(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0121746
(43) 공개일자 2020년10월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/18 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/18 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0045588
(22) 출원일자 2020년04월14일
심사청구일자 2020년04월14일
(30) 우선권주장
1020190044353 2019년04월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남데시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남데시앙포레아파트)
웬 덕 안
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 예술디자인대학 107호(서천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

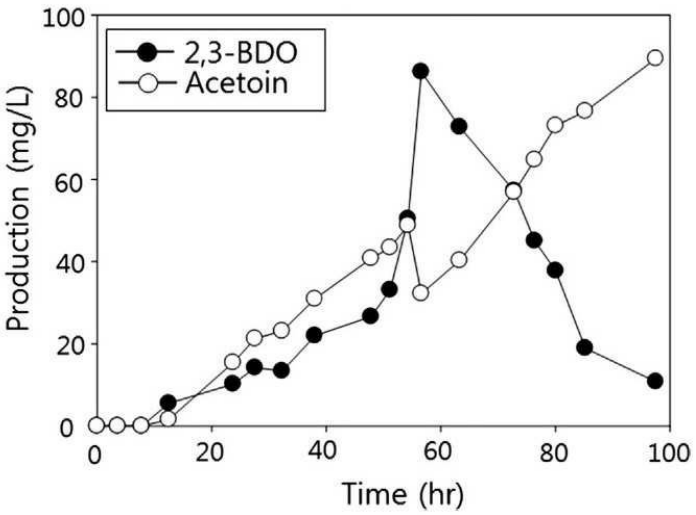
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **2,3-부탄디올 생산용 메탄자화균 형질전환체**

(57) 요 약

본 발명은 메탄자화균의 일종인 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주에, 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 유래 ALDC(α-acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 유전자 및 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 유래 ALS(α-acetolactate synthase)를 코딩하는 유전자가 도입되어, 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO)을 생산할 수 있는 형질전환체, 상기 형질전환체를 포함하는 2,3-BDO 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 2,3-BDO 생산용 키트 및 상기 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환체를 이용하면, 보다 효과적으로 대기중의 메탄 또는 배지중의 메탄올로부터 2,3-부탄디올을 생성할 수 있으므로, 2,3-부탄디올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도6b



(52) CPC특허분류
C12Y 101/01027 (2013.01)
C12Y 101/01037 (2013.01)
C12Y 207/02001 (2013.01)

(72) 발명자
이옥경
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27 907동 402호
황인엽
경기도 용인시 수지구 신봉1로172번길 8 101동 1203호(신봉동, 신봉마을 용인신봉 센트레빌 1단지)
전영찬
인천광역시 부평구 체육관로 111 삼산타운 4단지 414동 1203호(삼산동, 주공삼산타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105541
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸로마이크로븀 알칼리필룸(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 균주에, 클렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주 유래 ALDC(α-acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 유전자 및 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주 유래 ALS(α-acetolactate synthase)를 코딩하는 유전자가 도입되어, 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO)을 생산할 수 있는 형질전환체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 균주는 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주인 것인, 형질전환체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z 균주는 야생형 균주 또는 내재적인 유전자가 불활성화된 변이주인 것인, 형질전환체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 변이주는 MDH(malate dehydrogenase)를 코딩하는 *mdh* 유전자, ACKr(acetyl kinase)를 코딩하는 *ack* 유전자, LDH(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 *ldh* 유전자 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자가 불활성화된 것인, 형질전환체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 클렙시엘라 속 균주는 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 균주인 것인, 형질전환체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 ALDC를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 형질전환체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 바실러스 속 균주는 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주인 것인, 형질전환체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 ALS를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 형질전환체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 ALDC를 코딩하는 유전자와 ALS를 코딩하는 유전자는 P_{tac} 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z 균주에 도입되는 것인, 형질전환체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 벡터는 pAWP89 벡터인 것인, 형질전환체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 형질전환체 또는 그의 배양산물을 포함하는, 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO) 생산용 조성물.

청구항 12

제11항의 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO) 생산용 키트.

청구항 13

(a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 형질전환체를 메탄 또는 메탄올을 공급하는 조건에서 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 수득한 배양물로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계를 포함하는, 2,3-부탄디올 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄디올 생산용 메탄자화균 형질전환체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 메탄자화균의 일종인 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주에, 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 유래 ALDC(α-acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 유전자 및 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 유래 ALS(α-acetolactate synthase)를 코딩하는 유전자가 도입되어, 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO)을 생산할 수 있는 형질전환체, 상기 형질전환체를 포함하는 2,3-BDO 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 2,3-BDO 생산용 키트 및 상기 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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.

[0003] 메탄의 주요 발생원은 혐기성소화의 산물인 바이오가스와 자연적으로 생성된 천연가스이다. 바이오가스의 주요 성분은 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 있으며, 메탄자화균이 보유한 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)는 넓은 범위의 기질을 사용할 수 있어 메탄 뿐만 아니라 에탄과 같은 보다 긴 알칸(alkane)을 산화시킬 수 있는 능력을 보유하고 있으며, 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH) 역시 보다 넓은 범위의 기질을 사용할 수 있어, 다중 탄소 알콜도 산화시킬 수 있다고 알려져 있다.

[0004] 한편, 2,3-부탄디올은 광범위하게 산업적으로 이용되고 있는데, 프린트 잉크, 화장품, 합성수지를 합성을 위한 용매제 등 다양한 제조 산업에서 이용되고 있다. 또한 생물학적으로 생산된 2,3-부탄디올은 탈수과정을 통해 메틸에틸케톤(용매제)과 1,3-부타디엔(합성고무 생산에 사용) 등 유용한 물질로 변환이 가능하다는 장점이 있다. 이같은 2,3-부탄디올은 에어로박터 에어로제네스(Aerobacter aerogenes), 크렙시엘라 유모니아(Klebsiella pneumonia), 크렙시엘라 옥시티카(Klebsiella oxytoca), 바실러스 폴리믹사(Bacillus polymyxa) 등과 같은 미생물로부터 글루코스를 원료로 하여 생산되고 있다. 그러나, 상기 미생물을 이용할 경우에는, 2,3-부탄디올 뿐만 아니라, 부산물로 아세토인, 에탄올, 락테이트, 아세테이트 등이 함께 생산되고 있어, 2,3-부탄디올의 생산수율이 낮다는 단점이 있었다. 이러한 단점을 극복하고자, 다양한 연구가 수행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제1562866호에는 재조합 크렙시엘라 옥시토카 M1 균주를 사용하여, 아세토인과 같은 부산물의 함량을 감소시키고, 2,3-부탄디올의 수율을 증가시키는 방법이 개시되어 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 형질전환된 미생물을 이용하여 보다 효과적으로 2,3-부탄디올을 생산하는 방법을 개발하기 위하여, 예의 연구노력한 결과, 메탄자화균의 일종인 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주에, 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 유래 ALDC(α-acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 유전자 및 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 유래 ALS(α-acetolactate synthase)를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 사용할 경우, 보다 효과적으로 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 주된 목적은 2,3-부탄디올 생산용 메탄자화균 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 2,3-BDO 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 2,3-BDO 생산용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] **상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태는 메틸로마이크로븀 알칼리필룸(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 균주에, 클렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주 유래 ALDC(α-acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 유전자 및 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주 유래 ALS(α-acetolactate synthase)를 코딩하는 유전자가 도입되어, 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올(2,3-butanediol, 2,3-BDO)을 생산할 수 있는 형질전환체를 제공한다.**

[0011] 본 발명의 용어 "메틸로마이크로븀 알칼리필룸(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 균주"란, 메탄자화균의 일종을 의미한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 균주는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주가 될 수 있다.

[0013] 본 발명의 용어 "메틸로마이크로븀 알칼리필룸 20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주"란, 메틸로마이크로븀 알칼리필룸 균주의 일종으로서, 4.67Mb의 원형 염색체를 포함하는데, 상기 원형 염색체의 GC 컨텐츠의 함량은 48.75%이며, 상기 원형 염색체에는 3개의 rRNA 오페론, 44개의 tRNA 및 4,083개의 코딩시퀀스를 포함한다고 알려져 있다(Reshetnikov AS et al., Biochemistry (Mosc). 2005 Aug;70(8):878-83). 상기 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주의 게놈서열은 메탄자화균 중에서는 최초로 보고된 것으로 알려져 있다(Stephane Vuilleumier, et al., Genome Sequence of the Haloalkaliphilic Methanotrophic Bacterium Methylomicrobium alcaliphilum 20Z, J. Bacteriology, GENOME ANNOUNCEMENT, 551-552, 2011).

[0014] 본 발명의 용어 "메탄자화균(methanotrophs)"이란, 메탄산화세균이라고도 호칭되며, 메탄을 유일탄소원으로 이용하여 생육하는 원핵생물을 의미한다. 대부분의 메탄자화균은 대기중의 메탄을 탄소원으로서 사용하는데, 대체로 메탄을 피루브산의 형태로 전환시킨 후, 생체내 대사에 사용한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주는 이종의 유전자인 ALDC를 코딩하는 유전자 및 ALS를 코딩하는 유전자가 도입되어, 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 숙주 세포로 사용될 수 있다.

[0016] 한편, 상기 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주는 야생형 균주를 숙주 세포로 사용할 수 있고, 내재적인 유전자가 불활성화된 변이주를 숙주 세포로 사용할 수 있다.

[0017] 상기 변이주는 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주에 존재하는 MDH(malate dehydrogenase)를 코딩하는 *mdh* 유전자, ACKr(acetyl kinase)를 코딩하는 *ack* 유전자 또는 LDH(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 *ldh* 유전자 중의 하나가 불활성화 되거나 또는 상기 유전자의 조합이 불활성화된 형태가 될 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "불활성화(inactivated)"란, 상기 유전자가 다양한 형태(전체 또는 부분적인 삽입, 결실 또는 전좌)로 변이되어 유전자가 정상적으로 발현되지 못하는 상태인 것을 의미한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주를 숙주 세포로 이용할 경우, 야생형 균주를 사용한 경우 보다는 상기 3종의 유전자가 결실된 변이주를 사용할 경우에 2,3-BDO의 생산수율이 현저하게 증가됨을 확인하였다(도 5b).

[0020] 본 발명의 용어 "ALDC(α-acetolactate decarboxylase, ALDC))"란, *budA* 유전자에서 발현되는 효소의 일종으로서 α-아세토락테이트를 아세토인으로 전환시키는 반응을 수행할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 ALDC는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, *Klebsiella* 속 균주로부터 유래된 것이 될 수 있고, 다른 예로서, *Klebsiella pneumoniae* 균주로부터 유래된 것이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, *Klebsiella pneumoniae* 균주(KCTC 2242)로부터 유래된 것이 될 수 있고, 또 다른 예로서, 서열번호 1의 염기서열에 의해 발현된 것이 될 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어 "ALS(α-acetolactate synthase)"란, *budB* 유전자에서 발현되는 효소의 일종으로서 피루브산을 α-아세토락테이트로 전환시키는 반응을 수행할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 ALS는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, *Bacillus* 속 균주로부터 유래된 것이 될 수 있고, 다른 예로서, *Bacillus subtilis* 균주로부터 유래된 것이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, *Bacillus subtilis* 균주(KCTC 2210)로부터 유래된 것이 될 수 있고, 또 다른 예로서, 서열번호 2의 염기서열에 의해 발현된 것이 될 수 있다.

[0024] 아울러, 상기 각 효소는 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는 한, 각 효소를 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 1개 또는 다수개(단백질의 아미노산 잔기의 입체 구조에 있어서의 위치나 종류에 따라서 상이하지만, 구체적으로는 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10개, 보다 바람직하게는 2 내지 5개)의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 각 효소의 활성을 유지 또는 강화시킬 수 있는 한, 상기 각 효소의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 단백질로서, 실질적으로 각 효소와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되는 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범주에 포함하며, 이는 당업자에게 자명하다.

[0025] 본 발명의 용어 "상동성"이란, 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이티 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모티프로부터 다른 하나의 모티프까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성을 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlignTM(DNASTAR Inc) 등일 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 간 상동성은 상동 영역 간의 안정된 이중가닥을 이루는 조건 하에서 폴리뉴클레오티드의 혼성화한 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제로 분해시켜 분해된 단편의 크기를 결정함으로써 결정할 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "형질전환체"란, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주 세포인 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환체에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 ALDC를 코딩하는 *budA* 유전자 및 ASL를 코딩하는 *budB* 유전자가 될 수 있는데, 상기 각 유전자는 P_{tac} 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주에 도입될 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 ALDC를 코딩하는 *budA* 유전자 및 ASL를 코딩하는 *budB* 유전자가 포함된 발현벡터를 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주에 도입하여 형질전환체를 제작할 경우, 상기 발현벡터에 포함되는 프로모터와 도입되는 유전자의 원천 균주가 적합하게 매칭될 경우에만 상기 제작된 형질전환체로부터 2,3-BDO를 생산할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 프로모터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, P_{tac} 프로모터가 될 수 있다.

[0030] 본 발명의 용어 "P_{tac} 프로모터"란, trp 및 lac 오페론의 프로모터를 조합하여 합성한 프로모터를 의미하는데, 통상적으로 대장균에서 재조합 단백질의 생산에 사용된다고 알려져 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 의하면, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190로부터 유래된 *budABC* 유전자 클러스터를 도입하거나 또는 *Bacillus subtilis* KCTC 2210로부터 유래된 *budABC* 유전자 클러스터를 도입할 경우, 이들을 포함하는 발현벡터의 프로모터로서 P_{tac} 프로모터를 사용하면, 상기 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산할 수 없는 반면, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242로부터 유래된 *budABC* 유전자 클러스터를 도입할 경우, 이들을 포함하는 발현벡터의 프로모터로서 P_{tac} 프로모터를 사용하면, 상기 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산할 수 있다(도 3a).

[0032] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242로부터 유래된 *budABC* 유전자 클러스터를 도입할 경우, 이들을 포함하는 발현벡터의 프로모터로서 P_{mxaF} 프로모터, P_{abc} 프로모터 또는 P_{tac} 프로모터를 사용하면, P_{tac} 프로모터를 사용한 경우에만 상기 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여 2,3-BDO를 생산할 수 있다(표 5).

[0033] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 P_{tac} 프로모터를 사용할 경우, 발현벡터에 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242로부터 유래된 *budABC* 유전자 클러스터가 도입된 형질전환체 보다도, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242로부터 유래된 *budA* 유전자와 *Bacillus subtilis* KCTC 2210로부터 유래된 *budB* 유전자가 도입된 형질전환체를 사용할 경우, 2,3-BDO의 생산수율이 현저하게 증가됨을 확인하였다(도 4a).

[0034] **본 발명의 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체 또는 그의 배양산물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 제공한다.**

[0035] 상술한 바와 같이, 상기 2종의 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체에서는 메탄 또는 메탄올을 이용하여 2,3-부탄디올을 생산할 수 있으므로, 상기 형질전환체 또는 그의 배양물을 이용하면 메탄 또는 메탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체의 배양산물은 2,3-부탄디올을 생산하는데 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 형질전환체의 배양물, 배양상등액, 파쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, 형질전환체를 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 파쇄물, 상기 배양물, 배양상등액, 파쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.

[0037] **본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 키트를 제공한다.**

[0038] 본 발명의 2,3-부탄디올 생산용 키트는 상기 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하여 2,3-부탄디올을 생산하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 반응에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있고, 구체적인 예로 상기 2,3-부탄디올 생산에 사용되는 완충액, 상기 2,3-부탄디올 생산을 수행하기 위한 반응용기, 상기 2,3-부탄디올 생산을 수행하기 위한 진탕배양기, 상기 2,3-부탄디올 생산 반응을 수행하기 위한 타이머 등을 포함할 수 있다.

[0039] **본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 사용하여 2,3-부탄디올을 생산하는 방법을 제공한다.**

[0040] **구체적으로, 본 발명에서 제공하는 2,3-부탄디올의 생산방법은 (a) 상기 형질전환체를 메탄 또는 메탄올을 공급하는 조건에서 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 수득한 배양물로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계를 포함한다.**

[0041] 상기 메탄의 농도는 상기 형질전환체를 이용하여 메탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 10 내지 80%(v/v)가 될 수 있고, 다른 예로서, 20 내지 50%(v/v)가 될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 메탄올의 농도 역시 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 0.1 내지 5%(v/v)가 될 수 있고, 다른 예로서, 1 내지 2%(v/v)가 될 수 있다.

[0043] 아울러, 상기 형질전환체의 배양시간 역시 상기 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄으로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 24 내지 120시간이 될 수 있다.

[0044] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 형질전환체로부터 2,3-부탄디올을 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.

[0046] 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/).

[0047] 특히, 배지에 NaCl, KCl 등의 염류를 포함할 경우, 형질전환체의 증식 또는 2,3-부탄디올의 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.

[0048] 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.

[0049] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 상기 폐타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다.

[0050] 아울러, 배양물로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응액을 원심분리하여 형질전환 미생물을 제거하고 얻어진 상등액을, 용매추출법에 적용하여 목적하는 2,3-부탄디올을 회수하는 방법을 사용할 수 있고, 이외에도 상기 목적하는 2,3-부탄디올의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 2,3-부탄디올을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 형질전환체를 이용하면, 보다 효과적으로 대기중의 메탄 또는 배지중의 메탄올로부터 2,3-부탄디올을

생성할 수 있으므로, 2,3-부탄디올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1a는 1% 메탄올 및 다양한 농도(0 내지 10g/L)의 2,3-BDO를 포함하는 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 72시간 동안 배양하면서, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준 변화를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 1% 메탄올 및 다양한 농도(0 내지 40g/L)의 2,3-BDO를 포함하는 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 72시간 동안 배양한 후, 균체의 수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 미생물에서 2,3-BDO를 생산하는 경로를 나타내는 개략도이다.

도 3a는 3종의 균주(*Bacillus subtilis* KCTC 2210, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 및 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242)로부터 유래된 2,3-BDO 생산용 유전자가 도입된 형질전환체에서 생산된 2,3-BDO 생산수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 기체상의 메탄을 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 나타내는 그래프이다.

도 3c는 메탄올을 포함하는 배지를 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 나타내는 그래프이다.

도 3d는 메탄올을 포함하는 배지를 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600}) 변화, 메탄올의 농도변화 및 2,3-BDO의 농도변화를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 20Z/pBudK.p 균주, 20Z/pNBM-Re 균주 및 20Z/pNBM-Ri 균주의 배양시간의 경과에 따른 2,3-BDO의 생산성(mg/L)을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 20Z/pBudK.p 균주, 20Z/pNBM-Re 균주 및 20Z/pNBM-Ri 균주의 배양시간의 경과에 따른 증식수준(OD_{600})의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 대상으로 호기성 조건하에서 in silico 녹아웃 시뮬레이션을 수행하여, 2,3-BDO 생산성에 영향을 미칠 수 있는 후보 유전자를 발굴한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 내재적으로 존재하는 3종의 유전자를 결실된 숙주 세포를 사용하여 제작된 각 형질전환체를 배양하여 산출한 2,3-BDO의 생산수율을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6a는 메탄공급 조건으로 20ZM3/pNBM-Re 균주를 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600})을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 메탄공급 조건으로 20ZM3/pNBM-Re 균주를 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 아세토인의 생산수준(mg/L) 및 2,3-BDO의 생산수준(mg/L)을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 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.

[0054] **실시예 1: *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 대한 2,3-BDO의 독성분석**

[0055] 본 발명에서 사용한 *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 대하여 2,3-BDO가 독성을 나타내는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0056] 대략적으로, 1%(v/v) 메탄올 및 다양한 농도(0 내지 10g/L)의 2,3-BDO를 포함하는 각각의 액상배지에 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 접종하고, 72시간 동안 배양하면서, 시간의 경과에 따른 배양물의 흡광도(OD_{600})를 측정하여, 균체의 증식수준을 비교하였다(도 1a 및 1b).

[0057] 도 1a는 1% 메탄올 및 다양한 농도(0 내지 10g/L)의 2,3-BDO를 포함하는 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 72시간 동안 배양하면서, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준 변화를 나타내는 그래프이고, 도 1b는 1% 메탄올 및 다양한 농도(0 내지 40g/L)의 2,3-BDO를 포함하는 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 72시간 동안

배양한 후, 균체의 수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0058] 상기 도 1a 및 1b에서 보듯이, 10g/L 이하의 2,3-BDO를 포함하는 배지에서는 *M. alcaliphilum* 20Z 균주가 증식됨을 확인하였다.

[0059] 또한, 공지된 바에 의하면, *M. alcaliphilum* 20Z 균주의 해당 과정에 기반한(glycolysis-based) 메탄 동화 경로(methane assimilation pathway)가 보고되었고(Kalyuzhnaya, M.G., et al., 2013. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. Nature communications 4, 2785.), *M. alcaliphilum* 20Z 균주가 속하는 제1형 메탄자화균주(type I methanotrophs)가 피루베이트를 통해 다양한 부가가치 화합물을 생산할 수 있고, 생산되는 화합물의 생산량은 상기 균주의 배양물 1L 당 100 mg 이하의 수준이라고 보고되었다(K, alyuzhnaya, M.G., et al., 2015. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. Metab. Eng. 29, 142-152.).

[0060] 따라서, 상기 *M. alcaliphilum* 20Z 균주는 2,3-BDO를 생산할 수 있는 바이오리액터용 숙주세포로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0061] **실시예 2: *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 이용한 2,3-BDO 생산용 형질전환체의 개발**

[0062] **실시예 2-1: 발현벡터의 제작**

[0063] 통상적으로, 균주를 통해 2,3-BDO를 생산하는 경로는 *budA* 유전자로부터 발현된 ALDC(α-acetolactate decarboxylase), *budB* 유전자로부터 발현된 ALS(α-acetolactate synthase) 및 *budC* 유전자로부터 발현된 BDH(2,3-butanediol dehydrogenase)의 연쇄반응을 이용하는 것으로 알려져 있다(도 2).

[0064] 도 2는 미생물에서 2,3-BDO를 생산하는 경로를 나타내는 개략도이다.

[0065] 2,3-BDO를 생산하는 다양한 균주가 알려져 있으나, 이들 균주로부터 생산된 2,3-BDO가 화학적으로 모두 동일하지는 않다고 알려져 있다. 예를 들어, *B. subtilis* 균주는 (2R,3R)-2,3-BDO를 생산하고, *K. pneumoniae* 균주는 meso-2,3-BDO를 생산하며, *E. aerogenes* 균주는 (2S,3S)-2,3-BDO를 생산한다(Ji, X., et al., 2011. Microbial 2, 3-butanediol production: a state-of-the-art review. Biotechnol. Adv. 29, 351-364.; Xu, Y., et al., 2014. Systematic metabolic engineering of Escherichia coli for high-yield production of fuel biochemical 2, 3-butanediol. Metab. Eng. 23, 22-33.).

[0066] 이처럼 다양한 형태의 2,3-BDO를 생산하는 이유는 2,3-BDO의 생산에 관여하는 효소가 서로 상이하기 때문인 것으로 알려져 있기 때문이다.

[0067] 본 발명자들은 pAWP89 벡터(oriV oriT trfA ahp dTomato P_{tac})를 이용하여 2,3-BDO 생산에 관여하는 다양한 효소(ALDC, ALS 및 BDH)를 코딩하는 유전자(*budA* 유전자, *budB* 유전자 및 *budC* 유전자)가 도입된 다양한 형태의 재조합 발현벡터를 다음과 같이 제작하였다(표 1).

표 1

[0068] 재조합 발현벡터

명칭	특징
pBudB.s	pAWP89-based backbone carrying P_{tac} promoter and *budA*, *budB* gene originated from *Bacillus subtilis* KCTC 2210
pBudE.a	pAWP89-based backbone carrying P_{tac} promoter and 2,3-BDO gene cluster(*budA*, *budB* and *budC*) originated from *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190
pBudK.p	pAWP89-based backbone carrying P_{tac} promoter and 2,3-BDO gene cluster(*budA*, *budB* and *budC*) originated from *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242

[0069] **실시예 2-2: 형질전환체의 제작**

[0070] 상기 실시예 2-1에서 제작된 재조합 발현벡터를 *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 도입하여, 각각의 형질전환체를 제작하였다(표 2).

표 2

[0071] 형질전환체

명칭	특징
20Z/pBudB.s	*M. alcaliphilum* 20Z harboring pBudB.s
20Z/pBudE.a	*M. alcaliphilum* 20Z harboring pBudE.a
20Z/pBudK.p	*M. alcaliphilum* 20Z harboring pBudK.p

[0072] **실시예 2-3: 형질전환체를 이용한 2,3-BDO의 생산**

[0073] 상기 실시예 2-2에서 제작된 각각의 형질전환체를 배양하고, 이로부터 2,3-BDO를 생산한 후, 생산수율을 비교하였다.

[0074] 먼저, 상기 각 형질전환체를 스크류 캡으로 밀봉된 500 ㎖ 배플 플라스크에 담겨진 50 ㎖의 NMS 배지에 접종하고, 28℃ 및 230 rpm의 조건으로 96시간 동안 배양하였으며, 24시간 마다 상기 배플 플라스크의 헤드 스페이스에 50%(v/v) 메탄을 공급하거나 또는 1%(w/w) 메탄올이 포함된 배지를 사용하였다. 또한, 형질전환체를 구별하기 위하여, 최종 농도 50㎍/㎖의 카나마이신(Km)을 배지에 추가하였다.

[0075] 다음으로, 배양이 종료된 후, 각각의 배양물을 원심분리하여 배양상등액을 수득하고, 수득한 각 배양상등액을 RI detector 및 Aminex HPX- 87H organic acid column (Bio-Rad, Hercules, USA)이 구비된 HPLC(Jasco Co., Easton, USA)에 적용하여, 상기 배양상등액에 포함된 아세토인과 2,3-BDO를 정량분석하였다(도 3a). 이때, 황산(0.005M)을 60℃에서 이동상으로 사용하고, 유속은 분당 0.7㎖로 설정하였으며, 사용된 모든 용액은 0.2㎛ 멤브레인으로 여과한 것을 사용하였다. 또한, 배양상등액 48 ㎕과 물 2 ㎕를 혼합하여 시료를 수득하고, 이를 5%(w/v) 나프톨이 용해된 2.5 N NaOH과 0.5%(w/v) 크레아틴 수용액으로 구성된 용액 50 ㎕과 혼합하여 40분 동안 반응시켰다. 반응시작후 5분 마다 Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 모니터링하였다. 이때, 5가지 상이한 농도의 순수 아세토인을 사용하여 제작한 표준곡선을 사용하였다. 끝으로, 대조군으로는 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 사용하였다.

[0076] 도 3a는 3종의 균주(*Bacillus subtilis* KCTC 2210, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 및 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242)로부터 유래된 2,3-BDO 생산용 유전자가 도입된 형질전환체에서 생산된 2,3-BDO 생산수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0077] 도 3a에서 보듯이, 기체상의 메탄을 공급하거나 또는 배지에 메탄올을 공급하는 모든 조건에서, 3종의 균주(*Bacillus subtilis* KCTC 2210, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 및 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242) 중에서 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242로부터 유래된 2,3-BDO 생산용 유전자가 도입된 형질전환체(pBudK.p)만이 2,3-BDO를 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0078] **실시예 2-4: 20Z/pBudK.p를 이용한 2,3-BDO의 생산특성 분석**

[0079] **실시예 2-4-1: 기체상의 메탄을 공급하는 조건에서 2,3-BDO의 생산량 분석**

[0080] 상기 실시예 2-3의 결과에 따라, 기체상의 메탄을 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 120시간 동안 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 비교하였다(도 3b).

[0081] 도 3b는 기체상의 메탄을 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 나타내는 그래프이다.

[0082] 도 3b에서 보듯이, 배양초기에는 2,3-BDO의 생산수준에 비하여 아세토인의 생산수준이 현저히 높은 수준을 나타내었으나, 배양시간이 경과됨에 따라 아세토인의 생산수준은 급격히 감소되는 반면, 2,3-BDO의 생산수준은 급격히 증가되는 양상을 나타냄을 확인하였다. 96시간 동안 배양한 경우, 2,3-BDO의 생산수준은 35.66 ± 0.56 mg/L인 것으로 확인되었다.

[0083] **실시예 2-4-2: 메탄올이 포함된 배지를 공급하는 조건에서 2,3-BDO의 생산량 분석**

[0084] 상기 실시예 2-3의 결과에 따라, 1%(w/w) 메탄올이 포함된 배지를 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 120시간 동안 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 비교하였다(도 3c).

[0085] 도 3c는 메탄올을 포함하는 배지를 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 아세토인과 2,3-BDO의 생산수준을 나타내는 그래프이다.

[0086] 도 3c에서 보듯이, 도 3b의 결과와 유사하게, 배양초기에는 2,3-BDO의 생산수준에 비하여 아세토인의 생산수준이 현저히 높은 수준을 나타내었으나, 배양시간이 경과됨에 따라 아세토인의 생산수준은 급격히 감소되는 반면, 2,3-BDO의 생산수준은 급격히 증가되는 양상을 나타냄을 확인하였다. 다만, 96시간 동안 배양한 경우, 도 3b에서 측정된 값보다 2,3-BDO의 생산수준이 더욱 높은 수준을 나타내었는데, 63.6 ± 0.76 mg/L인 것으로 확인되었다.

[0087] 아울러, 상기 1%(w/w) 메탄올이 포함된 배지를 공급하는 조건으로 배양한 경우, 시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600}) 변화, 메탄올의 농도변화 및 2,3-BDO의 농도변화를 측정하였다(도 3d).

[0088] 도 3d는 메탄올을 포함하는 배지를 공급하는 조건으로 상기 20Z/pBudK.p를 배양한 경우, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600}) 변화, 메탄올의 농도변화 및 2,3-BDO의 농도변화를 나타내는 그래프이다.

[0089] 도 3d에서 보듯이, 96시간이 경과된 후의 메탄올 g 당 2,3-BDO의 생산수율은 0.016±0.0003 g을 나타내었고, 체적생산성(volumetric productivity)은 0.66 mg/L/h임을 확인하였다.

[0090] **실시예 2-5: 2,3-BDO 생산성 최적화를 위한 프로모터의 선별**

[0091] 상기 제작된 형질전환체 20Z/pBudK.p에서 2,3-BDO의 생산성을 최적화 하기 위한 프로모터와 전사조절인자를 선별하고자 하였다.

[0092] *M. alcaliphilum* 20Z 균주와 관련된 선행연구 결과를 조사하여, 상기 균주에 적합한 프로모터로서 P_{mxaF}, P_{abc} 및 P_{tac}을 선발하였고, 전사조절인자로서 LysR을 선발한 다음, *K. pneumoniae* 균주 또는 *B. subtilis* 균주유래의 2,3-BDO 합성유전자와 조합하여 pAWP89 벡터에 도입함으로써 각각의 발현벡터를 수득하고(표 3), 이들 수득한 각 발현벡터를 *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 도입하여 각각의 형질전환체를 수득하였다(표 4).

표 3

[0093] 재조합 발현벡터

명칭	특징
P_{mxaF}-BudK.p	pAWP89-based backbone carrying P_{mxaF} promoter and 2,3-BDO gene cluster(*budA*, *budB* and *budC*) originated from *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242
P_{abc}-BudK.p	pAWP89-based backbone carrying native P_{abc} promoter, LysR transcription regulator and 2,3-BDO gene cluster(*budA*, *budB* and *budC*) originated from *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242
pNBM-Re	pAWP89-based backbone carrying P_{tac} promoter, *budA* gene originated from *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242, *budB* gene originated from *Bacillus subtilis* KCTC 2210 with native RBS
pNBM-Ri	pAWP89-based backbone carrying P_{tac} promoter, *budA* gene originated from *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242, *budB* gene originated from *Bacillus subtilis* KCTC 2210 with synthetic RBS for ALS gene is TIR of 640K au

표 4

[0094] 형질전환체

명칭	특징
20Z/P_{mxaF}-BudK.p	*M. alcaliphilum* 20Z harboring P_{mxaF}-BudK.p
20Z/P_{abc}-BudK.p	*M. alcaliphilum* 20Z harboring P_{abc}-BudK.p
20Z/pNBM-Re	*M. alcaliphilum* 20Z harboring pNBM-Re
20Z/pNBM-Ri	*M. alcaliphilum* 20Z harboring pNBM-Ri

[0095] 상기 수득한 각 형질전환체를 메탄을 공급하는 조건 또는 메탄올을 공급하는 조건에서 배양하고, 2,3-BDO의 생산성(mg/L)을 측정하였다(표 5). 이때, 대조군으로는 20Z/pBudK.p 균주를 사용하였다.

표 5

[0096] 다양한 형질전환체의 2,3-BDO의 생산성(mg/L)

명칭	2,3-BDO의 생산성(mg/L)	
	메탄올공급	메탄공급
20Z/pBudK.p	63.6	35.6
20Z/P_{mxaF}-BudK.p	-	-
20Z/P_{abc}-BudK.p	-	-
20Z/pNBM-Re	91.6	57.7
20Z/pNBM-Ri	86	52.6

[0097] 상기 표 5에서 보듯이, P_{mxaF} 및 P_{abc} 프로모터를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체(20Z/P_{mxaF}-BudK.p / 20Z/P_{abc}-BudK.p)는 2,3-BDO를 생산하지 못하였으나, P_{tac} 프로모터를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체(20Z/pNBM-Re / 20Z/pNBM-Ri)는 대조군(20Z/pBudK.p) 보다도 높은 수율로 2,3-BDO를 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0098] 상기 도 3a에서는 P_{tac} 프로모터와 *Bacillus subtilis* KCTC 2210 균주 유래의 *budA* 및 *budB* 유전자가 조합된 발현벡터를 사용한 형질전환체(20Z/pBudB.s)에서 2,3-BDO가 생산되지 않는 결과를 얻었음에도 불구하고, 상기 표 5에서는 P_{tac} 프로모터, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242 균주 유래의 *budA* 유전자 및 *Bacillus subtilis* KCTC 2210 균주 유래의 *budB* 유전자가 조합된 발현벡터를 사용한 형질전환체(20Z/pNBM-Re 및 20Z/pNBM-Ri)에서 높은 수준으로 2,3-BDO가 생산된다는 결과를 얻을 수 있었다.

[0099] 이러한 표 5의 결과는 상기 P_{tac} 프로모터가 *budA* 유전자에 작용하여 2,3-BDO 생합성 경로에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다는 점과, P_{tac} 프로모터가 작용할 수 있는 *budA* 유전자는 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242 균주 유래의 *budA* 유전자로 제한된다는 점을 시사하는 것으로 분석되었다

[0100] 한편, 상기 표 5의 결과는 순수한 *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242 균주 유래의 2,3-BDO 생합성 유전자 클러스터(*budA*, *budB* and *budC*)를 모두 사용한 것 보다도, 이종의 2,3-BDO 생합성 유전자를 조합하여 사용할 경우, 도입되는 유전자의 종류를 감소시키면서도 2,3-BDO의 생산량을 증대시킬 수 있음을 시사하는 것으로 분석되었다.

[0101] **실시예 2-6: 이종 유전자의 조합**

[0102] 상기 실시예 2-5의 표 5의 결과에서 보듯이, 이종의 2,3-BDO 생합성 유전자(*K. pneumoniae* 균주 유래 유전자와 *B. subtilis* 균주 유래 유전자)를 조합하여 사용할 경우, 도입되는 유전자의 종류를 감소시키면서도 2,3-BDO의 생산량을 증대시킬 수 있음을 확인하였으므로, 이에 대하여 구체적으로 분석하고자 하였다.

[0103] 대략적으로, 상기 20Z/pBudK.p, 20Z/pNBM-Re 및 20Z/pNBM-Ri를 메탄올을 공급하는 조건에서 120시간 동안 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 2,3-BDO의 생산성(mg/L) 및 균체의 증식수준(OD_{600})의 변화를 비교하였다(도 4a 및 4b).

[0104] 도 4a는 20Z/pBudK.p 균주, 20Z/pNBM-Re 균주 및 20Z/pNBM-Ri 균주의 배양시간의 경과에 따른 2,3-BDO의 생산성(mg/L)을 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 4b는 20Z/pBudK.p 균주, 20Z/pNBM-Re 균주 및 20Z/pNBM-Ri 균주의 배양시간의 경과에 따른 증식수준(OD_{600})의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0105] 도 4a 및 4b에서 보듯이, 상기 각 균주별 증식수준은 별다른 차이를 나타내지 않았으나, 3종 유전자가 모두 도입된 대조군(20Z/pBudK.p)의 2,3-BDO의 생산성 보다도 BDH를 코딩하는 유전자를 제외한 2종 유전자 만이 도입된 형질전환체의 2,3-BDO의 생산성이 더욱 높은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0106] 추가연구를 통해, 2,3-BDO의 생산과정에 필요한 BDH의 기능은 *M. alcaliphilum* 20Z 균주의 내재적인 알코올 탈수소 효소가 수행할 수 있음을 알 수 있었다.

[0107] **실시예 2-7: 2,3-BDO 생산성 최적화를 위한 숙주 세포의 제작**

[0108] 2,3-BDO의 생산과 관련된 단백질의 아미노산 서열 및 유전자 서열을 이용하여 *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 존재하는 내재적인 유사 유전자를 검색한 결과, *M. alcaliphilum* 20Z 균주에도 2,3-BDO의 생산과 관련된 단백질을

코딩하는 내재적인 유전자가 존재함을 확인하였으나, *M. alcaliphilum* 20Z 균주 자체는 메탄올 또는 메탄을 공급하는 조건에서도 2,3-BDO를 생산하지 않음을 확인하였다.

[0109] 이러한 숙주 세포의 특성을 연구하기 위하여, 상기 확인된 내재적인 유전자를 발현시키고, 이를 이용하여 2,3-BDO를 생산하고자 하였으나, 발현된 단백질의 활성이 매우 낮은 수준을 나타내어 실질적인 2,3-BDO의 생산이 수행되지 않음을 확인하였다.

[0110] 또한, i20ZR 모델을 사용하여 FBA에 의한 균주내 탄소흐름을 시뮬레이션하였다.

[0111] 대략적으로, flux balance analysis를 이용한 상기 i20ZR-BDO 모델의 이론적인 수율은, 2,3-BDO의 교환 유량(exchange flux of 2,3-BDO)을 목적 함수(objective function)로 사용한 Optflux v3.3.0를 사용하여 산출하였다. 향상된 2,3-BDO 생산 균주를 개발하기 위하여, OptFlux 소프트웨어에 포함된 "진화 최적화(evolutionary optimization)" 알고리즘을 사용하여 유전자 최적화(OptGene)를 수행하였는데, 돌연변이 균주의 시뮬레이션은 MOMA simulation method를 사용하여 수행하였고, 진화 알고리즘은 최대 50,000 번의 솔루션 평가와 6 번의 최대 녹아웃 횟수로 3 회 실행하였다.

[0112] 상기 시뮬레이션 결과, 상기 내재적인 효소의 낮은 활성으로 인하여 피루브산이 α-acetolactate로 전환되지 않고, 대부분 발린, 이소류신 및 류신의 합성에 사용됨을 확인하였다.

[0113] 한편, 상기 숙주 세포에서 2,3-BDO 생산을 더욱 향상시키기 위해, OptGene을 사용하여 호기성 조건하에서 in silico 녹아웃 시뮬레이션을 수행하여, 2,3-BDO 생산성에 영향을 미칠 수 있는 후보 유전자를 발굴하였다(도 5a).

[0114] 도 5a는 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 대상으로 호기성 조건하에서 in silico 녹아웃 시뮬레이션을 수행하여, 2,3-BDO 생산성에 영향을 미칠 수 있는 후보 유전자를 발굴한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0115] 도 5a에서 보듯이, *M. alcaliphilum* 20Z 균주에서 PDH(Pyruvate dehydrogenase), MDH(malate dehydrogenase), ACKr(acetyl kinase) 및 LDH(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 각 유전자를 결실시키면, 2,3-BDO 생산수율이 증가될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0116] 상기 연구결과를 반영하여, *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 내재적으로 존재하는 3종의 유전자를 결실시킨 형질전환체 20ZM3(*M. alcaliphilum* 20Z △*ldh* △*mdh* △*ack*) 균주를 제작하였다. 상기 3종의 유전자는 피루베이트를 각각 말레이트로 전환시키는 MDH를 코딩하는 *mdh* 유전자, 아세테이트로 전환시키는 ACKr를 코딩하는 *ack* 유전자 및 락테이트로 전환시키는 LDH를 코딩하는 *ldh* 유전자이다. 한편, PDH는 공지된 바와 같이 NADH의 생산에 관여하고, 숙주 세포의 생존에 중요한 역할을 담당하기 때문에 PDH를 코딩하는 유전자는 결실시키지 않았다.

[0117] 상기 제작된 20ZM3 균주에 발현벡터 pNBM-Re 및 pNBM-Ri를 각각 도입하여 각각의 형질전환체 20ZM3/pNBM-Re 및 20ZM3/pNBM-Ri를 제작하고, 이들 제작된 형질전환체를 메탄올 또는 메탄을 공급하는 조건에서 배양하여, 2,3-BDO의 생산수율을 측정하였다(도 5b). 이때, 대조군으로는 상기 실시예 2-5에서 사용된 20Z/pBudK.p 균주, 20Z/pNBM-Re 균주 및 20Z/pNBM-Ri 균주를 사용하였다.

[0118] 도 5b는 내재적으로 존재하는 3종의 유전자를 결실된 숙주 세포를 사용하여 제작된 각 형질전환체를 배양하여 산출한 2,3-BDO의 생산수율을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0119] 도 5b에서 보듯이, 내재적으로 존재하는 3종의 유전자를 결실된 숙주 세포를 사용하여 제작된 각 형질전환체는 야생형 숙주 세포를 사용하여 제작된 각 형질전환체에 비하여, 우수한 2,3-BDO 생산성을 나타냄을 확인하였다.

[0120] 또한, 내재적으로 존재하는 3종의 유전자를 결실된 숙주 세포를 사용하여 제작된 각 형질전환체 중에서, 20ZM3/pNBM-Re 균주가 20ZM3/pNBM-Ri 균주보다 상대적으로 우수한 2,3-BDO 생산성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0121] **실시예 3: 2,3-BDO 생산용 형질전환체를 이용한 2,3-BDO의 생산**

[0122] 0.4L 유가식 배양기(fed-batch reactor)를 사용하여 메탄공급 조건으로 상기 실시예 2-7에서 제작된 20ZM3/pNBM-Re 균주를 100시간 동안 배양하면서, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600}), 아세토인의 생산수준(mg/L) 및 2,3-BDO의 생산수준(mg/L)을 측정하였다(도 6a 및 6b). 이때, 메탄(20%), 질소(75%) 및 산소(5%)의 혼합가스는 40 ml/분의 유량으로 지속적으로 공급하였다.

[0123] 도 6a는 메탄공급 조건으로 20ZM3/pNBM-Re 균주를 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 균체의 증식수준(OD_{600})을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0124] 도 6a에서 보듯이, 상기 20ZM3/pNBM-Re 균주의 증식수준은 약 80시간이 경과된 후에 최대 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0125] 도 6b는 메탄공급 조건으로 20ZM3/pNBM-Re 균주를 배양하고, 배양시간의 경과에 따른 아세토인의 생산수준(mg/L) 및 2,3-BDO의 생산수준(mg/L)을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

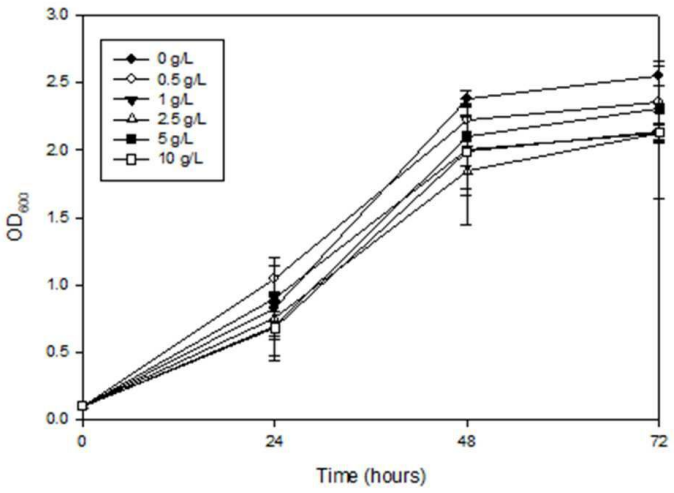
[0126] 도 6b에서 보듯이, 상기 20ZM3/pNBM-Re 균주의 배양시간의 경과에 따라, 아세토인의 생산수준은 지속적으로 증가한 반면, 2,3-BDO의 생산수준은 약 50시간이 경과된 시점에서 급격히 증가되어, 약 60시간이 경과된 시점에서 최대 수준(약 86mg/L)을 나타내고, 이후에는 감소됨을 확인하였다.

[0127] 상기 배양시 소모된 메탄가스 대비 2,3-BDO 생산수율은 약 0.0318로 산출되었으므로, 공급된 메탄의 2.26 몰%가 2,3-BDO로 전환됨을 알 수 있었다.

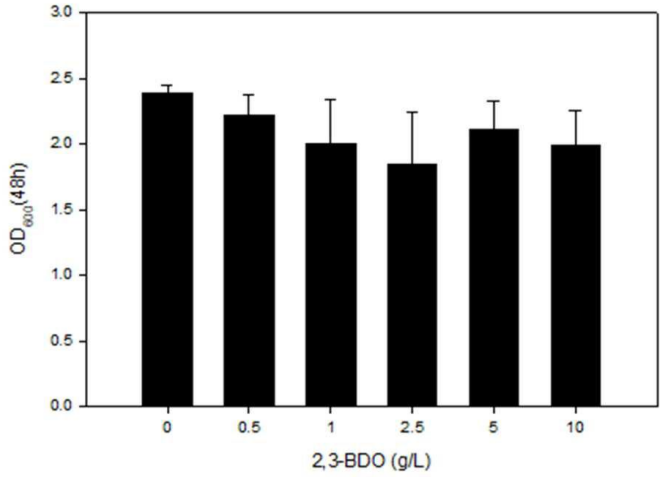
[0128] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

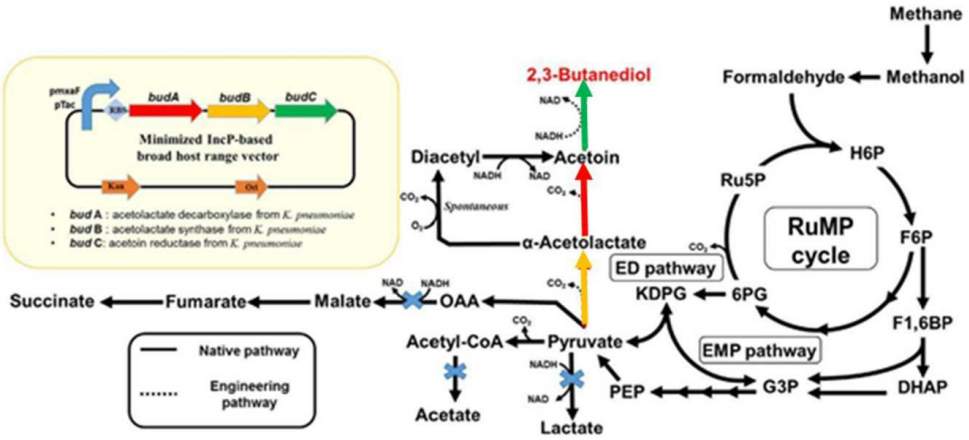
도면1a



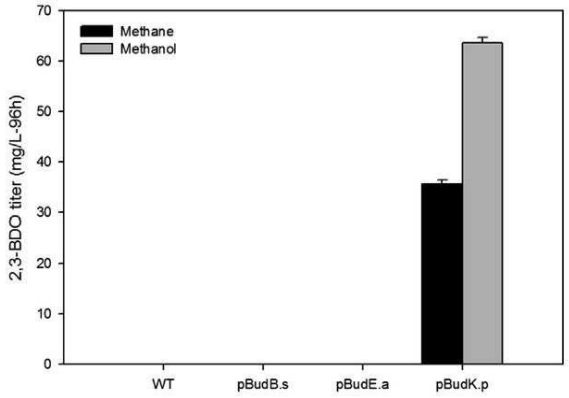
도면1b



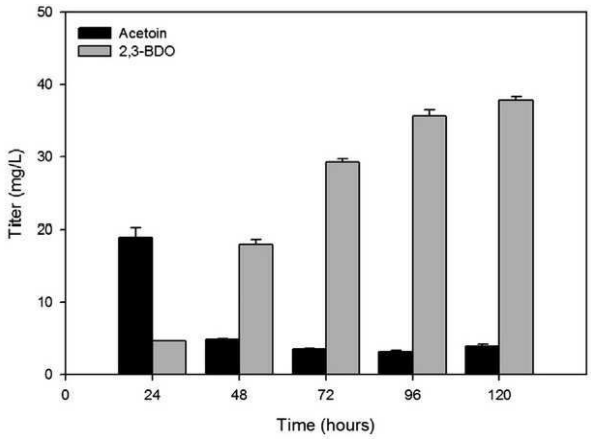
도면2



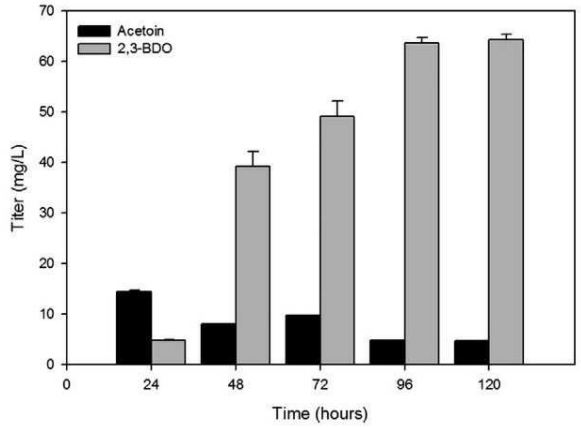
도면3a



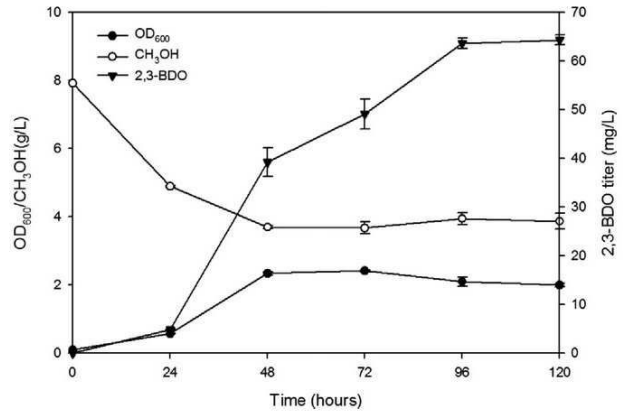
도면3b



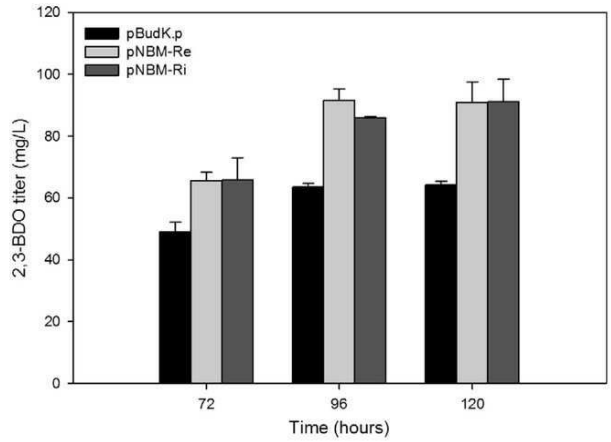
도면3c



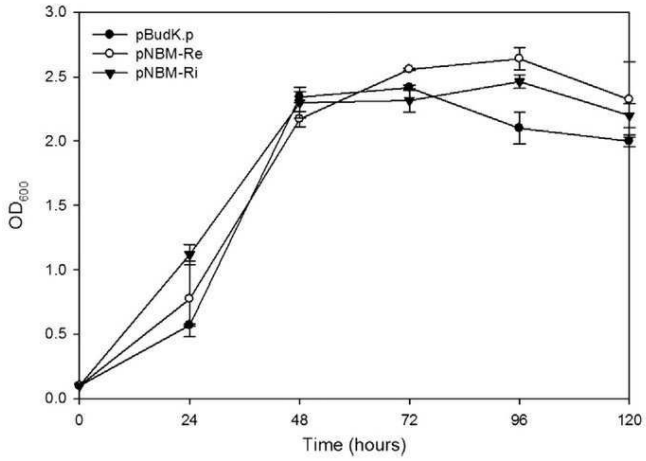
도면3d



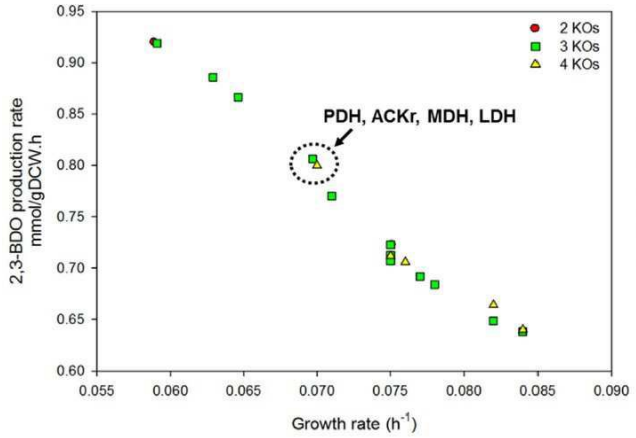
도면4a



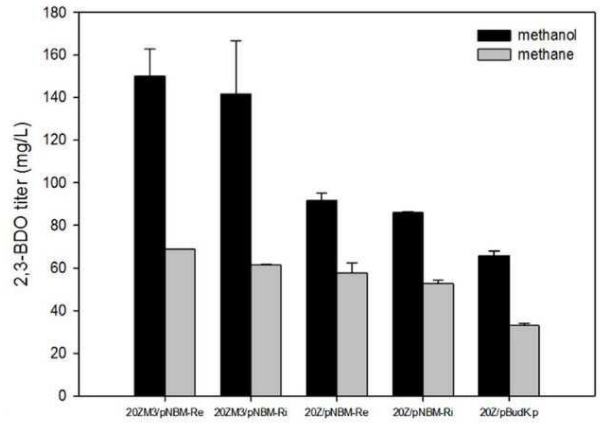
도면4b



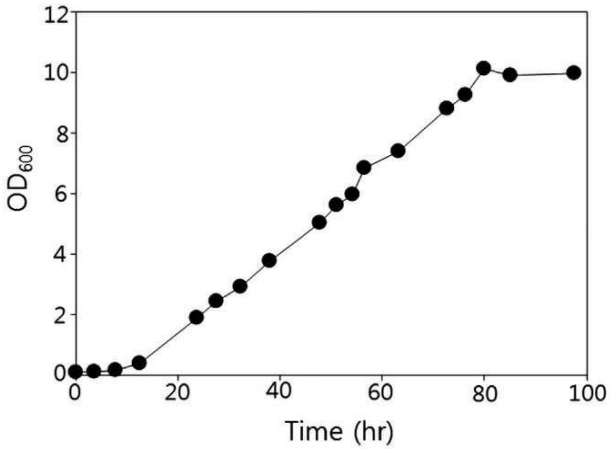
도면5a



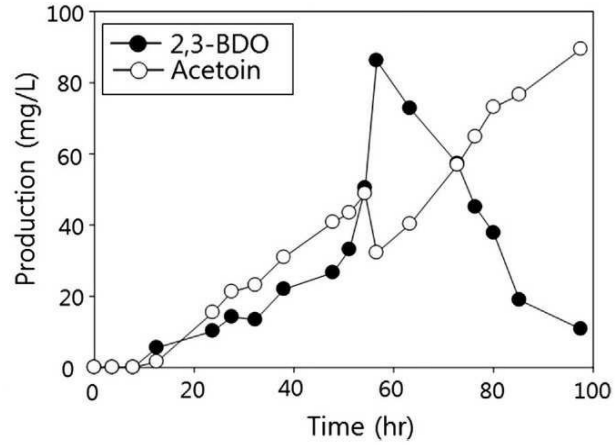
도면5b



도면6a



도면6b



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Engineered methanotrophs for producing 2,3-BOD

<130> KPA181467-KR-P1

<150> KR 10-2019-0044353

<151> 2019-04-16

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant DNA

<400> 1

atgaatcatt ctgctgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaaccct gcgggcgttt 60

tccgcgcagc atcccgagag cgtgctctat cagacatcgc tcatgagcgc cctgctgagc 120

ggggtttacg aaggcagcac caccatcgcc gacctgctga aacacggcga tttcggcctc 180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atcgccttca gcagtcaggt ctatcagctg 240

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg 300

acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc tttgaccatc cggtgagccg ccagcagctg 360

cacgaggtga tcgaccagca aatcccctct gacaacctgt tctgcgccct gcgcatcgac 420

ggccatttcc gccatgccca tacccgcacc gtgccgcgcc agacgccgcc gtaccgggcg 480

atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttccgcttta accagcgcga aggggtgctg 540

gtcggcttcc ggaccccgca gcatatgcag gggatcaacg tcgccgggta tcacgagcat 600

tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggt cacctgctgg attaccagct cgaccacggg 660

gtgctgacct tcggcgaaat tcacaagctg atgatcgacc tgcccgccga cagcgcgttc 720

ctgcaggcta atctgcatcc cgataatctc gatgccgcca tccgttccgt agaaagttaa 780

780

<210> 2

<211> 1713

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant DNA

<400> 2

ttgacaaaag caacaaaaga acaaaaatcc cttgtgaaaa acagaggggc ggagcttgtt 60

gttgattgct tagtggagca aggtgtcaca catgtatttg gcattccagg tgcaaaaatt 120

gatgcggtat ttgacgcttt acaagataaa ggacctgaaa ttatcgttgc ccggcacgaa 180

caaaacgcag cattcatggc ccaagcagtc ggccgtttaa ctggaaaacc gggagtcgtg 240

ttagtcacat caggaccggg tgcctctaac ttggcaacag gcctgctgac agcgaacact 300

gaaggagacc ctgtcgttgc gcttgctgga aacgtgatcc gtgcagatcg tttaaaacgg 360

acacatcaat ctttggataa tgcggcgcta ttccagccga ttacaaaata cagtgtagaa 420

gttcaagatg taaaaaatat accggaagct gttacaaatg catttaggat agcgtcagca 480

gggcaggctg gggccgcttt tgtgagcttt ccgcaagatg ttgtgaatga agtcacaaat 540

acgaaaaacg tgcgtgctgt tgcagcgcca aaactcggtc ctgcagcaga tgatgcaatc 600

agtgcggcca tagcaaaaat ccaaacagca aaacttcctg tcgttttggt cggcatgaaa 660

ggcggaagac cggaagcaat taaagcggtt cgcaagcttt tgaaaaaggt tcagcttcca 720

tttgttgaaa catatcaagc tgccggtacc ctttctagag atttagagga tcaatatttt 780

ggccgtatcg gtttgttccg caaccagcct ggcgatttac tgctagagca ggcagatgtt 840

gttctgacga tcggctatga cccgattgaa tatgatccga aattctggaa tatcaatgga 900

gaccggacaa ttatccattt agacgagatt atcgctgaca ttgatcatgc ttaccagcct 960

gatcttgaat tgatcggtga cattccgtcc acgatcaatc atatcgaaca cgatgctgtg 1020

aaagtggaat ttgcagagcg tgagcagaaa atcctttctg atttaaaaca atatatgcat 1080

gaaggtgagc aggtgcctgc agattggaaa tcagacagag cgcaccctct tgaaatcgtt 1140

aaagagttgc gtaatgcagt cgatgatcat gttacagtaa cttgcgatat cggttcgcac 1200

gccatttgga tgtcacgtta tttccgcagc tacgagccgt taacattaat gatcagtaac 1260

ggtatgcaaa cactcggcgt tgcgcttcct tgggcaatcg gcgcttcatt ggtgaaaccg 1320

ggagaaaaag tggtttctgt ctctggtgac ggcggtttct tattctcagc aatggaatta 1380

gagacagcag ttcgactaaa agcaccaatt gtacacattg tatggaacga cagcacatat 1440

gacatggttg cattccagca attgaaaaaa tataaccgta catctgcggt cgatttcgga 1500

aatatcgata tcgtgaaata tgcggaaagc ttcggagcaa ctggcttgcg cgtagaatca 1560

ccagaccagc tggcagatgt tctgcgtcaa ggcatgaacg ctgaaggtcc tgtcatcatc 1620

gatgtcccgg ttgactacag tgataacatt aatttagcaa gtgacaagct tccgaaagaa 1680

ttcggggaac tcatgaaaac gaaagctctc tag 1713