

Article

Pseudomonas aeruginosa P-5에 존재하는 polyhydroxyalkanoate synthase PhaC1과 PhaC2의 기질특이성

우상희 · 이선희 · 이영하*

충남대학교 미생물·분자생명과학과

Substrate chain-length specificities of polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa* P-5

Sang Hee Woo, Sun Hee Lee, and Young Ha Rhee*

Department of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

(Received September 13, 2016; Revised September 22, 2016; Accepted September 23, 2016)

ABSTRACT: *Pseudomonas aeruginosa* P-5 is an unusual organism capable of synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHAs) consisting of 3-hydroxyvalerate (3HV) and medium-chain-length (MCL) 3-hydroxyalkanoate (3HA) monomer units when C-odd alkanolic acids are fed as the sole carbon source. Evaluation of the substrate chain-length specificity of two *P. aeruginosa* P-5 PHA synthases (PhaC1_{P-5} and PhaC2_{P-5}) by heterologous expression of PhaC1_{P-5} and PhaC2_{P-5} genes in *Pseudomonas putida* GPp104 revealed that PhaC2_{P-5} incorporates both 3HV and MCL 3HAs into PHA, whereas PhaC1_{P-5} favors only MCL 3HAs for polymerization. In order to obtain PhaC2_{P-5} mutants with altered substrate specificity, site-specific mutagenesis for PhaC2_{P-5} was conducted. Amino acid substitutions of PhaC2_{P-5} at two positions (Ser326Thr and Gln482Lys) were very effective for synthesizing copolymers with a higher 3HV fraction. When recombinant *P. putida* GPp104 harboring double mutated *phaC2_{P-5}* gene (*phaC2_{P-5}QKST*) was grown on nonanoic acid, 2.5-fold increase of copolymer content with 3.8-fold increase of 3HV fraction was observed. The *phaC2_{P-5}QKST*-containing *Ralstonia eutropha* PHB-4 supplemented with valeric acid also produced copolymers consisting of 3HV and 3-hydroxyheptanoate with a high 3HV fraction. These results suggest that recombinants containing *phaC2_{P-5}QKST* could be useful for production of new PHA copolymers with improved material properties.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* P-5, polyhydroxyalkanoate synthases, site-directed mutagenesis, substrate specificity

Poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs)는 과량의 탄소원이 존재하지만 질소, 인, 황과 같은 영양분이 결핍되거나 용존산소의 농도가 낮은 불균형 영양조건하에서, 탄소 및 에너지원으로 사용하기 위하여 세균 세포 내에 축적되는 저장성 폴리에스터 고분자이다(Steinbüchel and Lütke-Eversloh, 2003). PHAs는 합성플라스틱과는 달리 재생자원을 발효기질로 사용하여 생산될 수 있고 생분해성 및 생체친화성이 우수하기 때문에 식품, 정밀화학, 의약품 소재 등의 다양한 분야에서 합성고분자를 대체하여 사용될 수 있는 미생물고분자로 큰 관심을 모으고 있다(Akaraonye *et al.*, 2010; Keshavarz and Roy, 2010; Chen, 2011).

3-Hydroxyalkanoates (3-HAs)를 구성 단위체(monomer units)로 하는 PHAs는 단위체의 탄소수를 기준으로 short-chain-length (SCL)-PHAs (C3~C5)와 medium-chain-length (MCL)-PHAs (C6~C14)로 구분된다. 지금까지 발견된 대부분의 PHA 생합성 균주들의 경우 SCL-PHAs와 MCL-PHAs 중 한 가지만을 생합성할 수 있는데, 이러한 특징은 서로 다른 탄소사슬 길이를 가지는 (R)-hydroxyalkanoyl-CoAs에 대한 PHA synthases의 기질특이성(substrate specificity)에 기인한다. 즉, SCL-PHAs 생합성 미생물은 탄소수가 5 이하인 (R)-hydroxyalkanoyl-CoAs에만 선택적 특이성을 보이는 SCL-PHA synthase를 보유하는데 반하여, MCL-PHAs 생합성 미생물은 탄소수가 6 이상인 (R)-hydroxyalkanoyl-CoAs에 기질특이성을 나타내는 MCL-PHA synthase를 갖고 있다(Kim *et al.*, 2007). Polyhydroxybutyrate

*For correspondence. E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr;
Tel.: +82-42-821-6413; Fax: +82-42-822-7367

(PHB)로 대표되는 SCL-PHAs는 결정화도와 녹는 온도가 비교적 높은 열가소성 고분자로서의 성질을 갖고 있다. 이에 반하여 MCL-PHAs는 곁가지에 긴 탄소사슬을 가짐으로써 결정화도와 녹는 온도가 비교적 낮은 고무탄성체 혹은 점착성 고분자의 성질을 가진다. 이러한 물성의 차이에 의해 SCL-PHAs와 MCL-PHAs는 각각 고유의 용도로 활용될 수 있지만, 특히 MCL-PHAs의 경우 사용되는 균주 및 탄소원에 따라 곁가지의 중간이나 말단에 불포화기(C=C 결합 및 C≡C 결합) 등의 활성기(기능기)를 갖는 MCL-PHAs 생합성이 가능하므로 다양한 물성의 기능성 고분자를 창출할 수 있다는 장점을 갖고 있다(Kim et al., 2000; Hazer and Steinbüchel, 2007; Kim et al., 2007).

최근 본 저자들의 연구실에서는 nonanoic acid, heptanoic acid와 같이 홀수개의 탄소수를 갖는 alkanolic acids를 탄소원으로 공급하였을 때, MCL 3HAs 이외에 3-hydroxyvalerate (3HV)를 단위체로 하는 공중합체를 생합성하는 *Pseudomonas aeruginosa* P-5 균주를 보고한 바 있다(Woo et al., 2012). 이 균주로부터 생산되는 공중합체 내 3HV의 함량은 탄소원에 따라 5-10 mol% 수준이나, valeric acid를 보조기질로 첨가 시 26 mol%까지 크게 증진될 수 있었다. 이처럼 SCL 단위체와 MCL 단위체가 같이 존재하는 SCL-MCL-PHA 공중합체는 매우 특이한 고분자로서 기존의 SCL-PHAs 및 MCL-PHAs와는 확연히 구분되는 물성을 가짐으로써 미생물고분자의 산업적 응용 범위를 확장시키는데 유용할 것으로 기대된다. 또한 *P. aeruginosa* P-5 균주로부터 PHA synthase 유전자를 분리하고 분석한 결과, 이 균주는 두 개의 MCL-PHA synthases (PhaC1_{P-5}과 PhaC2_{P-5}) 유전자를 소유하지만 SCL-PHA synthase 유전자는 결여되어 있는 것으로 나타났다(Woo et al., 2012). 이러한 결과는 P-5 균주의 MCL-PHA synthases가 MCL (R)-hydroxyacyl-CoAs와 마찬가지로 (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA를 합성반응의 기질로 인지하는 독특한 기질특이성의 효소임을 시사해 준다. 지금까지 MCL-PHA synthase가 SCL (R)-hydroxyacyl-CoA인 (R)-3-hydroxybutyryl-CoA를 기질로 인지하여 3-hydroxybutyrate (3HB)를 함유하는 SCL-MCL-PHA 공중합체를 생성할 수 있음은 몇몇 *Pseudomonas* 속 균주들에서 발견된 바 있으나(Abe et al., 1994; Lee et al., 1995; Chen et al., 2001; Hein et al., 2002), 3HV를 함유하는 SCL-MCL-PHA 공중합체의 생합성은 매우 드문 현상이다(Kang et al., 2001).

Pseudomonas aeruginosa P-5 균주의 PhaC1_{P-5}과 PhaC2_{P-5}는 다른 MCL-PHA 생산균주들의 PhaC1과 PhaC2와 마찬가지로 각각 559개의 아미노산과 560개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 두 효소간 아미노산 서열의 상동성은 58.1%에 불과하다

(Woo et al., 2012). 본 연구에서는 PhaC1_{P-5}과 PhaC2_{P-5} 효소 중 SCL-MCL-PHA 공중합체 생합성이 어느 MCL-PHA synthase에 기인하는지를 밝히기 위하여, PhaC1_{P-5}과 PhaC2_{P-5} 유전자를 각각 PHA 생합성능이 결여된 돌연변이 균주(*Pseudomonas putida* GpP104와 *Ralstonia eutropha* PHB-4)에서 발현시키고 생성된 PHAs의 조성을 조사함으로써 각 효소의 기질특이성을 비교하였다. 또한 MCL-PHA synthase의 특정 아미노산 치환에 의한 효소활성 및 기질특이성의 변화를 살펴보기 위하여 위치지정 돌연변이생성(site-directed mutagenesis)을 수행하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였으며, 클로닝을 위하여 사용된 올리고뉴클레오타이드는 Table 2에 정리하였다.

PHA synthase 유전자의 클로닝 및 위치지정 돌연변이생성

pGEM-T easy vector에 *P. aeruginosa* P-5의 phaC1_{P-5}와 phaC2_{P-5}를 각각 클로닝 한 뒤, broad host vector로 알려진 pBBR1MCS-2 (Kovach et al., 1995)에 도입하기 위하여 제한 효소 *SacI*과 *KpnI*의 작용염기서열이 각각 전방향과 역방향에 삽입된 프라이머를 제작하였으며 앞서 클로닝된 각각의 phaC1_{P-5}와 phaC2_{P-5}의 플라스미드를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 이후 증폭된 산물과 pBBR1MCS-2에 *SacI*과 *KpnI*를 처리한 뒤 연결하였으며, phaC1_{P-5}이 도입된 plasmid를 pBRC1, phaC2_{P-5}가 도입된 plasmid를 pBRC2로 명명하였다(Fig. 1).

phaC2_{P-5}의 아미노산 326번과 428번의 아미노산 치환을 위한 위치지정 돌연변이생성을 수행하기 위해 염기서열을 바꾼 primers인 S326X, S326rev 그리고 Q482X, Q482rev을 제작하였다(Table 2). 각각의 pBRC1과 pBRC2를 주형으로 하여 위에서 제작한 3세트의 primer를 넣고 PCR을 수행하여 아미노산 326번과 428번의 염기서열이 변경된 PCR 산물을 얻었다. PCR 조건은 95°C 5분 반응 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 7분 50초 처리를 16회 반복하고 마지막 extension은 생략하였다. 위에서 얻어진 pBRC1과 pBRC2, 그리고 phaC2_{P-5}의 아미노산 326번과 428번이 mutation된 plasmids는 PHA 합성 negative 균주인 *P. putida* GpP104와 *R. eutropha* PHB-4에 전기천공법(electroporation) 방법(Iwasaki et al., 1994)을 이용

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P-5		Lee <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104	PHA-synthase negative mutant of <i>P. putida</i> KT2440	Huisman <i>et al.</i> (1991)
<i>Ralstonia eutropha</i> PHB-4	PHA-synthase negative mutant of <i>R. eutropha</i> H16	Schubert <i>et al.</i> (1988)
<i>E. coli</i> DH5α	Standard cloning strain	
Plasmids		
pGEM-T easy vector	Amp ^r , pSKBluescript derivative, <i>lacPOZ</i>	Promega Co.
pBBR1MCS-2	Km ^r , broad host vector, <i>lacPOZ</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBRC1	pBBR1MCS-2 derivative, <i>phaC1</i> of <i>P. aeruginosa</i> P-5	This study
pBRC2	pBBR1MCS-2 derivative, <i>phaC2</i> of <i>P. aeruginosa</i> P-5	This study
pS326T	pBRC2 derivative, mutant <i>phaC2_{p.5}</i> Ser326→Thr	This study
pQ482K	pBRC2 derivative, mutant <i>phaC2_{p.5}</i> Gln482→Lys	This study
pQ482R	pBRC2 derivative, mutant <i>phaC2_{p.5}</i> Gln482→Arg	This study
pQKST	pBRC2 derivative, double mutant <i>phaC2_{p.5}</i> Ser326→Thr, Gln482→Lys	This study

Table 2. Oligonucleotide sequences used in this study to amplify *phaC1_{p.5}* and *phaC2_{p.5}*

Primers for amplification of <i>phaC_{p.5}</i>	
C1F- <i>SacI</i>	5'-GCCG <u>GAGCTC</u> ATGAGTCAGAAGAACAATAACG-3'
C1R- <i>KpnI</i>	5'-CTGTGGTACCTCATCGTTCGTGCACGTAGG-3'
C2F- <i>SacI</i>	5'-GTCCGAGCTCATGCGAGAAAAGCAGGAATCGG-3'
C2R- <i>KpnI</i>	5'-CTTGGTACCTCAGCGTATATGCACGTAGG-3'
Primers for Ser326 site mutagenesis	
S326X ^a	5'-CACCTACCTGGTCA <u>AGC</u> CTGCTCGACAGCCAG-3'
S326rev	5'-CTGGCTGTCGAGCAGGCTGACCAGGTAGGTG-3'
Primers for Gln482 site mutagenesis	
Q482X	5'-CAGCGGGCACATCCAGAGCATCCTCAACCCT-3'
Q482rev	5'-AGGGTTGAGGATGCTCTGGATGTGCCCGCTG-3'

Bases underlined indicate *SacI* and *KpnI* restriction sites in F and R, respectively. Double underlines indicate the substitution codons for Ser326 (AGC) and Gln482 (CAG) in S326X and Q482X, respectively; Ser326→Thr (AGC→ACC), Gln482→Lys (CAG→AAG), and Gln482→Arg (CAG→CGG).

^a X indicates the mutant amino acid residues.

하여 삽입하였다.

PHA 생합성 및 분석

Plasmid가 삽입된 재조합 균주들은 2단계 배양법을 이용하여 100 ml의 mineral medium이 들어있는 500 ml의 삼각플라스크에서 200 rpm, 30°C의 조건으로 배양하였다. Mineral medium은 리터당 0.2 g NH₄NO₃, 5.8 g K₂HPO₄, 3.7 g KH₂PO₄, 0.37 g MgSO₄·7H₂O와 3 ml의 trace element stock solution이 포함된 배지이다. Trace element solution은 1 N HCl 용액에 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 CuCl₂·2H₂O가 녹아있는 용액이다. 먼저, 1단계로 PHAs 합성 없이 세포 성장만 이루기 위해 kanamycin (200 µg/ml)이 첨가된 nutrient broth에서 재조합 균주를 20시간 배양하였다. 이후 원심분리를 통하여 세포를 수득한 뒤, alkanolic acids가 2 g/L 포함된 mineral medium에 접종하여 48시간 동안 두 번째 단계의 배양을 수행하여 PHA 합성을 유도하였다.

세포건조중량(dry cell weight)은 배양된 균체를 원심분리

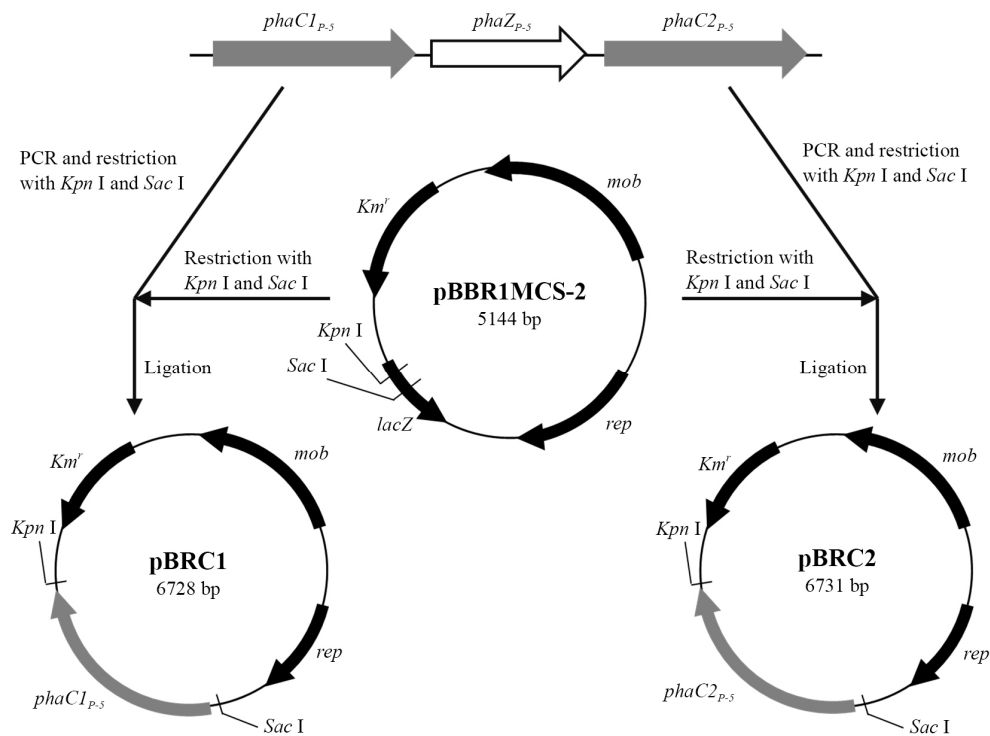


Fig. 1. Construction and restriction maps of plasmids pBRC1 and pBRC2.

하여 수득하고, -20°C 에서 얼린 뒤, 동결건조기로 하룻동안 건조시켜서 측정하였다. 생성된 PHAs의 회수 및 정제는 Lee 등(2011)의 방법으로 수행하였다. PHA의 정량 및 정성 분석은 PHB와 polyhydroxyoctanoate를 표준시료로 하여 gas chromatography 방법을 이용하였다. GC 분석을 위한 초기 오븐온도는 60°C 로 4분 동안 유지한 뒤 분당 8°C 씩 280°C 까지 증가시켰다. PHA 단위체의 동정은 gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS) 분석에 의하였다.

결과 및 고찰

재조합 균주의 PHA 생합성

MCL-PHAs를 생합성하는 것으로 알려진 rRNA homology group I의 *Pseudomonas* 종들은 두 종류의 MCL-PHA synthases (PhaC1과 PhaC2)를 가지고 있다. 그동안 이 두 가지 효소가 기능적으로 어떠한 차이가 있는지 여부에 대하여 많은 연구자들에 의한 연구가 이루어져 왔다. 각각 *Pseudomonas chlororaphis* HS21와 *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 PhaC1과 PhaC2의 기질특이성에 관하여 조사한 Chung 등(2012)과 Qi 등(1997)은 두 효소간 유의할만한 기질특이성의 차이가 없다고 보고한

반면에, Matsusaki 등(1998)은 *Pseudomonas* sp. 61-3 균주의 PhaC1과 PhaC2의 기질특이성이 상이하하며, PhaC1이 PhaC2에 비하여 기질특이성이 넓어서 MCL-3HAs 뿐만 아니라 SCL-3HAs인 3HB도 합성하는 효소라고 보고하였다. 한편, Chen 등(2004, 2006)은 *P. stutzeri*의 두 효소는 위와는 상반되게 PhaC2가 PhaC1에 비하여 기질특이성이 넓어서 MCL-3HAs 뿐만 아니라 SCL-3HAs인 3HB도 합성하는 효소임을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 PhaC1_{p.5}와 PhaC2_{p.5}의 기능적 차이를 알아보기 위하여 클로닝 된 phaC1_{p.5}와 phaC2_{p.5}을 pBBR1MCS-2 vector에 삽입하여 pBRC1과 pBRC2를 제조하였고, 이들을 각각 PHA 생합성능이 결여된 *P. putida* GPp104 균주와 *R. eutropha* PHB-4 균주에 전기천공법을 이용하여 도입하였다. pBRC1 또는 pBRC2가 삽입된 재조합 *P. putida* GPp104와 *R. eutropha* PHB-4 균주는 각각 nonanoic acid와 valeric acid을 단일 탄소원으로 공급하여 배양하였다. pBRC2가 도입된 재조합 *P. putida* GPp104 균주는 4.4% 3HV가 포함된 SCL-MCL-PHAs을 전체량의 12.6% (w/w) 되게 합성하였다. 하지만 pBRC1이 도입된 균주에서는 3-hydroxynonanoate (3HN)와 3-hydroxyundecanoate (3HU)가 주를 이루는 MCL-PHAs만 합성되었다(Table 3). 이 실험 결과를 통하여 PhaC1_{p.5}는 긴

탄소수의 MCL-3HAs 만을 인식하여 합성하는 역할을 하고 PhaC2_{P-5}는 SCL-3HAs인 3HV부터 MCL-3HAs까지 보다 광범위한 기질특이성을 가지고 있는 것으로 판단되었다. 재조합 *R. eutropha* PHB-4 균주의 경우, pBRC1이 도입되었을 때 PHA를 생성하지 못하였으나 pBRC2가 도입되었을 때 3HV가 72.41% 함유된 SCL-MCL-PHAs를 합성하였다(Table 3). 이러한 결과로 PhaC1_{P-5}와 PhaC2_{P-5}는 상이한 기질특이성을 가지고 있으며, 그 중 PhaC2_{P-5}가 SCL-MCL-PHAs를 생합성하는데 기여한다는 사실을 알 수 있었다. 또한 PhaC2_{P-5}는 발현되는 균주와 탄소원에 따라서 3HV 비율이 크게 다른 SCL-MCL-PHAs를 합성할 수 있는 것으로 나타났는데, 이는 PHA 단위체 조성의 조절을 통하여 서로 다른 물성의 바이오분자를 생산할 수 있다는 점에서 매우 유용한 특징이라 할 수 있다.

PHB와 같은 SCL-PHAs는 딱딱하고 잘 부러지는 성질을 지녀 산업적인 응용범위가 제한되고 있는 반면에, MSC-PHAs는 고무탄성 혹은 점착성의 성질을 지닌다(Kim *et al.*, 2007). 이에 반하여 SCL-MCL-PHAs는 일반적으로 SCL-PHAs와 MCL-PHAs의 성질이 혼합된 물성을 갖고 있으며, 공중합체 내 각 단위체의 함량에 따라 매우 다양한 물성을 보임으로써 향후 PHAs의 실용화 범위를 크게 확장시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다(Abe and Doi, 2002; Nomura *et al.*, 2004; Chen, 2011; Leong *et al.*, 2014). 자연환경에서 분리되는 PHA 생합성 미생물의 대부분이 SCL-PHAs 혹은 MCL-PHAs 중 한가지 고분자만을 생산할 수 있음을 고려할 때, SCL-MCL-PHAs를 합성하는 미생물은 희귀성이 인정된다. 특히, 지금까지 알려진 SCL-MCL-PHAs 생성 미생물들이 SCL 단위체로 3HB를 이용하는 데 반하여 *P. aeruginosa* P-5의 PhaC2_{P-5}는 3HV를 단위체로 이용한다는 점에서 매우 흥미로운 MCL-PHA synthase이다.

PhaC2_{P-5}의 위치지정 돌연변이생성을 통한 효소개량

SCL-MCL-PHAs를 합성하는 미생물 중에서 *Pseudomonas* sp. 61-3의 PhaC1_{P₆₁₋₃}와 *Pseudomonas stutzeri* 1317의 PhaC2_{P₁₃₁₇}이 3HB가 포함된 공중합체를 합성한다는 것이 알려져 있다 (Matsusaki *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2006). 이 중 *Pseudomonas* sp. 61-3는 PhaC1_{P₆₁₋₃}을 무작위 돌연변이(random mutagenesis)를 통하여 공중합체 내 3HB 함량이 크게 증가된 두 개의 돌연변이주를 얻었다(Takase *et al.*, 2003, 2004). 두 개 변이주의 돌연변이 생성위치는 각각 Ser325와 Gln481로써 Ser325는 활성 중심(active center) 근처의 아미노산이며, Gln481은 잠정적 catalytic dyad의 아미노산으로 이들의 돌연변이가 SCL-MCL-PHA 공중합체의 3HB의 함량의 증대에 관여했을 것이라고 추론하고 있다. 이에 Shen 등(2011)은 *P. stutzeri* 1317의 PhaC2_{P₁₃₁₇}가 기능적으로 *Pseudomonas* sp. 61-3의 PhaC1_{P₆₁₋₃}와 유사하며, 아미노산 서열 비교상 유사하게 Ser325와 Gln481 부분이 Ser326와 Gln482로 일치하였기 때문에 이를 동일하게 돌연변이 시켰으며, Ser326 Gln482를 Thr326, Lys482로 돌연변이 시켰을 경우 SCL-MCL-PHA 공중합체의 3HB의 함량이 증대되는 것을 보고하였다.

이러한 결과들을 바탕으로 *P. aeruginosa* P-5의 PhaC2_{P-5} 역시 Ser326을 Thr326로, Gln482을 Lys482 또는 Arg482로 치환한 돌연변이 플라즈미드를 제작하였다. 아미노산이 치환된 pBRC2는 PHAs 합성을 위해 *P. putida* GPp104와 *R. eutropha* PHB-4에 전기천공법을 통해 삽입하였다. 야생형 PhaC2_{P-5}와 비교해 보았을 때 단일 돌연변이(single mutation)된 PhaC2_{P-5} 모두 PHA 합성과 3HV 비율이 증가되는 것을 확인하였다 (Table 4). 하지만 Gln482Arg보다 Gln482Lys으로 치환한 PhaC2_{P-5}가 PHAs 합성율과 3HV 함량이 더 높았다. Lys482가 짧은 탄소수의 단위체를 인식하여 합성하는데 더 적합하다 판

Table 3. PHA accumulation by recombinant strains harboring *phaC1_{P-5}* and *phaC2_{P-5}*

Plasmid	Carbon source (g/L)	DCW (g/L) ^a	PHA content (%)	PHA composition (%) ^c					
				3HV	3HHp	3HN	3HD	3HU	3HDD
<i>P. putida</i> GPp104		0.69	ND ^b						
pBRC1	Nonanoic acid (2)	0.58	0.7			19.6		80.4	
pBRC2		0.71	12.6	4.4	17.4	69.5	1.4	5.2	2.0
<i>R. eutropha</i> PHB-4		0.69	ND						
pBRC1	Valeric acid (2)	0.71	ND						
pBRC2		0.78	27.4	72.4	26.9	0.8			

Cells were grown aerobically in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml mineral medium at 30°C for 48 h with shaking at 200 rpm.

^a DCW, dry cell weight.

^b ND, not detected.

^c Calculated from GC area%. 3HV, 3-hydroxyvalerate; 3HHp, 3-hydroxyheptanoate; 3HN, 3-hydroxynonanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HU, 3-hydroxyundecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

Table 4. Biosynthesis of PHA by recombinant *P. putida* GpP104 strains harboring mutated *phaC2_{p-5}* gene

Plasmid	Carbon source (g/L)	DCW (g/L) ^a	PHA content (%)	PHA composition (%) ^c					
				3HV	3HHp	3HN	3HD	3HU	3HDD
<i>P. putida</i> GpP104		0.69	ND ^b						
pBRC2	Nonanoic acid (2)	0.71	12.6	4.4	17.4	69.5	1.4	5.2	2.0
pS326T		0.64	25.1	7.3	18.7	67.9	1.8	2.4	1.9
pQ482R		0.47	23.1	6.0	20.4	65.9	2.4	2.8	2.5
pQ482K		0.65	23.3	11.2	22.5	61.6	1.1	2.2	1.4
pQKST		0.67	30.6	15.3	22.9	56.5	1.2	2.1	1.9
<i>R. eutropha</i> PHB-4			0.69	ND					
pBRC2	Valeric acid (2)	0.78	27.4	72.4	26.9	0.8			
pS326T		0.85	34.8	77.8	22.2				
pQ482R		1.01	27.3	85.9	14.1				
pQ482K		0.79	30.0	88.7	11.3				
pQKST		1.08	37.4	95.2	4.8				

Cells were grown aerobically in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml mineral medium at 30°C for 48 h with shaking at 200 rpm.

^a DCW, dry cell weight.

^b ND, not detected.

^c Calculated from GC area%. 3HV, 3-hydroxyvalerate; 3HHp, 3-hydroxyheptanoate; 3HN, 3-hydroxynonanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HU, 3-hydroxyundecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

단되어 3HV의 함량을 최대한 증가시키고자 Ser326Thr와 Gln482Lys의 이중 돌연변이(double mutation; pQKST)을 진행하였다. pQKST가 삽입된 *P. putida* GpP104의 경우 PHAs 함성율은 2.5배, 3HV 함량은 3.5배 증가하였다(Table 4). 마찬가지로 pQKST가 도입된 재조합 *R. eutropha* PHB-4에서도 PHAs 함성이 1.3배, 공중합체 내의 3HV 비율이 1.2배 증가하였다(Table 4). 따라서 PhaC2_{p-5}의 Ser326와 Gln482가 3HV를 인식하고 공중합체로 합성하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. PhaC2_{p-5}의 위치지정 돌연변이가 생성을 통해 같은 배양조건에서 다양한 조성을 가지는 공중합체를 합성할 수 있고 물성이 다른 PHAs를 생산함으로써 PHA의 응용범위를 넓힐 수 있다는 점에서 *phaC2_{p-5}QKST*를 포함하는 재조합균주는 산업적으로 유용할 것으로 기대된다.

적 요

Pseudomonas aeruginosa P-5 균주는 홀수개의 탄소수를 갖는 지방산으로부터 3-hydroxyvalerate (3HV)와 medium-chain-length (MCL) 3-hydroxyalkanoates (3HAs) 단위체로 구성된 polyhydroxyalkanoate (PHA) 공중합체를 생산하는 특이한 성질을 갖고 있다. 이 균주가 갖고 있는 2개의 MCL-PHA synthases (PhaC1_{p-5}와 PhaC2_{p-5})의 탄소길이에 따른 기질특이성을 비교하기 위하여 각각의 유전자를 PHA 생합성능

이 결여된 돌연변이주 *Pseudomonas putida* GpP104에 도입하고 발현시킨 결과, PhaC2_{p-5}는 3HV와 MCL 3HAs로 이루어진 공중합체를 생산하지만 PhaC1_{p-5}는 단지 MCL 3HAs로 구성된 공중합체를 생산하였다. 이는 PhaC2_{p-5}가 PhaC1_{p-5}과는 달리 보다 짧은 탄소길이의 3-hydroxyvaleryl Co-A를 기질로 인지하여 합성반응에 이용할 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 PhaC2_{p-5}의 효소활성 및 기질특이성의 변화를 유도하기 위하여 위치지정 돌연변이생성을 수행하고 *P. putida* GpP104과 다른 PHA 생합성능 결여 돌연변이주인 *Ralstonia eutropha* PHB4에서 발현시킨 결과, PhaC2_{p-5}내 두 개 아미노산의 치환(Ser326Thr과 Gln482Lys)이 공중합체의 3HV 함량을 크게 증진시키는 효과를 보였다. 두 개 아미노산이 모두 치환된 PhaC2_{p-5} 유전자 (*phaC2_{p-5}QKST*)를 갖는 *P. putida* GpP104를 nonanoic acid가 탄소원으로 함유된 배지에서 배양하였을 때, 모균주에 비해 공중합체 함량과 공중합체 내 3HV 함량이 각각 2.5배 및 3.5배 증가하였다. 따라서 *phaC2_{p-5}QKST*를 포함하는 재조합 균주는 개량된 물성의 신규 PHAs 생산에 유용할 것으로 기대된다.

감사의 말

본 논문은 2014년도 충남대학교 CNU 학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Abe, H. and Doi, Y.** 2002. Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (*R*)-3-hydroxybutyric acid with (*R*)-3-hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules* **3**, 133–138.
- Abe, H., Doi, Y., Fukushima, T., and Eya, H.** 1994. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 115–119.
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., and Roy, I.** 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 732–743.
- Chen, G.Q.** 2011. Biofunctionalization of polymers and their applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **125**, 29–45.
- Chen, J.Y., Liu, T., Zheng, Z., Chen, J.C., and Chen, G.Q.** 2004. Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 231–237.
- Chen, J.Y., Song, G., and Chen, G.Q.** 2006. A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**, 157–167.
- Chen, G., Zhang, G., Park, S., and Lee, S.** 2001. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 50–55.
- Chung, M.G. and Rhee, Y.H.** 2012. Overexpression of the (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase gene from *Pseudomonas chlororaphis* HS21 in *Pseudomonas* strains for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates of altered monomer composition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 613–616.
- Hazer, B. and Steinbüchel, A.** 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1–12.
- Hein, S., Paletta, J., and Steinbüchel, A.** 2002. Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 229–236.
- Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B.** 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* **266**, 2191–2198.
- Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K., and Takamura, Y.** 1994. Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 851–854.
- Kang, H.O., Chung, C.W., Kim, H.W., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H.** 2001. Cometabolic biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxyvalerate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. DSY-82. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**, 185–191.
- Keshavarz, T. and Roy, I.** 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 321–326.
- Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., and Rhee, Y.H.** 2007. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* **45**, 87–97.
- Kim, D.Y., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H.** 2000. Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**, 23–29.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Lee, E.Y., Jendrossek, D., Schirmer, A., Choi, C.Y., and Steinbüchel, A.** 1995. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1, 3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 901–909.
- Lee, S.H., Kim, J.H., Mishra, D., Ni, Y.Y., and Rhee, Y.H.** 2011. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid. *Bioresour. Technol.* **102**, 6159–6166.
- Leong, Y.K., Show, P.L., Ooi, C.W., Ling, T.C., and Lan, J.C.W.** 2014. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **180**, 52–65.
- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., and Doi, Y.** 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* **180**, 6459–6467.
- Nomura, C.T., Taguchi, K., Taguchi, S., and Doi, Y.** 2004. Coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-ACP synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) genes leads to short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 999–1007.
- Qi, Q.S., Rehm, B.H.A., and Steinbüchel, A.** 1997. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 155–162.
- Schubert, P., Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G.** 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 5837–5847.
- Shen, X.W., Shi, Z.Y., Song, G., Li, Z.J., and Chen, G.Q.** 2011. Engineering of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC2_{ps} of *Pseudomonas stutzeri* via site-specific mutation for efficient production of PHA copolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 655–665.

- Steinbüchel, A. and Lütke-Eversloh, T.** 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* **16**, 81–96.
- Takase, K., Matsumoto, K.I., Taguchi, S., and Doi, Y.** 2004. Alteration of substrate chain-length specificity of type II synthase for polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *in vitro* evolution: *in vivo* and *in vitro* enzyme assays. *Biomacromolecules* **5**, 480–485.
- Takase, K., Taguchi, S., and Doi, Y.** 2003. Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and *in vitro* recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. *J. Biochem.* **133**, 139–145.
- Woo, S.H., Kim, J.H., Ni, Y.Y., and Rhee, Y.H.** 2012. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxyvalerate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by the *Pseudomonas aeruginosa* P-5 strain. *Korean J. Microbiol.* **48**, 200–206.