

Bioconversion of methane to methanol using *Methylosinus trichosporium* OB3b in the repeated batch reaction system

이상귀¹, 김희곤¹, 김진권¹, 이중현², 김시욱^{1,3}

¹조선대학교 생물신소재학과, ²조선대학교 화학공학부, ³조선대학교 환경공학부
전화 (062) 230-6649, FAX (062) 225-6040

Abstract

Type strain, *Methylosinus trichosporium* OB3b, was used to convert methane to methanol. To prevent further oxidation of methanol, NaCl and EDTA were used as inhibitors of methanol dehydrogenase. The reaction temperature was 25°C, and the concentrations of cell and sodium formate added to the reaction mixture were 0.6 mg dry cell wt/ml and 20 mM, respectively. During 12hr reaction, 8 mM methanol was accumulated in the reaction mixture. In this reaction K_m and V_{max} values were found to be 532.6 mM and 1.749 mmol/hr, respectively, and the conversion rate was approximately 37%. To increase the concentration of methanol in the medium, a repeated batch reaction was carried out. In this process, methane was injected every eight hours, and the produced methanol concentration was 18 mM.

서 론

Methylosinus trichosporium OB3b는 메탄을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 성장하는 세균으로 methane monooxygenase (MMO)에 의해 메탄을 메탄올로 산화시킨다. 생성물인 메탄올은 methanol dehydrogenase (MDH)에 의해 포름알데히드로 산화되는데 메탄올을 축적하기 위해서는 이 산화과정을 막아야한다. 즉, MDH의 활성을 저해시킴으로써 세포내에서 생합성된 메탄올이 세포외로 용출되도록 하여야 한다. 본 연구에서는 MDH의 활성을 저해하기 위한 저해제로 sodium chloride (NaCl)와 EDTA를 이용하여 반복 회분식 반응에서 최대의 메탄올을 생산하기 위한 최적 반응조건 및 메탄에서 메탄올로의 전환률을 산출하였다.

실험재료 및 방법

균체배양용 배지는 Higgins의 무기질산염 최소배지를 변형하여 이용하였다[1]. 이때

particulate methane monooxygenase (pMMO)가 많이 생성될 수 있도록 배지 내 구리의 농도를 5 μ M로 유지하였다. 배양시스템은 강제순환확산방식을 이용하였으며 메탄과 공기는 gas regulator를 이용하여 각 gas의 유량을 조절하여 메탄과 air를 1 : 1의 부피 비율로 0.45 μ m의 air filter를 통과시켜 주입하였다. 균체의 배양은 30 $^{\circ}$ C, pH 7.0, 250 rpm의 조건에서 배양하였다.

M. trichosporium OB3b의 pMMO활성은 propylene이 propylene oxide로 전환되는속도로 계산하였다[3]. 분석은 불꽃 이온검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피로 수행하였다. 사용된 column은 stainless steel (3 mm \times 4 m)이었으며, 충전제로는 Sorbitol Gasport 25 % 60/80를 사용하였다. MDH활성은 cytochrome c assay방법에 의해서 활성을 측정하였다.

M. trichosporium OB3b에 의한 메탄올 생성 실험에서는 12.9 mM phosphate buffer (pH 7.0) 100 ml에 sodium formate, sodium chloride, 그리고 EDTA를 각각 다르게 처리한 후 gas regulator를 이용하여 메탄올을 주입하고 생성되는 메탄올의 양을 측정하였다. 생성된 메탄올은 불꽃 이온검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피에서 수행하였다.

실험결과 및 고찰

1. 메탄올 생합성 최적 조건 탐색

M. trichosporium OB3b에 의한 최적 메탄올 축적 조건으로는 세포농도, 반응온도, sodium formate 농도, 저해제의 농도 등이 중요하다. 본 실험에서는 MDH활성 저해제로서 세포액에 NaCl 100 mM과 EDTA 1 mM를 처리하였다.

M. trichosporium OB3b의 세포농도에 의한 메탄올 생성 실험에서 최적 세포농도는 0.6 mg dry cell/ml일 때였으며, 이 조건에서 7.46 mM의 메탄올을 생성하였다 (Fig. 1A). 최적 반응 온도는 25 $^{\circ}$ C일 때 7.51 mM의 메탄올을 생성하였으며 (Fig. 1B), sodium formate 농도가 20 mM일 때 7.38 mM의 메탄올을 생성하였다 (Fig. 1C).

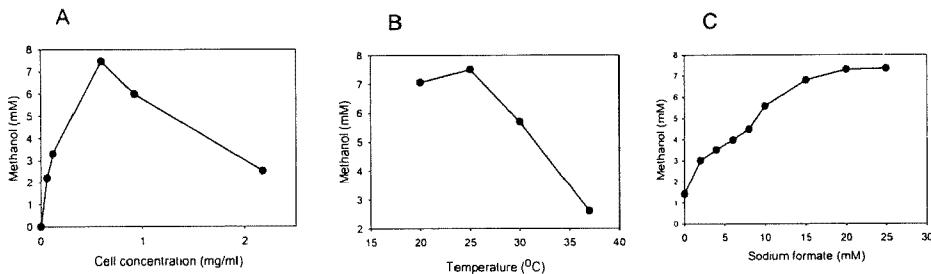


Fig. 1. Factors for methanol biosynthesis. (A) cell density; (B) temperature; (C) sodium formate concentration.

2. 회분식 반응에서 최적조건에 의한 메탄올 생합성

회분식 반응에서 얻은 메탄올생성에 관한 최적반응조건들은 Table 1에 나타나 있다.

Table 1. Optimum Reaction Conditions for methanol biosynthesis

Conditions	Optimum
Cells	0.6 mg dry-cell/ml
Sodium formate	20 mM
Phosphate buffer (pH 7.0)	12.9 mM
Sodium chloride	100 mM
EDTA	1 mM
Temperature	30 °C

이 조건에서 생성된 메탄올은 12시간동안 8 mM이 생성되었다 (Fig. 2).

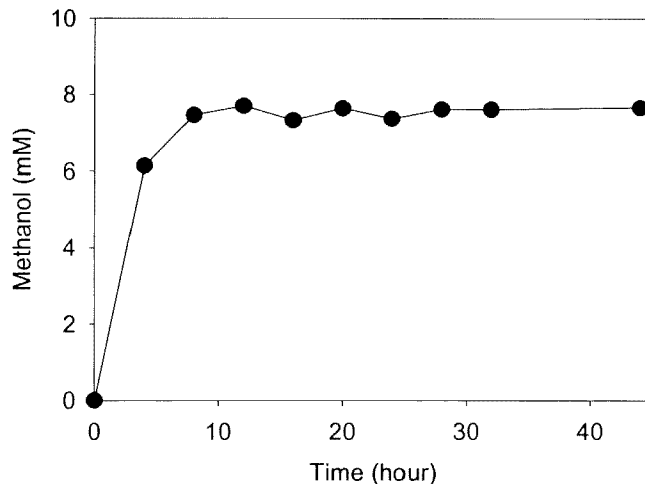


Fig. 2. Time-dependent methanol biosynthesis in the optimum conditions.

3. 메탄 전환속도 산출

회분식 반응에서 메탄이 메탄올로 전환될 때의 전환률을 산출하기 위해 시간에 따른 메탄올 생성량과 메탄의 소비량을 관찰한 결과 *M. trichosporium* OB3b에 의한 메탄의 전환률은 10시간동안 약 37%이었다 (Fig. 3).

반응기 내에서 메탄이 메탄올로 전환되는 과정에서 기상의 메탄이 액상의 미생물로 전달되는 속도와 미생물에 의한 메탄산화속도 중 어느 인자가 전환률에 더 많은 영향을 주는지 알아보았다. 메탄량에 따라 생성되는 메탄올량을 관찰한 결과 반응기

내의 세포 농도가 매우 적기 때문에 물질전달 속도가 메탄이 산화되는 속도보다 빨라 액상과 기상의 메탄은 거의 평형에 도달하는 것으로 간주되며 따라서 메탄 산화속도가 메탄 전환의 더욱 중요하다는 것을 알 수 있었다. 이때 *M. trichosporium* OB3b가 메탄에 대해 갖는 K_m 및 V_{max} 값은 각각 532.6 mM과 1.749 mmol/hr이었다.

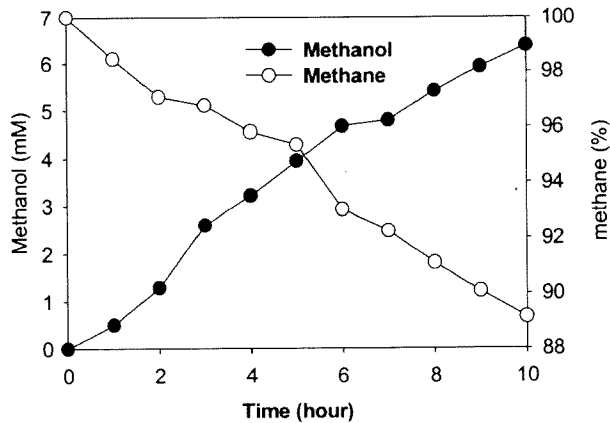


Fig. 3 Time-dependent methanol biosynthesis with concomitant methane consumption by *M. trichosporium* OB3b.

4, 반복 회분식에 의한 메탄올 생합성

회분식반응에 의한 메탄올 생성 실험은 8시간 이상이 되면 더 이상 메탄올 양이 증가하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 고농도의 메탄올을 생성하기 위해서는 각 8시간별로 새로운 반응액과 메탄 그리고 sodium formate를 추가적으로 주입하는 반복 회분식 반응으로 메탄올 생성 실험을 수행한 결과 24시간동안 약 18 mM의 메탄올을 생성하였다.(Fig. 4)

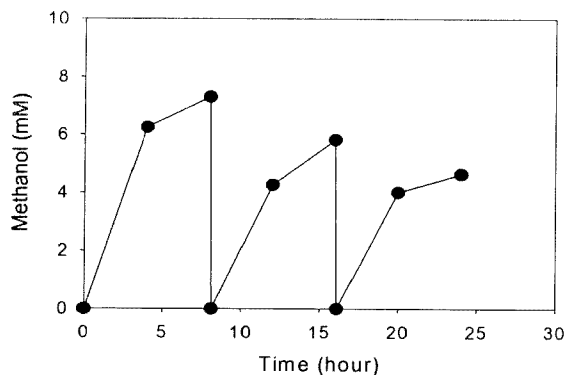


Fig. 6. Semicontinuous methanol with *M. trichosporium* OB3b. The reaction mixture contains cell suspension (0.6 mg dry cell/ml), methane (3ml), sodium formate (20mM), 1mM EDTA and 100 mM of sodium chloride in phosphate buffer (12.9 mM), pH 7.0. The reaction was carried out at 25 °C.

참고문헌

- [1] Takeguchi, M., Furuto, T., Sugimori, D. and Okura, I. (1997) Optimization of Methanol Biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b: An Approach to Improve Methanol Accumulation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **68**, 143-152.
- [2] Takeguchi, M., Miyakawa, K. and Okura, I. (1998) Purification and properties of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*. **132**, 145153.