



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0129763
(43) 공개일자 2023년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12N 15/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0026770
(22) 출원일자 2022년03월02일
심사청구일자 2022년03월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남테시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남테시앙포레아파트)
차오 호앙 트럼 퐁
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 17 (서천동, 진영빌라 4동)
(74) 대리인
위병갑

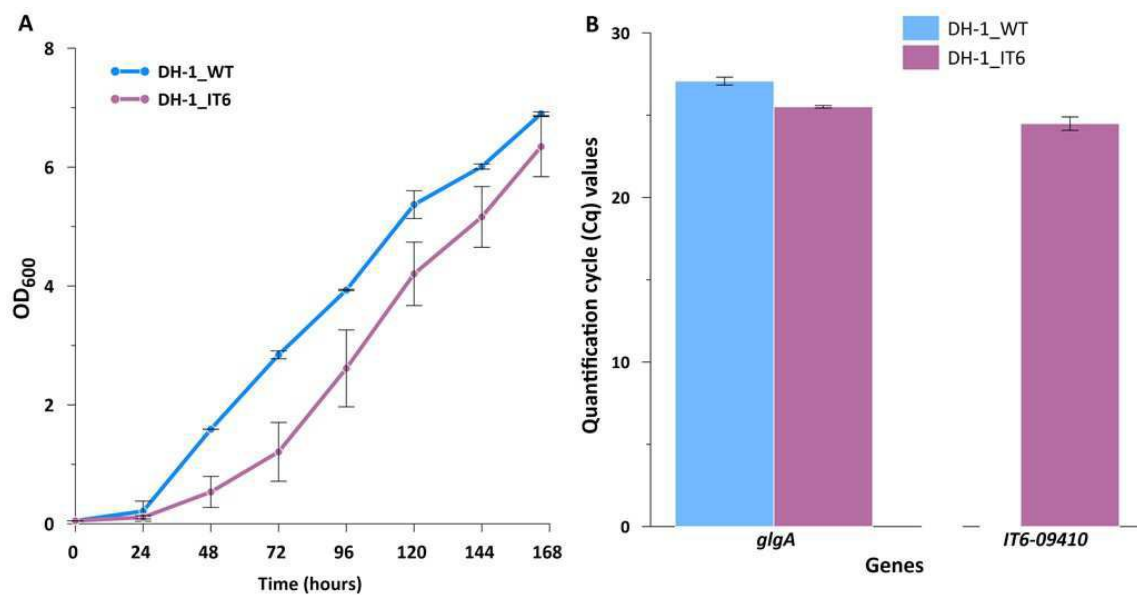
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 아세트물 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 아세트물 생산방법

(57) 요약

본 발명은 아세트물 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 아세트물 생산방법에 관한 것으로, 친환경적이고 안전한 방법으로 아세트물을 생산할 수 있으며, 아세트물의 높은 생산비용을 절감할 수 있는 아세트물 생산방법을 제공한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12P 7/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129694
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

PmoD 단백질을 코딩하는 유전자가 형질전환된 아세트 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PmoD 단백질을 코딩하는 유전자는 *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주 유래인 것인, 아세트 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 *Methylomonas* sp. DH-1인 것인, 아세트 생산용 형질전환 메탄자화균.

청구항 4

메탄을 이용하여 제1항의 균주를 배양하는 단계 (a) 및;

배지에 아세톤을 첨가하는 단계 (b);를 포함하는 것인, 아세트의 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 아세톤은,

1 내지 10 g/L인 것인, 아세트의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아세트 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 아세트 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메탄자화균(methanotrophs)은 메탄을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 미생물이다. 메탄자화균은 메탄산화효소를 가지고 있어, 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있고, 일련의 대사과정을 거쳐 바이오매스로 전환할 수 있는 능력을 가졌다. 메탄산화효소는 수용성 메탄산화효소(sMMO)와 미립자메탄산화효소(pMMO)로 분류된다. pMMO는 sMMO에 비해 메탄에 대해 더 높은 친화력을 가지고 있어, 메탄을 산화시켜 성장하는 세포내에서의 주요 생체 촉매로 유망하며, 상온 상압에서 메탄을 전환을 가능하게 한다. 이외에도 메탄자화균을 이용하여 다양한 고부가가치 화합물을 생산하려는 시도가 꾸준히 이루어지고 있으며, 메탄자화균을 대사공학적으로 개량하여 2,3-부탄디올 등을 생산하는 방법이 보고된 바 있다.

[0003] 한편, 아세트는 하이드록시케톤의 일종으로, 글리세롤을 탈수하여 제조하거나, 프로필렌글리콜 또는 당 알코올의 탈수소화 반응을 통해 제조한다. 그러나 이러한 화학적 합성 공정은 생산비용이 높은 단점이 있어, 최근 아

세톨의 생물학적 생산방법이 주목받고 있다.

[0004] 이에 본 발명은 메탄자화균 유래 PmoD 단백질과 미립자메탄산화효소(pMMO) 활성을 연계시켜, 아세톤으로부터 아세톨을 제조하는 생체촉매(biocatalyst)로서의 활용 가능성을 확인하여 그 방법을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2045043 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 메탄자화균(methanotrophs)인 *Methylomonas* sp. DH-1 균주를 대사공학적으로 개량하여 아세톤으로부터 아세톨을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 PmoD 단백질을 코딩하는 유전자가 형질전환된 아세톨 생산용 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

[0008] 본 발명에 있어서, 상기 PmoD 단백질을 코딩하는 유전자는 *Methylocidiphilum* sp. IT6 균주 유래인 것이 좋다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 메탄자화균은 *Methylomonas* sp. DH-1인 것이 좋다.

[0010] 또한, 본 발명은 메탄을 이용하여 상기 제1항의 균주를 배양하는 단계 (a) 및; 배지에 아세톤을 첨가하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아세톨의 생산방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 아세톤은, 1 내지 10 g/L인 것이 좋다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 아세톤으로부터 아세톨을 생산하는 생물학적 방법을 제공함에 따라, 친환경적이고 안전한 방법으로 아세톨을 생산할 수 있으며, 아세톨의 높은 생산비용을 절감할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1 내지 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, PmoCAB3의 서브 유닛의 BLASTP 퍼센트 동일성을 확인한 도이다. 도 1은 PmoA3, 도 2는 PmoB3, 도 3은 PmoC3의 퍼센트 동일성 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Methylocidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Methylocidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질 계통수 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Methylocidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질 구조를 예측한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Methylomonas* sp. DH-1 균주의 야생형(DH-1_WT)과 재조합된 *Methylomonas* sp. DH-1 균주(DH-1_IT6)의 세포 성장률(7A), 정량화주기(Cq)(7B)를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DH-1_WT의 아세톨 생산량(8A), DH-1_IT6의 아세톨 생산량(8B), DH-1_WT의 세포 질량 농도(8C), DH-1_IT6의 세포 질량 농도(8D)를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 시토크롬 P450의 결실을 확인한 PCR 결과와 균주의 성장률을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DH-1_WT, DH-1_IT6, DH-1_ΔP450의 세포 성장률(10A), 아세톨 역가

(10B), 피루브산의 축적량(10C)을 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아세톤의 증발량을 확인한 도이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 아세톤 동화 경로를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 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 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0016] <실험예 1> *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질 분석
- [0017] 단백질 PmoD는 *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoCAB3 클러스터 옆에 위치하며, 구조나 기능에 대한 정보가 없는 가상의 단백질이다. PmoD 단백질 서열은 NCBI 비중복 단백질 서열 데이터베이스를 사용하여 BLASTP에 의해 스크리닝 되었다. 모든 서열은 Clustal Omega를 사용하여 정렬하였고, Jalview 프로그램을 이용하였다.
- [0018] 가상의 단백질인 PmoD를 분석하기 위해 PmoCAB3의 서브 유닛을 *Methyloacidiphilum kamchatkense* Kam1, *Methyloacidiphilum alcaliphilum* 20Z, *Methylomonas* sp. DH-1 균주와 정렬하여 분석하였다. BLASTP를 사용하여 퍼센트 동일성을 확인한 결과를 도 1 내지 3에 나타내었다. PmoA3(도 1)는 Kam1 균주와 98.39%, 20Z 균주와 38.17%, DH-1 균주와 37.84% 동일하였고, PmoB3(도 2)는 Kam1 균주와 57.41%, 20Z 균주와 35.47%, DH-1 균주와 33.88% 동일하였고, PmoC3(도 3)은 Kam1 균주와 85.17%, 20Z 균주와 41.47%, DH-1 균주와 37.82% 동일하여, 각각 높은 퍼센트 동일성을 보였다.
- [0019] 한편, 서브 유닛은 3개의 균주 중 Kam1과 85 % 이상의 퍼센트 동일성을 보였으며, 나머지 두 균주에서는 30~40 % 퍼센트 동일성을 보였다. 이러한 결과는 *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoCAB3이 미립자 메탄 모노옥시게나제의 상동체로 보고된 이전의 연구 결과와 일치하였다(Awala SI et al., *Verrucomicrobial methanotrophs grow on diverse C3 compounds and use a homolog of particulate methane monooxygenase to oxidize acetone*, *The ISME Journal* 15, 3636-3647(2021)).
- [0020] *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질과 참조 균주 단백질의 다중 정렬을 통해 서열간 공유되는 보존 영역을 도 4에 나타내었다. *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질 서열과 참조균주 균주의 PmoD 사이에는 2개의 보존된 시스테인 잔기(Cys31 및 Cys63)와 1개의 히스티딘 잔기(His42)가 확인되었으며, *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질(WP_206826270.1 PmoD)은 *Methyloacidiphilum kamchatkense* Kam1 균주의 PmoD3(QDQ42582.1 PmoD3) 서열과 매치되었다.
- [0021] 계통수 분석은 Jones-Taylor-Thornton(JTT) 매트릭스 기반 모델과 500-replicate 부트스트랩을 이용하여 PmoD 서열을 3개의 하위 그룹으로 분류하였다(도 5). *Methyloacidiphilum infernorum* V4, *Methyloacidiphilum kamchatkense* Kam1, *Methyloacidiphilum fumariolicum* strain SolV의 PmoD3 염기서열이 *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD로의 가장 높은 가능성을 보였다. 한편, PmoD3 하위 그룹은 *Methyloacidiphilum* 종의 PmoD5 하위 그룹과 연결되어 있었다. 이는 *Methyloacidiphilum* 속의 상동체(homologs)로서의 연결을 의미한다. 이와는 대조적으로, *M. alcaliphilum* 20Z, *Methylocystis* sp. strain Rockwell, *M. trichosporium* OB3b는 별도의 하위 그룹으로 확인되었다. 이러한 결과는 *Methyloacidiphilum* sp. IT6의 PmoD 단백질이 상기 균주의 PmoD 단백질로부터 분리되어 진화한 것임을 시사한다.
- [0022] 도 6에 InterProScan을 사용하여 PmoD 쿼리(query) 단백질의 구조를 조사하여 도메인과 해당 패밀리 단백질을 예측한 결과를 나타내었다. InterProScan은 PmoD protein family의 신규성 때문에 PmoD family 단백질을 예측할 수 없었으나, PmoD가 아미노산 176-198의 C-말단 막횡단 나선을 가지는 막 단백질이고, N-말단의 신호 펩티드가 *Methyloacidiphilum* spp.의 Kam1, SolV 및 V4 세 균주 모두의 PmoD5 상동체(homologs)에 존재하는 처음 25개의 아미노산을 구성하였다. PmoD 단백질은 C-말단에 큰 비세포질(non-cytoplasmic) 도메인(아미노산 26-175)과 작은 세포질 도메인(아미노산 198-205)을 가질 것으로 예측되었으며, 이 비세포질 도메인은 주변 세포질에서 프로테오박테리아 메탄산화균(proteobacterial methanotroph)의 PmoD 단백질에 위치할 수 있다.

[0023] *Methyloacidiphilum* sp. IT6 균주의 PmoD 단백질은 서열번호 1의 205개의 아미노산 전단백질(preprotein)을 인코딩하는 서열번호 2의 염기서열(618 bp)을 포함한다.

[0025] <실험예 2> *Methylomonas* sp. DH-1 균주의 형질전환

[0026] 아세톤을 산화시키는 PmoD와 pMMO의 커플링 활성을 확인하기 위해 *Methylomonas* sp. DH-1의 *pmo* 오페론에 PmoD를 통합(integrate)하였다. 선형 DNA 구조는 *E. coli* σ 70-유사 프로모터에 의해 제어되는 구성적 발현과 함께 *pmo* 오페론과 PmoD의 공동 발현을 위해 *Methylomonas* sp. DH-1에 전기천공되었다. PmoD DH-1_IT6과 통합된 재조합 균주는 RT-qPCR을 통해 확인되었다. *Methylomonas* sp. DH-1 균주는 10 μ M CuSO₄를 포함하는 질산염 무기염(NMS)배지에서 배양하였다. *Methylomonas* sp. DH-1 재조합 균주의 50 ml 배양물을 성장 속도 실험을 위해 OD600 0.05에서 사전 배양된 세포에 접종하였다. zeocin을 최종 농도 30 μ g/ml로 사용하여 *Methylomonas* sp. DH-1 재조합 균주를 선택하였다.

[0027] 도 7에서 보듯이, 재조합 균주는 야생형(WT) DH-1과 유사한 성장 패턴을 보였으나 다소 느리게 성장하였고, 이는 *pmoD*의 이종 발현(heterologous expression)이 세포 성장을 방해하기 때문인 것으로 판단하였다. 한편, *Methylomonas* sp. DH-1 균주에서 SDS-PAGE를 수행하여 PmoD 단백질의 발현을 확인하려 하였으나, 발현량이 낮아 원하는 밴드를 확인하지 못하였다.

[0028] DH-1_IT6 재조합 균주에서 PmoD 발현을 확인하기 위해 야생형(WT) *Methylomonas* sp. DH-1 균주와 DH-1_IT6 재조합 균주의 총 RNA를 RT-qPCR에 사용하였다. 음성대조군으로 물(water)을 사용하였으며, 글리코젠 합성효소(glgA)는 참고 유전자(reference gene)로 사용하였다. 30 %(v/v) 메탄에서 배양된 DH-1_WT와 DH-1_IT6의 정량화 주기(quantification cycle, Cq)를 도 7B에 나타내었다. glgA의 RNA 수준은 DH-1_WT와 DH-1_IT6 균주에서 모두 Cq가 25 이상으로 유사하게 나타났다. PmoD(IT6-09410)의 경우 DH-1_WT에서는 RNA가 발현되지 않은 반면, DH-1_IT6 균주의 Cq 값은 참조 유전자인 glgA와 유사하였다. 이러한 결과는 전사 수준에서, DH-1_IT6 균주의 PmoD 발현을 확인한 것이다.

표 1

	primers
Fwd_qPCR_ <i>pmoD</i>	AAGAACCCGGGAGACAGATA
Rev_qPCR_ <i>pmoD</i>	CCATTCTCCATAAAGCACCAATAAA
Fwd_qPCR_ref gene_ <i>glgA</i>	TGGAAGGCAAACAGGCCAAT
Rev_qPCR_ref gene_ <i>glgA</i>	GTACTCTATGCTCTTGTCGC

[0032] <실험예 3> 전세포 생물촉매를 이용한 아세톤으로부터 아세톨로의 생물전환

[0033] 프로판은 pMMO를 통해 2-프로판올로 산화되며, *Methylomonas* sp. DH-1 균주를 이용하여 알코올 탈수소효소에 의해 아세톨로 전환된다 (Hur et al., Selective bio-oxidation of propane to acetone using methane-oxidizing *Methylomonas* sp. DH-1, J Ind Microbiol Biotechnol, 2017;44(7):1097-105). 본 실험에서는 DH-1_IT6 균주를 전세포 생물촉매(whole-cell biocatalyst)로 사용하여 아세톨의 생산을 확인하였다. 세포 질량 농도 범위(0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 g DCW/L)를 테스트하였다.

[0034] 반응 매질로 20 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0) 1 ml를 포함하는 24 ml 혈청병에서 반응을 수행하였다. headspace는 회색 부틸 고무 격막과 알루미늄 실로 밀봉하여 액체의 증발을 방지하였다. 반응 완충액은 생물촉매로서 1, 2.5, 5, 7.5, 10 g/L의 아세톤, 40 mM 포름산나트륨, 2.4 g DCW/L의 박테리아 전체 세포를 함유하였다. 전체 세포 반응을 인큐베이션 하고, 6시간 및 12시간 후에 샘플링하였다.

[0035] 도 8A에서 보듯이, DH-1_WT의 아세톨 생산량은 배양 시간에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 반면, 도 8B에서 보듯이, DH-1_IT6는 6시간 배양한 경우에 아세톨 생산량이 최대로 확인되었으며, 12시간 배양한 경우에는 오히려 아세톨 생산량이 감소하는 것으로 나타났다. DH-1_WT는 10 g/L의 아세톤에서 12시간 배양한 경우 2.943 mM의 최대 아세톨 역가(titer)를 확인하였으며, DH-1_IT6는 10 g/L의 아세톤에서 6시간 배양한 경우 4.364 mM의 최대

아세트 역가를 보였다. 이는 야생형(WT)에 비해 약 1.48배 높은 수치이다. 또한, DH-1_WT의 최대 세포 전환율은 12시간 배양 후 0.244 mM/h, DH-1_IT6의 최대 세포 전환율은 6시간 배양 후 0.727 mM/h였다.

[0036] 한편, 도 8C 및 도 8D에 10 g/L의 아세톤과 세포 농도에 따른 아세트 역가를 나타내었다. 도 8C에서 보듯이, DH-1_WT 균주에서 0.3 ~ 4.8 g DCW/L의 세포 농도범위에서, 세포 농도와 배양 시간이 증가할수록 아세트 생산량이 증가하는 경향을 보였으나, 최대 아세트 생산량은 4.689 mM에 불과하였다. 또한 9.6 g DCW/L의 세포 농도에서는 6시간 배양한 경우 아세트 생산량이 8.709 mM(645.13 mg/L)로 가장 높은 역가를 보였다. 한편, 도 8D에서 보듯이, DH-1_IT6 균주에서 9.6 g DCW/L의 세포 농도에서 최대 18.291 mM(1.35 g/L)의 아세트 역가를 보였으며, 비생산성(specific productivities)은 0.317 mmol/g cell/h로 계산되었다.

[0038] <실험예 4> 배치(batch) 배양에 따른 아세톤의 아세트로의 생물전환

[0039] *Methylomonas* sp. DH-1 균주에는 미량의 시토크롬 P450이 포함되어 있는데, 시토크롬 P450은 아세톤을 아세트로 전환시키는 효과가 있다고 알려져 있다(Brodel S et al., Genome Scale Metabolic Model of the versatile methanotroph *Methylocella silvestris*, Microbial Cell Factories 19, Article number:144(2020)). 본 실험은 *Methylomonas* sp. DH-1 야생형에서 아세톤 전환 능력을 검증하기 위해 벡터 pCM184-p450를 이용하여 시토크롬 P450_deleted 돌연변이체(DH-1_ΔP450)를 구성하였다. kanamycin을 포함하는 배지에서 배양하고 스크리닝하여 유전자 특이적 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다.

표 2

	primers
Fwd_Cyt P450_DH1	ATGCCTAACACCAGACCCGTAC
Rev_Cyt P450_DH1	TTAAGGTTTAGCCAACCGCT

[0043] 도 9A에서 시토크롬 P450의 결실을 확인하였으며, 도 9B에 30 %(v/v) 메탄에서 배양한 균주의 성장물을 나타내었다.

[0044] 한편, DH-1_WT 균주와 DH-1_IT6 균주는 탄소원으로 아세톤을 이용할 경우에는 성장이 불가능하므로, 본 실험에서는 10 g/L의 아세톤과 함께 탄소원으로 30 %(v/v) 메탄을 공급하여 OD600 0.05로 배양하였다. 아세톤에 의한 성장 억제를 방지하기 위해, 아세톤은 24시간 배양 후 배양액에 공급하였다. 배양 샘플을 1,000 ×g에서 10분간 원심분리하고, 상층액을 수집한 뒤, 0.2 μm 멤브레인을 통해 여과하였다.

[0045] 세포 내 피루브산(pyruvate) 축적은 120시간과 168시간의 두 시점에서 평가하였다. 상층액은 HP-Innowax column (30 m × 0.53 mm inner diameter)과 화염 이온화 검출기가 장착된 GC(Younglin, 6500GC)를 이용하여 정량하였다. 1 μl 샘플을 사용하여 비분할 모드로 주입하였다. 오븐 온도는 100 °C에서 3분 유지한 뒤, 215 °C까지 분당 10 °C씩 증가시켰다. 추출된 피루브산은 HPLC(Jasco Co., Japan)로 측정하였다. 실험은 3번 수행하였으며, 대표적인 1개의 실험을 선택하였다. 분산 통계 분석(ANOVA)을 사용하여 평균값을 비교했으며 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다(*=p<0.05).

[0046] 도 10A에서 보듯이, DH-1_WT 및 DH-1_ΔP450의 성장은 아세톤에 의해 약 0.5의 OD600으로 유의하게 억제된 반면, 재조합 균주 DH-1_IT6은 아세톤의 억제 효과를 능가하여 OD600 4.46까지 성장하였다. 야생형(WT) 및 재조합 균주에서 생산된 잔류 아세톤과 아세트의 양을 도 9B에 나타내었다. 24 h 후, 야생형(WT) 및 재조합 균주 모두에서 아세톤 역가가 크게 감소하였다. 도 11에 아세톤의 증발량을 확인한 결과를 나타내었다. 일정량의 아세트가 증발된 것을 고려하면 상당한 양의 아세톤(초기 역가의 거의 50%)이 흡수된 것으로 확인되었다. 48 h와 96 h 사이에서, 아세트는 DH-1_IT6 재조합 균주에서만 검출되었으며 72 h에 1.443 mM의 가장 높은 역가를 나타냈다.

[0047] 피루브산은 120 및 168 h의 두 시점에서 평가하였다. DH-1_IT6 균주의 피루브산 축적량이 168 h에서 4.394 μmol pyruvate/gDCW로, 같은 시간의 DH-1_WT(1.20 μmol pyruvate/gDCW)에 비해 3.65배, DH-1_ΔP450(1.02 μmol pyruvate/gDCW)에 비해 4.3배 높게 나타났다.

[0048]

아세톤은 아세톤 탈수소효소에 의해 메틸글리옥살로 전환될 수 있으며, 이는 추가로 피루브산으로 전환될 수 있다. *Methylophilum* sp. IT6 균주에서 제안된 아세톤 동화 경로(Awala SI et al., Verrucomicrobial methanotrophs grow on diverse C3 compounds and use a homolog of particulate methane monooxygenase to oxidize acetone, The ISME Journal (2021) 15:3636-3647))를 도 10에 나타내었다. *Methylophilum* sp. IT6 균주의 염색체에서 제안된 아세톤 동화 경로에서 관련 유전자의 구성을 도 12A에 나타내었다. 도 12B에서 보듯이, *Methylophilum* sp. IT6 균주는 아세톤을 아세토로 산화시키며, 이는 GMC 산화환원효소 (AYM39_RS20165)에 의해 메틸글리옥살로 추가 산화될 수 있다. 수송체 단백질(ABC transporter)을 통한 수동 확산 또는 능동 수송은 세포질로의 메틸글리옥살 수송을 담당할 수 있다. 7개의 후보 유전자(AYM39_RS20250, AYM39_RS03110, AYM39_RS04650, AYM39_RS09045, AYM39_RS14435, AYM39_RS16860, AYM39_RS21550)는 글리옥살라아제(glyoxalase) 효소가 메틸글리옥살을 S-락토일글루타티온으로 전환할 수 있다고 보고된 바 있으며, 이는 hydroxyacylglutathione 가수분해 효소(AYM39_RS06120)에 의해 락테이트로 전환되고, 젖산 탈수소효소 (AYM39_RS04895, AYM39_RS13600)에 의해 피루브산으로 전환된다. 생성된 피루브산은 TCA 회로에 들어가기 위해 아세틸-CoA로 전환되거나 PEP-합성효소(AYM39_RS13170)에 의해 포스포에놀피루브산(PEP)으로 전환될 수 있다. 포스포에놀피루브산은 세린 회로로 진입하여 옥살로아세트산(OAA)으로 전환되며, TCA 회로로 들어간다. 이를 통해 TCA 회로로의 탄소 플럭스를 향상시킬 수 있으며, 바이오매스를 더 만들기 위한 전구체 풀을 향상시킬 수 있다. 또한, 피루브산 전환으로 인한 acetyl-CoA 풀의 증가를 통해 acetyl-CoA를 전구체로 사용하는 다양한 종류의 바이오 산물 생산도 가능할 것으로 판단되었다.

도면

도면1



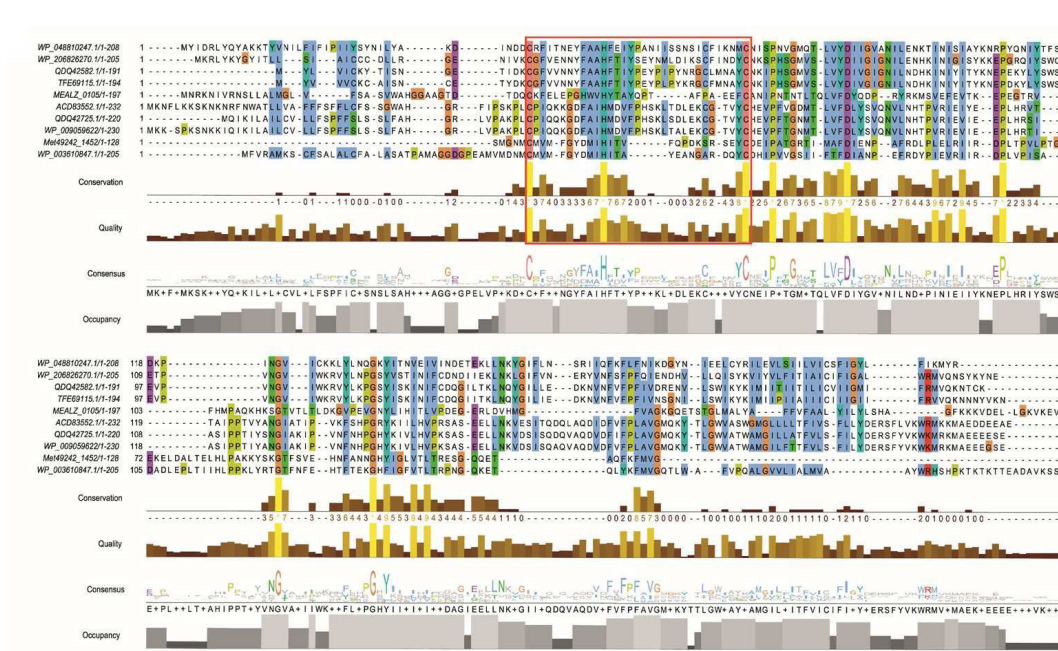
도면2



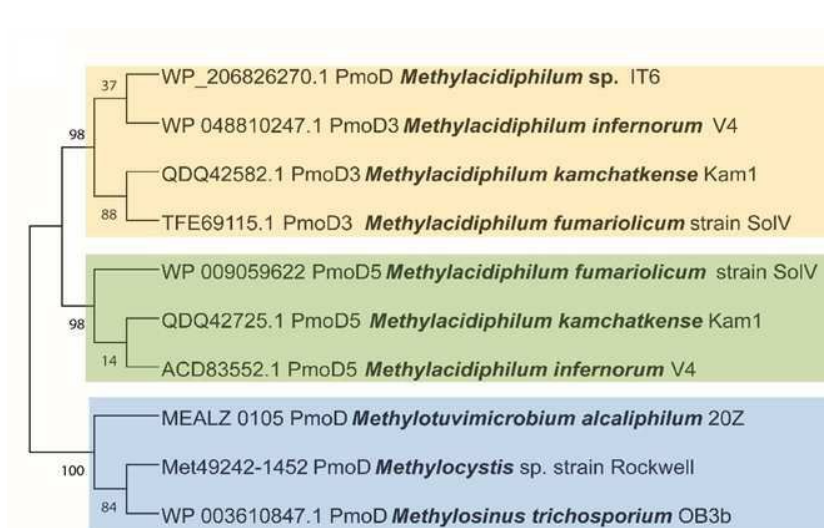
도면3



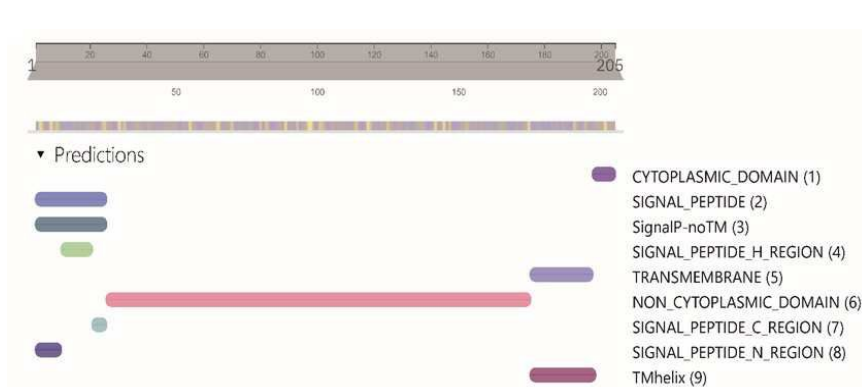
도면4



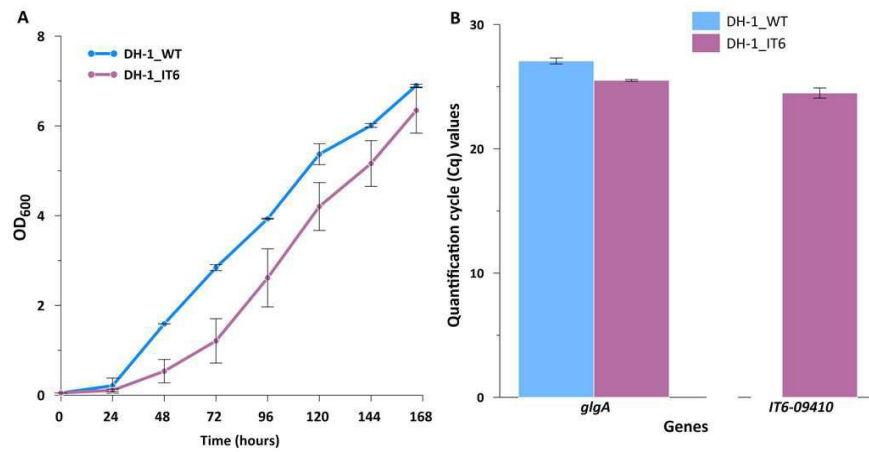
도면5



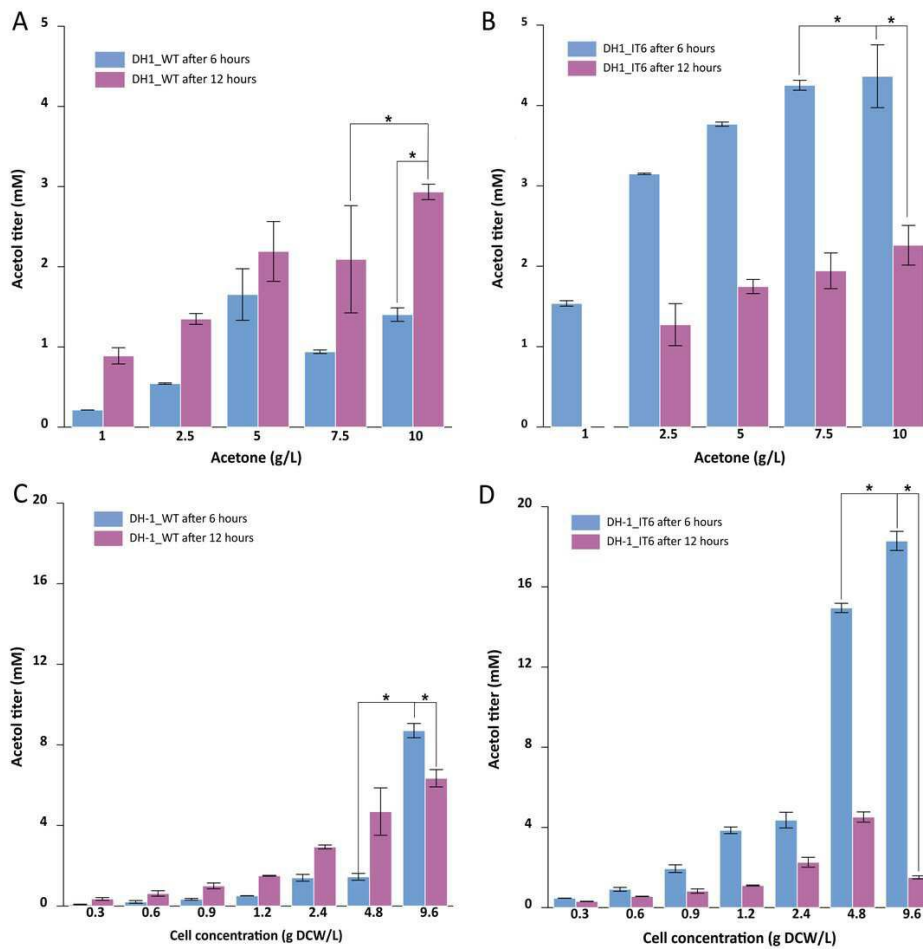
도면6



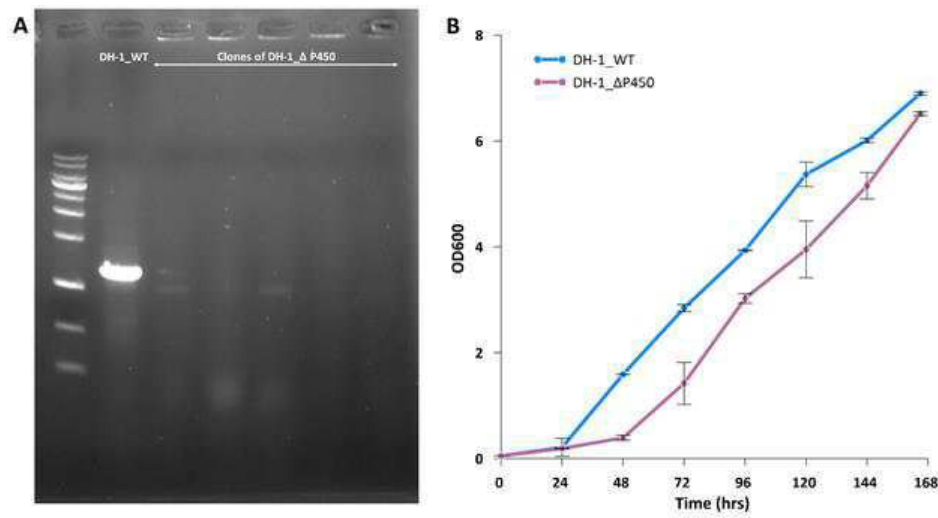
도면7



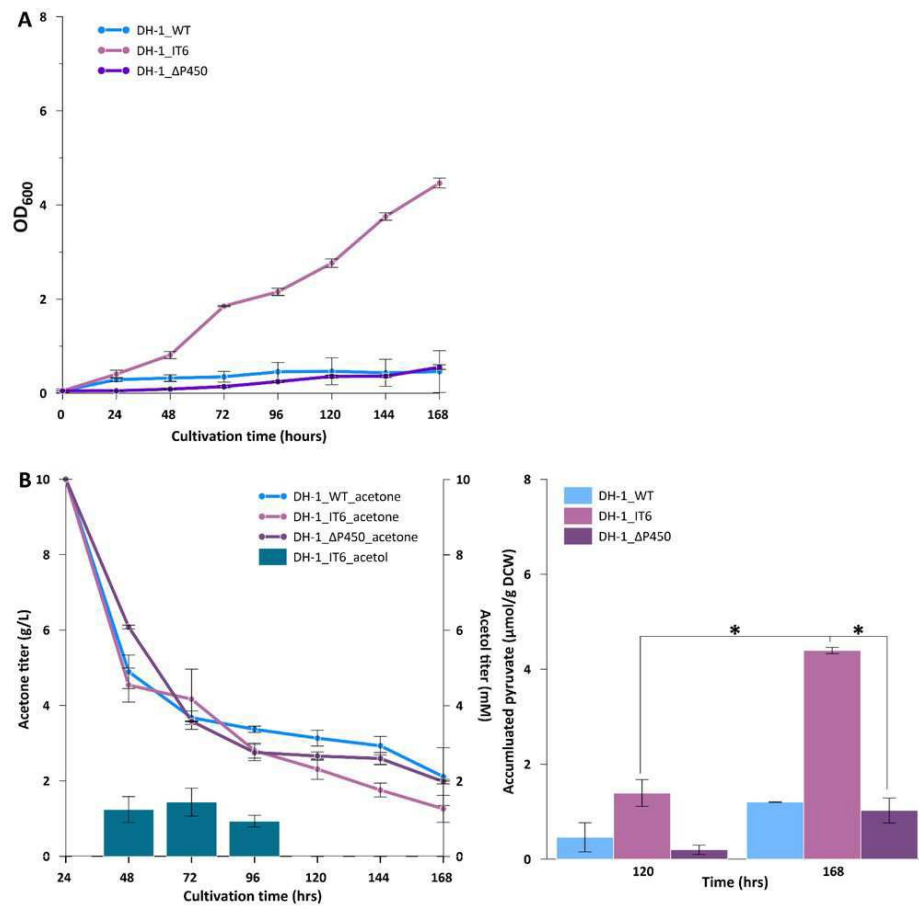
도면8



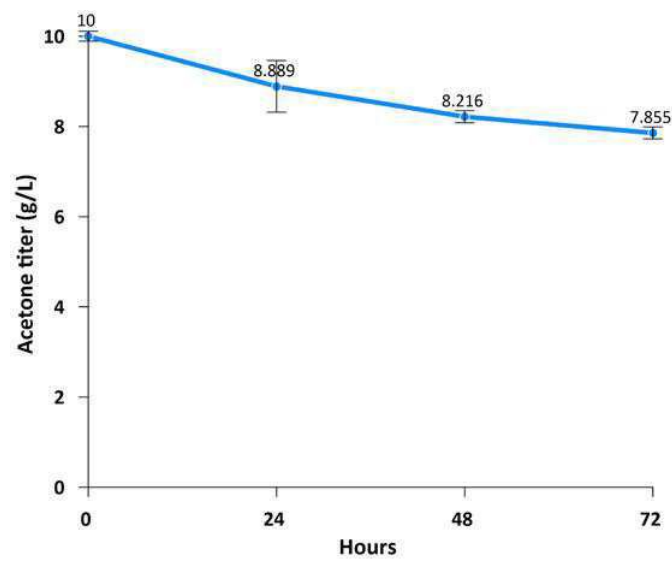
도면9



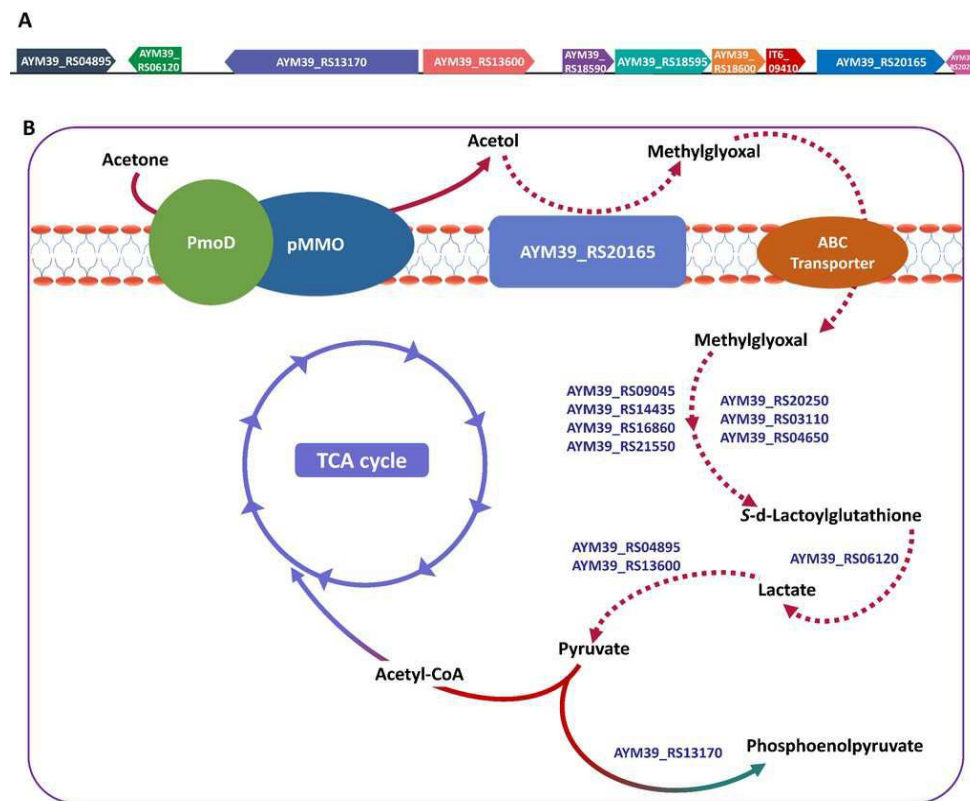
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transformed methanotroph for acetol producing ability and acetol production method using the same
- <130> PN2112-645
- <160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pmoD of Methylophilum sp. IT6

<400> 1

Met Lys Arg Leu Tyr Lys Tyr Gly Tyr Ile Thr Leu Leu Ser Ile Ala

1 5 10 15

Ile Cys Cys Cys Asp Leu Leu Arg Gly Glu Asn Ile Val Lys Cys Gly

20 25 30

Phe Val Glu Asn Asn Tyr Phe Ala Ala His Phe Thr Ile Tyr Ser Glu

35 40 45

Tyr Asn Met Leu Asp Ile Lys Ser Cys Phe Ile Asn Asp Tyr Cys Asn

50 55 60

Lys Ser Pro His Ser Gly Met Val Ser Leu Val Tyr Asp Ile Ile Gly

65 70 75 80

Ile Gly Asn Ile Leu Glu Asn His Lys Ile Asn Ile Gly Ile Ser Tyr

85 90 95

Lys Lys Glu Pro Gly Arg Gln Ile Tyr Ser Trp Cys Glu Thr Pro Val

100 105 110

Asn Gly Val Ile Trp Lys Arg Val Tyr Leu Asn Pro Gly Ser Tyr Val

115 120 125

Ser Thr Ile Asn Ile Phe Cys Asp Asn Asp Ile Ile Glu Lys Leu Asn

130 135 140

Lys Leu Gly Ile Phe Val Asn Glu Arg Tyr Val Asn Phe Ser Phe Pro

145 150 155 160

Phe Gln Ile Glu Asn Asp His Val Leu Leu Gln Ile Ser Tyr Lys Val

165 170 175

Ile Tyr Val Leu Phe Ile Thr Ile Ala Ile Cys Ile Phe Ile Gly Ala

180 185 190

Leu Trp Arg Met Val Gln Asn Ser Tyr Lys Tyr Asn Glu

	195	200	205	
<210>	2			
<211>	618			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	pmoD of Methyacidiphilum sp. IT6			
<400>	2			
	atgaaaagac tatataaata tggatatata acactgttgt ctatagctat atgttgttgc			60
	gatctgttaa gaggtgaaaa catagtaaaa tgtggttttg tggaaaataa ttattttgca			120
	gctcatttta ctatatattc agaataaac atgttagata taaaatcctg ctttataaac			180
	gattattgca ataagagccc gcacagcgga atgggtgtcat tgggtgatga catcattggg			240
	ataggaaaca tacttgaaaa tcataaaata aacataggta tatcatacaa aaaagaaccc			300
	gggagacaga tatactcttg gtgcgaaacc cctgtaaatg gtgtcatatg gaaaagggtg			360
	tatctgaatc ctgggtctta tgtatctaca ataaatatat tttgtgataa cgatataata			420
	gaaaaattaa ataagttagg tatctttgtt aatgaaagat atgttaattt tagttttcct			480
	ttccaaatag aaaatgatca tgttttattg cagataagct ataaagtaat atatgtatta			540
	tttataacta tagctatatg catatttatt ggtgctttat ggagaatggt tcagaatagt			600
	tataagtata acgaataa			618