

# Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using Waste Frying Oil

Tae-Gyeong Kim, Woosung Lee, Seongho Gang, Jong-Sik Kim and Chung-Wook Chung\*

Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received October 19, 2018 / Revised January 9, 2019 / Accepted January 11, 2019

In this study, the optimal growth and poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) biosynthesis of *Pseudomonas* sp. EML2 were established using waste frying oil (WFO) as a cheap carbon source. The fatty acid composition of WFO and fresh frying oil (FFO) were analyzed by gas chromatography. The unsaturated and saturated fatty acid contents of the FFO were 82.6% and 14.9%, respectively. These contents changed in the WFO. The compositional change in the unsaturated fatty acid content in the WFO was due to a change in its chemical and physical properties resulting from heating, an oxidation reaction, and hydrolysis. The maximum dry cell weight (DCW) and PHB yield (g/l) of the isolated strain *Pseudomonas* sp. EML2 were confirmed under the following culture conditions: 30 g/l of WFO, 0.5 g/l of NH<sub>4</sub>Cl, pH 7, and 20 °C. Based on this, the growth and PHB yield of *Pseudomonas* sp. EML2 were confirmed by 3 l jar fermentation. After the cells were cultured in 30 g/l of WFO for 96 h, the DCW, PHB content, and PHB yield of *Pseudomonas* sp. EML2 were 3.6 g/l, 73 wt%, and 2.6 g/l, respectively. Similar results were obtained using 30 g/l of FFO as a carbon source control. Using the FFO, the DCW, PHB content, and PHB yield were 3.4 g/l, 70 wt%, and 2.4 g/l, respectively. *Pseudomonas* sp. EML2 and WFO may be a new candidate and substrate, respectively, for industrial production of PHB.

**Key words** : Poly(3-hydroxybutyrate), *Pseudomonas* sp. EML2, waste frying oil

## 서 론

현재 널리 사용되는 석유 기반 플라스틱은 난분해성 특징으로 인해 심각한 환경오염 문제를 야기 하고 있으며 합성 플라스틱 생산을 위한 석유자원의 고갈이 예상되므로 석유 기반 플라스틱을 대신할 생분해성을 지닌 친환경적 대체품이 필요하다.

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs)는 다양한 미생물들에 의해 탄소원 또는 에너지 저장물질로서 생합성 되는 세포 내 저장물질이다[17]. PHAs의 축적은 과량의 탄소원이 존재하는 조건에서 P, N, O 및 Mg와 같은 영양소가 제한된 조건, 또는 영양소 제한 없이 세균의 성장과 동시에 나타나는 것으로 보고되었다[12, 16, 22]. 생체적합성, 생분해성 특징을 지닌 PHAs는 산업적 소비재, 약물 전달체 및 의약품 등 이용 가치가 높은 매력적인 생물 고분자로 평가된다[14, 18]. 열가소성 및 높은 용해 온도와 결정화도를 갖는 poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)의 물리적, 기계적 성질은 석유 기반 플라스틱인 폴리프로필렌과 유사한 것으로 보고되었으며 이러한 친환경적이며 범용

적 이용가능성은 많은 사람들의 관심을 갖게 만들었다[5, 8].

하지만 PHAs의 생산단가가 비싸다는 단점은 아직까지 이 매력적인 생물 고분자가 상용화되지 않은 이유이다[20]. PHB 생산비용은 석유 기반 플라스틱에 비해 5~10배 이상 높는데, 특히 PHB 생산 시 사용되는 탄소 기질 가격이 전체 공정비용의 50% 이상 차지한다[9]. 따라서 PHB의 생산비용을 감소시키기 위하여 값싸고 재생 가능한 탄소원을 이용한 PHB 생산 연구가 이루어져 왔다[19].

현대사회의 늘어나는 튀김 소비량과 비례하여 폐식용유(waste frying oil, WFO)의 양도 급증하는 추세이다. WFO는 수거 및 처리 과정이 복잡하며 버려질 경우 환경오염의 가능성이 높다. 국내에는 연간 약 293,000톤의 WFO가 발생하며 이 중 74.4%가 회수되는 것으로 추정된다[15]. 회수되는 약 218,000톤의 WFO 중 일부는 바이오디젤과, 동물 사료 첨가제, 재생비누 생산으로 재활용되지만 대부분의 WFO는 전처리 없이 하수로 버려지거나 추가 처리 공정을 거쳐 방류됨으로 환경 문제 및 처리비용 문제를 야기한다[10, 11]. WFO로 사용되는 식물유는 다양한 지방산으로 구성된 높은 탄소를 함유한 천연자원이며, 이를 이용한 많은 PHA 생합성 연구가 보고 되어왔다[20]. Soybean oil은 50% 이상이 linoleic acid (C18:2)로 구성되어 있으며, 세균의  $\beta$ -oxidation 경로를 통해 반복적인 산화과정을 거쳐 CO<sub>2</sub> 방출 없이 acetyl-CoA 분자 9개를 형성 후 PHA의 합성경로로 이용 될 수 있음이 보고되었다[2].

본 연구에서는 PHB 생산단가 감소와 WFO의 upcycling을 위해, 새 식용유(fresh frying oil, FFO)가 아닌 WFO를 단일

### \*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5465, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : chung1409@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

탄소원으로 사용하여 PHB 생합성을 위한 최적화 조건을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 WFO는 안동대학교 교내식당에서 제공받았다. *Pseudomonas* sp. EML2는 안동대학교 부속농장에서 채취한 토양샘플에서 WFO의 평균배양으로 분리하였다. 접종용 균주의 배양은 peptone 5.0 g/l, beef extract 3.0 g/l의 nutrient broth (NB) 배지에서 24시간 선 배양 후, 접종량 10% (v/v)을 미네랄염 배지로 옮겨 배양하였다. 미네랄염 배지 1 L에는 WFO 20 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 9.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g 및 미량 원소 용액 1 ml이 포함되었다. 미량 원소 용액은 0.1M HCl 1 L당 FeCl<sub>3</sub> 9.7 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10.33 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.22 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.16 g, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.12 g, CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.11 g를 첨가하여 제조하였다.

### 16S 리보솜 DNA 염기서열 결정

분리 균주의 동정은 *Pseudomonas* sp. EML2의 염색체 DNA를 분리한 후 primer 1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' [8F])과 primer 2 (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' [1492R])를 사용하여 polymerase chain reaction 방법으로 16S 리보솜 DNA를 증폭시켜 염기서열을 확인한 뒤 BLAST search를 통해 조사하였다.

### PHB 생산을 위한 최적 조건 확립

균주의 최적 성장 및 PHB 축적 조건을 확인하기 위해, *Pseudomonas* sp. EML2를 NB 배지에서 배양 후 optical density 값이 0.6에 도달하였을 때 접종량이 10%(v/v)가 되도록 WFO 20 g/l가 포함된 미네랄염 배지로 옮겼다. 모든 실험은 pH 7.0, 30°C, 200 rpm의 조건으로 3회 배양하였다. 세포 성장 및 PHB 생합성을 위한 최적 배양시간, 배양온도 및 pH는 *Pseudomonas* sp. EML2를 각각 0~120시간, pH 5~9, 그리고 10~40°C의 조건에서 배양하여 확립하였다. 균주 성장 및 PHB 생합성을 위한 최적의 질소원 및 탄소원 농도를 결정하기 위해, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, beef extract, yeast extract, peptone을 0.5 g/l씩 동일양 사용하였으며, WFO가 1~50 g/l가 포함된 미네랄염 배지에서 pH 7, 30°C, 200 rpm으로 96시간 배양하였다.

### PHB 생산을 위한 fermentation 조건 확립

대량 배양 조건은 3 l jar fermentation을 통해 *Pseudomonas* sp. EML2를 96시간 배양하여 확립하였다. 배양에 사용된 탄소원 농도, pH, 온도, 교반속도 및 통기율은 각각 WFO 30 g/l,

pH 7, 20°C, 200 rpm 및 1 vvm이었다. Fermentation 중 12시간 간격으로 배양액 20 ml을 표집하여 10,000 g로 10분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리하였으며, 침전된 균체는 증류수와 hexane을 첨가하여 재현탁 하였다. 이 후 원심분리를 통해 잔류하는 WFO를 제거하여 70°C 건조 오븐에서 3일간 건조 후 건조세포중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

### 배양액 내 oil 측정

12시간마다 배양액 20 ml을 표집하여 hexane과 함께 혼합하였다. 혼합 용액을 10,000 g에서 10분간 원심분리 하였으며, hexane 층을 다른 tube로 옮겨 흡 후드에서 hexane을 완전히 제거시킨 후 남아있는 WFO의 무게를 측정하였다.

### Gas chromatography (GC)와 gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) 분석

PHB 조성과 수율은 GC 분석을 통해 결정하였으며, 내부표준물질(internal standard)로 2 mg/ml의 benzoic acid를 사용하였다. GC 측정 전처리를 위하여 건조세포 20 mg에 GC base solution (1 l 당 methanol 850 ml, 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150 ml, benzoic acid 2 g) 538 µl와 chloroform 538 µl를 첨가하여 90°C에서 3.5시간 반응시켰다. 증류수 200 µl를 첨가하여 24시간 층 분리한 후 chloroform 층만 GC vial에 옮겨 GC를 측정하였다. GC는 flame ionization detector (FID)가 장착된 GC-2010 plus (Agilent Inc., USA)를 사용하였으며 column은 HP-1 (25 m × 0.2 mm × 0.5 µm)을 사용하였다. GC/MS는 5977A Series GC/MSD system (Agilent Inc., USA)를 사용하였고, column은 HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)을 사용하였다.

### WFO와 FFO 지방산 분석

지방산 분석은 식품공전에 명시된 지방산 시험법을 참고하였다. 시료 20 mg을 tube에 넣고 100 mg pyrogallol, 내부표준용액 2 ml (Supelco™ 37 Component FAME Mix 10 mg, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 ml)을 첨가하였다. 8.3M NaOH 10 ml을 넣고 vortexing한 후 70°C에서 40분 중탕하여 비누화하였다. 실온에서 냉각한 후, 7% 트리플루오로보란메탄올 2 ml, N<sub>2</sub>를 첨가하여 100°C에서 45분 가열하였다. 실온으로 냉각하여 증류수 5 ml, hexane 1 ml, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g을 첨가한 후 진탕하였다. 상층액을 분리하여 FID가 장착된 Agilent 6890N GC (Agilent Inc., USA)로 하였으며 column은 SP-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 µm)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### *Pseudomonas* sp. EML2의 PHB 생산 특성

균주를 분리하기 위해, 안동대학교 부속농장 인근에서 토양 샘플을 채취한 후 WFO 20 g/l가 포함된 미네랄염 배지에서

Table 1. PHA production of soil bacteria in MS medium containing 2% of WFO as the sole carbon source

Strain	DCW (g/l)	PHAs (wt%)	PHA composition (%)
			3-HB (C <sub>4</sub> )
EML1	1.2 ± 0.1	ND	ND
EML2	1.7 ± 0.2	45.5	100
EML3	0.3 ± 0.1	ND	ND

Note: ND - not detected.

30°C, 200 rpm 으로 5일간 증균배양을 진행하였으며, 그 결과 총 10종의 균주를 분리하였다. 균주의 WFO 분해능력과 PHA 생산능력은 WFO가 20 g/l 포함된 100 ml 미네랄염 배지에서 48시간 배양한 후 건조세포중량과 PHA 축적률(wt%)을 통해 확인되었다(Table 1). 배양 결과 토양에서 분리한 10종의 분리 균주 중 7종의 균주는 DCW와 PHA 생합성이 관찰되지 않았다. 나머지 3종의 균주 중 분리 균주 EML1과 EML3의 건조세포중량은 각각 1.2 g/l와 0.3 g/l이며, PHA는 모두 축적하지 못하였다. EML2는 EML1, EML3에 비해 1.4배와 5배 더 높은 건조세포중량을 보여주었으며, 다른 균주들과 달리 유일하게 PHA를 45.5 wt% 축적하여 추후 실험 균주로 선별하였다.

EML2로부터 생합성된 PHA의 조성과 축적률을 확인하기 위해 GC 및 GC/MS 분석을 진행하였다(Fig. 1). Fig. 1A의 peak는 retention time 11.467 min (benzoic acid peak)외에 retention time 6.269 min를 볼 수 있었으며, 이 peak를 확인하기 위하여 동일한 PHA를 GC/MS 분석하였다. 분석결과 Fig. 1A의 retention time 6.269 min가 Fig. 1B의 retention time 2.506 min와 동일하며, 이는 PHB로 확인되었다.

16S 리보솜 DNA 염기서열 분석과 BLAST search 결과는 EML2가 *Pseudomonas fluorescens* strain KBL28와 97.0% similarity를 보여주어, 본 실험의 분리 균주 EML2를 *Pseudomonas* 속으로 판단하였다(Table 2).

### FFO와 WFO의 특성

FFO와 WFO의 지방산 분석 결과는 Table 3에 나타내었다. FFO의 지방산 함량은 불포화지방산 82.6%, 포화지방산 14.9%를 차지하는 것으로 나타났다. 불포화지방산의 가장 많은 비율은 linoleic acid (C18:2)가 54.8%로 과반을 차지하였으며, 다음으로 oleic acid (C18:1)와 linolenic acid (C18:3)가 각각 21.2%, 6.7%였다. 포화지방산의 구성은 palmitic acid (C16:0)가 10.9%, stearic acid (C18:0) 4.0%였다. FFO의 불포화 및 포

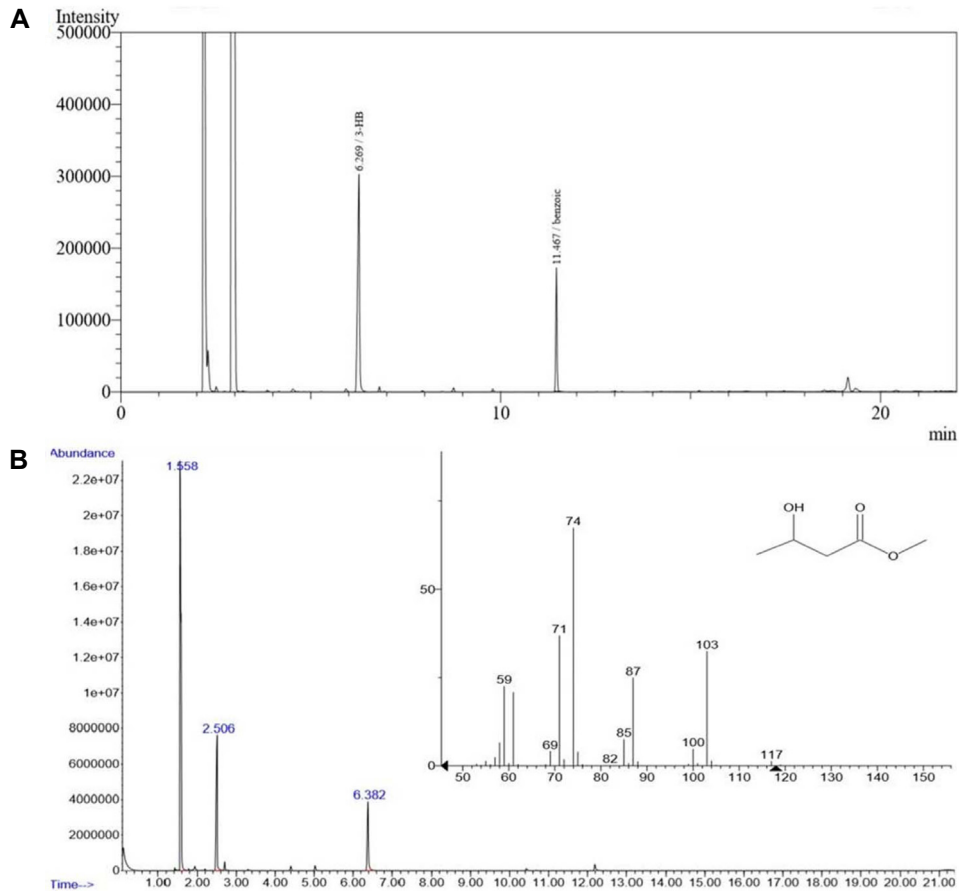


Fig. 1. GC and GC/MS analysis of PHAs produced from *Pseudomonas* sp. EML2. Strain was cultivated in MS medium with 2% WFO for 48 hr at 30°C. After PHAs are extracted with chloroform, (A) GC and (B) GC/MS analysis were performed.

Table 2. Identification of isolated *Pseudomonas* sp. EML2 strains by 16S rRNA gene

Strain	Closest match			
	Family	Identity	Similarity (%)	Accession no.
EML2	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KBL28	97.0	MG576181.1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KBL33	97.0	MG576186.1
		<i>Pseudomonas</i> sp. strain DC3N-3	97.0	MF716678.1
		<i>Pseudomonas</i> sp. F49 (2015)	97.0	KT767897.1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain F43	97.0	KT767891.1

Table 3. Fatty acid composition of WFO and FFO

Fatty acids	WFO Composition (%)	FFO Composition (%)
Linoleic acid (C18:2)	30.2	54.8
Palmitic acid (C16:0)	24.4	10.9
Oleic acid (C18:1, cis)	21.2	21.2
Stearic acid (C18:0)	09.1	04.0
Elaidic acid (C18:1, trans)	04.8	ND
Linolenic acid (C18:3)	00.2	06.7
Others	10.2	02.5

Note: ND - not detected.

화 지방산 함량 특징은 대표적인 식물유 중 하나인 soybean oil에 해당하는 것으로 확인하였다[21, 22]. WFO의 경우 불포화지방산 56.3%와 포화지방산 33.5%로 FFO와 비교할 때 지방산 조성의 변화를 확인할 수 있었다. 불포화지방산의 대부분을 차지하는 linoleic acid (C18:2)의 비율이 30.2%로 FFO에 비해 감소하였다. 또한 FFO에서 6.7%를 차지하던 linolenic acid (C18:3)은 WFO에서 0.2%로 6.5%가 감소한 것이 확인되었으며, FFO에서 나타나지 않던 elaidic acid (C18:1)가 4.8%를 차지하였다. Oleic acid (C18:1)의 경우 21.2%로 FFO와 비슷한 구성을 보였다. 이 같은 결과는 Chung 외[6]의 실험에서 FFO의 가열 횟수가 많아질수록 linolenic acid (C18:3)가 감소한 결과와 동일하며, 불포화지방산의 감소 이유가 fresh oil이 튀김기름으로 사용시 산화 반응과 트리아실글리세롤의 에스테르결합 가수분해 결과 di- 및 mono-acylglycerols, glycerol 그리고 유리지방산의 생성이라 보고하였다. 따라서 본 논문에서 FFO의 linoleic acid (C18:2)와 linolenic acid (C18:3) 등 높은 불포화지방산 조성 변화는 가열, 산화반응 및 가수분해에 의한 화학적, 물리적 특성의 변화 때문인 것으로 사료된다[19].

### PHB 생산을 위한 *Pseudomonas* sp. EML2 최적 성장조건 확립

*Pseudomonas* sp. EML2의 최적 성장 및 PHB 생합성 조건을 확립하기 위하여 배양 시간, pH, 온도, 질소원, 탄소원의 농도 등의 배양 조건을 변화시킨 후 건조세포중량과 PHB 생합성 양상을 확인하였다(Fig. 2). 96시간 배양 후 *Pseudomonas* sp. EML2의 건조세포중량과 PHB 생합성량은 각각 3.3 g/l, 2.0

g/l로 확인하였다. 120시간 배양 시 96시간 배양 결과와 동일한 세포 성장 및 PHB 생합성량이 확인되어 최적 배양 시간은 96시간으로 결정하였다. 일반적으로 PHAs는 세포 생장이 끝난 정지기(stationary phase)에서 과량의 탄소원이 존재할 때 축적되는 것으로 알려져 있다[12, 16, 22]. 그러나 본 연구에서 사용한 분리 균주 *Pseudomonas* sp. EML2는 정지기에서 PHB의 축적이 시작되지 않고, 대수기(log phase)에서 균체 성장과 동시에 PHB 생합성을 보여준다(Fig. 2A). Yamane 외[22]의 보고에 따르면 *Paracoccus denitrificans*의 경우 *n*-pentanol을 탄소원으로 사용하여 배양시 성장과 동시에 PHA 생합성 양상을 나타내며, 균주가 *n*-pentanol을 acetyl-CoA와 D-(-)-3-hydroxyvaleryl-CoA의 중간대사체인 3-ketovaleryl-CoA로 전환시키는 pathway를 가져 세포 성장과 PHA 생합성이 동시에 가능한 것으로 추정하였다. Gamal 외[7]의 보고에서 *Pseudomonas fluorescens* S48를 WFO와 함께 배양시 12시간에 건조세포중량 0.3 g/l와 PHB 축적률 16.0%에서 72시간까지 건조세포중량 2.9 g/l와 PHB 축적률 31.7%를 나타냈으며, 대수기 단계부터 성장과 동시에 PHA 생합성하였다. 본 논문에서 분리한 *Pseudomonas* sp. EML2 또한 *Pseudomonas fluorescens* S48과 유사하게 WFO를 단일 탄소원으로 사용시 성장과 동시에 PHA 합성이 가능한 pathway를 가진 것으로 사료된다.

최적 성장 및 PHB 생합성을 위한 pH 연구 결과를 Fig. 2B에 나타내었다. *Pseudomonas* sp. EML2는 pH 5, pH 6과 같은 산성 조건에서 성장하지 못했으나 pH 7에서 건조세포중량이 3.8 g/l로 가장 높았다. 혐기성 조건인 pH 8과 pH 9에서 건조세포중량은 각각 2.9 g/l와 2.7 g/l였다. PHB 생합성량은 pH 7에서 1.9 g/l로 가장 높았으며 pH 8과 pH 9에서 각각 1.8 g/l, 1.8 g/l로 나타났다. 따라서 가장 높은 건조세포중량과 PHB 생합성량(g/l)을 확인한 pH 7을 선정하였다.

Fig. 2C에서 보는 바와 같이, *Pseudomonas* sp. EML2는 20°C에서 가장 높은 건조세포중량 4.35 g/l를 나타냈으며, 온도가 높아질수록 건조세포중량이 점차 감소하여 35°C 이상에서 성장하지 못했다. 또한 성장과 유사하게 20°C에서 PHA 생합성량이 3.9 g/l로 가장 높았으며 온도가 높아질수록 감소하였다. 따라서 최적의 배양 온도는 20°C로 선정하였다. Ayub 외[3, 4] 보고에 따르면 *Pseudomonas* sp. 14-3는 저온성 미생물로서 PHA 생합성을 통해 극한의 환경에 대한 스트레스를 완화시키는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp.

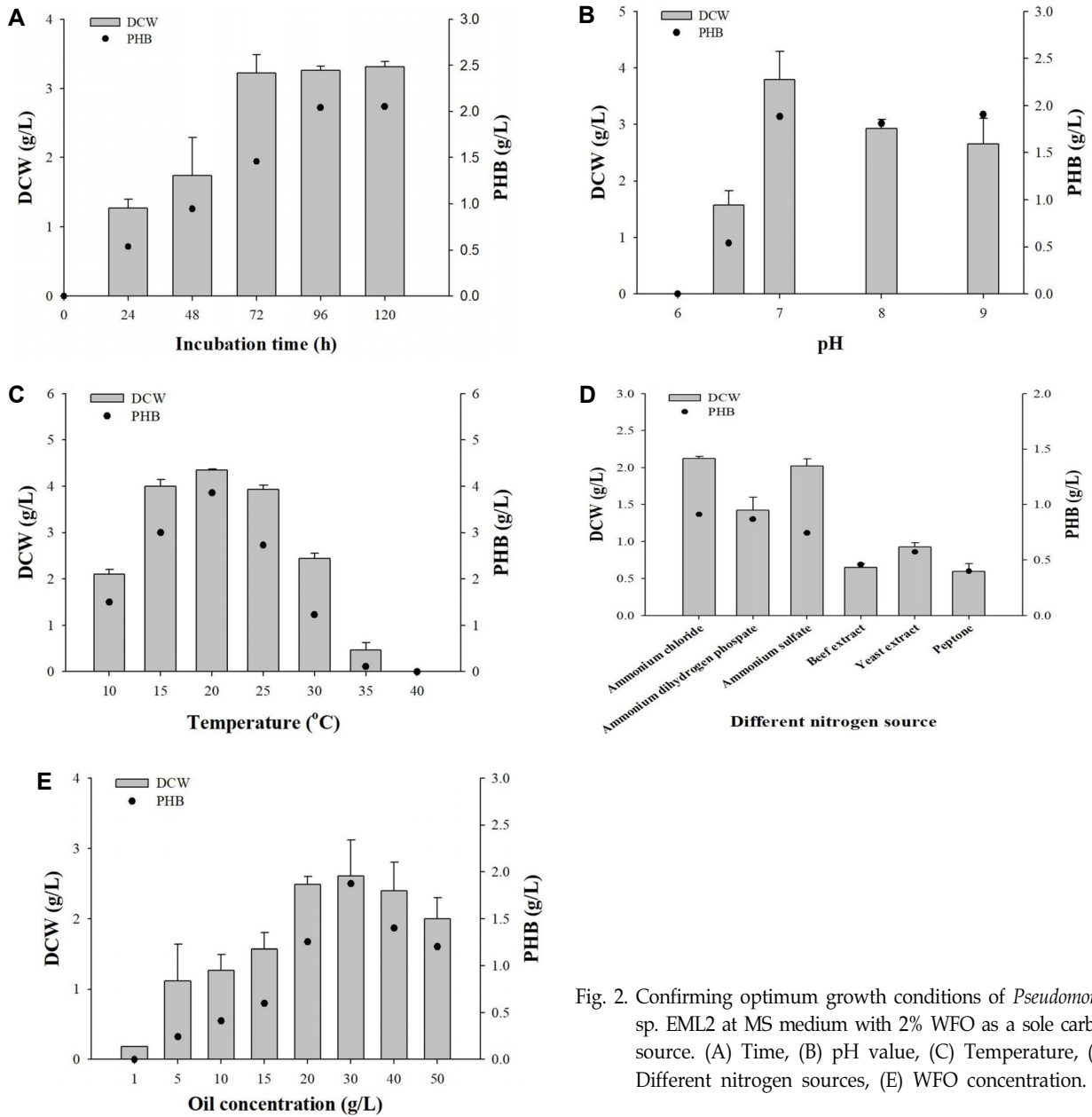


Fig. 2. Confirming optimum growth conditions of *Pseudomonas* sp. EML2 at MS medium with 2% WFO as a sole carbon source. (A) Time, (B) pH value, (C) Temperature, (D) Different nitrogen sources, (E) WFO concentration.

EML2는 10~30°C 에서 생장이 가능하며, 저온에서 PHB 생합성량(g/l)이 증가하는 것으로 볼 때 저온 환경에서 스트레스를 완화시키기 위한 수단으로 PHA 합성 물질대사를 이용하는 중저온성 미생물인 것으로 사료된다.

6종류의 무기 및 유기 질소원을 사용하여 균주의 성장 및 PHA 합성에 최적인 질소원을 평가하였다. NH<sub>4</sub>Cl과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 질소원으로 사용한 경우 건조세포중량은 각각 2.1 g/l, 2.0 g/l 으로 다른 질소원을 사용한 경우보다 약 1.5배에서 3배가량 높게 나타났으나, PHA 축적률은 61.0 wt%로 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에서 가장 높게 측정되었다(Fig. 2D). PHB 합성을 위한 최적의 질소원은 PHB 생합성량(g/l)을 비교하여 0.9 g/l로 가장 높은 NH<sub>4</sub>Cl이 선정되었다.

균주의 성장 및 PHB 생합성을 위한 최적 탄소원 농도가 확인되었다(Fig 2E). 다양한 농도(1~50 g/l)에서 *Pseudomonas* sp. EML2를 배양한 결과 WFO의 농도가 높아질수록 건조세포중량과 PHB 생합성량(g/l)이 증가하는 경향을 나타내었으며, WFO 30 g/l에서 가장 높은 건조세포중량 2.6 g/l과 PHB 생합성량 1.9 g/l를 보여주어 최적 탄소원 농도로 선정하였다.

#### PHB생합성을 위한 *Pseudomonas* sp. EML2의 fermentation

대량 배양 조건 확립을 위해 3L jar fermentation은 탄소원 3% WFO, pH 7, 20°C, 질소원 NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/l을 기본조건으로 하여 진행하였다. 단일 탄소원으로 WFO 30 g/l를 공급하여

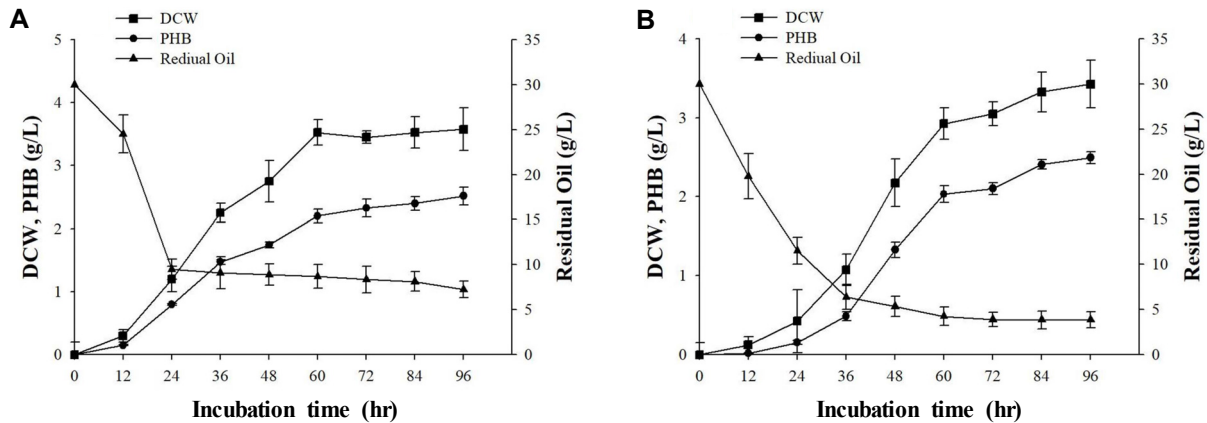


Fig. 3. Production of PHAs by *Pseudomonas* sp. EML2 at batch fermentation with 3% WFO and FFO. The graph shows time courses of DCW, PHA yield and residual oil when batch fermentation with (A) WFO and (B) FFO as a sole carbon source, respectively.

Table 4. The comparison of microbial production of PHA from oil sources reported in the literature with the present work

Strain	Carbons source	Type of PHA	Culture mode	Culture time (hr)	Yield (g/l)	Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. EML2	WFO	PHB	Fermentation	96	2.6	Present work
	FFO				2.4	
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Crude palm oil	PHB	Flask	72	3.5	[13]
	Coconut oil				3.3	
	Sunflower oil				3.4	
	Olive oil				3.9	
<i>Alcaligenes</i> sp. AK 201	Olive oil	PHB	Flask	61	1.5	[1]
	Soybean oil			48	0.8	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> S48	WFO	PHB	Fermentation	72	0.9	[7]

배양한 결과, 12~60시간에 건조세포중량이 0.3 g/l에서 3.5 g/l까지 도달하였으며, 이 시기에 세포의 급격한 생장이 이루어졌다. 60시간 이후 건조세포중량은 지속적으로 유지되어 최종 96시간에 가장 높은 3.6 g/l를 나타냈다. 배양 24시간에 잔류 WFO는 10 g/l였으며, 이는 *Pseudomonas* sp. EML2의 성장과 PHB 축적을 위해 WFO의 급격한 소비가 이루어진 것으로 사료된다. 배양 24시간 이후 급격히 완화된 WFO 소비패턴을 보여주며, 96시간 배양 후 잔류 WFO는 7.5 g/l로 공급된 WFO의 75%가 세포 성장과 PHB 축적에 사용되었다. 플라스크 결과와 동일한 PHB 생합성 양상을 fermentation 결과 확인하였다. PHB 생합성은 균주의 성장과 동시에 진행되었으며, 배양 96시간 후 PHB 축적률과 PHB 생산량(%)은 각각 73 wt%, 2.6 g/l였다(Fig. 3A). PHB의 생산 단가 절감을 위한 값싼 탄소원으로 WFO의 이용가능성을 평가하기 위해 대조군으로 동일한 양의 FFO를 사용하여 fermentation 배양하였다(Fig. 3B). Fig. 3A의 결과와 유사하게, 급격한 균주 성장 및 PHB 축적이 배양 24~60시간에 확인되었다. 배양 24시간의 잔류 FFO는 11 g/l로 총량의 63%가 사용되었으며, 추후 완화된 소비패턴이 나타났다. 배양 96시간에 FFO의 소비률은 85%였으며, 건조세포중량 3.4 g/l, PHB 축적률 70 wt%와 PHB 생합성량 2.4 g/l을 획득

하였다. 이러한 결과는 본 연구의 분리 균주 *Pseudomonas* sp. EML2는 단일 탄소원으로 WFO를 사용하여 FFO와 동일한 수율의 PHB를 생합성 할 수 있음을 시사한다.

식물유를 사용하여 PHB 생합성에 관한 연구들을 본 실험의 결과와 함께 Table 4에 나타냈다. Lee 외[13]는 *Cupriavidus necator* H16균주를 이용하여 crude oil, coconut oil, sunflower oil, olive oil과 같은 FFO를 탄소원으로 사용 시 3.3~3.4 g/l의 PHB를 생합성함을 확인하였다. Akiyama 외[1]는 *Alcaligenes* sp. AK 201을 FFO인 soybean oil에서 배양하여 PHB를 생합성함을 보고하였으며 이 경우 *Pseudomonas* sp. EML2의 PHB 생합성량(g/l)보다 69.2% 낮은 0.8 g/l의 PHB를 생합성하였다. Gamal 외[7]는 본 연구에서 사용한 것과 비슷한 WFO를 단일 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas fluorescens* S48를 배양 시 본 연구결과 보다 65.4% 낮은 0.9 g/l의 PHB 수율을 나타냄을 발표하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp. EML2가 WFO를 사용하여 다른 균주에 비해 상대적으로 높은 수율의 PHB를 생합성을 보여주며, *Pseudomonas* sp. EML2는 PHB의 산업적 생산을 위한 잠재적인 PHB 생산 후보자가 될 수 있음을 보여준다.

## 감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었으며, 본 연구의 지방산 분석에 도움을 주신 안동 경북바이오산업연구원 임정희, 원준 연구원님께 감사드립니다.

## References

1. Akiyama, M., Taima, Y. and Doi, Y. 1992. Production of poly (3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 698-701.
2. Akiyama, M., Tsuge, T. and Doi, Y. 2003. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym. Degrad. Stab.* **80**, 183-194.
3. Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Méndez, B. S. and Lopez, N. I. 2007. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid* **58**, 240-248.
4. Ayub, N. D., Tribelli, P. M. and López, N. I. 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* **13**, 59-66.
5. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A. and Alvarez, V. A. 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polym. Lett.* **8**, 791-808.
6. Chung, J., Lee, J. and Choe, E. 2004. Oxidative stability of soybean and sesame oil mixture during frying of flour dough. *J. Food Sci.* **69**, 574-578.
7. Gamal, R. F., Abdelhady, H. M., Khodair, T. A., El-Tayeb, T. S., Hassan, E. A. and Aboutaleb, K. A. 2013. Semi-scale production of PHAs from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens* S48. *BJM.* **44**, 539-549.
8. Harding, K., Dennis, J., Von Blottnitz, H. and Harrison, S. 2007. Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-β-hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *J. Biotechnol.* **130**, 57-66.
9. Kim, B. S. 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 774-777.
10. Kim, S. H., Lee, Y. D. and Kim, M. S. 2015. Generation and Treatment Problem of Used Cooking Oils and Search for Resourcelization-in-local. *JRS.* **23**, 77-95.
11. Kim, T., Kim, D. and Chung, Y. 2015. Environmental impact evaluation of the waste cooking oil recycling products. *JFMSE* **27**, 516-525.
12. Kim, Y. B. and Lenz, R. W. 2001. Polyesters from microorganisms, pp. 51-79, In Anonymous Biopolyesters, Springer.
13. Lee, W., Loo, C., Nomura, C. T. and Sudesh, K. 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresour. Technol.* **99**, 6844-6851.
14. Lu, J., Tappel, R. C. and Nomura, C. T. 2009. Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *J. Macromol. Sci. ©, Part C: Polym. Rev.* **49**, 226-248.
15. Min, K. I., Park, C. K., Kim, J. K. and Na, B. K. 2016. Study on potential feedstock amount analysis of biodiesel in Korea. *Trans. Kor. Hydrogen New Energy Soc.* **27**, 447-461.
16. Nitschke, M., Costa, S. G. and Contiero, J. 2011. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochem.* **46**, 621-630.
17. Poli, A., Donato, P. Di., Abbamondi, G. R. and Nicolaus, B. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea* **2011**, 693253.
18. Pouton, C. W. and Akhtar, S. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 133-162.
19. Raza, Z. A., Abid, S. and Banat, I. M. 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **126**, 45-56.
20. Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* **22**, 261-279.
21. Wang, F. and Lee, S. Y. 1997. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3703-3706.
22. Yamane, T., Chen, X. and Ueda, S. 1996. Growth-associated production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from n-Pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 380-384.

## 초록 : Waste frying oil를 사용한 Poly(3-Hydroxybutyrate) 생합성

김태경 · 강성호 · 이우성 · 김종식 · 정정욱\*

(국립안동대학교 생명과학과)

본 연구에서는 생분해성 고분자인 poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)의 생산 비용 절감을 위해, 탄소원으로 폐식용유(waste frying oil, WFO)을 사용하여 분리 균주 *Pseudomonas* sp. EML2의 최적 성장 및 PHB 생합성 조건을 확립하였다. WFO와 새 식용유(fresh frying oil, FFO)의 지방산을 분석한 결과 FFO의 지방산 함량은 불포화지방산 82.6%, 포화지방산 14.9%를 차지하는 것으로 나타났으나 WFO의 경우 불포화지방산 56.3%와 포화지방산 33.5%로 FFO와 비교할 때 지방산 조성의 변화를 확인할 수 있었으며, 이러한 불포화지방산의 조성 변화는 가열, 산화반응 및 가수분해에 의한 화학적, 물리적 특성의 변화 때문인 것으로 사료된다. 분리 균주 *Pseudomonas* sp. EML2의 최대 건조세포중량과 PHB 생합성량(g/l)을 확인하기 위해 플라스크를 이용하여 탄소원 농도, 질소원 종류 및 배양 pH와 온도 및 시간을 확립하였다. 그 결과 30 g/l의 WFO과 0.5 g/l의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 질소원으로 사용하여 pH 7 및 20°C의 배양 조건에서 96시간 배양 시 최적의 건조세포중량과 PHB 생합성량을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 3 l jar fermenter를 이용하여 *Pseudomonas* sp. EML2의 성장 및 PHB 수율을 확인하였다. 그 결과 30 g/l의 WFO를 단일 탄소원으로 사용하여 96시간 배양 시 3.6 g/l의 건조세포중량을 얻었으며 73.0 wt%의 PHB 축적률을 확인하였다. 이 경우 PHB 생합성량 2.6 g/l로 나타났다. FFO를 대조군으로 사용하여 대량배양 한 결과 WFO를 사용한 경우와 비슷한 건조세포중량(3.4 g/l), PHB 축적률(70.0 wt%), 그리고 PHB 생합성량(2.4 g/l)을 확인하였다. 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp. EML2는 WFO를 효과적으로 이용하여 PHB를 생합성 하였으며 이 균주와 WFO는 PHB의 산업적 생산을 위한 새로운 생산 후보자 및 탄소원으로서 이용될 수 있음을 확인하였다.