(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0087361
(43) 공개일자 2017년07월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/28 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 7/04* (2006.01)
C12R 1/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/28 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0007276
(22) 출원일자 2016년01월20일
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, 은미아파트)
허동훈
서울시 강남구 언주로30길 57, F동 3701호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

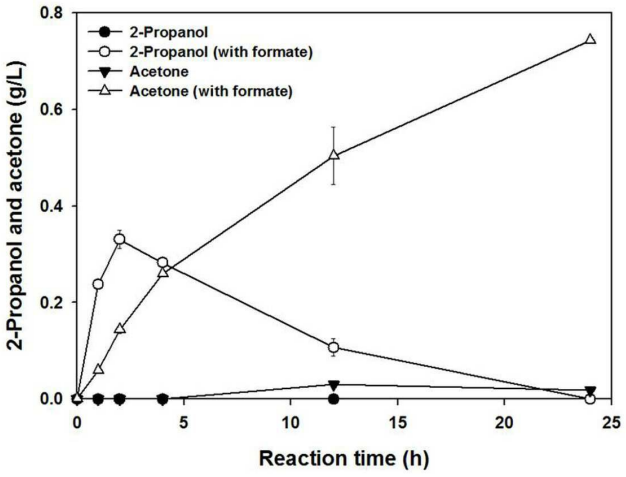
(54) 발명의 명칭 **메탄자화균을 이용한 프로판으로부터의 아세톤 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 메탄자화균을 이용한 프로판으로부터의 아세톤 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로 메탄자화균을 포함하는 아세톤 생산용 조성물, 키트, 상기 균주를 이용한 아세톤의 생산 방법 및 2-프로판올의 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명의 메탄자화균, 구체적으로 메틸로모나스 속 DH-1(KCTC18400P) 균주는 프로판을 이용하여 아세톤을 생산할 수 있고, 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않아 아세톤을 고효율 및 고농도로 축적할 수 있으므로, 아세톤의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)
C12P 7/04 (2013.01)
C12Y 114/18003 (2013.01)
C12R 1/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015M3D3A1A010648
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 C1가스리파이너리사업
연구과제명 메탄 - 메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2015.09.17 ~ 2024.02.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20133030000090
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 신재생에너지핵심기술 - 핵심기술개발사업
연구과제명 메탄 및 syngas의 상온 상압에서의 알코올 전환기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로마이크로븀 속(*Methylomicrobium*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로썰머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속(*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*) 및 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양산물을 포함하는 아세톤 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 미립자메탄산화효소를 발현하는, 아세톤 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 프로판으로부터 아세톤을 생산하는 것인, 아세톤 생산용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 프로판으로부터 2-프로판올을 거쳐 아세톤을 생산하는 것인, 아세톤 생산용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배양산물은 균주의 배양물, 배양상등액, 파쇄물 및 이들의 분획물로 구성된 군으로부터 선택되는 아세톤 생산용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 메틸로모나스 속(*Methylomonas*) 균주는 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주인 것인, 아세톤 생산용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 메틸로모나스 속(*Methylomonas*) 균주는 기탁번호 KCTC18400P로 기탁된 것인, 아세톤 생산용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 아세톤 생산용 키트.

청구항 9

(i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및

(ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 아세톤을 회수하는 단계를 포함하는 아세톤의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 반응 용기는 공기 및 프로판을 5 내지 7 : 3 내지 5의 부피비로 포함하는 것인, 아세톤의 생산방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 반응 용기는 포름산(formate)을 추가로 포함하는 것인, 아세톤의 생산방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 반응은 4 내지 40℃에서 수행되는 것인, 아세톤의 생산방법.

청구항 13

(i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및

(ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 2-프로판올을 회수하는 단계를 포함하는 2-프로판올의 생산방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 2-프로판올은 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase)에 의해 프로판으로부터 전환되는 것인, 2-프로판올의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메탄자화균을 이용한 프로판으로부터의 아세톤 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로 메탄자화균을 포함하는 아세톤 생산용 조성물, 키트, 상기 균주를 이용한 아세톤의 생산 방법 및 2-프로판올의 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 메탄자화균은 메탄을 포함한 단일탄소 기질을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있는 원핵생물이다. 메탄자화균은 메탄산화효소를 보유하고 있어 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있고 일련의 대사과정을 거쳐 바이오매스로 전환할 수 있는 능력을 가졌다. 메탄산화효소는 수용성 메탄산화효소(soluble methane monooxygenase; sMMO), 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase; pMMO)로 분류된다. pMMO는 sMMO와 비교하여 메탄에 대해 더 높은 친화력을 가지고 있어 메탄을 산화시켜 성장하는 세포내에서의 주요 생체 촉매로 생각되며, 상온 상압에서 메탄을 수산화하여 상온 상압에서의 메탄올 전환을 가능하게 한다. 구리가 존재하는 환경에서는 sMMO의 발현이 억제됨과 동시에 pMMO의 발현이 유도되며 pMMO는 막 단백질로서 세포막에 존재하여 메탄을 산화시킨다. 메탄이 산화되어 생성된 메탄올은 각종 화합물과 바이오연료로서의 사용이 가능한 고부가가치 산물이며, 이에 따라 메탄자화균을 이용한 메탄-메탄올 전환 연구가 국내외로 진행되고 있다. 그러나 이러한 메탄-메탄올 전환은 메탄올 포름알데히드로 전환하는 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase; MDH)를 저해하여 물질대사경로를 차단해야함에 따라 효소 저해의 선택성, 축적되는 메탄올의 독성 등에 의해 수율이 좋지 못하다는 단점이 있어 상용화되기에는 무리가 있다는 의견이 지배적이다. 그에 따라 메탄-메탄올 전환을 통한 저부가가치산물의 고부가가치산물로의 전환 외에 다른 생물화학공정의 개발을 필요로 한다.

[0004] pMMO는 메탄뿐만 아니라 다른 알칸 또한 산화시킬 수 있다는 것이 기존 문헌을 통해 밝혀진 바 있다. 알칸으로부터 생산된 알코올은 다양한 알데히드 또는 케톤으로 전환될 수 있으며, 균주 특성에 따라 이후의 물질대사경로에 의해 사용되거나 배양액에 축적될 수 있다(Elliott, S. J. et al., 1997, Journal of the American Chemical Society, 119(42), 9949-9955.)

[0005] 이와 관련하여, 알칸 화합물인 프로판을 유일탄소원으로 사용하는 고도니아 속(*Gordonia* sp.) 균주 등은 프로판 산화효소(propane monooxygenase, PrMO)를 이용하여 프로판을 2-프로판올로 전환한 후, 2-프로판올을 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase; ADH)를 이용하여 아세톤으로 전환시킨다는 연구 결과가 발표되었다(Tetsuya Kotani et al., JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2006, Vol. 189, No. 3, p.886-893). 그러나, 상기 균주는 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase) 효소를 이용하여 생산한 아세톤을 메틸 아세테이트(methyl acetate)로 전환시키므로, 상기 균주를 프로판-아세톤 전환에 사용할 경우, 아세톤 이후의 물질대사를 차단해야 하는 번거로움이 있으며, 그 효율 역시 뛰어나지 못하여 아세톤 생산 수율이 낮을 것으로 예상된다.

[0006] 또한, 아르트로박터 속(*Arthrobacter* sp.) 균주는 프로판을 1-프로판올과 2-프로판올이 혼합된 상태로 전환한 후 각각의 물질대사 경로를 통해 사용하며, 아세톤은 2-프로판올에서 생성된다는 점에서 상기 균주를 프로판-아세톤 전환에 사용할 경우, 전환의 수율이 낮을 것으로 예상된다(GILLIAN M. STEPHENS et al., Journal of General Microbiology, 1986, 132, 2453-2462.).

[0008] 한편, 아세톤은 그 쓰임이 매우 다양한 화합물이다. 전체 아세톤의 1/3은 용매로 사용되는데, 플라스틱 및 합성섬유의 용매로 사용되며, 아세틸렌의 안전한 운송 및 저장을 위한 용매로도 널리 사용된다. 또한, 의약품의 제조, 화장품의 제조, 식품 첨가물 및 포장 등의 구성 요소로 사용되며, 여드름 치료를 위한 박피 시술 등 의료적인 용도로도 사용되고 있다.

[0009] 상술한 아세톤은 프로판 등의 화합물로부터 합성될 수 있다. 프로판은 나프타 분해(naphtha cracking) 과정에서 부산물로서 발생하며, 셰일가스와 천연가스 등에 다량 매장되어 있어, 그의 이용에 경제적인 이점을 제공한다. 이러한 프로판을 화학공정을 통하여 사용하기 위해서는 반드시 분리정제과정을 통해 불순물을 제거한 고순도 상태로 만들어야 한다. 하지만, 생물공정을 이용할 시엔, 효소가 불순물에 의해 저해받지 않고 프로판을 선택적으로 사용할 수 있기 때문에 추가적인 분리정제과정 없이 저순도의 프로판을 이용하여 아세톤 등의 다른 화합물을 생산할 수 있으며, 고온, 고압의 조건이 수반되는 화학공정과 달리 상온, 상압 조건하에서 반응이 수행될 수 있다.

[0011] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 생물공정을 이용하여 아세톤을 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구노력한 결과, 본 발명의 메탄자화균은 프로판을 2-프로판올로 전환한 후, 2-프로판올을 아세톤으로 전환함을 확인하였다. 또한, 상기 균주는 아세톤 이후의 물질대사경로는 진행하지 않고, 배양액 또는 세포 내에 고농도의 아세톤을 축적함을 확인하였다. 이를 통해, 상기 균주는 저부가가치산물인 프로판으로부터 고부가가치산물인 아세톤을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 하나의 목적은 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로마이크로븀 속(*Methylomicrobium*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로썰머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속(*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*) 및 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양산물을 포함하는 아세톤 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 아세톤 생산용 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및 (ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 아세톤을 회수하는 단계를 포함하는 아세톤의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및 (ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 2-프로판올을 회수하는 단계를 포함하는 2-프로판올의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로마이크로븀 속(*Methylomicrobium*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로썰머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속(*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*) 및 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양산물을 포함하는 아세톤 생산용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 메탄자화균은 프로판을 2-프로판올로 전환한 후, 상기 2-프로판올을 아세톤으로 전환한다. 상기 균주는 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않으므로 고효율 및 고농도로 축적할 수 있음에 따라 아세톤 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명의 용어, "메탄자화균"은, 메탄산화세균으로서 메탄을 유일탄소원으로 이용하여 생육하는 원핵생물을 의

미한다.

[0023] 상기 메탄자화균은 구체적으로 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로마이크로븀 속(*Methylomicrobium*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로썰머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넘 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노범 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시너스 속(*Methylosinus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*) 또는 메틸아시디마이크로븀 속(*Methylacidimicrobium*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 상기 메틸로모나스 속을 포함한 메탄자화균은 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase, pMMO)를 발현할 수 있으므로, 프로판으로부터 2-프로판올을 생산하는데 이용될 수 있으며, 또한 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase; ADH)를 발현할 수 있으므로, 2-프로판올로부터 아세톤을 생산하는데 이용될 수 있다.

[0026] 상기 균주는 미립자메탄산화효소를 발현하는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 용어, "미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase)"는 메탄산화효소의 일종으로, 메탄에 대해 높은 친화력을 가지고 있어 메탄을 산화시켜 성장하는 세포 내에서 주요 생체 촉매로 작용하는 효소를 의미한다. pMMO는 메탄뿐만 아니라 다른 알칸도 산화시킬 수 있으며, 구체적으로 프로판을 산화시킬 수 있고, 더욱 구체적으로 프로판을 산화시켜 2-프로판올로 전환시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 상기 균주는 프로판으로부터 아세톤을 생산할 수 있으며, 구체적으로 프로판으로부터 2-프로판올을 거쳐 아세톤을 생산할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 메탄자화균의 일종인 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주는 메탄뿐만 아니라 다른 알칸 화합물인 프로판을 탄소원으로 이용하여 생육할 수 있음을 확인하였다. 이에, 공기:프로판을 6:4의 비율로 제공하여 반응한 후, 배양액에 존재하는 2-프로판올과 아세톤의 농도를 분석한 결과, 2-프로판올의 농도는 반응 2시간째까지 증가하나 그 이후에는 감소하고, 반면에 아세톤의 농도는 2-프로판올이 고갈되는 24시간까지 꾸준히 증가함을 확인하는데, 생산된 아세톤의 농도는 감소하지 않음을 확인하였다(도 4). 이는, 본 발명의 메탄자화균은 저부가가치산물인 프로판을 고부가가치산물인 아세톤으로 전환하므로, 아세톤의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0032] 상기 균주의 배양산물은 아세톤을 합성할 수 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 구체적인 예로, 상기 균주의 배양물, 배양상등액, 파쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있다.

[0033] 더욱 구체적으로, 상기 배양상등액은 균주의 배양물을 원심분리하여 수득할 수 있고, 상기 파쇄물은 균주를 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득할 수 있으며, 상기 분획물은 상기 배양물, 배양상등액, 파쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 상기 메틸로모나스 속(Methylomonas) 균주는 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) DH-1 균주인 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 용어, "메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주"는 2015년 8월 27일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁되어, 기탁번호(KCTC18400P)를 부여받은 균주를 의미한다. 메탄자화균인 상기 DH-1 균주의 프로판으로부터 아세톤 생산 능력은 종래에 보고된 적 없으며, 본 발명자에 의하여 처음으로 규명되었다.

[0038] 또 다른 하나의 양태는 상기 아세톤 생산용 조성물을 포함하는 아세톤 생산용 키트를 제공한다.

[0039] 이때, 아세톤 생산용 조성물은 상기 설명한 바와 같다.

[0040] 본 발명의 아세톤 생산용 키트는 상기 조성물을 포함하여 아세톤을 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 아세톤 생산에 사용되는 완충액, 상기 아세톤 생산을 수행하기 위한 반응용기, 상기 아세톤 생산을 수행하기 위한 진탕배양기, 상기 아세톤 생산 반응을 수행하기 위한 타이머 등을 포함할 수 있다.

[0042] 또 다른 하나의 양태는 (i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및 (ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 아세톤을 회수하는 단계를 포함하는 아세톤의 생산방법을 제공한다.

[0043] 이때, 제1항의 균주 및 배양산물은 상기 설명한 바와 같다.

[0044] 상기 프로판을 포함하는 반응 용기는 공기 및 프로판을 0.01 내지 10 : 0.01 내지 10의 부피비로 포함할 수 있으며, 구체적으로 5 내지 7 : 3 내지 5의 부피비, 더욱 구체적으로 6 : 4의 부피비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 용어, "공기"는 지구를 둘러싼 대기의 하층 부분에 있는 혼합기체를 의미하며, 화학적 조성은 장소와 그 외의 조건에 따라 다소 다르지만 주로 질소 약 78%, 산소 약 21%로 대부분을 차지하고, 그 외 소량의 아르곤, 이산화탄소, 네온, 헬륨, 크립톤, 크세논 등을 포함한다.

[0046] 상기 반응 용기는 포름산(formate)을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 포름산은 포름산메틸(methyl formate), 포름산에틸(ethyl formate), 포름산프로필(propyl formate), 포름산나트륨(sodium formate) 또는 포름산칼륨(potassium formate)의 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 반응은 4 내지 40℃에서 수행될 수 있으며, 구체적으로 25 내지 35℃, 더욱 구체적으로 30℃에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 또한, 상기 반응은 0 내지 500 rpm에서 수행될 수 있으며, 구체적으로 200 내지 300 rpm, 더욱 구체적으로 230 rpm에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명의 메탄자화균은 프로판으로부터 아세톤을 생산하는 다른 균주와 달리 아세톤을 다른 물질로 전환하지 않으므로, 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않아 고효율 및 고농도로 축적할 수 있다.

[0050] 본 발명의 구체적 일 실시예에서, 메탄자화균의 일종인 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주를 포함하는 반응 용기에 기체치환방법을 통해 60% 공기와 40% 프로판을 제공한 후, 40 mM 포름산나트륨의 존재하에 30℃에서 230 rpm으로 진탕해주며 반응시킨 결과, 반응 24시간 후에는 생산된 아세톤의 농도가 0.74 g/L에 달함을 확인하였고, 생산된 아세톤의 농도가 감소하지 않음을 확인하였다(도 4). 이는, 메탄자화균은 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않음을 시사하는 것이며, 상기 균주는 생산한 아세톤을 고효율 및 고농도로 축적할 수 있으므로 아세톤의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0052] 또 다른 하나의 양태는 (i) 제1항의 균주 또는 이의 배양산물을 프로판을 포함하는 반응 용기에서 반응하는 단계; 및 (ii) 상기 반응된 균주 또는 이의 배양산물로부터 2-프로판올을 회수하는 단계를 포함하는 2-프로판올의 생산방법을 제공한다.

[0053] 상기 2-프로판올은 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase)에 의해 프로판으로부터 전환되는 것일 수 있다.

[0054] 이때, 제1항의 균주, 배양산물 및 미립자메탄산화효소는 상기 설명한 바와 같다.

[0055] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 메탄자화균의 일종인 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주를 공기:프로판을 6:4의 비율로 제공하여 반응한 후, 배양액에 존재하는 2-프로판올의 농도를 분석한 결과, 2-프로판올의 농도는 반응 2시간째까지 증가함을 확인하였다(도 4). 이는, 본 발명의 메탄자화균은 저부가가치산물인 프로판을 2-프로판올로 전환하므로, 2-프로판올의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0056]

발명의 효과

[0057] 본 발명의 메탄자화균, 구체적으로 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.) DH-1 균주는 프로판을 이용하여 아세톤을 생산할 수 있고, 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않아 아세톤을 고효율 및 고농도로 축적할 수 있으므로, 아세톤의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 본 발명의 DH-1 균주의 모습을 보여주는 이미지로서, 도 1a는 상기 균주를 주사전자현미경으로 관찰한 결과이며, 도 1b는 투과전자현미경을 통해 관찰한 결과이다.

도 2는 본 발명의 DH-1 균주의 계통분류도로서, 도 2a는 16S rDNA 유전자 염기서열을 이용한 분자생물학적 계통분류도이고, 도 2b는 상기 균주의 미립자메탄 모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase alpha subunit, *pmoA*)유전자의 염기서열을 이용한 분자생물학적 계통분류도이다.

도 3은 프로판으로부터 아세톤의 생산 방법을 나타내는 개략도이다. 메탄자화균의 미립자메탄산화효소(particulate methane monooxygenase)는 프로판(propane)을 산화하여 2-프로판올(2-propanol)을 만들 수 있으며, 상기 2-프로판올을 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase)를 통해 아세톤(acetone)으로 전환한다.

도 4는 반응 시간에 따른 반응용액 내의 2-프로판올과 아세톤의 농도를 보여주는 그래프이다. 포름산(formate)은 포름산나트륨(sodium formate)의 형태로 제공하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 본 발명은 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **실시예 1. 하수슬러지로부터 메탄자화균의 분리**

[0064] 하수슬러지로부터 메탄자화균을 분리하기 위한 방법은 다음과 같다. 채취한 하수슬러지를 NMS(nitrate mineral salt) 배지(liter 당; 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g KNO_3, 0.2 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.0038 g Fe-EDTA, 0.0005 g $NaMo \cdot 4H_2O$)에 trace elements 용액(1×) 1 mL (liter 당; 500 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 400 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 50 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 15 mg H_3BO_3, 250 mg EDTA), 인산염 스톡(stock) 용액(1×) 10 mL (liter 당; 26 g KH_2PO_4, 62 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), 비타민 스톡(1×) 2 mL (liter 당; 2 mg Biotin, 2 mg Folic acid, 5 mg Thimine HCl, 5 mg Ca pantothenate, 0.1 mg Vitamin B12, 5 mg Riboflavin, 5 mg Nicotinamide)가 담겨있는 시험관에 첨가한 후, 시험관을 고무마개와 절연테이프를 이용하여 밀봉하였다. 그 다음, 주사기를 이용하여 공기를 30% 제거하고, 메탄가스를 주입하여 시험관내의 메탄가스의 최종농도가 30%가 되도록 조정하였다. 그 다음, 30℃, 230 rpm에서 배양하였다. 배지에 미생물이 충분히 배양되면 고체 NMS agar에 미생물을 도말하였다. 도말된 고체 NMS agar를 진공 데시케이터 안에 넣어 공기와 메탄의 비율이 7:3으로 유지되도록 밀봉한 후, 30℃에서 수일간 배양하였다. 수일 후, 생성된 균락을 채취하여 2 내지 3회 정도 계대배양함으로써 단일균주를 분리하였다.

[0065] 분리한 메탄자화균의 외형을 관찰하기 위해 주사전자현미경과 투과전자현미경을 이용해 관찰하여 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다. 도 1a 및 1b에 나타내는 바와 같이 주사현미경을 통해 1×1.5 ㎛의 크기를 갖는 간균임을 확인하였으며, 투과현미경을 통해 내부에 만입세포막(intracytoplasmic membrane; ICM)구조를 갖는 type I 메탄자화균임을 확인하였다.

[0067] **실시예 2. 신규한 메틸로모나스 속 균주의 동정 및 명명**

[0069] 상기 실시예 1에서 분리한 메탄자화균을 동정하기 위해 16S rDNA 유전자의 염기서열분석을 하기와 같이 실시하였다. 16S rDNA 유전자 증폭을 위해 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후, 증폭한 PCR 산물을 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석하였다.

[0070] 정방향 프라이머 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (서열번호 1)

[0071] 역방향 프라이머 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (서열번호 2)

[0072] 상기 분석한 균주의 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information: 미국 국립생물정보센터)의 BLAST를 이용하여 미생물 상동성을 조사한 결과, 본 발명에서 분리한 균주의 염기서열은 *Methylomonas koyamae* Fw12E-Y 균주와 99% 이상의 유사도를 나타내었다. 상기 균주의 16S rDNA염기서열의 분석 결과를 서열번호 3으로 기재하였으며, 상기 분석한 염기서열을 이용한 계통학적 결과는 Kimura 2-parameter 모델과 neighbor-joining 방법으로 염기서열 간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(도 2a).

[0073] 또한, 상기 균주의 미립자메탄 모노옥시게나제 알파 소단위체(particulate methane monooxygenase alpha subunit, *pmoA*)유전자의 염기서열을 분석하기 위해 서열번호 4 및 서열번호 5에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후, 증폭된 PCR 산물을 시퀀싱(sequencing)반응을 통해 염기서열을 분석하였다.

[0074] 정방향 프라이머 A189F : 5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3' (서열번호 4)

[0075] 역방향 프라이머 mb661R : 5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3' (서열번호 5)

[0076] 상기 분석한 균주의 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information: 미국 국립생물정보센터)의 BLAST를 이용하여 미생물 상동성을 조사한 결과, 상기 균주의 *pmoA* 유전자는 *Methylomonas koyamae* Fw12E-Y 균주의 *pmoA* 유전자와 98% 이상의 유사도를 나타내었다. 상기 균주의 *pmoA* 유전자의 염기서열을 서열번호 6으로 기재하였으며, 상기 분석한 염기서열을 이용한 계통학적 결과는 Kimura 2-parameter 모델과 neighbor-joining 방법으로 염기서열 간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(도 2b).

[0077] 상기 결과를 토대로, 본 발명에서 분리한 미생물이 메탄을 메탄올로 산화하는 미생물로 널리 알려진 메탄자화균 메틸로모나스 속(*Methylomonas* sp.)임을 확인하였다.

[0078] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 "메틸로모나스 속(*Methlyomonas* sp.) DH-1"으로 명명하고, 이를 2015년 8월 27일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC18400P를 부여받았다.

[0080] **실시예 3. DH-1 균주의 형태학적 및 생화학적 특성**

[0082] 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 및 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)을 통해 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 형태학적 특성을 관찰하였다.

[0083] 도 1에서 나타내는 바와 같이, DH-1 균주는 메틸로모나스의 전형적인 형태인 막대 형태를 보였고, 고체배지에서 점차적으로 light yellow -> yellow -> orange -> brown의 콜로니 색깔을 갖고 있음을 알 수 있었다. 또한, 생화학적 특성으로는 본 상기 DH-1 균주는 그람음성의 미생물로, 항생물질인 클로람페니콜(chloramphenicol; Cam), 테트라사이클린(tetracycline; Tet)과 리팜피신(rifampicin; Rif)에 대해 저항성을 가지며, 적절한 배양 온도는 30℃이며, 적절한 구리이온의 농도는 10 ㎛이며, 공기:메탄의 비율이 7:3인 조건에서 배양이 효율적으로 이루어지는 것을 확인하였다. 이러한 DH-1 균주의 형태학적 및 생화학적 특징은 하기 표 1에 정리하였다.

[0084] [표 1]

[0085] DH-1 균주의 형태학적 및 생화학적 특징

Characteristics	Strain DH-1
Morphology	Short-rod
Gram reaction	Negative
Size	1 × 1.5 μm
Colony color	Light Yellow →Yellow → Orange → Brown
Motility	Negative
Growth temperature (optimal)	20 – 37 °C (30)
Growth pH range (optimal)	4 – 12 (9)
Optimal methane concentration	30 % (v/v)
Optimal Cu^{2+} concentration	10 μM
Methanol tolerance	7 % (v/v)
Antibiotic resistance	Cam, Tet, Rif

[0086]

[0088] **실시예 4. DH-1 균주의 기질 이용능력**

[0090] 상기 실시예 1 및 2에서 분리동정한 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 기질 이용능력을 조사하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0091] [표 2]

[0092] DH-1 균주의 기질 이용능력

Substrate	Utilization	Substrate	Utilization
Methane	+	Sorbitol	-
Methanol	+	Ethanol	-
Methylamine	+	1-Propanol	-
Methylacetate	-	2-Propanol	-
Methylformate	-	1-Butanol	-
Formate	-	Acetone	-
Carbonate	-	Glycerol	-
Dextrose	-	Triton X-100	-
Sucrose	-	Tween 20	-
Fructose	-	Ethylene glycol	-
Arabinose	-	Acetate	-
Dextrin	-	Citrate	-
Esculin	+	Lactate	-
Mannitol	-	Ethyl acetate	-

[0093]

[0095] 상기 표 2에서 볼 수 있듯이, 상기 DH-1 균주는 메탄(methane), 메탄올(methanol), 메틸아민(methylamine), 에스큘린(esculin)의 탄소원에서 잘 생육하는 것을 알 수 있었다.

[0097] **실시예 5. 다양한 메탄자화균과 DH-1 균주의 지방산 조성의 비교**

[0099] 메탄자화균 type Ⅰ의 메틸로모나스 속(*Methylosinus*), 메틸로박터 속(*Methylobacter*), 메틸로마이크로비움 속(*Methylomicarobium*) 및 메틸로코커스 속(*Methylococcus*)과, DH-1 균주의 지방산 조성에 대해 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0100] [표 3]

[0101] 메탄자화균 type Ⅰ에 속하는 속(genus)과 DH-1 균주의 주요 지방산 조성의 비교

[0102]

Fatty acid	*Methylomonas*	*Methylobacter*	*Methylomicrobium*	*Methylococcus*	Strain DH-1
14:0	22±3	9±2	1±1	1±1	23.59
16:1ω8c	30±11	-	16±3	-	-
16:1ω7c	11±4	57±1	17±3	28±10	31.82
16:1ω6c	9±4	5±1	10±4	3±2	3.52
16:1ω5c	4±2	7±1	6±1	3±2	12.31
16:1ω8t	12±4	11±1	20±10	<1	-
16:0	7±2	8±1	15±3	44±8	19.41

[0104] 상기 표 3에서, 14:0은 탄소개수 14개이며 포화되어 있는 지방산을 의미하고, 16:1ω8c는 탄소개수 16개이며 8번 탄소에 cis 구조의 이중결합이 존재하는 불포화 지방산을 의미한다.

[0105] 상기 표 3에서 볼 수 있듯이, DH-1 균주의 포화 지방산 14:0이 23.59%를 나타내어 메틸로모나스 속과 지방산 조성에 있어서 유사한 결과를 나타냄을 확인하였다. 그러나, 불포화 지방산인 16:1ω8c, 16:1ω7c, 16:1ω5c 및 16:1ω8t는 메틸로모나스 속과 다른 지방산 조성을 나타내었고, 16:1ω6c(3.52%)는 메틸로코커스 속과 지방산 조성에 있어서 거의 유사한 결과를 나타냄을 확인하였다.

[0107] **실시예 6. DH-1 균주의 아세톤 생산 능력 분석**

[0109] **실시예 6-1. 실험방법**

[0111] 실시예 1 및 2에서 분리, 동정한 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 아세톤 생산 능력을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, DH-1 균주를 NMS(nitrate mineral salt) 최소배지에서 30℃에서 230 rpm으로 진탕해주며 30%의 메탄을 유일탄소원으로 제공하여 세포를 배양하였다. 이후, 배양한 지수성장기 상태의 메틸로모나스 속 DH-1 세포를 4℃에서 10000 x g의 속도로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 멸균된 증류수에 재현탁시켜 다시 원심분리한 후, 상층액을 제거하는 과정을 2회 반복함으로써 세포로부터 각종 염을 제거하였다. 이렇게 세척한 세포 펠렛을 20 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0)에 재현탁 시켰다.

[0113] 프로판(propane)-아세톤(acetone) 전환은 24ml의 serum vial에 담긴 반응 용액에서 진행하였으며, 반응용액은 2.4 mg DCW/mL의 DH-1 균주와 포름산나트륨을 포함한 1 mL의 20 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0)으로 구성하였다. Serum vial에 반응용액을 넣고 알루미늄 씰과 부틸고무마개로 밀봉한 후, 기체치환방법을 통해 60% 공기와 40% 프로판을 제공한 후, 30℃에서 230 rpm으로 진탕해주며 반응을 진행하였다.

[0114] 이후, 배양액에 존재하는 2-프로판올(2-propanol)과 아세톤의 농도는 불꽃이온검출기(flame ioniazation detector; FID)가 장착된 Younglin사의 gas chromatography (6500 GC)를 이용하여 분석하였다. 칼럼(column)은 HP-PlotQ 칼럼을 이용하였으며, 주입구와 오븐, 검출기의 온도는 각각 250, 160, 250℃였다.

[0116] **실시예 6-2. 실험결과**

[0118] 상기 실시예 6-1의 실험방법에 따른 메틸로모나스 속 DH-1 균주의 아세톤 생산 능력 분석 결과는 도 4에 도시하였다.

[0119] 구체적으로, 메탄자화균을 포함한 반응 용기에 프로판을 제공한 후, 시간이 지남에 따라 배양액 내에 프로판으로부터 2-프로판올을 거쳐 아세톤이 생산됨을 확인할 수 있었다. 이러한 아세톤의 생산은 포름산나트륨(sodium formate)의 존재에 따라 가속화됨을 확인하였는데, 포름산(formate)은 메탄자화균 내에서 포름산탈수소효소(formate dehydrogenase; FDH)에 의하여 이산화탄소로 전환되며, 1분자의 NAD^+를 $NADH/H^+$로 환원하여 전자전달계를 거쳐 pMMO에 전자를 전달하며 프로판의 산화를 촉진하는 역할을 수행한다.

[0120] 구체적으로, 2-프로판올은 반응 2시간째까지 그 농도가 꾸준히 증가하여 0.33 g/L까지 도달하지만, 이후에는 감소함을 확인하였다. 반면, 아세톤의 농도는 2-프로판올이 고갈되는 24시간까지 꾸준히 증가하여 40 mM 포름산나트륨 존재하는 경우에는 최종 농도가 0.74 g/L에 달하였으며(평균 생산속도 0.031 g/L/h), 생산된 아세톤의 농도는 감소하지 않음을 확인하였다.

[0121] 상기 결과를 통해, 반응 2시간 이후에는 프로판이 2-프로판올로 전환되는 속도보다 생성된 2-프로판올이 아세톤으로 전환되는 속도가 더 빠르다는 것을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 균주는 저부가가치산물인 프로판을 고부가가치산물인 아세톤으로 효율적으로 전환하는데, 생산한 아세톤에 대해서는 이후의 물질대사를 수행하지 않으므로 고효율 및 고농도로 축적할 수 있음에 따라, 아세톤의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0123] 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 실시예들은 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

[0125]

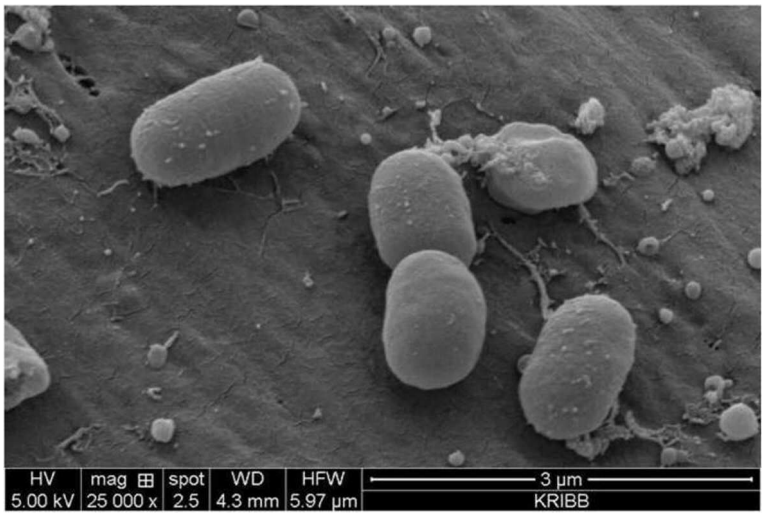
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18400P

수탁일자 : 20150827

도면

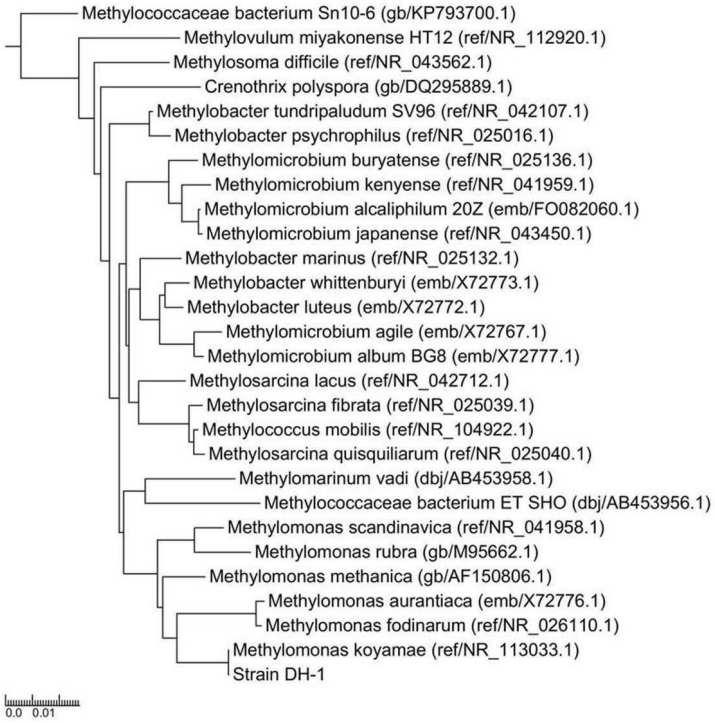
도면1a



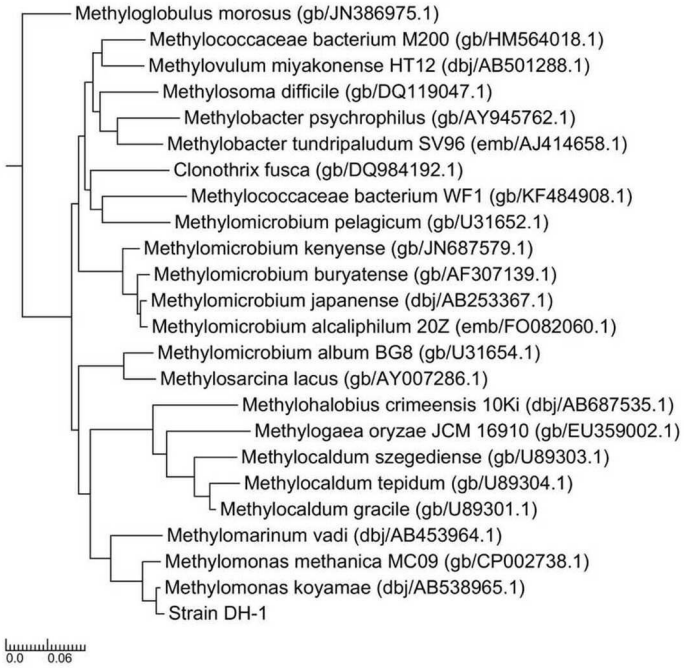
도면1b



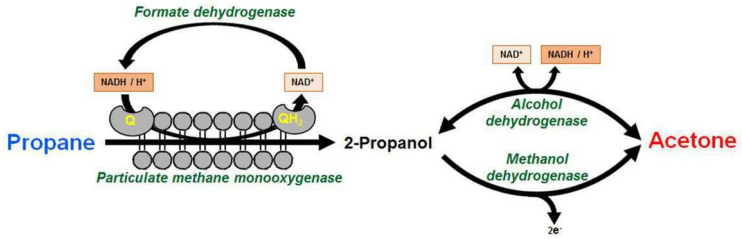
도면2a


Methylococcaceae bacterium Sn10-6 (gb/KP793700.1)
Methylovulum miyakonense HT12 (ref/NR_112920.1)
Methylosoma difficile (ref/NR_043562.1)
Crenothrix polyspora (gb/DQ295889.1)
Methylobacter tundripaludum SV96 (ref/NR_042107.1)
Methylobacter psychrophilus (ref/NR_025016.1)
Methylomicrobium buryatense (ref/NR_025136.1)
Methylomicrobium kenyense (ref/NR_041959.1)
Methylomicrobium alcaliphilum 20Z (emb/FO082060.1)
Methylomicrobium japanense (ref/NR_043450.1)
Methylobacter marinus (ref/NR_025132.1)
Methylobacter whittenburyi (emb/X72773.1)
Methylobacter luteus (emb/X72772.1)
Methylomicrobium agile (emb/X72767.1)
Methylomicrobium album BG8 (emb/X72777.1)
Methylosarcina lacus (ref/NR_042712.1)
Methylosarcina fibrata (ref/NR_025039.1)
Methylococcus mobilis (ref/NR_104922.1)
Methylosarcina quisquiliarum (ref/NR_025040.1)
Methylomarinum vadi (dbj/AB453958.1)
Methylococcaceae bacterium ET SHO (dbj/AB453956.1)
Methylomonas scandinavica (ref/NR_041958.1)
Methylomonas rubra (gb/M95662.1)
Methylomonas methanica (gb/AF150806.1)
Methylomonas aurantiaca (emb/X72776.1)
Methylomonas fodinarum (ref/NR_026110.1)
Methylomonas koyamae (ref/NR_113033.1)
Strain DH-1
0.0 0.01

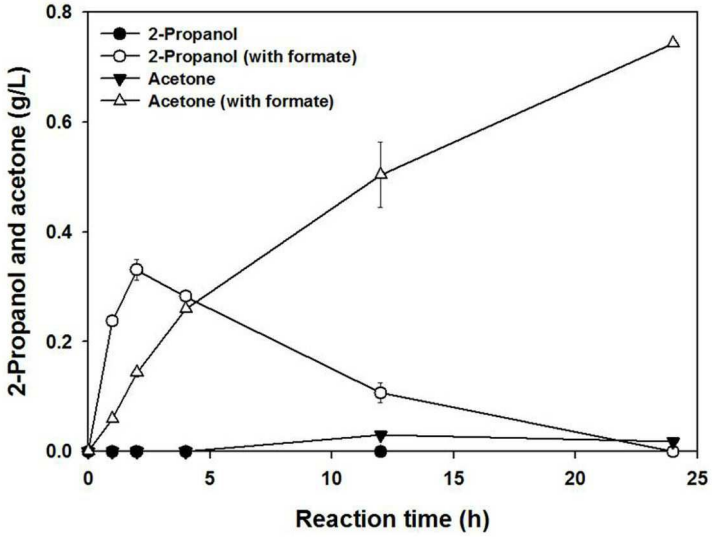
도면2b


Methyloglobulus morosus (gb/JN386975.1)
Methylococcaceae bacterium M200 (gb/HM564018.1)
Methylovulum miyakonense HT12 (dbj/AB501288.1)
Methylosoma difficile (gb/DQ119047.1)
Methylobacter psychrophilus (gb/AY945762.1)
Methylobacter tundripaludum SV96 (emb/AJ414658.1)
Clonothrix fusca (gb/DQ984192.1)
Methylococcaceae bacterium WF1 (gb/KF484908.1)
Methylomicrobium pelagicum (gb/U31652.1)
Methylomicrobium kenyense (gb/JN687579.1)
Methylomicrobium buryatense (gb/AF307139.1)
Methylomicrobium japanense (dbj/AB253367.1)
Methylomicrobium alcaliphilum 20Z (emb/FO082060.1)
Methylomicrobium album BG8 (gb/U31654.1)
Methylosarcina lacus (gb/AY007286.1)
Methylohalobius crimeensis 10Ki (dbj/AB687535.1)
Methylogaea oryzae JCM 16910 (gb/EU359002.1)
Methylocaldum szegediense (gb/U89303.1)
Methylocaldum tepidum (gb/U89304.1)
Methylocaldum gracile (gb/U89301.1)
Methylomarinum vadi (dbj/AB453964.1)
Methylomonas methanica MC09 (gb/CP002738.1)
Methylomonas koyamae (dbj/AB538965.1)
Strain DH-1
0.0 0.06

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> University Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel Methylomonas. species strain and use thereof

<130> KPA160016-KR

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27F primer

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1492R primer

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 3

<211> 1464

<212> DNA

<213> Methylomonas sp. DH-1

<400> 3

gctcagattg aacgctggcg gtatgcttaa cacatgcaag tcgaacgctg ataaggtgct 60

tgcacctttg atgagtggcg gacgggtgag taatgcatag gaatctgcct attagtgggg 120

gacaacgtgg ggaaactcac gctaataccg catacgatct acggatgaaa gcaggggacc 180

ttcgggcctt gcgctaatag atgagcctat gtcggattag ctagttggtg gggtaaaggc 240

ctaccaaggc gacgatccgt agctggtctg agaggatgat cagccacact gggactgaga 300

cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg gcgaaagcct 360

gatccagcaa taccgcgtgt gtgaagaagg cctgagggtt gtaaagcact ttcaatggga 420

aggaacacct atcggttaat acccggtaga ctgacattac ccatacaaga agcaccggct 480

aactccgtgc cagcagccgc ggtaatacgg agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg 540

cgtaaagcgt gcgtaggcgg ttgtttaagt cagatgtgaa agccctgggc ttaacctggg 600

aactgcattt gatactgggc aactagagtt gagtagaggg gagtggaatt tcaggtgtag 660

cggtgaaatg cgtagagatc tgaaggaaca ccagtggcga aggcggctcc ctggactcaa 720

actgacgctg aggtacgaaa gcgtgggtag caaacaggat tagataccct ggtagtccac 780

gccgtaaacg atgtcaacta actgttgggt tctttaagaa cttagtagtg gagctaacgt 840

attaagttga ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa actcaaatga attgacgggg 900

gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa ccttacctac 960

ccttgacatc ctcggaactt gtcagagatg acttggtgcc ttcgggaacc gagagacagg 1020

tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgttgt gaaatgttgg gttaagtccc gtaacgagcg 1080

caacccttat ccttagttgc cagcgagtaa tgtcgggaac tctagggaga ctgccggtga 1140

taaaccggag gaaggtgggg acgacgtcaa gtcatcatgg cccttatggg tagggctaca 1200

cacgtgctac aatggccggt acagagggca gcgaaaccgt gaggtcaagc aaatcccaca 1260

aagccggtcc cagtccggat tgcagtctgc aactcgactg catgaagtcg gaatcgctag 1320

taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc 1380

acaccatggg agtgggttgc aaaagaagta ggtagtttaa ccttcgggag ggcgcttacc 1440

actttgtgat tcatgactgg ggtg 1464

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A189F primer

<400> 4

ggngactggg acttctgg 18

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mb661R primer

<400> 5

ccggmgcaac gtcyttacc 19

<210> 6

<211> 471

<212> DNA

<213> Methylomonas sp. DH-1

<400> 6

accgactgga aagatagacg tctgtgggta accgtagctc ctatcgtttc tattactttc 60

cctgcggctg ttcaagcttg cttgtggtgg agataccgtt tgccaatcgg cgcaaccatt 120

tctgttgttg ctctgatgat tggtgagtgg atcaaccgtt acatgaactt ctggggttgg 180

acttacttcc cagtaaacat ttgcttccca tctaaccttc tgccaggcgc tatcgttctt 240

gatgtgatcc tgatgttggg taacagcatg accttgactg ctgttttggg tggtttggct 300

tacggtttgt tgttctaccc aggcaactgg ccggtaattg ctcctcttca cgttcctgta 360

gagtacaacg gcatgatgat gaccctggct gacttgcaag gttaccacta tgttcgtacc 420

ggtacacctg agtacatccg tatggttgag aaaggtacat taagaacttt c 471