

# Production of Medium-chain-length Poly (3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas* sp. EML8 from Waste Frying Oil

Tae-Gyeong Kim<sup>1</sup>, Jong-Sik Kim<sup>2</sup> and Chung-Wook Chung<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>R&D Center, NGeneBio Inc., Seoul 08390, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received October 19, 2020 / Revised November 18, 2020 / Accepted November 19, 2020

In this study, to reduce the production cost of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHA), optimal cell growth and PHA biosynthesis conditions of the isolated strain *Pseudomonas* sp. EML8 were established using waste frying oil (WFO) as the cheap carbon source. Gas chromatography (GC) and GC mass spectrometry analysis of the medium-chain-length PHA (mcl-PHA<sub>WFO</sub>) obtained by *Pseudomonas* sp. EML8 of WFO indicated that it was composed of 7.28 mol% 3-hydroxyhexanoate, 39.04 mol% 3-hydroxyoctanoate, 37.11 mol% 3-hydroxydecanoate, and 16.58 mol% 3-hydroxydodecanoate monomers. When *Pseudomonas* sp. EML8 were culture in flask, the maximum dry cell weight (DCW) and the mcl-PHA<sub>WFO</sub> yield (g/l) were showed under WFO (20 g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 g/l), pH 7, and 25°C culture conditions. Based on this, the highest DCW, mcl-PHA<sub>WFO</sub> content, and mcl-PHA<sub>WFO</sub> yield from 3-l-jar fermentation was obtained after 48 hr. Similar results were obtained using 20 g/l of fresh frying oil (FFO) as a control carbon source. In this case, the DCW, the mcl-PHA<sub>FFO</sub> content, and the mcl-PHA<sub>FFO</sub> yields were 2.7 g/l, 62 wt%, and 1.6 g/l, respectively. Gel permeation chromatography analysis confirmed the average molecular weight of the mcl-PHA<sub>WFO</sub> and mcl-PHA<sub>FFO</sub> to be between 165-175 kDa. Thermogravimetric analysis showed decomposition temperature values of 260°C and 274.7°C for mcl-PHA<sub>WFO</sub> and mcl-PHA<sub>FFO</sub>, respectively. In conclusion, *Pseudomonas* sp. EML8 and WFO could be suggested as a new candidate and substrate for the industrial production of PHA.

**Key words** : Fresh frying oil, medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates), PHAs, *Pseudomonas* sp. EML8, waste frying oil

## 서 론

지난 수 십년 동안 널리 사용해진 석유 기반 합성 플라스틱은 난분해성의 특징으로 환경에서 분해되는데 오랜 시간이 필요하며, 이로 인해 심각한 환경오염 문제를 야기시킨다. 또한 석유에서 생산되는 합성 플라스틱은 석유자원의 고갈로 인해 생산이 중단될 수 있다[7, 13]. 따라서 합성 플라스틱의 환경오염과 석유자원 고갈 문제를 해결할 수 있는 새로운 친환경 대체품의 개발이 필요한 실정이다.

Poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs)는 다양한 미생물들이 에너지원 및 탄소원으로 세포내에 저장하는 고분자물질이다[20]. 일반적으로 PHAs는 과량의 탄소원이 존재하는 동시에 용존산소, 질소(N), 인(P), 황(S) 및 마그네슘(Mg)과 같은 영양소가 제한된 조건에서 축적되며, 현재까지 90속 이상의 PHAs 생합성 미생물과 약 150종류의 PHA 단위체(PHA monomer)

가 보고되었다[12, 27]. 생체적합성과 생분해성을 지닌 PHAs는 일반적으로 PHAs를 구성하는 단위체의 탄소수 개수에 따라 크게 두 그룹으로 구분된다. 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV)와 같이 PHA 단위체의 탄소수가 5개 이하인 short-chain-length PHAs (scl-PHA)는 높은 결정성(crystalline)과 50~180°C의 높은 녹는점(melting temperature)을 지니며, 딱딱하고 부서지기 쉬운 열가소성(thermoplastic)의 성질을 보인다. 반면 PHAs를 구성하는 단위체의 탄소수가 6~14개의 monomer로 구성된 medium-chain-length PHAs (mcl-PHA)는 scl-PHA와 비교하여 낮은 결정성, 40~60°C의 녹는점 및 단위체의 side chain 길이가 길어질수록 높은 고무탄성체적 성질을 보인다. 대표적인 mcl-PHA monomer는 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxynonanoate (3HN), 3-hydroxydecanoate (3HD), 3-hydroxyundecanoate (3HUD), 3-hydroxydodecanoate (3HDD)가 있다[22].

생분해성과 생체적합성을 지닌 PHA는 monomer의 조성에 따라 다양한 물성이 나타나기 때문에 석유 기반 플라스틱 대체품이나 산업적 소비재, 의료산업 등 광범위한 분야에 이용이 가능하다[15, 21]. 하지만 PHA의 생산비용은 폴리에틸렌과 같은 석유 기반 플라스틱에 비해 5~10배 이상 높으며, 특히 PHA 생산과정 중 발효단계에서 사용하는 탄소원의 비용이

### \*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.

전체 비용의 50% 이상을 차지한다[8]. PHAs 생산 비용의 문제는 아직까지 PHA가 상용화되지 않은 가장 큰 이유이며, 이를 해결하기 위해 값싸고 풍부하며 지속적으로 공급 가능한 탄소원으로 PHA를 생합성할 수 있는 생산공정이 개발되어야 한다. 현재 주목 받는 탄소원 중 하나는 식물유이다.

튀김기름으로 사용되는 식물유는 다양한 지방산과 트리아실글리세롤로 구성되며 이는 무게 당 높은 탄소 수를 함유한 천연자원이다. 식물유인 soybean oil은 50% 이상이 linoleic acid ( $C_{18:2}$ )로 구성되어 있으며, 세균의  $\beta$ -oxidation 경로를 통해 acetyl-CoA 분자 9개를 형성하며, 형성된 acetyl-CoA는 세포 성장 및 PHA 합성에 이용되었음이 보고된 바 있다[1, 19, 24]. Cooking oil, olive oil, coconut oil 및 sunflower oil을 탄소원으로 사용하여 *Cupriavidus necator* H16 균주에서 scl-PHAs의 생합성이 보고된 바 있으며, *Pseudomonas stutzeri* 1317균주는 soybean oil을 탄소원으로 이용하여 mcl-PHAs를 생합성하는 것을 확인하였다[6, 14]. 풍부하며 값싼 천연자원인 식물유를 탄소원으로 이용한다면 PHA 생산비용 중 탄소원의 비용을 절감할 수 있을 것으로 판단된다.

현대사회에서 식물유의 사용이 증가하면서 폐식용유(waste frying oil, WFO)의 양도 급증하는 추세이며 국내에는 연간 약 293,000톤의 WFO가 발생하고 이 중 74.4%(218,000 여톤)의 WFO가 회수되는 것으로 추정된다[17]. 그러나 회수되는 WFO 중에 재생비누, 혹은 바이오디젤 등으로 재활용되는 비율은 매우 낮으며 대부분의 WFO는 전처리 없이 하수로 버려지거나 추가 처리 공정을 거쳐 방류되는 실정으로 이로 인한 환경 문제가 야기된다[9, 17].

지난 연구에서 PHAs 생산비용 절감을 위한 방안으로 WFO를 단일탄소원으로 이용하여 poly (3HB) (PHB)를 생합성하는 균주를 분리한 뒤, 균주의 성장과 PHB 생합성을 위한 최적 배양조건 확립에 관한 연구결과를 발표하였다[10]. 본 연구에서는 scl-PHAs인 PHB에 비해 다양한 물성을 지닌 mcl-PHAs를 생산하기 위해 WFO로부터 mcl-PHAs를 생합성하는 균주를 도양에서 분리하였으며, mcl-PHA 생합성 수율을 높이기 위한 최적배양조건을 플라스크 및 fermentation 조건에서 수립하고 생합성된 mcl-PHAs의 물성을 분석하였다. 결과적으로 본 연구에서는 mcl-PHA 상용화와 WFO의 처리 문제를 해결하기 위한 값싼 탄소원으로서 WFO의 이용가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 *Pseudomonas* sp. EML8 균주는 안동대학교 부속농장에서 채취한 토양시료를 WFO (20 g/l)를 단일탄소원으로 사용한 mineral salt (MS) 배지에서 pH 7.0 30°C, 200 rpm으로 7일간 증균배양(enrichment culture)을 통해 분

리하였다. MS 배지 1 l의 조성은 다음과 같다:  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  9.00 g,  $KH_2PO_4$  1.50 g,  $NH_4Cl$  0.50 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g 및 microelement solution 1 ml. Microelement solution은  $FeCl_3$  9.70 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  10.33 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.22 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.16 g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.12 g 및  $CrCl_3 \cdot 6H_2O$  0.11 g을 0.1 M HCl 1 l에 녹여 제조하였다. 탄소원으로 사용한 WFO는 안동대학교 교내식당(채육관)에서 제공받았으며, 대조군으로 사용한 fresh frying oil (FFO)은 콩 식용유(Chefone Inc., Seoul., Korea)를 구입하여 사용하였다[10].

### 16S rDNA sequencing

분리 균주의 동정을 위해 *Pseudomonas* sp. EML8의 염색체 DNA를 G-spin™ Total DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 분리하였다. 분리된 염색체 DNA의 증폭을 위해 T100™ Thermal Cycler PCR machine (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)와 TaKaRa Ex Taq® DNA polymerase (Takara, Shiga, Tokyo), 그리고 8F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하였다. 염기서열을 확인한 뒤 BLAST search를 이용하여 균주를 동정하였다.

### PHAs 생합성 조건 확립

균주의 최적 성장 및 PHAs 축적 조건을 확립하기 위해 *Pseudomonas* sp. EML8을 nutrient broth (NB)에서 배양하여 optical density (OD)값이 600 nm에서 0.6에 도달하였을 때 접종량이 10% (v/v)가 되도록 WFO 20 g/l가 포함된 MS 배지로 옮겼다. 모든 실험은 pH 7.0, 30°C, 200 rpm의 조건으로 3회 수행하였다. 배양 시간, pH, 온도, 그리고 탄소원의 농도에 따른 *Pseudomonas* sp. EML8의 균체생장 및 PHAs 축적을 각각 0~120 hr, pH 5~9, 20~40°C 그리고 1~30 g/l의 조건에서 각각 평가하였다. 균주의 성장과 PHAs 축적에 최적인 질소원을 평가하기 위해 동일량(0.5 g/l)의  $NH_4Cl$ ,  $NH_4H_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$ , beef extract, yeast extract 그리고 peptone을 사용하였다. 배양 후 1,200 g에서 10분간 원심분리하여 세포를 수득한 뒤 동결건조하여 건조세포중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

균주의 성장 및 PHA 생합성량을 확인하기 위하여 플라스크에서 확립된 조건을 토대로 3 l jar fermentor에서 *Pseudomonas* sp. EML8을 배양하였다. 균주를 NB 배지에서 배양하여 OD 값이 0.6에 도달하였을 때 접종량이 10% (v/v)가 되도록 MS 배지로 옮겼으며, WFO 20 g/l, pH 7, 25°C, 200 rpm 및 1 vvm으로 배양하였다.

### 탄소원 잔량 측정

배양액 내 탄소원 농도를 측정하기 위해 12시간 간격으로 20 ml씩 시료를 수집하여 hexane과 함께 혼합하였다. 혼합

용액을 1,200 g에서 10분간 원심분리 하였으며, hexane 층을 다른 tube로 옮겨 흡 후드(fume hood)에서 hexane을 완전히 제거시킨 후 남아있는 WFO의 무게를 측정하여 탄소원의 잔량을 확인하였다.

#### 질소원 잔량 측정

배양액내의 암모늄 이온( $\text{NH}_4^+$ ) 농도를 측정하기 위해 12시간 간격으로 시료를 수집하여 1,200 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 사용하였다. 상등액 0.05 ml에 Nessler's reagent (1/5) 시약 2 ml와 DW 2.95 ml를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### WFO와 FFO의 지방산 분석

WFO와 FFO의 지방산 분석은 지난 연구에서 사용한 방법을 동일하게 사용하였다[10]. 시료 20 mg을 tube에 넣고 pyrogallol 100 mg, 내부표준용액 2 ml (Supelco™ 37 Component FAME Mix 10 mg,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1 ml), 8.3 M NaOH 10 ml를 첨가하여 vortexing한 후 70°C에서 40분 중탕하여 비누화하였다. 실온에서 냉각한 후, 7% (v/v) Boron trifluoridemethanol solution 2 ml와 질소( $\text{N}_2$ )를 첨가하여 100°C에서 45분간 가열하였다. 용액을 실온에서 냉각하고 DW 5 ml, hexane 1 ml과  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1 g을 추가로 첨가한 뒤 진탕하였다. 분리된 상층액은 gas chromatography (GC)를 통해 분석하였다. 분석에는 flame ionization detector (FID)가 장착된 Agilent 6890N GC (Agilent Inc., Santa Clara., USA)와 SP-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm) column을 사용하였다[18].

#### GC와 GC mass spectrometry (GC/MS) 분석

PHAs의 조성은 GC와 GC/MS 분석을 통해 결정하였으며, 내부 표준물질(internal standard)로 2 mg/ml의 benzoic acid를 사용하였다. 전처리를 위해 dry cell 20 mg에 GC base solution (1 l 당 methanol 850 ml, 98% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  150 ml, benzoic acid 2 g) 538 μl와 chloroform 538 μl를 첨가하여 90°C에서 3.5시간 반응시켰다. 증류수 200 μl를 첨가하여 24시간 층을 분리한 후 chloroform 층만을 GC vial에 옮겨 측정하였다. GC는 FID가 장착된 GC-2010 plus (Agilent Inc., Santa Clara., 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., Santa Clara., USA)을 사용하였고, column은 HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)을 사용하여 GC와 동일 조건에서 측정하였다[10].

#### mcl-PHA 물성분석

정제된 PHA의 분자 질량(molecular weight)은 Alliance e2695 (Waters Inc., Milford, USA)을 사용하여 측정하였다.

Column은 Waters Styragel HR3, Waters Styragel HR4와 Waters Styragel HR5E를 사용하였으며, detector-RI로 gel permeation chromatography (GPC)를 수행하였다. 정제된 PHA 시료 20 mg을 취하였으며, 유출용매로서  $\text{CHCl}_3$  10 ml를 사용하여 1 ml/min의 속도로 주입시켰다.

DSC 분석은 DSC Q2000 (TA Instruments Inc., Leatherhead, UK)을 사용하여 수행하였으며, 녹는 온도(melting temperature,  $T_m$ ), 유리전이 온도(glass transition temperature,  $T_g$ )와 용융 엔탈피(melting enthalpy,  $\Delta H_m$ )를 측정하였다. 분석온도 10°C/min의 속도로 -70°C에서 150°C까지 증가시켜 주었으며, 정제된 PHA 7~8 mg을 분석에 이용하였다. 생합성 PHAs의 열안정성(thermal stability)은 TG-DTA 8122 (Rigaku Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 thermogravimetric analysis (TGA)를 통해 확인하였다. PHA 시료 20 mg을 사용하였으며, 질소 40 ml/min와 승온속도 10°C/min으로 500°C까지 상승시켜 무게감량변화를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

#### WFO와 FFO의 지방산 조성

지난 연구결과에서 언급했듯이 FFO의 지방산 함량은 불포화지방산(linoleic acid, oleic acid, linolenic acid)과 포화지방산(palmitic acid, stearic acid)이 각각 82.6%와 14.9%를 차지하는 것으로 나타났다. 이는 FFO의 불포화 및 포화지방산의 함량이 대표적인 식물성 기름 중 하나인 soybean oil과 유사한 것으로 확인되었다[26]. 반면 FFO를 튀김기름으로 사용 시에 산화반응과 트리아실글리세롤의 에스테르결합 가수분해 결과로 di-, mono-acylglycerols, glycerol 그리고 유리지방산(free fatty acid) 등이 생성[4]되는 화학적, 물리적 특성의 변화[23] 때문에 WFO의 경우 FFO에 비해 상대적으로 감소한 함량의 불포화지방산(56.3%)과 증가한 포화지방산(33.5%)을 함유하는 것으로 나타났다[10].

#### WFO를 단일 탄소원으로 하여 PHAs를 생합성하는 균주 탐색

WFO를 단일탄소원으로 사용하여 PHAs를 생합성하는 균주를 분리하기 위해, 안동대학교 부속농장 인근에서 토양 시료를 채취한 후, WFO 20 g/l가 포함된 MS 배지에서 30°C, 200 rpm으로 7일간 증균배양을 진행하였으며, 그 결과 13종의 균주를 분리하였다(Table 1). 그 중 DCW가 2.7 g/l로 가장 높으며, DCW의 60% (wt/wt)의 mcl-PHA를 생합성하는 EML8균주를 실험 균주로 선정하였다. PHA의 조성과 축적률을 확인하기 위해 GC와 GC/MS 분석을 진행하였다(Fig. 1). Fig. 1A는 EML8균주가 생합성한 PHAs를 GC로 분석한 것이며 retention time 10.526 min (3HHx), 11.461 min (benzoic acid), 14.419 min (3HO), 17.669 min (3HD)와 20.586 min (3HDD)의

Table 1. Biosynthesis of PHAs by soil bacteria in an MS medium containing 20 g/l of WFO as the sole carbon source

Strains	DCW (g/l)	PHAs (wt%)	PHA composition (%)				
			3HB (C <sub>4</sub> )	3HHx (C <sub>6</sub> )	3HO (C <sub>8</sub> )	3HD (C <sub>10</sub> )	3HDD (C <sub>12</sub> )
EML1	1.18±0.10	-	-	-	-	-	-
EML2	1.74±0.20	45.52	100	-	-	-	-
EML3	0.29±0.01	-	-	-	-	-	-
EML4	0.83±0.03	-	-	-	-	-	-
EML5	1.08±0.16	21.87	-	-	38.91	49.14	11.95
EML6	0.23±0.03	-	-	-	-	-	-
EML7	-	-	-	-	-	-	-
EML8	2.69±0.46	60.00	-	7.28	39.04	37.11	16.58
EML9	1.34±0.46	39.33	-	6.94	37.56	39.60	15.91
EML10	-	-	-	-	-	-	-
EML11	0.25±0.01	37.59	-	3.23	40.33	41.42	15.02
EML12	1.12±0.12	39.71	-	5.72	35.20	41.18	17.89
EML13	-	-	-	-	-	-	-

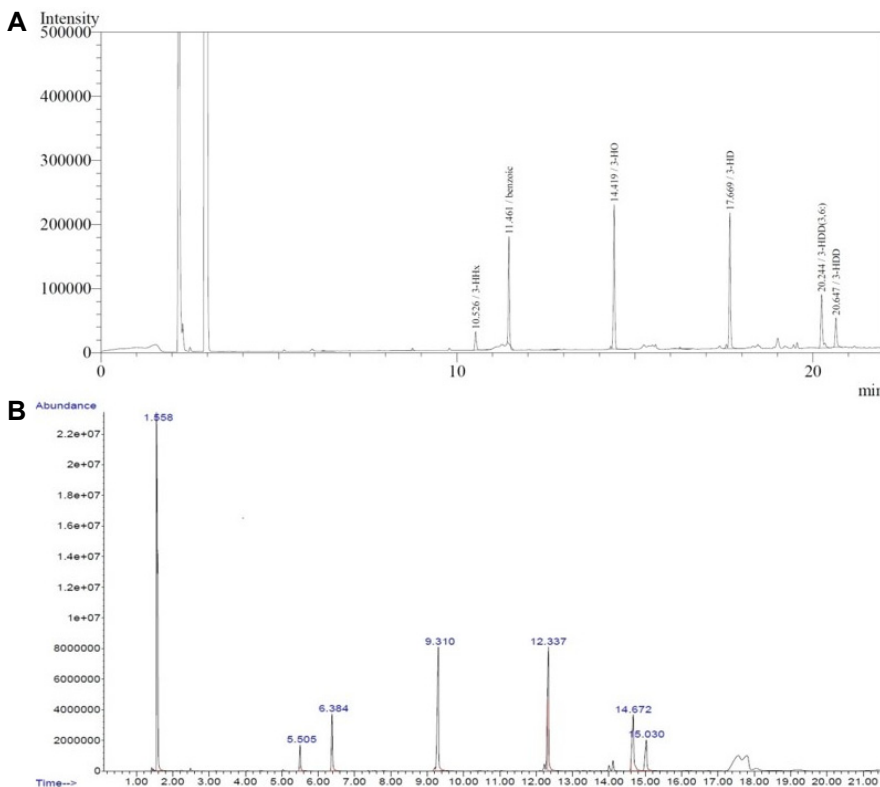


Fig. 1. Composition analysis of PHA using (A) GC and (B) GC/MS analysis. EML8 strain was cultivated in an MS medium with 20 g/l of WFO for 48 hr (30°C, 200 rpm) and the PHA was extracted from the dry cells with chloroform.

peak를 볼 수 있었다. 이들 각각의 peak들은 Fig. 1B의 retention time 5.505 min (3HHx), 6.384 min (benzoic acid), 9.310 min (3HO), 12.337 min (3HD) 및 15.030 min (3HDD)와 각각 동일하였다. Fig. 1B는 GC/MS 분석결과로 각 retention time에 나타나는 peak이 의미하는 화학물질들의 reference를 확인한 결과 분리균주 EML8이 생합성한 PHA는 7.28 mol% 3HHx, 39.04 mol% 3HO, 37.11 mol% 3HD와 16.58 mol% 3HDD 등 네 종류의 mcl-PHA monomer로 구성된 mcl-PHA임을 확인하였다. Ashby 등은 soybean oil, olive oil, sun-

flower oil을 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas resinovorans*에서 C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>의 다양한 PHA monomer의 mcl-PHA 생합성을 보고하였다[2]. 이 같은 결과는 탄소원으로 사용한 식물유에 포함된 불포화 및 포화지방산이 β-oxidation을 통해 NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase에 의한 환원효소 경로를 통하여 다양한 mcl-PHA monomer 조성을 지닌 mcl-PHA가 생합성된다고 설명하였다. 따라서 본 연구의 분리균주 EML8도 이와 유사한 환원효소 경로를 통해 mcl-PHA를 생합성하는 것으로 사료된다. 16S rDNA 염기서열 분석과 BLAST

Table 2. Identification of isolated EML8 strains by the 16S rRNA gene

Strain	Closest match			
	Family	Identity	Similarity (%)	Accession no.
EML8	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain strain KBL28	98.0	MG576181.1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KBL33	98.0	MG576186.1
		<i>Pseudomonas</i> sp. strain DC3N-3	98.0	MF716678.1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain K12	98.0	KT767976.1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M8	98.0	KT767963.1

search를 통해 EML8 균주를 동정하였다. 그 결과 EML8 균주는 *Pseudomonas fluorescens* strain KBL33와 높은 similarity (98.0%)을 보여주어, *Pseudomonas* sp. EML8로 명명하였다 (Table 2).

**mcl-PHA 생합성을 위한 최적 배양조건 확립**

*Pseudomonas* sp. EML8의 최적 성장 및 mcl-PHA (mcl-PHA<sub>WFO</sub>) 생합성 조건을 확립하기 위해 20 g/l의 WFO가 포함된 MS 배지에서 다양한 시간(0, 24, 48, 72, 96, 120시간) 동안 배양한 후 DCW와 PHA 생합성량을 확인하였다(Fig. 2A). 실험 결과 배양 96시간에 3.4 g/l의 DCW로 가장 높은 성장을 보여주었지만 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량은 배양액 1 l 당 2.1 g (g/l)으로 72시간에 비해 낮았다. 배양 72시간에 DCW은 3.2 g/l로 96시간에 비해 0.2 g/l만큼 낮았지만, mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량을 고려하여 최적 배양 시간은 72시간이 적절할 것으로 판단하였다.

최적의 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 맞추어 *Pseudomonas* sp. EML8 균주를 배양한 후 DCW와 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량을 확인한 결과를 Fig. 2B에 나타내었다. *Pseudomonas* sp. EML8는 pH 5, pH 6과 같은 산성 조건에서 성장하지 못했으나 중성 pH인 pH 7에서 DCW이 3.2 g/l로 가장 높았으며 알칼리 조건인 pH 8과 pH 9에서 DCW은 각각 2.7 g/l와 2.5 g/l로 중성 pH에서 배양한 것에 비해 세포 생장이 감소하는 경향을 보였다. 가장 높은 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량은 pH 7에서 2.3 g/l로 확인되었으며, pH 8과 pH 9에서 각각 1.7 g/l, 1.8 g/l로 확인되었다. 따라서 가장 높은 세포 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub> 생합성량을 나타낸 pH 7을 균주의 성장 및 PHAs 생합성을 위한 최적 pH로 선정하였다.

Fig. 2C는 온도를 제외한 나머지 조건을 동일하게 유지시키며 다양한 배양온도(20, 25, 30, 35, 40℃)에서 배양하여 *Pseudomonas* sp. EML8의 DCW와 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량을 확인한 결과이다. *Pseudomonas* sp. EML8는 배양온도 20℃에서 2.3 g/l의 DCW을, 그리고 25℃에서 가장 높은 DCW (2.97 g/l)를 나타냈으며, 온도가 높아질수록 DCW이 점차 감소하여 35℃ 이상에서는 성장하지 못했다. *Pseudomonas* sp. EML8는 25~30℃에서 생장률이 높은 중저온성 미생물로 사료된다. 세포 성장결과와 유사하게 20℃에서 mcl-PHA<sub>WFO</sub> 생합성량이 2.0 g/l로 가장 높았으며 온도가 높아질수록 감소하였다. 따라

서 균주의 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량을 고려하여 최적의 배양 온도는 25℃로 선정하였다.

6종류의 무기 및 유기 질소원을 사용하여 균주의 성장 및 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성에 최적인 질소원을 평가하였다(Fig. 2D). 무기질소원인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 질소원으로 사용하여 배양한 경우에 DCW는 3.0 g/l로 가장 높았으며, 이는 다른 무기 및 유기 질소원으로 배양한 결과보다 1.2~6.8배 높은 값이었다. 균주의 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 최적 생합성량은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 질소원으로 사용하여 배양한 경우에 1.7 g/l로 가장 높아 최적 성장 및 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성을 위한 질소원은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 선정하였다.

균주의 성장 및 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성을 위한 탄소원의 최적 농도를 확인하기 위해 다양한 탄소원 농도(1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/l)에서 *Pseudomonas* sp. EML8를 배양하여 확인하였다(Fig. 2E). 그 결과, 탄소원의 농도가 1-20 g/l에서는 농도가 높아질수록 DCW와 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 가장 높은 DCW와 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량은 WFO 20 g/l에서 각각 3.1 g/l과 1.9 g/l로 나타났다. WFO 25 g/l에서 배양한 경우에 WFO 20 g/l의 농도에서 배양한 경우와 비교하였을 때 동등한 세포 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량을 확인하였으며, WFO 30 g/l의 농도에서 배양한 경우에는 세포 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성량이 낮아졌다. 따라서 최적 탄소원 농도를 WFO 20 g/l로 선정하였다.

**Fermentor를 이용한 mcl-PHAs의 생합성**

세포 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생합성양상을 확인하기 위해 탄소원 WFO 20 g/l, pH 7, 25℃, 질소원 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g/l을 기본조건으로 3 l jar fermentor를 이용한 fermentation을 진행하였다(Fig. 3A). 그 결과, 배양 0~12시간에 세포 생장이 느리게 나타났으며, 이 기간은 세균이 새로운 배지에 적응하는 지체기(lag phase)로 판단된다. 배양 12~30시간에서의 DCW는 0.4 g/l에서 3.0 g/l까지 도달하여 세포의 급격한 생장이 이루어진 대수기로 사료되며, 배양 30시간 이후에는 세포의 DCW는 3.0 g/l로 유지되었다. 잔류 WFO의 양을 확인한 결과, 배양 초기인 지체기(0~12시간)에는 WFO가 7.7% 소모되었으며, 배양 12~36시간 동안에 WFO의 급격한 소비패턴을 보였다. 이는 *Pseudomonas* sp. EML8의 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 축적을 위해 WFO의 급격한 소비가 이루어진 것으로 사료된다. 생장이 끝

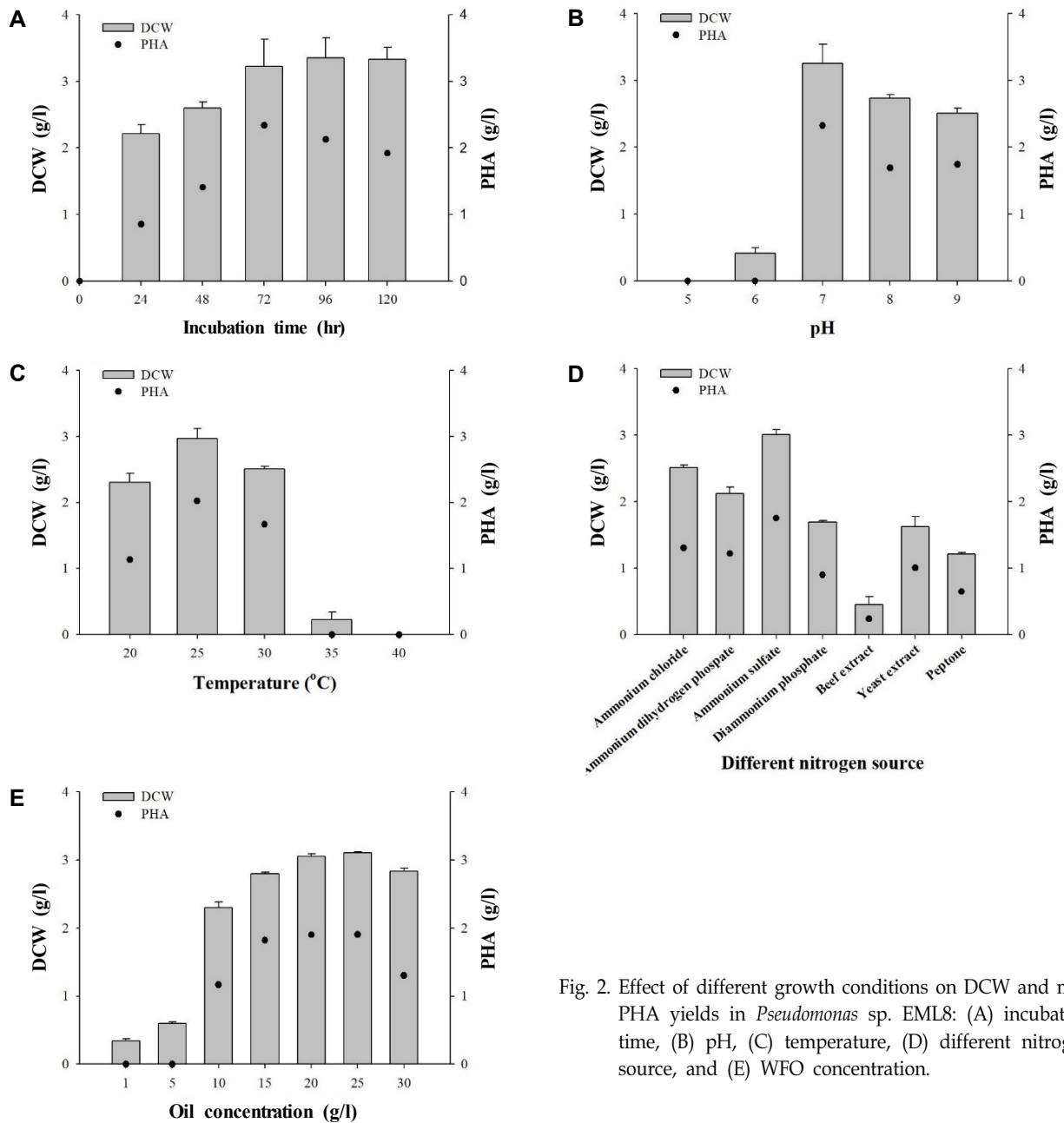


Fig. 2. Effect of different growth conditions on DCW and mcl-PHA yields in *Pseudomonas* sp. EML8: (A) incubation time, (B) pH, (C) temperature, (D) different nitrogen source, and (E) WFO concentration.

난 정지기 단계에서 완화된 WFO의 소비패턴을 확인할 수 있었으며, 48시간 배양한 후의 잔류 WFO의 양은 6.0 g/l로 총 70%의 WFO가 세포의 성장과 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 축적에 사용된 것을 확인하였다. 질소원으로 사용한 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 양이 고갈된 12~18시간 사이에서 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 축적이 시작되어 48시간까지 지속적으로 생합성되었다. 배양 48시간 후에는 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 축적률과 생합성량은 각각 62 wt%와 1.9 g/l에 도달하였다.

WFO를 mcl-PHA의 생산 단가 절감을 위한 값싼 탄소원으로 평가하기 위해 대조군으로 동일량의 FFO 20 g/l를 사용하여 fermentation 배양을 수행하였다(Fig. 3B). 배양 12~36시

간에 *Pseudomonas* sp. EML8의 급격한 성장이 관찰되었으며, 36시간 배양한 후에는 DCW가 2.7 g/l로 유지되었다. FFO는 배양 12시간부터 매우 빠르게 소비되었으며 48시간 배양 후 배양액 내 남아있는 잔류 FFO의 양은 1 g/l로 약 95%의 탄소원이 세포 성장과 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 생합성에 사용된 것을 확인하였다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 거의 고갈된 12~18시간 사이에 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 축적이 시작되어 48시간까지 지속적으로 생합성되었으며, mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 축적률과 생합성량은 각각 62 wt%와 1.6 g/l였다. 이러한 결과는 본 연구의 분리 균주인 *Pseudomonas* sp. EML8이 단일 탄소원으로 WFO를 사용하여 FFO와 유사한 수율의 mcl-PHA를 생합성할 수 있음을 시사한다.

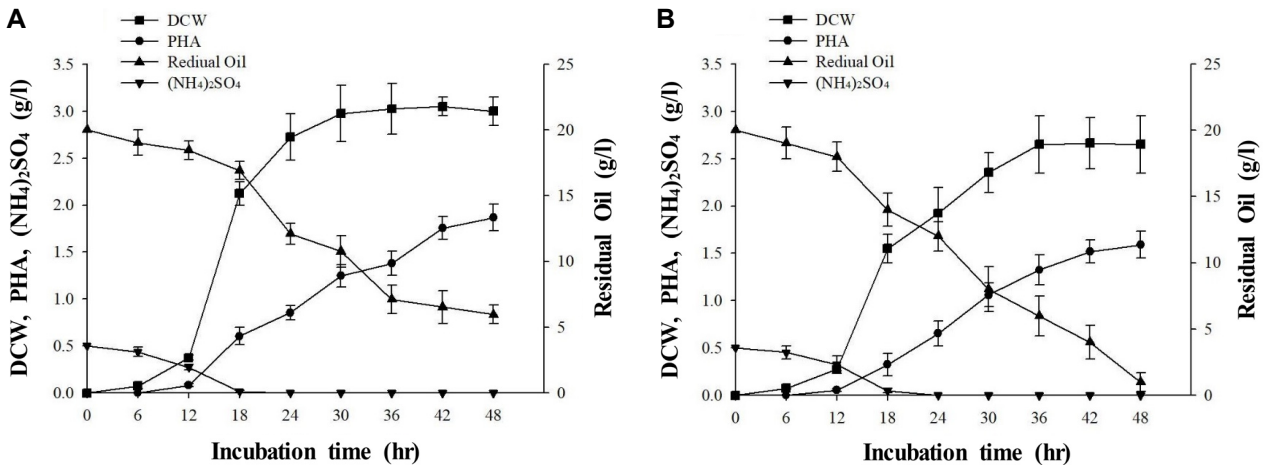


Fig. 3. Biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas* sp. EML8 at batch fermentations. The strain was cultivated at 25°C in a 3 l jar fermentor containing 2 l of an MS medium with 20 g/l of (A) WFO and (B) FFO (pH 7, 200 rpm, 1 vvm, and 0.5 g/l of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

식물유를 사용한 mcl-PHA의 생합성에 관한 연구들을 본 실험의 결과와 함께 Table 3에 나타냈다. Marsudi 등은 palm oil를 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924에서 0.9 g/l의 mcl-PHA 생합성량을 보고하였다[16]. Fernandez 등은 WFO를 사용하여 *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045에서 mcl-PHA의 생합성량을 0.9 g/l으로 보고하였으며[5], *Pseudomonas* sp. strain DR2를 이용하여 cone oil과 fried oil을 탄소원으로 사용하였을 때 mcl-PHA를 각각 0.1과 0.3 g/l의 농도로 합성하는 것을 확인하였고[25], *Pseudomonas stutzeri* 1317 균주의 경우는 soybean oil을 사용하여 mcl-PHA를 1.7 g/l의 농도로 생합성하는 것으로 보고하였다[6].

본 연구에서 사용된 *Pseudomonas* sp. EML8은 위의 보고된 mcl-PHA의 생합성량과 비교하여 1.1~19배 높은 mcl-PHA를 생합성하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *Pseudomonas* sp. EML8가 다른 균주에 비해 상대적으로 높은 수율의 mcl-PHA<sub>WFO</sub>를 생합성할 수 있음을 보여주며, 결론적으로 *Pseudomonas* sp. EML8는 mcl-PHA의 산업적 생산을 위한 잠재적인 후보균주가 될 수 있음을 시사한다.

**mcl-PHA의 물성**

*Pseudomonas* sp. EML8균주가 생합성한 mcl-PHA<sub>WFO</sub>와 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 무게평균분자량(average molecular weight, *Mw*), 수평균분자량(number average molecular weight, *Mn*)과 다분산지수(polydispersity index, PDI, *Mw*/*Mn*)를 분석하기 위해 각각 정제된 시료 20 mg을 CHCl<sub>3</sub> 10 ml에 녹여 detector-RI를 이용하여 GPC를 수행하였다(Fig. 4). 그 결과, mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 *Mw*는 170,920 Da, *Mn*은 77,835 Da으로 측정되었으며, PDI (*Mw*/*Mn*)는 2.19이었으며, mcl-PHA<sub>FFO</sub>는 169,630 Da의 *Mw*, 77,392 Da의 *Mn*, 2.19의 PDI (*Mw*/*Mn*)로 확인되었다. 일반적인 mcl-PHAs의 *Mw*는 60,000~410,000 Da의 범위에 속하며[3], 본 실험에서 얻어진 mcl-PHA<sub>WFO</sub> 및 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 *Mw*는 이 범위 이내인 것으로 나타났다. PHA의 *Mw*와 *Mn*은 세균의 유형, 사용한 탄소원의 종류 및 이들의 단량체 조성 등에 의해 결정된다[5]. 본 연구의 실험 균주 *Pseudomonas* sp. EML8은 단일 탄소원으로 WFO와 FFO를 사용하였을 때에 mcl-PHA<sub>WFO</sub>와 mcl-PHA<sub>FFO</sub>를 각각 생합성하였으며, 생합성된 두 mcl-PHA의 *Mw*, *Mn*, 그리고 PDI는 유사하였다. 따라서 *Pseudomonas* sp. EML8은 탄소원으로 사용된 WFO와 FFO의 상이한 지방산 조성에 상관 없이 유사한 mcl-PHA 생합성

Table 3. The comparison of microbial productions of PHAs from oil sources reported in the literatures with the present work

Strain	Carbon source	Type of PHA	Culture mode	Culture time (h)	Yield (g/l)	Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. EML8	WFO	mcl-PHA	Fermentation	48	1.9	Present work
	FFO	mcl-PHA	Fermentation	48	1.6	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3924	Palm oil	mcl-PHA	Fermentation	100	0.9	[27]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIB 40045	WFO	mcl-PHA	Flask	72	0.9	[28]
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain DR2	Cone oil	mcl-PHA	Flask	72	0.3	[29]
	Fried oil	mcl-PHA	Flask	72	0.1	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	Soybean oil	mcl-PHA	Flask	48	1.7	[18]

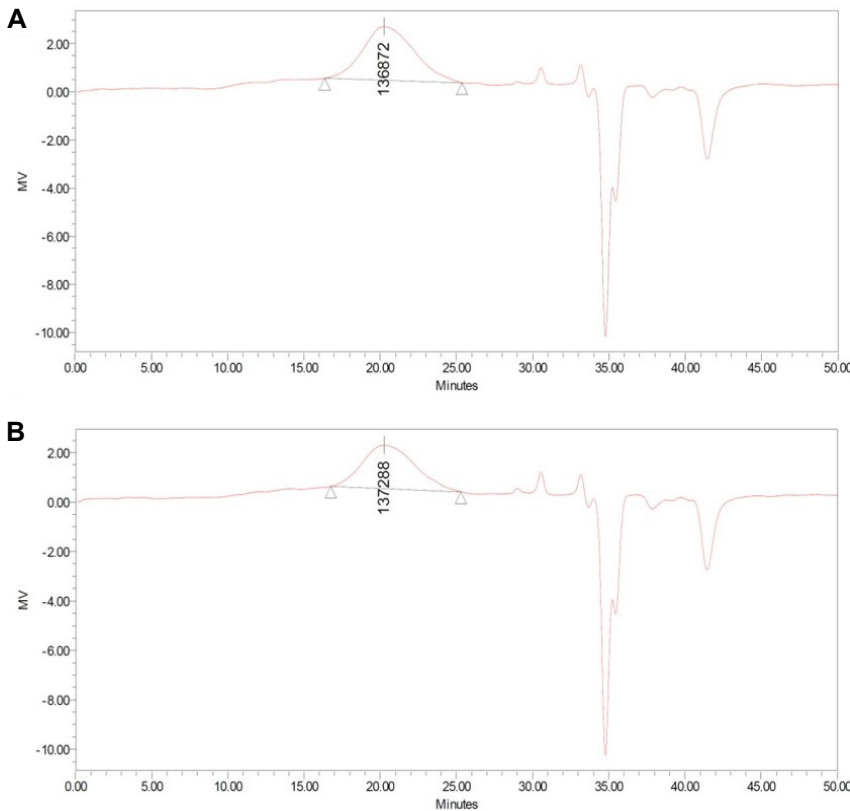


Fig. 4. GPC analysis of mcl-PHA extracted from *Pseudomonas* sp. EML8 using (A) WFO and (B) FFO as a sole carbon source, respectively.  $M_w$  = average molecular weight,  $M_n$  = number average molecular weight, PDI = polydispersity index.

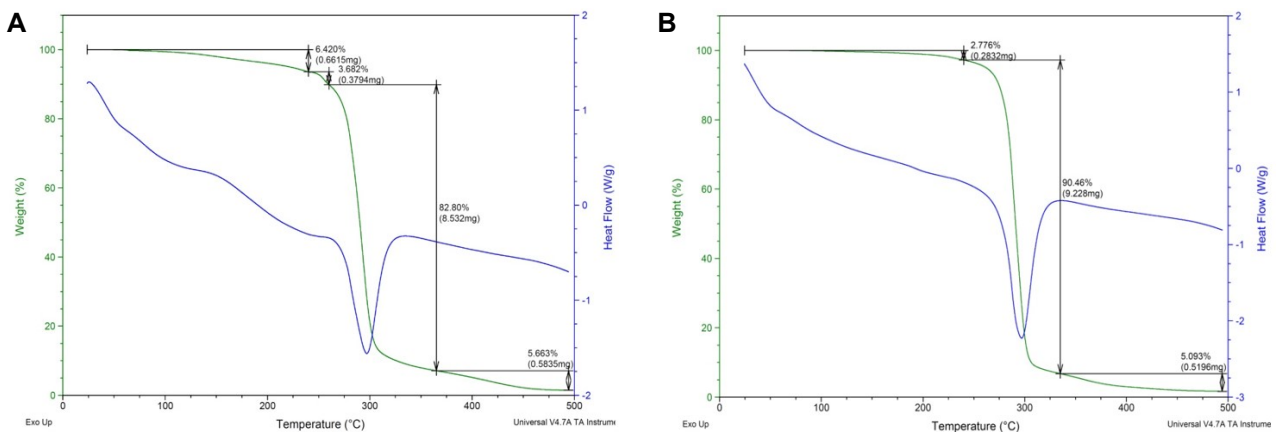


Fig. 5. TGA analysis of mcl-PHA extracted from *Pseudomonas* sp. EML8 using (A) WFO and (B) FFO as a sole carbon source, respectively.

pathway를 가진 것으로 사료되며, 이는 mcl-PHA의 생합성을 위한 값싼 탄소원으로서 WFO가 이용될 수 있음을 시사한다.

고분자의 DSC분석은 TGA를 이용하여 15~500 °C 범위에서 측정되었으며 분석결과, mcl-PHA<sub>WFO</sub>와 mcl-PHA<sub>FFO</sub> 모두 유리전이 온도( $T_g$ ), 녹는 온도( $T_m$ ) 그리고 용융 엔탈피( $\Delta H_m$ )가 측정범위 내에서 관찰되지 않았다(Fig. 5). 열안정성과 분해온도(decomposition temperature,  $T_d$ )를 측정한 결과, mcl-PHA<sub>WFO</sub>는 약 25~260 °C의 온도에서 분해되지 않고 유지되는 경향을 보였으며, 260~365 °C에서 급격한 무게 감소를 보

였다(82.8%). 또한 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 10% 무게 감소( $T_d$  (10%))온도는 260 °C로 확인되었다. TGA 분석결과 대조군인 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 경우에는 83.2%의 고분자무게 손실이 PHA<sub>WFO</sub>와 비슷한 274.7~335.1 °C에서 관찰되었으며 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의  $T_d$ 는 274.7 °C로 나타났다.

### 감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되



었습니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- 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.
- Ashby, R. and Foglia, T. 1998. Poly (hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 431-437.
- Basnett, P., Marcello, E., Lukasiewicz, B., Panchal, B., Nigmatullin, R., Knowles, J. C. and Roy, I. 2018. Biosynthesis and characterization of a novel, biocompatible medium chain length polyhydroxyalkanoate by *Pseudomonas mendocina* CH50 using coconut oil as the carbon source. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **29**, 179.
- 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.
- Fernández, D., Rodríguez, E., Bassas, M., Viñas, M., Solanas, A., Llorens, J., Marqués, A. and Manresa, A. 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem. Eng. J.* **26**, 159-167.
- He, W., Tian, W., Zhang, G., Chen, G. and Zhang, Z. 1998. Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 45-49.
- Hottle, T. A., Bilec, M. M. and Landis, A. E. 2013. Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polym. Degrad. Stab.* **98**, 1898-1907.
- Kim, B. S. 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 774-777.
- 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. *J. Regional Studies* **23**, 77-95.
- Kim, T. K., Lee, W., Gang, S., Kim, J. S. and Chung, C. W. 2019. Production of poly (3-hydroxybutyrate) using waste frying oil. *J. Life Sci.* **29**, 76-83.
- Kim, T. S., Kim, D. G. and Chung, Y. H. 2015. Environmental impact evaluation of the waste cooking oil recycling products. *J. Fish. Mar. Sci. Edu.* **27**, 516-525.
- Kim, Y. B. and Lenz, R. W. 2001. Polyesters from microorganisms. *Biopolyesters* **71**, pp. 51-79.
- Kunasundari, B. and Sudesh, K. 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* **5**, 620-634.
- 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.
- Lu, J., Tappel, R. C. and Nomura, C. T. 2009. Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* **49**, 226-248.
- Marsudi, S., Unno, H. and Hori, K. 2008. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 955-961.
- 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.
- Morrison, W. R. and Smith, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600-608.
- Numata, K., Morisaki, K., Tomizawa, S., Ohtani, M., Demura, T., Miyazaki, M., Nogi, Y., Deguchi, S. and Doi, Y. 2013. Synthesis of poly-and oligo (hydroxyalkanoate) s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polym. J.* **45**, 1094.
- Poli, A., Donato, P. D., Abbamondi, G. R. and Nicolaus, B. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea* **2011**, 1-13.
- Pouton, C. W. and Akhtar, S. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 133-162.
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J., Boccaccini, A. R. and Roy, I. 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* **72**, 29-47.
- Raza, Z. A., Abid, S. and Banat, I. M. 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **126**, 45-56.
- Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M. C. M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* **22**, 261-279.
- Song, J. H., Jeon, C. O., Choi, M. H., Yoon, S. C. and Park, W. 2008. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1408-1415.
- 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.
- Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 5-21.

## 초록 : *Pseudomonas* sp. EML8 균주를 이용한 폐식용류로부터 medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) 생합성

김태경<sup>1</sup> · 김종식<sup>2</sup> · 정정욱<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>엔젠바이오, <sup>2</sup>국립안동대학교 생명과학과)

본 연구에서는 poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA)의 생산 비용을 줄이기 위해, 토양에서 분리된 균주 *Pseudomonas* sp. EML8을 이용하여 폐 튀김유(waste frying oil, WFO)를 단일 탄소원으로 하여 균주의 최적 성장 및 PHA의 생합성 조건을 확립하였다. WFO를 단일 탄소원으로 이용하여 *Pseudomonas* sp. EML8에 의해 생합성된 PHA를 gas chromatography (GC)와 GC mass spectrometry로 분석한 결과, 7.28 mol% 3-hydroxyhexanoate, 39.04 mol% 3-hydroxyoctanoate, 37.11 mol% 3-hydroxydecanoate 및 16.58 mol% 3-hydroxydodecanoate의 단량체로 이루어진 medium-chain-length PHA (mcl-PHA<sub>WFO</sub>)라는 것을 확인하였다. 플라스크로 배양한 결과, *Pseudomonas* sp. EML8의 최대 건조세포중량(dry cell weight, DCW) 및 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 최대 생산수율(g/l)은 WFO 20 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g/l, pH 7 및 25°C의 조건에서 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 3 l 발효기를 이용하여 48시간 배양한 후에 가장 높은 DCW, mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 함량 및 mcl-PHA<sub>WFO</sub>의 생산수율(3.0 g/l, 62 wt% 및 1.9 g/l)을 얻었다. 대조군인 신선한 튀김유(fresh frying oil, FFO) 20 g/l를 탄소원으로 사용하여 이와 유사한 DCW, mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 함량 및 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 생산수율(2.7 g/l, 62 wt%, 1.6 g/l)을 확인했다. 겔 투과 크로마토그래피 분석을 통해 mcl-PHA<sub>WFO</sub> 및 mcl-PHA<sub>FFO</sub>의 평균 분자량이 165-175 kDa인 것을 확인했으며, 열중량을 분석한 결과, mcl-PHA<sub>WFO</sub> 및 mcl-PHA<sub>FFO</sub>는 각각 260 및 274.7°C의 분해온도값을 보여주었다. 결론적으로 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. EML8과 WFO는 mcl-PHA의 생산을 위한 새로운 균주와 탄소원으로서의 사용 가능성을 확인하였다.