



등록특허 10-2079741



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월20일

(11) 등록번호 10-2079741

(24) 등록일자 2020년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01D 53/84 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B01D 53/84 (2013.01)

C12N 1/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0117635

(22) 출원일자 2018년10월02일

심사청구일자 2018년10월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160106109 A

JP2018516552 A

KR101324494 B1

KR1020170125118 A

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김옥빈

경기도 고양시 일산동구 백석1동 흰돌마을6단지아파트 610동 306호

김남연

서울특별시 서초구 매현로 16길 40

김유섭

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트3동 102호

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 13 항

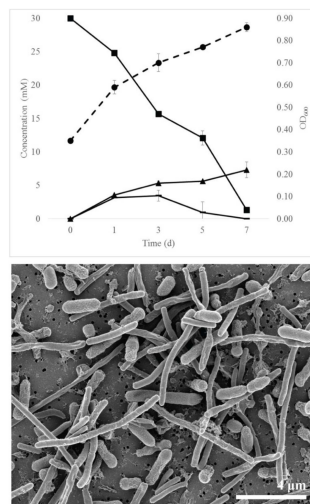
심사관 : 김훈석

(54) 발명의 명칭 메타노박테리움 콩고렌스를 유효성분으로 포함하는 포름산 제거용 조성물 및 이를 이용한 숙신산 제조방법

(57) 요약

본 발명은 메타노박테리움 콩고렌스를 유효성분으로 포함하는 포름산 제거용 조성물, 상기 조성물을 배양하는 단계를 포함하는 포름산 제거 방법, 상기 조성물과 대장균을 공동배양하는 단계를 포함하는 숙신산 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12P 39/00 (2013.01)

C12P 7/46 (2013.01)

B01D 2251/95 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A4A1041997

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구실지원사업

연구과제명 적응진화 유전체 분석 연구실

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium Congolense*)를 유효성분으로 포함하는, 포름산 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 접종원 형태인 것인, 포름산 제거용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 고세균(Archaea) 및 박테리아(Bacteria)를 포함하는 것인, 포름산 제거용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 메타노박테리움 콩고렌스는 전체 포함된 고세균 중 90% 이상 포함된 것인, 포름산 제거용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 박테리아로서 디설포비브리오 속 균주를 추가로 포함하는 것인, 포름산 제거용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 숙신산을 분해하지 않는 것을 특징으로 하는 것인, 포름산 제거용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 배양하는 단계를 포함하는, 포름산 제거 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물 및 대장균(*E.coli*)을 공동배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 생산 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 숙신산 생산은 글리세롤 발효에 의해 글리세롤을 소모하여 생산되는 것인, 숙신산 생산 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 추가로 포름산이 제거되는 것인, 숙신산 생산 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 추가로 메탄이 생산되는 것인, 숙신산 생산 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 방법은 대장균의 단독배양에 비하여 숙신산 생산능이 향상된 것인, 숙신산 생산 방법.

청구항 13

메타노박테리움 콩고렌스 및 대장균을 공동배양하는 단계를 포함하는, 포름산 제거 및 숙신산 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메타노박테리움 콩고렌스를 유효성분으로 포함하는 포름산 제거용 조성물, 상기 조성물을 배양하는 단계를 포함하는 포름산 제거 방법, 상기 조성물과 대장균을 공동배양하는 단계를 포함하는 숙신산 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 21세기 들어서 중국, 인도 등과 같은 거대 신흥공업국가들의 출현과 세계경제의 지속적 팽창으로 인하여 화석연료 사용량이 해마다 증가하고 있으며, 화석연료의 사용과정에서 발생하는 이산화탄소는 주요 온실가스로서 지구 온난화에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이러한 화석연료의 대체연료로 개발된 바이오디젤은 제조과정이 간단하고 기존 경유와 혼합 이용이 가능하나, 바이오디젤 생산 시 부산물로서 발생하는 폐글리세롤은 바이오디젤 생산량의 약 10%를 차지하는바, 이의 처리가 문제되고 있다.

[0004] 숙신산은 TCA 회로의 중간 대사 산물로, 가장 단순한 이카르복실 유기산이다. 숙신산을 이용하여 여러가지 폴리 에스테르 화합물을 제조할 수 있기 때문에, 숙신산은 식료품, 의류, 의약, 플라스틱 등 산업적인 유도체로 여러 방면에 활용되며 석유화학 기술의 한 축을 담당할 정도로 그 용도가 다양하다 (Willke et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 66:131, 2004). 숙신산의 세계시장은 현재 약 20조 원 규모로 형성되어 있고, 지금까지 생산 플랫폼의 대부분은 화학합성을 통한 생산이었으나, 생물 공정을 통한 숙신산 생산의 비중이 상당히 높아지고 있으며, 이에 생물공학적인 방법을 통하여 숙신산을 대량생산하는 플랫폼은 재생 가능한 에너지 자원의 활용 및 환경오염의 방지 등 여러 가지 이유로 그 중요성이 점점 대두되고 있다.

[0005] 현재까지 숙신산을 생산하기 위한 방법으로는, 변이 균주를 이용하여 숙신산 생산 수율을 높인 것이 대부분이나 (한국공개특허 2012-0113146, 한국공개특허 2011-000457 등), 유전자 조작으로 변이된 균주로 숙신산을 생산하는 경우, 사회적으로 안정성에 문제가 있는 것으로 인식되는 문제점이 있다.

[0006] 한편, 배양 배지의 성분을 다르게 함으로써 숙신산을 생산하는 방법으로, 유청을 이용한 숙신산의 생산방법(한국등록특허 10-0301960호)이 있는데, 낙농 산업에서 나오는 폐기물인 유청을 전처리 과정 없이 바로 배양원료로 이용하였기 때문에 배양 효율이 떨어지며, 질소원으로는 값비싼 효모 추출물을 사용한 결과 경제성 배지를 완전히 달성하지 못하는 문제점이 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 대장균의 숙신산 생산능을 강화하기 위해, 하수처리장의 슬러지로부터 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)를 포함하는 포름산 제거능을 갖는 조성물을 제조하여, 대장균과 상기 조성물을 공동배양하여 대장균의 폐글리세롤 분해능 및 숙신산 생산능이 개선되는 것을 확인함으로써 본 발명을

완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium Congolense*)를 유효성분으로 포함하는, 포름산 제거용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 배양하는 단계를 포함하는, 포름산 제거 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물과 대장균(*E.coli*)을 공동배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명에 개시한 일 실시 양태의 설명 및 실시에는 공통된 사항에 대하여 다른 실시 양태의 설명 및 실시예에서도 적용될 수 있다. 또한, 본 발명의 상세한 설명에 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 발명의 권리범위에 속하는 것은 물론이다. 그뿐만 아니라, 하기 기술된 구체적인 설명에 의하여 본 발명출원의 권리범위가 제한되는 것이 아니다.
- [0015] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0017] 본 발명은 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)가 포름산 분해능을 갖는다는 것을 새롭게 규명한 것에 특징이 있다.
- [0018] 야생형 대장균(*Escherichia coli*)은 혐기성 조건에서 발효 복합산물을 생산한다. 이러한 발효 복합산물은 초산, 젖산, 포름산, 숙신산, 알코올이 포함되어 있는 혼합산 발효형태(mixed acid-fermentation type)이다. 그러나 혐기성 조건에서 야생형 대장균의 글리세롤 발효는 잘 일어나지 않는다.
- [0019] 구체적으로, 혐기성 조건에서 글리세롤을 발효하기 위해서는, 글리세롤이 대장균 내부로 수송되어 산화되는 단계가 필요하다(도 1). 이 단계에서 1ATP가 소모되고 MQH₂, NADH₂가 생성된다.
- [0020] 포름산의 형태로 전환된 환원 등가물은 CO₂ 및 H₂로 전환될 수 있다. 그러나 포름산을 CO₂ 및 H₂로 전환시키는 효소인 FDH(Formate hydrogenlyase)의 포름산에 대한 친화도가 낮으며, 이러한 전환은 발효가 충분히 진행된 후 외부 pH가 낮은 상태에서만 포름산이 다시 대장균 내로 유입되어야만 일어나고, 포름산이 전환된다고 하더라도 세포외로 방출된 H₂가 대장균 성장을 저해한다는 문제가 있다.
- [0021] 따라서, 포름산 및 H₂가 제거되는 것이 글리세롤 발효를 통한 숙신산 생산에 유리하다.
- [0022] 한편, 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)는 메탄생성균에 속하는 고세균으로, CO₂ 및 H₂를 이용하여 메탄을 생성할 수 있는 것으로 알려져 있으나, 메타노박테리움 콩고렌스가 포름산을 기질로 이용할 수 있는지는 밝혀진 바 없다.
- [0023] 본 발명자들은 상기 메타노박테리움 콩고렌스가 포름산을 기질로 이용한다는 사실을 새롭게 밝혀내었다. 따라서, 본 발명의 일 구현예는 메타노박테리움 콩고렌스를 포함하는 조성물을 포름산을 제거하는 데 사용하는 것을 포함하는 메타노박테리움 콩고렌스의 신규한 용도를 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 구현예는 메타노박테리움 콩고렌스를 포함하는 조성물을 대장균과 공동배양하여 글리세롤로부터 숙신산을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)를 유효성분으로 포함하는, 포름산 제거용 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 조성물은 접종원(inoculum) 형태일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "접종원"은 "접종물", "접종체"와 상호 교환적으로 사용되는 용어로, 배양을 시작할 때 접종

에 사용될 수 있는 미생물을 함유한 물질을 의미한다.

- [0029] 상기 접종원은 다양한 미생물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 접종원은 고세균(archaea)을 1종 이상 포함하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 고세균 및 박테리아(bacteria)를 각각 1종 이상 포함하는 것일 수 있다. 또한, 이에 제한되지는 않으나, 상기 접종원은 진균(fungi)은 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서는 다양한 미생물을 포함하고 있는 슬러지에 앰피실린, 스트렙토마이신, 카나마이신을 매 계대마다 첨가하여 계대배양한 후 반코마이신을 처리하여, 고세균 및 박테리아를 포함하는 접종원을 제조하였다.
- [0032] 상기 조성물은 고세균(Archaea)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0033] 구체적으로, 상기 고세균은 포름산을 기질로 하는 메탄생성균일 수 있다. 보다 구체적으로, 메타노마이크로바이아세아에(*Methanomicrobiaceae*), 메타노코카세아에(*Methanococcaceae*), 메타노코푸스쿨라세아에(*Methanocorpusculaceae*), 메타노스피릴라세아에(*Methanospirillaceae*), 메타노박테리아세아에(*Methanobacteriaceae*)에 속하는 메탄생성균 등일 수 있으며, 보다 구체적으로는 메타노박테리움(*Methanobacterium*)속에 속하는 메탄생성균일 수 있고, 보다 더 구체적으로는 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)일 수 있다.
- [0034] 상기 조성물은 상기 메탄생성 고세균을 전체 고세균의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 메타노박테리움 콩고렌스(*Methanobacterium congolense*)를 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0036] 상기 조성물은 추가로 박테리아(Bacteria)를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 박테리아는 숙신산 분해능을 갖지 않는 것이라면 어느 것이든 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 또한, 상기 박테리아는 포름산 분해능을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 박테리아는 디설포비브리오(*Desulfovibrio*)속에 속하는 미생물일 수 있으며, 보다 더 구체적으로는 디설포비브리오 레갈리(*Desulfovibrio legallii*)일 수 있다.
- [0038] 상기 조성물은 상기 박테리아를 전체 박테리아의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 디설포비브리오 레갈리(*Desulfovibrio legallii*)를 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0040] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 배양하는 단계를 포함하는, 포름산 제거 방법을 제공한다. 상기 조성물 및 포름산 제거에 관해서는 전술한 바와 같다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 조성물을 포름산 및 아세트산을 포함하는 배지에 접종하여, 포름산 분해능을 갖는 고세균인 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicicum*)에 비해 상기 조성물의 포름산 분해능이 더 뛰어나다는 것을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태는 상기 조성물과 대장균(*E.coli*)을 공동배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 생산 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 대장균은 숙신산 생산이 가능한 것이면 어느 것이든 본 발명의 조성물과 사용될 수 있으며, 구체적으로는 숙신산 생산 경로에 관여하는 유전자 또는 효소가 변형되지 않은 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 야생형 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0046] 상기 방법은 글리세롤 발효에 의한 것일 수 있다.
- [0047] 상기 글리세롤은 순수 글리세롤 또는 바이오디젤 생산 공정으로부터 발생한 폐글리세롤일 수 있다. 상기 폐글리세롤은 두유, 폐식용유 등을 사용한 바이오디젤 생산 공정(알칼리 촉매와 메탄올 또는 에탄올 사용)에서 발생한 것일 수 있다. 또한, 상기 폐글리세롤은 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 직접 글리세롤 농도로 묻혀 사용할 수 있다. 또는, 폐글리세롤에 HCl과 같은 산을 첨가하여 생성되는 검은 불순물 층을 제거한 전처리된 폐글리세롤을 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에서는 글리세롤 및 자일로즈 배지에서 상기 조성물과 대장균을 공동배양하여, 자일로즈를 기질로 사용한 경우에 비해 글리세롤 배지에서 기질 분해 속도가 빠르고, 포름산 생성량이 더 적으며, 메탄 생성량은 더 증가한 결과를 확인하였다.

- [0050] 상기 방법은 추가로 포름산이 제거되는 것일 수 있다. 포름산 제거에 관해서는 전술한 바와 같다.
- [0051] 상기 방법은 추가로 메탄이 생성되는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 방법은 대장균의 단독배양에 비하여 숙신산 생산능이 향상된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에서는, 상기 메탄생성균을 포함하는 조성물과 대장균을 공동배양한 결과 대장균을 단독 배양한 경우에 비하여 숙신산 생산능이 향상되면서도 포름산은 거의 생성되지 않는 것을 확인하였으며, 추가로 메탄생성균에 의해 메탄이 생성되는 것을 확인하였다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명의 조성물은 미생물을 형질전환하는 단계가 필요하지 않으므로 복귀돌연변이체가 발생하지 않아 수율이 유지될 수 있으며, 제조 및 배양이 간편한 효과가 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 포름산 제거능을 가질 뿐만 아니라, 대장균과 공동배양함으로써 바이오디젤 부산물인 페글리세롤로부터 숙신산을 생산할 수 있으며, 에너지 원료인 메탄 또한 수득할 수 있으므로 유용산물 생산에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 대장균의 글리세롤 대사 경로를 나타낸 것이다.
- 도 2는 슬러지와 그 선별과정에서 고세균 및 박테리아의 구성 변화를 파이 차트로 도시한 것이다. 왼쪽은 고세균, 오른쪽은 박테리아를 나타내며 도 1(a)는 슬러지, 도 1(b)는 FRI-Middle(최초 3회의 계대배양 후 제조된 접종원), 도 1(c)는 FRI-complete(완성된 접종원)의 구성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 슬러지와 그의 선별과정에서 고세균 및 박테리아의 구성 변화를 관찰한 전자 현미경(SEM) 사진이다.
- 도 4는 FRI에 의한 세포 성장 및 포름산 소모량이다. 검은 원으로 표시한 것은 OD₆₀₀, 하이픈으로 표시한 것은 포름산 소모량(mM)을 나타낸다.
- 도 5는 대장균과 FRI의 공동배양을 나타낸 것이다. 도 4(A)는 글리세롤 발효, 도 4(B)는 자일로즈 발효 결과이며, 검정색은 공동배양, 회색은 E.coli의 단독배양을 나타내며, OD₆₀₀값은 원, 글리세롤은 사각형, 자일로즈는 마름모, 숙신산은 삼각형, 포름산은 하이픈으로 나타내었다.
- 도 6은 대장균과 FRI를 공동배양하여 글리세롤을 발효한 결과를 나타낸 그래프 및 전자현미경 사진이다. OD₆₀₀값은 원, 글리세롤은 사각형, 숙신산은 삼각형, 포름산은 하이픈으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] **실시예 1: FRI(Formate removing inoculums; 포름산 제거용 접종원) 선별 및 농축**
- [0061] E.coli의 숙신산 생산을 돕기 위한 접종원으로서, 포름산을 제거할 수 있으면서도 숙신산을 분해하지 않는 접종원을 슬러지로부터 분리하고자 하였다.
- [0063] **1-1: ID(inoculum development) 배지 제조**
- [0064] DSMZ 120a 배지를 변형하여 FRI를 개발하기 위한 배지를 제조하였다(이하 ID 배지로 표시함). 구체적으로, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.3 mM K₂HPO₄, 9.4 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 38.8 mM NaCl, 0.01 mM FeSO₄, 40mM 포름산, 20mM 아세트산, 20 mM HCO₃Na, 1 mL 미량 원소 용액 SL-10(DSMZ, media 320), 10mL 비타민 용액(DSMZ, media 141), 0.1%(w/v) 효모 추출물, 0.2% (w/v) 카지톤(casitone), 1.7 mM 시스테인, 1.3 mM Na₂S, 2 μM 레사주린(resazurin)을 포함하고 pH 7.0, 부피 1L가 되도록 배지를 제조하였다.
- [0066] **1-2: FRI 선별 및 농축**
- [0067] 마곡지구 서남하수처리장에서 혐기성 슬러지 샘플 2L를 채취하였다. 멸균된 H₂/CO₂(80:20, v/v) 가스 하에 ID 배지에서 선택적 농축을 수행한 후, 90mL ID 배지에 변형되지 않은 10mL 슬러지 접종원을 접종하였다.

- [0068] 박테리아 성장을 억제하고 메탄생성 유기체를 선별, 농축하기 위해, 그람양성 박테리아, 그람음성 박테리아 및 마이코플라스마(mycoplasma)를 타겟으로 하는 항생제들인 앰피실린(100ug/mL), 스트렙토마이신(20ug/mL) 및 카나마이신(100ug/mL)을 ID 배지에 첨가하였다. 37℃에서 1주일간 농축 배양 후, 메탄 생성을 확인하여 5%를 신선한 ID 배지에 옮긴 후 계대배양을 수행하였다.
- [0070] 처음 3회의 계대배양 동안, ID 배지에 처음 처리한 항생제 농도의 절반(앰피실린 50ug/mL, 스트렙토마이신 10ug/mL, 카나마이신 50ug/mL)을 처리하였다. 3회의 계대 배양 이후, 포름산 및 숙신산의 양을 HPLC로 측정하였다. 측정 결과, 접종원은 포름산을 분해할 수 있었지만, 숙신산을 분해할 수 있는 종 또한 여전히 포함하고 있었다. 처음 3회의 계대배양 이후 선별된 접종원을 FRI-Middle이라고 이름붙였다.
- [0072] 다음으로, 접종원의 1%를 이용한 계대 배양을 추가로 3회 더 수행하였으며 숙신산 분해 박테리아를 제거하기 위하여 더 엄격한 배양 조건을 적용하였다.
- [0073] 이 기간 동안, ID 배지에는 앰피실린 50ug/mL, 스트렙토마이신 10ug/mL, 카나마이신 50ug/mL에 더하여 반코마이신(Vancomycin)을 50ug/mL 추가로 첨가하였으며, 계대 배양 시간 간격을 2시간으로 단축하였다. 반코마이신은 대부분의 그람 양성 박테리아에 효과적이며 증식 중인 유기체에서 펩티도글리칸의 교차결합을 방해하는 항생제이다.
- [0074] 모든 배양물은 37℃에서 100rpm으로 shaking incubator에서 혐기성 조건에서 성장했다. 최종 계대배양의 배양물을 12일 동안 인큐베이션하였다.
- [0076] 모든 배양물에 대해 메탄 생성량, 호기성 박테리아의 존재 및 포름산 소모량을 측정하였으며, 처음 3번의 계대 배양으로 선별된 접종원(FRI-Middle), 그리고 최종 접종원(FRI-complete)에 대해 숙신산 분해를 측정하였다. 포름산 분해능이 있는 메탄 생성균의 선별을 위해, 각 계대배양의 발효가 완료된 이후, HPLC와 GC 분석을 통해 포름산 분해 및 메탄 가스 생성을 확인한 후 다음 단계의 계대배양을 수행하였다
- [0078] 상기와 같은 6회의 계대배양을 통한 선별 및 농축 단계 이후, 포름산은 제거하지만 숙신산은 분해하지 않는 메탄균 접종원을 수득하였다. 최종 선별된 접종원을 FRI-complete이라고 이름붙였다.
- [0080] **실시예 2: 제조된 FRI의 조성 분석**
- [0081] **2-1: PCR 및 Illumina sequencing**
- [0082] FRI의 조성을 알아보기 위해 16S rRNA의 타겟 특이적 PCR 증폭 및 Illumina sequencing을 수행하였다. PCR 확인 결과 진균류(fungi)의 흔적이 검출되지 않았기 때문에, 진균에 대해서는 Illumina sequencing을 수행하지 않았다.
- [0083] 박테리아, 진균류, 고세균의 16S rRNA를 증폭하기 위해 PCR을 수행하였다. 각각의 16S rRNA 유전자의 V3 내지 V4 영역, ITS2 영역, V4 내지 V5 영역을 타겟으로 하는 프라이머를 사용하였다. 구체적인 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

분류	프라이머 서열 (밑줄 : 타겟 영역)	
박테리아	341F	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3'
	805R	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA <u>GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'</u>
진균류	ITS3	5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG <u>GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'</u>
	ITS4	(5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA <u>GTC CTC CGC TTA TTG ATA TGC-3'</u>
고세균	519F	5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CAG CCG CCG CGG TAA-3'
	958R	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GYC CGG CGT TGA MTC CAA TT-3'

- [0087] 95 ℃에서 3분간 변성한 후, 95 ℃에서 30초간 변성, 55 ℃에서 30 초간 프라이머 어닐링, 72 ℃에서 30초간 중합을 25회 반복한 후, 최종 중합을 72 ℃에서 5 분간 증폭을 수행하였다. 그리고 나서, i5 forward primer (5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACX XXX XXX XTC GTC GGC AGC GTC-3') 및 i7 reverse primer (5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXX XXX X XGT CTC GTG GGC TCG G-3')를 이용하여 Illumina NexTera 바코드를

부착하기 위한 2차 증폭을 수행하였다. X는 바코드 영역을 나타낸다. 2차 증폭 조건은 이전과 동일하나, PCR 사이클을 최대 8회로 변형하여 수행하였다. 증폭된 산물들을 CleanPCR(CleanNA, NL)을 이용해 정제하여 짧은 단편(타겟이 아닌 산물들)을 제거하였고, 동일한 양의 정제된 산물들을 모았다. DNA 7500 chip을 이용한 Bioanalyzer 2100 (Agilent, US) 를 통해 산물의 품질 및 크기를 분석하였다.

[0088] 사전 필터에 의해 짧은 길이 및 낮은 Q값을 갖는 판독값을 제거하였고, paired-end 시퀀싱에서 unmerged read 또한 제거했다. 비특이적 증폭물, 타겟 분류군에 대응되지 않는 증폭물 및 키메라(chimera)를 QC 과정에서 제거하였다. 종 수준에서 확인된 판독값은 EzBioCloud 데이터베이스에서 97% 유사성 수준의 종에 대해 성공적으로 확인된 수를 나타낸다. 이후 2개의 taxonomic assignment를 통해 MiSeq 데이터를 처리하였다. 구체적으로는, QC를 통과한 판독값을 OTU(operational taxonomic unit)으로 분류한 후, EzBioCloud taxonomy database에 등록된 OTU에는 종 이름을 붙였다. EzBioCloud taxonomy database에 대응된 판독값에 대한 OTU 수를 샘플로써 종의 숫자를 결정하였고, 총 OTU 수는 종 이름이 붙여지지 않은 OTU 숫자를 더함으로써 계산하였다(표 2).

표 2

	Sludge		FRI-Middle		FRI-Complete	
	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria
Total reads after pre-filter	78,057	93,129	49,122	87,046	62,536	64,831
Total valid reads	73,260	64,281	48,681	66,867	62,524	29,192
No. of reads identified at the species level	67,204	52,388	12,372	71,047	62,289	28,977
No. of species	104	1,095	29	269	4	19
No. of total OTUs	458	2549	142	445	7	22

[0090]

[0092] 2-2: 조성 분석 결과

[0093] 변형되지 않은 슬러지에 포함된 미생물 중, EzBioCloud database 상에서 확인 가능한 고세균 종은 104종이었으며 이들은 다수의 메탄생성균을 포함하고 있었다. 고세균 중에서 *Methanosaeta concilii*가 가장 풍부했으며 (30.4%) *Methanobacterium congolense*는 0.3%만을 차지했다.

[0094] 미생물 조성은 FRI 선별 및 농축 과정을 거치면서 변화했다. 3번의 최초 계대배양 이후 선별된 FRI-middle에서 *M. congolense*는 61.6%로 농축되었다.

[0095] 추가적인 3번의 계대배양 후 완성된 접종원에서, *M. congolense*는 99.5% 로 거의 대부분을 차지했다.

[0097] 변형되지 않은 슬러지에 포함된 확인 가능한 박테리아 종은 1,095 종이였다. 선별 과정은 이 숫자를 매우 급격히 감소시켰다.

[0098] 처음의 3번의 계대배양에서, 박테리아 종은 269 종으로 감소했다. 그러나, HPLC 데이터 분석 결과, 숙신산 분해 박테리아가 여전히 존재했다.

[0099] 마지막 3번의 계대배양 이후 완성된 접종원에서, 숙신산을 분해하지 않는 미생물인 디설포비브리오 레갈리(*Desulfovibrio legallii*)가 박테리아 종의 대부분을 차지했다.

[0101] 슬러지, FRI-middle 및 FRI-complete에 포함된 고세균 및 박테리아의 종 및 비율을 하기 표 3 내지 표 5 및 도 2에 나타내었다. Abundance가 1% 미만인 종의 비율은 합산하여 나타내었다. 각 표의 가장 좌측 숫자는 도 2의 파이 차트의 숫자와 대응한다.

표 3

Sludge				
	Archaea	%	Bacteria	%
1	Methanosaeta concilii	30.4	Unclassified	9.8
2	LNJC_s (Euryarchaeota)	13.3	CU921187_s(Bacteroidales)	6.5
3	Methanobacterium ferruginis	11.7	Z94009_s(Anaerolinaceae)	4.5
4	Methanobrevibacter acididurans	8.3	EU407212_s(Anaerolinaceae)	4.3
5	Methanobacterium subterraneum	7.0	Sporosarcinaureae group	4.2
6	AY454733_s(Methanobacteriaceae)	3.7	CU922738_s(Prolixibacteraceae)	2.8
7	Methanosaeta_uc	3.2	AB603812_s(Bacteroidales)	2.8
8	Methanobacterium beijingense	3.1	AB195871_s(Thermovirga)	2.7
9	Methanobacterium_uc	2.8	FJ825495_s(Sedimentibacter)	2.6
10	Methanobacterium petrolearium	2.3	Psychrobacterfaecalis group	2.4
11	Methanobacterium palustre	1.8	HQ768009_s(Romboutsia)	2.3
12	JQLY_s(Methanobacterium)	1.4	Mycobacteriumsmegmatis group	2.0
13	Methanomassiliicoccus luminyensis	1.1	AJ853573_s(Cloacamonas)	1.6
14	109 species[<1.0]	10.0	DQ415754_g_uc(Bacteroidales)	1.6
15			DQ984664_s(Cloacamonas)	1.4
16			Psychrobacteralimentarius group	1.2
17			AJ249100_s(Leptolinea)	1.1
18			FJ234903_s(Thermoanaerobaculum)	1.1
19			Mycobacteriumfortuitum group	1.0
20			1451 species[<1.0]	44.0

[0103]

표 4

FRI-Middle				
	Archaea	%	Bacteria	%
1	Methanobacterium congolense	61.6	Escherichia coli group	15.3
2	Methanosarcinahoronobensis	16.5	Bacteroides thetaiotaomicron	12.1
3	EU662692_s(Methanogranum)	7.8	Enterococcus durans group	10.2
4	Methanosarcinaspelaei	3.3	Clostridium symbiosum	7.7
5	Methanofollis_uc	2.3	Bacteroides uniformis	6.7
6	Methanomassiliicoccusluminyensis	1.4	Clostridium difficile	6.2
7	Methanofollisethanolicus	1.2	Clostridium scindens	3.2
8	Methanobacterium_uc	1.1	HQ750839_s(Pseudoflavonifractor)	3.0
9	AF424770_s(Methanomassiliicoccaceae)	1.0	Sporanaerobacter acetigenes	2.6
10	39 species[<1.0]	3.9	Flavonifractor plautii	2.0
11			Desulfovibrio legallii	2.0
12			Aminobacteriumthunnarium	1.9
13			Unclassified	1.6
14			Clostridium clostridioforme group	1.6
15			HM003101_s(Pseudoflavonifractor)	1.6
16			AB218327_s(Ruminococcaceae)	1.5
17			Parabacteroides_uc	1.5
18			Eubacterium limosum group	1.4
19			HQ810970_s(Bacteroides)	1.3
20			321 species[<1.0]	16.7

[0104]

표 5

FRI-complete				
	Archaea	%	Bacteria	%
1	Methanobacterium congolense	99.5	Desulfovibrio legallii	92.3
2	Unclassified	0.1	Desulfovibrio_uc	2.8
3	4 species[<1.0]	0.4	Unclassified	1.3
4			20 species [<1.0]	3.7

[0105]

[0107] SEM 이미지로 각 종의 변화 및 abundance를 시각적으로 나타내었다(도 3).

[0108] 선별이 진행되면서 긴 막대 형태의 *M. congolense* 종이 FRI의 대부분을 차지하게 되는 것을 SEM 이미지를 통해 알 수 있다.

[0109] 실험 결과를 통해, 포름산은 제거하지만 숙신산은 분해하지 않는 FRI의 주요 성분이 *M. congolense*임을 확인하였는바, *M. congolense*가 포름산 분해능을 가진다는 것을 유추할 수 있다.

[0111] 실시예 3: FRI의 포름산 분해능 확인

[0112] 제조된 FRI의 포름산 분해능을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0113] 구체적으로, 혐기성 조건에서($H_2/CO_2=80/20$, v/v) 포름산 및 아세트산을 포함하는 ID 배지에서 FRI의 포름산 분해능 및 성장 속도를 측정하였다. 이의 대조군으로서, 포름산 분해능을 갖는 대표적인 메탄균인 *M. formicicum*의 포름산 분해능 및 성장 속도를 측정하였다. FRI의 배양 결과를 하기 표 6 및 도 4에 나타내었다.

표 6

Culture characteristics of formate-removing inoculum

Time (d)	OD ₆₀₀	pH	Formate	Acetate	Methane (ppm)
0	0.04±0.03	6.48±0.02	38.98±0.59	21.63±0.64	0
1	0.11±0.01		34.74±0.88	21.90±0.45	
2	0.17±0.01		13.47±5.38	21.99±0.96	
3	0.20±0.01		3.97±0.01	20.67±1.07	
4	0.20±0.01	7.59±0.10	3.84±0.14	19.87±0.14	32,046.12±47,205.60

[0115]

[0117] FRI는 3일간 35mM의 포름산을 소모하였고 OD₆₀₀값은 0.20이었다. 이와 비교하여, 포름산 분해능을 갖는 메탄생성 균인 *M.formicicum*의 순수 배양체는 7일간 30mM 포름산을 소모하였고 OD₆₀₀ 값은 0.27이었다.

[0118] 이를 통해, FRI는 *M.formicicum*의 순수 배양체에 비해 포름산 분해능이 더 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

[0120] **실시예 4: *E.coli*와 FRI의 공동배양을 통한 숙신산 생산**

[0121] 실시예 2 및 3의 실험 결과를 통해 *M.congolense*를 주요 성분으로 포함하는 본 발명의 FRI가 포름산 분해능을 갖는다는 것을 확인하였는바, 숙신산 생산 경로에서 포름산을 부산물로 생성하는 *E.coli*와의 공동배양을 통해 숙신산 생산이 가능한지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0123] **4-1: *E.coli* 및 FRI의 공동배양 배지 제조 및 배양 조건**

[0124] 공동배양의 배지 조성은 포름산 및 아세트산을 가하지 않았다는 것을 제외하고 ID 배지와 동일하다. 기질로 xylose, pure glycerol, crude glycerol(AEKYUNG PETROCHEMICAL, KR)을 사용하였다. 멸균된 H₂/CO₂(80:20, v/v) 혼합가스하에 혐기성으로 배지를 제조하였다.

[0125] *E.coli* K-12 균주 MG1655를 FRI와의 공동배양에 사용하였다. *E.coli*의 계대배양을 Luria-Bertani(LB) broth 에서 OD₆₀₀이 1.2가 될 때까지 37℃, 혐기성 조건에서 수행하였다. FRI의 계대배양을 ID 배지에서 OD₆₀₀이 0.2가 될 때까지 37℃, 혐기성 조건에서 수행하였다. 글리세롤(또는 자일로즈) 발효를 위한 공동 배양에서, 30mM 글리세롤(또는 자일로즈)를 포함하는 발효 배지에 *E.coli* 및 FRI의 계대배양물을 10%(v/v) 접종하였다. 페글리세롤 발효를 위한 공동배양에서, 페글리세롤을 50mM 포함하는 발효 배지에 *E.coli*의 계대배양물을 10%, FRI의 계대배양물을 30% 접종하였다.

[0126] 단독 배양 및 공동배양은 멸균된 80% H₂ + 20% CO₂ 가스 혼합물 하에 37 ℃에서 수행되었다. 산소와의 접촉을 피하기 위해, 접종원에 대한 계대 배양 또는 배양액의 조작은 anaerobic workstation(Whitley DG250, Don Whitley Scientific Limited, GB)을 이용하여 수행되었다.

[0128] **4-2: *E.coli*와 FRI를 이용한 숙신산 생산의 최적 기질 선별**

[0129] FRI를 *E.coli*와의 공동배양에 적용하기 위하여, 선택적 기질로 자일로즈(xylose)를 테스트하였다. 도 5 및 표 7-8에 글리세롤 및 자일로즈 발효 결과를 나타내었다.

표 7

글리세롤 발효 결과

시간(h)		0	24	48	72	96
OD600	Single	0.16±0	0.29±0	0.29±0.01	0.28±0.01	0.28±0.01
	Co	0.24± 0.01 ^a	0.55± 0.03 ^a	0.71± 0.06 ^a	0.73± 0.07 ^a	0.74± 0.08 ^a
glyecrol	Single	0	0.86±0.34	2.63±1.45	3.05±1.23	3.88±1.14
	Co	0	6.98± 1.78 ^a	14.22± 0.32 ^a	18.80± 1.33 ^a	21.85± 1.56 ^a
succinate	Single	0	1.32±0.11	1.62±0.02	1.82±0.07	1.92±0.03
	Co	0	2.25± 0.19 ^a	3.59± 0.11 ^a	4.42± 0.18 ^a	4.72± 0.45 ^a
formate	Single	0	7.05±0.47	8.49±0.14	9.02±0.34	9.19±0.39
	Co	0	0.53± 0.04 ^a	0.53± 0.07 ^a	0.58± 0.13 ^a	0.44± 0.09 ^a
acetate	Single	0	3.63±0.13	3.83±0.07	3.96±0.05	4.05±0.04
	Co	0	5.83± 0.25 ^a	7.52± 0.17 ^a	9.04± 0.90 ^a	10.03± 1.98 ^a
EtOH	Single	0	6.60±0.24	8.71±0.32	10.28± 0.17	11.20± 0.35
	Co	0	14.40± 0.75 ^a	20.84± 0.32 ^a	22.52± 4.14 ^a	18.16± 1.73 ^a
Methane	Single	0				66.90± 83.02
	Co	0				75,907.83± 16,127.89 ^a
pH	Single	6.56±0.03	6.30±0.03	6.23±0.05	6.12±0.02	6.13±0.06
	Co	6.63±0.10	6.79± 0.10 ^a	6.52± 0.03 ^a	6.44± 0.13 ^a	6.43± 0.02 ^a

[0131]

표 8

자일로즈 발효 결과

시간(h)		0	24	48	72	96
OD600	Single	0.16±0.01	0.47±0	0.46±0.01	0.48±0.03	0.50±0.03
	Co	0.24±0.03 ^a	0.57±0.04	0.60±0.06 ^a	0.59±0.05 ^a	0.60±0.04 ^a
xylose	Single	0	8.17±2.84	11.41±1.76	12.03±1.26	12.46±1.16
	Co	0	12.24±2.04 ^a	16.23±1.38 ^a	20.29±0.88 ^a	21.99±1.35 ^a
succinate	Single	0	1.63±0.04	2.41±0.12	2.87±0.19	3.02±0.27
	Co	0	2.07±0.04 ^a	2.99±0.11 ^a	3.68±0.13 ^a	4.06±0.06 ^a
formate	Single	0	13.14±0.84	15.08±1.97	16.13±1.13	16.62±1.24
	Co	0	12.53±0.51	13.52±0.98	15.09±1.42	15.06±1.54
acetate	Single	0	8.06±0.03	9.25±0.13	9.61±0.42	9.75±0.37
	Co	0	10.58±0.45 ^a	13.98±0.40 ^a	15.00±0.19 ^a	15.17±0.11 ^a
EtOH	Single	0	11.52±0.85	12.77±0.16	13.67±0.86	13.99±0.84
	Co	0	13.19±0.17 ^a	16.78±0.25 ^a	19.89±0.38 ^a	21.06±0.32 ^a
Methane	Single	0				124.08±103.59
	Co	0				3,585.19±3,372.31
pH	Single	6.53±0.03	5.33±0.04	5.16±0.06	5.10±0.02	5.12±0.01
	Co	6.63±0.05	5.44±0.13	5.44±0.05 ^a	5.31±0.07 ^a	5.35±0.08 ^a

[0132]

[0134] *E. coli*의 단독 배양에 비해 *E. coli*와 FRI의 공동배양에서 세포 성장, 글리세롤 소모량 및 숙신산 생산량은 각각 2.6배, 5.6배, 및 2.5배 증가하였다. 다른 발효 산물의 생산량 또한 증가하였지만, 포름산은 공동 배양 초기에 거의 생산되지 않았으며 이는 *E. coli*가 생산하는 즉시 FRI가 포름산을 소모하였음을 의미한다.

[0135] 반면, *E. coli*가 자일로즈를 발효했을 때 공동배양에 의한 장점은 뚜렷하지 않았다. 자일로즈를 기질로 할 경우, 공동배양 시 자일로즈 소모량이 증가하기는 했지만, 포름산 생산량이 단독배양에 비해 공동배양에서 감소하지 않았으며, 이로 인해 pH가 5.3-5.4로 급격히 감소했기 때문에, 자일로즈 발효는 FRI를 적용하기에 최적의 조건이 아니었다. 또한 자일로즈에 비해 글리세롤을 기질로 이용한 경우 메탄 생산량이 더 큰 폭으로 증가한 것을 확인하였다.

[0136] 결과적으로, 글리세롤을 기질로 이용하는 것이 *E. coli*와 FRI의 공동배양을 통한 숙신산 생산에 적합하다고 결론

내렸다.

4-3: *E.coli*와 FRI의 공동배양을 통한 폐글리세롤 발효

*E.coli*가 글리세롤을 발효하여 숙신산을 생산하기 위해서는, 부산물인 포름산을 제거하기 위한 외부 전자 수용체가 필요하다. *E.coli*의 숙신산 생산을 위해 FRI를 전자 수용체로 이용하였다. FRI와 *E.coli*를 7일간 공동배양하여 산물의 양을 측정하였다(표 9 및 도 6).

표 9

Time (d)	OD ₆₀₀	Consumption (mM)		Production (mM)		pH	Methane (ppm)
		Glycerol	Succinate	Formate			
0	0.35±0	0	0	0		6.92±0.04	0
1	0.59±0.03	5.2±0.4	3.5±0.1	3.1±0.1		7.02±0.02	
3	0.70±0.04	14.3±0.3	5.3±0.3	3.4±0.8		7.09±0.02	
5	0.77±0.01	17.9±1.1	5.6±0.1	0.9±1.6		7.05±0.04	
7	0.86±0.02	28.7±0.4	7.3±1.2	0		7.01±0.01	92,877.61±29,054.96

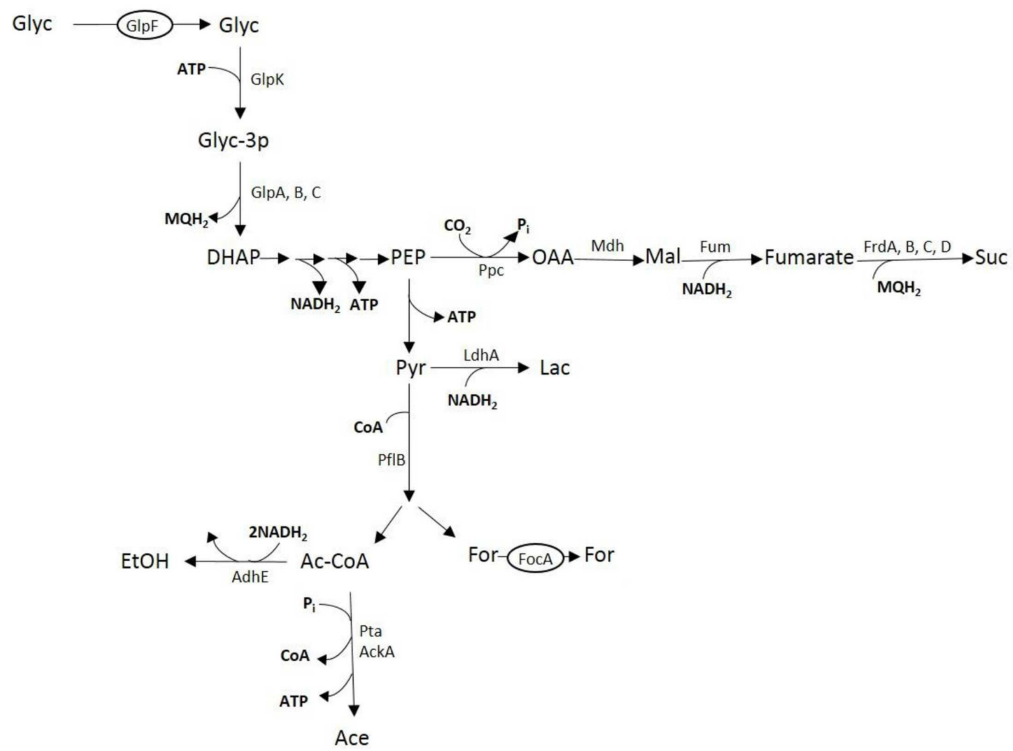
7일간의 공동배양 동안, *E.coli*는 28.7mM의 폐글리세롤을 발효하였고, 7.3mM 숙신산 및 92,878 ppm의 메탄을 생산하였다. 포름산은 거의 생성되지 않았으며, 이는 FRI가 포름산을 완전히 소모하였음을 나타낸다. 또한 공동배양에서 PEP의 25%가 대사과정을 거쳐 숙신산으로 환원되었음을 알 수 있다.

이를 통해, FRI와 *E.coli*를 공동배양하여 폐글리세롤로부터 숙신산 및 메탄 생산이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

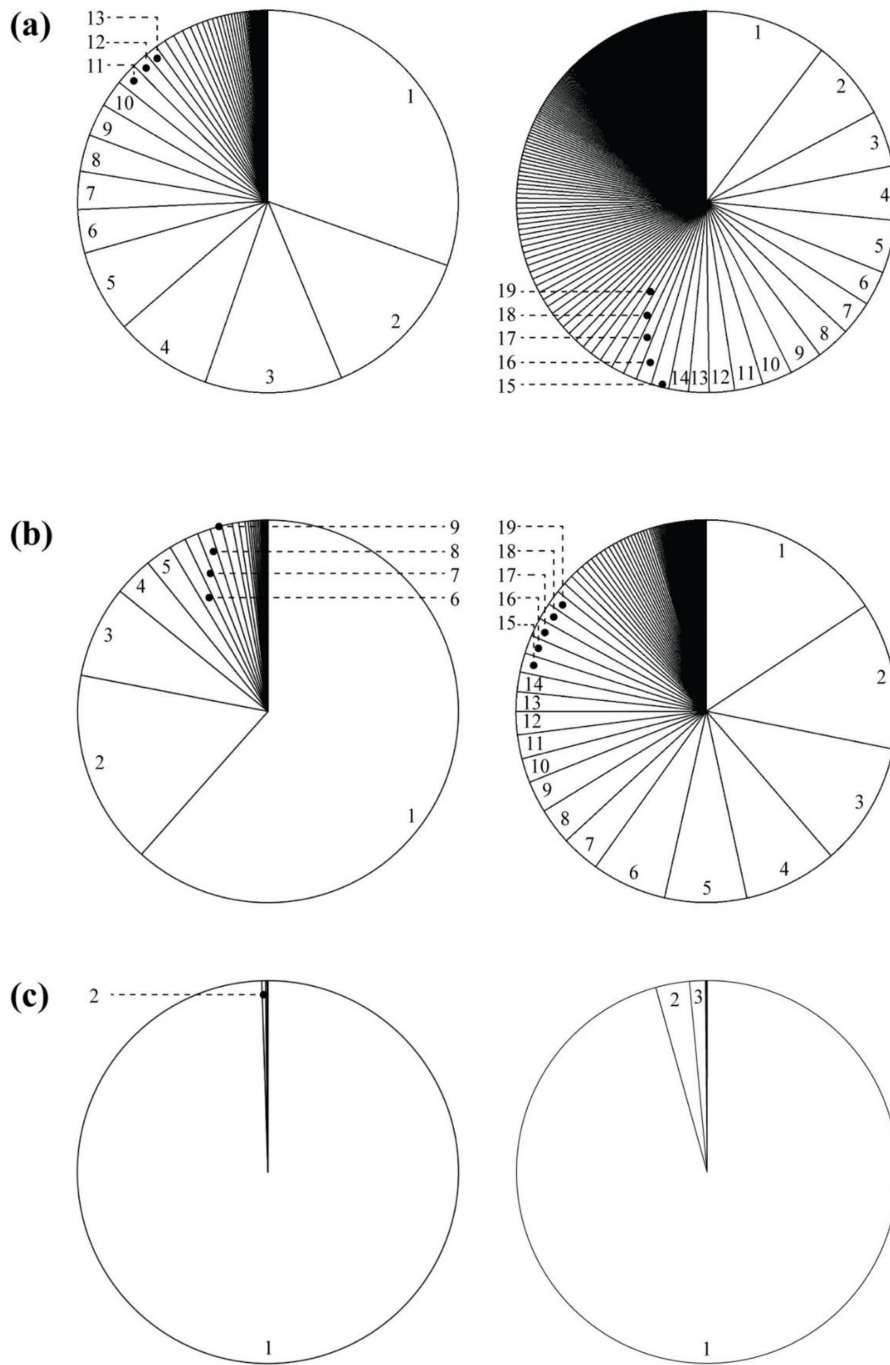
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

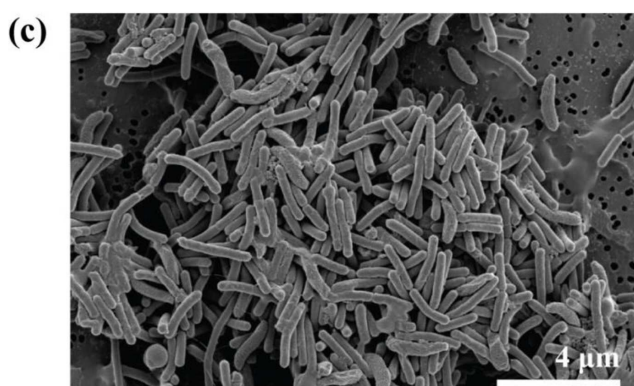
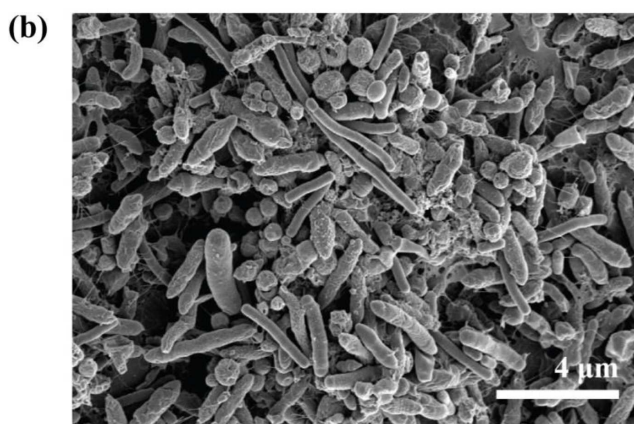
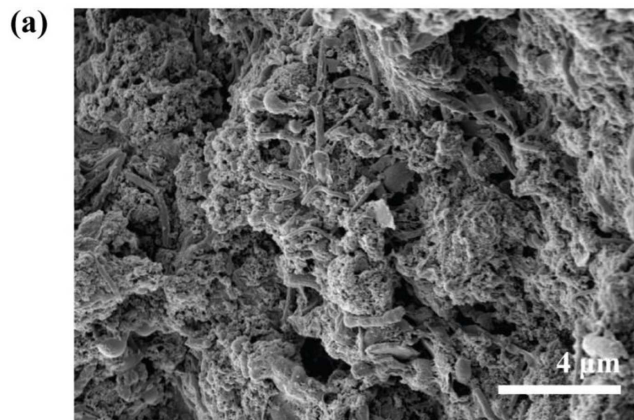
도면1



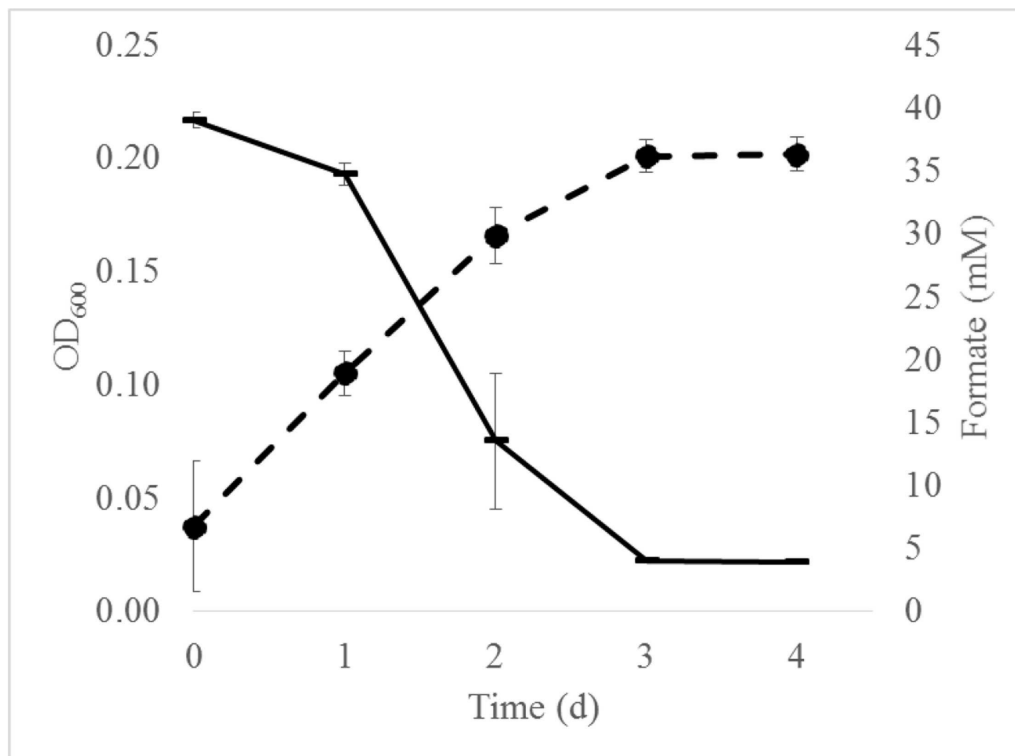
도면2



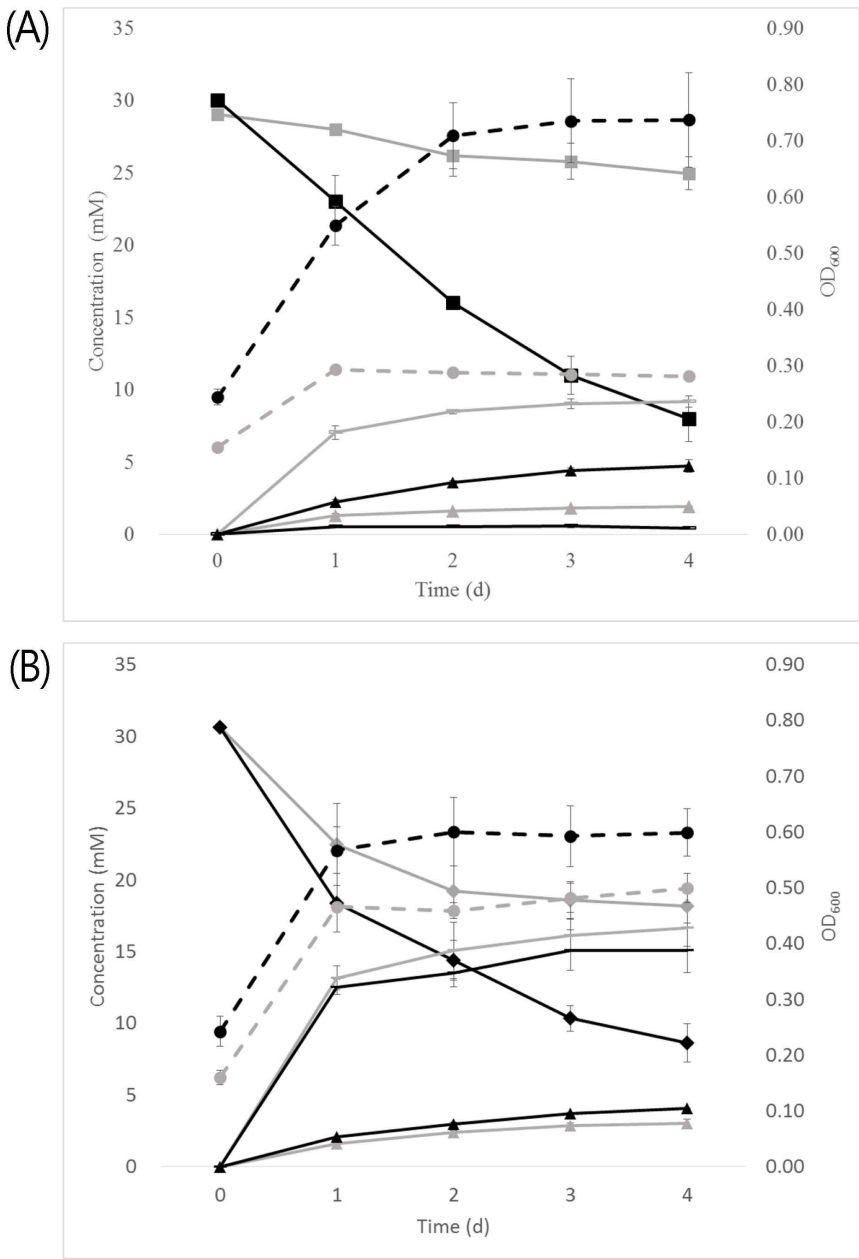
도면3



도면4



도면5



도면6

