

메탄올자화균 *Methylobacterium extorquens* AM1의 *phaR* 유전자 결실을 통한 poly 3-hydroxybutyrate (PHB) 생합성 억제

김유진* · 이광현** · 김현수* · 조숙형*** · 이진원****,†

*서강대학교 화공생명공학과
04107 서울특별시 마포구 백범로 35
** 서강대학교 생명과학과
04107 서울특별시 마포구 백범로 35
***서강대학교 C1 Gas Refinery 사업단
04107 서울특별시 마포구 백범로 35

(2017년 1월 3일 접수, 2017년 2월 6일 수정본 접수, 2017년 2월 13일 채택)

Inhibition of poly 3-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *phaR* deletion in *Methylobacterium extorquens* AM1

Yujin Kim*, Kwanghyun Lee**, Hyeonsoo Kim*, Sukhyeong Cho*** and Jinwon Lee****,†

*Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, 35, Baekbeom-ro, Mapo-gu, Seoul, 04107, Korea

**Department of Life Sciences, Sogang University, 35, Baekbeom-ro, Mapo-gu, Seoul, 04107, Korea

***C1 Gas Refinery R&D Center, Sogang University, 35, Baekbeom-ro, Mapo-gu, Seoul, 04107, Korea

(Received 3 January 2017; Received in revised form 6 February 2017; accepted 13 February 2017)

요 약

메탄올자화균이란 일탄소 화합물인 메탄올을 주탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 미생물을 말한다. *Methylobacterium extorquens* AM1은 serine cycle을 탄소대사경로로 이용하는 메탄올자화균 중에서도 가장 많이 연구가 진행된 균주이다. *M. extorquens* AM1의 poly 3-hydroxybutyrate (PHB) cycle은 EMCP (ethylmalonyl-CoA pathway), glyoxylate regeneration cycle, TCA cycle과 연결되어 있으며 EMCP 유래 유기산 또는 TCA 유기산을 생산하기 위해서는 PHB cycle로 흐르는 carbon flux의 차단이 필요하다. 이를 위해서 PHB 합성과 acetyl-CoA flux의 조절유전자로 알려져 있는 *PhaR* 유전자를 markerless gene deletion 방법을 이용해서 *M. extorquens* AM1에서 knockout했다. 결과적으로, knockout 균주인 $\Delta phaR$ 에서 야생종 대비 확연히 PHB granule이 줄어든 것이 확인되었다. Lag phase가 약 12 h 늦어졌지만, $\Delta phaR$ 은 야생종과 비슷한 세포성장과 메탄올소비 경향을 보임을 확인하였다.

Abstract – Methylo-trophy is able to use reduced one-carbon compound, such as methanol and methylamine, as a sole carbon source. *Methylobacterium extorquens* AM1 is the most extensively studied methylo-troph utilizing serine-isocitrate lyase cycle. Because the Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) synthesis pathway in *M. extorquens* AM1 is likely to interlink with EMCP (ethylmalonyl-CoA pathway), glyoxylate, and TCA cycles, regulation of PHB production is needed to produce EMCP-derived acid or TCA acids. To adjust carbon flux to PHB production, *PhaR*, which seems to have function of regulator of PHB synthesis and acetyl-CoA flux, was knocked out in *M. extorquens* AM1 by using markerless gene deletion methods. As a result, PHB granules were remarkably reduced in the knockout strain $\Delta phaR$ compared to parental strain. Although lag phase was extended for 12h, $\Delta phaR$ showed similar cell growth and methanol consumption rate compared to wild type.

Key words: *PhaR*, PHB, *Methylobacterium extorquens* AM1, poly(3-hydroxybutyrate) granule formation

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jinwonlee@sogang.ac.kr

‡이 논문은 서강대학교 유기공 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

메탄올은 메탄이 주성분인 셰일가스나 바이오 가스에서 합성 가능한 물질로 1960년대부터 배양 기질로 많은 주목을 끌어들였다. 메탄올은 기존 생물공정의 feedstock인 포도당(Dextrose) 대비 가격이 낮아 경제적이고, 수용액에서 용해도는 무한대에 가까울 정도로 크다. 또한 메탄올은 독성을 지니기 때문에 발효 공정상 발생할 수 있는 다른 미생물에 의한 오염을 줄일 수 있으며, 미네랄 배지에 공급되어 기질로 사용되기 때문에 다운스트리밍 공정에서의 비용을 줄일 수 있다[1-4,25]. 이와 같은 장점으로 메탄올은 메탄올자화균 배양에 있어 훌륭한 기질로 사용될 수 있다.

메탄올자화균이란 호기 상태에서 일탄소 화합물인 메탄올을 주 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 미생물을 일컫는다[5,6]. 이에 대한 연구는 1970년대 이후 균체 단백질(single cell protein, SCP)이나 생분해성 고분자인 poly 3-hydroxybutyrate (PHB)를 생산하기 위해 많이 진행되었다[6-8]. 메탄올자화균은 세포내 막 구조에 따라 Type I과 Type II로 분류된다. Type I은 여러 겹의 막이 세포 전체에 고루 분포하고 있는 반면, Type II는 두 겹의 막이 세포 표면 쪽에 분포하고 있다. 또한 일탄소 화합물을 생합성에 이용하는 경로에 따라 ribulose monophosphate (RuMP) cycle methylotroph와 serine cycle methylotroph로 분류된다. 대부분의 Type I은 RuMP cycle을 이용하는 반면 Type II는 Serine cycle을 이용한다[5,6]. 대표적인 Type I 균주 속으로는 *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium* 등이 있고, Type II 균주 속으로는 *Methylobacterium*, *Methylosinus* 등이 있다[5,6,16].

Methylobacterium extorquens AM1은 serine cycle을 이용하는 Type II 균주로 메탄올을 기질로 이용하는 메탄올자화균이다[5,6,9,11]. *M. extorquens* AM1은 메탄올을 산화시켜 serine cycle을 통해 formaldehyde

와 이산화탄소를 대사한다[11]. 이 균은 메틸영양(methylotrophy) 대사공학 및 유전공학 분야에서 활발히 연구된 균주이며, 유전자 조작이 가능하고, 유전체 서열이 알려져 있다[5,12-14]. 따라서 메탄올을 유용한 생화학물질로 전환할 수 있는 생체촉매로서의 가능성을 가지고 있다.

M. extorquens AM1을 이용하여 유용한 생화학물질을 생산하고자 할 때에는 우선 불필요한 대사경로로 carbon flux가 흐르는 것을 차단해야 한다. 대표적으로 carbon flux 차단이 필요한 대사경로는 PHB cycle이다[19]. PHB는 미생물이 에너지와 탄소를 저장하기 위해 세포내에 축적하는 고분자이기 때문에[15] 추가적인 세포 추출 비용이 발생하게 된다. 반면 ethylmalonyl-CoA Pathway (EMCP) 또는 tricarboxylic acid (TCA) Cycle 유래 유기산 등의 세포외액에 존재하는 생화학물질은 추가 추출비용이 발생하지 않을 뿐 아니라 상대적으로 고부가가치 산물이라는 점에서 가치가 있다[24]. 따라서 다른 대사경로의 carbon flux를 늘리기 위해서는 PHB cycle로 흐르는 carbon flux의 차단이 필요하다[19]. *M. extorquens* AM1의 대사경로를 살펴보면 PHB cycle은 glyoxylate regeneration cycle, serine cycle과 부분적으로 중복된다(Fig. 1)[17,18]. PHB 합성에 관여하는 유전자는 *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR*이 있다. *phaA*와 *phaB*의 결실 일어날 경우 *M. extorquens* AM1이 C₁ 화합물을 이용해 전혀 성장하지 못하며, *phaC*의 결실이 일어날 경우에는 성장속도가 느려져 세포가 성장하는데 결함이 생기게 된다[17,18]. 따라서 미생물의 acetyl-CoA flux 및 PHB 합성 조절유전자로 알려져 있는 *phaR* 유전자를 제거함으로써 carbon flux의 과잉을 해결하고자 하였다. 본 연구는 *phaR* 유전자 제거를 위해 기존의 insertion 방법[17]이 아닌 pK19mobsacB를 이용한 markerless gene deletion 방법을 *M. extorquens* AM1에서 확립하였고, *M. extorquens* AM1에서 공초점 현미경을 통해 PHB granule이 가시적으로 확인가능함을 제시하였다.

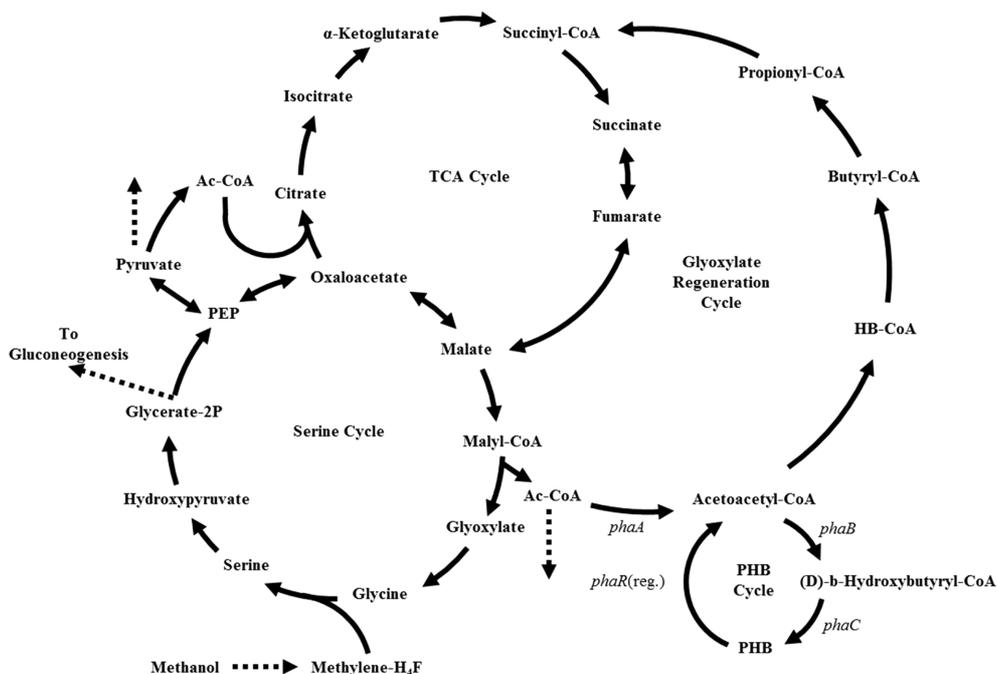


Fig. 1. Overview of *M. extorquens* AM1 central metabolism, taken from Van Dien and Lidstrom (2002). Energy metabolites and electron carriers are not included. Dotted lines denote fluxes of a metabolite to other parts of metabolism, and eventually to biomass. Fluxes that were considered reversible are shown with double-headed arrows. Note that the same enzyme is not necessarily responsible for the reverse reaction. Abbreviations: PEP, phosphoenolpyruvate; HB-CoA, hydroxybutyryl-CoA; PHB, poly-β-hydroxybutyrate.

2. 실험 재료 및 방법

2-1. 실험 균주 및 플라스미드

실험에 사용된 균주인 *Methylobacterium extorquens* AM1은 ATCC에서 분양받았다. *phaR* 유전자 제거를 위해서는 markerless gene deletion 방법에 쓰이는 pK19*mobsacB* 벡터를 사용하였다[20].

이 실험에서 사용된 미생물 균주와 플라스미드 정보는 Table 1에 자세하게 기재되어 있다.

2-2. *phaR* 결실 돌연변이 *M. extorquens* AM1 균주와 plasmid 제작 방법

M. extorquens AM1의 *phaR* 결실 돌연변이는 two-step homologous recombination 방법을 통해 제작하였다[20]. *phaR* 유전자의 upstream (551bp)과 downstream (298bp)을 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 증폭한다. 이때 사용한 primer (Cosmogenetech co.)는 Table 1에 명시하였다. 각각의 PCR산물을 주형으로 overlap PCR을 하였고 그 결과 875bp의 최종 PCR 산물이 생성되었다. overlap PCR에 사용한 overlap primer는 Table 1에 명시하였다. 생성된 875bp 크기의 최종 PCR 산물은 제한효소 Pst I와 EcoR I (Takara, Japan)을 이용하여 pK19*mobsacB*에 삽입하였다. 구축한 재조합 플라스미드는 *M. extorquens* AM1에 Gene Pulser Xcell Electroporator (Bio-Rad, USA)를 이용해 전기천공법으로 도입하였다. 재조합 플라스미드 (pK19*mobsacB*- Δ *phaR*)가 도입된 재조합 클론은 standard protocol에 따라 선별되었다[20]. Kanamycin-sensitive, saccharose-resistant clone은 overlap primer를 이용해 colony PCR으로 확인하였다. *phaR* deletion에 이용된 올리고 정보는 Table 1에 기재하였다.

2-3. 배양조건 및 분석방법

실험에 사용된 균주는 메탄올을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 성장하는 균주로서 ATCC에서 분양받은 *Methylobacterium extorquens* AM1 (ATCC 14718)을 이용하였다. 균주의 배양에 사용된 기본 배지는 Higgins의 Nitrate Minimal Salt (NMS) medium을 약간 변형시켜 사용하였다[21]. NMS 배지는 MgSO₄·7H₂O 1 g/L, KNO₃ 1 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.2 g/L, Fe-EDTA 0.0038 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.0006g/L, Phosphate buffer (10 mL/L), Trace element solution (0.1 mL/L) and Vitamin stock (1 mL/L)을 포함한다. Phosphate buffer는 KH₂PO₄ 26 g/L, Na₂HPO₄·7H₂O 62 g/L을 포함한다. Trace element solution은 FeSO₄·7H₂O 5 g/L, ZnSO₄·7H₂O 4 g/L, MnCl₂·7H₂O 0.2 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.5 g/L, NiCl₂·6H₂O 0.1 g/L, H₃BO₃ 0.15 g/L, EDTA 2.5 mg/L를 포함한다. Vitamin stock은 Biotin 20 mg/L, folic acid 20 mg, thiamine HCl 50 mg/L, Ca pantothenate 50 mg/L, vitamin B12 1 mg/L, riboflavin 50 mg/L, nicotinamide 50 mg/L를 포함한다.

전배양은 250ml 용량의 삼각플라스크에 50 ml NMS 배지를 넣고 3 ml로 2일 배양한 균체를 1% 접종하였다. 기질로 사용된 methanol은 working volume의 1%를 주입한 후 30 °C, 240 rpm 조건으로 배양하였다. 본배양은 250 ml 용량의 삼각플라스크에 20 ml NMS 배지를 넣고 균체의 초기OD를 0.25로 계산하여 접종하였고 methanol은 1% (v/v)으로 주입하고 30 °C, 240 rpm 조건으로 배양하였다. 미생물 배양액은 61 h까지 600 nm 파장에서 세포 광학밀도(OD)를 측정하였다.

실험에서 반응한 Methanol은 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) YL9100 (Younglin, Korea)을 이용하여 분석하였으며, 검출기는 굴절률 검출기(RID) YL9170 (Younglin, Korea)을 이용하였다. Column은 Hi-Plex H (300×7.7 mm Column Dimensions, polystyrene-divinylbenzol resin; Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. 검출조건은 column

Table 1. Bacterial strains and plasmids and primers used in this study

Strain, plasmid or primer	Relevant characteristic	Source or reference
Strains		
<i>M. extorquens</i> AM1 ATCC 14718	Wild-type strain, methanol, monomethylamine, formate heterotrophic methylotroph	Vuilleumier S <i>et al.</i> (1960)
<i>M. extorquens</i> AM1 Δ <i>phaR</i>	ATCC 14718 derivative with deletion of the <i>phaR</i>	This work
<i>E. coli</i> DH5 α	F-(80d <i>lacZ</i> M15) (<i>lacZYA</i> -rgF)U1691 <i>hsdR17</i> (m+) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i>	RBC
Plasmids		
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R ; vector for allelic exchange in <i>M. extorquens</i> AM1 (pK18 <i>oriV_{Ec}</i> , <i>sacB</i> <i>lacZα</i>)	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>phaR</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> derivative containing a 855 bp overlap-extension PCR product (PstI/EcoRI) which covers the flanking regions of the <i>M. extorquens</i> AM1 <i>phaR</i> gene	This work
Primers^a		
F- <i>phaR</i> Upstream -PstI	5'- GACTGACTGACTTGCACCTGCAGGGCGACCGCCTAAGCGC -3'	This work
R- <i>phaR</i> Upstream -Sall	5'- TGAGCTTTGCGCAGACTCGTCGACGGCCTCGTCCCGAAGGAC -3'	This work
F- <i>phaR</i> Downstream -Sall	5'- GTCCTTCGGGACGAGGCCGTGACGAGTCTGCGCAAAGCTCA -3'	This work
R- <i>phaR</i> Downstream -EcoRI	5'- GACTGACTGACTAATTGAAATCCGTGACGTTCTCCTCAT TC -3'	This work
F- <i>phaR</i> overlap -PstI	5'- TGCACCTGCAGGGCGACCGCCTAAGCGC -3'	This work
R- <i>phaR</i> overlap -EcoRI	5'- AATTGAATTCCGTGACGTTCTCCTCATTC -3'	This work
F- pK19- <i>phaR</i> integration Up1	5'- GTTATACAGCCCGCCTCGAA -3'	This work
R- pK19- <i>phaR</i> integration Up1	5'- AGCTATCGCCATGTAAGCCC -3'	This work
F- pK19- <i>phaR</i> integration Up2	5'- CAGTGAGCGCAACGCAATTA -3'	This work
R- pK19- <i>phaR</i> integration Up2	5'- CAATCGCCGGCTCTATCACA -3'	This work
F- pK19- <i>phaR</i> integration Down1	5'- AGAATTCGAGGAAGCTCGGC -3'	This work
R- pK19- <i>phaR</i> integration Down1	5'- AGCTATCGCCATGTAAGCCC -3'	This work
F- pK19- <i>phaR</i> integration Down2	5'- TACCGCCTTTGAGTGAGCTG -3'	This work
R- pK19- <i>phaR</i> integration Down2	5'- CCGAAGATCACCTCGTCCAC -3'	This work

^aItalic bold letters indicate restriction site

온도 80 °C 이었으며, 이동상은 0.01N H₂SO₄를 사용하였고 flow rate는 0.6 ml/min으로 조절하였다. 반응한 메탄올은 표준 메탄올로 외부표준법이 적용된 standard curve를 작성한 후 정량하였다. 모든 배양액은 harvest 후 상온에서 13000 rpm으로 10분동안 원심분리 후 얻어진 상등액을 0.2 µm pore size를 가진 syringe filter를 통과시켜 시료 전처리 후 HPLC 측정에 사용하였다.

2-4. 형광현미경

미생물의 PHB granule은 형광 염색시약인 Nilered로 염색 후 관찰되었다[22,23]. 미생물 샘플은 OD₆₀₀ 값이 1이 넘지 않을 때 harvest하여 Nilered 용액(1 mg/mL in ethanol)으로 염색하였다. 슬라이드 글라스 위에 1% low melting agarose와 미생물부유물을 10 µl씩 섞어 기울여서 얇게 편 다음 커버 글라스로 덮고 자연건조했다. 미생물의 PHB granule은 렌즈(ACS APO 40x/1.15 oil CS)가 장착된 공초점 형광현미경 Leica TCS SPE (Leica Microsystems, Germany)을 이용하여 100배(40배, 추가 2.5배)로 관찰되었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. *phaR* 결실 돌연변이 *M. extorquens* AM1 균주의 전기영동 확인

phaR 결실을 확인하기 위해, *phaR* upstream, downstream의 overlap

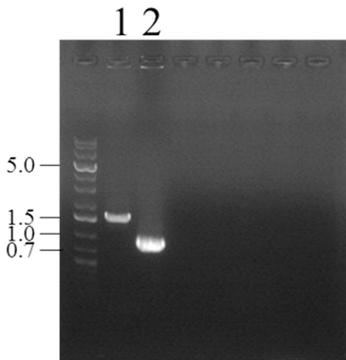


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of crude lysates of *M. extorquens* AM1 wild type (lane 1, 1508bp), *M. extorquens* AM1 Δ*phaR* (lane 2, 875bp) Numbers at left are molecular masses in kilodaltons.

PCR용 올리고머를 사용해 colony PCR 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 통해 wild type과 *phaR* 결실 균주의 DNA사이즈를 확인하였다(Fig. 2). 기존 *phaR* deletion은 insertion deletion방법을 주로 사용했다[17]. 이 방법을 사용할 시에 kanamycin 저항 유전자가 돌연변이 균에 남게 되어 추가 유전자 결실 균주 제작이나, 배양에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 *mobsacB*를 이용한 유전자제거 방법을 사용하였고, 이 방법은 insertion deletion에 비해 삽입되는 유전자가 없고, 기존 야생종 대비 변화 부분이 *phaR* deletion 외에 없다는 장점이 있다.

3-2. PHB granule의 형광현미경 관찰

phaR 유전자 제거를 확인하기 위해 PHB granule을 선택적으로 염색하는 Nile-red 시약을 이용해 염색 후 공초점 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 덩벨 또는 막대기 모양으로 세포 양쪽에 PHB granule이 관찰되었다. *phaR* 결실 돌연변이는 wild type에 비해 두드러지게 PHB granule이 줄어들어 확인되었다(Fig. 3).

세포당 상대적인 형광흡수세기는 Pixel sum/Cell count로 계산하였으며 wild type과 Δ*phaR*은 약 17.8배 차이를 보였다(Fig. 4). 실험 결과 wild type의 경우 거의 대부분의 세포에서 PHB가 생성되었으

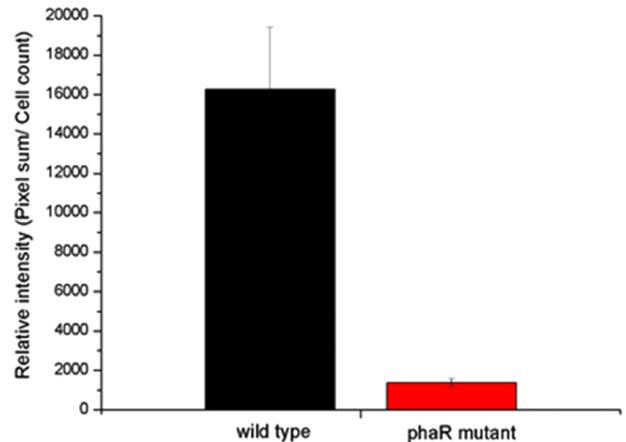


Fig. 4. Comparison of relative intensity (fluorescence absorbance of PHB) of *M. extorquens* AM1 wild type, *M. extorquens* AM1 Δ*phaR*.

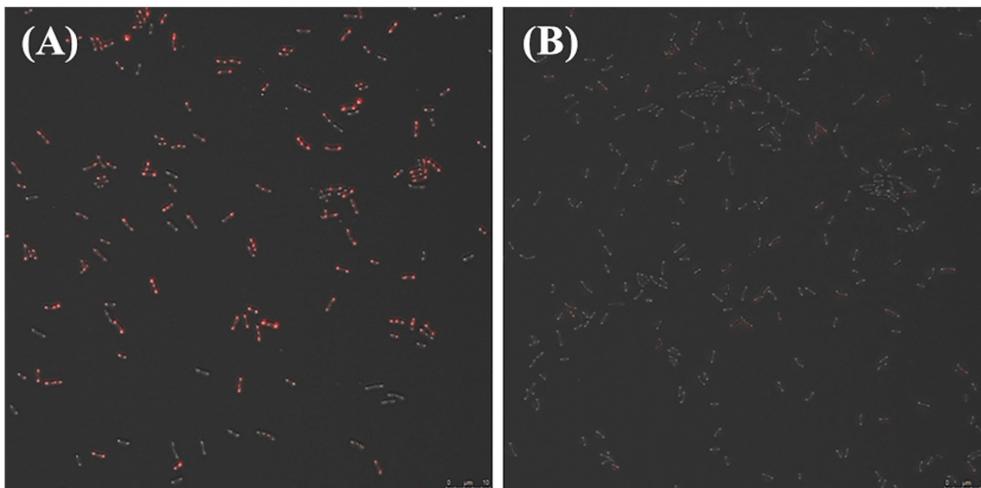


Fig. 3. Confocal laser scanning fluorescence microscopy of (A) *M. extorquens* AM1 wild type, (B) *M. extorquens* AM1 Δ*phaR*. FM-images of samples taken at a time point as indicated were generated after staining with Nile red in red channel.

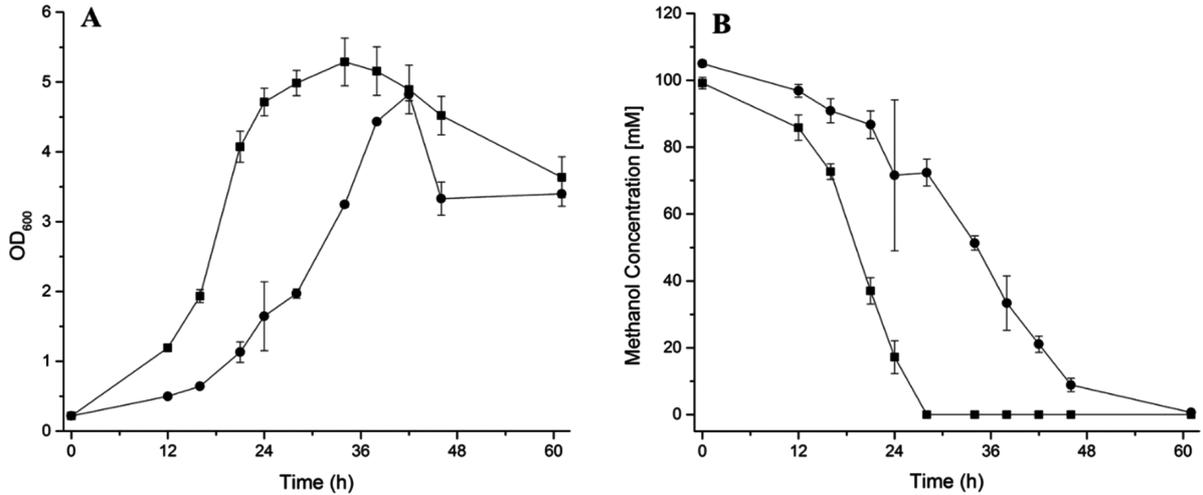


Fig. 5. Comparison of (A) optical density(600nm), (B) methanol consumption of *M. extorquens* AM1 wild type (squares, n=3), *M. extorquens* AM1 Δ *phaR* (circles, n=3) in aerobic batch cultivations in NMS medium containing 1% (v/v) methanol under a plain flask scale. The results displayed are mean values from n independent experiments.

나, *phaR* 결실 돌연변이의 경우는 일부만 PHB가 생성되었고, 형광 흡수세기 값도 매우 낮았다. 따라서 실험결과 *phaR*을 제거할 경우 PHB 생성은 강력히 저해되는 것을 확인하였다.

3-3. *phaR* 결실이 미생물 성장성에 미치는 영향

M. extorquens AM1 wild type과 Δ *phaR* 균주의 차이를 확인하기 위해 배양 실험을 진행하였다. 실험 배지는 *M. extorquens* AM1이 쉽게 성장 가능한 한정배지인 NMS Media에 메탄올을 주 탄소원으로 추가하였으며, 재현성을 위해 flask scale에서 3번 진행하였다.

61시간 배양 실험 결과, *phaR*이 결실된 재조합 균의 경우 wild type에 비해 lag phase가 12 h 늦어졌지만 세포 성장 최대값은 비슷한 것으로 보아 성장에 크게 영향을 주지는 않는 것으로 보인다. HPLC 분석결과 wild type, 재조합 균 모두 메탄올 1% (v/v, 7.91 g/L)는 100% uptake함을 확인하였으나 다른 Metabolite는 검출되지 않았다(Fig. 5). TCA cycle유래 대사산물의 경우 Acetyl-CoA flux가 부족한 것으로 추정된다[19]. *phaR* 유전자는 PHB합성과 acetyl-coA flux의 조절 유전자이므로 이 유전자의 결실은 PHB 생성을 억제하는 동시에 acetyl-coA flux에도 영향을 주게 된다[11]. 따라서 메탄올에서 acetyl-coA로 흐르는 flux를 증가시키는 유전자 발현 및 EMCP, TCA cycle내 유전자 제거를 진행한다면 EMCP, TCA cycle 유래 대사산물의 생산 가능성이 있다.

4. 결 론

메탄올은 serine cycle을 통해 *M. extorquens* AM1의 대사 과정에 유입되며 TCA cycle, glyoxylate regeneration cycle과 중복되는 Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) 합성경로를 보유하고 있다. PHB cycle은 EMCP (ethylmalonyl-CoA pathway), TCA cycle과 연결되어 있으며 EMCP 유래 유기산 또는 TCA 유기산을 생산하기 위해서는 PHB 합성 대사경로의 차단이 필요하다. 따라서 PHB를 암호화하는 유전자인 *phaABC*를 조절하는 *phaR* 조절유전자의 knockout을 통해 메탄올로부터 TCA cycle로 향하는 carbon flux를 강화하였다. 기존 유전자 제거 방법과 다르게 pK19*mobsacB* 벡터를 이용한

markerless gene deletion 방법을 이용해 항생제저항유전자가 남지 않는 strain을 제작하였다. *phaR*이 knockout된 돌연변이에서 세포 내 PHB granule의 생성이 저해되는 것을 공초점 현미경을 통해 가시적으로 확인할 수 있었다. 본 연구는 *M. extorquens* AM1의 중심 대사과정과 PHB cycle의 후속연구에 도움이 될 것이라 생각한다.

References

- Hou, C.-T., *Methylotrophs: Microbiology, biochemistry, and genetics*, CRC pp. 1-53(1984).
- Faust, U. and Pr Fa, H., "Biomass from Methane and Methanol," *Biotechnology. VCH Weinheim* **3**, 84(1991).
- Kim, P., Kim, J.-H. and Oh, D.-K., "Improvement in Cell Yield of *Methylobacterium* sp. by Reducing the Inhibition of Medium Components for Poly- β -hydroxybutyrate Production," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 357(2003).
- Schrader, J., Schilling, M., Holtmann, D., Sell, D., Villela Filho, M., Marx, A. and Vorholt, J. A., "Methanol-based Industrial Biotechnology: Current Status and Future Perspectives of Methylotrophic Bacteria," *Trends Biotechnol.*, **27**, 107(2009).
- Lidstrom, M. E., Murrell, J. C. and Dalton, H., (Ed.), *The genetics and molecular biology of methanol-utilizing bacteria: Methane and Methanol Utilizers*, Springer US, 183-206(1992).
- Anthony, C., *The Biochemistry of Methylotrophs*, Academic Press, London, United Kingdom (1982).
- Senior, P. J. and Windass, J., "The ICI Single Cell Protein Process," *J. Biotechnol. Lett.*, **2**(5), 205-210(1980).
- Asenjo, J. A. and Suk, J. S., *J. Fem Technol.*, **64**, 271-2789(1986).
- Chistoserdova, L., "Modularity of Methylotrophy, Revisited," *Environ. Microbiol.*, **13**, 2603-2622(2011).
- Salem, A. R. and Quayle, J. R., "Mutants of *Pseudomonas* AM1 that Require Glycollate or Glyoxylate for Growth on Methanol and Ethanol," *Biochem. J.*, **124**, 74(1971).
- Chistoserdova, L., Chen, S. W., Lapidus, A. and Lidstrom, M. E., "Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a Genomic Point of View," *J. Bacteriol.*, **185**(10), 2980-2987(2003).

12. Chistoserdova, L., Metabolism of formaldehyde in *M. extorquens* AM1: Microbial Growth on C1 Compounds, Springer Netherlands, 16-24(1996).
13. Marx, C. J. and Lidstrom, M. E., "Development of Improved Versatile Broad-host-range Vectors for Use in Methyloprophs and Other Gram-negative Bacteria;" *Microbiology*, **147**(8), 2065-2075 (2001).
14. <http://www.integratedgenomics.com/genomereleases.html#list6>.
15. Anderson, A. J. and Dawes, E. A., "Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates;" *Microbiol Rev.*, **54**(4), 450-472(1990).
16. Ginige, M. P., Hugenholtz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J., and Blackall, L. L., "Use of Stable-isotope Probing, Full-cycle rRNA Analysis, and Fluorescence in situ Hybridization-microautoradiography to Study a Methanol-fed Denitrifying Microbial Community;" *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(1), 588-596(2004).
17. Korotkova, N., Chistoserdova, L. and Lidstrom, M. E., "Poly-β-hydroxybutyrate Biosynthesis in the Facultative Methyloproph *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and Mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*;" *J. Bacteriol.*, **184**(22), 6174-6181(2002).
18. Korotkova, N. and Lidstrom, M. E., "Connection Between Poly-β-Hydroxybutyrate Biosynthesis and Growth on C₁ and C₂ Compounds in the Methyloproph *Methylobacterium extorquens* AM1;" *J. Bacteriol.*, **183**(3), 1038-1046(2001).
19. Van Dien, S. J., Strovas, T. and Lidstrom, M. E., "Quantification of Central Metabolic Fluxes in the Facultative Methyloproph *Methylobacterium extorquens* AM1 Using ¹³C-label Tracing and Mass Spectrometry;" *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 45-55(2003).
20. Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A., "Small Mobilizable Multi-purpose Cloning Vectors Derived from the *Escherichia coli* Plasmids pK18 and pK19: Selection of Defined Deletions in the Chromosome of *Corynebacterium glutamicum*;" *Gene*, **145**(1), 69-73(1994).
21. Kim, H. G., Han, G. H., Eom, C. Y. and Kim, S. W., "Isolation and Taxonomic Characterization of a Novel type I Methanotrophic Bacterium;" *J. Bacteriol.*, **46**(1), 45-50(2008).
22. Degelau, A., Scheper, T., Bailey, J. E. and Guske, C., "Fluorometric Measurement of Poly-β Hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by Flow Cytometry and Spectrofluorometry;" *Appl Microbiol Biotechnol.*, **42**(5), 653-657(1995).
23. Spiekermann, P., Rehm, B. H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., and Steinbüchel, A., "A Sensitive, Viable-colony Staining Method Using Nile Red for Direct Screening of Bacteria that Accumulate Polyhydroxyalkanoic Acids and Other Lipid Storage Compounds;" *Arch Microbiol.*, **171**(2), 73-80(1999).
24. Lee, O. K., Hur, D. H., Nguyen, D. T. N. and Lee, E. Y., "Metabolic Engineering of Methanotrophs and Its Application to Production of Chemicals and Biofuels from Methane;" *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2016).
25. Lee, W., "Selection of Medium Components by Plackett-Burman Design for Cell Growth of a Newly Isolated Methylobacterium sp. WJ4;" *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(6), 812-816(2016).