



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월23일
(11) 등록번호 10-1860649
(24) 등록일자 2018년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 17/12 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12P 17/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0172608
(22) 출원일자 2016년12월16일
심사청구일자 2016년12월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR100011343 B1
KR101324359 B1
WO2015108777 A1
JP2010193807 A

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림
픽션수기자촌아파트) 201동 1601호
이왕준
경기도 수원시 장안구 천천로22번길 34 522동 50
4호 (정자동, 백설마을삼환나우빌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김지연

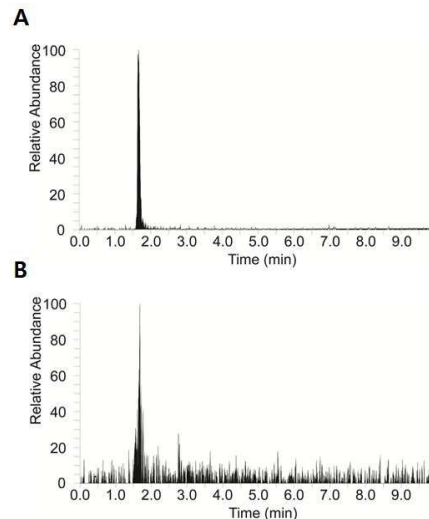
(54) 발명의 명칭 메틸로모나스 속 SW1 균주 및 이를 이용한 우라실 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 메탄으로부터 우라실을 생산하는 메틸로모나스 속 균주에 관한 것으로서, 수탁번호 KFCC11685P로 기재되는 메틸로모나스 속 SW1 균주를 포함한다.

상기와 같은 본 발명에 따르면, 메탄을 탄소원으로 이용하여 우라실을 생산하는 메틸로모나스 속의 균주를 제공함으로써, 상온, 상압 조건에서 우라실을 생산할 수 있으므로 이를 효과적으로 핵산 및 핵산 관련 물질의 생산에 이용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12R 1/01 (2013.01)

(72) 발명자

권유현

경기도 수원시 팔달구 권선로 477 124동 1003호 (매산로2가, 대한대우아파트)

김상우

전라북도 익산시 선화로 209 (남중동)

조재훈

서울특별시 동작구 동작대로 29길 119 사당동 극동아파트 101동 1806호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064929

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KFCC11685P로 기탁된 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) 균주를 포함하는, 메탄으로부터의 우라실(uracil) 생산용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주의 16S rRNA(16S ribosomal RNA)를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 우라실의 생산 방법:

- (a) 수탁번호 KFCC11685P로 기탁된 메틸로모나스 속 균주를 메탄을 첨가한 배지에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양에 의해 생산된 우라실을 획득하는 단계.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 배지는 NMS(Nitrate Mineral Salts) 배지인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 메탄의 첨가는 상기 균주를 배양하는 배양용기 내에서 기체상으로 존재하는 메탄의 용해에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 기체상으로 존재하는 메탄의 농도는 10 내지 50(v/v)%인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 7

제 3 항에 있어서, 상기 배지는 2가 금속 이온을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 2가 금속 이온은 Cu^{2+} 인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 9

수탁번호 KFCC11685P로 기탁된 메탄으로부터의 우라실 생산용 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) 균주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메틸로모나스 속 SW1 균주 및 이를 이용한 우라실 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 토양에서 분리된 메틸로모나스 속 균주를 메탄을 탄소원으로 하는 배지에서 배양하여 우라실을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하수처리장 오수에서부터 분리한 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) SW1 균주는 메탄영양세균으로 환원성 일원자 탄소분자인 메탄을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 세균이다. 메탄은 천연 가스의 주성분으로 미래의 석유의 대체 자원으로 생각 되는 자원이다. 현재 메탄은 화학 공정을 이용해 고온, 고압에서 메탄올로 전환되는데, 메탄영양세균을 이용하면 이 공정을 상온, 상압 조건에서 진행할 수 있어 비용 절감 효과를 얻을 수 있기 때문에 이러한 관점에서 메탄영양세균은 많은 관심을 받고 있다.

[0003] 핵산 및 핵산관련 물질의 생산 방법은 크게 천연물 추출법, 화학적 합성법, 미생물을 이용한 생산법이 있다. 미생물을 이용한 핵산 관련 물질의 생산에는 미생물이 가지고 있는 RNA, DNA를 분해하는 효소를 이용해 핵산을 분해하여 얻는 방법, 변이주에 의해 축적된 핵산 관련 물질을 얻는 방법, 배양액 중에 분비된 핵산 관련 물질을 얻는 방법이 있다. 본 연구실에서는 분리한 메틸로모나스 균주가 메탄을 탄소원으로 이용하고, 이를 배양할 때 배양액 중에 우라실을 분비하는 것을 밝혀냈다. 핵산 관련 물질은 조미료와 같은 물질의 산업적 생산에 유용한 물질이다.

[0004] 기존에 당(sugar)을 이용한 핵산 관련 물질의 생산 연구는 보고된 바가 있으나, 메탄영양세균을 이용한 메탄으로부터 우라실을 생산하는 방법에 대해서는 현재까지 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1324359호(2013.10.25)
(특허문헌 0002) 일본공개특허 제2010-193807호(2010.09.09)
(특허문헌 0003) 국제공개특허 WO 2015/108777(2015.07.23)
(특허문헌 0004) 한국등록특허 제10-0011343호(1981.02.11)

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Anderson CM. et al, Trends Pharmacol Sci, Potential signalling roles for UTP and UDP: sources, regulation and release of uracil nucleotides, 1997 Oct;18(10):387-92.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 균주를 배양함으로써 핵산 관련 물질을 생산하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 메틸로모나스 속의 분리 균주가 메탄을 이용하여 우라실을 생산할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 메탄을 탄소원으로 이용하여 우라실을 생산하는 메틸로모나스 속의 균주를 제공함에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 메틸로모나스 속 균주를 이용하여 우라실을 생산하는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 소정의 균주를 배양함으로써 핵산 관련 물질을 생산하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 메틸로모나스 속의 분리 균주가 메탄을 이용하여 우라실을 생산할 수 있음을 규명하였다.

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) 균주를 포함하는, 메탄으로부터의 우라실(uracil) 생산용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 메틸로모나스 속 SW1 균주는 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium sp.), 메틸로박터 속(Methylobacter sp.), 메틸로칼둠 속(Methylocaldum sp.), 메틸로파가 속(Methylophaga sp.), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina sp.), 메틸로써머스 속(Methylothermus sp.), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius sp.) 및 메틸로스파에라 속(Methylosphaera sp.) 등과 함께 타입(Type) I 메탄영양세균 그룹에 속한다. 이 그룹의 균주들은 RuMP(Ribulose monophosphate) 사이클을 주요 메탄 동화 경로로 사용한다. 이 균주들은 메탄을 이용해 탄소와 에너지를 얻어 성장하며, 이 과정에서 다양한 화합물을 합성한다.

[0013] 본 명세서 상의 용어 "메탄으로부터의 우라실 생산"은 배양 배지에 첨가한 메탄을 이용하여 균주가 우라실을 생산함을 의미한다.

[0014] 본 발명의 조성물은 메틸로모나스 속 균주 외에 메틸로모나스 속 균주의 배양을 위해 종래 알려진 배양 배지를 제한 없이 포함하는 것이 가능하다. 본 발명에서 이용 가능한 배지는 구체적으로 예를 들면, NMS(Nitrate Mineral Salts) 배지, DNMS(Dilute nitrate mineral salts) 배지, AMS(Ammonium mineral salts) 배지, Medium 10 배지이다.

[0015] NMS(Nitrate Mineral Salts) 배지의 조성(g/L)은 다음과 같다: KNO_3 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.717; KH_2PO_4 , 0.272; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2; ferric ammonium EDTA, 0.004; 0.1% (v/v)의 제1 미량원소 용액(trace element solution); pH 6.8. 제1 미량원소 용액의 조성(g/L)은 다음과 같다: Na_2EDTA , 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; H_3BO_3 , 0.03; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.003; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.002; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.003.

[0016] DNMS(Dilute nitrate mineral salts) 배지의 조성(g/L)은 다음과 같다: NMS 배지를 증류수와 1:5로 희석한 배지(1 mM의 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer pH (5.5??7.0)를 포함).

[0017] AMS(Ammonium mineral salts) 배지의 조성(g/L)은 다음과 같다: NH_4Cl , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.717; KH_2PO_4 , 0.272; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2; ferric ammonium EDTA, 0.005; 0.1% (v/v)의 제1 미량원소 용액; pH 6.8. 상기 제1 미량원소 용액의 조성은 상기 NMS 배지의 조성에 대하여 기재된 바와 같다.

[0018] Medium 10 배지의 조성(g/L)은 다음과 같다: NH_4Cl , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.7; KH_2PO_4 , 0.3; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; 0.1% (v/v)의 제2 미량원소 용액 2; pH 7.0. 상기 제2 미량원소 용액의 조성(g/L)은 다음과 같다: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.44; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.17; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06; H_3BO_3 , 0.10; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.08.

[0019] 메탄 동화 경로에서 메탄은 MMO에 의해 메탄올로 산화되고, 이렇게 전환된 메탄올은 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)에 의해 포름알데히드로 전환된다. 포름알데히드는 핵솔로스-6-인산염(Hexulose-6-phosphate, Hexulose-6-P) 합성 효소에 의해 리불로스-5-인산염(Ribulose-5-phosphate, Ribulose-5-P)과 합쳐져 Hexulose-6-P가 되어 RuMP 사이클로 들어가게 된다. 이 대사 경로로 들어간 Hexulose-6-P는 RuMP 사이클을 돌아 Ribulose-5-P로 다시 돌아가게 되고, 일부는 다시 사이클을 돌고, 일부는 사이클을 빠져 나와 Ribose-5-P를 거쳐 PRPP(5-phosphorybosyl-1-pyrophosphate)로 전환된다(도 1A). 상기 PRPP는 피리미딘 대사경로(도 1B)를 통해 우라실로 전환된다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에서 제시하는 균주의 16S rRNA(16S ribosomal RNA)를 코딩하는 핵산 서열은 서열목록 제1서열로 표시되는 핵산 서열이다.

[0021] 본 발명의 명세서상의 용어 "16S rRNA"는 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 1,500 뉴클

레오타이드 정도의 길이를 갖는다. 원핵생물은 16S 리보솜 RNA의 서열을 비교함으로써 동정할 수 있다. 이 RNA의 서열은 대부분 상당히 보존되어 있는 한편 일부 구간에서는 높은 염기서열 다양성이 나타난다. 동종간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종간에는 다양성이 나타나므로 특히 생물동정에 사용된다. 특히 배양이 불가능하거나 어려운 생물, 또는 보고된 적이 없는 생물의 동정 및 분류에 유용하게 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 우라실의 생산 방법을 제공한다: (a) 메틸로모나스 속 균주를 탄소원을 첨가한 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양에 의해 생산된 우라실을 획득하는 단계.

[0023] 본 발명의 방법을 단계별로 이하 자세히 설명한다:

[0024] 단계 (a) : 메틸로모나스 속 균주를 탄소원을 첨가한 배지에서 배양하는 단계

[0025] 본 발명인 우라실의 생산 방법은 메틸로모나스 속 균주가 탄소원을 우라실로 전환 생산하는 능력을 이용한다. 본 발명의 방법에서 이용할 수 있는 배지는 NMS 배지, DNMS (Dilute nitrate mineral salts) 배지, AMS (Ammonium mineral salts) 배지 및 Medium 10 배지가 있다.

[0026] 본 발명의 방법 중 단계 (a)에서의 메틸로모나스 속 균주의 배양은 종래 알려진 동속 균주의 일반적인 배양 방법에 따라 행해질 수 있고, 구체적으로 예를 들면, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 배지는 NMS(Nitrate Mineral Salts) 배지이다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 탄소원의 첨가는 본 발명의 균주를 배양하는 배양용기 내에서 기체상으로 존재하는 메탄의 용해에 의해 이루어진다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 기체상으로 존재하는 메탄의 농도는 10 내지 50(v/v)%이다. 다른 구현예에 있어서, 기체상으로 존재하는 메탄의 농도는 15 내지 30(v/v)%이다. 메탄의 농도가 너무 높거나 낮으면 메틸로모나스 균주의 성장이 저하될 수 있고, 이에 따라 우라실 생산도 저하될 수 있다.

[0030] 단계 (b) : 상기 배양에 의해 생산된 우라실을 획득하는 단계

[0031] 본 발명의 단계 (b)에서의 우라실의 획득은, 메틸로모나스 속 균주의 고유 대사 경로에 따라 메탄으로부터 변환된 우라실을 균주 내 또는 균주를 배양한 배양액에 축적시켜 분석할 수 있고, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 배지는 2가 금속 이온을 추가적으로 포함한다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 2가 금속 이온은 Cu^{2+} 이다.

[0034] 상기 배지가 포함하는 Cu^{2+} 의 농도는 1 내지 30 μM 이다. Cu^{2+} 의 농도는 5 내지 10 μM 로 하는 것이 바람직하다. Cu^{2+} 의 농도가 10 μM 을 초과하는 경우, 메틸로모나스 균주 세포에 독성으로 작용할 수 있기 때문이다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 균주의 배양 온도는 25 내지 40℃이다. 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 균주의 배양 온도는 30 내지 38℃이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 메탄으로부터의 우라실 생산용 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) 균주(수탁번호 KFCC11685P)를 제공한다. 상기 메틸로모나스 속 균주는 SW1 균주이며, 하수처리장 오수에서 분리된 것이다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0038] 본 발명은 메탄을 탄소원으로 이용하여 우라실을 생산하는 메틸로모나스 속 균주를 제공한다.

[0039] 본 발명의 균주를 이용하면 메탄을 이용하여 상온, 상압 조건에서 우라실을 생산할 수 있으므로 이를 효과적으로 핵산 및 핵산 관련 물질의 생산에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 RuMP 사이클과 피리미딘 대사경로를 통한 메틸로모나스 속 균주의 우라실 합성 경로를 나타낸 모식도이

다.

도 2는 메틸로모나스 속 SW1 균주와 다른 메탄 영양세균들과의 관계를 보여주는 계통수를 나타낸 모식도이다.

도 3은 (A) 우라실 표준 용액 및 (B) 메틸로모나스 속 SW1 균주 배양액의 LC-MS/MS비교 결과를 나타낸다.

도 4는 (A) 우라실 표준 용액 및 (B) 메틸로모나스 속 SW1 균주 배양액 내 분자량이 111인 물질의 유사 프래그먼트 비교 분석 결과이다.

도 5는 (A) 배양액 내의 구리 이온 또는 (B)배양 온도가 메틸로모나스 속 SW1 균주의 성장과 우라실 생산에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 6은 시간에 따른 메틸로모나스 속 SW1 균주의 성장과 배양액 속 우라실의 농도의 증가를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예 1. 메틸로모나스 속 SW1 균주의 16S rRNA 유전자 시퀀스 분석

[0043] 메틸로모나스 속 SW1 균주의 16S rRNA 유전자 시퀀스 분석은 바이오팩트에 의뢰하여 27F, 1492R 프라이머를 이용하여 진행하였다. 두 프라이머를 통해 분석한 시퀀스들을 정렬한 결과는 하기 표 1의 서열목록 제 1 서열과 같다.

표 1

[0044]	서열목록 제 1 서열
	GTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTATCCTAGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAA GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTACACACGTGTACAAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGAAACCGTGAGGTC AAGCAAATCCCAAAAGCCGGTCCAGTCCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGAATGC CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGGT

[0045] NCBI의 16S rRNA 유전자 시퀀스 데이터베이스를 이용하여 관련 메탄 영양세균들과 메틸로모나스 속 SW1 균주의 16S rRNA 유전자 시퀀스 일치 정도를 분석한 결과, 메틸로모나스 코야마에(Methylomonas koyamae) 균주가 메틸로모나스 속 SW1 균주와 99.3%의 유전자 시퀀스 일치율을 보여 가장 가까운 균주임을 확인했다. 그 밖의 메틸로모나스 균주인 메틸로모나스 아우란티아(M. aurantiaca), 메틸로모나스 메타니카(M. methanica), 메틸로모나스 포디나룸(M. fodinarum)과는 각각 96.0%, 96.0%, 95.4%의 유전자 시퀀스 일치율을 보였다. 계통 분석을 통해 해당 분리 균주인 메틸로모나스 속 SW1 균주는 메틸로모나스 속에 속하는 균주임을 확인하였다(도 2).

[0046] 실시예 2. 메틸로모나스 속 SW1균주 배양액 내의 우라실 확인

[0047] 측정 자료를 제시하지는 않았지만 NMS(Nitrate Mineral Salts) 배양액 50 ml에 메틸로모나스 속 SW1 균주를 1(v/v)% 투입하여 30℃에서 72 h 배양한 후 HPLC를 이용해 배양액을 분석한 결과, 별도의 유전자 조작 없이도 우라실을 배양액으로 배출하는 것을 확인하였다.

[0048] 메틸로모나스 속 SW1 균주의 배양액을 컬럼(YMC pack ODS-AQ)이 장착된 LC-MS/MS(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry)에서 이동상 A(5 mM acetic acid in water)와 이동상 B(5 mM acetic acid in acetonitrile)를 사용해 이동상 B를 10분 동안 0%에서 100%까지 선형 구배(linear gradient)를 주면서 유속 0.25 ml/분 조건으로 분석했을 때 1.6분에서 분리되는 물질이 우라실임을 확인하였다(도 3).

[0049] 메틸로모나스 속 SW1 균주에 우라실이 포함되었는지의 여부는, 우라실 스탠다드 용액의 분석 결과와 구조적으로 유사한 프래그먼트(fragment)를 대조함으로써 판단하였다(도 4).

[0050] 실시예 3. 구리 이온이 메틸로모나스 속 SW1 균주의 성장과 우라실 생산에 미치는 영향의 확인

[0051] 구리 이온 농도를 0, 5, 10, 25 및 50 μ M로 달리하여 배양액 50 ml에 메틸로모나스 속 SW1 균주를 1(v/v)% 투입하여 30℃에서 72시간 동안 배양하면서 균주의 성장 정도와 배양액 속의 우라실의 농도를 측정하였다.

[0052] 구리 이온의 농도가 10 μ M일 때, 균주의 성장 정도와 배양액 속의 우라실의 농도가 가장 높았고, 최적 농도인

10 μM 를 초과하면 균주의 성장 정도와 배양액 속의 우라실의 농도가 모두 급격히 감소하였다(도 5A). 이것은 10 μM 을 초과하는 농도의 구리 이온이 메틸로모나스 속 SW1 균주 세포에 독성으로 작용함을 나타낸다.

[0053] **실시예 4. 배양 온도가 메틸로모나스 속 SW1 균주의 성장과 우라실 생산에 미치는 영향의 확인**

[0054] 온도를 20, 25, 30, 35 및 40℃로 달리하여 배양액 50 ml에 메틸로모나스 속 SW1 균주를 1(v/v)% 투입하여 72 시간 동안 배양하면서 균주의 성장과 배양액 속의 우라실의 농도를 측정하였다.

[0055] 온도별 배양 실험에서는 구리 이온 농도별 실험과는 달리 균주의 성장 정도와 배양액 속의 우라실 생산의 최적 농도가 일치하지 않았다. 균주의 성장 정도는 30℃에서 최적인 것으로 나타났고, 우라실 생산은 35℃에서 최적인 것으로 나타났다(도 5B). 이것은 균주의 성장과 우라실 생산에 관여하는 효소가 다르기 때문에, 최적의 효과를 나타내는 온도가 각각 다르게 나타나는 것이라고 판단할 수 있다.

[0056] **실시예 5. 메틸로모나스 속 SW1 균주를 이용한 우라실 생산의 확인**

[0057] 배양액 50 ml에 메틸로모나스 속 SW1 균주를 1(v/v)% 포함하는 플라스크를 캡(cap)을 이용하여 밀폐시킨 후, 헤드스페이스(headspace, 밀봉용기 내에 존재하는 상부의 공간부분)에서 20(v/v)%의 공기를 빼낸 뒤 그만큼의 메탄 가스를 탄소원으로서 주입하였다. 이후 메틸로모나스 속 SW1 균주를 30℃에서 96시간 동안 배양하며 균주의 성장 정도와 우라실의 농도를 측정하였다. 우라실의 농도는 메틸로모나스 속 SW1 균주가 성장하면서 점차 증가하였고, 96시간 배양 시점에서 2.54 mg/L 농도까지 증가하는 결과를 보였다(도 6).

[0058] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0059]

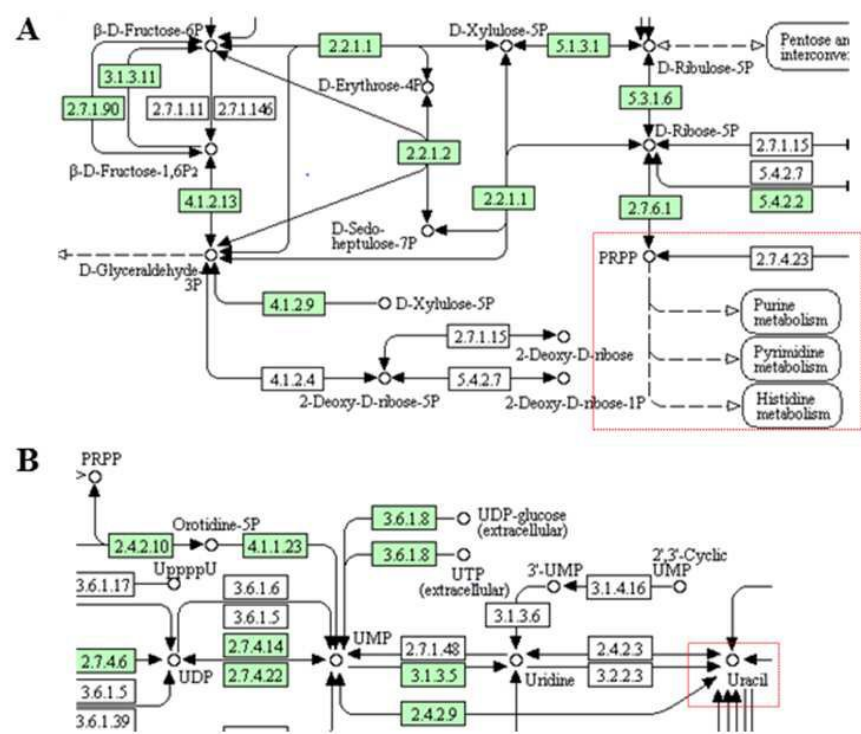
기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KFCC11685P

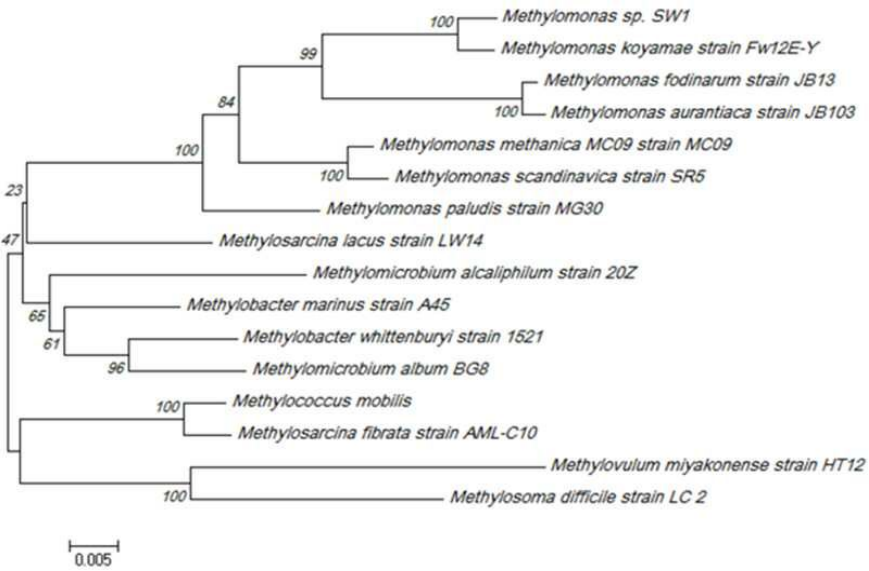
수탁일자 : 20160823

도면

도면1

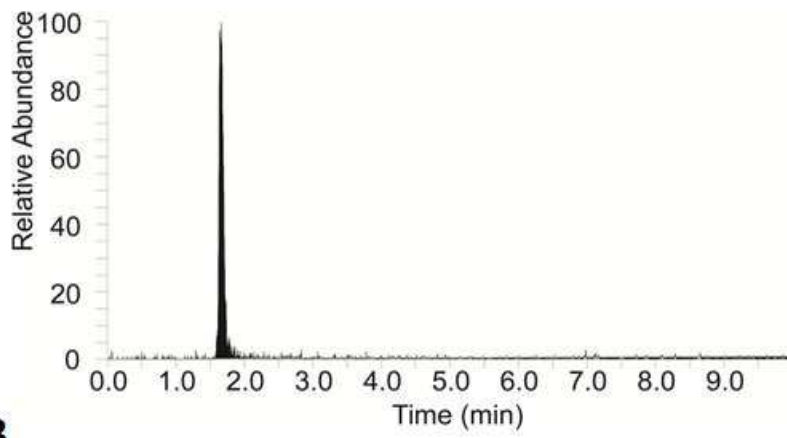


도면2

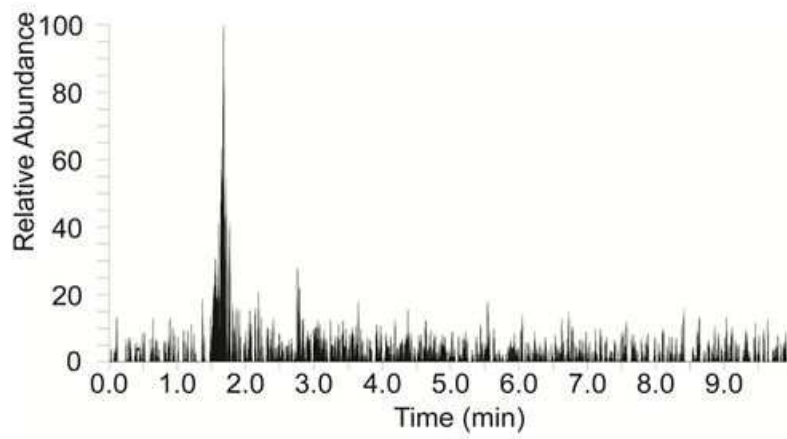


도면3

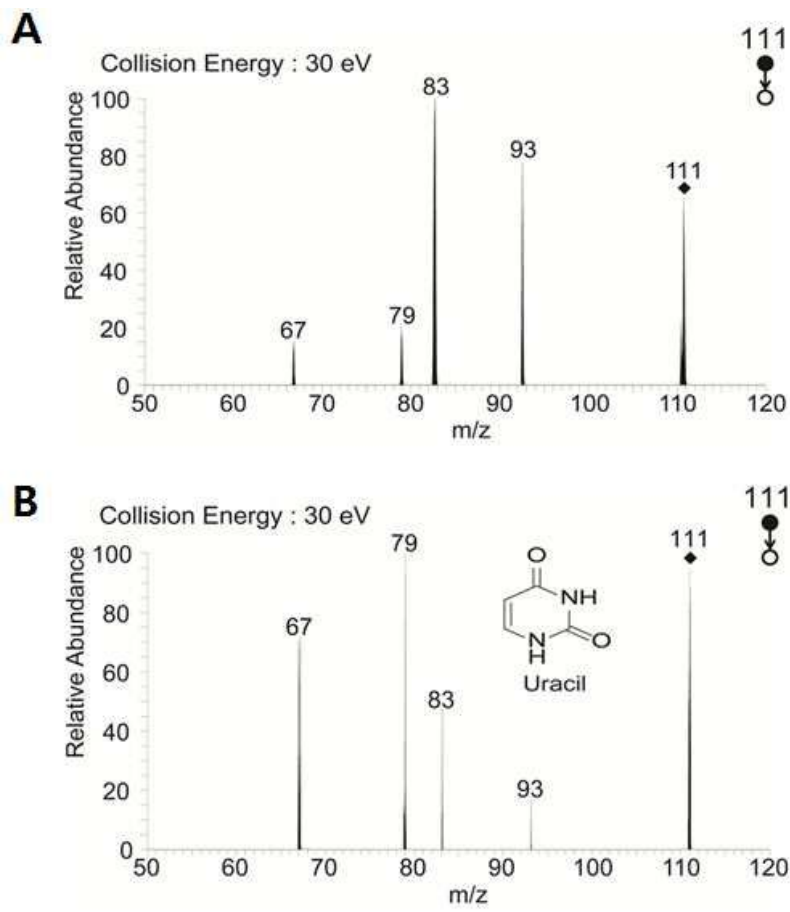
A



B

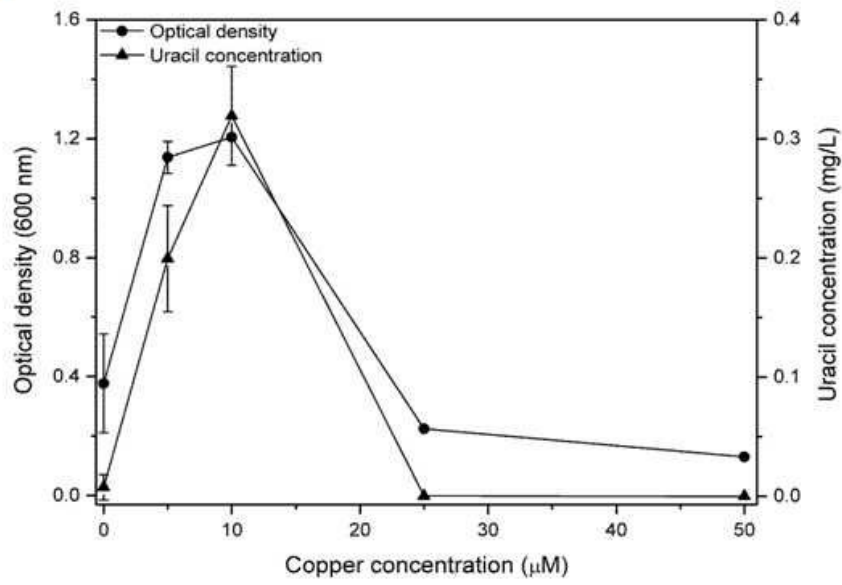


도면4

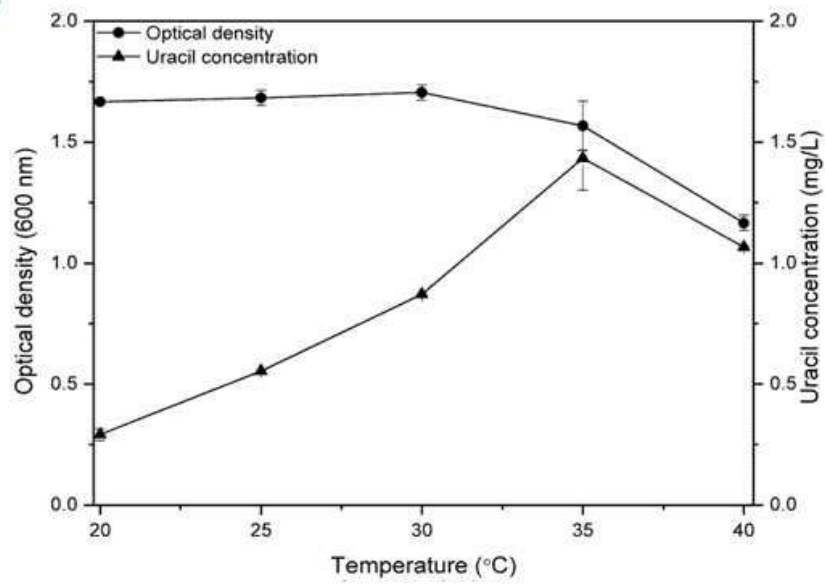


도면5

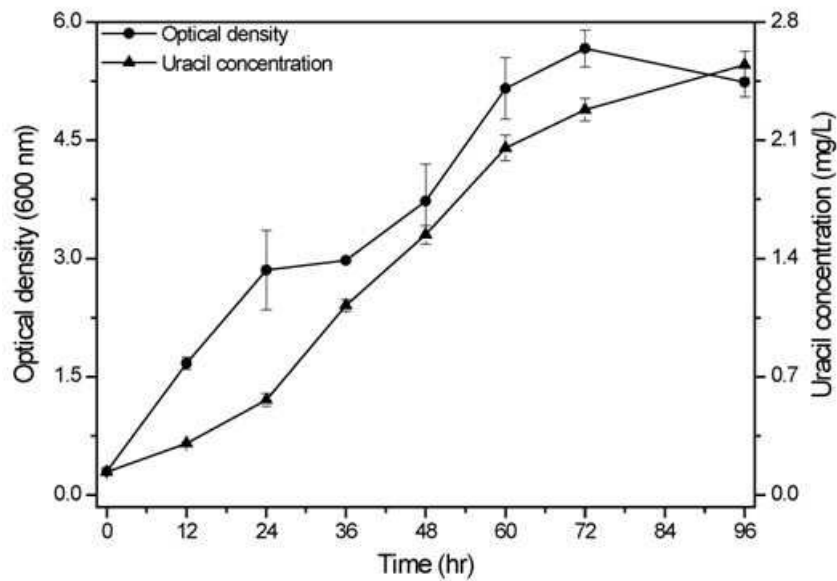
A



B



도면6



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Methylomonas sp. SW1 strain and method for producing uracil using the same
- <130> PN160273
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1378
- <212> DNA
- <213> Methylomonas sp.
- <400> 1

tgcagtcgaa cgctgataag gtgcttgac ctttgatgag tggcggacgg gtgagtaatg cataggaatc tgctattag tgggggacaa cgtggggaaa ctcacgctaa taccgcatac gatctacgga tgaaagccgg ggaccttcgg gcctggcgct aatagatgag cctatgtcgg	60 120 180
attagctagt tgggtgggta aaggcctacc aaggcgacga tccgtagctg gtctgagagg atgatcagcc aacttgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattggac aatggggcga agcctgatcc agcaataccg cgtgtgtgaa gaaggcctga gggttgtaaa gcactttcaa tgggaaggaa cacctatcgg ttaatacccg gtagactgac attacccata caagaagcac cggctaactc cgtgccagca gcccggttaa tacggagggt gcaagcgta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgta ggcggtgatt taagtcagat	240 300 360 420 480 540

gtgaaagccc cgggcttaac ctgggaactg catttgatac tgggtcacta gagttgagta	600
gaggagagtg gaatttcagg tgtagcgggtg aaatgcgtag agatctgaag gaacaccagt	660
ggcgaaggcg gctctctgga ctcaaaactga cgtgaggta cgaaagcgtg ggtagcaaac	720
aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgtc aactaactgt tgggttctta	780
aagaacttag tagtggagct aacgtattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg	840
ctaaaactca aatgaattga cgggggcccgc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg	900
atgcaacgcg aagaacctta cctacccttg acatcctcgg aacttgtcag agatgacttg	960
gtgccttcgg gaaccgagag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gttgtgaaat	1020
gttgggttaa gtcccgtaac gagcgcaacc cttatcctta gttgccagcg agtaatgtcg	1080
ggaactctag ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac	1140
catggccctt atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaga gggctgcgaa	1200
accgtgaggt caagcaaata ccacaaagcc ggtcccagtc cggattgcag tctgcaactc	1260
gactgcatga agtcggaata gctagtaata gcggatcaga atgccgcggt gaatacgttc	1320
ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtgg gttgcaaaag aagtaggt	1378