



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

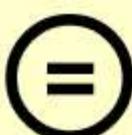
이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



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 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)



2008년 8월
석사학위논문

Methylosinus trichosporium
OB3b의 methanol
dehydrogenase 활성 조절에
의 한 메탄올 생합성

조선대학교 대학원

생물신소재학과

이상귀

Methylosinus trichosporium
OB3b의 methanol
dehydrogenase 활성 조절에
의한 메탄올 생합성

*Biosynthesis of methanol by controlling of
methanol dehydrogenase activity of *Methylosinus
trichosporium* OB3b*

2008년 8월 24일

조선대학교 대학원
생물신소재학과
이상귀

Methylosinus trichosporium
OB3b의 methanol
dehydrogenase 활성 조절에
의 한 메탄올 생합성

지도교수 김 시 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함.

2008년 4월

조선대학교 대학원
생물신소재학과
이상귀

이상규의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이인화 印

위원 조선대학교 교수 신현재 印

위원 조선대학교 교수 김시우 印

2008년 4월

조선대학교대학원

TABLE OF CONTENTS

<i>TABLE OF CONTENTS</i>	I
<i>LIST OF TABLES</i>	III
<i>LIST OF FIGURES</i>	IV
<i>ABSTRACT</i>	VI
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	12
1. 균주	12
2. 배양조건	12
3. 효소활성측정	18
4. <i>MDH</i> 저해제를 이용한 메탄올 생합성 조건 확립	20
5. <i>NaCl</i> 에 의한 형태 변화	23
6. 메탄에서 메탄올로의 전환 효율	24
7. <i>Repeated-batch system</i> 에 의한 메탄올 생합성 조건	25
8. 메탄올 대량생산을 위한 반응기 실험	25
9. 생합성된 메탄올 추출	26

III. 결과 및 고찰	29
1. 균주의 최적 배양 조건	29
(1) 배양방법에 따른 균주의 성장	29
(2) 구리농도에 따른 영향	29
(3) 균체의 비성장속도와 세대시간	30
2. 회분식에 의한 메탄을 생합성	35
(1) 메탄을 생합성 최적 조건 산출	35
(2) <i>NaCl</i> 에 의한 <i>M. trichosporium OB3b</i> 에 형태 변화 ..	40
(3) 메탄을 생합성 효율	46
3. <i>Repeated-batch system</i> 에 의한 메탄을 생합성	50
(1) <i>Repeated-batch system</i> 를 위한 조건 산출	50
(2) <i>Repeated-batch system</i> 에 의한 메탄을 생합성	50
4. 반응기를 이용한 메탄을 대량 생합성	54
(1) 반응기에서 균체 배양	54
(2) 반응기에서 메탄을 생합성	54
5. 생합성된 메탄을 종류	57
IV. REFERENCES	58

LIST OF TABLES

<i>Table 1. Classification and characterization of methanotrophs</i>	4
<i>Table 2. Composition and concentration of stock solution for Higgins nitrate minimal salt medium</i>	14
<i>Table 3. Comparison of the specific growth rate and generation time depending on the copper concentrations</i>	34

LIST OF FIGURES

<i>Fig. 1. Pathway for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde</i>	5
<i>Fig. 2. The methane oxidation pathway of methanotrophic bacteria and the role of particulate methane monooxygenase</i>	6
<i>Fig. 3. Injection of methane and air mixture into a flask ..</i>	15
<i>Fig. 4. Two types of mixed gas injection technique for the cultivation of methanotroph</i>	16
<i>Fig. 5. Methanol biosynthesis in small vial system</i>	21
<i>Fig. 6. Schematic diagram of methanol production reactor using <i>M. trichosporium</i> OB3b</i>	27
<i>Fig. 7. Distillatory apparatus for methanol extraction</i>	28
<i>Fig. 8. Effect of mixed gas injection on the growth for the <i>M. trichosporium</i> OB3b</i>	31
<i>Fig. 9. Effect of copper concentration on the growth of the <i>M. trichosporium</i> OB3b</i>	32
<i>Fig. 10. SDS-polyacrylamide electrophoresis of the proteins of <i>M. trichoporum</i> OB3b which were grown on the different copper concentrations</i>	33

<i>Fig. 11. Effect of sodium chloride concentration on methanol biosynthesis</i>	36
<i>Fig. 12. Effect of inhibitor concentration on methanol biosynthesis</i>	37
<i>Fig. 13. Effect of NaCl concentration on pMMO and MDH activity</i>	38
<i>Fig. 14. Effect of cell density on the methanol accumulation</i>	41
<i>Fig. 15. Effect of temperature on methanol biosynthesis</i>	42
<i>Fig. 16. Effect of sodium formate concentration on methanol biosynthesis</i>	43
<i>Fig. 17. Time-course of methanol biosynthesis by <i>M. trichosporium OB3b</i> under the optimum condition</i>	44
<i>Fig. 18. Morphological changes of intracytoplasmic membrane (ICM) and slime layer by NaCl concentration</i>	45
<i>Fig. 19. Conversion of methane to methanol by <i>M. trichosporium OB3b</i></i>	48
<i>Fig. 20. Time-course of methane consumption(○) and methanol production(●) by <i>M. trichosporium OB3b</i></i>	49
<i>Fig. 21. Inhibitory effect of initial methanol concentration on the pMMO activity(propene epoxidation assay)</i>	51

<i>Fig. 22. Effect of feeding factors on the methanol biosynthesis in the repeated-batch system</i>	52
<i>Fig. 23. Repeated-batch reaction methanol production with <i>M. trichosporium</i> OB3b</i>	53
<i>Fig. 24. Growth of <i>M. trichosporium</i> OB3b in the 3 L fermentor 55</i>	
<i>Fig. 25. Methanol biosynthesis by <i>M. trichosporium</i> OB3b in the 3 L fermentor</i>	56

Abstract

*Biosynthesis of methanol by controlling of
methanol dehydrogenase activity of *Methylosinus
trichosporium OB3b**

Lee, Sang Gui

Advisor : Prof. Kim, Si Wouk, Ph.D.

*Department of Bio Materials Engineering,
Graduate School of Chosun University*

A methanotrophic bacterium, *Methylosinus trichosporium OB3b*, was used to synthesize methanol from methane. Cell cultivation was performed by applying mixed gas (methane : air = 1:1, v/v) which was prepared in the tightly sealed gas reservoir to the nitrate minimal salt medium (NMS) medium using gas pump. The optimum pH and temperature for growth were pH 7.0 and 30°C, respectively, and the initial copper concentration was 5 µM. Cells were harvested by centrifugation and washed three times using 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). To biosynthesize methanol, methanol dehydrogenase (MDH) activity should be inhibited. The 200 mM of sodium chloride (NaCl) and EDTA 1 mM was used as a MDH inhibitor for the maximum production of methanol. The reaction temperature was 30°C, and the treated concentrations of cell and sodium formate in the reaction mixture were 0.6 mg dry cell wt/ml and 20 mM, respectively. During 36 hr reaction, 7.7 mmole/g dry cell methanol has been accumulated maximally in the reaction mixture. Also to prevent further oxidation of methanol, NaCl and EDTA, inhibitors for methanol

*dehydrogenase, were treated to the cell suspension. However, the batch type methanol synthesis by *M. trichosporium* OB3b was terminated at ca. 8 mmole/g dry cell of methanol, because increasing methanol concentration inhibits methane monooxygenase (MMO) activity. For the prolonged methanol accumulation, a semicontinuous process was carried out. In this process, the reaction was repeated three times and the produced methanol was 18 mmole/g dry cell compared to 8 mmole/g dry cell in batch reaction under the same condition. During 1hr reaction, 1.1 mmole/g dry cell methanol was accumulated in the reaction mixture. In this reaction Km and Vmax values were found to be 532.6 mM and 1.749 mmol/hr, respectively, and the conversion rate was approximately 37%.*

I. 서론

A. *Methanotroph*의 정의

*Methanotroph*는 *methylotroph*라고 알려진 미생물 집단의 하위 그룹에 속하는 집단이다. 그 가운데 *methylotrophic bacteria*는 호기성 세균으로써 일원자 탄소화합물로 되어 있는 *methane*, *methanol*, *methylated amines*, *halomethanes*, 그리고 황을 포함하는 *methyl*화된 유기화합물 등을 산화하며, 그 중간 산물인 *formaldehyde* (*HCHO*)를 *RuMP pathway* 또는 *serine pathway*를 통해 세포구성 물질로 동화한다(*Fig. 1*). 그 후 다음 중간산물인 *formic acid*를 산화하여 *NADH*를 생성함으로써 다음 다시 메탄을 산화시킬 수 있는 환원력을 재생한다¹⁻²⁾(*Fig. 2*). 하지만 *methylotroph* 중에서도 특히 *methane*만을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 세균 집단을 *methanotroph*(메탄산화세균)라고 일컫는다. 이 미생물의 존재가 알려진 것은 1906년 *Söhngen*등이 *Bacillus methanicus*라고 명명한 균주를 동정하면서부터지만 (후에 *Dworkin*과 *Foster*에 의해 *Methylomonas methanica*로 개칭됨)³⁾ 실제로 활발한 연구가 진행된 것은 1970년 *Whittenbury* 등이 100여종의 새로운 균주를 동정하면서부터이다⁴⁾. 뒤이어 *methane*과 산소가 존재하는 환경이면 어느 곳이나 *methanotroph*이 광범위하게 분포되어 있음이 밝혀지고 *methanotroph*의 목록은 해가 갈수록 길이를 더해가고 있다.

B. *Methanotroph*의 분류

*Methanotroph*는 1906년에 *Söhngen*에 의해 처음으로 알려졌으나, 분류학적인 연구는 1970년에 *Whittenbury* 등에 의해서 100여 개의 새로운 *methanotroph*가 새로이 분리되면서 그들 각각의 특성

(*methanotroph*의 morphology, resting stage에서의 형태변화, *intracytoplasmic membrane*의 구조, 계통학적인 특징)에 따라 다섯 가지의 그룹(*Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Methylosinus*)으로 나뉘게 되면서 구체화되었다⁴⁻⁶⁾. *Methanotroph*는 또한 Table 1에 나타난 기준에 의해서 크게 type I과 type II 두 가지로 나뉘어진다. *Methylomonas* 종과 *Methylobacter* 종은 type I으로 분류되고, *Methylosinus* 종과 *Methylococcus* 종은 type II에 속한다⁷⁻⁹⁾. 하지만 *Methylococcus* 종(ex. *Methylococcus capsulatus*)은 type I과 매우 유사한 특징을 가지고 있음에도 불구하고 별도로 type X로 분류되는데, 그 이유는 *Methylococcus* 종은 type I과 유사하게 formaldehyde 동화작용의 primary pathway로 ribulose monophosphate(RuMP) pathway를 이용하지만, Calvin-Benson cycle에 존재하는 serine pathway의 ribulose biphosphate carboxylase라는 효소가 낮은 농도로 존재한다는 점이 type I과 구별된다⁹⁻¹¹⁾. 또한 type X *methanotroph*는 type I과 type II *methanotroph*보다는 높은 온도에서 성장을 할 수 있으며, DNA 상에서 type I *methanotroph* 보다 높은 G+C함유량 (mol%)를 나타내고 있다^{4,9-11)}.

그러나, 1993년 Bowman의 연구팀에서는 Whittenbury팀과는 달리 수치학적인 면과 분류학적인 진화관계, DNA-DNA hybridization, phospholipid fatty acid (PLFA)의 조성 분석, genomic physicochemical properties와 유전적 진화관계 등을 연구하여 각 종들 간의 내연관계를 파악함으로써 더욱 세부적으로 몇 가지의 새로 분리된 균주를 포함한 136종 *methanotroph*의 약 124개 표현적 특징들을 비교하였다^{12,13)}. 그럼으로써 그들은 type I *methanotrophs* 종간에는 세 가지의 유사한 cluster를 가지고 있다

고 밝혔으며, 또한 *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter* 와 그들이 새로운 종으로 제안한 *Methylomicrobium*등은 *Methylococcaceae*과(family)에 속한다고 제안하였다^{12,13)}. 그리고 type I에 속하는 종들 사이에서도 그 종들의 특징들이 다르다는 것을 밝혀냈다.

Table 1. Classification and characterization of methanotrophs.

Characteristics	Type I	Type X	Type II
Morphology	Straight rod	Coccus	Straight, curved or pear-shaped rod
Membrane arrangement			
Bundle of vesicular disks	+	+	
Paired peripheral membranes	-	-	-
			+
	±	-	
Motility			±
	Azotobacter-type	Azotobacter-type	
Resting stage	cyst	cyst	Lipid cyst or terminal exospore
Rosette formation	-	-	+ (most strain)
Major carbon assimilation	RuMP	RuMP	Serine
Autotrophic CO ₂ fixation	-	+	-
Complete TCA cycle	-	-	+
Nitrogenase	-	-	+
Predominant fatty acid carbon -chain length	16	16	18
Growth at 45 °C	Variable	+	-
Mol% G+C of DNA	50 ~ 54	62.5	61.7 ~ 63.1

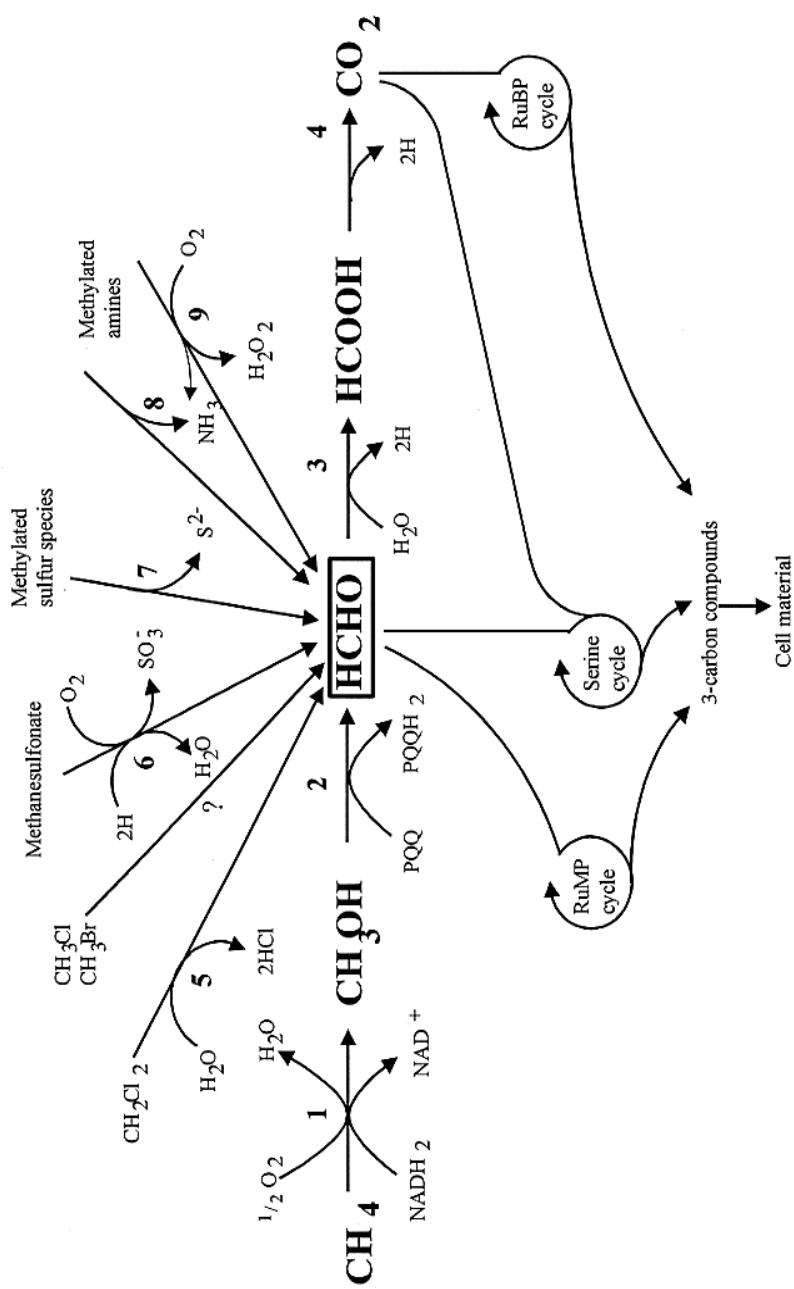


Fig. 1. Pathway for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde.

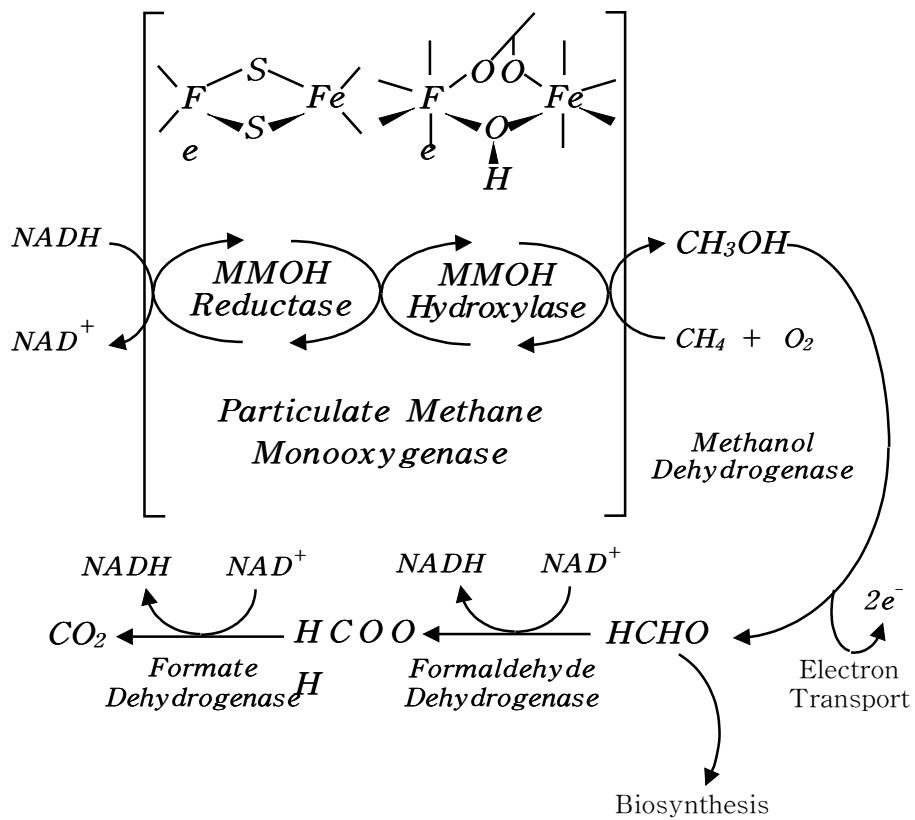


Fig. 2. The methane oxidation pathway of methanotrophic bacteria and the role of particulate methane monooxygenase.

C. 연구배경 및 목적

현재 국내외에서는 수처리 과정에서 발생하는 슬러지 및 음식물쓰레기등 많은 양의 유기성 폐기물이 발생하고 있으며, 유기성 폐기물의 처리방법으로 얼마전까지 매립에 의존하였으나 최근에 소각 및 협기성 소화를 통한 처리가 대두되고 있다. 협기성 소화를 통하여 처리 시에는 최종적으로 메탄가스가 함유된 바이오가스가 생성되는데, 본 연구에서는 이렇게 생성된 메탄을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 메탄산화세균을 이용하여 저부가치의 메탄으로부터 고부가치의 메탄올로 전환하고자 한다.

메탄산화세균의 대사경로는 Fig. 2에 개략적으로 나타낸 바와 같아 *methane, methanol, formaldehyde, formate* 등을 거쳐서 최종적으로 물과 이산화탄소로 분해되는 일련의 산화과정이다.

*Methanotroph*은 1970년대 이후 단세포 단백질(*single cell protein, SCP*)의 생산이나 생분해성 고분자인 *PHB*, 그리고 대체 에너지인 메탄올의 생산등과 관련하여 많은 주목을 끌어왔다¹⁴⁻¹⁷⁾. 최근에는 난분해성 염소화 유기 화합물의 분해에 탁월한 능력이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 메탄올 생산이나 유기화합물의 분해에 가장 중요한 효소는 메탄의 대사에 관여하는 첫 번째 효소인 메탄산화효소(*methane monooxygenase, MMO*)이다. 최근 연구에 의하면 *Methyllosinus trichosporium OB3b*나 *Methylococcus capsulatus (Bath)* 등의 몇 가지 메탄자화균은 배양 조건에 따라 두 가지 다른 *MMO*를 생성한다는 것이 밝혀졌다. 즉 배양액 중에 구리 이온이 존재할 때는 세포막에 생성(*particulate methane monooxygenase, pMMO*)되고, 구리 이온이 결핍될 때는 세포질 내에 생성(*soluble methane monooxygenase, sMMO*)된다 는 것이다¹⁸⁻²³⁾. 이들 *sMMO*와 *pMMO*는 기질이나 저해제에 대한

특이성 뿐만 아니라 동일한 기질이나 기질 방해제에 대한 동력학적 변수에서도 차이를 보이며, 효소의 안정성, 활성의 크기, MMO 활성에 필요한 환원력의 공급 방법 등에 있어서 많은 차이가 있는 것으로 보고되었다²³⁾. 특히 환원력 공급 방법의 경우 sMMO는 오직 NADH만을 환원제로 이용할 수 있지만 pMMO는 메탄올을 포함한 헤이드로 산화시키는 효소인 메탄올 탈수소효소(*methanol dehydrogenase, MDH*)를 통해 환원력을 제공받을 수 있다고 알려지고 있다. *Leak*와 *Dalton*은 이러한 환원력 공급 방식의 차이가 탄소 전환율(*carbon conversion efficiency, CCE*) 크기에 많은 영향을 준다는 것을 *type I* 메탄자화세균인 *Methylococcus capsulatus*의 연속배양 연구를 통해 제안하였다. 즉 pMMO 균체가 sMMO 균체에 비해 높은 CCE 값을 가지며, 지금까지 메탄자화균에 대해 보고된 19~70%의 지나치게 넓은 범위의 CCE 값은 기체 기질을 다루는데서 오는 실험적인 오차 이외에도 MMO 종류에 따른 에너지 요구량의 차이가 그 원인이 될 수 있다는 것이다.

메탄올은 가솔린을 대신해서 자동차 연료로 사용할 수 있는 액체 청정연료이다. 또한 가솔린의 옥탄가 상승제로 쓰이는 *methyl tertiarybutyl ether(MTBE)*를 비롯한 여러 화학물질 합성 전구체로도 용도가 크다. 메탄올의 제조연료는 메탄(천연가스, 바이오가스), 석탄, 중유, 남사, *shale oil* 등이 될 수 있다. 이중 메탄은 값이 쌀 뿐 아니라 그 매장량도 전 세계적으로 $70\sim230\times10^{12} m^3$ 으로 아주 풍부하여 유용하게만 활용된다면 매우 중요한 자원이다. 그러나 현재는 매년 상당부분이 석탄이나 원유 채취시 부산물로 취급되어 공기 중으로 그냥 방출되거나 아무 의미 없이 태워지고 있는 실정이다. 연료로 사용되는 메탄은 액화 천연가스(*liquefied natural gas, LNG*) 형태로 부피를 줄인 후 생산지에서 소비지로 운반되는 것이

보통인데 이 방법은 비용이 많이 들 뿐 아니라 상당한 폭발위험을 내포하고 있다. 따라서 메탄을 메탄올로 전환하는 것은 연료의 취급 면에서도 큰 도움이 된다¹⁷⁾.

현재 상업화된 메탄 전환공정은 수증기와 금속촉매를 사용하는 2 단계 무기화학공정이다. 첫 번째 단계에서는 메탄을 산소와 수증기 존재 하에 개질 시켜 일산화탄소와 수소의 합성가스(*syn-gas*)로 만들고, 두 번째 단계에서는 아연-구리 촉매 하에서 *syn-gas*를 메탄 올로 전화시킨다. 이 공정은 고온 고압이 요구되고 수율이 높지 않으며 또한 적절한 제어가 매우 어렵다고 알려져 있다. 새로운 금속 촉매를 개발하려는 노력이 계속되고 있으나 반응의 특성상 선택성, 안정성 등에 많은 문제가 있다. 한편 메탄을 기질로 하여 자라는 *methanotroph*를 이용하면 상온 · 상압에서 메탄의 직접 산화에 의한 메탄올의 생산이 가능하다. 따라서 *methanotroph*를 이용한 생물학적 전환공정이 무기화학공정을 사용하는 것보다 경제적인 비용과 위험성을 배제할 수 있는 장점이 있다. 그러나 *methanotroph*를 이용하여 메탄올을 생산하는 공정에서 가장 중요한 것은 활성이 높은 *methanotroph*를 분리하는 것이며 이는 자국의 미생물자원을 보존 · 보호 차원에서 매우 중요하다. 따라서 메탄산화세균을 이용하여 메탄올을 생산하고자 할 때에는 다음 두 가지 사항을 고려하여야 한다. 첫째, 메탄올은 균체의 최종 생성물이 아니고 중간 대사물이므로 메탄올이 계속 산화되는 것을 억제하여야 한다. 이는 메탄올을 기질로 사용하는 메탄올 탈수소효소(*methanol dehydrogenase, MDH*)의 효소 활성을 부분 또는 완전히 제어함으로써 가능하다¹⁷⁾.

지금까지 보고된 바로는 *cyclopropane*이나 *cyclopropanol*, 혹은 고농도의 인산염을 처리하는 것이 효과적인데 균체 내 다른 효소들에 미치는 영향이나 저해 정도의 조절 용이도 등을 고려할 때 인산

염처리가 보다 우수한 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

두 번째 중요한 것은 MMO에 지속적으로 NADH를 공급하는 일이다. 1분자의 메탄이 메탄올로 전화되려면 반드시 1분자의 NADH가 필요한데(Fig. 2), 균체 성장시의 정상 대사과정에서는 메탄 산화의 마지막 단계를 담당하는 개미산 탈수소 효소(formate dehydrogenase, FDH)가 이를 공급하지만, 만일 MDH의 활성이 완전히 제거되어 메탄올 이후의 대사가 중단된다면 인위적으로 반응액 속으로 개미산을 연속적으로 공급해 주어야 한다. 또는 MDH의 활성을 부분적으로만 억제시켜 세포 내에서 메탄올 중 일부가 계속 개미산으로 전환되도록 할 수 있는데 이 경우 이론적으로 메탄 2분자로부터 1분자의 메탄올이 생성되므로 메탄올 생산의 최대 수율은 탄소의 몰수를 기준으로 할 때 50%가 된다²⁴⁾.

메탄산화세균을 이용한 메탄을 생산의 시도는 최근 몇몇 논문에 보고되고 있다. Mehta 등은 *M. trichosporium NCIB11131*을 이용, 세포 혼탁액과 고정화 세포의 회분식 및 연속식 생산 공정에서 메탄올 합성의 기본적인 동력학을 검토하였다²⁵⁾. 이들이 확립한 세포 혼탁액의 최적 조건에서 최대 메탄올 생성속도는 $6 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{hr}$ 이였고, 고정화세포를 이용할 경우 최대 메탄올 생성속도는 $267 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{hr}$ 이였으며 이 속도는 72시간 이상 유지될 수 있었다. 한편 Patras와 Tang은 facultative methanotroph인 *Methylobacterium organophilum*을 이용하였는데 메탄 생성속도는 저해제의 농도에 매우 민감하고 온도나 pH 등의 환경 요인에 크게 의존하였다²²⁾.

한편, Okura 등은 *M. trichosporium OB3b*를 이용, 세포 혼탁액에 cyclopropanol를 사용하여 MDH에 활성을 저해시켜 메탄을 생성에 관한 기초적인 조건들을 확립하였으며²³⁾, 또한 메탄을 생성공정

의 회분식 및 반연속식 공정에 대해 연구를 수행하였고²⁴⁾. Shimoda 등은 *M. trichosporium OB3b*를 cyclopropane으로 처리한 후 메탄, 에탄, 프로판, 그리고 부탄으로부터 해당 알코올 생산과정을 연구하였다²⁵⁾.

위의 연구들은 메탄을 생합성에 있어서 메탄산화세균을 이용할 수 있는 가능성을 보여주었지만, 균체의 배양조건이나 MMO 생성의 최적화 메탄을 생성에 관련된 효소 및 메탄에서 메탄올로의 전환에 대한 효율등에 대해서는 구체적으로 제시하기에는 미흡함이 많다.

본 연구에서는 메탄산화세균의 배양조건 및 MMO 효소활성의 최적화 그리고 메탄을 생합성의 기초적인 조건확립 및 메탄을 생합성 수율을 높일 수 있는 방법 등을 모색하기 위한 연구를 수행하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 균주

메탄을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *methanotroph*의 대표적인 균주인 *M. trichosporium OB3b*를 이용하였다.

2 배양조건

1) 배지 조성

균체 배양용 배지는 Higgins가 개발한 무기 질산염 최소배지를 약간 변화시켜 사용하였다(Table 2). 이 때 *particulate methane monooxygenase(pMMO)*가 많이 생성될 수 있도록 배지 내 구리의 농도를 각각 상이하게 하였다.

2) 배양방법에 따른 균체의 성장

배양에는 5L 용량의 삼각플라스크를 사용하였으며, 배양액의 용량은 2L이었다. Gas regulator로 각각의 gas 유량을 조절하여 메탄과 공기를 1:1의 부피로 혼합하고, 0.45 μm 의 air filter를 통과시키면서 주입한 후 30°C, pH 7.0, 250 rpm의 조건에서 세균을 배양하면서 (Fig. 3) 분광광도계를 이용하여 3시간 간격으로 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 배양방법에 따른 균체의 성장속도를 알아보기 위하여 배양시스템은 단순확산방식(simple diffusion)과 강제 순환방식(forced circulation diffusion) 두 가지의 방식으로 배양하였다 (Fig. 4).

3) 구리농도에 따른 균체 성장속도

메탄 산화세균은 MMO라는 효소 복합체를 통해 메탄을 메탄올로 전환시키는데, 현재까지 100종 이상의 균주가 보고되고 있다. 이들 중 *Methylosinus trichosporium OB3b*나 *Methylococcus capsulatus* 등과 같은 몇몇의 *obligatory methanotroph*은 배양액 내의 구리 이온 존재 유무에 따라 MMO의 세포내 위치가 바뀐다 (*copper switch protein*). 즉, 구리이온이 다량 존재할 때는 세포막에서 MMO가 생성되고(*pMMO*), 반대로 구리가 소량 존재하는 상태에서 배양되면 세포질 내에서만 생성된다(*sMMO*). 일반적으로 메탄으로부터 메탄올을 생성하고자 할 때에는 *sMMO*보다는 *pMMO*가 훨씬 더 효과적인 것으로 보고되고 있다. 이에 구리이온에 따른 균체의 성장 여부를 확인하였다.

Table 2. Composition and concentration of stock solution for Higgins nitrate minimal salt medium.^a

1. 100 × Salt solution	g/ℓ	10mℓ
NaNO ₃	85	
K ₂ SO ₄	17	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.7	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.7	
2. 100 × Phosphate buffer solution	g/ℓ	10mℓ
KH ₂ PO ₄	53	
Na ₂ HPO ₄	86	
Adjust solution to pH 7.0		
3. 500 × Trace mineral solution	g/ℓ	2mℓ
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.287	
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.223	
H ₃ BO ₃	0.062	
NaMnO ₄ · 2H ₂ O	0.048	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.048	
KI	0.083	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25	
1mℓ of 1mM H ₂ SO ₄ per liter of trace metals		
4. 500 × Iron solution	g/ℓ	2mℓ
FeSO ₄ · 7H ₂ O	22.4	
5mℓ of 1mM H ₂ SO ₄ per 100mℓ of iron		

a : Culture medium was made up as follows; Appropriate aliquots of concentrated solutions 1~3 were added to the desired volume of double distilled water and the combined diluted mixture was sterilized by passage through a 0.22 μm membrane filter. separate and freshly prepared sterile iron solution 4 was then added aseptically to this mixture. Higgins standard nitrate minimal medium contain Cu at a final concentration of 1.0 μM

b : Each stock solution was stored at 4°C after sterilization, except for the phosphate buffer which was stored at room temperature.

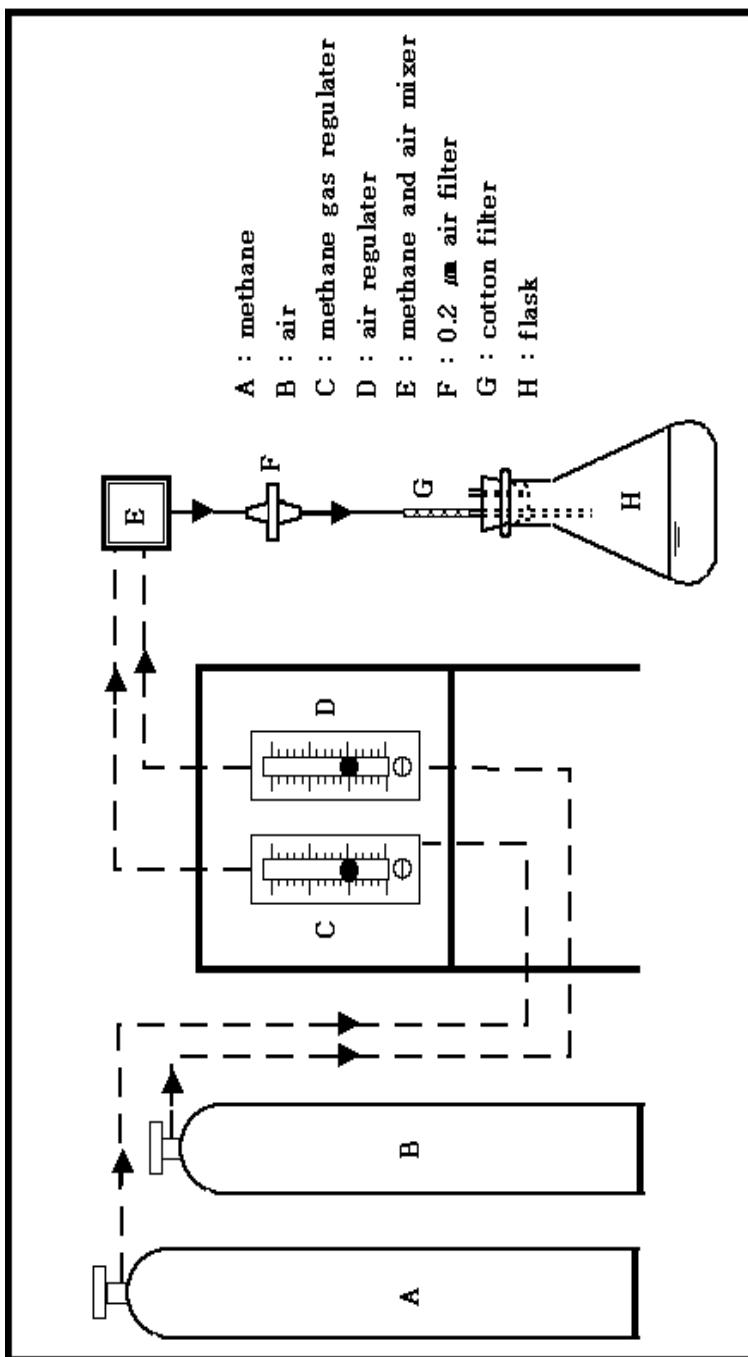


Fig. 3. Injection of methane and air mixture into a flask.

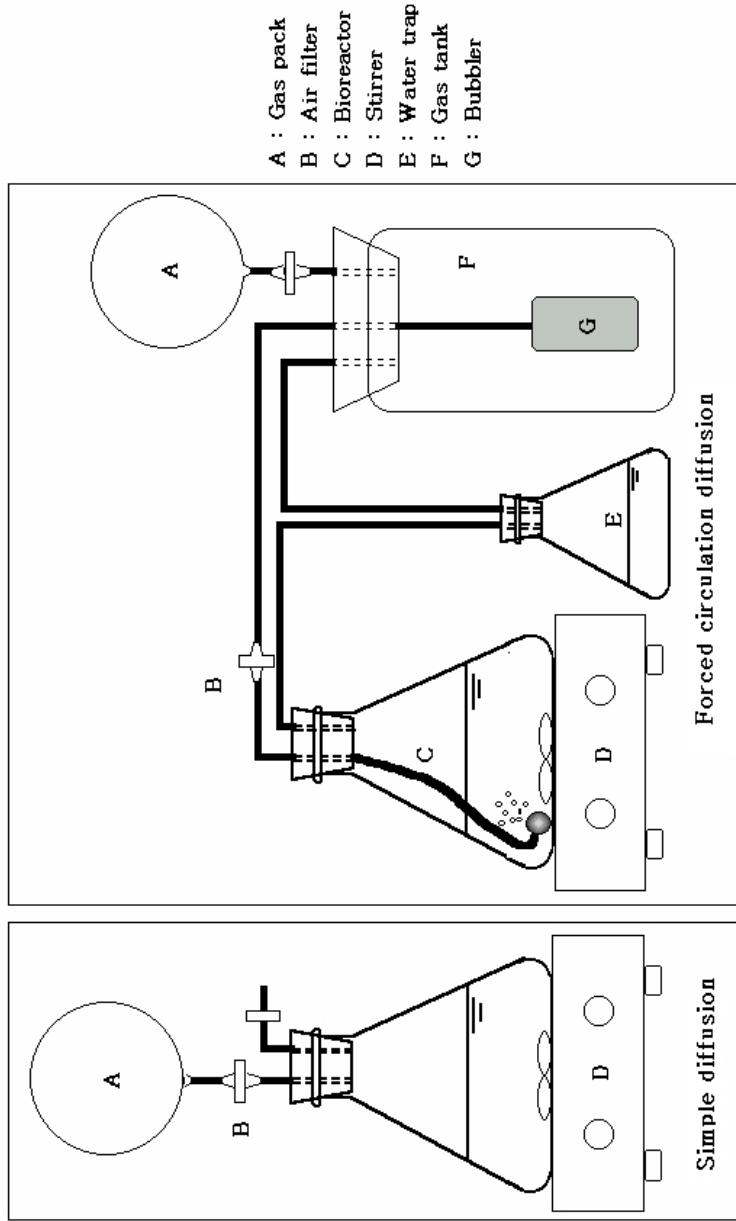


Fig. 4. Two types of mixed gas injection technique for the cultivation of methanotroph.

4) 배양시간

배양시간에 따른 균체 성장속도를 조사하기 위해 발효조에서 배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 취한 후 $660nm$ 에서의 흡광도로써 균체 성장속도를 측정하였다. 발효조는 5리터 용량을 사용하였고 배지는 2리터를 제조하였으며 초기 배지의 pH 는 7.0으로 맞추었다.

5) 균체의 비성장속도(*specific growth rate*)와 세대시간(*generation time*)의 측정

균체의 성장은 *UV-visible spectrophotometer*를 이용하여 $660nm$ 에서 흡광도를 측정하였으며 다음과 같은 식을 이용하여 비성장속도와 세대시간을 구하였다²²⁾.

$$\text{Specific growth rate}(\mu) = \frac{\ln A/A_0}{t - t_o}$$

$$\text{Generation time}(G) = \frac{0.693}{\mu}$$

A_0 : 초기 흡광도

A : 말기 흡광도

t_0 : 초기 배양시간

t : 말기 배양시간

3. 효소활성 측정

1) *pMMO* 활성측정

*pMMO*의 활성은 *M. trichosporium OB3b*의 성장 영양원인 메탄을 기질로 사용하여 결정할 수 있으나, 메탄의 소모속도는 실험 오차가 과도하고 메탄을 계속 포름알데히드 등으로 산화되므로 정확한 측정에 어려움이 있다. 따라서 *pMMO*활성을 정확하게 측정하기 위해서는 원래 기질인 메탄처럼 *MMO*에 의해 잘 산화되면서도 더 이상 분해가 일어나지 않는 기질을 선택하는 것이 효과적인데 본 실험에서는 *whole-cell* 상태와 효소상태로 *NaCl*를 처리하였을 때 각각의 농도에 따른 *pMMO*의 활성을 *propylene*이 *propylene oxide*로 생성되는 속도로 측정하였다. *Propylene oxide*는 극성이므로 대부분 반응액 내에 존재하고 가스크로마토그래피로 쉽게 그 양이 측정된다. 활성측정을 위한 가스크로마토그래피에 사용한 *column*은 *stainless steel* ($3\text{ mm} \times 4\text{ m}$)이었으며, 충진제로는 *Sorbitol Gasport* (25%, 6/80)를 사용하였다. *Propylene oxide*의 경우 *column*의 온도는 50°C , *injector* 100°C , *detector* 100°C , *flow rate* 30 ml/min 의 조건이며, 운반기체로는 헬륨을 이용하였다.

2) *MDH* 활성측정

NaCl 농도에 따른 *MDH* 활성을 측정하였다. 활성측정시 세포농도는 분광광도계로 구한 흡광도와 균체 건조중량을 사용하여 측정하였으며, *NaCl* 농도에 따른 균체량은 동일시하였다. *MDH*활성을 측정하기 위해 먼저 *cell*을 *MDH* 저해제와 반응 시킨 후 그 반응액 안에 존재하는 *cell*를 모아서 파쇄하고 원심분리한 후 그 상층액으로 다음과 같은 방법에 의해 활성을 측정하였다.

MDH 활성 측정 방법에는 *dye-link assay system*과 *cytochrome c assay system*으로 활성을 측정하였다. *Dye-link assay system*은 첫 번째 전자 수용체로 *PES(phenazine ethosulfate)*를 이용하고 마지막 전자 수용체로는 *DCPIP(2,6-dichlorophenol indophenol)*를 이용하여 600nm에서 흡광도 변화로 활성을 측정하였다.

*Cytochrome c assay system*은 첫 번째 전자 수용체로 *cytochrome c*를 이용하고 마지막 전자 수용체로 *DCPIP*를 이용하여 550 nm에서 흡광도 변화로 활성을 측정하였다.

4. MDH 저해제를 이용한 메탄을 생합성 조건 확립

메탄올의 생합성은 메탄을 기질로 사용하며, 생합성된 메탄올이 더 이상 산화되는 것을 방지하기 위해 메탄올을 포름알데히드로 산화시키는 효소(MDH)의 활성을 억제할 수 있는 저해제로 $NaCl$ 를 사용하였다. 메탄올 생합성 실험의 여러 가지 최적의 조건들을 확립하여 최적의 조건에서 최대 메탄올을 생합성하고자 하였다. 메탄올 생합성 실험을 하기 위해서 먼저 배양된 균체를 12.9 mM phosphate buffer ($pH\ 7.0$)에서 혼탁한 후 메탄올 생합성 실험에 이용하였다. 분석에 사용된 23 ml 유리병과 내용물은 Fig. 5에 나타내었다.

1) 저해제 농도에 따른 메탄올 생성

저해제로 *sodium chloride* ($NaCl$)를 이용하였으며, $NaCl$ 의 농도에 따른 메탄올 생성의 최적 조건을 산출하기 위하여 각각 상이한 농도에서 실험을 하였으며 그로 인하여 최적의 $NaCl$ 의 농도를 결정하고자 하였다. 반응온도는 30°C , 20 mM *sodium formate*로 메탄올 생합성 실험을 수행하였다.

2) 균체 농도에 따른 메탄올 생합성

메탄올 생합성 실험에서 균체의 양은 상당히 중요하다. 이에 균체에 따른 메탄올 생합성 정도를 관찰하였다. 균체의 농도는 건조균체량으로 측정하였으며, 균체 혼탁액을 일정한 비율로 완충액에 희석한 10 ml 중 6 ml 은 반응에 사용하고 나머지 4 ml 은 미리 무게가 측정된 여과지에 여과 시켜 건조한 후의 무게를 측정하였다.

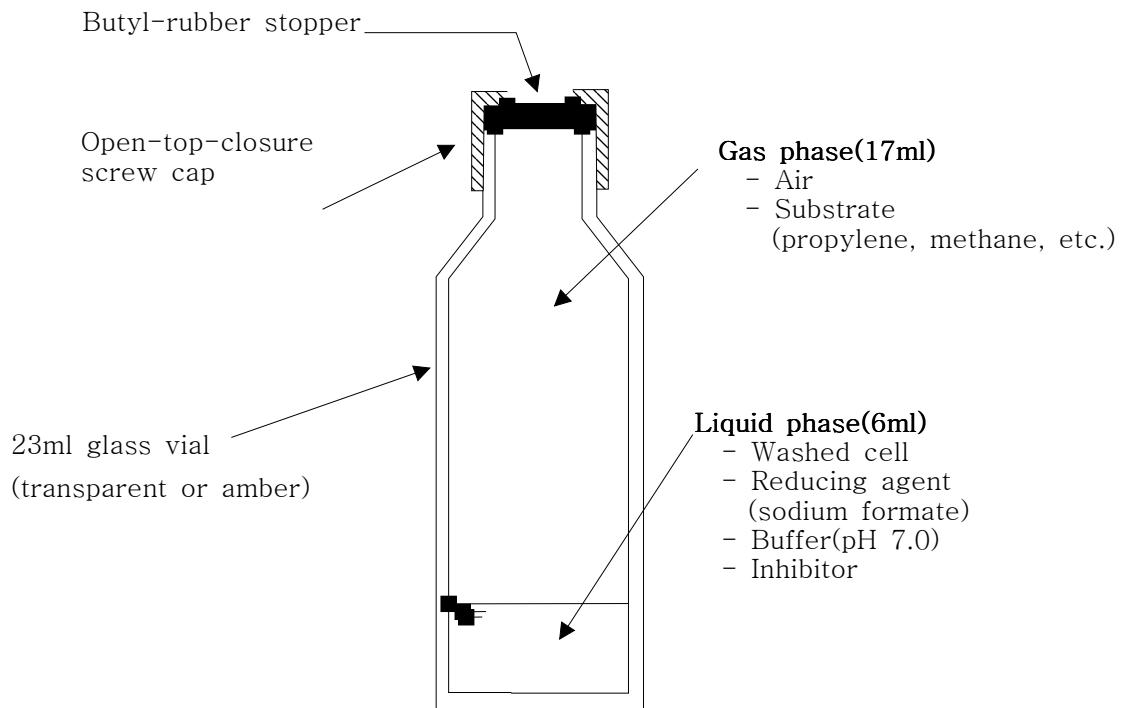


Fig. 5. Methanol biosynthesis in small vial system.

3) 반응 온도에 따른 메탄을 생합성

반응온도는 메탄용해도 및 균체 활성에 영향을 미치기 때문에 중요하다. 메탄을 생합성에서 반응온도를 20°C에서 37°C까지 각각 상이하게 하여 메탄을 생합성실험을 수행하였다.

4) 개미산 농도에 따른 메탄을 생합성

*pMMO*의 경우 메탄의 산화반응에 필요한 세포내 환원력은 NADH에 의해 공급되는데 개미산 탈수소효소(*formate dehydrogenase, FDH*)가 개미산을 CO_2 와 H_2O 로 산화시킬 때 NAD^+ 를 환원시킬 수 있으므로 반응액 내에 개미산을 첨가함으로써 세포 내 환원력을 공급하여, 개미산 농도에 따른 메탄을 생합성 정도를 측정하였다.

5) 생합성 된 메탄을 분석

분석은 불꽃 이온검출기(*FID*)가 장착된 가스크로마토그래피에서 수행하였다. 생합성 된 메탄을의 농도를 알기 위해 표준 시료인 메탄을로 *standard curve*를 작성한 후 시료를 측정하였다. 사용된 *column*은 *stainless steel* ($3\text{ mm} \times 4\text{ m}$)이었으며, 충진제로는 *sorbitol gasport* (25%, 6/80)를 사용하였다. 메탄을의 경우 *column*의 온도가 140°C, *injector* 210°C, *detector* 210°C, *flow rate* 30 ml/min 의 조건이며, 운반기체로 헬륨을 이용하였다.

5. *NaCl*에 의한 형태 변화

메탄을 생합성 실험에서 저해제로 사용한 *NaCl*농도에 따른 *M. trichosporium OB3b*의 형태를 관찰하기 위해 투과전자 현미경을 이용하여 관찰하였다.

1) 배양과 고정

균체를 NMS배지에 1%를 접종한 후 메탄과 공기를 1:1로 주입하여 72시간 배양하여 균체를 모아서 12.9 mM에 phosphate buffer, pH 7.0에 혼탁한 후 각각 *NaCl*를 0 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM를 처리하여 12시간 후에 균체를 모아서 12.9 mM phosphate buffer, pH 7.0를 이용하여 3회 이상 씻어주었다. 균체에 0.1% glutaraldehyde 와 4% paraformaldehyde로 4°C에서 2 시간 동안 고정하였고 cacodylate 완충액(0.1 M, pH 7.4)으로 수세한 후 2% osmium tetroxide로 1시간 더 고정하였다.

2) 탈수 및 포매

고정이 끝난 시료들은 수분을 제거하기 위해 탈수과정을 거쳤다. 탈수 과정은 50%, 70%, 80%, 90%, 95%의 에탄올(20분, 1회)로 처리하였고, 마지막으로 100% 에탄올(30분, 3회)을 처리하였다. 그런 다음 propylene oxide (20분, 2회)를 처리해 주었다. 포매 과정은 포매제인 epon이 천천히 잘 스며들게 하기 위해서 단계적으로 실시하였다. propylene oxide와 epon을 1:1 비율(1시간)에서 시작하여 epon의 비율을 점차 높여, 1:2 비율로 overnight 한 후, 다음 날 100% epon mixture에 2시간 정도 두었다가, 마지막으로 탈수가 끝난 시료를 젤라틴 캡슐에 심고 다시 100%의 신선한 epon mixture를 부어 64°C 건조기에서 24시간을 두어 굳게 하였다.

3) 절편제작 및 염색

굳힌 epon block을 초박절편기(*Leica Ultramicrotome*)에 유리칼을 부착하여 가로 세로 1 mm 정도의 사각형으로 다듬은 후에 다이아몬드 나이프를 이용하여 80~90 nm 두께의 절편을 얻은 후, 완전히 말려서 전자염색 과정을 거쳤다. 전자 염색은 먼저 5% uranyl

*acetate*로 10분간 염색한 후 70% 에탄올로 깨끗이 씻어주고 다시 *lead citrate*액으로 5분간 염색하였다. 그리고 CO_2 제거 중류수로 여러 번 수세한 후 건조시켰다.

4) 투과전자현미경을 이용한 관찰

염색 후, 건조된 그리드를 60~80 kv 상태의 투과전자현미경 (*JEOL 100CX*)에서 53000배의 배율로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

6. 메탄에서 메탄올로의 전환율

메탄올 생합성에서 소비되는 메탄에 따른 메탄올로의 전환되는 수율을 산출하였다.

1) 메탄 양에 따른 메탄올 생합성량

메탄올 생합성에서 메탄으로부터 메탄올로의 전환율을 산출하기 위해서 최적의 메탄 양을 산출하였다.

반응은 500 ml flask를 이용하였으며, 반응액은 *MDH*저해제 및 *sodium formate*, 균체를 포함하여 100 ml로 하였고, 메탄량을 각각 상이하게 하여 37°C 200 rpm에서 1시간동안 생합성되는 메탄올 농도를 관찰하였다. 또한 *Michaelis-Menten kinetics*에 의해서 K_m , V_{max} 를 산출하였다.

2) 메탄에서 메탄올로의 전환율

최적의 메탄 양에서 메탄올로의 전환율을 산출하기 위한 반응 조건은 위의 조건에서 산출한 메탄량과 동일한 조건으로 하였으며, 시간에 따른 메탄의 감소량과 생합성되는 메탄올 양으로 메탄에서 메탄올로의 전환율을 산출하고자 하였다. 소비되는 메탄량을 측정하기 위해 사용된 *column*은 *stainless steel* (3 mm × 3 m)이었으며, 충진제로는 *Hayesep R* (100/120 mesh)를 사용하였다. 메탄올의 경우 *column*의 온도가 100°C, *injector* 100°C, *detector* 150°C, *flow rate* 40 ml/min의 조건이며, 운반기체로 헬륨을 이용하였다.

7. *Repeated-batch system*에 의한 메탄을 생합성 조건

메탄을 생합성 실험에서 회분식으로 메탄을을 생합성시 그 양이 적기 때문에 더 많은 양의 메탄을을 생합성하기 위해 *repeated-batch system*으로 메탄을을 생합성하기 위한 조건들을 산출하였다.

1) 메탄을 농도에 따른 MMO 활성측정

메탄올이 MMO의 활성에 어떠한 영향을 주는지 관찰하기 위하여 반응 초기에 메탄올의 농도를 각각 상이하게 한 후 *propylene*를 이용하여 *whole-cell*에서 MMO의 활성을 측정하였다.

2) 메탄과 sodium formate 영향

회분식 메탄을 생합성 실험에서 각각의 인자인 메탄과 sodium formate를 일정한 시간에 추가적으로 주입하여 각각 생합성하는 메탄을을 측정하였다.

3) *Repeated-batch system*에 의한 메탄을 생합성

회분식으로 메탄을을 생합성하는 것은 너무나 한정적이다. 이에 단 시간내에 보다 많은 양의 메탄을을 생합성하기 위해 *repeated-batch system*으로 메탄을을 생합성 하였다. 실험 방법은 회분식과 동일하지만 8시간을 주기로 원심분리에 의해 균체와 반응액을 분리하였으며, 균체를 다시 새로운 반응액에 넣어 메탄을 생합성 실험을 수행하였다.

8. 메탄을 대량생산을 위한 소형반응기

1) 반응기에서 균체 배양

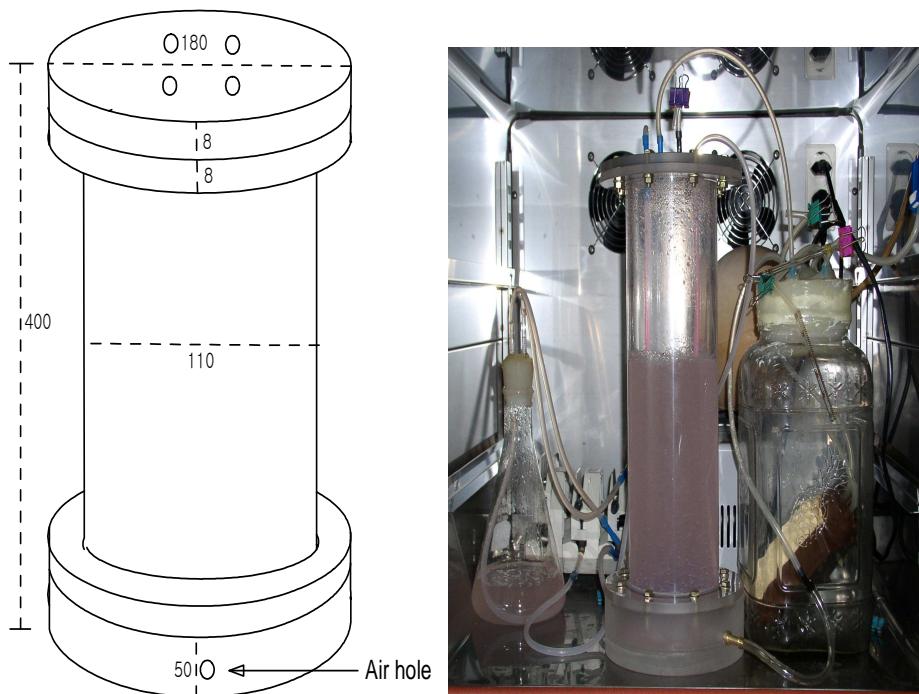
반응기를 이용하여 메탄을을 생합성하기 위해서는 균체의 성장과 메탄을 생합성 실험을 동일한 조건에서 수행하여야 한다. 이에 반응기에서 균체를 배양하여 메탄을 생합성을 수행하고자 하였다. 균체 배양에 이용된 반응기는 원기둥 모양이다. 총 부피는 3L로 제작되었으며, 균체 배양액은 총 부피의 1/2인 1.5L로 실험하였으며, 실물은 Fig. 6과 같다.

2) 반응기에서 메탄올 생합성

대량으로 메탄올을 생산하기 위해서 소용량의 회분식 실험에서 최적화한 조건으로 대용량의 반응기를 제작하여 실험을 수행하였다. 3L의 용량을 가진 반응기에 1 L의 반응액을 첨가하였고, 조성은 다음과 같다. MDH의 활성 저해제인 *NaCl* 100 mM, *EDTA* 1 mM, 환원제인 *sodium formate* 20 mM, 0.6 mg dry cell wt/ml의 균체를 12.9 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 혼탁한 후, 반응 온도를 일정하게 유지하기 위해서 25 °C 배양기 내에서 실험을 수행하였다 (Fig. 6).

9. 생합성된 메탄올 추출

*M. trichosporium OB3b*에 의해서 생합성된 메탄올의 농도를 증가시킬 뿐만 아니라. 생합성된 메탄올을 산업적으로 이용하기 위해 분별 증류를 이용하여 메탄올 농도를 증가시키고자 하였다. 생합성되는 메탄올 농도가 낮기 때문에 일차적으로 단순 증류를 통하여 메탄올 농도를 농축한 후 이차적으로 분별 증류를 통하여 메탄올을 증류하였으며, 증류 장치는 Fig. 7과 같다.



*Fig. 6. Schematic diagram of methanol production reactor using *M. trichosporium* OB3b.*



Fig. 7. Distillatory apparatus for methanol extraction.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 최적 배양 조건

1) 배양방법에 따른 균주의 성장

균주의 배양방법에 따른 균체의 성장속도를 알아보기 위하여 단순 확산방식(*simple diffusion*)과 강제순환방식(*forced circulation diffusion*) 두 가지의 방식으로 배양하면서 *UV-visible spectrophotometer*를 이용하여 시간대별로 660 nm 에서 흡광도를 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 두 경우 모두 26시간이 지난 후에 지수성장기에 들어섰지만 단순확산방식의 경우에는 접종 46시간이 지나 정지기에 들어선 후 더 이상 균체 성장을 보이지 않았으나 강제 순환방식은 지속적인 성장을 보이고 72시간이 지난 후에야 정지기에 들어섰다. 단순확산방식에서의 비성장속도(μ)는 $0.04\text{ (h}^{-1}\text{)}$ 이며, 세대시간(G)은 17.325 h 이었으나 강제순환방식에서의 비성장 속도는 0.059 h^{-1} 이며, 세대시간은 11.745 h 으로 단순확산방식보다 높은 성장을 보였다.

2) 구리농도에 따른 영향

배양액 내 구리 농도에 따른 균체 성장은 Fig. 9과 같다. 초기 구리 농도가 높아짐에 따라 균체의 성장도 좋아져 $5\text{ }\mu\text{M}$ 일 경우 성장이 가장 좋았으나 그 이상의 농도에서는 성장에 저해를 받게 되고, 농도가 $20\text{ }\mu\text{M}$ 일 때에는 성장에 저해를 받았다. 또한 구리 농도에 따라 *pMMO*에 발현 정도를 관찰한 결과 Fig. 10과 같다.

3) 균체의 비성장속도(*specific growth rate*)와 세대시간(*generation time*)

Methane 과 *air*를 50 : 50의 비율로 조정하여 공급하는 액체배지 를 이용하여 균체의 성장속도를 살펴보았다. 성장곡선은 Fig. 9와 같으며 균체성장은 일정한 시간동안 660nm에서 흡광도를 측정함으로써 조사하였다. 구리 농도에 따른 비성장속도 및 세대시간을 관찰한 결과 *Table 3*와 같다.

$$Specific\ growth\ rate(\mu) = \frac{\ln A / A_0}{t - t_0}$$

$$Generation\ time(G) = \frac{0.693}{\mu}$$

A_0 : 초기 흡광도

A : 말기 흡광도

t_0 : 초기 배양시간

t : 말기 배양시간

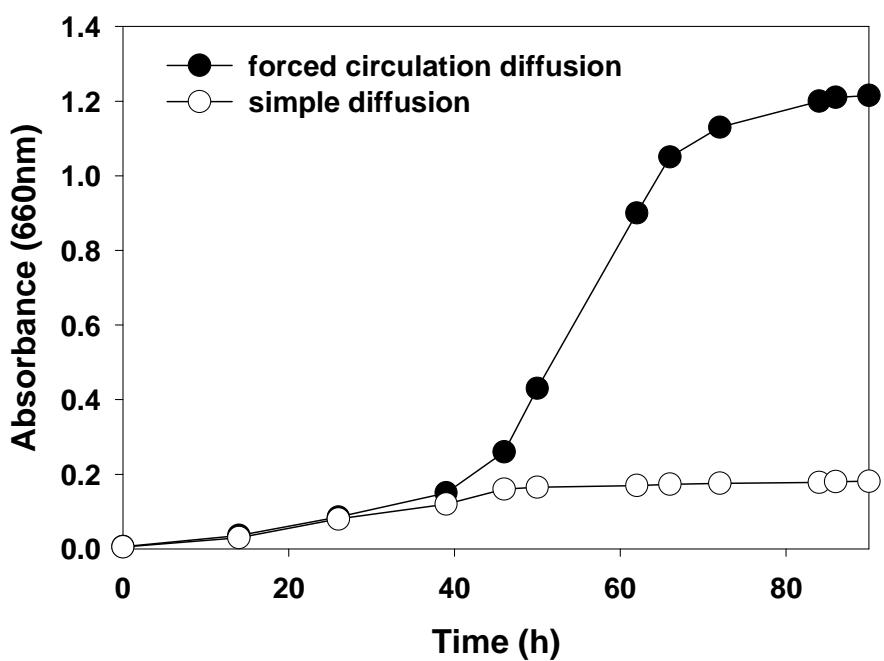


Fig. 8. Effect of mixed gas injection on the growth of the *M. trichosporium* OB3b.

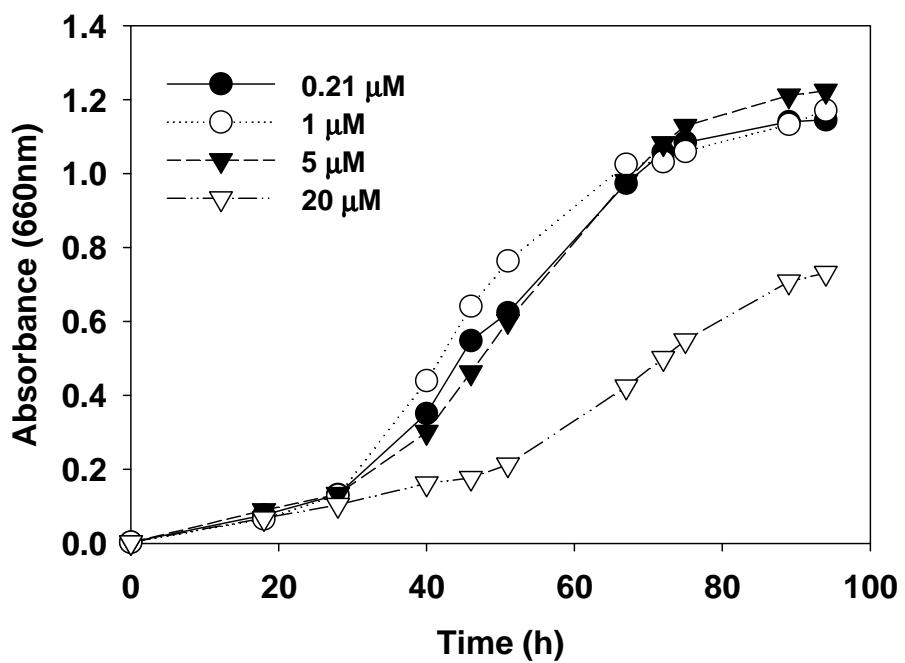
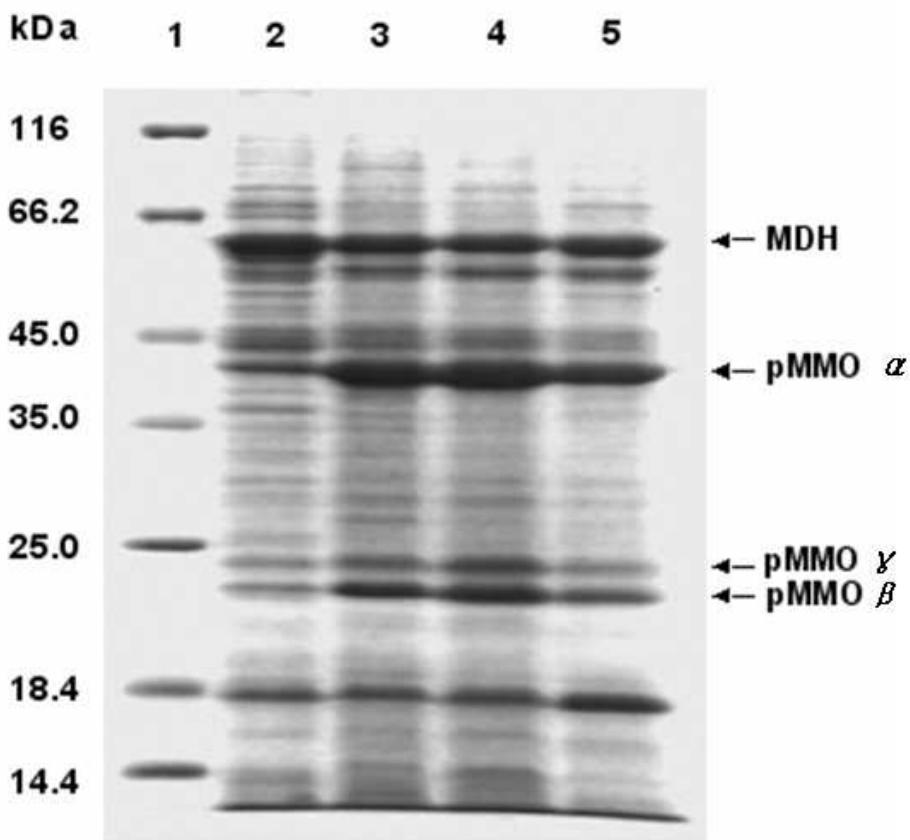


Fig. 9. Effect of copper concentration on the growth of the *M. trichosporium* OB3b.



*Fig. 10. SDS-polyacrylamide electrophoresis of the proteins of *M. trichoporum* OB3b which were grown on the different copper concentrations. Lane 1, protein molecular weight standards (β -galactosidase, M 116.0: bovine serum albumin, M 66.2: ovalbumin, M 45.0: lactate dehydrogenase, M 35.0: restriction endonuclease Bsp981, M 25.0: β -lactoglobulin, M 18.4: lysozyme, M 14.4); lane 2, copper 0.21 μM ; lane 3, copper 1 μM ; lane 4, copper 5 μM ; lane 5, copper 20 μM*

Table 3. Comparison of the specific growth rate and generation time depending copper concentrations.

<i>Copper concentration</i>	0.21 μM	1 μM	5 μM	20 μM
$\mu(h^{-1})$	0.038	0.04	0.041	0.034
$g(h)$	18.237	17.325	16.902	20.382

2. 회분식에 의한 메탄을 생합성

1) 메탄을 생합성 최적 조건 산출

(a) 저해제 농도에 따른 메탄을 생합성

*M. trichosporium OB3b*에 의한 메탄으로부터 메탄을 생합성시 저해제인 $NaCl$ 농도에 따른 결과를 관찰한 결과 Fig. 11과 같다. $NaCl$ 농도가 200 mM일 때 7.6 mM로 가장 많은 양의 메탄을을 생합성 할 수 있었다. 또한 $NaCl$ 과 *EDTA*를 복합적으로 처리하였을 때 생합성되는 메탄을 양을 관찰한 결과 Fig. 12와 같다. $NaCl$ 100 mM과 *EDTA* 1mM를 처리하였을 경우 8 mmole/g dry cell로 가장 많은 양의 메탄을이 생합성되었다.

(b) 저해제 농도에 따른 *MMO*와 *MDH* 활성 측정

MDH 저해제로 사용하는 $NaCl$ 농도에 따른 *MMO*와 *MDH* 활성을 측정한 결과는 Fig. 13과 같으며 메탄을 생합성에서 최적농도인 200 mM $NaCl$ 에서 효소 자체의 활성은 각각 25 %, 50 % 감소하였다.

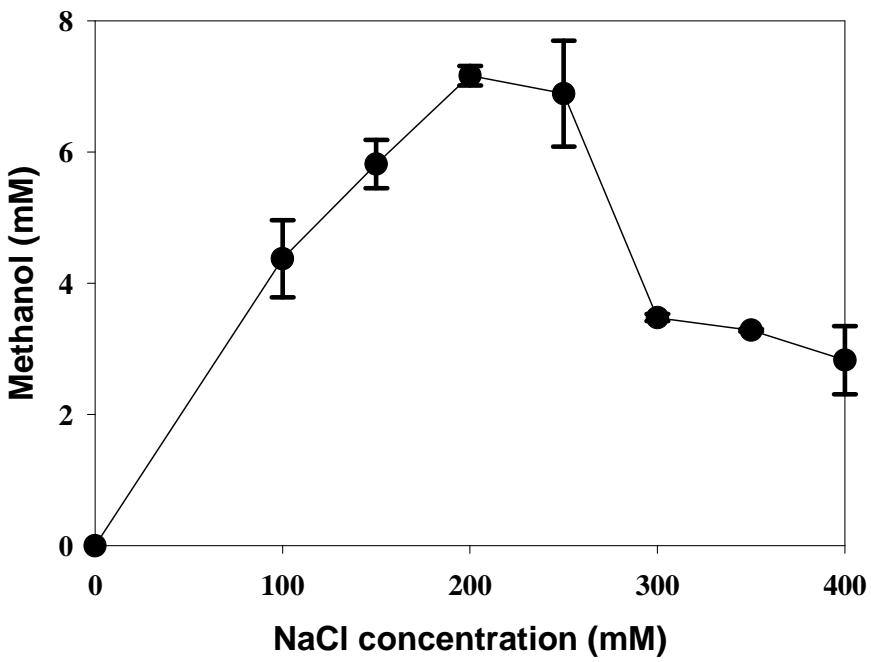


Fig. 11. Effect of sodium chloride concentration on methanol biosynthesis.

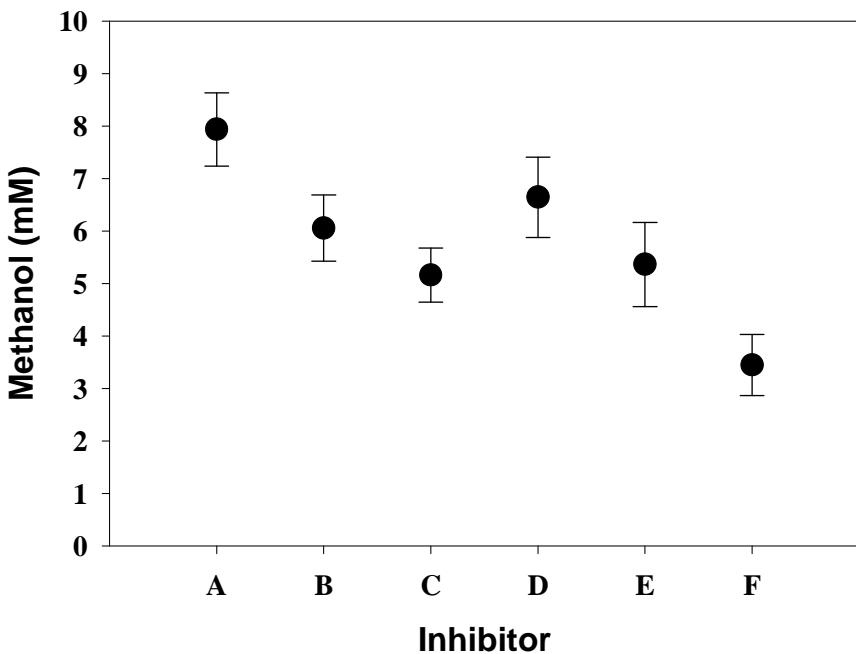


Fig. 12. Effect of inhibitor concentration on methanol biosynthesis. A, NaCl 100 mM & EDTA 1mM; B, NaCl 100 mM & EDTA 2 mM; C, NaCl 100 mM & EDTA 3 mM; D, NaCl 200 mM & EDTA 1 mM; E, NaCl 200 mM & EDTA 2 mM; F , NaCl 200 mM & EDTA 3 mM.

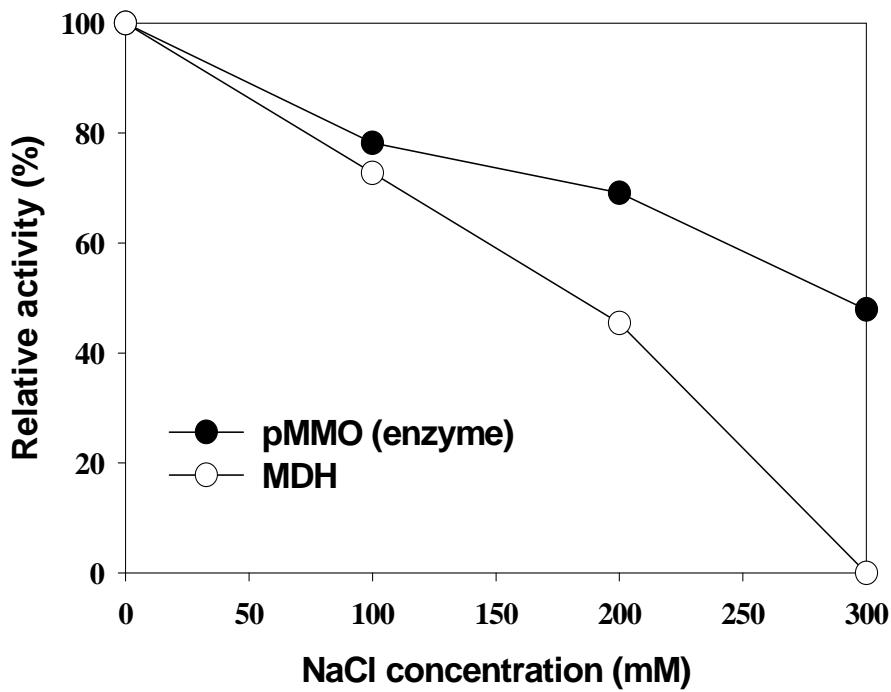


Fig. 13. Effect of NaCl concentration on pMMO and MDH activity. pMMO activity (●) was measured by propene epoxidation assay. MDH activity (○) was measured by two dye-linked assay.

(c) 균체 농도에 따른 메탄을 생합성

메탄으로부터 메탄올을 생합성 시 최적의 균체량을 산출하기 위해 균체량에 따른 메탄올 생합성 정도를 관찰한 결과 Fig. 14과 같이 나타났다. 균체량이 $0.6 \text{ mg dry wt cell/ml}$ 일 때 $7.5 \text{ mmole/g dry cell}$ 로 가장 많은 양의 메탄올을 생합성하였다.

(d) 반응 온도에 따른 메탄을 생합성

메탄을 생합성에서는 반응액 내에 메탄이 얼마나 용해할 수 있는지, 그리고 반응액 온도가 *M. trichosporium OB3b*의 대사활동에 얼마나 영향을 미치는지가 중요하다. 이러한 점을 고려하여 메탄을 생합성에 최적 온도를 관찰한 결과 Fig. 15과 같다. 결과적으로 25°C 가 메탄을 생합성에 최적 온도이며, 이때에 생합성된 메탄올은 $7.5 \text{ mmole/g dry cell}$ 이었다.

(e) 환원제 농도에 따른 메탄을 생합성

메탄올을 생합성하기 위해서는 먼저 메탄이 산화되어 메탄올이 생성되는데 이 과정에서 메탄이 연속적으로 산화되기 위해서는 환원제가 계속 공급되어야 한다. 따라서 환원제의 일종인 *sodium formate*를 이용하여 메탄을 생합성에 미치는 영향을 관찰한 결과 Fig. 16과 같다. *Sodium formate*의 농도가 20 mM 일 때가 최적이며, 그 이상에서는 별 차이가 없음을 관찰할 수 있었다.

(f) MDH 저해제를 이용한 최적 조건에서의 메탄을 생합성

MDH에 저해제로 *NaCl*과 *EDTA*를 이용하여 앞에서 얻은 결과를 바탕으로 최적의 조건에서 메탄을 생합성 실험을 수행한 결과 약 $13 \text{ mmol/mg dry cell}$ 의 메탄올을 생합성 할 수 있었다(Fig. 17).

2) *NaCl*에 의한 *M. trichosporium OB3b*의 형태 변화

지수성 장기 말기까지 배양한 *M. trichosporium OB3b*에 *NaCl*을 각각 농도 별로 처리한 후 형태 변화를 관찰한 결과 Fig. 18과 같다. *NaCl* 농도에 따라 균체의 *intracytoplasmic membrane (ICM)*과 *vegetative cell capsule*의 감소함을 알 수 있었으며, *NaCl*의 농도가 증가됨에 따라 균체가 *autolysis*됨을 알 수 있었다.

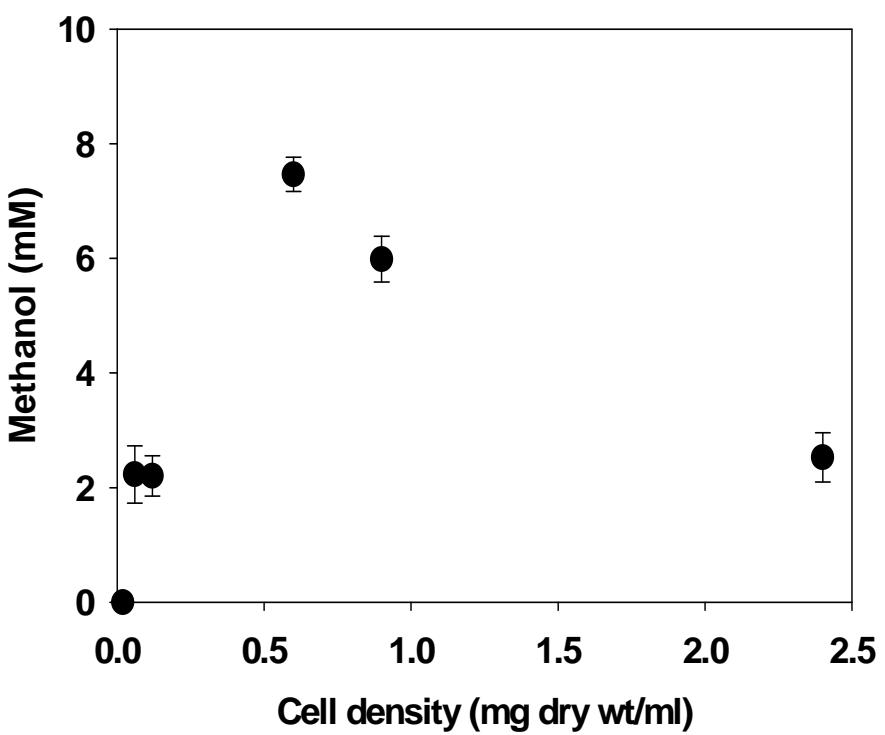


Fig. 14. Effect of cell density on methanol accumulation.

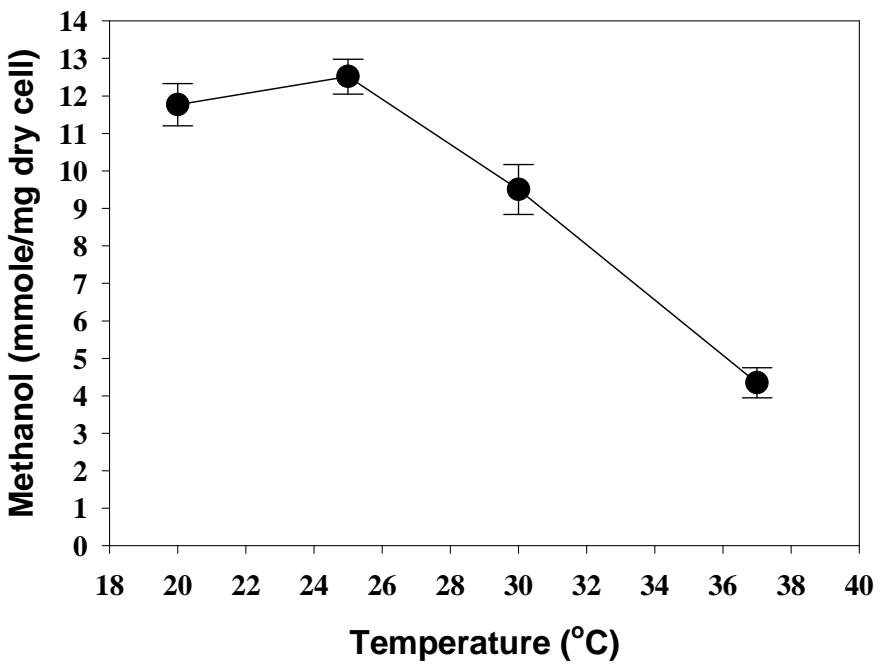


Fig. 15. Effect of temperature on methanol biosynthesis.

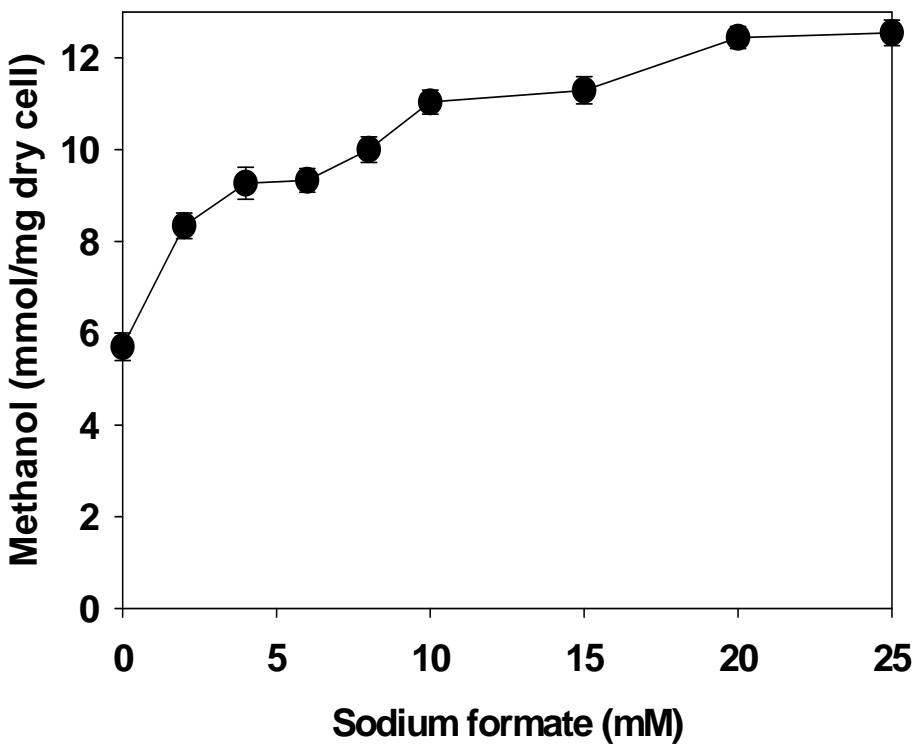


Fig. 16. Effect of sodium formate concentration on methanol biosynthesis.

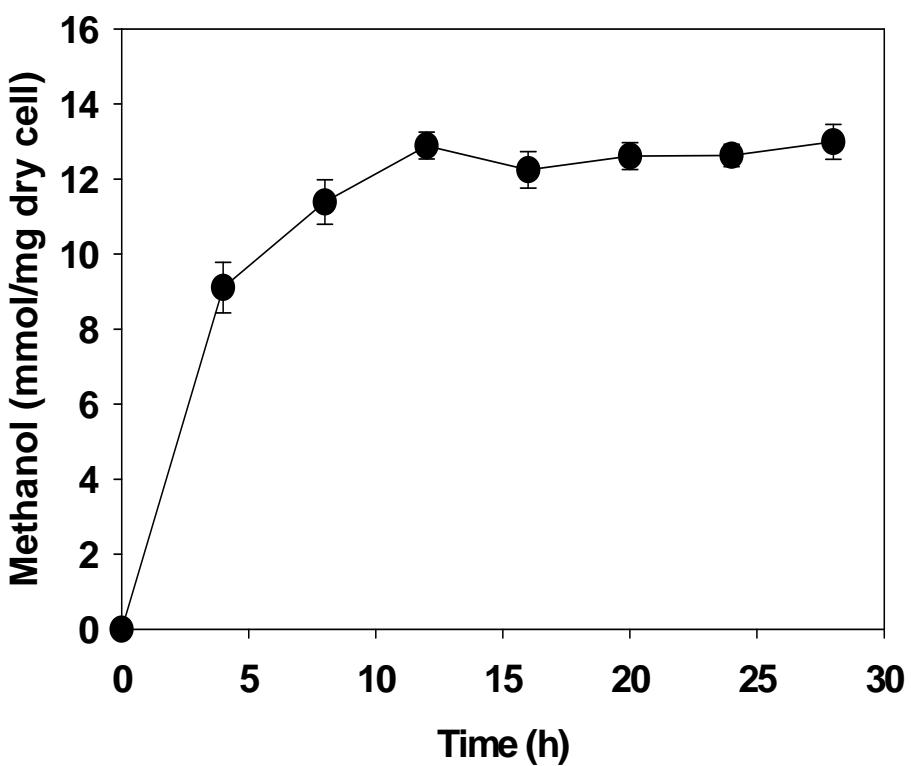


Fig. 17. Time-course of methanol biosynthesis by *M. trichosporium* OB3b under the optimum condition.

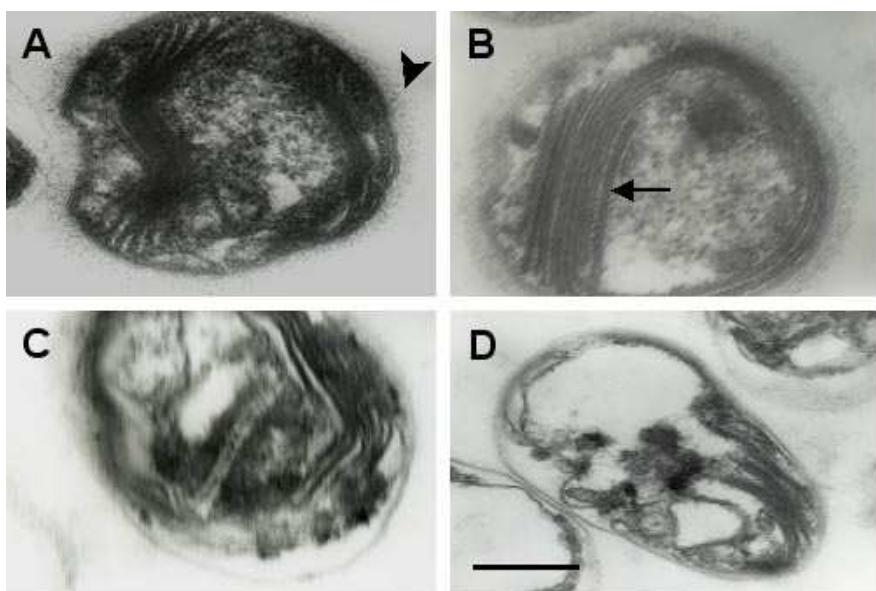


Fig. 18. Morphological changes of intracytoplasmic membrane (ICM) and slime layer by NaCl concentration. A. *M. trichosporium* OB3b; B 100 mM NaCl treated *M. trichosporium* OB3b ; C 200 mM NaCl treated *M. trichosporium* OB3b ; D 300 mM NaCl treated *M. trichosporium* OB3b. Bar, 0.5 μ M. Arrowheads slime layer. Arrows, typical ICM. Arrowheads slime layer.

3) 메탄을 생합성 효율

(a) 메탄에 대한 V_{max} , K_m

*M. trichosporium OB3b*에 존재하는 MMO는 메탄을 기질로 메탄을을 생합성하기 때문에 반응 1시간동안 메탄 양에 따라 균체로부터 생합성되는 메탄올의 양을 관찰한 결과 Fig. 19과 같다. 미생물 반응에서 반응 속도는 기질의 농도가 낮을 때는 선형적으로 증가하지만 높을 때는 점차 감소하여 점진적으로 최대치에 도달하는 경향이므로 효소 반응에서 잘 알려진 Michaelis-Menten kinetics [Eq. (1)]식을 적용하였다.

여기서 K_m , V_{max} 은 각각 최대 반응속도 및 반응포화상수이고 S 는 메탄 농도이다.

한편, Eq. (1) 양변의 역수를 취하면 Eq. (2)가 얻어지고, 이를 도시하면 (Lineweaver-Burke plot) 기울기 K_m/V_{max} 및 $1/V_{max}$ 로부터 K_m , V_{max} 을 얻을 수 있다. K_m , V_{max} 은 각각 1.1332 atm , $2.915 \text{ mmol/mg dry cell/h}$ 이었다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

(b) 메탄으로부터 메탄올로의 전환 효율

일반적으로 메탄에서 메탄올로의 전환은 균체의 물질대사에 의해서 이루어지기 때문에 균체의 대사 능력과 관계가 있으며, 또한 기질에 양과도 관계가 있다. 앞서 최적의 메탄 양을 산출하였기에 최적의

메탄으로부터 생합성되는 메탄올과 이 때 대사활동의 산물인 이산화탄소 양을 관찰한 결과 Fig. 20과 같다. 즉, *M. trichosporium* OB3b를 이용하여 메탄에서 메탄올로의 전환율을 관찰하기 위해서는 단위 시간동안 소모된 메탄의 양과 단위 시간동안 생합성된 메탄올의 양이 관여하는데 Eq. (3)에 의해서 전환율을 산출한 결과 37%의 전환율을 가지고 있음을 알 수 있다.

$$\text{Conversion rate} = \frac{\Delta \text{Methanol}}{\Delta \text{Methane}} \times 100 \quad (3)$$

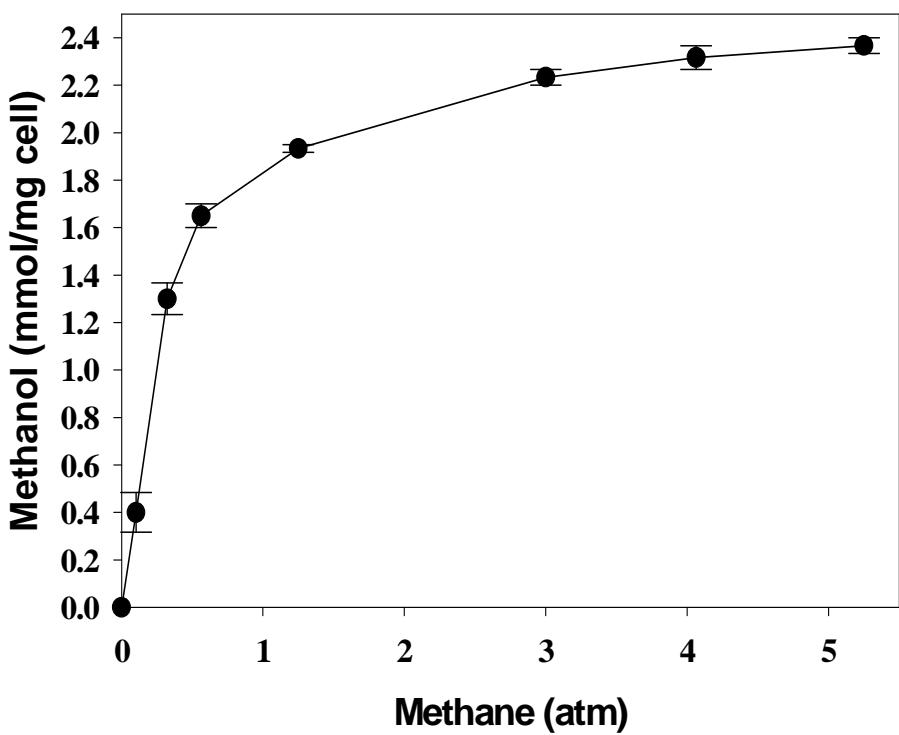


Fig. 19. Conversion of methane to methanol by *M. trichosporium* OB3b.

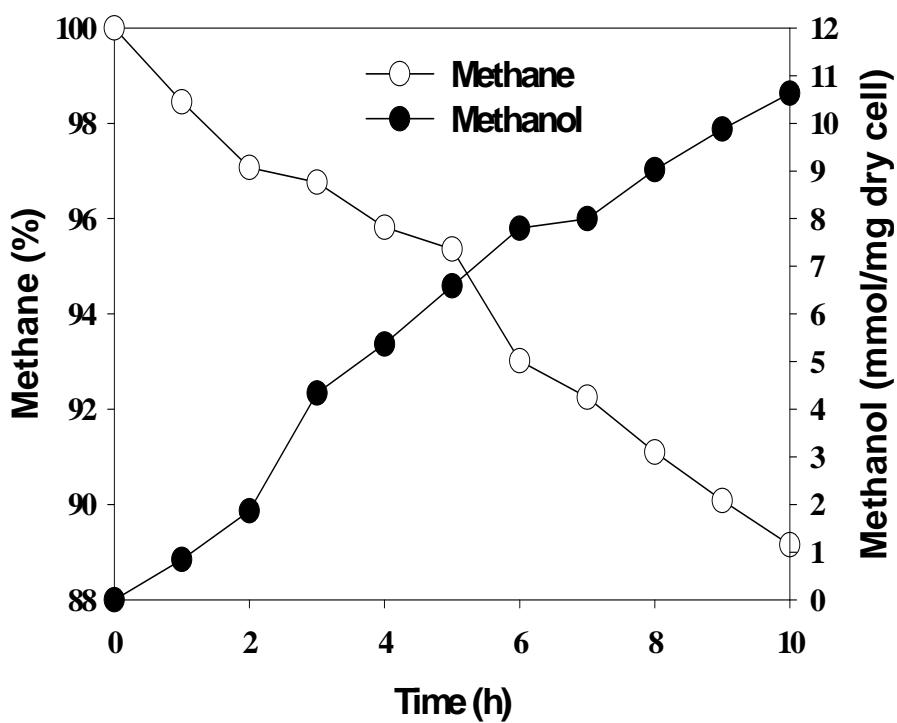


Fig. 20. Time-course of methane consumption(○) and methanol production(●) by *M. trichosporium* OB3b.

3. *Repeated-batch system*에 의한 메탄을 생합성

1) *Repeated-batch system*를 위한 조건 산출

(a) 초기 메탄을 농도에 따른 MMO 활성 측정

메탄을을 반복적으로 생성하기 위해서는 생합성된 메탄을이 MMO에 어떠한 영향을 주는지 확인하여야 한다. 실험 결과 초기 메탄을 농도가 증가함에 따라 MMO의 활성이 저해됨을 알 수 있었다. 그 결과 고농도의 메탄을이 MMO의 활성을 저해하는 것을 알 수 있었으며, 메탄을 농도가 15 mM 존재시에 활성이 75% 정도 감소함을 알 수 있었다(*Fig. 21*).

(b) 메탄을 생합성에 관여하는 인자들

*Repeated-batch system*으로 메탄을을 생합성하기 위해서 반복적으로 보충되어야 하는 인자가 무엇인지 관찰하기 위하여 반응 8시간이 지난 후에는 큰 변화가 없어 반응 8시간부터 sodium formate와 메탄을 보충하여 실험을 수행한 결과 *Fig. 22*과 같다. 실험 결과 환원제 역할을 하는 sodium formate 20 mM과 반응 초기의 메탄 양과 같이 보충하였을 때 생합성되는 메탄을 양이 그렇지 않을 경우보다 약 3 mmole/g dry cell 정도 증가함을 알 수 있었다.

2) *Repeated-batch system*에 의한 메탄을 생합성

*M. trichosporium OB3b*를 이용하여 8시간마다 원심분리를 통하여 생성된 메탄을과 반응액을 제거한 후 환원제인 sodium formate 20 mM과 12.9 mM phosphate buffer(pH 7.0)의 반응액으로 균체를 다시 혼탁한 후 *repeated-batch system*으로 메탄을을 생합성 실험을 3회 반복 수행한 결과 24시간동안 약 31.2 mmole/g dry cell의 메탄을을 생합성 하였다. 회분식 8시간에 비하면 약 2.3배 증가된 양이다(*Fig. 23*).

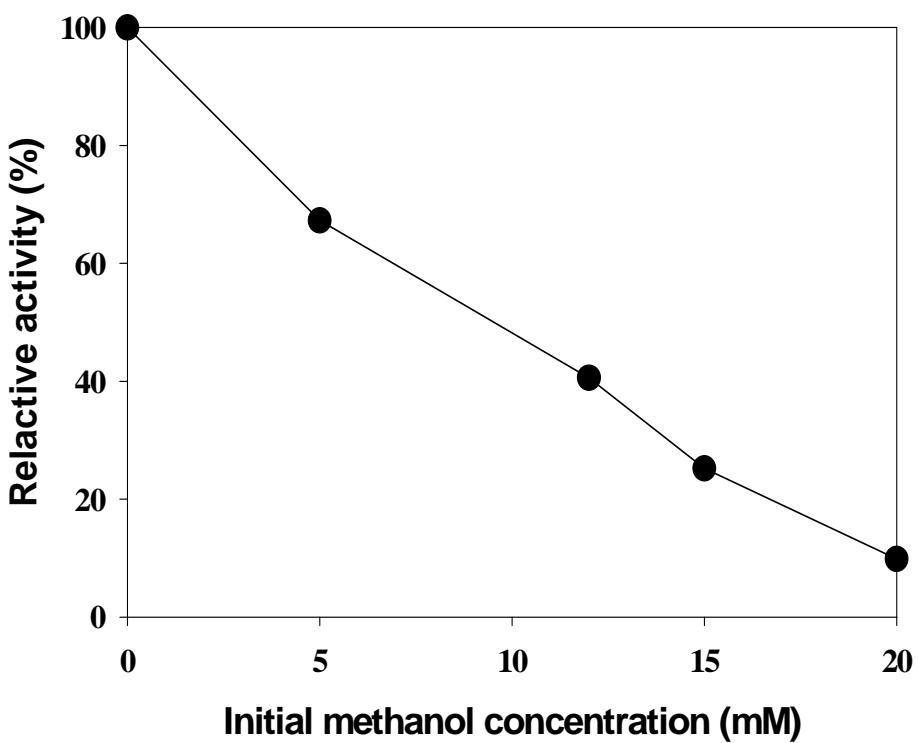


Fig. 21. Inhibitory effect of initial methanol concentration on the pMMO activity(propene epoxidation assay).

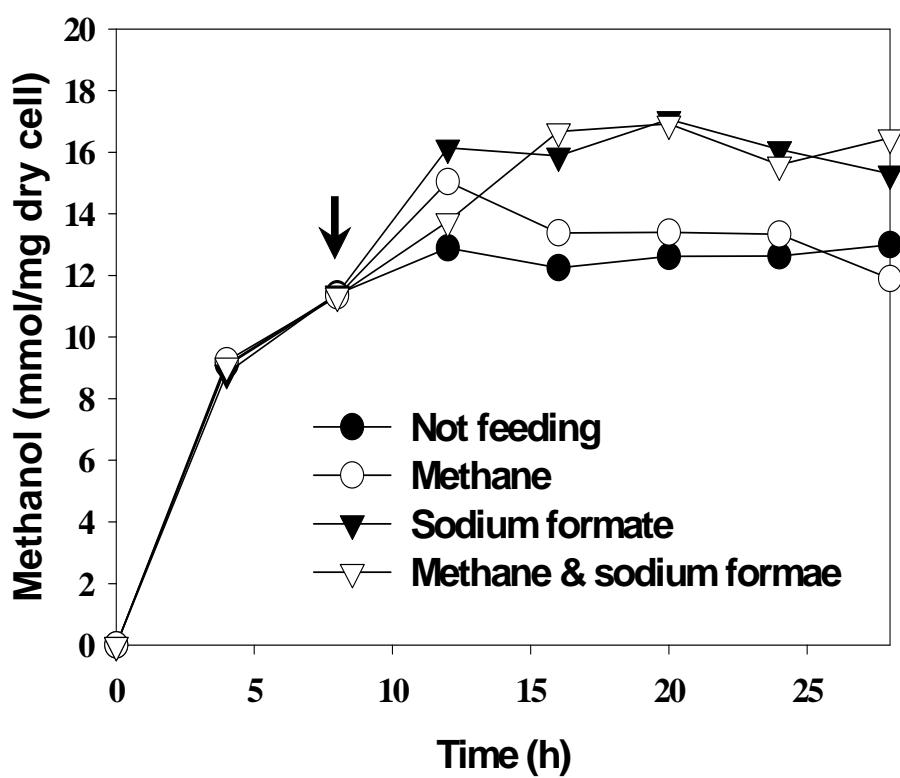


Fig. 22. Effect of feeding factors on the methanol biosynthesis in the repeated-batch system.

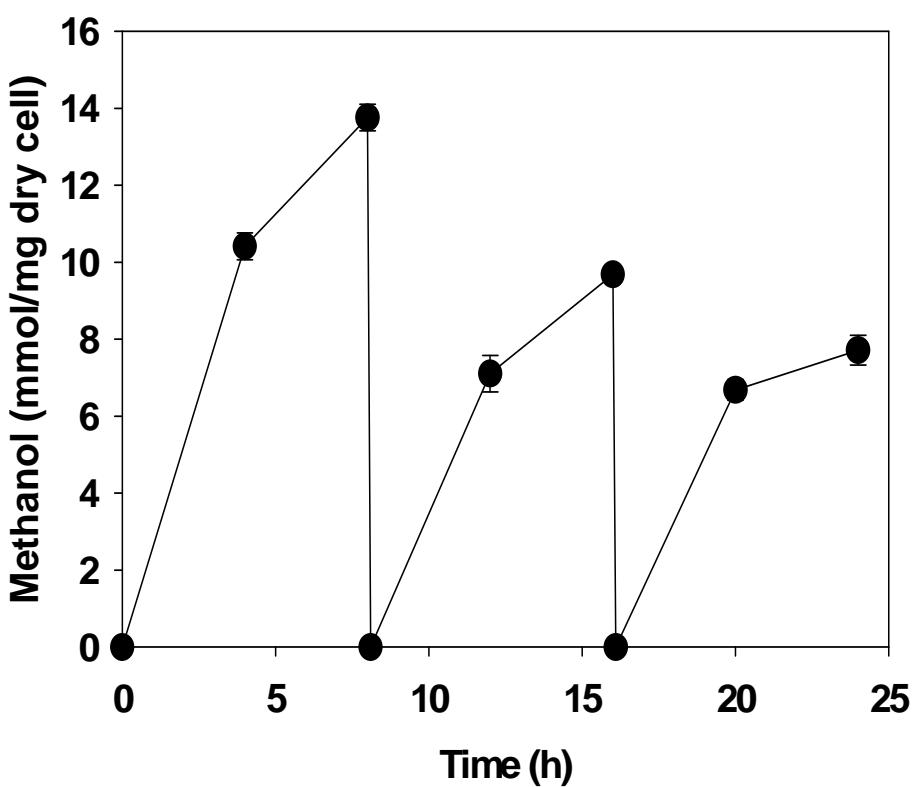


Fig. 23. Repeated-atch reaction methanol production with *M. trichosporium OB3b*.

4. 반응기를 이용한 메탄을 대량 생합성

1) 반응기에서 균체 배양

균체 배양시 *flask*와 3L 용량에 반응기에서 2L 배양액으로 성장 속도를 관찰한 결과 큰 차이가 없음을 알 수가 있었다(*Fig. 24*).

2) 반응기에서 메탄을 생합성

메탄을 생합성을 반응기를 이용하여 수행하였을 경우 생합성되는 메탄을 양은 거의 비슷하였으나 반응기에서 조금 많은 13.75 $mmol/mg\ dry\ cell$ 의 메탄을이 생합성 되었다(*Fig. 25*).

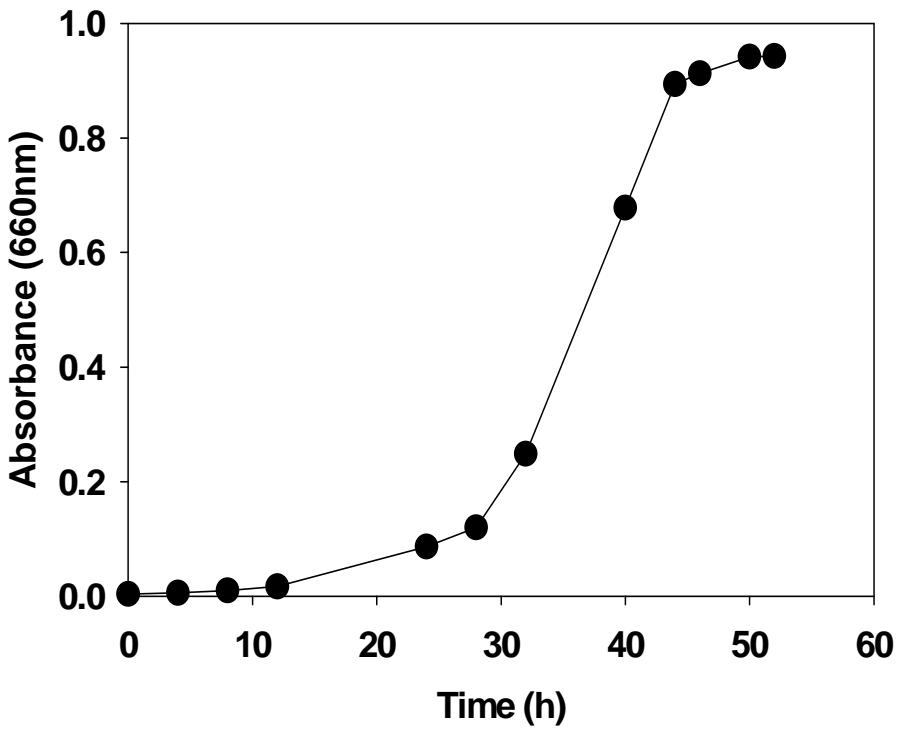


Fig. 24. Growth of *M. trichosporium* OB3b in the 3L fermentor.

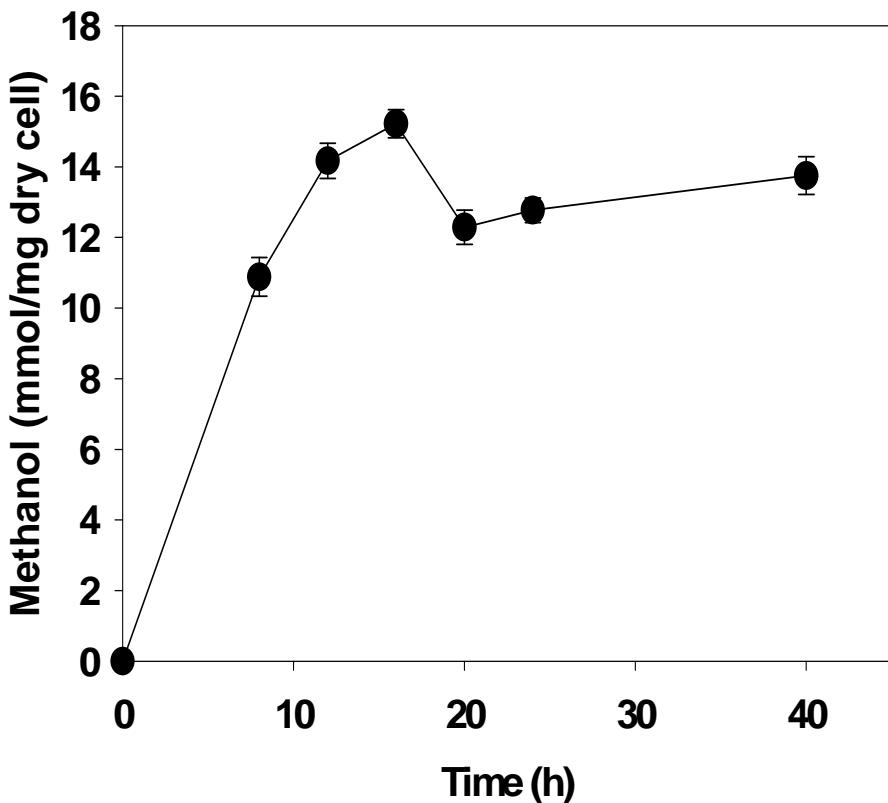


Fig. 25. Methanol biosynthesis by *M. trichosporium* OB3b in the 3L fermentor.

5. 생합성 된 메탄올 증류

*M. trichosporium OB3b*를 이용하여 메탄으로부터 메탄올을 생합성 하였을 경우 농도가 매우 낮았다. 이에 메탄올의 농도 및 순도를 증가시키기 위해서 증류하였다(*Fig. 7*). 증류는 일차적으로 단순 증류를 하여 메탄올 농도를 농축한 후 이차적으로 분별 증류를 수행하였다. 그 결과 $13.75 \text{ mmole/mg dry cell}$ 의 농도를 1 M 까지 높였으며 그 순도 또한 매우 좋은 것으로 확인하였다.

REFERENCES

1. Anthony, C. *The biochemistry of methylotrophs.* Academic press Ltd., London. 1982
2. Anthony, C. "Bacterial oxidation of methane and methanol." *Adv. Microb. physiol.* 27 113-210, 1986
3. M. Dworckia and J.w..Forster. *J.BACT.* 12, 646, 1956
4. R. Whittenbury, K.C. Phillips and J.F. Wilkins. "Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria." *J. Gen. Microbial.* 61, 205, 1970
5. Whittenbury, R. and H. Dalton. *The prokaryotes : The methylotrophic bacteria.* Springer-verlag KG Berlin. 1981, pp. 849-952
6. Whittenbury, R. Kreig, N.R and Holt, J.G.. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology.* vol.1 : *Methylococceaceae fam. nov.*, The williams & willkins co. 1984, pp.256-262
7. Gal chen ko, V.F. and Andreev, L.V. *Microbial growth on C1 compounds : Tazonomy of obligate methylotrophs,* Americal society for Microbiology. washington D.C. 1984 pp. 269-281
8. Hanson, R.S Netrysov, A.I. and Tsuji, K.. *The prokaryotes : The obligate methanotrophic bacteria* *Methylococcus, Methylomonas, Methylosinus and related bacteria,* Springer-Verlag, New York. 1991, pp. 2350-2365
9. Whittenbury, R. Dalton, H. Starr, M.P. Stolph, H. Truger, H.G Balows, A. and Schleifer, H.G.. *The prokaryotes : The methylotrophic bacteria.* Spriger-Verlag KG. Berlin. 1981, pp.894-902

10. Whittenbury, R. and Kreig, N.R.. *Bergey....'s manual of systematic bacteriology : Methylococcaceae fam.nov..vol.1*,The williams & wilkins Co. Baltimore. 1984.pp.256-262
11. Whittenbury, R. *Microbial growth on C1 compounds : The interrelationship of autotrophy and methylotrophy as seen in Methylococcus capsulatus (Bath)*. Heyden London. 1981, pp.181-190
12. Bowman, J.P. Sly, L.I. Nichols, P.D and Hayward, A.C. "Revised taxonomy of the methanotrophs : Description of *Methylobacter* gen.nov.,emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and proposal that family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs." *Int. J. Syst. Bacterial.* 43 : 735-753, 1993
13. Bowman, J.P Sly, L.I and Stacker brandt, E.."The phylogentic position of the family *Methylococcaceae*." *Int J. Syst. Bacteriol.* 45 : 182-185, 1995
14. Senior, P.J. and Windass.."The ICI single cell process." *J. Biotechnol. Lett.* 2: 205-210. 1980
15. Smith, S.R.L.. *Microbial Growth on C1 compound.(Dalton, H.ed)*, Heyden, London. 342-348, 1984
16. Asenjo, J.A and Suk, J.S.."Microbial conversion of methane into poly- β -hydroxybutyrate(PHB) :growth and intracellular product accumulation in a typeII Methanotroph." *J. Fem Technol.* 64 : 271-2789, 1986

17. Park, S. and Choo, S.Y. "Production of Methanol by resting cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase." *Appl. Environ. Microbial.* 55 : 2819-2826, 1993
18. Higgins, I.J and Quayle, J.R.. "Oxygenation of methane by methane-grown *Pseudomonas methanica* and *Methanomonas methanoxidans*." *Biochem. J.* 118: 201-208. 1970
19. S.H. Stanley, S.D. Prior, D.J. Leak, and H. Dalton.
20. Park, S.H.. "Production of methanol by resting cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b" *Korean J. Biotechnol. Bioeng* 8: 341-350, 1993
21. Metha, P.K. Mishra, S. and Ghose, T.K " Methanol biosynthesis by covalently immobilized cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b : Batch and continuous studies." *Biotechnol. Bioeng.* 37 : 551-556, 1991
22. Patras, L.E and Tang, A.. Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American society for Microbiology. 1998, pp.270
23. Masayuki Takeguchi, Takako Furuto, Daisuke Sugimori, Ichiro Okura. "Optimization of Methanol Biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b : An Approach to Improve Methanol Accumulation" *Applied Biochemistry and Biotechnology* 68 : 143-152, 1997

24. Takako Furuto, Masayuki Takeguchi, Ichiro Okura.
"Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium OB3b.*" *Journal of Molecular catalysis A chemical* 144 : 257-261, 1999
25. Shimoda, N.S and Okura, I.. *Abstracts of International chemical congress of pacific basin society, Abstract No. Bios. 1989, pp.04-307*

저작물 이용 허락서					
학 과	생물신소재학과	학 번	20027373	과 정	석사
성 명	한글: 이 상 귀 한문 : 李 上 貴 영문 : Lee Sang Gui				
주 소	광주광역시 광산구 월계동 778-8 201호				
연락처	E-MAIL : choman77@nate.com				
논문제목	한글 : <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b의 methanol dehydrogenase 활성조절에 의한 메탄올 생합성 영어 : Biosynthesis of methanol by controlling of methanol dehydrogenase activity of <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b				
본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.					
- 다 음 -					
<ol style="list-style-type: none"> 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. 					
동의여부 : 동의(<input type="radio"/>) 반대(<input type="checkbox"/>)					
2008년 8월 일					
저작자: 이 상 귀 (서명 또는 인)					
조선대학교 총장 귀하					