creative commons

COMMONS DEED

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:

BY: **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 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236708

2008년 8월
박사학위 논문

해수에서 분리한 신규 메탄올 산화세균 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T 유래 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호관계 및 trimethylamine biosensor 개발

조선대학교 대학원
생물신소재학과
김 희 곤

해수에서 분리한 신규 메탄올 산화세균 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T 유래 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호관계 및 trimethylamine biosensor 개발

Interaction between methanol dehydrogenase and MxaJ protein of a novel methanol oxidizing bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T and development of trimethylamine biosensor

2008년 8월 25일

조선대학교 대학원

생물신소재학과

김 희 곤

해수에서 분리한 신규 메탄올 산화세균 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T 유래 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호관계 및 trimethylamine biosensor 개발

지도교수 김 시 욱

이 논문을 이학박사 학위신청 논문으로 제출함

2008년 4 월

조선대학교 대학원

생물신소재학과

김 희 곤

김희곤의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 함 경 수 (인)

위 원 경북대학교 교수 강 범 식 (인)

위 원 부산대학교 교수 오 정 일 (인)

위 원 조선대학교 교수 신 현 재 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 시 욱 (인)

2008년 6월

조선대학교 대학원

차 례

제1장 메탄올 산화세균의 순수 분리 ····· 1

제1절 연구배경 및 중요성 ····· 1

제2절 실험 재료 및 방법 ····· 8

1. 균주의 분리 및 동정 ····· 8

가. 기본 배지의 조성 ····· 8

나. 균주의 분리 방법 ····· 8

다. 우수균주의 선별 ····· 8

라. 분리 균주의 특성 조사 ····· 9

(1) 형태 및 배양학적 특징 ····· 9

(2) 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있는 기질의 범위 ····· 9

(3) 질소원의 영향 ····· 10

(4) 배양 온도 및 초기 pH 영향 ····· 10

(5) 균체 비생장속도와 세대시간 ····· 10

(6) 세포벽의 구조 및 운동성 여부 ····· 10

(7) Catalase와 oxidase 활성 측정 ····· 11

(8) 분리균주의 fatty acid 구성 및 ubiquinone 분석 ····· 11

(9) 3-Hexulose phosphate synthase의 활성측정 ····· 12

(10) G+C mol% ····· 12

(11) Chromosomal DNA의 분리 ····· 13

(12) 16S rDNA 분석 ····· 13

(13) Plasmid의 존재여부 ····· 14

제3절 결과 및 고찰 ····· 15

1. 실험균주의 분리 및 특성 ····· 15

가. 분리균주의 형태 및 배양학적 특징 ····· 15

나. 이용 가능한 기질 및 질소원 ····· 15

다. 분리 균주의 최적 배양 조건 ····· 17

라. 균의 비생장 속도와 세대시간 ····· 22

마. 생리 생화학적 특징 ····· 22
바. Methanol과 methylamine에서 배양한 균주의 효소학적 특징 ····· 22
사. 분리 균주의 분자생물학적 특성 ····· 26
제4절 결 론 ····· 29
제5절 참고문헌 ····· 30

제2장 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}의 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호 관계 ····· 34
제1절 연구배경 및 중요성 ····· 34
제2절 실험 재료 및 방법 ····· 40
1. 시약 및 기기 ····· 40
2. 세균 배양 조건 ····· 40
3. Methanol dehydrogenase (MDH) 정제 ····· 40
가. 초음파 파쇄기를 이용한 cell free extract의 제조 ····· 40
나. MDH 효소 정제 ····· 41
다. Lysozyme을 이용한 cell free extract 제조 ····· 43
라. Gel filtration chromatography ····· 43
마. MDH 효소 활성 측정 및 단백질 정량 ····· 44
바. SDS-PAGE를 통한 MDH 효소 정제도의 확인 ····· 44
사. Native PAGE 및 활성염색 ····· 44
아. 등전점의 측정 ····· 44
자. *N*-말단 아미노산 서열 결정 ····· 45
차. EST-FT ICR mass spectrometry ····· 45
4. Genomic library 구축 ····· 46
가. Southern blot analysis ····· 46
나. *MxaFJGIR* 메탄올 산화 유전자의 분석 ····· 46
(1) 염기 서열의 분석 ····· 46
(2) Total RNA의 분리 ····· 46
(3) RT-PCR을 통한 *mxaFJGI* 유전자 발현 양상 조사 ····· 47
5. 항체의 제조 및 정제 ····· 48

가. 항체의 제조 ····· 48
나. 항체의 정제 ····· 48
다. Western blot analysis ····· 49
6. MDH와 MxaJ 단백질간의 상호 작용 ····· 49
가. MxaJ 단백질의 발현 및 MDH와의 결합 ····· 49
나. Co-immunoprecipitation ····· 50
다. MxaJ 항체를 이용한 MDH 활성 저해 실험 ····· 50
제3절 결과 및 고찰 ····· 52
1. Methanol dehydrogenase의 분리 및 정제 ····· 52
2. MDH I과 MDH II 단백질의 특성 분석 ····· 56
3. MDH I과 MDH II의 subunit 구조 분석 ····· 61
4. *MxaFJGIR* cluster 분석 ····· 63
5. MxaJ와 native MDH의 *in vitro* binding assay ····· 69
가. Native MDH I과 MxaJ 단백질의 direct binding assay ····· 69
나. Co-immunoprecipitation ····· 69
6. Methanol oxidation gene의 transcript 분석 ····· 73
7. MDH와 cytochrome c_L 그리고 MxaJ 간의 상호 작용 ····· 73
8. MxaJ 단백질과 MDH의 활성간 상관관계 ····· 80
가. MxaJ 항체를 이용한 MDH 활성 저해 실험 ····· 80
나. Sonication에 의한 MDH II 단백질의 활성변화 ····· 80
제4절 결 론 ····· 83
제5절 참고문헌 ····· 85

제3장 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}의 trimethylamine dehydrogenase를 이용한 trimethylamine biosensor 개발 ····· 89
제1절 연구개발의 필요성 ····· 89
제2절 재료 및 방법 ····· 95
1. TMADH 효소 순수 분리 및 정제 ····· 95
가. Soluble fraction 제조 ····· 95
나. Anion exchange column (POROS 20 HQ) chromatography ····· 95

다. Hydrophobic (HiPrep 16/10 Phenyl) chromatography ····· 95
라. Gel filtration (Sephacryl S-200) chromatography ····· 95
2. Trimethylamine dehydrogenase의 특성조사 ····· 96
가. 효소활성 측정 ····· 96
3. TMADH 효소를 이용한 전기화학적 분석시스템 구축 ····· 96
가. 전기전달매개체 (PVI-Os)를 이용한 trimethylamine의 분석 ····· 96
나. Mediator 제조 ····· 99
다. 전기화학실험을 위한 electrode의 제작 ····· 102
(1) 스크린 프린팅 탄소 전극의 제작 ····· 102
(2) Carbon electrode를 이용한 trimethylamine 정량 ····· 102
(3) Cyclic voltammetry 측정 ····· 102
(4) 탄소전극위에 금 나노입자의 전기흡착 (electrodeposition) ····· 102
제3절 결과 및 고찰 ····· 105
1. Trimethylamine dehydrognase 정제 및 특성 조사 ····· 105
가. TMADH의 정제 ····· 105
나. TMADH 특성 조사 ····· 105
(1) 최적온도, 온도 안정성 및 최적 pH ····· 105
(2) K_m과 V_{max} 결정 ····· 5 ····· 10
2. TMADH를 이용한 TMA의 전기화학적 분석 ····· 108
가. 전극위에 금 나노입자의 전기흡착 실험 ····· 108
나. 전극위에 redox complex의 고정화 실험 (Self Assemble Monolayer; SAM) ····· 108
다. 전기전달매개체를 이용한 TMA의 분석 ····· 110
(1) PVI-Os를 이용한 다양한 농도의 trimethylamine 검출 ····· 112
(2) Ferrocene 화합물을 이용한 다양한 농도의 trimethylamine 검출 ····· 111
제4절 결 론 ····· 115
제5절 참고문헌 ····· 116

LIST OF FIGURES

Fig. 1-1. Pathway for the oxidation of C_1 compounds and assimilation of formaldehyde. ···· 3
Fig. 1-2. SEM image of *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T. ····· 16
Fig. 1-3. Effect of initial pH on the growth of the isolate. ····· 19
Fig. 1-4. Effect of NaCl concentration on the growth of the isolate. ····· 20
Fig. 1-5. Effect of methanol concentration on the growth of the isolate. ····· 1··· 2
Fig. 1-6. Cell growth curve of the isolate under the optimum conditions. ····· 24
Fig. 1-7. 16S rDNA-based dendrogram showing the phylogenetic position of *M. aminisulfidivorans* sp. nov. MP^T among methylotrophs of the *Gammaproteobacteria.* ····· 28
Fig. 2-1. A model for the expression of methanol dehydrogenase genes of *M. extorquens* AM1. ····· 35
Fig. 2-2 The α β units of methanol dehydrogenase simplified to show the β strands in the α chain and the long α helix of the β subunit. ····· 9····· 3
Fig. 2-3. Elution profile of MDHs prepared by sonication method for cell disruption. ···· 42
Fig. 2-4. Construction of His-tagged pASK-IBA6 mature *mxaJ* plasmid (A) and purification of expressed mature MxaJ protein from *E. coli* (B). ····· 51·····
Fig. 2-5. Elution profile of MDHs by enzymatic cell disruption method. (A) Elution was made by using a linear gradient of NaCl from 0 to 200 mM (-) through POROS HQ-20 anion exchange chromatography. (B) Native-PAGE separation and activity staining of the eluted fractions containing MDH. ····· 53
Fig. 2-6. Molecular weight estimation of MDH I and II through a Sephacryl S300 gel filtration column. ····· 55
Fig. 2-7. Electrophoresis analysis of purified MDH I and II. ····· 57
Fig. 2-8. MALDI-TOF/TOF MS spectrum of the peptides generated by trypsin digestion of MxaJ proteins (A) and Mascot search results (B). ····· 58
Fig. 2-9. CBR staining on a SDS-PAGE gel of purified MDH I and MDH II (A) and comparison of each subunits intensity value using SDS-PAGE data (B). ····· 62
Fig. 2-10. 7-Tesla LTQ FT-ICR MS analysis of MDH I protein. ····· 64·····
Fig. 2-11. 7-Tesla LTQ FT-ICR MS analysis of MDH II protein. ····· 5····· 6

Fig. 2-12. SDS-PAGE analysis of purified MDH I and MDH II stained by silver staining (A) and comparison of each subunits intensity value using SDS-PAGE data (B). ····· 66
Fig. 2-13. Typical LTQ-FT MS/MS spectrum of parental ion (m/z 1782.83) from MxaJ of *M. aminisulfidivorans* MP^T. ····· 67
Fig. 2-14. Schematic diagram of the isolated genomic DNA fragments. ····· 68
Fig. 2-15. Molecular weight determination of expressed mature MxaJ protein on a Sephacryl S200 gel filtration column. ····· 70
Fig. 2-16. Column binding assay with MDH and expressed MxaJ protein in *E. coli*. ····· 71
Fig. 2-17. Co-immunoprecipitation analysis of MxaJ protein with MDH I. ····· 72
Fig. 2-18. Gene organization of the *mxa* cluser of *M. aminisulfidivorans* sp. strain MP^T. ··· 74
Fig. 2-19. Comparison of reduced absorption spectra of wild type and recombinant cytochrome c_L. ····· 75
Fig. 2-20. Reduction of potassium ferricyanide with MDH and wild or recombinant type cytochrome c_L. ····· 75
Fig. 2-21. Relationship between methanol concentration and relative activity of MDH (A) and Western blot analysis of MDH and MxaJ protein expression profile depending on the growth phase (B). ····· 77
Fig. 2-22. Expression of MDH and MxaJ protein in the cells grown on different carbon source. ····· 79
Fig. 2-23. Effect of sonication on MDH activity. After native electrophoresis gel was CBR staining (A) and activity staining (B). ····· 82
Fig. 3-1. Potential wave form for cyclic voltammetry (A) and a typical cyclic voltammogram showing reduction and oxidation current peaks (B). ····· 94
Fig. 3-2. Schematic diagram of TMA biosensor using electrochemical method. ····· 97
Fig. 3-3. Synthesis of Poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$). ····· 99
Fig. 3-4. Structure of Poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$) (A) and cyclic voltammograms of Poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$). ····· 100
Fig. 3-5. Synthesis of ferrocene-ap-imidazole (A) and cyclic voltammograms of ferrocene-ap-imidazole (B). ····· 101
Fig. 3-6. Carbon electrode (A) and cyclic voltammetrical analysis (B). ····· 10

Fig. 3-7. Preparation of the gold-coated screen printed carbon electrodes. ····· 4· 10
Fig. 3-8. Effects of temperature on the activity of TMADH (A) and pH (B) on the activity of TMADH, and thernal stability of TMADH (C). ····· 107
Fig. 3-9. SEM images of screen printed carbon electrodes (A and B) and gold-coated screen printed carbon electrodes (C and D). ····· 109
Fig. 3-10. Cyclic voltammograms of poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$) in the presence of TMADH and TMA (A). Changes of catalytic oxidation current curves depending on TMA concentration. Calibration graph of TMA biosensor using osmium complex (B). ····· 112
Fig. 3-11. Cyclic voltammograms of ferrocene-ap-imidazole in the presence of TMADH and TMA (A). Changes of catalytic oxidation current curves depending on TMA concentration. Calibration graph of TMA biosensor using ferrocene complex (B). ····· 113
Fig. 3-12. Effect of pH on TMA biosensor using ferrosen-ap-imidazole. Experiments were performed in 100 mM phophate buffer (pH 6 to 8). Concentration of TMADH and TMA were 5 mg/ml and 62.5 μM, respectively. ····· 114

LIST OF TABLES

Table 1-1. Potential C_1 substrates founds in seawater and their sources ····· 7
Table 1-2. Characteristics of the type strains belonging to the genus *Methylophaga* ····· 17
Table 1-3. Cellular fatty acid composition of *M. aminisulfidivorans* MP^T grown on methanol ····· 25
Table 1-4. Enzymatic activities in cell extracts of the isolate MP^T grown with methanol or methylamine ····· 27
Table 2-1. Purification of MDH I and II from *M. aminisulfidivorans* MP^T ····· 54
Table 2-2. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits by CBR staining ····· 63
Table 2-3. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits by silver staining ····· 66
Table 2-4. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits by LTQ FT-ICR MS data ····· 67
Table 2-5. Identification of *mxa* genes from *M. aminisulfidivorans* MP^T based on the comparison with functionally characterized homologs ····· 68
Table 3-1. Purification of TMADH from *M. aminisulfidivorans* MP^T ····· 106

ABSTRACT

Interaction between methanol dehydrogenase and MxaJ protein of a novel methanol oxidizing bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T and development of trimethylamine biosensor

Hee Gon Kim
Advisor: Prof. Si Wouk Kim, Ph. D
Department of Biomaterials Engineering,
Graduate School, Chosun University

A new restricted facultatively methylotrophic marine strain MP^T (KCTC 12909^T= VKM B-2441^T = JCM 14647^T) possessing the ribulose monophosphate pathway of C_1-carbon compound assimilation was isolated from a seawater sample obtained from Mokpo, South Korea. The isolate was aerobic, Gram-negative, asporogenous, and was non-motile short rod. It grew well on methanol, methylated amines, dimethylsulfide and dimethylsulfoxide. Optimal growth occurred with 3% NaCl at 30^oC and pH 7.0. Fructose was utilized as a multicarbon source. Growth factors were not required and vitamin B_{12} did not stimulate growth. Its cellular fatty acid profile consists primarily of straight-chain saturated $C_{16:0}$ and unsaturated $C_{16:1}$ acids. The major ubiquinone is Q-8. The dominant phospholipids are phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. The DNA G + C content is 44.9 mol% (T_m). Based on 16S rRNA gene sequence analysis and DNA-DNA relatedness (25 ~ 41%) with the type strains of marine methylotrophs belonging to the genus *Methylophaga*, we proposed the isolate MP^T (= KCTC 12909 = VKM B-2441 = JCM 14647) be assigned as *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov.

Methylophaga aminisulfidivorans MP^T, a restricted facultative marine methylotrophic bacterium, was able to utilize methanol as a sole carbon and energy source, and possessed a methanol dehydrogenase (MDH) that is a key enzyme in the process of methanol oxidation. During purification of MDH, two types of MDH (MDH I and II) were obtained in the cell free extracts from MP^T cells grown on methanol. When analyzed by SDS-PAGE and ESI-FT ICR MS, MDH I was confirmed to consist of two subunits of with molecular masses of ~66 and ~10 kDa, respectively, in a form of $\alpha_2\beta_2$. By contrast, MDH I and MDH II contained an additional ~30 kDa protein, designated γ, in a form of $\alpha_2\beta_2\gamma$ and $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, respectively. MDH II showed 1.5–2.0 times higher activity than MDH I. Based on these observations and experimental data, it seems that the original MDH conformation is $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ within MP^T, and subunit γ keeps MDH in an active form, and/or makes MDH easily bind to the substrate, methanol.

Methylophaga aminisulfidivorans MP^T could be grown aerobically on trimethylamine (TMA) as a source of carbon and energy. The trimethylamine dehydrogenase (TMADH) could catalyze the oxidative demethylation of TMA. The active TMADH from MP^T was purified 12.3 fold through three purification steps. We detected the trimethylamine using an electrochemical biosensor with the electron-conducting redox polymers, Osmium and Ferrocene-imidazole complexes were electrode posited on the thiol-modified gold electrodes. As TMA was catalyzed by TMADH, the electrical signal obtained from a biosensor was monitored at 0.3 V versus Ag/AgCl. The produced electrons were transferred to the electrode via Ferrocene-imidazole complexes. The detection limit of TMA biosensor was 0.125 mM. The intensity of catalytic current almost linearly increased depending on the TMA concentrations.

제1장 메탄올 산화세균의 순수 분리

제1절 연구배경 및 중요성

Methylotrophic bacteria는 호기성 세균으로써 탄소-탄소간에 결합이 없는 한 개 또는 그 이상의 탄소원자를 포함하고 있는 환원된 C_1 화합물(methane, methanol, methylated amines, halomethanes, 그리고 황을 포함하는 methyl화된 유기화합물)을 에너지 및 탄소원으로 이용하여 생장할 수 있는 세균의 집단을 말한다. Methylotroph에 대한 연구는 Söhngen (1906)이 수중식물체에서 최초로 분리한 메탄 이용 세균(*Methanomonas methanica*)에서부터 시작되었지만 1966년까지 단 3종(*Psedomonas methanica*, *Methanomonas methanooxidans*, *Methylococcus capsulatus*)만이 보고될 정도로 methylotroph에 관한 연구는 활발하지 못하였다. 그 이유는 메탄 이용세균의 분리에 관한 연구방법이 확립되지 않았을 뿐만 아니라 형태적, 배양학적, 생리학적 특성에 대한 기준이 현재와 같은 체계를 갖추지 못하였기 때문이었다. 연구초기에는 methylotroph가 C_1 화합물을 산화해서 얻은 에너지를 이용하여 단순히 이산화탄소를 세포구성 물질로 만드는데 사용하기 때문에 이 세균들이 chemosynthetic autotroph로 생각되어 관심을 받지 못하였다. 그러나 이와 같은 탄소대사 경로를 가지는 몇 종의 균주를 제외한 대부분의 메탄올산화세균이 새로운 탄소 동화 경로를 이용하여 포름알데히드와 같이 이산화탄소보다 더욱 환원된 C_1 화합물을 동화한다는 사실이 알려지게 됨으로써 이 분야에 대한 연구가 더욱 활발히 진행되어 여러 탄소 및 에너지 합성 대사경로가 발견되었다. 1970년대에 이르러 Whittenbury 등에 의해 메탄산화세균의 분리 및 배양 방법이 개발되면서 메탄올 산화세균의 범위가 점차 늘어나게 되었음은 물론 (Whittenbury *et al*., 1970), 유전학적인 분석 기술의 발전에 의해 새로운 종들이 밝혀지게 되었고 현재까지 다양한 환경으로부터 메탄올산화세균이 발견되고 있다. 일반적으로 사용하는 기질에 따라 methylotroph를 분류해 보면 메탄산화세균 (methanotrophs), 절대메탄올산화세균(obligate methylotrophs), 통성메탄올산화세균(facultative methylotrophs), 자가영양적메탄올산화세균(autotrophic methylotrophs)의 4 그룹으로 분류할 수 있다 (Whittenbury *et al*., 1970; Large, 1983).

메탄산화세균이란 기질로 메탄과 메탄올만을 이용하는 세균을 말하며, 절대메탄올산화세균이란 메탄을 이용하지 못하고 메탄올이나 메틸아민을 이용하여 생장하는 균들을 말한다. 반면 통성메탄올산화세균은 메탄올을 포함한 여러 다탄소 화합물을 이용하여 생장할 수 있는 세균을 일컫고, 자가영양적 메탄올산화세균이란 환원상태의 C_1 화합물을 이산화탄소로 산화시킨 후 이것을 이용하는 균을 말한다. 이들은 다시 환원형 화합물을 어떠한 경로를 통해 세포구성 물질로 동화하는가에 따라 메탄올에서 일단계 산화된 포름알데히드 수준에서 탄소를 동화하는 ribulose monophosphate (RuMP) pathway, 포름알데히드와 최종 산화생성물인 이산화탄소가 동시에 동화하는 serine pathway 그리고 이산화탄소를 고정하여 생체물질을 생성하는 calvin pathway로 더욱 세밀히 분류될 수 있다.

Peel과 Quayle (1961)는 methanol과 formate를 유일한 탄소 및 에너지원으로 이용하여 생장할 수 있는 *Pseudomonas* AM1을 분리하였고, Large (1961)등은 이 균으로부터 methanol, formate, bicarbonate 등이 세포구성 물질로 생합성 되는 경로를 추적하여 CO_2 및 formaldehyde가 serine, glycine, malate 그리고 aspartate로 이어지는 경로를 통해 세포물질로 합성된다고 보고하였다. 한편 Kemp와 Quayle (1966)는 메탄을 이용해 생장하는 *Pseudomonas methanica*의 경우 formaldehyde와 ribose 5-phosphate가 allulose phosphate로 축합되어 세포구성 물질로 되는 pentose phosphate cycle을 이용해 탄소를 동화한다고 보고하였다. 이 두 가지 탄소동화 경로는 많은 연구자들에 의해 연구 비교되었고, 각각 serine pathway와 rubulose monophosphate pathway로 명명되었으며 이 두 가지 생리·화학적 특징은 현재까지도 methylotroph를 분류하는데 중요한 지표가 되고 있다. 한편 메탄올 산화 경로에 관련된 효소는 Anthony 연구그룹에 의해 최초로 연구되기 시작되었으며, 메탄올 산화과정을 일으키는 첫번째 단계 효소는 methanol dehydrogenase (EC. 1.1.98.8., MDH)에 의해 Fig. 1-1과 같은 산화과정을 거친다고 제시되었다 (Anthony, 1982; 1986). 그 중간 산물인 formaldehyde (HCHO)를 이용하여 세포구성 물질로 동화(RuMP pathway 혹은 serine pathway)하고, 그 다음 중간산물인 formic acid를 산화하여 NADH를 생성한 다음 다시 메탄을 산화시킬 수 있는 환원력을 재생한다 (Fig. 1-1).

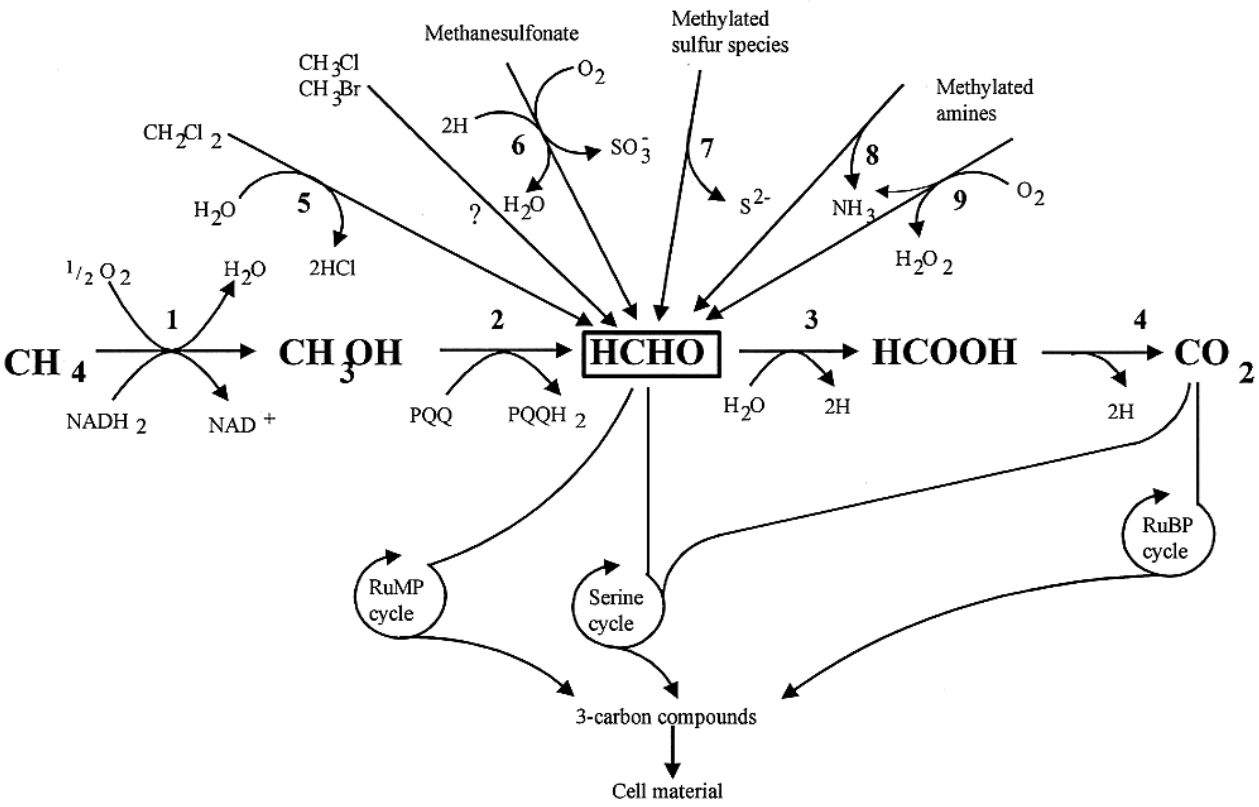


Fig. 1-1. Pathway for the oxidation of C_1 compounds and assimilation of formaldehyde (Lidstrom and Stirling, 1990). 1: Methane monooxygenase, 2: Methanol dehydrogenase, 3: Formaldehyde dehydrogenase, 4: Formate dehydrogenase, 5. Dichloromethane dehalogenase. 6; Methanesulfonate monooxygenase. 7: Methyl transferase, 8: Tri-, di-, monomethylamine dehydrogenase. 9: Tri-, di-, monomethylamine monooxygenase.

Methylotroph은 70년대 초부터 산업적 응용 가능성 때문에 주목을 끌어왔다. 초기에는 주로 단세포 단백질(Single Cell Protein) 생산과 관련된 것이었고 (Senior and Windass, 1980; Smith, 1984), 80년대 이후에는 주로 환경오염문제 해결이나 생분해성 고분자의 일종인 poly-β-hydroxybutyrate (PHB)의 생산이나 대체에너지인 메탄올 생산과 관련된 부분이 많이 연구되어졌다 (Asenjo and Suk, 1986; Park and Choo, 1993; Park, 1993). 대부분의 methanotroph는 세포 내 저장물질로 polyester 계통의 생분해성 고분자물질의 하나인 PHB를 합성한다. 배양조건과 균주에 따라서 PHB의 생성수율은 차이가 있으나 건조 균체중량의 최고 70%까지 생성이 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 methanotroph는 인체에 유해한 용매인 tri-chloroethylene (TCE), dichloroethylene (DCE), 1,1,1-chloroethane, dichloroethane, chloroform, dichloromethane 등을 호기적으로 분해할 수 있을 뿐만 아니라 methanol이나 여러 종류의 alkene epoxide를 생산하는 능력도 있다 (Aziz *et al*., 1999; Byers and Sly, 1993; Uchiyama *et al*., 1989). Methanol은 높은 옥탄가를 가지고 있기 때문에 자동차 연료로써 가솔린 대신 사용할 수 있는 액체연료이며, 연소 시 가솔린에 비해 훨씬 적은 공해물질을 배출하는 청정연료로 알려져 있다. 또한 가솔린의 옥탄가 상승제로 쓰이는 methyl tertiary butyl ether (MTBE)를 비롯한 여러 화학물질의 합성 전구체로도 용도가 크다. 메탄올은 메탄(천연가스, 바이오 가스), 석탄, 중유, 잡사, shale oil 등을 이용하여 제조할 수 있다. 이 중 메탄은 값이 쌀 뿐만 아니라 그 매장량도 전 세계적으로 70 ~ 230 × 10^{12} m^3 으로 아주 풍부하여 유용하게 활용된다면 매우 중요한 자원으로 이용될 수 있다. 그러나 현재까지는 매년 상당부분이 석탄이나 원유 채취 시 부산물로 취급되어 공기 중으로 그대로 방출되거나 아무 의미 없이 태워지고 있는 실정이다. 연료로 사용되는 메탄은 액화 천연가스(liquefied natural gas, LNG) 형태로 부피를 줄인 후 생산지에서 소비지로 운반되는 것이 보통이지만 이 방법은 비용이 많이 들 뿐 아니라 상당한 폭발위험을 내포하고 있다. 따라서 메탄을 메탄올로 전환하는 것은 연료의 안정성 향상에 큰 도움이 된다 (Park, 1993). 현재 상업화된 메탄 전환공정은 수증기와 금속촉매를 사용하는 2단계 무기화학공정이다. 첫 번째 단계에서는 메탄을 산소와 수증기 존재 하에 개질시켜 일산화탄소와 수소의 합성가스(syn-gas)로 만들고, 두 번째 단계에서는 아연-구리 촉매 하에서 syn-gas를 메탄올로 전환시킨다. 이 공정은 고온 고압이 요구되고 수율이 높지 않으며 또한 적절한 제어가 매

우 어렵다고 알려져 있다. 새로운 금속촉매를 개발하려는 노력이 계속되고 있으나 반응의 특성상 선택성, 안정성 등에 많은 문제가 있다. 한편 메탄을 기질로 하여 자라는 methanotroph를 이용하면 상온·상압에서 메탄의 직접 산화에 의한 메탄올의 생산이 가능하다. 따라서 methanotroph를 이용한 생물학적 전환공정이 무기화학공정을 사용하는 것보다 경제적인 비용과 위험성을 배제할 수 있는 장점이 있다. 그러나 methanotroph를 이용하여 메탄올을 생산하는 공정에서 가장 중요한 것은 활성이 높은 methanotroph를 분리하는 것이며 이는 자국의 미생물자원의 보존·보호 차원에서 매우 중요하다. Methanotroph의 산업적인 응용을 위해서는 기체 기질의 물질전달속도를 증대시킬 수 있는 적절한 반응기의 개발과 함께 미생물 자체의 생리적 특성에 대한 연구가 중요하다. 이 중 미생물 생장과 관련된 생리적 특성에 대한 연구는 기질의 이용이나 ATP 생산, 세포 내 저장 물질이나 세포 대사산물 생산 등의 상관관계를 밝히는 것을 주 연구대상으로 하고 있다.

1970년대로 접어들면서 MDH에 관한 연구가 본격적으로 수행되어졌는데 최초로 연구가 시도된 균주는 *Pseudomonas* sp. M27로 MDH의 분자량, 소단위 구성, 메탄올에 대한 K_m, 효소에 대한 기질 특이성에 관한 연구가 수행되었으며, 다른 메탄올 산화세균에 존재하는 MDH 역시 비교 연구 되어왔다. MDH는 methylotroph의 periplasms내에 soluble protein의 15% 정도로 존재하며, 메탄올을 산화시켜 메탄올을 formaldehye로 전환한다. 메탄올이 산화될 때 나오는 전자는 전자수용체인 cytochrom c_L에 전달되어 에너지를 생성한다. MDH는 $\alpha_2\beta_2$ 구조를 가진 tetramer로 α내에 prosthetic group으로써 PQQ를 포함하며, MDH의 구조를 유지하는데 Ca^{2+}이 중요한 역할을 담당하고 있다. 지금까지 진행된 MDH에 관한 연구에서 Gram positive methylotroph를 제외한 gram-negative methylotroph의 MDH는 생화학적인 특성이 유사한 것으로 나타나고 있다.

1970년대 후반 Yamamoto 연구그룹에 의해 해수로부터 methanol을 산화시킬 수 있는 65종의 신규 미생물이 최초로 분리되었다 (Yamanoto *et al.*, 1978; 1980). 해수에는 dimethyl sulfide (DMS), β-dimethyl-sulfoniopropionate (DMSP), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등 다양한 C_1 화합물들이 포함되어 있으며, 이들은 다양한 생물 또는 미생물에 의해 합성되는 것으로 보고되고 있다 (Kiene, 1993). 이렇듯 해수 및 해양퇴적물에는 다양한 형태의 C_1 화합물들과 C_1 화합물로써 이용 가능한 methylated 화합물이 포함되어 있으며, 미생물의 다양한 효소 반응을 통해 이용됨으로써 지구환경

의 탄소순환에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 최근 세계적으로 생물자원 및 신규 유전자의 중요성을 인식하고 새로운 환경으로부터 신규 생물자원을 발굴하기 위해 다양한 노력을 기울이고 있다. 특히 생물촉매제를 이용한 정밀 화학 물질 생산이나 신규 의약 후보 물질 연구 분야는 연구 특성상 신규 유전자의 확보가 연구의 성패를 좌우하기 때문에 고유한 우수 유전자를 확보하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 다양한 화합물들을 포함하고 있는 해양 환경은 새로운 기능을 가진 신규 세균을 확보하기에 중요한 생태적 다양성을 지니고 있고, 이로부터 신규 유용 유전자 및 단백질을 획득할 수 있는 중요한 자원으로 생각되고 있다.

*Methylophaga*속은 해양에서 분리된 해양성 세균으로써 호기성이며 메탄을 기질로 사용하지 못하는 methylotroph이다. 이 미생물들은 해양 침전물(sediment)과 탄산염 호수(Soda lake)등의 다양한 해양 환경으로부터 분리되었으며, 이들의 특징은 C_1 화합물들을 RuMP pathway를 통하여 세포구성 물질로 축적시키고, 어떤 종은 multi-carbon compound인 fructose를 이용할 수 있다. 현재까지 *Methylophaga* 속은 호중성(neutrophilic)의 특징을 가지고 있는 *M. marina, M. thalassica* 그리고 *M. sulfidovorans* 종이 알려져 있다 (Janvier *et al.*, 1985; De Zwart *et al.*, 1996). 최근에는 호염·호알칼리성(haloalcalophilic)인 *M. alcalica*와 *M. natronica*종이 발견되면서 methylotroph가 자연환경에서 보다 광범위하게 존재하고 있음이 밝혀졌다 (Doronina *et al.*, 2003a; 2003b). 이들 *Methylophaga*속은 RuMP pathway를 이용하는 methylotroph들과는 달리 Na^+, Mg^{2+} 이온과 vitamin B_{12}를 필요한다는 특징이 있고, NaCl에 대한 저항성과 낮은 G+C mol% (38.0 ~ 49.0 mol%)를 가지고 있다는 것이 다른 종들과 구별되는 특징이다. 하지만 최근에는 Red Sea algae로부터 생장 시 vitamin B_{12}를 필요로 하지 않는 새로운 종인 *M. marina* KM3과 KM5가 분리되었다 (Li *et al.*, 2007).

본 연구에서는 *Methylophaga*속에 속하며, RuMP pathway를 통해 탄소를 동화시키고 vitamin B_{12}를 필요로 하지 않는 새로운 제한적 통성메탄올산화세균을 분리하였고, *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov.로 명명하였다.

Table 1-1. Potential C_1 substrates founds in seawater and their sources (Kiene, 1993)

Substrate	Sources
C_1 compounds	
Methane	Sediments, seeps, microbiological
Methanol	Other C_1 compounds
Formaldehyde	Photochemical source
Formate	Oxidation of HCHO
Trimethylamine (TMA)	Algae, glycine betine, TMAO
Dimethylamine (DMA)	TMA, TMAO
Methylamine	TMA, TMAO
Trimethylamine oxide (TMAO)	Algae, fish
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Photochemical source from DMS
Dimethyl sulfide (DMS)	Alghae, DMSP, methionine
Methane thiol	DMS, methionine, methiolpropionate
Dimethyl disulfide (DMDS)	Methanetiol, methionine
Methane sulfonate[a]	DMS, methanetiol
Carbon monoxide	Photochemical source, DOC
Methyl iodide	Algae
Methylated metals (Hg, Sn)	Metabolites
Methylated metalloids (Ge, As)	Metabolites
Methylated compounds capable of being utilized as C_1 substrates	
Glysine betaine	Algae, invertebrates
Dimethyl glycine	Degradation of glycine betaine
Sarcosine	Degradation of glycine betaine
Choline	All organisms
Choline sulfate	Fungi, yeasts
β-dimethylsulfoniopropionate (DMSP)	Certain species of algae
3-methiolpropionate	Degradation of DMSP
Methionine	All organisms
Arsenobetaine	Selected species of marine invertebrates
Dimethylsulfocholine	Selected diatoms
S-methylmentionine	Possibly algae

[a] Methane sulfonate has not been measured in seawater but it is present in rain and aerosols and should occur in seawater.

제2절 실험 재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 동정

가. 기본 배지의 조성

메탄올을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 선별적 분리를 위하여 전라남도 일대의 해수로부터 시료를 채취하여 분리용 시료로 사용하였다. 채취한 시료로부터 methylotroph의 분리 및 균주의 배양에 사용된 기본 배지는 Kim 등이 제안한 standard minimal salt medium (SMM ; KH_2PO_4 2 gl^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 2 gl^{-1}, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 gl^{-1}, NaCl 30 gl^{-1}, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 gl^{-1}, pH 7.0)을 사용하였다 (Kim *et al*., 1991).

나. 균주의 분리 방법

Methanol을 탄소 및 에너지원으로 이용하는 세균을 분리하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다. 액체 시료의 경우에는 100배 농축하여 농축액 1 ml를 500 ml 용량의 삼각플라스크에 1% (v/v) methanol이 포함되어 있는 50 ml용량의 SMM 배지에 접종하였다. 처음 시료로부터 접종한 액을 2일간 진탕 배양한 후 다시 신선한 배지에 1% (v/v) 접종하고 진탕 배양하였다. 이와 같은 조작을 3회 반복한 후에 균주가 메탄올 배지에서 생장하면 1% (v/v) methanol이 포함되어 있는 한천배지 위에 분산 평판하였다. 나타나는 집락 중 생장속도가 빠르고 그 크기가 가장 큰 것을 1차적으로 선별하였으며 이 과정을 3회 반복하여 순수 분리하였다.

다. 우수균주의 선별

SMM 기본 배지 50 ml를 500 ml flask에 넣고 멸균한 후, 1차 순수 분리된 균주를 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 배양하면서 2시간마다 UV-visible spectrophotometer (Ultrospec2000, Amersham Phamacia Biotech)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생장속도가 빠른 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주 중 다량의 균체를 생산하는 균주를 3차로 선별하기 위해 72시간 배양 후, 건조중량을 측정하여 최종적으로 우수균주를 선발하였다.

라. 분리 균주의 특성 조사

(1) 형태 및 배양학적 특징

분리균주의 형태와 크기는 균주를 고체배지에서 2일 배양하였고, 액체배양의 경우 1일 정도 배양하여 그램염색을 한 후 위상차 현미경으로 관찰하였다. Exospore의 존재 유무는 Bowman 등이 사용한 방법을 약간 변형하여 이용하였다 (Bowman *et al*., 1993). 액체 배양하여 잘 자란 균체 5 ml를 20 ml용량의 glass vial에 담고, 미리 온도가 80℃로 데워져 있는 water bath에서 20분 동안 반응시킨 후 negative-staining을 하여 현미경으로 관찰하였다. 분리균주의 배양학적 특징은 SMM 한천배지에서 자란 집락의 크기, 모양 및 색깔 등을 관찰하였고, 운동성은 반유동 고체배지에 stab culture하여 검사하였으며, 영양 배지에서의 생장유무도 관찰하였다.

(2) 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있는 기질의 범위

균주가 탄소원으로 이용할 수 있는 기질범위를 알아보기 위하여 메탄올 대신 다양한 기질을 첨가하여 SMM 배양액에 접종한 후, 5일 동안 관찰하여 생장을 하면 탄소원으로써 이용할 수 있다고 판단하였다. 본 실험에 탄소 및 에너지원으로 이용된 유기물의 농도는 0.1% (w/v)로 조정하였고, 휘발성 유기물은 0.2 μm의 pore size를 가진 syringe filter로 여과한 후 멸균된 배양액에 접종하였다. 사용한 기질은 다음과 같다.

Methanol, ethanol, formate, formamide, urea, sodium succinate, sodium malate, yeast extract, D-glucose, D-fructose, casitone, peptone, tryptone, trimethylamine, dimetylamine, monomethylamine, dimethylsulfide (DMS), dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO).

분리균주의 메탄사용 여부는 고무마개로 밀폐한 50 ml의 SMM 액체배지가 포함된 500 ml flask의 상부에 가스유량 조절기로 메탄과 공기의 비율을 1:1 (v/v)로 공급하여 생장여부를 확인하였고, 수소의 이용여부는 동일한 조건의 배지에 수소와 산소, 이산화탄소 비율을 7:2:1 (v/v)로 조절하여 공급한 후 생장여부를 확인하였다.

(3) 질소원의 영향

기본 SMM 배지에 포함되어 있는 질소원 이외에 다른 질소원을 이용할 수 있는지의 여부를 알아보기 위하여 아래에 나타낸 질소원들을 이용하였다. SMM 액체배지 50 ml에 균체를 접종한 후 생장 할 수 있는지에 따라 질소원 이용 여부를 조사하였고, 질소원이 전혀 포함되지 않은 배지에 균을 접종시킨 것을 대조군으로 사용하였다. 각 질소원의 농도는 0.1% (w/v)로 조절하였으며 사용한 질소원은 다음과 같다.

Ammonium molybdate, ammonium aminosulfate, ammonium vanadate, ammonium dihydrogen phosphate, potassium nitrate, formamide, glycine, urea, yeast extract, ammonium oxalate, L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid, L-tryptophan, D-asparagine, casitone.

(4) 배양 온도 및 초기 pH 영향

균주의 생장 가능한 온도와 최적 온도를 찾기 위해 25℃에서 35℃ 사이의 적절한 간격을 두어 배양시킨 후 배양 온도에 따른 균체 생장을 비교 검토하였다. 배양액의 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 배양액을 멸균한 후, 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 초기 pH를 각각 4 ~ 10 까지 1 간격으로 조절하였다.

(5) 균체 비생장속도와 세대시간

배양시간에 따른 균체 생장속도를 조사하기 위해 발효조에서 배양하면서 2시간 간격으로 배양액을 취한 후 600 nm에서의 흡광도로써 균체 생장속도를 측정하였다. 발효조는 5리터 용량을 사용하였고 배지는 2리터를 제조하였으며 초기 배지의 pH는 7.0으로 맞추었다.

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

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

* A_0 : 초기 흡광도, A : 말기 흡광도, t_0 : 초기배양시간, t : 말기배양시간

(6) 세포벽의 구조 및 운동성 여부

생리학적 및 생화학적 특성의 조사는 Microbiological Applications에 기술된 방법들을 참조하여 수행하였다. 세포벽의 구조는 Gram staining에 의해 분리균주를 염색한 후 광학현미경으로 × 1000배의 배율로 관찰하였으며, 균체가 붉은색 또는 보라색으로 염색되었는지를 관찰하였다. 균주의 운동성은 10 ml 시험관에 agar (0.5% w/v)를 포함한 SMM 배지를 5 ml정도 넣고 굳혀서 반유동 고체배지를 만들고, 침 끝에 균체를 묻혀 배지에 수직으로 찔러서 접종을 하였다. 균체가 자라는 동안 접종부위를 중심으로 바깥쪽으로 퍼져 자라는지, 접종부위에 국한되어 자라는지를 관찰하여 운동성 유무를 결정하였다.

(7) Catalase 와 oxidase 활성 측정

Catalase 활성은 진탕배양한 균종을 따서 3%의 hydrogen peroxide 몇 방울을 가하고, 즉시 또는 5분정도 후에 기포가 발생하는지 여부에 따라서 결정하였다. Catalase 활성은 기포가 발생하면 positive, 기포가 발생하지 않으면 negative로 결정하였다.

Oxidase 활성의 측정은 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine을 포함한 oxidase disc test (BioMerieux, France)를 사용하였다. 멸균된 slide glass 위에 disc를 놓고 멸균된 증류수를 수 방울 떨어뜨려 disc를 충분히 적신 후 agar plate에서 자란 colony를 따서 disc위에 접종을 하였다. 접종부위가 30초 이내에 dark purple로 변하면 positive, 색의 변화가 없으면 negative로 결정하였다.

(8) 분리균주의 fatty acid 구성 및 ubiquinone 분석

분리균주의 세포막을 구성하고 있는 fatty acid 구성성분을 알아보기 위하여 동결건조한 균체를 이용하였다. 동결건조한 균체 30 mg에 5.4 M anhydrous HCl 용액 200 µl를 첨가하여 70℃에서 2시간 동안 가열하였다. 이 용액은 100 µl hexane으로 두 번 추출하여 fatty acid의 methyl ester와 aldehyde derivative들을 분리하였다. 추출물은 evaporator를 이용하여 건조하였고, *N,O*-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide를 20 µl 첨가하여 60℃에서 15분간 반응하였다. 반응물은 1 µl를 취하여 GC-MS (HP-5985B, Hewlett Packard)로 분석하였다. 이때 분석컬럼은 capillary column (25 × 0.25 mm)에 Ultra-1 nonpolar methylsilicone를 충진하여 사용하였다. 분석조건은 150℃에서 2분,

분당 5℃씩 250℃까지 승온한 후 분당 10℃씩 300℃까지 승온하여 분석하였다. Ubiquinone은 Collins (1985)방법에 의해 추출 및 정제를 한 후 mass spectrometer (MX-1310, Finnigan)로 분석하였다.

(9) 3-Hexulose phosphate synthase의 활성측정

효소활성은 ribulose 5-phosphate와 formaldehyde의 축합으로 인한 formaldehyde의 감소 정도로 측정하였다 (Ferenci *et al.*, 1974). 먼저 균체 0.2 g을 300 μl의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 초음파분쇄기로 100 μl 당 10초씩 초음파로 파쇄한 후 원심분리(15,000 × *g*/30min/4℃)하여 상등액을 cell free extract로 사용하였다. 초기 반응혼합물은 50mM sodium-phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml 내에 5mM $MgCl_2$, 0.55mM formaldehyde, phosphoisomerase (10 unit/ml), 그리고 5 mM D-ribose 5-phosphate를 첨가하였다. 처음 이 반응혼합물을 30℃에서 10분간 반응시켜 ribose 5-phosphate가 ribulose 5-phosphate로 반응이 일어나도록 한 다음 cell free extract를 첨가하였다. 효소반응에 의한 formaldehyde의 소비는 30℃에서 5분간 반응시킨 후 sample에 0.5 M의 HCl (100 μl)을 처리하여 반응을 정지시켰고, formaldehyde의 잔존량을 Nash (1953)방법에 의한 비색정도를 412 nm에서 조사함으로써 측정하였다. 3-hexulose phosphate synthase에 의하지 않은 formaldehyde의 감소는 ribose 5-phosphate를 포함하고 있지 않은 반응용액을 control로 하여 실험함으로써 오차를 줄였다.

(10) G+C mol%

분리균주의 G+C mol%를 알아보기 위해 DNA는 Marmur 방법 (1961)에 따라 정제하였다. DNA G+C 함유량은 spectrophotometer (DU-8B, Beckman)을 이용하여 thermal denaturation (T_m) 방법으로 heating rate를 분당 0.5℃씩 승온하여 분석하였다. DNA G+C mol%는 Owen과 Lapaga (1975)가 사용한 equation (mol G+C = (T_m × 2.08) − 106.4)으로 계산하고, DNA standard는 *Escherichia coli* K-12의 DNA를 사용하였다. DNA-DNA hybridization은 Johnson (1985)의 방법인 DNA reassociation 방법으로 결정하였고, type strain인 *M. marina* ATCC 35842^T, *M. thalassica* ATCC 33146^T 그리고 *M. sulfidovorans* LMD 95.210^{T}를 대조군으로 사용하였다.

(11) Chromosomal DNA의 분리

분리균주의 chromosomal DNA는 다음과 같은 방법을 이용하여 분리하였다. 지수성장기 말기에 들어선 균체 0.5 g을 50 ml의 용량을 가진 tube에 모은 후 용액 Ⅰ (50mM glucose와 10mM EDTA가 들어있는 25mM Tris-HCl 완충용액, pH 8.0) 10 ml, RNase (2 mg/ml) 500 µl, lysozyme (50 mg/ml) 100 µl, proteinase K (50 mg/ml) 100 µl를 섞어 현탁시켰다. 현탁액을 37℃에서 1시간동안 방치한 후 10% SDS 용액 600 µl를 넣고 혼합한 후 다시 37℃에서 1시간 동안 방치하였다. 1 ml의 mercaptoethanol과 3M sodium acetate (pH 5.2) 6.5 ml을 혼합하고 20 ml의 chloroform을 넣은 다음 조심스럽게 흔들어 섞었다. 이 혼합액을 12,000 × *g*에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 새로운 tube에 옮겨 담고 상등액의 0.6 volume의 isopropanol을 첨가하여 섞었다. 파스퇴르피펫을 이용하여 DNA를 조심스럽게 eppendorf tube에 옮겨 담고 70% ethanol 1 ml를 첨가하여 DNA를 씻어 내고 60℃에서 DNA를 건조하였다. 잘 건조된 DNA는 50 µl TE buffer (10mM Tris-HCl와 1mM EDTA 혼합액, pH 8.0)를 첨가하여 녹인 후 1.5% agarose gel 전기영동을 통하여 확인하였다.

(12) 16S rDNA 분석

순수하게 분리된 chromosomal DNA를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 16S rDNA를 증폭하였다. primer는 16Sf1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCT-CAG-3', *E. coli* 16S rRNA position 8 to 27), 16Sr1 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-TT-3', *E. coli* 16S rRNA position 1512 to 1491)을 이용하였으며 denaturation 94℃ 1분, annealing 50℃ 1분, extention 72℃ 1분의 조건으로 35 cycle을 수행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel 전기영동을 통하여 확인한 후 pGEM T easy vector (Promega, USA)에 ligation 하였다. Cloning이 확인된 산물은 최종적으로 vector에 포함되어 있는 SP6 와 T7 promoter에 상응하는 primer를 이용하여 sequencing 하였다. 16S rDNA 서열은 총 1415 bp의 염기서열로써 NCBI의 BlastSearch를 통해 가장 유사한 서열을 비교분석하였고, Clustal W 및 PHYLIP program (Thompson *et al*., 1994; Felsenstein, 1989)을 이용하여 다른 methylotroph의 16S rDNA와 비교 분석하였다.

(13) Plasmid의 존재여부

Plasmid의 존재여부는 Kim과 Lidstrom (1989)의 Acetone alkaline hydrolysis 방법을 사용하여 조사하였다. 지수성장기 말기에 들어선 균체를 eppendorf tube에 모은 후 acetone 100 µl에 현탁하여 얼음에 10분간 방치한 다음 1분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전물을 2 mg/ml lysozyme이 녹아있는 100 µl 의 용액 I 에 현탁하였다. 용액 I은 50 mM glucose와 10 mM EDTA가 들어있는 25 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)을 사용하였다. 현탁액을 37℃에서 20분간 방치한 후 새로 만든 용액 II (0.2 N NaOH와 1% SDS 혼합액)를 200 µl 첨가하여 서너번 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 다음 얼음에 10분간 방치시켰다. 얼음에 들어있던 용액 III을 150 µl 첨가하여 서너번 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 후 4℃에서 5분간 원심분리 (12,000 × *g*) 하였다. 용액III은 5 M potassium acetate 60 ml와 glacial acetic acid 11.5 ml 그리고 증류수 28.5 ml를 혼합한 후 멸균된 증류수를 첨가하여 전체 용량을 100 ml가 되게 하였다. 원심분리가 끝난 상등액은 새로운 튜브에 옮겨서 phenol과 chloroform을 1:1로 섞은 혼합액을 처리하여 두 번 추출한 후 원심분리(1200 × *g*/30분)하여 상등액을 얻었다. 이것을 다시 chloroform으로 한번 더 추출하여 상등액을 새 용기에 옮긴 후 -20℃의 95% ethanol 900 µl를 넣어 잘 흔든 다음 -70℃에서 15분간 방치하였다. 4℃에서 15분간 원심분리한 후 침전물에 차가운 95% ethanol 1 ml을 넣어 잘 흔든 다음 4℃에서 5분간 다시 원심분리(12,000 × *g*)하였다. 상등액을 제거하고 65℃에서 5분간 침전물을 건조시켰다. DNase가 없는 pancreatic RNase (20 µg/ml)를 포함하고 있는 TE buffer (pH 8.0, 20 µl)에 침전물을 녹인 후, dye 4 µl를 첨가하여 agarose gel electrophoresis를 수행하여 plasmid의 존재 여부를 확인하였다. Dye는 40% (w/v) sucrose와 xylene cyanol 0.25% (w/v) 그리고 bromophenol blue 0.25% (w/v) 등이 포함된 것을 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

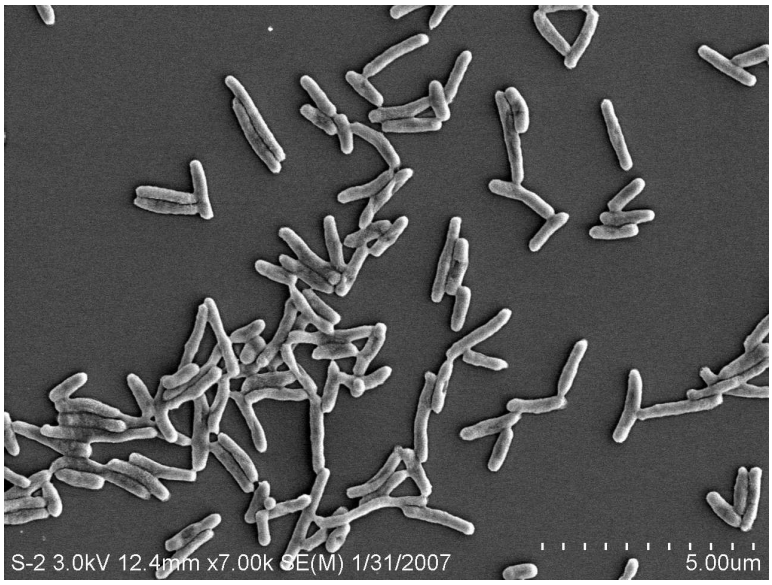
1. 실험균주의 분리 및 특성

가. 분리균주의 형태 및 배양학적 특징

분리 균주는 그램음성균이며 짧은 막대형으로, 크기는 0.2 ~ 0.4 × 0.8 ~ 1.2 μm 정도이고, 운동성이 있었다 (Fig. 1-2). 고체배양 시 colony는 1주 후 0.5 ~ 1.5 mm 정도의 크기를 나타내었고, 분홍빛이 나는 둥글고 불투명한 colony를 형성하였다. 액체배지에서 배양 시 지수성장기 말기 배양액의 색깔은 연한 홍색을 띠었고 균체가 응집되는 현상은 관찰되지 않았다.

나. 이용 가능한 기질 및 질소원

SMM 액체배지에 여러 가지 탄소원을 첨가하고 같은 조건으로 3회 실험을 하여 이용가능성을 조사하였다. 분리균주는 탄소 및 에너지원으로 첨가된 기질 중 C_1 화합물인 methanol, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, dimethylsulfide, dimethylsulfoxide와 dimethylformamide를 이용할 수 있었으며, 실험에 사용한 다탄소 유기물로는 fructose만을 이용할 수 있었다. 지금까지 *Methylophaga* 속의 대부분은 methanol과 methylamine을 탄소 및 에너지원으로 이용할 수 있음이 보고되었다. 하지만 *Methylophaga sulfidovorans*와 같은 일부의 종은 di- 또는 trimethylamine도 이용할 수 있다고 보고되었는데, 분리균주는 DMSO, DMS, DMF와 같은 methyl기가 포함된 sulfide 또는 fluoride 화합물질도 분해할 수 있는 점이 다른 *Methylopaga* 속과 구별되는 특징이다. 분리균주는 메탄과 수소를 이용하지 못하였고, 또한 당, 유기산, 아미노산, 다탄소 알콜 (C_2-C_6), nutrient 및 peptone 등은 기질로써 사용하지 못하는 제한적 통성메탄올산화세균이었다 (Table 1-2).



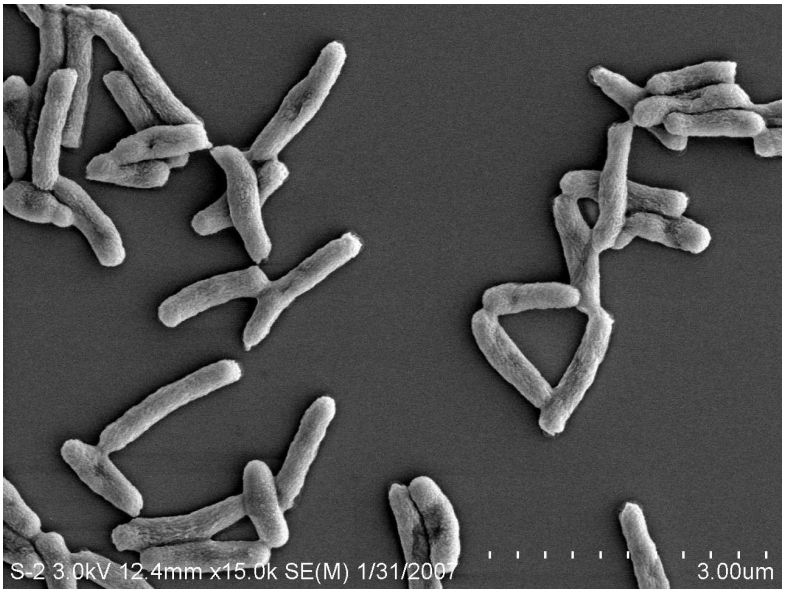


Fig. 1-2. SEM image of *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}.

Table 1-2. Characteristics of the type strains belonging to the genus *Methylophaga*

Characteristics	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Requirement of vitamin B_{12}	-	+	+	+	+	+
Motility	-	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	-	-	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	-	-	+
42°C	-	-	+	-	-	-
Optimal pH	6.8-7.0	7.0-7.5	7.0-7.5	7.4-7.8	9.0-9.5	9
Tolerance for NaCl (%)	9	12	12	12	10	10
Utilization of						
Fructose	+	+	+	-	-	+
Glucose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Dimethylamine	+	-	-	+	-	-
Trimethylamine	+	-	-	-	-	-
Dimethylsulfide (DMS)	+	-	-	+	-	-
Dimethylsulfoxide (DMSO)	+	ND*	ND	ND	ND	ND
Dimethylformamide (DMF)	+	ND	ND	ND	ND	ND
Major ubiquinone	Q8	Q8	Q8	Q8	Q8	Q8
DNA G+C content (mol%)	44.9	43.0	44.0	42.4	48.3	45.0

Species are listed as; 1: *M. aminisulfidivorans* MP^T; 2: *M. marina* ATCC 35842^T (Janvier *et al*., 1985); 3: *M. thalassica* ATCC 33146^T (Janvier *et al*., 1985); 4: *M. sulfidovorans* LMD 95.210^T (De Zwart *et al*., 1996); 5: *M. alcalica* ATCC BAA-297^T (Doronina *et al*., 2003a); 6: *M. natronica* VKM B-2288^T (Doronina *et al*., 2003b). All taxa are positive for growth on methanol and methylamine.

* ND: Not determined.

분리균주는 질소원으로써 ammonium molybdate, ammonium amidosulfate, ammonium vanadate, ammonium dihydrogen phosphate, potassium nitrate 등과 같은 환원형태의 무기질소 대부분을 이용할 수 있었다. 유기질소원으로는 urea, yeast extract, ammonium oxalate 등을 이용할 수 있었으나, 실험에 사용된 다른 유기질소원(L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid, L-tryptophan, D-asparagine, casitone) 들은 이용하지는 못하였다.

다. 분리 균주의 최적 배양 조건

분리균주의 최적 배양온도를 알아보기 위해 각각 25, 30, 35℃로 온도를 맞추어 배양시키고, 각 시간대별로 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리균주는 30℃ 에서 최대의 생장률을 나타내었으며, 25℃ 와 35℃에서는 생장에 저해를 받았고 42℃에서는 심각하게 저해 받아 생장할 수 없었다. 이는 다른 *Methylophaga* 속과 비슷한 양상이다. 분리균주의 초기 pH에 대한 영향은 Fig. 1-3과 같다. 분리균주의 생장 최적 pH는 7.0이었고, pH 4.0 ~ 6.0까지는 생장에 저해를 받았으나 pH 6.5 ~ 8.5까지의 영역에서는 생장이 잘 이루어졌으며, pH 10에서는 자라지 않았다. 해수로부터 이 균주를 분리하였기 때문에 분리균주의 최적 생장 pH는 약알칼리성을 띠는 해수의 pH 영역과 매우 유사함을 알 수 있었다. 이는 해수로부터 분리한 *M. marina*, *M. thalassica* (Janvier *et al*., 1985) 그리고 *M. sulfidovorans* (De Zwart *et al*., 1996)와 유사한 생리학적 특징을 보였으며, 알칼리염호수에서 분리된 *M. alcalica* (Doronina *et al*., 2003a)와 *M. natronica* (Doronina *et al*., 2003b)와는 구별되는 특징이다. 분리균주의 초기 methanol 농도의 저항성에 대한 영향에 대한 결과는 Fig. 1-4와 같다. 분리균주는 배양액 내의 methanol의 농도가 2% (v/v)까지는 생장에 저해를 받지 않았으나 3 ~ 4% (v/v)농도에서는 약간 저해를 받았고 5% (v/v)이상의 농도에서는 cell의 뭉침현상이 나타나 생장에 심각한 영향을 미침을 알 수 있었다. 분리균주는 배양액 내 NaCl의 농도가 3% (w/v)일 때 최적 생장률을 보였고 (Fig. 1-5), 최대 9% 농도에서도 cell은 생장하였으나 심각한 저해를 받았으며, NaCl이 포함되지 않은 배양액에서는 전혀 자라지 않음을 관찰하였다. 또한 진탕 배양 시 최적 진탕속도는 180 rpm으로써 200 rpm이 넘어서게 되면 cell의 뭉침현상이 발생하였고, 그 이하의 속도에서는 생장의 저해를 받았다.

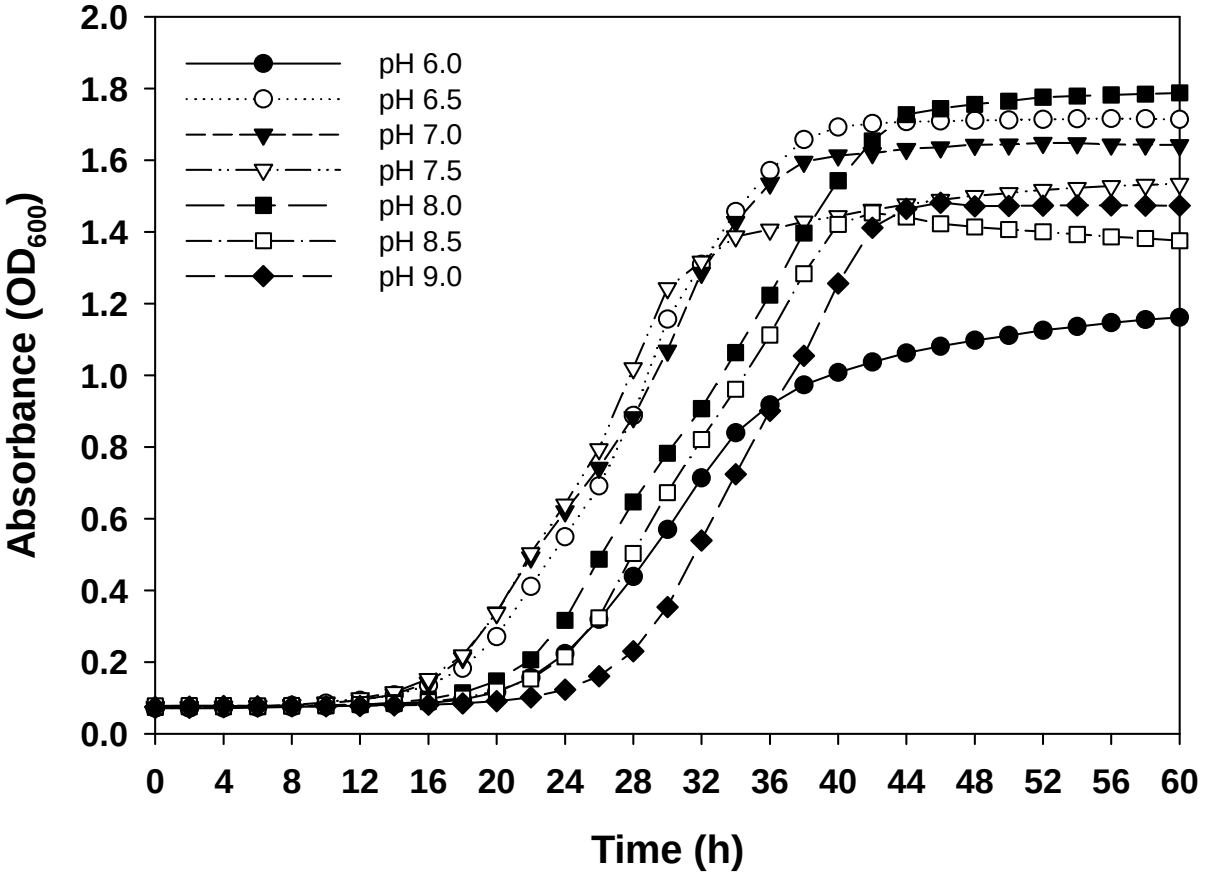


Fig. 1-3. Effect of initial pH on the growth of the isolate.

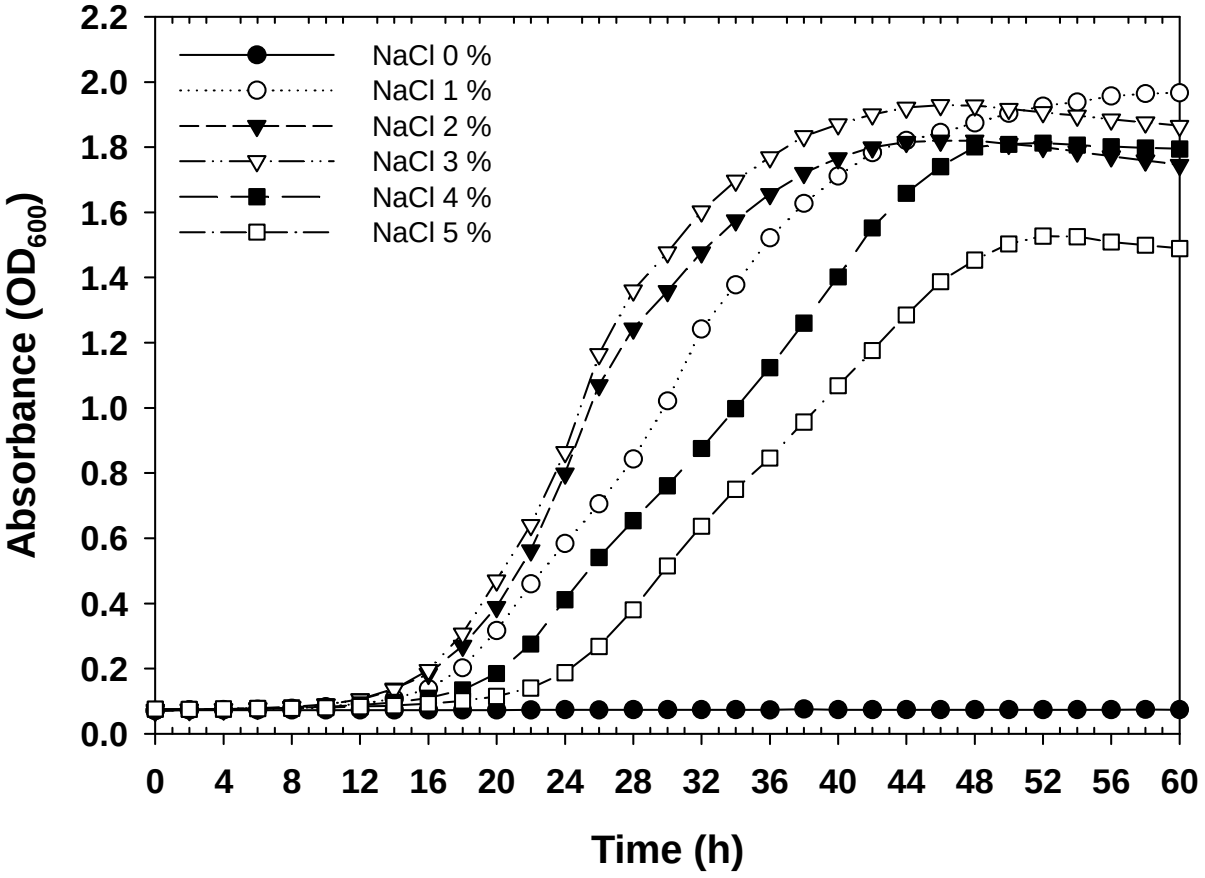


Fig. 1-4. Effect of NaCl concentration on the growth of the isolate.

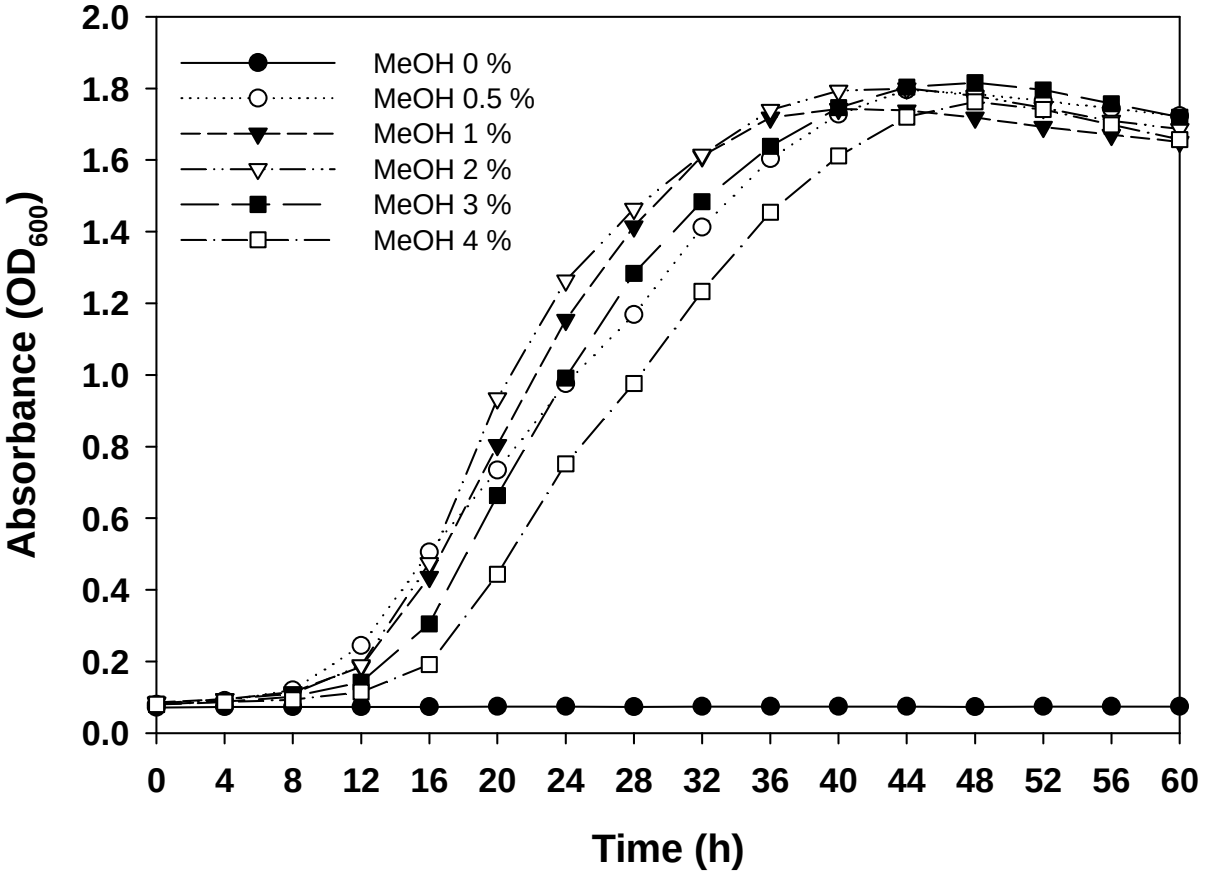


Fig. 1-5. Effect of methanol concentration on the growth of the isolate.

라. 균의 비생장 속도와 세대시간

5 L 용량의 발효기에서 3 L의 액체배지를 이용하여 균체의 생장속도를 조사하였다. 균체의 생장속도는 최적생장조건 (pH 7.0, NaCl 3% (v/v), methanol 1%, 온도 30℃)에서 2시간마다 600nm에서 흡광도를 측정함으로써 조사하였다. 배양 12시간 후 지수성장기에 이르러 배양시간 27시간에 최대의 성장속도를 보였고, 42시간 후 정체기에 도달하였다. 최적 비성장속도 (μ_{max})는 0.132 hr^{-1}이었고, 세대시간(G)은 5.23 hr이었다 (Fig. 1-6).

마. 생리 생화학적 특징

분리균주의 생리 생화학적인 특성은 Table 1-2와 같다. 분리균주는 catalase의 활성을 가지고 있으며, oxidase도 포함하고 있었다. 분리균주는 다른 *Methylophaga* 속과는 달리 growth factor로써 vitamine B_{12}나 yeast extract를 필요로 하지 않았다. Major ubiquinone은 다른 *Methylophaga*속과 마찬가지로 Q8을 사용하였고, G+C mol%도 44.9%로 다른 *Methylophaga* 속(42.4 ~ 48.3%)과 유사하였다.

분리균주가 가지고 있는 지방산(cellular fatty acid)을 분석한 결과 직쇄구조의 지방산 중 직쇄구조를 가진 $C_{16:0}$ 과 $C_{16:1}\omega7c$가 각각 42.9%와 35.9%로 대부분을 차지하였다 (Table 1-3). 이러한 특징은 분리균주가 type A의 지방산 구성을 가지고 있으며 해양 메탄올산화세균 중 group 11에 해당한다 (Govorukhina and Trotsenko, 1989). 또한 세포막을 구성하고 있는 major phospholipid는 phosphatidylethanolamine과 phosphatidylglycerol이며, phosphatidic acid와 phosphatidylserine, cardiolipin (diphosphatidylglycerol)은 minor 성분으로 이루어져 있음을 알 수 있었다.

바. Methanol과 methylamine에서 배양한 균주의 효소학적 특징

Methanol과 methylamine에서 배양한 균주의 효소학적 특징을 조사하였다 (Table 1-4). 각각의 기질에서 생장한 cell은 공통적으로 활성이 있는 PQQ-linked methanol dehydrogenase (MDH)를 가지고 있었고, PQQ-linked methylamine dehydrogenase (MADH)는 methylamine에서 자란 cell에서만 induction 됨을 알 수 있었다. Formaldehyde dehydrogenase 및 formate dehydrogenase 는 phenazine methosulfate (PMS)에 대해 활성이 있었으나, NAD^+-dependent 활성은 보이지 않았다. 세포내에 3-hexulose phosphate

synthase와 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase가 존재하는 것으로 보아 RuMP cycle (Entner-Doudoroff variant)를 통해 formaldehyde가 세포구성 물질로의 동화된다는 것을 알 수 있었다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase는 cofactor로써 NAD^+와 $NADP^+$ 모두 이용하였다. 이 두 가지 효소가 다소 높은 활성을 가지고 있다는 것은 이 균주가 formaldehyde를 CO_2로 산화시킬 때 생합성을 위한 환원력 재생과 에너지 생산에 관여하는 hexulose-phosphate cycle을 우선적으로 이용함을 의미한다.

분리균주는 methylotroph에서 발견되는 serine pathway에 관여하는 특이적 효소 (hydroxypyruvate reductase, serine-glyoxylate transaminase)와 ribulose bisphosphate pathway에 관여하는 ribulose bisphoscarboxylase는 존재하지 않았다. Tricarboxylic acid (TCA) cycle에 관여하는 α-ketoglutarate dehydrogenase 활성은 불완전하였고, isocitrate lyase와 malate synthase의 활성이 없다는 것은 이 균주가 비타민(vitamins)을 만들고 아미노산을 재순환하기 위해 네 개의 탄소로 구성된 화합물을 만드는 대사 과정인 glyoxylate shunt를 이용하지 않는다는 것을 의미한다. 어떤 미생물들은 탄소원이 부족할 경우 glyoxylate shunt pathway를 이용하여 지방산으로부터 탄소원을 얻는다. 이 pathway는 isocitrate로부터 생성되는 중간대사물과 acetyl-CoA 이 결합하여 두 가지 중간대사물을 생성한다. 먼저 isocitrate (C_6)는 isocitrate lyase에 의해 succinate (C_4)와 glyoxylate (C_2)로 분해되며, glyoxylate는 acetyl-CoA과 결합하여 malate (C_4)를 생성한다. Malate와 succinate는 TCA cycle의 중요한 중간대사물이다. 일차 암모니아는 glutamate cycle (GS/GOGAT system)을 통해 α-ketoglutarate 로부터 glutamate로 전환되는 환원형 아민화 반응에 의해 축적되는 특징을 가졌다.

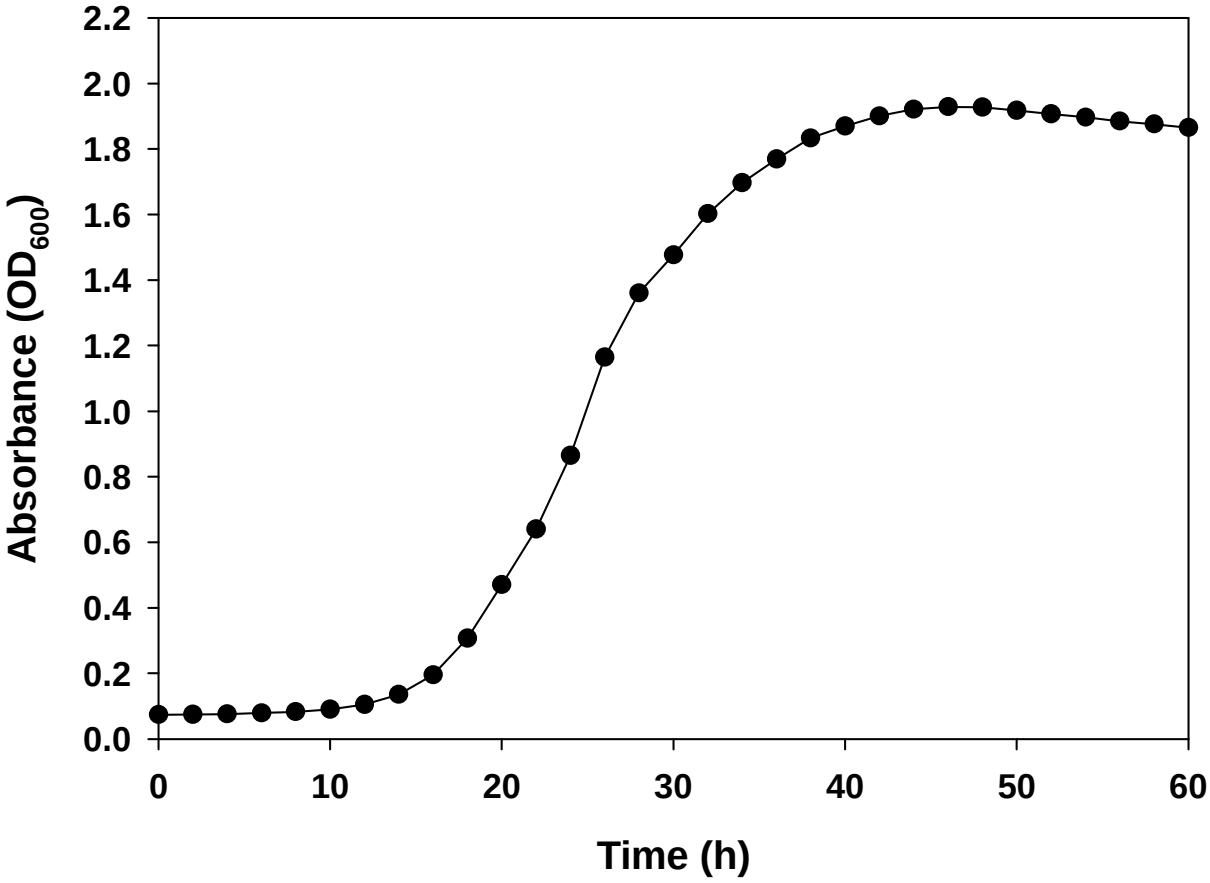


Fig. 1-6. Cell growth curve of the isolate under the optimum conditions (pH 7.0, 30℃, MeOH 1%, NaCl 3%). Specific growth rate and generation time were 0.132 h^{-1} and 5.23 hr, respectively.

Table 1-3. Cellular fatty acid composition of *M. aminisulfidivorans* MP^T grown on methanol (Kim *et al*., 2007)

Fatty acid	**% of total fatty acids**
Straight-chain acids	
$C_{12:0}$	2.20
$C_{14:0}$	6.51
$C_{14:1}\ \omega 5$	1.01
$C_{15:0}$	1.00
$C_{16:0}$	42.91
$C_{16:1}\ \omega 7c$	35.94
$C_{16:1}\ \omega 5c$	0.15
$C_{17:0}$	0.09
$C_{18:0}$	0.18
$C_{18:1}\ \omega 7$	2.38
Cyclopropane acids	
$C_{17:0}$ cyclo	7.39
$C_{19:0}$ cyclo	-
Hydroxy acids	
3-OH $C_{10:0}$	0.12
3-OH $C_{15:0}$	0.14

사. 분리 균주의 분자생물학적 특성

Tm 방법에 의해 측정된 분리균주의 DNA G+C 함유량은 44.9 mol%로 나타났다. DNA-DNA hybridization 결과 대조군으로 사용한 *Methylophaga* 종 (*M. marina* ATCC 35842^T, *M. thalassica* ATCC 33146^T 그리고 *M. sulfidovorans* LMD 95.210^T)과의 상관관계도가 25 ~ 42% 를 넘지 않았다. 이것은 분리 균주가 *Methylophaga* 속의 새로운 종으로 구별될 수 있는 특징이다. 또한 분리균주의 분리한 *M. aminisulfidivornas* MP^{T}는 16S rDNA 분석결과 *Methylophaga* 속과 96 ~ 98%의 유사성 (similarity)을 보였다. 16S rDNA phylogenetic 분석결과에서 분리균주는 *Methylophaga* 속과의 일치성 (identity)은 94 ~ 98%를 보였다. 그 중 특히 *M. marina*와의 상관관계가 가장 높았다 (Fig. 1-7). 그러나 분리균주는 trimethylamine, dimethylamine, monomethylamine 등을 이용할 수 있고, DMSO, DMS, DMF와 같은 methyl기를 포함한 sulfur 또는 fluoride 물질도 분해할 수 있었을 뿐만 아니라, amine 화합물을 보다 잘 이용하는 특징 등 다른 *Methylophaga*속과 구별되는 형질과 유전자형을 나타내고 있어 새로운 종인 *Methylophaga aminisulfidivornas* MP^T (= KCTC 12909 = VKM B-2441 = JCM 14647)로 명명하였다 (Kim *et al*., 2007).

Table 1-4. Enzymatic activities in cell extracts of the isolate MP^T grown with methanol or methylamine (Kim *et al*., 2007)

Enzyme (co-factors)	**Enzyme activity [nmol min^{-1} (mg protein)$^{-1}$]**	
	methanol	methylamine
Methanol dehydrogenase (PMS)	61	0
Methylamine dehydrogenase (PMS)	0	47
Formaldehyde dehydrogenase (PMS)	25	19
Formaldehyde dehydrogenase (NAD^+, GSH^*)	0	0
Formate dehydrogenase (PMS)	64	57
Formate dehydrogenase (NAD^+)	0	0
3-Hexulosephosphate synthase	194	171
Hydroxypyruvate reductase (NADH, NADPH)	0	0
Serine-glyoxylate aminotransferase (NADH, NADPH)	0	0
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	0	0
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD^+)	163	125
Glucose-6-phosphate dehydrogenase ($NADP^+$)	632	583
6-Phosphogluconate dehydrogenase (NAD^+)	23	21
6-Phosphogluconate dehydrogenase ($NADP^+$)	25	24
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0	0
KDPG aldolase	137	119
α-Ketoglutarate dehydrogenase	0	0
Isocitrate dehydrogenase (NAD^+)	134	95
Isocitrate dehydrogenase ($NADP^+$)	38	33
Isocitrate lyase	0	0
Malate synthase	0	0
Glutamate dehydrogenase (NADH)	44	39
Glutamate dehydrogenase (NADPH)	23	20
Glutamate synthase (NADPH)	57	51
Glutamine synthetase (ATP, Mn)	110	102

*GSH = reduced glutathione; PMS = phenazine methosulfate: KDPG = 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate.

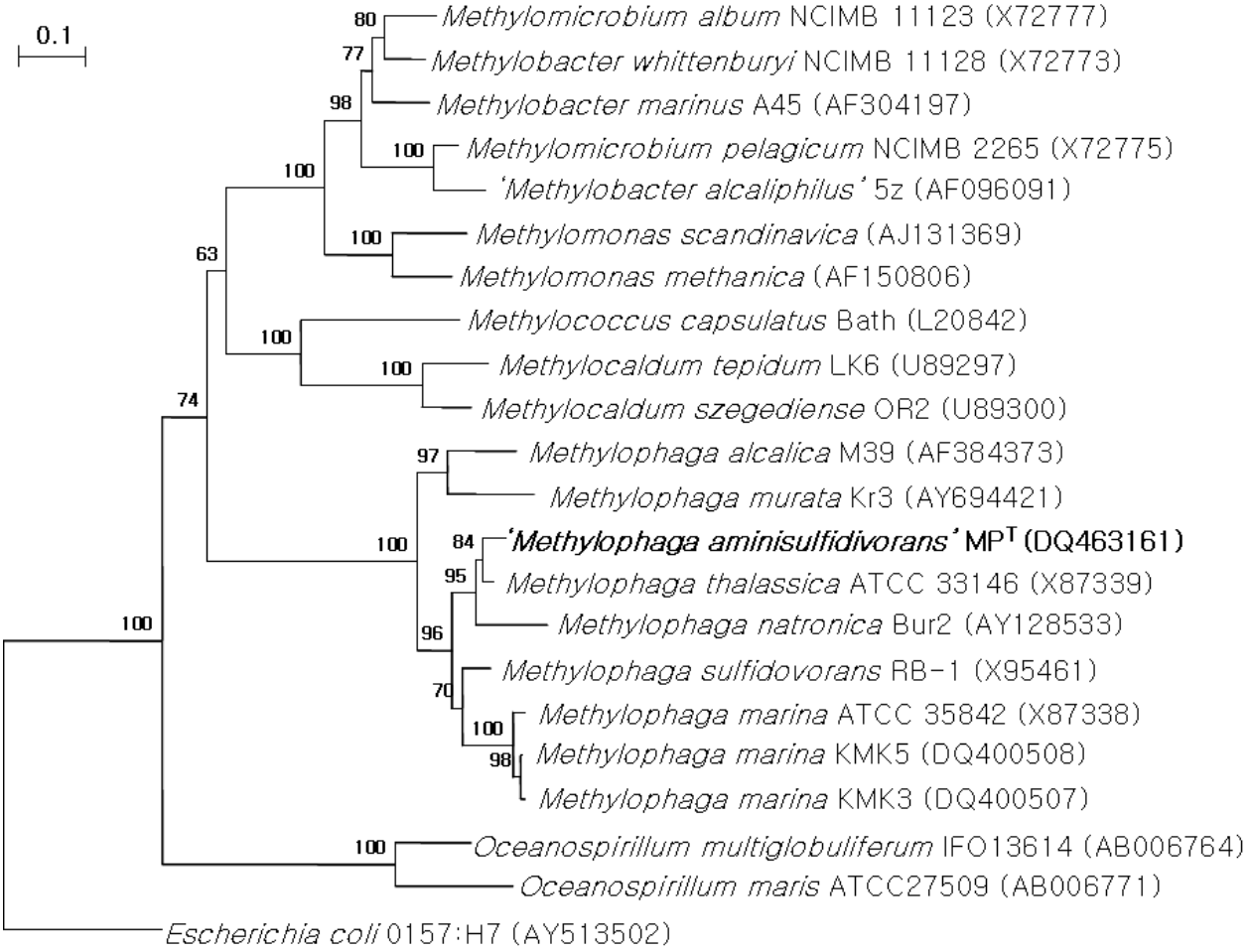


Fig. 1-7. 16S rDNA-based dendrogram showing the phylogenetic position of *M. aminisulfidivorans* sp. nov. MP^T among methylotrophs of the *Gammaproteobacteria* (Kim *et al*., 2007). Numbers at the branch points are bootstrap values from 100 replicates. Bar, 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

제4절 결론

전라남도 목포의 해수로부터 채취한 시료를 이용하여 3차에 걸쳐 순수분리를 한 후 가장 생장속도가 빠르고 다량의 균체를 생성하는 한 개의 균주를 분리하였다. 분리균주는 그램음성균이며 짧은 막대형으로 크기는 0.2 ~ 0.4 × 0.8 ~ 1.2 μm 정도이고, 운동성이 있었다. 고체배양 시 colony는 1주일 후 0.5 ~ 1.5 mm 정도의 크기를 나타내었고, 분홍빛이 나는 둥글고 불투명한 colony를 형성하였다. 액체배지에서 배양 시 지수성장기 말기 배양액의 색깔은 연한 홍색을 띠었고 균체가 응집되는 현상은 관찰할 수 없었다. 분리균주는 30℃ 에서 최대의 생장률을 나타내었으며, 최적 생장 pH는 7.0 이었다. 분리균주는 초기 배양액 내의 methanol 농도가 2%까지는 생장에 저해를 받지 않았고, 5% 이상의 농도에서는 cell의 뭉침 현상이 나타나 생장에 심각한 영향을 미쳤다. 분리균주의 배양액 내의 NaCl 농도는 3% 일 때 최적으로 조사되었으며 최대 9% 농도에서도 cell이 생장할 수 있었다. NaCl이 포함되지 않은 배양액에서는 전혀 자라지 않아 생장에 NaCl이 꼭 필요함을 알 수 있었다. 분리균주의 생화학적 특성을 조사한 결과 catalase 및 oxidase의 활성을 나타내었고, 탄소동화작용으로는 RuMP pathway를 가지고 있었다. 분리균주는 무기 질소원으로는 ammonium molybdate, ammonium amidosulfate, ammonium vanadate, ammonium dihydrogen phosphate, potassium nitrate 등을 질소원으로 이용할 수 있었고, 유기질소원으로는 urea, yeast extract, ammonium oxalate 등만 이용할 수 있었으며, 실험에 사용된 다른 유기질소원들은 이용하지 못하였다. 16S rDNA 계통유전학적 분석결과에서 분리균주는 *Methylophaga* 속과의 일치성(identity)은 94 ~ 98%를 보였다. 그 중 특히 *M. marina*와의 상관관계가 가장 높았다. 또한 분리균주는 trimethylamine, dimethylamine, monomethylamine 등을 이용할 수 있고, DMSO, DMS, DMF와 같은 methyl기를 포함한 sulfur 또는 fluoride 물질도 분해할 수 있었을 뿐만 아니라, amine 화합물을 보다 잘 이용하는 특징 등 다른 *Methylophaga*속과 구별되는 형질과 유전자형을 나타내고 있어 새로운 종인 *Methylophaga aminisulfidivornas* MP^T(= KCTC 12909 = VKM B-2441 = JCM 14647)로 명명하였다.

제5절 참고문헌

Anthony, C. (1982) The biochemistry of methylotrophs. *Academic Press* Ltd., London.

Anthony, C. (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microb. Physiol.* 27, 113-210.

Asenjo, J.A. and Suk, J.S. (1986) Microbial conversion of methane into poly-β-hydroxybutyrate (PHB): growth and intracellular product accumulation in a type Methanotroph. *J. Ferm. Technol*. 64, 271-278.

Aziz, C.E., Georgiou, G., and Spetiel Jr. G.E. (1999) Cometabolism of chlorinated solvents and binary chlorinated solvent mixtures using *M. trichosphorium* OB3b PP358. *Biotech. Bioeng*. 65(1), 100-107.

Bowman, J.P., Skerttratt, 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.

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 I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 735-753.

Bowman, J.P., Sly, L.I., and Stackerbrandt, E. (1995) The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 45, 182-185.

Byers, H.K. and Sly L.I. (1993) Toxic effects of dichloromethane on the growth of methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol*. 12(1), 35-38.

Collins, M.D. (1985) Analysis of isoprenoid quinones. *Methods Microbiol.* 18, 329-366.

De Zwart. J.M.M., Nelisse, P.N., and Kuenen, J.G. (1996) Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 261-270.

Doronina, N.V., Braus-Stromeyer, S.A., Leisinger, T., and Trotsenko, Y.A. (1995) Isolation and characterization of a new facultatively methylotrophic bacteria: description of

Methylorhabdus multivorans, gen. nov., sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 92-98.

Doronina N.V., Darmaeva Ts. D., and Trotsenko, Y.A. (2003 a) *Methylophaga alcalica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from the East Mongolian saline soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 223-229.

Doronina N.V., Darmaeva Ts. D., and Trotsenko, Y.A. (2003 b) *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted- facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikal region. *System. Appl. Microbiol.* 26, 382-389.

Dworkin, M. and Foster, J.W.. (1956) Studies on *Pseudomonas methanica*. (Shöngen) Nov. Comb. *J. Bacteriol.* 91, 646-657.

Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.

Ferenci, T., Strom, T., and Quayle, J.R. (1974) Purification and properties of 3-hexulose phosphate synthase and phospho-3-hexuloisomerase from *methylococcus capsulatus. Biochem. J.* 144, 477-486.

Galchenko, V.F. and Andreev, L.V. (1984) Microbial growth on C_1 compounds: Taxonomy of obligate methylotrophs., *Amer. Soc. Microbiol.* Washington D.C. pp. 269-281.

Govorukhina, N.I. and Trotsenko, Y.A. (1989) Phospholipid composition of methylotrophic bacteria. *Mikrobiologiya* (English translation) 58, 318-323.

Johnson, J.L. (1985) DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. *Method Microbiol*. 28, 33-74.

Janvier, M., Frehel, C., Grimont, F., and Gasser, F. (1985) *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 131-139.

Kiene, R.P. (1993) Microbial growth on C_1 compounds: Microbial sources and sinks for methylated sulfur compounds in the marine environment. *Athenaeum Press*. Newcastle upon Tyne. pp. 15-33.

Kemp, M.B. and Quayle, J.R. (1966) Microbial growth on C_1 compounds: Incorporation of

C_1 units into allulose phosphate by extracts of *Pseudomonas methanica*. *Biochem. J.* 99, 41-48

Kim, S.W., Kim, B.H., and Kim, Y.M. (1991) A *Methylobacillus* isolate growing only on methanol. *Kor. J. Microbiol*. 29, 250-257.

Li Ts.D., Doronina N.V., Ivanova E.G., and Trotsenko Y.A. (2007) B_{12}-independent isolates of *Methylophaga marina* from Red Sea algae. *Mikrobiologiya* (English translation) 76, 18-23.

Lidstrom M.E. and Stirling D.I. (1990) Methylotrophs: Genetics and commercial applications. *Annu. Rev. Microbiol*. 44, 27-58

Murrell, J.C. and H. Dalton. (1992) Methane and Methanol Utilizer. *Plenum Press*. New York. p. 119.

Murrell, J.C. and Kelly, D.P. (1993) Microbial growth on C_1 compounds. *Athenaeum Press*. Newcastle upon Tyne.

Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch. *Biochem. 55*: 416-421.

Owen, R.J. and Lapage, S.P. (1976) The thermal denaturation of partly purified bacterial deoxyribonucleic acid and its taxonomic applications. *J. Appl. Bacteriol.* 41, 335-340.

Park, S.H. and Choo, S.Y. (1993) Production of Methanol by resting cells of *Methylosinus trichosporium* OB3B expressing soluble methane monooxygenase." *Appl. Environ. Microbiol. 55*: 2819-2826.

Senior, P.J. and Windass, J. (1980) The ICI single cell process. *J. Biotechnol. Lett. 2*: 205-210.

Söhngen, N.L.. (1906) Uber bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebranchen, Parasitenkd, Infectionskr. *Abt*. 2. *15*:513-517.

Strimmer, K. and Von Haeseler, A. (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13, 964-969.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W; Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22,

4673-4680.

Trotsenko, Y.A., Doronina, N.V., and Govorukhina, N.I. (1986) Metabolism of non-motile obligately methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 293-297.

Uchiyama, H., Nakajima, T., Yagy, O., and Tabuchi T. (1989) Aerobic degradation of trichloroethylene by a new type II methane-utilizing bacterium, strain M. *Afric. Biol. Chem.* 53(11), 2903-2907.

Urakami, T. and Komagata, K. (1987) Characterization of species of marine methylotrophs of the genus *Methylophaga*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 402-406.

Vorholt, J.A., Chistoserdova, L., Stolyar, S.M., Thauer, R.K., and Lidstrom, M.E. (1999) Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyltetrahydromethanopterine cyclohydrolases. *J. Bacteriol.* 181, 5750-5757.

Whittenbury, R., Phillips, K.C., and Wilkinson, J.F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol. 61*:205-218.

Whittenbury, R. and H. Dalton. (1981) The prokaryotes : The methylotrophic bacteria. Springer-Verlag KG Berlin. pp. 849-952.

Whittenbury, R., Kreig, N.R., and Holt, J.G.. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* vol. 1: *Methylococcaceae* fam. nov., The Willams and Willkins Co. pp. 256-262.

Yamamoto, M., Seriu, Y., Kouno, K., Okamoto, R., and Insui, T. (1978) Isolation and characterization of marine methanol utilizing bacteria. *J. Ferm. Technol*. 56, 451-458.

Yamamoto, M., Iwaki, H., Kouno, K., and Inui, T. (1980) Identification of marine methanol utilizing bacteria. *J. Fermentation Technol.* 58, 99-106

제2장 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}의 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호 관계

제1절 연구배경 및 중요성

Methylotroph는 탄소원과 에너지원으로 메탄을 이용하는 메탄산화세균(methanotroph)과 메탄올을 이용하는 메탄올 산화세균(methanol oxidizing bacteria)으로 나뉜다. Methylotroph에 의한 메탄올의 산화에는 여러 개의 효소가 관여하고 있으나 이 가운데 특히 메탄올을 포름알데히드로 산화하는 MDH가 가장 연구가 많이 되어 있다. 메탄올은 periplasmic space 내에 존재하는 methanol dehydrogenase (MDH, EC 1.1.99.8)에 의해 최초로 산화가 시작되며, 이때 발생되는 전자는 동일한 공간 내에 존재하고 있는 전자전달시스템(periplasmic electron transport chain)에 의해 최종전자수용체인 산소에 이르기까지 다음과 같이 전자 이동이 이루어진다.

$$CH_3OH \longrightarrow MDH \longrightarrow \text{Cytochrome } c_L \longrightarrow \text{Cytochrome } c_H \longrightarrow \text{Oxidase} \longrightarrow \text{Oxygen}$$

이제까지 보고된 methanol 산화 관련 유전자의 연구는 *Methylobacterium extorquens* AM1에서 가장 잘 알려져 있으며, 이 세균은 메탄올 산화 대사에 관여하는 유전자가 최소 25가지가 관련되어 있다고 보고되었다 (Lidstrom, 1991). *M. extorquens* AM1의 메탄올 산화 대사에는 5개의 gene cluster (*mxa, mxb, pqqABC/DE, pqqFG* 그리고 *mxc*)가 관여하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 2-1). 그 중 첫 번째 locus인 *mxa*는 14개의 gene 즉, *mxaFJGIRSACKLDEHB*로 구성되어 있으며, 이들의 upsteam 부분에 *mxaW*가 존재한다. *mxaF*와 *mxaI*는 각각 MDH의 α (~60 kDa)와 β (10 kDa) subunit을 암호화하고 있고, *mxaG*는 MDH에 의해 메탄올이 산화될 때 발생하는 전자를 수용하는 cytochrome c_L을 암호화 하고 있는 구조 유전자이다 (Nunn and Lidstrom, 1986). *mxaJ* 유전자는 *mxaFJGI* 순으로 하나의 gene cluster를 이루고 있지만 아직 이 유전자의 기능은 밝혀지지 않고 있다 (Lidstrom, 1991).

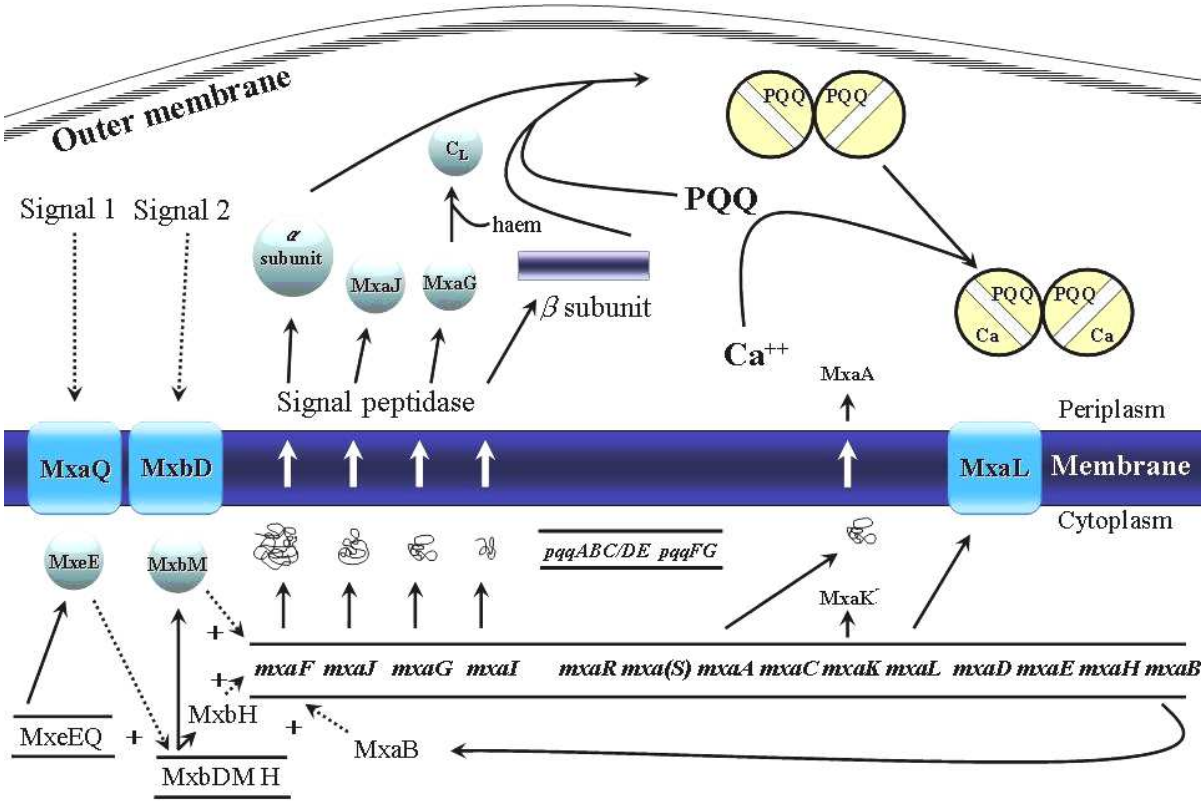


Fig. 2-1. A model for the expression of methanol dehydrogenase genes of *M. extorquens* AM1.

mxaR, mxaS, mxaD, mxaE 그리고 *mxaH* 유전자는 아직 그 기능이 밝혀져 있지 않으며, 다만 MDH의 stability와 assembly에 관여할 것이라고 생각되고 있다 (Lidstrom, 1991). MDH는 수용성 단백질로써 효소활성부위에 칼슘이온을 포함하고 있는 metalloenzyme이며, pyrroloquinoline quinone (PQQ)를 prosthetic group으로 이용하는 quinoprotein이다. *mxaACKL*은 MDH안에 칼슘이온을 insertion하는 역할을 하고 있다 (Morris et al., 1995; Richardson and Anthony, 1992). *mxaB*는 메탄올 산화유전자들의 transcriptional regulator로 알려져 있다 (Springer et al., 1998). *pqqABC/DE*와 *pqqFG* 유전자는 MDH의 prosthetic group인 PQQ biosynthesis에 관여하는 유전자이며, *mxbDM*과 *mxcQE* 유전자는 methanol 산화 관련 유전자들의 전사를 조절하는 유전자일 것으로 생각되어 지고 있다. MxbD는 bacterial histidine protein kinase의 일종이며, MxbM는 DNA-binding protein에 속하는 것으로 생각되어 이 두 단백질은 two-component system으로써 작용할 가능성을 보여주고 있다. 이 두 단백질은 MxcQE에 의해 발현이 조절된다고 생각되고 있으나 아직 그 기능이 명확히 밝혀진 바는 없다. MxaD와 MxcQ의 기능은 명확하지는 않지만 두 단백질 모두 sensor kinase superfamily에 속하며 methanol 산화 유전자를 조절하는 것으로 생각된다. 따라서 methanol 산화 유전자의 조절은 최소 2가지 이상의 signal이 관여할 것으로 생각되며, methanol과 formaldehyde 그리고 PQQ가 그 후보물질로 거론되고 있다 (Springer et al., 1997).

지금까지 *mxa* 유전자군에 대한 연구는 주로 토양세균에서 이루어져 왔으나 최근 들어 해양세균이 발견되면서 이들에 대한 연구도 본격화 되고 있다. 이들은 토양세균과는 몇 가지 다른 특성을 지니고 있는데 특히 DNA-DNA 상동성이 매우 낮다. 본 실험실에서 분리한 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T는 지금까지 알려진 해양세균에 비해 독특한 특징을 가지고 있는 새로운 균주로 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 2007). 예를 들어 기존 세균들의 MDH가 강한 염기성 단백질(pI 10.5)로 되어 있어 분리 단백질을 이용한 native PAGE를 수행할 수 없었기 때문에 *mxa* 유전자군 가운데 *mxaF*와 *mxaJ* 단백질 사이의 상호관계에 대한 연구가 이루어질 수 없었다. 반면 본 실험실에서 분리한 균주의 MDH는 약산성 단백질(pI 6.5)로 되어 있어 native PAGE를 수행 할 수 있기 때문에 기존의 MDH로는 수행 할 수 없었던 *mxa* 유전자 유래 단백질들의 상호관계를 연구하는 계기가 되었다.

지금까지 몇가지 methylotroph 와 autotroph로부터 MDH가 분리 정제되어 그 특성이 밝혀졌고 (Anthony, 1986, 1993), 아미노산 서열 분석과 X-ray crystal 구조결정 방법에

의해 그 구조가 밝혀졌다. 대표적으로 *M. extorquens* AM1 (Ghosh *et al*., 1995)과 *Methylophylus methylotrophus* W3A1 (Xia *et al*., 1996) 두 가지 균주로부터 MDH의 high-resolution crystal 구조가 밝혀져 있으며, 이 둘은 매우 유사한 구조를 가지고 있고 몇 가지 특징적인 구조를 가지고 있다. 먼저 66 kDa의 PQQ가 binding 되어 있는 large subunit (α subunit, *mxaF*)과 8.5 kDa의 small subunit (β subunit, *mxaI*)이 $\alpha_2\beta_2$의 구조를 이루고 있으며, small subunit의 기능은 아직 밝혀지지 않았다. MDH의 α subunit은 4개의 β sheet가 antiparallel 하게 조합되어 있는 구조(antiparallel four-stranded β sheets) 여덟 개가 날개모양으로 대칭적으로 놓여있는 구조(eightfold radial symmetry)이다. 이 구조는 β sheet 부분의 바깥쪽 strand에 tryptophan 잔기가 반복적으로 나타나는 특별한 tryptophan docking motif가 있어 구조를 안정화 시키는 것으로 보고되었다 (Ghosh *et al*., 1995). PQQ는 날개모양의 중심부위에 위치하고 있고 전체적인 α subunit은 깔때기 모양의 구조(funnel-shaped cavity)를 지니고 있다 (Fig. 2-2). 거의 모든 PQQ-dependent 효소들은 칼슘이온이나 2가 양이온을 포함하고 있는 독특한 구조를 이루고 있다. 칼슘이온 대신 스트론튬이나 바륨 이온을 배양액내에 넣고 균체를 배양하게 되면 MDH의 칼슘이온은 스트론튬이나 바륨 이온으로 치환될 수 있다. 스트론튬으로 치환된 *P. denitrificans* 의 MDH는 온도 안정성의 증가를 가져온 반면 (Harris and Davidson, 1993), 바륨으로 치환된 *M. extorquens* 의 MDH는 methanol에 대한 K_m과 V_{max} 값이 더 높아짐으로써 MDH의 활성이 낮아진다고 보고되었다 (Goodwin and Anthony, 1996). 바륨이온은 칼슘이온보다 그 크기가 크기 때문에 MDH의 활성부위의 구조가 변화함으로써 활성이 낮아지는 것으로 생각된다. 이들의 결과는 MDH가 포함하고 있는 칼슘이온은 메탄올 촉매반응과 MDH의 구조를 안정화 시키는 데 매우 중요한 역할을 한다는 것을 보여 준다 (Richardson and Anthony, 1992; Goodwin and Anthony, 1996).

MDH는 methanol을 산화시켜 전자를 발생시키고 전자는 최초 cytochrome c_L로 전달되는데, MDH로부터 cytochrome c_L로의 전자전달율은 이론적인 측정치보다 느리게 전달이 된다고 보고하였다 (Afolabi *et al*., 2001; Beardmore-Gray and Anthony, 1984; Dijkstra *et al*., 1988; 1989). MDH의 활성은 pH 9에서 ammonia 이온에 의해 activation 되게 되지만 생리활성 pH인 7에서는 이러한 반응이 매우 느리게 진행된다. 하지만 ferricytochrome c_L은 pH7에서 전자수용활성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 MDH와 cytochrome c_L 사이에 pH7에서 전자전달율을 높여 줄 수 있는 단백질이나

factor가 존재 할 것으로 생각하였다. *Hyphomicrobium* X로부터 정제된 MDH는 산소 존재하에서 불안정한 factor (oxygen labile factor)를 가지고 있었고 이 factor는 MDH로부터 cytochrome c_L로의 전자전달율을 증가시켜 주는 것으로 보고하였다 (Dijkstra *et al*., 1988). 하지만 단백질의 발현 양상은 매우 불안전하여 이후 실험에서 검출할 수 없었다. Matsushita 그룹에서는 MDH에 MxaJ가 binding되어 있는 새로운 형태의 MDH를 보고하였고, 이 단백질이 MDH와 cytochrome c_L 사이에 전자전달율을 높여 줄 수 있는 protein이며, MxaJ 단백질이 MDH를 구성하는 세 번째 subunit일 것으로 생각되고 있다 (Matsushita *et al*., 1993). 이들의 연구가 *mxaJ* 유전자 유래 단백질에 관한 최초의 보고이지만 아직까지 MxaJ 단백질의 기능을 명확히 밝히지 못하고 있다.

또한 유전학적인 접근 방법으로 다양한 methylotroph들의 deletion mutant를 제작하여 MxaJ 단백질의 기능을 밝히기 위한 노력도 계속되어져 왔다. 토양세균인 *P. denitrificans*에서 *mxaJ* 유전자를 제거한 돌연변이의 경우 *mxaF* 유전자의 발현 산물인 MDH의 α subunit이 여전히 존재함에도 불구하고 MDH의 활성이 존재하지 않았다 (Van Spanning, 1991). 이는 MxaJ 단백질과 MDH의 활성사이에 상관관계가 있음을 암시한다.

본 연구에서는 해양 메탄올 산화 세균으로부터 메탄올 산화와 관련된 유전자군 (*mxaFJGIRS*)을 클로닝하고 이들 유전자들의 발현양상, 발현된 단백질들의 상호작용에 관한 연구를 수행하였고, 특히 MDH와 MxaJ 단백질간의 상관관계를 밝히고자 하였다.

Fig. 2-2 The α β units of methanol dehydrogenase simplified to show the β strands in the α chain and the long α helix of the β subunit. The PQQ prosthetic group is shown in skeletal form and the calcium ion as a small sphere (Ghosh *et al*., 1995). The α subunit is shown in green and β subunit is shown in blue.

제2절 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

DNase, phenazaine ethosulfonate (PES), 2,6-Dichlorophe nol-indophenol (DCPIP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 분자량 표준 단백질, dialysis membrane은 Sigma 사에서 구입하였다. 제한효소들과 DNA ligase는 Takara사의 것을 이용하고, pGEM T-easy vector (Promega)를 클로닝에 사용하였다. 항체의 제작에 필요한 시약은 Sigma사에서 구입하였으며, Protein A agarose bead는 Amersham Pharmacia Biotech사에서 구입하여 사용하였다. 대장균에서 과발현된 6-histidine tag 단백질 정제를 위하여 Ni-NTA resin (Peptron)을 사용하였다.

2. 세균 배양 조건

Methylophaga aminislufidivorans MP^T은 3% (w/v) NaCl과 탄소원 및 에너지원으로 1% (v/v) methanol을 포함하는 standard mineral base medium (SMM)에서 호기적으로 배양하였으며, pH 7.0, 배양온도는 30℃로 조절하였다.

3. Methanol dehydrogenase (MDH) 정제

가. 초음파 파쇄기를 이용한 cell free extract의 제조

효소 정제를 위해 균체를 지수성장기 중기에서 회수하였으며 모든 정제과정은 4℃에서 수행하였다. 회수된 균체 20 g에 3배 용량의 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, standard buffer)로 1회 씻은 후 원심분리하여 다시 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 60 ml의 standard buffer를 넣어 재현탁 시킨 후, 현탁액에 DNase를 소량 첨가하고 sonicator (SONOIFIER 250, Branson)로 파쇄하였다. 파쇄액을 원심분리하여 (15,000 × *g*, 30분) 상등액을 cell free extract로 사용하였다. 이 상등액을 다시 100,000 × *g*에서 90분간 초원심분리한 후 이때의 상등액을 soluble fraction으로 간주하였다.

나. MDH 효소 정제

Soluble fraction으로부터 MDH를 정제하기 위한 모든 과정은 4℃ 에서 수행하였고, 사용된 모든 column을 AKTA Prime system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 장착하여 효소정제에 사용하였다. 첫 번째 정제단계로 anion exchange column을 이용하였다. Standard buffer로 미리 평형화 된 POROS HQ 20 (PerSeptive Biosystems, Cambridge, USA) column에 soluble fraction 5 ml을 주입하고, 1 $ml{\cdot}min^{-1}$의 속도로 약 30분 동안 standard buffer를 흘려주었다. MDH 단백질은 column의 resin에 결합되었고, 결합된 단백질을 200 mM의 NaCl이 포함된 standard buffer를 이용하여 직선 농도구배를 걸어 용출시켰다. 용출된 분획물들은 fraction collector를 이용하여 분획하였다. 활성이 있는 MDH는 fraction 43 ~ 51번에서 용출되었고, 용출된 protein은 native gel electrophoresis를 수행한 후 CBR staining 및 activity staining을 하여 단백질 양상을 살펴보았다. POROS column을 이용하여 MDH를 정제할 때 대부분이 한가지의 형태(MDH I)로 분리 정제 되었지만, 가끔 어떤 fraction (No. 45 ~ 48)에 native-PAGE 상에서 다른 이동도를 가진 새로운 형태의 MDH (MDH II)가 존재함을 관찰하였다 (Fig. 2-3) 이러한 현상은 cell을 파쇄할 때 sonication 세기가 강할수록 MDH II의 양이 줄어드는 것을 확인하였다.

이는 물리적인 충격이 고유한 형태의 MDH의 구조를 파괴하는 것으로 생각되어, 세포 파쇄시 lysozyme을 이용하여 온화한 조건으로 cell free extract를 제조함으로써 고유한 MDH 구조가 파괴되는 것을 최소화 하고자 하였다. 또한 colume을 통해 단백질을 분리 정제할 때에도 buffer에 methanol을 첨가하여 준 경우와 그렇지 않은 경우에 MDH II의 양이 줄어드는 것을 확인하였고, 따라서 모든 MDH 정제과정 중 사용한 buffer에는 100 mM의 methanol을 첨가하여 분리정제에 사용하였다.

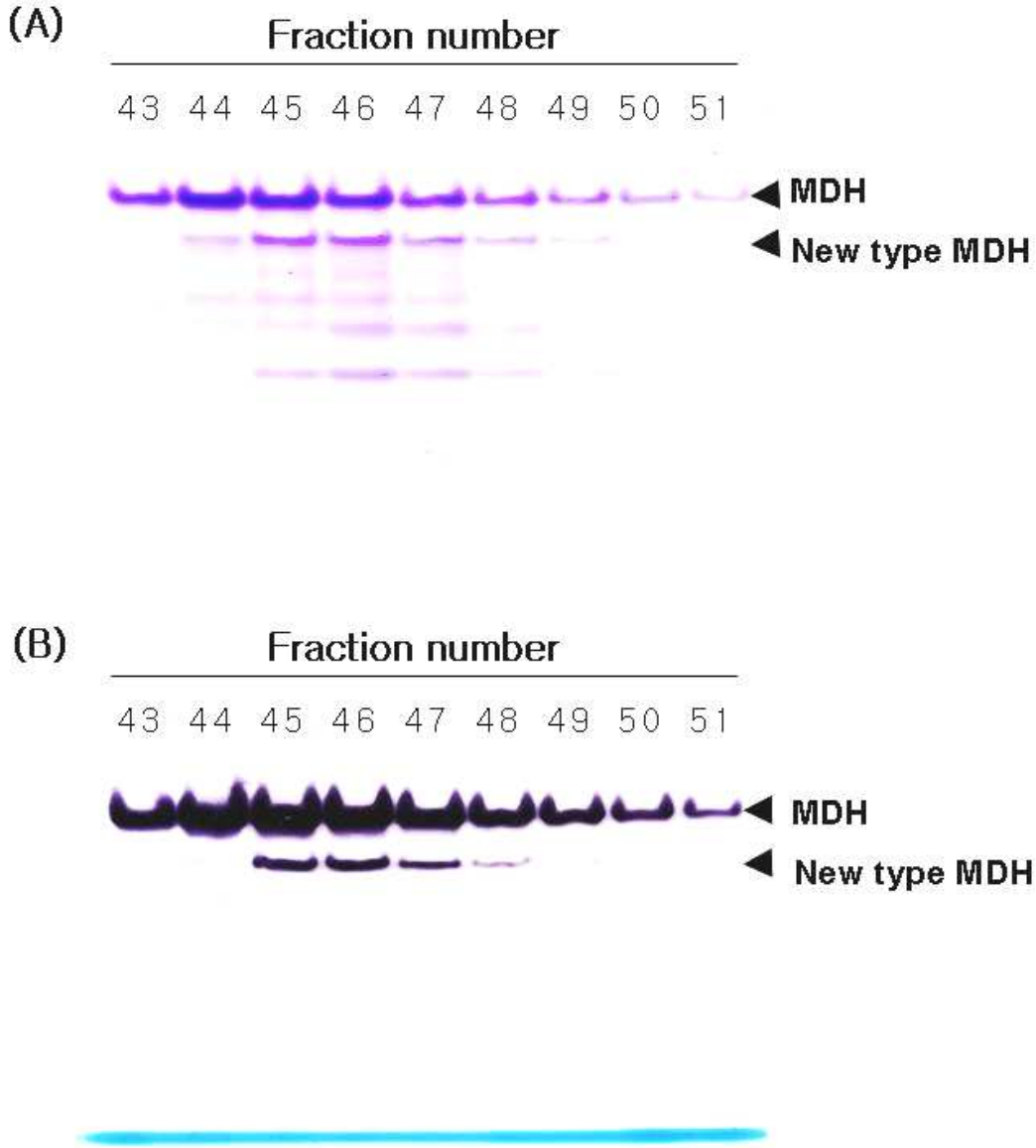


Fig. 2-3. Elution profile of MDHs prepared by sonication method for cell disruption. (A) CBR staining and (B) activity staining. Elution was made by using a linear gradient of NaCl from 0 to 200 mM (-) through POROS HQ-20 anion exchange chromatography.

다. Lysozyme을 이용한 cell free extract 제조

Sonication 방법을 이용한 MDH 정제 방법은 물리적 충격이 고유의 MDH 단백질 구조에 영향을 미칠 수 있다고 판단하였기 때문에 그 후 모든 cell free extract 제조 방법에는 lyzyme을 이용하여 준비하였다. 회수한 균체에 standard buffer를 넣어 재현탁 시킨 후, DNase를 소량 첨가하고 lysozyme을 최종농도 100 unit/ml 이 되게 첨가하였다. 이후 현탁액을 30분간 상온에서 교반한 후 -80℃의 초저온냉동고에 2시간동안 방치하였다. 이와 같은 조작(냉동과 해동)을 2회 더 반복하였을 때 시료는 매우 끈적한 형태로 만들어졌으며, 이 시료는 매우 짧은 시간동안 sonication (2 ~ 5회, power 7, duty cycle 50)하여 MDH의 구조에 미치는 영향을 가급적 최소화하였다. 파쇄된 cell은 잘 균질화 되었으며, 이 액을 원심분리하여(15,000 × *g*, 30분) 상등액을 cell free extract로 사용하였다. 이 상등액을 다시 100,000 × *g*에서 90분간 초원심분리하였다. 이때의 상등액을 soluble fraction으로 간주하였다. 이후의 단백질 정제과정은 위의 방법과 동일하게 정제하였다. POROS 20 HQ anion exchange colume을 통해 정제되어진 MDH는 sonication 방법에 의해 준비된 시료보다 MDH II를 더 많이 포함하고 있음을 알 수 있었다. 새로운 형태의 MDH는 SDS-PAGE를 수행하고 CBR staining을 통해 30 kDa의 새로운 단백질이 binding되어 있는 형태임을 알 수 있었다. 따라서 기존에 알려져 있는 α와 β subunit으로만 이루어진 $\alpha_2\beta_2$ 구조의 MDH를 MDH I이라 명명하고, 30 kDa의 단백질을 γ subunit으로 명명하여 $\alpha_2\beta_2\gamma_x$ 가지는 MDH를 MDH II로 명명하였다.

라. Gel filtration chromatography

POROS colume을 통하여 부분 정제된 두 가지 형태의 MDH fraction (5 ml) 을 각각 500 μl로 농축시킨 후 150 mM NaCl과 100 mM methanol을 포함한 Tris-HCl buffer (pH8.0)로 평형화된 Sephacryl S300 gel filtration column을 이용하여 0.5 $ml \cdot min^{-1}$의 속도로 정제하였다. 활성이 있는 분획을 모아 SDS-PAGE를 수행하여 각 단계별 정제도를 확인하였다. MDH의 분자량은 colume의 총용량 (V_o)와 단백질 elution 용량 (V_e)의 비율 (V_e/V_o)로 산출하였고, 표준 단백질의 retention time과 비교하여 결정하였다. 사용한 표준 단백질은 다음과 같다: - *β*-amylase (200,000 Da), alcohol dehydrogenase (150,000 Da), bovine serum albumin (66,000 Da), carbonic anhydrase (29,000 Da), cytochrome *c* (12,400 Da).

마. MDH 효소 활성 측정 및 단백질 정량

MDH의 활성은 Anthony의 방법을 변형하여 측정하였고 (Anthony, 1982; 1986), MDH가 methanol을 산화시킬 때 발생하는 전자에 의한 DCPIP의 환원속도(ε_{600} = 1.91 × 10^7 $cm \cdot M^{-1}$)를 측정하여 결정하였다. 활성 측정액은 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 6.7 mM methanol, 1 mM KCN, 15 mM $MgCl_2$, 1.1 mM PES, 0.04 mM DCPIP가 포함되도록 제조하였다. 효소활성은 30℃에서 반응용액 3 ml에 효소액을 넣은 다음, 분광분석기로 600 nm에서 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하였고, 1분 동안 1 μmol의 DCPIP를 환원시키는 protein의 양을 1 unit로 정의하였다. 단백질의 농도는 Bradford 방법에 따라 결정하였고 (Bradford, 1976), bovine serum albumin (BSA)를 사용하여 만든 검량선으로 정량하였다.

바. SDS-PAGE를 통한 MDH 효소 정제도의 확인

정제된 MDH 효소는 SDS-PAGE를 이용하여 정제도를 확인하였다. SDS-PAGE는 12.5% polyacrylamide (Sigma)와 0.1% (w/v) SDS가 포함된 running gel을 사용하여 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue R250 (CBR)이 포함된 염색용액에서 염색시켰다 (Weber와 Osborn, 1969). 염색된 gel은 30% (v/v) methanol과 10% (v/v) acetic acid가 포함된 탈색용액에 담가 잘 흔들어 주면서 탈색시킨 후 건조하여 보관하였다.

사. Native PAGE 및 활성염색

Native PAGE는 SDS가 포함되지 않은 8% polyacrylamide gel과 SDS가 포함되지 않은 buffer를 사용하여 SDS-PAGE 방법과 동일하게 수행되었다. MDH의 활성염색은 시료를 non-denaturing PAGE를 수행한 후, activity 측정시약의 DCPIP 대신에 10 mM의 NBT (nitroblue tetrazolium)를 넣고, 빛이 차단된 상태로 30℃에서 5분간 반응시킨 후, 증류수로 10회 씻어서 보관하였다.

아. 등전점의 측정

정제된 효소의 등전점(pI)은 PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하였다. Polyacrylamide slab gel에 이미 pI값이 알려져 있는 몇 개의 표준단백질과 함

께 isoelectrofocusing하여 결정하였다.

자. *N*-말단 아미노산 서열 결정

MDH II에 존재하는 30 kDa의 단백질의 아미노산 서열을 결정하기위하여, MDH II fraction을 모아 native-PAGE를 수행한 후 MDH의 활성이 존재하는 band의 단백질을 용출하였다. 용출된 효소액을 5분간 끓여 12.5% SDS-PAGE를 수행하였고, 전기영동이 끝난 gel은 electroblot을 실시하여 PVDF membrane에 옮긴 후, CBR로 염색하여 소단위를 확인한 다음 잘라내어 전남대학교 기초과학지원연구센터에 의뢰하여 *N*-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 사용한 아미노산 분석기는 Hewlett Packard사의 241 Protein sequencer를 사용하였다.

차. EST-FT ICR mass spectrometry

정제된 MDH I와 II를 BN-PAGE (4% stacking gel, 5 ~ 16% gradient seperating gel)를 수행한 후 (Schägger and Von Jagow, 1991), 12% SDS-PAGE를 수행하여 각각 MDH를 구성하고 있는 subunit별로 분리하였다. 전기영동 후 gel은 CBR 및 silver staining을 통해 각각의 subunit을 확인한 후 gel을 잘라내었다. 잘라낸 gel을 더욱 잘게 부순 후 소량의 acetonitrile을 첨가하여 dehydration 시켰고, Thermo Savant SpeedVac Plus (Savant, Holbrook, NY)를 이용하여 진공상태에서 건조시켰다. 전처리된 시료에 sequencing grade trypsin (1:20, w/w)을 첨가한 후 37℃에서 16시간동안 반응시켜 단백질을 peptide로 분해하였다. Peptide들은 C_{18} RP nanoscale LC-ESI spray (Suveyor nanoflow system, Thermo Electron)을 통해 먼저 peptide의 크기별로 나눈 뒤 자동적으로 7-Tesla FT-ICR mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany)로 주입하여 분석하였다 (Choi *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2004). 수집된 자료는 MASCOT search engine (Matrix Science, London, UK)을 이용하여 database를 분석하였다. 아직까지 MASCOT search engine에는 MDH에 관련된 database가 없는 상태이므로 MP^T의 gene으로부터 deduced된 아미노산 서열(MxaF, MxaI, MxaJ) 정보를 이용해 만들어진 home-made sequence database를 이용하여 분석하였다. FT-MS 분석 시 사용된 α, β 그리고 γ subunit의 농도는 각각 0.57, 1.58, 2.95 μg 이었다.

4. Genomic library 구축

가. Southern blot analysis

M. aminisulfidivorans MP^{T}로부터 분리된 chromosomal DNA로부터 메탄올 산화 유전자를 분리하기 위하여 DNA를 제한효소 *BamH*I, *EcoR*I, *Pst*I과 *Hind*III로 완전히 절단하였다. 그 후 1% agarose gel에 전기영동하고 capillary transfer 방법을 이용하여 Hybond-N$^+$ membrane에 alkaline bridge를 통해 16시간 동안 transfer시켰다. Hybrid의 검출은 digoxygenin(Dig)-detecting kit (Roche)를 사용하였으며, 검출을 위해 *mxaF*의 conserved region 461 bp를 probe로서 사용하였다.

나. *MxaFJGIR* 메탄올 산화 유전자의 분석

(1) 염기 서열의 분석

Genomic Southern blot 분석 결과 획득한 5.4 kb *Hind*III fragment는 전체 ORF 중 *mxaF* 1.3 kb와 각 *mxaJGIR* 유전자 전체의 ORF를 포함하고 있었다. Genomic Southern blot 분석 결과 3.6 kb *Pst*I fragment와 *mxaF*의 앞쪽에 있는 0.5 kb를 포함하고 있었다. 각각의 클로닝된 5.4 kb *Hind*III fragment와 3.6 kb *Pst*I fragment의 중복된 부분을 제거하여 7.6kb *Pst*I ~ *Hind*III의 염기지도를 작성할 수 있었다 (Cho, 2005).

(2) Total RNA의 분리

Total RNA를 분리하기 위하여 *M. aminisulfidivorans* MP^{T}을 1% (v/v) 메탄올이 첨가된 배지에서 약 20시간 동안 배양한 후 5,400 × g에서 10분간 원심 분리하여 침전시켰다. 실험에 사용된 모든 용액들은 0.1% DEPC로 처리된 water를 사용하였다. 침전된 균체를 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 증류수로 washing 한 후 Trizol (Invitrogen) 1 ml를 넣어 잘 현탁시키고, 약 3초 동안 sonication한 다음 상온에서 약 3분간 놓아두었다. 200 µl의 chloroform을 넣고 잘 섞은 후 10분 동안 상온에 반응시킨 뒤 4℃, 15,000 × *g*에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 Trizol과 chloroform 층이 분리되는데 약 400 µl의 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 상층액의

0.6부피에 해당하는 isopropanol을 넣고 상온에서 10분간 방치하였다. RNA를 침전시키기 위해 15,000 × *g*에서 15분간 원심분리 하고, 침전된 pellet에 75% ethanol 1 ml를 넣고 세척한 후 상온 건조하였다. 완전히 건조된 RNA를 DEPC water 50 µl에 녹여 실험에 사용하였다.

(3) RT-PCR을 통한 *mxaFJGI* 유전자 발현 양상 조사

분리되어진 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 RT premix (Bioneer, Korea)를 이용하여 실험을 수행하였다. 원하는 fragment의 3'의 primer를 total RNA와 함께 70℃에서 10분 동안 반응시킨 후 즉시 4℃ 얼음에 넣어 primer와 RNA를 annealing 하였다. Annealing 과정 후 역전사효소 premix와 annealing 된 RNA-primer를 섞어준 후 total volume을 20 µl로 하여 PCR machine (Roche)에서 42℃로 1시간 동안 반응하고, 역전사 효소의 활성을 없애기 위하여 94℃에서 5분 동안 반응시켰다. MDH의 구조와 관련된 유전자는 *mxaFJGI* culster로 알려져 있으며, 이 중 *mxaF* 와 *mxaI*는 각각 α와 β subunit을 암호화하고 있고 *mxaG*는 cytochrome c_L을 암호화 하는 유전자임이 밝혀졌다. 하지만 현재까지도 *mxaJ* 유전자의 기능은 정확히 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 *mxaFJGI* cluster 로부터 MDH가 합성될 때 어떠한 유전적 조절을 받아 합성되는지 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.

Transcript의 3' primer로 합성된 cDNA를 template로 사용하여 원하는 transcript의 upstream과 인접된 두 ORF사이의 primer는 다음과 같다 ; *mxaFJ*, 5'-aattctctgtttggg-gtggta-3' (forward), 5'-gttatgcctttatctacccagc-3' (reverse); *mxaJG*, 5'-gtcagcctctgtaccactaaa-3' (forward), 5'-aatcttgcacatcatggc- ctg-3' (reverse); *mxaGI*, 5'-ttcctgtcgctcaatctcaa-3' (forward), 5'-gaacaaacaagatgctgcgt-3' (reverse); *mxaIR*, 5'-atgtcgtcgcaaaaataagg-3' (forward), 5'-cacac-tttttccctcatttacag-3' (reverse))로 PCR을 수행하였다. 실험에 사용된 RNA는 genomic DNA의 오염 여부를 확인하기 위하여 reverse transcritase 반응을 수행하지 않은 total RNA시료를 template로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 산물이 생성되지 않을 경우 genomic DNA에 의한 오염이 없는 것으로 판단하였다. 대조군으로써 trancript의 정확한 크기를 측정하기 위하여 genomic DNA를 template로 PCR을 수행하였다.

5. 항체의 제조 및 정제

가. 항체의 제조

MDH의 항체를 제조하기 위한 항원으로 사용할 MDH는 *M. aminisulfidivorans* MP^T에서 순수 분리 정제하였고, MxaJ 단백질의 경우 pre-*mxaJ* pHCEIIB vector를 지닌 *E. coli*로부터 발현된 단백질을 사용하였으며, pre MxaJ의 정제도를 높이기 위하여 electroelution을 수행하여 단일 단백질로 분리하였다. 항체 제조에 사용한 rabbit은 태어난 지 5주된 개체를 사용하였다. 분리된 단백질을 항원으로 사용하여 1회 주입시 마다 150 μg씩 총 4회 rabbit의 피하에 주입하였다. 각 항원의 주입은 3주 간격을 두어 시행하였고, 최종 주입한지 10일 후에 피를 뽑아 Western blot analysis를 수행하여 항체의 형성을 확인하였다 (Cho, 2005).

나. 항체의 정제

MxaJ 항체의 정제를 위하여 MxaJ affinity resin을 제조하였다. Affinity resin을 제조하기 위하여 NHS Sepharose (Amersham pharmacia) resin 20 μl에 1 mM HCl 200 μl를 넣어 씻어주고 200 × *g*에서 1분 동안 원심분리하여 resin을 회수하였다. 이 resin에 100 μl coupling solution (10 mM phosphate buffer, pH 8.0)과 100 μl (80 μg)의 순수 분리된 MxaJ 단백질을 넣고 pH를 7.5로 조정였으며, 2시간 30분 동안 상온에서 천천히 흔들어 주었다. 반응이 끝난 resin에 blocking solution 10 μl (ethanolamine)을 넣고 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 200 × *g*에서 1분 동안 원심분리하여 resin을 회수하고, 60 μl 25 mM Tris-HCl (pH 8.8)과 acetate buffer (pH 3.8)를 반복적으로 3번 세척하여 200 × *g*에서 1분 동안 원심 분리하였다. 분리된 resin을 MxaJ-Sepharose affinity resin으로 사용하였다. 항체의 정제는 MxaJ-Sepharose affinity resin에 토끼에서 분리한 혈청 20 μl과 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 180 μl를 넣어 상온에서 4시간 정도 반응하였다. 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 2번 세척하고 원심분리하여 resin만을 조심스럽게 회수하였다. 회수된 resin을 100 mM glycine (pH 2.5) 100 μl를 넣어 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 15 μl를 넣고 500 × *g*에서 1분 동안 원심분리한 후 상등액만을 취하여 MxaJ 항체로 사용하였다.

다. Western blot analysis

MDH와 MxaJ의 antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. 확인하고자하는 단백질들을 SDS-PAGE를 수행한 후 gel을 PVDF membrane에 semi-dry transfer system (Southam Warwickshire CV33 0HP, ENGLAND)에 의하여 전압을 100 V로 유지하면서 2시간 동안 transfer하였다. Western blot에는 TBS buffer (25 mM Tris HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)를 사용하였고, TBS buffer에 각 단계별 목적에 맞게 시약들을 첨가하여 실험에 사용하였다. 단백질이 transfer된 membrane을 blocking solution (3% BSA가 포함된 TBS)에서 1시간 동안 blocking한 후, 제작된 항체를 5 ml의 blocking solution에 1:10,000 비율로 희석하여 membrane에 붓고 1시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후 membrane은 washing solution (0.1% Tween 20이 포함된 TBS)으로 15분씩 3번 세척하였고, Anti-rabbit Alkaline phosphatase가 conjugation 되어있는 2차 항체 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)를 5 ml의 blocking solution에 1:5,000의 비율로 희석하여 1시간 동안 상온에서 반응한 뒤, washing solution으로 15분씩 3번 세척하였다. 세척된 membrane을 5ml의 검출용액 (BCIP 250 mg/ml, NBT 50 mg/ml, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 5 mM $MgCl_2$)을 넣고 발색반응을 관찰함으로써 protein의 발현양상을 분석하였다.

6. MDH와 MxaJ 단백질간의 상호 작용

가. MxaJ 단백질의 발현 및 MDH와의 결합

pASK-IBA6 vector의 strep tag을 coding하는 sequence는 제한 효소 NheI과 EcoRI으로 제거하고, annealing된 6× His tag linker (5'-CTAGCCATCACCATCACCATCA-CA-3', 5'-GGTAGTGGTAGTGGTAGTGTTTAA-3')를 삽입하였고 multicloning site에는 signal peptide를 가지고 있지 않은 mature 형태의 mxaJ 유전자를 삽입하였다. 이렇게 구성된 vector는 *E. coli* DH5α로 transformation 되었으며, 2 μg/ml의 tetracycline을 inducer로 사용하여 MxaJ 단백질을 발현시켰다. 발현된 단백질은 Ni-NTA column을 사용하여 단일 단계 순수 분리하였다 (Fig. 2-4). 대장균에서 발현, 정제된 mature-MxaJ와 native한 MDH의 상호작용을 살펴보기 위하여 eppendorf tube에 정제된 MxaJ 10 μg과 native MDH 20 μg을 넣고 binding buffer (40 mM Tris-HC1, 10 mM $MgCl_2$

0.01 mM EDTA, 20% glycerol)를 넣어 마지막 용량을 20 µl로 한 뒤, 4℃에서 16시간 동안 잘 섞어주었다. 비교실험을 위하여 각각의 MDH와 MxaJ만 20 µl로 하여 동일한 조건하에서 반응하였다. 각 시료를 native-PAGE를 수행하여 활성염색과 CBB염색 그리고 western blot 분석을 통하여 두 단백질이 결합하는지를 살펴보았다.

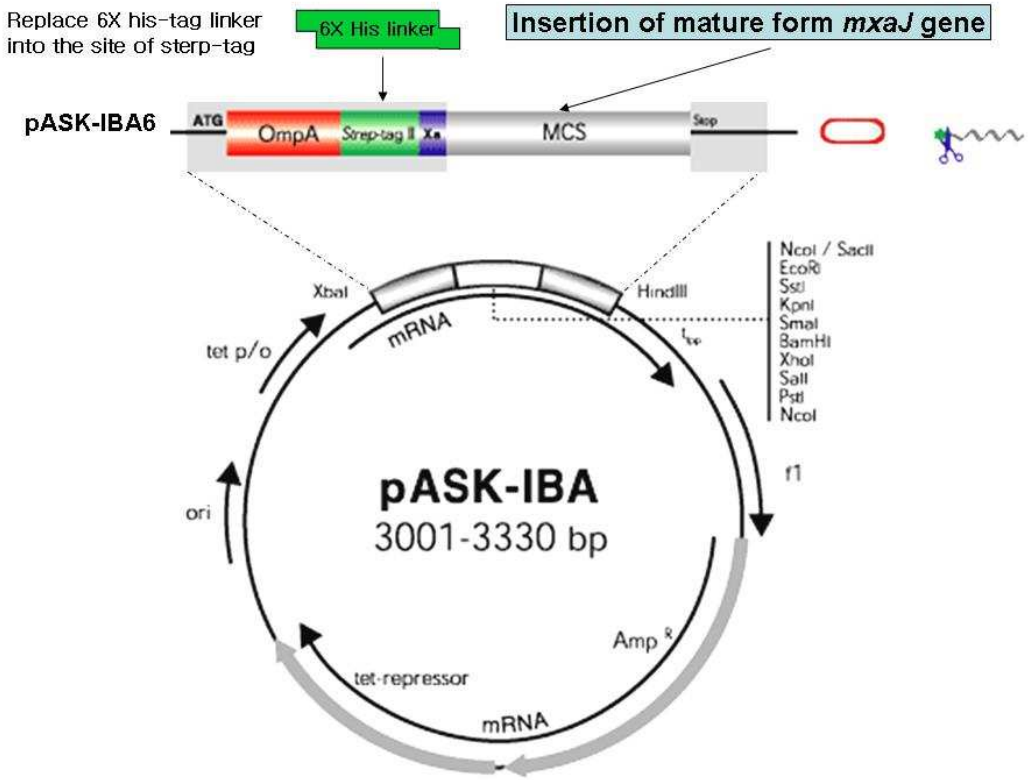
나. Co-immunoprecipitation

M. aminosulfidivornas MP^T 세포 내의 MDH와 MxaJ의 상호작용을 살펴보기 위하여 지수성장기의 세포를 회수하고 sonicatior로 균체를 파쇄한 후 15,000 × *g*에서 30분간 원심분리를 행한 뒤 그 상등액을 시료로 사용하였다. 획득된 시료 300 µl에 정제되어진 항체 10 µl (10 µg)를 섞어주고, 1시간동안 반응한 후, Protein A agarose bead 45 µl를 넣고 2시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 NETN buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% NP-40)로 bead를 세척하였고 이 과정을 동일 buffer로 3회 수행하였다. 세척된 bead에 1× SDS sample dye를 첨가하여 95℃에서 5분간 끓인 뒤 SDS-PAGE를 수행하고, silver staining한 후 PVDF membrane에 transfer 하여 MDH 항체로 westhern blot 분석을 수행하였다.

다. MxaJ 항체를 이용한 MDH 활성 저해 실험

MxaJ가 MDH의 활성에 영향을 주는지 알아보기 위한 간접적인 실험으로 MxaJ 항체를 섞어주어 MxaJ 항체가 MDH와 MxaJ와의 결합을 경쟁적으로 저해하는지 여부를 확인하였다. *M. aminosulfidivornas* MP^T 세포의 cell free extract에 MxaJ 항체를 10, 20, 50 µl를 각각 첨가하고, 상온에서 2시간동안 반응시켰으며 비교실험을 위하여 cell free extract에 MxaJ 항체 대신 동량의 BSA를 첨가하여 동일하게 반응시킨 후 반응이 끝난 시료는 바로 MDH의 활성을 측정하였다.

(A)



(B)

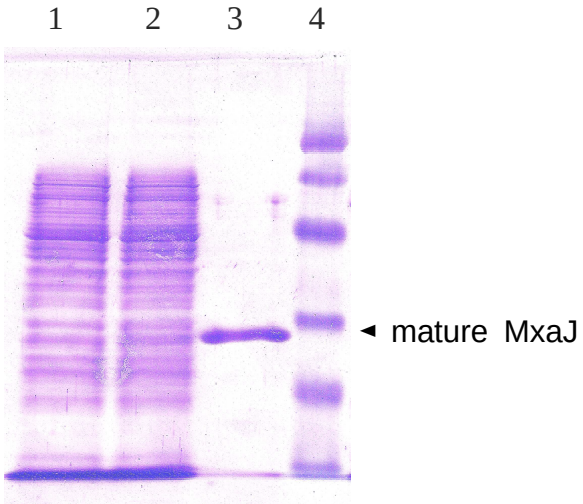


Fig. 2-4. Construction of His-tagged pASK-IBA6 mature *mxaJ* plasmid (A) and purification of expressed mature MxaJ protein from *E. coli* (B). Lane 1 : Cell free extract of *E. coli* with the His-tagged mature MxaJ expression vector; Lain 2 : flow thorough by Ni-NTA column; lane 3: Purified mature MxaJ protein from Ni-NTA column; lane 4: molecular size marker.

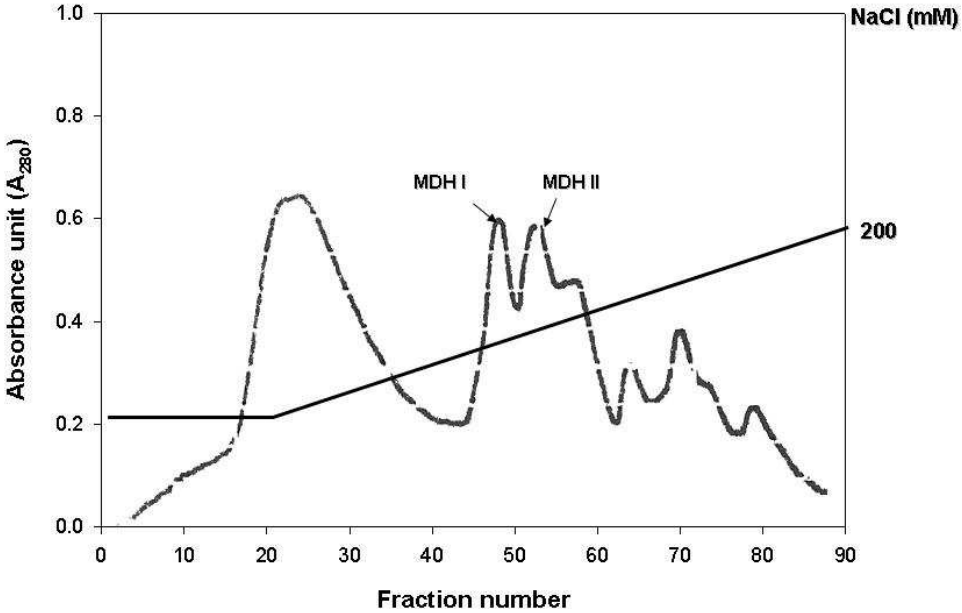
제3절 결과 및 고찰

1. Methanol dehydrogenase의 분리 및 정제

M. aminisulfidivorans MP^{T}로부터 POROS HQ 20 column을 이용하여 MDH를 정제하는 과정에서 MDH 활성이 존재하는 분획을 NaCl 농도 기울기 약 100 mM과 150 mM 에서 두 가지 형태의 MDH를 각각 분리하였다 (Fig. 2-5). Strain MP^{T}로부터 MDH를 정제하는 과정 중 물리적인 세포파쇄 방법으로 정제하였을 경우 MxaJ 단백질은 쉽게 떨어져 MDH II의 형태는 쉽게 얻을 수 없었고, 대부분이 MDH I 형태로 정제되었다. 물리적 충격 방법으로 세포를 파쇄 하였을 때 MDH 총량 중 MDH I : II의 비율은 9:1로 MDH II의 비율이 상대적으로 낮게 나타났으며, MxaJ 단백질은 POROS-column 정제과정 중 western blot 분석방법을 통해 MDH와 별개의 fraction에 존재하고 있음을 확인하였다(data not shown). 하지만 동일한 sample을 lysozyme으로 cell을 파쇄한 결과 MDH의 총량 중 MDH I : II의 비율은 3:1로 물리적 세포파쇄 방법보다 더 많은 양의 MDH II 형태를 얻을 수 있었다 (Table 2-1). 또한 단백질 정제 시 buffer에 methanol을 넣지 않은 경우 MDH II가 colume을 통과하면서 MxaJ 단백질이 떨어져 MDH I의 형태로 분리되는 경우가 발생하였는데, buffer 내에 100 mM의 methanol을 포함시켜 정제함으로써 MDH II의 형태를 더 많이 얻을 수 있었다. 이는 MxaJ 단백질이 methanol이 희석되었을 때에는 MDH의 상호결합이 더 약해진다는 것을 의미한다.

MDH I과 II는 gel filtration chromatograpy를 통해 순수한 형태의 단백질을 얻을 수 있었고, 분자량이 알려져 있는 표준단백질을 이용하여 분자량을 측정한 결과 MDH I은 150,000 Da, MDH II는 185,000 Da으로 MDH II의 분자량이 약 35,000 Da 정도 크게 나타났다 (Fig. 2-6). 최종적으로 분리 정제된 MDH I와 MDH II의 specific activity를 비교해 본 결과 MDH I의 activity가 1.5 ~ 2배 정도 활성이 더 낮았으며 (Table 2-1), 이는 MDH II에 결합되어 있는 protein이 없는 MDH I의 경우 활성이 낮아지는 것으로 판단된다.

(A)



(B)

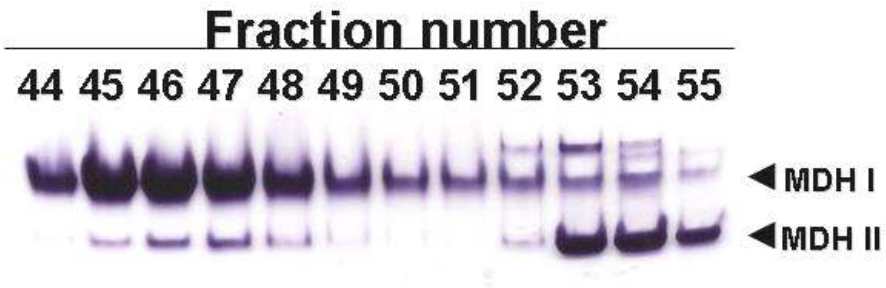


Fig. 2-5. Elution profile of MDHs by enzymatic cell disruption method. (A) Elution was made by using a linear gradient of NaCl from 0 to 200 mM through POROS HQ-20 anion exchange chromatography. (B) Native-PAGE separation and activity staining of the eluted fractions containing MDH.

Table 2-1. Purification of MDH I and II from *M. aminisulfidivorans* MP^T cells disrupted by lysozyme and freezing method

	Total protein (mg)		Total activity (U*)		Specific Activity (U/mg)		Purification fold		Yield (%)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Cell free extracts	205.8		109.6		0.53		1		100	
Soluble fraction	143.1		97.6		0.66		1.2		89	
POROS 20 HQ	21.4	5.6	64.5	36.4	3.01	6.5	5.6	12.2	58.8	33.2
Sephacryl S300	4.6	1.3	19.3	10.2	4.21	7.8	7.9	14.7	17.6	9.3

* One unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 mol DCPIP per minute. Enzyme activities were obtained as average values from three independent experiments.

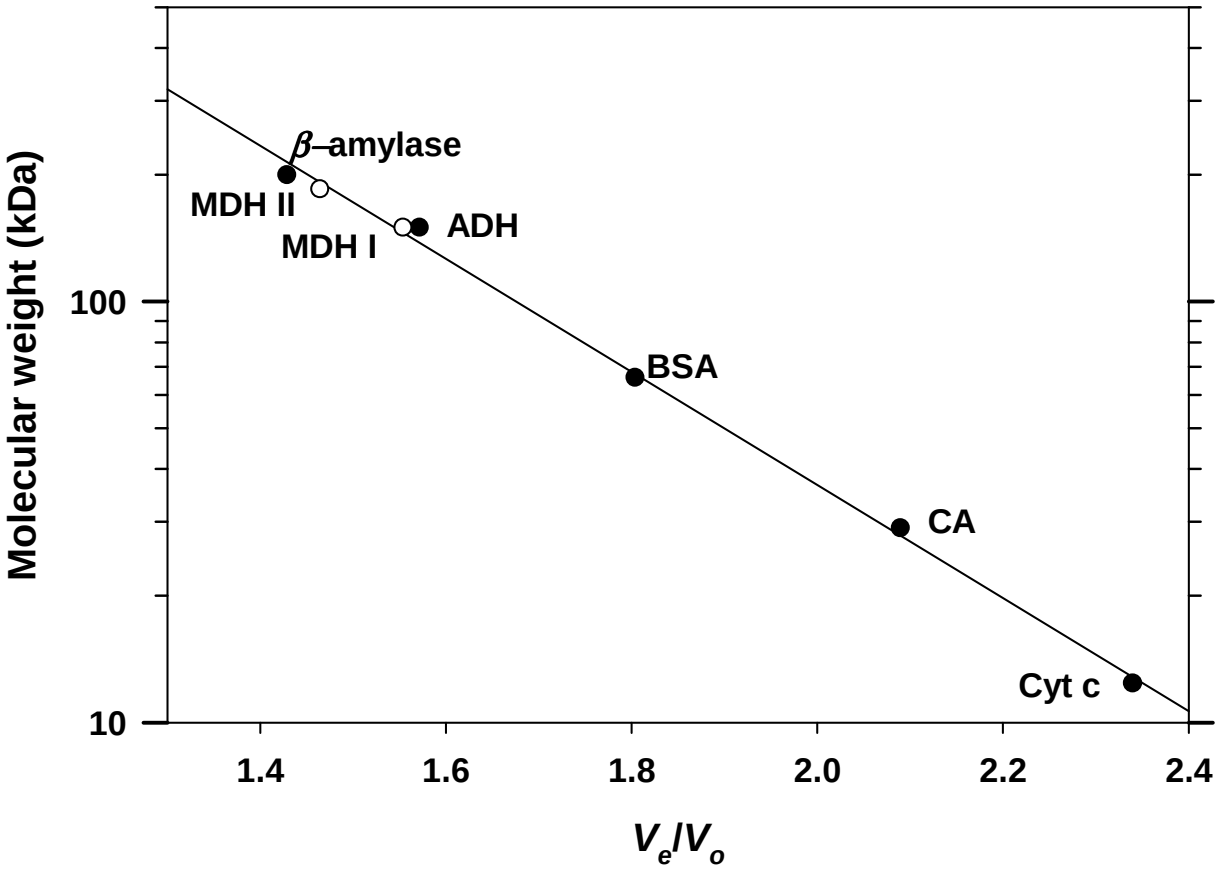


Fig. 2-6. Molecular weight estimation of MDH I and II through a Sephacryl S300 gel filtration column. V_e is the elution volumn and V_o is the void volume determined with blue dextran (Mw 2,000,000). The column was equilibrated with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 150 mM sodium chloride. The protein used for calibration (MW-GF-200, Sigma) were horse heart cytochrome *c* (Cyt *c*, 12,400 Da), carbonic anhydrase (CA, 29,000 Da), bovine serum albumin (BSA, 66,000 Da), yeast alcohol dehydrogenae (ADH, 150,000 Da), and *β*-amylase (200,000 Da). ○ represents the points of elution of methanol dehydrogenase I and II.

2. MDH I과 MDH II 단백질의 특성 분석

M. aminisulfidivorans MP^T 세포내 두 종류의 MDH 단백질들의 차이를 비교해 보기 위하여 MDH I과 MDH II 단백질을 활성 염색과 SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig. 2-7와 같다. Native-PAGE를 수행한 후, 활성 염색한 결과 MDH I과 MDH II 단백질의 이동도가 다름을 알 수 있었고 (Fig. 2-7A), SDS-PAGE 분석결과 MDH II 단백질에는 MDH III 단백질에 존재하지 않는 30 kDa의 단백질이 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 2-7B).

활성이 존재하는 두 개의 fraction의 차이점을 살펴보기 위해 pI를 측정하였다. MDH I fraction의 pI는 약 5.4이었고, MDH II fraction은 5.8이었다 (Fig. 2-7C). MxaJ 단백질의 이론적인 pI 값은 6.77로 MDH에 비해 basic한 protein임을 알 수 있는데, MxaJ 단백질이 MDH에 binding 됨으로써 MDH의 전체적인 pI 값이 달라지는 것으로 사료된다. Matsushita의 연구결과에서도 MxaJ 단백질로 추정되는 단백질이 결합되어 있는 MDH I와 또 다른 MDH I의 pI 값이 각각 8.0과 6.7로 다르게 나타났다 (Matsushita *et al*., 1993).

MDH II를 SDS-PAGE를 수행하여 PVDF membrane으로 electrotransfer한 다음 α, β 그리고 γ subunit로 각각 분리된 단백질 중 30 kDa의 γ subunit을 gel로부터 elution하여 *N*-terminal 아미노산 서열을 분석하였다. 분석된 20개의 아미노산 서열은 *N*-NTSALKVHAADDEMPYSNKI로 분석되었고, MP^{T}의 *mxaJ* 유전자를 아미노산 서열로 전환하여 비교한 결과 일치하였으며, 다른 methylotroph들의 MaxJ 단백질로 생각되는 단백질의 아미노산 서열과 비교 분석한 결과 *Hyphomicrobium methylovorum* (*N*-DTSALRVCAAANEAPYSVMDESGYENKI) 및 *Methylovorus* sp. SS1 (*N*-SADNPLR-ICAGEDELPYSN)의 아미노산서열과 10개의 아미노산이 일치하였다. 따라서 이 결과를 통해 MDH II 유래 30 kDa의 단백질이 MxaJ 단백질일 것으로 추정하였다. 한편 MDH II를 SDS-PAGE를 수행하여 각각 α, β 그리고 γ subunit으로 분리된 단백질 중 30 kDa의 γ subunit을 gel로부터 elution하여 MALDI-TOF/TOF mass (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) 분석을 하였고, *mxaJ* 유전자로부터 아미노산 서열로 전환된 서열과 비교한 결과 74%의 서열이 정확히 일치함을 알 수 있었다. 따라서 MDH II에 binding 되어 있는 30 kDa의 단백질은 MxaJ 단백질임을 확인하였다 (Fig. 2-8).

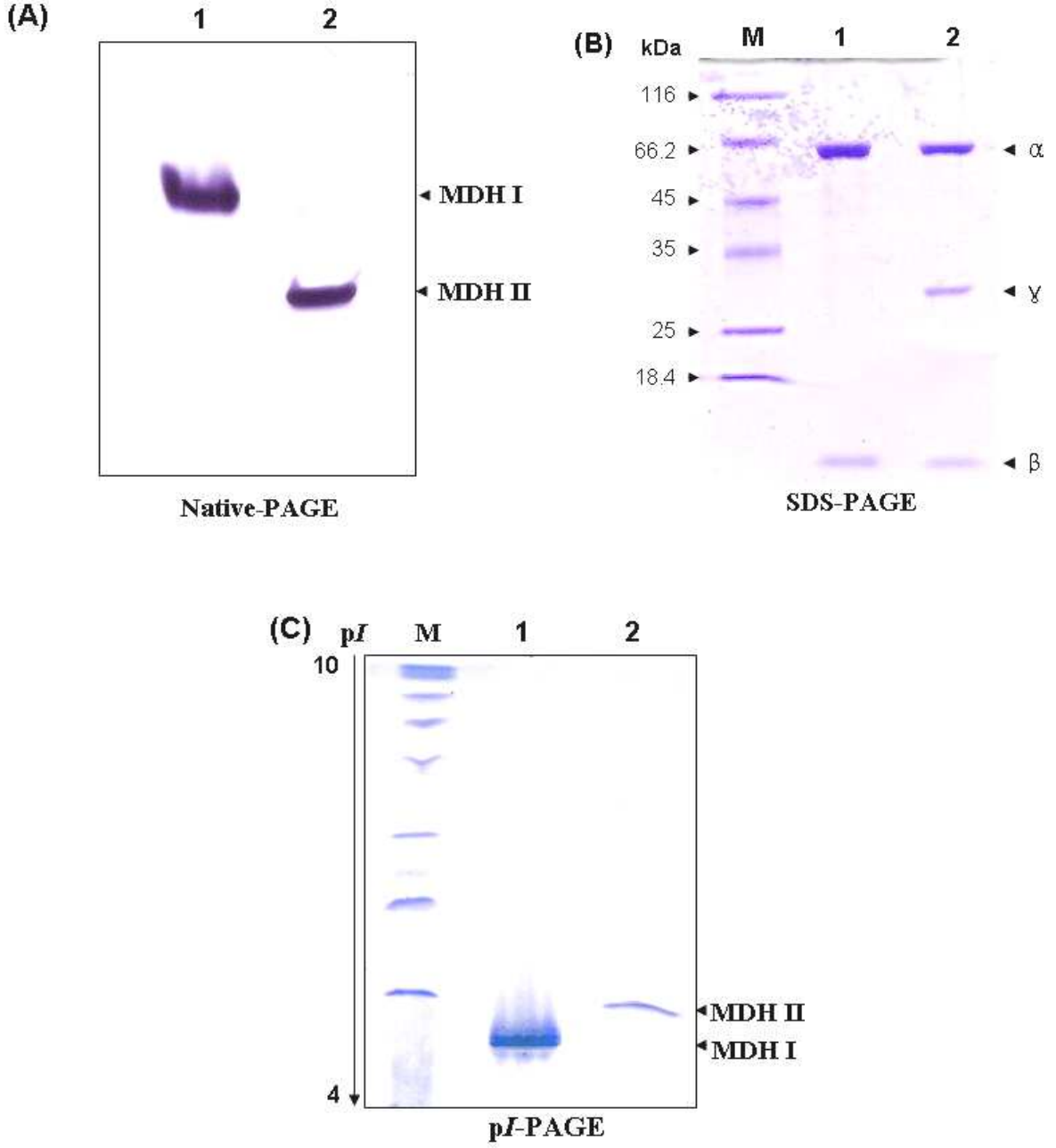
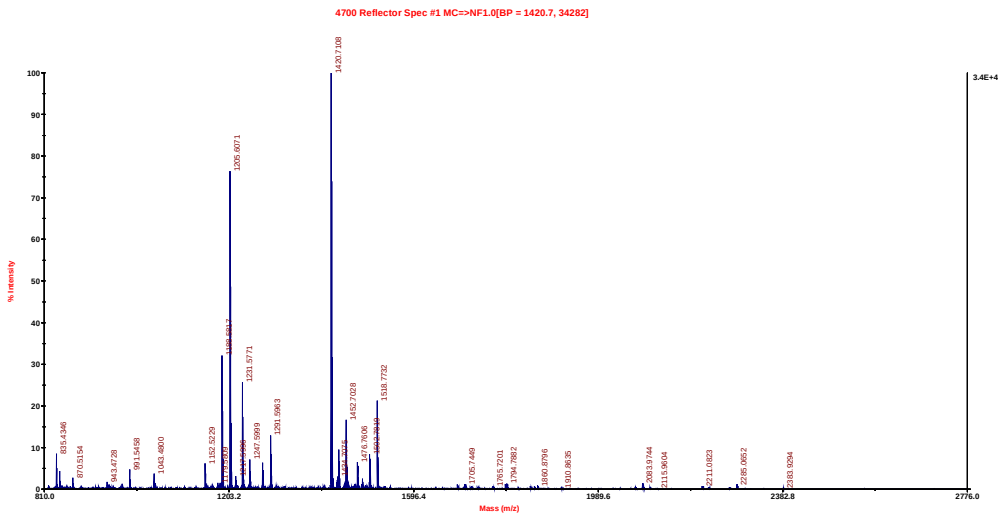


Fig. 2-7. Electrophoresis analysis of purified MDH I and II. (A) Native-PAGE : Each of MDH I or MDH II protein (10 μg) was applied. Gel was stained with activity staining using nitroblue tetrazolium. (B) SDS-PAGE : Each of 5 μg proteins was applied. M, molecular size marker; lain 1, MDH I; lane 2, MDH II. Gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. (C) p*I*-PAGE of MDH I and MDH II.

(A)



(B)

```
   1 MKRNMKQAKS GRMLPSFLAL LLGSGLAFNA QANTSTLKVC AASDEMPYSN
  51 KQQEGFENQL AKILADTMDR ELEFVWSDKA AIFLVTEKLL KNQCDVVMGV
 101 DKGDPRVATS DPYYKSGYAF IYPADKGLDI KNWQSPALKD MSKFAIVPGS
 151 PSEVMLREID KYEGNFNYTM SLIGFKSRRN QYVRYAPDLL VSEVVSGKAD
 201 IAHIWAPEAA RYVKSASVPL KMVVSEEIAP TRDGEGVRQQ FEQSIAVRSD
 251 DQELLKEINT ALHKADPKIK AVLKDEGIPL L
```

Fig. 2-8. MALDI-TOF/TOF MS spectrum of the peptides generated by trypsin digestion of MxaJ proteins (A) and Mascot search results (B). ESI-MS/MS of the MxaJ protein showing the peptides matched (bold), and 74% sequence coverage of the MxaJ protein sequence in the database.

Methane과 methanol만을 에너지원 및 탄소원으로 이용하는 *Methylosinus trichosporium* OB3b로부터 분리·정제된 MDH는 MDH I의 구조를 지니고 있었지만, 기존에 보고된 pI값이 각각 6.3, 6.58, 6.63, 6.88로 서로 다르게 나타났다 (Paker *et al*., 1987). 이것은 아마도 *M. trichosporium* OB3b 균주 유래 MDH 또한 MxaJ 단백질이 결합되어 있으나, MxaJ 단백질이 결합되어 있는 비율이 다름으로 해서 서로 다른 pI 값을 나타내는 것으로 사료된다. Strain MP^T 에서도 마찬가지로 MDH를 정제하는 과정 중 간혹 MDH의 활성이 있는 band가 두 개 이상 나타났는데 (Fig. 2-5B), 위의 결과에서도 MDH에 MxaJ 단백질이 binding함으로써 MDH의 pI 값이 달라지는 것으로 보아 MxaJ 단백질이 MDH와 binding 하는 비율이 비례적이지 않을 것으로 판단된다. 최근 연구에서는 *M. extorquens* AM1 및 *Methylococcus capsulatus* Bath의 2차원 전기영동(IEF, SDS-PAGE)을 통해 메탄올에서 생장한 균주의 단백질의 발현양상을 비교 분석하였다. *M. extorquens* AM1의 균주에서는 2차원 전기영동을 통해 MxaF 단백질은 하나의 main spot과 7개의 minor spot이 관찰되었다 (Laukel *et al*., 2004). 비록 이 실험에서는 MDH의 β subunit은 높은 pI 값 (pI 9.3)과 크기가 작기 때문에 gel상에서는 관찰되지 않았으나, methanol에서 생장한 경우 메탄올산화와 관련된 유전자 유래 단백질인 MxaF, MxaJ, MxaG, MxaD 그리고 MxaE가 발현된다고 보고하였다. 마찬가지로 succinate에서 생장한 균주는 methanol에서 생장한 균주에 비해 단백질의 발현양은 적었으나 MxaF 단백질 및 MxaJ 단백질이 관찰되었다. 이들의 연구에서도 마찬가지로 *M. extorquens* AM1도 기질과 상관없이 MxaF 및 MxaJ 단백질이 동시에 발현된다는 것을 보여주는 결과이다.

또한 이와 비슷하게 *M. capsulatus* Bath에서도 IEF running gel에서 MxaF단백질이 7개의 다른 spot으로 관찰되었다 (Berven *et al*., 2003). 이 연구에서는 비록 MxaJ 단백질에 관한 언급은 없었으나 *M. extorquens* AM1과 유사한 결과를 보이고 있다.

MDH는 methanol을 산화시켜 전자를 발생시키고 전자는 최초 cytochrome c_L로 전달되는데, MDH로부터 cytochrome c_L로의 전자전달율은 이론적인 측정치보다 느리게 전달된다고 보고하였다 (Afolabi *et al*., 2001; Beardmore-Gray and Anthony, 1984; Dijkstra *et al*., 1988; 1989). MDH의 활성은 pH 9에서 ammonia 이온에 의해 activation되게 되지만 생리활성 pH조건인 pH 7에서는 이러한 반응이 매우 느리게 진행된다. 하지만 ferricytochrome c_L은 pH 7에서 전자수용활성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 MDH와 cytochrome c_L 사이에 pH7에서 전자전달율을 높여 줄

수 있는 단백질이나 factor가 존재할 것이란 보고도 있었다. *Hyphomicrobium* X로부터 정제된 MDH는 산소 존재하에서 불안정한 factor (oxygen labile factor)를 가지고 있었고 이 factor는 MDH로부터 cytochrome c_L로의 전자전달율을 증가시켜 주는 것으로 보고하였다 (Dijkstra *et al*., 1988). 하지만 단백질의 발현 양상은 매우 불안전하여 이후 실험에서 검출할 수 없었다. Matsushita 그룹에서는 MDH에 MxaJ가 binding되어 있는 새로운 형태의 MDH를 보고하였고, 이 단백질이 MDH와 cytochrome c_L사이에 전자전달율을 높여 줄 수 있는 protein이며, MxaJ 단백질이 MDH를 구성하는 세 번째 subunit일 것으로 보고하였다 (Matsushita *et al*., 1993). 하지만 이 연구에서도 MxaJ 단백질의 기능을 정확히 명시하지 못하였다. 또한 Toyama 연구그룹에서는 MxaD 단백질이 MDH로부터 전자를 전달 받을 수 있는 가능성을 제시하기도 하였다 (Toyama *et al*., 2003).

지금까지 MDH 구조는 *M. methylotrophus* W3A1, *M. extorquens* AM1, *P. denitrificans* 균주들의 crystal structure가 밝혀져 있고, 각각 두 개의 large subunit (*mxaF*)와 small subunit (*mxaI*)으로 이루어진 $\alpha_2\beta_2$의 구조로 되어 있다고 알려져 있다. 하지만 methanol을 이용하여 자랄 수 있는 유일한 아세트산 bacterium인 *Acetobacter methanolicus*가 methanol을 생장 기질로 하여 자란 경우 두 가지 다른 형태의 MDH (MDH I, II)가 존재한다고 보고하였다 (Matsushita *et al*., 1993). Type I MDH는 $\alpha_2\beta_2$의 구조로 되어있고, type II MDH는 *mxaJ* 유전자에서 유래할 것으로 추정되는 30 kDa의 단백질이 binding 되어 있는 형태인 $\alpha_2\beta_2\gamma$ 혹은 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 구조로 이루어져 있다고 보고하였다. 이들의 보고에서도 MDH II 단백질은 MDH I 단백질의 농도에 비해 10 ~ 44%로 그 농도가 일정하게 나타나지 않았다. 이것은 아마도 본 연구와 마찬가지로 MxaJ 추정 단백질이 MDH와 binding을 약하게 하고 있어 cell 파쇄 시 떨어져 나와 그 양이 일정치 않은 것으로 사료된다. 또한 *A. methanolicus*는 multicarbon source로써 glycerol을 이용하여 자랄 경우 MxaJ 단백질이 만들어 지지 않아 MDH I만 만들어 졌고, MDH의 활성 역시 methanol 존재 하에 자란 균주로부터 유래된 것이 glycerol에서 자란 것보다 50배 정도 MDH 활성이 높았다.

이렇듯 지금까지의 연구결과들이 *mxaJ* 유전자 유래 단백질로 추정되는 단백질에 관한 연구는 있었으나 MxaJ 단백질을 분리할 수 없었던 이유는 MxaJ 단백질의 양이 적게 발현되어 검출할 수 없었거나 세포파쇄과정 중 MxaJ 단백질이 binding되어 있는 형태의 MDH가 물리적 충격에 의해 떨어져 나와 MDH I의 형태로만 관찰되었

던 것으로 판단된다. 본 실험에서도 MDH의 정제과정 중 물리적 충격이나 정제단계 중 column을 통과하면서 MDH II의 형태가 다시 MDH I의 형태로 elution되는 경우가 많았다. 이렇듯 MxaJ 단백질은 MDH와 강한 결합을 하는 것이 아니라 약하게 결합하고 있어 기존의 연구에서는 MxaJ 단백질을 검출하기 어려웠을 것으로 판단된다.

3. MDH I과 MDH II의 subunit 구조 분석

최종적으로 순수 분리된 MDH I과 MDH II 단백질의 구조를 분석하기 위하여 먼저 SDS-PAGE를 수행한 후 Coomassie brillant blue R250 (CBR-250) staining 하여 분리된 subunit의 intensity (Fluorchem 8900 program, Alpha Innotech, USA)를 비교함으로써 두 단백질의 subunit 구성비를 산출하였다. CBR staining 결과 MDH I은 두 개의 band (α, β subunit)가 관찰되었으며, MDH II에서는 MDH I와 달리 30 kDa의 protein (γ subunit)이 결합되어 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2-9A, 2-9B).

MDH I에 나타난 α와 β band의 intensity는 각각 82.02와 17.98로 나타났고, MDH I의 총 분자량으로 각 subunit의 분자량으로 나눈 mol% 비율은 α-subunit이 87.43, β-subunit가 12.57으로 산출되었다. 각 band의 intensity와 subunit의 mol%가 유사하다는 것은 MDH I의 α:β subunit의 비율이 1:1로 구성되어 있음을 알 수 있는 결과이다. 또한 MDH II에 나타난 α,β 그리고 γ band의 intensity는 각각 63.02, 13.18 그리고 23.81로 나타났고, 각 band의 mol%는 α-subunit이 62.67, β-subunit가 9.01, γ-subunit는 28.32로 산출되었다. 이 결과로 본 실험에 사용한 MDH II는 α:β:γ subunit의 비율이 1:1:1로 구성되어 있음을 알 수 있었다 (Table 2-2).

하지만 MDH I과 MDH II 단백질을 7테슬라급 고분해능 질량분석기 (7-Tesla FT-ICR MS, 대전 한국기초과학지원연구원)로 분석한 결과 MDH II에서 뿐만 아니라 MDH I 에서도 MxaJ 단백질이 존재한다는 것을 알 수 있었다. 실험결과는 Ishihama 등이 제안한 방법을 이용하여 protein의 abundance index를 비교하여 각 subunit의 비율을 산출하였다 (Ishihama *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004).

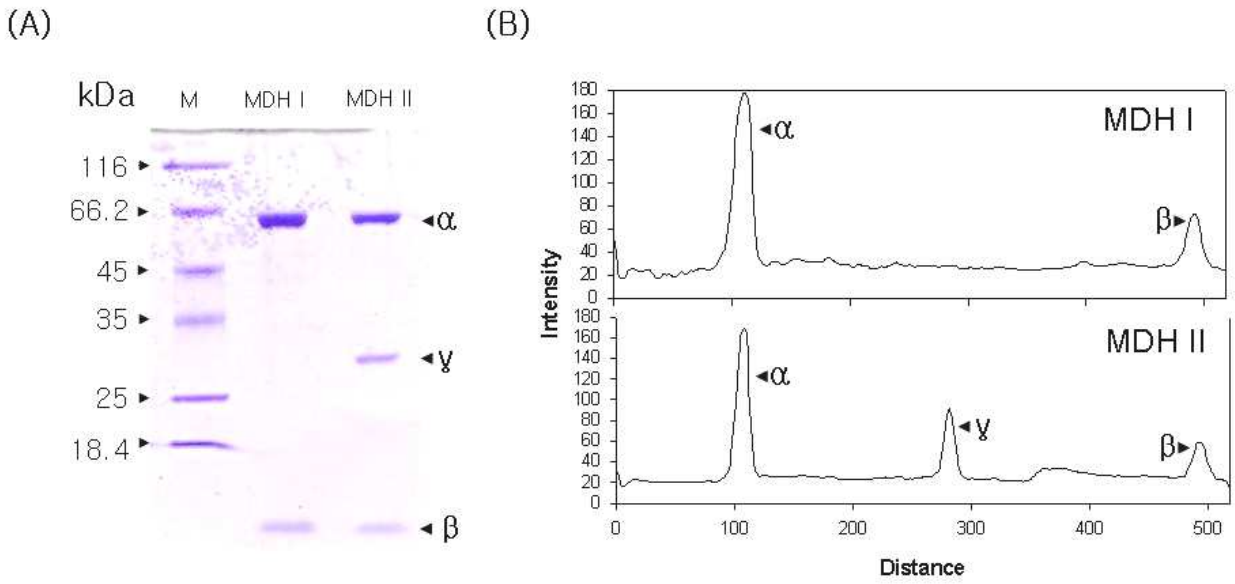


Fig. 2-9. CBR staining on a SDS-PAGE gel of purified MDH I and MDH II (A) and comparison of each subunits intensity value using SDS-PAGE data (B).

Table 2-2. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits by CBR staining

	MDH I				MDH II			
	Mw	Mol%	Intensity	Intensity (%)	Mw	Mol%	Intensity	Intensity (%)
α	69219	87.43	2496	82.02	69219	62.67	1755	63.02
γ	0	0.00	0	0.00	31274	28.32	663	23.81
β	9953	12.57	547	17.98	9953	9.01	367	13.18
Total	79172	100	3043	100	110446	100	2785	100

MDH I의 MxaF 단백질의 sequence coverage는 49%, MxaJ 단백질의 sequence coverage는 7%로 산출되었고, MDH II의 MxaF 단백질의 sequence coverage는 50%, MxaJ 단백질의 sequence coverage는 55%로 산출되었다 (Fig. 2-10, 2-11). 이 결과를 MDH I 와 MDH II의 ion score 값을 sample의 mol수로 나누어 보면, 두 단백질의 α subunit 의 비율은 0.893과 0.958로 거의 유사한 농도를 보였고, γ subunit은 MDH I에 비해 II에 binding 되어 있는 양이 1.698배로 높게 나타났다 (Fig. 2-12, Table 2-5). 하지만 CBR staining한 결과에서는 MDH I의 MxaJ 단백질이 관찰되지 않았는데, 이는 아마도 CBR staining 의 검출감도 (30 ~ 100 ng protein)가 낮기 때문인 것으로 사료된다.

따라서 검출감도가 더 좋은 silver staining (검출감도: 1 ~ 2 ng protein)을 통해 MDH I와 MDH II에 존재하는 MxaJ 단백질의 intensity를 비교하였다 (Fig. 2-12). Silver staining 결과 MDH I에 존재하는 MxaJ 단백질이 관찰 되었으나 β subunit은 염색되지 않았다. 하지만 CBR staining 결과 α와 β subunit 은 1:1로 존재하는 것을 밝혔으므로 α와 γ와의 intensity를 비교하여 MDH I에 binding 되어 있는 MxaJ 단백질의 비율을 산출하였다. 두 단백질의 α subunit의 intensity의 차이는 각각 MDH I이 2750, MDH II가 2456로 유사한 농도로 보이지만, MDH γ의 intensity는 각각 MDH I이 660, MDH II가 1592으로 MDH II가 약 2.41배 정도 높게 나타났다 (Table 2-3). 결론적으로 고분해능 질량분석과 CBR, silver staining을 통해 MDH I와 MDH II의 subunit과 각 subunit들의 구성 비율을 확인할 수 있었고, MDH I은 $\alpha_2\beta_2\gamma$의 구조로 MDH II는 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$의 구조로 이루어져 있음을 알 수 있었다 (Table 2-4).

4. *MxaFJGIR* cluster 분석

7.6 kb *Pst*I ~ *Hind*III fragment의 결정된 염기서열을 NCBI의 Blast search 프로그램을 사용하여 비교 분석 한 결과 다른 기존에 알려진 methylotrophs의 염기 서열들과 상당히 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 2-14). 7.6 kb크기의 fragment에는 *mxaFJGIRS*의 ORF가 모두 존재하였으며, NCBI Blast search에 따르면 *mxaF* 유전자 앞에 HKR (Histidine kinase Regulator), TCRP (Two component regulatory protein)와 유사한 ORF가 존재하였다 (Table 2-5). 분석 결과 *mxaFJGI* ORF는 *M. extorquens* AM1과 상동성이 높았고 (*mxaF* 77%, *mxaJ* 45%, *mxaG* 51%, *mxaI* 61%), *mxaRS*는 *M. capsulatus* Bath와 상동성이 높았다 (*mxaR* 65%, *mxaS* 30%).

Mascot Search Results

```
User                    : Cho Kun
Email                   : chokun@kbsi.re.kr
Search title            : Cho Sun UNI
MS data file            : E:\Choi\MDH_2.xml
Database                : MDH 20070813 (4 sequences; 1192 residues)
Timestamp               : 16 Aug 2007 at 02:25:39 GMT
Enzyme                  : Trypsin
Variable modifications  : Carbamidomethyl (C),Oxidation (M),Pyro-glu (N-term E),Pyro-glu (N-term Q)
Mass values             : Monoisotopic
Protein Mass            : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance  : ± 10 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.8 Da
Max Missed Cleavages    : 2
Instrument type         : ESI-FTICR
Number of queries       : 3667
```

Select Summary Report

Format As [Select Summary (protein hits)] Help

Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO

Standard scoring ○ MudPIT scoring ◉ Ions score cut-off 0 Show sub-sets ☐

Show pop-ups ◉ Suppress pop-ups ○ Sort unassigned [Decreasing Score] Require bold red ☐

1. gi|999991 Mass: 69219 Score: 24787 Queries matched: 416

MDH large subunit [a subunit mxaF]

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
25	423.7321	845.4497	845.4494	0.0003	0	42	3e-006	1	R.DLETGLAK.F
61	485.7513	969.4881	969.4879	0.0002	0	54	2.2e-007	1	R.QNGIGSGQVK.A
119	517.2628	1032.5110	1032.5087	0.0022	0	28	8.6e-005	1	R.ETGDLVSANK.M
140	525.7636	1049.5125	1049.5117	0.0009	0	45	1.5e-006	1	K.WTMTIWGR.D 133 134 135 136 137 138 139 141 142 1
156	532.7913	1063.5681	1063.5662	0.0019	0	59	6.4e-008	1	R.NGIIYTLDR.E
181	540.2451	1078.4757	1078.4753	0.0004	0	52	2.9e-007	1	K.MDDTANWVK.K 179 180 182 189 190
200	556.8190	1111.6234	1111.6237	-0.0003	0	49	7e-007	1	K.VDLETGLPIR.D
207	561.2679	1120.5212	1120.5189	0.0023	0	49	6.5e-007	1	R.GLAYWPGDDK.A 205 206 208 209 210 211 212
267	596.7751	1191.5356	1191.5342	0.0014	0	63	2.7e-008	1	K.SNENWVMQGK.D 264 265 266 268 283
289	607.2783	1212.5421	1212.5411	0.0010	0	55	3.5e-007	1	K.DFSGTHYSTAK.Q
702	716.8008	1431.5870	1431.5864	0.0006	0	76	1.2e-009	1	K.SPYDDVSLGEYGM.- 703 723
776	732.8441	1463.6736	1463.6681	0.0055	0	52	3e-007	1	K.GLGTSTWEDNAWK.I 750 751 752 753 754 755 756 757
948	750.3638	1498.7131	1498.7092	0.0039	0	78	8.4e-010	1	K.AYNAITGEFAWEK.M 946 947 949
954	750.9056	1499.7967	1499.7943	0.0024	0	100	4.6e-012	1	K.DLVIQGSSGAELGVR.G 954 955 956 957 958 959 960 9
1062	754.3587	1506.7029	1506.6990	0.0038	0	90	4.5e-011	1	R.WYATGPDADVGLDK.D 1060 1061 1063 1064
1396	820.8945	1639.7745	1639.7697	0.0048	0	104	1.9e-012	1	K.NTQMGGGVMVFSLDGK.S 1391 1393 1394 1395 1415 14
1411	827.4255	1652.8365	1652.8344	0.0021	0	67	9.3e-009	1	K.LPSGVIGHPMTYTHK.G 186 187 1386 195
2127	919.9669	1837.9193	1837.9151	0.0042	0	101	4.1e-012	1	R.AGQFFVGANVWTYPGPK.G 318 2110 2111 2112 2113 21
334	616.6503	1846.9290	1846.9287	0.0003	1	54	2.2e-007	1	R.GLAYWPGDDKAPAMIVK.S 2093 2094 2095 301 302 209
2372	949.4530	1896.8915	1896.8828	0.0086	0	104	2e-012	1	R.GYVTAYDIHTGEMVWR.W 2348 365 2349 366 367 368 2
2461	957.0093	1912.0041	1912.0029	0.0013	1	80	4.7e-010	1	K.FKLPSGVIGHPMTYTHK.G 481 2504
2623	1006.4803	2010.9461	2010.9323	0.0139	1	81	3.9e-010	1	R.WYATGPDADVGLDKDFNK.H 549 550 551 552 553 554 5
2688	1017.0197	2032.0249	2032.0112	0.0137	0	52	2.9e-007	1	K.VENGDISVGQTETAAPFVAK.D 611
636	687.0330	2058.0772	2058.0745	0.0027	2	40	4.9e-006	1	K.KVDLETGLPIRDPEYGTR.M 635 637 638 639 640 641 6
3111	1116.0509	2230.0873	2230.0905	-0.0033	0	79	6.3e-010	1	K.SLLDGHVVALNAETGEEYWK.V 825 826 827 828 829 830
1186	784.0223	2349.0450	2349.0405	0.0045	0	58	8.7e-008	1	K.TPHDEWDYAGVNVMMLSEQK.D 1185 1187 1188 1206 32

2. gi|999992 Mass: 31274 Score: 71 Queries matched: 2

MDH binding protein [mxaJ]

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
281	603.3184	1204.6223	1204.6200	0.0023	0	50	5.5e-007	1	R.QQFEQSIAVR.S
333	616.3217	1230.6288	1230.6278	0.0010	0	22	0.00035	1	K.MVVSEEIAPTR.D

Mascot: http://www.matrixscience.com/

Fig. 2-10. 7-Tesla LTQ FT-ICR MS analysis of MDH I protein. Identification of protein by LC/MS/MS and protein database searches. Sequence information obtained from Nanospray/LC/MS/MS of MDH I was taken and submitted to MASCOT search engine (Matrix Science, London, UK) for protein identification using the home-made database containing MxaF, mxaI, MxaJ from strain MP^{T}. Sequence coverage of MxaF protein was 49% and sequence coverage of MxaJ protein was 7%.

Mascot Search Results

```
User                    : Cho Kun
Email                   : chokun@kbsi.re.kr
Search title            : Cho Sun UNI
MS data file            : E:\Choi\MDH_3.xml
Database                : MDH 20070813 (4 sequences; 1192 residues)
Timestamp               : 16 Aug 2007 at 02:09:48 GMT
Enzyme                  : Trypsin
Variable modifications  : Carbamidomethyl (C),Oxidation (M),Pyro-glu (N-term E),Pyro-glu (N-term Q)
Mass values             : Monoisotopic
Protein Mass            : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance  : ± 10 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.8 Da
Max Missed Cleavages    : 2
Instrument type         : ESI-FTICR
Number of queries       : 3930
```

Select Summary Report

Format As [Select Summary (protein hits)] Help

Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits AUTO

Standard scoring ○ MudPIT scoring ⊙ Ions score cut-off 0 Show sub-sets ☐

Show pop-ups ⊙ Suppress pop-ups ○ Sort unassigned [Decreasing Score] Require bold red ☐

1. gi|999991 Mass: 69219 Score: 36628 Queries matched: 574
MDH large subunit [a subunit mxaF]
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
146	517.2628	1032.5111	1032.5087	0.0024	0	34	2e-005	1	R.ETGDLVSANK.M
165	525.7636	1049.5127	1049.5117	0.0010	0	45	1.6e-006	1	K.WTMTIWGR.D 157 158 159 160 161 162 163 164 166
184	532.7913	1063.5680	1063.5662	0.0018	0	59	6.5e-008	1	R.NGIIYTLDR.E 185
201	540.2455	1078.4764	1078.4753	0.0011	0	45	1.6e-006	1	K.MDDTANWVK.K 198 199 200
211	556.8188	1111.6231	1111.6237	-0.0005	0	50	5.5e-007	1	K.VDLETGLPIR.D
219	561.2675	1120.5204	1120.5189	0.0015	0	51	3.7e-007	1	R.GLAYWPGDDK.A 215 216 217 218 220
263	596.7745	1191.5344	1191.5342	0.0002	0	49	6e-007	1	K.SNENWVMQGK.D
278	607.2781	1212.5416	1212.5411	0.0005	0	53	4.6e-007	1	K.DFSGTHYSTAK.Q 3
349	620.8673	1239.7201	1239.7186	0.0014	1	67	1.1e-008	1	K.KVDLETGLPIR.D
703	716.8033	1431.5920	1431.5864	0.0057	0	97	9.7e-012	1	K.SPYDDVSLGEYGM.- 702 715 716 717
766	732.8442	1463.6738	1463.6681	0.0057	0	54	2.2e-007	1	K.GLGTSTWEDNAWK.I 728 729 730 731 732 733 734 73
940	750.3632	1498.7119	1498.7092	0.0027	0	90	5.5e-011	1	K.AYNAITGEFAWEK.M 938 939 941 942 943 944 945 94
970	750.9052	1499.7959	1499.7943	0.0016	0	104	2.1e-012	1	K.DLVIQGSSGAELGVR.G 957 958 959 960 961 962 78 9
1072	754.3582	1506.7019	1506.6990	0.0028	0	88	8.3e-011	1	R.WYATGPDADVGLDK.D 1073 1074
1534	819.4289	1636.8432	1636.8395	0.0037	0	65	1.4e-008	1	K.LPSGVIGHPMTYTHK.G 202 203 1533 1535 204 205 1
1577	820.8945	1639.7745	1639.7697	0.0048	0	106	1.4e-012	1	K.NTQMGGGVMVFSLDGK.S 1538 1539 1540 1541 1542 1
2221	919.9671	1837.9197	1837.9151	0.0046	0	108	7.9e-013	1	R.AGQFFVGANVWTYPGPK.G 328 2198 2199 329 2200 22
2318	924.4708	1846.9270	1846.9287	-0.0017	1	56	1.3e-007	1	R.GLAYWPGDDKAPAMIVK.S 284 285 286 2187 288 289
2403	949.4510	1896.8874	1896.8828	0.0046	0	102	3.4e-012	1	R.GYVTAYDIHTGEMVWR.W 362 363 364 2398 365 366 3
480	638.3421	1912.0045	1912.0029	0.0016	1	41	3.8e-006	1	K.FKLPSGVIGHPMTYTHK.G 479 481
2571	965.9980	1929.9815	1929.9796	0.0020	1	29	0.00013	1	K.VDLETGLPIRDPEYGTR.M 2572
2674	1006.4747	2010.9349	2010.9323	0.0026	1	92	3.3e-011	1	R.WYATGPDADVGLDKDFNK.H 524 525 526 527 528 529
2744	1017.0150	2032.0154	2032.0112	0.0041	0	101	3.6e-012	1	K.VENGDISVGQTETAAPFVAK.D 2743
2817	1030.0454	2058.0763	2058.0745	0.0018	2	28	8.3e-005	1	K.KVDLETGLPIRDPEYGTR.M 627 2818 628 629 630 631
3236	1116.0519	2230.0892	2230.0905	-0.0013	0	87	9.2e-011	1	K.SLLDGHVVALNAETGEEYWK.V 823 824 825 826 827 82
3451	1175.5336	2349.0526	2349.0405	0.0121	0	71	3.9e-009	1	K.TPHDEWDYAGVNVMMLSEQK.D 1249 1250 1251 1252 1
1952	875.1111	2622.3114	2622.3005	0.0109	0	71	4.3e-009	1	K.FSVWGGTTATEGGLVFYGTLDGFIK.A 1950

2. gi|999992 Mass: 31274 Score: 4568 Queries matched: 94
MDH binding protein [mxaJ]
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
37	463.2592	924.5038	924.5029	0.0010	0	29	5.9e-005	1	K.EINTALHK.A
40	472.2539	942.4932	942.4923	0.0009	0	24	0.00018	1	K.NWQSPALK.D
72	496.2952	990.5758	990.5749	0.0008	0	59	5.8e-008	1	K.AAIFLVTEK.L 65 66 67 68 69 70 71 73 74 75 76
149	522.2565	1042.4984	1042.4971	0.0013	0	44	2.2e-006	1	R.VATSDPYYK.S
230	576.7825	1151.5505	1151.5499	0.0007	0	37	9.4e-006	1	R.ELEFVWSDK.A 227 228 229 231 232 233 234 235 236
246	584.3540	1166.6935	1166.6910	0.0024	1	48	8.6e-007	1	K.AVLKDEGIPLL.- 244 245 247 248
276	603.3183	1204.6220	1204.6200	0.0020	0	69	6.3e-009	1	R.QQFEQSIAVR.S 261 272 273 274 275
338	616.3037	1230.5929	1230.5920	0.0008	0	50	5.1e-007	1	K.SGYAFIYPADK.G 337
341	616.3217	1230.6288	1230.6278	0.0010	0	69	6.4e-009	1	K.MVVSEEIAPTR.D 339 340 342 355
494	646.3193	1290.6241	1290.6204	0.0037	0	52	3e-007	1	K.QQEGFENQLAK.I 493 495
45	474.2500	1419.7282	1419.7259	0.0023	0	60	5.3e-008	1	K.ADIAHIWAPEAAR.Y 42 690 691 43 692 44 693 694
796	738.9013	1475.7881	1475.7871	0.0010	0	87	1.1e-010	1	R.YAPDLLVSEVVSGK.A 795 797 798 799 800 801 802 80
1169	759.9040	1517.7934	1517.7911	0.0023	0	59	6.1e-008	1	K.FAIVPGSPSEVMLR.E 1054 1055
2074	892.4254	1782.8362	1782.8286	0.0075	0	97	1e-011	1	K.YEGNFNYTMSLIGFK.S 2073 2075
3365	1135.0481	2268.0816	2268.0772	0.0045	1	94	2.2e-011	1	R.EIDKYEGNFNYTMSLIGFK.S 1083 1084 1085 3364 108

Mascot: http://www.matrixscience.com/

Fig. 2-11. 7-Tesla LTQ FT-ICR MS analysis of MDH II protein. Identification of protein by LC/MS/MS and protein database searches. Sequence information obtained from Nanospray/LC/MS/MS of MDH II was taken and submitted to MASCOT search engine (Matrix Science, London, UK) for protein identification using the home-made database containing MxaF, mxaI, MxaJ from strain MP^{T}. Sequence coverage of MxaF protein was 50% and sequence coverage of MxaJ protein was 55%.

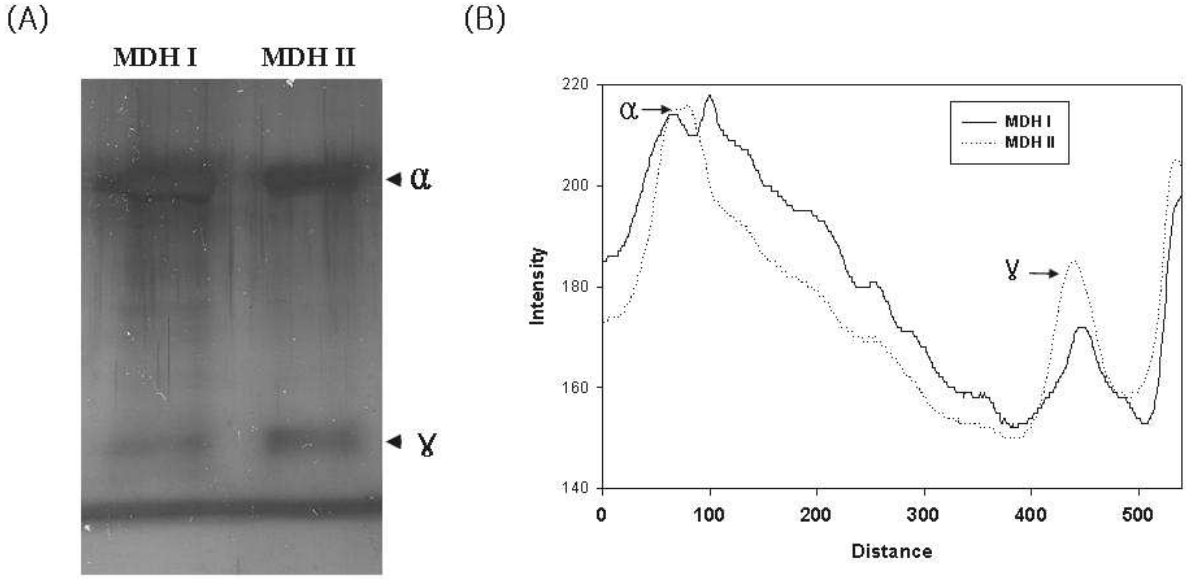
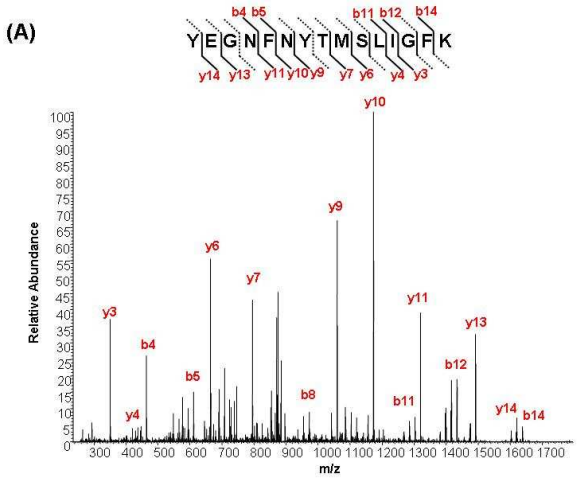


Fig. 2-12. SDS-PAGE analysis of purified MDH I and MDH II stained by silver staining (A) and comparison of each subunits intensity value using SDS-PAGE data (B).

Table 2-3. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits by silver staining

	MDH I				MDH II			
	Mw	Mol%	Intensity	Intensity (%)	Mw	Mol%	Intensity	Intensity (%)
α	69219	62.67	2750	80.65	69219	62.67	2456	60.67
γ	31274	28.32	660	19.35	31274	28.32	1592	39.33
β	9953	9.01	0	0.00	9953	9.01	0	0.00
Total	110446	100	3410	100	110446	100	4048	100



(B) **MDH-binding protein, MxaJ of MDH-I**
Sequence Coverage : 7%

MKRNMKQAKS GRMLPSFLAL LLGSGLAFNA QANTSTLKVC
AASDEMPYSN KQQEGFENQL AKILADTMDR ELEFVWSDKA
AIFLVTEKLL KNQCDVVMGV DKGDPRVATS DPYYKSGYAF
IYPADKGLDI KNWQSPALKD MSKFAIVPGS PSEVMLREID
KYEGNFNYTM SLIGFKSRRN QYVRYAPDLL VSEVVSGKAD
IAHIWAPEAA RYVKSASVPL K**MVVSEEIAP TR**DGEGVR**QQ**
FEQSIAVRSD DQELLKEINT ALHKADPKIK AVLKDEGIPL L

MDH-binding protein, MxaJ of MDH-II
Sequence Coverage : 55%

MKRNMKQAKS GRMLPSFLAL LLGSGLAFNA QANTSTLKVC
AASDEMPYSN K**QQEGFENQL AK**ILADTMDR **ELEFVWSDKA**
AIFLVTEKLL KNQCDVVMGV DKGDPR**VATS DPYYKSGYAF**
IYPADKGLDI K**NWQSPALK**D MSK**FAIVPGS PSEVMLREID**
KYEGNFNYTM SLIGFKSRRN QYVR**YAPDLL VSEVVSGKAD**
IAHIWAPEAA RYVKSASVPL K**MVVSEEIAP TR**DGEGVR**QQ**
FEQSIAVRSD DQELLK**EINT ALHK**ADPKIK **AVLKDEGIPL L**

Fig. 2-13. Typical LTQ-FT MS/MS spectrum of parental ion (m/z 1782.83) from MxaJ of *M. aminisulfidivorans* MP^T (A). Mascot search results of MxaJ were shown in bold (B). Sequence coverages of MDH I and MDH II complex were 7%, 55%, respectively.

Table 2-4. Constitution ratio of MDH I and MDH II subunits determined by LTQ FT-ICR MS data

Ion Score	α subunit			ɣ subunit		
	total	Score/α mole	ratio	total	Score/ɣ mole	ratio
MDH I	24787	4051	0.893	71	711	1
MDH II	36628	4346	0.958	4568	1207	1.698

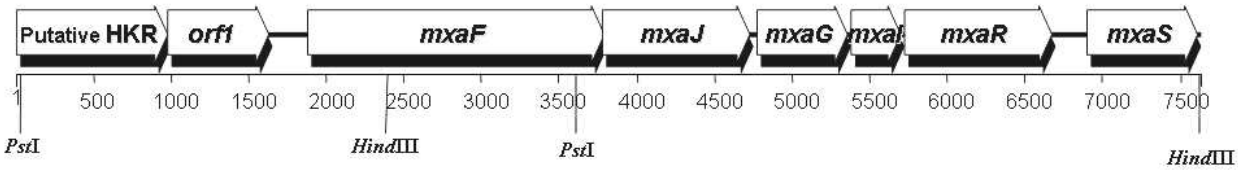


Fig. 2-14. Schematic diagram of the isolated genomic DNA fragments. Empty boxed arrows show possible ORFs which are highly homologous to the known proteins listed in NCBI Genebank Database.

Table 2-5. Identification of *mxa* genes from *M. aminisulfidivorans* MP^T based on the comparison with functionally characterized homologs

ORF	Representative homolog (gene)	Identity (%)	Organism	NCBI protein access no.
orf1	Putative response regulator	43	*Methylococcus capsulatus* Bath	YP_113279
mxaF	MDH large subunit (*moxF*)	77	*Methylobacterium extorquens* AM1	P16027
mxaJ	Unknown protein (*moxJ*)	45	*Methylobacterium extorquens* AM1	P16028
mxaG	Cytochrome c_L (*moxG*)	51	*Methylobacterium extorquens* AM1	P14774
mxaI	MDH small subunit (*moxI*)	61	*Methylobacterium extorquens* AM1	P14775
mxaR	Unknown protein	65	*Methylococcus capsulatus* Bath	YP_113981
mxaS	Unknown protein	30	*Methylococcus capsulatus* Bath	YP_113982

5. MxaJ와 native MDH의 *in vitro* binding assay

가. Native MDH I과 MxaJ 단백질의 direct binding assay

MxaJ 단백질은 periplasmic space에 존재하고 있으므로 cell의 inner membrane을 통과할 수 있는 signal peptide를 가지고 있다. 따라서 MxaJ 단백질을 *E. coli*의 periplasmic space에서 발현시키기 위해 MxaJ 단백질의 signal peptide sequence가 포함되지 않게 PCR로 유전자를 증폭하였고, *E. coli*의 OmpA signal을 가진 pASK-IBA6 vector에 증폭된 PCR 산물을 삽입하여 발현시켰다. MDH는 wild type MP^T로부터 정제된 type I 형태를 이용하였고 MxaJ 단백질은 대장균에서 발현한 후 Ni-NTA column으로 정제하여 사용하였다. 정제 후 MxaJ 단백질은 gel filtration chromatography를 통해 분자량이 약 35 kDa임을 확인하였다 (Fig 2-15). 확인된 MxaJ 단백질은 native MDH I과 함께 binding buffer에 넣어 반응시킨 후, Native PAGE에서 확인한 결과 MDH-MxaJ complex band가 생성됨을 알 수 있었다 (Fig. 2-16A). 또한 native-PAGE를 이용하여 MDH를 활성 염색한 결과 역시 새로운 band에서 MDH 활성이 나타남을 알 수 있었고, MDH 항체를 이용한 Western blot 결과 또한 MDH와 MxaJ 단백질이 직접적으로 binding 할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2-16B, 2-16C). 이는 native MDH와 *E. coli* DH5α에서 발현 정제된 MxaJ가 서로 결합하는 것을 의미한다. 하지만 molar ratio를 일정히 증가시키거나 감소시켜도 새로이 형성되는 band의 양이 증가되지 않았다. 이는 MDH I의 구조에 MxaJ 단백질이 소량 결합되어 있는 형태이고, 일단 결합에서 떨어져 나오면 조건을 바꾸어 주어도 다시 결합하지 않는 것으로 판단된다.

나. Co-immunoprecipitation

Protein agarose A를 이용하여 세포내의 MxaJ를 MxaJ 항체에 의해 침전시키고 세척한 후, 이 침전물을 SDS-PAGE를 수행하여 silver staining하고 일부는 MDH 항체를 사용하여 western blot analysis를 수행하였다. Western blot analysis에서 MDH의 α subunit에 해당하는 band가 나타났다 (Fig. 2-17A). 그리고 SDS-PAGE에서도 동일한 위치에 band가 관찰되었다 (Fig. 2-17B). 이는 *M. aminisulfidivorans* MP^T 세포의 *in vivo*상의 MxaJ와 MDH가 직접 결합하고 있음을 보여주는 결과이며, *in vitro* binding assay와 column binding assay 결과와 일치하는 결과이다.

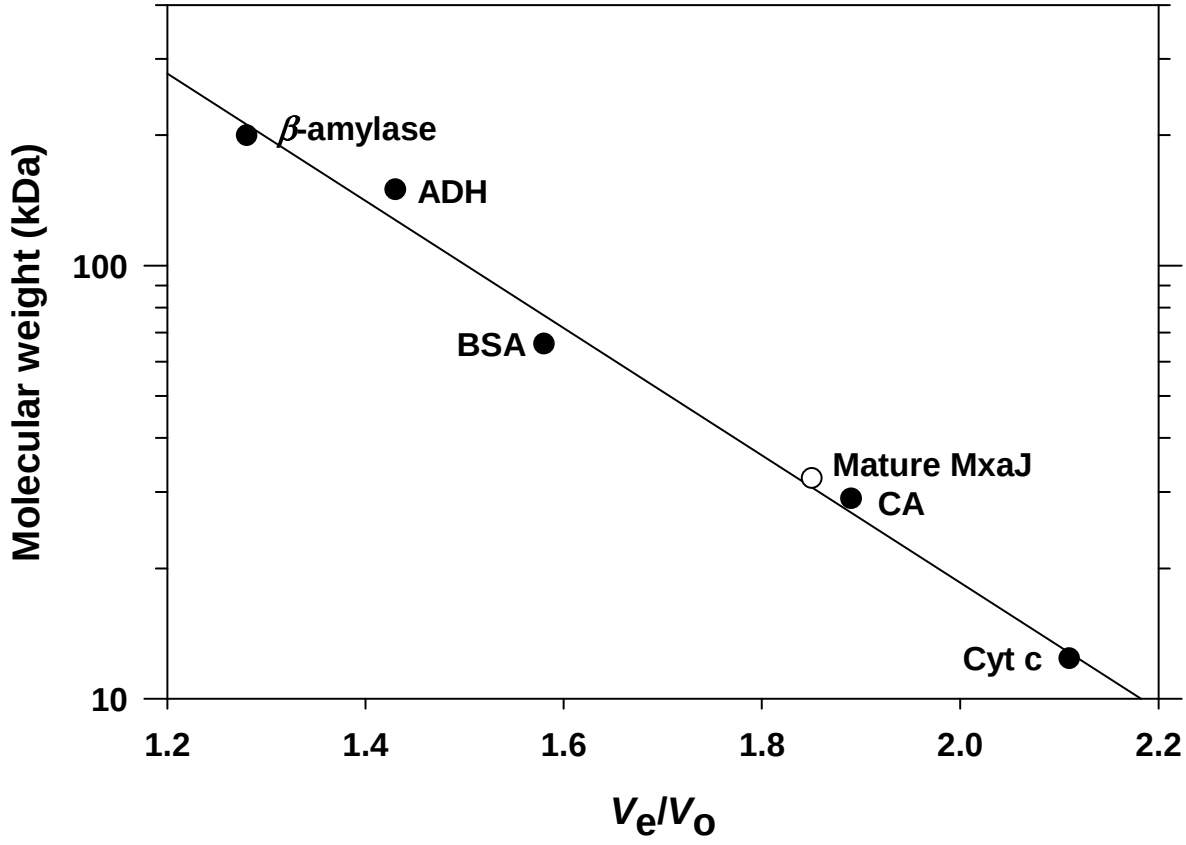


Fig. 2-15. Molecular weight determination of expressed mature MxaJ protein on a Sephacryl S200 gel filtration column. V_e is the elution volumn and V_o is the void volume determined with blue dextran (Mw 2,000,000). The column was equilibrated with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 150 mM sodium chloride. The protein used for calibration (MW-GF-200, Sigma) were horse heart cytochrome *c* (Cyt c, 12,400 Da), carbonic anhydrase (CA, 29,000 Da), bovine serum albumin (BSA, 66,000 Da), yeast alcohol dehydrogenae (ADH, 150,000 Da), and β-amylase (200,000 Da). ○ represents the point of elution of mature MxaJ protein.

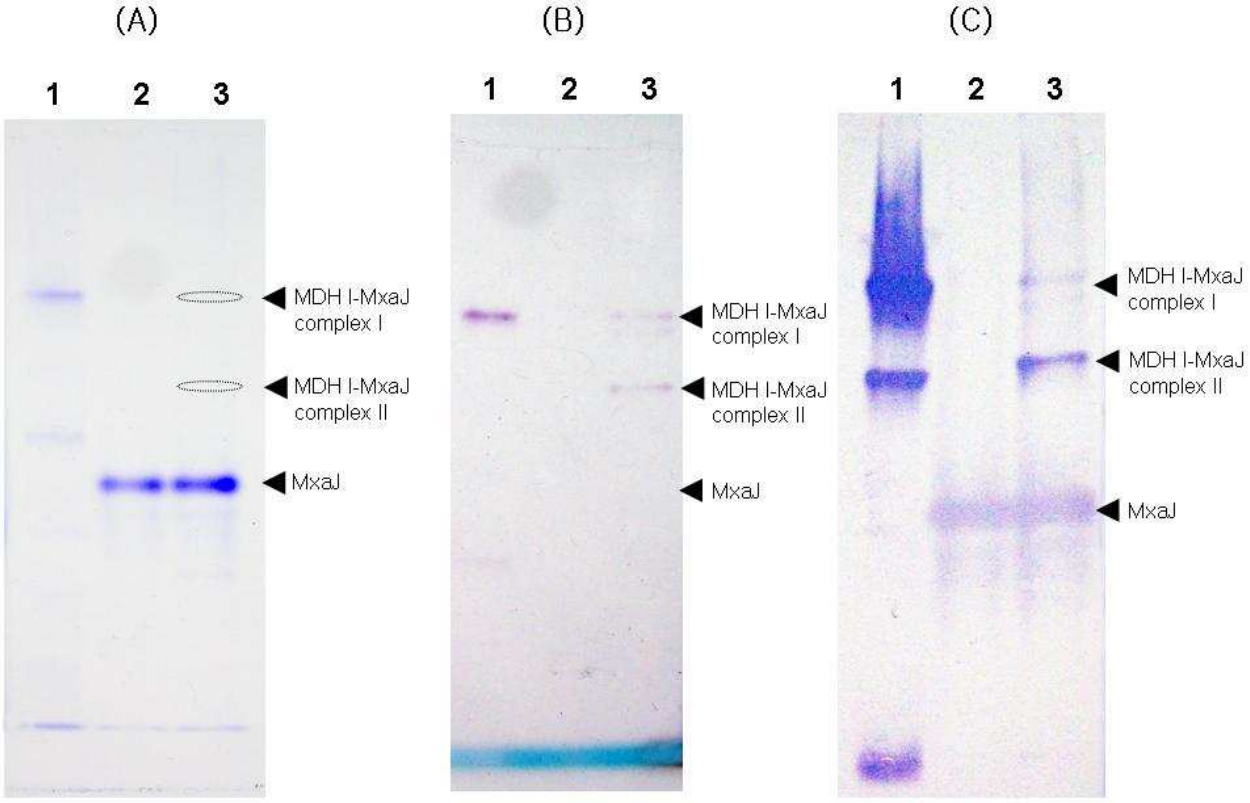
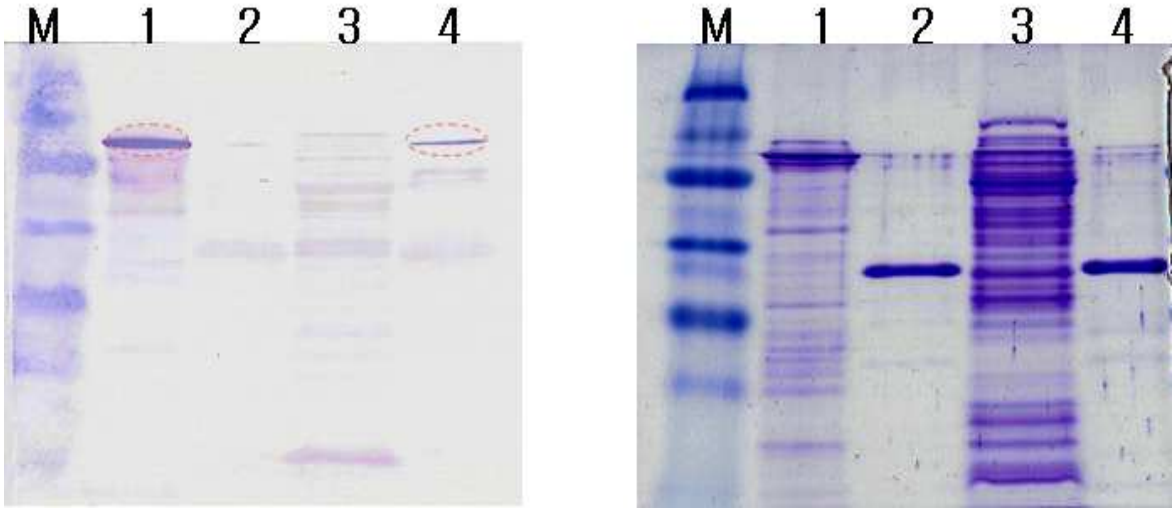


Fig. 2-16. Column binding assay with MDH and expressed MxaJ protein in *E. coli*. MDH-MxaJ complex I and II considered to $\alpha_2\beta_2\gamma$ and $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, respectively. Lane 1: soluble fraction of strain MP^T; lane 2 : purified MxaJ protein by NI-NTA column; lane 3: MDH I and MxaJ complexes. (A) Native-PAGE analysis of MDH and MxaJ protein complex. Gel was stained with CBR250. (B) Gel was stained with activity staining using nitroblue tetrazolium. (C) Western blot analysis of MDH I and MxaJ complexes with anti-MDH polyclonal antibody.



(A) **(B)**

Fig. 2-17. Co-immunoprecipitation analysis of MxaJ protein with MDH I. (A) Western blot analysis of immunoprecipitant with anti-MDH polyclonal antibody (pull down with anti-MxaJ antibody). (B) SDS-PAGE analysis of immunoprecipitatants with CBR staining. M; molecular size marker, 1; strain MP^T cell free extract, 2; purified MxaJ protein from *E. coli*, 3; *E. coli* cell free extract, 4; Co-immunoprocipitant.

6. Methanol oxidation gene의 transcript 분석

Methanol에서 자란 균체로부터 분리한 총 RNA를 template로 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과 *mxaFJ* (843), *mxaJG* (699), *mxaGI* (780), *mxaIR* (837)로 RT-PCR 결과물을 만들어 냈으며, 결과적으로 MP^T의 MDH의 구조 유전자(*mxaFJGI*)는 하나의 mRNA를 만든다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2-18B). MP^T의 *mxa* 유전자는 methylotroph 중 유전학적으로 생화학적으로 가장 많은 연구가 되어있는 *M. extorquens* AM1 (Lidstrom, 1991; Zhang and Lidstrom, 2003), *H. methylovorum* GM2 (Tanaka *et al*., 1997)의 *mxaFJGIR* 유전자와 유사성이 높았다. 지금까지 methanol 산화과정에 관여하는 gene은 5개의 유전자 집단으로 이루어져 있고 최소 25가지 이상의 유전자들로 구성되어 있다고 알려져 있으며, MP의 *mxaFJGI* 유전자 구성과 전사방향을 다른 methylotroph와 비교분석 하였을 때 AM1과 동일함을 알 수 있었다. AM1의 methanol 산화 고정에 관여하는 13개의 유전자 (*mxaFJGIRSACKLDEH*)는 하나의 mRNA로 전사되는 것으로 알려져 있다 (Amaratunga *et al*., 1997; Zhang and Lidstrom, 2003). 이와 같은 결과는 strain MP^T도 다른 methylotorph와 마찬가지로 구조유전자인 *mxaFJGI* gene cluster는 하나의 transcript를 만들고, 활성 있는 MDH를 구성하기 위해서는 cell 내에서 동시에 발현된다는 것을 단적으로 알 수 있었다. 결론적으로 *mxaFJGI*유전자가 동시에 발현되면서 MDH 구성 소단위체인 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$를 형성하고, 여기에 cytochrome c_L이 결합하여 정상적인 메탄올 산화계를 형성한다고 볼 수 있다.

7. MDH와 cytochrome c_L 그리고 MxaJ 간의 상호 작용

Cytochrome c_L을 암호화하고 있는 *mxaG* 유전자를 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켜 절대혐기조건하에서 발현하였다 (Kim *et al*., 2005). 과발현된 cytochrome c_L은 야생형과 마찬가지로 각각 415.5, 521.0, 551.0의 cytochrome에서 나타나는 특이적 peak를 가지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2-19). 과발현된 cytochrome c_L 은 야생형과 동일한 분자량을 가지고 있고 MDH로부터 전자를 수용하는 환원력을 가지고 있었다 (Fig. 2-20). 결과적으로 *mxaG* 유전자는 methanol 산화작용 시 MDH의 일차전자수용체로서 작용하는 것을 알 수 있었다. Cytochrome c_L은 상당히 안정적인 단백질로써 야생형 균주의 생장에 따라 그 양을 변하지 않았으며, 균체가 정체기의 후반부에서도 전자 수용활성은 변하지 않았다.

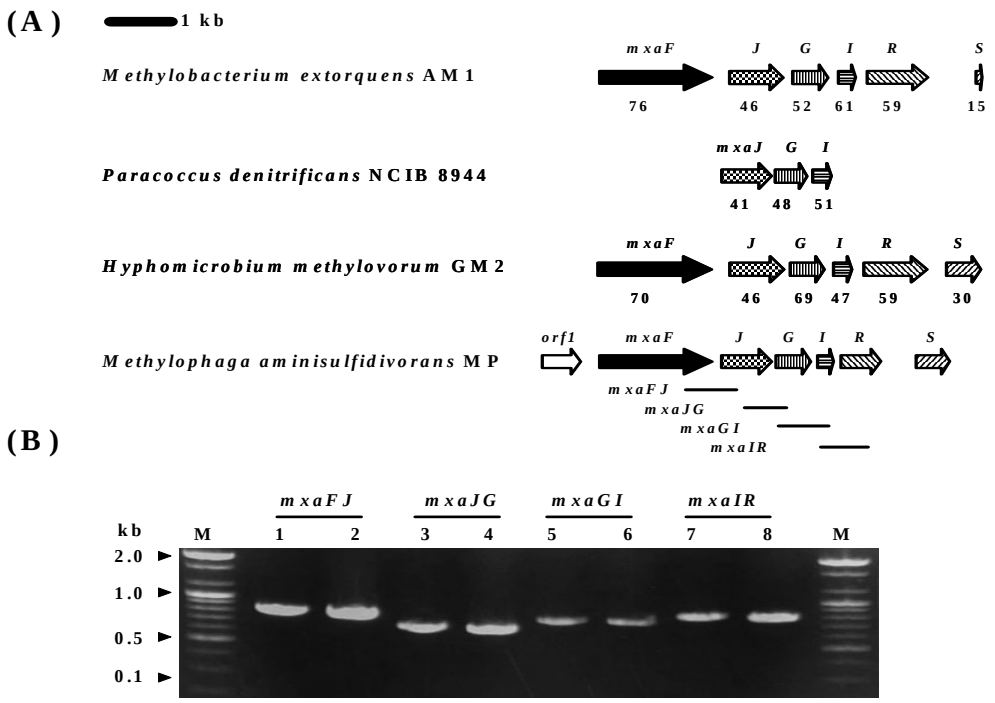


Fig. 2-18. Gene organization of the *mxa* cluser of *M. aminisulfidivorans* sp. strain MP^{T}. (A) Comparisons with homologous genes from other methylothrophic bacteria. The directions of transcription are indicated by arrowheads. Numbers underneath the arrows indicate the similarity index (MegAlign software, DNAStarInc., USA) between the amino acid sequences deduced from *mxa* and corresponding homologous genes in strain MP^{T} and other methylothrophs, respectively. (B) RT-PCR for the intergenic regions of *mxa* genes. Lane 1, 3, 5 and 7 indicates positive controls using chromosomal DNA as the template. Lane 2, 4, 6 and 8 used cDNA as the template.

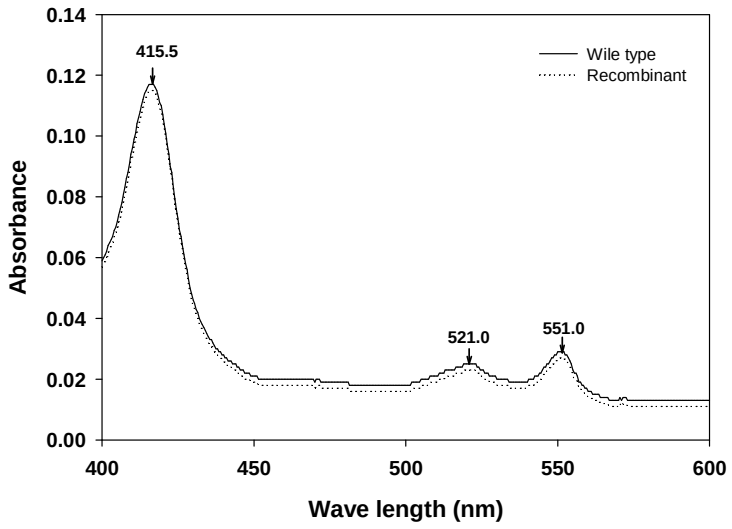


Fig. 2-19. Comparison of reduced absorption spectra of wild type and recombinant cytochrome c_L (Kim *et al.*, 2005).

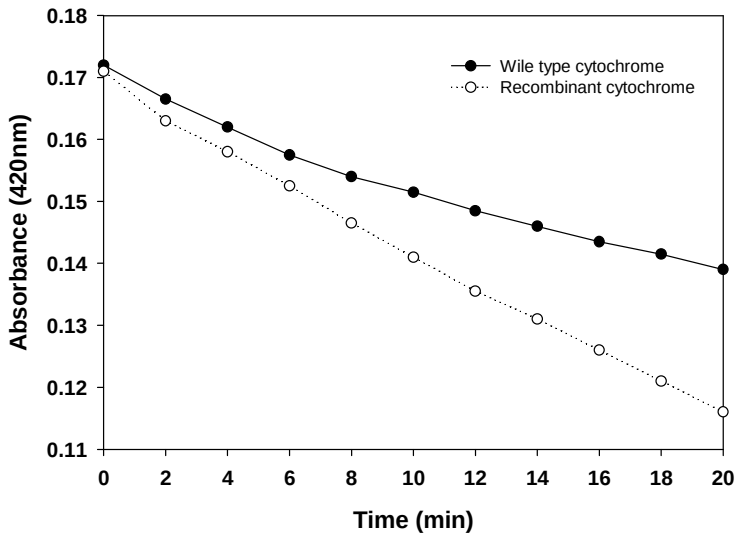


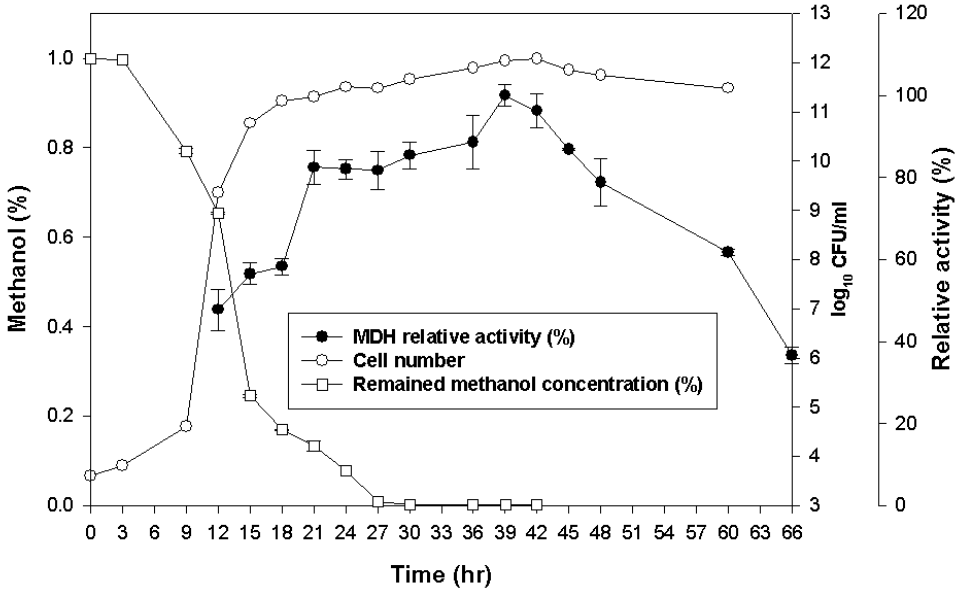
Fig. 2-20. Reduction of potassium ferricyanide with MDH and wild or recombinant type cytochrome c_L (Kim *et al.*, 2005). Reduction rates were measured by the decrease of absorbance at 420 nm at room temperature. The assay systems differed from each other as follows: 3 μM $K_3Fe(CN)_6$, 13.4 mM MeOH, 25 μM wild type or recombinant cytochrome c_L. Reactions were started by the addition of MDH (20 μM).

MP^T의 생장에 따른 MDH 효소활성과 MxaJ 발현과의 상관성을 비교하기 위하여 시간에 따른 MP^T의 생장에 따라 세포를 회수하였다. 회수된 균체를 sonicator를 사용하여 파쇄하고, 15,000 × *g*에서 30분 동안 원심분리한 후 cell free extract를 준비하였다. 동일량의 단백질을 사용하여 specific activity를 측정하고, 시료의 일부는 SDS-PAGE 후 Ab-MDH와 Ab-MxaJ를 이용하여 Western blot analysis를 함으로써 균주 생장에 따른 MxaF와 MxaJ 단백질 발현정도를 비교 분석하였다. Fig. 2-21에서 보는 것과 같이 MP^T는 9시간 이후 지수성장기에 들어섰으며 개체수가 17시간 후 2.9×10^9 CFU/ml로 최대에 이르렀으며, 정체기까지 균체의 CFU 값은 변하지 않고 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 균체가 지수 성장함에 따라 생장기질인 methanol의 농도 급격하게 줄어들었으며 21시간 이후에는 methanol의 농도가 0.1% (v/v) 이하로 감소하였고, 39시간 이후 methanol의 농도는 검출한계 이하로 떨어져 더 이상 검출할 수 없었다.

흥미로운 점은 MDH의 발현양(α subunit)은 각각의 성장기 동안 동일양이 존재하나 MxaJ의 발현은 정체기 말기에 이르렀을 때부터 점점 감소함을 알 수 있었다. MDH의 상대활성은 MxaJ 단백질이 최대로 발현되는 39시간에 이르러 활성이 최대치를 보였으며, 이후 MxaJ 단백질의 양이 감소함에 따라 활성이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 배지 내 methanol 농도가 낮아짐에 따라 MxaJ 단백질 발현양이 감소하게 되고 따라서 MDH의 활성도 줄어드는 것으로 사료되며, 결국 MxaJ 단백질이 MDH의 활성을 유지하는데 직접적인 관계가 있음을 보여준다. 또한 MP 균주가 정체기에 들어섬에 따라 methaol의 농도가 검출한도 이하까지 감소하였지만 MDH의 활성은 어느 정도 유지됨을 알 수 있는데, 이는 배양액 내에 methanol은 검출되지 않았다 하더라도 일정양은 periplasmic space내에 남아있어 MDH의 활성이 유지되는 것으로 생각된다. 하지만 39시간 이후 periplasmic space내에 남은 methanol이 완전히 없어짐에 따라 MxaJ 단백질이 감소하면서 MDH의 활성도 점차 없어지는 것으로 판단된다.

Methnaol이 1% 포함되어 있는 배양액에서 자란 MP^T 균체의 추출물을 이용하여 효소활성을 측정한 결과 정체기 이전까지 활성이 있는 형태의 MDH I과 MDH II가 관찰되었으며, 최소배지에 fructose와 trimethylamine 기질이 포함된 배양액에서 자란 균체에서도 MDH 활성이 측정되었다.

(A)



(B)

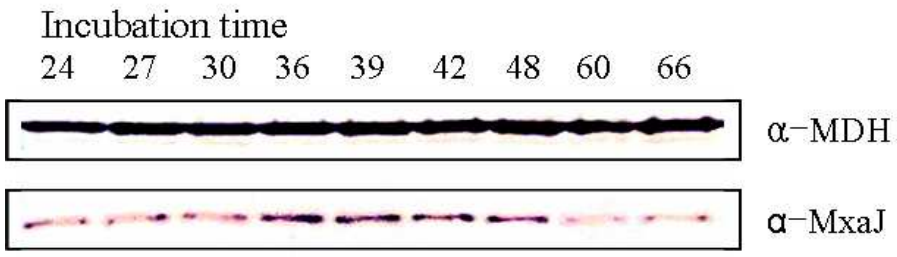


Fig. 2-21. Relationship between methanol concentration and relative activity of MDH (A) and Western blot analysis of MDH and MxaJ protein expression profile depending on the growth phase (B). After 42 hr, MDH activity dramatically decreased as MxaJ protein expression decreased.

이와 동일한 경우로 facultative methylotrotroph인 *M. extorquens* AM1 균주의 경우 *mxaFJGIRSACKLDEHB* cluster에 대한 promoter (P_{mxaF})의 -10/-35 region에 보존된 조절 염기서열을 확인하였으며, 이 부분의 서열은 enhancer element로써 유도기질에 상관없이 MDH를 consitutive expression 되게 한다고 보고하였다 (Zang *et al*, 2005). 실제적으로 야생형 균주에 P_{mxaF}와 *xylE* 유전자 융합 promoter를 가진 vector를 형질 도입하여 methanol에서 자란 균주와 succinate에서 자란 균주의 발현정도를 비교한 결과 methanol에서 자란 균주의 promoter 발현정도가 4.8배 높은 것으로 나타났으며, 이 결과는 생장기질을 methanol을 사용하여 자랐을 경우 MDH의 발현이 다른 기질에 비해 더욱 잘 일어날 뿐만 아니라 growth phase와는 독립적으로 항상 발현된다는 것을 보여주었다. 이러한 경향은 strain MP^T에서도 유사하게 나타났으며, 각각 fructose와 trimethylamine을 기질로 생장하였을 때에도 MDH는 항상 발현되었다. MDH는 methanol에서 생장했을 때 가장 많이 발현이 되었고, trimethylamine와 fructose에서는 발현양은 줄어들었으나 MDH (α subunit)는 항상 발현됨 SDS-PAGE를 통해서 확인하였다 (Fig. 2-22A). 모든 경우에서 MDH는 활성이 있음을 activity staining을 통해 확인 하였고 (Fig. 2-22B), 또한 western blot 분석방법을 통해 MxaJ 단백질도 MDH와 같이 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 2-22C). Trimethylamine을 생장기질로 하였을 때 methanol에서 생장한 균주의 MDH에 대한 상대 활성은 82.3%, fructose를 생장기질로 하였을 때 상대활성은 72.3%로 나타났다. 각각의 생장기질로 이용하여 생장한 균체의 cell free extract를 이용하여 Western blot 분석을 한 결과 MxaJ 발현양은 methanol에서 가장 많았고 trimethylamine, fructose의 순으로 발현양이 감소하였다 (Fig. 2-22). 이 결과는 MxaJ 단백질은 기질에 상관없이 발현되기는 하나 methnaol이 존재할 경우 가장 많이 발현이 되며, 비록 methanol이 생장기질이 아니더라도 MxaJ가 발현이 되며 활성 있는 MDH를 구성할 것으로 사료된다.

RT-PCR의 결과에서 알 수 있듯이 *mxaFJGI*의 transcript는 하나로 만들어지므로 MDH 단백질이 만들어지는 경우에는 모든 subunit (α, β, γ)이 동시에 만들어지는 것을 알 수 있다. MDH는 기질에 따라 그 발현양의 차이가 있기는 하나 기질에 상관없이 만들어 지고, transcript가 하나로 만들어진다는 것은 MxaF 단백질이 만들어질 때 MxaJ 단백질도 동시에 만들어진다는 것을 의미한다. 이는 MDH가 기질에 따라 MxaJ 단백질을 선택적으로 발현하는 것이 아니라 활성이 있는 MDH를 구성하기 위해서는 MxaJ 단백질이 필요하다는 것을 나타내주는 결과이다.

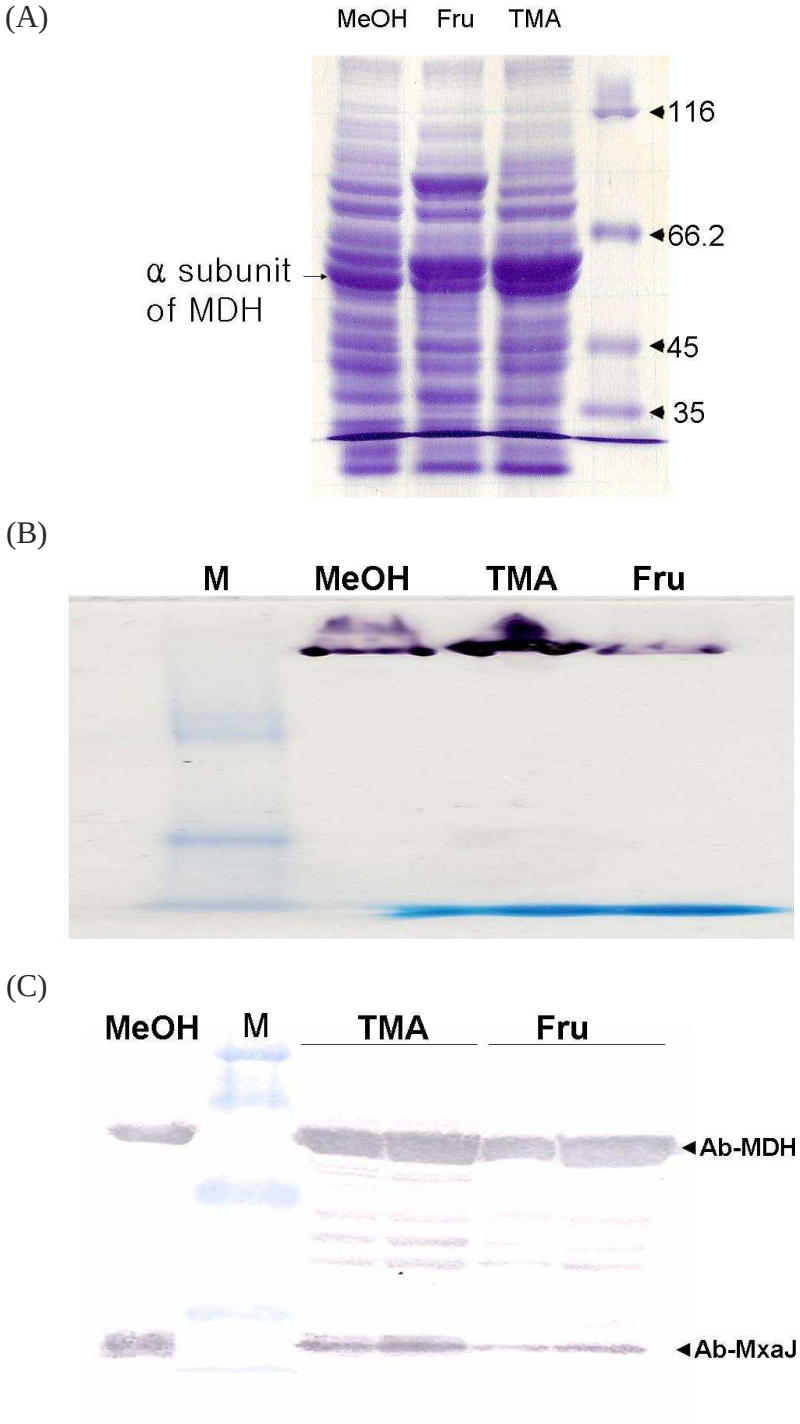


Fig. 2-22. Expression of MDH and MxaJ protein in the cells grown on different carbon source. (A) SDS-PAGE analysis of cell free extracts. (B) Activity staining of MDH. (C) Western blot analysis. Symbol : M, marker; MeOH, methanol; TMA, trimethylamine; Fru, fructose.

또한 methanol을 기질로 사용하여 자라는 acetic bacterium인 *Acetobacter methanolicus*의 경우 glycerol을 이용하여 자란 균주보다 methanol에서 자란 균주의 MDH activity가 50배 정도 높은 것으로 보고되었고, 특히 methanol에서 자란 균주는 MxaJ 단백질로 추정되는 단백질이 강하게 발현되는 것으로 나타났다 (Matsushita *et al*., 1992). 추가적으로 *Paracoccus denitrificans* 의 경우 MDH의 두개의 subunit (*mxaF*, *mxaJ*)과 cytochrome c_{551} (*mxaG*)가 발현된다 할지라도 *mxaJ* 유전자가 파괴된 mutant는 활성이 전혀 없는 MDH를 만든다고 보고하였다. 이 결과에서 MxaJ 단백질의 역할은 균체의 periplasm 공간 내에서 활성 있는 MDH를 구성하는데 관여할 것이라고 제안하였다 (Van Spanning *et al*., 1991).

8. MxaJ 단백질과 MDH의 활성간 상관관계

가. MxaJ 항체를 이용한 MDH 활성 저해 실험

MxaJ가 binding 되어 있는 MDH 활성에 영향을 주는지 알아보기 위하여 MxaJ 항체를 섞어주어 MDH와 MxaJ와의 결합을 경쟁적으로 저해하는 실험을 수행하였다. *M. aminosulfidovornas* MP^T의 cell free extract에 MxaJ 항체의 양을 각각 10, 20, 50 μg씩 점차적으로 증가시켜 첨가하고 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 비교실험을 위하여 cell free extract에 MxaJ 항체 대신 동량의 BSA를 첨가하여 동일하게 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 MDH 활성을 측정하여 MxaJ 항체가 MDH 활성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 실험결과 MxaJ 대신 동일양의 BSA를 넣어준 대조군보다 MxaJ 항체를 넣어준 실험에서 각각 8%, 12%, 20%씩 MDH의 활성이 줄어드는 것을 관찰하였다. 이는 MxaJ 항체가 경쟁적으로 MxaJ와 결합함으로써 MDH와 MxaJ 사이의 결합을 방해하여 MDH의 활성이 줄어들었음을 의미한다. 결국 MxaJ는 MDH와 결합하여 MDH의 활성을 증가 시켜주는 것으로 판단된다.

나. Sonication에 의한 MDH II 단백질의 활성변화

정제 과정 중 강한 물리적인 충격은 MDH II로부터 MxaJ 단백질을 떨어지게 하는 결과를 나타냄으로, 정제된 MDH II protein을 sonication하여 인위적으로 MxaJ 단백질을 제거하고, MxaJ 단백질이 제거된 MDH의 활성에 어떤 변화가 생기는지 관

찰하였다. Sonication은 Branson SONOIFIER 250 (power 9, duty cycle 50%)을 이용하여 20회, 40회를 처리하였다. Sonication 후 western blot 분석법을 통해 MDH II 로부터 MxaJ 단백질이 떨어져 나온 것을 확인하였다. Sonication후 sample을 Native-PAGE를 수행하고 MDH band만을 잘라내었고, SDS-PAGE를 하여 각각의 subunit의 intensity를 비교한 결과 Control에 비해 20회 40회 sonication한 sample의 MxaJ 단백질은 각각 69, 65%로 sonication 횟수가 증가하면서 band intensity가 감소하는 양상을 보였으며, 이때의 MDH III의 상대 활성은 각각 74.9, 56.1%로 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 2-23). 이 결과는 MxaJ 단백질이 MDH II에서 떨어져 나와 활성이 감소하는 것으로 보이며, 역으로 MDH에 MxaJ 단백질이 binding 되어 MDH의 활성을 높여주는 것으로 사료된다.

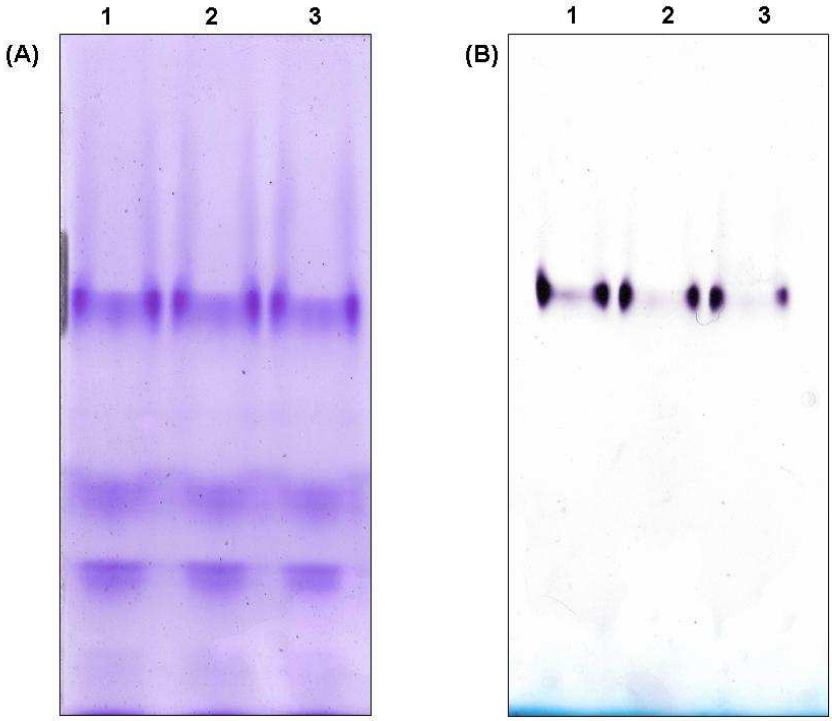


Fig. 2-23. Effect of sonication on MDH activity. After native electrophoresis gel was CBR staining (A) and activity staining (B). MDH II was sonicated by Branson sonifier microtip (Power 9, duty cycle 50%). Lain 1: control; lain 2: sonication 20 times; lain 3: sonication 40 times.

제4절 결 론

본 연구에서는 해양으로부터 분리한 신규 메탄올산화세균인 *M. aminisulfidivorans* MP^T 로부터 두 가지 type (MDH I, II)의 Methanol dehydrogenase를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 분리균주로부터 genomic DNA를 순수분리 하여 만든 genomic library를 바탕으로 메탄올 산화에 관련된 구조유전자인 *mxaF* (methanol dehydrogenase, MDH, large subunit), *mxaJ* (MDH binding protein, unknown function), *mxaG* (cytochrome c_L, MDH electron accepter), *mxaI* (MDH small subunit) 유전자군의 전체 염기서열 분석 및 유전자지도를 작성하였고, MP^T로부터 메탄올 산화에 관련된 첫 번째 효소인 MDH를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 정제과정 중 두 가지 형태의 분자생물학적인 특성이 다른 MDH를 정제할 수 있었고, 7 tesla ($1Wb/m^2$)급 고분해능 질량분석기로 분석한 결과 각각 MDH에 대한 MxaJ 단백질의 결합정도가 다르다는 것을 밝혔다. 즉, large subunit (α), small subunit (β), MxaJ 단백질 (γ)을 각각 결합 형태에 따라 MDH I ($\alpha_2\beta_2\gamma$), MDH II ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$)로 명명하였다. 정제과정 중 MxaJ 단백질은 sonication 등과 같은 물리적 충격에 쉽게 떨어져 MDH II를 얻기 힘들었으나 (용액 내 비율 MDH I : MDH II = 9 : 1), lysozyme을 이용하여 균체를 온화한 조건으로 cell을 파쇄한 결과 비교적 높은 농도 (MDH I : MDH II = 3 : 1)의 MDH II를 순수분리 할 수 있었다. 하지만 MDH I의 형태는 MDH 활성 검출 한도 이하로 그 양이 매우 적어 activity staining 결과로만 확인할 수 있었고, 순수정제는 되지 않았다. 이 결과로 보아 MDH의 원구성은 기존에 알려진 $\alpha_2\beta_2$가 아니라 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$일 것으로 사료되며, 분리정제 과정 중에 물리적 충격에 의해 MxaJ 단백질은 쉽게 떨어져 나가 $\alpha_2\beta_2$ 혹은 $\alpha_2\beta_2\gamma$로 나타나는 것으로 사료된다. 정제된 MDH I와 MDH II의 구성 소단위체인 α, β, γ subunit 은 모두 동일하게 나타났으나 그 구성비가 달랐으며 pI 값은 각각 5.5와 5.8로 MxaJ 단백질의 binding 양의 정도에 따라 조금 다르게 나타났다. 또한 MDH II는 MDH I에 비해 활성도가 1.5 ~ 2배정도 높았으며, 온도에도 안정하였다. MDH 및 MxaJ 단백질의 상호작용을 밝히기 위해 polyclonal antibody 제조하였고, 이를 이용하여 *E. coli*에서 발현하여 분리정제된 MxaJ 단백질을 *in vitro* direct binding assay, column binding assay, immunoprecipitation를 통해 MDH의 구조단백질과 MDH binding protein인 MxaJ 단백질이 서로 결합할 수 있음을 실험적으로 증명하였다. methanol을 생장기질로 하였을 때 MP^T의 생장

곡선에 따른 methanol 산화와 관련된 단백질들(MxaF, MxaJ, MxaG, MxaI)의 발현양상 및 MDH 활성변화를 조사하였다. 그 결과 MxaF, G, I 단백질은 생장단계에 상관없이 단백질의 발현양이 일정하게 유지된 반면 MxaJ 단백질의 경우 초기지수성장기부터 후기 지수성장기까지는 단백질의 발현양이 일정하게 유지되었으나, 정체기에 이르는 시점 즉, 기질인 methanol이 결핍되는 시점에서 MxaJ 의 발현양은 점차 줄어들었으며, 전체 MDH의 활성 또한 점차 줄어들었다. 이 결과는 MxaJ 단백질이 MDH에 binding하여 활성이 있는 MDH를 구성하고 MDH의 활성 및 안정성을 높여주는 것으로 사료된다. 이를 증명하기 위해 정제된 MDH II를 20회, 40회 sonication 하면서 MDH II 로부터 인위적으로 MxaJ 단백질을 떨어뜨린 결과 각각 31, 35% 비율로 MxaJ 단백질이 MDH II 로부터 떨어져 나왔으며, 이 때 MDH II의 상대활성은 각각 74.9, 56.1%로 감소하는 양상을 보였다. 이 결과는 MxaJ 단백질이 MDH II로부터 떨어져 나와 활성이 감소하는 것으로 보이며, 다시말해 MDH에 MxaJ 단백질이 binding 되어 MDH의 활성을 높여주는 것으로 사료된다. 위의 결과를 종합적으로 볼 때 *M. aminisulfidivorans* MP^T의 MDH는 지금까지 알려진 $\alpha_2\beta_2$ conformation이 아니라 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$일 것으로 사료되며, MxaJ 단백질은 활성이 있는 MDH를 구성하는데 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, MDH의 자체 활성과 안정성을 유지하는데 필수적으로 필요하다고 사료된다. RT-PCR을 통해 *mxaFJGI*유전자들은 하나의 transcript를 만들어 내는 것으로 밝혀졌고, 이는 MDH가 발현될 때 각각의 subunit들은 동시에 발현되어 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$의 MDH의 구조를 형성하며 여기에 cytochrome c_L이 결합하여 정상적인 메탄올 산화계를 형성한다고 볼 수 있다.

제5절 참고문헌

Anthony, C. (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microb. Physiol.* 27, 113-210.

Amaratunga, K., Goodwin, P.M., O'connor, C.D, and Anthony, C (1997) The methanol oxidation genes *mxaFJGIR(S)ACKLD* in *Methylobacterium exotrquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 146(1), 31-38

Afolabi, P.R., Mohammed, F,. Amaratunga, K., Majekodunmi, O., Dales, S.L., Gill, R., Thompson, D., Cooper, J.B., Wood, S.P., Goodwin, P.M., and Anthony, C. (2001) Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L. *Biochemistry* 40, 9799−9809.

Beardmore-Gray, M. and Anthony, C. (1984) Methanol: cytochrome c activity of methylotrophs. In: Crawford, R.L. and Hanson, R.S. Editors, Microbial Growth on C-1 Compounds, American Society for Microbiology, Washington, DC , pp. 97−105.

Berven, F.S., Karlsen, O.A., Murrell, J.C., and Jensen, H.B. (2003) Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (BATH) polypeptides are generated during the separation procedure. *Electrophoresis* 24, 757-761

Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Colinge, J., Chiappe, D., Lagache, S., Moniatte, M., and Bougueleret, L. (2005) Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores. *Anal. Chem.* 77, 596-606.

Dijkstra, M., Frank, J., and Duine, J.A. (1988) Methanol oxidation under physiological conditions using methanol dehydrogenase and a factor isolated from *Hyphomicrobium* X. *FEBS Lett.* 227, 198−202.

Dijkstra, M., Frank, J., and Duine, J.A. (1989) Studies on electron transfer from methanol dehydrogenase to cytochrome c_L. *Biochem. J.* 257, 87−94.

Gourion, B., Rossignol, M., and Vorholt, J. (2006) A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13186-13191.

Goodwin, M.G. and Anthony, C. (1996) Characterization of a novel methanol dehydrogenase containing a Ba^{2+} ion at the active site. *Biochem. J.* 318, 673-679

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1265-1272.

Kim, H.G., Doronina, N.Y., Trotsenko, Y.A., and Kim, S.W. (2007) *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2096-2101.

Kim, H.G., Phan, T.N., Jang, T.S., Koh, M.J., and Kim, S.W. (2005) Characterization of *Methylophaga* sp. strain SK1 cytochrome c_L expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 43, 499-502.

Kim S.W., Kim, B.H., and Kim, Y.M. (1991) A *Methylobacillus* isolate growing only on methanol. *Kor. J. Microbiol.* 29, 250-257.

Laukel, M., Rossignol, M., Borderies, G., Völker, U., and Vorholt, J. (2004) Comparison of the proteome of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions. *Proteomics* 4, 1247-1264.

Lidstrom, M. E. (1991) *The Methylotrophic Bacteria*. Springer-Verlag, New York.

Liu, H., Sadygov, R.G., and Yates, J.R. (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 76, 4193-4201.

Matsushita, K., Takahashi, K., and Adachi, O. (1993) A novel quinoprotein methanol dehydrogenase containing an additional 32-kilodalton peptide purified from *Acetobacter methanolicus*: identification of the peptide as a MoxJ product. *Biochemistry* 32, 5576-5582.

McDonald, I.R. and Murrell, J.C. (1997) The methanol dehydrogenase structural gene mxaF and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3218-3224.

Morris, C.J., Kim, Y.M., Perkins, K.E., and Lidstrom, M.E. (1995) Identification and nucleotide sequences of *mxaA*, *mxaC*, *mxaK*, *mxaL*, and *mxaD* genes form *Mehtylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 177(23), 6852-6831.

Parker, M.W., Cornish, A., Gossain, V., and Best, D.J. (1987) Purification, crystallisation and perliminary X-ray diffraction characterisation of methanol dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Eur. J. Biochem.* 164, 223-227

Richardson, I.W., and Anthony, C. (1992) Characterization of mutant forms of the qiunoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *Biochem. J.* 287, 709-715.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schägger, H. and Von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231.

Springer, A.L, Morris, C.J., and Lidstrom, M.E. (1997) Molecular analysis of mxbD and mxbM, a putative sensor-regulator pair required for oxidation of methanol in *Methylobacterium extorquencs* AM1. Microbiol. 143, 1737-1744

Tanaka, Y., Yoshida, T., Watanabe, K., Izumi, Y., and Mitsunaga, T. (1997) Cloning and analysis of methanol oxidation genes in the methylotroph *Hyphomicrobium methylovorum* GM2. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 397-401.

Toyama, H., Inagaki, H., Migita, T., Matsushita, K., Anthony, C., and Adachi, O. (2003) The role of the MxaD protein in the respiratory chain containing the quinoprotein methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 372−375.

Trotsenko, Y.A., Doronina, N.V., and Govorukhina, N.I. (1986) Metabolism of non-motile

obligately methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 293-297.

Van Spanning, R., Wansell, C., De Boer, T., Hazelaar, M., Anazawa, H., Harms, N., Oltmann, L., and Stouthamer, A. (1991a) Isolation and characterization of the *moxJ, moxG, moxI,* and *moxR* genes of *Paracoccus denitrificans*: inactivation of *moxJ, moxG,* and *moxR* and the resultant effect on methylotrophic growth. *J. Bacteriol.* 173, 6948-6961.

Van Spanning, R., Wansell, C., Reijnders, W., Harms, N., Ras, J., Oltmann, L., and Stouthamer, A. (1991b) A method for introduction of unmarked mutations in the genome of *Paracoccus denitrificans*: construction of strains with multiple mutations in the genes encoding periplasmic cytochromes c_{550}, c_{551i}, and c_{553i}. *J. Bacteriol.* 173, 6962-6970.

Yamada, Y., Aida, K., and Uemura, T. (1969) Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. V. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of the so-called intermediate strains. *J. Gen. Appl. Microbiol*., 15, 189-196.

Yamamoto M., Yoshihiro S., Kageaki K., Rokuro. O., and Taiji I. (1978) Isolation and characterization of marine methanol-utilizing bacteria. *J. Ferment. Technol.* 56. 451-458.

Zhang, M., FitzGerald, K.A., and Lidstrom, M.E. (2005) Identification of an upstream regulatory sequence that mediates the transcription of *mox* genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiol.* 151, 3723-3728.

Zhang, M. and Lidstrom, M.E. (2003) Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiol.* 149, 1033-1040.

제3장 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}의 trimethylamine dehydrogenase를 이용한 trimethylamine biosensor 개발

제1절 연구개발의 필요성

환경 악취 오염 물질인 트리메틸아민 (trimethylamine, TMA)은 어류에 존재하는 콜린, 베타인 또는 트리메틸아민 *N*-옥사이드로부터 미생물의 작용에 의해 생성되는 유해한 물질이다. 이 물질은 때로 어류사료를 생산하는 공정에서 발생하는 폐수에서도 발견된다. TMA는 난분해성 물질로 사람을 포함한 포유류 동물의 근육 조직에 부식작용이 있을 뿐만 아니라 DNA, RNA와 protein을 포함한 macromolecule에 변성을 일으킴으로써 동물배태조직의 기형을 초래한다 (Guest *et al*., 1997). 그러므로 환경오염으로부터 TMA를 효과적으로 제거하여야 한다. 소수의 methylotrophic bactera들은 에너지원으로 methylamine, dimethylamine을 이용할 수 있을 뿐만 아니라 TMA도 이용할 수 있다. TMA를 분해 할 수 있는 효소는 trimethylamine monooxygenase를 통해 trimethylamine-*N*-oxide로 전환된 후 trimethylamine-*N*-oxide demethylase에 의해 formaldehyde와 dimethylamine으로 전환되는 기작을 통해 분해되어지거나 (Colby and Zatman, 1973; 1975), trimethylamine dehydrogenase (TMADH, EC 1.5.99.7)에 의해 직접적으로 formaldehyde와 dimethylamine으로 분해되는 두 가지의 경로를 가지고 있다. TMADH는 iron-sulfur flavoprotein이며 (Lim *et al*., 1982; 1986; Barber *et al*., 1992), TMA의 oxidative *N*-demethylation반응을 촉매 함으로써 TMA를 dimethylamine과 formaldehyde로 분해한다. 이 효소는 Colby와 Zatman에 의해 최초로 *Methylophilus methylotrophus* W_3A_1로부터 nicotinamide-dependent TMADH가 보고되었으며, 분자량이 83,000 Da인 두 개의 동일한 subunit을 포함하고 있는 homodimer이다. 각 subunit에는 하나의 [4Fe-4S] cluster와 하나의 FMN prosthetic group을 포함하고 있는 것으로 보고되었다 (Kasprzak *et al*., 1983; Boyd *et al*., 1992).

1962년 Clark이 당 산화효소 (glucose oxidase, Gox)를 고정한 막을 산소측정 전극의 표면에 부착하여 포도당을 전류법으로 측정한 이래 바이오센서는 활발하게 연구되어져 왔다. 여기서 바이오센서란 생체감응물질 (bioreceptor)과 신호 변환기 (signal transducer)로 구성되어 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 감지할 수 있게 제작한 기구를 지칭한

다. 생체감지물질로는 특정 물질과 선택적으로 반응 및 결합할 수 있는 효소, 항체, 항원, 렉틴, hormone-receptor 등이 쓰이고, 신호변환방법으로는 전기화학(electrochemical), 형광, 발색, SPR (surface plasmon resonance), FET (field-effect transistor), QCM (quartz crystal microbalance), 열 센서 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다 (Chaubey and Malhotra, 2002).

바이오센서의 연구초기에는 Clark의 포도당센서와 같이 효소를 신호변환기 소자에 결합하여 제작한 것이 대부분 이었으나, 차츰 다양한 분자식별 소자를 쓰는 센서들이 제안되었다. 즉, 생체 내에서 서로 친화성이 있는 물질, 효소-기질, 항원-항체, hormone-receptor 등의 어느 한 물질을 막에 고정화해서 분자식별소자로 쓰면 대응하는 짝을 선택적으로 계측할 수가 있다. 더욱이, 세포소기관(organelle), 세포조직, 미생물 등도 분자식별 소자로서 적용되고 있다 (Cooper and Cass, 2004). 이러한 생체감지물질을 센서로 적용하기 위해서는 감지물질에서 나타나는 화학적 정보로부터 변환된 물리 변량을 컴퓨터에 입력하기 위해 전기적인 신호로 신호변환을 해야 한다. 전기화학 신호변환 방법은 특정한 정보를 곧바로 전기적 신호로 변환시켜준다는 점에서 신호변환이 가장 간단한 방법이다. 이 방법은 빛을 사용하는 방법처럼 일정한 공간이나 정교한 배치(alignment)를 요구하지도 않고, 질량이나 기계적 변화를 재는 것처럼 외부 진동에 의한 영향이 극심하지도 않으면서, 매우 넓은 농도 범위에서 높은 감도로 작동된다. 또한 검출 부위뿐 만 아니라 전기화학 측정기기 전체가 저비용으로 소형화, 집적화되기 쉽기 때문에 성능만 충분하다면 산업적으로 가장 선호되는 방식이다.

그러나 이런 훌륭한 장점에도 불구하고 선택성이 부족하다는 문제점 때문에 바이오센서에 적용이 힘들었지만, 생체물질을 전극과 결합시킴으로써 선택성을 보완할 수 있게 되었고, 그 대표적인 예가 효소전극(enzyme electrode)이었다. 생체 효소의 대부분은 특정한 기질에만 선택적으로 결합, 반응을 유도하는 성질을 가지고 있으므로 효소를 전극 상에 고정시키고 효소 반응에 의해 변화하는 화학적인 환경들을 간접적으로 측정함으로써 선택성의 문제를 해결할 수 있었다. 이런 효소전극을 기초로 하여 상용화된 전기화학적 바이오센서는 혈당센서(glucose sensor)이다. 혈당센서에 사용되는 효소인 당 산화효소(glucose oxidase)는 쉽고 값싸게 구할 수 있으며, 다른 효소보다 pH, 이온강도, 온도에 안정하며 또한 화학적인 고정화에 잘 견디고 상온에서 높은 회전율(turnover rate; ~ 10^3 s^{-1})을 갖는다는 이유 때문에 크게 성

공했다고 볼 수 있다 (Palmisano *et al*., 2002).

이러한 혈당센서의 구조를 살펴보면 전기적인 신호변환을 할 수 있는 전극(electrode)위에 glucose를 산화시키는 효소인 GOx를 고분자(polymer)막에 고정화하여 전극에 흡착시킨 형태가 대부분이다. 하지만 glucose가 glucose oxidase에 의해 산화되어 발생하는 많은 전자들을 직접 전극에 전자를 전달하기에는 효소의 활성중심(active center)과 거리가 너무 멀기 때문에 이러한 전자 전달반응(electron transfer reaction)을 용이하게 할 산화/환원매개체(redox mediator)가 필수적으로 있어야 한다. 즉 자연에서 얻은 혹은 인위적으로 합성된 산화환원매개체를 통해 효소의 활성 중심(active center)부터 전극에 전자를 전달함으로써 glucose의 주된 방해물질인 아스코르브산 같은 전기적으로 산화되는 물질로부터의 간섭을 피할 수 있고, 이로 인해 높은 선택성과 감도를 얻을 수 있다. 이러한 매개체는 우선 효소의 활성중심에 쉽게 접근할 수 있게 작은 분자량을 갖는 산화·환원 쌍(redox couple)을 이뤄야하며, 측정대상에 포함하고 있는 전기화학적인 간섭물질보다 낮은 산화·환원 전위 (redox potential)를 갖고 있어야 한다. 또한 전극이나 산소의 간섭에 영향을 받지 않고 바이오센서로서 전기적인 응답(electric response)이 빨리 이루어져야 한다. 지금까지는 페로쎈(ferrocene)과 페로쎈의 유도체 같은 금속화합물, polyaniline과 polypyrrole 같은 전도성 폴리머, tetrathiafulvalene과 N-methyl-phenaziniumtetracyano quinodimethane 같은 전도성 염 등이 매개체로 연구되었는데, 최근에 집중적으로 8족 금속인 iron, ruthenium, osmium 화합물들이 연구되어지고 있다 (Eskelinen *et al*., 2003; Haddox and Finklea, 2004; Palmisano *et al*., 2002). 이러한 금속들은 전자 상태가 II/III를 유지하고 있으며, 6배위(hexa-coordination)를 할 수 있는 상태로 존재한다. 또한 피리딘(pyridine)과 이미다졸(imidazole) 고리에 있는 질소와 배위를 잘하고, 특히 2,2′-bipyridine complexes의 구조를 갖는 리간드와 배위로 만들어지는 배위화합물은 화학적으로 안정한 산화·환원 쌍을 이루며 전기적으로 좋은 가역성(reversibility)을 갖는 구조를 갖는다. 그리고 pyridine ring의 4번 위치에 전자를 끄는 치환기(electron-withdrawing substituents)나 전자를 주는 치환기(electron-donating substituents)를 더해 배위하며 여러 위치의 전위(potential)로 조절이 가능하다. 대표적인 예로 ruthenium에 여러 치환기(substituents)를 갖는 pyridine을 배위시켜 전기화학적인 특성을 알아본 연구가 발표되었다. Osmium 또한 여러 pyridine complexes를 합성하여 혈당센서에 적용한 연구가 진행되어 왔다 (Tsujimura *et al*., 2002; Yang *et al*., 2002; Zang *et al*., 2000).

이러한 매개체를 통해 혈당센서를 연구할 때 중시되는 또 하나의 연구가 전극위에 매개체와 효소인 glucose oxidase의 고정화방법이다. 고정화 기술은 혈당센서를 제품으로서 출시하기 위해서는 가장 중요시 되는 기술로 현재까지 많은 방법들이 연구되어 왔다. 특히 매개체의 고정화방법은 지금까지 polymer에 금속화합물을 붙여 전기적으로 흡착(electrodeposition)하는 방법 (Gregg and Heller, 1991)과 자기 조립 단분자막(Self Assembled Monolayer ; SAM, Faucheux *et al*., 2004)등이 많이 이용되고 있다. 전기적으로 흡착하는 방법은 매개체의 산화·환원 쌍이 반응하는 특정 전위를 맞추고 일정 전류를 가해주어 전극위에 흡착시키는 방법이고, 자기 조립 단분자막은 고체표면에 자발적으로 형성되는 유기 단분자막을 이용하는 방법으로 금 또는 은에 강한 결합력을 갖는 Mercapto (-SH) 작용기를 금표면에 공유결합에 의한 자발적인 형성이 대표적인 예이다. 즉 금 처리된 전극이나 또는 금 전극위의 용액 쪽에 아민작용기나 카르복실작용기를 갖는 메르캅탄알칸(mercaptoalkane)을 올려 금과 메르캅탄 사이의 공유결합을 형성시키고 용액 쪽에 아민작용기나 카르복실작용기를 금속배위화합물에 붙어있는 일차 아민작용기나 카르복실작용기를 EDC (*N*-(3-dimethyl-aminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride)/NHS (*N*-hydroxysuccinimide) 처리를 통해 아마이드 결합(amide coupling)을 시키는 방법이다. 이 방법은 금 표면 위에서 메르캅탄알칸의 자기 조립 단분자막 구조가 잘 밝혀져 있고, 공기 중에서의 안정성으로 인해 많이 사용되며, 전기화학적 혈당센서에서도 재현성이 우수한 점 때문에 연구되고 있다 (Tsujimura *et al*., 2002; Marks *et al*., 2007).

본 연구에서는 TMA를 정량적으로 분석하기 위하여 전기화학분석 방법중의 하나인 순환전류법을 사용하였다. 전기화학분석법은 크게 전위차법(potentiometry), 전기량법(coulometry), 전류법(amperometry), 전압-전류법(voltammetry)으로 나눌 수 있다. 이중 전압-전류법은 전압을 변화 시키면서 전류를 측정하고 전압-전류도(voltammogram)를 작성하여 전해전위로 목적물질을 정성하고, 그 때의 전류값으로 정량할 수 있다. Cyclic voltammetry는 이러한 전압-전류법의 대표적인 예로서 산화 환원종의 전기화학적인 거동을 살펴보고, 이로부터 산화-환원반응의 메카니즘을 규명하는데 기본적으로 가장 많이 사용되는 전기화학적인 기술이다 (Marks *et al*., 2007). Cyclic voltammetry에서는 Fig. 3-1A와 같은 삼각파형의 전압을 working electrode에 걸어준다. 즉, 시간에 따라 전압을 순환시켜가면서 이에 따른 전류를 전압의 함수로 측정하게 되며 이는 voltammogram으로 나타낼 수 있다 (Fig. 3-1B). Fig. 3-1B를 살펴보

면 전압이 증가함에 따라 파형이 정점에 도달하였다가 전류가 점점 감소하는 것을 볼 수 있는데, 이는 전극표면에 전기활성물질의 농도가 감소하는데 반해 전극표면으로 확산되어 들어오는 속도가 상대적으로 느려 이를 따라오지 못하기 때문이다. 또한 그림 (B)는 전형적인 가역적 전극 반응의 전기화학적 거동을 나타낸다. 가역적이라는 의미는 산화-환원반응이 충분히 빨라서 전압이 변함에 따라 전극 표면에 반응물과 생성물의 농도가 평형을 유지할 수 있는 경우를 뜻한다. 이러한 Cyclic voltammetry는 화합물의 전기화학적인 산화-환원 거동을 살펴보는데 주로 이용되며, 이를 통해 전극 반응의 kinetics에 관한 정보를 얻을 수 있다. 이때 전극으로 사용되는 것은 주로 Pt, C, Au, 혹은 Hg등이 사용된다.

본 연구에서는 환경 악취 오염 물질인 트리메틸아민을 전기화학적으로 모니터링할 수 있는 바이오센서를 개발하기 위해 *M. aminisulfidivorans* MP^T로부터 TMADH를 분리・정제하였다. 정제된 TMADH를 이용하여 TMA를 검출할 수 있는 센서의 매개체로서 8족 금속인 osmium에 메틸기가 포함된 4,4'-disubstituted 2,2'-bipyridine ligand에 배위시켜 이들의 산화·환원 전위를 측정하여 전기적인 특성을 조사하였다. 자기 조립 단분자막 위에서 TMADH와 TMA와의 반응을 촉매전류로 학인하고, osmium complex 및 ferrosen 화합물을 전자전달매개체로 사용한 바이오센서를 개발하고자 하였다.

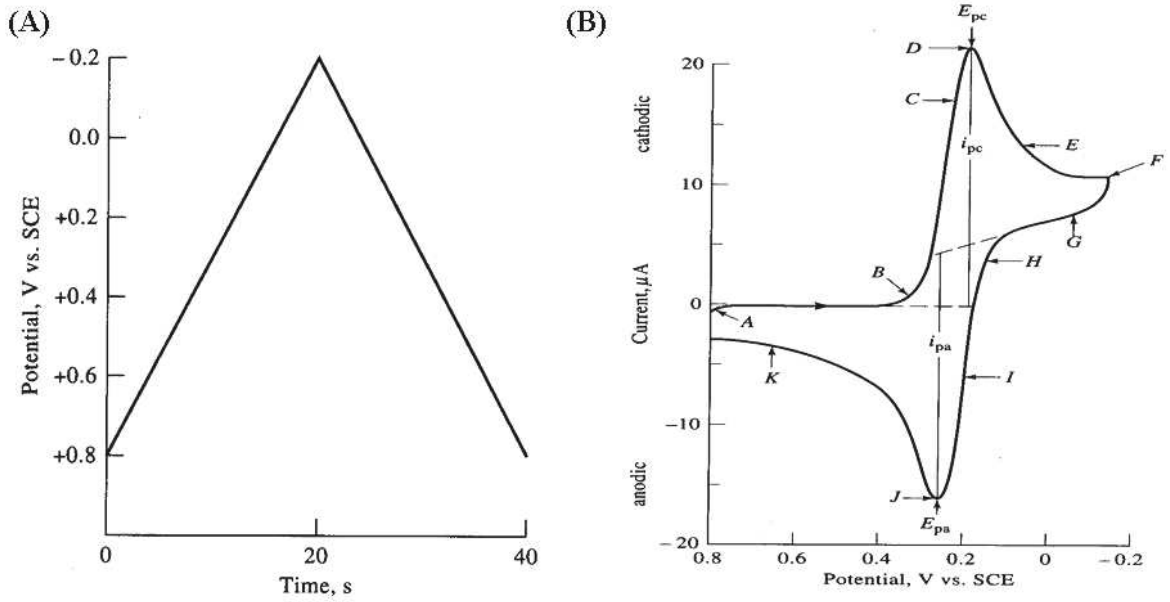


Fig. 3-1. Potential wave form for cyclic voltammetry (A) and a typical cyclic voltammogram showing reduction and oxidation current peaks (B) (Marks *et al*. 2007).

제2절 재료 및 방법

1. TMADH 효소 순수 분리 및 정제

가. Soluble fraction 제조

TMADH의 분리 및 정제를 위한 모든 과정은 4℃에서 수행하였다. 지수성장기 말기에 들어선 균체는 10,000 × *g*로 10분간 원심분리하였다. 회수된 균체 20 g에 60 ml의 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, standard buffer)로 1회 씻은 후 원심분리하였다. Standard buffer를 넣어 재현탁 시킨 후, DNase를 소량 첨가하고 초음파 분쇄기로 파쇄한 후, 원심분리하여 (15,000 × *g*, 30분) 상등액을 cell free extract로 사용하였다. 이 상등액을 다시 100,000 × *g*에서 90분간 초원심분리하여 얻은 상등액을 soluble fraction으로 간주하였다.

나. Anion exchange column (POROS 20 HQ) chromatography

Soluble fraction 5 ml를 25 mM Tris-HCl (pH 7.0)로 미리 평형화시킨 POROS 20 HQ column에 1 ml/min의 속도로 용출시켰다. Column에 결합된 단백질은 1M의 NaCl이 들어있는 Tris- HCl buffer로 농도구배를 걸어 용출시켰으며, 각 분획물은 1 ml씩 수집하여 활성을 측정하였다. 각 분획물 중에서 활성이 있는 분획을 모아 농축한 다음 정제단계의 시료로 사용하였다.

다. Hydrophobic (HiPrep 16/10 Phenyl) chromatography

일차 정제된 분획물에 $(NH_3)_2SO_4$의 농도가 1.5 M 되게 첨가하고, 1.5 M $(NH_3)_2SO_4$로 미리 평형화시킨 Phenyl hydrophobic column에 주입하고 1 ml/min의 속도로 용출시켰다. Column에 결합된 단백질은 25 mM Tris-HCl buffer (pH8.0)로 용출시켰다.

라. Gel filtration (Sephacryl S-200) chromatography

활성이 있는 분획을 모아 500 µl로 농축시킨 후 Sephacryl S-200 gel filtration column에 0.15 M NaCl을 포함한 Tris-HCl buffer (pH8.0)와 함께 0.8 ml/min 속도로

용출시켰다. 분획물 중에서 활성이 있는 분획을 모아 SDS-PAGE를 이용하여 각 단계별 정제도를 확인하였다. TMADH의 분자량은 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography를 이용하여 측정하였으며 0.15 M NaCl을 포함한 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 이용하여 0.8 ml/min로 용출하였다. 효소의 분자량은 표준 단백질의 retention time과 비교하여 결정하였다. 사용한 표준 단백질은 다음과 같다: β-amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), bovine serum albumin (66,000), carbonic anhydrase (29,000), cytochrome c (12,400).

2. Trimethylamine dehydrogenase의 특성조사

가. 효소활성 측정

TMADH 활성은 Colby 와 Zatman (1973)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 반응완충용액 3 ml에는 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.04 mM DCPIP, 1.1 mM phenazine methosulfate (PMS), 1.0 mM KCN, 5 μM sodium hydrosulfite, 10 μM sodium bicarbonate이 들어있으며, 기질로는 TMA을 155 μM 첨가하였고, TMADH soluble fraction을 10 μl 넣었다. 반응은 30℃에서 TMADH를 넣은 직후 시작하였고 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP)의 1분 동안의 흡광도 변화를 600 nm에서 측정하였다.

3. TMADH 효소를 이용한 전기화학적 분석시스템 구축

가. 전기전달매개체 (PVI-Os)를 이용한 TMA의 분석

전기화학적인 방법을 이용한 바이오센서는 작은 금속 전극 위에 표적물질을 인지하는 미생물 혹은 효소 등을 전극 상에 고정시킨 뒤에 고정화된 미생물(혹은 효소)과 표적물질의 농도에 비례하여 산화/환원반응을 통하여 생성되거나 소비되는 전류를 정확하게 정량하는 분석시스템이다. 효소 또는 미생물과 전극의 직접적인 전자전달반응을 용이하게 하기 위하여 전기전달매개체로 osmium complex (PVI-Os, Mediator)를 이용하여 보다 정확하고 빠르게 표적물질을 정량할 수 있다 (Fig. 3-2).

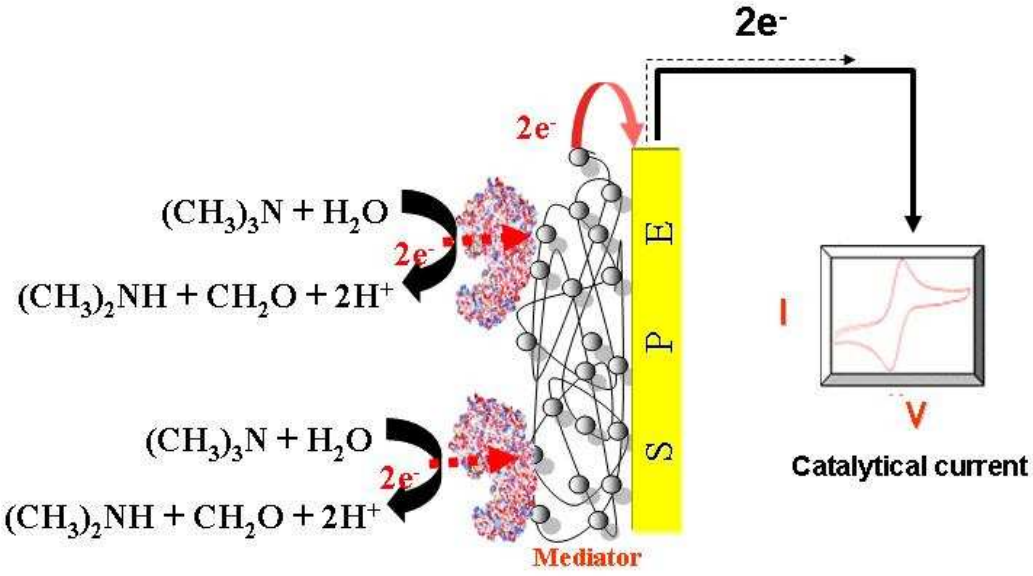


Fig. 3-2. Schematic diagram of TMA biosensor using electrochemical method.

구조 확인을 위한 핵자기 공명 스펙트럼은 Varian Mercury plus Spectrometer (200 MHz)를 사용하여 $CDCl_3$을 용매로 사용하였으며 전극 표면의 확인을 위한 SEM (Scanning Electron Microscopy, S-4300, Hitachi)을 사용하였다. 전기화학 실험의 순환전압전류법 (Cyclic Voltametry)의 측정 및 시간전위차법(Chronopotentiometry) 측정은 Electrochemical Workstation model 660B(CH Instruments, USA)를 사용하였다.

나. Mediator 제조

Osmium complex는 단국대학교 김혁한 교수연구실에서 합성한 화합물을 사용하였다. Potassium hexachloroosmate(IV)에 ethylene glycol과 ethanol을 용매로 사용하여 pyridine ring이 금속에 킬레이트형성이 잘 되는 반응을 이용해 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl을 넣고, $[Os(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})_2Cl_2]^{2+/3+}$을 합성하였다. 생성된 갈색 액상은 sodium hydrosulfite로 침전시켜 분말로 얻을 수 있었다.

이 후 $[Os(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})_2Cl_2]^{2+/3+}$와 1-(3-aminopropyl)-imidazole을 동일한 비율로 넣고 용매로는 ethylene glycol과 ethanol을 사용하여 $[Os(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})_2(ap\text{-}im)Cl]^{+/2+}$을 합성하였다 (Fig. 3-3). 최종생성물은 관 크로마토그래피를 이용하여 정제를 할 수 있었다. 구조 확인은 순환전압전류법을 통하여 $[Os(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})_2Cl_2]^{2+/3+}$가 Ag/AgCl 기준전극 (0 Volt)에 대하여 전위 값이 -0.123 V에서 나오는 것과 이 배위화합물에 polyvinylinidazole이 하나 더 배위될 때 전위가 약 200 mV 가량 증가하는 쪽으로 이동하여 0.118 V에서 전위 값이 나오는 것을 보고 Poly(vinylimidazole- $[Os(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})_2 Cl]^{+/2+}$)의 합성을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-4). 이 때 scan rate은 100 mV/sec 이었다. Ferrocene 화합물은 ferrocene과 imidazole을 동일 비율로 넣고 용매로는 ethylene glycol과 ethanol을 사용하여 ferrocene-ap-imidazole 을 합성하였다 (Fig. 3-5A). 순환 전류법을 통하여 측정한 결과 ferrocene-ap-imidazole은 Ag/AgCl 기준전극(0 Volt)에 대하여 전위 값은 0.3V에서 전위값이 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-5B).

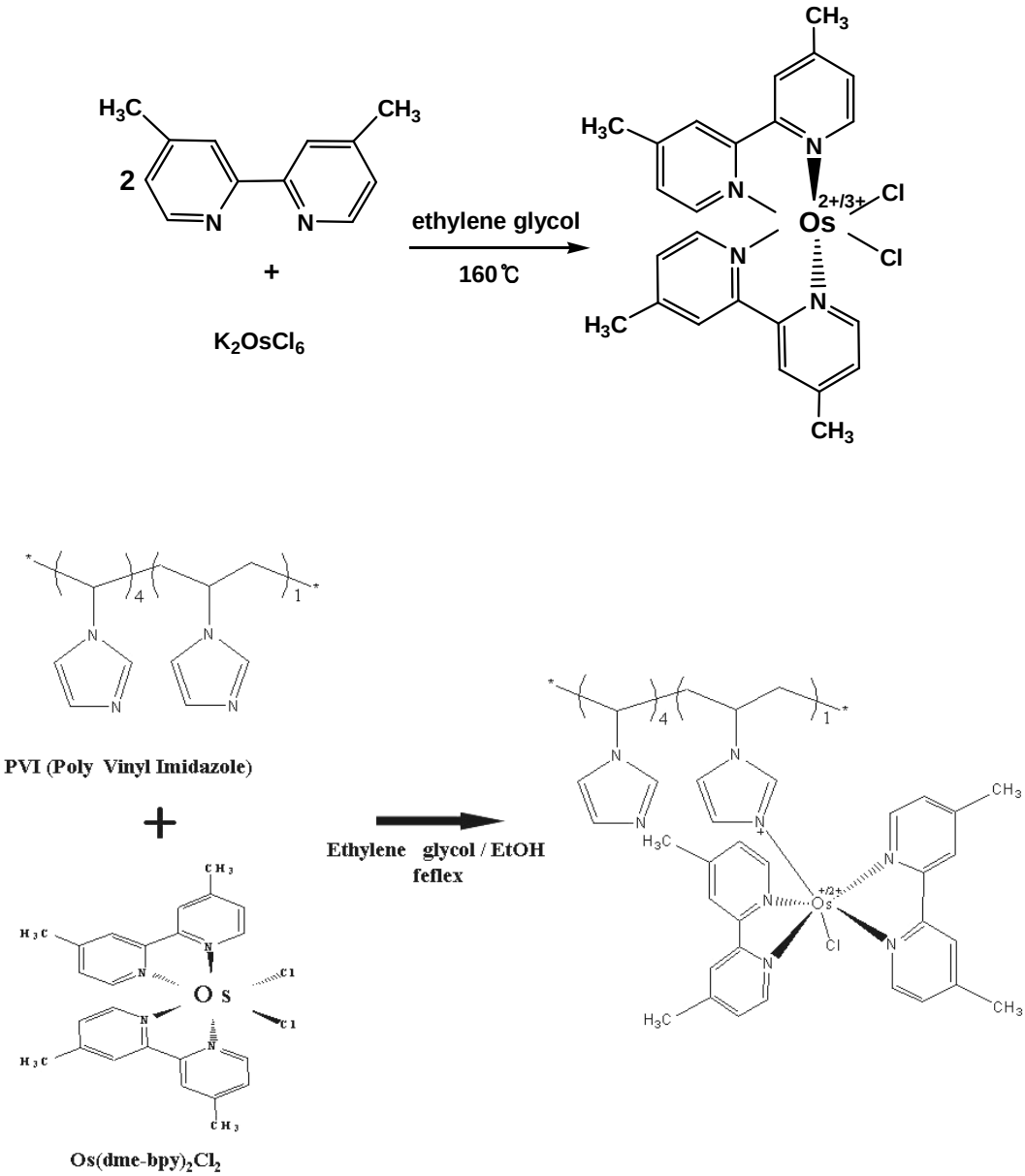
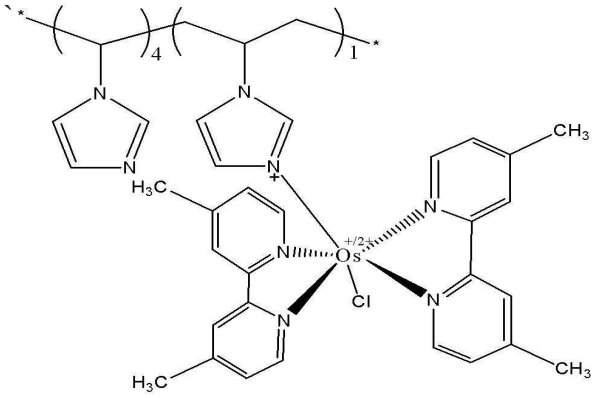


Fig. 3-3. Synthesis of Poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$ Cl]$^{+/2+}$).

(A)



(B)

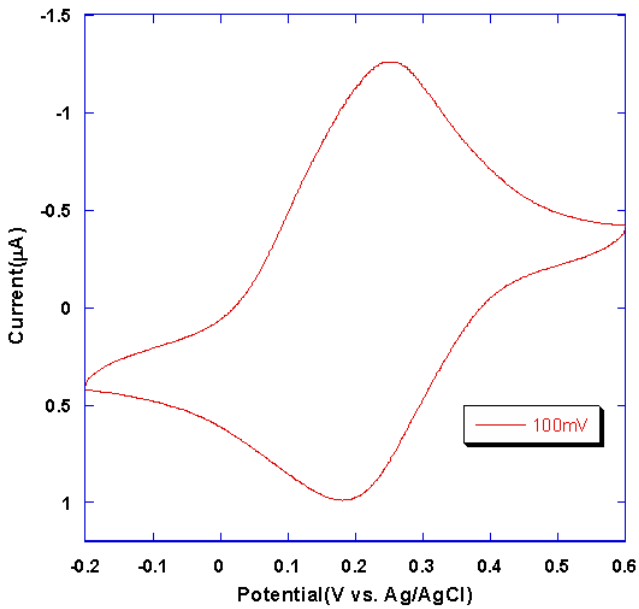
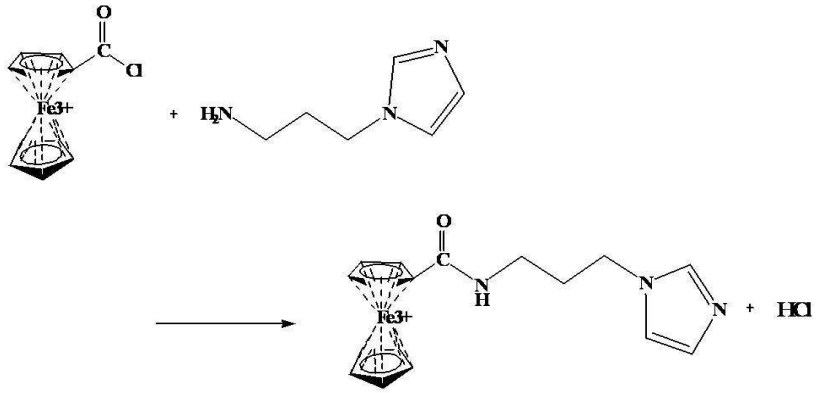


Fig. 3-4. Structure of poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$ Cl]$^{+/2+}$) (A) and cyclic voltammograms of poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$ Cl]$^{+/2+}$) (B).

(A)



(B)

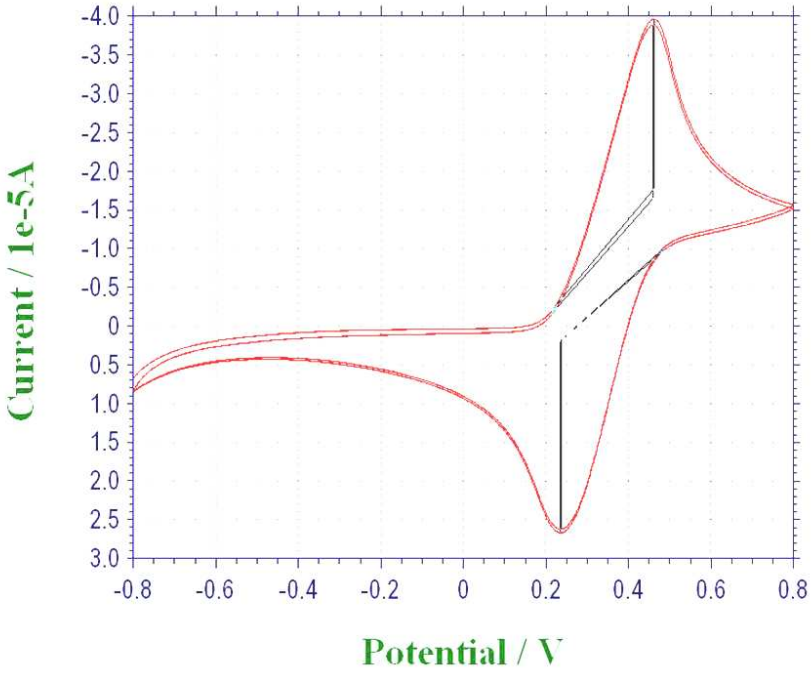


Fig. 3-5. Synthesis of ferrocene-ap-imidazole (A) and cyclic voltammograms of ferrocene-ap-imidazole (B).

다. 전기화학실험을 위한 electrode의 제작

(1) 스크린 프린팅 탄소 전극의 제작

스크린 프린팅 탄소 전극(screen printed carbon electrodes; SPEs)은 반자동인쇄기 model BS-860AP (Bando Co., Korea)를 이용하여 인쇄하였다. 잉크는 Electrodag 423SS (Acheson, USA)를 사용하여 OHP film에 인쇄하였다. 인쇄 후 건조조건은 70℃에서 30분간 건조하였다. 이 전극위에 측정 시료를 올려 작업 전극으로 사용하였다 (Fig. 3-6A). 기준전극(reference electrode)으로는 Ag/AgCl electrode를 사용하였고, 상대전극(counter electrode)으로는 백금선을 사용하였다 (Fig. 3-6B).

(2) Carbon electrode를 이용한 TMA 정량

Carbon electrode의 한쪽에는 10 mg/ml 농도의 TMADH와 mediator인 osmium complex를 혼합하여 잘 섞어주고 기질로써 TMA를 농도별로 첨가하면서 산화/환원 반응에서 발생하는 촉매전류를 측정하였다.

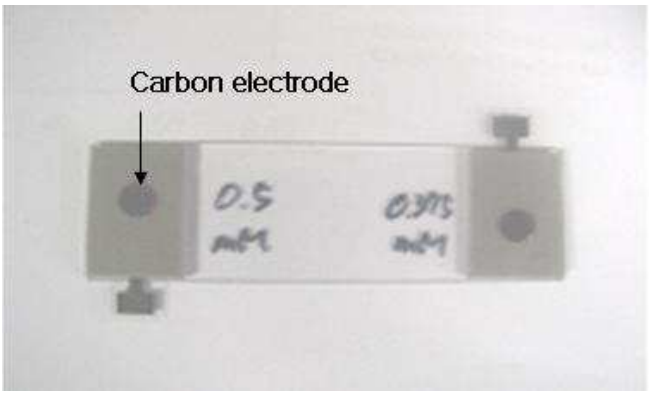
(3) Cyclic voltammetry 측정

Cyclic voltametry는 Electrochemical Workstation (model 660B, CH Instruments, USA)로 측정하였다. 선형적으로 전압을 증가시킨 후 처음의 전압으로 되돌아 올 때까지의 전압-전류관계, 반응의 가역성 및 산화환원반응의 상대속도차 등에 대하여 측정하였다. 측정에 사용된 전극은 탄소전극을 사용하였다.

(4) 탄소전극위에 금 나노입자의 전기흡착 (electrodeposition)

시간전위차 방식은 일정한 산화전류나 환원전류를 시간을 조절하여 가해주게 되면 금속 입자를 탄소전극위에 deposition 시킬 수 있다. 스크린 프린팅 카본 전극 (screen printed carbon electrodes; SPEs) 위에 $KAuCl_4$ (1 mM in 1M H_2SO_4) 용액을 40 μl 첨가하였고, 기준전극과 상대전극을 용액에 접촉시킨 후 시간전위차를 통해 금 입자를 탄소전극위에 deposition시켰다. 이때의 반응 조건은 1.41×10^{-5} A의 환원전류를 300초 동안 가해주어 탄소전극위에 Au(III)가 환원전류에 의해 Au 입자로서 전극 위에 흡착되었다 (Fig. 3-6, 3-7).

(A)



(B)

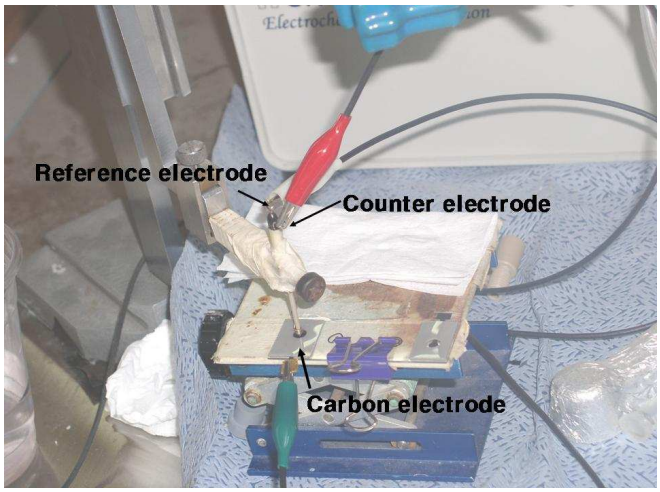


Fig. 3-6. Carbon electrode (A) and cyclic voltammetrical analysis (B).

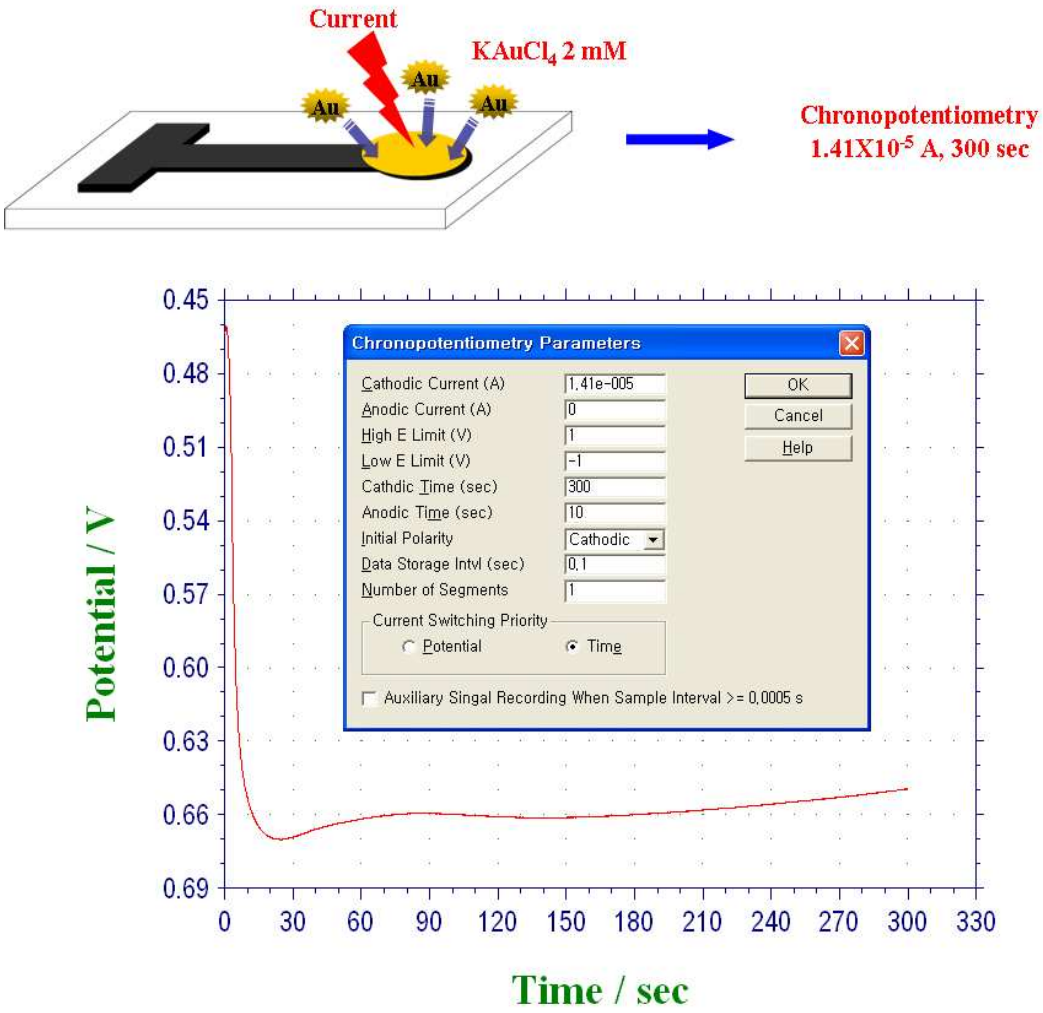


Fig. 3-7. Preparation of the gold-coated screen printed carbon electrodes.

제3절 결과 및 고찰

1. Trimethylamine dehydrognase 정제 및 특성 조사

가. TMADH의 정제

TMADH를 정제한 결과는 Table 3-1과 같다. Cell free extracts에서부터 네 단계를 거치는 동안 약 12배정도 정제되었고, 최종 수율은 2%였다 (Table 3-1). 정제된 TMADH의 최종 specific activity는 2.29 unit/mg protein 이었으며, 1 unit는 분당 1 mol DCPIP를 환원시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였다. 정제된 TMADH는 노란색을 나타내었으며 온도에 약간 불안정하였다. Gel filtration chromatography 과정을 거쳐 정제된 효소는 SDS-PAGE를 실행하여 TMADH의 정제 정도를 확인하였다.

나. TMADH 특성 조사

(1) 최적온도, 온도 안정성 및 최적 pH

반응혼합물의 온도를 5 ~ 70℃까지 달리하여 최대 효소활성을 측정하였을 때 55℃에서 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 3-8A). TMADH를 여러 온도에서 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60분간 방치하면서 열에 대한 안정성을 측정하였는데 60℃에서는 60분경과 후에도 약 50%의 활성을 나타내었으나, 70℃에서는 10분 방치에도 대부분의 효소 활성을 잃었다 (Fig. 3-8B). 이것은 TMADH가 온도에 민감한 효소임을 알 수 있었다. 효소의 활성에 영향을 미치는 pH를 각각 달리하여 효소활성을 비교하였다. pH는 phosphate buffer와 Tris-HCl buffer를 이용하여 pH 7.0 ~ 10.0 까지 만들어 사용하였으며 pH 7.0 ~ 8.5에서는 거의 비슷한 활성을 보였으나 pH 9에서는 활성이 급격히 감소하였다. (Fig. 3-8C).

(2) K_m과 V_{max} 결정

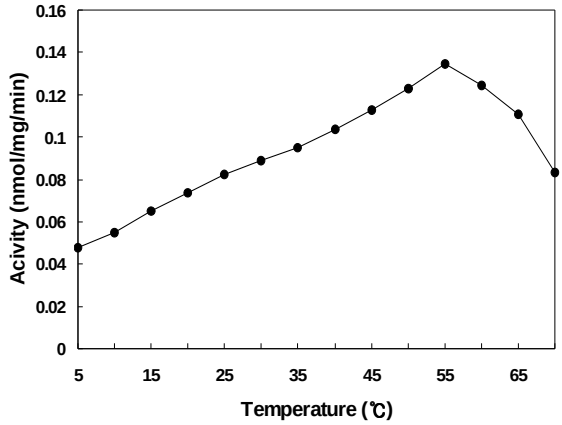
TMA의 농도를 다양하게 하여 동일양의 효소와 반응 시켰을 때 DCPIP의 흡광도 변화속도를 Michaelis-Menten 반응식으로 구하여 Hanes plot으로 나타냈다. TMA에 대한 V_{max}는 7.934 nmol/min/mg protein 이고 K_m은 1.5 μmol이였다.

Table 3-1 . Purification of TMADH from *M. aminisulfidivorans* MP^T

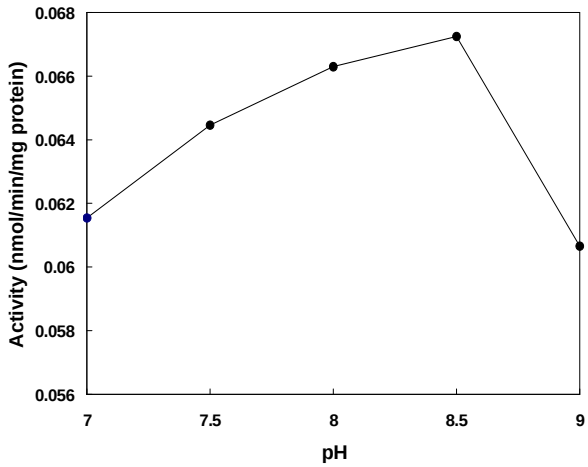
	Total protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg protein)	Purification Fold (%)	Yield (%)
Cell free extract	67.02	12.53	0.19	1	100
Soluble fraction	42.16	10.04	0.24	1.27	80
POROS HQ	4.62	5.05	1.19	6.36	44
Phenyl hydrophobic	0.61	1.32	2.18	11.66	11
Sephacryl S200	0.11	0.25	2.29	12.27	2

*One activity unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 mol DCPIP per minute. Enzyme activities were obtained as average values from three independent experiments.

(A)



(B)



(C)

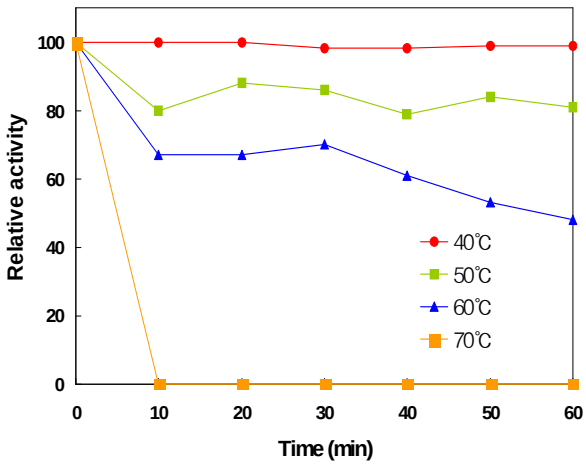


Fig. 3-8. Effects of temperature on the activity of TMADH (A) and pH (B) on the activity of TMADH, and Thermal stability of TMADH (C).

2. TMADH를 이용한 TMA의 전기화학적 분석

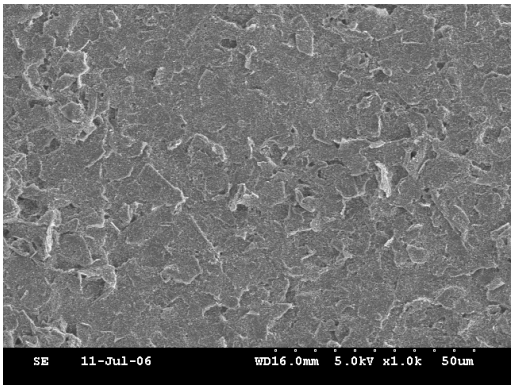
가. 전극위에 금 나노입자의 전기흡착 실험

스크린 프린팅 카본 전극(screen printed carbon electrodes; SPEs) 위에 $KAuCl_4$ (1 mM in 1 M H_2SO_4, 40 µl)을 올리고 기준전극과 상대전극을 용액에 접촉시킨 후, Chronopotentiometry technique을 통해 반응시켰다. Chronopotentiometry 방식은 일정한 산화전류나 환원전류를 시간을 조절하여 가해주는 technique으로서 3 mm의 탄소전극을 Au로 deposition시키는 조건은 1.41×10^{-5} A의 환원전류를 300초 동안 가해주게 되면 탄소전극위에 Au(III)가 환원전류에 의해 Au 입자로서 전극 위에 흡착되었다.

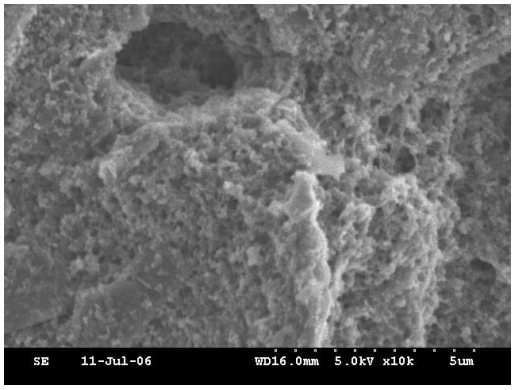
이렇게 반응을 시킨 전극은 SEM을 통하여 Au 흡착이 되지 않은 카본전극과 Au particle이 흡착 되어있는 카본전극을 측정하여 Au particle의 흡착을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-9). 이 때 약 200 nm size의 금 나노입자 (Au nanoparticles)들이 뭉쳐서 1 µm size의 입자 뭉치들로 형성되는 것을 SEM을 통하여 확인할 수 있었다.

나. 전극위에 redox complex의 고정화 실험 (Self Assemble Monolayer; SAM)

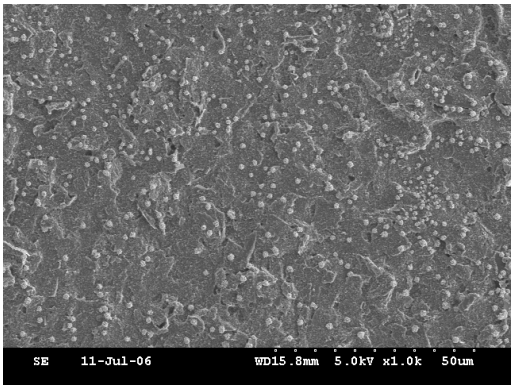
금 나노입자가 흡착된 SPE 위에 3-mercaptopropionic acid (1 mM, 40 µl)를 올리고 상온에서 1 시간 동안 반응을 시키면 mercapto group의 경우는 강한 결합력을 갖는 S-Au 결합의 자발적인 형성을 통하여 금속 박막 상에서 자기 조립 단분자막 (Self Assembled Monolayer ; SAM) 의 형성을 가능케 하였다. mercapto 반응 후 증류수를 이용하여 전극을 세척하고 EDC와 NHS를 섞은 혼합액 (40 µl)을 올리고 상온에서 1 시간 동안 반응을 시키면 3-mercaptopropionic acid의 mercapto 반대편의 작용기인 카르복실기가 EDC에 의해 활성화 되므로 일차 아민과의 결합을 할 수 있는 조건이 생성되었다. 이 후 전극을 세척하고 일차 아민을 포함하고 있는 여러 종류의 osmium complex (40 µl)를 올리고 상온에서 1 시간 동안 반응을 시키면 carboxyl group과 complexes의 아민이 화학적 결합을 형성하게 되어서 전극위에 osmium complex를 고정화 시킬 수 있었다.



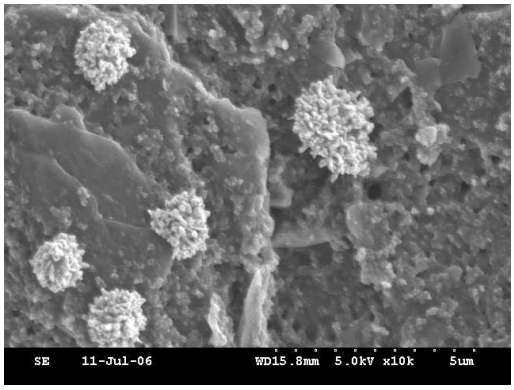
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 3-9. SEM images of screen printed carbon electrodes (A and B) and gold-coated screen printed carbon electrodes (C and D).

확인은 모든 반응이 끝난 후 전극을 증류수로 세척하고 전해질로서 PBS 용액을 사용하여 순환전압전류법을 통해 osmium complex가 SPEs위에 고정화 되었는지를 확인하였다. osmium complex는 같은 농도일 때 비슷한 양의 osmium complex가 고정화 된다는 것을 current (anodic : -1.1 μA ~ -1.53 μA, cathodic : 1.12 μA ~ 1.37 μA) 양과 peak를 적분하여 전극의 면적당 올라갈 수 있는 complex의 mol수를 통하여 확인하였다. 이 때 단위면적당(surface coverage) mole 수는 3.7×10^{-10} ~ 5.05×10^{-10} mole/cm^2 값을 가지며, 그 때의 scan rate은 100 mV/sec를 사용하였으며, 대개 3 mm 직경의 평평한 전극표면이 갖는 surface coverage는 4.5×10^{-11} mole/cm^2 인데 비해 약 10배가량 surface coverage가 증가함을 알 수 있었다. 이유는 실험에 사용한 스크린 프린팅 카본 전극이 다른 전극에 비해 표면이 매우 거칠어서 표면이 깨끗한 다른 전극보다 surface coverage가 많이 증가함을 확인 할 수 있었다.

다. 전기전달매개체를 이용한 TMA의 분석

효소 또는 미생물과 전극의 직접적인 전자전달반응을 용이하게 하기 위하여 전기전달매개체로 osmium complex (PVI-Os, Mediator)를 이용하여 보다 정확하고 빠르게 표적물질을 정량할 수 있다. 또한 훌륭한 전기전달매개체로 알려져 있는 ferrocene 화합물을 이용하여 TMA의 농도에 따른 전기화학적 특성을 조사하였다.

(1) PVI-Os를 이용한 다양한 농도의 TMA 검출

SAM 방법을 통해 osmium complex를 고정화 시킨 SPEs 위에 TMA과 TMADH (5 mg/ml, 100mM Tris-HCl pH, 8.0)가 반응하여 나오는 전자를 mediator인 osmium complex가 전극에 전자를 전달할 때 발생하는 산화 촉매전류를 순환전압전류법을 이용하여 TMA의 농도 (0.125, 0.25, 0.375, 0.5 mM)별로 측정하였다.

TMADH에 의한 TMA의 산화반응 시 발생하는 촉매산화전류를 정량적으로 얻음으로써 다양한 TMA 농도에 대한 직선전압곡선을 얻을 수 있었다. 이 때 가해 준 전위의 범위는 -0.2 ~ 0.6 V 이고, scan rate은 10 mV/sec 이었다 (Fig. 3-10A). 촉매전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.4 V (versus Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 glucose의 농도에 따라 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인하였다 (Fig. 3-10B). TMA의 농도가 100 μM 이하의 농도에서는 촉매전류 발생량이 낮아 일정한 data값을 구하기 어려웠고, 각각의

TMA의 농도(0.125, 0.25, 0.375, 0.5 mM)에 따라 정량적으로 촉매산화전류가 증가함을 알 수 있었다. 이 곡선을 이용하여 TMA의 농도와 촉매산화전류와의 상관관계를 조사한 결과 농도에 따라 촉매산화전류가 일정하게 증가하는 일차방정식을 얻을 수가 있었다. 결과적으로 산화전류치에 따른 TMA의 농도를 정량할 수 있었다.

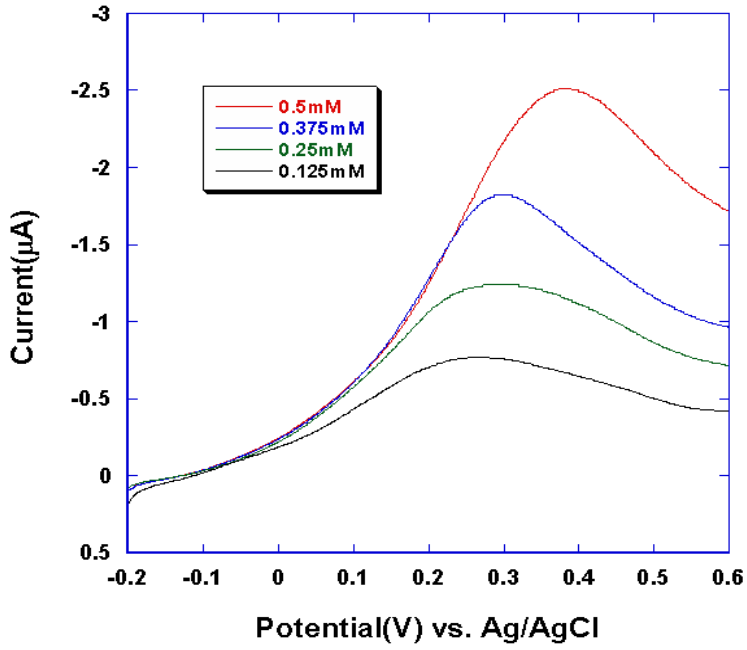
(2) Ferrocene 화합물을 이용한 다양한 농도의 TMA 검출

SAM 방법을 통해 ferrocene 화합물을 고정화 시킨 SPEs 위에 TMA과 TMADH (5 mg/ml, 100 mM Tris-HCl pH, 8.0)가 반응하여 나오는 전자를 mediator인 ferrocene 화합물이 전극에 전자를 전달할 때 발생하는 산화 촉매전류를 순환전압전류법을 이용하여 TMA의 농도(7.8 ~ 250 μM)별로 측정하였다.

TMADH에 의한 TMA의 산화반응 시 발생하는 촉매산화전류를 정량적으로 얻음으로써 다양한 TMA 농도에 대한 직선전압곡선을 얻을 수 있었다. 이 때 가해 준 전위의 범위는 0.0 ~ 0.8 V 이고, scan rate은 10 mV/sec 이었다 (Fig. 3-11A). 촉매전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.8 V (versus Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 glucose의 농도에 따라 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인하였다 (Fig. 3-11B).

Osmium complex와는 달리 100 μM 이하의 농도에서도 충분한 촉매산화전류값을 얻을 수 있었고, 각각의 TMA의 농도 (7.8 ~ 250 μM) 에 따라 정량적으로 촉매산화전류가 증가함을 알 수 있었다. 이 곡선을 이용하여 TMA의 농도와 촉매산화전류와의 상관관계를 조사한 결과 일차방정식의 직선을 얻을 수가 있었다. 또한 이 바이오센서는 pH 8에서 가장 최적의 촉매산화전류를 생성함을 알 수 있었고 이는 TMADH가 pH에서 최적 활성을 나타내기 때문이다 (Fig. 3-12).

(A)



(B)

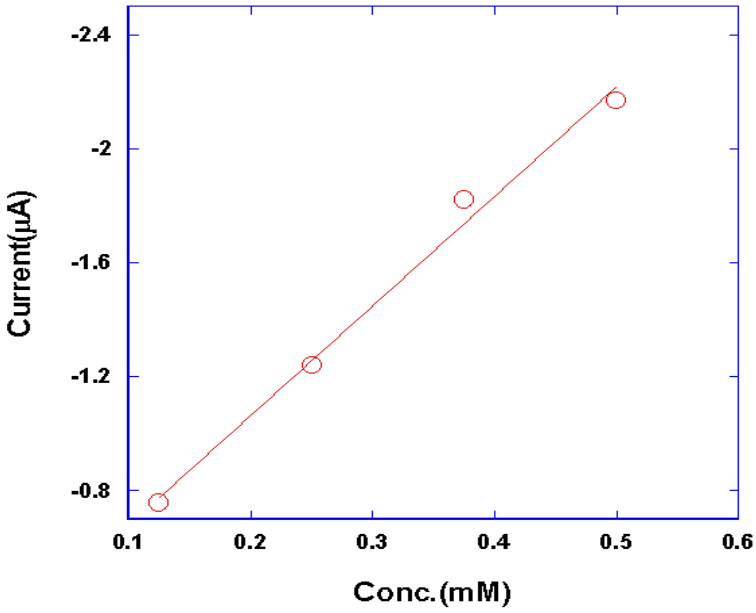
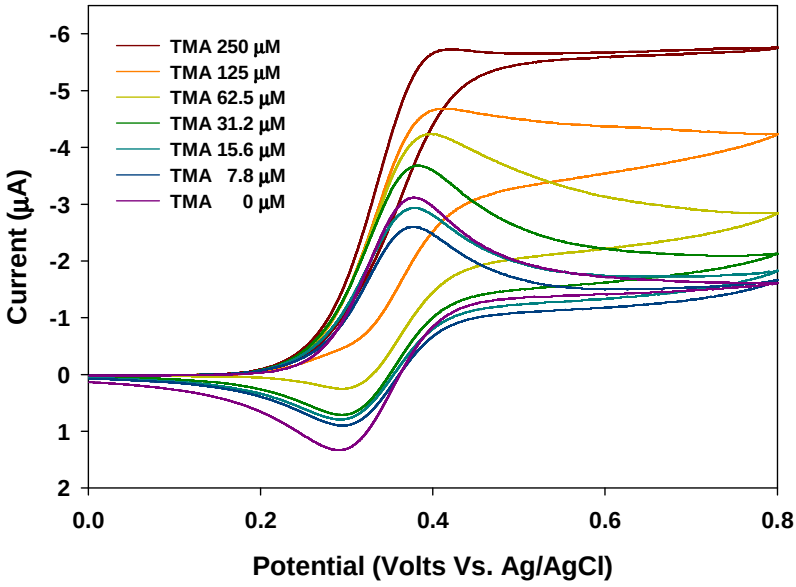


Fig. 3-10. Cyclic voltammograms of poly(vinylimidazole-[Os(4,4´-dimethyl-2,2´-bipyridine)$_2$Cl]$^{+/2+}$) in the presence of TMADH and TMA (A). Changes of catalytic oxidation current curves depending on TMA concentration. Calibration graph of TMA biosensor using osmium complex (B).

(A)



(B)

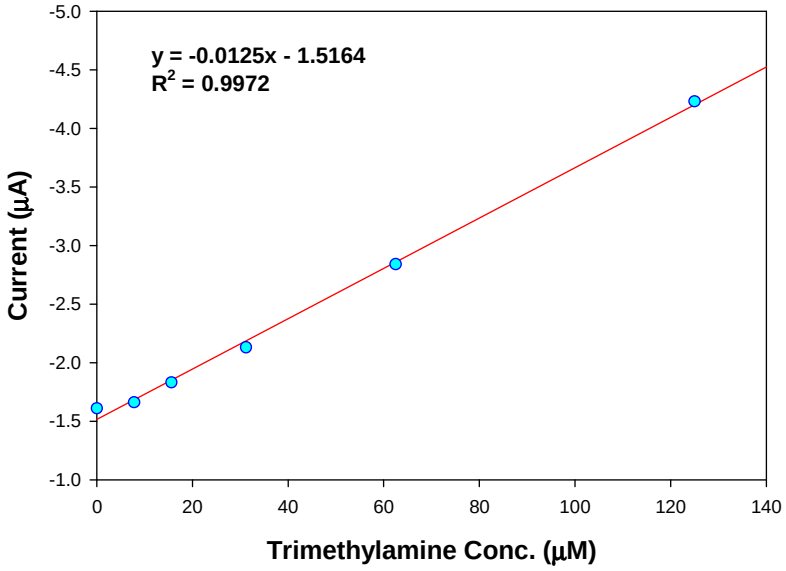


Fig. 3-11. Cyclic voltammograms of ferrocene-ap-imidazole in the presence of TMADH and TMA (A). Changes of catalytic oxidation current curves depending on TMA concentration. Calibration graph of TMA biosensor using ferrocene complex (B).

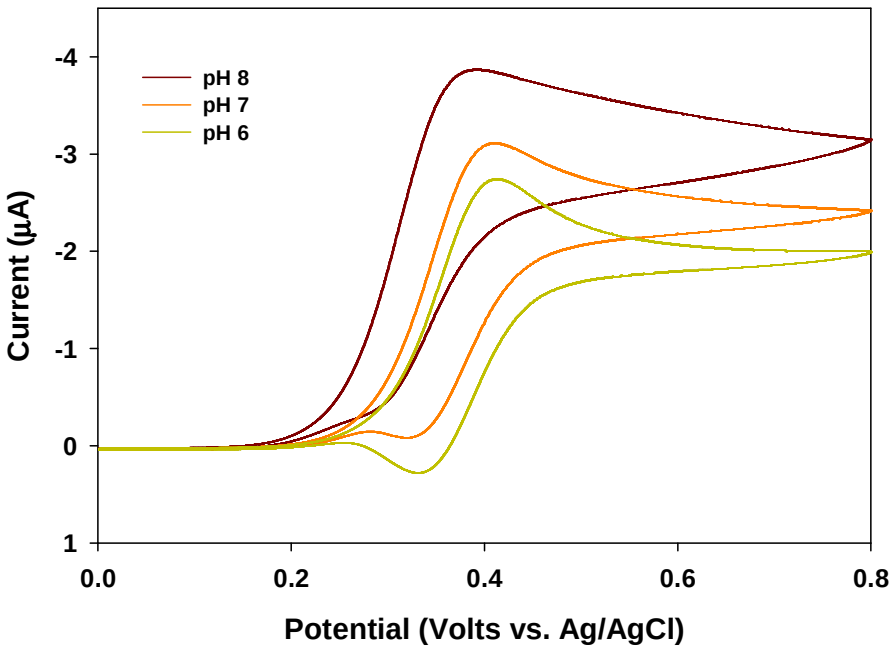


Fig. 3-12. Effect of pH on TMA biosensor using ferrosen-ap-imidazole. Experiments were performed in 100 mM phophate buffer (pH 6 to 8). Concentration of TMADH and TMA were 5 mg/ml and 62.5 µM, respectively.

제4절 결 론

바이오센서로 생체물질을 측정할 때 전자를 운반하는 매개체인 redox complexes를 8족 금속원소인 osmium에 치환기를 변화시킨 pyridine ligand를 각각 2개씩 배위 결합시켜 4배위를 하고 있는 osmium complexes를 합성하였다. 합성된 ligand와 배위 화합물은 순환전압전류법을 이용하여 구조를 확인하고, 전기적 특성을 조사하였다. 여기에 일차아민을 포함하고 있는 1-(3-aminopropyl)-imidazole을 osmium complex에 배위 시켜 5배위를 하고 있는 일차 아민을 포함한 새로운 osmium complex를 합성하고, 이 화합물들의 전기적 특성을 순환전압전류법을 통해 확인 할 수 있었다. 합성한 osmium complex를 전극위에 고정화하기 위해 제작한 SPE위에 금 나노입자 (Au nanoparticle)를 시간 전위차 법을 이용한 전기적 흡착으로 올려 SEM을 통해 전극위에 흡착된 금 나노입자(Au nanoparticle)의 크기와 분포에 대해 확인 할 수 있었다. 금 나노입자로 코팅된 전극에 SAM방법을 통하여 osmium complexes를 고정화 시킬 수 있었고, 올라가는 osmium complexes의 양이 일정하다는 것을 순환전압전류법을 통해 확인하여 재현성을 볼 수 있었다. 전자전달 매개체인 osmium 및 ferrocene 화합물이 고정화된 전극을 통하여 TMA와 TMADH와의 반응을 순환전압전류법을 통해 촉매전류가 발생됨을 확인하였고, TMA의 농도에 따라 일정하게 촉매전류가 변화함을 농도 직선을 통하여 확인 할 수 있었다.

기존의 바이오센서에서 사용된 redox complexes는 주로 유기용매에서 전기적인 특성을 조사해야 하는 점에서 측정의 어려움과 명확하지 않은 결과를 가져왔는데, 이번 연구에서 합성한 osmium complexes는 수용성이라는 장점을 갖고 있어 전기적인 특성이나 촉매전류 측정에 좋은 결과를 확인 할 수 있었다. 또한 기존의 polymer에 결합하여 사용한 osmium complexes보다 비교적 간단하게 합성 할 수 있었고, 고정화 방법 또한 SAM을 사용하여 화학적인 결합으로 실험한 결과 높은 재현성을 확인 할 수 있었다.

제5절 참고문헌

Barber, M.J., Neame, P.J., Lim, L.W., White, S., and Matthews, F.S. (1992) Correlation of x-ray deduced and experimental amino acid sequences of trimethylamine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267(10), 6611-6619.

Barton, S.C., Kim, H.H., Binyamin, G., Zhang, Y., and Heller, A. (2001) The "wired" laccase cathode: high current density electroreduction of O_2 to water at +0.7 V (NHE) at pH 5. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5802-5803.

Boyd, G., Mathews, F.S., Packman, L.C., and Scrutton, N.S. (1992) Trimethylamine dehygrogenase of bacterium W_3A_1. Molecular cloning, sequence determination and overexpression of the gene. *FEBS Letts.* 308, 271-276

Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248-254.

Chaubey, A. and Malhotra, B.D. (2002) Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 17, 441-456.

Clark, L.C. Jr. and Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular Surgery. *Ann. NY. Acad. Sci.* 102, 29-45.

Colby, J. and Zatman, L.J. (1973) Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. *Biochem. J.* 132, 101-112.

Colby, J. and Zatman, L.J. (1974) Purification and properties of the trimethylamine dehydrogenase of bacterium 4B6. *Biochem. J.* 143, 555-567.

Colby, J.,and Zatman, L.J. (1975) Enzymological aspects of the pathways for trimethylamine oxidation and C_1 assimilation in obligate methylotrophs and restricted facultative methylotrophs. *Biochem. J.* 148:513-520.

Cooper, J. and Cass T. (2004) Biosensors-second edition. OXFORD university press. New York

Eskelinen, E., Haukka, M., Kinnunen, T.J. J. and Pakkanen, T. A. (2003) The effect of bipyridine modifications on the electrochemical and electronic properties of Ru(II)-bipyridine carbonyls. *J. Electroanal. Chem.* 556, 103-108.

Faucheux, N., Schweiss, R., Lützow, K., Werner, C., and Groth, T. (2004) Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials.* 25, 2721-2730.

Gregg B.A. and Heller, A. (1991) Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone. *J. Phys. Chem*. 95(15), 5970−5975.

Guest, I. and Varma, D.R. (1997) Teratogenic and macromolecular synthesis inhibitory effects of trimethylamine on mouse embryos in culture. *J. Toxicol. Environ. Health* 36, 27-41.

Haddox, R.M. and Finklea, H.O. (2004) Proton-coupled electron transfer of an osmium aquo complex on a self-assembled monolayer on Gold. *J. Phys. Chem. B* 108, 1694-1700.

Kasprzak, A.A., Papas, E.J., and Steenkamp, D.J. (1983) Identity of the subunits and the stoicheiometry of prosthetic groups in trimethylamine dehydrogenase and dimethylamine dehydrogenase. *Biochem. J.* 211, 535-541.

Lim, L.W., Mathew, F.S., and Steenkamp, D.J. (1982) Crystallographic study of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase from the bacterium W_3A_1. *J. Mol. Biol.* 162, 869-876.

Lim, L.W., Shamala, N., Mathew, F.S., Steenkamp, D.J., Hamlin, R., and Xuong, N.H. (1986) Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J. Biol. Chem*. 261, 15140-15146.

Marks, R.S., Cullen, D.C., Karuve, I., Lowe, C.R., and Weetall H.H (2007) Handbook of BIOSENSORS AND BIOCHIPS: Part four-Transducer technologies for biosensors and bioarray technologies. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. England. pp.343-345.

Mewies M., Basran, J., Packman, L.C., Hille, R., and Scrutton, N.S. (1997) Involvement of a flavin iminoquinone methide in the formation of 6-hydroxyflavin mononucleotide in

trimethylamine dehydrogenase: A rationale for the existence of 8α-methyl and C6-linked covalent flavoproteins. *Biochem.* 36, 7162-7168.

Nakabayashi, Y., Omayu, A., Yagi, S., Nakamura, K., and Motonaka, J. (2001) Evaluation of osmium(II) complexes as electron transfer mediators accessible for amperometric glucose sensors. *Anal. Sci.* 17, 945-950.

Palmisano, F., Zambonin, P.G., Centonze, D., and Quinto, M. (2002) A disposable, reagentless, third-generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/ tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane Composite. *Anal. Chem.* 74, 5913-5918.

Steenkamp, D.J., Kenney, W.C., and Singer, T.P. (1978a) A novel type of covalently bound coenzyme in trimethylamine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 253, 2812-2817

Steenkamp, D.J., McIntire, W.S., and Kenney, W.C. (1978b) Structure of the covalently bound coenzyme of trimethylamine dehydrogenase. Evidence for a 6-substituted flavin. *J. Biol. Chem.* 253, 2818-2828.

Tsujimura, S., Kano, K., and Ikeda, T. (2002) Electrochemical oxidation of NADH catalyzed by diaphorase Conjugated with Poly-1-vinylimidazole Complexed with Os(2,2'-dipyridylamine)$_2$Cl. *Chem. Lett.* 31, 1022-1023.

Yang, H., Chung, T.D., Kim, Y.T., Choi, C.A., Jun, C.H., and Kim, H.C. (2002) Glucose sensor using a microfabricated electrode and electropolymerized bilayer films. *Biosensors and Bioelectronics* 17, 251-259.

Zhang, C., Haruyama, T., Kobatake, E. and Aizawa, M. (2000) Evaluation of substituted-1,10-phenanthroline complexes of osmium as mediator for glucose oxidase of *Aspergillus Niger*. *Anal. Chim. Acta* 408, 225-232.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Hee Gon Kim

Home Address

#104-1209 Juklimmaeuljugong Apt., 234, Dongnim-dong
Buk-gu, Gwangju 500-908, Korea
C.P: 82-10-4615-2492

Mailing Address

Environmental Microbiology Lab.
Department of Environmental Engineering
Chosun University
375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea
Tel: 82-62-230-6649 Fax: 82-62-225-6040
e-mail: micro6649@hotmail.com

Education

Ph.D. 2002-2008 Department of biometerials, Chosun University, Korea
M.S. 2000-2002 Department of Environmental Science, Chosun University, Korea
B.S. 1994-2000 Department of Environmental Science, Chosun University, Korea

Dissertation Titles

- Isolation and characterization of an obligate methane-oxidizing bacterium, M.S. thesis
  Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.
- Relationship between methanol dehydrogenase and MxaJ protein of a novel methanol oxidizing bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T and development of trimethylamine biosensor
  Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.

Major Research Interests

- Marine microbe
- C_1 compound (methane and methanol) utilizer
- Methanol production
- Protein purification and characterization
- Protein-protein interaction

Honors and Awards

2006 Poster prize, "Isolation, characterization and phylogenetic position of a novel marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga aminosulfidovorans* sp. nov." 2006 International Meeting of the Micorbiological of Korea, Korean Society of Microbiology, EXCO, Daegu, 3-4 May.

1998 Scholarship, Department of Environmental Science, Chosun University

Publications

1. Lee, S.G., Goo, J.H., **Kim, H.G.**, Oh, J.I., Kim, Y.M., and Kim S.W. (2004) Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Biotechnol. Letts.* 26, 947-950.
2. **Kim, H.G.**, Phan, T.N., Jang, T.S., Koh, M.J., and Kim S.W. (2005) Characterization of *Methylophaga* sp. strain SK1 cytochrome c_L expressed in *Escherichia coli*, *J. Microbiol.* 43(6), 499-502.
3. **Kim, H.G.** and Kim, S.W. (2006) Purification and characterization of a methanol dehydrogenase derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 cultivated using a compulsory circulation diffusion system, *Biotech. Bioprocess Engin.* 11, 134-139.
4. **Kim, H.G.**, Kim, Y., Lim, H.M., Shin, H.J., and Kim, S.W. (2006) Purification, characterization, and cloning of trimethylamine dehydrogenase from *Methylophaga* sp. strain SK1, *Biotech. Bioprocess Engin.* 11, 337-343.
5. **Kim, H.G.**, Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., and Kim, S.W. (2007) *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 57: 2096-2101.
6. **Kim, H.G.**, Han, G.H., Eom, C.Y., and Kim, S.W. (2008) Isolation and taxonomic characterization of a novel type I methanotrophic bacterium, *J. Microbiol.*, 46(1): 45-50.

Patents

1. Application Number : 2007-63885, Korea
   Title of the Invention : Method for Trimethylamine Detection
   Application Date : 2007. 06. 27.
2. Patent Number : 0551711, Korea
   Title of the Invention : METHOD FOR HIGH YIELD PRODUCTION OF METHANOL USING METHANOTROPHIC BACTERIA
   Registration Date : 2006. 02. 06.

Participation in Professional Meeting

1. **Kim**, **H.G.,** H.S. Choi, E.H. Cho, and Kim, S.W. (2002) Isolation, characterization, and phylogenetic position of a novel methanotrophic bacterium, Molecular basis of microbial one-carbon metabolism, July. Poster.
2. 김시욱, 유진철, 최학선, 김희곤, 이상귀 (2002) Optimization of methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b: to improve methanol production using sodium chloride, 한국미생물생명공학회, Poster.
3. 김시욱, 유진철, 최학선, 김진권, 김희곤, 이상귀, 조선영 (2002) Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylomicrobium* sp. HG-1 한국미생물생명공학회, Poster.
4. Kim, Y., J.K. Kim, **H.G. Kim**, J.H. Goo, and Kim, S.W. (2003) Isolation and purification of trimethylamine dehydrogenase from *Methylophaga* sp. strain SK1, International Symposium of Korean Society of Microbiology, Chuncheon, 2-3 May, Poster.
5. Kim, J.K., S.G. Lee, **H.G. Kim**, K.S. Hahm, and Kim, S.W. (2003) Indigo and indirubin production by recombinant bacterial flavin-containing monooxygenase

of a marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga thalassica*, 25th International Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, National Renewable Energy Laboratory, Breckenridge, USA, 4-8 May, Poster.

6. Kim, J.K., E.H. Cho, **H.G. Kim,** J.H. Goo, and Kim, S.W. (2003) Molecular cloning, expression and characterization of a novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1, Annual Meeting & International Symposium of Korean Society of Microbiology and Biotechnology, June 24-26, Muju. Poster.
7. 김시욱, 이중헌, 김진권, 김희곤, 이상귀 (2003) Bioconversion of methane to methanol using *Methylosinus trichosporium* OB3b in the repeated batch reaction system, 한국생물공학회, Poster.
8. Goo, J.H., S.Y. Cho, **H.G. Kim**, Y.M. Kim, and Kim, S.W. (2004) Cloning of methanol oxidation genes and relationship between methanol dehydrogenase and *mxaJ* product of *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1, Gordon Research Conference on the Molecular Basis of One-Carbon metabolism, Mount Holyoke College, Massachusetts, 1-6 Aug, Poster.
9. Kim, J.K., J.H. Goo, **H.G. Kim**, and Kim, S.W. (2004) Cloning and characterization of a novel bacterial flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1, Gordon Research Conference on the Molecular Basis of One-Carbon metabolism, Mount Holyoke College, Massachusetts, 1-6 Aug, Poster.
10. 김시욱, 김진권, 김연, 김희곤, 구재환 (2004) Cloning, purification and characterization of trimethylamine dehydrogenase from *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1, 한국미생물학회 춘계국제학술대회, Poster.
11. 김시욱, 김희곤, 조선영, 임향미, 구재환 (2004) Expression, purification and characterization of cytochrome *c* of *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1 in *Escherichia coli*, 한국미생물학회 춘계국제학술대회, Poster.

12. **Kim, H.G.** and Kim, S.W. (2005) Expression, purification and characterization of trimethylamine dehydrogenase of *Methylophaga*

aminosulfidovorans SK1 in *Escherichia coli*, 2005 International Meeting of the Microbiological Society of Korea. Hoengseong, Korea, 12-13 May, Poster.

13. Kim, S.W., J.K. Kim, **H.G. Kim** and G.H. Han (2005) Development of an efficient Bio-indigo production system, The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Jinju, 27-29 Oct, Poster.
14. Phan Trong Nhat, 김희곤, 김시욱 (2005) Construction and characterization of a recombinant cytochrome *c* of *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1 in *E. coli*, 한국생물공학회 춘계학술대회, Poster.
15. **Kim H.G.**, D. Kim, and Kim, S.W. (2006) Preliminary promoter analysis of the trimethylamine dehydrogenase gene (*tmd*) from Methylophaga sp. strain SK1. 2006 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, 19-20 Oct, Poster.
16. Kim, S.W., J.K. Kim, **H.G. Kim,** B.R. Oh and G.H. Han (2006) Hydrogen production by *Citrobacter amalonaticus* Y19 and *Clostridium beijerinkii* KCTC1785, 6th International Symposium on Biochemical Engineering Science, Salzburg, Austria, 27-30 Aug, Poster.
17. **Kim, H.G.** and Kim, S.W. (2006) Isolation, characterization and phylogenetic position of a novel marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga aminosulfidovorans* sp. nov. Korean Society of Microbiology, EXCO, Daegu, 3-4 May, **Poster (Poster Prize)**.
18. **Kim**, **H.G.,** G.H. Han, B.R. Oh and Kim, S.W. (2006) Characterization of trimethylamine dehydrogenase and analysis of *tmd* gene from *Methylophaga* sp. strain SK1, 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, 24-29 June, Poster.
19. **Kim, H.G**., D. Kim, J.Y. Son, and Kim, S.W. (2007) Overexpression and purification of bacterial flavin-containing monooxygenase to detect a hazardous trimethylamine, 2007 International Meeting of the Microbiological

Society of Korea. PyeongChang, 10-11 May, Poster.

20. Kim, S.W. **H.G. Kim**, J.E. Lee and G.H. Han (2007) Optimization of indigo production by recombinant *E. coli* harboring flavin-containing monooxygenase, Biorefinery 2007, Symposium of the International Conference on Biorefinery, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, China, 20-23 Oct, Poster.
21. **Kim, H.G.**, J.Y. Son, and Kim, S.W. (2007) The role of 30 kDa binding protein of methanol dehydrogenase from a novel marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans* MP, 2007 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, 11-12 Oct. Poster.
22. **Kim, H.G.** and Kim, S.W. (2008) Detection of hazardous trimethylamine using trimethylamine dehydrogenase and flavin-containing monooxygenase, The 7th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring, Hawaii, USA, 25-28 Feb, Poster.
23. **Kim, H.G.**, S.W. Kim, H. Shin, and H.J. Shin (2008) Production of novel microbial transglutaminase in *Escherichia coli*. The 48th MSK Annual Meeting and 2008 International Symposium on Microbiology, Daejeon, Korea, 15-16 May, Poster.
24. **Kim, H.G**., Y.B. Choi, H.H. Kim, and S.W. Kim (2008) Detection of hazardous trimethylamine using an trimethylamine dehydrogenase based electrochemical biosensor. The 48th MSK Annual Meeting and 2008 International Symposium on Microbiology, Daejeon, Korea, 15-16 May, Poster.
25. **Kim, H.G.**, J.Y. Son, and Kim, S.W. (2008) Relationship of MxaJ protein and methanol dehydrogenase activity from marine methylotrophic bacterium *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^{T}. The 48th MSK Annual Meeting and

2008 International Symposium on Microbiology, Daejeon, Korea, 15-16 May, Poster.

26. **Kim H.G.** (2008) The interaction between methnaol dehydrognease and MxaJ protein of a marine methylotrophic bacterium *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T. The 48th MSK Annual Meeting and 2008 International Symposium on Microbiology, Daejeon, Korea, 15-16 May, **Oral presentation.**

The Journal of Microbiology, February 2008, p. 45-50 Vol. 46, No. 1
DOI 10.1007/s12275-008-0017-2
Copyright © 2008, The Microbiological Society of Korea

Isolation and Taxonomic Characterization of a Novel Type I Methanotrophic Bacterium

Hee Gon Kim[1], Gui Hwan Han[2], Chi-Yong Eom[3], and Si Wouk Kim[1,2]*

[1]*Department of Biomaterials Engineering,*
[2]*Department of Environmental Engineering, BK 21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea*
[3] *Metabolome Analysis Team, Korea Basic Science Institute, Seoul 136-713, Republic of Korea*

(Received January 15, 2008 / Accepted January 31, 2008)

A methane-oxidizing bacterium was isolated from the effluent of manure and its molecular and biochemical properties were characterized. The isolate was aerobic, Gram-negative, and non-motile. The organism had a type I intracytoplasmic membrane structure and granular inclusion bodies. The outer cell wall surface (S-layers) was tightly packed with cup-shaped structures. Colonies were light yellow on nitrate mineral salt agar medium. In addition, the organism was catalase and oxidase positive. The isolate used the ribulose monophosphate (RuMP) pathway for carbon assimilation, and was able to utilize methane and methanol as a sole carbon and energy source, however, it could not utilize any other organic compounds that were tested. The cells grew well in a mixture of methane and air (methane:air=1:1, v/v) in a compulsory circulation diffusion system, and when grown under those conditions, the optimum pH was approximately 7.0 and the optimal temperature was 30°C. In addition, the specific growth rate and generation time were 0.13 per h and 5.43 h, respectively, when grown under the optimum conditions. The major ubiquinone was Q-8, and the G+C mol% of the DNA was 55.3. Phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene sequence comparisons showed that this bacterium belongs to a group of type I methanotrophs, and that it is most closely related to *Methylomicrobium*, with a sequence similarity of 99%. Therefore, the isolate was named *Methylomicrobium* sp. HG-1.

***Keywords*:** Methanotrophic bacteria, intracytoplasmic membrane structure, ribulose monophosphate (RuMP) pathway, *Methylomicrobium*

Methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) are widespread in nature and play an indispensable role in the global carbon cycling of methane. The atmospheric concentration of methane, which is an important global warming gas, has been increasing for many decades (Whittenbury *et al*., 1970; Hanson and Hanson, 1996). Methanotrphs are a ubiquitous group of microorganisms that possess the unique ability to utilize methane as the sole source of carbon and energy, and are therefore considered to be important regulators of atmospheric methane fluxes in nature (Reeburgh *et al*., 1993; Mancinelli, 1995; Fjellbirkeland *et al*., 2001). Methanotrophs are aerobic bacteria that convert methane to methanol in the first step of their metabolic pathway using methane monooxygenase (MMO). In addition, methanol dehydrogenase (MDH), which is an enzyme responsible for the oxidation of methanol to formaldehyde, is assimilated into cellular biomass or oxidized to CO_2, thereby providing reducing power for biosynthesis. *In vitro*, MDH is coupled to the electron transport chain at the level of cytochrome *c* (Ro *et al*., 2000; Brantner *et al*., 2002; Koh *et al*., 2002; Kim *et al*., 2005, 2006).

Methanotrophs have been difficult to identify because information regarding their phenotypic and chemotaxonomic properties is limited. This has led to nomenclatural problems, especially concerning the assignment of species to genera. However, several studies have evaluated the species and genus organization of the methanotroph groups using a more thorough polyphasic taxonomic approach, which has led to redefinition of several species and genera (Bowman *et al*., 1995).

The current classification separates all known methanotrophs into three groups (Types I, II, and X) based on multiple criteria, including cell morphology, the arrangement of intracytoplasmic membranes (ICM), the pathway for formaldehyde assimilation, the DNA G+C content and the major cellular fatty acid profiles (Whittenbury *et al*., 1970; Higgins *et al*., 1981; Bowman *et al*., 1993, 1995; Kaluzhnaya *et al*., 2001). Type I methanotrophs include three broadly homologous clusters of species, referred to as *Methylococcacea*, and it has been proposed that this group should also contain the genera *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, and *Methylomonas* (Bowman *et al*., 1995). The type II methanotrophs contain closely related groups that belong to the genera *Methylocystis* and *Methylosinus*. In addition, a new group, type X, was added to accommodate methanotrophs similar to *Methylococcus capsulatus* that, like type I methanotrophs, utilize ribulose monophosphate (RuMP) as the primary pathway for formaldehyde assimilation. Type X

* To whom correspondence should be addressed.
(Tel) 82-62-230-6649; (Fax) 82-62-225-6040
(E-mail) swkim@chosun.ac.kr

methanotrophs are also distinguished from type I methanotrophs because they possess low levels of ribulose-bisphosphate carboxylase, which is involved in the serine pathway by which carbon assimilation occurs (Hanson *et al.*, 1996). Due to the ability of methanotrophs to catalyze a large number of biotransformations, they have attracted the interest of scientists studying the development of biological methods for degradation of toxic chemicals and the use of bacteria containing MMO for the production of chemicals with commercial values (Han *et al.*, 1999; Han and Semrau, 2000).

In this study, we isolated, characterized, and phylogenetically positioned a novel strain of type I methanotrophic bacterium that grows rapidly in the presence of methane.

Materials and Methods

Isolation and culture conditions

A novel strain of bacteria was isolated from the effluent of manure in Goksung, Republic of Korea using the modified nitrate-mineral-salt (NMS) medium described by Higgins *et al.* (1981). The bacterium was cultured using medium in which the pH had been adjusted to 7.0 at an agitation speed of 150 rpm at 30°C.

An appropriate dilution of the liquid culture samples was spread onto a NMS plate that contained 1.5% (w/v) noble agar (Difco), and then placed in an airtight box. A mixture of methane and air (1:1, v/v) was then passed through a 0.2 μm pore air filter and injected into the box. Control plates were also incubated in the absence of methane to determine if the samples were contaminated with non-methane oxidizing colonies. The plates were incubated at 30°C in the dark and then observed at 3 day or 1 week intervals over 3~4 weeks. In addition, the gas mixture was exchanged every 3 days. Single colonies that formed on the NMS agar plates were transferred onto fresh NMS agar plates and then reincubated for another week. Isolates were considered to be pure if they were morphologically similar in appearance. Methane-oxidizing colonies generally appeared after 5~7 days, and small, non-methane-oxidizing colonies also appeared on plates that were incubated with and without methane. The purity of the methanotrophic bacteria was ascertained by phase-contrast microscopic observation. For long-term storage, 500 μl of 50% (v/v) glycerol was added to 1 ml of late exponential phase liquid culture, and the mixed suspension was then frozen at -70°C.

The pH range at which growth could occur was determined to range from 4.0 to 10.0 and the growth temperature range was determined to range from 10 to 45°C. In addition, the tolerance to concentrations of NaCl ranging from 1 to 5% (w/v) was also evaluated.

Morphology and electron microscopy

Cell morphology was determined using 5-day-old liquid culture medium by Gram-staining, with detailed morphological examinations being made using electron microscopy. Briefly, the cells in the NMS medium were initially fixed with glutaraldehyde, which was added to the medium at a final concentration 2% (v/v), during the late-exponential phase. The cells were then subjected to an additional fixation using 1% (w/v) OsO_4 in 0.1 M cacodylate buffer, followed by two water washes. After dehydration in a series of alcohols, the cells were embedded with Epon resin and then polymerized at 60°C for 18 h. Sections of 70~80 nm were then cut using an ultramicrotome (LKB 2128 Ultratome; LKB) and viewed on a transmission electron microscope (JEOL JEM-2000F X2) operating at 80 kV.

Utilization of carbon and nitrogen sources

The ability of the isolate to utilize the following carbon sources at a concentration of 0.1% (w/v or v/v) was tested in the presence of potassium nitrate, which was used as a nitrogen source: ethanol, formate, formamide, urea, sodium succinate, malate, yeast extract, D-glucose, D-fructose, methylamine, casitone, peptone, tryptone, and methanol. In addition, the ability of the isolate to grow on methanol was tested in a liquid medium that contained concentrations of methanol ranging from 0.1~5.0% (v/v). Volatile liquid carbon sources were filter sterilized and then added to the basal medium after autoclaving. This solution was then dispensed in 3 ml volumes into 20 ml glass vials. Nitrogen sources were tested similarly in the presence of methane using NMS medium in which the potassium nitrate was replaced with one of the following compounds at a concentration of 0.1% (w/v): ammonium molybdate, ammonium amidosulfate, ammonium vanadate, ammonium dihydrogen phosphate, potassium nitrate, formamide, glycine, urea, yeast extract, ammonium oxalate, L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid, L-tryptophan, L-asparagine, and casitone. All test preparations were incubated for 1 week in duplicate. For carbon and nitrogen source tests, growth was confirmed by comparison with negative controls. Sensitivity to antibiotics was examined by plating the cells onto agar-solidified medium and then placing BBL sensi-discs containing the following antibiotics (μg/ml) on the medium: Penicillin (10), Amoxicillin (30), Piperacillin (100), Aztreonam (30), Imipenem (10), Cefamandole (30), Cefazolin (30), Cefotaxime (30), Gentamicin (10), Amikacin (30), Netilmicin (30), Tobramycin (10), Tetracycline (30), Erythromycin (15), Chloramphenicol (30), Vancomycin (30), Ciprofloxacin (5), Clindamycin (2), and Sulfamethoxazole (23.75). Growth under methane was assessed after 5 days.

Chemotaxonomic characterization

Fatty acid methyl esters were prepared from a biomass harvested from the NMS medium after 7 days of incubation at 30°C, and then analyzed using a gas chromatograph (GC-14A, Shimadzu) according to the instructions provided by the Microbial Identification System (MIDI). Ubiquinones were extracted and purified according to the method described by Collins (1985). Analysis of the ubiquinones was conducted using a HPLC apparatus (Agilent 1200, USA) equipped with a C-18 reverse-phase column. DNA was extracted using the method described by Marmur (1961), and the DNA G+C content was determined following the method described Tamaoka and Komagata (1984) using a HPLC apparatus (Agilent 1200, USA) equipped with a C-18 reverse-phase column.

Enzyme assay

The activity of hexulose-6-phosphate synthase (HSP), the

key enzyme involved in the RuMP pathway, was measured following a modification of the method described by Nash (1953). Briefly, the HPS activity was assayed at 37°C by measuring the decrease in the amount of formaldehyde that occurred after the reaction of the added formaldehyde with the ribulose 5-phosphate formed in the reaction mixture. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to consume 1 μmol of formaldehyde per min.

Analysis of 16S rRNA and *pmoA* gene sequences

Chromosomal DNA from the isolate was obtained using the following method: Two liters of batch culture (Kim and Kim, 2006) were pelleted and resuspended in 5 ml of solution I (50 mM Tris; pH 8.0, 25% sucrose). Next, 0.5 ml of lysozyme (20 mg/ml in 0.25 mM Tris; pH 8.0) was added and the solution was then incubated for 1 h at 37°C. After incubation for 1 h at 37°C, 1ml of 0.25 M EDTA (pH 8.0) was added, followed by incubation for 1 h at 37°C. Finally, Sarkosyl was added to a final concentration of 1% (v/v), and the mixture was incubated at 37°C for 30 min and then at 60°C for 5 to 30 min until lysis was complete. The lysate was then subjected to CsCl gradient centrifugation for 16 h (Sambrook *et al.*, 1989; Gilbert *et al.*, 2000). The 16S rRNA gene was then amplified by PCR using the following primers: 16SF; 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', *E. coli* 16S rRNA position 9-27 and 16SR; 5'-AGAAAGGAGGTGATC CAGCC-3', *E. coli* 16S rRNA position 1542~1525. The samples were subjected to the following conditions in a Roche Diagnostic System (Applied Biosystems, *GeneAmp* PCR system 2400): initial denaturation at 94°C for 5 min; 30 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 52°C), and extension (1.5 min at 72°C); and a final extension at 72°C for 5 min. The *pmoA* gene was amplified by PCR using primers *pmoA*F; 5'-TTCTGGGGNTGGACN TAYTTYCC-3' and *pmoA*R; 5'-CCNGARTAYSTHMGNAT GGTNGA-3' following the method described by Steinkamp *et al.* (2001). PCR for *pmoA* gene amplification was performed in 50 μl reaction mixtures in 0.3 ml microcentrifuge tubes using a Roche Diagnostic System.

16S rRNA and the deduced *pmoA* sequences were com-

Table 1. Morphological and biochemical properties of the strain HG-1

Characteristics	Strain HG-1
Morphology	Short-rod
Gram reaction	Negative
Size	1×1.5 μm
Colony color	Light yellow
Motility	Negative
Exospore	Absent
Cyst	Absent
pH	
Growth range	6.5~9.0
Optimal	7.0
Temperature	
Growth range	25~35
Optimal	30
Oxidase	Positive
Catalase	Positive
Carbon assimilation pathway	RuMP
Specific growth rate (μ)	0.13 h^{-1}
Generation time (G)	5.43 h
Quinone system	Q-8
DNA G+C mol %	55.3

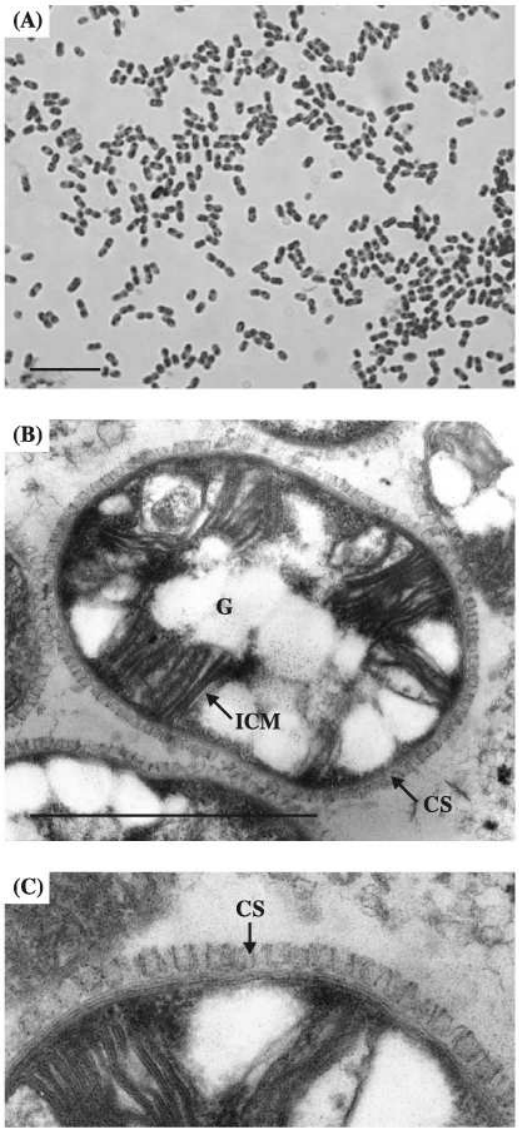


Fig. 1. Phase-contrast micrograph (A) and transmission electron micrograph (B) of the isolate: (A) phase-contrast micrograph; (B) thin section of the cell with cup-shaped structures (CS) on the outer membrane surface and large granular inclusion bodies (G); (C) enlarged cup-shaped structures. Bar: 10 μm (A) and 1 μm (B).

pared with available sequences in the GenBank database using the NCBI tool, BLAST. Next, the DNA sequences were aligned to representative sequences of closely related organisms using the CLUSTAL X 1.81 program. Phylogenetic trees were then constructed using the Tree-View 1.6.6 program.

Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rRNA gene and partial *pmoA* gene nucleotide sequences were deposited in the NCBI GenBank nucleotide sequence database under the accession numbers AF495887 and AF495888, respectively.

Results and Discussion

Morphology and ultrastructure

The isolate was a non-motile, Gram-negative, non-spore forming short rod that formed light-yellow, opaque, round colonies when grown on NMS agar medium. However, the isolate did not form cyst-like structures that are often found in *Methylobacter* species, which is a key differential trait that divides *Methylomicrobium* from *Methylobacter* (Wise *et al.,* 2001). The isolate was catalase and oxidase positive and reproduced by binary fission (Table 1). In addition, the intracytoplasmic membrane structure of the isolate appeared to be comprised of stacks of vesicular disks, which are the typical appearance of type I membranes (Fig. 1). The isolate also had tightly packed cup-shaped structures on the outer cell wall surface, similar to those found on haloalkaliphilic and haloalkalitolerant methanotrophs such as *Methylomicrobium alcaliphilum*, *M. modestohalophilum*, and *M. buryatense*, which are known to live in environments with high osmolarity and pH (Sorokin *et al*., 2000; Kaluzhnaya *et al*., 2001). Furthermore, similar structures that are not identical to S-layers have also been found in *M. album* BG8, which is a neutrophilic and nonhalophilic methanotroph (Jeffries and Wilkinson, 1978). However, the taxonomic importance of bacterial S-layers is still obscure, although it has been proposed that they are related to the osmoadaption mechanisms in haloalkaliphilic methanotrophs (Khmelenina *et al*., 1999).

Physiological and biochemical characteristics

The physiological and biochemical characteristics of the isolate are shown in Table 1. The optimum pH and temperature were 7 and 30°C, respectively, and NaCl was not required

Table 2. Comparison of major fatty acids of type I methanotroph genera with the strain HG-1

Fatty acid	*Methylomonas*	*Methylobacter*	*Methylomicrobium*	*Methylococcus*	Strain HG-1
14:0	22±3	9±2	1±1	1±1	1.7
16:1ω8c	30±11	0	16±3	0	14.6
16:1ω7c	11±4	57±1	17±3	28±10	14.0
16:1ω6c	9±4	5±1	10±4	3±2	8.1
16:1ω5c	4±2	7±1	6±1	3±2	21.2
16:1ω5t	12±4	11±1	20±10	<1	15.9
16:0	7±2	8±1	15±3	44±8	2.4

Values are percentages of the total phospholipid fatty acids (for genera : Mean±SD) ; data are from Bowman *et al.* (1995).

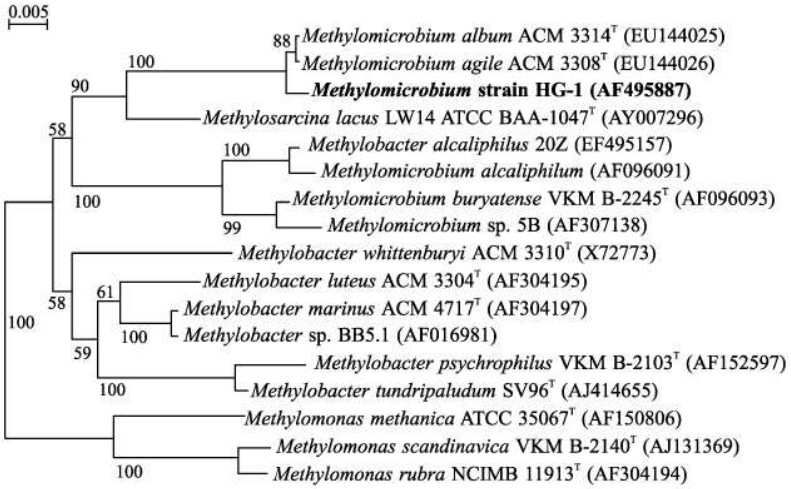


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences of type I methanotrophs and the isolate. The dendrogram shows the results of analysis using CLUSTAL X and TREE-VIEW. Bar, 0.005 substitutions per base position. Bootstrap analysis from 100 replicates is shown (values less than 50% are not shown).

for growth. In addition, the isolate could not utilize any carbon sources evaluated except for methane and methanol, and no growth was observed on nutrient-rich media. However, the isolate was able to grow well using a novel culture system (compulsory circulation diffusion system) that contained a mixture of methane and air (methane:air=1:1, v/v) (Kim and Kim, 2006), and under these conditions it was found to have a specific growth rate and generation time of 0.13 per h and 5.43 h, respectively. The strain was also capable of growth in NMS medium that contained a high concentration of methanol (3%). This result shows that methanol is not inhibitory to the growth of the isolate, which is uncommon for the type I methanotrophs. The isolate could also utilize urea, yeast extract, potassium nitrate and ammonium-containing chemicals as nitrogen sources, however, the isolate was not able to fix nitrogen. In addition, the isolate was resistant to erythromycin, chloramphenicol and clindamycin, but sensitive to other antibiotics tested. Additionally, the isolate was positive for hexulose phosphate synthase, the key enzyme involved in the ribulose monophosphate (RuMP) pathway for formaldehyde assimilation. The isolate also possessed a Q-8 with ubiquinone system. The G+C content of the isolate's DNA, as determined by HPLC, was 55.3 mol%, and, as seen in Table 2, the predominant cellular fatty acids of the isolate were unsaturated $C_{16:1\omega8c}$ (14.6%), $C_{16:1\omega7c}$ (14.0%), $C_{16:1\omega5c}$ (21.2%) and $C_{16:1\omega5t}$ (15.9%). The profiles for strain HG-1 suggest that, based on the significant amounts of $C_{16:1\omega8c}$, $C_{16:1\omega7c}$, and $C_{16:1\omega5t}$ that were detected, the strain is most similar to the genus *Methylomicrobium*. However the strain contained four times more $C_{16:1\omega5c}$ than other *Methylomicrobium* species (Table 2), and when compared with other type I methanotrophic genera, the major cellular fatty acids profile of the isolate was unique.

Phylogenetic analysis

The 16S rRNA gene and partial *pmoA* gene sequences of the isolate were determined, and the phylogenetic tree derived from these data revealed that the isolate branched together with a cluster of *Methylomicrobium* species within the *Gammaproteobacteria* (Fig. 2). The relatively high level of 16S rRNA gene sequence identity between the isolate and members of the genus *Methylomicrobium* indicated that they were closely related, with the closest relatives being *M. album* ACM 3314^T [formerly *Methylobacter albus* (Bowman *et al.*, 1993)] (99%), *M. agile* ACM 3308^T (99%), and *Methylosarcina lacus* LW14 ATCC BAA-1047^T (96%). Lower sequence similarities were found when the sequence of the isolate was compared with those of all other species with validly published names in the genus *Methylobacter*, including *M. whittenburyi* ATCC 51738^T (94%), *M. luteus* ATCC 49878^T (94%), and *M. alcaliphilus* (94%). Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequence of *pmoA* using CLUSTAL X showed that the *pmoA* sequence of the isolate branched within the *Methylosarcina*/*Methylobacter* group of *pmoA* sequences, however, there is a shortage of *pmoA* sequences from type strains of these groups of methanotrophs, therefore, the precise position of the *pmoA* sequence from strain HG-1 could not be determined (data not shown).

Based on the phenotypic and genotypic characteristics of the isolate, it was preliminarily classified as a species of the genus *Methylomicrobium*. The isolate is closely related to *Methylomicrobium album*, however, some features are different. For example, strain HG-1 was capable of growth on NMS medium that contained a high methanol concentration (3%), whereas *M. album* cannot grow on media that contains greater than 0.1% methanol. In addition, strain HG-1 contained a higher concentration of $C_{16:1\omega5c}$ than *M. album*, and the phylogenetic similarity of the deduced *pmoA* sequence obtained from strain HG-1 and that of *M. album* was not very high. Therefore, we propose the name *Methylomicrobium* sp. HG-1 for this isolate.

Acknowledgements

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRI) (No. KRF-2004-202-C00472).

References

Bowman, J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols, and A.C. Hayward. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus*, and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 735-753.

Bowman, J.P., L.I. Sly, and E. Stackebrandt. 1995. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 182-185.

Brantner, C.A, C.C. Remsen, H.A. Owen, L.A. Buchholz, and M. Collins. 2002. Intracellular localization of the particulate methane monooxygenase and methanol dehydrogenase in *Methylomicrobium album* BG8. *Arch. Microbiol.* 178, 59-64.

Collins, M.D. 1985. Analysis of isoprenoid quinones. *Methods Microbiol.* 18, 329-366.

Fjellbirkeland, A., V. Torsvik, and L. Ovreås. 2001. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxaF*, and 16S rRNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 209-217.

Gilbert, B., I.R. McDonald, R. Finch, G.P. Stafford, A.K. Nielsen, and J.C. Murrell. 2000. Molecular analysis of the *pmo* (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 966-975.

Han, J.I., S. Lontoh, and J.D. Semrau. 1999. Degradation of chlorinated and brominated hydrocarbons by *Methylomicrobium album* BG8. *Arch. Microbiol.* 172, 393-400.

Han, J.I. and J.D. Semrau. 2000. Chloromethane stimulates growth of *Methylomicrobium album* BG8 on methanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 77-81.

Hanson, R.S. and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439-471.

Higgins, I.J., D.J. Best, R.C. Hammond, and D. Scott. 1981. Methane-oxidizing microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45, 556-590.

Jeffries, P. and J.F. Wilkinson. 1978. Electron microscopy of cell wall complex of *Methylomonas albus*. *Arch. Microbiol.* 119, 227-229.

Kaluzhnaya, M., V. Khmelenina, B. Eshinimaev, N. Suzina, D. Nikitin, A. Solonin, J. Lin, I. McDonald, C. Murrell, and Y. Trotsenko. 2001. Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the southeastern transbaikal region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 166-176.

Khmelenina, V.N., M.G. Kalyuzhnaya, V.G. Sakharovsky, N.E.

Suzina, Y.A. Trotsenko, and G. Gottschalk. 1999. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch. Microbiol.* 172, 321-329.

Kim, H.G. and S.W. Kim. 2006 Purification and characterization of a methanol dehydrogenase derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 cultivated using a compulsory circulation diffusion system. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 11, 134-139.

Kim, H.G., T.N. Phan, T.S. Jang, M.J. Koh, and S.W. Kim. 2005. Characterization of *Methylophaga* sp. strain SK1 cytochrome c_L expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 43, 499-502.

Koh, M.J., C.S. Kim, Y.A. Kim, H.S. Choi, E.H. Cho, E.B. Kim, Y.M Kim, and S.W. Kim. 2002. Properties of electron carriers in the process of methanol oxidation in a new restricted facultative marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga* sp. MP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 476-482.

Mancinelli, R.L. 1995. The regulation of methane oxidation in soil. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 581-605.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.

Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55, 416-421.

Reeburgh, W. S., S.C. Whalen, and M.J. Alperin. 1993. The role of methylotrophy in the global methane budget, p. 1-14. *In* J.C. Murrell and D.P. Kelly (eds.). Microbial growth on C_1 compounds. Intercept. Andover, UK.

Ro, Y.T., E.B. Kim, and Y.M. Kim. 2000. Enzyme activities related to the methanol oxidation of *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803. *J. Microbiol.* 38, 209-217.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.

Sorokin, D.Y, B.E. Jones, and J.G. Kuenen. 2000. An obligate methylotrophic, methane-oxidizing *Methylomicrobium* species from a highly alkaline environment. *Extremophiles* 4, 145-155.

Steinkamp, R., W. Zimmer, and H. Papen. 2001. Improved method for detection of methanotrophic bacteria in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* 42, 316-322.

Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 125-128.

Whittenbury, R., K.C. Phillips, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation, and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61, 205-218.

Wise, M.G., J.V. McArthur, and L.J. Shimkets. 2001. *Methylosarcina fibrata* gen. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 611-621.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2007), **57**, 2096–2101 **DOI** 10.1099/ijs.0.65139-0

Methylophaga aminisulfidivorans sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium

Hee Gon Kim,[1] Nina V. Doronina,[2] Yuri A. Trotsenko[2] and Si Wouk Kim[3]

Correspondence
Si Wouk Kim
swkim@chosun.ac.kr

[1]Department of Biomaterials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

[2]Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia

[3]Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

A novel restricted facultatively methylotrophic marine strain, MP^T, possessing the ribulose monophosphate pathway of C_1-carbon compound assimilation was isolated from a seawater sample obtained from Mokpo, South Korea. The novel isolate is aerobic, Gram-negative, asporogenous and a non-motile short rod. It grows well on methanol, methylated amines, dimethylsulfide and DMSO. Optimal growth occurs with 3 % NaCl at 30 °C and pH 7.0. Fructose is utilized as a multicarbon source. Growth factors are not required and vitamin B_{12} does not stimulate growth. The cellular fatty acid profile of the novel strain consists primarily of straight-chain saturated $C_{16:0}$ and unsaturated $C_{16:1}$ acids. The major ubiquinone is Q-8. The dominant phospholipids are phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. The DNA G+C content is 44.9 mol% (T_m). Based on 16S rRNA gene sequence analysis and DNA–DNA relatedness (25–41 %) with the type strains of marine methylotrophs belonging to the genus *Methylophaga*, it is suggested that isolate MP^T represents a novel species, *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov. (type strain MP^T=KCTC 12909^T=VKM B-2441^T=JCM 14647^T).

Bacteria belonging to the genus *Methylophaga* are a unique group of aerobic, halophilic, non-methane-utilizing methylotrophs. These organisms have been isolated from various marine sediments and soda lakes. They use the ribulose monophosphate (RuMP) pathway of C_1-carbon compound assimilation and some grow on a single multicarbon compound, fructose. Three neutrophilic species, *Methylophaga marina*, *Methylophaga thalassica* and *Methylophaga sulfidovorans*, have been described (Janvier *et al.*, 1985; De Zwart *et al.*, 1996). More recently, *Methylophaga alcalica* and '*Methylophaga natronica*' – moderately haloalcalophilic obligately and restricted facultatively methylotrophic bacteria were described by Doronina *et al.* (2003a, b). Species of the genus *Methylophaga* are distinguished from methylobacteria of the other RuMP pathway by their requirement for Na^+, Mg^{2+} and vitamin B_{12}, tolerance of NaCl and the low G+C content (38.0–49.0 mol%) of their DNA. On the other hand, two strains, *Methylophaga marina* KM3 and KM5, isolated recently from Red Sea algae were not found to require vitamin B_{12} (Li *et al.*, 2007).

Abbreviations: H_4MPT, tetrahydromethanopterin; PMS, phenazine methosulfate; PQQ, pyrroloquinoline quinone.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain MP^T is DQ463161.

Here, we report the taxonomic characterization of a neutrophilic, moderately halophilic, vitamin B_{12}-independent, RuMP pathway restricted facultative methylotroph belonging to the genus *Methylophaga*. The name *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov. is proposed for this new isolate.

The novel strain was isolated from a seawater sample collected from Mokpo, South Korea. A 1 ml sample was used to inoculate a 500 ml flask containing 50 ml mineral salts medium [MSM; 2 g KH_2PO_4 l^{-1}; 2 g $(NH_4)_2SO_4$ l^{-1}; 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$ l^{-1}; 30 g NaCl l^{-1}; 0.002 g $FeSO_4.7H_2O$ l^{-1}; pH 7.0] supplemented with 1 % methanol (v/v) and the flask was then incubated at 150 r.p.m. for 2 days at 30 °C. An aliquot of 0.5 ml of the turbid suspension was then transferred to fresh medium with 1 % (v/v) methanol and incubated as before. After serial transfers, a small amount of the suspension was spread on an agar-containing methanol plate and incubated at 30 °C for 3 days. From the plate, fast-growing colonies were selected and transferred to fresh plates. After several purification steps, a novel fast-growing strain, MP^T, was obtained. The culture purity of the isolated methylotrophic bacteria was tested by examining colonies and cell suspensions with light and electron microscopes.

The pure culture of strain MP^T was stored in liquid MSM for 10 days, on agar slants at 4 °C for 2 weeks or freeze-dried

 65139 © 2007 IUMS *Printed in Great Britain*

with a protectant (skimmed milk) for over a year. Cell morphology was examined using batch cultures in the late-exponential growth phase. An aliquot of cell suspension was mounted on a Formvar-coated copper grid and stained with 0.2 % (w/v) phosphotungstic acid (pH 7.2). For thin sectioning, cells were collected by centrifugation and pre-fixed with 1.5 % (w/v) glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2) and washed three times with 1 % (w/v) OsO_4 in the same buffer for 3 h at 20 °C. After dehydration in a series of alcohols, the cells were embedded in Spurr epoxy resin and sectioned with a microtome (LKB 2128 Ultratome; LKB). Ultrathin sections were mounted on copper grids and double-strained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963). Negatively stained preparations and thin sections were viewed with a transmission electron microscope (JEM-100B; JEOL) at operating voltages of 60 kV and 80 kV, respectively.

The methods, reagents and media used for phenotypic characterization were as described by Doronina *et al.* (1995). Utilization of a wide range of growth substrates was determined in MSM after cultivation for 2 weeks with methanol replaced by the other carbon compounds (more than 60 were tested). Organic acids, amino acids and methylated amines were added at concentrations of 0.2 % (w/v), while carbohydrates and alcohols were added at concentrations of 0.2–0.5 % (w/v or v/v). To test alternative nitrogen sources, $(NH_4)_2SO_4$ was replaced by other nitrogen compounds. Methane utilization was tested in an atmosphere containing methane and air (1 : 1, v/v) in 700 ml conical flasks containing 100 ml MSM and fitted with rubber stoppers. Hydrogen utilization was tested by the same procedure but under an atmosphere consisting of $H_2/O_2/CO_2$ (7 : 2 : 1, v/v).

Fatty acids were extracted from cell biomass dried by lyophilization. A 200 μl aliquot of a 5.4 M solution of anhydrous HCl in methanol was added to 30 mg of dry biomass and the mixture was heated at 70 °C for 2 h. The methyl esters of fatty acids and aldehyde derivatives obtained were extracted twice with 100 μl hexane. The extract was dried and silylated in 20 μl N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide for 15 min at 65 °C. A 1 μl portion of the reaction mixture was analysed with a GC-MS system (model HP-5985B; Hewlett Packard) equipped with a capillary column (25 × 0.25 mm) consisting of fused quartz containing an Ultra-1 nonpolar methylsilicone phase. The temperature program was run from 150 °C (2 min isotherm) to 250 °C at 5 °C min^{-1} and then from 250 to 300 °C at 10 °C min^{-1}. Data processing was carried out with a computer (HP-1000; Hewlett Packard) by using the standard programs of the GC-MS system (Hewlett Packard). Phospholipid composition of the cells was determined according to previously described methods (Govorukhina & Trotsenko, 1989). Ubiquinones were extracted and purified according to Collins (1985). Analysis of ubiquinones was carried out using a mass spectrometer (MX-1310; Finnigan). Enzyme assays were performed as described previously (Trotsenko *et al.*, 1986; Doronina *et al.*, 1995).

DNA was isolated and purified according to Marmur (1961). The DNA G+C content was determined by using the thermal denaturation (T_m) method with a spectrophotometer (DU-8B; Beckman) at a heating rate of 0.5 °C min^{-1}. DNA G+C content was calculated according to Owen & Lapage (1976) using the equation: mol G+C=(T_m × 2.08)–106.4. The DNA of *Escherichia coli* K-12 was used as the standard. DNA–DNA relatedness was defined by DNA reassociation (Johnson, 1985). *M. marina* ATCC 35842^T, *M. thalassica* ATCC 33146^T and *M. sulfidovorans* LMD 95.210^T were used as the reference strains.

The 16S rRNA gene of the novel strain was amplified and sequenced (Lane, 1991). The 16S rRNA gene sequences determined were aligned against the sequences of representative methylobacteria by using the CLUSTAL program. The position of sequence uncertainties was omitted; in total, 1415 nucleotides were used in the analysis. The phylogenetic relationships were determined by the neighbour-joining method and programs from the TREECON software package (Van de Peer & DeWachter, 1994), by maximum-likelihood using the PUZZLE program (Strimmer & von Haeseler, 1996) and by maximum-parsimony with the DNAPARS program from the PHYLIP package (Felsenstein, 1989) with bootstrap analysis of 100 trees. The sequences were compared with representatives of the class *Gammaproteobacteria*, including recognized methylotrophic species. In preliminary trials, a total of 98 sequences were used and several phylogenetic trees were generated. Phylogenetic analyses that employed different algorithms showed similar results.

Cells of the novel isolate were Gram-negative, non-motile, non-spore-forming rods and 0.2–0.4 × 0.8–1.0 μm in size. Reproduction occurred by binary fission. No internal complex membrane or capsules were observed. When grown on methanol agar medium, colonies were 0.5–1.5 mm in diameter after 3 days at 30 °C and were opaque, milky and raised with a smooth surface with a round edge.

The novel isolate utilized C_1-compounds: methanol, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, dimethylsulfide, DMSO and dimethylformamide (Table 1). Fructose was utilized as a multicarbon source. Strain MP^T could not utilize other sugars, organic acids, amino acids, C_2–C_6 alcohols, nutrient or peptone broth supplemented with 3 % (w/v) NaCl at pH 7.0. It did not grow under gas mixtures of $CO_2/H_2/O_2$ or CH_4/O_2. Nitrate was reduced to nitrite. Hydrolysis of starch was not observed. No cell aggregation and pigmentation occurred in MSM. The novel isolate was catalase- and oxidase-positive. The isolate grew in the presence of 9 % NaCl (optimum 3 % NaCl), over the pH range of 6.0 to 8.0 and over the temperature range of 25 to 32 °C (optimum pH 7.0, optimum temperature 30 °C). No growth occurred at 45 °C. Strain MP^T did not require additional growth factors when grown on methanol and

Table 1. Characteristics of the type strains of species of the genus *Methylophaga*

Taxa: 1, strain MP^T; 2, *M. marina* ATCC 35842^T; 3, *M. thalassica* ATCC 33146^T; 4, *M. sulfidovorans* LMD 95.210^T; 5, *M. alcalica* ATCC BAA-297 ^{T}; 6, '*M. natronica*' VKM B-2288. All taxa are positive for growth on methanol and methylamine. All taxa are negative in tests for utilization of glucose and sucrose. +, Positive; −, negative; ND, not determined.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Requirement for vitamin B_{12}	−	+	+	+	+	+
Motility	−	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	−	−	−	+	+
Growth at:						
37 °C	+	+	+	−	−	+
42 °C	−	−	+	−	−	−
Optimal pH	6.8–7.0	7.0–7.5	7.0–7.5	7.4–7.8	9.0–9.5	ND
Tolerance for NaCl (%)	9	12	12	12	10	10
Utilization of:						
Fructose	+	+	+	−	−	+
Dimethylamine	+	−	−	+	−	−
Trimethylamine	+	−	−	−	−	−
Dimethylsulfide	+	−	−	+	−	−
DMSO	+	ND	ND	ND	ND	ND
Dimethylformamide	+	ND	ND	ND	ND	ND
Major ubiquinone	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8
DNA G+C content (mol%)	44.9	43.0	44.0	42.4	48.3	45.0

the addition of vitamin B_{12} or yeast extract did not stimulate growth.

As seen from Table 2, the predominant cellular fatty acids of the novel isolate were straight-chain saturated $C_{16:0}$ and unsaturated $C_{16:1}\omega7c$ acids. The presence of 3-hydroxy fatty acids was observed, but 2-hydroxy fatty acids were not observed. The novel isolate had a cellular fatty acid composition of type A and was similar to group 11 of the marine methylobacteria (Urakami & Komagata, 1987). Analysis of the cellular phospholipids revealed the presence of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as the dominant phospholipids and phosphatidic acid, phosphatidylserine and cardiolipin (diphosphatidylglycerol) as minor components. The major isoprenoid ubiquinone is Q-8.

Table 2. Cellular fatty acid content of strain MP^T grown on methanol

Fatty acid	Total fatty acids (%)
Straight-chain acids:	
$C_{12:0}$	2.20
$C_{14:0}$	6.51
$C_{14:1}\omega5$	1.01
$C_{15:0}$	1.00
$C_{16:0}$	42.91
$C_{16:1}\omega7c$	35.94
$C_{16:1}\omega5c$	0.15
$C_{17:0}$	0.09
$C_{18:0}$	0.18
$C_{18:1}\omega7$	2.38
Cyclopropane acids:	
$C_{17:0}$ cyclo	7.39
$C_{19:0}$ cyclo	−
Hydroxy acids:	
3-OH $C_{10:0}$	0.12
3-OH $C_{15:0}$	0.14

The enzyme profiles of methanol- or methylamine-grown cells indicated that the novel isolate oxidized methanol to formaldehyde by an inducible pyrroloquinoline quinone (PQQ)-linked methanol dehydrogenase (Table 3). Methylamine dehydrogenase PQQ was present in methylamine-grown cells. Formaldehyde and formate dehydrogenases were active with phenazine methosulfate (PMS) while NAD^+-dependent activities were absent. Formaldehyde assimilation occurred via the RuMP cycle (Entner–Doudoroff variant), as confirmed by the presence of 3-hexulosephosphate synthase and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenases were active with both NAD^+ and $NADP^+$. Rather high levels of these enzymes indicated the preferential oxidation of formaldehyde to CO_2 via the dissimilatory hexulosephosphate cycle which provided the methylotroph with the reduced equivalents and energy for biosynthesis. However, we could not rule out the same potential role of the tetrahydromethanopterin (H_4MPT)-dependent oxidation pathway in formaldehyde dissimilation in the novel isolate because high activities of methenyl H_4MPT cyclohydrolase

Table 3. Enzymic activities in cell extracts of strain MP^T grown with methanol or methylamine

GSH, Reduced glutathione; PMS, phenazine methosulfate; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate.

Enzyme (co-factors)	Enzyme activity [nmol min^{-1} (mg protein)$^{-1}$]	
	Methanol	Methylamine
Methanol dehydrogenase (PMS)	61	0
Methylamine dehydrogenase (PMS)	0	47
Formaldehyde dehydrogenase (PMS)	25	19
Formaldehyde dehydrogenase (NAD$^+$, GSH)	0	0
Formate dehydrogenase (PMS)	64	57
Formate dehydrogenase (NAD$^+$)	0	0
3-Hexulosephosphate synthase	194	171
Hydroxypyruvate reductase (NADH, NADPH)	0	0
Serine glyoxylate aminotransferase (NADH, NADPH)	0	0
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	0	0
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD$^+$)	163	125
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP$^+$)	632	583
6-Phosphogluconate dehydrogenase (NAD$^+$)	23	21
6-Phosphogluconate dehydrogenase (NADP$^+$)	25	24
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0	0
KDPG aldolase	137	119
α-Ketoglutarate dehydrogenase	0	0
Isocitrate dehydrogenase (NAD$^+$)	134	95
Isocitrate dehydrogenase (NADP$^+$)	38	33
Isocitrate lyase	0	0
Malate synthase	0	0
Glutamate dehydrogenase (NADH)	44	39
Glutamate dehydrogenase (NADPH)	23	20
Glutamate synthase (NADPH)	57	51
Glutamine synthetase (ATP, Mn)	110	102

and NAD(P)-dependent methylene H_4MPT dehydrogenases are found in *Methylobacillus flagellatus* KT^T (Vorholt *et al.*, 1999).

The absence of the serine pathway-specific enzymes (hydroxypyruvate reductase and serine glyoxylate transaminase) and the ribulose bisphosphate pathway enzymes (ribulose bisphosphate carboxylase) enabled these pathways to be discounted from operating in the methylotroph studied.

The tricarboxylic acid cycle was deficient in α-ketoglutarate dehydrogenase activity. The absence of isocitrate lyase and malate synthase activities indicated a non-functional glyoxylate shunt in the novel isolate. Primary ammonia assimilation occurred by reductive amination of α-ketoglutarate to glutamate and via the glutamate cycle (GS/GOGAT system).

The DNA G+C content of strain MP^T was estimated via T_m as 44.9 mol% (Table 1). The level of DNA–DNA relatedness between the novel isolate and reference strains of the genus *Methylophaga* (*M. marina* ATCC 35842^T, *M. thalassica* ATCC 33146^T and *M. sulfidovorans* LMD 95.210^T) did not exceed 25–42 %, consistent with the assignment of the novel strain to a separate species of the genus *Methylophaga*. According to 16S rRNA gene sequence analysis, strain MP^T had gene sequence similarity of 96–98 % with *M. marina*, *M. thalassica* and *M. sulfidovorans*.

In the phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequences (Fig. 1), strain MP^T consistently branched together with the cluster of species within the genus *Methylophaga* within the class *Gammaproteobacteria*. The relatively high level of 16S rRNA gene sequence identity (94–98 %) between strain MP^T and members of the genus *Methylophaga* indicated their close relationship. Thus, phenotypic and genotypic data allow the separation of strain MP^T as a distinct genospecies of the genus *Methylophaga*. Consequently, strain MP^T is classified as the type strain of a novel species of the genus *Methylophaga*, *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov.

Description of *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov.

Methylophaga aminisulfidivorans (am.i.ni′sul.fi.di′vo.rans. N.L. n. *aminum* the amine group; N.L. n. *sulfidum* sulfide; L. v. *voro* to devour; N.L. part. adj. *aminisulfidivorans* amine-sulfide-devouring, amine-sulfide-utilizing).

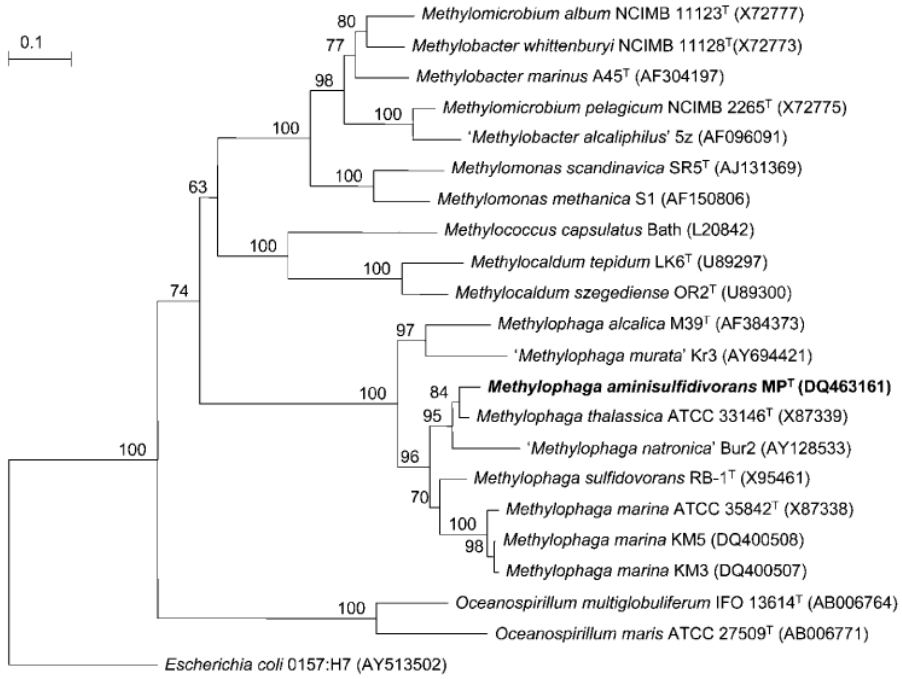


Fig. 1. 16S rRNA gene sequence-based dendrogram showing the phylogenetic position of *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov. MP^T among methylotrophs of the class *Gammaproteobacteria*. Numbers at the branch points are bootstrap values from 100 replicates. Bar, 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

Cells are Gram-negative rods, 0.8–1.2 μm in length and 0.2–0.4 μm in diameter. Colonies on mineral salts/methanol agar are white to slightly cream and 1–2 mm in diameter. Non-motile, strictly aerobic and does not require vitamin B_{12}. Moderately halophilic. Able to grow at 20–37 °C, at pH 6.0–8.0 on MSM with 1.5–9 % (w/v) NaCl. Optimal growth takes place at 30 °C, pH 6.8–7.0 and 3 % NaCl. Catalase- and oxidase-positive. Reduces nitrate to nitrite. Restricted facultative methylotroph that utilizes methanol, monomethylamine, dimethylamine, trimethylamine, dimethylsulfide, DMSO, dimethylformamide and fructose. Utilizes C_1-compounds via the RuMP pathway. Does not grow on peptone-yeast extract medium with or without NaCl. The prevailing cellular fatty acids are $C_{16:0}$ and $C_{16:1}$. The major ubiquinone is Q-8. DNA G+C content is 44.9 mol%.

The type strain, MP^T (=KCTC 12909^T=VKM B-2441^T=JCM 14647^T), was isolated from a seawater sample collected from Mokpo, South Korea.

Acknowledgements

This work was supported by the Marine and Extreme Genome Research Center Program, Ministry of Marine Affairs and Fisheries, Republic of Korea. This work was also supported by the Regional Technology Innovation Program of the Ministry of Commerce, Industry and Energy (MOCIE), Republic of Korea (Grant No. RTI-04-03-03).

References

Collins, M. D. (1985). Analysis of isoprenoid quinones. *Methods Microbiol* **18**, 329–366.

De Zwart, J. M. M., Nelisse, P. N. & Kuenen, J. G. (1996). Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol* **20**, 261–270.

Doronina, N. V., Braus-Stromeyer, S. A., Leisinger, T. & Trotsenko, Y. A. (1995). Isolation and characterization of a new facultatively methylotrophic bacterium: description of *Methylorhabdus multivorans*, gen. nov., sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **18**, 92–98.

Doronina, N. V., Darmaeva, Ts. D. & Trotsenko, Y. A. (2003a). *Methylophaga alcalica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from the East Mongolian saline soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 223–229.

Doronina, N. V., Darmaeva, T. D. & Trotsenko, Y. A. (2003b). *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikal region. *Syst Appl Microbiol* **26**, 382–389.

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**, 164–166.

Govorukhina, N. I. & Trotsenko, Y. A. (1989). Phospholipid composition of methylotrophic bacteria. *Mikrobiologiya* **58**, 318–323 (English translation).

Janvier, M., Frehel, C., Grimont, F. & Gasser, F. (1985). *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs. *Int J Syst Bacteriol* **35**, 131–139.

Johnson, J. L. (1985). DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. *Methods Microbiol* **28**, 33–74.

Lane, D. S. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics,* pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons.

Li, T. D., Doronina, N. V., Ivanova, E. G. & Trotsenko, Y. A. (2007). B_{12}-independent strains of *Methylophaga marina* from Red Sea algae. *Mikrobiologiya* **76**, 18–23 (English translation).

Marmur, J. A. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**, 208–218.

Owen, R. J. & Lapage, S. P. (1976). The thermal denaturation of partly purified bacterial deoxyribonucleic acid and its taxonomic applications. *J Appl Bacteriol* **41**, 335–340.

Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208–219.

Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1996). Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol* **13**, 964–969.

Trotsenko, Y. A., Doronina, N. V. & Govorukhina, N. I. (1986). Metabolism of non-motile obligately methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **3**, 293–297.

Urakami, T. & Komagata, K. (1987). Characterization of species of marine methylotrophs of the genus *Methylophaga*. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 402–406.

Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* **10**, 569–570.

Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Stolyar, S. M., Thauer, R. K. & Lidstrom, M. E. (1999). Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyltetrahydromethanopterine cyclohydrolases. *J Bacteriol* **181**, 5750–5757.

Biotechnology and Bioprocess Engineering **2006**, 11: 134-139 ©KSBB

Purification and Characterization of a Methanol Dehydrogenase Derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 Cultivated Using a Compulsory Circulation Diffusion System

Hee Gon Kim[1] and Si Wouk Kim[1,2]*

[1] Department of Biomaterials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[2] Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract Methanotrophs are microorganisms that possess the unique ability to utilize methane as their sole source of carbon and energy. A novel culture system, known as the compulsory circulation diffusion system, was developed for rapid growth of methanotrophic bacteria. Methanol dehydrogenase (MDH, EC 1.1.99.8) from *Methylomicrobium* sp. HG-1, which belongs to the type I group of methanotrophic bacteria, can catalyze the oxidation of methanol directly into formaldehyde. This enzyme was purified 8-fold to electrophoretic homogeneity by means of a 4 step procedure and was found in the soluble fraction. The relative molecular weight of the native enzyme was estimated by gel filtration to be 120 kDa. The enzyme consisted of two identical dimers which, in turn, consisted of large and small subunits in an $\alpha_2\beta_2$ conformation. The isoelectric point was 5.4. The enzymatic activity of purified MDH was optimum at pH 9.0 and 60°C, and remained stable at that temperature for 20 min. MDH was able to oxidize primary alcohols from methanol to octanol and formaldehyde.

Keywords: methanol dehydrogenase, *Methylomicrobium* sp. HG-1, methanotrophic bacteria

INTRODUCTION

Methane plays an important role in global warming, and its atmospheric concentration has been increasing over many decades [1,2]. Methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) are widespread in nature and are considered important regulators of atmospheric methane fluxes in nature [3,4]. Methanotrophs possess the unique ability to utilize methane as their sole source of carbon and energy. These aerobic bacteria convert methane to methanol in the presence of methane monooxygenase in the first step of their metabolic pathway. The current classification system separates all known methanotrophs into 3 groups –types I, II, and X– on the basis of multiple criteria, including cell morphology, the arrangement of intracytoplasmic membranes, the pathway for formaldehyde assimilation, the guanine plus cytosine content of the DNA, and major cellular fatty acid profiles [2].

Methanol dehydrogenase (MDH) is an enzyme responsible for the oxidation of methanol to formaldehyde, which is assimilated into the cellular biomass or oxidized further to CO_2 to provide the reducing power needed for biosynthesis. *In vitro* MDH is coupled to the electron transport chain at the level of cytochrome *c* [5-9]. When prepared aerobically, this coupling is irreversibly destroyed. As a result, MDH requires ammonium salt to be activated (this can be replaced by methylamine, but not by di- or trimethylamine) [10]. Most of the MDH enzymes that have been described, especially those derived from facultative or obligate methylotrophic bacteria, are very similar in their molecular and biochemical properties, with exceptions in those derived from several gram-positive and thermotolerant bacteria [11].

The oxidation of methanol is usually catalyzed by a MDH that was originally described in *Pseudomonas* M27 [12]. This enzyme is found in large amounts especially in organisms that grow on one-carbon compounds (*e.g.*, methane and methanol) and is known for its relatively broad spectrum of substrate specificity [13]. MDH has pyrroloquinoline quinone as a prosthetic group and cytochrome c_L as its primary electron acceptor.

MDH has been characterized in several methanotrophs [14,15]. *Methylomicrobium* sp. HG-1 is a type I novel obligate methane-oxidizing bacterium that was isolated from the effluent of manure by this lab. In this study, we describe a novel culture system for the rapid growth of methanotrophic bacteria and purification as well as some of the biochemical and molecular properties of MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1.

***Corresponding author**
Tel: +82-62-230-6649 Fax: +82-62-225-6040
e-mail: swkim@chosun.ac.kr

MATERIALS AND METHODS

Microorganism, Medium, and Cultivation

Methylomicrobium sp. HG-1 was isolated from the effluent of manure distributed at Goksung, Jeon-Nam, South Korea. The modified nitrate-mineral-salt (NMS) medium [13,16] with 1 μM copper ions was used for cultivation. Cells were cultured in a 500 mL Erlenmeyer flask, containing 50 mL of the medium and covered with a gas tight seal. The head space in the flask was displaced with a methane mixture (methane:air = 1:1, v/v), that was used as the sole source of carbon and energy for cell growth. Cultivation was carried out in the 30°C incubator. The pre-cultured cells were inoculated into a 5 L Erlenmeyer flask containing 3 L of the medium, and gas mixture contained in a separated reservoir was supplied to the flask (Fig. 1A). As soon as a fresh methane mixture in a gas bag was injected into the gas reservoir, it was transferred to the flask through an air filter using an air bubbler. The mixture dispersed evenly in the NMS medium by continuous stirring and was consumed by the bacteria. Part of methane mixture was fed back to the gas reservoir and recirculated into the flask until the fresh gas mixture in the gas bag was consumed completely. This compulsory gas circulation system, which was developed in this laboratory, was very effective in cultivating methanotrophic bacteria.

Enzyme Purification

All purification procedures were carried out at 4°C. Cells were harvested when the optical density of the culture reached 1.0 at 600 nm. Harvested cells were washed with 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, standard buffer) and disrupted by 2 passes through a French Pressure Cell (SLM Instruments, USA). Cellular debris was removed by centrifugation at 15,000 × g for 15 min and, when necessary, the membrane fraction was removed by further centrifugation at 100,000 × g for 60 min [17,18].

The soluble fraction was concentrated with Centricon (Millipore, Billerica, Mass, USA) and applied to a POROS 20 HQ column equilibrated with standard buffer. After elution with a standard buffer, bound MDH was released along a linear gradient of 0 to 1 M NaCl dissolved in standard buffer. Active fractions were pooled, concentrated, and applied to a FPLC Superose 12 HR 10/30 column that had been equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl. The purity of the MDH was determined by 15% SDS-PAGE.

Enzyme Assay

The protein concentration was determined using the Bradford method [19], with bovine serum albumin (BSA) used as a standard. MDH activity was assayed photometrically at 30°C using a two-dye linked assay system, phenazine ethosulfate (PES) was used as an artificial electron acceptor, and 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) as a terminal acceptor. The reaction mixture (3 mL) contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 13.4 mM methanol, 1.1 mM PES, 0.04 mM DCPIP, 1 mM KCN and 15 mM NH_4Cl. Reactions were initiated by adding MDH, and the reduction of DCPIP was measured by the decrease in absorbance at 600 nm [20]. One unit was defined as the amount of enzyme needed to catalyze the reduction of DCPIP at a rate of 1 mol/ min.

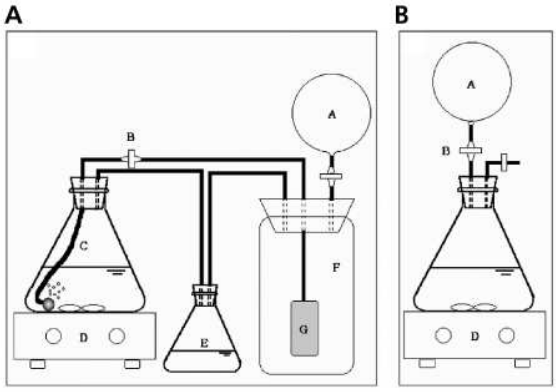


Fig. 1. Schematic diagram of cultivation system for methanotrophic bacteria. (A) Compulsory gas circulation diffusion system, which was developed in this lab. (B) Simple diffusion system. A, gas bag; B, 0.2 μm pore size air filter; C, bioreactor; D, stirrer; E, water trap; F, gas reservoir; G, air bubbler.

Analysis of MDH

The molecular weight of the native MDH was determined by gel filtration on a Sephacryl S200 column using the following standard proteins: β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and cytochrome *c* (12.4 kDa). The molecular weight of the subunit was determined by SDS-PAGE using 15% polyacrylamide gels, as described by Laemmli [21].

Native 8% polyacrylamide gel was used to determine the activity staining of purified MDH. After electrophoresis, the gel was stained with an active staining solution that contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 13.4 mM methanol, 1.1 mM PES, 0.04 mM nitro blue tetrazolium, 1 mM KCN and 15 mM NH_4Cl.

The isoelectric point for MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 was determined by native isoelectric focusing [22]. The MDH was visualized by active staining.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of a Novel Culture System on Cell Growth

The novel culture system developed in this laboratory is summarized in Fig. 1A. As described in the Materials and Methods section of this article, a methane mixture that was kept in a separate reservoir was supplied com-

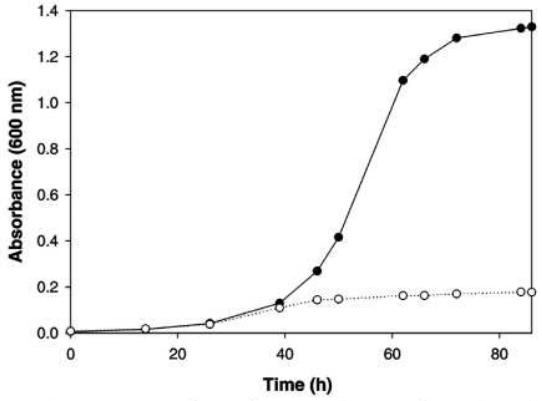


Fig. 2. Comparison of specific growth rates for each culture system. Symbols: ●, compulsory gas circulation diffusion system; ○, simple diffusion system.

pulsorily to the flask using an air bubbler. Because methane solubility in water is poor, the concentration of methane in the medium acts as a limiting factor for cell growth. Compared with the conventional simple diffusion culture system (Fig. 1B), a compulsory circulation diffusion system is better able to increase methane solubility. We found that cells growing in the compulsory circulation diffusion system demonstrated higher optical density than those growing in the simple diffusion culture system (Fig. 2). The growth rate (μ) and doubling time (D_T) of cells in the simple diffusion culture system were 0.067 h^{-1} and 14.9 h, respectively, compared with 0.127 h^{-1} and 7.9 h, respectively, for cells in the compulsory circulation diffusion system. This suggests that our compulsory circulation diffusion system is very effective in cultivating bacteria growing on methane.

Purification of MDH

After *Methylomicrobium* sp. HG-1 cells were disrupted, more than 95% of MDH activity was found exclusively in the soluble fraction and only a trace of MDH was detected in the membrane fraction. This observation differed from that seen with MDH derived from the type I methanotrophic bacterium, *Methylocystis* sp. GB25 [14]. It has been known that after cell disruption, MDH derived from type II methanotrophs appears mostly in the soluble fraction [15,23], however, in the type I and type X methanotroph, MDH activity was found both in the soluble and particulate fractions in nearly equal amounts [24]. Although *Methylomicrobium* sp. HG-1 is a type I obligate methanotroph, MDH was found only in its soluble fraction. It has been suggested that the MDH in methylotrophs is a peripheral membrane protein localized to the periplasmic face of the membrane [25-28]. Methanotrophs are distinguished from other methylotrophs by the presence of an intracytoplasmic membrane (ICM). MDH has been found in both the soluble and particulate fractions of the methanotroph [24,29]. The formation of an ICM in a methanotroph is dependent on its growth conditions [30-33]. It has been suggested that the ICM is continuous with the cytoplasmic membrane [34-36] and that this continuity further implies continuity between the periplasm and intra-ICM space.

Copper is known to be important in the formation of ICMs. High copper concentrations are essential for the formation of extensive ICMs, and copper is thought to play an active role at both the catalytic site and along the electron transport chain [37,38]. *Methylomicrobium* sp. HG-1 also required copper for growth. As the copper concentration increased, the formation of ICM in cell increased remarkably. When the cells were grown on a medium containing 1 μM copper, 99% of the MDH activity was found in the soluble fraction. By comparison, when the cells were grown in a medium containing 50 μM copper, 10% of the MDH activity was detected in the membrane fraction. This indicates that the distribution of MDH is dependent on the formation of ICM. MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 is detected only in the soluble fraction; authentic MDH is bound loosely to the cytoplasmic membrane and ICM, but it was released into the soluble fraction when the cells were forcefully disrupted through French pressure. Moreover, the cells needed for MDH purification were cultivated in the 1 μM copper containing medium, because the cells grown in the presence of a high copper concentration were not easily disrupted (data not shown).

The steps involved in the purification of MDH are summarized in Table 1. MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 was purified about 8-fold through a 4 step process, with a yield of 17.6% and specific activity of 4.21 units/mg protein. An electrophoretically homogeneous preparation was obtained during the final purification on a Superose 12 HR 10/30 column. Purified MDH, dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), lost 20% of its activity during 24 h of exposure to air at 4°C.

Table 1. Purification of MDH from *Methylomicrobium* sp. HG-1

	Total protein (mg)	Total activity[a] (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Cell free extracts	205.8	109.6	0.53	1.0	100.0
Soluble fraction	143.1	97.6	0.66	1.2	89.0
POROS 20 HQ	21.4	64.5	3.01	5.6	58.8
Sephacryl S200	4.6	19.3	4.21	7.9	17.6

[a] One unit is the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 μmol DCPIP per minute. Enzyme activity represents the mean of 3 independent experiments.

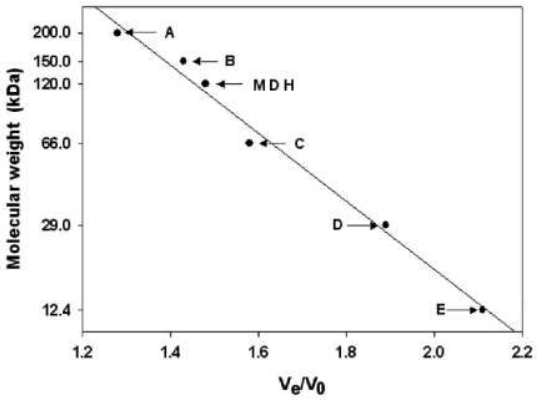


Fig. 3. Determination of the molecular mass of MDH by gel filtration on a Sephacryl S200 column using the following standard proteins: β-amylase (200 kDa); B, alcohol dehydrogenase (150 kDa); C, bovine serum albumin (66 kDa); D, carbonic anhydrase (29 kDa); E, cytochrome *c* (12.4 kDa).

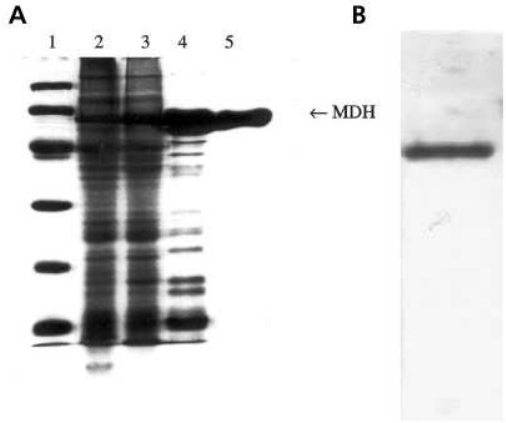


Fig. 4. (A) SDS-PAGE of MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1. Lane 1, molecular size marker; lane 2, cell free extract; lane 3, soluble fraction; lane 4, POROS 20 HQ column; lane 5, MDH purified through the Sephacryl S200 column. (B) Activity staining of MDH.

Molecular Mass and Isoelectric Point

The molecular mass of the MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 was estimated to be 120 kDa (Fig. 3). This enzyme consists of two identical subunits with a molecular weight of 62 kDa each (Fig. 4A). It has been suggested that the MDH derived from methylotroph has an $\alpha_2\beta_2$ conformation, which indicates that they consist of two large (60 kDa) and two small (10 kDa) subunits [39]. However several MDHs derived from methanotrophs, such as *Methylosinus trichosporium* OB3b [40], *Methylocystis* sp. GB25 [14], *Methylomonas methanica* [41], and *Methylosinus sporium* [23], consisted of only two identical large subunits, although the molecular masses are slightly different. An analysis of methanol oxidation genes (*mxaFJGI* genes) in the *Methylomonas* sp. strain A4, a type I marine methanotroph, showed that its MDH has an $\alpha_2\beta_2$ conformation and that it consists of two different subunits with a molecular weight of 59 kDa (*mxaF*) and 12 kDa (*mxaI*) [42]. Similarly, a genetic analysis of the MDH derived from our isolate showed that it also has an $\alpha_2\beta_2$ conformation and consists of two different subunits with molecular weights of 62 and 10 kDa (GenBank No. DQ463162). Consequently, it is assumed that the MDHs of methanotroph have an $\alpha_2\beta_2$ conformation, although the small subunit was not detected by SDS-PAGE or gel chromatography. The results of activity staining of purified MDH are shown in Fig. 4B. The isoelectric point was 5.4.

Substrate Specificity

Purified MDH showed broad substrate specificity with primary alcohols and aldehydes (Table 2). Similar to the MDH derived from *Methylocystis* sp. GB25, the activity of MDH of *Methylomicrobium* sp. HG-1 decreased as the number of carbons in the alcohol increased; however, it showed relatively high activity with hexanol and heptanol among the alcohols tested in this study. Unfortunately it was very difficult to obtain a real value for MDH activity with primary alcohols with longer carbon chains, because those alcohols could not be solubilized sufficiently in the enzyme reaction mixture before the assay was carried out. Sometimes a period of vigorous shaking is required to ensure complete solubilization. Similar to other MDHs, the MDH of *Methylomicrobium* sp. HG-1 showed high activity with formaldehyde, but low affinity with acetaldehyde [14].

Table 2. Substrate specificity of MDH derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1

Substrate	Relative activity[a] (%)	*Km* (mM)
Methanol	100.00	0.81
Ethanol	85.13	5.73
Propanol	59.93	184.0
Butanol	49.13	186.0
Pentanol	67.40	172.0
Hexanol	94.10	162.0
Heptanol	101.88	80.78
Octanol	16.33	ND[b]
Formaldehyde	73.24	ND
Acetaldehyde	7.06	ND

[a] Activity in the presence of methanol was assumed to be 100%.
[b] Not determined.

Effect of Temperature and pH

The optimum temperature was determined in a 100 mM Tris-HCl buffer. MDH activity was highest at 60°C. After a 60 min incubation period at a temperature below 60°C, more than 70% of enzyme activity remained. The

Table 3. Effect of divalent cations on MDH activity

	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100.00
Zn^{2+}	1.0	77.16
Mg^{2+}	1.0	90.16
Ca^{2+}	1.0	81.89
Fe^{2+}	0.1	93.59
Co^{2+}	0.1	92.50
Cu^{2+}	0.1	80.16
Mn^{2+}	0.1	0.00
EDTA	0.1	110.59

effect of pH on MDH activity was tested in the range of pH 7.0 to 10. The optimum pH was found to be 9.0.

Effect of Divalent Cations

The effect of divalent cations on MDH activity is shown in Table 3. As indicated, 1 mM of Zn^{2+}, Mg^{2+}, and Ca^{2+} did not affect MDH activity significantly, whereas the same concentrations of Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, and Mn^{2+} inhibited completely. The inhibitory effects of these cations at a lower concentration are shown in Table 3. MDH is not inhibited by metal chelating agents such as EDTA. It is well known that most MDH activity, while strongly inhibited by EDTA *in vivo*, is not inhibited by EDTA when phenazine methosulfate is used for electron transfer [10]. This may be due to the functional coupling of MDH with the electron transport chain at the level of cytochrome *c in vivo* [14].

Acknowledgements This work was supported by grant No. RTI-04-03-03 (BPF-2004- S-1-5[A]) from the Regional Technology Innovation Program of the Ministry of Commerce, Industry and Energy (MOCIE).

REFERENCES

[1] Whittenbury, R., K. C. Phillips, and J. P. Wilkinson (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.

[2] Hanson, R. S. and T. E. Hanson (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-437.

[3] Reeburgh, W. S., S. C. Whalen, and M. J. Alperin (1993) The role of methylotrophy in the global methane budget. pp. 1-14. In: J. C. Murrell and D. P. Kelly (eds.). *Microbial Growth on C_1 Compounds*. intercept. Andover, United Kingdom.

[4] Mancinelli, R. L. (1995) The regulation of methane in soil. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 581-605.

[5] Duine, J. A., J. Frank, and J. Westerling (1978) Purification and properteis of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. *Biochem. Biophys. Acta.* 524: 277-287.

[6] Duine, J. A., J. Frank, and L. G. De Ruiter (1979) Isolation of a methanol dehydrogenase with a functional coupling to cytochrome *c*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 523-526.

[7] Dispirito, A. A. (1990) Soluble cytochromes *c* from *Methylomonas* A4. *Meth. Enzymol*. 188: 289-297.

[8] Kim S. W., Y. T. Tae, and Y. M. Kim (1991) Methanol dehydrogenase of an obiligate methanotroph, *Methylobacillus* sp. strain SK1. *Mol. Cells*. 19: 407-413.

[9] Koh, M. J., C. S. Kim, Y. A. Kim, H. S. Choi, E. H. Cho, E. B. Kim, Y. M. Kim, and S. W. Kim (2002) Properties of electron carriers in the process of methanol oxidation in a new restricted facultative marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga* sp. MP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 476-482.

[10] Anthony, C. (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microbial. Physiol.* 27: 113-210.

[11] Arfman, N. and L. Dukhuizen (1990) Methanol dehydrogenase from thermotolerant methylotroph *Bacillus* C1. *Meth. Enzymol*. 188: 223-226.

[12] Anthony, C. and L. J. Zatman (1964) The microbial oxidation of methanol. Purification and properties of methanol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* 92: 614-621.

[13] Higgins, I. J., D. J. Best, R. C. Hammond, and D. Scott (1981) Methane-oxidizing microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45: 556-590.

[14] Grosse, S., K. D. Wendlandt, and H. P. Kleber (1997) Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylocystis* sp. GB 25. *J. Basic Microbiol.* 37: 269-279.

[15] Grosse, S., C. Voigt, K. D. Wendlandt, and H. P. Kleber (1998) Purification and properteis of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14. *J. Basic Microbiol.* 38: 189-196.

[16] Kim, H., H. J. Eom, J. Lee, J. Han, and N. S. Han (2004) Statistical optimization of medium composition for growth of *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 278-284.

[17] Lee, J. H., M. H. Choi, J. Y. Park, H. K. Kang, H. W. Ryu, C. S. Sunwo, Y. J. Wee, K. D. Park, D. W. Kim, and D. Kim (2004) Cloning and characterization of the lactate dehydrogenase genes from *Lactobacillus* sp. RKY2. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 9: 318-322.

[18] Lee, Y. J., J. H. Kim, H. K. Kim, and J. S. Lee (2004) Production and characterization of keratinase from *Paracoccus* sp. WJ-98. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 9: 17-22.

[19] Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.

[20] Anthony, C. and L. J. Zatman (1964) The microbial oxidation of methanol. 2. The methanol oxidizing enzyme of *Psudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* 92: 614-621.

[21] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

[22] O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

[23] Patel, R. N. and A. Felix (1976) Microbial oxidation of methane and methanol: Crystallization and properties of

methanol dehydrogenase from *Methylosinus sporium*. *J. Bacteriol.* 128: 413-414.

[24] Wadzinski, A. M. and D. W. Ribbons (1974) Oxidation of C_1 compounds by particulate fractions from *Methylococcus capsulatus*: Properties of methanol oxidase and methanol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 122: 1364-1374.

[25] Alefounder, P. R. and S. J. Ferguson (1981) A periplasmic location for the methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*: implications for proton pumping by cytochrome *aa3*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 778-784.

[26] Jones, C. W., S. A. Kingsbury, and M. J. Dawson (1982) The partial resolution and dye-mediated reconstitution of methanol oxidase in *Methylophilus methylotrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13: 195-200.

[27] Kasprzak, A. A. and D. J. Steenkamp (1983) Localization of the major dehydrogenases in two methylotrophs by radiochemical labeling. *J. Bacteriol.* 156: 348-353.

[28] Fassel, T. A., L. A. Buchholz, M. L. Collins, and C. C. Remsen (1992) Localization of methanol dehydrogenase in two strains of methylotrophic bacteria detected by immunogold labelling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2302-2307.

[29] Ferenci, T., T. Stom, and J. R. Quayle (1975) Oxidation of carbon monoxide and methane by *Pseudomonas methanica*. *J. Gen. Microbiol.* 91: 79-91.

[30] Takeda, K. and K. Tanaka (1980) Ultrastructure of intracytoplasmic membranes of *Methanomonas margaritae* cells grown under different conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 46: 15-25.

[31] Scott, D., J. Brannan, and I. J. Higgins (1981) The effect of growth conditions on intracytoplasmic membranes and methane mono-oxygenase activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Gen. Microbiol.* 125: 63-72.

[32] Prior, S. D. and H. Dalton (1985) The effect of copper ions on membrane content and methane monoxygenase activity in methanol-grown cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* 131: 155-163.

[33] Collins, M. L. P., L. A. Buchholz, and C. C. Remsen (1991) The effect of copper on *Methylomonas Albus* BG8. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1261-1264.

[34] Best, D. and I. J. Higgins (1981) Methane-oxidizing activity and membrane morphology in a methanol-grown obligate methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Gen. Microbiol.* 125: 73-84.

[35] DeBoer, W. E. and W. Hazeu (1972) Observation on the fine structure of a methane-oxidizing bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* 38: 33-47.

[36] Suzina, N. E., V. V. Dmitriev, E. V. Chetina, and B. A. Fikhte (1984) Cytobiochemical features of methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya*. 53: 257-260.

[37] Semrau, J. C., D. Zolandz, M. E. Lidstrom, and S. I. Chan (1995) The role of copper in the pMMO of *Methylococcus capsulatus* bath: A structural vs. catalytic function. *J. Inorg. Biochem.* 58: 235-244.

[38] Basu, P., B. Katterle, K. K. Andersson, and H. Dalton (2003) The membrane-associated form of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem. J.* 369: 417-427.

[39] Nunn, D. N., D. Day, and C. Anthony (1989) The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochem. J.* 260: 857-862.

[40] Parker, M. W., A. Cornish, V. Gossain, and D. J. Best (1987) Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction characterization of methanol dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Eur. J. Biochem.* 164: 223-227.

[41] Patel, R. N., C. T. Hou, and A. Felix (1978) Microbial oxidation of methane and methanol: Crystalization of methanol dehydrogenase and properties of holo- and apomethanol dehydrogenase from *Methylomonas methanica*. *J. Bacteriol.* 133: 641-649.

[42] Waechter-Brulla, D., A. A. Dispirito, L. V. Christoserdova, and M. E. Lisdstrom (1993) Methanol oxidation genes in the marine *Methylomonas* sp. strain A4. *J. Bacteriol.* 175: 3767-3775.

[Received December 28, 2005; accepted March 31, 2006]

Biotechnology and Bioprocess Engineering **2006**, 11: 337-343 ©KSBB

Purification, Characterization, and Cloning of Trimethylamine Dehydrogenase from *Methylophaga* sp. Strain SK1

Hee Gon Kim[1], Yan Kim[1], Heon Man Lim[2], Hyun-Jae Shin[3], and Si Wouk Kim[1,4]*

[1] Department of Biomaterials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[2] Department of Biology, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea
[3] Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[4] Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract Trimethylamine dehydrogenase (TMADH, EC 1.5.99.7), an iron-sulfur flavoprotein that catalyzes the oxidative demethylation of trimethylamine to form dimethylamine and formaldehyde, was purified from *Methylophaga* sp. strain SK1. The active TMADH was purified 12.3-fold through three purification steps. The optimal pH and temperature for enzyme activity was determined to be 8.5 and 55°C, respectively. The V_{max} and K_m values were 7.9 nmol/min/mg protein and 1.5 mM. A genomic DNA of 2,983 bp from *Methylophaga* sp. strain SK1 was cloned, and DNA sequencing revealed the open reading frame (ORF) of the gene coding for TMADH. The ORF contained 728 amino acids with extensive identity (82%) to that of *Methylophilus methylotrophus* W_3A_1.

Keywords: trimethylamine, trimethylamine dehydrogenase, *tmd* gene, *Methylophaga* sp. strain SK1

INTRODUCTION

Trimethylamine is toxic to animals including humans because of its tissue-corrosive and tissue-penetrative properties. Trimethylamine has also been shown to inhibit the synthesis of macromolecules such as DNA, RNA, and proteins, and to have teratogenic effects on animal embryos [1]. Elimination of trimethylamine from contaminated environments by using microorganisms, therefore, would be beneficial to mankind. Methylotrophic bacteria are a group of microbes that can grow aerobically on compounds that contain one or more carbon atoms, but not compounds having carbon to carbon bonds. Obligate methylotrophs will grow only on C_1 compounds, whereas facultative methylotrophs are able to grow on a variety of multicarbon substrates.

Three different enzymes capable of oxidizing trimethylamine have been identified in methylotrophs. The majority of methylotrophs that use trimethylamine as a sole carbon source utilize trimethylamine monooxygenase to generate trimethylamine-*N*-oxide, which is subsequently converted to dimethylamine and formaldehyde by trimethlyamine-*N*-oxide demethylase catalysis [2,3]. In obligate methylotrophs and in some restricted facultative methylotrophs, however, trimethylamine is oxidized by a nicotinamide-independent trimethylamine dehydrogenase (TMADH, EC 1.5.99.7) [2]. TMADH is a complex iron-sulfur flavoprotein enzyme that transfers electrons to a soluble flavoprotein known as electron transferring flavoprotein [4]. In one case, a nicotinamide-dependent TMADH has been reported [5]. Since Colby and Zatman first purified the nicotinamide-independent TMADH [6], this enzyme, obtained from *Methylophilus methylotrophus* W_3A_1, has been extensively studied. The TMADH is composed of two identical 83,000-dalton subunits, each of which folds into three different structural domains [7]. The largest domain, at the NH_2 terminus of the molecule, is folded as an eight-stranded parallel α/β barrel and contains the [4Fe-4S] and covalently bound FMN cofactors [8]. The medium and smaller domains bear a striking resemblance to the FAD and NADPH-binding domains of glutathione reductase.

We have isolated a novel marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga* sp. strain SK1, from seawater obtained near Mokpo, Korea [9]. This bacterial strain could be cultivated aerobically in a media containing trimethylamine as a source of carbon and energy and interestingly could also grow on methanol, monomethylamine, dimethylamine, dimethyl sulfide, glucose, and fructose (a restricted facultative methylotroph) substrates. In this study, we report on the purification and characterization of TMADH from *Methylophaga* sp. strain SK1 in our efforts to develop a biosensor that detects trimethylamine generated from decaying fishes. We also report on our cloning of the gene for the enzyme and the function of the gene.

***Corresponding author**
Tel: +82-62-230-6649 Fax: +82-62-225-6040
e-mail: swkim@chosun.ac.kr

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, Medium, and Culture Conditions

Methylophaga sp. strain SK1 was cultivated on an artificial seawater medium [9] containing 0.45% (w/v) trimethylamine HCl as carbon and energy sources. The pre-cultured cells were inoculated into a 100 L fermentor (KF-100L, KoBioTech, Korea) containing 70 L of medium. Cells were incubated at 30°C and aerated by continuous air flow (35 L/min). Cells from the late exponential growth phase were harvested by centrifugation at 10,000 × g, washed with 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, standard buffer), and kept frozen at –80°C. *E. coli* DH5α cells were cultured at 37°C on Luria-Bertani medium and used as a host strain for the gene cloning experiments [10-14]. Vector plasmid pUC19 was used for cloning and recombinant DNA was introduced into *E. coli* DH5α by electroporation [15]. Transformed *E. coli* DH5α cells were grown on LB medium supplemented with ampicillin (50 μg/mL).

Enzyme Purification

All purification procedures were carried out at 4°C. Harvested cells were disrupted by two passages through a French Pressure Cell (SLM Instruments, USA). Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 × g for 15 min, and when necessary the membrane fraction was removed by further centrifugation at 100,000 × g for 60 min. Ammonium sulfate was slowly added to the supernatant to achieve 60% saturation. After removal of the precipitate by centrifugation at 5,000 × g for 60 min, additional ammonium sulfate was added to give 80% saturation. After centrifugation, the precipitated proteins were dissolved in standard buffer and dialyzed. The dialysate was concentrated using a Centricon (Millipore, USA) and applied to a POROS 20 HQ column (PerSeptive Biosystems, USA) equilibrated with standard buffer. After elution with standard buffer, the bound TMADH was released using a linear gradient of 0 to 1.0 M NaCl dissolved in standard buffer; TMADH eluted in the range of 0.4 to 0.5 M NaCl. Fractions containing TMADH were collected and dialyzed against standard buffer and the supernatant applied to a hydrophobic column (High prep 16/10 Phenyl, Amersham Bioscience) equilibrated with standard buffer containing 1.5 M ammonium sulfate. After the unabsorbed materials were washed from the column using equilibrating buffer, the adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of ammonium sulfate (from 1.5 to 0 M) in standard buffer. TMADH was eluted by ammonium sulfate free buffer solution. Each active fraction was pooled, concentrated and applied to a Sephacryl S200 (HiPrep™ 16/60, Amersham Bioscience) which was equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl. The purity of TMADH was assessed by 15% SDS-PAGE.

Enzyme Assay

Protein concentration was determined by the Bradford method [16] using bovine serum albumin as standard. TMADH activity was assayed photometrically at 30°C by a two-dye linked assay system; phenazine ethosulfate (PES) was used as an artificial electron acceptor and 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) as terminal acceptor [2]. The reaction mixture (3 mL) contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 4.6 mM trimethylamine, 1.1 mM PES, 0.04 mM DCPIP, 1 mM KCN, 5 μM sodium hydrosulfate, and 10 μM sodium bicarbonate. Reactions were started by adding the TMADH and reduction of the DCPIP was measured by the decrease in absorbance at 600 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to catalyze the reduction of 1 mol DCPIP per min.

Molecular Weight Determination

The molecular weights of native TMADH was determined by gel filtration on a Sephacryl S200 column using the following proteins as standards: β-amylase (200,000 Da); alcohol dehydrogenase (150,000 Da); bovine serum albumin (66,000 Da); carbonic anhydrase (29,000 Da); and cytochrome *c* (12,400 Da). The molecular weight of the subunits was determined by SDS-PAGE as described by Laemmli [17] using 15% polyacrylamide gels; electrophoresis was carried out at a constant current of 50 mA for 90 min at room temperature.

Activity Staining

Native 8% polyacrylamide gels were used to identify activity by staining the purified TMADH. After electrophoresis, the gels were treated with staining solution until the blue-black band was observed. The staining solution (30 mL) contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 4.6 mM trimethylamine, 1.1 mM PES, 0.04 mM nitro blue tetrazolium, 1 mM KCN, 5 μM sodium hydrosulfate, and 10 μM sodium bicarbonate [18].

DNA Extraction and the Cloning of a *tmd* Gene

Genomic DNA of *Methylophaga* sp. SK1 was extracted by the method of Goldberg and Ohman [19], and plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis method [20]. Extracted genomic DNA was fully digested with *Hind*III and subjected to agarose gel electrophoresis. DNA fragments in the desired size range were cut out from the agarose gel and extracted using a Qiagen Gel Extract Kit (Qiagen, USA). *Hind*III digested plasmid pUC19 was treated with bacterial alkaline phosphatase and ligated to fractionated genomic DNA using T4 ligase. Ligated DNA was transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Transformant (ampicillin-resistant white colony) containing the trimethylamine gene (*tmd* gene) were screened using degenerate PCR (*tmdF* primer 5′-AARGCYGAAGGCGGNTGG, and *tmdR* primer 5′-GCCNCCGTAYTYGTC KGTRC, probe F1). This primer was designed based on the known amino acid sequence of TMADH from *M. methylotrophus* W_3A_1. Probe F1 (100 pmol) was 5′-end labeled with [α-^{32}P] ATP and T_4 kinase according

Table 1. Purification of TMADH from *Methylophaga* sp. strain SK1

	Total protein (mg)	Total Activity* (U)	Specific activity (U/mg protein)	Purification fold (%)	Yield (%)
Cell free extract	67.02	12.53	0.19	1.00	100
Soluble fraction	42.16	10.04	0.24	1.27	80
POROS 20 HQ	4.62	5.05	1.19	6.36	44
Phenyl hydrophobic	0.61	1.32	2.18	11.66	11
Sephacryl S200	0.11	0.25	2.29	12.27	2

*One activity unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 mol DCPIP per minute. Enzyme activities were obtained as average values from three independent experiments.

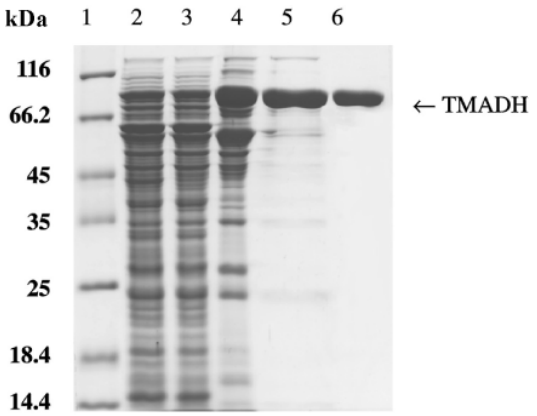


Fig. 1. SDS-PAGE of TMADH from *Methylophaga* sp. strain SK1. Lane 1, molecular size marker; lane 2, cell free extract; lane 3, soluble fraction; lane 4, POROS 20 HQ column; lane 5, phenyl hydrophobic column; lane 6, purified TMADH with Sephacryl S200 column.

to the manufacturer's instruction. Colony hybridization was performed using the labeled F1 probe. Hybridization was performed at 42°C for 16 h with hybridization buffer containing 6 × SSC (0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate), 1 × Denhardt solution, 100 μg/mL yeast tRNA, and 0.05% sodium pyrophosphate. Final washes were performed at increasing temperatures (55 to 65°C) in a 1 × SSC. Autoradiographs were subsequently obtained by exposing the hybridized filters to Fuji RX films for 16 to 24 h.

Nucleotide Sequence Determination and Analyses

The isolated 3 kb *Hind*III fragment was sequenced by a DNA sequencer (Applied Biosystems Model 373A, USA) using a Taq DyeDeoxy Terminater Cycle sequencing kit. Custom-made oligonucleotides (Bioneer, Korea) were used for DNA sequencing and cloning. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, version 2.0) network service [21] was used to search similar sequences in the international database (NCBI). DNA sequences were aligned and analyzed by the DNASIS program (Hitachi, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of TMADH

TMADH has been suggested to be a peripheral membrane protein of the methylotrophs and localized in the membranes periplasmic face [22]. However, after disruption of the cells using a French press, the TMADH activity of *Methylophaga* sp. strain SK1 was found exclusively in the soluble fraction. The purification steps of TMADH are summarized in Table 1. TMADH was purified more than 12-fold through a three step process, with a final yield of 2% and a specific activity of 2.29 units per mg protein. Gel filtration on Sephacryl S200 was necessary to obtain a single band in SDS-PAGE (Fig. 1). Solutions of the purified TMADH stored in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) showed an approximate 20% loss of activity during 24 h at 4°C.

Relative Molecular Mass and Isoelectric Point

The molecular mass of TMADH, by gel filtration, was estimated as 143 kDa. The molecular mass of the subunit in SDS-PAGE appeared to be 80 kDa (Fig. 1). The *tmd* gene of 2,187 bp encodes a protein of 728 amino acids with an apoenzyme subunit molecular mass of 81.6 kDa (Fig. 2). The calculated subunit molecular mass, therefore, is in good agreement with the SDS-PAGE value approximating 80 kDa. Together these results suggest that the enzyme is a dimer consisting of two identical subunits. The isoelectric point determination for the enzyme was determined to be 7.2.

Substrate Specificity

Purified TMADH of *Methylophaga* sp. strain SK1 showed narrow substrate specificity with methylated amines (Table 2). Enzyme activities toward substrates such as dimethylamine (DMA), diethylamine (DEA), and benzylamine were 85.1, 59.9, and 49.1% of that toward trimethylamine, respectively. Moreover, the TMADH demonstrated no activity with primary amines such as monomethylamine and *n*-butylamine, and tertiary triethyla-mine (TEA). Similarly, the TMADH of *M. methylotrophus* W_3A_1 was only able to oxidize substrates such as DMA, DEA, and TEA [3]. A detailed study on the sub-

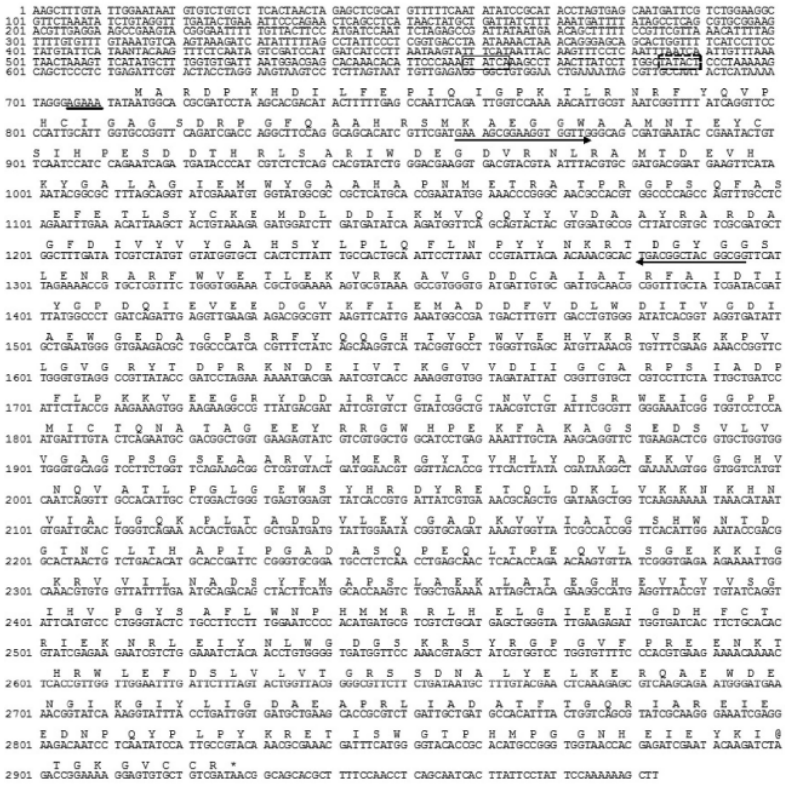


Fig. 2. The entire nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *tmd* gene. 2,983 bp genomic fragment which contain entire TMADH ORF was isolated by colony hybridization with 437 bp fragment as a probe. Potential Shine-Dalgarno sequences (underlined) was found at –10 bp of the upstream of *tmd* gene. A putative promoter region of TMADH has the following conserved sequences; "GTATCA" sequence at –35 (boxed), "TATACT" sequence at –10 regions (dot boxed) from a putative transcription start site A (bold). Termination codons are indicated by an asterisk, and the potential Shine-Dalgarno sequences are underlined. Arrows indicated primer sequences.

Table 2. Substrate specificities of TMADH

Substrates		Relative activity[a] (%)	K_m (mM)
Tertiary amine	Trimethylamine	100.0	1.5
	Triethylamine	0	
Secondary amine	Dimethylamine	85.1	3.9
	Diethylamine	59.9	21.5
Primary amine	Monomethylamine	0	
	n-Butylamine	0	152.3
	Benzylamine	49.1	

[a]Relative activity in the presence of trimethylamine was taken as 100%.

strate specificity of the enzyme has been carried out over a wider range of substrates for the TMADH of bacterium 4B6 [6]. The TMADH could oxidize both tertiary amines (such as TMA, TEA (very low activity), diethylmethylamine) and secondary amines (such as DMA, DEA); by contrast, primary, quaternary, and poly-amines were not substrates. The V_{max} and K_m values for TMADH from *Methylophaga* sp. strain SK1 were 7.9 nmol/min/mg protein and 1.5 mM, respectively.

Effects of pH and Temperature

The effect of pH on TMADH activity was studied in the pH range of pH 7 to 10. Similar to the TMADH from bacterium 4B6 [2], the TMADH of *Methylophaga* sp. strain SK1 showed a high activity at pH 8.5 (Fig. 3A). The TMADH activity was assessed at various temperatures in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) (Fig. 3B), and was determined to peak at 55°C. After 60 min of incubation at 60°C, the enzymes activity remained at 50% (Fig. 4).

Effects of Divalent Cations

The effects of several divalent cations on TMADH activities were tested under the assay conditions noted in Table 3. TMADH was strongly inhibited by Fe^{2+} and to-

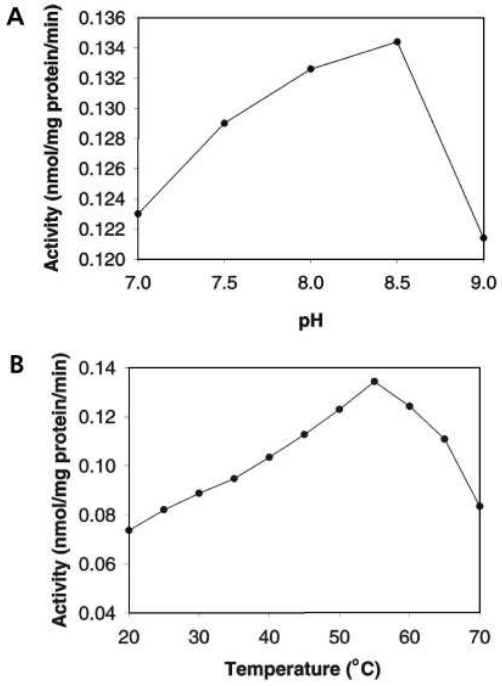


Fig. 3. (A) Effects of pH and (B) temperature on the activity of TMADH.

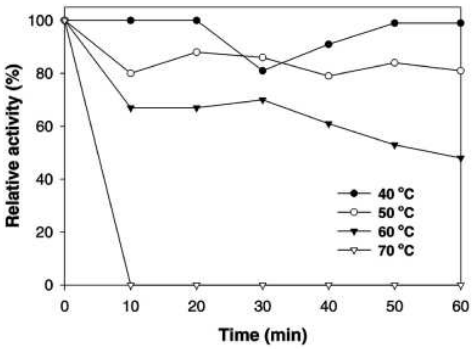


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of TMADH.

tally inhibited by Cu^{2+}, Co^{2+}, and Mn^{2+}. However, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, and Ba^{2+} did not suppress enzyme activity.

Isolation of the *tmd* Gene from *Methylophaga* sp. Strain SK1

The genomic library of *Methylophaga* sp. strain SK1 was constructed, and we have isolated a 437 bp DNA fragment that encodes a portion of the trimethylamine dehydrogenase gene (specifically amino acids from 49 to 194) from the *Methylophaga* sp. strain SK1 using PCR. This fragment was subsequently used as a probe to isolate the *tmd* gene from the genomic library. A total of 1,200 recombinant clones from the library were screened by colony hybridization using this probe to find a single clone with a positive signal. The clone contained an insert measuring 3 kb. The nucleotide sequence of the entire 3 kb-*Hind*III DNA fragment was determined as described in Materials and Methods.

Table 3. Effects of divalent cations on TMADH activity

	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	–	100
Cd^{2+}	1	173
Mg^{2+}	1	123
Ca^{2+}	1	120
Ba^{2+}	1	115
Zn^{2+}	1	90
Fe^{2+}	1	40
Cu^{2+}	1	3
Co^{2+}	1	0
Mn^{2+}	1	0

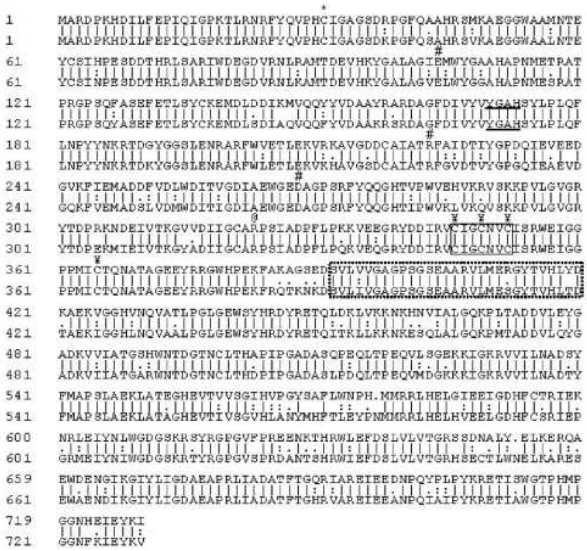


Fig. 5. Alignment of TMADH from *Methylophaga* sp. strain SK1 (upper line) with that from *M. methylotrophus* W_3A_1 (lower line, Swiss-Plot accession number P16099), Identity = 82.83% (603/728), Similar residues = 13.74% (100/728). The box indicates the 4Fe-4S binding motif (*C-X-X-C-X-X-C*). The dotted box indicates ADP-binding site. Underlined residue indicate substrate-binding region. Symbols on the amino acid, *: S-6-FMN cysteine; #: FMN-binding site; @: FMN phosphate group binding site; ¥: iron-sulfur (4Fe-4S) binding group.

Nucleotide Sequence Analysis of the TMADH Gene

DNA sequencing of the 3 kb insert revealed the open reading frame (ORF) of the *tmd* gene, and 5′ untranslated

Table 4. Sequence alignment of the *C-X-X-C-X-X-C* motif of trimethylamine dehydrogenase with the TMADH family in SWISS-PROT/TREMBL and closely similar ferredoxins

Protein	Species	Residue No.[a]	Sequence	Accession No.[b]
TMADH	*Methylophaga* sp. strain SK1	345	**C**IG**C**NV**C**	In this study
TMADH	*M. methylotrophus* W_3A_1	345	**C**IG**C**NV**C**	P16099
DMADH	*Hypermicrobium* X	352	**C**IG**C**NV**C**	Q48303
BaiC[c]	*Eubacterium* sp.	332	**C**IG**C**DQG**C**	P19410
Ferredoxin	*C. vinosum*	8	**C**IN**C**NV**C**	P00208
Ferredoxin II	*R. capsulata*	39	**C**ID**C**GV**C**	P18082

[a]Residue No. indicates the starting position of the 4Fe-4S binding motif in the primary sequence.
[b]Swiss-Plot accession number (http://www.expasy.ch).
[c]BaiC: Bile acid-inducible operon protein C.

region (Fig. 2). The ORF was comprised of 2,187 base pairs coding for 728 amino acids (GenBank accession number DQ675455). The ORF had the highest match to the *tmd* gene from *M. methylotrophus* W_3A_1 (82% identity) [23,24]. A putative ribosomal binding site (AGAAA) was also found (underlined in Fig. 2). A supposed promoter region of the gene has been assigned; "GTATCA" sequence at −35, "TATACT" sequence at −10 regions from an accepted transcription start site "A".

Comparative Analysis of Deduced Amino Acid Sequences of the *tmd* Gene

TMADH is a homodimeric protein with identical subunits. Each subunit contains the following cofactors: a covalently linked 6-*S*-cysteinyl FMN (linking the flavin via its 6-position to Cys30 of the polypeptide), a bacterial ferredoxin type [4fe-4S] center, and an equivalent of tightly bound ADP having no known function [25-27]. The deduced amino acids of the *tmd* gene from *Methylophaga* sp. strain SK1 (728 amino acids) were compared with those of *M. methylotrophus* W_3A_1 (Fig. 5) wherein the amino acid sequences matched putative FMN-binding sites (Cys-30, Glu-103, Arg-222, Asp-267, and Arg-322). The incorporation of FMN and covalent attachment were important in TMADH. Flavinylation proceeds via a nucleophilic attack by the thiolate of Cys-30 at C-6 of the isoalloxazine ring of enzyme-bound FMN [28]. Potential amino acids involved in the 4Fe-4S binding motif (Cys-345, Cys-348, Cys-351, and Cys-364) were also found by our analyses. The first three of these cysteines are separated by two groups of two residues, Ile-Gly and Asx-Val, respectively. This *C-X-X-C-X-X-C* motif has been found in several [4Fe-4S] ferredoxins [24] (Table 5). The amino acids in the motif are completely conserved among the TMADH and dimethylamine dehydrogenases [29]. In addition, this deduced amino acid showed an ADP-binding site at positions 391 through 420. Several other interacting residues had conservative changes.

Acknowledgement This work was supported by grant No. RTI-04-03-03 (BPF-2004-S-1-5(A)) from the Regional Technology Innovation Program of the Ministry of Commerce, Industry and Energy (MOCIE).

REFERENCES

[1] Guest, I. and D. R. Varma (1992) Teratogenic and macromolecular synthesis inhibitory effects of trimethylamine on mouse embryos in culture. *J. Toxicol. Environ. Health* 36: 27-41.
[2] Colby, J. and L. J. Zatman (1973) Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. *Biochem. J.* 132: 101-112.
[3] Colby, J. and L. J. Zatman (1975) Enzymological aspects of the pathways for trimethylamine oxidation and C1 assimilation in obligate methylotrophs and restricted facultative methylotrophs. *Biochem. J.* 148: 513-520.
[4] Sutcliffe, M. J. and N. S. Scrutton (2000) Enzymology takes a quantum leap forward. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* 358: 367-386.
[5] Loginova, N. V. and Y. A. Trotsenko (1978) Carbon metabolism in methylotrophic bacteria isolated from activated sludge. *Mikrobiologiia* 47: 939-946.
[6] Colby, J. and L. J. Zatman (1974) Purification and properties of the trimethylamine dehydrogenase of bacterium 4B6. *Biochem. J.* 143: 555-567.
[7] Lim, L. W., F. S. Mathews, and D. J. Steenkamp (1982) Crystallographic study of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase from the bacterium W_3A_1. *J. Mol. Biol.* 162: 869-876.
[8] Lim, L. W., N. Shamala, F. S. Mathews, D. J. Steenkamp, R. Hamlin, and N. H. Xuong (1986) Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-A resolution. *J. Biol. Chem.* 261: 15140-15146.
[9] Koh, M. J., C. S. Kim, Y. A. Kim, H. S. Choi, E. H. Cho, E. B. Kim, Y. M. Kim, and S. W. Kim (2002) Properties of electron carriers in the process of methanol oxidation in a new restricted facultative marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga* sp. MP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 476-482.
[10] Park, J. H., J. H. Lee, Y. S. Kim, Y. K. Hong, and I. S. Kong (2001) Molecular cloning and expression of a sodium-driven flagella motor component gene (*motX*) from *Vibrio fluvialis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 973-978.
[11] Ryou, C., T. Chung, and M. Kwon (2001) Molecular cloning and hyperexpression of a Bt gene, *cryIAc*, in *Escherichia coli* DH5α: Production and usage of anti-cryIAc antibody. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 1093-1098.

[12] Shin, J. H., D. H. Roh, G. Y. Heo, G. J. Joo, and I. K. Rhee (2001) Purification and characterization of a regulatory protein XylR in the D-xylose operon from *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 1002-1010.

[13] Jeong, Y. S., H. J. Yoo, S. D. Kim, D. H. Nam, and Y. H. Khang (2005) Cloning and sequencing of a novel glutaryl acylase β-subunit gene of *Pseudomonas cepacia* BY21 from bioinformatics. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 510-515.

[14] Lee, J. H., M. H. Choi, J. Y. Park, H. K. Kang, H. W. Ryu, C. S. Sunwo, Y. J. Wee, K. D. Park, D. W. Kim, and D. Kim (2004) Cloning and characterization of the lactate dehydrogenase genes from *Lactobacillus* sp. RKY2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 318-322.

[15] Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.

[16] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

[17] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

[18] Kim, H. G. and S. W. Kim (2006) Purification and characterization of a methanol dehydrogenase derived from *Methylomicrobium* sp. HG-1 cultivated using a compulsory circulation diffusion system. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11: 134-139.

[19] Goldberg, J. B. and D. E. Ohman (1984) Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J. Bacteriol.* 158: 1115-1121.

[20] Birnboim, H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

[21] Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

[22] Kasprzak, A. A. and D. J. Steenkamp (1983) Localization of the major dehydrogenases in two methylotrophs by radiochemical labeling. *J. Bacteriol.* 156: 348-353.

[23] Boyd, G., F. S. Mathews, L. C. Packman, and N. S. Scrutton (1992) Trimethylamine dehygrogenase of bacterium W_3A_1. Molecular cloning, sequence determination and over-expression of the gene. *FEBS Lett.* 308: 271-276.

[24] Barber, M. J., P. J. Neame, L. W. Lim, S. White, and F. S. Matthews (1992) Correlation of x-ray deduced and experimental amino acid sequences of trimethylamine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267: 6611-6619.

[25] Steenkamp, D. J., W. S. McIntire, and W. C. Kenney (1978) Structure of the covalently bound coenzyme of trimethylamine dehydrogenase. Evidence for a 6-substituted flavin. *J. Biol. Chem.* 253: 2818-2824.

[26] Steenkamp, D. J., W. C. Kenney, and T. P. Singer (1978) A novel type of covalently bound coenzyme in trimethylamine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 253: 2812-2817.

[27] Kasprzak, A. A., E. J. Papas, and D. J. Steenkamp (1983) Identity of the subunits and the stoicheiometry of prosthetic groups in trimethylamine dehydrogenase and dimethylamine dehydrogenase. *Biochem. J.* 211: 535-541.

[28] Mewies, M., J. Basran, L. C. Packman, R. Hille, and N. S. Scrutton (1997) Involvement of a flavin iminoquinone methide in the formation of 6-hydroxyflavin mononucleotide in trimethylamine dehydrogenase: A rationale for the existence of 8α-methyl and C6-linked covalent flavoproteins. *Biochemistry* 36: 7162-7168.

[29] Yang, C. C., L. C. Packman, and N. S. Scrutton (1995) The primary structure of *Hyphomicrobium* X dimethylamine dehydrogenase. Relationship to trimethylamine dehydrogenase and implications for substrate recognition. *Eur. J. Biochem.* 232: 264-271.

[Received February 27, 2006; accepted June 8, 2006]

The Journal of Microbiology, December 2005, p.499-502 Vol. 43, No. 6
Copyright ⓒ 2005, The Microbiological Society of Korea

Characterization of *Methylophaga* sp. strain SK1 Cytochrome c_L Expressed in *Escherichia coli*

Hee Gon Kim[1], Trong Nhat Phan[1], Tae Sa Jang[2], Moonjoo Koh[3] and Si Wouk Kim[4,*]

[1]*Department of Biomaterials Engineering,* [3]*Department of Chemistry,*
[4]*Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea*
[2]*Department of Environmental Engineering, Gwangju University, Gwangju 503-703, Republic of Korea*

(Received October 19, 2005 / Accepted November 21, 2005)

***Methylophaga* sp. strain SK1 is a new restricted facultative methanol-oxidizing bacterium that was isolated from seawater. The aim of this study was to characterize the electron carriers involved in the methanol oxidation process in *Methylophaga* sp. strain SK1. The gene encoding cytochrome c_L (*mxaG*) was cloned and the recombinant gene was expressed in *Escherichia coli* DH5α under strict anaerobic conditions. The recombinant cytochrome c_L had the same molecular weight and absorption spectra as the wild-type cytochrome c_L both in the reduced and oxidized forms. The electron flow rate from methanol dehydrogenase (MDH) to the recombinant cytochrome c_L was similar to that from MDH to the wild-type cytochrome c_L. These results suggest that recombinant cytochrome c_L acts as a physiological primary electron acceptor for MDH.**

***Key words*:** cytochrome c_L, methanol dehydrogenase (MDH), methanol oxidation, *Methylophaga* sp. strain SK1

Cytochrome *c* is an electron transport protein that is involved in the respiratory processes of almost all organisms. The main distinguishing feature of this protein family is the presence of a heme group covalently linked to a polypeptide by one or two thioether bonds (Moore and Pettigrew, 1990). In Gram-negative soil methylotrophic bacteria, methanol is oxidized to formaldehyde by periplasmic methanol dehydrogenase (MDH), which has a pyrroloquinoline quinone (PQQ) as a prosthetic group and cytochrome c_L as its primary electron acceptor (Anthony, 1986). MDH and cytochrome c_L are found in the periplasm at high concentrations and form the first part of a methanol oxidation electron transport chain. A typical class I type cytochrome (cytochrome c_H) is also involved in methanol oxidation, and cytochrome c_H is oxidized by a terminal oxidase according to the following scheme:

Methanol→MDH→cyt. c_L→cyt. c_H→terminal oxidase

Most soil methylotrophic bacteria contain at least two soluble *c*-type cytochromes whose molecular weights, isoelectric points and absorption spectra differ from each other. The *c*-type cytochromes can be classified based on the isoelectric point and the isoelectric point of cytochrome c_L is usually lower than that of cytochrome c_H. A new restricted facultative marine methanol-oxidizing bacterium, *Methylophaga* sp. strain SK1, was isolated from the seawater at Mokpo, Korea, and the electron carriers involved in the process of methanol oxidation in this bacterium were characterized (Koh *et al*., 2002).

There are several reports regarding the expression of bacterial *c*-type cytochromes, which address both homologous and heterologous strategies (Karan *et al*., 2002; Kellogg and Bren, 2002; Londer *et al*., 2002; Miller *et al*., 2003; Evers and Merk, 2005). This study describes the cloning and expression of the gene, *mxaG*, which encodes cytochrome c_L from *Methylophaga* sp. strain SK1. Under strict anaerobic conditions, the heterologous expression of the *mxaG* gene can be achieved in *E. coli* DH5α at levels that allow the protein to be isolated. The heterologously expressed protein was purified and compared with the cytochrome c_L isolated from the *Methylophaga* sp. strain SK1.

Materials and Methods

Bacteria, media and culture conditions

The *Methylophaga* sp. strain SK1 was grown aerobically in an artificial seawater medium (NaCl 30 g, NaH_2PO_4 2.34 g, K_2HPO_4 6.1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $NaNO_3$ 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.01 g, and 1 ml of trace elements solution per liter) containing 1% (v/v) methanol as the sole carbon and energy source. Expression studies were carried out using *E. coli* DH5α, which were performed using rich TYS medium (1% trypton, 1% yeast extract,

* To whom correspondence should be addressed.
(Tel) 82-62-230-6649; (Fax) 82-62-225-6040
(E-mail) swkim@chosun.ac.kr

0.5% NaCl and 50 μg/ml ampicillin) at 37°C.

Construction of genomic library and identification of mxa genes

DNA manipulation was performed using the method reported by Sambrook and Russell (2001). A genomic library of the *Methylophaga* sp. strain SK1 was constructed by cloning the *Hin*dIII treated chromosomal DNA fragments into the pUC19 vector. A 5.4 kb *Hin*dIII fragment of genomic DNA was selected using colony hybridization with the conserved region of *mxaF* as a probe, which encodes the α-subunit of methanol dehydrogenase involved in the methanol oxidation. The fully sequenced fragment revealed four tightly linked genes (encoding partial *mxaF*, *mxaJ*, *mxaG*, and *mxaI*) to be involved in methanol oxidation.

Construction of expression plasmids

The Plasmid pGEM T-easy (Promega, USA) was first ligated with the *mxaG* gene. The *mxaG* gene was subcloned from the genomic library using the following primer set (5'-CTCGAGTTATAAAAGTGGGATGCC-3' and 5'-AAACTCGAGTCAAATAGGCTTAGATCT-3'. The underline sequences indicate the *Xho*I and *Xba*I sites, respectively). The resulting plasmid was digested using *Xho*I and *Xba*I, and the DNA fragment containing *mxaG* was ligated into the expression vector, pASK-IBA6, that had been digested with *Xho*I and *Xba*I. The recombinant plasmid pEC05 was introduced into the *E. coli* DH5α cells by electroporation. An *E. coli* DH5α was transformed using this vector and incubated at 37°C overnight on an LB agar plate containing ampicillin. The recombinant plasmid contained the 585 bp DNA fragment originating from *Methylophaga* sp. strain SK1.

Expression and purification of recombinant cytochrome c_L from E. coli

Fresh colonies of *E. coli* DH5α containing the pEC05 plasmid were inoculated into the TYS medium and grown overnight under aerobic conditions. The preculture was inoculated into the TYS medium fully contained in a 5 L flask under strict anaerobic conditions, which were maintained by continuous flushing the growth chamber with N_2. The growth medium was supplemented with 50 μg/ml ampicillin, 200 ng/l tetracycline and 10 mM KNO_3, and *mxaG* gene expression was induced with 0.1 mM IPTG when the OD_{600} reached 0.5 - 0.6. The cells were harvested by centrifugation at 15,000 × *g* for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 10 ml of a precooled buffer P (500 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing 1 mg/ml lysozyme and placed in ice for 30 min. The suspension was then centrifuged at 20,000 × *g* for 5 min at 4°C. The clear supernatant was applied to a Ni-NTA affinity column in order to purify the recombinant protein with 6×His-tagged proteins using the QIA express system. Heme staining was carried out according to the method reported by Thomas *et al.* (1976).

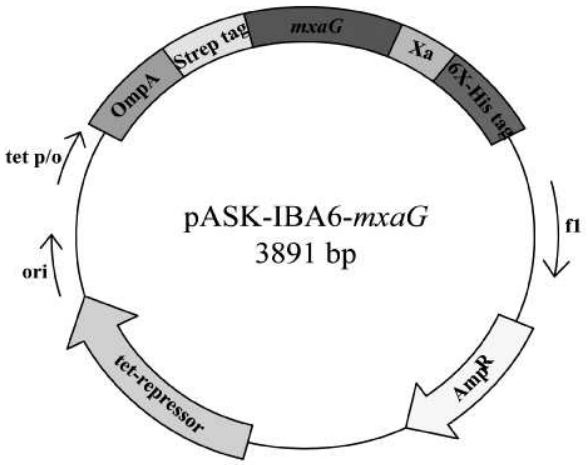


Fig. 1. Construction of the pEC05 vector.

Electron flow from MDH to cytochrome c_L

The electron flow from MDH to cytochrome c_L was determined using potassium ferricyanide as the final electron acceptor. The assay mixture contained 3 μM $K_3Fe(CN)_6$, 13.4 mM MeOH, and 25 μM cytochrome c_L. The reaction was started by adding MDH (20 μM). The rate of potassium ferricyanide reduction was determined by measuring the decrease in absorbance at 420 nm. The rate of electron flow from the MDH to cytochrome c_L was also determined using the following procedure: cytochrome c_L was oxidized completely by adding potassium ferricyanide, and the excess reagent was removed by gel filtration using a PD-10 column. Subsequently, active MDH (20 μM) was added to the cytochrome c_L solution, and the rate of cytochrome c_L reduction was determined by measuring the increase in absorbance at 551 nm.

Results and Discussion

Expression and purification of recombinant cytochrome c_L

The heterologous expression of a bacterial *c*-type cytochrome in *E. coli* has been problematic because *E. coli* lack the ability to covalently attach the cysteine thiols to protoporphyrin IX, which has been shown to be a crucial step for yeast to produce the enzyme heme *c* lyase (Dumont *et al.*, 1987). An analogous enzyme has not been identified in *E. coli* but *E. coli* produces an assimilatory nitrite reductase containing heme *c* under anaerobic conditions. Similarly, mature *Thiobacillus versutus* cytochrome *c*-550 (Ubbink *et al.*, 1992), *Chromatium vinosum* cytochrome *c*' (Even *et al.*, 1995), cytochrome *c*-551 (Miller *et al.*, 2000), horse cytochrome *c* (Kellogg and Bren, 2002) and equine cytochrome *c* (Rumbley *et al.*, 2002) have been successfully expressed in *E. coli* at rea-

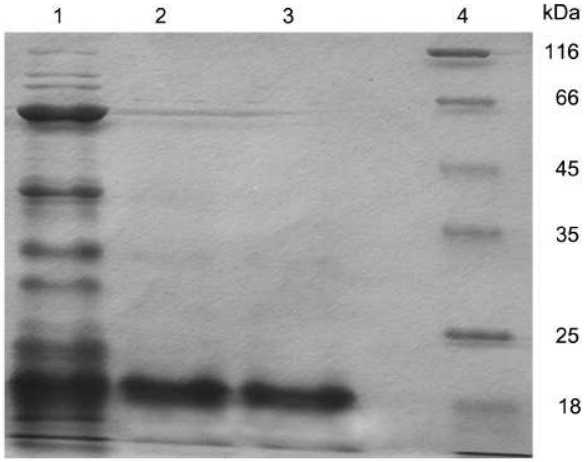


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the wild-type and recombinant cytochrome c_L. Lane 1, cell-free extract; lane 2, purified wild-type cytochrome c_L; lane 3, purified recombinant cytochrome c_L; lane 4, protein size markers.

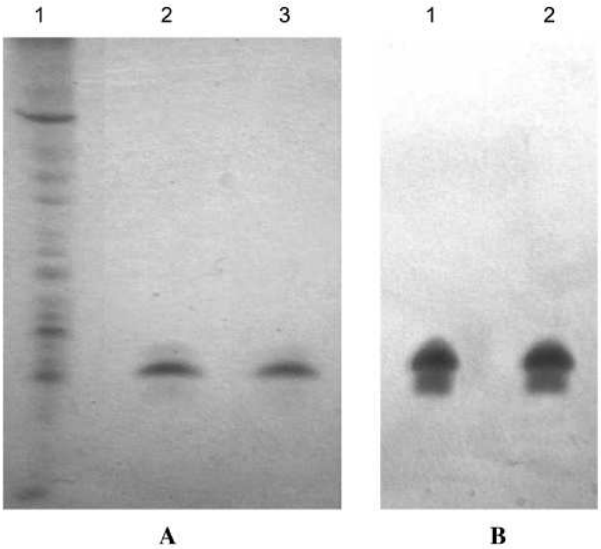


Fig. 3. A, Native PAGE analysis of the wild-type and recombinant cytochrome c_L. Lane 1, cell-free extract; lane 2, purified wild-type cytochrome c_L; lane 3, purified recombinant cytochrome c_L. B, Heme staining of cytochrome c_L. Lane 1, wild-type cytochrome c_L; lane 2, recombinant cytochrome c_L.

sonable levels.

E. coli DH5α containing the *mxaG* gene was used to produce preparative amounts of the His-tagged protein. Recombinant cytochrome c_L containing the 6×His-tagged proteins was bound to Ni-NTA resin. The bound protein was washed with 250 mM Tris-HCl buffer containing 10 mM imidazole and 300 mM NaCl and eluted with a linear gradient of 20 - 250 mM imidazole in the same buffer. Fractions containing the respective proteins were

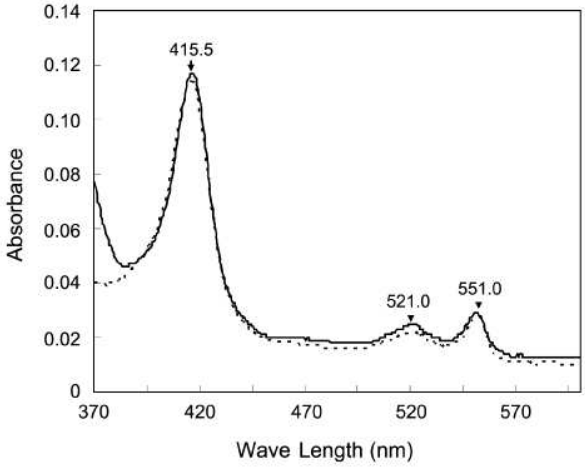


Fig. 4. Comparison of reduced absorption spectra of the wild-type cytochrome c_L (—) and recombinant cytochrome c_L (····).

pooled and concentrated. Yields of the recombinant cytochrome c_L obtained were approximately 0.3 mg/l of culture. Fig. 2 shows the SDS-PAGE analysis of the authentic and recombinant cytochrome c_L. The molecular weight of the recombinant cytochrome c_L was similar to that of the wild-type cytochrome c_L (21 kDa). Fig. 3A and B show the native PAGE and heme staining of the authentic and recombinant cytochrome c_L, respectively. According to the molecular weight measurement and heme staining results, the heme was covalently linked to the recombinant protein. Fig. 4 shows the absorption spectra of the reduced wild-type and recombinant cytochrome c_L. Both proteins had the same three absorption peaks at 551.0, 521.0 and 415.5 nm.

Electron flow from MDH to cytochrome c_L

Fig. 5A shows the electron flow rates from MDH to the wild-type or recombinant cytochrome c_L, which had been oxidized by potassium ferricyanide prior to the reaction. The oxidized cytochrome c_L was reduced by MDH and the absorbance at 551.0 nm increased in a time-dependent manner. The electron transfer reaction was complete within 20 sec.

Electron flow between the electron carriers during methanol oxidation was determined using an artificial electron transport system in which potassium ferricyanide was used as the final electron acceptor (Koh *et al*., 2002). The decrease in absorbance at 420 nm as a result of the reduction of potassium ferricyanide was monitored. Fig. 5B shows the rates of electron transfer from MDH to potassium ferricyanide via cytochrome c_L. Regardless of the source of cytochrome c_L, the potassium ferricyanide was completely reduced within 20 min.

In summary, a recombinant cytochrome c_L from *Methylophaga* sp. strain SK1 was expressed in *E. coli* DH5α and characterized under strict anaerobic conditions. The

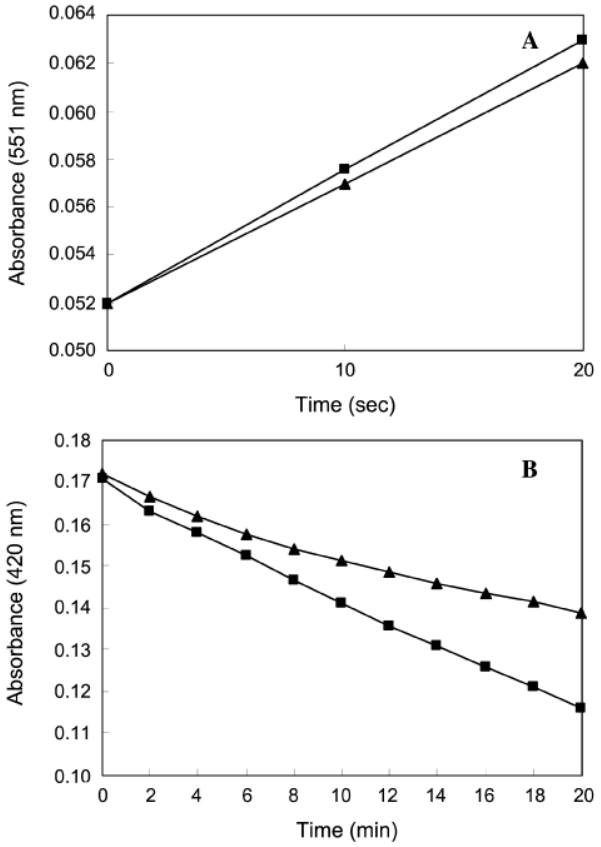


Fig. 5. A, Comparison of the reduction rates of the wild-type and recombinant cytochrome c_L. The wild-type and recombinant cytochrome c_L (25 μM) were oxidized with 3 μM potassium ferricyanide and the oxidant was removed by passage through a PD-10 column. The reaction rates were measured by the increase in absorbance at 551.0 nm. Each reaction mixture contained either the oxidized wild-type cytochrome c_L (▲) or recombinant cytochrome c_L (■), and the reactions were started by adding MDH (20 μM). B, Reduction of potassium ferricyanide with MDH and cytochrome c_L (wild-type or recombinant type). The reduction rates were measured by the decrease in absorbance at 420 nm at room temperature. The assay systems differed from each other as follows: (▲), 3 μM $K_3Fe(CN)_6$, 13.4 mM MeOH, 25 μM wild-type cytochrome c_L; (■), 3 μM $K_3Fe(CN)_6$, 13.4 mM MeOH, 25 μM recombinant cytochrome c_L. The reactions were started by adding MDH (20 μM).

biochemical and spectroscopic properties of the recombinant cytochrome c_L were the same as those of the wild-type. This indicates that both the wild-type and recombinant cytochrome c_L act as physiological primary electron acceptors for MDH and will be useful for examining the roles of the *mxaG* gene in the *mxaFJGIR* gene cluster of *Methylophaga* sp. strain SK1.

Acknowledgement

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOE-HRD) (C00472).

References

Anthony, C. 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microbial. Physiol.* 27, 113-210.

Dumont, M.E., J.F. Ernst, D.M. Hampsey, and F. Sherman. 1987. Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 6, 235-241.

Even, M.T., R.J. Kassner, M. Dolata, T.E. Meyer, and M.A. Cusanovich. 1995. Molecular cloning and sequencing of cytochrome *c*' from the phototrophic purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 220-223.

Evers, T.H. and M. Merkx. 2005. Successful recombinant production of *Allochromatium vinosum* cytochrome *c'* requires coexpression of *cmm* genes in heme-rich *Escherichia coli* JCB712. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 327, 668-674.

Karan, E.F., B.S. Russell, and K.L. Bren. 2002. Characterization of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c* (552) expressed in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7, 260-272.

Kellogg, J.A. and K.L. Bren. 2002. Characterization of recombinant horse cytochrome *c* synthesized with the assistance of *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1601, 215-221.

Koh, M.J., C.S. Kim, Y.A. Kim, H.S. Choi, E.H. Cho, E. Kim, Y.M. Kim, and S.W. Kim. 2002. Properties of electron carriers in the process of methanol oxidation in a new restricted facultative marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga* sp. MP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 476-482.

Londer, Y.Y., P.R. Pokkuluri, D.M. Tiede, and M. Schiffer. 2002. Production and preliminary characterization of a recombinant triheme cytochrome c_7 from *Geobacter sulfurreducens* in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1554, 202-211.

Miller, G.T., B. Zhang, J.K. Hardman, and R. Timkovich. 2000. Converting a *c*-type to a *b*-type cytochrome: Met61 to His61 mutant of *Pseudomonas* cytochrome *c*-551. *Biochemistry* 39, 9010-9017.

Miller, G.T., D.Q. Mackay, M.S. Standley, S.L. Fields, W.M. Clary, and R. Timkovich. 2003. Expression of *Pseudomonas stutzeri* Zobell cytochrome *c*-551 and its H47A variant in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 29, 244-251.

Moore, G.R. and G.W. Pettigrew. 1990. Cytochrome *c*: Evolutionary, structural and physicochemical aspects. Springer-Verlag, New York.

Rumbley, J.N., L. Hoang, and S.W. Englander. 2002. Recombinant equine cytochrome *c* in *Escherichia coli*: High level expression characterization, and folding and assembly mutants. *Biochemistry* 41, 13894-13901.

Sambrook. J. and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Thomas, P.E., D. Ryan, and W. Levin. 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P450 on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75, 168-176.

Ubbink, M., J.V. Beeumen, and G.W. Canters. 1992. Cytochrome *c*-550 from *Thiobacillus versutus*: cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of the heterologous holoprotein, *J. Bacteriol.* 174, 3707-3714.

Biotechnology Letters **26:** 947–950, 2004.
© 2004 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b

Sang Gui Lee[1], Jae Hwan Goo[1], Hee Gon Kim[1], Jeong-Il Oh[2], Young Min Kim[3] & Si Wouk Kim[1,4,*]

Departments of [1]Biomaterials and [4]Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[2]Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
[3]Departments of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
[*]Author for correspondence (Fax: +82-62-225-6040; E-mail: swkim@chosun.ac.kr)

Received 23 February 2004; Revisions requested 24 February 2004; Revisions received 29 March 2004; Accepted 30 March 2004

Key words: methanol dehydrogenase (MDH), *Methylosinus trichosporium* OB3b, particulate methane monooxygenase (pMMO), sodium chloride

Abstract

Methylosinus trichosporium OB3b oxidized methane to methanol in the presence of a high concentration of Cu^{2+}. Further oxidation of methanol to formaldehyde was prevented by adding 200 mM NaCl which acted as a methanol dehydrogenase H inhibitor. The bacterium, 0.6 mg dry cell ml^{-1}, in methane/air (1:4, v/v) at 25 °C in 12.9 mM phosphate buffer (pH 7) containing 20 mM sodium formate and 200 mM NaCl accumulated 7.7 mM methanol over 36 h.

Introduction

Methanotrophic bacteria can grow aerobically on methane as a sole source of carbon and energy. The first two enzymes involved in methane oxidation are methane monooxygenase (MMO) and methanol dehydrogenase (MDH) (Anthony 1986). MMO oxidizes methane to methanol, and MDH catalyzes the oxidation of methanol to formaldehyde. *Methylosinus trichosporium* OB3b is a methanotrophic bacterium and contains two forms of MMOs: a soluble-(sMMO) and a membrane-bound particulate (pMMO) one whose syntheses depends on growth conditions. *M. trichosporium* OB3b growing on methane in Higgins nitrate mineral salt (NMS) medium (Fox *et al.* 1990) containing 5 μM Cu^{2+}, produced only pMMO (Murrell *et al.* 2000, Nielson *et al.* 1997, Takeguchi & Okura 2000).

Dithiothreitol, phenylhydrazine, metal chelating agents, iodoacetate, $MgCl_2$, high concentrations of phosphate, cyclopropane, and cyclopropanol act as MDH inhibitors (Anthony 1986, Carver *et al.* 1984, Frank *et al.* 1989, Shimoda & Okura 1991). Among these cyclopropanol has the highest inhibitory effect and has been used as an inhibitor for the experimental production of methanol from methane (Takeguchi *et al.* 1997, Furuto *et al.* 1999). The cyclopropanol, however, is very difficult to synthesize chemically and to maintain its stability under aerobic conditions.

The primary electron acceptor of MDH is cytochrome c_L. The two proteins interact by electrostatic interactions which can be disrupted by high salt concentrations (Cox *et al.* 1992), thereby preventing further oxidation of methanol to formaldehyde. In this paper, we have identified optimal conditions that inhibit MDH activity but retain MMO activity by using NaCl, resulting in the production of methanol from methane in high yield using *M. trichosporium* OB3b.

Materials and methods

Bacterial strain, cultivation conditions, and cell free extract preparation

Methylosinus trichosporium OB3b, provided by Dr I. Okura of the Tokyo Institute of Technology, was cultivated in the modified NMS medium containing 5 μM $CuSO_4$ under 30% (v/v) methane/70% (v/v) air at 30 °C. Cells were harvested in the early stationary phase by centrifugation at 15 000 × *g* for 10 min, washed once with 12.9 mM phosphate buffer (pH 7) and resuspended in the same buffer. Cells in the suspension were then disrupted by sonic treatment (10 s ml^{-1}) and centrifuged at 15 000 × *g* for 30 min, and the resulting supernatant was used for MDH and pMMO assays.

Enzyme assays

pMMO activity was determined by measuring the amount of propylene oxide produced following propylene epoxidation (Burrows *et al.* 1984). The activity was calculated from the initial slope of a time course of propylene oxide formation. MDH activity was measured by a cytochrome *c*/DCPIP-linked assay system (Cox *et al.* 1992). Horse cytochrome *c* and 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) were used as artificial primary and terminal electron acceptors, respectively. The reduction of DCPIP was measured at 600 nm.

Methanol biosynthesis

The determination of methanol produced in the batch reaction was carried out as follows. The sample (5 ml), which contained a cell suspension treated with appropriate amounts of NaCl and sodium formate in 12.9 mM phosphate buffer (pH 7), was introduced into a 20 ml bottle. The bottle was sealed with a Teflon septa and incubated for 5 min at 30 °C. The reaction was initiated by replacing 3 ml air in the head-space of the bottle with 3 ml methane using a gas-tight syringe. Methanol concentration in the reaction mixture was determined after 36 h by gas chromatography using a 25% sorbitol Gasport B (60/80) column (3 mm × 4 m, GL Sciences, Japan). Conditions were: column 80 °C, injector 100 °C, detector 100 °, carrier gas He at 30 ml min^{-1}.

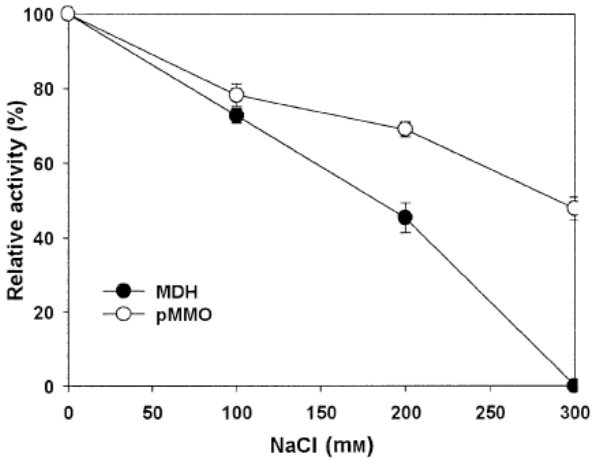


Fig. 1. Effect of NaCl on the MDH and pMMO activities. MDH activity (●) was measured by the cytochrome c_L/DCPIP-linked assay system. pMMO activity (○) was determined by the propylene epoxidation assay procedure as described in Materials and methods. All values are average of three independent determinations.

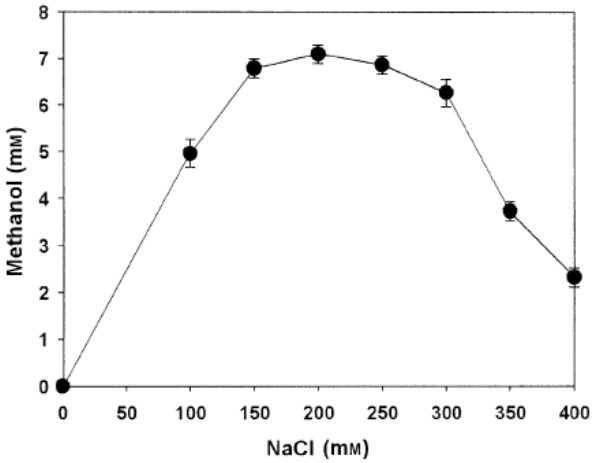


Fig. 2. Effect of NaCl on the methanol accumulation. The reaction mixture contained cell suspension (0.6 mg dry cell ml^{-1}), sodium formate (20 mM), and various concentrations of NaCl in 12.9 mM phosphate buffer (pH 7). The reaction was carried out for 36 h at 25 °C by injecting methane gas (3 ml) into a 20 ml reaction bottle containing 5 ml of reaction mixture. All values are average of three independent determinations.

Results and discussion

Effect of NaCl on the pMMO and MDH activities

As shown in Figure 1, both MDH and pMMO activities decreased concomitantly with an increase in NaCl concentration in the assay mixture. To achieve a high yield of methanol, MDH should be inhibited but pMMO has to maintain a high activity. With 300 mM NaCl MDH activity was completely inhibited but pMMO lost only half of its original activity. However,

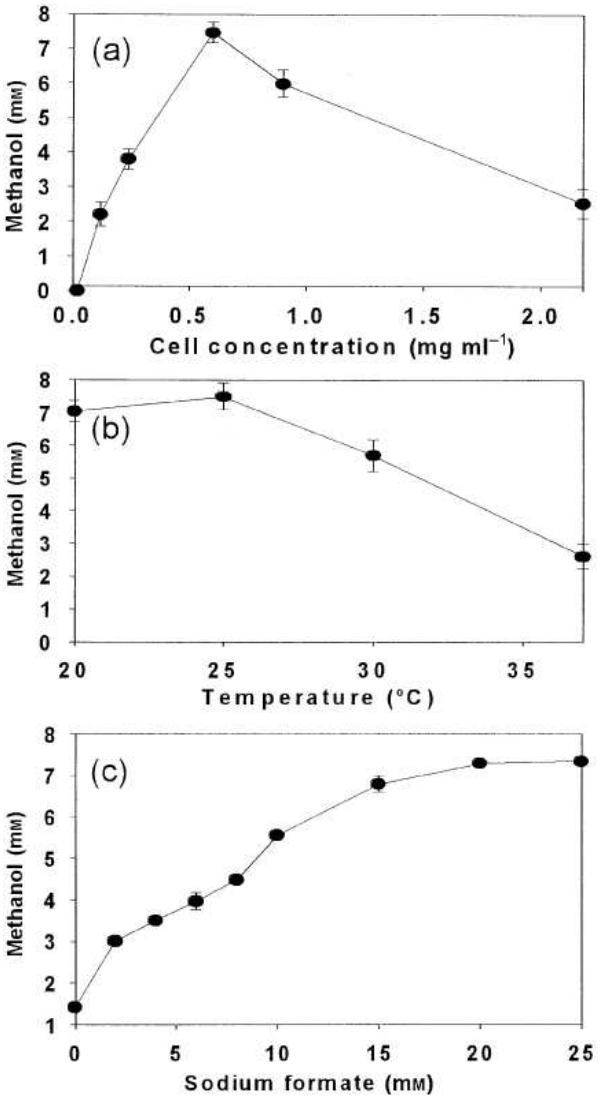


Fig. 3. Factors affecting methanol accumulation. (a) Cell density, (b) temperature, and (c) sodium formate. All values are average of three independent determinations.

as shown in Figure 2, the optimal concentration of NaCl for methanol accumulation was 200 mM. Where 7 mM methanol accumulated over 36 h.

Optimization of methanol biosynthesis

To establish the optimal reaction conditions for methanol synthesis by *M. trichosporium* OB3b, several parameters such as the cell density, reaction temperature, and sodium formate concentration were examined.

As shown in Figure 3a, methanol accumulation increased as cell density increased up to 0.6 mg dry cell ml^{-1}. *M. trichosporium* OB3b produced most methanol at 25 °C (Figure 3b) above which possibly pMMO became unstable. Accumulation of methanol also increased with an increase in the concentration of sodium formate up to 20 mM (Figure 3c). Under the optimal conditions, *M. trichosporium* OB3b accumulated 7.7 mM methanol over 36 h incubation (Figure 4).

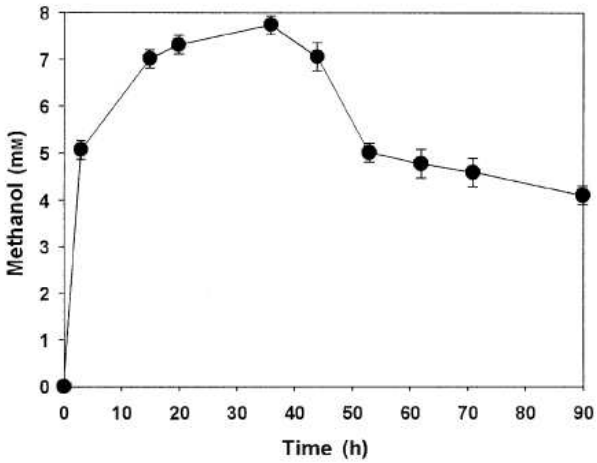


Fig. 4. Time-dependent methanol production by *M. trichosporium* OB3b. The methanol biosynthesis was carried out under the optimal conditions described in Results and discussion. All values are average of three independent determinations.

As an inhibitor acting on MDH, NaCl has advantages over cyclopropanol in that it is cheaper and stable. It may therefore open a door for cheap and efficient biological production of methanol from methane using methanotrophic bacteria.

Acknowledgement

This work was supported by research grants from Ministry of Environment as 'The Eco-technopia 21 project (No. 2001-44002-3)'.

References

Anthony C (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microb. Physiol.* **27**: 113–210.

Burrows KJ, Cornish A, Scott D, Higgins IJ (1984) Substrate specificities of the soluble and particulate methane monooxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 3327–3333.

Carver MA, Humphrey KM, Patchett RA, Jones CW (1984) The effect of EDTA and related chelating agents on the oxidation of methanol by the methylotrophic bacterium, *Methylophilus methylotrophus*. *Eur. J. Biochem.* **138**: 611–615.

Cox JM, Day DJ, Anthony C (1992) The interaction of methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L in methylotrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1119**: 97–106.

Fox BG, Froland WA, Jollie DR, Lipscomb JD (1990) Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Meth. Enzymol.* **188**: 191–202.

Frank JJr, van Krimpen SH, Verwiel PE, Jongejan JA, Mulder AC, Duine JA (1989) On the mechanism of inhibition of methanol dehydrogenase by cyclopropane-derived inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **184**: 187–195.

Furuto T, Takeguchi M, Okura I (1999) Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Mol. Catal.* **144**: 257–261.

Murrell JC, McDonald IR, Gilbert B (2000) Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol.* **8**: 221–225.

Nielsen AK, Gerdes K, Murrell JC (1997) Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol. Microbiol.* **25**: 399–409.

Shimoda M, Okura I (1991) Selective inhibition of methanol dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* (OB3b) by cyclopropanol. *J. Mol. Catal.* **64**: L23–L25.

Takeguchi M, Okura I (2000) Role of iron and copper in particulate methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Catal. Surv. Jpn.* **4**: 51–13.

Takeguchi M, Furuto T, Sugimori D, Okura I (1997) Optimization of methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b: an approach to improve methanol accumulation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **68**: 143–152.

특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 0551711 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2002-0073376 호

출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2002년 11월 25일

등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2006년 02월 06일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

메탄산화세균을 이용한 고수율 메탄올 제조방법

특허권자 (PATENTEE)

학교법인조선대학교

광주 동구 서석동 375번지

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2006년 02월 06일

특 허 청 장

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

등 록 사 항

특 허 등록 제 0551711 호

발 명 자

김시욱(590815-1******)
광주광역시 남구 봉선동 삼익 2차 Apt. 201-405

이상귀(770210-1******)
인천광역시남구주안5동15-43(11통6반)

김희곤(761003-1******)
전라남도함평군함평읍내교리217

최학선(650926-1******)
부산광역시동래구온천동1123-1

류광환(590220-1******)
인천광역시남동구고잔동713-12남동공단2단지147B-4L

저작물 이용 허락서

학 과	생물신소재	학 번	20027569	과 정	박사
성 명	한글: 김 희 곤 한문 : 金 熙 坤 영문 : Kim Hee Gon				
주 소	광주광역시 북구 동림동 234번지 주공 죽림마을 104동 1209호				
연락처	E-mail : micro6649@hotmail.com				
논문제목	한글 : 해수에서 분리한 신규 메탄올 산화세균 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T 유래 methanol dehydrogenase와 MxaJ 단백질의 상호관계 및 trimethylamine biosensor 개발 영어 : Interaction between methanol dehydrogenase and MxaJ protein of a novel methanol oxidizing bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T and development of trimethylamine biosensor				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2008 년 08 월 30 일

저작자: 김 희 곤 (인)

조선대학교 총장 귀하