

Actinobacillus sp. EL-9로부터 생산된 생분해성 폴리에스터의 구조 및 특성

손홍주[†] · 이 건* · 김근기 · 김한수 · 김용균 · 이상준*

밀양대학교 생물공학과

*부산대학교 미생물학과

Structure and Characteristics of Biodegradable Polyester from *Actinobacillus* sp. EL-9

Hong-Joo Son[†], Geon Lee*, Keun-Ki Kim, Han-Soo Kim, Yong-Gyun Kim, and Sang-Joon Lee*

Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

*Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

In this study, the composition and characteristics of poly-β-hydroxybutyrate(PHB) biosynthesized by *Actinobacillus* sp. EL-9 are investigated. PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9 was identified as the homopolymer of 3-hydroxybutyric acid (PHB) by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis. The melting temperature (T_m), and crystallization temperature(T_c) of PHB was 169.7°C and 69.13°C, respectively. The viscosity on the basis of Brookfield viscometer was 6.01 dl/g. The viscosity-average molecular weight estimated by Mark-Ho-wink-Sakurada equation was $1.08 \times 10^6 (\pm 3,000)$.

Key words : *Actinobacillus* sp., polyester, PHB

서 론

생분해성 고분자 물질은 미생물이 세포내에 축적하는 생분해성 플라스틱(polyhydroxyalkanoic acid ; PHA), 미생물이 세포외로 분비하는 다당류(xanthan gum, alginate), 미생물 유래의 biochemical을 원료로 한 기능성 고분자 물질(polycaprolactone, polylactic acid) 및 chitin 등과 같은 천연 화합물을 원료로 한 고분자 물질로 대별 할 수 있다¹⁾.

이러한 다양한 생분해성 고분자중에서 환경오염을 초래하는 합성플라스틱의 대체물질로서 가장 주목을 받고 있는 것이 바로 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)이다²⁾. PHB는 1925년 Lemoigne이 *Bacillus megaterium*으로부터 최초로 분리해 내었는데, 대부분의 세균들이 질소, 산소 등의 영양원이 부족한 상태에서 세포내에 축적하는 탄소 저장물질로서, 합성플라스틱인 polyester와 polypropylene의 중간적인 물성을 지니고 있다³⁾. 또한 생분해성 이외에 인체조직 적합성,

[†] Corresponding author

서방성, 광학활성, 자외선 차단성 등 다양한 물리적 성질을 가지고 있어 그 응용범위가 매우 넓다^{4,5)}.

미생물로부터 추출된 고분자 물질의 조성 및 conformation을 규명하는 것은 고분자 물질의 물리화학적 성질과 합성과정을 이해하고 예측하는데 필수적이다. 또한 고분자 물질의 물리화학적 성질을 규명하는 것은 실제로 고분자 물질을 성형, 가공하는데 있어 매우 중요하므로 많은 연구자들에 의하여 다양한 세균으로부터 생산된 각종 PHA의 구조와 성질 등이 보고되고 있다. 즉 Doi와 Abe⁶⁾는 500 MHz ¹H-NMR와 125 MHz ¹³C-NMR을 이용하여 3-hydroxyalkanoic acid와 3-hydroxy- ω -chloroalkanoic acid로 구성된 PHA copolymer의 구조를, Kim 등⁷⁾은 gas chromatography/atomic emission detector(GC/AED)를 이용하여 brominated repeating unit를 가진 PHA copolymer의 구조를 확인하였다. 또한 많은 연구자들이 differential scanning calorimeter(DSC)를 이용하여 PHA의 crystalline temperature(T_c), melting temperature(T_m), heat of fusion(ΔH_m) 등의 열적 성질을, X-ray diffraction에 의하여 crystallization behavior를 분석하였다^{8,9)}.

본 연구에서는 토양에서 분리한 *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 생산된 PHB의 조성을 IR 및 NMR로 분석한 후, 그 구조를 확인하였으며 열적 성질, 점도 및 분자량 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 경남 양산공단지역의 토양으로부터 분리된 *Actinobacillus* sp. EL-9로서, PHB 생산배지의 조성은 glucose 2%, NH_4NO_3 0.15%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, KH_2PO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, 미량원소용액 (H_3BO_3 600 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 400 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, Na_2MoO_4 60 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mg per liter) 5 ml/ ℓ 이었다¹⁰⁾.

2. 배양조건

균체 및 PHB 생산을 향상시키기 위하여 유가배양을 실시하였다. 5- ℓ 용량의 발효조(한국발효기 제품)에 pH 7.0

으로 조절된 PHB 생산배지 2 ℓ 를 넣어 30°C, 400 rpm, 2 vvm의 조건으로 배양하다가 glucose의 농도 0.5% 이하가 될 때마다 glucose와 NH_4NO_3 를 각각 최종농도 2%, 0.15%가 되도록 간헐적으로 첨가하였다. 이때 종균 접종량은 5%(v/v)였다.

3. 균체량, 포도당 및 암모늄이온 분석

균체량은 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 cell pellet을 회수한 후, 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 건조중량으로 나타내었다. 포도당과 암모늄 이온의 소비량은 균체를 제거한 배양 상등액을 취하여 dinitrosalicylic acid에 의한 환원당 정량법¹¹⁾과 indophenol blue method¹²⁾로 각각 측정하였다.

4. PHB 정량

Braunegg 등¹³⁾의 방법에 준하여 균체를 methanolysis시킨 후, GC로 PHB를 정량하였다. 이때 사용한 GC는 HP-5890 A였으며, 컬럼은 10% Carbowax 20M-ON glass를 사용하였고, 운반기체는 N_2 , oven temperature는 160°C, 유속은 30 ml/min, 시료의 주입량은 2 $\mu\ell$ 였으며, 불꽃이온화검출기를 사용하였다. 표준 PHB는 Sigma 제품을 사용하였다.

5. PHB 정제

클로로포름을 soxhlet apparatus에서 가열환류시키면서 균체내부의 PHB를 추출한 후, 여과지로 cell debris를 제거한 여액에 메탄올을 첨가하여 PHB를 침전시켰다. 침전된 PHB를 회수하여 acetone과 ether로 세척하여 정제된 PHB를 얻었다¹⁴⁾.

6. Infrared spectroscopy(IR) 분석

완전 건조된 PHB powder 2 mg과 IR spectroscopic grade KBr 198 mg을 혼합하여 마쇄한 후, 90°C에서 건조시키고 압력을 가하여 KBr pellet을 제조하였다. 여기에 적외선을 조사하여 그 흡수 spectrum을 조사하였다.

7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR) 분석

정제된 PHB를 각각 2 mg씩 CDCl_3 용액에 용해시킨 후, 500 MHz ¹H-NMR과 125 MHz ¹³C-NMR을 사용하여

NMR spectrum을 조사하였다. 이때 실험온도는 30°C이었다.

8. Thermal property의 검토

정제된 PHB 10 mg을 aluminum pan에서 encapsulation시킨 후, nitrogen atmosphere하에서 heating rate 20 °C/min의 속도로 0°C에서 200°C까지 가열하였다(1st scanning). 다시 0°C로 급냉한 후, 1st scanning과 동일한 조건으로 2nd scanning하였다. 이때 indium의 heat of fusion (6.8 cal/g)을 calorimetric calibration으로 이용하였다. Melting temperature(T_m)과 fusion enthalpy(ΔH_m)은 1st scanning의 melting endotherm의 peak로부터 얻었으며, crystallization temperature (T_c)는 2nd scanning으로부터 얻었다.

9. 점도 및 분자량 측정

PHB powder를 클로로포름에 용해시켜 각각 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 % 용액을 조제한 후, glass filter로 여과하였다. 여과된 각 PHB 용액을 Brookfield viscometer를 이용하여 점도를 측정하였다. PHB의 viscosity-average molecular weight는 다음 식으로 정의되는 Mark-Ho-wink-Sakurada 식¹⁵⁾에 의하여 산출하였다.

$$[\eta] = K'M_w^a$$

여기서 K'와 a는 Akita 등¹⁶⁾이 확립한 값인 1.18×10^{-4} (cm^3/g , in chloroform)과 0.78을 각각 사용하였으며, $[\eta]$ 는 30°C, 클로로포름에서의 intrinsic viscosity를 나타낸다.

결과 및 고찰

1. PHB의 구조확인

1) GC chromatogram

GC chromatogram에 나타난 PHB peak의 retention time은 standard PHB와 거의 일치함을 알 수 있었으므로, 추출된 PHB가 이와 유사한 구조를 가질 것으로 추측되었다 (Fig. 1).

2) IR spectrum

정제된 PHB를 IR로 분석한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. $1,750 \text{ cm}^{-1}$ 에서 carbonyl stretching(C=O)을 보여주는 최대 흡수 peak가, $2,960 \text{ cm}^{-1}$ 에서 C-H stret-

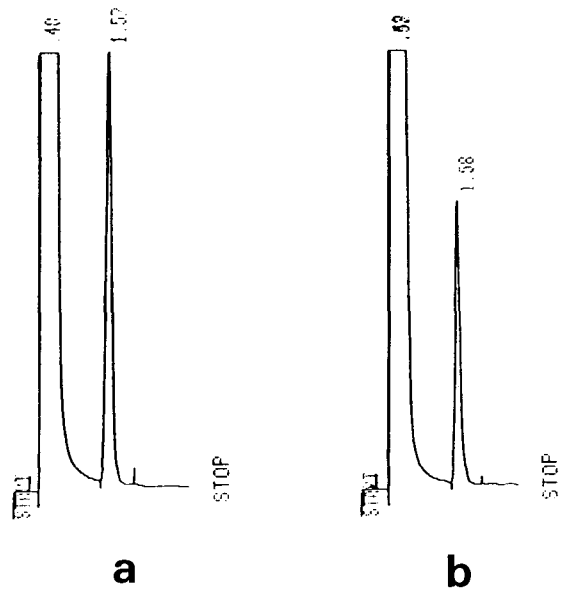


Fig. 1. Gas chromatogram of standard PHB and PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9. a, standard PHB ; b, PHB from *Actinobacillus* sp. EL-9.

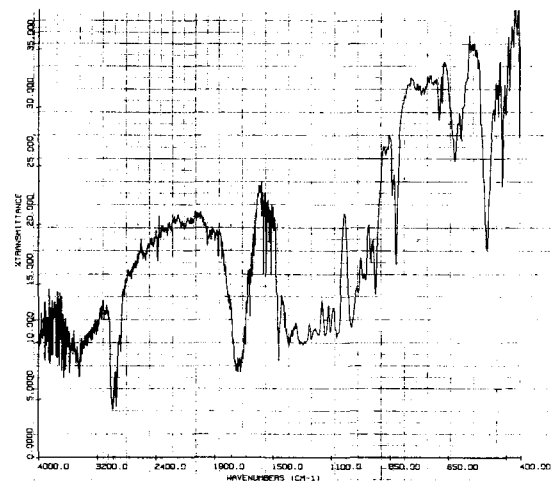


Fig. 2. Infrared spectrum of PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9.

ching을 보여주는 최대 흡수 peak가 각각 나타났다. 또한 $1,050 \sim 1,100 \text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O stretching을 보여주는 최대

흡수 peak가 나타났으며, terminal -OH group의 최대 흡수 peak는 $3,500\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타났다. $1,400\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타난 흡수 peak는 methyl group(CH_3)이 존재한다는 사실을 뒷받침하고 있다.

3) 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum

공시균으로부터 분리, 정제된 PHB를 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ 로 분석한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 1.274 ppm에 나타난 doublet resonance는 methyl proton(B_4 ; CH_3)에 해당되고, 5.26 ppm에 나타난 multiplet proton resonance는 methine proton(B_3 ; CH)에 해당된다. 또한 2.45~2.65 ppm에 나타난 proton resonance는 methylene proton(B_2 ; CH_2)으로 추정된다. Doi 등¹⁷⁾에 의하면, 2.45~2.65 ppm에 나타난 methylene proton(H_A , H_B)은 methine proton(H_X)과 spin-coupling되어 있으며, 또한 인접한 H_A , H_B proton들이 서로 coupling되어 있기 때문에 $\text{CH}_2\text{-CH}$ bond 주위의 conformational structure는 다음과 같은 ABX type three-spin system이라고 하였다.

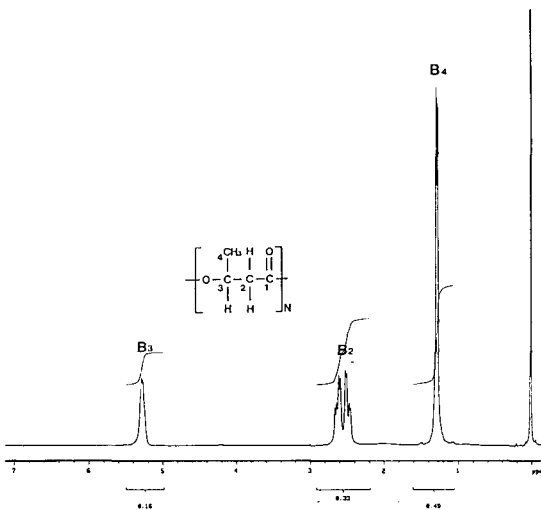
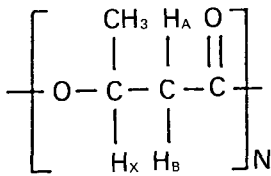


Fig. 3. 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9.

4) 125 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum

공시균으로부터 분리, 정제된 PHB를 125 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ 로 분석한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 proton decoupling없이 4개의 peak signal이 나타났다. 즉 19.8 ppm, 40.8 ppm, 67.7 ppm, 169.2 ppm에서 각각 me-

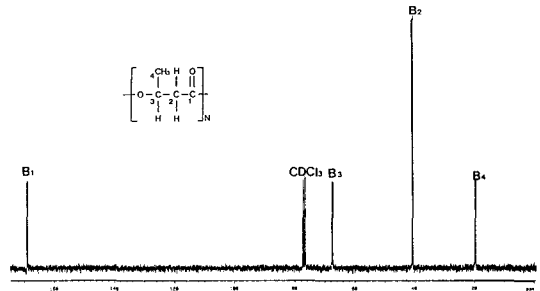


Fig. 4. 125 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9.

thyl(B_4 ; CH_3), methylene(B_2 ; CH_2), methine(B_3 ; CH), carbonyl(B_1 ; CO)에 해당되는 carbon resonance가 나타났다.

이상과 같이 GC, IR 및 NMR의 결과를 종합하여 분석한 결과, *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 생산된 PHB는 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer(PHB)임을 알 수 있었다.

2. PHB의 특성

1) Thermal property

Actinobacillus sp. EL-9에 의해 생산된 PHB의 열적 성질을 DSC를 이용하여 조사한 thermogram은 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 즉 169.7°C 에서 단일 흡열 peak가 나타나 PHB의 T_m 은 169.7°C 임을 알 수 있었는데, 이것은 합성플라스틱인 polypropylene의 T_m ($171^\circ\text{C}\sim 186^\circ\text{C}$)보다 약간 낮은 것으로 고분자의 성형, 가공시 유리하게 작용할 것으로 예상된다. 또한 T_c 는 69.13°C 이었다.

2) 점도 및 분자량

Actinobacillus sp. EL-9에 의해 생산된 PHB의 점도를 측정 한 결과 6.01 dl/g 이었다. 고분자를 성형, 가공하는 동안 고분자 고유의 strength를 유지하기 위해서는 분자량이 매우 높아야 한다¹⁸⁾. 따라서 공시균으로부터 생산된 PHB의

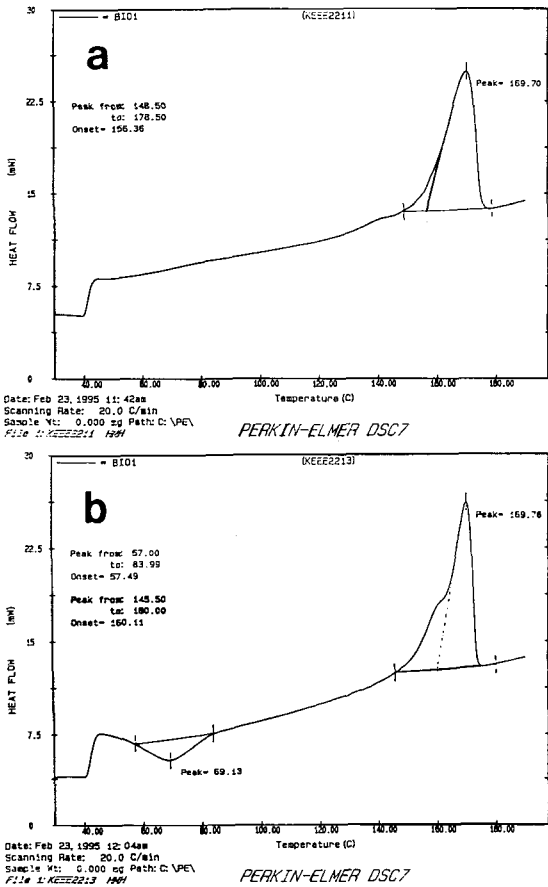


Fig. 5. DSC thermogram of PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9.
a, first scanning; b, second scanning.

분자량을 측정하였다. 상기에서 측정한 점도를 Mark-Hovink-Sakurada 식에 대입하여 산출한 viscosity-average molecular weight(M_v)는 $1.08 \times 10^6 (\pm 3,000)$ 이었다. *Methylobacterium extorquens*¹⁹⁾, *Rhizobium* spp.²⁰⁾, *Pseudomonas cepacia*²¹⁾에 의하여 생산된 PHB의 분자량은 각각 197,000~268,000, 60,000~160,000, 460,000이다. 이러한 결과들과 비교컨데, 본 공시균으로부터 생산된 PHB는 비교적 고분자로서의 성질이 우수한 것으로 사료된다.

요 약

Actinobacillus sp. EL-9로부터 추출, 정제된 PHB를 GC,

IR 및 NMR로 분석한 후, 그 구조를 확인하였으며, 열적 성질, 점도 및 분자량 등을 검토하였다. *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 추출, 정제된 PHB를 IR, 500 MHz ¹H-NMR 및 125 MHz ¹³C-NMR을 이용하여 조성분석을 실시한 결과, 본 공시균이 생산한 PHB는 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer임을 알 수 있었다. 또한 PHB의 melting temperature(T_m)은 169.7°C임을 알 수 있었으며, crystalline temperature(T_c)는 69.13°C이었다. PHB의 점도는 6.01 dl/g이었으며, 분자량은 점도를 이용하여 측정된 결과 $1.08 \times 10^6 (\pm 3,000)$ 이었다.

참 고 문 헌

1. 유영제 : Biopolymer, 유전공학, 20, 58(1987).
2. 이용현 : 생분해성 고분자의 개발추세 및 방향, 유전공학, 35, 44(1991).
3. Dawes, E. A. and Senior, P. J. : The role and regulation of energy reserve polymers in microorganism, *Adv. Microb. Physiol.*, 10, 135(1973).
4. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. : Plastics from bacteria and for bacteria : poly(β -hydroxyalkanoate) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41, 77(1990).
5. Uttley, N. L. : Polyhydroxybutyrate : a commercial challenge, *BIOTECH*, 86, 171(1986).
6. Doi, Y. and Abe, C. : Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- ω -chloroalkanoates, *Macromolecules*, 23, 3705(1990).
7. Kim, Y. B., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. : Poly(β -hydroxyalkanoate) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*, *Macromolecules*, 25, 1852(1992).
8. Hazer, B., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. : Biosynthesis of methyl-branched poly(β -hydroxyalkanoate)s by *Pseudomonas oleovorans*, *Macromolecules*, 27, 45(1994).
9. Abe, H., Doi, Y., Satkowski, M. M. and Noda, I. : Miscibility and morphology of blends of isotactic and atactic poly(3-hydroxybutyrate), *Macromolecules*, 27, 50(1994).
10. Son, H. J. and Lee, S. J. : Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Actinobacillus* sp. EL-9 under balanced-growth condition, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 344(1996).

11. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : *Carbohydrate analysis*, IRL Press(1986).
12. Weatherburn, M. W. : Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.*, **39**, 971 (1967).
13. Braunegg, G., Sonneleitner, B. and Lafferty, R. M. : A rapid gas chromatographic method for the determination of polyhydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29 (1978).
14. Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. and Witholt, B. : Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2924(1988).
15. Marchessault, R. H., Okamura, K. and Su, C. J. : Physical properties of poly(β -hydroxybutyrate), *Macromolecules*, **3**, 735(1970).
16. Akita, S., Einaga, Y., Miyaki, Y. and Fujita, H. : Solution properties of poly(D- β -hydroxybutyrate), *Macromolecules*, **9**, 774(1976).
17. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. : ^1H and ^{13}C NMR analysis of poly(β -hydroxybutyrate) isolated from *Bacillus megaterium*, *Macromolecules*, **19**, 1274(1986).
18. Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K. and Dennis, D. : Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsilla* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1198(1994).
19. Bourque, D., Ouellette, B., Andre, G. and Groleau, D. : Production of poly- β -hydroxybutyrate from methanol ; characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 7(1992).
20. Scandola, M., Pizzoli, M., Ceccorulli, G., Cesaro, A., Paoletti, S. and Navarini, L. : Viscoelastic and thermal properties of bacterial poly(D-(-)- β -hydroxybutyrate), *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 373(1988).
21. Ramsay, B. A., Ramsay, J. A. and Cooper, D. G. : Production of poly- β -hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 584 (1989).