

Pseudomonas chlororaphis HS21에 의한 식물유로부터 Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates 생합성에 미치는 포도당 및 아크릴산의 첨가 효과

정문규 · 윤혜선 · 김형우¹ · 남진식² · 정정욱 · 이영하*

충남대학교 생명과학부 미생물학과, ¹충남대학교 생물공학연구소, ²수원여자대학 식품영양학과

식물유를 탄소원으로 사용하여 medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHAs)를 생산할 수 있는 *Pseudomonas chlororaphis* HS21을 대상으로 대사경로의 변화를 통하여 식물유의 MCL-PHA로의 전환율을 증진시키고 MCL-PHAs의 단위체 조성의 변화를 유도하기 위한 방안을 모색하였다. *P. chlororaphis* HS21의 MCL-PHAs 생합성은 세포생장과 동시에 일어나는 특징을 보였으며, 팜유를 유일 탄소원으로 사용한 희분배양의 결과 2.4 g/L의 전체량과 전체량의 40.2 wt%에 해당하는 MCL-PHAs를 얻을 수 있었다. 또한 생합성된 MCL-PHAs의 단위체는 3-hydroxyhexanoate (7.0 mol%), 3-hydroxyoctanoate (45.3 mol%), 3-hydroxydecanoate (39.0 mol%), 3-hydroxydodecanoate (6.8 mol%) 및 3-hydroxytetradecanoate (1.9 mol%)로 구성되어 있었다. 식물유와는 달리 포도당과 같은 탄수화물은 *P. chlororaphis* HS21의 생장에는 이용되지만 MCL-PHAs의 생합성에는 거의 이용되지 못하는 탄소원임을 확인하고, 식물유와 함께 포도당을 보조기질로 공급한 결과 식물유의 MCL-PHAs로의 전환율이 크게 증가함으로써, PHA 생산에 직접적으로 이용되지 못하는 보조기질의 사용을 통하여 특정 기능을 함유하는 기질로부터 해당 기능을 갖는 MCL-PHAs를 효율적으로 생산할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 지방산의 β -oxidation 회로를 방해하는 아크릴산을 첨가할 경우 아크릴산의 독성에 의하여 세포생장은 저해를 받지만 세포 내 MCL-PHAs의 축적율은 감소하지 않았으며, MCL-PHAs를 구성하는 단위체 중 3-hydroxydodecanoate 및 3-hydroxytetradecanoate와 같이 탄소수가 보다 큰 단위체의 함량이 크게 증가하였다. 이러한 특징에 의해 헤바라기유와 옥수수유로부터는 3-hydroxydodecanoate, 3-hydroxytetradecanoate와 같은 불포화 단위체의 함량이 크게 증가된 기능성 MCL-PHAs를 생산할 수 있었다. 이러한 결과는 아크릴산의 첨가와 같은 PHA 대사경로의 인위적 변화가 새로운 단위체 조성을 갖거나 기능을 가짐으로써 독특한 물성을 지니는 신규의 MCL-PHAs 개발에 유용할 수 있음을 보여준다.

Key words □ acrylic acid, β -oxidation inhibition, cosubstrate, pathway engineering, polyhydroxyalkanoate, *Pseudomonas chlororaphis* HS21

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 과량의 탄소원이 존재하는 조건에서 에너지 및 탄소원으로서 미생물의 세포내에 축적되는 저장성 폴리에스터 고분자이다. 미생물에 의해 생합성되는 PHAs의 조성은 사용되는 균주와 탄소원에 따라 달라지게 되는데, PHAs는 그 조성에 따라 다양한 물성을 지니며 또 생분해성과 생체친화성의 장점을 가짐으로써 화학합성 고분자를 대체할 수 있는 유용한 생물소재로 많은 주목을 받고 있다(20). PHAs는 구성 단위체의 탄소수에 따라 크게 short-chain-length PHAs (SCL-PHAs)와 medium-chain-length PHAs (MCL-PHAs)로 구분된다. 탄소수가 5 이하인 SCL-PHAs는 높은 결정성과 높은 용융점을 갖는 열가소성 고분자인데 반하여, 단위체의 탄소수가 6 이상인 MCL-PHAs는 일반적으로 낮은 결정성과 낮은 용융점을 가지며 고무 탄성체 혹은 점착제의 성질을 보인다(1, 24).

MCL-PHAs는 두 가지 이상의 단위체를 포함하는 공중합체의

형태로 생합성 되어지며, 이러한 공중합체를 생합성하는 미생물로는 *Pseudomonas oleovorans*와 *P. putida*를 비롯한 RNA homology group I의 pseudomonads가 있다(7, 8, 12). 이 미생물들은 alkanes, alkenols 및 alkanic acids 등을 탄소원으로 사용하여 C₆에서 C₁₄사이의 3-hydroxyalkanoic acid를 단위체로 하는 다양한 MCL-PHAs 공중합체를 생합성한다. MCL-PHAs의 생합성은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 주로 fatty acid β -oxidation과 fatty acid de novo synthesis의 대사 과정을 거쳐 다양한 (R)-3-hydroxyacyl-CoA가 만들어진 후, 이를 기질로 인지할 수 있는 PHA synthase(또는 PHA polymerase)의 중합작용에 의해 이루어진다(4, 10).

MCL-PHAs 생산을 위하여 주로 이용되고 있는 지방산은 비교적 값비싼 탄소원이기 때문에 MCL-PHAs의 상업화를 저해하는 주요 원인이 되고 있다(17). 일반적으로 탄소원이 PHA 발효생산비 전체에서 차지하는 비율이 37% 이상 차지함을 고려해 볼 때(14), PHA 생산에 있어서 저가의 탄소원 개발과 탄소원에 대한 PHA 전환수율($Y_{p/s}$) 향상은 매우 중요하다. 이러한 관점에서 최

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

근 지방산을 주성분으로 하는 유지류를 일반 지방산의 대체 물질로 사용하여 MCL-PHAs를 생산하기 위한 시도가 이루어지고 있다. 특히 포화지방산을 다량 함유하고 있는 동물성 유지류와는 달리 식물성 유지류는 많은 불포화지방산을 함유하고 있기 때문에 곁가지에 불포화기를 갖는 MCL-PHAs를 생산하는데 매우 유리하다(8, 17-19, 21). 불포화기를 갖는 MCL-PHAs는 자체적으로 점착제로서의 성질을 가지고 있고, 또 자외선이나 산화제에 의한 화학적 개질(chemical modification)을 통하여 다양한 물성의 고분자로 전환이 가능하기 때문에 의료용 소재로 많은 관심을 모으고 있다(2, 13).

최근 본 실험실에서는 유지 분해능이 우수하여 여러 가지 식물성 유지가 유일 탄소원으로 첨가된 배지에서 점착성 MCL-PHAs를 효율적으로 축적하는 *Pseudomonas chlororaphis* HS21를 분리한 바 있다(23). 이 균주는 식물성 유지류의 종류에 따라 전체량의 45%까지 MCL-PHAs를 축적할 수 있으나, 공급된 탄소원이 세포생장을 위한 에너지 대사와 MCL-PHAs 생합성 대사에 모두 이용됨으로써 탄소원에 대한 PHA 전환수율이 낮은 단점을 가지고 있다. 또한 탄소원으로 사용된 식물유의 탄소수가 12 이상인 지방산으로 구성되어 있음에도 불구하고 생합성된 MCL-PHAs의 단위체는 3-hydroxyhexanoate (C_6), 3-hydroxyoctanoate (C_8) 및 3-hydroxydecanoate (C_{10})가 대부분을 차지하는 현상을 보였다(25). 이러한 현상은 지방산의 β -oxidation에 기인하는 것으로서 실제로 대부분의 pseudomonads에서 생합성되는 MCL-PHAs의 단위체 탄소수는 10 이하이다(7, 11). 탄소수가 보다 큰 단위체로 구성된 MCL-PHAs가 반드시 보다 유용한 것은 아니지만 일반적으로 탄소의 길이가 긴 단위체의 MCL-PHAs의 경우 결정화가 보다 쉽게 이루어짐으로써 강인성(toughness)이 증가되는 등 서로 다른 용도로 활용될 수 있는 MCL-PHAs의 다변화를 도모할 수 있다는 점에서 의미가 크다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 *P. chlororaphis* HS21를 이용하여 식물유로부터 MCL-PHAs를 생합성하는 과정에서 탄소원인 식물유에 대한 MCL-PHAs 전환수율을 향상시키고 탄소수가 보다 큰 단위체로 구성된 MCL-PHAs의 생합성 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 PHA 생합성에는 이용되지 않으나 세포 증식에 유용한 탄소원을 보조기질로 사용하는 방안과 지방산의 β -oxidation을 저해하는 아크릴산을 처리하여 MCL-PHAs 생합성 대사과정에 변화를 유도하는 방안을 모색하고, 이와 같은 보조기질 및 저해제 첨가가 식물유로부터 MCL-PHAs의 생합성 및 조성 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용된 *P. chlororaphis* HS21은 기름에 오염된 토양으로부터 농화 배양을 통해 분리한 균주로서(23), 기본적으로 5 g/L 식물유를 탄소원으로 사용한 E* 배지 [1 L 당 1.10 g (NH_4)₂HPO₄, 5.80 g K₂HPO₄, 3.70 g KH₂PO₄, 0.37 g MgSO₄ · 7H₂O, 3 ml microelement solution (1 L 당 0.29 g ZnSO₄ · 7H₂O, 1.98

g MnCl₂ · 4H₂O, 1.67 g CaCl₂ · 2H₂O, 2.78 g FeSO₄ · 7H₂O, 2.81 g CoSO₄ · 7H₂O, 0.17 g CuCl₂ · 2H₂O) 함유]를 이용하여 30°C에서 배양하였다. MCL-PHAs 생산을 위한 *P. chlororaphis* HS21의 배양은 5 L jar fermentor (Korea Fermenter Co. Ltd.)를 이용하여 5 g/L 식물유가 포함된 E* 배지 3 L로 배양하였다. 종균은 동일 배지가 포함된 플라스크에서 24 시간 진탕배양 (200 rpm) 하였으며, 발효배지 부피의 10% (v/v)의 양으로 발효조에 접종하였다. 발효조에서의 배양을 위하여 기본적으로 정한 교반 속도, pH, 온도 및 통기율은 각각 250 rpm, pH 7.0, 30°C 및 1 vvm이었다. 배양액내 미생물의 증식은 spectro-photometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 모든 배양 실험은 3회 이상의 반복 실험을 통해 실험 결과에 대한 오차를 줄였다.

PHA 분석

배양이 끝난 후 배양액을 6000 rpm으로 15 분간 원심분리하여 균체를 수득하고, 냉동실에서 얼린 후 동결건조 하였다. PHA를 추출하기 위하여 동결건조한 세포를 적당량의 sea sand와 함께 막자사발에 넣어 곱게 갈아 thimble filter (Advantec Co.)에 넣고, soxhlet extractor에서 chloroform으로 PHA를 추출하였다. 추출된 고분자는 차가운 methanol에 PHA가 녹아있는 chloroform 용액을 한 방울씩 떨어뜨리면서 vortex mixer로 격렬하게 저어주는 방법을 이용하여 정제하였다(2). 이러한 과정을 세 번 이상 반복하여 최종적으로 PHA의 순도를 높였으며, 획득된 PHA에 남아있는 methanol은 상온에서 고분자를 건조시키는 과정에서 모두 제거되었다. 정제된 PHA의 정량 및 정성분석은 gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) analysis에 의해 수행하였으며(13), 이때 내부 표준물질(internal standard)로는 2 mg/ml의 benzoic acid를 사용하였다.

배양액 내 영양원 잔량 측정

발효조(fermenter)를 이용한 배양 중 일정 시간별로 배양액을 채취한 후 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하고, 상등액은 탄소원과 질소원의 잔량 측정에 사용하였으며, 침전된 균체는 동결건조하여 전체량(dry cell weight) 측정에 사용하였다. 상등액에 존재하는 식물유의 잔량은 gas chromatography에 의하여 측정하였다. 이를 위하여 먼저 5 ml의 상등액에 1 ml의 HCl을 넣어 5 분 동안 vortexing 한 후, 0.2% benzoic acid가 포함된 chloroform 5 ml를 첨가하여 또다시 vortexing 하였다. 여기에 0.88% KCl 10 ml를 첨가하여 3000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 층을 분리시켰으며, 분리된 두 층 중 아래의 chloroform층을 취하여 Pyrex cap tube에 옮겨 담고 15% sulfuric acid가 녹아있는 methanol 2 ml를 넣어 100°C water bath에서 1 시간 동안 methanolysis하였다. 이후 시료를 냉각시키고 증류수 1 ml를 첨가하여 3 분간 강하게 vortexing하여 섞어준 후, 아래의 chloroform층을 취하여 GC/MS로 분석하였다. 상등액 내 포도당의 잔량은 Yellow Springs Instrument (YSI) glucose analyzer를 이용하여 측정하였다. 배양액내의 암모늄 이온 (NH_4^+)농도의 측정은 직접 네슬러화법(direct nesslerization)을 사용하여 측정하였다(5).

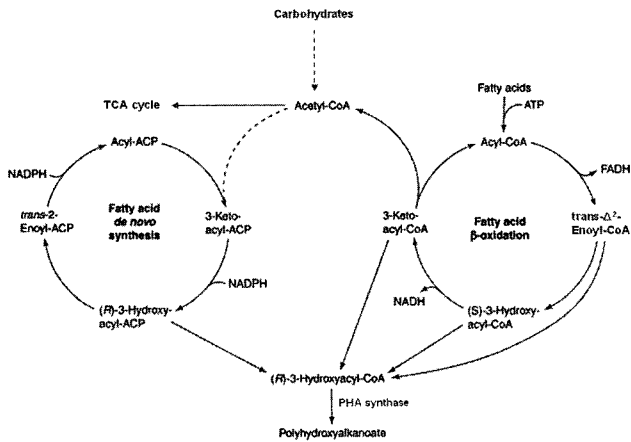


Fig. 1. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis in context of microbial metabolism.

결과 및 고찰

팜유를 이용한 회분 배양

식물유 중 *P. chlororaphis* HS21로부터 MCL-PHAs 생합성에 가장 효과적인 팜유를 단일 탄소원으로 사용한 회분배양을 통하여 탄소원의 농도에 따른 세포 성장, MCL-PHAs의 생합성량 및 단위체 조성의 경시적 변화를 조사하였다(Fig. 2). 먼저 5 g/L의 팜유를 단일 탄소원으로 공급해 주었을 경우(Fig. 2A), 탄소원과

질소원 [초기에 1 g/L (NH₄)NO₃ 공급]이 모두 고갈되는 배양 28 시간까지 세포 내에 축적된 PHAs의 양 (%DCW)은 세포의 성장과 유사한 양상으로 증가하여 최대 건체량의 40.2%에 달하였다. 그러나 탄소원의 고갈 이후 PHAs 축적량의 감소가 일어났는데, 이는 저장물질로 세포 내에 축적된 PHAs가 intracellular PHA depolymerase 작용에 의해 분해되어 탄소 및 에너지원으로 사용되었기 때문으로 보여진다(3). 한편, 배양 시간에 따라 생합성되는 MCL-PHAs 단위체의 조성 변화를 살펴보면 배양 초기에 생합성된 MCL-PHAs는 주로 3-hydroxyoctanoate (3HO)와 3-hydroxydecanoate (3HD)로만 구성되어 있고 3HO가 3HD에 비하여 약 2배 정도 많이 존재하였다. 그러나 미생물의 성장과 MCL-PHAs 생합성이 활발히 이루어지는 배양 20시간 이후에는 3-hydroxyhexanoate (3HHx)의 출현과 함께 3HD의 구성비가 증가하는 반면에 3HO의 구성비는 감소함으로써 세포 내 에너지 대사의 효율성에 따라 생합성되는 MCL-PHAs의 단위체 조성이 달라짐을 보여주었다. 이에 반하여 탄소원의 고갈에 의해 MCL-PHAs의 분해가 이루어지는 시기에 존재하는 고분자의 단위체 중에는 3HD의 구성비가 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 MCL-PHAs의 단위체 중 3HHx, 3HO에 비하여 3HD가 보다 선택적으로 분해되고 있음을 의미한다. 만약 세포 내에 축적된 PHA granules간에 단위체의 조성이 일정하다면 intracellular PHA depolymerase의 작용에 의해 모든 granules이 일정하게 분해되기 때문에 남아있는 PHAs의 단위체 조성은 변하지

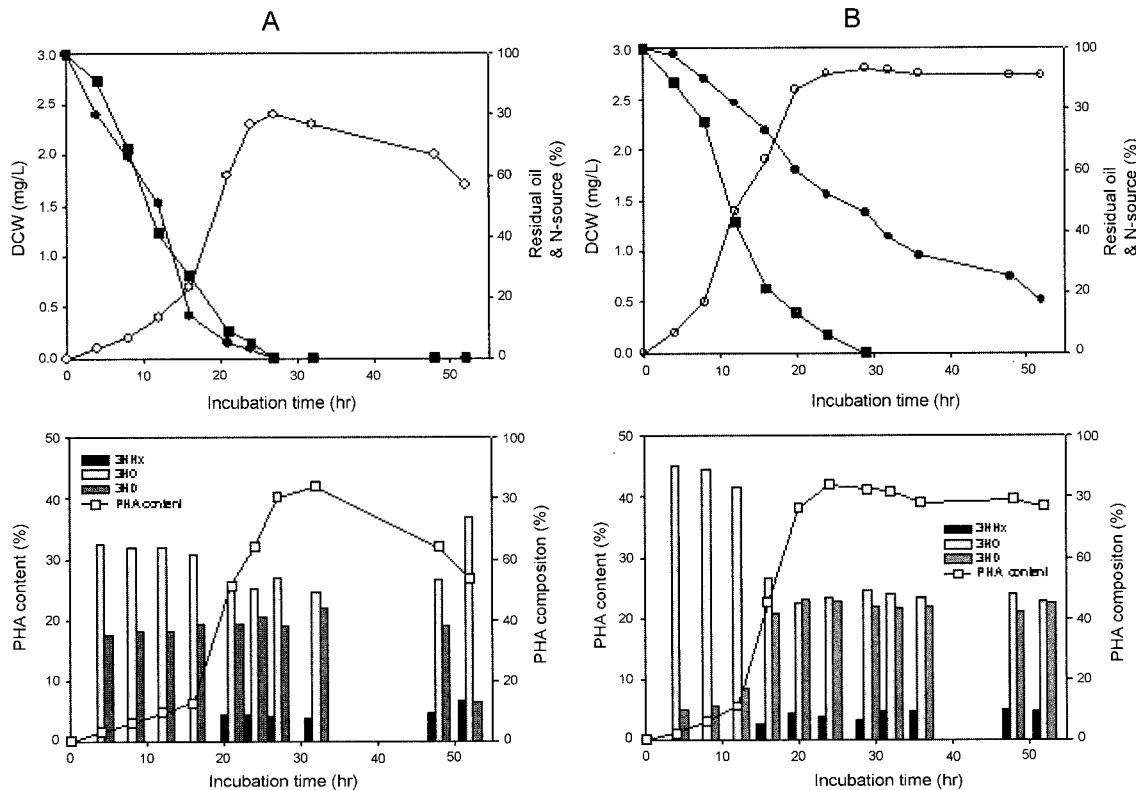


Fig. 2. Time courses of cell growth and MCL-PHA accumulation during the batch fermentation of *P. chlororaphis* HS21 in E* medium containing 5 g/L (A) and 10 g/L (B) of palm oil as the sole carbon substrate. Symbols: ○, cell growth; ●, residual oil; ■, residual N-source; □, PHA content.

Table 1. Effect of palm oil concentration on cell growth and MCL-PHA accumulation in batch cultures of *P. chlororaphis* HS21

Palm oil (g/L)	Culture time (hr)	Dry cell weight (g/L)	Residual oil (g/L)	PHA content (g/L)	PHA composition ^a (mol%)					Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Overall Productivity (g/hr)
					3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HTD			
5	27	2.4	0	0.965	7.0	45.3	39.0	6.8	1.9	0.48	0.1929	0.0357
10	29	2.8	4.3	1.156	6.2	43.2	42.5	6.4	1.7	0.49	0.2028	0.0398
20	33	2.6	12.4	1.118	6.9	43.0	41.2	7.1	1.8	0.34	0.1471	0.0338
30	36	2.6	21.9	1.092	6.5	44.8	40.4	6.6	1.7	0.32	0.1348	0.0303

^aPHAs content-and composition were determined by GC-MS. 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HTD, 3-hydroxytetradecanoate.

않을 것이다. 따라서 본 실험의 결과는 *P. chlororaphis* HS21 세포 내에 축적된 PHA granules간에 composition distribution이 매우 상이할 수 있으며, 상대적으로 3HD 함량이 많은 PHA granules가 상대적으로 먼저 intracellular PHA depolymerase의 작용을 받았음을 시사한다. 실제로 미생물로부터 생합성되는 PHAs 공중합체의 경우, 균주 및 배양조건 등에 따라 composition distribution이 크게 달라질 수 있으며(22), 또 생합성된 PHAs의 단위체 조성이 같다 할지라도 composition distribution의 범위가 좁거나 (즉 granule간 단위체 조성의 차이가 크지 않음) 혹은 넓거나 (즉 granule간 단위체 조성의 차이가 큼)에 따라 고분자의 성질에 큰 영향을 줄 수 있음이 밝혀지고 있다(15).

한편 10 g/L의 팜유를 단일 탄소원으로 공급한 경우의 결과는 Fig. 2b에서 보는 바와 같다. 질소원의 고갈은 5 g/L의 탄소원을 넣어 준 경우와 유사하게 배양 30 시간에 나타났으나, 탄소원은 전 실험보다 2배의 양을 공급하였기 때문에 배양 50 시간까지도 고갈이 되지 않고 약 20 % (2 g/L)가 남아있었다. 세포의 생장은 5 g/L의 팜유를 넣어주었을 때와 마찬가지로 질소원이 고갈되는 시점에서 최고의 전체량 (2.6 g/L)을 보였으며, 이후의 배양기간 중에는 탄소원이 배양액 내에 남아 있기 때문에 전체량의 변화를 보이지 않았다. MCL-PHAs의 생합성은 세포의 생장과 비슷한 양상을 보였는데, 이는 대부분의 미생물의 경우 탄소원이 존재하지만 질소, 인 등의 영양원이 결핍되는 불균형 영양조건에서 PHA의 생합성이 이루어진다는 점(6)에서 매우 대조되는 현상이다. 최근 *P. chlororaphis* HS21와 마찬가지로 세포생장과 연관된 PHA 생합성(growth-associated PHA synthesis) 양상을 보이는 균주들이 보고된 바 있다(11). 생합성된 MCL-PHAs의 단위체 조성은 5 g/L 팜유가 공급된 경우와 유사하게 배양초기에는 3HO가 80 mol% 이상으로 높게 나타났으며, 세포의 생장과 MCL-PHAs 생합성이 활발한 시점부터는 3HO와 3HD가 비슷한 수준의 mol%를 보였다.

이에 반하여 팜유를 과량 공급(20 g/L 혹은 30 g/L)하여 수행한 회분발효의 경우, 세포 생장 및 MCL-PHAs 생합성이 다소 지연되는 것으로 나타났으나 획득된 최대 전체량 및 MCL-PHAs 축적량은 Fig. 2에서 얻은 결과와 유사한 수준이었다(미제시 자료). Table 1은 팜유의 농도에 따라 최대 전체량과 MCL-PHAs 생성량을 나타낸 배양시간에서의 고분자 조성 및 발효효율을 비교한 것이다. 공급된 탄소원의 농도에 상관없이 최대 전체량과 MCL-PHAs 축적량은 각각 2.6 g/L 및 42%DCW의 범위로 비슷

하였고, 생합성된 고분자의 조성 상에도 뚜렷한 차이가 발견되지 않았다. 그러나 탄소원이 20 g/L 이상 공급될 경우 소비된 탄소원에 대한 전체량 수율 및 MCL-PHAs 생산 수율은 다소 낮아졌는데, 이는 발효조 내 산소 확산의 제한 등과 같은 요인에 의하여 세포 생장이 비효율적으로 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다.

포도당과 아크릴산의 첨가 효과

세포 내 대사경로의 인위적 변경을 도모하는 pathway engineering은 PHAs의 생합성량을 증진시키고 PHAs를 구성하는 단위체 조성의 변화를 유도하는데 매우 유용한 기술이다(20). 본 연구에서는 보조기질과 억제제 (inhibitor) 첨가에 의한 pathway engineering을 통하여 주탄소원으로 공급된 식물유로부터의 MCL-PHAs 생합성의 향상 및 MCL-PHAs 조성 변화의 가능성을 조사하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 *P. chlororaphis* HS21의 생장을 위한 탄소원으로는 유용하나 MCL-PHAs 생합성에는 이용되지 못하는 값싼 탄소원을 탐색하였다. 그 결과 포도당, 과당 등의 단당류와 일부의 이당류는 *P. chlororaphis* HS21의 생장에 유용하나 MCL-PHAs 생합성을 위한 탄소원으로는 적합하지 않음을 확인할 수 있었다(미제시 자료). 이를 토대로 주탄소원인 팜유 외에 포도당을 보조기질로 첨가하였을 때, 세포의 생장과 MCL-PHAs 생합성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 보조기질인 포도당을 단일 탄소원으로 사용하였을 경우 27시간 배양 후 1.5 g/L의 전체량을 얻었지만 PHAs의 합성은 4% 미만으로 매우 낮았다. 팜유와 포도당의 복합탄소원을 사용하였을 경우 팜유만을 사용하였을 때와 비슷한 수준의 전체량을 얻었으나, 세포 내 PHAs의 축적량은 팜유만을 넣었을 경우보다 다소 낮았다. 또한 복합탄소원 공급시 얻어진 MCL-PHAs의 조성은 농도에 관계없이 단일 탄소원으로 팜유만 공급된 경우와 유사하였다. 그러나 소모된 팜유에 대한 PHAs 생성량, 즉 팜유가 MCL-PHAs로 전환되는 수율($Y_{p/s}$)은 복합탄소원 사용시 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 보조기질인 포도당이 생장에 필요한 에너지 대사에 이용됨으로써 주탄소원인 팜유가 MCL-PHAs 생합성 대사에 보다 많이 이용될 수 있음을 시사하는 것으로서, 결과지에 기능기를 갖는 MCL-PHAs 생산을 위하여 이용되고 있는 탄소원들이 비교적 고가임을 고려해볼 때 단위체 조성에 큰 영향을 주지 않으면서 기능성 MCL-PHAs를 보다 효율적으로 생산하는데 보조기질의 사용이 유효할 수 있을 것으로

Table 2. Fermentation results for *P. chlororaphis* HS21 grown with various carbon substrate mixtures and compositions of synthesized MCL-PHAs

Carbon source (g/L)		Culture time (hr)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	Y _{PS} (g/g)	PHA composition ^a (mol %)				
Palm oil	Glucose					3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HTD
5.0	-	27	2.40	0.969	0.2052	7.0	45.3	39.0	6.8	1.9
3.7	5	27	2.36	0.745	0.2094	6.7	43.9	41.4	5.6	2.4
2.5	10	27	2.38	0.718	0.2957	6.1	43.5	42.3	5.3	2.8
-	20	27	1.50	0.050	-	-	-	100	-	-

^aPHAs content and composition were determined by GC-MS analysis. 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HTD, 3-hydroxytetradecanoate.

기대된다.

아크릴산은 MCL-PHAs의 생합성 경로 중 하나인 지방산의 β -oxidation 회로를 억제하는 저해제로서, β -oxidation에 의한 acetyl-CoA의 생성 보다는 보다 긴 사슬의 중간산물들이 (R)-3-hydroxyacyl-CoA로 전환됨으로써 생합성되는 PHAs의 단위체 조성에 변화를 줄 수 있다(16). 따라서 SCL-PHAs만을 생합성하는 미생물로 알려진 *Ralstonia eutropha*는 지방산과 아크릴산을 공급해줄 경우, β -oxidation에 영향을 받아 3-hydroxypropionate (3HP)와 3-hydroxybutanoate (3HB)와 같은 SCL-PHAs 단위체 이외에도 MCL-PHAs의 단위체인 3HHx와 3HO를 생합성할 수 있다(6). 팜유와 포도당을 복합 탄소원으로 사용하고 아크릴산을 첨가하여 회분배양을 수행한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 배양액 내 아크릴산의 농도가 1 mM 또는 5 mM 공급시 세포 내 MCL-PHAs의 축적량은 30%DCW 수준으로 아크릴산이 공급되지 않은 대조군의 경우와 유사하였다. 그러나 *P. chlororaphis* HS21의 생장은 아크릴산에 의해 저해받는 것으로 나타났으며, 5 mM의 아크릴산 첨가에 의해 획득된 전체량은 1.66 g/L으로 대조군에 비하여 약 40% 감소하였다. 또한, 아크릴산의 첨가는 생합성된 MCL-PHAs의 단위체 조성에 큰 변화를 주었는데, 아크릴산이 첨가되지 않은 경우에 비하여 보다 탄소수의 길이가 큰 3-hydroxydodecanoate (3HDD)와 3-hydroxytetradecanoate (3HTD)의 함량이 크게 증가하는 경향을 보였다. 5 mM의 아크릴산을 첨가한 경우 3HDD와 3HTD의 mol%는 각각 17.6 mol%와 8.8 mol%로서 두 단위체의 합은 대조군에 비하여 2.9배 정도 높은 반면에 3HHx 및 3HO 단위체의 mol%는 크게 감소하였다. 이러한 결과는 아크릴산에 의하여 지방산 β -oxidation 회로가 방해를 받음으로써 acetyl-CoA의 생성은 감소하는 대신에 탄소수가 보다 큰 (S)-3-hydroxyacyl-CoA 또는 3-ketoacyl-CoA가 (R)-3-hydroxyacyl-CoA로 전환되고, 이로부터

PHA synthase 작용에 의해 MCL-PHAs가 생성됨을 간접적으로 보여주는 것으로서, 아크릴산 공급이 탄소수가 10 이상인 3-hydroxyalkanoates를 단위체로 하는 MCL-PHAs 생산에 유용함을 보여주고 있다.

이와 같은 포도당과 아크릴산의 첨가효과가 다른 식물유를 탄소원으로 사용할 경우에도 나타나는지를 확인하기 위하여, 해바라기유(sunflower oil) 또는 옥수수유(corn oil)에 포도당이 첨가된 혼합배지에서 아크릴산의 농도를 달리하여 *P. chlororaphis* HS21의 회분배양을 수행하였다. 식물유 중 해바라기유와 옥수수유는 불포화지방산을 다량 함유하고 있어 결과지에 불포화기를 함유하는 MCL-PHAs 생합성에 유용한 기질이다(18). 불포화기를 기능기로 갖는 MCL-PHAs는 점착력이 우수하고 생체친화성이 높아 자체적으로도 의료용 점착제 등의 용도에 적합하며, 또 화학적 개질 혹은 다른 고분자와의 블렌딩을 통하여 다양한 물성의 고분자로 전환이 가능하기 때문에 최근 많은 관심을 모으고 있다(2). Table 4에서 보는 바와 같이 해바라기유 또는 옥수수유가 함유된 배지에서의 *P. chlororaphis* HS21 생장은 팜유가 함유된 배지에 비하여 저조하였으나, 생합성된 모든 MCL-PHAs에는 3-hydroxydodecanoate [3HDD(=)], 3-hydroxytetradecanoate [3HTD(=)]와 같은 불포화 단위체가 다량 함유되어 있었다. 특히 MCL-PHAs 내 불포화 단위체의 함량은 아크릴산의 농도 증가에 따라 점차 증진되는 양상을 보였으며, 5 mM 아크릴산 첨가 시에는 해바라기유와 옥수수유 모두에서 30 mol%를 상회하였다. 불포화기를 다량 함유하는 식물유를 단일 탄소원으로 사용하였을 경우 생합성된 MCL-PHAs의 불포화 단위체 함량이 18 mol% 이하로 나타난 결과와 비교하여 볼 때, 본 실험의 결과는 포도당 및 아크릴산 첨가에 의해 식물유가 함유하고 있는 지방산이 보다 효율적으로 MCL-PHAs 생합성에 이용될 뿐 아니라 탄소사슬의 길이가 보다 큰 단위체의 형성이 가능해짐으로써 3HDD(=)

Table 3. Effect of acrylic acid addition on cell growth, PHA accumulation and compositions of synthesized copolyesters

Acrylic acid (mM)	Culture time (hr)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	Y _{PS} (g/g)	PHA composition ^a (mol %)				
					3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HTD
None	48	2.78	0.847	0.3391	6.9	47.1	36.8	7.4	1.8
1	48	2.37	0.711	0.2844	4.3	40.6	34.5	14.0	6.6
5	48	1.66	0.496	0.1985	-	31.3	42.3	17.6	8.8

Cells were grown with a mixture of palm oil (2.5 g/l) and glucose (5 g/l).

^aPHAs content and composition were determined by GC-MS. 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HTD, 3-hydroxytetradecanoate.

Table 4. Effect of acrylic acid addition on cell growth, PHA accumulation and compositions of copolyesters synthesized by *P. chloraphis* HS21 from a mixture of glucose (5 g/L) and either sunflower oil (2.5 g/L) or corn oil (2.5 g/L)

Carbon source	Acrylic acid (mM)	Culture time (hr)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	PHA composition ^a (mol%)							
					3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDD(=)	3HTD	3HTD(=)	
Sunflower oil	None	48	2.00	0.588	7.8	40.2	27.9	4.9	12.4	3.2	3.6	
	1	48	1.91	0.551	5.4	28.4	23.4	8.1	14.4	7.1	13.2	
	5	48	1.04	0.292	3.6	20.4	21.2	8.6	15.4	13.3	17.5	
Corn oil	None	48	2.10	0.630	8.0	35.6	25.4	7.5	13.7	5.4	5.4	
	1	48	1.96	0.562	5.0	27.6	22.8	9.9	14.1	13.2	13.2	
	5	48	1.12	0.325	3.2	3.2	22.6	11.1	14.8	15.2	15.2	

^aPHAs content and composition were determined by GC-MS analysis. 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HDD(=), 3-hydroxydodecenoate; 3HTD, 3-hydroxytetradecanoate; 3HTD(=), 3-hydroxytetradecenoate.

와 3HTD(=) 같은 불포화기 함유 고분자가 효율적으로 생합성될 수 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초과학연구사업(특정기초)의 지원에 의하여 수행되었습니다(R01-2003-000-10742-002004).

참고문헌

- Ashby R.D., T.A. Foglia, C.K. Liu, and J.W. Hampson. 1998. Improved film properties of radiation-treated medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates). *Biotechnol. Lett.* 20, 1047-1052.
- Chung C.W., H.W. Kim, Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2003. Poly(ethylene glycol)-grafted poly(3-hydroxyundecenoate) network for enhanced blood compatibility. *Int. J. Biol. Macromol.* 32, 217-225.
- Doi Y., Y. Kawaguchi, N. Koyama, S. Nakamura, M. Hiramitsu, and H. Kimura. 1992. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 103-108.
- Fiedler S., A. Steinbüchel, and B.H. Rehm. 2000. PhaG-mediated synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2117-2124.
- Fischer R.B., and D.G. Peter. 1968. Quantitative chemical analysis, p. 677-679. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, U.S.A.
- Green P.R., J. Kemper, L. Schechtman, L. Guo, M. Satkowski, S. Fiedler, A. Steinbüchel, and B.H. Rehm. 2002. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid beta-oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules* 3, 208-213.
- Hang X., Z. Lin, J. Chen, G. Wang, K. Hong, and G.Q. Chen. 2002. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 71-75.
- Hassan M.A., O. Nawata, Y. Shirai, N.A.A. Rahman, P. Yee, B. Lai, A. Ariff, K. Abdul, and I. Mohamed. 2002. A proposal for zero emission from palm oil industry incorporating the production of polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent. *J. Chem. Eng. Jpn.* 35, 9-14.
- Hazenberg W. and B. Witholt. 1997. Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 588-596.
- Ilans S.A. and D.K. Jay. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 1-9.
- Kang H.O., C.W. Chung, H.W. Kim, Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2001. Cometary biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxyvalerate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas sp.* DSY-82. *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 185-191.
- 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.* 28, 23-29.
- Kim, D.Y., Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2002. Cometary production of poly(3-hydroxyalkanoates) containing carbon-carbon double and carbon-carbon triple bonds by *Pseudomonas oleovorans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 518-521.
- Kim, G.J., Y.K. Yang, and Y.H. Rhee. 2001. Economic consideration of poly(3-hydroxybutyrate) production by fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* KHB 8862. *Kor. J. Microbiol.* 37, 92-99.
- Kim, Y.B., C.W. Chung, H.W. Kim, and Y.H. Rhee. 2005. Shape memory effect of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate). *Macromol. Rapid Commun.* 26, 1070-1074.
- Lu X., J. Zhang, Q. Wu, and G.Q. Chen. 2003. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 97-101.
- Minoru A., T. Takeharu, and Y. Doi. 2003. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym. Degrad. Stabil.* 80, 184-194.
- Solaiman D.K.Y., R.D. Ashby, and T.A. Foglia. 1999. Medium-chain-length poly(β -hydroxyalkanoate) synthesis from triacylglycerols by *Pseudomonas saccharophila*. *Curr. Microbiol.* 38, 151-154.
- Solaiman D.K.Y., R.D. Ashby, and T.A. Foglia. 2002. Physiological characterization and genetic engineering of *Pseudomonas corrugata* for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis from triacylglycerols. *Curr. Microbiol.* 44, 189-195.
- Steinbüchel A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of poly-

- hydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Biosci.* 1, 1-24.
21. Tan, I.K.P., K.S. Kumar, M. Theanmalar, S.N. Gan, and B. Gordon III. 1997. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 207-211.
22. Yoshie, N. and Y. Inoue. 1999. Chemical composition distribution of bacterial copolyesters. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 193-200.
23. Yun H.S, D.Y Kim, C.W. Chung, H.W. Kim, Y.K. Yang, Y.H. Rhee. 2003. Characterization of a tacky poly(3-hydroxyalkanoate) produced by *Pseudomonas chlororaphis* HS21 from palm kernel oil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 64-69.
24. Witholt, B. and B. Kessler. 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 279-285.

(Received August 17, 2005/Accepted September 6, 2005)

ABSTRACT: Effects of Glucose and Acrylic acid Addition on the Biosynthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas chlororaphis* HS21 from Plant Oils
Moon-Gyu Chung, Hye Sun Yun, Hyung Woo Kim¹, Jin Sik Nam², Chung Wook Chung, and Young Ha Rhee (Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, ¹Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, ²Department of Food and Nutrition, Suwon Women's College, Hwasung 445-890, Korea)

The characteristics of cell growth and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) biosynthesis of *Pseudomonas chlororaphis* HS21 were investigated using plant oils as the carbon substrate. The organism was efficiently capable of utilizing plant oils, such as palm oil, corn oil, and sunflower oil, as the sole carbon source for growth and MCL-PHA production. When palm oil (5 g/L) was used as the carbon source, the cell growth and MCL-PHA accumulation of this organism occurred simultaneously, and a high dry cell weight (2.4 g/L) and MCL-PHA (40.2 mol% of dry cell weight) was achieved after 30 hr of batch-fermentation. The repeating unit in the MCL-PHA produced from palm oil composed of 3-hydroxyhexanoate (7.0 mol%), 3-hydroxyoctanoate (45.3 mol%), 3-hydroxydecanoate (39.0 mol%), 3-hydroxydodecanoate (6.8 mol%), and 3-hydroxytetradecanoate (1.9 mol%), as determined by GC/MS. Even though glucose was a carbon substrate that support cell growth but not PHA production, the conversion rate of palm oil to PHA was significantly increased when glucose was fed as a cosubstrate, suggesting that bioconversion of some functionalized carbon substrates to related polymers in *P. chlororaphis* HS21 could be enhanced by the co-feed of good carbon substrates for cell growth. In addition, the change of compositions of repeating units in MCL-PHAs synthesized from the plant oils was markedly affected by the supplementation of acrylic acid, an inhibitor of fatty acid β -oxidation. The addition of acrylic acid resulted in the increase of longer chain-length repeating units, such as 3-hydroxydodecanoate and 3-hydroxytetradecanoate, in the MCL-PHAs produced. Particularly, MCL-PHAs containing high amounts of unsaturated repeating units could be produced when sunflower oil and corn oil were used as the carbon substrate. These results suggested that the alteration of PHA synthesis pathway by acrylic acid addition can offer the opportunity to design new functional MCL-PHAs and other unusual polyesters that have unique physico-chemical properties.