



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0049573  
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 7/04 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12P 7/04 (2013.01)  
C12Y 114/13025 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0131172  
(22) 출원일자 2018년10월30일  
심사청구일자 2018년10월30일  
(30) 우선권주장  
1020170142093 2017년10월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
서강대학교산학협력단  
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)  
(72) 발명자  
나정걸  
서울특별시 마포구 백범로 28 서강제2빌딩 702호  
오병근  
서울특별시 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
윤대웅, 공병욱

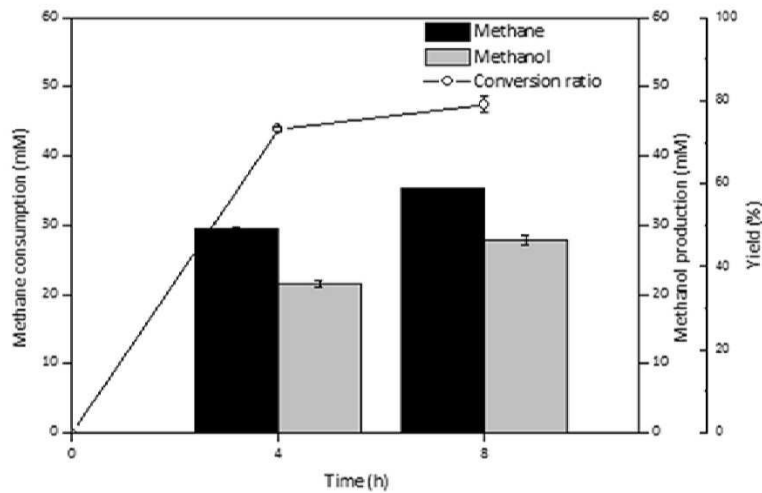
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 외부 환원력이 필요없는 메탄자화균을 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법

### (57) 요약

본 발명은 외부 환원력이 필요없는 메탄자화균을 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따르면 메탄을 생산 과정에서 MDH를 부분적으로 저해하여 촉매량과 환원력 양을 일정하게 유지함으로써 메탄을 생산량을 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄을 생산 공정에 이용할 수 있다.

대표도 - 도4b



(72) 발명자

**김현수**

서울특별시 강남구 청담동 삼익아파트 12동 907호

**한준희**

대전광역시 유성구 원내동 샘물타운 아파트 306  
동403호

**김유진**

광주광역시 동구 의재로82번길 9, 101동 402호

**이진원**

서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽  
선수기자촌아파트) 201동 1601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064929

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼물라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 메탄올 생산용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것인, 메탄올 생산용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM의 농도로 포함하는 것인, 메탄올 생산용 조성물.

#### 청구항 4

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼물라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주로부터 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 균주는 메틸로모나스 속 DH-1인 것인, 메탄올 생산 방법.

#### 청구항 6

제4항에 있어서, 상기 배양액은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM의 농도로 포함하는 것인, 메탄올 생산 방법.

#### 청구항 7

제4항에 있어서, 상기 전환 단계는 균주 세포 내의 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 0.5 이상으로 유지하며 수행되는 것인, 메탄올 생산 방법.

#### 청구항 8

제4항에 있어서, 상기 전환 단계는 10 내지 50%(v/v)의 메탄을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것인, 메탄을 생산 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 전환 단계는 상기 가스를 10 내지 900분 동안 배기하여 수행되는 것인, 메탄을 생산 방법.

#### 청구항 10

제4항에 있어서, 상기 전환 단계는 25 내지 35℃의 온도에서 수행되는 것인, 메탄을 생산 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 외부 환원력이 필요없는 메탄자화균을 이용한 메탄 이용 메탄을 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 EDTA를 일정량 포함하는 조건에서 메탄자화균을 이용하여 촉매량과 환원력을 일정하게 유지함으로써 메탄올의 생산량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 현재 보고된 메탄자화균을 이용한 메탄 이용 메탄을 생산 방법은 메탄올 탈수소화 효소의 블로킹을 통해 메탄올로부터 생산된 메탄올이 대사되지 않도록 하여 배양액에 축적시키는 방법을 사용하고 있다.

[0003] 온화한 조건에서 메탄의 전환이 가능함에도 생물학적인 방법에 의한 메탄올 생산이 어려운 이유는 두 가지가 있다. 첫째, 메탄 산화 효소(methane monooxygenase; MMO)는 메탄의 전환을 위하여 환원력이 필요하다. 둘째, 생산된 메탄올은 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH)에 의하여 분해된다.

[0004] 메탄자화균(methanotroph) 세포 내에서는 메탄 전환에 필요한 환원력이 메탄올 산화로부터 회수되고, 이 과정에서 생성된 포름알데히드가 세포 대사를 통해 생장에 이용되므로 자연적인 메탄올 축적 유도는 매우 어려울 수밖에 없다. 따라서 현재까지의 메탄자화균에 의한 메탄올 생산 연구 결과를 보면, 생성된 메탄올의 분해를 방지하고자 MDH 저해제를 사용하고 있다. 그러나, 인위적으로 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 억제할 경우 환원력이 부족하여 메탄 산화가 이루어지지 않는다.

[0005] 따라서, 기존의 방법들은 이를 해결하기 위하여 메탄올 탈수소화 효소의 저해와 함께 외부 환원력으로 메탄올보다 고가인 개미산 등을 공급하고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH)를 부분적으로 저해하였을 때 외부 환원력의 공급 없이 메탄올 생산 공정의 수행이 가능함을 확인하였다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼울라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 메탄올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 메틸로모나스 속, 메틸로박테리움 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코

커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로셀머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼롤라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주로부터 EDTA를 포함하는 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 외부 환원력이 필요없는 메탄자화균을 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 EDTA를 일정량 포함하는 조건에서 메탄자화균을 이용하여 촉매량과 환원력을 일정하게 유지함으로써 메탄올의 생산량을 증가시킨다.
- [0010] 본 발명자들은 EDTA를 일정량 포함하는 조건에서 메탄자화균을 이용하여 메탄올을 생산함으로써, 외부 환원력의 공급 없이도 메탄올의 생산량을 증가시켰다.
- [0011] 본 발명의 구현을 위하여 1) 지속적으로 세포를 생산하는 세포 배양 장치와 2) 메탄올을 생산하는 메탄올 생산 장치를 구성하고, 메탄올 생산 과정에 배양 장치에서 생산된 세포를 공급하여 촉매량과 환원력 양을 일정하게 유지함으로써 메탄올 생산량을 증가시키고자 하였다.
- [0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 일 양태는 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylolalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼롤라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 메탄올 생산용 조성물이다.
- [0014] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 상기 조성물은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM, 0.01 내지 2.00 mM, 0.01 내지 1.00 mM, 0.01 내지 0.80 mM, 0.10 내지 5.00 mM, 0.10 내지 2.00 mM, 0.10 내지 1.00 mM, 0.10 내지 0.80 mM, 0.20 내지 5.00 mM, 0.20 내지 2.00 mM 또는 0.20 내지 1.00 mM, 예를 들어, 0.20 내지 0.80 mM의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태는 메틸로모나스 속, 메틸로박테리움 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로셀머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼롤라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주로부터 EDTA를 포함하는 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법이다.
- [0017] 본 명세서상의 용어 "전환"은, 배양액 내의 물질을 이용하여 균주가 특정 물질을 생산하는 과정을 의미한다.
- [0018] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 조성물은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM, 0.01 내지 2.00 mM, 0.01 내지 1.00 mM, 0.01 내지 0.80 mM, 0.10 내지 5.00 mM, 0.10 내지 2.00 mM, 0.10 내지 1.00 mM, 0.10 내지 0.80 mM, 0.20 내지 5.00 mM, 0.20 내지 2.00 mM 또는 0.20 내지 1.00 mM, 예를 들어, 0.20 내지 0.80 mM의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한

정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 전환 단계는 균주 세포 내의 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 0.5 이상으로 유지하며 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 전환 단계는 10 내지 50%(v/v), 10 내지 45%(v/v), 10 내지 40%(v/v), 10 내지 35%(v/v), 20 내지 50%(v/v), 20 내지 45%(v/v), 20 내지 40%(v/v), 20 내지 35%(v/v), 25 내지 50%(v/v), 25 내지 45%(v/v) 또는 25 내지 40%(v/v), 예를 들어, 25 내지 35%(v/v)의 메탄을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 전환 단계는 상기 가스를 10 내지 900분 동안 배기하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가스의 배기에 소요되는 최적 시간은 전체 배양액의 부피, 공정 수행 시간, 사용하는 균주의 종류 및 배지 조성을 포함하는 조건의 변동에 따라 적절히 조정될 수 있다.

[0023] 상기 전환 단계는 25 내지 35℃, 27 내지 35℃, 29 내지 35℃, 25 내지 32℃, 또는 27 내지 32℃, 예를 들어, 29 내지 32℃의 온도에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

### 발명의 효과

[0024] 본 발명은 외부 환원력이 필요없는 메탄산화균을 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따르면 메탄올 생산 과정에서 MDH를 부분적으로 저해하여 촉매량과 환원력 양을 일정하게 유지함으로써 메탄올 생산량을 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄올 생산 공정에 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 메탄올 생산 경로를 보여주는 모식도이다.

도 2는 DH-1 균주의 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH)의 활성화에 대한 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)의 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 EDTA의 농도에 따른 DH-1 균주 세포의 MDH 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 EDTA를 첨가하지 않은 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

도 4b는 EDTA를 0.50 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

도 4c는 EDTA를 10.00 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

도 5a는 EDTA를 첨가하지 않은 배지 조건하에서 DH-1 균주 세포 내 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 EDTA를 0.50 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주 세포 내 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 나타낸 그래프이다.

도 5c는 EDTA를 10.00 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주 세포 내 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 DH-1 균주의 전환반응에서 EDTA의 농도를 달리한 배지 조건과 흡광도의 관계를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

#### [0028] 실시예 1: EDTA의 최적 농도 결정

[0029] 메탄 한 분자의 전환에는 전자 두 개가 필요하며, 메탄올의 산화를 통해 전자 네 개가 생산될 수 있으므로 이론적으로는 MDH 효소 활성의 적절한 조절을 통해 메탄 1몰로부터 최대 1/2몰의 메탄올을 얻을 수 있다.

[0030] 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH) 활성 제어를 통한 메탄올의 선택적 생산을 위하여 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 사용하였다. EDTA는 금속 킬레이터로서 MDH에서 리실(lysyl) 또는 아르기닐(arginyl) 잔기의 고정을 통한 초기 결합을 방해함으로써 MDH의 전자 전달을 방해할 수 있어 이전의 메탄올 생산 연구에서 많이 사용되어 왔다.

[0031] 50 mL NMS 배지가 포함된 500 mL 배플 플라스크(baffled flask)에 1 mL의 DH-1 스탁(stock, KCTC 13004BP)을 접종한 후 주기적으로 메탄/공기를 주입하며 600 nm에서 배양액의 흡광도(OD600)가 5 내지 6이 될 때까지 진탕 배양기에서 30℃, 230 rpm으로 배양하여 도 1과 같은 경로로 반응을 유도하였다. 배양 시 외부 공기의 유입과 내부 메탄 또는 프로판의 유출을 방지하기 위하여 플라스크에 부틸 고무(butyl rubber) 재질의 셉텀(septum)이 있는 마개를 사용하였다. NMS 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0032]

| NMS 조성                                                 | Amount for 1L |
|--------------------------------------------------------|---------------|
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 1 g           |
| KNO <sub>3</sub>                                       | 1 g           |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                  | 0.228 g       |
| Fe-EDTA                                                | 0.0038 g      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>                       | 0.0006 g      |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 0.5 mg        |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 0.4 mg        |
| MnCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 0.02 mg       |
| CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                  | 0.05 mg       |
| NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                  | 0.01 mg       |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 0.015 mg      |
| EDTA                                                   | 0.25 mg       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 0.26 g        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7(H <sub>2</sub> O) | 0.62 g        |
| 바이오틴(Biotin)                                           | 0.02 mg       |
| 폴산(Folic acid)                                         | 0.02 mg       |
| 티아민 HCl(Thiamine HCl)                                  | 0.05 mg       |
| Ca 판토텐산염(pantothenate)                                 | 0.05 mg       |
| 비타민(Vitamin) B12                                       | 0.001 mg      |
| 리보플라빈(Riboflavin)                                      | 0.05 mg       |
| 니코틴아마이드(Nicotinamide)                                  | 0.05 mg       |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                  | 2.5 mg        |

[0033] 메탄을 전환 실험을 위하여 상기 배양한 배양액을 원심분리하고 상등액을 제거한 다음 PBS 버퍼(buffer)로 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 이후 pH 8.5의 PBS 버퍼에 EDTA 농도를 0.00, 0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 및 10.00 mM로 설정하여 추가한 다음 세척된 메탄산화균 세포를 OD 30이 되도록 추가하였다. 메탄:공기=3:7 부피비의 가스를 30분간 배기한 다음 진탕 배양기에서 30℃에서 230 rpm으로 교반하며 진행하였다.

[0034] 다양한 EDTA 농도에서 메틸로모나스 속(Methylobacterium sp.) DH-1의 MDH 활성에 대한 EDTA의 영향을 관찰하였다. MDH의 활성은 MDH가 메탄올을 산화시킬 때 발생하는 전자에 의한 DCPIP(2,6-dichlorophenolindophenol)의 환원 속도를 측정하여 결정하였다 (참고문헌: 김희곤, 이상귀, 김시욱, "신규 type I 메탄산화세균 *Methylobacterium* sp. HG-1을 이용한 메탄올의 생합성", 공학기술논문지, 1(1), 33-37 (2008))

[0035] 도 2에서 확인할 수 있듯이, EDTA에 의한 저해 효과는 0.01 mM까지는 나타나지 않았으며, 이후 1.00 mM 농도까지는 급격히 증가하였다. 0.50 mM의 EDTA를 첨가하였을 때, MDH의 특이적 활성(specific activity)은 2.095 nmol/mg protein/min로서, 원래 활성의 31% 수준이었다. 1.00 mM 이상의 EDTA에서 활성은 서서히 저해되며 최종적으로 EDTA 농도가 10.00 mM에 이르면 MDH의 활성은 완전히 저해되었다. 메탄이 메탄올로 전환하는데 필요한 전자와 메탄올이 산화되어 얻을 수 있는 전자를 고려할 때, MDH의 활성이 1/3 내지 1/2일 때 메탄올을 가장 많이 축적할 수 있으리라 예상되어 EDTA 최적 농도를 0.50 mM로 결정하였다.

[0037] 실시예 2: EDTA에 의한 MDH 저해 효과의 확인

[0038] EDTA에 의한 MDH 효소 저해가 in-vivo 상에서도 이루어지는지 확인하기 위하여 반응 버퍼(reaction buffer)에서



초기 메탄올 농도가 45 mM일 때 *Methylomonas* sp. DH-1 세포를 투입하여 메탄올 분해를 관찰하였다. 효소 활성 실험에서 도출한 0.00 mM, 0.50 mM, 그리고 10.00 mM의 EDTA 농도에서 DH-1 휴지 세포(resting cell)의 시간당 메탄올 소모량을 분석하였다.

[0039] 도 3에서 확인할 수 있듯이, EDTA가 포함되지 않았을 때 DH-1 세포는 4시간만에 메탄올을 모두 소모하였다. 그러나 MDH 활성이 대부분 저해를 받는 EDTA 10.00 mM이 포함된 조건에서는 4시간이 지나도 1.80 mM의 메탄올만을 소모함으로써 메탄올 분해가 거의 이루어지지 않았음을 확인할 수 있다. 한편, MDH 부분저해 조건인 EDTA 0.50 mM 포함 조건에서 DH-1 세포는 4시간 동안 투입 메탄올의 31%인 13.9 mM의 메탄올을 소모하여 실제 전세포 전환 실험에서도 MDH의 부분 저해가 가능함을 확인하였다.

### [0041] 실시예 3: 메탄올 전환 및 축적 정도의 확인

[0042] 실시예 1 및 2에서 수행한 효소 활성 실험과 휴지 세포 실험으로부터 얻은 MDH 부분 저해 효과를 이용하여 실제 메탄 전환 실험을 수행하였다. *Methylomonas* sp. DH-1 세포를 투입하여 메탄의 소모를 관찰하였다.

[0043] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, MDH 저해를 받지 않는 EDTA가 없는 조건에서 메탄 전환 메탄올 생산 실험 결과, 반응 4시간 및 8시간째에 메탄의 소비량은 각각 36.28 mM, 37.10 mM이었다. 이는 대사 과정에 저해를 받지 않았기 때문에 세포 내에서 가장 많은 메탄 소비량을 보인 것으로 볼 수 있다.

[0044] 그러나 MDH 저해가 없는 조건에서 메탄올은 계속해서 산화되기 때문에 메탄올 축적은 거의 발생하지 않았다. 반응 4시간째에 최대 메탄올 생산은 0.273 mM였으며 메탄 소비 대비 메탄올 수율은 0.8%이었다. 반응 8시간째에 메탄올은 더 감소하여 0.224 mM였으며 메탄 소비 대비 메탄올 수율은 0.6%이었다.

[0045] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, MDH 활성을 1/3 수준으로 낮춘 조건(EDTA 0.50 mM)에서 메탄올은 성공적으로 축적되었다. 메탄 소모량은 4시간 및 8시간째에 각각 29.41 mM과 35.24 mM로서 EDTA가 없는 조건보다 줄어들었으나, 메탄올 농도는 반응 4시간째에 21.52 mM(0.69 g/l)로 빠르게 증가하였고 이 후, 반응 8시간째에 메탄올 생산은 최종 27.85 mM(0.892 g/l) 까지 증가하였다. 메탄 소비 대비 메탄올 생산 수율은 각각 4시간 및 8시간째에 73.1%, 79.0%였다.

[0046] 도 4c에서 확인할 수 있듯이, MDH 완전 저해가 발생하는 EDTA 10.00 mM 조건에서는, 메탄올 산화를 통한 환원력 공급이 이루어지지 않으므로 메탄 전환이 이루어지지 않아 메탄 소비와 메탄올 축적이 모두 거의 발생하지 않았다. 반응 4시간째에 소비된 메탄은 3.62 mM, 생산된 메탄올 농도는 0.06 mM에 불과하였다.

[0047] 결론적으로, MDH 부분 저해를 통하여 외부 환원력 없이도 최대 0.892 g/l의 메탄올을 생산할 수 있었다.

### [0049] 실시예 4: NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 통한 세포 내 환원력 측정

[0050] 메탄자화균을 이용한 메탄의 전환과 메탄올 생산 과정에서 환원력 레벨(level)은 매우 중요한 역할을 담당한다. *Methylomonas* sp. DH-1 휴지 세포를 사용한 메탄올 전환에서 세포 내의 환원력 레벨을 판단하기 위하여, NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 측정하였다.

[0051] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, MDH 저해를 받지 않는 EDTA가 없는 조건에서 전환 시간 동안 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율이 초기 상태에서 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 *Methylomonas* sp. DH-1 내에서 메탄으로부터 생산되는 메탄올이 모두 메탄 생산에 필요한 환원력 공급에 다시 활용되는 것을 의미한다.

[0052] 도 5b에서 확인할 수 있듯이, MDH가 부분적으로 저해된 EDTA 0.50 mM이 포함된 조건에서의 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율은 전환 시간 동안 초기에 일부 감소하지만 어느 정도 유지되고 있음을 알 수 있었다. 생산된 메탄올은 부분 저해된 MDH의 활성에 따라 일부는 메탄 전환에 필요한 환원력으로 공급되고, 일부는 반응 버퍼(reaction buffer)에 축적되는 것으로 판단된다. 다만, 전체적인 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율이 낮기 때문에 메탄 전환 속도는 EDTA가 없는 조건보다는 늦어지는 것으로 판단되었다.

[0053] 도 5c에서 확인할 수 있듯이, MDH 활성을 완전히 저해시킨 EDTA 10.00 mM이 포함된 조건에서의 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율은 지속적으로 감소하였다. 메탄 전환에 필요한 환원력 제공 및 메탄올 산화가 원활히 이루어지지 않으므로 미량의 메탄 전환만이 관찰되는 것으로 해석할 수 있다. EDTA 10.00 mM 조건에서 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율은 반응 초기의



0.766에서 반응 8시간째에 0.254로 현저하게 낮아졌다.

**[0055] 실시예 5: 전환반응 중 세포 농도의 변화 확인**

**[0056]** 전환반응 중의 세포 흡광도(optical density; OD)값을 측정하였다.

**[0057]** 도 6에서 확인할 수 있듯이, EDTA가 0.00 mM일 때 세포 OD 값은 초기에 31이었다가 반응 4시간 후 2.8 감소하였으나, 다시 반응 8시간 후에 0.8 회복되었다. 전체 반응과정에서 EDTA가 없을 경우 세포의 유지에도 큰 저해가 나타나지 않음을 확인했다.

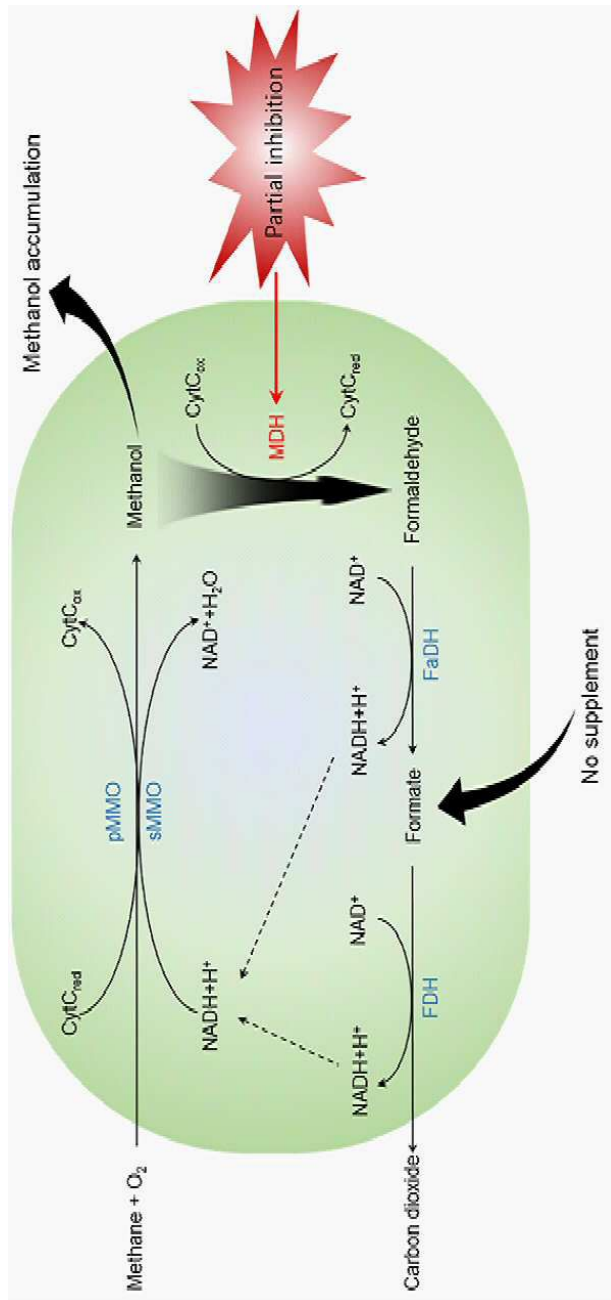
**[0058]** 그러나 EDTA가 포함된 경우 세포농도는 꾸준히 감소하였으며, 농도에 따라 그 정도가 심해졌다. MDH 부분 저해가 발생하는 EDTA 0.50 mM이 포함되었을 때 반응 4시간 및 8시간 후 세포 OD 값은 각각 6.5, 10.8 감소하였으며, 4시간 이후 메탄올의 생산 속도가 느려진 것은 이러한 생축매 감소에서 야기한 것으로 판단된다.

**[0059]** 그리고 세포 내의 MDH가 완전히 저해된 EDTA 10.00 mM이 포함된 조건에서는 세포가 이전 조건보다 더 빠르게 감소되는 것을 확인하였다. 반응 4시간 및 8시간 후 세포 OD 값은 각각 24.5 및 27.55만큼 감소하여 대부분의 세포가 사멸된 것으로 분석되었다.

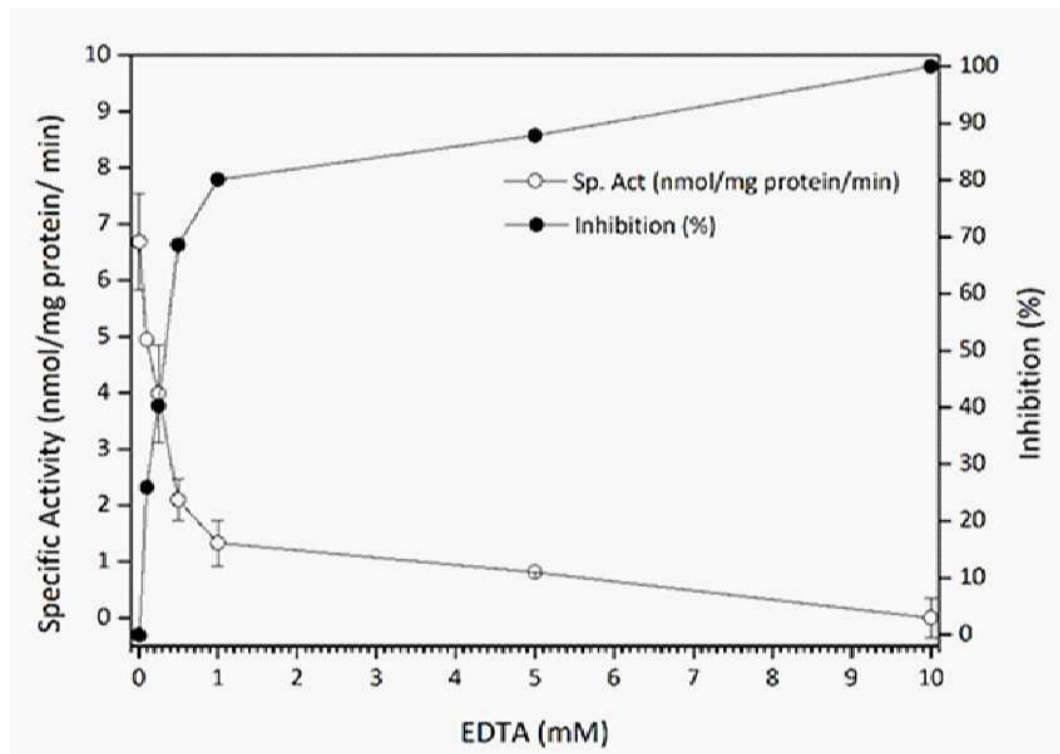
**[0060]** 이러한 결과로부터 EDTA 농도가 MDH 활성 뿐 아니라 휴지 세포의 분해에도 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 지속적인 세포의 활성 및 세포 내 환원력 유지 방법이 상업적인 메탄올 생산 공정 개발을 위하여 마련되어야 할 것으로 보인다.

도면

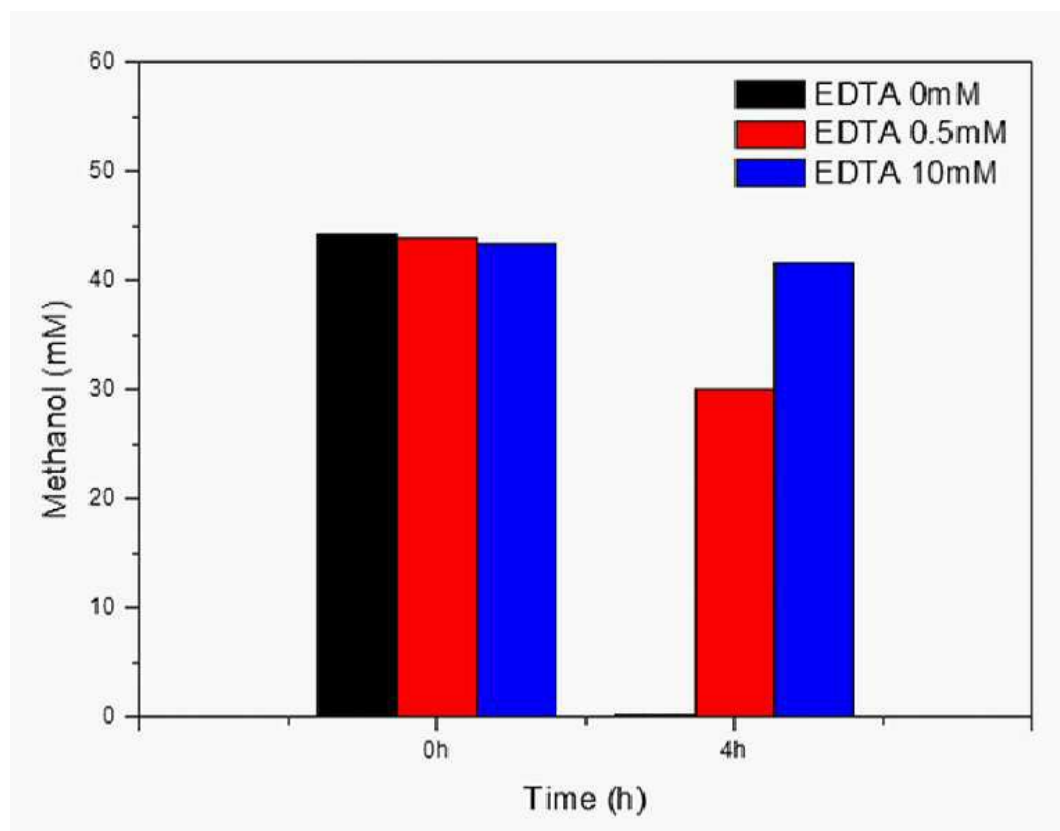
도면1



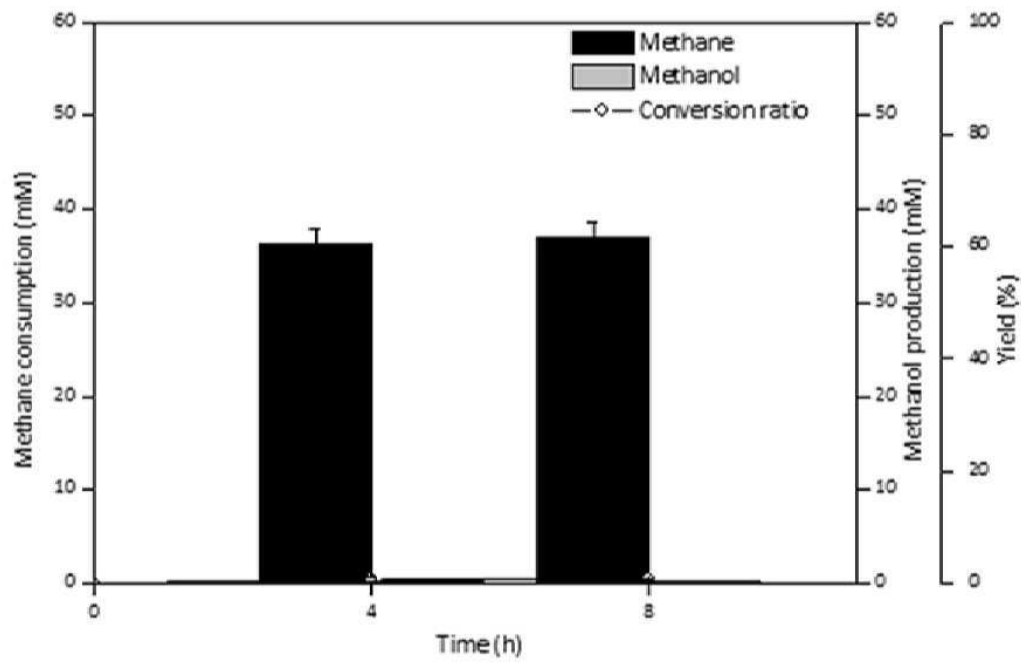
도면2



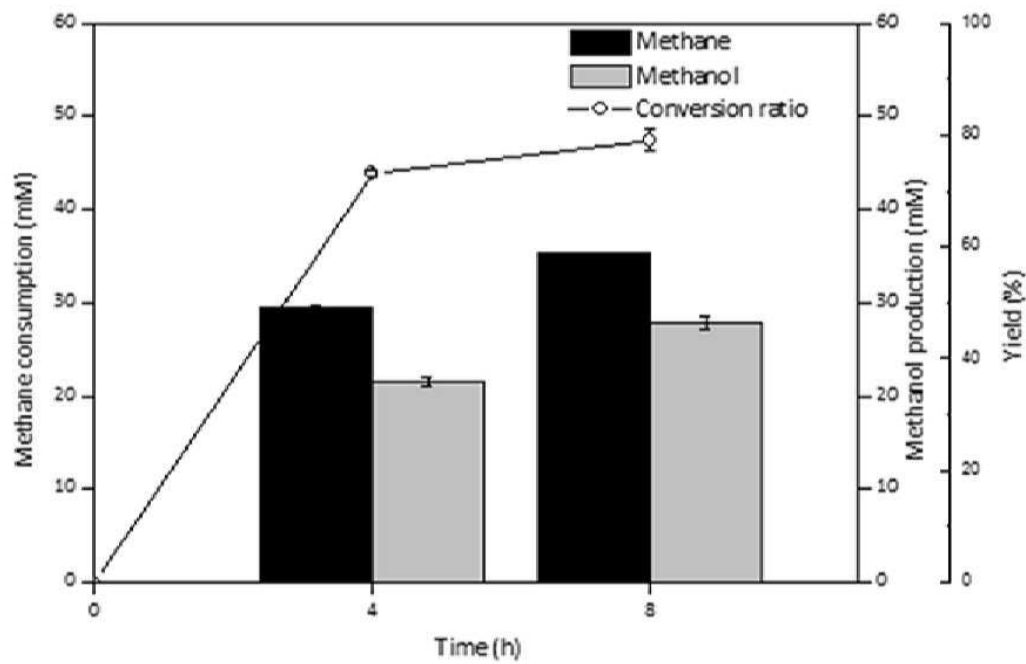
도면3



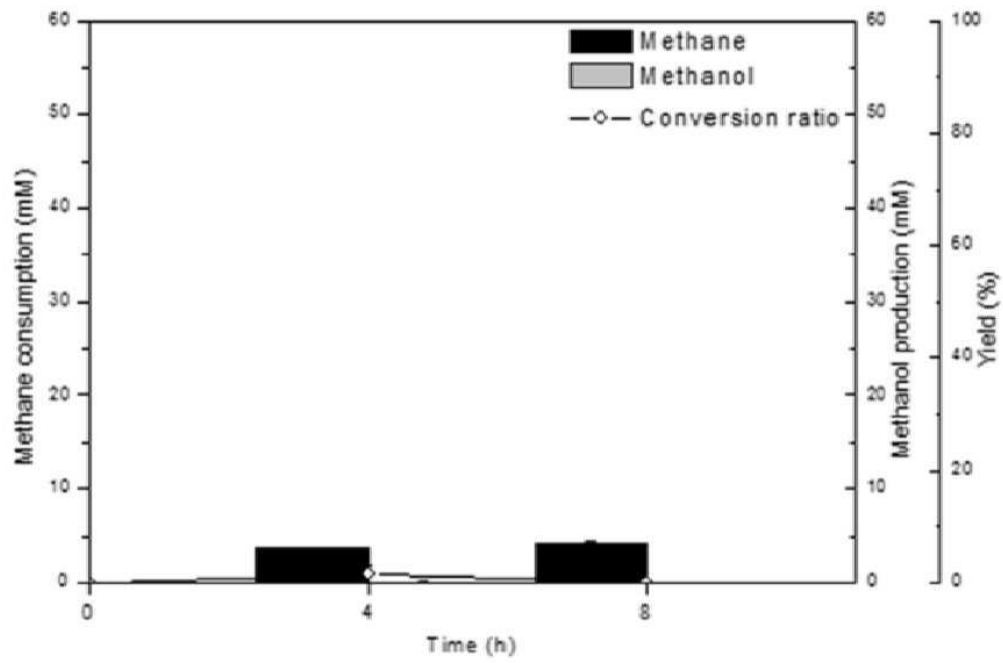
도면4a



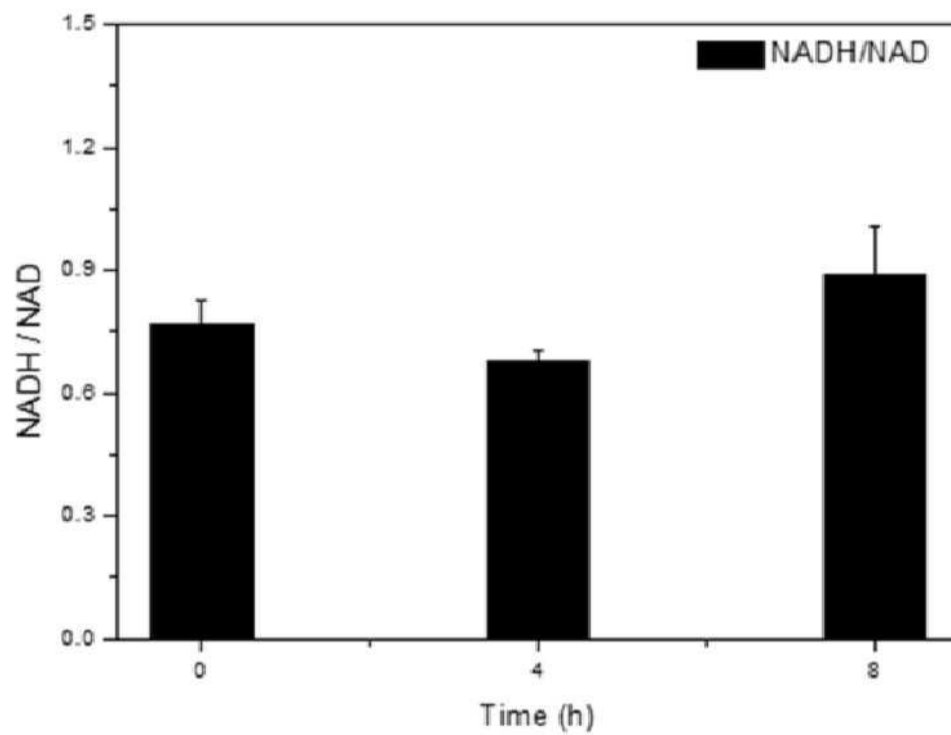
도면4b



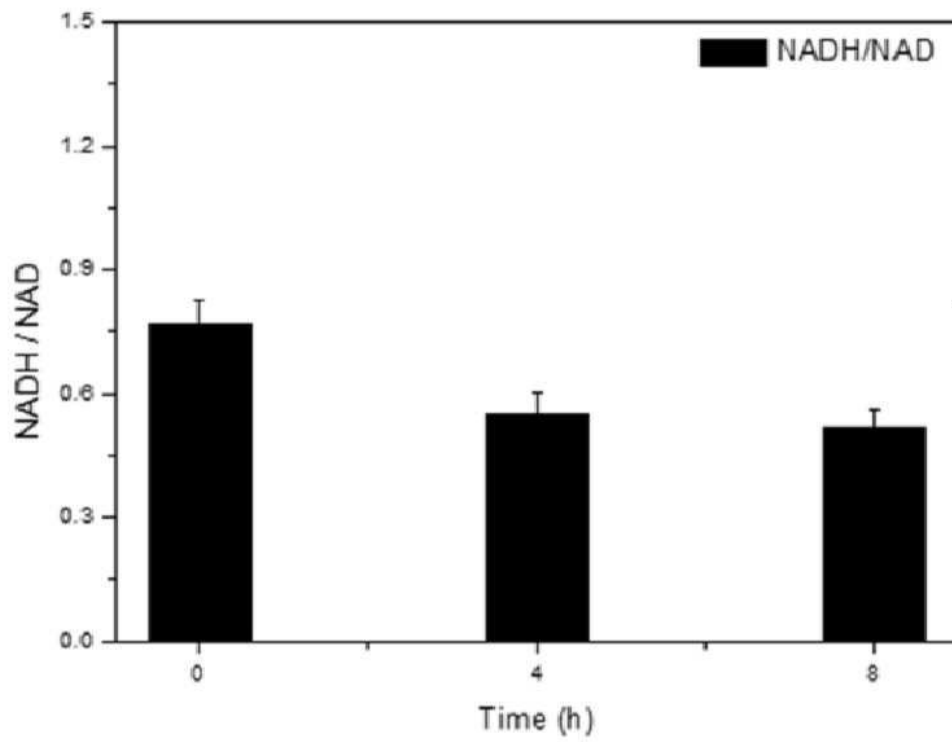
도면4c



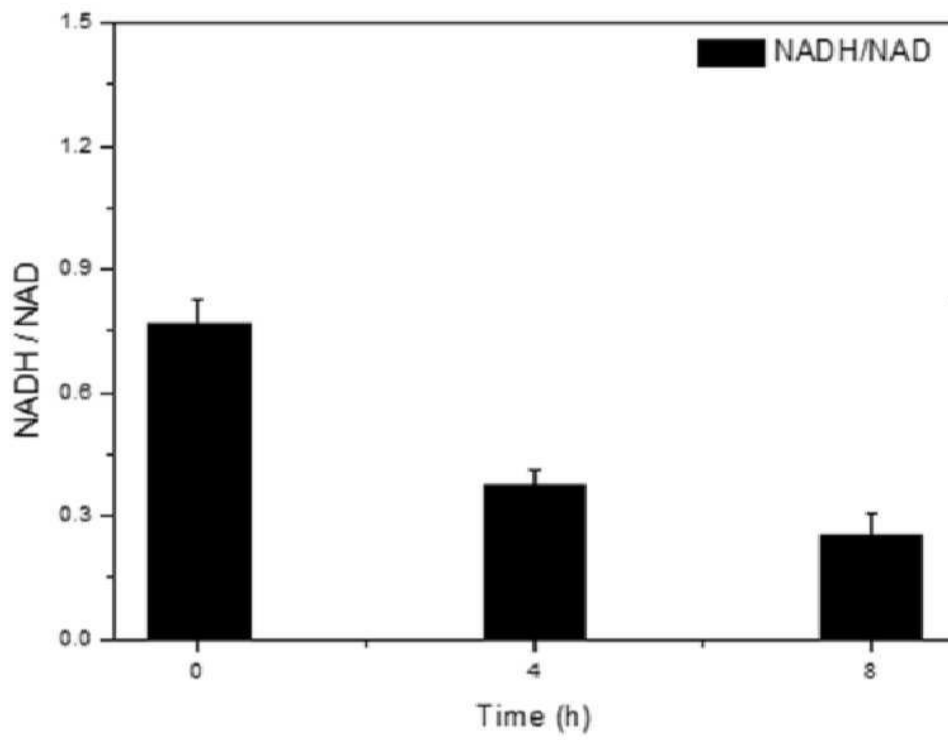
도면5a



도면5b



도면5c





도면6

