



메탄가스 전환 미생물촉매 개량을 위한 플라스미드 복제 시작점 예측

김민식^{1)*}

Predicting Plasmid Replication Origin for Methane-converting Microbial Catalyst Improvement

Min-Sik Kim^{1)*}

Received 9 October 2023 Revised 27 November 2023 Accepted 5 December 2023 Published online 15 December 2023

ABSTRACT Methane is the second most emitted greenhouse gas after carbon dioxide. Despite lower emissions than those of carbon dioxide, methane receives significant attention owing to its more than 20-fold higher global warming potential. Consequently, the importance of research on methanotrophic bacteria, microorganisms capable of converting methane gas into high-value materials, is increasingly emphasized. In the case of methanotrophic bacteria, knowledge on episomal plasmids that can be used for genetic engineering remains lacking, which poses significant challenges to the engineering process. The replication origin sequences of natural plasmids within methanotrophic bacteria have been predicted through *in silico* methods. The basic characteristics of the replication origin, such as a high A/T ratio, repetitive sequences, and proximity to proteins related to replication, have been used as criteria for identifying the replication origin. As a result, a region with a sequence of 18 base pairs repeated eight times could be identified. The putative replication origin sequence thus identified generally takes the form of iterons, but it also possesses unique features such as the length of the gap between iterons and the repetition of identical iteron sequences. This information can be valuable for future design of episomal plasmids applicable to methanotrophs.

Key words Methane(메탄), Methanotroph(메탄산화균), Plasmid(플라스미드), Replication origin(복제 시작점)

1. 서론

메탄가스는 그 배출량에 있어 이산화탄소에 이어 두 번째로 많이 배출되는 온실가스이다.^[1] 메탄가스가 가진 global warming potential은 이산화탄소보다 높은 것으로 알려져 있다. 메탄가스의 global warming potential은 20년 기준으로 생각하였을 때는 이산화탄소보다 84배 높고 100

년을 기준으로 생각하였을 때는 28배 정도 높은 것으로 생각된다.^[2,3] 뿐만 아니라 미국해양대기청의 Mauna Loa 관측소의 기록에 따르면 메탄가스는 산업혁명이전 700 ppb에서 현재 1900 ppb 수준으로 빠르게 증가하고 있다. 이러한 사실들로 인해 이산화탄소보다 적은 배출량에도 불구하고 메탄가스에 대한 세계적인 관심은 계속 높아지고 있다. 특히 2021년 유엔 당사국 총회(COP26)에서는 2030년까지 메탄의 배출량을 30%이상 감축하는 것을 목표로 하는 글로벌 메탄 서약(Globla Methane Pledge) 프로그램을 추진하기로 결정하였다.^[4]

이에 발맞추어 메탄가스를 고부가 물질로 전환하는 기술

1) Principal Researcher, Bioenergy and Resources Upcycling Research Laboratory

*Corresponding author: kms0540@kier.re.kr
Tel: +82-42-860-3312

에 대한 관심 또한 계속 높아지고 있다. 특히 메탄자화균을 이용하여 고부가 물질을 생산하는 기술은 상온 상압에서 반응이 이루어질 수 있다는 점에서 화학전환 공정에 비해 장점을 가지고 있다. 메탄자화균을 이용하여 젯산, 숙신산, 2,3-butanediol, squalene 뿐 만아니라 생분해성고분자인 polyhydroxybutyrate(PHB)에 이르기까지 다양한 물질을 생산하는 것이 가능하며 genetic engineering을 통해 그 생산성을 높이려는 시도가 계속되고 있다.^[4~9] 그러나 메탄자화균의 경우 아직까지 미생물 촉매를 개선하기 위한 유전공학적 도구들이 충분히 개발되어 있지 못한 것이 현실이다. 특히 외부 유전자를 전달하기위한 episomal plasmid vector의 경우 중에 따라 그전에 알려진 vector들이 전혀 사용되지 못하는 경우가 많다.^[10]

본 연구는 이러한 메탄자화균의 기술적 한계를 극복하기 위한 실마리를 제공하기 위해 진행되었다. Plasmid vector를 설계함에 있어 가장 중요한 정보는 genome의 바깥에서 plasmid가 독립적으로 존재할 수 있도록 해주는 복제시작점 서열이다. *Methylomonas* sp. DH-1의 경우 277 kb의 길이를 지니는 episomal plasmid를 가지고 있는 것으로 보고되었다.^[11] 이 plasmid의 복제시작점의 경우 이전에 보고된 바 없으며 그 서열이 밝혀지는 경우 메탄자화균을 위한 새로운 episomal plasmid를 설계함에 있어 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 in-silico 분석을 통하여 DH-1 strain 내부에 존재하는 episomal plasmid의 복제시작점을 예측하였다.

2. 재료 및 방법

DNA 서열의 경우 GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)에 공개된 서열(*Methylomonas* sp. DH-1: accession number CP014361, *Methylochromobium album* BG8: accession number CM001476)을 사용하였다. Plasmid 내 유전자 서열 예측은 Prodigal V2.6.3을 사용하였다. 단백질 서열의 유사성 확인을 위해 BLAST 프로그램을 이용하였으며 data base로 GenBank nr database 및 PFAM database를 활용하였다. DNA 서열의 유사도 확인을 위하여 BLASTN 프로그램을 사용하였다.

3. 분석결과

3.1 Plasmid의 복제시작점(oriV: origin of vegetative replication) 분석 전략

Plasmid의 복제시작점의 경우 replication initiation proteins(RepA, RepB etc.) 및 plasmid stabilization proteins(StbA) 존재하는 위치 가까이에 존재할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.^[12] Plasmid 내에 존재하는 단백질 서열을 검색하여 replication initiation protein들과 plasmid stabilization protein의 위치를 먼저 파악하였다. 또한 복제원점은 유전체 및 plasmid 전체에서 AT 비율이 높게 유지되는 것으로 알려져 있기 때문에 plasmid내에 non-coding region의 GC ratio를 계산하였다.^[12] oriV의 경우, iteron과 같은 반복 서열이 존재하는 것으로 알려져 있어 repeat sequence 검색을 수행하였다. 위 정보를 종합하여 plasmid의 복제 원점을 예측하고 타 균주의 유전체 정보에서 서열이 유지되는 지 확인하는 방식으로 oriV 서열 예측을 진행하였다(Fig. 1 참조).

3.2 Strategy for the prediction of plasmid 복제시작점 in Methanotrophs

3.2.1 Plasmid 내 유전자 서열 분석

GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 *Methylomonas* sp. DH-1의 plasmid의 완전 해독된 염기서열(accession number CP014361)을 확보하였다. 확보된 염기서열을 기반으로 Prodigal V2.6.3 프로그램을 활용하여 유전자 annotation을 진행하였으며 그 결과 247개의 CDS(protein coding sequence)가 예측되었다. 각 CDS를 GenBank nr database 및 PFAM database를

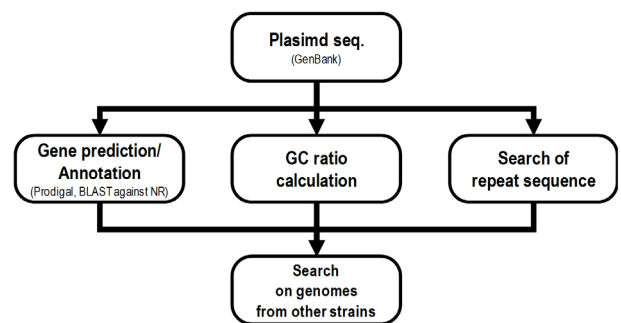


Fig. 1. The strategy for prediction of plasmid replication origin

Table 1. List of replicaion/conjugation-related genes in the plasmid of *Methylomonas* sp. DH-1

Contig_name	Start	End	direction	Gene ID	Annotation	Note
CP014361	84433	85182	-	XXXX_0000123	kfra protein	Truncated protein
CP014361	91073	91231	-	XXXX_0000130	kfra protein	Truncated protein
CP014361	150360	151328	+	XXXX_0000174	hypothetical protein	putative plasmid stability protein StbA
CP014361	153237	156911	-	XXXX_0000180	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraG
CP014361	156908	158356	-	XXXX_0000181	conjugal transfer protein	putative conjugal transfer protein TraH
CP014361	158390	159337	-	XXXX_0000182	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraF
CP014361	162094	164892	-	XXXX_0000186	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraN
CP014361	164894	165958	-	XXXX_0000187	conjugal transfer protein TraU	conjugal transfer protein TraU
CP014361	165951	167117	-	XXXX_0000188	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraW
CP014361	167910	170309	-	XXXX_0000191	type-IV secretion system protein TraC	conjugal transfer protein TraC
CP014361	171042	171596	-	XXXX_0000194	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraV
CP014361	172390	173718	-	XXXX_0000196	hypothetical protein	putative conjugal transfer protein TraB
CP014361	174593	175210	-	XXXX_0000198	TraE protein	conjugal transfer protein TreE
CP014361	175207	175488	-	XXXX_0000199	conjugal transfer protein TraL	conjugal transfer protein TraL
CP014361	229180	229488	+	XXXX_0000239	plasmid stabilization protein	putative plasmid stabilization protein
CP014361	242456	242776	+	XXXX_0000257	hypothetical protein	putative plasmid stabilization protein
CP014361	263686	264591	+	XXXX_0000286	kfra protein	putative kfra protein used in this plasmid

활용하여 기존 알려진 유전자들과 유사성 검색 수행하여 그 기능을 예측하였다. 그 중 replication/conjugation과 직접적인 연관이 있는 유전자는 17개로 Table 1에 정리하였다.

3.2.2 DH-1 strain 내부 plasmid Gap 서열 분석

복제시작점의 경우 AT 비율이 상대적으로 높은 것으로 알려져 있다. CDS 사이 gap에 해당하는 염기서열의 길이가 400 bp 이상인 부분에 대하여 GC ratio를 계산하였다. Plasmid의 전체 GC ratio는 51.66% 였으며, 91,232~92,018 base에서 가장 낮은 GC ratio(37.61%)를 보였다 (Table 2 참조). 이외에도 107 kbase, 117 kbase, 207 kbase 근처에서 평균보다 10% 낮은 ratio를 보이는 것을 확인하였다.

각 gap에서 10 mer 이상의 internal repeat sequences를 검색한 결과, gap5, gap6, gap10, gap12, gap17, gap21, gap23에서만 repeat sequences가 발견되었다. 이 중, gap5, gap12, gap17, gap21 부위에서 근거리 repeat sequences가 존재함이 관찰되었다.

또한 gap sequences들을 기 보고된 *Methylomonas* genus 유전체 서열 중 plasmid replication 관련 유전자를 포함하는 contig들과 비교한 결과, gap6, gap12, gap16에서의 각각 15 bp, 19 bp, 11 bp 염기서열이 높은 유사성 (91.9%)을 보이는 것으로 확인되었다. 특히, gap12는 다

Table 2. GC ratios of gap sequences which are over 400 bp

Gap_ID	Sequence position		Size	GC ratio
	Start	End		
gap1	10,947	11,707	761	49.67
gap2	28,368	29,191	824	51.33
gap3	31,233	31,707	475	42.74
gap4	32,056	32,578	523	47.42
gap5	34,336	34,912	577	43.50
gap6	40,978	42,412	1,435	45.78
gap7	51,961	52,541	581	45.09
gap8	63,099	63,526	428	50.47
gap9	67,284	67,722	439	50.34
gap10	69,997	70,749	753	52.86
gap11	79,369	79,823	455	49.45
gap12	91,232	92,018	787	37.61
gap13	92,457	93,035	579	46.29
gap14	106,980	107,579	600	41.17
gap15	110,217	111,005	789	46.64
gap16	117,383	117,843	461	39.91
gap17	126,339	127,113	775	54.06
gap18	148,658	149,202	545	49.72
gap19	186,262	186,794	533	45.22
gap20	206,558	207,045	488	44.47
gap21	207,196	210,414	3,219	40.51
gap22	214,030	214,527	498	46.59
gap23	215,101	216,602	1,502	45.87
gap24	235,306	235,779	474	46.62
gap25	240,565	241,161	597	47.07
gap26	264,592	265,273	682	45.89

른 것들보다 좀 더 긴 부위에서 보존 되어 있음이 확인되었다(Fig. 2 참조).

그러나 DH-1의 plasmid 내부에는 plasmid replication 에 필요한 *repABC* 유전자가 암호화되어있지 않았다. 다만, 가장 AT-rich한 영역인 91,232~92,018의 upstream에는 DNA replication에 관여하는 것으로 알려진 *kfrA* gene(XXXX_0000130)이 존재하는 것이 확인되었다(Table 1 참조). *Methylomonas*의 *kfrA* gene은 300여개의 amino acid를 coding하는 것으로 알려져 있지만, XXXX_0000130 유전자는 52 개의 amino acid로 구성되어 있다. 이 52개의 아미노산은 Blast 분석 결과 기존에 보고된 *kfrA*의 C-terminal을 coding하고 있었다(Fig. 3 참조).

이러한 사실들을 기반으로 생각하였을 때 본래의 *kfrA* 유전자가 transduction 등의 genetic event로 인하여 분절된 것으로 추정할 수 있다(Fig. 4 참조).

온전한 크기의 *kfrA* gene(XXXX_0000286)은 263,686~

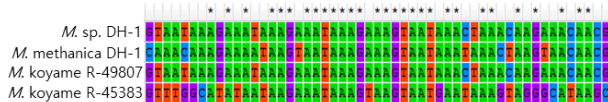


Fig. 2. The conserved sequences among DH-1 strain gap12 and plasmid sequences of other *Methylomonas* strains

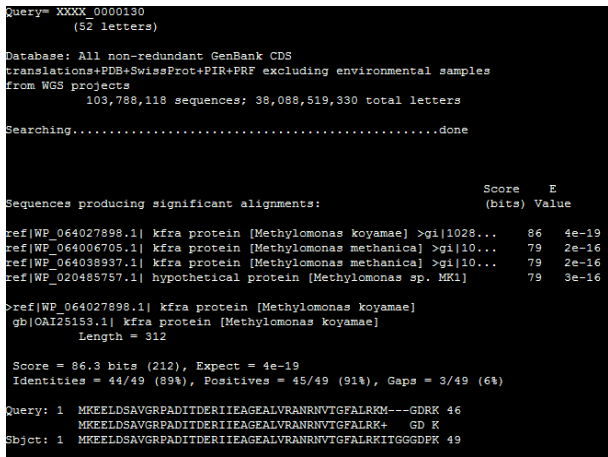


Fig. 3. Blast results of truncated KfrA (XXXX_0000130)



Fig. 4. The genetic structure of DNA sequences near a putative *oriV* location. *kfrA* gene (yellow), hypothetical protein (grey), transposon related genes (red), *oriV* (green)

264,591에 위치하고 있으나 이 유전자의 downstream에 위치한 gap sequences(gap26)의 GC ratio가 46%로 낮지 않으며, repeat sequence가 존재하지 않는다. 또한, 이 영역의 서열은 타 균주에서 보존되어 있지 않았다. 또한, 91,232~92,018 영역에서 보존된 sequence에는 repeat sequence(AAGT(A)AATAAA)를 포함하고 있는 것이 확인되었다(Fig. 2 참조).

이외에도 본 plasmid에는 conjugation 관련된 유전자들(*tra* genes)을 다수 포함하고 있는 것이 확인되었다(Table 1 참조). Conjugation을 위하여서는 일반적으로 *oriV* 이 아닌 *oriT*를 요구하는 것으로 알려져있다. *oriT*는 inverted repeat을 포함하고 있어 stem-loop 구조를 이루는 것으로 알려져 있기 때문에 inverted repeat finder를 활용하여 분석을 진행하였다. 그 결과, 두 영역에서 20mer 수준의 repeat이 발견되었다(Table 3 참조).

이들 inverted repeats 영역을 타 균주에서 유사성 검색을 수행하였다. 그 결과, 150,234~150,253을 포함한 서열이 다른 두 균주에서 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 6 참조). 또한, 150,234~150,253의 주위에

Table 3. inverted repeat analysis

Left Indices	Length	Right Indices	Length	Loop	Percent Matches	Percent Indels
117569-117593	25	117601-117625	25	7	96	0
150234-150253	20	150259-150278	20	5	90	0

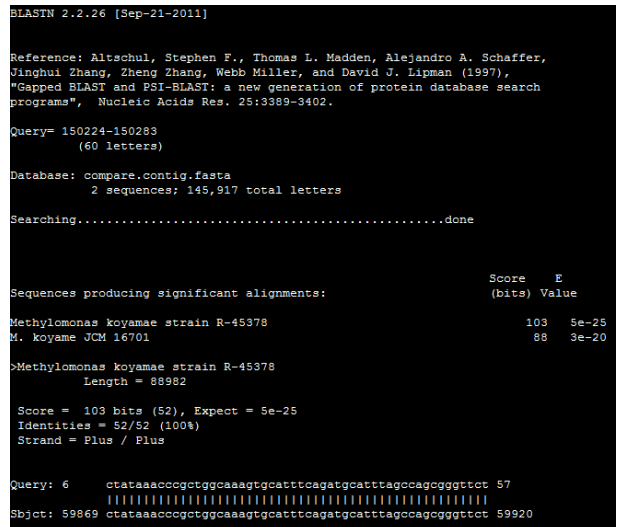


Fig. 5. Sequence similarity analysis of the 150,234~150,253 bp region

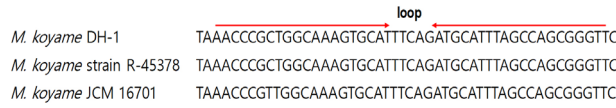


Fig. 6. Alignment of the inverted repeat sequence with those of other *Methylomonas* strains

는 plasmid stabilization protein *stbA* 유전자가 위치하고 있었다.

본 결과를 종합하여 볼 때, 91,232~92,018의 영역과 *kfrA* gene(XXXX_0000286)이 plasmid replication에 관여할 것으로 예상되며, 150,234~150,253 영역은 conjugation의 복제 원점으로 추정된다.

3.3 *Methylomicrobium album* BG8의 플라스미드 분석

3.3.1 BG8 strain plamid 서열 분석

기본적으로 DH-1 strain과 동일한 전략을 사용하였다. GenBank로부터 *Methylomicrobium album* BG8의 plasmid의 완전 해독된 염기서열(accession number CM001476) 확보하여 Prodigal V2.6.3 프로그램을 활용하여 유전자 예측 수행하였다. 그 결과, 49개의 CDS(protein coding sequence)를 확보하였다. 각 CDS를 GenBank nr database 및 PFAM database를 활용하여 기존 알려진 유전자들과 유사성 검색 수행함. 그 결과, 본 plasmid 내에 8개의 replication 관련된 유전자가 존재함을 확인하였다(Table 3 참조).

3.3.2 BG8 strain 내 plasmid gap 서열 분석

CDS 사이 gap에 해당하는 염기서열의 길이가 400 bp 이상인 region에 대하여 GC ratio를 계산하였다(Table 4 참조). 본 plasmid 전체의 GC ratio는 52.60% 였으며,

Table 5. The GC ratio of gaps with over 400 bp

Gap_ID	Sequence position		Size	GC ratio
	Start	End		
gap1	903	1,348	446	49.55
gap2	7,832	8,280	449	55.46
gap3	12,374	12,946	573	59.51
gap4	15,722	16,130	409	49.63
gap5	45,226	45,996	771	33.59

Table 4에서 보듯 45,226~45,996 base에서 가장 낮은 GC ratio(33.59%)를 보였다.

각 gap에서의 internal repeat을 조사한 결과, gap2 및 gap5에서 internal repeat이 존재하는 것을 확인하였음. 특히, gap5의 경우, 서열 CCCCTAACAGTGATAT이 8번 반복되는 것을 확인할 수 있었음. 이 반복 서열은 *Methylomicrobium agile* strain ATCC 35068의 유전체 초안 서열에서도 존재(CCCCTAACAGTGA CAT)하는 것을 확인할 수 있었으며, 역시 근접한 거리에서 5번 반복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7 참조).

gap5 주위에 *repB*, *kfrA*, *repA* gene이 위치하고 있어 iteron containing plasmid에서 볼 수 있는 replicon의 모습을 갖추고 있는 것이 확인되었다(Fig. 8 참조)



Fig. 7. The sequence of a predicted iteron in gap5

Table 4. The replication-related genes in the plasmid of *Methylomicrobium album* BG8

Contig_name	Start	End	direction	Gene ID	Annotation	Note
CM001476	1349	2029	-	XXXX_0000002	hypothetical protein	RepA family protein
CM001476	9968	10618	-	XXXX_0000014	chromosome partitioning protein	chromosome partitioning protein ParA
CM001476	24492	27365	+	XXXX_0000027	helicase	helicase
CM001476	32734	33180	+	XXXX_0000033	DNA polymerase V	DNA polymerase V
CM001476	33180	34457	+	XXXX_0000034	DNA polymerase V subunit UmuC	DNA polymerase V subunit UmuC
CM001476	36971	39172	-	XXXX_0000036	recombinase RecD	recombinase RecD
CM001476	43906	45225	-	XXXX_0000047	replication initiation protein	replication initiation protein RepB
CM001476	46226	47176	-	XXXX_0000049	hypothetical protein	Plasmid replication region DNA-binding protein KfrA



Fig. 8. BG8 plasmid putative replicon, genes related to replication of plasmid (yellow), hypothetical protein (grey), oriV (green)

4. 결과 및 토의

메탄자화균 중 *Methylomonas* sp. DH-1, *Methylo-*
microbium album BG8 두 strain 내에 존재하는 plasmid
의 복제시작점이 예측되었다. 이전에 알려진 복제시작점의
특성에 대한 정보를 기반으로 하여 복제시작점을 가지고 있
을 확률이 높은 서열을 찾아내었다. 그 결과 gap5에 해당
하는 서열에서 18개의 nucleotide 서열이 8번 반복되는 것
이 확인되었다. 이러한 서열의 반복은 direct repeat의 성
격을 가지고 있다. 이러한 복제시작점 주변의 반복서열은
RepA 단백질이 결합하는 자리로 생각되며 iteron이라 불
린다. 보통 iteron들은 20 bp 안팎의 길이를 가지는 것으
로 알려져 있으며 DH-1 내부 plasmid의 iteron 또한 18
bp의 길이를 가지고 있다.^[13,14] 이러한 특성들은 그동안
알려진 그동안 theta type replication을 하는 것으로 알
려진 다른 plasmid들과 유사하다. 그러나 이번에 찾아진
DH-1 plasmid의 예상 복제시작점 서열의 경우 그동안 알
려진 다른 복제시작점과는 몇 가지 다른 특성을 지니고 있는
것으로 생각된다. pPS10의 경우를 제외한 대부분의 알려진
iteron 서열의 경우 origin 안에서 완전히 같은 서열로 반복
되지 않는다. 그러나 이번에 찾아진 DH-1 plasmid의
iteron 서열의 경우 그 nucleotide 서열이 완전히 일치한
다. 또한 iteron서열들은 일반적으로 11 bp의 gap을 두고
배치되어 있는 것으로 알려져 있는데 이는 DNA 이중나선
구조의 회전 주기와도 어느 정도 일치한다.^[12] 그러나 이번
에 찾아진 서열의 경우 7개의 interon 사이의 gap 중 4개
의 gap에서 5 bp의 서열[TTCA(C/T)]이 반복되는 것이 관
찰되었다. 5 bp가 DNA 회전 주기의 절반정도인 것을 생각
하였을 때 그동안 알려진 RepA 결합과 다른 형태를 지닌
결합일 가능성이 있다. 새롭게 찾아진 서열이 iteron 형태
인 것을 보았을 때 plasmid 복제 방식은 theta-type이거
나 strand displacement방식일 것으로 생각된다. 가장 특
이한 부분은 RepA 단백질이 plasmid내에 존재하지 않는

다는 점이다. 모균주의 DH-1 strain의 genome에서도 RepA
단백질과 유사한 단백질은 찾아지지 않았다. Plasmid 내
에 존재하는 다른 DNA binding protein이 그 역할을 대신
할 가능성도 있으나 이에대해서는 추가적인 연구가 필요할
것으로 생각된다.

본 논문이 제시하는 결과는 향후 메탄자화균에 필요한
episomal plasmid를 설계함에 있어 유용한 정보가 될 수
있을 것으로 생각된다. 다만 모든 분석이 *in silico*에서 진
행되었기 때문에 *in vivo*에서 이 서열이 제대로 작동함을
증명하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

References

- [1] Ritchie, H., Rosado, P., and Roser, M., 2020, "Greenhouse gas emissions", Our World in Data, <https://ourworldindata.org/greenhouse-gas-emissions>.
- [2] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007, "Chapter 2: Changes in atmospheric constituents and radiative forcing", In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, UK.
- [3] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2014, "Chapter 8: Anthropogenic and natural radiative forcing", In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, UK.
- [4] Global Methane Pledge, Accessed 7 January 2023, <https://www.globalmethanepledge.org/>.
- [5] Henard, C.A., Smith, H., Dowe, N., Kalyuzhnaya, M.G., Pienkos, P.T., and Guarnieri, M.T., 2016, "Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium", Scientific Reports, 6, 21585.
- [6] Lee, J.K., Kim, S., Kim, W., Kim, S., Cha, S., Moon, H., Hur, D.H., Kim, S.Y., Na, J.G., and Lee, J.W., et al., 2019, "Efficient production of D-lactate from methane in a lactate-tolerant strain of *Methylomonas* sp. DH-1 generated by adaptive laboratory evolution", Biotech-

- nology for Biofuels, **12**, 234.
- [7] Nguyen, D.T.N., Lee, O.K., Hadiyati, S., Affifah, A.N., Kim, M.S., and Lee, E.Y., 2019, "Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane", *Metabolic Engineering*, **54**, 170-179.
- [8] Kang, C.K., Jeong, S.W., Jo, J.H., Park, J.H., Kim, M.S., Yang, J.E., and Choi, Y.J., 2021, "High-Level squalene production from methane using a metabolically engineered *Methylomonas* sp. DH-1 strain", *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **9**(48), 16485-16493.
- [9] Helm, J., Wendlandt, K.D., Jechorek, M., and Stottmeister, U., 2008, "Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture", *J. Appl. Microbiol.*, **105**(4), 1054-1061.
- [10] Nguyen, A.D., Hwang, I.Y., Lee, O.K., Kim, D., Kalyuzhnaya, M.G., Mariyana, R., Hadiyati, S., Kim, M.S., and Lee, E.Y., 2018, "Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2,3-butanediol production from methane", *Metabolic Engineering*, **47**, 323-333.
- [11] Nguyen, A.D., Hwang, I.Y., Lee, O.K., Hur, D.H., Jeon, Y.C., Hadiyati, S., Kim, M.S., Yoon, S.H., Jeong, H., and Lee, E.Y., 2018, "Functional analysis of *Methylomonas* sp. DH-1 genome as a promising biocatalyst for bioconversion of methane to valuable chemicals", *Catalysts*, **8**(3), 117.
- [12] Novick, R.P., 1987, "Plasmid incompatibility", *Microbiol Rev.*, **51**(4), 381-395.
- [13] Solar, G.D., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R., 1998, "Replication and control of circular bacterial plasmids", *MMBR*, **62**(2), 434-464.
- [14] Chattoraj, D.K., 2000, "Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical", *Mol Microbiol.*, **37**(3), 467-476.