

## *Pseudomonas* sp. RY-1에 의한 Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates의 생분해

류강은 · 김영백<sup>1</sup> · 양영기<sup>2</sup> · 이영하\*

충남대학교 미생물학과, <sup>1</sup>배재대학교 신소재공학부, <sup>2</sup>조선대학교 생물과학부

*Pseudomonas* sp. RY-1이 생성하는 extracellular depolymerase system을 이용하여 단위체의 곁가지에 서로 다른 탄소 길이와 불포화기를 함유하는 medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHAs)의 생분해도를 실험실 조건에서 조사하였다. 생분해도는 평판배지에서의 clear zone 형성, 효소 처리에 의한 고분자 현탁액의 탁도 감소 및 호흡량의 경시적 변화로 측정하였다. *Pseudomonas* sp. RY-1은 MCL-PHA depolymerase의 생성을 통하여 조사된 모든 종류의 MCL-PHAs를 분해할 수 있었으나, 이 효소의 생성은 쉽게 이용될 수 있는 이차기질에 의해 저해받는 것으로 나타났다. MCL-PHAs의 분해율은 고분자 단위체의 조성에 영향을 받았으며, 단위체의 탄소수가 짝수개로 구성된 MCL-PHAs의 분해율이 단위체의 탄소수가 홀수개로 구성된 고분자에 비하여 보다 높았다. 곁가지에 불포화기를 함유한 MCL-PHAs는 불포화기를 갖지 아니하는 고분자에 비하여 분해가 빠르게 이루어졌으며, 이들의 분해는 고분자의 결정화도와 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

**Key words** □ biodegradation, medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas* sp. RY-1

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 다양한 미생물이 과량의 탄소원이 존재하지만 질소, 인과 같은 필수 영양분이나 용존산소가 제한된 불균형 배양조건에서 탄소원 및 에너지원으로 세포 내에 축적하는 저장성 고분자 물질이다. PHAs는 단위체의 탄소수에 따라 short-chain-length PHAs (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>, SCL-PHAs)와 medium-chain-length PHAs (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, MCL-PHAs)로 분류된다(16,19). MCL-PHAs는 일반적으로 SCL-PHAs보다 녹는점과 결정화도가 낮기 때문에 SCL-PHAs와는 달리 점성이 높고 고무탄성체의 성질을 갖고 있다(3,20) 대부분의 미생물은 SCL-PHAs와 MCL-PHAs 중 한가지 종류의 PHA만을 생합성할 수 있다.

PHAs의 가장 중요한 특징은 생분해성 고분자로서 이산화탄소와 물로 완벽하게 분해될 수 있다는 점이다. 자연환경 내에서 PHA의 생분해는 extracellular PHA depolymerases의 작용에 의해 일어난다(7). 지금까지 많은 종류의 미생물로부터 extracellular PHA depolymerases가 분리되고 연구되었지만, 이들의 대부분은 SCL-PHAs에만 특이적으로 작용하는 SCL-PHA depolymerases이다. 이에 반하여 MCL-PHA 분해 미생물의 분포는 매우 제한적일 뿐 아니라 대부분 *Pseudomonas*속 균주들로 알려져 있다(22). 지금까지 MCL-PHA depolymerase에 대해서는 *Pseudomonas fluorescens* GK13 (23), *Pseudomonas* sp. RY-1(12), *Xanthomonas* sp. JS02 (11)이 생성하는 효소만이 분리·정제를 통하여 그 효소학적 성질이 보고되고 있을 뿐이다. 따라서 최근 새로운 조성의 다양한 MCL-PHAs가 미생물에 의해 생합성되고

있음에도 불구하고 이들 미생물 고분자의 생분해 특성은 잘 규명되어 있지 않은 실정이다.

일반적으로 고분자의 생분해도 측정 방법은 실험실시험, 현장모사시험 및 현장시험으로 구분할 수 있다(8). 이 중 실험실 시험법에는 효소시험법, clear zone 시험법, 수용액내에서 미생물에 의한 시험법(호기적 조건, 혐기적 조건), 실험실 퇴비화 시험법 등이 포함되는데, 측정 결과가 실제 자연환경을 반영하지 못한다는 단점이 있음에도 불구하고 시험 조건이 잘 정의되어 있어 재현성이 있고, 정량적인 결과를 얻을 수 있으며, 시험기간이 짧은 장점을 가지고 있어 고분자의 분해 양상 및 동태를 비교하거나 분석하기 위한 목적으로 많이 이용되고 있다(2).

본 실험에서는 *Pseudomonas* sp. RY-1 균주를 이용하여 *Pseudomonas putida* 등의 미생물로부터 생합성된 서로 다른 조성의 MCL-PHAs와 곁가지에 이중결합의 불포화기를 갖는 기능성 MCL-PHAs를 대상으로 고분자의 조성에 따른 생분해도를 몇 가지 실험실 시험법으로 조사하였다. 또한 사용된 측정방법 사이에 나타나는 측정결과의 유의성에 대하여 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 배지 및 MCL-PHAs 시료의 제조

본 실험에서 MCL-PHAs의 분해 미생물로 사용된 균주는 extracellular MCL-PHA depolymerase를 생산하는 것으로 밝혀진 *Pseudomonas* sp. RY-1이며, 이 균주의 배양을 위한 배지 및 배양조건은 앞서 발표한 논문에서와 같다(12). 또한 MCL-PHAs의 생합성을 위해 사용된 균주는 *Pseudomonas putida* KCTC 2407(13), *Pseudomonas* sp. HJ-2(5)와 토양으로부터 분리한

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-821-6413, Fax: 042-822-7367  
E-mail yhrhee@cnu.ac.kr

DSY-82 균주 등이다. MCL-PHA 생산 균주의 배양은 서로 다른 alkanolic acid를 탄소원으로 첨가한 mineral salt (MS) 배지(10)에서 수행하였다. 이들 균주로부터 생합성되어 본 실험에 사용된 고분자의 조성은 Table 1에서와 같다. 한편 불포화기를 기능기로 갖는 MCL-PHAs는 Table 2에서 보는 바와 같이 10-undecenoic acid [10-UND(=)]와 nonanoic acid (NA)의 농도를 각각 달리한 혼합 탄소원으로부터 *P. putida*를 이용하여 생합성하였다(10).

### MCL-PHAs 현탁액의 제조

MCL-PHA 0.1 g을 25 ml의 acetone에 녹이고 교반기를 돌려 주면서 차가운 증류수 25 ml를 넣어준 후 후드에서 acetone을 날려보냄으로써 각 고분자의 현탁액을 만들었다(22). 각각의 MCL-PHA plate는 2%의 agar가 함유된 MS 배지에 탄소원으로 0.1% (w/v)의 MCL-PHA가 함유되도록 PHA 현탁액을 넣어 제조하였다.

### 생분해 측정법

#### Plate test

20 mM glucose가 탄소원으로 사용된 MS 배지에 *Pseudomonas* sp. RY-1을 접종하고, 진탕 배양기에서 30°C로 20 시간 배양한 후, 종균으로 사용하였다. PHAs가 탄소원으로 사용된 각각의 plate에 멸균한 filter disc를 올려놓고, 10  $\mu$ l의 균 배양액을 접종한 후, 30°C에서 배양하면서 시간에 따라 형성되는 colony size 및 clear zone size를 측정하였다.

#### 고분자 현탁액의 탁도 감소

MCL-PHA 현탁액 300  $\mu$ l에 50 mM Tris/HCl (pH 8.5) 1.6 ml과 *Pseudomonas* sp. RY-1 균주로부터 얻은 extracellular MCL-PHA depolymerase 효소액 100  $\mu$ l를 넣고 30°C 배양기에서 정제 배양시키면서 시간별로 감소되는 optical density (OD) 값을 650 nm에서 측정하였다(12).

#### Respirometry

*Pseudomonas* sp. RY-1을 2% glucose가 탄소원으로 사용된 MS 배지에서 24시간동안 진탕배양 (30°C)한 후, 배양액을 종균으로 사용하였다. 분해 실험을 위한 액체배지로는 역시 MS 배지를 사용하였으며, 1.6%의 agar가 함유된 묽은 agar 현탁액 상태로 만들어진 MCL-PHAs를 탄소원으로는 사용하였다. 분해 실험을 위한 액체배지를 용기에 넣고 고분자 현탁액과 증균 10 ml를 접종한 후, 200시간 동안 교반기를 돌려주면서 배양하여 시간별로 소모되는 산소량을 computerized respirometer (N-CON Systems Co., USA)로 측정하였다. 이 실험은 30°C의 항온실에서 수행되었다. 또한 발생된 이산화탄소는 0.5 N NaOH 수용액을 사용하여 포집하였으며, 다음과 같은 화학적 적정방법으로 이산화탄소를 정량하였다(4). 이산화탄소가 포집되어 있는 0.5 N NaOH 수용액에 1 M BaCl<sub>2</sub> 2 ml를 첨가하여 흡착된 이산화탄소가 BaCO<sub>3</sub>로 침전되게 한 후, 13,000 rpm에서 원심분리하여 남아있는 NaOH 수용액을 얻었고, 이 수용액에 phenolphthaleine (1 g phenolphthaleine/15 ml EtOH) 용액 10  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 0.5 N HCl 수용액으로 적정하였다 (1 ml의 0.5 N HCl은 1.10025 mg의 이산화탄소를 야기함).

## 결 과

### Clear zone size 측정

MCL-PHAs가 탄소원으로 사용된 plate에서 *Pseudomonas* sp. RY-1 균주에 의해 생성되는 clear zone size에 이차기질 (secondary substrate)이 미치는 영향을 조사하기 위하여, 이차기질이 첨가되지 않은 배지와 이차기질로서 glucose, heptanoate, octanoate, nonanoate 등이 20 mM의 농도로 각각 첨가된 PHN 배지에서 형성되는 clear zone size를 비교하였다(Fig. 1). Plate에서 생기는 clear zone size는 이차기질이 첨가되지 않은 plate에서 가장 컸으며, heptanoate, octanoate, nonanoate를 이차기질로 넣어준 plate에서 생성된 clear zone size는 상대적으로 작았다.

Table 1. Monomeric compositions of MCL-PHA samples used in this study

Polymer	Concentration of Carbon source (mM)	Strain	Relative amount of repeating units in PHAs <sup>a</sup>					
			3HHx	3HHp	3HO	3HN	3HD	3HUD
PHHx	Hexanoate (20)	<i>Pseudomonas</i> sp. HJ-2	92	-	8	-	-	-
PHHp	Heptanoate (20)	DY-82	-	69.3	-	18.6	-	12.1
PHO	Octanoate (20)	<i>P. putida</i>	4.4	-	82.7	-	7.6	5.3
PHN	Nonanoate (20)	<i>P. putida</i>	-	22.6	-	74.6	-	1.8
PHD	Decanoate (20)	<i>P. putida</i>	5.3	-	60.3	-	32.2	1.2
PHUD	Undecanoate (20)	<i>P. putida</i>	-	21.2	-	57.1	-	21.7

Table 2. Monomeric compositions of MCL-PHAs bearing carbon-carbon double bonds

Polymer	Concentration of carbon source (mM)	Strain	Relative amount of repeating units in PHAs <sup>a</sup>				
			3HHp(=)	3HHp	3HN(=)	3HN	3HUD(=)
PHN(2.5=)	10-UND(=)(2.5) + NA(7.5)	<i>P. putida</i>	3.1	17.9	17.4	55.0	6.6
PHN(5.0=)	10-UND(=)(5) + NA(5)	<i>P. putida</i>	5.2	12.5	34.6	35.0	12.6
PHN(7.5=)	10-UND(=)(7.5) + NA(2.5)	<i>P. putida</i>	6.2	5.3	54.5	16.1	17.9

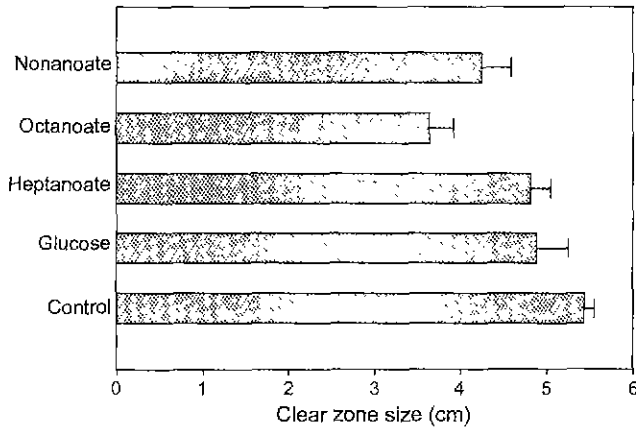


Fig. 1. Changes in clear zone size of *Pseudomonas* sp. RY-1 grown on PHN plates containing different soluble substrates as a secondary carbon source (three replicates per secondary carbon substrate).

그 중에서도 octanoate와 nonanoate를 이차기질로 넣어준 plate에서 배양 8일 후 나타난 clear zone size는 이차기질이 첨가되지 않은 plate에 비해 69~76% 수준으로 가장 작았으나, 어떠한 경우에도 MCL-PHA가 첨가되어 있는 조건하에서는 extracellular MCL-PHA depolymerase의 작용에 의한 clear zone이 형성되었다. PHHp 및 PHO 고분자를 대상으로 수행된 실험에서도 이차기질이 clear zone size에 미치는 영향은 비수한 수준이었다.

한편 MCL-PHAs (PHHx, PHHp, PHO, PHN, PHD, PHUD)가 함유된 plate에서의 clear zone size와 colony size를 측정된 결과, PHO 고분자 plate의 clear zone size가 가장 컸으며, PHHp 고분자가 탄소원으로 사용된 plate의 clear zone size가 가장 작았다. 그 외의 고분자 plate에서의 clear zone size는 비슷하였다(Fig. 2a). 균주의 colony size 경우 clear zone size가 가장 컸던 PHO 고분자 plate에서 생성되는 colony size가 가장 컸으며, 가장 작은 clear zone size를 나타냈던 PHHp 고분자 plate에서 생성되는 colony size가 가장 작았다(Fig. 2b). 각 plate에서 관찰된 clear zone size와 colony size간에는  $r=0.83$  ( $P>0.001$ )의 높은 상관관계를 보였다.

**고분자 현탁액의 탁도 감소율**

각각의 MCL-PHAs (PHHx, PHHp, PHO, PHN, PHD, PHUD) 현탁액에 PHO를 inducer로 사용하여 *Pseudomonas* sp. RY-1으로부터 얻은 MCL-PHA depolymerase 조효소액을 처리하고, 고분자의 분해에 의해 발생하는 현탁액의 탁도 감소율을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 단위체의 탄소수가 짝수인 PHHx, PHO, PHD 고분자 현탁액에서의 OD 감소율이 상대적으로 컸으며, 단위체의 탄소수가 홀수인 MCL-PHAs 중에서 PHN을 제외한 PHHp과 PHUD 현탁액에서의 탁도 감소율은 상대적으로 작았다. 이런 결과가 *Pseudomonas* sp. RY-1으로부터 MCL-PHA depolymerase를 얻기 위하여 사용된 탄소원(PHO)에 의한 영향인지 여부를 확인하기 위하여 단위체의 탄소수가 홀수 탄소원인 PHN을 inducer로 사용하여 *Pseudomonas* sp. RY-1으로부터 MCL-PHA depolymerase 조효소액을 얻고, 동일한 고분

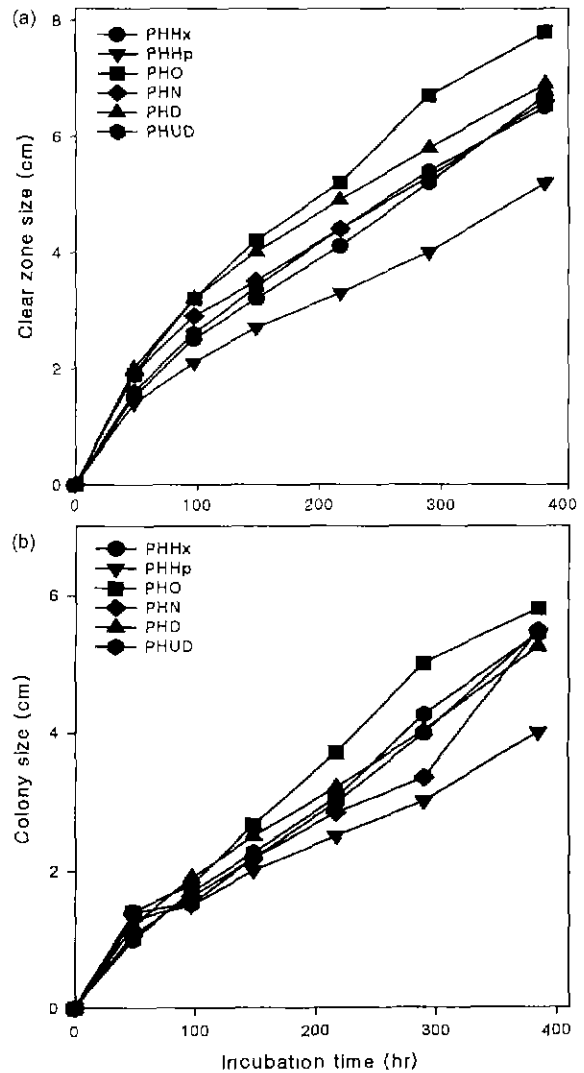


Fig. 2. Changes in clear zone (a) and colony (b) size of *Pseudomonas* sp. RY-1 grown on plates containing different MCL-PHAs as the sole carbon source (three replicates per MCL-PHA).

자 현탁액에 대한 탁도 감소율을 측정해 보았으나 유사한 결과를 나타내었다.

**Respirometry**

각각의 MCL-PHA를 탄소원으로 첨가한 배양액으로부터 *Pseudomonas* sp. RY-1에 의해 소모된 산소량을 computerized respirometer를 이용하여 측정하였다(Fig. 4). 배양 200 시간까지 누적된 산소소모량은 PHHx와 PHO 고분자에서 가장 높았으며, 반면에 PHN과 PHUD에서 가장 낮았다. PHUD의 경우 최종적으로 소모된 산소량이 PHHx의 72% 수준에 머물렀다. 이 고분자들을 탄소원으로 이용하여 자란 균주의 전체량을 측정된 결과, PHHx의 경우에 전체량이 0.81 g/l로 가장 높았으며 PHHp의 경우 0.62 g/l로 가장 낮았다.

또한 동일한 배양조건에서 MCL-PHA의 무기물화(mineralization)의 결과로 발생한 이산화탄소의 경시적 변화는 Fig 5에서와

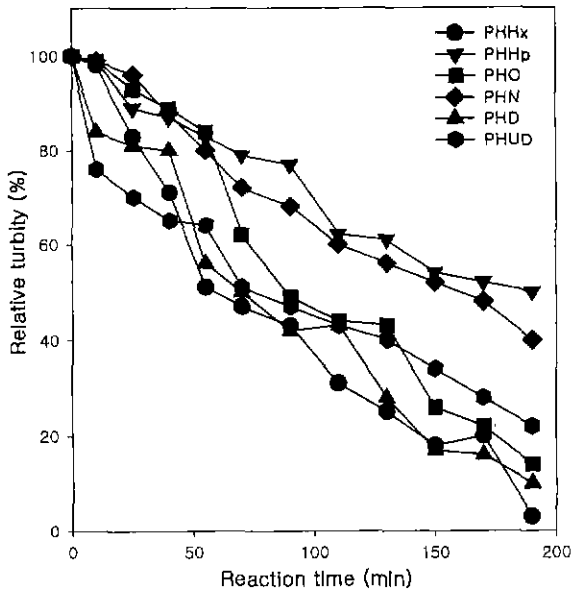


Fig. 3. Changes in turbidity of MCL-PHA suspensions treated with extracellular MCL-PHA depolymerase from *Pseudomonas* sp. RY-1 (three replicates per MCL-PHA).

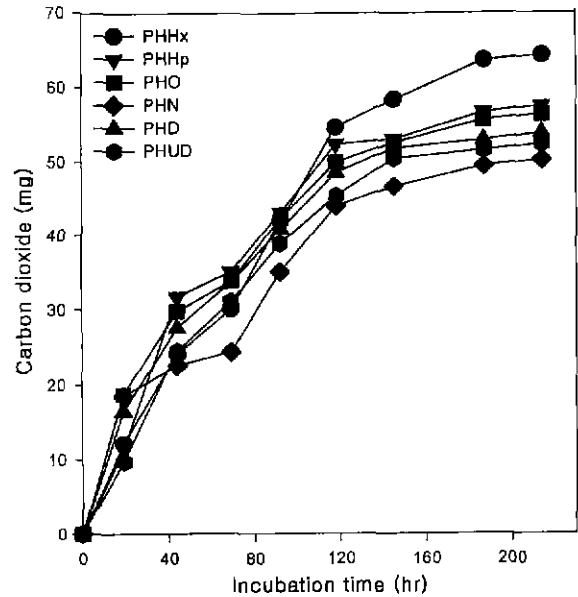


Fig. 5. Carbon dioxide production as a result of the mineralization of MCL-PHAs by *Pseudomonas* sp. RY-1 (two replicates per MCL-PHA).

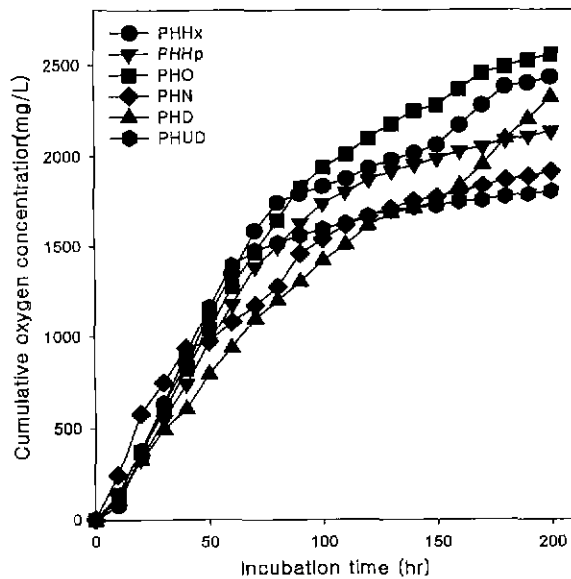


Fig. 4. Cumulative concentration of oxygen consumed by *Pseudomonas* sp. RY-1 during the growth in a medium containing different MCL-PHAs as the sole carbon source (two replicates per MCL-PHA).

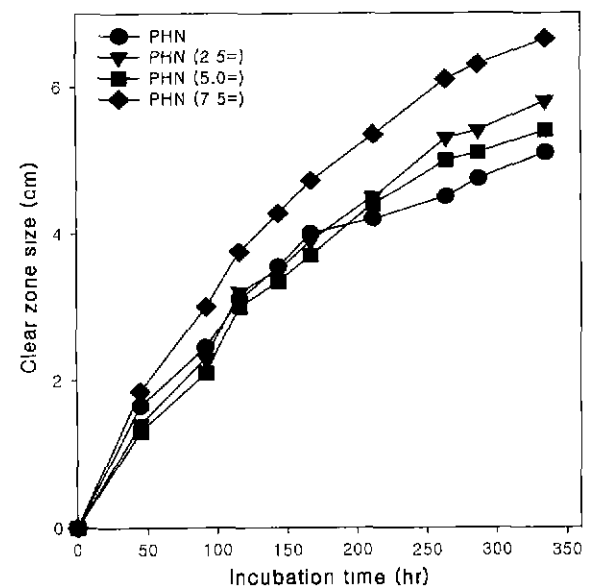


Fig. 6. Hydrolysis of MCL-PHAs bearing different concentrations of unsaturated monomer unit on clear zone plates by *Pseudomonas* sp. RY-1 (three replicates per polymer).

같다. 배양 150 시간까지의 이산화탄소 생성률은 0.39 mg/h로 PHHx 고분자에서 가장 높았으며, 0.31 mg/h의 PHN 고분자가 가장 낮았으나 고분자간의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

**불포화기를 기능기로 갖는 PHAs의 생분해도 측정**

10-UND (=)와 NA의 농도를 각각 2.5 mM:7.5 mM, 5.0 mM:5.0 mM, 7.5 mM:2.5 mM의 비로 혼합 탄소원을 사용하여 생합성된 PHN (2.5=), PHN (5.0=) 및 PHN (7.5=) 고분자의

이중결합 함유 단위체의 함량은 각각 27.1%, 52.4% 및 78.6%로서 첨가된 10-UND (=)의 농도에 비례하였다(Table 2). 이들 고분자들이 포함된 plate에서 *Pseudomonas* sp. RY-1을 접종하여 생기는 clear zone size를 측정된 결과, PHN plate보다는 이중결합이 들어간 고분자 plate에서의 clear zone size가 컸다(Fig. 6) 특히, 이중결합이 가장 많이 포함된 PHN(7.5=) plate에서의 clear zone size가 가장 컸다.

또한 MCL-PHA depolymerase 조효소액을 처리하여 발생하는

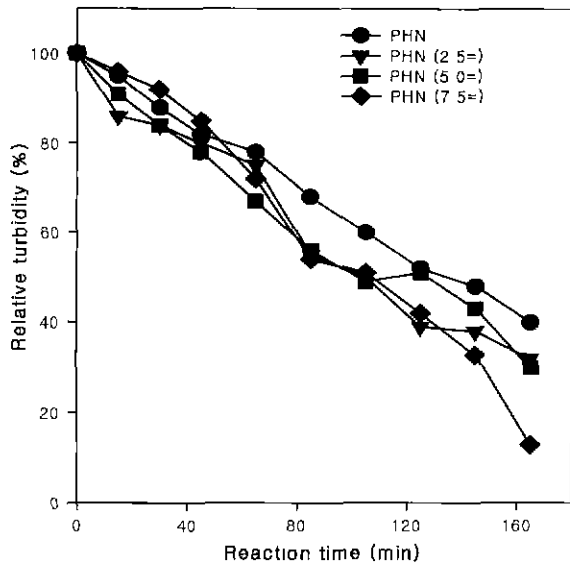


Fig. 7. Effect of unsaturated group concentration on enzymatic hydrolysis of MCL-PHAs in the turbidity assay (three replicates per polymer).

고분자의 현탁액의 탁도 감소율도 대체로 이중결합이 포함된 고분자 현탁액에서 보다 크게 나타남으로써 불포화기를 함유하는 단위체의 함량이 높은 고분자가 보다 빠르게 분해됨을 보였다 (Fig. 7).

## 고찰

최근 생분해성 고분자에 대한 관심이 고조되면서 생분해성 고분자의 기준 설정 및 생분해도 평가를 위한 측정 방법에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 특히, 미생물에 의하여 생합성되는 PHAs는 대표적 생분해성 고분자로서 다양한 분야에 응용이 기대되고 있으며, 이에 따라 이들 고분자의 자연환경 내에서의 생분해 거동에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 관련하여 polyhydroxybutyrate 및 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)와 같은 SCL-PHAs의 경우 고분자의 조성이 생분해에 많은 영향을 주고 있음이 많은 연구자들에 의해 밝혀진 바 있다(1,17,18,24). 이에 반하여, MCL-PHAs의 분해실험에 대해서는 아직까지 많은 연구가 되어있지 않으며, 특히 고분자 조성에 따른 생분해도의 비교는 이루어지지 않고 있다. 이러한 이유는 생분해 시험에 필수적인 MCL-PHAs 현탁액 제조 방법(22)이 비교적 최근에서야 확립된 것과 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 사용된 *Pseudomonas* sp. RY-1의 MCL-PHA depolymerase는 MCL-PHA에 의해 생산이 유도되는 inducible enzyme으로서 조성이 서로 다른 다양한 종류의 MCL-PHAs에 기질 특이성을 갖고 있음이 확인되었다. 특히 MCL-PHA 고분자 외에 이차기질로서 glucose, heptanoate, octanoate, nonanoate 등이 첨가된 plates에서 clear zone size가 억제됨은 *Pseudomonas* sp. RY-1의 MCL-PHA depolymerase 생성이 쉽게 이용할 수 있

는 탄소원의 존재에 의해 저해받음을 보여준다(Fig. 1). 그러나 높은 농도의 이차기질이 존재하고 있음에도 배양시간에 따라 clear zone size의 증가가 일어나고 있음은 첨가된 MCL-PHA와 이차기질이 동시에 이용되고 있음을 시사하는 것으로, 이러한 현상은 PHO 및 PHN를 대상으로 수행된 *P. maculicola*의 경우와 매우 유사하다(6).

*Pseudomonas* sp. RY-1이 PHA 단위체의 탄소길이에 상관없이 모든 종류의 MCL-PHAs에 대한 분해능을 가지고 있음이 확인되었지만, 본 실험에서 사용된 clear zone size 측정, 효소에 의한 고분자 탁도 감소 측정 및 respirometry 시험의 결과는 MCL-PHAs의 단위체 조성에 따라 분해율에 차이가 있음을 보여 주었다(Fig. 2-5). 최근 Qunteros 등(21)은 *Comamonas* sp. 균주를 이용한 SCL-PHAs 및 MCL-PHAs의 생분해 실험에서 단위체 길이의 길이가 짧을수록 분해율이 증가됨을 보고하였다. 이에 반하여 본 실험의 *Pseudomonas* sp. RY-1은 결가지의 길이보다는 단위체의 탄소수가 홀수인지 혹은 짝수인지에 따라 분해율의 차이를 보였는데, 전체적으로 PHHx, PHO, PHD와 같이 단위체가 짝수개의 탄소로 구성된 고분자들의 분해율이 홀수개의 고분자들보다 상대적으로 높았다. 특히, 이런 경향은 고분자 현탁액에 조효소액을 처리하여 탁도 감소를 측정할 실험에서 두드러지게 나타났다(Fig. 3). 단위체 탄소수에 따른 생분해 차별성은 매우 독특한 현상으로서 MCL-PHA depolymerase 효소의 구조적 특징에 의한 기질의 친화성과 관련 있을 것으로 추정된다. 실제로 앞서 수행된 연구에서 *Pseudomonas* sp. RY-1로부터 분리·정제된 MCL-PHA depolymerase의 PHO 및 PHN에 대한  $K_m$  값은 각각 0.86 및 147 mg/ml로서, PHO에 대한 친화력이 보다 높은 것으로 조사된 바 있다(12).

결가지에 불포화기를 기능기로 갖는 PHAs는 화학적 개질을 통하여 친수성을 높일 수 있는 등 물성의 조절이 가능하기 때문에 그 응용성이 매우 높은 고분자이다(9,10,15). 이들 고분자에 대해서는 본 실험에서 사용한 방법들 중 가장 간편하고 시험조건에의 영향을 가장 적게 받는 clear zone size 측정과 고분자 현탁액의 탁도 감소 측정 방법을 이용하여 실험한 결과, 이중결합을 가지고 있는 고분자의 분해가 보다 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 6과 7). 일반적으로 SCL-PHAs의 경우 결정화도(crystallinity)가 낮은 고분자의 경우 생분해도가 보다 높은 것으로 알려져 있다(7,24). *P. oleovorans*로부터 생합성된 이중결합 함유 MCL-PHAs의 경우 이중결합의 함량에 따라 고분자의 결정성이 낮아진다는 점(14)을 고려해 볼 때, 본 실험에서의 결과는 고분자의 결정화도와 밀접하게 관련 있는 것으로 생각된다.

MCL-PHA의 생분해도 비교를 위하여 본 실험에서 사용된 실험실 시험법들은 시험기간이 짧고 정량적인 결과를 얻을 수 있으며 재현성이 높은 장점을 가지고 있다. 본 실험의 경우 각각의 시험방법을 통하여 얻어진 측정치간에는 매우 유의성있는 상관관계를 보이는 것으로 나타났다. 그러나 향후 MCL-PHAs 혹은 결가지에 기능기를 갖는 MCL-PHAs에 대한 산업적 응용이 이루어지기 위해서는 이들 고분자의 생분해성을 정확하게 이해하는 것이 필요하며, 이를 위한 측정 방법의 확립이 이루어져야 한다. 특히 MCL-PHAs의 화학적 조성 및 생분해성 사이의 관계를 이해

할 수 있을 경우, 화학적 조성의 변화를 통하여 고분자의 생분해성을 조절할 수 있을 것이며(13), 이는 MCL-PHAs의 산업적 용도를 확장시키는데 있어서도 매우 중요할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 기초과학연구소지원 학술연구조성비 (과제번호 1998-015-D00245)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Abe, H. and Y. Doi. 1999. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 185-192.
2. Augusta, J., R.J. Müller, and H. Widdecke. 1993. A rapid evaluation plate test for the biodegradability of plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 673-678.
3. Babu, G.N., W.J. Hammar, D.R. Rutherford, R.W. Lenz, R. Richards, and S.D. Goodwin. 1996. Poly-3-hydroxyalkanoates as pressure sensitive adhesives. p. 48-56. Proc. International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates '96 (Davos, Switzerland).
4. Bauer, E., C. Pemmerstorfer, P. Holubar, C. Plas, and R. Braun. 1991. Microbial activity measurement in soil—a comparison of methods. *J. Microbiol. Methods* 14, 109-117.
5. Chung, C.W., Y.S. Kim, Y.B. Kim, K.S. Bae, and Y.H. Rhee. 1999. Isolation of a *Pseudomonas* sp. strain exhibiting unusual behavior of poly(3-hydroxyalkanoates) biosynthesis and characterization of synthesized polyesters. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 847-853.
6. Foster, L.J.R., S.J. Zervas, R.W. Lenz, and R.C. Fuller. 1995. The biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoates). PHAs, with long alkyl substituents by *Pseudomonas maculicola*. *Biodegradation* 6, 67-73.
7. Jendrossek, D., A. Schürmer, and H.G. Schlegel. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 451-463.
8. Kaplan, D.L., J.M. Mayer, M. Greenverger, R. Gross, and S. McCarthy. 1994. Degradation methods and degradation kinetics of polymer films. *Polym Degrad Stab* 45, 165-172.
9. Kim, D.Y., Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 1998. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) bearing carbon-carbon triple bonds. *Macromolecules* 31, 4760-4763.
10. Kim, D.Y., Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2000. Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *Int. J. Biol. Macromol.* In Press.
11. Kim, H., H.S. Ju, and J. Kim. 2000. Characterization of an extracellular poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate) depolymerase from *Xanthomonas* sp. JS02. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 323-327.
12. Kim, H.M., K.E. Ryu, K.S. Bae, and Y.H. Rhee. 2000. Purification and characterization of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas* sp. RY-1. *J. Biosci. Biotechnol.* 89, 196-198.
13. Kim, Y.B., D.Y. Kim, and Y.H. Rhee. 1999. PHAs produced by *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas oleovorans* growth with n-alkanoic acids containing aromatic groups. *Macromolecules* 32, 6058-6064.
14. Kim, Y.B., R.W. Lenz, and R.C. Fuller. 1995. Poly-3-hydroxyalkanoates containing unsaturated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *J. Polym. Sci.* 33, 1367-1374.
15. Lee, M.Y., W.H. Park, and R.W. Lenz. 2000. Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer* 41, 1703-1709.
16. Madison, L.L. and G.W. Huismann. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxy-alkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53.
17. Mergaert, J., C. Anderson, A. Wouters, and J. Swings. 1994. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. *J. Environ. Polym. Degrad.* 2, 177-183.
18. Mergaert, J., A. Webb, C. Anderson, A. Wouters, and J. Swings. 1993. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3233-3238.
19. Poirier, Y., C. Nawrath, and C. Somerville. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. *Bio/Technology* 13, 142-150.
20. Preusting, H., A. Nijenhuis, and B. Witholt. 1990. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* 23, 4220-4224.
21. Quinteros, R., S. Goodwin, R.W. Lenz, and W.H. Park. 1999. Enzymatic biodegradation of polymers. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 135-143.
22. Ramsay, B.A., I. Saracovan, J.A. Ramsay, and R.H. Marchessault. 1994. A method for the isolation of microorganisms producing extracellular long-side-chain poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) depolymerase. *J. Environ. Polym. Degrad.* 1, 1-7.
23. Schürmer, A., D. Jendrossek, and H.G. Schlegel. 1993. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid)[P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1220-1227.
24. Yoshic, N., M. Fujiwara, K. Kasuya, H. Abe, Y. Doi, and Y. Inoue. 1999. Effect of monomer composition and composition distribution on enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromol. Chem. Phys.* 200, 977-982.

(Received May 25, 2000/Accepted June 12, 2000)

---

**ABSTRACT : Biodegradation of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. RY-1**

**Kang-Eun Ryu, YoungBaek Kim,<sup>1</sup> Young-Ki Yang,<sup>2</sup> and Young Ha Rhee\***(Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea, <sup>1</sup>Department of Polymer Engineering, PaiChai University, Taejon 302-735, Korea, <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

Biodegradation of various medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHAs) by an extracellular depolymerase system from *Pseudomonas* sp. RY-1 was investigated under laboratory conditions. The degradation rate of the polymers was determined by quantitative clear zone technique, enzyme (turbidity) assay, and respirometry assay. Although the enzyme system secreted by *Pseudomonas* sp. RY-1 was capable of degrading all MCL-PHAs tested, its secretion was influenced by the availability of secondary carbon sources. The rate of enzymatic degradation of MCL-PHAs was dependent upon the monomeric composition of the polyesters and reduced as the chain lengths of the monomer units in the polyesters increased. MCL-PHAs containing C-even monomer units showed faster degradation rate than MCL-PHAs containing C-odd monomer units. Respiration rates of MCL-PHAs with C-even monomer units were also much faster than those of MCL-PHAs with C-odd monomer units. The degradation rate of MCL-PHAs bearing unsaturated substituents was faster than that of mcl-PHAs without functional substituents, which is suggesting the correlation between the degradation rate and the crystallinity of MCL-PHAs.