

## 메탄자화균 *Methylosinus trichosporium* OB3b의 성장 속도와 수율 :

### I. 실험적 고찰

<sup>1</sup>황재웅 · 송효학 · 박성훈

부산대학교 공과대학 화학공학과, <sup>1</sup>서울대학교 공과대학 공업화학과  
(접수 : 1998. 3. 13., 게재승인 : 1998. 6. 18.)

## Growth Rate and Yield of a Methanotrophic Bacterium *Methylosinus Trichosporium* OB3b : I. Experimental Measurements

Jae-Woong Hwang<sup>1</sup>, Hyo-Hak Song, and Sunghoon Park<sup>†</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 1998. 3. 13., Accepted : 1998. 6. 18.)

The effect of culture medium copper availability on the specific growth rate( $\mu$ ) and carbon conversion efficiency (CCE) was studied for an obligatory methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b under various combinations of carbon and nitrogen sources. Methane or methanol was used as a carbon source, and nitrate or ammonium was used as a nitrogen source. Medium copper availability determined the intracellular location or kind of methane monooxygenase (MMO), cell-membrane (particulate or pMMO) when copper was present and cytoplasm (soluble or sMMO) when copper was deficient. When methane was used as a carbon source, copper-containing medium exhibited higher  $\mu$  and CCE than copper-free medium regardless of the kind of nitrogen source. When methanol was used as a carbon source, however, the effect of copper disappeared. Ammonium gave the higher  $\mu$  and CCE than nitrate for both methane and methanol. Those observations suggest that there exist an important difference in energy utilization efficiency for methane assimilation between sMMO and pMMO.

Key Words : growth rate, carbon conversion efficiency, *M. trichosporium* OB3b, copper availability

### 서 론

메탄자화균(methanotrophs)은 C<sub>1</sub> 화합물인 메탄의 대사로부터 탄소와 에너지를 얻는 일군의 미생물을 통칭한다(Figure 1). 이 미생물은 1970년대 이후 단세포 단백질(single cell protein, SCP)의 생산(1, 2)이나 생분해성 고분자인 PHB(3), 그리고 대체 에너지인 메탄올의 생산(4) 등과 관련하여 많은 주목을 끌어들였다. 최근에는 난분해성 염소화 유기 화합물의 분해에 탁월한 능력이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(5-8).

메탄자화균의 산업적인 응용을 위해서는 기체 기질의 물질전달 속도를 증대시킬 수 있는 적절한 반응기의 개발과 함께, 미생물 자체의 생리적 특성에 대한 연구가 중요하다. 이 중 미생물 성장과 관련된 생리적 특성에 대한 연구는 기질의 이용이나 ATP 생산,

세포내 저장 물질이나 세포외 대사 산물의 생산 등의 상관관계를 밝히는 것을 주 연구대상으로 하고 있다(9). 특히 메탄자화균의 경우 ribulose monophosphate pathway (type I) 혹은 serine pathway (type II) 등 탄소원의 대사경로가 비교적 잘 밝혀져 있어서 미생물 성장의 stoichiometry를 연구하는데 적합하다(10). 그러나 지금까지의 연구 결과를 살펴보면 대부분의 연구가 이론적인 수율 계산에 치우쳐 있고, 이를 뒷받침 할 실험적인 결과는 많지 않을 뿐 아니라 그나마 서로 일치하지 않는 경우가 많았다. 특히 성장수율을 나타내는 탄소 전환율(carbon conversion efficiency, CCE)은 비슷한 균주, 비슷한 조건의 실험에서도 19-70%로 매우 넓은 범위의 값들이 보고되고 있다(10-11).

메탄올 생산이나 유기화합물의 분해에 가장 중요한 효소는 메탄의 대사에 관여하는 첫번째 효소인 메탄자화효소(methane monooxygenase, MMO)이다. 최근의 연구에 의해 여러 메탄자화균 MMO의 세포내 생성위치가 배양조건에 따라 변한다는 사실이 밝혀졌다. 즉 배양액 중에 구리 이온이 존재할 때는 세포막에 생성(particulate MMO 혹은 pMMO라 불림)되고, 구리 이온이 결핍될 때는 세포질 내에 생성(soluble MMO 혹은 sMMO라 불림)된다는 것이다(12-14). 이들 sMMO와 pMMO는

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, San 30 Changjeongdong, Kumjeongku, Pusan 609-735, Korea

Tel : 051-510-2395, Fax : 051-512-8563

e-mail : shpark0@hyowon.cc.pusan.ac.kr

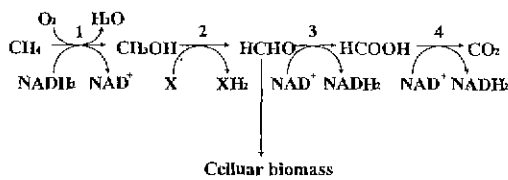


Figure 1. Pathway of methane catabolism in methanotrophs. X is the quinone form of PQQ and  $XH_2$  is the quinol form. The reactions designated as 1~4 are carried out by the following enzymes respectively :

1, methane monoxygenase ; 2, methanol dehydrogenase ; 3, formaldehyde dehydrogenase ; 4, formate dehydrogenase

기질이나 저해제에 대한 특이성 뿐 아니라 효소의 안정성, 활성의 크기, MMO 활성에 필요한 환원력의 공급 방법 등에 있어 많은 차이가 있는 것으로 보고되었다. 특히 환원력 공급 방법의 경우 sMMO는 오직 NADH만을 환원제로 이용할 수 있지만 pMMO는 메탄올을 포름알데히드로 산화시키는 효소인 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)를 통해 환원력을 제공할 수 있다고 알려져 있다(Figure 1). Leak와 Dalton(15-16)은 이러한 환원력 공급 방식의 차이가 CCE 크기에 많은 영향을 준다는 것을 type I 메탄산화균인 *Methylococcus capsulatus*(Bath)의 연속배양 연구를 통해 제안하였다. 즉 pMMO 균체가 sMMO 균체에 비해 높은 CCE 값을 가지며, 지금까지 메탄산화균에 대해 보고된 19-70%의 지나치게 넓은 범위의 CCE 값(9-11)은 기체 기질을 다루는 데서 오는 실험적인 오차 이외에도 MMO 종류에 따른 에너지 요구량의 차이가 그 원인이 될 수 있다는 것이다.

본 연구에서는 대표적인 type II 메탄산화균인 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 대상으로 균의 성장속도와 탄소원에 대한 성장수율을 실험적으로 측정하였다. *M. trichosporium* OB3b는 PHB 생산(3)이나 염소화 유기화합물의 분해 등에 응용가능성이 매우 높은 뿐만 아니라 탄소의 대사 경로가 비교적 상세히 알려져 있기 때문이다(10-11). 본 연구에서는 구리이온의 존재여부, 즉 세포내 MMO의 생성위치가 세포성장속도나 성장수율에 미치는 영향을 여러 탄소원과 질소원에 대해 조사하고 그 결과를 Leak와 Dalton이 type II 메탄산화균에 대해 얻은 결과와 비교하였다. 특히 Leak와 Dalton은 연속배양 방법을 채택함으로써 생물 반응기내 일정 비율의 사멸 세포가 존재하는 것과 제한 기질의 종류에 따라 균체의 생리적 성질이 변화하는 것을 피할 수 없었는데, 본 실험에서는 회분배양 방법을 채택하고 또 균형 지수 성장기(balanced exponential growth period)에 모든 실험을 실시함으로써 보다 정확한 실험값을 얻고자 노력하였다. 본 연구에서 측정된 실험값들은 추후 대사과정의 분석에 기초한 *M. trichosporium* OB3b의 이론적 CCE 값을 산출하는데 기초 data로 사용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 *M. trichosporium* OB3b는 미국 Lawrence

Livermore 국립연구소 생물의학연구부(Biomedical Sciences Division)의 R. T. Taylor박사로부터 제공받았으며 균체 배양에 사용된 배지는 Higgins nitrate minimal salt medium(Higgins 무기 질산염 최소배지)(14, 17)으로 질소원과 구리 이온의 조성을 조정하여 사용하였다. 모든 실험은 진탕배양기(Model KMC-8480sf, Vision과학, 서울)를 이용하여 교반속도 250rpm, 온도 30°C에서 행하였다. 플라스크는 300ml용량의 마개 달린 플라스크(Figure 2)를 사용하였고 배양액 부피는 30ml이었다. 균체의 접종량은 특별한 경우를 제외하고는 0.5ml이었다. 기체 기질(메탄과 공기)은 gas proportioner(II 60648, Cole-Parmer, USA)를 통해 적절한 비율로 섞은 후 플라스크의 시료 채취용 가지를 통해 주입하였다. 메탄올을 탄소원으로 사용할 때는 초기 농도 0.5%로 넣어주었다.

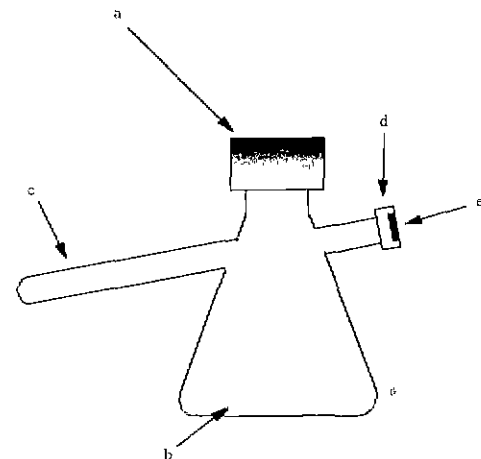


Figure 2. The 300ml side-arm culture flask. a teflon-sealed cap, b culture medium (30ml), c.  $\varnothing$  11mm side-arm, d. open-top-closure cap, e teflon-faced rubber septum.

### 세포농도의 측정

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., USA)를 이용, 파장 660nm에서 흡광도(Absorbance,  $A_{660}$ )를 측정하고 미리 구한 검량선을 이용하여 흡광도를 건조균체중량(dry cell weight, DCW)으로 환산하여 결정하였다( $1 A_{660} \text{ unit} = 0.55 \text{ mg cells/ml}$ ). DCW는 균체 시료를 3번 증류수로 세척하고 80°C에서 12 시간 이상 건조하여 측정하였다. 흡광도의 경우 세포농도가 낮을 때는 세포배양용 300ml 플라스크에 부착된 직경 11mm 유리판을 통해 시료의 채취 없이 바로 측정하였고, 고농도에서는 rubber septum으로 밀봉된 시료 채취용 가지를 통해 주사기로 배양액을 취한 후 희석하여 10mm cuvette으로 측정하였다. 동일한 배양액에 대한 10mm cuvette과 플라스크에 달린 11mm 유리판의 흡광도 비는 1 : 0.87이었다.

### 균체 수율 측정

탄소원으로 메탄이 사용될 경우 균체수율을 측정하기 위해서는 메탄, 이산화탄소, 질소, 그리고 산소를 동시에 분석하여야 하므로 porapak Q(Alltech, USA) 및 molecular sieve 5A(Alltech, USA) 2가지 종류의 column을 이용하여 GC로 분석

하였다(15). 먼저 porapak Q(Alltech, USA)에서 메탄과 이산화탄소의 peak 면적을 구하고 이어 molecular sieve 5A(Alltech, USA)에서 메탄, 산소 및 질소를 분석하였다. 이때 porapak Q에서는 메탄과 이산화탄소가 잘 분리되었으나 산소와 질소는 동시에 검출되었고 molecular sieve 5A에서는 이산화탄소의 분석이 불가능하였다. 따라서 질소가 미생물의 지수성장기에는 생성되거나 소모되지 않는다는 점에 착안하여 이를 내부 표준 물질로 간주하고 molecular sieve 5A에서 먼저 메탄 및 산소의 양을 산출한 후 이 결과를 porapak Q의 분석결과에 적용하여 이산화탄소의 양을 구하였다. 메탄올의 분석에는 Graphac C(Alltech, USA)가 충전된 column이 사용되었다. GC 분석에 사용된 여러 가지 조건들은 Table 1에 요약하였다.

CCE를 구하기 위한 균체 중의 탄소, 질소, 산소, 그리고 수소원소의 함량은 원소분석기(EA1108, CARLO ERBA Instruments, Italy)를 이용하여 측정하였다. 수율 측정에 필요한 모든 분석은 각각의 시료에 대해 3번 이상 실시하여 평균값을 취하였다.

**효소의 활성측정**

균체내 MMO활성은 propylene을 기질로 propylene oxide의 생성속도를 측정하여 구하였다(14, 18). 활성 측정을 위해 성장기질인 메탄을 사용하여 메탄의 소비속도나 메탄올의 생성속도를 측정할 수도 있으나, 메탄의 소비속도는 측정시 오차가 크고, 메탄올의 생성속도는 생성된 메탄올의 계속적인 산화로 인해 정밀한 측정에 어려움이 따른다. 이에 비해 propylene은 MMO에 의한 산화의 좋은 기질일 뿐 아니라 또한 생성물인 propylene oxide가 더 이상 산화되지 않기 때문에 정밀한 측정이 가능하였다. MMO의 활성이 세포내 NADH의 공급에 의한 제한을 받지 않도록 하기 위해 NADH 공급원으로 20mM의 formate를 첨가하였고 산소나 propylene에 의한 물질전달의 영향이 없도록 세포농도, 진탕속도 등을 적절히 조절해주었다. pMMO와 sMMO 간의 활성을 구분할 필요가 있을 때에는 sMMO에 대해서만 기질로 작용하는 chloroform이나 trichloroethylene을 사용하여 이들의 소모속도를 측정하였다. 구체적인 분석방법은 이미 발표한 논문(14)에 자세히 기술하였다.

**결과 및 고찰**

**메탄기질에서의 배양**

메탄이 기질로 사용될 때 질소원 및 구리 첨가 유무가 세포성장 속도와 수율에 미치는 영향을 Table 2에 정리하였다. 균체 생성효율은 탄소전환율(CCE), 즉 기질의 탄소가 균체내 탄소로 전환되는 비율로 나타내었고, 이때 세포의 원소구성성분은 원소 분석 결과에 기초하여  $C_4H_5O_2N$ 으로 일정하며 ash성분은 건조 균체 질량의 5%라고 가정하였다. 또한, 소모된 메탄 전체의 물질수지를 정확히 하기 위해 산소 소모, 이산화탄소 및 메탄올의 생성 등을 정량적으로 측정하였다. 이 측정은 앞서 재료 및 방법에서 언급한 대로 GC를 이용한 가스분석과 균체의 원소 분석에 기초하고 있는데 메탄소모량에 대해 탄소수율 기준으로 95~100%의 비교적 정확한 recovery를 보여 주었다. 모든 가스분석은 3차례 이상 행하여 평균값을 취하였고 각 조건에서 플라스크 배양도 3차례 행하여 평균값을 취하였다. 특히 세포가 균형성장을 하고 있는 지수성장기 동안에 모든 실험을 진행함으로써 비균형성장기에 관찰되는 균체사멸이나 균체 성분 변화에 따르는 영향을 최소화하고자 하였다(15, 19). Figure 3은 메탄에 대한 균체수율( $Y_{X/S}$ )를 구하는데 사용된 대표적인 실험결과로 실험의 정확도를 보여주고 있다.

**메탄기질에서의 성장속도와 MMO활성**

$NaNO_3$ 가 질소원으로 사용될 때 균체의 성장속도와 MMO활성은 배양액내 구리 존재 유무에 따라 크게 변한다(Table 2). 최대 비성장속도( $\mu$ )의 경우 구리가 존재할 경우  $0.12\text{ hr}^{-1}$ 로 구리가 존재하지 않을 때의  $0.070\text{ hr}^{-1}$  보다 약 70% 빨라지며, propylene으로 측정된 활성의 크기도 구리가 존재할 경우가 그렇지 않을 경우에 비해 2배 가까이 증가한다.

Table 3은 구리 존재 유무에 따른 활성을 각각 다른 기질에 대해 측정된 결과를 보여준다. 구리가 존재 할 경우 propylene에 대해서만 활성이 나타나지만 구리가 존재하지 않을 경우 chloroform 및 trichloroethylene 모두에 대해 활성이 나타난다. pMMO는 chloroform과 trichloroethylene에 대해 활성이 거의

Table 1. Operating conditions of gas chromatography for measuring growth yield and enzyme activity.

	CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> plus N <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> OH	propylene, propylene oxide
Column	6ft × 1/8inch stainless steel	6ft × 1/8inch stainless steel	6ft × 1/8inch stainless steel	6ft × 1/8inch stainless steel
Packing material	Porapak Q (80/100 mesh)	Molecular Sieve 5A (60/80 mesh)	Graphac C (80/100 mesh)	Graphac C (80/100 mesh)
Detector	TCD	TCD	FID	FID
Oven temperature	40°C	40°C	120°C	85°C
Detector temperature	170°C	170°C	180°C	120°C
Carrier gas	Helium	Helium	Nitrogen	Nitrogen
Flow rate	30ml/min	30ml/min	30ml/min	20ml/min
Internal standard	Nitrogen	Nitrogen	-	-

Table 2. Efficiency of carbon assimilation into biomass, specific growth rate, and MMO activity of *M. trichosporium* OB3b with methane as a carbon source.\*

Nitrogen source	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (mg/l)	CCE (%)	O <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>4</sub>	Y <sub>X/S</sub>	Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	MMO activity
NaNO <sub>3</sub>	0.25	34.2	1.75	0.63	0.06	0.55	0.12 (0.11)*	120
NaNO <sub>3</sub>	0.00	30.6	1.78	0.70	0.05	0.49	0.070 (0.060)*	65
NH <sub>4</sub> Cl	0.25	35.4	1.24	0.50	0.05	0.56	0.12 (0.070)*	75
NH <sub>4</sub> Cl	0.00	32.1	1.77	0.59	0.05	0.51	0.070 (0.045)*	40

CCE : carbon conversion efficiency, mol carbon assimilated into cellular material per mol methane(or carbon) consumed

O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> : O<sub>2</sub> consumption(mol)/CH<sub>4</sub> consumption(mol)

CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> : CO<sub>2</sub> formation(mol)/CH<sub>4</sub> consumption(mol)

CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>OH in the medium(mol)/CH<sub>4</sub> consumption(mol)

Y<sub>X/S</sub> : g cell formation/g substrate consumption

MMO activity : nmol propylene oxide formation/mg DCW-min

\* Flask cultures were performed under a 1:1(v/v) methane/air mixture except for the marked (\*), which were under a 1:9(v/v) methane/air mixture. Each number is the average of three or more independent measurements, the variation of which was less than 10%.

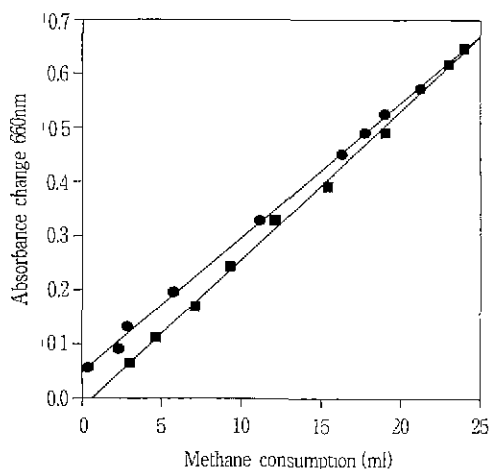


Figure 3. Typical experimental measurements for the determination of *M. trichosporium* OB3b in Cu-containing medium with NH<sub>4</sub>Cl (■) or NaNO<sub>3</sub> (●) as a nitrogen source. Methane consumption vs. absorbance change was plotted.

없는 것으로 알려져 있으므로(10-11) 본 결과는 구리 존재시 pMMO가 생성되는 것을 확인시켜 준다.

구리첨가에 따른  $\mu$ 의 증가는 MMO활성의 변화와 연관을 지을 수 있다. 즉 균체성장의 율속단계가 탄소기질의 대사 첫 단계인 메탄 산화단계라면  $\mu$ 는 MMO활성과 비례할 것이다. 실제로 Table 2에 나타난  $\mu$ 와 MMO활성의 수치는 이 가능성을 어느 정도 시사하고 있다. 그러나, 이 가능성을 명확히 판단하려면 채택된 배양조건하에서 MMO 활성을 기초로 계산한 최대 메탄

Table 3. Effect of culture medium Cu availability on MMO activities for various substrates in *M. trichosporium* OB3b<sup>a</sup>

Culture Condition	MMO activity(nmol/min · mg cell)		
	Propylene	Chloroform	Trichloroethylene
(+)Cu <sup>b</sup>	120	0	0
(-)Cu	65	65	32

<sup>a</sup>Flask-grown cells on CH<sub>4</sub> and NO<sub>3</sub> were used for the activity measurements.

<sup>b</sup>10  $\mu$ M.

소모속도와 균체성장에 필요한 메탄소모 속도를 자세히 비교해 볼 필요가 있다. 메탄을 기질로 균체(resting cell)의 MMO 활성을 측정된 결과에 의하면 sMMO의 최대활성은 270 nmol CH<sub>4</sub>/mg DCW · min 정도이고 Michaelis-Menten model에서의 포화상수( $K_s$ )는 30  $\mu$ mol CH<sub>4</sub>/L이다(4, 20). 메탄의 용해도를 1 기압 하에서 1.24 mmol/L로 가정할 경우(21) 플라스크 기체상에 공기와 메탄이 1:1로 존재할 때 배양액내 메탄의 농도는 0.62 mmol/L이므로 sMMO의 활성은 약 257 nmol CH<sub>4</sub>/mg DCW · min ( $\approx$  0.247 g CH<sub>4</sub>/g DCW · hr)에 이른다. 만일 이 속도가 메탄의 실제 소모 속도 ( $q_s$ )가 된다면  $\mu$ 는 다음식으로 계산된다.

$$\mu = q_s \cdot Y_{X/S} = 0.116 \text{ hr}^{-1}$$

이때  $Y_{X/S}$ 는 Table 2의 CCE, 즉 NaNO<sub>3</sub>가 질소원이고 구리

가 결핍된 배지에서 얻어지는 값인 30.6%에서 환산한 0.47 g cell/g CH<sub>4</sub>를 사용하였다. 그러나 여기서 계산된 비성장속도 0.116 hr<sup>-1</sup>은 구리 결핍 배지에서 성장 속도 0.070 hr<sup>-1</sup>보다 65%가량 큰 값이므로 주어진 배양 조건에서 MMO에 의한 메탄의 산화단계는 균체성장의 율속단계로 보기는 어렵다. 구리가 첨가된 배지에서 자란 whole-cell pMMO의 CH<sub>4</sub> 산화활성 및 K<sub>s</sub>에 대한 정확한 측정치는 없으나 이 경우도 q<sub>s</sub>로부터 계산한 성장속도가 Table 2의 μ보다 크게 나올 것으로 예상된다. Park 등(14)은 회분식 및 연속식 생물반응기 실험을 통해서 MMO의 propylene활성이 *M. trichosporium* OB3b의 성장속도와 무관함을 밝힌 바 있는데 이 역시 μ와 MMO활성의 직접적인 관련성을 부정하는 증거이다.

NH<sub>4</sub>Cl이 질소원으로 사용된 경우에도 배지내 구리존재 유무에 따라 μ와 MMO활성 등이 많이 달라졌다. 특히 μ는 구리이온에 따라 큰 차이가 있을 뿐 아니라 메탄의 농도에 따라서도 큰 차이를 보여준다. 즉 head space내 메탄의 농도가 50%일 때는 μ가 각각 0.12 hr<sup>-1</sup>(구리존재시) 및 0.070 hr<sup>-1</sup>(구리결핍시)로 NaNO<sub>3</sub>가 질소원으로 사용된 경우와 큰 차이가 없으나, head space내 메탄의 농도가 10%로 낮아질 때는 0.070 hr<sup>-1</sup>(구리존재시) 및 0.045 hr<sup>-1</sup>(구리결핍시)로 크게 감소한다. 이러한 감소는 Whittenbury 등(24)과 O'Neill과 Wilkinson 등(20)이 밝힌 대로 MMO산화반응시 NH<sub>3</sub>가 메탄의 경쟁방해물질로 작용하기 때문으로 판단된다.

NH<sub>3</sub>에 의한 저해상수는 다음식으로 계산할 수 있다(Table 4).

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

Table 4. Inhibition of NH<sub>3</sub> on the methanotrophic growth of *M. trichosporium* OB3b.

Culture Condition	μ <sub>m</sub> (hr <sup>-1</sup> )	K <sub>s</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)
(+)Cu <sup>a</sup>	0.125	16	11
(-)Cu	0.073	16	12

<sup>a</sup>10 μM.

이때 μ<sub>m</sub>, K<sub>s</sub>값은 Table 2의 실험값과 문헌값(4)으로부터 계산하였고, NH<sub>3</sub>의 농도는 Handerson-Hasselbalch 식에서, 또한 배지내 메탄의 농도는 기상의 농도와 메탄 용해도 상수로부터 구하였다. 구리 존재 유무에 관계없이 K<sub>i</sub>값은 비슷하였고, 이 값은 O'Neill과 Wilkison(20)이 얻은 10.5 μM과 거의 일치한다.

한편 propylene에 대한 MMO 활성은 pMMO 균체의 경우 75 nmol/mg DCW · min이고 sMMO 균체의 경우 40 nmol/mg DCW · min로 질산염 배지가 사용되었을 때보다 현저히 감소한다. 이 감소가 세포내 실제 MMO 생성량의 감소를 뜻하는지 혹은 산화반응에 필요한 NADH 공급속도의 감소를 뜻하는지는 분명치 않다. 또한 이 값은 propylene에 대해 측정된 메탄산화효소 최대활성이므로 실제균체 성장시의 메탄산화속도와는 차이가 있다. 그러나 여기에서 한가지 지적할 수 있는 사실은 NH<sub>4</sub>Cl 배지에서 메탄산화효소 최대활성의 감소에도 불구

하고 head space 메탄 농도 50%에서의 균체성장속도는 질산염 배지와 비교할 때 거의 감소하지 않았으므로 μ와 MMO 최대활성이 직접적으로 비례한다고 보기는 어렵다.

#### 메탄기질에서의 성장수율

Table 2는 구리 존재여부가 CCE 값에 많은 영향을 미치고 있음을 보여준다. 구리 결핍시 즉 sMMO가 형성될 경우 약 30.6%이고, 이에 비해 구리 존재시 즉 pMMO가 형성될 경우 약 34.2%로 후자가 약 10% 정도 높다. 이러한 경향은 Dalton과 Leak이 type I 메탄산화균인 *M. capsulatus* (Bath)에 대해 얻은 결과(18)와 일치한다. 그러나 CCE 값의 절대적인 크기는 *M. capsulatus*(Bath)의 경우가 31.3% 및 42.5%로 *M. trichosporium* OB3b보다 높는데 이는 type I에 존재하는 ribulose monophosphate pathway가 type II의 serine pathway 보다 높은 에너지 효율을 갖기 때문으로 판단된다(17, 22, 23).

일반적으로 유기탄소원에서 자라는 미생물(heterotroph)의 CCE나 Y<sub>X/S</sub>는 미생물대사의 ATP 효율과 직접적인 관계가 있어서 ATP 생산효율이 올라갈 때 CCE가 증가하는 이른바 'ATP-제한' 성장으로 분류된다. 그러나 메탄산화균의 경우 Anthony 등(23)의 분석에 의하면 'ATP-제한' 성장이라기 보다는 'NADH-제한' 성장으로 분류된다. Leak와 Dalton은 Anthony의 연구를 바탕으로 *M. capsulatus*(Bath)에 대한 실험을 통해 pMMO를 갖는 균체가 sMMO가 갖는 균체보다 높은 CCE를 보여주는 것은 pMMO가 보다 적은 NADH를 요구하기 때문이라고 제안하였다. MMO가 계속적으로 메탄을 메탄올로 전환하려면 그 자신이 환원되어야 하고 이때 구리 결핍시 생성되는 sMMO는 반드시 NADH를 환원제로 요구하는 반면, 구리 존재시 생성되는 pMMO는 메탄올을 포름알데히드로 산화하는 효소인 methanol dehydrogenase(MDH)로부터 혹은 MDH로부터 cytochrom c를 거쳐 전자(electron)를 전달받을 수 있다는 설명이다(16, 30). 이 설명은 구리 존재 유무에 따른 CCE 차이를 세포내 MMO의 역할만으로 국한시킨 것이기는 하지만 현재까지 가장 많은 지지를 받고 있다. 또한 기질을 CH<sub>3</sub>OH로 바꾸어 실험한 결과와도 잘 일치한다(Table 5 참고). 그러나 pMMO가 매우 불안정하므로 아직 순수 분리되어 *in vitro* 실험에서 활성이 측정된 바가 없으며 따라서 MDH가 pMMO를 직접 환원시킨다는 실험적 증거는 존재하지 않는다(17, 28, 29). 또한 구리이온이 균체내 MMO의 존재위치를 바꾼 것처럼 여러 다른 중요한 효소의 형태, 위치, 발현정도 등을 변화시켜 균체의 전반적인 생리를 현저히 변화시키고 그 결과로 CCE에 변화가 초래되었을 가능성도 무시될 수 없다고 하겠다.

한편 NH<sub>4</sub>Cl이 질소원으로 사용될 경우도 pMMO 균체가 sMMO 균체보다 높은 CCE를 보여준다. 이 결과도 메탄이 메탄올로 전환될 때의 에너지 효율차이나 균체 전체적 생리변화로 설명될 수 있다. 그러나 CCE의 크기가 질산염 배지에서의 값과 거의 동일한 데 일반적으로 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>가 생체물질로 동화될 때 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>보다 작은 에너지를 필요로 한다는 사실(25)을 고려할 때 다소 의외의 결과이다(아래 CH<sub>3</sub>OH기질에서의 성장 참조). 그러나 한가지 가능성은 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>가 nonspecific MMO에 의해 nitrite로 산화되는 반응때문에 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>가 에너지 면에서 갖는 장점이 상쇄되는 것이다(20, 27).

Table 5. Efficiency of carbon assimilation into biomass and specific growth rate of *M. trichosporium* OB3b with methanol as a carbon source.

Nitrogen source	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (mg/l)	CCE(%)	O <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH	CO <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH	Y <sub>X/S</sub>	Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	0.25	41.0	1.02	0.57	0.29	0.15
NaNO <sub>3</sub>	0.00	40.0	1.00	0.58	0.28	0.15
NH <sub>4</sub> Cl	0.25	48.0	0.89	0.53	0.34	0.21
NH <sub>4</sub> Cl	0.00	48.0	0.91	0.53	0.34	0.20

CCE : carbon conversion efficiency, mol carbon assimilated into cellular material per mol methanol(or carbon) consumed

O<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH : O<sub>2</sub> consumption(mol)/CH<sub>3</sub>OH consumption(mol)

CO<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH : CO<sub>2</sub> formation(mol)/CH<sub>3</sub>OH consumption(mol)

Y<sub>X/S</sub> : g cell formation/g substrate consumption

#### 메탄올 기질에서의 배양

탄소원이 메탄에서 메탄올로 바뀌면 메탄 대사과정의 첫 단계인 메탄 산화과정만 불필요해지므로(Figure 1) 메탄올에서의 성장은 지연기간(lag period)이 없이 바로 시작될 것으로 생각하기 쉽다. 그러나 탄소원 전환에 따르는 균체의 성장적응에는 많은 시간이 소요되어 실제로는 3-4차례의 계대배양이 필요하다(26). 또한 일단 메탄올기질에 적용된 *M. trichosporium* OB3b는 메탄기질에서는 다시 자라지 않는 특징을 가진다(11, 26). Table 5에는 메탄올기질에 충분히 적응시킨 균체의 성장특성을 정리하여 놓았다. MMO활성은 메탄올 배지에서 성장한 경우 전혀 나타나지 않았으므로 Table 5에 표시하지 않았다.

#### 메탄올기질에서의 성장속도

메탄올을 탄소원으로 할 때 성장속도에 대한 구리 이온의 영향은 사라질 뿐 아니라 메탄을 탄소원으로 하는 경우보다 상당 수준 증가한다. 또한 질소원의 영향이 뚜렷이 나타난다. 예를 들어 메탄기질의 경우 질소원에 관계없이  $\mu$ 는 0.12 hr<sup>-1</sup>로 관찰되었으나, 메탄올 기질의 경우 NaNO<sub>3</sub> 배지에서는 0.15 hr<sup>-1</sup>인 반면 NH<sub>4</sub>Cl 배지에서는 0.20 hr<sup>-1</sup>로 약 33% 증가된 값을 보여준다.

메탄올을 탄소원으로 할 경우 메탄을 탄소원으로 할 때보다 성장속도가 증가하는 이유로 MDH에 의한 메탄올의 assimilation이 MMO에 의한 메탄의 assimilation보다 더 효과적이기 때문이라는 추정이 가능하다. Leak, Anothony 등의 실험결과(11, 30)에 의하면 세포에 독성이 강한 메탄올의 세포내 축적을 방지하기 위해 메탄산화균은 MMO 보다 훨씬 높은 MDH 활성을 소유하고 있으며, 또한 Table 2의 결과에 의하면 MMO 활성의 크기 혹은 세포내 MMO 생성량도 메탄산화균이 필요로 하는 것보다 훨씬 높은 수준을 유지하고 있다. 따라서 만약 메탄올 기질로 사용하면서 성장속도를 증가시키려면 NADH 공급 속도를 늘리는 것을 고려해 볼 수 있다(Figure 1 참고). 본 연구에서는 이 가능성을 확인하기 위해 메탄기질배양에서 5-20 mM 농도로 formate를 첨가하여 보았다 그러나 예상과 달리 성장속도의 증가는 관찰되지 않았다.

메탄올이 보다 높은 성장속도를 나타내는 또 다른 이유는 기체기질인 메탄을 assimilation하기 위해 다량 생성되는 MMO가 세포성장에 과도한 부하로 작용하였을 가능성을 들 수 있다. 실제로 *M. trichosporium* OB3b의 경우 sMMO가 세포질내 존재

하는 전체 단백질의 약 20%에 달할 정도로 큰 비중을 차지한다는 보고가 있고, pMMO의 경우도 이와 비슷한 비중으로 세포질에 생성된다고 알려져 있다(11). 그러나 이 가능성을 검증하려면 메탄올 기질에서 메탄산화균을 배양하면서 동시에 MMO가 발현되도록 하는 조건에서 성장속도를 측정할 수 있어야 하는데 현재 이러한 조건은 알려져 있지 않다.

한편 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>를 사용할 경우에 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>보다  $\mu$ 가 증가하는 것도 세포내 NADH 소모량과 어느 정도 관계가 있을 것으로 판단된다. 물론 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 세포내로의 전달속도나 동화반응의 속도가  $\mu$ 에 영향을 주었을 가능성도 높으나 이 영향이 중요하다면 메탄기질에서도 질소원의 차이에 따라  $\mu$ 의 변화가 나타났어야 할 것이다(Table 2 참고). NADH공급속도가  $\mu$ 에 미치는 영향을 조사하기 위해 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 및 메탄올을 기질로 자라고 있는 플라스크에 역시 5-20 mM의 formate를 첨가하여 보았다. 그러나 이 경우에도  $\mu$ 의 증가가 관찰되지 않았다. 이 부분은 추후 보다 자세한 실험이 필요하다.

#### 메탄올기질에서의 성장수율

메탄기질에서의 성장특징과 비교할 때 가장 큰 차이는 배양액내 구리 존재유무에 따른 차이가 없어졌다는 것이다. 즉 동일한 질소원에서는 CCE, Y<sub>X/S</sub>,  $\mu$  등이 배양액내 구리 존재 유무에 관계없이 동일해 졌다. 이는 앞서 언급한 것처럼 메탄기질에서 pMMO 균체와 sMMO 균체가 보여주는 CCE의 차이가 주로 메탄대사의 첫 단계인 MMO에 의한 산화반응의 차이 때문이라는 것을 확인시켜주는 결과이다. 다시 말해 메탄산화에 필요한 환원력이 pMMO의 경우 MDH로부터 전달되지만 sMMO의 경우에는 그렇지 못하므로 에너지 효율면에서 pMMO가 보다 유리하다는 뜻이다

한편 Table 5는 Table 2와 비교하여 CCE 수치면에서 2가지 특징을 보인다. 첫째는 탄소원의 영향으로, 메탄에 비해 메탄올의 경우가 보다 높은 CCE를 보여준다는 것이다. 둘째는 질소원의 영향으로, 메탄기질에서는 질소원의 영향이 거의 나타나지 않았으나 메탄올 기질에서는 NH<sub>4</sub>Cl이 더 높은 CCE를 보여준다는 것이다. 탄소원의 영향은 Figure 1에서 알 수 있는 것처럼 메탄산화시 NADH가 소모되기 때문이다. 따라서 열역학적으로는 메탄이 메탄올보다 고에너지 화합물이지만 메탄산화균에 의해 생물학적으로 이용될 때는 메탄올이 보다 더 많은 유용한 에

너지를 갖고 있다는 뜻이 된다. 질소원의 영향 역시  $\text{NH}_4^+$  및  $\text{NO}_3^-$ 의 생체내 대사과정 중의 에너지 소요량 차이로 설명이 가능하다. Stouthamer는  $\text{NO}_3^-$ 가 동화될 때  $\text{NH}_4^+$ 보다 질소 1몰당 NADH 4몰이 더 소모된다고 제안한 바 있다(9, 25).

요 약

본 연구에서는 type II 메탄산화균인 *M. trichosporium* OB3b의 성장 속도와 수율을 실험적으로 다루었다. 탄소원으로 메탄올을 사용할 때가 메탄을 사용할 때보다 전체적으로 비성장 속도도 빠르고 탄소전환율도 높았다. 구리 이온의 영향은 메탄의 경우에는 분명히 나타났으나 메탄올의 경우에는 전혀 나타나지 않았다. 이는 메탄을 메탄올로 산화시키는 과정에서 pMMO와 sMMO간에 환원력 이용 방법에 차이가 나기 때문인 것으로 설명될 수 있었다. 한편 질소원의 종류에 따른 비성장속도나 균체수율의 차이는 메탄을 기질로 쓸 경우에는 매우 미미하였으나 MMO 활성은  $\text{NaNO}_3$  배지에서 훨씬 높았다. 메탄올을 기질로 사용하는 경우에는 질소원으로  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 사용한 경우가 보다 높은 비성장속도와 균체수율을 나타내었다. 이도 역시 질소원 동화에 필요한 에너지 소요량의 차이로 설명될 수 있었다. 전반적으로 type II 메탄산화균인 *M. trichosporium* OB3b는 type I 메탄산화균인 *M. capsulatus*(Bath)보다 낮은 성장속도와 수율을 보여 주었다. 한편, 본 연구의 결과가 *M. trichosporium* OB3b의 산업적 응용에 대해 시사하는 점은 다음과 같다. 첫째, *M. trichosporium* OB3b를 이용하여 메탄올이나 프로필렌옥사이드와 같은 유용물질을 생산하기 위해서 메탄기질에서 균주를 성장시키는 경우에 질소원으로써  $\text{NaNO}_3$ 를 사용하는 것이 좋고, 또한 pMMO 균체가 sMMO 균체보다 높은 활성을 가지므로 효소 안정성이 유지될 수 있다면 pMMO 균체가 더 유리하다. 둘째, 난분해성 유기 염소 화합물의 분해를 위해서는 sMMO를 발현시키는 환경에서 균주를 성장시켜야만 되지만 이 조건은 *M. trichosporium* OB3b의 성장환경 중 가장 열악한 환경이다. 셋째, 단세포 단백질을 생산할 경우 메탄올의 가격이 비싸지 않으면 메탄올 및  $\text{NH}_4\text{Cl}$  배지를 사용하는 것이 좋고 메탄올 탄소원으로 써야한다면 구리를 첨가하여 pMMO 균체를 기르는 것이 성장속도와 수율면에서 유리하다.

감 사

이 연구는 95년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임 (과제 번호 : 95-0502-10-01-3).

사 용 기 호

- $\mu$  : Specific growth rate( $\text{hr}^{-1}$ )
- $q_s$  : Methane consumption rate( $\text{g CH}_4/\text{g DCW} \cdot \text{hr}$ )
- $Y_{X/S}$  : Growth yield( $\text{g DCW}/\text{g CH}_4$ )
- $\mu_m$  : Maximum specific growth rate( $\text{hr}^{-1}$ )
- S : Concentration of substrate( $\mu\text{mol CH}_4/\text{L}$ )
- $K_s$  : Saturation constant( $\mu\text{mol CH}_4/\text{L}$ )
- i : Concentration of inhibitor( $\mu\text{mol NH}_3/\text{L}$ )

$K_i$  : Inhibition constant( $\mu\text{mol NH}_3/\text{L}$ )

참 고 문 헌

1. Senior, P. J. and Windass. (1980), The ICI single cell process. *J. Biotechnol. Lett.*, 2, 205-210.
2. Smith, S. R. L. (1984), "Microbial Growth on  $\text{C}_1$  Compounds" (Dalton, H. ed.), 342-348, Heyden, London.
3. Asenjo, J. A. and Suk, J. S. (1986), Microbial Conversion of Methane into poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB): Growth and Intracellular Product Accumulation in a type II Methanotroph. *J. Ferm. Technol.* 64, 271-278.
4. Park, S. and Choo, S. Y. (1993), Production of Methanol by Resting Cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *한국생물공학회지*, 8, 341-350.
5. Oldenhuis, O., Vink, R. M. J. M., Jessen, D. B., and Withalt, B. (1989), Degradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2819-2826.
6. Tsien, H. C., Brusseau, G.A., Hanson, R. S., and Wackett, L. P. (1989), Biodegradation of Trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3155-3161.
7. Alvarez-Cohen, L. and McCarty, P. L. (1991), Effects of Toxicity, Aeration, and Reductant Supply on Trichloroethylene Transformation by a Mixed Methanotrophic Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 228-235.
8. Jahang, D. and Wood, T. K. (1994), Trichloroethylene and Chloroform Degradation by a Recombinant Pseudomonad Expressing Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2473-2482.
9. Stouthamer, A. H. and van Verseveld, H. W. (1985), In "Comprehensive Biotechnology", ed. Moo Young, M., vol. I, chap 12, Pergamon press, Oxford, UK.
10. Anthony, C. (1985), "The Biochemistry of Methylo-trophs", pp. 158-159 Academic Press, N.Y.
11. Leak, D. J., Stanley, S. H., and Dalton, H. (1985), "Microbial Gas Metabolism : Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects" (R. K. Pool and C. S. Dow ed.), Chap 12, Academic Press, N.Y.
12. Stanley, S. H., Prior, S. D., Leak, D. J., and Dalton, H. (1983), Copper Stress Underlies the Fundamental Change in Intracellular Location of Methane Mono-oxygenase in Methane-oxidizing Organisms: Studies in Batch and Continuous Cultures. *Biotech. Lett.* 5(7), 487-492.
13. Davis, K. J., Cornish, A., and Higgins, I. J. (1987), Regulation of the Intracellular Location of Methane Monooxygenase During Growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methanol. *J. Gen. Microbiol.* 133, 291-297.

14. Park, S., Hanna, M. L., Taylor, R. T., and Droege, M. W. (1991), Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b : I. Production of Soluble Methane Monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 423-433.
15. Leak, D. J. and Dalton, H. (1986), Growth Yields of Methanotrophs: 1. Effects of Copper on the Energetics of Methane Oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 470-476.
16. Leak, D. J. and Dalton, H. (1986), Growth Yields of Methanotrophs : 2. A Theoretical Analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 477-481.
17. Woodland, M. P., Dalton, H. (1984), Purification and Characterisation of Component A of the Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. of Biol. Chem.*, **259**(1), 53-59.
18. Hou, C. T., Patel, R., Laskin, A. I., and Barnabe, N. (1979), Microbial Oxidation of Gaseous Hydrocarbons : Epoxidation of C<sub>2</sub> to C<sub>4</sub> n-Alkenes by Methylophilic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**(1), 127-134.
19. Shuler, M. L. and Kargi, F. (1992), "Bioprocess Engineering: Basic concepts", Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
20. O'Neill, J. G. and Wilkinson, J. F. (1977), Oxidation of Ammonia by Methane-oxidizing Bacteria and the Effect of Ammonia on Methane Oxidation. *J. of Gen. Microbiol.*, **100**, 407-412.
21. Perry, R. H. and Green, D. (1984), "Perry's Chemical Engineers' Handbook", 6th ed., pp.3-103, McGraw-Hill, New York, NY.
22. Van Dijken, J. P. and Harder, W. (1975), Growth Yields of Microorganisms on Methanol and Methane: A Theoretical Study. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 15-30.
23. Anthony, C. (1978), The Prediction of Growth Yields in Methylophilic. *J. Gen. Microbiol.*, **104**, 91-104.
24. Whittenbury, R., Phillips, K. C., and Wilkinson, J. F. (1970), Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205-218.
25. Stouthamer, A. H. (1977), Theoretical Calculations on the Influence of the Inorganic Nitrogen Source on Parameters for Aerobic Growth of Microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, **43**, 351-367.
26. Kang, M. S. and Park, S. (1995), Growth of an Obligatory Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methanol. *한국생물공학회지*, **10**, 212-220.
27. Murrell, J. C. and Dalton, H. (1983), Ammonia Assimilation in *Methylococcus capsulatus*(Bath) and Other Obligate Methanotrophs. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1197-1206.
28. Tonge, G. M., Harrison, D. E. F., and Higgins, I. J. (1977), Purification and Properties of the Methane Monooxygenase Enzyme System from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem. J.*, **161**, 333-344.
29. Tonge, G. M., Drozd, J. W., and Higgins, I. J. (1977), Purification and Properties of the Methane Monooxygenase Enzyme System from *Methylosinus trichosporium* OB3b. (1977b), *J. Gen. Microbiol.*, **99**, 229-232.
30. Anthony, C. (1986), Bacterial Oxidation of Methane and Methanol. *Adv. Microbial Physiol.* **27**, 113-210.