(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0087710
(43) 공개일자 2017년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0007622
(22) 출원일자 2016년01월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 삼성로 212 은마아파트 22동 908호 (대치동, 은마아파트)
뉴엔 테이 넉 딥
경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교국제캠퍼스 공과대학 공학실험동 103호
황인엽
경기도 용인시 기흥구 서천동 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공학실험동 103동 나노바이오공학 연구실
(74) 대리인
손민

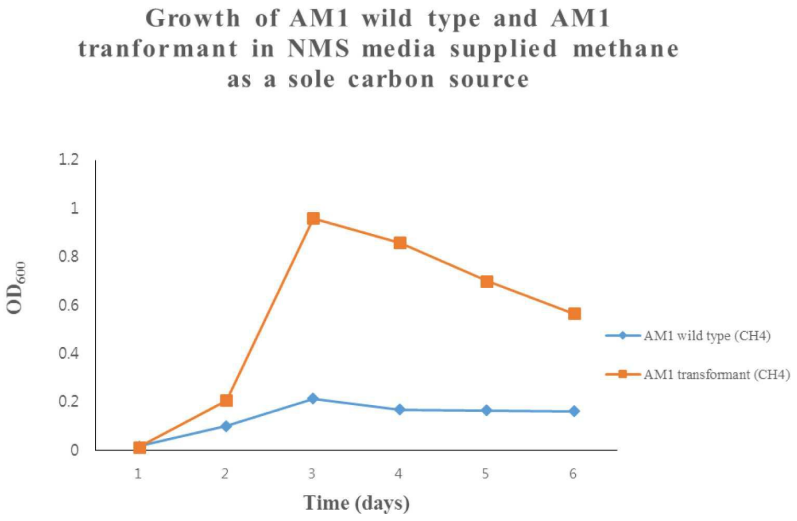
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **메탄올 생산을 위한 재조합 미생물 및 이를 이용한 메탄올 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)가 도입된, 형질전환 미생물, 상기 형질전환 미생물의 제조 방법, 상기 미생물을 이용한 메탄올 제조방법 및 상기 미생물을 포함하는 메탄올 생성용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서 메탄 자화균 유래의 pMMO를 이종인 메탄올 자화균에 도입한 형질전환 미생물을 처음으로 제조하였고, 상기 형질전환 미생물은 메탄을 메탄올로 산화할 수 있으므로, 메탄올의 보다 안전하고 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 9/0073 (2013.01)
C12P 7/04 (2013.01)
C12Y 114/13025 (2013.01)
C12Y 114/18003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20133030000090
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 신재생에너지핵심기술-핵심기술개발사업
연구과제명 메탄 및 syngas의 상온 상압에서의 알코올 전환기술 개발
기 여 율 50/100
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015M3D3A1A010648
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 C1가스리파이너리사업
연구과제명 메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율 50/100
주관기관 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2015.09.17 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) 미생물로부터 유래된 메탄 모노옥시게나제(methane monooxygenase, MMO)를 코딩하는 유전자가 도입된, 메탄올 생성용 형질전환 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄 모노옥시게나제는 메틸로시너스 스포리움(*Methylosiuns sporium*), 메틸로시너스 푸세레나(*Methylosinus pucelana*), 또는 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosiuns trichosporium*)으로부터 유래된 것인, 형질전환 미생물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 메탄 모노옥시게나제는 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 유래의 메탄 모노옥시게나제인 것인, 형질전환 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 메탄 모노옥시게나제는 수용성 메탄 모노옥시게나제(soluble methane monooxygenase, sMMO), 또는 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxigenase, pMMO)인 것인 형질전환 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 메탄 모노옥시게나제는 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)인 것인, 형질전환 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 유전자의 도입은 1) 상기 유전자를 포함하는 벡터를 도입하거나, 2) 염색체상에서 당해 유전자의 카피수를 증가시키거나, 3) 당해 유전자의 프로모터 서열을 치환 또는 변형시킴으로서 이루어진 것인, 형질전환 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 형질전환 미생물은 메틸로박테리움 속(*Methylobacterium sp.*) 미생물인 것인, 형질전환 미생물.

청구항 8

메탄 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 제1항의 형질전환 미생물의 제조방법.

청구항 9

(a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 형질전환 미생물을 배양하여 배양산물을 수득하는 단계; 및

(b) 상기 배양산물로부터 메탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 메탄올의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 배양은 메탄을 포함하는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 11

제9항의 방법에 의해 생성된 메탄올.

청구항 12

제1항의 형질전환 미생물 또는 이의 배양산물을 포함하는, 메탄올 생성용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)가 도입된, 형질전환 미생물, 상기 형질전환 미생물의 제조 방법, 상기 미생물을 이용한 메탄올의 제조방법, 및 상기 미생물을 포함하는 메탄올 생성용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메틸로박테리움 엑소토르퀀스(*Methylobacterium extorquens*) AM1은 메탄올을 사용하여 성장할 수 있는 통성 메탄올 자화균(methylotrophic bacteria)이다. 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1은 탄소를 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 미생물로 알려져 있다. 또한, 상기 메탄올 자화균은 메틸로트로프 폴리- β-하이드록시부티레이트(methylotrophs poly-β-hydroxybutyrate), 비타민 B12, 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone), 및 카로테노이드(carotenoids)를 생산하는데 이용되어 왔다. 지난 수십 년간, 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1은 유전학적 및 생리학적으로 연구되어, 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1가 산업적으로 제품이나 재조합 단백질을 생산하는데 활용되어왔다. 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1은 메탄올 유도성 프로모터(PmxaF)를 보유하고 있으며, 이는 메탄올 탈수소 효소를 코딩하는 유전자의 upstream에 위치한다.

[0003] 메틸노시너스 트리초스포리움(*Methylosinus thrichosporium*) OB3b는 메탄을 유일한 탄소원과 에너지원으로서 사용할 수 있는 메탄 자화균(Methylotrophic bacteria)으로, 이러한 메탄 자화균은 환경오염을 야기하는 할로겐화 용매를 생물학적으로 정화할 수 있는 능력으로 인해 환경오염 개선에 대한 연구가 진행되어 왔다. 또한, 메탄 자화균은 메탄 사이클에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만, 이에 대한 분자 생물학적 연구가 아직 미흡한 실정이다.

[0004] 메탄 자화균은 메탄 모노옥시게나제(methane monooxygenase)를 보유하고 있어 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있고, 일련의 대사과정을 거쳐 바이오 매스로 전환할 수 있는 능력을 가진다. 메탄 모노옥시게나제는 수용성 메탄 모노옥시게나제(soluble methane monooxygenase, sMMO)와 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)로 분류되며, 이중, 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase)는 만입 세포막(intra cytoplasmic membrane, ICM)에 존재하는 것으로 알려져 있다. pMMO는 sMMO와 비교하여 메탄에 대한 더 높은 친화력을 가지고 있으며, 상온 상압에서 메탄을 산화하여 메탄올로의 전환이 가능하다. 구리가 존재하는 환경에서는 sMMO의 발현이 억제되고, pMMO의 발현이 유도되며, pMMO는 막 단백질(membrane protein)로써 세포막에 존재하여 메탄을 산화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, pMMO는 3개의 서브유닛(subunit) pmoA, pmoB 및 pmoC로 이루어져 있으며 이들은, 세포막 금속효소(metalloenzyme)라고도 알려져 있다(Methods Enzymol, 495, 195-210, 2011). 이와 같이, pMMO는 메탄을 메탄올로 전환할 수 있는 유용한 효소이므로, 이를 환경오염 정화, 친환경적인 메탄올 생산 및 바이오 매스 분야에 적용하기 위한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 그러나, pMMO는 세포 외에서 불안정한 상태로 존재하고, 이종에서의 발현이 어려워 그 연구가 제한되어 왔다(Zhongxuan Gou et.al., FEMS Microbiol Lett 263, (2006) 136-141, Functional expression of the particulatemethanemono-oxygenase gene in recombinantRhodococcus erythropolis, 및 Bing Han., *Chin J Biotech* 2009, August 25; 25(8): 1151-1159, Heterologous expression of particulate methane monooxygenase in different host cells).

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 메탄 자화균이 갖는 pMMO를 이종의 메탄올 자화균에 도입시킨 형질전환 미생

물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 메탄 자화균 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b 유래의 pMMO를 이종인 메탄올 자화균 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1에 도입하여, pMMO를 발현하는 메탄올 자화균인 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1 형질전환 미생물을 제조하였으며, 상기 형질전환 미생물이 메탄을 포함하는 배지에서 성장 가능함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) 미생물로부터 유래된 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)를 코딩하는 유전자가 도입된 메탄올 생성용 형질전환 미생물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 메탄 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 상기 형질전환 미생물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 미생물을 포함하는, 메탄올의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 메탄올의 제조방법에 의해 생성된 메탄올을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 미생물 또는 이의 배양산물을 포함하는 메탄올 생성용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) 미생물로부터 유래된 메탄 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자가 도입된 메탄올 생성용 형질전환 미생물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 메탄 자화균 유래의 pMMO는 세포 외에서 불안정한 상태로 존재하고, 이종에서의 발현이 어렵다고 알려져 있으나, 본 발명에서 처음으로 이종인 메탄올 자화균인 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1에 형질도입하였으며, 상기 형질전환된 메틸로박테리움 엑소토르퀀스 AM1이 메탄을 포함하는 배지에서 성장하는 것을 확인하였다.

[0013] 본 발명의 용어, "메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) 미생물"은 본 발명에서 사용한 메탄 자화균(methanotrophic bacteria)으로서, 메탄을 유일 탄소 및 에너지원으로 사용하여 성장하는 미생물을 의미한다. 본 발명에서 메틸로시너스 속 미생물로는 메틸로시너스 스포리움(*Methylosinus sporium*), 메틸로시너스 푸세레나(*Methylosinus pucelana*), 또는 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosinus trichosporium*)를 사용할 수 있으며, 구체적으로는 메틸로시너스 트리초스포리움(Methylosinus trichosporium) OB3b를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 용어, "미생물"은 조류(algae), 세균류(bacteria), 원생동물류(protozoa), 사상균류(fungi), 효모류(yeast)와 한계적 생물이라고 할 수 있는 바이러스(virus) 등이 이에 속한다. 최소 생활단위임에 따라 생명을 유지하기 위한 최소한의 대사과정을 수행하고 있으며, 이러한 대사과정에 유전공학적인 방법을 이용하여 특정 대사과정을 촉진 또는 저해하거나 하는 방법으로 원하는 방향으로 조절할 수 있다.

[0015] 본 발명의 용어, "메탄 모노옥시게나제(Methane monooxygenase)"는 메탄을 산화하여 메탄올을 생성하는 산화반응을 촉매할 수 있는 효소를 의미한다. 본 발명의 목적상, 형질전환체에서 발현되어 메탄으로부터 메탄올을 생산하는 반응을 촉매하는 활성을 나타내는 한, 상기 메탄 모노옥시게나제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 로도코커스 속(*Rhodococcus sp*). 브레비박테리움 속(*Brevibacterium sp.*), 코마노나스 속 (*Comanonas sp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter sp.*), 아트로박터 속(*Arthrobacter sp.*), 브라키모나스 속(*Brachymonas sp.*), 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus sp.*) 등의 미생물로부터 유래된 메탄 모노옥시게나제 등 일 수 있고, 보다 구체적으로는 메틸로시너스 스포리움(*Methylosinus sporium*), 메틸로시너스 푸세레나(*Methylosius pucelana*), 또는 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosinus trichosporium*)으로부터 유래된 메탄 모노옥시게나제일 수 있으며, 가장 구체적으로는 메틸로시너스 트리초리포리움(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 유래의 메탄 모노옥시게나제이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명에서 메탄 모노옥시게나제는 수용성 메탄 모노옥시게나제(soluble methane monooxygenase, sMMO)와 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase)로 분류되며, 미립자 메탄 모노옥시게나제는 만입

세포막(intra cytoplasmic membrane, ICM)에 존재한다. pMMO는 sMMO와 비교하여 메탄에 대한 더 높은 친화력을 가지고 있으며, 상온 상압에서 메탄을 수산화하여 메탄올로의 전환이 가능하여, 본 발명에서는 pMMO를 형질전환 미생물의 도입에 사용하였다.

[0017] 상기 pMMO는 3개의 서브유닛 pmoA, pmoB 및 pmoC로 이루어져 있으며, 이러한 pMMO를 코딩하는 유전자의 염기서열은 NCBI의 GeneBank 등 공지의 데이터 베이스로부터 얻었다(GeneBank Accession No.U31650.2).

[0018] 본 발명의 일 실시예에서는 메탄 모노옥시게나제 중에서도 메탄에 대한 친화력인 더 높은 pMMO를 포함하는 벡터를 제조하여, 이종인 메탄올 자화균, 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 도입함으로써 형질전환 미생물을 제작하여, 상기 형질전환 미생물이 메탄을 포함하는 배지에서 성장함을 확인하였다. 구체적으로, 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 유래 pMMO의 3개의 서브유닛인 pmoA, pmoB 및 pmoC 유전자를 증폭시켜 차례로 pBBRIMCS-2 벡터에 결합시켜, 상기 벡터를 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 도입함으로써 형질전환 미생물을 제작하였다(도 1).

[0019] 본 발명에서 용어, "형질전환 미생물"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.

[0020] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환 미생물은 공지된 pMMO를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제작할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 숙주세포로는 본 발명의 pMMO를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입되어 pMMO를 발현시킬 수 있는 숙주세포라면 특별히 제한되지는 않으나, 구체적으로는 생물전환공정에 적용하기에 적합한 배양가능한 단세포성 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는 메틸로박테리움 속(*Methylobacterium sp.*) 미생물을 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 메틸로시너스 속 미생물 유래의 pMMO를 도입한 형질전환 미생물은 pMMO에 의해 메탄을 에너지원으로 사용이 가능하며, 메탄을 포함하는 배지에서 높은 생존율을 나타냄을 확인하였다(도 5).

[0022] 본 발명의 용어, "벡터"는 특정 유전자를 숙주세포 내로 전달하는 목적을 가진 모든 핵산분자가 될 수 있으며, 일반적으로는 자가복제서열, 게놈삽입서열, 파지 또는 뉴클레오티드 서열, 선형 또는 원형, 단일 또는 이중가닥의 DNA 혹은 RNA이다. 특히, 외래 유전자를 가지고 있으며 외래 유전자 외에 특정 숙주세포의 형질전환을 용이하게 하는 인자를 갖는 것일 수 있다. 일반적으로 벡터에는 적당한 유전자의 전사 및 번역을 지시하는 서열, 선택마커, 및 자가복제 또는 염색체 삽입을 허용하는 서열이 포함된다. 벡터의 구체적인 예로는, 플라스미드 벡터(pSE계, pBR계, pUC계, pBluscriptII계, pGEM계, pTZ계, pET계, pJSKM316GPD계, pCOLA계, pACYC계, pBBR1MCS-2)와 파지 또는 코스미드 벡터(pWE15, M13, EMBL3, EMBL4, FIX II, DASH II,ZAP II, gt11, Charon4A, Charon21A) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 대장균 발현 벡터인 pET, pCOLA, 또는 pACYC 벡터는 두 가지 목적 단백질을 동시에 미생물 내로 도입시키고 발현시킬 수 있는 발현 구조를 가질 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 벡터는 효모에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있는 효모 발현용 벡터일 수 있다. 구체적으로는 상기 효모 발현용 벡터는 효모의 게놈(genome) 상에 목적 단백질을 도입(integration)시키는 것인 벡터일 수 있다. 한편, 상기 효모 발현용 벡터는 구체적으로는 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에서 발현되는 pBBR1MCS-2 벡터일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는 pMMO의 3개의 서브유닛 pmoA, pmoB 및 pmoC를 차례로 pBBR1MCS-2 벡터에 결합시켰다(도 1). 구체적으로, pmoC 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, HindIII 및 EcoRV 제한효소의 절단부위를 갖는, 서열번호 7 및 8의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoC를 증폭시켜, pmoC 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC에 pmoA 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, EcoRI 및 SmaI 제한효소의 절단부위를 갖는 서열번호 3 및 4의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoA를 증폭시켜, pmoA 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA 벡터를 제작하였다. 그 다음, 상기 제작된 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA에 pmoB 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, SmaI 및 XbaI 제한효소의 절단부위를 갖는 서열번호 5 및 6의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoB를 증폭시켜, pmoB 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 제작하였다.

[0025] 본 발명의 용어, "도입"은 외부에 존재하던 유전자가 벡터나 숙주세포 등에 포함되도록 하는 어떤 방법도 포함한다. 해당 유전자를 벡터로 도입하거나, 벡터 등을 숙주세포 등에 도입하는 방법은 당 분야에서 공지된 바와

같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 특히, 본 발명에서 벡터를 미생물에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 선택하여 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 미세주입법(microijection), 전기천공법(electroporation), 입자분사법(particle bombardment), 직접근육주입법, 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존을 이용한 방법 중에서 적절하게 선택하여 적용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서 pMMO의 3개의 서브유닛 pmoA, pmoB 및 pmoC를 차례로 pBBR1MCS-2 벡터에 결합시켜, 상기 pMMO가 메틸로박테리움 속(*Methylobacterium sp.*) 미생물 내에 도입되어 정상적으로 발현되는지의 여부를 RT-PCR과 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. RT-PCR의 결과, pMMO의 각 서브유닛인 pmoA, pmoB 및 pmoC는 각각의 사이즈인 789 bp 1,314 bp 및 777 bp를 나타내어, pmoA, pmoB 및 pmoC가 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에서 발현함을 확인하였으며, SDS-PAGE 분석 결과에서도 마찬가지로 pMMO의 서브유닛인 pmoA, 및 pmoC가 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에서 발현함을 확인하였다(도 2 내지 4).

[0027] 본 발명의 용어, "메틸로박테리움 속(*methylobacterium sp.*) 미생물"은 본 발명에서 숙주 미생물로서 사용한 메탄올 자화균(methylotrophic bacteria)을 의미하며, 메탄올 자화균은 탄소-탄소 결합을 갖지 않는 메탄올 또는 다른 메틸화된 화합물 등의 탄소기질을 환원하여 에너지원으로 사용하는 미생물을 의미한다. 본 발명에서 메틸로박테리움 속 미생물로는 메틸로박테리움 에드해시범(*Methylobacterium adhaesivum*), 메틸로박테리움 아미노보람스(*Methylobacterium. aminovorans*), 메틸로박테리움 에퀘에티컴 (*Methylobacterium. aquaticum*), 메틸로박테리움 클로로메타니컴(*Methylobacterium. chloromethanicum*), 메틸로박테리움 디클로로메타니컴(*Methylobacterium. dichloromethanicum*), 메틸로박테리움 엑소퀀스(*Methylobacterium. Extorquens*), 메틸로박테리움 퓨지사완스(*Methylobacterium. fujisawaense*), 메틸로박테리움 히스판시컴(*Methylobacterium. hispanicum*), 메틸로박테리움 이스빌리엔스(*Methylobacterium. isbiliense*), 메틸로박테리움 루시타넘(*Methylobacterium. lusitanum*), 메틸로박테리움 메소필리컴(*Methylobacterium. mesophilicum*), 메틸로박테리움 노두란스(*Methylobacterium. nodulans*), 메틸로박테리움 오가노필럼(*Methylobacterium. organophilum*), 메틸로박테리움 포다리움(*Methylobacterium. podarium*), 메틸로박테리움 포푸리(*Methylobacterium. populi*), 메틸로박테리움 라디오톨러렌스(*Methylobacterium. radiotolerans*), 메틸로박테리움 로데시아눔(*Methylobacterium. rhodesianum*), 메틸로막테리움 로디눔(*Methylobacterium. rhodinum*), 메틸로박테리움 수애미엔스(*Methylobacterium. suomiense*), 메틸로박테리움 티오시아나툼(*Methylobacterium. thiocyanatum*), 메틸로박테리움 바리어블(*Methylobacterium. variabile*), 또는 메틸로박테리움 자트마니(*Methylobacterium. zatmanii*)등을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 메틸로박테리움 엑스토르퀀스(*Methylobacterium extorquens*) AM1을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 다른 양태는 메탄 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 상기 형질전환 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0029] 상기 메탄 모노옥시게나제는 앞서 설명한 바와 같다.

[0030] 본 발명에서 메탄 모노옥시게나제 중에서 메탄에 대해 더 높은 친화력을 갖는 미립자 메탄 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자를 마이크로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 도입하여, 형질전환 미생물을 제조하였다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에서 PmxaF 프로모터의 제어 하에서 pMMO를 포함하는 벡터를 제조하기 위해, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b 유래 pMMO의 3개의 서브유닛인 pmoA, pmoB 및 pmoC와, 리보솜 결합부위를 표 1에 나타낸 프라이머를 사용하여 증폭시켜, 차례로 pBBR1MCS-2 벡터에 결합시켰다. 그 다음, pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 *Escherichia coli* S17-1으로 형질전환한 후, 메틸로박테리움 엑스토르퀀스(Methylobacterium extorquens) AM1 균주에 도입하여, 형질전환 미생물을 제조하였다.

[0032] 본 발명의 다른 양태는 상기 (a) 형질전환 미생물을 배양하여 배양산물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양산물로부터 메탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 메탄올의 제조방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 용어, "배양"은 상기 형질전환된 메틸로박테리움 속 미생물로부터 메탄올을 생산하기 위해, 상기 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일련의 행위를 의미한다. 본 발명에서 상기 미생물을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속적으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소

원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 일원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0035] 또한, 배양시의 온도조건은 구체적으로는 27 내지 37, 보다 구체적으로는 30 내지 35를 유지하고, 배양기간은 1 내지 36일 동안 배양하는 것이 좋으며, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제하는 방법을 사용할 수 있다.

[0036] 아울러, 반응액으로부터 메탄올을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 크로마토그래피, 또는 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응액을 원심분리하여 형질전환 미생물을 제거하고 얻어진 상등액을, 가스크로마토그래피에 적용하여 목적하는 메탄올을 회수하는 방법을 사용할 수 있으나, 이외에도 상기 목적하는 메탄올의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 메탄올을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어, "배양산물"은 미생물과 그 미생물을 배양한 배양기 내에 존재하는 모든 물질을 포함한다. 일반적으로 미생물 자체와 미생물이 배지에 배설한 각종 효소, 및 대사물질 등을 함유하는 물질을 의미한다.

[0038] 본 발명의 용어, "회수"는 특정 물질을 혼합물에서 분리해내는 과정을 의미한다. 특히, "메탄올을 회수하는 단계"는 상기 배양산물 및 미생물의 대사 산물인 다른 물질들과 혼합되어 있는 메탄올을 분리해 내는 과정을 의미하며, 이는 당업계에 널리 알려져 있는 방법으로 세포 또는 배양 배지로부터 분리해낼 수 있다. 예를 들면, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 다른 양태는 상기 메탄올 제조 방법에 의해 생산된 메탄올을 제공한다.

[0040] 본 발명에서 pMMO를 코딩하는 유전자를 도입한 형질전환 미생물은 pMMO에 의해 메탄을 메탄올로의 전환이 가능하다.

[0041] 본 발명의 다른 양태는 상기 형질전환 미생물 또는 이의 배양산물을 포함하는 메탄올 생성용 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 형질전환 미생물 및 배양산물은 앞서 설명한 바와 같다.

[0043] 본 발명에서 pMMO를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물인, 마이크로박테리움 엑스토르퀜스 AM1은 메탄을 포함하는 배지에서 성장할 수 있으므로, 상기 형질전환 미생물 또는 이의 배양산물을 이용하여, 메탄으로부터 메탄올을 용이하고 안전하게 생산할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명은 메틸로박테리움 엑소토르퀜스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 미생물에 이종의 메틸로시너스 트리초스포리움(*Methylosinus trichosporium*) OB3b 유래의 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)을 도입하여 형질전환 미생물을 제조하였으며, 상기 형질전환 미생물이 메탄을 포함하는 배지에서 성장이 가능하며, 또한, pMMO에 의해 메탄을 메탄올로 산화할 수 있으므로, 메탄올의 보다 안전하고 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 pBBR1MCS-2 벡터에 미립자 메탄 모노옥시게나제(particulate methane monooxygenase, pMMO)의 서브유닛 pmoA, pmoB 및 pmoC를 도입한 벡터의 모식도를 나타낸 도면이다.

도 2는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 메틸로박테리움 엑스토르퀜스(*Methylobacterium extorquens*) AM1에 형질 도입한 후, 콜로니 PCR을 통해 pmoA, pmoB 및 pmoC의 도입 여부를 확인한 도면이다.

도 3은 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1에 형질 도입한 후, RT-PCR을 통해 pmoA, pmoB 및 pmoC의 도입 여부를 확인한 도면이다.

도 4는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1에 형질 도입한 후, SDS-PAGE를 통해 pmoA, 및 pmoC의 발현 여부를 확인한 도면이다(레인 1-6: 형질전환된 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1).

도 5는 야생형 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1과, 형질전환 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1의 메탄에서의 성장을 확인한 그래프이다. 주황색 사각형 선은 형질전환된 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1의 성장곡선을 나타내며, 파란색 둥근 선은 야생형 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1의 성장곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명은 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1: 벡터 및 형질전환 미생물 제조**

[0048] **실시예 1-1. 벡터 설계**

[0049] PmxaF 프로모터의 제어 하에서 pMMO를 포함하는 벡터를 제조하기 위해, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b 유래 pMMO의 3개의 서브유닛인 pmoA, pmoB 및 pmoC와, 리보솜 결합부위를 표 1에 나타낸 프라이머를 사용하여 증폭시켜, 차례로 pBBR1MCS-2 벡터에 결합시켰다(도 1).

[0050] [표 1]

유전자	프라이머	서열	서열번호
PmxaF	PmxaF-F	5'-GGGCCCGCGGTATCTCTCAGACGTTTTT-3'	1
	PmxaF-R	5'-GGTACCGTTGACGACAACGGTGCGATGG-3	2
pmoA	pmoA-F	5'-GAATTCGAGGAGAATGCATCATCATCATCATCACTCTACATCGAAGAGCGGGG-3'	3
	pmoA-R	5'-CCCGGGTCAGATCTTCTGGATCACCTTG-3'	4
pmoB	pmoB-F	5'-CCCGGGGAGGAGAATGCATCATCATCATCATCACAAAGCTCTGGAGAGAATGG-3'	5
	pmoB-R	5'-TCTAGATCAGGGCATGTCGCCGGCGACG-3'	6
pmoC	pmoC-F	5'-AAGCTTGAGGAGAATGCATCATCATCATCATCACAGCGTAACAACAGAGACAA-3'	7
	pmoC-R	5'-GATATCTCAGCCGACCAGGGCCGCGACG-3'	8

[0051]

[0052] 먼저, pBBR1MCS-2 벡터에 PmxaF 프로모터를 도입하기 위해, KpnI 및 ApaI 제한효소의 절단부위를 갖는, 서열번호 1 및 2의 프라이머를 사용하여, 메틸로박테리움 엑스토르퀜스 AM1의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 PmxaF을 증폭시켜, PmxaF 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pBBR1MCS2-PmxaF 벡터에 pmoC 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, HindIII 및 EcoRV 제한효소의 절단부위를 갖는, 서열번호 7 및 8의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoC를 증폭시켜, pmoC 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC 벡터를 제작하였다. 이어, 상기 제작된 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC에 pmoA 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, EcoRI 및 SmaI 제한효소의 절단부위를 갖는 서열번호 3 및 4의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoA를 증폭시켜, pmoA 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA 벡터를 제작하였다. 이어, 상기 제작된 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA에 pmoB 서브유닛을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해, SmaI 및 XbaI 제한효소의 절단부위를 갖

는 서열번호 5 및 6의 프라이머를 사용하여, 메틸로시너스 트리초스포리움 OB3b의 염색체 DNA로부터 PCR을 통해 pmoB를 증폭시켜, pmoB 서열을 포함하는 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 제작하였다.

[0053] **실시예 1-2. 형질전환 미생물 제조**

[0054] 상기 실시예 1-1에서 제작한 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터를 *Escherichia coli* S17-1으로 형질전환한 후, 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 (Methylobacterium extorquens) AM1 균주에 도입하였다. 그 다음, 상기 균주를 NMS 고체배지(1% 메탄올 포함)위의 필터페이퍼에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 필터페이퍼에서 배양한 균주를 1% 메탄올, 50㎍의 카나마이신(kanamycin), 및 날리딕스산(nalidixic acid)을 포함하는 NMS 고체배지에서 2주간 배양하여 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터가 도입된 단일 콜로니를 선별(selection) 하였다. 상기 pBBR1MCS2-PmxaF-pmoC-pmoA-pmoB 벡터가 도입된 단일 콜로니를 NMS 액체배지에 접종하고 headspace법을 통해 플라스크내의 공기의 30%를 메탄으로 대체하여 30℃, 230 rpm으로 배양하여 성장곡선을 확인하였다.

[0055] **실시예 2: pMMO 유전자의 형질전환 여부 확인**

[0056] **실시예 2-1. 콜로니 PCR 분석**

[0057] 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 pMMO의 각 서브유닛이 도입되었는지 확인하기 위해, 실시예 1-2의 선택배지에서 얻은 단일콜로니를 액체 배양하여 수확한 다음, RT-PCR을 통해 pMMO의 각 서브유닛의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 2에서 나타내는 바와 같이, pmoA, pmoB 및 pmoC 는 각각의 사이즈인 789 bp 및 1,314 bp 및 777 bp를 나타냈으며, 이와 같은 결과로부터 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 pmoA, pmoB 및 pmoC가 도입되었음을 알 수 있었다(도 2a). 또한, 양성 대조군으로 메탄에서 배양한 야생형 메틸로시너스 트리초리스포리움 OB3b을 사용하였다(도 2b).

[0058] **실시예 2-2. RT-PCR 분석**

[0059] 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 pMMO의 각 서브유닛이 도입되었는지 확인하기 위해, RT-PCR을 통해 pMMO의 각 서브유닛의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 3에서 나타내는 바와 같이, pmoA, pmoC 및 pmoB는 각각의 사이즈인 789 bp, 777 bp, 및 1,314 bp를 나타냈으며, 이와 같은 결과로부터 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 pmoA, pmoC 및 pmoB가 도입되어 발현함을 알 수 있었다.

[0060] **실시예 2-3. SDS-PAGE 분석**

[0061] 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에 pMMO의 각 서브유닛이 도입되었는지 확인하기 위해, SDS-PAGE 분석을 통해 pMMO의 각 서브유닛의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 4에서 나타내는 바와 같이, 형질전환된 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1에서 pmoC 및 pmoA가 발현함을 확인하였다.

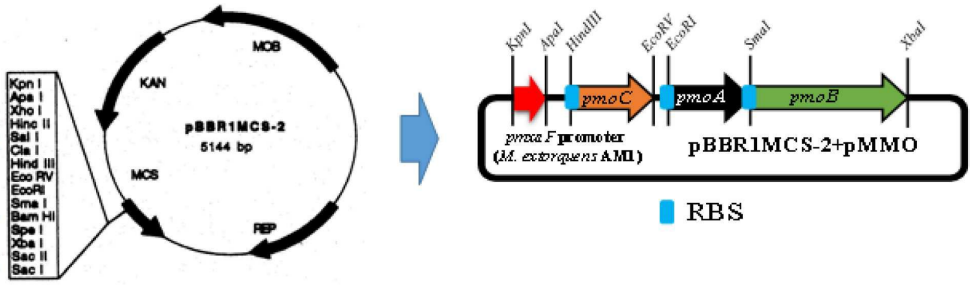
[0062] **실시예 3: 형질전환 미생물의 메탄에서의 성장**

[0063] 메탄을 메탄올로 전환할 수 있는 유전자인 pMMO를 도입한 형질전환 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1이 메탄을 포함하는 배지에서 메탄을 탄소원으로 사용하여 성장이 가능한지의 여부를 검토하였다. 대조군으로서 야생형 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1을 사용하였다. 그 결과, 도 5에서 나타내는 바와 같이, 야생형 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1은 메탄을 포함하는 배지에서 거의 성장하지 않음을 알 수 있다. 이에 반해, 형질전환 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1은 메탄을 포함하는 배지에서 높은 성장률을 나타내는 것을 확인하였다. 이는, pMMO를 도입한 형질전환 메틸로박테리움 엑스토르퀀스 AM1이 메탄으로부터 메탄올을 생산할 수 있는 능력을 갖게 되어 메탄을 탄소원으로 소비하여 성장함을 나타내는 결과이다.

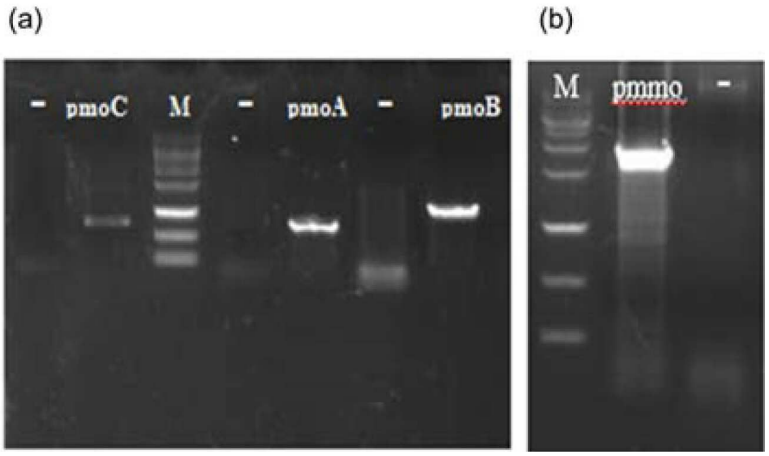
[0064] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

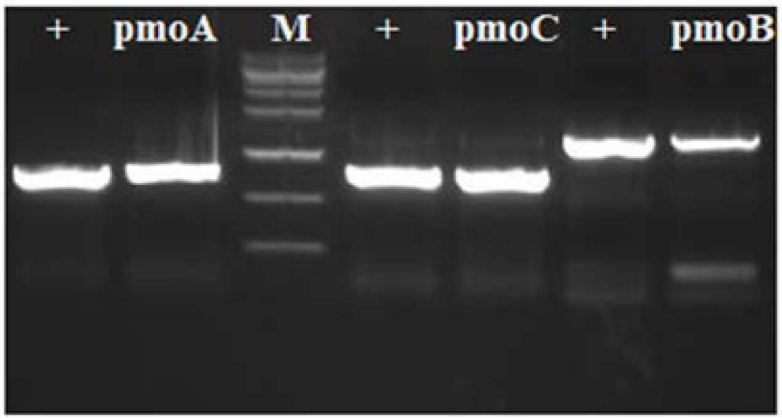
도면1



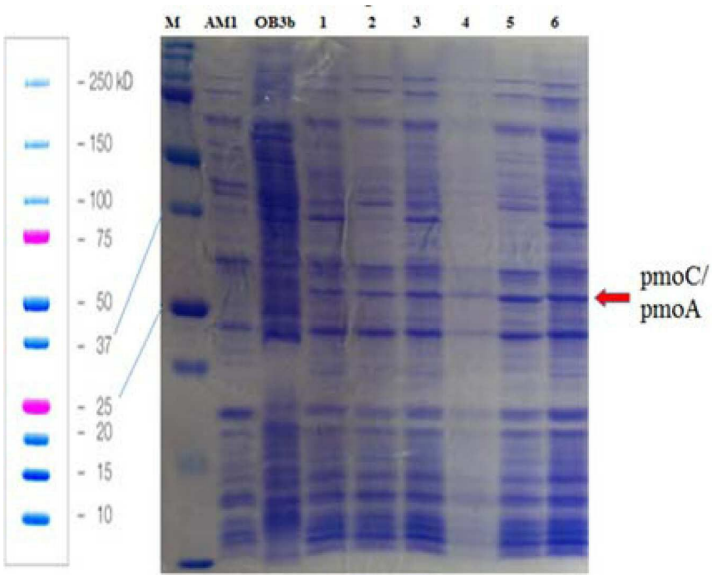
도면2



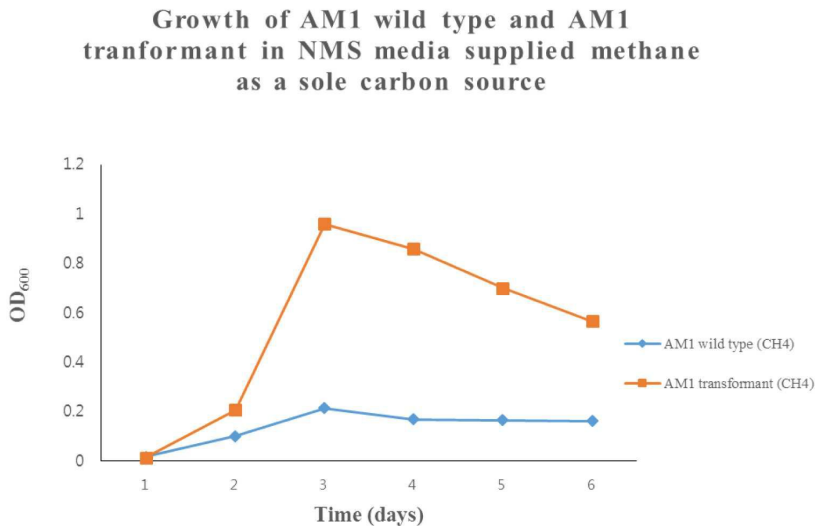
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> University Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Recombinant micro-organisms for producing methanol and the method for producing methanol by using thereof

<130> KPA151323-KR

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmxaF-F primer

<400> 1

gggcccgcgg tatctctcag acgttttt 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmxaR-primer

<400> 2

ggtaccgttg acgacaacgg tgcgatgg 28

<210> 3

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoA-F primer

<400> 3

gaattcgagg agaatgcatc atcatcatca tcactctaca tcgaagagcg ggg 53

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoA-R primer

<400> 4

cccgggtcag atcttctgga tcaccttg 28

<210

> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoB-F primer

<400> 5

cccggggagg agaatgcatc atcatcatca tcacaaagct ctggagagaa tgg 53

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoB-R primer

<400> 6

tctagatcag ggcatgtcgc cggcgacg 28

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoC-F primer

<400> 7

aagcttgagg agaatgcatc atcatcatca tcacagcgta acaacagaga caa 53

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoC-R primer

<400> 8

gatatctcag ccgaccaggg ccgcgacg 28