

# 메탄올탈수소효소 저해시 메탄산화에 의한 메탄올 전환생성 특성

## Characteristics of Methanol Production Derived from Methane Oxidation by Inhibiting Methanol Dehydrogenase

유연선 · 한지선 · 안창민 · 민동희 · 모우종 · 윤순욱 · 이종규\* · 이종연\*\* · 김창균<sup>†</sup>  
Yeon-Sun Yoo · Ji-Sun Han · Chang-Min Ahn · Dong-Hee Min · Woo-Jong Mo ·  
Soon-Uk Yoon · Jong-Gyu Lee\* · Jong-Yeon Lee\*\* · Chang-Gyun Kim<sup>†</sup>

인하대학교 환경공학과 · \*포항산업과학연구원 · \*\*한국환경공단  
Department of Environmental Engineering, Inha University

\*Research Institute of Industrial Science & Technology · \*\*Korea Environment Corporation, Environmental Research Complex

(2011년 1월 31일 접수, 2011년 9월 28일 채택)

**Abstract :** This study was conducted to biologically convert methane into methanol. Methane contained in biogas was bio-catalytically oxidized by methane monooxygenase (MMO) of methanotrophs, while methanol conversion was observed by inhibiting methanol dehydrogenase (MDH) using MDH activity inhibitors such as phosphate, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, and EDTA. The degree of methane oxidation by methanotrophs was the most highly accomplished as 0.56 mmol for the condition at 35°C and pH 7 under 0.4 (v/v%) of biogas (CH<sub>4</sub> 50%, CO<sub>2</sub> 50%) / Air ratio. By the inhibition of 40 mM of phosphate, 50 mM of NaCl, 40 mM of NH<sub>4</sub>Cl and 150 μm of EDTA, methane oxidation rate could achieve more than 80% regardless of type of inhibitors. In the meantime, addition of 40 mM of phosphate, 100 mM of NaCl, 40 mM of NH<sub>4</sub>Cl and 50 μm of EDTA each led to generating the highest amount of methanol, i.e., 0.71, 0.60, 0.66, and 0.66 mmol when 1.3, 0.67, 0.74, and 1.3 mmol of methane was each concurrently consumed. At that time, methanol conversion rate was 54.7, 89.9, 89.6, and 47.8% respectively, and maximum methanol production rate was 7.4 μmol/mg · h. From this, it was decided that the methanol production could be maximized as 89.9% when MDH activity was specifically inhibited into the typical level of 35% for the inhibitor of concern.

**Key Words :** Methanotrophs, *Methylosinus Sporium*, Biogas, Methanol, Methane Monooxygenase (MMO), Methanol Dehydrogenase (MDH)

**요약 :** 본 연구에서는 메탄의 생물학적 메탄올 전환에 관한 연구를 수행하였다. 바이오가스 중의 메탄은 메탄산화균의 methane monooxygenase (MMO)의 생물학적 촉매반응에 의해 산화되었으며, 인산염, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, EDTA와 같은 methanol dehydrogenase (MDH)의 활성 저해제를 이용하여 MDH의 활성도를 저해함으로써 메탄올의 전환이 이루어졌다. 메탄산화균은 35°C, pH 7, 인공 바이오가스(CH<sub>4</sub> 50%, CO<sub>2</sub> 50%) / Air의 부피비가 0.4인 조건에서 메탄 산화 정도가 0.56 mmol로 최대로 나타났다. 인산염 40 mM, NaCl 50 mM, NH<sub>4</sub>Cl 40 mM, EDTA 150 μm 이하일 때 저해제의 종류에 상관없이 메탄 산화율은 80% 이상을 달성하였다. 한편, 인산염 40 mM, NaCl 100 mM, NH<sub>4</sub>Cl 40 mM, EDTA 50 μm 주입 시 각각 1.30, 0.67, 0.74, 1.30 mmol의 메탄이 산화되는 동시에 각각 0.71, 0.60, 0.66, 0.66 mmol의 메탄올이 최대로 생성되었다. 이때의 메탄올 전환율은 각각 54.7, 89.9, 89.6 및 47.8%였으며 최대 메탄올 생성 속도는 7.4 μmol/mg · h였다. 이로부터 대상 저해제로 MDH 활성도를 일반적으로 35% 저해 시에 메탄올 생산량이 최대인 89.9%까지 나타남을 알 수 있었다.

**주제어 :** 메탄산화균, *Methylosinus Sporium*, 바이오가스, 메탄올, Methane Monooxygenase (MMO), Methanol Dehydrogenase (MDH)

## 1. 서론

매립지에서 발생하는 매립가스와 혐기성 소화 시 발생하는 소화가스는 55~60%의 CH<sub>4</sub>, 35~40%의 CO<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> 그리고 미량의 H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, CFCs 및 VOC 등이 구성되어 있으며,<sup>1)</sup> 그 중 메탄은 온실효과가 이산화탄소의 20배 이상인 대표적인 non-CO<sub>2</sub> 가스이다.<sup>2)</sup> 2013년부터 유기성 폐기물의 해양 투기가 전면 금지되면서 유기성 폐기물의 처분 및 에너지 생산을 동시에 가능하게 하는 바이오가스 생산 및 바이오연료 생산 연구가 활발히 진행 중이지만, 시설비가 높고 가스 정제가 필요하며 대규모인 경우에만 경제성을 가진다는 단점이 있다. 현재 국내 전국 매립지(226개소) 중 대부분의 중소규모 매립지(216개소)에서 발생하는 매립가스를 소각 및

대기 중에 방출시켜 처리하며,<sup>3)</sup> 특히 소화가스 경우 7.3%가 소각 등으로 처리되고 있다.<sup>4)</sup> 또한 소비 시장과 거리가 먼 지역으로부터 생산된 가스의 운반 시 경제성이 낮다. 따라서 최근에 이러한 바이오가스의 주성분인 메탄을 자동차 연료, 화학물질의 원료 및 연료 전지의 에너지원 등으로 이용 가능한 메탄올로 전환하는 연구가 진행 중이다.<sup>5)</sup> 그러나 대부분 물리화학적 전환 기술을 채택하고 있어 그에 따른 고압의 에너지 비용이 과다하게 요구된다.

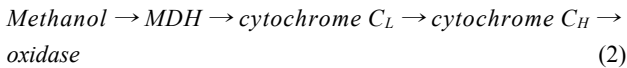
이러한 문제점을 해결하고자 메탄산화균(methanotrophs)을 이용한 생물학적 메탄의 메탄올 전환연구가 수행되고 있다. 메탄올을 유일 탄소원과 에너지원으로 하여 생육하는 특이 메탄산화균은 그람음성의 호기성 세균으로,<sup>6)</sup> 이들은 methane monooxygenase (MMO), methanol dehydrogenase (MDH),

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: ckg@inha.ac.kr Tel: 032-860-7561 Fax: 032-865-1425

formaldehyde dehydrogenase (FAD), formate dehydrogenase (FDH) 등의 효소를 이용하여 메탄을 메탄올 → 포름알데히드 → 개미산 → 이산화탄소로 식 (1)과 같이 산화시킨다.<sup>7)</sup>



이 과정에서 균체 내에 생성된 메탄올이 MDH에 의해 식 (2)와 같이 포름알데히드로 산화시키기 때문에 효소 저해제 또는 분자생물학적으로 MDH의 효소활성을 억제하여 메탄올을 에너지원으로 회수할 수 있다.



MDH 활성 저해제는 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DDT), 페닐하이드라진(phenylhydrazine), 금속 킬레이트제, 요오드 아세트산, MgCl<sub>2</sub>, 고농도의 인산염, cyclopropane, cyclopropanol 등이 알려져 있다.<sup>8)</sup> 이 중 고농도의 염은 그 이온강도에 의해 미생물 생체내의 단백질-단백질 간 정전기적 인력에 영향을 준다.<sup>9)</sup> Chan 등<sup>10)</sup>은 고농도의 염이 cytochrome c와 MDH의 친화도를 감소시키는 작용을 한다고 규명하였다. EDTA는 메탄산화균 전체 세포에서의 메탄올 산화를 저해하며,<sup>11)</sup> EDTA와 EGTA는 MDH에 잔류하는 lysyl나 arginyl를 고정하여 결국 초기 결합 프로세스를 막음으로써 MDH에서 cytochrome CL로의 전자 전달을 저해한다고 알려져 있다.<sup>12)</sup>

이러한 원리를 이용한 메탄올 생산 연구가 몇몇 보고되고 있다. Mehta 등<sup>13)</sup>은 휴면기의 *Methylosinus trichosporium* NCIB 11131와 70~80 mM의 인산염을 이용한 경우 최대 메탄올 생성속도는 6 μmol/mg · h이었으며, 박 등<sup>14)</sup>은 *Methylosinus trichosporium* OB3b와 91 mM의 인산염을 이용, 4.5 시간 동안 메탄올의 생성 속도는 평균 4.7 μmol/mg · h이었다. Takeguchi 등<sup>15)</sup>은 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용, cyclopropanol 67.0 nm로 처리된 반응의 메탄올 생산량은 152 mmol/g dry cell이었으며, Lee 등<sup>16)</sup>은 NaCl 200 mM을 저해제로 하고 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용하여 7.7 mM의 메탄올을 축적하였다.

메탄산화균을 이용할 경우 상온 및 상압 조건에서 메탄의 메탄올로의 직접 전환이 가능하여<sup>17)</sup> 물리 화학적 방법에 비해 경제적이다. 그러나 균체의 배양 조건, 저해제의 종류와 농도에 따른 메탄올 생성 조건 및 메탄올 전환 수율 등에 관한 비교연구가 아직 미흡하다. 따라서 기존 연구에 사용된 인산염, NaCl 저해제와 Chan 등<sup>12)</sup>의 연구 결과 중 MDH 활성도 저해가 높은 NH<sub>4</sub>Cl과 EDTA를 선정하여 가능성을 시험해보고 그 결과를 비교함으로써, 메탄산화균의 MDH 효소 활성을 저해하면서 메탄올을 높은 수율로 합성할 수 있는 최적의 저해제와 그 조건을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 배양 조건

메탄올 축적을 위해서는 sMMO가 존재하는 메탄산화균이 필요하므로 sMMO를 coding하는 유전자 *mmoX*를 가진 *Methylosinus sporium* (KCTC, 22312)을 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 균주는 modified Higgins nitrate mineral salt medium을 사용하여 배양하였으며, 본 실험에서는 기질 특이성을 나타내는 sMMO를<sup>18)</sup> 메탄 산화 효소로 사용하기 위해서 배지 내 구리를 제외하였다.<sup>7)</sup> 배양용기로는 530 mL serum bottle (Wheaton)을 사용하였으며, 배양액의 부피는 200 mL로 하였다. 인공 바이오가스 (CH<sub>4</sub> 50% + CO<sub>2</sub> 50%)와 공기를 100 mL 용량의 유리 실린지(Hapdong)를 이용하여 4 : 6의 비율로 취한 후 가스 치환 방식으로 5회 주입한 후에 200 rpm의 shaking incubator (Vision, vs-8480)에 넣어 35 °C에서 배양하였다.

*Methylosinus sporium*에 대한 sMMO 및 MDH 효소의 존재 여부를 확인하기 위해 PCR을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. PCR은 미생물의 16S rRNA gene, MMO coding gene (*mmoX*) 및 MDH coding gene (*mxoF*)을 증폭하였다. Fig. 1과 같이 메탄산화균 내에 sMMO를 coding하는 유전자 *mmoX*와 MDH를 coding하는 유전자 *mxoF*를 확인할 수 있었다. 이를 통해 본 실험에 사용된 *Methylosinus sporium*은

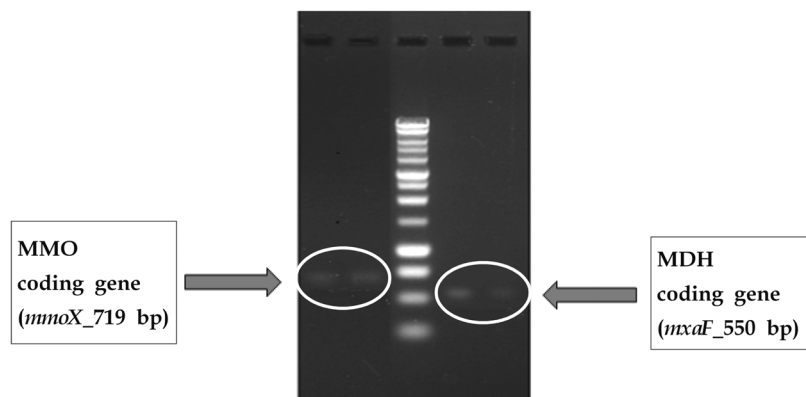


Fig. 1. Gel picture of MMO coding gene (*mmoX*) and MDH coding gene (*mxoF*) of *Methylosinus Sporium*.

MMO와 MDH가 존재하는 type II 메탄산화균으로, 메탄을 MMO에 의해 메탄올로 산화하고 MDH에 의해 생성된 포름알데히드를 serin 경로를 통해 동화하는 것으로 확인되었다.<sup>7)</sup>

### 2.2. MMO 및 MDH coding 유전자 분석 방법

*mmoX*는 sMMO의 수산화효소의 subunit을 coding하는 유전자이며 *mxoF*는 methanol dehydrogenase 활성부분의 subunit을 coding하는 유전자이다. 따라서 분자생물학적으로 메탄산화균의 sMMO 및 MDH 유무를 확인하기 위해 Table 1과 같은 프라이머<sup>19,20)</sup>를 사용하여 PCR machine (Techgene)으로 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭을 실시하였다. PCR 수행 후 ethidium bromide를 포함하는 0.8% agarose를 0.5 × TAE 완충용액(Tris-acetate EDTA buffer)에서 전기영동 (Mupid-α, Japan)한 후 UV transilluminator (Vilber Lourmat)로 그 증폭산물을 확인하였다.

### 2.3. 가스 및 메탄올 분석 방법

반응기 내의 메탄, 산소, 질소 및 이산화탄소의 함량을 분석하기 위하여 packed column (Alltech 403412-1417) 및 TCD가 장착된 가스 크로마토그래피(HP6890 series GC system, U.S.A.)를 이용하였다(Inlet 110°C, Oven 50°C, Detector 210°C). 반응액을 0.45 μm filter로 여과 후 HP-INNOWax Polyethylene Glycol (Agilent 1909N-133)칼럼 및 FID가 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent Technologies 6890N Network GC System, USA)로 메탄올을 분석하였다(Inlet 220°C, Detector 250°C, 운반가스 He 1.5 mL/min, Oven 35°C 5 min → 5°C/min → 150°C → 20°C/min → 250°C 2 min).

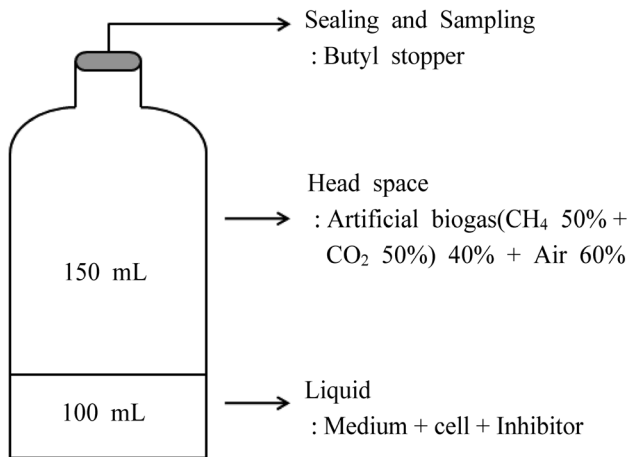


Fig. 2. Batch type reactor for methanol biosynthesis.

Table 1. Amplification primers of MMO and MDH target gene

Target gene	Size of product (bp)	Primer	Sequence (5' - 3')	Reference
<i>mmoX</i>	719	mmoX206F	ATCGCBAARGAATAYGCSCG	Hutchens, E. et al. <sup>19)</sup>
		mmoX886R	ACCCANGGCTCGACYTTGAA	
<i>mxoF</i>	550	mxo1003F	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	Mcdonald, I. R. et al. <sup>20)</sup>
		mxo1561R	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC	

### 2.4. sMMO 및 MDH 활성도 분석 방법

sMMO의 활성도는 수정된 Naphthalene oxidation assay<sup>21)</sup>로 UV-spectrophotometer (Agilent)를 이용하여 525 nm에서 측정하였다. Control은 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5%가 포함된 배지를 사용하였다. sMMO의 비활성도는 Diazo dye가 naphthalene이 sMMO 효소에 의해 naphthol로 산화된 농도에 비례하므로 이를 통해 결정하였다. MDH의 활성도는 메탄올 산화 속도<sup>13,14)</sup>로 측정하였다. 즉, 초기 균주의 농도는 1 mg/L, 메탄올 농도는 1 mM로 고정하고, 초기와 24시간 후의 메탄올 농도를 측정하였으며, 저해제를 주입하지 않았을 때의 메탄올 산화량을 활성도 100%로 기준하여 상대적인 메탄올의 산화속도로 MDH 활성도를 구하였다.

### 2.5. 메탄산화균의 메탄산화 영향인자 실험 방법

메탄산화균에 의한 최적 메탄산화 조건을 수립하기 위해 온도(25, 30, 35 및 40°C), pH (5, 6, 7, 8 및 9) 및 인공바이오가스/공기 부피비율(0.2, 0.3, 0.4 및 0.5)을 달리하여 실험을 수행하였다. 즉, 각 영향인자에 따라 72시간 동안 1 mg dry cell/L의 *Methylosinus sporium*을 주입하여 배양하였으며, 이 때 sMMO 활성도 증가율과 메탄 및 산소의 변화를 측정하였다. 배양용기로는 Fig. 2와 같은 250 mL serum bottle (Wheaton)을 사용하였으며, modified Higgins nitrate mineral salt medium의 부피는 100 mL였다.

### 2.6. 저해제에 따른 메탄산화 특성 및 효소 활성도 실험 방법

MDH의 활성도 저해제인 인산염(10~100 mM), NaCl (0~125 mM), NH<sub>4</sub>Cl (0~80 mM), EDTA (0~250 μM)의 농도를 달리 하여 100 mL 배양액에 주입 하였으며, 초기 농도 20 mg dry cell/L의 *Methylosinus sporium*의 48시간 대사과정에 이용한 메탄산화 특성 변화와 sMMO와 MDH 활성도 변화를 분석하였다. 배양 온도는 35°C이고 250 mL serum bottle (Wheaton)을 사용하였으며, 주입한 초기 메탄은 head space의 10%, 산소는 15%였다. 초기 조건과 48시간 배양 후의 가스 변화를 측정하였다.

### 2.7. MDH 저해제에 따른 최대 메탄올 발생량 및 메탄올 전환 수율 실험 방법

*Methylosinus sporium*을 100 mL의 modified Higgins nitrate mineral salt medium과 함께 250 mL serum bottle (Wheaton)에 20 mg dry cell/L이 되도록 주입하였다. 배지의 저해제인

인산염(10~100 mM), NaCl (0~125 mM), NH<sub>4</sub>Cl (0~80 mM), EDTA (0~250 μm)의 농도를 변화시켰으며, 48시간 동안 6시간 별로 가스 농도 변화와 메탄을 발생량을 측정하여 메탄올이 최대로 발생했을 때의 메탄올과 메탄의 양을 측정하였다.

### 2.8. 메탄산화균 농도 및 시간에 따른 메탄을 생산량 분석 결과

메탄산화균의 농도에 따른 메탄을 생성량 확인을 위해 NaCl 100 mM을 저해제로 하고 *Methylosinus sporium*의 초기 농도를 1, 5, 10, 25, 50 mg/L로 변화시켜 100 mL의 배지와 함께 250 mL serum bottle (Wheaton)에 주입하고 35°C에서 30시간 배양하여 메탄을 생성량을 측정하였다. 또한, 시간에 따른 메탄을 생산량을 분석하기 위해 초기 미생물 농도를 20 mg/L로 하고 NaCl 100 mM을 저해제로 첨가하여 30 시간동안 메탄을 생산량을 모니터링 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 메탄산화균의 메탄산화 영향인자 분석 결과

온도, pH 및 인공바이오가스/공기 부피비율을 달리하여 실험을 수행한 후 sMMO 활성도 증가율과 메탄 및 산소의 저감율을 산정하여 Fig. 3에 나타내었다. 온도가 25~40°C로 변화하는 경우 배양 72시간 후 sMMO 활성도 증가율은 35°C에서 가장 높았으며, 이 때 초기 반응기의 head space 중 평균 8.6%를 차지하는 메탄의 산화율은 89%로 가장 활발하였다. 그러나 40°C의 경우 가스 산화율 및 sMMO 활성도가 급격히 감소하는 것으로 보아 40°C 이상에서는 메탄산화균의 생장이 저해됨을 알 수 있었다. 일반적으로 Type II 메탄산화균은 45°C에서 성장하지 못하는 특성이 있으며<sup>7)</sup> 본 실험에서도 Type II 메탄산화균의 일종인 *Methylosinus sporium*은 40°C에서 생장이 저해되고 35°C에서 최대 성장을 보이는 증온균임을 확인하였다.

배양액 내의 pH 변화에 따른 sMMO 활성도는 pH 7에서 가장 높은 증가를 보였으며, 메탄 및 산소의 소모율은 pH 7 이상에서 큰 차이가 없었다. pH 5의 경우 sMMO 활성도와 메탄 소모율이 가장 낮은 것으로 보아 산성 조건보다 pH 7 이상의 중·염기성 조건에서 메탄산화균의 활성이 높음을 알 수 있었다.

인공 바이오가스/공기(v/v)의 주입에 따라 head space 내에 포함된 산소와 메탄 mmol로 환산하였을 때 초기 및 72시

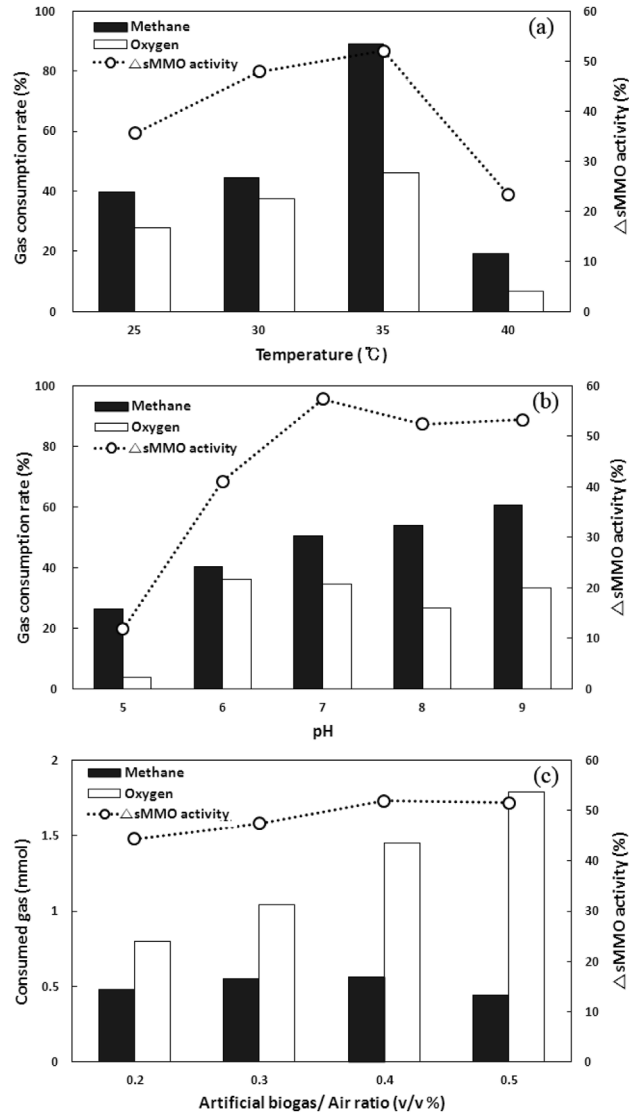


Fig. 3. Effect of (a) temperature, (b) pH and (c) artificial biogas/air ratio (v/v%) on gas oxidation rate and change rate of sMMO activity for 72 hr incubation (dry cell concentration = 1 mg/L).

간 후의 메탄/산소 몰비는 Table 2와 같다. 메탄산화균이 이론적으로 메탄을 이용하여 메탄올을 합성하는데 1몰의 메탄과 1몰의 산소가 필요하며,<sup>7)</sup> Table 2에서 보는바와 같이 바이오가스/공기(v/v)비가 0.3 및 0.4의 경우 메탄이 0.55~0.56 mmol로 가장 많이 산화되어 이 때 메탄/산소의 몰비는 1.04~1.45로 이론적 값에 근사하였다. 그러나 그 비가 0.2 및 0.5의 경우 메탄/산소의 몰비는 0.80 및 1.79로 나타나 메

Table 2. Variation of gas concentration by artificial biogas/air ratio (v/v%)

Artificial biogas/air ratio (v/v%)	CH <sub>4</sub> (mmol)		CH <sub>4</sub> oxidized (mmol)	O <sub>2</sub> (mmol)		O <sub>2</sub> consumed (mmol)	Initial CH <sub>4</sub> /O <sub>2</sub> ratio
	0 hr	72 hr		0 hr	72 hr		
0.2	0.76	0.28	0.48	0.95	0.61	0.35	0.80
0.3	0.95	0.40	0.55	0.91	0.55	0.36	1.04
0.4	1.20	0.64	0.56	0.83	0.48	0.36	1.45
0.5	1.38	0.93	0.44	0.77	0.46	0.32	1.79

탄의 농도가 낮거나 이론적 몰비에서 크게 벗어난 경우 메탄 산화에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

### 3.2. MDH 활성도 저해제에 따른 메탄산화 특성 및 효소 활성도 분석 결과

MDH의 활성도 저해제인 인산염, NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , EDTA를 배양액 내에 농도를 달리 하여 주입 시에 메탄산화균의 48시간 대사과정에 이용한 메탄산화 특성 변화와 sMMO와 MDH 활성도 저해 정도를 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. 초기 메탄 10%, 산소 15%를 차지하는 head space 내의 48시간 배양 전후의 가스 산화 정도를 측정하였으며, 상대적 활성도는 저해제를 주입하지 않았을 때의 활성도를 100%로 기준하여 나타내었다. 배양액은 10 mM의 인산염 완충액을 포함하고 있으며, 인산염 40 mM, NaCl 50 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM, EDTA 150  $\mu\text{M}$  이하의 주입 농도에서 메탄 산화율은 각각 83.8, 79.8, 75.8, 86.0% 이상이었으나, 그 이상의 농도에서는 메탄 산화율이 크게 감소하여 메탄의 산화가 저해되는 것을 알 수 있었다. 그 원인은 효소의 활성도 분석을 통해 파악할 수 있었으며 인산염 40 mM, NaCl 50 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM, EDTA 150  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 sMMO 활성도는 90.1, 80.3, 86.8, 82.3%, MDH 활성도는 72.1, 79.4, 75.7, 29.7%로 MDH 활성도는 저해하면서 sMMO 활성도는 크게 저해하지 않으나, 그 이상의 농도에서는 MDH 활성도 저해 뿐만 아니라 sMMO 활성도도 크게 저해되어 메탄 산화에 영

향을 주는 것으로 나타났다. 또한, 인산염, NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  저해제에 비해 EDTA는 sMMO 활성도는 크게 저해하지 않으면서 MDH 활성도를 29.7%까지 저해하므로 가장 고효율의 MDH 저해제로 작용하여 메탄 산화율을 증가시키는 동시에 고농도의 메탄올을 생성할 수 있었다.

### 3.3. MDH 저해제에 따른 최대 메탄올 발생량 및 메탄올 전환 수율

저해제의 농도에 따른 메탄올 최대 발생량과 메탄에 대한 메탄올 전환수율은 Fig. 5와 같다. 메탄올 전환 수율은 메탄산화균이 48시간 동안의 대사과정을 모니터링 하는 중에서 이용한 메탄(mmol) 대비 최대로 생산된 메탄올(mmol)을 퍼센트 비율로 나타낸 것이다. 인산염 저해제 40 mM 주입 시 메탄이 1.3 mmol 산화되어 0.71 mmol의 최대 메탄올이 생산되어 산화된 메탄의 양 대비 메탄올 전환 수율은 54.7%였다. 이 때의 최대 메탄올 생성 속도는 7.4  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$ 로 Mehta 등<sup>13)</sup>이 얻은 최대 메탄올 생성속도인 6  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$ 보다 높은 결과를 얻을 수 있었다. NaCl 저해제 100 mM 주입 시 최대 메탄올의 발생량이 0.60 mmol(최대 메탄올 생성 속도는 6.25  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$ )이었으며, 메탄은 0.67 mmol 산화되어 메탄올 전환 수율은 89.9%로 산정되었다. 이 결과는 저해제 농도별 메탄산화 및 효소 활성도 결과에서 예측한 바와 다른 결과를 나타낸다. 이는 효소활성도 실험은 정확히 48시간 후에 측정된 실험 결과이나 최대 메탄올 전환수

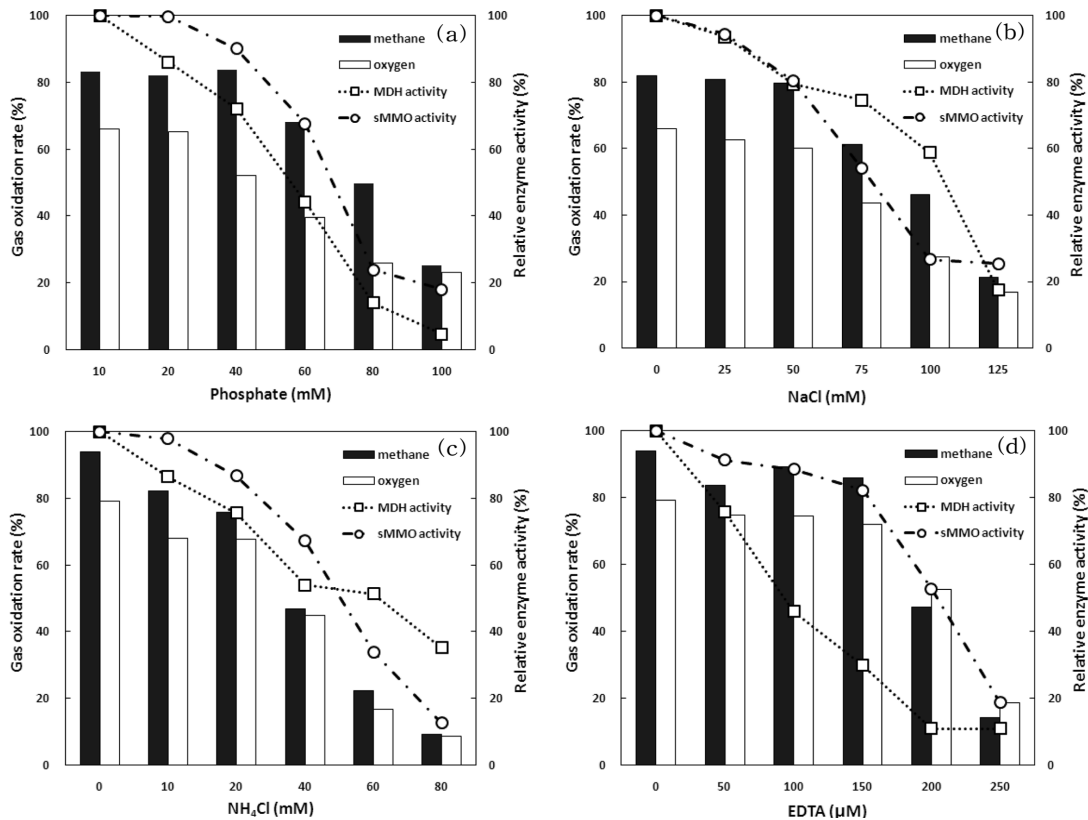


Fig. 4. Effect of MDH activity inhibitors on gas oxidation rate and relative enzyme activity (a) phosphate, (b) NaCl, (c)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (d) EDTA (dry cell concentration = 20 mg/L).

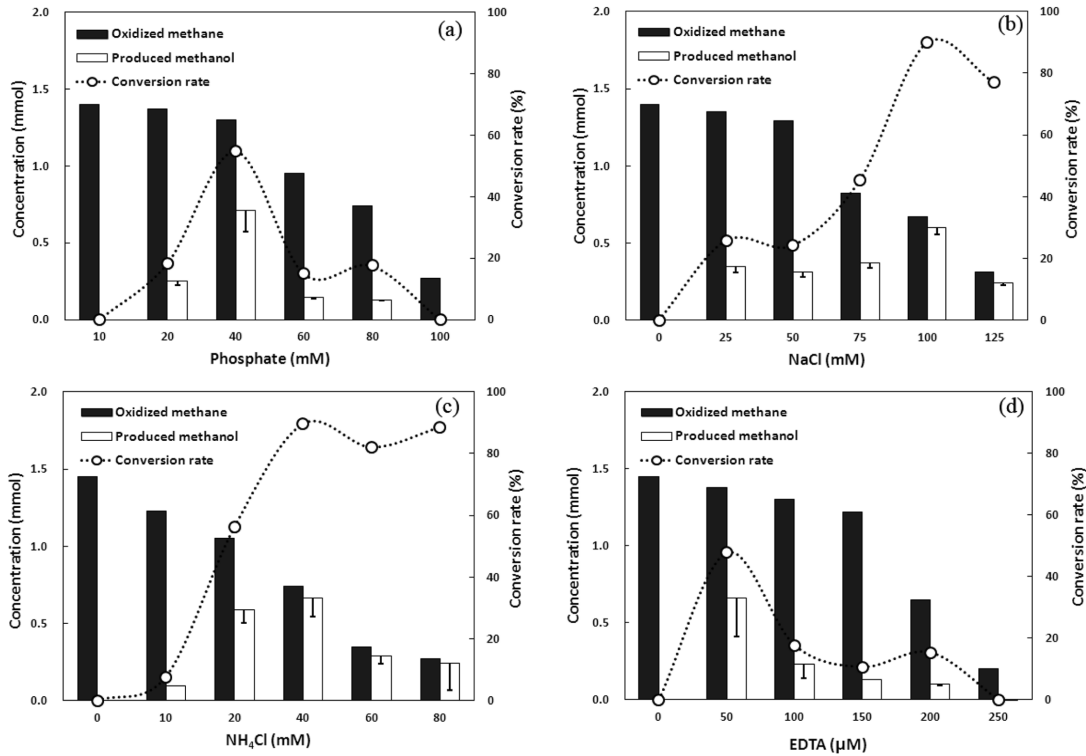


Fig. 5. Effect of MDH activity inhibitors on methane, methanol concentration and conversion rate (a) phosphate, (b) NaCl, (c) NH<sub>4</sub>Cl, (d) EDTA (dry cell concentration = 20 mg/L).

율을 구하기 위해 진행한 본 실험에서 최대 메탄올 전환은 48시간 이전에 일어나 그 결과가 서로 상이한 것으로 여겨진다. NaCl의 경우 수율은 높으나 인산염 저해제에 비해 메탄 산화량 및 메탄올 생산량이 낮아 인산염 저해제가 NaCl 저해제에 비해 메탄산화와 메탄올 생산을 동시에 효과적으로 달성할 수 있음을 보였다.

NH<sub>4</sub>Cl 저해제 40 mM 주입 시 메탄이 0.74 mmol 산화되어 최대 0.60 mmol(최대 메탄올 생성 속도는 6.25 μmol/mg · h)의 메탄올이 생산되었으며, 메탄의 메탄올 전환 수율은 89.6%로 높게 나타났다. 또한, 60 mM 및 80 mM의 경우도 메탄올 전환 수율은 높았지만 메탄 산화량이 각각 0.35 mmol 및 0.27 mmol로 매우 낮아 고농도의 저해제에 의해 메탄산화가 방해받는 것으로 판단되었다. EDTA 저해제 50 μM 주입 시 메탄이 1.30 mmol 산화되어 생성된 메탄올은 0.66

mmol로 높았고 이때의 최대 메탄올 생성 속도는 6.88 μmol/mg · h이었으나 NaCl 100 mM 및 NH<sub>4</sub>Cl 40 mM을 사용할 경우의 메탄올 전환수율(약 90%)보다 47.8%로 낮았다.

### 3.4. 메탄산화균 농도 및 시간에 따른 메탄올 생산량 분석 결과

Fig. 6은 NaCl 100 mM을 저해제로 하고 메탄산화균의 농도를 1, 5, 10, 25, 50 mg/L까지 증가시킨 경우 메탄올 생성량을 나타낸 것이다. 메탄산화균의 농도가 1 mg/L일 때 최대 메탄올 생산량은 0.16 mmol이었다. 그 이상의 농도에서는 메탄올 농도가 감소하였다가 점차적으로 메탄올의 생산량이 증가하여 50 mg/L일 때 0.21 mmol의 메탄올이 축적되었다. 이는 메탄산화균의 농도가 1 mg/L 이상일 때, 생산된 메탄올이 다시 메탄산화균에 의해 산화되어 메

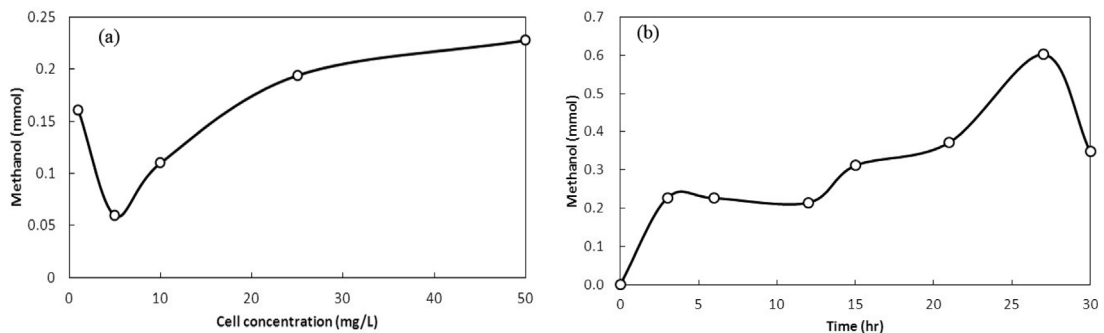


Fig. 6. Effect of (a) cell concentration and (b) reaction time on methanol formation inhibited by NaCl 100 mM (20 mg/L of dry cell was injected for (b)).

탄올의 축적이 원활히 이루어지지 않았지만 메탄산화균의 농도를 25 mg/L 이상으로 높일 경우 메탄올의 산화 속도보다 생산 속도가 더 빠르게 진행되어 메탄올의 축적량이 증가한 것으로 여겨진다.

메탄산화균의 농도 20 mg/L, NaCl 100 mM 주입 조건에서 배양시간에 따른 메탄올 생산량 변화를 평가하였다. 즉, 저해제를 가하더라도 생산된 메탄올의 일부는 메탄산화균에 의해 산화될 수 있기 때문에, 일단 생산된 메탄올의 고효율 회수를 위하여 최적 배양시간을 결정하고자 하였다. 실험 결과 배양시간 3시간 이후부터 메탄올의 축적이 일어나기 시작하여 20시간을 전후로 급격하게 메탄올 생산량이 증가했다. 27시간 후에는 최대 0.60 mmol의 메탄올이 생산되어 27시간 후까지 배양을 지속할 경우 메탄올을 최대로 회수할 수 있는 것으로 나타났다.

### 3.5. MDH 활성도와 메탄올 생성량의 상관관계

Fig. 7은 저해제를 주입하지 않은 경우의 MDH 활성도를 기준으로 저해제 주입시 활성도 저감 정도를 상대적 MDH 활성도를 x축에 그에 따른 메탄올 생성량을 y축에 나타내었다. Mehta 등<sup>13)</sup>과 박성훈과 추석열<sup>14)</sup>의 연구에서 인산염 저해제로 MDH 활성도를 약 20% 및 30%까지 저해하였을 때, 또한 Lee 등<sup>16)</sup>의 연구에서 NaCl 저해제로 MDH 활성도를 약 45%까지 저해하였을 때 메탄올이 최대로 생성되었다.

본 연구에서는 저해제별 메탄올 생성은 각각 인산염 40 mM, NaCl 100 mM, NH<sub>4</sub>Cl 40 mM 및 EDTA 50 μm 주입시 최대로 나타났으며, 이 때 상응하는 MDH 활성도는 72.1, 58.7, 54.0 및 75.7%까지 저해되었다. 따라서 MDH 활성도를 저해제 종류에 관계없이 평균 65%까지 저해 시 메탄올의 생성량이 최대로 획득되는 것으로 판단되었다. 그 이상의 농도로 저해제를 주입하여 MDH 활성도를 저해하는 경우 sMMO 활성도 또한 동시에 저해되어 메탄올의 생성 농도가 감소하는 것으로 여겨졌다.

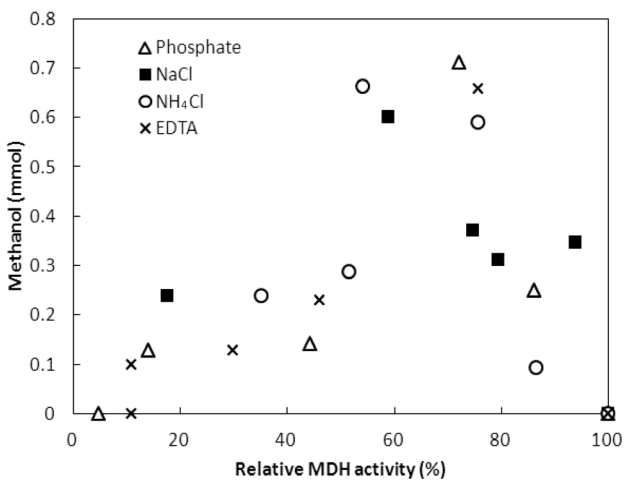


Fig. 7. Correlation between relative MDH activity and methanol.

## 4. 결론

본 연구에서는 메탄산화균 *Methylosinus sporium*의 메탄 산화 영향 인자를 분석한 후에, 메탄올 탈수소효소의 활성도 저해제인 인산염, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, EDTA의 농도를 달리하여 주입한 경우 메탄 산화에 미치는 영향과 메탄올 생성량 분석을 실시하였다. 효소 coding 유전자 분석을 통해 메탄산화균으로 사용한 *Methylosinus sporium* (KCTC, 22312)내에 MMO, MDH 효소가 존재함을 확인하였다. *Methylosinus sporium*은 35°C에서 메탄산화량 및 증식속도가 높은 중온균이었으며, pH는 산성 보다는 중·염기성 조건에 적합하였다. 인공바이오가스(메탄 50%, 이산화탄소 50%)와 공기의 주입 비율이 0.4인 경우 이론적 메탄/산소 몰비 1에 비교적 부합하며 다소 높은 메탄 산화량을 보였다. 저해제의 농도별 실험 결과, 인산염 40 mM, NaCl 50 mM, NH<sub>4</sub>Cl 40 mM, EDTA 150 μm일 때 메탄 산화율이 80% 이상으로 큰 저해가 없었으나, 그 이상의 농도에서 MDH 활성도 저해보다 sMMO 활성도의 저해가 더 커 메탄 산화에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 인산염 저해제 40 mM 주입 시 0.71 mmol의 메탄올이 생산되었으며 이 때의 최대 메탄올 생성 속도는 7.4 μmol/mg · h로 나타났다. 최대 메탄올이 생산된 각 저해제 농도에서의 MDH 활성도는 평균 65%였다. 따라서 저해제로 MDH 활성도를 35% 저해 시에 메탄올을 최대로 생성할 것으로 보인다. 본 연구 결과 메탄산화균을 이용하여 바이오가스 중 메탄의 효율적인 산화 저감이 가능하였다. 또한 MDH 활성도 저해제를 주입 시 메탄의 산화와 동시에 메탄올을 생산하여 바이오가스의 자원화 기술로의 적용 가능성이 있을 것이라 판단된다.

KSEE

## 사사

본 연구는 포항산업과학기술연구원(RIST)의 “전처리에 의한 바이오가스 생성효율 증대 및 바이오가스 중 메탄에 기인한 메탄올 합성기술개발” 과제 및 환경부의 “폐기물 에너지화 특성화대학원사업”의 지원으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 이성호, 문동현, 조대섭, “생활폐기물 매립지의 매립가스 자원화에 관한 연구,” 대한환경공학회지, 8(1), 203~213(2003).
2. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), “Climate Change 2001 : The Scientific Basis,” Cambridge University Press, Cambridge, UK(2001).
3. 환경부 자원순환국, “전국 생활폐기물 매립시설 설치운영 실태 조사결과,” 환경부(2009).
4. 환경부, “공공하수도시설 에너지 절감대책 수립에 관한 연구 : 최종보고서,” 환경부(2006).

5. Persson, M., "Biogas-a renewable fuel for the transport sector for the present and the future," Swedish Gas Center (SGC), Sweden(2007).
6. Ford, T. E., Aquatic Microbiology, Blackwell Scientific Publications, Inc., Boston, pp. 82~89(1993).
7. Hanson, R. S. and Hanson, T. E., "Methanotrophic bacteria," *Microbiol. Rev.*, **60**(2), 439~471(1996).
8. Carver, M. A., Humphrey, K. M., Patchett, R. A. and Jones, C. W., "The effect of EDTA and related chelating agents on the oxidation of methanol by the methylotrophic bacterium, *Methylophilus methylotrophus*," *Eur. J. Biochem.*, **138**(3), 611~615(1984).
9. Pettigrew, G. W. and Moore, G. R., "Cytochrome c: Biological Aspects (Springer Series in Molecular Biology)," Springer, New York, pp. 29~113(1987).
10. Chan, H. T. C. and Anthony, C., "The interaction of methanol dehydrogenase and cytochrome CL in the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*," *Biochem. J.*, **280**(1), 139~146(1991).
11. Anthony, C. and Williams, P., "The structure and mechanism of methanol dehydrogenase," *Biochim. Biophys. Acta*, **1647** (1~2), 18~23(2003).
12. Chan, H. T. C. and Anthony, C., "The mechanism of inhibition by EDTA and EGTA of methanol oxidation by methylotrophic bacteria," *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**(2~3), 231~234(1992).
13. Mehta, P. K., Mishra, S. and Ghose, T. K., "Methanol accumulation by resting cells of *Methylosinus trichosporium*(I)," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**(3), 221~229(1987).
14. 박성훈, 추석열, "*Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용한 메탄올의 생산," 한국생물공학회지, **8**(4), 341~350(1993).
15. Takeguchi, M., Furuto, T., Sugimori, D. and Okura, I., "Optimization of methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b: and approach to improve methanol accumulation," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **68**(3), 143~152(1997).
16. Lee, S. G., Goo, J. H., Kim, H. G., Oh, J. I., Kim, Y. M. and Kim, S. W., "Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b," *Biotechnol. Lett.*, **26**(11), 947~950(2004).
17. Anthony, C., The Biochemistry of Methylotrophs, Academic Press, New York, pp. 17~34(1982).
18. Anthony, C., "The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone," *Biochem. J.*, **304**(3), 665~674(1994).
19. Hutchens, E., Radajewski, S., Dumont, M. G., McDonald, I. R. and Murrell, J. C., "Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing," *Environ. Microbiol.*, **6**(2), 111~120(2004).
20. McDonald, I. R. and Murrell, J. C., "The methanol dehydrogenase structural gene *mxaf* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(8), 3218~3224(1997).
21. Bowman, J. P., Jimenez, L., Rosario, I., Hazen, T. C. and Saylor, G. S., "Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene-contaminated subsurface groundwater site," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (8), 2380~2387(1993).