

Polyhydroxyalkanoate 생합성 연구의 최근 동향

이용현 · 박진서
경북대학교 유전공학과

1. 서 론

Polyhydroxyalkanoate(PHA)는 다양한 미생물의 세포내에 축적되는 에너지 저장물질로서 carboxyl group, hydroxyl group, 그리고 다양한 alkyl group 이 chiral carbon을 중심으로 결합되어 있는 hydroxyalkanoate 단량체가 100~30000개 정도 ester 결합으로 연결되어 있는 불용성 공중합체이다.

PHA 중 가장 대표적인 것은 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)로서 D(-)-3-hydroxybutyric acid가 직선상으로 연결된 단일 중합체이며, 분자량은 6×10^4 에서 10^6 , 용융점은 157~188°C 전후이다. PHB는 연결축을 따라 59.6 nm 간격으로 fiber가 이중으로 배열된 right-handed 21 helix의 결정구조를 갖고 있다[1]. 또한 alkanes, alcohols, alkanolic acids와 같은 다양한 탄소원을 기질로 배양할 경우 단량체로서 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, 3-hydroxypropionate, 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxycaproate, 3-hydroxyheptanoate, 3-hydroxydodecanoate, 그리고 4-hydroxybutyrate 등 다양한 구조를 갖는 PHA가 생성되며 현재 35종류 이상의 구조가 알려져 있다[2,4]. 그 중 3-hydroxyvalerate가 최고 47 mol%까지 구성된 공중합체 P(3HB-co-3HV)가 가장 주목을 받고 있다[3].

PHA는 1925년에 Pasteur 연구소의 Lemoigne에 의해 *Bacillus megaterium*으로부터 처음 분리 확인되었고, 1959년에 세포내에 축적되는 탄소(에너지) 저장 물질임이 밝혀졌다. 1960년대에 이르러 생분해성 고분자 물질로서 상업적 응용성이 주목을 받기 시작하였으며[1], 1980년대 들어서 영국의 ICI사는 단세포 단백질의 대량 생산에 관한 축적된 경험을 바탕으로 PHB의 산업적 생산을 위한 연구를 개시

하였고, 1985년 *Alcaligenes eutrophus*를 glucose와 propionate의 혼합기질에서 배양함으로써 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerate가 임의로 공중합된 P(3HB-co-3HV) copolyester를 개발하여 "Biopol"이란 상품명으로 생산하였다[3]. 또한 1988년 Doi 등[4]은 1,4-butanediol 등의 related substrate에 배양하여 3-hydroxybutyrate와 4-hydroxybutyrate의 공중합체인 P(3HB-co-4HB)를 생산하였다.

PHA 생합성에 관련된 기초 연구도 미생물학, 생화학, 그리고 분자생물학 각도에서 활발히 수행되어, 신규 PHA 생합성 미생물의 탐색, 대사경로 및 조절 mechanism의 규명, 그리고 물성이 개량된 각종 PHA 공중합체의 개발 연구가 활발히 이루어졌다. 특히 최근에는 recombinant DNA 기술을 이용한 각종 미생물 유래의 PHA 생합성 관련 유전자의 분리와 그 기능에 관한 연구가 활발히 수행되고 있고, 1988년 *A. eutrophus*의 PHB 생합성 관련 세개의 효소를 coding하는 유전자가 독일의 Steinbchel 등[5], 미국의 Dennis 등[6], 그리고 Sinskey 등[7,8]에 의해 거의 동시에 cloning되었으며, 이를 이용한 대사 경로 및 조절 기작에 관한 연구가 본격화 되었다. 또한 최근에는 재조합 균주를 이용한 PHA의 생산에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으며, 이와 같은 최근의 연구 성과는 몇 편의 총설 [9-12]에 잘 요약되어 있다.

2. PHA 생산 미생물

PHA는 독립 또는 종속 영양요구성 호기성 세균, 혐기성 광합성 세균, gliding 세균, *Actinomycetes*, 그리고 *Cyanobacteria* 등 매우 다양한 종의 원핵

Table 1. Number of publications in literature related to polyhydroxyalkanoic acid.

Species	Microbial	Biochemical	Genetical
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	27	57	16
<i>Alcaligenes lactus</i>	4	5	
<i>Azotobacter beizerlinkii</i>	2	12	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	12		
<i>Bacillus cereus</i>	15	9	
<i>Bacillus megaterium</i>	31	18	
<i>Methylobacterium extorquens</i>	4	4	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	3	1
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	25	6	6
<i>Pseudomonas putida</i>	12	1	3
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	4	3	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	9	12	
<i>Zoogloea ramigera</i>	7	20	2

미생물에서 발견된다[12, 13]. 주로 연구된 균주로는 *Alcaligenes eutrophus*, *lactus*를 포함하는 *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas oleovorans*, *Aeruginosa*, *putida*와 같은 *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., methanol 자화성 세균인 *Methylotroph* sp., 그리고 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum* 등을 들 수 있다. 최근의 Steinbchel의 총설[12]에 수록된 이들의 PHA 관련 연구논문을 미생물학, 생화학, 분자유전학 분야로 세분하여 분류한 결과는 Table 1과 같다.

PHA는 미생물이 불균형적인 성장조건 즉 특정 영양원인 산소, 질소, 황, 인 또는 칼륨 등이 결핍된 반면 탄소원이 충분량 존재할 때 축적된다. 특히 에너지원인 탄소원은 충분하지만 질소원이 결핍된 환경에서 핵산과 단백질의 합성이 저해됨으로 동화되는 탄소원이 PHA로 대부분 저장된다. 그러나 외부의 탄소원이 고갈되고 질소원이 공급된다면 세포내의 PHA는 분해되어 에너지원으로 재사용된다[1].

세포내의 PHB granule은 2.5~4.5 nm 두께의 non-unit membrane으로 둘러싸여 있고 직경이 0.2~0.7 μm 정도인 소수성 결정입자의 형태로 되어 있다. 각각의 PHB granule은 granule 부피의 약 50%를 차지하는 central core와 이와는 밀도가 다른 outer coat로 이루어져 있고, 그 성분은 98%의 PHB,

2%의 protein, 그리고 0.5%의 lipid로 구성되어 있다. 또한 PHB는 세포질 내에 여러 개의 granule로 존재하며 세포 중량의 30~80% 정도를 차지한다[8].

3. PHA 생합성 경로 및 관련효소

3.1. *Alcaligenes eutrophus*에서의 PHB 생합성 경로

PHB 생합성 경로에 대한 연구는 *Alcaligenes eutrophus*를 중심으로 주로 이루어져 왔다. Fig. 1에서와 같이 해당작용에 의해 생성된 두분자의 acetyl-CoA는 PHA 생합성에 관여하는 첫 효소인 β -ketothiolase의 축합반응에 의하여 acetoacetyl-CoA로 전환된다. 이는 다음 효소인 acetoacetyl-CoA reductase에 의하여 β -hydroxybutyryl-CoA로 전환되며, 이때 해당과정의 glucose-6-phosphate나 TCA cycle의 isocitrate의 탈수소과정에서 생성된 NADPH₂가 cofactor로 이용된다. β -Hydroxybutyryl-CoA는 마지막 효소인 PHB synthase의 head-to-tail mechanism에 의해 PHB polymer로 전환된다.

최근 Doi 등은 butyric acid를 기질로 사용하여 β -ketothiolase를 이용하지 않고 PHB를 합성하는 새로운 경로를 보고한 바 있다[14]. 즉 세포내에

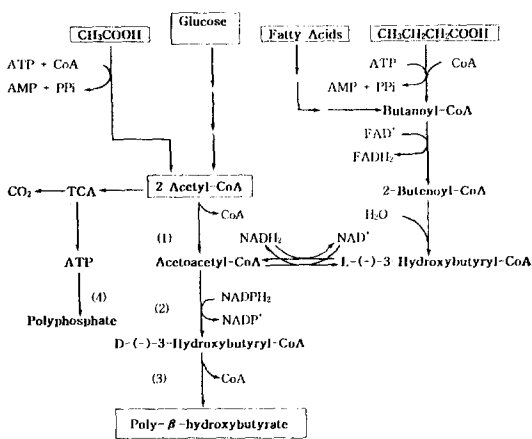


Fig. 1. PHB-biosynthetic pathway in *Alcaligenes eutrophus*. (1) 3-ketothiolase, (2) NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase, (3) PHB synthase, (4) Polyphosphate kinase

이송된 butyric acid가 β -oxidation cycle를 경유하여 acetoacetyl-CoA로 전환된 후 PHB로 축적되는 새로운 경로이다.

3.2. *Alcaligenes eutrophus*의 PHB 생합성 관련 효소

PHB 생합성에 관여하는 효소들의 생화학적 특성은 Table 2와 같다. *Alcaligenes eutrophus*가 생산하는 β -ketothiolase는 기질특이성이 적은 효소 A, 기질특이성이 큰 효소 B의 두 종류가 분리되었는데, 이중 효소 A가 주로 PHB 생합성에 관여하는 것으로 보고되었다[15]. 두 효소 모두 조효소인 CoA-SH에 의해 활성이 저해되며, 세포성장상태와 관계없이 항상 발현되는 constitutive enzyme인 것으로 추측되고 있다.

Acetoacetyl-CoA reductase도 두 종류가 분리되

었으며, 기질로 D-(-)-3-hydroxyacyl-CoA, 조효소로 NADPH_2 를 이용하는 효소와, 기질로 L-(+)-3-hydroxyacyl-CoA를 조효소로 NADH_2 를 이용하는 효소가 있다[16]. 이중 전자가 직접 PHB 생합성에 관여하며, 후자는 lipid 대사과정중 생성된 L-(+)-3-hydroxyacyl-CoA를 D-(-)-3-hydroxyacyl-CoA로 전환시켜 PHB 생합성에 간접적으로 관여하는 것으로 추측되고 있다.

PHB synthase는 현재까지 한 종류만이 분리되어 있으며, 생육조건에 따라 효소의 검출부위가 달라진다. 즉 이 효소는 PHB가 축적되지 않을 경우에는 주로 세포의 가용부위(soluble fraction)에서 검출되고, PHB 축적시에는 PHB granule-associated particulate fraction에서 검출된다. 세포내 PHB 축적속도는 *Alcaligenes eutrophus*내의 PHB synthase의 total 양과는 무관한 것으로 밝혀져 있으며, PHB 생합성은 복잡한 membrane-bound polymerization system과는 무관한 것으로 추측된다[17].

3.3. 기타 균주에서의 PHA 생합성

*Alcaligenes eutrophus*의 PHB 생합성 경로와는 다른 독특한 경로를 이용하는 두 종류의 PHB 또는 PHA 생합성 대사과정이 알려져 있는데, 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*과 *Pseudomonas oleovorans*의 생합성 경로가 그것이다. *Rhodospirillum rubrum*의 경우 PHB 생합성은 *Alcaligenes eutrophus*의 생합성 과정에 Fig. 2에서와 같이 두개의 대사경로가 더 첨가된다[20]. 첫번째 관련 효소인 β -ketothiolase의 반응은 동일하나, 그 다음 효소인 reductase는 acetoacetyl-CoA를 D-(-)-form으로 전환하는 *A. eutrophus*와는 달리 L-(+)-form으로 전환시키며, cofactor도 NADPH_2 대신

Table 2. Properties of PHB-biosynthetic enzymes in *Alcaligenes eutrophus*.

	Substrate specificity	Molecular weight	Km	Subunit
β -Ketothiolase				
A	C ₄ to C ₅	176,000	1.10 mM	4
B	C ₄ to C ₁₀	184,000	0.23 mM	4
Acetoacetyl-CoA reductase				
NADPH-dependent	D-(-)-C ₄ to C ₆	92,000	ND	4
NADH-dependent	L-(+)-C ₄ to C ₆	150,000	ND	3
PHB synthase	D-(-)-C ₄ to C ₅	160,000	0.68-1.63 mM	ND

*ND; not determined

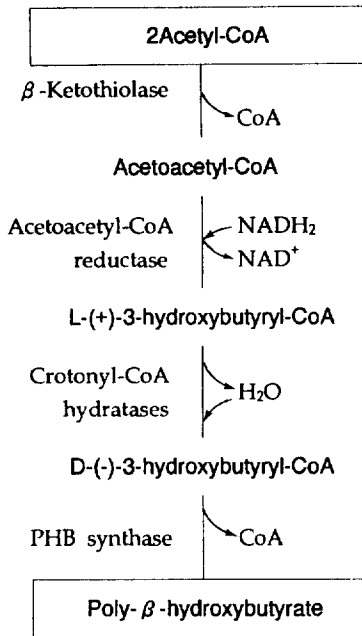


Fig. 2. PHB-biosynthetic pathway in *Rhodospirillum rubrum*.

NADH₂를 사용한다. 이렇게 생성된 L-(+)-form을 D(-)-form으로 전환시키는 두 반응이 첨가되며, 작용효소는 두 종류의 enoyl-CoA hydratase가 관여한다.

Ribosomal RNA homology group I에 속하는 *Pseudomonas*의 경우에는 다양한 지방산을 기질로 하여 medium-chain length의 PHA를 형성한다. 가장 잘 알려진 예로는 Fig. 3과 같은 *Pseudomonas oleovorans*의 PHA 생합성 경로이며[21,22], 탄소 원인 octanoate로부터 poly-3-hydroxyoctanoate를 합성한다. 세포내로 이동된 octanoate는 β -oxidation에 의하여 산화되며, 그 중간산물들이 여러 종류의 효소작용에 의하여 PHA 생합성 경로로 이동되고, 최종적으로 PHA synthase의 작용에 의하여 poly-3-hydroxyoctanoate로 전환된다. 이외에 *Pseudomonas oleovorans*를 제외한 대부분의 ribosomal RNA homology group I에 속하는 미생물들은 위 합성경로외에 acetyl-CoA로부터 medium-chain length의 hydroxyalkanoic acid로 구성된 copolymer를 합성하는 경로가 있는 것으로 밝혀졌으며, 주

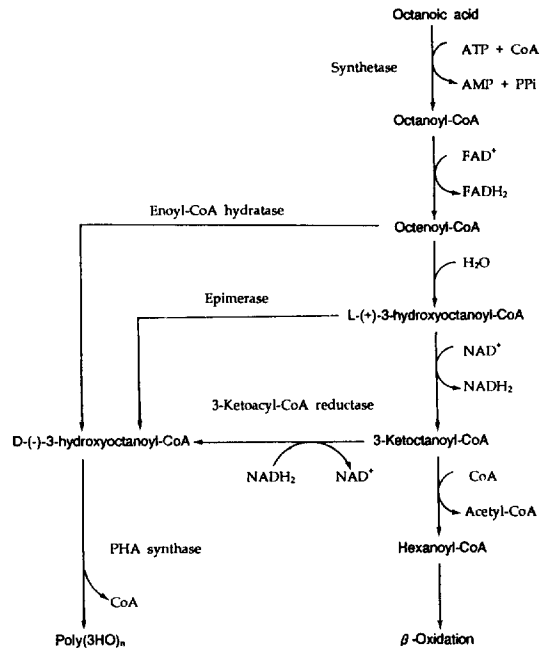


Fig. 3. PHA-biosynthetic pathway in *Pseudomonas oleovorans*[21,22].

구성단량체는 3-hydroxydecanoate이다[23,24]. 그러나 그 생합성 경로는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

3.4. *Alcaligenes eutrophus*에서의 PHB 분해 경로

*Alcaligenes eutrophus*에서 PHB는 축적과 동시에 분해도 일어나는 것으로 알려져 있으며, 그 분해경로는 Fig. 4와 같다. PHB는 P(3HB) depolymerase에 의하여 D(-)-3-hydroxybutyrate로 분해되며, 그 산물은 monomer만이 형성된다. 반면 *Bacillus megaterium* 경우에는 dimer도 생성되는 것으로 알려져 있다. 생성된 D(-)-3-hydroxybutyrate는 NAD-specific D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase에 의하여 acetoacetate로 전환되며, 이 경로는 PHB 분해경로에서의 첫 energy production 단계인 것으로 보여진다. 최종적으로 acetoacetate는 acetoacetyl-CoA로 전환되며, 이 반응에는 acetoacetyl-CoA synthetase가 관련되는 것으로 추측되고 있다[18]. 그러나 아직까지 PHB 분해대사의 regulation에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

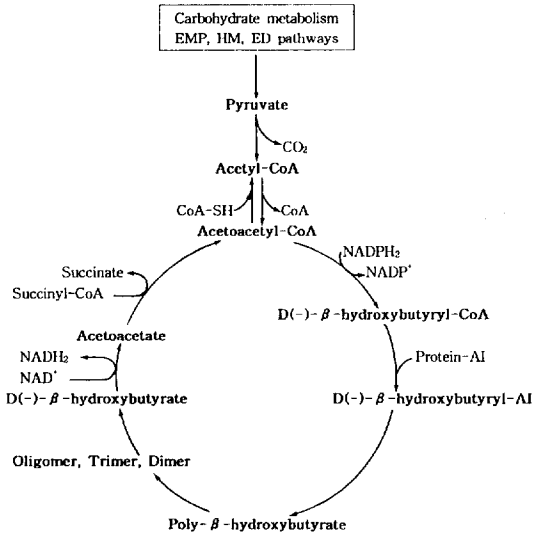


Fig. 4. General pathway in the biosynthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyrate in microorganisms[18]

3.5. Related substrate로부터 PHA 합성

20년전에 Wallen과 Rohwedder[19]는 미생물로부터 합성되는 PHA 단량체의 구조는 배양시 사용되는 기질의 종류에 따라 결정된다는 사실을 보고한 바 있다. 이와 같은 결과로부터 사용되는 기질의 종류를 다양하게 함으로서 여러종류의 단량체를 얻을 수 있었으며, 현재까지 35종의 단량체가 알려져 있다. Carbon chain length 3에서 12까지의 straight-chain saturated 3-hydroxyalkanoic acid, carbon chain length 5에서 14까지의 unsaturated 3-hydroxyalkanoic acid 등이 주로 확인되었다. 이외에 branched 3-hydroxyalkanoic acid와 brominated 3-hydroxyalkanoic acid도 분리되었다. 또한 수종의 기질을 함께 사용함으로써 단량체가 혼합된 PHA를 합성할 수 있었다.

그 단량체의 구조는 미생물의 특성에 따라 이중 결합, aromatic side chain 등이 첨가되는 등의 다소 변화가 있는 경우도 알려져 있다. 지금까지 related substrate로부터의 PHA 생합성 경로에 관한 연구 결과가 많이 얻어져 있으나, 미진한 부분이 많아 계속 연구가 진행중에 있다.

3.6. Unrelated substrate로부터 PHA 합성

합성된 PHA의 종류 및 화학구조는 사용하는 기질의 종류와 구조에 따라 다양하게 변화하는 것으로 알려져 있으나, 최근 다양한 미생물이 단량체의 구조와는 무관한 unrelated substrate로부터 PHA를 합성할 수 있음이 Dawes 등[25]에 의해 밝혀졌으며, 그 예를 Table 3에 나타내었다.

이러한 현상은 세포내의 대사작용에 필요한 에너지 생성에 이용되는 중요한 중간 대사물질들이 PHA 생합성대사경로로 이동되는 것에 기인하는 것으로 추측되고 있다. 이와 같은 결과는 비교적 독성이 높고 위험한 기질로부터 PHA를 합성하는 것보다는 포도당, 설탕 등의 값싸고 유용한 탄소원으로부터 PHA를 합성할 수 있는 가능성을 제시하는 것으로 매우 중요한 결과라 할 수 있다.

4. PHA의 생합성 대사조절

미생물내에서 PHA의 합성은 질소, 산소, 인, 황산 등 다양한 영양인자들이 결핍된 부적절한 영양상태에서 PHA가 축적되는 것으로 알려져 있으며, 그 대사과정은 다양한 조절 mechanism에 의해 영향을 받게 된다. PHA를 합성하는데 있어 가장 중요한 인자는 PHA 전구물질인 세포내의 acetyl-CoA농도라 할 수 있으며, 세포내의 acetyl-CoA의 농도에 영향을 미치는 다양한 중간 대사과정들이 PHA 축적속도에 절대적인 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다.

대사조절기작은 *Alcaligenes eutrophus*와 *Azotobacter beijerinckii*를 중심으로 연구되었다. *Alcaligenes eutrophus*에서는 질소, 인 등이 고갈될 경우 많은 양의 PHA를 축적한다. 질소원 등이 고갈될 경우 단백질과 핵산의 합성이 억제되고, 이는 이들 전구물질의 중요 합성부위인 TCA cycle의 원활한 기능을 요하지 않아 그 활성이 감소하게 된다. 그 결과 세포내의 CoA의 농도가 낮아지고 acetyl-CoA의 농도가 높아지게 되며, 이는 PHA 생합성 효소인 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase를 활성화시켜 PHA 축적을 유도한다. 또한 세포내의 NADPH₂는 위 효소의 활성인자로, NADP는 억제인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 정상적인 세포성장 상태하에서는 세포내의 acetyl-CoA

Table 3. Synthesis and accumulation of PHA from unrelated substrates.

Organism	Carbon source	PHA detected ¹
<i>Alcaligenes eutrophus</i> strain R3	Fructose, gluconate	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Alcaligenes</i> sp. SH-69	Glucose	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Corynebacterium hydrocarboxydans</i>	Fructose, glucose, succinate, acetate, lactate	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Starch	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Rhodococcus</i> sp. ATCC 19070	Fructose, glucose, sucrose, acetate, lactate	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 40126	Fructose, glucose, molasses, succinate, acetate, lactate	Poly(3HB-co-3HV)
<i>Nocardia</i> strain 107-322	Butane	Poly(3HB-co-3HBen)
<i>Nocardia lucida</i>	Fructose, glucose, acetate, succinate	Poly(3HB-co-3HB)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (and other fluorescent pseudomonads)	Gluconate, fructose, glucose,	Poly(3HB-co-3HD-co-3HDD)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (and other non-sulphur purple bacteria)	Acetate	Poly(3HB-co-3HV)

Abbreviation: PHA, polyhydroxyalkanoates

의 농도는 낮고 상대적으로 CoA의 농도가 높아져 PHA 생합성 효소의 작용을 저해시켜 PHA 축적을 억제하게 된다[26]. *Azotobacter beijerinckii*는 산소원이 불충분할 경우 많은 양의 PHA를 축적한다. 산소원이 불충분할 경우 불완전한 전자전달계의 작동으로 세포내의 NADH₂/NAD의 비율이 높아지게 되고, 이는 TCA cycle의 첫효소인 citrate synthase와 isocitrate dehydrogenase를 저해시켜 PHA 합성의 전구물질인 acetyl-CoA의 대사흐름이 PHA 합성경로로 유도됨으로서 PHA가 축적된다[27,28].

5. PHA 생합성 관련 유전자

PHA의 생합성에 관여하는 유전자의 구조와 배열에 관한 연구는 *Alcaligenes eutrophus* 뿐만 아니라 그 밖의 많은 균주들을 대상으로 수행되고 있다. 특히 PHA 생합성에 직접 관여하는 효소인 β -ketothiolase, ketoacyl-CoA reductase, 그리고 PHA synthase의 유전자들을 중심으로 연구되고 있다.

PHA 합성 유전자의 cloning은 효소활성의 측정, transposon mutagenesis, heterologous DNA probe, oligonucleotide probe, phenotypic complementation 등의 방법들에 의해 행하여졌다[10].

효소 활성도 측정에 의한 cloning 방법은 gene

source의 genomic DNA library를 만든 후 host 균주를 형질전환시켜 transformants를 얻고 그중 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase activity를 갖는 transformants를 선별하여 필요한 유전자를 cloning하고 이를 적절한 vector plasmid에 cloning하는 방법이다. Transposon mutagenesis에 의한 방법은 우선 transposon 5(Tn5)를 이용하여 PHB를 생성하지 않는 mutant를 만든 뒤, *A. eutrophus* H16의 phage λ genomic DNA library로 형질 전환하여 PHB 생성능이 복원된 것을 선별하는 방법이다.

또한 heterologous DNA probe에 의한 방법은 다른 종류의 단백질들과는 구별되어지는 PHA synthase 유전자들간의 높은 homology를 이용하여 PHA 생합성 유전자를 확인하는 방법으로서, PHA synthase 유전자내에 쉽게 찾을 수 있는 marker가 포함되어 있는 mutant의 분리가 불가능하여 homologous DNA probe를 얻을 수가 없는 많은 균주들에 대해 사용된다. 이러한 방법으로 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 probe으로 이용하여 *Z. ramigera* 등의 여러 다른 균주들의 PHA 생합성 유전자들을 cloning 할 수 있었다.

Oligonucleotide probe에 의한 방법은 PHA synthase의 highly conserved region 유래의 ³²P-la-

Table 4. PHA synthase genes available and strategies employed for cloning[10].

Bacterium	Source	A	B	C	D	E
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H16 [5-8]	DSM 428	+	+	+		+
<i>Chromatium vinosum</i> D [29]	DSM 180			+		
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i> N1	DSM 243			+		
<i>Lamprocystis reseopersicina</i> 3112	N.Pfenning					+
<i>Methylobacterium extorquens</i> IBT6	W.Babel					+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 [30]	DSM 1707				+	
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	DSM 50332				+	
<i>Pseudomonas oleovorans</i> [31]	ATCC 29347					+
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442 [32]						+
<i>Pseudomonas</i> sp.	DSM 1650				+	
<i>Pseudomonas</i> sp.	GP4BH1 DSM 5927				+	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> [33]	ATCC 17023					+
<i>Rhodococcus ruber</i> PP2 [34]	NCIMB 40126					+
<i>Rhodospirillum rubrum</i> Ha [33]	DSM 107					+
<i>Syntrophomonas wolfei</i> [35]						+
<i>Thiocapsa pfennigii</i> 9111	N.Pfenning				+	
<i>Thiocystis violacea</i> 2311 [29]	DSM 208				+	

A: Screening by enzyme activity, B: Transposon mutagenesis C: Heterologous DNA probe, D : Oligonucleotide probe, E: Phenotypic complementation

belled oligonucleotide를 합성한 후 이를 probe으로 사용하여 PHA locus를 확인하는 방법이며 *A. eutrophus* H16과 *P. oleovorans*의 PHA synthase로부터 oligonucleotide probe을 합성하여 다른 균주들의 PHA 생합성 유전자들을 cloning하였다.

Phenotypic complementation에 의한 방법은 wild type genome의 incompletely restricted DNA의 genomic library를 만든 후 agar plate상에서 PHA-negative mutant와 혼합 배양시 plate 상의 opacity, transparency에 따라 PHA를 축적하는 positive colonies를 선별해 내는 방법으로서 배양시 질소원을 고갈시키고 충분한 탄소원을 공급하면 positive clones를 더 쉽게 확인할 수 있다. 위에서 기술한 방법들에 의해 PHA synthase가 cloning된 균주들과 사용된 방법들을 Table 4에 나타내었다 [10].

6. PHA 생합성 유전자의 구조

PHA 생합성 관련 유전자들에 관한 연구는 DNA

염기 서열 분석, physical mapping, subclone 상에서의 효소활성 측정 등의 방법에 의해 수행되고 있으며, 밝혀진 유전자들의 구조와 기능은 Fig. 5와 Table 5에 보인 것과 같다. *A. eutrophus* H16의 PHA 생합성 유전자의 크기는 약 4.0 kb이며, PHA synthase(*phaC*), β -ketothiolase(*phaA*), 그리고 NADPH₂-dependent acetoacetyl-CoA reductase(*phaB*)가 하나의 단일 operon을 이루고 있고, *phaC* 유전자의 320 bp 상단에 *E. coli*의 σ^{70} consensus promoter와 유사한 promoter가 포함되어 있다[36].

혐기성 광합성균인 *Chromatium vinosum*의 경우[29]는 *phaC* 유전자뒤에 *phaE* 유전자가 위치하고 있으며 *phaE* 유전자의 앞쪽에 σ^{70} -dependent promoter가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 *phaE* 유전자 산물의 기능은 아직 알려져 있지 않고, 단지 PHA synthase의 expression을 위해 필요한 것으로 유추되어지고 있다. 또한 *phaA*와 *phaB* 유전자 사이에는 비교적 작은 크기의 coding sequences로 ORF4와 ORF5가 위치하며 그 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. *C. vinosum*의 *phaA* promoter 또한

Table 5. Terminology of PHA biosynthetic genes[36].

Bacterium	Designation used in literature	Protein encoded
<i>A. eutrophus</i>	<i>phbA(phaA)</i>	β -Ketothiolase
	<i>phbB(phaB)</i>	NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase
	<i>phbC(phaC)</i>	PHA synthase
<i>Z. ramigera</i>	<i>phbA(phaA)</i>	γ -Ketothiolase
	<i>phbB(phaB)</i>	NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase
<i>P. oleovorans</i>	ORF1(<i>phaC1</i>)	PHA synthase 1
	ORF2(<i>phaZ</i>)	PHA depolymerase
	ORF3(<i>phaC2</i>)	PHA synthase 2
	<i>phaD</i>	Protein of unknown function
<i>P. aeruginosa</i>	<i>phaC1</i>	PHA synthase 1
	<i>phaD(phaZ)</i>	PHA depolymerase
	<i>phaC2</i>	PHA synthase 2
	ORF3(<i>phaD</i>)	Protein exhibiting homology to the <i>phaD</i> product of <i>P. aeruginosa</i>
<i>C. vinosum</i>	<i>phbA(phaA)</i>	β -Ketothiolase
	<i>phbB(phaB)</i>	NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase
	<i>phbC(phaC)</i>	PHA synthase
	ORF2(<i>phaE</i>)	Granule-associated protein required for expression of PHA synthase activity
<i>T. violacea</i>	<i>phbA(phaA)</i>	β -Ketothiolase
	<i>phbC(phaC)</i>	PHA synthase
	ORF2(<i>phaE</i>)	Protein exhibiting homology to the <i>phaE</i> product of <i>C. vinosum</i>

phaA, *phaB*, *phaC*, *phaD*: Genes coding for proteins involved in the biosynthesis of PHA

phaZ, *phaY*, *phaX*, *phaW*: Genes coding for protein required for intracellular degradation of PHA Fig. 6. Three types of bacterial PHA synthase[36].

E. coli σ^{70} consensus promoter와 유사하며 *phaE* promoter와 겹쳐져 위치하고 있다.

PHA 생합성 유전자가 cluster를 이루고 있지 않은 균주도 많이 있으며 그 예로는 *Zoogloea ramigera*의 경우[37] *phaA*와 *phaB* 유전자는 하나의 단일 operon을 이루고 있으나 *phaC* 유전자는 같이 cluster를 이루고 있지 않고 있으며 그 위치도 아직 밝혀지지 않고 있다. 그외에도 *P. oleovorans*[31], *P. aeruginosa*[30], *Thiocystis violacea*[29] 등의 PHA 생합성 관련 유전자들의 분자 배열이 밝혀져 있다.

7. PHA synthase 유전자 구조

PHA synthase의 genome상에서의 위치와 염기 서열은 여러 균주에 대하여 밝혀진 바 있다. 그러나 이들 효소의 2차 이상의 구조에 대한 연구는 미비하며, DNA 염기서열로부터 단백질의 1차 구조에 따라 유추된 PHA synthase 유전자의 형태는 Fig. 6과 같이 세 종류로 나누어지고 있다.

Type I PHA synthase는 그들간에 36.8%에서 39.0%까지의 amino acids homology를 지니며 type II는 53.7%에서 79.6%까지의 homology를 지니고 있으며 type I의 N-terminal의 26개의 amino acids가 결손된 형태이다. Type III는 87.3%의 homology를 지니며 type I의 N-terminal에 175개의 a.a가 C-terminal에는 55개의 a.a가 결손된 형태이다. 또한

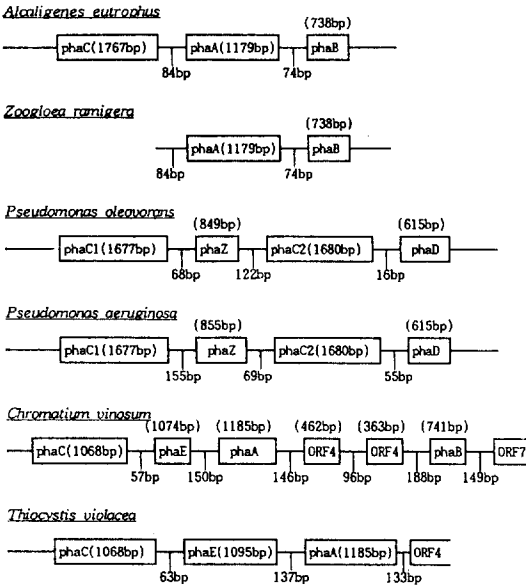


Fig. 5. Molecular organization of genes relevant for biosynthesis of PHA. ORF4, ORF5, ORF7 refer to open reading frames whose function has not yet been evaluated[36].

type I과 type II는 34.4%에서 39.9%의 homology를 나타내며 type I과 type II는 21%에서 27.7%의 homology를 나타내는 것으로 밝혀져 있다.

8. 재조합 균주에 의한 PHA 생합성

1988년에 미국의 Dennis 등, Sinskey 등과 독일의 Steinb chel 등에 의해서 각각 다른 방법에 의해서 *A. eutrophus*의 PHA 합성 유전자가 cloning된 이후 PHA 생합성 유전자를 cloning한 재조합 균주를 이용한 PHA 합성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Dennis 등[6]은 효소 활성도 측정에 의해 cloning하는 방법을 사용하여 *A. eutrophus* H16를 cosmid pVK102, pUC18, pUC13을 이용하여 genomic DNA library를 만든 뒤 *E. coli* LE392, DH1, DH5를 형질전환하고 그 중 β -ketothiolase 활성을 갖는 형질전환균주를 선별하고, acetoacetyl-CoA reductase 활성을 지닌 것을 다시 선별하는 방법으로 PHA 합성에 필요한 세개의 유전자를 5.2 kb Kpn I-EcoR I fragment에 cloning하였다. 얻어진 형질전환체를

Type	Structure	Preferred substrates	Representative bacterium
II		HA _{MCL} -CoA	<i>P. oleovorans</i>
I		HA _{SCL} -CoA	<i>A. eutrophus</i>
III		HA _{LCL} -CoA	<i>C. vinosum</i>

Fig. 6. Three types of bacterial PHA synthase[36]. HA_{SCL}: Short-chain-length hydroxyalkanoic acids(HA) HA_{MCL}: Medium-chain-length HA, which consist of 6-14 carbon atoms. HA_{LCL}: HA consisting of more than 14 carbon atoms.

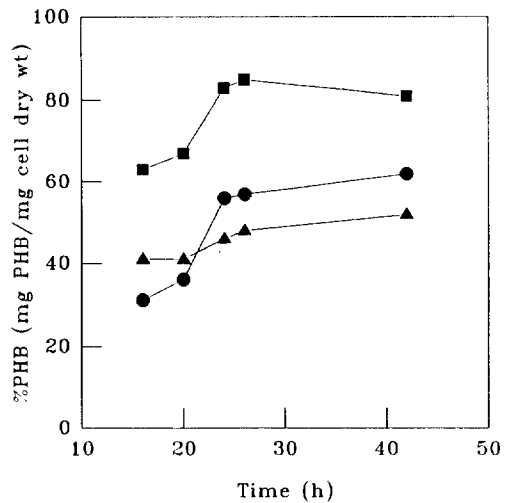


Fig. 7. Comparison of intracellular PHB accumulation in *E. coli* DH5 α strains containing (●) pUC 13/PHB, (▲) pGem7f, (■) p4A [38].

1% gluconate를 포함하는 LB 배지에 배양하여 각각의 재조합 균주로부터 PHB 합성능을 살펴보고, 그 중 가장 높은 경우에 있어서 dry cell weight의 80%까지 PHB가 축적되었음을 보고 한 바 있다.

그리고 1992년 Dennis group[38]에서는 Fig. 7의 결과와 같이 *A. eutrophus*로부터 분리한 PHA 합성 유전자를 pUC13, pGEM7f, p4A를 이용하여 *E. coli* DH5 α 에 cloning한 재조합 균주를 진탕 flask와 발효조에서 배양했을 때 high plasmid copy number

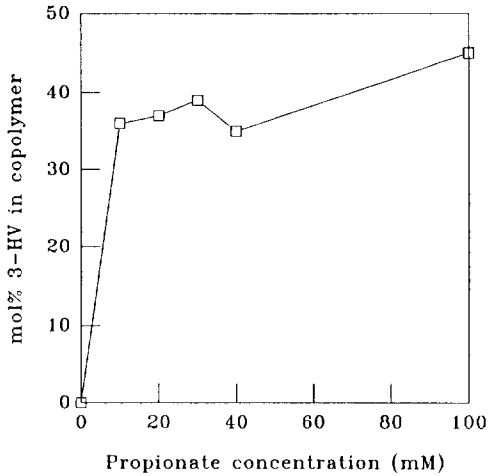


Fig. 8. 3-Hydroxyvalerate into copolymer as a function of propionate concentration in culture [38].

를 지닌 p4A를 vector로 사용했을 때 cell mass의 90%에 이르는 높은 PHB 축적율을 나타냄을 보고 하였다.

또한 Fig. 8의 결과와 같이 propionate에 의해 P (3HB-co-3HV)의 합성이 유도되었고, total polymer에 대한 3HV(3-hydroxyvalerate)의 혼합비율은 20~30 mol%였으며, 3HV의 혼합비율은 배양시 첨가되는 propionate 농도, glucose 농도, 배양시 propionate의 첨가 시기, 그리고 사용된 배지의 종류에 따라 조절될 수 있으며, propionate의 농도가 세포 성장에 저해를 주지 않는 상한선으로 첨가했을 때 가장 높은 3HV 혼합비율인 50 mol%를 얻음을 보고하였다. 같은 해에 독일의 Steinb chel 등[39]은 *A. eutrophus*로부터 분리한 PHA 합성 유전자를 pUC9-1::PP1, pSUP202::PP1, pVK101::PP1를 이용하여 *E. coli* JM83, K-12에 cloning한 재조합 균주를 0.5~1.0%(w/v) glucose를 함유한 LB 배지에서 배양하여 세포 건량의 30%까지 PHB를 축적하였고, 같은 유전자를 pRK2013을 이용하여 *P. oleovorans* GPol에 cloning한 후 NE2 배지에서 50~60시간 배양할 경우 세포 건량의 50%에 해당하는 PHB가 축적되었음을 보고하였으며, 또한 *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17023 유래의 PHA 합성 유전자를 pEH140을 이용하여 *A. eutrophus* PHA-4

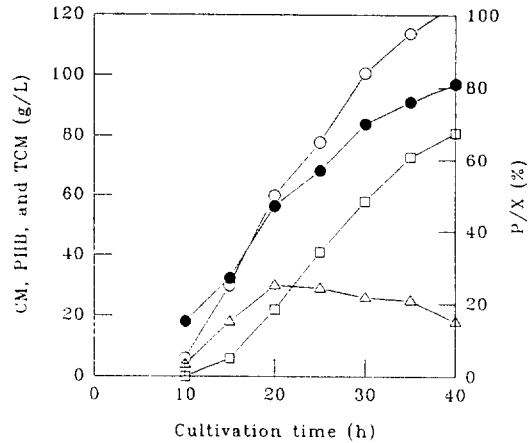


Fig. 9. The time courses of cell mass, PHB, and P/X during the fed-batch culture of XL1-blue (pSYL 104) in complex medium[40]. ○; cell mass, □; PHB, △; true cell mass, ●; P/X, CM; cell mass, TCM; true cell mass.

(DSM541)에 cloning한 후 nutrient broth(NB) 배지에서 배양했을 때 세포 건량중 80.1%가 PHB로 축적됨을 보고 하였다. 한편 재조합 균주의 고농도 배양은 국내의 Lee 등[40]에 의하여 수행되었다. Fig. 9는 *A. eutrophus* 유래의 PHA 합성 유전자를 cloning한 pSYL101, pSYL 102, pSYL103, pSYL 104를 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 얻은 재조합 균주를 pH-stat fed-batch 방법으로 glucose를 함유한 LB 배지에서 배양한 결과이다. Medium copy number plasmid인 pSYL103의 경우 세포 건량의 35.5%까지 PHB가 축적되었고, high copy number plasmid인 pSYL104의 경우는 39시간 배양 후 최고 80.1%의 PHB 축적율을 나타내었음을 보고 하였으며, 균체 최대농도도 101.4 g/L에 이르렀다.

본 연구실에서는[41] oligodeoxyribonucleotides probe과 colony hybridization 방법을 이용하여 *A. eutrophus* H16으로부터 phbCAB operon을 포함하는 5.2 kb DNA 절편을 분리하여 pSK(+)을 vector로 하여 *E. coli* 52α를 형질전환시킨 후 2% glucose를 포함한 LB 배지를 사용하여 발효조에서 18시간 배양하여 세포 건량의 35%에서 70%까지 PHB가 축적됨을 보고한 바 있다. 상기 재조합 균주를 이용한 PHB의 생합성에 관련된 분자생물학적 및 배양공학적 연구를 수행중에 있다.

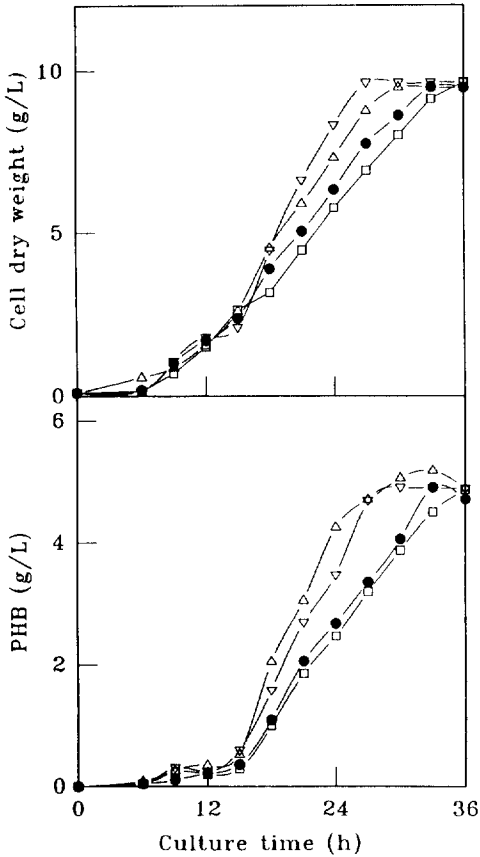


Fig. 10. Cell growth (A) and PHB accumulation (B) of *Alcaligenes eutrophus* H16 and its transformants in 2.5 L fermentor[42]. All Cells were cultivated in synthetic medium containing 20 g/L of fructose and 2 g/L of NH_4Cl at pH 7.0, 30°C, 400 srpm, and 1 vvm. ●; *Alcaligenes eutrophus* H16, △; *Alcaligenes eutrophus* H16/*phbCAB*, □; *Alcaligenes eutrophus* H16/*phbCB*, ▽; *Alcaligenes eutrophus* H16/*phbC*.

또한 *phbCAB* genes 전체 또는 일부를 *E. coli*-*A. eutrophus* shuttle vector system에 결합시킨 재조합 *phbCAB* plasmid를 제조하였으며, 이를 모균주인 *A. eutrophus*에 다시 electroporation 방법으로 도입하여 안정성있는 형질전환체들을 확보한 바있다[42]. 얻어진 형질전환체들을 fructose를 함유한 합성배지에서 배양한 결과 Fig. 10에서와 같이 형질전환균주들의 세포성장속도와 PHB 축적속도가 모균주에 비하여 현저히 증가되어 PHB 생산성을

크게 증가시킬 수 있는 가능성을 확인하였으며, 현재 배양공학적인 연구를 수행중에 있다[42].

재조합 균주를 이용한 PHA의 생합성에 관한 연구는 plasmid의 안정성 증대를 위한 연구, 세포의 과대성장을 막으며 PHA의 축적을 유도시키는 배양공학적인 연구, PHA 생합성에 필수적인 acetyl-CoA와 NADPH_2 의 효율적 공급 방법의 확립의 모색, 그리고 경제적인 합성 배지에서 배양시킬 수 있는 형질전환체의 개발 등의 방향으로 전개될 것이 예상된다.

참고문헌

1. Dawes, A. E. 1990. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. pp. 3-16.
2. Dawes, A. E. 1986. *Microbial Energetics*. Blackie Chapman and Hall, New York, pp. 158-164.
3. Holmes, P. A. 1986 *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
4. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nagamura, and K. Soga. 1988. *Macromolecules*. **21**: 2722-2727.
5. Schubert, P., A. Steinb chel and H. G. Schlegel. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
6. Slater, S. C., W. H. Voige and D.E. Dennis. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 4431-4436.
7. Peoples, O. P. and A. J. Sinskey. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 15298-15303.
8. Peoples, O. P. and A. J. Sinskey. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15297.
9. Dawes, A. E. 1990. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. pp. 417-453.
10. Steinb chel, A. E. Hustede, M. Liebergesell, U. Pieper, A. Timm and H. Valentin. 1992. *FEMS Microbiology Reviews*. **103**: 217-230.
11. Schlegel, H. G. and A. Steinb chel. 1992. *FEMS Microbiology Reviews*. **103**: 91-376.
12. Steinb chel, A. 1991. *Biomaterials*. David Byrom, ed. pp. 132-143.
13. Anderson, A. J. and E. A. Dawes. 1990. *Microbiol. Rev.* **54**: 450.
14. Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga. 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 330-334.
15. Haywood, G. W., A. J. Anderson, L. Chu and E. A. Dawes. 1988. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**:

- 91-96.
16. Haywood, G. W., A. J. Anderson, L. Chu and E. A. Dawes. 1988. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 259-264.
17. Haywood, G. W., A. J. Anderson and E. A. Dawes. 1989. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 1-6.
18. Hippe, H. and H. Schlegel. 1967. *Arch. Mikrobiol.* **56**: 278-299.
19. Wallen, L. L. and W. K. Rohwedder. 1974. *Environ. Sci. Technol.* **8**: 576-579.
20. Moskowitz, G. J., J. M. Merrick. 1969. *Biochemistry* **8**: 2748-2755.
21. Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink and B. Witholt. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2924-2932.
22. Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1977-1982.
23. Timm, A. and A. Steinbchel. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.
24. Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. F. EWing, and E. A. Dawes. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3354-3359.
25. Anderson, A. J., G. W. Haywood, D. R. Williams and E. A. Dawes. 1990. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. E. A. Dawes, Kløver and Dordrecht, eds. pp. 119-129.
26. Ruhr, E. M. 1977. Ph.D thesis, Universitat Gottingen, FRG.
27. Weitzman, P. D. J. and P. Dunmore. 1969. *Biochim. Biophys. Acta.* **171**: 8.
28. Eidels, L. and J. Preiss. 1970. *J. Biol. Chem.* **245**: 2937.
29. Liebergesell, M. and A. Steinbchel. 1992. *Eur. J. Biochem.* **209**: 135-150.
30. Timm, A. and A. Steinbchel. 1992. *Eur. J. Biochem.* **209**: 15-30.
31. Huisman, G. W., E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra, and P. Witholt. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**: 2191-2198.
32. Huisman, G. W. 1991 Ph.D. Thesis, Rijksuniversiteit Groningen.
33. Hustede, E., A. Steinbchel and H. G. Schlegel. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 285-290.
34. Pieper, U. and A. Steinbchel. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 73-80.
35. McInerney, J. J., D. A. Amos, K. S. Kealy and J. Palmer. 1992. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 195-206.
36. Schubert P., N. Krüger, and A. Steinbchel. 1991. *J. Bacteriol.* **173**: 168-175.
37. Peoples, O. P. and A. J. Sinskey. 1989. *Mol. Microbiol.* **3**: 359-357.
38. S. Fidler and D. Dennis. 1992. *FEMS Microbiology Reviews*, **103**: 231-236.
39. Preusting, H., J. Kingma, G. Huisman, A. Steinbchel and B. Witholt. 1992. *International Symposium on Biodegradable Plastics*. pp. 14-28, Korean Science and Engineering Foundation, Seoul, 23 November.
40. S. Y. Lee, H. N. Chang, and Y. K. Chang. 1993. *93' BPERC International Symposium*, pp. 39-46, BPERC, Taejon, KAIST, 10 September.
41. Kim, G. T., J. S. Park, H. C. Park, Y. H. Lee, T. L. Huh. 1993. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 221-228.
42. Park, H. C., J. -S. Park, Y. -H. Lee, and T. -L. Huh. 1994. Abstract of IUMS Congress '94. p. 276, International Union of Microbiological Societies, Prague, 3-8 July.