

## *Methylobacterium* sp. GL-10이 생산하는 3-Hydroxybutyrate와 3-Hydroxyvalerate의 Copolyester

이호재 · 박진서 · 이용현\*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Copolyester of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyvalerate Produced by *Methylobacterium* sp. GL-10

Lee, Ho-Jae, Jin-Seo Park and Yong-Hyun Lee\*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Abstract**— The further study for the identification of the previously reported pink-pigmented facultative methylotrophic bacterium (PPFM) GL-10 was carried out. The PPFM GL-10 was Gram negative, rod, and motile by a single polarly inserted flagellum. The colonies were smooth, pink, circular, along with convex with entire margin. The isolate could utilize C<sub>1</sub> compounds and a variety of multicarbon substrates as sole carbon and energy source. The isolate was obligately aerobic, and exhibited both catalase and oxidase activities. The deoxyribonucleic acid base composition was 65-67 mol% guanine plus cytosine. The isolate was mostly identical with *Methylobacterium extorquens* and named *Methylobacterium* sp. strain GL-10. *Methylobacterium* GL-10 accumulated a copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (poly-3HB/3HV) when grown in nitrogen-free culture media containing sodium propionate as substrate at the second polyester accumulation stage. The composition of copolyester, as determined from <sup>1</sup>H NMR spectra, was 23 mol% of 3-hydroxyvalerate (3HV).

Methylotrophic bacteria는 탄소-탄소간에 결합이 없는 한 개 또는 그 이상의 탄소원자를 포함하고 있는 환원된 C<sub>1</sub> 화합물을 에너지원 및 탄소원소으로 이용하여 성장할 수 있는 미생물의 집단으로서(1), single cell protein의 생산(2)이나 세포내 축적 혹은 세포외로 분비하는 biopolymer의 생산(3-6), 그리고 아미노산이나 비타민과 같은 대사산물의 생산(7) 등 많은 이용 가능성으로 인해 주목받고 있다. 저자 등은 전보(8)에서 분홍색 통성 메탄올 자화세균(PPFM GL-10)을 분리하여 균주의 특성과 메탄올을 기질로 한 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)의 축적을 위한 배양조건과 생성된 PHB의 물성과 구조를 확인하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 분리균주 PPFM GL-10의 보다 명확한 분류를 위한 보충적인 결과를 제시코저 하며, 아울러 상기 균주의 2단계 배양에 의해 합성되는 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerate copolyester (poly-3HB/HV)에 대해 조사한 결과를 보고하고자 한다.

#### Methylotrophic bacteria의 분리 및 선별

토양, 하천수, 연못, 퇴비, 하수 등에서 채취한 시료 1g을 메탄올을 유일한 탄소원으로 하는 액체선택배지 50 ml에 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양한 후 1.0% (v/v) 메탄올이 함유된 한천배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 성장이 빠른 colony를 새로운 한천배지에 streaking하여 같은 방법으로 여러 차례 계대배양하여 균주를 순수 분리하였고, 균체내의 PHB granule의 존재를 위상차 현미경으로 확인하여 우수

**Key words:** *Methylobacterium* sp. GL-10, Poly-3HB/3HV copolyester

\*Corresponding author

균주 5종을 선별하였다. 선별된 균주를 액체 배양하여 PHB 함량이 높은 균주 GL-10을 최종 선별하였다.

### 선별균주의 특성

분홍색 메탄올 자화성 균주 GL-10의 형태학적, 배양학적, 생리, 생화학적 특성 및 여러 가지 탄소원의 이용성, 그리고 DNA 염기 조성 등을 조사 검토하여 분류학상의 위치를 밝히기 위해 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(9)와 Manual of Methods for General Bacteriology(10)에 제시된 방법에 따라 동정하였다.

### 균체내 Polyester 축적을 위한 2단계 배양

Copolyester의 축적을 위해 1.0%(v/v) 메탄올이 함유된 액체배지에서 배양한 균체를 원심분리하여 균체를 모은 후, 각종 alcohol류와 유기산 및 당류 등 여러가지 다른 탄소원을 포함하는 질소원 결핍 액체 배지에 각각 현탁시켜 30°C에서 2일간 배양하였다.

### Polyester의 추출 및 정량

균체내에 축적된 polyester는 먼저 균체를 원심분리한 후 5% sodium hypochlorite solution으로 lysis시킨 뒤 증류수, acetone, ethanol 순으로 각각 현탁시켜 원심분리하여 모은 다음, hot chloroform으로 추출하였다. Chloroform에 용해된 polyester는 5-10배 volume의 cold n-hexane으로 침전시켜 glass filter로 여과하였다. 이 과정을 수차 반복하여 정제된 polyester를 얻었고, 그 건조 중량을 측정하여 함량을 결정하였다(11-13).

### Polyester의 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 분석

추출 정제한 polyester시료의 <sup>1</sup>H-NMR 분석은 BRUKER AM 300 MHz NMR spectrometer를 사용하였고, polyester의 <sup>1</sup>H-NMR spectra는 27°C CDC13 solution에서, 250 MHz로, 35 pulse(pw 4μsec)로, 0.7 sec의 pulse repetition으로 기록하였다(14, 15).

### 분리균주의 동정

**형태학적** : 분리균주는 Gram 음성의 막대 모양으로 크기는 0.8-1.2×2.3-2.8 μm이며, single polar flagellum으로 운동성이 있었고(Fig. 1), spore는 형성하지

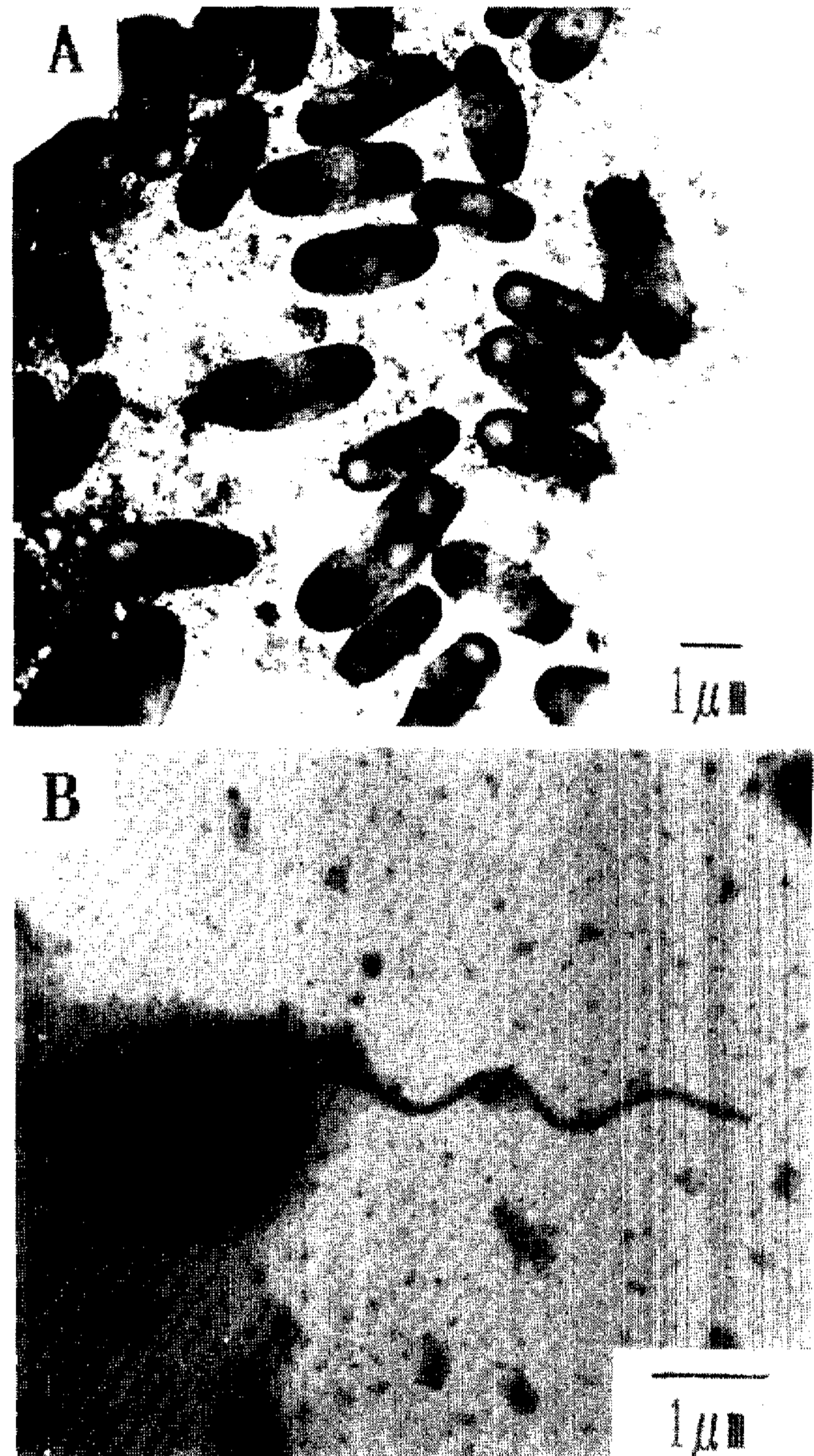


Fig. 1. Transmission electron micrograph of *Methylobacterium* sp. GL-10 containing PHB granules (A) and single polar flagellum (B).

않았다. 세포 주위에는 polysaccharide류의 다량의 slime이 관찰되었고, 세포내에 PHB granule을 확인할 수 있었다. 한천배지에서 colony는 분홍색으로 raised, entire smooth한 표면을 이루고 있었고, 30°C에서 3일간 배양했을 때 colony는 punctiform으로 되었고, 1주일 정도 배양했을 때 colony의 지름이 약 1 mm 정도로 되었다. 또한 본 균주는 절대 호기성이었으며, 액체배지에서 배양하는 동안 얇은 pellicle이 플라스크의 벽에 흡착되었다. Fig. 2는 세포를 초박절편하여 투사전자현미경(TEM)으로 관찰한 세포내 membrane의 구조를 나타낸 것으로 본 균주가 facultative

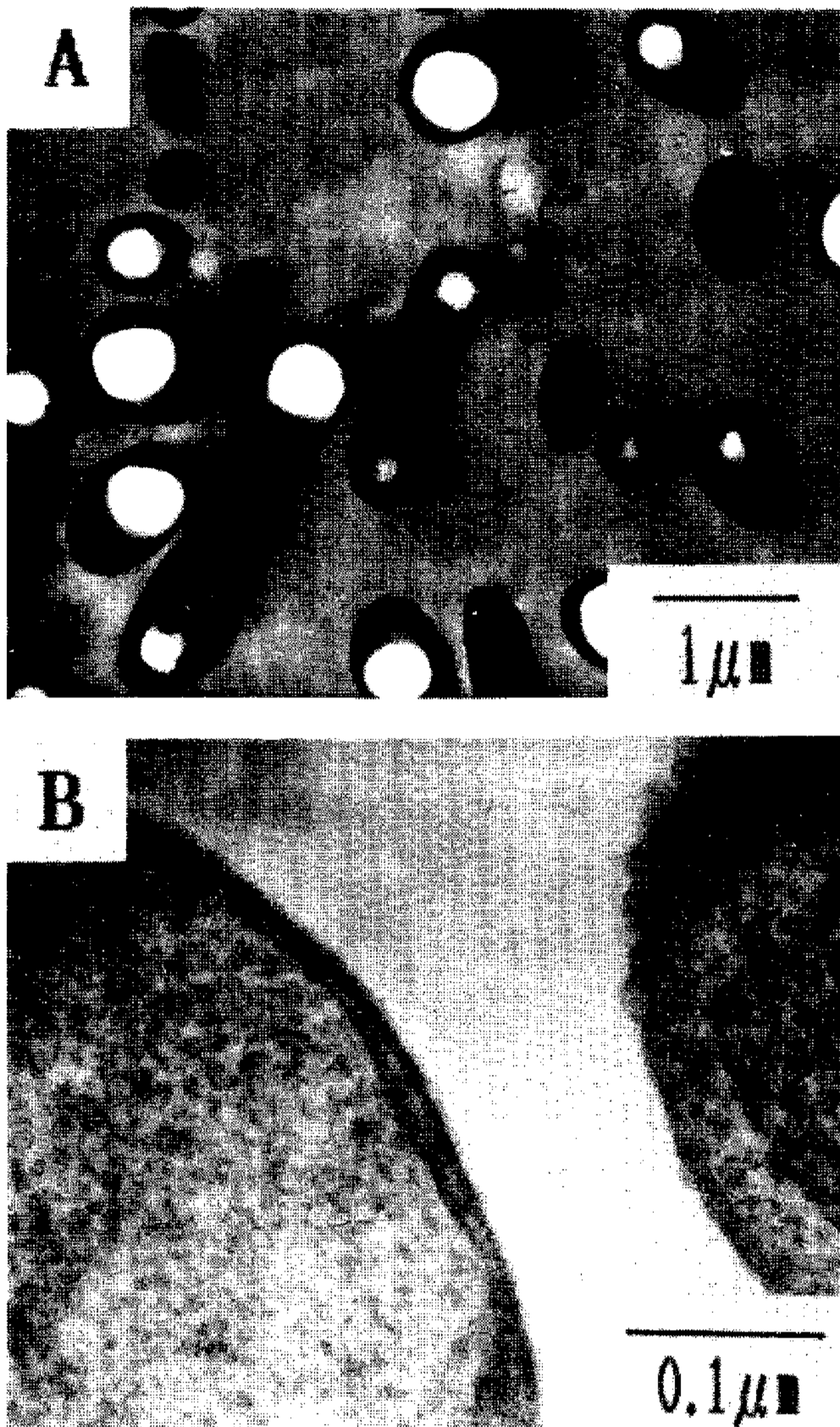


Fig. 2. Thin-section electron micrograph of *Methylobacterium* sp. GL-10 containing PHB granules (A) and intracytoplasmic membrane structure (B).

methylophile로 intracytoplasmic membrane 구조에 따른 분류로 type II에 속하지만 type II membrane 구조인 paired peripheral membrane은 관찰할 수 없었다. 이러한 membrane의 구조는 *Methylobacterium organophilum* XX(type strain) 균주의 경우 methane에서 성장했을 때는 paired peripheral membrane이 있으나, methanol이나 glucose에서 성장했을 때는 이러한 membrane 구조가 없다고 보고(16)된 바와 같이 *Methylobacterium*속 균주의 경우 intracytoplasmic membrane은 성장조건에 따라 induction되거나 repression되는데 기인한다(1).

**배양학적 특성:** 본 균주 PPFM GL-10은 초기 배지의 pH가 6.0-8.5의 넓은 범위에서 생육하나 최적

pH는 6.7-6.9이었으며, 5.0에서는 생육이 저해되었다. 또한 배양온도는 30°C에서 가장 잘 생육하였고, 25°C와 37°C에서도 생육하지만 42°C에서는 생육하지 못하였다. 기질인 메탄올의 농도가 1.0%(v/v)이상에서는 생육속도가 감소하였고 4% 이상에서는 생육이 저해되었다. Mass doubling time은 초기 메탄올의 농도에 따라 약간씩 차이가 있지만 평균 4-5시간 정도였다.

**에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있는 기질의 범위:** 메탄올 이외의 각종 유기화합물을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있는지를 조사한 결과, 본 균주는 메탄올 이외에 ethanol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, propyleneglycol, glucose, fructose, succinate 등은 매우 잘 이용하여 성장하였고, propanol, 2-butanol, n-butylacetate, xylose, galactose, sucrose, maltose, lactose, sodium formate, propionate 등에서도 성장하였지만, 1-butanol, formaldehyde, acetate, benzoate 등은 기질로서 이용하지 못하였다. 그러나 nutrient broth에서는 잘 성장하였다.

**생리 및 생화학적 특성:** 본 분리균주는 obligate aerobe로서 oxidase와 catalase 검정의 경우 높은 활성을 가지고 있었는데, 이것은 전자전달계에서 산소를 최종 전자수용체로 이용하고 있음을 나타낸다. 또한 대부분의 methylophiles는 3가지 type의 cytochrome a, b, c 모두 가지고 있는 것으로 알려져 있다(1, 17). 반면 methyl-red나 Voges-Proskauer, indole 생산, H<sub>2</sub>S 생산능은 없었고 또한 gelatin, starch 등의 분해능도 없었다.

**DNA 염기 조성:** 분리균주의 DNA를 추출하여 thermoregulator(Gilford)가 부착된 Gilford(System 2600) spectrophotometer로 온도변화에 따른 온도해리정도를 관찰(18)한 결과, T<sub>m</sub>값은 96-97°C였으며, J. De Ley(19)의 공식에 의한 mol% guanine + cytosine는 65-67 mol% G+C였다.

**PPFM GL-10의 분류학적 위치:** 분리된 분홍색 통성 메탄올 자화세균(PPFM) GL-10은 PHB를 축적하는 여러 종류의 PPFM균주들과 공통적인 형질적 특성을 가지고 있었다. Green 등(20)의 PPFM을 포함한 Gram 음성의 통성 메탄올 자화세균의 분류학적인 연구에 의하면 140가지의 특성별로 비교된 150여종의 PPFM은 2개의 major cluster로 나눌 수 있으나, 이 두 major cluster는 약 77%의 유사성을 보여주고 있다. 또한 지금까지의 *Methylobacterium*속은

통성적으로 methane을 이용할 수 없는 균주는 제외되었으나, type strain인 *Methylobacterium organophilum*은 methane을 이용하는 능력을 쉽게 잃어버리고 있고, 더구나 *M. organophilum* 균주가 methane을 이용하지 못하는 PPFM과 특성에 있어서 매우 유사하여 최근에 *Pseudomonas rhodos*, *P. radiosa*, *P. mesophilica* 균주와 *P. extorquens* 등을 포함하는 대부분의 PPFM을 *Methylobacterium*속으로 수정한 바 있다(16, 21, 22).

본 연구균주인 PPFM GL-10은 1964년 Stocks 등(23)에 의해 PHB를 축적하는 분홍색 메탄올 자화균주가 *Vibrio extorquens*로 확인된 것과 형질적 특성에 있어서 가장 많은 공통성을 가지고 있는 것으로 보인다. 이 균주는 1913년에 Bassalik에 의해 처음으로 분리되어 여러 차례 균주명이 바뀌어 오다가 Urakami 등에 의해 이러한 공통적 특성을 가지는 분홍색 통성 메탄올 자화세균 45균주의 형질적 특성이나 세포 지질조성, DNA 염기조성, 메탄올의 대사 등에 관한 연구결과, 이러한 PPFM 균주들이 모두 한 분류인 *Protomonas*속에 속한다고 보고한 바 있다(24). 그러나 1985년에 *Protomonas*속은 *Methylobacterium*속으로 수정되었고(25), 그 후 PPFM 균주의 16S RNA와

DNA : DNA hybridization 연구에 의한 분류체계에서 이러한 PPFM 균주를 *Methylobacterium*속으로 분류하고 있다(26).

본 균주는 *Methylobacterium extorquens*와 형태학적, 생화학적, 배양학적 특성에 있어서 거의 일치하였으나 기질의 이용성이 매우 다양하여 기질 이용성으로 볼 때 새로운 분류위치를 차지한다고 볼 수 있어서 최종적으로 *Methylobacterium* sp. GL-10으로 명명하였다.

### Copolyesters의 생산

*Methylobacterium* sp. strain GL-10 균주를 이용한 copolyester의 생산가능성을 검토하기 위하여 메탄올을 기질로 하여 1단계에서 배양한 균체를 원심분리하여 2단계에서 각종 alcohol류와 유기산 및 당 등을 기질로 한 질소원이 결핍된 액체배지에 각각 현탁시켜 30°C shaking incubator에서 2일간 배양한 균체량과 축적된 polyester의 양은 Table 1과 같다.

2단계에서 여러가지 다른 탄소원을 기질로하여 배양한 균체내에 축적된 polyester를 추출 정제하여 300 MHz <sup>1</sup>H NMR로 polyester의 조성을 검토한 결과, 2단계에서 sodium propionate를 기질로하여 배양하

**Table 1. Biosynthesis of polyesters from different carbon sources by *Methylobacterium* sp. GL-10 for 48 hr at 30°C**

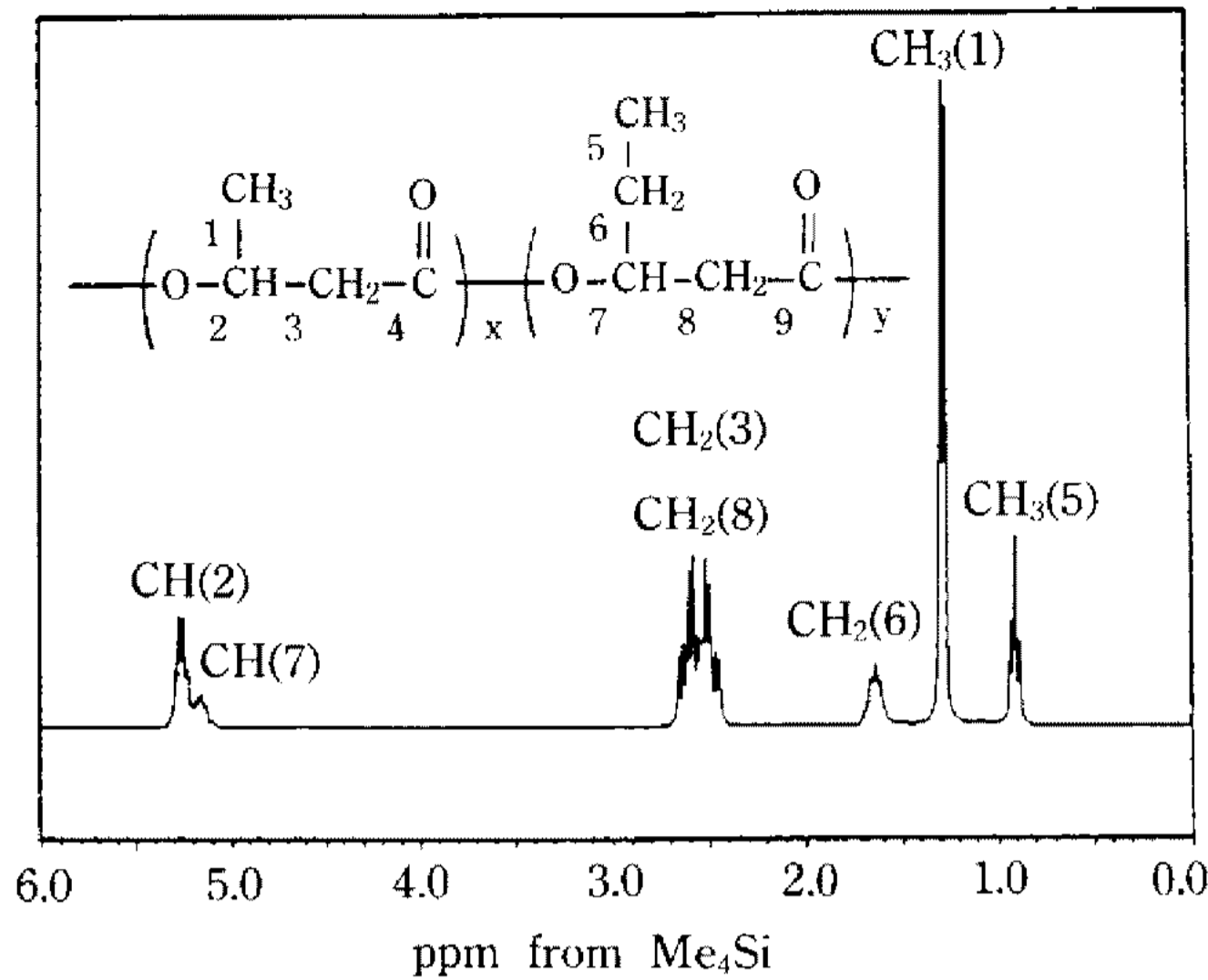
Carbon source <sup>a</sup>	Cell dry <sup>b</sup> weight (g/l)	Polyester <sup>c</sup> content (wt %)	Polyester composition <sup>d</sup> (mol%)	
			3HB	3HV
Methanol	2.76	43	100	0
Ethanol	2.52	31	100	0
Propanol	1.74	17	100	0
Butanol	1.75	18	100	0
1,2-Butanediol	2.30	30	100	0
1,3-Butanediol	3.35	30	100	0
Sodium formate	1.94	16	100	0
Sodium acetate	1.81	16	100	0
Sodium propionate	1.92	19	77	23
Glucose	2.55	28	100	0
Fructose	2.26	24	100	0
Xylose	2.24	19	100	0

<sup>a</sup> Carbon source(alcohols: 0.5%(v/v), organic acids and sugars: 5.0 g/l) in nitrogen-free culture media at two-stage cultivation.

<sup>b</sup> Initial concentration of resuspended cells in first stage was 1.53 g/l.

<sup>c</sup> Polyester content in dry cell weight.

<sup>d</sup> Determined from <sup>1</sup>H NMR spectra.



**Fig. 3.** 250-MHz <sup>1</sup>H NMR spectrum of a copolyester containing 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate from *Methylobacterium* sp. GL-10.

Chemical shifts are in ppm downfield from Me<sub>4</sub>Si.

였을 때 Fig. 3에서와 같이 homopolyester인 PHB와는 다른 chemical shift가 각각 5.14, 2.16, 0.89 ppm에서 관찰되었는데 이는 3-hydroxyvalerate unit의 -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> 기를 나타내는 것이다(13-15). 따라서 본 균주에 의해 2단계에서 propionate를 기질로하여 배양하였을 때 poly-3HB/3HV copolyester가 축적되었고, NMR spectrum 분석에 의한 3-hydroxyvalerate unit의 각 peak를 integration한 결과, 3-hydroxyvalerate unit 함량이 약 23 mol%인 copolyester임을 확인하였다.

Methylotrophic bacteria를 이용한 copolyester의 생산에 관한 연구는 지금까지 거의 이루어지지 않았고, 최근 G.W. Haywood 등(27)에 의해 *Methylobacterium* sp.(ICI 11484 X) 균주와 *Pseudomonas extorquens* MP4(ICI 309) 균주에 의해 3-hydroxyvalerate unit을 포함하는 copolyester의 축적을 확인한 바 있다.

Homopolyester인 PHB는 결정화도가 높고 stiffness와 brittleness가 크기 때문에 bioplastics로의 응용에 있어서 장애요인으로 작용하므로 좀 더 부드러운 물성을 가지는 다양한 종류의 copolyester의 개발이 요구되고 있다(28-29). 특히 methylotrophic bacteria를 이용한 copolyester의 생산은 초기 기질을 값이싼 메탄올을 이용할 수 있는 장점이 있기 때문에 산업적인 대량생산에 있어서 매우 유리하다고 볼 수

있다.

앞으로 본 균주에 의한 새로운 copolyester의 개발 및 균체내 polyester의 축적률을 증가시키기 위한 배양공학적 연구와 기질첨가 조성비를 변화시켜 copolyester의 조성을 다양하게 변화시킬 수 있는 배양법, 그리고 본 균주에 의해 생산되는 copolyester의 물리적 특성 등을 검토코져 한다.

**References**

1. Anthony, C.: The Biochemistry of Methylotrophs, Academic Press, London, (1982).
2. Howells, E.R.: *Chem. and Ind.* 7, 508 (1982).
3. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 322 (1986).
4. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 366 (1986).
5. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 370 (1986).
6. Linton, J.D., P.D. Watts, R.M. Austin, D.E. Haugh and H.G.D. Niekus: *J. Gen. Microbiol.* 132, 779 (1986).
7. Koichi, O., Y. Izumi, M. Kawamori, Y. Asamo and Y. Tani: *J. Ferment. Technol.* 55, 444 (1977).
8. 송미연, 이호재, 이용현: *산업미생물학회지*, 18, 273 (1990).
9. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 1, 9th ed., (1984).
10. Philipp, G.: *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington D.C. (1981).
11. Law, J.H. and R.A. Slepecky: *J. Bacteriol.* 82, 33 (1960).
12. Karr, D.B., J.K. Water and D.W. Emerich: *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1339 (1983).
13. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga: *Macromolecules*, 20, 2988 (1987).
14. Bloembergen, S. and D.A. Holden: *Macromolecules*, 19, 2865 (1986).
15. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga: *Macromolecules*, 19, 2860 (1986).
16. Patt, T.E., G.C. Cole and R.S. Hanson: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 226 (1976).
17. Anthony, C.: *Biochem. J.* 146, 289 (1975).
18. Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.* 5, 109 (1962).
19. De Ley, J.: *J. Bacteriol.* 101, 738 (1970).
20. Green, P.N. and I. Bousfield: *J. Gen. Microbiol.* 128, 623 (1982).
21. Green, P.N. and I. Bousfield: *Int. J. Syst. Bacteriol.*

- 33, 875 (1983).
22. Green, P.N., I.J. Bousfield and D. Hood: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 124 (1988).
23. Stocks, P.K. and C.S. Mcleskey: *J. Bacteriol.* **88**, 1065 (1964).
24. Urakami, T. and K. Komagata: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**(2), 188 (1984).
25. Bousfield, I.J. and P.N. Green: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**(2), 209 (1985).
26. Hood, D.W., C.S. Dow and P.N. Green: *J. Gen. Microbiol.* **133**, 709 (1987).
27. Haywood, G.W., A.J. Anderson and E.A. Dawes: *Biotechnology Letters*, **11**, 471 (1990).
28. 이용현: 유전공학, 26호, 48 (1989).
29. Holmes, P.A.: *Phys. Technol.* **16**, 32 (1985).

(Received March 9, 1991)