



(51) 국제특허분류:

C12N 15/63 (2006.01) C12P 7/46 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 5/02 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/000500

(22) 국제출원일: 2018년 1월 10일 (10.01.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0003301 2017년 1월 10일 (10.01.2017) KR
10-2017-0003302 2017년 1월 10일 (10.01.2017) KR
10-2017-0041834 2017년 3월 31일 (31.03.2017) KR
10-2017-0057991 2017년 5월 10일 (10.05.2017) KR
10-2017-0117324 2017년 9월 13일 (13.09.2017) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이은열 (LEE, Eun Yeol); 06362 서울시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호, Seoul (KR). 이육경 (LEE,

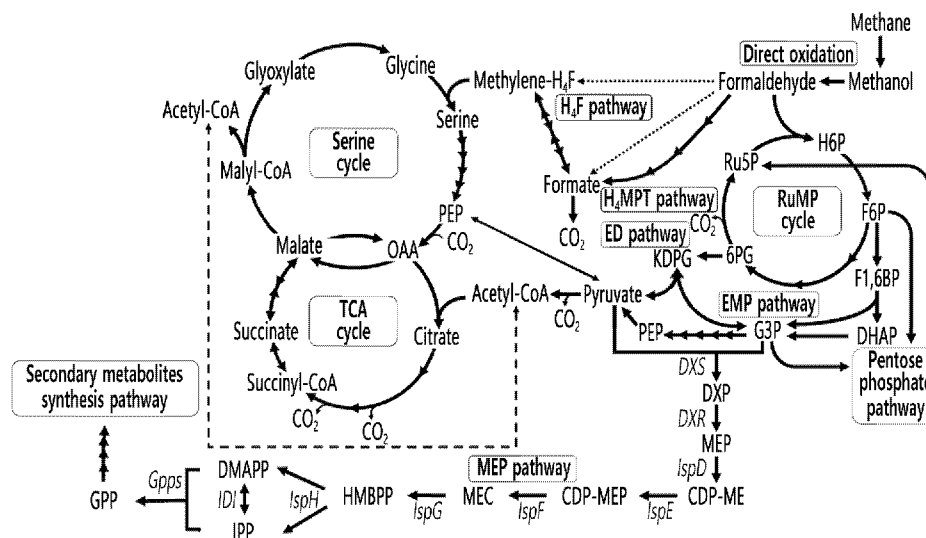
Ok Kyung); 16705 경기도 수원시 영통구 청명로21번길 7, 101호, Gyeonggi-do (KR). 황인엽 (HWANG, In Yeub); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공과실험동 103호 나노바이오공학 연구실, Gyeonggi-do (KR). 전영찬 (JEON, Young Chan); 21342 인천시 부평구 체육관로 111, 414동 1203호, Incheon (KR). 뉴엔테이 닝 딕 (NGUYEN, Thi Ngoc Diep); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공과실험동 103호, Gyeonggi-do (KR). 김혜진 (KIM, Hye Jin); 14051 경기도 안양시 동안구 관평로212번길 21, 310동 501호, Gyeonggi-do (KR). 웬덕 안 (NGUYEN, Duc Anh); 17103 경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 4동 2-2호, Gyeonggi-do (KR). 웬티후 (NGUYEN, Thi Thu); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공과실험동 103호, Gyeonggi-do (KR). 오소현 (OH, So Hyeon); 16382 경기도 수원시 권선구 금곡로73번길 71, 404동 601호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 6층 한일국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: NOVEL USE OF METHYLOMONAS SP. DH-1 STRAIN

(54) 발명의 명칭: 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 신규한 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing various metabolites from a gaseous alkane compound using a *Methylomonas* sp. DH-1 strain, deposited as Accession Number KCTC18400P, and a transformant thereof. As using the method according to the present invention can produce various metabolites from a gaseous alkane compound more effectively than a case of using conventional methanotrophic bacteria, the method can be widely used for production of a target substance using a bioreactor.

(57) 요약서: 본 발명은 KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여, 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하면, 종래의 메탄산화균을 이용할 경우 보다도 더욱 효과적으로 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산할 수 있으므로, 바이오리액터를 이용한 목적 물질의 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.



EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 신규한 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 메틸로모나스 속 (*Methylomonas* sp.) DH-1 균주의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여, 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세계적으로 지구온난화에 대한 관심이 높아지고 있으며 주요 원인은 이산화탄소와 메탄 등의 온실효과로 알려져 있다. 이를 해결하기 위하여 이산화탄소를 사용하는 미생물을 활용하여 이산화탄소로부터 고부가가치 산물을 생산하는 연구가 활발히 수행되고 있으며, 최근 이산화탄소를 전환하기 위하여 컴퓨터로 계산하여 설계한 합성 생촉매를 만들고 이를 활용한 대사 경로를 재구축하는 연구가 수행되었다.
- [3] 메탄의 주요 발생원은 혐기성소화의 산물인 바이오가스과 자연적으로 생성된 천연가스이다. 바이오가스의 주요성분은 메탄과 이산화탄소이고, 천연가스의 70~90%는 메탄이며 나머지는 에탄과 소량의 프로판으로 구성되어있다. 최근, 셰일층에서 생산되는 천연가스인 셰일가스의 생산량이 급증하여 메탄 및 에탄의 사용에 대한 관심이 높은 상황이다. 그에 따라 메탄을 활용할 수 있는 능력을 가진 미생물인 메탄자화균에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [4] 메탄자화균은 메탄을 포함한 단일탄소 기질을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있는 원핵생물이다. 메탄자화균은 메탄산화효소를 보유하고 있어 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있고 일련의 대사과정을 거쳐 바이오메스로 전환할 수 있는 능력을 가졌다. 메탄산화효소는 수용성 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase; sMMO), 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase; pMMO)로 분류된다. pMMO는 sMMO와 비교하여 메탄에 대해 더 높은 친화력을 가지고 있어 메탄을 산화시켜 성장하는 세포내에서의 주요 생체 촉매로 생각되며, 상온 상압에서 메탄을 수산화하여 상온 상압에서의 메탄을 전환을 가능하게 한다. 구리가 존재하는 환경에서는 sMMO의 발현이 억제됨과 동시에 pMMO의 발현이 유도되며 pMMO는 막 단백질로서 세포막에 존재하여 메탄을 산화시킨다. 메탄이 산화되어 생성된 메탄올은 각종 화합물과 바이오연료로서의 사용이 가능한 고부가가치 산물이며, 이에 따라 메탄자화균을 이용한 메탄-메탄올 전환 연구가 국내외로 진행되고 있다.
- [5] 한편, 상기 메탄자화균은 다양한 물질 대사과정을 통해 메탄을 다양한 대사산물로 전환시킬 수도 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2017-0087361호에는 메탄자화균을 이용하여 아세톤을 생산하는 방법이

개시되어 있고, 한국공개특허 제2017-0089227호에는 호염성 메탄자화균을 이용하여 이소프렌을 생산하는 방법이 개시되어 있다.

- [6] 그러나, 상기 개발된 방법들은 대체로 메탄자화균에 외래 유전자를 도입하거나 또는 메탄자화균의 내재적 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체를 제조한 후, 제조된 형질전환체를 바이오리액터로 사용하여 다양한 대사산물을 생산하는 방법인데, 상기 방법은 메탄자화균의 종류에 따라, 목적하는 대사산물의 생산효율이 변화된다는 단점이 있었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 메탄자화균을 이용하여 보다 효과적으로 대사산물을 생산하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 이용할 경우, 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 더욱 효과적으로 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여, 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [9] 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하면, 종래의 메탄자화균을 이용할 경우 보다도 더욱 효과적으로 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산할 수 있으므로, 바이오리액터를 이용한 목적 물질의 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1a는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 다양한 대사경로를 나타내는 개략도이다.
- [11] 도 1b는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 이차 대사산물을 합성하는 대사경로를 나타내는 개략도이다.
- [12] 도 2a는 대조균 균주 및 DH-1 균주로부터 생산된 에탄올의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [13] 도 2b는 대조균 균주 및 DH-1 균주로부터 생산된 프로판올의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [14] 도 3a는 메탄을 단독으로 공급하면서 배양된 DH-1 균주의 배양물 및 대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인 및 메탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (◆)는 메탄을 나타내고, (●)는 아세트알데히드를 나타내며, (▼)는 아세트인을 나타낸다.
- [15] 도 3b는 메탄과 에탄올 동시에 공급하면서 배양된 DH-1 균주의 배양물 및

대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인, 메탄 및 에탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (●)는 메탄, (■)는 에탄을 나타내고, (◆)는 아세트알데히드를 나타내며, (▼)는 아세트인을 나타낸다.

- [16] 도 3c는 메탄과 에탄을 동시에 공급하면서 배양된 DH-1/2,3-BDO의 배양물 및 대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인, 메탄 및 에탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (●)는 메탄, (■)는 에탄을 나타내고, (◆)는 아세트알데히드, (▼)는 아세트인을 나타내며, (▲)은 2,3-부탄디올을 나타낸다.

- [17] 도 4a는 DH-1 균주로부터 생산된 숙신산의 배지내 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [18] 도 4b는 본 발명에서 제공하는 4종의 형질전환 DH-1 균주로부터 생산된 숙신산의 배지내 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [19] 도 5는 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 2종류의 형질전환 DH-1 균주로부터 생산된 아미노레불린산의 배지내 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [20] 도 6은 16시간 및 28시간 동안 배양된 DH-1 균주 또는 DH-1/SQU 균주에서 합성된 스쿠알렌의 생산성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [21] 도 7a는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 도입한 후, 야생형 메탄자화균과 형질전환 메탄자화균을 메탄을 기질로 96시간 배양하여 2,3-부탄디올을 생산하는지 비교한 그래프이다.

- [22] 도 7b는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 형질 도입한 후, 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄으로부터 아세트인 그리고 2,3-부탄디올의 생산량을 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [23] 도 7c는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 형질 도입한 후, 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄으로부터 2,3-부탄디올의 생산량과 세포의 성장속도를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [24] 도 8a는 에탄올 및 글루코스를 단독으로 또는 함께 포함하는 배지조건에서 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2로부터 생산된 아세트인의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [25] 도 8b는 에탄올을 포함하는 배지에서 배양된 MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing acetoin)과 MDH, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing 2,3-butanediol)의 배양산물에 포함된 성분을 HPLC를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 발명자들은 메탄자화균을 이용하여 보다 효과적으로 대사산물을 생산하는

방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobacter* sp. DH-1) 균주(이하, "DH-1 균주"라 약칭함)에 주목하게 되었다. 상기 DH-1 균주는 메탄으로부터 효율적으로 메탄올을 생합성하는 특징을 나타내는 메탄자화균의 일종으로서, 본 발명자들이 하수 슬러지로부터 분리동정하여 2015년 8월 27일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하고, 기탁번호 KCTC18400P를 부여받은 균주이다.

- [27] 상기 균주의 유전체 및 대사체를 이용하여 상기 균주의 특성을 규명한 결과, (a) 수용성 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않고; (b) 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자, PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL) 유전자, 스쿠알렌 호펜 사이클라제(squalene hopene cyclase, shc) 유전자 및 이들의 조합으로 구성되는 균으로부터 선택되는 유전자가 발현되며; (c) 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterin pathway), H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway), 세린 대사경로(serine pathway), TCA 대사경로(TCA cycle), C30 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway), 호판노이드 생합성 경로(hopanoid biosynthesis pathway), C40 카로티노이드 합성경로(C40 carotenoid synthesis pathway) 및 이들의 조합으로 구성되는 균으로부터 선택되는 경로가 활성화되어 있고; 및, (d) 피루브산카르복시화효소(pyruvate carboxylase) 유전자, 포스포에놀피루브산카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase) 유전자 및 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자의 조합으로 이산화탄소를 흡수하여 고정화한다는 특징을 규명하였다.
- [28] 상기 규명된 특징들은 종래에 알려진 제1형 메탄자화균의 특징과 제2형 메탄자화균의 특징을 함께 포함하는 것으로서, 종래의 메탄자화균에서는 찾아볼 수 없는 것임을 확인하였다.
- [29] 특히, 대사과정 중에 TCA 대사경로와 세린 대사경로가 동시에 활성화되어 있고, 대사과정 중에 이산화탄소를 지속적으로 흡수할 수 있다는 점에서 볼 때, 외부에서 유입되는 기체상의 알칸 화합물의 사용효율을 증대시킬 수 있을 것으로 분석되었다.

- [30] 이에, 본 발명자들은 DH-1 균주에 다양한 외래 유전자를 도입하거나 또는 내재적인 유전자의 발현을 억제함으로써, 다양한 대사산물을 보다 효과적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [31] 이처럼, 제1형 메탄자화균의 특징과 제2형 메탄자화균의 특징을 함께 포함하는 메탄자화균을 이용하여, 기체상의 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 보다 효과적으로 생산하는 기술은 지금까지 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.
- [32]
- [33] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여, 기체상 알칸 화합물로부터 대사산물을 생산하는 방법을 제공한다.
- [34]
- [35] 본 발명의 용어 "메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주"란, 하수슬러지로부터 유래되고, 종래에 보고되지 않았던 메틸로모나스 속(*Methylobomonas* sp.)에 속하는 균주로서, 2015년 8월 27일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하고, 기탁번호 KCTC18400P를 부여받은 균주를 의미한다.
- [36] 본 발명에 있어서, 상기 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주(이하, "DH-1 균주"라 약칭 함)는 다음과 같은 특징을 나타낸다.
- [37] (a) 수용성 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않는다.
- [38] (b) 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자, PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL) 유전자, 스쿠알렌 호펜 사이클라제(squalene hopene cyclase, shc) 유전자 등이 발현된다.
- [39] (c) 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterim pathway), H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway), 세린 대사경로(serine pathway), TCA 대사경로(TCA cycle), C30 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway), 호파노이드 생합성 경로(hopanoid biosynthesis pathway), C40 카로티노이드 합성경로(C40 carotenoid synthesis pathway) 등이 활성화되어 있다.

- [40] (d) 피루브산카르복시화효소(pyruvate carboxylase) 유전자, 포스포에놀피루브산카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase) 유전자 및 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자의 조합으로 이산화탄소를 흡수하여 고정화한다.
- [41]
- [42] 본 발명의 용어 "형질전환체"란, 숙주 미생물에 외래 유전자를 도입하여 발현시키거나 또는 내재적인 유전자의 발현을 억제하여 숙주 미생물이 가지는 원래의 유전적인 특징과 상이한 유전적인 특징을 새로이 나타내도록 변이시킨 변이 균주를 의미한다.
- [43] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체는 DH-1 균주에 외래 유전자를 도입하여 발현시키거나 또는 내재적인 유전자의 발현을 억제하여 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산할 수 있는 변이 균주를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [44]
- [45] 본 발명의 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체는 기체상 알칸 화합물로부터 대사산물을 생산하는 바이오리액터로서 사용될 수 있다.
- [46] 이때, 상기 알칸 화합물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 저급 알칸 화합물이 될 수 있고, 다른 예로서, 탄소수 1 내지 6개의 알칸 화합물인 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 펜탄, 헥산 등을 단독으로 사용하거나 또는 이들을 조합하여 사용할 수 있다.
- [47] 또한, 상기 대사산물은 본 발명의 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체에 의하여 기체상 알칸 화합물로부터 생산될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 저급 알코올, TCA 대사경로 구성요소, 스쿠알렌, 아미노레불린산 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 2,3-부탄디올, 펜탄올, 헥산올 등의 저급 알코올이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 숙신산, 옥살로아세트이트, 시트르산, 말산, 숙시닐-코에이 등의 TCA 대사경로 구성요소가 될 수 있다.
- [48]
- [49] 본 발명의 실시예에서는 상기 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여 다양한 대사산물을 합성하였다.
- [50] 일 예로서, DH-1 균주를 이용하여, 기체상 에탄으로부터 에탄올을 생산하거나; 기체상 프로판으로부터 프로판올을 생산하거나; 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하거나; 기체상 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하거나; 기체상 메탄으로부터 스쿠알렌을 생산할 수 있다.
- [51] 다른 예로서, DH-1 균주에 아세트인 환원효소를 코딩하는 유전자를 도입한 형질전환체를 이용하여 기체상 에탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산하거나; DH-1 균주에서 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase, SDH)를 코딩하는 유전자를 결실시킨 형질전환체(DH-1/suc:2-B)를 이용하여 기체상 메탄으로부터

숙신산을 생산하거나; 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-B)에 이소시트르산 분해효소 유전자 및 말산 합성효소 유전자를 도입한 형질전환체(DH-1/suc:2-A)를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하거나; 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-A)에서 포스포아세틸 트랜스퍼라제(phosphoacetyl transferase, pta) 유전자 및 아세테이트 키나제(acetate kinase, ack) 유전자를 결실시킨 형질전환체(DH-1/suc:2-C)를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하거나; 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-C)에서 피루브산 포름산 분해효소(puruvate formate-lyase, pfl) 유전자를 결실시킨 형질전환체(DH-1/suc:2-D)를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하거나; DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소 유전자를 도입한 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하거나; DH-1 균주에서 스쿠알렌 호펜 사이클라아제 유전자를 결실시킨 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 스쿠알렌을 생산할 수 있다.

[52] 본 발명의 DH-1 균주는 다양한 측면에서 종래의 메탄자화균과는 구별되는 특징을 나타낸다.

[53] 예를 들어, DH-1 균주는 유전체의 상동성의 측면에서는 제1형 메탄자화균과 유사하지만, 활성화된 대사경로를 살펴보면, 제1형 메탄자화균의 특성 뿐만 아니라 제2형 메탄자화균의 특성을 동시에 나타내고; DH-1 균주는 종래의 제1형 메탄자화균에 비하여, 메탄 이외의 에탄, 프로판과 같은 저급 알칸 화합물로부터, 에탄올, 프로판올과 같은 저급 알코올을 높은 수준으로 생산할 수 있으며; 에탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산하기 위하여 외래의 α -아세토락테이트 신타제 유전자, α -아세토락테이트 디카르복실라제 유전자 및 아세트인 환원효소 유전자를 도입하여 함께 발현시켜야만 하는 종래의 메탄자화균과는 달리, DH-1 균주는 아세트인 환원효소 유전자만을 도입하여 발현시키는 것만으로도 에탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있고; DH-1 균주는 종래에 보고되었던 어떠한 종류의 메탄자화균에서도 나타나지 않았던, 특별한 변이 없이 자체적으로 메탄으로부터 숙신산을 생산하는 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 형질전환을 통해 상기 숙신산의 합성효율을 현저히 향상시킬 수 있으며; 아미노레불린산을 생합성하기 위하여, 사용되는 기질인 숙시닐 코에이(succinyl-CoA)와 글리신 중의 어느 하나를 배지를 통해 별도로 공급받아야만 하는 종래의 미생물(대장균, 코리네박테리움 등)과는 달리, DH-1 균주는 활성화된 세린 대사경로 및 TCA 대사경로를 통해 숙시닐 코에이(succinyl-CoA)와 글리신을 자체적으로 생합성할 수 있어, 상기 기질을 외부에서 공급받지 않아도 메탄으로부터 아미노레불린산을 생합성할 수 있고; 메탄으로부터 스쿠알렌을 생합성할 수 있는지의 여부에 대하여는 알려져 있지 않은 종래의 메탄자화균과는 달리, DH-1 균주는 메탄으로부터 스쿠알렌을 생산하는 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 형질전환을 통해 상기 스쿠알렌의 합성효율을 현저히 향상시킬 수 있다.

[54] 따라서, DH-1 균주는 제1형 메탄자화균에 속하면서도, 종래의 메탄자화균 보다는, 외부의 기체상 알칸을 탄소원으로 이용하여 대사산물을 생산하는 바이오 리액터로서의 유용성이 우수함을 알 수 있다.

[55]

[56] 본 발명의 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산할 때, 대체로 균체로부터 생산된 대사산물을 수득할 수 있으나, 경우에 따라서는 균체가 아닌 배양산물로부터 상기 대사산물을 수득할 수도 있다.

[57] 상기 배양산물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 배양물, 배양상등액, 과쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 과쇄물, 상기 배양물, 배양상등액, 과쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.

[58]

[59] 한편, 본 발명의 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 이용하여 기체상 알칸 화합물로부터 다양한 대사산물을 생산할 때, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 배양하는 조건은 대기중 기체상 알칸 화합물의 농도, 배양온도, 배양시간 등이 될 수 있다.

[60] 상기 조건 중에서 대기중 기체상 알칸 화합물의 농도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 10 내지 80%(v/v)가 될 수 있고, 다른 예로서, 30 내지 50%(v/v)가 될 수 있다.

[61] 상기 조건 중에서 배양온도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 20 내지 40°C가 될 수 있고, 다른 예로서, 25 내지 35°C가 될 수 있다.

[62] 상기 조건 중에서 배양시간은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 10 내지 300시간이 될 수 있고, 다른 예로서, 16 내지 200시간이 될 수 있다.

[63]

[64] 본 발명에 있어서, 상기 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체로부터 다양한 대사산물을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[65] 배양에 사용되는 배지는 메탄자화균의 배양에 사용되는 것으로 알려진 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 사용할 수 있고, 메탄자화균에 따라 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 조절한 배지를 사용할 수 있다(<http://methanotroph.org/wiki/culturing-tips/>).

- [66] 특히, 배지에 NaCl, KCl 등의 염류를 포함할 경우, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 증식 또는 대사산물의 생산성을 향상시킬 수 있다. 이때, 배지에 포함되는 염류의 농도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 0.1 내지 3.0%(w/w)가 될 수 있고, 다른 예로서 1.0 내지 2.0%(w/w)가 될 수 있으며, 또 다른 예로서 1.5%(w/w)가 될 수 있다.
- [67] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [68] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다.
- [69] 아울러, 대사산물을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체를 제거하고 얻어진 상등액을, 용매추출법에 적용하여 목적하는 대사산물을 회수하는 방법을 사용할 수 있고, 이외에도 상기 목적하는 대사산물의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 대사산물을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [70] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 실시예 1: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주의 유전체 및 전사체 분석
- [72] 본 발명자들이 한국등록특허 제10-1714967호를 통해 특허등로받은 신규한 메탄자화균인 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주(KCTC18400P)(이하, "DH-1 균주"라 약칭 함)의 유전체 및 전사체 분석을 수행하여, 상기 DH-1 균주의 구체적인 특성을 새로이 규명하였다.
- [73] 먼저, DDH(DNA-DNA hybridization)를 통해 DH-1 균주의 유전체(Genbank NZ_CP014360, NZ_CP014361)를 분석한 결과, 4.86 Mb의 게놈 염색체와 278 kb의 플라스미드를 포함하고, 제1형 메탄자화균으로 분류되는 *Methylomonas koyamae* Fw12E-YT 균주와는 전체 유전자의 73.9%가 유사하며, 두 균주 간의 ANI(average nucleotide identity)는 97.76%임을 확인하였다.
- [74] 아울러, 상기 DH-1 균주의 전사체를 이용하여 메탄을 이용한 대사경로를 분석한 결과, 종래의 제1형 메탄자화균과는 구별되는 다양한 대사경로가 활성화되어 있음을 확인하였다(도 1a).

- [75] 도 1a는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 다양한 대사경로를 나타내는 개략도이다.
- [76] 도 1a에서 보듯이, 일반적인 메탄자화균에 존재하는 C1 metabolism과 관련된 유전자의 경우, DH-1 균주는 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않는 반면, 2 copy의 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자(서열번호 1), PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterin pathway) 및 H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway)가 모두 활성화되어 있다는 점을 확인하였다.
- [77] 특이하게도, 제2형 메탄자화균에 주로 존재하는 것으로 알려진 세린 대사경로(serine pathway) 관련 유전자를 모두 포함하고, ppc(Phosphoenolpyruvate carboxylase)를 발현시킬 수 있어, 상기 ppc와 세린 대사경로를 통해 이산화탄소를 흡수하면서 PEP(Phosphoenolpyruvate)를 OAA(oxaloacetate)로 전환시킬 수 있다. 아울러, 종래의 메탄자화균에서는 정상적으로 작동하지 않는 것으로 알려진 TCA 대사경로(TCA cycle)가 정상적으로 작동함을 확인하였다.
- [78] 지금까지 알려진 바에 의하면, 일반적인 제1형 메탄자화균에서는 ppc가 발현되지 않아, 세린 대사경로가 정상적으로 작동하지 못하는 것으로 알려져 있으나, 상기 DH-1 균주는 ppc 뿐만 아니라, 피루브산 카르복실라제(Pyruvate carboxylase), 아세틸 코에이 카르복실라제(acetyl-CoA carboxylase) 및 PEP 카르복실라제(PEP carboxylase)가 활성화되어 있어, 지금까지 알려진 제1형 메탄자화균에 비하여, 이산화탄소를 현저하게 높은 수준으로 흡수할 수 있음을 확인하였다.
- [79] 또한, 상기 DH-1 균주는 제1형 및 제2형 메탄자화균에서는 알려지지 않은 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC)(서열번호 2)가 활성화되어, 에탄올을 공급할 경우, 2,3-부탄디올의 전구체인 아세트인을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [80] 뿐만 아니라, MET 대사경로에 의하여 생성된 GPP(geranyl pyrophosphate)를 이용하여 이차 대사산물을 합성하는 대사경로도 활성화되어 있음을 확인하였다(도 1b).
- [81] 도 1b는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 이차 대사산물을 합성하는 대사경로를 나타내는 개략도이다.
- [82] 도 1b에서 보듯이, MET 대사경로에 의하여 생성된 GPP는 C30 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway), 호파노이드 생합성 경로(hopanoid biosynthesis pathway), C40 카로티노이드 합성경로(C40 carotenoid synthesis

pathway) 등과 같은 다양한 합성경로를 통해 다양한 이차 대사산물을 합성할 수 있음을 확인하였다.

- [83] 이 외에도, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, *gltX*)(서열번호 4)를 코딩하는 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, *hemA*)(서열번호 5)를 코딩하는 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(*glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL*)(서열번호 6)를 코딩하는 유전자, 스쿠알렌 호펜 사이클라제(*squalene hopene cyclase, shc*)(서열번호 9)를 코딩하는 유전자 등의 발현을 확인하였다.
- [84] 이처럼, 본 발명에서 제공하는 DH-1 균주는 유전체의 상동성의 측면에서는 제1형 메탄자화균과 유사하지만, 활성화된 대사경로를 살펴보면, 제1형 메탄자화균의 특성 뿐만 아니라 제2형 메탄자화균의 특성을 동시에 나타냄을 확인하였다.
- [85] 따라서, 상기 DH-1 균주는 지금까지 알려진 어떤 종류의 메탄자화균 보다도, 외부의 기체성 알칸을 탄소원으로 이용하여 대사산물을 생산하는 바이오 리액터로서의 유용성이 우수한 것으로 분석되었다.
- [86] 실시예 2: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas sp.* DH-1) 균주를 이용한 알콜 생합성
- [87] 메탄자화균을 이용하여 에탄 또는 프로판 등의 메탄 이외의 저급 알칸으로부터 에탄올 또는 프로판과 같은 알코올을 생합성하는 방법에 있어서, 상기 DH-1 균주의 성능을 평가하였다. 이때, 대조균 균주로는 제1형 메탄자화균인 *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z 균주를 사용하였다.
- [88] 구체적으로, 대조균 균주 및 DH-1 균주를 race elements solution(1000X), phosphate stock solution(100X) 및 vitamin stock(100X)이 포함된 NMS(nitrate mineral salts) 배지에 접종하여 동일한 농도(2.4 g DCW/L)로 배양하고, 배양된 각 균주를 수득한 다음, sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 각각의 현탁액을 수득하였으며, 상기 각 현탁액에 40 mM formate와 0.5 mM EDTA를 첨가하여, 각 균주의 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)의 활성을 억제하였다. 이때, 상기 trace elements solution (1000X)의 조성은 500 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/l H_3BO_3 및 250 mg/l EDTA 이고; 상기 phosphate stock solution (100X)의 조성은 26 g/l KH_2PO_4 및 62 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 이며; 상기 vitamin stock (100X)의 조성은 2 mg/l Biotin, 2 mg/l Folic acid, 5 mg/l Thimine HCl, 5 mg/l Ca pantothenate, 0.1 mg/l Vitamin B12, 5 mg/l Riboflavin 및 5 mg/l Nicotinamide 이고; 상기 NMS 배지의 조성은 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l KNO_3 , 0.2 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0038 g/l Fe-EDTA 및 0.0005 g/l $\text{NaMo}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 로 설정하였다.
- [89] 그런 다음, 상기 각 현탁액을 밀폐용기에 넣고, 30% (v/v) 에탄 (또는 프로판)을 주입한 후 30°C에서 230 rpm 조건으로 16시간 동안 반응시키면서, 1, 2 4 및

16시간이 경과된 시점에서 시료를 분취하였다. 분취된 각 시료를 90°C에서 30 분간 가열하여 각 시료에 포함된 균주를 불활성화시키고, 4°C에서 냉각한 후 원심분리하여 상층액을 수득한 다음, 수득한 상층액에 포함된 에탄올 또는 프로판올의 농도를 각각 측정하였다(도 2a 및 2b). 이때, 상기 에탄올 또는 프로판올의 농도는 HP-Plot Q 모세관 및 열전도 검출기가 장착된 영린6500 가스크로마토그래프 (GC)를 사용하여 분석하였다. 이동상으로 질소를 사용하였으며, 유속은 2 ml / min 주입량은 10 µl을 분석하였다. GC oven 온도는 초기 100°C에서 1 분간 유지, 10°C/min으로 170°C까지 증가한 후, 170°C에서 1분동안 유지되었다. Injector, detector 온도는 각각 250 및 230°C였다. 에탄올과 2-프로판올 분석을 위해, 불꽃 이온화(FID) 검출기를 사용하였다. Injector, detector 온도는 250°C로 유지하였고, 오븐 온도는 60°C에서 0.5 분 동안 유지하고, 20°C/min으로 260°C까지 증가시킨 후, 260°C에서 5분동안 유지하였다.

- [90] 도 2a는 대조균 균주 및 DH-1 균주로부터 생산된 에탄올의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [91] 도 2a에서 보듯이, 대조균 균주는 에탄올로부터 에탄올을 전혀 생산하지 못하는 반면, DH-1 균주는 에탄올로부터 일정 수준(최고농도 0.11 g/L 및 최대 생산성 0.025 g/L/h)의 에탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [92] 도 2b는 대조균 균주 및 DH-1 균주로부터 생산된 프로판올의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [93] 도 2b에서 보듯이, 대조균 균주는 프로판올로부터 프로판올을 낮은 농도(0.1g/L 이하)로 생산하는 반면, DH-1 균주는 프로판올로부터 상대적으로 높은 수준(최고농도 0.272 g /L 및 최대 생산성 2.566 g/g DCW)의 프로판올을 생산함을 확인하였다.
- [94] 상기 에탄올 또는 프로판올과 같은 저급알코올은 제1형 메탄자화균에서 발현되는 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO)에 의해 외부의 기체성 알칸으로부터 합성하는 1차적인 대사산물이며, 이러한 저급알코올의 생산성은 메탄자화균이 바이오리액터로서의 성능을 평가하는 주요한 판정기준이 될 수 있다.
- [95] 상기 도 2a 및 2b에서 보듯이, 본 발명에서 새로이 특징을 규명한 DH-1 균주는 종래의 제1형 메탄자화균에 비하여, 외부의 기체성 알칸으로부터 알코올을 생합성하는 능력이 우수한 것으로 분석되었기 때문에, 상기 DH-1 균주에서는 pMMO 이외의 다른 효소가 발현되는 지를 분석한 결과, 종래의 제1형 메탄자화균과 유사하게 pMMO를 코딩하는 유전자 클러스터(pmmoBAC, 서열번호 1) 만이 발현됨을 확인하였다.
- [96] 따라서, 상기 DH-1 균주는 제1형 메탄자화균에 속하면서도, 종래의 메탄자화균 보다는, 외부의 기체성 알칸을 탄소원으로 이용하여 대사산물을 생산하는 바이오 리액터로서의 유용성이 우수함을 다시 한번 확인할 수 있었다.
- [97] 실시예 3: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobionas* sp. DH-1) 균주를 이용한

2.3-부탄디올(2,3-BDO) 생합성

[98] 실시예 3-1: DH-1 균주의 아세트인 생산능 확인

[99] 천연가스에는 주성분인 메탄 외에 에탄, 프로판 등의 각종 불순물이 포함되어 있으므로, DH-1 균주를 이용한 메탄 및 에탄의 동시 전환을 통해 메탄은 세포 성장을 위한 탄소원으로 활용하고, 에탄은 대사산물 생산용 기질로서 활용하고자 하였다.

[100] 우선, DH-1 균주를 NMS 배지에 접종하고, 20% 메탄과 80% 공기를 포함하는 대기조건하에서 200시간 동안 배양하고, 배양과정 중 분취한 배지에 포함된 아세트알데히드와 아세트인의 농도 및 대기중 메탄의 농도변화를 분석하였다(도 3a).

[101] 도 3a는 메탄을 단독으로 공급하면서 배양된 DH-1 균주의 배양물 및 대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인 및 메탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (◆)는 메탄을 나타내고, (●)는 아세트알데히드를 나타내며, (▼)는 아세트인을 나타낸다.

[102] 도 3a에서 보듯이, 배양시간이 경과됨에 따라, 대기중의 메탄농도는 감소하고, 균체수는 증가하였으나, 아세트알데히드의 농도 및 아세트인의 농도(0.038 mmol)는 변화되지 않음을 확인하였다.

[103] 따라서, DH-1 균주의 배양시 공급되는 메탄은 대부분 균체의 성장을 위한 탄소원으로 사용됨을 알 수 있었다.

[104] 다음으로, DH-1 균주를 NMS 배지에 접종하고, 20% 메탄, 10% 에탄 및 70% 공기를 포함하는 대기조건하에서 200시간 동안 배양하고, 배양과정 중 분취한 배지에 포함된 아세트알데히드와 아세트인의 농도 및 대기중 메탄의 농도변화를 분석하였다(도 3b).

[105] 도 3b는 메탄과 에탄을 동시에 공급하면서 배양된 DH-1 균주의 배양물 및 대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인, 메탄 및 에탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (●)는 메탄, (■)는 에탄을 나타내고, (◆)는 아세트알데히드를 나타내며, (▼)는 아세트인을 나타낸다.

[106] 도 3b에서 보듯이, 배양시간이 경과됨에 따라, 대기중의 메탄 및 에탄의 농도는 감소하고, 아세트인의 농도는 증가되어 최대 0.322 mmol의 농도를 나타냄을 확인하였다

[107] 실시예 1에서 수행한 유전체 및 전사체 분석결과에 의하면, 대기중의 에탄은 pMMO와 메탄올 탈수소화효소(methanol dehydrogenase, MDH)에 의해 에탄올과 아세트알데히드(acetaldehyde)로 전환된 후, 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC)(서열번호 2)에 의해 아세트인으로 전환되는 것으로 분석되었다.

[108] 실시예 3-2: 아세트인 환원효소 유전자가 도입된 형질전환 DH-1 균주의 제작 및 이를 이용한 2,3-부탄디올(2,3-BDO) 생합성

[109] DH-1 균주에서 에탄을 이용하여 2,3-부탄디올을 생산하기 위하여, DH-1

- 균주에 *Klebsiella pneumonia* 유래 아세토인 환원효소(acetoin reductase; 서열번호 3)를 코딩하는 유전자 도입용 벡터를 다음과 같이 제작하였다.
- [110] 먼저, pAWP89 벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [111] pAWP89 vector FP: 5'-TAGTTGTCGGGAAGATGCGT-3'(서열번호 10)
- [112] pAWP89 vector RP: 5'-AGCTGTTTCCTGTGTGAATA-3'(서열번호 11)
- [113] 또한, 클렙시엘라 속 균주(*K. pneumonia*)의 gDNA로부터 budABC gene cluster를 증폭하기 위하여, 상기 gDNA를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [114] budABC_FP: 5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGAATCATTCTGCTGAATGCACC-3'(서열번호 12)
- [115] budABC_RP: 5'-GCATCTTCCCGACAACACTATTAGTTAAACACCATGCCGCC-3'(서열번호 13)
- [116] 다음으로, 상기 각각의 증폭된 단편을 결합하여, 재조합 벡터 pAWP89-kleb-budABC를 제작하였다.
- [117] 상기 제작된 pAWP89-kleb-budABC를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편을 DpnI, antarctic phosphatase, T4 polynucleotide kinase 및 T4 ligase로 가공하여, pAWP89-kleb-budC를 제작하였다.
- [118] Kleb-budC FP: 5'-aggaaagaaaaatgaaaaagtgcacttgt-3'(서열번호 14)
- [119] Kleb-budC RP: 5'-tattgtgatgacCCACACATTATACGAGCCGA-3'(서열번호 15)
- [120] 한편, DH-1 균주의 유전체에 존재하는 글리코젠 합성효소(glycogen synthase, GS) 유전자 위치에 아세토인 환원효소 유전자를 삽입하기 위하여 우선 pCM351_GS 결손용 벡터를 제작하였다.
- [121] 이에 따라, 상기 GS 유전자 업스트림(upstream)에 해당하는 1000bp의 유전자 조각(GS_A region)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [122] A region_FP: 5'-aattggtaccCAAAATTCGCAGAATATCCT-3'(서열번호 16)
- [123] A region_RP: 5'-CGGTAATACGGGCGGTTTGCCTGGCGCTGG-3'(서열번호 17)
- [124] 또한, 상기 GS 유전자 다운스트림(downstream)에 해당하는 1000bp의 유전자 조각(GS_B region)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [125] B region_FP: 5'-gttaaccggtGTGGCAAATTACATTTTCAA-3'(서열번호 18)
- [126] B region_RP: 5'-tagtgagctcTCTGGCTGGAGGAATTCCAT-3'(서열번호 19)
- [127] 상기 증폭된 업스트림 절편과 다운스트림 절편을 연결하여 pCM351-GS 결손용 벡터를 제작하였다.
- [128] 상기 제작된 pCM351-GS 결손용 벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를

사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[129] 351_RP: 5'-CGGTAATACGGGCGGTTTGCCTGGCGCTGG-3'(서열번호 20)

[130] 351_FP: 5'-GATGCGTGATatggatgcatatggcgccg-3'(서열번호 21)

[131] 상기 제작된 pAWP89-kleb-budC를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[132] tac budC FP: 5'-GCAAACCGCCCCGTATTACCGCCTTTGAGTG-3'(서열번호 22)

[133] tac budC RP: 5'-atgcatccatATCACGCATCTTCCCGACAA-3'(서열번호 23)

[134] 상기 pCM351-GS 결손용 벡터의 증폭산물 및 pAWP89-kleb-budC의 증폭산물을 연결하여, 재조합벡터 pCM351-GS::budC,GenR를 제작하였다.

[135] 상기 제작된 재조합벡터 pCM351-GS::budC,GenR를 전기충격 형질전환(electro transformation) 방법으로 DH-1 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 젠타마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도말한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합(double crossover homologous recombination)을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주(DH-1/2,3-BDO)를 제작하였다.

[136] 상기 제작된 DH-1/2,3-BDO를 NMS 배지에 접종하고, 20% 메탄, 10% 에탄 및 70% 공기를 포함하는 대기조건하에서 200시간 동안 배양하고, 배양과정 중 분취한 배지에 포함된 아세트알데히드와 아세트인의 농도 및 대기중 메탄의 농도변화를 분석하였다(도 3c).

[137] 도 3c는 메탄과 에탄을 동시에 공급하면서 배양된 DH-1/2,3-BDO의 배양물 및 대기에서 측정된 아세트알데히드, 아세트인, 메탄 및 에탄의 농도변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프로써, (●)는 메탄, (■)는 에탄을 나타내고, (◆)는 아세트알데히드, (▼)는 아세트인을 나타내며, (▲)은 2,3-부탄디올을 나타낸다.

[138] 도 3c에서 보듯이, 배양시간이 경과됨에 따라, 대기중의 메탄 및 에탄의 농도는 감소하고, 2,3-부탄디올의 농도가 증가함을 확인하였다. 이때, 2,3-부탄디올의 최고 농도는 0.237 mmol임을 확인하였다.

[139] 지금까지 알려진 바에 의하면, 미생물을 이용하여 메탄으로부터 2,3-BDO를 생합성하고자 할 경우에는, 메탄산화효소, 메탄올탈수소효소, 알데하이드 라이에이즈 및 아세트인 환원효소를 함께 발현시키도록 이들 단백질을 코딩하는 유전자를 모두 도입한 형질전환체를 제작하거나 또는 메탄자화균을 숙주세포로 사용할 경우에도 α -아세트락테이트 신타제, α -아세트락테이트 디카르복실라제 및 아세트인 환원효소를 함께 발현시키도록 이들 단백질을 코딩하는 유전자를 모두 도입한 형질전환체를 제작하여야 한다고 알려져 있다.

[140] 그러나, 상기 DH-1 균주를 숙주세포로 사용하면, 아세트인 환원효소를 코딩하는 유전자 만을 도입하여도 에탄으로부터 2,3-부탄디올을 합성할 수 있음을 규명하였으며, 이는 2,3-부탄디올의 합성 경로에서 이산화탄소의 형태로 손실되는 탄소원의 손실을 방지할 수 있어, 종래의 미생물은 물론 메탄자화균을 사용하는 기술에 비하여 현저한 장점을 갖는다고 분석되었다.

[141] 실시예 4: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobacter* sp. DH-1) 균주를 이용한

숙신산 생합성

[142] 실시예 4-1: DH-1 균주에서 숙신산의 생산

[143] DH-1 균주를 NMS 배지에 접종하고, 메탄 30%를 포함하는 대기하에서 30°C 및 230rpm의 조건으로 배양하면서, 24시간 마다 배양액을 분취하고, 이에 포함된 숙신산의 농도를 분석하였다(도 4). 이때, 숙신산의 농도는 HPLC를 사용하여 Aminex HPX-87H 컬럼으로 분석하였으며, 굴절률검출기(RI detector)를 사용하였고 60°C의 컬럼에 5mM H₂SO₄를 0.7mL/min으로 흘려주었다.

[144] 도 4는 DH-1 균주로부터 생산된 숙신산의 배지내 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[145] 도 4에서 보듯이, DH-1 균주를 7일동안 배양하면, 최대 9.53mg/L의 숙신산을 생산함을 알 수 있었다.

[146] 실시예 4-2: 숙신산 생산을 위한 형질전환 DH-1 균주 제작

[147] 보다 효율적인 숙신산 생산을 위하여 4종의 형질전환 DH-1 균주를 제작하였다.

[148] 첫 번째 형질전환 DH-1 균주는 다음과 같이 제작하였다:

[149] 먼저, pCM184 벡터(Addgene Plasmid #46012)의 다중 복제 부위(multiple cloning site)에 존재하는 제한효소 작용 부위를 EcoRI 및 SacI을 이용하여 절단하였다.

[150] 다음으로, DH-1 균주의 유전체에 포함된 SDH 유전자 카세트의 업스트림(upstream)에 해당하는 666bp의 유전자 조각(flank-1-SDH)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[151] Flank 1-SDH-For:

5'-acctgacgtctagatctgGTTCCGCTTGATGGGCTTTG-3'(서열번호 24)

[152] Flank 1-SDH-Rev:

5'-gtaccaattgtacagctgGCGGTAAACCTGCAAATGGG-3'(서열번호 25)

[153] 또한, 상기 SDH 유전자 카세트의 다운스트림(downstream)에 해당하는 574bp의 유전자 조각(flank-2-SDH)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[154] Flank 2-SDH-For:

5'-cgtgttaaccggtgagctATCAGCGACTACCAAGGCAC-3'(서열번호 26)

[155] Flank 2-SDH-Rev:

5'-tggatcctctagttagctGTTGCAGACAGATAAGCGCG-3'(서열번호 27)

[156] 상기 증폭된 업스트림 단편과 다운스트림 단편을 상기 절단된 pCM184 벡터에 연결하여, pCM184-SDH 결손용 벡터를 제작하였다.

[157] 상기 제작된 pCM184-SDH 결손용 벡터를 전기충격 형질전환 방법으로 DH-1 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나마이신 또는 젠타마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도말한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-B)를 제작하였다.

- [158] 두 번째 형질전환 DH-1 균주는 다음과 같이 제작하였다:
- [159] 대장균(*Escherichia coli*) MG1655 균주의 유전체 상에 존재하는 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase) 및 말산 합성효소(malate synthase)를 코딩하는 유전자를 클로닝 한 후, 각각의 효소를 코딩하는 서열의 업스트림에 메틸로모나스 속(*Methylobacter* sp.) DH-1에서 작동하는 리보솜 결합 부위(ribosome binding site)를 삽입하였고 이소시트르산 분해효소 및 말산 합성효소가 붙어있는 클러스터 앞에 메틸로모나스 속 *mxoF* 프로모터를 삽입하여 클러스터 서열을 수득하였다.
- [160] 상기 수득한 클러스터 서열을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [161] Cluster-For: 5'-cagctgtacaattggtacAGGCAATACTTCCTCTTTTCGC-3'(서열번호 28)
- [162] Cluster-Rev: 5'-catatgcatccatggtacTTAGAACTGCGATTCTTCAGTGGA-3'(서열번호 29)
- [163] 상기 PCR 증폭을 통해 얻어진 유전자 단편을 *kpnI*으로 절단한 pCM184-SDH 결손용 벡터에 삽입하여, 재조합 벡터 pCM184-SDH::-ISL-MS를 제작하였다.
- [164] 상기 제작된 재조합 벡터 pCM184-SDH::-ISL-MS를 전기충격 형질전환 방법으로 DH-1 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나마이신 또는 젠타마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도말한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-A)를 제작하였다.
- [165] 세 번째 형질전환 DH-1 균주는 다음과 같이 제작하였다:
- [166] DH-1 균주의 유전체에 포함된 *pta*(phosphoacetyl transferase) 유전자를 결손시키기 위하여, pCM351 벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [167] Flank 2-pta-For: 5'-CGTGTTAACCGGTGAGCTATGTCTTGGGCAAAACAGGC-3'(서열번호 30)
- [168] Flank 2-pta-Rev: 5'-TGGATCCTCTAGTGAGCTAAACTCGTCGGTGGTGTTG-3'(서열번호 31)
- [169] 또한, DH-1 균주의 유전체에 포함된 *ack*(acetate kinase) 유전자를 결손시키기 위하여, pCM351 벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [170] Flank 1-ack-For: 5'-ACCTGACGTCTAGATCTGCCGAAAGATTGGCTGCTGAT-3'(서열번호 32)
- [171] Flank 1-ack-Rev: 5'-GTACCAATTGTACAGCTGAAAATACATCGGCGCCTACT-3'(서열번호 33)
- [172] 상기 각각의 PCR 증폭을 통해 얻어진 2개의 유전자 단편을 재조합 벡터 pCM184-SDH::-ISL-MS에 클로닝하여, 이소시트르산 분해효소 유전자 및 말산 합성효소 유전자를 부가하고, 아세테이트 생산 경로를 결손시키는

pCM351-ack-pta 결손용 벡터를 제작하였다.

[173] 상기 제작된 pCM351-ack-pta 결손용 벡터를 전기충격 형질전환 방법으로 상기 두 번째로 제작된 DH-1/suc:2-A 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나마이신 또는 젠타마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도달한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-C)를 제작하였다.

[174] 네 번째 형질전환 DH-1 균주는 다음과 같이 제작하였다:

[175] DH-1 균주의 유전체에 포함된 피루브산 포름산 분해효소(puruvate formate-lyase, pfl) 유전자를 결손시키기 위하여, pCM351 벡터의 다중 복제 부위를 EcoRI 및 SacI을 이용하여 절단하였다.

[176] 다음으로, DH-1 균주의 유전체에 포함된 pfl 유전자 카세트의 업스트림(upstream)에 해당하는 유전자 조각(flank-1-pfl)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[177] Flank 2-pfl-For: 5'-acctgacgtctagatctgGCCGCTTTCACCATTTTCCTT-3'(서열번호 34)

[178] Flank 2-pfl-Rev:

5'-gtaccaattgtacagctgCGATGAAAATCTGCGCGGTAG-3'(서열번호 35)

[179] 또한, pfl 유전자 카세트의 다운스트림(downstream)에 해당하는 유전자 조각(flank-1-pfl)을 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[180] Flank 1-pfl-For: 5'-cgtgttaaccggtgagctTTCTACCGAAATACCGCCGT-3'(서열번호 36)

[181] Flank 1-pfl-Rev:

5'-tggatcctctagtgagctAACCACGCCGAAAACCTAAC-3'(서열번호 37)

[182] 상기 각각의 PCR 증폭을 통해 얻어진 2개의 유전자 단편을 재조합하여 pCM351-PFL::GenR 결손용 벡터를 제작하였다.

[183] 상기 제작된 pCM351-PFL::GenR 결손용 벡터를 전기충격 형질전환 방법으로 상기 두 번째로 제작된 DH-1/suc:2-A 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 젠타마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도달한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주(DH-1/suc:2-D)를 제작하였다.

[184] 실시예 4-3: 두 가지 형질전환 DH-1 균주의 검증

[185] 상기 실시예 4-2에서 제작된 4종의 형질전환 DH-1 균주 중에서 DH-1/suc:2-A 균주 및 DH-1/suc:2-B 균주의 형질전환 여부를 이소시트르산 분해효소 및 말산 합성효소의 활성을 통해 검증하였다(표 1):

[186] 먼저, 이소시트르산 분해효소의 활성은 100mM 인산 칼륨(pH 7.0), 6mM MgCl₂, 4mM 페닐하이드라진 염산, 12mM L-시스테인 염산 및 DH-1/suc:2-A 균주 또는 DH-1/suc:2-B 균주의 추출물(50 내지 200μg)로 구성된 반응 혼합물

A에 8mM의 이소시트르산을 가하고, 글리옥살산 페닐하이드라존(glyoxylate phenylhydrazone)이 생성됨에 따른 324nm의 흡광도 변화를 측정하여 산출하였다.

- [187] 다음으로, 말산 합성효소의 활성은 90mM 트리스(pH 8.0), 3.4mM MgCl₂, 0.05mM 아세틸-CoA 나트륨염 및 DH-1/suc:2-A 균주 또는 DH-1/suc:2-B 균주의 추출물(100 μ g)로 구성된 반응 혼합물 B에 글리옥살산(최종 농도 0.5mM)을 첨가하여 아세틸 CoA의 황-에스터 결합이 분해됨에 따른 232nm의 흡광도 변화를 측정하여 산출하였다.

[188] [표1]

이소시트르산 분해효소 및 말산 합성효소의 활성 분석

균주	이소시트르산 분해효소의 활성	말산 합성효소의 활성
DH-1 균주	ND	ND
DH-1/suc:2-A 균주	7203 $\pm$ 216	10370 $\pm$ 419
DH-1/suc:2-B 균주	ND	ND

- [189] 상기 표 1에서 보듯이, 이소시트르산 분해효소 유전자 및 말산 합성효소 유전자가 도입되지 않은 DH-1 균주 및 DH-1/suc:2-B 균주에서는 이소시트르산 분해효소 및 말산 합성효소의 활성이 검출되지 않았으나, 이소시트르산 분해효소 유전자 및 말산 합성효소 유전자가 도입된 DH-1/suc:2-A 균주에서는 이소시트르산 분해효소 및 말산 합성효소의 활성이 검출되었으므로, 상기 DH-1/suc:2-A 균주는 정상적으로 제작된 것으로 분석되었다.

[190] 실시예 4-4: 네 가지 형질전환 DH-1 균주의 세포성장 및 숙신산 생산성 분석

- [191] 상기 실시예 4-2에서 제작된 4종의 형질전환 DH-1 균주의 세포성장 및 숙신산 생산성을 분석하였다.

- [192] 먼저, 상기 4종의 형질전환 DH-1 균주를 각각 NMS 배지에 접종하고, 메탄 30%를 포함하는 대기하에서 30°C 및 230rpm의 조건으로 배양하면서, 24시간 마다 흡광도를 측정하여 균체의 농도를 분석하여, 이들의 세포성장 수준을 분석하였다.

- [193] 또한, 상기 4종의 형질전환 DH-1 균주를 각각 NMS 배지에 접종하고, 메탄을 포함하는 대기하에서 30°C 및 230rpm의 조건으로 배양하면서, 24시간 마다 배양액을 분취하고, 이에 포함된 숙신산의 농도를 분석하였다(도 4). 이때, 숙신산의 농도는 HPLC를 사용하여 Aminex HPX-87H 컬럼으로 분석하였으며, 굴절률검출기(RI detector)를 사용하였고 60°C의 컬럼에 5mM H₂SO₄를 0.7mL/min으로 흘려주었다.

- [194] 도 4b는 본 발명에서 제공하는 4종의 형질전환 DH-1 균주로부터 생산된 숙신산의 배지내 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [195] 도 4b에서 보듯이, DH-1/suc:2-B 균주는 최대 95.0mg/L의 숙신산을 생산하였고,

DH-1/suc:2-A 균주는 최대 134.48mg/L의 숙신산을 생산하여 DH-1 균주대비 숙신산 생산성이 14.1배 향상되었다.

[196] DH-1/suc:2-A 균주에 숙신산 생산과 경쟁 경로를 결손시킨 DH-1/suc:2-C 균주(99.76mg/ml)와 DH-1/suc:2-D 균주(92.0mg/ml)는 8일째까지 숙신산 생산성이 유사한 수준을 나타내었으나 이후 DH-1/suc:2-D 균주의 균체 농도는 유지되는 반면 숙신산 생산성은 감소됨을 확인하였다.

[197] 상술한 바를 종합하면, 본 발명의 DH-1 균주는 종래에 보고되었던 어떠한 종류의 메탄자화균에서도 나타나지 않았던, 메탄으로부터 숙신산을 생산하는 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 형질전환을 통해 상기 숙신산의 합성효율을 현저히 향상시킬 수 있다는 장점이 있음을 알 수 있었다.

[198] 실시예 5: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주를 이용한 아미노레불린산 생합성

[199] 실시예 5-1: DH-1 균주의 아미노레불린산 생합성능 검증

[200] DH-1 균주, 제1형 메탄자화균(*Methylophilum alcaliphilum* 20Z) 또는 제2형 메탄자화균(*Methylosinus trichosporium* OB3b)을 각각 NMS 배지(1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l KNO_3 , 0.2 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0038 g/l Fe-EDTA 및 0.0005 g/l $\text{NaMo} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)에 접종한 후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 대기조건 및 30°C의 온도조건에서 230 rpm으로 120시간 동안 배양하였다.

[201] 배양이 종료된 후, 각 균주의 배양상등액을 수득하고, 수득한 배양상등액에 포함된 아미노레불린산의 농도를 측정하였다. 이때, 아미노레불린산의 농도는 다음과 같이 측정하였다: 배양상등액 2ml와 1.0M 초산나트륨(pH 4.6) 1ml를 혼합한 다음, 0.5ml의 아세틸아세톤을 첨가하여 혼합물을 수득하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 100°C에서 15분간 가열한 후, 15분동안 냉각시켰다. 냉각된 혼합물 2ml와 Ehrlich 시약 2ml를 혼합하고 30분 동안 반응시킨 다음, 554 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[202] 그 결과, DH-1 균주를 120시간 동안 배양하여 수득한 배양상등액에서는 약 2.19 mg/L의 아미노레불린산이 검출된 반면, 제1형 메탄자화균(*Methylophilum alcaliphilum* 20Z) 또는 제2형 메탄자화균(*Methylosinus trichosporium* OB3b)을 120시간 동안 배양하여 수득한 각각의 배양상등액에서는 미량의 아미노레불린산만이 검출되었다.

[203] 따라서, DH-1 균주는 C5 경로를 통해서 아미노레불린산을 생합성 할 수 있고, 이의 효율이 종래의 메탄자화균 보다 우수함을 알 수 있었다.

[204] 실시예 5-2: 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 형질전환 DH-1 균주의 제작

[205] 상기 DH-1 균주는 C4 경로에 관여하는 아미노레불린산 합성효소를 발현하지 못하기 때문에, C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성 할 수 없다. 그러나, 상기 DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소 유전자를 도입하여, 아미노레불린산 합성효소를 발현시킬 경우, 상기 아미노레불린산 합성효소에

- 의해 C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성 할 수 있는지 확인하고자 하였다.
- [206] 먼저, 도입할 아미노레불린산 합성효소 유전자로서 제2형 메탄자화균(*Methylosinus trichosporium* OB3b) 유래의 아미노레불린산 합성효소 유전자(OB-ALAS, 서열번호 7) 또는 로도박터 속 균주(*Rhodobacter* sp.) 유래의 아미노레불린산 합성효소 유전자(Rs_ALAS, 서열번호 38)를 각각 합성하였다.
- [207] 다음으로, pAWP78 벡터에 DH-1 균주로부터 유래된 복제기원(replication origin)과 DNA 결합단백질(DNA binding protein)을 코딩하는 염기서열을 삽입하여 pDH 셔틀벡터(pDH shuttle vector)를 제작하였다.
- [208] 상기 제작한 pDH 셔틀벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 inverse PCR 증폭을 수행하였다.
- [209] DH_inverse_FP: 5'-CAAtaaggatccccagcagc-3'(서열번호 40)
- [210] DH_inverse_RP: 5'-CCATATGAGATctcctttaacag-3'(서열번호 41)
- [211] 다음으로, 상기 합성된 OB-ALAS를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [212] OB3bALAS_FP:
5'-gttaaaggagATCTCATATGGATTACCGGCGCTTTTTCGAGACGG-3'(서열번호 42)
- [213] OB3bALAS_RP:
5'-gatgcctggggatccttaTTGCGCGGCGAGCTTGATCTCGGGATAG-3'(서열번호 43)
- [214] 또한, 상기 합성된 Rs_ALAS를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.
- [215] RsALAS_FP:
5'-cacatacactgttaaaggagATCTCATATGGACTACAACCTTGGCCTTGGACACCGC-3'(서열번호 44)
- [216] RsALAS_RP:
5'-cgttttatttgatgcctggggatccTCAGGCGACGACTTCGGCGCGGTTCAAG-3'(서열번호 45)
- [217] 상기 증폭된 pDH 셔틀벡터에 OB-ALAS를 도입하여 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터를 제작하고, 상기 증폭된 pDH 셔틀벡터에 Rs_ALAS를 도입하여 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터를 제작하였다.
- [218] 상기 제작된 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터 또는 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터를 각각 전기충격 형질전환 방법으로 DH-1 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도말한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 각각의 형질전환 DH-1 균주인 DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)를 제작하였다.
- [219] 상기 제작된 DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)의 형질전환 여부를 검증하기 위하여, 먼저 콜로니 PCR을 수행함으로써, 형질전환 여부를

검증하였다.

[220] 또한, 상기 각각의 형질전환 DH-1 균주를 배양하고, 이로부터 총 RNA를
수득한 다음, 역전사를 수행하여 cDNA를 수득하고, 상기 cDNA를 PCR
증폭시켜서, 형질전환 여부를 다시 한번 검증하였다.

[221] 실시예 5-3: 형질전환 DH-1 균주에서 생산된 아미노레불린산 생산성 분석

[222] DH-1 균주, DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)을 각각 NMS 배지에 접종한
후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 대기조건 및 30°C의 온도조건에서 230 rpm으로
120시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 균주의 배양상등액을 수득하고,
수득한 배양상등액에 포함된 아미노레불린산의 농도를 측정하였다(도 5).

[223] 도 5는 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 2종류의 형질전환 DH-1
균주가 나타내는 아미노레불린산의 생산성을 비교한 결과를 나타내는
그래프이다.

[224] 도 5에서 보듯이, DH-1 균주에 비하여, 형질전환 DH-1 균주가 상대적으로
우수한 아미노레불린산 생산성을 나타내었고, 상기 아미노레불린산 생산성의
차이는 배양시간이 경과할 수록 더욱 증가하였다. 단적으로 120시간 동안
배양할 경우, DH-1 균주는 약 2.19 mg/L의 아미노레불린산을 생산하는 반면,
형질전환 DH-1 균주는 약 3.78 내지 3.94 mg/L의 아미노레불린산을 생산할 수
있으므로, 상기 형질전환 DH-1 균주는 DH-1 균주에 비하여 1.8배 증가된
아미노레불린산 생산성을 나타냄을 확인하였다.

[225] 통상적으로, C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성하기 위하여는,
기질로서 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)와 글리신이 요구되고, 글리신을 공급하는
세린 대사경로 및 숙시닐-CoA를 공급하는 TCA 대사경로가 함께 활성화되지
않는 종래의 메탄자화균에서는 상기 기질 중의 하나를 외부에서 공급하여야만
C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 있다는 단점이 있다.

[226] 그러나, 본 발명에서 제공하는 DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소
유전자가 도입된 형질전환 DH-1 균주는 상기 세린 대사경로와 TCA 대사경로가
함께 활성화되어 있으므로, 외부에서 숙신산 또는 글리신을 추가로 공급하지
않아도 메탄을 단일 탄소원으로 사용하여 아미노레불린산을 생합성할 수
있으며, 이러한 장점은 종래의 메탄자화균에서는 전혀 나타나지 않는 형질전환
DH-1 균주만의 새로운 특징임을 확인할 수 있었다.

[227] 실시예 6: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas sp.* DH-1) 균주를 이용한
스쿠알렌 생합성

[228] 상기 DH-1 균주는 메탄으로부터 스쿠알렌을 생합성할 수 있음을 확인하였고,
DH-1 균주에서 발현되는 스쿠알렌 호펜 사이클라아제(Squalene hopene cyclase,
Shc)의 발현을 억제할 경우, 스쿠알렌 생산성을 향상시킬 수 있는지 확인하고자
하였다.

[229] 실시예 6-1: Shc의 발현을 억제한 형질전환 DH-1 균주의 제작

[230] DH-1 균주에서 발현되는 Shc 단백질(서열번호 9)을 코딩하는 유전자를 상기

균주로부터 제거하기 위하여, cre-lox system을 이용하였다.

[231] 대략적으로, pCM184 벡터의 lox 좌위에 존재하는 제한효소 EcoR I 및 Kpn I의 사이에 하기 프라이머를 사용하여, Shc 유전자의 상류(upstream)의 염기서열(서열번호 46)을 클로닝하였다.

[232] DH-1_upstream_EcoRI(Forward):

5'-ACGTCTAGATCTGAATTCCATCTCGGCCGGGTCGGCAATAGC-3'(서열번호 47)

[233] DH-1_upstream_KpnI(Reverse):

5'-ATATGCATCCATGGTACCCGTGAGTTGCGGAATCGTCG-3'(서열번호 48)

[234] 또한, 상기 pCM184 벡터의 lox 좌위에 존재하는 제한효소 Mlu I 및 Sac I의 사이에 하기 프라이머를 사용하여 Shc 유전자의 하류(downstream)의 염기서열(서열번호 49)을 클로닝하여, Shc 유전자 결실용 벡터를 제작하였다.

[235] DH-1_downstream_MluI (Forward):

5'-GGCCCTACGTACGCGTGGCGATTCCTTATGGTCCAG-3'(서열번호 50)

[236] DH-1_downstream_SacI (Reverse):

5'-CTGTCCTCTAGTGAGCTCTGTTGAAGTTATCGGTATCG-3'(서열번호 51)

[237] Gene Pulser Xcell™ Electropotation system(Bio-rad)을 이용하여, 배양된 DH-1 균주에 상기 제작된 Shc 유전자 결실용 벡터를 도입하여 전기충격 형질전환을 수행하였다. 이어, DH-1 균주를 NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도말한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 형질전환 DH-1 균주인 DH-1/SQU를 제작하였다.

[238] 하기 프라이머를 사용한 실시예 5-2와 유사한 방법을 수행하여, 상기 DH-1/SQU 균주가 형질전환 균주인지의 여부를 검증하였다.

[239] DH-1_ΔShc (Forward) 5'-

ACGTCTAGATCTGAATTCCATCTCGGCCGGGTCGGCAATAGC-3'(서열번호 52)

[240] DH-1_ΔShc (Reverse)

5'-CTGTCCTCTAGTGAGCTCTGTTGAAGTTATCGGTATCG-3'(서열번호 53)

[241] 실시예 6-2: 형질전환 DH-1 균주를 이용한 스쿠알렌 생산성 분석

[242] DH-1 균주 또는 DH-1/SQU 균주를 NMS 배지에 접종하고, 30% (v/v) 메탄올 포함하는 대기조건 및 30°C의 온도조건에서 230 rpm으로 16시간 및 28시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양물을 원심분리하여 균체를 수득하였다.

[243] 상기 수득한 균체를 추출용매(클로로폼:메탄올 = 1:2, v/v)에 현탁시키고, 교반하면서 추출하였다. 상기 반응물을 원심분리하여 상층액을 수득하고, 상기 수득한 상층액, 아세트니트릴 및 헵탄을 1:1:2(v/v/v)의 비율로 혼합하고, 격렬히 교반한 후, 최상층의 헵탄층을 수득하였다. 상기 수득한 헵탄층에 질소를 가하여 용매를 증발시켜서 잔사를 수득하여, 스쿠알렌을 포함하는 추출물을

수득하였다.

- [244] 이어, 상기 추출물에 포함된 스쿠알렌을 정량분석하기 위하여, 상기 수득한 잔사를 HPLC 분석용매(헵탄:아세토니트릴 = 5:95, v/v)에 용해시키고, 0.2 μ m의 필터로 여과한 다음, HPLC를 이용하여 스쿠알렌을 정량분석하였다(도 6). 이때, 표준물질로는 합성된 스쿠알렌을 사용하고, 이동상으로는 아세토니트릴을 사용하고, 이동상의 속도는 분당 1.5ml로 설정하였다.
- [245] 도 6은 16시간 및 28시간 동안 배양된 DH-1 균주 또는 DH-1/SQU 균주에서 합성된 스쿠알렌의 생산성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [246] 도 6에서 보듯이, DH-1 균주에 비하여, 형질전환 DH-1 균주가 상대적으로 우수한 스쿠알렌 생산성을 나타내었고, 상기 스쿠알렌 생산성의 차이는 배양시간이 경과할 수록 더욱 증가하였다. 단적으로 28시간 동안 배양할 경우, DH-1 균주는 약 1.0 mg/g DCW의 스쿠알렌 생산성을 나타내는 반면, 형질전환된 DH-1/SQU 균주는 약 1.41 mg/g DCW의 스쿠알렌 생산성을 나타낼 수 있으므로, 상기 DH-1/SQU 균주는 DH-1 균주에 비하여 약 1.4배 증가된 스쿠알렌 생산성을 나타냄을 확인하였다.
- [247] 지금까지 알려진 제1형 또는 제2형 메탄자화균이 메탄으로부터 스쿠알렌을 생합성할 수 있는지의 여부에 대하여는 알려져 있지 않다.
- [248] 이러한 종래의 메탄자화균과는 달리, 본 발명의 DH-1 균주는 메탄으로부터 스쿠알렌을 생산하는 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 형질전환을 통해 상기 스쿠알렌의 합성효율을 현저히 향상시킬 수 있다는 장점이 있음을 알 수 있었다.
- [249] 실시예 7: 형질전환 메탄자화균을 이용한 2,3-부탄디올의 생산
- [250] IncP 계열 벡터(IncP-based vector)인 pAWP89 벡터를 증폭시키고, α -아세토락테이트 신타제(ALS), α -아세토락테이트 디카르복실라제(ALDC) 및 2,3-부탄디올 디하이드로게나아제(BDH)를 코딩하는 각각의 유전자(서열번호 54, 55 및 56)를 하기 프라이머를 사용하여 증폭시켜 벡터에 증폭된 유전자를 결합시키고, 이를 통하여 서열번호 57의 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 제작하였다.
- [251] pAWP89-Tac/Forward: 5'- TAGTTGTCGGGAAGATGCGT-3'(서열번호 58)
- [252] pAWP89-Tac/Reverse: 5'- AGCTGTTTCCTGTGTGAATA-3'(서열번호 59)
- [253] BudABC-Kleb-Forward:
5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGAATCATTCTGCTGAATGCACC-3'(서열번호 60)
- [254] BudABC-Kleb-Reverse:
5'-GCATCTTCCCGACAACCTATTAGTTAAACACCATGCCGCC-3'(서열번호 61)
- [255] 상기 실시예 1을 통하여 얻어진 메탄자화균용 발현 벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 형질전환 시키기 위하여, 전기천공법(electroporation)을 실시하였다.
- [256] 대략적으로, 상기 메탄자화균을 배양한 후, 이에 상기 제작된 발현 벡터를 Gene

Pulser Xcell™ Electroporation system(Bio-rad)을 이용하여 도입하였다. 그런 다음, 메탄자화균을 회수하여 10 ml NMS 배지에 옮겨 메탄 기질을 공급하여 배양함으로써, 안정화시킨 후 카나마이신이 첨가된 고체 NMS 배지에 도달한 후 배양함으로써, 형질전환 메탄자화균을 제작하였다.

- [257] 상기 제작된 형질전환 메탄자화균을 통해 메탄 기질로부터 2,3-부탄디올 생산이 가능한지의 여부를 확인하였다. 이때, 대조군으로는 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)을 사용하였다.
- [258] 대략적으로, 야생형 메탄자화균과 형질전환 메탄자화균을 NMS 배지에 접종한 후 50%(v/v) 메탄을 포함하는 대기조건, 30°C 및 230 rpm의 조건으로 각각 배양하면서, 일정시간마다 배양액 1 ml를 채취하여 원심분리하여 상층액을 0.2 μ m 필터한 후 aminex HPS-87H 컬럼이 장착된 HPLC를 이용하여 2,3-부탄디올을 분석하였다(도 7a 내지 7c). 이때, 분석조건으로 이동상으로는 0.005 M H^2SO_4 , 유속(flow rate)은 0.7 ml/min, 오븐 온도는 60°C로 설정하였다.
- [259] 도 7a는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 도입한 후, 야생형 메탄자화균과 형질전환 메탄자화균을 메탄을 기질로 96시간 배양하여 2,3-부탄디올을 생산하는지 비교한 그래프이다.
- [260] 도 7a에서 보듯이, 야생형 메탄자화균에서는 2,3-부탄디올을 생산하지 않았으나, 형질전환 메탄자화균에서는 2,3-부탄디올이 생산됨을 확인하였다.
- [261] 도 7b는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 형질 도입한 후, 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄으로부터 아세트인 그리고 2,3-부탄디올의 생산량을 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [262] 도 7b에서 보듯이, 상기 형질전환 메탄자화균은 성장 초기 단계에서 2,3-부탄디올의 전구체인 아세트인을 생산하고, 이후 이를 기반으로 2,3-부탄디올을 생산함을 확인할 수 있었다.
- [263] 도 7c는 budABC 유전자를 포함하는 메탄자화균용 발현벡터를 야생형 메탄자화균(*M. alcaliphilum* strain 20Z)에 형질 도입한 후, 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄으로부터 2,3-부탄디올의 생산량과 세포의 성장속도를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [264] 도 7c에서 보듯이, 상기 형질전환 메탄자화균이 성장하면서 2,3-부탄디올을 생산하며, 최대 38 mg/ml의 2,3-부탄디올을 생산함을 확인하였다.
- [265] 상기 결과를 종합하면, ALS, ALDC 및 BDH를 발현시키도록 형질전환된 메탄자화균은 메탄을 기질로서 사용하여 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.
- [266] 실시예 8: 형질전환 대장균을 이용한 2,3-부탄디올의 생산
- [267] 대장균에 메탄올탈수소효소의 유전자와 알데하이드 라이에이즈의 일종인 포몰라제(formolase, FLS) 유전자를 도입하여, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을

생합성할 수 있는 형질전환 대장균을 제작하였다.

[268] 실시예 8-1: 재조합 벡터의 수득

[269] 첫 째, 바실러스 균주(*Bacillus methanolicus* MGA3)에서 유래된 메탄올탈수소효소(NAD⁺-dependent methanol dehydrogenase)를 코딩하는 mdh 유전자를 대장균에서 발현하기 위해 최적화된 서열로 변경하여 합성하고(서열번호 62), 합성된 mdh 유전자를 pACYCDuet™-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pMDH를 수득하였다.

[270] 둘 째, 알데하이드 라이에이즈의 일종인 포몰라제(formolase, FLS) 유전자(서열번호 63)를 합성하고, 합성된 FLS 유전자를 pACYCDuet™-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pFLS를 수득하였다.

[271] 셋 째, 상기 합성된 FLS 유전자를 pET21b(+) 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pFLS_2를 수득하였다.

[272] 넷 째, 상기 합성된 mdh 유전자와 FLS 유전자를 pACYCDuet™-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pMDHFLS를 수득하였다.

[273] 다섯 째, 아세토인 환원효소의 일종인 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase, bdh1)를 코딩하는 budABC 유전자를 합성하고, 합성된 budABC 유전자를 pAWP89 벡터(Addgene)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pBUD를 수득하였다.

[274] 실시예 8-2: 형질전환 대장균의 제작

[275] 상기 실시예 8-1에서 합성된 4가지 재조합 벡터를 대장균(*E. coli* BL21(DE3))에 도입하여, 각각의 형질전환 대장균을 제작하였다.

[276] 구체적으로, 재조합 벡터 pMDH를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDH를 제작하였고; 재조합 벡터 pFLS를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pFLS를 제작하였으며; 재조합 벡터 pMDHFLS를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS를 제작하였고; 재조합 벡터 pMDH 및 pFLS_2를 함께 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2를 제작하였으며; 재조합 벡터 pMDH, pFLS_2 및 pBUD를 함께 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLSBUD를 제작하였다.

[277] 상기 제작된 각 형질전환 대장균을 10mL의 LB배지에서 하룻밤 동안 전 배양하고, 상기 전 배양한 배양액을 LB배지에 접종하여 OD600기준 0.5 내지 0.6까지 배양한 후 0.1mM의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 첨가하여 유전자의 전사를 유도하였으며, IPTG를 첨가한 후에 37°C에서 4.5시간 또는 15°C에서 24시간동안 단백질을 발현하였다.

[278] 실시예 8-3: 형질전환 대장균을 이용한 2,3-부탄디올의 생산

[279] 상기 실시예 8-2에서 제작된 형질전환 대장균 중에서 BL21-pMDHFLS2를 배양하고, 도입된 2종의 유전자를 발현시킨 다음, 에탄올 또는 글루코스를 포함하는 LB 배지 또는 M9 배지에서 반응시킨 후, 반응산물로서 생산된 아세토인의 정량분석을 수행하였다(도 8a).

- [280] 도 8a는 에탄올 및 글루코스를 단독으로 또는 함께 포함하는 배지조건에서 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2로부터 생산된 아세트인의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [281] 도 8a에서 보듯이, 에탄올이 포함된 LB 배지를 사용할 경우에만, BL21-pMDHFLS2로부터 아세트인을 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [282] 상기 실시예 8-2에서 제작된 형질전환 대장균 중에서, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2 및 상기 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2에 재조합 벡터 pBUD가 추가된 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLSBUD을 1.7%(v/v) 에탄올이 첨가된 LB 배양액에서 배양한 다음, 배양액 내의 반응산물을 HPLC를 통해 분석하였다(도 8b). 이때, 대조군으로는 야생형 대장균을 사용하였다.
- [283] 도 8b는 에탄올을 포함하는 배지에서 배양된 MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing acetoin)과 MDH, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing 2,3-butanediol)의 배양산물에 포함된 성분을 HPLC를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [284] 도 8b에서 보듯이, MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균은 에탄올을 이용하여 아세트인만을 생산할 수 있었으나, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균은 에탄올을 이용하여 아세트인 뿐만 아니라, 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [285] 상기 결과에서 보듯이, 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH), 알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)의 일종인 포몰라제(FLS) 및 아세트인 환원효소(acetoin reductase)의 일종인 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase, bdh1)를 발현시킬 수 있는 형질전환 대장균은 상기 발현된 효소의 연쇄반응을 통해, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [286] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[287]

특허미생물 기탁증

2015 년 09 월 01 일

경희대학교 허동훈 귀하

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 나노바이오공학연구소

2015 년 08 월 27 일 제 5283호 귀하가 보관 기탁 신청
한 특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기
탁번호를 통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물 기탁번호 : KCTC18400P

2. 미생물의 명칭 : *Methylomonas* sp. DH-1

한국생명공학연구원 미생물자원센터장



청구범위

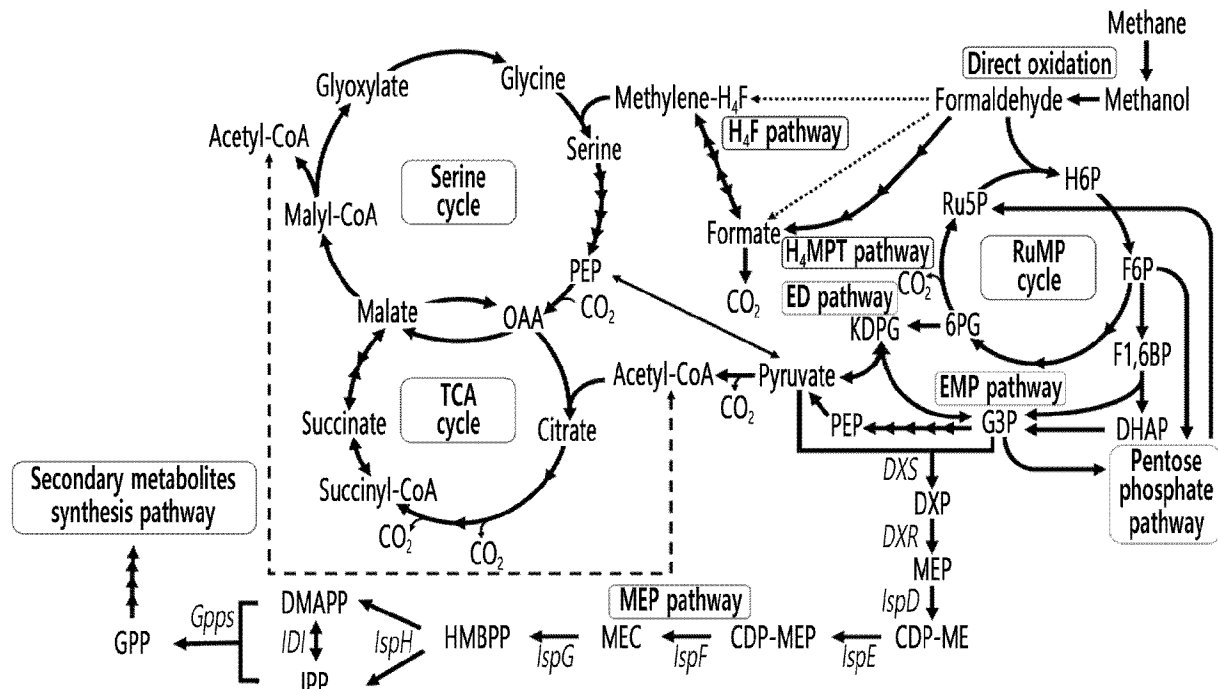
- [청구항 1] KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주 또는 그의 형질전환체를 기체상 알칸 화합물을 포함하는 대기조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 대사산물의 생산방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주는 하기의 특징을 나타내는 것인, 방법:
(a) 수용성 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않고;
(b) 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자, PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL) 유전자, 스쿠알렌 호펜 사이클라제(squalene hopene cyclase, shc) 유전자 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자가 발현되며;
(c) 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterim pathway), H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway), 세린 대사경로(serine pathway), TCA 대사경로(TCA cycle), C30 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway), 호파노이드 생합성 경로(hopanoid biosynthesis pathway), C40 카로티노이드 합성경로(C40 carotenoid synthesis pathway) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 경로가 활성화되어 있고; 및,
(d) 피루브산카르복시화효소(pyruvate carboxylase) 유전자, 포스포에놀피루브산카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase) 유전자 및 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자의 조합으로 이산화탄소를 흡수하여 고정화한다.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 기체상 알칸 화합물은 기체상 저급 알칸 화합물인 것인, 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 저급 알칸 화합물은 탄소수 1 내지 6개의 알칸 화합물인 것인, 방법.

- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 기체상 알칸 화합물의 대기내 함량은 10 내지 80%(v/v)인 것인, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 대사산물은 저급 알코올, TCA 대사경로 구성요소, 스쿠알렌,
아미노레불린산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인,
방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 2,3-부탄디올,
펜탄올, 헥산올 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는
알코올인 것인, 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 TCA 대사경로 구성요소는 숙신산, 옥살로아세테이트, 시트르산,
말산, 숙시닐-코에이 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는
것인, 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주를 이용하여 기체상 에탄으로부터
에탄올을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주를 이용하여 기체상 프로판으로부터
프로판올을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주를 이용하여 기체상 메탄으로부터
숙신산을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주를 이용하여 기체상 메탄으로부터
아미노레불린산을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주를 이용하여 기체상 메탄으로부터
스쿠알렌을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에 아세트인
환원효소(acetoin reductase) 유전자가 도입된 균주이고, 상기
형질전환체를 이용하여 기체상 에탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산하는
것인, 방법.
- [청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에서 숙신산
탈수소효소(succinate dehydrogenase, SDH)를 코딩하는 유전자가 결실된
균주이고, 상기 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을

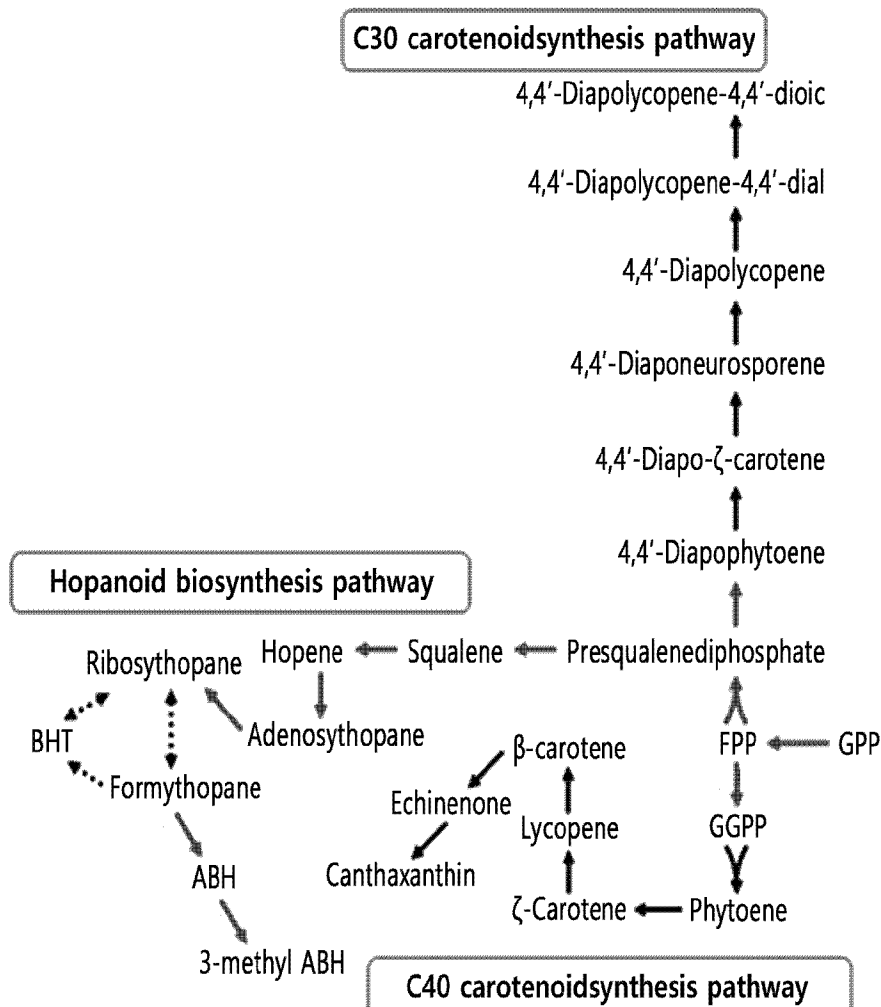
생산하는 것인, 방법.

- [청구항 16] 제1항에 있어서,
 상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에 이소시트르산 분해효소 유전자 및 말산 합성효소 유전자가 도입된 균주이고, 상기 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
 상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에서 포스포아세틸 트랜스퍼라제(phosphoacetyl transferase, pta) 유전자 및 아세테이트 키나제(acetate kinase, ack) 유전자가 결실된 균주이고, 상기 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 숙신산을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 18] 제1항에 있어서,
 상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 균주이고, 상기 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 19] 제1항에 있어서,
 상기 형질전환체는 메틸로모나스 속 DH-1 균주에서 스쿠알렌 호펜 사이클라아제(Squalene hopene cyclase, Shc)를 코딩하는 유전자가 결실된 균주이고, 상기 형질전환체를 이용하여 기체상 메탄으로부터 스쿠알렌을 생산하는 것인, 방법.
- [청구항 20] 제1항에 있어서,
 상기 형질전환체는 α -아세토락테이트 신타제(α -acetolactate synthase, ALS)를 코딩하는 유전자, α -아세토락테이트 디카르복실라제(α -acetolactate decarboxylase, ALDC)를 코딩하는 유전자, 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)를 코딩하는 유전자, 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)를 코딩하는 유전자 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 유전자가 추가로 도입된 것인, 방법.

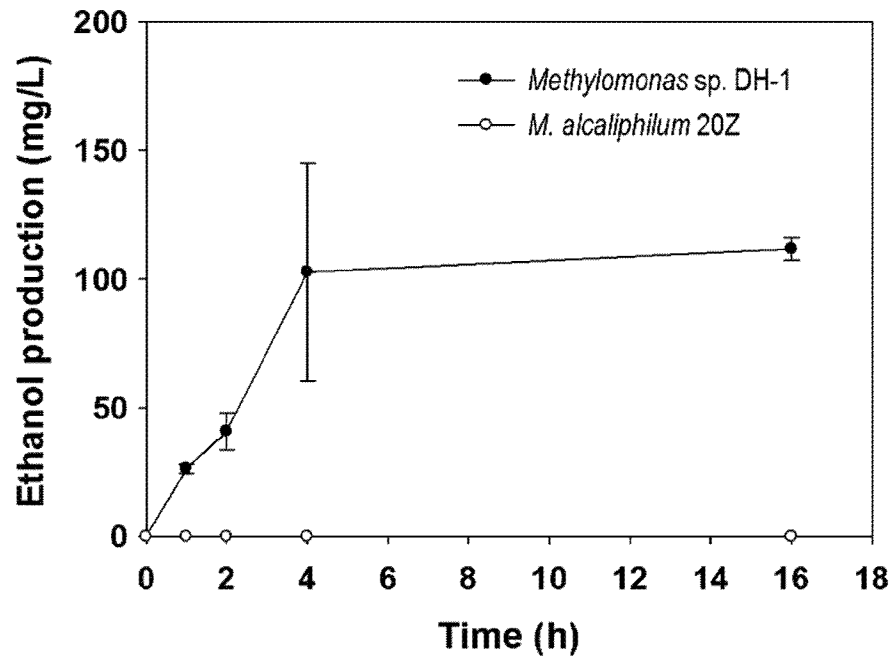
[도 1a]



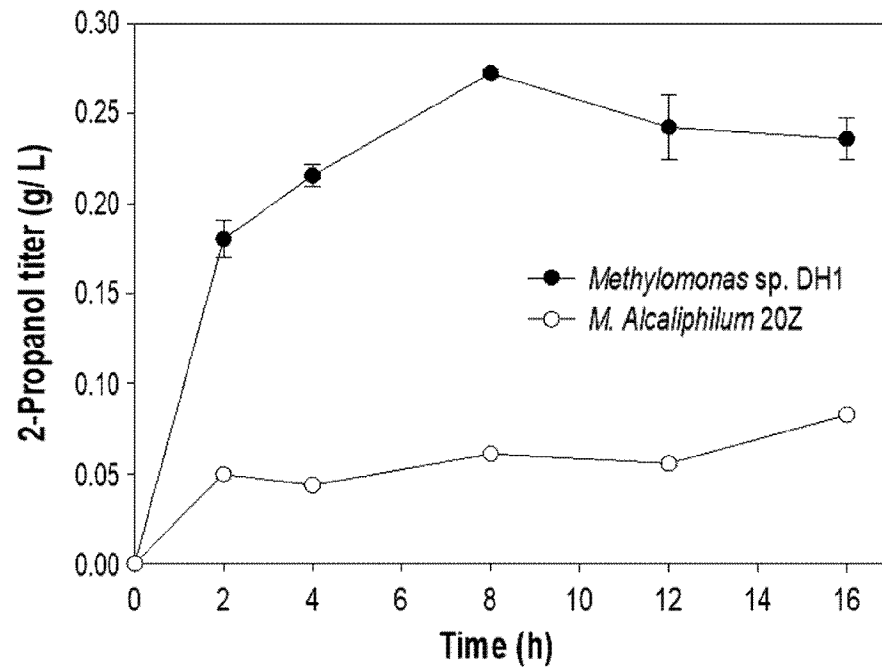
[도 1b]



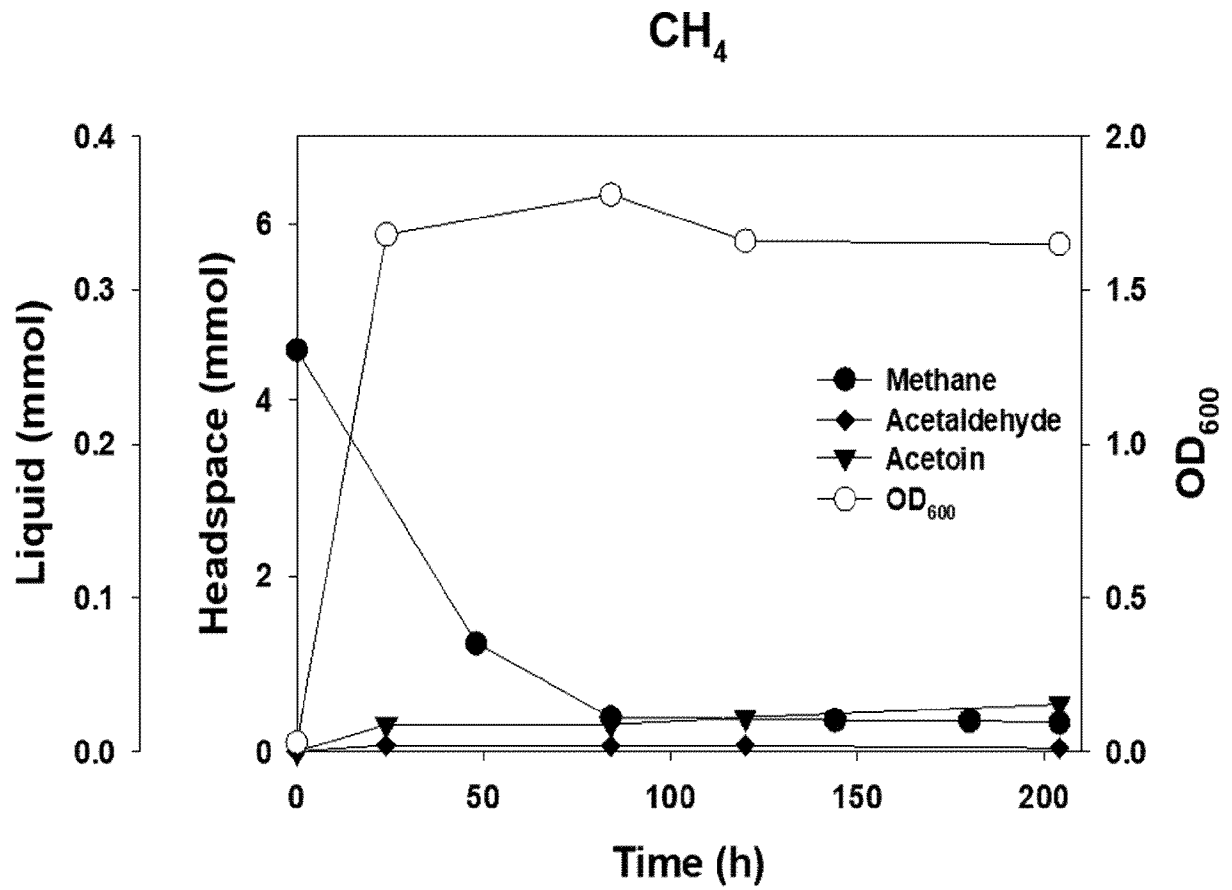
[도2a]



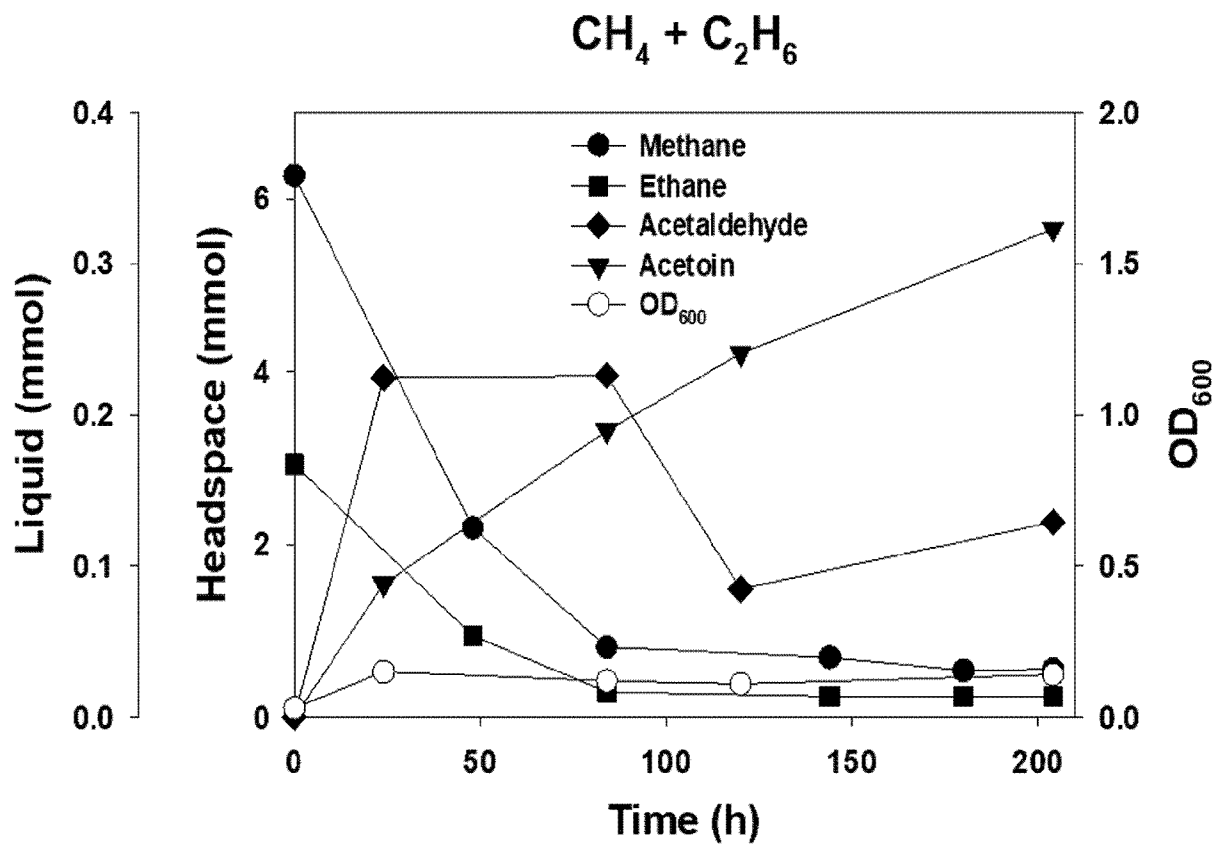
[도2b]



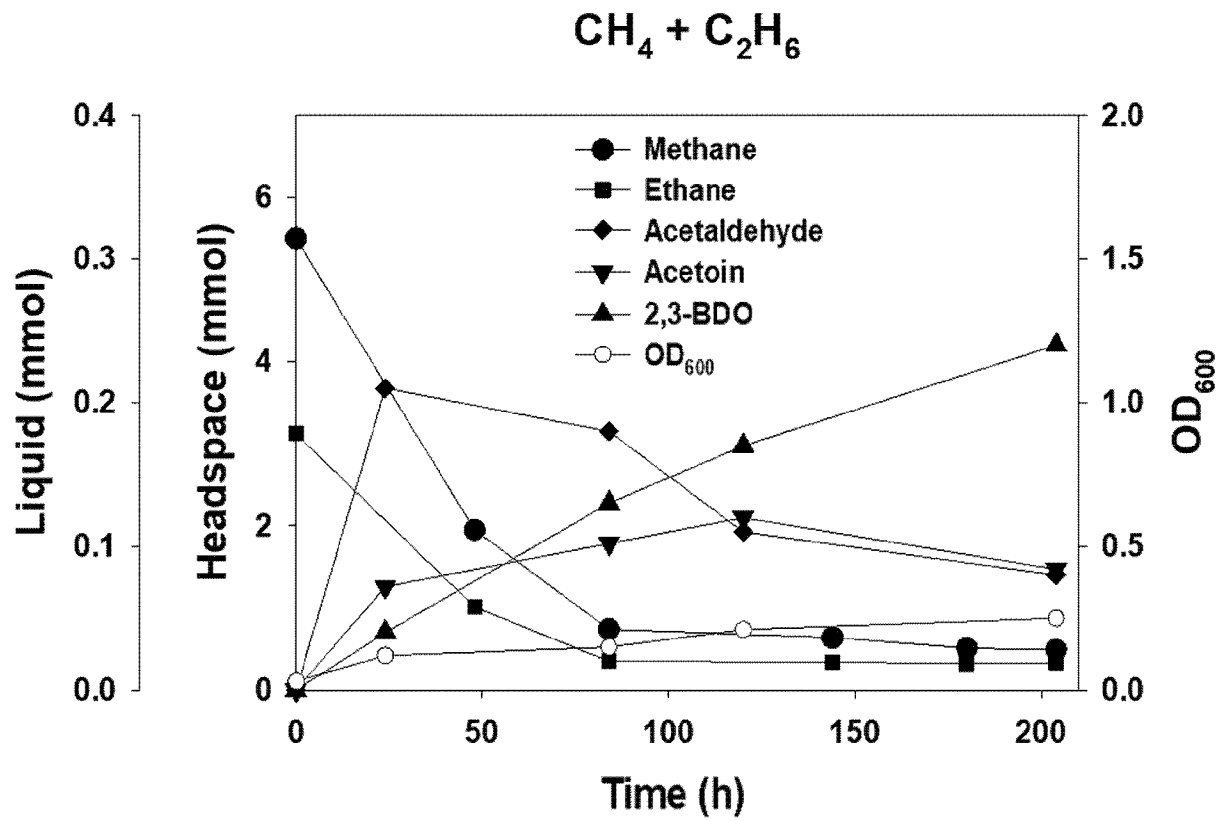
[도3a]



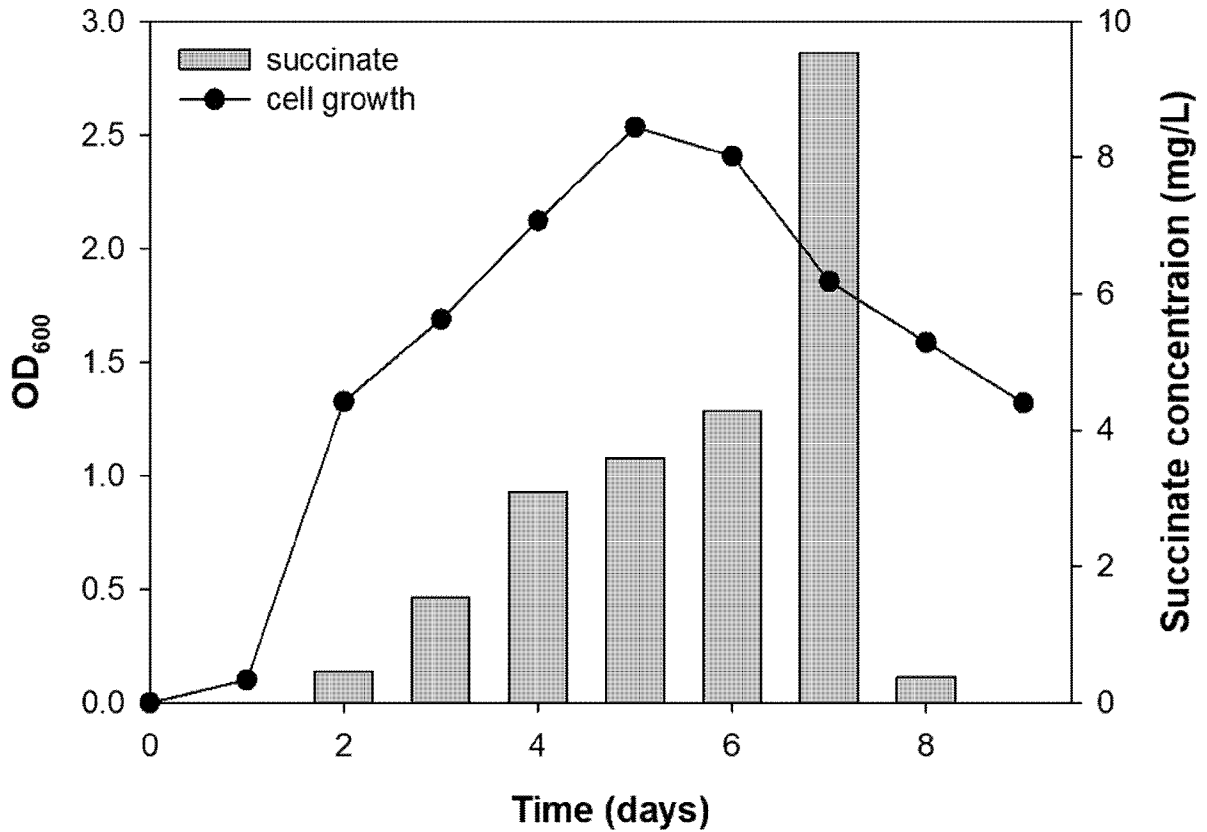
[도3b]



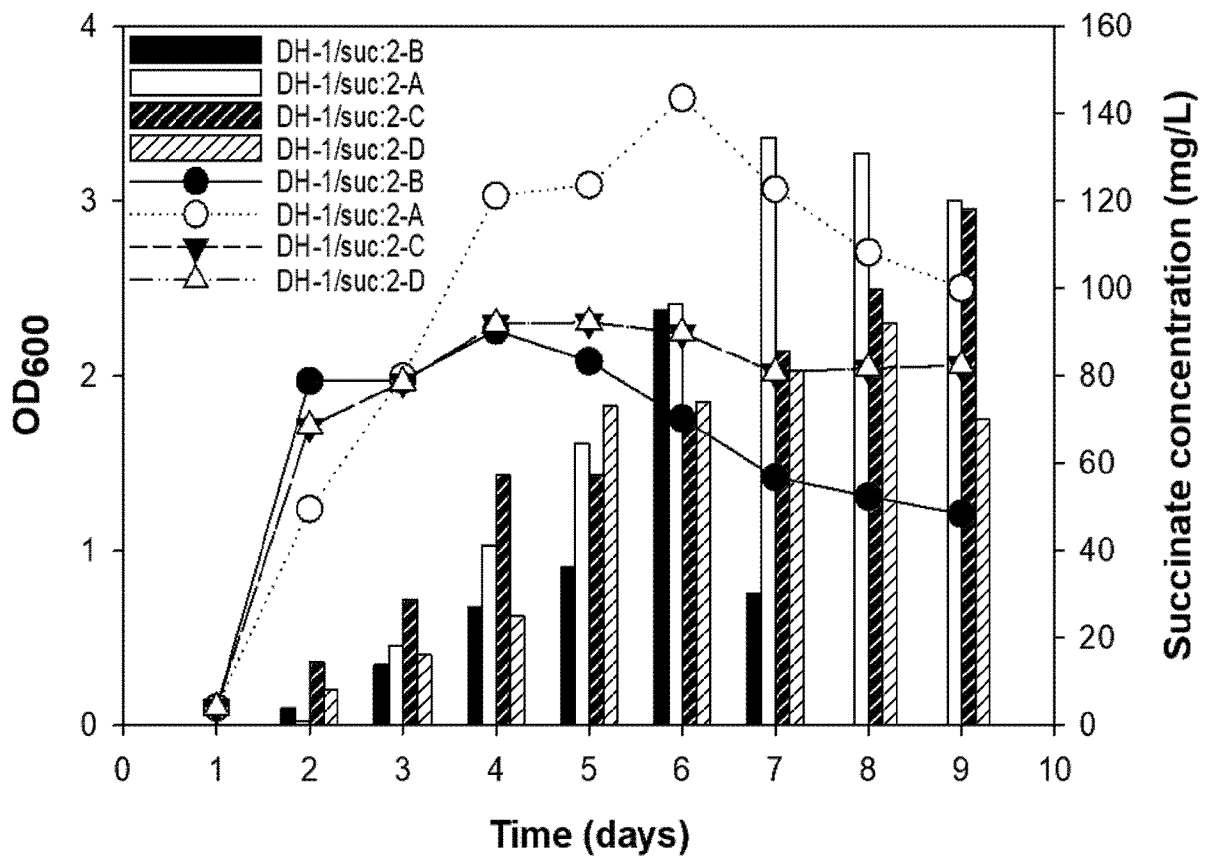
[도3c]



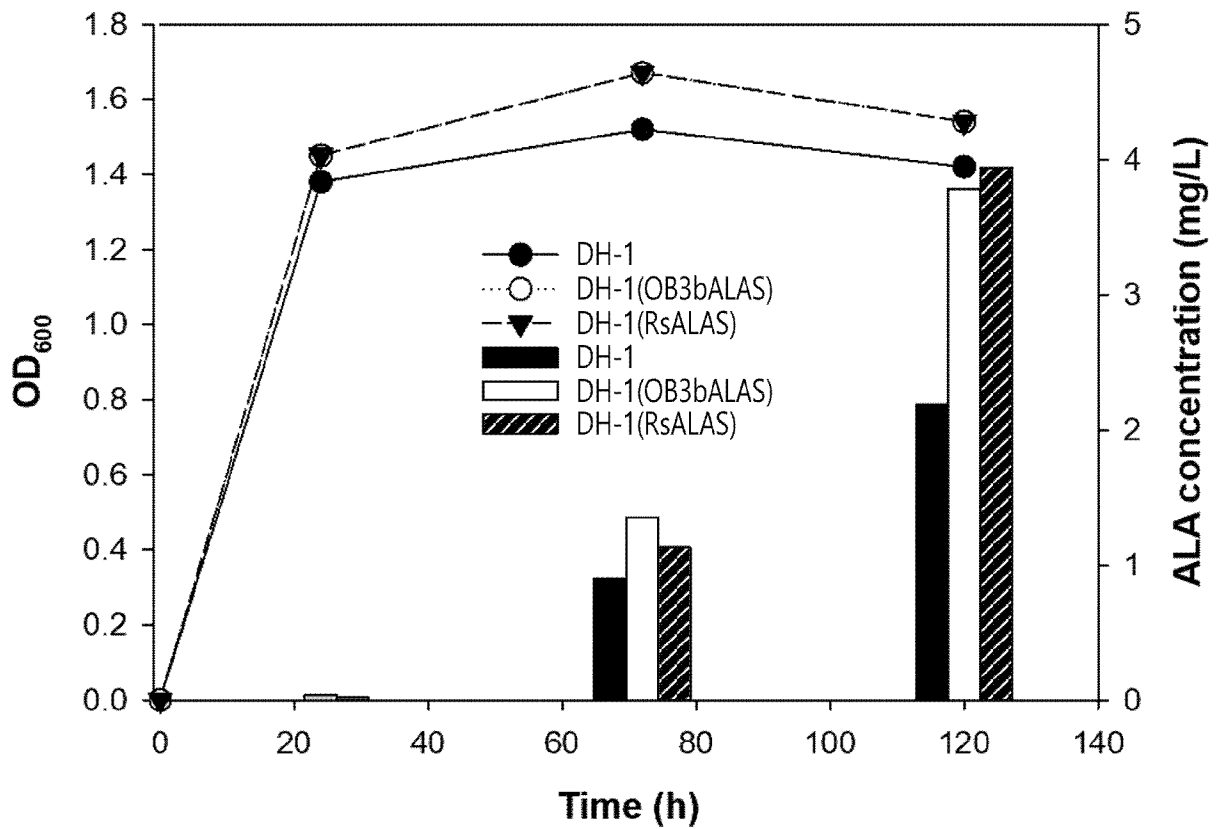
[도4a]



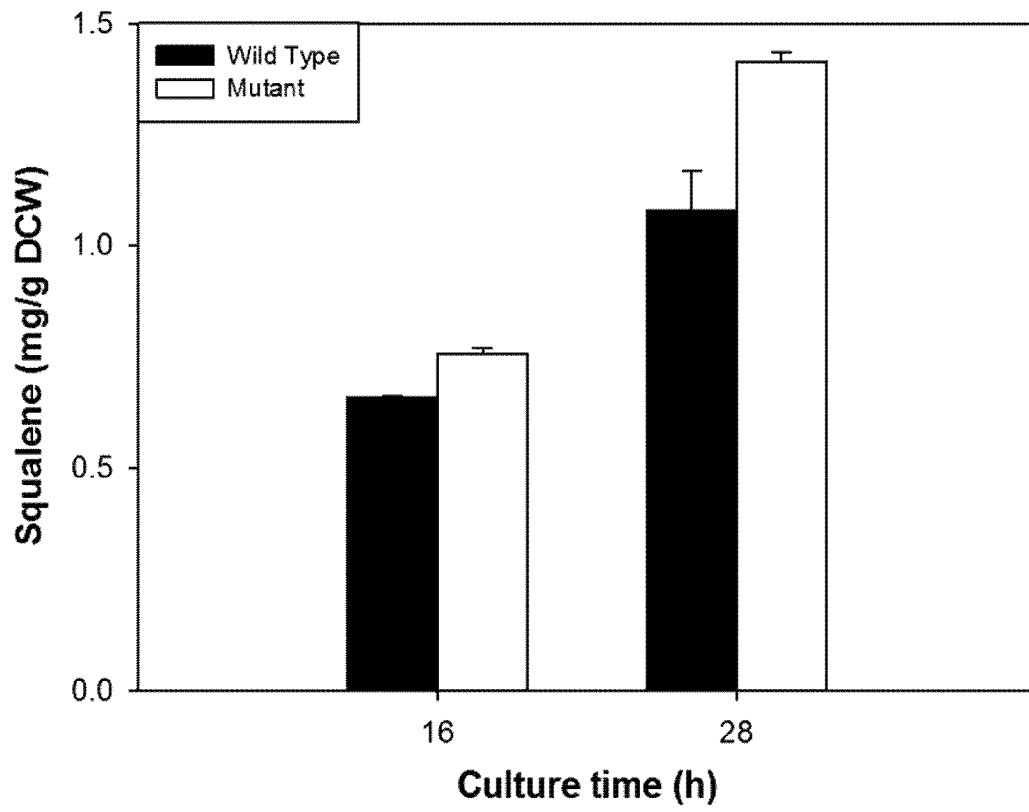
[도4b]



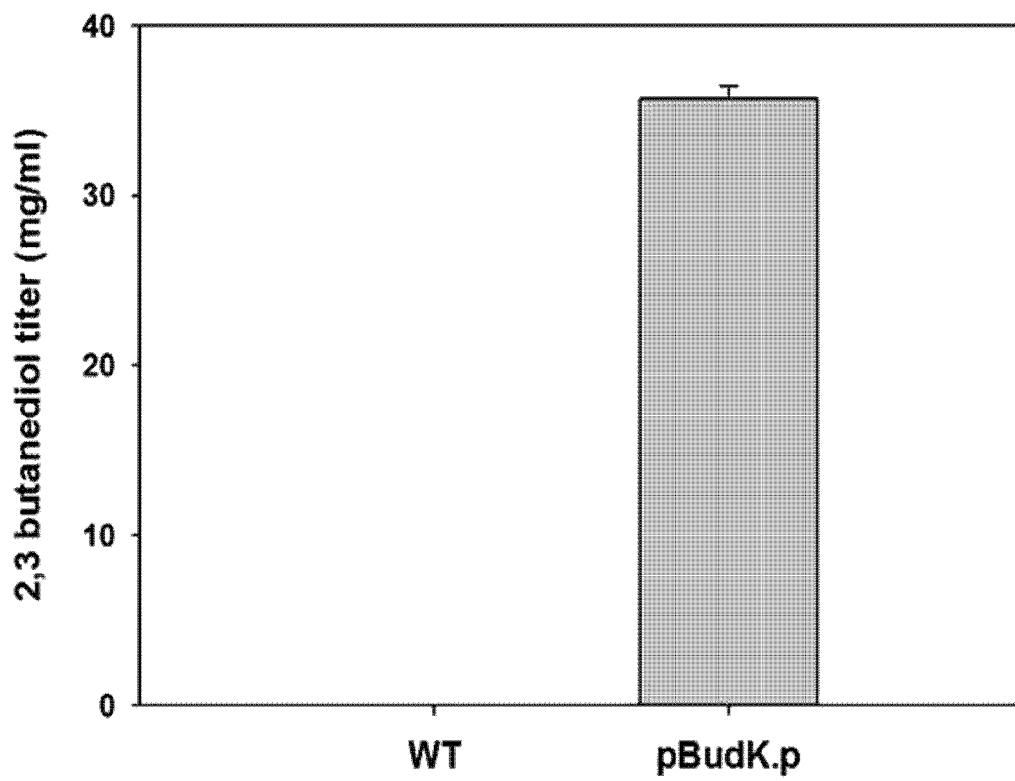
[도5]



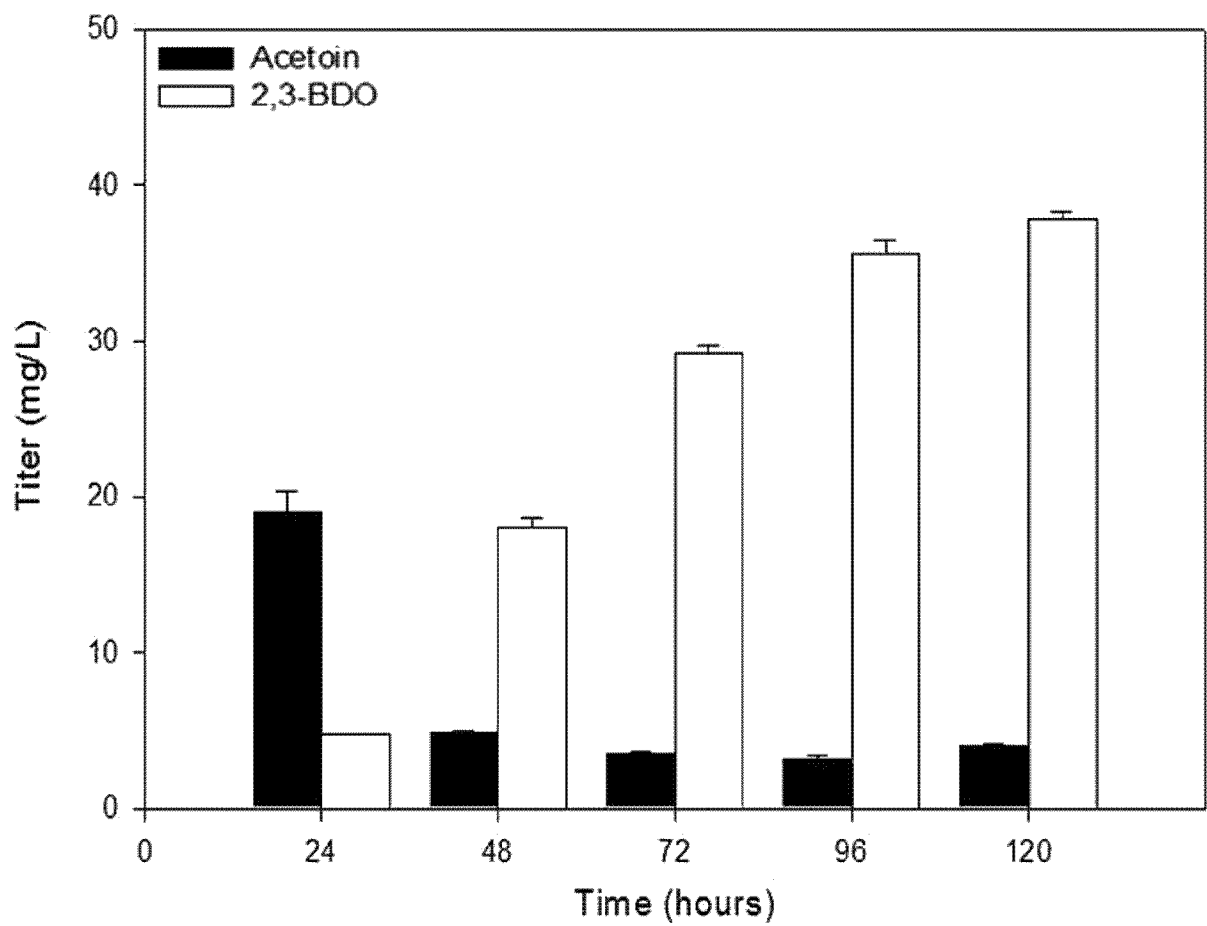
[도6]



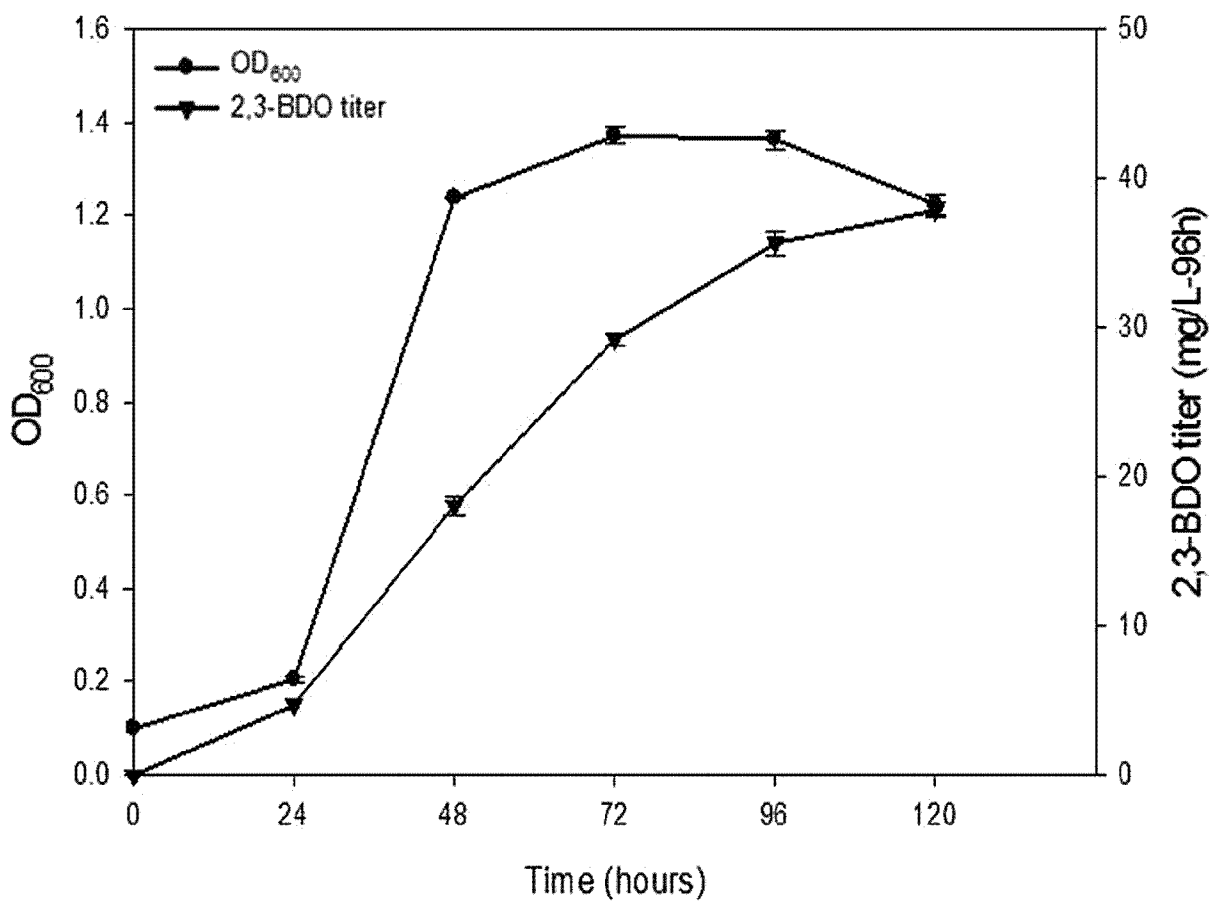
[도7a]



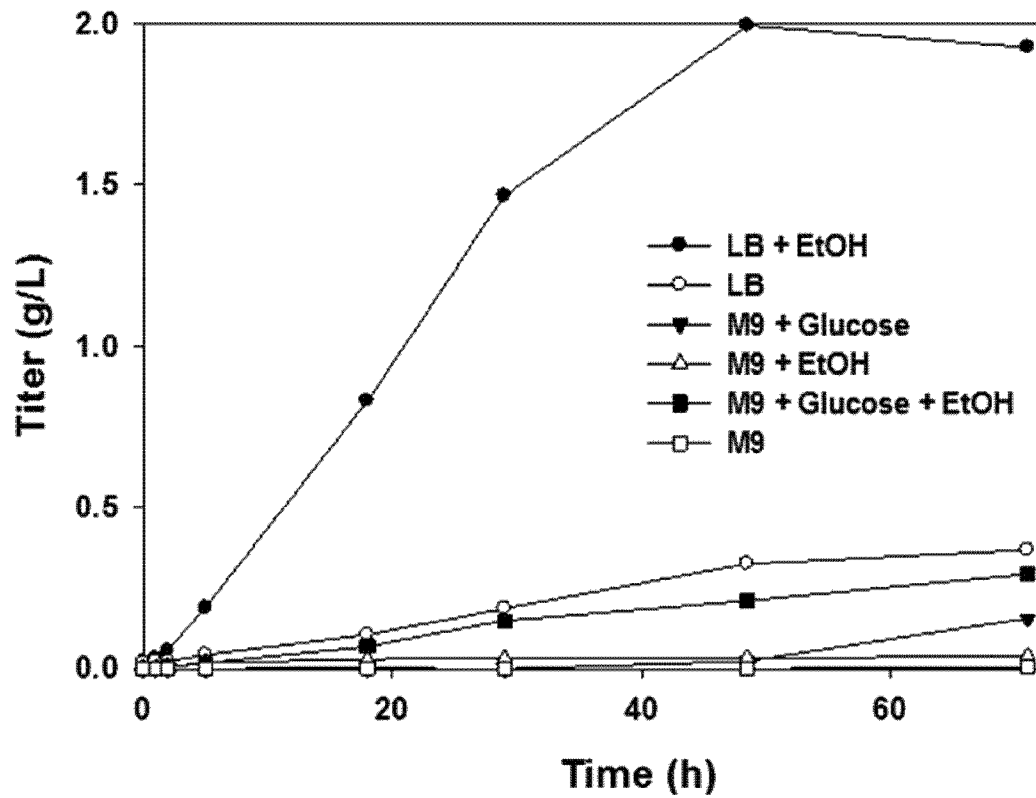
[도7b]



[도7c]



[도8a]



[도8b]

