

새로운 생분해성 미생물 폴리에스터

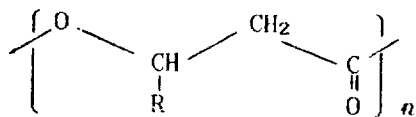


경상대학교 자연과학대학 미생물학과 윤성철

합성 플라스틱은 이제 우리 일상생활에서 없어서는 안될 값싼 생활용품의 제조에서부터 고가의 산업용 복합재료 및 첨단 의료용 소재에 이르기까지 그 성질에 따라 다양하게 여러 원자재로 쓰이고 있다. 그러나, 석유화학공업의 산물인 대부분의 합성고분자는 낮은 회수율 및 낮은 재생성과 자연환경에서의 난분해성 때문에 많이 쓰이는 만큼 “플라스틱 공해”라는 사회문제를 야기시키고 있다. 이러한 사회적 비판의 여론에 대응하여 최근에는 미생물을 이용한 생물공학 기술의 진보와 함께 자연분해성(environmentally degradable) 고분자의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

미생물에 의해 생산되는 것으로서 자연분해성 플라스틱으로 사용이 가능한 현재 알려진 고분자는 PHB(poly(β -hydroxybutyrate))와 그 유사체인 PHAs(poly(β -hydroxyalkanoates)) 계열의 intracellular polyesters이다.⁽¹⁻⁶⁾ 연구가 많이 되고 있는 PHB는 합성고분자인 polypropylene과 물성을 비교했을 때 용매저항성과 Extension to break는 뒤지지만 투명도(Transparency)가 좋고, T_m (150~175°C), T_g (~15°C), Tensile strength(40 MPa) 등은 거의 비슷해서 생산기술의 진보로 경제성이 어느정도 고려된다면 식품포장용이나 일회용 제품포장용 film에 대체시킴으로써 일회용 포장재료의 폐기에 의한 심각한 공해문제를 덜 수 있을 것이다.^(1,4)

그람 양성 및 그람 음성의 세균들에 의해서 세포내의 에너지 저장물질로서 축적되는 PHB(R=CH₃)의 1차 구조는 다음과 같다(그림).



세포내의 PHB의 축적은 탄소원이 풍부한 조건 하에서 산소, 질소, 인, 황, 혹은 칼륨 등의 결핍에 의한 불균형 영양상태일 때 촉진된다. 한동안은 원핵세포의 저장물질은 PHB가 주인 것으로 알려져 있었으나 1974년에 Wallen과 Rohwedder에 의해 R-group이 -CH₂CH₃인 β -hydroxyvaleric acid(HV)가 공중합 형태로 되어 있는 경우도 있음이 sewage plants의 activated sludge에 대한 GC, IR, MS, NMR 등의 물리, 화학적 분석결과 밝혀졌다.^(4,7) 그 이후 특히 최근에 와서 많은 학자들에 의해 미생물을 이용한 다양한 구조의 R group을 갖는 PHA를 생산하려는 노력이 시도되어 오고 있다. PHA의 생합성연구를 위해 사용되는 균주로는 *A. eutrophus*, 또는 *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. pseudoflava* 등의 *Pseudomonas* species 또는 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*, 또는 *Rhizobium meliloti* 등의 여러 세균들이 있다.^(1,4)

산업화의 예로서, 영국의 ICI사에서는 *Alcaligenes eutrophus* 균주를 이용하여, glucose와 propionate의 cosubstrate의 비를 조절하여 P(3HB-co-3HV) random copolymer를 개발, “Biopol”이라는 상품명으로 시판하고 있다. 그러나, 이 생물고분자를 일반 플라스틱재료로 사용하기에는 폴리프로필렌 Kg당 가격 \$1과 ICI에서의 P(HB-co-HV) 생산단가 Kg당 \$45을 고려할 때 현재로서는 가격경쟁력이 없다.⁽⁸⁾ 반면에 고부가가치의 첨단약용 고분자 소재로써 널리 사용되고 있는 실정이다.^(1,4,6) 세포내 저장이라는 생산상의 제약이 있으나 균주의 개발, 최적 배양, 회수공정의 개발 및 생산라인의 대형화로 언젠가는 생산단가를 상당히 낮출 수 있을 것으로 기대된다.

본 발표에서는 PHA 연구 붐이 일기 시작한 최근

표 1. 모노카아복시산을 탄소원으로한 *A. eutrophus*의 polyesters 생산.

탄소원	탄소원의 양 (g/l)			polyester 함량 (wt %)			polyester 조성(mol%)						[η] (dl/g)		
	A	B	C	A	B	C	A		B		C		A	B	C
							3HB	3HV	3HB	3HV	3HB	3HV			
acetate	20	20	20	35	35	42	100	0	100	0	100	0	5.5	nd	2.7
propionate	20	10	20	31	18	37	69	31	59	41	64	36	3.9	nd	4.7
butyrate	20	10	20	38	55	54	100	0	100	0	100	0	2.8	nd	3.3
valerate	20	10	20	51	18	45	25	75	58	42	10	90	2.0	2.9	4.0
hexanoate	20	10	20	33	42	17	100	0	100	0	100	0	2.7	1.6	3.7
heptanoate	20	10	20	0	2	0	—	—	34	66	—	—	—	nd	—
octanoate		10			10				100	0				nd	
nonanoate		10			25				96	4				3.9	
decanoate		4			0				—	—				—	
gluconate		10			46				100	0				2.8	
crotonate		10			62				100	0				4.0	

A; ATCC 17699 (Doi)⁽⁵⁾, B; ATCC 17699 (This study)⁽⁹⁾, C; NCIB 11599 (Doi)⁽⁵⁾

80년도 중반이후의 국내의 여러 학자들의 “New” polyesters의 탐색에 대해 알아보기로 한다. 미생물에 의해 생산된 PHA의 화학구조는 배양시에 넣어준 탄소원의 화학구조에 지배를 받는다. 따라서, 세균별, 탄소원의 homologue별로 어떤 종류의 polyester가 합성되는지를 살펴보기로 한다.

1. 모노 및 디카아복시산을 탄소원으로 한 *A. eutrophus*의 polyesters 생산

*A. eutrophus*에 의한 카아복시산 탄소원을 이용한 PHA 생산에 관한 연구는 동경공업대의 Doi group에 의해 많이 이루어졌다.⁽⁵⁾ 배양법은 1차적으로 풍부한 영양원에서 30°C, 22-24시간 배양한 후, 질소원이 결여된 각 탄소원의 배지로 옮긴 후 48시간 동안 PHA 합성을 촉진시키는 2단계 배양을 하였다. 폴리머중의 각 단량체의 정량은 300 또는 500 MHz ¹H-NMR을 이용하였다. 표 1에 Doi의 결과와 우리의 결과⁽⁹⁾를 함께 비교하였다. Doi의 결과와 다른 점은 홀수 탄소원인 heptanoate의 경우 우리는 소량이긴 하나 3HB/3HV의 비가 34 : 66의 몰비를 갖는 P(3HB-co-3HV)를 2 wt% 정도 얻었다는 것이다. 따라서, *A. eutrophus* H16 균주는 C₃, C₅, C₇의 홀수 탄소 모노카아복시산을 이용하여 3HV 함량이 높은 copolyester를 만든다, 짝수 카아복시산의 경우는 모두

P(3HB)가 생산된다고 결론지을 수 있다. 그러나, 홀수탄소의 nonanoate의 경우, yield는 25 wt%로 비교적 높지만 단지 4 mol% 정도의 3HV를 함유하는 polyester가 얻어졌다. polyester 함량에 관한 우리들의 결과는 용매추출에 의해 회수된 폴리머의 양인데, 모노카아복시산중에서는 crotonate를 이용했을 때 polyester 생산수율이 62 wt%로 가장 높았다. 표 2는 디카아복시산을 이용한 *A. eutrophus*의 polyester 생합성 결과⁽⁹⁾를 나타낸다. 디카아복시산에 대해서는 문헌상으로 아직 보고된 바가 없었다. 흥미롭게도 얻어진 polyester의 구성 모노머가 탄소수의 홀·짝에 관계없이 거의 모두 ~100% 3HB이며, monanedioate를 사용했을 때 생산수율이 50 wt%로 가장 높았다. 모노카아복시산으로부터 얻어진 polyesters와 분자량을 비교해 보면 디카아복시산을 이용했을 때 대체적으로 분자량이 높은 편이다.

2. 모노카아복시산을 탄소원으로한 *Rhodospirillum rubrum*의 polyesters 생산

U. Mass.의 Fuller와 Lenz⁽²⁵⁾ 등은 phototrophic, purple 박테리아인 *R. rubrum*(ATCC 25903)을 여러가지 모노카아복시산에서 배양하여 *A. eutrophus*의 경우에서 보다 더 높은 함량의 3HV를 포함하는 polyesters를 합성하였다(표 3). 짝수탄소의 카아복

표 2. 디카아복시산을 탄소원으로 한 *A. eutrophus* H16 (ATCC 17699)의 polyesters 생산⁽⁹⁾.

탄소원	탄소원의 양 (g/l)	polyester 함량 (wt %)	polyester 조성(mol %)		[η] (dl/g)
			3HB	3HV	
propanedioate	10	4	97	3	nd
butanedioate	10	37	100	0	4.8
pentanedioate	10	35	100	0	4.4
hexanedioate	10	38	100	0	4.6
heptanedioate	10	10	99	1	4.5
octanedioate	10	38	99	1	5.3
nonanedioate	10	50	99	1	5.3
decanedioate	10	40	99	1	5.1
glucaric acid	10	28	100	0	4.6

표 3. 모노카아복시산을 탄소원으로한 *Rhodospirillum rubrum*의 polyesters 생산.

탄소원	농도(mM)	균체량(g/l)	PHA 함량(wt%)	polyester 조성(mol%) ^a			
				3HB ^b	3HV	3HC	3HH
acetate	150	0.317	12.3	99.9	0.1	0	0
propionate	90	0.520	0.4	0	100.0	0	0
butyrate	90	0.716	19.3	98.5	0.5	1.0	0
valerate	60	0.148	7.7	21.7	77.9	0.4	0
hexanoate	30	0.499	7.3	89.2	5.6	5.4	0
heptanoate	10	0.543	4.1	25.1	72.5	2.4	0
octanoate	1	0.379	0.1	100.0	0	0	0
nonanoate	1	0.402	0.1	9.9	90.1	0	0
decanoate	1	0.462	0.4	29.6	59.4	11.0	0

^a균주를 10일동안 광원하에서 혐기적으로 배양하였다.

^b가스크로마토그래피(g.c.)를 이용하여 전체 균체로부터 분석을 행하였다.

^c3HB: 3-hydroxybutyrate, 3HV: 3-hydroxyvalerate
3HC: 3-hydroxycaproate, 3HH: 3-hydroxyheptanoate

시산을 이용했을 때도 소량의 3HV가 폴리머중에 포함될 뿐만 아니라, decanoate를 이용했을 때는 3HV가 59.4 mol%로 주 모노머이다. 홀수탄소의 기질을 이용시 P(3HB-co-3HV-co-3HC)의 terpolyesters가 얻어지는 것이 특징이다. 즉, *A. eutrophus*에 비해 모노머 스펙트럼이 약간 넓은 편이다.

3. 치환된 카아복시산을 이용한

A. eutrophus H16(ATCC 17699)의 polyesters 생산

-Cl, -OH, -CH₃, 이중결합 등이 치환되거나 포함하는 카아복시산을 탄소원으로 하여 *A. eutrophus*를 배양하였을 때 어떤 구조를 갖는 polyesters가 얻

어지는 지가 Doi group,⁽⁵⁾ Lenz group⁽²⁶⁾ 등에 의해 조사되었다. 표 4에서 보듯이 헤테로 원자나 이중결합이 R group에 도입되지 않았다. 2-, 또는 3- 위치에 치환된 원자나 group을 제거하고 3HB 또는 3HV가 얻어졌고, 4- 또는 5- 위치의 헤테로 원자(Cl)는 제거되고 일부분 그 위치가 산화되어 4HB 또는 5HV가 얻어졌으며, 3-hydroxypropionate의 경우처럼 기질이 그대로 수식없이 사슬중에 끼어들어 가기도 한다. 앞의 결과와 종합해보건데 *A. eutrophus*는 C₃, C₄, C₅의 모노머만 폴리머 사슬에 끼워 넣는다. 이것은 R group이 C₃ 이상으로서는 구성될 수 없을지도 모른다는 것을 의미한다. 따라서 지금까지 발견되지 않은 사실 등에 비추어서도 *A. eutrophus* H16에 의해서는 R group이 수식(modification)

표 4. 치환된 카이복시산을 이용한 *A. eutrophus* H16 (ATCC 17699)의 polyesters 생산.

탄소원	탄소원의 양(g/l)	polyester 함량 (wt %)	polyester 조성(mol %)				
			3HP	3HB	4HB	3HV	5HV
4-hydroxybutyrate ⁽⁵⁾	20	19		69	31		
4-chlorobutyrate ⁽⁵⁾	20	27		89	11		
γ -butyrolactone ⁽⁵⁾	20	21		83	17		
4-valerolactone ⁽²⁶⁾	20 (mM)	22		83	17		
3-hydroxypropionate ⁽⁵⁾	20	12	7	93			
2-hydroxypropionate ⁽⁵⁾	20	68		96		4	
3-chloropropionate ⁽⁵⁾	20	22		95		5	
2-chloropropionate ⁽⁵⁾	20	20		97		3	
2-methylpropionate ⁽⁵⁾	20	25		85		15	
5-chloropentanoate ⁽²⁷⁾	20	1		24		24	52
4-pentenoate ⁽²⁶⁾	50 (mM)	35		75		25	

표 5. 알콜류를 이용한 *A. eutrophus* H16 (ATCC 17699)의 polyesters 생산.

탄소원	탄소원의 양 (g/l)	polyester 함량 (wt %)	polyester 조성(mol %)			
			3HP	3HB	4HB	3HV
1,4-butanediol ^{a)}	20	22		89	11	
1,4-butanediol ^{b)}	10	14		96	2	2
1,5-pentanediol ^{a)}	20	28	3	97		
1,5-pentanediol ^{b)}	10	36	1	98		1
1,6-hexanediol ^{c)}	20	25		84	16	
1,7-heptanediol ^{c)}	10	10	2	98		
1,8-octanediol ^{c)}	5	13		79	21	
1,9-nonanediol ^{c)}	2.5	1	5	95		
1,10-decanediol ^{c)}	5	13		91	9	
D-sorbitol ^{b)}	10	7.9		100		
D-sorbitol ^{d)}		37		86		14
D-mannitol ^{d)}		59		94		6

a)⁽⁵⁾ and c)⁽²⁴⁾ Doi's data, b) Our data⁽⁹⁾, d) Rhee *et al*'s data, Biotech. Lett., 14, 27 (1992)

된 polyester를 생산하기 어렵지 않나 생각된다.

4. 알콜류를 이용한 *A. eutrophus* H16 (ATCC 17699)의 polyesters 생산

양말단에 -OH기를 갖는 ω -diol은 흥미로운 기질 중의 하나이다. 산화된 한끝으로부터 4번위치 이상에서 다시 산화되어 있을 때 어떤 반응을 보일까에서이다. 선형 ω -diol 탄소원들에 대한 결과를 종합해보면(표 5) 홀수탄소원의 경우 주 모노머가 3

HB와 소량의 3HP로 구성된 P(3HB-co-3HP)가 얻어지고, 짝수탄소원의 경우 P(3HB-co-4HB)로서 소량의 4HB가 삽입된 polyester가 얻어진다. 그러나, 우리의 실험실에서는 1,4-butanediol과 1,5-pentanediol의 경우 소량의 3HV도 comonomer로 존재하는 terpolyester가 얻어졌다.⁽⁹⁾ *A. eutrophus* H16은 D-sorbitol을 탄소원으로 했을 때 P(3HB) homopolymer가 얻어진다. 그러나 충남대의 Rhee 등은 분리한 *Alcaligenes* sp. SH-69 균주의 경우 비교적 높은 함량의 3HV를 갖는 P(3HB-co-3HV)가 얻어졌다고

표 6. 모노카이부시산을 탄소원으로 한 긴 알킬 chain의 R group을 갖는 polyesters 생산.

탄소원	PHAs 함량(wt%)		PHAs 조성 mol% ^{e)}																				
	Lenz ^{d)}	Witholt ^{b)}	This study ^{c)}	3HB ^{d)}		3HV		3HC		3HH		3HO		3HN		3HD		3HUD		3DD			
				Le	W	T	Le	W	T	Le	W	T	Le	W	T	Le	W	T	Le	W	T	Le	W
acetate	0	--	14.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
propionate	0	--	14.0	--	--	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
butyrate	0	0.6	11.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	67	--
pentanoate	0	0.7	7.0	--	4	--	18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	65
hexanoate	5	3.3	20.0	3	3	--	--	72	95	76	--	--	22	5	7	--	3	--	14	--	--	--	--
heptanoate	22	2.3	20.0	--	--	7	3	--	--	--	86	100	95	--	--	7	2	--	--	--	--	--	--
octanoate	41	8.7	27.1	--	--	--	2	7	8	20	--	--	--	85	91	80	--	6	1	--	--	--	--
nonanoate	49	9.1	10.2	--	--	3	3	--	--	--	27	35	29	6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
decanoate	37	12.5	25.0	--	--	--	--	7	8	11	--	--	--	45	75	49	--	48	17	40	--	--	--
gluconate	--	--	27.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	38	--	--	--	--	62	--	--	--
glucose	--	--	26.1	--	--	--	--	--	2	--	--	--	--	--	28	--	--	--	--	70	--	--	--
crotonate	--	--	13.5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	33	--	--	--	--	67	--	--	--
3-methyl- valerate	--	--	18.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	31	--	--	--	--	69	--	--	--
citronellol	--	--	8.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Le; Lenz's data⁽¹²⁾, W: Witholt's data⁽¹³⁾, T; This study's data⁽¹⁴⁾

^{a)} *P. oleovorans* (ATCC 29347), ^{b)} *P. oleovorans* GPO1, ^{c)} *P. citronellolis* (ATCC 13674)

^{d)} HB; 3-hydroxybutyric acid, HV; 3-hydroxyvaleric acid, HC; 3-hydroxycaproic acid, HH; 3-hydroxyheptanoic acid, HO; 3-hydroxyoctanoic acid, HN; 3-hydroxynonanoic acid, HD; 3-hydroxydecanoic acid, HUD; 3-hydroxyundecanoic acid, HDD; 3-hydroxydodecanoic acid.

^{e)} NMR 데이터로부터 계산

표 7. 디카아복시산을 탄소원으로한 *Pseudomonas citronellolis* (ATCC 13674)의 polyesters 생산⁽¹⁴⁾.

탄소원	탄소원의 양 (g/l)	균체량 (g/l)	polyester 함량 (wt %)	polyester 조성(mol %) ^{a)}	
				3HO ^{b)}	3HD
propanedioate	6	0.9	0.0	—	—
butanedioate	6	1.2	10.0	38	62
pentanedioate	6	1.3	14.4	36	64
hexanedioate	6	1.5	13.5	33	67
heptanedioate	8	1.5	0.0	—	—
octanedioate	8	1.4	13.2	33	67
nonanedioate	8	1.6	1.5	nd	nd
decanedioate	8	1.6	10.6	37	63

a); NMR 데이터로부터 계산, b); 3HO; 3-hydroxyoctanoate, 3HD; 3-hydroxydecanoate

보고하였다.⁽¹⁰⁾

5. 모노 및 디카아복시산을 탄소원으로 한 긴 알킬 chain의 R group을 갖는 polyesters 생산

R group이 C₃ 이상의 탄소사슬을 갖는 polyesters가 얻어진다는 사실은 화란의 Witholt group에 의해 1983년에 밝혀졌다.⁽¹¹⁾ 그들은 *P. oleovorans*를 n-octane에서 배양하여 얻은 PHA polymer는 탄소원의 골격과 같은 3-hydroxyoctanoate(3HO)가 주 모노머이고 두 탄소가 잘려진 3-hydroxycaproate(3HC)가 부성분으로 구성되어 있음을 밝혔다. 그 이후로 Lenz 등 많은 학자들^(12,13)에 의해 *Pseudomonas oleovorans*(ATCC 29347)를 중심으로한 그외의 *Pseudomonas* species의 PHA 생합성 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 표 6과 7에 나타난 바와 같이 윤성철⁽¹⁴⁾ 등도 *P. citronellolis* 균주를 택하여 모노 및 디카아복시산을 이용한 계통적 생합성 연구를 수행하였다. 모노카아복시산의 경우, *P. oleovorans*와 *P. citronellolis* 공히 C₆, C₇, C₈, C₉의 탄소원에 대해 같은 탄소수의 3-hydroxyacid가 주 모노머이고, 두 개의 탄소가 잘려나가거나 더해진 것이 부 모노머이다. 그리고 C₁₀의 경우는 두개 잘려나간 것이 주 모노머이다. *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* 등에 대해서도 같은 결과가 얻어짐이 Haywood 등의 연구⁽¹⁵⁾에서 밝혀졌다. *P. oleovorans*는 C₂와 C₃ 모노카아복시산을 PHA 합성에 이용하지 못하나, *P. citronellolis*는 이용하여 3HD가 주 모노머이고 3

HO가 부 모노머인 polyester를 생산한다. C₄와 C₅의 모노카아복시산에 대해서도 두 균주가 차이를 나타낸다. 즉, *P. citronellolis*는 3HD가 주 모노머이고 2개가 잘려진 3HO가 부 모노머인 반면, *P. oleovorans*는 이에 각 2개씩이 더해진 주 모노머와 부 모노머를 갖는 polyester를 생산한다. 또 *P. oleovorans*는 gluconate를 이용하지 못하지만, *P. citronellolis*는 3HD가 주 모노머인 P(3HD-co-3HO) copolyester를 합성한다. *P. citronellolis*는 glucose와 crotonate도 이용하여 3HD를 주 모노머로 하는 P(3HD-co-3HO)를 생산한다. *P. citronellolis*는 β-methyl 치환된 카아복시산(3-methylvalerate) 또는 알콜(citronellol)을 이용한다. 3-methylvalerate로부터는 역시 P(3HD-co-3HO)가 얻어졌으며, 이중결합을 포함하는 medium chain의 citronello로 부터도 PHA가 얻어져 구조를 결정하는 중인데 R group 중에 이중결합을 포함하는 것이 NMR 결과로부터 확인되었다.⁽¹⁴⁾ 표 7에서 보는 바와 같이 *P. citronellolis*는 디카아복시산의 경우에 C₃와 C₇을 제외한 C₁₀까지의 모든 디카아복시산을 이용하여 탄소원의 길이에 관계없이 3HD를 주 모노머(함량도 모두 같음)로 하고 3HO를 부 모노머로 하는 P(3HD-co-3HO)를 생산하였다. Timm과 Steinbüchel⁽⁴⁾은 아주 최근 논문에서 41종의 *Pseudomonas*의 55 strains에 대한 gluconate와 octanoate를 탄소원으로 하는 PHA 생합성 연구결과를 발표하였다. 그 결과에 의한 *Pseudomonas* strain들의 공통된 특징을 살펴보면 두 탄소원에 대해 P(3HB) homopolymer를 생산하거나, C₆-C₁₂ 중의 3-hydroxyacid의 multimer를 생산하거나, 아주 이용

하지 못하는 것으로 대별되었다.

6. R group 중의 작용기를 갖는 PHAs 생산

박테리아를 이용한 PHA의 생산에서 큰 관심거리 중의 하나는 R group에 반응성이 있는 -NH₂, -OH, -Cl, -Br, 이중결합, 카보닐 등의 작용기(functional group)를 갖는 polyester를 합성하는 것이다.⁽⁶⁾ 왜냐하면 이러한 작용기를 이용하여 폴리머의 성질을 바꾼다던가, 또는 약리작용을 하는 화합물을 비교적 약한 공유결합으로 묶는다던가 하여 그 응용성을 확대시켜 나갈 수 있기 때문이다. 지금까지 알려져 있는 R에 작용기가 도입된 polyester는 그리 많지 않으나, 작용기가 치환된 카아복시산을 이용한 작용기 도입의 예가 표 8에 나타나 있다. *P. oleovorans*는 이중결합을 포함하는 지방산 탄소원을 사용한 경우에는 이중결합이 환원되어 이용된다.⁽¹³⁾ 5-phenylvalerate에서처럼 Ph- group은 R group 중에

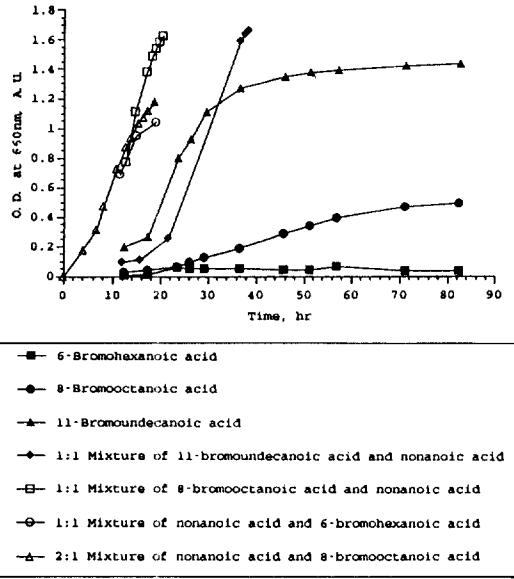


그림 1. nonanoic acid와 bromoalkanoic acid 혼합 탄소원에서의 *P. oleovorans*의 성장곡선.

표 8. 작용기가 치환된 카아복시산을 이용한 작용기를 갖는 PHAs 생산.

박테리아	탄소원	polyester함량 (wt%)	폴리머중의 단량체 조성(mol%)								
			HV	HC	HH	HO	HN	HD	HHD	HDD	HPV ^{a)}
	3-hydroxybutyrate	1.2				22		57		21	
	oleate	7.4		9		57		28		6	
	elaidate	11.2		10		56		27		7	
<i>Pseudomonas</i>	γ -linoleate	5.9		10		57		30		4	
<i>oleovorans</i>	5-phenylvalerate(PA)	25									100
	nonanoate(NA)	39	1.7		25.3		70.1		2.9		
	NA : PA(2 : 1)	37	1.7		21.7		60.7		3.3		12.6
	NA : PA(1 : 2)	32	0.6		16.0		41.1		1.7		40.6

박테리아	탄소원	균체량(g/L)	PHA함량(wt%)	공중합체중의 작용기 mol%	
				HB	HPE ^{b)}
<i>Pseudomonas</i>	11-bromoundecanoate/ nonanoate (NA) (1 : 1)	0.68	13.5		38
	8-bromooctanoate/NA (1 : 1)	0.63	13.0		25
	8-bromooctanoate/NA (2 : 1)	0.55	38.2		4.2
	6-bromohexanoate/NA (1 : 1)	0.42	4.5		25

박테리아	탄소원	탄소원 농도 (mM)	PHA 조성 (mol%)		
			HB	HPE ^{b)}	HV
<i>R. rubrum</i>	4-pentenoate	50	11	30	59
	4-pentenoate/valerate	30/30	14	14	72

a): 3-hydroxy-5-phenylvalerate, b): 3-hydroxy-4-pentenoate

표 9. 당류를 이용한 박테리아의 polyesters 생산.

균 주	탄소원	PHA 함량 (wt%)	PHA의 조성 (mol%)					
			3HB	3HV	4HB	3HC	3HO	3HD
<i>A. eutrophus</i> (ATCC 17699)	glucose ⁽⁵⁾	21	100					
	fructose ⁽⁵⁾	45	100					
	glucose ⁽⁹⁾	17	100					
	L-arabinose ⁽⁹⁾	6.1	99	1				
<i>A. eutrophus</i> (NCIB 11599)	glucose ⁽⁵⁾	92	100					
	fructose ⁽⁵⁾	48	100					
<i>Alcaligenes</i> ⁽¹⁰⁾ sp. SH-69	glucose	15	86	14				
	sucrose	15	92	8				
<i>Pseudomonas</i> ⁽²⁸⁾ sp. strain (NCIMB 40135)	glucose	8				24	76	
	fructose	16				17	83	
<i>P. pseudoflava</i> ⁽⁸⁾ (ATCC 33668)	glucose	5.7	100					
	galactose	2.5	100					
	mannose	0	—					
	lactose	0	—					
	D-xylose	20	100					
	L-arabinose	25	100					
<i>P. pseudoflava</i> ⁽²⁹⁾ (KCTC 2348)	glucose	47	100					
	galactose	29	100					
	mannose	41	100					
	lactose	36	100					
	D-xylose	27	100					
	L-arabinose	21	94	1	5			
<i>P. citronellotis</i> (ATCC 13674) ⁽¹⁴⁾	glucose	26			2	28	70	

그대로 도입되며 homopolymer가 얻어진다.^(17,18) 그러나 3-phenylpropionic acid 또는 3-hydroxy-3-phenylpropionic acid를 탄소원으로 사용하면 폴리머는 생성되지 않을 뿐만 아니라 균체도 자라지 않는다.⁽¹⁸⁾ 그 이유는 phenyl기가 반응자리(reaction center)에 너무 가까이 있어서 입체적 방해효과를 미치기 때문이라고 생각된다. 이것은 또 다른 카이복시산 탄소원과는 달리 homopolymer가 얻어지는 이유이기도 하다. nonanoate와 cosubstrate로 사용, PHA를 생산하여 용매분별 추출에 의해 분리한 후, NMR로 확인한 결과, 3NA-rich fraction과 3HPV-rich fraction이 얻어졌다.⁽¹⁷⁾ 이것은 두개의 다른 폴리머합성 효소(polymerase)의 존재⁽¹⁹⁾를 반영하는 지도 모른다.

*P. oleovorans*는 R group에 Br-을 도입하기도 한다. Lenz 등⁽²⁰⁾은 6-bromohexanoic acid(6BA), 8-bromohexanoic acid(8BA), 11-bromoundecanoic acid(11BA) 등의 ω -bromoacids를 이용하여 *P. oleovorans*를 성장시켜 보았을 때 11BA에서 가장 잘 자랐고 6BA에서는 거의 자라지 않았다(그림 1). 이 사실 또한 Br 치환자리와 반응성 카이복시기 사이의 거리가 충분히 떨어져야 탄소원으로 이용될 수 있음을 시사한다. 그러나 이 브롬알칸산에서는 PHA 생성이 없었다. 흥미롭게도 각 브롬알칸산을 nonanoic acid와 cosubstrate로 이용했을 때는 균주 성장속도가 매우 빠를 뿐만 아니라 brominated β -hydroxyacid가 포함된 polyester가 얻어졌다. Lenz 등은 또한 *Rhodospirillum rubrum*을 이중결합이 포함된

표 10. 무관 단일 탄소원으로부터 poly (3HB-co-3HV)를 합성하는 박테리아⁽³⁰⁾.

균 주	탄소원	PHA 함량(w/w %)	PHA의 조성(mol%)	
			3HB	3HV
<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 40126	glucose	31	24	76
	acetate	40	27	73
	lactate	32	12	88
	succinate	7	7	93
	fructose	16	13	87
	molasses	4	37	63
<i>Rhodococcus</i> sp. ATCC 19070	glucose	14	9	91
	acetate	4	27	73
	lactate	2	28	72
	fructose	11	3	97
	sucrose	11	10	90
<i>Nocardia lucida</i> NCIMB 10980	glucose	0	-	-
	acetate	20	47	53
	succinate	7	21	79
	fructose	<1	33	67
<i>Corynebacterium hydrocarboxydans</i> ATCC 21767	glucose	8	28	72
	acetate	21	50	50
	lactate	2	61	39
	succinate	2	21	79
	fructose	1	50	50
<i>Alcaligenes</i> sp ⁽¹⁰⁾ . SH-69	glucose	15	86	14
	gluconate	5	78	22

카이복시산인 4-pentenoate에서 성장시킴으로써 3-hydroxy-4-pentenoate를 30 mol% 포함하는 polyester를 얻을 수 있었다.⁽²⁰⁾(표 8)

7. 당류를 이용한 박테리아의 polyesters 생산

PHA의 생산단가를 낮추기 위해 비교적 값싼 당류를 이용한 생합성 연구가 수행되어 왔다.⁽⁸⁾ 표 9에 의하면 *A. eutrophus* H16은 당류를 이용하면 3HB 100%로 구성된 P(3HB) homopolymer를 생산한다. 충남대의 Rhee 등⁽¹⁰⁾은 분리한 *Alcaligenes* sp. SH-69 균주가 당류만을 사용해도 제법 높은 양의 3HV를 포함하는 P(3HB-co-3HV) copolymer를 합성한다고 보고하였다. *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135⁽²⁸⁾와 *P. citronellolis*(ATCC 13674)⁽¹⁴⁾는 glu-

cose를 이용하여 주 모노머가 3HD, 부 모노머가 3HO인 copolyester를 합성하는 반면, 같은 속인 *P. pseudoflava*⁽⁸⁾는 당을 이용하여 P(3HB) homopolymer를 생산한다. Ramsay 등⁽⁶⁾은 *P. pseudoflava*가 β-galactosidase에 대해 (-)이기 때문에 lactose를 이용할 수 없다고 보고하였으나, 우리⁽²⁹⁾는 같은 strain인 KCTC 2348을 이용 lactose를 탄소원으로 사용했을 때 36 wt%의 P(3HB)를 얻을 수 있었다. 또한 L-arabinose를 탄소원으로 *P. pseudoflava* (KCTC 2348)를 성장시켰을 때 얻어진 PHA를 300-MHz NMR에 의해 분석한 결과 5 mol%의 4HB를 포함하는 P(3HB-co-4HB-co-3HV) terpolyester가 얻어졌다. 지금까지는 *Pseudomonas* species들은 3-position에서만 oxidation이 된 polyester가 보고되었었는데, 우리가 알기로는 4-position에서 산화가 된 polyester가 얻어지기는 이번이 처음으로 생각

표 11. 다양한 단일 탄소원들을 이용한 *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126에 의해 합성된 PHAs의 조성⁽³⁰⁾.

탄소원	PHA의 함량(w/w %)	PHA의 조성(mol%)				
		3HB	3HV	3HC	4HB	5HV
acetate	40	27	73			
propionate	18	11	89			
butyrate	17	89	11			
valerate	34	1	99			
isovalerate	10	50	50			
2-pentanoate	77	3	97			
hexanoate	16	45	17	38		
2-hexenoate	21	45	31	24		
heptanoate	12	15	85			
octanoate	5	51	49			
glucose	31	24	76			
fructose	16	13	87			
pyruvate	9	24	76			
lactate	32	23	88			
citrate	5	23	77			
α -ketoglutarate	4	12	88			
succinate	7	7	93			
fumarate	8	47	53			
L-malate	7	47	53			
oxaloacetate	12	25	75			
1,4-butanediol	14	23	66		11	
5-chlorovalerate	25	32	62			6

된다.

8. Unrelated 탄소원으로부터

P(3HB-co-3HV)를 합성하는 박테리아

*A. eutrophus*를 이용한 copolyester P(3HB-co-3HV)의 생합성에서는 탄소원으로써 3HV를 생성케 하는 저급 홀수 카이복시산이 꼭 필요하다. 최근 Dawes group⁽³⁰⁾에서는 저급 짝수 카이복시산, 당 등 모든 이용가능한 단일 탄소원으로부터 높은 함량(50-100 mol%)의 3HV를 갖는 P(3HB-co-3HV)를 합성하는 균주들을 찾아내었다(표 10). 즉, *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Nocardia lucida* NCIMB 10980, *Corynebacterium hydrocarboxydans* ATCC 21676 등의 분류학적으로 상관관계가 있는 genera에 속하는 것들이다. 그 중에서도 *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126의 hexa-

noate와 2-hexenoate를 이용한 상당량의 3HC를 포함하는 P(3HB-co-3HV-co-3HC) terpolyester의 합성은 특이하다(표 11). 또 1,4-butanediol과 5-chlorovalerate 이용시에는 3HB, 3HV 이외에 각각 4HB 및 5HV를 포함하는 polyester를 합성하는 양상은 *A. eutrophus*와 유사하다. 그러나 *Rhodococcus*는 3-ketothiolase activity가 매우 낮은 등의 PHA 합성에 관여하는 효소적 특성이 *A. eutrophus*와 매우 달라 PHA 생합성 경로가 다른 것으로 생각되어 연구가 진행중에 있다.⁽³⁰⁾

9. 탄화수소 및 불포화 탄화수소를 이용한 *P. oleovorans*의 PHAs 생산

*P. oleovorans*는 알칸 hydroxylase complex를 encoding한 OCT plasmid를 포함하기 때문에, *n*-알칸을 *n*-알카놀로 산화시킨다.⁽²¹⁾ 이것을 다시 지방산

표 12. 탄화수소 및 불포화탄화수소를 이용한 *P. oleovorans*의 PHAs 생산.

탄소원	polyester 함량 (wt%)	PHA 조성(3HA의 mol%)								
		HB	HV	HC	HH	HO	HN	HD		
hexane ⁽²²⁾	2.0			83.1	<1.0	12.0	<1.0		4.9	
heptane	11.4		2.5		97.5	<1.0	<1.0			
octane	25.3	<1.0		12.2		87.8		<1.0		
nonane	24.3		2.3		40.6	1.4	55.7			
decane	21.9	<1.0		11.1	1.1	65.8	1.2	20.8		
할로겐치환 탄화수소		HV	HC	HCC	HH	HFH	HO	HCO	HN	HFN ^(a)
1-fluorononane ⁽⁵⁾ (5 ml/l)	3	3			3	1			69	24
octane(33g)+ 1-chlorooctane(40g) in 1 liter ⁽²³⁾	5		2	10			29	59		
불포화 탄화수소		HC	HUC	HO	HUO	HN	HUN	HD	HUD ^(b)	
1-octene ⁽²²⁾		7.2	5.4	41.5	45.9			<1.0	<1.0	
1-decene		8.1	3.0	28.8	33.5	1.6	<1.0	6.6	18.5	

^aHCC = 3-hydroxy-6-chlorocaproate, HCO = 3-hydroxy-8-chlorooctanoate
 HFH = 3-hydroxy-7-fluoroheptanoate, HFN = 3-hydroxy-9-fluorononanoate
^bHUC = 3-hydroxy-5-hexenoate, HUO = 3-hydroxy-7-octenoate
 HUN = 3-hydroxy-8-nonenoate, HUD = 3-hydroxy-9-decenoate

으로 전환시킨 후 β -oxidation 경로에 의해 분해하기 때문에 과량의 3-hydroxy 지방산은 PHA로 합성될 수 있다(표 12). 특히 중간길이의 알칸 한쪽 끝에 할로겐 원소나, 알켄 group이 치환되어 있는 탄화수소를 탄소원으로 이용하면 PHA의 R group에 할로겐 원소 또는 이중결합이 도입되게 된다(표 12).

10. 결 론

생분해성 고분자의 연구는 이제 시작단계에 불과하다. 플라스틱 소재로서의 현재 응용이 가능한 미생물자원으로부터 개발된 생분해성 고분자는 intracellular polyesters이다. 고분자의 물성은 그 구조에 따라 결정되기 때문에 좋은 성질의 polyesters를 얻기 위해 R group을 어떻게 변형(modification)시키느냐가 큰 관건일 수 있다.

지금까지 알려진 polyesters는 R group 중의 알킬 group의 길이가 변화된 것, R group에 F-, Cl-, Br- 등의 할로겐 원소, phenyl group, 이중결합이 도입된 것, 또는 ester 산소 결합위치가 3-위치에서 4- 또는 5-로 바뀐 가지없는(no branch) polyesters 등의 정

도이다. 특히 R group 중에 -NH₂ 또는 -OH 등의 반응성 작용기가 도입될 수 있다면 2차적 변형 또는 약리작용을 하는 group을 공유결합시킴으로써 물성의 변환 및 효율성이 높은 drug delivery system에의 응용이 가능하겠다.

앞으로 적절한 균주의 선택, 균주의 개량, 배양 조건의 조절, 탄소원의 선택 등의 많은 연구를 통해 여러가지 목적에 맞도록 R group이 변형된 다양한 특성을 가진 새로운 polyesters 또는 전혀 새로운 biopolymer가 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. R.M. Lafferty, B. Korsatko and W. Korsatko, "Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid", in *Biotechnology (A Comprehensive Treatise)* ed. by Ho-J. Rehm and G. Reed, Vol. 6b (1988).
2. P.A. Holmes, *Phys. Technol.*, **16**, 32 (1985).
3. D. Byron, *Trans Biotechnol.*, **5**, 246 (1987).
4. A.J. Anderson and E.A. Dawes, *Microbiol. Rev.*,

- 54, 450 (1990).
5. Y. Doi, "Microbial Polyesters", VCH Publishers, New York (1990).
 6. E.A. Dawes ed., "Novel Biodegradable Microbial Polymers", Kluwer Academic, London (1990).
 7. L.L. Wallen and W.K. Rohwedder, *Environ. Sci. Technol.*, **8**, 576 (1974).
 8. J.L. Bertrand, B.A. Ramsay, J.A. Ramsay and C.Chavarie, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3133 (1990).
 9. J.J. Song, Y.S. Shin and S.C. Yoon, the manuscript in preparation.
 10. G.J. Kim, K.Y. Yun, K.S. Bae and Y.H. Rhee, *Biotech. Lett.*, **14**, 27 (1992).
 11. M.J. De Smet, G. Eggink, B. Witholt, J. Kingma, and H. Wynberg, *J. Bacteriol.*, **154**, 870 (1983).
 12. R.A. Gross, C. DeMello, R.W. Lenz, H. Brandl and R.C. Fuller, *Macromolecules*, **22**, 1106 (1989).
 13. G.W. Huisman, O. deLeeuw, G. Eggink and B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1949 (1989).
 14. M.H. Choi, J.J. Song and S.C. Yoon, the manuscript in preparation.
 15. G.W. Haywood, A.J. Anderson and E.A. Dawes, *Biotech. Lett.*, **11**, 471 (1989).
 16. A. Timm and A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3360 (1990).
 17. Y.B. Kim, R.W. Lenz and R.C. Fuller, *Macromolecules*, **24**, 5256 (1991).
 18. K. Fritzsche, R.W. Lenz and R.C. Fuller, *Makromol. Chem.*, **191**, 1957 (1990).
 19. G.W. Husman, E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra and B. Witholt, *J. Biol. Chem.*, **266**, 2191 (1991).
 20. R.W. Lenz, B.W. Kim, H.W. Ulmer, K. Fritzsche, E. Knee, and R.C. Fuller, in Ref. 6.
 21. R.G. Lageveen, G.W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink and B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2924 (1988).
 22. H. Preusting, A. Nijenhuis and B. Witholt, *Macromolecules*, **23**, 4220 (1990).
 23. Y. Doi and C. Abe, *Macromolecules*, **23**, 3705 (1990).
 24. Y. Doi, A. Segawa, S. Nakamura and M. Kunioka, in Ref. 6.
 25. H. Brandl, E.J. Knee Jr., R.C. Fuller, R.A. Gross and R.W. Lenz, *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**, 49 (1989).
 26. H.W. Ulmer, R.A. Gross, P. Weishach, R.C. Fuller and R.W. Lenz, *Polym. Prepr.*, **30**, 402 (1989).
 27. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga, *Makromol. Chem., Rapid. Commun.*, **8**, 631 (1987).
 28. G.W. Haywood, A.J. Anderson and D.F. Ewing and E.A. Dawes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3354 (1990).
 29. M.H. Choi, C.H. Cho and S.C. Yoon, Unpublished result.
 30. A.J. Anderson, G.W. Haywood, D.R. Williams and E.A. Dawes, in Ref. 6.