

Methane 자화성 세균 *Methylosinus trichosporium* OB3b에 의한 propene으로부터 propylene oxide의 생산

정대석 · 백운화* · 방원기

고려대학교 농화학과, *두산연구소

초록 : Propene으로부터 propylene oxide를 생산하기 위하여, methane 자화성 세균인 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용하였다. 이 균주는 methane을 methanol로 전환시키는 methane monooxygenase를 가지고 있는데, 이 효소는 또한 propene을 propylene oxide로 전환시킬 수 있다. 이 균주의 휴지세포를 이용하여 propene으로부터 propylene oxide 생산의 최적조건을 검토하였다. 최적 pH는 7.0이었으며, 최적온도는 35°C이었다. 최종산물인 propylene oxide는 propylene oxide의 생산반응을 저해하지 않았으며, 더 이상 대사되지도 않았다. Methane 대사중간물질들(methanol, formaldehyde, formic acid)의 첨가는 propylene oxide의 생산을 3~4배 증가시켰으며, 특히 methanol 첨가의 경우에 가장 좋은 효과를 보였다. 상기의 최적조건하에서, 1시간 반응시 propylene oxide의 최대 생산량은 14.2 mM이었으며, 이 때 공급한 propene으로부터 propylene oxide로의 전환율은 약 8.0%이었다(1991년 12월 13일 접수, 1991년 12월 30일 수리).

탄소수 1~4개로 구성된 탄화수소류중, 특히 methane은 천연가스 상태로 양이 풍부하고 가격이 저렴하며 고순도로 많은 양을 쉽게 구할 수 있는 특성을 지니고 있는데, 이러한 methane을 기질로 이용하여 자랄 수 있는 미생물은 1906년에 Sohngen¹⁾에 의해 최초로 보고된 이래, 값싼 기질로부터 단세포 단백질을 생산할 목적으로 그 연구가 시작되었고, 이들 미생물의 산업적 이용에 대한 연구가 계속 수행되어 왔다. 특히 methane을 탄소원으로 이용하는 미생물에 대한 연구 결과, 이들은 공히 methane을 methanol로 산화한 뒤, formaldehyde와 formate를 거쳐 CO₂로 산화시키는 과정을 거쳐 에너지를 얻는 것으로 보고되었다.^{2,3)} 그 후, 여러 가지 생체촉매로서의 기능이 보고되었고,⁴⁻⁷⁾ 그 기능이 균체내 효소의 비기질 특이성 때문인 것으로 발표되었다.^{8,9)} 대표적인 반응은 alkane의 hydroxylation과 alkene의 epoxidation이며 그 중에서도 특히 propene epoxidation이 주목을 받고 있다.¹⁰⁾ 그 산물인 propylene oxide는 여러 homo- 및 hetero-polymer의 기본원료로 쓰이며, 그 외에도 안료, 살균제 등 다양한 화학제품의 기본원료로 사용되는 매우 중요한 물질이다. 이 반응은 methanotroph의 methane 산화대사의 첫 과정에 작용하는 methane monooxygenase에 의해 촉매되는 것인데,

Fig. 1에 나타난 바와 같이 조효소로 NADH를 필요로 한다

본 실험에서는 *Methylosinus trichosporium* OB3b (NRRL B-11,196)의 현탁액을 사용하여, propene으로부터 propylene oxide 생산반응의 최적조건을 검토하였으며, methane 산화대사 중간물질을 반응계에 첨가하여, 이에 따른 propylene oxide 생산성 증가를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 탄소원으로 C₁-화합물만을 이용하는 *Methylosinus trichosporium* OB3b(NRRL B-11, 196)로서 미국의 Agricultural Research Service Culture Collection으로부터 구입하여 사용하였다.

배지

배지는 Nitrate mineral salts(NMS)로써 배지의 조성은 Na₂HPO₄ 0.21g/l, NaH₂PO₄ 0.09g/l, NaNO₃ 2.0g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2g/l, KCl 0.04g/l, CaCl₂ 0.015g/l, FeSO₄·7H₂O 1.0 mg/l, CuSO₄·5H₂O 0.01 mg/l, H₃BO₃ 0.02 mg/l, MnSO₄·5H₂O, 0.02 mg/l, ZnSO₄ 0.14 mg/l, MoO₃ 0.02 mg/l이며,

이 NMS 배지에 탄소원으로 methane을 주입하여 사용하였다.¹¹⁾ 또한 균주의 보관에는 상기배지에 1.7% 한천이 포함된 평판 및 사면배지를 사용하였다.

배양방법

균주의 보관은 Jar안에 균을 접종한 NMS agar plate를 넣고 내부의 공기를 methane과 air가 부피비로 1 : 1 혼합되어 있는 기체로 치환한 후, 밀봉하여 30°C에서 배양하고 냉장보관하여 사용하였다.¹²⁾ 전 배양은 NMS agar plate 위에서 자란 균락으로부터 한 백금니를 취하여 10 ml의 NMS 배지를 넣은 100 ml 삼각플라스크 (narrow mouth, joint size 24/40)에 접종한 후, Suba-seal septum(Aldrich Chemical Co., joint size 24/40)으로 밀봉하고 내부의 공기를 상기의 동일한 혼합기체로 치환하였다. 이것을 30°C에서 36시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 본배양은 100 ml의 NMS배지를 함유하는 동일한 구경의 1 L 삼각 플라스크에 전배양액 10 ml를 접종한 후 전배양과 동일한 방법으로 시행하였다.

Propylene oxide 생산

균체배양액을 원심분리(5,000×g, 15 min.)하여 균체를 얻고, 5 mM MgCl₂를 함유하는 phosphate buffer(20 mM, pH 7)로 2회 세척하였고, 다시 균체를 동일한 buffer에 현탁시켜, 660 nm에서의 흡광도가 0.7이 되도록 조정하였다. 이 현탁액을 60 ml vial에 2.5 ml씩 넣고 butyl rubber cap으로 vial을 밀봉시킨 후, 내부의 공기를 propene과 순수산소가 부피비로 1 : 1 혼합되어 있는 기체로 치환한 다음, rotary shaking incubator를 이용하여 35°C에서 300 rpm으로 반응시켰다. 일정시간 반응이 끝난

반응액은 급격히 냉각시켜 균체를 제거하고 여과된 액을 취하여 분석용으로 사용하였다.

Propylene oxide의 정성 및 정량분석

Propylene oxide의 정성 및 정량분석은 Gas chromatography(Traco 520)를 사용하였다. Porapak Q 80/100을 충전한 6'×1/8" stainless steel column을 사용하였으며, carrier gas로 질소를 사용하였고 injector는 190°C, oven은 150°C로 하여, flame ionization detector(FID)로 분석하였다.^{13,14)}

결과 및 고찰

반응시간에 따른 propylene oxide의 생산

반응시간에 따른 propylene oxide의 생산량은 Fig. 2에 나타나 있다. 1시간 반응시에 최대 생산량의 약 90%인 0.48 mM이 생산되었고, 그 이후에는 완만히 증가하여 2시간 반응시에 최대에 이른 후 더 이상 증가하지 않았다. 이 결과로부터 propylene oxide 최대생산을 위한 반응시간은 2시간이었으나, 1시간 반응시켰을 경우와 비교하여 반응시간을 두배로 증가시켰을 때, propylene oxide의 생산성 증가는 10%에 불과하므로 반응시간은 1시간으로 하는 것이 효율적인 것으로 생각되어 반응시간을 1시간으로 결정하여 실험을 수행하였다.

Propylene oxide 생산에 미치는 pH의 영향

Propylene oxide 생산에 미치는 최적 pH를 검토하기 위하여 반응 pH를 5.0에서 9.0까지 변화시켰다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이, propylene oxide의 생산은 pH

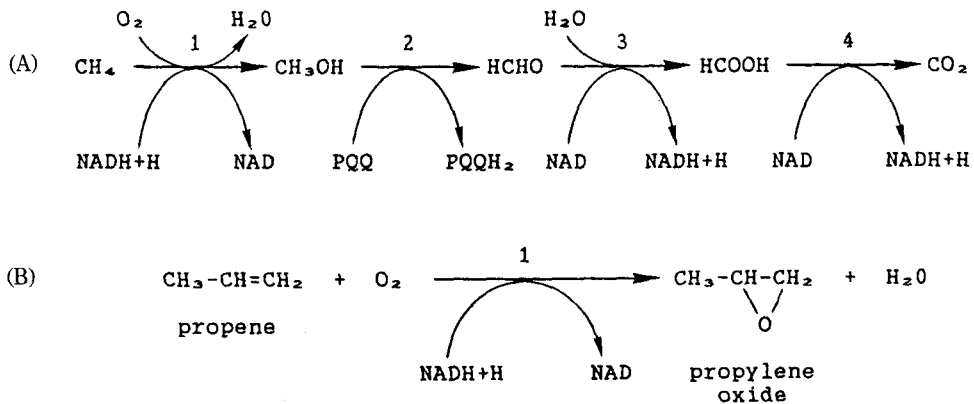


Fig. 1. Pathway of the methane oxidation (A), and the propene epoxidation (B) by methanotrophs. (1) Methane monooxygenase, (2) Methanol dehydrogenase, (3) Formaldehyde dehydrogenase, (4) Formate dehydrogenase

7.0일 때 0.53 mM로서 최적이었으며, pH 6.5이하 및 7.5 이상일 경우에는 생산량이 급격히 감소하여 pH 변화에 민감한 경향을 보였다. 이와같은 결과는 Hou 등¹²⁾이 보고한 최적 pH보다는 좁은 범위였으나, Tonge 등¹⁵⁾이 보고한 pH에 매우 민감하다는 결과와는 일치하는 것이었다. 이때 pH 5와 6의 반응액은 20 mM acetate buffer를 사용하였으며, pH 6.5~7.5의 반응액은 20 mM phosphate buffer pH 8과 9의 반응액은 20 mM Tris-HCl buffer를 사용하였다.

Propylene oxide 생산에 미치는 온도의 영향

1) 반응온도의 영향

Propylene oxide 생산에 미치는 반응온도의 영향을 조사하기 위하여 반응온도를 25°C에서 45°C까지 변화시켜 생산량을 검토한 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 35°C에서 0.54 mM로서 최대 생산량이었다.

2) 온도에 따른 propylene oxide의 생산 안정성

온도에 따른 propylene oxide의 생산 안정성을 검토하기 위하여 균체 현탁액을 각 온도에서 7시간까지 시간별로 예비 열처리한 후, 35°C에서 1시간 반응시켜 생성된 propylene oxide를 측정하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이, 상기의 최적반응온도인 35°C에서 7시간 전처리한 결과 약 70%의 생산활성이 유지되었으나, 이 이상의 온도에서는 생산 안정성이 급격히 감소하여 열에 불안정한 결과를 보였다. 이 결과는 Stirling 등⁸⁾이 수

행한 온도에 따른 저장 안정성 실험 결과와 유사한 것이었다.

최종산물에 의한 propylene oxide의 생산저해

반응중에 생성된 최종산물이 지속적인 생산반응을 저해하는지의 여부를 살펴보기 위해, 반응전에 미리 반응액에 propylene oxide를 농도별로 첨가하여 1시간 반응시킨 후, 생성된 propylene oxide의 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6에서와 같이 첨가해 준 propylene oxide의 양에 관계없이 생산량이 일정하여, 최종산물에 의한 propylene oxide의 생산저해는 관찰되지 않았다.

생산된 propylene oxide의 효소적 분해 및 2차적 전환

생성된 propylene oxide의 효소적 분해 및 2차적 전환을 살펴보기 위해, 반응혼합액에 propylene oxide가 0.4 mM이 되도록 미리 첨가해 준 후, 반응기질인 propene이 공급되지 않은 상태에서 10시간까지 반응시키면서 시간에 따른 propylene oxide의 양적변화를 조사하였으며, 이때 비효소적 분해유무를 확인하기 위해 대조구는 열처리하여 사멸시킨 균체를 사용하였다. Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응혼합물내에 미리 첨가해준 propylene oxide는 양적변화가 없어 반응액 중에 생성된 propylene oxide의 효소적 또는 비효소적 분해 혹은 2차적 전환은 관찰되지 않았다. 이와같은 결과는 Hou 등¹²⁾의 보고와 일치하는 것이었다.

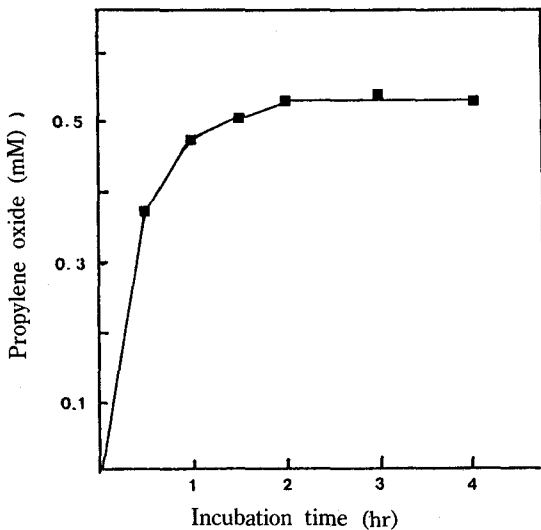


Fig. 2. Time course of propylene oxide production by resting cell suspension of *Methylosinus trichosporium* OB3b.

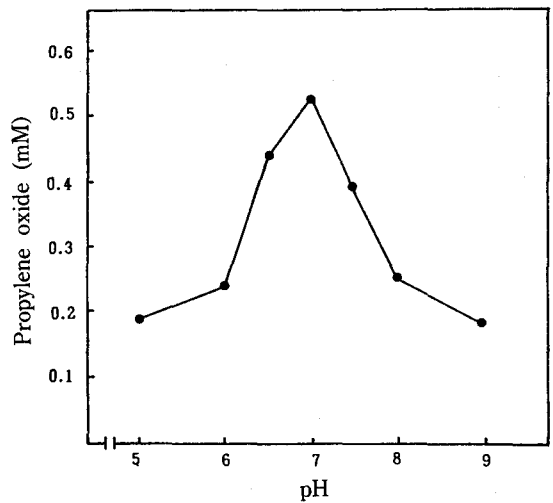


Fig. 3. Effect of pH on the epoxidation of propene by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b.

Propylene oxide 생산에 미치는 methane 대사 중간 물질의 첨가효과

본 실험반응에 필수적으로 요구되는 조효소 NADH를 반응계에 인위적으로 공급함에 따른 생산효과를 살펴 보았다. 본 실험의 propylene oxide 생산반응에 사용한

균체는 성장을 위한 영양원이 전혀 없는 반응혼합액 중에 존재하므로 propylene oxide 생산에 소모되는 NADH를 재생시킬 능력이 없기 때문에 NADH를 반응계에 생성하기 위하여, Fig. 1에 나타난 바와 같이 methane 대사 중간물질인 methanol, formaldehyde, formic acid를 반응

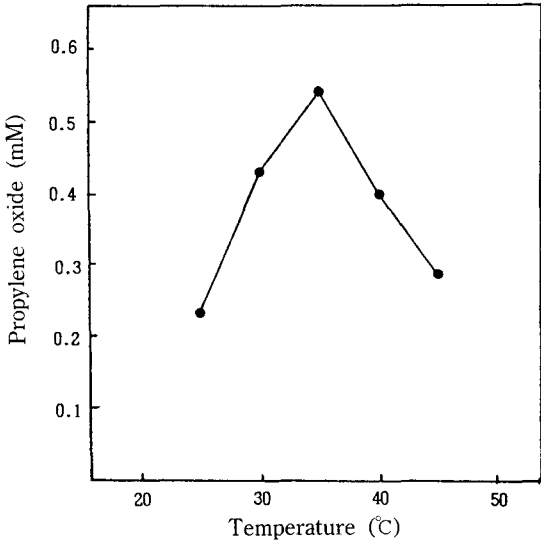


Fig. 4. Effect of temperature on the epoxidation of propene by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b.

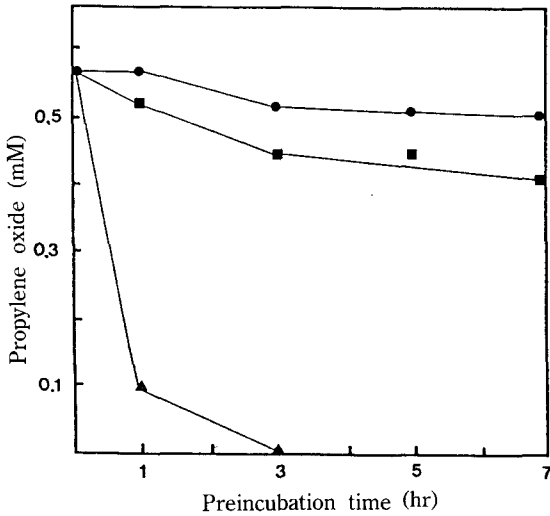


Fig. 5. Temperature stability of resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b for the production of propylene oxide. Propylene oxide was estimated after 1 hour of incubation at 35°C.
●—● : 25°C, ■—■ : 35°C, ▲—▲ : 45°C

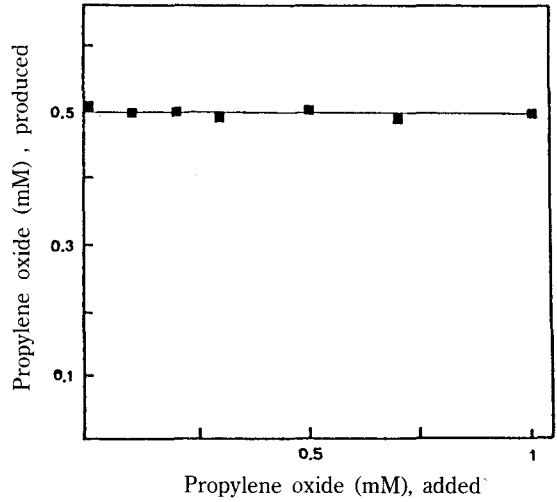


Fig. 6. Inhibition of propylene oxide on the epoxidation of propene by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b. Propylene oxide was added to reaction mixture before incubation.

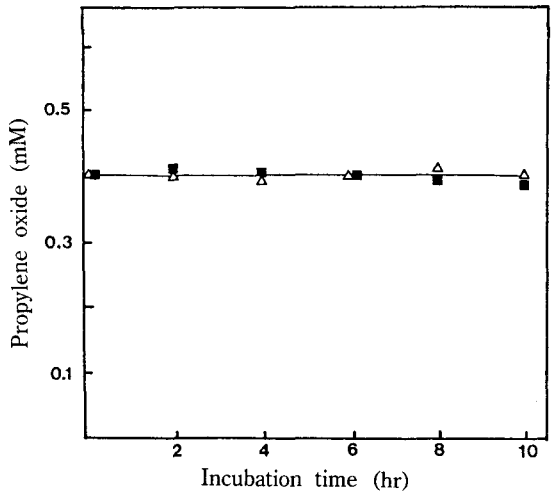


Fig. 7. Degradation of propylene oxide by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b. A 0.4 mM of propylene oxide was added to each reaction mixture before incubation. Propene was not supplied.
■—■ : Viable cell suspension, △—△ : Heat-killed cell suspension.

액 중에 첨가하여 생성되는 NADH가 propylene oxide 생산에 미치는 효과를 살펴보았다.

Table 1에 나타난 바와 같이 methanol의 경우에는 6 mM의 methanol을 첨가한 반응에서 최초 1시간 만에

Table 1. Stimulation of epoxidation of propene in whole cell suspension of *M. trichosporium* OB3b by methane metabolite

Metabolite added	Propylene oxide produced (mM)			
	1 hr.	2 hr.	4 hr.	
Control	0.4	0.5	0.5	
CH ₃ OH	2 mM	1.1	1.2	1.2
	4 mM	1.5	1.6	1.8
	6 mM	1.7	1.8	1.8
	8 mM	1.5	1.8	1.9
	10 mM	1.3	1.6	1.9
HCHO	1 mM	0.9	0.9	1.0
	4 mM	1.5	1.7	1.7
	7 mM	0.7	1.3	1.6
10 mM	0.6	0.7	1.4	
HCOOH	4 mM	1.4	1.5	1.4
	8 mM	1.7	1.7	1.8
	12 mM	0.6	0.9	1.2

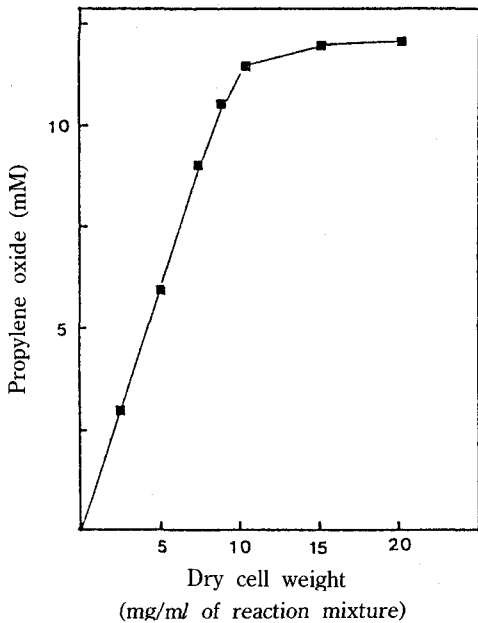


Fig. 8. Effect of cell concentration on the epoxidation of propene by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b.

propylene oxide가 1.73 mM 생산되어 최대생산량을 나타냈으며, 이는 대조구에 비해 약 4배에 이르는 양이었다. 또한 반응시간이 1시간 이후의 propylene oxide의 생산량은 완만한 증가를 보였다. Formaldehyde의 경우에는 4 mM을 첨가했을 때 생산된 propylene oxide의 양은 1.5 mM로서 최대량이었으며, 대조구의 약 3배에 이르는 양이었다.

Formic acid의 경우에는 8 mM을 첨가했을 때 propylene oxide가 1.68 mM 생산되어 최대생산량을 나타냈으며, 이는 6 mM의 methanol을 첨가했을 때와 유사한 생산량을 보여 대조구의 약 4배에 이르는 양이었다.

상기 실험결과로부터 methanol을 6 mM 첨가한 경우에 propylene oxide의 생산효율이 가장 좋았으며, 1시간 반응시 생성된 propylene oxide의 양은 반응에 사용된 건조균체량 1 mg당 4.7 μmole로서, Hou 등¹²⁾의 생산량인 1.8 μmole보다 2.6배 증가된 양이었다.

균체농도에 따른 propylene oxide의 생산

반응액중에 현탁되어 있는 균체의 농도에 따른 propylene oxide의 생산을 검토하기 위하여, 균체의 농도를 건조균체량으로 1.5 mg/ml부터 20 mg/ml까지 현탁시킨 후 35°C에서 반응시켰다. Fig. 8에 나타난 바와 같이, 8 mg/ml의 농도까지는 propylene oxide의 생산량이 균체

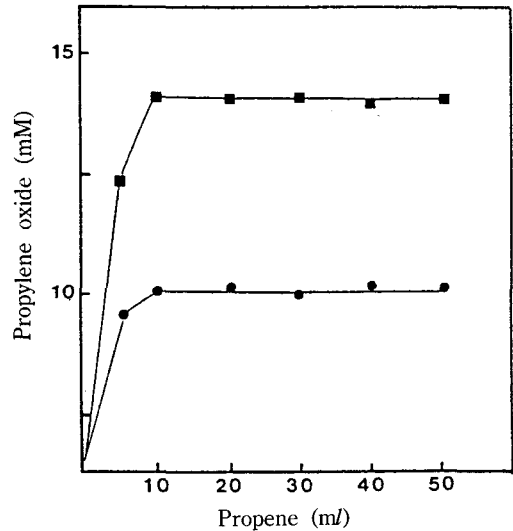


Fig. 9. Effect of propene partial pressure and addition of methanol on the epoxidation of propene by resting cell suspension of *M. trichosporium* OB3b. ●—● : 0 mM of methanol, ■—■ : 6 mM of methanol

농도에 직선적으로 비례하였으나, 이후에는 완만한 증가를 보였으며 20 mg/ml 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다.

반응기질인 propene의 기체분압이 propylene oxide 생산에 미치는 영향

반응기질인 propene의 기체분압이 propylene oxide 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 반응액의 균체농도를 8 mg/ml로 조정한 후 propene의 양을 변화시켜 반응 vial에 주입하였다. 이때 산소도 propene과 같은 양으로 주입하였고 질소를 사용하여 시료간의 내부 총압력을 일정하게 유지시켰다. Fig. 9에 나타난 바와 같이, propene을 반응용기 내부용량의 약 17%에 해당하는 10 ml를 주입하였을 때 최대생산량을 나타냈으며, 그 이상의 농도에서는 propylene oxide의 생산을 촉진하지도

저해하지도 않았다. 이 결과는 Hou 등¹²⁾의 실험결과와 유사하였다.

한편 6 mM의 methanol을 첨가했을 경우, propylene oxide 생산에 미치는 반응기질의 영향은 Fig. 9에서 볼 수 있는 바와 같이, methanol 첨가에 따른 propylene oxide의 생산증가는 약 1.4배였으나, 반응기질의 양에 따른 효과는 methanol을 첨가하지 않은 경우와 동일한 결과를 보였다.

상기의 조건에서 휴지세포를 이용한 propylene oxide의 생산에 있어서, propylene oxide의 최대생산에 위한 균체농도는 건조 균체량 8 mg/ml이었으며, 반응기질인 propene의 양은 반응용기 내부용량의 약 17%인 10 ml이었다. 상기의 최적조건에서 propylene oxide의 최대생산량은 14.2 mM이었으며, 이때 propene으로부터 propylene oxide로의 전환율은 약 8%이었다.

참 고 문 헌

1. Sohngen, N. L. : Zentralbl. Bacteriol., Parasitenk., Abt. II, 15 : 513(1906)
2. Krug, E. L. R., Lim, H. C. and Tsao, G. T. : Annual reports on fermentation process, Vol. 3, p. 141, Academic press, U.S.A.(1979)
3. Tonge, G. M., Harrison, D. E. F., Knowles, C. J. and Higgins, I. J. : FEBS Letters, 58 : 293(1975)
4. Leadbetter, E. R. and Foster, J. W. : Arch. Mikrobiol., 35 : 92(1960)
5. Van der Linden, A. C. : Biochim. Biophys. Acta, 77 : 157(1963)
6. Hou, C. T., Patel, R. N., Laskin, A. I. and Barnabe, N. : FEMS Microbiol. Lett., 9 : 267(1980)
7. Dalton, H. : Adv. Appl. Microbiol., 26 : 71(1980)
8. Stirling, D. J. and Dalton, H. : Eur. J. Biochem., 96 : 205(1979)
9. Higgins, I. J., Best, D. J. and Hammond, R. C. : Nature, 286 : 561(1980)
10. Hou, C. T. : Enzyme dynamics and regulation, p. 261 Springer-Verlag, U.S.A.(1988)
11. Hou, C. T., Laskin, A. I. and Patel, R. : European patent, 098, 138(1984)
12. Hou, C. T., Patel, R., Laskin, A. I. and Barnabe, N. : Appl. Environ. Microbiol., 38 : 127(1979)
13. Miyawaki, O., Wingard, Jr. L. B., Brackin, J. S. and Silver, R. S. : Biotechnology and Bioengineering, 28 : 343(1986)
14. Furuhashi, K., Taoka, A., Uchda, S., Karube, I. and Suzuki, S. : Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12 : 39(1981)
15. Tonge, G. M., Harrison, D. E. F. and Higgins, I. J. : Biochem. J., 161 : 333(1977)

Production of propylene oxide from propene by a methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b

Dae-Seok Chung, Un-Hwa Peck* and Wong-Gi Bang(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea, *Doosan Research Laboratory, Seoul 150-020, Korea)

Abstract : Whole cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b, the obligate methylotroph, were used to produce propylene oxide from propene. This strain has methane monooxygenase, which catalyzes the conversion methane to methanol and can catalyze also the conversion propene to propylene oxide. Optimal condition for the production of propylene oxide was investigated in resting-whole cell system. The optimal pH and temperature was 7.0 and 35°C respectively. The end product, propylene oxide, didn't inhibit the production of propylene oxide and was not further metabolized in reaction mixture. The addition of methane metabolites (methanol, formaldehyde and formic acid) to the reaction mixture stimulated formation of propylene oxide by 3~4 times, and methanol was the most effective especially. Under the optimal conditions, the 14.2 mM of propylene oxide was produced after incubation of 60 min. and the conversion ratio of propene to propylene oxide was approximately 8%.