(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0040048
(43) 공개일자 2018년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 9/18* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 9/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0131639
(22) 출원일자 2016년10월11일
심사청구일자 2017년09월25일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 오륜동 양재대로 1218 올림픽선수기자촌아파트 201동 1601호
김상우
전라북도 익산시 선화로 209 (남중동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

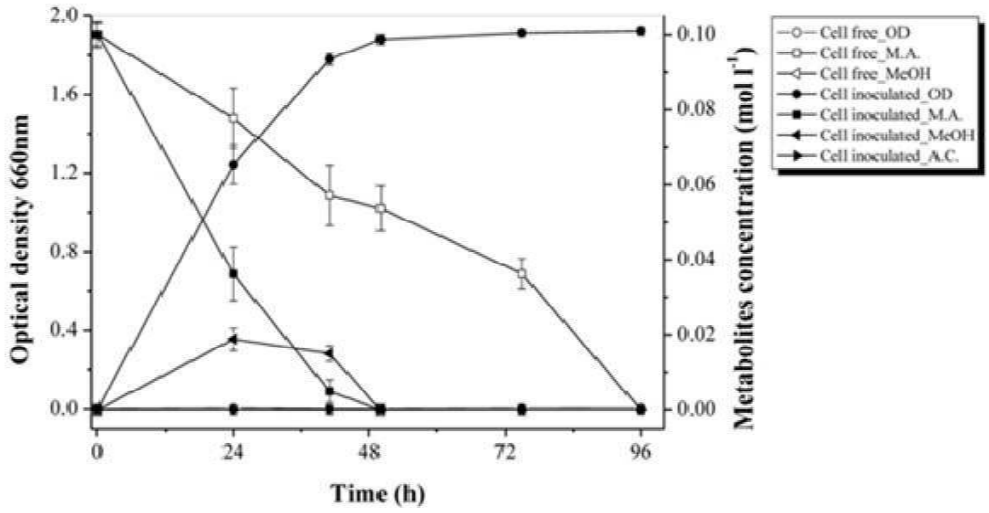
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 신규 아시네토박터 균주 KFCC11687P**

(57) 요 약

본 발명은 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 제공한다. 상기 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 카르복실에스터라아제 활성을 가짐으로써 배양액 내 메틸아세테이트를 아세트산 및 메탄올로 분해하는 동시에 상기 메틸아세테이트 탄소원으로 이용한다. 본 발명에 따르면, 상기 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 화학공정의 부산물인 메틸아세테이트를 생물학적 방법을 통해 경제적으로 용이하게 분해할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Y 301/01001 (2013.01)
C12R 1/01 (2013.01)
(72) 발명자
권유현
경기도 수원시 팔달구 권선로 477 124동 1003호 (매산로2가, 대한대우아파트)

이왕준
경기도 수원시 장안구 천천로22번길 34 522동 504호 (정자동, 백설마을삼환나우빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201632003
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)한국연구재단
연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸아세테이트(methyl acetate)를 단일 탄소원으로 이용하는 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.) 균주 KFCC11687P.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 서열목록 제1서열의 16S rRNA 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 카르복실에스터라아제(carboxylesterase) 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 카르복실에스터라아제는 메틸아세테이트를 아세트산 및 메탄올로 가수분해 하는 것을 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 호기성 조건에서 2 내지 10 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는 것을 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 혐기성 조건에서 2 내지 10 mM/h 메틸아세테이트 분해율을 갖는 것을 갖는 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 (ⅰ) 온도 15℃ 내지 38℃; 및 (ii) pH 4.5-8.5의 조건에서 생장하는 것을 특징으로 하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 접촉시키는 단계를 포함하는 메틸아세테이트의 분해 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 메틸아세테이트는 0.05 내지 0.5 mol/L 농도인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 신규 아시네토박터 균주 KFCC11687P에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 근래에 미국에서 수평보링 및 프래킹 기술을 이용하여 셰일 가스의 생산이 빠르게 증가하고 있다. 이에 따라 풍부한 생산량과 가격에 이점을 가지고 있는 셰일 가스는 주성분이 메탄이기 때문에 C1 탄소원으로서 가능성을 가지고 있는 물질이다. 하지만 메탄가스의 낮은 용해도로 인해 미생물의 성장이 더디고, 발효하는데 어려움을 가지고 있는 문제가 있다.

[0004] 메틸아세테이트 및 메틸포메이트는 메탄올과 일산화탄소에서 파생 될 수 있는 물질로서 공급 원료로서 사용될 수 있다. 특히 메틸아세테이트는 BASF社의 코발트와 같은 금속촉매, 이리듐 촉매를 이용한 카티바(Cativa) 공정, 몬산토社의 로듐 촉매를 이용하여 메탄올과 일산화탄소로부터 생산될 수 있다. 따라서 메틸아세테이트는 C1 가스 대신 사용될 액체 원료로서 잠재력을 가지고 있어, 연구가 되고 있다. 메틸아세테이트는 독성이 적으며 휘발성 유기 화합물이고, 대기오염의 요소로 고려되고 있지 않다는 장점이 있다. 아세토박테리움 우오디이, 유박테리움 리모섬은 혐기 조건에서 메틸아세이트를 아세테이트와 메탄올로 가수분해 할 수 있다고 알려져 있다.

[0005] 아시네토박터 균주는 감마프로테오박테리아 강, 그람 음성균 속에 속하는 균이다. 균주는 비 운동성, 산화 효소 음성, 호기성 조건을 갖는다. 이 균주는 방향족 화합물을 무기물화 하는데 기여하는 토양 생물이다. 아시네토박터 칼코아세티쿠스는 에탄올을 원료로 이멀산(emulsan) 생산에 사용되었고, 아시네토박터 종 스트레인 PD12는 페놀의 생분해에 사용 할 수 있다. 하지만 아시네토박터 종에서 메틸아세테이트를 활용 할 수 있는 균은 보고 된 적이 없다.

[0006] 고농의 메틸아세테이트는 보일러의 보조 연료로서 사용이 된다. 대부분의 저농도 메틸아세테이트는 액체산 촉매로 가수분해 시켜 초산 및 메탄올로 만들거나 폐수처리장으로 보내진다. 메틸아세테이트의 가수분해는 가역반응이고 평형상수가 낮아서 전환율을 상승시키기 위해 다량의 물을 사용한다. 이에 따라 증류탑 여러개가 연속 설치되어야 해서 경제성이 떨어진다. 이를 극복하기 위한 방법으로 반응 증류 공법이 있는데, 이 방법은 반응과 분리를 동시에 진행하여 경제성을 향상시킨 방법이다.

[0007] 메틸아세테이트 분해와 관련된 국내특허로는 등록특허 제10-0888065호(메틸아세테이트의 향상된 가수분해 방법), 등록특허 제10-0339973호(메틸아세테이트의 가수분해 방법 및 장치), 공개특허 제10-2015-0096792호(아세트산으르 제조하기 위한 통합 프로세서) 등이 공지되어 있고, Choo S et al.의 Engineering of Corynebacterium glutamicum to utilize methyl acetate, a potential feedstock derived by carbonylation of methanol with CO(J Biotechnol. 224 2016 47-50)에서 메틸 아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 코리네박테리움 글루타미쿰을 개시한다.

[0008]

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0888065호

(특허문헌 0002) 등록특허 제10-0339973호

(특허문헌 0003) 공개특허 제10-2015-0096792호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Burnham A, Han J, Clark CE, Wang M, Dunn JB, Palou-Rivera I. 2011. Life-cycle greenhouse gas emissions of shale gas, natural gas, coal, and petroleum. Environ. Sci. Technol. 46: 619-627.

(비특허문헌 0002) DuP., Eikmanns, B.J., 2015. C1-carbon sources for chemical and fuel productionby microbial gas fermentation. Curr. Opin. Biotechnol. 35, 6372.

(비특허문헌 0003) Kwangmin Kim, Jaewon Lee, Kyeongjun Seo, Myung-Gil Kim, Kyoung-Su Ha, Choongik Kim. 2016. Enhancement of methanewater volumetric mass transfer coefficient by inhibiting bubble coalescence with electrolyte, Journal of Industrial and Engineering Chemistry 33, 326329.

(비특허문헌 0004) Morris, G. 2005. Carbonylation of methanol to acetic acid and methyl acetate toacetic anhydride. In: Heaton, B. (Ed.), Mechanisms in Homogeneous Catalysis:A Spectroscopic Approach. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 195230.

(비특허문헌 0005) Thomas, C.M., Suss-Fink, G. 2003. Ligand effects in the rhodium-catalyzedcarbonylation of methanol. Coord. Chem. Rev. 243, 125142.

(비특허문헌 0006) Le Berre, C., Kalck, P., Serp, P., Layeillon, L., Thiebaut, D. 2000. Method forpreparing acetic acid and or methyl acetate in the presence of iridium andplatinum. Acetex Chimie. US Patent US6916952 B1.

(비특허문헌 0007) Uhm, S.J., Han, S.H., Oh, J.W., Joo, O.S. 1996. Processes for the carbonylation ofmethanol to form acetic acid, methyl acetate and acetic anhydride. KoreaInstitute of Science and Technology. US Patent US5488143 A.

(비특허문헌 0008) Lessner D. J., Lhu L., Wahal C. S., Ferry J. G. 2010. An Engineered Methanogenic Pathway Derived from the Domains Bacteria and Archaea, MBio., 1 (5) e0024310.

(비특허문헌 0009) Liu S. and Suflita J. M. 1994. Anaerobic biodegradation of methyl esters by Acetobacterium woodii and Eubacterium limosu,. J. Ind. Microbiol., 13(5), 321-7.

(비특허문헌 0010) Choi J. W., Choi H. G., Lee K. S. and Lee W. H. 1996. Control of ethanol concentration in a fed-batch cultivation of Acinetobacter using a feedback-assisted iterative learning algorithm, J. Biotechnol., 49, 29?43.

(비특허문헌 0011) Wang Y., Tian Y., Han B., Zhao H., Bi J. and Cai B. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized Acinetobacter sp. strain PD12, Journal of Environmental Sciences 19, 222?225.

(비특허문헌 0012) Choo S et al. Engineering of Corynebacterium glutamicum to utilize methyl acetate, a potential feedstock derived by carbonylation of methanol with CO J Biotechnol. 224 2016 47-50.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 화학공정 부산물인 메틸아세테이트(methyl acetate)를 분해할 수 있는 신규 균주를 분리 동정하고자 노력하였다. 그 결과, 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.) 균주 KFCC11687P를 분리 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 메틸아세테이트의 분해 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 제공한다.

[0021] 본 발명자들은 화학공정 부산물인 메틸아세테이트를 분해할 수 있는 신규 균주를 분리 동정하고자 노력하였다. 그 결과, 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 분리 동정하였다.

[0023] 본 발명의 신규 균주 KFCC11687P는 16S rRNA 염기 서열 분석을 통하여 아시네토박터 속 미생물로 동정되었으며 2016년 08월 23일자로 한국 미생물 보존 센터(KCCM)에 기탁하였고, 기탁번호 KFCC11687P를 부여받았다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 서열목록 제1서열의 16S rRNA 서열을 갖는다. 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 16S rRNA 서열은 NCBI GenBank에 등록하여 Accession number KX608736을 부여받았다.

[0026] 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 16S rRNA의 계통수 분석을 통해 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) DSM 30007이 가장 근접한 균주로 검색되었다.

[0028] 본 발명의 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 주요한 특징은 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 것이다.

[0029] 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 카르복실에스터라아제 활성을 가짐으로써 메틸아세테이트를 아세트산 및 메탄올로 가수분해 할 수 있다.

[0031] 본 발명의 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 호기성 및 혐기성 조건에서 메틸아세테이트 분해 활성을 갖는다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 호기성 조건에서 2 내지 10 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0033] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 호기성 조건에서 2 내지 8 mM/h, 2 내지 6 mM/h 또는 2 내지 4 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0034] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 호기성 조건에서 3.65 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 혐기성 조건에서 2 내지 10 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0036] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 혐기성 조건에서 2 내지 8 mM/h, 2 내지 6 mM/h 또는 2 내지 4 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0037] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 혐기성 조건에서 5.43 mM/h의 메틸아세테이트 분해율을 갖는다.

[0039] 본 발명의 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 온도 15℃ 내지 38℃; 및 (ii) pH 4.5-8.5의 조건에서 생장한다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 15℃ 내지 36℃, 17℃ 내지 36℃, 19℃ 내지 36℃ 또는 20℃ 내지 35℃ 온도 조건에서 생장한다.

[0041] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 20℃ 내지 35℃ 온도에서 정상적인 미생물 생장 곡선을 나타내었으며, 최적 온도는 30℃이다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 pH 4.5-8.5의 조건에서 생장한다.

[0043] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 pH 5.0-8.5, pH 5.0-8.0, pH 6.0-8.0 또는 pH 6.5-7.5의 조건에서 생장한다.

[0044] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 pH 5.0-8.0에서 0.5 이상의 흡광도(660 ㎚)를 나타내었으며, 최적 pH는 pH 7이다.

[0046] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 접촉시키는 단계를 포함하는 메틸아세테이트의 분해 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 메틸아세테이트는 0.05 내지 0.5 mol/L 농도이다.

[0048] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 메틸아세테이트는 0.1 내지 0.5 mol/L이다.

[0050] 본 발명의 방법은 상기 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053] (a) 본 발명은 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용하는 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P를 제공한다.

[0054] (b) 상기 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 카르복실에스터라아제 활성을 가짐으로써 배양액 내 메틸아세테이트를 아세트산 및 메탄올로 분해하는 동시에 상기 메틸아세테이트 탄소원으로 이용한다.

[0055] (c) 상기 신규 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P는 화학공정의 부산물인 메틸아세테이트를 생물학적 방법을 통해 경제적으로 용이하게 분해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 전자 현미경 이미지를 나타낸다.

도 2는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 16s rRNA의 계통수를 나타낸다.

도 3은 메틸아세테이트 하이드롤라아제(EC.3.1.1.)에 의한 메틸아세테이트의 생분해 과정을 나타낸다.

도 4a 내지 4c는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 성장 특성을 나타낸다. 도 4a 내지 4c는 각각 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 생장에 대한 온도, pH 및 메틸아세테이트의 초기 농도의 영향을 나타낸다.

도 5는 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 메틸아세테이트 분해 활성에 대한 호기성 조건의 영향을 나타낸다.

도 6은 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P의 메틸아세테이트 분해 활성에 대한 혐기성 조건의 영향을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] **실시예**

[0061] 메틸아세테이트(Methyl acetate)는 메탄올과 일산화탄소의 카르보닐화 반응 뿐만 아니라 아세트산 생성 공정과 같은 화학공정의 부산물로 얻어진다. 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 하는 미생물을 토양에서 동정하여, 처음으로 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용 할 수 있는 신규한 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.) 균주 KFCC11687P을 확보하였다. 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 이용 할 수 있는 균주를 동정하기 위해서 동두천 환경 사업소에서 샘플을 확보하였다. 3차수에 샘플 3 g을 넣고 배양 후, NMS(Nitrate Minimal Salt) 배지 및 100 mM 메틸아세테이트를 넣고 배양을 진행하였다. 또한 고체배지(NMS 배지 및 100 mM 메틸아세테이트)에 스크리닝하여 싱글 콜로니를 확보함으로써 16s rRNA 서열을 얻을 수 있었다.

[0062] 미생물 동정을 통해 찾은 아시네토박터 속 균주 KFCC11687P은 16s rRNA 시퀀싱(*Acinetobacter* sp. SWSWS 1)의 결과, 아시네토박터 바우만니 주 DSM 30007(*Acinetobacter baumannii* strain DSM 30007)에 가까운 종인 것을 확인하였다(도 1 및 2). NCBI Genbank에서 Accession number KX608736을 부여받았다.

[0064] **신규 *아시네토박터* 속 균주를 이용한 메틸아세테이트의 생분해**

[0065] 미생물에서 메틸아세테이트를 생분해하기 위해서는 카르복실에스테라아제(carboxylesterase, 메틸아세테이트 가수분해 효소, EC 3.1.1.)가 필요하다. 카르복실에스테라아제는 메틸아세테이트를 아세테이트와 메탄올로 분해하는 역할을 한다. 메틸아세테이트 유래 아세테이트와 메탄올은 각각 아세틸-CoA로 전환 되어 대사물질이나 세포매스(cell mass)로 전환된다(도 3).

[0067] **신규 아시네토박터 속 균주의 성장 특성**

[0068] NMS 배지(표 1)에 아시네토박터 속 균주의 성장 특성을 분석하기 위해서 온도, pH, 그리고 초기 메틸아세테이트의 농도 별로 실험을 진행하였다.

[0069] 아시네토박터 속 균주의 온도 최적화 실험은 pH 7인 NMS 배지 50 ㎖에 필터 처리한 메틸아세테이트 100 mM을 넣고, 균주를 1 v/v%으로 접종한 후 20, 25, 30, 35, 40℃로 셋팅이 된 쉐이킹 인큐베이터에서 진행하였다. pH 최적화 실험은 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10인 NMS 배지 50 ㎖에 각각 필터 처리한 메틸아세테이트 100 mM을 넣고, 균주 1 v/v%로 접종 후 30℃ 쉐이킹 인큐베이터에서 배양하였다. 초기 메틸아세테이트 농도 실험은 pH 7인 50 ㎖ NMS 배지에 필터 처리한 메틸아세테이트를 농도 별로 넣고, 균주 1 v/v%로 접종 후 30℃ 교반 인큐베이터에서 배양하였다.

[0070] 온도는 20-40℃ 구간별 범위에서, pH는 pH 4-10의 범위에서 진행하였다. 또한, 초기 메틸아세테이트 농도는 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 mol/L에서 진행하였다. 균주는 30℃, pH 7에서 가장 높은 성장을 보였으며, 초기 메틸아세테이트의 농도가 0.1 mol/L인 경우에 가장 높은 성장을 보였다(도 4a 내지 4c). 메틸아세테이트가 과도하게 들어가게 되면 박테리아에 독성물질로 작용을 해서 균주 성장 저해제로 작용 된다고 알려져 있다.

표 1

[0071]

NMS Medium	
Ingredient	Amount (per liter)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
KNO_3	1.25 g
NH_4Cl	0.25 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.23 g
3.8% (w/v) solution Fe-EDTA	0.1 ml
0.1% (w/V) $NaMo \cdot 4H_2O$	0.5 ml
Trace element solution	1.0 ml
Phosphate stock solution	10 ml
Vitamin stock	1.0 ml

Phosphate stock solution	
Ingredient	Amount (per liter)
KH_2PO_4	26 g
Na_2HPO_4	33 g

Trace element solution	
Ingredient	Amount (per liter)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	500 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	400 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	16 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	50 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	10 mg
H_3BO_3 (boric acid)	15 mg
EDTA	250 mg

Vitamin Stock	
Ingredient	Amount (per liter)
Biotin	2.0 mg
Folic acid	2.0 mg
Thiamine HCl	5.0 mg
Ca pantothenate	5.0 mg
Vitamin B_{12}	0.1 mg
Riboflavin	5.0 mg
Nicotiamide	5.0 mg

[0073] **호기성 배양**

[0074] NMS 배지에서 메틸아세테이트를 단일 탄소원으로 공급하였을 경우, 신규 아시네토박터 속 균주의 성장 및 배양액 분석을 수행하였다. 조건은 호기성 조건에서 균주를 접종한 것과 균주를 접종하지 않은 플라스크로 진행하였다.

[0075] 250 ㎖ 플레인 플라스크에 pH 7인 NMS 배지 50 ㎖와 필터 처리한 메틸아세테이트를 100 mM을 넣은 후, 아시네토박터 속 균주를 1 v/v%로 접종한 것과 균주를 접종하지 않는 두 가지 조건으로 실험을 진행하였다. 배양은 30 ℃ 쉐이킹 인큐베이터에서 진행하였다. 호기성 조건에서 실험을 진행하기 때문에 스토퍼를 사용하였다. 배양액 속의 메틸아세테이트의 농도는 WATERS HPLC를 이용하여 분석하였다.

[0076] 메틸아세테이트는 휘발성이 강해서 균주-프리 조건에서 1.48 mM/h로 감소하였고, 접종이 된 경우 3.65 mM/h로 감소하는 것을 확인하였다(도 5). 메틸아세테이트가 가수분해 될 경우 아세테이트와 메탄올이 생성이 되어야 하는데, 균주 접종 된 경우 아세테이트는 측정이 되지 않았고 메탄올은 측정이 되다가 사라지는 것을 확인하였다. 신규 아시네토박터 속 균주의 대사 경로는 밝혀지지 않았지만, 아세테이트와 메탄올을 아시네토박터 속 균주가 세포매스나 대사물질로 사용하는 것으로 추정 할 수 있다.

[0078] **혐기성 배양**

[0079] 혐기성 배양은 아시네토박터 속의 균주 SWSWS1이 에스터라아제를 활용해 메틸아세테이트를 메탄올과 아세테이트로 전환할 수 있는지 확인하는 실험이다. 호기성 조건에서는 메틸아세테이트의 감소, 균주의 성장, 그리고 메탄올이 측정이 되다가 사라지기 때문에 혐기조건에서 균주내 효소의 활성을 이용한 전환실험을 진행하였다. 메틸아세테이트가 에스터라아제에 의하여 메탄올과 아세테이트로 전환이 되는데, 아세테이트가 생성이 되어 축적이 되면 배양액의 pH가 내려가서 효소의 활성에 영향을 주는 문제가 있다. 혐기성 조건에서의 실험은 균주의 성장이 목적이 아니기 때문에 다른 성분은 중요한 요소가 아니다. NMS 배지에 1 mM 인산완충액이 있지만 아세테이트의 축적에 따른 완충작용을 할 수 없기 때문에 150 mM 인산완충액을 사용하였다. 균주 10 g/l(OD_{600}

15.2) 및 메틸아세테이트 250 mM을 세럼 바틀(serum bottle)에 넣고 고무 캡으로 막고 알루미늄 실 크림프 캡(aluminum seal crimp cap) 및 바이알 크림퍼(vial crimper)을 이용해 혐기성 조건을 만들었다. 시료 2시간마다 시린지(syringe)를 이용해 채취하여 HPLC, GC-FID를 이용해 측정하였다.

[0080] 혐기 조건에서 150 mM 인산완충액에 DCW(Dry Cell Weight) 10 g/L 아시네토박터 속 균주 및 250 mM 메틸아세테이트를 넣어 전세포 생물전환(whole cell conversion)을 수행하였다. 44시간의 실험 결과, 250 mM의 메틸아세테이트가 생분해되어 생성된 메탄올 및 아세테이트는 각각 251.7mM 및 180.0mM이 축적된 것을 GC-FID로 측정하였다(도 6). 메틸아세테이트가 가수분해되면 메탄올과 아세테이트가 1:1 비율로 생성이 되어야 하지만, 혐기 조건을 진공 조건으로 만들지 않았기 때문에 상부 공간의 산소와 아세테이트가 세포매스나 대사물질로 소모 된 것으로 추정 할 수 있다. 반면 혐기 조건에서 아시네토박터 속 균주가 들어가지 않은 실험군에서는 메틸아세테이트가 일정한 농도로 남아 있는 것을 확인하였다.

[0081] 혐기 조건에서의 실험은 균주 내의 에스터라아제를 이용해 메틸아세테이트가 메탄올과 아세테이트로 전환이 되어 소모되지 않고 축적이 되는지 확인하는 실험이다. 따라서 균주의 성장에 필요한 성분이 포함된 NMS 배지보다 아세테이트의 축적에 따른 pH 완충작용을 할 수 있는 150 mM 인산완충액을 사용하였다. 인산완충액에는 pH 완충작용을 위한 약산 및 짝염기 외에는 첨가된 물질이 없기 때문에 균주 성장에 제한을 받을 수 있다.

[0082]

[0083] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0085]

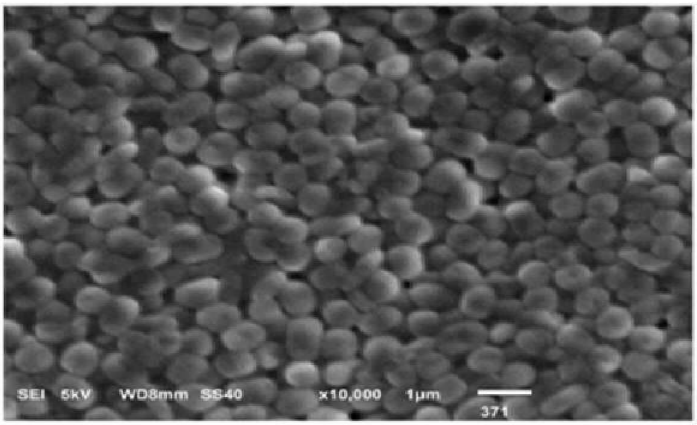
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11687P

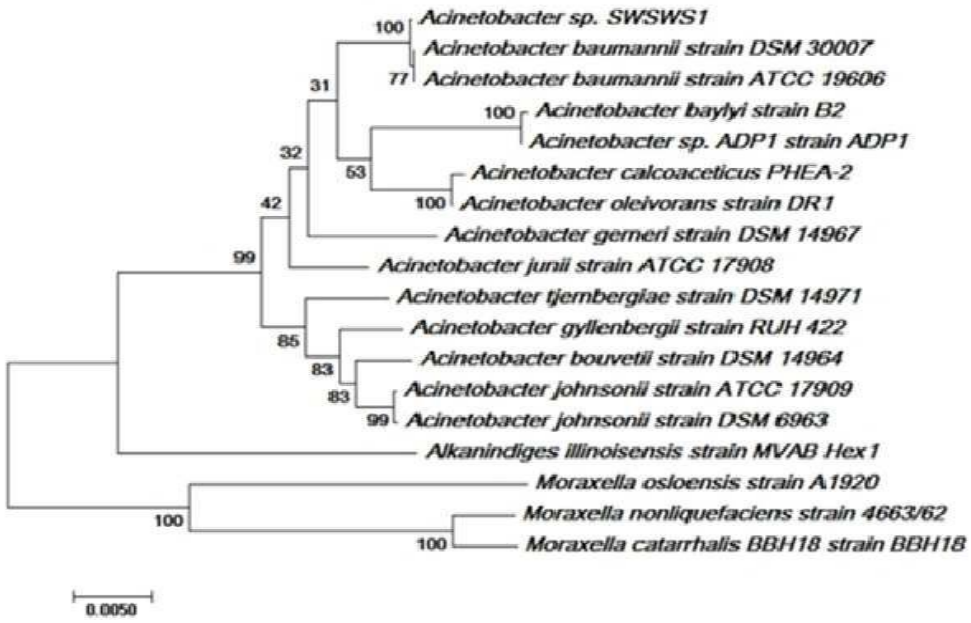
수탁일자 : 20160823

도면

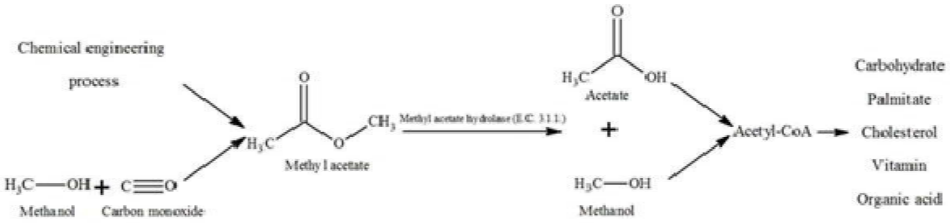
도면1



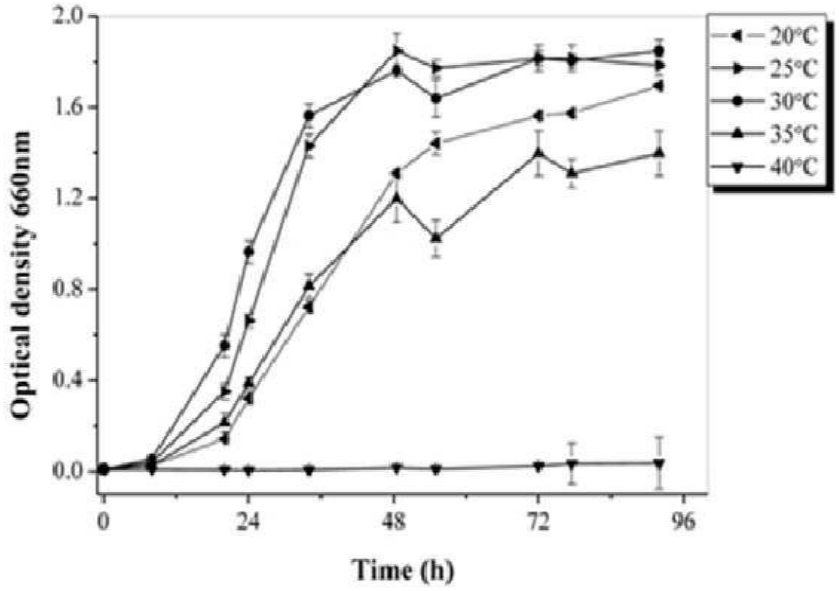
도면2


Acinetobacter sp. SWSWS1
Acinetobacter baumannii strain DSM 30007
Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606
Acinetobacter baylyi strain B2
Acinetobacter sp. ADP1 strain ADP1
Acinetobacter calcoaceticus PHEA-2
Acinetobacter oleivorans strain DR1
Acinetobacter gerneri strain DSM 14967
Acinetobacter junii strain ATCC 17908
Acinetobacter tjernbergiae strain DSM 14971
Acinetobacter gyllenbergii strain RUH 422
Acinetobacter bouvetii strain DSM 14964
Acinetobacter johnsonii strain ATCC 17909
Acinetobacter johnsonii strain DSM 6963
Alkanindiges illinoisensis strain MVAB Hex1
Moraxella osloensis strain A1920
Moraxella nonliquefaciens strain 4663/62
Moraxella catarrhalis BBH18 strain BBH18
100
77
31
100
32
53
100
42
99
85
83
83
99
100
100
0.0050

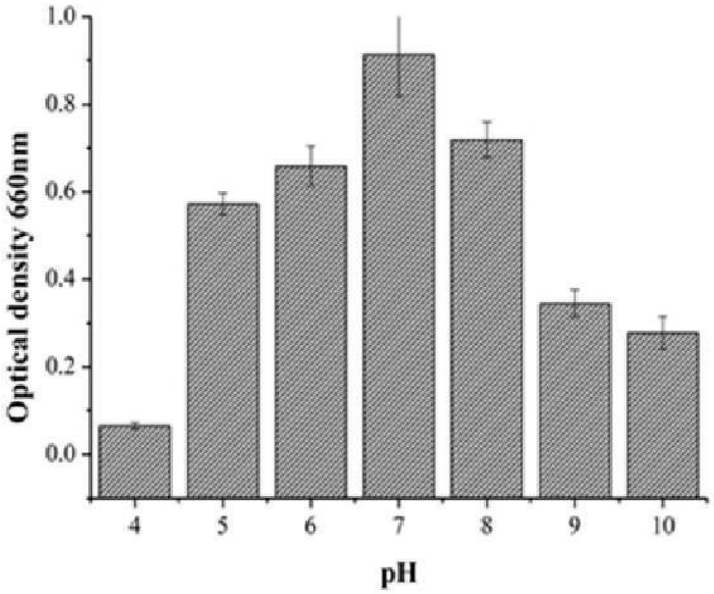
도면3


Chemical engineering process
Methanol
Carbon monoxide
Methyl acetate
Methyl acetate hydrolase (E.C. 3.1.1.)
Acetate
Methanol
Acetyl-CoA
Carbohydrate
Palmitate
Cholesterol
Vitamin
Organic acid

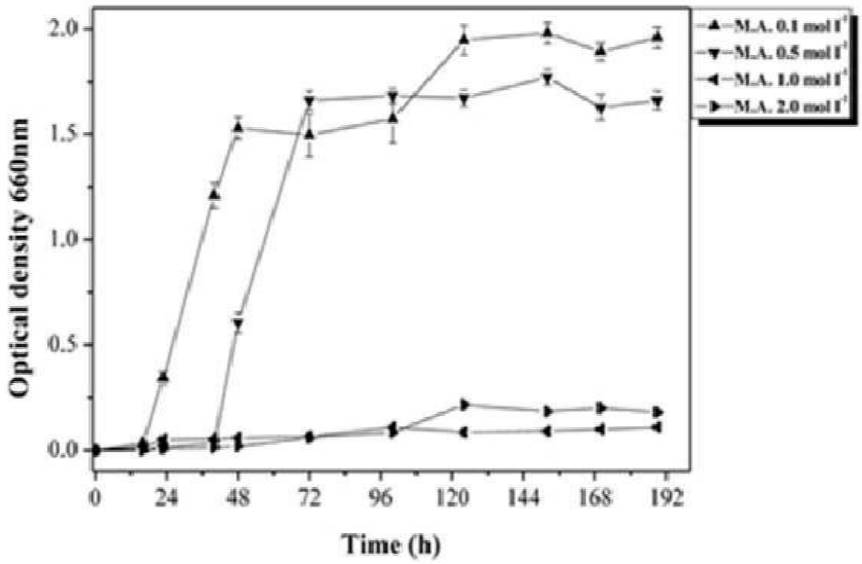
도면4a


Optical density 660nm
Time (h)
20°C
25°C
30°C
35°C
40°C
0.0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
0
24
48
72
96

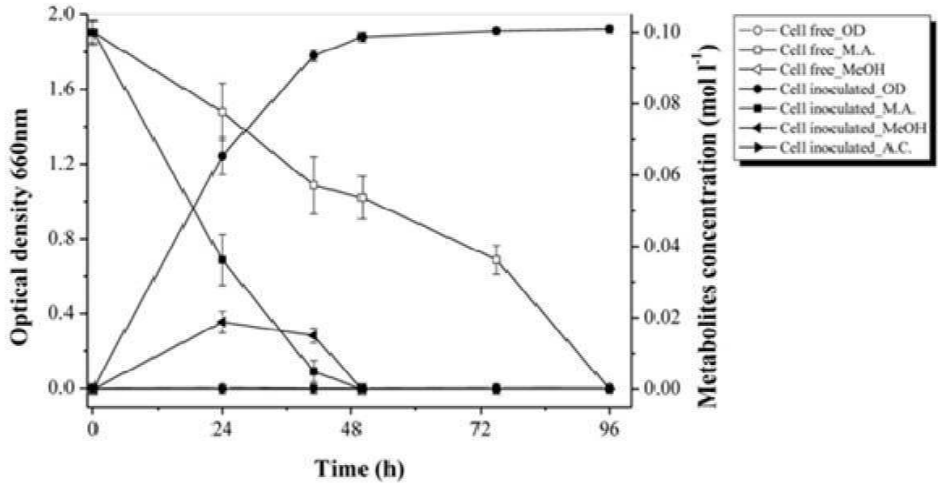
도면4b


Optical density 660nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
4
5
6
7
8
9
10
pH

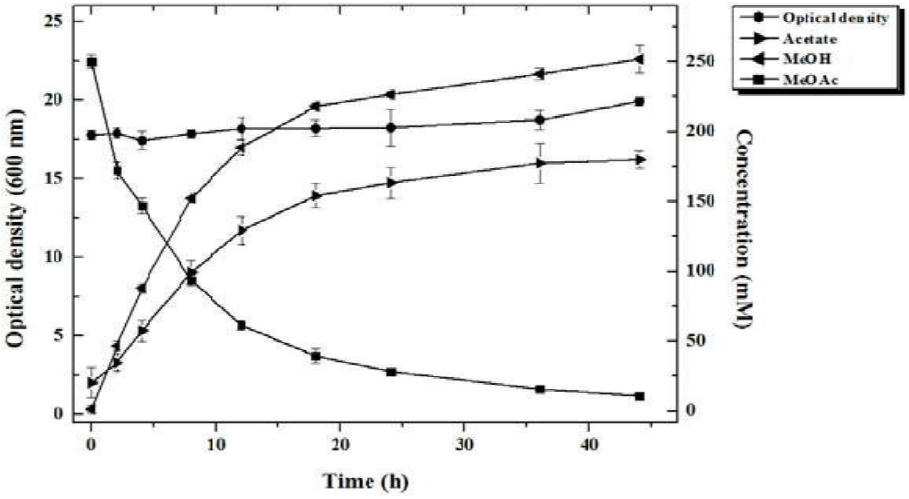
도면4c


Optical density 660nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
24
48
72
96
120
144
168
192
Time (h)
M.A. 0.1 mol l-1
M.A. 0.5 mol l-1
M.A. 1.0 mol l-1
M.A. 2.0 mol l-1

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Novel Acinetobacter sp. KFCC11687P Using Methyl Acetate as a Sole Carbon Source

<130> PN160274

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1483

<212> DNA

<213> Acinetobacter sp.

<400> 1

attgacgctg gcggcaggct taacacatgc aagtcgagcg ggggaaggta gcttgctacc 60

ggacctagcg gcggacgggt gagtaatgct taggaatctg cctattagtg ggggacaaca 120

tctcgaaagg gatgctaata ccgcatacgt cctacgggag aaagcagggg atcttcggac 180

cttgcgctaa tagatgagcc taagtcggat tagctagttg gtggggtaaa ggcctaccaa 240

ggcgacgatc tgtagcgggt ctgagaggat gatccgccac actgggactg agacacggcc 300

cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggggggaac cctgatccag 360

ccatgccgcg tgtgtgaaga aggccttatg gttgtaaagc actttaagcg aggaggaggc 420

tactttagtt aatacctagg gatagtggac gttactcgca gaataagcac cggctaactc 480

tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt gcgagcgtta atcggattta ctgggcgtaa 540

agcgtgcgta ggcggcttat taagtcggat gtgaaatccc cgagcttaac ttgggaattg 600

cattcgatac tggtgagcta gagtatggga gaggatggta gaattccagg tgtagcggtg 660

aaatgcgtag agatctggag gaataccgat ggcgaaggca gccatctggc ctaatactga 720

cgctgaggta cgaaagcatg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccatgccgt 780

aaacgatgtc tactagccgt tggggccttt gaggctttag tggcgcagct aacgcgataa 840

gtagaccgcc tggggagtac ggtcgcaaga ctaaaactca aatgaattga cgggggcccg 900

cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctggccttg 960

acatactaga aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaatctagat acaggtgctg 1020

catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc 1080

cttttcctta cttgccagca tttcggatgg gaactttaag gatactgcca gtgacaaact 1140

ggaggaaggc ggggacgacg tcaagtcatc atggcccttа cggccagggc tacacacgtg 1200

ctacaatggt cggtacaaag ggttgctaca cagcgatgtg atgctaatct caaaaagccg 1260

atcgtagtcc ggattggagt ctgcaactcg actccatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg 1320

cggatcagaa tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca 1380

tgggagtttg ttgcaccaga agtagctagc ctaactgcaa agagggcggt taccacggtg 1440

tggccgatga ctggggtgaa gtcgtaacag gggaaacccg taa 1483