

## *Pseudomonas* sp. HJ-2를 이용한 고무탄성 Polyhydroxyalkanoates의 생산

정정욱 · 최강국 · 김영백<sup>1</sup> · 이영하\*

충남대학교 미생물학과, <sup>1</sup>배재대학교 신소재공학부

*Pseudomonas* sp. HJ-2는 heptanoic acid를 단일탄소원으로 이용하여 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV) 및 3-hydroxyheptanoate (3HHp)를 구성 단위체로 하는 고무탄성 polyhydroxyalkanoate (PHA)를 생합성한다. 이 미생물 고분자는 poly(3HB-co-3HV) 공중합체와 poly(3HHp) 단일중합체로 이루어진 혼합물임이 밝혀졌다. 본 연구에서는 PHA가 고무탄성체로서의 성질을 유지하는데 필요한 단위체 조성과 HJ-2의 배양조건이 PHA의 생산 및 단위체 조성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 생합성된 PHA의 탄성률은 poly(3HHp)의 존재로 크게 감소되었으나, 3HV의 함량이 높은 poly(3HB-co-3HV) 자체도 최대변형률 740%로서 고무탄성체로서의 성질을 보였다. HJ-2의 성장 및 PHA 생합성은 탄소원인 heptanoic acid의 초기농도가 40 mM일 때 가장 높았으나, 50 mM의 농도에서는 큰 저해를 받았다. PHA 생합성은 질소와 인이 결핍된 조건에서 크게 증가되었다. 배양액의 pH 및 통기는 HJ-2로부터 생합성되는 PHA의 단위체 조성에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. pH 7.5에서 생합성되는 고분자는 poly(3HB-co-38% 3HV)인 반면에 pH 8.0에서의 고분자는 3HHp가 95%를 차지하였다. 발효조의 교반속도를 달리한 실험의 결과 고분자 내 3HHp의 함량은 산소전달 속도가 높아질수록 증가하였다.

**Key words** □ polyhydroxyalkanoate, poly(3HB-co-3HV), *Pseudomonas* sp. HJ-2, rubber-elastomer

미생물로부터 생합성되는 polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 이를 이루는 단위체의 탄소수를 기준으로 크게 short-chain-length PHAs (SCL-PHAs)와 medium-chain-length PHAs (MCL-PHAs)의 두 그룹으로 구분된다(19,21). SCL-PHAs는 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV)와 같이 단위체 탄소수가 5 이하로 구성된 polyesters로서 자연계에서 가장 흔히 발견되는 polyhydroxybutyrate (PHB)를 포함하여 poly(3HB-co-3HV) 등이 이 그룹에 포함된다. 반면 MCL-PHAs는 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyheptanoate (3HHp), 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxynonanoate (3HN) 등과 같이 탄소수가 6 이상의 단위체를 구성단위로 하는 PHA로서, 보통 두 가지 이상의 단위체를 포함하는 공중합체로 생합성된다. 미생물이 어떠한 조성의 PHA를 생합성할 수 있는지는 사용되는 탄소원의 종류와 균주의 생리적 특성 이외에도 다양한 3-hydroxyacyl-CoA를 기질로 인지할 수 있는 PHA synthase (PHA polymerase)의 효소학적 특징에 의해 결정된다(8). 이와 같은 PHA synthase의 기질 특이성에 의해 대부분의 미생물은 SCL-PHAs와 MCL-PHAs 중 한가지의 고분자만을 생산한다.

SCL-PHAs와 MCL-PHAs의 물성은 판이하게 다르다. SCL-PHAs는 녹는 점과 결정성이 높고 신축성이 없는 열가소성 고분자 (thermoplastic)인 반면에 MCL-PHAs는 녹는 점과 결정성이 낮고 상온에서도 점착성을 가지는 탄성체의 성질을 가지고 있다

(10,25). 흥미롭게도 최근 SCL과 MCL 3-hydroxyalkanoates (3HA) 단위체를 모두 갖는 *Pseudomonas* sp. 61-3(1.11), *Pseudomonas* sp. A33(15), *Aeromonas caviae*(7,9), *A. hydrophila*(16) 등의 균주가 보고되고 있는데, 이러한 혼성 PHAs (hybrid PHAs)는 단위체의 종류와 함량에 따라 SCL-PHAs 또는 MCL-PHAs와 구분되는 독특한 물성을 가질 수 있기 때문에 많은 관심을 모으고 있다(4). 이러한 균주들이 가지고 있는 PHA 생합성 양상은 PHA synthase(s)의 기질 특이성과 관련있을 것으로 예상되지만(9), 아직 세부적 기작은 밝혀지지 않고 있다.

최근 본 저자들은 매우 특이한 PHA 생합성 양상을 보이는 *Pseudomonas* sp. HJ-2를 활성오니로부터 분리하였는데, 이 균주의 가장 큰 특징은 탄소원에 따라 SCL-PHAs와 MCL-PHAs를 모두 생합성할 수 있다는 점이다(5). 특히 이 균주는 탄소원인 heptanoic acid로부터 SCL-PHA 단위체인 3HB, 3HV와 MCL-PHA 단위체인 3-hydroxyheptanoate (3HHp)가 함께 포함된 혼성 PHA를 생산하는데, 이러한 조성을 지닌 PHA는 기존의 PHAs에서 찾아 볼 수 없는 매우 흥미로운 고무탄성체(rubber elastomer)의 성질을 갖고 있다. 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. HJ-2의 배양조건이 고무탄성 PHAs의 생산 및 단위체 조성에 미치는 영향과 고무탄성체로서의 물성을 유지하는데 필요한 단위체 조성에 대하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-821-6413, Fax: 042-822-7367  
E-Mail: yhrtee@cnu.ac.kr

### 균주

본 연구에서 사용된 균주는 활성오니로부터 분리된

*Pseudomonas* sp. HJ-2이다(5). *Pseudomonas* sp. HJ-2는 5 g/l nonanoic acid를 단일 탄소원으로 한 0.5×E2 medium (14)에서 삼일 간격으로 계대 배양하였다. 균주의 장기보관을 위하여 5 g/l nonanoic acid를 탄소원으로 한 액체배지에서 20시간 진탕 배양한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 세포를 동결 건조하여 -70°C에서 보관하였다.

### 배양 조건

PHA 생산을 위한 *Pseudomonas* sp. HJ-2의 배양은 5 l jar fermentor (Korea Fermentor Co. Ltd.)를 이용하여 3 g/l heptanoic acid가 포함된 0.5×E2 medium 3 l로 배양하였다. 종균은 동일 배지가 포함된 플라스크에서 20 시간 진탕배양 (200 rpm) 하였으며, 발효배지 부피의 10% (v/v)의 양으로 발효조에 접종하였다. 발효조에서의 배양을 위하여 기본적으로 정한 agitation speed, pH, 온도 및 aeration rate는 각각 350 rpm, pH 7.0, 30°C 및 1 vvm이었으며, 실험목적에 따라 조건을 달리하였다.

### PHA 추출과 정제

배양이 끝난 후 배양액을 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 수득하고, 냉동실에서 얼린 후 동결건조 하였다. 동결 건조된 균체를 적당량의 sea sand와 함께 막자사발에 넣고 곱게 갈아 thimble filter에 넣고, soxhlet extractor에서 chloroform으로 PHA를 추출하였다. 추출된 고분자는 차가운 methanol에 PHA가 녹아있는 chloroform 용액을 한 방울씩 떨어뜨리면서 vortex mixer로 격렬하게 저어주는 방법을 이용하여 정제하였다(12). 이러한 과정을 세 번 이상 반복하여 최종적으로 PHA의 순도를 높였으며, 획득된 PHA에 남아있는 methanol은 상온에서 고분자를 건조시키는 과정에서 모두 제거되었다.

### 분석

건조세포중량(dry cell weight, DCW)은 배양된 균체를 원심분리하여 수확하고 증류수를 이용하여 2~3 회 세척한 후 동결건조기로 8~10 시간동안 건조시켜 측정하였다. 배양액내 미생물의 증식은 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 생성된 PHA의 정량 및 정성분석은 16 mol%의 3HV를 함유하는 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 표준시료로 Braunneg 등(3)의 gas chromatography법에 의해 수행하였으며, 이때 내부 표준물질 (internal standard)로는 5 mg/ml의 benzoic acid를 사용하였다. 생성된 PHA의 총량은 3HB, 3HV와 3HHp의 합으로 정하였다.

## 결과 및 고찰

### Heptanoic acid로부터 생합성된 PHA의 성질

Heptanoic acid를 단일탄소원으로 *Pseudomonas* sp. HJ-2로부터 생산된 혼성 PHA를 세포로부터 추출하여 film형태로 만들어 본 결과, 이 고분자는 끈적이지 않고 부드럽고 질겼으며, 쉽게 clastic band나 섬유모양으로 만들 수 있어, 기존의 딱딱한 플라스틱 성질을 갖는 SCL-PHAs나 끈적이는 성질로 대표되는 MCL-PHAs와는 확연히 구분되는 성질을 가진다. 앞서 *n*-hexane을 이용하여 수행된 분획실험(fractionation test)을 통하여 이 혼성 PHA는 3HB, 3HV 및 3HHp 단위체로 구성된 terpolymer가 아니라 SCL-PHA인 poly(3HB-co-3HV) 공중합체(*n*-hexane-insoluble)와 MCL-PHA인 poly(3HHp) 단일중합체(*n*-hexane-soluble)가 혼합물 형태로 존재하고 있음이 밝혀진 바 있다(5). 본 실험에서는 혼성 PHA가 갖는 유연한 고무탄성체로서의 성질이 세 단위체가 모두 있을 경우에 나타나는 것인지 아니면 SCL-PHA에 기인하는지를 알아보기 위해 세 단위체가 모두 포함된 혼성 PHA (3HB, 3HV 및 3HHp의 함량이 각각 30, 50 및 20%로 구성)와 *n*-hexane으로 MCL-PHA 단위체가 제거된 poly(38% 3HB-co-62% 3HV)를 대상으로 몇가지 물리적 성질을 비교하였다 (Table 1). 혼성 PHA의 경우 poly(3HB-co-3HV)에 비하여 탄성률(modulus)이 훨씬 낮았는데, 이는 혼성 PHA의 강성도(stiffness)가 낮아서 보다 낮은 응력(stress)으로도 형태적 변형이 이루어질 수 있음을 의미한다. 그러나 두 고분자간의 최대 변형률(maximum % strain)은 740 및 810%로서 비슷한 수준을 보였다. 이것은 고무탄성체로서의 성질이 MCL-PHA 단위체의 혼합 여부에 관계없이 poly(3HB-co-3HV)에 의해 나타나고 있음을 보여준다. MCL-PHAs의 경우 녹는 온도가 비교적 낮고 (30~50°C) 유리 전이 온도(glass transition temperature)가 낮은 (-30~-40°C) 탄성체로서 결정성이 낮기 때문에(10,25), poly(3HHp)이 함유된 혼성 PHA가 보다 낮은 탄성률을 보이는 것은 충분히 예상할 수 있는 결과이다. 그러나 poly(3HB-co-3HV)가 고무탄성체와 같이 높은 변형율(신장율)을 지니고 있음은 매우 흥미로운 발견이다.

최근 일부의 미생물들이 단일기질로부터 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 생산할 수 있음이 밝혀진 바 있지만(13,24). 대부분의 미생물의 경우 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 생합성하기 위하여서는 3HV 단위체의 전구물질을 보조기질 (cosubstrate)로 요구하며 또한 보조기질의 농도에 비례하여 공중합체내 3HV 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 보조기질로 이용되는 propionic acid, valeric acid 등은 세포에 매우 toxic하여 미생물

**Table 1.** Comparisons of physical properties of a random copolymer of 38% 3HB and 62% 3HV (sample A) and a blend of 80% poly(3HB-co-62% 3HV) and 20% poly(3HHp) (sample B)

Sample <sup>a</sup>	Load at Max. Load (kgf)	Stress at Max. Load (kgf/mm <sup>2</sup> )	Load at Upper Yield (kgf)	Stress at Upper Yield (kgf/mm <sup>2</sup> )	Modulus (Aut Young) (kgf/mm <sup>2</sup> )	Maximum percent strain (%)
A	0.68 ± 0.11	1.47 ± 0.27	0.35 ± 0.02	0.76 ± 0.01	11.37 ± 0.84	740
B	1.07 ± 0.15	1.38 ± 0.17	0.41 ± 0.01	0.54 ± 0.02	3.88 ± 0.17	810

<sup>a</sup>Three replicates per PHA sample

의 성장에 영향을 주기 때문에(22,24), poly(3HB-co-3HV) 생산을 위해 사용할 수 있는 보조기질의 농도는 극히 제한될 수밖에 없으며, 이에 따라 one-stage 회분배양을 통하여 생합성될 수 있는 공중합체의 3HV 최대 함량도 보통 20 mol%를 크게 벗어나지 못하고 있다. 따라서 아직까지 3HV 함량이 높은 poly(3HB-co-3HV) 공중합체에 대한 연구는 매우 미진한 형편이다. 본 실험에서 확인된 poly(3HB-co-3HV)의 성질은 높은 3HV 함량과 관련이 있는 것으로 판단되고 있으나, *Ralstonia eutropha* 및 *Alcaligenes* sp. SH-69로부터 생산된 3HV 함량이 높은 poly(3HB-co-3HV)의 경우 다소 다른 성질을 보이는 것으로 나타남으로써 (미제시 자료), 3HV 함량 이외에도 composition distribution 등과 같은 고분자의 미세구조 (microstructure) 차이도 성질에 영향을 주는 주요 요인일 것으로 믿어진다(18).

**배양조건이 PHA 생산 및 단위체 조성에 미치는 영향**

Heptanoic acid를 탄소원으로 사용하여 *Pseudomonas* sp. HJ-2로부터 혼성 PHA를 생산하기 위한 발효조건을 조사하였다. 먼저 탄소원의 농도에 따른 균주의 성장 및 PHA 생성량은 Table 2에서와 같다. HJ-2 균주의 성장 및 PHA 생산을 위한 탄소원의 최적 농도는 40 mM이었으며, 30 mM 이하 농도의 heptanoic acid로부터는 PHA가 거의 생성되지 못하였다. 이는 mineral nutrients의 농도에 비하여 탄소원의 농도가 낮을 경우 PHA의 생합성을 위한 조건(특정 mineral nutrient의 고갈 등)이 갖추어지지 않았기 때문이라 생각된다(2). 그러나 50 mM 이상의 탄소원 농도는 세포의 독성효과로 인하여 생장이 크게 제한 받는 것으로 나타났으며, PHA 생성량도 저조하였다.

위의 실험으로부터 HJ-2 균주의 PHA 생합성을 위하여서는 특정 mineral nutrient의 결핍이 필요할 것으로 예상되었기 때문에 HJ-2로부터 PHA 생합성을 위한 제한요인(limiting factor)을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 0.5×E2 medium에서 배양된 HJ-2 균체를 각각 질소(N), 황(S), 인(P) 등이 결핍된 동일배지에 접종하고 24시간 배양한 후 생성된 PHA량을 비교하였다(Fig. 1). HJ-2의 경우 황은 PHA 생합성을 유도하는 제한요인이 아닌 반면에 질소 또는 인의 결핍은 PHA 생합성을 크게 증진시켰다. 특히 질소의 결핍시 PHA 생성량은 건체량의 40%에 달함으로써 가장 효과적이었으나, 균체의 생장이 크게 저해받는 것으로 나타났다. 따라서 HJ-2를 이용한 PHA의 생산을 위해서는 질소원이

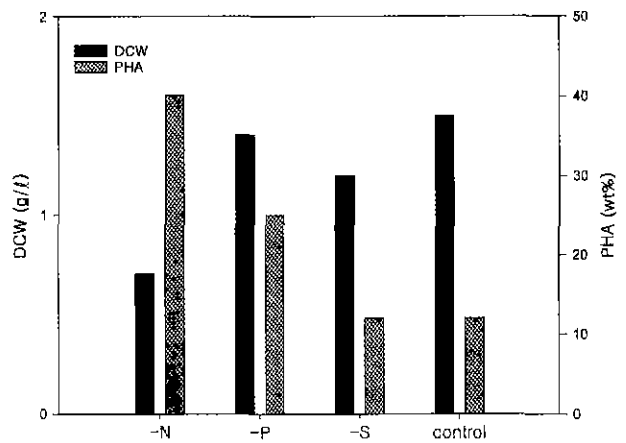
**Table 2.** Effect of heptanoic acid concentrations on the biosynthesis of PHA by *Pseudomonas* sp. HJ-2

Heptanoic acid (mM)	Culture time (hr)	DCW (g/l)	PHA (% DCW)	PHA composition (%) <sup>a</sup>		
				3HB	3HV	3HHp
10	7	0.55	ND <sup>b</sup>	-	-	-
20	8	0.84	ND	-	-	-
30	14	1.14	Tr <sup>c</sup>	-	-	-
40	15	1.68	24	16	50	34
50	20	1.18	12	23	56	21

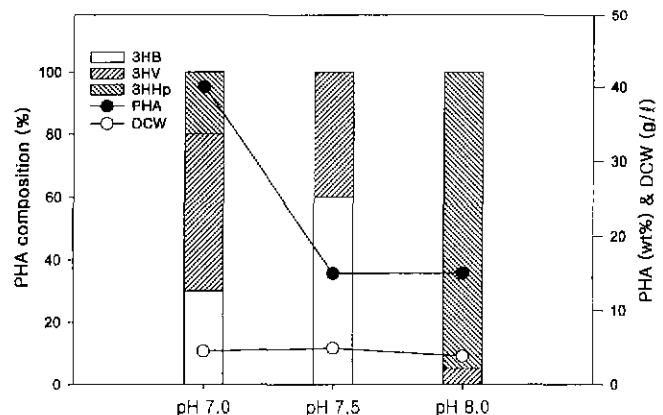
<sup>a</sup>GC area %. <sup>b</sup>Not detected. <sup>c</sup>Trace amounts.

첨가된 성장단계(growth phase)와 질소원이 결핍된 PHA 축적단계 (PHA accumulation phase)로 구성되는 2단계 배양(26)이 필요할 것으로 믿어진다. 탄소원인 heptanoic acid의 농도를 40 mM로 고정하고 질소원의 농도를 달리하여 회분배양을 수행한 결과, C/N ratio가 20일 경우 축적된 PHA의 양은 건체량의 35% 수준으로 가장 높았으며, C/N ratio에 따른 PHA 단위체 조성의 변화는 매우 미미하였다(미제시 자료)

HJ-2 균주의 성장을 위한 최적 배양온도는 35°C로 배양온도의 변화는 세포 성장에 영향을 주었을 뿐 PHA 단위체 조성에는 특별한 영향을 주지 않았다(미제시 자료). 이에 반하여 배양액의 pH는 PHA의 생성량 뿐 아니라 단위체의 조성에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 2). HJ-2는 6.5 이하의 pH에서는 생장도 저조하였고 PHA도 거의 축적하지 못하였다. 그러나 pH 7.0에서는 PHA 축적량이 건체량의 40%로 가장 높았으며, 이 때 생성된 PHA는 30% 3HB, 50% 3HV 및 20% 3HHp로 구성되었다. 이에 반하여 pH 7.5에서는 3HB (62%)와 3HV (38%) 단위체로만 구성된 SCL-PHA가 생합성되었고, pH 8.0에서는 거의 3HHp (95%) homopolymer가 생합성됨을 확인할 수 있었다. 수



**Fig. 1.** Effect of medium component deficiency on the biosynthesis of PHA by *Pseudomonas* sp. HJ-2.



**Fig. 2.** Effect of pH on the biosynthesis of PHA by *Pseudomonas* sp. HJ-2. Air flow rate was 1.0 vvm and agitation speed was 350 rpm.

차례의 반복실험을 통하여 확인된 이러한 현상은 매우 이해적이라 할 수 있는데, 현재로서는 그 기작을 충분히 설명하기 어렵다. 최근 Chung 등(6)은 *R. eutrophus*로부터 propionic acid를 탄소원으로 사용하여 poly(3HB-co-3HV)를 생산할 때, pH 6.5에서는 균의 성장과 PHA 생합성이 전혀 이루어지지 않았으나 pH를 7.0 또는 7.5로 높였을 때 propionic acid의 짝플립 기능(uncoupling role)이 최소화되어 세포의 성장 및 PHA 생합성이 증가될 수 있음을 보고하였는데, 본 실험에 사용한 heptanoic acid도 세포막의 지질 이중막에 쉽게 용해될 수 있는 지용성 탄소원인 만큼 이에 대한 추후의 실험이 요구되며, 이러한 특성 규명은 배양액의 pH 조절을 통하여 원하는 조성의 PHA를 생산하는데 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

배양액 내의 산소 공급은 균주의 성장과 PHA 생합성에 많은 영향을 주는 요인이다. 특히 호기성 미생물에서의 PHA 생합성은 최종 전자 수용체가 충분하지 못한 조건에서 환원력을 소모하기 위한 수단이 되므로, 일반적으로 제한된 산소 공급이 PHA 생합성에 유리하다(2,24). 이와 같은 통기(aeration)의 효과를 조사하기 위하여 배양액의 부피를 50, 100, 150, 200, 250, 300 ml로 달린 500 ml 삼각플라스크에서 HJ-2를 배양한 결과, 산소의 공급이 보다 원활한 조건에서 균의 성장과 PHA 생합성이 좋았다(미제시 자료). 또한 상대적으로 통기의 조건이 좋은 조건에서는 3HB와 3HV 이외에 3HHp 단위체가 생성되었으나 통기가 원활치 못한 조건에서는 3HHp 단위체가 나타나지 않았다. 본 실험에서는 산소 공급이 HJ-2의 PHA 생합성과 단위체 조성에 미치는 영향을 좀더 정확하게 알아보기 위해 발효조에서의 배양을 시도하였다. 발효조에서의 통기는 일반적으로 aeration rate이나 agitation speed의 조절 또는 발효조내에 압력을 걸어주어 산소가 좀 더 잘 녹을 수 있는 상황을 만들어주는 방법 등이 사용된다. 그러나 통기가 세포 성장 및 PHA 생성에 미치는 영향을 보다 일관성 있게 나타내 줄 수 있는 기준은 산소전달 속도이므로(20), 본 실험에서는 aeration rate 등 다른 조건은 일치시키고 단지 agitation speed를 250, 350 및 450 rpm으로 조절하여 산소 공급의 효과를 살펴보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 교반속도에 따라 생합성되는 고분자의 단위체 및 조성은 크게 달랐다. 앞서의 플라스크 실험과 마찬가지로 산소전달 속도가 낮을 때에는

3HHp 단위체가 나타나지 않았으나, 산소전달 속도가 높아지면서 PHA를 구성하는 3HHp 단위체의 함량이 증가되었고 PHA 생합성량도 상대적으로 높았다. PHA의 생합성이 통기가 극히 저조한 조건보다 다소 높은 조건에서 보다 활발히 이루어질 수 있는 많은 균주에서 확인되고 있다(23). 하지만 본 실험에서의 가장 특징적인 것은 HJ-2 균주가 생산하는 고분자의 구성 단위체가 pH 뿐만 아니라 통기에 의해서도 크게 달라지며, 특히 배양 조건에 따라 고분자를 구성하는 SCL-PHA 단위체와 MCL-PHA 단위체의 함성능이 다르게 나타난다는 점이다. 배양액 내 통기의 수준은 propionyl-CoA를 acetyl-CoA로의 decarboxylation이나  $\beta$ -oxidation 등과 같이 산소를 필요로 하는 반응에 영향을 줄 수 있기 때문에(17) PHA 단위체의 전구물질 형성과 그에 따른 PHA 조성을 결정하는데 매우 중요한 것으로 믿어진다. 또한 HJ-2 균주의 경우에는 서로 다른 환경조건에서 기능의 차이를 보이는 PHA 생합성 효소계를 가지고 있을 가능성도 배제할 수 없다. 실제로 본 실험실에서는 HJ-2의 PHA synthase 유전자의 클로닝을 통하여 이 균주가 2개의 PHA synthase 유전자를 가지고 있다는 단서를 확보하고 있다(미발표 자료).

지금까지의 미생물 배양조건에 대한 연구는 대부분 PHA 생합성에 초점을 맞추어 이루어졌다. 그러나 본 실험의 결과는 미생물의 배양조건이 PHA 생산은 물론 PHA를 구성하는 단위체의 조성에도 많은 영향을 주고 있음을 보여주었다. 따라서 배양조건과 PHA 조성간의 관련성에 대한 정확한 이해를 위해서는 이에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다(과제번호: HMP-98-E-3-0014).

## 참고문헌

1. Abe, H., Y. Doi, T. Fukushima, and H. Eya. 1994. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *Int. J. Biol. Macromol.* 16, 115-119.
2. Anderson, A. J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450-472
3. Braunegg, G., B. Sconleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29-37.
4. Caballero, K. P., S. F. Karel, and R. A. Register. 1995. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 86-92
5. Chung, C. W., Y. S. Kim, Y. B. Kim, K. S. Bae, and Y. H. Rhee. 1999. Isolation of a *Pseudomonas* sp. strain exhibiting unusual behavior of poly(3-hydroxyalkanoates) biosynthesis and characterization of synthesized polyesters. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 847-853.
6. Chung, Y. J., H. J. Cha, J. S. Yeo, and Y. J. Yoo. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using propionic

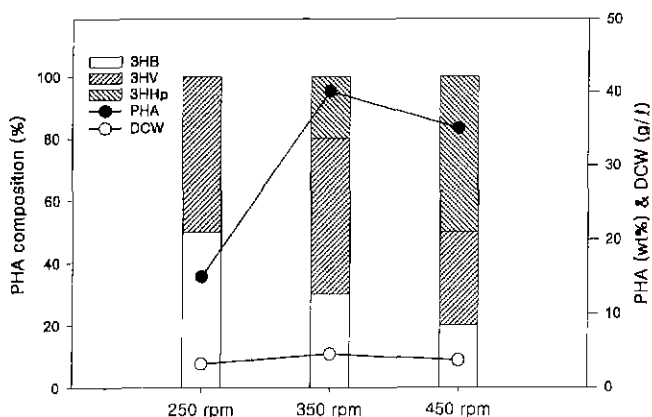


Fig. 3. Effect of agitation speed on the biosynthesis of PHA by *Pseudomonas* sp. HJ-2 in a 5 l jar fermentor.

- acid by pH regulation. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 492-495.
7. Doi, Y., S. Kitamura, and H. Abe. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) *Macromolecules* 28, 4822-4828.
  8. Eggink, G., P. de Waard, and G. N. Huijbert. 1995. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can. J. Microbiol.* 41(Supp.1), 14-21
  9. Fukui, T. and Y. Doi. 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 179, 4821-4830.
  10. Gagnon, K. D., R. W. Lenz, R. J. Farns, and R. C. Fuller. 1992. Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* 25, 3723-3728.
  11. Kato, M., H. J. Bao, C. K. Kang, T. Fukui, and Y. Doi. 1996. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 363-370.
  12. Kim, D. Y., Y. B. Kim, and Y. H. Rhee. 1998. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) bearing carbon-carbon triple bonds. *Macromolecules* 31, 4760-4763.
  13. Kim, G. J., K. Y. Yun, K. S. Bae, and Y. H. Rhee. 1992. Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp. SH-69 in batch culture. *Biotech. Lett.* 14, 27-32.
  14. Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2924-2932.
  15. Lee, E. Y., D. Jendrossek, A. Schirmer, C. Y. Choi, and A. Steinbuchel. 1995. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 901-909.
  16. Lee, S. H., D. H. Oh, W. S. Ahn, Y. Lee, J. H. Choi, and S. Y. Lee. 1999. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 240-244.
  17. Lefebvre, G., M. Rocher, and G. Brauneegg. 1997. Effect of low dissolved-oxygen concentrations on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 827-823.
  18. Madden, L. A., A. J. Anderson, and J. Astar. 1998. Synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) polymer mixtures produced in high-density fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*). *Macromolecules* 31, 5660-5667.
  19. Madison, L. L. and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53
  20. Park, C. H. 1998. Effect of oxygen transfer rate and dissolved oxygen on the production of PHBV by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(6), 529-536.
  21. Poirier, Y., C. Nawrath, and C. Somerville. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. *BioTechnology* 13, 142-150.
  22. Ramsay, B. A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, B. Batalle, and J. Ramsay. 1990. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric- $\beta$ - $\beta$ -hydroxyvaleric) acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2093-2099.
  23. Rhee, Y. H., J.-H. Jang, and P. L. Rogers, 1993. Production of copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. *Biotechnol. Lett.* 15, 377-382
  24. Steinbuchel, A. and Pieper, U. 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1-6.
  25. Witholt, B. and B. Kessler. 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 279-285.
  26. Yoon, J. S., J. Y. Kim, and Y. H. Rhee. 1995. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon source by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. *Microorg. Ind.* 21, 107-113.

(Received June 29, 2000/Accepted July 8, 2000)

---

**ABSTRACT: Production of Rubber-Elastic Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. HJ-2**

**Chung-Wook Chung, Gang-Guk Choi, Young-Baek Kim<sup>1</sup> and Young-Ha Rhee\***(Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea, <sup>1</sup>Department of Polymer Materials, PaiChai University, Taejeon 302-735, Korea)

*Pseudomonas* sp. HJ-2 is capable of producing a rubber-elastic polyhydroxyalkanoate (PHA) consisting of 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV), and 3-hydroxyheptanoate (3HHp) from heptanoic acid as the sole carbon source. The polyester produced was a blend of poly(3HB-co-3HV) and poly(3HHp). Although the mixing of poly(3HHp) fraction to poly(3HB-co-3HV) resulted in a decrease of modulus, the sole fraction of poly(3HB-co-3HV) with a high molar fraction of 3HV was shown to be an elastomer with the maximum percent strain of 740%. The biomass yield and the PHA synthesis were relatively high when the initial heptanoic acid concentration was 40 mM, and were significantly decreased when the substrate concentration exceeded 50 mM. The accumulation of PHA was stimulated by deficiency of nitrogen and phosphorus in the medium. The PHA contents and its monomeric compositions were greatly affected by pH and oxygen transfer rate. At pH 7.5, poly(3HB-co-38% 3HV) was produced from heptanoic acid and a mixture of 95% 3HHp and 5% 3HV was produced at pH 8.0. Increased content of 3HHp in the polyesters with the increasing oxygen transfer rate by agitation speed at a fixed aeration rate was observed.