



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0082975
(43) 공개일자 2018년07월19일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12P 13/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/113</i> (2010.01)
 <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>C12N 9/10</i> (2006.01)
 <i>C12N 9/88</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12P 13/00</i> (2013.01)
 <i>C12N 15/1137</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0003562
 (22) 출원일자 2018년01월10일
 심사청구일자 2018년01월10일
 (30) 우선권주장
 1020170003302 2017년01월10일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 이은열
 서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남테시앙포레아파트 104동 802호</p> <p>이옥경
 경기도 수원시 영통구 청명로21번길 7 101호 (영통동)</p> <p>(74) 대리인
 손민</p> |
|--|---|

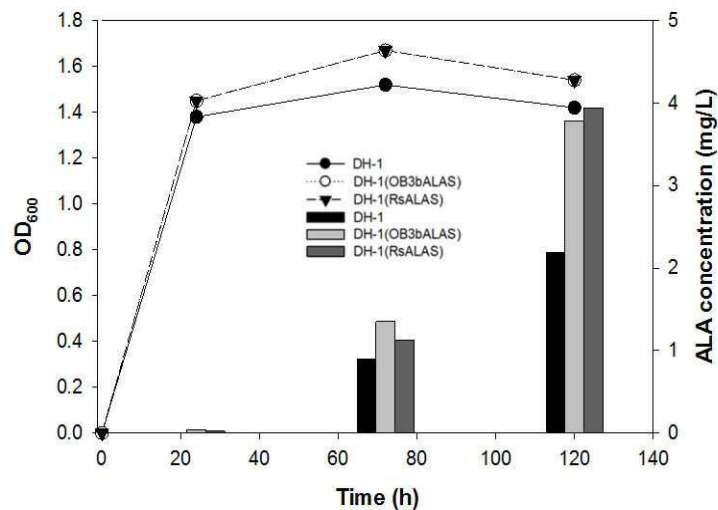
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **아미노레불린산 생산용 형질전환메탄자화균 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 아미노레불린산 생산용 형질전환체, 상기 형질전환체를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 아미노레불린산 생산용 키트 및 상기 형질전환체를 배양하여 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 형질전환체를 이용하면, 대기중의 메탄을 유일 탄소원으로 이용하여, 아미노레불린산을 생산할 수 있으므로, 경제적인 아미노레불린산의 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 9/1029 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12Y 203/01037 (2013.01)

C12Y 402/01024 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064882

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스리파이너리사업

연구과제명 메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 아미노레불린산 생산용 형질전환체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 KCTC18400P로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1(Methylomonas sp. DH-1) 균주인 것인, 아미노레불린산 생산용 형질전환체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아미노레불린산 합성효소 유전자는 동종 유래 또는 이종 유래 유전자인 것인, 아미노레불린산 생산용 형질전환체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아미노레불린산 합성효소 유전자는 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 구성되는 것인, 아미노레불린산 생산용 형질전환체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질전환체는 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL) 유전자 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 유전자가 추가로 도입된 것인, 아미노레불린산 생산용 형질전환체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 아미노레불린산 생산용 형질전환체를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물.

청구항 7

제6항의 아미노레불린산 생산용 조성물을 포함하는 아미노레불린산 생산용 키트.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 아미노레불린산 생산용 형질전환체를 메탄을 포함하는 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형질전환체는 숙신산 및 글리신이 포함되지 않은 배지에서 배양하는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 배양은 상기 형질전환체를 기체상 메탄을 포함하는 대기조건하에서 수행되는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 대기에 포함된 기체상 메탄의 함량은 0.01 내지 50%(v/v)인 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 배양은 20 내지 40℃의 온도조건에서 수행되는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 배양은 200 내지 300rpm의 교반조건에서 수행되는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 배양은 30 내지 200시간동안 수행되는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 15

제8항에 있어서,

상기 배양이 종료된 후, 배양물로부터 아미노레불린산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 배양물은 메틸로모나스 속 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 배양물, 상기 배양물의 배양상등액, 상기 메틸로모나스 속 DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 파쇄물, 이들의 분획물 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 아미노레불린산의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아미노레불린산 생산용 형질전환체 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 아미노레불린산 생산용 형질전환체, 상기 형질전환체를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 아미노레불린산 생산용 키트 및 상기 형질전환체를 배양하여 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메탄은 천연가스와 셰일가스의 주성분으로 바이오매스의 혐기소화 과정에서 발생하거나 매립지가스에서 주로 발생한다. 매년 국내에서 200만톤, 세계적으로는 1,500억톤이 발생하며, CO₂보다 온실가스 효과가 21배 정도 높은 원인 물질로 알려져 있다. 이러한 메탄가스는 메탄자화균을 이용하여 생물학적 전환을 통해 바이오 연료 또는 화학원료 등의 다양한 고부가가치 목적산물을 생산할 수 있다.

[0003] 아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA)은 탄소 5개의 지방족 화합물로 생물체 내에 클로로필 및 헴(heme)을 포함하는 모든 테트라피롤(tetrapyrrole) 생합성 과정의 필수적인 전구체로서 생체 내에서 테트라피롤은 여러 단계를 거쳐 헤모글로빈, 클로로필, 비타민 B12 등의 조효소인 헴(heme)으로 생합성된다.

[0004] ALA의 이러한 생합성 경로의 특징에 따라 식물생장촉진제, 제초제, 또는 살충제 등 농업적으로 응용할 수 있고, 암 치료제나 뇌종양 진단 등 의학적 응용, 그리고 화장품 첨가물이나 헴(heme) 구조를 포함한 효소의 생산 등에 이용할 수 있다.

[0005] ALA는 친환경적인 생물농약 및 식물촉진제로서 식물에 처리시 식물의 생장과 발달을 촉진하는데 이러한 촉진효과는 클로로필 함량 증가, 광합성 활성 증대 및 호흡작용 억제를 통해 기인한 것으로 보고되었다.

[0006] 의약부문에 ALA 는 미생물 저항성 약품 및 피부암 치료제 등 생물학적인 활성물질로 이미 사용되고 있어 FDA에서 허용한 악성종양치료용 광역학치료법(photodynamic therapy, PDT)의 광민감제로서 널리 알려져 있다. ALA는 헴(heme) 생합성 경로를 통해 전구물질인 광민감제 프로토포르피린 IX(protoporphyrine IX)를 형성하며 짧은 시간동안 작용을 나타낸 후 빠르게 대사된다. 상기 프로토포르피린 IX가 광민감제로 활성화되기 시작하면 형광을 나타내고 세포독성을 나타내게 되는데 이를 활용하여 암의 진단이나 치료의 목적으로 사용된다.

[0007] ALA는 화학적 공정을 통해서 합성이 가능하지만 합성단계가 복잡하고 수율이 낮은 문제점이 있다. 그러나 미생물을 이용할 경우 많은 양의 ALA를 합성할 수 있고 생물학적 합성과정은 매우 간단하다.

[0008] ALA의 생물학적 합성과정은 크게 두 경로를 통해 가능하다. ALA는 미생물내의 C5 경로(C5 pathway, Beale pathway) 또는 C4 경로(C4 pathway, Shemin pathway)를 통해 생산할 수 있다. 상기 C5 경로는 식물, 조류, 그리고 많은 미생물에 존재하며 글루타메이트로부터 ALA를 합성하는데, 이때, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX), NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 및 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL)가 관여한다고 알려져 있다. 상기 C4 경로는 아미노레불린산 합성효소를 사용하여 숙시닐-CoA와 글리신으로부터 ALA를 합성하는 것으로 알려져 있다.

[0009] 그러나, 이처럼 생물학적 합성과정을 통해, ALA를 생산하기 위하여는 미생물의 성장 및 ALA 합성의 탄소원으로

사용되는 포도당을 과량으로 공급하여야만 하므로, ALA의 생산비용이 높은 수준을 나타낸다는 단점이 있어, 이를 개량할 필요성이 대두되었으나, 효과적인 해결방안이 제시되지 않고 있는 실정이다.

- [0010] 이러한 배경하에서, 보다 경제적으로 생물학적 합성과정을 통해 ALA를 생산하는 기술을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 형질전환체를 이용할 경우, 메탄을 유일 탄소원으로 사용하여 경제적으로 ALA를 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 하나의 목적은 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 아미노레불린산 생산용 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 아미노레불린산 생산용 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하여 메탄으로부터 아미노레불린산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 보다 경제적으로 생물학적 합성과정을 통해 ALA를 생산하는 기술을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 메탄자화균에 주목하게 되었다. 메탄자화균은 탄소원으로서 대기중의 메탄을 사용하므로, 메탄자화균을 이용하여 생물학적 합성과정을 통해 ALA를 생산할 경우, 배지에 공급되는 포도당의 함량을 감축시켜서 보다 경제적으로 ALA를 생산할 수 있을 것으로 예상하였다.
- [0016] 그러나, 메탄자화균을 사용할 경우에는 대기중의 메탄을 탄소원으로 이용하는 C5 경로를 통해 ALA를 생산할 수 있었으나, 숙시닐-CoA와 글리신을 필요로 하는 C4 경로는 사용할 수 없음을 확인하였는데, 이는 대부분의 일반적인 메탄자화균에서는 숙시닐-CoA를 공급하는 TCA 대사경로와 글리신을 공급하는 세린 대사경로가 동시에 활성화되지 않기 때문임을 확인하였다.
- [0017] 이에 따라, 상기 TCA 대사경로와 세린 대사경로가 동시에 활성화되는 메탄자화균을 발굴하기 위하여, 다양한 연구를 수행한 결과, 본 발명자들이 한국등록특허 제10-1714967호를 통해 특허등록받은 신규한 메탄자화균인 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주(KCTC18400P)(이하, "DH-1 균주"라 약칭 함)가 TCA 대사경로와 세린 대사경로가 동시에 활성화되는 메탄자화균임을 확인하였다. 그러나, 상기 DH-1 균주에서는 C4 경로에서 중요한 역할을 수행하는 ALAS가 발현되지 않아, C4 경로를 통해 ALA를 생산하지는 못함을 확인하였다.
- [0018] 이에, C4 경로에 관여하는 ALAS 유전자를 DH-1 균주에 도입한 형질전환체를 제작하고, 메탄을 포함하는 대기조건 하에서, 숙신산 및 글리신을 포함하지 않은 배지를 이용하여 상기 형질전환체를 배양하면서, 이의 ALA 생산성을 분석한 결과, DH-1 균주의 ALA 생산성에 비하여 상기 형질전환체의 ALA 생산성이 약 1.8배로 증가됨을 확인하였다.
- [0019] 이처럼, 배지에 숙신산 및 글리신을 공급하지 않은 조건에서, TCA 대사경로와 세린 대사경로가 동시에 활성화되는 DH-1 균주에 ALAS 유전자가 도입된 형질전환체를 대기중의 메탄만을 유일 탄소원으로 이용하여 배양함으로써, ALA를 생산하는 기술은 지금까지 전혀 알려져 있지 않고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.
- [0020] 상술한 목적을 달성하기 위한, 일 실시양태로서, 본 발명은 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균에 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 아미노레불린산 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "메탄자화균(methanotrophs)"이란, 메탄산화세균이라고도 호칭되며, 메탄을 유일탄소원으로 이용하여 생육하는 원핵생물을 의미한다. 대부분의 메탄자화균은 대기중의 메탄을 탄소원으로서 사용하는데, 대체로 메탄을 메탄올의 형태로 전환시킨 후, 생체내 대사에 사용한다.

- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 메탄자화균은 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로가 동시에 활성화된 메탄자화균인 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로(TCA cycle) 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로(serine pathway)가 동시에 활성화된 메탄자화균으로서, 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주를 사용하였다.
- [0023] 본 발명의 용어 "메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주"란, 하수슬러지로부터 유래되고, 종래에 보고되지 않았던 메틸로모나스 속(*Methylobomonas* sp.)에 속하는 균주로서, 2015년 8월 27일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하고, 기탁번호 KCTC18400P를 부여받은 균주를 의미한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobomonas* sp. DH-1) 균주(이하, "DH-1 균주"라 약칭 함)는 다음과 같은 특징을 나타낸다.
- [0025] (a) 수용성 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않는다.
- [0026] (b) 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자, PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자, 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL) 유전자, 스쿠알렌 호펜 사이클라제(squalene hopene cyclase, shc) 유전자 등이 발현된다.
- [0027] (c) 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterin pathway), H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway), 세린 대사경로(serine pathway), TCA 대사경로(TCA cycle), C30 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway), 호파노이드 생합성 경로(hopanoid biosynthesis pathway), C40 카로티노이드 합성경로(C30 carotenoid synthesis pathway) 등이 활성화되어 있다.
- [0028] (d) 피루브산카르복시화효소(pyruvate carboxylase) 유전자, 포스포에놀피루브산카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase) 유전자 및 피루브산 탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자의 조합 활성화에 의해 이산화탄소를 흡수하여 고정시킨다.
- [0029] 본 발명의 용어 "형질전환체"란, 숙주 미생물에 외래 유전자를 도입하여 발현시키거나 또는 내재적인 유전자의 발현을 억제하여 숙주 미생물이 가지는 원래의 유전적인 특징과 상이한 유전적인 특징을 새로이 나타내도록 변이시킨 변이 균주를 의미한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체는 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로가 동시에 활성화된 메탄자화균에 C4 경로에 관여하는 ALAS 유전자를 도입하고, 이를 발현시켜서 기체상의 메탄으로부터 ALA를 생산할 수 있는 변이 균주를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0031] 상기 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로가 동시에 활성화된 메탄자화균은 TCA 경로의 활성화와 C5 경로에 관여하는 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자 및 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL)를 코딩하는 유전자의 조합 및 발현으로 C5 경로에 의하여 기체상의 메탄으로부터 ALA를 생산할 수 있는 특성을 나타낸다.
- [0032] 따라서, 상기 형질전환체는 C5 경로에 관여하는 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX) 유전자, NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 유전자 및 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL)를 코딩하는 유전자를 단독으로 또는 조합하여 추가로 도입함으로써, C5 경로의 활성이 증가된 변이 균주가 될 수도 있다.
- [0033] 상기 각 유전자의 추가적인 도입은 각각 단독으로 또는 조합하여 수행함으로써, 형질전환체를 제작할 수 있다.
- [0034] 상기 형질전환체에 도입되는 ALAS 유전자는 특별히 이에 제한되지 않으나, 메탄자화균으로부터 유래된 동종유래의 유전자가 될 수도 있고, 다른 미생물로부터 유래된 이종유래의 유전자가 될 수도 있다. 본 발명의 실시예에서는 DH-1 균주에 제2형 메탄자화균 유래의 ALAS 유전자(서열번호 1) 또는 로도박터 속 미생물 유래의 ALAS 유

전자(서열번호 2)를 도입한 형질전환체를 제작하였다.

- [0035] 본 발명에서 제공하는 숙시닐-CoA를 생합성하는 TCA 대사경로 및 글리신을 생합성하는 세린 대사경로가 동시에 활성화된 메탄자화균은 TCA 대사경로가 활성화되어 있어, 숙시닐-CoA를 내재적으로 합성할 수 있고, 세린 대사경로가 활성화되어 있어, 글리신을 내재적으로 합성할 수 있으므로, 이에 ALAS 유전자가 도입된 형질전환체는 외부에서 글리신 또는 숙시산을 공급받지 않아도, 메탄을 단일 탄소원으로 사용하여 C4 경로를 통해 ALA를 생합성할 수 있는 특성을 나타낸다.
- [0036] 이러한 형질전환체의 특성은 세린 대사경로와 TCA 대사경로가 함께 활성화되지 않아, C4 경로를 통해 ALA를 생합성하기 위하여는 반드시 숙시산 또는 글리신을 외부로부터 공급받아야만 하는 종래의 메탄자화균에 구별될 수 있는 장점이 될 수 있다.
- [0037] 뿐만 아니라, 상기 형질전환체는 일반적인 C5 경로를 통해서도 ALA를 생산할 수 있다.
- [0038] 따라서, 상기 형질전환체는 종래의 메탄자화균과는 달리, 대기중의 메탄을 단일 탄소원으로 사용하여 C4 경로 및 C5 경로를 통해 ALA를 생산할 수 있으므로, 종래의 메탄자화균을 이용할 경우 보다도 경제적으로 ALA를 생산할 수 있다.
- [0039] **다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 포함하는 아미노레블린산 생산용 조성물을 제공한다.**
- [0040] 상술한 바와 같이, 상기 ALAS 유전자가 도입된 형질전환체에서는 활성화된 C4 경로에 의하여 메탄으로부터 ALA를 생산할 수 있으므로, 상기 형질전환 미생물 또는 이의 배양물을 이용하면 메탄으로부터 ALA를 높은 수율로 생산할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체의 배양산물은 메탄으로부터 ALA를 생산하는데 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 형질전환체의 배양물, 배양상등액, 파쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, 상기 형질전환체를 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 파쇄물, 상기 배양물, 배양상등액, 파쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.
- [0042] **또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 아미노레블린산 생산용 조성물을 포함하는 아미노레블린산 생산용 키트를 제공한다.**
- [0043] 본 발명의 ALA 생산용 키트는 상기 ALA 생산용 조성물을 포함하여 ALA를 생산하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 반응에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있고, 구체적인 예로 상기 ALA 생산에 사용되는 완충액, 상기 ALA 생산을 수행하기 위한 반응용기, 상기 ALA 생산을 수행하기 위한 진탕배양기, 상기 ALA 생산 반응을 수행하기 위한 타이머 등을 포함할 수 있다.
- [0044] **또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 메탄을 포함하는 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 아미노레블린산의 생산방법을 제공한다.**
- [0045] 이때, 상기 형질전환체에 대하여는 앞서 설명한 바와 동일하다.
- [0046] 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, 메탄을 포함하는 대기조건 하에서, 숙시산 및 글리신이 포함되지 않은 배지에 접종하여 배양함으로써 수행될 수 있다.
- [0047] 이때, 상기 대기중 메탄의 농도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 0.01 내지 50%(v/v)가 될 수 있고, 다른 예로서, 10 내지 40%(v/v)가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 30%(v/v)가 될 수 있다.
- [0048] 또한, 배양온도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 20 내지 40℃가 될 수 있고, 다른 예로서, 25 내지 35℃가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 30℃가 될 수 있다.
- [0049] 아울러, 상기 배양은 교반조건에서 수행될 수 있는데, 상기 교반조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 200 내지 300rpm이 될 수 있고, 다른 예로서, 210 내지 250rpm이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 230rpm이 될 수 있다.
- [0050] 끝으로, 배양시간은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 30 내지 200시간이 될 수 있고, 다른 예로서, 60 내지 140시간이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 120시간이 될 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 형질전환체로부터 ALA를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나,

배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[0052] 배양에 사용되는 배지는 메탄자화균의 배양에 사용되는 것으로 알려진 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 사용할 수 있고, 메탄자화균에 따라 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 조절한 배지를 사용할 수 있다 (<http://methanotroph.org/wiki/culturing-tips/>).

[0053] 특히, 배지에 NaCl, KCl 등의 염류를 포함할 경우, DH-1 균주 또는 그의 형질전환체의 증식 또는 ALA의 생산성을 향상시킬 수 있다. 이때, 배지에 포함되는 염류의 농도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 0.1 내지 3.0%(w/w)가 될 수 있고, 다른 예로서 1.0 내지 2.0%(w/w)가 될 수 있으며, 또 다른 예로서 1.5%(w/w)가 될 수 있다.

[0054] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0055] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다.

[0056] 아울러, ALA를 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 상기 형질전환체를 제거하고 얻어진 상등액을, 용매추출법에 적용하여 ALA를 회수하는 방법을 사용할 수 있고, 이외에도 상기 ALA의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 ALA를 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에서 제공하는 형질전환체를 이용하면, 대기중의 메탄을 유일 탄소원으로 이용하여, 아미노레불린산을 생산할 수 있으므로, 경제적인 아미노레불린산의 생산에 널리 활용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1a는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 다양한 대사경로를 나타내는 개략도이다.

도 1b는 일반적인 메탄자화균에 존재하는 C4 경로(Shemin pathway) 및 C5 경로(Beale pathway)를 통해 아미노레불린산을 생합성하는 과정을 나타내는 개략도이다.

도 2a는 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터의 벡터맵을 나타낸다.

도 2b는 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터의 벡터맵을 나타낸다.

도 2c는 각각의 형질전환 DH-1 균주에서 재조합 벡터를 통해 도입된 유전자의 전사여부를 확인한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 3은 DH-1 균주 및 아미노레불린산 합성효소가 도입된 형질전환 DH-1 균주 2종으로부터 아미노레불린산의 생산성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실시예 1: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobacterium* sp. DH-1) 균주의 유전체 및 전사체 분석**

[0061] 본 발명자들이 기존에 개발한 신규한 메탄자화균인 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylobacterium* sp. DH-1) 균주(KCTC18400P)(이하, "DH-1 균주"라 약칭 함)의 유전체 및 전사체 분석을 수행하여, 상기 DH-1 균주의 구체적인 특성을 새로이 규명하였다.

[0062] 먼저, DDH(DNA-DNA hybridization)를 통해 DH-1 균주의 유전체(Genbank NZ_CP014360, NZ_CP014361)를 분석한 결과, 4.86 Mb의 게놈 염색체와 278 kb의 플라스미드를 포함하고, 제1형 메탄자화균으로 분류되는 *Methylobacterium* *koyamae* Fw12E-YT 균주와는 전체 유전자의 73.9%가 유사하며, 두 균주 간의 ANI(average nucleotide identity

y)는 97.76%임을 확인하였다.

- [0063] 아울러, 상기 DH-1 균주의 전사체를 이용하여 메탄을 이용한 대사경로를 분석한 결과, 종래의 제1형 메탄자화균과는 구별되는 다양한 대사경로가 활성화되어 있음을 확인하였다(도 1a).
- [0064] 도 1a는 본 발명의 DH-1 균주에서 활성화된 다양한 대사경로를 나타내는 개략도이다.
- [0065] 도 1a에서 보듯이, 일반적인 메탄자화균에 존재하는 C1 metabolism과 관련된 유전자의 경우, DH-1 균주는 미립자 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase, sMMO) 유전자가 존재하지 않는 반면, 2 카피의 미립자 메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO) 유전자, PQQ-의존성 메탄올 디하이드로게나제(PQQ-dependent methanol dehydrogenase, mxaFJGIRSACKLDEK) 유전자, PQQ 생합성 유전자 클러스터(PQQ biosynthesis gene cluster, pqqBCDE) 유전자, 포름알데히드를 대사하는 RuMP 대사경로(ribulose monophosphate cycle), ED 대사경로(Entner-Doudoroff pathway), EMP 대사경로(Embden-Meyerhof-Parnas pathway), PP 대사경로(pentose phosphate pathway), H₄MPT 대사경로(Tetrahydromethanopterin pathway) 및 H₄F 대사경로(tetrahydrofolate pathway)가 모두 활성화되어 있다는 점을 확인하였다.
- [0066] 특이하게도, 제2형 메탄자화균에 주로 존재하는 것으로 알려진 세린 대사경로(serine pathway) 관련 유전자를 모두 포함하고, ppc(Phosphoenolpyruvate carboxylase)를 발현시킬 수 있어, 상기 ppc와 세린 대사경로를 통해 이산화탄소를 흡수하면서 PEP(Phosphoenolpyruvate)를 OAA(oxaloacetate)로 전환시킬 수 있다. 아울러, 종래의 메탄자화균에서는 정상적으로 작동하지 않는 것으로 알려진 TCA 대사경로(TCA cycle)가 정상적으로 작동함을 확인하였다.
- [0067] 지금까지 알려진 바에 의하면, 일반적인 제1형 메탄자화균에서는 ppc가 발현되지 않아, 세린 대사경로가 정상적으로 작동하지 못하는 것으로 알려져 있으나, 상기 DH-1 균주는 ppc 뿐만 아니라, 피루브산 카르복실라제(Pyruvate carboxylase), 아세틸 코에이 카르복실라제(acetyl-CoA carboxylase) 및 PEP 카르복실라제(PEP carboxylase)가 활성화되어 있어, 지금까지 알려진 제1형 메탄자화균에 비하여, 이산화탄소를 현저하게 높은 수준으로 흡수할 수 있음을 확인하였다.
- [0068] 한편, 일반적으로 C4 경로(Shemin pathway) 또는 C5 경로(Beale pathway)를 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 있다고 알려져 있다(도 1b).
- [0069] 도 1b는 C4 경로(Shemin pathway) 및 C5 경로(Beale pathway)를 통해 아미노레불린산을 생합성하는 과정을 나타내는 개략도이다.
- [0070] 도 1b에서 보듯이, C4 경로를 통해 합성된 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)와 글리신을 기질로 사용하고, 아미노레불린산 합성효소의 반응을 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 있고; C5 경로를 통해 글루타메이트를 기질로 사용하고, 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthase, gltX), NADPH-의존성 글루타밀-tRNA 환원효소(NADPH-dependent glutamyl-tRNA reductase, hemA) 및 글루타메이트-1-세미알데히드 아미노트랜스퍼라제(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, hemL)의 연속반응을 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 있다.
- [0071] 다만, 일반적인 대장균, 코리넨박테리움에서는 주로 C5 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성하지만 제1형 또는 제2형 메탄자화균은 TCA 경로의 일부 유전자들이 비활성화로 인해 아미노레불린산의 생합성이 제한된다. 또한, C4 경로에서 기질로 사용되는 글리신과 숙시닐-CoA의 경우에도 종래의 제2형 메탄자화균에서 아미노레불린산의 생산에 대한 보고가 없어, 글리신 또는 숙신산이 외부에서 공급되지 않는 한, 상기 경로를 통한 아미노레불린산의 생합성이 제한된다.
- [0072] 이같은 C4 경로를 통한 아미노레불린산의 생합성 제한은 DH-1 균주에서는 나타나지 않으나, 아미노레불린산 합성효소가 DH-1 균주에서는 발현되지 않기 때문에 결과적으로는 DH-1 균주에서도 C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 없다.
- [0073] 그러나, C5 경로에 관여하는 gltX, hemA 및 hemL는 모두 DH-1 균주에서 발현되므로, DH-1 균주는 C5 경로를 통해서 아미노레불린산을 생합성할 수 있을 것으로 분석되었다.
- [0074] **실시예 2: 메틸로모나스 속 DH-1(*Methylomonas* sp. DH-1) 균주의 아미노레불린산 생합성능 검증**
- [0075] 상기 실시예 1에서 DH-1 균주가 C5 경로를 통해서 아미노레불린산을 생합성할 수 있을 것으로 분석하였으므로, 이를 실험적으로 확인하고자 하였다.
- [0076] 대략적으로, DH-1 균주, 제1형 메탄자화균(*Methylophilum alcaliphilum* 20Z) 또는 제2형 메탄자화균

(*Methylosinus trichosporium* OB3b)을 각각 NMS 배지(1 g/ℓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/ℓ KNO_3 , 0.2 g/ℓ $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0038 g/ℓ Fe-EDTA 및 0.0005 g/ℓ $\text{NaMo} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)에 접종한 후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 대기조건 및 30℃의 온도조건에서 230 rpm으로 120시간 동안 배양하였다.

[0077] 배양이 종료된 후, 각 균주의 배양상등액을 수득하고, 수득한 배양상등액에 포함된 아미노레불린산의 농도를 측정하였다. 이때, 아미노레불린산의 농도는 다음과 같이 측정하였다: 배양상등액 2ml와 1.0M 초산나트륨(pH 4.6) 1ml를 혼합한 다음, 0.5ml의 아세틸아세톤을 첨가하여 혼합물을 수득하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 100℃에서 15분간 가열한 후, 15분동안 냉각시켰다. 냉각된 혼합물 2ml와 Ehrlich 시약 2ml를 혼합하고 30분 동안 반응시킨 다음, 554 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0078] 그 결과, DH-1 균주를 120시간 동안 배양하여 수득한 배양상등액에서는 약 2.19 mg/L의 아미노레불린산이 검출된 반면, 제1형 메탄자화균(*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z) 또는 제2형 메탄자화균(*Methylosinus trichosporium* OB3b)을 120시간 동안 배양하여 수득한 각각의 배양상등액에서는 미량의 아미노레불린산만이 검출되었다.

[0079] 따라서, DH-1 균주는 C5 경로를 통해서 아미노레불린산을 생합성 할 수 있고, 이의 효율이 종래의 메탄자화균보다 우수함을 알 수 있었다.

[0080] **실시예 3: 아미노레불린산 합성효소(aminolevulinic acid synthase, ALAS) 유전자가 도입된 형질전환 DH-1 균주를 이용한 아미노레불린산의 생합성**

[0081] 실시예 1에서 살펴본 바와 같이, DH-1 균주는 C4 경로에 관여하는 아미노레불린산 합성효소를 발현하지 못하기 때문에, C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성 할 수 없다. 그러나, 상기 DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소 유전자를 도입하여, 아미노레불린산 합성효소를 발현시킬 경우, 상기 아미노레불린산 합성효소에 의해 C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성 할 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0082] **실시예 3-1: 형질전환 DH-1 균주의 제작**

[0083] 먼저, 도입할 아미노레불린산 합성효소 유전자로서 제2형 메탄자화균 유래의 아미노레불린산 합성효소 유전자(OB-ALAS, 서열번호 1) 또는 로도박터 속 균주(*Rhodobacter* sp.) 유래의 아미노레불린산 합성효소 유전자(Rs_ALAS, 서열번호 2)를 각각 합성하였다.

[0084] 다음으로, pAWP78 벡터에 DH-1 균주로부터 유래된 복제기원(replication origin)과 DNA 결합단백질(DNA binding protein)을 코딩하는 염기서열을 삽입하여 pDH 셔틀벡터(pDH shuttle vector)를 제작하였다.

[0085] 상기 제작한 pDH 셔틀벡터를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 inverse PCR 증폭을 수행하였다.

[0086] DH_inverse_FP: 5'-CAAtaaggatccccagcgc-3'(서열번호 3)

[0087] DH_inverse_RP: 5'-CCATATGAGATctcctttaacag-3'(서열번호 4)

[0088] 다음으로, 상기 합성된 OB-ALAS를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[0089] OB3bALAS_FP: 5'-gttaaaggagATCTCATATGGATTACCGCGCTTTTCGAGACGG-3'(서열번호 5)

[0090] OB3bALAS_RP: 5'-gatgcctggggatccttaTTGCGCGCGAGCTTGATCTCGGGATAG-3'(서열번호 6)

[0091] 또한, 상기 합성된 Rs_ALAS를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[0092] RsALAS_FP: 5'-cacatacactgttaaaggagATCTCATATGGACTACAACCTGGCCTTGACACCGC-3'(서열번호 7)

[0093] RsALAS_RP: 5'-cgttttatttgatgcctggggatccTCAGGCGACGACTTCGGCGCGGTTCAG-3'(서열번호 8)

[0094] 상기 증폭된 pDH 셔틀벡터에 OB-ALAS를 도입하여 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터를 제작하고, 상기 증폭된 pDH 셔틀벡터에 Rs_ALAS를 도입하여 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터를 제작하였다(도 2a 및 2b).

[0095] 도 2a는 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터의 벡터맵을 나타내고, 도 2b는 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터의 벡터맵을 나타낸다.

[0096] 상기 제작된 DH-1 shuttle vector_OB3bALAS 재조합 벡터 또는 DH-1 shuttle vector_RsALAS 재조합 벡터를 각각 전기충격 형질전환 방법으로 DH-1 균주에 도입하고, NMS 배지에서 16시간 동안 배양하여 안정화시켰으며, 카나

마이신이 첨가된 NMS 고체 배지에 도달한 후 일주일 간 배양하여 이중 교차 혼성 재조합을 유도하여, 각각의 형질전환 DH-1 균주인 DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)를 제작하였다.

[0097] 상기 제작된 DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)의 형질전환 여부를 검증하기 위하여, 먼저 콜로니 PCR을 수행함으로써, 형질전환 여부를 검증하였다.

[0098] 또한, 상기 각각의 형질전환 DH-1 균주를 배양하고, 이로부터 총 RNA를 수득한 다음, 역전사를 수행하여 cDNA를 수득하고, 상기 cDNA를 PCR 증폭시켜서, 아미노레불린산 합성효소 유전자의 전사 여부를 확인하였다(도 2c).

[0099] 도 2c는 각각의 형질전환 DH-1 균주에서 재조합 벡터를 통해 도입된 유전자의 전사여부를 확인한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

[0100] 도 2c에서 보듯이, 각 형질전환 DH-1 균주에서는 도입된 유전자에 의하여 각각의 아미노레불린산 합성효소 유전자가 전사됨을 확인하였다.

[0101] 실시예 3-2: 형질전환 DH-1 균주에서 생산된 아미노레불린산 생산성 분석

[0102] DH-1 균주, DH-1(OB3bALAS) 또는 DH-1(RsALAS)을 각각 NMS 배지에 접종한 후 30%(v/v) 메탄을 포함하는 대기조건 및 30℃의 온도조건에서 230 rpm으로 120시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 균주의 배양상등액을 수득하고, 수득한 배양상등액에 포함된 아미노레불린산의 농도를 측정하였다(도 3).

[0103] 도 3은 DH-1균주, 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 2종의 형질전환 DH-1 균주로부터 아미노레불린산의 생산성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0104] 도 3에서 보듯이, DH-1 균주에 비하여, 형질전환 DH-1 균주가 상대적으로 우수한 아미노레불린산 생산성을 나타내었고, 상기 아미노레불린산 생산성의 차이는 배양시간이 경과할 수록 더욱 증가하였다. 단적으로 120시간 동안 배양할 경우, DH-1 균주는 약 2.19 mg/L의 아미노레불린산을 생산하는 반면, 형질전환 DH-1 균주는 약 3.78 내지 3.94 mg/L의 아미노레불린산을 생산할 수 있으므로, 상기 형질전환 DH-1 균주는 DH-1 균주에 비하여 1.8배 증가된 아미노레불린산 생산성을 나타냄을 확인하였다.

[0105] 앞서 살펴본 바와 같이, C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성하기 위하여는, 기질로서 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)와 글리신이 요구되고, 글리신을 공급하는 세린 대사경로 및 숙시닐-CoA를 공급하는 TCA 대사경로가 함께 활성화되지 않는 종래의 메탄자화균에서는 상기 기질 중의 하나를 외부에서 공급하여야만 C4 경로를 통해 아미노레불린산을 생합성할 수 있다는 단점이 있다.

[0106] 그러나, 본 발명에서 제공하는 DH-1 균주에 아미노레불린산 합성효소 유전자가 도입된 형질전환 DH-1 균주는 상기 세린 대사경로와 TCA 대사경로가 함께 활성화되어 있으므로, 외부에서 숙신산 또는 글리신을 추가로 공급하지 않아도 메탄을 단일 탄소원으로 사용하여 아미노레불린산을 생합성할 수 있으며, 이러한 장점은 종래의 메탄자화균에서는 전혀 나타나지 않는 형질전환 DH-1 균주만의 새로운 특징임을 확인할 수 있었다.

[0107] 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.

수탁번호

[0108]

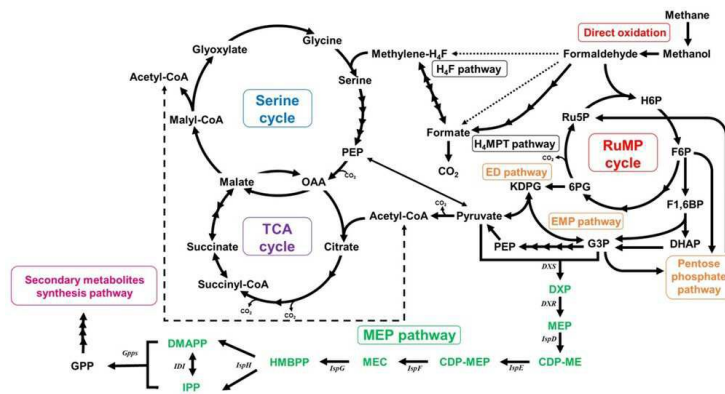
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18400P

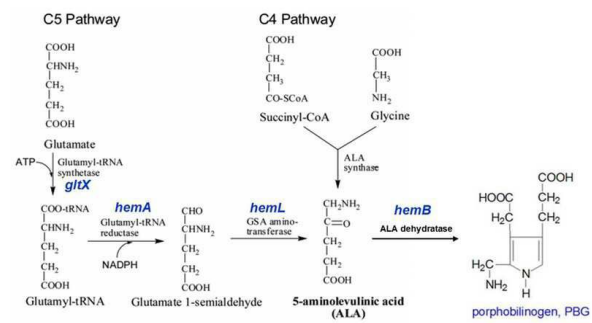
수탁일자 : 20150827

도면

도면1a



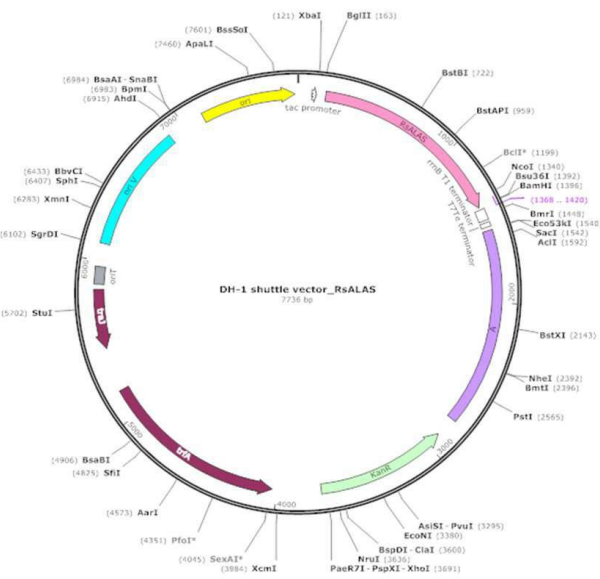
도면1b



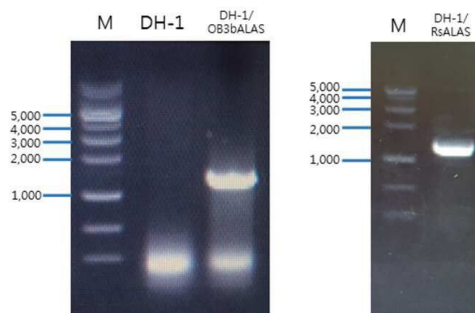
도면2a



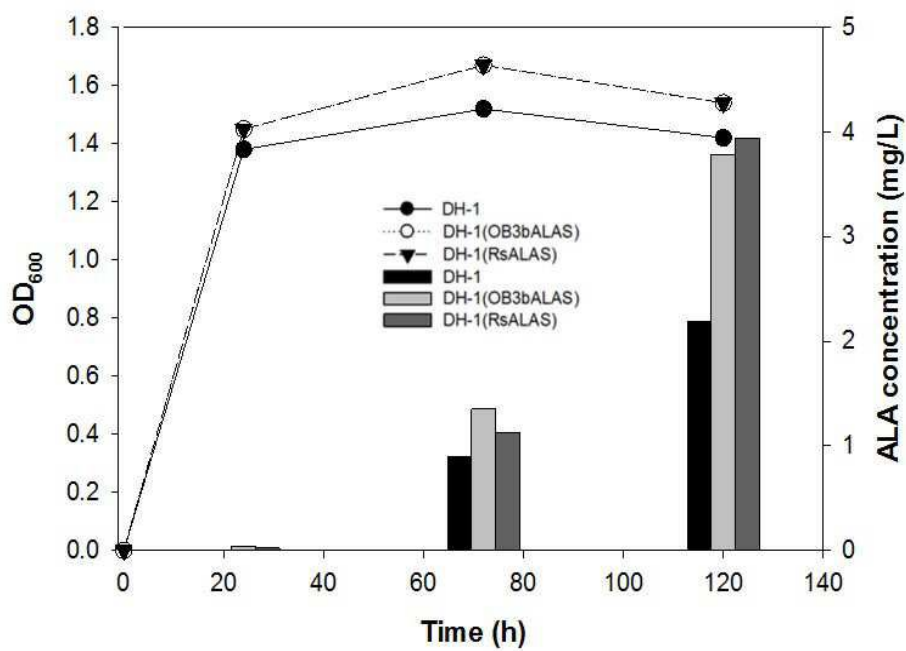
도면2b



도면2c



도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Transformed methanotrophs for producing aminolevulinic acid and
 uses thereof
 <130> KPA161711-KR-P1
 <150> KR 10-2017-0003302
 <151> 2017-01-10
 <160> 8
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 1284
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OB-ALAS
 <400> 1

atggattacc ggcgcttttt cgagacggcg atcacacgtc tccaggacga gcgccgttac	60
cgagtcttcg cccatctcga acgtcgcgtc gaatgcttcc cgcgcgcgct ctggcaccgg	120
gacgacggca cgacgcagga tgtgacgatc tggtgctcca atgattatct cggcatgggc	180
cagcaccgcc aggtgatcgc cgctatggtc gacaccgccg cgcgcgtcgg cgccggctcg	240
ggcggcacgc gcaacatctc cggcaccagc catgcgatcg tcgagctgga gagcgagctc	300
gccgacctgc acggcaagga ggcggcgtc gtcttcacct cgggatggat ttccaatctc	360
gcggcgatct ccacgatcgc cgatcttctg cccgactgtc tcacctctc cgacgcctcc	420
aatcacaatt cgatgatcga gggcgtcaag cgctcgcgcg ccgagcgcaa gatcttcgcg	480
cacaacgacc tcggccatct cgaggagctg ctgccgcgg cggcgcgcg gcccaagctc	540
atcgtcttcg agagcctcta ttgatgaac ggcaatatcg cgccggctcg cgagatcgcc	600
gcgctcgccg agcgttatgg cgcgatgacc tatatcgacg aggttcatgc ggtcggcatg	660
tatggcgcgc gcggcggcgg cgtttgcgag caggccggcg tgatggaccg tatcgatgtg	720
atcgagggca cgctggccaa gggcttcggc acgctcggcg gctatatcgc cggcgatcgc	780
gtcatcatcg acgcatccg cagctatcgc gcgtccttca tcttcaccac agctctgccg	840
ccggcggtcg ccggcggcgc gaccgccgt gtgcgcctct tgaagacgcg ccccgatctg	900
cgcgccgcgc atcagcgcgc caccataatc accaagcacg cgctcggcgc cgcgggcctg	960

ccggtgctgg agaacggctc gcatactgtg ccggtgatgg tgcgcgaggc ggagctgtgc 1020
aaggccgcga gcgacatgct gctcgagcgg caggcatct atattcagcc gatcaattat 1080
ccgacggctg cagcggggac ggagcgtctg cgcacacgc cgacgccctg ccatacgggc 1140
gagcatatcg tcacgtggt cgaagcgaatg gtcgatgtct ggaacacgt cggcacgcgc 1200
ttcgtcgagc cgccgcagca tctccacgtc gatcccgaga gccgcgagcg ctgtacctat 1260
cccagatca agctcgccgc gcaa 1284

<210> 2

<211> 1224

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rs_ALAS

<400> 2

atggactaca acttggcctt ggacaccgcc ttgaaccgt tgcacaccga aggccgctac 60
cgcaccttca tcgacatcga acgccgcaaa ggcgcttcc cgaaagccat gtggcgcaaa 120
ccggacggca gcgaaaaaga aatcaccgtc tgggtcggca acgactactt gggcatgggc 180
caacaccggc tcgtcttggg cgccatgcac gaagccttgg acagcaccgg cgccggcagc 240
ggcggcacc gcaacatcag cggcaccacc ttgtaccaca aacgtttgga agccgaattg 300
gccgacttgc acggcaaaaga agccgccttg gtcttcagca gcgcctacat cgccaacgac 360

gccaccttga gcaccttgcc gcaattgatc ccgggcttgg tcacgtcag cgacaaattg 420
aaccacgcca gcatgatcga aggcacccgc cgcagcggca ccgaaaaaca catcttcaaa 480
cacaacgact tggacgactt gcgccgcac ttgaccagca tcggcaaaga ccgcccgatc 540
ttggtcgcct tcgaaagcgt ctacagcatg gacggcgact tcggccgcat cgaagaaatc 600
tgcgacatcg ccgacgaatt cggcgcttgg aaatacatcg acgaagtcca cgccgtcggc 660
atgtacggcc cgcgcggcgg cggcgctgcc gaacgcgacg gcttgatgga ccgcatcgac 720
atcatcaacg gcaccttggg caaagcctac ggcgcttctg gcggtacat cgccgccagc 780

agcaaaatgt gcgacgccgt ccgcagctac gccccgggct tcactttcag caccagcttg 840
ccgccggtcg tcgcccgccg cgcccgccgc agcgtccgcc acttgaaagg cgacgtcgaa 900
ttgcgcgaaa aacaccaaac ccaagccgc atcttgaaaa tgcgcttgaa aggcttgggc 960
ttgccgatca tcgaccaggg cagccacatc gtcccgttcc acgtcggcga cccggtccac 1020
tgcaaaatga tcagcgacat gttgttgga cacttcggca tctacgtcca accgatcaac 1080
ttcccagaccg tcccgcggg caccgaacgc ttgcgttca ccccagccc ggtccacgac 1140

agcggcatga tcgaccactt ggtcaaagcc atggacgtct tgtggcaaca ctgcgccttg	1200
aaccgcgccg aagtcgtcgc ctaa	1224
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
caataaggat cccagggcat c	21
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
ccatatgaga tctcctttaa cag	23
<210> 5	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
gttaaaggag atctcatatg gattaccggc gctttttcga gacgg	45
<210> 6	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
gatgcctggg gatccttatt gcgcggcgag cttgatctcg gtagatg	46
<210> 7	
<211> 56	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

cacatacact gttaaaggag atctcatatg gactacaact tggccttgga caccgc 56

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cgtttttattt gatgcctggg gacctcagg cgacgacttc ggcgcggttc aag 53