



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0142251  
(43) 공개일자 2013년12월30일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/67 (2006.01)<br/>C12N 15/74 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0065303</p> <p>(22) 출원일자 2012년06월19일<br/>심사청구일자 2012년06월19일</p> | <p>(71) 출원인<br/>한국해양과학기술원<br/>경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)</p> <p>(72) 발명자<br/>이정현<br/>경기도 안산시 상록구 사동 1346번지 월드아파트 702-1502<br/>강성균<br/>경기도 안산시 상록구 사동 1346번지 월드아파트 702-1502<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>윤여강</p> |
|---|--|

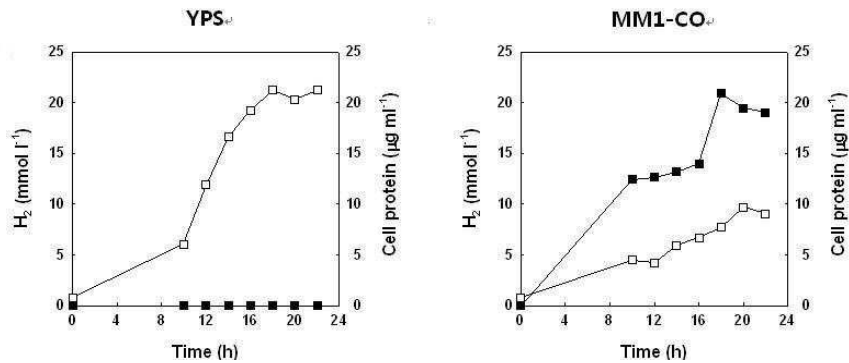
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 수소생산능이 증가된 써모코코스 온누리우스 엔에이원 돌연변이 균주 및 이를 이용한 수소생산방법

**(57) 요약**

본 발명은 수소생산능이 증가된 써모코코스 온누리우스 엔에이원 돌연변이 균주 및 이를 이용한 수소생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(mch) 및 복합-구조체 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 안티포터(antiporter) (mnh3)유전자 클러스터의 발현율이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1 및 이를 이용한 수소 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

**이현숙**

경기도 안산시 상록구 일동 579-3 2층

**권개경**

경기도 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

**이성혁**

경기도 안산시 상록구 사동 1579-3 301호

**김윤재**

경기도 안산시 상록구 사동 1519-12 402호

**배승섭**

경기 시흥시 정왕동 1575-9 203호

**임재규**

경기도 안산시 상록구 사2동 1413-4 202호

**김민식**

경기도 안산시 상록구 사동 1546-5 203호

**김태완**

경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을청구아파트  
116-101

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 안티포터(antiporter) (*mnh3*) 유전자 클러스터의 발현율이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurii*

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12157BP

수탁일자 : 20120309

*neus* NA1.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서 상기 발현율의 증가는 유전자 복제수의 증가, 유전자 전사율의 증가, 유전자 번역율의 증가, 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어진 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서 상기 유전자 전사율의 증가는 강력한 프로모터를 이용하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로모터는 글루타메이트 디하이드로게나아제(*Pgdh*)의 프로모터, 시그마 70 프로모터, 박테리오파지 λ의 pL; Plac; Ptrp; Ptac(Ptrp-lac 혼성 프로모터), 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드(IPTG)-유도성 프로모터, 테트라사이클린 유도성 프로모터, 아라비노스 유도성 프로모터, 자일로스-유도성 프로모터, 트립토판 프로모터, lac 프로모터, 알콜-유도성 프로모터, 열-유도성 프로모터로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 프로모터인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 프로모터는 글루타메이트 디하이드로게나아제(*Pgdh*)의 프로모터인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 *Thermococcus onnurineus* NA1은 KCTC12157BP 호 인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항중 어느 한 항에 따른 *Thermococcus onnurineus* NA1 균주를 이용한 수소 생산 방법.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서 상기 수소 생산은 1기압 이상 고압의 일산화탄소를 공급하는 것을 특징으로 하는 수소 생산 방법.

### 청구항 9

제 7 항에 있어서 상기 일산화탄소는 합성가스 또는 제강산업의 부생가스의 형태로 공급되는 것을 특징으로 하는 수소 생산 방법.

## 명세서

**기술분야**

[0001] 본 발명은 수소생산능이 증가된 썬모코코스 온누리우스 엔에이원 및 이를 이요용한 수소생산방법에 관한 것이다.

[0002] *Termococcus onnurineus* NA1은 CO, 포름산 또는 녹말의 공급되는 혐기적 조건에서 수소를 생산할 수 있다. 본 발명자들은 상기 균주에서 카복시도트로픽(carboxydrotrophic ; '탄소하나를 가진 물질을 영양분으로 이용할 수 있는'의 의미 이하 같은 의미로 사용됨)하고 수소생성 능력(CO + H<sub>2</sub>O → CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>)이 있는 것은 단기능성(monofunctional) CO 디하이드로게나아제(*codh*) 및 막 결합 하이드로게나아제(*mch*)를 암호화하는 유전자 클러스터의 존재에 의해서 설명이 되는 것을 발견하였다. 상기 균주는 100%의 CO에 매우 불감적이었고, 100%의 CO의 2기압에서 카시도트로픽 수소생성을 유지할 수 있었다. 일산화탄소로부터의 수소생성능력은 카본 모노옥사이드 디하이드로게나아제의 프로모터 지역을 변형시킴으로서 상당히 증가되었고, RT-PCT 및 웨스턴 브랏팅에 의해 확인하였을 때 *codh-mch* 유전자 클러스터에서 유전자의 증가된 발현 비율과 잘 조화되었다. MC01로 명명된 돌연변이체는 CO로부터 수소로의 전환율은 야생형과 비슷하게 유지되면서, 야생형이 시간당 15-30mmol의 수소를 생산하는 것에 비하여, 시간당 50-120 mmol의 수소를 생산하였다. 실용적인 관점에서 MC01은 철강산업의 부산물인 가스를 이용하여 수소를 생산할 수 있고, LDG 용광로 가스로부터 시간당 58 mmol의 생산성을 보였다. 본 발명은 유전공학적 방법을 이용해 카본 모노옥사이드 하이드로겐라이아제(*codh-mch*)를 이용해 CO로부터 수소를 효과적으로 생산할 수 있는 균주를 만들었고, 이를 이용해서 철강 산업의 부생가스로 또는 합성가스로부터 수소 생산을 증가시킬 수 있다.

**배경기술**

[0003] 수소 가스는 생태친화적인 특징 때문에 미래의 에너지원으로 다시 관심을 받고 있다. 이에 대한 가치가 증가됨에도 불구하고, 대부분의 H<sub>2</sub>는 예를 들어 천연 가스 스트림 변형, 석탄 가스화 및 물의 가수분해와 같은 에너지가 많이 소모되는 주로 화학적 공정에 의해 생산되었다(Nath and Dasth, 2004).

[0004] 실험실 수준에서 미생물을 H<sub>2</sub> 생산을 위하여 사용하려는 여러 번의 시도가 있었다 (Manish and Banerjee, 2008). 시아노박테리아 및 조류에서 물의 직접적인 광분해가 수십년간 연구되었고, H<sub>2</sub>가 재생가능하고 지속가능한 자원 즉 바이오매스 가축 사료 및 합성가스로부터 생산되었다. (Li et al., 2008; Antonopoulous et al, 2007; Yokoi et al., 2001; Davila Vazquez et al., 2009; Tirado-Acevedo, et al., 2010).

[0005] 바이오매스의 가스화 과정을 통해 생산되는 합성가스(Synthesis gas, syngas)는 주로 일산화탄소(CO), 이산화탄소(CO<sub>2</sub>), 수소가스(H<sub>2</sub>), 질소가스(N<sub>2</sub>) 및 메탄(CH<sub>4</sub>)으로 이루어져 있고(Tirado-Acevedo et al., 2010; Munasinghe and Khanal, 2010), 여러가지 재생 연료 및 화합물을 생산하기 위해 생물학적 발효의 기질로써 연구되었다(Mohammadi et al., 2011). 제강 부생 가스는 주로 CO, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> 및 CO<sub>2</sub>로 이루어져 있고, 생산 공정에 따라 조성이 달라진다([http://www.ge.com/metals/docs/3461982\\_1265141459\\_Gusso-%20ILVA%20Paper.pdf](http://www.ge.com/metals/docs/3461982_1265141459_Gusso-%20ILVA%20Paper.pdf); GE의 홈페이지). 높은 농도의 H<sub>2</sub> 및 CO는 이것을 재생을 위한 매력적인 에너지원으로 만들고 이것을 가스 터빈에 대한 원료로서 시도되거나 보다 높은 가치를 가진 수소, 에탄올 및 부탄에디올 같은 것으로 전환하는 이용하려는 시도가 있었다(Joseck F et al. 2008; Michael Kopke et al. 2008).

[0006] 합성가스 또는 제강 부산물에 있는 CO로부터 H<sub>2</sub> 생산은 일산화탄소를 수소로 전환하는(CO+ H<sub>2</sub>O → CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>; ΔG° = -20 kJ/mol) 물-가스 이동(water-gas shift; WGS)를 통하여 이루어진다(Oelgeschlaer and Rother, 2008). 두 개의 효소 클러스터가 이 반응에 관여한다: CO 디하이드로게나아제(Codh)는 CO를 CO<sub>2</sub>로 산화하며 두 환원 당량을 만들고, 이것은 하이드로게나아제가 양성자를 H<sub>2</sub>로 전환하는데 사용된다(Fox et al., 1996; Soboh et al., 2002). 카복시도트로픽 수소 생성 성장을 하는 많은 세균 및 고세균이 다양한 지역에서 분리되었고, 수세기 동안 연구되었다. 가장 잘 연구된 것은 *Rhodospirillum rubrum*, *Carboxydotherrmus hydrogenosofomans* 이다 (Oelgeschlager and Rother, 2008; Techtmann et al., 2009). CO는 탄소 동화를 위한 에너지 생산의 기질뿐만 아니라 금속에 대해 높은 친화도 때문에 세포 대사에 독성 물질이기도 하다(Ragsdale 2004). 대부분의 하이드로게나아제 복합체는 *P. furiosus*, *R. rubrum* 또는 *Alcaligenes eutrophus*와 같은 CO-내성균을 제외하고는 CO에 민감하다. 따라서 높은 CO 농도 또는 제강 부생 가스 또는 합성 가스로부터의 다른 해로운 성분에서 높은 물-가스 이동(water-gas shift; WGS) 활성도를 유지하는 균주는 H<sub>2</sub> 생산에 바람직하다. 그러나 카복시도트로픽

수소생성 성장 능력을 가진 세균 또는 고세균의 유전공학적 개발은 거의 없다.

[0007] *Thermococcus onnurineus* NA1 는 카복시트로픽 성장을 할 수 있는 호열성 고세균중의 하나이다(Lee et al., 2008). 상기 균주는 전자 수용체로서 황을 가지는 펩타이드 또는 아미노산에서 자랄 수 있고, 포름산을 ATP 합성을 위한 에너지원으로 사용될 수 있다 Bae et al., 2006; Kim et al., 2010). *in silico* 분석을 통해 보존된 [NiFe]-하이드로게나아제 클러스터 cluster (mch)가 codh 및  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  안티포트 유전자(mnh3) 사이에 위치하고 있었다(Lim et al., 2010).

[0008] 본 발명자들은 *codh-mch-mnh3* 클러스터가 수소생산 카르복시도트로픽에 실질적으로역할을 하고 있으며 전사 및 번역 수준 모두에서 조절되고 있다는 점을 알고 본 발명을 완성하였다. 상기 클러스터의 상류부분을 수소 생산 향상을 위해 강한 프로모터로 변형하였다. 이 돌연변이는 야생균과 비교하였을 때 CO로부터 증가된  $\text{H}_2$  생산성을 보였고, 산업 균주의 하나로 이 균주의 이용성을 확인하기 위하여 제강 부생 가스를 사용하여 생장 실험을 수행하였다

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 수소생산능력이 증가된 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 수소생산능력이 증가된 균주를 이용한 수소생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 수소생산수율이 높은 수소생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0012] 상기한 목적을 위하여 본 발명의 제1의 구현형태는 CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(mch) 및 복합-구조체  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  안티포터(antiporter) (mnh3)유전자 클러스터의 발현율이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1을 제공하는 것이다. 상기 유전자 발현율의 증가는 유전자 복제수의 증가, 유전자 전사율의 증가, 유전자 번역율의 증가, 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어질 수 있다. 보다 더 구체적으로 상기 유전자 전사율의 증가는 고세균에서 작동 가능한 강력한 프로모터를 이용하여 얻어질 수 있다. 바람직하게는 상기 프로모터는 글루타메이트 디하이드로게나아제(Pgdh)의 프로모터이다.

[0013] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의하여 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 이하와 같은 의미들을 가지는 것으로 정의될 다수의 용어들을 참고하기로 한다.

[0014] "임의의" 또는 "임의로"라는 용어는, 후술하는 특징 또는 구조가 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있다는 것, 또는 후술하는 현상이나 환경이 발생 또는 조성되거나 발생 또는 조성되지 않을 수 있다는 것, 그리고 구체적인 특징이나 구조가 존재하는 경우와, 이와 같은 특징 또는 구조가 부재하는 경우, 또는 현상이나 환경이 발생 및 조성되는 경우, 그리고 현상이나 환경이 발생 또는 조성되지 않는 경우를 포함하는 의미이다.

[0015] "발현 벡터" 또는 "벡터"란 용어는, 숙주 세포에 형질 도입되거나, 이 숙주 세포를 형질 전환 또는 감염하여, 이 숙주 세포가, 상기 세포가 원래 생산하는 단백질 이외의 핵산 및/또는 단백질을 생산하도록 만들거나, 또는 상기 세포 내에서는 진행되지 않던 방식으로 핵산 및/또는 단백질을 발현하도록 만드는 핵산을 의미한다.

[0016] "내인성"이란 용어는, 어떤 물질 또는 과정이, 예를 들어, 비-재조합 숙주 세포 내에서 원래 생산 또는 진행되는 경우를 의미한다.

[0017] "핵산"이란 용어는, 임의의 길이를 가지는 중합체 뉴클레오티드(리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드)를 의미한다. 그러므로, 상기 용어로서는, 단일 사슬, 이중 사슬 또는 다중 사슬 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 혼성체 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 기타 천연, 화학 또는 생화학 변형된, 비-천연 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] "오피론"이란 용어는, 각각 유전자 생산물 예를 들어, RNA 또는 단백질을 암호화하는 2개 이상의 연속 뉴클레오

티드 서열을 의미하는 것으로서, 이것의 발현은 하나 이상의 제어 요소(예를 들어, 프로모터)에 의해 연계적으로 조절되는 서열들을 의미한다.

- [0019] "유전자 생산물"이란 용어는, DNA에 의해 암호화된 RNA(또는 RNA에 의해 암호화된 DNA), 또는 RNA나 DNA에 의해 암호화되는 단백질을 의미하는 것으로서, 여기서, 유전자는 통상적으로, 단백질을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함할 뿐만 아니라, 인트론 및 기타 비-암호화 뉴클레오티드 서열을 포함할 수도 있다.
- [0020] "단백질"이란 용어는, 임의의 길이를 가지는 아미노산 중합체를 의미하는 것으로서, 암호화 및 비 암호화된 아미노산, 화학적 또는 생화학적으로 변형 또는 유도체화된 아미노산, 그리고 변형된 펩티드 주쇄를 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0021] 본원에 사용된 "이중 핵산"이란 용어는, 다음과 같은 특징 중 하나 이상을 가지는 핵산을 의미한다: (a) 핵산이 소정의 숙주 세포에 대하여 외래임(즉, 천연의 환경하에 숙주 세포 내에서 발견되지 않음); (b) 핵산이 천연의 환경 하에 소정의 숙주 세포 내에서는 발견되는(즉, 소정의 숙주 세포에 대해 "내인성"인) 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 뉴클레오티드 서열은 상기 세포 내에서 인위적 양(예를 들어, 천연의 환경 하에서 발견될 것으로 예상되는 양보다 많은 양 또는 이보다 많은 양)으로 생산됨; (c) 핵산 서열이 내인성 뉴클레오티드 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하되, 이 뉴클레오티드 서열은 (동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가지는) 동일한 단백질을 암호화하고, 상기 세포 내에서 인위적 양(예를 들어, 천연의 환경 하에서 발견될 것으로 예상되는 양보다 많은 양 또는 천연의 환경 하에서 발견되는 양보다 많은 양)으로 생산됨; 또는
- [0022] (d) 핵산이 천연의 환경에서 각자 동일한 관계를 갖는 것으로 발견되지 않는 2개 이상의 뉴클레오티드서열들을 포함함(예를 들어, 상기 핵산이 재조합체임).
- [0023] 본 발명의 뉴클레오티드 핵산은 하나 또는 여러 개의 벡터에 의하여 발현될 수 있다. 예를 들어, 하나의 발현 벡터는 전체 CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체  $Na^+/H^+$  안티포터(*antiporter*) (*mnh3*) 유전자 클러스터를 암호화하는 이중 서열을 1 이상, 2 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 전부를 포함할 수 있다. 하나 또는 여러 개의 벡터를 선택하는 것은 이중 서열의 크기와 벡터의 수용 능력에 따라서 달라질 수 있는데, 이러한 과정은 상기 벡터가 선택된 숙주 세포 내에서 발현될 때 생산할 수 있는 소정의 수소 생산의 전체 수율에 따라서 크게 영향을 받을 것이다. 상기 벡터는 에피솜의 형태로서 복제가능한 상태에 있을 수 있거나, 아니면 숙주 세포 계놈의 구성 부분으로서 복제될 수 있다. 통상적으로, 숙주 세포를 지속적으로 증식시키는 경우에는 후자의 형태로 복제되는 것이 바람직하다.
- [0024] 임의의 숙주 세포에서, CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체  $Na^+/H^+$  안티포터(*antiporter*) (*mnh3*) 유전자 클러스터를 암호화하는 하나 이상의 이중 서열은 하나 이상의 오페론에 의해 제어될 수 있다. 몇몇 경우, 2개 또는 3개의 오페론 시스템은 하나의 오페론 시스템보다 수소 생산 수율을 더욱 높은 수율로 제공한다.
- [0025] 원하는 경우, 본 발명의 핵산 서열은 숙주 세포 내에서 이와 같은 서열을 더욱 높은 수준으로 발현하기 위해, 선택된 숙주 세포의 코돈 선호도를 반영하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 몇몇 구체예에서 *Thermococcus* 코돈 선호도에 따라서 변형될 것이다.
- [0026] 소정의 숙주 미생물의 코돈 중 가장 많이 사용되는 코돈을 사용하면, 일반적으로 번역 가능성이 증가하게 되므로, 원하는 서열의 발현 수준도 증가하게 된다.
- [0027] 다수의 통상적인 재조합 기술과 합성 방법에 의하여 본 발명의 핵산을 제조할 수 있다. 간단하게 말하면, 본 발명의 핵산 즉, 계놈 DNA 단편, cDNA 및 RNA가 제조될 수 있는데, 이들 핵산은 모두 세포로부터 직접 추출되거나 또는 다양한 증폭 방법 예를 들어, PCR 및 rt-PCR에 의해서 재조합 방식으로 생산될 수 있다.
- [0028] 핵산의 직접 화학 합성법은 통상적으로 3'-블로킹된 뉴클레오티드 단량체 및 5'-블로킹된 뉴클레오티드 단량체를, 연장되고 있는 뉴클레오티드 중합체 사슬의 5' 말단 하이드록실기에 연속적으로 부가하는 과정을 포함하는데, 여기서, 각각의 부가 과정은 부가된 단량체의 3'-위치 상에서 연장되고 있는 사슬의 5' 말단 하이드록실기를 친핵 공격하여 수행되며, 이때, 상기 부가된 단량체는 통상적으로 인 유도체 예를 들어, 포스포트리 에스테르 및 포스포라미데이트 등이다. 이와 같은 방법은 당 업자에게 알려져 있으며, 이에 관하여는 관련 문헌 및 논문에 개시되어 있다[예를 들어, Matteuci의 다수 (1980) Tet Lett 521 719, 미국 특허 제4,500,707호 (Caruthers의 다수) 및 미국 특허 제5,436,327호 및 동 제5,700,637호(Southern의 다수)].

- [0029] 숙주 미생물 내 핵산의 전사 수준은 다양한 방법으로 증가될 수 있다. 예를 들어, 효소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 복사체 수를 증가시킴으로써[예를 들어, 이 효소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터 복사체를 다수 개 사용하거나, 또는 상기 효소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 부가 복사체를 예를 들어, 유전자 재조합법에 의해 숙주 미생물 계능에 도입하거나, 트랜스포존 또는 이동 가능한 요소를 삽입함으로써, 전사 수준을 증가시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 오페론의 폴리시스트론 mRNA상에 있는 암호화 부위의 순서를 바꾸거나, 오페론을 자체의 제어 요소를 가지는 개별 유전자로 나누거나, 효소 암호화 부위와 작동 가능하도록 결합되어 있는 프로모터(전사 개시 서열 또는 전사 제어 서열)의 강도를 증가시키거나, 또는 유도성 프로모터를 사용하고 화학 물질을 성장 배지에 첨가함으로써 유도성 프로모터를 유도시켜,
- [0030] 전사 수준을 증가시킬 수 있다. 숙주 미생물 내 뉴클레오티드 서열의 번역 수준은, 다양한 방법 예를 들어, mRNA의 안정성을 증가시키거나, 리보솜 결합 위치의 서열을 변형시키거나, 리보솜 결합 위치와 효소 암호화 서열의 개시 코돈 사이의 거리나 서열을 변형시키거나, 효소 암호화 부위의 개시 코돈의 5' 쪽의 "상류"에 위치하거나 이에 인접하는 전체 시스트론간 부위를 변형시키거나, 헤어핀 서열 및 특정 서열을 사용하여 mRNA 전사체의 3' 말단을 안정화하거나, 효소의 코돈 선호도를 변경하거나, 효소의 생합성에 사용되는 희귀 코돈 tRNA의 발현 수준을 변경시키거나/변경시키고, 예를 들어, 효소의 암호화 서열을 돌연 변이시켜 이 효소의 안정성을 증가시킴으로써, 증가할 수 있다. 선호되는 코돈과 희귀 코돈 tRNA의 결정은, 숙주 미생물로부터 유래하는 유전자의 서열 분석을 바탕으로 할 수 있다.
- [0031] 몇몇 구체예에서, 수소 생산의 전체 수율에 지대한 영향을 미치는 CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  안티포터(antiporter) (*mh3*) 유전자 클러스터의 전체 활성은, 강력한 프로모터로부터 효소를 발현시킴으로써 증가한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 숙주 내 하나 이상의 CO 디하이드로게나아제, 하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  안티포터(antiporter) (*mh3*) 유전자 클러스터의 전체 활성은, 많은 복사체 수의 플라스미드상에 존재하는 강력 프로모터로부터 효소를 발현시킴으로써 증가된다. 원핵 생물 숙주 세포에 사용되는 구성적 프로모터의 비 제한적인 예로서는 시그마 70 프로모터(예를 들어, 공통 시그마 70 프로모터)를 포함한다. 박테리아 숙주 세포에서 사용되는 적당한 유도성 프로모터의 비제한적인 예로서는 박테리오파지  $\lambda$ 의 pL; Plac; Ptp; Ptac(Ptrp-lac 혼성 프로모터); 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드(IPTG)-유도성 프로모터 예를 들어, lacZ 프로모터; 테트라사이클린 유도성 프로모터; 아라비노스 유도성 프로모터 예를 들어, PBAD(예를 들어, Guzman의 다수 (1995) J. Bacteriol. 177:4121-4130 참조); 자일로스-유도성 프로모터 예를 들어, Pxy1(예를 들어, Kim의 다수 (1996) Gene 181:71-76 참조); GAL1 프로모터; 트립토판 프로모터; lac 프로모터; 알콜-유도성 프로모터 예를 들어, 메탄올-유도성 프로모터, 에탄올-유도성 프로모터; 라피노스-유도성 프로모터; 열-유도성 프로모터 예를 들어, 열 유도성 람다 PL 프로모터; 감열성 억제 인자의 제어를 받는 프로모터(예를 들어, CI857-억제 람다계 발현 벡터(예를 들어, Hoffmann의 다수 (1999) FEMS Microbiol Lett. 177(2):327-34 참조) 등을 포함한다.
- [0032] 효모 숙주 세포에 사용되는 구성적 프로모터의 비 제한적인 예로서는 ADH1, ADH2, [0200] PGK 또는 LEU2를 포함한다. 효모 숙주 세포에 사용되는 적당한 유도성 프로모터의 비 제한적인 예로서는 발산형 갈락토스-유도성 프로모터 예를 들어, GAL1 또는 GAL10 프로모터[West의 다수(1984) Mol. Cell. Biol. 4(11):2467-2478] 또는 CUP1 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 발현 벡터 내에 사용될 수 있는 기타 조절 요소로서는 전사 인핸서 요소와 전사 종결 인자를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Bitter의 다수 (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544]을 참조하시오.
- [0034] 발현 벡터는 특정 유형의 숙주 미생물에서만 사용하기 적당하며, 다른 미생물에서는 적당하지 않다. 그러나, 당업자는 통상의 실험을 통하여, 어느 특정 발현 벡터가 소정의 숙주 미생물에 적당한지를 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 숙주 유기체에 도입될 수 있으며, 이후 상기 벡터 내에 포함된 임의의 유전자의 자생력과 발현 여부에 대해 모니터링된다.
- [0035] 발현 벡터는 또한, 발현시 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포를 선별 또는 동정하는데 유용한 하나 이상의 표현형적 특징을 부여하는, 하나 이상의 선별 마커 유전자도 함유할 수 있다.
- [0036] 형질 전환법으로서는 미세 주입법, DEAE 텍스트란 매개 형질 전환법과, 아세트산리튬의 존재 하에 열 충격을 주는 방법을 포함한다. 숙주 미생물을 형질 감염시키는데에 지질 복합체, 리포솜 및 덴드리머(dendrimer)도 사용될 수 있다.
- [0037] 형질 전환시, 대상 벡터가 도입된 숙주 세포를 동정하기 위하여, 다수의 방법들이 실시될 수 있다. 한 가지 대

표적인 선별법은, 각각의 세포들을 계대 배양하여 각각의 콜로니를 형성시킨 다음, 원하는 유전자 생산물을 발현하는지 여부에 대해 테스트하는 과정을 포함한다. 다른 방법은, 발현 벡터 내에 포함된 선별 마커 유전자를 발현시켜, 주어진 표현형적 특징을 바탕으로 하여 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 과정을 포함한다. 당업자는 이와 같은 방법 또는 기타 당 업계에 통용되고 있는 방법을 이용하여, 유전자 변형된 숙주 세포를 동정할 수 있다.

[0038] 본 발명의 유전자가 숙주 세포에 도입되었는지 여부는 여러 가지 방법들 예를 들어, PCR, 서던 블롯 혼성화 또는 노던 블롯 혼성화에 의해 확인할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 결과로 생성된 숙주 세포로부터 생산될 수 있으며, 목적으로 하는 특이 서열은 목적 서열에 특이적인 프라이머를 이용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 증폭된 생성물을 사용하여 아가로스 겔 전기 영동법, 폴리아크릴아미드겔 전기 영동법 또는 모세관 전기 영동법을 실시한 다음, 브롬화에티딴 또는 SYBR 그린 용액 등으로 염색하거나, 또는 UV 검출법을 수행하여, DNA를 검출한다. 대안적으로, 목적 서열에 특이적인 핵산 프로브가 혼성화 반응에 사용될 수 있다. 특이적인 유전자 서열의 발현 여부는, 역전사 커플링된 PCR, 노던 블롯 혼성화를 통하여 상응하는 mRNA를 검출하거나, 또는 암호화된 유전자 생성물과 반응성인 항체를 사용하는 면역 검정법에 의해 확인될 수 있다. 대표적인 면역 검정법의 예로서는 ELISA, 방사성 면역 검정법 및 샌드위치 면역 검정법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 제2의 구현형태는 상기 수소생산능력이 증가된 *Thermococcus onnurineus* NA1 균주를 이용한 수소 생산 방법을 제공한다. 보다 바람직하게는 상기 수소 생산은 1기압 이상 고압의 일산화탄소를 공급하여 생산수율을 높일 수 있다. 그러나 2기압 이상의 일산화탄소 농도에서는 수소의 생산 효율이 떨어지는 문제가 있다. 상기 일산화탄소는 합성가스 또는 제강산업의 부생가스의 형태로 공급되어 질 수 있다.

### 발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 *Thermococcus onnurineus* NA1 돌연변이는 종래의 *Thermococcus onnurineus* NA1 보다 높은 수소생산능력을 가지고 있다.

[0041] 본 발명에 따른 수소생산방법은 높은 농도의 일산화탄소 농도에서도 사용이 될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 수소생산방법은 적은 비용으로 고효율적으로 수소를 생산한다.

[0043] 본 발명에 따른 수소생산방법은 합성가스 및 제강산업 부생가스를 이용하여 수소를 생산할 수 있는 방법이다.

### 도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 *Thermococcus* 속(*T. onnurineus* NA1, *T. barophilus* MP, 및 *Thermococcus* sp. AM4)로 부터의 *Codh-mch-mnh3* 클러스터, 및 *R. rubrum* 및 *C. hydrogenoformans*로 부터의 *Codh-ech* 클러스터의 유전자 구조를 비교 분석한 것을 보인다.

도 2는 YPS (왼쪽 컬럼) 및 MM1-CO (0.5 g/l 이스트 엑스트랙트 포함) 배지(오른쪽 컬럼)위에서, 야생형 (A), *mch* (B) 및 *mnh2* (C)의 성장 곡선 및 H<sub>2</sub> 생산을 보인다. 열린사각형, 성장; 채워진 사각형, H<sub>2</sub> 생산.

도 3. MM1-CO 또는 YPS 배지상에서 마이크로어레이(A) 및 RT-PCR(B)를 이용한 *T. onnurineus* NA1 하이드로게나아제 유전자 클러스터의 발현 분석. (A) *T. onnurineus* NA1의 8개의 하이드로게나아제 유전자 클러스터의 마이크로어레이 분석. 대조군으로 YPS와 비교하여 MM1-CO (0.5, 1.0, 및 3.0 g/l 이스트 엑스트랙트 포함)에서의 mRNA의 계층적 클러스터링. 상향조절 및 하향조절을 붉은색 및 초록색으로 각각 나타내었다. 성장 조건을 클러스터링의 맨 위쪽에 나타내었다. 클러스터링의 오른쪽에 *Codh-mch-mnh3*, *fdh1-mfh1-mnh1*, 및 *fdh2-mfh2-mnh2* 클러스터에 있는 ORF를 바(bar)로 나타냈다. YE 는 이스트 엑스트랙트이다. (B) *mbh* (TON\_1593), *mbx* (TON\_0489), *frh* (TON\_1560), *sulfI* (TON\_0534), *mch* (TON\_1023), *mnh2* (TON\_1569), 또는 *mnh1* (TON\_0276) 하드로게나아제의 MM1-CO (0.5 g/l 이스트 엑스트랙트) 또는 YPS 위에서 각각의 대형 서브유닛의 반-정량적 RT-PCR 분석. *cha*, *T. onnurineus* NA1로부터의 사페론-암호화하는 유전자를 발현 수준을 노멀화하기 위하여 사용하였다. PCR 밴드 아래의 숫자는 YPS 샘플과 비교하여 MM1-CO 샘플의 상대적인 밴드의 진한 정도를 나타낸다. 초록 바(bar): YPS로부터의 RNA, 붉은 바(bar): MM-CO로 부터의 RNA.

도 4. (A) 야생형과 MC01에서 영양원의 변화에 따른 *codh-mch-mnh3* 클러스터의 전사 수준의 변화. *codh-mch-mnh3* 클러스터의 세 개의 모듈을 구성하는 세 개의 유전자(TON\_1018: *cooS*, TON\_1023: *cooH*, TON\_1031: *mnh3*)의 RNA 양을 정량적 RT-PCR를 이용하여 측정했다. 각각의 바(bar) 위의 숫자는 상대적인 양을 나타낸다. 에러



바(bar)는 세 번의 독립적인 실험 데이터로부터의 표준 편차를 의미한다.

(B) CooS 및 H의 웨스턴 블랏 분석. 단백질 수준을 측정하였다. 쿠마시 블릴리언트 블루 R-250으로 염색된 SDS-PAGE를 웨스턴 블랏 아래 나타냈다. P: *E. coli*로부터 분리된 단백질.

도 5는 CSTR 발효에서 야생형 및 돌연변이의 수소 생산의 동력학적 분석. (a), 최대 수소생산율; (b), 최대 수소 생산율

도 6은 LDG 용광로의 부생 가스를 이용한 돌연변이체내에서 수소 생산의 변화. (a), 성장곡선; (b), 수소 생산율.

도 7. 돌연변이 균주의 제조

(A) 돌연변이 균주의 제조 전략을 보이는 모식도 각각의 유전자(TON\_1016, 1023 and 1569)를 동형 유전자재조합을 통하여  $P_{gdh}hmg_{Fru}$  카세트로 대체하였다. 확인을 위하여 사용되어진 프라이머의 위치를 해당되는 유전자들 아래의 검은색 화살표로 나타내었다.

(B) 돌연변이 제조의 PCR 확인. 예상되는 크기를 각각의 도 아래 양쪽에 나타냈다.

도 8. YPS 및 MM1-CO 배지에서 MC01의  $hmg_{Fru}$ 의 전사 수준을 보인다..

도 9. MM1-CO에서 하이드로게나아제 돌연변이주의 성장 및 수소 생산을 보인다. 병의 위부분 공간에서 OD<sub>600</sub> (왼쪽 컬럼) 및 수소 농도 (오른쪽 컬럼)을 MM1-CO 에서 7 하이드로게나아제 돌연변이체의 성장 동안에 측정했다. (A) 야생형,  $\Delta frh$  및  $\Delta sulf1$ . (B) 야생형,  $\Delta mfh1$ ,  $\Delta mbx$ ,  $\Delta sulf2$  및  $\Delta mbh$ . 2반복 시험 데이터의 대표적인 수치를 나타냈다.

도 10. 여러 CO 압력에서의 야생형 및 MC01의 성장 및 수소 생산을 보인다.

CO 1 기압(A), 1.5기압 (B), 2 기압 (C)에서의 야생형 및 MC01의 OD<sub>600</sub> (왼쪽 컬럼) 및 수소생산(오른쪽 컬럼)를 측정했다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하 본 발명의 구체적인 실시예를 기술한다. 본 발명의 기술분야에 속하는 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 요지를 통하여 다양한 응용을 할 수 있으므로, 본 발명의 권리범위는 이하의 실시예로 한정되지 않는다. 본 발명의 권리 범위는 특허청구범위에 기재된 사항을 기초로 하여 본 발명의 기술분야에 속하는 통상의 지식을 가진 자가 종래 기술을 이용하여 용이하게 치환 또는 변경하는 것이 자명한 부분에까지 미친다.

[0046] 실시 방법 및 물질

[0047] 균주 및 배지

[0048] *Thermococcus onnurineus* NA1는 일반적으로 이전에 보고된 YPS (이스트 엑스트랙트/펩톤/황) 배지에서 일반적으로 배양된다(Bae et al., 2006). 배양을 위해서, g/l로 이스트 엑스트랙트(1), NaCl (35), KCl (0.7), MgSO<sub>4</sub> (3.9), CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (0.4), NH<sub>4</sub>Cl (0.3), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.15), NaSiO<sub>3</sub> (0.03), NaHCO<sub>3</sub> (0.5), cysteine·HCl (0.5), 리자추린(resazurin)(0.001)로 구성된 변형된-M1 (Modified- MI; MMI) 배지를 이용하였다. 평균후에 1ml/l | 홀텐의 미량 원소 및 1 ml/l Fe-EDTA, 및 1ml/l의 발크(Balch)의 비타민 용액이 배지에 첨가되었다. 배지에 5% (w/v) Na<sub>2</sub>S·H<sub>2</sub>O를 0.005% (v/v) 첨가하여 환원시켰다. 최초의 배지 pH는 대기압에서 6.5로 맞추었다. 모든 반응은 혐기적 챔버(Coy, USA)에서 수행되었다.

[0049] 세포 성장 및 돌연변이주 제작

[0050] 혐기적 챔버(Coy)를 세포 접종을 위해 사용했다. 세포를 80℃에서 YPS 또는 MM1-CO 배지에서 배양하였다. 세포 성장을 건조 세포 무게(Dry Cell Weight; DCW)내의 세포 단백질의 양이 50%이라는 가정(Kengen & Stams, 1994)에 따라 DC 단백질 분석 키트(DCW) 또는 배양 동안에 UV-vis 분광기(Biophotometer plus, Eppendorf)의 600 nm에서의 광학밀도(OD<sub>600</sub>)로 세포 배양물 1ml의 단백질 양을 측정하여 관측하였다. OD<sub>600</sub>의 1 단위는 0.361 g-DCW/L에 해당한다. 형질전환 및 분쇄가 *Thermococcus kodakarensis* (Matsumi et al., 2007)에 따라

수행되었다. 간략하게 목표 유전자가 연결되어 있는 약 1 kb DNA 지역을 pUC118 벡터에 클론된  $P_{gdh}hmg_{Pfu}$  카세트의 양 옆에 삽입한다. 이들 벡터(2 ~ 6  $\mu$ g)로 ASW-YT 배지내에서 성장된 세포를 형질전환하고, 심바스타인을 선택압으로 하여 배양하였다. 돌연변이 후보자를 PCR 증폭을 통하여 확인하였다. 개발된 균주는 2012년 3. 9 일자로 KCTC12157BP로 기탁되었다.

[0051] 가스 분석

[0052] 가스 샘플( $H_2$ , CO and  $CO_2$ )을 열 전도 검출기 및 불꽃 이온화 검출기(flame ionisation detector)가 장착된 가스 크로마토그래피(YL 6100) (Yong lin, Korea)을 이용하여 측정하였다. 장착된 컬럼 (3FT 1/8 IN Molsieve 5A Column, 10FT 1/8 IN Porapak N Column, Supelco, USA). 장착된 컬머(3FT 1/8 IN Molsieve 5A Column, 10FT 1/8 IN Porapak N Column, Supelco, USA)을 가스 분석에 사용했다. 아르곤을 30 ml/분의 유속으로 운반가스로 사용하였다.

[0053] .

[0054] DNA 마이크로어레이 분석

[0055] 보통의 마이크로어레이가 Roche Nimblegen (Madison, WI)에 의해 제조되었다. *T. onnurineus* NA1의 주석된 (annotated) 게놈내의 예상된 모든 1,986개의 오픈 리딩 프레임에 대한 특유의 여섯개의 60-머 올리고뉴클레오타이드가 설계되고 합성되었다. 전체 RNA를 제조자의 지침에 따라 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하였다. 전체 RNA 샘플(5  $\mu$ g)을 SuperScript II 역전사효소(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 Cy5 염색제-컨쥬게이트된 dCTP로 라벨링 하였다. 라벨된 cDNA 혼합물을 에탄올 침전으로 농축하였다. 농축된 Cy5-라벨된 cDNAs를 마이크로 어레이에 위치시키고 MAUI Mixer X4 하이브리다이제이션 챔버 믹서(BioMicro Systems, Salt Lake City, UT)로 덮어주었다.

[0056] 슬라이드를 12 시간 동안 42 °C에서 MAUI 12-베이 시스템(BioMicro Systems, Salt Lake City, UT)을 이용해 하이브리다이제 시켰다. 하이브리드화된 슬라이드를 실내 온도에서 2X 생리식염수-소듐 시트레이트(saline-sodium citrate; SSC)/0.1% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)로 2 분 동안, 1X SSC로 3분 동안 그리고 나서 0.2X SSC로 2분 동안 세척하였다. 슬라이드를 건조시키기 위해 1,000 x g 에서 20초 동안 원심분리하였다. 어레이를 GenePix 4000B 스캐너(Molecular Devices, Union City, CA)를 이용해 스캔하였고, 데이터를 NimbleScan 2.4 소프트웨어(Roche NimbleGen, Madison, WI)를 이용해 추출하였다. 어레이 노멀화를 메디안 폴리쉬(median polish) 및 퀀타일(quantile) 노멀화 방법 (Amaratunga and Cabrera, 2001)으로 수행하였다. 개별적인 프로브에 대한 노멀화된 발현 값을 주어진 ORF에 대한 발현 값으로 이리자리(Irizarry *et al.*, 2003)가 기술한 방법으로 로부스트 멀티-어레이 평균(Robust multi-array average; RMA) 방법으로 발현 값을 얻었다. 마지막으로 n-배 변화율(R)을 샘플내에서 특정 유전자에 대해 얻어진 RMA-처리된 발현 값(RMA calls)을 이용하여 계산하였다. 데이터 분석을 GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 수행하였다. 배수-변화(Fold-change) 필터를 대조구에 비하여 유전자 발현이 적어도 200% 증가한 것을 상향 조절된 유전자로, 대조구에 대하여 적어도 50% 감소할 것을 하향-조절된 유전자로 보도록 포함하였다.

[0057] RT-PCR 분석

[0058] *Thermococcus onnurineus* NA1 및 돌연변이 균주의 50-ml 배양액을 100%의 CO 가스상에서 여러 농도의 이스트 익스트랙트의 첨가와 함께 변형된 배지 1으로 초기에서 중간-지수성장기까지 배양하였다.

[0059] 세포를 30분 동안 4,000 rpm에서 원심분리하여 수집하였다. 펠렛을 500  $\mu$ l 의 Trizol 리전트(Invitrogen)를 첨가하여 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)에 재현탁하였다. 세포를 동결용해(freezing and thawing)을 이용하여 분해한 후 샘플을 200  $\mu$ l의 클로로포름으로 추출하였다. 전체 RNA를 포함하는 수용액상을 에탄올 침전 및 추가적으로 처리하고 증류수에 재현탁하였다. RNA 농도 및 완전성을 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 측정 뿐만 아니라 0.8% 아가로스 젤 분석으로 측정하였다. 역전사를 제조자의 지시에 따라 SuperScript™ II 역전사효소 (Invitrogen)를 이용하여 수행하였다 PCR 증폭에 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

Name	Sense	Anti-sense
<b>RT-PCR</b>		
<i>mbh</i> (TON_1593)	5'-cacgacataggctacgacacgg-3'	5'-ctggcttaactcctaggtcagg-3'
<i>mbx</i> (TON_0489)	5'-gcgattcggatgataccggac-3'	5'-ccatccttcgccgaagagctcg-3'
<i>fth</i> (TON_1560)	5'-gtaagctcagcagtagcagcgtg-3'	5'-gcaccacaacctatcgagggcc-3'
<i>sulf1</i> (TON_0534)	5'-gcagtagcaggaagtgcagggg-3'	5'-gagggcctcgtcgataaggtcg-3'
<i>mch</i> (TON_1023)	5'-ctaccggacgattggccagaagg-3'	5'-ccttatatactgtctctctccg-3'
<i>mfh1</i> (TON_0276)	5'-gcgaccggtagcgaaccttcg-3'	5'-cttgtagctatgacgtagtg-3'
<i>mfh2</i> (TON_1569)	5'-gaccgaggttcacctcgatagc-3'	5'-gcagacctggtcgtaggttagcc-3'
<b>Q-PCR</b>		
<i>codh</i> (Ton_1018)	5'-gttcgagaatcctcgtggtctt-3'	5'-agcaactggcaagtctgaaatg-3'
<i>mch</i> (Ton_1023)	5'-tgccatctctcggctttg-3'	5'-gctctgctatgtccattatgtattct-3'
<i>mnh3</i> (Ton_1031)	5'-ccgtaggaaccacgatgtacttt-3'	5'-ccgtcaaactggcaagattaa-3'
<b>Gene disruption</b>		
Flk- <i>mch</i>	5'-cgttgctttgccccttggggcagggatatac-3'	5'-ggcaattgcttggactgccgaaagccaatggc-3'
Flk- <i>mfh2</i>	5'-ggactgctctctctgtagcgggtcaatattc-3'	5'-ggcgcacttaaagtggcgtagccctttgcc-3'
Ivs- <i>mch</i>	5'-aatttaccacccaccactcccaaatccaac-3'	5'-aatggggaggctgaaactactgggcaaggc-3'
Ivs- <i>mfh2</i>	5'-gagcaccacctcaccatcccagggaagctatc-3'	5'-gatggccgtgacgctgaaagtacccttcgtga-3'
<b>Confirmation of gene disruption</b>		
<i>P<sub>Flk</sub>Δmch</i>	5'-cgttgctttgccccttggggcagggatatac-3'	5'-cgtctttgctgaaactaccgttc-3'
	5'-ggactgctctctctgtagcgggtcaatattc-3'	5'-cgtctttgctgaaactaccgttc-3'
<i>mch</i>	5'-atggtattgatatacctcaaagga-3'	5'-ccgataccgagtttgaatggaggaatctc-3'
<i>mfh2</i>	5'-atgtctgaaagtatcaagtttaacg-3'	5'-tgaggccttatggagagcttggtg-3'

[0060]

[0061] 정량적 RT-PCR (Q-PCR)

[0062] MM1-CO 및 YPS 배지에서 지수적으로 성장하는 세포를 원심분리로 수거하여 RNA 샘플을 약간의 변형이 있으나 제조자의 지시대로 Trizol 리전트(Invitogen)으로 준비하였다. 게놈 DNA 오염을 DNase I(Fermentas) 처리하여 제거하였고, RNA를 클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 순수분리하였다. RNA를 분광기에 의해 정량하였고 cDNA를 M-MuLV 역전사효소(Fermentas)를 이용하여 1 μg RNA로 합성하였다. 역전사 반응 생성물을 연속적으로 희석하여 실시간 PCR 분석에 적절한 농도를 찾았고, 5\*10<sup>-3</sup> 또는 5\*10<sup>-4</sup> 로 희석된 샘플을 SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 시그널을 StepOnePlus<sup>™</sup> (Applied Biosystems)으로 측정하였다. Q-PCR을 위하여 사용된 프라이머를 Applied Biosystems 에서 제공하는 Primer Express version 3.0 을 이용하여 설계하였고, 표 1에 나타내었다. 각각의 유전자의 상대적인 양을 상응하는 16s rRNA(Ton\_1979) 양으로 노멀화한 후 표준 곡선을 이용하여 C<sub>T</sub> 값으로부터 계산하였다.

[0063] 웨스턴 블랏팅

[0064] *E. coli* BL21 에서 과량 발현한 단백질(CooS and CooH)로부터 항체를 얻었고, Ni-NTA 컬럼으로 순수분리하였다. MM1-CO 및 YPS에서 지속적으로 성장하는 세포를 원심분리로 수거하여 초음파로 파괴하였다. 세포 찌꺼기를 원심 분리하여 제거하고, 조추출액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 분석 용액으로 정량하였다. 각 균주의 5 µg 조추출액을 10% SDS-PAGE 에 재용해시키고, Trans-Blot® Turbo™ 을 가진 PVDF 막(Trans-Blot® Turbo™ transfer pak)으로 이동시켰다. 상기 막을 0.5% BSA가 보충된 0.1% TritonX-100 (TBST)을 포함하는 Tris-완충된 생리식염수 완충용액에 담가두었다. 상기 막을 1:5000으로 희석된 항체를 첨가한 후 TBS-T 완충용액에 항온반응시켰다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제(Horse raddish peroxidase)-컨쥬게이트된 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.

[0065] 야생형과 돌연변이 균주에서 수소 생산의 동력학적 분석

[0066] 수소 생산에 대한 동력학적 분석을 위하여 80℃ 에서 혐기적 모드로 2 l-작업 부피, 3 l 의 미세 스파저(sparger, 5 µl 지름의 구멍 크기)를 가진 연속 교반 탱크 반응기(continuous stirred tank reactor; CSTR)에서 수행하였다. 교반 속도는 300 rpm 이었고, pH는 3.5% NaCl을 포함하는 0.2 M NaOH을 사용하여 6.1±0.1으로 조절하였다. 시드 배양을 50 ml의 작업 부피로 100ml 2개의 시립병을 사용하여 수행하였다. 시립병의 위쪽 빈공간을 100% CO로 채웠다. 시드 배양을 80℃에서 지수 성장기가 될 때까지 배양시켰다. 100 ml의 시드 배양액을 30분 동안 CSTR에 혐기적조건을 유지하기 위하여 아르곤 가스를 퍼징한 후 CSTR에 50ml 피하 주사기를 이용하여 접종하였다. 10 g/l 이스트 엑스트랙트를 제외한 MM1-배지가 사용되었다. 100% CO 또는 LDG (Linz Donawitz Gas, Hyun-dai incorporation)의 인입 가스를 매쓰 플로우 조절기(MKP, Korea)를 이용하여 공급 속도를 0.02 내지 0.2 vvm의 범위내에서 CSTR에 공급하였다. 부피적인 수소 생산 속도를 1 기압에서 웨트 가스 미터(Shinagawa, Japan)를 사용하여 GC 분석에 의하여 측정된 배출 가스 성분의 속도로 계산하였다. 비수소생산율(specific hydrogen production rate)은 수소 생산 속도를 바이오매스로 나누어서 시간의 함수로 측정하였다. 최대 비생산속도(specific growth rate)는 중간 지수성장기에서 시간에 대한 ln (X, g-세포)의 회귀 분석에 의해 얻어졌다. 수율은 소모된 CO 에 대한 생산된 H<sub>2</sub> 가스의 몰로서 표현되었다.

[0067] <실시예 1> *T. onnurineus* NA1에서 카복시도트로픽 수소생성 대사

[0068] 본 발명자들은 2008년 Journal of Bacteriology 190 pp. 7491-7499에서 CO에서 자랄 수 있는 *T. onnurineus* NA1을 보고하였다(Lee, H.S., Kang, S.G., Bae, S.S., Lim, J.K., Cho, Y., Kim, Y.J., Jeon, J.H., Cha, S.S., Kwon, K.K., Kim, H.T., et al. (2008). The Complete Genome Sequence of Thermococcus onnurineus NA1 Reveals a Mixed Heterotrophic and Carboxydrotrophic Metabolism. Journal of Bacteriology 190, 7491-7499.) 혈청 바틀(병)의 위부분 공간에 100% CO를 공급하였을 때 CO로부터의 수소생산능력 및 수율이 각각 1.55mmol H<sub>2</sub>/l/h 및 0.98 (mol H<sub>2</sub>/mol 기질)이었다(Bae et al. 2012). 1 기압 이상의 CO 압력에서도 수소생산 및 성장의 억제가 없었다(도 10). 이 현상은 CO를 자신의 대사물질로 이용할 수 있는 많은 균주가 CO가 1기압 가까이 또는 그 이상에서 성장 및 생산성이 떨어지는 것으로 보였기 때문에 상당히 흥미로운 것이다. *Methanobacterium thermoautotrophicum*은 CO 및 H<sub>2</sub>O로부터 CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>를 생산할 수 있고, 50%의 CO에서 생존할 수 있다(Daniels et al., 1997). *Achaeglobus fulgidus*은 CO의 부분압이 0.4기압을 넘어서면 지연기간이 연장되었다(Henstra et al., 2007). *C. hydrogeniformans*의 CO 비소비율(specific CO consumption rate)이 1기압 이상의 CO 수준에서 감소하였다(Zhao et al., 2011). *T. onnurineus* NA1은 1.5 및 2 기압의 CO 압력에서 수소생산 및 성장 억제가 없었다. 이는 상기 균주가 CO 독성에 매우 높은 저항성을 보이는 것으로 보인다.

[0069] CO를 CO<sub>2</sub>로 산화(CO + H<sub>2</sub>O -> CO<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>)하는 것은 단기능적인 CO 디하드로게나아제(Codh) 및 에너지 전환 하드로게나아제(Energy Converting hydrogenase; ech)에 의해 촉매되는 것으로 알려졌다. 게놈분석에 기초하여, *T. onnurineus* NA1이 단기능성의 Codh를 한 복제수 암호화하고 있었고, 이것은 하이드로게나아제 클러스터(mch)의 바로 업스트림에 위치하고 있었다(Lee et al., 2008). 이 클러스터(codh-mch-mnh3)가 CODH (cooS),

하이드로게나아제(*mch*) 및 복합-구조체 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 안티포터(antiporter) (*mnh3*) 유전자로 이루어진 세 구획(tripartite)의 유전자 구조이라는 것을 보고하였고, 이 구조가 수소생성 카복시도트로픽 *Thermococcus barophilus* MP (GenBank accession number, ABSF0000000) 및 *Thermococcus* sp. AM4 (GenBank accession number, ABXN00000000) 같은 Thermococcales 균주에서 공통되었다(도 1; Lim et al., 2011). *mnh3* 모듈은 *Rhodospirillum rubrum* 및 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 같은 대조 세균 그룹에서는 보존되지 않은 것은 주목할 만하다. *codh*와 *mch* 유전자 클러스터가 수소생성 및 카복시도트로픽에서 역할을 할 것이라는 가설은 제안되었으나, *mbh*, *mbx*, *mfh1*(*Hyg4-I*), *mfn2*(*Hyg4-III*), *mch*(*Hyg4-II*), *frh*(*F420 hydrogenase*), *sulfI* 및 *sulfIII* 같은 여러 복제수의 하이드로게나아제를 고려하여, 다른 하이드로게나아제가 수소생성 카복시도트로픽에 관여할 것이라는 것을 제외시킬 수 없었다. 어떤 하이드로게나아제가 CO를 H<sub>2</sub>로 전환시키는데 역할을 하는지 이해하기 위하여, CO를 포함하는 배지(MM1-CO) 및 황을 포함하는 복합배지(YPS)에서 각각의 하이드로게나아제의 전사 수준을 마이크로 어레이와 RT-PCR를 이용하여 모니터링하였다. 대부분의 유전자의 발현은 일정하게 유지되었지만, 8개의 하이드로게나아제 유전자 클러스터로부터 여러개의 유전자가 CO에서 성장 동안에 2배 이상으로 상향 또는 하향-조절되었다(도 3). 이스트 엑스트랙트의 농도에 의존하여, *codh-mch-mnh3* 클러스터에 있는 16개의 유전자에서 4 내지 10개의 유전자가 상향 조절되어, CO에 의해 매개되는 유도의 발생 뿐만 아니라 대사 억제 또는 활성이 일어나는 것을 제시한다. 이들 유전자는 *codh*(Ton 1017-1020), 하이드로게나아제 대형 또는 소형 서브유닛(Ton 1023-1025), 및 Mnh3 구성성분(Ton 1029-1031)를 포함한다. 흥미롭게도 *fdh2-mfh2-mnh2* 클러스터 내의 유전자 또한 상향 조절되었다. 역으로 *fdh1-mfh1-mnh1*는 MM1-CO에서 감소되었다. 하이드로게나아제 유전자의 발현 패턴은 RT-PCR에 의해 확인되었고, 이것은 마이크로 어레이의 결과를 확인하였고, CO의 존재하에서 *mch* 및 *mfh2* 하이드로게나아제 대형 서브유닛의 증가 및 *mfh1* 하이드로게나아제 대형 서브유닛의 감소를 보였다. 대조적으로, *mbh*, *mbx*, *frh* 및 *sulfI* 같은 다른 하이드로게나아제 대형 서브유닛은 CO의 존재 또는 부존재 하에서 그대로 일정하게 남아 있었다(도 3b). 이들 데이터는 *codh-mch-mnh3* 및 *fdh2-mfn2-mnh2* 클러스터가 CO에 의해 유도되고, 그래서 수소생성에 관여할 것이라는 것을 지지한다. CO 위에서의 상기 *codh-mch-mnh3*의 상향 조절은 Codh 및 Mch 대형 서브유닛(Ton\_1023)이 CO-성장 세포에서 실질적으로 상향조절된다는 종전의 연구결과와 일치하고(Moon et al, 2012), 이것은 Codh 및 Mch 클러스터 유전자가 CO에 노출되었을 때 전사적인 유전자 조절을 통하여 상향 조절될 것이라는 것을 암시한다.

[0070] <실시예 2> *mch*는 CO-의존 성장에서 필수적인 하이드로게나아제임

[0071] 전사 분석에 기초하여, MM1-CO에서 상향조절된 *mch* 및 *mfh2*가 CO로부터 수소를 생산하는데 관여할 것으로 보인다. 이 둘 모두가 상기 과정에 참여하는지 확인하기 위하여 두개의 녹아웃 돌연변이체를 만들었고, 여기에는 *mch*(Ton\_1023) 또는 *mfn2*(Ton\_1596) 하이드로게나아제의 각각의 대형 서브유닛이 *P<sub>gdhHmg<sub>PTU</sub></sub>* 카세트로 교체되었고, 야생형 유전자들 대신에 *P<sub>gdhHmg<sub>PTU</sub></sub>*의 존재로 확인하였다(도 9).

[0072] 상기 두개의 돌연변이체의 성장은 YPS 배지에서 비슷하였고, YPS 배지에서 *mch* 또는 *mfh2*는 성장에 없어도 된다는 것을 보인다(도 2). 그러나  $\Delta mch$  균주의 표현형이 CO 위에서 매우 분명하였다.  $\Delta mch$  돌연변이체에서 CO 위에서 성장 및 수소생성이 크게 변하지 않는 반면에 이것은 *mch* 유전자의 삽입에 의한 결실은 CO 위에서 *T. onnurineus* NA1의 수소생성 카복시도트로픽은 없어졌다. 이 관찰은 *mch* 유전자가 *T. onnurineus* NA1에서 카복시도트로픽 수소생성에 필수적이라는 것을 보인다.

[0073] 최근의 프로테오믹 분석(Moon et al., 2012)에 기초하여 Codh 및 Mch 단백질의 첨가는 SulfII를 제외한 다른 하이드로게나아제가 MM1-CO에서 자란 세포에서 관찰되었다. 더욱이 CooS 및 H 단백질의 발현은 *C. hydrogenoformans*에서 완벽하게 공-조절되지 않았으며 세포내 과량의 CooS 단백질이 존재하였다(Hedderich, 2004). 때문에 *T. onnurineus* NA1에서 다른 하이드로게나아제가 CO로부터 추출된 전자를 운반하는데 관여하거나 MM1-CO에서 성장에 필요한 다른 대사가 있을 가능성이 여전히 남아있다. 남아있는 6개의 하이드로게나아제(*mfhI*, *sulfI*, *sulfIII*, *mbx*, *mbh*, *frh*)의 CO-의존 성장에의 관련성을 조사하였다(도 9). 상응하는 하이드로게나아제 대형 서브유닛이 *P<sub>gdhHmg<sub>PTU</sub></sub>* 카세트로 치환된 하이드로게나아제 돌연변이체가 제조되었다. 모든 돌연변이체는 CO 위에서 증식 및 수소 생성을 할 수 있었다.  $\Delta mch$  돌연변이는 성장 지연이 거의 보이지 않았으나, 최종 성장율은 야생형의 것과 비슷하였다. 이들을 종합하며, 이 균주의 8개의 하이드로게나아제에서 *mch*가 CO의 이용에 중요한 역할을 한다는 것이 분명하다.

[0074] <실시예 3> 프로모터 변형에 의한 *codh-mch-mnh3*의 대량발현

[0075] Thermococcus 균주의 유전적 조작이 성공적이었고, 녹아웃 연구 및 재조합 단백질의 생산을 촉진하였다(Atomi and Reeve). 미래에 재생가능한 에너지원으로서 H<sub>2</sub> 가스를 고려해 볼 때, H<sub>2</sub> 생산성의 향상은 산업균주로서 *T. onnurineus* NA1의 사용가능성을 증대시킨다. *codh-mch-mnh3*의 과량발현이 프로모터 지역의 변형 및 강한 프로모터를 도입하여 연구되었다. *codh-mch-mnh3* 지역의 일차적인 서열의 생물정보학적 분석에 기초하여, *codh*의 앞쪽에 보존되어진 잠재적인 전사 조절인자(Ton\_1016)가 있었다. 이 단백질은 N 및 C-말단에 각각에 CX3CX2C 모티프 및 헬릭스-턴-헬릭스 도메인을 가지고 있다. 이들 유전자를 완전히 제거한 경우에 CO위에서의 성장이 되지 않았다. *T. onnurineus* NA1의 게놈내의 *CooA* 및 *RcoM* 같은 다른 CO-센싱 조절자가 없는 점을 고려하면, TON\_1016이 길트-바이-어쏘시에션(guilty-by-association) 규칙에 의해 CO-센싱 유전자로 역할을 할 것으로 생각된다 (Roberts et al., 2004; Kerby et al., 2008).

[0076] *codh-mch-mnh3* 클러스터를 과량발현하기 위하여, HMG-CoA 환원효소 유전자를 가진 *P. furiosus*로부터 글루타메이트 디하이드로게나아제(*Pgdh*)의 강력한 프로모터가 도입되고, 잠재적인 전사 조절자(Ton\_1016)를 대신하여 MC01를 제조하였다(도 7 (Matsumi et al., 2007)). TON\_1016 유전자는, 이 잠재적인 조절자가 Ton\_1016 및 1017 사이의 프로모터 지역이 결합에 의해서 TON\_1016 유전자가 방해될 수 있다는 가능성을 배제하기 위하여 제거되었다. *codh* (Ton\_1018: *cooS*), *mch* (Ton\_1023: 하이드로게나아제 대형 서브유닛; *cooH*) 및 *mnh* (Ton\_1031) 유전자의 발현 수준이 Q-pcr 분석에 의해 측정되었다. 이들 세 유전자의 전사적 패턴은 다른 것들과 같았고, 이는 전체 클러스터가 하나의 오페론에 의해 조절될 수 있다는 가능성을 암시한다. 우선 MC01 돌연변이체내에서 *mch* 유전자 클러스터는 YPS 배지에서 구성적으로(constitutively) 발현이 되었다. 둘째, 야생형에서의 YPS 배지에서의 것들보다 유전자의 발현 수준이 MM1-CO에서 2 ~ 3 배 이상 증가하였다. 결론적으로 *codh* (Ton\_1018: *cooS*), *mch* (Ton\_1023: 하이드로게나아제 대형 서브유닛; *cooH*) 및 *mnh* (Ton\_1031) 유전자들의 발현 수준은 MC01에서 매우 높았으며, 영양상태에 관계없이 야생형의 것들 보다 40~50 배 더 높았다. *CooS* 및 *CooH* 단백질의 양은 웨스턴 블랏팅에 의해 RNA 수준에서의 유전자 클러스터의 과량 발현이 상기 유전자 클러스터의 단백질 생산의 증가를 가져오는지를 추적하였다. 명확하게 MC01 돌연변이체내에서 *CooS* 및 *CooH* 단백질의 양은 CO의 존재 하에서 야생형의 것과 비교하였을 때 의미 있는 수준으로 증가하였고, RNA 수준의 증가와 일관성이 있었다. 그러나 *CooS* 및 *CooH*는 Q-pcr의 데이터에서의 증가 배수와 정확하게 연관성이 있는 것은 아니었다는 점은 언급할 필요가 있다. CO에서 배양된 야생형내에서의 *cooS* 및 *cooH*의 단백질 수준은 MC01의 것과 약간 적었던 점에 반하여, CO에서 배양된 야생형에서 *cooS* 및 *cooH*의 전사적 수준은 CO에서 배양된 MC01의 대략 20 ~ 50% 이었다. YPS 배지에서 *cooH* 전사는 야생형의 것과 비교하였을 때 MC01에서 급격하게 증가하는 것으로 보인다. 여러가지의 하이드로게나아제를 담아두기에는 막 공간의 제한 때문에 RNA-단백질 수준에서 비정상적인 관련성을 일으키는지 또는 전사후 변형이 제시될 수 있는지에 대해서는 아직까지는 명확하지 않다. 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

[0077] <실시예 4> 강력한 프로모터의 간단한 삽입에 의한 증가된 수소생합성 증가

[0078] 강력한 프로모터의 삽입으로 *codh-mch-mnh* 유전자 클러스터의 발현 수준을 높이는데 성공하였다. 다음으로 돌연변이 균주 MC01에서 CO로부터의 수소생산을 야생형과 비교하였다. 이전에 설명된 바와 같이, 야생형의 CO로 H<sub>2</sub> 생산 및 수율은 100% CO가 공급되는 시럼병(serum bottle)에서 각각 1.55 mmol H<sub>2</sub>/1/h 이고, 0.98 (mol H<sub>2</sub>/mol 기질) 이었다. 돌연변이체는 야생형 보다 조금 더 빠르게 성장하였다. 그러나 CO 위에서의 H<sub>2</sub> 생산성 및 수율은 야생형의 균주의 것과 거의 비슷한 것으로 측정되었다(도 10). 돌연변이체에서 왜 높은 수준의 *codh-mch* 발현이 더 좋은 수소생산이 되지 않았는지는 실험에서의 CO 가용도가 제한요인일 것으로 생각되었다. 헨리 상수로부터의 계산에 의하면 병의 빈공간의 오직 약 1%만이 순간적으로 용해될 수 있다. 이런 점에서 여러 공급속도의 CSTR 발효기에서 100% CO의 지속적인 교반이 수행되어 증가된 기질의 용해도가 H<sub>2</sub> 생산을 증가시킬 수 있는지 확인하였다. 결과적으로 수소 생산은 공급속도가 0.02 to 0.06 vvm 로 증가됨에 따라 수소 생산성이 야생형에서도 증가되었고, 이는 증가된 CO의 공급이 더 많은 수소를 생산할 것이라는 것을 의미한다. 최대 비성장속도(specific growth rate) 및 수소 생산율은 0.06 vvm에서 0.29 h<sup>-1</sup> 및 33.2 mmol/1/h (CO의 41% 전환) 및 0.02 vvm 에서 0.14 h<sup>-1</sup> 및 11.1 mmol/1/h (CO의 21% 전환) 이었다(도. 8). 그러나 CSTR에 의해 증가된 기질 공급 속도의 효과는 돌연변이주에서 더 분명하였다. 성장 및 수소 생산율이 0.11 vvm까지 선형적으로 증가되다

정체기에 도달하였다. 이에 반해 야생형은 0.06 vvm 이상에서 억제되었다. 이것은 *codh-mch-mnh* 유전자 클러스터의 대량 발현이 수소 생산을 증가시켰으며, 0.06 vvm 이상의 더 높은 기질공급속도에서 균주가 견딜 수 있도록 도왔다는 것을 의미한다. 최대의 생산성과 최대의 성장율은 0.11 vvm에서 CO가 41% 전환되며 120 mmol/l/h 및 0.68 h<sup>-1</sup>으로 나타났다. 그러나 생산성 및 성장율은 돌연변이 균주에서도 0.21 vvm 에서 급격하게 감소되는 것이 관찰되었다. 이점은 MC01 균주는 상기 공급 속도 보다 더높은 기질 공급 속도에서 CO 에 민감성이 있을 것으로 보인다. 돌연변이 균주에서 수소의 몰당 수율은 0.98 수소 몰/ CO 몰 이었고, 야생형의 시립병에서의 것과 비슷하였다. 돌연변이주 그람 세포당 비생산성(specific productivity)는 227 mmol/g/h 이었다. 발명자들이 알고 있는 지식으로는 CO로부터의 최대 높은 바이오수소 생산이다. 결론적으로 *T. onnurineus* NA1의 CODH-MCH 유전자 클러스터의 프로모터를 변경함으로써 CO로부터 수소 생성에 관여하는 전체 유전자 클러스터의 발현을 조절할 수 있었고, CO로부터 높은 수준의 수소 생산을 할 수 있었다.

[0079] <실시예 5> 철강제조 회사의 배출가스로부터의 수소 생산에의 적용

[0080] RIST에 의하며, 철 및 철강제조 과정에서의 부산물 가스는 주로 일산화탄소(CO), 이산화탄소(CO<sub>2</sub>), 수소 (H<sub>2</sub>) 및 질소 (N<sub>2</sub>)로 주로 구성되어있고, 이들의 주조성은 용광로에 따라 달라진다. 더욱이 이들은 생물 공정을 이용하여 여러 종류의 생산 연료 및 화합물을 생산하기 위한 가장 저렴하고 가변성이 있는 기질이다. CO로부터 수소의 생산이 *T. onnurineus* NA1의 *codh-mch* 의 프로모터 지역을 변형함으로써 상당히 증대되었으므로, 본 발명자들은 상기 기술을 적용하여 현대 제철(회사)와의 협조로 부생 가스로부터 수소 생산을 시도하였다. LDG 용광로의 부생 가스를 용광로로부터 수집하고, 각각 0.03 및 0.09 vvm의 고정된 속도로 CSTR 발효기에 공급하였다. 공급 가스는 CO (57.4%), CO<sub>2</sub> (13.9%), H<sub>2</sub> (2.8%), 및 N<sub>2</sub> (25.9%)로 구성되었다. 결과적으로 0.09 vvm에서는 세포 생물량이 천배의 정도로 매우 증가하여 최종 OD<sub>600 nm</sub>의 값이 2.74 이었고, 0.03vvm에서는 OD<sub>600 nm</sub>의 값이 0.9 이었다. 더욱더 높은 LDG 공급 속도에서 수소 생산을 증가시킬 수 있었고, 최대의 생산율은 0.09 vvm 에서 CO를 42% 전환시키며 58 mmol/l/h 를 얻었다. 이것은 본 발명이 제강산업 또는 합성가스의 부산물로부터 수소 생산에 매우 효과적이라는 것을 보인다(도 6).

**수탁번호**

[0081]

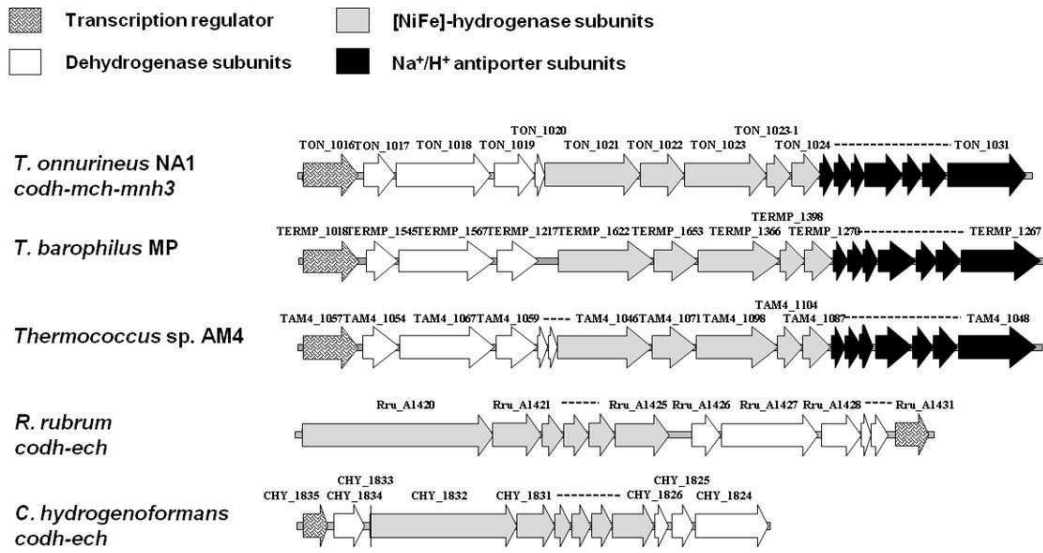
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12157BP

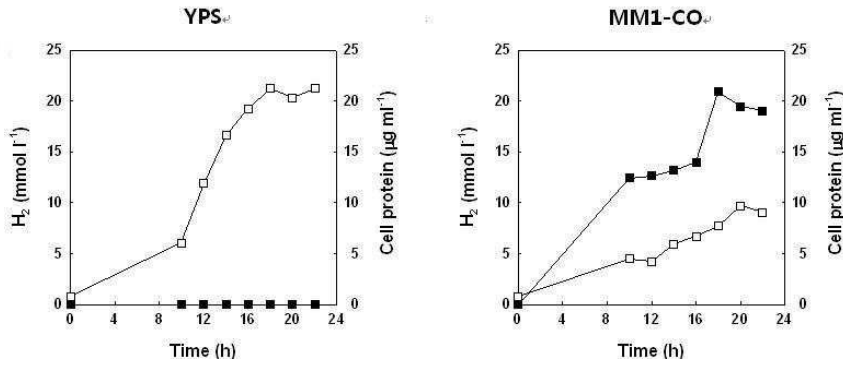
수탁일자 : 20120309

도면

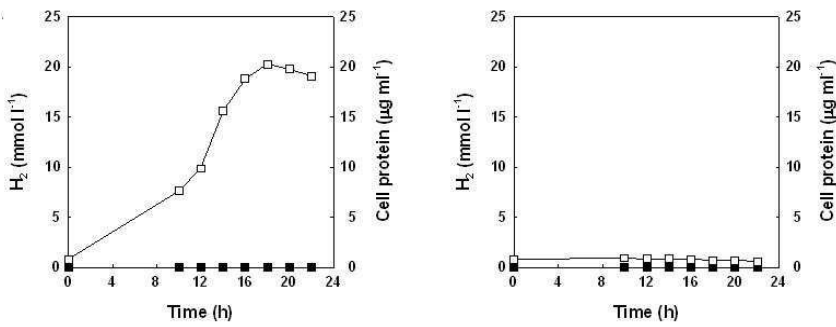
도면1



도면2a

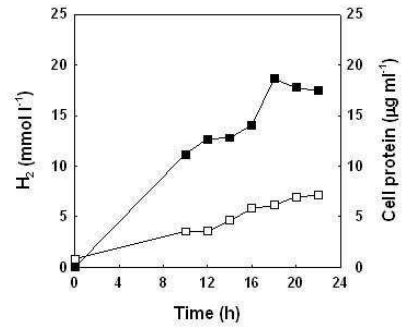
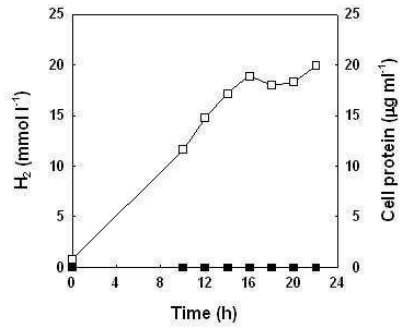


도면2b

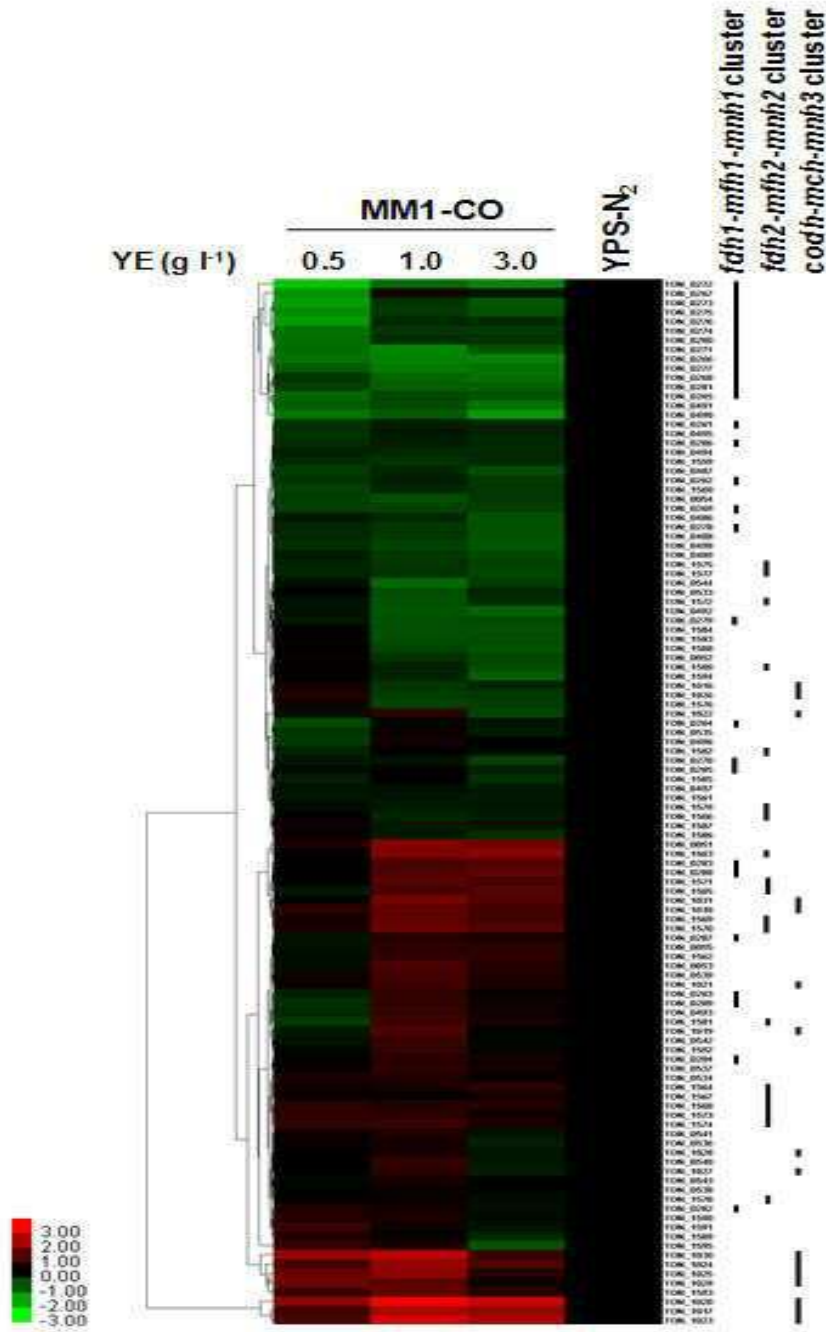




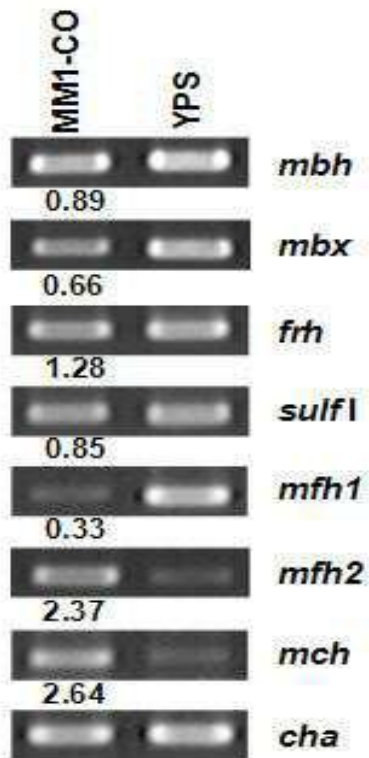
도면2c



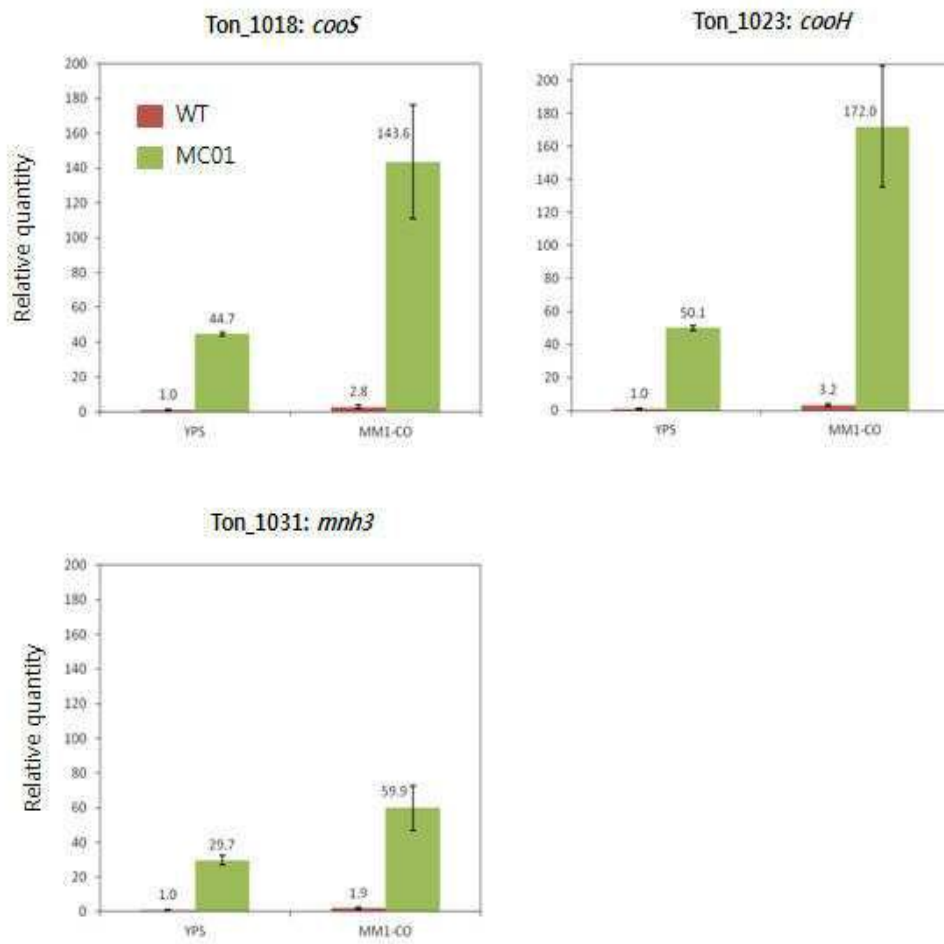
도면3a



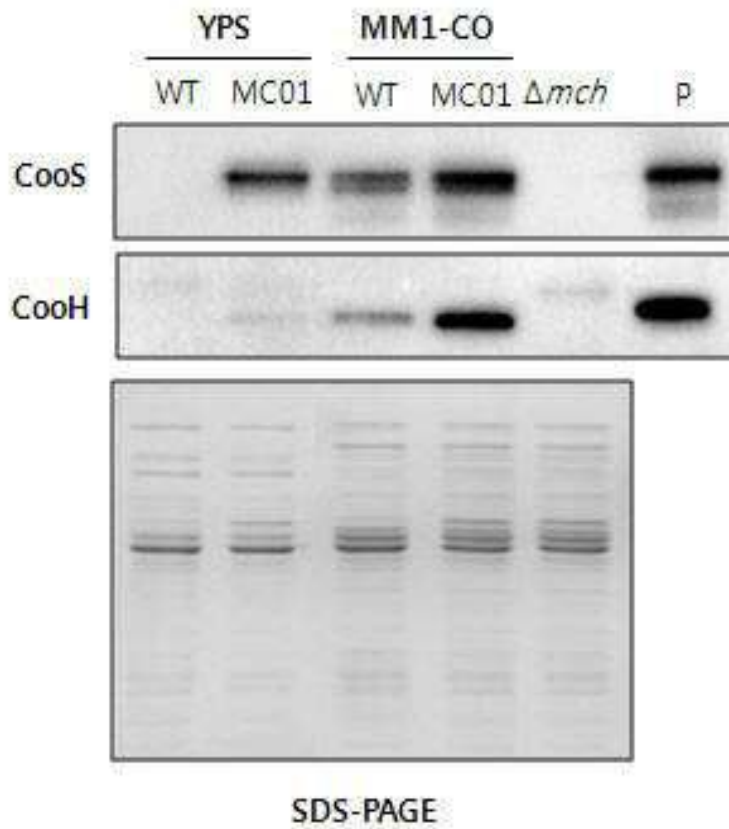
도면3b



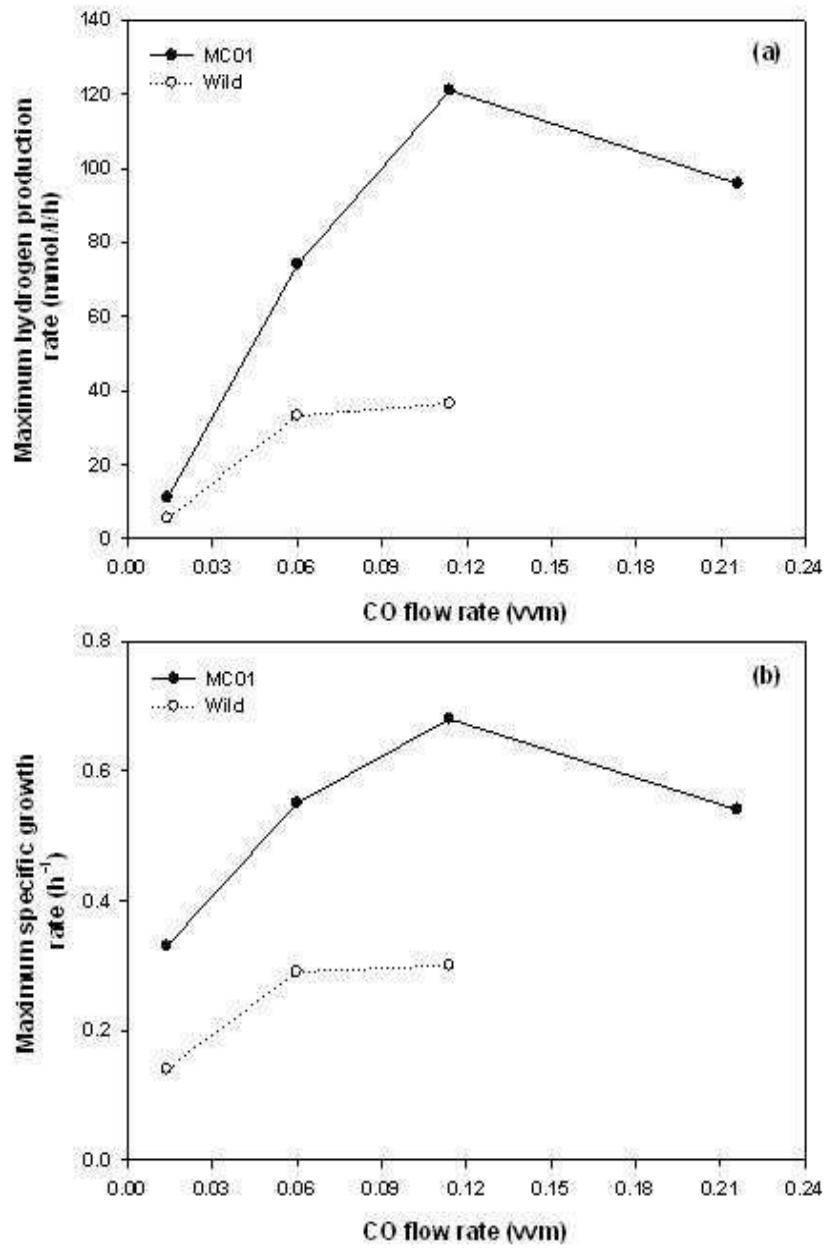
도면4a



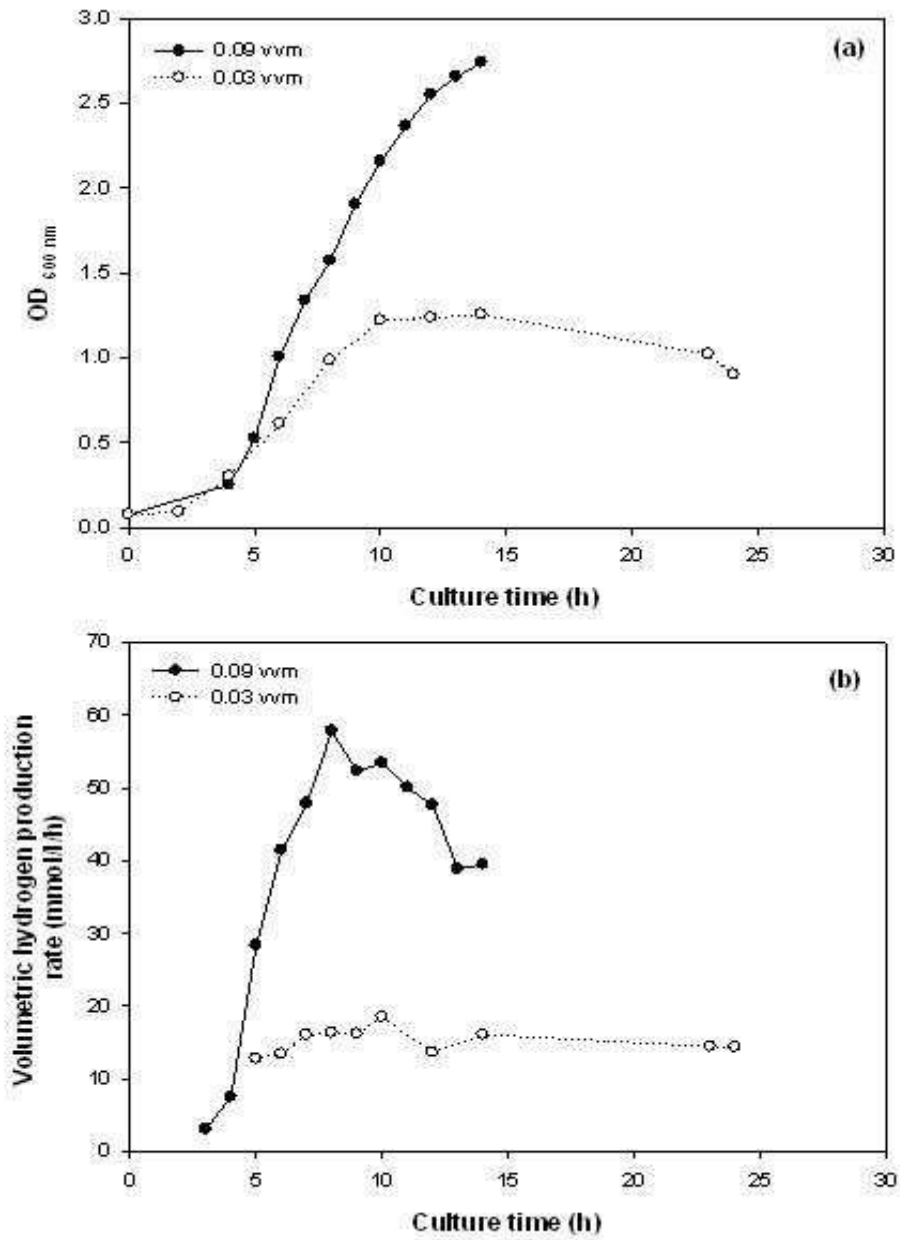
도면4b



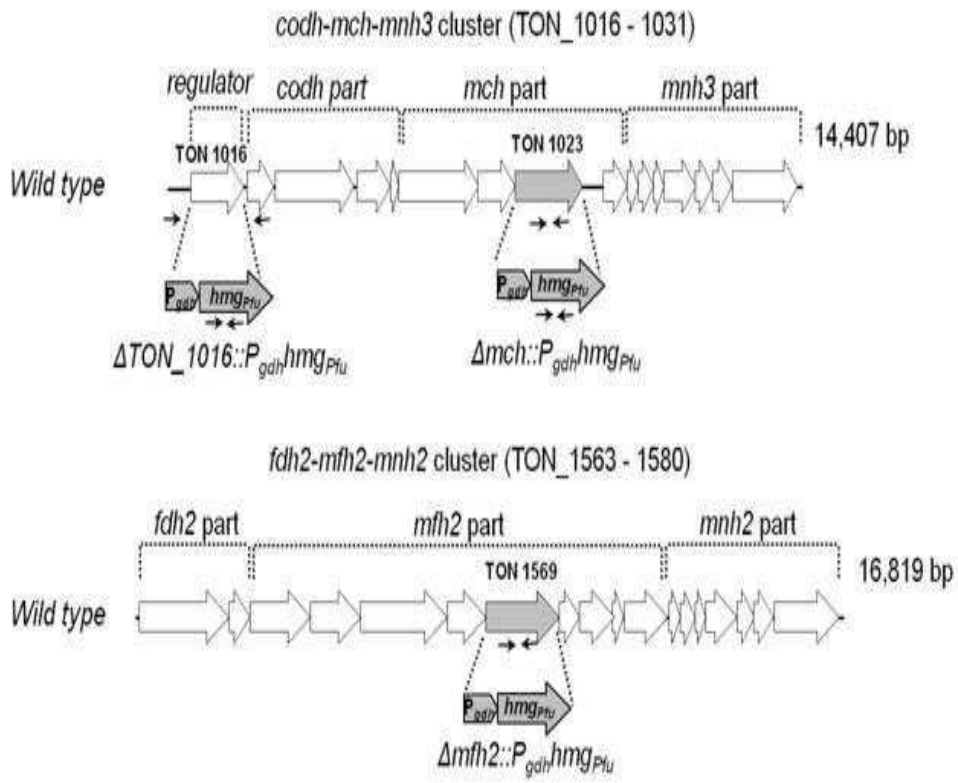
도면5



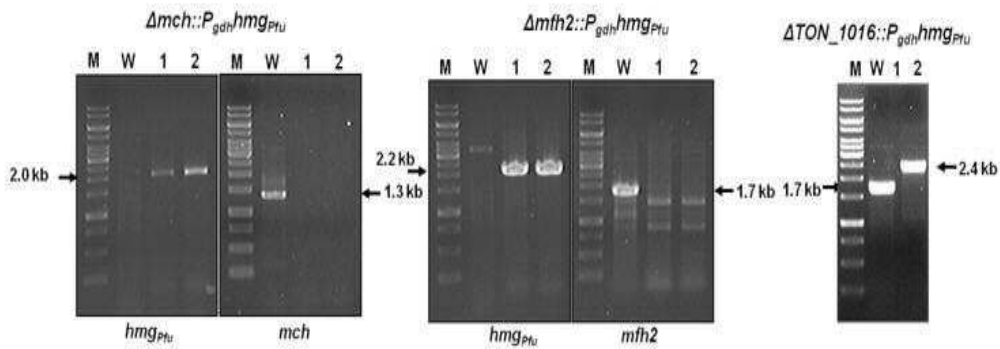
도면6



도면7a



도면7b

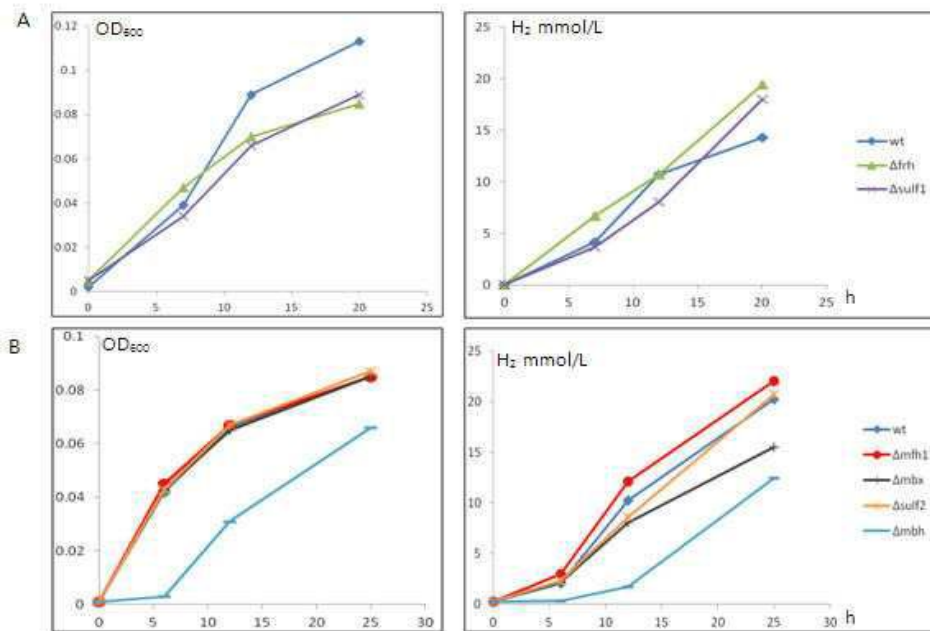




도면8



도면9



도면10

