



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월16일
(11) 등록번호 10-1736485
(24) 등록일자 2017년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0033345
(22) 출원일자 2013년03월28일
심사청구일자 2013년03월28일
(65) 공개번호 10-2014-0118079
(43) 공개일자 2014년10월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110069744 A*
논문1 - MOLECULAR AND CELLULAR PROTEOMICS*
KR1020110069744 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
강성균
경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)
이정현
경기 성남시 분당구 불정로 219, 116동 101호 (정자동, 한솔마을청구아파트)
(74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김정태

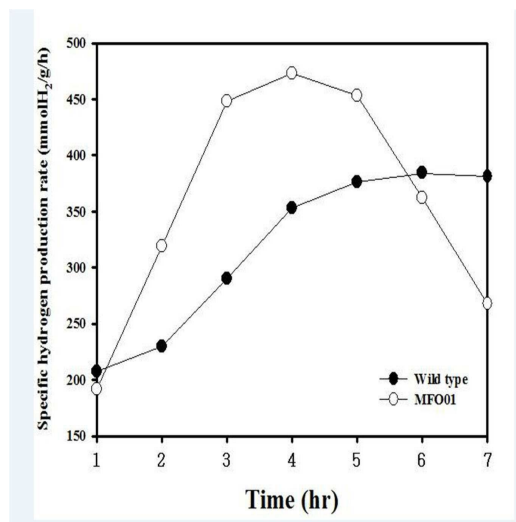
(54) 발명의 명칭 포름산염으로부터 수소생산능이 증가된 써모코코스 돌연변이체 및 이를 이용한 수소생산방법

(57) 요약

본 발명은 포름산염으로부터 수소생산능이 증가된 써모코코스 온누리우스 엔에이원 돌연변이체 및 이를 이용한 수소생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라 돌연변이화 된 *Thermococcus onnurineus* NA1는 야생형보다 포름산염을 포함하는 배지에서 수소 생산 능력이 증가되었고, 성장 속도도 야생형에 비해 증가하였다. 본 발명에 따른 균주를 이용하면 포름산으로부터 고효율로 수소를 생산할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

권개경

경기 안산시 상록구 부곡로5길 29, 2층 (부곡동)

이현숙

경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)

김태완

경기 안산시 상록구 삼리2길 17, 203호 (사동)

김윤재

경기 안산시 상록구 향호2길 18, 203호 (사동)

김민식

경기 안산시 상록구 장화2길 26, (사동)

전정호

인천 부평구 부흥북로84번길 23, 302호 (부평동, 광미리치빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1615005148

부처명 국토해양부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발

연구과제명 해양 초고온 고세균 이용 바이오수소 생산기술 개발

기 여 율 7/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM57371

부처명 국토해양부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양극한생물분자유전체연구단

연구과제명 해양극한생물분자유전체연구단

기 여 율 3/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

F420-환원 수소화효소가 과발현된 *Thermococcus onnurineus* 돌연변이 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 F420-환원 수소화효소가 과발현된 *Thermococcus onnurineus* 돌연변이 균주는 F420-환원 수소화효소 유전자 앞에 글루타메이트 디하이드로 게나아제(Pgdh)의 프로모터를 삽입하는 것을 특징으로 하는 *Thermococcus onnurineus* 돌연변이 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, *Thermococcus onnurineus* 돌연변이 균주는 미생물기탁번호 KCTC12356BP인 것을 특징으로 하는 *Thermococcus onnurineus* 돌연변이 균주.

청구항 4

*Thermococcus onnurineus*를 돌연변이 시켜 F420-환원 수소화효소의 발현율을 증가시키는 단계; 및 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 수소생산 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 *Thermococcus onnurineus*는 미생물기탁번호 KCTC12356BP인 것을 특징으로 하는 수소생산 방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 F420-환원 수소화효소의 발현을 증가하는 F420-환원 수소화효소 유전자의 복제수의 증가, 전사율의 증가, 번역율의 증가, 상기 F420-환원 수소화효소의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 수소생산 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 F420-환원 수소화효소의 발현율의 증가는 상기 F420-환원 수소화효소 유전자에 글루타메이트 디하이드로 게나아제(Pgdh)의 프로모터를 이용하는 것을 특징으로 하는 수소생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포름산염으로부터 수소생산능이 증가된 썬모코코스 돌연변이체 및 이를 이용한 수소생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 산업체에서 수소의 사용은 해를 거듭하면서 증가하고 있고, 연료 전지 자동차와 수소 발전소 등의 청정 에

너지원으로서의 수소의 이용이 점차 상용화되면서 수소 공급이 기하급수적으로 증가 될 전망에 있다. 이와 같이 청정 에너지로서의 수소의 가치가 높아지고 대량의 수소를 일정하게 공급할 수 있는 방안을 생각하게 되면서 수소를 생산하는 방법에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

- [0003] 수소에너지는 중량당 발열량이 석유보다 3배 이상 높으면서도, 이산화탄소, NOx, SOx 등 환경에 악영향을 미칠 수 있는 물질들을 배출하지 않아, 장차 화석에너지를 대체할 에너지로써 각광받고 있다.
- [0004] 종래부터 사용된 수소 생산 방법에는 물의 전기분해, 천연가스나 나프타의 열분해 (thermal-cracking) 또는 증기 개질법 (steam reforming) 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 다시 화석연료를 사용하여 고온, 고압 조건을 만들어야 하는 문제가 있으며, 일산화탄소를 포함한 혼합가스를 발생시키므로 그러한 가스로부터 일산화탄소를 제거하여야 하는 어려운 문제를 발생시킨다.
- [0005] 반면 미생물을 이용한 생물학적 수소 생산 방법은 별도의 에너지를 투입하여 고온, 고압 조건을 만들 필요가 없고, 생성된 가스에 일산화탄소를 포함하지 않는다는 장점이 있다. 이러한 생물학적 수소생산방법은 크게 광합성 미생물을 이용하는 것과 비-광합성 미생물(주로 혐기성 미생물)을 이용하는 것으로 나뉘볼 수 있다. 전자에 속하는 예로 대한민국 등록특허 제10-0680624호 "높은 염분농도에서 수소 생성능이 우수한 광합성 세균 로도박터 스페로이데스 균주를 이용한 수소생산 방법" 등이 있다.
- [0006] 그러나 빛을 에너지원으로 사용하는 광합성 세균들의 고농도 배양기술이 아직 충분히 개발되어 있지 않으며, 종래의 광합성 세균들은 높은 분압의 기질이 있을 경우 기질저해가 심하다는 단점이 있다. 또한, 이들은 빛이 존재하는 경우에만 수소생산능이 지속될 수 있다는 문제점이 있다.
- [0007] 따라서, 유기 탄소를 이용하여 수소를 생산할 수 있는 미생물들을 이용하여 수소를 생산하려는 시도가 지속적으로 이루어지고 있으며, 그 예로 대한민국 등록특허 제10-0315663호 "사이트로박터속 균주 Y19 및 이에 의한 수소 생산", 대한민국 등록특허 제10-0315662호 "로도슈도모나스 팔루스트리스 P4 및 이에 의한 수소생산" 등이 있다.
- [0008] 본 발명자들에 의한 한국 특허출원 10-2010-7013071호에서는 FDH2-MFH2-MNH2 수소화효소 클러스터가 공개되었으며, fdh2-mfh2-mnh2가 포름산을 이용한 수소생성에 중요하다는 것을 보고하였다. F420 수소화효소가
- [0009] 본 발명자들에 의한 한국 특허출원 10-2011-0021390호에서는 씨모코코스 속 균주를 이용한 수소가스 생성방법이 개시되어져 있다.
- [0010] 그러나 F420-환원 수소화효소가 포름산에서 수소를 생성하는데 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 밝혀져 있지 않았다. 본 발명자들은 F420-환원 수소화효소(F420-reducing hydrogenase, frh)가 포름산을 이용하여 수소를 생산하는 fdh2-mfh2-mnh2 클러스터 바로 앞에 존재는 점에 착안하여, F420-환원 수소화효소(F420-reducing hydrogenase, frh)의 발현을 증가시킨 결과 씨모코코스 속 균주에서 수소생산이 증가되는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 수소 생산 능력이 증가된 균주를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 효율적으로 수소를 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기한 목적을 위하여, 본 발명의 제 1 의 구현형태는 F420-환원 수소화효소가 과발현된 수소생산성이 증가된 *Thermococcus spp.* 돌연변이 균주를 제공한다. 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게는 상기 *Thermococcus spp.* 는 *Thermococcus onnurineus* 이고, 보다 더 바람직하게는 미생물기탁번호 KCTC 12356BP이다. 징으로 하는 돌연변이 균주이다.

- [0015] 본 발명의 제 2 의 구현형태는 *Thermococcus spp.*를 돌연변이 시켜 F420-환원 수소화효소의 발현율을 증가시키는 단계; 및 상기 균주를 포름산이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 수소생산방법이다. 이제 제한되는 것은 아니나 상기 *Thermococcus spp.* 는 *Thermococcus onnurineus* 일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 미생물기탁번호 KCTC 12356BP 이다.
- [0016] 상기 F420-환원 수소화효소의 발현율 증가는 상기 F420-환원 수소화효소 유전자의 복제수의 증가, 전사율의 증가, 번역율의 증가, 상기 F420-환원 수소화효소의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어질 수 있다. 유전자 복제수의 증가, 전사율의 증가, 번역율의 증가, 또는 효소의 안정성을 증가시키는 방법은 공지의 기술을 사용할 수 있다. 용어 "발현"은 상응하는 단백질, 유전자 생성물의 생성을 야기하는 유전자 서열의 전사 및 번역을 말한다. 본 발명의 바람직한 양상에서, F420-환원 수소화효소를 코딩하는 유전자가 미생물로 과발현된다. 용어 "증가된 발현" "향상된 발현" 또는 "과발현"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 유사한 의미, 즉 비-제조합 미생물에 비해 유전자의 전사 및 번역이 증가되어, 세포 내로 증가된 양의 효소를 야기하는 것을 말한다.
- [0017] 유전자의 발현을 증가시키기 위해, 본 분야의 전문가는 유전자 발현을 조종하는 다른 방법을 안다. 특히, 유전자는 유도될 수 있는 다른 강도를 갖는 프로모터를 사용하여 발현될 수 있다. 이러한 프로모터는 상동 또는 이종일 수 있다. 당업자는 어느 프로모터가 가장 편리한지 알며, 예를 들어 글루타메이트 디하이드로 게나아제 (Pgdh)의 프로모터, 프로모터 Ptrc, Ptac, Plac 또는 람다 프로모터 cI이 널리 사용된다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서, 유전자는 미생물로 도입되는 플라스미드 또는 벡터에 의해 발현될 수 있다. 상기 미생물은 그 뒤 "숙주 미생물"이라고 불리우며, 외래 또는 이종 유전자 또는 그 자신의 유전자의 여분의 복
- [0019] 제분을 받아들일 수 있고 그러한 유전자를 발현시켜 활성 단백질 생산물을 생산하게 할 수 있는 미생물을 말한다.
- [0020] 용어 "형질전환"은 새로운 유전자 또는 존재하는 유전자의 여분의 복제본의 숙주 유기체 내로의 도입을 말한다.
- [0021] 용어 "형질전환 벡터"는 숙주 유기체 내에 폴리뉴클레오티드를 도입시키는데에 사용되는 임의의 운반체를 말한다. 그러한 운반체는 사용되는 유기체에 따라 예를 들어 플라스미드, 파지 또는 본 기술분야의 전문가에게 공지된 다른 성분들일 수 있다. 형질전환 벡터는 일반적으로 폴리뉴클레오티드 또는 발현 카세트에 추가로 특정 숙주 세포의 형질전환을 용이하게 하는 다른 성분을 함유할 수 있다. 발현 벡터는 카세트 및 숙주 유기체 내로 벡터의 복제를 가능하게 하는 추가의 성분들에 의해 전달되는 유전자의 적절한 발현을 가능하게 하는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 숙주 유기체 내 단일 복제본이나 다중 복제본으로 존재할 수 있다. 당업자는 그들의 복제 개시점 및 그에 따른 세포 내 복제수가 다른, 다른 유형의 플라스미드를 안다.
- [0022] 유전자의 과발현을 획득할 수 있는 또 다른 수단은, 만약 mRNA의 번역이 최적화되었다면, 상응하는 메신저 RNA를 안정화시키는 성분의 발현 또는 조절을 개선하여 (문헌[Carrier et al. Biotechnol Bioeng. 59:666-72,1998]) 이용 가능한 효소의 양을 증가시키는 것이다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 돌연변이 균주는 종래의 씨모코코스 균주보다 성장속도가 약 31% 빠르며, 단위시간당 수소 생산 속도가 약 20% 증가되었다. 본 발명의 돌연변이 균주를 이용한 수소생산방법은 종래의 화학적 생산 방법과 달리 고온, 고압 조건을 필요로 하지 않고, 상온, 상압 조건에서 수소를 발생시킬 수 있으며, 유해한 부산물을 발생시키지 않는다는 장점이 있다. 또한, 미생물을 이용하여 수소를 생산하는 종래의 기술과 비교하더라도 고순도의 수소를 고효율로 생산할 수 있고, 고온 조건에서도 수소를 생산할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 *Thermococcus onnurineus* NA1의 frh-fdh2-mfh2-mnh2 클러스터의 유전자 구조를 비교 분석한 것을 보인다.
- 도 1b는 돌연변이 균주의 제조 전략을 보이는 모식도이고 유전자재조합을 통하여 P_{gdh}hmgP_{fu} 카세트를 F420-reducing hydrogenase(F420-환원 수소화효소, frh)의 알파 서브유닛 유전자(Ton_1559) 앞에 넣었다. 확인을 위

하여 사용되어진 프라이머의 위치를 해당되는 유전자들 아래의 검은색 화살표로 나타내었다.

도 2는 F420-환원 수소화효소(F420-reducing hydrogenase, frh)의 웨스턴 블랏 분석 및 단백질 수준을 측정하였다. 쿠마시 블릴리언트 블루 R-250으로 염색된 SDS-PAGE를 웨스턴 블랏 아래 나타냈다.

도 3은 포름산염을 기질로 이용한 CSTR 발효에서 야생형과 돌연변이체의 수소 생산의 변화. (a), 성장곡선; (b), 생산된 수소 누적 곡선.

도 4는 포름산염을 기질로 이용한 CSTR 발효에서 야생형 및 돌연변이체의 수소 생산의 동력학적 분석을 보인다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0026] **실시예**

[0027] **실험방법 및 물질**

[0028] 1) 균주 및 배지

[0029] 일반적인 배양조건으로서, 80의 혐기성 환경에서 g/l로 효모 추출액(Yeast extract) (4), NaCl (35), KCl (0.7), MgSO₄ (3.9), CaCl₂ · H₂O (0.4), NH₄Cl (0.3), Na₂HPO₄ (0.15), NaSiO₃ (0.03), NaHCO₃ (0.5), cysteine · HCl (0.5)로 구성된 변형된-MI (Modified-MI; MMI)에 400 mM 소듐 포름산염(sodium formate)을 추가시킨 배지를 이용하였다. 멸균후에 1.0 ml 미량 원소 혼합물(trace element mixture) 및 1 ml/l Fe-EDTA, 및 1ml/l의 발크(Balch)의 비타민 용액이 배지에 첨가되었다. 최초의 배지 pH는 대기압에서 6.5로 맞추었다.

[0030] 2) 세포 성장 및 돌연변이주 제작

[0031] 혐기적 챔버(Coy)를 세포 접종을 위해 사용했다. 세포를 80에서 MMI-sodium formate(MMI-소듐 포름산염, sodium formate) 배지를 사용하였다. 세포 성장을 건조 세포 무게(Dry Cell Weight; DCW)내의 세포 단백질의 양이 50%이라는 가정(Kengen & Stams, 1994)에 따라 DC 단백질 분석 키트(DCW) 또는 배양 동안에 UV-vis 분광기(Biophotometer plus, Eppendorf)의 600 nm에서의 광학밀도(OD600)로 세포 배양물 1ml의 단백질 양을 측정하여 관측하였다. OD600의 1 단위는 0.361 g-DCW/L에 해당한다. 형질전환 및 분쇄가 *Thermococcus kodakarensis* (Matsumi et al., 2007)에 따라 수행되었다. 간략하게 목표 유전자가 연결되어 있는 약 1 kb DNA 지역을 pUC118 벡터에 클론된 P_{gdh}hmgP_{fru} 카세트의 양 옆에 삽입한다. 이들 벡터(2 ~ 6 μg)로 ASW-YT 배지내에서 성장된 세포를 형질전환하고, 심바스타인을 선택압으로 하여 배양하였다. 돌연변이 후보자를 PCR 증폭을 통하여 확인하였다. 개발된 균주는 2013년 1월 23일자로 한국미생물자원센터에 KCTC 12356BP로 기탁되었다.

[0032] 3) 가스 분석

[0033] 가스조성분석은 Molesieve 5A column (Supelco, Bellefont, PA) 및 Porapak N column (Supelco)으로 열 전도성 탐지기(thermal conductivity detector)와 불꽃 이온화 검출기(flame ionisation detector)를 갖춘 YL6000 GC gas chromatograph (YL6000 GC 가스 크로마토그래피, YL Instrument Co)를 이용하여 측정하였다. 아르곤을 가스 운반체로 사용하였다. 수소가스를 정량하기 위하여 질소에 각각의 성분(CO, CO₂, H₂, CH₄ 및 O₂) 1%(w/w)가 포함된 가스 교정 표준(Gas calibration standard, Supleco)를 사용하였다.

[0034] 4) 웨스턴 블랏팅

[0035] *E. coli* BL21 에서 과량 발현한 단백질(frh α subunit)로부터 항체를 얻었고, Ni-NTA 컬럼으로 순수분리하였다. MMI-formate에서 지수적으로 성장하는 세포를 원심분리로 수거하여 초음파로 파괴하였다. 세포 찌꺼기를 원심분리하여 제거하고, 조추출액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 분석 용액으로 정량하였다. 각 균

주의 5 μ g 조추출액을 10% SDS-PAGE 에 재용해시키고, Trans-BlotTurbo™을 가진 PVDF 막(Trans-Blot Turbo™ transfer pak)으로 이동시켰다. 상기 막을 0.5% BSA가 보충된 0.1% TritonX-100 (TBST)을 포함하는 Tris-완충된 생리식염수 완충용액에 담가두었다. 상기 막을 1:5000으로 희석된 항체를 첨가한 후 TBS-T 완충용액에 항을 반응시켰다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제(Horse raddish peroxidase)-컨쥬게이트된 항-토끼 항체(Ab Frontier)를 2차 항체로 사용하였고, Immun-Star™ HRP 화학형광 키트(Bio-Rad)에 의해 발생된 신호를 ChemiDoc™ MP 이미징 시스템(Bio-Rad)으로 관측하였다.

[0036] 5) 야생형과 돌연변이 균주에서 수소 생산의 동력학적 분석

[0037] 수소 생산에 대한 동력학적 분석을 위하여 80°C 에서 혐기적 모드로 2 l-작업 부피, 3 l 의 미세 스파저 (sparger, 5 지름의 구멍 크기)를 가진 연속교반 탱크 반응기(continuous stirred tank reactor; CSTR)에서 수행하였다. 교반 속도는 150 rpm 이었고, pH는 3.5% NaCl을 포함하는 4M 포름산을 사용하여 6.2±0.1으로 조절하였다. 시드 배양을 80°C에서 지수 성장기가 될 때까지 배양시켰다. 5 ml의 시드 배양액을 CSTR에 10ml 피하 주사기를 이용하여 접종하였다. 400mM의 소듐 포름산염(sodium formate)가 포함된 MM1-배지를 사용되었다. 수소 가스는 Molesieve 5A column (Supelco, Bellefont, PA)과 Porapak N column (Supelco)으로 TCD 검출기가 구비된 가스 크로마토그래프 YL6000 GC 장비를 사용하여 측정하였다. 아르곤이 가스 운반자로 사용되었다. 오븐 온도는 40 였다. 분석을 위한 10의 가스 시료는 배양병의 부틸고무를 통해 가스-타이트 시린지(gas-tight syringe)로 꺼냈다. 검출된 수소 가스의 측정은 피크 면적을, 질소에 40% 수소를 포함하는 표준 가스를 사용한 회귀분석에 의해 수행된 보정 곡선과 비교함으로써 계산되었다.

[0038] <실시예1> *Thermococcus onnurineus* NA1의 F420-환원 수소화효소의 발현을 증가

[0039] *T. onnurineus* NA1의 유전체에서 수소화효소(hydrogenase) 및 그와 관련된 단백질들의 비율이 높은 것을 발견하였으며(5.5%), 이는 CO 탈수소효소(dehydrogenase) 및 포름산염 탈수소효소(formate dehydrogenase)를 포함하는 산화환원효소들과 관련된 환원력의 보존 내지 재순환의 증가를 나타낸다. 그 중에 *T. onnurineus* NA1의 F420-reducing 수소화효소(frh)는 Vignais *et al.*의 분류체계에 따라 그룹 3에 속한다 (Silva, P.J., van den Ban, E.C., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F.T. and Hagen, W.R. (2000) Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. Eur. J. Biochem. 267, 6541-6551).

[0040] 도 1a에 표시된 바와 같이, $\alpha/\beta/\gamma$ 서브유닛(subunit)들을 포함하는 F420-reducing 수소화효소(TON_1559-1561)는 fdh2-mfh2-mnh2의 앞에 위치하여 하나의 클러스터를 만드는 특징을 보인다. F420-reducing 수소화효소의 $\alpha/\beta/\gamma$ 서브유닛은 특이적인 일차 서열을 가졌고, 이는 *Pyrococcus yanosii* CH1의 조효소(coenzyme) F420-reducing hydrogenase (YP_004624049) (81%), *Thermococcus gammatolerans* EJ3의 조효소 F420-reducing hydrogenase (YP_002958434) (77%), *Thermococcus* sp. 4557의 조효소 F420-reducing hydrogenase (YP_004762049) (72%), *Methanococcus maripaludis* 의 조효소(coenzyme) F420-reducing hydrogenase (YP_001097176) (33%) 및 *Methanococcus maripaludis* S2 의 조효소 F420-reducing hydrogenase (NP_987940) (33%) 와의 유사성을 나타낸다.

[0041] <실시예2> 포름산염 성장 조건에서의 수소화효소 유전자의 발현

[0042] *T. onnurineus* NA1 은 외부 포름산염을 기질로 하여 성장할 수 있으며, 상기 성장은 수소 생성과 밀접한 상관관계가 있다는 것이 보고되었다. 포름산염을 기질로 하였을 때 fdh2-mfh2-mnh2 클러스터 앞의 10개의 ORF들의 mRNA 발현 수준은 YPS에 비해서 2배 이상 상향조절(up-regulated)되었지만, 다른 수소화효소 유전자 클러스터들의 ORF 발현 수준들은 상대적으로 일정하거나(mbx, frh 및 mch) 억제된 수준(mbh, sulf I 및 mfh1)으로 나타난 것이 확인되었다. 이러한 결과들은 fdh2-mfh2-mnh2 클러스터가 포름산염에 반응할 수 있다는 사실을 암시한다. F420-reducing hydrogenase(F420-환원 수소화효소) 유전자들이 fdh2-mfh2-mnh2 클러스터의 바로 앞에 존재하기 때문에 포름산염을 기질로 하였을 때 F420-reducing 수소화효소가 성장 및 수소생산에 영향을 미칠 수 있을 것이라 예상되었다.

[0043] F420-reducing 수소화효소를 과량발현하기 위하여, HMG-CoA 환원효소 유전자를 가진 *P. furiosus*로부터 글루타

메이트 디하이드로게나아제(P_{gdh})의 강력한 프로모터를 도입하여 MF001를 제조 하였다(도 1b). 강력한 프로모터의 삽입으로 F420-reducing 수소화효소 유전자의 발현 수준을 높이는데 성공하였고 웨스터 블랏팅으로 단백질 발현을 비교해 보았을 때 야생형보다 돌연변이체에서 5배 증가된 것을 확인하였다.

[0044] 돌연변이체의 세포 성장과 수소생산성은 포름산을 기질로 사용하여 CSTR 발효기에서 배양을 실시하였다. 돌연변이체는 배양 2시간 이후부터 야생형보다 빠른 성장을 보였고 야생형의 배가시간(doubling time)이 80분인데 반하여 돌연변이체의 경우 61분으로 성장속도가 월등히 빨라진 것을 확인할 수 있었다(도 3a). 이러한 결과는 F420-reducing hydrogenase(F420-환원 수소화효소, *frh*)의 과발현에 의해서 세포 생장이 촉진되어진 것을 의미한다. 누적수소생산량 또한 야생형에 비해서 돌연변이체에 비하여 증가된 것을 볼 수 있었다(도 3b). 단위세포당 최대수소생산속도(maximum specific H_2 production rate)의 경우 야생형은 384 mmol/g/h이었고 돌연변이체는 472 mmol/g/h로 발명자들이 알고 있는 지식으로는 포름산염로부터의 최대 높은 바이오수소생산이다 (도4). 결론적으로 *T. onnurineus* NA1의 F420-reducing 수소화효소를 과발현 함으로써 세포 성장과 수소 생산성을 증가 시킬 수 있었다.

수탁번호

[0045]

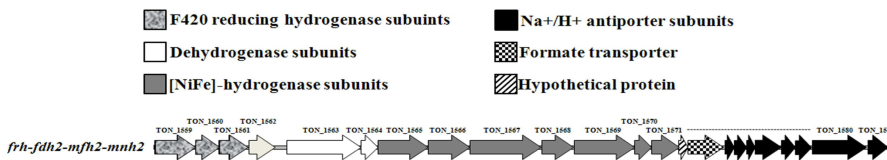
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCIC12356BP

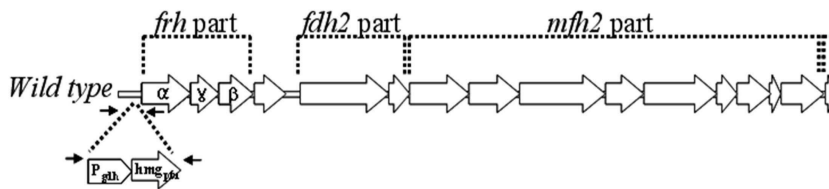
수탁일자 : 20130123

도면

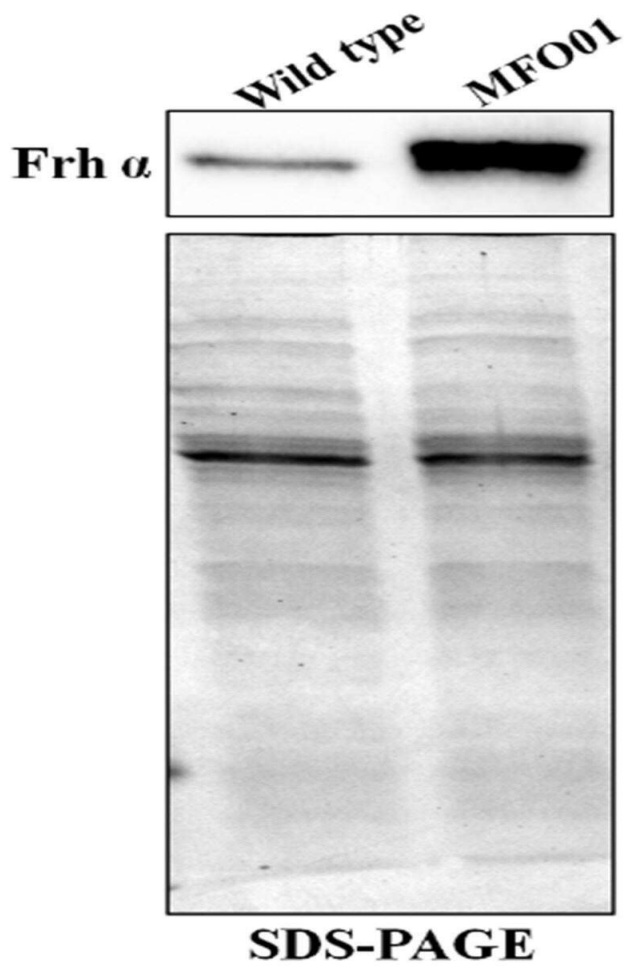
도면1a



도면1b



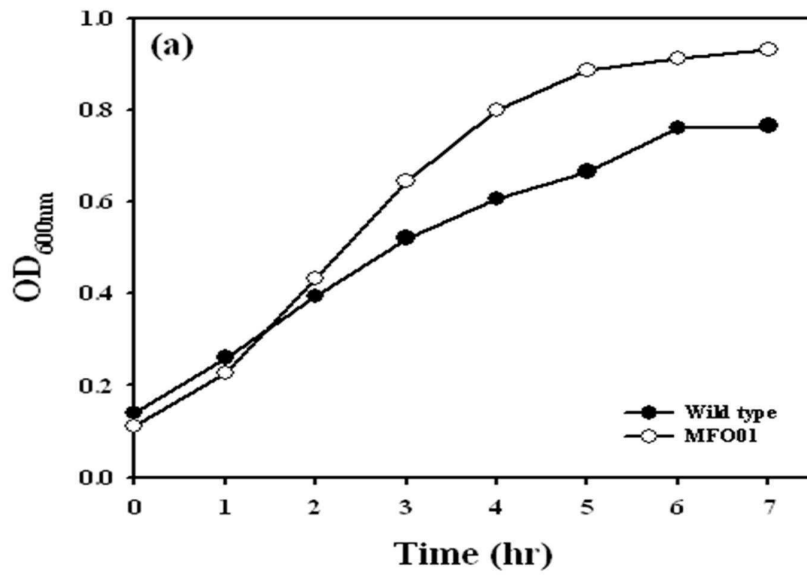
도면2



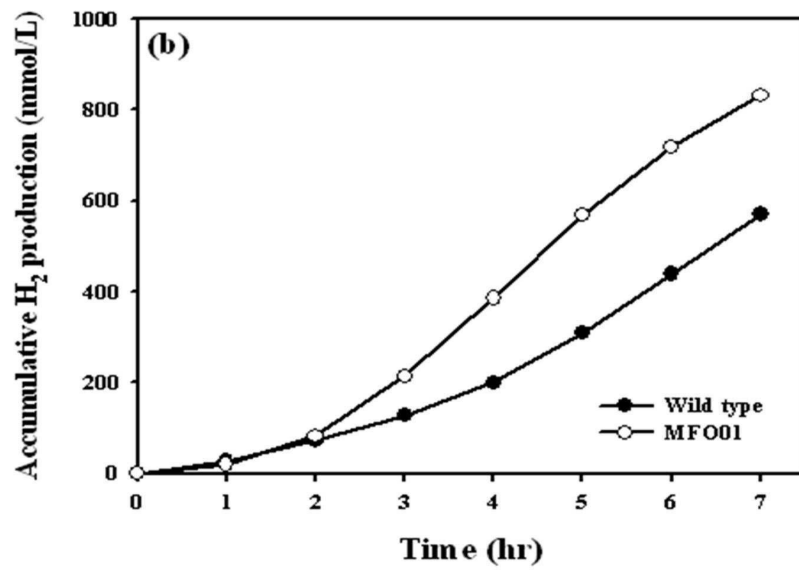
도면3

삭제

도면3a



도면3b



도면4

