



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2021년 2월
박사학위 논문

신규 메탄산화세균들의
분리, 배양학적 특성 및
대사체 분석

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

류 재 원

신규 메탄산화세균들의 분리, 배양학적 특성 및 대사체 분석

Isolation, cultivation and metabolite analysis from
novel methane oxidizing bacteria

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

류 재 원

신규 메탄산화세균들의 분리, 배양학적 특성 및 대사체 분석

지도교수 김 시 욱

이 논문을 박사학위 신청 논문으로 제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

류 재 원

류재원의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	<u>유진철</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>이성행</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>김태영</u> (인)
위원	국립낙동강생물자원관	선임	<u>박상화</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>김시욱</u> (인)

2020년 12월

조선대학교 대학원

목 차

제1장 서론

1. 메탄산화세균.....	1
2. 메탄산화세균과 공생 미생물의 관계.....	4
3. 연구 배경 및 목적.....	6

제2장 메탄산화세균 및 공생세균의 분리와 동정

1. 재료 및 방법.....	10
가. 시료의 채취 및 보관.....	10
나. 메탄산화세균 및 공생 종속영양세균의 분리.....	10
다. 균주의 동정.....	14
(1) 분자유전학적 동정.....	14
(2) 배양학적 특성.....	15
2. 결과 및 고찰.....	16
가. 균주의 분리.....	16
나. 분리 균주의 동정 및 특징.....	16
(1) 분자유전학적 동정.....	16
(2) 배양학적 특성.....	22

제3장 *Methylocystis* sp. JR02 strain 색소 생산

1. 재료 및 방법.....	24
가. JR02 균주의 배양조건.....	24
나. 색소의 분리 및 정제.....	24
다. 색소의 구조 분석.....	25
라. 색소의 항암특성 분석.....	26
마. JR02 균주의 유전체분석.....	26
2. 결과 및 고찰.....	28
가. 색소의 생산, 분리 및 정제.....	28

나. 색소의 구조 분석	34
다. 색소의 항암 활성	37
라. Phosphate의 농도에 따른 prodigiosin analogues의 생산	39
마. JR02 균주의 유전체분석	43

제4장 메탄산화세균과 공생세균의 혼합배양

1. 재료 및 방법	53
가. 사용 균주 및 배양 조건	53
나. 메탄 소비 속도 비교	53
다. 성장 촉진 물질	53
(1) 비타민 요구 균주의 분리	54
(2) 성장 촉진 물질의 생산 및 분리	55
(3) 성장 촉진 물질의 성장촉진 효과	55
(4) <i>Methylosinus</i> sp. JR31의 대사체 분석	56
라. 메탄산화세균과 대장균의 혼합배양	57
(1) 사용 균주 및 배양 조건	57
(2) 메탄 소비 속도 비교	57
2. 결과 및 고찰	58
가. 메탄산화세균의 순수 및 혼합배양	58
나. 비타민 요구 MOB 균주의 선발 및 JR31 균주의 성장촉진효과	61
다. <i>Methylosinus</i> sp. JR31 균주의 대사체 분석	66
라. 메탄산화세균과 대장균의 혼합배양	78

제5장 결론 80

제6장 참고문헌 83

List of Tables

Table 1.	3
Table 2.	11
Table 3.	12
Table 4.	17
Table 5.	22
Table 6.	25
Table 7.	41
Table 8.	45
Table 9.	46
Table 10.	48
Table 11.	49
Table 12.	50
Table 13.	54
Table 14.	71
Table 15.	72
Table 16.	76
Table 17.	77

List of Figures

Fig. 1.	2
Fig. 2.	5
Fig. 3.	7
Fig. 4.	13
Fig. 5.	21
Fig. 6.	23
Fig. 7.	29
Fig. 8.	30
Fig. 9.	31
Fig. 10.	32
Fig. 11.	33
Fig. 12.	35
Fig. 13.	36
Fig. 14.	38
Fig. 15.	40
Fig. 16.	42
Fig. 17.	47
Fig. 18.	59
Fig. 19.	60
Fig. 20.	62
Fig. 21.	63
Fig. 22.	64
Fig. 23.	65
Fig. 24.	68

Fig. 25. **69**
Fig. 26. **70**
Fig. 27. **73**
Fig. 28. **74**
Fig. 29. **75**
Fig. 30. **78**

ABSTRACT

Co-culture of several isolated methane oxidizing bacteria and production of prodigionic pigment

Jaewon Ryu

Advisor: Prof. Si Wouk Kim, Ph.D

Dept. of Renewable Energy Convergence

Graduate School of Chosun University

To isolate methane oxidizing bacteria (MOB) from various types of soils (paddy field, wetland, garbage landfill, etc.), enrichment culture was performed for 2 weeks at 30°C using nitrate mineral salt (NMS) medium with methane as sole carbon and energy source. Headspace of 300 mL Erlenmeyer flask was replaced with methane/air gas mixture (50/50, v/v). Over thirty methane oxidizing bacteria were isolated from the enrichment culture using a solid NMS medium. During isolation, more than 40 non-methane oxidizing heterotrophic bacteria, which were grown with methane oxidizing bacteria on NMS agar medium at first subculture but not grown on NMS medium at second subculture, were isolated from the LB agar medium. 16s rRNA gene sequence analysis of isolated MOB and heterotrophic bacteria were carried out. As a results, Twenty eight MOB strains were identified. They belonged to *Methylomonas* sp., *Methylophilus* sp., *Methylosarcina* sp., *Methylosinus* sp., *Methylocystis* sp.. And twenty three heterotroph strains were identified by 16S rRNA gene analysis. The eight strains that grow fast among the isolated MOBs were belonged to *Methylomonas* sp., *Methylosinus* sp., and *Methylocystis* sp.. In addition, the specific growth rates (μ^{-1}) in NMS medium contained in the 70 mL gas tightly sealed vial supplemented with methane/air gas mixture (50/50, v/v) were 0.031~0.178. Several mixed culture broths showed high OD₆₀₀ values of 10 within 5 day cultivation. It was found that some of mixed cultures showed higher OD₆₀₀

values than pure cultures of corresponding MOBs, but the other presented lower OD₆₀₀ values. This result suggests that a certain MOB and its related heterotrophic bacterium(a) are symbiotic with each other by exchanging carbon sources or growth promoting substances, but are competitive with each other by inhibiting cell growth.

In our study, a novel methane-oxidizing bacterium (MOB) isolated from a rice paddy field soil was identified as *Methylocystis* sp. JR02 by 16s rRNA gene sequencing analysis. Its specific growth rate and doubling time in nitrate mineral salt (NMS) medium contained in the 70 mL gas tightly sealed vial supplemented with methane/air gas mixture (50/50, v/v) were 0.089 hr⁻¹ and 7.79 hr, respectively. The color of the culture broth was milky white throughout the culture period in the NMS medium containing 4.2 mM phosphate. However, when the phosphate concentration in the medium decreased to less than 0.1 mM, the color of the culture broth turned pink, and the colonies of the NMS agar plate showed metallic green sheen. The pink pigment extracted from the bacterial cell showed two absorption peaks (λ_{max}) at 467 nm and 535 nm in methanol at neutral pH. However, λ_{max} was solvents and pH dependent. That was 467 nm at pH 2.0 and 535 nm at pH 12.0. The pigment was purified and analyzed by LC-MS/MS with m/z 338.7, 352.6 and 366.7. These values were the typical characteristics of the prodigiosin analogues consisting of 2-methyl-3-hexyl prodiginine (m/z 338.7), 2-methyl-3-heptyl prodiginine (m/z 352.6) and 2-methyl-3-octyl prodiginine (m/z 366.7), respectively. The maximal concentration of prodigiosin analogues in the medium was obtained in the stationary phase of cell growth, indicating that it was a secondary metabolite. The maximum concentrations produced were 62.9 mg/L for 2-methyl-3-heptyl prodiginine, 8.1 mg/L for 2-methyl-3-octyl prodiginine, and trace amount of 2-methyl-3-hexyl prodiginine, respectively. To our best knowledge, these were the maximum concentrations obtained from MOB.

The anticancer efficacy of the extracted pigment against several human cancer cells were demonstrated through cell viability assay. The pigment concentrations at which cell viability fell below 50% were 15.6, 500, 250 and 250 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ in prostate

cancer cell line LNCap and PC3, breast cancer cell line MDA-MB-231, and lung cancer cell line NCI-H460, respectively. Similarly, an immortalized cell line, HaCaT, exhibited $\leq 50\%$ cell viability with $62.5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ prodigiosin analogues produced by JR02. These results showed that the pigment produced by the JR02 strain was effective in suppressing cancer cell lines similar to prodigiosin.

The genome of JR02 strain consisted of a total of five contigs of 4,362,918 bp with GC content of 63.39%. Size of all contigs were 3,885,632; 311,335; 158,371; 4,565 and 3,015 bp. Contig1 has 3,624 CDSs, corresponding to 88.5% of the entire genome coding sequence (CDS) and it was analyzed that contig1 has 55 tRNA and 9 rRNA distinct genes than other contigs. Thus, contig1 is bacterial chromosomal DNA.

The particulate methane monooxygenase (pMMO) and the soluble methane monooxygenase (sMMO) gene groups were also present in contig1. Sequence analysis of the three pairs of pMMO α and β subunit genes revealed their close resemblance to the genus *Methylocystis*, similar to the results of the 16S rRNA gene analysis. Methane monooxygenase components A, B, and C, the constituent genes of sMMO, showed highest homology with the genus *Methylosinus*, while component D of MMO was most homologous with the genus *Methylocystis*.

Among the prodigiosin-related genes, *pigC*, *pigD*, *pigE*, *pigF*, *pigG*, *pigH*, *pigI*, *pigJ*, *pigM*, and *pigA* were located in contig2 in the form of an operon. *PigB*, *pigK*, *pigL*, *pigN*, and *pigO* genes were not found in pig operon of contig2. Instead, two hypothetical protein genes were found between *pigJ* and *pigM* genes. Protein blast analysis of each gene of pig operon showed relatively high homology with various types of prodigiosin biosynthetic gene groups such as *Hahella chejuensis*, *Zoshikella ganghwensis*, *Janthinobacterium lividum*, *Rugamonas rubra*, and *Massilia* sp. However, the homology was low with the gene group of the well-known prodigiosin-producer *Serratia* sp. The size of contig2 was about 311 kbp, which is a plasmid size. Considering above facts, it is possible that the JR02 strain has the ability to produce prodigiosin analogues by horizontal gene transfer.

In general, *phoR* and *phoB* genes related to phosphate uptake are known to be involved in prodigiosin biosynthesis depending on the concentration of phosphate and these genes were located in contig1. Homology analysis of these genes showed similarity to the strains of genus *Methylocystis* and *Methylosinus*. In addition, genes that regulate prodigiosin biosynthesis, such as *tamA*, *tamB*, and *rapA*, were found in contig1.

The culture supernatant of the JR31 strain, a MOB isolate, showed growth promotion effect on MOB strains (JR07, JR09, JR29, JR30) which require cobalamin(vitamin B12) to grow. Culture supernatant of the JR31 strain not only increased the biomass concentration of JR07 strain but also increased the growth rate. In the activity test of the culture supernatant obtained according to the culture period of the JR31 strain, the JR07 strain showed almost the same level of activity in the supernatant after 7 days of culture. The culture supernatant of the JR31 strain was fractionated by HPLC, and demonstrated growth promoting effect on the vitamin-requiring MOB strains with each fraction, and the best effects were observed with fraction No. 17 (20.1-21.0 min) and 18 (21.2-22.0 min). Fraction No. 11~20 fractions were analyzed for metabolites. In the GC-TOF-MS analysis, among different metabolites, elaidic acid was distinctly present in fractions no. 17 and 18 than other fractions. Elaidic acid is an unsaturated trans fatty acid, which is not known to promote the growth of microorganisms. In UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysis, a total of 14 possible metabolites were found and among them only one metabolite was identified as amino-methyl-oxononanoic acid. As a result of comparing the contents of metabolites, 5 metabolites (NI 1-5) showed relatively high content in fraction No. 17 whereas 9 metabolites (NI 6-13 & Amino-methyl-oxononanoic acid) showed relatively high content in fraction No. 18.

제1장 서론

1. 메탄산화세균

메탄산화세균(Methane Oxidizing Bacteria, MOB)은 일원자탄소인 메탄을 산화하여 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 박테리아를 말한다. 분류학적으로 메탄산화세균은 *Methylotrophic bacteria*의 하위 그룹에 속한다. *Methylotrophic bacteria*는 호기성 박테리아로, methane, methanol, methylated amines, halomethane, 그리고 황을 포함한 methylated 유기화합물 등의 일원자탄소를 탄소원과 에너지원으로 이용하여 살아가는 세균집단이다. 특히 *methylotrophic bacteria* 중에서 탄소원과 에너지원으로 methane만을 사용하는 종류를 메탄산화세균 또는 메탄자화세균(*methanotrophic bacteria*)으로 통칭한다. MOB는 methane을 methanol, formaldehyde, formate 그리고 최종적으로 CO₂로 산화시킨다 (Fig. 1)[1, 2]. 이 과정에서 중간 대사산물인 formaldehyde를 RuMP pathway 또는 serine pathway를 이용하여 세포 구성물질로 합성한다. 또한, 다음 중간산물인 formate를 산화시키는 과정에서 NADH를 만들어 methane을 산화시킬 때 필요한 환원력으로 사용한다.

메탄을 산화시키는 MOB는 1906년 Söhngen에 의하여 최초로 분리되었다[3]. 그러나 MOB에 관한 연구가 활발하게 진행된 것은 1970년 Whittenbury 연구팀에 의해 100여종의 새로운 균주가 분리·동정 되면서 부터이다[4]. 지속적인 연구로 메탄산화세균은 메탄과 산소가 있는 어느 곳에서나 광범위하게 분포되어 있다는 사실이 확인되었다. Whittenbury 등은 MOB를 박테리아의 형태, 세포내막(intracytoplasmic membrane)의 구조, 휴지기(resting stage)에서의 형태 변화 그 밖의 계통학적 특징 등으로 구분하여 *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*와 *Methylosinus*의 다섯 가지 그룹으로 분류하였다[4, 5, 6]. 그 이후 현재까지 많은 후속 연구가 진행되면서 분류학적 계통발생이 광범위하게 연구되고 있다[7]. 또한, MOB를 생리화학적, 형태학적, 세포구조적 특징으로 구분하면 크게 두 개의 그룹으로 나뉜다. Table 1에서 나타낸 기준으로 *Methylomonas* 속과 *Methylobacter* 속은 type I으로 분류되고 *Methylosinus* 속과 *Methylocystis* 속은 type II에 속한다[8, 9, 10, 11]. 한편, *Methylococcus* 속은 type I과 유사한 특징을 가지고 있지만, type X로 분류된다.

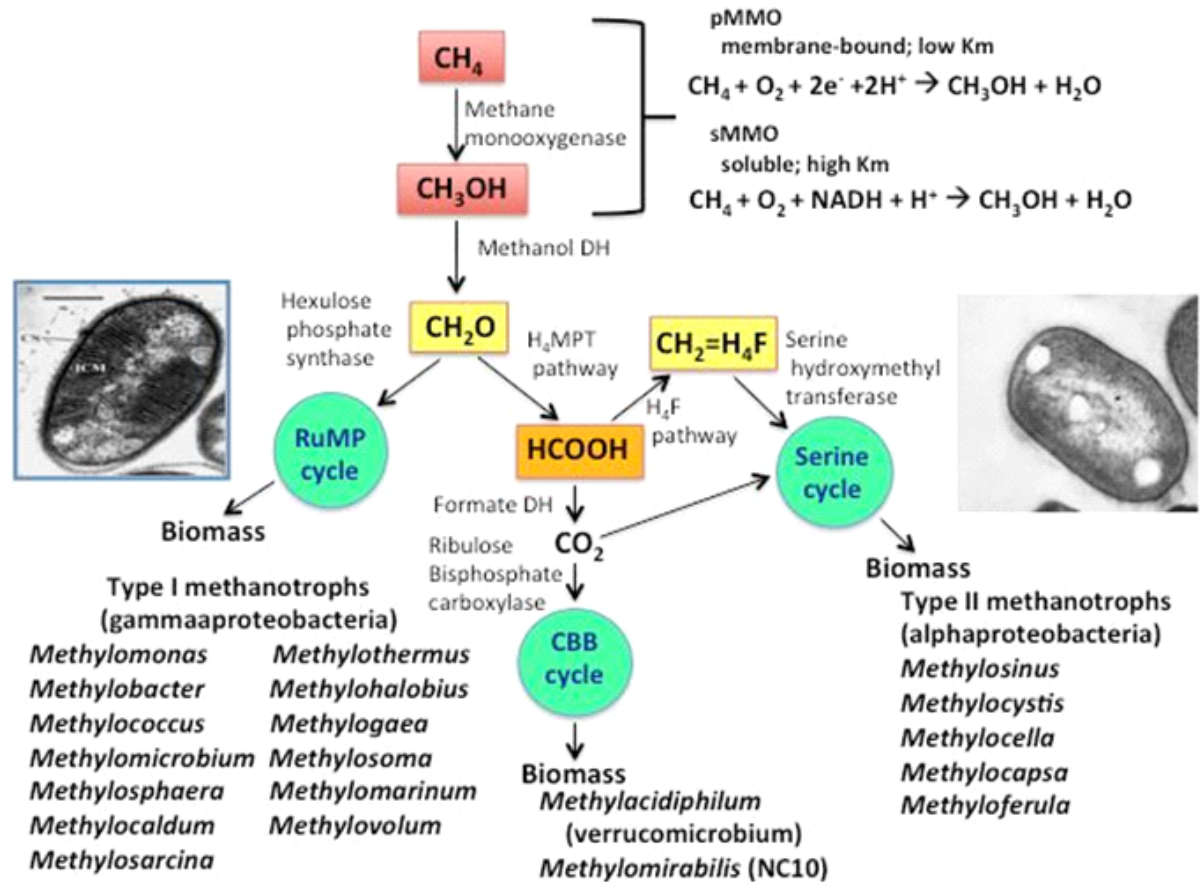


Fig. 1. Overview methane oxidizing bacteria[www.methanotroph.org].

Table 1. Characteristics of type I, type II, and type X methanotrophic bacteria

Characteristic	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rods, usually occur singly; some cocci or elipsoids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pairs
G+C content of DNA (mol %)	49-60	62-67	59-65
Membrane arrangement			
Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
Paired membranes aligned to periphery of cells	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting stages formed			
Exospores	No	Some strains	No
Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP pathway present	Yes	No	Yes
Serine pathway present	No	Yes	Some strains
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase present	No	No	Yes
Proteobacterial subdivision	Gamma	Alpha	Gamma

그 이유는 *Methylococcus* 속은 type I 과 같이 formaldehyde 동화작용의 primary pathway로 ribulose monophosphate(RuMP) pathway를 이용하지만, 추가하여 Calvin-Benson cycle을 사용하며 serine pathway의 ribulose biphosphate carboxylase가 낮은 농도로 존재하는 점이 type I 과 구별되기 때문이다. Type X MOB는 일반적으로 type I 과 type II MOB에 비하여 높은 온도에서 성장할 수 있으며, type I 에 비하여 상대적으로 높은 G+C contents(mol %)를 갖는다[10, 11, 12]. 1993년 Bowman 등은 연구에서 DNA-DNA hybridization, genomic physicochemical properties, 유전적 진화 관계와 phospholipid fatty acid (PLFA)의 구성성분 등을 연구하여 각종을 분류하고, 종간의 유연관계를 파악하여 더 세부적으로 분류하였다 [13]. 이 연구에서 새로 분리된 몇 종류의 균주를 포함하여 136종의 MOB를 124가지의 표현형들로 비교하였다. 그 결과 type I MOB는 크게 *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylobacter*의 세 종류의 집단으로 분류되며, 이 집단에 속하지 않는 종으로 *Methylomicrobium* 등은 *Methylococcaceae* family(과, 科)에 속하는 것으로 제안하였다[14]. type II에 속하는 종인 *Methylocystis*와 *Methylosinus*도 그 특징이 상이함을 보고하였다[13, 14].

2. 메탄산화세균과 공생 미생물과의 관계

동일한 주변 환경에서 대다수의 미생물은 공통으로 사용하는 탄소원과 에너지원에 대해 경쟁적 관계에 있거나 스스로 이용하지 못하는 탄소원을 다른 미생물의 도움으로 이용할 수 있게 되는 경우 또는 다른 미생물의 생육과 관련된 인자(비타민, pH 등)를 제공하는 경우처럼 서로 공생하는 관계에 놓이는 경우가 많다. 일반적으로 MOB는 탄소원과 에너지원으로 메탄 또는 메탄올만을 이용하고 다른 다탄소화합물은 이용하지 못하는 것으로 알려졌지만 동일한 환경에 공존하는 MOB와 종속영양세균을 혼합배양할 경우 종속영양세균의 종의 수가 늘어날수록 MOB의 메탄 산화능이 증가한다는 보고가 있다[15]. 그러나 그 기작은 아직 알려지지 않았고, 이러한 종속영양세균의 효과가 종 특이성을 갖는지 그리고 모든 MOB에도 유사하게 나타나는지에 관한 연구는 거의 없다. 하지만 일부 MOB는 메탄을 이용하지 못하는 종속영양세균에게 이용가능한 탄소원을 제공하고, 반대로 종속영양세균으로부터 비타민 B₁₂와 같은 생리활성물질을 제공 받아 성장하는 것이 보고되었고, 미세조류와 메탄산화세균의 혼합배양을 통하여 MOB가 메탄을 대사하고 만들어진 이산화탄소를 미세조류가 탄소를 고정하는 사이클이 반복되면서 성장하게 하는 연구도 진행되었다 (Fig. 2)[16, 17, 18].

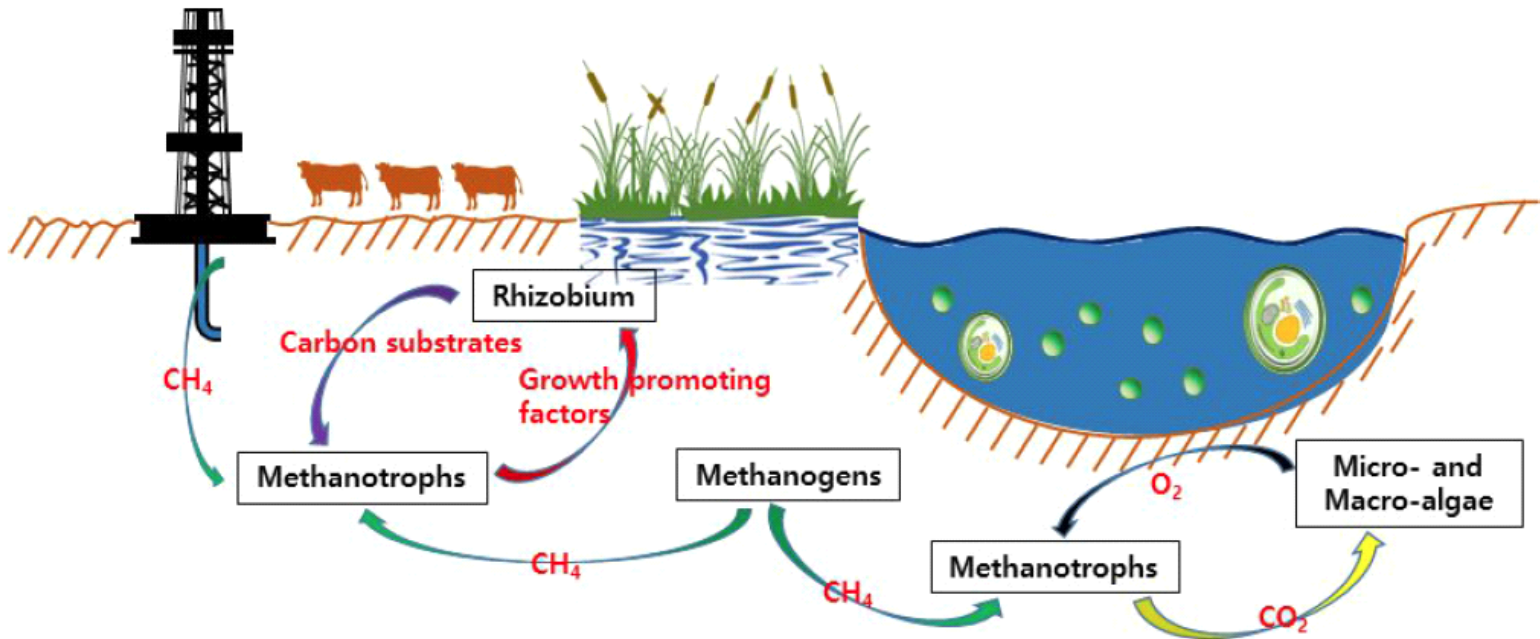


Fig. 2. Cycle of organic wastes degradation, methane production and methane oxidation in ecosystems.

3. 연구 배경 및 목적

메탄은 지구온난화를 일으키는 주요 온실가스의 하나로, 지구온난화지수(global warming potential, GWPs)를 이용하여 비교하면 단위 부피당 이산화탄소와 비교해 21배 이상 높다[19]. 미국 환경보호국(EPA)에 의하면 2010년 기준 온난화에 기여하는 물질 중 메탄은 16%를 차지하고 있다. 메탄은 천연가스 및 셰일가스의 80% 이상을 구성하는 주요 성분으로 전 세계적으로 $70\sim 230 \times 10^{12} \text{ m}^3$ 이상이 매장되어있을 것으로 추정된다, 그 밖에 쓰레기 매립장, 반추동물, 농지, 습지 등에서 지속적으로 발생한다(Fig 3). 그러나 석탄이나 원유를 채취할 때 나오는 메탄은 부산물로 취급되어 대기 중으로 방출되거나 의미 없이 연소되고 있다. 현재 연료로 사용되고 있는 메탄은 고압의 조건으로 액화시킨 형태로 보존하는데 이러한 방법은 비용이 많이 들 뿐만 아니라 폭발위험이 있다. 따라서 산지와 시장의 거리가 먼 경우 그 이용이 제한된다. 이러한 점을 고려하여 메탄가스를 위험도가 작은 물질로 액화시키는 것은 산업적·경제적 측면에서 이점이 생긴다. 특히 메탄을 메탄올로 전환하는 것은 물질의 안정성 및 이용의 측면에서 효과적이다. 메탄올은 에틸렌(ethylene), 프로필렌(propylene), 올레핀(olefin) 등의 전구체로 사용될 수 있는데, 이 물질들은 산업적으로 매우 중요한 물질로 대부분 석유로부터 생산되어 왔다. 또한, 메탄올은 가솔린을 대신하여 자동차 연료로 사용할 수도 있다. 이러한 메탄올을 자연에서 대량 발생하는 메탄으로부터 합성한다면 온실가스인 메탄을 저감함과 동시에 가치 있는 유용물질로 전환할 수 있게 된다.

메탄을 메탄올로 전환하는 방법은 물리화학적 방법과 생물학적 방법이 있는데 물리화학적인 방법은 간접적 전환 방법과 직접적 전환 방법으로 나뉜다. 간접적 전환 방법은 천연가스를 스팀 개질을 통해 수소와 일산화탄소로 구성된 합성가스를 제조하고, 촉매하에서 반응 용기에 공급하여 메탄올 이외의 물질을 제거하는 증류 장치를 통해 메탄올을 생산하는 방법이다. 이때 반응하지 않고 남은 합성가스는 메탄올 전환 장치로 재공급 된다. 이 프로세스는 메탄올의 전체 전환 효율이 높다. 하지만 에너지가 많이 소모되는 과정으로 많은 비용이 든다[20]. 그리고 직접적 전환 방법은 합성가스를 생성하는 과정을 포함하지 않고, 단일단계 반응으로 경제적이지만 여전히 고온의 반응 과정이 필요하여 에너지가 많이 소모되고 상대적으로 메탄올의 생산 수율이 낮다[21].

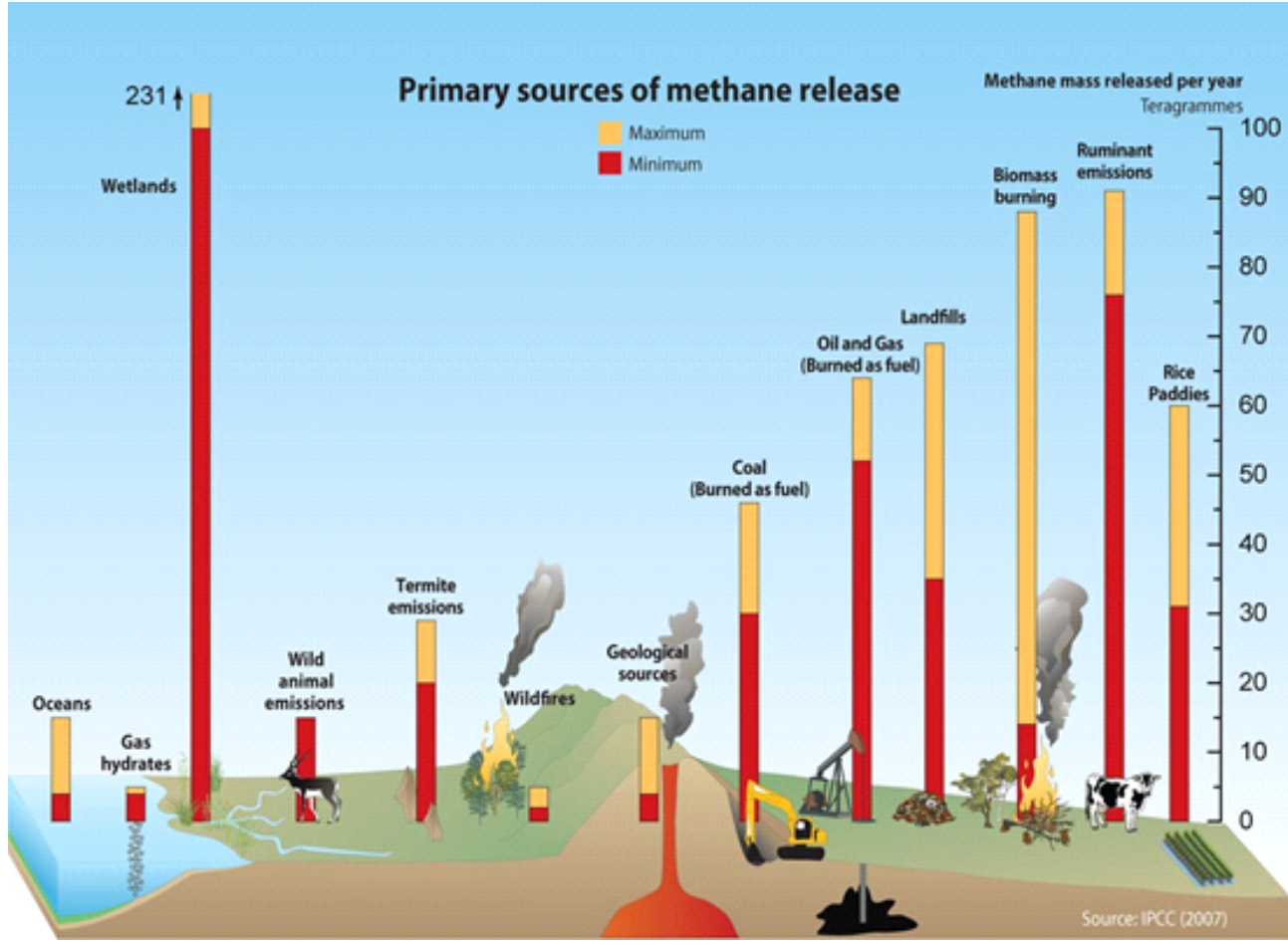


Fig. 3. Primary sources of methane release[IPCC, 2007].

메탄을 메탄올로 전환하는 생물학적인 방법은 메탄을 메탄산화세균을 이용하는 것이다. 메탄산화세균은 상온, 상압에서 메탄을 메탄올로 전환하므로 물리화학적인 공정보다 에너지 소모 측면에서 유리하다. 이러한 메탄의 산화는 메탄 일원자 산화효소(Methane Monooxygenase, MMO)라고 하는 효소에 의해 반응이 진행된다[22]. MMO는 particulate MMO (pMMO)와 soluble MMO (sMMO)의 두 형태로 존재한다. sMMO는 type II, type X MOB에서 발견되며, pMMO는 알려진 모든 MOB에서 발견된다. pMMO는 배양할 때 구리이온이 일정 농도 이상 존재할 때 세포막에서 생성된다. 반대로 sMMO는 구리이온이 없거나 일정 농도 이하일 때 세포질 내에서 생성된다. 이 sMMO와 pMMO는 활성 부위의 금속이온이 다르고 기질의 특이성, 촉매의 반응 특성, 저해제 종류 등에 있어 큰 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다[23, 24]. MOB는 연속된 대사 과정을 통하여 메탄을 최종적으로 CO₂와 H₂O로 분해하고, 메탄올은 그 중간 대사산물이다. 따라서 메탄올을 지속적으로 생산하고 축적하기 위해서는 MMO가 메탄을 메탄올로 산화시킬 때 NADH가 요구되므로 지속적인 NADH의 공급이 필요하며, 그러나 메탄올을 포름알데히드로 산화시키는 methanol dehydrogenase(MDH)의 활성은 억제하는 것이 필요하다. 메탄산화세균은 한 분자의 메탄을 메탄올로 전환하기 위해 반드시 한 분자의 NADH가 있어야 한다. 메탄의 대사가 이루어지면 산화의 마지막 단계에서 formate dehydrogenase가 formate를 산화하면서 NADH를 공급하지만, MDH의 활성이 제거될 경우 메탄올 이후의 대사가 중단되면 NADH의 공급이 중단되므로 메탄 산화 반응 시 인위적으로 formate를 공급해주어야 MMO가 메탄을 산화하여 메탄올을 생성할 수 있다. 또한, MDH의 활성을 적절히 억제해서 생성된 메탄올 일부가 계속 formate로 전환될 수 있도록 할 수 있다. 이러한 경우 축적되는 메탄올의 양이 감소하게 된다[25]. MDH의 활성을 저해하는 것으로 알려진 물질로는 EDTA, cyclopropane, cyclopropanol, dithiothreitol, phenylhydrazine, NaCl, iodoacetate, MgCl₂ 그리고 고농도의 phosphate 등이 있다[26]. MOB를 이용한 methanol 생산은 여러 연구를 통하여 보고되었다. Metha 등의 보고에서 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용하여, 세포 현탁액과 고정화 세포의 회분식 및 연속식 생산 공정에서 methanol 합성에 대한 동역학을 검토하였다[27]. 이들이 확립한 고정화 세포의 최적조건에서 메탄올의 생성속도는 267 μmol/mg·hr이었고, 세포 현탁액의 메탄올 생성속도는 6 μmol/mg·hr이었으며, 이 속도를 72시간 이상 유지하였다. 한편 Tang과 Patras의 연구에서 *Methylobacterium organophilum*을 메탄올 생산에 이용하였는데 생성속도는 MDH 저해제의 농도에 매우 민감하고, 온도나 pH 등의 환경적인 요인에도 큰 영향을 받았다[28]. Shimoda 등은 *M. trichosporium* OB3b를

cyclopentane으로 처리한 후 methane, ethane, propane, 그리고 butane으로부터 methanol, ethanol, propanol, butanol의 생산과정을 연구하였다[29].

본 연구에서는 전라남도 지역의 쓰레기 매립장, 농지, 습지, 숲, 배수로 등의 토양 시료를 채취하여 MOB와 종속영양세균을 분리하고 동정하여, 분리된 MOB의 특성을 파악하고, 종속영양세균과의 혼합배양을 통하여 MOB와 종속영양세균의 상호 관계를 파악하고자 하였다. 그리고 분리된 MOB로부터 유용물질의 생산이 가능한지를 연구하고, 종속영양세균과의 혼합배양을 시도하였다.

제2장 메탄산화세균 및 공생세균의 분리와 동정

1. 재료 및 방법

가. 시료의 채취 및 보관

MOB를 분리하기 위하여 광주광역시, 전라남도, 전라북도 지역의 쓰레기 매립장, 농지, 습지, 숲, 배수로 등의 토양 시료를 채취하였다. 같은 지역의 토양은 대표성을 고려하여 동일한 특성인 토양을 10 m 이상 거리를 두고 세 군데 이상에서 채취하여 혼합하였으며, 토양 표피층(~ 1 cm)을 제거한 후 1 ~ 3 cm 깊이의 토양을 채취하였다. 채취한 토양시료는 밀폐용기에 넣고 밀봉한 후 냉암소에 보관하여 이동 후, 4℃에서 보관하였다(Table 2).

나. 메탄산화세균 및 공생 종속영양세균의 분리

채취한 각 토양시료는 1%(wt/vol) 농도로 1ℓ 부피의 플라스크에 담긴 200 ml의 MOB 배양용 Nitrate mineral salt (NMS) 배지에 접종하였다 (Table 3)[11]. 플라스크의 입구는 가스 유출입이 가능한 관을 설치하고, 실리콘 마개를 이용하여 가스의 유출입이 발생하지 않도록 밀봉하였다. 가스 유출구를 열고, 가스 유입구에 메탄/공기의 비가 5:5인 혼합가스를 플라스크 headspace 부피의 10배 이상 주입하여 플라스크 내부의 공기가 모두 혼합가스로 치환시키고 가스의 유출입구를 밀봉하였다. 그리고 30℃, 180rpm 조건으로 2주간 1차 농화배양을 수행하고 배양액을 seed로하여 동일한 방법으로 2차 및 3차 농화배양을 하였다. 3차 농화배양된 배양액을 1/10³~10⁸배 연속 희석하여 NMS 고체배지에 희석배율별로 각 3개씩의 NMS 고체배지(1.5% 한천)에 평판도말하여 메탄/공기의 비가 5:5인 혼합가스를 공급한 배양용기에 넣고 밀봉하였다. 이렇게 준비된 시료를 30℃에서 7~14일간 배양 후 단일 콜로니(colony)를 채취하여 새 NMS 고체배지에 희석도말 하고, 동일한 혼합가스를 공급한 배양용기에서 동일 조건으로 배양하여 균주를 분리하였다 (Fig. 4).

1차 평판도말한 시료에서 많은 경우에 단일 콜로니 주위에 작은 다양한 콜로니가 자랐는데, 이러한 콜로니를 분리하여 메탄을 탄소원으로 순수배양하면 배양되지 않는 종 이 나타났다. 이들 콜로니를 다시 LB 한천배지에 재접종하여 배양하면 콜로니를 형성

하는 균주들이 나타나는데, 이러한 종속영양균주들을 별도로 분리하였다. 분리된 균주들을 액체배지에서 배양 후 MOB는 10% DMSO에, 종속영양세균은 25% 글리세롤에 혼합하여 -80℃에서 보관하고, 추후 실험에 사용하였다.

Table 2. Sampling site and type of soil samples

No.	Area name	Type of soil sample	Location
1	광주광역시 남구 양과동	Sludge	35°05'09.0N, 126°53'32.5E
2		Garbage	35°05'09.0N, 126°53'32.5E
3		Bio-gas outlet	35°05'10.0N, 126°53'23.0E
4	전남 화순군 동면	Wet land	35°04'59.2N, 127°00'08.0E
5		Forest	35°05'00.9N, 127°00'09.0E
6	전남 화순군 동면	Paddy field	35°02'42.4N, 127°01'50.3E
7	전남 곡성군 삼기면	Paddy field	35°13'45.4N, 127°13'21.9E
8	전남 곡성군 석곡면	Paddy field	35°07'23.7N, 127°14'56.1E
9	전남 담양군 창평면	Paddy field	35°13'44.6N, 127°00'28.2E
10	전남 담양군 대전면	Wet land	35°15'11.5N, 126°52'58.8E
11	전북 정읍시 신정동	Drainage	35°30'34.2N, 126°50'25.8E
12	전남 보성군 득량면	Wet land	34°46'39.5N, 127°11'07.6E
13	전남 보성군 득량면	Wet land	34°45'16.7N, 127°13'33.3E
14		Wet land(sea water)	
15	전남 보성군 북내면	Paddy field	34°53'26.4N, 127°08'11.2E
16	전남 보성군 미력면	Paddy field	34°47'34.1N, 127°06'23.7E
17	전남 보성군 미력면	Livestock wastewater	34°47'10.7N, 127°06'37.1E
18	전남 보성군 벌교읍	Wet land	34°50'10.6N, 127°21'51.2E
19	전남 보성군 벌교읍	Wet land(sea water)	34°50'09.8N, 127°03'14.4E
20	전남 곡성군 석곡면	Paddy field	35°07'25.1N, 127°14'54.8E
21	전남 곡성군 옥과면	Paddy field	35°13'56.9N, 127°13'13.8E
22	전남 담양군 창평면	Paddy field	35°13'43.6N, 127°00'31.7E
23	전남 순천시 해룡면	Paddy field	34°52'58.8N, 127°31'08.6E
24		Wet land	

Table 3. Composition and concentration of stock solution of modified nitrate mineral salt medium[4]

1. Stock solution		
KNO ₃	100 g/ℓ	100 X
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 g/ℓ	100 X
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 g/ℓ	100 X
Fe-EDTA	3.8%(w/v)	1,000 X
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1%(w/v)	200 X
(optional) CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.7 g/ℓ	1,000 X
2. 100 X Phosphate buffer solution		
KH ₂ PO ₄	26 g/ℓ	
Na ₂ HPO ₄	62 g/ℓ	
Adjust solution to pH 7.0		
3. 1,000 X Trace metal solution		mg/ℓ
FeSO ₄ ·7H ₂ O	500	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	400	
MnCl ₂ ·7H ₂ O	20	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	50	
NiCl ₂ ·6H ₂ O	10	
H ₃ BO ₃	15	
EDTA	250	
4. 1,000 X Vitamin solution		mg/ℓ
Biotin	20	
Folic acid	20	
Thiamine HCl	50	
Ca pantothenate	50	
Cobalamin	1	
Riboflavin	50	
Nicotinamide	50	

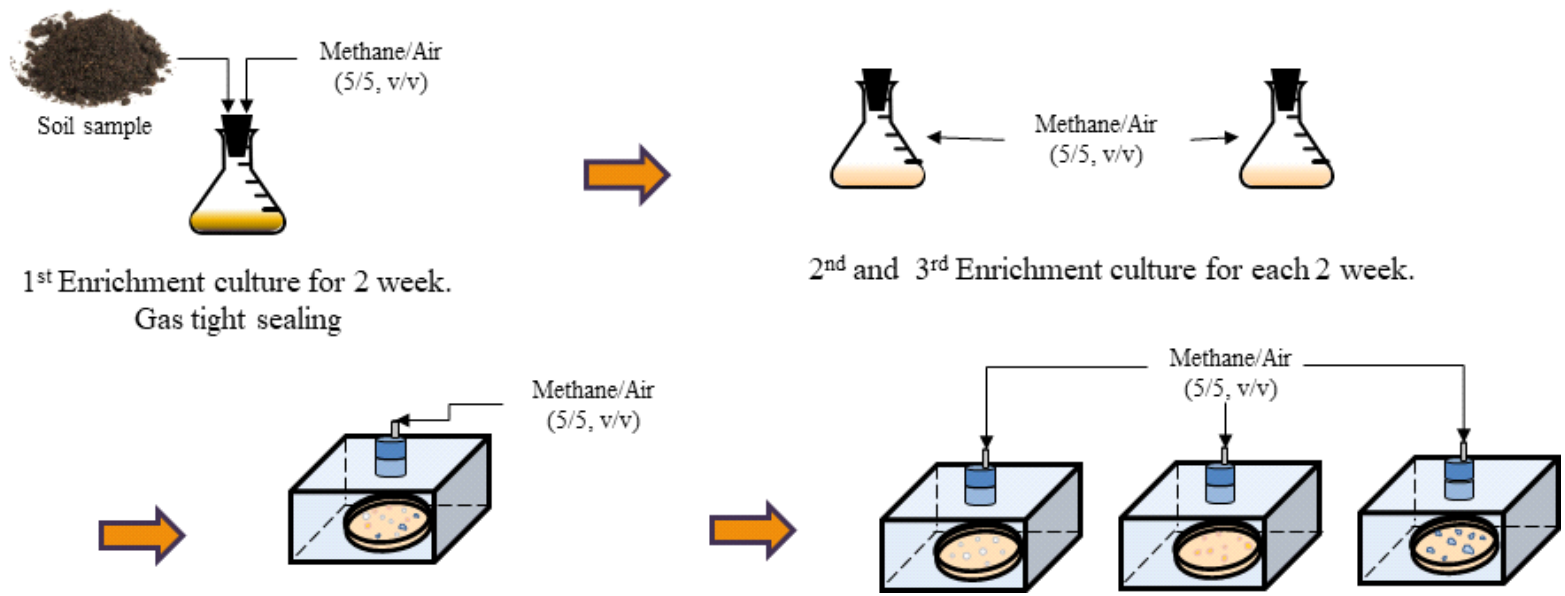


Fig. 4. Isolation of methane oxidizing bacteria.

다. 균주의 동정

(1) 분자유전학적 동정

분리된 균주의 유전학적 동정을 위하여 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 수행하였다. 선별된 각각의 균주를 상기한 방법으로 액체배양하고 배양액을 10,000 x g에서 원심분리하여 cell pellet을 수거하였다. 수거된 cell pellet을 phosphate buffer (pH 7.4)로 두 번 세척한 후 10 ml의 버퍼에(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재현탁 하였다. 여기에 1 ml의 lysozyme용액 (50 mg/ml)과 0.5 ml RNase (2 mg/ml) 및 0.1 ml proteinase K (50 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 1 시간 반응한 다음 0.6 ml의 10% SDS solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 이 반응액에 1 ml의 mercaptoethanol을 가한 후 반응액의 0.5배에 해당하는 3M sodium acetate solution (pH 5.2)을 가하여 반응액에 동일 양의 chloroform을 처리하였다. 이후 15,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻고, 이 상등액에 0.6배에 해당하는 iso-propanol을 가한 후 chromosomal DNA pellet을 회수하여 70% ethanol로 세척한 다음 60°C에서 건조하였다. 이를 3 ml의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다. 이후 준비된 genomic DNA의 16S rRNA gene의 염기서열을 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 증폭시켰다. PCR에 사용한 universal primer set은 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3')이다. Denaturation, annealing, extension의 온도와 시간은 각각 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분의 조건으로 30 cycles 수행하였다. 각 균주별로 PCR을 통하여 얻은 PCR product를 DNA purification kit (QIAGEN Inc.)로 정제한 후, pGEM-T easy vector system (Promega inc.)을 이용하여 T vector에 도입하고 ampicillin이 100 µg/ml의 농도로 첨가된 Luria-Bertani (LB)배지에 평판 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 white colony만을 균주별로 5개 이상 채취하여 ampicillin이 100 µg/ml의 농도로 첨가된 LB배지에서 액체배양한 후, 원심분리로 cell pellet을 얻었다. 얻은 각 균주별 cell pellet을 Thermofisher사의 PureLink™ Quick Plasmid miniprep kit을 이용하여 16S rRNA gene이 insert로 삽입된 T vector를 얻었다. 이렇게 준비된 시료를 Macrogen Co.에 염기서열의 분석을 의뢰하였다. 각 균주의 16S rRNA gene 염기서열은 NCBI GenBank의 BLAST program을 이용하여 분석하였다.

(2) 배양학적 특성

분리된 균주의 성장속도 및 메탄과 산소의 소비속도를 측정하기 위하여 550 ml의 유리 vial에 50 ml의 NMS 배지를 넣고 1%의 농도로 종균을 접종한 후, 가스가 유출입이 발생하지 않도록 실리콘 마개로 밀봉하였다. 밀봉된 플라스크에 syringe로 60 ml의 100% 메탄가스를 주입하고, 30℃에서 150 rpm으로 배양하였다. 균주에 따라 8-24시간 간격으로 주사기를 이용하여 배양액을 채취하여 600 nm의 파장에서 흡광도로 성장속도를 측정하였다. 동시에 동일한 시간 간격으로 headspace의 가스를 gas-tight syringe (Hamilton co.)를 이용하여 100 μ l를 채취하여 가스크로마토그래피를 이용하여 메탄과 산소의 농도를 측정하였다.

가스크로마토그래피 분석은 CP-molseive 5A capillary 컬럼(length 30 m, diameter 0.53 mm, film thickness 15 μ m, Agilent Inc.)을 이용하여 Shimadzu 사의 GC2010 plus 모델에서 분석하였다. 분석조건으로 주입구 온도는 150℃, column oven 온도 150℃, carrier gas는 헬륨을 사용하고, 유속은 2.45 ml/min, split ratio는 1:10으로 하였으며, detector는 TCD로 온도는 200℃로 설정하여 분석하였다. 이 분석조건에서 메탄은 분석 시작 후 3분 25초, 산소는 2분을 전후하여 검출되었다. 100% 메탄과 산소를 각각 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ l씩 분석하여 나온 peak area 값을 이용하여 메탄과 산소에 대한 표준정량곡선을 작성하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 균주의 분리

전라남도 내 28개소에서 채취한 토양시료를 NMS배지와 메탄/공기의 비가 5:5인 혼합가스를 이용하여 3단계의 농화배양을 실시하였고, 같은 배양 조건으로 농화배양액을 고체배지에 희석 평판도말하여 배양한 후 형성된 콜로니를 계대배양 하여 총 28종의 MOB를 순수분리하였다. 농화배양액을 첫 번째 고체배지에서 배양 시 나타났던 콜로니 중 두 번째 고체배지에서 자라지 못한 콜로니를 LB 복합 고체배지에 재접종하여 콜로니가 형성되는 경우 이를 재배양하여 이 중 23종의 종속영양세균을 순수분리하였다. 농화배양액의 1차 평판도말 배양에서 나타난 콜로니 중 일부는 계대배양에서 콜로니를 형성하지 못하는 경우가 있었는데, 이런 경우는 보통 특정 콜로니 주위에 형성된 작은 콜로니였다. 이들을 MOB의 중간 대사산물을 탄소원으로 이용하는 종속영양세균으로 판단하여 해당 콜로니를 LB 복합배지에 재접종한 결과, 그 중 일부에서 콜로니를 형성하였으며, 이들을 순수분리하였다. 균을 순수 분리할 때 나타나는 이러한 현상은 콜로니 주변의 세균들이 중심부에 있는 큰 콜로니가 제공하는 탄소원을 공급받고 있음을 의미할 수 있다. 반대로 만약 중심부에 있는 MOB의 주변에 종속영양세균 있을 때 MOB의 순수배양에 비하여 성장속도 등이 빨라질 수 있다면 해당 종속영양세균이 MOB에게 생장에 관련된 물질을 제공할 수도 있을 것이다. 이렇게 순수분리된 MOB와 종속영양세균을 이후의 실험에 사용하였다.

나. 분리 균주의 동정 및 특징

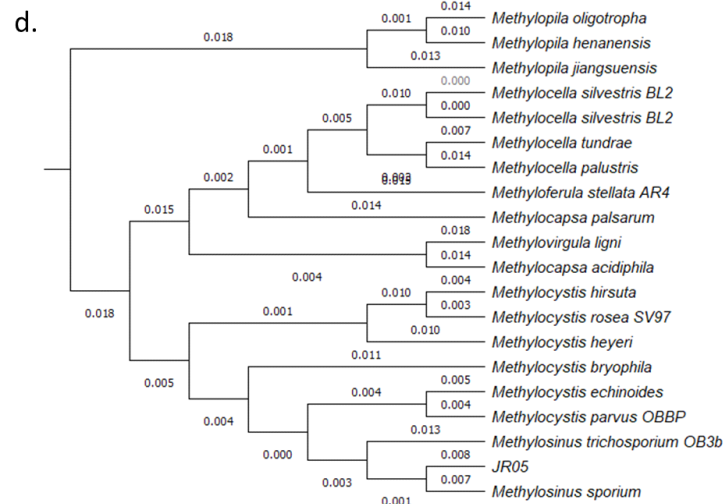
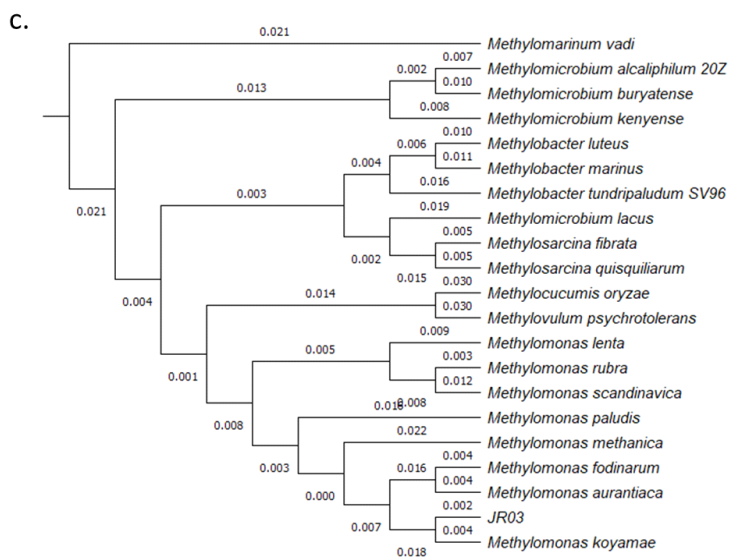
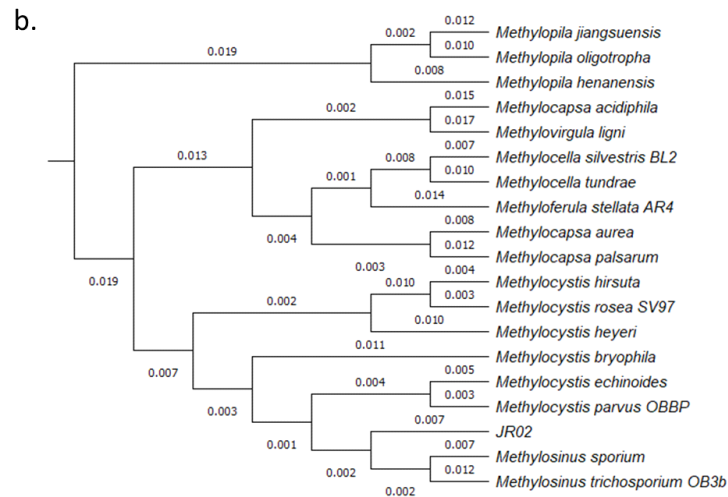
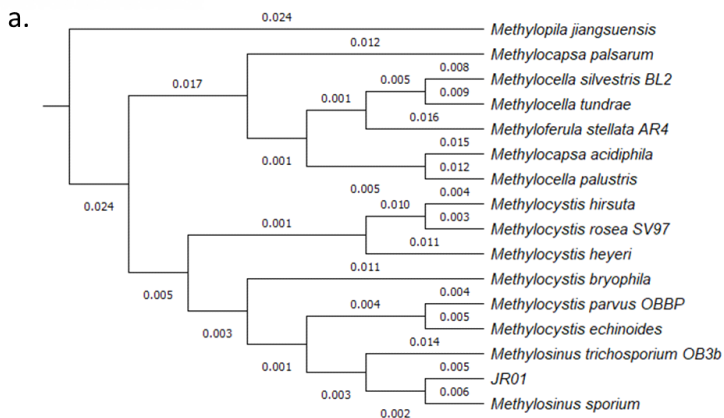
(1) 분자유전학적 동정

순수분리된 메탄산화세균은 16S rRNA gene analysis를 통하여 type I에 속하는 *Methylomonas*속 7종, *Methylophilus*속 3종, *Methylosarcina*속 2종으로 분리되었고, type II에 속하는 *Methylosinus*속 13종, *Methylocystis*속 3종이 확인되었다. 그리고 종속영양세균으로는 토양에서 흔히 발견되는 *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudoacidoborax*, *Variovorax*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Cupriavidus* 등이 골고루 발견되었고, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Doknonella*와 같이 하천이나 슬러지등에서 발견되는 종도 확인되었다. 그 외 *Acidoborax*, *Microbacterium*, *Micrococcus* 속의 종들도 동정 되었다 (Table 4). Fig. 5는 이 연구에서 사용된 주요 균주의 16S rRNA gene analysis 결과를 MEGA_X (v10.2.2) 프로그램을 이용하여 계통도를 작성한 결과이다.

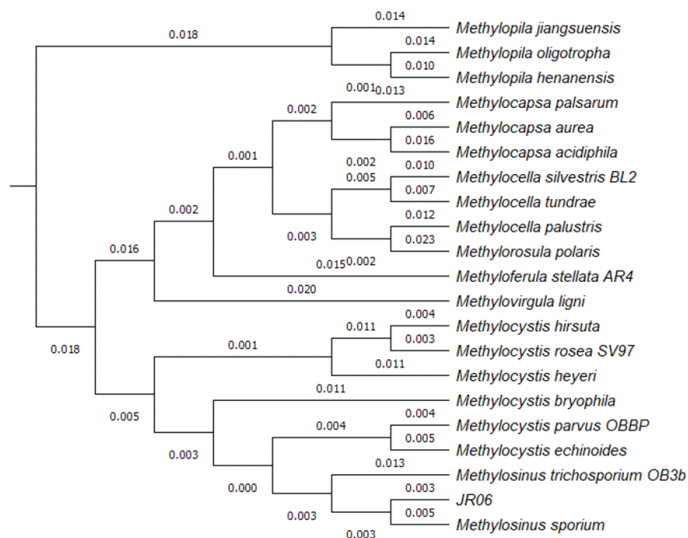
Table 4. List of identified strains by 16S rRNA gene analysis

No.	Strain name	Species	Identities	
			Match/Total	Percent
1	JR01	<i>Methylosinus</i> sp.	1393/1408	98.9
2	JR02	<i>Methylocystis</i> sp.	1391/1408	98.8
3	JR03	<i>Methylomonas</i> sp.	1493/1497	99.7
4	JR04	<i>Methylomonas</i> sp.	1485/1495	99.3
5	JR05	<i>Methylosinus</i> sp.	1386/1408	98.4
6	JR06	<i>Methylosinus</i> sp.	1396/1408	99.1
7	JR07	<i>Methylomonas</i> sp.	1492/1497	99.7
8	JR08	<i>Methylophilus</i> sp.	1491/1500	99.4
9	JR09	<i>Methylomonas</i> sp.	1427/1459	97.8
10	JR10	<i>Methylosinus</i> sp.	1359/1408	96.5
11	JR11	<i>Methylosarcina</i> sp.	1480/1484	99.7
12	JR12	<i>Methylosarcina</i> sp.	1488/1492	99.7
13	JR13	<i>Methylosinus</i> sp.	1401/1408	99.5
14	JR14	<i>Methylosinus</i> sp.	1399/1411	99.1
15	JR15	<i>Methylosinus</i> sp.	1399/1410	99.2
16	JR16	<i>Methylosinus</i> sp.	1402/1410	99.4
17	JR17	<i>Methylocystis</i> sp.	1446/1477	99.9
18	JR18	<i>Methylocystis</i> sp.	1444/1447	99.8
19	JR19	<i>Methylosinus</i> sp.	1443/1447	99.7
20	JR20	<i>Methylosinus</i> sp.	1394/1408	99.0
21	JR21	<i>Methylosinus</i> sp.	1393/1408	98.9
22	JR22	<i>Methylomonas</i> sp.	1510/1524	99.1
23	JR23	<i>Methylomonas</i> sp.	1515/1528	99.1
24	JR24	<i>Methylomonas</i> sp.	1502/1513	99.3
25	JR25	<i>Methylophilus</i> sp.	1471/1481	99.3
26	JR26	<i>Methylosinus</i> sp.	1403/1406	99.8
27	JR27	<i>Methylosinus</i> sp.	1401/1408	99.5

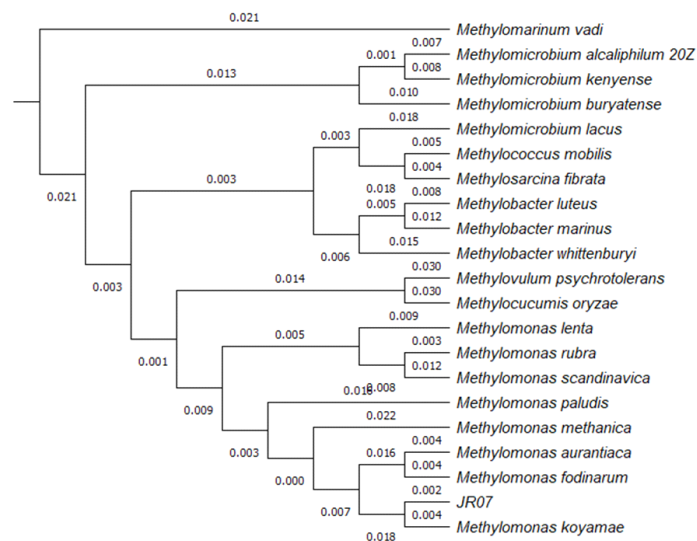
28	JR28	<i>Methylophilus</i> sp.	1486/1498	99.2
29	CUH01	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1513/1523	99.3
30	CUH02	<i>Bacillus</i> sp.	1526/1529	99.8
31	CUH03	<i>Dokdonella</i> sp.	1487/1498	99.3
32	CUH04	<i>Caulobacter</i> sp.	1440/1444	99.7
33	CUH05	<i>Acinetobacter</i> sp.	1493/1499	99.6
34	CUH06	<i>Flavobacterium</i> sp.	1470/1475	99.7
35	CUH07	<i>Pseudoacidoborax</i> sp.	1481/1487	99.6
36	CUH08	<i>Variovorax</i> sp.	1492/1493	99.9
37	CUH09	<i>Rhodococcus</i> sp.	1475/1475	100.0
38	CUH10	<i>Staphylococcus</i> sp.	1514/1514	100.0
39	CUH11	<i>Staphylococcus</i> sp.	1509/1509	100.0
40	CUH12	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1505/1506	99.9
41	CUH13	<i>Acidoborax</i> sp.	1487/1497	99.7
42	CUH14	<i>Microbacterium</i> sp.	1481/1482	99.9
43	CUH15	<i>Micrococcus</i> sp.	1481/1484	99.8
44	CUH16	<i>Flavobacterium</i> sp.	1462/1473	99.3
45	CUH17	<i>Bacillus</i> sp.	1510/1511	99.9
46	CUH18	<i>Variovorax</i> sp.	1490/1496	99.6
47	CUH19	<i>Rhodanobacter</i> sp.	1477/1477	100.0
48	CUH20	<i>Bacillus</i> sp.	1509/1510	99.9
49	CUH21	<i>Cupriavidus</i> sp.	1489/1490	99.8
50	CUH22	<i>Rhodococcus</i> sp.	1474/1474	100.0
51	CUH23	<i>Bacillus</i> sp.	1506/1507	99.9



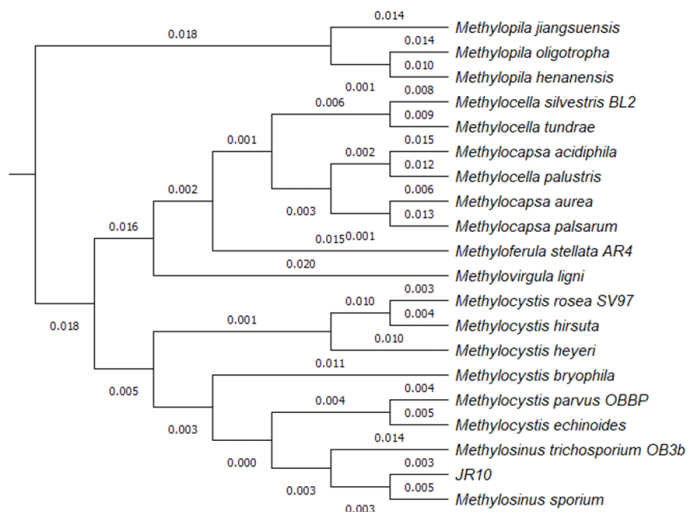
e.



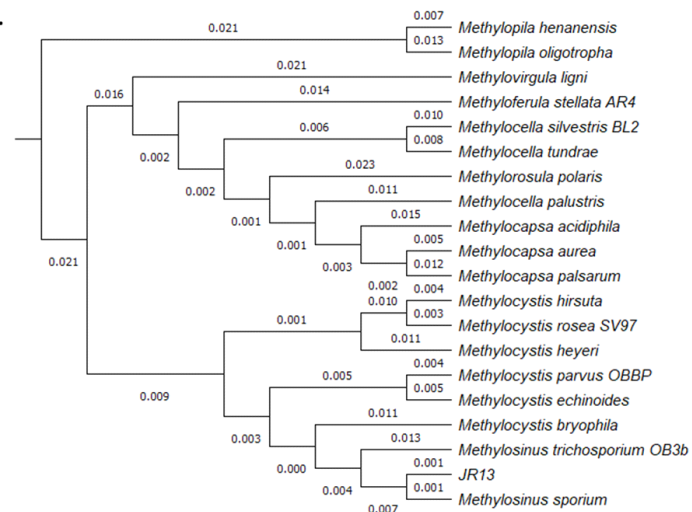
f.



g.



h.



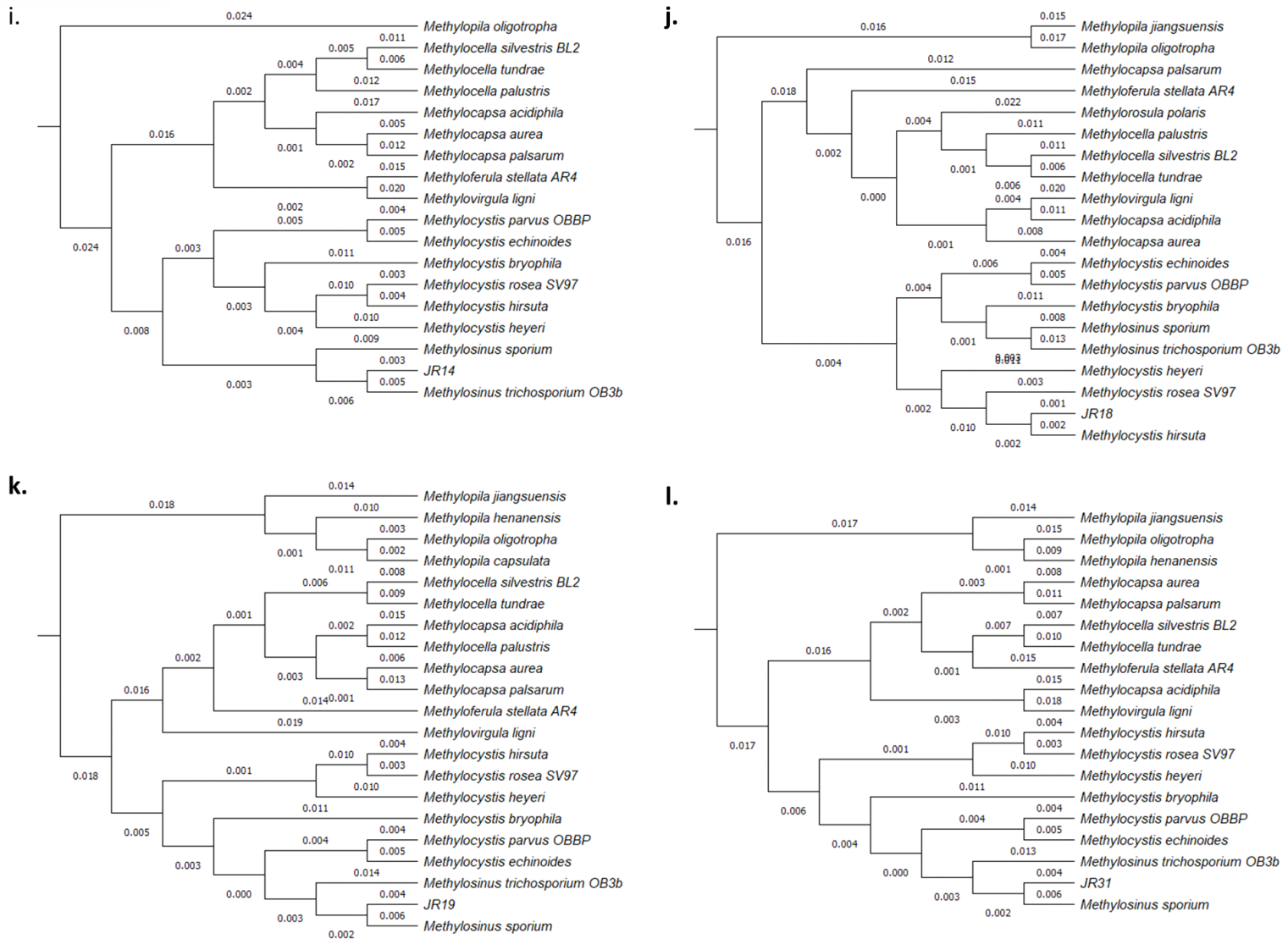


Fig. 5. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of the strains used in this study. JR01 (a), JR02 (b), JR03 (c), JR05 (d), JR06 (e), JR07 (f), JR10 (g), JR13 (h), JR14 (i), JR18 (j), JR19 (k), JR31 (l)

(2) 배양학적 특성

분리 균주 중 성장속도가 빠른 몇 개의 MOB를 선정하여 배양학적 특성을 확인하였다. 먼저 선별된 9개의 균주를 대상으로 상기한 조건으로 액체배양을 실시하여 성장속도를 측정하였다. 그 결과 specific growth rate (μ /hr)가 0.031 - 0.178 사이의 값을 나타냈으며, doubling time은 3.89 - 22.35 시간 정도로 나타났다 (Table 5). Type I에 속하는 *Methylomonas*속과 type II에 속하는 *Methylosinus*속, *Methylocystis*속이 빠른 성장속도를 보였으며, 분리한 모든 MOB 중에서 가장 빠른 성장속도를 보인 균주는 JR09 균주로 *Methylomonas* 속이었다.

선별된 균주를 액체배양하면서 균주의 생장곡선 및 메탄과 산소의 감소를 측정하였다. 대부분의 균이 최대 OD₆₀₀ 값이 2 이하로 나타났으나, 이는 실험에서 메탄과 산소가 고갈되는 시점과 일치하는 것으로 보아 추가적인 탄소원과 산소의 부족으로 인한 생장의 멈춤으로 보인다. 각 균주의 성장속도에 따라 30 - 90 시간 내에 배양용기 내 headspace의 산소와 메탄이 5% 미만으로 감소하였다 (Fig. 6).

Table 5. Specific growth rates and doubling times of several isolated strains

No.	Strain	Species	Source	Specific growth rate (μ /hr)	Doubling Time (hr)
1	JR01	<i>Methylosinus</i>	Paddy field	0.087	7.97
2	JR02	<i>Methylocystis</i>	Paddy field	0.089	7.79
3	JR03	<i>Methylomonas</i>	Garbage landfill	0.031	22.35
4	JR05	<i>Methylosinus</i>	Garbage landfill	0.072	9.63
5	JR09	<i>Methylomonas</i>	Garbage landfill	0.178	3.89
6	JR13	<i>Methylosinus</i>	Wet land	0.048	14.44
7	JR14	<i>Methylosinus</i>	Wet land	0.128	5.41
8	JR18	<i>Methylocystis</i>	Wet land	0.167	4.15
9	JR19	<i>Methylosinus</i>	Paddy field	0.063	11.00

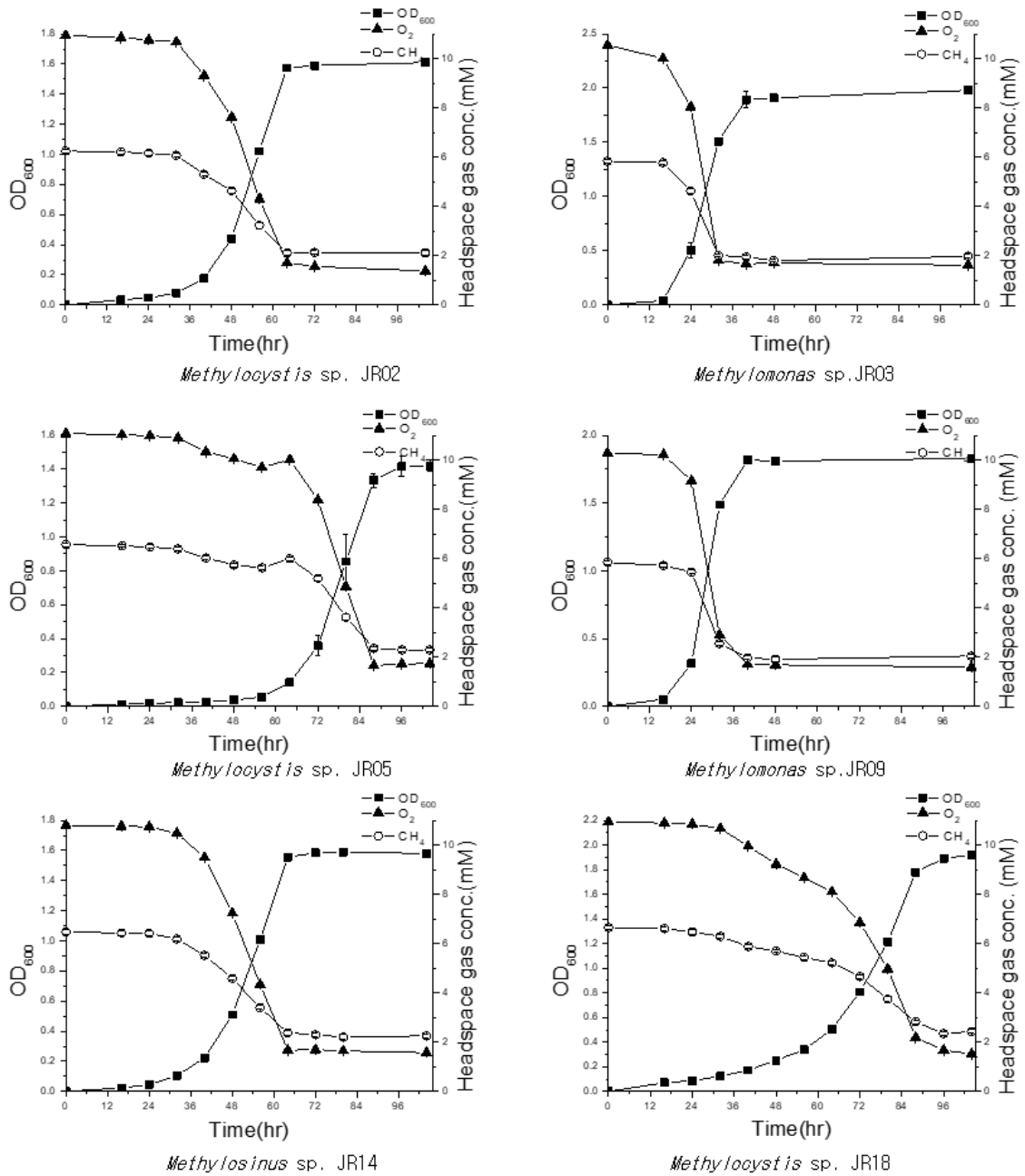


Fig. 6. Decrease of methane and oxygen concentrations in headspace of flask during cell growth of MOB.

제3장 *Methylocystis* sp. JR02 균주의 색소 생산

1. 재료 및 방법

가. JR02 균주의 배양조건

Methylocystis sp. JR02 strain은 배지 내 phosphate의 농도가 감소함에 따라 색소를 생산하였다. 이러한 사실을 확인하기 위하여 vent seal cap (0.2 μm pore size, SPL Life Science)으로 밀봉한 70 ml cell culture flask에 기본 NMS 배지의 phosphate의 농도 (4.2 mM)를 기준으로 하여 1/2, 1/4, 1/20, 1/100의 농도로 조절한 후 각 20 ml씩 분주하고, 미리 배양된 종균을 1% 농도로 접종하였다. 그 다음 각 플라스크를 가스가 유출되지 않게 제작된 배양 용기에 넣고 밀봉한 후 용기의 한쪽 가스 유출구를 열고, 다른 한쪽의 가스 유입구에 메탄과 산소를 5:5로 혼합한 가스를 용기의 5배 이상 주입하면서 내부를 메탄 혼합가스로 치환한 후 밀봉하여, 30°C에서 150 rpm으로 배양하면서 배양액의 색변화를 관찰하였다.

나. 색소의 분리 및 정제

색소의 분리 및 정제를 위하여 phosphate의 농도를 0.042 mM의 농도로 첨가한 NMS 배지 200ml씩 5개의 vent seal cap이 있는 600 ml cell culture flask에 분주하고, JR02 종균을 1%의 농도로 접종한 후 상기한 배양용기에 넣고 메탄:산소(5:5) 혼합가스를 공급한 후 7일간 진탕 배양하였다. 배양액은 6,000 x g에서 30분간 원심분리하여 균체를 얻고, 이 균체 wet weight 1 g당 10 ml의 메탄올을 넣고 mixer에서 30분간 vortexing하였다. 이 시료를 다시 15,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 채취하여 0.2 μm 의 pore size를 갖는 PTFE syringe filter (Pall Inc.)를 이용하여 여과한 후 이후의 실험에 사용하였다.

색소의 정제를 위하여 Agilent사의 1200series HPLC를 이용하였다. 분석조건으로 column은 Zorbax SB-C18(length 150 mm, diameter 4.6 mm, particle size 5 μm)를 사용하였다. 이동상은 5% acetonitrile(0.1% TFA)과 100% acetonitrile(0.1% TFA)를 이용하였다. 0 ~ 5분까지는 5% acetonitrile이 100%에 이를 때까지, 5 ~ 30분까지는 100% acetonitrile 용매가 100 %에 이르는 gradient 조건을 주었고, 1 ml/min의 유속으로 분석하였다. 검출기는 Diode Array Detector(DAD)를 사용하여 400 - 600 nm의 파장에서 스캔하였고, 표준정량곡선 및 활성분획을 받기 위해 533 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sample loading 양은 20 μl 였다. HPLC 분석을 통하여 두 개의 주요 peak를 확인하고, 각 peak의 용출물을 분획하여 구조 분석에 사용하였다. 표준정량곡선을 작성하기 위하여 HPLC로 정제된 시료를 1, 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농

도로 제작하여 사용하였다.

Phosphate 농도에 따른 JR02 균주의 색소 생산량을 분석하기 위하여 기본 농도 (4.2 mM) 를 기준으로 10, 1, 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 배의 농도로 배지를 제조하고, 균주를 접종한 후 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하였다. 1 mL의 배양액에 1 mL의 부탄올을 첨가하여 30분간 vortexing하면서 혼합한 후, 15,000 x g로 10분간 원심분리하였다. 이 원심분리액의 부탄올 층을 회수한 다음 20 μ l를 HPLC를 이용한 색소의 생산량 분석에 사용하였다.

다. 색소의 구조 분석

HPLC로 정제된 시료의 구조분석을 위하여 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. Thermo 사의 Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Linear Ion Trap Quadrupole spectrometer (UHPLC-LTQ XL) 이용하였다. 분석조건은 Table 6과 같다.

Table 6. Analytical conditions for the determination of pigment

Instrument	LC: 기기명		
	MS/MS: LTQ-XL (Thermo,		
UPLC conditions			
Column	hypersil GOLD (100 mm x 2.1 mm, 3 μ m)		
Column temperature	30 °C		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	10 μ l		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in 10% acetonitrile B: 0.1% fromic acid in 100% acetonitrile		
		Mobile phase	
	Time(min)	A(%)	B(%)
Gradient table	0	100	0
	1	100	0
	10	0	100
	15	0	100
MS/MS conditions			
Ion mode	ESI positive mode		
Ion spray voltage	3.8 kV		
Capillary temperature	275 °C		
Capillary voltage	30 V		
Collision energy	35 eV		

라. 색소의 항암특성 분석

JR02 strain이 생산하는 색소의 특성을 파악하기 위하여 추출물의 pH의 변화에 따른 흡광도 변화를 측정하였다. 또한, 추출물의 항암제로서의 효과를 파악하기 위하여 HaCaT (immortalized cell line), LNCaP (전립선암 세포주), PC-3 (전립선암 세포주), MDA-MB-231 (유방암 세포주), NCL-H460 (폐암 세포주)의 인간 세포주를 이용하여 cell viability assay를 수행하였다. Cell viability assay는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich)를 이용하여 평가하였다. 각 타입의 인간세포주는 96 well plate에서 200 μl 의 배지에 5×10^3 의 농도가 되도록 접종하고, 37°C에서 1 - 3일간 배양한 다음 각 배양액에서 배지를 제거한 후 20 μl 의 MTT (50 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가하였다. 이렇게 준비된 시료는 37°C에서 4.5시간 배양하여 색 변화를 측정하고, 또한 50 μl 의 DMSO를 첨가하여 formazan을 용해시켜 그 농도를 microtiter plate reader (Bio-Rad)를 이용하여 570 nm 파장의 흡광도를 측정하였다.

마. JR02 균주의 유전체 분석

JR02 균주의 유전체를 분석하기 위하여 NMS 고체배지에서 JR02 균주를 배양한 후, whole genome sequencing을 분석을 Macrogen Co.(Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 시료의 처리 과정은 다음과 같다. 우선 고체배지에서 배양된 균체를 수거하여 genomic DNA(gDNA)를 분리, 정제하고, NanoDrop 분광광도계(Thermo Scientific)와 Qubit fluorometer(Life Technology)로 gDNA의 농도를 측정하였다. QC 기준을 통과한 시료를 다음 실험에 사용하였다. PacBio RS 시퀀싱을 위한 20 kb library 제작용으로 8 μg 의 genome DNA를 사용하였다. 크기가 17 kb 미만인 gDNA의 경우 Bioanalyzer 2100(Agilent)를 사용하여 실제 크기 분포를 결정하였다. gDNA library insert의 크기는 최적 범위 내의 것을 사용하였고, 삽입할 gDNA의 크기가 40 kb보다 클 경우 g-TUBE(Cobaris Inc., Woburn, MA, USA)로 절단한 다음, AMPure PB magnetic beads(Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하여 정제한 후 library 제작에 사용하였다. library 제작에 사용된 gDNA의 크기를 확인하기 위하여 200 ng/ μl 농도의 시료를 field-inversion gel electrophoresis를 수행하였다. 총 10 μl 의 gDNA library는 PacBio DNA template Prep Kit 1.0(3~10 kb용)을 사용하여 준비하였다. 시퀀싱에는 PacBio DNA Sequencing kit 4.0 및 8 개의 SMRT 세포(Pacific Biosciences)를 사용하였다. 각 SMRT cell은 Macrogen Co.의 PacBio RS II 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 분석하였다. 다음 단계의 분석은 PacBio Sample Net-Shared 프로토콜을 기반으로 진행하였다(<http://pacificbiosciences.com/>). 시료 DNA는 PacBio RS II 시퀀싱 플랫폼 및 Illumina HiSeqXten 플랫폼을 사용하여 시퀀싱하였다. PacBio

RS II에서 생성된 subreads는 Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP)를 사용하여 조립하였다[30]. DNA 염기의 90% 이상의 phred 점수가 30 이상인 reads를 오류 수정에 사용하였다. 그리고 Pilon v1.21의 고품질 HiSeqXten reads를 사용하여 조립을 수정하였다[31]. Prokka v1.13은 --compliant, --rnammer 및 --addgenes 옵션을 사용하여 유전자 예측 및 기본 annotation에 사용하였다[32]. 추가 annotation을 위하여 EggNOG DB v4.5와 COG 데이터베이스 v2014를 이용하여 InterProscan v5.30-6.90과 psiblast v2.4.0을 수행하였다[33, 34, 35, 36]. 각 contig를 묘사하는 원형지도는 Cirocos v0.69.3을 사용하여 생성하였다[37].

2. 결과 및 고찰

가. 색소의 생산, 분리 및 정제

분리한 MOB중 *Methylocystis* sp. JR02 균주는 배지 내 phosphate의 농도가 감소함에 따라 유백색 또는 붉은색의 배양색을 보였다. 배지내 phosphate의 농도를 1 mM 이하로 하여 고체 배지에서 배양하였을 경우 콜로니가 붉은색이면서 표면의 빛 반사가 녹색으로 관찰되었다 (Fig. 7).

저농도 phosphate을 포함한 배지배양액을 원심분리하였을 때 색소는 대부분 cell pellet에만 존재하며, 상등액에는 거의 존재하지 않았다. 이는 색소가 불용성이거나 세포 외부로 분비되지 않는 것을 의미한다. 이렇게 얻은 cell pellet을 메탄올과 혼합하면 쉽게 색소가 추출되었다. 이렇게 추출된 crude extract를 NaOH와 HCl을 이용하여 pH의 변화를 주면, 색소가 낮은 pH에서는 자주색으로, 높은 pH에서는 노란색으로 변하였으며, 색 변화가 이루어진 시료에 다시 산이나 염기로 pH를 변화시키면 자주색과 노란색을 반복하여 나타내었다. 분광광도계를 이용하여 색소의 흡광패턴을 확인한 결과, 추출한 색소는 pH가 중성일 때 크게 467 nm와 535 nm에서 최대 흡광도를 나타낸 반면, 산성일 경우는 535 nm의 흡광도가 크게 증가하고, 467 nm에서 흡광도는 감소하였다. pH가 염기성일 경우는 산성의 경우와 정확히 반대의 양상을 나타내었다 (Fig. 8). 이는 색을 나타내는 물질이 pH의 변화에 따라 물질의 구조가 변화하여 흡광의 패턴이 바뀌는 것으로 해석할 수 있으며, 지속적인 pH의 변화에도 불구하고 반복적인 색변화가 이루어지는 것으로 보아 가역적인 반응임을 보여준다. 그리고 용매의 종류에 따라 추출물의 최대 흡광도 파장의 변화가 있었다. 두 개의 최대 흡광도 파장이 물에서는 495~497와 533 nm에서, 메탄올에서는 467과 535 nm, 아세트나이트릴에서는 469, 528 nm에서 나타났다 (Fig. 9).

JR02 세포를 메탄올로 추출한 cell free extract를 상기한 분석조건에서 HPLC를 이용하여 400 - 600 nm 범위의 파장에서 스캔한 결과, 추출물 대부분은 크게 두 개의 용출시간 (22.0 과 25.8 min)에서 peak를 나타냈으며, 최대 흡광도는 533 nm에서 나타났다(Fig. 10). 분석된 결과를 바탕으로 cell free extract를 연속적으로 HPLC를 수행하면서, 각각의 용출시간을 갖는 물질을 반복해서 분획하였다. 각 분획물을 진공건조한 후 최종적으로 메탄올에 녹이고 이를 다시 HPLC로 분석하면서 정제도를 검증하였다 (Fig. 11).

JR02 균주가 색소를 생산하는 조건에서 콜로니의 형태 및 색과 추출한 물질의 흡광 패턴 등의 특징은 prodigiosin 및 prodigiosin 생산 균주의 대표적인 특징으로 알려져 있다[38, 39, 40, 41]. prodigiosin을 생산하는 것으로 알려진 대표적인 *Serratia marcescens*이고 *S.*

pylmuthica, *S. rubidaea*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas Magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrus*, *Zooshikella rubidus* 등이 생산하는 것으로 알려져 있다[41, 42, 44]. MOB가 prodigiosin을 생산하는 경우는 1983년 Starauss 와 Berger의 연구에 의해서 최초로 보고되었으나 그 뒤로 소수의 *Methylosinus* sp.와 *Methylocystis* sp.에서의 생산이 보고된 바 있다[43, 45].

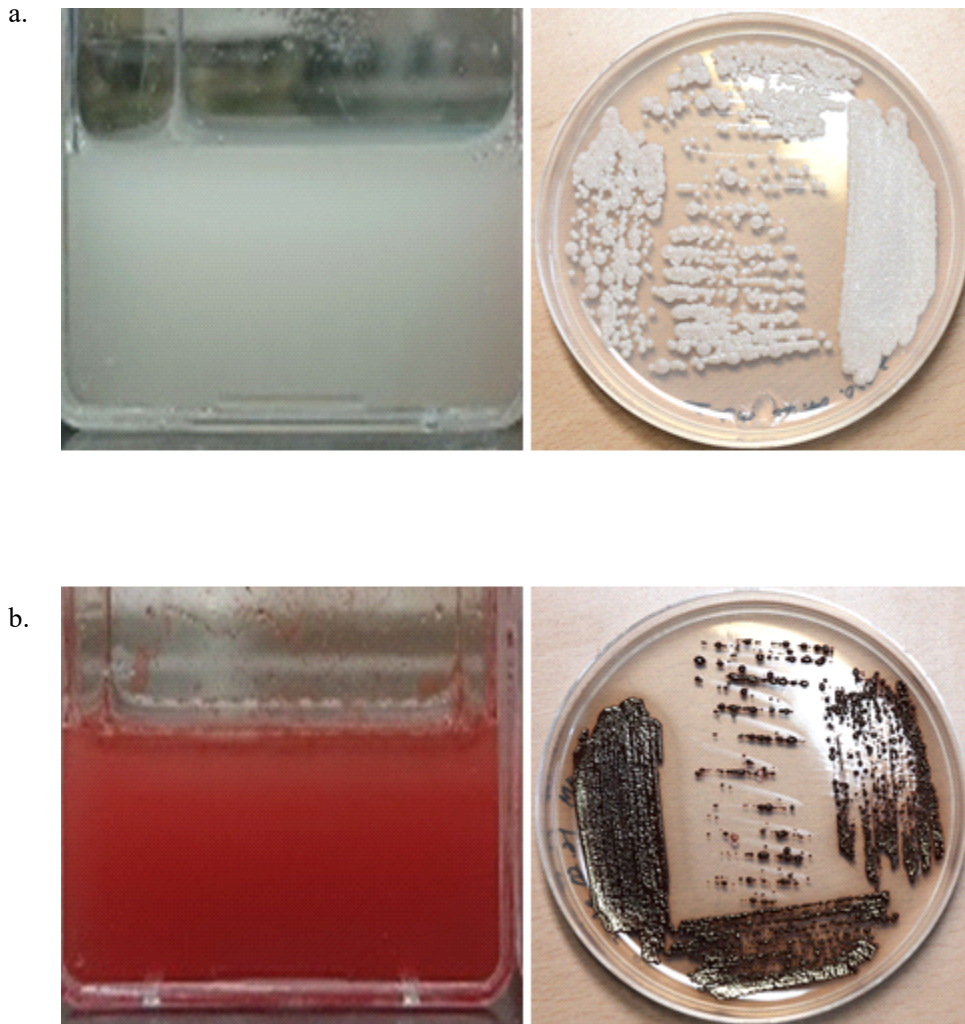


Fig. 7. Color changes of culture broth and colony on agar plate containing different concentrations of phosphate in NMS medium. (a) 4.2 mM and (b) < 1 mM phosphate.

a.



pH 2



pH 12

b.

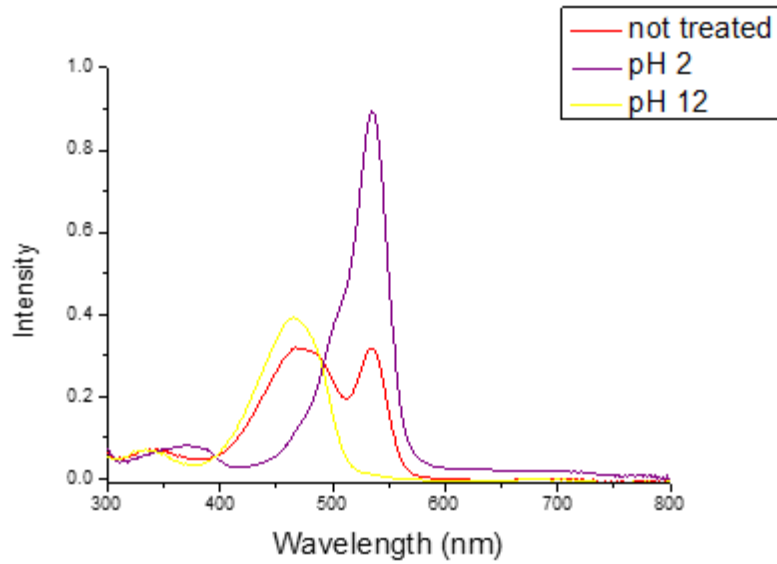


Fig. 8. Changes of pigment color (a) and maximal absorption peaks (b) at different pH conditions.

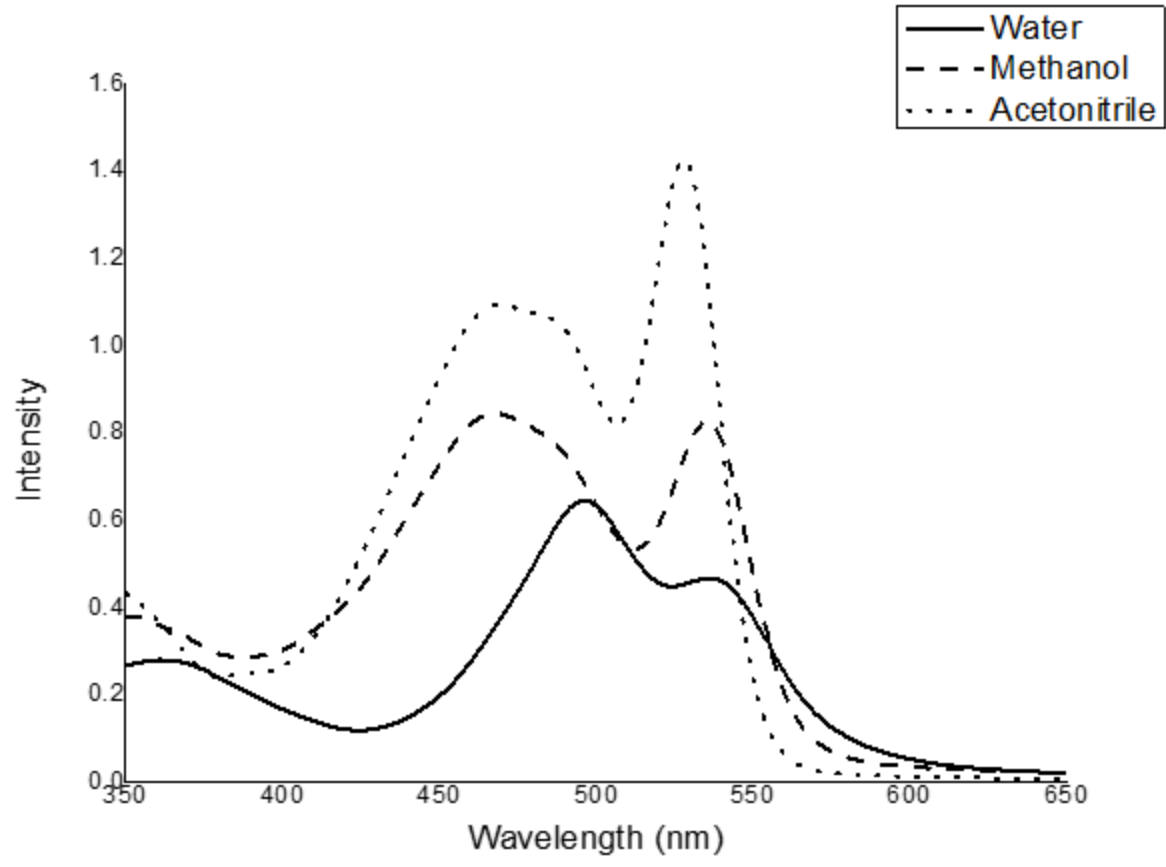


Fig. 9. Changes of absorption spectra of pigment dissolved in the different solvents.

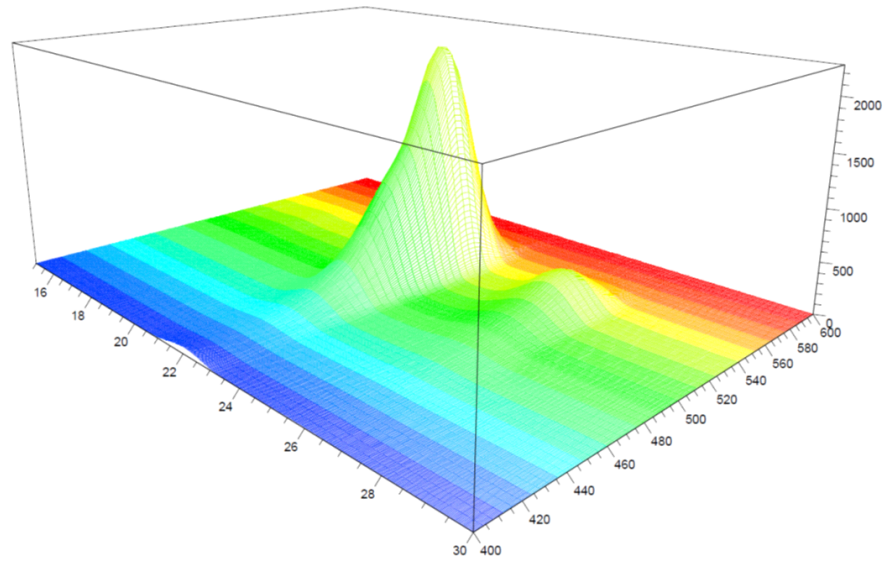


Fig. 10. HPLC profile of cell free extract from cell mass of JR02.

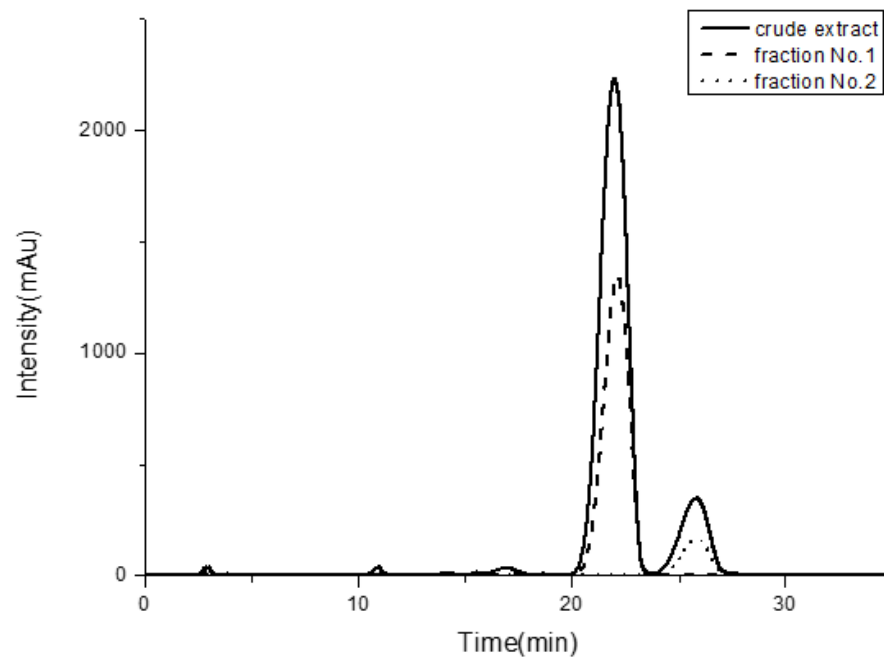


Fig. 11. HPLC profile of cell free extract and purified fractions.

나. 색소의 구조 분석

JR02 균주로부터 얻은 추출물을 LC-MS/MS를 이용하여 구조분석하였다. Cell free extract는 주요 mass peak로 m/z 352.6와 366.7($[M+H]^+$)이 나타났으며, 상대적으로 작은 양의 m/z 338.7이 나타났다. 각각 정제된 시료 (fraction 1과 fraction 2)에서 fraction 1은 m/z 352.60이, fraction 2는 m/z 366.70이 나타났다 (Fig. 12). 이러한 m/z 값은 전형적인 prodigiosin analogue의 m/z 값과 같다[42, 43]. 각 정제시료를 MS/MS 분석을 진행하였다. 그 결과, precursor ion $[M+H]^+ = m/z$ 352.6의 MS/MS 패턴은 m/z 135.1, 175.2, 252.3, 266.3, 320.5, 322.4가 주요 m/z 값으로 나타났고, precursor ion $[M+H]^+ = m/z$ 366.7의 MS/MS 패턴은 m/z 135.1, 175.2, 252.3, 266.3, 334.5, 366.5 m/z 가 나타났다 (Fig. 13). 이렇게 precursor ion m/z 352.6과 366.7은 거의 같은 fragmentation 패턴을 보였으며, 14의 분자량 차이는 전형적으로 분자내 acyl chain이 존재할 때, analogue간 $-CH_2$ 한 분자의 분자량 차이와 동일하다. m/z 252.2는 fraction 1과 2의 precursor ion m/z 352.6와 366.7에서 공통적으로 나타나는 fragment ion으로, prodigiosin과 그 analogue에서 alkyl chain을 잃으면 나타나는 ion이다. 추가로 HPLC 분석에서는 minor하게 나타났지만 MS분석에서 나타난 m/z 338.7도 동일하게 m/z 252.2가 fragment ion으로 나타났다.

JR02 균주의 배양학적 특성과 생산하는 색소의 분광학적 특성 및 MS spectrometry 분석의 결과를 볼 때, HPLC로 정제된 fraction 1 (m/z 352.6)과 2 (m/z 366.7)는 prodigiosin (2-methyl-3-pentyl prodigionine)의 analogue인 2-methyl-3-heptyl prodigionine과 2-methyl-3-octyl prodigionine으로 확인되었다. HPLC에서 정제되지는 않았지만, LC-MS/MS 분석을 통해 나타난 m/z 338.7의 물질은 fraction 1과 2의 용출시간 보다 약간 빨리 용출 (18.3 min)되었고, MS fragmentation 패턴도 fraction 1과 2와 같았다. Prodigiosin에 존재하는 acyl chain에서 $-CH_2$ 의 분자량(MW:14) 차이만큼 작은 m/z 값은 $-CH_2$ 잔기가 한 분자 줄어들었다는 것을 의미한다. 이것은 전체 분자의 소수성 감소를 유발하고 reverse phase HPLC에서의 용출시간 감소로 나타난다. 그리고 fragmentation pattern이 같았다는 사실을 종합하면, m/z 338.7의 물질은 2-methyl-3-hexyl prodigionine으로 결정할 수 있다.

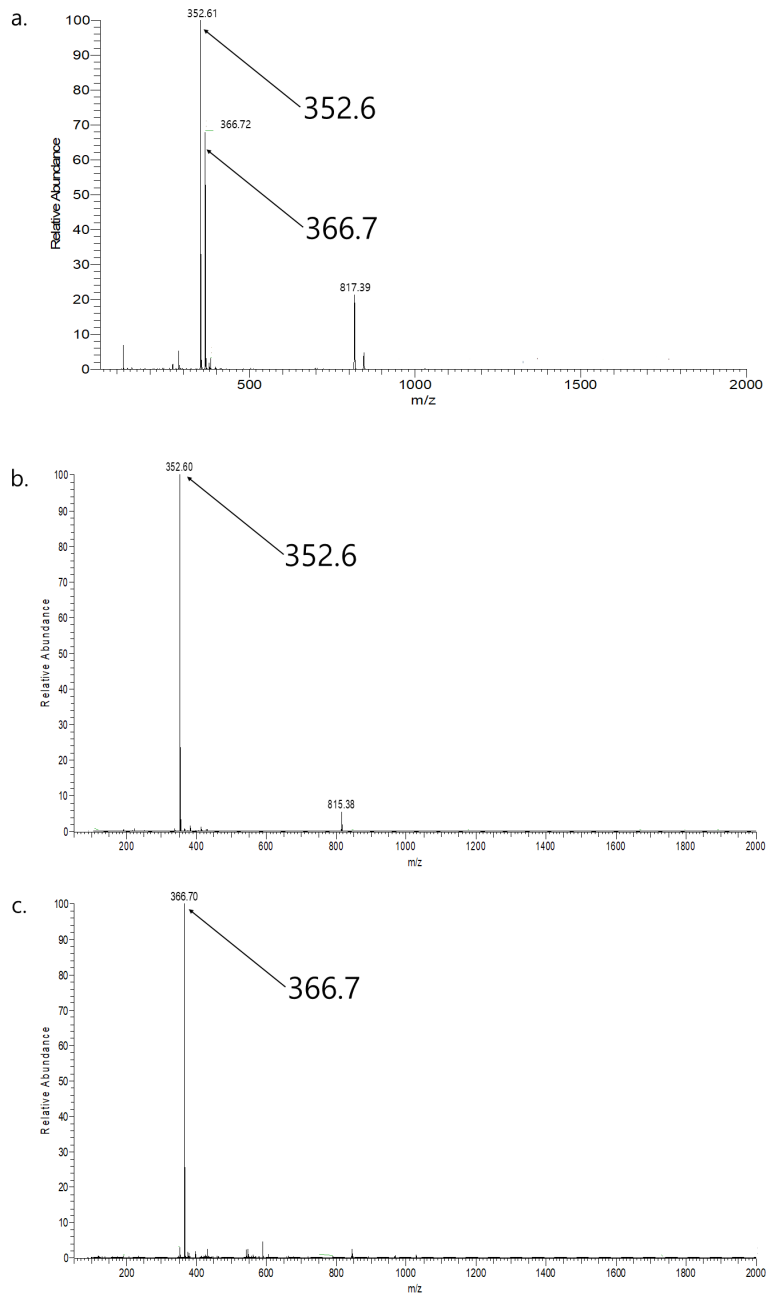


Fig. 12. Mass spectra of cell free extract (a), fraction 1 (b) and fraction 2 (c).

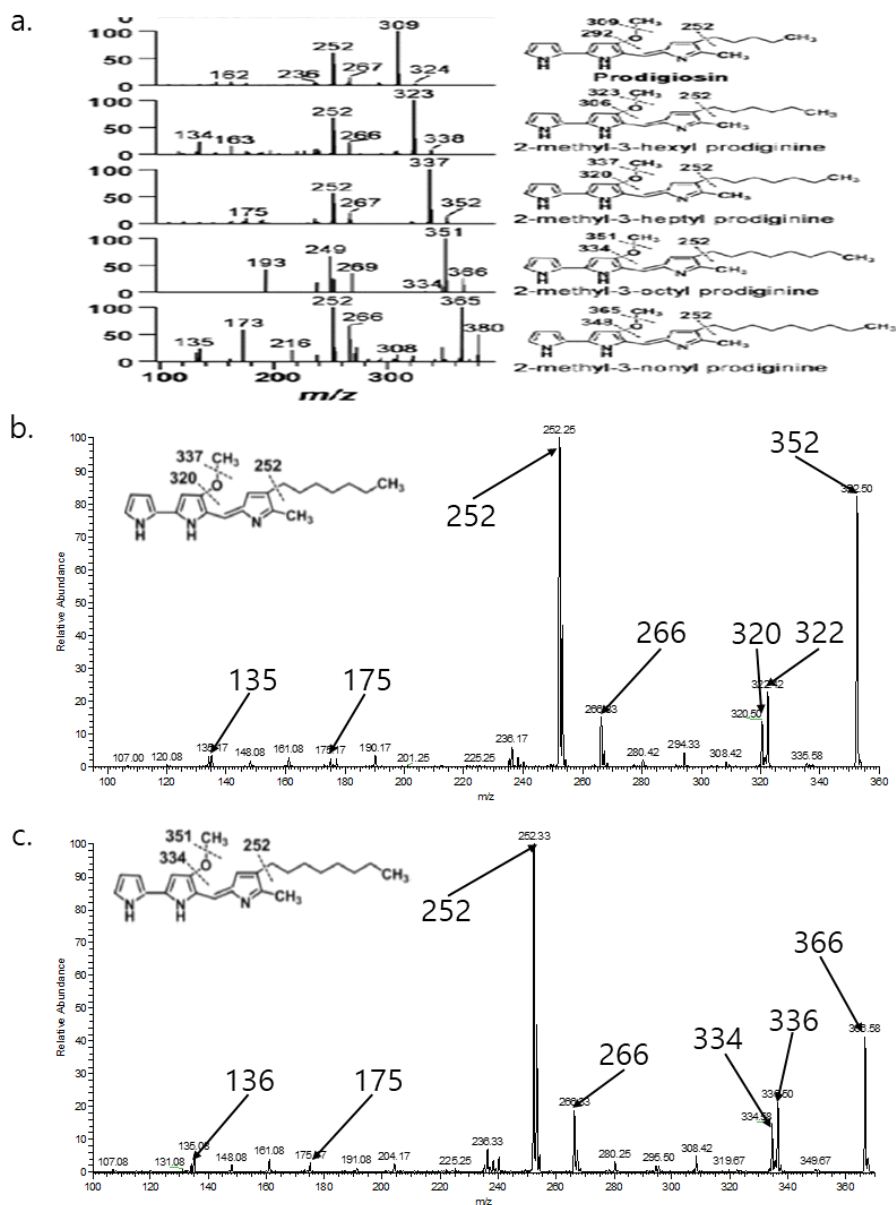


Fig. 13. MS/MS spectra-fragmentation patterns of the previously reported prodigiosin and analogue[42] (a), fraction 1 (b), and fraction 2 (c).

다. 색소의 항암 활성

Prodigiosin과 그 analogues는 항말라리아, 항세균, 항암, 면역억제, 세포주기 억제 등의 다양한 의약학적 활성을 가진 것으로 보고되어있다. 특히 Madin-Darby canine kidney(MDCK), Chinese hamster ovary (CHO), Human epithelial carcinoma (HeLa), Green monkey kidney (Vero-317), Human myeloid leukemia (U937), Human acute leukemia T-cells (Jurkat-T), Human lung carcinoma (A549, NCI-H460), Human colon adenocarcinoma (DLD1, HT29, SW-620), Human breast carcinomas (MDA-MB-231), Human promyeloblast (HL60), Mouse fibroblast (MC-3T3-E1), Small cell lung cancer (GLC4), Human myeloma (NSO), Human Burkitt lymphoma (Ramos), Human gastric carcinoma (HGT-1), Human neuroblastomas (LAN-1, IMR-2, SH-SY5Y, SK-N-AS), Mouse lymphoma (P388)등의 다양한 암세포의 억제에 효과적인 것으로 보고되어 있다[46, 47]. 또한 anti-bacterial, algicidal, anti-malarial, antineoplastic activity도 갖고 있는 것으로 알려져 있다[47, 48].

본 연구에서는 JR02 균주가 생산하는 prodigiosin analogues의 항암능력을 평가하기 위하여 cell viability assay를 실시하였다. 그 결과, cell viability가 50% 이하로 떨어지는 농도는 전립선암 세포주인 LNCap와 PC3에서 15.6, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 폐암 세포주인 NCI-H460에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 나왔다. 비교 대상으로 immortalized cell line인 HaCaT에서는 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이하의 cell viability를 보였다 (Fig. 14). 이러한 결과는 JR02 균주가 생산하는 색소가 prodigiosin과 유사하게 암세포의 억제에 효과가 있음을 보여주었다.

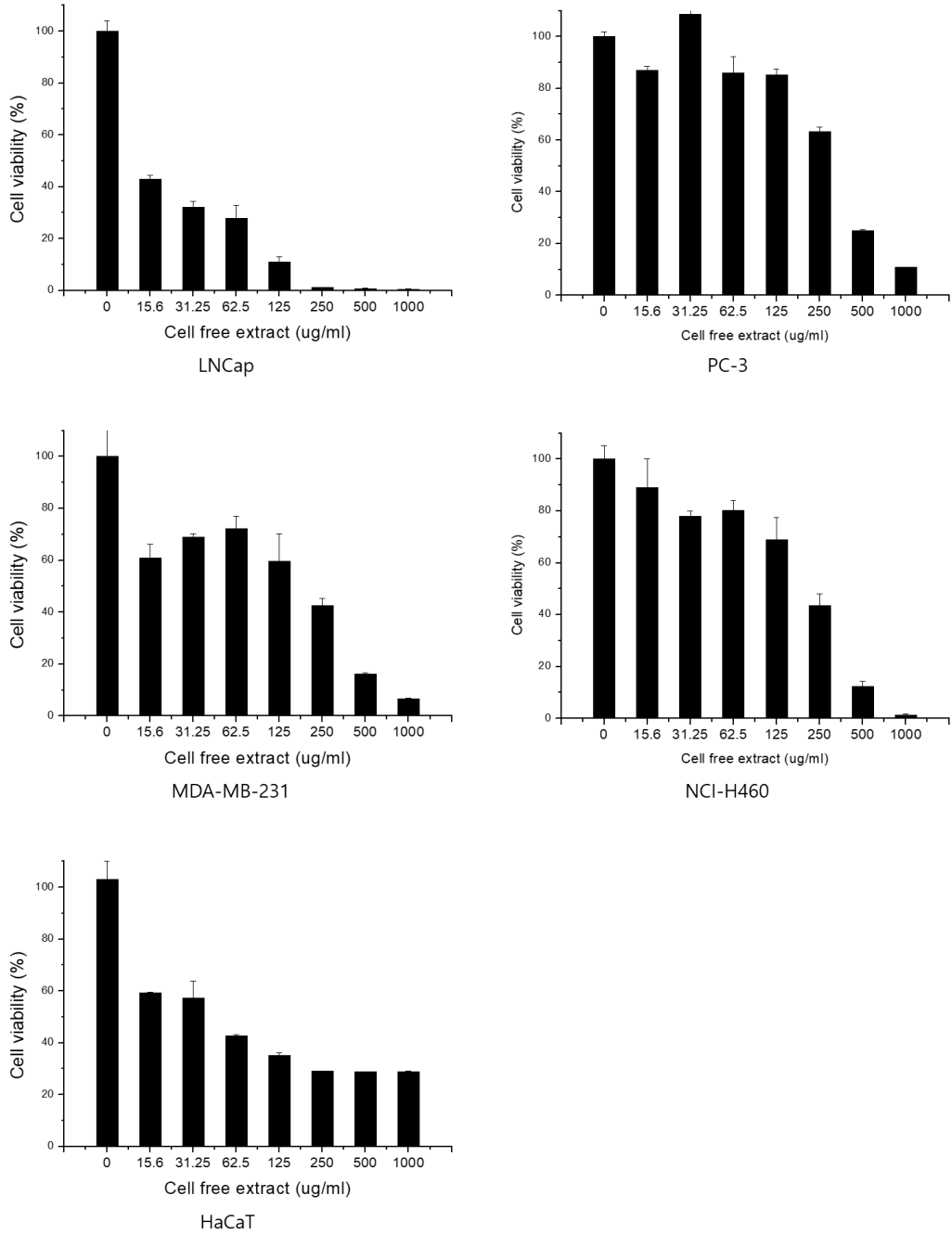


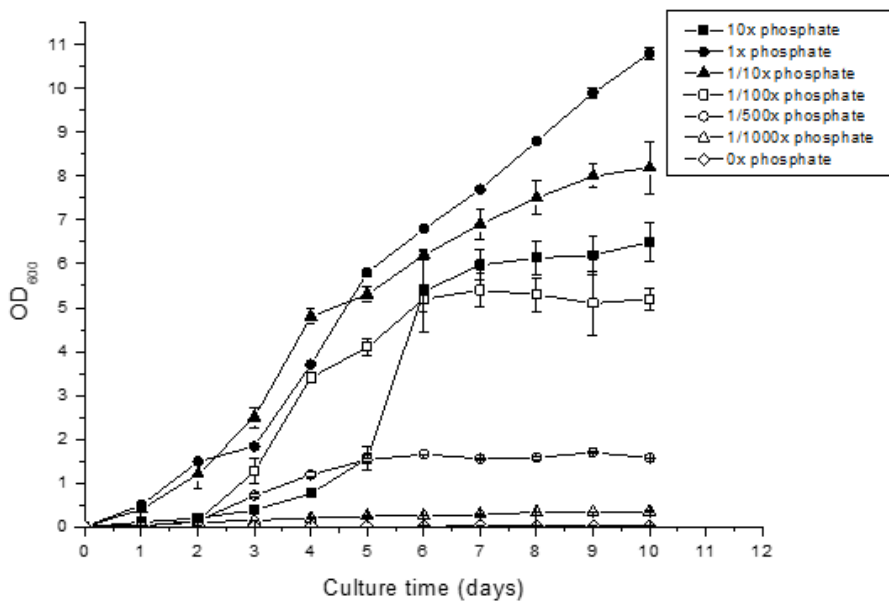
Fig. 14. Cell viability test of cell free extract from cell mass of JR02.

라. Phosphate의 농도에 따른 prodigiosin analogues의 생산

JR02 균주는 낮은 농도($1 < \text{mM}$)의 phosphate 농도에서 prodigiosin analogues를 생산하였다. Phosphate의 농도와 배양 기간에 따라 600 nm 파장의 흡광도 및 색소의 생산량을 평가한 결과, 정상 NMS배지의 phosphate 농도 대비 1/100배 낮게 제조한 배지(0.042 mM)에서 최대 70.3 mg/L로 가장 높게 나왔으며, 1/10배와 1/500배로 phosphate가 들어간 배지에서는 최대 31.1과 25.5 mg/L가 생산되었다 (Fig. 15). 그 외의 농도에서는 prodigiosin analogues가 생산되지 않았다. 흡광도로 측정된 생장의 추이를 분석한 결과, phosphate의 농도가 정상으로 들어 있는 배지(4.2 mM)에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 1/10배, 10배, 1/100배, 1/500배의 순서로 높은 OD₆₀₀ 값을 나타내었다. Phosphate가 1/1000배, 0배인 배지에서는 JR02 균주는 거의 성장하지 못하였다. Phosphate가 배지에 10배, 1배 첨가된 배지에서 JR02 균주는 가장 잘 자랐음에도 불구하고 prodigiosin analogues는 생산되지 않았다. 그리고 prodigiosin analogues가 생산되는 경우, 생산 시점 및 그 양이 증가하는 양상은 성장곡선과 거의 일치하였다. 한편 기존에 잘 알려진 *Serratia marcescens* 종의 prodigiosin의 생산에 최적화된 결과와 비교하였을 때, JR02 균주의 prodigiosin analogues의 생산량은 비록 생산량이 적기는 하지만 메탄을 탄소원으로만 사용하는 MOB가 생산하는 양을 측정한 것은 본 연구가 최초이고, 향후 prodigiosin analogues의 생산 최적화가 이루어지면 환경적, 경제적 측면에서 이점을 갖게 될 것으로 예상된다 (Table 7).

상기한 결과는 배지내 phosphate의 제한적 공급이 prodigiosin의 생산에 중요한 요소임을 보여준다. Phosphate의 제한이 prodigiosin의 생산량을 증가시키는 것은 이미 보고된 바 있다[51, 52]. Witney등은 *Serratia marcescens*가 10 ~ 250 mM의 inorganic phosphate 농도의 배지에서 prodigiosin을 생산하기 시작했고, 최대 생산은 0.3 mM 이하의 inorganic phosphate의 농도에서 이루어졌다고 보고하였다. 한편, prodigiosin의 전구체 합성은 inorganic phosphate의 첨가에 의하여 즉각적으로 억제되는 것도 확인하였다 [49, 51]. 이때, 배지 내 phosphate의 낮은 농도는 prodigiosin의 생합성 경로에서 Pst transporter 및 Pho/R2 two-component system을 통해 prodigiosin의 생산을 조절하는 것으로 보고되었다 (Fig. 16)[50, 56].

a.



b.

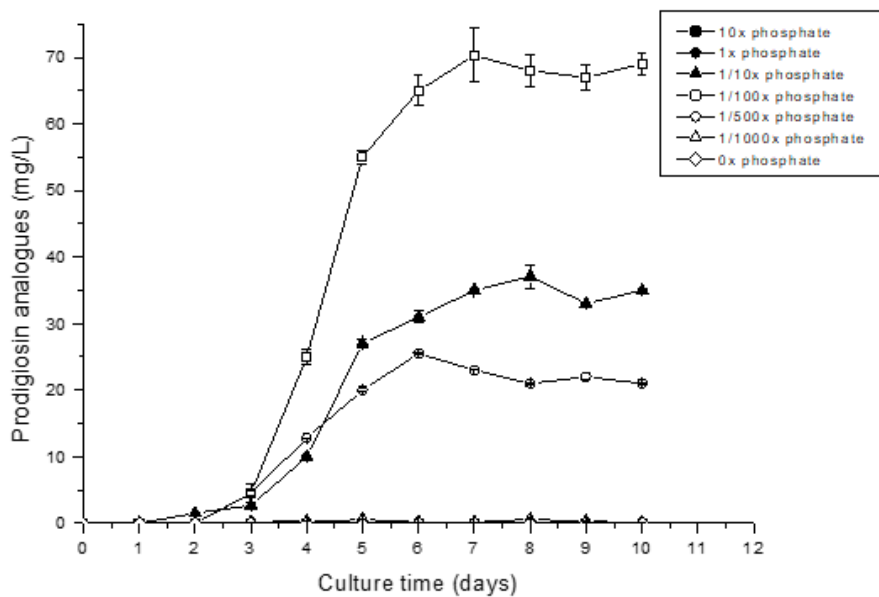


Fig. 15. Effects of phosphate concentrations on the cell growth (a) and prodigiosin analogues production (b).

Table 7. Comparison of prodigiosin production from several bacterial strains

Strain	Prodigiosin analogues	Production conc. (mg/L)	References
<i>Serratia marcescens</i> P-125	2-methyl-3-pentyl prodigionine	2423.4	[52]
<i>Serratia marcescens</i> UTM1	2-methyl-3-pentyl prodigionine	8000	[53]
<i>Serratia marcescens</i> TKU011	2-methyl-3-pentyl prodigionine	2480	[54]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	2-methyl-3-pentyl prodigionine	9.8	[55]
<i>Zooshikellarubidus</i> S-1	2-methyl-3-pentyl prodigionine	47.8	[42]
<i>Methylocystis</i> sp. JR02	2-methyl-3-heptyl prodigionine	62.3	in this study
	2-methyl-3-octyl prodigionine	8.0	

마. JR02 균주의 유전체분석

PacBio RS II 시퀀싱 플랫폼을 이용한 JR02 균주의 유전체 염기서열분석 결과를 생물정보학 소프트웨어인 Unicycler v0.4.6(<https://github.com/rrwick/Unicycler>)를 이용하여 조립하였다. 총 23개의 contig를 조립한 결과, gDNA total length가 4,352,433 bp이며, 최고 3,338,643 bp의 contig를 갖는 유전체 정보를 획득하였다. PacBio 분석 시스템은 시스템의 특성상 긴 reads의 분석을 위주로 하므로 정확한 유전체 분석을 위하여 교정이 필요하다. 이를 위해 상대적으로 작은 reads를 생성하는 Illumina HiSeqXten 플랫폼을 이용하여 나온 시퀀스를 Pilon v1.21(<https://github.com/broadinstitute/pilon/wiki>)를 사용하여 각 contig에 대한 subreads를 mapping하여 coverage depth 데이터가 포함된 교정된 염기서열을 작성하였다. 그 결과, 유전체는 총 다섯 개의 contig로 구성되어 있고, 모든 contig는 환형이었다. 유전체의 전체 크기는 4,362,918 bp였고, GC content는 63.39%였다. 각 contig의 크기는 각각 3,885,632, 311,335, 158,371, 4,565, 3,015 bp 였다(Table 8). assembly의 정확성을 검증하기 위해 Illumina의 reads를 assembly 결과에 mapping한 결과, mapping된 site의 %를 나타내는 coverage가 100%이고 평균 mapping depth가 227.5로 assembly된 결과가 신뢰할 만하다(Table 9). contig1은 3.8 Mbp의 크기의 환형 DNA로 bacterial chromosomal DNA로 예상된다. contig2~5는 크기가 수천~수십만 bp로 plasmid DNA로 예상된다. 기존 16S rRNA 분석에서 JR02 균주는 *Methylocystis parvus* OBBP^T와 가장 높은 상동성을 보였는데, *M. parvus* OBBP^T의 genome 크기는 4.5 Mbp이고 GC content는 63.4%이었다(Fig. 5-a).

조립된 JR02 균주의 각 contig에 대한 BLAST 결과는 Table 8과 같다. 각 contig의 circular map은 Fig. 17과 같다. contig1은 전체 게놈의 coding sequence(CDS)의 88.5%에 해당하는 3,624개의 CDS를 갖고 있으며 다른 contig에는 존재하지 않는 55개의 tRNA gene과 9개의 rRNA gene을 갖고 있는 것으로 확인되었으므로 contig1이 bacterial chromosomal DNA인 것으로 확인되었다. contig1에는 articulate methane monooxygenase(pMMO)의 구성유전자인 *pmoA*, *pmoB*가 각 세쌍이 발견되었으며 *pmoC*는 hypothetical protein으로 EggNOG 데이터베이스에서 검색되었다. 세 쌍의 *pmoA*, *pmoB*의 유전자를 비교분석한 결과, 이들은 16S rRNA 유전자 분석 결과와 유사하게 *Methylocystis* 속과 가장 유사한 것으로 확인되었다(Table 10). 마찬가지로 soluble methane monooxygenase(sMMO)의 구성 유전자인 *mmoB*, *mmoC*, *mmoD*, *mmoX*, *mmoY*, *mmoZ*는 contig1에 위치하고 있었으며 *mmoR*과 *mmoG*는 확인되지 않았다. sMMO의 구성 유전자를 BLAST한 결과, *mmoB*, *mmoD*, *mmoX*, *mmoZ*는 *Methylocystis* 속과, *mmoC*, *mmoY*는 *Methylosinus* 속과 가장 상동성이 높았다(Table 11). 그러나 MMO 관련 구성 유전자의

homology가 높은 경우라 할지라도 95%를 넘지 않았고, 많은 경우 90% 미만이었다. 이러한 결과는 JR02 균주가 신종일 가능성이 있다는 것을 의미한다.

Prodigiosin 관련 유전자군중 *pigC*, *pigD*, *pigE*, *pigF*, *pigG*, *pigH*, *pigI*, *pigJ*, *pigM*, *pigA*이 contig2에서 확인되었다. 알려진 *pig operon*의 구성은 Fig. 16에 나와 있듯이 *pigA*~O까지 총 15개로 이루어진 구조유전자를 갖고 있으나 JR02는 *pigB*, K, L, N, O가 또한 *pig operon*의 전사를 조절하는 단백질을 생산하는 *pigS*와 *pigR*도 발견되지 않았다. 그리고 operon 구조유전자내 유전자의 배치 또한 *pigA*가 *pigM* 유전자 다음의 downstream에 위치하고 *pigM*과 *pigA* 사이에 기능을 알 수 없는 CDS가 두 개 존재하였다. 각 유전자를 BLAST하면 상동성이 높은 결과가 거의 나오지 않아 단백질 서열을 이용한 BLASTP를 수행하였다. 그 결과, *pig operon*내의 유전자간 다소간의 차이는 있으나 *Massilia sp.*, *Hahella chejuensis*, *Zoshikella ganghwensis*, *Janthinobacterium lividum*, *Rugamonas rubra* 등의 prodigiosin을 생산하는 것으로 알려진 다양 균주가 보유한 단백질과 상대적으로 높은 상동성을 보였다(Table 12). 그러나 전체적으로 낮은 70% 미만의 유사도를 보였으며, 잘 알려진 *Serratia* 속의 prodigiosin 생산 균주의 유전자군과는 상동성이 낮았다. 이 유전자군이 위치한 contig2의 크기가 약 311 kbp로 plasmid 크기인 점까지 고려하면 이 유전자군이 horizontal gene transfer와 같은 기작을 통하여 외부로부터 유래했을 가능성을 내포한다. 최근의 연구에 의하면 *pig pathway*에 관련한 유전자들은 horizontal gene transfer를 통하여 *Serratia*와 *Pseugalteromonas*의 prodigiosin 유전자 집단간의 상동성을 설명할 수 있다[57, 58]

반면 Fig. 16에 나타나 있듯이, 일반적으로 세포내 phosphate uptake에 관련된 *phoR*, *phoB* gene은 phosphate의 농도에 따라 prodigiosin 생합성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 유전자들은 contig1에서 확인되었다. 이 유전자를 상동성 분석한 결과, *Methylocystis parvus*와 90% 이상의 상동성을 보였다(Table 12).

그 외에 prodigiosin의 생합성을 조절하는 유전자들인 *tamA*, *tamB*, *rapA* 등이 contig1에서 확인되었다. Prodigiosin의 생합성 및 그 조절과 관련된 유전자 분석결과를 볼 때, JR02 균주의 *pig operon*의 기원은 MOB가 아닌 다른 미생물일 가능성이 크며, *Serratia* 속의 균주가 직접적인 기원은 아닌 것으로 예측된다(Table 12). 그러나 phosphate의 농도에 따른 prodigiosin의 생합성 조절에 직접적으로 관여하는 *phoR*, *phoB* 유전자는 유전학적으로 유연관계에 있는 *Methylocystis* 속의 균주의 유전자와 높은 상동성을 보였다.

Table 8. Result of assembly and annotation

Contig name	Length(bp)	GC(%)	DNA form	CDS	tRNA	rRNA
contig1	3,885,632	63.70	circular	3,264	55	9
contig2	311,355	61.22	circular	286	0	0
contig3	158,371	60.06	circular	180	0	0
contig4	4,565	70.51	circular	2	0	0
contig5	3,015	50.91	circular	3	0	0
Total	4,362,918	63.39	circular	4,095	55	9

Table 9. Overall mapping stats

Library name	Total reads	Mapped reads*	Coverage(%)*	Depth*	Ins.size(Std.)*
JR02	7,161,128	6,737,983(94.09%)	100.00	227.5	438.45(95.47)

*Mapped reads: Total number of mapped reads

**Coverage(%): The percentage of mapped sites($\geq 1x$)

***Depth: Average mapping depth

****Ins.size(Std.): The length between adapters and standard deviation of predicted length

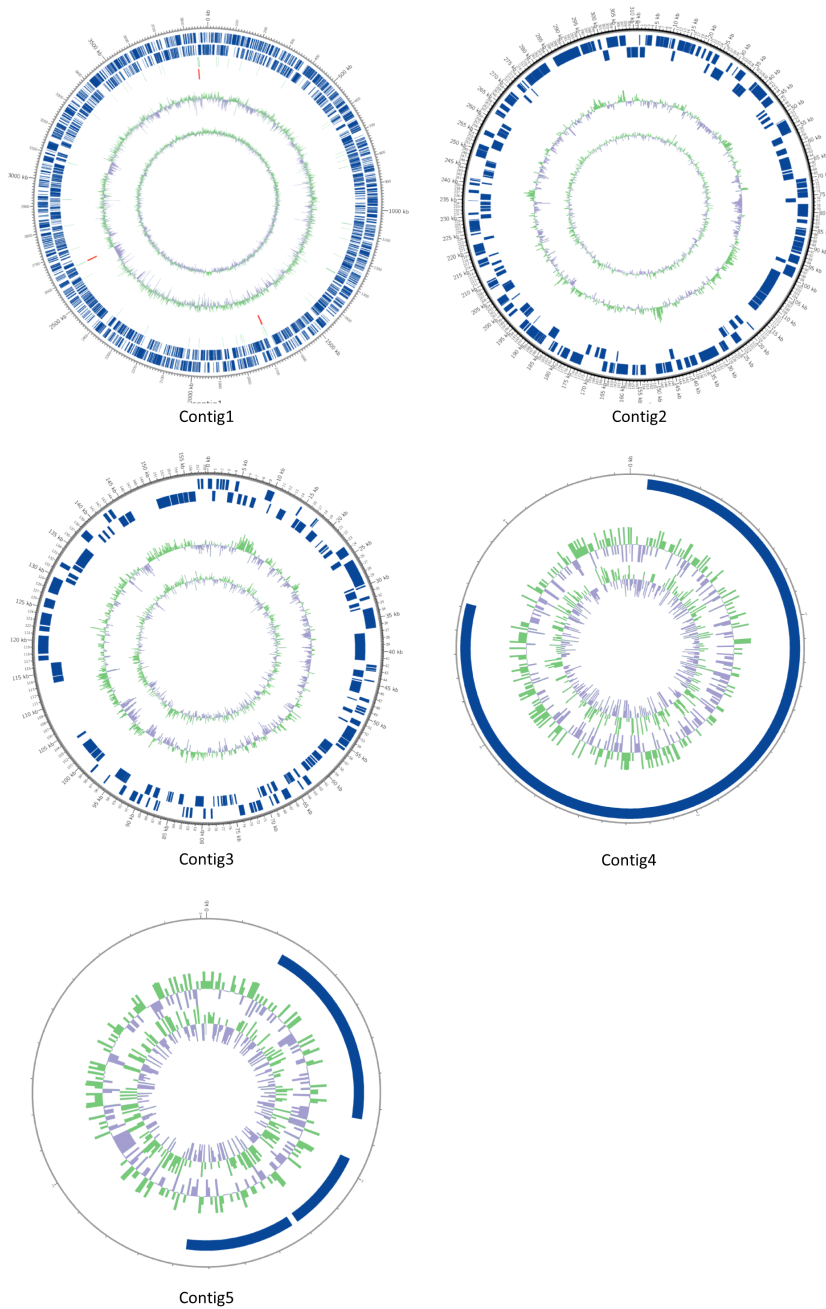


Fig. 17. Circular map of contigs of JR02 strain. Marked characteristics are shown from outside to the center; CDS on forward strand, CDS on reverse strand, tRNA, rRNA, GC content and GC skew.

Table 10. BLAST of *pmoA* and *pmoB* gene

<i>pmoA1_1</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pmoA1_2</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pmoA1_3</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Mc parvus</i> BRCS2	100	92.98	<i>Mc parvus</i> BRCS2	99	90.90	<i>Mc parvus</i> BRCS2	97	94.20
<i>Mc rosea</i> BRCS1	91	91.60	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	96	86.96	<i>Mc rosea</i> BRCS1	100	92.24
<i>Mc rosea</i> GW6	91	91.60	<i>Mc bryophila</i> S285	89	87.06	<i>Mc rosea</i> GW6	100	92.24
<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	88	87.80	<i>Mc bryophila</i> G2s ^T	68	87.97	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	100	88.04
<i>Mc bryophila</i> S285	86	88.04	** <i>Ms</i> <i>trichosporium</i> ATCC35069 ^T	64	88.96	<i>Mc bryophila</i> S285	97	87.75

<i>pmoB1_1</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pmoB1_2</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pmoB1_3</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Mc parvus</i> BRCS2	100	93.74	<i>Mc parvus</i> BRCS2	95	85.07	<i>Mc parvus</i> BRCS2	100	93.81
<i>Mc rosea</i> GW6	100	86.54	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	95	81.54	<i>Mc rosea</i> GW6	100	86.61
<i>Mc bryophila</i> S285	99	85.82	<i>Mc bryophila</i> S285	92	80.33	<i>Mc rosea</i> BRCS1	100	86.38
<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	99	85.59	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	46	78.41	<i>Mc bryophila</i> S285	99	86.04
<i>trichosporium</i> OB3b ^T	96	83.45	<i>Mc rosea</i> BRCS1	42	76.58	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	99	85.91

Mc*:*Methylocystis*; *Ms*:*Methylosinus*

Table 11. BLAST of *mmoB* and *mmoX* gene

<i>mmoB</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>mmoC</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>mmoD</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>*Mc rosea</i> sp. C49	100	94.48	** <i>Ms</i> <i>trichosporium</i> IMV3011	100	83.69	<i>Mc parvus</i> sp. WI14	89	88.74
<i>Mc parvus</i> sp. WI14	100	93.76	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	100	81.89	<i>Mc rosea</i> sp. C49	96	82.21
<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	100	93.29	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	100	74.28			
<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> IMV3011	100	93.05						
<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	98	86.37						
<i>mmoX</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>mmoY</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>mmoZ</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Mc parvus</i> BRCS2	100	93.74	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> IMV3011	100	91.08	<i>Mc parvus</i> sp. WI14	100	93.33
<i>Mc rosea</i> GW6	100	86.54	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	100	90.92	<i>Mc rosea</i> sp. C49	100	90.20
<i>Mc bryophila</i> S285	99	85.82	<i>Mc bryophila</i> S285	97	85.60	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> IMV3011	100	87.89
<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	99	85.59	<i>Mc heyeri</i> H2 ^T	97	84.44	<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	100	87.70
<i>Ms</i> <i>trichosporium</i> OB3b ^T	96	83.45	<i>Methylocella</i> <i>silbestris</i> BL2	72	76.75			

Mc*:*Methylocystis*; *Ms*:*Methylosinus*

Table 12. BLASTP of prodigiosin biosynthesis related genes

<i>pigA</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigC</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigD</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Massilia frigida</i>	100	67.28	<i>Hahella chejuensis</i>	97	58.94	<i>Massilia rubra</i>	96	57.29
<i>Janthinobacterium lividum</i>	100	66.75	<i>Janthinobacterium lividum</i>	96	59.26	<i>Massilia mucilaginoso</i>	95	58.17
<i>Massilia aquatica</i>	100	66.75	<i>Rugamonas rubra</i>	96	59.03	<i>Spartinivicinus ruber</i>	97	56.31
<i>Massilia mucilaginoso</i>	100	66.02	<i>Massilia aquatica</i>	96	59.14	<i>Massilia frigida</i>	96	57.14
<i>Rugamonas rubra</i>	100	66.75	<i>Massilia mucilaginoso</i>	96	58.92	<i>Rugamonas rubra</i>	95	58.11
<i>pigE</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigF</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigG</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Massilia mucilaginoso</i>	99	64.34	<i>Massilia aquatica</i>	99	59.17	<i>Massilia aquatica</i>	100	65.12
<i>Massilia rubra</i>	100	64.15	<i>Zooshikella ganghwensis</i>	99	61.24	<i>Massilia rubra</i>	100	65.12
<i>Hahella chejuensis</i>	100	64.70	<i>Massilia mucilaginoso</i>	99	58.58	<i>Massilia frigida</i>	94	66.67
<i>Spartinivicinus ruber</i>	100	59.79	<i>Massilia frigida</i>	99	57.99	<i>Massilia mucilaginoso</i>	100	63.95
<i>Serratia rubidaea</i>	99	59.04	<i>Massilia rubra</i>	99	57.99	<i>Janthinobacterium lividum</i>	100	63.95

<i>pigH</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigI</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>pigJ</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Hahella chejuensis</i>	97	59.51	<i>Janthinobacterium lividum</i>	95	55.58	<i>Massilia mucilaginoso</i>	99	48.36
<i>Zooshikella ganghwensis</i>	97	52.85	<i>Hahella chejuensis</i>	97	54.51	<i>Massilia frigida</i>	99	48.69
<i>Massilia mucilaginoso</i>	97	55.89	<i>Rugamonas rubra</i>	95	56.07	<i>Massilia rubra</i>	99	48.85
<i>Massilia frigida</i>	97	55.11	<i>Massilia aquatica</i>	95	57.20	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99	48.14
<i>Notoacmeibacter marinus</i>	73	72.46	<i>Massilia frigida</i>	95	56.05	<i>Rugamonas rubra</i>	99	47.92
<i>pigM</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>phoR</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>phoB</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Hahella chejuensis</i>	98	42.51	<i>Methylocystis parvus</i>	98	91.62	<i>Methylocystis parvus</i>	96	97.51
<i>Zooshikella ganghwensis</i>	96	40.73	<i>Methylocystis rosea</i>	98	75.43	<i>Methylocystis rosea</i>	100	92.37
<i>Janthinobacterium lividum</i>	98	42.22	<i>Methylocystis hirsuta</i>	98	75.14	<i>Methylocystis heyeri</i>	100	87.55
<i>Massilia frigida</i>	98	43.12	<i>Methylocystis heyeri</i>	97	70.03	<i>Methylocystis bryophila</i>	98	84.96
<i>Rugamonas rubra</i>	98	42.45	<i>Methylosinus sporium</i>	97	71.22	<i>Roseiarcus fermentans</i>	92	83.04

<i>tamA</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>tamB</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)	<i>rapA</i>	Query cover(%)	Per. Ident.(%)
<i>Methylocystis parvus</i>	99	82.80	<i>Methylocystis parvus</i>	98	73.93	<i>Methylocystis</i> sp.	99	87.68
<i>Methylosinus sporium</i>	99	63.92	<i>Methylosinus sporium</i>	99	55.92	<i>Methylosinus</i> sp.	99	68.90
<i>Methylocystis heyeri</i>	99	63.31	<i>Methylocystis heyeri</i>	99	58.60	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	97	65.83
<i>Methylosinus trichosporium</i>	99	62.38	<i>Microvirga aerophila</i>	97	45.62	<i>Rhodoblastus acidophilus</i>	99	63.70
<i>Microvirga ossetica</i>	100	51.18	<i>Bosea caraganae</i>	97	46.77	<i>Mesorhizobium loti</i>	99	61.60

제4장 메탄산화세균과 공생세균의 혼합배양

1. 재료 및 방법

가. 사용 균주 및 배양조건

분리한 MOB와 공생 종속영양세균의 혼합배양 시의 특성을 확인하기 위하여 앞에서 분리한 MOB를 다음 실험의 종균으로 사용하였다. MOB를 고체배지 위에서 순수분리하는 과정에서 MOB 콜로니 주위에 작은 콜로니를 형성하는 공생종속영양세균 균주를 20 ml의 LB배지에 접종하여 30°C, 150 rpm의 조건으로 배양하여 종균으로 사용하였다. 각각의 종균을 준비한 후, 종속영양세균이 MOB의 성장을 촉진하는지 알아보기 위하여 160 ml 유리 vial에 20 ml의 MOB 배양용 NMS 배지를 넣고, 각 0.5%의 종균 농도로 MOB만 접종하거나 또는 MOB와 공생 종속영양세균을 혼합해서 접종하였다. 접종 후, 메탄과 산소를 4:6의 비율로 혼합한 가스를 vial headspace 부피의 10배 이상 환류시켜 내부의 공기와 치환시킨 후, 외부의 공기가 혼합되지 않도록 즉시 실리콘 마개를 함으로써 바이알 내외부로 가스의 유출입이 없도록 하였다. 이렇게 준비된 시료를 30°C, 150 rpm의 조건으로 6 ~ 8일간 배양하였다.

나. 메탄 소비 속도 비교

MOB의 순수배양과 MOB와 공생 종속영양세균을 혼합배양하면서 배양 시간에 따른 메탄의 소비를 분석하였다. 6 ~ 24 시간 간격으로 vial headspace의 가스를 gas-tight syringe를 이용하여 100 μ l를 채취한 후 가스 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 가스 크로마토그래피 분석은 CP-molseive 5A capillary 컬럼 (length 30 m, diameter 0.53 mm, film thickness 15 μ m, Agilent Inc.)을 이용하여 Shimadzu 사의 GC2010 plus 모델로 분석하였다. 분석조건으로 주입구 온도는 150°C, column oven 온도 150°C, carrier gas는 헬륨을 사용하고, 유속은 2.45 ml/min, split ratio는 1:10으로 하였으며, 검출기는 TCD로 온도를 200°C로 설정하여 분석하였다. 이 분석조건에서 메탄은 분석 시작 후 3분 25초경에 용출됨을 확인하였고, 표준정량곡선을 이용하여 농도를 측정하였다.

다. 생산 촉진 물질

분리된 MOB중 JR31 균주를 배양한 배양상등액이 생장에 cobalamin(vitamin B12)을 필수적으로 요구하는 MOB 균주에 대하여 cobalamin이 없는 배지 조건에서도 성장을 촉진하는 결과를 보였다. 따라서 이 배양액에 cobalamin 또는 다른 생리활성물질이 있는지 확인하기 위

한 실험을 진행하였다.

(1) 비타민 요구 균주의 분리

다양한 비타민 요구 균주의 분리를 위하여 MOB 배양 배지인 NMS 배지 성분 중 비타민 stock의 각 성분을 각각 개별적인 stock (100x)으로 제조하였다 (Table 13). 분리한 MOB 균주를 비타민이 첨가된 정상 NMS 배지에서 배양한 후, 세균과 배양액 내의 비타민을 제거하기 위하여 10,000 x g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 후, cell pellet을 비타민이 첨가되지 않은 NMS 배지로 두 번 세척하여 종균으로 사용하였다. 분리 균주의 비타민 요구성을 파악하기 위하여 vent seal cap (0.2 μ m pore size, SPL Life Science)으로 밀봉한 70 ml cell culture flask에 비타민이 첨가되지 않은 NMS 배지 20 ml를 넣고, 각 한 종류의 비타민만 NMS 배지의 정상 농도로 첨가한 후, 세척된 종균을 1% (v/v) 농도로 접종하였다. 그 다음 각 플라스크를 가스가 유출되지 않게 제작된 배양 용기에 넣고 밀봉한 후 용기의 한쪽 가스 유출구를 열고, 다른 한쪽의 가스 유입구에 메탄과 산소를 5:5의 비율로 혼합한 가스를 용기의 5배 이상 주입하면서 내부를 메탄 혼합가스로 치환한 후 밀봉한 다음 30°C에서 150 rpm으로 배양하였다. 배양기간 중 24시간마다 배양액을 채취하여 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Table 13. Composition and concentration of individual vitamin stock(100x) solution of modified nitrate mineral salt medium

Vitamin	mg/ ℓ
Biotin (B ₇)	20
Folic acid (B ₉)	20
Thiamine HCl (B ₁)	50
Ca pantothenate (B ₅)	50
Cobalamin (B ₁₂)	1
Riboflavin (B ₂)	50
Nicotinamide (B ₃)	50

(2) 성장 촉진 물질의 생산 및 분리

비타민 요구균주에 대한 성장촉진 물질의 분석을 위하여 JR31 균주를 배양한 배양액으로 부터 성장 촉진 물질을 분리하였다. 먼저 비타민이 첨가되지 않은 NMS 배지 200ml씩을 vent seal cap이 있는 5개의 600 ml cell culture flask에 분주하고, JR31 균주를 1%의 농도로 접종한 후 배양 용기에 넣고 메탄:산소(5:5) 혼합가스를 공급한 후 10일간 진탕배양하였다. 배양액을 6,000 x g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 다시 0.2 μm pore size의 membrane filter를 이용하여 여과하였다. 여과액을 -20℃에서 동결시킨 후 동결건조기(Ilsin co.)를 이용하여 완전히 건조하였다. 이렇게 건조된 시료를 10 ml의 증류수로 재용해시켰다. 이때 상당량의 염이 용해되지 않은 채로 남게 되는데, 이것을 10,000 x g에서 10 분간 원심분리하여 제거하였다. 이렇게 배양액을 100배 농축한 시료(배지에 포함된 염은 각 염의 포화농도 수준으로 제한)를 HPLC로 분석하면서 성장촉진물질을 분리하였다.

HPLC의 분석조건으로 column은 Zorbax SB-C18(length 250 mm, diameter 9.4 mm, particle size 5 μm)를 사용하였다. 이동상은 5% acetonitrile (0.1% TFA)과 100% acetonitrile (0.1% TFA)를 이용하였다. 0 ~ 5분까지는 5% acetonitrile이 100%에 이를 때까지, 5 ~ 50분까지는 100% acetonitrile 용매가 100%에 이르는 gradient 조건을 주었고, 50 ~ 70분까지 100% acetonitrile을 유지하였다. 3.5 ml/min 유속으로 Diode Array Detector 검출기를 사용하여 220 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Sample loading 양은 100 μl였다. JR31 균주의 배양 상등액의 초기 HPLC 크로마토그램을 분석한 후, HPLC를 10회 반복 수행하면서 시간별로 용출물의 분획을 받았다. 각 분획은 동결건조기를 이용하여 건조한 후, 1 ml의 증류수를 이용하여 재용해한 후, 이후의 실험에 사용하였다.

(3) 성장 촉진 물질의 성장촉진 효과

비타민을 첨가하지 않은 NMS 배지에 JR31 균주의 배양상등액을 0.5, 5, 25% (v/v)의 농도로 첨가한 후, 비타민 요구 균주 (JR07, JR09, JR29, JR30)를 각각 1% 농도로 접종한 다음 메탄:산소(5:5)의 혼합가스를 공급한 배양용기에 넣고, 30℃, 150 rpm의 조건으로 배양하였다. 24시간마다 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 JR31 균주의 배양상등액 첨가에 따른 대상 MOB 균주의 성장 정도를 확인하였다.

또한, JR31 균주의 성장속도에 따른 배양상등액이 비타민 요구 균주에 대한 성장촉진에

효과가 있는지 확인하기 위하여 JR31 균주의 배양액을 배양일별로 채취한 다음, 비타민 요구 균주의 신선한 NMS 배지에 5%가 되도록 각각 첨가한 후 상기한 조건으로 배양하고, 24 시간마다 시료를 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편, JR31 균주의 배양상등액을 100배 농축하여 얻은 각 HPLC 분획이 비타민 요구 균주의 성장촉진에 미치는 효과를 확인하기 위하여 각 분획을 20 ml의 NMS 배지에 10 μ l씩 첨가하고 (배양상등액을 5%의 농도로 첨가한 것과 동일한 비율), 비타민 요구 JR29 균주를 1%의 농도로 접종한 후, 시간별로 흡광도를 측정하여 성장촉진 활성이 있는 분획을 선택하였다.

(4) *Methylosinus* sp. JR31의 대사체 분석

JR31 균주의 배양상등액을 HPLC로 정제한 분획 23개 중 No. 11 ~ 20의 분획물을 MetaMass사에 대사체 분석을 의뢰하였다. 대사체 분석은 Gas chromatography-Time of Flight-Mass spectrometry (GC-TOF-MS)와 Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Linear Trap Quadrupole-Orbitrap-Mass Spectrometry (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS)를 이용하였다. 또한, Metalign (Wageningen university & research) software를 이용하여 MS data를 처리하고, 이를 SIMCA-P+(ver. 12.0, Sartorius co.) software를 사용하여 Principal component analysis (PCA), Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), The Variable Importance in the Projection (VIP) 등의 다변량 통계분석을 수행하였다.

GC-TOF-MS를 이용한 대사체 분석을 위해 시료를 전처리하였다. 먼저 각 분획물 100 μ l를 speed vacuum dryer로 건조한 후, oxidation을 위해 methoxyamine hydrochloride (20 mg/ml in pyridine)를 50 μ l를 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시킨 후, Silylation을 위해 N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)를 50 μ l를 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.2 μ m pore size의 syringe filter로 여과 후 GC-TOF-MS를 수행하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Rtx-5MS (30 m length, 0.25 mm diameter, 0.25 μ m thickness)이고, Agilent 7890A GC system과 Pegasus III(Leco Inc.) mass spectrometer를 사용하였다. 전처리된 시료를 1 μ l를 주입하여 splitless 조건으로 50 ~ 600 m/z 의 mass range를 분석하였다.

UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 대사체 분석은 Vanquish binary pump H system (LC system, Thermo Scientific)과 Orbitrap Velos ProTMsystem (Mass spectrometer, Thermo)을 사용하

였다. 컬럼은 Thermo Scientific사의 Synchronis C18 UHPLC column (50 mm length, 2.1 mm diameter, 1.7 μ m particle size)를 사용하였고, 5 μ l의 시료를 주입하였다. 이동상은 100% 물 (solvent A, 0.1% formic acid)과 100 % acetonitrile (solvent B, 0.1% formic acid)를 사용하였고, 0 ~ 1분에 solvent A를 95%, solvent B를 5%, 1 ~ 10분에 solvent B를 100 %까지 linear gradient로 흘리면서 11분까지 유지하였다. 이때 유속은 0.8 ml/min이었고, 분석한 mass range는 100-1000 m/z 였다.

라. 메탄산화세균과 대장균의 혼합배양

(1) 사용 균주 및 배양 조건

분리된 MOB와 *E. coli* BL21을 혼합배양하기 위하여 MOB를 NMS 배지에서 메탄:산소(5:5) 혼합가스 공급하여 종균을 배양하고, *E.coli* BL21은 LB에서 배양하여 종균으로 사용하였다. 160 ml 용량의 유리 vial에 기본 NMS 배지를 각 20 ml씩 분주하고, 그 다음 각 0.5% (v/v)의 농도로 MOB만 접종하거나 또는 MOB와 *E. coli* BL21을 함께 접종하였다. 접종 후, 메탄과 산소를 4:6의 비율로 혼합한 가스를 vial headspace 부피의 10배 이상 환류시켜 내부의 공기와 치환시킨 후, 외부의 공기가 혼합되지 않도록 즉시 실리콘 마개를 하여 vial 내외부로 가스의 유출입이 없도록 하였다. 이렇게 준비된 시료를 30 $^{\circ}$ C, 150 rpm의 조건으로 6 ~ 8일간 배양하였다.

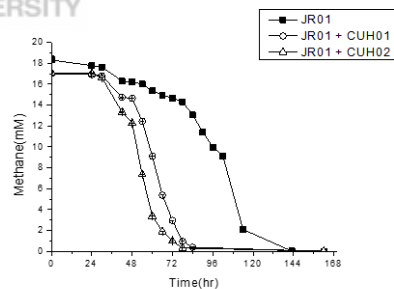
(2) 메탄 소비 속도 비교

MOB의 순수배양과 MOB와 대장균을 혼합배양하면서 배양 시간에 따른 메탄의 소비를 분석하였다. 6 ~ 24 시간 간격으로 vial headspace의 가스를 gas-tight syringe를 이용하여 100 μ l를 채취한 후 가스 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 가스 크로마토그래피 분석은 CP-molseive 5A capillary 컬럼 (length 30 m, diameter 0.53 mm, film thickness 15 μ m, Agilent Inc.)을 이용하여 Shimadzu 사의 GC2010 plus 모델로 분석하였다. 분석조건으로 주입구 온도는 150 $^{\circ}$ C, column oven 온도 150 $^{\circ}$ C, carrier gas는 헬륨을 사용하고, 유속은 2.45 ml/min, split ratio는 1:10으로 하였으며, 검출기는 TCD로 온도를 200 $^{\circ}$ C로 설정하여 분석하였다. 이 분석조건에서 메탄은 분석 시작 후 3분 25초경에 용출됨을 확인하였고, 표준정량곡선을 이용하여 농도를 측정하였다.

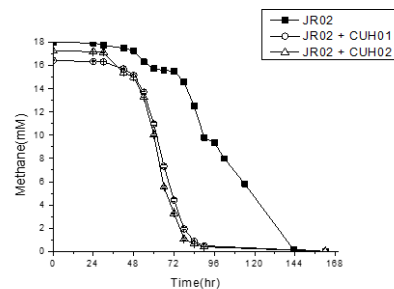
2. 결과 및 고찰

가. 메탄산화세균의 순수 및 혼합배양

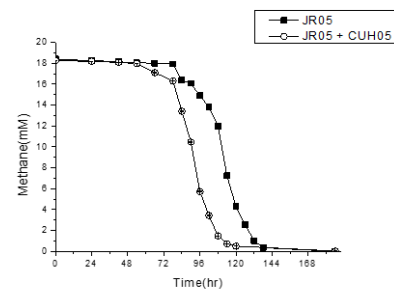
토양시료로부터 MOB 분리를 위한 농화배양을 실시하면 다양한 세균이 포함된 2차, 3차 농화배양에서는 대부분의 시료가 3~4일 이내에 세포 밀도가 최대치를 이루었으나, 순수분리된 MOB는 5일 이상을 배양해야 생장곡선 상에서 정지기에 진입하였다. 이는 농화배양 시 혼합되어 배양되는 미생물간에 상호 생장에 도움을 주는 물질 또는 신호를 배지내로 분비 또는 전달하는 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위하여 분리한 MOB와 공생 종속영양세균을 혼합배양하여 배양기간별 메탄의 소모를 측정된 결과 몇 종의 MOB(JR01, JR02, JR05, JR06, JR07, JR09, JR10, JR13, JR18)에서 공생종속영양세균(CHU01, CHU01, CHU05, CHU06, CHU7, CHU13, CHU24, CHU26, CHU27)과 혼합배양시 순수배양과 비교하여 메탄의 소비속도가 증가하거나 소비하는 시점이 빨라지는 경우를 확인하였다 (Fig. 18). 특히 JR01, JR02, JR06, JR07은 순수배양과 비교해 공생종속영양세균과의 혼합배양이 메탄의 소비속도를 급격히 증가시켰다. 이것은 MOB의 메탄대사 속도가 빨라진 것을 의미하므로 다음과 같은 두 가지 가정을 해볼 수 있다. 첫째, 혼합배양에 사용된 공생종속영양세균이 MOB의 메탄대사에 영향을 주는 물질을 생산하여 배지내로 분비하였거나, 둘째 희박한 확률이지만 공생종속영양세균이 직접적으로 MOB와 접촉하여 특정 유전자가 들어 있는 플라스미드를 전달함으로써 영향을 줄 수도 있을 것이다. 공생종속영양세균이 MOB의 메탄대사에 지속적인 영향을 주려면 해당 물질 또는 신호를 생산 또는 전달을 지속해야 하므로 스스로 생장을 위하여 에너지 및 탄소원을 필요로 하여야 한다. 그러나 종속영양세균은 직접 메탄을 탄소원으로 사용하지 못하므로 혼합배양시 MOB가 제공하는 탄소원이나 다른 에너지원을 받아야만 한다. 이러한 미생물간 상호작용은 자연계에서 많이 발견되었다. MOB도 종속영양세균과 서로의 생장을 증가시키거나 촉진하는 다양한 상호작용을 하는 것으로 보고되어있다 [59, 60, 61, 62, 63, 64]. 특히 메탄을 대사할 수 있는 특성 때문에 메탄이 많이 발생하는 환경에서 미생물 군집에서 중요한 역할을 하며, 조류, 지의류, 식물, 무척추동물 등과 서로에게 이점이 되는 상호작용을 한다(Fig. 19)[65]. 본 연구에서도 신규 분리한 MOB와 공생종속영양세균과의 혼합배양에서 MOB의 메탄 소비속도가 증가한다는 결과를 확인하였다. 향후 미생물간 상호작용에 관련하는 물질을 확인하고, 혼합배양을 이용한 MOB의 배양 및 메탄올 등의 유용물질 생산에 관한 추가적인 연구를 진행할 예정이다.



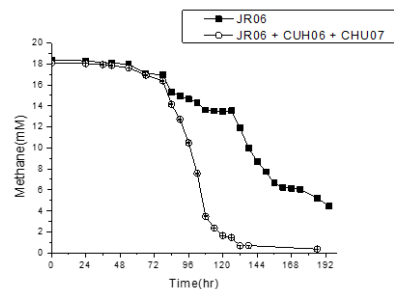
JR01



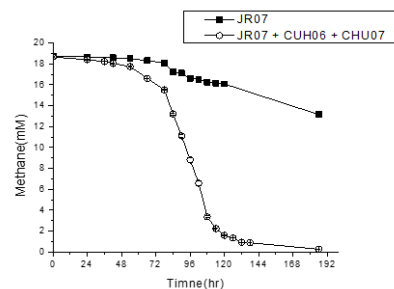
JR02



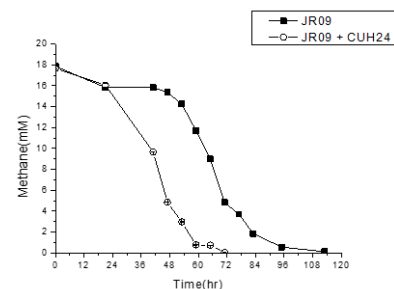
JR05



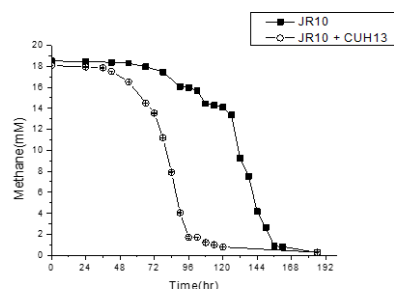
JR06



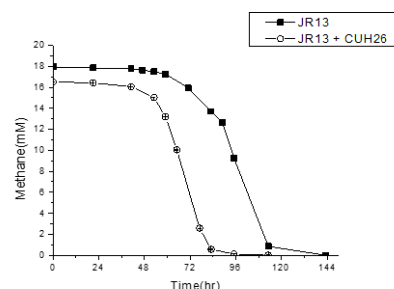
JR07



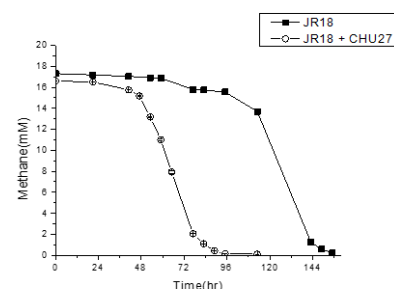
JR09



JR10



JR13



JR18

Fig. 18. Comparison of methane consumption in mixed culture of MOB and heterotrophs isolated from soil samples. JR and CUH represented MOB and heterotroph strains, respectively.

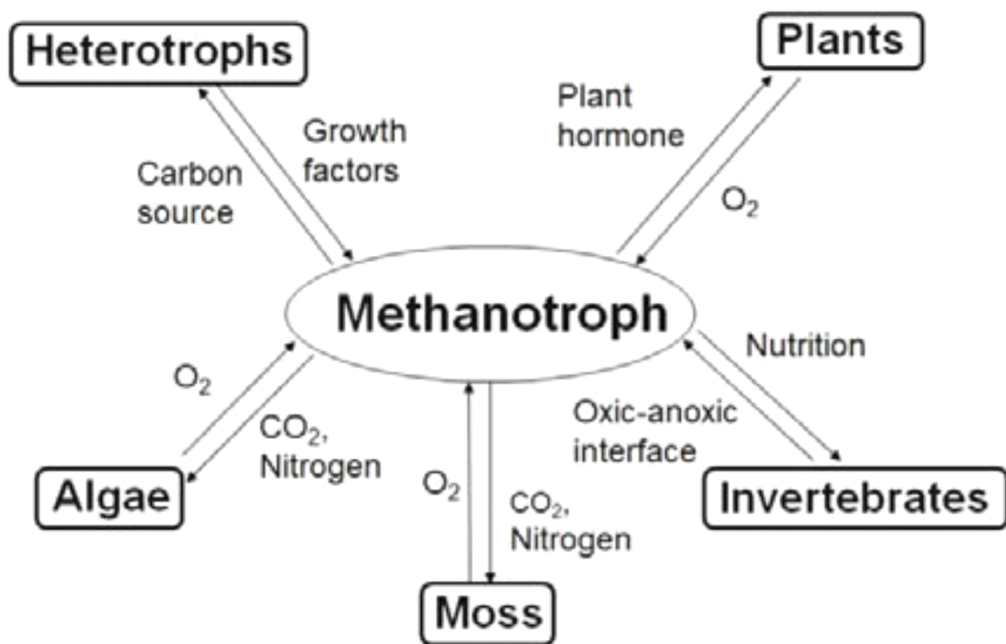


Fig. 19. Interaction of methanotrophs with non-methanotrophs [65].

나. 비타민 요구 MOB 균주의 선발 및 JR31 균주의 성장촉진효과

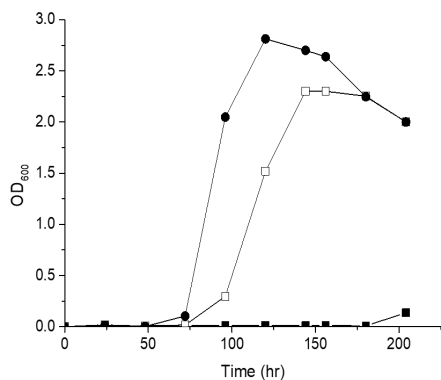
MOB 분리균주인 JR31 균주의 배양상등액이 비타민 요구 MOB 균주의 성장을 촉진하는 효과를 보여, 먼저 비타민 요구 균주의 성장에 관여하는 정확한 비타민의 종류를 파악하기 위하여 분리한 MOB를 대상으로 실험한 결과 JR07, JR09, JR29, JR30 균주에 대하여 cobalamin (vitamin B₁₂)이 성장에 필수적이며, NMS에 첨가하는 비타민 stock에서 성장촉진효과는 대부분 cobalamin에 의한 것으로 확인되었다 (Fig. 20).

농축하지 않은 JR31 균주의 배양 상등액 첨가 부피별 비타민 요구 균주에 대한 성장촉진 정도를 측정한 결과 각각 JR07, JR29, JR30 균주는 5 ml, JR09 균주는 1 ml의 상등액을 첨가하여 배양하면 비타민이 첨가된 normal NMS 배지에 비하여 더 높은 최고 흡광도 값을 보였다 (Fig. 21). 특히 JR07 균주의 경우 JR31 균주의 배양 상등액을 첨가하면 단순히 배양농도의 증가뿐 아니라 성장 속도도 빨라졌다.

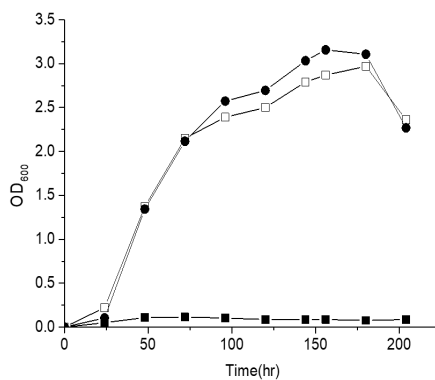
JR31 균주의 배양기간에 따라 얻은 배양 상등액의 활성테스트에서 JR07 균주는 배양 7일 이후의 상등액에서는 거의 동일한 정도의 활성을 보였다. JR09 균주는 5, 7, 13일의 상등액의 효과가 좋았다. JR29, JR30 균주에서는 배양 13일째의 상등액을 첨가하였을 때 가장 높은 흡광도 값을 나타냈다(Fig. 22). 즉, JR31균주가 생장곡선에서 정지기로 갈수록 촉진물질을 많이 생산하는 것으로 보아 이차대사 물질인 것으로 추정된다.

JR31 균주의 배양 상등액을 HPLC로 분석한 결과, 크로마토그램에서는 매우 많은 peak이 관찰되었다. 많은 수의 peak이 촘촘하게 나타나고 겹치는 경우도 있어 분획을 받기 위해 주요 peak을 기준으로 용출시간별로 분획을 받았다 (Fig. 23a). HPLC를 10회 수행하여 얻은 각 분획을 동결건조기로 재농축한 후, 각 분획물로 비타민 요구 균주들을 대상으로 성장촉진 활성 여부를 확인한 결과, fraction No. 17, 18에서 가장 좋은 활성을 보였고 fraction No. 15에서도 약간의 활성이 나타났다 (Fig. 23b).

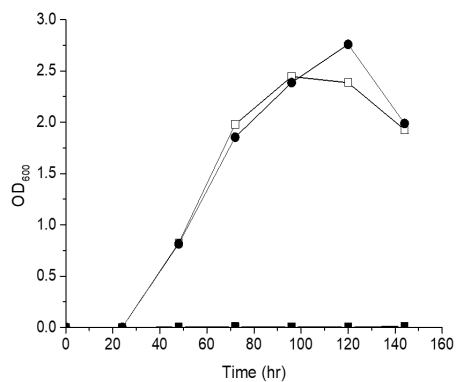
a.



b.



c.



d.

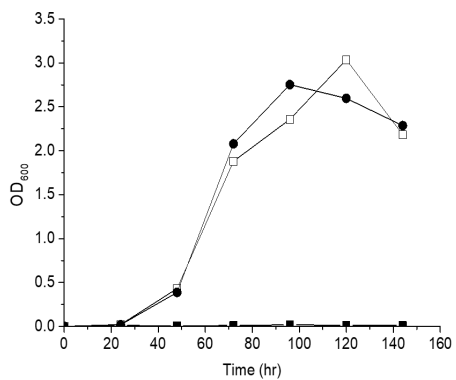
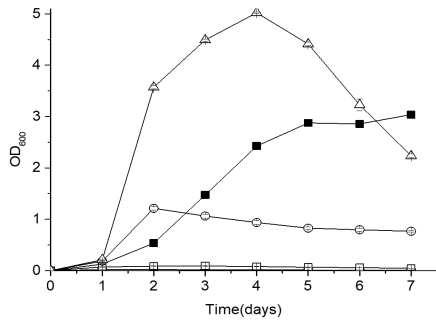
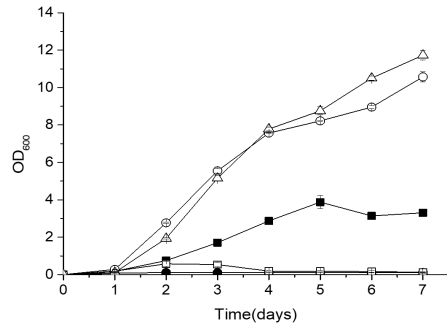


Fig. 20. Effect of cobalamin and vitamin mixture on the growth of several MOB. *Methylomonas* JR07 (a), *Methylomonas* JR09 (b), *Methylomonas* JR29 (c), and *Methylomonas* JR30 (d). Symbols: (□), vitamin mixture (thiamine, riboflavin, nicotinamide, pantothenate, biotin, folic acid, and cobalamin); (●), cobalamin; and (■), w/o vitamin.

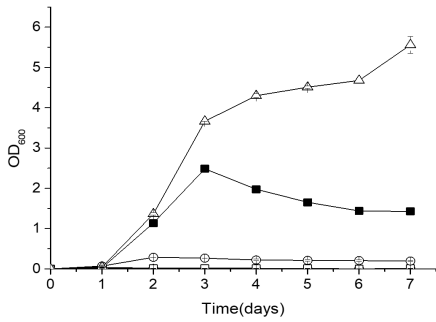
a.



b.



c.



d.

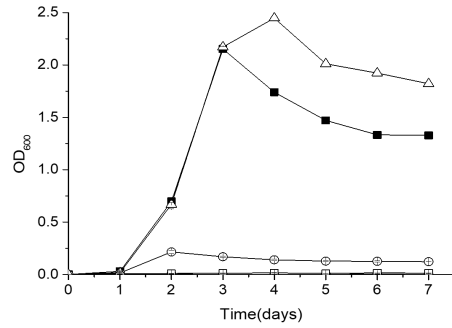


Fig. 21. Effects of vitamin mixture and culture supernatant of *Methylosinus* JR31 on the growth of several vitamin-requiring MOB. *Methylobacterium* J07 (a), JR09 (b), JR29 (c), and JR30 (d). Symbols: (■), vitamin mixture; (●), w/o vitamin; (□), 0.1 ml supernatant; (○), 1 ml supernatant; and (△) 5 ml supernatant.

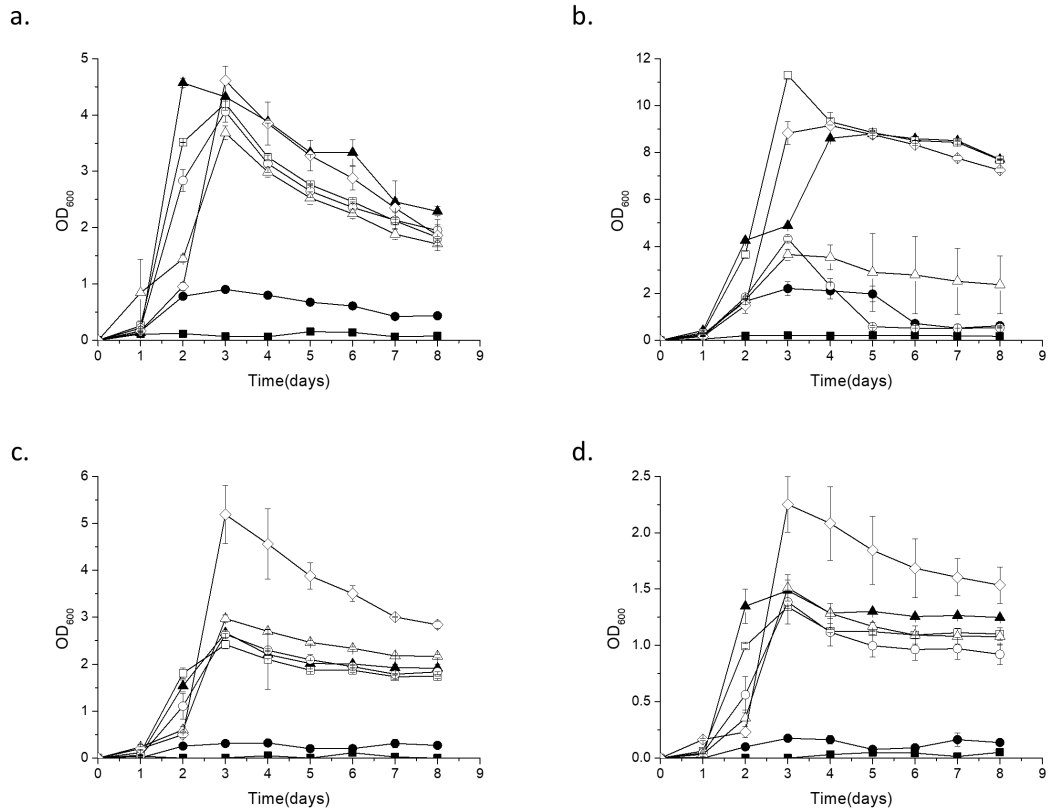


Fig. 22. Effect of cell culture supernatant of *Methylosinus* sp. JR31 obtained from different culture times on growth of several vitamin-requiring MOBs. *Methylomonas* JR07 (a), JR09 (b), JR29 (c), and JR30 (d). Symbols: (■) no addition, (●) 3 days, (▲) 5 days, (□) 7 days, (○) 9 days, (△) 11 days, and (◇) 13 days.

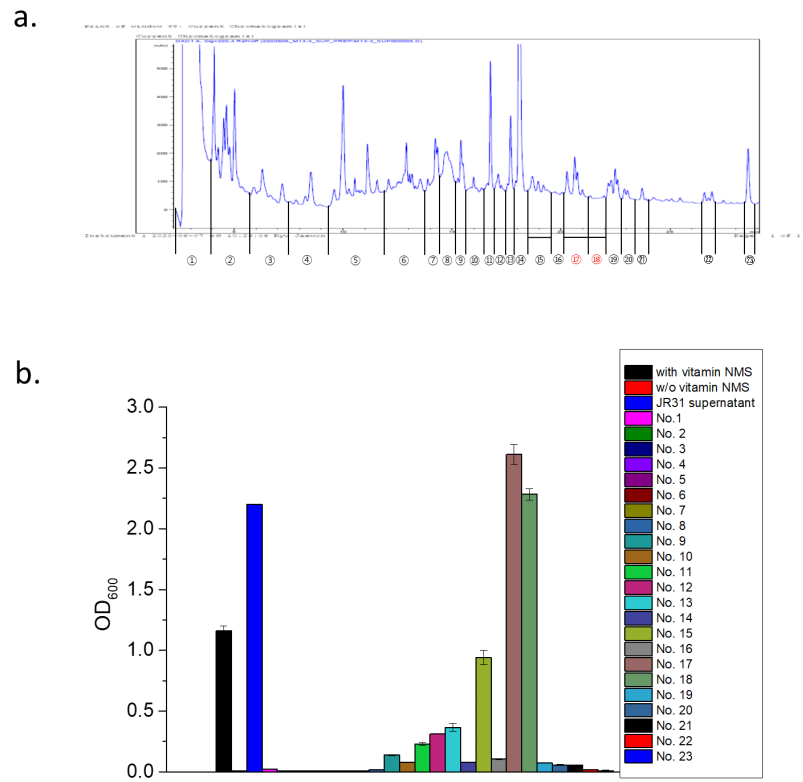


Fig. 23. HPLC profile of cell culture supernatant of *Methylosinus* JR31 (a), and effect of HPLC fractions on the growth of vitamin-requiring *Methylomonas* JR29.

다. *Methylosinus* sp. JR31 균주의 대사체 분석

JR31 균주의 배양상등액을 HPLC로 분획하여 농축한 시료 중 비타민 요구 균주에 대한 생리촉진활성을 테스트하고, fraction No. 11 ~ 20 분획물을 대사체 분석에 사용하였다. 시료는 MetaMass사에 분석을 의뢰하여 GC-TOF-MS와 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 통하여 분석한 후, Metalign software를 이용하여 MS data를 처리하고, 이를 SIMCA-P+ software를 사용하여 다변량 통계분석을 수행하였다. 그 결과, GC-TOF-MS 분석에서 각 분획물간 chromatogram은 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 24).

이 자료를 기반으로 다변량 통계분석을 수행한 결과, PCA 상에서 fraction No. 13과 14에서 다른 분획물과는 다르게 PC1(9.30%)와 PC2(6.53%)에 의해 나뉘는 현상을 보였다 (Fig. 25a). PCA기반 3D-plot에서는 비타민 요구 균주에 대한 활성 테스트에서 강한 활성을 보인 fraction No. 17과 18이 서로 다르게 cluster됨을 확인하였다 (Fig. 25b). Fraction No. 16 ~ 19를 별도로 sorting하여 다시 통계분석을 수행하였다. 그 결과, PCA 상에서 fraction No. 17과 18은 각각 cluster 되며, fraction No. 16과 19는 뭉쳐서 cluster 됨을 확인하였다. 따라서 Fraction No. 17과 18은 GC-TOF-MS를 통해 분석된 물질의 구성이 서로 다를 수 있음을 암시한다 (Fig. 26a). PLS-DA 모델분석도 PCA와 동일한 결과를 보였다 (Fig. 26b). PLS-DA 모델분석 결과가 유의한 범위에 들지는 않지만 활성 물질을 추적하기 위하여 다른 분획물과 차이가 나는 1차 대사체를 분석하였다. Fraction간 차이가 나는 대사체는 총 13종이 확인(Organic acids: 2종 / Fatty acids and Lipids: 4종 / Etc.: 1종 / Non-Identifications (N.I.): 6종)되었다 (Table 14). 차이가 나는 1차 대사체의 함량을 비교한 결과, fraction No. 16과 19에는 거의 존재하지 않았고, fraction No. 17과 18에 많이 존재하는 대사체는 Elaidic acid로 분석되었다 (Table 15). Elaidic acid는 불포화 트랜스 지방산으로 일반적으로는 미생물의 성장을 촉진하는 물질로 알려진 바는 없다.

HPLC fraction No. 11 ~ 20을 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 분석한 결과는 그림 27과 같다. GC-TOF-MS 분석에서보다는 chromatogram이 분획물간에 차이가 나타났다. 이 결과를 바탕으로 다변량 통계분석을 수행하였다. PCA 상에서 fraction No. 11과 15가 다른 fraction과 다르게 cluster 됨을 확인하였고, 나머지 fraction은 같이 cluster 되는 것이 확인되었다 (Fig. 28a). PCA기반 3D-plot의 분석 결과, fraction No. 11, 15, 17, 18이 다르게 cluster 되었고, 나머지 fraction (No. 12, 13, 14, 16, 19, 20)들은 같이 cluster 되어 있었다 (Fig. 28b). 활성물질 추적을

위해 활성 fraction No. 16 ~ 19를 따로 sorting 하여 다시 통계분석 수행하였다. PCA 상에서 fraction No. 16 ~ 19 모두 각각 cluster 되었고, PLS-DA 모델에서도 fraction No. 16 ~ 19 모두 각각 cluster 되었다 (Fig 29). PLS-DA 모델이 유의적이지는 않지만, 활성물질을 추적하기 위해서 PLS-DA 모델을 기반으로 하여 그 분포가 차이나는 대사체분석을 수행하였다. Fraction 간 차이가 나는 대사체를 확인한 결과 총 14개의 대사체를 확인하고 (Table 16), 14개 중 1개의 대사체를 동정하였다. 차이가 나는 대사체의 함량 비교 결과, 5개의 대사체 (N.I. 1 ~ 5)는 fraction No. 17에서 상대적으로 높은 함량을 보였고, 9개의 대사체 (N.I. 6 ~ 13 & Amino-methyl-oxononanoicacid)는 fraction No. 18에서 상대적으로 높은 함량을 보였다 (Table 17). UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 결과 동정되지 않는 많은 생리활성 후보물질이 있으므로 추가적인 구조분석이 필요하다.

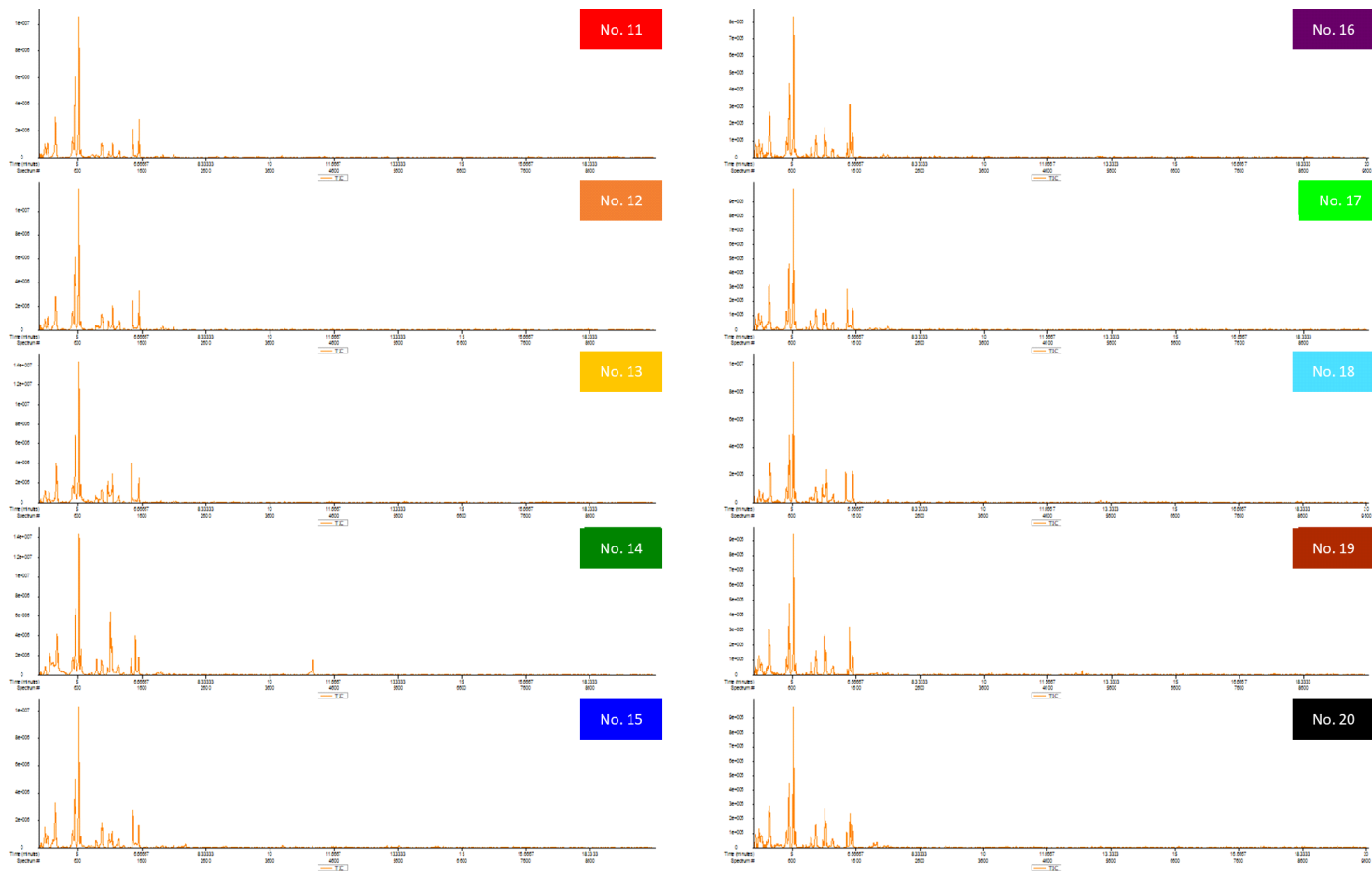


Fig. 24. Chromatogram of GC-TOF-MS of HPLC fraction No. 11 ~ 20.

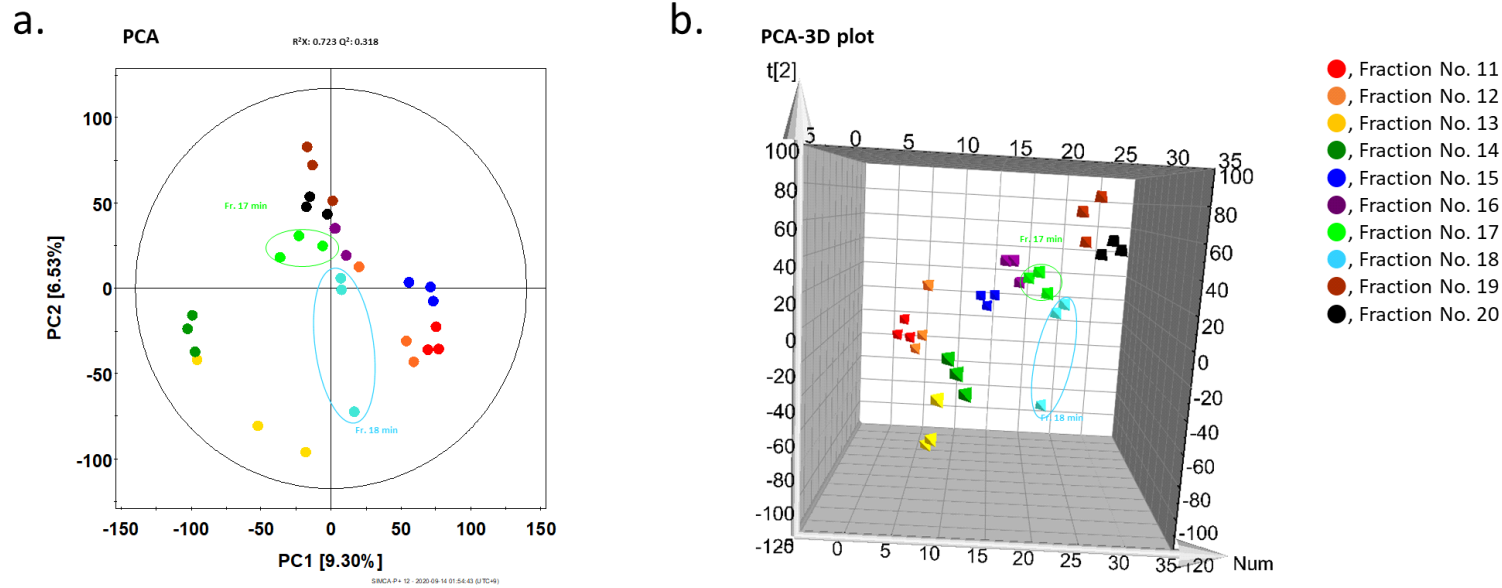
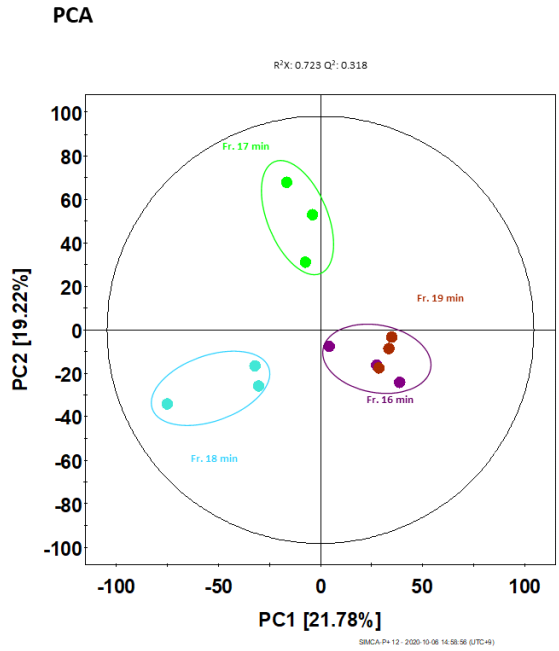


Fig. 25. PCA and PCA-3D plot of HPLC fraction No. 11 ~ 20 analyzed by GC-TOF-MS.

a.



b.

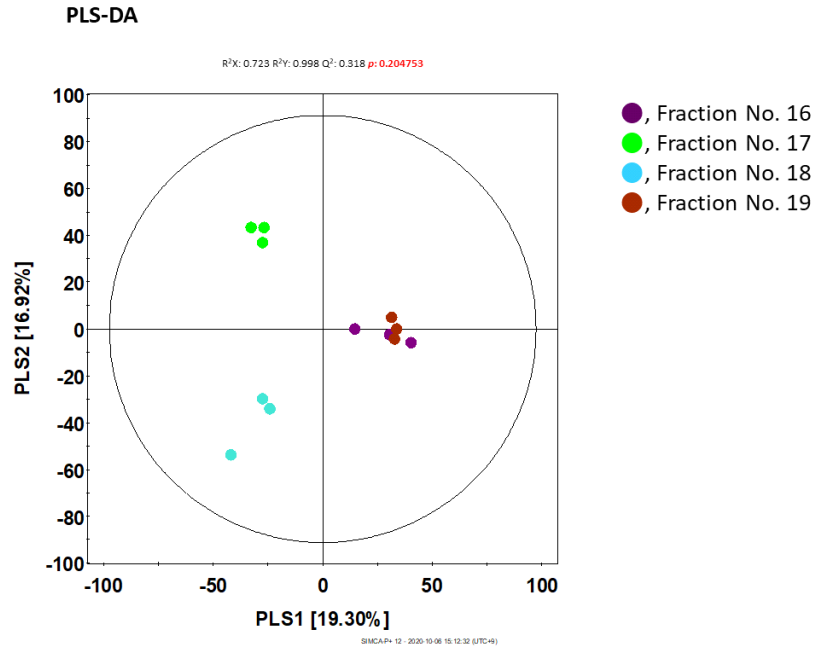


Fig. 26. PCA and PLS-DA plot of HPLC fraction No. 16 ~ 19 analyzed by GC-TOF-MS.


Table 14. Identification of differential primary metabolites
(VIP>1.0, p-value<0.05)

No.	VIP1	VIP2	Tentative Identifications	Ret (min) ^a	Unique Mass (<i>m/z</i>)	MS Fragment pattern (<i>m/z</i>)	REF ^b
1	1.58	1.34	N.I. 1	4.13	84	171, 73, 172, 79, 64, 52, 173, 58, 186	- ^c
2	1.67	1.38	N.I. 2	4.20	234	77, 73, 79, 110, 52, 69, 138, 58, 51	-
3	1.66	1.43	Lactic acid	5.07	117	73, 147, 117, 79, 52, 75, 66, 148, 191	STD/M S
4	0.78	1.32	N.I. 3	5.47	112	147, 73, 75, 85, 69, 66, 204, 57, 148	-
5	1.68	1.41	N.I. 4	5.51	204	147, 73, 66, 204, 148, 59, 79, 52, 57, 149	-
6	0.98	1.39	Hydroxylamine	5.61	146	73, 133, 146, 59, 119, 147, 86, 130, 74	STD/M S
7	1.97	1.49	N.I. 5	6.07	148	147, 73, 116, 75, 101, 148, 55, 79, 59	-
8	1.29	1.47	N.I. 6	7.18	186	73, 186, 142, 59, 84, 75, 56, 86, 201	-
9	0.88	1.57	Glycerol	7.19	103	73, 147, 103, 117, 205, 133, 75, 299	STD/M S
10	1.57	1.35	Fumaric acid	7.83	245	147, 73, 245, 75, 52, 55, 83, 76, 143, 115	STD/M S
11	1.89	1.62	Plamitic acid	13.05	117	73, 75, 117, 132, 129, 55, 145, 313	STD/M S
12	2.12	1.58	Elaidic acid	14.10	117	75, 73, 79, 117, 129, 147, 51, 81, 67, 339	STD/M S
13	1.72	1.66	Stearic acid	14.23	117	73, 117, 132, 129, 55, 145, 57, 69, 341	STD/M S

^aRetention time; ^bIdentification, Metabolites identified based on the in-house library of standard compounds (STD/MS: Standard compounds/Mass spectrometry fragments); ^cnot detected.

Table 15. Comparison of differential primary metabolites

No. 16	No. 17	No. 18	No. 19	Tentative Identifications
1.09	0.98	0.87	1.06	N.I. 1
1.08	0.98	0.90	1.03	N.I. 2
1.02	0.94	0.99	1.05	Lactic acid
0.99	1.14	0.74	1.13	N.I. 3
0.99	0.93	0.70	1.37	N.I. 4
0.99	1.08	0.81	1.12	Hydroxylamine
1.03	0.97	0.95	1.05	N.I. 5
0.79	0.85	1.47	0.89	N.I. 6
0.91	1.66	0.70	0.74	Glycerol
0.91	0.99	1.38	0.73	Fumaric acid
0.71	0.97	1.63	0.70	Palmitic acid
0.21	1.53	2.25	0.01	Elaidicacid
0.64	0.84	1.79	0.73	Stearic acid



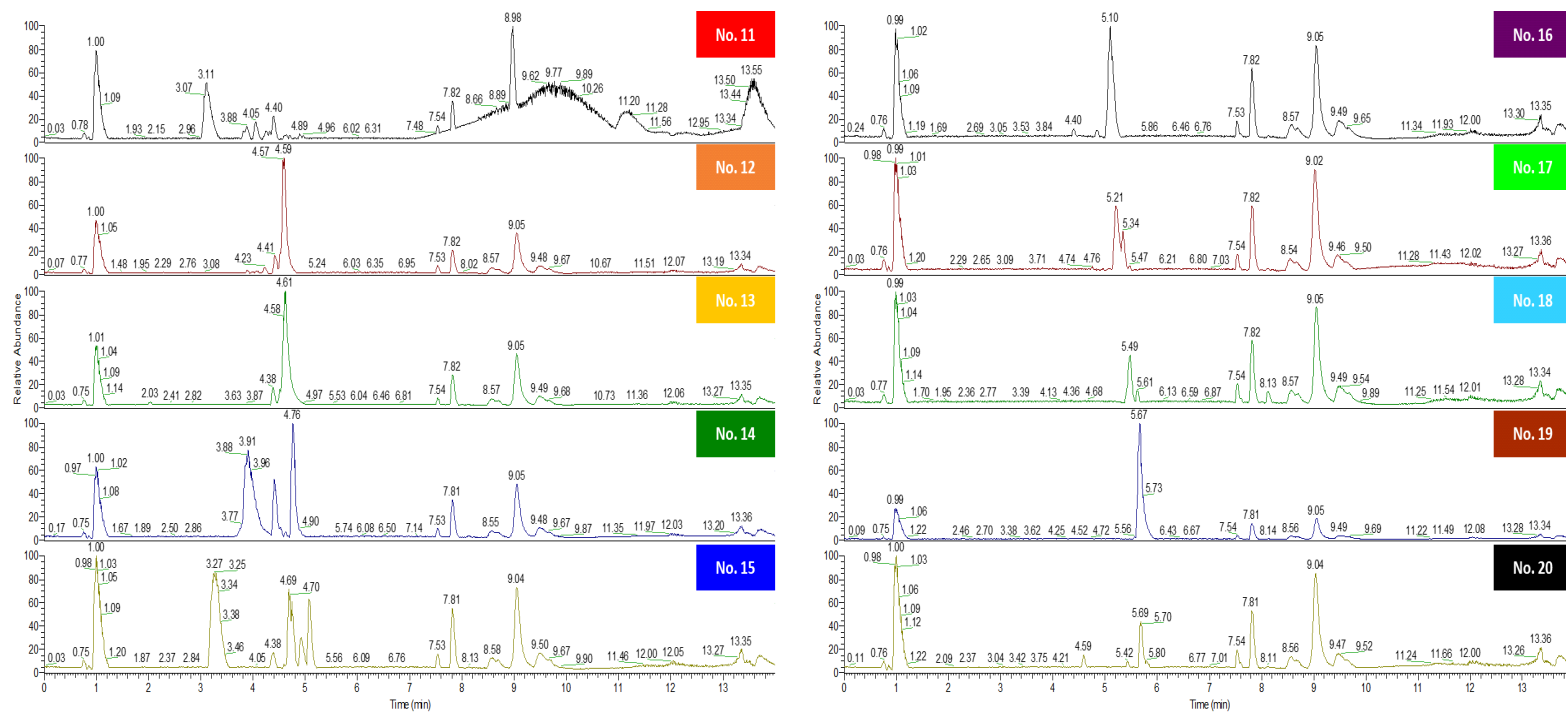
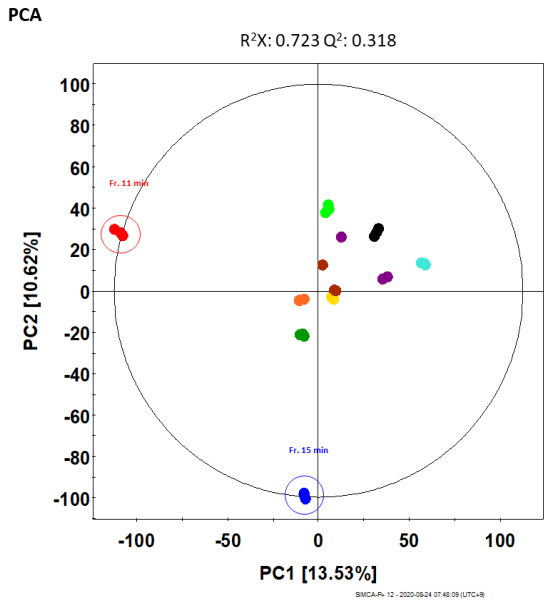


Fig. 27. Chromatogram of UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS of HPLC fraction No. 11 ~ 20.

a.



b.

PCA-3D plot

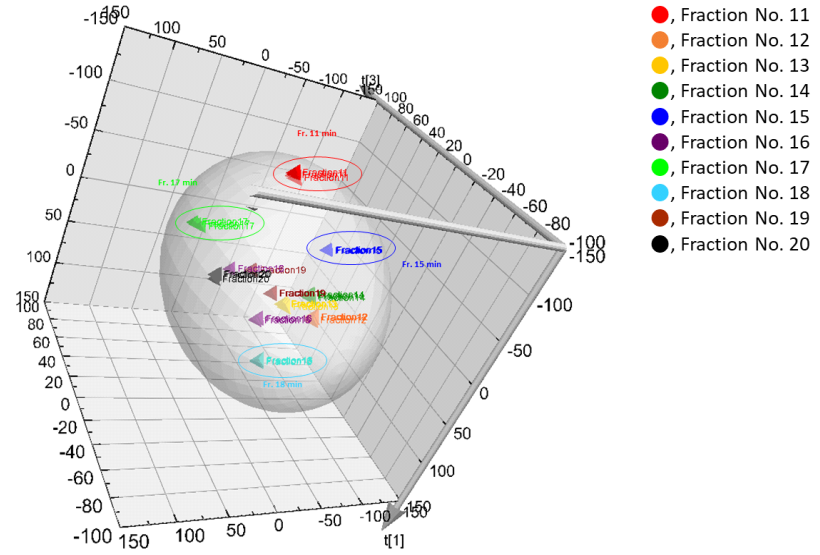
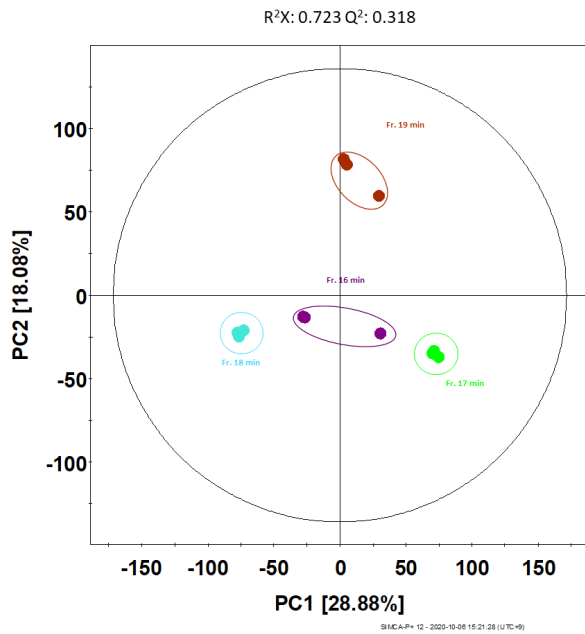


Fig. 28. PCA and PCA-3D plot of HPLC fraction No. 11 ~ 20 analyzed by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS.

a.

PCA



b.

PLS-DA

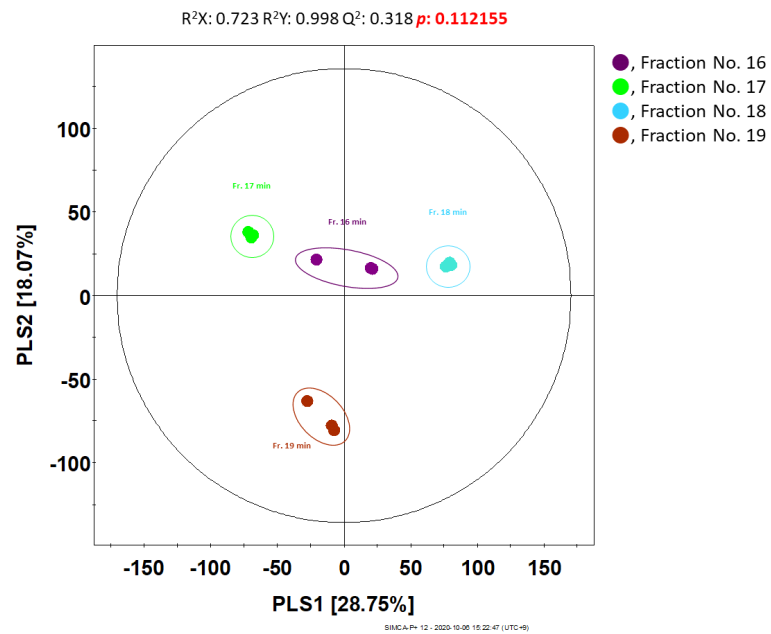


Fig. 29. PCA and PLS-DA plot of HPLC fraction No. 16 ~ 19 analyzed by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS.

Table 16. Identification of differential primary metabolites

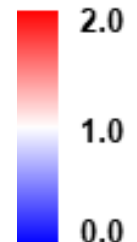
(VIP>1.0, p-value<0.05)

No.	VIP1	VIP2	Tentative Identifications	Ret (min) ^a	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻	M.W. ^b	Molecular formula	ΔPP M	ID ^c
1	1.20	1.28	N.I. 1	5.19	-	264.12	- ^d	-		-
2	1.46	1.32	N.I. 2	5.21	561.14	559.13	560	-		-
3	1.46	1.33	N.I. 3	5.23	342.05	340.31	341	-		-
4	1.45	1.32	N.I. 4	5.35	417.02	415.01	416	-		-
5	1.51	1.26	N.I. 5	5.35	457.15 ^e	433.16	434	-		-
6	1.64	1.16	N.I. 6	5.36	530.29	528.28	529	-		-
7	1.63	1.21	N.I. 7	5.39	631.29	629.33	630	-		-
8	1.64	1.16	Amino-methyl-oxononanoic acid	5.49	202.14	200.13	201	C ₁₀ H ₁₉ NO 3	2.315	CC D
9	1.63	1.21	N.I. 8	5.53	386.04	384.03	385	-		-
10	1.63	1.21	N.I. 9	5.57	356.06	354.05	355	-		-
11	1.63	1.21	N.I. 10	5.59	-	481.19	-	-		-
12	1.63	1.21	N.I. 11	5.61	-	388.19	-	-		-
13	1.63	1.21	N.I. 12	5.62	-	451.01	-	-		-
14	1.62	1.21	N.I. 13	5.63	431.04	429.03	430	-		-

^aRetention time; ^bMolecular weight; ^cIdentifications. CCD, The dictionary of natural products; ^dunknown or not detected; ^e[M+Na]⁺

Table 17. Comparison of differential primary metabolites

No. 16	No. 17	No. 18	No. 19	Tentative Identifications
0.01	3.34	0.65	0.01	N.I. 1
0.01	3.91	0.03	0.04	N.I. 2
0.03	3.95	0.01	0.00	N.I. 3
0.01	3.92	0.04	0.03	N.I. 4
0.27	2.93	0.27	0.53	N.I. 5
0.02	0.03	3.33	0.62	N.I. 6
0.02	0.01	3.95	0.02	N.I. 7
0.00	0.02	3.47	0.50	Amino-methyl-oxononanoic acid
0.01	0.01	3.96	0.03	N.I. 8
0.01	0.02	3.94	0.04	N.I. 9
0.02	0.02	3.94	0.02	N.I. 10
0.02	0.02	3.94	0.02	N.I. 11
0.03	0.03	3.92	0.03	N.I. 12
0.00	0.04	3.95	0.01	N.I. 13



라. 메탄산화세균과 대장균의 혼합배양

MOB는 최초로 보고된 이후 수많은 연구가 있었으나 분자생물학적인 도구가 많이 개발되지 못하여 MOB의 특성 연구 및 유용물질의 생산 등에 효과적으로 이용하기 어려운 점이 많았다. 대장균은 많은 연구를 통하여 다양한 분자생물학적 도구가 개발되었고, 따라서 대장균 유래의 물질이 아닌 다양한 유용물질의 생산에 적합하도록 개발되었다. 따라서 MOB와 대장균이 상호작용하면서 혼합배양이 가능하게 되면 메탄을 탄소원으로 다양한 유용물질을 생산할 수 있게 된다. 따라서 이러한 가능성을 탐색하고자 MOB와 대장균의 혼합배양을 시도하였다. 그 결과 JR01, JR02, JR14, JR18과 같은 몇 종의 신규 분리한 MOB가 *E. coli* BL21과의 혼합배양에서 지체기가 짧아지고, 메탄 소비도 빨라지면서 성장하는 것을 확인하였다 (Fig. 30). 이러한 결과는 앞서 MOB와 공생 종속영양세균과의 혼합배양에서 메탄의 소비속도가 증가하는 것과 유사한 것이며, 이를 통해 대장균을 통한 다양한 유용물질의 생산뿐만 아니라 MOB 자체의 성장속도도 증가시켜 결과적으로 메탄을 유용물질로 전환하는 속도도 증가시킬 수 있는 가능성을 보여준다. 주목할 만한 점은 이 네 가지종 모두 MOB의 분류상 Type II에 해당하는 *Methylosinus*와 *Methylocystis*라는 점이다. 이것은 Type II MOB의 대사과정에서 공통적인 어떤 점이 대장균과의 혼합배양에서 메탄소비를 증가시키는 것과 관련되었을 가능성이 있음을 암시한다.

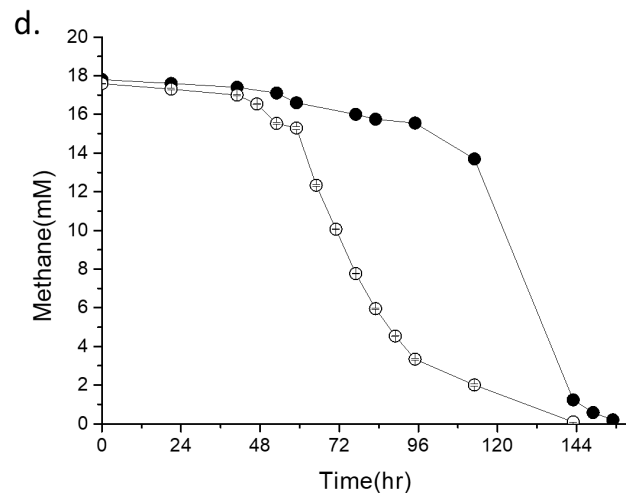
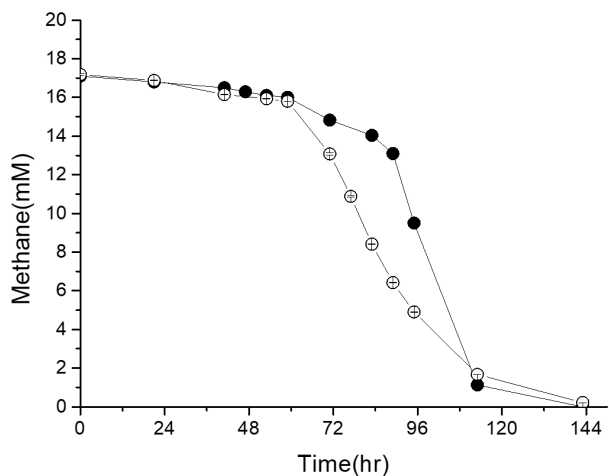
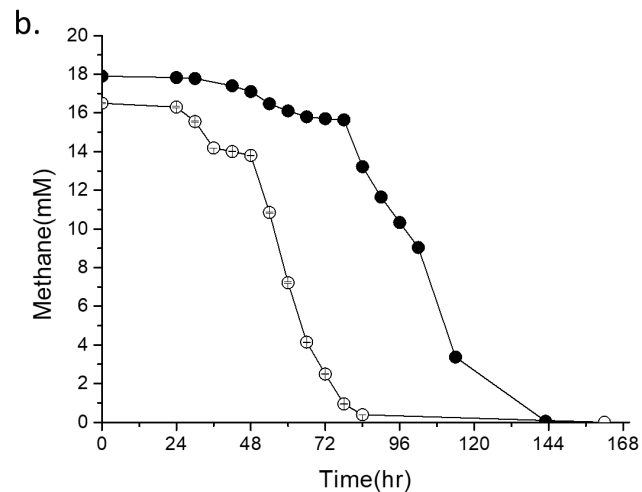
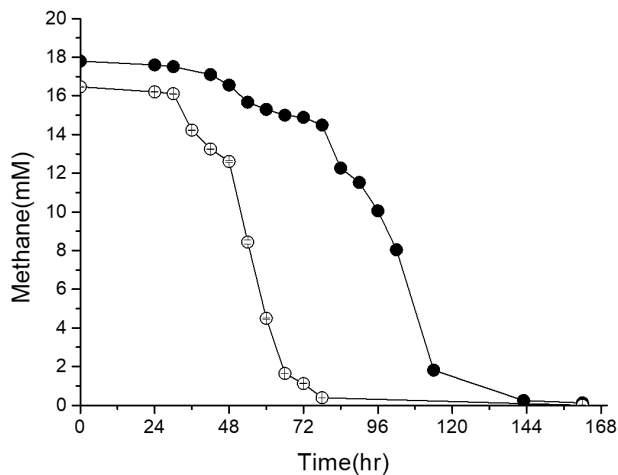


Fig. 30. Comparison of methane consumption in pure (●) and mixed (○) culture of MOBs with *E. coli* BL21. MOBs used were *Methylosinus* JR01 (a), *Methylocystis* JR02 (b), *Methylosinus* JR14 (c), and *Methylocystis* JR18 (d).

제5장 결론

1. 전라남도내 28개소에서 채취한 토양시료를 NMS배지와 메탄/공기의 비가 5:5인 혼합가스를 이용하여 3단계의 농화배양을 실시하고 농화배양액을 고체배지에 희석평판도말하여 배양후 형성된 콜로니를 재배양하여 28종의 메탄산화세균을 순수분리하였다. 그리고 농화배양액의 첫 번째 고체배양시 나타났던 콜로니중 2번째 고체배양에서 자라지 못한 콜로니는 LB 고체배지에 재접종하여 콜로니가 형성되면 재배양하여 23종의 종속영양세균을 순수분리하였다.
2. 순수분리된 메탄산화세균은 16S rRNA gene analysis를 통하여 type I에 속하는 *Methylomonas*속 7종, *Methylophilus*속 3종, *Methylosarcina*속 2종이 분리되었고, type II에 속하는 *Methylosinus*속 13종, *Methylocystis*속 3종이 확인되었다. 그리고 종속영양세균은 토양에서 흔히 발견되며 *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudacidoborax*, *Variovorax*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Cupriavidus* 등이 골고루 발견되었고, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Doknonella*와 같이 하천이나 슬러지등에서 발견되는 종도 확인되었다. 그 외 *Acidoborax*, *Microbacterium*, *Micrococcus* 속의 종들도 동정 되었다.
3. 선별된 9개의 MOB의 specific growth rate (μ /hr)를 측정한 결과, 0.031 - 0.178 사이의 값을 나타냈으며, doubling time은 3.89 - 22.35 시간 정도로 나타났다. Type I에 속하는 *Methylomonas*속과 type II에 속하는 *Methylosinus*속, *Methylocystis*속이 빠른 성장속도를 보였으며, 분리한 모든 MOB중에서 가장 빠른 성장속도를 보인 균주는 JR09 균주로 *Methylomonas* 속이었다.
4. *Methylocystis* sp. JR02 균주는 배지 내 phosphate의 농도가 감소함에 따라 유백색 또는 붉은색의 pigment를 생산하였다. 이 pigment는 배양액내로 분비되지 않았으며, 메탄올, 부탄올 등의 유기성 용매에의하여 쉽게 분리되었다. 이 색소는 용매 조건에 따라 물에서는 495~497 nm와 533 nm에서, 메탄올에서는 467 nm 535 nm, 아세토나이트릴에서는 469, 528 nm에서 최대 흡광도를 나타냈다. 또한, 메탄올을 용매로 산성 조건에서 535 nm의 흡광도가 크게 증가하였으며, 염기성 조건에서 467 nm 파장의 흡광도가 급격히 증가하였다. JR02 균주가 생산한 색소를 추출 정제하여 LC-MS/MS를 이용하여 구조분석한 결과, prodigiosin analogues인 2-methyl-3-heptyl prodigionine과 2-methyl-3-octyl prodigionine으로 확

인되었다.

5. *Methylocystis* sp. JR02 균주가 생산한 색소 추출물을 이용하여 몇 가지 인간 암세포를 대상으로 cell viability test를 한 결과, cell viability가 50% 이하로 떨어지는 농도는 전립선암 세포주인 LNCap와 PC3에서 15.6, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 폐암 세포주인 NCI-H460에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 나왔다. 비교 대상으로 immortalized cell line인 HaCaT에서는 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이하의 cell viability를 보였다
6. *Methylocystis* sp. JR02 균주가 색소를 생산하는데 배지내 phosphate의 농도가 결정적인 역할을 하는 것으로 확인되었다. 배지내 phosphate 농도가 4.2, 0.42 mM일 때 JR02 균주는 잘 자랐으나 색소를 생산하지 않았고, phosphate 농도가 0.042 mM일 때 prodigiosin analogues의 생산량이 70.3 mg/L로 최대를 이루었다. 기존에 잘 알려진 *Serratia marcescens* 종의 prodigiosin의 생산에 최적화된 결과와 비교하였을 때, JR02 균주의 prodigiosin analogues의 생산량은 비록 생산량이 적기는 하지만 메탄을 탄소원으로만 사용하는 MOB가 생산하는 양을 측정한 것은 본 연구가 최초이다.
7. *Methylocystis* sp. JR02 균주의 유전체를 분석한 결과, 총 다섯 개의 contigs로 구성되어 있고, 전체 유전체의 크기는 4.4 Mbp에 GC content는 63.39% 였다. Contig1~5의 크기는 3,885,632, 311,335, 158,371, 4,565, 3,015 bp 였다. Contig1은 전체 게놈의 coding sequence(CDS)의 88.5%에 해당하는 3,624개의 CDS를 갖고 있으며 다른 contig에는 존재하지 않는 55개의 tRNA gene과 9개의 rRNA gene을 갖고 있는 것으로 확인되어 contig1이 bacterial chromosomal DNA인 것으로 확인되었다.
8. *Methylocystis* sp. JR02 균주는 MOB에만 존재하는 pMMO와 sMMO를 구성하는 유전자군을 contig1에 갖고 있었다. 세 쌍의 pMMO α 와 β subunit은 6S rRNA 유전자 분석 결과와 유사하게 *Methylocystis* 속과 가장 유사한 것으로 확인되었다. sMMO의 구성 유전자인 methane monooxygenase component A, B, C의 분석에서는 *Methylosinus* 속과 상동성이 가장 높았으며, methane monooxygenase component D는 *Methylocystis* 속과 가장 상동성이 높았다.

9. Prodigiosin 관련 유전자군중 *pigC*, *pigD*, *pigE*, *pigF*, *pigG*, *pigH*, *pigI*, *pigJ*, *pigM*, *pigA*이 contig2에서 확인되었다. 각 유전자의 protein blast를 수행한 결과 *Hahella chejuensis*, *Zoshikella ganhwensis*, *Janthinobacterium lividum*, *Rugamonas rubra*, *Massilia* sp.등 다양한 종류의 prodigiosin 생합성 유전자군과 상대적으로 상동성이 높은 것으로 나타났으나, 잘 알려진 *Serratia* 속의 prodigiosin 생산 균주의 유전자군과는 상동성이 낮았다. contig2는 크기가 약 311 kbp로 plasmid 크기이고 상기한 특징들을 고려할 때, 이 유전자군이 horizontal gen transfer에 의하여 외부로부터 유래했을 가능성을 내포한다. 그 외에 prodigiosin의 생합성을 조절하는 유전자들인 *tamA*, *tamB*, *rapA* 등이 contig1에서 확인되었다.
10. 일반적으로 세포내 phosphate uptake에 관련된 *phoR*, *phoB* gene은 phosphate의 농도에 따라 prodigiosin 생합성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 유전자들은 contig1에서 확인되었다. 이 유전자를 상동성 분석한 결과, *Methylocystis* 속 균주들의 유전자와 상대적으로 유사하였다.
11. *Methylosinus* sp. JR31 균주의 배양상등액은 cobalamin (vitamin B₁₂)이 요구되는 MOB 균주(JR07, JR09, JR29, JR30)의 성장을 촉진하는 효과를 보였다. *Methylomonas* sp. JR07 균주의 경우 JR31 균주의 배양 상등액을 첨가하면 단순히 배양농도의 증가뿐 아니라 성장 속도도 빨라졌다. JR31 균주의 배양기간에 따라 얻은 배양 상등액의 활성테스트에서 JR07 균주는 배양 7일 이후의 상등액에서는 거의 동일한 정도의 활성을 보였다. *Methylosinus* sp. JR31 균주의 배양상등액을 농축, 정제하여 얻은 fraction의 활성 테스트 결과, fraction No. 17(20.1~21.0min), 18(21.2~22.0min)에서 가장 좋은 활성을 보였고 fraction No. 15(18.5~19.5min)에서도 약간의 활성이 나타났다. fraction No. 11 ~ 20 분획물을 대사체 분석한 결과, GC-TOF-MS를 통한 대사체 분석에서는 생리활성이 있는 17, 18번 fraction만 존재하는 대사체가 Elaidic acid로 확인되었으나 이 물질은 일반적으로 미생물의 성장을 촉진하는 물질로 알려진 바는 없다. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 통한 대사체분석 결과 총 14가지의 대사체가 17, 18번 fraction에만 존재하는 것으로 나왔으며, 이 중 1개의 대사체만 Amino-methyl-oxononanoicacid로 확인 되었다. 14종의 대사체중 5개의 대사체 (N.I. 1 ~ 5)는 fraction No. 17에서 상대적으로 높은 함량을 보였고, 9개의 대사체 (N.I. 6 ~ 13 & Amino-methyl-oxononanoicacid)는 fraction No. 18에서 상대적으로 높은 함량을 보였다.

제6장 참고문헌

1. Anthony, C. (1982). The biochemistry of methylotrophs. *Academic Press Ltd.* London.
2. Hanson, R.S. and Hanson, T.E. (1996). "Methanotrophic Bacteria." *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, p. 439-471.
3. Shöngen, N.L. (1906). "Über bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen. *Parasitenkd. Infectionskr.*" Abt. 2. (15):513-517.
4. Whittenbury, R. Philips, K.C. and Wilkinson, J.F. (1970) "Enrichment, isolation and some properites of methane utilizing bacteria" *J. Gen. Microbiol.* 61:205-218
5. Whittenbury, R. Dalton, H. starr, M.P. Stolph, H. Truger, H.G. Balows, A. and Schleifer, H.G. (1981). *The prokaryotes: The methylotrophic bacteria.* Springer-Verlag KG. Berlin. pp. 894-902.
6. Whittenbury, R., and Krieg, N.R. (1984). *Methylococcacea* fam. nov., In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 256-262.
7. Dedysh SN, Knief C (2018) Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs. In: Kalyuzhnaya MG, Xing XH (eds) *Methane biocatalysis: paving the way to sustainability.* Spinger, Cham, pp 17-42
8. Galchenko, V.F., and L.V. Andreev. (1984). Taxonomy of obligate methylotrophs. In R.L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbialgrowth on C1 compounds.* American Society for Microbiology, Washington,D.C. p. 269-281.
9. Hanson, R.S., Netrusov, A.I. and Tsuji, K. (1991). The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus* and related bacteria. In A. Balows, H.G. Tru`per, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes.* Springer-Verlag, New York. p. 2350-2365.
10. Whittenbury, R. and Dalton, H. (1981). The methylotrophic bacteria. In M. P. Starr, H. Stolph, H. G. Tru`per, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes.* Springer-Verlag KG, Berlin. p. 849-952.
11. Whittenbury, R. and Kreig, N.R. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology: methylococcaceae* fam. nov.. vol. 1., The williams & Wilkins Co. Baltimore. pp. 256-262.

12. Whittenbury, R. (1981). *Microbial growth on C₁ compounds*: The interrelationship of autotrophy and methylophony as seen in *Methylococcus capsulatus*(Bath). Heyden London. pp. 181-190.
13. Bowman, J.P. Sly, L.I. Nichols, P.D. and Hayward, A.C. (1993). "Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *methylococcus*, validation of *methylosinus* and *methylocystis* species, and proposal that the family *methylococcaceae* includes only the group | methanotrophs." int. J. Syst. Bacteriol. (43): 735-753.
14. Bowman, J.P. sly, L.I and stackerbrandt, E. (1995). "The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (45) : 182-185.
15. Adrian Ho, Karen de Roy, Olivier Thas, Jan De Neve, Sven Hoefman, Peter Vandamme, Kim Heylen, and Nico Boon (2014) The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity, ISME J. 8, 1945-1948
16. Iguchi, H., Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2011). Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia, *Appl. Environ. Microbiol.* 77(24):8509-8515
17. Iguchi, H., Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2015). Interactions of Methylophony with Plants and Other Heterotrophic Bacteria, *Microorganisms*. 2, 137-151
18. van der Ha D., Nachtergaele L., Kerckhof F.M., Rameiyanti D., Bossier P. Verstraete W., Boon N. (2012). Conversion of Biogas to Bioproducts by Algae and Methane Oxidizing Bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 46(24):13425-13431
19. IPCC (1997) "Revised 1996 IPCC Guidelines-3", 1.33~1.35.
20. INTECH. (2017) Conversion of Non-Homogeneous Biomass to Ultraclean Syngas and Catalytic Conversion to Ethanol.
21. Klerk, A.D. (2015). Engineering evaluation of direct methane to methanol Conversion, *Energy Sci. Eng.* 3(1):60-70
22. XIN, J.Y. (2004). Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. *Biocatalysis and Biotransformation*. 22(3), 225-229.
23. Bowman, J.P. Skertratt, J.H. Nichols, P.D. and Sly. L.I. (1991). "Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria.: *FEMS Microbiol. Ecol.* (85): 15-22.
24. Higgins, I.J. and Quayle, J.R. (1970). "Oxygenation of methane by methane grown

- Pseudomonas methanica* and *methanomonas methanoxidans*.” *Biochem. J.* (118): 201-208.
25. Park, S.H. (1993). “Production of methanol by resting cells of *methylosinus trichosporium* OB3b.” *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* (8): 341-350
 26. Hwang, I.Y., Lee, S.H., Choi, Y.S., Park, S.J, Na, J.G., Chang, I.S., Kim, C., Kim, H.C., Kim, Y.H., Lee. J.W. and Lee E.Y. (2014) “Biocatalytic conversion of methane to methanol as a key step for development of methane-based biorefineries”, *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(12): 1597-1605
 27. Metha, P.K. Mishra, S. and Ghose, T.K. (1991) “Methanol biosynthesis by covalently immobilized cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b: Batch and continuous studies.” *Biotechnol. Bioeng.* 37: 551-556
 28. Patras, L.E. and Tang, A. (1988). Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. p. 270
 29. Shimoda, M.S. and Okura. I. (1989) Abstract of international Chemical Congress of Pacific Basin Society, Abstract No. Bios. pp.04-307
 30. Chin, C., Alexander, D. H, Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., Turner, S. W. and Korlach J. (2013). “Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data.” *Nat. Methods* 10: 563-569.
 31. Walker, B. J., Aveel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, S. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, A. K and Earl, A. M. (2014) “Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement.” *PLoS ONE* 9(11): e112963.
 32. Seemann, T. (2014) “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.” *Bioinformatics* 30(14):2068-2069
 33. Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa S., Kuhn, M., Jensen, L. J., Mering, C. and Bork, P. (2016) “eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences.” *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D286-293
 34. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. and Koonin, E. V. (2000) “The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution.” *Nucleic Acids Res.* 28(1):33-36

35. Jones, P., Binns, D., Chang, H., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S., Lopez, R. and Hunter, S. (2014) "InterProScan 5: genome-scale protein function classification." *Bioinformatics* 30(9):1236-1240
36. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T. L. (2009) "BLAST+: architecture and applications." *BMC bioinformatics* 10:421
37. Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J. and Marra M. A. (2009). "Circos: An information aesthetic for comparative genomics." *Genome Res* 19:1639-1645
38. Margalith, P. Z. (1992) *Pigment Microbiology*. London: Chapman & Hall.
39. Allen, E. G. (1967). "Conditions of the colour change of prodigiosin." *Nature* 216, 929-931.
40. Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: - Volume II Part C, Springer, New York. p.418
41. Yi, H., Chang, Y., Oh, H.W., Bae, K.S. and Chun, J. (2003) "Zooshikella ganghwensis gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1013-1018
42. Lee, J.S., Kim, Y.S., Park, S., Kim, J., Kang, S.J., Lee, M.H., Ryu, S., Choi, J.M., Oh, T.K. and Yoon, J.H. (2011). "Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1." *Appl. Environ. Microbiol.* 77(14):4967-4973
43. Starauss, D.G. and Berger, U. (1983). "Methylosin A und B, Pigmente aus *Methylosinus trichosporium*" *J. Basic Microbiol.* 12(10):661-668
44. Bennett, J.W. and Bentley, R. (2000). "Seeing red: The story of prodigiosin" *Adv. Appl. Microbiol.* 47:1-32
45. Heyer, J., Galchenko V.F., and Dunfield, P.F. (2002) "Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments" *Microbiol.* 148:2831-2846
46. Pandey, R., Chander, R., and Sainis, K.B. (2007) "Prodigiosins: A novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity" *Indian J. Biochem. Biophys.* 44:295-302
47. Darshan, N., and Manonmani, H.K. (2015) "Prodigiosin and its potential applications" *J. Food Sci. Technol.* 52:5393-5407
48. Kim, D., Kim, J.F., Yim, J.H., Kwon, S.K. and Lee C.H. (2008) "Marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms" *J. Microbiol.*

Biotechnol. 18:1621-1629

49. Witney, F.R. Failla, M.L. and Weinberg, E.D. (1976) "Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Serratia marcescens*" *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:1042-1046
50. Slater, H., Crow, M., Everson, L. and Salmond, G.P. (2003) "Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways" *Mol. Microbiol.* 47:303-320
51. Khanafari, A., Assadi. M.M. and Fakhr, F.A. (2006) "Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*" *Online J. Biol. Sci.* 6:1-13
52. Su, W.T., Tsou, T.Y. and Liu, H.L. (2011) "Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens*" *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42:217-222
53. Aruldass, C.A, Venil, C.K., Zakaria, Z.A. and Ahmad, W.A. (2014) "Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1" *Int. Biodeter. Biodegr.* 95:19-24
54. Liang, T.W., Chen, S.Y., Chen, Y.C, Chen, C.H., Yen, Y.H. and Wang, S.L. (2013) "Enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens* TKU011 and Its insecticidal activity relative to food colorants" *J. Food Sci.* 78:M1743-1751
55. Do, H.N.A. and Nguyen, T.H.K (2014) "Studies on the prodigiosin production from *Streptomyces coelicolor* in liquid media by using heated *Lactobacillus rhamnosus*" *J. Appl. Pharm. Sci.* 4:21-24
56. Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J. and Salmond, G.P. (2006) "The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines" *Nat. Rev. Microbiol.* 4:887-899
57. Coulhurst, S.J., Williamson, N.R., Harris, A.K.P., Spring, D.R., and Salmond, G.P.C. (2006) "Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities." *Microbiol.* 152:1899-1911
58. Williamson, N.R., Simonsen, H.T., Harris, A.K.P., Leeper, F.J., and Salmond, G.P.C. (2006) "Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin." *J. Ind.Microbiol. Biotechnol.* 33:151-158.
59. Iguchi, H., Yurimoto, H., and Sakai, Y. (2011) "Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia" *Appl. Environ. Microb.* 77:8509-8515.

60. Stock, M., Hoefman, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., De Vos, P., De Baets, B., Heylen, K., and Waegeman, W. (2013) "Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs" *Res. Microbiol.* 164:1045-1054.
61. Ho, A., De Roy, K., Thas, O., De Neve, J., Hoefman, S., Vandamme, P., Heylen, K., and Boon, N. (2014) "The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity" *ISME J.* 8:1945-1948
62. Jeong, S.Y., Cho, K.S., and Kim, T.G. (2014) "Density dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *Methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp" *Biotechnol. Rep.* 4:128-133
63. Veraart, A.J., Garbeva, P., van Beersum, F., Ho, A., Hordijk, C.A., Meima-Franke, M., Zweers, A.J., and Bodelier, P.L.E. (2018) "Living apart together-bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity" *ISME J.* 12:1163-1166
64. Jeong, S.Y. and Kim, T.G. (2019) "Development of a novel methanotrophic process with the helper micro-organism *Hyphomicrobium* sp. NM3" *J. Appl. Microbiol.* 126:534-544.
65. Singh, R., Ryu, J. and Kim, S.W. (2019) "Microbial consortia including methanotrophs: some benefits of living together" *J. Microbiol.* 57:939-952