

메탄자화균 *Methylosinus trichosporium* OB3b의 메탄올 기질에서의 성장

강 문 선 · 황 재 응 · † 박 성 훈

부산대학교 공과대학 화학공학과

Growth of an Obligatory Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methanol

Moon-Seon Kang, Jae-Woong Hwang and Sung-hoon Park †

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

ABSTRACT

An obligatory type II methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b was cultivated on methanol as a sole carbon and energy source. The effects of methanol concentration, pH, temperature, nitrogen source and phosphate concentration on cell growth were investigated and the results were compared with the growth on methane which had been studied previously. When $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used as a nitrogen source, the maximal specific growth rate (μ_{max}) on methanol was 0.20hr^{-1} and the carbon conversion efficiency(CCE) was 43%. In comparison, on methane, μ_{max} and CCE were 0.08hr^{-1} and 32%, respectively. Ammonia was found to be a better nitrogen source for methanol-growing cells. Cell yield on nitrogen($Y_{X/V}$) was the same regardless of nitrogen source as 7.14g dry cells/g N, but the yield on methanol($Y_{X/S}$) was higher with ammonia(0.8g dry cells/g MeOH) than with nitrate(0.64g dry cells/g MeOH). Optimal pH and temperature were 7.0 and 30°C, respectively. Methanol inhibition on cell growth was observed at above 0.5%(v/v). Inhibition by phosphate was observed at above 60mM, although the inhibition on methanol dehydrogenase activity started at a much lower level of 20mM.

Based on the experimental findings, the cellular physiology of *M. trichosporium* OB3b growing on the two closely-related carbon sources were discussed extensively.

서 론

메탄자화균(Methanotroph)은 일탄소 유기화합물인 메탄의 대사로부터 에너지와 탄소를 얻는 일군의 미생물을 말한다. 메탄자화균의 중심대사는 Fig. 1에 개략적으로 나타낸 바와 같이 메탄, 메탄올, formaldehyde, formate 등을 거쳐서 최종적으로 물과

이산화탄소로 분해되는 일련의 산화과정이다.

본 실험에서 사용된 균주인 *Methylosinus trichosporium* OB3b는 분류학적으로 Type II, 강제성 메탄자화균(obligatory methanotroph)이다(1). 그런데 이 메탄자화균은 메탄이 아닌 메탄의 대사산물 즉 메탄올을 기질로 하여 성장할 수도 있다. 이때 몇 가지 장점이 예상된다. 첫째, 메탄이 기체인데 비해 메탄올은 액체이므로 취급이 용이하고 고농도 배양 시 기체 전달저항을 걱정할 필요가 없다. 둘째, 이

† Corresponding Author

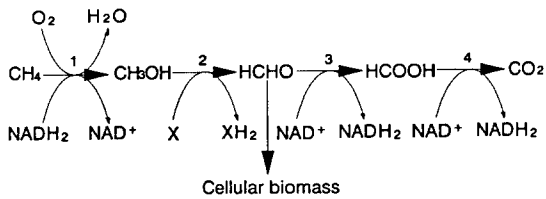


Fig. 1. Pathway of methane catabolism in methanotrophs. X is the quinone form of PQQ and XH_2 is the quinol form. The reactions designated as 1-4 are carried out by the enzymes: 1, methane monooxygenase; 2, methanol dehydrogenase; 3, formaldehyde dehydrogenase; 4, formate dehydrogenase.

론적인 계산에 의하면 메탄보다 메탄올의 경우가 소모되는 탄소당 균체수율이 높다(2). 이는 기질이 메탄일 경우 메탄을 메탄올로 산화시키는 메탄자화효소(methane monooxygenase, MMO)의 반응에 driving force가 필요하며, 이 역할을 하는 NADH의 생산에 많은 탄소가 소모되기 때문이다(3-6). 세균은 세포성장이 유리할 가능성이 크다. 왜냐하면 기질이 메탄일 경우 세포내 총단백질 중에서 MMO가 약 20%까지 만들어지고(7, 8), 이에 따라 세포의 총대사과정 중에서 MMO의 생산에 과도할 정도의 노력이 소모되고 있기 때문이다. 만일 메탄의 산화과정을 생략함으로써 MMO생산 필요성을 배제시킨다면 MMO의 생산에 이용되던 세포의 대사과정상 부하가 여타 다른 대사에 골고루 이용될 수 있고, 그 결과 세포성장속도가 빨라질 가능성이 높다.

본 연구실에서는 이미 메탄자화균이 메탄을 기질로 성장하는 경우에 있어서의 균의 성장특성과 메탄자화효소(MMO)의 생산에 대해 오랫동안 연구해왔다(9). 이에 본 연구에서는 기질을 메탄에서 메탄올로 변화시킴으로써 MMO에 의한 메탄에서 메탄올로의 산화단계를 생략하여 세포의 성장과 physiology에 생길지도 모르는 변화를 관찰하고자 하였다. 메탄올이 메탄에 비해 가지고 있는 여러 가지 장점 외에도, 중심 대사과정의 한 단계 생략에 따르는 *M. trichosporium* OB3b의 반응(response)이 매우 흥미롭기 때문이다. 특히 *M. trichosporium* OB3b는 메탄기질 성장시 생리적 특성이 잘 알려져 있으므로 메탄올 기질 성장을 비교할 수 있는 아주 훌륭한 미생물 시스템이다.

이러한 배경에서 본 실험의 목적은 메탄자화균인 *M. trichosporium* OB3b를 메탄올 기질에서 배양시

키면서 과거 행하였던 메탄에서의 배양과 비교하는 것이다. 더 나아가 메탄올 배양시의 최적 배양조건을 찾는 것이다. 이를 위해 pH, 온도 등 환경요인과 질소원, 메탄올 농도, 인산염 농도 등 중요 배지성분이 균체의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 정량적으로 균체수율과 여러 배지요인의 관계를 고찰하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 *M. trichosporium* OB3b는 미국 Lawrence Livermore 국립연구소 생물의학연구부(Biomedical Sciences Division)의 R. T. Taylor 박사로부터 제공받았으며 균체 배양에 사용된 배지는 Higgins 무기 질산염 최소배지로 성분의 양을 약간 조정하여 사용하였다(Table 1). 플라스크배양은 진탕배양기(Model KMC-8480sf, Vision과학, 서울)에서 교반속도를 300rpm으로 하여 30°C를 유지하며 행하였다. 사용된 플라스크는 250ml 용량의 마개 달린 플라스크였고 배양액 부피는 30ml이었다. 균체의 접종량은 특별한 경우를 제외하고는 0.5ml이었다.

생물반응기(Bioreactor)배양은 2.5ℓ의 발효조(Biolab, B. Braun, U.S.A.)를 이용하여 회분식으로 행하였다. 접종량은 5% (v/v), 통기속도는 0.5vvm, 교반속도는 500~700rpm, pH는 6.5~7.5를 유지하였다. 배양 중에 가스크로마토그래피로 분석하여 메탄올의 고갈이 생긴 경우는 메탄올의 농도가 0.2~0.5%가 되게 첨가하였다.

분석방법

각종 농도의 측정

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., U.S.A.)를 이용, 파장 660nm에서 흡광도(Absorbance, A_{660})를 측정하고 미리 구한 검량선으로 보정하여 결정하였다. 1 absorbance unit는 건조 균체중량(dry cell weight, DCW)으로 0.5mg/ml이었다. 건조 균체중량은 배양액 시료를 2번 증류수로 세척하고 100°C에서 12시간 이상 건조시켜 측정하였다. 흡광도의 경우 세포농도가 낮을 때는 세포배양용 250ml 플라스크에 부착된 직경 11mm 유리관을 통해 시료의 채취량이 바로 측정하였고, 고농도에서는 고무 septum으로 밀봉된 시료 채취용 지를 통해 주사기로 sample을 취한 후 희석하여 10-mm

Table 1. Composition and concentration of stock solutions for modified Higgins nitrate minimal salt medium^a.

	g/l
1. 100 × salt solution ^b	
NaNO ₃ [or (NH ₄) ₂ SO ₄]	85 [65.8]
K ₂ SO ₄	17
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.7
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.7
2. 100 × Phosphate buffer solution ^b	
KH ₂ PO ₄	53
Na ₂ HPO ₄	86
Adjust solution to pH7.0	
3. 500 × Trace metals solution ^b	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.287
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.223
H ₃ BO ₃	0.062
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.048
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.048
KI	0.083
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
1 ml of 1mM H ₂ SO ₄ per liter of trace metals	
4. 500 × Iron solution ^b	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	22.4
5 ml of 1mM H ₂ SO ₄ per 100ml of iron	

^a Culture medium was made 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 μ m membrane filter. Separate and filter-sterile iron solution 4 was added aseptically to this mixture.

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

cuvette로 측정하였다. 질산이온의 농도는 ion-specific nitrate electrode(Orion, Model 93-07, U.S.A.)를 이용하여 측정하였고 ammonia의 농도는 ammonia gas-sensing electrode(Phoenix, U.S.A.)와 Berthelot반응(10)을 이용하여 결정하였다. 메탄올 농도의 측정은 불꽃이온검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피로 행하였다. 분석조건은 아래 효소의 활성 측정에 자세히 기술하였다.

효소의 활성 측정

균체내 효소들의 활성 측정에서 MMO의 경우 기질로 propylene을 사용하였고 methanol dehydro-

genase(MDH)의 경우는 메탄올을 사용하였다. MMO활성은 메탄의 소비속도나 메탄올의 생성속도로 나타내는 것이 정상이나 메탄의 소비속도는 측정시 오차가 크고, 메탄올의 생성속도는 생성된 메탄올이 계속적으로 산화되므로 정밀한 측정이 어렵다. 따라서 일단 생성되면 더 이상 산화되지 않는 안정된 propylene을 기질로 선택하여 propylene oxide의 생성속도를 측정함으로써 MMO활성을 구하였다(11).

효소분석방법은 다음과 같다. 우선 배양액을 실온에서 Eppendorf microcentrifuge(Model HST-8, 한일기계, 인천)를 이용하여 3분간 12000rpm으로 원심분리한 후 상등액을 버리고 MOPS 완충용액 [25mM 3-N-morpholino-propane sulfonic acid, pH 7.0, plus 5mM MgCl₂]으로 1차 현탁시킨다. 그리고 다시 원심분리하여 상등액을 버리고 같은 완충용액에 재현탁시켜서 세포농도가 0.5mg dry cells/ml가 되게 한다. 그 다음 반응혼합물 0.5ml(세포량 0.1~0.5mg에 해당하는 세포현탁배양액; 12.5 μ mol MOPS buffer, pH 7.0; 2.5 μ mol MgCl₂; 10 μ mol sodium formate)를 5ml vial에 넣고 PTFE-faced rubber septa로 밀봉한 후 30°C의 진탕수조(Model KMC-1205SWI, Vision과학, Seoul)에서 분당 160회 왕복시키면서 3분 간격으로 2~3차례 sample을 채취하여 불꽃이온검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피(Yanaco G80, Japan)로 분석하였다. 항온조에서 진탕하기 전 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해 기질로 사용되는 propylene이나 메탄올은 다른 성분들을 넣은 후 제일 나중에 첨가하였다. 같은 이유로 분석용 vial은 진탕 전에는 항상 얼음통에 넣어 0°C를 유지하였다. 분석에 사용된 관은 직경 1/8inch에 길이가 6ft인 stainless관으로 0.1% AT1000을 담지한 80/100mesh의 graphac C분말(Alltech Inc., U.S.A.)이 충전되어 있었다. 오븐과 검출기의 온도는 propylene의 경우 85°C와 150°C였고 메탄올의 경우는 110°C와 150°C이었으며 운반기체로는 질소가 사용되었다. Injector의 온도는 오븐의 온도보다 20°C 높게 유지하였다.

결과 및 고찰

메탄올 기질에의 적응

오랫동안 메탄기질에서 자라던 *M. trichosporium* OB3b를 메탄올 기질에서 배양하기 위해 메탄올 0.5%가 포함된 Higgins 무기 질산염 최소배지에 옮겨

다. 모든 조건을 메탄배양시의 최적조건으로 하였으나 균의 성장은 상당히 느리게 진행되었다. 메탄배양의 경우 구리가 결핍된 배지에서 질소원이 고갈되거나 산소의 결핍이 생기면 배양액이 노란색을 띠는데, 메탄올 배지로 transfer된 경우 핑크색을 보였다. 통기성 메탄올자화균의 경우(12) 혹은 임의성(facultative) 메탄자화균의 경우(13, 20) 핑크색을 띠는다는 보고가 있고 또 *M. trichosporium* OB3b나 *M. capsulatus* 같은 강제성(obligatory) 메탄자화균도 agar plate상에서 고체배양될 때 균집이 핑크색을 띠는다는 보고가 있는 것으로 미루어(14), 메탄자화균이 분비하는 색상은 배지조건이나 환경요인에 따른 균체의 대사과정과 깊은 관련이 있는 것으로 여겨진다.

메탄올 기질로 이송되었을 때 나타나는 또 한가지 특징은 pellet 형성이다. 현미경 관찰시 실같이 길다란 모양으로 균들이 정렬되어 있고 또 pellet들은 균들로 뽁뽁이 차 있었다. 배양플라스크를 세게 흔들어 주면 pellet이 약간 풀렸으나 금방 다시 뭉쳐서 정지시 가라앉았고 진탕배양조의 교반속도를 크게 하여도 pellet이나 실모양의 형태는 없어지지 않았다. pellet 형성이 많아질수록 일반적으로 핑크색이 더 강하게 나타났으며 또 배양액의 점도가 높아져 점착성 물질이 생성되는 것을 알 수 있었다.

이러한 pellet의 형성은 분광광도계에 의한 균체량 측정을 어렵게 하므로 이를 제거하기 위해 배지조성에 약간 변화를 시도하였다. Table 1에 표시된 성분 중 철이온을 2배, 4배 보강하여 보았고 또 미량금속이온의 농도를 전체적으로 증가시켜 보았다. 철이온의 경우 약간의 개선이 있는 듯하였으나 결과의 재현성이 없었고 미량 금속이온은 아무런 효과가 없었다. 그러나 특별한 조치가 없이도 지속적인 계대가 진행되면서 pellet과 핑크색 형성은 점차 약화되었고 약 10회(2달) 경과 후 완전히 없어졌다. 그리고 배양액의 상태가 메탄 배양시와 동일하여졌다.

M. trichosporium OB3b의 doubling time이 5~10시간 정도인 것을 감안할 때 이렇게 천천히 새로운 환경에 적응하는 것은 매우 특이하다. 이 결과는 앞서 보고한 메탄배양의 경우 구리결핍 배지에서 구리를 10M 포함된 배지로 옮길 때 3~4번의 계대배양이 필요했던 결과와 함께, 메탄자화균의 새로운 환경에 적응하는 능력이 상당히 약하다는 것을 보여준다. 또한 Patel, Dalton 등이(15) C_2 이상의 탄소원에 적응된 임의성 메탄자화균을 메탄으로 옮겼을 때 균체성장률이 되지 않았던 점, 혹은 메탄올에 적응

된 *M. capsulatus*가 메탄에서는 성장하지 않았던 것(21) 등의 결과와 함께 메탄자화균이 일반적으로 탄소원의 교체에 대해 매우 느리고 특이하게 반응한다는 것을 보여준다(본 실험에서도 메탄올에 적응된 *M. trichosporium* OB3b를 반대로 메탄에 옮기려고 여러 차례 시도하였으나 실패하였다). 더 나아가 지구상에 메탄올 발생 환경보다 메탄 발생 환경이 많이 존재한다는 사실을 고려할 때, 이 결과들은 methylotroph로 분리 동정된 균주들 중 상당수가 자연에서는 실제로 메탄자화균이었을 가능성이 높다는 것을 시사한다(1, 15, 21). 물론 메탄자화균과 공생관계에 있는 오염균의 영향(16)이나 배지가 최적화되지 않았을 가능성도 전혀 배제할 수는 없다.

질소원의 영향

일반적으로 미생물이 이용하기 가장 좋은 질소원은 암모니아로 알려져 있다. 그러나 메탄 성장시 *M. trichosporium* OB3b의 경우 질산염을 사용하는 것이 암모니아보다 균체성장도 더 빠르고 MMO의 활성도 더 높은 것으로 관찰된 바 있다(2, 9). 또 Whittenbury(14), O'Neill(17) 등의 보고에 의하면 MMO의 활성은 암모니아에 의해 경쟁방해를 받는다고 알려져 왔다. 이는 본 실험에서도 확인되었다.

탄소원을 메탄에서 메탄올로 변경시킬 경우 MMO는 균체성장과 아무런 관계가 없기 때문에 MMO에 대한 암모니아의 영향은 나타나지 않을 것으로 예상된다. 실제로 메탄올을 기질로 할 때 MMO효소활성은 전혀 나타나지 않아서 MMO가 생성되지 않음을 알 수 있었다. 본 실험에서는 질소원으로 질산염과 암모니아를 각각 사용하여 균체성장률과 수율의 변화를 살펴 보았다. Fig. 2에서 알 수 있는 대로 메탄올 농도를 0.5% (v/v)로 할 때 암모니아배지에서 최대 비성장속도가 $0.20hr^{-1}$ 로 질산염배지의 $0.15hr^{-1}$ 보다 약 30% 정도 높았다. 이에 비해 질소원에 대한 균체수율($Y_{X/S}$)은 두 경우 모두 7.14g dry cells/g N으로 동일하게 나타났다. 이는 질소원이거나 탄소원의 변화와 관계없이 세포 내 질소의 구성비가 일정함을 뜻한다. 한편 탄소원에 대한 균체수율($Y_{X/S}$)은 암모니아의 경우 0.8g dry cells/g MeOH이고 질산염의 경우는 0.64g dry cells/g MeOH로 암모니아의 경우가 약 25% 가량 높았다.

암모니아가 질산염보다 비성장속도와 $Y_{X/S}$ 에 대한 증가를 가져오는 것은 암모니아의 세포 내로의 전달 속도, 대사과정에서의 이용 용이성 등과도 밀접한 관계가 있다(1, 5, 23). 그러나 본 *M. trichosporium*

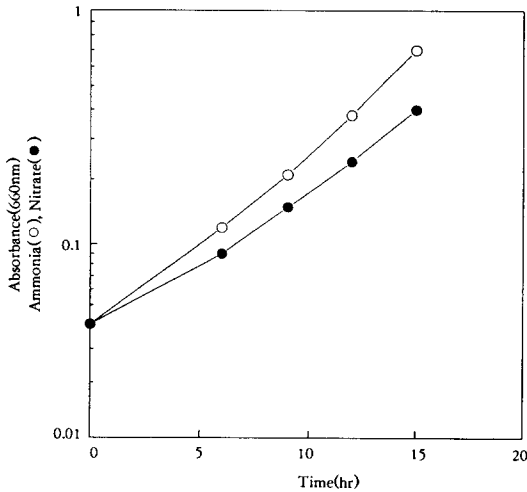


Fig. 2. Effect of nitrogen source on the the growth of *M. trichosporium* OB3b.

OB3b의 경우 에너지 대사와 보다 밀접한 관계가 있는 것으로 여겨진다. 즉 serine pathway를 따르는 methylotroph에서 MDH가 NADH의 생산과 연계되어 있지 않을 경우 NADH 생산을 위해 총 대사되는 탄소 중 약 40% 정도의 많은 양이 쓰이게 되는데(1), 여기에 환원도가 낮은 질산염이 사용되면 이의 환원에 NADH가 추가로 소요되어 NADH의 소요량이 크게 증가되기 때문이다. 이에 대해 Stouthamer 등(6)은 여러 methylotrophs의 대사과정에 대한 이론적인 물질수지식으로부터 1mole의 질산염이 암모니아 수준으로 환원되는데 4mole의 NADH가 소요된다고 보고한 바 있다. 본 연구팀에서도 *M. trichosporium* OB3b의 성장수율을 이론적으로 그리고 실험적으로 측정하여 보고한 바 있는데(2), 대략 Stouthamer의 결과와 일치하였다.

한편 Fig. 2의 결과에 따라 추후 모든 실험은 특별한 언급이 없는 한 암모니아염을 질소원으로 사용하였다. 사용량은 질산염과 같은 mol수의 질소가 첨가 되도록 정하였다.

메탄올 농도에 의한 영향

메탄올은 독성이 강하여 미생물의 성장에 큰 영향을 미친다. 메탄올 농도에 의한 영향을 조사해 본 결과(Fig. 3) 최적 메탄올농도는 0.5%(v/v)이었다. 최적농도보다 높거나 낮은 경우 비성장속도의 감소

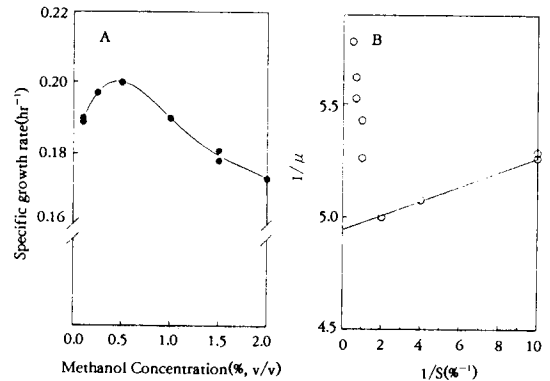


Fig. 3. Effect of methanol concentration on specific growth rate(Panel A) and Lineweaver-Burk plot for determination of μ_m and KS (Panel B).

가 관찰되었다. 메탄올의 농도가 매우 낮은 경우는 메탄올 고갈로 균체의 최종농도가 너무 낮았다. 메탄올 농도가 0.5% 이상에서는 기질 저해현상이 뚜렷하였으나 그 정도는 그리 심하지 않아 메탄올농도 2.0%에서도 최적 0.5%(v/v)에 비해 비성장속도가 대략 15% 정도만 감소하였다. 그림 3-B에는 3-A의 결과를 재정리하여 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었다. 최대 비성장속도(μ_m)와 포화상수(KS)는 각각 0.20hr^{-1} 및 0.007%로 얻어졌다. 이 값은 문헌에 보고된 다른 통기성 methylotroph과 거의 비슷하다(12, 18).

한편 메탄올 기질에서의 균체성장을 메탄 기질에서의 균체성장과 비교할 때 가장 중요한 차이점은 비성장속도가 2배 이상 빠른 것이다. 앞서 보고한대로 메탄 배지의 경우 구리 결핍조건에서의 최대 비성장속도는 약 0.07hr^{-1} 정도이고 구리포함 조건에서의 최대비성장속도는 약 0.09hr^{-1} 정도이다. 이에 비해 메탄올 배지에서의 최대비성장속도는 약 0.2hr^{-1} 정도로 매우 높다. 메탄올 배지에서는 비성장속도가 구리 첨가의 유무에는 거의 무관하였는데 이는 메탄 배지와는 달리 두 가지 종류의 MMO(soluble 및 particulate)가 아무런 역할을 하지 않기 때문으로 생각된다. 또한 탄소원 사용량에 대한 균체수율($Y_{X/S}$)의 증가도 큰 특징 중 하나이다. 메탄기질에 대해서는 질소원으로 질산염을 사용하는 경우 균체수율이 Carbon Conversion Efficiency(CCE)로 약 32% 수준인데 비해 메탄올 기질에서는 질산염을 사용할 때가 약 36%, 그리고 암모니아를 사용할 때는 약

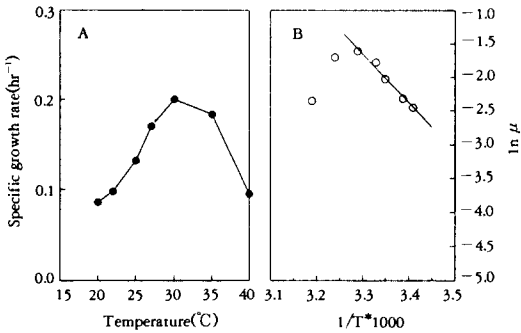


Fig. 4. Effect of temperature on the specific growth rate(Panel A) and Arrhenius plot for determination of the activation energy (Panel B).

43%로 훨씬 높다(2).

이러한 결과는 앞서 질소원의 영향에서도 언급한 대로 탄소원 변화에 따른 NADH소요량의 변화로 설명이 가능하다. 메탄을 기질로 하고 serine pathway를 따르는 메탄자화균은 NADH소요량이 특히 높는데 MMO의 반응으로 1몰의 메탄이 메탄올로 산화될 때 1몰의 NADH가 소모되기 때문이다(1). 이 때문에 열역학적으로는 메탄이 메탄올에 비해 고에너지 화합물이지만 메탄자화균에 의해 생물학적으로 이용될 때는 오히려 메탄올이 더 많은 유용에너지를 가지고 있게 된다. 또한 균체성장을 여러 소반응들의 복합적인 network로 볼 때 세포내 NADH 생성 속도가 전체 균체성장의 율속단계로 작용할 가능성이 크다는 뜻이 된다.

온도와 pH의 영향

메탄올 기질 성장시 온도와 pH의 영향을 관찰하였다. 질소원으로는 암모니아가 사용되었고 메탄올의 농도는 0.5%(v/v)이었다. 온도의 영향은 Fig. 4의 panel A에 나타낸대로 30°C가 최적이었다. Arrhenius plot을 통해 계산한 활성화에너지를 비교해 보면 메탄의 경우 2×10^4 cal(1)인 반면 메탄올 기질 사용시에는(Fig. 4, panel B) 1.49×10^4 cal로 다소 낮았다. 메탄 기질 성장시에는 온도가 최적 온도에서 5°C 이상 내려가는 온도범위에서 비성장속도가 크게 감소하였으나 메탄올 기질에서는 특히 고온에서 비성장속도가 크게 감소하였다.

Fig. 5에서는 온도와 메탄올의 영향을 동시에 고찰하였다. 메탄올 농도가 증가할 때 온도가 높을수

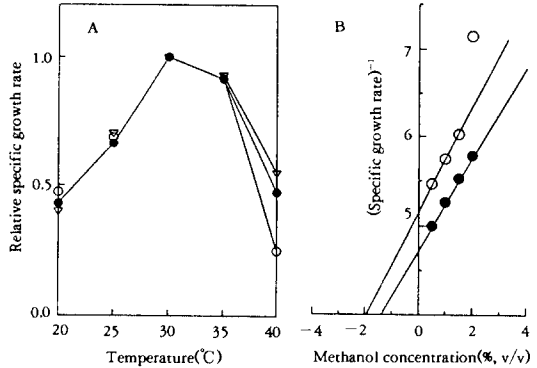


Fig. 5. Methanol toxicity on cell growth at methanol concentrations; 0.25%(▽), 0.5% (●), and 1.0%(○)(Panel A) and determination of methanol inhibition constant at 30°C (●), 35°C(○)(Panel B).

록 비성장속도가 크게 감소하여 메탄올의 독성이 증가함을 알 수 있었다. 기질에 의한 저해 작용은 비경쟁방해 방식을 따르므로 비성장속도 μ 는 식(1)로 주어지고, 일반적으로 저해상수 K_i 가 포화상수 K_s 보다 매우 크므로 식(2)로 간략화된다(22, 23).

$$\mu = \frac{\mu_m}{(1 + K_s/S)(1 + S/K_i)} \quad (1)$$

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad \text{when } K_i \gg K_s \quad (2)$$

또한 기질저해가 나타나는 메탄올 농도는 K_s 에 비해 매우 높으므로($K_s \ll S$), K_s 를 무시하면 식(3)이 얻어진다.

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + S/K_i} \quad (3)$$

식(3)의 역수를 취하면

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{S}{\mu_m K_i} \quad (4)$$

즉 $1/\mu$ vs. S의 plot에서 K_i 를 구할 수 있다. Fig. 5 Panel A 및 추가실험의 결과를 식(4)에 의해 도출하여 K_i 를 구하였다 (Panel B). 30°C 및 35°C의 경우 비교적 선형관계가 잘 만족되었고 K_i 값은 각각 9.3%(v/v), 8.7%(v/v)로 얻어졌다. 또한 K_i 값은 앞에서 구한 K_s 값 0.007%보다 훨씬 크므로 식(2)의 가정이 성립됨을 알 수 있었다. 40°C의 경우 선형관계가 만족되지 않았고 따라서 K_i 를 구하는 것도

불가능하였다.

pH의 영향은 6.0~8.0의 범위에서 살펴 보았다 (Table 2). 배지의 buffering capacity를 증가시키기 위해 인산염의 농도를 40mM(표준농도의 4배)로 하여 배지를 제조하였다. Table 2가 보여주는 대로 인산염의 농도 증가에 따라 배지 내 pH 감소는 현저히 개선되었다(인산염의 농도가 10mM인 경우 pH 7.0에서 6.0 근처까지 하락하였으나 40mM의 경우 최종 pH가 6.7로 거의 변화가 없었다). 메탄 기질에서 질산염을 질소원으로 사용할 시(9) 최종 pH가 7.0에 가깝게 접근하는 경우와는 달리 Table에 나타낸 바와 같이 암모니아의 소비로 인해 최종 pH가 전체적으로 감소하였다. 하지만 상대 비성장속도의 변화는 메탄의 경우와 비슷한 경향을 나타내었는데 pH 6.5~8.0 범위에서 완만한 최저값을 보여주었다. 그러나 6.0 혹은 8.5에서는 비성장속도가 급격히 감소하였다.

인산염농도의 영향

Fig. 6은 인산염농도가 10mM일 때를 기준으로 상대 비성장속도와 MDH의 상대활성을 나타낸 것이다. 비성장속도는 인산염농도가 60mM까지 거의 변화하지 않고 높은 값을 보이나 MDH의 활성은 처음부터 인산염농도의 증가에 따라 급격히 감소한다. 그 결과 80mM일 때는 약 40% 그리고 100mM에서는 약 30% 정도의 활성만 남아 있게 된다.

MDH의 활성에 미치는 인산염의 영향은 메탄자화균을 이용한 메탄올 생산을 연구한 논문에서 자세히 논의되었다(19). 인산염은 MMO의 활성에도 저해작용을 일으키나 MDH에 대한 저해정도가 훨씬 크기 때문에 메탄기질로 성장한 *M. trichosporium* OB3b의 경우 고농도 인산염용액에서 메탄올 축적이 가능하다. 한편 Fig. 6은 탄소원의 대사에 관여하는 첫번째 효소의 활성이 50% 이상 감소하더라도 균체의 성장은 거의 영향을 받지 않음을 보여준다. 즉

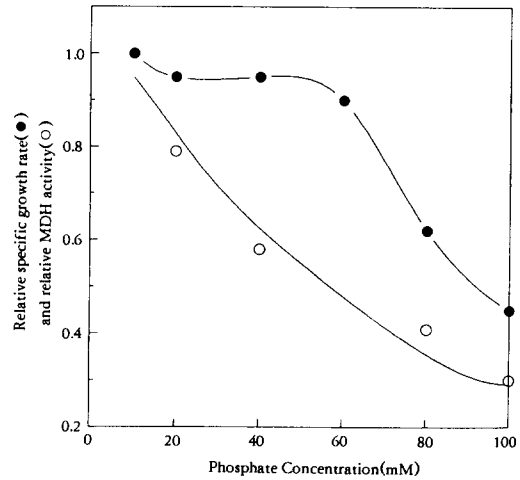


Fig. 6. Effect of culture medium phosphate concentration on the relative specific growth rate (●) and relative MDH activity (○) at pH 7.0. Relative values were obtained by normalizing each value against the corresponding value at 10mM phosphate.

MDH의 효소활성은 실제 균주의 최적 성장에 필요한 활성의 2배 이상 높게 유지되고 있다는 뜻이다. 메탄을 기질로 배양할 때도 비슷한 현상이 관찰되었는데 실제 필요한 MMO의 약 1.5~2배 정도 높은 활성이 유지되고 있었다(9). 인산염의 농도가 60mM 이상에서는 비성장속도가 급격히 감소하는데 MDH 활성 제한에 따른 탄소원 이용속도 감소에 영향을 받는 것으로 판단된다.

생물반응기 배양

플라스크배양에서는 배양 중에 pH의 변화와 산소의 고갈, 영양소의 결핍 등이 발생하므로 고농도의 세포를 얻기에 부적합하다. *M. trichosporium* OB3b의 경우 24시간 배양시 최종균체농도는 1.0mg dry cells/ml이었다. 배양액의 분석결과 질소원이나 탄소원의 고갈은 관찰되지 않았으므로 산소의 고갈과 pH의 하락(초기 7.0에서 최종 6.0으로 변화)이 균체의 성장을 정지시킨 주요 원인으로 여겨진다. 이에 비해 생물반응기에서는 지속적인 산소의 공급이 가능하며 최적의 pH범위에서 배양할 수 있으므로 최종 균체농도를 높일 수 있다.

먼저 생물반응기에서의 일반적인 성장패턴을 알아보기 위해 pH 조절이나 기질의 첨가없이 배양하였

Table 2. Effect of pH on cell growth.

pH		Lag time (hr)	Specific growth rate, μ (hr ⁻¹)
Initial	Final		
5.9	5.8	6	0.11
6.4	6.2	3	0.18
6.9	6.7	1	0.20
7.4	7.1	3	0.19
7.9	7.4	3	0.17
8.5	8.0	5	0.09

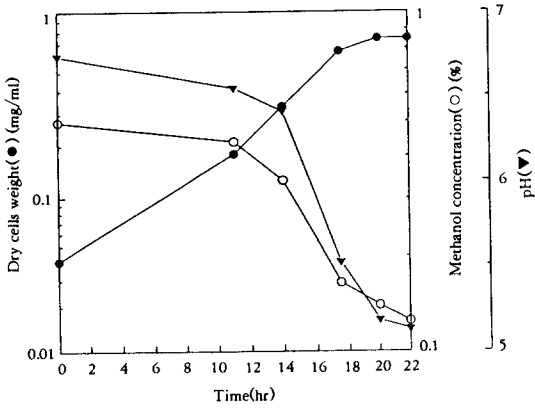


Fig. 7. Time course of batch cultivation of *M. trichosporium* OB3b at the initial methanol concentration of 0.5%(v/v) without pH control.

다. 공기 공급속도 0.5vvm, 교반속도 700rpm이었다(Fig. 7). 18시간 이후에도 메탄올의 농도가 K_s ($=0.007\%$)보다 높았음에도 불구하고 배양말기에 급격한 pH의 하락(초기 7.0에서 최종 5.13)으로 인해 비성장속도가 0.05hr^{-1} 이하로 떨어졌고 최종 균체농도는 플라스크의 경우보다 오히려 낮은 0.74에 머물렀다. 이에 비해 pH를 최적치 부근(6.8~7.2)으로 조절하며 메탄올의 고갈시 0.3~0.4%(v/v) 정도로 기질을 첨가한 경우(Fig. 8) 최종 균체농도는 2.10mg dry cells/ml에 달하여 플라스크배양과 비교할 때 2배 정도의 농도를 얻을 수 있었다. 또한 pH를 조절하지 않았을 때 보다 메탄올이 빨리 고갈되었는데, 이는 pH를 제어함에 따라 빠른 성장속도가 계속 유지되어 균체농도가 빨리 증가했기 때문이다.

기질에 대한 걸보기 균체수율($Y_{x/s}$)은 0.25g dry cells/g MeOH로 매우 낮게 나타났다. 플라스크에서의 균체수율 0.8g dry cells/g MeOH와 비교할 때 불과 30% 정도밖에 되지 않는다. 그 이유는 계속적인 공기의 공급으로 상당량의 메탄올이 유실되었기 때문으로 추정된다. 플라스크의 경우 완전히 밀폐되어 있어서 메탄올의 유실이 없으므로 플라스크 균체수율이 참값이라 가정할 때, 배양 중 메탄올의 유실속도는 약 1.0mg MeOH/ml·hr이었다. 질소원에 대한 수율($Y_{x/N}$)은 7.69로 플라스크 배양의 경우와 거의 같았다. 암모니아염의 고갈은 약 18시간에 일어났으며 암모니아염의 고갈 후에도 균체성장은 계속되었다. 다만 그 속도는 0.20hr^{-1} 에서

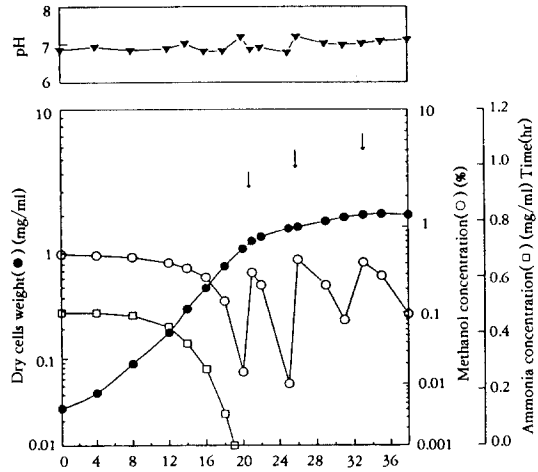


Fig. 8. Time course of batch cultivation of *M. trichosporium* OB3b at the initial methanol concentration of 0.5%(v/v) with pH control. Arrows indicate the methanol addition.

0.05hr^{-1} 로 크게 감소하였다. 이러한 diauxic growth pattern은 앞서 메탄 배양에서도 관찰되었는데(9), *M. trichosporium* OB3b가 공기 중 질소를 동화하여 성장할 수 있기 때문이다. 그러나 낮아진 비성장속도는 0.05hr^{-1} 로 메탄의 경우 0.01hr^{-1} 과 비교할 때 여전히 5배 정도 높아 앞서 언급한 NADH소요량이 중요한 역할을 하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 강제성 메탄산화균인 *M. trichosporium* OB3b를 메탄올기질에서 배양하면서 여러 환경요인 및 배지요인의 영향을 조사하고 최적 배양조건을 구하였다. 또한 배양특성을 메탄기질 성장의 경우와 비교하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 최대비성장속도는 메탄 기질 성장시 $\mu=0.08\text{hr}^{-1}$ 인데 반해 메탄올 기질 성장시에는 $\mu=0.20\text{hr}^{-1}$ 로 2배 이상의 증가를 보였다. 메탄올 최적농도는 0.5%(v/v)이었다.

2. 질소원으로는 메탄올 기질에서는 암모니아가 질산염보다 우수한 반면 메탄 기질에서는 질산염이 우수하였다.

3. 질소원에 대한 균체수율($Y_{x/N}$)은 탄소원의 종류와 관계없이 모두 7.14g dry cells/g N으로 동일하게 나타났다. 탄소원(MeOH)에 대한 균체수율($Y_{x/S}$)은 질소원으로 암모니아를 사용한 경우 0.8g dry cells/g MeOH이고 질산염을 사용한 경우는 0.64g dry cells/g MeOH로 암모니아의 경우가 약 20% 가량 높았다.

4. 배양온도는 최적온도가 30℃인데 메탄올의 농도가 높은 경우 고온에서 메탄올의 독성 증가에 따른 비성장속도의 큰 감소를 관찰할 수 있었다.

5. pH는 6.5~8.0 범위에 완전한 최적값을 보여 주었다.

6. 인산염의 농도가 증가함에 따라 메탄올탈수효소(MDH)의 활성은 급격히 감소하였으나 메탄올 기질에서 균체의 비성장속도는 인산염농도 60mM까지 거의 일정하였다. 이 결과는 MDH의 활성이 균체의 최적성장에 필요한 활성의 거의 2배 이상 수준으로 유지되고 있음을 보여준다.

7. 생물반응기 배양에서는 pH조절과 메탄올의 첨가로 최종 균체농도는 2.10mg dry cells/ml까지 볼 수 있었다.

감 사

본 연구는 1993년도 한국학술진흥재단 자유공모 과제 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. Anthony(1982), *The Biochemistry of methylotrophs*, Chap. 9, Academic Press, N.Y.
2. M. S. Kang, J. W. Hwang and S. Park(1994) p. 109, Proceedings of Bioprocess Engineering Center International Symposium, Taejeon.
3. J. P. Van Dijken and W. Harder(1975), *Biotech. Bioeng.*, **17**, 15.
4. C. Anthony(1978), *J. of Gen. Microbiol.*, **104**, 91.
5. D. J. Leak, S. H. Stanley and H. Dalton (1985), *Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects* (R. K. Pool and C. S. Dow ed.), Chap. 12, Academic Press, N.Y.
6. A. H. Stouthamer(1977), *Symposia of the Society for General Microbiology*, **27**, 285.
7. M. P. Woodland and H. Dalton(1984), *J. of Biol. Chem.*, **259**(1), 53.
8. B. G. Fox, W. A. Froland, J. E. Dege and John D. E.(1989), *J. of Biol. Chem.*, **264**(17), 10023.
9. S. Park, M. L. Hanna, R. T. Taylor and M. W. Droege(1991), *Biotech. Bioeng.*, **38**, 423.
10. F. Srienc, B. Arnold and J. E. Bailey(1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 982.
11. C. T. Hou, R. Patel, A. I. Laskin and N. Barnabe(1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**(1), 127.
12. M. Y. Song, H. J. Lee and Y. H. Lee(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 273.
13. R. N. Patel, C. T. Tou and A. Felix(1978), *J. of Bacteriology*, **136**, 352.
14. R. Whittenbury, K. C. Philips and J. F. Wilkinson(1970), *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205.
15. H. Dalton and D. J. Leak(1985), *Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects*(R. K. Pool and C. S. Dow ed.), Chap. 11, Academic Press, N.Y.
16. G. J. Shen, K. Tohru and M. Yasuji(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**(1), 191.
17. J. G. O'Neill and J. F. Wilkinson(1977), *J. of Gen. Microbiol.*, **100**, 407.
18. J. H. Choi, J. H. Kim, M. Daniel and J. M. Lebeault(1989), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**(4), 392.
19. S. Park and S. Y. Choo(1993), *생물화공*, **8**, 341.
20. T. E. Patt, C. C. Gloria, B. Judith and R. S. Hanson(1974), *J. of Bacteriology*, **120**, 955.
21. D. J. Leak and H. Dalton(1983), *J. of Gen. Microbiol.*, **129**, 3487.
22. K. L. Shuler and F. Kargi(1992), *Bioprocess Engineering*, p. 174, Prentice-Hall International, N. J.
23. C. H. Posten and C. L. Cooney(1993), *Biotechnology Vol. 1: Biological Fundamentals* (H. -J. Rehm and G. Reed eds.), Chap. 3, VCH Publishers Inc., N. Y.