

## *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용한 메탄올의 생산

박성훈·추석열  
부산대학교 공과대학 화학공학과

### Production of Methanol by Resting Cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b

Sung Hoon Park and Suek Yull Choo

Department of Chemical Engineering  
College of Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### ABSTRACT

As an effort to develop an alternative transportation fuel, the production of methanol from methane gas was studied using the resting cells of an obligatory methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b. The reaction was carried out in high concentration phosphate buffer solutions with the flask-grown cells containing the exclusively cytoplasmic methane monooxygenase(sMMO) activity. The methanol accumulation rate was observed to be 79nmol/mg·min during the initial 4.5hr. Phosphate-dependent inhibition was found for both sMMO and methanol dehydrogenase(MDH) activities, and the inhibition constants were 185mM and 42mM, respectively. The inhibition mode was noncompetitive. Methanol was found to be very inhibitory to the sMMO activity and the inhibition constant(noncompetitive) was 21mM when propylene was used as substrate. The sMMO activity in the resting cells was declined very fast and the rate became very high during the methanol production. These results indicate that the use of *M. trichosporium* OB3b as a biocatalyst for the methanol production is heavily dependent on the stable maintenance of the whole-cell sMMO activity as well as the effective alleviation of product inhibition.

#### 서론

메탄올은 가솔린을 대신해서 자동차 연료로 사용할 수 있는 액체 청정연료이다. 또한 가솔린의 옥탄가 상승제로 쓰이는 methyl tertiarybutyl ether (MTBE)를 비롯한 여러 화학물질의 합성 전구체로도 용도가 크다(1). 메탄올의 제조원료는 메탄(천연가스, 바이오 가스), 석탄, 중유, 납사, shale oil 등이 될 수 있다(2). 이중 메탄은 값이 쌀 뿐 아니라 그 매장량도 전세계적으로  $70-230 \times 10^{12} \text{m}^3$ 으로 아

주 풍부하여 유용하게만 활용된다면 매우 중요한 자원이다(3, 4). 그러나 현재는 매년 상당부분이 석탄이나 원유 채취시 부산물로 취급되어 공기중으로 그냥 방출되거나 아무 의미없이 태워지고 있는 실정이다. 연료로 사용되는 메탄은 액화 천연가스(li-quefied natural gas, LNG) 형태로 부피를 줄인 후 생산지에서 소비지로 운반되는 것이 보통인데 이 방법은 비용이 많이 들 뿐 아니라 상당한 폭발위험을 내포하고 있다. 따라서 메탄을 메탄올로 전환하는 것은 연료의 취급면에서도 큰 도움이 된다(5).

현재 상업화된 메탄 전환공정은 수증기와 금속촉매를 사용하는 2단계 공정이다. 첫번째 단계에서는 메탄을 산소와 수증기 존재하에 개질시켜 일산화탄소와 수소의 혼합가스(syn-gas)로 만들고 두번째 단계에서는 아연-구리 촉매하에서 syn-gas를 메탄올로 전환시킨다(1, 2). 이 공정은 고온 고압이 요구되고 수율이 높지 않으며 또 적절한 제어가 매우 어렵다고 알려져 있다. 새로운 금속촉매를 개발하려는 노력이 계속되고 있으나 반응의 특성상 선택성, 안정성 등에 많은 문제가 있다. 한편 메탄을 기질로 하여 자라는 메탄 자화균을 이용하면 상온 상압에서 메탄의 직접 산화에 의한 메탄올의 생산이 가능하다(6). 메탄 자화균은 메탄 산화효소(methane monooxygenase, MMO)라는 효소복합체를 통해 메탄을 메탄올로 전환시키는데, 현재까지 100종 이상의 균주가 보고되고 있다. 이들 중 *Methylosinus trichosporium* OB3b나 *Methylococcus capsulatus* 등과 같은 몇몇의 obligatory methanotroph은 배양액 내의 구리이온 존재유무에 따라 MMO의 세포 내 위치가 바뀐다(7-10). 즉 구리이온이 존재할 때는 세포막에서만 MMO가 생성되고(통상 particulate MMO 혹은 pMMO 라고 불림), 반대로 구리가 완전히 고갈된 상태에서 배양되면 세포질 내에서만 생성된다(통상 soluble MMO 혹은 sMMO라 불림). 이 두가지 MMO는 활성 자리에 존재하는 금속이온이 다를 뿐 아니라 기질 특이성, 저해제의 종류, 촉매반응 특성 등에 있어서 현저한 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다(11-12).

메탄 자화균의 중심 대사과정은 Fig. 1에 개략적으로 나타낸 일련의 산화과정이다. 기질로 사용된 메탄은 메탄올, 포름알데히드, 개미산(formate) 등을 거쳐 최종적으로 물과 이산화탄소로 분해된다. 따라서, 메탄자화균을 이용하여 메탄올을 생산하고자 할 때 다음 두 가지 사항이 중요하다. 첫째, 메탄올은 균체의 최종 생성물이 아니고 중간 대사물이므로 메탄올이 계속 산화되는 것을 막는 일이다. 이는 메탄올을 기질로 사용하는 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)의 효소 활성을 제거함으로써 가능하다. 지금까지 보고된 바로는 cyclopropane이나 cyclopropanol, 혹은 고농도의 인산염이 효과적이던데 균체내 다른 효소들에 미치는 영향이나 저해 정도의 조절 용이도 등을 고려할 때 인산염이 보다 우수한 것으로 알려져 있다(6, 13-14). 두번째 중요한 것은 MMO에 지속적으로 NADH를 공급하는 일이다. 1분자의 메탄이 메탄올로 전환되려

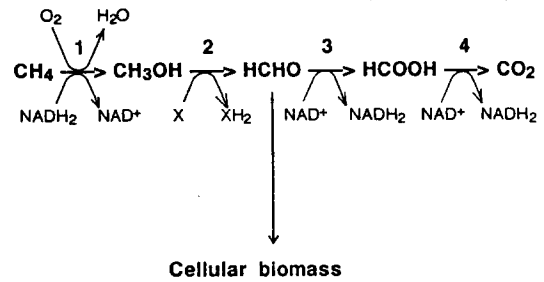


Fig. 1. Pathway of methane catabolism in methanotrophs. X is the quinone form of PQQ and  $XH_2$  is the quinol form. The reactions designated as 1-4 are carried out by the enzymes: 1, methane monooxygenase; 2, methanol dehydrogenase; 3, formaldehyde dehydrogenase; 4, formate dehydrogenase.

면 반드시 1분자의 NADH가 필요한데(Fig. 1) 균체 성장시의 정상 대사과정에서는 메탄 산화의 마지막 단계를 담당하는 개미산 탈수소 효소(formate dehydrogenase, FDH)가 이를 공급하나, 만일 MDH의 활성이 완전히 제거되어 메탄올 이후의 대사가 중단된다면 외부에서 반응액 속으로 개미산을 연속적으로 공급해 주어야 한다. 혹은 MDH의 활성을 부분적으로만 제거시켜 세포 내에서 메탄올 중 일부가 계속 개미산으로 전환되도록 할 수 있는데 이 경우 메탄 2분자로부터 1분자의 메탄올이 생성되므로 메탄을 생산의 최대 수율은 탄소의 몰수를 기준으로 할 때 50%가 된다.

메탄 자화균을 이용한 메탄올 생산의 시도는 최근 몇몇 논문에서 보고되고 있다. Mehta 등은 *M. trichosporium* NCIB11131을 이용, 세포 현탁액과 고정화 세포의 회분식 및 연속식 생산 공정에서 메탄올 합성의 기본적인 동력학을 검토하였다(14-16). 이들이 확립한 세포 현탁액의 최적조건에서 최대 메탄올 생성속도는  $6 \mu\text{mol}/\text{mg hr}$ 이었고, 인산염의 MDH 저해방식은 uncompetitive 및 가역적이었다. 또한 고정화세포를 이용할 경우 최대 메탄올 생성속도는  $267 \mu\text{mol}/\text{h}$ 였고 이 속도는 72시간 이상 유지될 수 있었다. 한편 Patras와 Tang은 facultative methanotroph인 *Methylobacterium organophilum*을 이용하였는데 메탄올 생성속도는 저해제의 농도에 매우 민감하고 온도나 pH 등의 환경요인에 크게 의존하였다(17). Shimoda 등은 *M. trichosporium*

OB3b를 cyclopropane으로 처리한 후 메탄, 에탄, 프로판 그리고 부탄으로부터 해당 알코올의 생산과정을 연구하였다(18).

위 연구들이 부분적으로 메탄을 합성에 있어서 메탄 자화군의 이용 가능성을 보여주었지만, 균체의 배양조건이나 MMO의 생성위치, 혹은 MMO 생성의 최적화, 메탄을 생성에 관련된 효소의 동력학적 거동 등을 구체적으로 제시하기에는 미흡함이 많다. 이에 본 연구에서는 *M. trichosporium* OB3b에 대해 최근 확립된 최적 배양조건에서 선택적으로 sMMO만을 갖는 균체를 배양하고, MMO와 MDH의 활성에 미치는 인산염, 메탄, 메탄올 등의 영향을 정량적으로 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

*M. trichosporium* OB3b는 미네소타대학 내 Gray Freshwater Biological Institute의 R. S. Hanson 교수로부터 제공받았다. 균체배양용 배지는 Higgins가 개발한 무기 질산염 최소배지를 약간 변화시켜 사용하였다(Table 1, ref. 10). 이때 pMMO가 생성되는 것을 방지하기 위해 구리는 첨가하지 않았다. 진탕 배양에는 300ml짜리 마개 삼각 플라스크를 사용하였는데, 분광광도계에서 세포농도를 직접 측정할 수 있도록 직경 11mm의 유리관을 부착하였다. 배양액의 부피는 20ml이었다. 메탄과 공기는 종균 접종 후 1:1의 부피비로 0.22  $\mu$ m 필터를 통해 주입하였는데 Cole-Parmer가 제조한 gas proportioner를 통해 각각의 유량을 조절하였다. 모든 준비가 완료된 플라스크는 분당 180회 회전운동을 하는 진탕 배양기(Model KMC-8480sf, Vision 과학, 서울)에 넣어 30°C에서 배양하였다.

### 분석방법

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., USA)로 구한 흡광도와 균체 건조중량을 비교하여 구하였다. 균체 내의 MMO 활성은 *M. trichosporium* OB3b의 성장 영양원인 메탄을 기질로 사용하여 메탄의 소모속도나 메탄올의 생성속도를 측정하여 결정할 수 있으나, 메탄의 소모속도는 실험오차가 과도하고 메탄올은 계속 포름알데히드 등으로 산화되므로 정확한 측정에 어려움이 있다. 따라서 MMO 활성을 정확하게 측정하기 위해서는 원래 기질인 메탄처럼 MMO에 의해 잘 산화되면서도

Table 1. Composition and concentration of stock solutions for higgins nitrate minimal salt medium.<sup>a</sup>

	g/l
1. 100 X Salt solution <sup>b</sup>	
NaNO <sub>3</sub>	85
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.7
2. 100 X Phosphate buffer solution <sup>b</sup>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	53
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	86
Adjust solution to pH 7.0	
3. 500 X Trace metals solution <sup>b</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.287
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.223
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.062
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.048
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.048
KI	0.083
1 ml of 1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per liter of trace metals	
4. 500 X Iron solution <sup>b</sup>	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11.2
5 ml of 1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 100ml of iron	

<sup>a</sup>Culture medium was made up as follows: Appropriate aliquots of concentrated solutions 1-3 were added to the desired volume of double distilled water and the combined diluted mixture was sterilized by passage through a 0.22  $\mu$ m membrane filter. Separate and filter sterile iron solution 4 was then added aseptically to this mixture. Higgins standard nitrate minimal medium contains Cu at a final concentration of 1.0  $\mu$ M.

<sup>b</sup>Each stock solution was stored at 4°C after sterilization, except for the phosphate buffer which was stored at room temperature.

더 이상 분해가 일어나지 않는 기질을 선택하는 것이 좋는데 본 실험에서는 propylene을 이용하여 propylene oxide의 생성속도를 측정하였다(20). Propylene oxide는 극성이므로 대부분 반응액 내에 존재하고 가스크로마토그래피로 쉽게 그 양이 측정된다. 메탄올의 생성속도는 메탄을 기질로 사용할 수 밖에 없는데 이때는 생성된 메탄올이 더 이상 산화되는 것을 방지하기 위해 고농도 인산용액을 사용하였다. 분석에 사용된 5ml 유리병과 내용물은 Fig. 2에 나타내었다. MDH의 활성은 메탄올의 분해속도

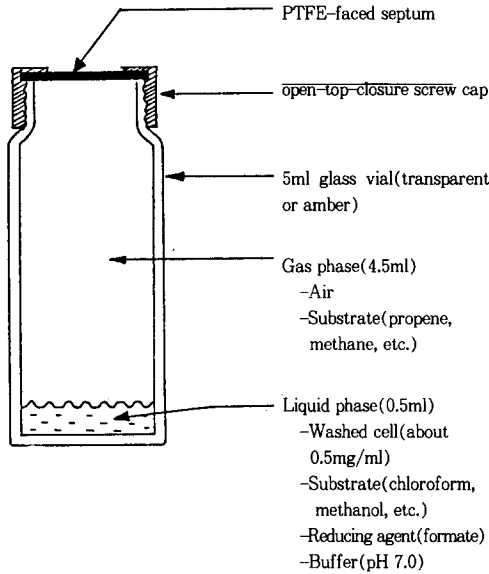


Fig. 2. 5ml glass vial used for the measurement of whole-cell enzymatic activities.

로 측정하였다. Fig. 2에 보여진 동일한 유리병이 사용되었고 특별한 경우를 제외하고는 반응액의 초기 메탄올 농도는  $0.1 \mu\text{l/ml}$ 이 되게 하였다.

균체 내 효소활성을 측정하기 위해 배양한 균체를 다음과 같이 처리하였다. 즉 에펜도르프형 미량 원심분리기 (Model HST-8, 한일기계, 인천)에서 3분간 원심분리하여 배양액을 제거한 후 5mM의  $\text{MgCl}_2$ 가 포함된 pH 7.0, 25mM의 3-N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)로 한 번 세척하였다. 그 후 분석용 유리병 속 세포농도가 약 0.5mg dry wt/ml이 되도록 넣어 주었다. MMO의 경우 메탄의 산화반응에 필요한 세포 내 환원력은 NADH에 의해 공급되는데 개미산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, FDH)가 개미산을  $\text{CO}_2$ 와  $\text{H}_2\text{O}$ 로 산화시킬 때  $\text{NAD}^+$ 를 환원시킬 수 있으므로 반응액 내에 개미산을 첨가함으로써 세포 내 환원력을 제고시킬 수 있다. 본 실험에서는 개미산이 첨가된 경우와 그렇지 않은 경우에 대해 각각 MMO활성을 조사하였다. 기질로 사용되는 propylene이나 메탄올은 다른 필요한 성분을 넣은 후 제일 나중에 첨가하였는데 항온조 속에서 진탕하기 전 반응이 시작되는 것을 방지하기 위해 분석용 유리병을 얼음통 속에 넣어  $0^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 모든 준비가 완료된 유리병은  $30^\circ\text{C}$  진탕수조 (Model KMC-1205 SWI, Vision과학, 서울)에서 분당 160회 왕복시키면서 3분 간격으로 2

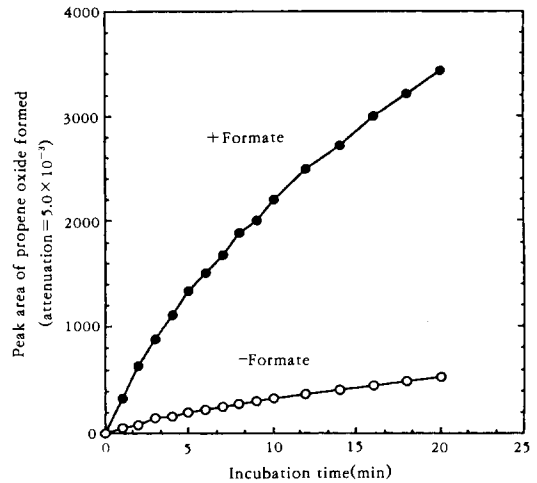


Fig. 3. Production of propene oxide with (●) and without (○) added formate. *M. trichosporium* OB3b cells were grown in copper-deficient medium, thus exhibited exclusively sMMO activity. Decreased slopes indicate the maximal enzymatic activity does not maintain even for the initial 10 min.

~3차례 분석하였다.

분석은 불꽃 이온검출기 (FID)가 장착된 가스 크로마토그래피 (Yanaco G80, Japan)에서 수행하였다. 사용된 관 (column)은 길이 6ft의 녹슬지 않는 강철관 (stainless steel)이고, 충전물질은 0.1% AT1000을 담지한 80/100mesh의 Graphac C 분말이었다 (Alltech Inc., USA). 가스 크로마토그래피 오븐과 검출기의 온도는 propylene oxide의 경우 각각  $85^\circ\text{C}$ 였고, 메탄올의 경우 각각  $110^\circ\text{C}$ 와  $150^\circ\text{C}$ 였다. 두 경우 모두 질소가 운반기체로 사용되었다.

Fig. 3은 진탕시간에 따른 propylene oxide의 생성을 보여 준다. 개미산은 앞서 언급한 대로 세포 내 환원력 (NADH)을 제고시키는데, 환원력이 충분할 때 MMO의 활성이 그렇지 못한 경우에 비해 약 4배 가량 더 큰 것을 알 수 있다. 또한 진탕시간의 증가에 따라 기질이 점차 감소하여 MMO의 활성이 떨어지므로 본 실험에서는 최대 속도를 측정하기 위해 10분 이내에 분석을 마쳤다.

클로로포름은 sMMO에만 선택적으로 반응하므로 균체 내의 MMO의 생성 위치를 판별하는데 쓰인다 (21). Propylene oxide의 경우와 동일한 column을 사용, 가스 크로마토그래피에서 분석하였다. 클로로포

름은 빛에 의해 쉽게 분해되므로 갈색 유리병을 사용하였고, 오븐의 온도는 120℃, 그리고 시료는 분석용 유리병 내의 기상에서 30 μl 취하여 분석하였다. 분해속도는 기상과 액상의 분배비를 고려하여 구하였다. 배양조건이나 분석과정에 대한 보다 자세한 사항은 앞서 발표된 논문에 수록되어 있다(10).

결과 및 고찰

온도 및 pH가 MMO 활성에 미치는 영향

*M. trichosporium* OB3b의 최적 성장조건은 대략 30℃, pH 7.0인데(10)MMO의 활성도 이 조건에서 최적인지 알아보기 위해 여러 pH 및 온도에서 propylene oxide의 생성속도를 비교하였다. Fig. 4는 whole-cell MMO 활성에 미치는 pH의 영향을 보여준다. 개미산 첨가시 pH 6.5~7.0 사이에서 완만한 최대값이 얻어지나 개미산이 없을 때는 pH가 6.0에서 7.0까지는 완만히 증가하다가 7.0 이상 8.5까지는 급격히 증가한다. Propylene을 기질로 하여 whole-cell의 MMO활성은 측정할 때 분석치에 영향을 주는 세포 내 인자는 MMO 자체의 활성, FDH 활성, NADH농도, O<sub>2</sub>의 농도 등 여러 가지인데 개미산 첨가시 pH 6.5~7.0에서의 최대값이 최적 성장조건과 대략 일치하는 것으로 MMO 활성이 이 범위에서 최대인 것을 의미한다. 반면 개미산 부재시 MMO활성은 pH가 증가할수록 증가하는데, 개미산 부재시 활성이 개미산 존재시 활성보다 낮은 것을 고려할 때, MMO 자체 활성의 증가보다는 NADH 공급량의 증가가 그 원인인 것으로 추정된다. 본 연구에서는 개미산 첨가 조건에서 메탄올 생산을 시도하였으므로 이후의 모든 분석은 pH 7에서 행하였다.

Fig. 5는 온도의 영향을 보여준다. 약 30~33℃에서 최대값을 보여주고 이 범위에서 멀어질수록 활성이 감소함을 알 수 있다. 개미산 부재시 MMO 활성도 역시 30~33℃에서 최대값을 보이나 온도의 변화에 대해 보다 완만하게 반응을 보인다.

Kinetics of methanol accumulation

*M. trichosporium* OB3b를 이용, 메탄올을 메탄올로 전환시킬 때 메탄올의 축적은 다음과 같은 물질수지식으로 표현된다.

$$(\text{rate of methanol accumulation}) = (\text{rate of methanol synthesis}) - (\text{rate of methanol degradation}) \quad (1)$$

이때 메탄올의 생성은 MMO에 의해 촉매되고 MMO의 활성은 기질인 메탄의 농도뿐 아니라 생성

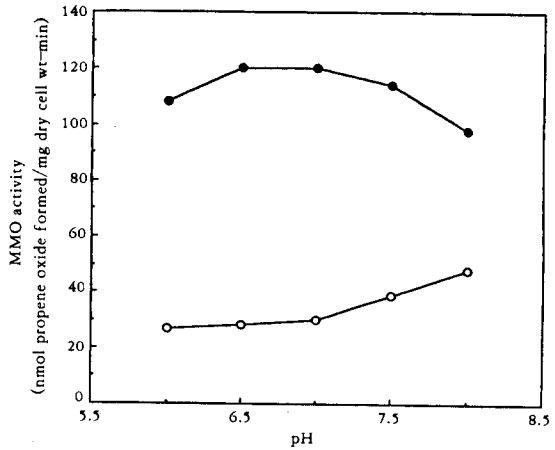


Fig. 4. Effect of pH on the whole-cell sMMO enzymatic activity, with (●) and without (○) added formate.

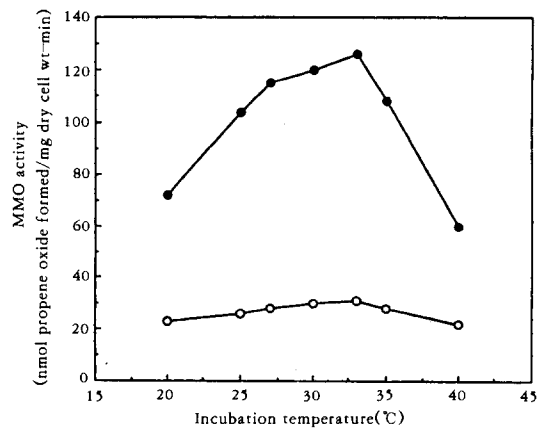


Fig. 5. Effect of incubation temperature on the whole-cell sMMO enzymatic activity, with (●) and without (○) added formate.

물인 메탄올, MDH 방해제로 넣어주는 인산의 농도 등에도 의존한다. 메탄올에의 의존성을 Michaelis-Menten식으로 가정하고, 메탄올 및 인산에 의한 방해기작을 각각 noncompetitive type으로 가정하면 메탄올 생성속도는 다음과 같다.

$$(\text{rate of methanol synthesis}) = V_{\text{max}} \frac{[\text{CH}_4]}{K_s + [\text{CH}_4]} \frac{1}{1 + [\text{MeOH}]/K_m} \frac{1}{1 + [\text{PO}]/K_p} \quad (2)$$

이때 [MeOH]와 [PO]는 각각 메탄올과 인산의

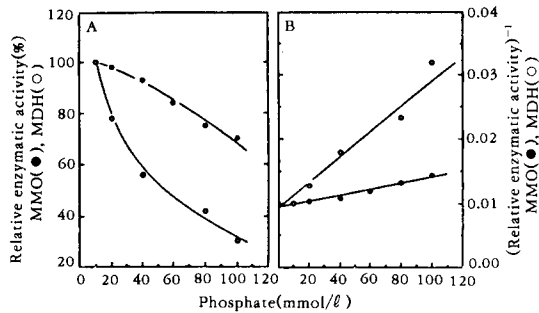


Fig. 6. Effect of phosphate concentration(Pi) on the whole-cell sMMO(●) and MDH(○) enzymatic activities. Relative enzymatic activities were defined as percent at each Pi of the corresponding values at Pi= 10mM. In panel B, the inverse enzymatic activities were plotted against Pi to determine inhibition constants.

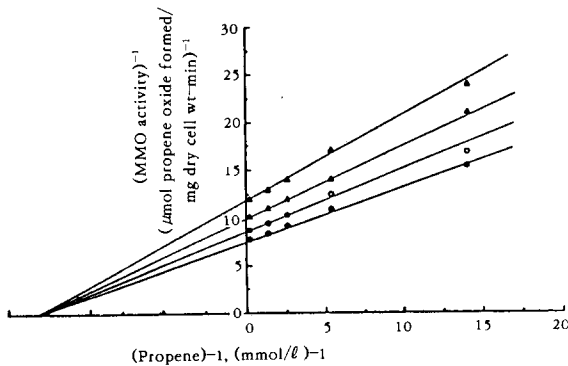


Fig. 7. Double reciprocal plot of inverse whole-cell MMO activity against inverse propene concentration at varying phosphate concentration. Symbols are: control(no phosphate, pH 7.0 MOPS buffer) (●), 20mM Pi(○), 60mM Pi(▲), and 100mM Pi(△).

농도이고  $K_s$ 는 기질인 메탄에 대한 포화정수, 그리고  $K_{im}$ 과  $K_{ip}$ 는 MMO의 활성에 대한 메탄올과 인산의 방해정수를 나타낸다.

한편 메탄올의 분해는 MDH에 의해 촉매되고 이 때 분해속도 역시 기질인 메탄올의 농도, 방해제인 인산의 농도에 의존한다. 메탄올의 분해산물인 포름알데히드에 의한 영향은 formaldehyde dehydro-

genase(FADH)의 크기에 따라 결정되는데 일반적으로 FADH의 활성이 매우 크므로(6) 포름알데히드의 축적은 무시할 수 있고 따라서 이의 영향도 매우 미미하다. 메탄올과 인산의 영향에 대해 (2)식과 같은 가정을 도입하면 식(3)이 얻어진다.

$$(\text{rate of methanol degradation}) = V'_{\max} \frac{[\text{MeOH}]}{K'_s + [\text{MeOH}]} \frac{1}{1 + [\text{PO}]/K'_{ip}} \quad (3)$$

식 (3)에서  $K'_s$ 은 포화정수 그리고  $K'_{ip}$ 는 MDH 활성에 대한 인산의 방해정수이다.

### MMO 및 MDH 활성에 미치는 인산의 영향

Fig. 6은 MMO 및 MDH 활성에 미치는 인산의 영향을 보여준다. MMO 활성은 propylene을 기질로 propylene oxide의 생성속도로 나타내었고, MDH 활성은 메탄올의 분해속도로 나타내었다. Panel A에서는 인산의 농도가 10mM일 때를 기준으로 다른 인산농도에서의 상대활성을 도시하였고, Panel B에서는 저해상수를 구하기 위해 Panel A의 결과를 재정리,  $1/V_{\max, app}$ 을 인산의 농도에 대해 도시하였다. 인산 농도가 10mM일 때 MMO 및 MDH의 절대 활성은 각각 130nmol/min mg cell 및 650nmol/min mg cell으로 MDH 활성이 약 5배 가량 컸다. Panel A에서 알 수 있는대로 MMO의 활성은 인산의 농도 증가에 따라 완만하게 감소하나 MDH의 활성은 매우 급격하게 감소한다. 일례로 인산의 농도가 100mM일 때 MMO의 상대활성은 약 70 정도이나 MDH의 활성은 약 20에 불과하다. Panel B는  $1/V_{\max, app}$ 이 인산의 농도에 대해 직선 관계를 가짐을 보여준다. 만일 인산의 저해기작이 noncompetitive model을 따른다면 기울기로부터 저해상수를 구할 수 있는데(아래에 설명한 Fig. 7 및 관련 기술 참고) MMO 및 MDH에 대해 각각 185mM 및 42.0mM이 얻어졌다. 이는 인산의 저해에 대해 MDH가 MMO보다 훨씬 민감함을 보여주는 정량적인 표현이 된다.

Fig. 6에서 보여준 인산의 방해기작을 좀 더 자세히 알아보기 위해 Fig. 7에서는 MMO 활성에 미치는 인산의 농도 및 propylene의 농도에 영향을 동시에 고찰하였다. MOPS 완충용액을 사용한 경우를 비교기준(control)으로 삼을 때 인산의 농도가 증가할수록 기울기가 증가하여 저해정도가 커짐을 보여준다. 실험치의 분산을 고려하더라도 X절편은 모두 한점에 모여져 저해기작은 noncompetitive임을 알 수 있었다. MDH에 대해서도 Fig. 7과 같은 실험을

반복하였는데 실험치의 오차가 좀 심하였지만 역시 인산의 저해기작은 MMO의 경우와 같은 noncompetitive였다(실험치는 나타내지 않았음).

지금까지 MMO의 활성을 propylene을 기질로 하여 측정하였으나 메탄을 합성 때는 메탄이 기질로 사용되므로 MMO의  $V_{max}$  및  $K_m$ 을 메탄에 대해 측정할 필요가 있다. 이때 기질인 메탄의 감소속도나 혹은 생성물인 메탄올의 생성속도를 측정하여야 하는데 다음과 같은 몇 가지 어려움이 따른다. 먼저 메탄올의 생성속도를 재는 경우를 보면, 무엇보다도 생성된 메탄올이 더 이상 산화되지 않도록 MDH 활성을 완전히 저해시켜야 하며 이때 사용된 저해제가 MMO 활성에는 영향을 주지 말아야 한다. 그러나 앞서 언급한 대로 MDH의 저해제가 대부분 MMO의 활성까지 저해하므로 MMO 활성의 참값은 실험치에 저해제의 영향이 고려된 간접적인 계산방법에 의존할 수밖에 없다. 한편 메탄의 감소속도를 측정하는 경우를 보면 기체 기질이므로 누출방지를 위한 기밀유지, 시료채취 등에 문제가 있고 propylene보다 용해속도 및 용해도가 떨어지므로 Fig. 2에서 보인 유리병을 이용할 때 기-액 평형의 가정에도 오차가 있을 수 있다. 메탄을 기질로 MMO 활성을 측정하는 또 다른 한 가지 방법은 1분자의 메탄이 메탄올로 전환될 때 1분자의 산소를 소모(Fig. 1 참고)하는 것에 착안, 산소전극으로 산소의 소모속도를 재는 것이다. 그러나 이때는 기체상의 산소로 인한 오차를 줄이기 위해 분석용기가 전부 액체로 가득차게 하고, 산소가 반응속도에 영향을 주지 않도록 분석시작 전 반응액을 산소로 포화시켜야 하며 산소나 메탄 등의 국부적인 농도 구배가 생기지 않도록 적절히 교반시켜 주어야 하는 등 번거로움이 따른다. 본 실험에서는 앞서 언급한 여러 문제가 있기는 하지만 Fig. 2에서 보인 유리병을 그대로 사용하기 위해 인산농도 100mM에서 메탄올의 생성속도를 측정하였다.

Fig. 8에서는 메탄농도가 MMO 활성에 미치는 영향을 Lineweaver-Burke plot으로 도시하였다. 이때 분석에 사용된 미생물의 농도가 낮고, 또 분석을 10분 이내에 마쳤기 때문에 생성되는 메탄올의 양은 매우 미미하였고 MDH에 의한 메탄올 분해는 무시할 수 있다고 가정하였다. 또 기상의 메탄은 액상의 메탄과 평형상태에 있고 Henry의 법칙을 따른다고 가정하였으며 MMO 활성은 Fig. 6에서의 결과를 바탕으로 인산에 의해 30% 저해 받는다고 가정하였다. Fig. 8에 보인 MMO 활성은 위의 가정들을 적용, 생성된 메탄을 양으로부터 저해받기 전의 MMO

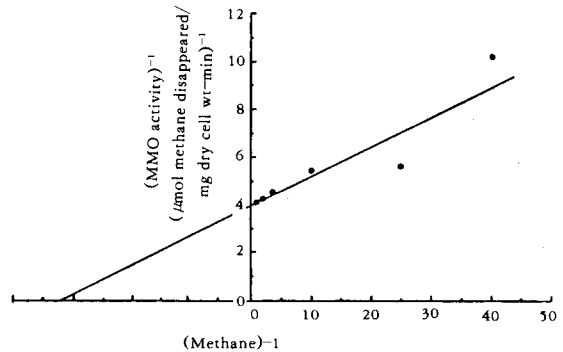


Fig. 8. Effect of methane concentration on the production of methanol. Inverse whole-cell MMO activities were plotted against inverse methane concentration. In order to prevent the degradation of methanol produced, phosphate concentration in the reaction mixture was elevated to 100mM. The value MMO activity was calculated with the assumption that the experimentally measured one is 70% of the true value following the inhibition by high Pi concentration.

활성을 계산한 값들이다. Fig. 7에서 보인 propylene의 경우와 비교하면 실험값들이 비교적 많이 산란하였다. 기율기와 절편으로부터  $V_{max}$ 와  $K_s$ 를 계산하였는데 각각 250nmol/min mg cell 및 30  $\mu$ M이었다.

#### MMO 활성에 미치는 메탄올의 영향

메탄올은 독성이 강한 물질로 미생물의 여러 효소에 저해작용을 한다. MMO도 예외가 아니어서 메탄올에 의해 산화력이 크게 저해 받는다. 메탄올에 의한 MMO 저해를 측정하기 위해 앞서 언급한 대로 propylene oxide의 생성속도, 메탄의 소모속도, 산소의 소모속도 등을 측정할 수 있다. 그러나 메탄올 생성속도의 경우 외부에서 반응액 중의 메탄올 농도를 변화시키기 위해 넣어주는 양이 너무 많기 때문에 MMO 활성측정에 이용하기는 곤란하다.

Fig. 9는 propylene을 기질로 메탄올이 MMO 활성에 미치는 영향을 조사한 것이다. 각 메탄올 농도에서 최대 MMO 활성을 측정하기 위해 반응액 내 propylene의 농도는 높게( $K_s$ 의 약 5배) 유지하였다. Panel A는 메탄올 농도가 0인 경우를 비교기준

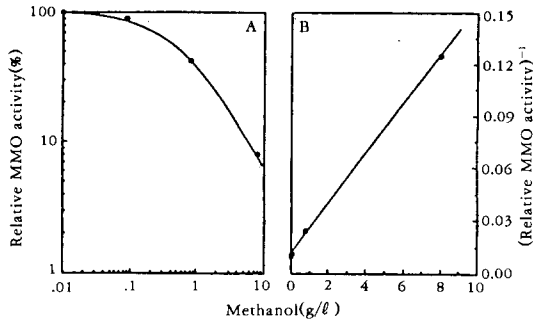


Fig. 9. Effect of methanol concentration (MeOH) on the whole-cell sMMO enzymatic activity. Relative activity was defined as percent at each MeOH of the value at MeOH = 0.0g/l. In panel B, inverse enzymatic was plotted against MeOH to determine inhibition constant.

(control)으로 삼아 메탄올 농도가 0.01g/l에서 10g/l까지 변화할 때의 MMO 상대활성을 log scale로 나타내었다. 메탄올에 의한 저해는 대략 0.1g/l부터 나타나기 시작하여 10g/l일 때 활성의 거의 90% 이상이 저해받음을 알 수 있다. 이러한 저해는 효모에 대한 에탄올의 저해현상과 비교할 수 있는데 효모의 경우 최대 에탄올 축적량이 약 12%인 것을 감안하면 메탄올의 저해현상이 훨씬 심각함을 알 수 있다. 이는 메탄올의 LD<sub>50</sub>이 약 1.3g/l으로 에탄올의 LD<sub>50</sub>(13.7g/kg)보다 훨씬 낮은 수준인 것과도 관련이 있다. 공업적인 생산측면에서 보면 원가에 영향을 주는 인자는 생성속도나 최대 축적량 외에도 사용원료의 가격, 생성물 분리 등이 있으므로 경제성 문제는 보다 종합적인 연구를 필요로 한다. 메탄올의 경우 원료인 메탄의 가격이 매우 저렴하고 끓는 점이 64.7°C로 에탄올(b. p. 78.5°C)보다 약 14°C 낮아 분리가 비교적 용이하다는 장점이 있다. Fig. 9의 panel B에서는  $1/V_{\max}$ 을 메탄올 농도에 대하여 도시하였다. 만일 메탄올 방해기작인 인산의 경우와 마찬가지로 noncompetitive 형태를 따른다면 기울기로부터 저해상수를 구할 수 있으며 그 값은 21mM이다.

#### MMO 활성의 안정성

앞서 Fig. 3에서 보인 대로 MMO 활성은 분석중에도 감소한다. 이 현상은 propylene oxide의 축적에 따른 생성물 저해의 결과일 수도 있고 혹은

MMO 활성의 소실에 의한 것일 수도 있다. 전자의 가능성은 propylene 외의 기질을 사용하고 또 이때의 생성물이 MMO 활성에 영향을 주지 않는 조건에서 반응액 내 propylene oxide의 농도를 변화시키면서 MMO 활성을 측정하면 밝힐 수 있다. 일례로 인산의 저해가 없는 조건에서 메탄올 기질로 산소의 소모속도를 측정하면 되나 Fig. 2에서 보인 유리병을 사용할 수 없고 여러 가지 번거로움이 따른다. Ethylene이나 butene도 MMO의 좋은 기질이기 하나 이들의 산화물인 epoxide가 propylene oxide 처럼 MMO 활성에 영향을 줄 수 있으므로 propylene oxide의 영향을 측정하는데는 적당치 못하다. 본 연구에서는 생성물이 계속 산화되어 더 이상 반응속도에 영향을 주지 않는 기질인 클로로포름을 사용하여 첫번째 가능성, 즉 propylene oxide의 저해를 조사하였다. Propylene oxide의 농도를 0~10mM 범위에서 변화시켰을 때 클로로포름의 분해 속도에는 전혀 변화가 없었다(결과는 나타내지 않았음). 이는 MMO 활성 측정치의 감소가 propylene oxide에 의한 저해보다는 MMO 자체 활성의 감소 때문임을 의미한다.

Fig. 10은 23°C에서 성장이 멈춰진 균체의 MMO 활성이 시간에 따라 어떻게 변화하는가를 보여준다. 앞서의 Fig. 3은 균체를 한 번 세척하여 MOPS 완충용액 속에서 진탕하면서 활성의 변화를 본 것이지만, Fig. 10은 배양액을 그대로 방치하면서 활성의 변화를 조사하였으므로 조건의 차이가 있다. 또 메탄올을 생산하는 경우 *M. trichosporium* 균체는 원래 기질인 메탄올을 계속 공급받게 되므로 균체내 MMO 활성의 안정성은 또 달라질 것으로 예측된다. 따라서 Fig. 10은 whole-cell 내의 MMO 활성이 얼마나 쉽게 소실되는가를 단지 한 가지 조건에서 보여주는 결과 이상으로 확대 해석해서는 곤란하다. Fig. 10에서 알 수 있는 대로 개미산이 존재하는 경우나 존재하지 않는 경우 모두 MMO 활성은 방치 24시간 이후에는 급격히 감소함을 알 수 있다. 개미산이 없는 경우는 보다 급격하게 감소하는데 이는 세포 내 환원력의 재생 능력이 MMO 자체 활성보다 더 쉽게 소실됨을 의미한다. 한편 A<sub>600</sub>은 거의 일정하고 현미경 상에서 세포수도 그다지 감소하지 않는 것으로 미루어 MMO 활성의 소실이 곧바로 cell lysis와 연계되는 것이 아님을 알 수 있다.

#### 메탄올 생성

Fig. 11은 300ml 마개 달린 플라스크에서 메탄올



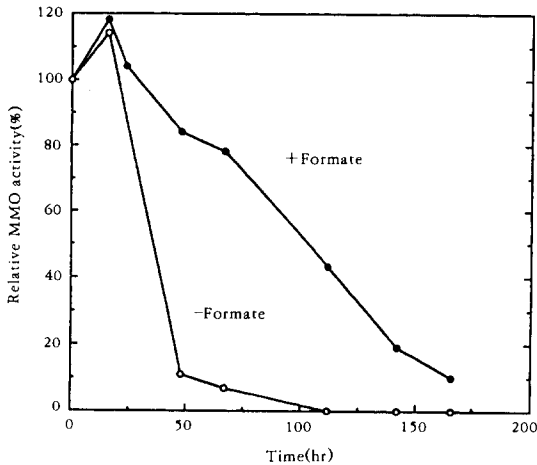


Fig. 10. Stability of the whole-cell sMMO enzymatic activity in spent medium with (●) and without (○) supplemented formate. During the experiment, cell suspension stood at room temperature (22~24°C) without methane.

의 생성량을 측정된 결과이다. 용액 중 인산의 농도는 91mM로 하였고 개미산은 20mM, 그리고 기상의 조성은 메탄 33%와 공기 67%였다. 균체는 별도 처리하지 않고 배양액에 인산의 조성만 변화시킨 후 그대로 사용하였다. 균체의 농도는 각각 0.060g/l 및 0.12g/l 이었다. 또한 배양액을 그대로 사용하였으므로 초기부터 약간의 메탄올(18mg/l)이 존재하였다.

그림에서 보여준 대로 메탄올의 생성속도는 점차 감소함을 알 수 있다. 초기 1시간 동안 메탄올의 생성속도는 약 120nmol/mg cell min 정도이지만 3시간에서 4시간 30분 사이 1시간 30분 동안은 초기값의 55%에 불과한 68nmol/mg cell min 정도이다. 그리고 총 진탕시간 동안의 평균속도는 약 79nmol/mg min였다. 균체의 배양이 끝났을 때 MMO의 활성이 메탄기질에 대해 약 400nmol/mg cell min 정도인 것을 고려하면 본 실험에서 얻어진 값은 매우 낮은 값으로 고농도 인산농도에서 진탕 중 MMO 활성이 급격히 감소했음을 알 수 있다. 생성물인 메탄올의 축적에 따른 MMO 활성저해도 한 가지 가능성이 될 수 있으나 Fig. 11의 최종 메탄올의 농도가 200mg/l 에도 못 미치는 낮은 농도인 것을 고려하면 이 가능성은 배제된다. 그러나 본 실험의 결과는

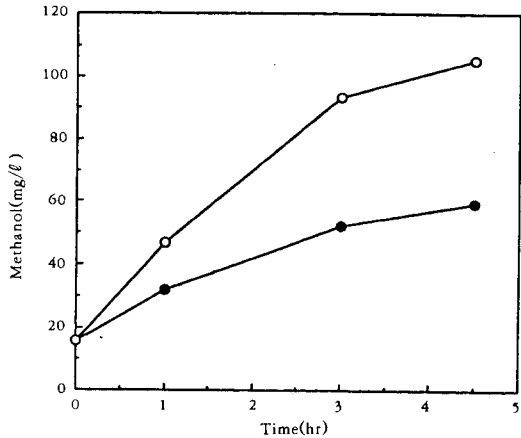


Fig. 11. Profile of methanol production in spent medium at two different cell densities, 0.060g/l (●) and 0.12g/l (○). The concentrations of phosphate and formate were 91mM and 20mM, and gas phase was adjusted to contain 33% methane and 67% air prior to incubation in 30°C incubating shaker.

최적이 아닌 단 한 가지 조건에서 메탄올의 생성을 측정된 것인 만큼 앞으로 인산의 농도, 온도, pH 등의 영향에 대해 좀 더 구체적인 실험이 요구된다. 특히 개미산을 사용하지 않는 조건에서 메탄올 생산을 시도하는 것이 공업적으로 가치가 있는데, 이 경우 MDH의 활성은 부분적으로만 차단시켜야 한다. 따라서 세포 내 전체적인 활성은 상당히 향상될 것으로 기대된다. 또 본 실험에서는 sMMO만을 갖는 균체를 사용하였는 바 pMMO의 경우에 대해서도 동일한 실험이 요구된다고 하겠다.

## 요 약

본 연구에서는 sMMO를 갖는 메탄 자화균인 *M. trichosporium* OB3b를 이용하여 메탄올 생산을 위한 기초실험을 수행하였다. 중요한 결과를 요약하면 다음과 같다(Table 2).

1. 세포 내 NADH의 재생을 위해 개미산을 첨가할 때 whole-cell의 sMMO 활성은 pH 7.0 및 30°C에서 최대값을 보이며 propylene을 기질로 할 경우 약 130nmol/mg cell min 정도이다.

2. 인산은 MMO와 MDH 활성을 모두 저해하나

**Table 2. Kinetic parameters related to the whole-cell enzymatic activities of soluble methane monooxygenase (sMMO) and methanol dehydrogenase (MDH) in *M. trichosporium* OB3b.**

enzyme	parameter(unit)	value(substrate or inhibitor)
sMMO	$V_{max}$ (nmol/mg dry wt-min)	130(propene) 270(methane)
	$K_s$ ( $\mu$ M)	71(propene) 30(methane)
	$K_m$ (mM)	21(methanol)
	$K_p$ (mM)	185(phosphate)
MDH	$V'_{max}$ (nmol/mg dry wt-min)	650(methanol)
	$K'_s$ (mM)	not determined
	$K'_p$ (mM)	42(phosphate)

MDH에 대한 저해 정도가 훨씬 크므로 메탄올 합성에 사용이 가능하다. Noncompetitive mode를 가정할 때 저해상수는 각각 185mM(MMO) 및 42mM(MDH)이었다.

3. 메탄올은 MMO 활성을 저해하며 noncompetitive mode를 가정할 때 propylene기질의 경우 21mM 이었다.

4. 균체 내 sMMO 활성은 성장이 멈춰진 상태에서 비교적 빠른 속도로 감소하며 고농도 인산용액에서 그 속도가 더 빨라진다.

5. 인산농도 91mM에서 메탄올은 메탄올로 산화되어 축적되며 4.5시간 동안 메탄올의 생성속도는 평균 79nmol/mg min이었다.

## 감 사

본 연구는 학술진흥재단 자유공모과제 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. D. Boutacoff(1989), *EPRJ Journal*, Oct. / Nov., **24**.
2. R. F. Probst and R. E. Hicks(1985), *Synthetic fuels*, McGraw Hill Book Co., New York.
3. O. Ghisalpa and F. Henzer(1982), *Experimentia*, **38**, 218.
4. DOE office of policy, planning, and analysis, (1988), *Jan.*, Department of Energy, U.S.A.
5. G. T. Austin(1984), *Shreve's chemical process*

*industries*, 5ed., McGraw Hill Book Co., New York.

6. C. Anthony(1982), *The Biochemistry of Methylophils*, Academic, New York.
7. S. H. Stanley, S. D. Prior and D. J. Dalton (1987), *Biotechnol. Lett.*, **5**(7), 487.
8. D. Scott, D. J. Best and I. J. Higgins (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**(11), 641.
9. K. J. Davis, A. Cornis and I. J. Higgins (1987), *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 291.
10. S. Park, M. L. Hanna, R. T. Taylor and M. W. Droegge (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 423.
11. H. Dalton, S. D. Prior, D. J. Leak and S. H. Stanley (1984), pp. 75~82 In *Microbial Growth on C1 Compounds* (R. L. Crawford and R. S. Hanson, ed.), American Society for Microbiology, Washington D. C.
12. O. Oldenhuis, R. M. J. M. Vink, D. B. Jessen and B. Witholt(1989), *App. Environ. Microbiol.*, **55**, 2819.
13. I. J. Higgins and J. R. Quayle(1970), *Biochem. J.*, **18**, 201.
14. P. K. Perdeep, S. Mishra and T. K. Ghose (1987), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 221.
15. P. K. Perdeep, S. Mishra and T. K. Ghose (1989), *Biotech. Appl. Biochem.*, **11**, 328.
16. P. K. Perdeep, S. Mishra and T. K. Ghose (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 551.
17. L. E. Patras and A. Tang(1988), *Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, P. 270.
18. M. Shimoda, S. Nemoto and I. Okura (1989), *Abstracts of International Chemical Congress of Pacific Basin Society*, Abstract No. Bios. 04-307.
19. A. Cornish, K. M. Nicholls, D. Scott, B. K. Hunter, W. J. Atton and I. J. Higgins (1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2565.
20. C. T. Hou, R. Patel, A. I. Laskin and N. Barnabe (1979), *App. Environ. Microbiol.*, **38** (1), 127.
21. R. T. Taylor, M. L. Hanna, S. Park and M. W. Droegge(1990), *Abstracts of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, P. 221.