

## *Pseudomonas* sp. HJ에 의한 Poly(Hydroxybutyric-Co-Hydroxyvaleric) Acid의 생산

손 홍 주 · 민 관 필 · †이 상 준  
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Production of Poly(Hydroxybutyric-Co-Hydroxyvaleric) Acid by *Pseudomonas* sp. HJ

Hong-Joo Son, Kwan-Pil Min and Sang-Joon Lee<sup>†</sup>

Department of Microbiology, College of Natural Science,  
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### ABSTRACT

To produce PHA(polyhydroxyalkanoic acid) from microbe, dozens of microorganism have been screened from sewage sludge. Selected a strain HJ out of 50 strains of PHA producing bacteria has a capability of accumulating large amounts of PHB/HV copolymer when grown in batch culture with a single carbon source(glucose) that was not generally considered as precursor of hydroxyvalerate monomer unit. The strain HJ was identified as the genus *Pseudomonas* with respect to morphological, cultural, and biochemical characteristics. The optimal temperature and pH for cell growth were 37°C and 7.0. The optimal medium compositions for cell growth were glucose 1% as a carbon source, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2% as a nitrogen source, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.45%. To investigate the optimal condition for PHA production two-step cultivation method was employed. PHA production was induced by deficiency of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Mg<sup>+2</sup>. Besides carbon source, deficiency of all nutrients stimulated PHA productivity but deficiency of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stimulated the most HV monomer content. The highest PHA production was C/N molar ratio 95.2. *Pseudomonas* sp. HJ was also able to produce PHB/HV copolymer when cultivated on alkane, alkanolate, alcohol as carbon sources. The contents of PHA and the proportions of hydroxyvalerate monomer units varied depending on the carbon sources. Especially *Pseudomonas* sp. HJ was able to incorporate hydroxyvalerate into PHB/HV to level as high as from 49 to 74 mol% when grown in a medium containing hexadecane and propionate. The purified PHA was identified PHB/HV copolymer by <sup>1</sup>H-NMR analysis.

#### 서 론

합성 플라스틱은 견고함과 내구성을 모두 가지고

있어 우리의 일상생활에 널리 사용되고 있으나, 사용후 폐기시 토양, 하천 등의 자연 생태계에서 반영구적으로 분해되지 않아 환경 보존과 폐기물 처리에 많은 문제를 야기하고 있다. 따라서 환경문제를 고려하면 합성 플라스틱을 소각 또는 매립하여 처리하

† Corresponding Author

는 방법보다는 자연계에서 생물분해가 가능한 합성 플라스틱 대체용 고분자물질을 찾아서 대량으로 생산할 수 있는 공정을 확립하는 것(1)이 중요하며 이미 전세계적으로 많은 연구가 지속되고 있다. 이러한 생물분해성 폴리에스테르로서 수십년 전부터 연구가 많이 되어온 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) 외(2,3)에 hydroxybutyrate monomer와 다른 hydroxyacid monomer로 구성된 polyhydroxyalkanoate(PHA)가 *Pseudomonas* spp. 등의 다양한 세균에서 발견되었다(4). 이러한 PHA는 유연성이 높고 녹는점이 PHB보다 낮아, PHB homopolymer가 가지는 단점을 극복할 수 있어 bulk plastic으로서의 산업적 이용가치가 매우 높다(4). PHA중 연구가 가장 많이 진행되어 있는 것은 PHB chain에 valeric acid가 공중합되어 있는 PHB/HV인데, 이미 영국의 ICI에서는 "Biopol"이라는 상품명으로 시판하고 있다(5).

*Alcaligenes eutrophus* 등과 같은 일부 세균의 경우, 주탄소원(main substrate)인 glucose외에 HV monomer의 전구체로 작용하는 보조탄소원(cosubstrate)인 propionate나 pentanoate를 배지내에 첨가할 때 3HB/3HV의 공중합체를 세포내에 축적하는 것으로 밝혀졌다(6). 이때 주탄소원에 대한 보조탄소원의 농도를 변화시킴으로써 HV monomer의 함량을 조절할 수 있는데, HV monomer의 함량이 증가함으로써 PHB/HV의 녹는점이 낮아짐과 동시에 기계적 물성이 크게 향상된다(7). 그러나 이들 보조탄소원들은 저농도에서도 세균의 생육을 저해하며(8), 가격 또한 PHA의 산업적 생산의 경제성을 제고할 만큼 비싸서 저가의 단일 탄소원으로부터 PHA를 생산할 수 있는 세균을 자연계로부터 분리하고자 하는 연구가 이루어졌다. 즉, Dawes 등은 *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Norcardia* sp. 등의 세균이 여러 종류의 carbohydrate로부터 비교적 높은 함량의 HV monomer를 가지는 3HB/3HV를 건조균체량의 30% 정도 생산한다고 보고(4)하였으며, Rhee 등은 단일 탄소원으로 glucose를 이용하여 *Alcaligenes* sp. SH-69로부터 3HV 함량이 3mol%인 poly(3HB-co-3HV)를 36g/l를 얻었다고 보고(8)하였다.

일반적으로 PHA 생산은 high-protein biomass가 생산되는 first stage와 PHA 축적으로 인하여 세포의 크기가 증가하는 second stage로 진행된다(9). 이때 PHA의 종류와 품질은 PHA 축적단계에 이용된 탄소원의 종류에 의존한다(10). 따라서 단일

탄소원으로부터 PHA를 생산할 수 있다면 발효공정의 단축뿐만 아니라 생산단가의 감소도 가져올 수가 있다.

본 연구실에서는 단일 탄소원으로부터 PHA를 생산하는 각각 다른 속의 균주를 분리하였다. 이 중에서 *Pseudomonas* sp.로 동정된 균주를 이용하여 PHA 축적 최적조건과 다양한 탄소원으로부터의 PHA 합성능을 검토한 후, 생산된 PHA의 조성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### PHA 생산균의 분리 및 선정

양산공단의 폐수처리장과 수영 하수종말 처리장의 활성오니를 분리용 시료로 사용하였다. 시료를 희석하여 nutrient agar plate에 배양하여 형태가 다른 colony들을 분리한 후 이들을 각각 nutrient broth에서 30°C, 48시간 배양후 다시 nutrient agar plate에서 순수분리하였다. 각 colony들을 YM medium(poly-peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, glucose 1%)에서 1차 배양한 후 원심분리하여 nutrient-free medium에서 2차 배양하였다. 균체를 획득하여 Braunegg 등(14)의 방법으로 전처리한 후 gas chromatography로 PHA 합성유무를 확인하였다. PHA 합성 유무를 확인하기 위하여 사용한 nutrient-free medium의 조성은 glucose 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.45%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, FeSO<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.002%, 미량원소 2ml(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 300mg, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 200mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 100mg, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 30mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 30mg, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 20mg, CuSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10mg per liter)이었다.

### 분리균의 분류 및 동정

분리균의 형태학적, 배양적, 생리학적 제 특성을 Cowan과 Steel(11)의 방법, Macfaddin(12)의 방법에 준하여 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1(13)에 따라 분류, 동정하였다.

### 균체 생육 최적조건을 검토

분리균의 최적 생육조건을 검토하기 위하여 PHA 합성여부를 확인하기 위하여 사용하였던 nutrient-free medium에 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0.2% 첨가한 것을 기본배지로 하여 250 rpm으로 24시간

Table 1. Taxonomical characteristics of HJ strain.

Contents	Characteristics
Morphological characteristics	
cell shape	rod
cell size	1.2-1.7 × 0.3-0.5 μm
gram stain	—
motility	+
spore formation	—
Cultural characteristics	
colony shape	irregular, convex, entire
surface	smooth
color	white
opacity	transparent
gelatin hydrolysis	—
Biochemical characteristics	
aerobic growth	+
anaerobic growth	+
catalase	+
cytochrome oxidase	+
OF	oxidation
acid production from glucose	+
growth at 5 °C	—
growth at 42 °C	+
growth on MacConkey agar	—
growth in KCN broth	+
starch hydrolysis	+
nitrate reduction	+
casein hydrolysis	—
urease	+
arginine dehydrogenase	+
lysine decarboxylase	—
ornithine decarboxylase	—
lecithinase	—
ONPG	—
esculin hydrolysis	+
indole production	—
H <sub>2</sub> S production	—
VP reaction	—
methyl red reaction	—
growth at 4.5% NaCl	—

동안 회전진탕배양하면서 각종 탄소원, 질소원, 인산염과 pH 및 배양온도에 대한 생육도를 측정하였다. 생육도의 측정은 흡광광도계를 이용하여 660 nm에서의 흡광도나 건조균체량으로 측정하여 조사하였다. Specific growth rate( $\mu$ )는 다음 식에 의하여

Table 2. Utilization of organic compounds by HJ strain.

Organic compounds	Utilization
Hexane, heptane, pentane, dodecane	+
Butyrate, propionate, gluconate	+
Acetate, 3-hydroxybutyrate	+
Butyl acetate	+
Pentanoate, hexanoate, heptanoate	+
Octanoate, nonanoate, decanoate	+
Citrate, oxalate	+
Glucose, fructose	+
Glycerol, sorbitol, mannitol	+
Methanol, propanol, butanol	+
Isoamylalcohol, n-amylalcohol	+
Isopropylalcohol	+

산출하였다.

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{\Delta t}$$

위 식에서  $X_0$ 는 배양초기의 cell mass(g/ℓ)를,  $X_1$ 은 배양말기의 cell mass(g/ℓ)를 그리고  $\Delta t$ 는 이 경우에 소요되는 배양시간을 의미한다.

#### PHA 생산 최적조건을 검토

PHA 생산 최적조건을 검토하기 위하여 2단계 배양(two-step culture)을 이용하였다. 즉 생육 최적 배지에서 18시간 동안 1차 배양하여 무균적으로 회수한 균체를 멸균된 생리적 식염수로 세척한 후 각종 영양원의 결핍, 영양원 결핍의 조합, C/N molar ratio에 따른 2차 배양을 실시하여 최종적으로 얻어진 균체를 회수하여 균체내에 축적된 PHA를 정량하였다.

#### 다양한 탄소원으로부터 PHA 생산 검토

단일 탄소원에 의한 PHA 조성의 다양성을 검토하기 위하여 각종 alkane, alkanolic acid, 당, 알콜, 유기산 등을 기질로 하여 37°C, 48시간 동안 회전진탕배양하였다. 또한 주 탄소원으로 glucose를 이용하여 각종 보조 탄소원의 첨가효과를 조사하였다.

#### 분석방법

Cell mass는 membrane filtration method에 의한 건조균체량으로 직접 측정하였으며, 경우에 따라 균체 현탁액의 O.D.와 건조균체량과의 표준곡선으로

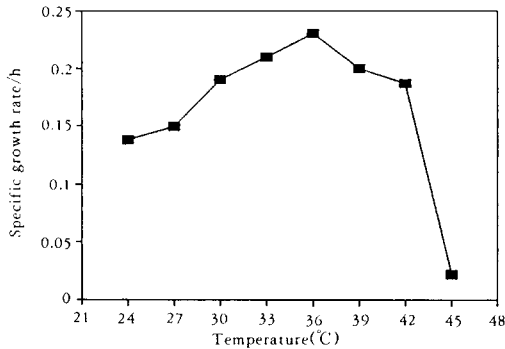


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas* sp. HH.

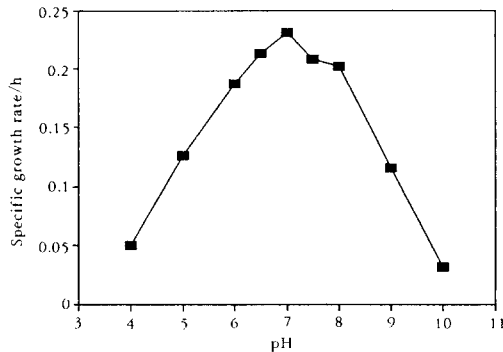


Fig. 2. Effect of pH on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

부터 간접적으로 측정하였다. PHA 정량분석은 GC로 실시하였다. GC 분석을 위한 전처리 방법은 다음과 같다. 배양액으로부터 회수한 건조균체를 클로로포름과 황산을 함유한 메탄올 혼합용액에 첨가하여 100°C, 3시간 30분 동안 반응시킨 후, 증류수를 첨가하여 PHA를 methylesterification 시켰다. 두 층으로 분리될 때까지 정치하였다가 유기용매층을 GC로 정량하였다(14). 이때 사용한 GC는 HP-5890A였으며, column은 10% Carbowax 20M-ON glass를 사용하였고, carrier gas는 N<sub>2</sub>, oven temperature는 160°C, flow rate는 30ml/min, 시료의 주입량은 2μl였으며, flame ionization detector를 사용하였다. 표준 PHA는 Aldrich사의 3HB/3HV를 사용하였다.

#### PHA의 정제 및 조성분석

균체를 아세톤으로 건조시킨 후, 유발에서 과쇄하

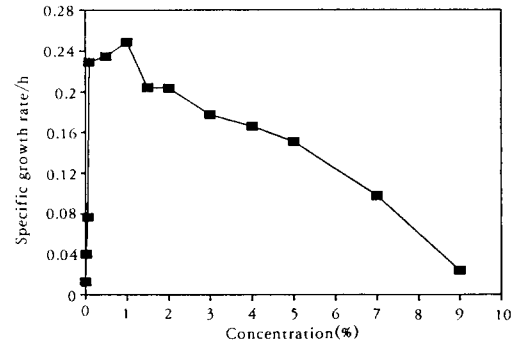


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

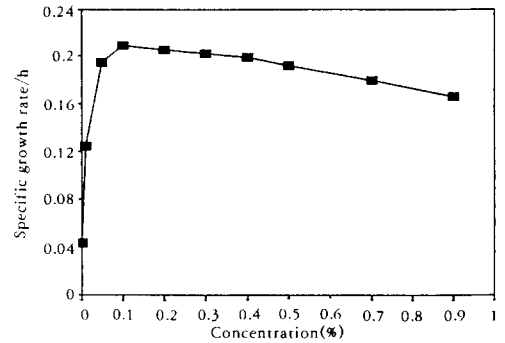


Fig. 4. Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

여 뜨거운 클로로포름에 정치하여 PHA를 추출시켰다. 추출액을 여과지에서 여과한 후 여액에 차가운 메탄올을 첨가하여 PHA를 침전시키고 다시 아세톤과 에테르로 세척하였다. 이 과정을 수회 반복하여 PHA를 정제하고, GC로 시료의 정제 peak를 확인한 후, 500MHz <sup>1</sup>H-NMR로 PHA의 조성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리 및 동정

PHB를 생산하는 50여 균주와 보조 탄소원의 첨가없이 단일 탄소원인 glucose로부터 PHA를 생산하는 3 균주를 분리하였다. 이 중에서 HV comonomer의 함량이 비교적 높은 HJ 균주를 공시균으로 선정하여 분류학적 위치를 검토한 결과는 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 공시균은

Table 3. Effect of carbon sources on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

Carbon sources(1%)	O.D. at 660nm
Glucose	9.89
Fructose	9.38
Galactose	0.73
Mannose	6.98
Sorbose	2.61
Rhamnose	0.107
Arabinose	0.113
Xylose	0.125
Lactose	0.101
Maltose	0.14
Sorbitol	6.04
Mannitol	7.79
Ribitol	0.103
Glycerol	5.42
None	0.078

Cells were cultivated in mineral salt medium containing 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as a nitrogen source at 37°C and pH 7.0.

Gram 음성의 단간균으로 포자를 형성하지 않았으며, 운동성이 있었다. Nutrient agar plate 상에서 둥글고 볼록한 colony를 형성하였다. Catalase, cytochrome oxidase, urease 등을 가지고 있었으며, indole,  $\text{H}_2\text{S}$  등을 생성하지 않았다. 또한 탄소원 및 에너지원으로서 hexane, heptane, dodecane 등의 alkane류, hexanoate, heptanoate, octanoate, nonanoate 등의 alkanolate류, citrate, oxalate, acetate 등의 유기산류 및 methanol, butanol, propanol 등의 알코올류를 이용할 수 있어 전형적인 *Pseudomonas* 속의 특징을 나타내었다. 이상의 실험 결과를 비교 검토한 결과 본 공시균은 *Pseudomonas* 속으로 동정되었으며, 여러 가지 type strain과의 상호 비교실험을 실시할 때 정확한 종(species)명을 알 수 있으리라 사료된다.

#### 균체 생육 최적조건

일반적으로 PHA 축적을 최대로 하기 위하여 고농도의 균체를 획득하는 것이 선결과제이므로 균체 생육 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 본 공시균은 27°C~42°C의 비교적 넓은 온도영역에서 생육을 보였으며, 최적 배양온도는 37°C였다(Fig. 1). 또한 최적 배양 pH는 7.0이었다(Fig. 2). 각종 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 24시간 배양한 결과 glu-

Table 4. Effect of nitrogen sources on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

Nitrogen sources(0.2%)	O.D. at 660nm
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.97
$\text{NH}_4\text{Cl}$	3.89
$\text{NH}_4\text{OH}$	3.87
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	7.32
$\text{NH}_4\text{HPO}_4$	8.35
$\text{CH}_3\text{COONH}_2$	0.931
$\text{NaNO}_2$	0.092
$\text{NaNO}_3$	0.585
$\text{KNO}_3$	0.452
Malt extract	0.128
Yeast extract	10.237
Polypeptone	8.222
Tryptone	6.3
Casamino acid	5.696
Urea	0.304
None	0.095

Cells were cultivated in mineral salt medium containing 1% glucose as a carbon source at 37°C and pH 7.0.

cose, fructose, mannose 등에서 우수한 생육을 보였으며(Table 3), 최적 탄소원으로 결정된 glucose는 1% 농도에서 가장 빠른 생육 속도를 나타내었고 그 이상의 농도는 생육을 저해하였다(Fig. 3). 최적 질소원을 선정하기 위하여 각종 질소원을 0.2%씩 첨가하여 배양한 결과 무기 질소원중  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  등의 암모니아태 질소원과 yeast extract, polypeptone 등의 유기 질소원이 생육에 유리함을 알 수 있었다(Table 4). 경제성의 제고를 위하여 선정한 질소원인  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 0.05%~0.4%의 농도에서 거의 비슷한 생육속도를 나타내었으며, 0.2%를 최적농도로 결정하였다(Fig. 4).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 최적농도는 0.3%로 나타났으며(Fig. 5), 기본 배지성분 중의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 보다  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.45%)가 생육을 더욱 촉진하는 것으로 나타나(Fig. 6) 이후의 실험에는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하였다.

#### PHA 생산 최적조건

PHA 축적에 영향을 미치는 제반 요인을 검토하기 위하여 우선 균체 생육 최적배지에서 균체를 증식시킨 후, 각종 영양원이 결핍된 배지에서 24시간 배양하는 two-step culture를 실시한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 즉  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  등이

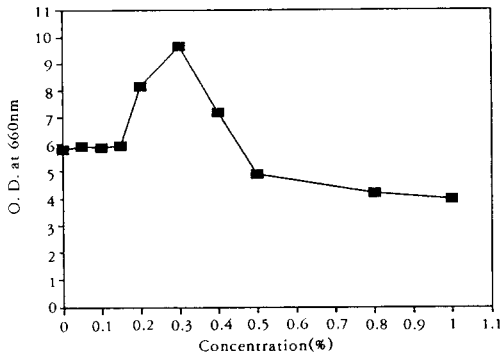


Fig. 5. Effect of  $K_2HPO_4$  concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.

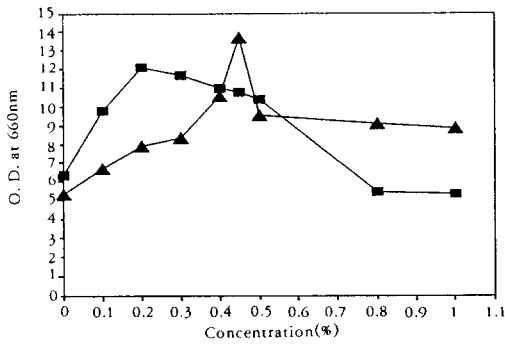


Fig. 6. Effect of hydrogenphosphates concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ.  
(■):  $Na_2HPO_4$ , (▲):  $K_2HPO_4$ .

결핍되었을 때 대조구에 비하여 PHA 축적이 향상되었으나, 그중  $NH_4^+$ 의 결핍이 건조균체량에 대한 PHA 축적률이 46%로 가장 높았다. 각종 영양원이 결핍됨으로써 HV monomer의 함량이 증가되어 이들이 PHA의 조성에 관여한다는 것을 간접적으로 추측할 수 있었다. 상기의 결과에 의해 각종 영양원을 조합하여 결핍시킴으로써 PHA 축적시기에 공급해야 할 배지성분을 검토한 결과, 탄소원을 제외한 모든 배지성분을 결핍시켰을 때 PHA 축적률이 가장 높았으나 건조균체량은 상대적으로 매우 낮았다 (Table 6). 따라서 대량의 PHA를 획득하기 위해서는 생육 최적배지를 적당하게 공급하여 고농도 배양을 실현한 후 탄소원만을 공급하는 유가배양이 적합함을 알 수 있었다. 그러나 탄소원인 glucose의 농도를 1%로 고정시킨 후 질소원인  $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도를 0~0.4%로 각각 조절 (C/N molar ratio로

Table 5. Effect of deficient nutrients on cell mass and PHA production of *Pseudomonas* sp. HJ.

Deficient nutrients	Dry cell weight (g/l)*	PHA content (%)**	HV content (mol%***)
$NH_4^+$	3.82	46	6.6
$SO_4^{-2}$	5.16	33	5.7
$K^+$	5.2	15	2.3
$PO_4^{-2}$	3.2	12	3.2
$Mg^{+2}$	5.13	26	2.2
$Fe^{+3}$	4.78	24	2.3
$Ca^{+2}$	5.53	10	1.9
Control	5.54	10	1.9

\* Initial concentration of resuspended cells was adjusted to 1.5g/l and the culture were carried out for 24 hours.

\*\* Indicated as the percent per dry cell weight.

\*\*\* Calculated from GC data.

Table 6. Effect of deficient-nutrients combination on cell mass and PHA production by *Pseudomonas* sp. HJ.

Deficient-nutrients Combination	Dry cell weight (g/l)*	PHA content (%)**
$NH_4$	3.79	47
$NH_4, SO_4$	3.69	47
$NH_4, SO_4, K$	3.02	46
$NH_4, SO_4, K, PO_4$	2.91	49
$NH_4, SO_4, K, PO_4, Mg$	2.15	51
$NH_4, SO_4, K, PO_4, Mg, Fe$	2.09	52
$NH_4, SO_4, K, PO_4, Mg, Fe, Ca$	2.01	52
Control	5.46	10

\* Initial concentration of resuspended cells was adjusted to 1.5g/l and the culture were carried out for 24hours.

\*\* Indicated as the percent per dry cell weight.

환산시 0~190.5)하여 배양한 후 PHA 축적을 검토한 결과 (Fig. 7)에서 보는 바와 같이 C/N molar ratio가 9.5로 조절된 배지에서 균체 생육이 가장 우수하였고, 95.2로 조절된 배지에서 PHA 축적률이 가장 높아 PHA 축적시기에 탄소원만 공급하는 것 보다는 소량의 질소원이 함유된 배지를 공급하는 것이 PHA의 대량 생산에 더욱 유리함을 알 수 있었다. 이는 Doi 등의 실험 결과(15)와 잘 일치하였다.

본 균주는 보조 탄소원의 첨가없이 HV monomer의 전구체가 아닌 glucose로부터 PHB/HV를 합성

**Table 7. Production of PHA from various carbon sources by *Pseudomonas* sp. HJ.**

Carbon sources*	Dry cell weight (g/l)	PHA content (%)	HV content (mol%)
Hexane	1	15	32.8
Heptane	1.2	12	35.7
Dodecane	1	19	36.8
Pentane	1.1	18	—
Hexadecane	1.3	33	74.1
Propionate	1.9	34	49.3
Butyrate	0.2	15	—
Valerate	0.4	38	34.3
Hexanoate	0.4	12	13.8
Heptanoate	0.2	14	—
Octanoate	0.6	12	11.4
Nonanoate	0.8	12	1.86
Decanoate	1	14	19.8
Citrate	2	5	—
Acetate	1.7	7	18.4
Oxalate	0.8	4	39.6
Glucose	3.9	43	6.9
Fructose	3.3	41	2.4
Sorbitol	4	46	1.9
Mannitol	3.6	49	2.5
Glycerol	3.3	38	2.3
Gluconate	1.5	13	18.7
Methanol	0.9	4	14.3
Butanol	1.2	4	13.3
Propanol	1.2	2	14.3
Butyl acetate	1.2	12	11.9
Isoamylalcohol	0.8	13	13.7
n-amylalcohol	1	15	17.9
Isopropylalcohol	1.1	4	—
3-hydroxybutyrate	2	13	12.5

\* Sugars were added with 1% concentration, others were added with 0.5% concentration.

하였다. 이러한 unrelated carbon source로부터 PHA를 합성하는 미생물은 *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 등과 같이 한정되어 있어 본 균주의 발견은 발효배양적인 측면에서 상당한 공정의 단축과 생산비용의 감소를 가져오리라 사료된다.

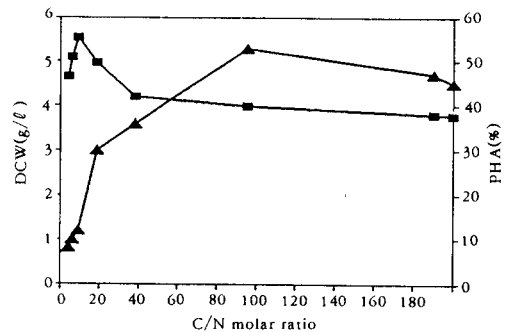
**다양한 탄소원으로부터 PHA 생산**

PHA 조성의 다양성과 PHA 생산에 이용가능한 새로운 탄소원을 검토하기 위하여 당류는 1%, 그외

**Table 8. Effect of two carbon sources concentrations on PHA production by *Pseudomonas* sp. HJ.**

Concentration (%)*	Dry cell weight (g/l)	PHA(%)	HV(mol%)
Hexadecane	0.1	3.36	24
	0.2	3.3	34
	0.3	2.78	36
	0.4	2.03	36
Propionate	0.1	3.38	12
	0.2	3.64	34
	0.3	1.95	31
	0.4	1.9	30

\* Glucose 1%+each carbon source concentration.



**Fig. 7. Effect of C/N molar ratio on cell mass and PHA production of *Pseudomonas* sp. HJ at the second stage.**

The cell concentration of 1.5g/l grown in optimal condition at the first stage was subjected to PHA accumulation. (■): dry cell weight, (▲): PHA content.

탄소원은 0.5%씩 각각 첨가하여 48시간 배양한 결과는 Table 7에서 보는 바와 같다. 탄소원의 종류에 따라 각각 다른 조성의 PHA가 합성되리라 예상하였으나 본 균주는 HV외의 다른 comonomer는 전혀 합성하지 않아 기존의 보고된 결과와 다른 양상을 보여주었다. 즉 일반적으로 *P. oleovorans*(16), *P. putida*(17), *P. resinovorans*(18) 등의 *Pseudomonas* 속은 사용된 탄소원의 종류에 따라 다양한 조성의 PHA를 합성하는 것으로 알려져 있으나 본 균주에 의해서는 이러한 양상이 보이지 않았다. 따라서 본 공시균은 *Pseudomonas* 속의 새로운 종 (species)

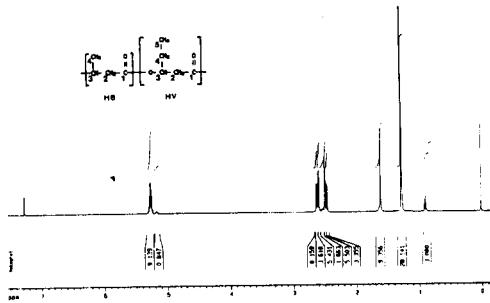


Fig. 8. 500MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PHA Produced by *Pseudomonas* sp. HJ.

일 가능성이 높아 현재 수치분류에 의한 분류를 수행중에 있다. 그러나 보다 확실한 조성분석을 위해 NMR 등을 통한 분석이 필요하리라 사료된다. 당류와 suger-alcohol을 제외한 다른 탄소원들에서 생육이 다소 불량하였고 PHA 축적률도 저조하였다. 그러나 당류외의 탄소원들에서 대부분 HV comonomer 함량의 증가를 보였고, 특히 hexadecane, propionate 등을 기질로 사용하였을 때에는 HV monomer의 비율이 49~74mol%로 아주 높았다. 상기 결과에 의하여 HV mol%가 높았던 hexadecane, propionate를 각 농도별로 1%의 glucose와 같이 첨가하여 48시간 배양한 결과는 Table 8에서 보는 바와 같이 균체 생육의 큰 감소없이 다양한 조성의 HV mol%를 함유한 PHA를 축적할 수 있음을 알 수 있었다. 이것은 각종 탄소원들을 적당하게 조합하여 첨가함으로써 다양한 mol%의 HV를 함유한 PHA를 합성할 수 있는 가능성을 제시해줌과 동시에 결과적으로 이러한 다양한 mol%의 HV monomer를 갖는 PHA를 이용하여 PHB homopolymer로서는 제조하기 어려운 bottle, film 등을 자유롭게 성형할 수 있음을 보여준다. 결론적으로 자연계에는 아직까지 분리되지 않은 특이한 생리적 성질을 가진 PHA 생산 미생물이 많으리라 사료되므로 PHA 대량생산 연구와 함께 균주 탐색도 꾸준히 이루어져야 하겠다.

#### PHA 조성분석

본 분리균으로부터 추출, 정제된 PHA의 조성을 500MHz  $^1\text{H}$ -NMR로서 분석한 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 즉 PHB homopolymer에서는 관찰되지 않는 chemical shift가 5.14, 2.56, 1.63,

0.89ppm에서 각각 나타났는데, 이것은 hydroxyvalerate monomer unit의  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  group을 나타내는 것이다(15). 따라서 본 분리균에 의하여 분리정제된 PHA는 HB와 HV의 copolymer임을 알 수 있었다.

#### 요 약

하수처리장의 활성오니를 분리원으로 하여 수십종의 PHA 생산균을 분리하였다. 일반적으로 hydroxyvalerate monomer unit의 전구물질로 알려져 있지않은 glucose로부터 비교적 많은 PHA를 생산하는 균주를 공시균으로 선정하여 형태학적, 배양적, 생리학적 제 특성을 검토한 결과 *Pseudomonas* 속으로 동정되었다. 균체 생육을 위한 최적 배양온도 및 배양 pH는 각각 37°C와 7.0이었으며, 최적 탄소원으로서는 glucose 1%, 최적 질소원으로서는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.45%였다. 최적 PHA 생산조건을 조사하기 위하여 2단계 배양법을 이용하였다. PHA 생산은 배지성분중  $\text{NH}_4$ ,  $\text{SO}_4$ , Mg가 결핍되었을 때 향상되었고, 그중  $\text{NH}_4$ 의 결핍시 PHA 축적률과 HV monomer의 함량이 가장 높았다. C/N molar ratio 95.2에서 PHA 축적률이 가장 높았다. 공시균주 *Pseudomonas* sp. HJ는 alkane, alkanolic acid, alcohol을 탄소원으로 하여 PHB/HV를 생산하였다. PHA의 생산량과 HV monomer의 함량은 이용된 기질에 따라 다양하였으며, 특히 hexadecane와 propionate를 탄소원으로 하였을 때 PHA중의 HV monomer의 함량이 49~74mol%로 매우 높았다.  $^1\text{H}$ -NMR로서 공시균으로부터 분리정제된 PHA의 조성을 분석한 결과 PHB/HV copolymer임을 알 수 있었다.

#### 참고 문헌

1. 김중균(1993), 생명과학, 3(4), 218.
2. F. B. Sriene, B. Arnold and J. E. Bailey (1984), *Biotech. Bioeng.*, 26, 982.
3. H. G. Schlegel, G. Gottschalk and R. Von Bartha(1961), *Nature*, 4787, 463.
4. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiological Reviews*, 54(4), 450.
5. 이용현(1992), 미생물과 산업, 18(1), 17.
6. R. M. Lafferty, B. Korsato and W. Korsato (1988), *Biotechnol.*, 6B, 136.



7. Y. Doi, M. Kunioka and K. Soga(1987), *Macromolecules*, **20**, 2988.
8. Y. H. Rhee, J. H. Jang and P. L. Rogers (1993), *Biotech. Lett.*, **15**(4), 377.
9. G. W. Haywood, A. J. Anderson and E. A. Dawes(1989), *Biotech. Lett.*, **11**, 471.
10. A. B. Ramsay(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2093.
11. J. Cowan and M. Steel(1987), *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Williams and Wilkins, Baltimore.
12. J. F. Macfaddin(1980), *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Williams and Wilkins, Baltimore.
13. R. K. Noel and J. H. Holt(1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins, U. S. A.
14. G. Braunegg, B. Sonnleither and R. M. Lafferty(1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29.
15. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330.
16. B. A. Ramsay, I. Saracovan, J. A. Ramsay and R. H. Marchessault(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(3), 625.
17. G. N. M. Huijberts, G. Eggink, P. Waard, G. W. Husiman and B. Witholt(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(2), 536.
18. B. A. Ramsay, I. Saracovav, J. A. Ramsay and R. H. Marchessault(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(2), 744.