

(11) 공개번호 10-2024-0110177
(43) 공개일자 2024년07월15일

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동
402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

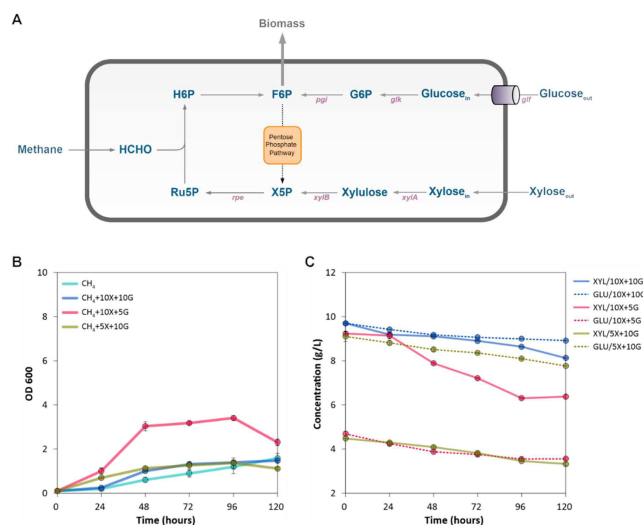
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 형질전환 메탄자화균은 메탄자화균 내 리그노셀룰로오스 유래 당 대사 경로를 도입하여 탄소원으로 메탄, 자일로스, 글루코스를 공동 기질로 활용하여 성장 속도를 향상시켜, 대사산물인 엑토인의 생산성을 현저히 증가시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/38 (2013.01)
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/92 (2013.01)
C12P 17/12 (2013.01)
C12Y 207/01002 (2013.01)
C12Y 503/01009 (2013.01)

팜능옥딕

경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 17, 4동

(72) 발명자

현승운

경기도 수원시 영통구 반달로 50, 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157126
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	기획재정부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 군주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (glf), 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자 (glk) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)를 포함하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 숙주세포의 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (glf), 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자 (glk) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)를 증폭시키는 것을 특징으로 하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터.

청구항 6

제1항의 재조합 벡터가 도입된, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속 (Methylomonas), 메틸로박터 속 (Methylobacter), 메틸로코커스 속 (Methylococcus), 메틸로스페라 속 (Methylosphaera), 메틸로칼덤 속 (Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 엑토인 (ectoin) 생산용 메탄자화균.

(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속 (Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속 (Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속 (Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속 (Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속 (Methylovulum), 메틸로마리노범 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속 (Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속 (Methylocella), 메틸로캡사 속 (Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속 (Methyloferula), 메틸아시디필럼 속 (Methylacidiphilum), 메틸아시디마이크로비움 속 (Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로비움 속 (Methylomicrobium) 또는 메틸로시너스 속 (Methylosinus) 균주인, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 메틸아시디마이크로비움 속 균주는 메틸아시디마이크로비움 알칼리필리움 (Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z인, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 형질전환 메탄자화균은 메탄, 자일로스 및 글루코스를 탄소원으로 이용하는 것을 특징으로 하는, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 형질전환 메탄자화균은 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD) 또는 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)가 결실 (deletion) 또는 적중 (knockout)된 것을 특징으로 하는, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD)는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 13

제6항 내지 제12항중 어느 한 항의 형질전환 메탄자화균 또는 이의 배양액을 포함하는, 엑토인 생산용 조성물.

청구항 14

메탄, 자일로스와 글루코스를 포함하는 배지에서 제1항의 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 엑토인 생산방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 배지는 텅스텐을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 엑토인 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 메탄자화균 내 자일로스, 글루코스 대사 경로를 도입하여 유전자 조작을 통해 C₁ 기질과 리그노셀룰로오스 유래 당의 공동 활용하는 형질전환 메탄자화균을 제작하여 부가가치 산물인 엑토인의 생산성을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 메탄영양생물은 온실가스인 메탄을 생물학적으로 제거할 수 있는 하나의 전략이다. 그러나 메탄에서 메탄영양체의 성장률은 기존 미생물에 비해 상대적으로 낮아 원하는 목적 산물 생산성이 낮다. 메탄영양생물의 느린 성장에 대한 이유는 MMO (메탄산화효소)의 낮은 활성과 물에서의 메탄과 산소의 낮은 용해도로 인한 낮은 mass-transfer 때문이다. 따라서 물에 잘 녹는 추가 탄소원을 사용하는 것은 메탄자화균의 성장을 향상시킬 수 있다.
- [0003] 재생 가능하고 식량 수급 이슈가 없는 목질계 바이오매스는 산업바이오회를 위한 중요한 탄소원이며, 목질계 바이오매스는 60~90%의 탄수화물 (셀룰로오스, 헤미셀룰로오스)과 10~40 %의 리그닌으로 구성되어 있다. 여기서 포도당 (글루코스)은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 단량체이다. 자일로는 헤미셀룰로오스 가수분해의 주요 생성물 중 하나이다. 따라서 메탄자화균에 의한 메탄과 더불어 글루코스와 자일로의 효율적인 공동 활용 및 부가가치 산물로의 전환은 유망한 전략이다.
- [0004] Xylose isomerase (xylA)는 xylose를 xylulose로 전환하고, xylulose kinase (xylB)에 의해 xylulose 5-phosphate (X5P)로 전환된다. Xylose 대사를 강화하기 위해 X5P를 ribulose 5-phosphate (Ru5P)로 전환하는 내인성 ribulose-phosphate 3-epimerase (rpe)를 xylA 및 xylB 유전자와 함께 *M. alcaliphilum* 20Z에 도입하여 자일로를 활용할 수 있는 균주 *M. alcaliphilum* 20Z^X를 이전 발명에서 개발하였다.
- [0005] *M. alcaliphilum* 20Z는 자연적으로 포도당을 탄소원으로 사용할 수 없기 때문에 *Zymomonas mobilis*의 glucose facilitator (glf), *M. alcaliphilum* 20Z의 endogenous glucokinase (glk) 및 *E. coli* 유래 glucose 6-phosphate isomerase (pgi)로 구성된 글루코스 이용 경로를 *M. alcaliphilum* 20Z^X에 발현하였다. 이렇게 만들어진 유전자 재조합 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}는 메탄, 자일로스, 글루코스 세 가지 기질에서 성장할 수 있다.
- [0006] 엑토인 (Ectoine)은 호염성 미생물에 의해 생성되는 천연 삼투 보호제 (osmoprotectant)이고, 이 산물은 생명공학, 화장품 및 의약에 널리 사용되고 있다. 본 발명에서는 메탄을 포함한 세 가지 기질에서 성장할 수 있는 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}를 이용하여 엑토인의 생합성을 시도하였고, 엑토인의 생산성을 향상시키기 위해 대사 공학적 균주 개량을 수행하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (glf), 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자 (glk) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)를 포함하는 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터를 제공하는 데

있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 엑토인 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 메탄, 자일로스와 글루코스를 포함하는 배지에서 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는 엑토인 생산방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (glf), 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자 (glk) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)를 포함하는 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 이어서, 본 발명은 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

[0015] 나아가, 본 발명은 상기 형질전환 메탄자화균을 포함하는 엑토인 생산용 조성물을 제공한다.

[0016] 더불어, 본 발명은 메탄, 자일로스와 글루코스를 포함하는 배지에서 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는 엑토인 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 형질전환 메탄자화균은 메탄자화균 내 리그노셀룰로오스 유래 당 대사 경로를 도입하여 탄소원으로 메탄, 자일로스, 글루코스를 공동 기질로 활용하여 성장 속도를 향상시켜, 대사산물인 엑토인의 생산성을 현저히 증가시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 일실시예에 있어서, 메탄자화균 *M. alcaliphilum* 20Z의 글루코스와 자일로스의 대사 경로 (A), 기질별 20ZXG의 성장 곡선 (B), 자일로스 글루코스 농도 비교 (C)를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 있어서, 텅스텐을 추가한 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}의 기질별 성장 곡선 비교 (A), 자일로스와 글루코스 잔류 농도 비교 (B)를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 있어서, 적응 진화시킨 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}의 세포 성장곡선 비교 (A), 자일로스와 글루코스 소모 속도 비교 (B)를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 있어서, *M. alcaliphilum* 20Z에서 아스파르트산과 엑토인의 대사 경로 (A), MXGW0-3의 메탄과 세 가지 공동 기질에서의 성장 곡선 비교 (B), 엑토인 수율 비교 (C)를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 있어서, ectD, ectR1 또는 doeA 유전자가 결손된 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}의 성장곡선 비교 (A), 엑토인 수율 비교 (B), hydroxyectoine 수율 비교 (C)를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 있어서, 세 가지의 기질에서 텅스텐과 같이 배양한 20Z^{XG}/△ectR의 질산염 1 g/L 조건에서의 성장 곡선 (A), ectoine 수율 (B), hydroxyectoine 수율 (C), 0.1 g/L 암모늄염과 질산염 1 g/L의 조건에서의 성장 곡선 (D), ectoine 수율 (E), hydroxyectoine 수율 (F)를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 자일로스를 공동 탄소원으로 사용할 수 있는 형질전환된 *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z 속주를 사용하였으며, *Zymomonas mobilis* 유래의 glf, *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z 유래의 glk 및 대

장균 유래의 *pgi* 유전자를 발현시킴으로써 메탄, 자일로스, 글루코스를 활용할 수 있는 능력과 함께 엑토인을 성공적으로 다량 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0022] 본 발명의 형질전환 메탄자화균에 의해 생성된 엑토인의 생산성은 37.93 ± 3.27 mg/g-DCW에 도달하였으며, 이는 야생형보다 2.3배 더 높음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0027] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (*glf*), 글루코키나아제 (*glucokinase*)를 코딩하는 유전자 (*glk*) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (*glucose-6-phosphate isomerase*)를 코딩하는 유전자 (*pgi*)를 포함하는 엑토인 (ectoin) 생산용 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0030] 상기 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (*glf*)는 *Zymomonas mobilis* 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 포도당 촉진 확산 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0031] 상기 글루코키나아제 (*glucokinase*)를 코딩하는 유전자 (*glk*)는 *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 2의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 글루코키나아제 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0032] 상기 포도당 6-인산 이성질화효소 (*glucose-6-phosphate isomerase*)를 코딩하는 유전자 (*pgi*)는 *Escherichia coli* 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 포도당 6-인산 이성질화효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 재조합 벡터는 외래유전자인 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (*glf*) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (*glucose-6-phosphate isomerase*)를 코딩하는 유전자 (*pgi*)를 발현시키고, 글루코키나아제 (*glucokinase*)를 코딩하는 유전자 (*glk*)를 과발현시키는 것일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (*glf*), 글루코키나아제 (*glucokinase*)를 코딩하는 유전자 (*glk*) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (*glucose-6-phosphate*

isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)의 삽입 위치는 상기 유전자들을 증폭시키기 위해서 숙주세포 내 어디든 삽입될 수 있으며 특별히 제한되지는 않는다.

[0035] 또한, 상기 재조합 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA, 재조합 바이러스성 벡터 등 숙주세포에 도입되어 표적 유전자를 전달할 수 있는 것이라면 제한되지 않고 포함할 수 있다. 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 일 측면에서, 본 발명은 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균에 관한 것이다.

[0038] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 포도당 촉진 확산 단백질 (glucose facilitated diffusion protein)를 코딩하는 유전자 (glf), 글루코키나아제 (glucokinase)를 코딩하는 유전자 (glk) 및 포도당 6-인산 이성질화효소 (glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자 (pgi)를 과발현하는 것일 수 있다.

[0039] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD) 또는 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)가 결실 (deletion) 또는 적중 (knockout)된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD)는 구체적으로 서열번호 4의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 4의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 4의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 엑토인 디옥시제나아제 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0041] 상기 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)는 구체적으로 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 5의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 MarR 패밀리 전사조절자를 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 결실 (deletion) 또는 적중 (knockout)은 당업계의 알려진 통상의 방법으로 수행되는 것일 수 있으며, 예를 들면 세균 내 염색체 삽입용 선형 유전자를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다.

[0043] 본 발명에 일 실시예에 있어서, 상기 적중(knockout)은 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD) 또는 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)의 상류 (upstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트, 하류 (downstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 포함하는 적중(knockout)용 재조합 벡터에 의해 되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 또한, 상기 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD)의 상류 (upstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 8 및 9의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 또한, 상기 엑토인 디옥시제나아제 (ectoine dioxygenase)를 코딩하는 유전자 (ectD)의 하류 (downstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 10 및 11의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 상기 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)의 상류 (upstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 12 및 13의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 또한, 상기 MarR 패밀리 전사조절자 (Transcriptional regulator MarR family)를 코딩하는 유전자 (ectR1)의 하류 (downstream) 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 14 및 15의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 상기 적중(knockout)용 재조합 벡터는 제오신 (zeocin)을 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0049] 또한, 상기 제오신 (zeocin)을 코딩하는 유전자는 구체적으로 서열번호 7의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 7의 서열과 보다 구체적으로, 상기 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 MarR 패밀리의 전사조절자를 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0050] 상기 언급한 각각의 효소 또는 단백질은 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는 한, 각 효소 또는 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 각 효소 또는 단백질의 활성을 나타내는 한, 상기 각 효소 또는 단백질의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로, 실질적으로 각 효소 또는 단백질과 동일하거나 상응하는 활성을 가지는 아미노산 서열의 경우도 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 형질전환 메탄자화균은 메탄, 자일로스를 및 글루코스를 탄소원으로 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서 용어 "메탄자화균 (methanotroph)"은 메탄을 주요 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다. 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 본 발명의 목적상 메탄, 글루코스, 자일로스를 탄소원으로 사용하여, 최종적으로 엑토인을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 상기 메탄자화균은 메탄 등 C₁화합물을 에너지원으로 사용할 수 있는 것이면 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로모나스 속 (*Methylomonas*), 메틸로박터속 (*Methylobacter*), 메틸로코커스 속 (*Methylococcus*), 메틸로스페라속 (*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속 (*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속 (*Methyloglobus*), 메틸로사르시나속 (*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속 (*Methyloprofundus*), 메틸로셀머스 속 (*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속 (*Methylohalobius*), 메틸로게아 속 (*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속 (*Methylomarinum*), 메틸로벨럼 속 (*Methylovulum*), 메틸로마리노뎀 속 (*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속 (*Methylo rubrum*), 메틸로파라코커스 속 (*Methyloparacoccus*), 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*), 메틸로셀라 속 (*Methylocella*), 메틸로캡사 속 (*Methylocapsa*), 메틸로페룰라 속 (*Methyloferula*), 메틸아시디필럼 속 (*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로븀 속 (*Methylacidimicrobium*), 메틸로마이크로븀 (*Methylomicrobium*) 속 또는 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*) 균주 일 수 있으며, 바람직하게는 메틸로마이크로븀 (*Methylomicrobium*) 속 균주일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메틸로마이크로븀 알칼리필리움 (*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 사용되는 용어 “형질전환”은 미생물이 외부로부터 주어진 DNA를 받아들여 미생물의 유전적 성질이 변하는 것을 의미한다.
- [0055] 또한, 상기 형질전환은 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술, 예를 들어, 전기천공법 (electroporation), 전기주입법 (electroinjection), 미세주입법 (microinjection), 인산칼슘공동-침전법 (calcium phosphate co-precipitation), 염화칼슘/염화루비듐법, 레트로바이러스 감염 (retroviral infection), DEAE-덱스트란 (DEAE-dextran), 양이온 리포솜 (cationic liposome)법, 폴리에틸렌 글리콜 침전법 (polyethylene glycol-mediated uptake), 유전자총 (gene gun) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에서 사용되는 용어 "형질전환 메탄자화균"은 상기 메탄자화균의 유전자를 도입하거나 또는 제거하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다.
- [0058] 일 측면에서, 본 발명은 상기 형질전환 메탄자화균 또는 이의 배양액을 포함하는 엑토인 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 엑토인 생산용 조성물은 상술한 형질전환 메탄자화균을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 형질전환 메탄자화균과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0060] 본 발명에서 사용되는 용어 “조성물”은 목적 물질을 생산하기 위한 다양한 물질을 혼합한 것으로서, 미생물

배양배지, 탄소원, 미량 원소 및 미생물 종균이 포함된 것을 의미한다.

- [0062] 일 측면에서, 본 발명은 메탄, 자일로스 및 글루코스를 포함하는 배지에서 상기 재조합 벡터가 도입된 엑토인 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는 엑토인 생산방법에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나뉠 수 있다. 본 발명의 형질전환 메탄자화균의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0064] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환 메탄자화균으로부터 엑토인을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입배치 또는 반복 주입 배치 공정 (fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다. 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 적절히 조절한 배지를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 형질전환 메탄자화균의 배양 온도는 15℃ 내지 45℃, 구체적으로 20℃ 내지 40℃, 보다 구체적으로 25℃ 내지 35℃일 수 있으며, 메탄과 균주의 원활한 접촉을 위해, 150rpm 내지 300rpm, 구체적으로 180rpm 내지 270rpm, 보다 구체적으로 200rpm 내지 250rpm으로 교반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 또한, 상기 방법은 상기 형질전환 메탄자화균을 메탄, 자일로스 및 글루코스, 바람직하게는 40 내지 60% (v/v) 메탄 (CH₄) 조건에서 자일로스 8 내지 12 g/L 및 글루코스 3 내지 7 g/L를 포함하는 배양액에 배양하는 것일 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 배양액은 텅스텐, 바람직하게는 텅스텐 1 내지 10 μM, 더욱 바람직하게는 3 내지 7 μM을 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 또한, 상기 생산방법은 배양액으로부터 엑토인을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 엑토인을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 엑토인 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해 (예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피 (예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.
- [0069] 일 측면에서, 본 발명은 상기 엑토인 생산용 조성물을 포함하는 엑토인 생산용 키트에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명의 엑토인 생산용 키트는 상기 조성물을 포함하여 엑토인을 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 엑토인 생산에 사용되는 완충액, 상기 엑토인 생산을 수행하기 위한 반응용기, 상기 엑토인 생산을 수행하기 위한 진탕배양기, 상기 엑토인 생산 반응을 수행하기 위한 타이머 등을 포함할 수 있다.
- [0072] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.
- [0074] <실시예 1> 균주의 준비 및 배양 조건
- [0075] *M. alcaliphilum* 20Z^{xc}를 50 μg/ml의 카나마이신 (kanamycin) 10 μg/ml의 겐타마이신 (gentamicin) 및 50 μg/ml의 제오신 (zeocin)을 포함하는 항생제가 보충된 50 ml의 질산 미네랄염 배지 (nitrate mineral salts medium; NMS)에서 배양 하였다. 플라스크 내 공기 중 50 % 메탄 조건에서 스크류캡으로 밀봉된 500 ml 플라스크에서 배양 조건을 30 °C 및 230 rpm으로 설정하였다. 추가 조건으로 메탄에서만 배양하거나 자일로스, 글루코스를 각각 5, 10 g/L 추가한 세 가지 기질에서 배양하였다. 배양 플라스크 내 공기를 매일 새로 교체해 주었다.

[0076] 본 발명에서 사용된 형질전환 메탄자화균은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0078]

균주	특징
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^x	자일로스를 이용한 <i>Methylovumicrobium alcaliphilum</i> 20Z 균주
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z ^{xg}	pFK-PGI를 포함한 <i>Methylovumicrobium alcaliphilum</i> 20Z ^x 균주
MXGW-1	텃스텐과 3가지 기질을 포함한 배지에서 배양한 20Z ^{xg}
MXGW-3	텃스텐과 3가지 기질을 포함한 배지에서 세 번째로 계대 배양한 20Z ^{xg}
MXGW-10	텃스텐과 3가지 기질을 포함한 배지에서 열 번째로 계대 배양한 20Z ^{xg}
20Z ^{xg} /△ectD	유전자 ectD가 결손된 MXGW-3 균주
20Z ^{xg} /△doeA	유전자 doeA가 결손된 MXGW-3 균주
20Z ^{xg} /△ectR	유전자 ectR1가 결손된 MXGW-3 균주

[0080] <실시예 2> DNA 플라스미드 구축

[0081] 2-1. *M. alcaliphilum* 20Z^{xg} 제작용 재조합 벡터 제작

[0082] 먼저, 유전자 glf (서열번호 1), glk (서열번호 2), pgi (서열번호 3)를 *Zymomonas mobilis*, *Methylovumicrobium alcaliphilum* 20Z 그리고 *Escherichia coli* K12-MG1655에서 각각 증폭시킨다. inverse pcr을 이용하여 선형 pAWP89를 만들고, Gibson Assembly를 이용하여 선형 pAWP89와 *Zymomonas mobilis* 유래 glf 유전자 및 *Methylovumicrobium alcaliphilum* 20Z 유래 glk 유전자를 결합하여 pFK 플라스미드를 생성하였다. 이어서, BamHI 절단부위에서 *Escherichia coli* K12-Mg1655 유래 pgi 유전자를 결합하여 pFK-PGI 플라스미드를 생성하였다. 플라스미드 pAWP89는 Addgene에 의해 제공되었다. 또한, 모든 벡터는 Gibson Assembly를 사용하여 구성되었다.

[0083] 실시예 2-1에서 사용된 벡터, 유전자 염기서열, 플라스미드 구축에 사용된 프라이머 서열은 각각 하기 표 2, 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 2

[0085]

플라스미드	특징
pFK-PGI	pAWP89-Ptac::glf (Zm)-glk (20Z)-pgi (Ec)

표 3

[0087]

유전자	염기서열
glf (<i>Z. mobilis</i>)	ATGAGTTCTGAAAGTAGTCAGGGTCTAGTCACGCGACTAGCCCTAATCGTGCTATAGCGGGCTTGCTTT TCGGTTACGATTACGCGGTATCGCTGCAATCGGTACACCGGTTGATATCCATTTTATTGCCCTCGTCA CCTGCTGCTACGGCTGCGGCTTCCCTTTCTGGGATGGTCGTTGTTGCTGTTTTGGTCGGTTGTTTACC GGTCTTTGCTGCTGGCTGGATTGGTATTCGCTTCGGTCGTCGCGCGGATTGTTGATGAGTCCATTT GTTTCGTCGCGCGCGGTTTTGGTGCTGCGTTAACCGAAAAATATTGGAACCGGTGGTTCCGGCTTACA AATTTTTTGCTTTTTCCGGTTTCTGCGGTTTAGGTATCGGTGTCGTTTCAACCTTGACCCCAACCTAT ATTGCTGAAATTGCTCCGCCAGACAAACGTGGTCAGATGGTTTCTGGTCAGCAGATGGCCATTGTGACGG GTGCTTTAACCGGTTATATCTTTACCTGGTTACTGGCTCATTTCCGGTTCTATCGAATGGGTTAATGCCAG TGGTTGGTGCTGGTCTCCGGCTTCAGAAGGCTGATCGGTATTGCCTTCTTATTGCTGCTGTTAACCGCA CCGATACGCCGATTGGTTGGTGATGAAGGGACGTCATTCGAGGCTAGCAAAATCCTTGCTCGTCTGG AACCGCAAGCCGATCCTAATCTGACGATTCAAAGATTAAAGCTGGCTTTGATAAAGCCATGGACAAAAG CAGCGCAGGTTGTTTGGCTTTTGGTATCACCGTTGTTTTGCGGGGATCCGTTGCTGCTTCCAGCAG TTGGTCGGTATTAACGCCGTGCTGATTATGCACCGCAGATGTTCCAGAATTTAGGTTTTGGAGCTGATA CGCATTATTGCAGACCATCTCTATCGGTGTTGTGAACCTCATCTCACCATGATTGCTTCCCGTGTGTTG TGACCGCTTCGGCCGTAAACCTTGTCTTATTTGGGGTGCTCTCGGTATGGCTGCAATGGCTGTTTTTA GGCTGCTGTTTTCTGGTTCAAAGTCGGTGGTGTGTTTGCCTTTGGCTTCTGTGCTTCTTTATATTGCAGTCT TTGGCATGTCATGGGGCCCTGTCTGCTGGGTTGTTCTGTCAGAAATGTTCCCGAGTCCATCAAGGCGC AGCTATGCCTATCGCTGTTACCGGACAATGGTAGTAATATCTTGGTTAACTTCTGTTTAAAGTTGCT GATGGTTCTCCAGCATTGAATCAGACTTCAACACCGTTTTCTCTATCTCGTTTTCCGAGCATTAAGTA TCTTAGTGGCTTGATTGTTGCTCGCTTCGTGCCGAAACCAAGGTCGGAGCCTGGATGAAATCGAGGA GATGTGGCGCTCCAGAAGTAG
glk (<i>M. alcaliphilum</i> 20Z)	ATGATTCTGGCAGGCGATATCGGAGGGACCAAAACGACCTTGGCATTATTGAGCAAGAATGAACACGGCT TGATTACGTTGCAACAAGAACAACCTTCAGCAGCGTTGAATTTCCAGAGTTCGATGAGGTATTAGATAA ATTCTTACCGGCGGGCGTGAAGGTCGATTTCGGCTGTTTCGGCGTCGAGGGCCGGTTATTGAGCAGCGC TGCAGCCGACCAATCTGCCCTGGCACTCGATGCTAAGGCACTGAAAAAACCTTACGCACCGATCGAG TAGCCTTATTAACGATTGGAAGCGATGGCGCTCGCATGCTGTGCTGGACGAAAAAGATTGGGTGGA ATTGAACCTAACGCCAAATCGCAAGCCGGAATATGGCCGTGATTGCAGCGGGAACAGGTCTCGGTGAA GCAATATTGTATTGGGACGGAGCGGCCATCATCCGATAGCGACCGAGGGCGGTTCATTGCGACTTTGCCG CGCAAACCGTTCAGCAAGATCAGCTCTCGAATTTCTGAGAAAAAATAAACGGGCATGTGAGTTTCGA ACGGCTCGTTTCAGGCATGGGGTTCGGCAATATTTATGACTTTTGGTCGAAAAACCGTTTCGCTCCTGCT TGTCAGCGGTTCTGACTGTGCTATCCGAGTGTCTACGGCTGCGATCGTAATGCGATTATTTCAAGAT TAGGCATCAACGGCGAAGATCCCTTATGTACCGAAACCATCCGATTTTATAGAGCTTTACGGTGCCGA AGCCGGTAATCTGGCCTTGAAGTCAATTCGCGACCGGCGGGGTTTTATCGGGGAGGCATTGTTCCAAAA ATTGATCGGTATTGGAGTGGGCAAGTTATCGAAGCATTTAAAGCCAAGGGCCGTTTCAGCGGTTTTTC TAGATACCGTGTCCGTAATAATATCGCTGAATCCGCGTACCCCGCTGATGGGGCGCATCAGTTATTTCCG CTGA
pgi (<i>E. coli</i>)	ATGAAAAACATCAATCCAACGCAGACCGCTGCCTGGCAGGCACTACAGAAACACTTCGATGAAATGAAAG ACGTTACGATCGCCGATCTTTTGGCTAAAGACGGCGATCGTTTTTCTAAGTTCTCCGCAACCTTCGACGA TCAGATGCTGGTGGATTACTCCAAAAACCGCATCACTGAAGAGACGCTGGCGAAATTACAGGATCTGGCG AAAGAGTGCATCTGGCGGGCGGATTAAAGTCGATGTTCTCTGGCGAGAAGATCAACCGCACTGAAACCC GCGCCGTGCTGCACGTAGCGCTGCGTAACCGTAGCAATACCCGATTTTGGTTGATGGCAAAGACGTAAT GCCGGAAGTCAACGCGGTGCTGGAGAAGATGAAAACCTTCTCAGAAAGCGATTATTTCCGGTGAGTGGAAA GGTTATACCGGCAAAGCAATCACTGACGTAGTGAACATCGGGATCGGCGGTTCTGACCTCGGCCATACA TGGTGACCGAAGCTCTGCGTCCGTACAAAAACCACTGAACATGCATTTGTTTCTAACGTCGATGGGAC TCACATCGCGGAAGTCTGAAAAAAGTAAACCCGGAACCAACGCTGTTCTTGGTAGCATCTAAAACCTTC ACCACTCAGGAACTATGACCAACGCCCATAGCGCGGTGACTGGTTCTGAAAGCGCGAGGTGATGAAA AACACGTTGCAAACACTTTGCGGCGCTTCCACCAATGCCAAAGCCGTTGGCGAGTTTGGTATTGATAC TGCCAACATGTTGAGTTCTGGGACTGGGTTGGCGGCGGTTACTCTTTGTGGTCAGCGATTGGCCTGTG ATTGTTCTCTCATCGGCTTTGATAACTTCGTTGAAGTGTCTCCGCGCACACGCGATGGACAAGCATT TCTCCACACGCTGCGGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGCGCTGATTGGCATCTGGTACAACAATTT CTTTGGTGCGGAACTGAAGCGATTCTGCCGTATGACCAGTATATGCACCGTTTCGCGGCGTACTTCCAG CAGGGCAATATGGAGTCCAACGGTAAGTATGTTGACCGTAACGGTAACGTTGTTGATTACAGACTGGCC CGATTATCTGGGGTGAACAGGCACTAACGGTCAGCACGCGTTCTACCAGCTGATCCACCAGGGAACCAA AATGGTACCGTGCATTTCATCGCTCCGGCTATCACCCATAACCCGCTCTCTGATCATCACAGAACTG CTGTCTAACTTCTTCCGCCAGACCGAAGCGCTGGCGTTTGGTAAATCCCGCAAGTGGTTGAGCAGGAAT ATCGTGATCAGGGTAAAGATCCGGCAACGCTTGACTACGTGGTGGCGTTCAAAGTATTGCAAGGTAACCG CCCGACCAACTCCATCTGCTGCGTGAATCACTCCGTTACGCTGGGTGCGTTGATTGCGCTGTATGAG CACAAAATCTTACTCAGGGCGTGATCTGAACATCTTACCTTCGACCAGTGGGGCGTGGAAGTGGGTGA AACAGCTGGCGAACCCTATTCTGCCAGAGCTGAAAGATGATAAAGAAATCAGCAGCCACGATAGCTCGAC CAATGGTCTGATTAAACCGCTATAAGCGTGCGCGGTTAA

표 4

[0089]

프라이머	염기서열 (5' -3')	특징
pAWP89_FW	TAGTTGTCGGGAAGATGCG	P _{lac} 이 포함된 pAWP89 backbone의 증폭을 위한 프라이머
pAWP89_RV	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA	
glf_FW	TTCACACAGGAAACAGCTATGAGTTCTGAAAGTAGTCAGG	<i>Zymomonas mobilis</i> 유래의 glf 유전자 증폭을 위한 프라이머
glf_RV	TTTTGTTTGCTTCTGGGAGCGCCACATCT	
glk_FW	CTCCCAGAAGCAAACAAAACAAGGAGATTCAC	<i>Methylovibrio mobilis</i> 유래의 glk 유전자 증폭을 위한 프라이머
glk_RV	GCATCTTCCCGACAACCTAGTGGATCCCTCAGCCGAAATAACTGA	
pgi_FW	AGTTATTTCGGCTGAGGGCAGCAGATCCGGGTCAAATCATAACATT CATGAAAAACATCAATCCAAC	대장균 유래의 pgi 유전자 증폭을 위한 프라이머
pgi_RV	ATCTTCCCGACAACCTAGTGTAAACCGCGCCACGCTTT	

[0091]

2-2. 유전자 녹아웃 (knockout)을 위한 재조합 벡터 제작

[0092]

20Z^Δ/ectD, 20Z^Δ/ectR, 20Z^Δ/doeA 제작을 위해 아래 방식으로 DNA를 제작하였다. *Methylovibrio mobilis* 20Z의 ectD (서열번호 4), ectR1 (서열번호 5), doeA (서열번호 6)의 주변에 각각의 F1, F2 primer를 이용하여 F1, F2 DNA 단편을 만들었고, 이전에 연구실에서 만든 제오신 (zeocin) 유전자(서열번호 7)가 포함된 pCM433에서 제오신 DNA 단편을 만들었다. 마지막으로 Gibson assembly를 이용하여 F1, F2, 제오신 DNA 단편을 조합하여 유전자 결손 (knockout)용 선형 DNA 단편을 재조합하였다.

[0093]

실시에 2-2에서 사용된 유전자 염기서열 및 유전자 결손에 사용된 플라스미드의 프라이머 서열은 하기 표 5 및 표 6에 나타내었다.

표 5

[0095]

유전자	염기서열
ectD	ATGATTACCGAGAATGCCGCACAGTCCGAACAAAGTGAAGATTTTATCAATCACGTAACGGTAGTAAGCCGAAA ATAATTCCGCGCTAGACCGGTAGTTTATGCGCAACAGCTAATCCAGGTCTCATTGCAGAGGACTTGAAGCA CGTTATGAGCAACAAGGTTTCTTGTTATTGATAATGTTTAAATGAGAGGGAGGTGCGACTGTTTCAAGCAAGAG CTCAAACGCTTGAACGACGATGAAAAGATAAAAGCCTCGGCGGAAGCGATAACTGAATTATCCAGCGACGAACTC CGTTCATATTTAAATTCATGAAGTCAGTCCGGTTTTTAAAGGTTAGCTGCCGATAATCGATTAGCGGGACTG GCTCAACATCTTTTGAACGACCGGGTTTATATTCATCAGTCGCGCTTAACTATAAGCCGGGTTTTTCGCGGCAAG GAATTTTACTGGCATTCGGAATTTGAAACTTGGCATGTAGAAGACGGTATGCCTAGAATGCGTGCGCTCAGCATG TCCATTATTCTTACCGAAAACGATCAGCATAACGGGCCTTTGATGTTGGTTCCCGATCGCATAAAAAATTTGTC GTTTGCAGAGGAAACGCGGAAATCATTATTCGGTCTCGTTGAAAAAGCAGGAGTACGGCATACCCAGCGAT GAATGCTTGGCTAGCTTGGTTGCCGATGGCGGCATCGTATCGGCAATGGAAAACCCGCGCAGTGTCTTGATTTTC GACAGTAATGTCATGCACGGTTCGAATAGTAATATCACTCCATGGCTCGCTCGAATCTCTTTTTCGTCTATAAC GCGATCAATAATCGAGTAACATGGCCGTTTTGCGGTTTATGCGCGCTCCTGAATATCTTTGCAGTCGCAAGAAT ATACGAGTTATCGAACCGCGGCTTTTATCGCGCGCCGATCAATTGATATATGCTTAG
ectR1	ATGCAAAACCCACAACCGCACGCCCTCATTGCTGGATACGCTCGACTTGAATCCGGTTGAAAAGGAACATTTG CTGAATCAAATGAAGAAGTACTGGTCGCTTACGTAGAGTGATTGCGGCCACCGATTACACTCAAAATATCTG GCAAAAACCACTAGCCTGACCGCACCGCAGATTCTTTTGTGTCAGACTGCGCGCCAAAGGTCAACTGACCAT GGTGAGCTAGCTCAGGACATGAGTCTCAGCCAAGCGACTGTGACAACAATTCTGGATCGCTGAAAAACGTCAA TTGGTGTTCGCGCAGCGCTCCAGACTGATAAACGAAAGTCCATGTCTATATGACGAGGCGGCCACGGAATG CTAATAAACGCCCCTATCCCTTTGAGGATCGCTTACGCGAGAATTCAGTAACTACAGGAATGGGAACAATTG ATGATTATTGCATCACTGCAACGTGTCGCTCAGATGATGGACGCGCAGAACATCCCTGTCGCTAAAGAAGCGTTT GATTTTCCGGTTTAA

doeA	ATGATTGAACGCGACGACATGACTTTTCCGTTTCGCGGAATACCAACGCCGAATCGACGAAGTGCCTGGGCGGATG CAAAAACGGCTGCTCGACGCTGCTGAATCAGCGATCCGGAACCTGATGTATCTAACCGACTATCAAAACGACC GGATATTCGTTTTCAGGCCCTGGTATCCCGCTCGACAACGAGCCGTTTCATGATCACTCGAAAACCTCGAAGAA TCCAATGTTTATGCGCGGACTTGGGTGGAATACACGCGACCTTATCCCGATACCGGCGACGCGATTCAAATGCTC GTGGAATCGCTTCGAGAATTCGGTTTGAATGGCAAACATATCGGTTATGAACGCAATAGTACTTCTTCCGGCC TATCATCAAGACTCGATTACACGACCTTACCGACGGGCGCTTACTGGATTGCTTCGGCATCGTCGAACAAGGG CGCATCACAAATCTCCGGTGGAATCGAAATCATGCGCAAGGCCGCGCATGCGACCGAAGCCGCGCATGAAGGCC GGGTTTCGAGGCTTGGTGGCGGTGCGACCGAAAACGAAATCGGAGCCGCGATCAGTGCAGGCATGTTTCAAGCG GGCGGCGAGACTCCCGCAGTAATGCCTTATGTCAGTGGGCCACGTACGATGATCGGCCATGCTACTTGGGAA GGACGCGTCGTGCAGCCTGGCGAACATGTCTTCTCGAAGTCGGCGGCTGCTACCGGCGCTACCATACCGCGATG ATGCGCACCGTCGTCTGGGCGATATGACGATACATTCTATAAGGCTCAGGAAAAATGAAATGGCGCTGCAA CGGCTGAAAGAAATCATGCGCCCGCGCTGACGGTTTCGGACGCCGATAACCTGGTGCAGCGCATCATCACCGAC AATGACATAGCGCGCAGCTGATCAGCGTTTCGGGCTATTCAATCGGCATCGCGTTTCCGCCGAGCTGGGACGAA GGTTACATCATCAGCTTAAAGCAAGGTATTTTCGACGGTGCTGGAAGAAGGCATGACATTTTCATCATCATCCCGTGG ATGTGGGGCGTCGAAGGCGATAAAACCATGGGCATATCGGACACGCTTTACGTGACCGAGAATAGTGCGAATCC TTTTTCACGCTGGATAAGGATTTTGTGGTGAACCCGAATACGGGGCTTAG
Zeocin	atggccaagt tgaccagtgcggt tccggtgct caccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagt tctggaccgac cggtcggttct cccgggact tctggaggacgact tgcgggtgtggt cgggacgacgtgacctgttcac agcgcggtccaggaccaggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtac gccgagtggtcgagggtcgtgtccacgaacttccgggacgcctccgggcccggccatgaccgagatcgccgagcag ccgtggggcgagggttgcctctgcgcgacccggccggcaactgcgtgcacttctggccgaggagcaggactga

표 6

[0097]

프라이머	염기서열 (5' -3')	서열번호	특징
F1_ectD_For	gcattgtcatctggtgga	8	ectD 유전자 knock out 시키기 위해 선형 DNA 에 결합하는 flanking region F1과 F2 증폭을 위한 프라이머
F1_ectD_Rev	CAACAGCTCATTTAGAGcggaattattttcggtt act	9	
F2_ectD_For	GCCGAGGAGCAGGACTGAcgagttatcgaaccgcg	10	ectR 유전자 knock out 시키기 위해 선형 DNA 에 결합하는 flanking region F1과 F2 증폭을 위한 프라이머
F2_ectD_Rev	ccgatatcctcgccgatt	11	
F1_ectR1_for	cagttagctggttaagt	12	doeA 유전자 knock out 시키기 위해 선형 DNA 에 결합하는 flanking region F1과 F2 증폭을 위한 프라이머
F1_ectR1_rev	CAACAGCTCATTTAGAGatcggtggcgcaatcac	13	
F2_ectR1_for	GCCGAGGAGCAGGACTGAccggtttaagctctaata attc	14	항생제 제오신 (zeocin) 유전자 증폭 을 위한 프라이머
F2_ectR1_rev	cgttgacgacactcctgg	15	
F1_doeA_for	gcattgatttgaaccgg	16	항생제 제오신 (zeocin) 유전자 증폭 을 위한 프라이머
F1_doeA_rev	CAACAGCTCATTTAGAGagttcgctcgattcggcgt	17	
F2_doeA_for	AGGTAGTCGGCAAATAAGacgaaggttacatcatca gc	18	항생제 제오신 (zeocin) 유전자 증폭 을 위한 프라이머
F2_doeA_rev	ctccaatcgccatagct	19	
F1_zeocin_for	CTCTGAAATGAGCTGTG	20	항생제 제오신 (zeocin) 유전자 증폭 을 위한 프라이머
F2_zeocin-rev	tcagtcctgctcctcggc	21	

[0099]

<실시예 3> *M. alcaliphilum* 20Z^x에서의 Electroporation 기반 유전자 조작 방법

[0100]

M. alcaliphilum 20Z^x는 OD가 0.4 내지 0.6에 도달 할 때까지 1 % 메탄올이 보충된 50 ml의 NMS 배지에서 배양 되었다. 먼저, 세포를 10 분 동안 5,000x g 및 4 °C에서 원심분리하여 수확하였다. 세포 펠렛을 50 ml 멸균 증류수로 2 회 세척한 후, 세척된 펠렛을 100 μl 멸균 증류수에 재현탁한 다음 1000 ng의 본 발명에서 구축한 DNA 플라스미드와 혼합하고 얼음 위에 보관 하였다. 혼합물을 ice-cold 큐벳 (Bio-rad)으로 옮기고 1.3 kV, 25 μF 및 200 Ω에서 Gene Pulser Xcell™ 전기천공 시스템 (Bio-rad)에 의해 전기천공을 수행 하였다. 방전 펄스 후, 실온에서 1 ml의 NMS 배지를 세포에 즉시 첨가 한 후, 10 ml의 NMS 및 0.1 % 메탄올을 함유하는 150 ml serum bottles로 옮겼다. 그 후 세포를 30 °C 및 200 rpm의 배양기에서 밤새 배양하였다. 배양 후, 세포를 탄소 원으로서 1 % 메탄올 및 50 μg/ml의 항생제 카나마이신, 10 ug/ml이 보충된 NMS 배지에 spread 하여 본 발명의 DNA 플라스미드가 도입된 균주를 선발하였다.

[0102] <실시예 4> 세포 내 대사산물 추출 및 분석 방법

[0103] 4-1. 세포 내 대사산물 추출 방법

[0104] 1 ml 배양 배지의 원심 분리 후 세포 펠렛을 수확 하였다. 메탄올, 클로로포름 및 물을 10:5:4의 비율로 혼합한 혼합물을 제조하고, 570 μ L의 혼합물로 세포 펠렛을 재현탁시켰다. 이어서, 세포 펠렛 혼합물을 3분 동안 볼텍싱 (vortexing)하고 170 μ L 클로로포름과 물을 추가하였다. 추가적으로 혼합물을 10 분 동안 볼텍싱하였다. 볼텍싱이 완료된 세포 펠렛 혼합물은 원심분리 후 상층액 (수층)을 분리하여 대사산물 (엑토인) 함량을 분석에 사용하였다.

[0106] 4-2. 상층액 내 대사산물 (엑토인) 함량 분석 방법

[0107] 플라스크 내 메탄은 영린 GC 6500 가스크로마토그래피와 HP-PlotQ 칼럼을 이용하여 측정하였다. 상층액의 잔류 글루코스와 자일로스의 양은 Aminex HPX-87H 칼럼 (Biorad, Hercules, USA) 이 탑재된 HPLC의 RI 측정기를 통해 측정하였다. 엑토인 (Ectoin)은 C18 column이 탑재된 HPLC의 UV 측정기를 통해 측정하였다.

[0109] <실시예 5> *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주의 성장 속도 향상을 위한 최적배양조건 확립

[0110] 5-1. 메탄, 자일로스 및 글루코스의 공동 기질 활용을 위한 *M. alcaliphilum* 20Z의 엔지니어링

[0111] 세 가지의 기질을 이용하기 위해 이전 연구에서 개발된 메탄과 자일로스를 동시에 사용하는 *M. alcaliphilum* 20Z^X 균주에 각각 *Z. mobilis*, *M. alcaliphilum* 20Z, *E. coli* 에서 유래한 유전자 glf (서열번호 1), glk (서열번호 2) 및 pgi (서열번호 3)를 P_{tac} 프로모터 하에 발현하도록 하는 pFK-PGI 플라스미드를 구축하고, 이를 전기천공법 (Electroporation)을 통해 20Z^X 균주에 형질전환 하였으며, 이를 다 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC}로 명명하였다 (도 1A 참조).

[0112] 메탄과 자일로스를 활용하는 *M. alcaliphilum* 20Z^X 균주와 pFK-PGI 플라스미드를 보유한 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주를 메탄이 공급된 NMS 배지와 다양한 글루코스, 자일로스 농도에서 배양하여, 세포 성장과 탄소원 농도의 변화를 모니터링하였다.

[0113] 그 결과, 메탄만 사용한 경우에는 성장 속도가 0.028 h⁻¹ 수준이나, 글루코스와 자일로스를 같이 사용한 경우에는 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주의 비성장속도가 0.035 h⁻¹와 0.048 h⁻¹ 수준으로 향상되었다. 또한 자일로스 10 g/L 와 글루코스 5 g/L 조건에서 가장 높은 성장 속도를 보여주었으며 (도 1B), 이는 추가 탄소원이 세포 성장에 도움을 준다는 것을 나타낸다.

[0114] 자일로스와 글루코스의 농도를 살펴보면, 자일로스 10 g/L와 글루코스 5 g/L에서는 자일로스가 소모된 농도값 (3 g/L)이 글루코스 (1.1 g/L)에 비해 3 배 높았고, 자일로스 10 g/L와 글루코스 10 g/L에서는 자일로스가 소모된 농도값 (1.5 g/L) 이 글루코스 (0.6 g/L) 에 비해 2배 높았으나, 자일로스 5 g/L와 글루코스 10 g/L에서는 같은 수준의 소모된 농도값 (1.1 g/L)을 보여주었다 (도 1C).

[0116] 5-2. 텅스텐 추가 및 적응 진화를 통한 성장 속도 개선

[0117] *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주가 메탄, 글루코스 및 자일로스를 동시에 이용하여도 낮은 성장률을 보인다는 문제점이 있었다. 이를 개선시키기 위해 20Z-formate dehydrogenase의 활성을 촉진시키는 텅스텐 5 μ M을 2차 기질로 이용하였다.

[0118] 그 결과, 거의 모든 조건에서 텅스텐을 사용한 경우, 텅스텐을 사용하지 않은 경우와 비교하여 균주의 성장이 향상되는 것으로 나타났다. 메탄만 사용한 경우에는 최종 OD₆₀₀ 값이 2에서 4로 2배, 자일로스 10 g/L와 글루코스 5 g/L에서는 3.5에서 8로 2.3배, 자일로스 5 g/L와 글루코스 10 g/L에서는 2에서 4로 2배 상승하였다. 자일

로스 10 g/L와 글루코스 10 g/L에서는 텅스텐을 사용한 경우, 성장 속도가 높았으나 최종 OD₆₀₀ 값은 2로 같았다 (도 2A).

[0119] 또한, 자일로스와 글루코스 소모값도 텅스텐을 사용한 경우가 사용하지 않은 경우보다 높게 나타났다. 자일로스 10 g/L와 글루코스 5 g/L에서 자일로스는 소모값은 3.8 g/L, 글루코스 소모값은 1.5 g/L로 증가하였다. 자일로스 5 g/L와 글루코스 10 g/L에서는 자일로스 소모값이 1.5 g/L로 증가하였고, 글루코스 소모값은 같았다. 자일로스 10 g/L와 글루코스 10 g/L에서도 소모값이 같았다 (도 2B).

[0120] 이러한 결과는 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주 배양 시 탄소원으로 메탄, 자일로스 및 글루코스를 이용하고, 텅스텐을 2차 기질로 추가 제공하는 경우 세포의 성장 속도가 현저히 증가한다는 것을 의미한다.

[0122] 이어서, 자일로스 10 g/L와 글루코스 10 g/L에 텅스텐을 추가로 포함하는 배지에서 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주를 1번, 3번, 10번 계대 배양하여 각각의 세포 성장률을 평가하였으며, 각각 MXGW-1, MXGW-3 및 MXGW-10으로 명명하였다.

[0123] 그 결과, 3번 계대 배양한 MXGW-3의 OD₆₀₀ 값은 3.5, 10번 계대배양한 MXGW-10의 OD₆₀₀ 값은 6.5를 보여주었다. 이는 처음 배양한 MXGW-1의 OD₆₀₀ 값에 비해 각각 1.75배, 3.25배 상승한 결과이다 (도 3A).

[0124] 또한, MXGW-10에서의 자일로스와 글루코스의 소모 속도는 MXGW-1에 비해 각각 1.87 배, 2.1 배 증가하였다 (도 3B).

[0125] 따라서 MXGW-1 대비 세포 성장 결과가 높은 MXGW-3을 하기 실험에 사용하였다. 또한 이와 동시에 적응 실험을 진행하였으며, 10번 계대한 MXGW-10이 그 결과이다.

[0127] <실시에 6> 엑토인 생산성 향상을 위한 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주의 엔지니어링 및 최적배양조건 확립

[0128] 6-1. *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주의 엑토인 생산성 분석

[0129] *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주는 이미 자일로스와 글루코스 활용 경로를 관련 외래 유전자를 다수 도입하였기 때문에, 대사산물의 생합성 경로 관련 유전자들을 추가로 구축하는 것은 균주 안정성 측면에서 어려움이 있다. 본 발명에서는 메탄, 자일로스와 글루코스를 제공하면서 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC}를 이용하여 엑토인 생산성을 증대시키고자 하였다. 엑토인은 *M. alcaliphilum* 20Z에서 aspartokinase (ask), aspartate β-semialdehyde dehydrogenase (asd), diaminobutyrate transaminase (ectB), diaminobutyric acid acetyltransferase (ectA), ectoin synthase (ectC) 효소 반응을 통해 생합성된다 (도 4A).

[0130] MXGW-3를 이용하여 NMS 배지에서 기질로서 메탄만 사용한 경우와 자일로스 10 /L, 글루코스 10 g/L를 추가로 제공한 경우에서 배양하면서 세포 성장률과 대사산물인 엑토인 수율을 분석하였다.

[0131] 그 결과, 세포 성장률은 메탄을 기질로 배양한 균주의 경우 OD₆₀₀은 6.0으로 나타났으며, 메탄, 자일로스 및 글루코스를 기질로 배양한 균주의 경우 OD₆₀₀은 3.2로 나타나, 메탄을 단독 기질로 사용하였을 때 성장 속도가 약 2배 향상되는 것을 확인하였다 (도 4B). 반면, 엑토인 생산성은 2일차에 세 가지의 기질 (메탄, 자일로스 및 글루코스)을 이용하여 배양된 균주로부터 26.44 ± 2.66 mg/g-DCW의 엑토인이 생산되었으며, 메탄을 단독 기질로 이용하여 배양된 균주로부터 15.65 ± 2.61 mg/g-DCW의 엑토인이 생산되어, 세 가지 기질을 모두 사용하는 경우 엑토인의 생산성이 1.7배 향상되는 것을 확인하였다 (도 4C).

[0132] 이러한 결과는 메탄산화균인 *M. alcaliphilum* 20Z^{XC} 균주 배양 시 메탄 이외에 자일로스와 글루코스를 공동 기질로 제공함으로써 아스파르트산 (aspartate) 대사 경로에서 탄소 플럭스를 강화시켰고, 엑토인과 라이신 (lysine) 같은 아스파르트산 유도체의 생성을 향상시켰다는 것을 의미한다. 추가적으로, 글루코스는 엑토인과 같은 삼투보호제를 생산을 촉진시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0133] 상기와 같은 결과를 통해 메탄 및 자일로스를 기질로 이용하도록 변형된 *M. alcaliphilum* 20Z^X 균주에 glf, glk

및 *pgi* 유전자를 과발현시키는 제조합 벡터를 도입하는 경우 대사산물인 엑토인의 생산성이 현저히 증가한다는 것을 확인하였다.

[0135] 6-2. 엑토인 분해 효소 및 생합성 억제 인자의 knockout을 통한 엑토인 생산성 개선

[0136] 다만, *M. alcaliphilum* 20Z^{XG} 균주는 배양 48시간까지 엑토인 수율이 증가하는 것으로 나타났으나, 배양 48시간 이후에는 엑토인 생산성이 감소하는 경향을 보였다 (도 4C). 이러한 결과는 엑토인 분해 효소인 ectoine hydroxylase (ectD)와 ectoine hydrolase (doeA)의 활성의 증가로 엑토인 함량이 감소한 것으로 판단된다.

[0137] *M. alcaliphilum* 20Z에서 ectD는 엑토인을 hydroxyectoine으로 전환시킨다. 엑토인 생합성의 반대 방향 대사경로에서 작동하는 doeA는 엑토인을 아스파르트산 (aspartate)로 재전환시킨다. 또한 ectR1에 의해 암호화된 전사 조절자는 엑토인 생합성의 억제자로서 작용한다.

[0138] 따라서 이러한 문제점을 개선하여 엑토인 생산성을 향상시키고자 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG} 균주에 추가적으로 ectD, doeA 또는 ectR1 유전자가 결손 (knockout)시킨 균주를 제작하였다. 구체적으로, ectD, doeA, ectR1 유전자에 대한 F1-제오신 유전자-F2를 갖는 DNA 단편을 제조합하였고, 이를 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG} 균주를 3번 계대 배양한 MXGW-3에 위에서 제시한 electroporation 기반 유전자 조작 방법을 이용하여 각 유전자가 결손된 균주를 제작하였으며, 이를 각각 20Z^{XG}/△ectD, 20Z^{XG}/△doeA, 20Z^{XG}/△ectR로 명명하였다. 이어서, 상기 3종의 균주를 각각 NMS 배지에서 메탄, 자일로스 및 글루코스를 기질 (탄소원)로 제공하여 배양하면서 세포 성장률 및 엑토인 수율을 분석하였다. 대조균으로는 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG} 균주를 사용하였다.

[0139] 그 결과, 20Z^{XG}와 20Z^{XG}/△ectD는 유사한 성장 패턴을 보였으며, OD₆₀₀는 대략 3.5이었다. 20Z^{XG}/△doeA와 20Z^{XG}/△ectR의 OD₆₀₀는 각각 2.4와 1.6이었다. 이는 ectD 결손이 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것을 나타낸다 (도 5A).

[0140] 20Z^{XG}/△ectD, 20Z^{XG}/△ectR, 20Z^{XG}는 각각 24시간 또는 48 시간에서 엑토인수율이 33, 37, 26 mg/g-DCW로 최대 수율을 보여주었으나, 그 이후에 수율이 감소하였다 (도 5B). 20Z^{XG}/△doeA의 경우 다른 조건과 달리 엑토인 수율이 감소하였으며, 엑토인 유도체인 hydroxyectoine이 위 조건에서만 세포 내에서 검출되었고, 144 시간에 hydroxyectoine이 30 mg/g-DCW의 수율을 보여주었다 (도 4C). EctR1의 결핍은 엑토인 생합성 오퍼론을 강화하는 동시에 ectD가 엑토인을 하이드로엑토인 (hydroxyectoine)으로 가수분해하는 활성을 자극한다. 20Z^{XG}/△doeA는 엑토인 수율이 20 mg/g-DCW로 다른 조건에 비해 낮지만, 144 시간까지 초기와 유사한 수율을 계속적으로 유지하였다 (도 5B). 이러한 결과로부터 *M. alcaliphilum* 20Z 균주 내에 있는 doeA의 활성이 엑토인 감소를 가져오는 것으로 판단된다.

[0141] 이러한 결과를 통해 *glf*, *glk* 및 *pgi* 유전자가 과발현된 *M. alcaliphilum* 20Z에 추가적으로 ectD 또는 ectR1 유전자를 결손 (knockout)시키는 경우, 대사산물인 엑토인의 생산성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[0143] 6-3. 질소원 추가를 통한 엑토인 생산성 개선

[0144] *M. alcaliphilum* 20Z에서 질소원 대사와 엑토인 생합성은 연관이 있으며, 세 가지의 기질 (메탄, 자일로스 및 글루코스)에서 자라는 *M. alcaliphilum* 20Z^{XG}가 증식기 (exponential phase) 후반에 질소원 결핍이 있으면 엑토인의 분해를 촉진시킬 가능성이 있는 것으로 판단하여 20Z^{XG}/△ectR 배양 시 질소원으로 질산칼륨 1 g/L를 추가로 제공하고, 엑토인 수율 및 하이드로엑토인 수율을 조사하였다.

[0145] 그 결과, 칼륨의 질산염인 질산칼륨을 추가로 제공하였을 때 질산염을 제공하지 않은 경우와 비교하여 성장 속도가 1.4배 증가하는 것으로 나타났다 (도 6A), 또한, 엑토인 수율의 경우 질산염 제공 유무와 관계없이 24 시간까지는 26 mg/g-DCW로 동일하였으나, 48 시간에는 질산염이 없는 조건에서 38 mg/g-DCW로 질산염을 추가한 조건에서 얻은 33 mg/g-DCW 보다 높게 나타났다. 하지만, 48 시간 이후부터는 질산염이 없는 조건에서 엑토인 수율이 빠르게 감소하였다 (도 6B). 엑토인 수율이 감소하면서 hydroxyectoine 수율은 증가하고, 144시간에 두 조

건의 엑토인 수율은 모두 12 mg/g-DCW 이고, 질산염이 없는 조건에서 hydroxyectoine 수율은 31 mg/g-DCW로, 질산염을 추가한 조건에서 얻은 18 mg/g-DCW 에 비해 1.72배 높았다 (도 6C). 이는 질소원이 부족한 경우 엑토인 분해가 일어나 하이드로엑토인 (hydroxyectoine) 생산이 증가함을 보여주었으나, 질소원이 추가되어도 엑토인 분해 자체는 일어난다는 것을 확인하였다.

[0147] 이어서, 암모늄염 0.1 g/L와 질산칼륨 1 g/L를 섞은 ANMS 배지에서 배양하는 조건에서 배양한 $20Z^{XG}/\Delta\text{ectR}$ 균주에 대하여 성장 속도, 엑토인 수율, 하이드로엑토인 수율을 분석하였다.

[0148] 그 결과, 암모늄과 질산염을 함께 제공하는 경우 OD_{600} 값은 3.8로 나타났으나, 상기 도 6A의 결과와 비교하였을 때 질산염만 추가로 제공하는 경우보다 긴 lag phase를 가지는 것으로 나타났다 (도 6D). 또한, 암모늄 및 질산염을 제공하는 조건의 경우 144 시간에서 엑토인 수율이 32 mg/g-DCW으로 최대 수율을 보였으나, 144시간 이후 엑토인 수율이 감소하여 질산염만 제공한 조건과 유사한 경향을 나타내었다 (도 6E). 하이드로엑토인 (hydroxyectoine) 수율은 약 20 mg/g-DCW 까지 증가하였다 (도 6F).

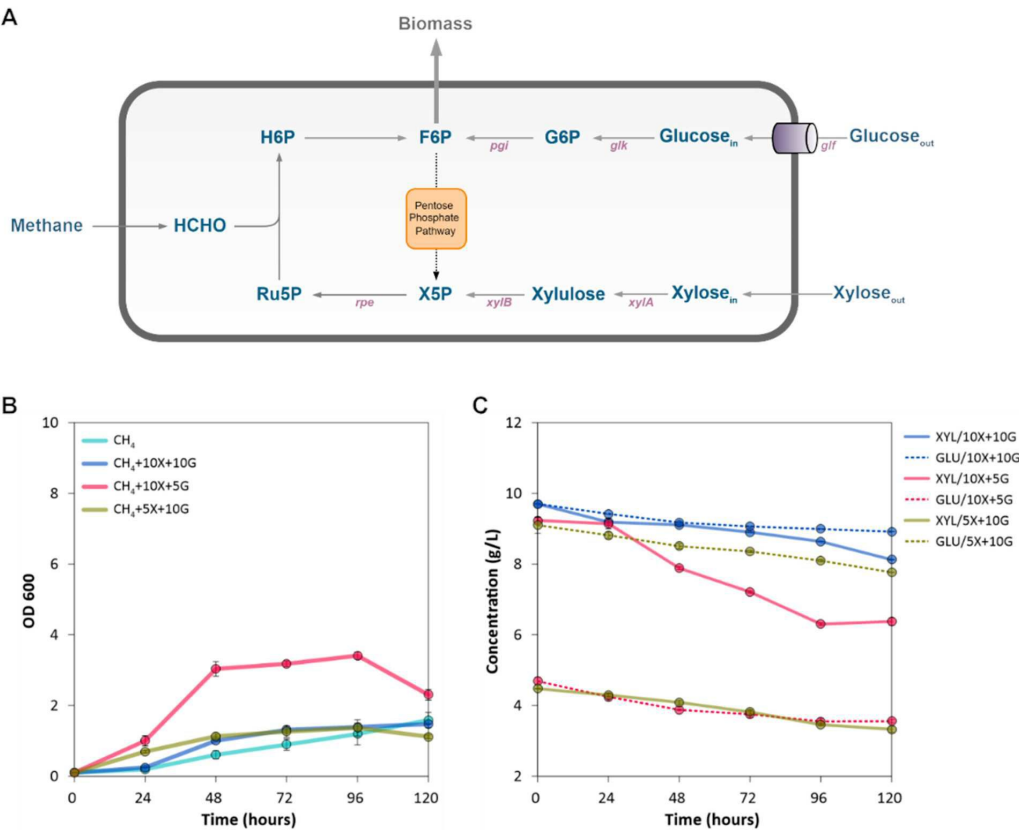
[0149] 이러한 결과는 *M. alcaliphilum* $20Z^{XG}$ 균주의 경우 배양 시 질산염이나 암모늄염을 추가로 제공한다고 하여도 엑토인 수율은 증가하지 않는다는 것을 보여준다.

[0151] 상기 실험 결과를 종합하여 *M. alcaliphilum* $20Z^{XG}$ 균주 배양 시 메탄, 자일로스와 글루코스를 공동 기질로 제공하고, 텅스텐을 2차 기질로 제공하는 경우, 즉 탄소원으로 메탄, 자일로스와 글루코스를 이용하고, 추가적으로 텅스텐을 포함하는 NMS 배지에서 배양하는 경우 엑토인 생산성이 가장 우수하다는 것을 확인하였으며, 이를 엑토인 생산성 향상을 위한 최적배양조건으로 선정하였다.

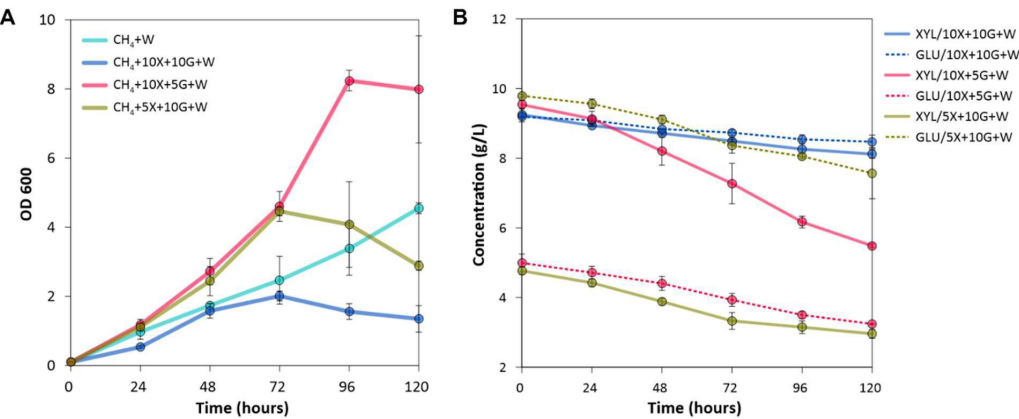
[0153] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

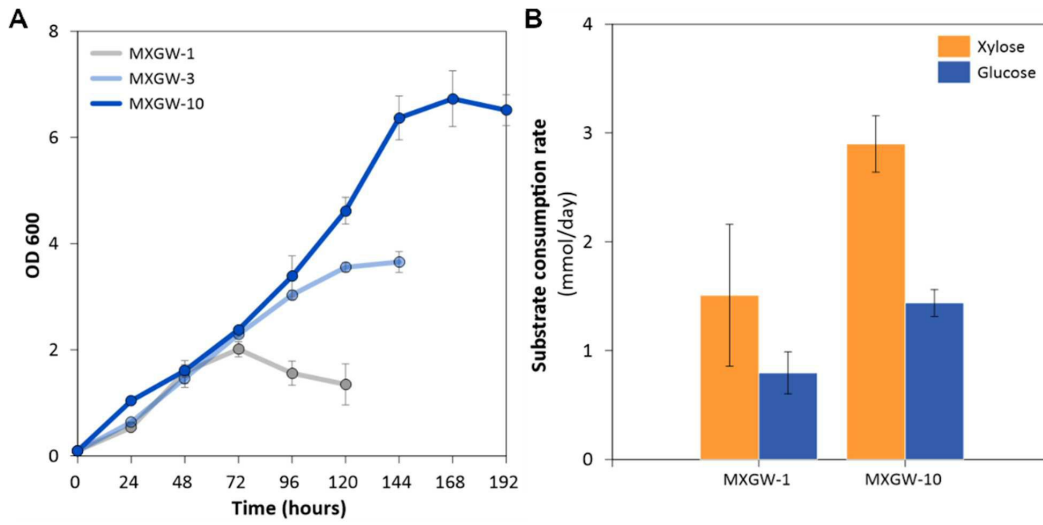
도면1



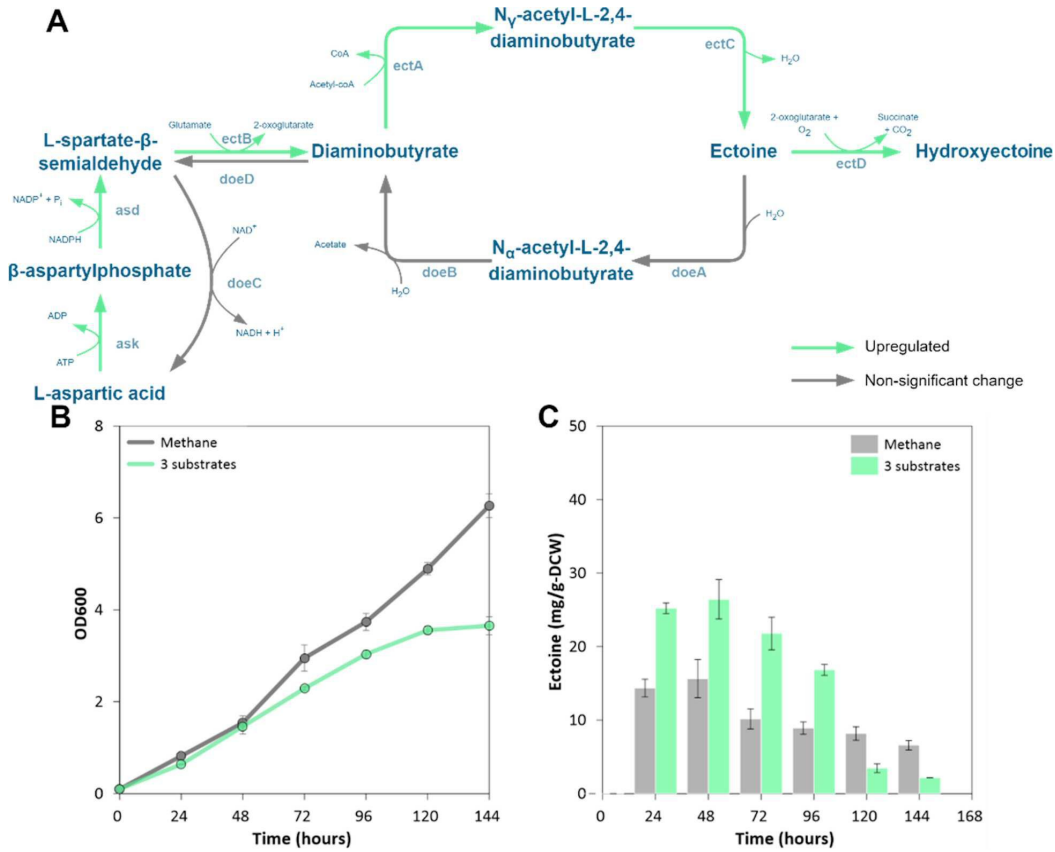
도면2



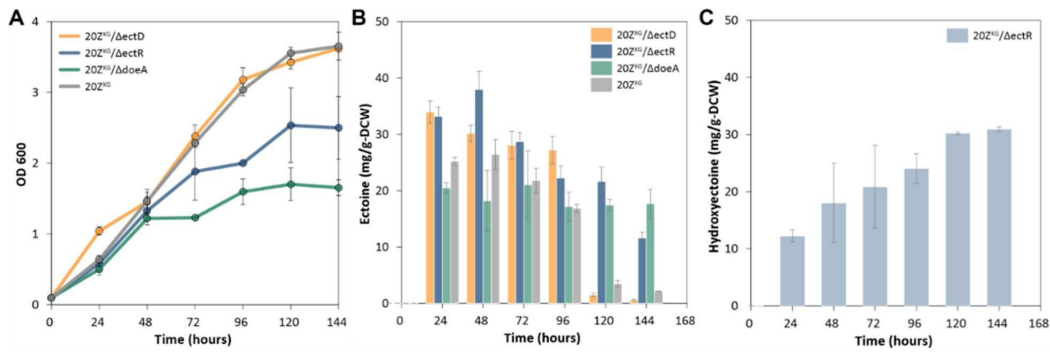
도면3



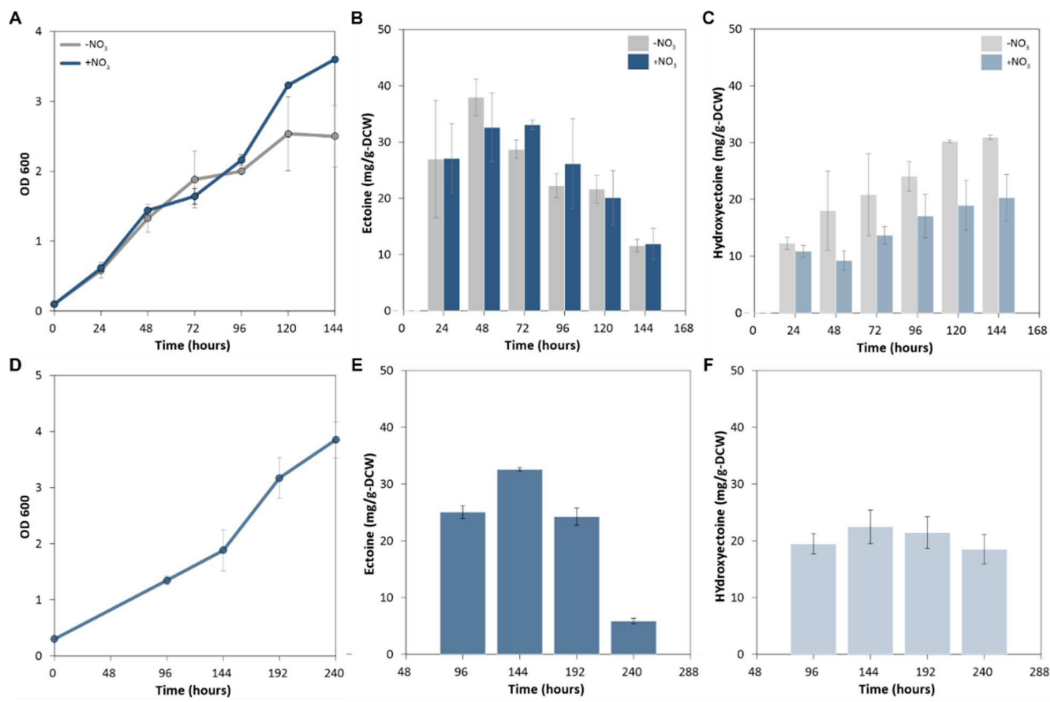
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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