



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051847

(43) 공개일자 2025년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/24 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)*C12N 15/74* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 7/24 (2013.01)*C12N 15/70* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0134455

(22) 출원일자 2023년10월10일

심사청구일자 2025년01월07일

(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
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

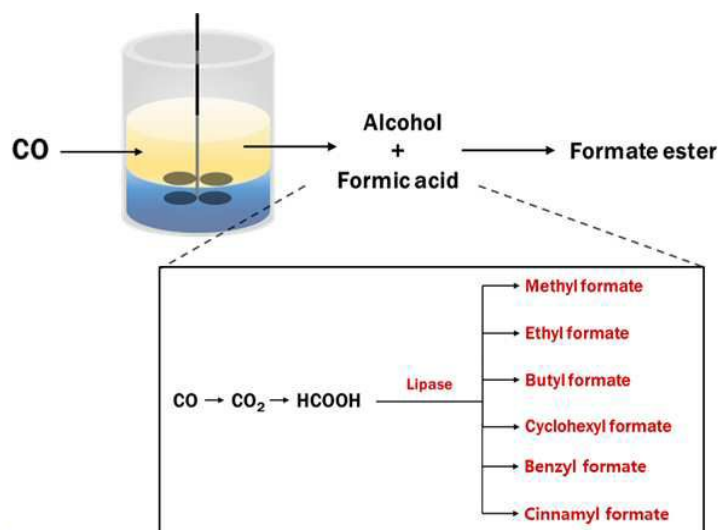
특허법인에스알비

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 일산화탄소로부터 포르밀 에스터를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 일산화탄소와 알코올을 사용하여 에스터를 생산하는 공정이므로, 이를 효과적으로 에스터 제조 공정의 비용 절감에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12Y 102/01002 (2013.01)

C12Y 102/07004 (2013.01)

C12Y 301/01003 (2013.01)

(72) 발명자

나정걸

서울특별시 서초구 고무래로 89, 107동 302호

김태환

서울특별시 은평구 가좌로6길 17, 1층

조숙형

경기도 고양시 덕양구 화신로 340, 707동 304호

이장섭

서울특별시 마포구 백범로 35, 곧자가국제학사 B동 1253호

이명준

서울특별시 마포구 승문16가길 26, 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1055001131
과제번호	2015M3D3A1A01064929
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발
연구과제명	C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180675
과제번호	20214000000500
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지인력양성(에텍)
연구과제명	녹색성장을 위한 CCUS 전문인력양성
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

일산화탄소 및 알코올(Alcohol)을 포함하는 기질;

톨루엔(toluene), 부틸 아세테이트(Butyl acetate), 1,2-디클로로에탄(1,2-dichloroethane), 헥산(hexane), 헵탄(heptane), 이소-옥탄(iso-octane), 사이클로헥산(cyclohexane), 디에틸 에테르(diethyl ether), 및 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를 포함하는 반응 완충액; 및

일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase; FDH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 라이페이즈(Lipase), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 효소액;

을 반응시킴으로써 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 일산화탄소는 일산화탄소, 이산화탄소 및 질소를 포함하는 합성 가스로서 공급되는 것인, 포르밀 에스터 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올(Methanol), 에탄올(Ethanol) 부탄올(Butanol), 사이클로헥산올(Cyclohexanol), 벤질알코올(Benzyl alcohol), 및 시나밀알코올(Cinnamyl alcohol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 포르밀 에스터 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반응 완충액은 물과 용매를 1:9 내지 9:1의 부피비로 혼합한 것인, 포르밀 에스터 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CODH를 생산하는 미생물은 ChCODH-2를 코딩하는 유전자 또는 ChCODH-4를 코딩하는 유전자가 도입된 것인, 포르밀 에스터 생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 FDH를 생산하는 미생물은 FDH1 α (formate dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고, FDH1(formate dehydrogenase 1)을 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 것인, 포르밀 에스터 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 일산화탄소 및 에탄올(Ethanol)을 포함하는 기질, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH), 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase; FDH) 및 라이페이즈(Lipase)를 포함하는 효소액을 반응시켜 포르밀 에스터를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 에스터의 경우 좋은 향 및 맛으로 인해 식품, 샴푸 등 각종 제품에 향 첨가제로서 사용됨. 기존의 포르밀 에스터(Formyl ester)를 포함한 다양한 에스터의 경우, 1) 화학적 합성(Chemical synthesis) 혹은 2) 자연물질로부터의 추출로 만들어지는데, 이 경우 공정 비용(process cost)이 높다는 단점이 있었다.
- [0003] 높은 공정 비용을 극복하기 위해, 라이페이즈(lipase)를 이용한 효소적 방법(Enzymatic method)들이 연구되고 있다. 그러나 기존 연구에서는 기질을 유기산 및 알코올을 직접 반응(Acid + Alcohol → ester)시켜 에스터를 생산하였다. 해당 반응의 경우 공정 비용은 기존 공정에 비해 저렴해지나, 기질로 사용되는 유기산 및 알코올의 가격에 대한 부담이 있다는 한계점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 이에 본 발명자들은 저렴한 C1 가스인 일산화탄소를 포름산으로 전환하는 공정을 에스터화 반응과 결합시켜 CO + 알코올 → 포르밀 에스터 공정을 개발하였다.
- [0005] 이에, 본 발명의 목적은 일산화탄소 및 알코올(Alcohol)을 포함하는 기질;
- [0006] 톨루엔(toluene), 부틸 아세테이트(Butyl acetate), 1,2-디클로로에탄(1,2-dichloroethane), 헥산(hexane), 헵탄(heptane), 이소-옥탄(iso-octane), 사이클로헥산(cyclohexane), 디에틸 에테르(diethyl ether), 및 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를 포함하는 반응 완충액; 및
- [0007] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase; FDH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 라이페이즈(Lipase), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 효소액;
- [0008] 을 반응시킴으로써 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 기존의 공정 대비 비용을 절감할 수 있는 이점을 나타낸다.
- [0010] 본 발명자들은 첫 번째 반응으로 두 가지 전세포 촉매(Whole-cell biocatalyst)인 형질전환된 대장균(*Escherichia coli*) BL21 균주와 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*) AM1 JJ(KCTC 13388BP) 균주를 활용하여 1) 일산화탄소로부터의 포름산 생산(CO → HCOOH) 공정을 수행하였고, 두 번째 반응을 연계시켜 상용 라이페이즈(Lipase)를 이용한 다단 반응(cascade reaction)을 통해 2) 포름산과 알코올의 에스터화반응(esterification)(HCOOH + R-OH → R-COOH)에 해당하는 반응을 수행함으로써, 두 반응을 결합시켜 일산화탄소와 알코올로부터의 에스터 생산 공정을 개발하였다:
- [0011] 1) $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH}$
- [0012] 2) $\text{HCOOH} + \text{Alcohol} \rightarrow \text{Formyl ester} + \text{H}_2\text{O}$
- [0013] ∴ $\text{CO} + \text{Alcohol} \rightarrow \text{Formyl ester}$.
- [0014] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0015] 본 발명의 일 양태는 일산화탄소 및 알코올(Alcohol)을 포함하는 기질;
- [0016] 톨루엔(toluene), 부틸 아세테이트(Butyl acetate), 1,2-디클로로에탄(1,2-dichloroethane), 헥산(hexane), 헵탄(heptane), 이소-옥탄(iso-octane), 사이클로헥산(cyclohexane), 디에틸 에테르(diethyl ether), 및 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를 포함하는 반응 완충액; 및
- [0017] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 포름산

탈수소효소(Formate dehydrogenase; FDH), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액, 라이페이스(Lipase), 이를 생산하는 미생물, 및 상기 미생물의 배양여액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 효소액;

- [0018] 을 반응시킴으로써 일산화탄소로부터 포르밀 에스터를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법이다.
- [0019] 본 명세서상의 용어 “배양여액”은 배양 수행의 결과물인 배양액으로부터 원심분리 또는 여과 공정을 수행하여 세포 또는 미생물을 제거하고 남은 것을 의미하고, 예를 들어, 배양된 세포로부터 분비된 효소 등의 물질이 함유된 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서 상기 일산화탄소는 일산화탄소(CO), 이산화탄소(CO₂) 및 질소(N₂)를 포함하는 합성 가스로서 공급되는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 합성 가스는 일산화탄소 30 내지 70%(v/v), 이산화탄소 8 내지 30%(v/v), 질소 18 내지 60%(v/v)를 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 일산화탄소 40 내지 60%(v/v), 이산화탄소 10 내지 30%(v/v), 질소 25 내지 50%(v/v)를 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 일산화탄소 45 내지 55%(v/v), 이산화탄소 12 내지 18%(v/v), 질소 30 내지 40%(v/v)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 합성 가스는 1 내지 5 bar의 조건으로 적용되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 4 bar, 1 내지 3 bar, 1 내지 2 bar, 2 내지 5 bar, 또는 2 내지 4 bar의 조건으로 적용되는 것일 수 있고, 예를 들어, 2 내지 3 bar의 조건으로 적용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서 상기 알코올은 메탄올(Methanol), 에탄올(Ethanol) 부탄올(Butanol), 사이클로헥산올(Cyclohexanol), 벤질알코올(Benzyl alcohol), 및 시나밀알코올(Cinnamyl alcohol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 에탄올인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 알코올은 전체 반응액에 대하여 10 내지 300 g/L의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 바람직하게는 10 내지 250 g/L, 10 내지 200 g/L, 10 내지 150 g/L, 10 내지 100 g/L, 10 내지 80 g/L, 10 내지 50 g/L, 10 내지 40 g/L, 10 내지 30 g/L, 15 내지 300 g/L, 15 내지 250 g/L, 15 내지 200 g/L, 15 내지 150 g/L, 15 내지 100 g/L, 15 내지 80 g/L, 15 내지 50 g/L, 15 내지 40 g/L, 15 내지 30 g/L, 20 내지 300 g/L, 20 내지 250 g/L, 20 내지 200 g/L, 20 내지 150 g/L, 20 내지 100 g/L, 20 내지 80 g/L, 20 내지 50 g/L, 20 내지 40 g/L, 20 내지 35 g/L, 20 내지 30 g/L, 25 내지 300 g/L, 25 내지 250 g/L, 25 내지 200 g/L, 25 내지 150 g/L, 25 내지 100 g/L, 25 내지 80 g/L, 25 내지 50 g/L, 25 내지 40 g/L, 25 내지 35 g/L, 25 내지 30 g/L, 30 내지 300 g/L, 30 내지 250 g/L, 30 내지 200 g/L, 30 내지 150 g/L, 30 내지 100 g/L, 30 내지 80 g/L, 30 내지 50 g/L, 또는 30 내지 40 g/L의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 예를 들어, 30 내지 35 g/L의 함량으로 투입되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에 있어서 상기 반응 완충액은 물과 용매를 1:9 내지 9:1의 부피비로 혼합한 것일 수 있고, 바람직하게는 1:9 내지 8:2, 1:9 내지 7:3, 1:9 내지 6:4, 1:9 내지 5:5, 1:9 내지 4:6, 1:9 내지 3:7, 1:9 내지 2:8, 2:8 내지 9:1, 2:8 내지 8:2, 2:8 내지 7:3, 2:8 내지 6:4, 2:8 내지 5:5, 또는 2:8 내지 4:6의 부피비로 혼합한 것일 수 있고, 예를 들어, 2:8 내지 3:7의 부피비로 혼합한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 반응 완충액은 전체 반응액에 대하여 70 내지 99%(v/v)의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 바람직하게는 75 내지 99%(v/v), 80 내지 99%(v/v), 85 내지 99%(v/v), 90 내지 99%(v/v), 95 내지 99%(v/v), 70 내지 98%(v/v), 75 내지 98%(v/v), 80 내지 98%(v/v), 85 내지 98%(v/v), 90 내지 98%(v/v), 95 내지 98%(v/v), 70 내지 97%(v/v), 75 내지 97%(v/v), 80 내지 97%(v/v), 85 내지 97%(v/v), 90 내지 97%(v/v)의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 예를 들어, 95 내지 97%(v/v)의 함량으로 투입되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에 있어서 상기 CODH를 생산하는 미생물은 ChCODH-2를 코딩하는 유전자 또는 ChCODH-4를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있다.
- [0028] 상기 CODH를 생산하는 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 것일 수 있고, 바람직하게는 대장균 BL21 균주인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 CODH를 생산하는 미생물은 전체 반응액에 대하여 0.1 내지 500 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고,

바람직하게는 0.1 내지 400 mg/mL, 0.1 내지 300 mg/mL, 0.1 내지 200 mg/mL, 0.1 내지 100 mg/mL, 0.1 내지 50 mg/mL, 1 내지 500 mg/mL, 1 내지 400 mg/mL, 1 내지 300 mg/mL, 1 내지 200 mg/mL, 1 내지 100 mg/mL, 1 내지 50 mg/mL, 10 내지 500 mg/mL, 10 내지 400 mg/mL, 10 내지 300 mg/mL, 10 내지 200 mg/mL, 10 내지 100 mg/mL, 10 내지 50 mg/mL, 20 내지 500 mg/mL, 20 내지 400 mg/mL, 20 내지 300 mg/mL, 20 내지 200 mg/mL, 또는 20 내지 100 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 예를 들어, 20 내지 50 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서 상기 FDH를 생산하는 미생물은 FDH1 α (formate dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자가 결실되고, FDH1(formate dehydrogenase 1)을 코딩하는 외인성 유전자가 도입된 것일 수 있다.

[0031] 상기 FDH를 생산하는 미생물은 메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*)인 것일 수 있고, 바람직하게는 수탁번호 KCTC 13388BP로 기탁된 메틸로모나스 엑스토르켄스 AM1 JJ 균주인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 FDH를 생산하는 미생물은 전체 반응액에 대하여 1 내지 400 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 300 mg/mL, 1 내지 250 mg/mL, 1 내지 200 mg/mL, 1 내지 180 mg/mL, 10 내지 400 mg/mL, 10 내지 300 mg/mL, 10 내지 250 mg/mL, 10 내지 200 mg/mL, 10 내지 180 mg/mL, 100 내지 400 mg/mL, 100 내지 300 mg/mL, 100 내지 250 mg/mL, 100 내지 200 mg/mL, 100 내지 180 mg/mL, 150 내지 400 mg/mL, 150 내지 300 mg/mL, 150 내지 250 mg/mL, 150 내지 200 mg/mL, 150 내지 180 mg/mL, 170 내지 400 mg/mL, 170 내지 300 mg/mL, 170 내지 250 mg/mL, 또는 170 내지 200 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 예를 들어, 170 내지 180 mg/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 CODH를 생산하는 미생물 및 FDH를 생산하는 미생물은 세포벽 또는 세포막이 물리적 또는 화학적인 처리에 의하여 부분적으로 파쇄된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 라이페이즈를 생산하는 미생물은 아스페질러스 나이저(*Aspergillus niger*)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 라이페이즈는 전체 반응액에 대하여 20 내지 80 U/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 바람직하게는 20 내지 70 U/mL, 20 내지 60 U/mL, 20 내지 50 U/mL, 30 내지 80 U/mL, 30 내지 70 U/mL, 30 내지 60 U/mL, 30 내지 50 U/mL, 40 내지 80 U/mL, 40 내지 70 U/mL, 40 내지 60 U/mL, 40 내지 50 U/mL, 50 내지 80 U/mL, 또는 50 내지 70 U/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있고, 예를 들어, 50 내지 60 U/mL의 함량으로 투입되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0036] 본 발명은 일산화탄소로부터 포르밀 에스터(Formyl ester)를 생산하는 생물전환 단계를 포함하는 포르밀 에스터 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 일산화탄소와 알코올을 사용하여 에스터를 생산하는 공정이므로, 이를 효과적으로 에스터 제조 공정의 비용 절감에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 일산화탄소로부터 포르산 에스터를 생산하는 공정을 보여주는 모식도이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 메탄올(Methanol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포르산염(formate) 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 에탄올(Ethanol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포르산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 부탄올(Butanol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포르산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따라 사이클로헥산올(Cyclohexanol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포르산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2e는 본 발명의 일 실시예에 따라 벤질알코올(Benzyl alcohol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포르산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2f는 본 발명의 일 실시예에 따라 시나밀알코올(Cinnamyl alcohol)에 대한 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포름산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 2g는 본 발명의 일 실시예에 따라 용매별 조건에 따라 전세포 생축매의 알코올 내성을 확인하기 위하여 시간별 포름산염 생산 속도를 나타낸 그래프이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 기질 알코올로 메탄올을 선택하였을 경우 사용 용매별로 포름산(formic acid)으로부터 에스터(ester)로의 전환율을 나타낸 그래프이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 기질 알코올로 에탄올을 선택하였을 경우 사용 용매별로 포름산으로부터 에스터로의 사용 용매별 전환율을 나타낸 그래프이다.

도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따라 기질 알코올로 부탄올을 선택하였을 경우 사용 용매별로 포름산으로부터 에스터로의 사용 용매별 전환율을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 톨루엔(Toluene) 수용액을 용매로, 에탄올을 기질로 선택하였을 경우 시간별 포름산 및 포름산에틸의 생산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 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.

[0039] 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.

[0041] 제조예 1: 일산화탄소로부터 이산화탄소를 생산하는 시스템의 제조

[0042] 산소 내성 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase; CODH)의 유전자 변이 주형(template)으로 이용하기 위해 카르복시도써머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus 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.

[0043] 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

[0044]

서열 번호	명칭	서열
1	야생종 ChCODH- II	atggcgaaacaaaatctgaagagcaccgacctgctgggttcaacaaatgctggataaagcgaagcgtgaggggtattcaaacctggtgggatcgttacgaggcgatgaagccgcagtgccgttccggcgaacccggtctgtgctgccgtcactgcctgcaagggtccgtgccgtatttaaccctgttgccgatgagccgaaagtgggcatttgcggtgacgacccggaagtgatcgttgcgctggtctggaccgtagcatttgcggcggtgagccgggtcatagcgggtcatgcaagcacctggcgacacccctgaagaaagcgggtgcagggcaaacggcgagctatatgattaaaggacctaccaaactgcacagcatcgcggaagcgtctgggtattccgaccgaaggccaaaaagacgaggatattgctgctggaagtgcgaaagcggcgctggcggttccatgagaaagatacccggttctgtgggtgaccaccgttctgccgcgagccgtgtgaaggtctgagcgcgcatggtctgatcccgcggttattgatcacgaaatcgcgagatattgcaccgtaccagcagcgttgcgacgcggtgcgcagaacctgctgctgggtggcctgctgtgcagcctggcggttgcctacatgggcacgacctggcggtatcctgtttgggtaccggcgcggtgggttacgaaagcaacctggcggtgctgaagcggtgagcggtgagcgttgcggtgacaggtcacaccgggttctgagcgacatcattgttagcgtgagcaagagatggaaacgagggcggtgagcggtgtgacgggtatcaacgtggttgggtatttgcgtgacccggcaacgaggtgctgatgctgacgggtattccggctgacccacagcgttagccaggaaatggcgatgatcaccggcgcggtgagcgcatgatcctggattatcagtgcatcaaccgagcgtggcgacctattgctggagtgcaccggtaccaccgttattaccaccatggaatgagcaaaatcaccgggtgcgacctatgtaactttcgggaggaaagcggttgagaacgcgaagcaaatcctgctgctggcgattgatacctttaaacgtcgtgaaggtaaacgggtggagatcccgaacattagaccaaagtgggtgcgggttgcgacccgaagcgtatcaacgcgtgagcaagctgaacgcgaacgatccgctgaacccgtgatgacaacgtgggttaacggtaacatccgtggcggtgctgctgttgcgggttgcaacaacgttaaggtgcccgaagaccaaactttaccaccattgctgctgaagctgctgaacagaaccttctgggtggttgcgacgggttgcggtgaggggtgctgctgatgctgacgggtttatggacccggcgacgtggatgagctgtgagcgacgggttgaaagcggttctgaccgcgatcggtgaagcgaaagcttgggtggcccgctgcccgggtgctgcacatgggtagctgctgtgacaacagccgtgaggtggcggtggttgcggcgctggcgaaaccttggcgagctggcggttgacatgggtgctgcccggatcgctgcccgggtgctgagcgcgccgggaagcgatgcatgagaagcggtggcgattggtacctggcggttaccatcggtctgcccagccacattggtgtgctgcccggatcaccggcagcctgcccgtgacccaaatctgaccagcagcgttaaagattaccgggtgctacttcatcgttgaactggaccggagaccggcggaacaaatgctggcggtcgatcaatgagcgtcgtgaggtctgcccgtgctgaggtgaggtgag
2	야생종 ChCODH- IV	atggataaaagcaagttatcagtagatcctgtgatcccgaatttatatcgtaagccagagaggaagggtattccactgttttgatcgttatgaagcacagcagcctcagtgccggtattgggcttacaggcctttgctgtcgtcattgctgaggggaccgtgccgcatagatccgtttggggaaggaccgcaagcgggcatattgcggtgctaccgcccaggttaataacggctcgcaatctgctgctcaagtcacggcggtgctgcccgggttagaccatgctgatgatgtgctggaagttttggaacaaatcgcccaaggtacggaatcatacagtatcaaatgaagaaaagttaaagcaggtcgcttttaccttaggtatagataccgctaacaaaaacagagcaggagattgttgaagagatgtgcaaatatctatcggtattttgcaaatctctggtgcaacacccgatgacctatctgaaagccaactctcctcgggaaagccttgagacatgggaaaaattaggggttctgctcgtgaacccagaccgtgaaatcagagaagccttacaccagactacaatgggagatggatggatgggaccagcagtaaatttaactttaaaaactattcgcttgggtggttgggttgggttgggttgggttgggttagcgaggtttacaggacatcatttttggcactccccagccagttgtcacagaagcaaatctgggtgactcaaaagagattatgtgaatcatagttccagggccatgttccgttacttagcgaaaaaatgttgaatggagcagaaagttggaagatgagggcaaaaaagcaggggcaaaaggaatcaatctgcaggtatattgtgactggtaacgaggtgttaatgctgaggggtgacgttagcaacaaacttccctggcccagagattggcgattattacggggcgagttgacttaatggtagtggtggtcagtgatattatgccctcattagcagaaattgctgcttgctatcatacccgcttagtcaatccatgccgattgtgaaatccaggtgagcgagcatgttccgttaccacagaaactgccgatgaggcctgcagcagattgtgctgattggctatagagagttacaaaaacgcaatccagccaaggtctacatcccagggaaaaagccaaagtgtgacaggttacgcgttaggcaatagtaaaagcgttagcgaaactaaatcctgacgatccgttaagcccttaattgataaatattgtgtctggcaacattctgggtggtggtgcccaccgttgggtgtgaacatgtgaaggtcaagcatgattggttccacatagaattagtaaaagaactaataaaaacaattgttagtggtgactacaggtgttccgctcatgctgtagcgaagcaggttgatggaccccgagcagccgaatgggctggcgaggggttacgagccgtcttaacggcaataggcacggctaatgatggggcgcccgtgcccgtgtttgacatgggatcggtgtgtgataactccgaatcggggacttagtgatgccgtcgcaaaactaccttaaagttaagtaaaagaccttccgatgagcggttctgcacctgaataccagcatgaaaaggctttgagcatcggaaacctggcggttagcgatgggtattatgaccacttgggagttgttccacctggttcggaagttaaaagttaaccgtattcttaccgaatgcccagggctttaaagggcgcaatttatgtggaacggagcccatataagcagcagcgggcatcattgaacataaaaggttaaacgggctctactgaattataa

[0045]

상기 재조합 미생물의 배양은 50 $\mu\text{g/mL}$ 카나마이신, 10 $\mu\text{g/mL}$ 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 $^{\circ}\text{C}$, 225 rpm의 조건으로 수행하였다.

[0047]

제조예 2: 이산화탄소로부터 포름산을 생산하는 시스템의 제조

[0048]

메틸로모나스 엑스토르켄스(*Methylobomonas extorquens*; *M. extorquens*) AM1 JJ(KCTC 13388BP)에서 FDH1 α (formate dehydrogenase 1 alpha subunit)를 코딩하는 내인성 유전자인 fdh1 α 를 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 FDH1 α 를 코딩하는 내인성 유전자의 결실 및, FDH1을 코딩하는 외인성 유전자의 도입이 반드시 요구된다.

[0049]

메틸로박테리움 엑스토르켄스 AM1 JJ의 FDH1 단백질은 FDH1 α 및 FDH1 β 로 이루어진다. 상기 FDH1 α 는 서열번호 6의 아미노산 서열(GenBank accession No. ACS42636.1)을 포함하고, 상기 FDH1 β 는 서열번호 7의 아미노산 서열(GenBank accession No. ACS42635.1)을 포함한다. 따라서 상기 FDH1 α 를 코딩하는 유전자인 *fdh1 α* 는 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 FDH1 β 를 코딩하는 유전자인 *fdh1 β* 는 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 *fdh1*은 상기 서열번호 8 및 9의 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 것일 수 있다.

표 2

[0050]

서열 번호	명칭	서열
6	<i>M. extorquens</i> AM1 JJ FDH1 α amino acids	MSNGPEPHGNKIEQPEIRADERQDAGGPANGAPSTSGGAYSQGAQSGGQAAPDPGSGYGIKDAPVAPATIAFEFDGQQ VEAQPGETIWAVAKRLGTHIPHLCHKPDGYPDGNCRACMVEIEGERVLAASCKRTPAIGMKVKSATERATKARAMV LELLVADQPERATSHDPSSHFVQADVLVTESRFPAERWTSQVSHPMASVNLDAQIQCNLCVRACREVQVNDVIGM AYRAAGSKVVFDDFDDPMGGSTCVACGECVQACPTGALMPAAYLDANQTRTVYPDREVKSLCPYCGVGQCVSYKVKDER IVYAEVNGPANQNRLCVKGRFGFDYVHHPHRLTVPLIRLENVPKDANDQVDPANPWFHREATWEEALDRAAGGLKA IRDTNGRKALAGFGSAKGSNEEAYLFQKLVRGFGTNNVDHCTRLCHASSVAALMEGLNSGAVTAPFSAALDAEVIVV IGANPTVNHVPAATFLKNAVKQKGAKLIIMDPRRQTLRSHAYRHAFRPGSDVAMLNAMLVIVTEGLYDEQYIAGYT ENFEALREKIVDFTPEKMASVCGIDAETLREVARLYARAKSSLIFWGMGVSQHVHGTDSRCLIALALITGQIGRPGT GLHPLRGQNNVQGASDAGLIPMVYPDYQSVEKDAVRELFEEFWGQSLDPQKGLTVVEIMRAIHAGEIRGMFVEGENPA MSDPLNHAHALAMLDDLVLVQDLFLTEAFHADVLPASAFAEKAGTFTNTDRRVQIAQPVVAPPGDARQDWWIIQE LARRLDLWNYYGGPADIFAEMAQVMPSLNNITWERLEREGAVTYPVDAPDQPGNEIFYAGFPTESGRAKIVPAIIVP PDEVDPDEFPMVLSTGRVLEHWHWTGSMTRRAGVLDALPEAVAFMAPKELYRLGLRPGGSMRLETRRGAVVLKVRSDR DVPIGMIFMPFCYAEAAANLLTNPALDPLGKIPEFKFCAARVVPAAAPMAAE
7	<i>M. extorquens</i> AM1 JJ FDH1 β amino acids	MSEASGTVRSFAHPGRGRNVARAVPKGRQVDPHAKVEIEELLGTRPRQRDLLIEHLHLIQDTYGQISADHLAALADEM SLAFAEVFETATFYAHFDVVKEGEADIPRLTIRVCDSTICAMFGADELLETQLRELASDAVRVVRAPCVGLCDHAPAV EVGHNFHLRADLASVRAAVEAETHAHIPTVYDYDAYRAGGGYATLERLRSGELPVDDVLKVLDDGGLRGLGGAGFPT GRKWRSVRGEPPRLMAVNGDEGEPGTFKDQLYLNTDPHRFLEGLIGAHVVEAADVYIYLRDEYPIISREILAREIAK LPEGGTRIHLRRGAGAYICGEESLIESLEGKRGLPRHKPPFPQVGLFNRPTLINNIETLFWVRDLIERGAEWKSH GRNGRVGLRSYSVSGRVKEPGVKLAPAGLTIQELIDEYCGGISDGHSAAYLPGGASGGILPASMNDIPLDFGTLEKY GCFIGSAAVVILSDQDDVRGAALNLMKFFEDESCGQCTPCRSGTQKARMLMENGVWDTDLLGELAQCMRDASICGLGQ AASNVPSTVIKYFPDLFPEPRVAAE

8	<i>M. extorquens</i> AM1 JJ FDH1 α polynucleotides	ATGAGCAACGGCCCCGAACCGCACGGCAACAAGATCGAACAGCCCGAGATCCGCGCCGACGAACGTCAGGATGCCGGG GGGCGGCAAAATGGCGCACCATCGACCTCCGGCGGCGCCTACTCGCAGGGCGCCAAGTCGGGTGGCCAGGCCGCGCCG GATCCGTCCGGCTCCTACGGCATCAAGGACGCCCGGTTCGCGCCCGCGACCATCGCCTTCGAGTTTCGACGCGCAACAG GTCGAGGCCCCAGCCCGGCGAGACGATCTGGGGCGTCCGAAGCGCCTTGGCACGCATATCCCGCATCTCTGCCACAAG CCCGATCCCGGCTACCGCCCGACGGCAATTGCCGCGCCTGCATGGTCGAGATCGAGGGCGAGCGCGTGCCTCGCCGCC TCGTGCAAGCGCACGCCCGCATCGGCATGAAGGTGAAGTCGGCCACCGAGCGCGCCCAAGGCCCGCCATGGTG CTCGAAGTGTCTCGTGGCCGATCAGCCCGAGCGCGACCTCGCATGACCCGTCTCGCATTTCTGGGTGCAGGCCGAC GTCCTCGATGTGACCGAGAGCGCTTCCCGCGGCGGAGCGCTGGACCAGCGACGTCAGCCACCCGCGATGAGCGTC AATCTCGACGCTGCATCCAGTGAATCTCTGTGTCGCGCCTGCCGCGAGGTTCAAGTCAACGACGTGATCGGCATG GCTACCGCGCGCGGGCTCCAAGTCTGTTGACTTCGACGATCCGATGGGTGGCTCCACCTGCGTGGCTGCGGC GAGTGCCTCAAGCTGCCCCAGCCGGGCGCTGATGCCGCGCGCTATCTCGACGCAAAACAGACCCGGACGGTCTAT CCCGACCGGAGGTGAAGTCGCTCTGCCCTATTGCCGCGTCGGCTGCCAAGTCTCTACAAGTCAAGGACGAGCGC ATCGTCTACGCGAGGGCGTGAACGGACCGCAACAGAACCGGCTCTGCTGAAGGGCGCTTCGACTTCGACTAC GTCCACACCCCCACCGCTGACGGTGCCTGATCCGCTTGGAGAACGTGCCAACGCAACGATCAGGTCGAT CCGGCGAACCCCTGGACGCTTTCGCGAGGCGACCTGGGAAGAGGCGCTCGACCGCGCGCGGGCGGCTGAAGGCG ATCCGTGACACCAACGGCGCAAGGCGTGGCGGGTTCGGCTCGGCCAAGGGTTCGAACGAGGAGGCTACCTCTTC CAGAAGCTCGTCCGCTCGGCTTCGGCACCAACAACGTCGATCCTGACGCGCTGTGCCACGCGCTCGTGGTGGCG GGCTGATGGAGGGCTGAATTCGCGCGCGTCAACGCTCCCTTCTCGGCGAGCTCGACGCGAGGTCATCGTCTGTC ATCGGCGCAACCCGACCGTGAACATCCGTCGCGCGACCTTCTCAAGAACCGGTCGAGCAGCGCGGCCCAAG CTGATCATCATGGACCGCGGCGCCAGACGCTCTCGCGCACGCTATCGGCACCTCGCCTTCGCGCCCGCTCGGAC GTGGCGATGCTCAACGCGATGCTCAACGTGATCGTCAACGAGGGGCTCTACGACGAGCAGTACATCGCCGCTACAC GAGAAGTTCGAGGCTCTGCGCGAGAAGATCGTCGACTTACGCGGAGAAGATGGCTCGGTCTGCGGCATCGACGCC GAGACCTGCGCGAGGTGCGCCGCTCTACGCGCGGCCAAGTCTGTCGCTATCTTCTGGGGCATGGGCGTCAGCCAG CAGGTGACGCGACCGACAACCTCGCGCTGCCTGATCGCGCTCGCCCTATCACCGGCCAGATCGGCCGCGCCGCGACC GGCTGCACCCGTTGCGCGGCCAGAACAACGTCAGGGCGCGTCCGATGCCGCGCTGATCCCGATGGTCTACCCGGAC TATCAGTCGGTCGAGAAGGACGCGGTGCGTGAGCTGTTTCGAGGAGTTCTGGGGGCGAGTCCCTCGATCCTCAGAAGGGC CTACCGTGGTCGAGATCATGCGCGCGATCCACGCGGGCGAGATCCGGGGCATGTTCTGTCAGGGCGAGAACCAGCG ATGTCGACCCCGACCTCAACCATGCCCCGCGACGCGCTGGCGATGCTCGACCATCTGCTGGTGCAGGAGCTGTTCTG ACGGAGACGGCTTCCACGCGCGAGTGGTGCTGCCGCGCTCGGCTTTCGCGAGAAAGCCGGGACCTTACCAACACC GACCGCGCGTGCAGATCGCCAGCCGCTCGTCCGCTCCGGGCGATGCGCGCAGGATTGGTGGATCATCCAGGAA CTGGCCGACGCTCGACCTCGACTGGAACACGCGCGCCGCGGCGACATCTTCGCGAGATGGCGAGGTGATGCGG TCCTTGAACAACATCACCTGGGAGCGGCTGGAGCGCGAGGGGCGGTGACCTATCCGGTCGATGCCCGGACAGCCC GGCAACGAGATCATCTTATGCGCGCTTCCGACCGAGAGCGGTGCGGCCAAGATCGTGCCCGCGCGCATCGTGCCG CCGACGAGGTGCGCGACGAGTTCGCGATGGTGCTCTCGACCGCGCGGTGCTCGAACATGGCACACGGGCTCG ATGACCGCGCGCGGGCGGTGCTCGACGCGCTGGAGCGGAGGCGGTGGCTTCTGGAAGGATGATCGCGCCACGCTACCGG CTCGGTCTCCGCGCGCGGGTGCATGCGGTGGAAACACGCGCGCGCGCGTCTGTTGAAGGTGCGCTCCGACCGG GACGTGCCGATCGGCATGATCTTCATGCCCTTCTGCTACGCGGAAGCCGCGCCAACTTCTGACCAACCCCGCCCTC GACCCCTCGAAAGATTCCCGAGTTCAAATTCTGCGCAGCCCGCTCGTCCCCGCGAGGCTGCGCGCATGGCCGCC GAGTAA
9	<i>M. extorquens</i> AM1 JJ FDH1 β polynucleotides	ATGAGTGAGGCAAGTGGGACTGTCCGAGCTTCGCGCATCCGGGCGGTGGCCGTAACGTCGCGCCGCGCGTGGCGAAG GGGCGTCAGGTCGATCCCCACGCCAAGTTCGAGATCGAGGAGCTGCTCGGCACCCGCCCCGCGCCAGCGCGACCTGCTG ATCGAGCACCTGCACCTGATCAAGACACCTACGGCCAGATCAGCGCCGATCATCTCGCGCGCTGGCCGACGAGATG AGCCTCGCCTTCGCGGAGGTGTTTCGAGACCGCGACCTTCTACGCGCATTTTCGATGGTGAAGGAGGGCGAGGCCGAC ATCCCGCGCTGACGATCCGGGTTTGGCAGACGATCACCTGCGCATGTTTCGCGCGCGACGAGCTGTGGAGACGCTG CAGCGCGAGCTGGCTCGGATGCGGTCCGCGTCTGCGCGCGCCCTGTGTCGGCTGTGCGACACGCCCGCGCGGTG GAGGTGCGGCACAACCTTCCTGCACCGGGCGACCTCGCCTCCGTGCGCGCGCGCGGTTCGAGGCGAGGACACCCACGCC CACATCCCCACTTACGTCGATTACGACGCTACCGGCGCGCGCGGCTACGCGACCTTGAAGCGGTGCGCAGCGGC GAACTGCCGTCGATGACGTGCTGAAGGTGCTCGACGACGCGCGCTGCGCGCGCTCGCGCGCGCGGCTTTCCACC GGCGCAAGTGGCGTCCGTGCGCGCGAGCCCGGACCCCGGCTGATGGCGTCAACGCGCAGCAGGCGGAGCCCGGC ACCTTCAAGGATCAGCTCTACCTCAACACCGATCCCGACCGCTTCTGGAAGGATGATTCGCGCCACGCTCGCTC GAGGCGCGCGAGCTACATCTACCTGCGCGACGAGTACCGATCTCCCGCGAGATCTGGCCCGCGAGATCGCGAAG CTCCCCGAGGGCGGACCCGATCCACCTGCGCGTGGGGCGCGCGCTATATCTGCGCGAGGAATCTCGCTGATC GAGTCGCTGGAGGGCAAGCGCGGCTGCGCGCGCACAAAGCCGCCCTTCCCTTCCAGGTGCGGCTGTTCACCGGCG ACGCTGATCAACAACATCGAGACGCTGTTCTGGGTGCGCGACCTGATCGAGCGCGCGCGCAATGGTGAAGAGCCAC GGGCGCAACGGCCGCGTCCGCTGCGCTCGTACTCGGTTTCGGGCGGGTCAAGGAGCCGGCGTCAAGCTCGCGCCC GCCGCGTACCATCCAGGAATCATCGACGATTTGCGGCGGCATCTCTGACGGCCACAGCTTCGCGGCTACCTG CCGGGCGGAGCTCGGGCGGCATCTGCGCGGCTCGATGAACGACATCCGCTCGATTTCGGCAGCGTGGAAAAATAC GGCTGCTTATCGGCTCGGGCGGCTGCTGATCCTGTCGATCAGGACGATGTGCGCGGTGCGCGGTGAACCTGATG AAGTTCTTCGAGGACGAGTCTGCGGGCAGTGACGCCCTGCGCTCGGGCACGAGAAGGCCCGCATGCTGATGGAG AACGGCGTGTGGGACACGATCTCTCGGCGAGCTGGCGCAATGATGCGCGACGCTCGATCTGCGGTCTCGGTGAG GCGGCTCGAACCCGTCAGCACGCTGATCAAGTACTTCCCTGATCTTCCCGGAGCGCGGGCGGTGGCGGCCGAG TGA

[0051]

상기 기재된 바에 따라 재조합된 미생물로서 수탁번호 KCTC 13388BP로 기탁된 *M. extorquens* AM1 JJ 균주를 사 용하였다. 기본적인 배양 배지는 탄소공급원으로 16 g/L 숙신산 및 최소염 배지(minimal salt medium)(1.62 g/L NH₄Cl, 0.2 g/L MgSO₄, 2.21 g/L K₂HPO₄, 및 1.25 g/L NaH₂PO₄ · 2H₂O)를 선택하였다.

[0053] 실시예 1: 전세포 생축매의 알코올 내성 확인

[0054] 해당 반응에서 투입되는 모든 재료는 하기 표 3과 같이 나열되었다.

표 3

구분	구성
생축매	<i>E.coli</i> BL21, <i>M.extorquens</i> AM1, 라이페이즈(lipase)
전자전달체	에틸 바이올로젠 다이브로마이드(Ethyl viologen dibromide; EV)
기질	일산화탄소(CO) 및 알코올(Alcohol)
용매	물과 추가적인 유기용매(toluene 등)

[0056] 먼저 상기와 같은 반응 환경이 구현 가능한지에 대한 테스트가 요구되었다. 미생물은 일반적으로 고농도의 알코올(Alcohol)에 의해 활성이 저해되는 특징을 가지고 있어, 대장균(*E.coli*) BL21 균주와 메틸로모나스 엑스토르켄스(*M.extorquens*) AM1 JJ 균주 두 전세포의 생축매로서의 알코올 저항성에 대한 실험이 진행되었다.

[0057] 메탄올(Methanol), 에탄올(Ethanol) 부탄올(Butanol), 사이클로헥산올(Cyclohexanol), 벤질알코올(Benzyl alcohol), 및 시나밀알코올(Cinnamyl alcohol)에 해당하는 네 가지 알코올에 대해 0~30 g/L 범위에서 저항성 테스트를 수행하였다.

[0058] 구체적으로, 125 mL 규격의 세럼 바이알(Serum vial)에서 BTP(Bis-tris propane) 200 mM을 포함하는 물(water)에 각 종류별 알코올을 0.3, 3, 30 g/L 농도로 첨가하여 반응 완충액(Working buffer)로 하고, EV 10 mM, *E.coli* BL21 균주 0.12 mg/mL, *M.extorquens* AM1 균주 0.4 mg/mL를 첨가하여 총 부피 20 mL이 되도록 준비하였다. 대조균은 반응 완충액 제작 과정에서 알코올을 첨가하지 않은 것으로 준비하였다. 이후 시간이 경과함에 따라 포름산(formic acid) 생산량의 변화를 측정하였다.

[0059] 도 2a 내지 2f에서 확인할 수 있듯이, 알코올이 독성(toxicity)을 띠지 않는 농도에서는 포름산 생산속도의 감소가 관찰되지 않았으며, 유독한 농도에서는 포름산 생산속도가 점차 감소하였다. 결과적으로 알코올을 선택함에 따라, 기질로서 사용가능한 적절한 농도 범위가 조사되었다.

[0061] 실시예 2: 일산화탄소로부터 포름산으로의 변환시 용매별 효율의 비교

[0062] 용매 선택에 따른 일산화탄소 → 포름산(HCOOH) 반응의 반응성 및 전환율을 테스트하였다.

[0063] 구체적으로, 125 mL 규격의 세럼 바이알(Serum vial)에서 BTP(Bis-tris propane) 200 mM을 포함하는 반응 완충액을 준비하였다. 상기 반응 완충액은 물:용매(solvent) = 1:1의 부피비로 섞어 사용했으며, EV 10 mM, *E.coli* BL21 균주 2.4 mg/mL, *M.extorquens* AM1 균주 8 mg/mL를 첨가하여 총 부피 20 mL이 되도록 준비하였다.

[0064] 사용된 용매는 각각 톨루엔(toluene), 1,2-디클로로에탄(1,2-dichloroethane), 헵탄(heptane), 이소-옥탄(isooctane), 사이클로헥산(cyclohexane), 디에틸 에테르(diethyl ether), 및 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)으로 선택하였다. 효소로는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래의 상용 라이페이즈(lipase)(Sigma-aldrich, CAS no. 9001-62-1) 0.5 U/mL를 첨가하여 도 2g와 같이 표시하였다.

[0066] 실시예 3: 포름산에서 에스터로의 전환

[0067] 알코올 + 포름산(HCOOH) → 포르밀 에스터(formyl ester) + H₂O 반응의 반응성 및 전환율을 테스트하였다.

[0068] 구체적으로, 반응 완충액은 물:용매(solvent) = 2:8의 부피비로 섞어 사용했으며, 사용된 용매는 각각 부틸 아세테이트(Butyl acetate), 톨루엔 또는 이소-옥탄으로 선택하였다. 효소로는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래의 상용 라이페이즈(lipase)(Sigma-aldrich, CAS no. 9001-62-1) 0.5 U/mL를 첨가하였고, 기질로는 포름산을 800 mM의 농도로 첨가하고, 메탄올, 에탄올 또는 부탄올 세 가지 알코올을 각각 30 g/L씩 첨가하였다.

[0069] 도 3a 내지 3c에서 확인할 수 있듯이, 실험 결과 기질과 용매의 조합에 따라 23 ~ 48% 정도의 전환율을 얻었으며, 해당 환경 조건하에서 포름산으로부터 포르밀 에스터가 생산될 수 있음을 확인하였다.

[0071]

실시예 4: 일산화탄소로부터 포름산에틸로의 전환

[0072]

실시예 1 및 3 두 단계의 반응을 결합한 CO + 알코올 → 포르밀 에스터 생산 반응을 테스트하였다.

[0073]

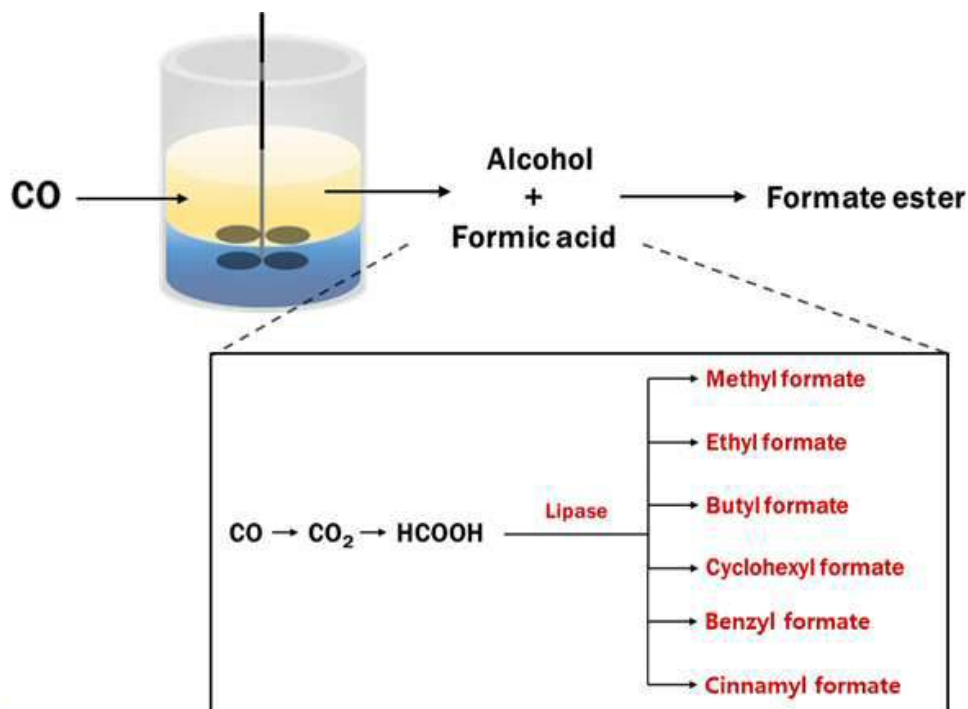
구체적으로, 125 mL 규격의 세럼 바이알에서 사용된 반응 완충액은 물:톨루엔 = 2:8 부피비(물 4 mL, 톨루엔 16 mL)의 혼합 용액이었으며, 효소로는 *E.coli* BL21 50 mg/mL, *M.extorquens* AM1 170 mg/mL, 라이페이즈 50 U/mL를 첨가하였고, 기질로는 합성가스(Syngas, CO:CO₂:N₂=50:15:35, v/v)를 2 bar 조건으로 적용하고 에탄올을 30 g/L 첨가하여 총 부피 20 mL이 되도록 준비하였다.

[0074]

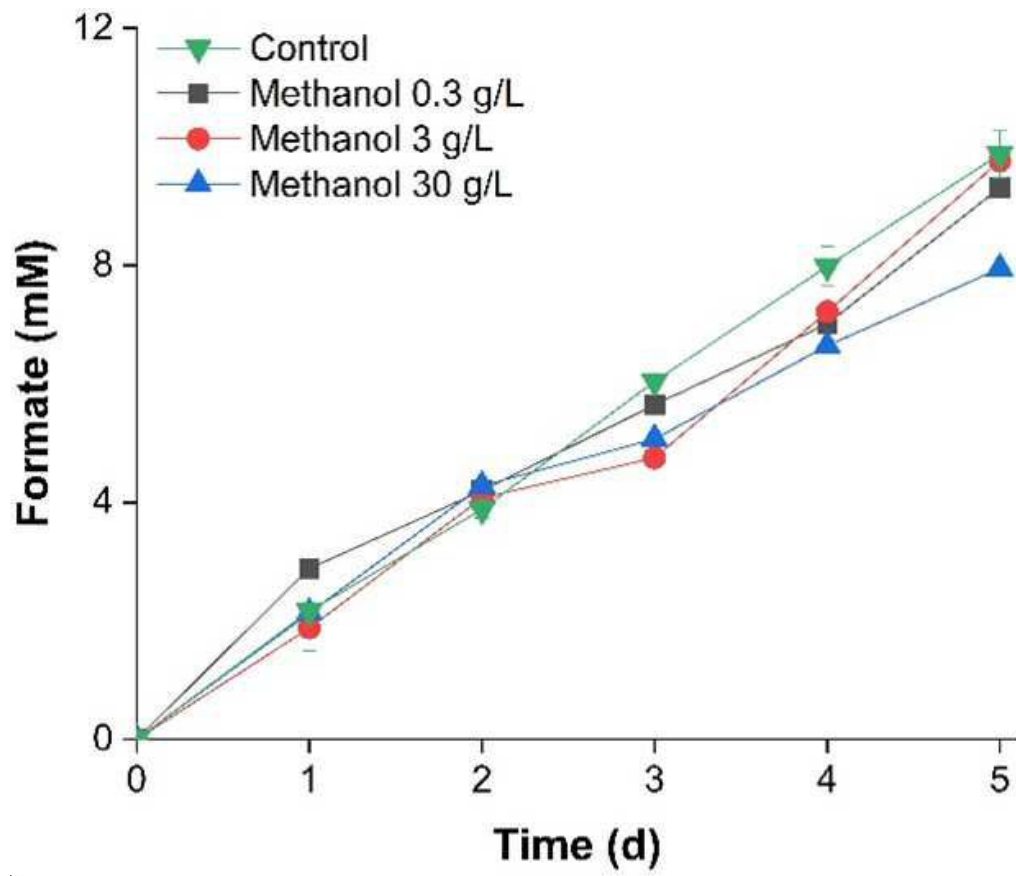
도 4에서 확인할 수 있듯이, 실험결과 CO + 에탄올 → 포름산에틸의 반응이 성공적으로 일어남이 관찰되어, 공정이 성공적으로 개발됐다고 판단하였다.

도면

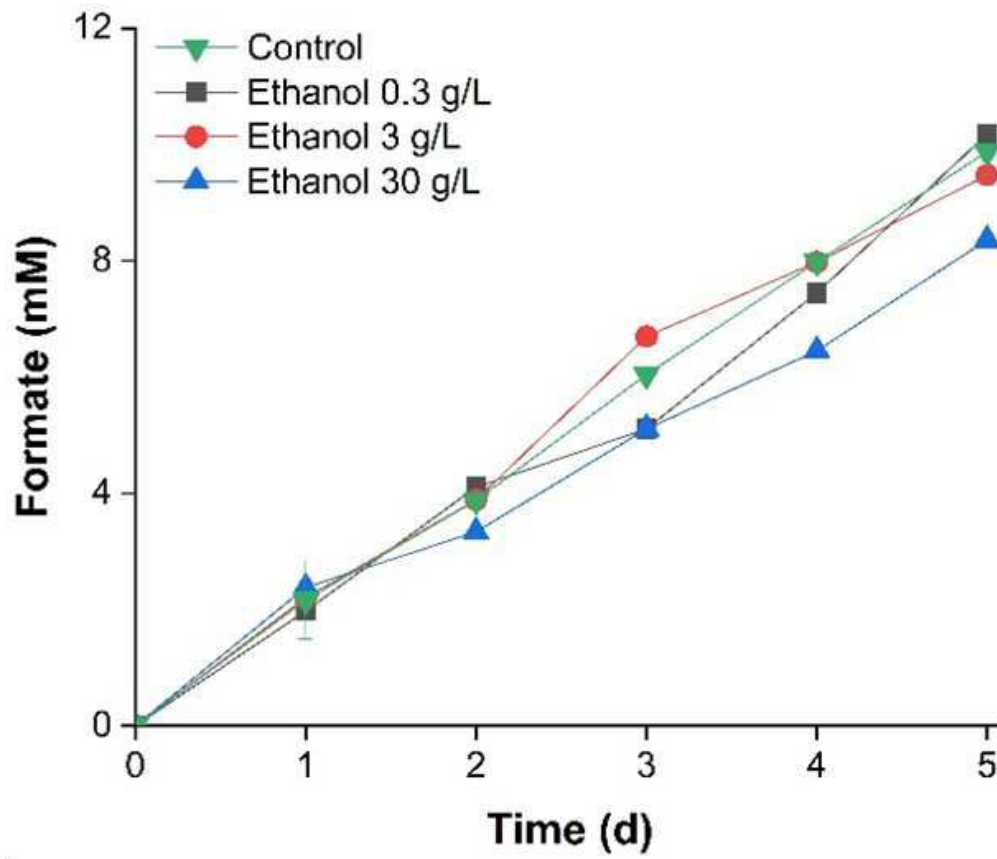
도면1



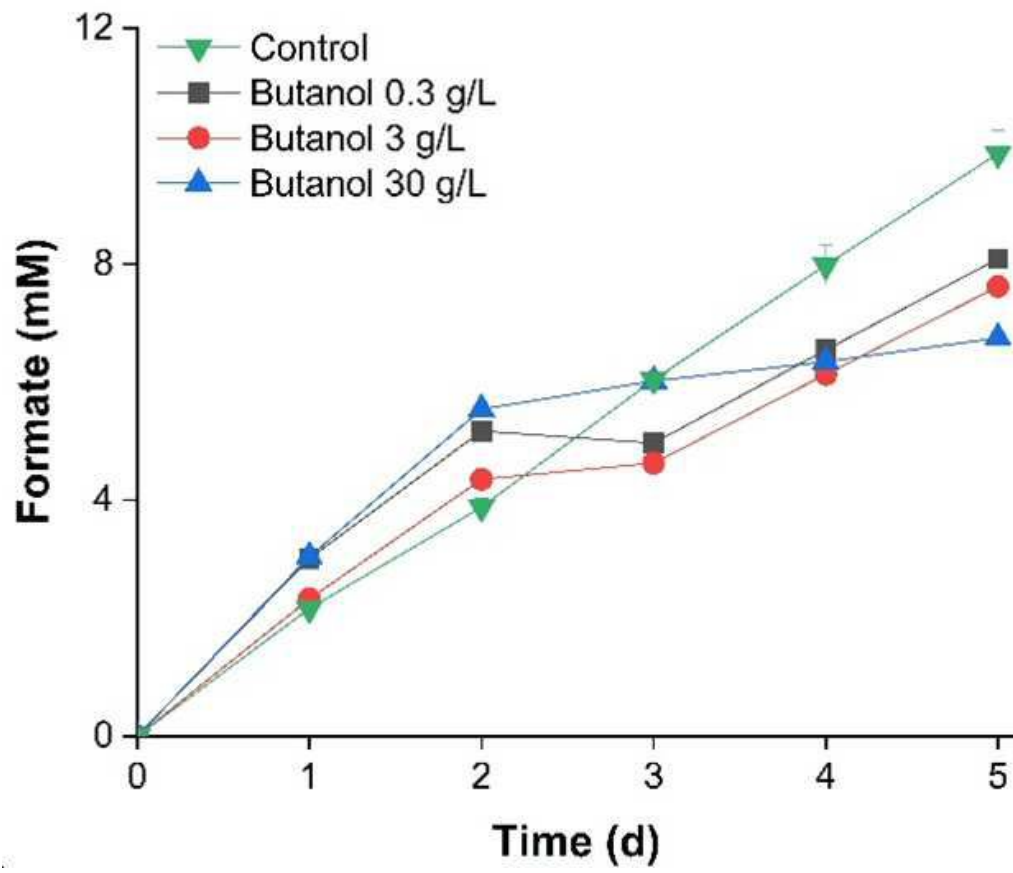
도면2a



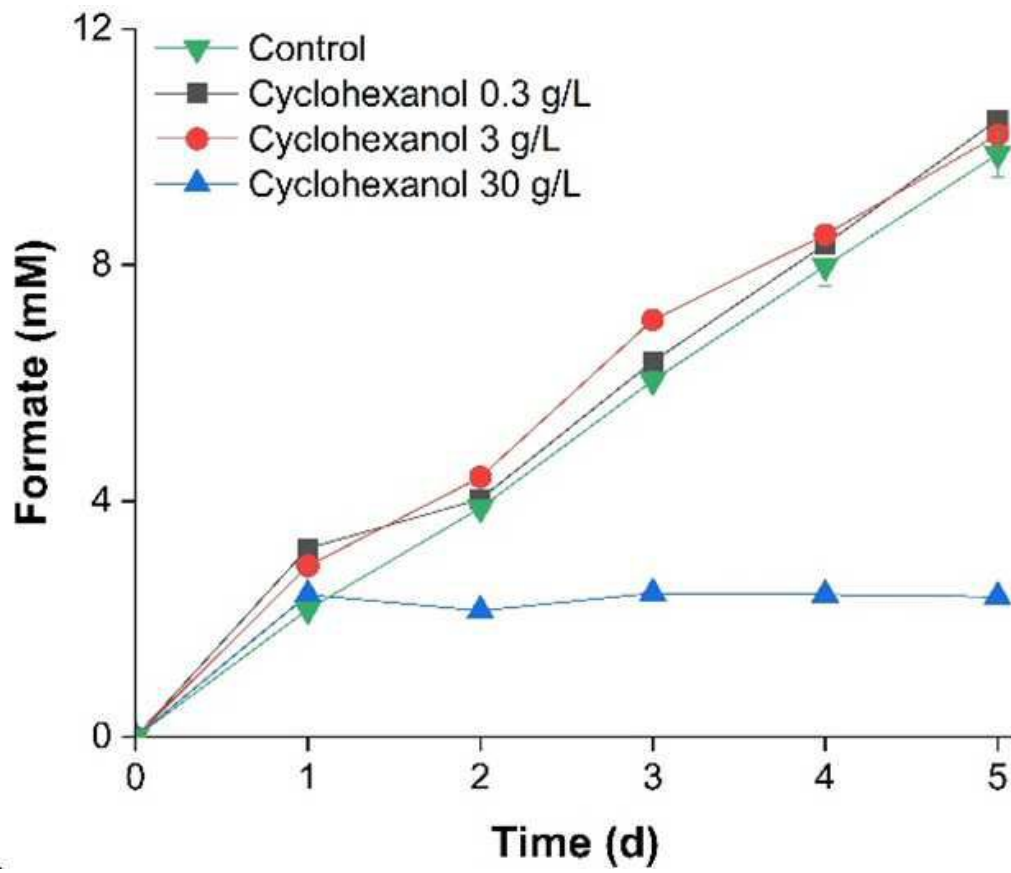
도면2b



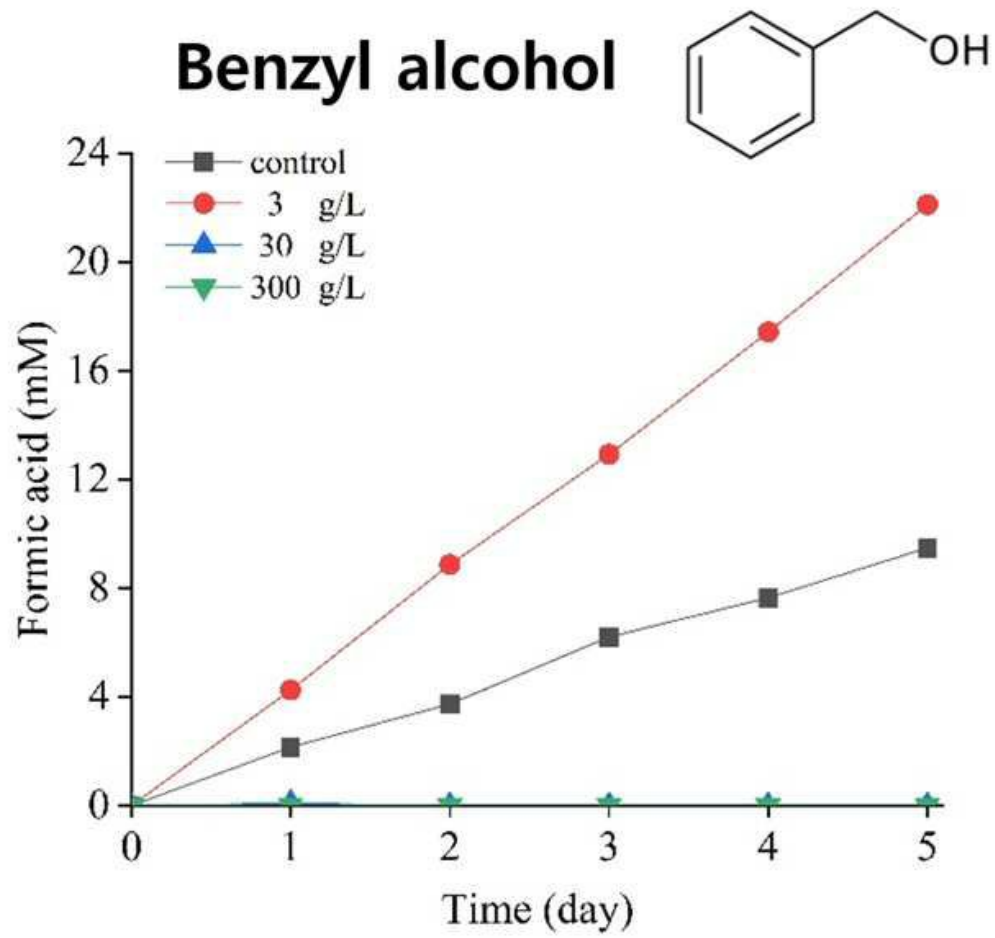
도면2c



도면2d

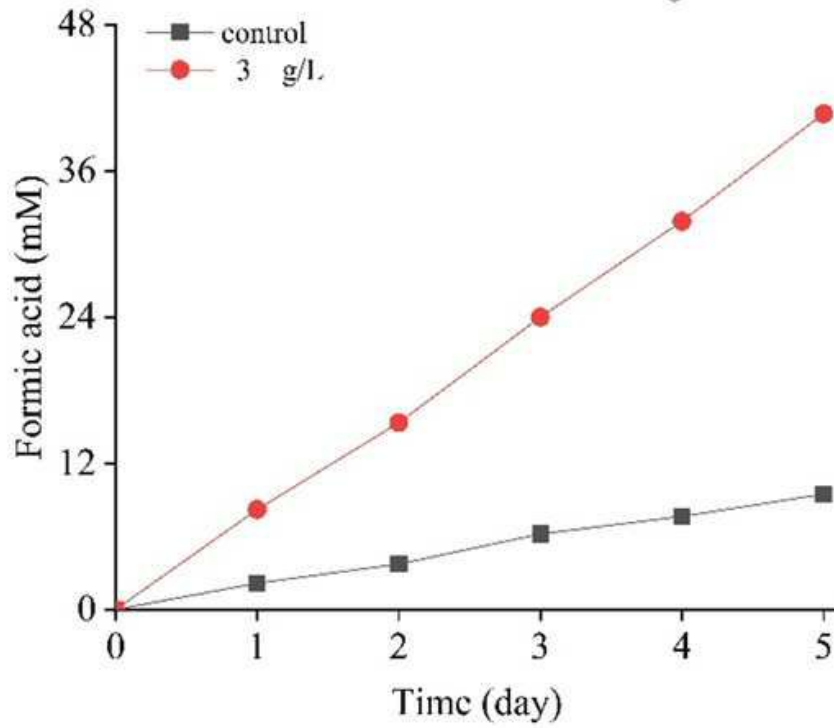
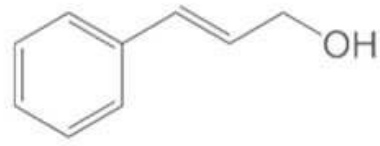


도면2e

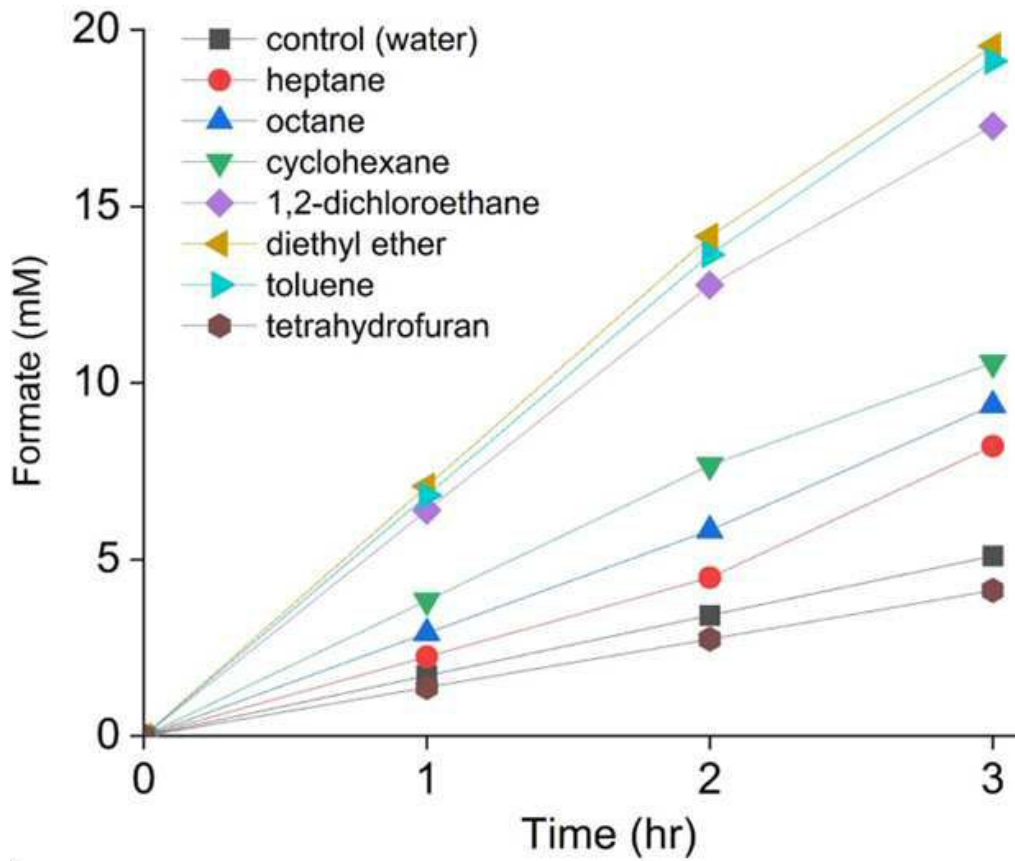


도면2f

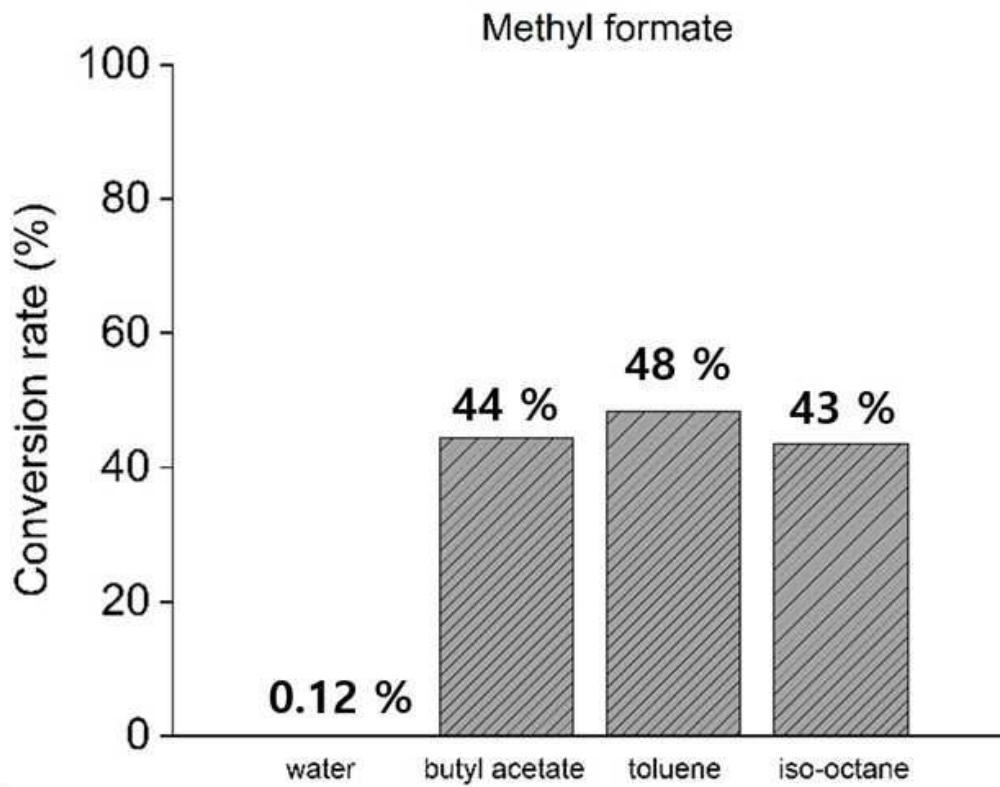
Cinnamyl alcohol



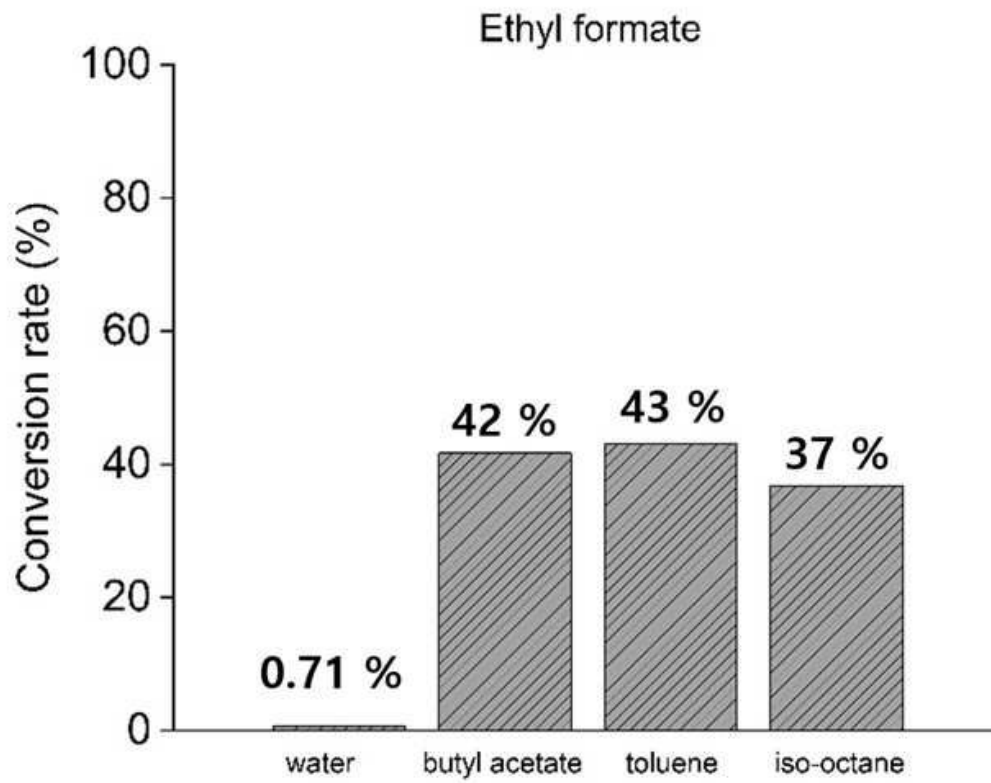
도면2g



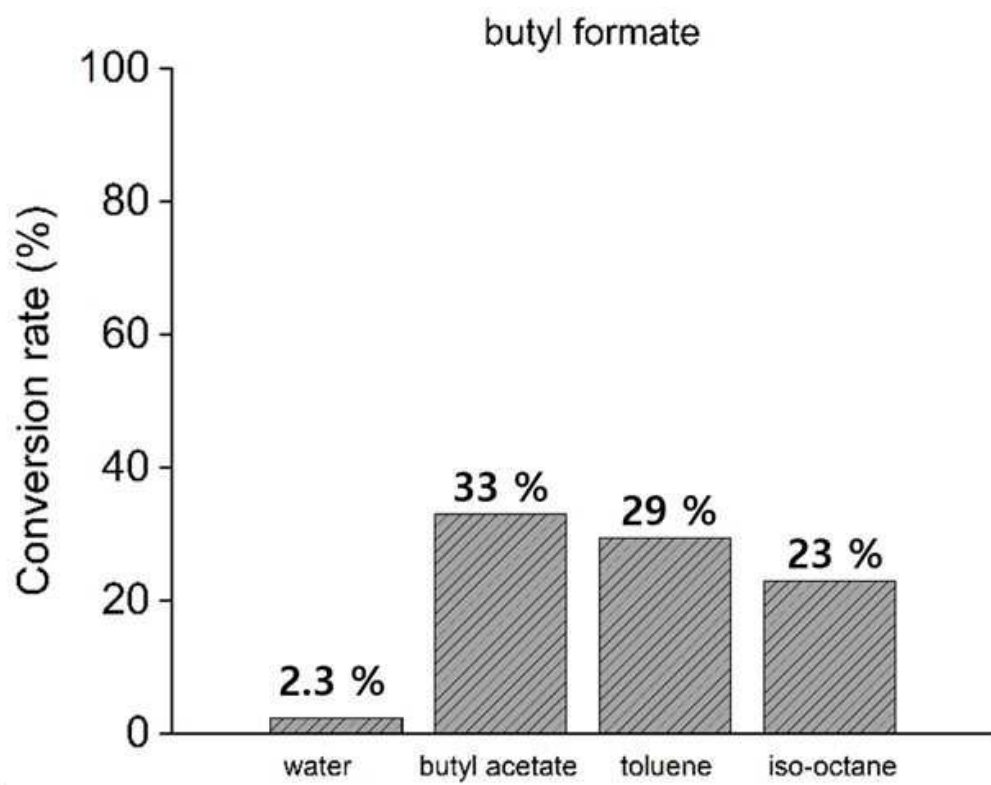
도면3a



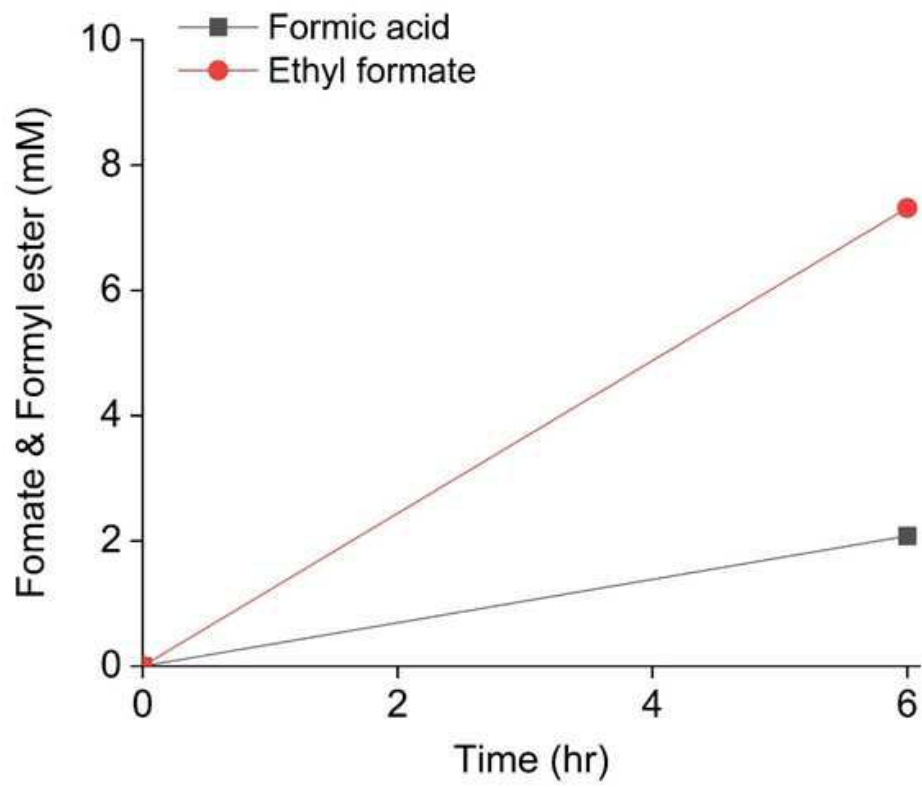
도면3b



도면3c



도면4



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.