Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 6, 577-581 (1993)

New Methylotrophic Bacterium KJ29의 Methanol Dehydrogenase와 Serine Hydroxymethyltransferase를 이용한 Threonine의 생산에 관한 연구

김 경 자
순천향대학교 유전공학과

Production of Threonine Using Methanol Dehydrogenase and Serine Hydroxymethyltransferase in a New Methylotrophic Bacterium KJ29

Kim, Kyoung-Ja
Department of Genetic Enginieering, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Onyang, 336-600, Korea

Abstract — The amino acid threonine was produced from glycine and ethanol in a reaction mixture using cell free extract of the methylotrophic bacterium isolated from soil and identified as *mellthylobacterium* sp. KJ29. Although the isolate could grow on carbon source other than methanol, only the cell free extract from the cells grown on methanol produced threonine. Methanol dehydrogenase (MDH) activity was present only in the cells grown on methanol when compared to the cells grown on heterotrophic substrates. MDH activity was the highest in the cells grown on 0.5% methanol, mid-exponential growth phase. Methanol dehydrogenase and serine hydroxymethyltransferase were responsible for the production of threonine from glycine and ethanol.

메탄올 자화세균(Methylotrophic bacteria)이란 메탄올과 같은 탄소원자를 하나 함유한 화합물이나 몇 개의 탄소원자를 함유하나 탄소-탄소 결합을 가지고 있지 않은 화합물을 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있는 세균들로(1-3), 편성 메탄올 자화세균(4)은 위에서 언급한 화합물만을 이용하여 성장할 수 있으나 통성 메탄올 자화세균(5, 6)은 그 외에 다른 탄소-탄소 결합을 가진 화합물도 이용하여 성장할 수 있다.

메탄올 자화세균은 single cell protein의 생산(7), 세포내 축적 혹은 세포외로 분비하는 biopolymer(8-11)의 생산, 그리고 유기산, 아마노산, 조효소, 비타민과 cytochrome C와 같은 대사산물의 생산(12, 13) 등 많은 이용가능성으로 인해 주목받고 있다. 저자는 전보(14)에서 분홍색 통성 메탄올 자화세균(*Methylobacterium* sp. KJ29)을 토양에서 분리하여 균주의 특성과 resting cell을 이용한 threonine생산을 보고한 바 있다. L-threonine은 필수 아미노산의 하나로 주사제, 동물의 사료첨가제, 항생제(예, Azthreonam)의 원료로 이용되고 있으나 공급이 수요에 못 미치고 있는 실정이다. 이에 L-threonine의 생산효율을 높이기 위한 여러가지 방법에 관한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다(15-18). 값이 싸고 안정된 화합물인 methanol을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 메탄올 자화세균의 효소를 이용한 threonine 생산에 관하여 조사하기 위하여 본 연구에서는 *Methylobacterium* sp. KJ29의 세포추출물을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine 생산의 최적조건에 관하여 연구하였다. 또한 methanol(ethanol)을 formaldehyde (acetaldehyde)를 변화시키는 methanol dehydrogenase 활성(19-21)과 glycine과 acetaldehyde(formaldehyde)로부터 threonine(serine)을 생성시키는 se-

Key words: Methylotroph, threonine, methanol dehydrogenase, serine hydroxymethyl-transferase
***Corresponding author**

rine hydroxymethyltransferase의 활성(22-25)을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

전보(14)에 보고한 바와 같이 토양에서 분리한 통성 메탄올 자화 세균인 *Methylobacterium* sp. KJ29를 사용하였으며 메탄올을 0.5% 함유한 최소 액체배지를 이용하여 30℃에서 배양하였다.

탄소원 및 질소원의 영향

탄소원 및 질소원의 cell free extract를 이용한 threonine 생산에 미치는 영향 및 성장도에 미치는 영향은 각 탄소원을 메탄올 대신 0.5%(w/v or v/v)로 첨가하여 조사하였으며, 각 질소원은 NH_4Cl 대신 최소 액체배지에 0.4%(w/v or v/v)로 첨가하여 조사하였다.

세포추출물의 준비

200 ml의 배지에 균을 배양하여 log phase까지 키워 원심분리(8000 rpm, 10분)한 후 0.85% NaCl로 씻었다. 그 후 cell을 Tris-HCl buffer(pH 9.0)에 현탁하여 Ultrasonic oscillation으로 4℃에서 30초 간격을 두고 30초간 10번 처리한 후 8000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 이용하였다.

세포추출물을 이용한 threonine생산의 반응조건

8 mg(as protein)의 cell free extract, 200 μmol Tris-HCl buffer(pH 8.0), 8 mg glycine, 0.35 mmol ethanol, 0.1 μmol pyridoxal phosphate와 0.1 μmol phenazine methosulfate를 전체 1 ml이 되도록 첨가 후 30℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 끓는 수조에 5분간 두어 반응을 멈추게 한 후 상등액에서 생성된 threonine양을 paper chromatography법이나 아미노산 자동 분석기를 이용하여 측정하였다.

Threonine의 분리

반응액을 8000 rpm에서 10분간 원심분리후 상등액을 Dowex 50WX8(H^+) cation exchage resin의 column에 부운 후 증류수로 씻고 0.5N-HCl로 elution 시켰다. 그 후 threonine을 함유한 용액만 모아 농축시켰다.

아미노산 분석

반응상등액의 threonine 생성여부는 paper chromatography를 이용하여 조사하였다. 1차 전개용매로는 n-butanol-acetone-diethylamine-water(10 : 10 : 2 : 5 by vol.)을 이용하고 2차 전개용매로는 n-butanol-methylethyl-ketone-ammonia water-water(5 : 5 : 1 : 1, by vol.)을 이용하여 같은 방향으로 전개시킨 다음 ninhydrin 용액으로 threonine 생성여부를 조사하였다. Threonine의 정량을 위하여는 자동 아미노산 분석기 또는 HPLC을 이용하였다.

Methanol Dehydrogenase(MDH)의 활성 측정법

Anthony와 Zatman법(26)을 이용하여 세포추출액의 MDH를 측정하였다. 세포추출물, 100 μmol Tris-HCl buffer(pH 9.0), 15 μmol NH_4Cl, 10 μmole methanol, 0.086 μmol 2.6-dichlorophenol-indophenol(DCPI)을 전체 1.5 ml가 되도록 섞은 후 11 μmol의 phenazine methosulfate(PMS)를 넣어 30℃, 600 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 효소반응은 세포추출액을 포함하고 있는 반응혼합물에 PMS를 첨가하면서 시작하였고, 효소활성 1 Unit는 PMS 첨가후 1분 동안 600 nm에서 흡광도를 0.01 변화시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

Serine hydroxymethyltransferase(EC 2.1.2.1)의 활성 측정법

Scromgeour와 Hoeunnekens 방법(27) : 50 μmol potassium phosphate buffer(pH 7.5), 50 μmol glycine, 8 μmol formaldehyde, 0.5 μmol tetrahydrofolate, 0.3 μmol pyridoxal phosphate와 세포추출액을 전체 1.2 ml이 되게 섞은 후 37℃에서 8분간 반응시킨 후 15% trichloroacetic acid 0.3 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 Nash의 방법에 따라 남은 formaldehyde양을 측정하였다.

Ulevitch와 Kallen 방법(24) : DL-β-phenylserine 50 μmol, Na_2EDTA 0.9 μmol, sodium sulfate 23 mmol를 함유한 HEPES buffer(pH 7.5) 45.5 μmol에 세포추출액를 소량 넣어 전체 1.0 ml로 한 후 25℃, 279 nm에서 benzaldehyde의 생성량을 측정하였다. 효소의 one unit는 방법 a에서는 1분당 1.0 μmol의 formaldehyde가 37℃에서 소모되는데 소요되는 효소의 양으로 정의하였고, 방법 b에서는 1분당 1.0 μmol의 benzaldehyde가 25℃에서 생성되는데 필요한 효소 양으로 정의하였다. Specific activity는 mg단백

질당 units로 표시하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

본 균주는 methanol 이외의 여러 탄소원을 이용하여 성장할 수 있었으나, methanol에서 자란 cell의 세포추출물에서만 methanol dehydrogenase(MDH) 활성을 보였으며, 또한 MDH 활성이 나타난 세포추출물만이 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산할 수 있었다. NAD(p)-independent MDH는 통성메탄올 자화세균인 *Pseudomonas* sp. M27에서 제일 먼저 연구되었으며(28), Patel 등에 의해서는 *Methylococcus capsulatus*에서 MDH가 연구되었는데 기질특이성이 다양했으며, 1차 알코올을 산화시키는 특성을 가지고 있었고, 사슬길이가 길수록 산화속도가 느린 것으로 밝혀졌다(29, 30). NAD^+를 cofactor로 요구하는 MDH의 경우 2-propanol, 2-butanol 등과 같은 2차 알코올을 산화시키는 것으로 보고되었으며, *Pichia* sp., *Pseudomonas* sp. 등에서 정제되었다(31, 32). Serine hydroxymethyltransferase(SHMT) 활성은 이와는 달리 methanol 및 다른 탄소원에서 성장한 cell의 세포추출물에서도 나타났으며, methanol에서 자란 cell의 세포추출물에서 약간 높았다(Table 1). *Pseudomonas* sp. AM1과 *Methylobacterium organophilum*에서 SHMT활성이 메탄올 등과 같은 C1-화합물에 의해 induction되는 것으로 알려져 있다.

Table 1. Effect of carbon compounds on growth, enzyme activities and threonine production of *Methylobacterium* sp. KJ29

Carbon compounds	Growth*	MDH (U/mg)	SHMT (U/mg)	Threonine (mg/ml)
Methanol	1.10	299.5	7.6	0.18
Ethanol	1.19	0	4.8	0
Acetate(Na)	0.94	0	4.1	0
Glucose	0.67	0	5.9	0
Citrate(Na)	0.96	0	4.3	0
Propanol	0	—	—	—

*: OD at 600nm of cultured broth
—: not determined
MDH: Methanol dehydrogenase activity
SHMT: Serine hydroxymethyltransferase activity
Carbon compounds were added at the concentration of 0.5%.
Reaction for threonine production by cell free extract was described in the Materials and Methods.

질소원의 영향

0.4%로 첨가된 질소원중에서 무기질소원에서 자란 cell의 세포추출물에서만 MDH 활성이 나타났으며, 또한 이 MDH 활성을 보이는 세포추출물만이 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산할 수 있었다. 유기질소원은 성장에는 좋은 결과를 나타내었으나 유기질소원에서 자란 세포추출물에서는 MDH 활성이 없었으며, 또한 이것을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산할 수 없었다(Table 2).

Methanol 농도의 영향

본 균주를 초기메탄올 농도 0.25%에서 4.0%까지 변화시켜 키운 후 세포추출물의 효소활성을 조사한 결과 0.5%에서 MDH 활성이 가장 높았다. SHMT 활성은 0.25%-2.0% 메탄올 농도내에서 큰 변화가 없이 유사하였다(Table 3). SHMT의 isozyme 중 하나는

Table 2. Effect of nitrogen compounds on growth, enzyme activities and threonine production of *Methylobacterium* sp. KJ29

Carbon compounds	Growth*	MDH (U/mg)	SHMT (U/mg)	Threonine (mg/ml)
NH_4NO_3	0.92	412.2	11.3	0.17
$(NH_4)_2SO_4$	0.97	544.1	3.85	0.15
NH_4Cl	1.10	299.5	7.6	0.18
Casamino acid	0.93	0	4.8	
Beef-extract	0.70	0	5.2	0
Yeast-extract	1.0	0	5.7	0
Bacto-peptone	0.82	0	4.7	0

Descriptions are same as Table 1 except that nitrogen compounds were added at the concentration of 0.4%.

Table 3. Effect of initial concentration of methanol on the growth, enzyme activities and threonine production of *Methylobacterium* sp. KJ29

MoOH conc.(%, v/v)	Growth* (U/mg)	MDH (U/mg)	SHMT (mg/ml)	Threonine
0.25	0.59	93.5	6.8	0.09
0.5	1.10	299.5	7.6	0.18
1.0	0.71	282.8	7.4	0.18
2.0	0.38	249.5	8.1	0.15

Descriptions are same as Table 1.

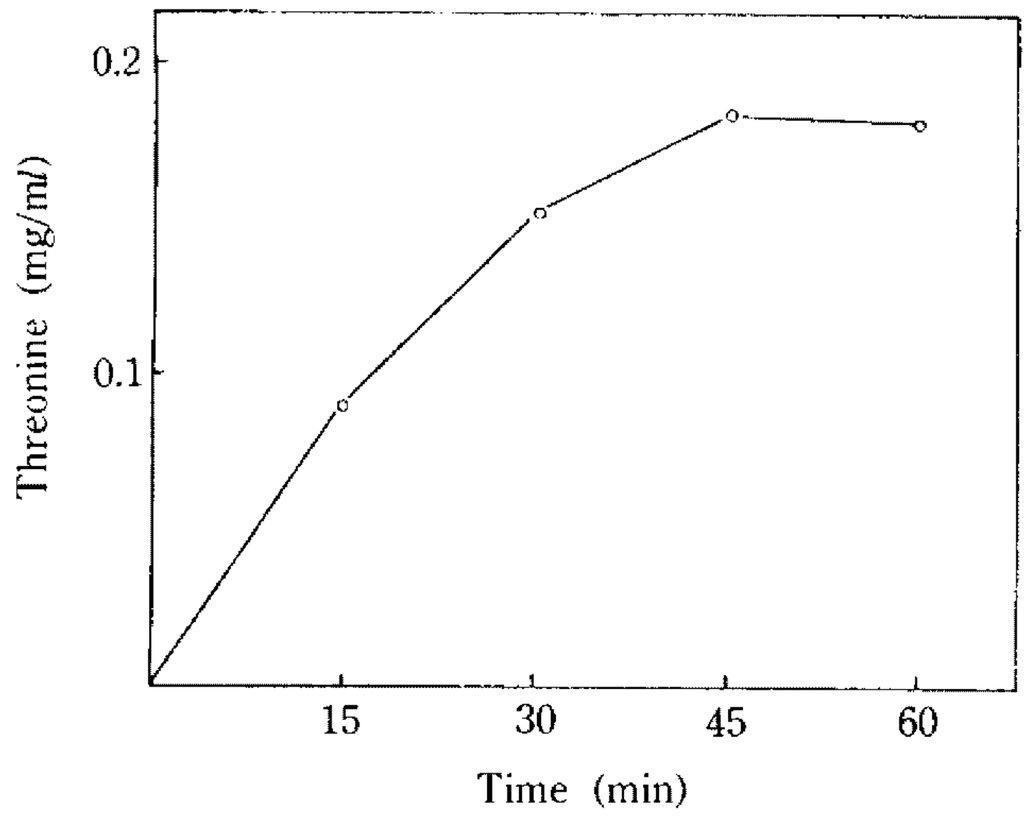

Fig. 1. Time course of production of threonine by cell free extract of *Methylobacterium* sp. KJ29.

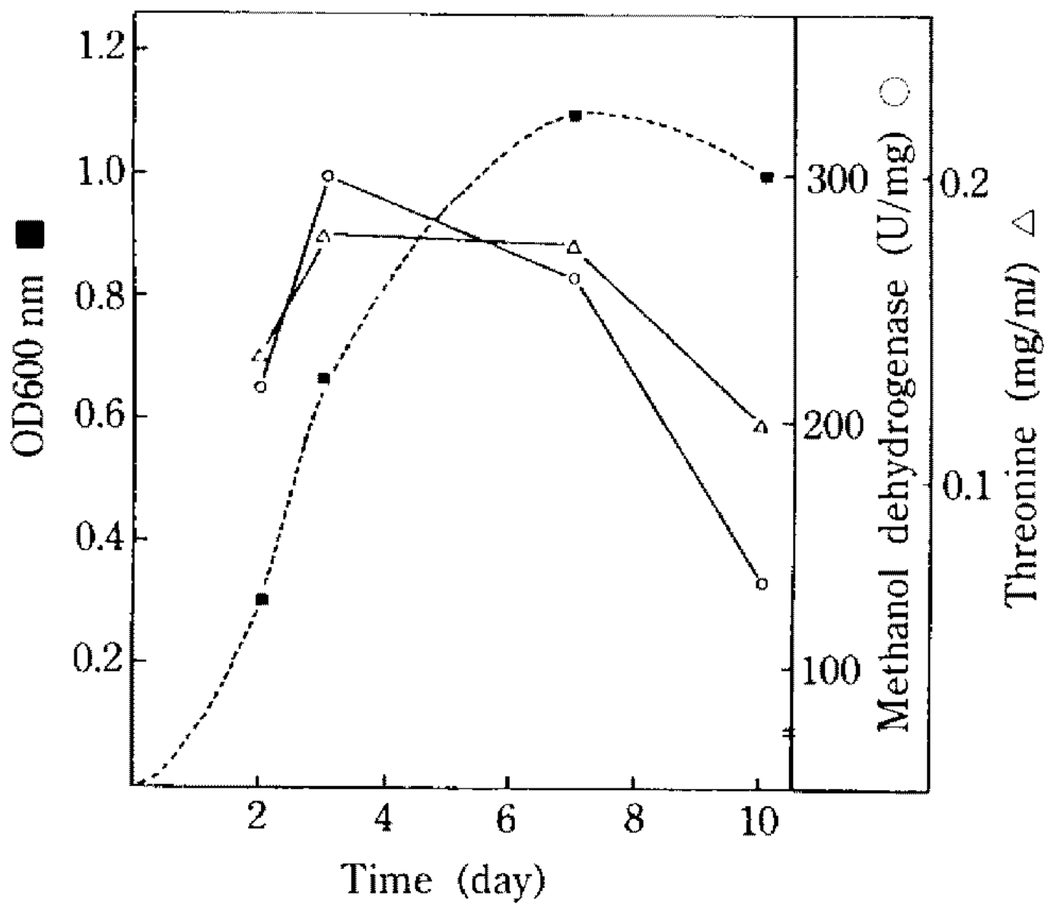

Fig. 2. Profiles of growth, methanol dehydrogenase activity and threonine production of *Methylobacterium* sp. KJ29.

constitutive한 것으로, L-serine으로부터 glycine을 형성시키는 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있으며, 또 하나는 inducible한 것으로 C_1-화합물의 동화작용을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 한편 *Salmonella typhimurium*에서는 L-serine과 glycine이 SHMT 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(33, 34).

시간에 따른 threonine 생산

세포추출물을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine 생산량을 반응시간에 따라 조사한 결과 45분에서 60분에 최고치에 달했다(Fig. 1).

균의 성장, MDH 활성과 threonine 생산과의 관계

MDH는 메탄올 대사과정중 이화작용의 첫 단계에 필요한 효소이다(3, 20). Methanol autotroph인 *Xanthobacter* sp. H4-14경우 MDH 활성이 지수 성장기 중기에서 가장 높게 나타났고 그 이후에는 급격히 감소한다고 보고되었다(26). 본 균주의 MDH 활성도 지수성장기 중기에서 가장 높은 것으로 나타났으며 그 후 점차 감소하였다. 또한 대수 증식기 중기까지 성장시킨 세포의 추출물이 glycine과 ethanol로부터 threonine을 가장 많이 생산시켰다(Fig. 2).

요 약

토양에서 분리한 통성 메탄올 자화세균중 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산하는 균주를 *Methylobacterium* sp. KJ29로 명명하고 이 균주의 세포추출물을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine 생산의 최적조건을 조사하였다. 이 균주는 methanol 뿐 아니라 다른 heterotrophic substrate에서도 잘 자랐으나 methanol에서만 methanol dehydrogenase (MDH) 활성이 나타났으며 이 세포추출물을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산할 수 있었다. 또한 이 균주는 무기 질소원 및 유기 질소원을 이용하여 성장할 수 있었으나 무기 질소원을 이용하여 성장한 균의 세포추출물에서만 MDH 활성이 나타났으며 역시 이 추출물을 이용하여 glycine과 ethanol로부터 threonine을 생산할 수 있었다. 0.5% methanol 농도에서 대수증식기 중기까지 자란 균의 세포추출물에서 MDH 활성이 가장 높았으며 threonine 생산은 45분-60분간의 반응시간에서 가장 높았다. serine hydroxymethyl-transferase(SHMT) 활성은 탄소원, 질소원에 큰 영향을 받지 않았다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 학술진흥재단 지방대 육성과제 학술연구조성비에 의해 이루어졌으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Holloway, B. 1984. *Genetics of methyltrophs*. In Methyltrophs: Microbiology, Biochmistry and

Genetics, ed. C.T. Hou. pp. 87. Boca raton: CRC press. 180pp.
2. Lidstrom, M.E. 1990. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 27.
3. Anthony, C. 1982. *The biochemistry of Methylotrophs.* Acadamic press, Inc., New York.
4. Baev., M.V., L.V. Christoserdova, L.V., B.M. Polanur, V.E. Sterkin, M.Y. Kiriukhin, Y.D. Tsygankor. 1992. *Arch. Microbiol.* **158**: 145.
5. Reed, W.M. and P.R. Dugan. 1987. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1389.
6. Wijngaard, A.J., Koen, W.H.J., D.B. Janssen. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 976.
7. Howells, E.R. 1982. *Chem. and Ind.* **7**: 508-515.
8. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizui. 1986. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
9. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizui. 1986. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 366-374.
10. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizui. 1986. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 370-376.
11. Linton, J.D., P.D. Watts, R.M. Austin, D.E. Haugh and H.G.D. Niekus. 1986. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 779-788.
12. Tani, Y., Yonehara, T., Sakai, Y., Yoon, B.D: Microbiol Growth on C-1 compounds, ed. H. Van Verseveld, H. Duine, pp. 248-254. Amsterdam.
13. Nishio, N. 1970. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 21.
14. 김경자, 박귀례. 1992. *Yakhak Hoeji* **36**: 315.
15. Yamada, H., S.S. Miyazaki. S.S., Izumi, Y. 1986. *Agri. Biol. Chem.* **50**: 17-24.
16. Davis, L. and R.S. Thompson, R.S. 1987. In: *Prod. 4th European Congress on Bipotechnology*, Vol. 2, Neijssel, O.M.; van der Meer, R.R. and Luyben, K.CH.AM. (eds), Elsevier Science Pub. B.V. Amsterdam.
17. Izumi, Y., Takizawa, H., Tani, Y., Yamada, H. 1982. *J. Ferment. Technol.*, **60**: 269-276.
18. Karasawa, M., Tosaka, O. Ikeda, S. and H. Yoshii. 1986. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 339.
19. Day, D.J. and C. Anthony. 1990. *Method. Enzymol.* Vol. 188, 210. Lidstrom, M.E. ed. Academic press.
20. Auton, K.A. and C. Anthony. 1989. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1923.
21. Eggeling, L. and H. Sahm. 1980. *Arch. Microbiol.* **127**: 119.
22. O'Conner, M.L. and R.S. Hansen. 1975. *J. Bacteriol.* **124**: 985.
23. Schomgeour, H.G. and F.M. Huenneskens. 1962. Enzymol. vol. V. 838-848. Colowick, S.P. and Kaplau, N.O. ed. Academic Press.
24. Ulevitch, R.J. and R.G. Kallen. 1977. *Biochemistry* **16**: 5343.
25. Schirch, V., D. Schirch, F. Martini and F. Bossa. 1986. *Eur. J. Biochem.* **161**: 45.
26. Anthony, C. and L.J. Zatmani. 1964. *Biochem. J.* **92**: 614.
27. Schomgeour, K.G. and F.M. Huennekens. 1962. Methods in Enzymology, (Colowick, S.P., N.O. Kaplan, ed.) Academic press, New York, Vol. 5, 838-845.
28. Anthony, C. and L.J. Zatman. 1964. *Biochem. J.* **92**: 609-617.
29. Patel, R.N., H.R. Bose, W.J. Many and D.S. Hoare. 1972. *J. Bacteriol.* **110**: 570-577.
30. Patel, R.N., C.T. Hou, A.I. Laskin, P.Derelanko and A. Felix. 1979. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 219-227.
31. Hou, C.T., R.N. Patel, N. Barhabel and I. Marczak. 1981. *Eur. J. Biochem.* **119**: 359-368.
32. Patel, R.N., C.T. Hou, A.I., Laskin and P. Derelanko. 1981. *J. Appl. Biochem.* **3**, 218-225.
33. Harder, W. and J.R. Quayle. 1971. *Biochem. J.* **121**: 753-760.
34. O'Conner, M.L. and Hanson, R.S. 1975. *J. Bacteriol.* **124**: 985-992.

(Received September 13, 1993)