(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0140343
(43) 공개일자 2023년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/06 (2017.01) *C12N 1/38* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/06 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0154533
(22) 출원일자 2022년11월17일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020220036674 2022년03월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
오병근
서울특별시 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에스알비

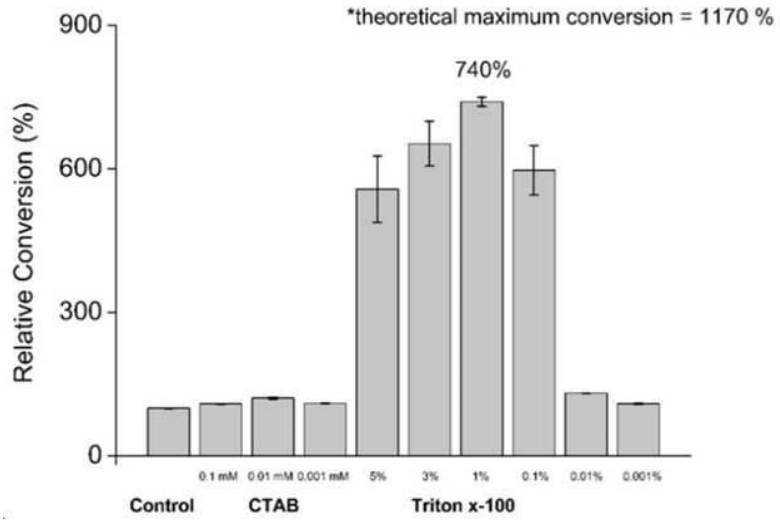
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법 및 이를 이용하는 생물전환 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포를 완전 파쇄가 아닌 부분 파쇄하여 세포가 외부 물질에 대해향상된 투과성을 나타내도록 만드는 기술에 관한 것으로, 세포 투과성을 획득하면서도 세포의 형태가 유지되도록 하는 방법을 개발하였고, 이와 같은 방법에 따르면 세포 내부 물질이 밖으로 유출되지 않으면서도 안팎으로의 물질 이동이 가능해지기 때문에 효소를 생산하는 미생물 자체를 효소 보관함으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12P 7/40 (2022.01)
C12Y 102/01002 (2013.01)
C12Y 102/99002 (2013.01)

(72) 발명자
나정걸
서울특별시 마포구 백범로 28, 702호 (신수동, 제2서강빌딩)
김태환
서울특별시 은평구 가좌로6길 17, 1층
윤지웅
서울시 마포구 숭문2길 8-2, 1층
이명준
서울특별시 마포구 숭문16가길 26, 303호
이장섭
서울특별시 마포구 백범로 35, 곤자가국제학사 B동 1253호 (신수동, 서강대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129486
과제번호 2015M3D3A1A01064929
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711153268
과제번호 2022R1A2C1006714
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 종양 유래 엑소좀 다종 바이오마커 동시 검출용 등온 핵산증폭 바이오칩 플랫폼 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 및 톨루엔(Toluen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것인, 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물을 이용하는 생물전환 방법:

세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 및 톨루엔(Toluen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

상기 미생물 전세포(whole cell)에 상기 세포내 효소에 반응하는 기질을 반응시킴으로써 세포내 효소 반응 생성물을 제조하는 생물전환 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것인, 세포 투과성이 향상된 미생물을 이용하는 생물전환 방법.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 포름산 생산 방법:

일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH)를 생산하는 미생물 및 포름산 탈수소효소(Formatedehydrogenase; FDH)를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 및 톨루엔(Toluen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

상기 미생물 전세포(whole cell)에 일산화탄소(CO)를 반응시킴으로써 포름산염을 생산하는 생물전환 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 CODH를 생산하는 미생물은 ChCODH-2를 코딩하는 유전자 또는 ChCODH-4를 코딩하는 유전자가 도입된 것인, 포름산 생산 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 FDH를 생산하는 미생물은 FDH1α(formate dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고, FDH1(formate dehydrogenase 1)을 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 것인, 포름산 생산 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것인, 포름산 생산 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 생물전환 단계는 pH 6.5 내지 pH 8.0의 조건에서 수행되는 것인, 포름산 생산 방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 생물전환 단계는 비스-트리스 프로판(Bis-tris propane), 인산수소포타슘(Potassium phosphate), MOPS(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), HEPES(하이드록시에틸피페라진에테인설폰산, Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonicacid), 및 중탄산염(Bicarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 버퍼 존재 하에서 수행되는 것인, 포름산 생산 방법.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 생물전환 단계는 CODH를 생산하는 미생물 및 FDH를 생산하는 미생물을 0.05:1 내지 16:1의 비율로 하여 수행되는 것인, 포름산 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법 및 이를 이용하는 생물전환 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미생물의 세포막 또는 세포벽을 완전히 파쇄하는 것이 아닌 부분적으로 파쇄함으로써 외부 물질의 세포 내부로의 전달을 가능하게 하면서도 미생물의 형태를 유지할 수 있으므로 이를 생물전환에 이용할 수 있는 효소 보관함으로 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포벽 파쇄(Cell lysis) 기술은 효소 정제(enzyme purification), DNA 추출(DNA extraction) 등 다양한 실험들에서 사용되는 기술로, 일반적으로 세포벽을 완전히 부숴 효소, DNA 등의 세포 내부물질(Intracellular metabolite)를 바깥으로 빼내는 기술로 알려져 있다.

[0003] 효소를 이용하기 위해 사용되는 기술인 세포 파쇄는 일반적으로 미생물의 세포벽을 부수고, 부숴져 바깥으로 나온 내용물들 중에서 효소만을 분리하여 사용하는 것이 일반적이다. 그러나 분리된 효소는 세포 밖에서는 안정성이 떨어지므로 오래 사용하기는 어렵기 때문에, 세포에서 분리한 세포를 고정화(enzyme immobilization)시켜서 사용하는 것이 통상적이다.

[0004] 미생물의 세포벽을 부수지 않고 미생물 자체를 효소 보관함으로 사용하는 사례들도 있으나, 이 경우는 기질/전자전달체와 같은 물질들이 세포벽/세포막을 통과해 효소까지 도달하는 데에서 많은 문제들이 발생하는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 미생물의 세포막 또는 세포벽을 완전히 파쇄하지 않고 부분적으로 파쇄함으로써 세포 투과성을 획득하면서도 세포의 형태가 유지되도록 하는 방법을 개발하였고, 이와 같은 방법에 따르면 세포 내부 물질이 밖으로 유출되지 않으면서도 안팎으로의 물질 이동이 가능해지기 때문에 대상 미생물을 효소 보관함으로서 생물전환 공정에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0006] 이에, 본 발명의 목적은 세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 및 톨루엔(Toluen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물을 이용하는 생물전환 방법을 제공하는 것이다:

[0008] 세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB, EDTA 및 톨루엔으로 이루어진 군으로

부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

[0009] 상기 미생물 전세포(whole cell)에 상기 세포내 효소에 반응하는 기질을 반응시킴으로써 세포내 효소 반응 생성물을 제조하는 생물전환 단계.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 포름산 생산 방법을 제공하는 것이다:

[0011] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH)를 생산하는 미생물 및 포름산 탈수소효소(Formatedehydrogenase; FDH)를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB, EDTA 및 톨루엔으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

[0012] 상기 미생물 전세포에 일산화탄소(CO)를 반응시킴으로써 포름산염을 생산하는 생물전환 단계.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법 및 이를 이용하는 생물전환 방법에 관한 것으로, 본 발명자들은 미생물의 세포막 또는 세포벽을 완전히 파쇄하지 않고 부분적으로 파쇄함으로써 세포 투과성을 획득하면서도 세포의 형태가 유지되도록 하는 방법을 개발하였고, 이와 같은 방법에 따르면 세포 내부 물질이 밖으로 유출되지 않으면서도 안팎으로의 물질 이동이 가능해지기 때문에 대상 미생물을 효소 보관함으로서 생물전환 공정에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0014] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0015] 본 발명의 일 양태는 세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 및 톨루엔(Toluen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물의 제조 방법이다.

[0016] 본 발명에 있어서 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 4.0%(v/v), 0.1 내지 3.0%(v/v), 0.2 내지 3.0%(v/v), 0.5 내지 3.0%(v/v), 또는 1.0 내지 3.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 예를 들어, 1.0 내지 2.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 상기 방법에 따라 제조된 세포 투과성이 향상된 미생물은 외부 전자전달체를 미생물 내부로 투과시키는 방법의 수행에 사용될 수 있다. 상기 전자전달체는 에틸 비올로겐(Ethyl viologen), 메틸 비올로겐(methyl viologen), 및 벤질 비올로겐(benzyl viologen)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 에틸 비올로겐인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 세포 투과성이 향상된 미생물을 이용하는 생물전환 방법이다:

[0019] 세포내 효소를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB, EDTA 및 톨루엔으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

[0020] 상기 미생물 전세포(whole cell)에 상기 세포내 효소에 반응하는 기질을 반응시킴으로써 세포내 효소 반응 생성물을 제조하는 생물전환 단계.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 4.0%(v/v), 0.1 내지 3.0%(v/v), 0.2 내지 3.0%(v/v), 0.5 내지 3.0%(v/v), 또는 1.0 내지 3.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 예를 들어, 1.0 내지 2.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 세포 표면 처리 단계는 30분 내지 120분 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 30분 내지 100분, 30분 내지 80분, 30분 내지 60분, 50분 내지 120분, 또는 50분 내지 80분 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 50분 내지 60분 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 세포 표면 처리 단계를 수행함에 따라, 세포의 세포막 또는 세포벽이 부분적으로 파쇄될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 포름산 생산 방법이다:

[0025] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH)를 생산하는 미생물 및 포름산 탈수소효소(Formatedehydrogenase; FDH)를 생산하는 미생물을 포함하는 반응액에 Triton X-100, CTAB, EDTA 및 톨루엔으

로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 계면활성제를 첨가하여 반응시키는 세포 표면 처리 단계; 및

[0026] 상기 미생물 전세포에 일산화탄소(CO)를 반응시킴으로써 포름산을 생산하는 생물전환 단계.

[0027] 본 발명에 있어서 상기 CODH를 생산하는 미생물은 국내공개특허 제10-2022-0013234호에서와 같이 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothermus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(ChCODH-2)를 코딩하는 유전자 또는 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(ChCODH-4)를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다. 상기 ChCODH-2를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 도입된 것일 수 있고, ChCODH-4를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 도입된 것일 수 있다.

[0028] 상기 CODH를 생산하는 미생물은 대장균(*Escherichia coli*; *E. coli*)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 있어서 상기 FDH를 생산하는 미생물은 국내등록특허 제10-1976691호에서와 같이 FDH1α(formate dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고, FDH1(formate dehydrogenase 1)을 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 것일 수 있다. 상기 FDH1α를 코딩하는 내인성 유전자는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, FDH1을 코딩하는 외인성 유전자는 서열번호 7 및 8의 염기서열을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 FDH1을 코딩하는 외인성 유전자는 재조합 벡터에 의해 도입된 것일 수 있다.

[0030] 상기 FDH를 생산하는 미생물은 메틸로박테리움 속 미생물인 것일 수 있고, 바람직하게는 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylomonas extorquens*; *M. extorquens*)인 것일 수 있으며, 예를 들어, 수탁번호 KCTC 13388BP로 기탁된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.

[0032] 상기 일산화탄소 탈수소효소를 발현하는 벡터는 재조합 벡터일 수 있고, 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈(pET-28 포함) 및 pUC19 등), 파지 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있고, 구체적으로, pET-28일 수 있다.

[0033] 용어 “재조합 벡터”는 목적하는 클로닝된 유전자를 함유하는 임의의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함한다.

[0034] 용어 “재조합”은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0035] 상기 재조합 벡터에서 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0036] 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결"됨으로써 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

[0037] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0038] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로

모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0039] 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터에 도입된 일산화탄소 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 상기 재조합 벡터는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서 상기 계면활성제는 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 5.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 4.0%(v/v), 0.1 내지 3.0%(v/v), 0.2 내지 3.0%(v/v), 0.5 내지 3.0%(v/v), 또는 1.0 내지 3.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 예를 들어, 1.0 내지 2.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 세포 표면 처리 단계는 30분 내지 120분 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 30분 내지 100분, 30분 내지 80분, 30분 내지 60분, 50분 내지 120분, 또는 50분 내지 80분 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 50분 내지 60분 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 세포 표면 처리 단계를 수행함에 따라, 세포의 세포막 또는 세포벽이 부분적으로 파쇄될 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서 상기 생물전환 단계는 pH 6.5 내지 pH 8.0의 조건에서 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.5의 조건에서 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5의 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서 상기 생물전환 단계는 비스-트리스 프로판(Bis-tris propane), 인산수소포타슘(Potassium phosphate), MOPS(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), HEPES(하이드록시에틸피페라진에테인설폰산, Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonicacid), 및 중탄산염(Bicarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 버퍼 존재 하에서 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 비스-트리스 프로판 버퍼 존재 하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 있어서 상기 생물전환 단계는 일산화탄소를 1회 이상 주입하여 수행되는 것일 수 있다.

[0046] 상기 일산화탄소의 1회 주입량은 10 내지 500 mM인 것일 수 있고, 바람직하게는 10 내지 200 mM, 10 내지 100 mM, 50 내지 500 mM, 또는 50 내지 200 mM, 예를 들어, 50 내지 100 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 있어서 상기 일산화탄소의 주입은 일산화탄소(CO), 이산화탄소(CO_2), 질소(N_2)의 혼합 가스 형태로 제공되는 것일 수 있고, 상기 혼합 가스의 조성은 일산화탄소 40 내지 60%, 이산화탄소 10 내지 20%, 질소 30 내지 40%의 부피비로 이루어진 것일 수 있다.

[0048] 상기 혼합 가스는 생물전환 단계의 수행을 위하여 1.0 내지 5.0 bar의 압력으로 제공되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1.0 내지 4.0 bar, 1.0 내지 3.0 bar, 2.0 내지 5.0 bar, 또는 2.0 내지 4.0 bar의 압력으로 제공되는 것일 수 있고, 예를 들어, 2.0 내지 3.0 bar의 압력으로 제공되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에 있어서 상기 생물전환 단계는 CODH를 생산하는 미생물 및 FDH를 생산하는 미생물을 0.05:1 내지 16:1의 비율로 포함하여 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.25:1 내지 16:1, 1:1 내지 16:1, 2:1 내지 16:1, 또는 4:1 내지 16:1의 비율로 포함하여 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 8:1 내지 16:1의 비율로 포함하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0050] 본 발명은 세포를 완전 파쇄가 아닌 부분 파쇄하여 세포막 또는 세포벽이 약간의 투과성을 나타내도록 만드는 기술에 관한 것으로, 세포 투과성을 획득하면서도 세포의 형태가 유지되도록 하는 방법을 개발하였고, 이와 같은 방법에 따르면 세포 내부 물질이 밖으로 유출되지 않으면서도 안팎으로의 물질 이동이 가능해지기 때문에 효소를 생산하는 미생물 자체를 효소 보관함으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 대장균(*Escherichia coli*) BL21 균주의 일산화탄소 산화작용을 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylomonas extorquens*) AM1 JJ 균주의 포름산염 산화작용을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 대장균 BL21 균주 및 재조합된 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 일산화탄소로부터의 포름산염(formate) 생산량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 대장균 BL21 균주 및 재조합된 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 pH 조건별 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 대장균 BL21 균주 및 재조합된 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 버퍼별 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 재조합된 대장균 BL21 균주 및 재조합된 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 외부 전자전달체 농도별 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주로부터 수행되는 포름산 생산 경과를 나타낸 모식도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 상이한 계면활성제의 처리에 의하여 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 계면활성제인 Triton X-100의 농도별 처리에 의하여 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 10a는 본 발명의 일 실시예에 따라 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 세포 비율에 따른 시간별 포름산염 생산량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따라 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 세포 비율별 최종 포름산염 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 부분적으로 파쇄된 대장균 BL21 균주 및 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주의 반응기 내 포름산염 생산량 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 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.

[0053] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0055] **실시예 1: 일산화탄소로부터 포름산을 생산하는 시스템의 제조**

[0056] **1-1. 일산화탄소로부터 이산화탄소를 생산하는 시스템의 제조**

[0057] 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH)의 유전자 변이 주형(template)으로 이용하기 위해 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydothermus hydrogenoformans*; *C. hydrogenoformans*)(GenBank no. NC_007503) 유래 ChCODH-2 및 ChCODH-4 단백질을 코딩하는 유전자(서열번호 1 및 2)는 GenScript사(Piscataway, NJ, USA)를 통해 인위적으로 합성하였다.

[0058] 상기 합성된 *C. hydrogenoformans* 유래 ChCODH-2 혹은 ChCODH-4 유전자는 NdeI/BamHI 혹은 NdeI/XhoI의 제한효소들(New England BioLabs Inc., US)로 37℃에서 20분간 절단한 후, SolGent™ T4 DNA Ligase를 이용하여 발현용 벡터 pET-28(Novagen, USA, 서열번호 3)에 클로닝하였다. 상기 CODH 유전자를 함유하는 벡터(서열번호 4 및 5)를 대장균(*Escherichia coli*) BL21에 열충격(heat chock, 42℃, 1분) 도입하여 야생형 CODH를 함유하는 재조합 미생물을 제조하였다.

표 1

[0059]

서열 번호	명칭	서열
1	야생종 ChCODH-II	atggcgaaacaaaatctgaagagcaccgaccgtgcggttcaacaaatgctggataaagcgaagcgtgagggtattc aaaccgtgtgggatcgttacgaggcgatgaagccgcagtgcggtttcggcgaaaccggtctgtgctgccgtcactg cctgcaaggtccgtgccgtattaacccgtttggcgatgagccgaaagtgggcatttgcggtgcgaccgcggaagtg atcgttgcgcgtggtctggaccgtagcattgcggcgggtgcggcgggtcatagcggtcatgcgaagcacctggcgc acaccctgaagaaagcggtgcagggcaaagcggcgagctatatgattaaggaccgtaccaaactgcacagcatcgc gaagcgtctgggtattccgaccgaaggccaaaaagacgaggatattgcgctggaagttgcgaaagcggcgctggcg gacttccatgagaaagataccccggttctgtgggtgaccaccgttctgccgccgagccgtgtgaaggttctgagcg cgcatggtctgatcccggcgggtattgatcacgaaatcgcggagattatgcaccgtaccagcatgggttgcgacgc ggatgcgcagaacctgctgctgggtggcctgcgttgcagcctggcggacctggcgggttgctacatgggcaccgac ctggcggatatcctgtttggtaccccggcgccggtggttaccgaaagcaacctgggcgtgctgaaggcggatgcgg tgaacgttgcggtgcacggtcacaacccggttctgagcgacatcattgttagcgtgagcaaagagatggaaaacga ggcgcgtgcggcgggtgcgaccggtatcaacgtggttggtatttgctgcaccggcaacgaggtgctgatgcgtcac ggtattccggcgtgcacccacagcgttagccaggaaatggcgatgatcaccggcgcgctggacgcgatgatcctgg attatcagtgcattcaaccgagcgtggcgaccattgcggagtgcaccggtaccaccgttattaccaccatggaaat gagcaaaatcaccggtgcgacccatgtgaactttgcggaggaagcggcggttgagaacgcgaagcaaatcctgcgt ctggcgattgataccttaaacgtcgtaagggtaaaccggtggagatcccgaacattaagaccaaagtggttgcgg gcttcagcaccgaagcgatcattaacgcgctgagcaagctgaacgcgaacgatccgctgaaaccgctgattgacaa cgtggttaacggtaacatccgtggcgtgtgcctgttcgcgggttgcaacaacgttaaggtgccgcaggaccaaaac tttaccaccattgcgcgtaagctgctgaaacagaacgttctggtggttgcgaccggttgcggtgcgggtgcgctga tgcgtcacggttttatggacccggcgaacgtggatgagctgtgcggcgacggtctgaaagcggttctgaccgcgat cggtgaagcgaacggtctgggtggcccgctgccgccggtgctgcacatgggtagctgcgttgacaacagccgtgcg gtggcgctggttgcggcgctggcgaaccgtctgggcgttgacctggatcgtctgccggtggttgcgagcgcggcgg aagcgatgcatgagaaggcggtggcgattggtacctgggcggttaccatcggtctgccgacccacattggtgtgct gccgccgatcaccggcagcctgccggtgacccaaatcctgaccagcagcgttaaagatattaccggtggctacttc atcgttgaactggacccggagaccgcggcggacaaactgctggcggcgatcaatgagcgtcgtgcgggtctgggtc tgccgtggtga
2	야생종 ChCODH-IV	atggataaaagcaagttatcagtagatcctgtgatcccgaatttatatcgtaaagccagagaggaagggatttcca ctgtttttgatcgttatgaagcacagcagcctcagtgcggatttgggcttacaggcctttgctgtcgtcattgcgt gcagggaccgtgccgcatagatccgtttggggaaggaccgcaagcgggcatttgcggtgctaccgccgaggtaata acggctcgcaatctgctgcgtcaagtcacggcgggtgctgccgcccatgtagaccatgcgtatgatgtgctggaag ttttggaacaaatcgcccaaggtacggaatcatacagtatcaaagatcaagaaaagttaaagcaggtcgcttttac cttaggtatagataccgctaacaaaacagagcaggagattgttgaagagatgtgccaaattatctatcgggatttt gccaattctggtgcaacaccgatgacctatctgaaagccaactctcctcgggaacgccttgagacatgggaaaaat taggggttctgcctcgtaacccagaccgtgaaatcagagaagccttacaccagactacaatggggatggatgcgga cccagtaaatttaatcttaaaaactattcgccttggtctggttgatggttttgcgggtctcaagttagcgacggat ttacaggacatcatttttggcactccccagccagttgtcacagaagcaaatctgggtgtactcaaagaagattatg tgaatatcatagtccacggccatgttccgttacttagcgaaaaaattgttgaatggagcagaaagttggaagatga ggcgaaaaaagcaggggcaaaaggaatcaatcttgcaggtatatgttgtactggtaacgaggtgttaatgcgtcag ggtgtaccgttagcaacaaacttcctggcccaggagttggcgattattacgggggcagttgacttaatggtagtgg atgttcagtgtattatgccctcattagcagaaattgctgcttgctatcatacccgcttagtcactaccatgccgat tgtgaaaattccaggtgcggagcatgttccgttcaccacagaaactgccgatgaggcctcgcagcagattgtgcgt atggctatagagagttaccaaaaacgcaatccagccaaggtctacatccccagggaaaaagccaaagttgtagcag gattcagcgttgaggcaatagtaaaagcgttagcgaaactaaatcctgacgatccgttaaagccccttaattgataa tattgtgtctggcaacattctgggtgtggtcgccaccgttggttgtaacaatgtgaaggtcaagcatgattggttc cacatagaattagtaaaagaactaattaaaaacaatgtgttagtggtgactacaggctgttccgctcatgcgttag cgaaagcaggcttgatggaccccgcagcagccgaatgggctggcgagggtttacgagccgtcttaacggcaatagg cacggctaatgatttgggcggcccgctgccgcctgttttgcacatgggatcgtgtgttgataactcccgaatcggg gacttagtgatcgccgtcgcaaactaccttaaagtaagtccaaaagaccttccgattgcggcttctgcacctgaat accagcatgaaaaggctttgagcatcggaacctgggcggtagcgatgggtattatgacccacttgggagttgttcc acctgtggtcggaagttcaaaagttacccgtattcttacccaagatgccgaggctttaataggcggcaaattttat gtggaaacggacccatataaagcagcagcgggcatcattgaacatattaaggctaaacgggctctactgaatttat aa

[0060] 상기 재조합 미생물의 배양은 50 μg/mL 카나마이신, 10 μg/mL 테트라사이클린, 0.02 mM 염화니켈($NiCl_2$), 0.1 mM 황산제일철($FeSO_4$), 2 mM 엘-시스테인(l-cysteine)이 포함되어 있는 TB 배지(400 mL, 2 L 플라스크)에서, 37 ℃, 225 rpm의 조건으로 수행하였다.

[0062] **1-2. 이산화탄소로부터 포름산을 생산하는 시스템의 제조**

[0063] 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylomonas extorquens*; *M. extorquens*) AM1 JJ에서 FDH1α(formate

dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자인 fdh1α을 녹-아웃하고, FDH1을 코딩하는 유전자 fdh1을 형질전환하여 재도입하는 경우, 야행성 *M. extorquens* AM1 JJ에 비해 포름산 생산량이 증가한다. 놀랍게도, 야행성 *M. extorquens* AM1 JJ에 녹-아웃 전처리 없이 fdh1 코딩하는 유전자를 형질전환하여 인위적으로 발현시키는 경우, 본 발명의 재조합 미생물과 같은 포름산 생산량을 기대할 수 없었다. 따라서 *M. extorquens* AM1 JJ로부터 증가된 포름산 생산량을 기대하기 위해서는 FDH1α를 코딩하는 내인성 유전자의 결실 및, FDH1을 코딩하는 외인성 유전자의 도입이 반드시 요구된다.

[0064] 메틸로박테리움 엑스토르켄스 AM1 JJ의 FDH1 단백질은 FDH1α 및 FDH1β로 이루어진다. 상기 FDH1α는 서열번호 6의 아미노산 서열(GenBank accession No. ACS42636.1)을 포함하고, 상기 FDH1β는 서열번호 7의 아미노산 서열(GenBank accession No. ACS42635.1)을 포함한다. 따라서 상기 FDH1α를 코딩하는 유전자인 fdh1α는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것으로서, 서열번호 8의 폴리뉴클레오티드 서열(GenBank accession, CP001510.1:5169596-5172565, Methylobacterium extorquens AM1 JJ, complete genome)을 포함하는 것일 수 있고, 상기 FDH1β를 코딩하는 유전자인 fdh1β는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것으로서, 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드 서열(CP001510.1:5167825-5169543, Methylobacterium extorquens AM1 JJ, complete genome)을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 FDH1을 코딩하는 유전자 fdh1은 상기 서열번호 8 및 9의 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 것일 수 있다.

표 2

[0065]

서열번호	명칭	서열
6	*M. extorquens* AM1 JJ FDH1α amino acids	MSNGPEPHGNKIEQPEIRADERQDAGGPANGAPSTSGGAYSQGAKSGGQAAPDPSGSYGIKDAPVAPATIAFEFDGQQ VEAQPGETIWAVAKRLGTHIPHLCHKPDPGYRPDGNCRACMVEIEGERVLAASCKRTPAIGMKVKSATERATKARAMV LELLVADQPERATSHDPSSHFWVQADVLDVTESRFPAAERWTSDVSHPAMSVNLDACIQCNLCVRACREVQVNDVIGM AYRAAGSKVVFDFDDPMGGSTCVACGECVQACPTGALMPAAYLDANQTRTVYPDREVKSLCPYCGVGCQVSYKVKDER IVYAEGVNGPANQNRLCVKGRFGFDYVHHPHRLTVPLIRLENVPKDANDQVDPANPWTHFREATWEEALDRAAGGLKA IRDTNGRKALAGFGSAKGSNEEAYLFQKLVRLGFGTNNVDHCTRLCHASSVAALMEGLNSGAVTAPFSAALDAEVIVV IGANPTVNHPVAATFLKNAVKQRGAKLIIMDPRRQTLSRHAYRHLAFRPGSDVAMLNAMLNVIVTEGLYDEQYIAGYT ENFEALREKIVDFTPEKMASVCGIDAETLREVARLYARAKSSLIFWGMGVSQHVHGTDNSRCLIALALITGQIGRPGT GLHPLRGQNNVQGASDAGLIPMVYPDYQSVEKDAVRELFEEFWGQSLDPQKGLTVVEIMRAIHAGEIRGMFVEGENPA MSDPDLNHARHALAMLDHLVVQDLFLTETAFHADVVLPASAFAEKAGTFTNTDRRVQIAQPVVAPPGDARQDWWIIQE LARRLDLDWNYGGPADIFAEMAQVMPSLNNITWERLEREGAVTYPVDAPDQPGNEIIFYAGFPTESGRAKIVPAAIVP PDEVPDDEFPMVLSTGRVLEHWHTGSMTRRAGVLDALEPEAVAFMAPKELYRLGLRPGGSMRLETRRGAVVLKVRSDR DVPIGMIFMPFCYAEAAANLLTNPALDPLGKIPEFKFCAARVVPAEAAPMAAE
7	*M. extorquens* AM1 JJ FDH1β amino acids	MSEASGTVRSFAHPGRGRNVARAVPKGRQVDPHAKVEIEELLGTRPRQRDLLIEHLHLIQDTYGQISADHLAALADEM SLAFAEVFETATFYAHFDVVKEGEADIPRLTIRVCDSITCAMFGADELLETLQRELASDAVRVVRAPCVGLCDHAPAV EVGHNFLHRADLASVRAAVEAEDTHAHIPTYVDYDAYRAGGGYATLERLRSGELPVDDVLKVLDDGGLRGLGGAGFPT GRKWRSVRGEPGPRLMAVNGDEGEPGTFKDQLYLNTDPHRFLEGMLIGAHVVEAADVYIYLRDEYPISREILAREIAK LPEGGTRIHLRRGAGAYICGEESSLIESLEGKRGLPRHKPPFPFQVGLFNRPTLINNIETLFWVRDLIERGAEWWKSH GRNGRVGLRSYSVSGRVKEPGVKLAPAGLTIQELIDEYCGGISDGHSFAAYLPGGASGGILPASMNDIPLDFGTLEKY GCFIGSAAVVILSDQDDVRGAALNLMKFFEDESCGQCTPCRSGTQKARMLMENGVWDTDLLGELAQCMRDASICGLGQ AASNPVSTVIKYFPDLFPEPRAVAAE

8	*M. extorquens* AM1 JJ FDH1α polynucleotides	ATGAGCAACGGCCCCGAACCGCACGGCAACAAGATCGAACAGCCCGAGATCCGCGCCGACGAACGTCAGGATGCCGGC GGGCCGGCAAATGGCGCACCATCGACCTCCGGCGGCGCCTACTCGCAGGGCGCCAAGTCGGGTGGCCAGGCCGCGCCG GATCCGTCCGGCTCCTACGGCATCAAGGACGCCCCGGTCGCGCCCGCGACCATCGCCTTCGAGTTCGACGGCCAACAG GTCGAGGCCCAGCCCGGCGAGACGATCTGGGCGGTCGCCAAGCGCCTTGGCACGCATATCCCGCATCTCTGCCACAAG CCCGATCCCGGCTACCGCCCGGACGGCAATTGCCGCGCCTGCATGGTCGAGATCGAGGGCGAGCGCGTGCTCGCCGCC TCGTGCAAGCGCACGCCCGCCATCGGCATGAAGGTGAAGTCGGCCACCGAGCGCGCCACCAAGGCCCGCGCCATGGTG CTCGAACTGCTCGTGGCCGATCAGCCCGAGCGCGCGACCTCGCATGACCCGTCGTCGCATTTCTGGGTGCAGGCCGAC GTCCTCGATGTGACCGAGAGCCGCTTCCCGGCGGCCGAGCGCTGGACCAGCGACGTCAGCCACCCGGCGATGAGCGTC AATCTCGACGCCTGCATCCAGTGCAATCTCTGTGTCCGCGCCTGCCGCGAGGTTCAGGTCAACGACGTGATCGGCATG GCCTACCGCGCCGCGGGCTCCAAGGTCGTGTTTGACTTCGACGATCCGATGGGTGGCTCCACCTGCGTGGCCTGCGGC GAGTGCGTCCAAGCCTGCCCGACCGGGGCGCTGATGCCGGCCGCCTATCTCGACGCAAACCAGACCCGGACGGTCTAT CCCGACCGCGAGGTGAAGTCGCTCTGCCCCTATTGCGGCGTCGGCTGCCAAGTCTCCTACAAGGTCAAGGACGAGCGC ATCGTCTACGCCGAGGGCGTGAACGGACCGGCCAACCAGAACCGGCTCTGCGTGAAGGGCCGCTTCGGCTTCGACTAC GTCCACCACCCCCACCGCCTGACGGTGCCGCTGATCCGCTTGGAGAACGTGCCCAAGGACGCCAACGATCAGGTCGAT CCGGCGAACCCCTGGACGCATTTCCGCGAGGCGACCTGGGAAGAGGCGCTCGACCGCGCGGCGGGCGGCCTGAAGGCG ATCCGTGACACCAACGGGCGCAAGGCGCTGGCGGGCTTCGGCTCGGCCAAGGGTTCGAACGAGGAGGCCTACCTCTTC CAGAAGCTCGTCCGCCTCGGCTTCGGCACCAACAACGTCGATCACTGCACGCGCCTGTGCCACGCCTCGTCGGTGGCG GCGCTGATGGAGGGCCTGAATTCCGGCGCCGTCACCGCTCCCTTCTCGGCAGCGCTCGACGCCGAGGTCATCGTCGTC ATCGGCGCCAACCCGACCGTGAACCATCCGGTCGCGGCGACCTTCCTCAAGAACGCGGTGAAGCAGCGCGGCGCCAAG CTGATCATCATGGACCCGCGGCGCCAGACGCTCTCGCGCCACGCCTATCGGCACCTCGCCTTCCGCCCCGGCTCGGAC GTGGCGATGCTCAACGCGATGCTCAACGTGATCGTCACGGAGGGCCTCTACGACGAGCAGTACATCGCCGGCTACACC GAGAACTTCGAGGCTCTGCGCGAGAAGATCGTCGACTTCACGCCGGAGAAGATGGCCTCGGTCTGCGGCATCGACGCC GAGACCCTGCGCGAGGTCGCCCGGCTCTACGCCCGGGCCAAGTCGTCGCTCATCTTCTGGGGCATGGGCGTCAGCCAG CACGTGCACGGCACCGACAACTCGCGCTGCCTGATCGCGCTCGCCCTCATCACCGGCCAGATCGGCCGGCCCGGCACC GGCCTGCACCCGTTGCGCGGCCAGAACAACGTCCAGGGCGCGTCCGATGCCGGCCTGATCCCGATGGTCTACCCGGAC TATCAGTCGGTCGAGAAGGACGCGGTGCGTGAGCTGTTCGAGGAGTTCTGGGGGCAGTCCCTCGATCCTCAGAAGGGC CTCACCGTGGTCGAGATCATGCGCGCGATCCACGCGGGCGAGATCCGGGGCATGTTCGTCGAGGGCGAGAACCCGGCG ATGTCCGACCCCGACCTCAACCATGCCCGCCACGCGCTGGCGATGCTCGACCATCTCGTGGTGCAGGACCTGTTCCTG ACGGAGACGGCCTTCCACGCCGACGTGGTGCTGCCGGCCTCGGCCTTTGCCGAGAAAGCCGGGACCTTCACCAACACC GACCGGCGCGTGCAGATCGCCCAGCCCGTCGTCGCCCCTCCGGGCGATGCGCGCCAGGATTGGTGGATCATCCAGGAA CTGGCCCGACGCCTCGACCTCGACTGGAACTACGGCGGCCCGGCCGACATCTTCGCCGAGATGGCGCAGGTGATGCCG TCCTTGAACAACATCACCTGGGAGCGGCTGGAGCGCGAGGGGGCGGTGACCTATCCGGTCGATGCCCCGGACCAGCCC GGCAACGAGATCATCTTCTATGCCGGCTTCCCGACCGAGAGCGGTCGCGCCAAGATCGTGCCCGCGGCGATCGTGCCG CCGGACGAGGTGCCGGACGACGAGTTCCCGATGGTGCTCTCGACCGGCCGCGTGCTCGAACACTGGCACACGGGCTCG ATGACCCGGCGCGCGGGCGTGCTCGACGCGCTGGAGCCGGAGGCGGTGGCCTTCATGGCACCCAAGGAGCTCTACCGG CTCGGTCTCCGGCCCGGCGGGTCGATGCGGTTGGAAACACGGCGCGGCGCCGTCGTGTTGAAGGTGCGCTCCGACCGG GACGTGCCGATCGGCATGATCTTCATGCCCTTCTGCTACGCGGAAGCCGCCGCCAACCTTCTGACCAACCCCGCCCTC GACCCCCTCGGAAAGATTCCCGAGTTCAAATTCTGCGCAGCCCGCGTCGTCCCCGCGGAGGCTGCGCCGATGGCCGCC GAGTAA
9	*M. extorquens* AM1 JJ FDH1β polynucleotides	ATGAGTGAGGCAAGTGGGACTGTCCGGAGCTTCGCGCATCCGGGCCGTGGCCGTAACGTCGCCCGCGCCGTGCCGAAG GGGCGTCAGGTCGATCCCCACGCCAAGGTCGAGATCGAGGAGCTGCTCGGCACCCGCCCGCGCCAGCGCGACCTGCTG ATCGAGCACCTGCACCTGATCCAAGACACCTACGGCCAGATCAGCGCCGATCATCTCGCGGCGCTGGCCGACGAGATG AGCCTCGCCTTCGCCGAGGTGTTCGAGACCGCGACCTTCTACGCGCATTTCGATGTGGTGAAGGAGGGCGAGGCCGAC ATCCCGCGCCTGACGATCCGGGTTTGCGACAGCATCACCTGCGCCATGTTCGGCGCCGACGAGCTGCTGGAGACGCTG CAGCGCGAGCTGGCCTCGGATGCGGTCCGCGTCGTGCGCGCGCCCTGTGTCGGCCTGTGCGACCACGCCCCGGCGGTC GAGGTCGGGCACAACTTCCTGCACCGGGCCGACCTCGCCTCCGTGCGCGCCGCGGTCGAGGCCGAGGACACCCACGCC CACATCCCCACTTACGTCGATTACGACGCCTACCGGGCCGGCGGCGGCTACGCGACCCTGGAGCGGCTGCGCAGCGGC GAACTGCCGGTCGATGACGTGCTGAAGGTGCTCGACGACGGCGGCCTGCGCGGCCTCGGCGGCGCCGGCTTTCCCACC GGCCGCAAGTGGCGCTCCGTGCGCGGCGAGCCCGGACCCCGGCTGATGGCGGTCAACGGCGACGAGGGCGAGCCCGGC ACCTTCAAGGATCAGCTCTACCTCAACACCGATCCGCACCGCTTTCTGGAAGGCATGCTGATCGGCGCCCACGTCGTC GAGGCCGCCGACGTCTACATCTACCTGCGCGACGAGTACCCGATCTCCCGCGAGATCCTGGCCCGCGAGATCGCGAAG CTCCCCGAGGGCGGCACCCGCATCCACCTGCGCCGTGGGGCCGGCGCCTATATCTGCGGCGAGGAATCCTCGCTGATC GAGTCGCTGGAGGGCAAGCGCGGCCTGCCGCGGCACAAGCCGCCCTTCCCCTTCCAGGTCGGCCTGTTCAACCGGCCG ACGCTGATCAACAACATCGAGACGCTGTTCTGGGTGCGCGACCTGATCGAGCGCGGCGCCGAATGGTGGAAGAGCCAC GGGCGCAACGGCCGCGTCGGCCTGCGCTCGTACTCGGTTTCGGGCCGGGTCAAGGAGCCGGGCGTCAAGCTCGCGCCC GCCGGCCTGACCATCCAGGAACTCATCGACGAGTATTGCGGCGGCATCTCTGACGGCCACAGCTTCGCGGCCTACCTG CCGGGCGGAGCCTCGGGCGGCATCCTGCCGGCCTCGATGAACGACATCCCGCTCGATTTCGGCACGCTGGAAAAATAC GGCTGCTTCATCGGCTCGGCCGCGGTCGTGATCCTGTCCGATCAGGACGATGTGCGCGGTGCCGCGTTGAACCTGATG AAGTTCTTCGAGGACGAGTCCTGCGGGCAGTGCACGCCCTGCCGCTCGGGCACGCAGAAGGCCCGCATGCTGATGGAG AACGGCGTGTGGGACACCGATCTCCTCGGCGAGCTGGCGCAATGCATGCGCGACGCCTCGATCTGCGGTCTCGGTCAG GCGGCCTCGAACCCCGTCAGCACCGTGATCAAGTACTTCCCTGATCTCTTCCCGGAGCCGCGGGCCGTGGCGGCCGAG TGA

[0066] 상기 기재된 바에 따라 재조합된 미생물로서 수탁번호 KCTC 13388BP로 기탁된 *M. extorquens* AM1 JJ 균주를 사용하였다. 기본적인 배양 배지는 탄소공급원으로 16 g/L 숙신산 및 최소염 배지(minimal salt medium)(1.62 g/L NH_4Cl, 0.2 g/L $MgSO_4$, 2.21 g/L K_2HPO_4, 및 1.25 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)를 선택하였다.

[0068] **실시예 2: 전세포 활용 촉매작용 확인**

[0069] **2-1. 재조합 *E.coli* BL21 균주의 일산화탄소 산화작용의 확인**

[0070] 하기 조건에 따라 재조합 *E.coli* BL21 균주의 일산화탄소 산화작용을 확인하였다.

표 3

[0071]

항목	조건
Initial pH	6.5
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Electron mediator	ethyl viologen 10 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30℃
Cell loading	0.05 g *E.coli* BL21

[0072] 에틸 비올로겐은 세포 내외부로 이동하며 반응을 매개한다. 중성 상태의 에틸 비올로겐(EV^0, 무색에서 옅은 노랑)은 *E.coli* BL21 내부로 들어가 CODH에 의한 일산화탄소 산화 반응을 매개하여 환원되고, 환원된 에틸 비올로겐(EV^-, 짙은 파랑)은 *M.extorquens* AM1 내부로 확산되어 FDH에 의한 CO_2 환원 반응을 매개함으로써 다시 EV^0 형태로 산화된다. 이러한 과정을 반복하며 포름산염 전환 과정을 매개한다.도 1에서 확인할 수 있듯이, 적정시간 경과 이후 반응액의 색상이 파랗게 변하는 것으로부터 에틸 비올로겐이 환원되었음을 확인하였다. 재조합 *E.coli* BL21 균주에 의해 [$CO + EV^0 \rightarrow CO_2 + EV^-$] 반응이 이루어지므로 CO가 소비되고, CO_2가 생산되었다.

[0073] CO의 산화과정에서 반응을 매개하는 전자전달체(Electron mediator) 에틸 비올로겐(Ethyl viologen(EV^0))이 10 mM 농도로 주입되었기 때문에, CO 또한 약 10 mM 소모된 것을 확인할 수 있었다. CO에 상응하여 CO_2 또한 약 10 mM 생산되었으므로, *E.coli* BL21 균주 내부의 CODH에 의해 CO 산화반응이 일어났음을 확인할 수 있었다.

[0075] **2-2. 재조합 *M.extorquens* AM1 JJ 균주의 포름산염 산화작용의 확인**

[0076] 하기 조건에 따라 재조합 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylomonas extorquens*) AM1 JJ 균주(KCTC 13388BP)의 포름산염 산화작용을 확인하였다.

표 4

[0077]

항목	조건
Initial pH	6.5
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Electron mediator	ethyl viologen 10 mM
Substrate	Formate 50 mM
Temperature	30 ℃
Cell loading	0.5 g *M.extorquens* AM1 JJ

[0078] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 재조합 *M.extorquens* AM1 JJ 균주에 의해 [$CO_2 + EV^- <-> HCOOH + EV^0$] 반응이 이루어지므로 포름산염이 산화되어 소비되고, CO_2가 생산된 것을 확인하였다. EV^0는 다시 실시예 2-1에 기재된 CODH의 반응에 사용될 수 있다. *E.coli* BL21 균주의 반응과 동일하게 전자전달체인 에틸 비올로겐을 10 mM 주입하였기 때문에, *M.extorquens* AM1 JJ 균주 내부의 FDH에 의해 포름산염의 산화 및 CO_2 생산도 약 10 mM 만큼 진행된 것을 볼 수 있었다.

[0080] **2-3. 전세포 기반 포름산염 생산성의 확인**

[0081] 세포에 표면처리를 통한 투과성 증대 실험에 앞서, 상기 실시예 2-1 및 2-2에 근거하여 *E.coli* BL21 균주와 *M.extorquens* AM1 JJ 균주를 동시에 생촉매로 활용하여 일산화탄소를 포름산염으로 전환하는 시스템을 설계하여 일산화탄소 전환 포름산염의 생산을 확인하였다. *E.coli* BL21은 CODH를, *M.extorquens* AM1 JJ 균주는 FDH를 가지고 있어, 각각 일산화탄소의 산화와 이산화탄소의 환원을 담당한다.

표 5

[0082] 두 균주를 이용한 일산화탄소 전환 포름산염 생산 실험조건

항목	조건
Initial pH	6.5
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Electron mediator	ethyl viologen 10 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30 ℃
Cell loading	0.05 g *E.coli* BL210.5 g *M.extorquens* AM1 JJ

[0083] 도 3에서 확인할 수 있듯이, *E.coli* BL21 균주와 *M.extorquens* AM1 JJ 균주를 전세포로 활용하여 일산화탄소를 포름산염으로 전환하는데 성공하였다. 초기 가스를 주입하고 약 29 hr 경과시, 포름산은 103 mM이 생산된 후 42 hr 경과시까지 생산량이 증가하지 않았으므로, 기질 부족으로 판단하여 42 hr 경과시에 추가로 동량의 syngas($CO:CO_2:N_2$=50:15:35) 기질을 추가로 주입하였다. 이를 통해 추가적으로 생산이 일어나 73 hr 경과시를 기준으로 최대 205 mM의 포름산염을 생산하였으며, 전세포 활용 시의 일산화탄소 전환 포름산염 생산의 가능성을 확인하였다.

[0085] **2-4. 포름산염 생산을 위한 pH 조건의 최적화**

[0086] *E.coli* BL21 균주와 *M.extorquens* AM1 JJ 균주를 전세포로 활용하여 일산화탄소를 포름산염으로 전환하는 최적 pH 조건을 탐색하기 위하여, 넓은 pH 조건에서 활용가능한 버퍼인 비스-트리스 프로판(Bis-tris propane)을 사용하여 하기 조건으로 반응을 수행하였다.

표 6

[0087] pH 최적화 실험 조건

항목	조건
Initial pH	6.5 ~ 9.5
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Reaction buffer	200 mM Bis-tris propane
Electron mediator	ethyl viologen 10 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35) 200 mM, 2.5 bar
Temperature	30 ℃
Cell loading	1 g *E.coli* BL210.1 g *M.extorquens* AM1 JJ

[0088] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 포름산염의 생산은 pH 7에서 가장 최적으로 나타났으며, 기준인 pH 6.5에 비해 2% 향상된 결과를 나타냈다.

[0090] **2-5. 포름산염 생산을 위한 반응 버퍼 선택 조건의 최적화**

[0091] pH 7의 조건에서 사용 가능한 인산수소포타슘(Potassium phosphate), MOPS(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), HEPES (하이드록시에틸피페라진에테인설폰산, Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonicacid), 비스-트리스 프로판(Bis-tris propane), 중탄산염(Bicarbonate) 버퍼들을 활용해 버퍼에 따른 생산성 차이를 관찰하였

으며, 기타 실험 조건은 상기 실시예 2-4의 pH 최적화 실험과 동일하게 수행하였다.

표 7

[0092] 반응 버퍼 최적화 실험 조건

항목	조건
Initial pH	7.0
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Electron mediator	ethyl viologen 10 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30 ℃
Cell loading	1 g *E.coli* BL210.1 g *M.extorquens* AM1 JJ

[0093] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 비스-트리스 프로판 버퍼에서 가장 최적의 생산성이 관찰되었다. 다른 비교군들도 통상적으로 사용되는 버퍼들이나, 생산성에 있어서 뚜렷한 차이가 관찰되었다.

[0095] **2-6. 외부 전자전달체 농도에 따른 생산성 변화**

[0096] 실시예 2-3에서 선행된 실험의 결과로부터, 외부 전자전달체가 세포 내부로 확산되는 과정에서 물질전달 저해가 있을 가능성이 고려되었다. 따라서, 외부 전자전달체인 에틸 비올로겐을 사용해 포름산염 생산성을 증가시키기 위해서는 이에 의한 전세포의 투과성을 개선하여 물질전달 속도 제한을 조절할 필요가 있으므로, 에틸 비올로겐의 투과 속도가 충분히 느려지는 농도를 탐색하기 위한 실험을 설계하고, 이에 따른 세포 투과 속도 및 포름산염 생산성을 확인하였다.

표 8

[0097] 에틸 비올로겐 농도에 따른 전세포 포름산염 전환 실험 조건

항목	조건
Initial pH	7.0
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Reaction buffer	200 mM Bis-tris propane
Electron mediator	ethyl viologen 0.1 ~ 10 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30℃
Cell loading	0.05 g *E.coli* BL21 1 g *M.extorquens* AM1

[0098] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 에틸 비올로겐(EV^0)의 농도를 0.1 mM 까지 감소시켜가며 생산 속도의 감소를 확인하였다. 에틸 비올로겐의 농도가 감소하자 세포 내부로 투과되는 속도의 감소로 생산성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] **실시예 3: 부분 파쇄된 균주의 효소 보관체 활용 가능성 확인**

[0101] **3-1. 전세포 표면처리를 통한 전자전달체 사용 생산성 증대**

[0102] 에틸 비올로겐 농도 0.1 mM을 기준으로 설정하여, 4종의 계면활성제(detergent)인 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic Acid) 0.5 mM, CTAB(Hexadecyltrimethylammonium bromide) 0.01 mM, Triton X-100 0.01%, 톨루엔(Toluen) 0.01%를 균주에 표면 처리함에 따라 세포 표면을 부분적으로 파쇄시켜 도 7과 같은 세포 투과성을 유도하는 실험을 진행하였다.

[0103] 구체적으로, 세포 표면 처리 방법은 pH 7.0 PBS 버퍼(buffer)로 2회 세척하고, 각각의 계면활성제를 wet cell 1 g 당 30 mL씩 1시간 동안 반응시켰다. 이후 pH 7.0 PBS 버퍼로 다시 2회 세척하였다.

[0104] *E.coli* BL21 균주 및 *M.extorquens* AM1 JJ 균주의 세포 비율 조건은 0.05:1로 설정하였으며, 이 비율은 균주를 파쇄하여 효소를 분리한 결과 CODH 및 FDH 유닛(unit)이 2:1이 되는 비율에 해당한다. 에틸 비올로겐의 농도 외의 실험조건은 기존 실험과 동일하게 설정하였다.

표 9

[0105] 계면활성제 표면처리에 따른 포름산염 전환 실험 조건

항목	조건
Initial pH	7.0
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Reaction buffer	200 mM Bis-tris propane
Electron mediator	ethyl viologen 0.1 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30℃
Cell loading	0.05 g *E.coli* BL21 1 g *M.extorquens* AM1 JJ

[0106] 도 8에서 확인할 수 있듯이, EDTA, CTAB, Triton X-100 처리군에서 생산성이 증가하였고, 그 중에서도 Triton X-100 처리군에서 생산성이 131%, CTAB 처리군에서 121%로 가장 크게 개선되었다.이에 Triton X-100 및 CTAB를 전세포의 투과성 증대에 가장 효율적인 물질로 판단하고, Triton X-100의 농도를 최적화하는 실험을 진행하였다. Triton X-100의 농도를 0.001, 0.01, 0.1, 1, 3, 5%로, CTAB의 농도를 0.001, 0.01, 0.1 mM으로 설정하고, 이외의 기타 실험조건은 상기 표 7의 조건과 동일하게 수행하였다.

[0107] 이론적인 전환효율 향상 한계(Theoretical maximum conversion)는 전자전달체의 물질전달 저해가 배제된 Ni-NTA 고정화(immobilization) 시스템을 적용한 경우를 의미하는데, 이는 공정의 수행이 복잡하고 많은 비용이 발생하므로 생산성이 1170% 향상되었음에도 불구하고 실제 생산에 적용하기 어려운 이론적인 값에 해당한다.

[0108] 도 9에서 확인할 수 있듯이, Triton X-100 1% 처리군에서 740%의 생산성 향상을 나타냈으며, CTAB에 비해서도 표면처리에 효율적인 것으로 관찰되었다.

[0109] 따라서 Triton X-100 1%를 최적의 표면처리 조건으로 결정하였고, 또한 부분 파쇄된 각 균주가 CODH 또는 FDH 보관체로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0111] **3-2. 표면처리된 전세포의 비율 최적화**

[0112] 표면처리된 전세포를 활용한 포름산염 생산성 극대화를 위해, 표면처리된 세포의 비율에 대한 최적화를 진행하였다.

[0113] 구체적으로, *E.coli* BL21 균주 및 *M.extorquens* AM1 균주의 비율을 0.025:1 에서 16:1까지 변화시키면서 생산성의 변화를 관찰하였다.

표 10

[0114] 균주의 혼합 비율에 따른 포름산염 전환 실험 조건

항목	조건
Initial pH	7.0
Working volume	50 mL (125 mL serum vial)
Reaction buffer	200 mM Bis-tris propane
Electron mediator	ethyl viologen 0.1 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 2.5 bar
Temperature	30℃
Cell loading	0.00625 ~ 4 g E.coli BL21 0.25 g M.extorquens AM1 JJ
Permeabilization	Triton X-100 1%, 1hr treated

[0115] 도 10a 및 10b에서 확인할 수 있듯이, 8:1 및 16:1의 세포 비율에서 더이상 유의적으로 생산성이 증대하지 않는 결과를 얻었으므로 최적의 세포비율을 도출한 것으로 판단하였다. 이는 실시예 3-1에서 수행한 실험에서 두 균주의 비율을 0.05:1로 수행한 것에 비해 약 1440% 향상된 결과이다.

[0117] **3-3. 표면처리된 세포를 활용한 암모늄 포름산염 생산**

[0118] 표면처리된 세포를 활용해 200 mL 기포 컬럼 반응기(bubble column reactor)에서 암모늄 포름산염 생산 공정을 운영하였다.

표 11

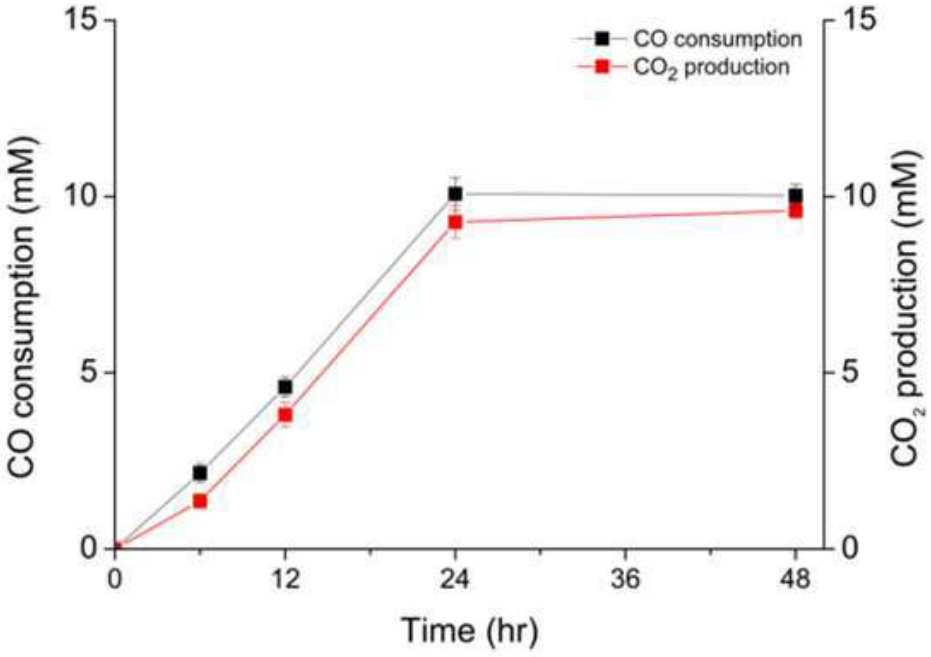
[0119] 표면처리된 세포를 활용한 암모늄 포름산염 생산 조건

항목	조건
Initial pH	7.0
Working volume	100 mL (200 mL bubble column reactor)
Reaction buffer	200 mM Bis-tris propane
Electron mediator	ethyl viologen 0.1 mM
Substrate	syngas ($CO:CO_2:N_2$=50:15:35), 3 vvm
Temperature	30℃
Cell loading	1.5 g *E.coli* BL21 0.15 g *M.extorquens* AM1 JJ
Permeabilization	Triton X-100 1%, 1hr treated

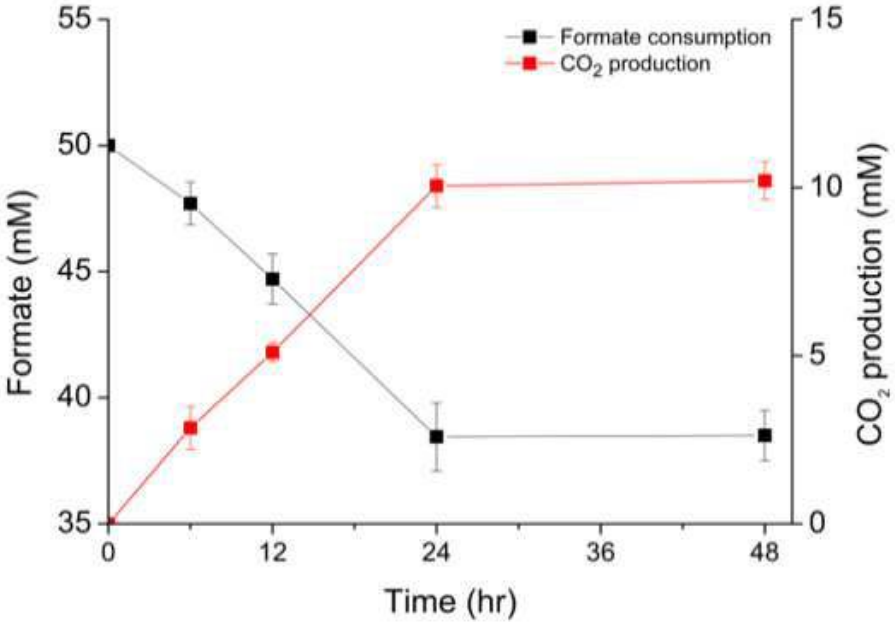
[0120] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 최대 생산 농도 106.0 mM, 최대 생산속도 7.5 mM/hr의 결과를 얻었다. 24시간 동안 암모늄 포름산염 생산이 이루어진 것으로 보아, 표면처리된 세포가 반응기 내부에서도 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면

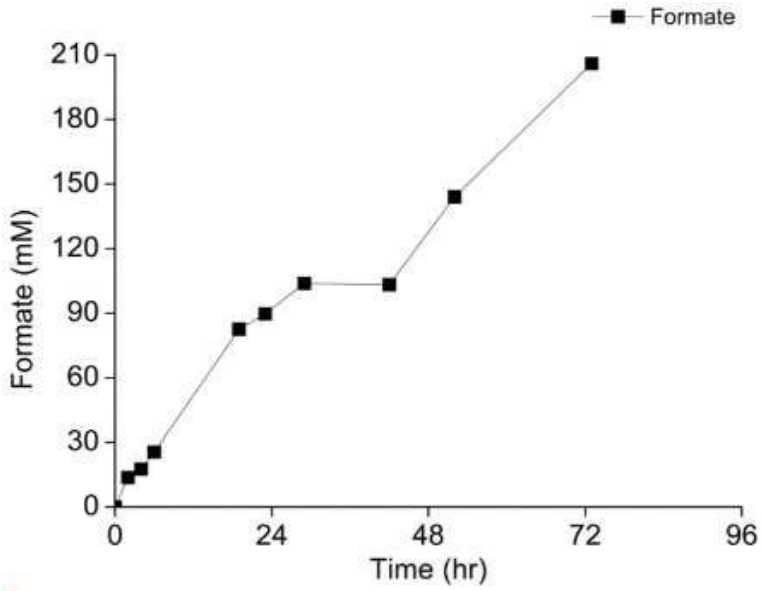
도면1


CO consumption
CO_2 production
CO consumption (mM)
CO_2 production (mM)
Time (hr)
0
5
10
15
0
12
24
36
48

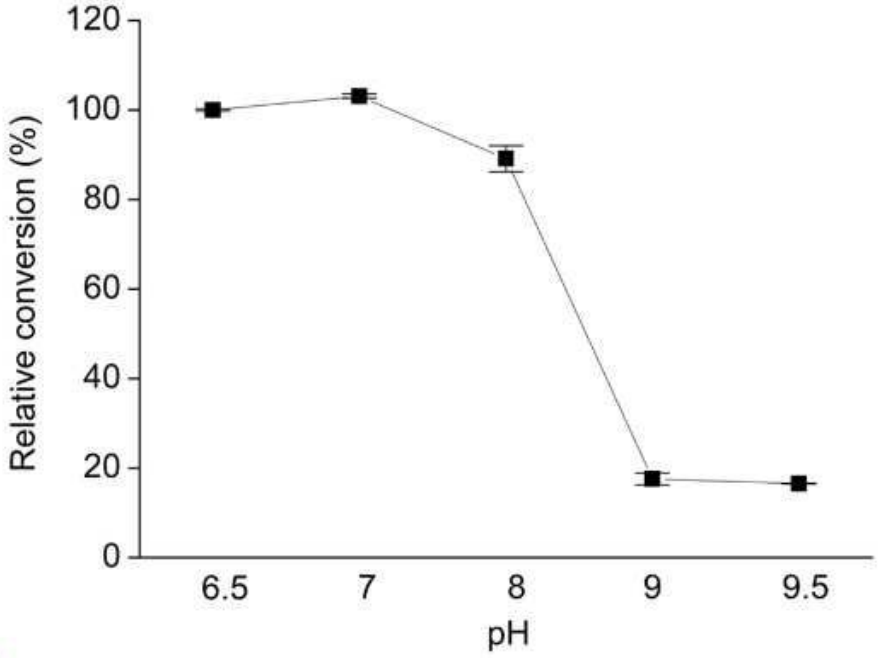
도면2


Formate consumption
CO_2 production
Formate (mM)
CO_2 production (mM)
Time (hr)
35
40
45
50
55
0
5
10
15
0
12
24
36
48

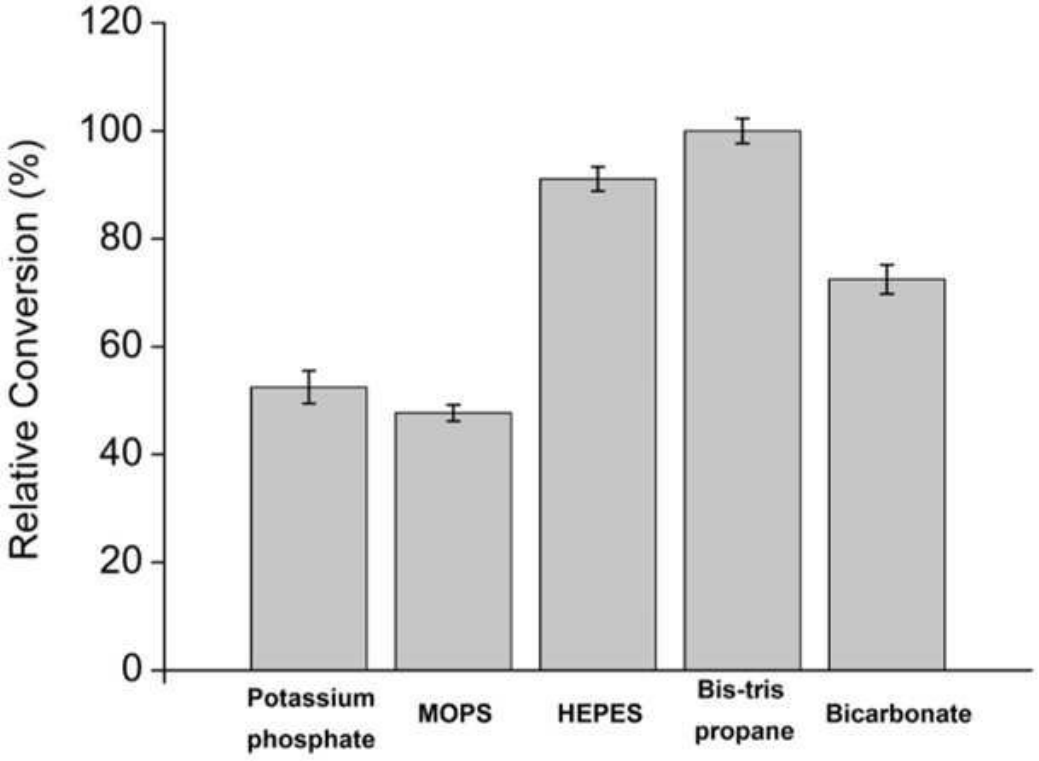
도면3


Formate
210
180
150
120
90
60
30
0
Formate (mM)
0
24
48
72
96
Time (hr)

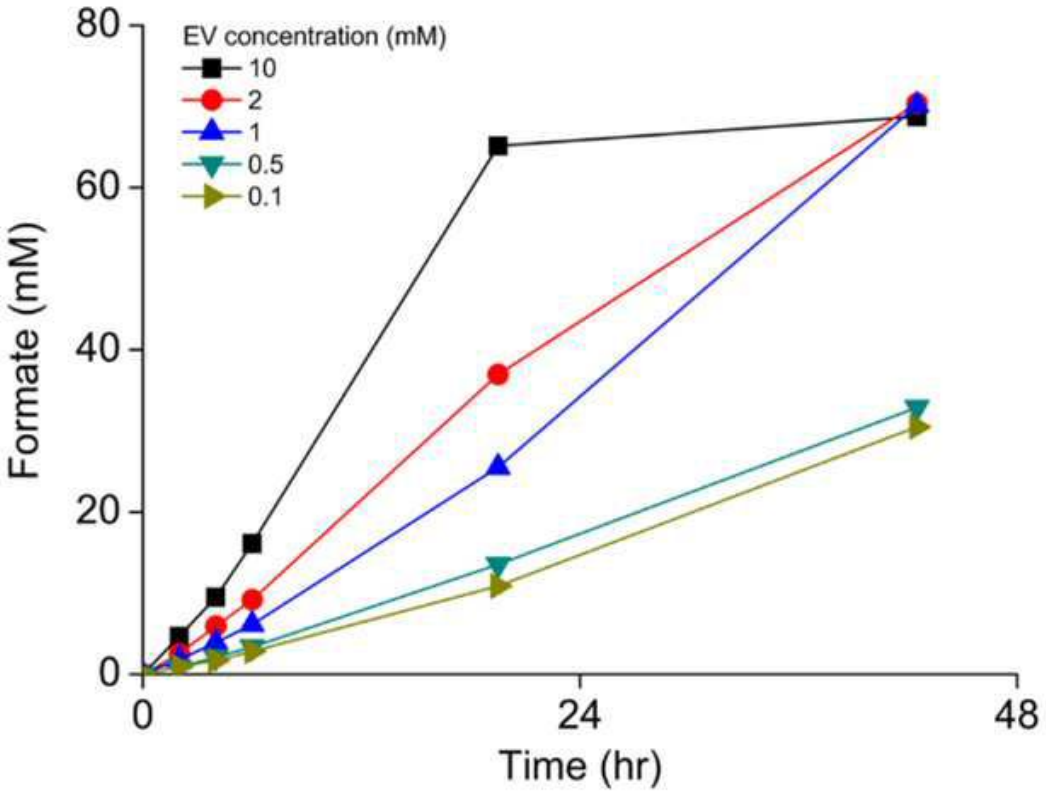
도면4


120
100
80
60
40
20
0
Relative conversion (%)
6.5
7
8
9
9.5
pH

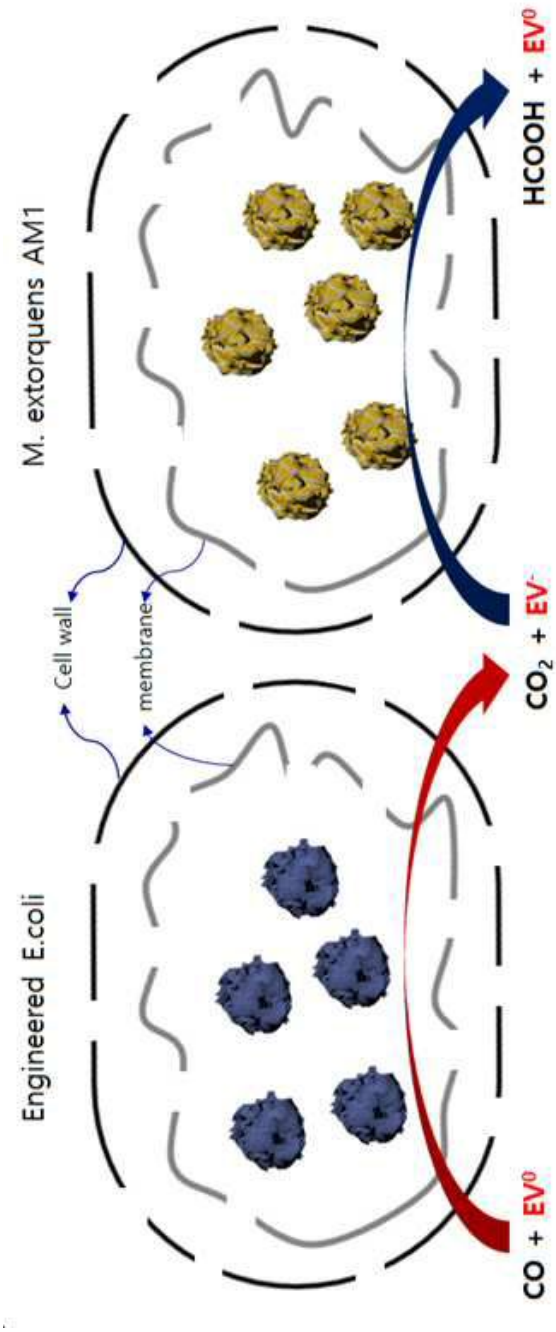
도면5


120
100
80
60
40
20
0
Relative Conversion (%)
Potassium phosphate
MOPS
HEPES
Bis-tris propane
Bicarbonate

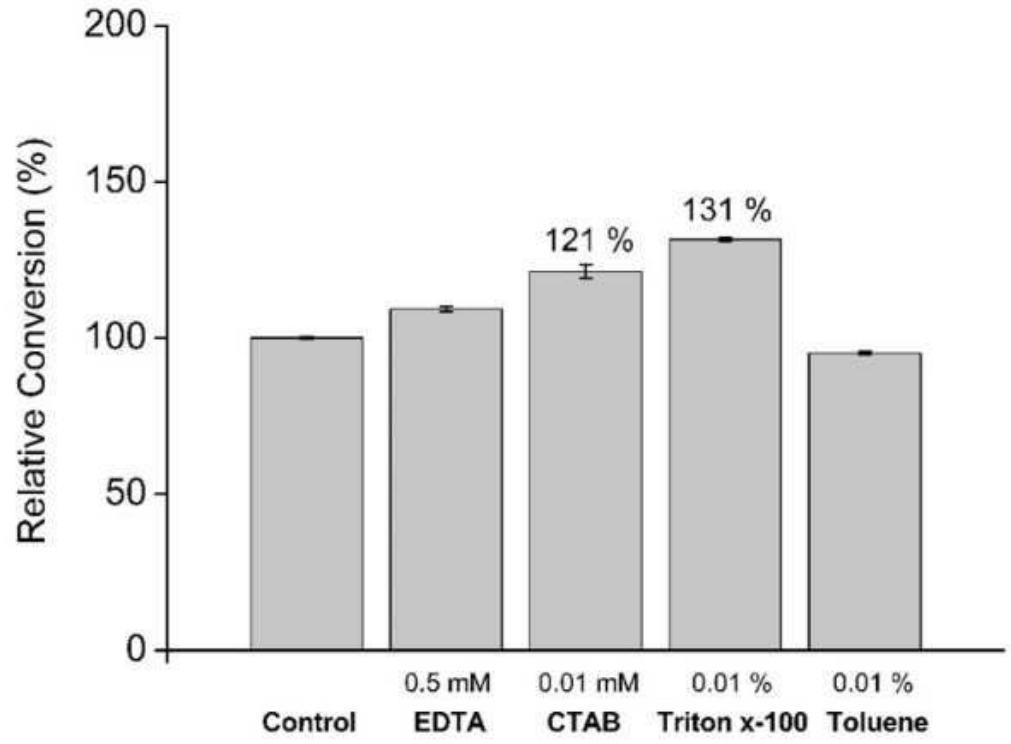
도면6


80
60
40
20
0
Formate (mM)
EV concentration (mM)
10
2
1
0.5
0.1
0
24
48
Time (hr)

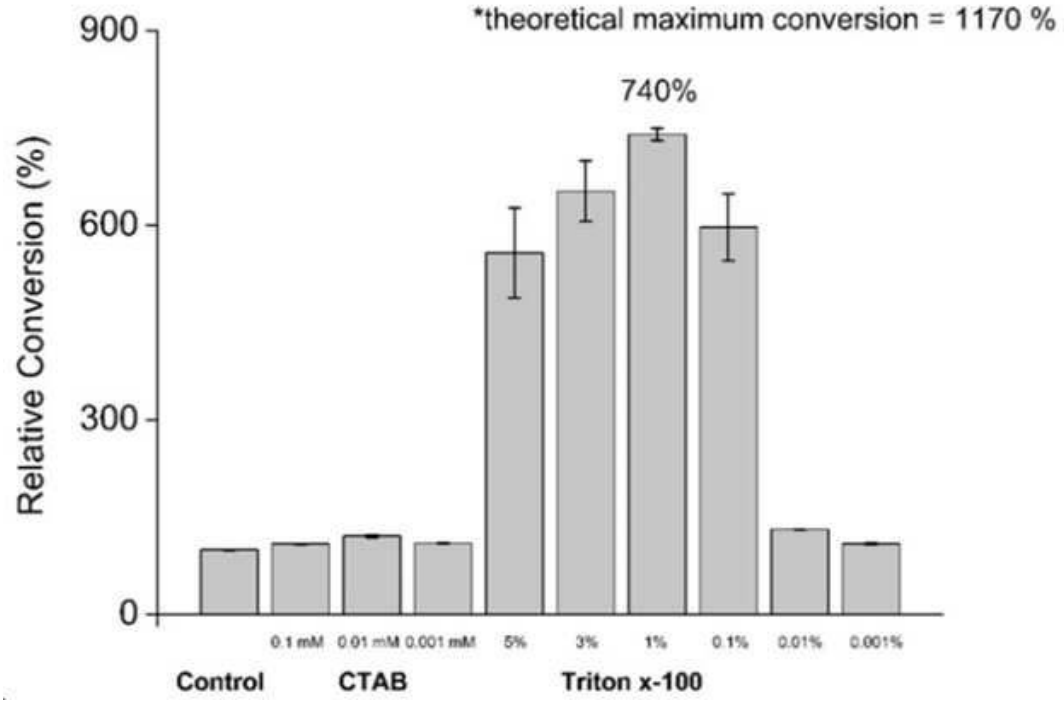
도면7


M. extorquens AM1
Cell wall
membrane
Engineered E.coli
HCOOH + EV⁰
CO₂ + EV⁻
CO + EV⁰

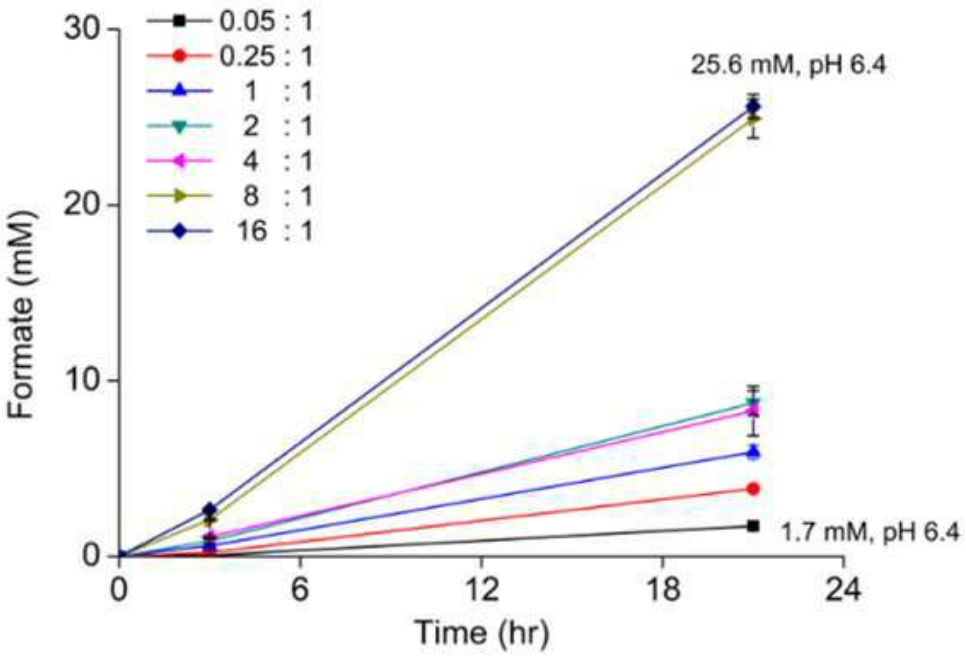
도면8


Relative Conversion (%)
200
150
100
50
0
121 %
131 %
Control
0.5 mM EDTA
0.01 mM CTAB
0.01 % Triton x-100
0.01 % Toluene

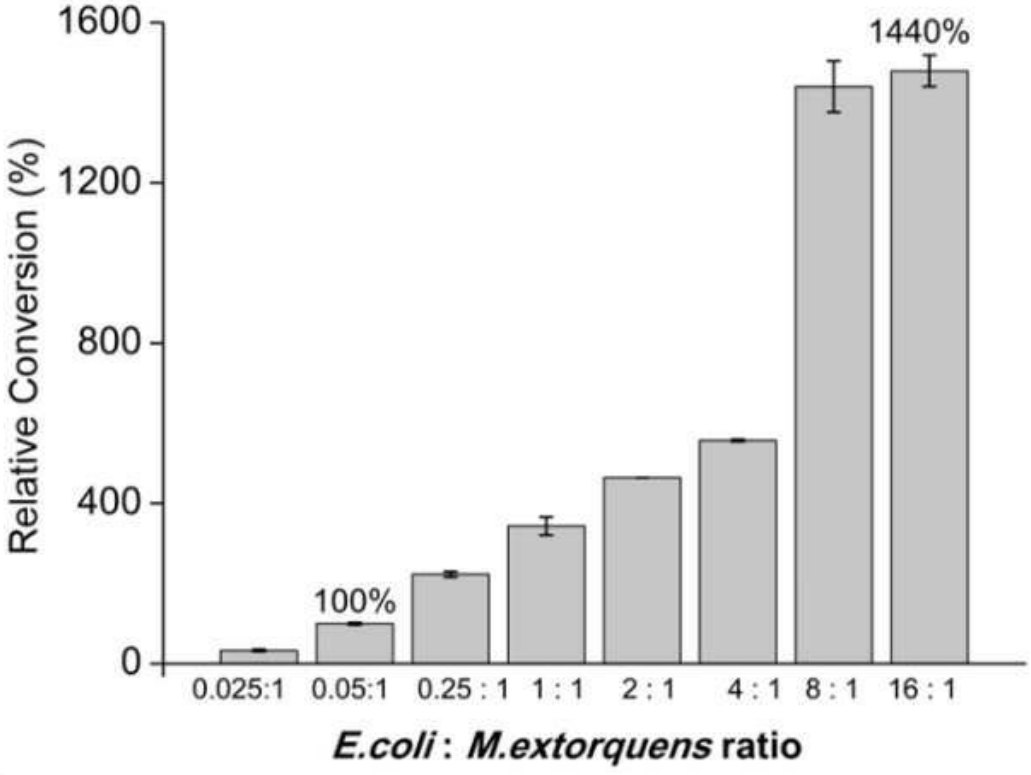
도면9


*theoretical maximum conversion = 1170 %
Relative Conversion (%)
900
600
300
0
740%
0.1 mM
0.01 mM
0.001 mM
5%
3%
1%
0.1%
0.01%
0.001%
Control
CTAB
Triton x-100

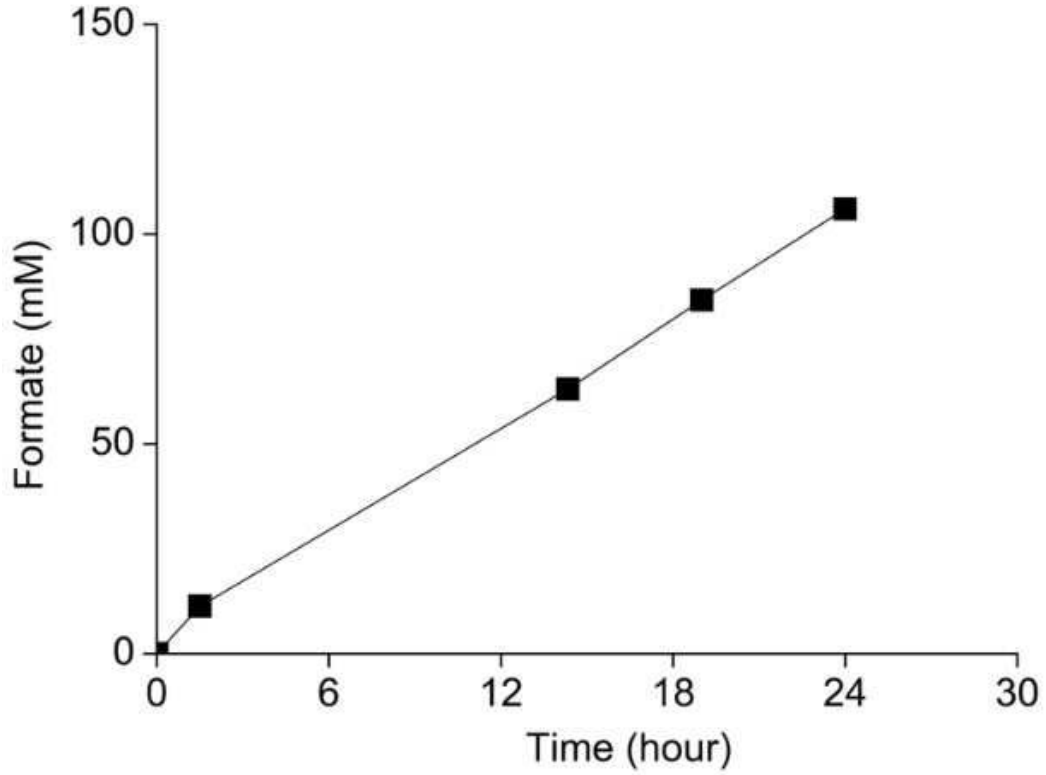
도면10a


0.05 : 1
0.25 : 1
1 : 1
2 : 1
4 : 1
8 : 1
16 : 1
25.6 mM, pH 6.4
1.7 mM, pH 6.4
Formate (mM)
Time (hr)
0
10
20
30
0
6
12
18
24

도면10b


1440%
100%
Relative Conversion (%)
0
400
800
1200
1600
0.025:1
0.05:1
0.25 : 1
1 : 1
2 : 1
4 : 1
8 : 1
16 : 1
E.coli : M.extorquens ratio

도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.