

*Alcaligenes latus*와 *Comamonas acidovorans*의 균체성장 및 Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) 합성 특성

송재용 · † 김범수
충북대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2004. 8. 20., 게재승인 : 2004. 10. 14.)

Characteristics of Cell Growth and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Synthesis by *Alcaligenes latus* and *Comamonas acidovorans*

Jae Yong Song and Beom Soo Kim†
Department of Chemical Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
(Received : 2004. 8. 20., Accepted : 2004. 10. 14.)

Characteristics of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] synthesis was investigated through flask and batch cultures of *Alcaligenes latus* and *Comamonas acidovorans*. The specific growth rate of *C. acidovorans* increased with yeast extract concentration and decreased with 1,4-butanediol concentration. Optimum glucose concentration for growth of *C. acidovorans* was 20 g/L. In one-step flask cultures of *C. acidovorans*, final dry cell weight and PHA content decreased with the ratio of 1,4-butanediol to glucose, while the 4HB fraction in copolymers gradually increased to 100 mol% with an initial 1,4-butanediol concentration of 20 g/L as single carbon source. The specific growth rate of *A. latus* decreased with γ -butyrolactone concentration and optimum sucrose concentration for growth was 10 g/L. In batch cultures of *A. latus*, 4HB fraction increased with initial γ -butyrolactone concentration. P(3HB-co-4HB) with 19 mol% 4HB was obtained when the initial ratio of γ -butyrolactone (g/L) to sucrose (g/L) was 10 : 10.

Key Words : Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Alcaligenes latus*, *Comamonas acidovorans*

서론

Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)]는 1988년 *Ralstonia eutropha*에서 처음 발견되었다(1). P(3HB-co-4HB)는 4HB의 함량에 따라 딱딱한 결정성 플라스틱에서 탄성이 큰 고무에 이르기까지 다양한 물성을 나타내며(2), 다른 polyhydroxyalkanoates (PHA)에 비해 생체 내 가수분해 속도도 크고 4HB 함량에 따라 조절 가능한 것으로 알려져 있다(3). 따라서 P(3HB-co-4HB)는 의약 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 보이며(4), 한 예로 최근 양 모델에서 심장 판막의 조직공학에 성공적으로 적용된 바 있다(3).

다양한 단량체 조성의 P(3HB-co-4HB)는 각각 3HB와 4HB 단량체를 합성하는 두 개의 다른 탄소원으로부터 생산된다. 3HB 단량체를 합성하는데 널리 이용되는 탄소원으로는 glucose, fructose, sucrose, butyric acid 등이 있으며, 4HB 합성 탄소원에는 미생물의 종류에 따라 4-hydroxy butyric acid, γ -butyrolactone, 1,4-butanediol 등이 흔히 이용된다(5). 현재까지 *R. eutropha*(6) (*Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*(7), *Comamonas acidovorans*(5, 8), *Comamonas testosteronii*(9), *Hydrogenophaga pseudoflava*(10) 등 다섯 종류의 wild-type 세균이 P(3HB-co-4HB)를 합성함이 확인되었다. 재조합 대장균을 이용하여 glucose를 단일 탄소원으로 P(3HB-co-4HB)를 합성하였다는 보고도 있었다(11). 이 중 *A. latus*는 성장과 동시에 P(3HB-co-4HB)를 단시간에 축적하는 특성이 있으며, *C. acidovorans*는 P(4HB) homopolymer를 비롯한 높은 4HB 함량의 P(3HB-co-4HB)를 합성하는 특성이 있다.

P(3HB-co-4HB)의 의약 분야 활용에 대한 장점에도 불구하고 많은 양의 P(3HB-co-4HB) 생산을 위한 발효 연구는 아직까지 드문 실정이다. 현재까지 상업적으로 이용가능한

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Tel : +82-43-261-2372, Fax : +82-43-269-2370
E-mail : bskim@chungbuk.ac.kr

PHA는 P(3HB)와 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] 두 종류에 불과하다. P(3HB-co-4HB)의 의약 분야 활용 가능성을 검토하기 위해서는 다양한 단량체 조성의 P(3HB-co-4HB) 시료가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 P(3HB-co-4HB)를 실험실 규모에서 생산하기 위한 기초 실험으로서 *A. latus*와 *C. acidovorans* 두 균주의 균체성장 및 P(3HB-co-4HB) 합성 특성을 플라스크 및 발효조에서의 회분식 배양을 통해 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Comamonas acidovorans* KCCM 34722 (IFO 13582)와 *Alcaligenes latus* ATCC 29713 이었다.

배지 및 배양

접종용 균주의 배양은 *C. acidovorans*의 경우 peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L의 LB 배지에서 수행하였고, *A. latus*의 경우 (NH₄)₂SO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, 미량원소용액(12) 1 ml/L이 포함된 mineral medium에 탄소원으로 sucrose 10 g/L가 첨가된 배지에서 수행하였다. *C. acidovorans*의 플라스크 배양은 위의 mineral medium에 탄소원으로 glucose와 1,4-butanediol의 비를 변화시켜 첨가하여 수행하였다. 접종된 배지 50 ml를 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30℃에서 250 rpm으로 진탕 배양 하였다. 플라스크 배양에서 접종농도는 2% (v/v)로 하였으며, 발효조에서의 회분식 배양에서는 10% (v/v)로 하였다. *A. latus*의 회분식 배양은 mineral medium에 탄소원으로 sucrose 10 g/L와 γ -butyrolactone을 2~10 g/L 첨가하여 2.5 L 발효조 (코바이오텍)를 이용, 초기 배양액 부피 1 L, 1.0 vvm의 통기 조건에서 수행하였다. 배양 온도는 30℃, pH는 5 N NaOH 용액을 이용 6.8로 조절하였다.

분석 및 정제 방법

균체 성장 및 초기 비성장속도는 spectrophotometer를 이용, 600 nm에서 optical density (OD)를 측정하여 결정하였다. 건조 세포 농도 (dry cell weight)는 배양액 5~10 ml을 원심분리하여 진공건조 후 질량을 측정하였다.

배양액 내 sucrose의 농도는 DNS method(13)를 이용, 표준 검량선 범위 내로 희석하여 측정하였다. P(3HB-co-4HB) 농도 및 조성은 기체 크로마토그래피 법(14)으로 결정하였으며, benzoic acid를 internal standard로 사용하였다. P(3HB-co-4HB) 표준 시료는 아래와 같이 배양된 균체로부터 정제하여 제조 후 400 MHz ¹H NMR을 이용하여 조성을 결정하였다. 배양액을 원심분리하여 진공건조 후 균체 1 g당 chloroform 100 ml을 첨가하였다. 24 h 이상 교반하여 PHA를 용매 추출 후 세로 찌꺼기를 여과하여 제거하였다. 분리된 여액을 증발시켜 농축액을 만든 후 과량의 methanol에 침전된 PHA를 다시 여과하여 회수 후 건조시켰다.

결과 및 고찰

*C. acidovorans*의 균체성장 및 P(3HB-co-4HB) 합성 특성

C. acidovorans 균주의 경우 glucose만을 탄소원으로 이용한 제한배지에서 성장이 어렵고 yeast extract, peptone과 같은 영양분이 공급된 복합배지를 필요로 하였다. Fig. 1과 2는 20 g/L의 glucose가 첨가된 mineral medium에서 yeast extract의 농도를 0~5 g/L로 변화시키면서 시간에 따른 OD 값의 변화와 초기 비성장속도를 나타낸 결과이다. 실험결과 yeast extract 농도가 증가할수록 최종 OD 및 초기 비성장속도 모두 증가함을 나타냈으나, 증가 정도는 점점 감소하였다.

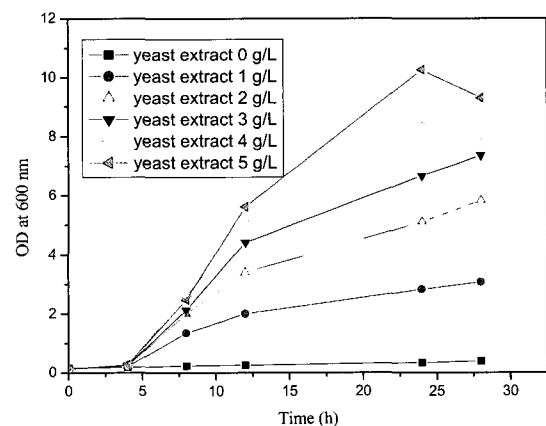


Figure 1. Effect of yeast extract concentration on the growth of *C. acidovorans* in flask cultures.

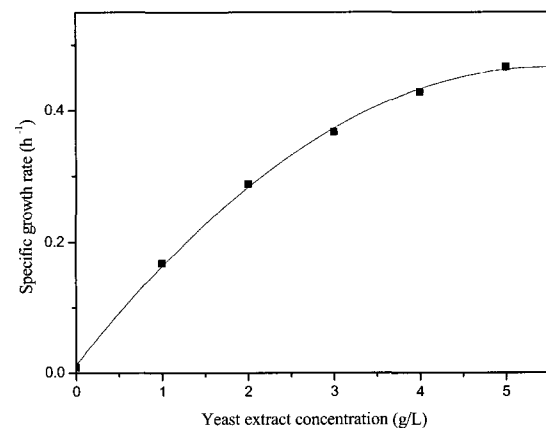


Figure 2. Effect of yeast extract concentration on the specific growth rate of *C. acidovorans* (glucose concentration = 20 g/L).

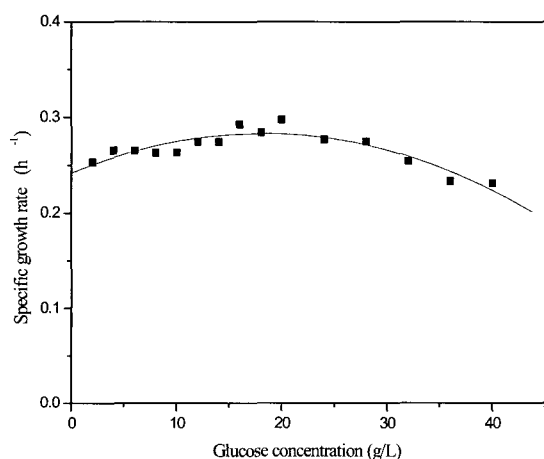
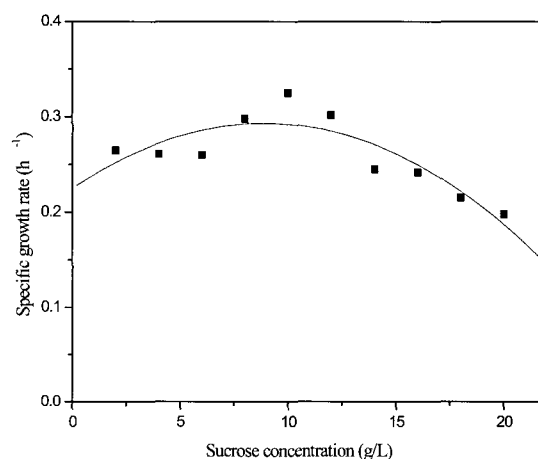
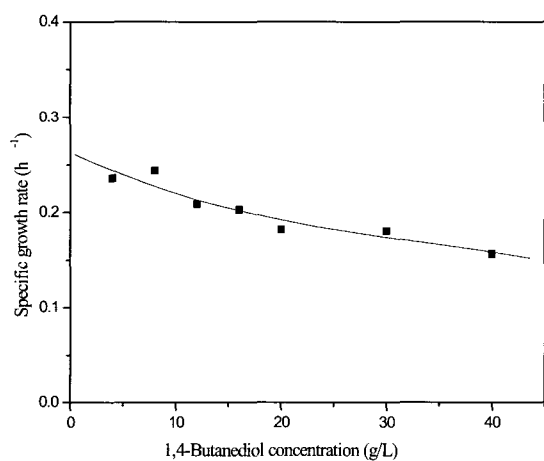
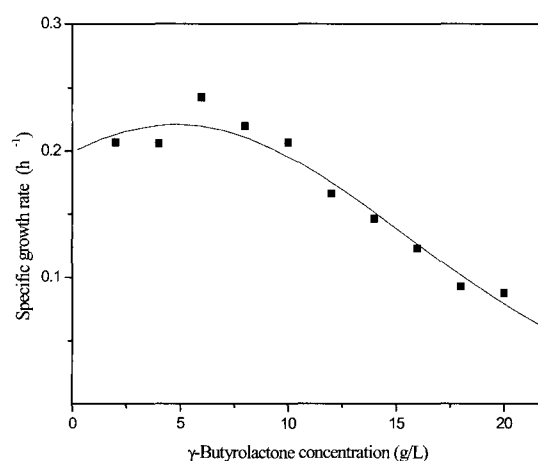
복합배지의 경제성을 고려하여 yeast extract 농도를 2 g/L로 고정하고 glucose와 1,4-butanediol 농도에 따른 초기 비성장속도의 영향을 알아보았다(Fig. 3, Fig. 4). Mineral medium 하에서 glucose만을 탄소원으로 공급시 20 g/L의 glucose 농도까지 비성장속도가 증가하다 그 이후 감소하였다. 최적의 비성장속도 값을 나타낸 20 g/L의 glucose 농도를 고정한 후 1,4-butanediol 농도의 변화에 따른 초기 비성장속도 측정 결과, 8 g/L 이후 서서히 기질 저해를 나타내었다.

Table 1. Production of P(3HB-co-4HB) from glucose and 1,4-butanediol by *C. acidovorans* for 96 h

Carbon source (g/L)		Dry cell weight (g/L)	Polyester content (wt%)	PHA Composition (mol%)	
Glucose	1,4-Butanediol			3HB	4HB
20	0	4.4	84	100	0
16	4	3.1	83	99	1
8	12	1.6	77	97	3
4	16	0.66	63	89	11
0	20	0.11	49	0	100

Table 2. Production of P(3HB-co-4HB) from sucrose and γ -butyrolactone by *A. latus*

Carbon source (g/L)		Culture time (h)	Dry cell weight (g/L)	PHA concentration (g/L)	Polyester content (%)	PHA Composition (mol%)	
Sucrose	γ -butyrolactone					3HB	4HB
10	2	40	5.1	4.2	81	95	5.1
10	6	40	5.8	4.6	79	91	9.4
10	8	42	7.3	5.9	81	88	12
10	10	40	6.5	5.5	84	81	19

**Figure 3.** Effect of glucose concentration on the specific growth rate of *C. acidovorans* (yeast extract concentration = 2 g/L).**Figure 5.** Effect of sucrose concentration on the specific growth rate of *A. latus*.**Figure 4.** Effect of 1,4-butanediol concentration on the specific growth rate of *C. acidovorans* (glucose concentration = 20 g/L, yeast extract concentration = 2 g/L).**Figure 6.** Effect of γ -butyrolactone concentration on the specific growth rate of *A. latus* (sucrose concentration = 10 g/L).

A. latus의 균체성장 및 P(3HB-co-4HB) 합성 특성

*A. latus*는 탄소원으로 sucrose를 이용하며, γ -butyrolactone 공급시 체내에 P(3HB-co-4HB) copolymer를 합성한다. 먼저 플라스크 배양을 통해 탄소원인 sucrose와 γ -butyrolactone 농도에 따른 비성장속도를 측정하였다(Fig. 5, Fig. 6). 실험 결과, 10 g/L의 sucrose 농도에서 최적의 비성장속도 값을 나타냈다. 다음으로 sucrose 농도를 10 g/L로 고정한 후 γ -butyrolactone 농도를 변화시켜 초기 비성장속도를 측정한 결과 10 g/L 이후 기질 저해를 보여 비성장속도 값이 크게 감소하였다. Fig. 6을 Fig. 4와 비교한 결과, *A. latus*의 γ -butyrolactone 성장저해 효과는 *C. acidovorans*의 1,4-butanediol에 대한 성장저해 효과보다 더 큼을 알 수 있었다.

위의 플라스크 배양 결과를 토대로 균체 성장에 최적인 10 g/L의 sucrose의 농도를 고정시키고 γ -butyrolactone 농도를 2~10 g/L까지 변화시키면서 2.5 L 발효조에서 회분식 배양을 수행한 결과를 Table 2에 정리하였다. Fig. 7과 8은

초기 sucrose (g/L) : γ -butyrolactone (g/L) 비가 각각 10 : 2 및 10 : 10일 때의 시간에 따른 균체, 3HB, 4HB 및 glucose 농도와 PHA 및 4HB 함량의 변화를 나타낸 것이다. 초기 γ -butyrolactone : sucrose 비가 증가할수록 4HB 함량은 5.1에서 19 mol%까지 증가하였으며, 균체농도는 5.1~7.3 g/L, PHA 농도는 4.2~5.9 g/L, PHA 함량은 79~84%의 범위를 보였다.

많은 세균들이 질소나 인과 같은 필수 영양소가 결핍될 때 PHA를 축적하는데 비해 *A. latus*는 영양소가 제한되지 않는 지수성장기에 상당량의 PHA를 축적하는 특성이 있다. Hiramitsu 등(7)은 *A. latus*의 성장 조건하에서 sucrose와 γ -butyrolactone으로부터 P(3HB-co-4HB)를 합성하였다. 이들의 결과에 의하면 sucrose를 단일 탄소원으로 이용했을 경우 48 h 후 58%의 P(3HB)를 포함하는 균체를 4.2 g/L 얻었으며, γ -butyrolactone : sucrose 비가 증가함에 따라 4HB 함량은 0에서 45 mol%까지 증가하였다. 또한 γ -butyrolactone을 단일 탄

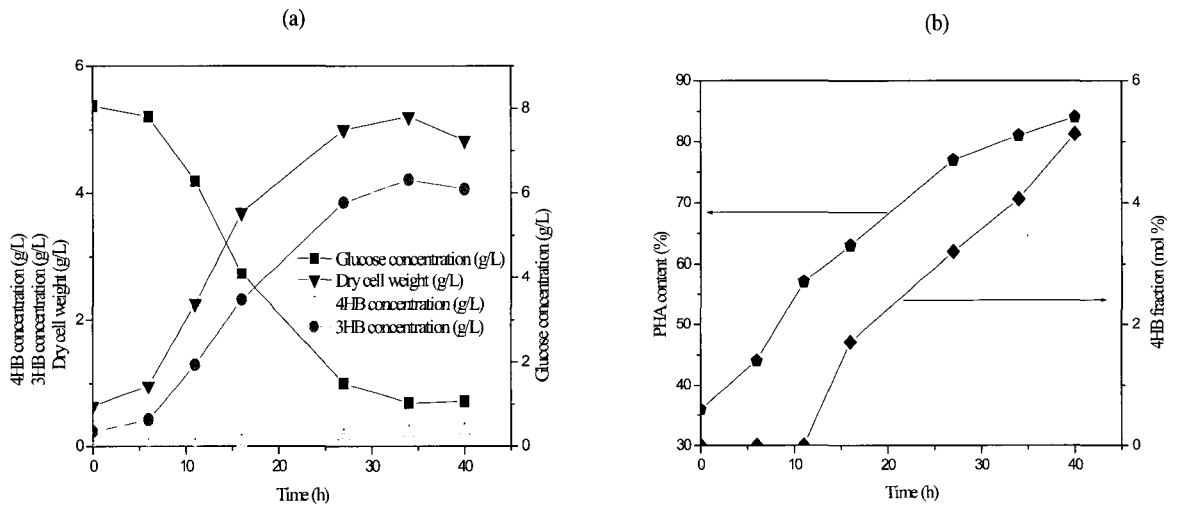


Figure 7. Batch culture of *A. latus* (sucrose : γ -butyrolactone = 10 g/L : 2 g/L).

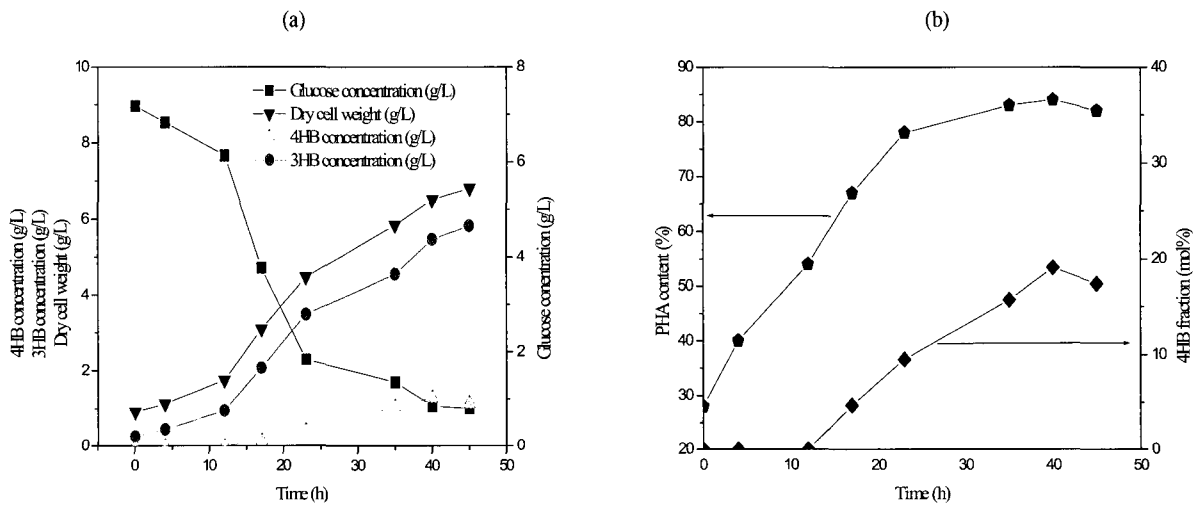


Figure 8. Batch culture of *A. latus* (sucrose : γ -butyrolactone = 10 g/L : 10 g/L).

소원으로 이용한 경우 균체는 성장하지 않았다. 이들은 *A. latus*가 *R. eutropha*에 비해 높은 4HB를 포함하는 P(3HB-co-4HB)를 축적하는 이유를 *C. acidovorans*와 마찬가지로 γ -butyrolactone으로부터 체내에서 생성된 4-hydroxybutyryl-CoA가 3HB 합성과 에너지 생성에 이용되는 acetyl-CoA로 잘 대사되지 않기 때문으로 보았다. Table 2의 실험결과를 이들의 결과와 비교하면 PHA 함량은 80% 내외로 이들의 결과보다 높았으나 4HB 함량은 최대 19 mol%로 이들의 결과보다 훨씬 낮았다. 그 이유는 사용한 균주의 차이에 기인한 것으로 보이며, 본 실험에 사용된 균주가 4-hydroxybutyryl-CoA로부터 acetyl-CoA로의 전환효율이 상대적으로 큰 특성을 가지고 있다고 할 수 있다.

이상과 같이 *A. latus*와 *C. acidovorans* 두 균주의 균체성장 및 P(3HB-co-4HB) 합성 특성을 플라스크 및 회분식 배양을 통해 알아보았으며, 본 결과는 향후 다양한 단량체 조성의 P(3HB-co-4HB)를 고농도로 생산하기 위한 유가식 배양의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

*Alcaligenes latus*와 *Comamonas acidovorans*의 플라스크 및 회분식 배양을 통하여 균체성장과 P(3HB-co-4HB) 합성 특성을 알아보았다. *C. acidovorans*의 비성장속도는 yeast extract 농도에 따라 증가하였고 1,4-butanediol 농도에 따라 감소하였으며, 최적 glucose 농도는 20 g/L였다. *C. acidovorans*의 1단 플라스크 배양에서 최종 균체농도 및 PHA 함량은 초기 1,4-butanediol : glucose의 비율이 증가함에 따라 감소하였으나 4HB 함량은 점점 증가하여 탄소원으로 1,4-butanediol 만을 20 g/L 공급하였을 경우 균체성장은 매우 낮았으나 100 mol%의 P(4HB) homopolymer를 얻을 수 있었다. *A. latus*의 비성장속도는 γ -butyrolactone 농도에 따라 감소하였으며, 최적 sucrose 농도는 10 g/L였다. *A. latus*의 회분식 배양에서 탄소원인 sucrose의 농도를 10 g/L로 고정하고 γ -butyrolactone의 농도를 2~10 g/L까지 변화하여 실험한 결과 γ -butyrolactone 농도가 증가할수록 4HB 함량 역시 증가함을 보였으며, 초기 γ -butyrolactone (g/L) : sucrose (g/L)의 비가 10 : 10일 때 19 mol%의 4HB를 포함하는 P(3HB-co-4HB)를 얻었다.

감 사

본 연구는 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

1. Kunioka, M., Y. Nakamura, and Y. Doi (1988), New bacterial copolyester produced from *Alcaligenes eutrophus* from organic acids, *Polym. Commun.* **29**, 174-176.
2. Saito, Y., S. Nakamura, M. Hiramitsu, and Y. Doi (1996), Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Polym. Int.* **39**, 169-174.
3. Martin, D. P. and S. F. Williams (2003), Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial, *Biochem. Eng. J.* **16**, 97-105.
4. Williams, S. F. and D. P. Martin (2002), Applications of PHAs in medicine and pharmacy, In *Biopolymers Polyesters III Vol. 4*, Y. Doi and A. Steinbüchel, Eds., p91, Wiley-VCH, Weinheim.
5. Lee, W-H., M. N. M. Azizan, and K. Sudesh (2004), Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*, *Polym. Degrad. Stab.* **84**, 129-134.
6. Nakamura, S., Y. Doi, and M. Scandola (1992), Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules* **25**, 4237-4241.
7. Hiramitsu, M., N. Koyama, and Y. Doi (1993), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*, *Biotechnol. Lett.* **15**, 461-464.
8. Saito, Y. and Y. Doi (1994), Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*, *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 99-104.
9. Renner, G., K. Pongraz and G. Brauneegg (1995), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Comamonas testosteronii* A3, *Food Technol. Biotechnol.* **34**, 91-95.
10. Choi, M. H., S. C. Yoon, and R. W. Lenz (1999), Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pседodoflava*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1570-1577.
11. Valentin, H. E. and D. Dennis (1997), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose, *J. Biotechnol.* **58**, 33-38.
12. Kim, B. S., S. C. Lee., S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 892-898.
13. Miller, G. L. (1958), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
14. Huijberts, G. N. M., H. van der Wal, C. Wilkinson, G. Eggink (1994), Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria, *Biotechnol. Tech.* **8**, 187-192.