



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067201

(43) 공개일자 2024년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01) C12P 17/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 15/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0061388

(22) 출원일자 2023년05월11일

심사청구일자 2023년05월11일

(30) 우선권주장

1020220146532 2022년11월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌 아파트) 201동 1601호

나정걸

서울시 서초구 고무래로 89 반포써밋 107동 302호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인에스알비

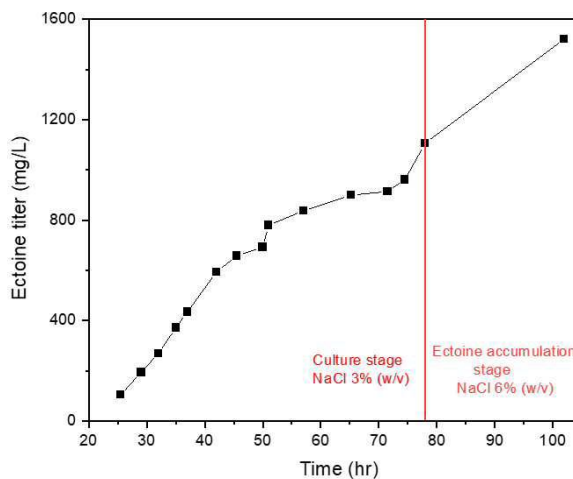
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **엑토인 가수분해효소 유전자의 결실을 통해 엑토인 생산 능력이 향상된 메탄자화균 및 이를 이용한 엑토인 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 및 이를 이용하여 엑토인을 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 엑토인 가수분해효소 유전자의 전부 또는 일부가 결실된 메탄자화균 균주를 구리 공급원 및 질소 공급원의 농도가 최적화된 배지에서 유가식 배양함으로써 종래의 메탄자화균을 회분식 배양하는 방법보다 약 12배 이상 증가된 수치의 효과적인 엑토인 생산이 가능하다.

대 표 도 - 도16



(52) CPC특허분류

C12N 9/78 (2013.01)

C12P 17/12 (2013.01)

C12Y 305/04 (2013.01)

(72) 발명자

조숙형

경기도 고양시 덕양구 화신로 340, 707동 304호

임상은

서울특별시 염창동261 101동 504호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711153913
과제번호	2015M3D3A1A01064929
부처명	기획재정부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발
연구과제명	C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

엑토인 가수분해효소 유전자 (*doeA*)의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속 (*Methylomonas*), 메틸로마이크로비움 속 (*Methylomicrobium*), 메틸로박터 속 (*Methylobacter*), 메틸로코커스 속 (*Methylococcus*), 메틸로스페라 속 (*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속 (*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속 (*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속 (*Methylosarcina*), 메틸로프로판더스 속 (*Methyloprofundus*), 메틸로셀머스속 (*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속 (*Methylohalobius*), 메틸로게아 속 (*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속 (*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속 (*Methylovulum*), 메틸로마리노븀 속 (*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속 (*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속 (*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*), 메틸로셀라 속 (*Methylocella*), 메틸로캡사 속 (*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속 (*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속 (*Methylacidiphilum*) 및 메틸아시디마이크로비움 속 (*Methylacidimicrobium*)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 균주인 것인, 균주.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 속에 속하는 것인, 균주.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z (*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주인 것인, 균주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주에서 내생 플라스미드가 제거되고, 및

엑토인 이산화효소 유전자 (*ectD*) 또는 엑토인 생합성 조절 유전자 (*ectR*)의 전부 또는 일부가 결실된 것인, 균주.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 (*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z DP3) 균주인 것인, 균주.

청구항 7

*doeA*의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주; 및

염화나트륨, 구리 공급원 및 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상;

을 포함하는, 엑토인 생산용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 엑토인 생산용 조성물은 30 내지 60 g/L 농도의 염화나트륨, 10 내지 20 uM 농도의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도의 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 엑토인 생산용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 구리 공급원은 염화구리(II) (CuCl_2)이거나, 또는 상기 질소 공급원은 질산칼륨 (KNO_3)인 것인, 엑토인 생산용 조성물.

청구항 10

메탄이 공급되는 배지에서 균주를 배양하는 배양단계; 및

균주가 배양된 배양배지에 포함된 엑토인을 수득하는 수득단계;

를 포함하고,

상기 균주는 *doeA*의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주인 것인,

엑토인 생산 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 메탄이 공급되는 배지는 염화나트륨, 구리 공급원 및 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 엑토인 생산 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 메탄이 공급되는 배지는 30 내지 60 g/L농도의 염화나트륨, 10 내지 20 μM 농도의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도의 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 엑토인 생산 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 구리 공급원은 염화구리(II) (CuCl_2)이거나, 또는 상기 질소 공급원은 질산칼륨 (KNO_3)인 것인, 엑토인 생산 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 배양단계는 유가식 배양 (fed-batch culture)으로 균주의 배양이 이루어지는 것인, 엑토인 생산 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 엑토인 생산 방법은,

균주의 배양이 종료된 후, 소정의 시간 동안 균주에 고삼투압 충격을 가하고, 및 배지에 질소 공급원을 추가 공급하여 세포 내 엑토인 축적을 유도하는 유도단계;

를 더 포함하는 것인, 엑토인 생산 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 및 이를 이용하여 엑토인을 생산하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 엑토인 가수분해효소 유전자 (*doeA*)의 전부 또는 일부가 결실된 메탄자화균 균주, 및 균주의 배양 조건을 최적화하고 배양 정지기 이후 단시간 내에 엑토인의 축적을 유도하기 위한 방법을 발명하여, 엑토인 생산량을 크게 증대시킬 수 있는 엑토인 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메탄가스는 천연가스와 세일가스의 주성분이며 온실효과를 일으키는 원인 물질로 알려져 있다. 석유로 대표되는 액체 탄화수소와는 달리 메탄은 그 자체만으로는 기체이기 때문에 고부가가치 산물로의 전환이 어렵고 연료로서의 사용 또한 어렵다고 평가된다. 그에 따라 메탄가스를 유용성을 지닌 화합물로 전환하고자 하는 노력이 계속

되어 왔다.

- [0003] 한편, 엑토인은 삼투환경이나 건조, 자외선방사 등의 외부 스트레스로부터 세포 내 거대분자를 보호하는 물질로, 화장품산업과 제약산업의 다양한 제품에 첨가되고 있는 상업성 있는 물질이다. 엑토인은 염도 있는 환경에 있는 호염성 미생물에서, 삼투압 스트레스를 견디기 위해 천연적으로 생산되므로, 미생물로부터 엑토인을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 그러나, 메탄가스 전환 및 엑토인 생산 방법에 관한 대부분의 연구는 식량난 문제를 야기할 가능성이 있으며 값이 비싼 당을 탄소원으로 이용하는 미생물의 공정에 집중되어 있다. 그에 비해 값이 저렴하며 온실가스인 메탄을 탄소원으로 활용하는 메탄자화균으로부터의 엑토인 생산 연구는 저조하며, 메탄자화균으로부터 생산되는 엑토인을 산업화하기에는 그 생산량 또한 낮은 실정이다.
- [0005] 이에, 메탄가스 전환 및 엑토인의 대량 생산이 모두 가능한 메탄자화균을 이용한 엑토인 생산법의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에, 본 발명자들은 연구를 통해 *doeA* 유전자가 제 기능을 하지 못하는 메탄자화균 균주를 최적화된 배양 조건에서 배양하는 경우 해당 균주를 통한 엑토인 생산량이 크게 증대될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 이에, 본 발명의 목적은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주를 포함하는 엑토인 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주를 배양하여 엑토인을 수득하는 엑토인 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 메탄자화균 균주가 배양 정지기에 돌입한 후, 단기간 내에 엑토인을 축적하는 엑토인 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 및 이를 이용하여 엑토인을 생산하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 엑토인 가수분해효소 유전자 (*doeA*)의 전부 또는 일부가 결실된 메탄자화균 균주, 및 균주의 배양 조건을 최적화함으로써 엑토인 생산량을 크게 증대시킬 수 있는 엑토인 생산 방법에 관한 것이다.
- [0012] 이하, 본 발명을 더욱 자세하게 설명하고자 한다.
- [0014] 본 발명의 일 양태는, *doeA*의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주에 관한 것이다.
- [0015] 본 명세서 상의 용어 “엑토인 가수분해효소 유전자 (*doeA*)”는 호염성 (halophile) 내지 내염성 (halotolerant) 균이 생산된 엑토인을 탄소원 및 질소원으로 사용하기 위해 분해하는 과정에서 사용되는 엑토인 가수분해효소 (ectoine hydrolase)를 암호화하는 유전자를 의미한다. *doeA*로부터 발현되는 엑토인 가수분해효소는 엑토인을 가수분해하여 아미노에스터로 변화시키며, 아미노에스터는 후속 효소의 기질이 되어 최종적으로 아미노산까지 분해되는 반응을 거친다. *doeA*는 *eutD*로도 지칭될 수 있다.
- [0016] 메탄자화균에서 *doeA*를 결실시키는 경우, 메탄자화균이 이미 생산된 엑토인을 가수분해할 수 없으므로 메탄자화균을 통한 엑토인 생산량을 증대시키기 위한 발판을 마련할 수 있다.
- [0017] 본 명세서 상의 용어 “메탄자화균”은 메탄을 탄소원 및 화학에너지원으로 사용하여 생명활동을 수행하는 원핵 생물종을 의미한다. 메탄자화균에 의해 메탄이 산화되는 과정에서 에너지가 발생할 수 있으며, 메탄 산화의 결과로 메탄올 (CH_3OH)이 생성될 수 있다. 메탄자화균은 절대호기성 (obligate aerobic), 약호기성 (microaerobic), 조건혐기성 (facultative anaerobic) 또는 절대혐기성 (obligate anaerobic) 세균일 수 있으

며, 예를 들어 절대호기성 또는 약호기성 메탄자화균이 엑토인 생산 공정에 활용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균은 메탄자화균은 메틸로모나스 속 (*Methylomonas*), 메틸로마이크로비움 속 (*Methylomicrobium*), 메틸로박터 속 (*Methylobacter*), 메틸로코커스 속 (*Methylococcus*), 메틸로스페라 속 (*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속 (*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속 (*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속 (*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속 (*Methyloprofundus*), 메틸로쉴머스속 (*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속 (*Methylohalobius*), 메틸로게아 속 (*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속 (*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속 (*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속 (*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속 (*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속 (*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*), 메틸로셀라 속 (*Methylocella*), 메틸로캡사 속 (*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속 (*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속 (*Methylacidiphilum*) 및 메틸아시디마이크로비움 속 (*Methylacidimicrobium*)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 균주인 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 속에 속하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z (*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주인 것일 수 있다.
- [0021] 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z (*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) 균주는 독일생물자원센터 (DSMZ)에 균주 번호 DSM 19304로 등록된 균주로서 DSMZ로부터 구매 또는 분양하여 확보할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주에서 내생 플라스미드가 제거되고, 및 엑토인 이산화효소 유전자 (*ectD*) 또는 엑토인 생합성 조절 유전자 (*ectR*)의 전부 또는 일부가 결실된 것일 수 있다.
- [0023] 본 명세서 상의 용어 “내생 플라스미드 (endogenous plasmid)”는 외부적 조작이 수행되기 이전에 세포가 자체적으로 보유하고 있는 내생성 플라스미드를 의미한다. 내생 플라스미드는 선형 또는 원형일 수 있고, 내생 플라스미드를 함유하는 세포의 생명활동에 긍정적이거나 부정적인 영향을 미치는 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 메탄자화균은 유전체에 포함되는 *doeA*, *ectD*, *ectR* 유전자와 별도로 내생 플라스미드에 포함되는 *doeA*, *ectD* 또는 *ectR* 유전자를 보유할 수 있다.
- [0024] 본 명세서 상의 용어 “엑토인 수산화효소 유전자 (*ectD*)”는 엑토인에 수산기 (-OH)를 첨가하여 엑토인을 하이드록시엑토인으로 변화시키는 엑토인 수산화효소 (ectoine hydroxylase)를 암호화하는 유전자를 의미한다. *ectD*로부터 발현되는 엑토인 수산화효소에 의해 엑토인으로부터 생산되는 하이드록시엑토인은 엑토인과 더불어 세포의 삼투 보호제 (osmoprotectant)로서 작용할 수 있다.
- [0025] 본 명세서 상의 용어 “엑토인 생합성 조절 유전자 (*ectR*)”은 엑토인 생합성을 유도하는 일련의 효소를 암호화하는 *ectABC* 오페론 또는 *ectABC-ask* 오페론에 대한 전사억제자를 암호화하는 유전자를 의미한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 메탄자화균의 유전체에 포함되는 *doeA*, *ectD* 및 *ectR*의 각 유전자의 전부 또는 일부를 결실시키기 위해, 자살 벡터 (suicide vector)를 이용할 수 있다.
- [0027] 본 명세서 상의 용어 “자살 벡터 (suicide vector)”는 상동재조합 (homologous recombination) 및 대향선택 (counterselection)을 통해 숙주세포 염색체로부터 표적 유전자의 결실을 유도하는 자살 유전자가 포함된, 복제 불가능한 벡터를 의미한다.
- [0028] 구체적으로, 결실시키고자 하는 유전자의 상류 (upstream)와 하류 (downstream) 영역의 서열이 삽입 자살 벡터를 숙주세포 내로 이동시킨 후, 숙주세포의 염색체에 대한 상동재조합을 유도하여 숙주세포를 형질전환 (transformation)시키고 형질전환된 숙주세포를 대향선택을 유발하는 물질을 첨가한 배지에서 배양하면, 숙주세포 염색체에 상동재조합 되어 있는 자살 벡터의 후속 상동재조합을 통해 자살 벡터가 염색체로부터 방출된 숙주세포를 선별할 수 있다. 최종적으로 선별된 숙주세포의 유전체에는 표적 유전자의 전부 또는 일부의 결실이 이루어지므로, 자살 벡터를 통해 효과적으로 표적 유전자의 기능을 제거할 수 있다.
- [0029] 예를 들어, 자살 벡터에 *doeA* 유전자의 상류 영역 및 하류 영역의 서열을 재조합한 후, 재조합된 자살 벡터와 숙주세포의 염색체를 상동재조합하여 대향선택을 수행하는 경우, 숙주세포의 유전체로부터 *doeA* 유전자를 결실시킬 수 있다.

- [0030] 자살 벡터는 “자살 플라스미드 (suicide plasmid)” 와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 (*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z DP3) 균주인 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, *doeA*의 전부 또는 일부가 결실되지 않은 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주에서 내생 플라스미드가 제거되고, *ectD* 및 *ectR*의 전부 또는 일부가 결실된 균주를 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주로 지칭할 수 있고, 내생 플라스미드와 *ectD* 및 *ectR*이 모두 제거된 균주에서 *doeA*의 전부 또는 일부가 더 결실된 균주를 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주로 지칭할 수 있다.
- [0033] 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주는 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC19047P로 기탁되었고, 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주는 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC19076P로 기탁되었다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태는, *doeA*의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주; 및 염화나트륨, 구리 공급원 및 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상;을 포함하는, 엑토인 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 본 명세서 상의 용어 “구리 공급원”은 세포에 구리 이온을 제공할 수 있는 물질을 의미하는 것으로, 세포가 배양되는 배지에 구리 공급원을 첨가하여 배양함으로써 세포가 배지 내의 구리 이온을 활용할 수 있도록 할 수 있다. 메탄을 메탄올로 산화시키며 화학에너지를 얻는 타입 I 메탄자화균은 메탄을 메탄올로 산화시키기 위한 효소인 pMMO (particulate methane monooxygenase)를 지니므로, 이 효소의 조효소인 구리 공급원의 첨가를 통해 메탄자화균의 성장을 촉진할 수 있다. 구리 공급원으로 염화구리 (CuCl_2), 황산구리 (Cu_2SO_4), 질산구리 ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) 등을 이용할 수 있으며, 예를 들어 염화구리 (CuCl_2)를 배지의 구리 공급원으로 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 명세서 상의 용어 “질소 공급원”은 세포에 질소 화합물을 제공할 수 있는 물질을 의미하는 것으로, 세포가 배양되는 배지에 질소 공급원을 첨가하여 배양함으로써 세포가 배지 내의 질소 화합물을 활용할 수 있도록 한다. 세포의 제반 생명활동에는 질소가 필수로 요구되며, 특히 메탄자화균의 엑토인 생합성 시 여분의 질소가 요구되므로, 질소 공급원의 첨가를 통해 메탄자화균의 엑토인 생합성을 촉진할 수 있다. 질소 공급원으로 질산칼륨 (KNO_3), 효모추출물 (Yeast extract), 요소 (Urea), 펩톤 (Peptone), 트립톤 (Tryptone), 육추출물 (Beef extract) 등을 이용할 수 있고, 예를 들어 질산칼륨 (KNO_3)을 배지의 질소 공급원으로 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 엑토인 생산용 조성물은 30 내지 60 g/L 농도, 예를 들어 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L 또는 60 g/L의 염화나트륨, 10 내지 20 μM 농도, 예를 들어 10 μM , 11 μM , 12 μM , 13 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 17 μM , 18 μM , 19 μM 또는 20 μM 의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도, 예를 들어 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L 또는 10 g/L의 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서, 메탄자화균 균주는 호염성 또는 내염성인 특성으로 인하여 배지에 일정 수준 이상의 염화나트륨 (NaCl)이 공급되어야 생체 대사 및 삼투를 정상적으로 유지하며 성장할 수 있으며, 30 내지 60 g/L 농도의 염화나트륨이 포함된 조건에서 메탄자화균 균주의 성장이 최적화될 수 있다.
- [0039] 또한, 메탄자화균 균주의 배양이 이루어지는 배지에 구리 공급원 및 질소 공급원을 첨가하여 균주의 성장 및 엑토인 생산을 촉진할 수 있으며, 배지에 10 내지 20 μM 농도의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도의 질소 공급원이 첨가될 때 메탄자화균 균주의 성장 및 엑토인 생산이 최적화될 수 있다.
- [0040] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 엑토인 생산용 조성물은 30 내지 60 g/L 농도, 예를 들어 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L 또는 60 g/L의 염화나트륨, 10 내지 20 μM 농도, 예를 들어 10 μM , 11 μM , 12 μM , 13 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 17 μM , 18 μM , 19 μM 또는 20 μM 의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도, 예를 들어 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L 또는 10 g/L의 질소 공급원을 모두 포함하여, 보다 더 높은 메탄자화균 균주의 성장률 및 엑토인 생산량을 달성할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따른 구리 공급원은 염화구리(II) (CuCl_2)이거나, 또는 질소 공급원은 질산칼륨 (KNO_3)인 것일 수 있다.

- [0042] 본 발명의 또 다른 양태는, 메탄이 공급되는 배지에서 균주를 배양하는 배양단계; 및 균주가 배양된 배양배지에 포함된 엑토인을 수득하는 수득단계;를 포함하고, 균주는 *doeA*의 전부 또는 일부가 결실되고, 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 균주인 것인, 엑토인 생산 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄이 공급되는 배지는 염화나트륨, 구리 공급원 및 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄이 공급되는 배지는 30 내지 60 g/L 농도, 예를 들어 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L 또는 60 g/L의 염화나트륨, 10 내지 20 μ M 농도, 예를 들어 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 19 μ M 또는 20 μ M의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도, 예를 들어 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L 또는 10 g/L의 질소 공급원으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄이 공급되는 배지는 30 내지 60 g/L 농도, 예를 들어 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L 또는 60 g/L의 염화나트륨, 10 내지 20 μ M 농도, 예를 들어 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 19 μ M 또는 20 μ M의 구리 공급원 및 2 내지 10 g/L 농도, 예를 들어 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L 또는 10 g/L의 질소 공급원을 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따른 구리 공급원은 염화구리(II) (CuCl_2)이거나, 또는 질소 공급원은 질산칼륨 (KNO_3)인 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따른 배양단계는 유가식 배양 (fed-batch culture)으로 균주의 배양이 이루어지는 것일 수 있다.
- [0048] 본 명세서 상의 용어 “유가식 배양 (fed-batch culture)”은 회분식 배양 (batch culture)의 변형된 형태로서, 세포 배양이 이루어지는 배지에 특정 기질 또는 불특정 기질을 연속적, 또는 간헐적으로 공급하며 세포를 배양하는 방법을 의미한다. 유가식 배양은 지속적인 기질의 공급을 통해 기질저해 또는 대사산물저해를 효율적으로 극복할 수 있으며, 이러한 장점으로 인해 한정된 양의 배지에서 세포를 배양하여 배지 내의 영양소가 고갈되면 세포의 성장이 중단되는 회분식 배양 (batch culture)과 비교하여 세포 성장 또는 특정 산물의 생산을 극대화할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 따른 유가식 배양을 통해 메탄자화균 균주의 성장 및 엑토인 생산량이 최적화된 배지 조건을 지속적으로 유지함으로써, 균주를 배양 조건이 최적화되지 않은 배지에서 배양하거나 회분식 배양으로 배양하는 경우에 비해 엑토인 생산을 크게 증대할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 따른 엑토인 생산 방법은, 균주의 배양이 종료된 후, 소정의 시간 동안 균주에 고삼투압 충격을 가하고, 및 배지에 질소 공급원을 추가 공급하여 세포 내 엑토인 축적을 유도하는 유도단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 본 명세서 상의 용어 “고삼투압 충격”은 세포 배양이 이루어지는 배지의 염 농도가 급작스럽게 상승되어 배지의 삼투압이 높아짐으로써, 세포가 급변한 삼투압 환경에 적응하기 위한 생명활동을 수행하도록 만드는 세포 외부 환경에 의한 자극을 의미한다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서, 고삼투압 충격은 메탄자화균이 배양되는 배지의 NaCl 농도를 급작스럽게 상승시킴으로써 메탄자화균에 가해질 수 있고, 예를 들어 배지 중의 NaCl 농도를 2% (w/v)에서 3% (w/v)로, 2% (w/v)에서 4% (w/v)로, 2% (w/v)에서 5% (w/v)로, 2% (w/v)에서 6% (w/v)로, 2% (w/v)에서 7% (w/v)로, 2% (w/v)에서 8% (w/v)로, 3% (w/v)에서 4% (w/v)로, 3% (w/v)에서 5% (w/v)로, 3% (w/v)에서 6% (w/v)로, 3% (w/v)에서 7% (w/v)로, 3% (w/v)에서 8% (w/v)로, 4% (w/v)에서 5% (w/v)로, 4% (w/v)에서 6% (w/v)로, 4% (w/v)에서 7% (w/v)로, 4% (w/v)에서 8% (w/v)로, 5% (w/v)에서 6% (w/v)로, 5% (w/v)에서 7% (w/v)로, 5% (w/v)에서 8% (w/v)로, 6% (w/v)에서 7% (w/v)로, 6% (w/v)에서 8% (w/v)로, 또는 7% (w/v)에서 8% (w/v)로 변화시킴으로써 배양되는 메탄자화균에 고삼투압 충격을 가할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 구체적으로, 메탄자화균 배양이 이루어지는 배지 중의 NaCl 농도를 3% (w/v)에서 6% (w/v)로 변화시킴으로써 메탄자화균이 그에 대한 반응으로 세포 내 과량의 엑토인을 축적하도록 유도할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에 따른 질소 공급원의 추가는 배양이 종료된 메탄자화균에게 여분의 질소를 공급함으로써

메탄자화균이 외부 환경의 변화에 대응하기 위한 여러 종류의 물질을 생산해낼 수 있도록 하는 것이고, 예를 들어 고삼투압 충격이 가해진 메탄자화균에 질소 공급원을 추가적으로 제공함으로써 메탄자화균이 고삼투압 환경에 적응하기 위한 과량의 엑토인을 생산하여 세포 내에 축적시킬 수 있도록 할 수 있다.

[0055]

본 발명의 일 실시예에서, 질소 공급원의 추가는 배양이 종료된 세포의 배양 배지에 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L 또는 75 g/L의 질소 공급원을 첨가함으로써 수행될 수 있고, 예를 들어 메탄자화균의 배양이 종료된 배양 배지에 5 g/L의 질소 공급원을 첨가함으로써 메탄자화균의 엑토인 생산 및 축적을 유도할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0056]

본 발명은 엑토인 생산 능력이 우수한 메탄자화균 및 이를 이용하여 엑토인을 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 *doeA*가 결실된 메탄자화균을 최적의 배양 조건에서 유가식 배양하고, 배양 정지기 이후의 고삼투압 성 충격을 이용한 엑토인 축적유도를 통해, 종래의 메탄자화균을 회분식 배양하는 방법보다 약 16.9배 이상 증가된 수치로 엑토인을 효과적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 유전체로부터 *doeA*를 결실시키기 위해 제작된 자살 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 자살 벡터에 포함된 *doeA* 상류 (*doeA* upstream) 부분과 메탄자화균 균주의 유전체의 *doeA*가 상동재조합된 후, 수크로스에 대한 대항선택이 수행된 균주에서의 *doeA*의 결실 여부를 아가로즈 젤 전기영동법으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자살 벡터에 포함된 *doeA* 하류 (*doeA* downstream) 부분과 메탄자화균 균주의 유전체의 *doeA*가 상동재조합된 후, 수크로스에 대한 대항선택이 수행된 균주에서의 *doeA*의 결실 여부를 아가로즈 젤 전기영동법으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 4는 대조균인 메틸로마이코로비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주와 본 발명의 일 실시예에 따른 실험균인 메틸로마이코로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주의 배양 시간에 따른 성장속도를 600 nm 파장에서의 광학 밀도를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 대조균인 메틸로마이코로비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주와 본 발명의 일 실시예에 따른 실험균인 메틸로마이코로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주의 배양 시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 성장속도를 배지에 함유된 구리 공급원 (CuCl_2)의 농도별로 600 nm 파장에서의 광학 밀도를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 배지에 함유된 구리 공급원 (CuCl_2)의 농도별로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주를 배양하였을 때, 배지 내의 주요 공급원소의 시간에 따른 농도 변화 (mg/L)를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 성장속도를 배지에 함유된 질소 공급원 (KNO_3)의 농도별로 600 nm 파장에서의 광학 밀도를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 배지에 함유된 질소 공급원 (KNO_3)의 농도별로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 건조세포중량당 엑토인 함량 (mg/DCW g)을 배지에 함유된 질소 공급원 (KNO_3)의 농도별로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주를 5 L 규모의 발효기를 통해 유가식 배양하였을 때, 배양 시간에 따른 균주 성장 속도를 600 nm 파장에서의 광학 밀도를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주를 5 L 규모의 발효기를 통해 유가식 배양하였을 때, 배양

시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 유가식 배양이 이루어진 메탄자화균 균주를 삼각 플라스크로 옮긴 후 배지의 염도를 6% (w/v) NaCl로 변경하여 고삼투압성 충격을 통해 엑토인 축적을 유도할 때, 축적 유도 시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 배지에 함유된 질소 공급원 (KNO_3)의 농도별로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 유가식 배양이 이루어진 메탄자화균 균주를 삼각 플라스크로 옮긴 배지의 염도를 9% (w/v) NaCl로 변경하여 고삼투압성 충격을 통해 엑토인 축적을 유도할 때, 축적 유도 시간에 따른 엑토인 축적량 (mg/L)을 배지에 함유된 질소 공급원 (KNO_3)의 농도별로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄자화균 균주의 유가식 배양이 이루어지는 5 L 규모의 발효기에서 특정 배양시점 이후 배지의 염도를 6% (w/v) NaCl로 변경하고, 질소 공급원 (KNO_3) 5 g/L를 추가 공급하며 24시간 동안 엑토인 축적을 유도하였을 때의 최종 엑토인 축적량 (mg/L)을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 메탄자화균의 배양 조건

본 발명의 메탄자화균은 DSMZ 메틸로마이크로비움 배지 (DSMZ, 독일)에서 배양하였으며, 배지의 조성은 하기 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

표 1

DSMZ 메틸로마이크로비움 배지 조성 (1L 기준)	
NaCl (g)	30 또는 60
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	0.2
KNO_3 (g)	5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g)	0.02
미량 원소 (mL)	1
1 M NaHCO_3 (mL)	50
1 M Na_2CO_3 (mL)	5
인산 버퍼 (mL)	20

표 2

인산 버퍼 (50배수) (g/L)	
KH_2PO_4	14
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	30

표 3

미량 원소 (1,000 배수) (mM)	
EDTA	17.11
CuCl ₂ · 5H ₂ O	15
FeSO ₄ · 7H ₂ O	7.19
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.35
H ₃ BO ₃	0.49
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.06
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.84
Na ₂ MoO ₄	0.15
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.49
텅스텐산나트륨	0.05

[0064]

[0065] 아울러, 메탄자화균을 유가식 배양할 때의 추가 공급 기질의 조성을 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

추가 공급 기질	
KNO ₃	2 g/L
미량 원소	1 mL

[0066]

[0067] 그리고, 모든 배양 과정에서 온도는 30 °C로 유지되었으며, 진탕 배양에 있어 교반 속도는 삼각 플라스크를 이용한 회분식 배양에서 230 rpm, 및 5L 발효기를 이용한 유가식 배양에서 300 내지 750 rpm이었다. 5L 발효기를 이용한 유가식 배양의 배지 pH는 8.9 내지 9.1로 유지되었다.

[0069] 실시예 2. 엑토인 가수분해효소 유전자인 *doeA*가 결실된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주의 제작

[0070] 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주는 염이 있는 환경에 처할 때, 삼투압을 견뎌내기 위한 기작으로 엑토인을 생산하고, *doeA* 유전자에서 발현되는 엑토인 가수분해효소는 엑토인을 N-α-아세틸-L-2,4-디아미노부티레이트로 가수분해한다.

[0071] 엑토인을 하이드록시엑토인으로 전환하는 반응을 매개하는 유전자인 *ectD* 및 엑토인 생합성에 관여하는 엑토인 오페론의 전사억제를 매개하는 유전자인 *ectR*이 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주 (DSM 19304, DSMZ, 독일)로부터 결실된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주에서, 특정 성장시점 이후에 관찰되는 엑토인의 분해를 저해하기 위해서 *doeA* 유전자를 *doeA* 유전자의 상류 또는 하류 단편과 자살 벡터 pK19mobsacB를 재조합한 재조합 자살 벡터와의 상동재조합을 통해 제거하였다.

[0072] 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주를 제작하는 구체적인 단계는 다음과 같다.

[0074] 2-1. *doeA*의 상류 및 하류 단편이 재조합된 자살 벡터의 제작

[0075] 제한효소 *Hind*III, *Eco*R I 를 이용하여 pK19mobsacB를 절단하였고, *doeA*의 상류와 하류 단편을 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통하여 얻어낸 뒤, 5X infusion (Takara)를 이용하여 두 개의 단편을 pK19mobsacB에 연결하였다. *doeA*의 상류 및 하류 단편의 염기서열과, 이를 증폭하기 위한 과정의 프라이머의 염기서열을 표 5에 나타내었다.

표 5

[0076]

서열번호	명칭	서열목록 (5'→ 3')
1	<i>doeA</i> Upstream gene	atgaaagtctttgaacaatgggaatcgaatcgcggctactgccgtgtgtatcctaccgttttcaaacc ggcctccaatgccgtcaagtggatgagtcgggaaaatcctatatcgacttcttcgcaggcgccgtgtac tcaatttcggccacaacaaccgttgatgaaaaagccttgatcgattttatcgaggcggatggcgtagcc cacagtctggacacctacaccacggcgaaacgcgattttatcgaagccttcgccaattccgtgcttaaac gcgaaaaatgaattacaaaatgcaattcatgggaccgaccggaactaatgcggtcgaaaccgcgtgaaat tggcgcgaaggtcacggggcgccgttcgattattcggttcaatcacggttttcacggcatgacactgggc tcgtggcctgcacggcaaccaatatttcgcaatgccgccggcgtaccctggaatatgttcgtcatga acccttcggctgcgaaaagccttgatcggttgccaattaggctgtggcctggaaaactatcgatcagttgc gcgcgcaattttcgattcgtcgagcggcctggaaccgcggcgccgtttttagtcgaaccgattcaagcc gaaggcgccgtcaatgtagccagtcggaatggttgcacgccgtgcaaaaaatggcgacgatctaggcgc gctattgatttttgacgacatccaggcaggttgcggcgccaccggtcaatatttcagttttgacggcatgg atttgaaccggacattatcacattagccaaaggcatcgccggcttcggcaccccgctggcgatgaatttg gtcaagcctgaacacgaccagcatggcgacccggcgaacataccggcactttcagaggtcaaggcttctc cttcgtcgcgggcaagtggcgctgtcctatttcgacgatgacgcattgatgaacgatgtcaagctgaaag gcactaagatgcagcagcacctcgaagacttggcggaacgcttcggtcaaggcggtttcaagttcgccgc aaaggcatgatgcaagggtggacatcgccgatggcgcttggcgaaaaacatcgatcaatcttgcctcga acgcggaactactactcagcgctcggaacggcggaaggtcatcaaatgattccgccgtaacgattc cggaagccgatctgctcgaaggtttaacgattttctcgggcgtcttagcggatgctttggaggcctt
2	<i>doeA</i> Downstream gene	gcaaggagggttactcaatggctaccacgtccagaactgtgaaagtattcaagattatgaattaacat gaagaacatgaagaatagatttgtactttataggctttttcttcatggtgaataaatttttatgatgt attcactaacttacggcctcaacagcgtgggagcgatgaataatgatattcctaatttagcttattcaacg gagaacgaaactaatgagcatacaagttattaatccatccaacggcgaatcatgggcataagcccggaac tcgacgcccgctcgcatgctgcgtcgatcgcgcgcaaatagcctatgccgattggagaaaccaatcc tttgcgcaacgcgcgcaaatgttcggtaaaaatcgctcagcgtttacgcgatgatgtagaattcgctggcacc gctgatgaccttggagatgggcaaacgatcaaggaggcccgctgctgaagtgatgaaggcagcgcttcgcg ccgaccattacgccgaacatggcgagagctatcttccccggatacattggcatctgacgccagctcttagc tatgtgcaatattgcctttggcggttgactgggcatttgccttggaaacgcaccattttggctggcttt tcgcttttgcgccccggcattgatggccggaaacacctgcctgatgaagcatgacccgcatgttcggcct gcgccgaagcaatcgcgcggttatttgagcagagcggagccccggcggtctattgcaaaactacccttg tcgaacaccgatgtagaagcggtcattcgcgatccacgcgtacaagccgtctcgttgaccggttcggatag agccggcactgtcgtggcctcgatcgccggtgctgaaatcaaacccggtcgttctggaattggcgcggtcgcg atccctgcatcgtactggccgatgcagatctggacaaagccgccgatgtgatagcgtgtcgcgcatcatc aatgccggccaatcttgatcgccgcaaacgcacatcatgtcgaagccggcatcatgatgaactcgtgac acggcttgaagaacgtctaaagcaagttgaaactggcgacccgaatgaggaaagcacagacatcgccccc tggcgcgagaagacttgcggctaaacctgcatcgtcaggttcaagaaacgattgccgccggcgcaaatgc cgactcgcggaaaaaataccggacggcgccgggtatttttatccgtgaccttgctaacggcggttacgaa cgacatgacggcgcccgagaagaacacttcggcccggtcgctgtagttattaaagccgaagatcaagatg aagcgatgcgcatagccaaacgacagtcattatggtctagccgacagcatctggacggaacgggtcgcgaggc gaagcgtggctcggaattggaacccggccaagttgcggtcaacggcatcgtcaaaaccgacccagact accaagcggcggtcgaagcgtcaggactcgcccggaactggggccgcacggcatgcacgaatttgtca acgcgacgaggtttggctgggttaa
3	<i>doeA</i> Upstream forward Primer	tgacatgattacgccaagcttatgaaagtctttgaacaatgggaa
4	<i>doeA</i> Upstream Reverse Primer	ccctccttgcaaggcctcaaagcatcgg
5	<i>doeA</i> Downstream forward Primer	tggaggccttgcaaggagggttactcaatggc
6	<i>doeA</i> Downstream Reverse Primer	aaaacgacggccagtgaattcttaaccagccaaacctgctgc

[0077]

자살 벡터 pK19mobsacB에 *doeA*의 상류와 하류 단편이 재조합된 재조합 자살 벡터의 유전자 지도를 도 1에 나타 내었다.

[0078]

이후, 제작된 재조합 자살 벡터를 *E. coli* DH10 수용성 세포 (competent cell)에 열충격법으로 삽입하여, 재조 합 자살 벡터의 안정성을 확인하였다.

[0080]

2-2. 메탄자화균 균주의 염색체에 대한 재조합 자살 벡터의 상동재조합

[0081] 재조합 자살 벡터를 *E. coli* S17-1 λ pir 균주의 수용성세포에 열충격법으로 삽입하여 *E. coli* S17-1 λ pir 균주를 형질전환한 후, 재조합 자살 벡터로 형질전환된 *E. coli* S17-1 λ pir 균주와 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주를 각각 50 mL씩 배양하여 600 nm 파장에서의 광학밀도 0.5에 도달했을 때, 4,000 rpm, 4 °C에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 각각 수확하였다.

[0082] 수확된 두 세포를 200 μ L의 배지에 용해시켜 섞은 후, 15%의 영양 배지가 추가된 2 g/L NaCl의 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체배지에 얹어진 0.2 μ m 기공크기를 가진 나이트로셀룰로스 여과지 위에 30 °C에서 이틀 동안 정치 배양시켜, 두 균주 사이의 접합에 의한 유전자운반체의 상동재조합을 유도하였다. 루프를 이용하여 여과지 위의 세포를 모아, DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 200 μ L가 들어있는 튜브에 넣고 현탁하였다.

[0083] 재조합 자살 벡터의 삽입에 성공한 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주만을 선별하기 위해, pK19mobsacB의 삽입을 나타내는 항생제인 카나마이신 (50 μ g/mL)과 *E. coli*에 독성을 끼치는 날리딕스산 (10 μ g/mL)가 들어있는 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체배지에, 현탁된 세포를 표면 도말하여 5일 간 30 °C에서 정치 배양하였다. 항생제 선별 결과의 확인을 위해, *doeA*의 상류 단편으로 상동재조합될 경우와 *doeA* 하류 단편으로 상동재조합 될 경우를 고려하여 두 쌍의 프라이머를 통해 PCR을 수행하였고, *doeA*의 상류 또는 하류 단편으로 각각 상동재조합된 세포를 확인하였다.

[0084] 항생제 선별 결과를 위한 PCR에 사용된 두 쌍의 프라이머의 염기서열을 표 6에 나타내었다.

표 6

서열번호	명칭	서열목록 (5'→ 3')
7	<i>doeA</i> Upstream Integration_check Forward Primer	atgcttccggtcgtatgtt
8	<i>doeA</i> Upstream Integration_check Reverse Primer	tccggatcgctgattacgac
9	<i>doeA</i> Downstream Integration_check Forward Primer	gcgtcgaaggcgataaaacc
10	<i>doeA</i> Downstream Integration_check Reverse Primer	taagcccactgcaagctacc

[0085] 2-3. 재조합 자살 벡터가 상동재조합된 메탄자화균 균주의 수크로스 대항선택을 통한 *doeA*의 제거

[0088] *doeA* 상류 단편과 하류 단편으로 상동재조합된 단일 콜로니를 각각 하나씩 선별한 후, DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 배지 3 mL에 접종하여 3일간 진탕 배양하였다. 그 후 5% (w/v) 수크로스가 용해된 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체 배지에 표면 도말하여 30 °C에서 5일간 정치 배양하여, 수크로스에 의한 대항선택으로 재조합 자살 벡터의 방출을 유도하여 *doeA*가 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2로부터 제거되도록 하였다.

[0089] 재조합 자살 벡터의 방출을 확인하기 위해 항생제 선별법을 진행하였다. 구체적으로, DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체배지와, 카나마이신이 용해된 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체배지에 100개의 칸이 그려진 도안을 각각 붙이고, 5% (w/v) 수크로스가 포함된 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 고체배지에서 배양된 단일 콜로니 100개를 임의 선별하여, 두 개의 배지에 각각 접종하였다.

[0090] 30 °C에서 5일간 정치배양한 후, 카나마이신이 용해된 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 배지에서 생존하지 못하지만 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 배지에서는 생존한 콜로니만을 선별하여, 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주로부터 재조합 자살 벡터와 *doeA*를 제거하였다.

[0091] 선별된 콜로니의 유전체 안에 *doeA*가 제거됨을 최종적으로 확인하기 위해서, 선별된 콜로니를 대상으로 하여 PCR 기법으로 *doeA* 유전자 단편의 증폭여부를 관찰하였다. *doeA*의 제거 확인을 위한 프라이머의 서열을 표 7에 나타내었다.

표 7

서열번호	명칭	서열목록 (5'→ 3')
11	<i>doeA</i> Elimination_check Forward Primer	gcttcgaacgcggactacta
12	<i>doeA</i> Elimination_check Reverse Primer	cgctgttgaggccgtaagtt

[0093] PCR 기법으로 증폭된 유전자 단편을 아가로즈 젤 전기영동법으로 확인하였고, 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내

었다. 이때, *doeA*가 제거되지 않은 경우 1490 bp 위치에, *doeA*가 제거된 경우 514 bp에 방사선 밴드가 위치하였다.

[0094] 확인 결과, 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주에 대해 *doeA*의 상류 단편 또는 하류 단편으로 상동재 조합이 이루어진 두 경우 모두 *doeA*가 성공적으로 결실되었음을 알 수 있었고, 결과적으로 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주에서 *doeA*가 결실된 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주를 수득할 수 있었다. 수득된 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주는 600 nm 파장에서의 광학밀도 1~2 범위의 성장농도에서, 10% (v/v) DMSO를 부동액으로 이용하여 초저온 냉동고에 보관하였다.

[0096] 2-4. 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주와 20Z DP3 균주의 성장 비교

[0097] 비활성화되어 초저온 냉동고에 보관되어 있는 균주를 50 mL DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 액체배지에 이틀 동안 배양하고, 한 번의 계대 배양을 통해 활성화시켰다. 그 후, 6% (w/v) NaCl 농도의 50 mL DSMZ에 메탄가스를 탄소원으로 하여 600 nm 파장에서 초기 광학밀도 0.2로 접종하였다. 배양은 120시간 동안 진행되었고, 12시간을 주기로 30% (v/v) 메탄가스를 분당 300 cc의 유량으로 4분간 가스를 치환하였다. 시료는 24시간 주기로 채취하여, 분광광도계를 이용하여 600 nm 파장에서의 광학밀도가 측정되었고, 그 결과를 도 4 및 표 8에 나타내었다.

표 8

	각 균주의 배양 시간별 배지 광학밀도 (OD _{600nm})					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
20Z DP2	0.2	1.66667	4.26667	8.14333	11.9	13.01
20Z DP3	0.2	2.01333	4.02333	6.79333	9.00333	8.69

[0098] 광학밀도 측정 결과, 개량 균주인 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP3의 성장세는 48시간까지는 대조균인 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2와 동일하게 성장하다가, 48시간 이후부터는 대조균에 비해 낮은 성장세를 보여, 최종적으로 대조균은 600 nm 파장에서의 광학밀도 13까지 성장하였고 개량 균주는 600 nm 파장에서의 광학밀도 8.7에 그쳤다.

[0100] 개량 균주에서는 대조균과는 달리 엑토인이 분해되지 않으므로, 엑토인을 균주의 질소원 혹은 탄소원으로 재사용할 수 없을 뿐만 아니라, 새로 섭취한 공급원을 산화시키기 위한 에너지가 추가로 소모되기 때문에 이에 대한 세포의 부담으로 성장세가 감소하는 것으로 사료되었다.

[0102] 2-5. 메틸로마이cro비움 알칼리필럼 20Z DP2 균주와 20Z DP3 균주의 엑토인 생산 비교

[0103] 실시예 2-5에서 진행된 배양에서, 24시간 주기로 2 mL의 배양액을 채취하여 13,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포는 -80 °C 초저온환경에서 하루 이상 냉동한 후 이틀 동안 동결 건조하여 세포를 건조하였다. 끝이 뾰족한 도구로 건조된 세포를 잘게 부숴 물리적으로 파쇄한 후, 메탄올:클로로포름:삼차수를 10:5:4의 비율로 섞은 용액 570 µL을 넣고 2,000 rpm에서 5분 동안 섞어주어 화학적인 방법으로 세포를 파쇄하였다.

[0104] 그 후 세포 내부의 소수성물질과 엑토인을 포함하는 친수성물질을 분리하기 위해 170 µL의 삼차수와 클로로포름을 넣고 2,000 rpm에서 5분 동안 섞어준 후, 13,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 층 분리를 이뤘다. 엑토인이 포함된 친수성물질 (상층액)만을 새 튜브에 넣어 시료를 얻었으며, 10 µL의 시료와 삼차수 490 µL, 아세트나이트릴 500 µL를 섞어 시료를 1/100 비율로 희석하였다.

[0105] 희석된 시료를 0.2 µm 기공크기를 가진 여과지를 이용하여 여과한 후, 고성능액체크로마토그래피용 초자에 담아 고성능액체크로마토그래피 (SHIMADZU)와 NH2 컬럼 (ZORBAX)을 이용하여 엑토인의 정성 및 정량분석을 진행하였다. 고성능액체크로마토그래피의 이동상으로는 먼지와 기포가 제거된 70% (v/v) 아세트나이트릴을 이용하였으며, 시료는 30 °C의 컬럼온도, 분당 0.7 mL의 유량으로 분석되었으며, 그 결과를 표 9 및 도 5에 나타내었다.

표 9

	각 균주의 배양 시간별 배지 내 엑토인 축적량 (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
20Z DP2	33.3928	89.5608	60.2672	19.76337	12.80932
20Z DP3	40.15333	82.89125	107.07988	107.75527	94.67329

분석 결과, 개량 균주의 경우 107 mg/L 이상의 엑토인이 생산되었고, 이는 89 mg/L의 엑토인을 생산한 대조균에 비해 1.2배 증가된 수치였다. 또한 48시간 이후로 엑토인 축적량이 현저히 감소하는 대조균과는 달리, 엑토인 분해경로 (*doeA*)가 결실된 개량 균주는 엑토인의 축적량이 유지되었다. 이로써 *doeA* 유전자가 엑토인 분해 기작의 주요한 원인임을 확인할 수 있었다.

실시에 3. 메탄자화균의 엑토인 생산 증대를 위한 배지 조건 최적화

3-1. 메탄자화균의 엑토인 생산 증대를 위한 배지 내 구리 농도의 최적화

3-1-1. 구리 농도에 따른 메탄자화균의 성장 비교

타입 I 에 속하는 메탄자화균은 메탄을 메탄올로 산화시키기 위한 효소 pMMO를 가지고 있기 때문에 메탄가스를 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있다. pMMO 효소는 조효소로 구리이온을 이용하므로 메탄자화균의 메탄산화 속도는 구리이온의 유무와 그 농도에 의존하고, 메탄자화균의 성장속도는 구리이온의 농도에 의존된다. 메탄자화균의 성장에 최적인 구리이온 농도를 적정하기 위해, 기존 배지 내의 구리 농도인 5 uM와 10 uM, 15 uM, 20 uM, 25 uM의 CuCl₂를 DSMZ 배지에 각각 용해하여 메탄자화균 배양을 진행하였다.

구체적으로, 50 mL DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 배지에 초저온냉동고에 보관되어있는 메틸로마이크로비움 알칼라필럼 20Z DP3를 접종하여 이틀 간 진탕 배양한 후, 균주의 활성화를 위해 같은 조건에서 한 번의 계대 배양을 진행하였다.

그 후 6% (w/v) NaCl이 용해된 50 mL DSMZ 배지를 250 mL 삼각플라스크에 담고, 메탄가스를 탄소원으로 하여 120시간 동안 진탕 배양하였다. 이때, 12시간 주기로 30% (v/v) 메탄가스를 공기와 섞어 한 번 여과한 뒤 공급하여 삼각플라스크 내 가스를 치환하였으며, 24시간 주기로 시료를 채취하여 성장농도를 측정하였고, 그 결과를 표 10 및 도 6에 나타내었다.

표 10

	메탄자화균의 구리 농도별 배양 시간에 따른 배지 광학밀도 (OD _{600nm})					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
5 uM CuCl ₂	0.2	1.92667	5.05333	12.80333	14.42667	12.71333
10 uM CuCl ₂	0.2	2.16667	4.73333	12.58333	12.84	13.04
15 uM CuCl ₂	0.2	1.63333	5.99667	13.06667	14.93333	12.20667
20 uM CuCl ₂	0.2	1.97	3.89	9.22	13.16	10.13
25 uM CuCl ₂	0.2	1.1	4.16	9.13	12.56	9.27

분광광도계를 이용하여 600 nm 파장에서 성장을 측정한 결과, 비교조건인 5 uM CuCl₂의 경우 최대 광학밀도 10.9를 기록하였고, 15 uM CuCl₂의 경우에 가장 높은 광학밀도 14.9에 도달하였다. 또한, 모든 실험군의 성장속도는 24시간까지 동일하다가 48시간부터 성장세에 차이가 관찰되었으며, 15 uM CuCl₂이 용해된 환경의 경우가 해당 시점부터 다른 실험군에 비해 빠른 성장을 보였다. 구리농도를 증가시킬수록 메탄자화균의 성장속도는 증가하였지만, 20 uM 이상의 농도에서는 성장 저해가 관찰되었다.

최종적으로, 메탄자화균의 메탄산화는 CuCl₂ 15 uM 농도의 환경에서 가장 빠른 속도로 진행되며, 이에 따른 탄소원 및 에너지원 공급속도가 증가됨에 따라 메탄자화균의 성장 또한 CuCl₂ 15 uM 농도의 환경이 최적임을 확인하

였다.

3-1-2. 구리 농도에 따른 메탄자화균의 엑토인 생산량 비교

실시에 3-1-1에서 진행된 배양에서, 배양과정 중 24시간 주기로 시료를 채취하였고, 그 중 2 mL의 배양액을 튜브에 넣고 4 °C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 수확하였다. 각 시간마다 수확된 세포는 -80 °C 초저온냉동고에 최소 하루동안 보관하여 열린 후 동결건조기를 이용하여 48시간 동안 낮은 온도와 진공상태로 세포를 건조하였다. 끝이 날카로운 도구를 이용하여 건조된 세포를 잘게 부숴 물리적으로 파쇄하였고, 그 후 메탄올과 크로로포름, 삼차수를 10:5:4의 비율로 섞어 각 튜브마다 570 μ L씩 취하고, 5분간 2,000 rpm에서 섞어주어 화학적인 방법을 통해 세포를 파쇄하였다.

엑토인을 포함한 친수성 물질과 소수성 물질의 분리를 위하여, 170 μ L의 삼차수와 동량의 크로로포름을 각 튜브에 취하여 5분간 2,000 rpm에서 섞어주었고, 층 분리를 위해 13,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리하였다. 세포를 가운데에 두고 분리된 상층 (친수성물질)에 존재하는 엑토인의 정성 및 정량분석을 위해 아세트나이트릴 500 μ L, 삼차수 490 μ L, 상층액 10 μ L를 섞어, 분석할 시료를 1/100 비율로 희석하였다.

희석된 시료는 0.2 μ m 기공을 가진 여과지로 여과하여 고성능액체크로마토그래피 (SHIMADZU, ZORBAX NH_2 column)용 초자에 담았고, 기포가 제거되고 여과된 70% 아세트나이트릴을 이동상으로하여, 시료 당 20분간 분석하여, 그 결과를 표 11 및 도 7에 나타내었다.

표 11

	메탄자화균의 구리 농도 별 배양 시간에 따른 배지 내 엑토인 축적량 (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
5 μ M CuCl_2	32.07724	66.22207	70.87187	77.23558	72.51242
10 μ M CuCl_2	31.85662	61.06742	71.33969	79.11074	76.73161
15 μ M CuCl_2	29.92316	61.90152	75.97319	78.89987	72.82571
20 μ M CuCl_2	25.36303	55.10473	69.64988	80.54342	80.7931
25 μ M CuCl_2	21.85601	52.17202	67.30266	77.57474	70.94842

분석 결과, 기존 배지 내의 구리 농도인 CuCl_2 5 μ M의 경우에 최대 72 mg/L의 엑토인을 생산하였고, 다른 실험군의 경우 20 μ M의 CuCl_2 농도에서 80 mg/L의 엑토인을 생산하였다. 각 CuCl_2 농도마다 엑토인 생산량에 차이가 있었지만, 표준편차를 고려했을 때 모든 실험군에서 동일한 양의 엑토인이 생산되었다고 판단하였다. 이를 통해, 600 nm 파장에서의 광학밀도 5 이하까지는 엑토인의 생산이 세포의 성장에 의존하지만, 그 이상의 밀도에서는 세포의 성장에 의존하지 않음을 확인하였다.

3-2. 메탄자화균의 엑토인 생산 증대를 위한 배지 내 질소 농도의 최적화

3-2-1. 메탄자화균 배양 시 배지 내 이온화된 원소의 시간별 추이 측정

DMSO를 부동액으로 하여 비활성화되어있는 메틸로마이크로비움 알칼라필럼 20Z DP3 균주를 DSMZ (1% (v/v) 메탄올) 배지 50 mL에 이를 동안 배양한 후, 한 번의 계대 배양을 통해 균주를 활성화시켰다. 메탄을 탄소원으로 하는 DSMZ 배지 50 mL가 담긴 250 mL 삼각 플라스크에 600 nm 파장에서의 초기 광학밀도 0.2로 접종하여 본 배양하였다.

배양은 120시간에 걸쳐 진행되었으며, 가스 질량유량 제어기를 이용하여 12시간 주기로 30% (v/v) 메탄가스를 공기와 섞어 분당 300 cc유량으로 4분 동안 치환하였다. 24시간 주기로 시료를 취하였으며, 배양액 1 mL를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 수확하고, 0.2 μ m 기공크기의 필터를 이용하여 여과한 후 시간별로 상등액에 남아있는 공급원소의 농도 추이를 이온 크로마토그래피로 분석하였고, 그 결과를 표 12 및 도 8에 나타내었다.

표 12

	메탄자화균의 배양 시간에 따른 배지 내 잔존 공급원소 농도 (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
K ⁺	798.04	788.424	776.925	769.815	763.204
Mg ²⁺	28.826	27.736	26.914	26.223	25.13
NO ₃ ⁻	353.449	39.75	0	0	0
PO ₄ ³⁻	175.699	157.623	148.543	136.477	130.45

[0130]

[0131]

분석 결과, 배지 내의 유일한 질소원인 NO₃⁻ 이온은 배양 48시간이 지난 후 고갈되었다. 고갈 시점은 엑토인의 생합성이 멈춘 시점과 일치하므로, 엑토인 생합성에 질소원이 주요한 역할을 하는 것으로 판단되었다.

[0133]

3-2-2. 질소 농도에 따른 메탄자화균의 성장 비교

[0134]

NaCl 6% (w/v)의 환경에서 배양이 진행되었고, 메탄가스를 탄소원으로 공급하기 위해 밀봉된 뚜껑이 체결된 삼각 플라스크에 30% (v/v) 메탄가스를 공기와 섞어, 질량유량제어기를 이용하여 300 cc/min으로 4분간 가스 치환하였으며, 탄소와 산소의 고갈을 방지하기 위해 12시간 주기로 가스를 치환하였다.

[0135]

250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 부피로 600 nm 파장에서의 초기 광학밀도 0.2로 배양을 시작하였다. 배양은 120시간 동안 진행되었고 24시간 주기로 시료를 채취하여 성장을 관찰하였으며, 세포의 성장은 분광광도계를 이용하여 600 nm 파장에서의 광학밀도로 관찰하였고, 그 결과를 표 13 및 도 9에 나타내었다.

표 13

	메탄자화균의 질소 농도별 배양 시간에 따른 배지 광학밀도 (OD _{600nm})					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.5 g/L KNO ₃	0.2	2.46333	9.1	9.38667	8.48	9.92
1 g/L KNO ₃	0.2	1.68333	5.13667	11.88	14.22	16.38
2 g/L KNO ₃	0.2	2.56	5.45	9.95	12.43333	21.64
5 g/L KNO ₃	0.2	2.27	5.61	9.38	12.48	16.90667
10 g/L KNO ₃	0.2	3.40667	6.38667	8.05	14.10667	15.60667

[0136]

[0137]

관찰 결과, 질소원의 농도변화는 세포의 성장에 영향을 미쳤으며, 120시간 동안 배양을 진행할 때에는 질소원인 KNO₃가 2 g/L일 경우에 가장 빠른 성장을 보여 광학밀도 21.64를 기록하였다. 이는 대조군인 KNO₃ 1 g/L의 경우에 비해 1.3배 이상 증가된 수치이며, 부족한 질소를 섭취하기 위한 질소고정에 소모되던 에너지가 더 고농도의 질소원을 공급함으로써 절약되었기 때문이었을 것으로 판단되었다. 다만, KNO₃ 5 g/L이상의 농도가 용해된 실험군에서는 과량의 KNO₃로 인해 세포의 성장이 저해되었다.

[0139]

3-2-3. 질소 농도에 따른 메탄자화균의 엑토인 생산량 비교

[0140]

실시에 3-2-2에 따른 배양에서, 배양 과정 중 24시간 주기로 시료를 채취하였고, 채취한 시료 속 엑토인 양을 분석하였다.

[0141]

구체적으로, 메탄올:클로로포름:삼차수를 10:5:4의 비율로 섞은 용액으로 세포를 파쇄한 후, 클로로포름과 삼차수의 층 분리현상을 이용하여 세포 내부에 있는 물질 중 친수성 물질만을 얻었다. 엑토인이 포함되어 있는 친수성 물질을 10배 희석하고, 고성능액체크로마토그래피 (SHIMADZU, ZORBAX NH₂ column)를 이용하여 세포 내부의

엑토인을 정성 및 정량분석하고, 분석 결과를 표 14 및 도 10에 나타내었다.

표 14

	메탄자화균의 질소 농도별 배양 시간에 따른 배지 내 엑토인 축적량 (mg/L)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.5 g/L KNO ₃	39.18751	41.40957	43.39519	44.77848	38.45056
1 g/L KNO ₃	35.61497	56.66045	70.40273	76.76646	67.56435
2 g/L KNO ₃	39.4262	64.01196	104.14957	132.15588	116.84946
5 g/L KNO ₃	45.64224	70.28152	103.14856	164.00134	176.67628
10 g/L KNO ₃	44.44282	71.37017	108.94428	141.53272	168.69243

아울러, 메틸로바이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주의 습식세포를 수확한 뒤 수분측정기를 이용하여 수분이 제거된 수확세포의 무게를 측정하고, 600 nm파장에서 광학밀도와 수분이 제거된 건식세포의 중량 사이의 관계를 수학적으로 정의하였다. 메틸로바이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주의 경우 그 계수가 0.198임을 확인하였다.

이를 통해 정의된 광학밀도에 따른 건조세포중량 관계를 이용하여, 배양이 이루어진 메틸로바이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주의 건조세포 1 g당 엑토인 함량을 측정하였고, 측정 결과를 표 15 및 도 11에 나타내었다.

표 15

	메탄자화균의 질소 농도별 배양 시간에 따른 건조중량당 엑토인 함량 (mg/DCW g)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.5 g/L KNO ₃	32.51884	9.18189	9.34489	10.61252	7.68642
1 g/L KNO ₃	42.8038	22.44847	12.13129	11.07732	8.53274
2 g/L KNO ₃	39.4262	24.87698	21.17448	21.4749	10.90742
5 g/L KNO ₃	40.53903	26.7565	22.20513	27.17626	21.20132
10 g/L KNO ₃	44.44282	22.58817	27.35995	20.33316	21.94593

분석 결과, 질소원 농도가 증가함에 따라 엑토인 생산이 증가하였고, 엑토인 생합성의 질소원에 대한 의존도가 확인되었다. 질소원 KNO₃ 5 g/L의 경우 엑토인 176 mg/L 이상으로 가장 많이 생산되었고, 이는 기존 배지 내 질소원 농도인 KNO₃ 1 g/L의 경우에 비해 2.6배 이상 증가된 수치이다.

메탄자화균의 성장 비교 시 가장 많은 성장을 보인 KNO₃ 2 g/L의 경우에도, 기존 조건에 비해 1.7배 이상 증가된 엑토인 생산량을 보였다. 하지만 이 경우보다 5 g/L의 경우에 1.5배 이상 많은 엑토인을 생산하였고, 그 이상의 농도에서는 5 g/L의 경우와 비슷한 결과를 보였으므로, KNO₃ 5 g/L 농도가 세포 성장에 약간의 저해를 끼침에도 불구하고, 엑토인을 대량으로 생산하기에 가장 적절한 농도임을 확정하였다.

한편, 건조세포중량 g당 엑토인 수율을 비교하면, KNO₃ 1 g/L 이하의 농도의 환경에서 배양할 경우, 배양 48시간 이후부터는 생산수율이 현저히 감소한다. 반면 2 g/L 이상의 농도에서는 생산 수율의 감소폭이 작았고, 5 g/L 이상의 농도에서는 다른 실험군에 비해 생산수율을 유지하는 것을 관찰하였다. 이는 질소원이 고갈되었을 시, 세포가 공기 중의 질소를 고정함으로써 질소를 섭취할 수 있지만, 그 양은 세포의 생존을 위한 최소한의 질소일 뿐 엑토인 등 대사물을 합성할 만큼 충분한 양이 아님을 의미하는 것으로 사료되었다.

이를 통해, 엑토인의 생합성과 질소원의 공급농도 사이의 직접적인 관계가 존재함과, 그 농도는 600 nm 파장에서 광학밀도 10 내지 15까지 성장할 경우 KNO₃ 5 g/L가 최적임을 발견하였으며, 결과적으로 메탄자화균의 회분식 배양을 통해 생산된 엑토인 생산량 중 가장 많은 수치인 176 mg/L 이상의 엑토인이 생산되었다.

[0151] 실시예 4. 메탄자화균을 이용한 엑토인 대량 생산을 위한 유가식 배양 및 엑토인 축적 유도 방법

[0152] 4-1. 유가식 배양을 통한 고농도 세포배양

[0153] 5 L 규모의 발효기에 표 1 내지 표 3의 조성을 가진 배지를 넣고 응축기, 용존산소 분석기, 시료채취를 위한 연결선, 연속적인 가스공급을 위한 가스선과 여과기, 집종구, 배양액을 균일하게 하기 위한 회전축과 동력기를 발효기 상판에 각각 조립하고, pH 분석기는 발효기 제어기에 연결하여 pH 표준용액 (pH 4 및 pH 7)을 이용하여 교정한 후 상판에 조립하였다.

[0154] 조립이 완료된 발효기 본체를 고압·습윤 멸균기로 살균한 후, 발효기 하부에 있는 발효기 덮개를 발효기 제어기와 연결하여 물의 흐름에 의한 온도조절 (30 ℃)이 되도록 안치하였다. 이때, NaCl 30 g/L, NaHCO₃, Na₂CO₃, 인산 버퍼, 미량 원소로 구성된 배지의 경우 발효기의 부식문제와 배지 내 영양소 석출로 인해 높은 온도를 지양해야 했으므로, 배지는 발효기의 온도조절이 완료된 후 집종구를 통해 발효기 내로 투입하였다.

[0155] 5 N의 황산과 수산화암모늄을 pH 적정용액으로 사용하여 배양액의 pH의 변동을 막고, 배양 진행 중 생기는 거품을 제거하기 위한 실리콘 성분의 소포제를 사용하였다. 배양의 유일한 탄소원인 메탄가스의 농도는 30% (v/v)로, 공기압축기를 통해 공급되는 공기와 섞여 가스선과 여과기를 통해 발효기 내로 투입되었으며, 응축기에 연결된 선을 통해 연속적으로 치환되었다. 발효기 내의 용존 산소는 30% (v/v) 이상의 농도로 유지하기 위해서, 회전축의 속도와 공급되는 가스의 양 (vv/m)을 실시간으로 조절하였다.

[0156] 또한, 마이크로비움 알칼리필럼 20Z DP3 균주의 성장에 따른 질소원과 미량원소의 고갈을 방지하기 위해, 600 nm 파장에서의 광학밀도 10마다 표 4에 따른 기질을 추가로 공급하여 유가식으로 배양하였고, 기질 공급시점을 광학밀도 10의 배수 시점과 일치시키기 위해 유동적으로 시료를 채취하였다. 세포의 성장은 분광광도계를 이용하여 600 nm 파장에서의 광학밀도로 관찰하였고, 그 결과를 표 16 및 도 12에 나타내었다.

표 16

[0157]

		메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 배지 광학밀도 (OD _{600nm})
배양 시간 (h)	0	0.128
	3	0.248
	6	0.344
	9	0.476
	21	5.15
	25.5	10.5
	29	15.5
	32	21.1
	35	26.1
	37	29.9
	42	40.9
	45.5	48.9
	50	57.4
	51	61.2
	54	64
	57	68.9
	65.2	84.2
	69.5	88.3
	71.5	92.2
	54.5	95

[0158] 관찰 결과, 본 발명의 유가식 배양을 통한 배양 시 최대 비증식속도 0.22를 기록하며 배양 종료 시점기준 광학밀도 100를 기록하였으며, 이는 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z 균주를 이용한 발효공정 중 가장 높은 농도의 세포성장을 달성하였다.

[0160] 4-2. 유가식 배양을 통한 엑토인 생산량 추이

[0161] 상기 실험을 통해 확인된 질소원과 엑토인의 직접적인 상관관계 및 최적화된 질소원 농도를 바탕으로, 600 nm

과장에서의 광학밀도 10마다 기질을 추가 공급하는 유가식 배양으로 5 L 발효기 수준에서 배양을 진행하였다.

[0162] 배양 초기에는 3시간을 주기로 시료를 채취하였고, 광학밀도 10 이상이 된 시점부터는 기본적으로 3시간을 주기로 하되, 비증식속도를 고려한 광학밀도 예측값이 10의 배수가 되는 시점에 시료를 채취하였다.

[0163] 배양 과정에서 생산되는 엑토인은 다음과 같이 분석하였다. 메탄올:클로로포름:삼차수를 10:5:4의 비율로 섞은 용액으로 세포를 파쇄한 후, 클로로포름과 삼차수의 층 분리현상을 이용하여 세포 내부에 있는 물질 중 친수성 물질만을 얻었다. 엑토인이 포함되어 있는 친수성 물질을 10배 희석하여 고성능액체크로마토그래피 (SHIMADZU, ZORBAX NH₂ column)를 이용하여 세포 내부의 엑토인을 정성 및 정량분석하고, 분석 결과를 표 17 및 도 13에 나타내었다.

표 17

		메탄자화균 균주의 배양 시간에 따른 발효기 내 엑토인 축적량 (mg/L)
배양 시간 (h)	25.5	104.2018977
	29	193.9438446
	32	269.498886
	35	371.3104119
	37	434.403474
	42	594.2460982
	45.5	657.6547155
	50	692.86651
	51	779.77532
	57	837.60196
	65.2	899.31214
	71.5	914.00204
	74.5	961.37146
	78	1106.5991

[0165] 분석 결과, 엑토인은 세포의 성장과 비례하게 세포 내에 꾸준히 축적되었으며, 배양 종료 시점에는 1.1 g/L 이상의 엑토인이 최종 관찰되었다. 이는 본 발명 이전의 엑토인 생산량에 비해 약 12.4배 증가한 수치이다.

[0167] 4-3. 고농도로 배양된 세포의 고삼투압성 충격을 통한 엑토인 축적 유도

[0168] 4-3-1. 유가식 배양 이후 세포 내 엑토인 축적 조건 최적화를 위한 삼각 플라스크 규모에서의 엑토인 축적 유도

[0169] 엑토인은 삼투압으로부터 세포를 보호하는 삼투보호제의 역할로써, 더 높은 염분의 환경일수록 엑토인 생합성에 관여하는 조절단백질의 반응에 의해 짧은 시간 안에 더 많은 엑토인이 합성되며, 본 발명을 통해 엑토인의 축적을 위해서는 높은 염 농도 이외에 질소원이 필수적이라는 것이 밝혀졌다.

[0170] 이에, 유가식으로 배양된 고농도의 세포 내부에 엑토인을 급속히 축적시키기 위한 조건을 수립하기 위해, 배양 종료 후 엑토인 축적을 유도하기 위해 배양액에 추가로 공급될 염 및 질소 공급원의 농도를 삼각 플라스크 규모의 실험을 통해 최적화하였다.

[0171] 구체적으로, 유가식 배양이 종료된 배양액을 멸균된 고무관을 통해 삼각 플라스크로 옮기고, 기존 염 농도에 비해 더 높은 염도인 NaCl 6% (w/v)와 9% (w/v) 및 질소 추가 공급원 (KNO₃) 5 g/L, 10 g/L, 25 g/L, 50 g/L의 조건을 바탕으로, 총 8개의 실험군을 설정하였다. 각 실험군별로 엑토인 축적 유도 시간 (0, 24시간, 48시간)에 따른 배양액 내 엑토인 축적량을 측정하였고, 이를 표 18, 표 19 및 도 14, 도 15에 나타내었다.

표 18

		유가식 배양된 메탄자화균의 6% (w/v) NaCl 환경에서의 질소 농도별 축적 유도 시간에 따른 배양액 내 엑토인 축적량 (mg/L)			
		5g/L KNO ₃	10g/L KNO ₃	25g/L KNO ₃	50g/L KNO ₃
축적 유도 시간 (h)	0	696.66366	696.66366	696.66366	696.66366
	24	1593.01404	1546.42981	820.85207	1629.78517
	48	1472.91186	1571.81789	1634.71197	1685.96452

[0172]

표 19

		유가식 배양된 메탄자화균의 9% (w/v) NaCl 환경에서의 질소 농도별 축적 유도 시간에 따른 배양액 내 엑토인 축적량 (mg/L)			
		5g/L KNO ₃	10g/L KNO ₃	25g/L KNO ₃	50g/L KNO ₃
축적 유도 시간 (h)	0	696.66366	696.66366	696.66366	696.66366
	24	1161.15869	1102.68652	1278.28129	1529.15552
	48	1351.85655	1325.85507	1392.81054	1634.72011

[0173]

[0174] 측정 결과, NaCl 6% (w/v) 및 NaCl 9% (w/v)의 염도별 엑토인 생산량에는 차이가 거의 없었으며, 축적 유도 지
속시간과 질소 공급원 농도별 엑토인 생산량 또한 눈에 띄는 차이가 관찰되지 않았다.

[0175] 따라서, 배양이 종료된 배양액의 염도를 NaCl 6% (w/v)로 변경하여 메탄자화균에 고삼투압성 충격을 주고, 엑토
인 합성에 필수적 요소인 질소원 (KNO₃) 5 g/L를 추가 공급하여 엑토인의 최대 축적을 유도할 수 있는 것으로,
세포 내 엑토인 축적 유도의 최적 조건을 수립하였다.

[0176] 수립된 최적 조건에 따라 유가식 배양을 거친 메탄자화균의 엑토인 축적을 유도하는 경우, 축적 유도 이후 24시
간 내에 1.6 g/L 이상의 엑토인이 배양액에 축적되는 것을 확인할 수 있었다. 이 수치는 유가식 배양종료 시점
에 비해 1.4배 이상 증가된 수치로서, 유가식 배양 후의 세포 내 엑토인 축적 유도의 최적 조건이 성공적으로
수립되었음이 증명되었다.

[0178] 4-3-2. 5 L 규모 발효기를 통한 유가식 배양 이후 세포 내 엑토인 축적 유도를 통한 엑토인 대량 생산

[0179] 실시예 4-3-1을 통해 수립된 세포 내 엑토인 축적의 최적 조건인 6% (w/v) NaCl, 5 g/L KNO₃의 배양액 조성을 5
L 규모의 발효기에 적용하였다. 엑토인 축적 유도를 위해 메탄자화균의 유가식 배양이 종료된 후 발효기의 배양
액의 염도를 6% (w/v) NaCl로 변경하고, 5 g/L KNO₃의 질소 공급원을 공급하였다. 발효기에 공기와 섞인 30%
(v/v)의 메탄가스를 0.1 vv/m만큼 넣어주었고, 300 rpm의 회전속도 및 30 °C의 온도를 유지하였다. 24시간의 축
적 유도 후의 배양액 내의 엑토인 축적량을 측정하였고, 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0180] 측정 결과, 최적 조건을 통한 엑토인 축적 유도 시 최종적으로 1.5g/L 이상의 엑토인이 생산되는 것으로 나타났
으며, 이는 유가식 배양 종료 시점의 배양액 내 엑토인 축적량에 비해 약 1.4배 증가된 수치임을 확인하였다.

[0181] 다양한 생물공학적인 공정이 적용되어 메탄자화균을 이용한 엑토인을 생산한 사례는 존재하지만, 현재 시점까지
보고된 사례에 비해 1.5 g/L 이상의 엑토인 생산량은 월등히 높은 수치에 해당한다. 또한 본 발명은 엑토
인 분해 경로 제거를 위해 균주를 개량하고, 그 균주를 통한 엑토인 생산량이 유지되는 바를 보인 최초의 사례
이며, 엑토인 생산이 질소원 농도에 의존되어 있음과 엑토인 생합성에 최적인 질소원의 농도를 확인한 최초의
사례인 것으로 사료되었다.

[0182] 아울러, 본 발명은 5 L 규모의 발효기에서 배양 정지기에 돌입하여 배양이 종료된 후, 24시간 내에 엑토인의 축
적을 유도하기 위한 염 농도와 질소 공급원 농도를 최적화한 후, 그 조건을 적용하여 엑토인 축적을 유도함으로

써 유가식 배양 종료 시점에 비해 크게 증가된 엑토인을 생산해낼 수 있음을 보인 최초의 사례이다.

수탁번호

[0183]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19047P

수탁일자 : 20230120

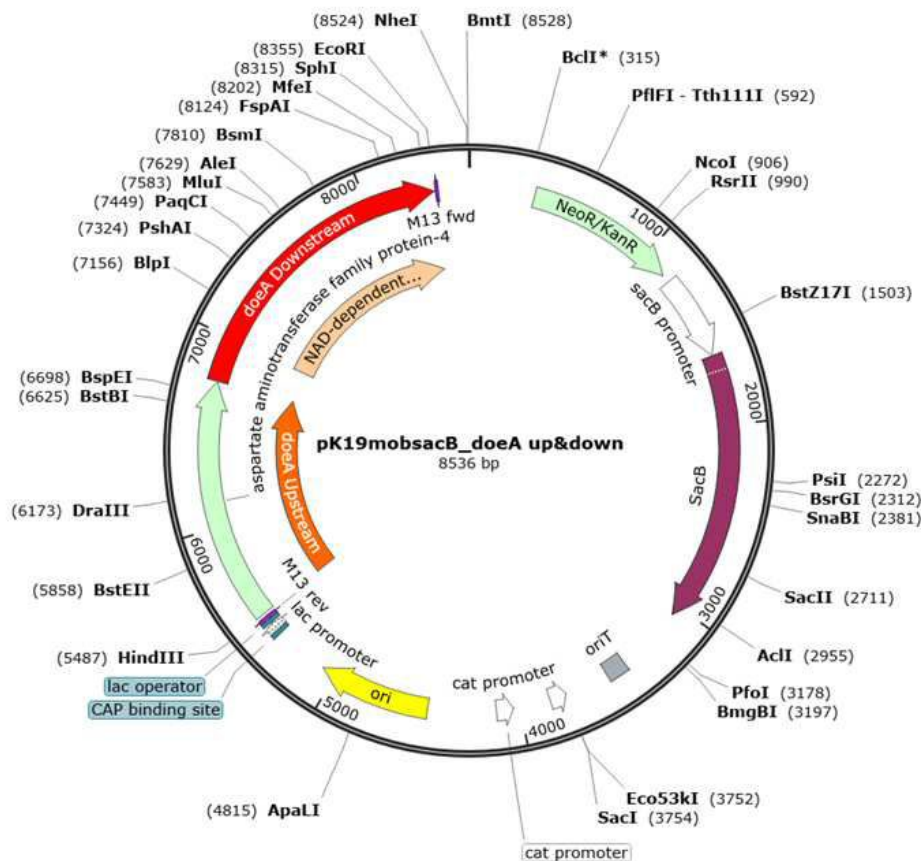
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19076P

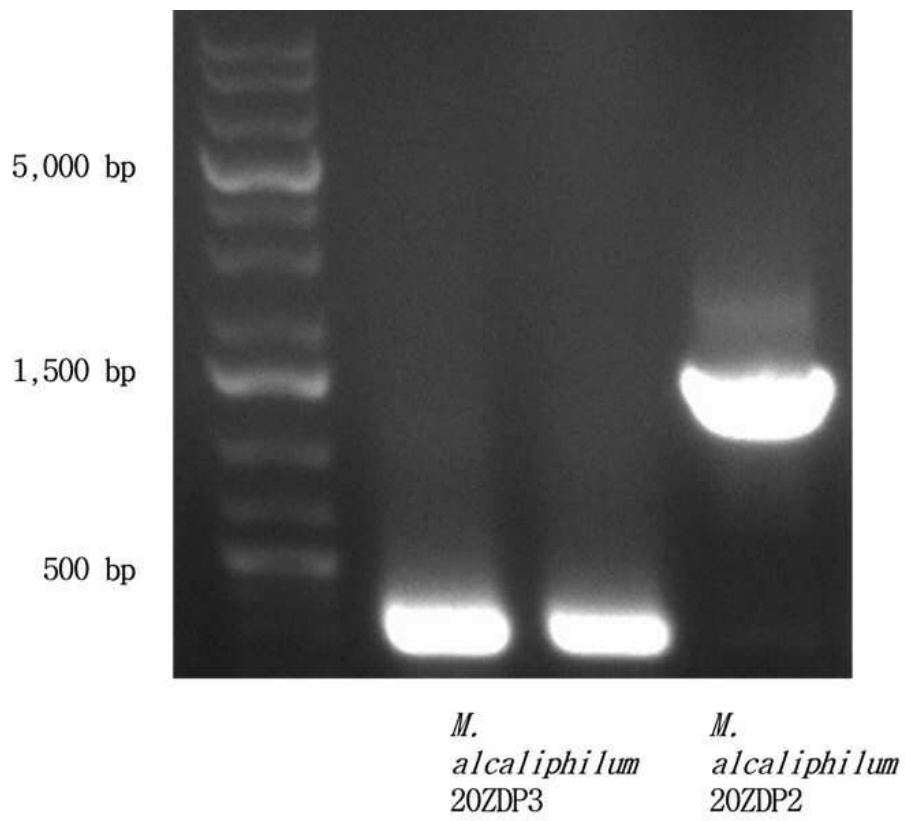
수탁일자 : 20230308

도면

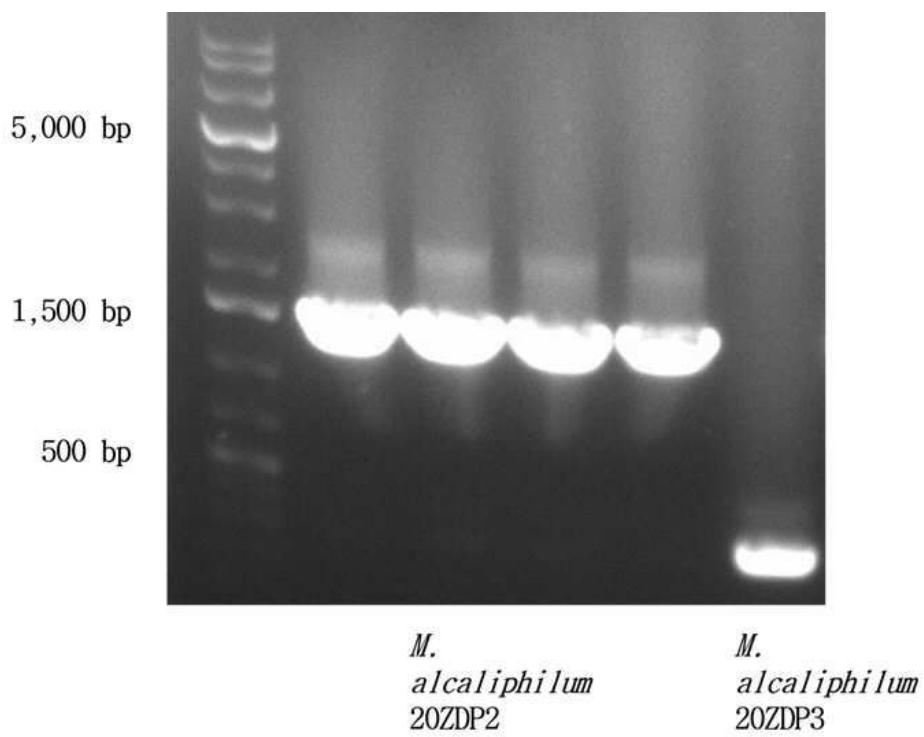
도면1



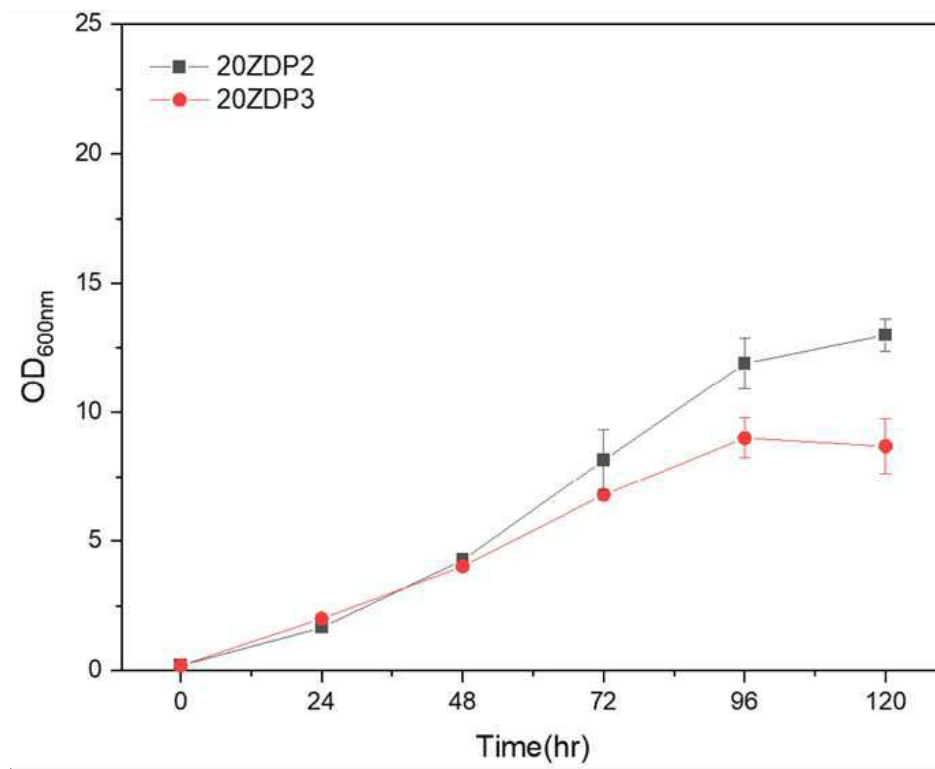
도면2



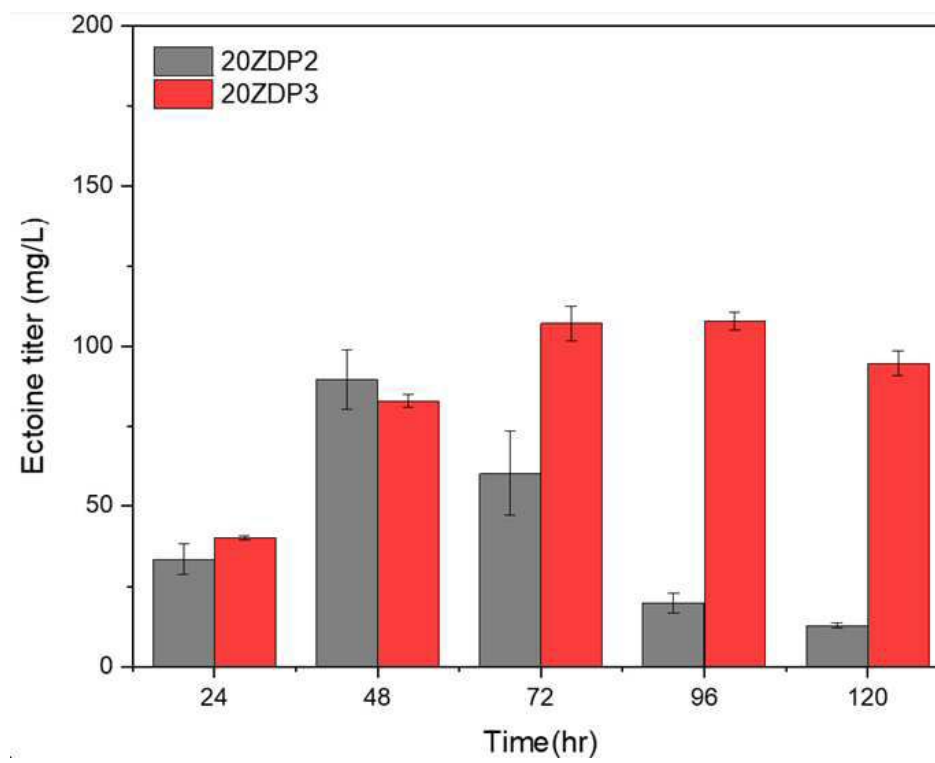
도면3



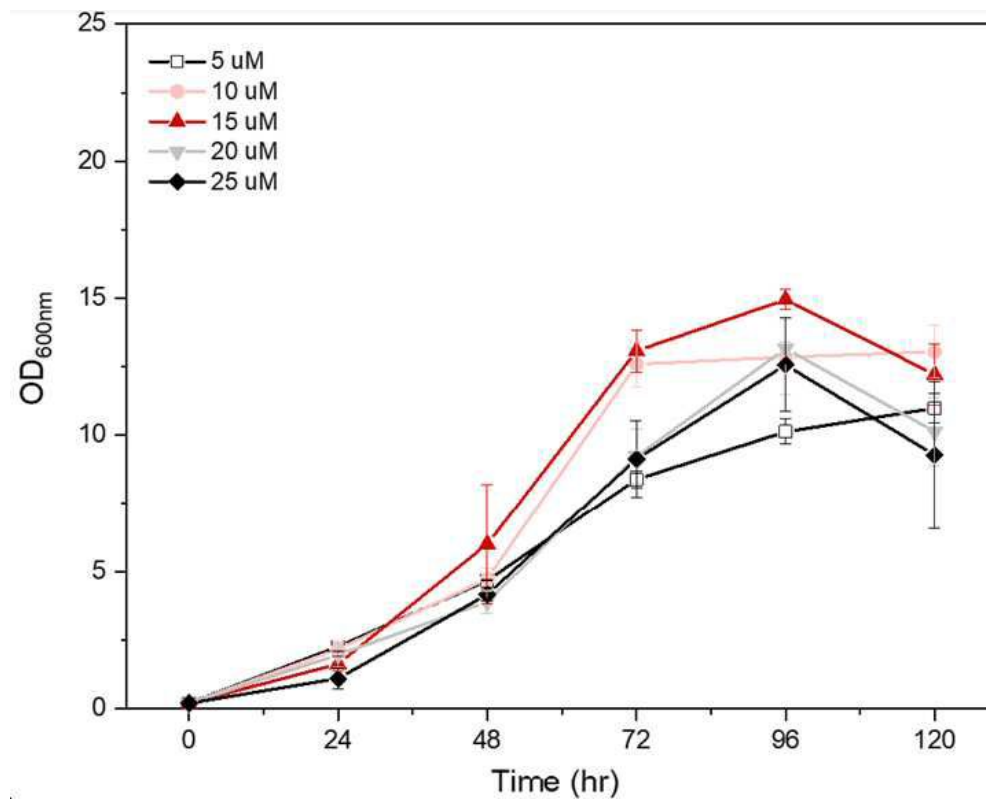
도면4



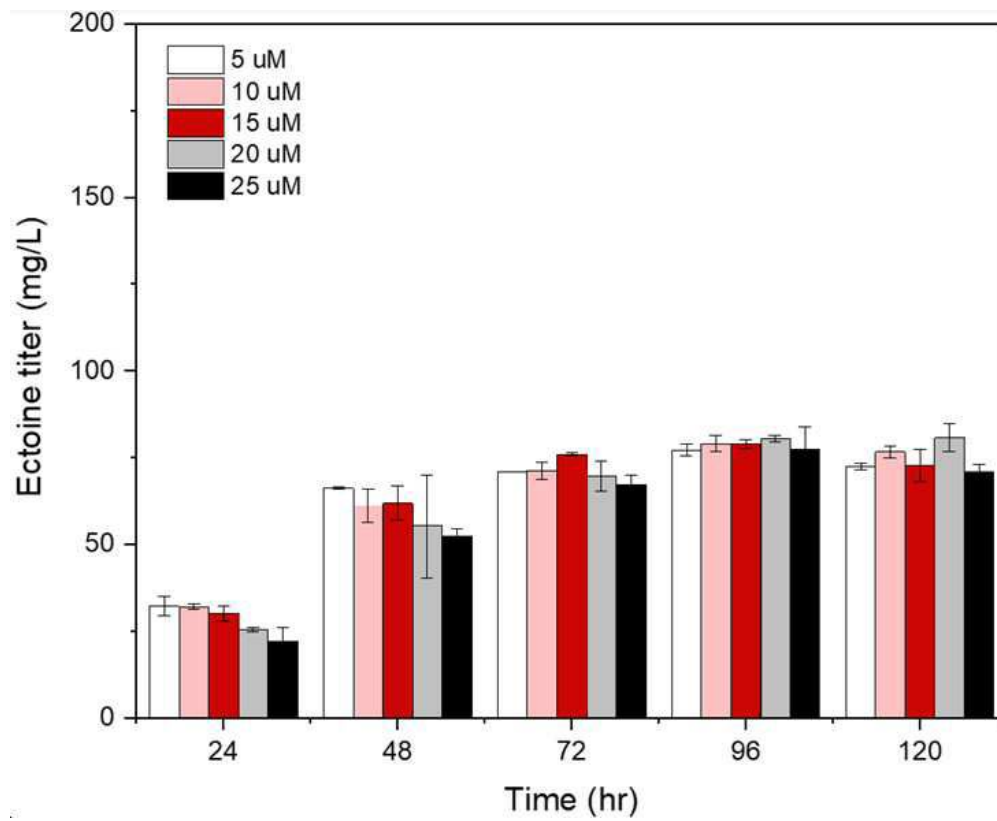
도면5



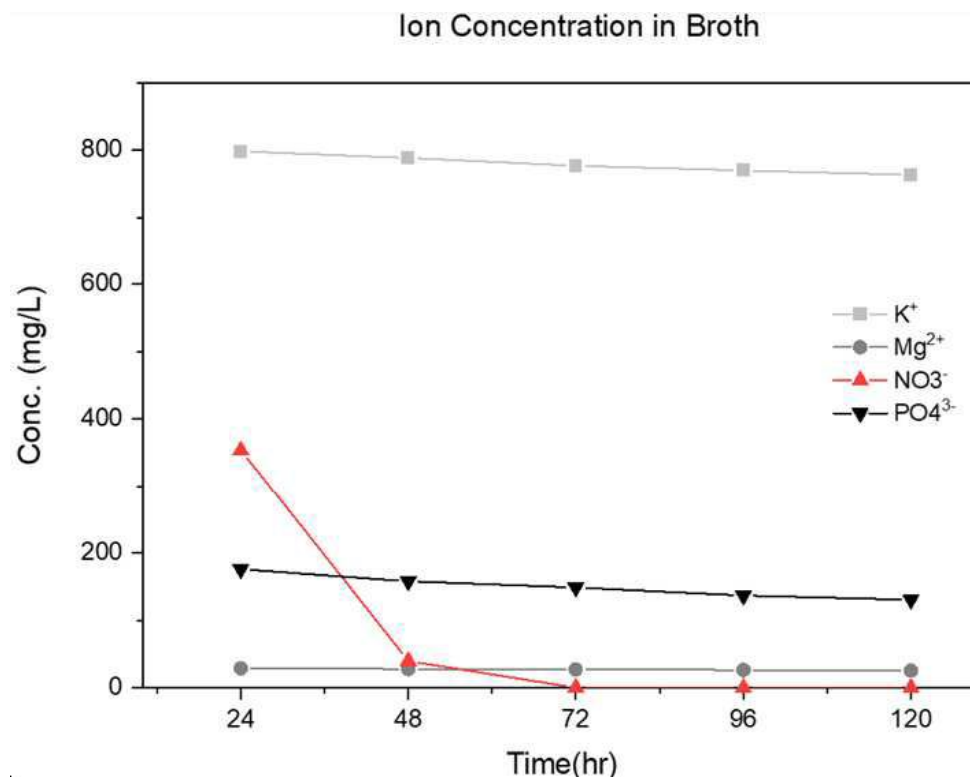
도면6



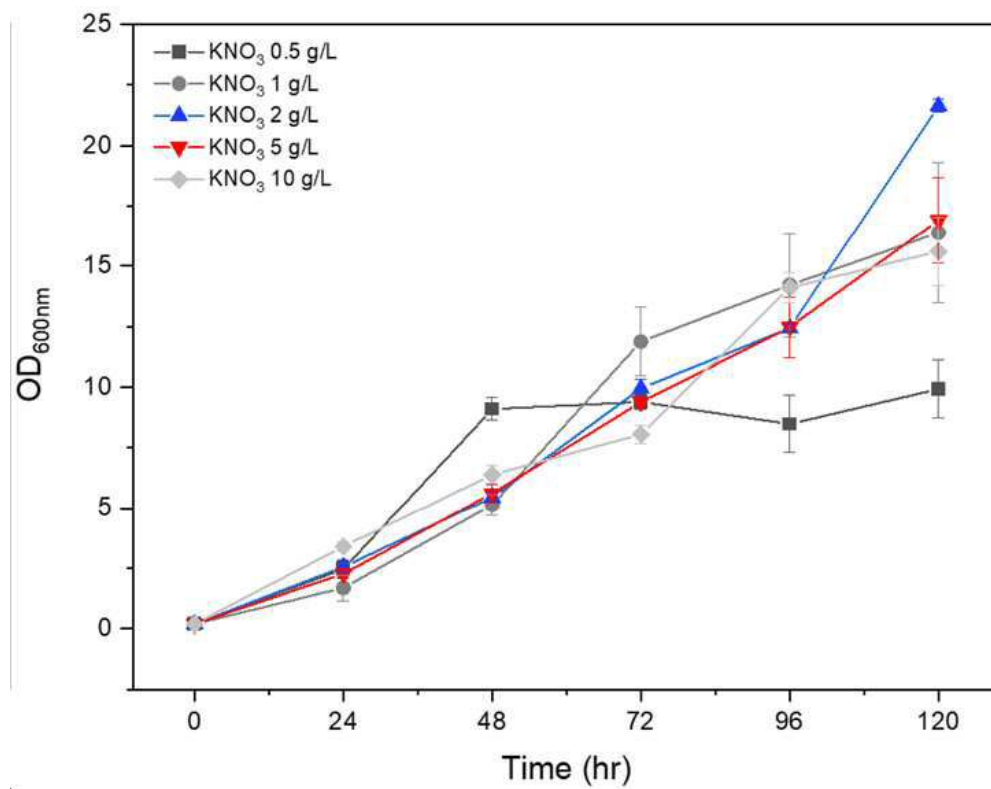
도면7



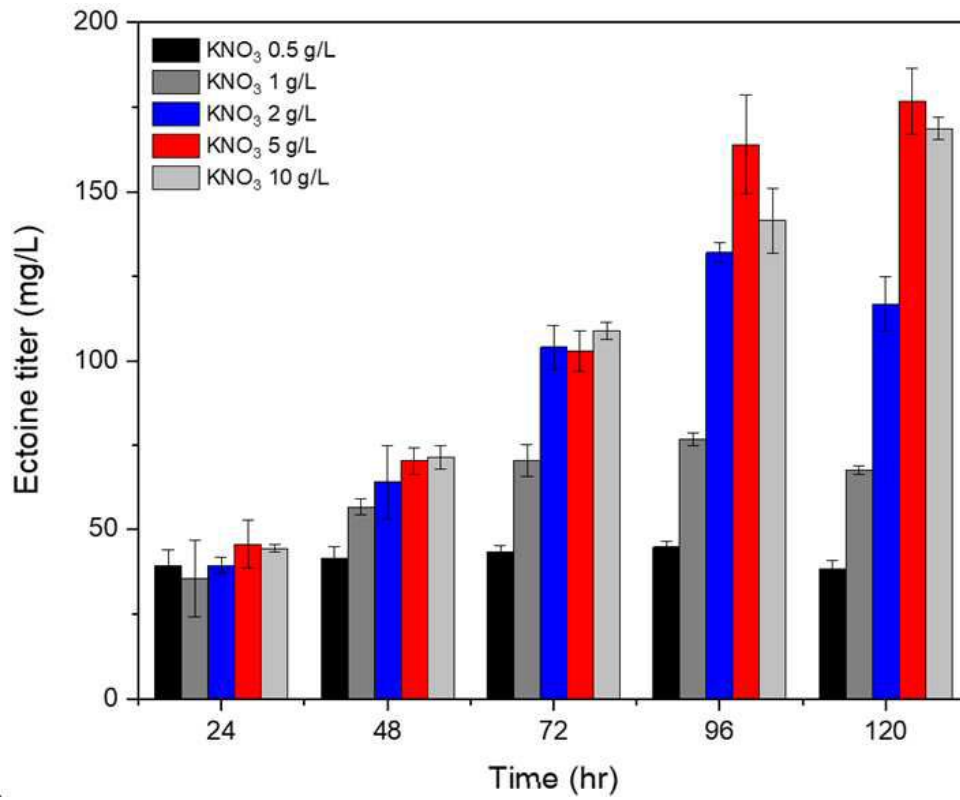
도면8



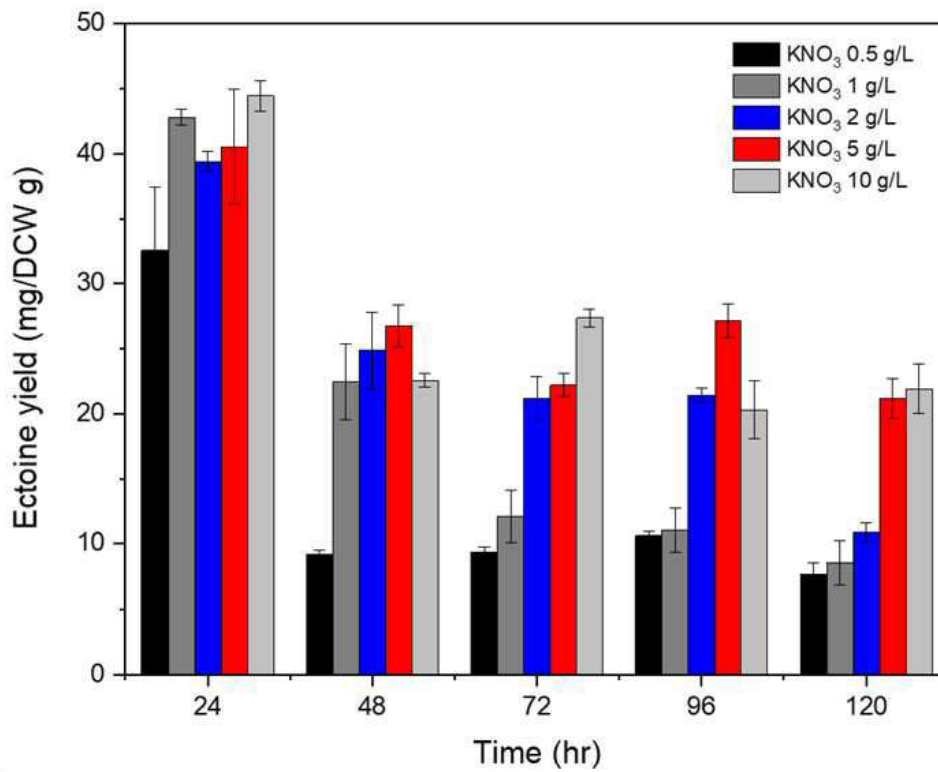
도면9



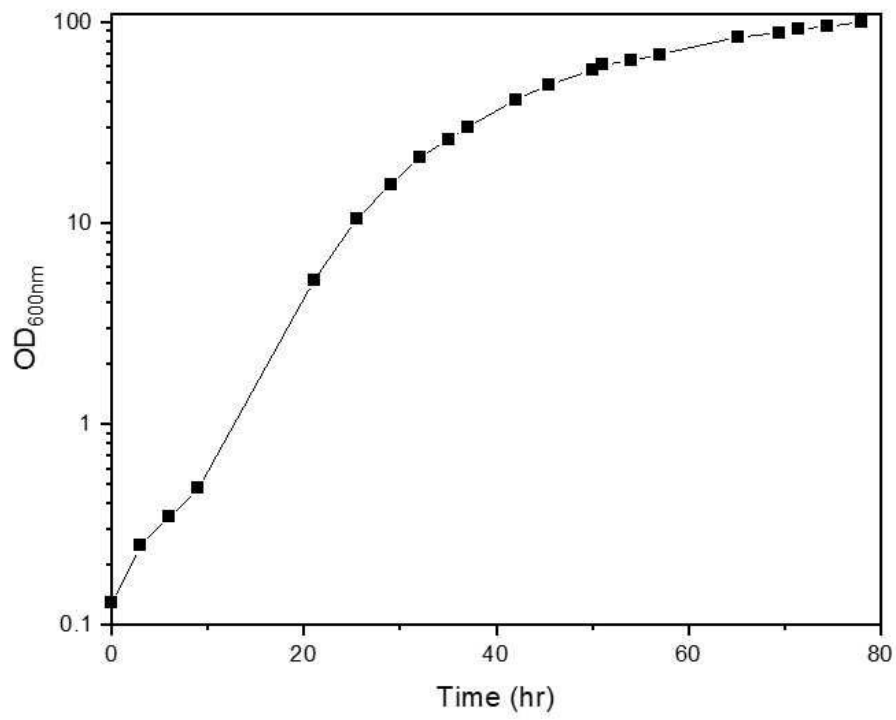
도면10



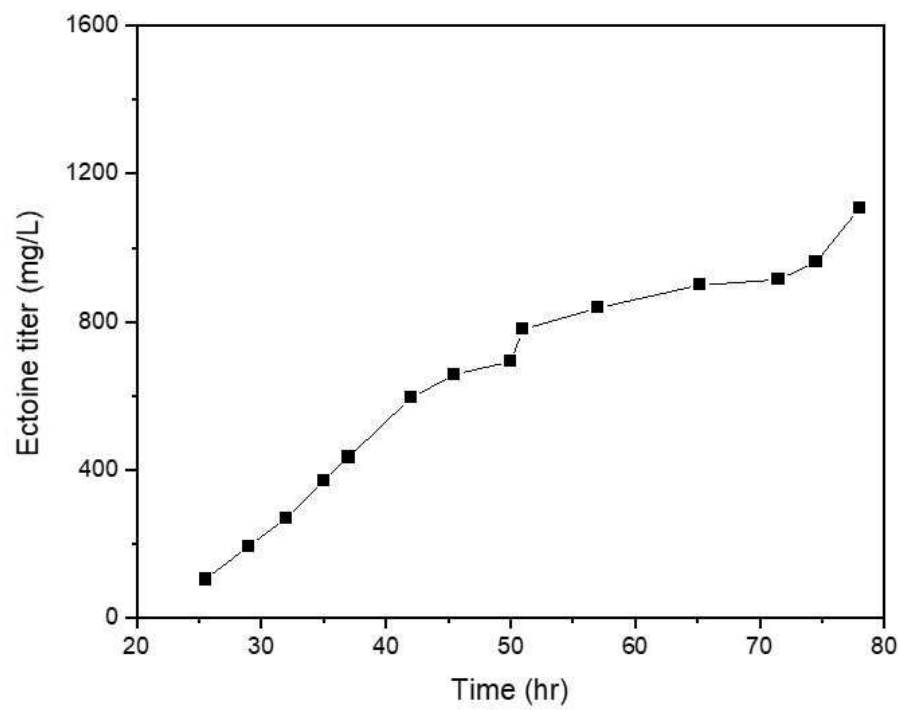
도면11



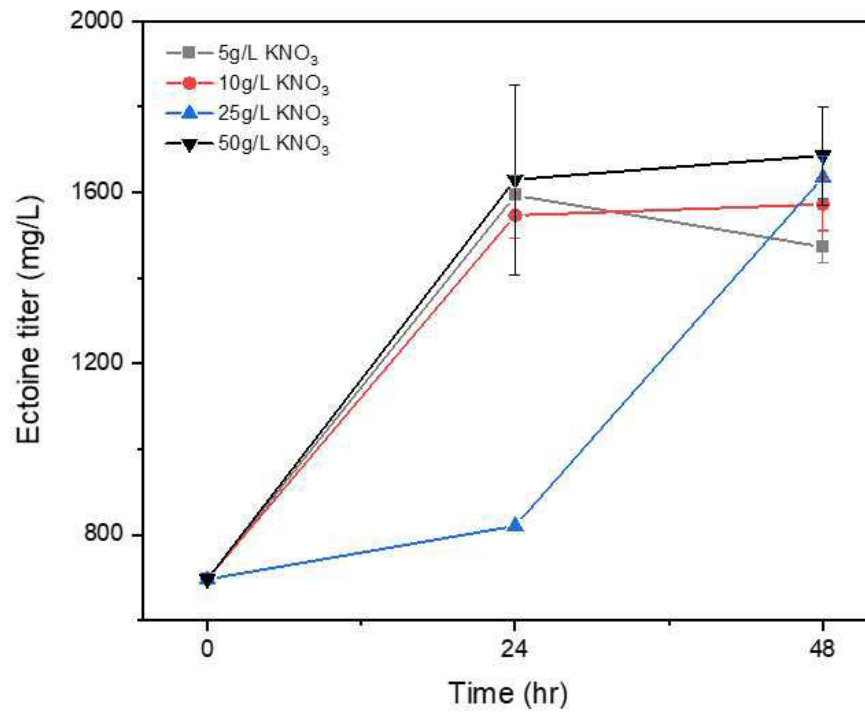
도면12



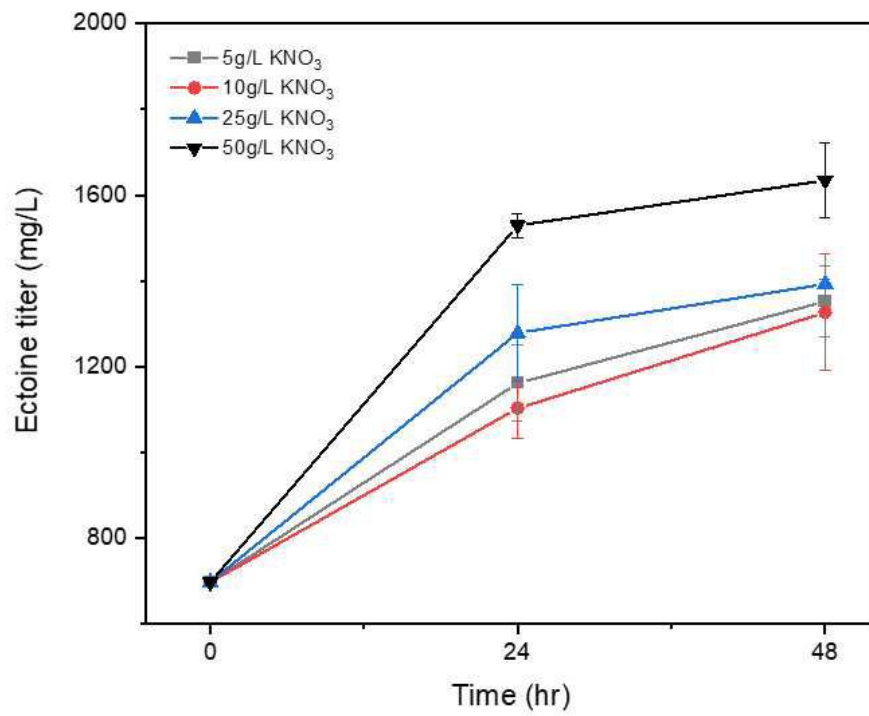
도면13



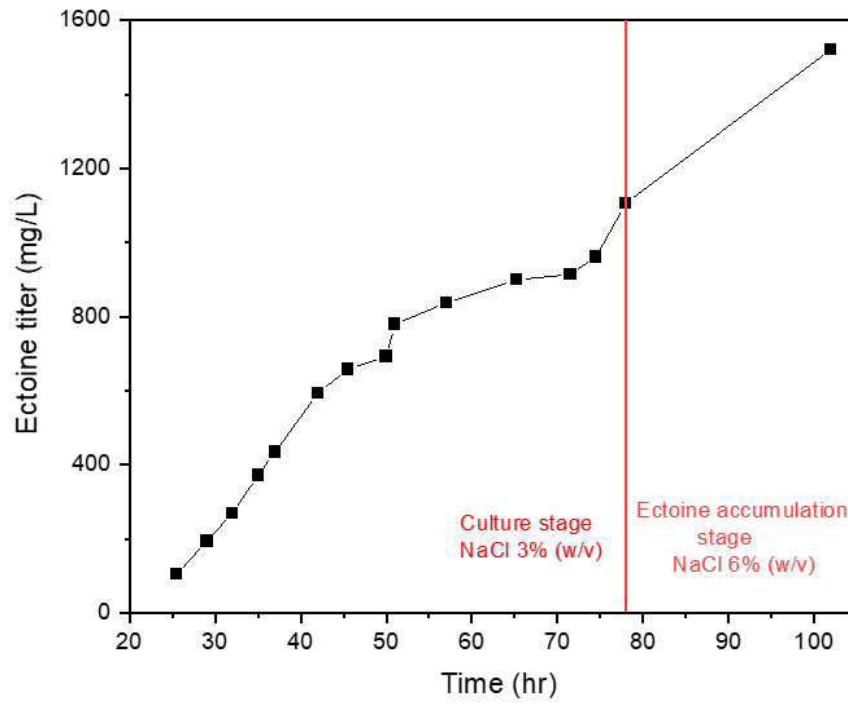
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.