

*Methylosinus trichosporium*을 이용한 메탄으로부터 메탄올 생성에 관한 연구

강 환 구

한남대학교 공과대학 화학공학과

Studies on Methanol Production from Methane by *Methylosinus trichosporium*

Whankoo Kang

Dept. of Chem. Eng., Hannam Univ., Daejeon 300-791, Korea

ABSTRACT

The effects of EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid), Cu, temperature, and gas(methane and oxygen) composition on methanol production from methane with *Methylosinus trichosporium* were investigated. In this experiment EDTA was found to be a potential methanol dehydrogenase inhibitor since it causes methanol accumulation and 6mM was found to be optimum concentration of EDTA for methanol production. When Cu was added in culture media, the produced methanol concentration level was increased. Hence it is believed that Cu enhanced the particulate methane monooxygenase formation and consequently the addition of Cu could increase the methanol production from methane. In this experiment the optimum concentration of Cu was found to be 1mM for methanol production. When temperature was shifted down from 30°C to 25°C, the methanol production level was enhanced by 50%. When the ratio of methane to oxygen in gas phase was increased to 2.3 from 1, produced methanol concentration was also enhanced by 100%.

서 론

석유화학 중간체로서 메탄올 생성은 1990년에 미국에서 73억 파운드였으며 유기화학 물질 생산중 여섯 번째를 차지하였는 바 메탄올의 용도를 살펴보면 가솔린을 대신해서 자동차 연료로 사용할 수 있는 액체 청정 연료이며 또한 가솔린의 옥탄가 상승제로 쓰이는 methyl tertiarybutyl ether(MTBE)를 비롯한 여러 화학물질의 합성 전구체로도 용도가 크다(1). 만일 현재 gasoline 소비중 10%가 메탄올로 대체될 경우 약 500억 파운드 이상의 메탄올 생산이

필요하게 되리라 예상된다. 메탄올의 제조 원료는 석탄, 중유, 납사, shale oil, 메탄 등인데(2) 이중 메탄은 값이 싸며 그 매장량도 매우 풍부하여 중요한 자원이다(3, 4). 현재 전세계적으로 매우 많은 천연 가스정의 가스 생산 농도가 너무 낮아 파이프 라인을 이용한 운송이 경제적으로 어려우므로 일반적으로 미국에서만 한해 10¹¹ft³ 이상의 이러한 천연 가스를 태워 버리는데 이 양은 92억 파운드의 메탄올을 만들 수 있는 양에 해당된다. 그러므로 이러한 메탄올로부터 메탄올로의 bioconversion 기술이 개발되어지면 실제 저농도의 천연 가스정 현지에서 메

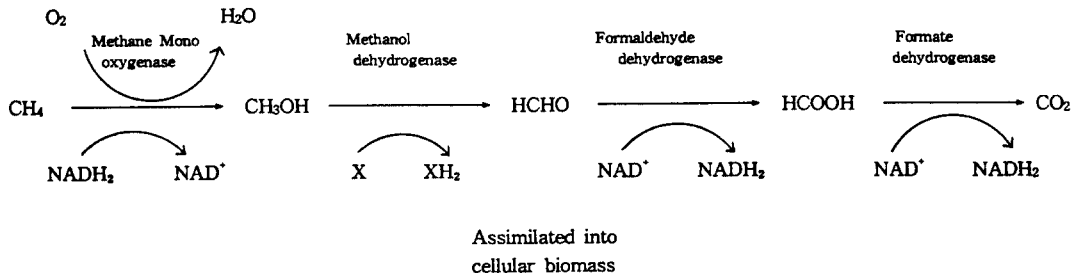


Fig. 1. Pathway of Methane Catabolism by Methylotrophs.

탄올을 생산할 수 있으리라 생각된다.

현재 메탄올은 촉매 반응에 의하여 수소와 일산화탄소로부터 300psi 이상의 압력에서 얻어지며 이때 수소와 일산화탄소는 메탄으로부터 수증기 개질에 의하여 만들어지는데 이때 H₂/CO 비를 높이기 위해 수성가스 반응이 함께 일어나며 이들 반응들은 800~1000°C 그리고 300psig 압력에서 금속 산화물 촉매를 이용하여 진행되므로(1, 2) 이러한 혹독한 반응 조건은 높은 시설 투자비와 운영비를 발생시키므로 더 효율적인 프로세스의 개발이 필요한 실정이다.

한편 메탄을 기질로 하여 자라는 메탄자화균을 이용하면 상온 상압에서 메탄의 직접 산화에 의한 메탄올의 생산이 가능하다고 알려져 있는데(5) 메탄자화균은 methane monooxygenase(MMO)라는 효소를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환시키며 현재까지 100종 이상의 균주가 보고되고 있다. 이 methane monooxygenase는 용존상(soluble) 형태와 입자상(particulate) 형태가 있는데 보통의 경우 배양액 내의 구리이온 존재 유무에 따라 두 가지 형태로 나뉘고 특히 구리이온이 고갈된 경우 용존상 형태로 세포질내에 생성되고 구리이온이 존재할 때는 입자상 형태로 세포막에 생성되는데 *Methylococcus capsulatus*와 *Methylosinus trichosporium* 등의 박테리아를 사용할 경우 입자상 methane monooxygenase가 메탄으로부터 메탄올 생성에 많은 관여를 한다는 보고가 있다(6-8). 이들 박테리아의 메탄 산화 과정은 Fig. 1과 같다. 즉 메탄올은 메탄이 이산화탄소와 세포 자체의 biomass로 전환되는 과정의 중간 물질이다(6). 이 산화과정 중 첫번째 과정은 메탄올 탈수소 효소(methane monooxygenase)에 의해 진행되며 이때 메탄올이 포름알데히드와 H⁺로 전환되고 그후 세번째와 네번째 과정에서 포름알데히드는 개미산으로, 개미산은 이산화탄소로 전환되며 H⁺를 발생하고 NADH₂를 만들어 내게 되어(9, 10) 이

NADH₂가 환원제(reductant)로 다시 첫번째 과정인 메탄올 생성 과정에 쓰이게 된다. 이와 같이 메탄으로부터 이산화탄소로 가는 대사경로에 대한 규명 및 관련 효소에 관한 기초 학문적인 연구는 많이 진행되어 있으나 본 연구에서 수행하고자 하는 메탄으로부터 메탄올의 생성에 관해서는 많은 연구가 되어 있지 않은 실정이다. 즉 생산하고자 하는 메탄올은 전 대사경로 중 중간 생성물이므로 이의 생산을 위해서는 메탄을 메탄올로 전환하는 효소인 methane monooxygenase의 활성을 극대화시키고 메탄올을 포름알데히드로 전환하는 효소인 methanol dehydrogenase의 활성을 저하시키는 것이 필요하나 첫번째 과정에서는 그 이후의 과정에서 생성(regeneration)되는 NADH₂가 필요하게 되므로 methanol dehydrogenase의 완전한 활성 저해는 또한 피해야 한다.

그러므로 본 연구에서는 메탄으로부터 메탄올의 생물전환 공정에 있어서 methane monooxygenase 효소 활성을 증가시키고 methanol dehydrogenase의 활성을 저해하는 방법을 실험하였고 아울러 온도 및 기체조성비(산소와 메탄)가 메탄올 생성에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 *Methylosinus trichosporium* OB3b로서 미네소타대학내 Gray Freshwater Biological Institute의 R. S. Hanson 교수 연구실로부터 분양받아 사용하였다. 균체 배양용 배지의 성분은 nitrate, phosphate염과 MgSO₄, FeSO₄, 및 미량 원소들과 미량의 vitamin들이고 이 성분은 Table 1에 나타내었고 사용한 chemical은 모두 Sigma사 제품이었다. 배지는 0.22µm filter를 이용

Table 1. Medium for Growth of Methylotrophs.

Component	Composition(g/L)
KNO ₃	2.5
NaH ₂ PO ₄	0.21
KH ₂ PO ₄	0.09
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
Trace elements	μg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	50
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	70
MoO ₃	10
Vitamin's(Wolfe's)	μg/l
Biotin	10.0
Folic acid	10.0
Pyridoxine HCl	50.0
Thiamine HCl	25.0
Riboflavin	25.0
Nicotinic acid	25.0
Ca pantothenate	25.0
Vitamin B12	0.5
P-Aminobenzoic acid	25.0
Thioctic acid	25.0

하여 멸균하였다. 균체 배양에는 Crimp seal이 있는 150mL짜리 serum bottle이 이용되어지며 이 병에 45mL의 배지와 5mL의 seed culture를 넣고 head space는 메탄과 산소 그리고 tracer로 약간의 질소를 원하는 압력으로 채워 실험하였고 전체 압력은 배 충전시 약 2atm으로 유지하였다. 이때 seed culture는 -70°C 저온 냉동고에 보관된 1mL master stock을 Table 1에 나타난 배지에 접종하여 메탄 50% 대 50%로 head space를 충전하고 온도 30°C, 250rpm에서 3일간 배양하여 준비하였다. 메탄, 산소 그리고 질소는 0.22μm 필터를 통해 주입하였고 serum bottle은 분당 200회 회전운동을 하는 진탕 배양기(Model KMC-8480SF, Vision 과학, 서울)에 넣어 여러 실험온도에서 배양하였다. 이때 사용한 메탄은 99.9%의 순도이었다.

분석방법

세포 농도는 분광광도계(Spectronic 21, Milton Roy Inc., U.S.A.)를 이용하여 368nm에서 구한 흡광도로 나타내었다. 메탄과 산소 그리고 질소분석은 가스크로마토그래피(DS6200, Donnanm, 서울)에

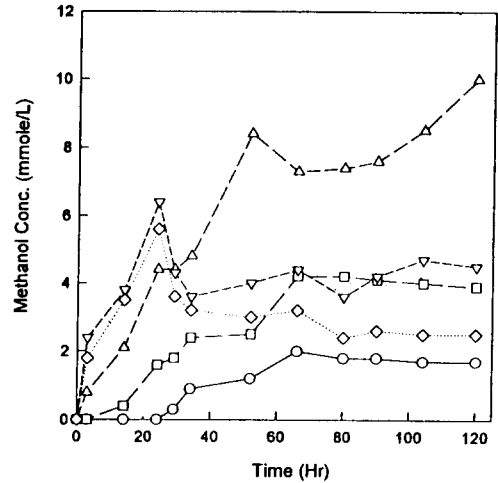


Fig. 2. The Effect of EDTA on Methanol Production. ○-○: no EDTA, □-□: 3mM EDTA, △-△: 6mM EDTA, ▽-▽: 12mM EDTA, ◇-◇: 20mM EDTA

서 수행하였다. 사용된 컬럼은 길이 6ft의 stainless steel이고 충전 물질은 Molecular sieve 13X(CRS)이었으며 TCD detector를 이용하였다.

실험 조건은 injector는 60°C, oven은 30°C, detector는 100°C였고, carrier gas로 He gas를 30 cc/min로 흘려주었다. 메탄올 분석은 가스크로마토그래피(DS6200, Donnanm, 서울)를 이용하였는데, 충전 물질은 HayeSep Q(CRS)이며 FID detector를 이용하였다. 실험조건은 injector는 180°C, oven은 130°C, detector는 200°C였으며 carrier gas로 He gas를 30cc/min로 흘려주었다.

결과 및 고찰

메탄올 생산에 미치는 EDTA 영향

Fig. 2에 EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid)가 메탄올로부터 메탄올 생성에 미치는 영향이 나타나 있다. 메탄올로부터 메탄올을 생산하고자 할 때는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 메탄올이 중간대사물이므로 메탄올로부터 생성된 메탄올이 계속 산화되어 포름알데히드로 되는 것을 막아야 한다. 그러므로 이 메탄올의 산화에 관계되는 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase)의 효소활성을 저해하는 것이 필요하다. 이러한 메탄올 탈수소효소의 활성을 저해하는 물질로는 고농도의 인산염, cyclopropane, cyclopropanol, phenyl hydrazine이 효과

적인 것으로 알려져 있다(5, 11, 12). 또한 Carver 등이 chelating agent가 메탄자화균에 의한 메탄올 산화를 저해한다고 발표한 바 있었다(13). 이를 토대로 chelating agent인 EDTA가 메탄올 생성에 어떤 영향을 주는지를 *Methylosinus trichosporium* 균주를 이용하여 Table 1에 나타난 배지에 EDTA를 첨가하여 실험하였고 이때 메탄과 산소의 비는 50% 대 50%이었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 EDTA를 넣지 않은 것을 control로 3mM, 6mM, 12mM, 20mM의 EDTA를 첨가한 경우와 비교해 보면 EDTA를 첨가하지 않았을 경우는 생성 메탄올 농도가 약 2mmole/L인데 반해 EDTA를 3mM, 6mM 첨가한 경우에는 각각 약 4mmole/L, 10mmole/L의 메탄올이 생성되어 EDTA가 methanol dehydrogenase 효소를 저해함을 확인할 수 있었으나 그보다 높은 EDTA 농도(12mM, 20mM)에서는 생성된 메탄올 농도가 4.3, 2.5mmole/L로 낮아졌는데 이는 EDTA에 의해 세포의 정상적 대사가 영향을 받기 때문으로 생각된다. 결론적으로 Fig. 2로부터 EDTA 농도 6mM이 메탄올 생성을 위한 최적 농도라고 유추된다. Carver(13) 등이 연구한 바에 의하면 Mg^{+2} 는 methanol dehydrogenase가 균체의 호흡막(respiratory membrane)에 기능적으로 결합하는데 꼭 필요한데 EDTA가 chelating agent로서 Mg^{+2} 를 제거하기 때문에 methanol dehydrogenase의 활성이 저해되는 것으로 생각되나 보다 정확한 저해기전은 더 연구되어야 할 것이다.

Fig. 3에서는 EDTA가 methanol dehydrogenase의 활성을 저해함을 확인하기 위해 EDTA가 methanol 소비속도에 어떤 영향을 미치는가를 실험해 보았다. *Methylosinus trichosporium* 균주를 이용하여 메탄과 산소 50%대 50%비로 30°C에서 초기에 배지에 1.4g/L의 메탄올을 인위적으로 첨가한 후 EDTA 영향을 조사하였는데 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 EDTA 농도가 증가될수록 메탄올의 소비속도가 떨어짐이 관측되었다. EDTA 농도 3mM에서 보다 6mM에서 메탄올의 소비속도가 1/3 정도로 줄어들음을 알 수 있었고 18mM에서는 약 70시간이 지나도 초기에 첨가한 메탄올을 다 이용하지 못함이 관찰되었다. 따라서 첨가된 EDTA가 methanol dehydrogenase의 활성을 저해함을 알 수 있었다. 한편 EDTA가 정상적인 균체의 대사에 미치는 영향을 알기 위해 EDTA 첨가가 메탄가스 소비에 미치는 영향을 조사하여 이 결과가 Fig. 4에 보였다. 이에 따르면 EDTA 농도 6mM까지는 시간이 지남에 따

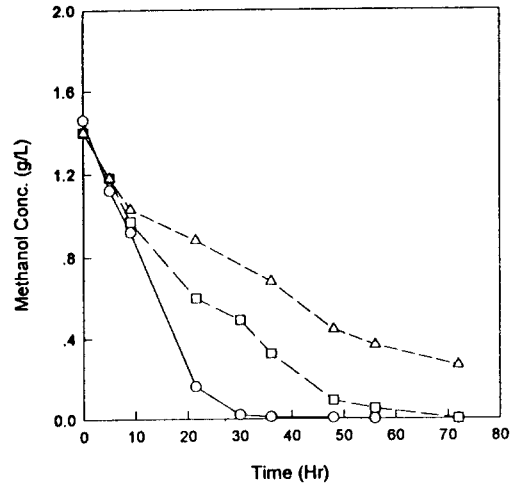


Fig. 3. The Effect of EDTA on Methanol Consumption. ○-○: 3mM EDTA, □-□: 6mM EDTA, △-△: 18mM EDTA
*initial added methanol conc. was 1.4g/L.

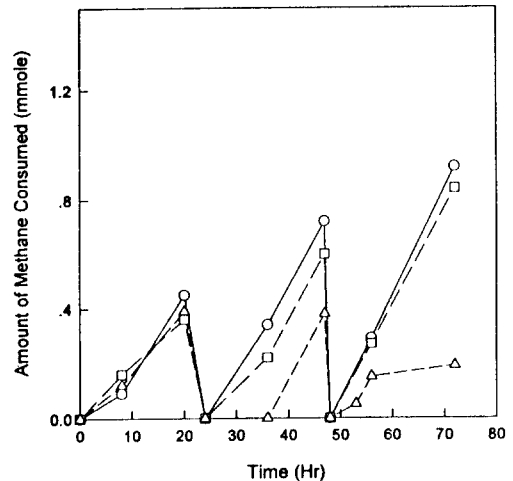


Fig. 4. The Effect of EDTA on Methane Gas Consumption. ○-○: 3mM EDTA, □-□: 6mM EDTA, △-△: 18mM EDTA
*initial added methanol conc. was 1.4g/L.

라 메탄가스 소비속도가 감소하지 않으나 18mM에서는 시간이 지남에 따라 메탄가스 소비가 둔화되어 70시간 후 메탄가스 소비가 거의 이루어지지 않음이 관측되어 EDTA가 methanol dehydrogenase 효소의 활성도 저해하나 아울러 높은 농도의 EDTA 존재하에서는 균체의 정상적인 대사도 저해함을 알 수

있다. Fig. 4에서 23hr와 48hr에 메탄과 산소를 배양 bottle에 다시 충전(regassing)하였으므로 이 시점의 메탄 가스 소비량을 0으로 놓고 그 시점으로부터 재충진된 가스의 소비량을 나타내었다. 이상의 결과로 EDTA가 methanol dehydrogenase의 효소 활성을 저해하는 물질의 하나로서 methanol 생성에 유용하게 쓰일 수 있음을 발견하였고 이때 메탄올 생성을 위한 본 연구 조건에서의 최적 EDTA 농도는 약 6mM임을 알 수 있었다.

메탄을 생산에 미치는 구리의 영향

Fig. 5에서는 이러한 Cu의 존재유무 및 Cu 농도가 메탄올 생성에 어떤 영향을 미치는가를 실험해 보았다. 이 실험에서는 *Methylosinus trichosporium* 균주를 이용하여 메탄과 산소 60% 대 40% 비로 30°C, 250rpm에서 Table 1에 나온 배지를 기본으로 여러 Cu 농도(5μM, 0.5mM, 1mM, 3mM)에서 Cu의 영향을 조사하였다. 그 결과 control(5μM Cu)에 비해 Cu 농도가 0.5mM, 1mM일 때 메탄올 생성농도가 2.5배 이상 증가하여 약 11mmole/L의 메탄올을 생성함을 알 수 있었다. 그러나 3mM 농도 Cu 존재시에는 오히려 세포의 성장 및 메탄올 생성 속도, 메탄 가스 소비속도 등이 감소함을 발견하였다. 이 실험에 의하여 메탄올 생성을 위한 최적 Cu 농도범위는 약 0.5-1mM임을 알 수 있었다. 따라서 적정 농도의 Cu 첨가가 pMMO의 생성을 촉진시키

며 이 세포 단위중량당 sMMO에 비해 MMO 활성이 높은 pMMO가 메탄으로부터 메탄올의 생성을 촉진시키는 것으로 생각된다(17). Dalton 등의 연구에 의하면 *Methylococcus capsulatus*와 *Methylosinus trichosporium*에는 두 가지 형태의 MMO(methane monooxygenase) 즉 입자상(particulate) MMO(pMMO)와 용존성(soluble) MMO(sMMO)가 존재하며 발효 배지중 Cu의 존재유무가 MMO의 세포내 위치를 결정한다고 보고하였다. 한편 배지중 Cu가 존재하면 pMMO가 생성되고 반면 발효배지 중 Cu가 결핍되면 sMMO가 생성되게 되고 만일 연속배양중 Cu가 결핍된 배지를 Cu가 보강된 배지로 바꾸어 공급하면 세포내 MMO의 활성이 세포질 분획(cytoplasmic fraction)에서 세포막 분획(membrane fraction)으로 이동된다고 발표되었다(14-16).

메탄을 생산에 미치는 온도의 영향

Methylosinus trichosporium 균주를 이용하여 메탄올 생성시 온도가 미치는 영향에 관한 실험이 진행되었다. 이를 위해 메탄대 산소 50%대 50% 비로 30°C, 250rpm에서 배지에 6mM EDTA와 1mM Cu를 첨가한 후 각각 다른 온도에서 발효를 수행하였다. Fig. 6에서는 25°C, 30°C, 37°C에서의 생성 메탄올 농도가 비교되었는데 온도가 37°C에서 30°C로 낮아짐에 따라 생성 메탄올 농도가 1mmole/L로부터 약 10mmole/L로 증가됨을 알 수 있었으며 온

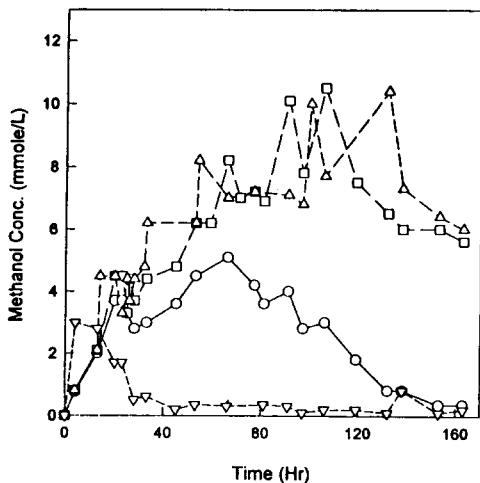


Fig. 5. The Effect of Copper on Methanol Production.

○-○ : 5μM Cu, □-□ : 0.5mM Cu
 △-△ : 1mM Cu, ▽-▽ : 3mM Cu

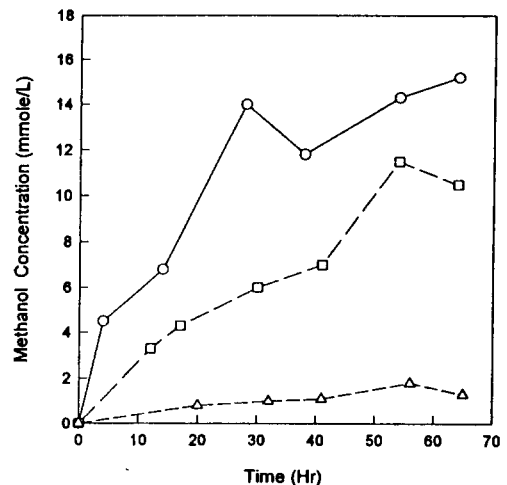


Fig. 6. The Effect of Temperature on Methanol Production.

○-○ : 25°C, □-□ : 30°C, △-△ : 37°C

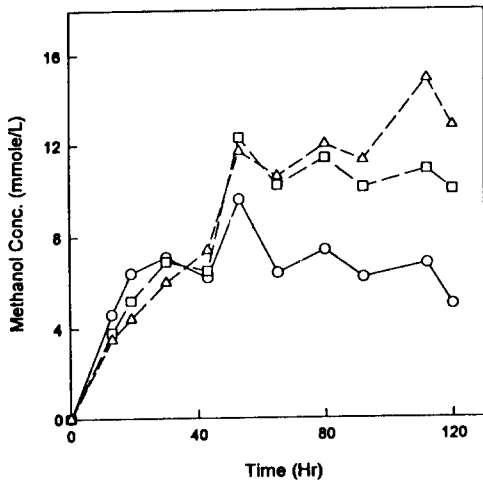


Fig. 7. The Effect of Gas Composition on Methanol Production.

○-○ : 50% O₂ & 50% CH₄, □-□ : 40% O₂ & 60% CH₄, △-△ : 30% O₂ & 70% CH₄

도가 30°C에서 25°C로 낮아짐에 따라 생성 메탄올 농도가 약 15.5mmole/L로 증가됨을 알 수 있었다. 또한 메탄 소비속도도 온도가 37°C로부터 25°C로 감소됨에 따라 두배 이상 증가됨을 알 수 있었다. 이 실험에서는 약 20hr과 45hr에 메탄과 산소 재충진 (regassing)이 이루어졌다. 이러한 온도의 영향은 온도가 낮아질수록 물에의 메탄과 산소의 용해도 증가에 의한 메탄 및 산소의 배지내 용존농도가 높아짐이 한 이유가 될 것으로 생각된다.

메탄을 생성에 미치는 기체조성의 영향

메탄으로부터 메탄올 생성에 있어서의 메탄과 산소 조성비의 영향을 실험하였다.

Perry's Chemical Engineering Handbook에 의하면 메탄가스의 20°C에서의 물의 용해도는 0.4cc CH₄/100g 물이며 산소가스의 20°C에서의 물의 용해도는 약 3.4cc O₂/100g 물로 알려져 있는 바 산소의 용해도가 메탄에 비해 무척 높다. 그러므로 가스상의 메탄과 산소비가 methanol 생성에 미치는 영향을 알기 위해 *Methyosinus trichosporium* 균주를 이용하여 Table 1에 나온 배지에 6mM EDTA와 1mM Cu를 첨가한 후 메탄과 산소의 비를 50% : 50%, 60% : 40%, 그리고 70% : 30%로 바꾸며 30°C, 250rpm에서 실험을 수행하였다. Fig. 7과 8에는 메탄과 산소의 구성 성분비가 메탄올 생성 및 세포농도 증가에 미치는 영향이 나타나 있는데

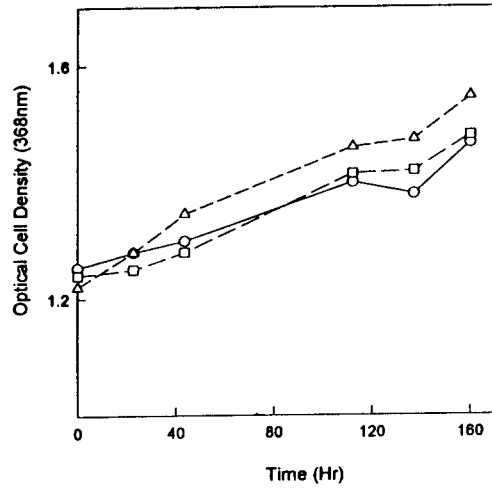


Fig. 8. The Effect of Gas Composition on Cell Growth.

○-○ : 50% O₂ & 50% CH₄, □-□ : 40% O₂ & 60% CH₄, △-△ : 30% O₂ & 70% CH₄

메탄 농도가 증가할수록 생성 메탄올의 농도 및 세포농도가 증가됨을 알 수 있다. 그리하여 50% 메탄, 50% 산소 존재하에 비해 60% 메탄, 40% 산소 존재하에는 약 25% 증가된 12mmole/L 농도의 메탄올을, 그리고 70% 메탄, 30% 산소 경우에는 약 50% 증가된 15.3mmole/L 농도의 메탄올을 얻을 수가 있었으며 세포농도도 많이 증가됨을 알 수 있다. 이는 메탄의 물에서의 용해도가 산소의 물에서의 용해도의 1/8 정도이므로 산소에 비해 높은 메탄가스의 분압이 적절한 메탄의 물에서의 용존농도를 위해 필요하기 때문으로 사려된다.

요 약

본 연구에서는 메탄 자화균인 *Methyosinus trichosporim* OB3b를 이용하여 메탄으로부터 메탄올 생성에 관한 실험을 수행하였다. 메탄으로부터 메탄올을 생성하기 위해서는 메탄 산화과정 중 두번째 효소인 methanol dehydrogenase 효소의 활성을 부분 저해해야 하므로 이를 위해 EDTA를 사용한 결과 EDTA가 methanol dehydrogenase의 저해제임을 확인하였고 배지에 6mM EDTA를 첨가하였을 때 전혀 첨가하지 않았을 때와 비교하여 메탄올 생성이 약 5배 정도 증가되어 10mmole/L의 메탄올을 얻을 수 있었다. 또한 Cu의 존재유무가 메탄올 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 1mM Cu 존재시 5μM

Cu 존재하에 비해 메탄올 생성이 약 2.5배 증가되어 약 11mmole/L의 메탄올을 얻을 수 있었는데 이는 Cu 존재가 입자상(particulate) MMO의 생성을 촉진시키며 생성된 이 세포 단위중량당 MMO 활성이 높은 pMMO가 메탄올로부터 메탄올의 생성을 촉진시키는 것으로 생각된다. 그리고 온도가 메탄올 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 온도가 37°C에서 30°C, 25°C로 낮아짐에 따라 생성 메탄올 농도가 증가하여 15.5mmole/L에 이르렀고 메탄 소비속도도 증가됨을 알 수 있었다. 또한 메탄과 산소의 구성성분비가 메탄올 생성에 미치는 영향을 실험한 결과 산소대비 메탄 농도가 증가할수록 생성 메탄올의 농도 및 세포농도가 증가됨을 알 수 있다. 그리하여 50% 메탄, 50% 산소 존재하에 비해 70% 메탄, 30% 산소 경우에는 약 50% 증가된 15.3 mmole/L 농도의 메탄올을 얻을 수가 있었으며 세포농도도 많이 증가됨을 알 수 있다.

감 사

이 논문은 1995년도 한국과학재단 연구비 지원(목적기초 과제 95-0502-40-3)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. Boutacoff(1989), EPRI Journal, Oct./Nov., 24.
2. R. F. Probst and R. E. Hicks(1985), Synthetic Fuels, McGraw Hill Book Co., N. Y.
3. O. Ghisalpa and F. Henzer(1982), Experimentia, **38**, 218.
4. DOE office of policy, planning, and analysis (1988), Jan., Department of Energy, U.S.A.
5. C. Anthony(1982), The Biochemistry of Methylotrophs, Academic, N. Y.
6. H. Dalton and D. Leak(1983), Microbial Gas Metabolism, Academic, N. Y.
7. H. Dalton, S. D. Prior, D. J. Leak, and S. H. Stanley(1984), pp. 75-82 In Microbial Growth on C1 Compounds(R. L. Crawford and R. S. Hanson, ed.), American Society for Microbiology, Washington D. C.
8. O. Oldenhuis, R. M. Vink, D. B. Jessen, and B. Witholt(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2819.
9. A. B. Hooper(1985), *Microbiol. Rev.*, **49**, 140.
10. M. B. Gray and C. Anthony(1983), *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 923.
11. I. J. Higgins and J. R. Quayle(1970), *Biochem. J.*, **18**, 201.
12. P. K. Perdeep, S. Mishra, and T. K. Ghose (1987), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 221.
13. M. A. Carver and C. W. Tones(1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 611.
14. H. C. Tsien, G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228.
15. S. H. Stanley, S. D. Prior, D. J. Leak, and H. Dalton(1983), *Biotech. Lett.*, **5**(7), 487.
16. K. J. Davis, A. Cornish, and I. J. Higgins (1987), *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 291.
17. D. J. Leak, S. H. Stanley, and H. Dalton (1985), pp201-208 In Microbial Gas Metabolism(R. K. Poole, and C. S. Dow ed.) Society for Microbiology, Academic Press.