(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0013959
(43) 공개일자 2023년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 17/12 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 17/12 (2013.01)
C07K 14/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0095083
(22) 출원일자 2021년07월20일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호
조숙형
경기도 고양시 덕양구 백양로 126, 1108동 901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

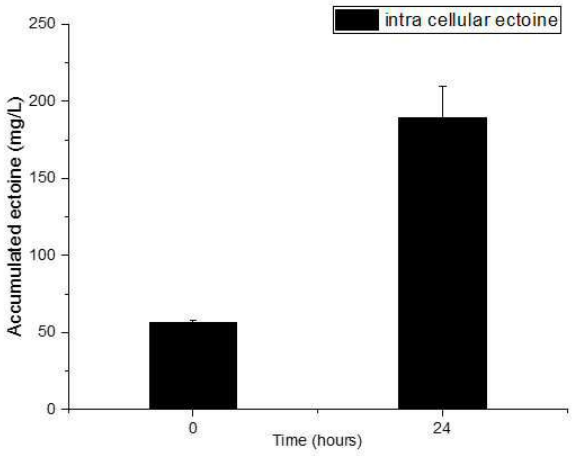
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **엑토인 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 엑토인 생산 촉진 방법**

(57) 요 약

본 발명은 엑토인 생산 능력이 향상된 메탄자화균, 및 엑토인 생산을 촉진하는 성분을 함유하는 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 엑토인을 효율적으로 대량 생산하는 생산 촉진 방법에 관한 것으로, 본 발명의 조성물 및 생산 방법을 이용하면 엑토인을 신속하고 효율적으로 대량 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
(72) 발명자
나정걸
서울특별시 서초구 고무래로 89, 107동 302호
이윤서
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 101동 204호
차이, 한위
서울특별시 마포구 대흥로24라길 6-8, 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129486
과제번호	2015M3D3A1A01064929
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

텅스텐 (Tungsten; W) 및 염화나트륨 (sodium chloride; NaCl)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 포함된 배지에서,

엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20ZDP 균주를 배양하는 배양 단계;

를 포함하는 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 엑토인 생산 저해 유전자는 *ectD* 및 *ectR*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양 단계는 다음의 단계를 포함하는 것인 엑토인 생산 촉진 방법:

메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 균주를 염화나트륨이 첨가된 배지에 배양하여 제1 배양액을 수득하는 제1 배양 단계;

제1 배양액을 염화나트륨이 첨가된 배지에서 배양하여 제2 배양액을 수득하는 제2 배양 단계; 및

제2 배양액을 염화나트륨이 첨가된 배지에서 배양하여 제3 배양액을 수득하는 제3 배양 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제1 배양 단계의 염화나트륨 농도는 0.1 내지 3 %(w/v)인 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 제2 배양 단계의 염화나트륨 농도는 6 내지 9 %(w/v)인 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 제2 배양 단계는 0.1 내지 24시간 동안 배양하여 제2 배양액을 수득하는 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 제3 배양 단계의 염화나트륨 농도는 0.1 내지 3 %(w/v)인 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 제3 배양 단계는 1 내지 60분 동안 배양하여 제3 배양액을 수득하는 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 제2 배양 단계 및 제3 배양 단계는 1 내지 20 회 반복하여 제3 배양액을 수득하는 것인, 엑토인 생산 촉진 방법.

청구항 10

엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼(*Methylomicrobium*

alcaliphilum) 20ZDP 균주, 및

텅스텐 (Tungsten; W) 및 염화나트륨 (sodium chloride; NaCl)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 엑토인 생산 저해 유전자는 *ectD* 및 *ectR*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 엑토인 생산 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엑토인 생산 능력이 향상된 메탄자화균, 및 엑토인 생산을 촉진하는 성분을 함유하는 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 엑토인을 효율적으로 대량 생산하는 생산 촉진 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메탄가스는 천연가스와 셰일가스의 주성분이며 온실효과를 일으키는 원인 물질로 알려져 있다. 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.

[0003] 메탄자화균 (Methanotroph)은 메탄을 유일한 에너지원으로 생육할 수 있는 미생물로, 1906년에 소노겐(Sohnogen)에 의해 처음으로 분리되었다. 그 후, 분류학적 연구로 세포의 형태, 정지기의 세포 또는 세포 내 막 구조의 형태에 따라 25종으로 분류되었다. 이러한 메탄산화세균은 메탄 모노옥시제네이즈 (monooxygenases, MMO)라는 효소를 함유하고 있어 상온 및 상압 하에서도 용이하게 메탄을 메탄올로 전환할 수 있다.

[0004] 메탄은 메탄 모노옥시제네이즈에 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 타입 I의 메탄산화세균은 리불로오스 일인산 회로를, 타입 II의 메탄산화세균은 세린 회로를 이용하여 바이오매스를 합성한다고 알려져 있다.

[0005] 메탄산화세균이 갖는 생리학적 특성으로 인해, 메탄산화세균을 이용하여 메탄을 유기화합물로 전환시켜, 유해한 메탄가스를 절감시키려는 노력과 유용 화학물질을 활용하려는 노력이 계속되어 왔다.

[0006] 이러한 노력 중, 최근 유기화합물 중 엑토인에 대한 관심이 점점 높아지고 있다. 엑토인은 호염성 미생물인 메탄자화균에서 생성되는 천연 화합물로, 유기체의 단백질과 세포 구조를 안정화시켜, 삼투환경에서 살아남도록 도와주는 물질이다. 또한, 엑토인은 UV방사와 건조로부터 피부를 보호하는 탁월한 성분을 가져, 피부 관리 및 태양 보호 제품의 활성 성분으로 널리 사용되는 것으로 알려졌다. 최근에는 메탄자화균을 제외한 유전자 조작이 쉬운 미생물을 통해 다양한 당으로부터 엑토인 생산 연구의 경우, 엑토인 생산 증대를 위한 생산 공정 연구는 진행되어 왔으나, 유전자 조작이 어려운 메탄자화균의 균주 개량을 통한 메탄으로부터의 엑토인 생산 연구는 저조한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*Δ*ectR* 균주, 및 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물을 이용한 결과, 엑토인 생산이 촉진되며, 일정양의 엑토인을 반복하여 안정적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0008] 본 발명의 목적은 배지에서, 엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*Δ*ectR* 균주를 배양하는 배양 단계를 포함하는 엑토인 생산 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP

Δ*ectD*Δ*ectR* 균주, 및 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명의 일 양태는 엑토인 생산 촉진 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에 있어서 엑토인 생산 촉진 방법은 텅스텐 (Tungsten; W) 및 염화나트륨 (sodium chloride; NaCl)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 포함된 배지에서, 엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20ZDP 균주를 배양하는 배양 단계;를 포함하는 것이다.

[0013] 본 발명에 있어서 배지는 메틸로마이크로븀 알칼리필럼(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20ZDP 균주를 배양하기 위한 배지로, 예를 들어, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) 메틸로마이크로븀 배지인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명에 있어서 배지에 포함되는 텅스텐의 농도는 0 내지 0.2 uM, 0 내지 0.15 uM, 0 내지 0.1 uM, 0 내지 0.05 uM, 0.03 내지 0.2 uM, 0.03 내지 0.15 uM, 0.03 내지 0.1 uM, 0.03 내지 0.05 uM, 예를 들어, 0.05 uM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에 있어서 배지에 포함되는 염화나트륨의 농도는 1 내지 9 %(w/v), 1 내지 8 %(w/v), 1 내지 7 %(w/v), 1 내지 6, 2 내지 9 %(w/v), 2 내지 8 %(w/v), 2 내지 7 %(w/v), 2 내지 6 %(w/v), 3 내지 9 %(w/v), 3 내지 8 %(w/v), 3 내지 7 %(w/v), 예를 들어, 3 내지 6 %(w/v)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명에 있어서 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Magnesium sulfate), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Calcium Chloride), KNO_3 (Potassium Nitrate), $NaHCO_3$ (sodium bicarbonate), Na_2CO_3 (Sodium carbonate), KH_2PO_4 (Potassium dihydrogen phosphate), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate), H_3BO_3 (boric acid), EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid), $CuCl_2 \cdot 5H_2O$ (copper(II) chloride pentahydrate), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Iron(II) (sulfate heptahydrate), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Zinc sulfate heptahydrate), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (Nickel(II) chloride hexahydrate puriss), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cobalt(II) chloride hexahydrate), Na_2MoO_4 (Sodium molybdate dihydrate) 및 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Manganese chloride)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서 엑토인 생성 저해 유전자는 *ectD* 및 *ectR*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*Δ*ectR* 균주는 하이드록시엑토인을 생산하지 않으면서 엑토인의 생산이 향상된 균주이다.

[0019] 본 명세서 상 용어 "*ectD*"는 엑토인 하이드록실라제를 발현하는 유전자로서, 엑토인으로부터 하이드록시엑토인을 생성하는데 관여하는 유전자이다.

[0020] 본 명세서 상 용어 "*ectR*"은 엑토인 생산의 조절에 관여하는 유전자이다.

[0021] 본 발명에 있어서 배양 단계는 중대수기 값이 OD 4 내지 6인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서 배양 단계는 다음의 단계를 포함하는 것일 수 있다:

[0023] 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 균주를 NaCl이 첨가된 배지에 배양하여 제1 배양액을 수득하는 제1 배양 단계;

[0024] 제1 배양액을 염화나트륨이 첨가된 배지에서 배양하여 제2 배양액을 수득하는 제2 배양 단계; 및

[0025] 제2 배양액을 염화나트륨이 첨가된 배지에서 배양하여 제3 배양액을 수득하는 제3 배양 단계.

[0026] 본 발명에 있어서 제1 배양 단계의 염화나트륨 농도는 0.1 내지 3 %(w/v), 1 내지 3 3 %(w/v), 2 내지 3 %(w/v), 예를 들어, 3 %(w/v)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서 제2 배양 단계의 염화나트륨 농도는 6 내지 9 %(w/v), 6 내지 8 %(w/v), 6 내지 7 %(w/v),

예를 들어, 6 %(w/v)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에 있어서 제2 배양 단계는 0.1 내지 24시간, 예를 들어, 24시간 동안 배양하여 제2 배양액을 수득하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 있어서 제3 배양 단계의 염화나트륨 농도는 0.1 내지 3 %(w/v), 0.1 내지 2 %(w/v), 0.1 내지 1 %(w/v), 예를 들어, 1 %(w/v)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서 제3 배양 단계는 1 내지 60분, 1 내지 50분, 1 내지 40분, 1 내지 30분, 1 내지 20분, 1 내지 15분, 예를 들어, 15분 동안 배양하여 제3 배양액을 수득하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 있어서 제2 배양 단계 및 제3 배양 단계는 1 내지 20회, 1 내지 17회, 1 내지 15회, 1 내지 13회, 1 내지 10회, 3 내지 20회, 3 내지 17회, 3 내지 15회, 3 내지 10회, 5 내지 20회, 5 내지 17회, 5 내지 15회, 5 내지 13회, 5 내지 10회, 8 내지 20회, 8 내지 17회, 8 내지 15회, 8 내지 13회, 8 내지 10회, 예를 들어, 10회 반복하여 제3 배양액을 수득하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 다른 일 양태는 엑토인 생산 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서 엑토인 생산 촉진용 조성물은 엑토인 생산 저해 유전자가 제거 또는 일부 결실된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20ZDP 균주, 및 텅스텐 (Tungsten; W) 및 염화나트륨(sodium chloride; NaCl)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 배지;를 포함하는 것이다.

[0034] 본 발명에 있어서 엑토인 생산 저해 유전자는 *ectD* 및 *ectR*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에 있어서 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*Δ*ectR* 균주는 하이드록시엑토인을 생산하지 않으면서 엑토인의 생산이 향상된 균주이다.

[0036] 상기 엑토인 생산 촉진 조성물에 있어서, 상기 엑토인 생산 촉진 방법과 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명은 엑토인 생산 능력이 향상된 메탄자화균, 및 엑토인 생산을 촉진하는 성분을 함유하는 배지;를 포함하는 엑토인 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 엑토인을 효율적으로 대량 생산하는 생산 촉진 방법에 관한 것으로, 본 발명의 조성물 및 생산 방법을 이용하면 엑토인을 신속하고 효율적으로 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 내의 *ectD* 유전자를 제거하기 위한 결실 (deletion) 벡터 구조를 나타낸 개열지도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 내의 *ectD* 유전자의 결실을 확인한 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD* 내의 *ectR* 유전자를 제거하기 위한 결실 (deletion) 벡터 구조를 나타낸 개열지도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD* 균주에서 *ectR* 유전자의 결실을 확인한 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 배지에 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*△*ectR* 균주의 성장을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 배지에 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*△*ectR* 균주의 엑토인 생산량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 배지에 3 %(w/v), 6 %(w/v) 및 9 %(w/v) 농도의 NaCl을 첨가 후, 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*△*ectR* 균주의 성장을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 배지에 3 %(w/v), 6 %(w/v) 및 9 %(w/v) 농도의 NaCl을 첨가 후, 메틸로마

이크로뷤 알칼리필럼 20ZDPΔ*ectD*△*ectR* 균주의 엑토인 생산량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 성장의 지표인 흡광도 (OD_{600nm}) 값에 따른 *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*의 엑토인 생산량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 *M.alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*를 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 배양 후, 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에 노출하였을 때, 세포 내 엑토인을 가장 많이 축적하는 고농도 배양의 최적화 된 시간을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 *M.alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*를 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 배양 후, 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에 노출하지 않았을 때와 노출 후 24시간 경과 후의 엑토인 추출량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 *M.alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*를 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 배양 후, 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에 24시간 노출 후, 다시 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에 배양하여 삼투 충격을 주고 15분 마다 세포 외 엑토인 배출량 및 세포 내 엑토인 축적량을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 엑토인이 세포밖으로 배출될 수 있는 최적화된 삼투 충격 NaCl 농도를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 삼투 충격 후 NaCl 6 %(w/v)이 포함된 배지에 배양하였을 때, 삼투 충격 농도 (NaCl 0, 1, 2 및 3 %(w/v))에 따른 *M.alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 성장을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 *M.alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*을NaCl 농도를 3 % (w/v)로 OD5까지 배양 후 생성된 세포를 수득하여 NaCl 농도 6 %(w/v)에서 24시간 배양 후 저농도 삼투충격을 주어 (NaCl 농도1 %(w/v), 15분) 엑토인을 배출하고 이후, 다시 고농도 NaCl에서 배양하는 과정을 총 10 회 반복한 후 측정한 엑토인 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 16은 본 발명의 실시예에 따른 엑토인 총 생산량과 NaCl 6 %(w/v)이 포함된 배지에서 생산된 총 엑토인의 양을 비교하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 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.

[0041] **제조예 1. 메탄자화균의 배양**

[0042] 메틸로마이크로뷤 알칼리필럼 (*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20ZDP△*ectD*△*ectR*를 DSMZ 메틸로마이크로뷤 배지에서 30 ℃의 온도, 230 rpm 및 텅스텐 (Tungsten) 농도를 0.05 uM으로 맞추어서 배양하였다. DSMZ 메틸로마이크로뷤 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0043]

성분	DSMZ 메틸마이크로뷤 배지 조성 (mM or mL)	
NaCl (3 %(w/v))	500 mM	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8 mM	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.14 mM	
KNO_3	9.9 mM	
1M $NaHCO_3$	50 mM	
1M Na_2CO_3	5 mM	
Phosphate buffer	KH_2PO_4	280 mM
	Na_2HPO_4*$12H_2O$	600 mM
	Distilled water	1000 mL
Trace element	EDTA	5 mM

$CuCl_2*5H_2O$	0.1 mM
$FeSO_4*7H_2O$	2 mM
$ZnSO_4*7H_2O$	0.1 mM
$NiCl_2*6H_2O$	0.02 mM
$CoCl_2*6H_2O$	0.2 mM
Na_2MoO_4	0.03 mM
$MnCl_2*4H_2O$	0.03 mM
H_3BO_3	0.03 mM
Distilled water	1000 mL

[0045] **제조예 2. 엑토인 생산 저해 유전자인 *ectD*가 제거된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD* 균주 제작**

[0046] 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 균주는 자연적으로 엑토인을 생산한다. 엑토인 생산 과정에서 최종 산물인 하이드록시엑토인 (Hydroxyectoin)을 생산하지 않도록 하기위해서 엑토인에서 하이드록시엑토인을 생산하는 유전자인 *ectD*를 제거하였다.

[0048] **2-1. *ectD* 유전자의 제거를 위한 재조합 pK19mobsacB 벡터의 제조**

[0049] *ectD* 유전자는 pK19mobsacB 벡터를 이용하여 상동 재조합 (homologous recombination)방법으로 결실 시켰다. 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP 내의 *ectD* 유전자를 제거하기 위한 결실 (deletion) 벡터는 도 1과 같다.

[0050] 유전자 결실을 위해 pK19mobsacB 벡터를 EcoR 1, Hind lll 제한 효소로 처리한 후, 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP의 *ectD* 유전자의 다운-스트림 (down-stream)과 업-스트림 (up-stream) 방향으로 PCR을 한 후, 획득한 단편 (fragment) 2개를 인퓨전 (infusion, Takara)으로 클로닝 하였다.

[0051] *ectD* 유전자의 다운-스트림과 업-스트림 방향의 단편을 PCR 하기 위한 프라이머 및 합성한 *ectD* 유전자의 각 단편은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0052]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
1	*ectD* Downstream Forward Primer	TGACATGATTACGCCAAGCTTTGTTCAGCAACAAAAGACAGAA
2	*ectD* Downstream Reverse Primer	ATCACGTAACATGCTTAGAATGTTAATAATGTTGA
3	*ectD* Upstream Forward Primer	TTCTAAGCATGTTACGTGATTGATAAAAATCTTCA
4	*ectD* Upstream Reverse Primer	AAAACGACGGCCAGTGAAAGTGAATTCTTGTACTGATGTTTCTTACCCCT
5	*ectD* Downstream gene	Tgttcagcaacaaaagacagaagttaatgagtattatcttcgctgggcaacagcgcgataaacggctcaaaacctttaacgcttgcagcgcggggtcatcggcaaacttatcgcgataatcctcggtacgcgccaaggcttcggataaacagttaacggcctcttcatattgatccaatgcggtatacgcacaagccaattggtaaaaagcatggccgttttcagggtcgattttcaacgcttgctgacataaattgacggcccactgcggctcgcccatatcgagtaccgcatcggccttataagtcaatgcttcgcaatcctcgggacgcaattttaaaatttgatcgtagatggcgattttattggccaagctgcctgcttgacctgctctaagccagagagattgcacatcttgcgtccgccccgatatcctcgccgattttctcaatcaattgtgcttccttgttgagttgttgttcgacaattgccaagcgctcttcgtattcatggaccagtttcgatactttcttatccgccatggactgcacacgctctttgatatctctgagcgaggtccaacccagcaacaccaaaatggtactggcaccggcaatcaagtagaaaaaatatgtgacagtattagtggcgtaagtaacgcctctatcgaccgagctaagctctctatccacaatttgctgaatcagctcattcctctgcgctgccatgtccatacgcaattgtttgagttcatccagcatatagcgctcgatgaacggactatataaaggcttatccaaagattcaaccgcatctaagcgctcttgaacctctgcttcatcgttgacgctctcgcccaacacggaacagggcgccagcacgatcaacattattaacattctaagcat

6	*ectD* Upstream gene	gttacgtgattgataaaaatcttcactttgttcggactgtgcggcattctcggtaatcattgaatattaaa cccatttttttgattaaagacttcgcgacaacagatagccctcgatcatcggccattcccaacttacgcag ggcttacccgtacatcttcagtttattgaaaaatagacggttaagtcattcattgctcgactgacttgcca tgaacaacctaaccttggacgaaaattgacttgcgactcgccttaatccgctaccgcttcagcggtcgagt ggtaaacgctttaagccttatgcgcttccttgtcgttcagcgcaagactgaagacgcaaggcattttcatt tctttggcagcaattcccagtttgagaaatttccccgtatttaggggtaagaaacatcagtacaa

[0054] 이와 같은 과정을 통하여, 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up) 벡터가 제조되었다.

[0056] **2-2. 재조합 pK19mobsacB 벡터를 포함하는 대장균 S17-1 λpir의 형질전환 및 선별**

[0057] 완성된 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up) 벡터는 대장균 S17-1 λpir 종을 이용한 컨쥬게이션 (conjugation) 방법을 이용하였고, 대장균 S17-1 λpir에 재조합한 pK19mobsacB 벡터를 넣기 위해 수용성 세포 (Competent cell)로 만든 후 열 충격 형질 전환 방법을 이용하였다.

[0058] 구체적으로, 상기 대장균 S17-1 λpir 균주를 수용성 세포로 만들기 위해 250 mL의 LB (Lysogeny broth) 배지에 대장균 S17-1 λpir 균주를 접종하여 배양액의 흡광도가 600 nm의 파장에서 OD (optical density) 값이 0.35에 이르렀을 때, 전체 배양액 250 mL를 얼음에 20 분간 차갑게 식힌 뒤 원심 분리기에서 8000 cfg, 20 분간 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수확한 세포는 4 ℃에서 차갑게 식힌 TSS용액 (LB배지 88mL에 DMSO 5mL, 1M $MgCl_2$ 2 mL 및 Polyethylene glycol 3350 10 g을 녹인 증류수 5 mL을 각각 첨가한 용액) 2.5 mL를 넣어 부드럽게 피펫팅으로 섞어주어 대장균 S17-1 λpir 수용성 세포로 만들었다.

[0059] 만들어진 대장균 S17-1 λpir 수용성 세포 100 uL에 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up) 500 ng를 넣은 후 3차 증류수 70 uL 및 KCM 용액 (KCM 용액, 1M KCl을 5.1 mL, 1M $CaCl_2$을 1.5 mL, 1M $MgCl_2$을 2.5 mL 및 3차 증류수 0.9 mL를 섞은 용액)을 20 uL 넣어 혼합액을 제조하였다. 상기 혼합액는 얼음에 30분간 차갑게 식힌 후, 42 ℃로 예열 된 항온 수조기에서 60초간 열 충격을 가하고, LB배지 700 uL를 첨가해 37 ℃230 rpm에서 1시간동안 진탕 배양하였다. 배양된 혼합액은 카나마이신 (25ug/mL)이 첨가된 LB 아가 플레이트에서 단일 균체가 생성될 때까지 37 ℃에서 배양하여, 재조합 대장균 S17-1 λpir (E.coli S17-1 λpir::pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up)를 수득하였다.

[0061] **2-3. 재조합 대장균 S17-1 λpir와의 메이팅을 통한 재조합된 형질전환 균주 (메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP::pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up)의 제조**

[0062] 재조합 대장균 S17-1 λpir는 단일 균체를 카나마이신 (25 ug/mL)이 첨가된 30 mL의 LB 배지에서 12 시간 동안 전 배양하여 배양액 1을 수득하였다. 이후, 전 배양으로 수득한 제1 배양액 200 uL을 동일한 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배지 20 mL에 접종하여 제2 배양액을 수득하였다. 제2 배양액을 흡광도가 600 nm인 파장에서 OD값이 0.6에 이르렀을 때, 4000 rpm, 4 ℃10분 동안 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다.

[0063] 또한, 제조예에 의하여 제조된 DSMZ 메틸마이크로븀 배지 50 mL에서 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP을 48시간동안 전 배양하여 제3 배양액을 수득하였다. 전 배양 후, 제3 배양액을 흡광도가 600 nm인 파장에서 OD (Optical Density)값이 0.2가 되도록 DSMZ 메틸마이크로븀 배지 50 mL에 접종하여 제4 배양액을 수득하였다.

[0064] 제4 배양액은 흡광도가 600 nm의 파장에서 OD 값이 0.4에 이르렀을 때, 4000 rpm, 4 ℃10분 동안 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다.

[0065] 각각 분리된 세포인 대장균 S17-1 λpir (E.coli S17-1 λ pir::pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up) 및 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP을 합하여 LB 배지 100 uL에 섞어주었다.

[0066] DSMZ 아가 배지 조성에서 NaCl 농도를 2 g/L로 낮추고, 뉴블리언트 브로스를 15% (v/v) 첨가하여 메이팅 플레이트를 제작하였다. 메이팅 플레이트 위에 0.2 um 크기의 기공을 가진 니트로 셀룰로오스 필터을 얹은 후, 앞서 LB 배지 100 uL에 섞어준 분리된 세포를 니트로 셀룰로오스 필터 위에 분주한 후 2 일 동안 30 ℃ 배양기에서 배양하였다.

[0067] 배양한 메이팅 세포는 니트로 셀룰로오스 필터에서 수확한 후, DSMZ 메틸로마이크로븀 배지 1 mL에 골고루 섞어 주었다.

[0068] DSMZ 아가 배지 조성에서 날리딕스산 (10 ug/mL) 및 카나마이신 (50 ug/mL)을 첨가하여 셀렉티브 플레이트를 제조하였다. 앞서 수확하여 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지 1 mL에 섞어준 배양한 메이팅 세포를 단일 균체가 형성될 때까지 30 ℃에서 배양하였고, 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD*을 수득하였다.

[0070] **2-4. 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD*의 *ectD* 유전자의 제거여부 확인**

[0071] 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD* (메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP::pK19mobsacB::ectD_down::ectD_up)의 단일 균체 (colony)를 획득하여, 재조합한 pK19mobsacB벡터가 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP에 내재된 *ectD* 유전자의 다운-스트림 혹은 업-스트림 중 어느 방향으로 유입되었는지 콜로니 PCR을 진행한 후 전기영동으로 그 결과를 확인하였다.

[0072] 콜로니 PCR은 PCR 프리믹스 (Premix, Bioneer) 및 하기 표 3에 나타낸 서열로 수행하였다.

표 3

[0073]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
7	*ectD*_down integration Forward Primer	CACTCATTAGGCACCCCAGG
8	*ectD*_down integration Reverse Primer	CAATGGAAAACCCGGCAGTG
9	*ectD*_up integration Forward Primer	CACTGCCGGGTTTTCCATTG
10	*ectD*_up integration Reverse Primer	ACGACGGCCAGTGAATTCTT

[0074] 이 중에서, 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP에 내재된 *ectD* 유전자의 다운-스트림 및 업-스트림 방향으로 재조합된 pK19mobsacB 벡터가 유입된 균주를 골라 제조예에서 제조한 DSMZ 메틸로마이크로븀 아가 배지에 수크로오스 5% (w/v) 가 함유된 배지에서 단일 균체가 생성될 때까지 30 ℃에서 배양하였다.

[0075] 생성된 단일 균체는 DSMZ 아가 배지와 카나마이신 (50 ug/mL)이 첨가된 DSMZ 아가 배지에서 동시에 배양하였다.

[0076] 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP에 내재된 *ectD* 유전자가 제거되었는지 확인하기 위하여, DSMZ 아가 배지에서만 자라는 균체를 선별하여 PCR 프리믹스 (Bioneer) 및 하기 표 4에 나타낸 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR을 수행하였다.

표 4

[0077]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
11	*ectD* deletion checking Forward Primer	TGCTTCATCGTTGACGCTCT
12	*ectD* deletion checking Reverse Primer	ATGGCAAGTCAGTCGAGCAA

[0078] 도 2에서 확인할 수 있듯이, *ectD* 유전자가 제거된 재조합 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP를 얻었고, 이를 변이형 균주인 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD*이라 명명하였다.

[0080] **제조예 3. 엑토인 생산 관련 조절 유전자인 *ectR*가 제거된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectDΔ ectR* 균주 제작**

[0081] 앞선 제조예 2를 통하여 변이형 균주는 하이드록시엑토인을 생산하지 않으며, 야생형 균주 대비 더 많은 엑토인을 생산하는 것을 확인하였다. 이에, 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD* 균주에서 엑토인 생산량을 더욱 향상시키기 위하여 엑토인 생산 유전자 오페론을 조절하는 조절 유전자인 *ectR*을 제거한 이중 변이형 균주를 제작하여 엑토인 생산량을 확인하였다.

[0083] **3-1. *ectR* 유전자의 제거를 위한 재조합 pK19mobsacB 벡터의 제조**

[0084] 제조예 2에서 수행한 컨쥬게이션 (Conjugation)을 통한 형질 전환법으로 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP△*ectD* 균주에서 엑토인 생산에 관련한 오페론 유전자이며 NaCl농도에 따라 조절하는 조절 유전자인 *ectR*을 결실시켜 제거함으로써, 엑토인의 생산성이 개선되는 것을 확인하였다.

[0085] 구체적으로, *ectR* 유전자는 pK19mobsacB 벡터를 이용하여 상동 재조합 (homologous recombination) 방법으로 결실 시켰다. 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP△*ectD* 내의 *ectR* 유전자를 제거하기 위한 결실 (deletion) 벡터는 도 3과 같다.

[0086] 유전자 결실을 위해 pK19mobsacB 벡터를 EcoR 1, Hind 111 제한 효소로 처리한 후, 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP△*ectD*의 *ectR* 유전자의 다운-스트림 (down-stream)과 업-스트림 (up-stream) 방향으로 PCR을 한 후, 획득한 단편 (fragment) 2개를 인퓨전 (infusion, Takara)으로 클로닝 하였다.

[0087] *ectR* 유전자의 다운-스트림과 업-스트림 방향의 단편을 PCR 하기 위한 프라이머 및 합성한 *ectR* 유전자의 서열은 하기 표 5와 같다.

표 5

[0088]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
13	*ectR* Downstream Forward Primer	TGACATGATTACGCCAAGCTTTCTAATTCTCTCCTGAGCAAGATG
14	*ectR* Downstream Reverse Primer	TTATTAGAGCCATTGATCACCAATCATTAGAATAG
15	*ectR* Upstream Forward Primer	GTGATCAATGGCTCTAATAATTCAGCTCAGCT
16	*ectR* Upstream Reverse Primer	AAAACGACGGCCAGTGAATTCAGAACATCAAGAGGTCTGGATTGT
17	*ectR* Downstream gene	Tctaattctctcctgagcaagatgggataatagtgtagtgaattaagcctgaac cgctttgaacggcccaaccttcaccagcatttcggtttcatgttgatctgcaaa atggcgtgtcttatcaaacatcacagcactgccaatttgagtgtccagttttttt tgccagcccctcaaacagagcccatgaggccttattattcggagtaatggtcgt ctcgattcggttaatatcctgattgaccggccgcgccagtatggctttcagcat ccgcgtggcaagcccttggccacgggcttttcgccgacagccacctgccagac aaacagcgtatccggacgttgcggaatacgataacccgagacaaaaccaaccaa ctcatcgccaattttggccgccaccgccgtttcagaaaaatggctgctctgcag caaattgcagtacatcgaattgggatccaggggcgggcatttgctaatcagccg atgcacctgcgctccgacttcggcagtaggctggctaagtgtaataatcggcaa ggcagttttatcaggcaacatataaataactctattatttagatttctgtgcaa ttaactcggctttaactgaataagccgggctcgaatttgatttttttatggccat cagcacgaatattctggcttcattgaaaaacataatatatagtacactaaataa tttaaatgtccaggccgcgtacttttgccttagattaattagatgtcatatcaa attatgcctttcgaacttcaaatttcggtagcgccctaggatgcgccgggcgga gcaccgaattttgttcttcgagggtatacaataatggctttgtaacgcgacggc ctctatttcaatgattggtgatcaatg
18	*ectR* Upstream gene	gctctaataattcagctcagctgcaacccgcatcacgcttttttcccaagctcca gcttgggaaaaacaccccggaagctccagcttccagaaaccgagataacctccg cacattctcaatcaaccccgactcgctcgttcaatctttttcctgattagcaag atgcttcaacttgctgaagccaattgtccgagcagtggccagtcgtagccactt ctgcgggacgggttatttaacccatccccaacgtttcggtttgccctaaacatt tcggctgacttcggccaaagtcaaaacgtttaggacggggctgcaaaccccgtc ctgctaaggatatgctggttttcgggctttagctgaagaaacttgctaatcagg atctttttttgattgtcgggaagctagagcttcctgaatagattacccaagccgg atcgctcgccgctatacacaaatatcggtaaacttgctaaacagaggtcgccgt atacttggaagcggtgctgtttgataaatctgcggatattggacatcagtggct tcgaagtcgggaacgttgggcgataaaaaatggtatcgaggcctcattggttaa gattgcaaaagggtaatttttgacttatgtataacgatgaggtaactattcagt cccccggcaattatcgttcccacgctctgcgtgggaatgcctgagtaccgctcc agcggtacgagacgctagagcgtctcggtcttcattcccacgccggagcgtgag aacgataggcggtgtgaataattacacgatgagagctggagcttgggtaacagc acaaaggcatatttagcctagttgccccccccccctgaacattaacaatccaga cctcttgatgttct

[0089] 이와 같은 과정을 통하여, 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up)벡터가 제조되었다.

[0091] **3-2. 재조합 pK19mobsacB 벡터를 포함하는 대장균 S17-1 λpir의 형질전환 및 선별**

[0092] 완성된 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up) 벡터는 *Escherichia coli* S17-1 λ pir 종을 이용한 컨쥬게이션 (conjugation) 방법을 이용하였고, *E.coli* S17-1 λ pir에 재조합한 pK19mobsacB 벡터를 넣기 위해 수용성 세포 (Competent cell)로 만든 후 열 충격 형질 전환 방법을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 *E.coli* S17-1 λ pir 균주를 수용성 세포로 만들기 위해 250 mL의 LB (Lysogeny broth) 배지에 *E.coli* S17-1 λ pir 균주를 접종하여 배양액의 흡광도가 600 nm의 파장에서 OD (optical density) 값이 0.35에 이르렀을 때, 전체 배양액 250 mL를 얼음에 20 분간 차갑게 식힌 뒤 원심 분리기에서 8000 cfg, 20 분간 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수확한 세포는 4 ℃에서 차갑게 식힌 TSS용액 (LB배지 88mL에 DMSO 5 mL, 1M $MgCl_2$ 2 mL 및 Polyethylene glycol 3350 10 g을 녹인 증류수 5 mL을 각각 첨가한 용액) 2.5 mL를 넣어 부드럽게 피펫팅으로 섞어주어 수용성 세포로 만들었다.

[0094] 만들어진 대장균 S17-1 λ pir 수용성 세포 100 uL에 재조합 pK19mobsacB (pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up) 500 ng를 넣은 후 3차 증류수 70 uL 및 KCM 용액 (각각 1M KCl을 5.1mL, 1M $CaCl_2$을 1.5 mL, 1M $MgCl_2$을 2.5 mL 및 3차 증류수 0.9 mL를 섞은 용액)을 20 uL 넣어 혼합액을 제조하였다. 상기 혼합액은 얼음에 30분간 차갑게 식힌 후, 42 ℃로 예열 된 항온 수조기에서 60초간 열 충격을 가하고, LB배지 700 uL를 첨가해 37 ℃, 230 rpm에서 1시간동안 진탕 배양하였다. 배양된 혼합액은 카나마이신 (25ug/mL)이 첨가된 LB 아가 플레이트에서 단일 균체가 생성될 때까지 37 ℃에서 배양하여, 재조합 대장균 S17-1균주 (*E.coli* S17-1 λ pir::pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up)를 수득하였다.

[0096] **3-3. 재조합 대장균 S17-1 λpir와의 메이팅을 통한 재조합된 형질전환 균주(메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP *Δ ectD*::pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up)의 제조**

[0097] 재조합 대장균 S17-1 λpir는 단일 균체를 카나마이신 (25 ug/mL)이 첨가된 30 mL의 LB배지에서 12 시간동안 전배양하여 배양액 A를 수득하였다. 이후, 전배양으로 수득한 배양액 A 200 uL을 동일한 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배지 20 mL에 접종하여 배양액 B를 수득하였다. 배양액 B를 흡광도가 600 nm인 파장에서 OD값이 0.6에 이르렀을 때, 4000 rpm, 4 ℃ 10분 동안 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다.

[0098] 또한, 제조예에 의하여 제조된 DSMZ 메틸마이크로븀 배지 50 mL에서 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP을 48시간동안 전 배양하여 배양액 C를 수득하였다.

[0099] 전 배양 후, 배양액 C를 흡광도가 600 nm인 파장에서 OD (Oprical Density)값이 0.2가 되도록 DSMZ 메틸마이크로븀 배지 50 mL에 접종하여 배양액 D를 수득하였다.

[0100] 배양액 D는 흡광도가 600 nm의 파장에서 OD값이 0.4에 이르렀을 때, 4000 rpm, 4 ℃10분 동안 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 각각 분리된 세포는 대장균 S17-1균주 (*E.coli* S17-1 λ pir::pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up) 및 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectD*을 합하여 LB 배지 100 uL에 섞어주었다.

[0101] DSMZ 아가 배지 조성에서 NaCl 농도를 2 g/L로 낮추고, 뉴블리언트 브로스를 15% (v/v) 첨가하여 메이팅 플레이트를 제작하였다. 메이팅 플레이트 위에 0.2 um 크기의 기공을 가진 니트로 셀룰로오스 필터를 살포시 얹은 후, 앞서 LB 배지 100 uL에 섞어준 분리된 세포를 니트로 셀룰로오스 필터 위에 분주한 후 2일 동안 30 ℃ 배양기에서 배양하였다.

[0102] 배양한 메이팅 세포는 니트로 셀룰로오스 필터에서 수확한 후, DSMZ 메틸로 마이크로븀 배지 1 mL에 골고루 섞어 주었다.

[0103] DSMZ 아가 배지 조성에서 날리딕스산 (10 ug/mL) 및 카나마이신 (50 ug/mL)을 첨가하여 셀렉티브 플레이트를 제조하였다. 앞서 수확하여 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지 1mL에 섞어준 배양한 메이팅 세포를 단일 균체가 형성될 때까지 30 ℃에서 배양하였고, 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectDΔ ectR* 을 수득하였다.

[0105] **3-4. 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectDΔ ectR*의 *ectR* 유전자의 제거여부 확인**

[0106] 재조합된 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ ectDΔ ectR* (메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*Δ* ectD::pK19mobsacB::ectR_down::ectR_up)의 단일 균체(colony)를 획득하여, 재조합한 pK19mobsacB벡터가 메틸

로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD*에 내재된 *ectR* 유전자의 다운-스트림 혹은 업-스트림 중 어느 방향으로 유입되었는지 콜로니 PCR을 수행한 후 전기 영동으로 그 결과를 확인하였다.

[0107] 콜로니 PCR은 PCR 프리믹스 (Premix, Bioneer) 및 하기 표 6에 나타낸 서열로 수행하였다.

표 6

[0108]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
19	*ectR*_down integration Forward Primer	TTTGCTGGCCTTTTGCTCAC
20	*ectR*_down integration Reverse Primer	GTAAATCGGTGGCGCGAATC
21	*ectR*_up integration Forward Primer	TACGTAGAGTGATTCGCGCC
22	*ectR*_up integration Reverse Primer	CGGACTGGCTTTCTACGTGT

[0109] 이를 통하여, 재조합한 pK19mobsacB벡터가 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD*에 내재된 *ectR* 유전자의 다운-스트림 방향으로 유입된 것을 확인하였다.

[0110] 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD*에 내재된 *ectR* 유전자의 다운-스트림 방향으로 재조합 된 pK19mobsacB 벡터가 유입된 균주를 골라서 제조예에서 제조한 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지에 수크로오스 5 % (w/v) 가 함유된 아가 플레이트에서 단일 균체가 생성될 때까지 30 ℃에서 배양하였다.

[0111] 생성된 단일 균체는 DSMZ 아가 배지와 카나마이신 (50 ug/mL)이 첨가된 DSMZ 아가 배지에서 동시에 배양하였다.

[0112] 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD*에 내재된 *ectR* 유전자가 제거되었는지 확인하기 위하여, DSMZ 아가 배지에서만 자라는 균체를 선별하여 PCR 프리믹스 (Bioneer) 및 하기 표 7에 나타낸 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR을 실시하였다.

표 7

[0113]

서열번호	명칭	서열목록 (5`- -> 3`-)
23	*ectR* deletion checking Forward Primer	GGGCATTTGCTAATCAGCCG
24	*ectR* deletion checking Reverse Primer	AACAGCACCGCTTCCAAGTA

[0114] 도 4에서 확인할 수 있듯이, *ectR* 유전자가 제거된 재조합 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectD*를 얻었고, 이를 변이형 균주인 메틸로마이크로븀 알칼리필럼 20ZDP*ΔectDΔectR*이라 명명하였다.

[0116] **실시예 1. 배양 배지에 텅스텐 첨가에 따른 세포 성장 및 엑토인 생산량의 평가**

[0117] 균주의 배양 배지에 텅스텐 (Tungsten, W)를 첨가하여 *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 균주의 세포 성장 및 엑토인 생산량을 평가하였다.

[0118] 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지 조성에 NaCl를 3 %(w/v) 농도로 첨가하였으며, 탄소원으로는 메탄가스를 이용하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, 0.05 uM의 텅스텐의 첨가 유무에 따른 *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 균주의 세포 성장과 엑토인 생산량을 측정하였다.

[0119] 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량 유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12시간 간격으로 치환하여 0시간부터 120시간까지 실험을 수행하였다. 매 24시간마다 배양액을 수확하여 600 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 세포의 성장을 확인하고, 그 결과를 하기 표 8 및 도 5에 나타내었다.

표 8

[0120]

Time (h)	Without W		With W	
	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV
0	0.2	3.39935E-17	0.2	3.39935E-17
24	0.96	0.122882057	2.16	0.085049005
48	2.28	0.156204994	4.8	0.255342907

72	2.89	0.240416306	9.38	1.128819442
96	4.03	0.040414519	13.7	1.814423692
120	3.55	0.081853528	14.0	0.999616593

[0122] 또한, 매 세포의 성장 확인 시마다 배양액 5 mL을 수확하여 4000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리한 후, 세포와 배지를 분리하였다. 그 다음, 상등액을 제거하고 -80 ℃에서 냉동 후, 동결건조기에서 48 시간 이상 동결 건조를 진행하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름:3차 증류수의 비율이 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 170 uL의 3차 증류수를 넣고 다시 5분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 세포 내 축적된 엑토인의 생산량을 측정하여 그 결과를 하기 표 9 및 도 6에 나타내었다.

표 9

[0123]

Time (h)	Without W		With W	
	Ectoine (mg/L)	STDEV	Ectoine (mg/L)	STDEV
24	12.1555706	0.961799332	26.14223468	2.162328467
48	29.71144091	4.796346034	54.04064585	1.880019723
72	38.46912566	2.932677284	12.00478585	8.522988957
96	39.54838699	2.825588941	1.396042412	0.262771656
120	43.78728286	6.508074395	1.510509523	0.716036607

[0125] 이를 통해, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*를 배양 시, 배지에 텅스텐 첨가하면 최대 OD 14까지 자랐으며, 텅스텐을 첨가하지 않은 배지에 비해 약 250 % 이상 성장한 것을 확인하였다 (도 5). 또한, 텅스텐을 첨가 시, 배양 48시간 후에 엑토인을 최대 53.24 mg/L을 생산하였다 (도 6). 반면, 텅스텐을 첨가하지 않고 배양한 경우는 120 시간 배양 후에 최대 43.78 mg/L 생산하는 것을 확인하였다 (도 2). 배지에 텅스텐을 첨가한 경우는 세포가 급격히 증가하여 48시간에 최대 엑토인을 생산하였으나, 이후 세포가 증가함에 따라 엑토인이 감소하는 경향을 보였다. 반면, 배지에 텅스텐을 첨가하지 않은 경우는 세포 성장의 속도가 더딜 뿐 아니라, 96시간 이후 세포 성장이 감소하지만 엑토인은 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 이는, 텅스텐이 첨가된 배지는 세포 성장이 급격히 증가하므로 생성된 엑토인이 분해되어 세포를 구성하는 물질로 전환되기 때문이다.

[0127] **실시예 2. 배양 배지의 NaCl 농도에 따른 세포 성장 및 엑토인 생산량의 평가**

[0128] 엑토인의 최적 생산 조건을 탐색하기 위하여 세포 성장 정도에 따른 엑토인의 축적 정도를 파악하였다. 메탄자화균에서 생성되는 엑토인은 유기체가 삼투환경에서 단백질과 세포 구조를 안정화 시키는데 필요한 삼투물질이다. 따라서, 메탄자화균을 성장시키는 DSMZ 배지 내 염분 농도가 높아질수록 균주 세포 내에 더 많은 엑토인이 생성될 수 있다. 하지만, 배지 내 염분 농도가 높을수록 세포 성장에 영향을 미치므로, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 균주의 세포 성장에 영향을 미치지 않으면서, 엑토인의 생산량을 최대한 증가시킬 수 있는 적정 염분 농도를 평가하였다.

[0129] 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지조성에 NaCl을 3 %(w/v), 6 %(w/v) 및 9 %(w/v) 농도로 첨가하고, 탄소원으로는 메탄가스를 이용하였다. 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가한 후 NaCl 농도에 따른 *M. alcaliphilum 20ZDP* △*ectD*△*ectR* 균주의 세포 성장과 엑토인 생산량을 측정하였다.

[0130] 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12시간 간격으로 치환하여 0시간부터 120시간까지 실험을 수행하였다. 매 24시간마다 배양액을 수확하여 600 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 그 결과를 하기 표 10 및 도 7에 나타내었다.

표 10

[0131]

Time (h)	NaCl 3 %		NaCl 6 %		NaCl 9 %	
	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV
0	0.2	3.39935E-17	0.2	3.39935E-17	0.2	3.39935E-17
24	3.12	0.377226722	0.939333333	0.081002058	0.245666667	0.002309401
48	6.4	0.425793377	3.17	0.301993377	0.172	0.022649503
72	12.55333333	1.874415464	4.183333333	0.384230833	0.086333333	0.008962886
96	12.255	0.233345238	5.963333333	1.123936534	0.095	0.010148892
120	12.14	0.282842712	9.13	0.749533188	0.123333333	0.026539279
144	11.11	0.608111832	9.78	0.636396103	0.086333333	0.01747379
168	11.77	0.749533188	9.183333333	1.479876121	0	0
192	11.025	0.6151829	9.586666667	0.743325859	0	0

[0133] 상기 표 10 및 도 7에서 확인할 수 있듯이, NaCl이 3 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 96 시간 배양하였을 때, 최대 OD 12.25까지 성장하였으며, NaCl이 6 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 168 시간 배양하였을 때, 최대 OD 10.02까지 성장하였다. 반면, NaCl이 9 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 세포의 성장이 이뤄지지 않았다. 이를 통해, NaCl이 3 %(w/v) 첨가된 배지에서 균주의 세포 성장이 가장 빠르며, 배지 에 NaCl이 9 %(w/v) 첨가된 배지에서는 세포의 성장이 급격히 저하되어 세포 성장에 적합한 농도가 아님을 확인할 수 있었다.

[0134] 또한, 매 세포의 성장 확인 시마다 배양액 5 mL을 수확하여 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리한 후, 세포와 배지를 분리하였다. 그 다음, 상등액을 제거하고 -80 ℃에서 냉동 후, 동결건조기에서 48시간 이상 동결 건조를 진행하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름:3차 증류수의 비율이 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 3차 증류수를 넣고 다시 5분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 엑토인 생산량을 측정하여 그 결과를 하기 표 11 및 도 8에 나타내었다.

표 11

[0135]

Time (h)	NaCl 3 %		NaCl 6 %		NaCl 9 %	
	Ectoine (mg/L)	STDEV	Ectoine (mg/L)	STDEV	Ectoine (mg/L)	STDEV
24	34.3668121	5.043587482	31.7159291	5.634791907	3.029551186	1.854520963
48	71.0739582	8.297196593	97.8410647	24.07948361	0	0
72	28.5118613	1.085296402	125.589827	19.29822746	0	0
96	30.2887205	10.47511361	142.313892	2.860799404	0	0
120	13.4046475	1.261254663	83.8118205	12.26306352	0	0
144	10.8420518	1.89398324	65.072685	6.004491837	0	0
168	12.985643	0.724695103	70.8072441	21.10665306	0	0
192	8.7873654	2.784572556	32.514425	0.654844973	0	0

[0137] 상기 표 11 및 도 8에서 확인할 수 있듯이, NaCl이 3 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 48시간 배양 시 최대 71.07 mg/L의 엑토인을 생산하였다. 또한, NaCl이 6 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 96시간 배양 시 최대 142.3 mg/을 생산하였으며, 배양 시간이 경과하여도 계속하여 세포 내 엑토인 축적이 잘 이뤄지는 것을 확인하였다. 반면, NaCl이 9 %(w/v) 첨가된 배지에서 배양한 균주는 24시간 배양 시 최대 3.02 mg/L의 엑토인을 생산하였지만, 배양 시간이 경과하면서 세포 성장이 잘 이뤄지지 않아 엑토인이 균주 세포 내에 축적되지 않음을 보였다. 이를 통해, 엑토인 생산량을 증가 시키기 위한 배지 내 NaCl의 농도는 6 %(w/v)가 적정 농도임을 확인 할 수 있었다.

[0139] **실시예 3. 세포 성장의 지표 측정에 따른 엑토인 생산량의 평가**

[0140] 세포 성장의 지표인 흡광도 (OD_{600}nm) 값에 따른 *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*의 엑토인 생산량을 측정하여, 가장 많은 엑토인을 생산하는 균주의 성장 시기를 확인하였다. 앞선 실험에서 텅스텐을 첨가 시 특정 배양 시기 이후 세포 성장은 잘 이루어졌으나, 엑토인의 생산이 감소하는 결과를 얻어, 최적의 엑토인 생산 조건 탐색을 위하여 아래의 실험을 진행하였다.

[0141] 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지조성에 NaCl은 6 %(w/v) 농도로 첨가하였으며, 탄소원으로는 메탄가스를 이용하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, 0.05 uM의 텅스텐의 첨가 유무에 따른 *M. alcaliphilum 20ZDP* △*ectD*△*ectR* 균주의 세포 성장과 엑토인 생산량을 측정하였다.

[0142] 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12 시간 간격으로 치환하여 OD값이 9가 될 때까지 실험을 진행하였다.

[0143] 또한, 매 세포의 성장 확인 시마다 배양액 5 mL을 수확하여 4000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리한 후, 세포와 배지를 분리하였다. 그 다음, 상등액을 제거하고 -80 ℃에서 냉동 후, 동결건조기에서 48 시간 이상 동결 건조를 하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름: 3차 증류수의 비율을 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5 분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 3차 증류수를 넣고 다시 5 분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10 분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 엑토인 생산량을 측정하여 그 결과를 하기 표 12 및 도 9에 나타내었다.

표 12

[0144]

OD 600 nm	Ectoine (mg/L)	STDEV
1	23.08463	3.003660178
2	53.90736	3.898092307
3	80.12396	2.470195473
4	98.66205	7.523611909
5	125.9111	7.348419096
6	138.4427	9.934381551
7	92.51317	7.586122397
8	68.50855	0.70334327
9	43.30968	5.86113628

[0146] 상기 표 12 및 도 9에서 확인할 수 있듯이, NaCl의 농도가 6 %(w/v)인 배지에서 배양 시 중대수기 (mid-exponetial phase, OD 4 내지6)에 도달했을 때, 세포 내 엑토인 생산량은 125.9 mg/L (OD 5), 138.4 mg/L (OD 6)로, 세포 내 엑토인의 축적이 매우 높게 확인되었다. 후대수기에서 정체기 (late exponential pahse ~ stationary phase, OD 7 내지 9 이상)에 도달하면 세포 내에 축적 되었던 엑토인이 분해되는 것을 확인하였다. 따라서, 엑토인 생산량을 증가시키기 위한 세포 성장의 최적 시기는 중대수기인 것을 확인하였다.

[0148] **실시예 4. 엑토인의 지속적인 생산 및 최종 생산량 증대를 위한 바이오 착유의 최적화 조건**

[0149] 엑토인 생산 능력이 향상된 *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*의 배양 조건 최적화를 통해 엑토인 생산량을 증가시켰다. 하지만, 이와 같은 방법은 엑토인 생산을 위한 세포 배양 후 추출이라는 1회성 방법이라는 단점을 가지고 있다.

[0150] 호염성 메탄자화균이 삼투 물질인 엑토인을 생산할 때, 세포 내에서 엑토인을 생산하여 축적하는데, 이때, 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 배양된 세포는 고농도 (6 %(w/v)) NaCl 환경에 노출되면 세포 내 더 많은 엑토인을 축적하게 된다. 또한, 고농도 (6 %(w/v)) 의 NaCl 환경에 노출된 세포를 다시 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에 노출시키는 삼투 충격을 주게 되면, 세포 내에 축적되어 있던 엑토인을 다시 세포 밖으로 배출하게 된다. 이 과정을

여러 번 반복하는 방법을 바이오 착유라고 한다. 바이오 착유의 최적화 조건을 탐색하기 위해 저농도 NaCl에서 배양된 세포가 고농도 NaCl에 노출되었을 때, 세포 내 엑토인의 축적량을 확인하였다. 그 다음, 세포를 다시 저농도 NaCl에 노출하여 삼투 충격을 주어서 엑토인을 세포 밖으로 배출하여 배출량을 확인하였다.

[0152] **4-1. 고농도 배양의 최적화에 따른 세포 내 엑토인 축적량 평가**

[0153] 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 배양된 세포가 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에 노출되었을 때, 세포 내 엑토인을 가장 많이 축적하는 고농도 배양의 최적화 된 시간을 평가하였다.

[0154] 구체적으로, 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl을 3 %(w/v) 농도로 첨가하였으며, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 세포 내 엑토인이 가장 많이 축적되는 중대수기인 OD 5.15까지 배양하였다. 이때, 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12시간 간격으로 치환하여 OD값이 5.15가 될 때까지 배양하였다.

[0155] OD 5.15가 된 세포 배양액은 13000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl을 6 %(w/v) 농도로 첨가하여 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 24시간까지 배양하였으며, 배양 3시간, 6시간, 12시간 및 24시간마다 5 mL의 배양액을 수득하였다. 수득한 각각의 배양액을 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여, 세포와 배지를 분리하고, 상등액을 제거한 후, -80 ℃에서 냉동한 후, 동결건조기에서 48시간 이상 동결건조를 하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름:3차 증류수의 비율을 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 3차 증류수를 넣고 다시 5분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 엑토인 생산량을 측정하여 그 결과를 하기 표 13 및 도 10에 나타내었다.

표 13

[0156]

Time (h)	OD 600 nm	STDEV	Intra cellular ectoine (mg/L)	STDEV
0	5.146667	0.213854	56.32754	1.593358
3	5.16	0.336006	67.03162	5.641904
6	5.923333	0.295691	112.5657	10.18533
12	6.433333	0.480867	160.2944	13.382791
24	8.01	0.34176	189.6903	20.41745

[0158] 상기 표 13 및 도 10에서 확인할 수 있듯이, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*을 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에 노출하였을 때, 시간이 지날수록 세포의 성장은 둔화되었지만, 6 시간째 세포 내 엑토인 축적량이 112.5 mg/L로 0 시간째의 엑토인 축적량에 비해 약 2배 증가하였다. 24 시간째에는 세포 내 엑토인 축적량이 189.7 mg/L로 0 시간째의 엑토인 축적량에 비해 약 3.4 배 이상 증가하였으며, 배양 24 시간 이후에는 세포 내 엑토인의 축적량이 크게 증가하지 않았다.

[0159] 이를 통해, 바이오 착유 시 저농도에서 고농도로 노출하여 세포 내 엑토인이 축적되게 하는 고농도 배양의 최적 시간은 24시간임을 확인하였다.

[0161] **4-2. 최적화된 삼투 충격 시간에 따른 세포 내 엑토인 축적량 평가**

[0162] 앞선 4-1 실시예에서는 바이오 착유의 최적화 조건을 탐색하기 위해 저농도 (3 %(w/v)) NaCl를 포함하는 배지에서 배양된 세포를 고농도 (6 %(w/v)) NaCl이 포함하는 배지에 시간별로 노출하여 엑토인 축적량이 가장 현저한 고농도 배양 최적 시간을 확인하였다. 엑토인 축적량이 가장 높은 24시간을 선택하고, 추가로 저농도 (3 %(w/v)) 삼투 충격을 주어 세포 외 엑토인 배출이 가장 많이 되는 배양의 최적 시간을 확인하였다.

[0163] 구체적으로, 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl 농도를 3 %(w/v)로 하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 세포 내 엑토인이 가장 많이 축적되는 중대수기인 OD 5.15까지 배양하였다. 이때, 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12시간 간격으로 치환하여 OD값이 5.15가 될 때까지 배양하였다.

[0164] 중대수기까지 배양된 세포 배양액은 13000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl 농도를 6 %(w/v), 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하여 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 24시간까지 배양하였으며, 세포 내 엑토인 축적량을 측정하기 위해 배양액 5 mL을 수득하여 흡광도 600 nm에서 OD값을 측정하고, 나머지 배양액은 세포 내 엑토인을 추출하기 위해 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여, 세포와 배지를 분리하고, 상등액을 제거한 후, -80 ℃에서 냉동한 후, 동결건조기에서 48시간 이상 동결건조를 하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름:3차 증류수의 비율을 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 3차 증류수를 넣고 다시 5분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10 분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 세포내 엑토인 축적량을 측정하여 그 결과를 하기 표 14 및 도 11에 나타내었다.

표 14

[0165]

Time (h)	OD600	STDEV	Accumulated ectoine (mg/L)	STDEV
0	5.14667	0.21385	56.32754	1.59336
24	8.01	0.34176	189.6903	20.41745

[0167] 상기 표 14 및 도 11에서 확인할 수 있듯이, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*를 고농도 (6 %(w/v)) NaCl 배지에서 24시간 배양했을 때, OD 값은 8.01이였으며, 세포 내 축적된 엑토인의 양은 약189 mg/L였다.

[0168] 그 다음, 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에서 배양된 세포 배양액은 삼투 충격을 주기 위해서 13000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전 된 세포를 상기 배지 조성과 같은 DSMZ 배지에 NaCl을 3 %(w/v) 농도로 첨가하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가한 된 배지에 넣어 배양 하였다. 이 때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 워킹 불륨으로 1시간 동안 배양 하였으며, 15 분마다 5 mL의 배양액을 수확하여 4000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여, 세포와 배지를 분리하였다. 그 다음, 세포 밖으로 배출된 엑토인 측정을 위해 원심 분리한 용액의 상등액 125 ul과 3차수 375 ul 및 아세토나이트릴 500 ul를 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 엑토인 생산량을 측정하였다.

[0169] 또한, 상등액과 분리된 세포는 앞선 세포내 엑토인 추출법과 같은 방법으로 세포 내 엑토인의 축적량을 확인하였다. 그리고 세포 외 엑토인 배출량 및 세포 내 엑토인 축적량의 결과를 비교하여 하기 표 15 및 도 12에 나타내었다.

표 15

[0170]

Time (min)	Intra cellular ectoine (mg/L)	STDEV	Extra cellular ectoine (mg/L)	STDEV
0	189.6903	0.34176	0	0
15	84.6936	3.828517	60.7643	0.772294
30	84.90215	1.86093	53.65725	4.349132
45	80.24651	7.768939	56.28525	0.816065
60	84.02343	3.517368	68.78436	1.794789

[0172] 상기 표 15 및 도 12에서 확인할 수 있듯이, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*을 저농도 (3 %(w/v)) NaCl에서 삼투 충격에 15 분부터 1 시간까지 노출시켰을 때, 15 분까지는 엑토인 배출량이 증가하였으나, 15 분 이후부터 1 시간까지 세포 내 엑토인 축적량과 세포 외 엑토인 배출량에 뚜렷한 변화가 없었음을 확인하였다.

[0173] 이를 통해, 삼투 충격을 주기 위해 저농도에서 세포를 15 분만 노출하여도 효과적으로 삼투 충격을 주어 세포 외 배출되는 엑토인의 수득이 가능한 것을 확인하였다.

[0175] **4-3. 최적화된 삼투 충격 농도의 평가**

[0176] 바이오 착유 방법에서 세포에 삼투 충격을 주어 엑토인을 세포 밖으로 배출할 때, 가장 많은 엑토인이 세포밖으로 배출될 수 있는 최적화된 삼투 충격 농도를 평가하였다.

[0177] 구체적으로, 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl을 3% 농도로 첨가하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR* 세포 내 엑토인이 가장 많이 축적되는 중대수기인 OD 4.78까지 배양하였다. 이때, 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12 시간 간격으로 치환하여 OD 4.78이 될 때까지 배양하였다.

[0178] 중대수기까지 배양된 세포 배양액은 13000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl을 6 %(w/v) 농도로 참가하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하여 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 24 시간까지 배양하였다. 고농도 (6 %(w/v)) NaCl에서 배양된 세포 배양액은 삼투 충격을 주기위해 13000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 0.05 uM의 텅스텐이 첨가된 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성 중 NaCl 농도를 각각 0 %(w/v), 1 %(w/v), 2 %(w/v) 및 3 %(w/v)로 조절하여 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 15분 동안 배양하였으며, 5 mL의 배양액을 수득하여 세포 외 배출된 엑토인과 세포 내 축적된 엑토인의 생산량을 측정하였다.

[0179] 측정을 위해, 각각의 5 mL의 배양액을 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여 세포와 배지를 분리하였다. 상등액은 세포 외 배출된 엑토인을 측정하기 위해, 상등액 125 ul과 3 차 증류수 375 ul 및 아세토나이트릴 500 ul을 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 세포 외 배출된 엑토인량을 측정하였다.

[0180] 그 다음, 세포 내 엑토인을 추출하기 위해, 남은 세포 배양액을 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여, 세포와 배지를 분리하고, 상등액을 제거한 후, -80 ℃에서 냉동한 후, 동결건조기에서 48시간 이상 동결건조를 하였다. 동결 건조한 세포에 메탄올:클로로포름:3차 증류수의 비율을 10:5:4로 제조한 엑토인 추출 용액 570 uL을 넣고 5분간 섞어주었다. 그 다음, 170 uL의 클로로포름과 3차 증류수를 넣고 다시 5분간 섞어준 후, 13000 rpm 4 ℃에서 10 분간 원심 분리를 하였다. 그 다음, 원심 분리 한 용액의 상등액 10 uL 분리하여, 3 차 증류수 490 ul 및 아세토나이트릴 500 uL과 섞어주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 세포 내 엑토인 축적량을 측정하였다.

[0181] 상기 실험 결과로, 세포 외 엑토인 배출량 및 세포 내 엑토인 축적량을 하기 표 16 및 도 13에 나타내었다.

표 16

[0182]

NaCl (%)	Intra-cellular ectoine (%)	STDEV	Extra-cellular ectoine (%)	STDEV
0	1.67382	2.07513	98.32618	1.37178
1	17.98622	11.88085	82.01378	3.31312
2	27.79348	13.08227	72.20652	1.49772
3	53.48411	5.14304	46.51589	10.2911

[0184] 상기 표 16 및 도 13에서 확인할 수 있듯이, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*을 0 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 삼투 충격을 주었을 때, 세포 내 축적된 엑토인의 98 % (77.2 mg/L) 이상이 세포 밖으로 배출된 것을

확인할 수 있다.

[0185] 반면, 1 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서는 세포 내 축적된 엑토인의 82 % (76.6 mg/L)이 세포 밖으로 배출 되었으며, 2 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서는 72.2 %(73.5 mg/L)이 세포 밖으로 배출되었다. 이는 2 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 균주를 성장 시킨 것 보다 1 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 성장시킨 것이 약 13.8% 이상 더 많은 엑토인을 세포 밖으로 배출한 것을 의미한다. 또한, 3 %(w/v) NaCl 배지에서는 46.5 %(49.7 mg/L)이 세포 밖으로 배출되었다. 이는 3 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 균주를 성장 시킨 것 보다 1 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 성장시킨 것이 약 78.3 % 이상 더 많은 엑토인을 세포 밖으로 배출한 것을 의미한다.

[0186] 가장 많은 엑토인을 배출하는 삼투 충격 농도를 확인한 후, 각각의 세포 내 엑토인 축적량 분석하였다. 세포 배양액을 13000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 0.05 uM의 텅스텐이 첨가되고, NaCl을 6 %(w/v)농도로 첨가하고 DSMZ 배지에서 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 워킹 볼륨으로 24 시간동안 배양하여 그 결과를 표 17 및 도 14에 나타내었다.

표 17

[0187]

	NaCl 0 %		NaCl 1 %		NaCl 2 %		NaCl 3 %	
	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV	OD 600 nm	STDEV
NaCl 6 %	6.81333	0.67929	6.72333	0.24379	6.74	0.6449	6.71	0.82018
Hypo-osmotic shock	2.12333	0.53948	4.43	0.48031	5.51667	0.31021	5.46	0.21703
NaCl 6 %	1.06867	0.87769	6.66333	0.40772	6.94667	0.39209	6.9	0.73328

[0189] 상기 표 17 및 도 14에서 확인할 수 있듯이, *M. alcaliphilum* 20ZDP △*ectD*△*ectR*을 0 %(w/v)의 NaCl이 포함된 배지에서 삼투 충격을 주고 다시 고농도 (6 %(w/v)) NaCl가 포함된 배지에서 배양하였을 때, 세포가 성장하지 않았다. 이는 급격한 저농도 충격으로 인해 세포가 분해되어 세포에 치명적인 영향을 미친 것을 의미한다.

[0190] 반면, 1 %(w/v) NaCl이 포함된 배지에서 삼투 충격을 주고 다시 고농도 (6 %(w/v)) NaCl이 포함된 배지에서 배양하였을 때는 OD 값이 6.66이고, 2 %(w/v) NaCl이 포함된 배지에서 삼투 충격을 주고 다시 고농도 (6 %(w/v)) NaCl이 포함된 배지에서 배양하였을 때는 OD값이 6.95이고, 3 %(w/v) NaCl이 포함된 배지에서 삼투 충격을 주고 다시 고농도 (6 %(w/v)) NaCl이 포함된 배지에서 배양하였을 때는 OD값이 6.9을 나타내었다.

[0191] 이를 통해, 세포 외 엑토인 배출을 위해 가장 최적화 된 삼투 충격 NaCl 농도는 1 %(w/v) 임을 확인하였다.

[0193] **4-4. 바이오 착유의 최적화된 조건을 이용한 지속적인 엑토인 생산 방법**

[0194] 제조예 1의 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl을 3 %(w/v) 농도로 첨가 하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하였다. 250 mL 삼각 플라스크 (baffled flask)에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고, 워킹 볼륨으로 하여 *M. alcaliphilum 20ZDP* △*ectD*△*ectR*를 엑토인이 가장 많이 생산되는 중대수기인 OD 4.78까지 배양하였다. 이때, 탄소원은 메탄:공기=3:7 비율로 가스질량유량계를 통해 주입하였으며, 메탄 및 산소의 원활한 공급을 위하여 12시간 간격으로 치환하여 OD값 4.78이 될 때까지 배양하였다.

[0195] 중대수기까지 배양된 세포 배양액은 13000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 DSMZ 메틸로마이크로븀 배지의 조성에 NaCl 을 6 %(w/v) 농도로 첨가하고, 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하여 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 24시간까지 배양하였다. 각 24시간 마다 5 mL의 배양액을 수확하여 세포내 축적된 엑토인의 생산량을 측정하였다.

[0196] 그 다음, 삼투 충격을 주기 위하여 배양액을 13000 rpm, 4 ℃에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, DSMZ 배지에 NaCl 1 %(w/v)와 0.05 uM의 텅스텐을 첨가하여 침전된 세포를 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 넣고 워킹 볼륨으로 15분 동안 배양하였으며, 5 mL의 배양액을 수득하였다. 그 다음, 수득한 배양액을 4000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여, 세포와 배지를 분리하였다 그 다음, 세포 외 배출된 엑토인 측정을 위해 원심 분리한 용액의 상등액 125 ul과 3차수 375 ul 및 아세토나이트릴 500ul를 섞어 주었다. 그 다음, 시린지 필터 (Syringe Filter)를 이용하여 여과한 후, Zorbox-NH2 컬럼을 사용하여 HPLC (Nexera XR, SHIMADZU사, 일본)을 수행하여 엑토인 생산량을 측정하였다. 또한, 상등액과 분리된 세포는 앞선

엑토인 추출과 같은 방법으로 세포 내 엑토인 축적량을 측정하였다.

[0197] 그 다음, 삼투 충격 이후 세포 성장을 관찰하기 위해 배출된 엑토인 측정을 위한 세포 배양액 외의 남은 세포 배양액을 13000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 0.05 uM의 텅스텐이 첨가되고, NaCl을 6 %(w/v) 농도로 첨가한 DSMZ 배지에 넣어 배양하였다. 이때, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL의 DSMZ 배지를 워킹 볼륨으로 24 시간 동안 배양하였다.

[0198] NaCl 6 %(w/v) 배지에서 24시간 배양, NaCl 1 %(w/v) 배지에서 15분 배양을10회 반복한 후, 그 결과를 하기 표 18 및 도 15에 나타내었다.

표 18

[0199]

Number of repetitions		NaCl 6 %(w/v)		NaCl 1 %(w/v)	
		Ectoine (mg/L)	STDEV	Ectoine (mg/L)	STDEV
1	Intra	139.1291	12.56472	16.80694	1.996807
	Extra	0		76.63649	2.539062
	OD 600nm	6.723333	0.24379	4.43	0.480312
2	Intra	124.4437	7.379045	18.06462	1.629848
	Extra	0	0	64.55337	5.053646
	OD 600nm	6.663333	0.407717	4.71	0.425793
3	Intra	132.1083	1.228203	16.58359	1.795532
	Extra	0	0	68.99977	2.97853
	OD 600nm	6.73	0.27	4.61	0.325115
4	Intra	119.3743	7.653661	14.12753	2.952566
	Extra	0	0	66.04253	3.354258
	OD 600nm	6.746667	0.198578	4.456667	0.400042
5	Intra	114.0118	4.895644	17.22188	2.124296
	Extra	0	0	64.41059	11.21773
	OD 600nm	6.8	0.46	4.61	0.49
6	Intra	110.8751	7.056622	14.98633	3.527247
	Extra	0	0	73.86725	5.429793
	OD 600nm	7.346667	0.487887	4.556667	0.332014
7	Intra	115.9608	11.31712	13.09138	3.599536
	Extra	0	0	72.76121	12.99091
	OD 600nm	7.246667	0.589604	4.536667	0.555188
8	Intra	112.9427	4.179362	9.820811	0.692814
	Extra	0	0	70.0279	0.391127
	OD 600nm	6.246667	0.374477	4.56	0.174356
9	Intra	100.6465	10.07189	10.14935	0.565996
	Extra	0	0	66.09655	6.253788
	OD 600nm	6.676667	0.432474	4.793333	0.140119
10	Intra	95.63059	9.362625	7.227352	0.361134
	Extra	0	0	62.29868	4.634053
	OD 600nm	6.256667	0.496017	4.556667	0.173877

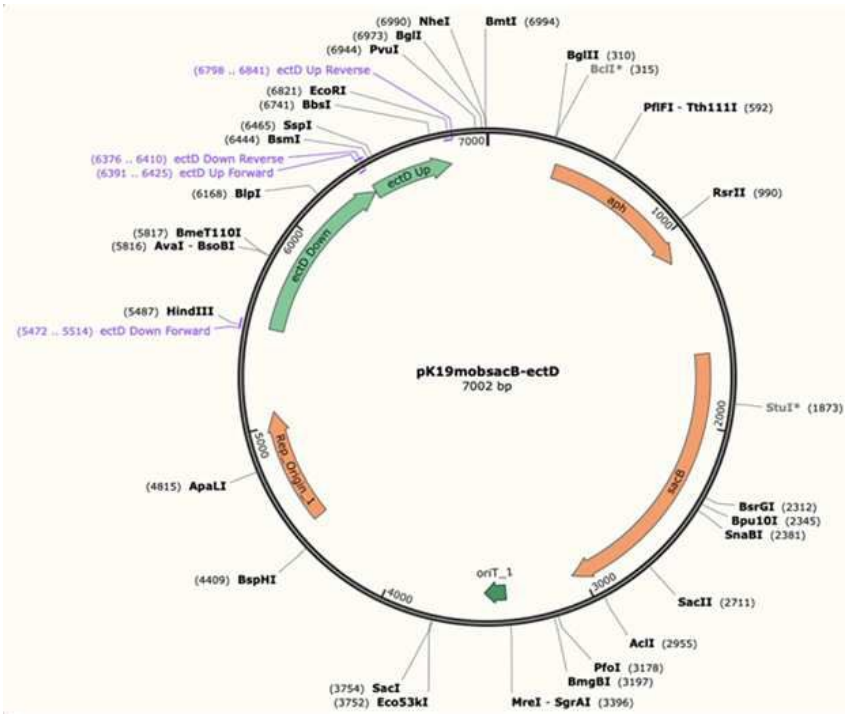
[0201] 상기 표 18 및 도 15에서 확인할 수 있듯이, 총 10회 반복한 바이오 착유 실험 결과, 세포 외로 엑토인을 최종 62.29868 mg/L 생산하였다.

[0202] 또한, 도 16에서 확인할 수 있듯이, 50 ml 플라스크 수준에서 바이오 착유를 10회 반복하여 생산된 총 엑토인의 생산량은 33.5 mg으로 6% NaCl에서 배양하였을 때의 엑토인 생산량 (7.1 mg)과 비교하여 월등히 높은 엑토인을 생산함을 확인하였다.

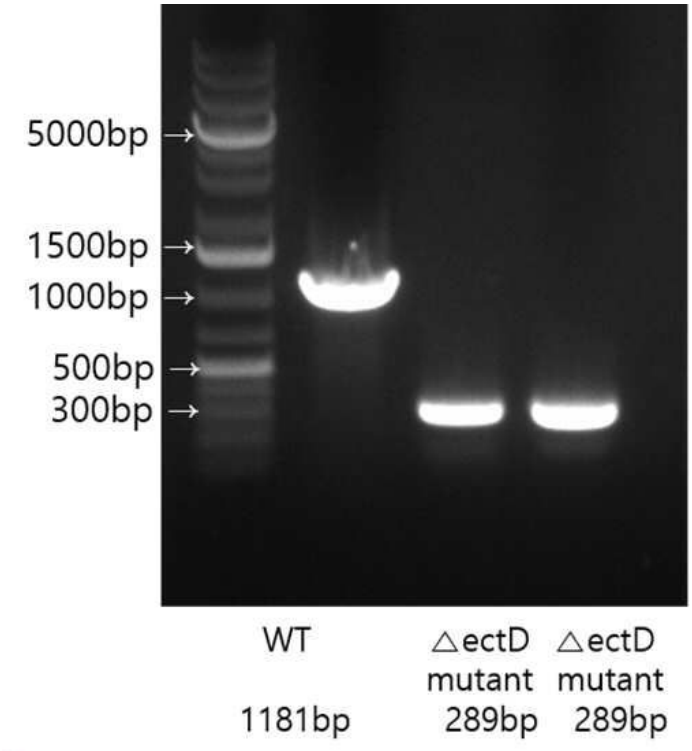
[0203] 이를 통해, 엑토인의 바이오 착유 방법은 세포를 반복적으로 재사용할 수 있으며, 특히, *M. alcaliphilum* 20ZDP *△ectD△ectR* 균주를 이용하여 더 많은 엑토인을 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

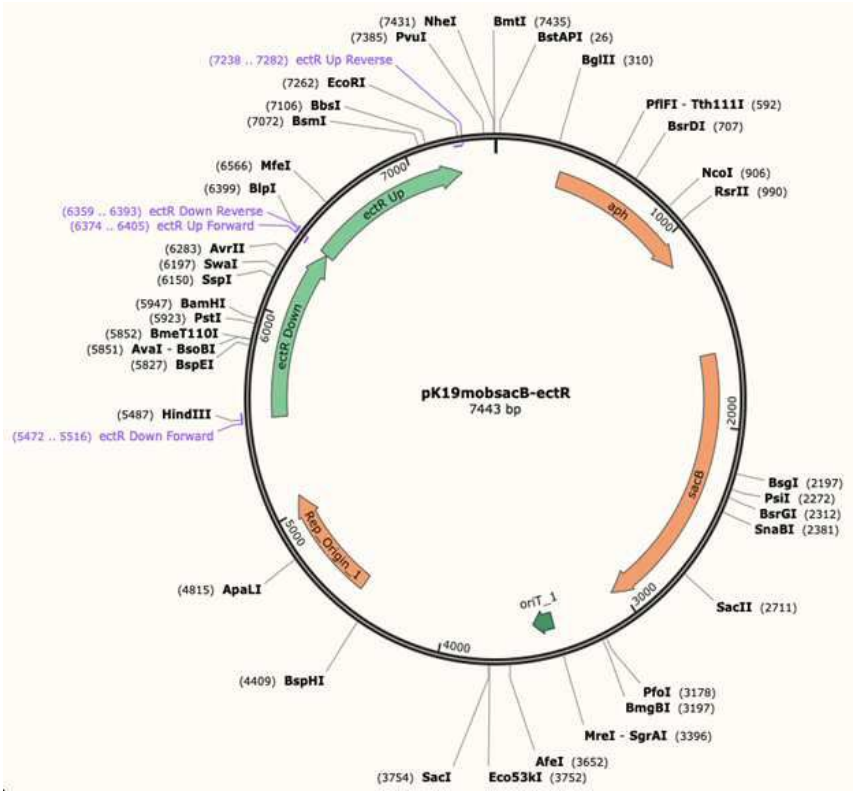
도면1


pK19mobsacB-ectD
7002 bp
(6990) NheI
(6973) BglI
(6944) PvuI
BmtI (6994)
BglII (310)
BclI* (315)
(6798 .. 6841) ectD Up Reverse
(6821) EcoRI
(6741) BbsI
PflFI - Tth111I (592)
(6465) SspI
(6444) BsmI
(6376 .. 6410) ectD Down Reverse
(6391 .. 6425) ectD Up Forward
(6168) BlpI
RsrII (990)
(5817) BmeT110I
(5816) AvaI - BsoBI
(5487) HindIII
(5472 .. 5514) ectD Down Forward
StuI* (1873)
(4815) ApaLI
BsrGI (2312)
Bpu10I (2345)
SnaBI (2381)
(4409) BspHI
SacII (2711)
AclI (2955)
PfoI (3178)
BmgBI (3197)
(3754) SacI
(3752) EcoS3kI
MreI - SgrAI (3396)
ectD Up
ectD Down
aph
sacB
Rep Origin 1
oriT_1
7000
1000
2000
3000
4000
5000
6000

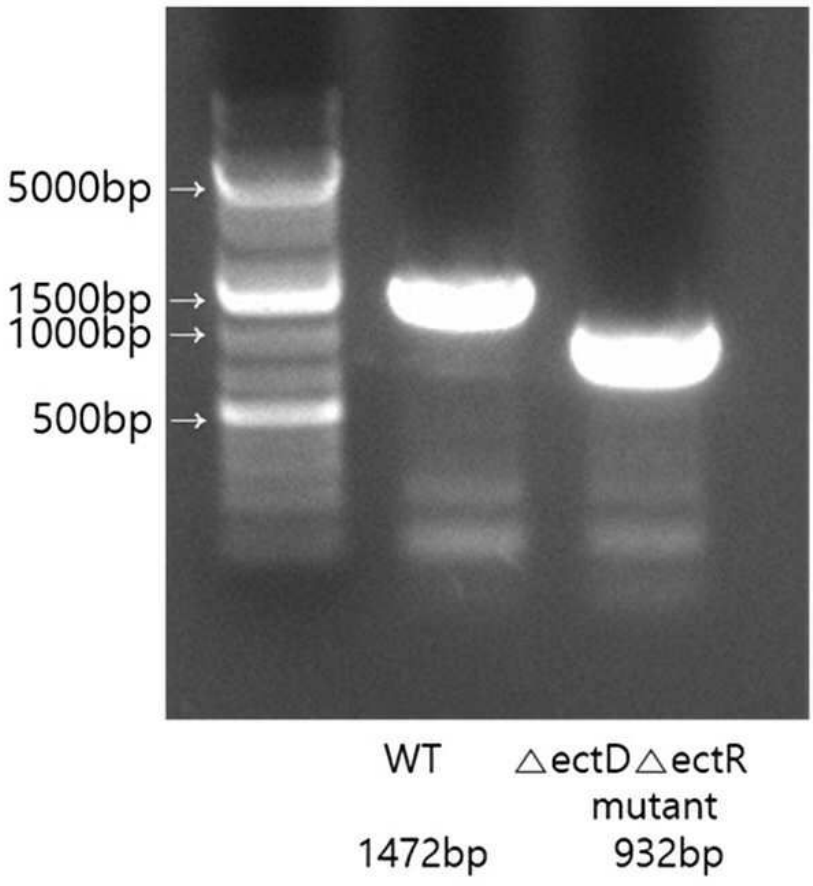
도면2


5000bp
1500bp
1000bp
500bp
300bp
WT
1181bp
△ectD mutant
289bp
△ectD mutant
289bp

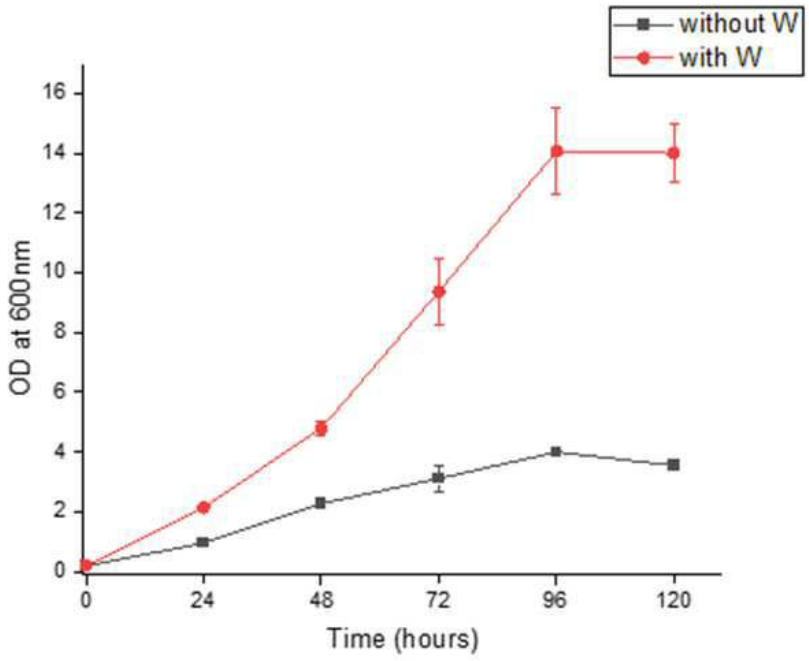
도면3


pK19mobsacB-ectR
7443 bp
(7431) NheI
(7385) PvuI
BmtI (7435)
BstAPI (26)
BglII (310)
(7238 .. 7282) ectR Up Reverse
(7262) EcoRI
(7106) BbsI
(7072) BsmI
PflFI - Tth111I (592)
BsrDI (707)
NcoI (906)
RsrII (990)
(6566) MfeI
(6399) BlpI
(6359 .. 6393) ectR Down Reverse
(6374 .. 6405) ectR Up Forward
(6283) AvrII
(6197) SwaI
(6150) SspI
(5947) BamHI
(5923) PstI
(5852) BmeT110I
(5851) AvaI - BsoBI
(5827) BspEI
(5487) HindIII
(5472 .. 5516) ectR Down Forward
(4815) ApaLI
(4409) BspHI
(3754) SacI
Eco53kI (3752)
AfeI (3652)
MreI - SgrAI (3396)
PfoI (3178)
BmgBI (3197)
SacII (2711)
BsgI (2197)
PsiI (2272)
BsrGI (2312)
SnaBI (2381)
ectR Up
aph
ectR Down
sacB
Rep Origin_1
oriT_1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

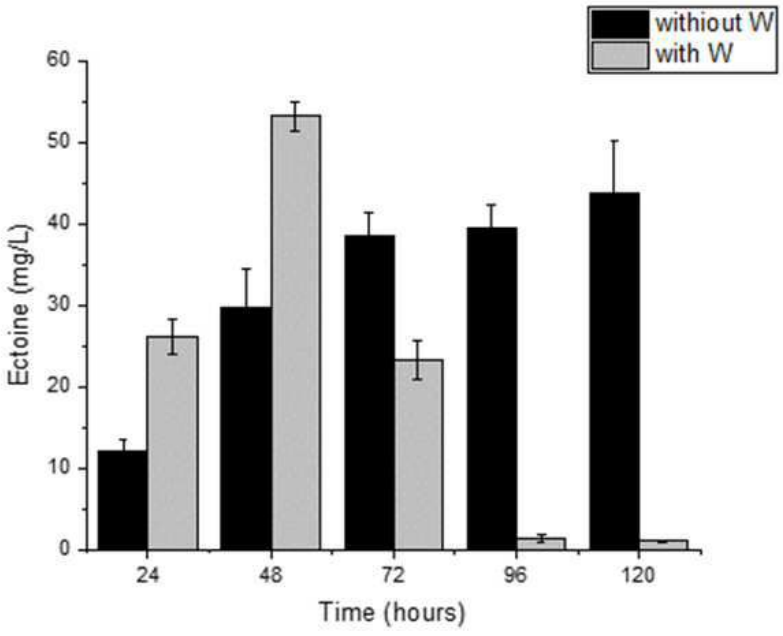
도면4


5000bp
1500bp
1000bp
500bp
WT
1472bp
△ectD△ectR
mutant
932bp

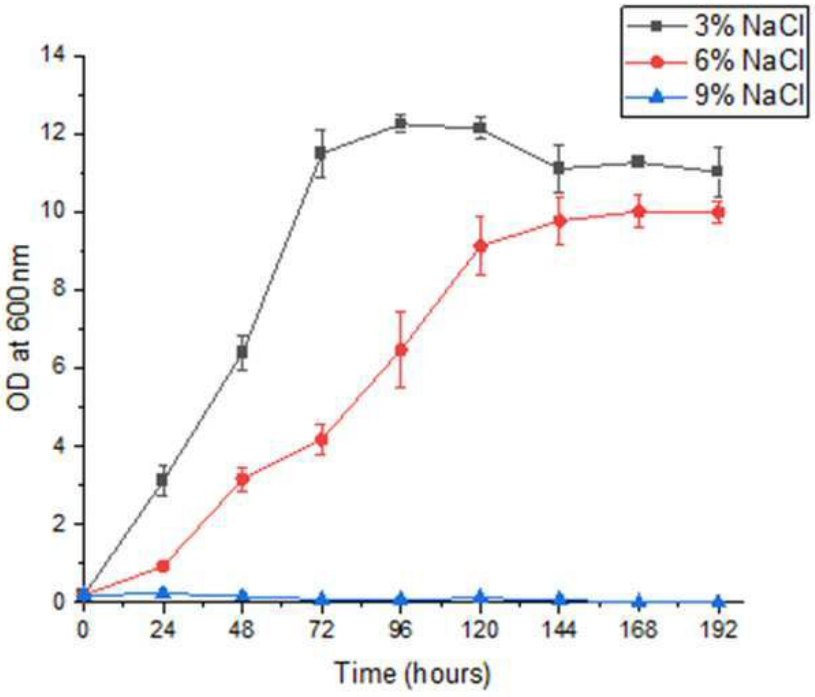
도면5


without W
with W
OD at 600nm
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
24
48
72
96
120
Time (hours)

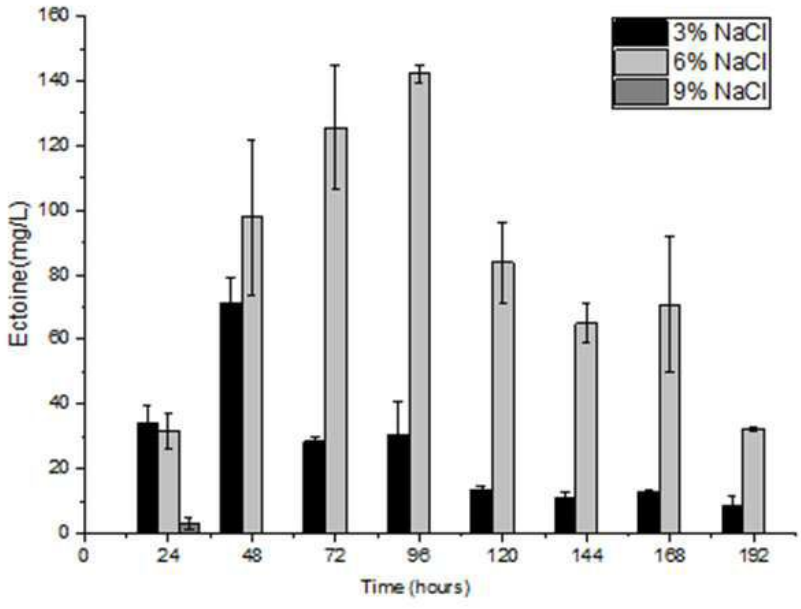
도면6


withiout W
with W
Ectoine (mg/L)
0
10
20
30
40
50
60
24
48
72
96
120
Time (hours)

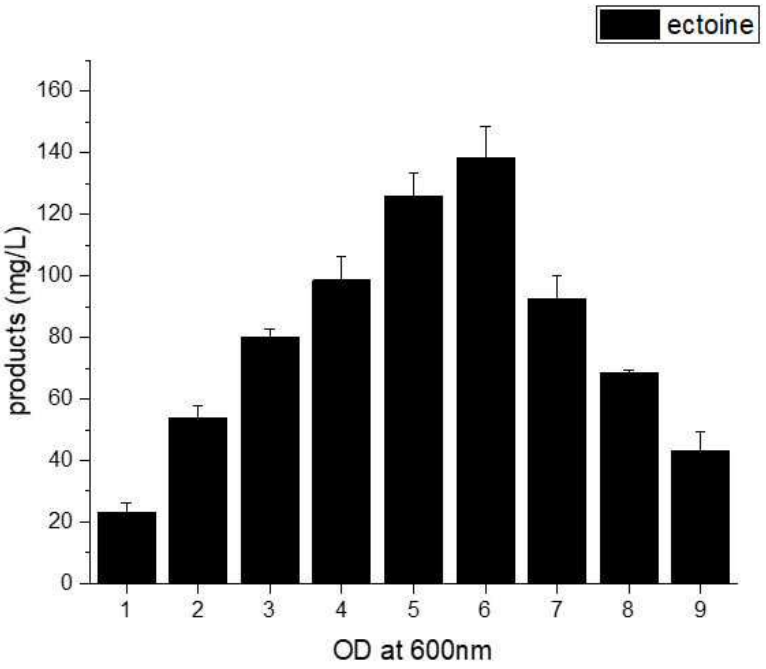
도면7


3% NaCl
6% NaCl
9% NaCl
OD at 600nm
Time (hours)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
24
48
72
96
120
144
168
192

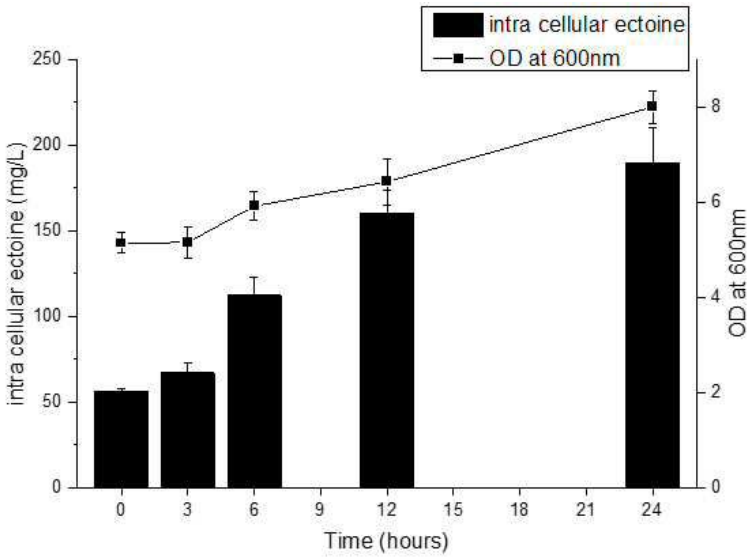
도면8


3% NaCl
6% NaCl
9% NaCl
Ectoine(mg/L)
Time (hours)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
24
48
72
96
120
144
168
192

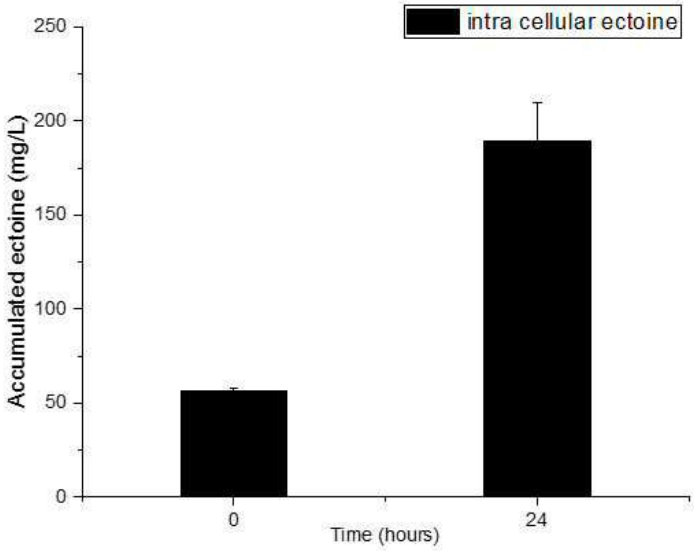
도면9


ectoine
products (mg/L)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
1
2
3
4
5
6
7
8
9
OD at 600nm

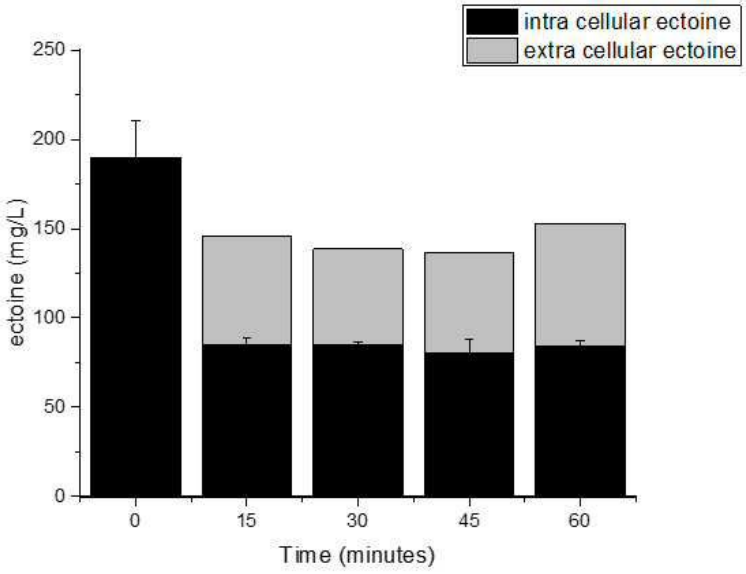
도면10


intra cellular ectoine
OD at 600nm
intra cellular ectoine (mg/L)
0
50
100
150
200
250
OD at 600nm
0
2
4
6
8
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Time (hours)

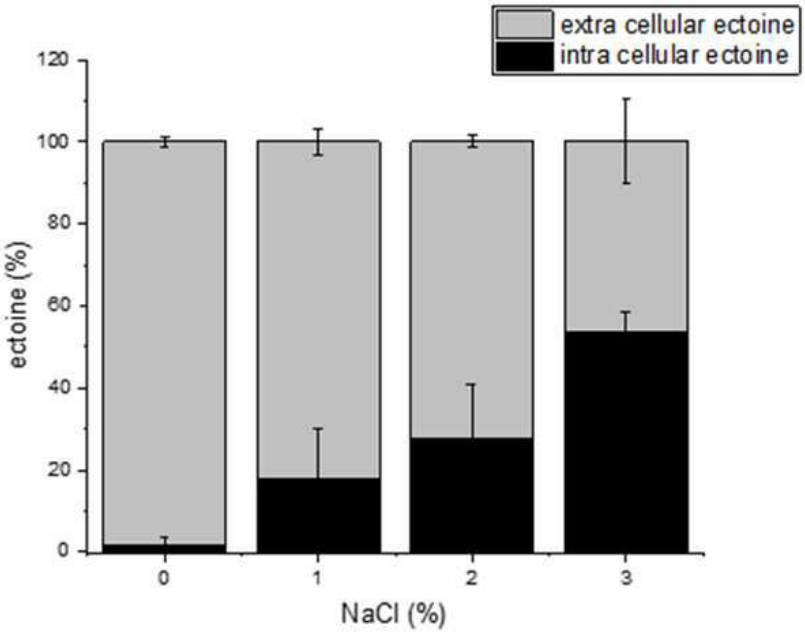
도면11


intra cellular ectoine
Accumulated ectoine (mg/L)
250
200
150
100
50
0
0
24
Time (hours)

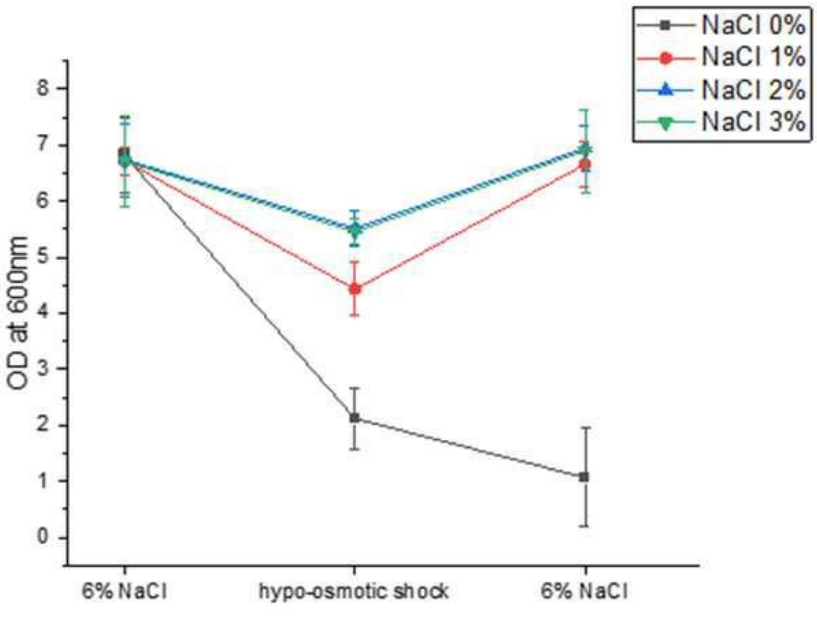
도면12


intra cellular ectoine
extra cellular ectoine
ectoine (mg/L)
250
200
150
100
50
0
0
15
30
45
60
Time (minutes)

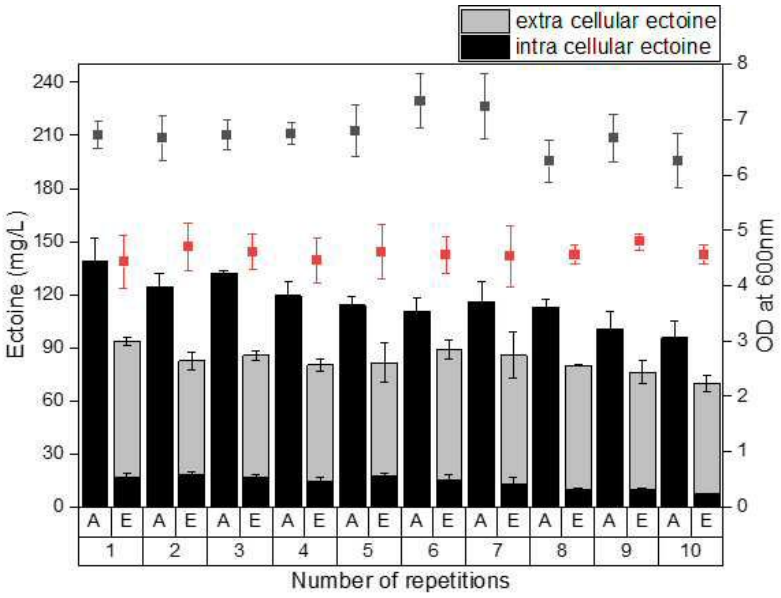
도면13


extra cellular ectoine
intra cellular ectoine
ectoine (%)
NaCl (%)
0
20
40
60
80
100
120
0
1
2
3

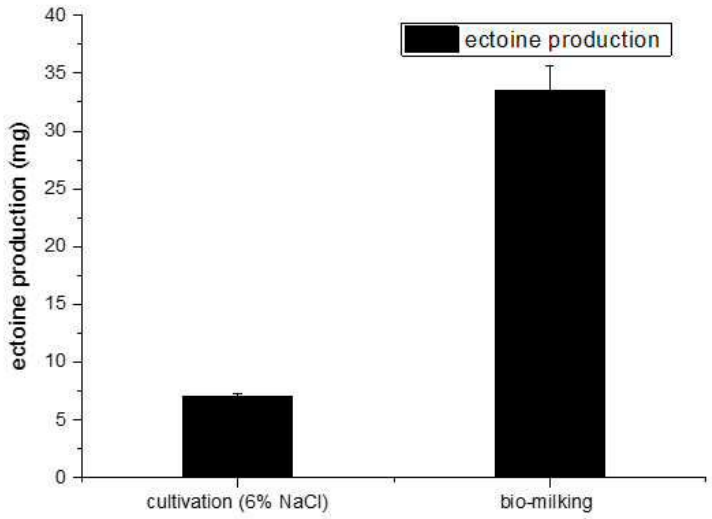
도면14


NaCl 0%
NaCl 1%
NaCl 2%
NaCl 3%
OD at 600nm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
6% NaCl
hypo-osmotic shock
6% NaCl

도면15



도면16



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Composition of improving ectoine production and Method for improved ectoine production using the same

<130> PN210233

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD Downstream Forward Primer

<400> 1

tgacatgatt acgccaagct ttgttcagca acaaaagaca gaa 43

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD Downstream Reverse Primer

<400> 2

atcacgtaac atgcttagaa tgttaataat gttga 35

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD Upstream Forward Primer

<400> 3

ttctaagcat gttacgtgat tgataaaaat cttca 35

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD Upstream Reverse Primer

<400> 4

aaaacgacgg ccagtgaaag tgaattcttg tactgatgtt tcttacccct 50

<210> 5

<211> 908

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ectD Downstream gene

<400> 5

tgttcagcaa caaaagacag aagttaatga gtattatctt cgctgggcaa cagcgcgata 60

aacggctcaa aacctttaa cgcttgcagc gcggggtcat cggcaaactt atcgcgataa 120

tcctcggtac gcgccaaggc ttcggataaa cagttaacgg cctcttcata ttgatccaat 180

gcggtatacg cacaagccaa ttggtaaaaa gcatggccgt tttcagggtc gattttcaac 240

gcttgctgac ataaattgac ggcccactgc ggctcgccca tatcgagtac cgcatcggcc 300

ttataagtca atgcttcgca atcctcggga cgcaatttta aaatttgatc gtagatggcg 360

attttattgg ccaagctgcc tgcttgacct gctctaagcc agagagattg cacatcttgc 420

gtccgcccga tatcctcgcc gattttctca atcaattgtg cttccttgtt gagttgttgt 480

tcgacaattg ccaagcgctc ttcgtattca tggaccagtt tcgatacttt cttatccgcc 540

atggactgca cacgctcttt gatatctctg agcgaggtcc aacccagcaa caccaaaatg 600

gtactggcac cggcaatcaa gtagaaaaaa tatgtgacag tattagtggc gtaagtaacg 660

cctctatcga ccgagctaag ctctctatcc acaatttgct gaatcagctc attcctctgc 720

gctgccatgt ccatacgcaa ttgtttgagt tcatccagca tatagcgctc gatgaacgga 780

ctatataaag gcttatccaa agattcaacc gcatctaagc gctcttgaac ctctgcttca 840

tcgttgacgc tctcgcccaa cacggaacag ggcgccagca cgatcaacat tattaacatt 900

ctaagcat 908

<210> 6

<211> 420

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ectD Upstream gene

<400> 6

gttacgtgat tgataaaaat cttcactttg ttcggactgt gcggcattct cggtaatcat 60

tgaatattaa acccatttt ttgattaaag acttcgcgac aacagatagc cctcgatcat 120

cggccattcc caacttacgc agggcttacc cgtacatctt cagtttattg aaaaatagac 180

ggttaagtca ttcattgctc gactgacttg ccatgaacaa cctaaccttg gacgaaaatt 240

gacttgcgac tcgccttaat ccgctaccgc ttcagcggtc gagtggtaaa cgctttaagc 300

cttatgcgct tccttgtcgt tcagcgcaag actgaagacg caaggcattt tcatttcttt 360

ggcagcaatt cccagtttga gaaatttccc cgtatttagg ggtaagaaac atcagtacaa 420

420

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD_down integration Forward Primer

<400> 7

cactcattag gcaccccagg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD_down integration Reverse Primer

<400> 8

caatggaaaa cccggcagtg 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD_up integration Forward Primer

<400> 9

cactgccggg ttttccattg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD_up integration Reverse Primer

<400> 10

acgacggcca gtgaattctt 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD deletion checking Forward Primer

<400> 11

tgcttcatcg ttgacgctct 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectD deletion checking Reverse Primer

<400> 12

atggcaagtc agtcgagcaa 20

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR Downstream Forward Primer

<400> 13

tgacatgatt acgccaagct ttctaattct ctcctgagca agatg 45

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR Downstream Reverse Primer

<400> 14

ttattagagc cattgatcac caatcattag aatag 35

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR Upstream Forward Primer

<400> 15

gtgatcaatg gctctaataa ttcagctcag ct 32

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR Upstream Reverse Primer

<400> 16

aaaacgacgg ccagtgaatt cagaacatca agaggtctgg attgt 45

<210> 17

<211> 891

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ectR Downstream gene

<400> 17

tctaattctc tcctgagcaa gatgggataa tagtgtagtg aattaagcct gaaccgcttt 60

gaacggccca accttcacca gcatttcggt ttcatgttga tctgcaaaat ggcgtgtctt 120

atcaaacatc acagcactgc caatttgagt gtccagtttt tttgccagcc cctcaaacag 180

agcccatgag gccttattat tcggagtaat ggtcgtctcg attcggttaa tatcctgatt 240

gaccggccgc gccagtatgg ctttcagcat ccgcgtggca agcccttggc cacgggcttt 300

ttcgccgaca gccacctgcc agacaaacag cgtatccgga cgttgcggaa tacgataacc 360

cgagacaaaa ccaaccaact catcgccaat tttggccgcc accgccgttt cagaaaaatg 420

gctgctctgc agcaaattgc agtacatcga attgggatcc aggggcgggc atttgctaat 480

cagccgatgc acctgcgctc cgacttcggc agtaggctgg ctaagtgtaa taatcggcaa 540

ggcagtttta tcaggcaaca tataaataac tctattattt agatttctgt gcaattaact 600

cggctttaac tgaataagcc gggctcgaat ttgatttttt atggccatca gcacgaatat 660

tctggcttca ttgaaaaaca taatatatag tacactaaat aatttaaatg tccaggccgc 720

gtacttttgc cttagattaa ttagatgtca tatcaaatta tgcctttcga acttcaaatt 780

tcggtagcgc cctaggatgc gccgggcgga gcaccgaatt ttgttcttcg agggtataca 840

ataatggctt tgtaacgcga cggcctctat ttcaatgatt ggtgatcaat g 891

<210> 18

<211> 878

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> ectR Upstream gene

<400> 18

gctctaataa ttcagctcag ctgcaacccg catcacgctt tttcccaagc tccagcttgg 60

gaaaaacacc ccggaagctc cagcttccag aaaccgagat aacctccgca cattctcaat 120

caaccccgac tcgctcgttc aatctttttc ctgattagca agatgcttca acttgctgaa 180

gccaattgtc cgagcagtgg ccagtcgtag ccacttctgc gggacgggtt atttaaccca 240

tccccaacgt ttcggtttgc cctaaacatt tcggctgact tcggccaaag tcaaaacgtt 300

taggacgggg ctgcaaaccc cgtcctgcta aggatatgct ggttttcggg ctttagctga 360

agaaacttgc taatcaggat ctttttttgat tgtcgggaag ctagagcttc ctgaatagat 420

tacccaagcc ggatcgctcg ccgctataca caaatatcgg taaacttgct aaacagaggt 480

cgccgtatac ttggaagcgg tgctgtttga taaatctgcg gatattggac atcagtggct 540

tcgaagtcgg gaacgttggg cgataaaaaa tggtatcgag gcctcattgg ttaagattgc 600

aaaagggtaa tttttgactt atgtataacg atgaggtaac tattcagtcc cccggcaatt 660

atcgttccca cgctctgcgt gggaatgcct gagtaccgct ccagcggtac gagacgctag 720

agcgtctcgg tcttcattcc cacgccggag cgtgagaacg ataggcggtg tgaataatta 780

cacgatgaga gctggagctt gggtaacagc acaaaggcat atttagccta gttgcccccc 840

ccccctgaac attaacaatc cagacctctt gatgttct 878

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR_down integration Forward Primer

<400> 19

tttgctggcc ttttgctcac 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR_down integration Reverse Primer

<400> 20

gtaaatcggt ggcgcgaatc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR_up integration Forward Primer

<400> 21

tacgtagagt gattcgcgcc 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR_up integration Reverse Primer

<400> 22

cggactggct ttctacgtgt 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR deletion checking Forward Primer

<400> 23

gggcatttgc taatcagccg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ectR deletion checking Reverse Primer

<400> 24

aacagcaccg cttccaagta 20