

# Haloarcular sp. EH-1으로부터 생분해성 Poly-3-Hydroxyalkanoate의 생산

정명주\* · 박형숙

경성대학교 생물학과

## Production of Poly-3-Hydroxyalkanoate by *Haloarcular* sp. EH-1

Myung-Ju Jung\* and Hyung-Sook Park

Department of Biology, Kyungshung University, Pusan 608 736, Korea

### Abstract

The extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcular* sp. EH-1 was isolated from solar salts. *Haloarcular* sp. EH-1 accumulated poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) as intracellular granules. PHA production in batch culture have been studied. The PHA was identified as poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)(PHB/HV) of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid by the analysis of GC, IR and NMR. The melting temperature of PHB/HV was 152.46°C, viscosity was 1.25 dl/g, and molecular weight was  $1.44 \times 10^5$ .

**Key words** – Halobacteria, *Haloarcular* sp. EH-1, Poly-3-hydroxyalkanoate

### 서 론

Poly-3-hydroxyalkanoate(PHA)는 미생물이 다량의 탄소원 존재하에 영양분 제한조건에서 탄소원 및 에너지 저장물질로서 합성·축적하는 hydroxyalkanoate로 이루어진 고분자물질이다[10]. PHA는 생분해성이면서 인체조직과의 용해성이 우수하고 인체에 무해하며 열가소성 등의 성질을 가지고 있기 때문에 플라스틱 대체물질 뿐만 아니라 생의학 등의 다양한 분야에서 활용가능성이 높은 것으로 알려져 있다[6]. PHA 계열의 고분자 중 가장 많은 연구가 이루어지고 있는 것이 poly-3-hydroxybutyrate(PHB), poly-3-hydroxyvalerate(PHV) 그리고 PHB에 PHV가 공중합되어 있는 poly(3HB-Co-HV)인데, poly(3HB-Co-HV)는 3HV

의 물분율이 증가함에 따라 유연성, 녹는점 등의 가공물성이 폴리에틸렌과 유사하여 보다 넓은 분야에서 그 응용이 가능하다고 알려져 있다[20,21]. 1926년 파스퇴르 연구소의 Lemoigne에 의해 *Bacillus megaterium*내에서 PHB가 처음으로 발견된 이후[14], *Alcaligenes*, *Azotobactor*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum* 등이 높은 농도의 PHA를 생산할 수 있는 대표적인 세균으로 알려져 PHA 연구의 주된 대상이 되고 있으며[6,9,12,13], 최근에는 고호염성균으로부터 PHB의 생산 가능성도 검토되고 있다[4]. 그러나 고호염성균으로부터 PHA 생산에 관한 연구는 거의 보고된 바 없고, Castillor 등[7]과 Lillo[15]에 의하여 *Haloferax mediterranei*에 의한 PHB 생성이 보고되어 있을 뿐이다. 고호염성균에 의한 PHA 생산은 배지 내에 고농도

\* Corresponding author

의 NaCl이 포함되어 있으므로 다른 미생물에 의한 오염이 거의 없고, NaCl과 무기염류가 다량 함유된 바닷물을 배지로 대체해서 사용할 수 있으므로 재료비의 절감을 가져올 수 있으며, 균체를 증류수에 넣을 경우 삼투압 차에 의해 균이 쉽게 파열되므로 PHA의 추출이 쉬울 뿐만 아니라, 탄소 원료로 starch 및 sugar를 이용할 수 있어 저가의 기질을 이용할 수 있다는 장점을 갖고 있다[15]. 따라서 *Haloarcula* 속에서의 PHA 생산은 경제적으로나 산업적으로 이용 가능성이 있고 환경보존에 많은 기여를 할 수 있을 것이다.

본 실험은 천일염에서 분리 동정된 고호염성 원시세균인 *Haloarcula* sp. EH-1로부터 PHA를 생산하여 PHA의 구조 및 성질 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

PHA 생산을 위해 사용한 균주는 천일염으로부터 분리한 *Haloarcula* sp. EH-1을 사용하였다[17]. PHA 생산을 위해 NaCl 25%, MgCl<sub>2</sub> 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 2.0%, CaCl<sub>2</sub> 0.3%, KCl 0.5%, NaHCO<sub>3</sub> 0.02%, NaBr 0.05%, NH<sub>4</sub>Cl 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.08%, FeCl<sub>3</sub> 0.0002%, glucose 1%(pH 7.0)의 액체배지를 500 ml의 진탕플라스크에 100 ml씩 준비하여 SGC 액체배지[19]에서 전배양한 종균액을 2% 접종한 후 38°C에서 진탕 배양하였다.

### PHA 추출 및 정량

생육도의 측정은 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 측정하였으며, 건조균체 중량(dry cell weight)은 막여과법으로 측정하였다. 균체로부터 PHA 추출은 유기용매 추출법[15,18]에 따라 sodium hypochloride(NaClO)를 사용하여 추출하였다. 또한 PHA 정량은 배양액으로부터 회수한 건조균체 50 mg에 클로로포름 2 ml와 3% 황산을 포함하는 메탄올 2 ml를 첨가하여 screw cap tube에 넣고 3시간 30분 동안 가열하여 methylesterification시켰다. 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 수용액층/균체층/유기용매층으로 분리시킨 후 이 중 PHA가 methylester화 되어있는 유기용매층을 분광광도계를 이용하여 235 nm에서 측정하였다[5,11].

### PHA 조성분석 및 성질검토

정제된 PHA의 repeating unit 조성은 Braunegg 등의

방법[6]에 따라 PHA를 methanolysis시켜, 각 성분을  $\beta$ -hydroalkanoic acid methylester로 전환시킨 후 GC(Shimadzu QP-5000, GC-17A)로 분석하였다(Table 1). IR 분석을 위해 완전 건조된 PHA 분말 0.01 g과 KBr 1 g(IR spectroscopic grade)을 혼합하여 마쇄하고 90°C에서 건조시킨 후 압력을 가하여 KBr pellet을 만들었다. 이것에 적외선을 조사(Bruker IFS 66/FRA 106, Bruker)하여 그 흡수 spectrum을 조사하였다. PHA 분말 0.1 g을 CDCl<sub>3</sub> 용액에 용해시킨 후 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR을 사용하여 NMR spectrum(Varian Unity plus 300, Varian)을 조사하였으며, 이때 실험온도는 30°C이었다. Thermal melting(Tm) 측정을 위해 PHA 분말 0.1 g을 알루미늄 pan에서 encapsulation시킨 후 nitrogen atmosphere하에서 scanning rate 20°C/min의 속도로 0°C~300°C까지 가열하여 scanning의 melting endotherm의 peak로부터 얻었다. 또한 PHA powder를 클로로포름에 용해시켜 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% 용액으로 조제한 후, PHA 용액을 Ostwald 점성도계(Fisher사)를 이용하여 40±0.1°C에서 5회 반복하여 efflux time(sec)을 측정된 뒤, 평균값을 산출하여 점도를 측정하였다. 각 농도의 PHA 용액의 specific viscosity( $\eta_{sp}$ )는 식(1)에 의하여 결정하였다.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta' - \eta}{\eta} \cong \frac{t' - t}{t} \quad (1)$$

여기서  $\eta_{sp}$ 는 specific viscosity,  $\eta$ 는 클로로포름의

Table 1. Operation conditions of GC for analysis of poly-3-hydroxyalkanoate

|  |
|--|
| Instrument: Shimadzu QP-5000, GC-17A   |
| Column Hewlett packard HP-1(25 m, ID 0.32 mm)                                |
| Column: packing material: Crosslinked Methyl Siloxane                        |
| Carrier gas: He, Linear velocity: 43.7 mm/sec,                               |
| Split Ratio: 50 cm/sec   |
| Temperature  |
| Column-initial: 80°C, Column-final: 200°C, Injector: 210°C, Interface: 230°C |
| Initial time: 1 min, Program rate: 30°C/min,                                 |
| Equilibrium time: 1 min  |
| Injection volume: 2 $\mu$ l  |
| Mass Range Start: 35, End: 400   |
| Scan interval: 0.5 sec, Detector Gain: 1.5 kV                                |

viscosity,  $\eta'$  는 PHA 용액의 viscosity,  $t$ 는 클로로포름의 efflux time(sec),  $t'$  는 PHA 용액의 efflux time(sec)을 나타낸다. 그런 다음 reduced viscosity( $\eta_{sp}/c$ )와 PHA 농도와의 표준곡선을 작성하여 y 축의 절편 값으로부터 intrinsic viscosity( $[\eta]$ , dl/g)를 구하였으며, 식(2)로 나타낼 수 있다.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2)$$

여기서  $c$ 는 PHA의 농도를 나타낸다. PHA의 viscosity-average molecular weight는 식(3)으로 정의되는 Mark-Howink-Sakurada equation[16]에 의하여 산출하였다.

$$[\eta] = K' M_w^a \quad (3)$$

여기서  $K'$ 와  $a$ 는 Akita 등[1]이 확립한 값인  $1.18 \times 10^{-4}$  (cm<sup>3</sup>/g, in chloroform)와 0.78을 각각 사용하였으며,  $[\eta]$ 는 40°C, NaClO에서의 intrinsic viscosity를 나타낸다. 표준 PHB는 Sigma 제품을, PHB/HV는 Aldrich 제품을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

*Haloarcular* sp. EH-1으로부터 생산된 PHA를 GC로 분석한 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 retention time 4.14 부근의 hydroxybutyric acid peak 외에 다른 peak(retention time 4.21)를 볼 수 있었으므로, retention time 4.14 및 4.20에서 peak를 나타내는 standard 3HB/HV(B)와 거의 일치함을 알 수 있었다. 따라서 본 공시균으로부터 추출된 PHA는 3HB와 3HV로 구성된 구조를 가질 것으로 추측되었다. IR로 분석한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 1721.3 cm<sup>-1</sup>에서 carbonyl stretching (C=O)을 보여주는 흡수 peak가, 2924.2 cm<sup>-1</sup>에서 C-H stretching을 보여주는 흡수 peak가 각각 나타났으며, 또 1060.4~1168.9 cm<sup>-1</sup>에서 C-O stretching을 보여주는 최대흡수 peak를 나타내어, 표준시료인 PHB(Sigma 사) 및 PHB/HV(Aldrich 사)의 흡수 peak와 유사한 경향을 나타내었다. NMR spectrum은 Fig. 3에 나타난 바와 같이, 1.254 ppm에서 hydroxybutyric acid의 methyl proton resonance (B4 ; CH<sub>3</sub>)가 doublet로 나타났고, 5.246~5.291 ppm 범위에서 hydroxybutyric acid의 비대칭 탄소에 연결된 methine proton resonance (B3 ;

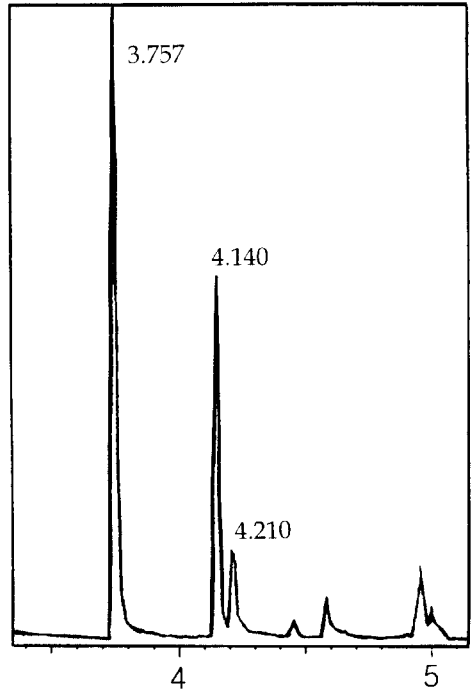


Fig. 1. Gas Chromatogram of poly-3-hydroxyalkanoate from *Haloarcular* sp. EH-1.

CH)가 sextet로 나타났다. 또한 2.435~2.648 ppm에서는 hydroxybutyric acid의 methylene proton resonance (B2 ; CH<sub>2</sub>)가 2개의 전자기적으로 inequivalent한 수소의 ABX type coupling에 의한 4개의 peak로 구성된 multiplet로 나타났다. 한편 위와 같은 hydroxybutyric acid와는 다른 chemical shift인 hydroxyvaleric acid ethyl side chain의 methyl proton resonance (V5 : CH<sub>3</sub>)가 0.855 ppm에서 triplet로 나타났는데, 이것은 methyl group이 methylene group에 linkage되어 있기 때문인 것으로 사료된다. 또한 hydroxyvaleric acid ethyl side chain의 methylene proton resonance (V4 : CH<sub>2</sub>)는 1.655 ppm에서 나타났으며, hydroxyvaleric acid의 methylene proton resonance (V2 : CH<sub>2</sub>)와 methine proton resonance (V3 : CH)는 각각 2.50, 5.24 ppm에서 나타났다. 1.655 ppm에서 나타난 peak로 보아 본 시료의 경우 methylene proton 함량이 표준시료 PHB/HV에 비해 다소 높게 나타났으나, 표준시료 PHB/HV와 정제된 PHA의 peak가 거의 일치함을 알 수 있었

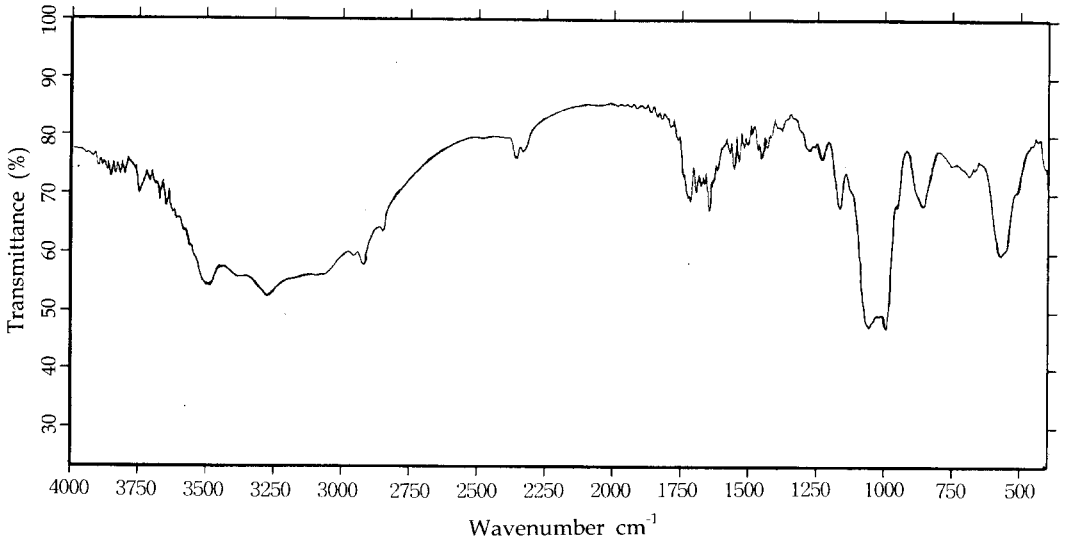


Fig. 2. Infrared spectrum of poly-3-hydroxyalkanoate from *Haloarcula* sp. EH-1.

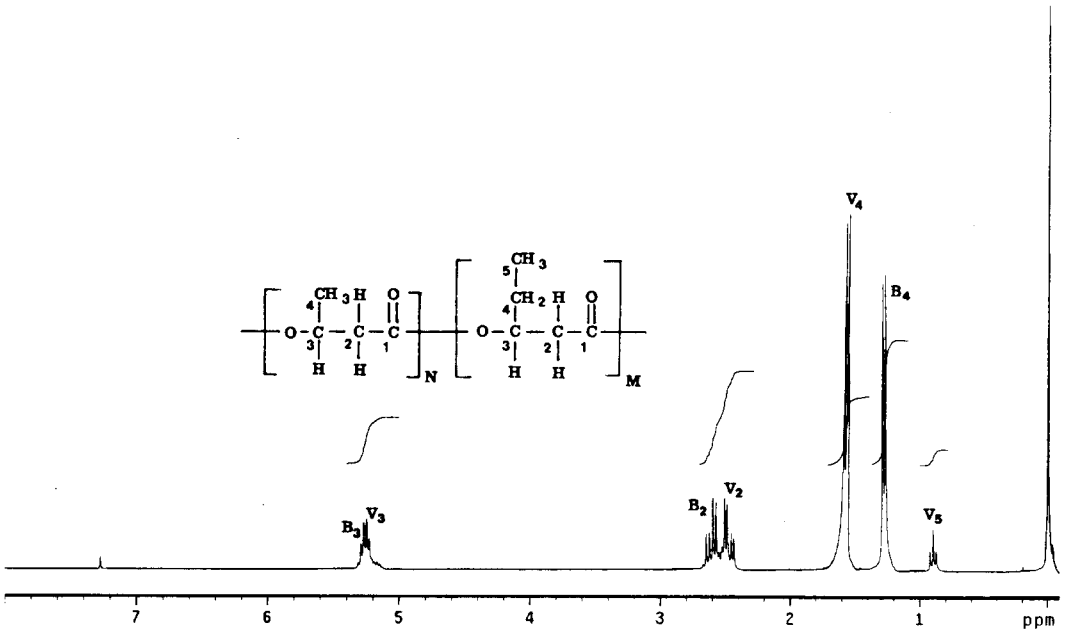


Fig. 3. 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of poly-3-hydroxyalkanoate from *Haloarcula* sp. EH-1.

다. PHA를 정제하여 T<sub>m</sub>을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 본 시료는 152.46°C에서 peak를 나타내었다. 일반적으로 3HB의 T<sub>m</sub>은 179°C이며, P-3HB/3HV의 T<sub>m</sub>은

copolymer 내의 HV 비율이 증가함으로써 170°C에서 점차 감소하기 시작하여 HV 함량이 40 mol%가 되면 75°C가 되는 것으로 알려져 있다[3]. Lee의 보고[13]에 따르면 3

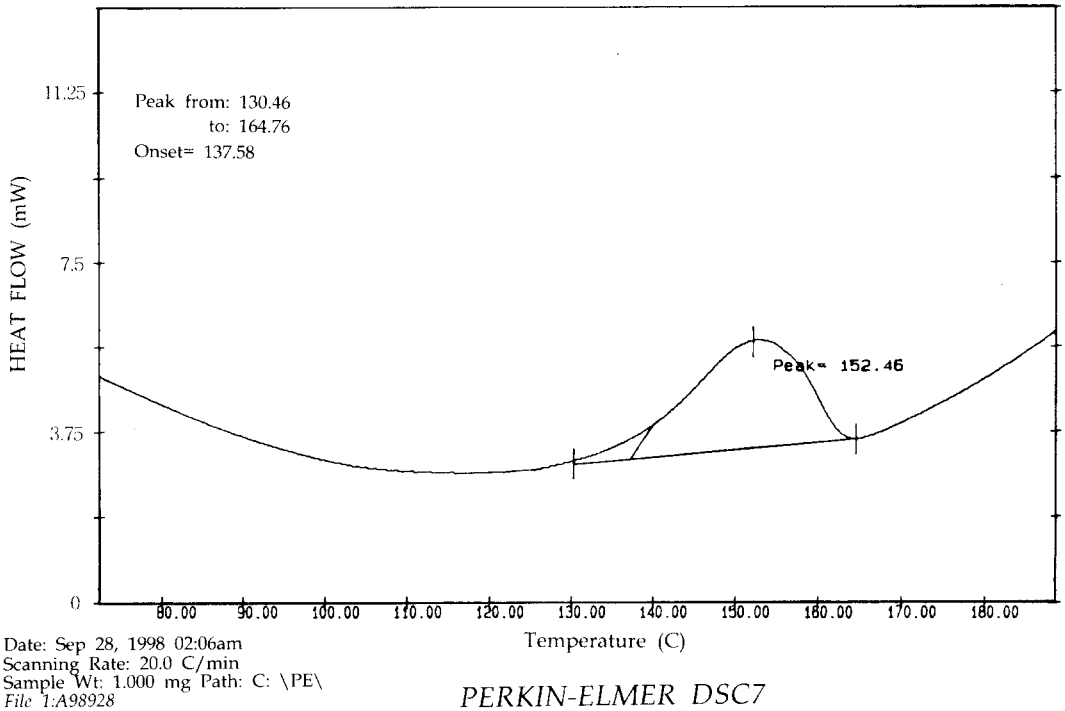


Fig. 4. Thermogram of poly-3-hydroxyalkanoate from *Haloarcula* sp. EH-1.

mol% 3HV는 170°C, 9 mol% 3HV는 162°C, 14 mol% 3HV는 150°C, 20 mol% 3HV는 145°C 그리고 25 mol% 3HV는 137°C의 Tm을 나타낸다. 따라서 HV 함량이 12 mol%인 표준시료(Aldrich 사)의 경우 Tm이 150.73°C이었으므로, 본 공시균이 생산한 PHA는 HV 함량이 9~12 mol%인 PHB/HV일 것으로 추정된다. NaClO로 추출한 PHA의 점도를 Ostwald 점성도계를 이용하여 측정할 결과 PHA의 점도는 1.25 dl/g이었으며, PHA의 분자량을 측정하기 위하여 상기에서 측정된 점도를 Mark - Howink - Sakurada equation에 대입하여 산출한 viscosity-average molecular weight(Mv)는  $1.44 \times 10^5$ 이었다. 세균에 의하여 생산되는 PHA의 분자량은 수만에서 수백만에 이르기까지 다양한데, 이는 주로 균주의 종류, 추출방법, 배양조건 등에 크게 영향을 받는다[2]. *Alcaligenes* sp. SH-69의 경우는 배양조건에 따라  $3.2 \times 10^5$  또는  $1.1 \times 10^6$ 으로 변화된다고 알려져 있으며[22], 클로로포름을 이용한 용매추출의 경우  $140 \sim 400 \times 10^3$ 으로 분자량의 감소가 거의 없지만 NaClO로 추출한 경우  $1 \sim 22 \times 10^3$ 으로 분자량의 감소가 매우 심한 것으로 보

고되었다[8]. 그러나 본 실험에서 *Haloarcula* sp. EH-1으로부터 추출한 PHA의 분자량은 클로로포름에서 분리한 분자량과 유사하게 나타났다. Tm, IR 및 NMR의 결과를 종합하여 분석한 결과 *Haloarcula* sp. EH-1으로부터 생산된 PHA의 구조는 3-hydroxybutyric acid와 3-hydroxyvaleric acid의 중합체인 PHB/HV로 추정되었다.

## 요 약

천일염에서 분리된 고호염성균인 *Haloarcula* sp. EH-1으로부터 PHA를 생산하여 PHA의 구조 및 성질 등을 검토하였다. 그 결과는 다음과 같다.

PHA를 GC chromatogram, IR 및 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR로 분석한 결과 *Haloarcula* sp. EH-1으로부터 추출된 PHA는 3-hydroxybutyric acid와 3-hydroxyvaleric acid의 중합체인 PHB/HV로 추정되었으며, thermal property는 152.46°C, 점도는 1.25 dl/g 그리고 분자량은  $1.44 \times 10^5$ 이었다.

## 참 고 문 헌

1. Akita, S., Y. Einaga, Y. Miyaki, and H. Fujita. 1976. Solution properties of poly(D- $\beta$ -hydroxybutyrate) 1. Biosynthesis and characterization. *Macromolecules*. **9**, 774-780.
2. Anderson, A.J., and E.A. Dawes. 1990. Occurance, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Microbiol. Rev.* **53**, 450-472.
3. Anderson, H. 1954. The reddening of salted hides and fish, *Appl. Microbiol.* **2**, 64-69.
4. Antón, J., I. Meseguer, and F.R. Valera. 1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2281-2286.
5. Braunegg, G., B. Sonneleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid chromatographic method for the determination of poly-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 29-37.
6. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech.* **5**, 246-250.
7. Castillor, R.F., F. R. Valera, J.G. Ramos, and F.R. Berraquero. 1986. Accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 214-216.
8. Dawes, E.A., and P.J. Senior. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **10**, 135-266.
9. Haywood, G.W., A.K. Anderson, and E.A. Dawes. 1989. A survey of the accumulation of novel poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate by bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**, 471-476.
10. Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**, 32-36.
11. Law, J.H., R.A. Slepceky. 1965. Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**, 33-36.
12. Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria? progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.*, **14**, 431-438.
13. Lee, S.Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioengin.* **49**, 1-14.
14. Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **8**, 770-782.
15. Lillo, J.G., and F.R. Valera. 1990. Effects of culture conditions on poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2517-2521.
16. Marchessault, R.H., K. Okamura, and C.J. Su. 1970. Physical properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) II. Conformational aspects in solution. *Macromolecules*. **3**, 735-740.
17. Park, H. S. and M. J. Jung. 1996. Isolation and Identification of an Extremely Halophilic Bacterium from Solar Salts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 671-677.
18. Ramsay, J.A., E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie, and B.A. Ramsay. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Techniq.* **8**, 589-594.
19. Sehgal, S.N., and N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **6**, 165-169.
20. Steinbüchel, A., and H.E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Letters*. **128**, 219-228.
21. Wallen, L.L., and W.K. Rohwedder. 1974. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* **8**, 576-579.
22. Yoon, J.S., S.K. Park, Y.B. Kim, H.Y. Maeng, and Y.H. Rhee. 1996. Culture conditions affecting the molecular weight distribution of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesized by *Alcaligenes* sp. SH-69. *J. Microbiol.* **34**, 279-283.