

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A01N 43/38* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A01N 43/38 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0015680

(22) 출원일자 2021년02월03일
 심사청구일자 2021년02월03일

(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
 희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자
 이은열
 서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호
 (수서동, 강남테시아포레아파트)

판 녹 답
 경기도 수원시 영통동 영일로 21번길 14, 103호
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 특허법인 이노

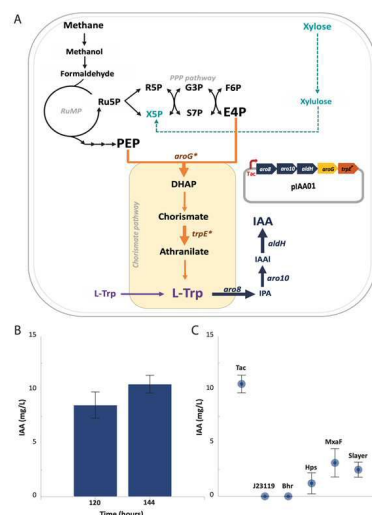
전체 청구항 수 : 총 15 항

- (54) 발명의 명칭 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄다화균 및 이를 이용한 식물성장촉진호르몬 생산방법

(57) 요약

본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 본 발명은 3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트 합성효소(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, DAHP synthase)를 코딩하는 제1유전자, 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)를 코딩하는 제2유전자, 인돌-3-피루브산 (indole-3-pyruvic acid, IPA) 합성효소를 코딩하는 제3유전자, 인돌-3-아세트 알데히드(indole-3-acetaldehyde, IAA1) 합성효소를 코딩하는 제4유전자, 및 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA) 합성효소를 코딩하는 제5유전자를 포함하는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/0073 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12Y 102/01003 (2013.01)
C12Y 205/01054 (2013.01)
C12Y 401/01043 (2013.01)
C12Y 401/03027 (2013.01)
C12Y 114/13168 (2015.07)

(72) 발명자

짜우 황 쯡 띠

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 진영빌라 4동1-3호 (서천동, 진영빌라 4동)

마이 황 안 용

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 진영빌라 4동2-1호 (서천동, 진영빌라 4동)

뉴엔 덕 안

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 진영빌라 4동2-2호 (서천동, 진영빌라 4동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1171110554
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 군주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트 합성효소(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, DAHP synthase)를 코딩하는 제1유전자,
 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)를 코딩하는 제2유전자,
 인돌-3-피루브산(indole-3-pyruvic acid, IPA) 합성효소를 코딩하는 제3유전자,
 인돌-3-아세트 알데히드(indole-3-acetaldehyde, IAA1) 합성효소를 코딩하는 제4유전자, 및
 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA) 합성효소를 코딩하는 제5유전자를 포함하는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 제1유전자는 aroG 유전자 또는 서열번호 1를 포함하는 aroG 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 3

제1항에 있어서,
 상기 3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트 합성효소는 서열번호 1의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에서 147번째 아미노산인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 제2유전자는 trpE 유전자 또는 서열번호 2를 포함하는 trpE 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 5

제1항에 있어서,
 상기 안트라닐레이트 합성효소는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에서 40번째 세린인 페닐알라닌으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제3유전자는 aro8 유전자 또는 서열번호 3를 포함하는 aro8 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제4유전자는 aro10 유전자 또는 서열번호 4를 포함하는 aro10 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제5유전자는 aldH 유전자 또는 서열번호 5를 포함하는 aldH 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 9

제1항에 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), 메틸로마리넘 속(Methylomarimum), 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), 메틸아시디마이크로븀속 (Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로븀 (Methylomicrobium) 속 또는 메틸로시 너스 속 (Methylosinus) 균주인 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균.

청구항 10

제1항 내지 제9항 어느 한 항의 메탄자화균 또는 이의 배양액; 및 메탄;을 포함하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물에 자일로스가 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물에 텅스텐이 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

논에서 발생하는 상기 메탄과 메탄자화균 또는 이의 배양액으로 하여금 생성된 식물성장촉진호르몬은 벼의 생장에 도움이 되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 메탄자화균을 탄소원으로 메탄이 포함된 배지에 접종하여 배양하는 단계;

상기 배양된 배양액에서, 상등액을 회수하는 단계; 및

회수된 상등액에서 식물성장촉진호르몬을 수득하는 단계를 포함하는, 식물성장촉진호르몬 생산방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 탄소원으로 자일로스가 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 조작방법을 이용하여 식물성장촉진호르몬의 한 종류인 인돌아세트산(IAA)(indole acetic acid) 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 식물성장촉진호르몬 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄가스는 천연가스와 셰일가스의 주성분이며 온실효과를 일으키는 원인 물질로 알려져있다. 석유로 대표되는 액체 탄화수소와는 달리 메탄은 그 자체만으로는 기체이기 때문에 고부가가치 사물로의 전환이 어렵고 연료로서의 사용 또한 어렵다고 평가된다. 그에 따라 메탄가스를 유용성을 지닌 화합물로 전환하고자 하는 노력이 계속되어 왔다.

[0004] 메탄은 지구 온난화 조절에 중요한 역할을하는 중요한 온실 가스(GHG)로 간주된다. 천연가스의 한 종류인 메탄은 태양으로부터 복사 에너지를 가두어 왔으며 생명체가 출현할 수 있도록 지구를 충분히 따뜻하게 유지하였으나 산업화와 문명의 급속한 확장으로 인해 농업, 축산 및 에너지 생산에서 발생하는 인위적 메탄 배출량은 천연 배출량을 훨씬 초과한 상태이다. 이러한 불균형은 지구탄소순환의 재분배와 기후변화를 가져왔다. 총 메탄 배출량 증가에 대한 각 공급원의 상대적 기여는 과학적 논쟁의 주제로 남아 있지만 그 결과는 분명하다. 대기의 메탄 수준은 놀라운 속도로 증가하고 있으며 지구 온난화에 크게 기여하고 있다. 특히 메탄 농도가 높아지면 대기의 산화 능력이 감소하고 메탄 및 기타 온실 가스의 수명이 더욱 늘어난다.

[0005] 농업은 전 세계적으로 메탄 배출의 주요 인위적 원천 중 하나이다. 지속 가능한 미래를 위해 인류가 직면해야하는 주요 과제 중 하나는 인위적 활동의 영향을 최소화하면서 점점 더 가혹한 환경에서 작물 수확량을 개선할 수 있는 방법을 찾는 것이다. 세계 인구는 2050년까지 91억명에 이를 것으로 예상되며,이 인구를 먹여 살리려면 세계 식량 생산이 70% 증가해야 한다. 그러나 토양 침식, 해수면 상승, 인간 활동 및 토지 이용 변화로 인한 예측할 수 없는 결과는 농지 부족의 위협을 악화시키고 있다. 최근에는이 문제를 해결하기 위해보다 지속 가능한 농업 관행이 개발되고 홍보되고 있다. 식물성장촉진 박테리아 (PGPB)는 생산성 향상, 금속 이온 및 염도 내성 향상, 병원균 억제와 같은 다양한 이점을 제공할 수 있는 녹색 기술로 부상했다. 식물성장촉진 박테리아 (PGPB)를 사용하면 화학 비료의 필요성이 줄어들어 토양 건강이 향상된다. 그러나 농지의 메탄 배출과 관련된 문제는 여전히 간과되고 있다.

[0006] 최근에 지속 가능한 농업을 위해 식물성장 촉진 박테리아 활용이 제시되었으며, 생산성 향상, 금속 이온 및 염도 내성 향상, 병원균 억제와 같은 다양한 이점을 제공할 수 있는 녹색 기술로 부상되고 있다. 식물성장 촉진

박테리아를 사용하면 화학 비료의 필요성이 줄어들어 토양 황폐화를 막을 수 있다. 본 발명에서는 이러한 장점을 살리면서 농지에서 나오는 메탄 배출을 줄이는 새로운 개념의 식물성장 촉진 박테리아를 개발한 것이다.

[0007] 식물성장 촉진 박테리아로 메탄자화균을 대사공학적으로 개량하여 온실가스인 메탄을 분해하고, 이를 식물성장 호르몬으로 전환하여 분비시킴으로써 유익한 식물-미생물 상호 작용을 제공하는 지속 가능한 농업을 위한 미생물 비료로 사용될 수 있는 새로운 개념의 식물성장 촉진 메탄자화균을 개발하였다.

[0008] 메탄자화균(Methanotrophic bacteria)은 메탄을 유일한 에너지원으로 생육할 수 있는 미생물로, 1906년에 Sohngen에 의해 처음으로 분리되었다. 그 후, 분류학적 연구로 세포의 형태, 정지기의 세포 또는 세포내막구조의 형태에 따라 25종으로 분류되었다. 이러한 메탄산화세균은 메탄 모노옥시게나아제(monooxygenases, MMO)라는 효소를 함유하고 있어 상온, 상압하에서도 용이하게 메탄을 메탄올로 전환할 수 있다. 메탄은 메탄 모노옥시게나아제에 의해 메탄올로 산화되고, 그 다음, 메탄올은 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)에 의해 포름알데히드(formaldehyde) 또는 포름산으로 산화되어 이산화탄소가 된다. 이러한 메탄으로부터 탄소화합물의 생합성은 리불로오스 일인산 회로(ribulose monophosphate cycle; RuMP cycle)와 세린 회로(serine cycle)에 의해 진행되고, 일반적으로 type I의 메탄산화세균은 리불로오스 일인산 회로를, type II의 메탄산화세균은 세린 회로를 이용하여 바이오매스를 합성한다고 알려져 있다(Biocatalytic Conversion of Methane to Methanol as a Key Step for Development of Methane-Based Biorefineries J Microbiol Biotechnol In Yeub Hwang et al(2014), 24(12), 1597-605). 이러한 메탄산화세균이 갖는 생리학적 특성으로 인해, 메탄산화세균을 이용하여 메탄을 유기화합물로 전환시켜, 유해한 메탄가스를 절감시키려는 노력과 에너지원으로 활용하려는 노력이 계속되어 왔다.

[0009] 식물성장촉진 박테리아 (PGPB)를 주요개념으로 사용하는 메탄자화균은 온실 가스 흡수를 통해 토양의 탄소 순환을 적극적으로 제어하고 식물-호르몬 분비를 통해 유익한 식물-미생물 상호 작용을 제공하는 지속 가능한 농업을 위한 새로운 플랫폼으로 간주 될 수 있다. 자연에서 메탄자화균은 메탄을 산화시킬 수 있는 독특한 박테리아 그룹입니다. 최근에서 일부 메탄자화균은 질소 고정에도 역할을 한다. 따라서 메탄자화균의 사용은 증가하는 대기 메탄 수준을 완화하고 미래의 식량 안보에 직접적으로 기여하는 혁신적인 방법이 될 수 있다.

[0010] 발현 벡터, 유전자 결실을위한 자살 벡터, C1 동화 경로에 대한 더 나은 이해를 포함한 유전 도구의 최근 개발은 메탄에서 다양한 산물을 생산할 수 있는 메탄자화균의 대사 공학을 가능하게 되었다. 대사 공학을 통해 다양한 식물 호르몬이 메탄자화균과 같은 비천원 숙주에서 합성될 수 있다. 조작된 메탄자화균이 혹독한 환경에 영향을 받는 작물의 성장 촉진을 위한 플랫폼 군주가 될 수 있는 방법을 입증하기 위해 호염성 메탄자화균인 *Methylovibrio alcaliphilum* 20Z가 여러 식물 발달을 자극하는 식물 호르몬인 인돌아세트산(indole-3-acetic acid) (IAA)를 생산하도록 설계되었다.

[0011] 세포 분열, 신장 및 분화와 같은 사건은 식염수 조건에서 비생물적 스트레스 내성을 유도한다. 이 발명은 IAA 생산 균주를 사용하여 높은 염분 조건에서 밀 종자의 발아 자극 및 초기 성장 향상을 추가로 입증했다. 결과는 식물의 생산성과 성장을 향상시키고 농업 활동으로 인한 메탄 배출을 줄임으로써 식물 성장을 촉진하는 메타 영양 박테리아가보다 지속 가능한 농업에 기여할 수 있는 새롭고 친환경적인 접근 방식이 될 수 있음을 보여주었다

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명이 이루고자 하는 과제는 상기한 문제점을 해결하기 위하여, IAA 생산의 전구체인 트립토판의 과잉생산 메탄화자균을 이용하는 것으로 *S. cerevisiae*의 *aro8* 및 *aro10*와 함께 *E. coli*의 *aldH*, *aroG*^{fbr(D146N)} 및 *trpE*^{fbr(S40F)}은 *M. alcaliphilum* 20Z의 P_{tac} 프로모터로 인해 발현되는 인돌아세트산(IAA)(indole acetic acid) 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한 본 발명은 염분이나 중금속 오염과 같은 가혹한 조건에서 식물 성장을 촉진하는 식물 호르몬을 생성하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트 합성효소(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, DAHP synthase)를 코딩하는 제1유전자, 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)를 코딩하는 제2유전자, 인돌-3-피루브산(indole-3-pyruvic acid, IPA) 합성효소를 코딩하는 제3유전자, 인돌-3-아세트 알데히드(indole-3-acetaldehyde, IAAI) 합성효소를 코딩하는 제4유전자, 및 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA) 합성효소를 코딩하는 제5유전자를 포함하는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명의 상기 제1유전자는 aroG 유전자 또는 서열번호 1를 포함하는 aroG 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명의 상기 3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트 합성효소는 서열번호 1의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에서 147번째 아미노산인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명의 상기 제2유전자는 trpE 유전자 또는 서열번호 2를 포함하는 trpE 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명의 상기 안트라닐레이트 합성효소는 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에서 40번째 세린인 페닐알라닌으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명의 상기 제3유전자는 aro8 유전자 또는 서열번호 3를 포함하는 aro8 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명의 상기 제4유전자는 aro10 유전자 또는 서열번호 4를 포함하는 aro10 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명의 상기 제5유전자는 aldH 유전자 또는 서열번호 5를 포함하는 aldH 유전자인 것에 특징이 있는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 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), 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), 메틸아시디마이크로븀속(Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로븀(Methylomicrobium) 속 또는 메틸로시너스 속(Methylosinus) 균주인 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 상기 메탄자화균 또는 이의 배양액; 및 메탄;를 포함하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 상기 조성물에 자일로스가 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 조성물에 텅스텐이 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한 본 발명은 논에서 발생하는 상기 메탄과 메탄자화균 또는 이의 배양액으로 하여금 생성된 식물성장촉진호르몬은 벼의 생장에 도움이 되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산용 조성물을 제공한다.
- [0029] 또한 본 발명은 상기 메탄자화균을 탄소원으로 메탄이 포함된 배지에 접종하여 배양하는 단계; 상기 배양된 배양액에서, 상등액을 회수하는 단계; 및 회수된 상등액에서 식물성장촉진호르몬을 수득하는 단계 포함하는, 식물성장촉진호르몬 생산방법제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 상기 상기 탄소원으로 자일로스가 추가 포함되는 것을 특징으로 하는 식물성장촉진호르몬 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명인 인돌아세트산(IAA)(indole acetic acid) 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균은 IAA 생산의 전구체인 트립토판의 과잉생산 메탄화자균을 이용하는 것으로 *S. cerevisiae*의 *aro8* 및 *aro10*와 함께 *E. coli*의 *aldH*, *aroG*^{fbr(D146N)} 및 *trpE*^{fbr(S40F)}은 *M. alcaliphilum* 20Z의 P_{tac} 프로모터로 인해 발현된다.

[0033] 본 발명인 형질전환 메탄자화균에 의해 생성되는 IAA는 염분이나 중금속 오염과 같은 가혹한 조건에서 식물 성장을 촉진하는 식물 호르몬의 특징이 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 *M. alcaliphilum* 20Z에서 L- 트립토판 과잉 생산의 대사 공학에 관한 것으로 (A) *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판 생산을 위한 제안된 경로, (B) 모 균주 20Z^X 및 트립토판 생산 균주 RS00의 성장 대 시간, (C) 144 시간의 메탄 배양에서 부모 및 RS00 균주 모두에서 트립토판 생산에 대한 도면이다.

도 2는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 IAA 생산의 대사 공학에 관한 것으로, (A) *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판으로부터 IAA 생산을위한 제안된 경로, (B) 재배 120 시간 및 144 시간에서 메탄에 대한 RS01 균주의 IAA 생산, (C) 상이한 프로모터의 구동하에 배양 144 시간에서 IAA 생산의 비교에 대한 도면이다.

도 3은 공동 기질 배양을 통한 제품 역가의 향상에 관한 것으로, (A) 메탄 및 자일로스 공동 배양에서 트립토판 역가의 개선, (B) 메탄 및 자일로스 공동 배양에서 IAA 역가의 개선을 보여주는 도면이다.

도 4는 조작된 IAA 생산 균주 RS01에 의한 초기 단계의 식물 성장 자극에 관한 것으로 (A) 가공된 *M. alcaliphilum* 20Z가 PGPR로서의 기능을 수행하고 논 토양에서 고체 탄소 순환을 구성, (B) RS01 균주에 담긴 종자는 발아율이 2.1배 (50±10 %) 증가, (C) RS01 처리에 의한 새싹의 신장과 밑의 뿌리 길이 비교를 보여주는 도면이다.

도 5는 IAA 생산 RS01 균주의 성장 패턴은 모균주 20Z^X의 성장 패턴과 유사함을 보여주는 도면이다.

도 6은 *M. alcaliphilum* 20Z로 형질 전환하여 생성된 RS02-06 균주를 메탄이 공급된 NMS 배지에서 배양하고 IAA 생산을 분석한 도면이다.

도 7은 조작된 균주 RS00 및 RS01에 메탄과 10g/L의 자일로스가 공급된 NMS 배지에서 배양된 후 광학 밀도에 대한 분석 도면이다.

도 8은 메탄과 자일로스에서 RS01 배양의 잔류 자일로스 농도와 부산물도 분석한 도면이다.

도 9는 트립토판을 배지에 첨가하여 IAA 역가를 최대 130mg/L까지 높일 수 있음을 보여주는 도면이다.

도 10은 파종 5 일째에 발아 한 종자의 발아율과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 본 발명은 3-데옥시-D-아라비노-헵투소네이트-7-포스페이트 합성효소(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, DAHP synthase)를 코딩하는 제1유전자, 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase)를 코딩하는 제2유전자, 인돌-3-피루브산(indole-3-pyruvic acid, IPA) 합성효소를 코딩하는 제3유전자, 인돌-3-아세트 알데히드(indole-3-acetaldehyde, IAA1) 합성효소를 코딩하는 제4유전자, 및 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA) 합성효소를 코딩하는 제5유전자를 포함하는 식물성장촉진호르몬 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균에 관한 것이다.

[0037] 인돌아세트산(옥신, IAA)은 식물의 성장을 촉진하는 물질로 3-인돌 아세트산 및 그와 같은 기능을 하는 천연물질을 통틀어 옥신이라고 한다. 대표적인 것으로 인돌아세트산(IAA)이 있다. 옥신은 세포벽의 신장을 용이하게 해

서 세포 하나하나를 크게 성장시켜 성장을 촉진한다. 세포막의 투과성을 높이고 세포분열, 부정근 형성, 화아 형성을 촉진한다. 옥신은 신초의 끝에서 생성되고, 줄기 끝, 뿌리 끝의 성장점에서 분포하여 같이생장을 촉진시킨다. 그러나 농도가 높으면 에틸렌의 합성을 촉진하여 성장이 억제된다. 조직의 종류에 따라 유효농도가 달라, 줄기 끝의 성장을 촉진하는 농도는 뿌리의 성장을 억제한다. 옥신은 새잎에서 만들어지고 뿌리로 내려가 뿌리 발육을 촉진한다.

[0038] 본 발명에서 용어 "메탄자화균(metahnotroph)"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 사용하여, 비산화 RuMP 사이클을 가지고 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 메탄, 메탄올, 메틸아민 등 C1 화합물을 에너지원으로 사용하는 메틸자화균(methylotroph) 중에서 메탄을 함께 사용할 수 있는 균주 또한 본 발명의 메탄화균에 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[0040] 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), 메틸로글로버스속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로판더스속(Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘속(Methylomarimum), 메틸로벨럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylo rubrum), 메틸로파라코커스속(Methyloparacoccus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum), 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium) 및 메틸로시너스 속(Methylosinus) 균주일 수 있으며, 구체적으로 메틸로마이크로비움 알칼리필리움 (Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어 "형질전환 메탄자화균" 은 상기 메탄자화균의 유전자를 도

[0042] 입하거나 또는 제거하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다.

[0043] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며,

[0044] DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들또는 숙주 세포 계놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어 “플라스미드”는 미생물의 세포 내에 염색체와

[0046] 는 별개로 존재하면서, 독자적으로 증식할 수 있는 DNA로, 생존에 필수적인 유전자는 아니나, 미생물의 환경 적응과 관련된 인자 및 벡터를 포함하는 고리형의 유전자를 의미한다.

[0047] 본 발명에서 사용되는 용어 “형질전환”은 미생물이 외부로부터 주어진 DNA를 받아들여 미생물의 유전적 성질이 변하는 것을 의미한다.

[0049] 1. IAA 생산의 주요 전구체인 L-트립토판의 파잉 생산을 위한 *M. alcaliphilum* 20Z의 엔지니어링

[0051] 미생물에서 IAA의 생합성을 위해 확인 된 다섯 가지 경로가 있다. 이들 대부분에서 L- 트립토판(트립토판)은 IAA를 생산하는 주요 전구체로 간주된다. 트립토판은 포스포에놀피루베이트(phosphoenolpyruvate, PEP)와 에리트로스-4-포스페이트 (erythrose-4-phosphate, E4P)의 축합으로 시작하여 DAHP 합성효소에 의해 3-데옥시-D-아라비노-헵투토소네이트-7-포스페이트(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)를 형성하는 shikimate pathway를 통해 미생물에서 생산될 수 있고 피드백억제에 의해 엄격하게 규제된다.

- [0052] 트립토판 생합성은 안트라닐레이트 합성효소(anthranilate synthase, TrpE)로 시작되며, 이는 또한 피드백 억제에 영향을 받는다. 산업 숙주(industrial hosts)에서 트립토판 과잉 생산의 경우 이러한 피드백 억제는 알로스테릭 피드백 저항성 효소(allosteric feedback-resistant enzymes)를 암호화하는 유전자의 과발현을 통해 극복될 수 있다.
- [0053] 첫 번째 단계로 *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판을 과잉생산한다. 호염성인 *methanotroph M. alcaliphilum* 20Z는 C1 동화를 위한 에너지 절약형 피로인산(pyrophosphate) 매개 Embden-Meyerhof-Parnas 경로와 함께 강력한 RuMP cycle을 작동한다. *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판이 과잉생산될 가능성을 조사하기 위해 대장균(*E. coli*)에서 유래한 피드백 내성 유전자 $aroG^{fbr(D146N)}$ 및 $trpE^{fbr(S40F)}$ 이 P_{tac} 프로모터의 구동하에 발현됨을 알 수 있다(도 1a).
- [0054] 생성된 균주, pTRP 벡터를 포함하는 RS00 및 모균주인 $20Z^X$ 를 유일한 탄소원으로서 메탄이 공급된 NMS 배지에서 배양한다. 그런 다음 그들의 성장과 트립토판 생산을 모니터링한다. 결과적으로 RS00 균주의 성장은 모균주의 성장과 유사했으며 (도 1b), 이러한 피드백 저항성 유전자의 과발현이 세포 성장에 결함이 없음을 확인할 수 있다. 흥미롭게도 트립토판 생산의 상당한 향상이 관찰된다(도 1c). RS00 균주는 39.6 mg/L의 역가(titer)로 트립토판을 생산했으며, 이는 $20Z^X$ 보다 5.2배 높은 수치이다. 또한, $20Z^X$ 및 RS00에서 트립토판의 역가(titer)는 세포추출물(각각 3.5 mg/L 및 4.7 mg/L)에서 유사했지만 상층액(supernatants)(각각 4.1 mg/L 및 34.9mg/L)에서 매우 달랐다. 이 결과는 트립토판이 생산되어 알려지지 않은 수송 메커니즘에 의해 배양배지로 주로 추출되었음을 나타낸다. 유사하게 증가된 트립토판 역가(titer)는 대장균(*E. coli*) 피드백 저항성 유전자가 식물 영양 박테리아인 *Synechocystis* sp.에 도입되었을 때도 관찰된다. 본 발명에서 $aroG^{fbr(D146N)}$ 의 발현은 광독립영양(photoautotrophic) 성장 10일 후 트립토판 역가(titer)를 0.06 mg/L에서 12.4 mg/L로 크게 증가시킨다. 즉, *E. coli*에서 유래된 피드백 억제효소 $AroG^{fbr(D146N)}$ 및 $TrpE^{fbr(S40F)}$ 의 과발현은 *M. alcaliphilum* 20Z에서 메탄으로부터 트립토판 생산을 크게 향상시켰으며, 이 발견은 추가 실험에서 트립토판 유래 제품을 생성하기 위한 전제일 수 있다.

[0056] 2. IAA 생산을 위한 대사 공학

- [0058] L- 트립토판 유래 생성물 IAA는 특히 염분이나 중금속 오염과 같은 가혹한 조건에서 식물 성장을 촉진하는 식물 호르몬이다. IAA는 메탄올을 유일한 탄소원으로 사용하는 메틸 영양 박테리아를 포함한 광범위한 식물 성장 촉진 박테리아 (plant-growth-promoting bacteria, PGPB)에 의해 생산된다. 최근 인돌-3-피루베이트(indole-3-pyruvate)를 통한 IAA의 생합성 경로가 비천연 숙주인 *E. coli*에서 특성화되고 발현되었다. 현재까지 자연적으로 IAA를 생성하는 메탄산화균은 발견되지 않았다.
- [0059] 식물성장을 지원할 수 있는 IAA 생산을 위한 합리적으로 가공된 methanotrophic biocatalyst 구축을 목표로, *S. cerevisiae*의 $aro8$ 및 $aro10$ 과 함께 대장균(*E. coli*)의 $aldH$, $aroG^{fbr(D146N)}$ 및 $trpE^{fbr(S40F)}$ 은 *M. alcaliphilum* 20Z의 P_{tac} 프로모터로 인해 균주 RS01이 생성된다(도2a). RS01 균주의 성장 및 IAA 생산을 NMS배지에서 분석하였다. 그 결과, IAA 생산 RS01 균주의 성장 패턴은 모균주 $20Z^X$ 의 성장 패턴과 유사하여 (도 5), IAA 생합성 경로의 도입이 *M. alcaliphilum* 20Z의 성장에 영향을 미치지 않는다. 144 시간의 배양 후 10.5 mg/L의 역가(titer)로 RS01 균주에서 IAA가 생산되었다(도2b). 이것은 methanotrophic biocatalyst를 사용하여 메탄으로부터 미생물 IAA 생산을 보여준다.
- [0060] 프로모터(Promoter)는 전사수준에서 유전자 발현을 정확하게 제어하는 중요한 요소이다. IAA 생산에 가장 적합한 프로모터를 조사하기 위해 *M. alcaliphilum* 20Z의 외인성(exogenous)(P_{tac} 및 P_{J23119}) 및 내인성(endogenous) 프로모터(P_{bhr} , P^{hps} , P_{mxAF} 및 $P_{S-layer}$)로 구성된 강력한 프로모터 세트를 스크리닝했다.
- [0061] 각 프로모터의 서열은 하기 표 1에 나와 있습니다.

표 1

[0062]

Promoter name	Sequence (5'→3')
Tac	CTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAGGTATTACACAGGAAACAGCT
J23119	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCGGTATTACACAGGAAACAGCT
Bhr	CCGTTTGCTCCGATAACAACATGCTGTTGCGCGAGGAAATATCGCCACGATTAAGGCAATGATCGACGCACCGTTGCTAGGAGTATTTCTTTATGCCGAACCGACTTCGATGAGCTGTCGGCGGCATTTCGAGAAAACCTATAAAAAATATTGAAATTAAGTTCCAAATAAACCAATAATCTTTGCGGTTATTTCCGGCATGCAAAACAGTTTGCAATGCAAGGGGAGGGCGAATGCGCCGATTCTCATAATTCAAAGCCTTGACGAGTGAAAAGGCTCAAACAAGGCAATTAAGGTATTACACAGGAAACAGCT
Hps	GAGGCGTTAGCAAAGAGCAAGTTTGATTTAAGTAATTGTTTCGCGCATAATTTTACCATCCGCTAGTAGTGTAGATCTGGCGACCTTTGAGTCGGCGAAATTGACAACCGCTCGCATTCTGGTTAGAGTTCCTCGTTACAGGGTAAAAATAGACTCGATTAAATCGATTAGGCACCAATTTCCGCTTCATAAAGGGAATTATGGTGGTTTAGGGCCTGATCGTTAATTATGATTTTTTCATTAACAACAATAAACCGTAACATCGGAGAAGAAACGGTATTACACAGGAAACAGCT
MxaF	ATAGACAAGTCCATCACGACAATATCCGGTTGATACTGAGTGTAGAGTTGGCAAGCGGTTTCGCCCTTGTGCGCTTCGTAAATATCGCCGATTCTATTGACAGTGAAAGGTAGGTTTTGTAAACCGGCCCTAACACCGCATGGTCGCCACAGCAAGACATCGATCTTATCCGACACGTTGTTACTTCTCCATACAATTAAATCGGGAATAATGTCGGATATTAACAGTAAAGCATGGGAGCTTTTCTGAAATAAACATGCGGGATATATTCCCGGTTTTTCTTAGCGTTTTTCCCGAGTTCTATGTGCCGTATTCGGTAACGTGCGGTACCGCTCCTTCGGTATGATTACCGTCCGTGCGCTGCCCTCTATGAATGATTGTTATGCGCCTTGATCAAGCTAAGCCGGTTGTAACAACAACACCGCGATTATTAGAGGCCGCGCCGACATTATGCGATAAAGGTTTCACACAGGAAACAGCT
S-layer	ATGGAATCGATATATCGATAAATAACAATGAAAAAACATTTTAATTAATCAAAATATATAAACTTAAATTACACTAAATACTTCAATCATAGTAATAGAAAGCCAAATTTTAAGCATTATTTCAACCAAAATAAGGGCGGTCCCTAGAAAAATTAATAAACTCTCTATACTCAAGCACCGTAAGCTATCAACTCAGTCCAGCTCTTTACTTAGAAAGGCTGATCAAGGTATAGTGCATACAAAATTCAGTGCGTATCAAAACGTGTCTAGAGTTCTTTCTAACAAAAAGCGAAAAGGTATTACACAGGAAACAGCT

[0064]

5' -UTR 시퀀스 (RBS 및 spacer 포함)는 일정하게 유지되었다. 이전에 보고 된 다중 오믹스(multi-omics) 데이터 세트에서 *M. alcaliphilum* 20Z에서 P_{bhr} , P_{hps} , P_{mxaf} 및 $P_{S-layer}$ 프로모터에 의해 제어되는 해당 유전자가 고폭도로 발현되었다(표 2).

표 2

[0066]

Gene ID	Gene, predicted function	Continuous culture (methane) FPKMs ^a	Continuous culture (methane) PSCs ^b
MEALZ_2316	Bhr, Bacteriohemerythrin	73	37.3
MEALZ_3953	Hps, 3-hexulose-6-phosphate synthase	6741	61
MEALZ_3448	MxaF, methanol dehydrogenase large subunit	13570	91
MEALZ_0971	S-layer protein	2014	ND

[0067]

^a FPKMs (Fragments per kilobase million) indicates for normalized gene expression

[0068]

^b PSCs indicates for number of observed peptides

[0069]

ND: not determined

[0070]

Transcriptomic data are compiled from Kalyuhnaya et al. 2013 (21) and Akberdin et al. 2018 (58).

[0072]

또한 대장균(*E. coli*)의 가장 잘 알려진 구성 프로모터인 P_{J23119} 도 스크리닝 분석에 포함되었다.

[0073] pIAA02-06 플라스미드는 각각 P_{J23119} , P_{bhr} , P_{hps} , P_{mxAF} 및 $P_{S-layer}$ 프로모터에 해당하는 구성되었다. 이 플라스미드를 *M. alcaliphilum* 20Z로 형질 전환하여 RS02-06 균주를 생성했다. 생성된 균주를 메탄이 공급된 NMS 배지에서 배양하고 IAA 생산을 분석하였다. 배양 144 시간 후 이러한 균주의 광학 밀도 값은 도 6에 나와 있다. 상층액에서 IAA의 생산은 도 2C에 표시된대로 144 시간 배양 후 정량화되었다. 다른 프로모터의 교체는 재조합 균주의 성장에 영향을 미치지 않았지만 IAA 역가(titer)에서 명확한 차이를 보였다(도 2C). P_{J23119} 및 P_{bhr} 프로모터에 해당하는 RS02 및 RS03에서는 IAA가 검출되지 않았다. P_{hps} , P_{mxAF} 및 $P_{S-layer}$ 프로모터에 해당하는 RS04, RS05 및 RS06에 의해 생성된 IAA의 역가(titer)는 각각 1.2 mg/L, 3.1mg/L 및 2.5mg/L이다. 한편, P_{tac} 프로모터는 IAA의 가장 높은 역가(titer)를 산출한다. 이러한 결과는 P_{tac} 이 *M. alcaliphilum* 20Z에서 이중 유전자 발현에 가장 적합한 프로모터임을 보여준다.

[0075] 3. 공동 기질 배양을 통한 IAA 생산 개선

[0077] 관심있는 제품의 생산을 크게 향상시키기 위해 비토착 및 토착 탄소 공급원의 조합이 널리 적용되었다.

[0078] 이전에 보고 된 바와 같이, 자일로스(xylose)는 자일로스 이성화 효소와 자일룰로스 키나제(xylulose kinase)의 발현을 통해 *M. alcaliphilum* 20Z의 중심대사에서 자일로스-5-인산(xylulose-5-phosphate)에 연결할 수 있다.

[0079] 이것은 산화성 5탄당 포스페이트 경로(oxidative pentose phosphate pathway)를 통해 자일룰로스-5-포스페이트(xylulose-5-phosphate)와 후속적으로 트립토판의 전구체인 에리트로스-4-포스페이트(erythrose-4-phosphate, E4P)의 가용성을 향상시킬 수 있다(도 2A).

[0080] *M. alcaliphilum* 20Z의 배양 배지에서 추가 탄소원으로서의 자일로스 보충은 플라스크 배양에서 2,3-부탄디올(2,3-butanediol) 및 시노린(shinorine)과 같은 다양한 가치있는 화학 물질의 생산에 유익한 것으로 입증되었다.

[0081] 따라서 본 발명에서는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판 및 IAA의 생산을 개선하기 위해 메탄과 함께 자일로스를 공급할 수 있다.

[0082] 조작된 균주 RS00 및 RS01은 메탄과 10g/L의 자일로스가 공급된 NMS 배지에서 배양되었다. 광학 밀도는 매일 측정되었으며 도 7에 나와 있다. RS00 및 RS01에 의해 각각 생산된 트립토판 및 IAA는 배양 144시간에 분석되었다. 자일로스를 배양 배지에 보충하면 조작된 균주 RS00 및 RS01 모두의 성장 속도가 증가했다. RS00과 RS01의 OD600값은 재배 144시간에서 각각 10.2와 9.8에 도달했으며, 이는 메탄을 유일한 탄소원으로 사용할 때보다 각각 1.8 배 및 1.6 배 더 높았다. 그 결과, 메탄 및 자일로스 공동재배에서 트립토판의 역가는 메탄재배에 비해 1.6배 향상되어 최대 63.3 mg/L에 도달했다(도 3A). 유사하게, RS01에 의해 생성된 IAA는 자일로스의 존재하에서 최대 19.1mg/L로 증가했으며, 이는 메탄만있는 것보다 1.8배 더 높았다(도 3B). 메탄과 자일로스에서 RS01 배양의 잔류 자일로스 농도와 부산물도 분석되었다(도 8). 자일로스는 서서히 소비되었고, 144시간 배양 후 3.2g/L만 남았다. 텅스텐의 존재 하에서 이산화탄소로의 완전한 산화로 인해 포름산염(formate)은 상층액에서 검출되지 않았다. 아세트산은 96 시간에 396.7 mg/L의 상대적으로 높은 농도로 배설되고, 후기 지수성장 동안 극적으로 동화되는 것으로 관찰되었다. 요약하면, 자일로스를 추가 탄소원으로 사용하면 트립토판과 그 파생 제품인 IAA의 생산이 개선되어 *methanotrophic M. alcaliphilum* 20Z를 사용하여 가치있는 제품을 산업적으로 생산할 수 있는 기회가 확대될 수 있다.

[0084] 4. 조작된 균주의 식물 성장 촉진 능력 입증

[0086] PGPB는 식물 호르몬, 항진균 화합물 및 동반 용질의 배설을 통해 식물 성장 자극에 중요한 역할을 한다. 그러나 PGPB 균주는 농업 활동에서 방출되는 메탄을 포획할 수 없다.

[0087] 위에서 언급 한 요구에 맞는 새로운 PGPB 균주의 개발 가능성을 입증하기 위해, 밀의 초기 성장(*Triticum aestivum* L.)에 대한 IAA 생산 공학 균주의 중요성을 조사했다. 높은 염분 및 알칼리성 조건에 대한 *M.*

alcaliphilum 20Z의 선호로 인해 30g/L의 NaCl을 함유하고 pH가 약 8~9인 NMS 배지(*M. alcaliphilum* 20Z의 배양 배지)의 효과가 먼저 결정되었다. 밀 씨앗의 성장에 종자를 다른 농도의 NMS에 밤새 담그고 상응하는 NMS 농도로 만든 한천 플레이트에 놓았다. 파종 5일 후에 발아된 종자의 수를 기록하였다. 파종 5 일째에 발아 한 종자의 발아율과 사진이 도 10에 나와 있다. NMS 10%는 밀 종자 발아에 영향을 미치지 않은 반면, 종자는 염 농도가 높은 NMS 100% 및 NMS 50% 배지에서 발아하지 않았다(각각 30g/L 및 15g/L의 염화나트륨). NMS 25%는 밀 종자의 발아에 상당한 영향을 미쳤으며, 물처리된 종자와 비교할 때 발아된 종자의 37.5%에 불과했다. NMS 25% 배지는 염화나트륨 7.5g/L에 해당하며 밀씨 발아율이 50%감소한 것으로 보인다. 결과적으로 NMS 25%가 밀 성장의 가속한 조건으로 간주될 수 있음을 나타낸다. 따라서 NMS 25%를 밀 종자에 대한 스트레스 조건으로 사용하여 RS01 균주에 의해 생성된 IAA가 추가 실험에서 이 식물의 성장에 미치는 영향을 조사했다.

[0088] 밀 종자는 RS01 균주 또는 부모 균주를 대조군으로 포함하는 NMS 25%에 밤새 담갔다. 파종 3일 후에 종자의 발아율을 기록하고, 파종 5일 후에 뿌리와 새싹 길이를 측정하였다. 모 균주로 처리한 종자는 NMS-25% 처리한 종자 ($30 \pm 7.5\%$)와 유사한 발아율($23.33 \pm 5.78\%$)을 보였지만, RS01 균주에 담긴 종자는 발아율이 2.1배 ($50 \pm 10\%$) 증가한 것으로 나타났다(도 4B). RS01 처리는 또한 새싹의 신장과 밀의 뿌리 길이를 가져왔다. 이 길이는 각각 $4.06 \pm 1.55\text{cm}$ 및 $1.91 \pm 0.38\text{cm}$ 였으며, 이는 부모 균주 접종 종자보다 3배 더 높았다(싹 길이 : $1.36 \pm 0.41\text{cm}$, 뿌리 길이 : $0.42 \pm 0.16\text{cm}$)(도 4C). 이전 연구에서 IAA는 식염수 조건(EC 15 dS/m)에서 밀 종자의 성장을 지원하는 것으로 입증되었으므로 여기에 제시된 결과는 타당하다. 이러한 결과를 바탕으로 IAA를 생산하는 *M. alcaliphilum* 20Z를 시험관 수준으로 접종함으로써 고염 조건하에서 초기 밀씨성장을 촉진 할 수 있다.

[0089] 메탄 배출의 상당 부분은 자연 습지와 논에서 44%를 차지하는 생물원에서 발생된다. 더욱이 전세계 농업용 경작지의 질과 양은 화학비료, 살충제 남용 및 기후 변화의 영향으로 인해 빠르게 감소하고 있다. 농작물 생산성을 향상시키는 기존 방법과 비교하여 식물성장촉진 박테리아(PGPB)는 농업 생태계에 친화적이기 때문에 유리할 것으로 보인다. PGPB의 가장 중요한 메커니즘 중 하나는 식물 성장을 촉진하고 식물에 대한 비생물적 스트레스의 부정적인 영향을 완화하는데 도움이 되는 식물 호르몬의 생산이다. Methanotrophic 박테리아는 대기 중 메탄 소비를 담당하는 유일한 박테리아 그룹이지만 식물 호르몬을 생성할 수 없었다. 따라서 *M. alcaliphilum* 20Z에서 IAA의 이중 생산을 통해 식물 성장을 촉진하는 동시에 전세계 메탄 배출량 감소에 기여할 수 있는 호염성 methanotroph 기반의 새로운 PGPB 플랫폼을 개발하기 위해 대사 공학을 접목시켰다.

[0090] 트립토판의 생합성은 비용이 많이드는 과정으로 PEP 2 분자, E4P 1 분자, 5- 포스포리보실 피로포스페이트(5-phosphoribosyl pyrophosphate) 1 분자, L-세린 1 분자; 고에너지 인산염 결합이 필요하다. 더욱이 *M. alcaliphilum* 20Z와 같은 methanotroph는 pMMO에 의한 메탄의 안정적인 C-H 결합을 활성화하기 위해 두 개의 전자가 필요하다. 따라서 트립토판의 이용 가능성은 바이오 매스 조성에서 극히 낮고 *M. alcaliphilum* 20Z에서 이 방향족 아미노산의 높은 생산은 어려울 것이다.

[0091] 흥미롭게도, 대장균(*E. coli*) 유래 피드백 저항성 유전자의 발현을 통해서 상기 대장균(*E. coli*)에 아미노산의 과잉 생산을 확인할 수 있었다. 결과는 *E. coli*와 *M. alcaliphilum* 20Z사이의 피드백 억제조절시스템에서 가능한 유사성을 보여 주었지만, 이 두 종의 shikimate 경로에 있는 주요 효소는 상대적으로 낮은 동일성을 공유한다(AroG : 66 %, TrpE : 38 %). 그러나 *M. alcaliphilum* 20Z에서는 트립토판 역가(titer)의 5배 증가만이 관찰되었다. 대조적으로, *E. coli*에서는 트립토판 생합성 유전자에서 *trpR* 조절을 제거하고 트립토판 퍼미아제(tryptophan permeases)를 차단하는 등의 추가 대사 공학 전략과 함께 피드백 저항성 유전자를 사용하면 트립토판이 향상된다는 결과를 알 수 있다(모 균주에 비해 5263 배 향상됨).

[0092] 따라서 methanotrophic biocatalysts에서 트립토판 생산을 향상시키기 위해 추가 엔지니어링 전략을 적용해야한다. 또한 트립토판은 주로 배양액(culture medium)으로 배설되는 것으로 나타났다. 따라서, 트립토판의 상세한 생합성 경로와 그 조절 및 methanotrophs의 수송 시스템을 밝히는 것이 필요하다.

[0093] *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판 과잉생산 가능성이 검증된 이후, *M. alcaliphilum* 20Z에 $\text{aroG}^{\text{fbr(D146N)}}$ 및 $\text{trpE}^{\text{fbr(S40F)}}$ 와 함께 IAA 생산에 관여하는 유전자를 도입하여 IAA 생산이 입증되었다.

[0094] 일부 미생물은 자연적으로 IAA를 생산하기 때문에 조작된 methanotrophic 균주에 의해 생산된 IAA의 역가(titer)는 그들의 것과 비슷했다(표 3).

표 3

Strains	Culture condition	IAA titer (mg/l)	Reference
<i>E. coli</i>	M9 medium, glucose 0.5 g/l L-tryptophan	387	(24)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Landy medium, glucose 3 mM L-tryptophan	22	(40)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Axenic medium	8.86	(39)
<i>M. extorquens</i> MM2	Not mentioned	6.16	(38)
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	NMS medium, methane	10.5	This study

예를 들어, 다른 C1-활용 균주와 비교할 때 *M. extorquens* MM2(메탄올로부터 6.16mg/L의 IAA를 생성함)와 설탕 기반 균주인 *Pseudomonas* sp.(영양이 풍부한 배지에서 포도당으로부터 8.86mg/L의 IAA를 생성), 조작된 *methanotrophic* 균주는 각각 1.7 배 및 1.2 배 더 많은 IAA를 생성한다.

다른 경우에는 *Bacillus subtilis* 168과 *E. coli*가 포도당과 트립토판의 존재하에서 RS01 균주보다 더 높은 IAA 생산을 보였다.

그러나 자연에서는 보통 소량의 식물 호르몬 투여만으로도 식물 성장 촉진에 충분하다.

자일로스(xylose)는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 원하는 제품의 성장과 생산을 지원하는 잠재적인 탄소원으로 알려졌다. 즉, 자일로스(xylose)의 첨가는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 트립토판 및 IAA의 생산을 향상시킨다(역가가 거의 2 배).

그러나 메탄과 자일로스를 함께 재배했을 때 생산 수율에 차이가 없었다(표 4). 이것은 자일로스가 트립토판 및 IAA를 생성하기 위해 시키메이트 경로(shikimate pathway)로 직접 이동하지 않고 대신 세포 성장에 기여하여 이러한 화합물의 역가를 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 바이오 매스와 함께 생성물 역가의 비례적인 증가는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 가능한 성장-생산 커플링을 나타내었으며, 이는 *E. coli*, *S. cerevisiae* 및 *Synechocystis*와 같은 일부 호기성 박테리아에서 실행 가능한 것으로 계산적으로 조사되었다.

표 4

Strain	Product	Carbon source	Product titer (mg/L)	Yield (mg/g DCW)
20Z ^x	Tryptophan	Methane	7.6 ± 1.9	6.0 ± 1.9
RS00	Tryptophan	Methane	39.6 ± 2.3	35.1 ± 0.4
	Tryptophan	Methane + Xylose	63.3 ± 2.5	31.5 ± 0.1
RS01	IAA	Methane	10.5 ± 0.8	9.0 ± 0.6
	IAA	Methane + Xylose	19.1 ± 0.2	10.0 ± 1.2

또한, 트립토판을 배지에 첨가하여 IAA 역가를 최대 130mg/L까지 높일 수 있다(도 9). 이러한 결과는 대규모 재배 접근법을 통해 *M. alcaliphilum* 20Z에서 높은 수준의 트립토판 및 IAA를 생산할 수 있는 기회를 제공한다. 또한, transketolase(*tkt*) 및 PEP synthase(*ppsA*)의 과발현 및 pyruvate kinase(*pyk*)와 같은 경쟁 경로의 삭제를 포함한 추가 대사 공학 전략을 적용하여 탄소 플럭스를 자일로스에서 shikimate 경로로 전용할 수 있다.

중요한 것은 IAA 생산 *M. alcaliphilum* 20Z 균주가 식염수 조건 하에서 밀 종자의 발아 및 뿌리를 자극하고 새싹 신장을 촉진하는 능력이 인식되어 토양 미생물 군집의 유망한 미생물 컨소시엄으로서 균주의 개발 가능성이 있다(도 4). 식물/토양 미생물 군집이 식물 성장과 생산성, 토양 건강에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다. 또한 인공 미생물 컨소시엄 (PGPB)을 사용하는 것과 같은 표적 미생물 균류 전체 공학 전략은 토양 분해의 맥락에서 이점을 보여준다.

효율적인 메탄 산화 경로의 작동을 통해 *M. alcaliphilum* 20Z는 토양의 산소 농도를 충족하는 산소 제한 조건에

서도 메탄을 포획할 수 있다. 설계된 *M. alcaliphilum* 20Z는 메탄으로부터 IAA를 생산하여 식물 성장을 지원한다. 동시에 물이 메탄 포집과정의 주요 산물로 방출되어 건기에 식물에 유익하다. 또한 아세트산 염, 포름산염, 이산화탄소, 수소 등 *M. alcaliphilum* 20Z의 성장 과정에서 발생하는 부산물은 다른 미생물, 특히 메탄젠(methanogen)에 유리한 영양소이다. 이 박테리아는 메탄 영양 물질 대신 메탄 영양성 부산물을 활용하는 동안 메탄 영양 물질의 성장을 지원하는 메탄을 방출한다. methanotroph와 지역 사회의 다른 미생물 사이의 상호 작용은 토양에서 methanotroph의 지속 가능한 생존을 제공한다.

[0109] 또한 *M. alcaliphilum* 20Z가 대체 C1 탄소 공급원으로 메탄올에서 성장하고 다중 탄소 공급원으로 자일로스가 이 균주의 유연성을 제공한다. 이들은 가공된 *M. alcaliphilum* 20Z가 PGPB로서의 기능을 수행하고 논 토양에서 고체 탄소 순환을 구성하는 데 도움이 될 수 있다(도 4A).

[0110] 전 세계 경작지의 50%가 2050년까지 염분화될 것으로 예측된다. 이 경우 내염성 PGPB는 식물의 성장을 지원하는 데 적합한 선택이될 것이다. *M. alcaliphilum* 20Z는 다른 methanotrophs보다 염분 조건을 더 선호하므로 기후 변화로 인해 염분 영향을 받은 토지의 농업 적용에 더 유망한 PGPB 후보가 된다. 이전에 IAA는 경미한 스트레스 조건과 비생물적 스트레스 조건에서 소량의 용량만으로 다양한 식물의 성장을 촉진하는 것으로 입증되었다. *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas mendocina* 및 *Arthrobacter* sp.와 같은 다양한 내염성 박테리아가 IAA의 분비로 인해 적당한 소금 조건(EC 4.6 dS/m)에서 밀 종자의 초기 성장을 촉진하는 것으로 뿌리와 새싹 길이를 각각 1.9 배 및 1.5 배 증가시킨다고 알려졌다. 이 균주와 비교하여 본 발명의 IAA 생산 *M. alcaliphilum* 20Z 균주가 더 효과적이다. 본 발명인 균주는 극도로 높은 염농도 (염화나트륨 : 7.5g/L는 EC> 8dS/m에 해당)에서 초기 단계에서 밀씨 성장을 자극할 수 있다. 또한, 이 연구에서 제시된 공학적 methanotrophic 균주는 식물의 아미노산 기반 질소 공급원으로 활용 될 수 있는 트립토판 생산 능력을 가지고 있다. 이는 질산 암모늄과 같은 질소 비료의 사용을 감소시켜 강력한 GHG인 아산화 질소의 대기 방출을 감소시킬 수 있다. 이론에서 실제 적용에 이르기 까지 이러한 긍정적인 결과는 IAA 생산 *M. alcaliphilum* 20Z를 지속 가능한 농업에서 미생물 균유 전체 공학을 위한 강력한 PGPB 후보로 만들었다.

[0111] 본 발명의 메탄산화균은 IAA를 생산하는 유전자 및 오페론을 특이적으로 발현하는 발현 벡터로 형질전환된 메탄산화균으로서, 상기 발현 벡터는 서열번호 1내지 서열번호 5를 포함하는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.

[0112] 본 발명의 발현 벡터와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 발현 벡터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 내지 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1 내지 서열번호 5에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당 업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0113] 또한, 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호 5로 표시되는 발현 벡터와 일부 유전자 영역은 공개된 IAA 생합성 경로 유전자의 일부를 포함하는 서열로, 서열번호 1 내지 서열번호 5로 표시되는 염기 서열 중 일부가 치환, 삽입 또는 삭제 되더라도 시노린 생합성 경로의 일부 유전자 영역에 위치한서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0114] 본 발명에 사용된 유전자 $aroG^{fbr(D146N)}$, $trpE^{fbr(S40F)}$, $aro8$, $aro10$ 및 $aldH$ 의 유전자 서열은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0116]

유전자	염기서열
서열번호 1 : aroG ^{fbr (D146N)}	ATGAATTATCAGAACGACGATTTACGCATCAAAGAAATCAAAGAGTTACTTCCTCCTGTCGCATTGCTGAAAA ATTCCCCGCTACTGAAAAATGCCGCGAATACGGTTGCCCATGCCGAAAAGCGATCCATAAGATCCTGAAAGGTA ATGATGATCGCCTGTTGGTTGTGATTGGCCCATGCTCAATTCATGATCCTGTCGCGGCAAAAGAGTATGCCACT CGCTTGCTGGCGCTGCCGTGAAGAGCTGAAAGATGAGCTGGAAATCGTAATGCGCGTCTATTTTAAAAAGCCGCG TACCACGGTGGGCTGGAAGGGCTGATTAACGATCCGCATATGGATAATAGCTTCCAGATCAACGACGGTCTGC GTATAGCCCGTAAATTGCTGCTTGATTAACGACAGCGGTCTGCCAGCGGCAGGTGAGTTTCTCAATATGATC ACCCCACAATATCTCGCTGACCTGATGAGCTGGGGCGCAATTGGCGCACGTACCACGAATCGCAGGTGCACCG CGAATGCGATCAGGGCTTTCTGTCCGGTCCGGCTTCAAAAATGGCACCGACGGTACGATTAAGTGGCTATCG ATGCCATTAATGCCGCCGGTGGCGCGCACTGCTTCCTGTCCGTAACGAAATGGGGGCATTGCGCGATTGTGAAT ACCAGCGGTAACGGCGATTGCCATATCATTCTGCGCGCGGTAAAGAGCCTAACTACAGCGCGAAGCAGCTTGC TGAAGTGAAGAAGGGCTGAACAAAGCAGCCTGCCAGCACAGGTGATGATCGATTTCAGCCATGCTAACTCGT CCAACAATTCAAAAAGCAGATGGATGTTGTGCTGACGTTTGCCAGCAGATTGCCGGTGGCGAAAAGGCCATT ATTGGCGTGATGGTGAAGCCATCTGGTGAAGGAATCAGAGCCTCGAGAGCGGGAGCCGCTGGCCTACGG TAAGAGCATCACCGATGCCTGCATCGCTGGGAAGATACCGATGCTCTGTTACGTCAACTGGCGAATGCAGTAA AAGCGCTCGCGGGTAA
서열번호 2 : trpE ^{fbr (S40F)}	ATGCAACACAAAAACCGACTCTCGAACTGCTAACCTGCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCACCGCGCTTTT TCACCACTGTGTGGGGATCGTCCGGCAACGCTGCTGTGGAATTTCGAGATATCGACAGCAAGATGATTTAA AAAGCCTGCTGCTGGTAGACAGTGCCTGCGCATTACAGCTTTAGGTGACACTGTCACAAATCCAGGCCTTTCC GGCACCGCGAAGCCCTCCTGGCACTACTGGATAACGCCCTGCTGCGGGTGTGGAAGTGAACAAATACCCAAA CTGCCGTGTGCTGCGCTTCCCCCTGTGAGTCCACTGCTGGATGAAGACGCCCGCTTATGCTCCCTTTTCGGTTT TTGACGCTTTCGGTTTATTGCAAGTCTGTTGAATGTACCGAAGGAAGAAGAGCCATGTTCTTCGCGCGC CTGTTCTCTTATGACCTTGTGGCGGGATTGAAGATTACCGCAACTGTCAGCGGAAAAATAACTGCCCTGATTT CTGTTTTTATCTCGCTGAAACGCTGATGGTGATTGACCATCAGAAAAAAGCACCCGCTTTCAGGCCAGCCGT TTGCTCCGAATGAAGAAGAAAAACAACGCTCTCACTGCTCGCCTGAACGAACACGTCAGCAACTGACCGAAGCC GCGCGCGCTGCCAGTGGTTTCCGTGCCGATATGCGTTGTGAATGTAATCAGAGCGATGAAGAGTTCGGTGG CGTAGTGCCTTTGTTGCAAAAGCGATTTCGCGCTGGAGAAATTTCCAGGTGGTGCCTATCTCGCGCTTCTCTC TGCCCTGCCCGTCAACCGCTGGCGGCTATTACGTGCTGAAAAAGAGTAATCCAGCCCGTACATGTTTTTATG CAGGATAATGATTTACCCCTATTGGCGCGTCCCGGAAAGCTCGCTCAAGTATGATGCCACCGCCGCGAGAT TGAGATCTACCCGATTGCCGAACACGCCACGCGGTGCTCGCGCGATGGTTTACTGGACAGAGATCTCGACA GCCGTATTGAAGTGAAGTGGTACCGATCATAAAGAGCTGCTGAACATCTGATGCTGGTTGATCTCGCCCGT AATGATCTGGCACGCAATTTGCACCCCGCGCAGCGCTACGTGCGCGATCTCACCAGGTTGACCGTTATTCCTA TGTGATGCACCTCGTCTCTCGCTAGTCCGCGAACTGCGTCACGATCTTGACGCCCTGCACGCTTATCGCGCT GTATGAATATGGGGACGTTAAGCGGTGCGCGGAAAGTACGCGCTATGCAGTTAATTGCCGAGGCGGAAGGTGCT CGCGCGCGCAGCTACGCGCGCGCGGTAGGTTATTTACCGCGCATGGCGATCTCGACACCTGCATTGTGATCCG CTCGCGCTGGTGAAGACGCTATCGCCACCGTGCAAGCGGGTGTGGTGTAGTCTTGAATTCTGTTCCGCGAGT CGGAAGCGCAGAAACCCGTAACAAAGCCCGCGCTGTACTGCGCGCTATTGCCACCGCGCATCATGCACAGGAG ACTTCTGA
서열번호 3 : aro8	ATGACTTTACCTGAATCAAAAGACTTTTCTTACTTGTTTTCGGATGAACCAATGCTCGTAAACCATCCCCATT GAAAACTGCATCCATCTTTTCCAAGATCCTAACATTATCTTTTGGGTGGTGGCTGCCATTAAAGATTATT TCCCATTGGGATAATCTATCTGTAGATTACCCAAGCCTCCTTTTCCCGAGGTATTGGAGCTCAATTGACGAG CAGAATTGCATAAAATACACCGTCAACAAAGATTACGCTGATAAAAGTGCCAATCCTTCAACGATATTCTTT GTCAGAGCTTTGCAATACGGGTTCAAGTCTGGTCAACCTGAACTATTAACTTCATTAGAGATCATACCAAGA TTATCCACGATTTGAAGTATAAGGACTGGGACGTTTATAGCCACTGCAGGTAACACAAATGCCTGGGAATCTACT TTAAGAGTCTTTTGAACCGAGGTGATGTCATCTTAGTTGAGGCACATTCTTTTCTCTTATTGGCTTCTGCG AGAGGCTCAAGGTGTCATTACCTTCCCGGTGCCAATTGACGCTGATGGTATCATTCTGAAAAATTAGCTAAAG TCATGAAAACTGGACACCTGGTGTCTCTAAACCAAGTTGTTATACACTATTCCAACCGGCCAAAAATCCAAT GGTACTTCCATTGCAGACCATAGAAAGGAGGCAATTTACAAGATCGCTCAAAAGTACGACTTCTCAATTGTGGA AGATGAACCTTATTATTCTTACAAATGAATCCCTACATCAAGACTTGAAGGAAAGAGAGAAGGCACAAAGTT CTCCAAAGCAGGACCATGACGAATTTTGAAGTCTTGGCAACACTTCTCTTCTTGGATACAGAAGGCCGT GTTATTAGAATGGATTCTTTTCAAAAGTTTGGCCCCAGGGACAAGATTGGGTGGATTACTGGTTCATCCAA AATCTTGAAGCCTTACTTGAGTTTGCATGAAATGACGATTCAAGCCCCAGCAGGTTTACACAAGTTTGGTCA ACGCTACGCTATCCAGGTGGGGTCAAAAGGGTTACTTGGACTGGTTGCTTGGCCTGCGTCATGAATACACTTTG AAACGTGACTGTGCCATCGATGCCCTTTACAAGTATCTACCACAATCTGATGCTTTCGTGATCAATCTCCAAT TGCAGGTATGTTTTTACCCTGAACATTGACGATCTGTCCACCCTGAGTTTAAACAAAAATACTACACTCAGACC CTTACCAGCTAGAACAGAGTCTTTACCACAAAGTGGTTGAACGTGGTGGTTTAGTGGTCCCGGTTCTGGTTC AAGAGTGAGGGTGAGACGGAACCTCTCAACCCGCTGAATCTAAAGAGTCAGTAATCCAACATAATTTTCTT CAGAGGTACCTATGCAGCTGTCTCTCTGAGAACTGACTGAAGGTCTGAAGAGATTAGGTGATACTTTATACG AAGAATTGGTATTTCCAAATAG

서열번호 4 : aro10	ATGGCACCTGTTACAATTGAAAAGTTCGTAAATCAAGAAGACGACACCTTGTTCACCGATCAGCAACAAT TCCGTTTGGTGAATACATATTTAAAAAGATTGTTGTCCATCGATACGAAATCAGTTTTCGGTGTTCCTGGTGA TCAACTTATCTCTATTAGAATATCTCTATTACCTAGTGTGAATCAGCTGGCCTAAGATGGGTGCGGACGCTGT AATGAACTGAACGCCGCTTATGCGGCCGACGGATATTTCCGTTACTCTAATAAGATTGGCTGTTAATAACCAC GTATGGCGTTGGTGAATTAAGCGCCTTGAACGGTATAGCCGGTTCGTTTCGCTGAAAAATGTCAAAGTTTGCACA TTGTTGGTGTGGCCAAAGTCCATAGATTTCGGCTTCAAGTAACCTTATGTGATCGGAACCTACATCATTGGTCCCA CAGCTACATGATTCAAATTTTAAAGGGCCAAATCATAAAGTATATCATGATATGGTAAAGATAGAGTCCGTTG CTCGGTAGCCTACTTGGAGGATATTGAACTGCATGTGACCAAGTCGATAATGTTATCCGCGATATTTACAAGT ATTCTAAACCTGGTTATATTTTGTTCCTGCAGATTTTGGGATATGTCTGTTACATGTGATAATTTGGTTAAT GTTCCACGTATATCTCAACAAGATTGTATAGTATACCCTTCTGAAAAACCAATTGTCTGACATAATCAACAAGAT TACTAGTTGGATATATCCAGTAAAAACCTGCGATCCTTGGAGACGTACTGACTGATAGGTATGGTGTGAGTA ACTTTTGAACAAGCTTATCTGCAAACTGGGATTGGAATTTTCCACTGTTATGGGAAAACTGTGAATTGAT GAGTCAAAACCAACTTATATGGGTCAATATAATGGTAAAGAAGGTTAAAAACAAGTCTATGAACATTTGAAC GTGCGAGCTTGGTCTTGCAATTTGGAGTGCACATCAATGAAATTAATAATGGGCATTATACCTTTACTTATAAAC CAAATGCTAAAAATCATTCAATTTTATCCGAATTATATTCGCCTTGTGGACACTAGGCAGGGCAATGAGCAATG TTCAAAGGAATCAATTTTGCCTTATTTTAAAGAACTATACAAGCGCATTGACGTTTCTAACTTTCTTTGCA ATATGATTCAAATGTAACCTAATATACGAACGAAACAATGCGGTTAGAAGATCCTACCAATGGACAATCAAGCA TTATTACACAAGTTCACTTACAAAAGACGATGCCTAAATTTTGAACCTGGTGTATGTTGCGTTTGTGAAACA GGCTCTTTTCAATCTCTGTTCTGTTGTTTTCGCTTTCCTTCGCAATTAATAATATATCGCAAGGATTTTCTCT TTCCATTGGCATGGCCCTTCTGCGCCCTAGGTGTTGGAATTGCCATGCAAGACCACTCAACGCTCAGTCA ATGTTGGCAACGTAAAAAGAGGACTATAAGCCCAAGATTAAATTTGTTTGAAGGTGACGGTGCAGCACAGATGACA ATCCAAGAACTGAGCACCATTCTGAAGTGAATATTCCTAGTGAAGTTATCATTGGAACAATAACGGCTACAC TATTGAAAGAGCCATCATGGCCCTACCAGGTGCTATAACGACGTTATGTCTTGGAAATGGACCAAACTATTTG AAGCATTGCGGAGACTTCGACGGAAGTATACTAATAGCACTCTCATTCAATGTCCCTCTAAATTAGCACTGAAA TTGGAGGAGCTTAAGAATTCAAAACAAAAGAAGCGGGATAGAATTTTAGAAGTCAAAATTAGGCGAATTGGATTT CCCCGAACAGCTAAAGTGCATGGTTGAAGCAGCGGCACTTAAAGAAATAAAAAATAG
서열번호 5 : aldH	ATGAATTTTCATCATCTGGCTTACTGGCAGGATAAAGCGTTAAGTCTCGCCATTGAAAACCGCTTATTTATTA CGGTGAATATACTGCTGCGCGGAAAAATGAAACCTTTGAAACCGTTGATCCGGTCACCCAGGCACCGCTGGCGA AAATTGCGCGCGCAAGAGCGTCGATATCGACCGTGCATGAGCGCAGCAGCGCGCTATTTGAAACGCGCGGAC TGCTCACTCTCTTCTCCGGCTAAACGTAAAGCGTACTGAATAAACTCGCCGATTTAATGGAAGCCCACGCGCA AGAGCTGGCACTGCTGGAACCTCTCGACACCGGCAACCGATTTCGTCACAGTCTCGGTGATGATATCCCGGCG CGGCGCGGCCATTTCGCTGGTACGCCGAAGCGATCGACAAAGTGTATGGCGAAGTGGCGACACCCAGTAGCCAT GAGCTGGCGATGATCGTGCCTGAACCGTTCGGCGTATTGCCGCCATCGTGCCGTGGAACCTCCCGCTGTGTCT GACTTGCTGGAACCTCGGCCCGCGCTGGCGCGGGAACAGCGTATTCTAAAACCGTCTGAAAAATCACCGC TCAGTGCATTTCGCTCGCGGGCTGGCGAAAGAAGCAGGCTTGGCGGATGGTGTGTTGAACGTGGTGACGGGT TTTGGTCATGAAGCGCGGCGAGCGCTGTGCGCTCATAAAGTATCGACGCGATTGCTTTACCGGTTCAACCG TACCGGGAACAGCTGCTGAAAGATGCGGCGCAGCAACATGAAACGCGTCTGGCTGGAAGCGGGCGGCAAAA GCGCAACATCGTTTTCGCTGACTGCCCGGATTGCAACAGCGCGCAAGCGCCACCGCAGCAGCATTTTCTAC AACCAGGGACAGGTGTGCATCGCCGAACGCGCTGTTGCTGGAAGAGAGCATCGCGATGAATTCTTAGCCCT GTTAAACAGCAGGCGCAAACTGGCAGCGGGCCATCCACTTGATCCCGCAACCACTGGGCACCTTAATCG ACTGCGCCACGCGGACTCGGTCCATAGCTTTATTCCGGAAGCGCAAGCAAGGGCAACTGTTGTTGGATGGC CGTAACGCGGGCTGGCTGCCGCCATCGGCCGACCATCTTTGTGGATGTGGACCCGAATGCGTCCTTAAGTCG CGAAGAGATTTTCGCTCCGGTGTGTTGTCACGCGTTTCACATCAGAAGAACAGCGCTTACCGCTTCCCAACG ACAGCCAGTACGCGCTTGGCGCGGCGTATGGACGCGCGACCTCTCCCGCGCGCACCGCATGAGCCGACGCGCTG AAAGCCGTTCCGTCTTCGTCATAAATAACAACGACGCGGATATACCGTGCCGTTTGGCGGCTATAAGCAGAG CGGCAACGGTTCGCGACAAATCCCTGCATGCCCTTGAATAATCACTGAACGAAACCATCTGGATAAGCCTGG AGGCTGA

- [0118] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 속 미생물인 것을 특징으로 하며, 더욱 상세하게는, 메틸로마이크로비움 알칼리필리움20Z(*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z)인 것을 특징으로 하는 메탄자화균(Methanotroph)일 수 있다.
- [0119] 또한, 본 발명은, 상기의 메탄자화균(Methanotroph) 또는 이의 배양액; 및메탄로 이루어진 탄소원을 포함하는 IAA 생산용 조성물을 제공한다. 또한 상기 조성물에 자일로스가 추가 포함되도 포함된다.
- [0120] 본 발명에서 사용되는 용어 “배양액”은 미생물이 증식하기에 적합한 요소가 포함된 배지에, 목적 미생물을 종균하여, 일정시간 배양한 후 수득되는 것으로서, 미생물 및 배지를 포함하는 개념이다.
- [0121] 본 발명에서 사용되는 용어 “조성물”은 목적 물질을 생산하기 위한 다양한물질을 혼합한 것으로서, 미생물 배양배지, 탄소원, 미량 원소 및 미생물 종균이 포함된 것을 의미한다.
- [0122] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 미량원소로 텅스텐, 칼슘 또는구리를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 IAA 생산용 조성물일 수 있다.

- [0123] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 미량 원소로 텅스텐을 추가 포함하는 것일 수 있다.
- [0124] 또한, 본 발명은, 상기의 메탄산화균을, 메탄 및 자일로스가 탄소원으로 포함된 배지에 접종하여 배양하는 단계; 상기 배양된 배양액에서, 상등액을 회수하는 단계; 및 회수된 상등액에서 식물성장촉진호르몬을 수득하는 단계 포함하는, 식물성장촉진호르몬 생산방법을 제공한다. 마찬가지로, 조성물에 자일로스가 추가 포함될 수 있다.
- [0126] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0128] <실험방법>
- [0129] (1) 화학물질 준비
- [0130] 본 연구에 사용된 모든 화학 물질은 Sigma Aldrich Inc.(독일)와 Daejung Chemicals and Metals Co.(한국)에서 구입했으며, Exprep 플라스미드 분리 키트와 Expin PCR 정제 키트는 GeneAll Biotechnology Co.(한국)에서 구입했다. 제한 효소는 Enzymomics Co. (한국)에서 구입했다. Lamp Pfu DNA polymerase는 BIOFACT 사 (한국)에서 구입하였으며, Gibson Assembly는 New England Biolabs Inc.(미국)에서 구입했고, Wizard Genomic DNA Purification Kit는 Promega (미국)에서 구입했다.
- [0132] (2) 박테리아 균주 및 배양 조건
- [0133] 이 연구에 사용된 균주는 표 6에 나열되어 있다. *E. coli* DH5α는 클로닝 벡터를 위해 LB 배지에서 배양되었다. *M. alcaliphilum* 20Z는 알려진 기술과 같이 최소 염배지(NMS 배지)에서 배양되었다. *M. alcaliphilum* 20Z 균주는 성장을 지원하기 위해 5μM의 텅스텐이 보충된 50mL의 NMS 배지가 들어있는 500mL 플라스크에 접종되었다. 메탄(50%, v/v)을 배양 플라스크에 공급한 다음 30℃ 및 230rpm으로 설정된 진탕 배양기에 배치했다. 공기를 환기시키고 24 시간마다 메탄을 주입했다. methanotrophic 재조합 균주를 선택하고 유지하기 위해 각각 50 μg/ml 및 10 μg/ml의 작업 농도에서 Kanamycin 및 gentamycin을 배지에 첨가시켰다. 메탄올은 유형 I methanotrophs의 또다른 탄소원이다. 따라서 *M. alcaliphilum* 20Z를 성장시키기 위해 유전자 조작에서 메탄 대신에 1% 메탄올이 사용되었다.

표 6

	Characteristics	Reference
Plasmid		
pET28a		Novagen
pAWP89	P _{tac} :: dTomato, oriV oriT trfA; Kan ^R	
pET-Trp	P _{T7} :: aroG(20Z)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} ; Kan ^R	본 발명
pET-IAA	P _{T7} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} ; Kan ^R	본 발명
pTRP	P _{tac} :: aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
pIAA01	P _{tac} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명

pIAA02	P _{J23119} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
pIAA03	P _{bhr} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
pIAA04	P _{hps} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
pIAA05	P _{mxaf} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
pIAA06	P _{S-layer} :: aro8(Sac)-aro10(Sac)-aldH(Ec)-aroG ^{fbr} -trpE ^{fbr} , oriV oriT trfA; Kan ^R	본 발명
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α		Novagen
<i>Escherichia coli</i> K12		KCTC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C		KCTC
<i>Methylovimicrobium alcaliphilum</i> 20Z ^x		
RS00	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pTRP plasmid	본 발명
RS01	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA01 plasmid	본 발명
RS02	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA02 plasmid	본 발명
RS03	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA03 plasmid	본 발명
RS04	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA04 plasmid	본 발명
RS05	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA05 plasmid	본 발명
RS06	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x harboring pIAA06 plasmid	본 발명

[0137] (3) 플라스미드 및 재조합 균주의 구축

[0138] 이 연구에 사용된 플라스미드는 표 6에 나열되어 있고, 이 연구에 사용된 프라이머는 표 7에 나와 있다. 모든 플라스미드는 Gibson Assembly에서 제작했다. 재조합 플라스미드의 구축에 필요한 모든 유전자는 *E. coli* K12 및 *Saccharomyces cerevisiae* S288C의 게놈 DNA에서 증폭되었다. 피드백 저항 유전자 aroG^{fbr(D146N)} 및 trpE^{fbr(S40F)}는 PCR에 의해 생성되었다. pET28(a) 벡터는 다중 클로닝 부위를 가지고 있어 하나의 플라스미드에서 여러 유전자를 쉽게 클로닝할 수 있다.

표 7

[0140]

Primers	Primer sequences (5' -3')	Descriptions
pAWP89_fw	TAGTTGTCGGGAAGATGCG	Linearize pAWP89 vector removing Tomato coding gene
pAWP89_rv	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA	
aroG_Ec_fw	GACAGCAAATGGGTCGCGATGAATTATCAGAACGAC	Amplify aroG from genomic DNA of <i>E. coli</i> for cloning to pET28 at BamHI restriction site
aroG_Ec_rv	CGACGGAGCTCGAATTCGTTACCCGCGACGCGCTTTTA	
aroG_D146N_rv	GTGATCATATTGAGAACTC	Construct aroG(D146N)

aroG_D146N_fw	GAGTTTCTCAATATGATCAC	
trpE_Ec_fw	AGCGCGTCGCGGGTAACGttcacacaggaacagctATGCAACA CAAAAACCGACTCT	Amplify trpE from genomic DNA of <i>E. coli</i> for cloning to pET28 at EcoRI restriction site
trpE_Ec_rv	GCTTGTCGACGGAGCTCGTCAGAAAGTCTCCTGTGC	
trpE_S40F_rv	GATATCTGCGAATTCCAGCAG	Construct trpE(S40F)
trpE_S40F_fw	CTGCTGGAATTCGCAGATATC	
aro8_Sc_fw	GACAGCAAATGGGTCGCGATGACTTTACCTGAATCA	Amplify aro8 from genomic DNA of <i>S. cerevisiae</i> for cloning to pET28 at BamHI restriction site
aro8_Sc_rv	CGACGGAGCTCGAATTCGCTATTTGGAAATACCAAATTC	
aro10_Sc_fw	AGCGCGTCGCGGGTAACGttcacacaggaacagctATGGCACCT GTTACAATTG	Amplify aro10 from genomic DNA of <i>S. cerevisiae</i> for cloning to pET28 at EcoRI restriction site
aro10_Sc_rv	GCTTGTCGACGGAGCTCGCTATTTTTTATTCTTTTAAGTGCCGCT	
aldH_Ec_fw	CTCCGTCGACAAGCTTGcttcacacaggaacagctATGAATTTT CATCATCTGGC	Amplify aldH from genomic DNA of <i>E. coli</i> for cloning to pET28 at NotI restriction site
aldH_Ec_rv	GTGGTGGTGCTCGAGTGCTCAGGCCTCCAGGCTTAT	
aroG_89_fw	TTCACACAGGAAACAGCTATGAATTATCAGAACGAC	Amplify L-Trp production gene cluster from pET-Trp plasmid to make pTRP plasmid
aroG_pET_fw	GCCTGGAGGCCTGAGCACttcacacaggaacagctATGAATTAT CAGAACGAC	Amplify L-Trp production gene cluster from pET-Trp plasmid for cloning to pET28 at XhoI restriction site to make pET-IAA plasmid
trpE_pET_rv	TGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCAGAAAGTCTCCTGTGC	
aro8_89_fw	TTCACACAGGAAACAGCTATGACTTTACCTGAATCA	Amplify IAA production gene cluster from pET-Trp plasmid to make pIAA01 plasmid
T7ter_89_rv	GCATCTTCCCACAACACTACAAAAACCCCTCAAGACCC	Amplify L-Trp production gene cluster and IAA production gene cluster from pET-Trp and pET-IAA plasmid, respectively, to make pTrp00 and pIAA01 plasmid
IAA_89_fw	GGTATTCACACAGGAAACAGCTATGACTTTACCTGAATCA	Linearize pIAA01 plasmid removing pTac promoter
IAA_89_rv	CAGCTCACTCAAAGCGGTAATACG	
Bhr_fw	CCGCCTTTGAGTGAGCTGCCGTTTGTCCGATAACAAC	Amplify Hps promoter from genomic DNA of <i>M. alcaliphilum</i> 20Z to construct pIAA03 plasmid
Bhr_rv	CTGTTTCCTGTGTGAATACCTTAATTGCCTTGTTTGAGCC	
Hps_fw	CCGCCTTTGAGTGAGCTGGAGGCGTTAGCAAAGAGCAA	Amplify Hps promoter from genomic DNA of <i>M. alcaliphilum</i> 20Z to construct pIAA04 plasmid
Hps_rv	CTGTTTCCTGTGTGAATACCGTTTCTTCCGATAGTTACGG	
MxaF_fw	CCGCCTTTGAGTGAGCTGATAGACAAGTCCATCACGAC	Amplify MxaF promoter from genomic DNA of <i>M. alcaliphilum</i> 20Z to construct pIAA05 plasmid
MxaF_rv	CTGTTTCCTGTGTGAATACCTTTATCGCATAATGTGCGCG	
Slayer_fw	CCGCCTTTGAGTGAGCTGATGGAATCGATATATCGATA	Amplify S-layer protein promoter from genomic DNA of <i>M. alcaliphilum</i> 20Z to construct pIAA06 plasmid
Slayer_rv	CTGTTTCCTGTGTGAATACCTTTTCGCTTTTGTAGAAAG	
pJ23119_89_fw	GCACAGGAGACTTCTGATAGTTGTGCGGAAGATGCGT	Linearize pIAA01 vector removing pTac and Tomato coding gene to construct pIAA02 plasmid
pJ23119_89_rv	CTGTTTCCTGTGTGAATACCGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGC TAGCTGTCAACAGCTCACTCAAAGGCGG	
IAA_89_fw	GGTATTCACACAGGAAACAGCTATGACTTTACCTGAATCA	Amplify IAA-production gene cluster from pIAA01 plasmid to construct pIAA02 plasmid
IAA_J23119_rv	TCAGAAAGTCTCCTGTGCATGATGC	

[0141] *Gibson Assembly에 사용되는 상동 시퀀스에는 밑줄이 그어져 있다. 리보솜 결합 부위는 소문자로 표시된다.

[0143] 따라서 트립토판 및 IAA 생산 경로를 pAWP89 벡터로 클로닝하기 전에 pET28 (a)를 사용하여 이러한 경로를 먼저 구축했다. 플라스미드 pET-Trp는 pET28(a) 벡터에서 각각 SacI 및 NotI의 제한 부위에서 $aroG^{fbr(D146N)}$ 및 $trpE^{fbr(S40F)}$ 를 차례로 클로닝하여 구축되었다. $aroG^{fbr(D146N)}$ 및 $trpE^{fbr(S40F)}$ 를 포함하는 단편을 pET-Trp에서 증폭하고 pAWP89 벡본에 연결하고, pAWP89-for 및 pAWP89-rev 프라이머를 사용하여 역PCR로 선형화하여 pTRP 플라스미드를 생성했다. pET-IAA 및 pIAA01의 구축은 pET-Trp 및 pTRP 구축과 동일한 전략을 사용하여 수행되었다. 프로모터 최적화를 위한 플라스미드를 구축하기 위해, P_{tac} 프로모터를 제거하기 위해 IAA_89_fw 및 IAA_89_rv 프라이머를 사용하는 역 PCR에 의해 pIAA01을 선형화했다. 이 단편은 *M. alcaliphilum* 20Z의 게놈 DNA에서 증폭된 Bhr, Hps, MxaF 또는 S-layer 프로모터와의 결합(ligation)을 위한 백본(backbone)으로 사용되어 pIAA03에서 pIAA06까지의 플라스미드 목록을 생성했다. pIAA02 플라스미드를 구축하기 위해 pAWP89 벡본 및 IAA 생산 유전자 클러스터를 pJ23119_89_fw 및 pJ23119_89_rv 프라이머를 사용하여 역PCR로 선형화하고, 각각 $aro8_89_fw$ 및 $T7ter_89_rv$ 프라이머를 사용하여 pIAA01에서 증폭 한 다음 라이게이션(ligated)했다.

[0144] Nguyen et al.에 의해 기술된 바와 같이, 재조합 플라스미드를 전기천공법에 의해 *M. alcaliphilum* 20Z에 도입하였다. *M. alcaliphilum* 20Z 세포를 OD_{600} 이 0.4-0.5에 도달할 때까지 배양하고 5000 x g 및 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 수확했다. 세포 펠렛을 차가운 멸균 증류수로 두번 세척했다. 생성된 펠렛을 50 μ L의 냉수에 재현탁시켰다. DNA 플라스미드(약 500ng)를 첨가하고 세포 재현탁액 50 μ L와 부드럽게 혼합한 후 이 혼합물을 차가운 1-mm 간격 큐벳(Bio-Rad)에 옮겼다. Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad)을 사용하여 1300V, 25 μ F 및 200 Ω 에서 전기천공을 수행했다. 전기 천공된 세포를 NMS 액체 배지에서 24시간 동안 회수한 후 선택적 한천 플레이트에 펼쳤다.

[0146] (4) 분석 방법

[0147] 세포 광학 밀도는 600nm의 파장에서 Implen(독일)에서 공급한 NanoPhotometer를 사용하여 기록되었다. 자일로스, 포름산염 및 아세테이트의 농도를 결정하기 위해 셰이크 플라스크 배양액의 상층액을 원심 분리에 의해 세포에서 분리하고 0.2 μ m 주사기를 통해 여과했다. 자일로스, 포름산염 및 아세테이트는 굴절률 검출기와 Aminex HPX-87H 유기산 컬럼 (Bio-Rad, Hercules, USA)이 있는 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(Agilent, USA)를 사용하여 검출 및 측정되었다. 황산(0.005 M)은 0.6 mL/min의 유속으로 이동상에 사용되었으며 컬럼 온도는 60℃로 유지되었다. 세포 추출물은 클로로포름으로 세포 파편을 추출하여 얻었다. Tryptophan은 Nagaraja et al.에 의해 설명된 분광 광도법에 의해 상층액과 세포 추출물 모두에서 분석했다. 간단히 말하면, 300 μ L의 0.2% p-페닐렌 디아민을 유리관에 부은 다음 600 μ L의 1:1 황산 용액을 첨가했다. 혼합물을 냉각기에서 냉각시켜 반응을 위해 온도를 약 0-4℃로 유지시켰다. 이어서, 0.5% 아질산 나트륨 200 μ L와 3% 설파믹산(sulfamic acid) 100 μ L를 차례로 첨가했다. 반응물을 담은 유리관을 차가운 상태로 유지하고 때때로 5분 동안 흔들었다. 그후 600 μ L의 시료를 첨가했습니다. 마지막으로 적절한 부피의 1:1 황산 용액을 혼합물에 첨가하여 총 부피 2.5 mL에 도달하고 완전히 혼합했다. 생성된 생성물은 520 nm의 파장에서 측정되었다. IAA는 0.5M 염화 제2철(ferric chloride)과 35% 과염소산(perchloric acid)으로 구성된 Salkowski 시약을 사용하여 화학적 방법으로 분석되었다. 배양액의 상층액 1mL를 신선한 Salkowski 시약 2mL와 혼합 하였다. 혼합물을 암실에서 실온에서 25분 동안 배양하였다. 생성된 핑크색 생성물의 흡수는 나노포토미터(NanoPhotometer)를 사용하여 520 nm의 파장에서 측정되었다.

[0149] (5) 종자 발아 분석

[0150] 본 실험에 사용된 밀 종자(*Triticum aestivum* L.)는 국내 현지 시장에서 구입한 것이다. 종자 발아 연구는 밀 종자 표면을 0.525% NaClO 용액에 15분 동안 담가서 살균하였다. 그런다음 밀 씨앗을 멸균수로 여러 번 세척하고 공기 건조시켰다. 건조된 종자를 10^8 개 세포/mL의 농도로 재조합 균주의 배양브로쓰(culture broth)를 포함하는 5mL의 NMS 25%에 밤새 담갔다. 대조군으로 모균주를 포함하는 NMS 25%에 담긴 종자를 사용하였다. 처리된 종자를 공기 건조시키고 NMS 25% 한천 플레이트(0.7 %한천)의 각 플레이트에 10개의 종자를 실온의 암실에서 3

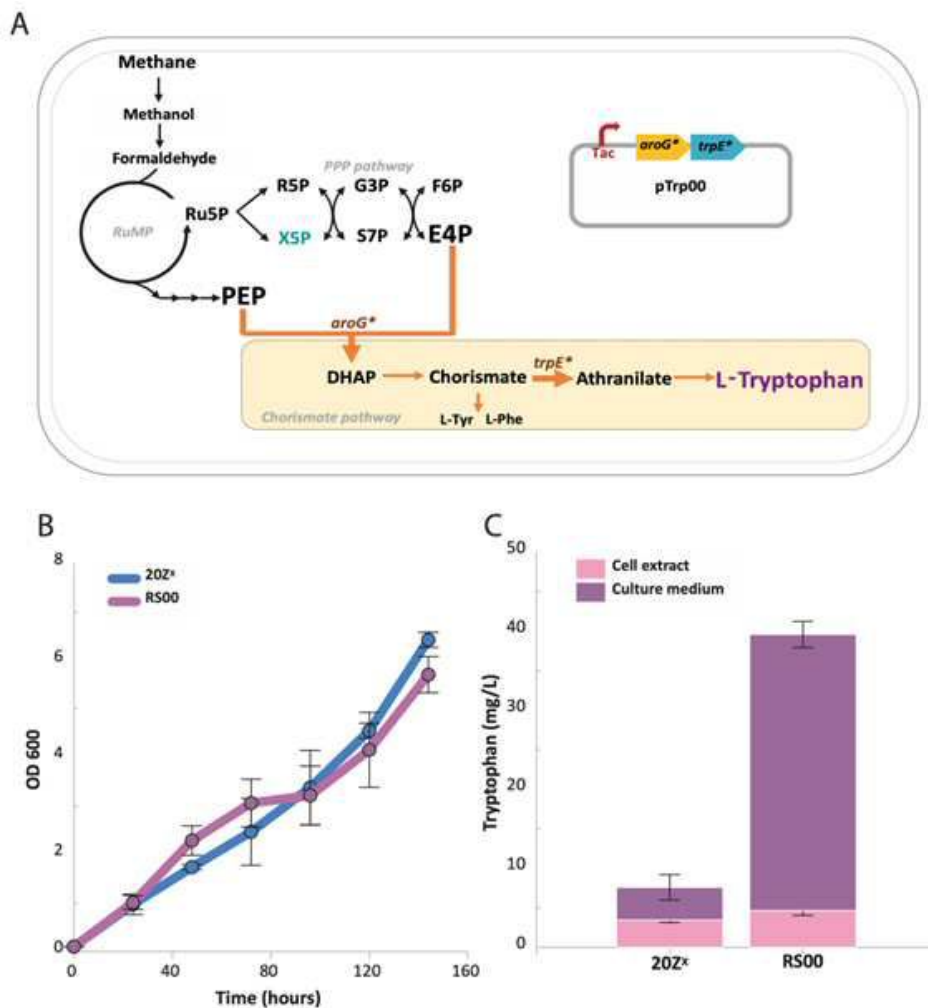
일 동안 두었다. 그 후, 발아된 종자를 NMS 25% 한천이 함유된 유리 시험관으로 옮겨 뿌리와 새싹의 연장을 위한 더 큰 공간을 제공했다. 파종 5일 후에 뿌리 및 새싹 길이와 함께 종자 발아를 기록하였다. 각 치료에 대해 5 번의 복제가 수행되었다.

[0152] 프로모터 최적화 실험에 사용되는 프로모터에 대한 설명

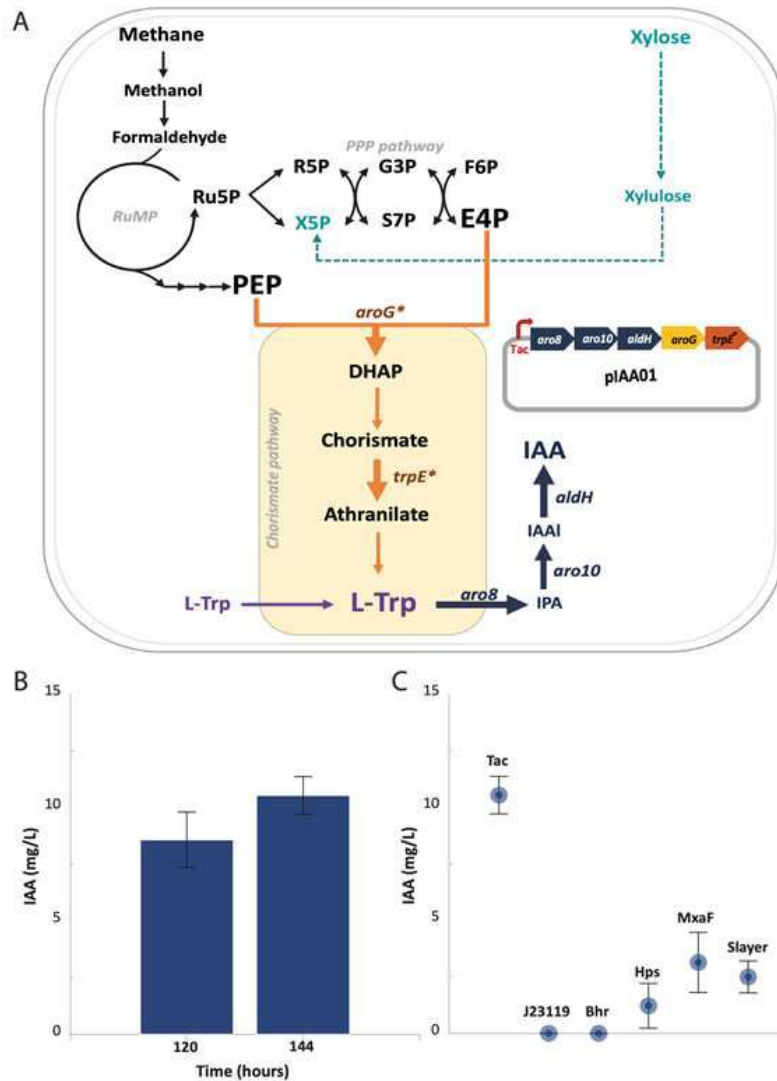
[0153] 구체적으로 bacteriohemerythrins(Bhr)는 *M. alcaliphilum* 20Z의 메탄산화 과정에서 입자성 메탄모노옥시게나제(methane monooxygenase, pMMO)에 산소를 공급하는 중요한 효소로 가정되었으며, 그 프로모토는 산소 가용성(availability)에 의해 조절된다. Hexulose-6-phosphate synthase(Hps)는 *M. alcaliphilum* 20Z의 C1 동화에서 핵심적인 반응인 포름알데히드(formaldehyde)와 리불로스-5-포스페이트(ribulose-5-phosphate)의 축합을 촉매한다. *M. alcaliphilum* 20Z의 P_{hps} 프로모터 구동 gfp 유전자는 상대적으로 높은 형광신호를 나타냈다고 알려졌다. MxaF는 *M. alcaliphilum* 20Z에서 hps, gln(질소 조절 단백질) 및 ect(ectoine synthase)의 프로모터와 비교할 때 가장 강력한 것으로 간주되는 메탄을 탈수소 효소의 큰 서브 유닛을 암호화한다. S-layer 단백질은 *M. alcaliphilum* 20Z의 지질 이중층 표면을 덮어 모양과 구조적 무결성을 유지한다. *Lactobacillus acidophilus*와 같은 일부 다른 박테리아에서는 S-layer 단백질이 높은 수준으로 발현되어 전체 단백질 함량의 약 15 %를 차지하며 그 프로모터가 가장 강력한 것으로 간주된다.

도면

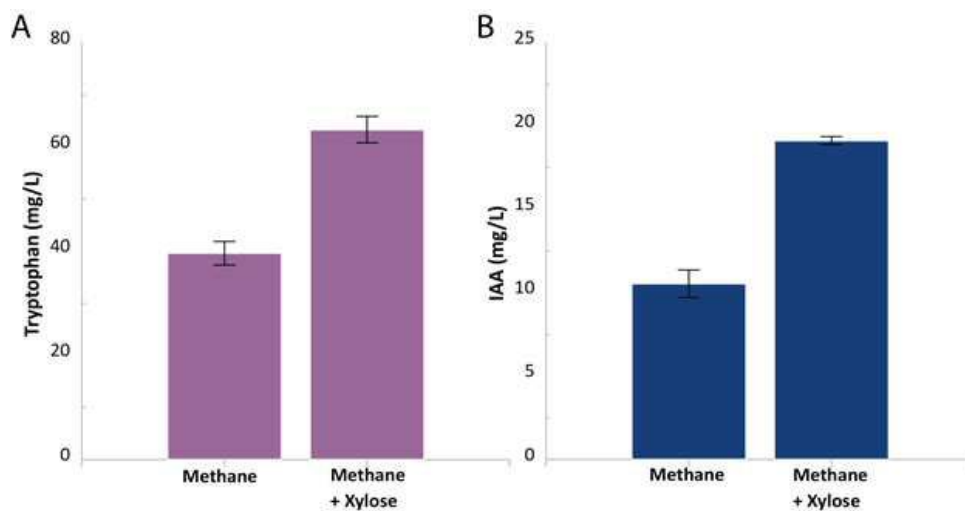
도면1



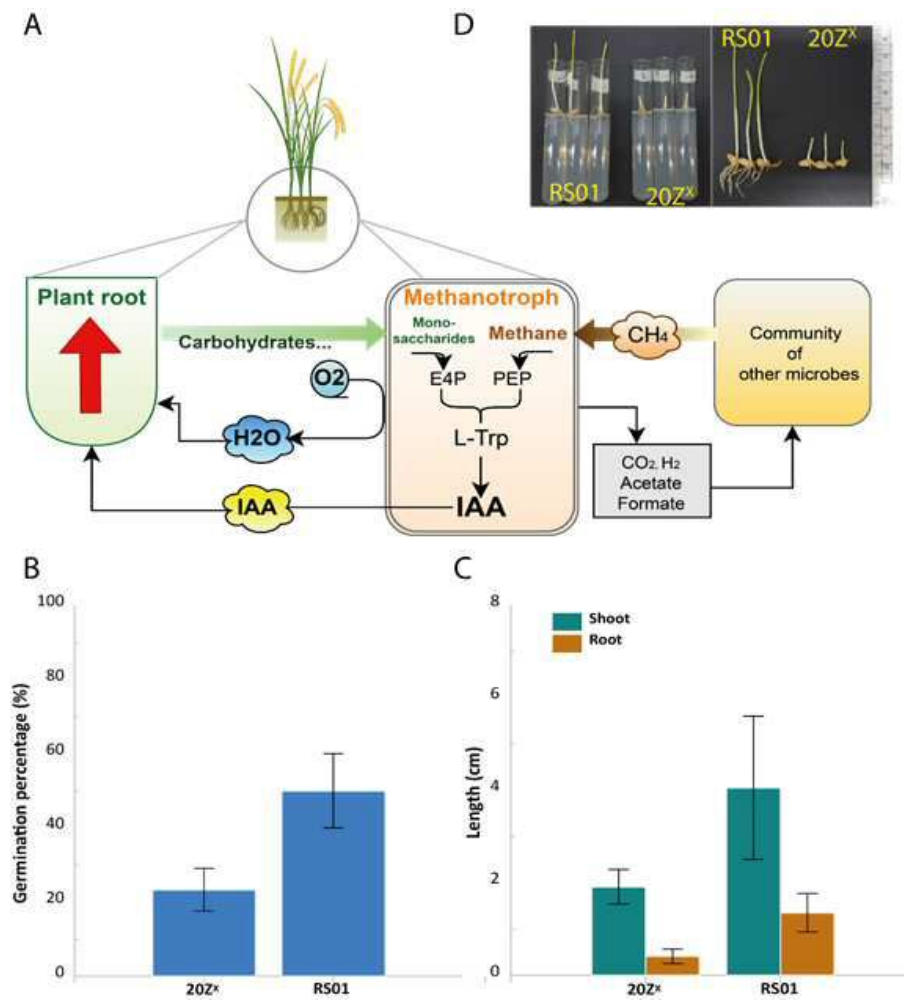
도면2



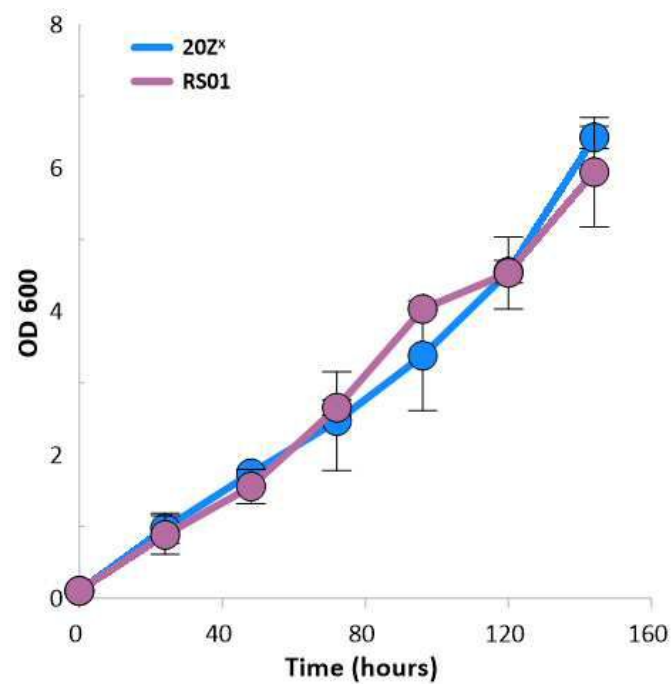
도면3



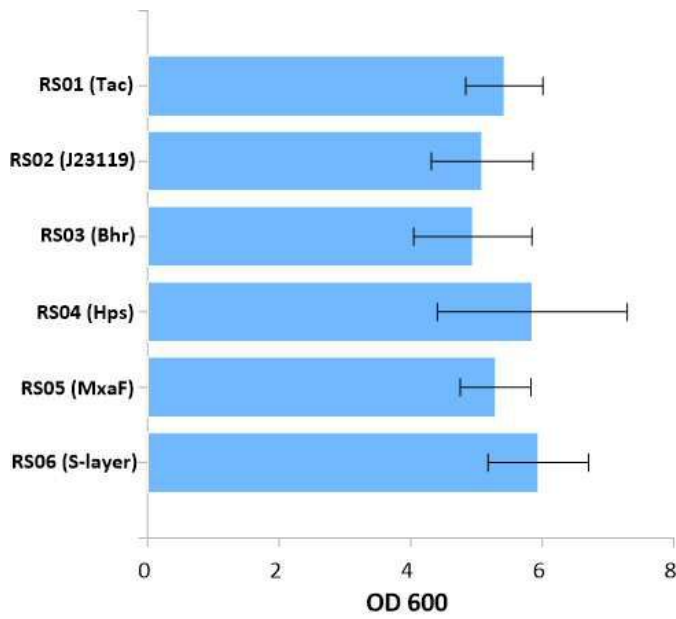
도면4



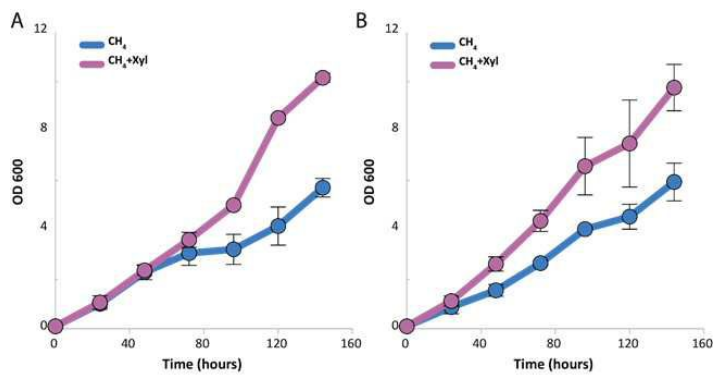
도면5



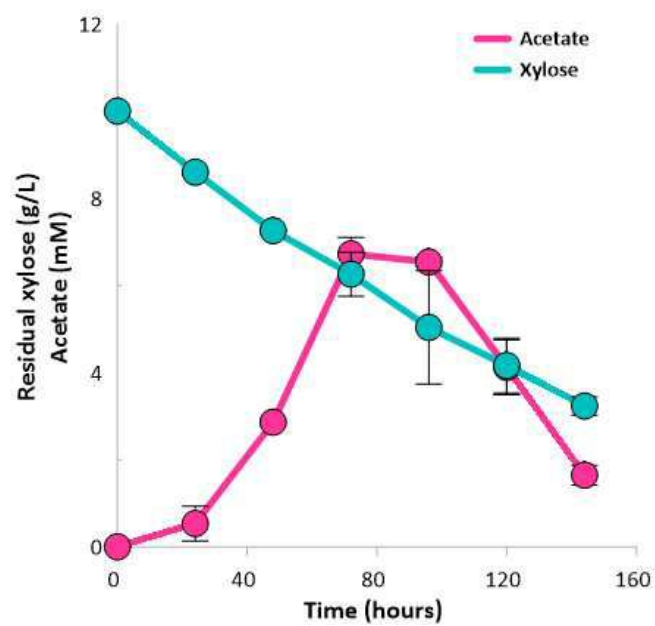
도면6



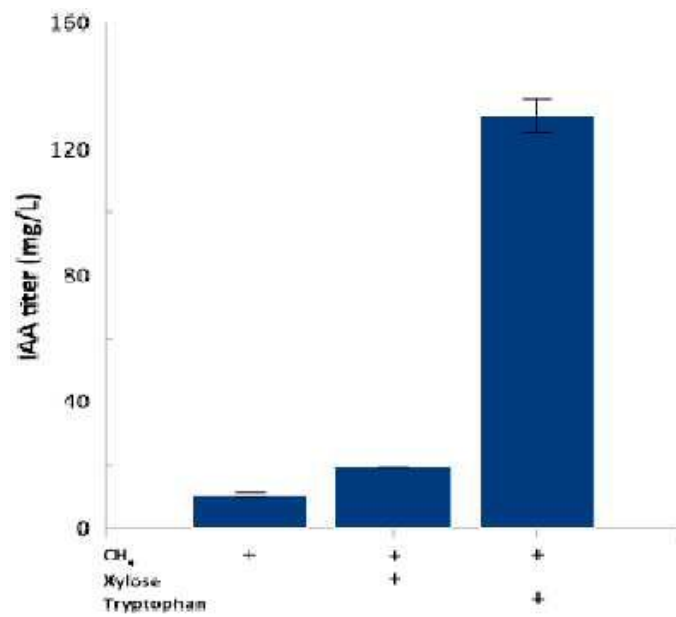
도면7



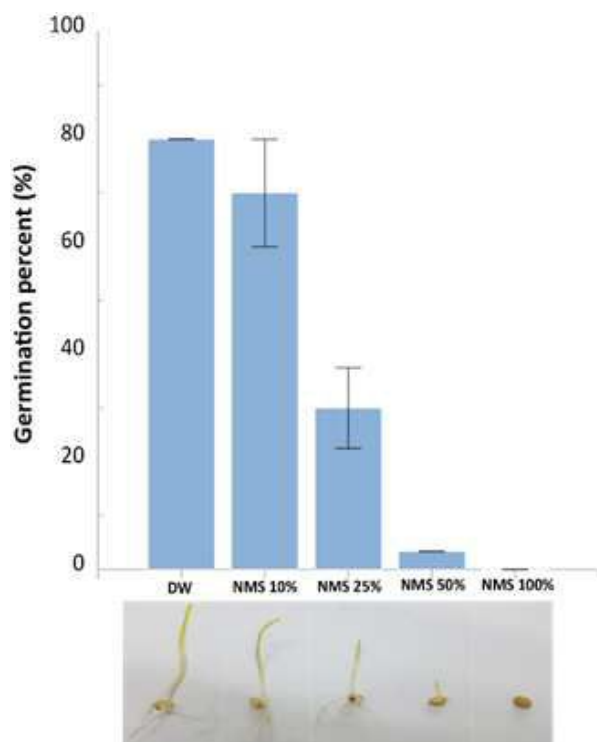
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transgenic Methanogens Having The Ability To Produce Plant Growth Promoting Hormone And Method For Producing Plant Growth Promoting Hormone Using The Same
- <130> GKH20P-0226

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1053

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atgaattatc agaacgacga tttagcatc aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc 60

gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga 120

aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca 180

tgctcaattc atgactcctgt cgcgcaaaaa gattatgcca ctgcttctgt ggcgctgcgt 240

gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgctctt attttgaaaa gccgctacc 300

acggtgggct ggaaagggt gattaacgat ccgcatatgg ataatactt ccagatcaac 360

gacggctctg gtatagcccg taaattgctg ctgatatta acgacagcgg tctgccagcg 420

gcaggtgagt ttctcaatat gatcaccca caatatctg ctgacctgat gagctggggc 480

gcaattggcg caggtaccac cgaatgcag gtgcaccgag aactggcatc agggctttct 540

tgccggctcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt 600

aatgccgcg gtgcgcgca ctgcttctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt 660

gtgaatacca gcgtaacgg cgattgcca atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac 720

tacagcgca agcacgttg tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg cctgccagca 780

caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat 840

gtttgtctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggcattat tggcgtgatg 900

gtggaaagcc atctggtgga aggcattcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac 960

ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tggaagata ccgatgctct gttacgtcaa 1020

ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taa 1053

<210> 2

<211> 1563

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

atgcaaacac aaaaaccgac tctgaactg ctaacctgcg aaggcgctta tcgcgacaat 60

cccaccgcgc tttttacca gttgtgtggg gatcgtccg caacgtgct gctggaattc 120

gcagatatcg acagcaaaga tgatttaaaa agcctgctgc tggtagacag tgcgctgcgc 180
 attacagctt taggtgacac tgtcacaatc caggcacttt ccggcaacgg cgaagccctc 240

ctggcactac tggataacgc cctgcctgcg ggtgtggaaa gtgaacaatc accaaactgc 300
 cgtgtgctgc gcttcccccc tgtcagtcga ctgctggatg aagacgcccg cttatgctcc 360
 ctttcggttt ttgacgcttt ccgtttattg cagaatctgt tgaatgtacc gaaggaagaa 420
 cgagaagcca tgttcttcgg cggcctgttc tcttatgacc ttgtggcggg atttgaagat 480
 ttaccgcaac tgtcagcggg aaataactgc cctgatttct gtttttatct cgctgaaacg 540
 ctgatggtga ttgacctca gaaaaaagc acccgattc aggccagcct gtttgcctcg 600
 aatgaagaag aaaaacaacg tctcactgct cgcctgaacg aactacgtca gcaactgacc 660

gaagccgcgc cgcgctgcc agtggtttcc gtccgcata tgcgttgtga atgtaatcag 720
 agcgtagaag agttcgggtg cgtagtgcgt ttgttgcaaa aagcgattcg cgctggagaa 780
 atttccagg tggtgccatc tcgccgtttc tctctgcct gcccgtcacc gctggcggcc 840
 tattacgtgc tgaaaaagag taatcccagc ccgtacatgt tttttatgca ggataatgat 900
 ttcacctat ttggcgctc gccgaaaagc tcgctcaagt atgatgccac cagccgccag 960
 attgagatct acccgattgc cggaacacgc ccacgcggtc gtcgcgccga tggttcactg 1020
 gacagagatc tcgacagccg tattgaactg gaaatgcgta ccgatacataa agagctgtct 1080

gaacatctga tgctggttga tctcgcccgt aatgatctgg cacgcatttg ccccccggc 1140
 agccgctacg tcgccgatct caccaaagt gaccgttatt cctatgtgat gcacctcgtc 1200
 tctcgcttag tcggcgaact gcgtcacgat cttgacgcc tgcacgtta tcgcgctgt 1260
 atgaatatgg ggacgttaag cgggtgcgccg aaagtacgcg ctatgcagtt aattgccgag 1320
 gcggaaggtc gtcgccgagg cagctacggc ggcgcggtag gttatttcac cgcgcatggc 1380
 gatctcgaca cctgcattgt gatccgctcg gcgctggtgg aaaacggtat cgccaccgtg 1440
 caagcgggtg ctggtgtagt ccttgattct gttccgcagt cggaagccga cgaaaccgt 1500

aacaaagccc gcgctgtact gcgcgtatt gccaccgcgc atcatgcaca ggagactttc 1560
 tga 1563

<210> 3
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 3

atgactttac ctgaatcaaa agacttttct tacttgtttt cggtatgaaac caatgctcgt 60

aaaccatccc cattgaaaac ctgcatccat cttttccaag atcctaacat tatctttttg	120
ggtgggtggcc tgccattaaa agattatttc ccatgggata atctatctgt agattcaccc	180
aagcctcctt ttccccaggg tattggagct ccaattgacg agcagaattg cataaaatac	240
accgtcaaca aagattacgc tgataaaaagt gccaatcctt ccaacgatat tcctttgtca	300
agagctttgc aatacgggtt cagtgtctgt caacctgaac tattaaactt cattagagat	360
cataccaaga ttatccacga tttgaagtat aaggactggg acgttttagc cactgcaggt	420
aacacaaatg cctgggaatc tactttaaga gtcttttcta accgaggtga tgtcatctta	480
gttgaggcac attctttttc ctcttcattg gcttctgcag aggcctcaagg tgtcattacc	540
ttccccgtgc caattgacgc tgatggatc attcctgaaa aattagctaa agtcatggaa	600
aactggacac ctggtgctcc taaaccaaag ttgttataca ctattccaac ggcccaaat	660
ccaactggta ctccattgc agaccataga aaggaggcaa tttaacagat cgctcaaaag	720
tacgacttcc taattgtgga agatgaacct tattatttct tacaatgaa tccctacatc	780
aaagacttga aggaaagaga gaaggcacia agttctcaa agcaggacca tgacgaattt	840
ttgaagtctt tgcaaacac ttctctttcc ttggatacag aaggccgtgt tattagaatg	900
gattcctttt caaaagtgtt ggccccaggg acaagattgg gttggattac tggttcatcc	960
aaaatcttga agccttactt gagtttgcac gaaatgacga ttcaagcccc agcaggtttt	1020
acacaagtgt tggtaacgc tacgtatcc aggtggggtc aaaagggtta ctggactgg	1080
ttgcttggcc tgcgtcatga atacactttg aaacgtgact gtgccatcga tgccctttac	1140
aagtatctac cacaatctga tgctttctgt atcaatcttc caattgcagg tatgtttttc	1200
accgtgaaca ttgacgcac tgctccacct gagtttaaaa caaaatacaa ctgagaccct	1260
taccagctag aacagagctt ttaccacaaa gtggttgaac gtggtgtttt agtgggtccc	1320
ggttcttggc tcaagagtga gggtagacg gaacctcttc aaccgctga atctaaagaa	1380
gtcagtaac caacataat ttcttcaga ggtacctatg cagctgtctc tctgagaaa	1440
ctgactgaag gtctgaagag attagtgat actttatag aagaatttgg tatttccaaa	1500
tag	1503
<210> 4	
<211> 1908	
<212> DNA	
<213> Saccharomyces cerevisiae	
<400> 4	
atggcacctg ttacaattga aaagtctgta aatcaagaag aacgacacct tgtttccaac	60

cgatcagcaa caattccgtt tggatgaatac atatttaaaa gattgtttgc catcgatacg	120
aaatcagttt tcggtgttcc tggatgacttc aacttatctc tattagaata tctctattca	180
cctagtgttg aatcagctgg cctaagatgg gtcggcacgt gtaatgaact gaacgccgct	240
tatgcggcgc acggatatcc cgttactct aataagattg gctgtttaat aaccacgtat	300
ggcgttgggtg aattaagcgc cttgaacggt atagccggtt cgttcgtga aaatgtcaaa	360
gttttgacac ttgttgggtg ggccaagtcc atagattcgc gttcaagtaa ctttagtgat	420
cggaaacctac atcatttgggt cccacagcta catgattcaa attttaagg gccaaatcat	480
aaagtatatc atgatattgt aaaagataga gtcgcttgc cggtagccta cttggaggat	540
attgaaactg catgtgacca agtcgataat gttatccgcg atatttaca gtattctaaa	600
cctgggtata ttttgttcc tgcagatttt gcggatatgt ctgttacatg tgataatttg	660
gttaattgtc cacgtatatc tcaacaagat tgtatagtat acccttctga aaaccaattg	720
tctgacataa tcaacaagat tactagttag atatatcca gtaaacacc tgcgatcctt	780
ggagacgtac tgactgatag gtatgggtg agtaactttt tgaacaagct tatctgaaa	840
actgggattt ggaattttc cactgttatg ggaaaatctg taattgatga gtcaaaccca	900
acttatattg gtcaatataa tggtaaagaa ggtttaaac aagtctatga acattttgaa	960
ctgtgcgact tggctcttga ttttggagtc gacatcaatg aaattaataa tgggcattat	1020
acttttactt ataaaccaa tgctaaaac attcaatttc atccgaatta tattegcctt	1080
gtggacacta ggcagggcaa tgagcaaatg ttcaaaggaa tcaattttgc ccctatttta	1140
aaagaactat acaagcgcgt tgacgtttct aaactttctt tgcaatatga ttcaaatgta	1200
actcaatata cgaacgaac aatgcggtta gaagatccta ccaatggaca atcaagcatt	1260
attacacaag ttcacttaca aaagacgatg cctaaatttt tgaaccctgg tgatgttgc	1320
gtttgtgaaa caggctcttt tcaattctct gttegtgatt tcgcgtttcc ttgcgaatta	1380
aaatatatat cgcaaggatt tttcctttcc attggcatgg ccttcctgc cgccctaggt	1440
gttggaattg ccatgcaaga ccactcaaac gtcacatca atggtggcaa cgtaaaagag	1500
gactataagc caagattaat tttgtttgaa ggtgacggtg cagcacagat gacaatccaa	1560
gaactgagca ccattctgaa gtgcaatatt ccactagaag ttatcatttg gaacaataac	1620
ggctacacta ttgaaagagc catcatgggc cctaccaggt cgtataacga cgttatgtct	1680
tggaaatgga ccaaactatt tgaagcattc ggagacttcg acggaaagta tactaatagc	1740
actctcattc aatgtccctc taaattagca ctgaaattgg aggagcttaa gaattcaaac	1800
aaaagaagcg ggatagaact tttagaagtc aaattaggcg aattggattt ccccgaacag	1860
ctaaagtgca tgggtgaagc agcggcactt aaaagaaata aaaaatag	1908

<210> 5

<211> 1488

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

atgaattttc atcatctggc ttactggcag gataaagcgt taagtctcgc cattgaaaac	60
cgcttattta ttaacgggtga atatactgct gcggcggaat atgaaacctt tgaaaccgtt	120
gataccggtca cccaggcacc gctggcgaaa attgcccgcg gcaagagcgt cgatatcgac	180
cgtagcgatga gcgcagcacg cggcgatttt gaacgcggcg actggctact ctcttctccg	240
gctaaccgta aagcggtagt gaataaactc gccgatttaa tggaagccca cgccgaagag	300
ctggcactgc tggaactctc cgacaccggc aaaccgattc gtcacagtct gcgtgatgat	360
attcccgcg cggcgcgcgc cattcgctgg tacgccgaag cgatcgaca agtgtaggc	420
gaagtggcga ccaccagtag ccatgagctg gcgatgatcg tgcgtgaacc ggtcggcgtg	480
attgccgcca tcgtgccgtg gaacttcccg ctgttctga cttgctggaa actcggcccg	540
gcgctggcgg cgggaaacag cgtgattcta aaaccgtctg aaaaatcacc gtcagtgcg	600
attcgtctcg cggggctggc gaaagaagca ggcttgcgg atggtgtgtt gaacgtggtg	660
acgggttttg gtcatgaagc cgggcaggcg ctgtcgcgtc ataacgatat cgacgccatt	720
gcctttaccg gttaaccgg taccgggaaa cagctgtga aagatgcggg cgacagcaac	780
atgaaacgcg tctggctgga agcggcggc aaaagcgcca acatcgtttt cgctgactgc	840
ccggatttgc aacaggcggc aagcgccacc gcagcaggca ttttctaca ccagggacag	900
gtgtgcatcg ccggaacgcg cctgttctg gaagagagca tcgccgatga attcttagcc	960
ctgttaaaac agcaggcgca aaactggcag cggggccatc cacttgatcc cgcaaccacc	1020
atgggcacct taatcgactg cgcccacgcc gactcggctc atagctttat tcgggaaggc	1080
gaaagcaaag ggcaactgtt gttggatggc cgtaacgcc ggctggctgc cgccatcggc	1140
ccgaccatct ttgtggatgt ggaccggaat gcgtccttaa gtcgcgaaga gattttcggt	1200
ccggtgctgg tggtcacgcg ttccacatca gaagaacagg cgctacagct tgccaacgac	1260
agccagtacg gccttggcgc ggcggtatgg acgcgcgacc tctcccgcg gcaccgcatg	1320
agccgacgcc tgaaagccgg ttccgtcttc gtcaataact acaacgacgg cgatatgacc	1380
gtgccgtttg gcggctataa gcagagcggc aacggtcgcg acaaatccct gcatgccctt	1440
gaaaaattca ctgaactgaa aaccatctgg ataagcctgg aggctga	1488