(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0049574
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/04 (2013.01)
C12Y 114/13025 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0131173
(22) 출원일자 2018년10월30일
심사청구일자 2018년10월30일
(30) 우선권주장
1020170142094 2017년10월30일 대한민국(KR)

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

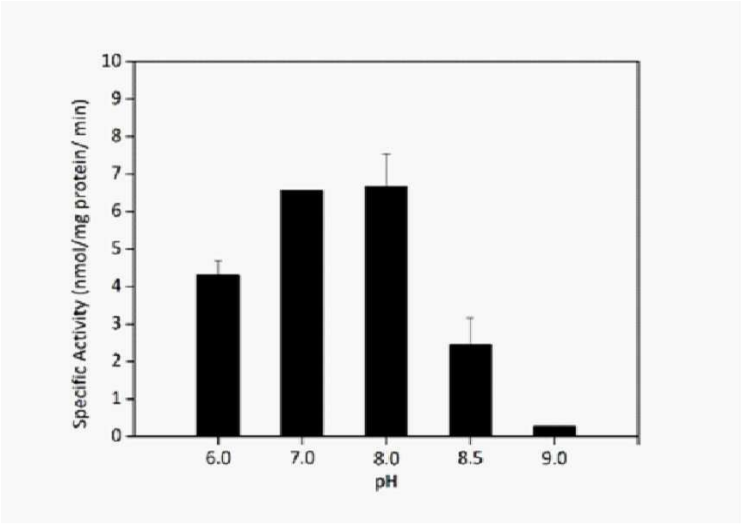
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **배양액 내 pH 조절을 통한 메탄올 탈수소화 효소 활성 저해 및 이를 이용한 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따르면 배양액 내 pH 조절을 통해 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 저해함으로써 메탄자화균 세포 농도의 감소 없이 지속적으로 메탄올을 생산할 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄올의 생산 공정에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김현수

서울특별시 강남구 청담동 삼익아파트 12동 907호

한준희

대전광역시 유성구 원내동 샘물타운 아파트 306동403호

김유진

광주광역시 동구 의재로82번길 9, 101동 402호

이진원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064929
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명	C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율	1/1
주관기관	서강대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주; 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하고, pH 값이 6.0 내지 10.0인 것인, 메탄올 생산용 조성물.

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주로부터 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 pH 값이 6.0 내지 10.0인 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것인, 메탄올 생산 방법.

청구항 6

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

청구항 7

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

청구항 8

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

청구항 9

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

청구항 10

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

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 배양액 내 pH 조절을 통해 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 저해하고 이에 따라 메탄자화균 세포 농도의 감소 없이 지속적으로 메탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 보고된 메탄자화균(methanotroph)을 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법은 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH)의 블로킹을 통해 메탄으로부터 생산된 메탄올이 대사되지 않도록 하여 배양액에 축적시키는 방법을 사용하고 있다.

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

[0004] 메탄자화균 세포 내에서는 메탄 전환에 필요한 환원력이 메탄올 산화로부터 회수되고, 이 과정에서 생성된 포름알데히드가 세포 대사를 통해 생장에 이용되므로 자연적인 메탄올 축적 유도는 매우 어려울 수밖에 없다. 따라서 현재까지의 메탄자화균에 의한 메탄올 생산 연구 결과를 보면, 생성된 메탄올의 분해를 방지하고자 MDH 저해제를 사용하고 있다.

[0005] 현재까지 가장 많이 사용된 MDH 저해제는 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)이다. EDTA는 MDH 효소의 서브유닛(subunit)에 있는 시토크롬-결합 도메인(cytochrome-binding domain)에 위치하여 메탄올에서 시토크롬 c로의 전자 전달을 저해함으로써 MDH 활성을 낮추는 것으로 알려져 있다. 그러나 과도한 EDTA가 포함될 경우 세포의 용해(lysis)를 유도하여 메탄올 생산 과정에서 촉매인 세포 농도가 급격하게 감소하게 된다.

[0006] 또한, EDTA는 화학물질로서 배양액에 투입되고 나면 회수나 재이용이 불가하여 지속적으로 공급해주어야 한다.

[0007] EDTA는 강력한 금속 킬레이터로서 과량 존재 시 메탄 전환에 필요한 MMO 효소의 활성도 저해할 수 있으므로 MDH 효소 이외 다른 미생물 촉매 활성에 대한 영향을 최소화하기 위한 방법의 탐색이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 배양액 내 pH 조절을 통한 메탄올 탈수소화 효소 활성 저해 시 세포 배양액의 pH를 변화시켜 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 억제함으로써 지속적으로 메탄올 생산을 가능하게 함을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비

우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주; 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하고, pH 값이 6.0 내지 10.0인 것인, 메탄올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 메틸로모나스 속, 메틸로박테리움 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로썰머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼룰라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주로부터 EDTA를 포함하는 pH 값이 6.0 내지 10.0인 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 배양액의 pH를 변화시켜 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 억제함으로써 메탄자화균을 이용하여 지속적인 메탄올 생산이 가능함을 나타낸다.

[0012] 본 발명자들은 산-염기 농도 조절을 통하여 비교적 용이하게 pH를 조절하였으며, 메탄올 탈수소화 효소 활성을 저해함으로써 메탄올 생산 공정에 적용하였다.

[0013] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주; 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)을 포함하는 메탄올 생산용 조성물이다.

[0015] 상기 조성물은 pH 값이 6.0 내지 10.0, 6.0 내지 9.5, 6.0 내지 9.0, 7.0 내지 10.0, 7.0 내지 9.5, 7.0 내지 9.0, 7.5 내지 10.0, 7.5 내지 9.5 또는 7.5 내지 9.0, 예를 들어, 7.5 내지 8.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 상기 조성물은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM, 0.01 내지 2.00 mM, 0.01 내지 1.00 mM, 0.01 내지 0.80 mM, 0.10 내지 5.00 mM, 0.10 내지 2.00 mM, 0.10 내지 1.00 mM, 0.10 내지 0.80 mM, 0.20 내지 5.00 mM, 0.20 내지 2.00 mM 또는 0.20 내지 1.00 mM, 예를 들어, 0.20 내지 0.80 mM의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 다른 양태는 메틸로모나스 속, 메틸로박테리움 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로썰머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼룰라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의

균주를 EDTA를 포함하는 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 메탄올 생산 방법이다.

[0019] 본 명세서상의 용어 "전환"은, 배양액 내의 물질을 이용하여 균주가 특정 물질을 생산하는 과정을 의미한다.

[0020] 상기 배양액은 pH 값이 6.0 내지 10.0, 6.0 내지 9.5, 6.0 내지 9.0, 7.0 내지 10.0, 7.0 내지 9.5, 7.0 내지 9.0, 7.5 내지 10.0, 7.5 내지 9.5 또는 7.5 내지 9.0, 예를 들어, 7.5 내지 8.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 조성물은 EDTA를 0.01 내지 5.00 mM, 0.01 내지 2.00 mM, 0.01 내지 1.00 mM, 0.01 내지 0.80 mM, 0.10 내지 5.00 mM, 0.10 내지 2.00 mM, 0.10 내지 1.00 mM, 0.10 내지 0.80 mM, 0.20 내지 5.00 mM, 0.20 내지 2.00 mM 또는 0.20 내지 1.00 mM, 예를 들어, 0.20 내지 0.80 mM의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 전환 단계는 메탄자화균 세포 내의 NADH/NAD+ 비율을 0.5 이상으로 유지하며 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 전환 단계는 10 내지 50%(v/v), 10 내지 45%(v/v), 10 내지 40%(v/v), 10 내지 35%(v/v), 20 내지 50%(v/v), 20 내지 45%(v/v), 20 내지 40%(v/v), 20 내지 35%(v/v), 25 내지 50%(v/v), 25 내지 45%(v/v) 또는 25 내지 40%(v/v), 예를 들어, 25 내지 35%(v/v)의 메탄을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 상기 전환 단계는 상기 가스를 10 내지 900분 동안 배기하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가스의 배기에 소요되는 최적 시간은 전체 배양액의 부피, 공정 수행 시간, 사용하는 균주의 종류 및 배지 조성을 포함하는 조건의 변동에 따라 적절히 조정될 수 있다.

[0026] 상기 전환 단계는 25 내지 35℃, 27 내지 35℃, 29 내지 35℃, 25 내지 32℃, 또는 27 내지 32℃, 예를 들어, 29 내지 32℃의 온도에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따르면 배양액 내 pH 조절을 통해 메탄올 탈수소화 효소의 활성을 저해함으로써 메탄자화균 세포 농도의 감소 없이 지속적으로 메탄올을 생산할 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄올의 생산 공정에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 메탄올 생산 경로를 보여주는 모식도이다.

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

도 3은 DH-1 균주의 MDH 활성을 pH 조건을 달리하여 비교한 그래프이다.

도 4는 EDTA의 농도에 따른 DH-1 균주 세포의 MDH 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5a는 EDTA를 첨가하지 않은 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

도 5b는 EDTA를 0.50 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

도 5c는 EDTA를 10.00 mM 첨가한 배지 조건하에서 DH-1 균주의 메탄 소비와 메탄올 생성을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 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.

[0031] **실시예 1: EDTA의 최적 농도 결정**

[0032] 메탄 한 분자의 전환에는 전자 두 개가 필요하며, 메탄올의 산화를 통해 전자 네 개가 생산될 수 있으므로 이론적으로는 MDH 효소 활성의 적절한 조절을 통해 메탄 1몰로부터 최대 1/2몰의 메탄올을 얻을 수 있다.

[0033] 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH) 활성 제어를 통한 메탄올의 선택적 생산을 위하여 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)를 사용하였다. EDTA는 금속 킬레이터로서 MDH에서 리실(lysyl) 또는 아르기닐(arginyl) 잔기의 고정을 통한 초기 결합을 방해함으로써 MDH의 전자 전달을 방해할 수 있어 이전의 메탄올 생산 연구에서 많이 사용되어 왔다.

[0034] 50 mL NMS 배지가 포함된 500 mL 배플 플라스크(baffled flask)에 1 mL의 DH-1 스탁(stock, KCTC 13004BP)을 접종한 후 주기적으로 메탄/공기를 주입하며 600 nm에서 배양액의 흡광도(OD600)가 5 내지 6이 될 때까지 진탕 배양기에서 30 ℃, 230 rpm으로 배양하여 도 1과 같은 경로로 반응을 유도하였다. 배양 시 외부 공기의 유입과 내부 메탄 또는 프로판의 유출을 방지하기 위하여 플라스크에 부틸 고무(butyl rubber) 재질의 셉텀(septum)이 있는 마개를 사용하였다. NMS 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0035]

NMS 조성	Amount for 1L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
KNO_3	1 g
$CaCl_2 . 2H_2O$	0.228 g
Fe-EDTA	0.0038 g
Na_2MoO_4	0.0006 g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.5 mg
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0.4 mg
$MnCl_2 . 7H_2O$	0.02 mg
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.05 mg
$NiCl_2 . 6H_2O$	0.01 mg
H_3BO_3	0.015 mg
EDTA	0.25 mg
KH_2PO_4	0.26 g
$Na_2HPO_4 . 7(H_2O)$	0.62 g
바이오틴(Biotin)	0.02 mg
폴산(Folic acid)	0.02 mg
티아민 HCl(Thiamine HCl)	0.05 mg
Ca 판토텐산염(pantothenate)	0.05 mg
비타민(Vitamin) B12	0.001 mg
리보플라빈(Riboflavin)	0.05 mg
니코틴아마이드(Nicotiamide)	0.05 mg
$CuSO_4 . 5H_2O$	2.5 mg

[0036] pH에 따른 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) DH-1의 MDH 효소 활성을 확인하기 위하여 반응 버퍼(reaction buffer)에 EDTA를 0.5 mM 첨가한 후 pH를 6.0, 7.0, 8.0, 8.5 및 9.0으로 달리하였다.

[0037] 다양한 EDTA 농도에서 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) DH-1의 MDH 활성에 대한 EDTA의 영향을 관찰하였다. MDH의 활성은 MDH가 메탄올을 산화시킬 때 발생하는 전자에 의한 DCPIP(2,6-dichlorophenolindophenol)의 환원 속도를 측정하여 결정하였다 (참고문헌: 김희곤, 이상귀, 김시욱, "신규 type I 메탄자화세균 *Methylobacterium* sp. HG-1을 이용한 메탄올의 생합성", 공학기술논문지, 1(1), 33-37 (2008))

[0038] 도 2에서 확인할 수 있듯이, EDTA에 의한 저해 효과는 0.01 mM까지는 나타나지 않았으며, 이후 1.00 mM 농도까지는 급격히 증가하였다. 0.50 mM의 EDTA를 첨가하였을 때, MDH의 특이적 활성(specific activity)은 2.095 nmol/mg protein/min로서, 원래 활성의 31% 수준이었다. 1.00 mM 이상의 EDTA에서 활성은 서서히 저해되며 최종적으로 EDTA 농도가 10.00 mM에 이르면 MDH의 활성은 완전히 저해되었다. 메탄이 메탄올로 전환하는데 필요한 전자와 메탄올이 산화되어 얻을 수 있는 전자를 고려할 때, MDH의 활성이 1/3 내지 1/2일 때 메탄올을 가장 많

이 축적할 수 있으리라 예상되어 EDTA 최적 농도를 0.50 mM로 결정하였다.

[0039] 메탄올 전환 실험을 위하여 상기 배양한 배양액을 원심분리하고 상등액을 제거한 다음 PBS 버퍼(buffer)로 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 이후 pH 조건을 달리한 PBS 버퍼에 EDTA 농도를 0.50 mM로 설정하여 추가한 다음 세척된 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) DH-1 세포를 OD 30이 되도록 추가하였다.

[0040] 메탄:공기=3:7 비율의 가스를 30분간 배기한 다음 진탕 배양기에서 30℃에서 230 rpm으로 교반하며 진행하였다.

[0041] 도 3에서 확인할 수 있듯이, MDH 활성은 pH에 따라 최적점이 존재하였는데, pH 7.0과 8.0에서 MDH 활성이 EDTA가 포함되지 않은 pH 7.0의 세포 용해(cell lysate)와 비교하였을 때 66%의 활성을 나타내어 가장 활성이 높았고, 8.5에서는 대조군(pH 7.0 cell lysate without EDTA) 대비 36.7%의 활성을 나타내었으며, 9.0이상에서는 MDH의 활성이 모두 사라지는 것으로 확인되었다. 그러나, 9.0 이상의 pH에서는 세포의 활성 역시 극도로 저하되므로 최적 pH는 8.5임을 알 수 있었다.

[0043] **실시예 2: EDTA에 의한 MDH 저해 효과의 확인**

[0044] EDTA에 의한 MDH 효소 저해가 in-vivo 상에서도 이루어지는지 확인하기 위하여 반응 버퍼(reaction buffer)에서 초기 메탄올 농도가 45 mM일 때 Methylomonas sp. DH-1 세포를 투입하여 메탄올 분해를 관찰하였다. 효소 활성 실험에서 도출한 0.00 mM, 0.50 mM, 그리고 10.00 mM의 EDTA 농도에서 DH-1 휴지 세포(resting cell)의 시간당 메탄올 소모량을 분석하였다.

[0045] 도 4에서 확인할 수 있듯이, EDTA가 포함되지 않았을 때 DH-1 세포는 4시간만에 메탄올을 모두 소모하였다. 그러나 MDH 활성이 대부분 저해를 받는 EDTA 10.00 mM이 포함된 조건에서는 4시간이 지나도 1.80 mM의 메탄올만을 소모함으로써 메탄올 분해가 거의 이루어지지 않았음을 확인할 수 있다. 한편, MDH 부분저해 조건인 EDTA 0.50 mM 포함 조건에서 DH-1 세포는 4시간 동안 투입 메탄올의 31%인 13.9 mM의 메탄올을 소모하여 실제 전세포 전환 실험에서도 MDH의 부분 저해가 가능함을 확인하였다.

[0047] **실시예 3: 메탄올 전환 및 축적 정도의 확인**

[0048] 실시예 1 및 2에서 수행한 효소 활성 실험과 휴지 세포 실험으로부터 얻은 MDH 부분 저해 효과를 이용하여 실제 메탄 전환 실험을 수행하였다. Methylomonas sp. DH-1 세포를 투입하여 메탄의 소모를 관찰하였다.

[0049] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, MDH 저해를 받지 않는 EDTA가 없는 조건에서 메탄 전환 메탄올 생산 실험 결과, 반응 4시간 및 8시간째에 메탄의 소비량은 각각 36.28 mM, 37.10 mM이었다. 이는 대사 과정에 저해를 받지 않았기 때문에 세포 내에서 가장 많은 메탄 소비량을 보인 것으로 볼 수 있다.

[0050] 그러나 MDH 저해가 없는 조건에서 메탄올은 계속해서 산화되기 때문에 메탄올 축적은 거의 발생하지 않았다. 반응 4시간째에 최대 메탄올 생산은 0.273 mM였으며 메탄 소비 대비 메탄올 수율은 0.8%이었다. 반응 8시간째에 메탄올은 더 감소하여 0.224 mM였으며 메탄 소비 대비 메탄올 수율은 0.6%이었다.

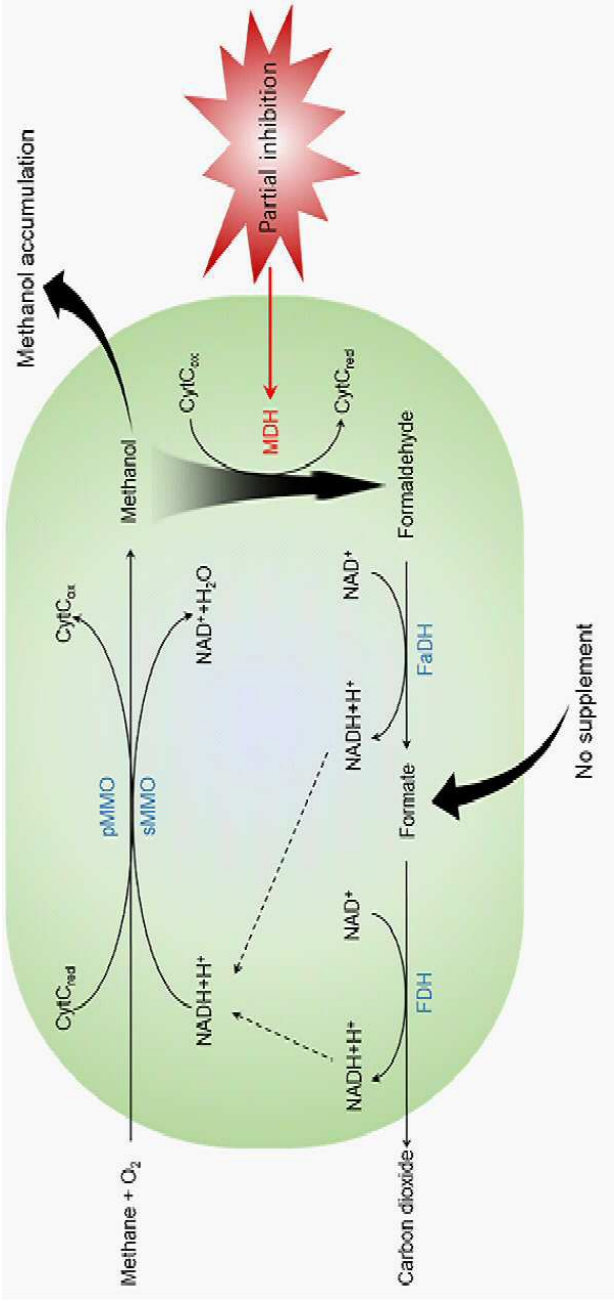
[0051] 도 5b에서 확인할 수 있듯이, MDH 활성을 1/3 수준으로 낮춘 조건(EDTA 0.50 mM)에서 메탄올은 성공적으로 축적되었다. 메탄 소모량은 4시간 및 8시간째에서 각각 29.41 mM과 35.24 mM로서 EDTA가 없는 조건보다 줄어들었으나, 메탄올 농도는 반응 4시간째에 21.52 mM(0.69 g/l)로 빠르게 증가하였고 이 후, 반응 8시간째에 메탄올 생산은 최종 27.85 mM(0.892 g/l) 까지 증가하였다. 메탄 소비 대비 메탄올 생산 수율은 각각 4시간 및 8시간째에 73.1%, 79.0%였다.

[0052] 도 5c에서 확인할 수 있듯이, MDH 완전 저해가 발생하는 EDTA 10.00 mM 조건에서는, 메탄올 산화를 통한 환원력 공급이 이루어지지 않으므로 메탄 전환이 이루어지지 않아 메탄 소비와 메탄올 축적이 모두 거의 발생하지 않았다. 반응 4시간째에 소비된 메탄은 3.62 mM, 생산된 메탄올 농도는 0.06 mM에 불과하였다.

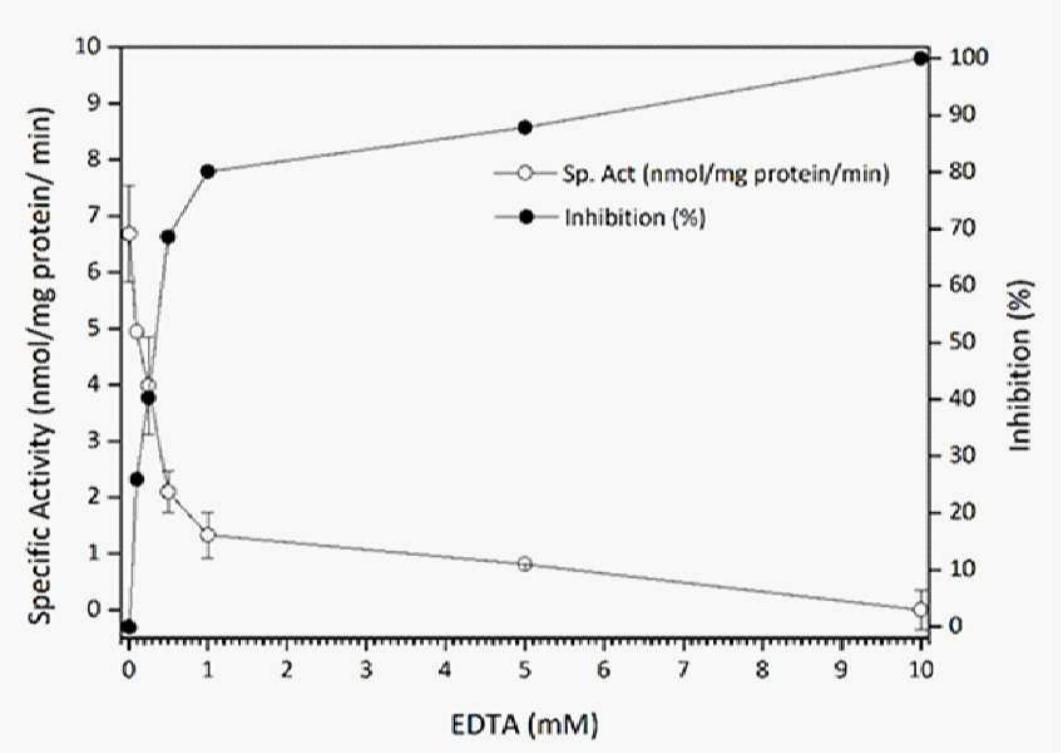
[0053] 결론적으로, MDH 부분 저해를 통하여 외부 환원력 없이도 최대 0.892 g/l의 메탄올을 생산할 수 있었다.

도면

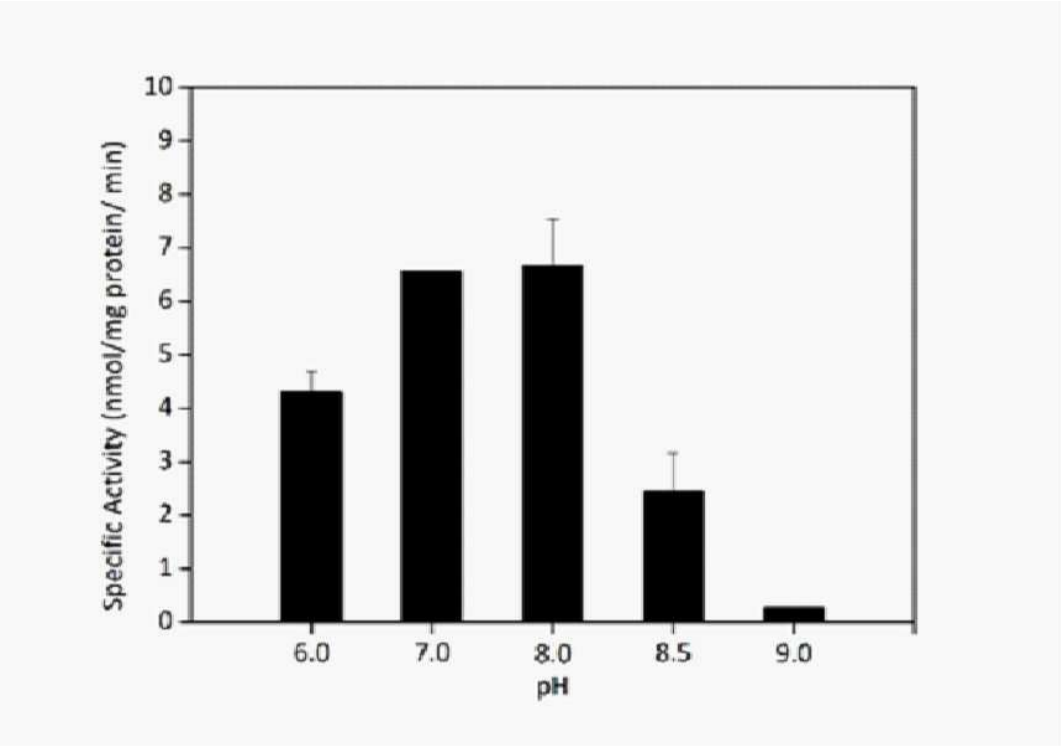
도면1


Methanol accumulation
Methane + O_2
$CytC_{red}$
$CytC_{ox}$
pMMO
sMMO
Methanol
$NADH+H^+$
NAD^+
NAD^++H_2O
$CytC_{ox}$
MDH
$CytC_{red}$
Partial inhibition
Formaldehyde
$NADH+H^+$
NAD^+
FDH
FaDH
Formate
$NADH+H^+$
NAD^+
Carbon dioxide
No supplement

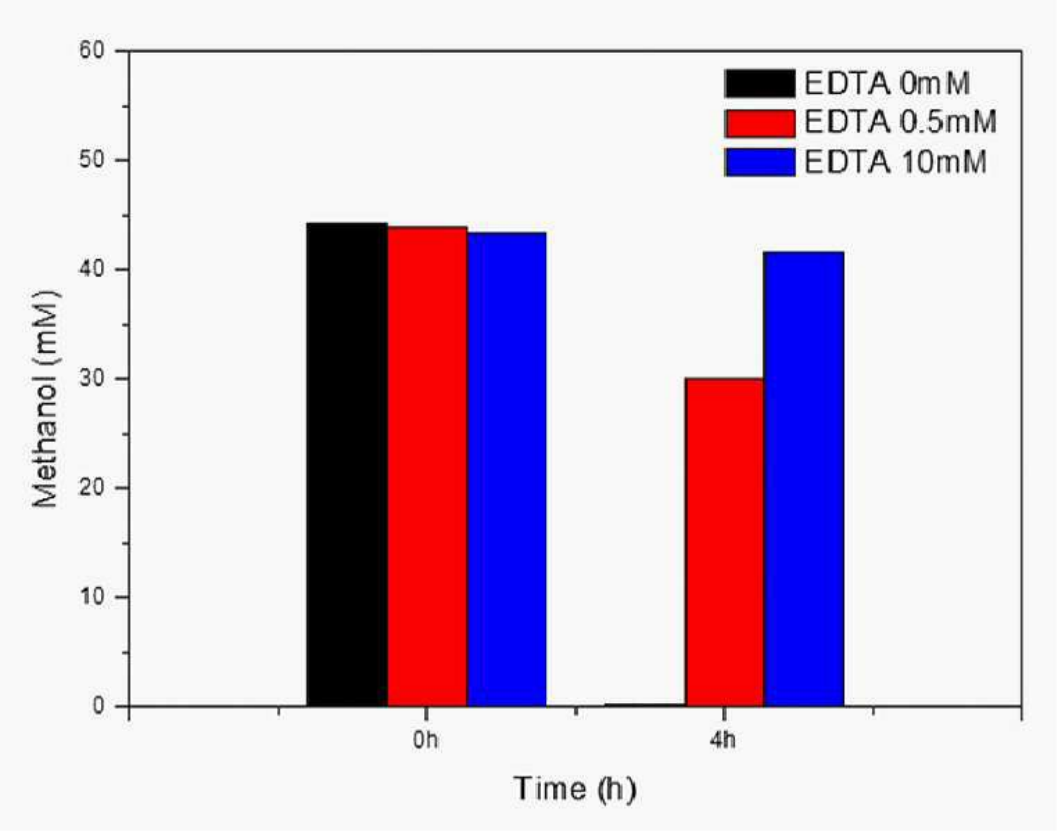
도면2


Specific Activity (nmol/mg protein/ min)
Inhibition (%)
Sp. Act (nmol/mg protein/min)
Inhibition (%)
EDTA (mM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

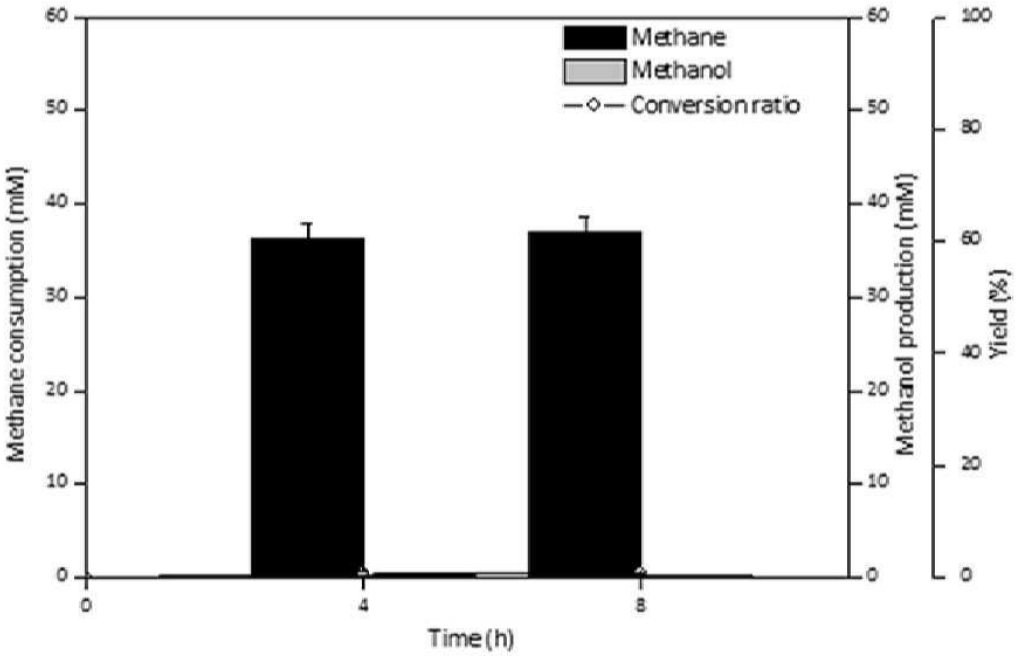
도면3


Specific Activity (nmol/mg protein/ min)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
6.0
7.0
8.0
8.5
9.0
pH

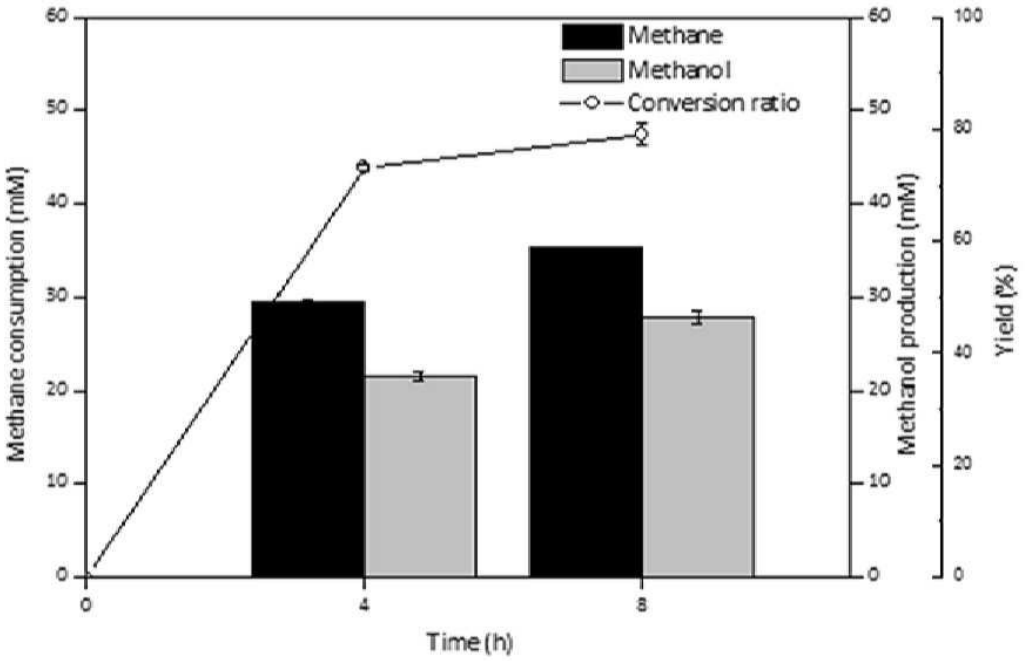
도면4


EDTA 0mM
EDTA 0.5mM
EDTA 10mM
Methanol (mM)
60
50
40
30
20
10
0
0h
4h
Time (h)

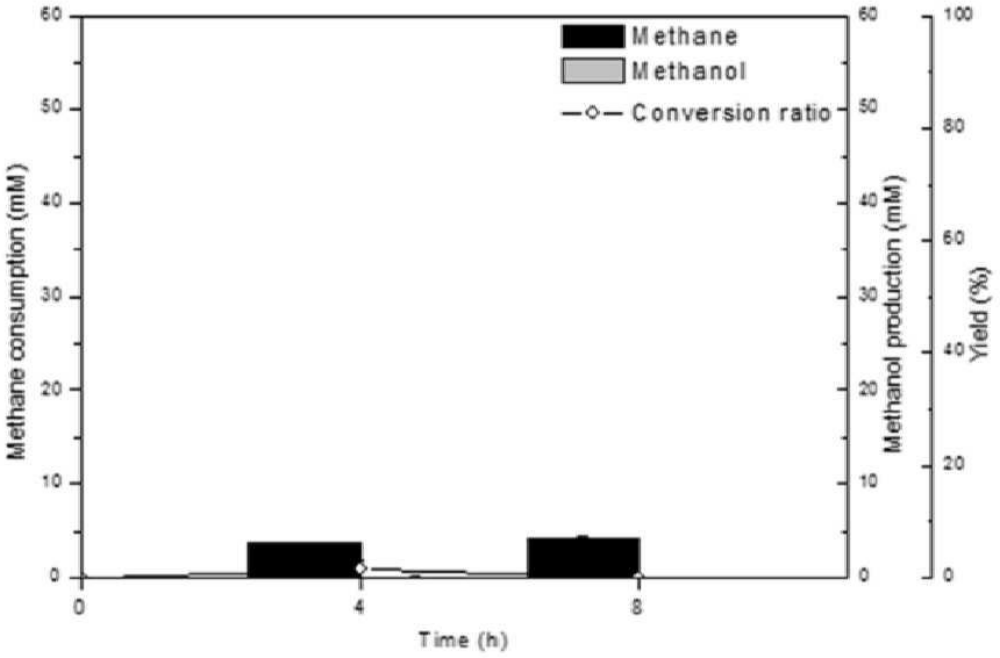
도면5a


Methane
Methanol
Conversion ratio
Methane consumption (mM)
Methanol production (mM)
Yield (%)
60
50
40
30
20
10
0
100
80
60
40
20
0
4
8
Time (h)

도면5b


Methane
Methanol
Conversion ratio
Methane consumption (mM)
Methanol production (mM)
Yield (%)
Time (h)
0
4
8
0
10
20
30
40
50
60
0
20
40
60
80
100

도면5c


Methane
Methanol
Conversion ratio
Methane consumption (mM)
Methanol production (mM)
Yield (%)
Time (h)
0
4
8
0
10
20
30
40
50
60
0
20
40
60
80
100