

새로운 메탄올자화세균에 의한 트레오닌의 생산

김경자[#] · 박귀례^{*}

순천향대학교 공과대학 유전공학과, *국립보건안전연구원

(Received June 18, 1992)

Threonine Production by A Newly Isolated and Characterized Methylotrophic Bacterium

Kyoung-Ja, Kim[#] and Kui-Lea, Park^{*}

Department of Genetic Engineering, Soonchunhyang University, Onyang 337-880, Korea

*National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

Abstract—The amino acid threonine was produced from glycine and ethanol in a reaction mixture using resting cells of a newly isolated gram-negative methylotrophic bacterium, capable of growth on methanol. The isolate could utilize C₁ compounds and a variety of multicarbon substrates as sole carbon and energy source. To obtain cells of isolate with high threonine producing activity, we investigated optimum cultural conditions. Optimal growth was at the initial concentration of 0.5%(v/v) methanol, at 30°C and pH 7.0. The growth was not affected by antibiotics inhibiting cell wall synthesis, but was completely suppressed by those inhibiting protein synthesis. The optimum reaction conditions from threonine production by resting cells of this strain were found.

Keywords □ Threonine, methylotrophic bacterium, C₁ compounds, glycine, ethanol.

메탄올 자화세균(Methylotrophs)이란 하나 혹은 몇개의 탄소원자를 함유하나 탄소-탄소결합을 가지고 있지 않은 화합물을 이용해서 호기성 상태에서 성장할 수 있는 박테리아 group을 말한다. 편성 메탄올 자화세균은 위에서 언급한 화합물만을 이용하여 성장할 수 있으나 통성메탄올 자화세균은 그 외에 다른 탄소-탄소결합을 가진 화합물을 이용하여 성장할 수도 있다. 메탄올 자화세균은 C₁ 화합물을 탄소원, 에너지원으로 사용하기 위해 ribose phosphate cycle이나 serine pathway를 이용한다. 전자를 type 1 methylotrophs라 하고 후자를 type 2 methylotrophs라 한다.

메탄올 자화세균은 최근에 큰 관심을 끌고 있는데 그 이유는 산업적으로 생물학적 촉매로 이용될 뿐 아니라¹⁻³⁾ 또 단일세포단백질(single cell protein,

SCP)생산원으로 이용될 수 있기 때문이다.⁴⁻⁸⁾ 또한 이들 세균은 C₁화합물들을 여러가지 산업적으로 유용한 화합물인 유기산, 아미노산, 비타민, 생물중합체(biopolymer)로 변화시킬 수 있기 때문에⁹⁻¹²⁾ 산업적으로 널리 이용될 수 있다. 메탄올 자화세균에 대한 관심이 높아짐에 따라 새로운 균주를 분리시켜 생화학적 특성을 연구한 보고들이 많이 나오고 있다.¹³⁻¹⁵⁾

본 연구에서는 도양에서 메탄올 자화세균을 분리시켜 그 중에서 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산하는 균주를 골랐다. Ethanol은 methanol dehydrogenase(MDH)에 의해 환원되어 acetaldehyde가 되고 이것이 serine hydroxymethyltransferase(SHMT)^{17,18)}에 의해 glycine과 반응하여 threonine을 생산하게 된다. threonine을 생산하는 메탄올 자화세균의 생화학적 특성, 항생제 감수성 검사 및 최적성장조건 등을 조사하고 resting cell을 이용한 threonine생산의 최

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

적조건에 대해 조사한 결과를 보고하는 바이다.

실험방법

균주 및 배양—충남 근교의 토양으로부터 분리한 methylotrophs KJ 29를 실험균주로 이용하였다. 토양을 멸균증류수로 10배 희석후 1.0%(v/v)의 methanol을 함유한 mineral salt agar배지에 고루 심은 다음 3~4일 후 colony가 나타나면 각 colony를 agar plug에 옮겨 순수 배양하였다. 각 agar plug에서 자란 균은 methanol을 함유한 최소액체배지(10 ml)에 심어 120 rpm에서 3~4일 정도 30°C 에서 배양하였다. 빨리 자라는 균주를 그후 200 ml의 최소액체배지에 심어 다시 3~4일 배양하였다. 고체배지의 경우 agar를 1.5%로 첨가하였다.

배지—NH₄Cl 4.0g, KH₂PO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, vitamin mixture* 10 ml, methanol 1.0%(v/v), pH 7.0, dist. water 1L

*Thiamine, riboflavine, pyridoxine, pantothenate and nicotinic acid at 1 mg each; p-aminobenzoic acid 0.2 mg, folic acid and biotin at 10 µg each; deionized water 1 litre.

탄소원 및 질소원의 영향—탄소원 및 질소원의 threonine생산에 미치는 영향 및 균주의 성장도는 각 탄소원을 메탄올 대신 0.5%(w/v or v/v)로 첨가하여 조사하였으며 각 질소원은 NH₄Cl 대신 최소액체배지에서 0.4%로 첨가하여 조사하였다. Formaldehyde의 경우는 0.005~0.04%(w/v)농도를 첨가하여 조사하였다.

항생제 감수성 검사—여러 항생제 디스크(BBL)를 사용하여 methanol을 0.5% 함유한 최소배지에서의 항생제 감수성 검사를 하였다.

Resting cell의 준비—최소액체배지에서 log phase 까지 자란 균을 8000 rpm에서 10분간 원심분리 후 0.85% NaCl용액으로 3번 씻어 resting cell로 이용하였다.

Resting cell을 이용한 threonine생산의 반응조건—Resting cell 300 mg(wet weight), glycine 8 mg, absolute ethanol 16 mg을 Tris-HCl buffer(0.25M, pH 9.0)에 첨가하여 전체 1 ml가 되도록 한 후 30°C 에서 24 시간동안 진탕한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 취해 threonine의 정성정량실험을

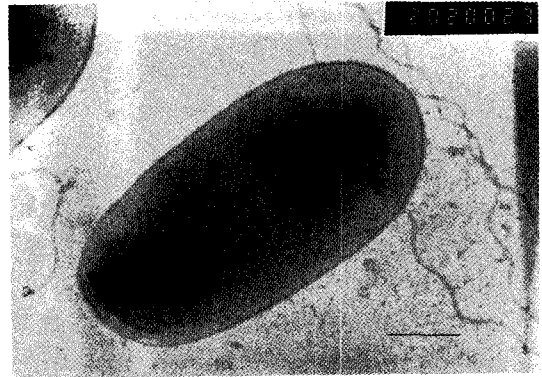


Fig. 1—Electron Micrograph of *Methylobacterium* sp. Strain KJ 29, growing on methanol. The bar equals 0.5 µm.

행하였다.

아미노산분석—반응상등액의 threonine생성여부는 paper chromatography를 이용하여 조사하였다. 1차 전개용매로는 n-butanol-acetone-diethylamine-water (10 : 10 : 2 : 5 by vol.)을 이용하고 2차 전개용매로는 n-butanol-methylethylketone-ammonia water-water (1 : 5 : 1 : 1, by vol.)을 이용하여 같은 방향으로 전개시킨 다음 ninhydrin용액으로 threonine생성여부를 조사하였다. Threonine의 정량을 위해서는 아미노산 자동분석기를 이용하였다.

Threonine의 분리—반응액을 8000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 Doxwex 50WX8(H⁺) cation exchange resin의 column에 부은 후 증류수로 씻고 0.5N-HCl로 elution시켰다. 그 후 threonine을 함유한 용액만 모아 농축시켰다.

균주의 일반적인 특징—“Manual for Identification of Medical Bacteria¹⁹⁾”에 따라 일반적인 방법으로 조사하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

형태학적 특성—분리균주는 Gram음성의 막대모양으로 크기는 1.28~1.33×2.33~2.65 µm이며 peritrichous flagella로 운동성이 있었고 spore는 형성하지 않았다(Fig. 1). Colony는 분홍색으로 30°C 에서 pH 7.0에서 가장 잘 자랐으며 entire smooth한 표면을 이루고 있었다.

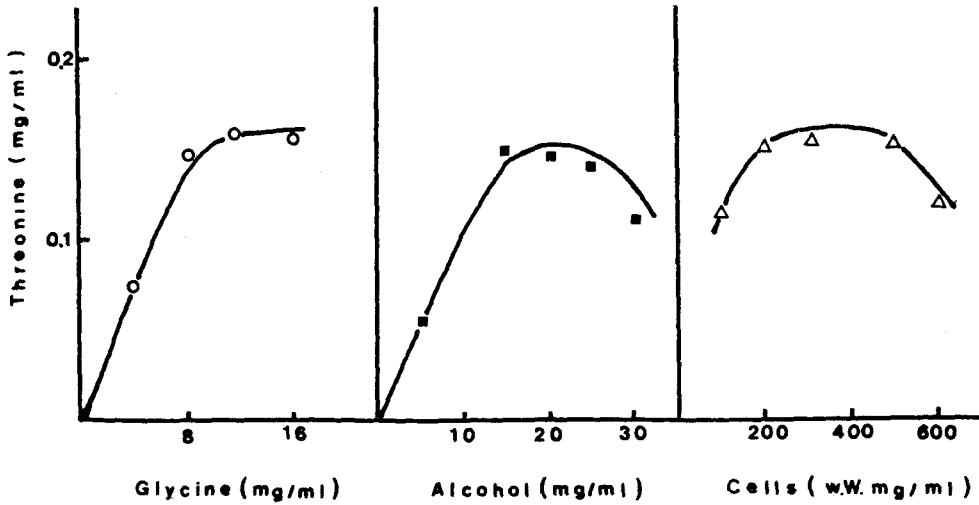


Fig. 2—Effect of glycine, alcohol, and cell concentration on production of threonine by resting cells of *Methylobacterium* sp. Strain KJ 29.

배양학적 특성—본 균주는 초기의 배지의 pH가 6.0~8.5의 넓은 범위에서 자라나 최적 pH는 7.0이었으며 배양온도는 30°C에서 가장 잘 생육하였다. 20°C와 40°C에서도 생육하였으나 42°C에서는 생육하지 못하였다. 기질인 메탄올의 농도가 4% 이상에서는 생육이 저해되었고 0.5%에서 가장 잘 생육하였다.

에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있는 기질의 범위—메탄올 이외의 각종 유기물을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있는지 여부를 조사한 결과, 본 균주는 메탄올 이외에 ethanol, sodium glutamate, glycerol, fructose, sucrose, sodium citrate와 sodium acetate 등을 매우 잘 이용하여 성장하였고, glucose에서도 성장하였으며 n-butanol과 isopropyl alcohol에서는 성장이 느렸다. Sodium formate, sorbitol과 formaldehyde 등은 기질로서 이용하지 못하였으나 nutrient broth에서는 잘 성장하였다(Table I).

생화학적 특성—본 분리 균주는 catalase검정의 경우 높은 활성을 가졌으나 oxidase활성은 없었다. Methyl red나 Voges-proskauer, indole생산, H₂S생산능은 없었고 또한 gelatin, starch 등의 분해능도 없었다. Streptomycin(10 mcg)과 tetracycline(30 mcg)과 같은 단백질합성을 저해하는 항생제에 대해서는 성장이 저해되었으나 ampicillin(10 mcg)과 cephalothin(30 mcg)과 같은 세포벽 합성을 저해하는 항생제에 대해서는 저항성을 가지는 것으로 나타났다(Table I).

탄소원의 영향—본 균주는 methanol이외의 여러 탄소원에서 성장할 수 있었으나 methanol에서 자란 resting cell에서만 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산하는 것으로 나타났다(Table II).

질소원의 영향—0.4%로 첨가된 질소원중에서 무기 질소원은 성장과 resting cell을 이용한 threonine 생산에 적당한 것으로 나타났으나 유기 질소원은 성장에는 좋은 결과를 나타내었으나 glycine과 ethanol로부터 threonine생산은 하지 않는 것으로 나타났다(Table III).

Resting cell을 이용한 threonine생산의 반응조건—Threonine생산에 있어서 glycine의 최적농도는 (12~16)mg/ml였으며, ethanol의 최적농도는 (15~20)mg/ml였다. resting cell을 이용한 threonine생산의 최적 buffer와 pH는 Tris-HCl buffer와 pH 9.0이었다(Fig. 3).

Methanol의 농도에 따른 균의 성장과 resting cell을 이용한 threonine생산에 미치는 영향—Methanol의 농도에 따른 균의 성장과 resting cell을 이용한 threonine생산에 미치는 영향을 살펴보면 0.5%의 methanol에서 최적생장을 보였으며 threonine생산은 0.25%~0.5%의 methanol에서 최적이었다(Fig. 4).

시간에 따른 threonine생산—Resting cell을 이용한 threonine생산은 반응시간 12시간까지는 증가하였으나 그 이후는 별 변화가 없었다(Fig. 5).

Table I—Taxonomical Properties of *Methylobacterium* sp. Strain KJ29

Cultural characteristics	
Agar colonies; pink to red, entire smooth	
Liquefaction of gelatin: negative	
Morphological characteristics	
Shape and size of cell: rods(1.28~1.33×2.33~2.65 μm)	
Mobility: motile by means of peritrichous flagella	
Gram strain: negative	
Spores: not produced	
Physiological characteristics	
Oxidase test: negative	
Catalase test: positive	
Indole test: negative	
Methyl-red test: negative	
Voges-Prokauer test: negative	
Hydrolysis of starch: negative	
Urease test: negative	
H ₂ S Production: negative	
KCN test: positive	
Nitrate Reduction: negative	
Glucose(Gas, Acid): positive	
Maltose(Gas, Acid): positive	
Sucrose(Gas, Acid): positive	
Lactose(Gas, Acid): positive	
Temperature for growth: 20 to 40°C, optimum 30°C	
Carbon source for growth:	
good growth on methanol, ethanol, sodium glutamate,	
glycerol, fructose, sucrose, sodium citrate and sodium acetate;	
moderate growth on glucose;	
slow growth on n-butanol, and isopropyl alcohol;	
poor growth on isoamylalcohol;	
no growth on sodium formate, sorbitol and formaldehyde	

결 론

1. 토양에서 분리된 새로운 메탄을 자화세균은 *Methylobacterium* sp.로 확인되었다.
2. 분리된 균주는 단백질 합성을 억제하는 항생제에 대해서는 감수성을 나타내었으나, 세포벽 합성을 억제하는 항생제에 대해서는 저항성을 나타내었다.
3. 분리된 균주는 메탄을 이외의 여러 탄소원에서도 성장은 하였으나, 메탄을에서 자란 cell만이 glycine과

Table II—Effect of Carbon Compounds on Growth and Threonine Production of *Methylobacterium* sp. Strain KJ 29

Carbon Compounds	Cultivation time(day)	Growth*	Final pH	Threonine (mg/ml)
Methanol	4	1.10	5.9	0.15
Ethanol	3	1.19	4.3	0
Acetate(Na)	2	0.84	7.7	0
Glucose	3	0.67	2.8	0
Sorbitol	15	0	—	—
Citrate(Na)	2	0.96	9.1	0
Propanol	15	0	—	—

*: OD at 600 nm of cultured broth, —: not determined
Cultivation was carried out in medium on a reciprocal shaker. Carbon compounds were added at the concentration of 0.5%. Resting cell reaction for threonine was studied as described in the Materials and Methods.

Table III—Effect of Nitrogen Compounds on Growth and Threonine Production of *Methylobacterium* sp. Strain KJ 29

Nitrogen Compounds	Cultivation Time(day)	Growth*	Final pH	Threonine (mg/ml)
NH ₄ NO ₃	3	0.92	5.9	0.13
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	0.97	5.9	0.12
NH ₄ Cl	4	1.10	5.9	0
Urea	5	0.62	8.2	0
Beef-extract	1	0.70	7.5	0
Casamino acid	1	0.93	6.3	0
Corn steep liquor	1	0.93	5.5	0
Yeast-extract	1	1.00	7.8	0
Bacto-peptone	1	0.82	6.3	0

*: OD at 600 nm of cultured broth. Cultivation was carried out in medium on a reciprocal shaker. Nitrogen compounds were added at the concentration of 0.4%. Methanol was added as carbon source at the concentration of 0.5%. Threonine production was measured using resting cells as described in the Materials and Methods.

ethanol로부터 threonine을 생산하였다.

4. 분리된 균주는 무기질소원 이외의 유기 질소원에서도 성장은 하였으나, 무기질소원에서 자란 cell만이 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산하였다.

5. 분리된 균주의 resting cell을 이용한 threo-

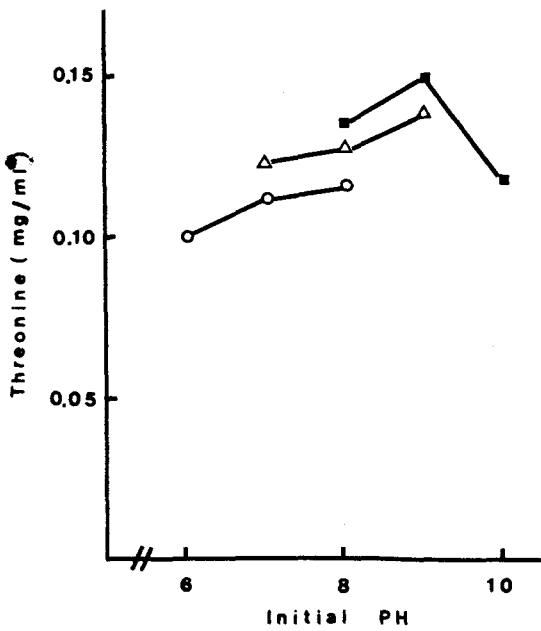
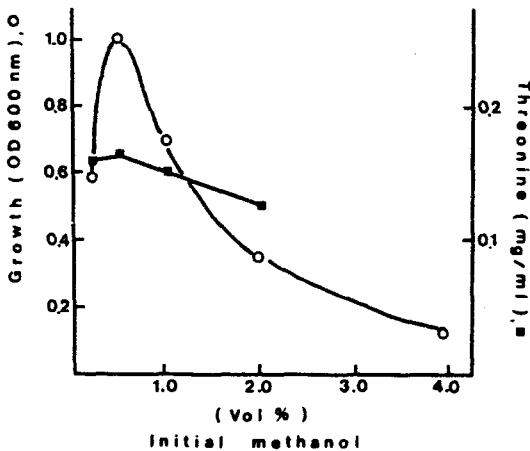


Fig. 3—Effect of initial pH on production of threonine by resting cells of *Methylobacterium* sp. strain KJ 29.

HEPES buffer(○—○), Tris-HCl buffer(■—■), Potassium phosphate buffer(△—△).



and on the production of threonine of *Methylobacterium* sp. strain KJ 29.

Fig. 4—Effect of initial concentration on the growth and threonine production of *Methylobacterium* sp. strain KJ 29. Threonine 생산의 반응조건은 glycine과 ethanol의 농도가 각각 (12~16)mg/ml와 (15~20)mg/ml일때 최적이었다. Cell양은 습중량 (200~500)mg/ml에서 거의 동일하게 threonine을 생산하였다.

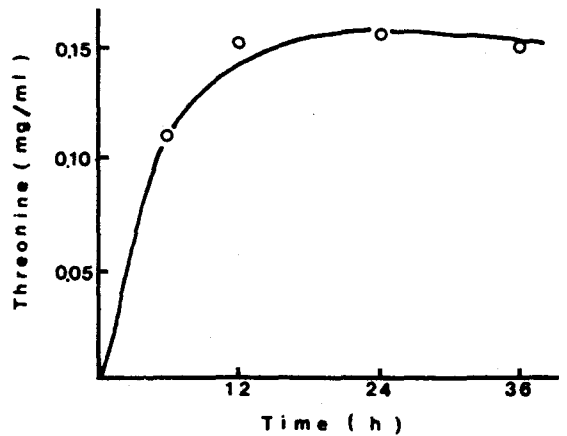


Fig. 5—Time course of production of threonine by resting cells of *Methylobacterium* sp. strain KJ 29.

6. 본 균주의 최적생장에 필요한 메탄올 농도는 0.5%(v/v)이었으며 threonine 생산은 (0.25~0.5)(v/v)에서 가장 높았다.

7. 본 균주의 resting cell을 이용한 threonine의 생산 양은 반응시간 12시간까지는 점차 증가하였으나 그 이후는 변화가 없었다.

문헌

- 1) Babel, W.: Methanol als substrat für biotechnische Prozesse. *Z. Chem.*, **2**, 49-56 (1987).
- 2) Hou, C.T.: Genetics of methylotrophs. In *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics*, ed. BocaRaton: CRC Press, p.180 (1984).
- 3) Dijkhuizen, L., Hansen, T.A. and Harder, W.: Methanol, a potential feedstock for biotechnological processes. *Trends Biotechnol.*, **3**, 262-267 (1985).
- 4) Drozd, J.W. and McCarty, P.W.: Mathematical model of microbial hydrocarbon oxidation. In *Microbial Growth on C₁ Compounds*, ed. H. Dalton pp. 360-369, London, Heyden, p.377 (1981).
- 5) Asthanza, H., Humphrey, A.E. and Moritz, V.: Growth of yeast on methanol as the sole carbon substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 923-929 (1971).
- 6) Cooney, C.L., Levine, D.W. and Snedecor, B.: Production of single cell protein from methanol. *Food Technol.*, **29**, 33-24 (1975).

- 7) Skinner, K.J.: Single cell protein moves toward market. *Chem. Eng. News* **53**, 24-26 (1975).
- 8) Young, V. and Scrimshaw, N.: Clinical studies on the nutritional value of SCP, p.567. In S, R, Tannenbaum and D.I.C. Wang(ed.), *Single Cell Protein II*, The MIT Press, Cambridge, Mass. (1975).
- 9) Anthony, C.: *The Biochemistry of Methylotrophs*. Academic Press, New York (1982).
- 10) Lidstrom, M.E. and Stirling, D.I.: Methylotrophs: Genetics and Commercial Applications. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 27-58 (1990).
- 11) Tani, Y.: Methylotrophs for biotechnology: Methanol as a raw material for fermentative production. *Biotechnol. Gent. Eng. Rev.*, **3**, 111-135 (1985).
- 12) Morinaga, Y. and Hirose, Y.: Production of metabolites by methylotrophs. In *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics* (Hou, C.T., ed.) pp. 107-118. CRC Press, Boca Raton, Florida (1984).
- 13) Reed, W.M. and Dugan, P.R.: Isolation and characterization of the facultative methylotroph *Mycobacterium* ID-Y. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1389-1395 (1987).
- 14) Auton, K.A. and Anthony, C.: The role of cytochromes and blue copper proteins in growth of an obligate methylotroph on methanol and methylamine. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1923-1931 (1989).
- 15) Urakami, T. and Komagata, K.: Characterization and identification of methanol utilizing *Hyphomicrobium* strains and a comparison with species of *Hyphomonas* and *Rhodomicrobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 521-542 (1987).
- 16) Day, C.J. and Anthony, C.: Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 in *Hydrocarbons and Methylotrophy, Method in Enzymology*(Lidstrom, M.E. ed.) Vol. 188. pp. 210~216 (1990).
- 17) Schimgeour, K.G. and Huennekens, F.M.: *Method in Enzymology*, vol.V. pp. 838-843.(Colowick, sp. and N.O. Kaplan ed., Academic Press INC). (1977).
- 18) Ulevitch, R.J. and Kallen, R.G.: Purification and characterization of pyridoxal 5'-phosphate dependent serine hydroxymethylase from lamb liver and its action upon β -phenyllserines. *Biochemistry*, **16**, 5342(1977).
- 19) Cowan, S.T. and K.J. Steel. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press(1965).