

P(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate)의 생산을 위한 재조합 *phbC* 유전자를 형질전환시킨 *Alcaligenes eutrophus*의 배양조건 검토

권순일 · 정영미 · 이용현*
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Cultivation Condition of Transformant *Alcaligenes eutrophus* Harboring Cloned *phbC* Gene for Production of P(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) Containing High Molar Fraction of 3-Hydroxyvalerate. Kwon, Soon-Il, Young-Mi Jung, and Yong-Hyun Lee*. Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - The cultivation conditions of transformant *Alcaligenes eutrophus* AER5 harboring cloned *phbC* gene for mass production of poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate)[P(3HB-3HV)] containing high molar fraction of 3-hydroxyvalerate (3-HV) were investigated. In two-stage batch cultivation, transformant accumulated P(3HB-3HV) containing 52.2 mol% of 3HV compared to 30 mol% of parent strain *A. eutrophus* H16. The increased 3-HV molar fraction was due to the amplified activity of PHB synthase participating in condensation of 3-HB and 3-HV. To increase efficiency of P(3HB-3HV) accumulation, fructose was added along with precursor compound valerate, and total cell mass and P(3HB-3HV) concentrations remarkably increased, but not 3-HV molar fraction. The effect of magnesium ion showed that P(3HB-3HV) concentration and 3-HV molar fraction were significantly increased upto 6.1 g/L and 71.3 mol% at 0.01 g/L of MgSO₄, respectively. The efficiency of several pH adjuster, NaOH, NaOH and (NH₄)₂SO₄, and NH₄OH, on total cell mass, P(3HB-3HV) concentration, and 3-HV molar fraction was also compared. To overcome the disadvantage of two-stage cultivation, one-stage intermittent fed-batch cultivation was attempted, such a way 10.0 g/L of fructose was supplied for cell growth at initial 36 hr and then 10.0 g/L of valerate and 5.0 g/L of fructose were applied to induce the accumulation of P(3HB-3HV), consequently, 10.4 g/L of P(3HB-3HV) with 38 mol% of 3-HV fraction could be obtained after 72 hr. These results can be used for elucidating cultivation strategy for mass production of P(3HB-3HV) containing high 3-HV molar fraction using transformant *A. eutrophus* AER5 harboring cloned *phbC* gene.

Key words: transformant *A. eutrophus*, cloned *phbC* gene, P(3HB-3HV), 3-HV molar fraction, two-stage cultivation, one-stage intermittent fed-batch cultivation

Poly-β-hydroxybutyrate(PHB)는 D(-)-3-hydroxybutyrate(3-HB)의 단일중합체로 이루어진 생물고분자 물질로서 생분해성, 내습성, 압전성, 그리고 생체 적합성 등 독특한 특성을 갖고 있다[1, 7]. 그러나 PHB는 높은 결정화도에 기인하는 강성도와 높은 메집성 등 단점을 갖고 있어 2단계 배양을 통하여 valerate와 같은 전구물질을 첨가하여 배양함으로써 단량체인 3-HB와 valerate에서 전환되는 3-hydroxyvalerate(3-HV)를 공중합시켜 물성의 개선을 시도하고 있다.

공중합체인 P(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-3HV)]는 3-HB 사슬에 3-HV가 불규칙적으로 중합된 구조를 이루며, 3-HV의 중합도에 따라 다양한 물성을 나타내게 된다[7]. 공중합체인 P(3HB-3HV)는 합성고분자인 polyethylene이나 polypropylene과 유사한

물리적 성질을 갖게되며, 사출, 성형, 연신이 가능할 뿐만 아니라 다른 천연 또는 합성고분자물질과 혼합할 경우 물리적 성질을 더욱 개선시킬수 있다.

PHB 및 PHB 관련 공중합체는 사용후 자연계에서 생분해됨으로서 공해문제를 경감시킬 뿐만 아니라 단량체의 물비율과 미세구조의 조절을 통하여 약물의 방출을 정교하게 조절하는 약물 전달시스템으로 사용할 수 있으며, 기계적 강도 및 압전성이 좋아 수술용 봉합사 및 뼈의 접합용 보철재료등의 의료용소재 분야에 응용된다. 또한 생체 적합성 및 생분해성이 뛰어나기 때문에 생분해성 플라스틱 용기등 합성 플라스틱의 대체 용도로 각광받고 있고, 농업분야에서도 비료나 농약의 조절방출에 응용하려는 시도가 이루어지고 있다[4, 6].

현재 공중합체인 P(3HB-3HV)의 생산에는 주로 *Alcaligenes eutrophus*를 이용한 2단계 유가식배양법이 주로 이용되고 있다. Valerate를 전구물질로 하는 2단계 유가식 배양법으로 얻을 수 있는 공중합체의 3-HV 몰분율

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5384, Fax. 82-53-959-8314
E-mail: leeyh@bh.kyungpook.ac.kr

은 최대 40 mol%정도이며, 대량생산시에는 10 mol% 미만으로 떨어지는 단점을 가지고 있다[6]. 따라서 물성이 우수한 P(3HB-3HV)의 대량생산을 위하여는 높은 3-HV 몰분율의 공중합체를 생산하는 연구가 시급한 실정이다[3, 12, 17].

본 연구실에서는 *A. eutrophus*의 *phbCAB* 유전자를 독자적으로 분리 확보하고, 이를 *E. coli*-*A. eutrophus* shuttle vector에 재조합시켜 다양한 plasmid를 확보한 바 있다[14, 15]. 또한 상기 재조합 plasmid를 다시 모균주인 *A. eutrophus* H16 및 PHB 생합성능 결함 변이 *A. eutrophus* DSM 541에 각각 형질전환시킨 형질전환균주들을 확보한 바 있다[9, 16].

전보에서 Park[12, 15] 등은 *phbC* 유전자를 모균주에 재도입시킨 형질전환 *A. eutrophus* AER5를 이용한 PHB 및 P(3HB-3HV)의 축적에 관한 연구를 수행한 바 있으며, 재조합 *phbC* 유전자를 재도입한 형질전환균주를 이용할 경우 P(3HB-3HV)의 축적량이 크게 증가할뿐만 아니라 특히 3-HV의 몰분율이 모균주에 비해 현저히 증가됨을 보고한 바 있다. 이와 같은 특성으로 미루어 상기 형질전환균주는 산업적 활용 잠재력이 매우 높은 균주로 판단되며, P(3HB-3HV)의 고농도 대량생산에 영향을 주는 여러 배양조건의 영향에 대한 기초 연구가 요망된다.

본 연구는 상기 형질전환균주 *A. eutrophus* AER5를 이용한 높은 3-HV 몰분율을 가진 P(3HB-3HV)의 대량생산에 적합한 배양조건을 확립하기 위한 기초 연구이다. 이를 위하여 형질전환균주의 P(3HB-3HV) 축적 특성을 검토하였고, P(3HB-3HV)내의 3-HV 몰분율변화와 P(3HB-3HV) 생합성 관련 효소의 활성 변화와의 상관관계를 검토하였다. 전구물질인 valerate의 균체저해성을 극복하고 균체의 생존력을 유지시키기 위하여 2단계 배양시 탄소원인 fructose를 소량 혼합첨가하고 총균체량, P(3HB-3HV) 축적농도, 축적율, 그리고 3-HV 몰분율에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 Mg^{2+} 이온의 영향과 각종 pH 조절제를 비교 검토하였다. 또한 2단계 회분배양의 번거로움을 극복하기 위하여 1단계 간헐적 유가배양을 실시하여 높은 3-HV 몰분율을 함유한 P(3HB-3HV)의 고농도 생산을 시도하였다. 이는 형질전환균주를 이용한 P(3HB-3HV)의 고농도 대량생산에 적합한 배양조건을 확립하는 기초 자료로 활용될 것이다.

재료 및 방법

사용 균주

모균주로는 *Alcaligenes eutrophus* H16(ATCC 17699)을 사용하였다. 형질전환균주로는 상기 모균주에서 독자분리한 PHB 생합성 관련 *phbCAB* 유전자중 중합반응에 관여하는 PHB synthase를 합성하는 *phbC* 유전자를 *E.*

coli-*A. eutrophus* shuttle vector에 재조합시켜, 이를 모균주에 형질전환시켜 얻은 형질전환 *A. eutrophus* AER5를 사용하였다[15, 16].

배지

균체량의 증식을 목표로 한 1단계 배양에는 복합배지를 사용하였으며, 그 조성은 polypepton 10.0 g/L, yeast extract 10.0 g/L, meat extract 10.0 g/L, 그리고 $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g/L였다[12]. P(3HB-3HV)의 축적을 위한 2단계 배양에는 조성이 Na_2HPO_4 3.8 g/L, KH_2PO_4 2.65 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L, $MgSO_4$ 2.0 g/L, 1 ml/L의 trace mineral, 그리고 valerate 10.0 g/L로 구성된 최소배지를 사용하였다[9].

P(3HB-3HV)생산을 위한 2단계 회분배양

1단계 회분배양은 복합배지를 사용하여 균체증식을 목표로 진탕 배양기에서 150 rpm, 30°C, 그리고 pH 7.0에서 36시간 배양하였으며 최종적으로 8.0 g/L의 균체를 얻었다. 2단계 회분배양은 P(3HB-3HV)의 축적을 목표로 전구물질로 valerate를 10.0 g/L 첨가한 최소배지를 사용하였다. 즉 1단계 배양에서 얻은 균체를 원심분리하여 회수하여 이를 접종한 후 진탕 배양기에서 150 rpm, 30°C, 그리고 pH 7.0에서 48시간 배양하였다. 또한 탄소원인 fructose를 0.0-40.0 g/L로, magnesium sulfate를 0.05-0.4 g/L로, 그리고 각종 pH 조절제의 종류와 농도를 변화시키면서 배양하였다.

P(3HB-3HV) 고농도 생산을 위한 1단계 간헐적 유가배양

배양초기인 36시간까지는 전구물질인 valerate를 첨가하지 않고 탄소원으로 fructose를 10.0 g/L와 질소원으로 NH_4OH 1.0 g/L를 첨가한 최소배지에서 배양하면서 균체농도가 각각 2.5 g/L 증가할때마다 20.0 g/L의 fructose가 함유된 최소배지를 분할 첨가 배양하여 균체와 PHB를 축적시켰다. 36시간 후 전구물질인 valerate와 fructose를 각각 10 g/L, 2.5 g/L씩 함유된 최소배지를 valerate가 60% 소모될 때마다 분할 첨가하여 72시간 배양하여 P(3HB-3HV)의 축적을 유도하였다.

P(3HB-3HV)의 분리

균체를 5% sodium hypochlorite solution으로 37°C에서 1시간동안 반응시켜 용해시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 침전물을 증류수, 아세톤, 그리고 에탄올 순으로 세척, 원심분리, 건조한 후, 클로포름에 용해 증발시켜 P(3HB-3HV) 분말을 얻었다[2].

GC를 이용한 P(3HB-3HV)의 정량 및 분석

P(3HB-3HV)의 정량 및 단량체 조성은 상기에서 분리한 P(3HB-3HV) 분말을 methanolysis에 의해 methyl ester시킨 후 gas chromatography로 분석하였다. Methanolysis는 acidified methanol에 일정량의 P(3HB-3HV)를 첨가하여 100°C에서 3시간 동안 행하였다. Methyl ester의 분석을 위해 사용된 column은 Carbowax 20M(Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Calif.)였으며, 이동상인 N₂의 유속은 30 mL/min였고, 그리고 flame ionization detector로 검출하였다. Injector와 detector 온도는 각각 125°C, 200°C였으며, column의 초기온도는 100°C로서 2분간 유지시키고, 5°C/min의 속도로 150°C까지 증가시킨 후 3분간 유지하였다. 단량체의 함량비는 분리된 단량체의 peak 면적의 상대비로서 나타내었다. 표준물질로는 β -hydroxybutyric acid(Sigma Co.)와 P(3HB-3HV)분말(Sigma Co.)을 사용하였다[10].

P(3HB-3HV) 생합성 관련 효소활성의 측정

β -Ketothiolase는 Senior 등[18]의 방법에 따랐으며, 42.0 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.8)에 2.5 unit β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 1.0 mM NADPH 및 세포 추출물을 넣고 30°C에서 2분간 예열시키고 acetyl-CoA를 첨가하여 반응시킨 후 감소된 NADPH 양을 340 nm에서 흡광도로 측정하여 활성을 결정하였다.

Acetoacetyl-CoA reductase는 Senior 등[19]의 방법에 따라 측정하였으며, 62.0 mM 인산 완충용액(pH 8.0)에 12.0 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 0.24 mM NADPH, 세포추출물, 그리고 0.04 mM acetoacetyl-CoA를 첨가하여 반응시킨 후 감소된 NADPH의 양을 340 nm에서 흡광도로 측정하여 활성을 결정하였다.

PHB 생합성에서 중합에 관계하는 효소인 PHB synthase는 β -hydroxybutyryl-CoA가 PHB로 전환될 때 형

성되는 CoA 농도를 측정함으로써 정량하였으며[15, 18], 200 mM 인산염 buffer에 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 0.1 mM EDTA, 세포추출물, 그리고 10.0 mM β -hydroxybutyryl-CoA를 넣은 후 최종 반응액의 부피가 3.0 mL 되도록 일정량의 증류수를 첨가하여 반응시킨 후, 생성된 CoA 양을 340 nm에서 흡광도로 측정하여 활성을 결정하였다.

결과 및 고찰

재조합 *phbC* 유전자를 도입시킨 형질전환 *A. eutrophus*의 P(3HB-3HV) 축적특성

Fig. 1은 형질전환 *A. eutrophus* AER5를 복합배지에서 1단계 배양하여 균체를 축적한 후, 이를 2단계에서 전구물질인 valerate 10.0 g/L를 함유한 최소배지에서 회분 배양하면서 배양시간에 따른 총균체량, P(3HB-3HV) 축적농도, 그리고 3-HV 물질의 변화를 측정하여 나타내었다.

총균체량은 2단계 배양에서 다소 증가는 하였으나 그 수준은 아주 미비하였는데, 이는 P(3HB-3HV)의 생합성을 위해 전구물질로 첨가된 valerate에 의한 균체생육 저해 작용에 기인하는 것으로 사료된다. 이는 P(3HB-3HV)를 고농도로 생산하기 위해서는 전구물질이 갖는 균체생육 저해성을 극복하기 위하여 전구물질의 분할 첨가, 탄소원의 부수적 첨가를 통한 저해효과의 감소와 같은 배양공학적인 검토가 필요하다. P(3HB-3HV)의 축적농도는 배양이 진행됨에 따라 현저히 증가하였으며, 배양 36시간 후 3.03 g/L로 최대값을 나타내었으며, 이후에는 배양이 진행됨에 따라 축적된 P(3HB-3HV)가 기질로 이용되므로 줄어드는 경향을 나타내었다.

3-Hydroxyvalerate(3-HV) 물질은 배양시간에 따라 점차적으로 증가하였으며 배양 36시간에 52.2 mol%로

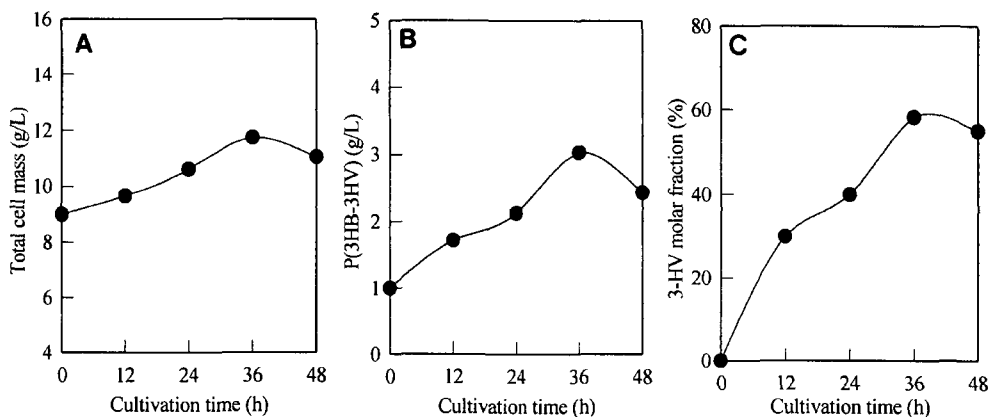


Fig. 1. Changes of total cell mass (A), P(3HB-3HV) concentration (B), and 3-HV molar fraction (C) of transformant *A. eutrophus* AER5 harboring cloned *phbC* gene during cultivation.

Cultivation: Two-stage cultivation, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 48 hr cultivation.

Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄.

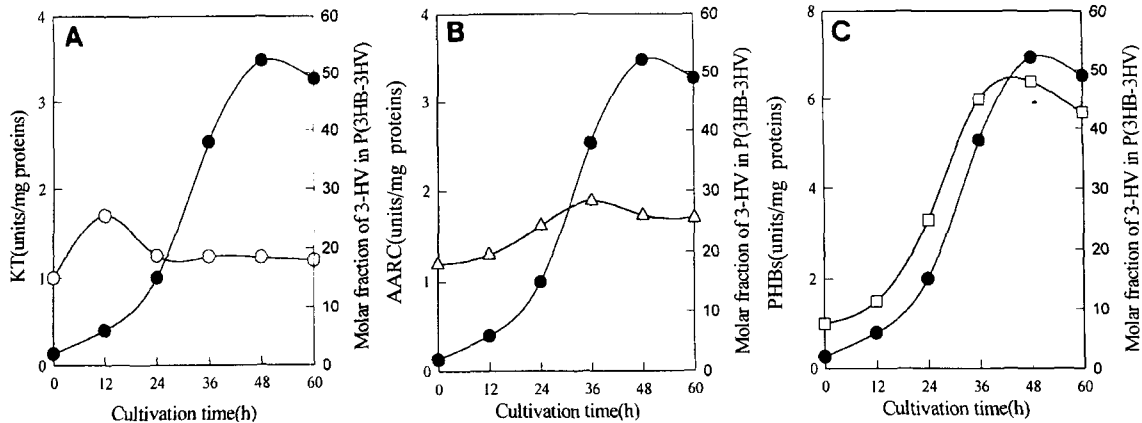


Fig. 2. The changes of molar fraction of 3-HV in P(3HB-3HV) and specific activities of β -ketothiolase (A), acetoacetyl-CoA reductase (B), and PHB synthase (C) during cultivation of transformant *A. entrophus* AER5 harboring cloned *phbC* gene. Cultivation: Two-stage cultivation, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 48 hr cultivation. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 1.0 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. ●: 3-HV Molar fraction, ○: β -ketothiolase, △: Acetoacetyl-CoA reductase, □: PHB synthase.

최대로 증가하다가 이후에 다시 감소하는 경향을 보였다. 위에서 관찰한 P(3HB-3HV)내의 3-HV 몰분율은 모 균주인 *A. entrophus* H16에서 보고된 수준인 30 mol%보다 현저히 증가된 결과로서[12, 16], PHB synthase를 생산하는 *phbC* 유전자의 재도입을 통한 형질전환균주를 이용하는 것이 3-HV 몰분율이 높은 P(3HB-3HV) 고농도 생산에 매우 효과적인 방법임을 알 수 있었다.

형질전환 *A. entrophus*의 3-HV의 몰분율과 PHB 관련 효소의 활성 변화

Fig. 2는 P(3HB-3HV)의 3-HV 몰분율과 PHB 관련 효소 활성변화와의 상관관계를 규명하기 위하여, 형질전환 *A. entrophus* AER5를 10.0 g/L valerate가 첨가된 최소배지에서 36시간 2단계 배양하면서 시간에 따른 3-HV 몰분율과 β -ketothiolase와 acetoacetyl-CoA reductase, 그리고 PHB synthase의 효소활성의 변화를 측정된 결과이다.

β -ketothiolase는 배양초기인 12시간경에 가장 높은 활성을 보이다가 낮아지는 경향을 나타내었는데, 이는 1단계배양 중 균체내에 축적된 acetyl-CoA가 활발하게 PHB의 생합성에 사용되기 때문으로 유추되며, 이는 3-HB의 축적이 가장 활발한 시기와 일치하였다. Acetoacetyl-CoA reductase는 36시간에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이는 전구물질인 valerate가 β -ketothiolase의 작용을 받지않고 바로 acetoacetyl-CoA reductase에 의해 환원되어지는 대사특성[7]과 관련되는 것으로 유추되며, 이는 3-HV의 축적이 가장 활발하게 이루어지는 시기와 일치하였다. PHB synthase의 활성은 재조합을 통하여 증폭된 *phbC* 유전자로 인하여 배양초기부터 매우 높은 활성을 보였으며, 특히 배양 후반기인 24~36시간

경 급속히 증가되는 양상을 보였으며, 이때 3-HV 몰분율도 현저히 증가하였다.

전구물질인 valerate는 P(3HB-3HV)의 생합성에 주로 이용되나 일부는 대사과정을 거쳐 valeryl-CoA를 경유하여 acetyl-CoA로 분해되어 에너지원으로 사용될수 있다[1]. 그러나 증폭된 PHB synthase의 활성으로 3-HB와 3-HV의 중합반응이 활발히 진행 되어 에너지원으로보다는 공중합체인 P(3HB-3HV)의 생합성쪽으로 강하게 유도됨으로 P(3HB-3HV)의 농도 및 3-HV 몰분율이 현저히 증대되는 것으로 사료된다. 이로 미루어 PHB 생합성 관련 세 효소 중 PHB synthase가 P(3HB-3HV)내의 3-HV 몰분율 증가에 가장 중요한 역할을 할 수 있다.

P(3HB-3HV)생합성과 3-HV 몰분율의 변화에 미치는 fructose 첨가의 영향

2단계 배양은 P(3HB-3HV)의 생합성을 유도하는 단계로 탄소원을 첨가하지 않는 최소배지를 이용한다. 그러나 균체의 viability 유지에 필요한 탄소원을 공급하여 준다면 전구물질인 valerate에 의한 균체생육 저해효과를 경감시킬 수 있으리라 예상된다. Table 1은 valerate의 농도를 10.0 g/L로 고정하고 fructose의 농도를 변화시키면서 총균체량, P(3HB-3HV) 축적농도, 축적율, 그리고 3-HV 몰분율의 변화를 검토한 결과이다.

총균체량은 fructose의 농도가 증가함에 따라 최대 18.0 g/L까지 증가하였으나, 농도가 20.0 g/L을 초과시에는 다소 감소하였다. 또한 P(3HB-3HV)의 축적농도, 축적율도 fructose가 증가할수록 점차적으로 증가하였다. 반면 3-HV 몰분율은 fructose가 증가할수록 오히려 큰폭으로 감소하였다. 이로 미루어 적정 fructose의 농도는

Table 1. Effect of fructose supplement on total cell mass, P(3HB-3HV) concentration, content, and 3-HV molar fraction of transformant *A. eutrophus* AER5

Fructose (g/L)	TCM ¹ (g/L)	P(3HB-3HV) (g/L)	PHA content ² (%)	3HV fraction (mol %)
0.0	12.5	3.2	25.8	52.2
5.0	14.3	3.8	26.5	45.6
10.0	17.7	5.9	33.1	35.0
20.0	18.0	6.2	34.4	21.1
40.0	17.1	6.4	37.4	14.3

Cultivation: Two-stage batch cultivation in minimal medium, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 48 hr cultivation. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ at second stage. ¹Total cell mass, ²[P(3HB-3HV)/total cell mass]×100.

Table 2. Effect of magnesium sulfate on accumulation of total cell mass, residual cell mass, P(3HB-3HV) concentration, content, and 3-HV molar fraction of transformant *A. eutrophus* AER5

MgSO ₄ (g/L)	TCM ¹ (g/L)	RCM ² (g/L)	P(3HB-3HV) (g/L)	PHA content ³ (%)	3HV fraction (mol %)
0.05	13.6	8.2	5.2	38.2	55.1
0.1	14.3	8.1	6.1	42.8	71.3
0.2	12.5	8.3	4.2	25.8	66.2
0.4	11.6	8.3	3.2	28.1	57.6

Cultivation: Two-stage batch cultivation in minimal medium, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 48 h cultivation. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ at second stage. ¹Total cell mass, ²Residual cell mass, ³[P(3HB-3HV)/total cell mass]×100.

10.0 g/L로 판단되며 이 경우를 fructose를 첨가하지 않을 경우와 비교하면 P(3HB-3HV)의 축적농도 및 축적율은 각각 5.9 g/L, 33.1%로서 각각 1.7배, 1.3배로 현저히 증가하였다. 반면 3-HV 물분율은 52.2 mol%에서 35.3 mol%로 다소 감소하였는데, 이는 fructose 대사를 통해 생성된 acetyl-CoA가 축합반응을 통해 3-HB로 전환되는 양이 증가되기 때문으로 사료된다. 이와 같이 물분율은 비첨가시에 비해 다소 감소하였으나 전보[12,16]에서 보고한 모균주의 경우 얻어진 30 mol%에 비해서는 다소 높은 수치임을 알 수 있다. Fructose의 보충첨가는 고가의 전구물질인 valerate 첨가량을 줄이면서도 높은 물분율의 3-HV가 포함된 P(3HB-3HV)를 고농도로 얻을 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 높은 3-HV 물분율을 지닌 P(3HB-3HV)를 고농도로 생산하기 위해서는 fructose와 valerate의 혼합비를 최적화하는 노력이 필요하며 적정 fructose와 valerate의 혼합비 유지를 위한 유가식배양법은 좋은 대안이 될 것으로 판단된다.

Magnesium sulfate 첨가가 P(3HB-3HV)생합성과 3-HV 물분율에 미치는 영향

Table 2는 MgSO₄의 농도가 형질전환균주의 P(3HB-3HV)의 생합성에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 1단계 복합배지에서 36시간 배양하여 얻은 균체를 valerate가 10.0 g/L 포함된 최소배지에 접종하고 MgSO₄의 농도를 변화시키면서 36시간 2단계 배양 후 총균체 농도, 순수균체농도, P(3HB-3HV) 농도, 축적율, 그리고 3-HV

물분율을 측정하여 결과를 나타내었다.

MgSO₄의 첨가량이 증가함에 따라 총균체량과 P(3HB-3HV)의 축적농도, 축적율, 그리고 3-HV 물분율은 점차적으로 증가하였으며, 0.1 g/L 이상에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 최적 농도로 판단되는 0.1 g/L의 MgSO₄ 첨가시 14.3 g/L의 총균체량과 6.1 g/L의 P(3HB-3HV) 축적농도, 그리고 71.3 mol %의 3-HV 물분율을 얻을 수 있었다.

일반적으로 MgSO₄는 *A. eutrophus*에서 이용되어 PHB 및 P(3HB-3HV)의 축적시 영양불균형 상태를 야기시켜 이들의 축적을 유도하는 주요 영양소중의 하나로 미량인 2.0 g/L가 주로 사용되고 있다[6]. 그러나 본 연구에서는 MgSO₄의 농도를 매우 낮은 수준인 0.1 g/L로 감소시킬 경우 오히려 P(3HB-3HV)농도는 물론 3-HV 물분율을 현저히 증가시킬 수 있다는 특이한 결과를 얻었다. 이는 총균체량에서 P(3HB-3HV)를 뺀 순수균체량은 Mg²⁺ 이온의 농도에 관계없이 거의 유사한 수준을 유지하는 것으로 미루어 보아, Mg²⁺ 이온은 P(3HB-3HV) 생합성 경로에 관여하는 효소반응을 촉진하는 인자로 작용하고 있지 않나 유추되며, 기작 규명을 위한 연구가 요망된다.

pH 조절제의 선정

P(3HB-3HV)의 축적을 유도하기 위하여 2단계 배양에서는 강산성인 valerate를 전구물질로 첨가함으로써 pH를 조절하고 배양중 pH의 유지를 위하여 각종 조절제를 첨가하게 된다. 대량 배양에 적합한 pH 조절제를 선

Table 3. Comparison of pH adjuster on accumulation of P(3HB-3HV) and 3-HV molar fraction of transformant *A. eutrophus* AER5

pH adjuster	TCM ¹ (g/L)	P(3HB-3HV) (g/L)	PHA content ² (%)	3-HV fraction (mol %)
3N-NaOH	12.5	3.2	25.8	76.2
3N-NaOH and 0.5N-(NH ₄) ₂ SO ₄	15.3	3.4	22.1	51.4
3N-NH ₄ OH	18.5	2.2	12.5	40.2

Cultivation: Two-stage batch cultivation in minimal medium, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 48 hr cultivation. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 1.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ at second stage. ¹Total cell mass, ²[P(3HB-3HV)/total cell mass]×100.

정하기 위하여 NaOH 용액, NaOH와 (NH₄)₂SO₄의 혼합액, 그리고 NH₄OH 용액을 비교 검토하였다. Table 3는 1단계에서 얻은 형질전환균주를 2단계에서 10.0 g/L의 valerate가 첨가된 질소원이 없는 최소배지에서 3N-NaOH, 3N-NaOH와 0.5N-(NH₄)₂SO₄의 혼합용액, 그리고 3N-NH₄OH를 pH 조절제로 사용하여 최적 pH인 7.0에서 36시간 배양시킨 후 총균체 농도, P(3HB-3HV) 농도와 축적율, 그리고 3-HV 물분율에 미치는 영향을 비교한 결과이다.

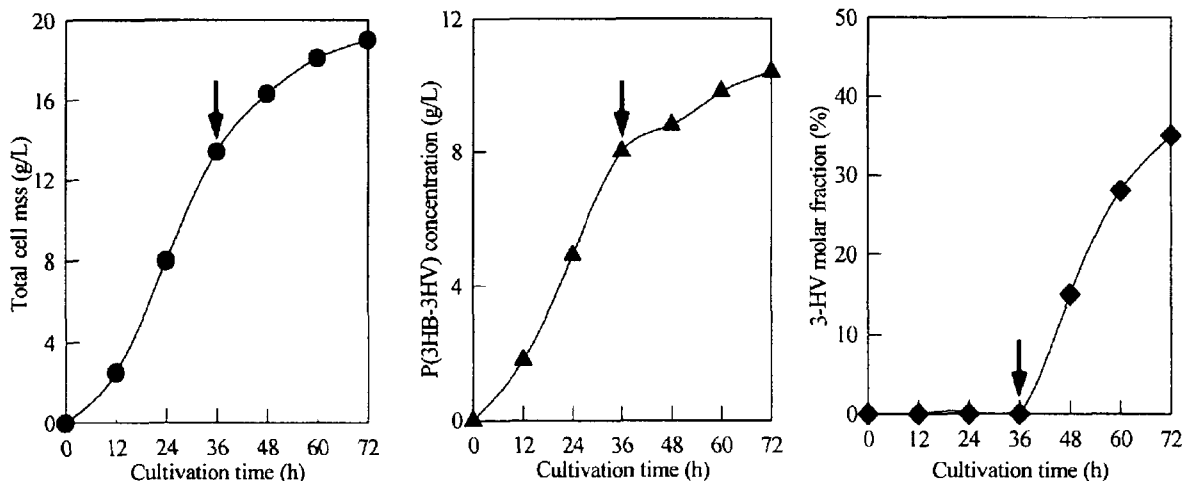
총균체량은 NH₄OH 용액을 사용하였을 경우에 18.5 g/L로 가장 높았고 NaOH와 (NH₄)₂SO₄의 혼합액의 경우 15.3 g/L, 그리고 NaOH의 경우 12.5 g/L로 가장 낮았다. 반면 공중합체의 축적농도, 축적율, 그리고 3-HV 물분율은 NaOH 용액을 사용할 때 각각 3.2 g/L, 25.8%, 76.2 mol%로 가장 우수한 결과를 보였고, NaOH와 (NH₄)₂SO₄의 혼합액의 경우는 각각 3.4 g/L, 22.1%, 51.4 mol%였으며, NH₄OH 용액의 경우는 각각 2.2 g/L, 12.5%, 40.2 mol%로서 가장 낮았다. 이와 같은 현상은 pH 조절

제에 함유된 NH₄⁺ 이온이 질소원으로 이용됨으로서 TCA 회로가 원활히 작동되어 P(3HB-3HV) 축적보다는 균체 생육이 활발히 이루어지기 때문으로 사료된다.

일반적으로 3N-NaOH 용액이 1, 2단계 배양에서 pH 조절제로 주로 활용되고 있다. 그러나 강산성인 valerate를 중화하기 위해서는 다량의 NaOH가 소요되며 과량의 Na⁺ 이온은 균체 증식을 저해할 것이 예상된다. 또한 질소원으로 주로 사용되는 (NH₄)₂SO₄는 과량의 SO₄²⁻ 이온을 유리시켜 균체생육 및 PHB 생합성에 악영향을 준다는 보고도 있다[3, 13].

따라서 2단계 배양을 통한 공중합체의 고농도생산을 목표로 한 형질전환균주의 배양에서는 1단계인 균체생육 단계에서는 pH 조절제로 NH₄OH를 이용하여 pH 조절 및 질소원으로 활용하고, 2단계인 공중합체 축적단계에는 NaOH를 pH 조절제로 사용하여 고함량의 3-HV 물분율을 갖는 공중합체 생산을 유도함이 필요하다.

P(3HB-3HV)의 고농도생산을 위한 1단계 간헐적 유가

**Fig. 3.** Changes of total cell mass, P(3HB-3HV) concentration, and molar fraction of 3-HV in P(3HB-3HV) during one-stage intermittent-feeding fed batch cultivation of transformant *A. eutrophus* AER5 harboring cloned *phbC* gene.

Cultivation: One-stage intermittent-feeding fed batch cultivation, flask shaker, pH 7.0, 30°C and 72 hr cultivation. Cultivated in minimal medium containing 20.0 g/L fructose and 1.0 g/L of NH₄OH at initial 36 hr, above minimal medium was intermittently fed according to each increment of 2.5 g/L of total cell mass. Thereafter, cultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of valerate and 5.0 g/L of fructose, feeding above minimal medium intermittently according to the consumption of 60% of valerate, upto 72 hr. ●: Total cell mass, ▲: P(3-hydroxybutyrate-3-hydrovalerate), ◆: 3-HV fraction.

배양

2단계 배양은 고가의 복합배지에 균체를 배양하고 이를 다시 회수하여 2단계에서 P(3HB-3HV)의 축적을 유도하여야 함으로 배양공정상 어려움이 있다. 그러나 1단계 간헐적 유가배양법(One-stage intermittent fed-batch cultivation)을 이용한다면 이와 같은 번거러움을 극복할 수 있으며, 경제성을 증대시킬 수 있으리라 예상된다.

Fig. 3은 균체증식의 효율성을 증가시키고 동시에 3-HV 몰분율이 증대된 P(3HB-3HV)를 고농도로 생산하기 위해 fructose, valerate, 그리고 최소배지 성분을 간헐적으로 첨가하여 배양하는 1단계 간헐적 유가배양을 시도하여 배양시간에 따른 총균체량, P(3HB-3HV) 축적농도, 그리고 3-HV 몰분율의 변화를 측정된 결과이다. 배양 초기 36시간까지는 최소배지에 질소원으로 1.0 g/L의 NH_4OH 와 20.0 g/L의 fructose가 첨가된 배양액을 균체의 농도가 2.5 g/L씩 증가할 때마다 간헐적으로 첨가하여 과량의 fructose에 의한 기질저해 효과를 경감시키면서 균체를 증식시켰다. 그 후 배양액을 10.0 g/L의 valerate와 5.0 g/L의 fructose가 첨가된 최소배지로 바꾸어 valerate 농도가 60% 감소할 때마다 간헐적으로 첨가하여 3-HV 몰분율이 높은 P(3HB-3HV) 고농도 생산을 시도하였다.

72시간 배양후의 최종 총균체량은 19.2 g/L로서 2단계 회분배양법으로 얻은 11.7 g/L에 비하여 1.6배로 증가하였다. 또한 P(3HB-3HV) 축적농도는 10.4 g/L로 2단계 회분배양에서 얻은 3.03 g/L에 비해 3.3배로 현저히 증가하였다. 그러나 3-HV 몰분율은 35 mol %로 2단계 배양법의 52.2 mol%에 비해 다소 감소되는 양상을 보였다. 1단계 간헐적 유가배양법은 고탍량 3-HV를 가진 P(3HB-3HV)의 고농도 생산을 위해 매우 효과적인 배양 방법으로 판단된다. 그러나 기질의 고갈을 피하고 적정 수준으로 유지함으로써 생성된 공중합체의 분해에 의한 손실을 최소화하기 위한 배양기술의 개발이 요망된다.

요 약

3-HV 몰분율이 증대된 P(3HB-3HV)의 고농도 생산을 위하여 재조합 *phbC* 유전자를 모균주에 재도입시킨 형질전환 *Alcaligenes eutrophus* AER5의 배양공학적 연구를 수행하였다. 상기 형질전환균주를 전구물질인 valerate가 10.0 g/L 첨가된 최소배지에서 2단계 배양한 결과 P(3HB-3HV)내의 3-HV 몰분율이 52.2 mol%로 모균주 *A. eutrophus* H16의 30 mol%에 비해 현저히 증가하였다. 이와 같은 몰분율의 증가는 *phbC* 유전자의 산물인 PHB synthase의 증폭과 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. 2단계 회분배양시 fructose의 보충첨가의 영향을 검토하였으며, 적정농도인 10.0 g/L의 fructose를

valerate와 같이 첨가할 경우 총균체량, P(3HB-3HV)의 축적농도, 그리고 축적율은 현저히 증가한 반면, 3-HV 몰분율은 다소 감소하는 경향을 보였다. Mg^{2+} 이온은 P(3HB-3HV) 축적에 매우 민감한 영향을 미쳤으며, 적정농도로 판단되는 0.1 g/L일 경우 P(3HB-3HV) 축적농도는 6.1 g/L, 그리고 3-HV 몰분율은 71.3 %로 현저히 증가하였다. 또한 적정 pH 조절제의 선정을 위하여 NaOH, NaOH와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 혼합액, 그리고 NH_4OH 을 비교 검토하였다. 2단계 배양법의 번거러움을 극복하고자 1단계 간헐적 유가식배양법을 검토한 결과, 배양 72시간 후 총균체량 19.2 g/L, P(3HB-3HV) 축적농도 10.4 g/L, 그리고 3-HV 몰분율 35 mol%로 2단계 회분배양법보다 우수한 결과를 얻었다. 이는 형질전환균주를 이용한 3-HV 몰분율이 높은 P(3HB-3HV)의 고농도 생산을 위한 배양조건 확립을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부와 (주)LG화학의 선도기술개발사업 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Alistair, J. A. and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Reviews* 12: 450-472.
2. Berger, E., B. A., Ramsay, J. A. Ramsay, and C. Charvarie. 1989. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Tech.* 3: 227-232.
3. Choi, J. H., J. H. Kim, M. Daniel, and J. M. Lebeault. 1989. Optimization of growth medium and poly- β -hydroxybutyric acid production from methanol in *Methylobacterium organophilum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17: 392-396.
4. Colin, W. P. and S. Akhtar. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 18: 133-162.
5. Daniel, M., J. H. Kim, M. Daniel, and J. M. Lebeault. 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of PHB by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 702-706.
6. Dawes, A. E. 1986. *Microbial Energetics*, pp. 158-164. Blackie Chapman and Hall, New York.
7. Doi, Y. 1990. *Microbial Polyesters*. VCH Publishers, Inc., N.Y.
8. Haywood, G. W., A. J. Anderson, L. Chu, and E. A. Dawes. 1988. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*.

- FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 91–96.
9. Jung, Y. M. and Y. H. Lee. 1997. Investigation of regulatory mechanism of flux of acetyl-CoA in *Alcaligenes eutrophus* using PHB negative mutant and transformants harboring cloned *phbCAB* genes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 215–222.
 10. Law, J. H. and R. A. Slepecky. 1960. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**: 33–36.
 11. Lee, I. Y., M. K. Kim, G. J. Kim, and Y. H. Park. 1995. Production of poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) from glucose and valerate in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **17**: 571–574.
 12. Lee, Y. H., J. S. Park, and T. L. Huh. 1997. Enhanced biosynthesis of P(3HB-3HV) and P(3HB-4HB) by amplification of the cloned PHB biosynthesis genes in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 771–774.
 13. Mulchandani, A., J. H. T. Luong, and C. Groom. 1989. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 11–17.
 14. Park, H. C., J. S. Park, Y. H. Lee, and T. L. Huh. 1994. Manipulation of the genes for poly- β -hydroxybutyric acid synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Proceedings of IUMS Congress '94*, pp. 276. International Union of Microbiological Societies. Prague, Czech Republic, July 3–8.
 15. Park, J. S., H. C., Park, T. L. Huh, and Y. H. Lee. 1995. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned *phbCAB* genes. *Biotechnol. Lett.* **17**: 735–740.
 16. Park, J. S., T. L. Huh, and Y. H. Lee. 1997. Characteristics of cell growth and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned *phbCAB* Genes. *Enzyme Microbiol. Technol.* **21**: 85–90.
 17. Rhee, I. H., P. L. Jang, and P. L. Rogers. 1993. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. *Biotechnol. Lett.* **15**: 377–382.
 18. Senior, P. J. and E. A. Dawes. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**: 55–66.
 19. Song, H. J., I. S. Lee, and W. G. Bang. 1996. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from butyric acid and valeric acid by *Azotobacter* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 92–100.

(Received September 15, 1998)