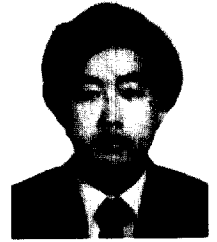


미생물 Biopolymer의 개발



서울대학교 공과대학 화학공학과 유 영 제

I. 서 론

최근 생물공학의 발달과 함께 미생물 Biopolymer에 대한 관심이 새로워지고 있다. 미생물이 생산하는 Biopolymer는 생분해성(Biodegradability), 우수한 성능(performance), 재생 가능한 기질의 사용, 그리고 구조의 다양성 등의 장점을 갖고 있어 연구, 개발에 의하여 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. Biopolymer의 범위를 Biomedical polymer, RNA, Protein 등으로 넓게 포함시킬 수 있으나 본고에서는 미생물이 생산하는 biopolymer에 대하여 필자의 연구실에서 연구되고 있는 다음의 3가지 범위로 제한하여 고찰하고자 한다.

- ① PHB-an intracellular biopolymer
- ② polysaccharides-extracellular biopolymers
- ③ Phenol resins-*in vitro* enzyme synthesized polymer

II. Biopolymer의 특성과 생합성

1. PHB-an intracellular biopolymer

PHB(Poly- β -hydroxybutyrate)는 1925년에 Lemoigne이 파리의 파스티르 연구소에서 세포로부터 처음 추출해 냈다. 그 이후에 많은 생화학자들에 의해 포유동물이 체내에 지방분을 축적하듯이 Gram 양성균과 Gram 음성의 Prokaryotes들이 질소, 산소 또는 인(1~4) 등이 결핍된 조건에서 에너지원으로 세포내에 PHB를 축적한다는 사실이 밝혀졌다. 표 1에 PHB를 생산하는 균주의 종류와 이용하는 탄소원, 그리고 체내에 축적하는 건조세포 무게당의 PHB 무게 비율을 나타내었다.

PHB는 용융점이 180°C 정도인 polyester의 일종으로써, 3-hydroxybutyric acid 단위가 23,000~25,000개 정도 연결된 고분자이다(Fig. 1). 이런 구조적 특성 때문에 PHB는 다른 polymer에 비하여 여러가지 흥미있는 특성을 가지고 있다. 가장 중요한 성질은 생분해성(biodegradability)으로써 식품포장재나 일회용 컵의 재료로 사용하게 되면 환경보존의 측면에서 유리하고 농약 또는 비료의 코팅제로 사용하여 장기간 소량씩 방출시킨다면 그 효과를 높일 수 있고 사용량을 줄일 수 있다. 그리고 생체조직과의 거부반응이 없기 때문에 의료용으로 수술용 봉합사, 슝, 가제, 분말운활제로써의 사용이 가능하다. 또한 gas barrier 성질이 우수하기 때문에 이런 성질을 갖는 film을 만들 수 있다. 그리고 PHB는 압전 효과(Piezoelectric effect)가 있기 때문에 압력 감지 장치에 이용될 수 있고 인체의 뼈가 전기자극으로 성장하므로 접골용으로도 이용가능하다. 마지막으로 hydroxybutyrate monomer 단위에 Chiral carbon center를 가지고 있기 때문에 광학적 활성을 띤다. 이런 성질을 이용하여 광학이성질체를 분리하는 chromatography에 사용할 수 있고 D(-3) 3-hydroxybutyrate는 혈액성분의 하나로써 포도당 대신 인체에 주입하여 비만치료 목적으로도 이용할 수 있다.

발효시에 포도당과 propionic acid를 같이 첨가하면, PHB/PHV(poly-hydroxyvaleric acid) copolymer(6)을 만들 수 있다. 이 copolymer는 PHB보다 crystallinity와 용융점이 낮기 때문에 PHB보다 moulding하는데 유리하다. Fig. 2는 hydroxyvalerate 함량에 따른 copolymer의 물성의 변화를 나타내었다.

PHB 생합성과 분해에 대한 대사과정은 Fig. 3에서와 같이 TCA Cycle을 거치게 되는데

표 1. PHB 생산균주 및 세포내 PHB 함량

균 주	탄소원	배양방법	PHB 함량 [% of dry cell wt.]
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	glucose	batch	74
<i>Azospirillum brasilense</i>	malate	"	75
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H1b	fructose	"	65
<i>Chromobacterium violaceum</i>	glucose	"	37
<i>Pseudomonas salanacearum</i>	glucose	"	30
<i>Rhizobium</i> sp.	manitol	"	57
<i>Spirillum</i> sp.	latate	continuous	18
<i>Hydrogenomonas</i> sp.	CO ₂	batch	65
<i>Methylocystis parvus</i> OBBP	methane	"	70

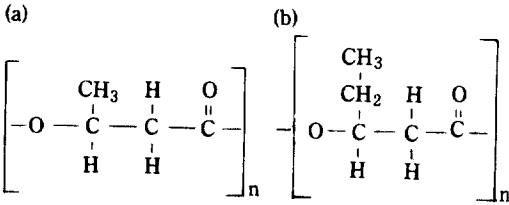


Fig. 1. Structures of PHB and PHV: (a) PHB, (b) PHV

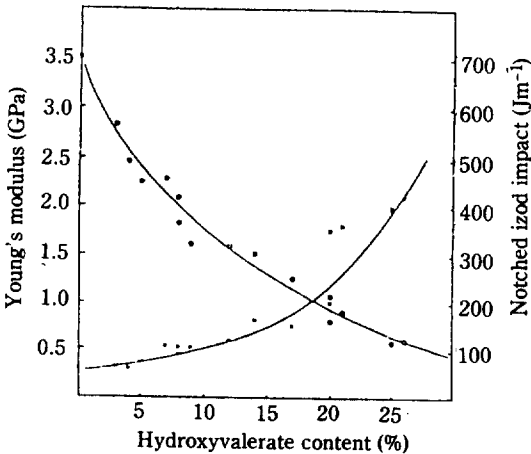


Fig. 2. Effect of HV comonomer content on Young's modulus (stiffness) and notched izod impact strength (toughness) of Biopol copolymers.

balanced growth 상태에서는 PHB 생합성이 저하되지만 N, P 또는 O 등이 부족하고 탄소원이 과잉이 되면 저해작용이 없어져 PHB가 생합성된다. 탄소원으로 glucose 또는 sucrose를 이용하는 *Azotobacter*, methanol 등을 이용하는 *Methylobacterium*, fructose 또는 glucose를 이

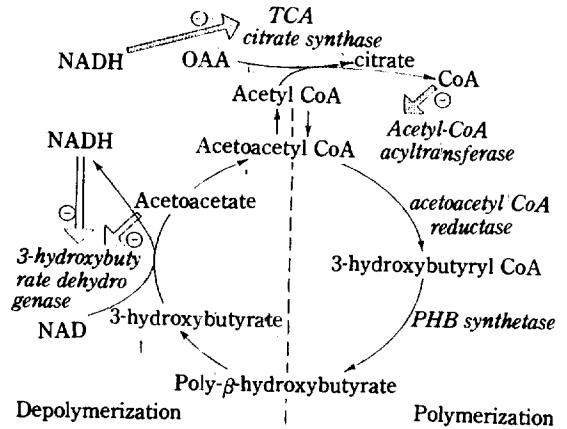


Fig. 3. Biosynthesis and breakdown of PHB. Under conditions of carbon (energy) excess, NADH levels inhibit both the depolymerization of PHB and the tricarboxylic acid cycle (TCA). The resulting reduced levels of free CoA means that acetyl-CoA acyltransferase can catalyse the condensation of acetyl CoA to acetoacetyl CoA, and that PHB can be synthesized. In energy (carbon) deficiency, the control is reversed.

용하는 *Alcaligenes eutrophus* 등이 있으나 세포 농도가 높은 경우 *Alcaligenes* 균주로부터 높은 함량의 PHB를 얻을 수 있어 상업적으로 유망한 균주로 보고되었다(7).

PHB의 상업적 생산에 대하여는 1950년대 미국의 W.R. Grace가 상업성을 타진하기 위하여 소량 생산하였는데 생산수율과 순도가 낮고 추출방법도 복잡하여 경제성이 없었다. 최근들어 영국의 ICI사에서 1,000 MT/yr 규모로 생산하는 시험공

장을 가동중이고 "Biopol"이란 상품명으로 판매하고 있다. PHB를 경제적으로 생산하기 위한 연구가 많이 진행되고 있는데 1977년에 Lafferty & Heinze(8)이 회분식 배양에 의하여 건조 세포무게의 80%까지 PHB를 얻었고 1986년에 Suzuki(9) 등은 methanol을 탄소원으로 하는 *Pseudomonas* 균주로 fed-batch culture에 의하여 PHB를 136g/l(건조세포무게의 66%)까지 생산하였다.

PHB는 polyester로 수소결합을 할 수 있기 때문에 다른 polymer와 어느정도 섞일 수 있다. 그러므로 앞으로 PHB를 다른 polymer와 혼합하여 새로운 polymer를 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 유전공학적인 방법에 의하여 생산성의 향상 그리고 우수한 특성을 갖는 구조의 PHB를 생합성할 수 있을 것으로 기대되며 이에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다.

2. Polysaccharides-extracellular biopolymer

다당류는 Gram 양성균, Gram 음성균, Algae 등에 의해서 생산되는데 물성과 구조에 있어서 독특하고 다양한 특성을 가지고 있기 때문에, 유화제(emulsifiers), 안정제(stabilizers), 접착제(binders), 윤활제(lubricants)로써 식품, 의학 및 화학공업 분야에서 폭넓게 응용되고 있다. 상업적으로 중요한 몇몇 다당류의 특성과 응용을 살펴보면 다음과 같다.

(1) Alginate

Alginate는 해초에서 얻어지는 상업적으로 중요한 gum으로 용액의 점도조절제, 교화제(gelling agent) 등으로 사용되고 있으며 특히 생물공학 분야에 있어서 전기영동, 크로마토그래피 및 고정화 촉매의 담체 등에 사용되고 있어 그 중요성이 크다. Alginate는 박테리아 *Azotobacter vinelandii*로부터 생합성할 수 있는데 공정조건과 분리방법을 조절하여 일정한 화학적, 물리적 성질을 지닌 제품으로 만들 수 있는 장점이 있다(10).

(2) Xanthan Gum

여러 종류의 다당류가 상업적으로 생산되지만 가장 생산량이 많은 것은 *Xanthomonas campestris* 균주에 의해 생산되는 Xanthan gum이다. Xanthan gum은 넓은 범위의 온도, pH 그리고 전해질 농도의 변화에 대해서도 점성이 거의 변하

지 않는 우수한 유변학적(rheological) 특성을 가지고 있기 때문에 액체 현탁액의 안정제 및 식품의 교화제 그리고 화학공업에서 제품의 각종 첨가제로 쓰인다. 또 염에 의해서도 영향을 적게 받기 때문에 3차 원유회수공정(tertiary oil recovery)에 쓰일 수 있는데 이는 잠재성이 가장 큰 시장이라 할 수 있다(11). 또 다른 Xanthan gum의 중요한 특성은 전단비율(Shear rate)이 증가함에 따라 점도가 감소하는 Pseudoplasticity인데 이는 배양과정중 운전에 중요한 영향을 끼치는 특성이 된다.

(3) Pullulan

*Aureobasidium pullulans*에 의해 생산되는 pullulan은 발효공정 조건에 따라 분자량이 $5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ 으로 큰 차이를 보이는데 독특한 구조와 물리적 특성을 가지고 있기 때문에 점착제, 각종 구조물, 코팅, 필름 등에 폭넓게 응용된다(12). 현재 일본에서는 *Azotobacter pullulans*를 이용하여 생산되고 있다.

(4) Dextran

Dextran은 상업적으로 두 미생물 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Leuconostoc dextranicum*에 의해서 생성된다. 사용한 미생물의 종류와 기질의 형태, 배양조건에 따라서 가지가 많거나 적은 구조를 가진 다양한 dextrans이 생산되는데 산 가수분해를 통해 분자량이 각기 다른 dextran series를 얻어 제약 및 산업용으로 광범위하게 이용할 수 있다. molecular sieves의 제조과정에서 dextran을 이용하는 것이 그 주된 응용의 일례이다.

다당류의 중요성에도 불구하고 여러가지 다당류의 생합성에 관계되는 생화학적 pathway는 많이 알려져 있지 않다. 그러나 생합성 경로를 이해하는 것이 생산 수율을 향상시키기 위한 생물공학적인 방법의 발전 및 공정의 개발 그리고 제어 및 최적화를 위하여 필요하다. 미생물의 생화학적 pathway, 메카니즘 그리고 genetic regulation을 규명함으로써 funtional design에 의하여 신규의 그리고 물성이 우수한 biopolymer를 만들 수 있으며, 기존의 biopolymer를 overproduction하게 할 수 있다. Xanthan gum의 경우 sugar residue의 수를 인위적으로 조절하여 점도 특성을 변화시켰으며, flocculant로써 사용되는 *Z.*

*ramigera*로부터 얻는 exopolysaccharide의 경우에는 cloning vector (pLAFR3)와 plasmid (pRK 2013)을 사용한 rDNA 방법에 의하여 polymer의 charge density를 증가시켜 응집제로서의 특성을 향상시켰다(13).

특정한 기질을 제한하여 다당류 생산의 경제성을 향상시키기 위한 생물반응기의 설계 및 운전방법이 개발되고 있는데 그중 몇가지 형태는 ① 2-stage chemostat, ② Cell free production, ③ Immobilized Cell 생물반응기, 그리고 ④ 반연속식(Fed-batch) 배양 등이다. Xanthan gum의 경우 질소원이 부족하게 되면 생성물이 생성되기 시작하므로 2-stage chemostate 방식을 채택하여 1단계에서 세포의 농도를 극대화하고, 2단계에서 질소원을 제한함으로써 생산성을 높일 수 있다. 반연속식 배양의 경우에는 미생물의 maintenance에 필요한 정도의 질소원을 탄소원과 함께 공급해 줌으로써 점도가 증가함에 따른 물질전달의 문제도 막고 생산성 향상을 기할 수 있다. 배양이 종료된 배양액은 Methanol, Ethanol 또는 Acetone과 같은 용매를 가하여 침전분리하게 되는데 분리된 생물 고분자에서 물 또는 용매를 제거시켜 건조한 다음 분쇄하여 분말상태의 제품을 얻는다.

미생물에 의해 생산된 다당류는 독특한 물리적, 화학적 특성을 가지며 또 뛰어난 유연특성(Rheological properties)을 가지고 있어 폭넓은 적용가능성을 가지고 있음에도 불구하고 현재로는 수요가 특수용도에만 한정되어 있는데 그 주된 이유는 미생물에 의해 생산된 다당류의 생산비용이 corn starch나 cellulose로부터 유도된 다당류에 비해 비싸기 때문이다. 향후 균주의 개발, 유전공학적인 방법의 적용, 생물반응기 등의 연구에 의하여 경제적으로 신규의 biopolymer를 제조함으로써 대량 수요가 가능할 것으로 기대된다.

3. Phenol 수지-in vitro enzyme synthesized polymer

생체내에서 미생물은 melamine과 같은 여러가지 polymer를 생합성하는데 최근 효소공학의 발달과 함께 in vitro enzymatic polymer synthesis에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 연구의 목적은 주로 생체내에서 polymer가 만들

어지는 메카니즘의 규명 및 상업적으로 유용한 고분자신소재를 얻으려는 것이다. 이 분야에 있어서는 미국의 MIT를 중심으로 하는 유기용매상에서의 효소반응과 GE(General Electric)에서의 효소에 의한 고분자 신소재의 개발에 관한 연구가 활발하다. 아직은 초기단계로서 주로 phenol계 수지를 대상으로 연구가 진행되고 있다.

페놀-포름알데히드 수지는 페놀수지의 대표적인 것으로써 지금까지 합성목재, 합판, 섬유접착제, 콘우팅용 플라스틱, 난연성 플라스틱 재료로 널리 사용되어 왔다. 이것은 페놀, p-cresol, p-tert-butylphenol, 또는 p-phenylphenol과 같은 페놀 치환제를 포름알데히드와 축합중합 시킴으로써 Novolak(분자량 800~1,500 D)과 Resol(분자량 1,500 이상)이라는 두가지 형태의 중간체(oligomer)를 만들고 이들을 thermal curing하여 제조하였다. 그러나 포름알데히드의 독성으로 인한 공해문제가 심각하게 제기되어 최근 고분자 합성분야에서 포름알데히드를 함유하지 않는 페놀 수지를 얻고자 연구가 활발하게 진행되고 있다.

peroxidase나 catalase와 같은 산화환원 효소는 과산화수소 등을 산화제로 하여 여러가지 phenol을 탈수소작용에 의하여 coupling하는 것으로 알려져 있다. horseradish peroxidase를 이용하여 dioxane이나 acetone과 같은 용매와 소량

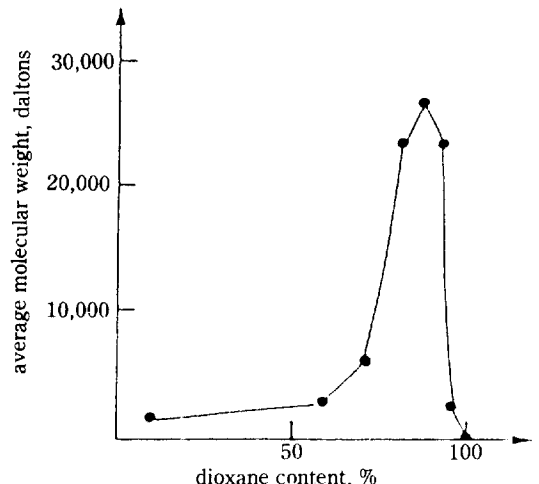


Fig. 4. The dependence of the average molecular weight of enzymatically produced poly(p-phenylphenol) on the concentration of dioxane in the reaction system.

의 물을 첨가한 혼합용매하에서 여러가지 phenol 들을 중합시킬 수 있다는 연구결과가 보고되었다 (14). 이러한 반응계의 장점은 유기용매의 함량이 많을수록 물에 난용성인 phenol을 대량으로 용해시킬 수 있기 때문에 반응생산물을 높은 수율로 얻을 수 있다는 것이다. 또한 phenol의 coupling에 의하여 생성된 phenol dimer나 trimer 역시 물에 난용성이므로 수용액에서는 중합도중에 용액에 침전되어 높은 분자량의 고분자 물질을 얻는 것이 어려운 반면, 유기용매가 과량인 계를 사용하면 (15) 높은 분자량의 고분자를 얻을 수 있다. 따라서 혼합용매계에서 유기용매의 양을 조절해 줌으로써 얻고자 하는 분자량의 고분자를 얻을 수 있다. Fig. 4는 dioxane의 함량에 따른 poly(P-phenylphenol)의 평균분자량을 나타내고 있다.

이러한 방법으로 제조할 수 있는 polymer의 종류는 phenol, P-phenylphenol, 2,6-dimethylphenol, P-methoxyphenol 등을 단량체로 하는 고분자 신소재로서 기존의 화학적 방법으로 제조한 소재에 비하여 전기전도성 수지, 엔지니어링 플라스틱 등으로 사용할 수 있는 물성이 우수한 것이 많은 것으로 알려져 있다. 향후 단백질 공학기법에 의한 인공효소촉매의 개발, 반응메카니즘 및 Kinetics의 규명, 효율적인 생물반응기의 개발, 그리고 반응조건의 최적화 연구 등에 의하여 새로운 polymer가 많이 개발될 것으로 기대된다.

III. 결 어

biopolymer중 intracellular biopolymer로서는 PHB 이외에 최근 poly- β -hydroxyalkanoates, polyoctanoates 등에 관하여 연구가 수행되고 있다. 또한 polysaccharides에는 위에서 언급한 것들 이외에도 Hyaluronic acid (HA, 태평양화학에서 생산), alginate 등이 있으며 최근 미국의 Kelco(Merck의 산하회사)에서는 gellan, welan, rhamsan 등의 신제품을 oil industry용, agar 대용품, 사진 film 및 microcapsule용 등으로 개발하고 있다. 또한 박테리아성 질병을 치료하기 위하여 protein 운반체와

bacterial capsular polysaccharides의 conjugate로 구성된 새로운 biopolymer 백신의 개발에 관하여도 많은 연구가 진행되고 있다(13). 그리고 화학촉매를 사용하여 수행하던 중합반응을 효소촉매로 대체할 수 있다는 가능성을 열어 놓은 것도 중요한 전환이라고 할 수 있다. 미생물에 의하여 또는 미생물이 생산하는 효소에 의하여 우수한 물성의 고분자 신소재를 제조하는 것은 향후 생물공학의 중요한 현 분야가 될 것으로 예상되며 이를 위하여 생화학자, 생물학자, 그리고 생물화학공학자의 협조 및 기여가 필요하다.

REFERENCES

1. Dawes, E.A. and P.J. Senior, *Adv. Microbiol. Physiol.* **10**, 203 (1973).
2. Emeruwa, A.C. and R.Z. Hawirko, *J. Bacteriol.* **116**, 989 (1973).
3. Schlegel, H.G., G. Gottschalk and R. Bartha, *Nature* **191**, 463 (1961).
4. Ward, A.C., B.I. Rowley and E.A. Dawes, *J. Gen. Microbiol.* **102**, 61 (1977).
5. Holmes, P.A., *Phys. Technol.* **16**, 32 (1985).
6. Holmes, 1981, Eur. Pat. 0,052,459
7. Byrom, D., *Trends in Biotechnol.* **5**, 246 (1987).
8. Lafferty, R.M. and Heinzle, *Chem. Rundsch*, **30**, 14 (1977).
9. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 322 (1986).
10. Commercial Biotechnology; An International Analysis, OTA (USA), 209-211 (1984).
11. Rogovin, P., W. Alblecht, and V. Sohns, *Biotech. Bioeng.* **7**, 161 (1965).
12. Margaritis, A. and G.W. Pace, in *Comprehensive Biotechnology* (ed. M. Moo-Young), Vol. 3, Pergamon Press, NY. 1005-1040 (1985).
13. Genetic Engineering News, **7**(6), June 1987.
14. Dordrick, J.S., M.A. Marletta, and A.M. Klibanov, *Biotech. Bioeng.* **30**, 31 (1987).
15. Klibanov, A.M., *Chemtech.*, June 1986. pp 354-359.