



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월07일
(11) 등록번호 10-1534483
(24) 등록일자 2015년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0137330
(22) 출원일자 2013년11월13일
심사청구일자 2013년11월18일
(65) 공개번호 10-2015-0055243
(43) 공개일자 2015년05월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130122385 A
KR1020130142251 A
KR1020090060124 A
KR1020110069744 A

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이정현
경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)
강성균
경기 안산시 상록구 감골로 59, 702동 1502호 (사동, 상록수타운월드아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 5 항

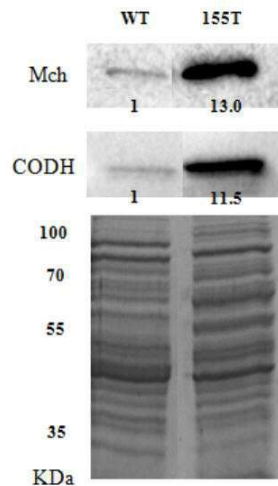
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **써모코커스 온누리누스 WTC155T 균주 및 이를 이용한 수소생산방법**

(57) 요약

본 발명은 써모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T, 기탁번호: KCTC12414BP) 균주에 관한 것이다. 또한, (a) 제 1 항의 균주에 일산화탄소를 공급하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 수소를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 균주는 고농도의 일산화탄소에서 적용한 균주로서 0.2 내지 0.4 vvm의 일산화탄소에서도 성장속도 및 수소생산능력이 증가하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이현숙

경기 안산시 상록구 성호로5길 7, 2층 (일동)

권개경

경기 안산시 상록구 성안2길 34, 301호 (사동)

이성혁

경기 안산시 상록구 성안2길 36, 301호 (사동)

김윤재

경기 안산시 상록구 천문4길 19, 402호 (사동)

배승섭

경기 시흥시 봉우재로36번길 11, 203호 (정왕동)

임재규

경기 안산시 상록구 장화2길 26, 202호 (사동)

김민식

경기 안산시 상록구 삼리2길 17, 203호 (사동)

김태완

경기 성남시 분당구 불정로 219, 116동 101호 (정자동, 한솔마을청구아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM57720

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양 초고온 고세균 이용 바이오수소 생산기술 개발

기여율 7/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2009.07.01 ~ 2015.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM57371

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양극한생물분자유전체연구

기여율 3/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2004.10.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

써모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T, 수탁번호: KCTC12414BP) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 100%의 일산화탄소에서 생장가능한 써모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T, 수탁번호: KCTC12414BP) 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 100%의 일산화탄소에서 수소 생산 능력이 있는 써모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T, 수탁번호: KCTC12414BP) 균주.

청구항 4

- (a) 제 1 항의 균주에 일산화탄소를 공급하여 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양물로부터 수소를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산방법.

청구항 5

- (a) 제 1 항의 균주에 합성가스 또는 제강산업의 부생가스를 공급하여 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양물로부터 수소를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 써모코커스 온누리누스 WTC155T 균주 및 이를 이용한 수소생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 수소에너지는 중량당 발열량이 석유보다 3배 이상 높으면서도, 이산화탄소, NOx, SOx 등 환경에 악영향을 미칠 수 있는 물질들을 배출하지 않아, 장차 화석에너지를 대체할 에너지로써 각광받고 있다.

[0003] 종래부터 사용된 수소 생산 방법에는 물의 전기분해, 천연가스나 나프타의 열분해(thermal-cracking) 또는 수증기 개질법(steam reforming) 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 다시 화석연료를 사용하여 고온, 고압 조건을 만들어야 하는 문제가 있으며, 일산화탄소를 포함한 혼합가스를 발생시키므로 그러한 가스로부터 일산화탄소를 제거하여야 하는 어려운 문제를 발생시킨다.

[0004] 이러한 종래의 수소생산방법에 비하여, 미생물을 이용한 생물학적 수소 생산 방법은 별도의 에너지를 투입하여 고온, 고압 조건을 만들 필요가 없고, 생성된 가스에 일산화탄소를 포함하지 않는다는 장점이 있다. 이러한 생물학적 수소생산방법은 크게 광합성 미생물을 이용하는 것과 비-광합성 미생물(주로 혐기성 미생물)을 이용하는 것으로 나뉘볼 수 있다. 그러나, 전자는 빛을 에너지원으로 사용하는 광합성 세균들의 고농도 배양기술이 아직 충분히 개발되어 있지 않으며, 종래의 광합성 세균들은 높은 분압의 기질이 있을 경우 기질저해가 심하다는 단점이 있다. 또한, 이들은 빛이 존재하는 경우에만 수소생성능이 지속 될 수 있다는 문제점이 있다. 따라서, 유기 탄소를 이용하여 수소를 생산할 수 있는 미생물들을 이용하여 수소를 생산하려는 시도가 지속적으로 이루어지고 있다. 본 발명자들은 한국 특허출원 10-2010-7013071호 (공개일: 2011.06.23)을 통하여 *Thermococcus* 속 균주를 이용하여 일산화탄소로부터 수소를 생산할 수 있음을 밝혔다.

[0005] 본 발명자들은 일산화탄소로부터 수소를 생산할 수 있는 썬모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)을 일산화탄소가 기질로 들어 있는 배양액에서 장기간에 걸친 적응을 통해 독성가스로 알려진 일산화탄소에 대한 적응력 향상과 더불어 수소생산성을 증가시키고자 하였다. 일산화탄소에 적응이 된 썬모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)은 야생형과 비교하였을 때 일산화탄소로부터 독성에 대한 적응력이 증가됨과 동시에 높은 수소 생산성을 보였고, 야생형과 비교하였을 때 성장 속도도 증가되었음을 확인할 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 특허출원 제10-2008-0087806호에서는 고호열성 신균주인 *Thermococcus onnurineus* NA1에서 발견한 새로운 수소화효소(hydrogenase)를 이용하여 수소를 생산하는 방법 등이 기재되어 있다.

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Pin-Ching Maness 등은 광합성 박테리아인 루브리비넥스 젤라티노누스 (*Rubrivivax gelatinosus*)에서 일산화탄소로부터 수소생산을 유도하는 과정을 기재하고 있다 (International Journal of Hydrogen Energy 27, 2002, 1407~1411).

(비특허문헌 0002) Ya Zhaoa 등은 고호열성 혐기성의 그람-양성 박테리아인 카복시도썬무스 히드로제노포만스 (*rboxydothermus hydrogenoformans*)에서 생물학적 물-가스 교환반응(water-gas shift reaction)에 의해 일산화탄소로부터 수소생산에 대하여 기재하고 있다 (International Journal of Hydrogen Energy, Volume 36, Issue 17, August 2011, Pages 10655~10665)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 썬모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T) 균주를 제공하는 것이다.
 [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 썬모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T) 균주에 일산화탄소를 공급하여 수소를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 제 1 의 형태는 썬모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T, 기탁번호: KCTC12414BP) 균주를 제공한다.
 [0011] 보다 구체적으로는, 썬모코커스 온누리누스 WTC155T 균주는 고농도의 일산화탄소에 적응되어 고농도의 일산화탄소에서 생장가능한 균주이고, 고농도의 일산화탄소에서 수소 생산 능력이 있는 균주이다.
 [0012] 본 발명의 제 2 의 형태는 (a) 썬모코커스 온누리누스 WTC155T의 균주에 일산화탄소를 공급하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 수소를 분리하는 단계를 포함하는 수소생산방법을 제공한다.
 [0013] 본 발명의 제 3 의 형태는 (a) 썬모코커스 온누리누스 WTC155T의 균주에 합성가스 또는 제강산업의 부생가스를 공급하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 수소를 분리하는 단계를 포함하는 수소생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 균주는 고농도의 일산화탄소에서 적응한 균주로서, 연속교반 탱크 반응기(continuous stirred tank reactor; CSTR)에서 고농도인 0.2 내지 0.4 vvm 농도의 일산화탄소로 균주를 배양할 때, 야생형에 비하여 성장속도 및 수소생산능력이 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)와 수소화효소(hydrogenase)의 웨스턴 블롯 분석 및 단백질 수준을 측정하였다. 쿠마시 블릴리언트 블루 R-250으로 염색된 SDS-PAGE를 웨스턴 블롯으로 나타냈다.

도 2은 야생형 균주와 155번 계대를 통해 적응된 균주 (155T)를 밀폐된 세럼병에서 100% 일산화탄소를 상부공간에 공급하여 균주의 성장과 수소생산성을 비교한 것이다. (a), 성장곡선; (b), 생산된 수소 누적 곡선.

도 3는 100% 일산화탄소를 기질로 이용한 연속교반 탱크 반응기 발효에서 야생형 및 돌연변이체의 수소 생산의 동력학적 분석으로 최대 수소생산성을 비교한 것이다.

도 4는 야생형 균주를 참조 균주로 하여 적응 균주 (155T)의 일산화탄소에 대한 독성극복 여부를 비교한 것이다. (a), 성장곡선; (b), 생산된 수소 누적 곡선.

도 5는 야생형 균주를 참조 균주로 하여 적응 균주 (155T)의 유전체 분석을 통해 유전자 변이를 비교한 것이다.

도 6은 모사가스를 공급한 경우의 균주의 성장과 수소생산성을 비교한 것이다. (a), 성장비교; (b), 생산된 수소량 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0017] **실시 방법 및 물질**

[0018] 1) 균주 및 배지

[0019] 본 연구에 사용된 균주는 야생형 써모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)이며, 일반적인 배양조건으로서, 80℃의 혐기성 환경에서 4g/l의 효모 추출물, 35g/l의 염화나트륨, 0.7g/l의 염화칼륨, 3.9g/l의 황산마그네슘, 0.4g/l의 염화칼슘이수화물, 0.3g/l의 염화암모늄, 0.15g/l의 인산나트륨, 0.03g/l의 규산나트륨(Na₂SiO₃), 0.5g/l의 탄산나트륨, 0.5g/l의 시스테인-염산(cysteine-HCl)으로 구성된 변형된-MM1 (Modified-MM1; MM1) 배지의 상부에 100% 일산화탄소를 충전시켜 이용하였다 (이하, 'MM1-CO 배지'). 멸균 후에 1L의 배지에는 1 ml의 미량원소혼합물, 1ml의 철(Fe)-EDTA, 및 1ml의 발크(Balch)의 비타민 용액이 첨가되었다. 최초의 배지 pH는 대기압에서 6.5로 맞추었다.

[0020] 2) 세포 성장 및 적응 균주 제작

[0021] 세포 접종을 위하여 혐기적 챔버(Coy)를 사용하였다. 세포는 MM1-CO 배지를 사용하여 80℃에서 유지되었다. 최초의 써모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1) 야생형 균주로부터 20ml의 MM1-CO 배지에 야생형 균주를 접종하고, 20시간 동안 배양을 한 후 새로운 MM1-CO 배지에 주사기를 이용하여 접종량을 2%(v/v)로 하여 계대 배양을 총 155회에 걸쳐 적응 균주를 선별하였다.

[0022] 3) 가스 분석

[0023] 가스조성분석은 Molesieve 5A 컬럼(Supelco, Bellefont, PA) 및 Porapak N 컬럼(Supelco)으로 하여, 열전도성 검출기와 불꽃이온화 검출기를 갖춘 YL6000 가스 크로마토그래피(YL Instrument Co.)를 이용하여 측정하였다. 아르곤을 가스 운반체로 사용하였다. 수소가스를 정량하기 위하여 질소에 각 1%(w/w)의 성분(일산화탄소, 이산화탄소, 수소, 메탄 및 산소)이 포함된 가스교정 표준기(Supleco)를 사용하였다.

[0024] 4) 웨스턴 블롯팅

[0025] 씨모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1) 야생형 균주와 155번 계대 배양을 통해 얻어진 균주를 MM1-CO배지에서 각각 80ml 부피로 키운 후, 지수적으로 성장하는 세포를 원심분리로 수거하여 초음파로 파괴하였다. 세포 찌꺼기를 원심분리하여 제거하고, 조추출액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 분석 용액으로 정량하였다. 각 균주의 5 μ g의 조추출액을 10% SDS-PAGE에 재용해시키고, Trans-Blot@Turbo™을 가진 PVDF 막(Trans-Blot@Turbo™ transfer pak)으로 이동시켰다. 상기 막을 0.5% 소혈청알부민(BSA)이 보충된 0.1% TritonX-100 (TBS-T)을 포함하는 Tris-완충된 생리식염수 완충용액에 담가두었다. 상기 막을 1:5000으로 희석된 항체를 첨가한 후 TBS-T 완충용액에 항은 반응시켰다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제(Horse raddish peroxidase)-접합된 항-토끼 항체(Ab Frontier)를 2차 항체로 사용하였고, Immun-Star™HRP 화학형광 키트(Bio-Rad)에 의해 발생된 신호를 ChemiDoc™MP 이미징 시스템(Bio-Rad)으로 관측하였다.

[0026] 5) 야생형과 적응 균주 (155T)에서 수소 생산의 동력학적 분석

[0027] 수소 생산에 대한 동력학적 분석을 위하여 80℃에서 혐기적 모드로 미세 스파저(sparger, 5 μ 지름의 구멍 크기)를 가진 연속교반 탱크 반응기(continuous stirred tank reactor; CSTR)에서 수행하였다. 교반 속도는 300 rpm 이었고, pH는 3.5% 염화나트륨을 포함하는 2N 수산화나트륨을 사용하여 6.1 \pm 0.1으로 조절하였다. 시드 배양을 80℃에서 지수 성장기가 될 때까지 배양시켰다. 100 ml의 시드 배양액을 연속교반 탱크 반응기에 50ml 이하 주사기를 이용하여 접종하였다. 배양 볼륨 2L에서 10 g/l 효모가 첨가된 MM1배지를 이용하여 100% 일산화탄소 가스를 0.014에서 0.12 vvm 으로 공급하여 비교실험을 수행하였다. 수소 가스는 Molesieve 5A 컬럼(Supelco, Bellefont, PA)과 Porapak N 컬럼(Supelco)으로 TCD 검출기가 구비된 YL6000 가스 크로마토그래프 장비를 사용하여 측정하였다. 아르곤을 가스 운반체로 사용하였다. 오븐 온도는 40℃였다. 분석을 위한 10 μ l의 가스 시료는 배양병의 부틸고무를 통해 가스-타이트 시린지기로 꺼냈다. 검출된 수소 가스의 측정은 피크 면적을, 질소에 40% 수소를 포함하는 표준 가스를 사용한 회귀분석에 의해 수행된 보정 곡선과 비교함으로써 계산되었다.

[0028] 6) 적응 균주(155T)의 유전적 변화 관찰

[0029] 적응배양을 통해 얻어진 우수균주(155T)의 수소생산성 능력 향상이 어떤 유전자 변이에 의해 나타난 현상인지 파악하기 위해 유전체 분석을 실시하였다. 유전체 분석을 위하여 Illumina Hiseq2000 sequencer를 사용하였고, 분석을 위해 사용된 소프트웨어는 Illumina Pipeline (CASAVA) v1.8.2 이다. 유전체 분석을 통해 얻어진 전체 베이스(base) 수는 2,371,763,204 였으며, 약 2백만 베이스를 가지는 균주를 분석하기 위한 충분한 데이터를 확보하였으며, read count는 23,482,804 이었다. 유전자 변이 분석을 위해 씨모코커스 온누리누스 엔에이원 야생형 균주를 참조균주로 하여 비교 분석을 실시하였다. 얼라인먼트를 위해 BWA v0.5.9-r16 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 소프트웨어를 사용하였으며, 데이터 분석을 위하여 GATKv1.4.11 (http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit) tool을 사용하였다. 변이 분석을 위하여 Samtools v0.1.18 (<http://samtools.sourceforge.net/>)을 사용하였다.

[0030] <실시예1> 씨모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)의 야생형과 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T) 균주의 단백질 발현 비교

[0031] 씨모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)의 유전체에서 일산화탄소를 기질로 이용하기 위해 필요한 일산화탄소 탈수소화효소(CO dehydrogenase) 와 수소화효소(hydrogenase) 단백질들의 비율이 도 1에 표시된 바와 같이, 야생형에 비해 적응 균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)에서 높은 것을 발견하였다. 이는 일산화탄소를 기질로 충분히 잘 이용할 수 있다는 증거이다.

[0032] <실시예2> 100% 일산화탄소 공급 후 성장과 수소생산성 향상 비교

[0033] 씨모코커스 온누리누스 엔에이원의 야생형과 적응 균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 성장과 수소생산성은 시럽병을 이용하여 위쪽 빈공간에 100% 일산화탄소를 공급 후 밀폐된 조건에서 배양을 실시하였다. 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)는 배양 6시간 이후부터 야생형보다 월등히 빠른 성장을 확인할 수 있었다(도 2a). 이러한 결과는 일산화탄소가 공급되어 있는 배지에서 연속적인 계대를 통해 일산화탄소를 이용하기 위해 적응됨으로써 나타난 결과를 의미한다. 누적 수소생산량 또한 야생형에 비해서 돌연변이체에서 증가된 것을 볼 수 있었다(도 2b). 결론적으로 씨모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)의 야생형 균주에 비해 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T) 균주가 일산화탄소에 적응을 통해 일산화탄소를 기질로 이용하기 위해 필요한 단백질의 양을 많이 증가시킴으로써 세포 성장과 수소 생산성을 증가시킬 수 있었다.

[0034] 야생형과 적응균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 세포 성장과 수소생산성은 실시간으로 100% 일산화탄소를 기질로 사용하여 CSTR 발효기에서 배양을 실시하였다. 적응균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)는 일산화탄소의 공급량을 40ml/min에서 240ml/min으로 높여준 이후부터 야생형보다 상당히 빠른 성장을 보였고, 야생형의 배가시간(doubling time)이 80분인데 반하여 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 경우 60분으로 성장속도가 월등히 빨라진 것을 확인할 수 있었다(도 3a). 이러한 결과는 일산화탄소에 의한 적응을 통해 생장이 촉진된다는 것을 의미한다. 누적수소생산량 또한 야생형에 비해서 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)에서 증가된 것을 볼 수 있었다(도 3b). 단위 세포당 최대수소생산속도(maximum specific H₂ production rate)의 경우 야생형은 31 mmol/l/h이었고 돌연변이체는 107 mmol/l/h로 약 3배 정도 증가된 것을 확인할 수가 있었다. 결론적으로 씨모코커스 온누리누스 엔에이원(*Thermococcus onnurineus* NA1)을 일산화탄소 조건에서 장기간에 거친 적응을 통해 일산화탄소를 기질로 사용하는데 필수적인 일산화탄소 탈수소화효소(CO dehydrogenase)와 수소화효소(hydrogenase)가 과발현됨으로써 세포 성장과 수소 생산성을 증가시킬 수 있었다

[0035] 일산화탄소의 독성 극복 여부를 확인하기 위해 0.2vvm과 0.4vvm에서 야생형과 적응균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 세포 성장과 수소생산성은 실시간으로 100% 일산화탄소를 기질로 사용하여 CSTR 발효기에서 배양을 실시하였다. 야생형 균주의 경우 0.2vvm에서 0.4vvm으로 일산화탄소의 공급량을 증가시켰을 때 지속적인 성장 및 수소생산을 하지 못하는 반면, 적응균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 경우 일산화탄소의 공급량을 0.2에서 0.4vvm으로 높여 줘에도 불구하고 지속적인 성장과 수소생산이 가능하였고, 최대 균체 농도 (도 4a) 와 최대 수소생산성 (도 4b) 이 0.2vvm에서 4.3과 170 mmol/l/h , 0.4vvm에서는 5.5와 220 mmol/l/h를 나타내었다. 이는 공급되는 일산화탄소의 양이 증가함에도 불구하고 일산화탄소에 의한 독성을 극복하여 나타난 결과라고 말할 수 있다.

[0036] <실시예3> 야생형 균주와 적응균주(155T)의 유전체 비교

[0037] 씨모코커스 온누리누스 엔에이원의 야생형을 참조균주로 하여 적응 균주인 씨모코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)의 SNP(single nucleotied polymorphism)와 INDEL(Insertion or Deletion) 유전체 변이를 분석하였다. 총 42개의 유전체 변이가 관찰되었고, 17개의 변이는 ORF(Open Reading Frame)에서 발견되었다. 이 중에서 4개의 SNP가 발견이 되었고, 이 중 1개의 유전자는 아미노산 변화가 없었으며 나머지 3개의 유전자에서 아미노산의 변화가 관찰이 되었다. 또한 13개의 유전자에서 특정 염기의 INDEL이 관찰이 되었는데 전반적으로 유전자 변이 위치에서 down stream의 아미노산의 변화가 관찰되었다(도 5a). ORF 지역 외 non-coding 지역에서 25개의 INDEL이 관찰되었다(도 5b). Annotation 결과로부터 일산화탄소를 잘 이용할 수 있는 것과 관련된 일산화탄소 탈수소화효소(CO dehydrogenase)와 수소화효소(hydrogenase)의 변이는 관찰되지 않은 것으로 보아 현재까지 알려지지 않은 다른 요인에 의해 적응균주의 수소생산성이 향상되었다고 볼 수가 있으며 Reverse engineering 방법을 통해 일산화탄소를 이용하는데 중요한 유전자를 찾을 수 있을 것이라 사료된다. 또한 Non-coding 지역에서의 변이는 유전자 발현과 관련된 프로모터 영역이나 단백질 합성을 위해 중요한 RBS(Ribosome Binding Site)와 같은 영역 주변 일 수도 있다. 따라서 이러한 변이로 인해 특정 중요 유전자의 발현이 증가 또는 불필요 유전자의 발현 감소 등을 유발하여 일산화탄소로부터 수소를 생산할 수 있는 능력이 향상된 것으로 사료된다. 결론적으로 일산화탄소에서의 지속적인 적응 배양을 통해 확보된 적응 균주인 씨모

코커스 온누리누스 WTC155T(*Thermococcus onnurineus* WTC155T)는 환경에 적응함과 동시에 유전자 변이에 의해서 일산화탄소 조건에서의 수소생산성이 증가된 것으로 볼 수 있다.

<실시예4> 모사가스 이용 수소 생산 연구

건식, 습식 방법으로 아래 표 1과 같은 조성의 합성가스 조성의 혼합 가스를 이용한 씨모코커스 온누리누스 WTC155T의 성장 및 수소 생산성을 실험한 결과를 보면, 혼합가스에 포함되어 있는 미량의 황화합물 등에 의해 균주의 성장이나 수소생산이 저해되지 않았고, 혼합가스에 함유된 일산화탄소를 이용하여 균주의 성장(도 6a) 및 수소생산능력(도 6b)이 있음을 확인하였다.

표 1

가스조성	일산화탄소(%)	수소(%)	질소(%)	이산화탄소(%)
석탄가스화(건식)	65	30	2.5	2.5
석탄가스화(습식)	40	40	10	10
기타	20	10	52	18

수탁번호

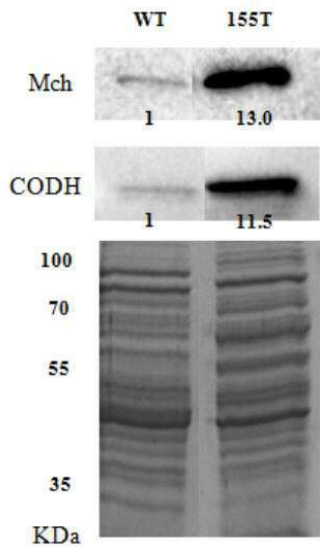
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12414BP

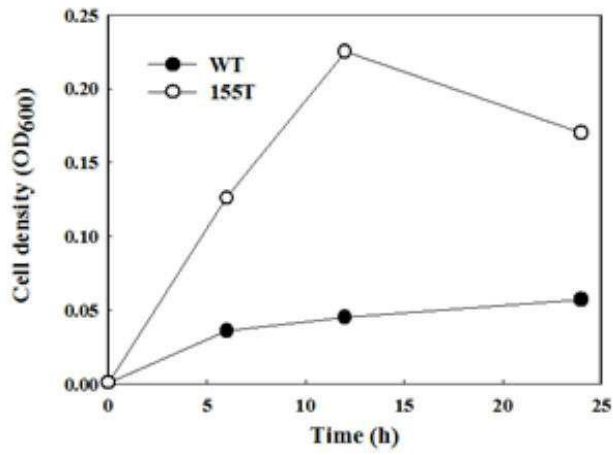
수탁일자 : 20130604

도면

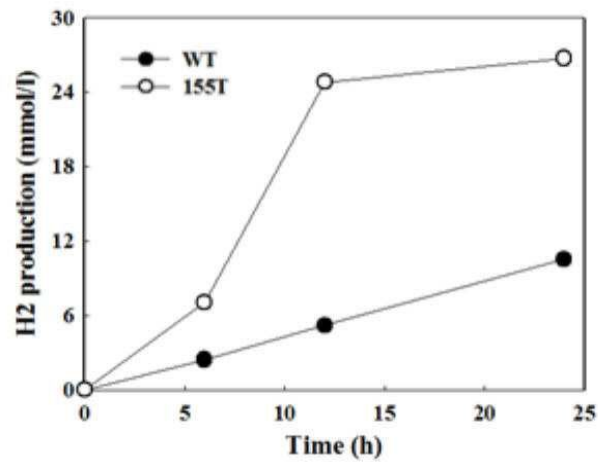
도면1



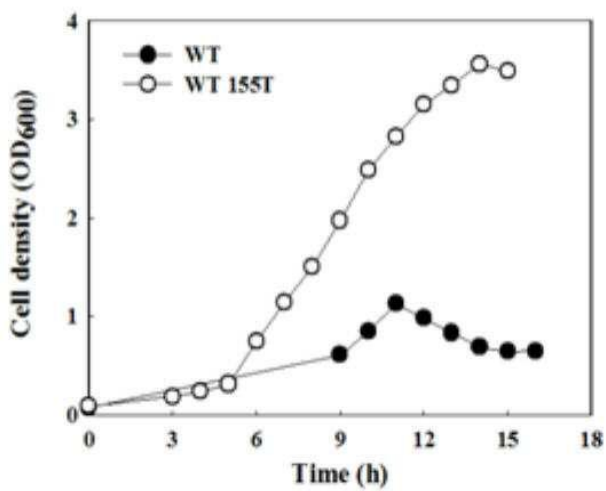
도면2a



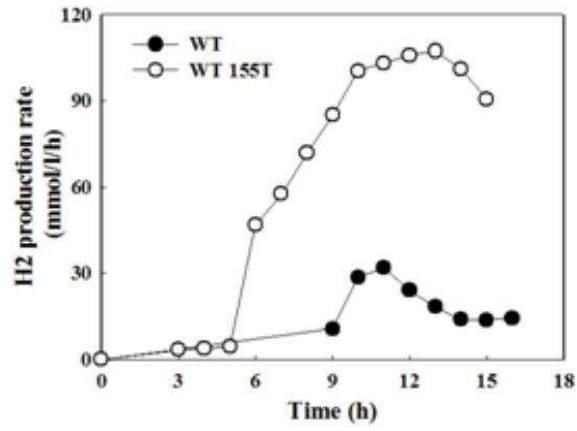
도면2b



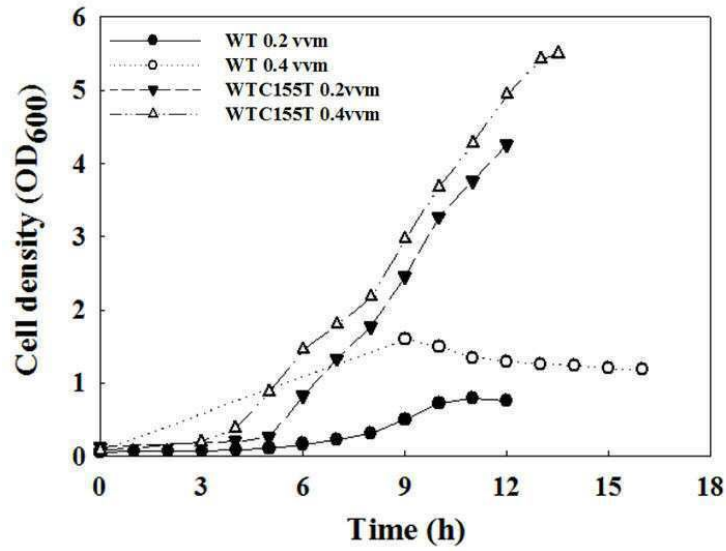
도면3a



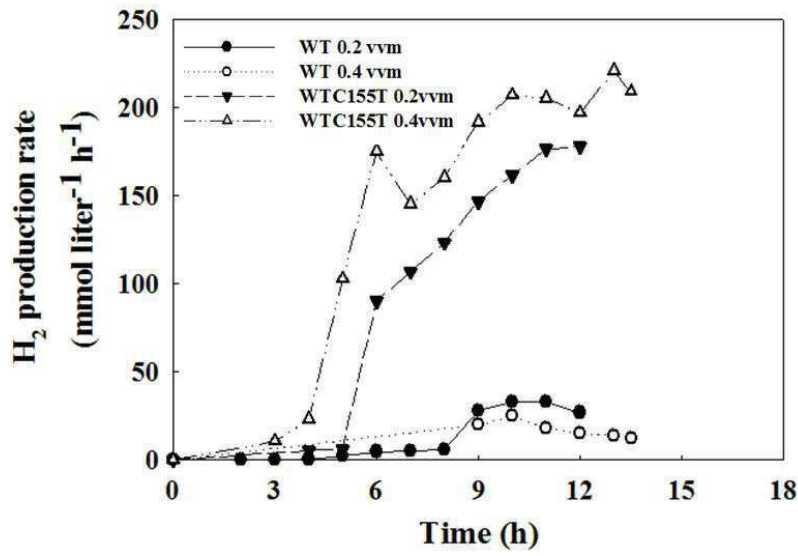
도면3b



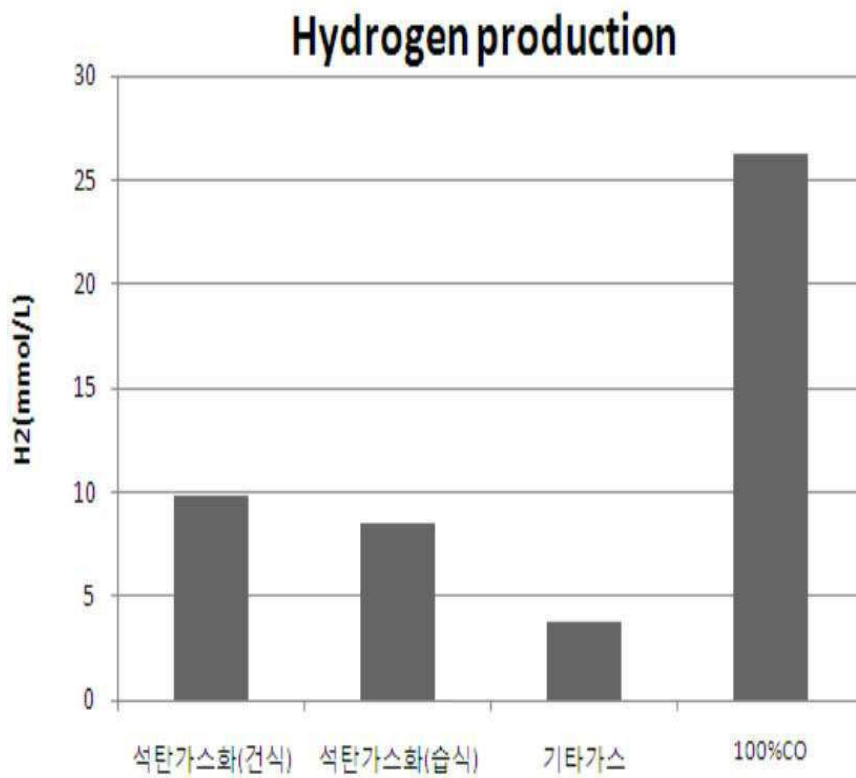
도면4a



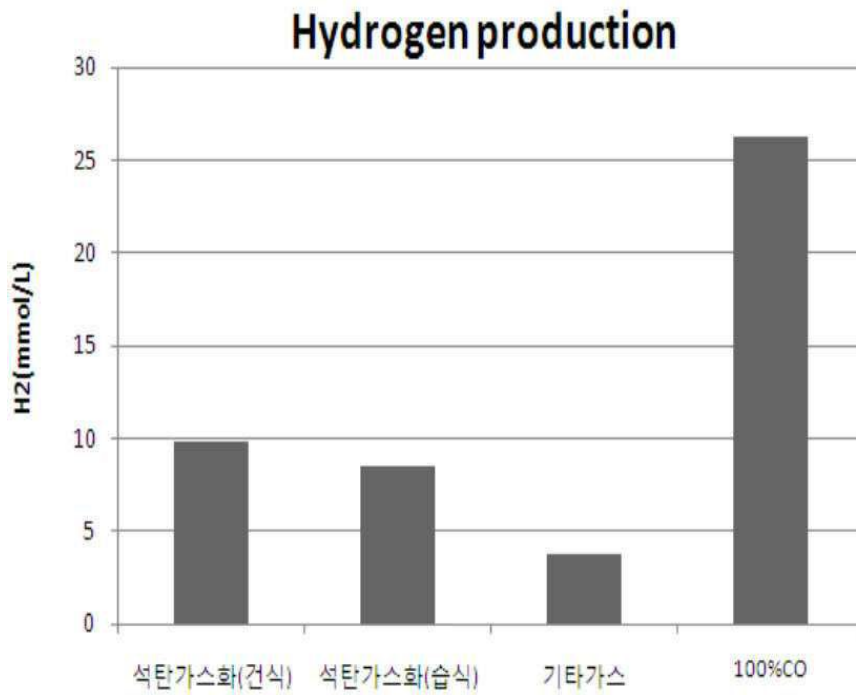
도면4b



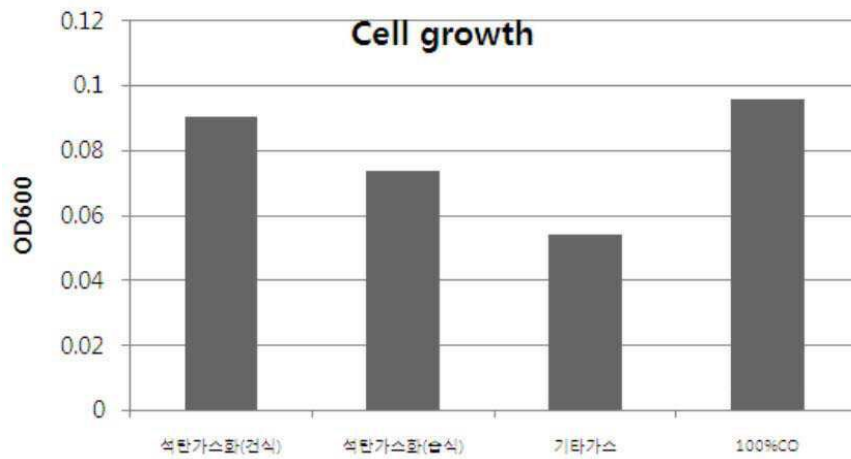
도면5a



도면5b



도면6a



도면6b

