

phbC 유전자가 도입된 형질전환 *Alcaligenes eutrophus*를 이용한 고분율 4-hydroxybutyrate 함유 P(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate)의 생산

강 명 신 · 정 영 미 · †이 용 현
경북대학교 자연과학대학 유전공학과
(접수 : 1999. 4. 28., 게재승인 : 1999. 8. 9.)

Cultivation of *Alcaligenes eutrophus* Transforming Cloned *phbC* Gene from *Alcaligenes latus* for Production of P(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) Containing High Molar Fraction of 4-Hydroxybutyrate

Myung-Shin Kang, Young-Mi Jung, and Yong-Hyun Lee†

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received : 1999. 4. 28., Accepted : 1999. 8. 9.)

A transformant *Alcaligenes eutrophus* GA5 harboring cloned *phbC* gene from *A. latus* was cultivated for production of Poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate)[P(3HB-4HB)] containing high molar fraction of 4-hydroxybutyrate(4HB). Transformation did not influenced significantly on total cell growth, concentration, and content of P(3HB-4HB), however, significantly influenced on 4HB molar fraction in P(3HB-4HB) increasing from 12.3 to 23.5 mol% after 48 h cultivation in two-stage using 1.0%(W/V) of γ -butyrolactone as a precursor compare to parent strain. Above increment may be due to the accelerated polymerization between 3HB and 4HB converted from precursor compound by amplified *phbC* gene. Citrate increased remarkably total cell mass and P(3HB-4HB) concentration, but did not influenced on the molar fraction of 4HB, meanwhile, magnesium ion influenced on P(3HB-4HB) concentration and 4HB molar fraction significantly. The two-stage cultivation method was modified, in such a way minimizing P(3HB) accumulated inside of cell grown at first-stage, consequently, 26.3% of P(3HB-4HB) containing 61.0 mol% of 4HB fraction was obtained after 72 hr. Furthermore, semi-homopolymeric P(4HB) containing 92.0 mol% of 4HB was obtained, and its structure was confirmed by ¹H-NMR.

Key Words : transformant *A. eutrophus*, cloned *phbC* gene of *A. latus*, P(3HB-4HB), molar fraction of 4HB, γ -butyrolactone, citrate, magnesium ion, modified two-stage cultivation, homopolymeric P(4HB)

서 론

Poly- β -hydroxybutyrate(PHB)는 생분해성, 내습성, 압전성, 그리고 생체 적합성 등 biopolymer로서의 독특한 특성을 갖고 있으나, 결정화도가 높아 강성도와 메짐성 등 면에서 단점을 갖고 있다. 따라서 2단계 배양을 통하여 propionate나 valerate와 같은 전구물질을 첨가하여 P(3-hydroxybutyrate-3-hydroxy-valerate)[P(3HB-3HV)]를 생산하거나(1) 또는 γ -butyrolactone이나 4-hydroxybutyrate를 첨가하여 P(3HB-4HB)를 생산하여 물성의 개선을 시도하고 있다(2).

공중합체인 P(3HB-4HB)는 3HB 사슬에 4HB가 불규칙적으

로 중합된 구조를 이루며, 4HB의 중합도에 따라 다양한 물성을 나타내며(3), 합성고분자인 polyethylene이나 polypropylene과 유사한 물리적 성질을 갖게되어, 사출, 성형, 연신이 가능하다. 또한 다른 천연 또는 합성고분자물질과 혼합할 경우 물리적 성질을 더욱 개선시킬 수 있게 된다.

Saito 등은(2,4) P(3HB-4HB)를 필름형태로 성형화하여 토양과 활성오니의 생분해 조건하에서 생분해속도를 측정하였으며, PHB depolymerase에 의한 P(3HB-4HB)의 분해속도가 PHB나 P(3HB-3HV)보다 빠르며, 또한 lipase에 의한 분해속도도 4HB 물분율이 증가할수록 비례적으로 증가함을 보고한 바 있다. 이로 미루어 4HB의 물분율은 물리적 성질에서 뿐만이 아니고 환경적인 측면에서도 유리한 특성을 갖고 있음을 알 수 있다.

P(3HB-4HB)의 생산은 주로 *Alcaligenes eutrophus*를 중심으로 2단계 배양을 통해 이루어져 왔다(4). 하지만 이들의 산업적 활용을 위해서는 배양시간의 단축, 4HB 물분율 증대, 전구물질에 의한 균체생육 저해 현상의 극복, 그리고 전구물질의 경제성 증대를 위한 노력이 요망된다. 이를 위해 Hiramitsu 등은(5)

† Corresponding Author : Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
Tel : 053-950-5384, Fax : 053-959-8314
e-mail : leeyh@bh.kyungpook.ac.kr

최근 *A. latus*를 이용하여 1단계 배양만으로 sucrose와 γ -butyrolactone의 혼합기질로부터 45.0 mol%의 4HB 함유 P(3HB-4HB)를 생산하였으며, *A. latus*의 P(3HB-4HB) 생합성능이 *A. eutrophus*보다 우수함을 제시한 바 있다.

본 연구실에서는 *A. eutrophus* 및 *A. latus*의 *phbCAB* 유전자를 독자적으로 분리 확보하고, 이를 *E. coli*-*A. eutrophus* shuttle vector에 재조합시킨 다양한 plasmid를 제조한 바 있다(6,7). 또한 상기 재조합 plasmid를 다시 모균주인 *A. eutrophus*-H16 및 PHB 생합성능 결함 변이주인 *A. eutrophus* DSM 541에 각각 형질전환시켜 형질전환균주들을 확보하였으며(8-10), 이들을 이용하여 PHB, P(3HB-3HV) 및 P(3HB-4HB)의 축적에 관한 연구를 수행한 바 있다(11-13).

A. latus 유래의 *phbC* 유전자는 *A. eutrophus* 유전자에 비교하여 *phbC* 유전자 산물인 PHB synthase의 효소적 특성으로 보아 높은 4HB 물분율을 가진 P(3HB-4HB) 생산에 유리할 것으로 예상된다.

본 연구의 목적은 *phbC* 유전자가 도입된 형질전환 *A. eutrophus*를 이용하여 4HB의 물분율이 높은 P(3HB-4HB)를 생산하기 위한 배양공학적 연구를 수행함에 있다. 이를 위하여 *A. latus* 유래의 *phbC* 유전자를 *A. eutrophus*에 형질전환시켜 PHB synthase 활성이 증폭된 형질전환균주를 확보하였으며, 이를 이용하여 고분율 4HB 함유 P(3HB-4HB)의 생합성을 유도하였다. 또한 γ -butyrolactone의 농도, citrate, 그리고 magnesium ion이 균체생육, P(3HB-4HB)농도, 그리고 4HB 물분율에 미치는 영향을 비교 검토하였다. 또한 2단계 배양시 전구물질인 γ -butyrolactone의 첨가시기를 늦춘 변형된 2단계 회분배양법을 활용하여 4HB 물분율 함량이 높은 P(3HB-4HB) 및 semi-homopolymeric P(4HB)의 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드

Glucose 이용 변이균주인 *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599를 모균주로 사용하였다. *A. latus* 유래의 *phbC* 유전자를 분리하고 이를 plasmid pSK(+)에 재조합시켜 플라스미드 pAL32를 제조한 후, 제한효소 *NotI*-*EcoRI*로 처리한 *phbC* 유전자 단편을 *E. coli*-*A. eutrophus* shuttle vector인 pKT230에 삽입하여 pKTC32를 재구성하였으며, 이를 *A. eutrophus* NCIMB 11599에 eletroporation으로 재도입시켜 형질전환균주 *A. eutrophus* GA5를 얻었으며, 이 과정은 Figure 1과 같다(8).

배지조성

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 (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L였다(13). 또한 P(3HB-4HB)의 축적을 위한 2단계 배양에는 최소배지를 사용하였으며, 그 조성은 Na₂HPO₄ 3.8 g/L, KH₂PO₄ 2.65 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, 그리고 MgSO₄ 2.0 g/L였다(14).

배양방법

모균주와 형질전환균주 *A. eutrophus* GA5의 균체생육을 위한 1단계 회분배양은 복합배지에서 30℃, pH 7.0에서 수행되었

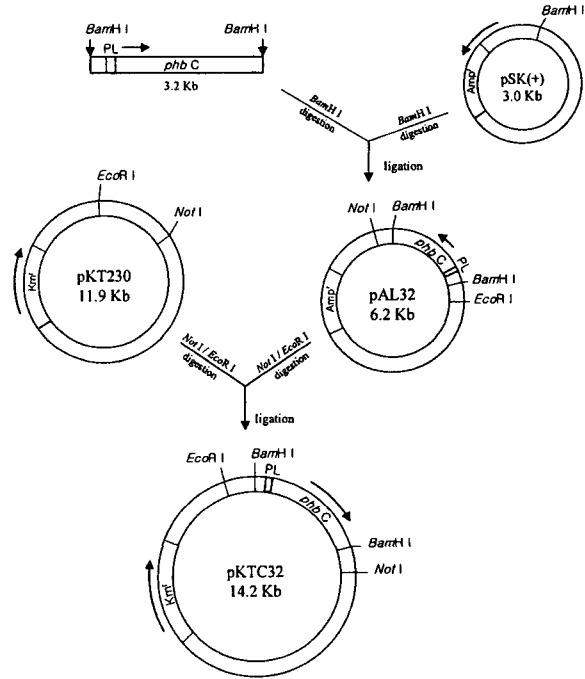


Figure 1. Schematic diagram for reconstruction of the recombinant plasmid pKTC 32.

다. 36시간 배양한 후 회수한 일정량의 균체를 전구물질로 γ -butyrolactone이 첨가된 최소배지에서 2단계 배양하여 P(3HB-4HB) 생합성을 유도하였다. 또한 2단계 배양시 citrate를 보충 첨가하거나 또는 MgSO₄의 농도를 변화시키면서 균체생육과 P(3HB-4HB) 생합성 특성에 미치는 영향을 검토하였다.

P(3HB-4HB)의 분리

균체를 5% sodium hypochlorite solution으로 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 용해시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 침전물을 증류수, 아세톤, 그리고 에탄올 순으로 세척하고, 원심분리, 건조한 후, 클로로포름에 용해한 후 증발시켜 P(3HB-4HB) 분말을 얻었다(11).

GC를 이용한 P(3HB-4HB)의 정량 및 분석

P(3HB-4HB)의 정량 및 단량체 조성은 분리한 P(3HB-4HB)를 methanolysis에 의해 methyl ester시킨 후 gas chromatography로 분석하였다. Methyl ester의 분석을 위해 사용된 column은 Carbowax 20M(Hwelett-Packard Co., Palo Alto, Calif.)였으며, 이동상인 N₂의 유속은 30 mL/min였고, 그리고 flame ionization detector로 검출하였다. 표준물질로는 β -hydroxybutyric acid(Sigma Co.)와 P(3HB-4HB)분말(Sigma Co.)을 사용하였다(11).

배지내의 γ -butyrolactone의 정량

배양액을 원심분리해 얻은 상등액 1.0 mL를 2.0%의 H₂SO₄가 포함된 acidified methanol 2.0 mL과 screw-cap tube에서 혼합시킨 후, heating block에서 3시간동안 100℃에서 methylation 시켰다. 상온으로 냉각시킨 후, 각각 1mL의 증류수와 고순도 dichloromethane을 첨가해 강하게 교반시킨 후 상온에서

정체시켜 유기용매층을 얻고, methylation된 γ -butyrolactone을 gas chromatography(Young-In Co. Ltd., GC-680A)로 분석하였다. Methyl ester의 분석을 위해 사용된 column은 Carbowax 20M(Hwelett-Packard Co., Palo Alto, Calif.)였으며, flame ionization detector로 검출하였다.

¹H-NMR을 이용한 P(3HB-4HB)의 조성 분석

P(3HB-4HB)의 조성은 300 MHz NMR spectrometer를 이용하여 분석하였다. 300 MHz ¹H-NMR은 Varian Unity Tnova 300 WB(Varian co., USA)를 사용하여 측정하였으며 5-s pulse(450), 2 pulse repetition, 4,499 Hz spectral width, 40 accumulations, 8 K data points의 조건하에서 27°C, CDC13 10.0 mg/ml의 용액에서 수행하였다. 표준물질로는 trimethylsilane(TMS)를 사용하였다.

결과 및 고찰

phbC 유전자의 형질전환이 균체생육에 미치는 영향

Figure 2는 *A. latus* 유래의 *phbC* gene이 도입이 균체생육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 모균주와 형질전환균주를 glucose 20.0 g/L와 (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L이 함유된 최소배지에서 60시간 배양하면서 총균체량과 총균체량에서 PHB 축적량을 뺀 순수균체량을 측정 비교한 결과이다. 배양 초기에는 형질전환균주와 모균주는 유사한 총균체량 증가 양상을 보였으나 질소원이 거의 소실되는 30시간 후부터는 형질전환균주의 총균체량 축적 속도가 빨라져 모균주보다 높은 값을 보였으며, 형질전환균주의 대수증식기에서의 총균체생장속도는 0.133 g/L/h로써 모균주의 0.108 g/L/h에 비하여 1.2배로 증가하였다.

반면, 총균체량에서 PHB 축적량을 뺀 순수균체량은 거의 유사한 수준을 유지하였는데, 이로 보아 총균체량의 증가는 균체 내에 생합성된 PHB에 기인함을 알 수 있었다. 이로 미루어 *A. latus*에서 분리한 *phbC* 유전자는 host cell인 *A. eutrophus*에서도 효과적으로 발현되며 또한 PHB는 물론 그 공중합체인 P(3HB-4HB)의 대량생산에 유용한 수단으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

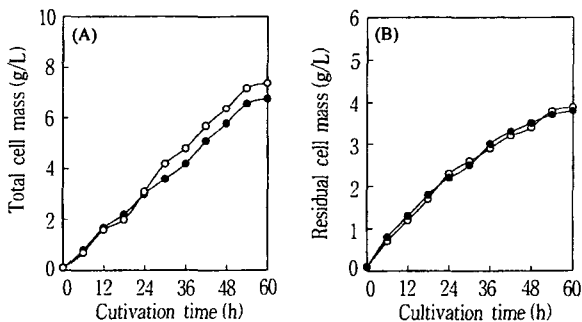


Figure 2. Comparison of total cell mass(A) and residual cell mass(B) between parent and transformant *A. eutrophus* GA5 harboring cloned *phbC* gene of *A. latus*. Cultivated in minimal medium containing 10.0 g/L of glucose and 2.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ for 60 h. (●); parent *A. eutrophus* NCIMB 11599, (○); transformant *A. eutrophus* GA5.

phbC 유전자의 형질전환이 P(3HB-4HB) 생합성에 미치는 영향

Figure 3은 *A. latus*의 *phbC* 유전자의 형질전환이 P(3HB-4HB) 생합성에 미치는 영향을 검토한 결과로서, 모균주와 형질전환균주를 각각 1단계 배양으로 복합배지에서 균체를 증식시킨 후 이를 전구물질인 γ -butyrolactone이 10.0 g/L 첨가된 최소배지에서 2단계 배양하여 P(3HB-4HB)의 생합성을 유도시킨 후 총균체량, 축적된 P(3HB-4HB)의 농도, 축적률, 그리고 4HB 물분율을 각각 비교하였다.

형질전환균주의 경우 최종 P(3HB-4HB) 농도와 축적률은 각각 1.87 g/L, 30.0%로서 모균주의 1.51 g/L, 27.2%에 비해 다소 향상되었다. 반면 P(3HB-4HB)내의 4HB의 물분율은 형질전환균주의 경우 23.5 mol%로 모균주의 12.3 mol%에 비해 현저히 증가하여, *phbC* 유전자의 증폭은 주로 물분율의 향상에 영향을 줄 수 있었다.

이와 같은 물분율의 증가는 증폭된 *phbC* 유전자 산물인 PHB synthase가 해당과정에서 유래되는 3-hydroxybutyryl-CoA와 전구물질로 첨가한 γ -butyrolactone에서 전환되는 4-hydroxybutyryl-CoA 사이의 중합반응을 촉진시키기 때문으로 사료된다. 이와 같은 경향은 *A. eutrophus* 유래의 *phbC* 유전자를 *A. eutrophus*에 재도입시켰을 경우에도 관찰된 바 있다(11).

형질전환균주의 P(3HB-4HB) 축적 및 4HB 물분율 증대를 위한 배양조건의 검토

γ -butyrolactone 농도의 영향 : Table 1은 γ -butyrolactone의 적정 첨가농도를 결정하기 위하여 농도를 5.0~25.0

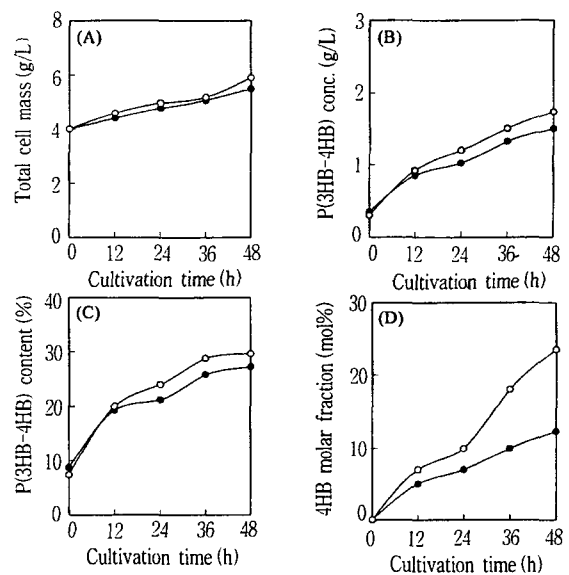


Figure 3. Comparison of total cell mass(A), P(3HB-4HB) concentration(B), content(C), and molar fraction of 4HB in P(3HB-4HB)(D) of parent and transformant *A. eutrophus* GA5. Cultivation: Two-stage cultivation, minimal medium, pH 7.0, and for 48 h. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in nitrogen-free medium containing 10.0 g/L of γ -butyrolactone at second stage. (●); parent *A. eutrophus* NCIMB 11599, (○); transformant *A. eutrophus* GA5.

g/L까지 변경하여 48시간 동안 2단계 배양 후 총균체량, P(3HB-4HB)농도 및 축적률, P(3HB-4HB)의 수율, 그리고 P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율을 나타낸 것이다. 총균체량은 10.0 g/L까지는 증가하였고, 그 후 거의 유사한 수준을 유지하였으며, 25.0 g/L에서는 다소 감소하는 경향을 보였는데, 이는 과량의 γ -butyrolactone이 기질저해를 일으켰기 때문으로 사료된다.

P(3HB-4HB) 농도, 축적률, 그리고 P(3HB-4HB)의 수율은 γ -butyrolactone의 농도가 10.0 g/L일 때 각각 1.08 g/L, 24.3%, 그리고 0.164로서 최대값을 보였으며, 그 이상에서는 오히려 감소하였다. 반면 4HB 물분율은 γ -butyrolactone 농도에 비례하여 증가하여 25.0 g/L일 때 30.0 mol%로서 최대값을 보였으며, 4HB 물분율은 전구물질의 농도와 밀접한 상관관계에 있음을 알 수 있었다. 이와같은 총균체량, P(3HB-4HB) 농도 및 축적률, 수율, 그리고 4HB 물분율을 고려할 때 최적 γ -butyrolactone 농도는 10.0 g/L 전후로 판단된다.

Magnesium sulfate의 영향 : *A. eutrophus* 유래의 *phbC* 유전자를 도입한 형질전환 *A. eutrophus*의 경우 Mg^{2+} 이온이 균체량과 P(3HB-3HV) 농도, 그리고 3HV 물분율에 아주 민감히 영향을 줌을 관찰한 바 있다(13). Table 2는 *A. latus* 유래의 *phbC* 유전자를 도입한 형질전환균주의 총균체량, P(3HB-4HB)농도 및 축적률, 그리고 4HB 물분율에 미치는 Mg^{2+} 이온의 영향을 검토하기 위하여 γ -butyrolactone이 10.0 g/L 첨가된 최소배지에서 $MgSO_4$ 의 농도를 0.0~0.2 g/L로 변화시키면서 48 시간동안 2단계 배양한 결과이다. 총균체량은 첨가농도에

비례적으로 증가를 한 반면 P(3HB-4HB) 농도 및 축적률은 0.1 g/L까지는 증가하였으나 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 총균체량의 증가는 Mg^{2+} 이온이 TCA 관련 효소의 보조인자로 작용하여 균체생육을 촉진하기 때문으로 사료된다. 반면 P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율은 $MgSO_4$ 의 농도와 반비례하는 양상을 보였다.

P(3HB-4HB) 농도, 축적률, 그리고 4HB 물분율등을 고려할 때 $MgSO_4$ 의 적정농도는 일반적으로 사용되고 있는 농도의 절반 수준인 0.1 g/L가 최적으로 판단되며, Mg^{2+} 이온에 의한 P(3HB-4HB) 생합성 조절기작 규명에 대한 연구가 요망된다.

Citrate 보충첨가의 영향 : PHB 생합성 관련효소중 acetyl-CoA reductase의 환원반응에 필요한 NAD(P)H는 PHB 및 관련 공중합체 생합성에 있어 중요한 제한 요소로 작용하므로, 이의 원활한 공급을 위하여 각종 중간 대사산물을 보충 첨가하는 배양법을 시도한 바 있다(15). 특히 TCA 회로중 NADH 생산효소인 isocitrate dehydrogenase의 기질인 citrate를 보충첨가할 경우 세포내 환원력의 증가가 예상되며 균체증식 및 P(3HB-4HB) 생합성에도 영향을 줄 것으로 예상된다(16,17). Table 3은 citrate 보충 첨가의 효과를 검토하기 위하여 2단계 배양시 10.0 g/L의 γ -butyrolactone이 첨가된 최소배지에 citrate의 농도를 0.0~0.1 g/L까지 변화시키면서 48시간 배양한 결과이다. P(3HB-4HB)의 농도와 축적률은 citrate의 농도가 0.04 g/L일 때 최대값인 1.51 g/L와 30.8%를 보여 첨가하지 않는 경우보다 1.31, 1.22 배로 증가하였다. 그러나 그 이상의 농

Table 1. Effect of γ -butyrolactone concentration on total cell mass, P(3HB-4HB) concentration, content, P(3HB-4HB) yield, and 4HB molar fraction of transformant *A. eutrophus* GA5.

γ -butyrolactone (g/L)	TCM ¹ (g/L)	P(3HB-4HB) (g/L)	content ² (%)	yield ³	4HB fraction (mol%)
5.0	3.75 ± 0.03	0.42 ± 0.02	11.3	0.121	12.0 ± 0.3
10.0	4.43 ± 0.02	1.08 ± 0.02	24.3	0.164	23.5 ± 0.2
15.0	4.21 ± 0.02	0.93 ± 0.02	22.1	0.152	26.4 ± 0.3
20.0	4.84 ± 0.03	0.74 ± 0.02	15.3	0.149	37.1 ± 0.3
25.0	4.04 ± 0.02	0.56 ± 0.03	13.9	0.137	32.2 ± 0.1

Cultivation: two-stage cultivation, cultivated in minimal medium, 100 μ g/mL of kanamycin, for 48 h at nutrient-rich medium at first-stage, and then recultivated in minimal medium containing 5.0~25.0 g/L of γ -butyrolactone at second stage. 1: Total cell mass(TCM), 2: [P(3HB-4HB)/TCM] × 100(content), 3: g of P(3HB-4HB)/ g of consumed γ -butyrolactone.

Table 2. Effect of $MgSO_4$ on total cell mass, P(3HB-4HB) concentration, and content, and 4HB molar fraction of transformant *A. eutrophus* GA5.

$MgSO_4$ (g/L)	TCM (g/L)	P(3HB-4HB) (g/L)	content (%)	4HB fraction (mol%)
0.05	3.92 ± 0.01	0.94 ± 0.02	24.0	33.3 ± 0.1
0.10	4.13 ± 0.03	1.08 ± 0.02	24.7	30.2 ± 0.2
0.20	4.45 ± 0.02	1.13 ± 0.01	25.4	26.2 ± 0.2
0.30	4.69 ± 0.02	0.90 ± 0.02	22.4	25.5 ± 0.1
0.40	4.74 ± 0.02	0.73 ± 0.02	20.3	22.6 ± 0.3

Cultivation: two-stage cultivation, cultivated in minimal medium, 100 μ g/mL of kanamycin, for 48 h at nutrient-rich medium at first-stage, and then recultivated in minimal medium containing 0.05~0.40 g/L of $MgSO_4$ at second stage.

Table 3. Effect of citrate on total cell mass, P(3HB-4HB) concentration, content, and 4HB molar fraction of transformant *A. eutrophus* GA5.

Citrate (g/L)	TCM (g/L)	P(3HB-4HB) (g/L)	content (%)	4HB fraction (mol%)
0.00	4.55 ± 0.02	1.15 ± 0.02	25.3	26.5 ± 0.1
0.02	4.78 ± 0.03	1.32 ± 0.02	27.6	27.6 ± 0.2
0.04	4.92 ± 0.03	1.51 ± 0.02	30.8	27.3 ± 0.2
0.06	5.07 ± 0.02	1.39 ± 0.02	27.5	28.2 ± 0.2
0.10	5.20 ± 0.02	1.20 ± 0.03	23.2	27.7 ± 0.2

Cultivation: two-stage cultivation, cultivated in minimal medium, 100 µg/mL of kanamycin, for 48 h at nutrient-rich medium at first-stage, and then recultivated in minimal medium containing 0.00~0.10 g/L of citrate at second stage.

도에서는 총균체량은 증가한 반면 P(3HB-4HB)의 농도와 축적률은 오히려 감소하였다. 이는 NADH가 일정수준 이상으로 공급될 때는 P(3HB-4HB)의 생합성보다는 순수균체의 생육에 이용되기 때문으로 사료된다. 반면, P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율은 citrate의 첨가에 의해 영향을 받지 않았다.

P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율 증대를 위한 변형된 2단계 배양

*A. eutrophus*를 이용한 P(3HB-4HB)의 생산에 있어서는 4HB의 물분율을 향상시키는 방법으로는 2단계 배양시 전구물질인 γ -butyrolactone, 4-hydroxybutyrate, 또는 1,4-butanediol 등을 고농도로 첨가하는 방법이 주로 사용되고 있으나, 일정농도 이상에서는 균체의 생육 저해가 유발되고 또한 고농도 전구물질 사용으로 인한 경제성의 문제로 한계가 있어, 전구물질의 농도를 높이지 않고 4HB 물분율을 향상시키기 위한 효율적인 배양방법의 모색이 요망된다.

모균주는 물론 형질전환균주를 배양할 때 4HB의 전구물질인 4-hydroxybutyryl-CoA는 P(3HB-4HB)로의 중합반응에 이용될 뿐만 아니라 소량은 acetyl-CoA로 전환되어 3HB의 합성축으로 사용되므로 P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율은 위의 3HB의 축적량에 따라 큰 영향을 받을 것으로 예상된다. 따라서 고분율의 4HB를 얻기 위해서는 2단계 배양을 위해 최후한 균체내에 축적되어 있는 P(3HB)의 양을 최소화 시킬 필요가 있다.

이를 위하여 2단계 배양 초기에 질소원만을 공급하여 1차 배양시 균체내에 축적된 P(3HB)를 acetyl-CoA로 전환시켜 균체 생육에 이용되도록 유도함으로써 P(3HB)의 농도를 최소화시켰다. 24 시간 경과 후 전구물질인 γ -butyrolactone 10.0 g/L를 일시에 첨가하여 P(3HB-4HB)의 생합성을 유도하였으며, 동시에 citrate를 보충 첨가하여 P(3HB-4HB) 축적률의 증대를 도모하였다. Figure 4는 이와 같은 변형된 2단계 배양법을 이용하여 형질전환균주를 72 시간 배양하면서 총균체량, P(3HB-4HB) 축적률, 그리고 4HB 물분율의 변화를 검토한 결과이다. 배양 초기 총균체량은 다소 감소하였는데 이는 축적된 P(3HB)가 소비된 데 따른 결과이며, 24 시간 후 γ -butyrolactone과 citrate가 첨가됨에 따라 다시 증가하여 일반적인 2단계 배양시와 유사한 수준으로 증가하였다.

P(3HB-4HB)의 최종 축적률은 26.3 %로서 처음부터 γ -butyrolactone과 citrate를 첨가한 일반적인 2단계 배양의 31.8%

에 비해 다소 낮은 값을 보였다. 그러나 4HB의 최종 물분율은 61.0 mol%로서 일반 배양의 30.2 mol%에 비해 현저히 향상되었으며, 변형된 2단계 배양법을 활용함으로써 4HB 물분율이 높은 공중합체를 얻을 수 있었다. 반면에 P(3HB-4HB)의 농도가 다소 감소하고 배양시간이 연장되는 단점이 있었으며 이를 보완할 배양 공학적 방법이 요구된다.

변형된 2단계 배양을 통한 homopolymeric P(4HB)의 생산 및 구조확인

위에서 관찰한 바와 같이 P(3HB-4HB)내의 4HB 물분율은 γ -butyrolactone의 농도와 밀접한 관계에 있어 고농도의 γ -

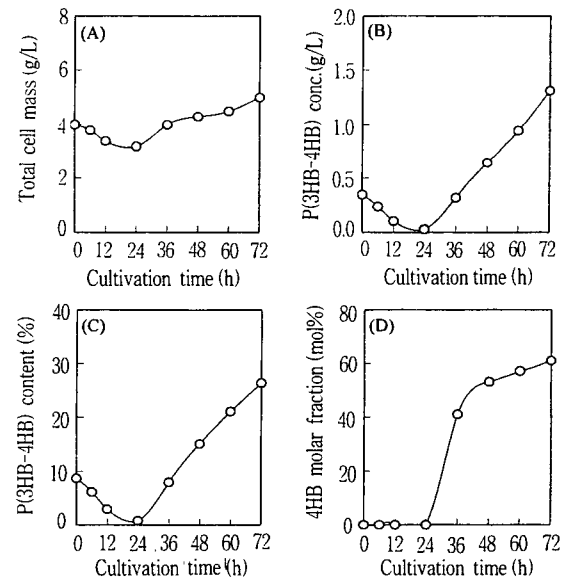


Figure 4. Changes of total cell mass(A), P(3HB-4HB) concentration(B), P(3HB-4HB) content(C), and molar fraction of 4HB in P(3HB-4HB)(D) during modified two-stage cultivation of transformant *A. eutrophus* GA5. Cultivation: Two-stage cultivation, minimal medium, pH 7.0, and for 48 h. Cultivated in nutrient-rich medium at first stage, and then recultivated in γ -butyrolactone-free medium containing 2.0 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for 24 h, thereafter, supplied 10.0 g/L of butyrolactone and 0.04 g/L of citrate, and then cultivated to 72 h at second stage.

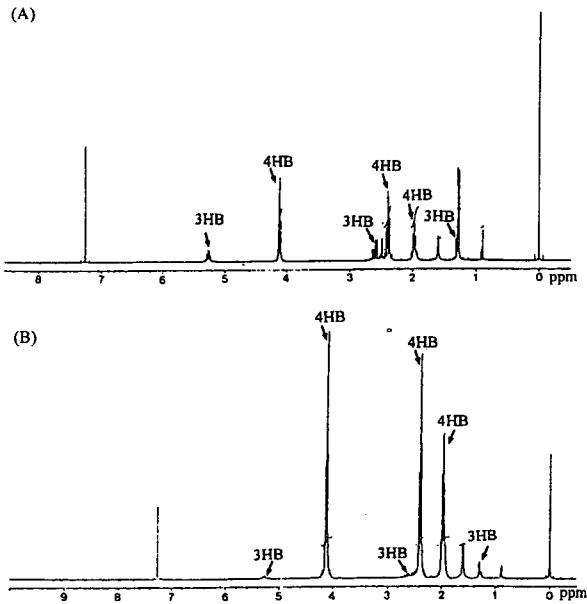


Figure 5. Comparison of $^1\text{H-NMR}$ spectrum of P(3HB-4HB) produced by parent(A) and transformant *A. eutrophus* GA5(B).

butyrolactone을 첨가하여 *phbC* 유전자가 도입된 형질전환 균주를 배양할 경우 4HB의 몰분율이 극대화된 homopolymeric P(4HB)의 생산이 가능할 것으로 예상된다.

Figure 5(A, B)는 변형된 2단계 배양법으로 전구물질인 γ -butyrolactone을 기질저해를 피할 수 있는 최고 농도인 2.0%를 첨가하여 배양 72시간후 모균주(A)와 형질전환균주(B)에서 얻어진 공중합체인 P(3HB-4HB)를 분리 정제하여 $^1\text{H-NMR}$ 로 구조를 확인 비교한 결과이다. 3HB의 $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ group에 해당하는 chemical shift를 보여주는 3개의 peak가 5.26, 2.62, 1.27 ppm에서 나타났으며, 4HB의 methylester 결합에 존재하는 $-\text{CH}_2$ group에 해당하는 peak가 1.95, 2.38 그리고 4.18 ppm에서 관찰되었다. 공중합체중의 3HB와 4HB 몰분율은 3HB와 4HB의 proton resonance peak 면적으로부터 얻었다.

4HB 몰분율은 모균주의 경우 58.0 mol%인 반면 형질전환균주는 92.0 mol%로 거의 homopolymer에 가까운 조성을 보였으며, 이는 gas chromatography를 통해 확인한 몰분율과도 일치하였다. 이때 총균체량, P(3HB-4HB) 농도, 그리고 축적율은 형질전환균주의 경우 각각 3.87 g/L, 0.83 g/L, 그리고 21.5%로 γ -butyrolactone을 1.0% 사용하였을 때보다 다소 저하된 수준을 보였으나, 생산된 homopolymer는 P(3HB-4HB)에 비해 탄력성과 강도가 뛰어나 합성고무와 유사한 물성을 보였다. 이로 미루어 *phbC* 유전자의 형질전환은 homopolymeric P(4HB) 생산에도 유리한 수단이 된다는 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

Alcaligenes latus 유래의 *phbC* 유전자를 *A. eutrophus*에 재도입시킨 형질전환균주를 이용하여 높은 4HB 몰분율을 갖는 P(3HB-4HB)의 고농도 생산을 시도하였다. 형질전환균주는 총

균체량, P(3HB-4HB) 농도, 그리고 축적물에서 모균주에 비해 다소 증가한 반면 P(3HB-4HB)내의 4HB 몰분율은 23.5 mol%로 모균주의 12.3 mol%에 비해 현저히 증가하였다. 이는 *phbC* 유전자의 증폭으로 인해 해당과정에서 생성된 3HB와 전구물질인 γ -butyrolactone에서 전환된 4HB의 중합반응이 촉진되기 때문으로 사료된다. 또한 γ -butyrolactone의 농도, Mg^{2+} 이온, 그리고 citrate 첨가량이 P(3HB-4HB)의 농도, 축적물, 그리고 4HB 몰분율에 미치는 영향을 검토하였다. P(3HB-4HB)내의 4HB 몰분율을 증대시키기 위하여 일반적으로 사용되는 2단계 배양법을 변형시켜 γ -butyrolactone과 citrate의 첨가시기를 늦춘 2단계 배양법을 활용하여 P(3HB-4HB)내의 4HB 몰분율을 61.0 mol%로 증가시킬 수 있었다. 또한 γ -butyrolactone의 첨가량을 조절하여 P(3HB-4HB)내의 4HB 몰분율이 92.0 mol%에 이르는 homopolymeric P(4HB)를 생산할 수 있었으며, 그 구조를 $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 확인하였다.

감 사

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

참 고 문 헌

1. Kunioka, M. and Y. Doi (1990), Thermal degradation of microbial copolyester: poly (3-hydroxy-butyrates-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules* **23**, 1933-1936.
2. Kunioka, M., Y. Kawaguchi, and Y. Doi (1989), Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. biotechnol.* **30**, 569-573.
3. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nagamura, and K. Soga (1988), Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. *Macromolecules* **21**, 2722-2727.
4. 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.
5. Hiramitsu, M., N. Koyama, and Y. Doi (1993), Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. *Biotechnol. lett.* **15**, 461-464.
6. Kim, G.T., J.S. Park, H.C. Park, Y.H. Lee, and T.L. Huh (1988), Construction of the recombinant *phbCAB* operon of *Alcaligenes eutrophus* for accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 221-228.
7. Park, H.C., J.S. Park, Y.H. Lee, and T.L. Huh (1995), Manipulation of the genes for poly- β -hydroxybutyric acid synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **17**, 729-734.
8. Park, H.C., K.J. Lim, J.S. Park, Y.H. Lee, and T.L. Huh

- (1995), High frequency transformation of *Alcaligenes eutrophus* producing poly- β -hydroxybutyric acid by electroporation. *Biotechnol. Tech* **9**, 31-34.
9. Park, J.S., H.C. Park, T.L. Huh, and Y.H. Lee (1995), Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformant harbouring cloned *phbCAB* genes. *Biotechnol. Lett.* **17**, 735-740.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Park, J.S., T.L. Huh, and Y.H. Lee (1997), Characteristics of cell growth and Poly-hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned *phbCAB* genes. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 85-90.
 13. Kwon, S.I., Y.M. Jung, and Y. H. Lee(1998) 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., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 537-544.
 14. Park, J.S. and Y.H. Lee (1996), Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly- β -hydroxybutyrate production., *J. Ferment Bioeng.* **81**,197-205.
 15. Lee, S. Y., Y. K. Lee, and H.N. Chang (1995), Stimulatory effect of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli*., *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 177-180.
 16. Lee, Y.H., T.W. Kim, J.S. Park, and T.L. Huh (1996), Effect of the supplementation of metabolites on cell growth and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes latus*., *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 120-127.
 17. Kim, T.W., J.S. Park, and Y.H. Lee (1996), Enzymatic characteristics of biosynthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyrate of *Alcaligenes latus*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 425-431.