

*Polyhydroxyalkanoates*의 생산 및 응용

†이 상 업 · 이 영 · 최 종 일
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

Production and Application of Polyhydroxyalkanoates

Sang-Yup Lee[†], Young Lee and Jong-Il Choi

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,
KAIST, Taejeon 305-701, Korea

ABSTRACT

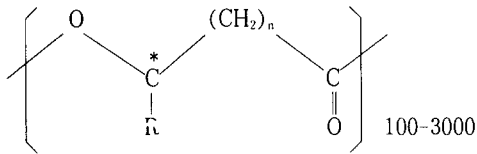
Polyhydroxyalkanoates[PHAs] are the polyester of hydroxyalkanoates(HAs) synthesized by numerous bacteria as an intracellular carbon and energy storage compound and accumulated as granules in the cytoplasm of the cells under unbalanced growth condition in the presence of excess carbon source. Even though PHAs have been recognized as good candidates for biodegradable plastics, their high price compared with conventional plastics has limited their use in a wide range of applications. To reduce the high production cost of PHAs, many group of scientists have devoted much efforts to improve productivity by employing various microorganisms and by developing efficient culture techniques. The strategies of producing PHAs to a high concentration with high productivity and their potential applications are reviewed.

서 론

플라스틱 물질의 사용은 일상생활에 편리함을 주지만 자연계에서 분해가 되지 않아 심각한 환경문제를 초래하고 있다. 이러한 플라스틱 쓰레기의 양을 줄이기 위해 재활용과 쓰레기 종량제와 같은 정부차원에서의 관리 프로그램이 전세계적으로 도입되었다. 이와 더불어 일부 플라스틱을 대체하여 생분해성 플라스틱을 사용하는 것이 또 다른 해결책으로 등장하였다. 생분해성 플라스틱의 하나인 PHA는 불균형적 성장조건에서 과잉 탄소원이 존재할 경우 많은 미생물들이 합성·축적하는 폴리에스터 구조의 천연 저장 합성물로서 기존의 화학 합성고분자와 유

사한 특성과 뛰어난 생분해성으로 인하여 관심의 대상이 되고 있다(1-5). 흔히 발견되는 poly-(3-hydroxybutyric acid) [P(3HB)] 외에도 많은 다른 3-, 4- 또는 5-hydroxyalkanoic acid로 이루어진 PHA들이 지난 수년간 발견되어 이 고분자들의 구성물로 알려졌으며 이제까지 60여 종의 다른 단량체가 보고되었다(6, 7). PHA는 단량체(monomer)내의 탄소원자의 숫자에 따라 3~5개의 탄소원자를 가지는 short-chain-length PHA(PHA_{SLC})와 6~14개의 탄소원자를 가지는 medium-chain-length PHA(PHA_{MCL})의 두 그룹으로 나눌 수 있다(6). PHA의 일반적인 구조식을 Fig. 1에 나타내었다. 취화성(brittleness)과 경도, 녹는점 또는 유리 전이점 등의 물리적, 기계적 성질은 단량체 구성이 다른 여러 PHA들에 따라 많이 변화함이 보고되었다(4, 6).

† Corresponding Author



n=1	R=hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
	R=methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
	R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
	R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
	R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
	R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
n=2	R=hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)
n=3	R=hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerate)

*Chiral center in D(-) absolute configuration

Fig. 1. General structure of polyhydroxyalkanoates. Various functional groups described in the text can be incorporated into the R group.

이러한 성질로 인해서 PHA는 일상생활, 농업, 해양, 그리고 의료산업 등 넓은 분야에서의 응용이 제시되었으나(4, 8), 현재까지는 기존의 플라스틱에 비해 비싼 가격으로 인하여 응용범위가 제한되고 있다. 지금까지 300종 이상의 미생물들이 여러 종류의 PHA들을 합성·축적하는 것으로 알려졌다(6). PHA는 불균형적 성장조건에서 과잉 탄소원이 존재할 경우 합성·축적되기 때문에(3, 5) 이러한 조건을 조절하여 효과적으로 PHA를 생산할 수 있는 배양전략들이 개발되었다. 많은 미생물들이 PHA를 축적하고, 균종에 따라 다른 최적조건을 가진다. PHA의 산업적 생산을 위한 균주 선택은 값싼 배지의 이용능력과 성장률, 고분자 합성속도, 고분자 축적률 등과 같은 여러 인자에 기초를 두어야 한다(1, 9, 10). 또한 원하는 생산물의 높은 생산성과 수율을 얻기 위해 필수적인 배양전략도 연구되어야 한다. 고농도의 세포를 얻기 위한 가장 일반적으로 사용되는 방법은 유가식 배양이다(11). 연속식 배양법은 유가식 배양보다 높은 생산성을 얻을 수 있지만 오염의 위험이 따른다. 오염없이 안정하게 배양이 유지될 수 있으면 연속식이 유가식 배양보다 높은 생산성을 나타낼 수 있다.

본 총설에서는 이제까지 PHA의 효과적인 생산을 위하여 개발된 *Alcaligenes eutrophus*(2), *Alcaligenes latus*(12), *Azotobacter vinelandii*(13), me-

thylotrophs(14, 15), *Pseudomonads*(16), 그리고 재조합 대장균(1, 17) 등의 배양공정을 살펴 보고 각각의 장단점을 제시하였으며 응용가능분야를 제시하였다.

Alcaligenes eutrophus

PHA를 축적하는 많은 박테리아들 중 *A. eutrophus*는 건조균체에 대한 중량비로 약 80%나 되는 많은 양의 P(3HB)를 축적할 수 있어 가장 널리 연구되었다. Chemolithoautotrophic aerobic bacterium인 *A. eutrophus*에서의 PHA 합성 관여 대사는 잘 알려져 있다. β -ketothiolase(EC2.3.1.9), NADPH를 보조인자로 사용하는 acetoacetyl-CoA reductase(EC1.1.1.36)과 PHA synthase의 세 효소가 acetyl-CoA에서 P(3HB)로의 변환에 관여한다(5, 6). 1981년에 Imperial Chemical Industries (현재의 ZENECA Bio Products, UK)에서는 3HB와 3-hydroxyvalerate(3HV)의 copolyester인 P(3HB-co-3HV)가 *A. eutrophus*에 의해 glucose와 propionic acid로부터 합성될 수 있다는 것을 발견하였고(2, 19), 그 이후로 여러 종류의 탄소원들로부터 여러 종류의 copolymer들이 *A. eutrophus*에 의해 합성될 수 있음이 알려졌다(3, 4, 6). ICI는 PHA의 생산과 회수에 관한 여러개의 특허를 획득했고 현재 glucose와 glucose-propionic acid 혼합물에서 각각 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)를 *A. eutrophus* H16의 glucose 이용 변이균주를 이용하여 유가식 배양으로 생산하고 있다(2, 18, 19). 현재 연간 600톤의 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 공장이 가동중이고 연간 1,000톤의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있는 공장이 새로 건립될 예정이다. P(3HB-co-3HV)는 Biopol이라는 상표로 약 \$16/kg의 비싼 가격으로 미국, 일본, 유럽 등지에서 판매되고 있다.

ICI는 균체성장기와 고분자 축적기의 두 단계로 공정을 나누는 영양제한 전략에 의해 PHA를 생산한다. 질소나 인산과 같은 여러 종류의 영양성분에 의한 PHA의 합성·축적에 대한 제한효과가 검토되었고 ICI 공정에서는 인산이 제한인자로 선택되었다(2). 우선 *A. eutrophus*는 원하는 정도의 세포성장까지만 유지되도록 제한된 양의 인산을 포함하는 glucose-염 배지에서 배양된다. 약 60시간의 세포성장 후 인산제한에 이르며, 이후 40~60시간 동안 glucose가 첨가되어 약 70~80%의 P(3HB)의 축

적이 이루어진다(2, 18). P(3HB-co-3HV)의 생산 공정은 고분자 축적기에 glucose와 propionic acid가 같이 공급되는 것을 제외하곤 P(3HB)의 생산 방법과 유사하다. 고분자 내의 3HV 함유율은 glucose와 propionic acid의 비를 바꿈으로써 조절 가능하며 일반적으로 0~30mole%의 3HV를 포함하는 P(3HB-co-3HV) copolymer가 생산된다(2, 18). 더 높은 비율(90mole%까지)의 3HV를 포함하는 copolymer는 butyric acid와 pentanoic acid를 기질로 하여 생산할 수 있지만(3), 산업적 규모의 생산은 보고된 바 없다.

Kim 등은 *A. eutrophus* H16의 glucose 이용 변이균주인 *A. eutrophus* NCIMB11599의 유가식 배양으로 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)를 고농도로 생산하였다(20, 21). Glucose 농도를 최적치로 유지하기 위해 두 가지 방법, 즉 mass spectrometry로 CER을 측정하여 glucose를 근사하는 방법과 on-line glucose analyzer를 사용하여 배양액으로부터 직접 glucose 농도를 제어하는 방법을 사용하였다. 이때, glucose 농도는 이 균주의 성장에 최적치인 10~20g/l로 유지되었고, 고분자의 축적을 유도하기 위해 질소원을 제한하였다. 세포 성장기에는 pH의 조절과 질소원의 공급을 위해 암모니아수를 사용하였으나, 세포중량이 원하는 값에 이르면 질소원 제한을 위해 NaOH/KOH 혼합용액으로 대체하였다. 이때 질소원 제한의 적절한 도입시기를 찾는 것이 중요한데 도입시기가 너무 이르면 최종 PHA 농도가 너무 낮게 되고, 너무 늦으면 세포중량에 비해 불완전한 축적, 곧 낮은 PHA 함유율을 야기한다. Kim 등은 질소원 제한 도입시기를 변화시키며 일련의 유가식 배양을 수행하여, 세포농도가 70g/l에 이르기까지는 세포농도가 높을수록 최종 P(3HB) 농도와 생산성이 증가하나 90g/l 이후로 도입시기를 늦추면 배양의 불안정성으로 인하여 고분자 농도가 감소한다는 결과를 얻었다(20). 이때 50시간만에 최종 세포중량과 P(3HB) 농도 및 함유량은 각각 164g/l, 121g/l, 76%로 얻어졌고, 생산성은 보고된 값들 중 가장 높은 값인 2.42g/l-h를 얻었다.

P(3HB-co-3HV)의 생산을 위한 *A. eutrophus*의 유가식 배양도 위와 유사한 기질 공급 전략으로 수행되었고, 이때 glucose 농도는 on-line glucose analyzer를 사용하여 제어하였다(21). 세포 농도가 약 60~70g/l에 이를 때까지의 성장기에는 glucose만을 기질로 사용한 후 축적기에는 공급기질을

glucose와 propionic acid의 혼합용액으로 바꾸어 고분자를 축적시켰다. 이때, 고분자 축적기에 P/G 비율(공급기질의 glucose에 대한 propionic acid의 비율)을 변화시켜가며 수행하였다. P/G 비율을 0.17에서 0.52로 증가시킴에 따라 최종 세포농도와 PHA 농도가 각각 158과 117에서 113과 64g/l로 감소하였고, PHA 함유율과 생산성도 각각 74에서 56.5%와 2.55에서 1.64g/l-h로 감소하였다(21). 공중합 고분자의 3HV 함유비는 P/G 비율이 증가함에 따라 14.3mole%까지 증가하였다. Propionic acid에 대한 3HV의 수율과 총 기질에 대한 총 PHA 생산 수율은 P/G 비율이 증가함에 따라 모두 감소하였다. P/G 비율이 0.17, 0.35, 0.52일 때 3HV 최종 수율은 각각 0.344, 0.324, 0.293(g 3HV/g propionic acid)이었으며 총 PHA 수율은 각각 0.3, 0.221, 0.2(g PHA/g substrate)로 얻어졌다(21).

에탄올 또한 *A. eutrophus* 변이균주에 의한 P(3HB)의 생산에 기질로써 사용될 수 있다(2). P(3HB-co-3HV)는 질소원 제한상태에서 에탄올과 함께 propanol을 더해 줌으로써 생산될 수 있다(22). 최근 *A. eutrophus* NCIMB12080의 유가식 배양에 의해 alcohol로부터 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)의 생산이 보고되었으나 최종 PHA 농도는 50시간 후에 50g/l 보다 낮은 값을 얻었으며(23), 산업적 관점에서 볼 때 에탄올은 탄수화물보다 비싸기 때문에 PHA 생산에 좋은 기질이 되지 못한다.

A. eutrophus H16은 수소, 이산화탄소, 공기의 혼합기체에서 성장할 수 있는 chemolithoautotrophic bacterium이다(5, 24). 따라서 발효기질로 수소, 이산화탄소를 이용하는 것은 경제적으로 흥미를 끄는 공정이라 생각되어져 왔다. 그러나 공장건설 및 가연성 혼합기체의 안전한 운전과 관련된 기술적 문제에 대한 조사결과, 높은 자산비용으로 인해 비경제적이란 결론을 내리게 했다(2). 그럼에도 불구하고 수소, 이산화탄소 혼합기체로부터의 P(3HB) 생산을 연구하여 공급기체를 완전히 소모하게 하는 재순환 기체 폐쇄회로공정이 개발되었다(25). 이 경우에 암모늄 제한보다는 산소제한이 적합함이 발견되었고(26), 특수제작된 발효기에서 40시간의 배양으로 세포중량과 P(3HB) 농도가 각각 91와 61.9g/l로 얻어졌다(27). 혼합기체로부터의 PHA 생산은 현재 일본의 gas company와의 공동과제로 진행되고 있으며, 안전성 문제가 우선적으로 해결되어야 할 것이다.

Alcaligenes latus

PHA가 생분해성 플라스틱 원료로써 가능성이 높아짐에 따라 1980년대 중반 오스트리아의 회사 Chemie Linz AG에서도 P(3HB) 생산 연구를 시작하였으며, 나중에 Petrochemie Danubia가 된 이 회사의 고분자 팀은 *A. latus*에 의한 P(3HB) 생산에 대해 여러 특허를 취득했다(28-30). Chemie Linz와 다른 오스트리아 회사들이 연합하여 만든 biotechnologische forschungesellschaft mbH(btF)에서는 15m³ 크기의 발효조에서 *A. latus* DSM1124에서 유도된 높은 P(3HB) 생산성을 갖는 변이균주 *A. latus* btF-96을 사용하여 주당 1톤의 P(3HB)를 생산하는 공정을 개발하였다(12, 31). *A. eutrophus*에 비하여 *A. latus*는 성장속도가 빠르고, 값이 저렴한 sucrose를 탄소원으로 이용할 수 있으며 성장과 더불어 P(3HB)를 축적하는 장점을 갖고 있다. *A. latus*의 유가식 배양으로 sucrose로부터 60g/ℓ 이상의 P(3HB)를 생산한 것이 보고되었다(31). 이 회사는 현재 PHA의 응용분야 미확보 문제로 문을 닫은 상태이지만 학계에서는 이 균주의 여러 장점들 때문에 지속적인 연구를 하고 있는 상태이다. 최근 일본 나고야대학의 Yamane 교수팀은 *A. latus* DSM1123을 이용하여 P(3HB) 생산성이 2.6g/ℓ-h로 매우 높은 연속식 배양법을 개발하고 지속적으로 연구하고 있다(Lee, S. Y., personal communication). 이 연속식 배양법은 세포성장과 고분자 축적이 장기간 안정하게 유지만 된다면 현재 사용중인 공정을 대체할 수 있는 좋은 공정이 될 것이다. 그렇지 않을 경우이라도 btF에서 개발한대로 유가식 배양에 의해 *A. eutrophus*와 같은 좋은 결과를 얻을 수 있다. *A. latus*에 의한 PHA의 생산이 갖는 최대의 장점은 무엇보다도 값이 싼 sucrose과 같은 저가의 탄소원을 이용할 수 있는 것이라 하겠다.

Azotobacter vinelandii

캐나다의 W. Page 연구진은 *A. vinelandii*를 이용한 PHA 생산을 연구해 왔으며, 그들이 이용한 균주는 건조세포중량의 75% 이상에 달하는 많은 양의 PHA를 축적할 수 있는 변이균주 *A. vinelandii* UWD(ATCC53799)이다(32). 이 균주는 산소제한에 의하여 고분자를 축적하진 않으나 산소제한이 glucose로부터의 고분자 변환효율을 증진시킨다. *A. vinelandii* 야생균주 UW가 단지 0.05g P(3HB)/g

glucose의 수율로 고분자를 축적함에 비해 *A. vinelandii* UWD에 의한 수율은 0.33으로 매우 높았다(32). 이 균주의 또 하나의 장점은 다른 *Azotobacter*와는 달리 PHA 수율을 저하시키는 세포외 다당류를 합성하지 않는 것이다.

여러 복합 탄소원 및 질소원을 이용한 *A. vinelandii* UWD의 배양실험에서 사탕무우와 수수당밀과 같은 비정제 탄소원에서 P(3HB)가 더 잘 합성되었으며, 값싼 사탕무우 당밀을 사용한 flask 배양으로 7g/ℓ 이상의 P(3HB)를 축적한 연구는 배지 비용 감소 면에서 흥미를 끈다(13, 33, 34). *A. vinelandii*는 배양시 사탕무우 당밀배지에 valeric acid 또는 heptanoic acid를 첨가하면 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성할 수 있었으며, valeric acid의 농도를 조절함으로써 3HV 함유율이 23mol%에 달하는 공중합체를 얻을 수 있었다(35). 그러나 valeric acid는 propionic acid보다 값이 비싸기 때문에 이 균주에 의한 copolymer의 생산은 아직까지 비경제적이라 할 수 있다. 복합질소원을 첨가해 줌으로써 P(3HB) 수율을 높일 수 있었으며(34), fish peptone이나 protease peptone, 또는 yeast extract를 단지 0.05~0.2% 첨가함으로써 최대 25배까지의 PHA 합성·축적의 증대효과가 나타났다(34). 복합 질소원에 의한 PHA 생산 증진 효과는 세포의 *de novo* amino-N 합성 요구도의 감소에 의한 것으로 설명할 수 있는데, 흥미롭게도 세포 성장은 증대시키지 않으며 PHA 합성만을 촉진하였다(13). 그러나 최적 조건에서도 생산성은 *A. eutrophus*나 *A. latus*에 의해 얻을 수 있는 것에 비해 낮은 0.68g P(3HB)/ℓ-h에 불과했다.

Fish peptone 첨가 배지에서 배양한 *A. vinelandii* UWD 세포는 깨어지기 쉬어서 45℃에서 10분간의 1N NH₃ 수용액(pH 11.4) 처리만으로 쉽게 P(3HB)를 추출할 수 있었다(36). 이 방법으로 94%의 P(3HB)와 2%의 단백질, 4%의 잔여 세포 구성물로 구성된 고분자 혼합물을 얻을 수 있었다(36). 배양법이 더 개선되어 *A. eutrophus*나 *A. latus*와 비슷한 수준의 PHA 생산성을 얻을 수 있게 되면 *A. vinelandii* UWD는 값싼 기질을 사용할 수 있다는 점과 효과적 정제공정을 갖는 장점으로 인하여 좋은 PHA 생산균주가 될 것이다.

Methylotrophs

메탄올은 발효에 사용될 수 있는 가장 싼 탄소원

중 하나로써 영국의 ICI 사는 *Methylobacterium organophilum* 종의 여러 균주들을 이용한 여러 P(3HB) 생산 공정을 개발하여 특허를 취득했으나(37), 상대적으로 낮은 고분자 축적량으로 인해 P(3HB)를 회수하기 위해 더 많은 생체물질을 공정에 투입해야 하는 등의 문제점으로 메탄올의 사용이 경제성이 없는 것으로 결론지었다(2). 그럼에도 불구하고 메탄올의 낮은 가격으로 인하여 많은 연구자들이 새로 동정한 메탄올 자화균주를 사용하고 효과적인 배양기술을 개발하여 PHA 생산공정을 개선하려는 노력을 기울이고 있다.

T. Yamane 그룹은 메탄올을 탄소원으로 하는 *Protomonas extorquens* K의 완전 자동화된 유가식 배양으로 136g/ℓ란 높은 농도의 P(3HB)를 생산하였다(14, 38). 탄소와 질소 비율을 최적화하여 최종 세포 및 P(3HB) 농도가 170시간만에 0.2g P(3HB)/g 메탄올의 수율로 각각 233과 149g/ℓ로 얻어졌으나(14), 생산성은 *A. eutrophus*나 *A. latus*보다 낮은 0.88g P(3HB)/ℓ-h에 불과했다. 평균 분자량은 메탄올 농도를 변화시키기에 따라 5×10^4 에서 8×10^5 까지 크게 변화하였고, 배지 내의 메탄올 농도가 낮을수록 높은 분자량을 얻을 수 있었다(39). 이 균주는 후에 *Methylobacterium extorquens* K로 명명되었고(15), *M. extorquens* K와 또 다른 메탄올 자화균주인 *Paracoccus denitrificans*는 질소 제한 배지에 탄소원으로 메탄올과 n-amyl alcohol이 함께 사용될 때 P(3HB-co-3HV) 공중합 고분자를 합성한다는 것이 밝혀졌다(15, 40). 두 탄소원의 농도비에 따른 HV 함유율의 변화 정도는 두 균주가 서로 크게 다르며 *P. denitrificans*의 경우는 n-amyl alcohol 농도를 증가시키기에 따라 최대 91.5mol%까지 함유율이 증가함에 비해 *M. extorquens* K의 경우는 최대 38.2mol%에서 더 이상 증가하지 않았다(15). 아직 보고된 바는 없지만 기질 공급이 제어되는 유가식 배양에 의해 높은 농도의 공중합 고분자도 얻어질 수 있을 것으로 기대된다.

또한 다른 몇몇 그룹들이 다른 메탄올 자화균주들에 대한 PHA 생산을 연구하고 있다. *Methylobacterium sp.*(KCTC0048)은 메탄올을 주 탄소원으로 하는 질소제한 배양에 valeric acid, pentanol, 4-hydroxybutyric acid, 또는 1,4-butanediol을 부가적 탄소원으로 첨가하면 여러 공중합 고분자를 합성하지만(41), 이들의 유가식 배양은 보고된 바 없다. 캐나다의 한 그룹은 새로 분리한 *M. extorquens*에 의한 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV) 생산을 보고하

였다(42). 세포와 P(3HB) 농도는 유가식 배양에서 메탄올 농도를 1.4g/ℓ로 제어하였을 때 각각 120과 60g/ℓ로 얻어졌다(Lee, S. Y., personal communication).

메탄올 자화균주를 이용한 PHA 생산은 저렴한 기질인 메탄올로부터 높은 농도의 PHA를 얻을 수 있어 관심의 대상이 되지만, PHA 함유율이 일반적으로 *Alcaligenes*나 *Azotobacter*보다 낮고 생산성도 최대값이 *M. extorquens*의 0.88g PHA/L-h로(14) *A. eutrophus*의 2.42보다 상당히 낮았다(20). 따라서 저가의 메탄올을 사용한다는 장점을 제대로 살리고 낮은 생산가로 PHA를 생산하기 위해서는 공정을 더욱 개선해야 한다. 또한 메탄올 자화균주에 의해 합성한 PHA 평균 분자량도 *Alcaligenes*나 *Azotobacter*로부터 얻은 것보다 일반적으로 낮다는 특성이 고려되어야 한다.

Pseudomonads

Pseudomonads는 많은 자연환경에 널리 분포되어 있으며 6~14개의 탄소원자로 구성된 medium-chain-length PHA(PHA_{MCL}) 합성능을 갖고 있다(43, 44).

여러 종류의 MCL-3-hydroxyalkanoic acids를 갖는 PHA는 n-octane에서 자라는 *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347의 세포에서 처음 검출되었다(45). 6~11 탄소원자를 갖는 6가지 다른 유형의 단량체로 구성된 PHA들이 C₆-C₁₀ n-alkanoic acids에서 자란 *P. oleovorans* 안에 형성되며, 최대 30%의 고분자 함유율과 9×10^4 에서 3.7×10^5 까지의 평균 분자량 범위를 갖는다(46). *P. oleovorans*가 C₆-C₁₀ n-alkanes와 1-alkenes에서 성장하면 각각 포화 단량체와 포화 및 불포화 단량체를 갖는 PHA_{MCL}을 합성하며, 이때 불포화 단량체의 비율은 배지 내의 alkanes에 대한 alkenes의 비로 조절할 수 있는데, 이것은 화학적 수식이 가능한 여러 종류의 고분자를 개발하는 데에 유용하다(47). 다른 pseudomonads에 대한 연구로부터 rRNA homology 그룹 I에 속한 모든 형광 pseudomonads가 PHA_{MCL}을 합성할 수 있다는 것이 알려졌다(43, 44, 48). 이 PHA_{MCL}의 조성은 기질 탄소원 backbone의 길이에 좌우되고(43, 48), 또한 *P. oleovorans*를 제외한 대부분의 형광 pseudomonads가 탄수화물과 같은 비연관 탄소원으로부터 PHA_{MCL}을 합성한다고 밝혀졌다(48, 49). 기질로 C₆-C₁₀ alkane이나 alkanol, 또는

alkanoic acid가 사용될 때는 PHA_{MCL}의 단량체가 β -oxidation 경로로부터 유도되고, 탄수화물이나 gluconate가 사용될 경우에는 *de novo* 지방산 합성 경로로부터 유도된다고 제안되었다(46-49). Glucose에서 배양한 *P. putida*에서의 포화 및 불포화 단량체를 포함하는 PHA_{MCL}의 합성은 후자의 가설을 간접적으로 뒷받침하며, 방사선 동위원소를 갖는 탄소기질인 1-¹³C-decanoic acid와 1-¹³C-acetic acid를 사용한 *P. putida* 지방산 대사 경로의 ¹³C NMR 연구에 의해 위의 가설들이 증명되었다(50, 51). 1-¹³C-hexanoic acid를 기질로 사용하여 대사중간물을 분석함으로써 β -oxidation과 *de novo* 지방산 합성경로의 두 지방산 대사경로가 독립적으로 PHA 합성에 작용한다는 것이 밝혀졌다(51).

이외에도 olefin, branched alkyl, halogen, phenyl 기 등이 첨가된 다양한 PHA_{MCL}가 여러 종류의 pseudomonads에 의해 합성되어진다고 보고되었는데(52, 53), 이는 잠재적으로 유용한 성능을 갖는 다양한 PHA의 합성가능성을 제시했다는 의미에서 중요하다. 그러나 이러한 특이한 PHA는 고가의 기질요구와 기질의 독성 때문에 대량생산 연구는 전무한 상태이다.

현재 스위스 ETH로 자리를 옮긴 B. Witholt 그룹에서는 *P. oleovorans*의 고농도 배양을 통한 PHA_{MCL}의 생산(54)을 연구하여 부피비 15%의 n-octane을 포함하는 액-액 2상 배지에서 *P. oleovorans* ATCC29347의 연속식 배양을 수행하였다. 변화하는 dilution rate에서 암모늄 제한조건으로 배양하여 성장물의 함수로 세포농도와 PHA 함유율을 측정하였는데 dilution rate를 0.09에서 0.46h⁻¹로 증가시켰을 때 세포농도는 2.25에서 1.32g/l로 감소한 반면 PHA 함유율은 46.7에서 8.3%으로 크게 감소하였다(55). 정상상태의 세포농도를 증가시켜 PHA 생산성을 높이기 위해 제한 영양물인 암모늄 농도를 16.7에서 116.7mM로 증가시키고 배지 최적화와 산소전달률의 증가를 통해 정상세포농도를 11.6g/l로 높일 수 있었고 0.58g PHA/L-h의 PHA 생산성을 얻었다(56).

Octane을 탄소원으로 하는 *P. oleovorans*의 유가식 고농도 배양도 수행되었는데(16), 고농도의 균체를 얻기 위해서는 매우 효과적으로 산소가 전달되는 반응기의 설계가 필요하였다. 실험에 쓰인 반응기에서는 공기 흐름 속도가 2 l/min이고 교반속도가 2500rpm일 때 부피산소전달계수가 0.49s⁻¹의 높은 값이었다. 이 반응기를 magnesium과 제한 영양물

인 암모늄의 최적 첨가량으로 운전하여 38시간만에 세포 및 PHA 농도가 각각 37.1과 12.1g/l로 얻어졌으며 PHA 함유율과 생산성은 각각 33%와 0.32g PHA/L-h였다(16).

본 연구진은 octanol과 octanoic acid를 탄소원으로 하여 *P. oleovorans*의 유가식 배양을 수행하였는데 반응기의 낮은 산소전달용량으로 인하여 순수 산소를 공급하였다. 산소 사용시 폭발의 위험성 때문에 octane을 탄소원으로 사용하지 않고 octanoic acid를 탄소원으로 하여 수행하였고 공급기질로 octanoic acid와 황산 암모늄, 황산마그네슘이 간헐적으로 공급되었다. 45시간의 배양으로 세포농도와 PHA 농도, PHA 함유율이 각각 41.8과 15.5g/l, 37.1%으로 얻어졌다(Lee, S. Y., unpublished results). 유가식 배양이 40시간 정도 진행되었을 때 octanoic acid가 축적됨으로 인하여 세포성장이 저해되었다. 식물로부터 추출될 수 있기 때문에 octanoic acid보다 저렴한 octanol을 탄소원으로 사용하면 40시간만에 약 14g/l의 PHA를 축적하며 octane보다 사용이 안전하고 가격이 적당하기 때문에 좋은 기질로 생각될 수 있었으나 배양액으로부터 세포를 분리하기가 어렵다는 문제점이 있음을 알았다(Lee, S. Y., unpublished results).

*P. oleovorans*에 의한 PHA_{MCL}의 경제적 생산을 위해서는 배양방법을 더 개선할 필요가 있다. 유가식 배양에 의한 생산에서는 배양온도와 산소 전달 방법등의 최적화에 의해 높은 산소요구량을 낮추는 것이 요구되며, *P. oleovorans*는 연속배양시 적어도 1달 이상 안정하기 때문에(56) 연속배양도 효과적 인 방법으로 생각된다.

Recombinant *Escherichia coli*

1988년에서 1989년 사이에 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자가 세 연구진에 의해 대장균에 클로닝되었다(57-60). 이 유전자들은 sequence가 밝혀졌고 특성이 잘 연구되었는데 오페론을 형성하고 자체 promoter로부터 대장균에서 발현함을 알았다(60-62). PHA 생합성 유전자를 갖는 재조합 대장균의 사용은 flask 배양으로 건조세포중량의 약 90%의 P(3HB)를 축적할 수 있기 때문에 매우 흥미로운 것이다(61).

본 연구진은 *A. eutrophus*의 PHA 생합성유전자를 갖는 재조합 대장균의 고농도 배양을 통한 PHA 생산 연구를 수행해왔다(1, 63-74). 재조합 대장균

에서의 PHA 축적에 따른 플라스미드의 복제수 및 안정성의 효과를 조사하기 위해 서로 다른 특성을 갖는 여러 플라스미드들을 제작했다. *A. eutrophus* PHA 오페론이 클로닝된 높은 복제수의 pSYL101과 중간 복제수의 pSYL102 두 플라스미드를 제작했다(65). Flask 배양에서 48시간만에 최종 세포중량과 P(3HB) 농도, P(3HB) 함유율은 XL1-Blue(pSYL101)의 경우 각각 6.2g/l과 4.6g/l, 74.2%인 반면, XL1-Blue(pSYL102)의 경우 각각 4.9g/l과 2.4g/l, 49%에 불과하였다(65). 따라서 대장균에서의 P(3HB)의 고농도 생산을 위해서는 높은 복제수가 필요하다는 것이 알게 되었고, 이는 낮은 복제수의 플라스미드에 비해 높은 복제수의 플라스미드를 사용할 경우 40배까지의 더 높은 농도의 P(3HB)를 생산할 수 있음을 보인 다른 연구에 의해서도 뒷받침되었다(61). 다음으로는 재조합 균주의 발효에 있어서 가장 중요한 인자중 하나인 플라스미드의 안정성을 검사하였다. 산업적 발효시에는 항생제의 사용이 거의 불가능하기 때문에 안정한 균주 시스템의 사용은 매우 중요하다. pSYL101과 pSYL102는 항생제가 없는 배지에서의 연속 계대배양 실험결과 모두 불안정하였다(65). pSYL102와 pSYL101에 플라스미드 R1의 *parB* locus를 클로닝하여 항생제 투여없이 배양할 경우에도 110 generation동안 100% 안정한 pSYL103과 pSYL104를 만들었다.

Luli와 Strohl(75)이 연구한 결과에서 잘 보여졌듯이 서로 다른 균주에 따라 성장속도, 얻을 수 있는 최종 세포농도, 건조균체 수율, 기질 이용속도, 부산물 생성 정도 등이 크게 다르기 때문에 재조합 균주 발효시 숙주 균주는 조심스럽게 선택해야 한다. 본 연구진은 대장균 K12, B, W와 그것의 변이주 등 모두 15개의 대장균 균주에 또다른 안정한 높은 복제수 플라스미드인 pSYL105(Fig. 2)를 도입하여 P(3HB) 합성 및 축적능을 비교하였다. 비교시험한 균주들의 세포성장과 P(3HB) 합성속도, P(3HB) 함유율, P(3HB) 수율, glucose 이용도, 그리고 acetate 생성이 크게 차이 났다(69). pSYL105를 함유하는 XL1-Blue와 B가 20g/l glucose를 포함하는 LB 배지에서 0.2g P(3HB)/g true cell mass-h의 가장 빠른 속도로 P(3HB)를 합성하였고, 48시간만에 플라스크 배양에 의해 최대 7g/l까지의 P(3HB)를 축적하였다(69). P(3HB)를 합성하는 대장균 세포는 filamentation에 의해 길어졌는데 길어지는 원인은 외래 PHA 생합성 유전자의 과다 발현

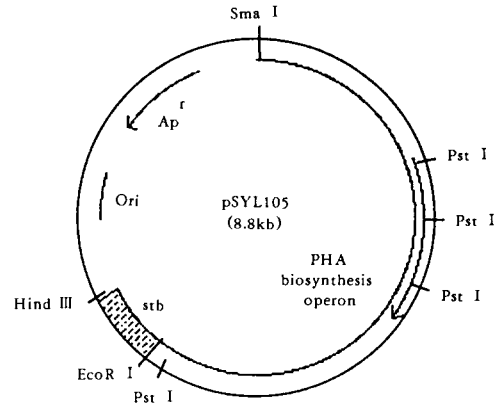


Fig. 2. The restriction map of pSYL105, a stable high-copy-number plasmid used for the construction of recombinant *E. coli* strains synthesizing P(3HB). Abbreviations are: Ap, ampicillin; Ori, origin of replication; r, resistance gene; stb, the *parB* locus of plasmid R1.

이나 고분자 결정의 축적으로 인한 세포분열 단백질인 FtsZ의 불활성화로 인하여 밝혀졌으며(67, 69), PHA 축적 대장균에서 FtsZ를 과다 발현시키면 정상적인 형태의(또는 짧은) 균체로 유지됨을 밝혔다(67). Filamentation이 억제된 대장균에 의해 P(3HB) 생산량도 향상될 수 있음을 보였다(68).

재조합 대장균에 의한 여러 재조합 단백질의 생산에 가장 많이 사용된 방법은 유가식 배양이다. 본 연구진은 재조합 대장균을 이용한 P(3HB) 생산법으로 DO-stat, pH-stat, 비성장속도제어의 여러 기질 공급법을 검사하였고, pH-stat 방식이 가장 적합함을 알아냈다. LB 배지에 20g/l의 glucose와 0.1g/l의 ampicillin을 첨가한 것을 초기배지로 하고 400g/l의 glucose와 100g/l 효모추출물, 100g/l tryptone을 공급기질로 하여 glucose 고갈로 인해 pH가 7.1보다 높아지면 50ml이 pulse로 공급되는 pH-stat 유가식 배양을 XL1-Blue(pSK2665)에 대해 수행하였다. 세포중량과 P(3HB) 농도, P(3HB) 함유율, 그리고 생산성은 각각 42시간만에 117g/l과 89g/l, 76%, 그리고 2.1g P(3HB)/L-h로 얻어졌다(63). 값비싼 항생제의 사용을 피하기 위해 안정한 높은 복제수의 플라스미드 pSYL104를 갖는 XL1-Blue의 배양을 같은 조건에서 항생제 투여없이 수행하여 39시간만에 세포 농도와 P(3HB)

농도로 각각 101과 81g/ℓ을 얻었다(65).

이와 같이 높은 농도의 P(3HB)를 얻을 수 있었으나 많은 양의 값 비싼 효모추출물과 tryptone의 사용은 경제적으로 비효율적이기 때문에, 배지 비용을 낮추려는 목적으로 동일한 기질 공급전략에 의해 단순배지에서 유가식 배양을 수행하였다. 그러나 단순배지에서 얻어진 최종 세포중량과 P(3HB)농도, P(3HB) 함유율은 35시간에 각각 71.4g/ℓ과 16.3g/ℓ, 22.8%으로 P(3HB)이 비효율적으로 얻어졌다(66). P(3HB) 축적량이 적은 이유는 acetyl-CoA의 이용 가능량에 의해 다음과 같이 설명할 수 있다. 대장균에 새로 도입된 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 경로는 citric acid와 acetic acid, 그리고 fatty acid를 합성하는 *E. coli*의 여러 대사경로들과 경쟁관계에 있다(1, 73, 76). 따라서 P(3HB) 합성에 사용할 수 있는 acetyl-CoA의 양은 세포의 대사상태에 좌우되며, 복합배지에서는 아미노산과 비타민들을 포함하는 전구체(precursor)들이 거대 분자의 합성에 사용가능한 상태로 존재하여 PHA 생합성 경로에 충분한 acetyl-CoA를 사용가능하게 한다. 단순배지에서는 더 많은 acetyl-CoA가 생합성 전구체를 합성하는데 사용되기 때문에 P(3HB)합성에 사용가능한 양이 적어진다. NADPH의 재생 또한 PHA 합성경로에서 두번째 효소인 reductase가 보조인자로 사용하기 때문에 중요하다(5). 아미노산과 fatty acid 합성에도 NADPH가 많이 요구되는데 단순배지에서는 이러한 아미노산과 fatty acid가 모두 합성되어야 하기 때문에 NADPH가 많이 소모된다(71). NADPH의 중요성을 간접적으로 증명하는 결과를 얻었는데 하나 혹은 몇몇 아미노산을 특정배지에 첨가함으로써 P(3HB) 농도가 2배에서 4배 정도 증가하였고, 합성에 더 많은 NADPH를 필요로 하는 아미노산을 첨가할 때 일반적으로 더 많은 P(3HB)를 축적하였으며, 지방산 합성에 전구체로 사용되는 oleic acid도 역시 P(3HB) 합성을 증진시켰다(71, 73). 또한 β -ketothiolase는 CoA 분자에 의해 억제된다(5). 단순배지에서는 생합성 요구를 충족시키기 위해 세포가 TCA cycle을 집중적으로 수행하게 되고 이 cycle의 첫번째 효소인 citrate synthase가 CoA 분자를 방출한다. 이러한 것들 모두가 복합배지에 비해 단순배지에서 적은 양의 P(3HB) 축적을 초래하는 것으로 보인다.

세포의 생합성 요구를 충족시키기 위해 충분한 소량의 복합 질소원 첨가와 적합한 배양 전략의 개발로 P(3HB) 농도를 증가시킬 수 있다. P(3HB) 합성

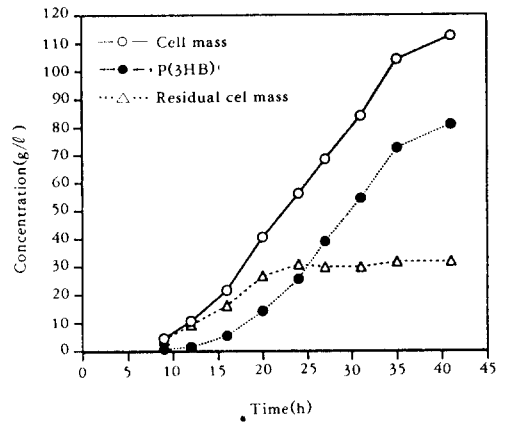


Fig. 3. The time profiles of cell mass, P(3HB) concentration, and residual cell mass during the fed-batch culture of XL1-Blue(pSYL105) in a semidefined medium. The initial medium was R + 10g/ℓ glucose + 1g/ℓ yeast extract + 5g/ℓ corn steep liquor + 2g/ℓ casein hydrolysate. The feeding solution contained per liter: 700g glucose, 20g MgSO₄ · 7H₂O, 8.8g yeast extract, 52.5g corn steep liquor, and 8.8g casein hydrolysate. The nutrients fed per pulse upon the pH rise were equivalent to 20g glucose + 0.57g MgSO₄ · 7H₂O + 0.25g yeast extract + 1.5g corn steep liquor + 0.25g casein hydrolysate.

을 증진시키는 능력을 보기 위해 10가지 복합질소원을 여러 농도로 검사하였는데, tryptone, casamino acids, 또는 casein hydrolysate를 0.2% (wt/vol)로 첨가했을 때 P(3HB) 합성을 최대 4배까지 증진하였다. 산업에서 종종 쓰이는 값싼 복합질소원인 corn steep liquor는 효모 추출물과 같이 사용될 때 P(3HB) 합성을 많이 증진하였다. 유가식 배양시 여러 종류의 복합질소원을 소량 첨가하여 약 40시간만에 70g/ℓ 이상의 P(3HB)를 얻을 수 있었다(72). Fig. 3에 효모추출물, corn steep liquor, 그리고 casein hydrolysate를 첨가하고 배양하여 41.5시간에 세포중량과 P(3HB) 농도, 그리고 P(3HB) 함유율이 각각 116g/ℓ과 72.2g/ℓ, 62.2%으로 얻어진 결과를 나타냈다.

E. coli W는 sucrose을 탄소원으로 이용할 수 있어 sucrose을 사용할 경우 기질비용을 감소시킬 수 있다. Sucrose을 함유하는 특정배지에서 *E. coli* W

의 고세포농도 배양방법을 발표한 바 있으며, pSYL104를 갖는 *E. coli* W를 유가식 배양하여 48 시간만에 각각 124.6g/l의 세포중량과 34.3g/l의 P(3HB)를 얻었다(64). 역시 적은 양의 복합질소원의 첨가로 낮은 농도의 P(3HB) 농도를 증가시킬 수 있었다(74). 최근에 Zhang 등(77)은 *A. eutrophus* PHA 생합성 유전자를 도입한 새로 분리한 sucrose 이용 대장균 균주에 의한 P(3HB) 합성을 보고하였다.

재조합 대장균에 의한 P(3HB)의 생산은 빠른 성장과 여러 탄소원 기질의 사용 및 많은 양의 고분자 축적, 그리고 depolymerase가 없다는 등의 여러 장점을 가지며, 더욱이 재조합 대장균 세포에 많은 양의 P(3HB)가 축적된 후에는 세포벽이 약화되어 분리 정제가 용이하다. P(3HB)를 축적하는 재조합 대장균에 bacteriophage ϕ X174의 lysis 유전자 E를 발현시켜 P(3HB)를 배지로 방출시키는 연구도 수행되었다(78). 다른 방법으로는 T7 bacteriophage의 lysozyme 유전자를 포함하는 system이 개발되어 배양 후에 detergent를 첨가함으로써 P(3HB) 입자를 효과적으로 방출시키는 것도 개발되었다(17). 재조합 대장균에서 생산된 P(3HB)는 결정도가 높아 낮은 농도의 hypochlorite용액으로 분리 정제시 *A. eutrophus*에서 생산된 P(3HB)와 달리 분자량의 감소가 거의 없이 회수될 수 있었다(79).

P(3HB-co-3HV) 공중합체도 *A. eutrophus* PHA 생합성 유전자를 도입한 재조합 대장균 LS5218 (*fadR atoC*)을 propionic acid를 첨가한 배지에서 배양함으로써 40mole%까지의 3HV를 함유하는 공중합체를 합성할 수 있었다(80). Glucose와 함께 propionic acid 또는 valeric acid를 포함하는 기질을 공급할 경우 pH-stat 방식이 부적합하기 때문에 P(3HB-co-3HV)의 고농도 생산을 위해 기질 농도 제어에 의한 기질 공급전략을 개발 중에 있다.

PHA 생산에 재조합 대장균을 사용할 경우 한 가지 문제점은 고세포농도를 얻기 위해 순수 산소를 사용해야 한다는 것인데, 이를 해결하기 위해 높은 PHA 생산성을 유지시키며 세포의 산소 요구량을 감소시키려는 연구가 수행되고 있다.

이상에서 살펴본 박테리아 이외에도 여러 종류의 PHA 합성 미생물이 발견되고 있으며 PHA 합성 관련 유전자가 지속적으로 클로닝됨에 따라 재조합 미생물에 의한 신규 PHA의 합성, 대공학적 방법의 개발에 따라 이용 기질 다양화와 합성능을 향상시키는

연구가 활발히 수행되고 있다. 재조합 균주를 이용한 PHA 생산에 관한 자세한 내용은 다른 곳에 정리한 바 있다(81).

식물로부터 PHA의 생산

지구상에서 풍부한, 그러므로 값이 싼 생물고분자 중 하나는 전분이다. P(3HB)를 전분과 같이 싸게 만들 수 있는 방법으로 감자나 옥수수에 P(3HB)를 축적시키는 것이 제안되었다. 미래에는 plastic potato(82)를 수확하게 될 수도 있을 것이라는 꿈같은 얘기는 최근 형질전환된 식물체에서 P(3HB) 합성 실험이 성공적으로 수행되어 그 가능성을 보여주고 있다. *Arabidopsis thaliana*라는 작은 식물에 *A. eutrophus*의 reductase gene과 PHA synthase gene을 넣어(β -ketothiolase는 이미 식물체내에 존재함) 발현시 직경 0.2~0.5 μ m 크기의 P(3HB)가 핵, 세포질 등에 organelle-nonspecific하게 축적되었다(83). 그러나 총 축적량은 겨우 100 μ g/g fresh weight에 불과하였다. 최근에는 plastid로 gene targeting을 시켜 한층 더 효율적인 P(3HB) 합성 및 축적이 가능함을 보였다(84). 상세한 내용은 Poirier 등(84)의 최근 논문에 잘 정리되어 있다. 그러나 비록 형질전환 식물에 의한 효율적인 P(3HB)의 생산이 가능하더라도 우리나라와 같이 작은 나라에서는 재배지의 부족으로 비현실적일 수도 있음을 염두에 두기 바란다.

생합성 PHA의 성질 및 응용

지금까지 발견된 PHA들은 기본적으로 hydroxyalkanoates의 선형 polyester이다. 이들 고분자들의 광학적 활성도는 chiral 구조의 carbon에 기인한 것으로서, 모든 단량체들은 생물체 내에서 D(-)-configuration으로만 존재한다고 알려져 있다. 즉, 모든 생합성 PHAs는 isotactic 구조를 갖는다(5).

산업적으로 응용되기 위해서는, 특성있는 물성을 가진 PHA를 생산하기 위하여 고분자 내에서 서로 다른 단량체들의 결합을 조절할 수 있어야 한다. 고분자의 물리적, 화학적 물성은 공중합체 내의 단량체 조성에 크게 의존하기 때문이다. 이러한 "tailor-made" 공중합체는 성장조건을 조절함으로써 만들어질 수 있다. 만약 어떠한 박테리아에 대해서 특정한 영양분 공급이 이루어진다면, 특정한 고분자가 얻어지게 된다(4).

Table 1. Polymer property of P(3HB-co-3HV) with varying 3HV content.*

3HV fraction	Melting temp.(°C)	Young's modulus(GPa)	Tensile strength(MPa)	Notched izod impact strength(J/m)
0mol%**	179	3.5	40	50
3mol%	170	2.9	38	60
9mol%	162	1.9	37	95
14mol%	150	1.5	35	120
20mol%	145	1.2	32	200
25mol%	137	0.7	30	400

* Data taken from Holmes(85)

** Data for P(3HB) homopolymer

지금까지 생합성 PHA의 물리적, 열적 성질에 관한 연구는 주로 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)에 대해서 주로 이루어졌고, 또한 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)만이 산업적으로 대량생산되고 있다. P(3HB)는 55~80%에 이르는 높은 결정도와 moisture resistance, piezoelectric property, 그리고 optical purity 등과 같은 여러 유용한 성질을 나타낸다(3, 85). P(3HB)는 물리적 성질이나 분자구조에서 isotactic polypropylene(PP)과 비슷하지만, P(3HB)는 분해되지 않는 PP와 비교할 때 생분해성에서 뚜렷한 차이를 나타낸다. 또한, 이들 두 고분자 사이에는 밀도차가 서로 다르기 때문에, 밀도가 낮은 PP는 수용생태계에서 물위로 뜨지만, 높은 비중을 가진 P(3HB)는 버려질 경우 물속에 가라앉아 분해되게 된다. 하지만 P(3HB)는 녹는점 부근인 200°C 근처에서 분해되기 때문에 고분자 가공이 용이하지 않다는 점과 대기중에서 aging에 의해 깨어지기 쉬워진다는 등의 단점을 가지고 있다(85-87). 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 3-hydroxyvalerate와의 공중합(8, 85), 다른 고분자나 화학적으로 합성된 atactic P(3HB)와의 블렌딩 등이 연구되었다(88, 89). Annealing에 의한 P(3HB)의 처리도 연구되어 간단한 열처리에 의해 노화현상이 상당히 방지되고 일반적으로 사용되어지고 있는 합성 플라스틱과 같은 기계적 성질이 얻어졌다는 것이 보고 되었다(90). 공중합체인 P(3HB-co-3HV)에서는 3-hydroxyvalerate의 분율이 증가할수록 충격강도의 증가, Young's modulus의 감소, 인장강도의 감소 등을 가져왔다(Table 1). P(3HV-co-3HV) 공중합체에서 조성에 따른 용융온도의 변화는 3HV 분율이 40mol% 근처에서 최소값을 가지며, 용융열의 경우도 비슷한 모양을 나타낸다. 유리전이 온도의 경우 3HV의 분율이 증가함에 따라

감소한다. P(3HB-co-3HV)의 기계적 성질은 발효 과정에서 3-hydroxyvalerate의 분율을 변화시킴으로써 조절될 수 있다. 이와 같이 PHA들은 단량체의 조성에 따라 결정체에서 탄성체로의 넓은 기계적 성질 변화를 나타낸다. 한 예로서 PHA_{MCI}의 경우, 반결정성 탄성체로 낮은 용점, 낮은 인장 강도 등의 성질을 갖고 있어서 생분해성 고무로써 사용되어질 수 있다(91).

PHA의 생분해성에 영향을 미치는 변수로는 주위의 환경, 박테리아의 수와 활성도, 물의 사용여부, 온도, 분해되는 플라스틱 물질의 두께, 표면 구조, 공극률, 플라스틱 내의 다른 화합물들의 존재여부 등이다. 이러한 PHA의 생분해는 두 가지 다른 경로로 이루어질 수 있다. 무균 상태에서 PHA는 hydrolytic 경로에 의해 분해된다. 특히 높은 pH의 경우에는 더욱 그러하다(92, 93). 이러한 분해 과정은 drug delivery system이나 수술용 봉합사에 사용되는 PHA와 같이 의학 응용분야에서 중요하다. 자연 환경에서는 depolymerase나 esterase에 의해서 PHA는 분해되게 된다. 일반적으로, 분자량은 고분자의 생분해도에 중요한 영향을 끼치는데, 고분자량의 P(3HB)는 낮은 분자량을 가진 고분자와 같은 속도로 분해된다. L(+)-configuration을 갖는 단량체가 존재할 경우, esterase 효소의 stereoselectivity에 의해서 분해는 감소하게 된다. 공중합체의 경우 P(3HB-co-3HV)는 고분자 내의 조성에 관계없이 분해가 잘 일어나지만, β -hydroxynonanoate가 단량체로 사용될 경우에는 분해가 일어나지 않는다. 이러한 결과로부터 단량체의 구성을 조절함으로써 PHA의 생분해성과 분해속도가 조절되도록 할 수 있다(94, 95).

PHA는 넓은 응용분야를 가진 biodegradable, biocompatible한 플라스틱으로써 인식되고 있다. 초

Table 2. Potential applications of PHA.

– Packaging material(films, bags and containers)
– Disposable articles such as razors, utensils, or diapers
– Biodegradable carrier for the delivery and/or release of drugs, insecticides or fertilizers
– Starting materials for the synthesis of chiral compounds
– Biomedical use(surgical pins, sutures, staples, swabs, wound dressing, bone replacements, bone growth stimulation, blood vessel replacements)

Table 3. Production of PHA by various microorganisms and culture methods.

Bacterium	PHA	Culture method	Major substrates	Culture time(h)	Cell conc.(g/l)	PHA conc.(g/l)	PHA content(%)	Productivity (g/l/h)	Reference
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucose control fed batch	Glucose	50	164	121	76	2.42	(20)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Recycled gas culture system	CO ₂ /H ₂	40	85	61.5	72	1.54	(27)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Fed batch	Ethanol	50	63.5	47	74	0.94	(23)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB/3HV)	Glucose control fed batch	Glucose + propionic acid	46	158	117	74	2.55	(21)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glucose control fed batch	Glucose + fish peptone	47	40.1	32	79.8	0.68	(36)
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)	Fully automatic fed batch	Methanol	170	233	149	64	0.88	(38)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HH/3HO)	Continuous	n-Octane	D=0.2h ⁻¹	11.6	2.9	25	0.58	(56)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HH/3HO)	Fed batch	n-Octane	38	37.1	12.1	33	0.32	(16)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HH/3HO)	Fed batch	Octanoic acid	45	41.8	15.5	37.1	0.34	Lee, S. Y. unpublished results
Recombinant <i>E. coli</i>	P(3HB)	pH-stat fed batch	Glucose + LB medium	42	117	89	76	2.11	(63)
Recombinant <i>E. coli</i>	P(3HB)	pH-stat fed batch	Glucose + yeast extract + corn steep liquor	41.5	116	72.2	62.2	1.74	(72)
Recombinant <i>E. coli</i>	P(3HB)	pH-stat fed batch	Glucose + yeast extract + corn steep liquor + casein hydrolysate	41	112	81	72.3	1.98	(73)
Recombinant <i>Klebsiella aerogenes</i>	P(3HB)	Fed batch	Molasses	32	37	24	65	0.75	(77)

기의 PHA granule에 대한 연구에서 상용 열가소성 수지와 같이 가공되어질 수 있다는 것이 밝혀졌다. P(3HB)의 상업적 플라스틱으로써 최초의 제안은 Baptist에 의한 수술용 봉합사로써 P(3HB)의 사용에 관한 것이다(96, 97).

P(3HB)의 분해물질인 D(-)-3-hydroxybutyrate이 고등 동물의 물질대사에 관여하는 물질이고, 저분자량의 P(3HB)가 procaryotic과 인간을 포함한 eucaryotic 생물의 구성성분으로 존재한다는 것이 알려졌다(98-100). 이러한 사실로부터 인체에

무해한 의료용 원료로써 P(3HB)를 사용할 수 있다는 것이 확신되었으며, P(3HB)에 관한 초기의 연구에서 수술용 봉합사로써 사용하게 하였다. Bio-compatibility와 가격의 문제 때문에 지금까지 P(3HB)나 다른 PHA의 가장 흥미를 끄는 응용분야로는 의학과 제약에 관한 분야이다. 제약분야에서는 주로 drug delivery로서의 역할에 관여하고 있다. Polyglycolate나 polylactate와 비교할 경우, P(3HB)는 여러 장점을 가지고 있다. 우선 P(3HB)는 쉽게 가공되어질 수 있고, 완전히 생분해되며, 근육세포에 대해 잘 화합한다. 게다가 처방되어지는 약과 응집체를 이룰 수 있는 분말로써 생산되어질 수 있기 때문에, 더욱 다양한 성질을 가질 수 있으며 분해되는 시간을 조절 할 수 있다(101).

P(3HB)나 PHA는 열경화성의 특성을 가지고 있기 때문에 압출, 성형 등의 공정을 거칠 수 있다. PHA의 물성은 합성고분자를 첨가함으로써 더욱 개선되어질 수 있고, 효과적인 가공 공정을 위하여 상용고분자에 PHA를 소량 첨가하기도 한다. 또한 PHA는 자연계에서 완전히 생분해될 수 있기 때문에, 포장재나 일회용 위생용품의 원료로서도 사용되어질 수 있다. 또한 PHA는 낮은 산소 확산도를 가지기 때문에 식품포장에 쓰이는 필름의 원료로서도 사용되어질 수 있다(102).

PHA는 결정분자 내의 극성을 띤 원자들 사이의 분자간 힘에 의하여 piezoelectric 성질을 가진다. P(3HB)의 piezoelectric 상수는 온도에 의존하고, P(3HB)의 결정상과 비결정상으로부터의 반대 극성의 영향에 의하여 결정된다. Polyvinylidone fluoride와 같은 합성 piezoelectric 고분자로 만들어진 film은 뼈의 성장을 촉진시킨다는 것이 알려졌다. P(3HB-co-3HV)와 같은 생고분자도 또한 shear piezoelectricity를 가지고 있으며, 생물학적으로 분해되어질 수 있기 때문에 뼈의 형성을 촉진하기 위한 재료로 사용될 수 있다(103, 104).

P(3HB)의 다른 용도로는 D(-)-3-hydroxybutyrate의 원료로써의 사용이다. 유기화학에서 여러 중요한 합성 공정들이 enantiomeric 화합물을 요구하기 때문에, 이러한 순수한 화합물을 얻기 위하여 PHA는 분해되어진다. 단량체를 얻기 위하여 해중합되는 방법에는 미생물로부터 얻어지는 수용성 세포외 depolymerase를 이용한 enzymatic depolymerization과 PHB polymerase system이 없는 돌연변이 균주를 이용하는 것이다(105, 106).

PHA의 가능한 응용분야로 제시된 것들을 Table

2에 정리하였다.

전세계적으로 많은 기업들이 PHA의 상업적 생산을 위해 연구, 개발하고 있다. 현재 ZENECA Bio Products(UK)는 BIOPOL이라는 상품명으로 P(3HB-co-3HV)를 연간 600톤 규모로 생산하고 있으며, 이를 이용한 일회용 면도기, 삼푸병 등 여러 시제품들은 이미 유럽, 미국, 일본의 시장에 나와 있다. 또한 미국과 캐나다 등의 몇몇 다른 기업들도 여러 균주를 이용한 PHA의 생산 및 응용분야 개발에 많은 투자를 하고 있다.

결 론

본 총설에서는 이제까지 개발된 여러 박테리아들에 의한 PHA의 생산방법을 간략히 살펴 보고 그들을 채용할 때의 장단점을 논하였다. Table 3에 여러 미생물들과 그들의 배양법들에 의한 PHA의 고농도 생산 결과를 요약하였다. 배양공정 개선에 의해 생산성을 높이려는 노력과 재조합 DNA 기술에 의한 미생물의 성능 개선 가능성으로 보아 머지 않아 PHA의 경제적인 생산이 가능해질 것으로 보인다.

감 사

이 논문은 (주)LG화학 기술연구원 바이오텍 연구소의 일부지원으로 가능하였으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. Y. Lee and H. N. Chang(1995), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, In press.
2. D. Byrom(1987), *TIBTECH*, **5**, 246.
3. Y. Doi(1990), *Microbial Polyesters.*, VCH Publishers, New York.
4. H. Brandl, R. Gross, R. Lenz and R. C. Fuller (1990), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **41**, 77.
5. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **54**, 450.
6. A. Steinbuchel(1991), *Polyhydroxyalkanoic acids. In: Biomaterials*(Ed. Byrom D.), p. 123, Macmillan, London.
7. A. Steinbuchel(1993), *CLB Chem. Labor Biotechnik*, **44**, 378.

8. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
9. T. Yamane(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 257.
10. R. M. Lafferty, B. Korsatko and W. Korsatko (1988), *Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid*. In : *Biotechnology*(Eds. Rehm H. J., Reed G.), **6b**, 135, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
11. T. Yamane and S. Shimizu(1984), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **30**, 147.
12. O. Hrabak(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 251.
13. W. J. Page(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 149.
14. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370
15. S. Ueda, S. Matsumoto, A. Takagi and T. Yamane(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3574.
16. H. Preusting, R. Houten, A. Hoefs, E. Langenberghe, O. Favre-Bulle and B. Witholt (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 550.
17. S. Fidler, D. Dennis(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 231.
18. D. Byrom(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 247.
19. P. A. Holmes and I. F. Wright, S. H. Collins (1981), Eur. Patent 52, 459.
20. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892.
21. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo(1994), *Enz. Microbiol. Technol.*, **16**, 556.
22. P. J. Senior, S. H. Collins and K. R. Richardson(1986), Eur. Patent 204442.
23. J. E. Alderete, D. W. Karl and C. H. Park (1993), *Biotechnol. Prog.*, **9**, 520.
24. H. G. Schlegel, G. Gottschalk and R. Bartha (1961), *Nature*, **191**, 463.
25. A. Ishizaki and K. Tanaka(1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 170.
26. A. Ishizaki and K. Tanaka(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 254.
27. K. Tanaka, A. Ishizaki, T. Kanamarn and T. Kawano(1995), *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 268.
28. R. M. Lafferty and G. Braunegg(1984), Eur. Patent 144,017.
29. R. M. Lafferty and G. Braunegg(1984), Eur. Patent 149,744.
30. R. M. Lafferty and G. Braunegg(1990), US Patent 4957861.
31. U. J. Hangii(1990), *Pilot scale production of PHA with *Alcaligenes latus**. In : *Novel Biodegradable Microbial Polymers*(Ed. Dawes E. A.), p. 65, Kluwer Publishers, Dordrecht
32. W. J. Page and O. Knosp(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1334.
33. W. J. Page(1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 329.
34. W. J. Page(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 117.
35. W. J. Page, J. Manchak and B. Rudy(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2866.
36. W. J. Page and A. Cornish(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4236.
37. K. A. Powell and B. A. Collins(1982), US Patent 4,336,334.
38. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.
39. T. Suzuki, H. Deguchi, T. Yamane, S. Shimizu and K. Gekko(1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 487.
40. S. Ueda, S. Matsumoto, A. Takagi and T. Yamane(1992), *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 57.
41. C. K. Kang, H. S. Lee and J. H. Kim(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 1017.
42. D. Bourque, B. Ouellette, G. Andre and D. Groleau(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 7.
43. G. W. Huisman, O. DeLeeuw, G. Eggink and B. Witholt(1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1949.
44. G. W. Haywood, A. J. Anderson and E. A. Dawes(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**, 471.
45. M. J. DeSmet, G. Eggink, B. Witholt, J. Kingma and H. Wynberg(1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 870.
46. H. Brandl, R. A. Gross, R.W. Lenz and R. C. Fuller(1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**,

- 1977.
47. R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink and B. Witholt(1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2924.
 48. A. Timm and A. Steinbuchel(1990), *Appl Environ. Microbiol.*, **56**, 3360.
 49. G. W. Haywood, A. J. Anderson, D. F. Ewing and E. A. Dawes(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3354.
 50. G. N. M. Huijberts, G. Eggink, P. DeWaard, G. W. Huisman and B. Witholt(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 536.
 51. G. N. M. Huijberts, T. C. DeRijk, P. DeWaard and G. Eggink(1994), *J. Bacteriol.*, **176**, 1661.
 52. R. W. Lenz, Y. B. Kim and R. C. Fuller (1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 207.
 53. B. A. Ramsay, I. Saracovan, J. A. Ramsay and R. H. Marchessault(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 744.
 54. B. Witholt and R. G. Lageveen(1992), US Patent 5,135,859.
 55. H. Preusting, J. Kingma and B. Witholt (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 770.
 56. H. Preusting, W. Hazenberg and B. Witholt (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 311.
 57. P. Schubert, A. Steinbuchel and H. G. Schelegel(1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 5837.
 58. S. C. Slater, W. H. Voige and D. E. Dennis (1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 4431.
 59. O. P. Peoples and A. J. Sinskey(1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 15293.
 60. O. P. Peoples and A. J. Sinskey(1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 15298.
 61. B. Janes, J. Hollar and D. E. Dennis(1990), *Molecular characterization of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic pathway of Alcaligenes eutrophus H16. In, Novel Biodegradable Microbial Polymers*(Ed. Dawes, E. A.), p. 175, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
 62. P. Schubert, N. Kruger and A. Steinbuchel (1991), *J. Bacteriol.*, **173**, 168.
 63. B. S. Kim, S. Y. Lee and H. N. Chang(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 811.
 64. S. Y. Lee and H. N. Chang(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 971.
 65. S. Y. Lee, K. S. Yim, H. N. Chang and Y. K. Chang(1994), *J. Biotechnol.*, **32**, 203.
 66. S. Y. Lee, H. N. Chang and Y. K. Chang (1994), *Ann. NY Acad. Sci.*, **721**, 43.
 67. S. Y. Lee(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 1247.
 68. 이상엽(1994), *산업미생물학회지*, **22**, 614.
 69. S. Y. Lee, K. M. Lee, H. N. Chang and A. Steinbuchel(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337.
 70. S. Y. Lee, H. N. Chang and Y. k. Chang (1994), *Comparison of Escherichia coli strains for the synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in various media*(Ed. Teo, W. K. et al.), p.53, Continental Press Pte Ltd, Singapore.
 71. S. Y. Lee, Y. K. Lee and H. N. Chang(1995), *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 177.
 72. S. Y. Lee and H. N. Chang(1994), *J. Environ. Polymer Degrad.*, **2**, 169.
 73. S. Y. Lee and H. N. Chang(1995), *Can. J. Microbiol.*, In press.
 74. 이상엽, 장호남(1995), *한국생물공학회지*, In press.
 75. G. W. Luli and W. R. Strohl(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1004.
 76. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham and M. Schaechter(1990), *Physiology of the bacterial cell, A molecular approach.*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
 77. H. Zhang, V. Obias, K. Gonyer and D. Dennis (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1198.
 78. H. J. Busse, S. Kalousek and W. Lubitz (1992), *Abstracts of International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates '92*, P213, Gottingen.
 79. S. K. Hahn, Y. K. Chang and S. Y. Lee (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 34.
 80. S. Slater, T. Gallaher and D. Dennis(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1089.
 81. 이상엽(1994), *생명공학동향*, **2**, 78.
 82. R. Pool(1989), *Science*, **245**, 1187.
 83. Y. Poirier, D. Dennis, K. Klomparens and C. Somerville(1992), *Science*, **256**, 520.
 84. Y. Poirier, C. Nawrath and C. Somerville (1995), *Bio/Technol.*, **13**, 142.

85. P. A. Holmes(1988), *Biologically produced PHA polymers and copolymers. In : Developments in Crystalline Polymers*, 2(Ed. Bassett, D. C.), 1, Elsevier, London
86. Y. Inoue and N. Yoshie(1992), *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 571.
87. M. K. Cox(1994), *Properties and applications of polyhydroxyalkanoates. In : Biodegradable Plastics and Polymers*(Eds. Doi, Y., Fukuda, K.), p. 120, Elsevier Science, Amsterdam.
88. Y. Kumagai and Y. Doi(1992), *Polym. Degrad. Stab.*, **35**, 87.
89. Y. Kumagai and Y. Doi(1992), *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **13**, 179.
90. G. J. M. De Koning and P. J. Lemstra (1993), *Polymer*, **34**, 4089.
91. G. J. M. De Koning and H. M. M. van Bilsen, P. J. Lemstra, W. Hazenberg, B. Witholt, H. Preusting, J. G. van der Galien, A. Schirmer and D. Jendrossek(1994), *Polymer*, **35**, 2090.
92. S. J. Holland, A. M. Jolly, M. Yasin, B. J. Tighe(1987), *Biomaterials*, **8**, 289.
93. N. D. Miller and D. F. Williams(1987), *Biomaterials*, **8**, 289.
94. Doi, Y., Kawaguchi, Y., Koyama, N., Nakamura, S., Hiramitsu, M., Yoshida, Y., Kimura, U.(1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 103.
95. Doi, Y., Mukai, K., Kasuya, K., Yamada, K. (1994), *Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates, In : Biodegradable Plastics and Polymers.*(Eds. Doi, Y., Fukuda, K.), p. 39, Elsevier Science, Amsterdam.
96. J. N. Baptist(1959), US patent 3,036,959.
97. J. N. Baptist(1960), US patent 3,044,942.
98. R. N. Reusch and H. L. Sadoff(1983), *J. Bacteriol.*, **156**, 778.
99. R. N. Reusch and H. L. Sadoff(1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 4176.
100. R. N. Reusch, T. Hiske, H. L. Sadoff, R. Harris and T. Beveridge(1987), *Can. J. Microbiol.*, **33**, 435.
101. N. D. Miller and D. F. Williams(1987), *Biomaterials*, **8**, 129
102. P. A. Holmes, A. B. Newton and F. M. Willmouth(1981), Eur. patent 52,460.
103. E. Fukuda(1983), *Q. Rev. Biophys.*, **16**, 59.
104. E. Fukuda(1984), *Biorheology*, **21**, 75.
105. H. G. Schlegel, R. M. Lafferty and I. Krauss (1970), *Arch. Mikrobiol.*, **71**, 283.
106. A. M. Cook and H. G. Schlegel(1978), *Arch. Microbiol.*, **47**, 167.