

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0117213

(43) 공개일자 2021년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 1/20 (2021.05)

(21) 출원번호 10-2021-0035288

(22) 출원일자 2021년03월18일

심사청구일자 2021년03월18일

(30) 우선권주장

1020200033428 2020년03월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호(수서동, 강남대시앙포레아파트)

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동 402호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)

뉴엔 탄 린

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 2-2호(서천동, 진영빌라 4동)

(74) 대리인

위병갑

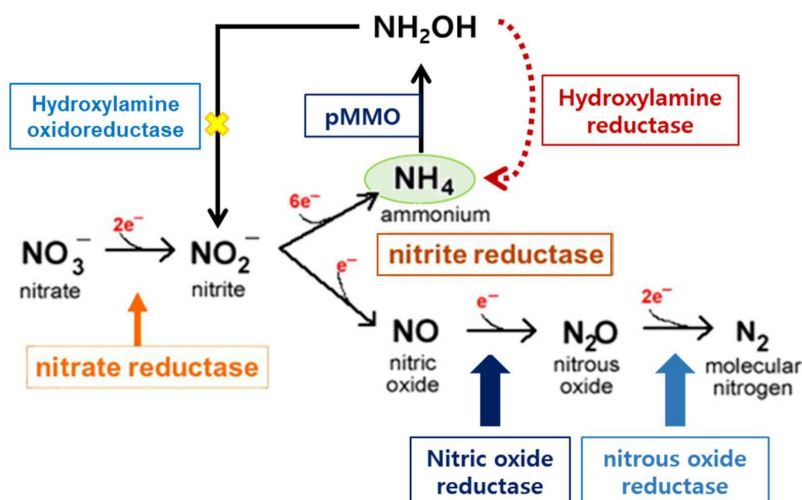
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 세포 성장 및 대사물질 생산이 우수한 형질전환 메탄자화균 및 이의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 질소원으로 암모늄을 제공했을 때, 세포 성장 및 바이오매스의 성장이 우수한 형질전환 메탄자화균에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메탄자화균에 하이드록실아민 환원효소를 과발현시키고, 추가로 하이드록실아민 산화환원효소의 내재된 활성을 결손시킨 형질전환 메탄자화균에 질소원으로 암모늄을 제공하는 AMS 배지에서 세포 성장 및 대사물질의 생산이 우수한 메탄자화균 배양방법에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 저가의 메탄과 암모늄을 각각 탄소원 및 질소원으로 사용하여 세포 성장 및 대사물질을 생산할 수 있는 바, 친환경적이고 경제적으로 메탄자화균의 산업용 균주로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0044 (2013.01)

C12Y 107/99001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105541
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)는 하이드록실아민의 암모늄으로 전환을 촉매하는 효소인, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 추가로 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout)시키는 것을 특징으로 하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터.

청구항 6

하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속 (Methylomonas), 메틸로박터 속 (Methylobacter), 메틸로코커스 속 (Methylococcus), 메틸로스페라 속 (Methylosphaera), 메틸로칼덤 속 (Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속 (Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속 (Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속 (Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속 (Methylogaea), 메틸로마리

넴 속 (*Methylo Marinum*), 메틸로벌럼 속 (*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속 (*Methylo Marinovum*), 메틸로러브럼 속 (*Methylo rubrum*), 메틸로파라코커스 속 (*Methyloparacoccus*), 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*), 메틸로셀라 속 (*Methylocella*), 메틸로캡사 속 (*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속 (*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속 (*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로비움 속 (*Methylacidimicrobium*), 메틸로마이크로비움 속 (*Methylomicrobium*) 또는 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*) 균주인, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질 전환 메탄자화균.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 메틸아시디마이크로비움 속 균주는 메틸아시디마이크로비움 알칼리필리움(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z인, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질 전환 메탄자화균.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 메틸로시너스 속 균주는 메틸로시너스 트리코스포룸(*Methylosinus trichosporium*) 0B3b인, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질 전환 메탄자화균.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 형질 전환 메탄자화균은 질소원으로 암모늄을 사용하는 것을 특징으로 하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질 전환 메탄자화균.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 형질 전환 메탄자화균은 추가로 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)의 활성이 감소 또는 불활성화된 것을 특징으로 하는, 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질 전환 메탄자화균.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항의 형질 전환 메탄자화균을 AMS (ammonium mineral salt)배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균은 배양 시 온실가스를 생성하지 않는 것을 특징으로 하는, 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 온실가스는 일산화질소(nitric oxide, NO) 또는 아질산질소(nitrous oxide, N₂O)인 것을 특징으로 하는, 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균은 암모늄을 질소원으로 사용하여 질산염에서 암모늄을 생산하는 대사과정에서 일어나는 에너지 소모를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 성장 및 대사물질 생산이 우수한 형질전환 메탄자화균 및 이의 배양방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 하이드록실아민 환원효소 과발현을 통해 암모늄을 질소원으로 제공하는 AMS(ammonium mineral salt)배지에서 배양이 가능하며, 질소원으로 질산염을 사용하는 NMS(nitrate mineral salt)배지 배양 대비 세포 에너지학적으로 유리한 형질전환 메탄자화균 및 이의 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 바이오매스로 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.

[0003] 메탄자화균의 성장에는 탄소원인 메탄 외에 질소원이 필수적이며 질소원의 종류에 따라 세포 성장 및 대사물질이 달라질 뿐만 아니라, 세포 배양액의 pH 변화가 달라진다. 일반적으로 메탄자화균은 질산염 또는 암모늄을 질소원으로 사용하는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 질소원으로 암모늄(NH₄⁺)을 사용할 경우, 암모늄과 메탄의 공존은 미립자메탄산화효소(Particulate methane monooxygenase, pMMO)의 경쟁적 억제 및 암모니아를 하이드록실아민(NH₂OH)으로 산화시켜 세포에 독성을 준다. 또한 하이드록실아민은 일산화질소(nitric oxide, NO), 아질산질소(nitrous oxide, N₂O)로 전환됨으로써 온실가스를 유발한다. 하이드록실아민 산화환원효소(HAO)가 없는 메탄자화균은 암모니아의 산화로부터 생성된 하이드록실아민의 독성으로 인해 세포 성장의 지연을 초래한다.

[0005] 질소원으로 질산염(NO₃⁻)을 사용할 경우, 질산염은 질산환원효소(nitrate reductase)에 의해 아질산염(NO₂⁻)로 환원되고, 이어서 아질산염은 아질산환원효소(nitrite reductase)에 의해 암모늄(NH₄⁺)으로 환원된 후, 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)와 글루타민산염 합성효소(glutamate synthetase)를 이용하여 최종적으로 아미노산으로 축적시킨다. 이러한 환원 과정에 필요한 에너지를 메탄 산화 과정에서 얻은 에너지를 사용해야 하므로 에너지 측면에서 불리하다. 반면에, 질소원으로서 암모늄을 사용하는 경우, 이론적으로, 질소원으로서 암모늄을 사용하는 경우, 세포 에너지학적으로 직접 동화될 수 있기 때문에 질산염에 비해 열역학적으로 유리하다(도 1 참조).

[0006] 또한, 메탄자화균의 발효공정에서 질소원은 주요 비용 동인으로 암모늄은 산업 규모에서 바람직한 질소 공급원으로 평가받고 있다. 메탄자화균의 산업적 균주로서의 타당성을 확보하기 위해서는 질소원으로 암모늄을 사용했

을 때 더 유리하다.

[0007] 본 발명은 하이드록실아민 환원효소 과발현을 통해 AMS를 배지로 제공했을 때 세포 성장 및 대사물질의 생산이 우수한 균주를 개발함으로써 메탄자화균이 발효공정의 경제성을 확보하고자 한다. 또한, 하이드록실아민 산화환원효소의 결손함으로써 온실가스를 저감시킬 수 있으며, 질소원으로서 암모늄을 사용함으로써 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양법을 확보하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균을 제공하는 데 있다.

[0010] 이어서, 본 발명의 다른 목적은 AMS(ammonium mineral salt)배지에서 배양가능한 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균 배양방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 상기 재조합 벡터는 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한, 상기 재조합 벡터는 하이드록실아민 환원효소를 코딩하는 유전자 발현용 벡터인 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 재조합 벡터는 하이드록실아민 산화환원효소를 코딩하는 유전자를 결손시키는 결손용 벡터인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 재조합 벡터는 하이드록실아민 환원효소를 코딩하는 유전자를 메탄자화균 염색체 내에 삽입시키는 삽입용 벡터인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명은 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

[0017] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 추가로 하이드록실아민 산화환원효소의 활성이 감소 또는 불활성화된 것을 특징으로 한다.

[0018] 이어서, 상기 형질전환 메탄자화균을 질소원으로 암모늄을 제공하는 AMS 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 저가의 탄소원 및 질소원인 메탄과 암모늄을 사용하여 세포 성장 및 대사물질을 생산할 수 있는 바, 친환경적이고 경제적으로 메탄자화균의 산업용 균주로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 암모늄과 질산염의 메탄자화균 내 대사 경로를 간략히 나타낸 모식도이다.

도 2는 하이드록실아민 환원효소를 과발현 시키기 위하여 제작된 발현용 pAWP89-harNADH 재조합 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 하이드록실아민 환원효소를 과발현 시키기 위하여 제작된 발현용 pAWP89-harMB 재조합 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 하이드록실아민 산화환원효소를 제거하기 위하여 제작된 결손용 벡터 pCM351/hao 벡터의 유전자 지도를

나타낸 것이다.

도 5는 하이드록실아민 산화환원효소를 제거하고 그 위치에 하이드록실아민 환원효소를 삽입하기 위하여 제작된 351-pTharN 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 6는 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z와 형질전환 메탄자화균 20Zhar3를 AMS 배지에서 배양한 세포성장 곡선을 나타낸 것이다.

도 7는 야생형 균주 *M. trichosporium* OB3b와 형질전환 메탄자화균 OB3b-hcp를 AMS 배지에서 배양한 세포성장 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하도록 한다.
- [0022] 도 1은 암모늄과 질산염의 메탄자화균 내 대사 경로를 간략히 나타낸 모식도이며, 하이드록실아민 환원효소의 과발현 및 하이드록실아민 산화환원효소의 결손을 간략히 나타낸 것이다.
- [0023] 도 1을 참조하여 암모늄과 질산염의 메탄자화균 내 대사경로를 설명하자면, 질산염(nitrate, NO_3^-)은 질산 환원 효소(nitrate reductase)에 의해 아질산염(nitrite, NO_2^-)로 환원되고, 아질산염은 아질산환원효소(nitrite reductase)에 의해 암모늄(ammonium, NH_4^+) 또는 산화질소(nitric oxide, NO)으로 환원된다. 암모늄은 질소원으로 사용되거나 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)와 글루타민산염 합성효소(glutamate synthetase)를 이용하여 최종적으로 아미노산으로 축적시키는 반면, 산화질소는 산화질소 환원효소(nitric oxide reductase)에 의해 온실가스인 아산화질소(nitrous oxide) 생성한다. 또한, 암모늄은 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase; pMMO)에 의해 독성이 있는 하이드록실아민(hydroxylamine)으로 산화되고, 하이드록실아민 환원효소는 암모늄의 산화에 의해 생성된 하이드록실아민을 암모늄으로 재환원시키며, 하이드록실아민 산화환원효소는 하이드록실아민으로부터 아질산 생성반응을 촉매한다.
- [0024] 본 발명은 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase, hcp)"는 하이드록실아민(hydroxylamine)을 암모늄으로 전환시키는 효소를 의미한다.
- [0026] 상기 하이드록실아민 환원효소를 코딩하는 유전자(hcp)는 *Methylosinus trichosporium* OB3b 유래일 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 하이드록실아민 환원효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0027] 상기 하이드록실아민 환원효소를 코딩하는 유전자(hcp)는 *Methylobacterium buryatense* 유래일 수 있으며, 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 하이드록실아민 환원효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 재조합 벡터는 추가로 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자를 녹아웃(knockout)시키는 것일 수 있으며, 구체적으로는 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 결손용 벡터일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase, hao)"는 하이드록실아민(hydroxylamine)으로부터 아질산염(nitrite)을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0030] 상기 하이드록실아민 산화환원효소를 코딩하는 유전자(hao)는 *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 하이드록실아민 산화환원효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

이 포함될 수 있다.

- [0031] 이어서, 본 발명은 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된 세포 성장 또는 대사물질 생산 증진용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "메탄자화균(methanotroph)"은 메탄을 주요 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다. 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 본 발명의 목적상 메탄을 탄소원으로 사용하고 질소원으로 암모늄을 사용하는 메탄자화균, 암모늄은 미립자메탄산화효소(Particulate methane monooxygenase, pMMO)에 의해 하이드록실아민으로 산화되고 이는 다시 하이드록실아민 환원효소에 의해 암모늄으로 환원되어 질소원 또는 아미노산 합성에 직접 활용되는 한 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 메탄, 메탄올 등 C₁ 화합물을 탄소원으로 사용하는 메탄올자화균(methylotroph) 중에서 메탄을 함께 사용할 수 있는 균주를 모두 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 메탄자화균은 메탄 등 C₁ 화합물을 에너지원으로 사용할 수 있는 것인한 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박터속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum), 메틸아시디마이크로븀 속(Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로븀(Methylomicrobium) 속 또는 메틸로시너스 속(Methylosinus) 균주 일 수 있으며, 구체적으로 메틸아시디마이크로븀 알칼리필리움(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z 또는 메틸로시너스 트리코스포룸(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 일 수 있다.
- [0034] 이러한 메탄자화균을 이용한 바이오전환 공정의 경우, 비교적 저렴한 메탄과 암모늄을 각각 탄소원과 질소원으로 사용할 수 있어 경제적으로 유리하며, 배양과정에서 온실가스의 방출을 저감하는 등 환경적인 면에서도 장점이 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "형질전환 메탄자화균"은 상기 메탄자화균의 유전자를 도입하거나 또는 제거하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 하이드록실아민 환원효소 (hydroxylamine reductase, hcp)가 과발현된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 질소원으로 암모늄을 제공하는 AMS 배지에서 배양할 때 야생형 메탄자화균에 비해 세포 성장 및 대사물질의 생산이 향상된 것일 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 하이드록실아민 환원효소가 과발현된 형질전환 메탄자화균은 AMS배지에서 보다 효율적인 배양이 가능한 것일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 하이드록실아민 환원효소가 과발현된 형질전환 메탄자화균은 암모늄을 질소원으로 사용하여 AMS(ammonium mineral salt)배지에서 배양이 가능한 것일 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 추가로 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase, hao)의 내재적 활성이 결여된 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 내재적 활성의 결여는 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)를 코딩하는 유전자의 치환, 결실, 및/또는 삽입에 의해 이루어 지는 것일 수 있다.
- [0042] 또한, 대사과정에서 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase)와 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)는 하이드록실아민을 기질로 사용한다. 따라서, 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase)의 활성을 감소 또는 불활성화는 세포 내에 하이드록실아민 환원효소와 하이드록실아민 산화환원효소의 경쟁적 억제를 감소시켜 하이드록실아민 환원효소의 작용을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0043] 마지막으로, 본 발명은 상기 형질전환 메탄자화균을 암모늄이 포함된 AMS (ammonium mineral salt)배지에서 배양하는 단계를 포함하는 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균 배양방법을 제공한다.

[0044] 또한, 상기 세포 에너지학적으로 유리한 메탄자화균은 암모늄을 질소원으로 사용하여 질소원을 질산염으로 사용하는 경우와 비교하여 질산염에서 암모늄을 생산하는 대사과정에서 일어나는 에너지 소모를 감소시키는 것일 수 있으며, 구체적으로는 질산염에서 암모늄을 생산하는데 필요한 전자 8개의 전달과정에서 일어나는 에너지 소모를 감소시키는 것일 수 있다(도 1 참조).

[0045] 본 발명의 일 실시예에서는, *Methylosinus trichosporium* OB3b 또는 *Methylobacterium buryatense* 유래 하이드록실아민 환원효소(hydroxylamine reductase, hcp)를 과발현하고, 하이드록실아민 산화환원효소(hydroxylamine oxidoreductase, hao)의 내재적 활성을 결여시킨 결과, 질소원으로 암모늄을 제공하는 AMS 배지에서 세포 성장 및 대사물질 생산이 향상되는 것을 확인하였다. 상기 대사물질은 아미노산 또는 지방산일 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명은 실시예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1. 질소원 (질산염 또는 암모늄)에 따른 야생형 *M. trichosporium* OB3b 및 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z의 세포 성장 곡선 비교

[0049] Type I, 메탄자화균인 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z와 type II, 메탄자화균 *M. trichosporium* OB3b를 NMS(nitrate mineral salt)와 AMS(ammonium mineral salt)배지에서 각각 배양하였다. 각 야생형 균주는 50ml의 배지가 들어있는 500ml 배플 플라스크(baffled flask)에서 스크류 캡으로 밀봉한 후, 기밀식 주사기(gas-tight syringe)를 사용하여 최종 농도 30%(v/v) 메탄을 공급하였으며 30℃, 및 230 rpm으로 교반하며 배양하였다. 5일간 동일한 조건으로 배양하였으며, 세포 밀도는 1cm 경로 길이의 1.5 ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광 광도계에서 측정하였으며, 각 균주의 아미노산 농도 및 지방산(fatty acid) 농도는 각각 HPLC와 GC를 이용하여 분석하였다.

[0051] 실시예 2. 하이드록실아민 환원효소 과발현용 벡터 및 하이드록실아민 산화환원효소, 아질산 환원효소, 일산화질소 환원효소 결손용 벡터의 제작

[0052] *M. alcaliphilum* 20Z 및 *M. trichosporium* OB3b의 gDNA는 Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)를 사용하여 분리하였으며, 프라이머는 마크로젠(한국)에서 합성하였다(표 1 참조). 모든 플라스미드는 Gibson 어셈블리를 사용하여 제작되었다.

표 1

프라이머	서열
FWD_harNADH	TTCACACAGGAAACAGCTATGTTCTGTTATCAATGCCA
REV_harNADH	GCATCTTCCCGACAACATATCAGGCCGGCGAAAATCGCT
FWD_harMB	TTCACACAGGAAACAGCTGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA
REV_harMB	GCATCTTCCCGACAACATATAGGCCGGCTTTTGTTAGCGA
Rv_harNADH351	GTCAGCTCGAGATCGCTATCAGGCCGGCGAAAATCGCT
Fw_pTharNADH	TGCTTTCGCGACGGATGGAACCGTATTACCGCCTTTGA
REV_pZeoharext	CCATCCGTCGCGAAAGCATCAGTCCTGCTCCTCGGCCA
FWD_haoF2	TAGCGATCTCGAGCTGACCATGGATGAAGACACGCGTT
REV_primer_hao F2	CTGAACGAAAAGCACCCCAA
FWD_primer_hao F1	ACCACTGTCAGTATCGGCAT
REV_primer_hao F1	AACTGACCCCAAGGCCGTCGAGTTGTTGGCCTTTGT
FWD_primer_Zeocin	GGCCTTGTTGGGTCAGTTCC

[0054] 도 2 내지 도 5는 본 발명에서 구축된 재조합 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다. 본 발명에서 구축된 플라스미드 4종은 표 2에 나타내었다.

표 2

플라스미드	특징
pAWP89-harNADH	pAWP89 containing hydroxylamine reductase (hcp) from <i>M. trichosporium</i> OB3b

pAWP89-harMB	pAWP89 containing hydroxylamine reductase (hcp) from <i>Methylobacterium buryatense</i>
pCM351_hao	pCM351, hydroxylamine oxidoreductase (hao) deletion vector
351-pTharN	pCM351- deletion hao with integration of hcp

실시예 3. 하이드록실아민 환원효소의 과발현 및 하이드록실아민 산화환원효소의 결손을 위해 제작된 벡터시스템의 *M. alcaliphilum* 20Z로의 형질전환

실시예 2에서 제작된 각각의 재조합 벡터는 전기충격법을 통하여 *M. alcaliphilum* 20Z 균주에 도입하고 AMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시킨 후, 각 항생제가 첨가된 AMS 고체 배지에 도말 한 후 15일간 배양하여 재조합 균주를 얻었다.

형질전환 메탄자화균을 선별하기 위하여, 16s DNA 분석법을 통하여 *M. alcaliphilum* 20Z임을 확인하고 실시예 2에서 사용한 프라이머를 이용하여 각각의 유전자가 삽입되었는지 확인하였다. 이를 통해 얻은 형질전환 메탄자화균은 표 3과 같다.

표 3

균주	특징
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	An obligate aerobic methane-oxidizing gamma-proteobacterium, used as host strain
20Z_hcp1	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring 351-pTharN
20Z_hcp2	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pAWP89-harNADH with deletion hao
20Z_hcp3	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pAWP89-harMB with deletion hao

실시예 4. 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z와 형질전환 메탄자화균을 이용한 AMS 배지에서의 세포 성장

야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z와 형질전환 메탄자화균을 각각 AMS 배지에 접종한 후, 기밀식 주사기(gas-tight syringe)를 사용하여 최종 농도 30%(v/v) 메탄을 공급하였으며 30℃, 및 230 rpm으로 교반하며 배양하였다. 5일간 동일한 조건으로 배양하였으며, 세포 밀도는 1cm 경로 길이의 1.5 ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광광도계에서 측정하였다.

실시예 5. 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z와 형질전환 메탄자화균을 이용한 AMS 배지에서의 대사물질 생산량 비교

야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z와 형질전환 메탄자화균을 각각 AMS 배지에 접종한 후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 최종 농도 30%(v/v) 메탄을 공급하였으며 30℃, 및 230 rpm으로 교반하며 5일간 배양하였다. 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z는 AMS 배지에서 성장하지 못하는 반면, 20Zhar3 균주는 성장할 수 있었다. AMS에서 배양한 세포의 아미노산 농도를 HPLC를 이용하여 분석하였고, 지방산(fatty acid)의 양을 GC로 분석하였다.

실시예 6. 하이드록실아민 환원효소가 과발현을 위해 제작된 벡터시스템의 *M. trichosporium* OB3b로의 형질전환

상기 실시예 2을 통하여 얻어진 재조합 발현용 벡터 pAWP89-harNADH 또는 pAWP89-harMB를 야생형 메탄자화균 *M. trichosporium* OB3b에 형질전환시키기 위하여, 컨주게이션(conjugation)을 실시하였다.

형질전환 메탄자화균을 선별하기 위하여, 16s DNA 분석법을 통하여 *M. trichosporium* OB3b임을 확인하고 실시예 2에서 사용한 프라이머를 이용하여 각각의 유전자가 삽입되었는지 확인하였다. 이를 통해 얻은 형질전환 메탄자화균은 OB3b_hcp 균주이다.

실시예 7. 야생형 균주 *M. trichosporium*과 형질전환 메탄자화균을 이용한 AMS 배지에서의 세포 성장 및 대사물

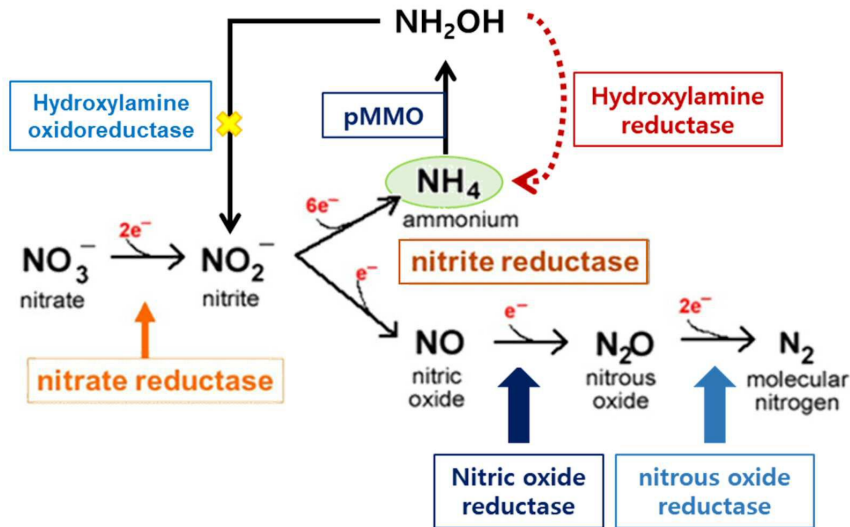
질 비교

[0073]

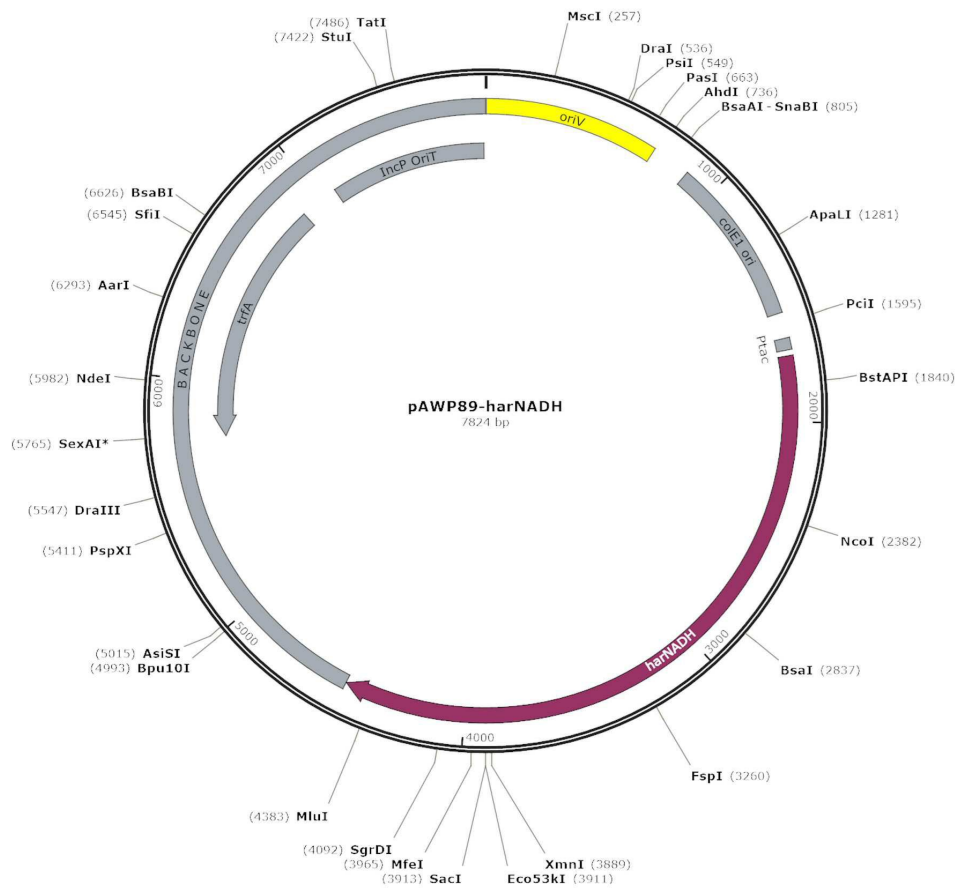
야생형 균주 *M. trichosporium* OB3b와 OB3b_hcp를 각각 AMS 배지에 접종한 후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 최종 농도 30%(v/v) 메탄을 공급하였으며 30℃, 및 230 rpm으로 교반하며 4일간 배양하였다. 세포 밀도는 1cm 경로 길이의 1.5 ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광 광도계에서 측정하였다. 배양시간에 따른 각 균주의 세포 밀도는 야생형 균주 *M. trichosporium* OB3b 대비 OB3b_hcp가 1.38배 향상되었으며 수득한 세포의 아미노산 농도를 HPLC를 이용하여 분석하였고, 지방산(fatty acid)의 양을 GC로 분석하였다.

도면

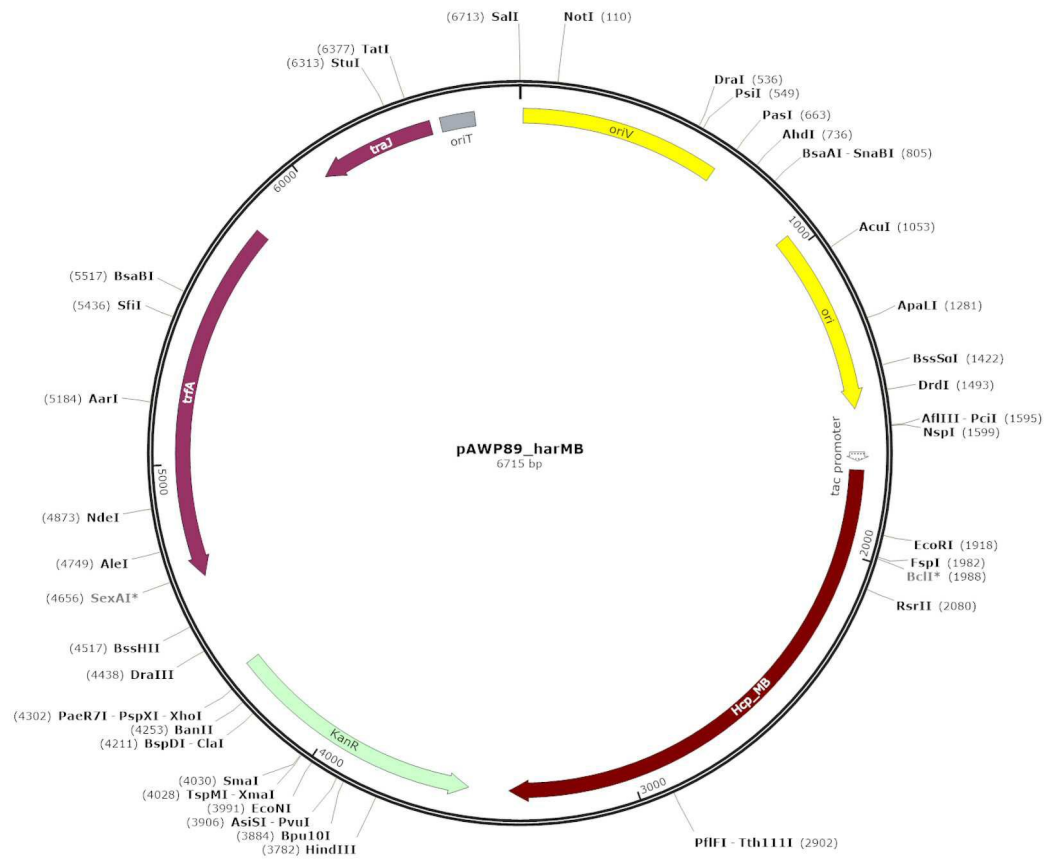
도면1



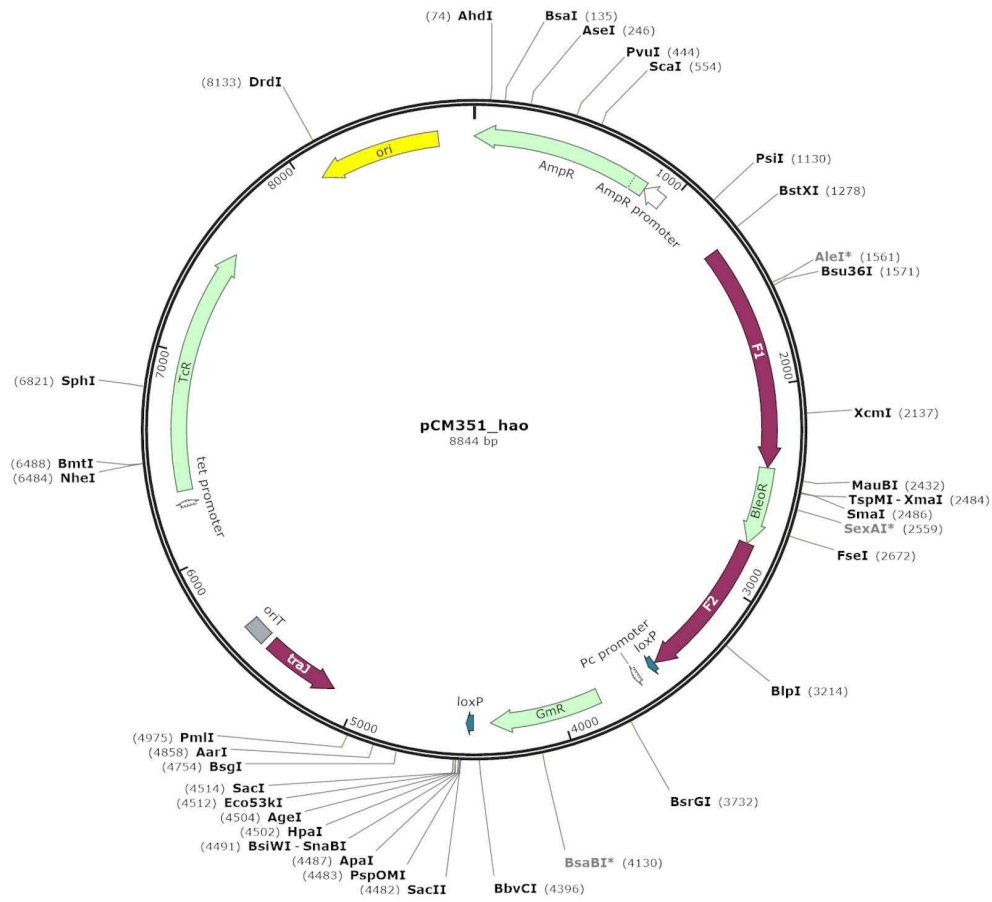
도면2



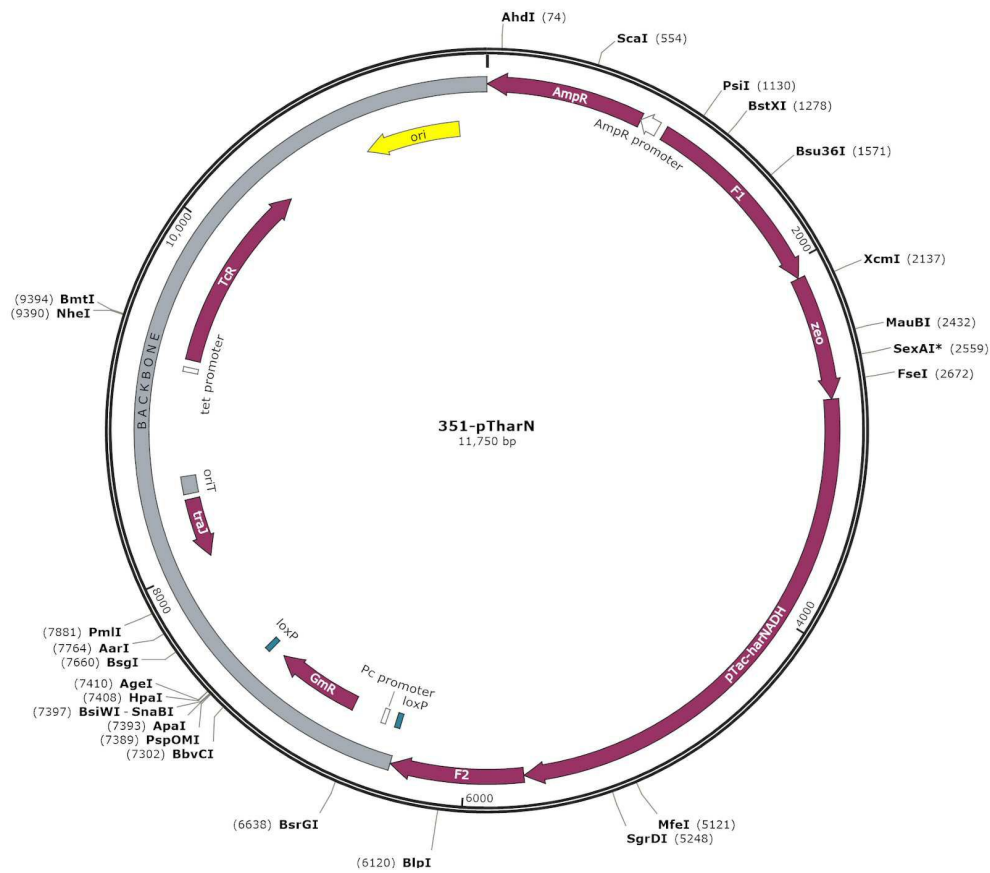
도면3



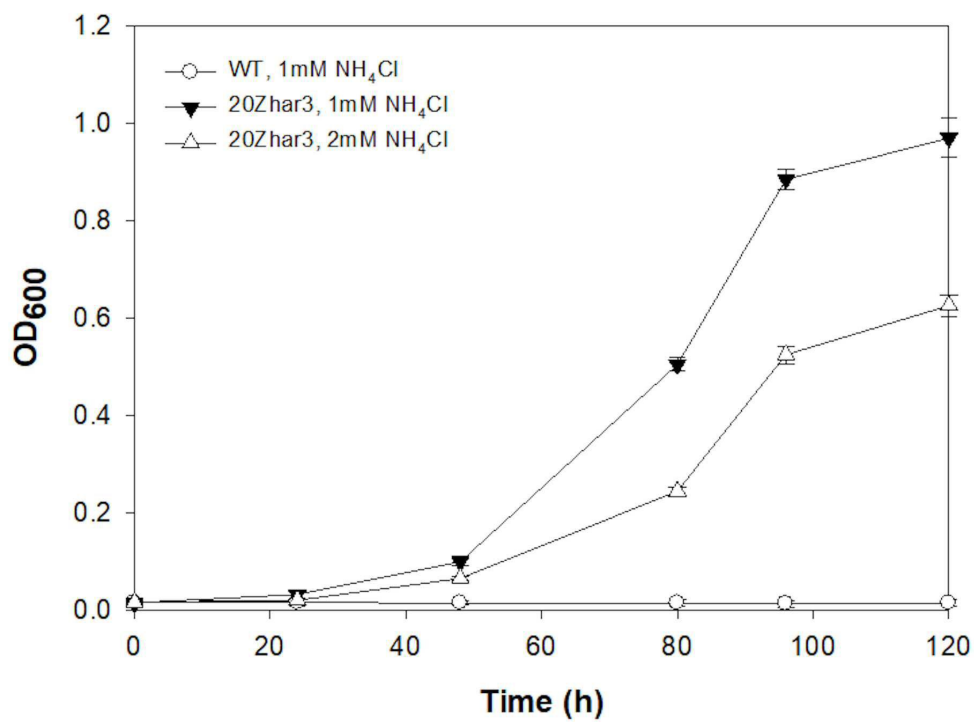
도면4



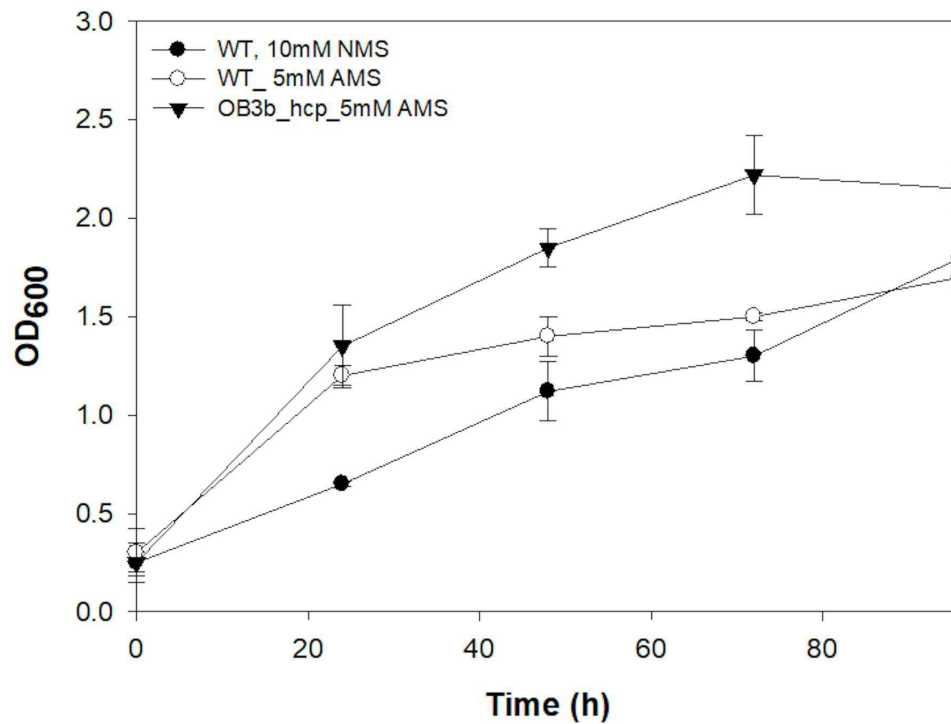
도면5



도면6



도면7



서열 목록

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

<120> methanotrophs having improved cell growth and metabolic production and a culturing method thereof

<130> GKH20P-0045-KR-PRI

<150> KR 10-2020-0033428

<151> 2020-03-18

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hcp from Methylosinus trichosporium OB3b

<400> 1

atgttctgtt atcaatgca gcagacctat cgttcggacg agggcgcggg ctgcgccggg 60

tcgaagggca tgtgtggcaa ggacgccgcg acttcggatt tgcaggacgt gctgctgcat 120

gtctgcgagg ggatcggccca atatctgcat cgcgcccgcg cgctcggcgc gacggacgtc 180
caggccgacc gcttcgtgct ctatgcattc ttcaccacgc tgaccaacgt caatttcaat 240
gcatcaaaat ttgtgctcct gatccaacag gcaggcgaaa tcaagaagcg cgtccaggcg 300
ctctacgaag cggctgcggc aagcgcggga aaggcgcccg aagccctcgc gggcgcggcc 360
gctttcattc ccgcagccga actcgtatggg ctctcaccg aggcggccgt ggcgtccgtg 420
aaaaaggacg cggttgtgct cggcgcggat gtcgtcgggc ttcgatcgtt ggtcctttat 480

ggactgaagg gcgtctgcgc ttacgcgcat cagccgagg tgctcggcga ggagcgggac 540
gcgatctacg aagcggtcga gcatgcgtc gatctcctcg ccggcggctc cgaggaaatc 600
ggcccgtcgc tcgaagaagc tctggcgtc ggccgcgcca atttcctcgc catggaggcg 660
ctcgtatccg ccaacaccgg caatttcgga acgcccgcgc cgacgcgggt ccgcgtgacg 720
cccagaaagg gaaaggcggt gtcgttttcc ggtcacgata tgaaggatct ctgcgccatt 780
ctcgaagcca ccaaggacaa gggaatcgac gtctacacgc atggcgaatt gctccccgcg 840
cactcctatc ccaagctcaa ggcttatccg catctcgccg gcaattacgg cggcgcctgg 900

caggatcaac aaaggaggtt cgccgagttt ccgggtccga tcgtcatgac ctccaactgt 960
ctgatcgagc cgcagcccg cttatcgccg cgcatttca ccgcccggcc ggtcggctgg 1020
ccgggaattc ggcatatcga gaacggcgat ttctccatcg tcgcgcaagc ggccgccgt 1080
ctgccgggtt tcgcggagga tgccggcgag gagaccgtca ccattggatt tggccgcgac 1140
acggtgctcg gcgtcgccga caaggtgatc gaggcggtga aggcgggggc gatccgccac 1200
tttttcttgg tcggcggctg cgacggcgcg gcgccgggac gaaactatta taccgacttc 1260
gccgagcatg cgccgcagga caggttggtg ttgacactcg gctcgggcaa atatcgcttc 1320

aatcgatatg acttcggaac gatcggcggc ttgccccgcc tcttcgacat gggccagtgc 1380
aacgacgctt attcggtctt cgtcgtcgcg accaagctcg ccgaggtttt cggcgtgggc 1440
gtgaacgaat tgccattgtc gttgatcgtt tcttggttcg agcagaaagc cgccgccgtg 1500
ctgctgaccc tgctggcgct gggggtgcgc aatgttcggc tcggcccgac gctgccggcc 1560
ttttctgacg cgccgctgat cgatgtgctg gtcgaaaaat tcggcgtgct gccgatcacg 1620
gacgccaagg ccgacatcga agcttcgctc gcgcggggccg cgtga 1665

<210> 2

<211> 1665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hcp from *Methylobacterium buryatense*

<400> 2

atgttttgc	atcaatgcga	acaaaccacc	cgttccgaaa	ccggtagcgg	ctgccaggaa	60
gtcaaaggcg	tatgcggtaa	agatgaaacg	accgccgatt	tacaagactt	gatgatatac	120
ggcctgcaag	gcatcgctca	atatgccacc	cgttacgga	aattgggcga	ggcgcaacct	180
aaagccgatg	aattcatgct	ctatgcctta	ttcaccacgc	tgaccaatgt	taatttcaat	240
gccaacccgat	ttgcgcaatt	gatcaaagaa	accgctcaat	ggcgtgacca	actcaaatca	300
cactatcaag	aactggccgc	acagcaaggc	gaggcggttg	aagatttggg	cggtcgggcc	360
cagtggcagc	ccgccggcac	tatgccgggc	ttgttgatac	aggcgaaaga	ggcggcgatc	420
aatgtggaat	tagcgcaagt	aggcgaggac	atcatcggtt	tgccggccat	gctgttgtat	480
ggatatcaaag	gcgctgccgc	ttatgcttat	cacgccttga	tgctaggcta	tcgcgacgat	540
gacatttacg	ccggctttga	acaagcgtg	gaatttctgg	cgactcatcc	gaccgatgcc	600
gatgcgctat	tggcgtgggc	attacgcata	ggtgaattga	actatcgggt	tatggccatg	660
ttggatgccg	ccaataccgg	cagtttcggc	gccagcaac	ccggcacggt	caatctggcg	720
ccggtcaaag	gtaaagccat	cttggtcagc	ggtcacgacc	tgcatgacct	ggcgcaattg	780
ctggagcaga	ctcaaggact	ggggatcaat	gtctacaccc	acggtgaaat	gctgccggcg	840
cacgcctatc	ccaaattaaa	agcctatccg	catctgtcgg	gtaattacgg	gtcggcctgg	900
caaaatcagc	ataacgattt	taccgcgttt	ccgggaccta	tcttgatgac	ctccaattgt	960
ctagtcgagc	cggcccatgc	ctatcggcaa	cggatcttta	ccgcgggacc	ggtgggttgg	1020
ccaggcgtea	gacatatcca	aaacggggat	tttgcgccgg	tgatagccgc	cgctcacgcg	1080
ctgcccgcat	ttaccaaaaga	tgaaccggaa	cacttgatta	acgtcggttt	cggtcgcgat	1140
gccgtaattg	gagttgccga	taaagtcatt	gacgcggtca	aaaccggagc	gattcaacat	1200
ttctttttga	tcggcggttg	cgacggcgcg	gccccgggcc	ggaattat	taccgaagtg	1260
gccgaacaag	ctcccgacga	tagcgtgatt	ctaaccctcg	gttgcggcaa	ataccgcttc	1320
aacagccacg	atttcggtgc	cataggcggc	attcctcggt	tgctggacat	gggccaatgc	1380
aacgagcct	attcagccat	tcaagtcgcg	tccgatttag	ccaaggcttt	cgattgcggc	1440
gtcaacgatt	taccgttgtc	aatgatgata	tcttggtttg	aacaaaaagc	cgttgcggtg	1500
ctattgacct	tgctggcgct	gggcattcgc	ggcattcgtc	tcggccccgac	cctgccggca	1560
ttcttgacce	cggccttatt	ggctaaactg	agcgaggcat	tcgacttaaa	agccaccggc	1620
acggctaccg	acgatattcg	cgatgcgcta	caaaaagccg	cctaa		1665

<210> 3

<211> 1656

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hao

<400> 3

atgaaaaaca aatcgctcag tttactgac gcgttggtgt tcagtcctaat cgggtttgga	60
gtgggtaatt ttgccttcgc cgcacaaccc gatttcgaac aacttaaaaa agattattac	120
gaatcgcatc cggggaaagg atctcacggt aaatatggg agccgattcc tattcaaaaa	180
tattggaatc ccaaagattt ctatacacca cctaaaaccg ttcagggcga agttggtcgc	240
gatacctgta tcggttgta ccaaagcacc tcacccggcg cattccatgc ttggaaaaac	300
agtgttcattg gcgatttgaa aaagatccgc aacttgccgg atagcgacgt gcgcgcctat	360
aaaaagaaaa aattagcga agtcgaagcc aatttgacaa agctaggctt gctcgacaaa	420
ggccaacaac tcgaccaagt cggttgtatc gactgtcatg gcggtgtcgg caaagacacc	480
atcaatcatg ccgaaaatct ggtcatgccg gaccgggtcg cttgcggtac ttgccatttg	540
agcgagtttg ccgaagccga agccgaaaaa gaccaggagt ggccgcaaaa gcaatggagt	600
aaaggccatc cticgcatgc tgtcgattgg gaagcgaatg tcgaaaacac gatttgggcg	660
gcgatgcccg agcgtgaagt cgcgcaaggc tgcgacatgt gccactatca gcaaaacaaa	720
tcgcacggct gtcatacccg gcacaccttt tcggtcgccg aagctagaca acccgaagct	780
tgtgcgactt gtcacaacgg cgtcgatcat aatgagtttg aaaacttcat gatgtcgaag	840
cacggtagcg agtatcaaac tttgggtaaa gccaactgga atttcgaagt accattgaaa	900
gacgcatcgc ctaaaggcgg ctataccgcg ccgacctgtc aatttgttca tttcgaatac	960
aagggcgaat actcgacaaa cctggtgcgc aaggtgcggt gggcgttcaa tccgactcgg	1020
gctatcgccg acaacctggg tcatccttgg ttcgaagagc gtaaagagtc atgggtagag	1080
actttagtgc tgtgtcactc ggccagtttt gccaaagctt acctcgatgc ggccgataaa	1140
ggcacgattc aagggttcgc ggttgagcag gaagccaaaa aagtcattaa caaactctat	1200
gacgatggtt tattagtcgg ccaaaacagc aatcgccgg cacctcctgc acctgaaaaa	1260
gatgcggccg gcggattctt ccaactgttc tgggctaaag gcaataatcc aagccatgtt	1320
gaaagagttt atgccgatat gtgggaacat gatgtcatca agcactataa aggtatcttc	1380
catgcgaatc ccggcggttt tacttacact gagggtttgt cgaacctgat gcgcggttac	1440
actgagatca tggatgaaga cagcggtttg cgcgaaatgg ccgcatgaa atcgggcggt	1500
aaattgcaaa cggtttccgc ttcggcccaa caacagtcct cggacaaaaga taacagcttg	1560
ctccttagtg cattgttgtt gattgcattc ggttaggca ttgcttactt gatgctaaag	1620

cctgcaaaac cagaatcgga tcaaggacag aagtga

1656