

식물성 오일로부터 *Ralstonia eutropha*의 polyhydroxyalkanoates 합성 특성

박대후 · 김범수*

충북대학교 공과대학 화학공학과 산업과학기술연구소

Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Synthesis by *Ralstonia eutropha* from Vegetable Oils

Dae Hoo Park and Beom Soo Kim*

Department of Chemical Engineering and Research Institute of Industrial Science and Technology,
College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract Six strains of *Ralstonia eutropha* were grown to investigate characteristics of polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis from vegetable oils or glycerol. Poly(3-hydroxybutyrate) homopolymer was formed using soybean oil, olive oil, or glycerol as carbon source, while poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) or poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers were synthesized by co-feeding γ -butyrolactone or pentanoic acid, respectively. Optimum strain was determined as *R. eutropha* KCTC 2662 in terms of final cell concentration and PHA content. From 20 g/L of soybean oil (optimum substrate), cell concentration and PHA content at 72 h ranged 1.7~9.2 g/L and 70~92 wt%, respectively.

Keywords: polyhydroxyalkanoates (PHA), *Ralstonia eutropha*, vegetable oil, glycerol

서 론

Polyhydroxyalkanoates (PHA)는 N, P, S, Mg, O₂ 등의 영양소가 제한된 성장 조건 하에서 여러 종류의 미생물들에 의해 세포 내 탄소와 에너지 저장 물질의 형태로 축적되는 생분해성 고분자이다. PHA는 가수분해나 효소에 의해 분해되기 때문에 농업, 해양, 의약 등 다양한 분야의 적용에 있어서 환경적으로 분해 가능한 열가소성 물질로써 많은 관심을 불러 일으키고 있으며 상업적 관심의 초점이 되고 있다 [1].

PHA 중 가장 단순한 형태인 poly(3-hydroxybutyrate) homopolymer는 부식되기 쉽고 가공성이 용이하지 않아 이를 보다 유연하게 만든 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] 및 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] copolymer가

propionic acid, pentanoic acid, γ -butyrolactone 등의 기질을 함께 공급하여 합성되었다. 특히 P(3HB-co-4HB)는 4HB의 함량에 따라 딱딱한 결정성 플라스틱에서 탄성이 큰 고무에 이르기까지 다양한 물성을 나타내며 [2], 다른 PHA에 비해 생체 내 가수분해 속도도 크고 4HB 함량에 따라 조절 가능하며 의약분야 소재로서의 활용이 기대되고 있다 [3].

식물성 오일은 값싸고 풍부하며 대량생산 가능한 대표적인 천연자원으로 이를 어떻게 유용한 고부가가치 제품으로 만드는지에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 미생물 배양시 탄소원으로 식물성 오일을 사용할 경우 식물성 오일 내의 높은 탄소 함량 때문에 높은 수율을 얻을 수 있음이 보고되고 있다 [4]. 식물성 오일은 다른 원료물질들에 비해 비교적 저가의 물질로 미생물 산업분야에서 매력적인 원료로 부각되고 있다. 식물성 오일의 주성분인 oleic acid와 linoleic acid와 같은 불포화 지방산의 함량은 soybean oil의 경우 각각 22%와 55%, olive oil의 경우 78%와 7%에 달한다 [5,6]. 또한 이론적으로 식물성 오일을 사용하였을 경우 약 1.0 g-PHA per g-vegetable oil의 수율 [4]을 얻을 수

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2372, Fax: +82-43-269-2370

e-mail: bskim@chungbuk.ac.kr

있다고 보고되어 있으며, 이는 glucose를 사용하였을 경우 0.48 g-PHA per g-glucose [7]와 비교하였을 때 두 배 이상에 달한다.

Ralstonia eutropha (*Cupriavidus necato*)는 성장이 용이하고 균체내 PHA 축적율이 높아 PHA 합성에 관해 가장 많이 연구되어 온 균주로서 본 연구진은 glucose 또는 fructose를 주요 기질로 *R. eutropha*의 고농도 유가식 배양을 통해 최대 약 200 g/L의 균체농도 및 80 wt%의 PHA 함량을 얻은 바 있다 [8-12]. 본 연구에서는 비교적 저가이고 높은 수율을 얻을 수 있는 식물성 오일 또는 바이오디젤 제조 공정의 부산물인 glycerol을 탄소원으로 이용하여 *R. eutropha* 여섯 균주를 배양하여 최종 균체농도 및 PHA 함량 면에서 최적 균주를 결정하였다. 또한 식물성 오일에 γ -butyrolactone 또는 pentanoic acid를 첨가하여 이용하여 P(3HB) homopolymer 외에 P(3HB-co-4HB) 및 P(3HB-co-3HV) copolymer의 합성 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 여섯 종류의 *R. eutropha* (*C. necato*)는 다음과 같다. KCTC 22469 (ATCC 17699, KCCM 11972, DSM 428), KCTC 2657 (DSM 416), KCTC 2658 (DSM 418), KCTC 2659 (DSM 422), KCTC 2662 (DSM 530), KCTC 2649 (NCIMB 11599).

접종용 균주의 배양은 peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L의 LB 배지에서 선 배양 후 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 가 포함된 mineral medium에 미량원소용액 1 mL/L와 soybean oil 20 g/L가 첨가된 배지에 옮겨 접종하였다. 미량원소용액의 조성은 다음과 같다.

H_3BO_3 0.3 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{-}5\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L

위 조성의 배지 50 mL를 250 mL 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 250 rpm으로 72 h 동안 진탕 배양하였다. P(3HB-co-4HB) 및 P(3HB-co-3HV) 합성을 위해 24 h 배양 후 5 g/L의 γ -butyrolactone과 3 g/L의 pentanoic acid를 각각 첨가하였다.

분석 방법

건조 세포 농도 (dry cell weight)는 배양액 5-10 mL을 원심분리 후 동결건조하여 질량을 측정하였다. 배양액 내 soybean oil의 농도와 P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB) 조성은 기체 크로마토그래피 법 (GC 6890N, Agilent, Inc., HP-5 column, 30 m \times 320 μm \times 0.25 μm)으로 결정하

였으며, margaric acid와 benzoic acid를 각각 internal standard로 사용하였다. GC 측정을 위한 시료의 전처리는 시료 10~20 mg에 methanol : H_2SO_4 : internal standard (850 : 150 : 2 g)의 비율로 만든 용액 2 mL와 chloroform 2 mL를 각각 첨가 후 100°C에서 5시간 반응 후 냉각한 뒤 증류수 1 mL를 첨가한 후 교반하여 충분히 된 아래층을 injection 하여 사용하였다. GC의 조작 조건은 다음과 같다.

Injection volume = 1 μL , Initial column temperature = 60°C for 5 min, Temperature rising rate = 4°C/min, Final column temperature = 180°C for 5 min, Carrier gas flow rate = 20 mL/min, Temperature of injection port = 230°C, Temperature of detection port = 280°C

P(3HB-co-3HV) 및 P(3HB-co-4HB) 표준 시료는 아래와 같이 배양된 균체로부터 정제하여 제조 후 400 MHz ^1H NMR을 이용하여 조성을 결정하였다. 배양액을 원심분리하여 동결건조 후 균체 1 g 당 chloroform 100 mL를 첨가하였다. 24 h 이상 교반하여 PHA를 용매 추출 후 세포 찌꺼기를 여과하여 제거하였다. 분리된 여액을 증발시켜 농축액을 만든 후 과량의 methanol에 침전된 PHA를 다시 여과하여 회수 후 건조시켰다.

결과 및 고찰

*R. eutropha*의 P(3HB) 합성 특성

*R. eutropha*는 단일 탄소원으로 식물성 오일 또는 glycerol을 공급시 P(3HB) homopolymer를 합성하였다. 먼저 플라스크 배양을 통해 여섯 종류의 *R. eutropha* 각각의 P(3HB) 축적에 관하여 측정하였다 (Fig. 1). 탄소원 20 g/L를 첨가하여 실험한 결과, soybean oil을 기질로 사용한 경우 균체농도는 0.42~9.2 g/L, PHA 함량은 63~93 wt%, olive oil을 사용한 경우 균체농도는 0.43~7.1 g/L, PHA 함량은 54~81 wt%, glycerol을 사용한 경우 균체농도는 0.38~2.0 g/L, PHA 함량은 30~43 wt%의 P(3HB) homopolymer를 합성하였다. Glycerol을 기질로 사용하였을 경우 균체의 성장이나 PHA 함량 면에서 soybean oil 또는 olive oil을 사용하였을 경우와 비교하여 보면 효율적이지 못한 것을 알 수 있었고, KCTC 2657 및 2649의 경우 모든 탄소원에서 P(3HB)를 합성하지 못하는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 P(3HB) 합성의 최적 기질 및 균주는 soybean oil 및 KCTC 2662였으며, 약 90 wt%의 P(3HB)를 포함하는 9 g/L의 균체농도를 얻을 수 있었다.

*R. eutropha*의 P(3HB-co-4HB) 합성 특성

위의 P(3HB)의 실험과 동일하게 플라스크 배양을 통해 여섯 종류의 *R. eutropha* 각각의 P(3HB-co-4HB) 축적에 관하여 측정하였다 (Fig. 2, Table 1). 식물성 오일 또는 glycerol 20 g/L에 γ -butyrolactone 5 g/L를 첨가하여 실험

한 결과, soybean oil을 기질로 사용한 경우 균체농도는 0.51~6.5 g/L, PHA 함량은 55~78 wt%, olive oil을 사용한 경우 균체농도는 0.8~7.0 g/L, PHA 함량은 43~77 wt%, glycerol을 사용한 경우 균체농도는 0.78~2.5 g/L, PHA 함량은 17~28 wt%의 P(3HB-co-4HB) copolymer를 합성하였다. P(3HB) homopolymer 실험 시와 동일하게 glycerol을 기질로 사용하였을 경우 균체의 성장이나 PHA 함량이 soybean oil 또는 olive oil을 사용하였을 경우와 비교하여 보면 효율적이지 못한 것을 알 수 있었고, KCTC 2657 및 2649의 경우도 동일하게 모든 탄소원에서 P(3HB-co-4HB)를 합성하지 못하는 것을 알 수 있었다. 실험 결과 우수한 P(3HB-co-4HB) 합성 특성을 보인 균주는 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2658 및 2659, soybean oil을 이용한 경우 KCTC 22469, soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2662 등으로 약 70~80 wt%의 P(3HB-co-4HB)를 포함하는 6~7 g/L의 균체농도를 얻을 수 있었다. 합성된 P(3HB-co-4HB) 중의 4HB 조성은 soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 0.6~2.7 mol%였으며, glycerol을 이용한 경우 5.9~13 mol%로 상대적으로 높은 4HB 함량을 나타냈다. 이는 glycerol의 P(3HB)로의 전환효율이 낮기 때문으로 보인다.

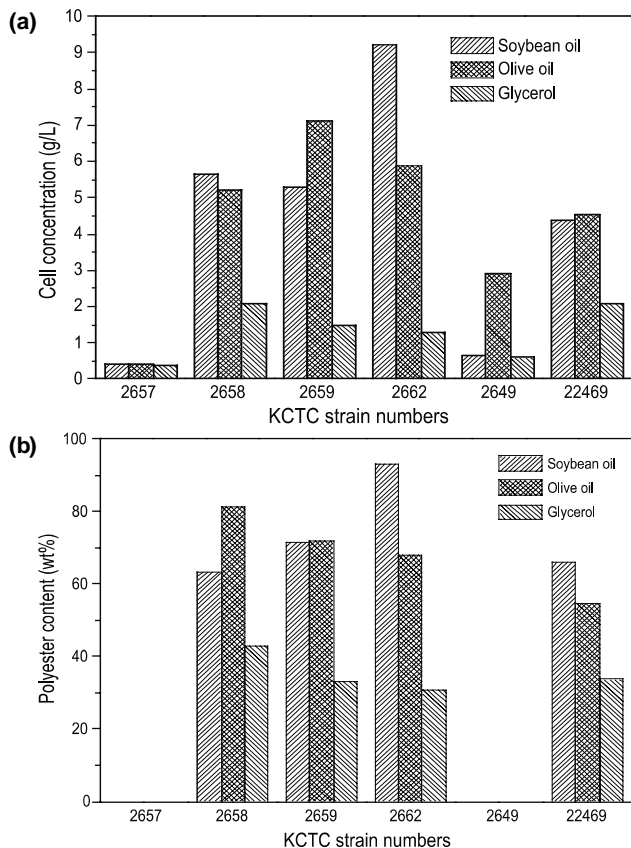


Fig. 1. Production of P(3HB) from vegetable oil or glycerol by *R. eutropha* (vegetable oil or glycerol concentration = 20 g/L). (a) Dry cell weight. (b) PHA content.

Table 1. Composition of P(3HB-co-4HB) synthesized after 72 h by various *R. eutropha* strains from vegetable oil or glycerol (vegetable oil or glycerol concentration = 20 g/L, γ -butyrolactone concentration = 5 g/L)

	Carbon source	Soybean oil	Olive oil	PHA Composition (mol%)			
				KCTC strain numbers			
				3HB	4HB	3HB	4HB
<i>Ralstonia eutropha</i>	2657	-	-	-	-	-	-
	2658	99.4	0.6	97.7	2.3	94.1	5.9
	2659	98.3	1.7	98.4	1.5	86.8	13.2
	2662	98.4	1.6	98.9	1.1	87.8	12.2
	2649	-	-	-	-	-	-
	22469	99.1	0.9	97.3	2.7	91.2	8.7

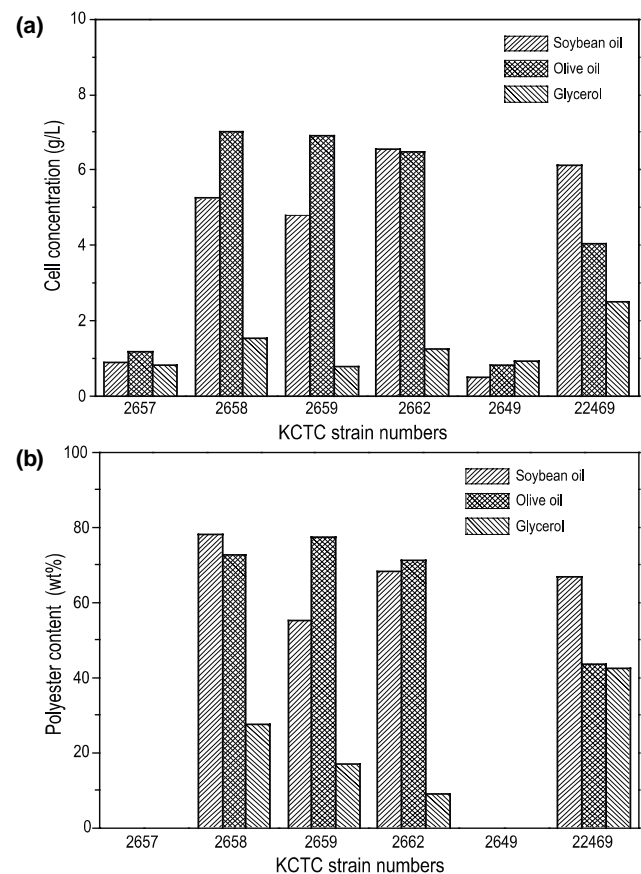


Fig. 2. Production of P(3HB-co-4HB) from vegetable oil or glycerol by *R. eutropha* (vegetable oil or glycerol concentration = 20 g/L, γ -butyrolactone concentration = 5 g/L). (a) Dry cell weight. (b) PHA content.

***R. eutropha*의 P(3HB-co-3HV) 합성 특성**

식물성 오일 또는 glycerol 20 g/L에 pentanoic acid 3 g/L를 첨가하여 플라스크 배양을 통해 여섯 종류의 *R. eutropha* 각각의 P(3HB-co-3HV) 축적 특성을 조사하였다 (Fig. 3, Table 2). Soybean oil을 기질로 사용한 경우 균체농도는 0.25~1.67 g/L, PHA 함량은 7.9~65 wt%, olive oil을 사용

Table 2. Composition of P(3HB-co-3HV) synthesized after 72 h by various *R. eutropha* strains from vegetable oil or glycerol (vegetable oil or glycerol concentration = 20 g/L, pentanoic acid concentration = 3 g/L)

	Carbon source	PHA Composition (mol%)					
		Soybean oil		Olive oil		Glycerol	
		3HB	3HV	3HB	3HV	3HB	3HV
	KCTC strain numbers						
<i>Ralstonia eutropha</i>	2657	15.5	84.5	-	-	74.7	25.3
	2658	96.9	3.1	97.6	2.4	77.8	22.2
	2659	66.0	34	91.8	9.2	77.3	22.7
	2662	95.0	5.0	94.8	5.2	100	0
	2649	100	0	100	0	-	-
	22469	88.7	11.3	100	0	100	0

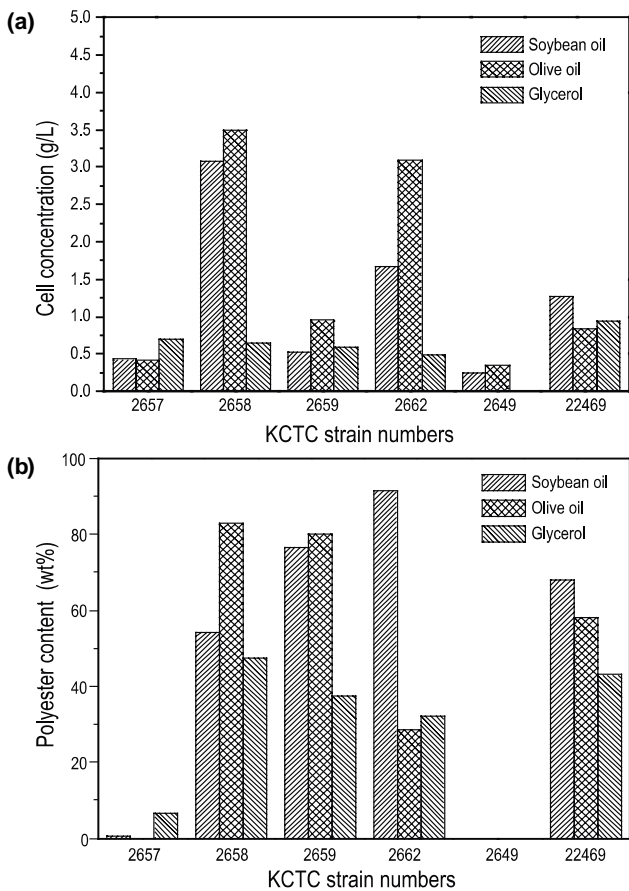


Fig. 3. Production of P(3HB-co-3HV) from vegetable oil or glycerol by *R. eutropha* (vegetable oil or glycerol concentration = 20 g/L, pentanoic acid concentration = 3 g/L). (a) Dry cell weight. (b) PHA content.

한 경우 균체농도는 0.34~3.5 g/L, PHA 함량은 3.6~69 wt%, glycerol을 사용한 경우 균체농도는 0.0071~0.94 g/L, PHA 함량은 9.9~31 wt%의 P(3HB-co-3HV) copolymer를 합성하였다. 마찬가지로 glycerol을 기질로 사용하였을 경우 균체의 성장이나 PHA 함량이 soybean oil 또는 olive oil을 사용하였을 경우와 비교하여 보면 효율적이지 못한 것을 알 수

있었고, KCTC 2657 및 KCTC 2649의 경우도 P(3HB-co-3HV) 합성에 적당한 균주가 아님을 알 수 있었다. 실험 결과 우수한 P(3HB-co-3HV) 축적 특성을 보인 균주는 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2658, soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2659, soybean oil을 이용한 경우 KCTC 2662 등이었으며, 균체농도는 soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2658, olive oil을 이용한 경우 KCTC 2662 등이었다. KCTC 22469는 soybean oil, olive oil 및 glycerol로부터 45~70 wt%의 고른 P(3HB-co-3HV) 축적 특성을 보였다. 합성된 P(3HB-co-3HV) 중의 3HV 조성은 KCTC 2657의 경우 85 mol%의 높은 3HV 함량을 보였으나 균체농도나 PHA 함량이 너무 낮았다. 다른 균주의 경우 soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 0~11 mol%였으며, glycerol을 이용한 경우는 0~23 mol%로 상대적으로 높은 3HV 함량을 나타냈다.

결론

여섯 종류의 *R. eutropha* 균주를 식물성 오일 또는 glycerol을 탄소원으로 이용하여 배양한 결과 P(3HB) 합성의 최적 기질 및 균주는 soybean oil 및 KCTC 2662였으며, 약 90 wt%의 P(3HB)를 포함하는 9 g/L의 균체농도를 얻을 수 있었다. P(3HB-co-4HB) 합성이 우수한 균주는 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2658 및 2659, soybean oil을 이용한 경우 KCTC 22469, soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2662 등으로 약 70~80 wt%의 P(3HB-co-4HB)를 포함하는 6~7 g/L의 균체농도를 얻을 수 있었다. 우수한 P(3HB-co-3HV) 축적 특성을 보인 균주는 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2658, soybean oil 및 olive oil을 이용한 경우 KCTC 2659, soybean oil을 이용한 경우 KCTC 2662 등이었으며, KCTC 22469는 soybean oil, olive oil 및 glycerol로부터 45~70 wt%의 고른 P(3HB-co-3HV) 축적 특성을 보였다. 종합적으로 P(3HB), P(3HB-co-4HB) 및 P(3HB-co-3HV) 합성에 최적인 기질 및 균주는 soybean oil 및 KCTC 2662였다.

요약

식물성 오일 또는 glycerol로부터 *Ralstonia eutropha* 여섯 균주의 polyhydroxyalkanoates (PHA) 합성 특성을 조사하였다. 탄소원으로 soybean oil, olive oil, 또는 glycerol 만을 공급시 poly(3-hydroxybutyrate) homopolymer가 생성되었으며, γ -butyrolactone 또는 pentanoic acid를 함께 공급시 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) 또는 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer가 각각 합성되었다. 최종 균체농도 및 PHA 함량면에서 최적인 균주는 *R. eutropha* KCTC 2662로 결정되었으며, 최적 기질인

soybean oil 20 g/L로부터 72 h에 균체농도 1.7~9.2 g/L, PHA 함량 70~92 wt%를 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 지식경제부 및 한국산업기술진흥원의 전략기술 인력양성사업에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 12월 2일, 게재승인 : 2010년 5월 27일

REFERENCES

- Chen, G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38: 2434-2446.
- 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.
- 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.
- Akiyama, M., T. Tsuge, and Y. Doi (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym. Degrad. Stab.* 80: 183-194.
- Song, B.-S., N. S. Han, B. H. Lee, C. T. Hou, and B. S. Kim (2009) Production and analysis of oxygenated unsaturated fatty acids from oleic acid by *Flavobacterium* sp. strain DS5. *KSBB J.* 24: 41-46.
- Kim, B. S., Song, B.-S., and Hou, C. T. (2008) Production of lipase and oxygenated fatty acids from vegetable oils. In *Biocatalysis and Bioenergy*, C. T. Hou and J. F. Shaw, Eds, p. 547, John Wiley & Sons.
- Yamane, T. (1992) Cultivation engineering of microbial bioplastics production. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 257-264.
- 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.
- 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-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 556-561.
- Kim, B. S. and H. N. Chang (1995) Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Techniques* 9: 311-314.
- Kim, J. S., B. H. Lee, and B. S. Kim (2005) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Eng. J.* 23: 169-174.
- Song, J. Y. and B. S. Kim (2005) Characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 and ATCC 17699. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 603-606.