 pJ294[Ptac-ChFATB2\_optEc] (서열 2)로 지칭하였다.
- [0115] 예비배양 1: 양쪽 배양물을 각 경우에 10 ml의 M9, mod-G 액체 배지에서 접종에 의해 배플(baffle)이 있는 100 ml 진탕 플라스크 내로 옮겼다. M9 mod-G 배지는 800 ml M9 완충제 및 150 ml ddH<sub>2</sub>O에 용해된 2.6 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.49 g/l MgSO<sub>4</sub>+7H<sub>2</sub>O, 20 g/l 글루코스, 1 ml/l 미량 원소 US3으로 구성되었다. M9 완충제는 800 ml ddH<sub>2</sub>O에 용해된 6.79 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/l NaCl, 2 g/l NH<sub>4</sub>Cl로 이루어졌다. 플라스크-보유 균주에 대해, 100 µg/ml 앰피실린을 배지에 첨가하였다.
- [0116] 접종 바늘을 각 경우에 사용하여 완전 루프(loop)의 세포 물질을 플레이트로부터 상응하는 액체 배지로 옮겼다.
- [0117] 배양물을 37°C 및 200 rpm에서 철야로 인큐베이션하였다.
- [0118] 20시간 후, OD는 하기와 같았다:
- [0119] 이. 콜라이 JW5020-1 ( $\Delta$ fadE) 10.6
- [0120] 이. 콜라이 JW5020-1 ( $\Delta$ fadE) pJ294[Ptac-ChFATB2\_optEc] 12.8.
- [0121] 예비배양 2
- [0122] 예비배양 1로부터의 0.5 ml를 20 ml의 M9, mod-G에서의 접종에 의해 배플이 있는 100 ml 진탕 플라스크 내로 옮겼다. M9, mod-G 배지는 800 ml M9 완충제 및 170 ml ddH<sub>2</sub>O에 용해된 2.6 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.49 g/l

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60 mM 아세트산나트륨 (실시에 2로부터의 것), 1 ml/ℓ 미량 원소 US3으로 구성되었다. 플라스미드-보유 균주의 배양을 위해, 100 μg/ml 앰피실린을 배지에 첨가하였다.

- [0123] 배양물을 37°C 및 200 rpm에서 철야로 인큐베이션하였다.
- [0124] 예비배양 2의 OD는 하기와 같았다
- [0125] 이. 콜라이 JW5020-1 (ΔfadE)/아세테이트 2.5
- [0126] 이. 콜라이 JW5020-1 (ΔfadE) pJ294[Ptac-ChFATB2\_optEc]/아세테이트 1.75
- [0127] 배플이 있는 1000 ml 진탕 플라스크 내의 균주 당 100 ml의 변형된 M9 액체 배지 + 60 mM 아세테이트에 OD 0.2가 수득되도록 예비배양물을 접종하였다.
- [0128] 배양물을 37°C 및 225 rpm에서 인큐베이션하였다.
- [0129] 약 0.5의 OD<sub>600</sub>에서, 1M IPTG의 모액으로부터의 1 mM IPTG로 유도를 수행하였다.
- [0130] 샘플링을 위해, 각 경우에 4 ml의 세포 상청액을 무균 조건 하에 제거하고, OD를 결정하고, 샘플을 프로세싱할 때까지 나머지 현탁액을 -80°C에서 15 ml 팔콘 튜브에서 보관하였다.
- [0131] 기체 크로마토그래피에 의해 지방산 메틸 에스테르로서의 유도체화 후에 지방산 정량을 수행하였다. 1 ml의 아세톤 및 2 ml의 물을 첨가한 후에, 2 ml의 배양 브로스로 이루어진 샘플에 내부 기준 물질로서 50 μl의 헵타데칸산 (에탄올에 용해된 10 g/ℓ)을 첨가하였다. 샘플을 200 μl의 아세트산으로 산성화하고, 10 ml의 1:1 (v/v) 클로로포름/메탄올 혼합물과 혼합하였다. 샘플을 1분 이상 동안 철저히 혼합시켰다. 그 후, 클로로포름 상을 제거하고, 증발시켰다. 건조 잔류물을 1 ml의 1.25 M 메탄올성 염산에 용해시키고, 50°C에서 철야로 인큐베이션하여, 존재하는 지방산을 에스테르화시켰다. 5 ml의 포화 탄산나트륨 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다 (모든 물질은 스타인하임의 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)의 것임). 1 ml의 n-헵탄을 첨가하고 15초 동안 격렬하게 혼합함으로써 지방산 메틸 에스테르를 추출하였다. 기체 크로마토그래피에 의해 헵탄 상을 측정하였다. 지방산 메틸 에스테르의 분리를 위해, 치수가 100 m × 0.25 mm이고 필름 두께가 0.2 μm인 모세관 칼럼 SP<sup>TM</sup>-2560 (수펠코(Supelco), 시그마-알드리치 (스타인하임))을 정지 상으로서 사용하였다. 사용된 캐리어 가스는 헬륨이었다. 260°C의 주입기 온도, 260°C의 검출기 온도, 및 시작할 때는 140°C이고, 5분 동안 유지되며, 4°C/분의 속도로 240°C로 증가되고, 15분 동안 유지되는 칼럼 온도에서 45분 과정에 걸쳐 분리가 수행되었다. 주입 부피는 1 μl였고, 분할율은 1:20이었으며, 캐리어 가스의 처리량은 1 ml/분이었다. 불꽃 이온화 검출기 (GC 퍼킨 엘머 클라루스(GC Perkin Elmer Clarus) 500, 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer) (로드가우))에 의해 검출을 수행하였다. 헵타데칸산 (시그마-알드리치, 스타인하임)이 지방산 메틸 에스테르를 정량하기 위한 내부 기준 물질로서 사용되었다. 기준 물질 C8:0-Me 카프릴산 메틸 에스테르, C10:0-Me 카프르산 메틸 에스테르, C12:0-Me 라우르산 메틸 에스테르, C14:0-Me 미리스트산 메틸 에스테르, C16:0-Me 팔미트산 메틸 에스테르, C16:1-Me 팔미톨레산 메틸 에스테르, C18:0-Me 스테아르산 메틸 에스테르, C18:1-Me 올레산 메틸 에스테르 (GLC 스탠다드 믹스(GLC Standard Mix) GLC-20 1892-1AMP, GLC-30 1893-1AMP, GLC-50 1894-1AMP, 시그마-알드리치, 스타인하임)를 검정에 사용하였다. 모든 지방산 메틸 에스테르에 대한 정량 한계는 10 mg/ℓ의 농도였다.
- [0132] 96시간 후의 이. 콜라이 JW5020-1 (ΔfadE) pJ294[Ptac-ChFATB2\_optEc]에 대한 지방산 농도의 분포는 도 1에 제시된 바와 같이 OD 1에 표준화되는 것으로 나타났다.
- [0133] 실시예 4: 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8로의 3-히드록시이소부티르산 (3-HIB)를 제공하는 아세테이트의 반응
- [0134] EP 11191923.9의 실시예 1, 항목 1 내지 3에 따라, 3-히드록시이소부티르산 데히드로게나제(dehydrogenase)의 활성이 약독화된 와이. 리폴리티카(*Y. lipolytica*) 세포 H222-41을 합성하였다; 이러한 세포를 이하 H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8로 칭한다.
- [0135] H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8을 상응하는 야생형 H222-41 (ura)-8과 비교하여 배양하였다.
- [0136] 배양
- [0137] 양쪽 균주를 접종 바늘을 사용하여 무균 조건 하에 냉동 배양물로부터 YEPD 한천 플레이트 상에 스트리킹하였다. YEPD 한천 플레이트는 10 g의 글루코스, 10 g의 효모 추출물, 20 g의 펩톤 및 15 g의 한천-한천으로 이루어졌다. pH는 5.4였다. 80시간 동안 25°C에서 인큐베이션을 수행하였다.

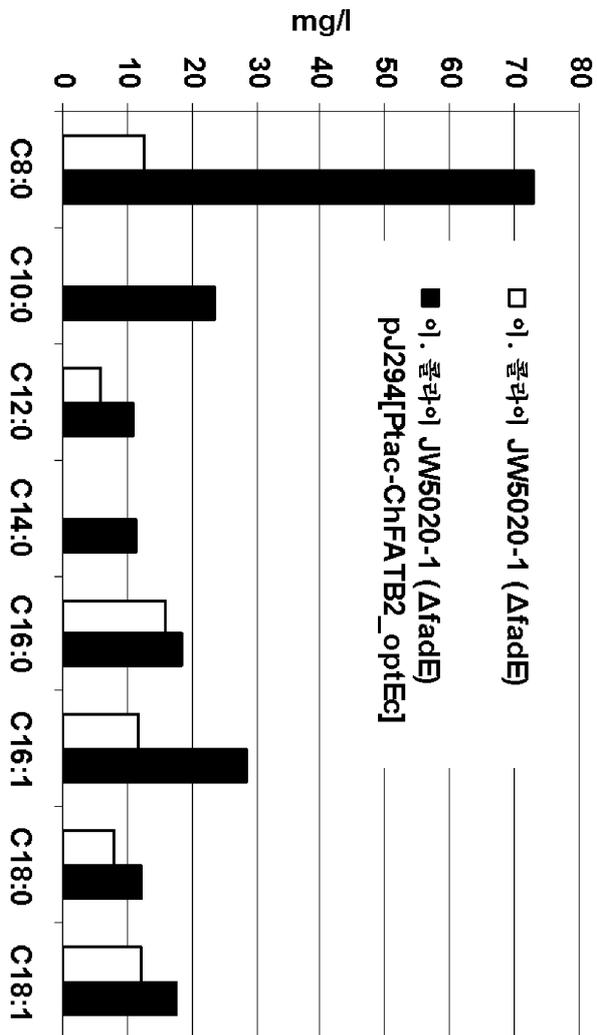
- [0138] 예비배양 (바이오매스 생산)
- [0139] 6개의 배플이 없는 1000 ml 진탕 플라스크에 글루코스, 10 g의 효모 추출물, 20 g의 펩톤 pH 5.4로 이루어진 100 ml의 YEPD 액체 배지를 충전하였다. 3방울의 델멕스(Delmex) 소포제를 각각의 진탕 플라스크에 첨가하였다.
- [0140] 균주 당 각각 3개의 진탕 플라스크에 대해, 각 경우에 2회의 완전 루프의 세포 물질을 무균 조건 하에서의 접종에 의해 상응하는 YEPD 한천 플레이트로부터 접종 바늘을 사용하여 옮겼다. 진탕 플라스크의 인큐베이션을 20 시간 동안 28°C 및 180 rpm (진폭 2.5 cm)에서 수행하였다.
- [0141] 아세테이트 배양물을 위한 접종원의 제조
- [0142] 20시간 후에, 와이. 리폴리티카 H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8 및 와이. 리폴리티카 H222-41 (ura)-8이 있는 3개의 진탕 플라스크를 합쳤다. 크레인바움 비센샤프티헤 메스시스템 이. 케이(KREIENBAUM Wissenschaftliche Meßsysteme e.K.)로부터의 바이오애널리티컬 시스템(Bioanalytical System) YSI 7100 멀티파라미터를 사용하여 글루코스 함량이 0 g/l로 결정되었다. 브로스를 50 ml 팔콘 튜브에서 분할하고, 10분 동안 5600 rpm에서 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하고, 펠릿을 0.9% 강도의 NaCl 용액에 재현탁시키고, 다시 10분 동안 5600 rpm에서 원심분리시켰다. 가능한 잔류 당을 제거하기 위해 이러한 작업을 2회 더 반복하였다. 그 후, 펠릿을 각 경우에 15 ml의 아세테이트 배지에 재현탁시키고, 배양물을 균주에 따라 합치고, 아세테이트 배지로 각 경우에 50 ml로 채웠다.
- [0143] 반 우덴(van Uden)에 따른 아세테이트 배지는 조성이 하기와 같았다:
- [0144] 기본 배지
- [0145] 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/l MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 0.15 g/l CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 4 g/l Na 아세테이트 (실시에 2로부터의 것), 5 ml/l 비타민 용액, 5 ml/l 비오틴 용액, 5 ml/l 미량 원소 용액 A, 5 ml/l 미량 원소 용액 B.
- [0146] 비타민 용액
- [0147] 80 mg/100 ml 칼슘 판토테네이트, 200 mg/100 ml 미오이노시톨, 160 mg/100 ml 니코틴산, 160 mg/100 ml 피리독신 HCl, 16 mg/100 ml 티아민 HCl.
- [0148] 비오틴 용액
- [0149] 비오틴 8 mg/l
- [0150] 미량 원소 용액 A
- [0151] 100 mg/100 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20 mg/100 ml KI, 40 mg/100 ml NaMoO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O
- [0152] 미량 원소 용액 B
- [0153] 8 mg/100 ml CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, 40 mg/100 ml FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 80 mg/100 ml MnSO<sub>4</sub> × 4 H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O 0.001 N HCl.
- [0154] 기본 배지의 고체 구성성분을 700 ml의 ddH<sub>2</sub>O에 용해시키고, pH를 5.4로 조정하고, 배지를 오토클레이빙하였다. 용액을 멸균-여과하고, 냉각 후에 기본 배지에 첨가하고, 멸균 ddH<sub>2</sub>O로 전체 배지를 1000 ml로 채웠다.
- [0155] 발효기 컨디셔닝
- [0156] DASGIP로부터의 평행 발효 시스템의 800 ml 무균 발효기 4개에 175 ml의 아세테이트 배지를 충전하였다. 공정 조건을 30 pO<sub>2</sub> [%], 14 sl/h 기류, 400-1500 rpm 교반기 속도, 28°C 온도, 및 pH 5.4로 조정하였다. 0.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 또는 25% 아세트산 및 12.5% NH<sub>4</sub>OH로 pH를 조절하였다. 사용된 공급물은 14% 강도 아세트산나트륨 용액 pH 5.4였다.
- [0157] 3-HIB 생산
- [0158] 각 경우에 2개의 발효기에 25 ml의 와이. 리폴리티카 H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8 및 와이. 리폴리티카 H222-41

(ura)-8 접종원을 접종하였다.

- [0159] 접종하고 나서 0, 3, 5, 21, 30 및 46시간 후에 샘플링을 수행하였다. 모든 샘플에 대해, OD600 및 아세테이트 함량을 알-바이오팜(R-Biopharm)으로부터의 분석 테스트 키트로 결정하였다. 아세테이트 소비에 대해 공급물이 개조되었다.
- [0160] 0시 및 46시 샘플에 대해, 추가적으로 D20를 용매로 하고 아세테이트 및 3HIB의 물 억제가 있는 NMR 결정을 수행하였다.
- [0161] 결과
- [0162] OD가 실험 기간 내에 평균 10에서 평균 45으로 증가하였다.
- [0163] 출발 시의 아세테이트 함량은 평균 2250 mg/kg이었고, 발효 말기에는 32 mg/l 였다.
- [0164] 발효를 시작할 때의 3HIB 함량은 와이. 리폴리티카 H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8 및 와이. 리폴리티카 H222-41 (ura)-8 둘 다에 대해 0 mg/l 였다.
- [0165] 46시간 후, 야생형 와이. 리폴리티카 H222-41 (ura)-8에 대해서 0 mg/kg이 측정되었다.
- [0166] 3-HIB 테히드로게나제가 녹-아웃(knock-out)된 와이. 리폴리티카 H222-41 Δ3HIBDH (ura)-8 균주는 평균 18 mg/kg 3HIB를 생산하였다.
- [0167] 실시예 5: 방법 단계 B) 에탄올 분리
- [0168] 실시예 1로부터의 발효 브로스의 직접적인 증류에 의해 수성 농축물의 형태로 에탄올이 분리되었다.
- [0169] 실시예 6: 혐기성 박테리아 클로스트리디움 클루이베리(*Clostridium kluyveri*)로의 헥산산 및 헥산산 에틸 에스테르를 제공하는 아세테이트 및 에탄올의 반응
- [0170] 배양을 위해, 부틸 고무 마개를 사용하여 기밀 방식으로 밀봉될 수 있는 압력-저항성 유리병을 사용하였다. 모든 배양 단계가 혐기성 조건 하에 수행되었다. 무균성을 확실히 하기 위해 병을 20분 동안 121°C에서 오토클레이빙하였다.
- [0171] 배양을 위해, 4개의 압력-저항성 유리병 (500 ml 부피)에 씨. 클루이베리(*C. kluyveri*)용 배지 52로서 DSMZ가 추천한 혐기성 배지 200 ml를 충전하였다. 요구되는 아세테이트 및 에탄올은 실시예 2 및 5로부터 사용되었다. 그 후, 배양물에 각 경우에 10 ml의 씨. 클루이베리 배양물을 접종하였다. 배양물을 각 경우에 부틸 고무 마개로 밀봉하고, 116.25시간 동안 35°C에서 인큐베이션하였다. 배양을 시작할 때 및 종료할 때 샘플을 취했다. 이를 광학 밀도 및 다양한 분석물에 대해 NMR에 의해 분석하였다. 헥산산 및 헥산산 에틸 에스테르는 누적 파라미터로서만 NMR에 의해 확인될 수 있기 때문에, 최종 샘플 내의 개별적인 물질 둘 다의 존재의 증명을 GC/MS 분석에 의해 수행하였다.
- [0172] 배양 시간에 걸쳐, 아세테이트의 경우는 5.4 g/l에서 1.4 g/l로, 에탄올의 경우는 14.2 g/l에서 5.8 g/l로의 감소가 4개의 복제물에 대해 평균적으로 확인되었다. 동시에, 부티르산 형성이 확인되었고 (값이 0.13 g/l에서 2.5 g/l로 증가함), 헥산산/헥산산 에틸 에스테르의 형성도 확인되었다 (값이 합계하여 0.05 g/l에서 7.6 g/l로 증가함).

도면

도면1



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Evonik Industries

<120> Mehrstufiges Syntheseverfahren mit Synthesegas

<130> 201100374

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon optimized gene

<400> 1

```

gcggccgcaa attcagtaag cagaaaagtc aaagcctccg accggaggct ttgactatt      60
aggaaacgct gttgccatta gacgtcttgc cggtgctaat agcaccattc gcacctgcat      120
ttttcggacg ccaactcggtt gcaccattga cgattgcagt accatcctcc agacgcagca      180

ggtgttgata ttggctacgc acaccaactt tggacgggtc catcgccgtc acgctttcca      240
aaacgctgtc acggccgcac tcgcgacgat attccagagc caggctgcac agctcctgcg      300
tttccaggac ctcggtcggc atgctctcca gaatccagcc aatgtatttg acgttgctga      360
catgttgatt cacatccaga tcgttccagc ctggggtcaa gcctttttgg atgctgtcac      420
cggctttaac cttagaacta tggaccttca gatcgctatc ctcgataacc ggagagtcaa      480
cgaacagagg gacgatttcc tgatgcacct cgtacggcag cttgctcagg cgacgagttt      540
tctgattcat catggcatal gcgctggctc cagcaccag gatttcgccc gtattgcaat      600

cgctaatacag ccagtcgcca cccataccaa tcttaccag acggtgaaa cgcgtgttaa      660
tctcaacggt gtcaccccag gccgggtaac ggtaacttt gatctgcatc ttaatcacca      720
cccaaatcaa atcacgctta cacatctcca ggtgctgacc gaaacatcc aacaggatac      780
cggtagatatt acagtggttc aagctggttt cctgcaggtg gttcatcagg gtttcgatgc      840
tcgcggtacg atccgtgcca atctcgtagc tgcggatgct aaaggattga cgaaacacca      900
ggccgtcctg gaccgtgctt tccagaccaa acgagtctac cagcatgtcc gggcgtttgg      960
atitgcggtc gtgcatatgt tttacctctt gttaaacaaa attatttcta gagggaaacc     1020

gttgtggaat tgtgagcgt cacaattcca catccacaca ttatagagc cgatgattaa     1080
ttgtcaacag cgtcgatcac tgtgcatgaa gctcgtaatt gttatccgct cacaattgga     1140
tcc                                                                                   1143

```

<210> 2

<211> 4985

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> vector

<400> 2

```

accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag      60
ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggettacca tetggcecca     120
gcgctgcgat gataccgca gaaccacgct caccggctcc ggatttatca gcaataaacc     180

```

agccagccgg aaggccgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgc tccatccagt 240  
 ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 300  
 ttgttgccat cgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca 360  
 gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg 420  
 ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca 480  
 tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 540  
 tgactggtga gtactcaacc aagtattctt gagaatagtg tatgctggcga ccgagttgct 600  
  
 ctgccccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca 660  
 tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 720  
 gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 780  
 tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggata agggcgacac 840  
 ggaaatgttg aatactcata ttcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 900  
 attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggtca 960  
 gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag cccatttata cctgaatatg 1020  
  
 gctcataaca ccccttgttt gcctggcggc agtagcggg tggcccacc tgaccccatg 1080  
 ccgaactcag aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggactcc ccatgcgaga 1140  
 gtagggaact gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg 1200  
 cccgggctaa ttatgggggtg tcgcccttat tcgactctat agtgaagttc ctattctcta 1260  
 gaaagtatag gaacttctga agtgggggcg gccgcaaatt cagtaagcag aaagtcaaaa 1320  
 gcctccgacc ggaggctttt gactattagg aaacgctgtt gccattagac gtcttgccgg 1380  
 tgctaatagc accattcgca cctgcatttt tcggacgcca ctcggttgca ccattgacga 1440  
  
 ttgcagtacc atctccaga cgcagcaggt gttgatattg gctacgcaca ccaactttgg 1500  
 acgggtccat cgcgctcacg ctttcaaaa cgctgtcacg gccgactcg cgacgatatt 1560  
 ccagagccag gctgcacagc tctgcgttt ccaggacctc ggtcggcatg ctctccagaa 1620  
 tccagccaat gtatttgacg ttgtgacat gttgattcac atccagatcg ttccagcctg 1680  
 gggtaagcc tttttgatg ctgtcaccgg tcttaacctt gaacttatgg accttcagat 1740  
 cgctatcctc gataaccgga gactcaacga acagagggac gatttctga tgacactcgt 1800  
 acggcagctt gctcaggcga cgagttttct gattcatcat ggcatacgcg ctggtcgcac 1860  
  
 gcaccaggat ttgccccgta ttgcaatcgc taatcagcca gtcgcgacc ataccaatct 1920  
 taccagacg gctgaaacg gtgttaatct caacgggtgc acccaggcc gggtaacggt 1980  
 taactttgat ctgcatctta atcaccacc aaatcaaatc acgcttacac atctccaggg 2040

tgcgaccgaa accatccaac aggataccgg tagatttaca gtggttcaag ctggtttctt 2100  
 gcaggtgggt catcagggtt tcgatgctcg cggtagcatc cgtgccaatc tcgtagctgc 2160  
 ggatgctaaa ggattgacga aacaccaggc cgtcctggac cgtgctttcc agaccaaacg 2220  
 agtctaccag catgtccggg cgtttggatt tgcggtcgtg catatgtttt acctcctggt 2280  
  
 aaacaaaatt atttctagag ggaaaccgtt gtggaattgt gagcgtcac aattccacat 2340  
 ccacacatta tacgagccga tgattaattg tcaacagcgt cgatcactgt gcatgaagct 2400  
 cgtaattggt atccgctcac aattggatcc aaaatgaagg gaagtcccta tactttctag 2460  
 agaataggaa ctctatagg gagtcgaata agggcgacac aaaaggtatt ctaaatgcat 2520  
 aataaatact gataacatct tatagtttgt attatatttt gtattatcgt tgacatgtat 2580  
 aattttgata tcaaaaactg attttccctt tattattttc gagatttatt ttcttaattc 2640  
 tctttaacaa actagaaata ttgtatatac aaaaaatcat aaataataga tgaatagttt 2700  
  
 aattataggt gttcatcaat cgaaaaagca acgtatctta tttaaagtgc gttgcttttt 2760  
 tctcatttat aaggttaaat aatttccata tatcaagcaa agtgacaggc gcccttaaat 2820  
 attctgacaa atgctctttc cctaaactcc ccccataaaa aaaccgcgag aagcgggttt 2880  
 ttacgttatt tgcggattaa cgattactcg ttatcagaac cgcccaggat gcctggcagt 2940  
 tccctactct cggcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggg acctcagcgc tagcggagtg 3000  
 tatactggct tactatgttg gcactgatga ggggtgcagt gaagtgttc atgtggcagg 3060  
 agaaaaaagg ctgcaccggt gcgtcagcag aatatgtgat acaggatata ttccgcttcc 3120  
  
 tcgctcactg actcgtcagc ctcggtcgtt cgactgcggc gagcggaaat ggcttacgaa 3180  
 cggggcggag atttcttggg agatgccagg aagatactta acagggaaat gagagggccg 3240  
 cggcaaagcc gtttttccat aggtccgcc cccctgacaa gcatcacgaa atctgacgt 3300  
 caaatcagtg gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggcg 3360  
 gctccctcgt gcgtctcct gttcctgcct ttccggttac cgggtgcatt ccgctgttat 3420  
 ggccgcgttt gtctcattcc acgctgaca ctcagttccg ggtaggcagt tcgctccaag 3480  
 ctggactgta tgcacgaacc ccccgctcag tccgaccgct gcgccttacc cggttaactat 3540  
  
 cgtcttgagt ccaaccgga aagacatgca aaagcaccac tggcagcagc cactggtaat 3600  
 tgatttagag gatttagctt tgaagtcatg cgcgggttaa ggctaaactg aaaggacaag 3660  
 ttttggtgac tgcgtcctc caagccagtt acctcggttc aaagagttgg tagctcagag 3720  
 aacctcgaa aaaccgcctt gcaaggcgtt ttttctgtt tcagagcaag agattacgcg 3780  
 cagacaaaaa cgatctcaag aagatcatct tattaatcac tgcctcgttt ccagtggga 3840  
 aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgctg 3900

attggcgcc aggttggtt tcttttcac cagtgagact ggcaacagct gattgcctt 3960  
  
 caccgctgg cctgagaga gttgcagcaa gcgtccacg ctggtttgcc ccagcaggcg 4020  
 aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg gatataacat gagctatctt cggtatcgtc 4080  
 gtatccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgat 4140  
 tgcgcccage gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca gtgggaacga tgcctcatt 4200  
 cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc cagtgcctt cccgttccgc 4260  
 tatcggtga atttgattgc gagtgagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc 4320  
 cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tggtagacca atgacaccag 4380  
  
 atgctccacg ccagtcgcg taccgtctc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt 4440  
 ctggtcagag acatcaagaa ataacgccg aacattagtg caggcagctt ccacagcaat 4500  
 ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag 4560  
 attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac 4620  
 gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt aatgcccgcg acaatttgcg acggcgcgtg 4680  
 cagggccaga ctggaggtgg caacccaat cagcaacgac tgtttgccg ccagttgttg 4740  
 tgccacgagg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt 4800  
  
 tttcgagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc 4860  
 ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcata ttcaccacc tgaattgact 4920  
 ctctccggg cgctatcatg ccataccgcg aaaggttttg cgccattcga tggcgcgccg 4980  
 ctttt 4985