



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0000839
(43) 공개일자 2015년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 7/62* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0076503
(22) 출원일자 2014년06월23일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
13173575.5 2013년06월25일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
드리테 파렌트포트폴리오 베타일리궁스케젤샤프트
엠베하 운트 코. 카게
독일 쉐네펠트 베를린너 슈트라쎄 1 (우:12529)
(72) 발명자
바사스 갈리아, 모니카
독일연방공화국, 38300 볼펜부텔, 브라우어글리텐
슈트라쎄 16
아리아스 리바스, 사그라리오
독일연방공화국, 38100 브라운슈바익, 노이에 슈
트라쎄 9
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인오리진

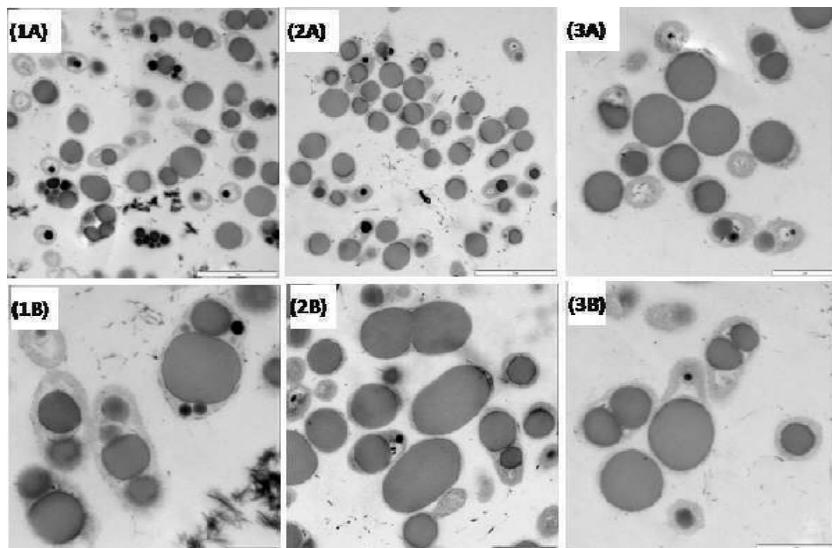
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 *mc1/1c1-PHA 및 특수-PHA의 효율적인 제조를 위한, 신규의 환경적 분리 슈도모나스 sp. IPB-A36의 이용*

(57) 요약

본 발명은 Leibnitz Institute DSMZ에 DSM26198로 수탁된 슈도모나스 속에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 탄소 공급원을 포함하는 배지에서 미생물을 배양하는 단계 및 상기 미생물로부터 PHA를 분리시키는 단계를 포함하는, 중쇄 및 장쇄 PHA의 제조방법에 관한 것이다. 상기 미생물이 높은 수율로 PHA를 제조할 수 있게 한다는 것이 관찰되었다. 또한, 본 발명의 미생물은 불포화기 및/또는 방향족기에 의해 개질된 지방산을 제조되는 PHA로 효율적으로 흡입시킬 수 있다는 유용한 능력을 가진다. 따라서, 본 발명의 미생물은 화학적으로 다양한 PHA를 제조할 수 있게 하고, 이에 따라 상기 물질들에 대한 새로운 적용분야를 열고 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

몰리나리, 가브리엘라

독일연방공화국, 38304 불펜뷰텔, 만치누스백 43

팀미스, 케네스 니겔

독일연방공화국, 38124 브라운슈바이크, 인호펜슈트

라쎄 7

특허청구의 범위

청구항 1

수탁번호 DSM26198로 DSMZ에 기탁된 슈도모나스 속의 미생물.

청구항 2

하기 단계를 포함하는, 중쇄 또는 장쇄 PHA의 제조방법:

- 수탁번호 DSM26198로 DSMZ에 기탁된 슈도모나스 속의 미생물을 탄소 공급원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- 상기 미생물로부터 PHA를 분리시키는 단계.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 배지는 C-Y 배지, 바람직하게는 C-Y(2N) 배지인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 탄소 공급원은 하나 이상의 불포화기를 포함하거나 포함하지 않는 하나 이상의 C4 내지 C20 지방산, 바람직하게는 C8 내지 C18 지방산; 방향족기를 포함하는 하나 이상의 카르복시산, 바람직하게는 ω -페닐 치환 지방산, 더욱 바람직하게는 지방산 사슬에 4 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 ω -페닐 치환 지방산; 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

하나 이상의 불포화기를 포함하는 카르복시산 및 포화 및/또는 불포화 지방산의 혼합물이 배지에 함께 공급되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

질소가 암모늄 염으로서, 바람직하게는 약 8 내지 30 mM, 특히 10 내지 20 mM의 암모늄 몰 농도로, 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 쉐이크-플라스크-공정 또는 배치-공정이고, 배지 내의 탄소 대 질소비(C/N)가 약 20 내지 45, 바람직하게는 약 25 내지 35인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 탄소 공급원은, 초기 배치(batch) 시기 이후에 지수적으로 증가하는 탄소 공급원 투여량을 제공하기 위해 페드-배치(fed-batch) 방식으로, 바람직하게는 $0.05 \text{ 내지 } 0.1 \text{ h}^{-1}$, 더욱 바람직하게는 $0.06 \text{ 내지 } 0.085 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도 μ_{set} 로, 배지에 공급되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

배치 시기에서, 탄소 공급원의 초기 덩어리가 배지에 첨가되고, 초기 탄소 공급원을 완전히 소비시키는데 충분한 시간 동안 배양이 유지되며, 초기 배치 시기는 12 내지 22 시간 동안, 더욱 바람직하게는 12 내지 15 시간 동안 유지되는 것을 특징을 하는 제조방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 탄소 공급원의 초기 덩어리는 약 10 내지 20 mM, 바람직하게는 약 12 내지 17 mM의 배지 내 탄소 공급원 농도를 제공하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제2항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PHA는 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 바람직하게는 아세톤에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PHA는 약 60°C 이하, 바람직하게는 약 20 내지 40°C의 온도에서 추출되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의해 제조되는 PHA로서,

바람직하게는 불포화기 및/또는 방향족기를 포함하고, 더욱 바람직하게는 상대적 mol% 비율로 5 내지 20%의 포화 모노머, 30 내지 70%의 불포화 모노머 및 20 내지 60%의 방향족 모노머를 포함하는 PHA.

청구항 14

제1항에 따른 미생물을 중쇄 또는 장쇄 PHA를 제조하는데 사용하는 방법.

청구항 15

수탁번호 JN651419(*phaC1*) 또는 JN216884(*phaC2*)로 유전자은행 NCBI에 기탁된 PHA 신타아제, 이의 유사체, 또는 상기 PHA 신타아제 또는 이의 유사체의 혼합물을, PHA, 바람직하게는 탄소-탄소 이중결합 및/또는 방향족기를 포함하는 PHA를 제조하는데 사용하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리히드록시알카노에이트(PHA)의 생합성 분야에 속한다. 본 발명은 Leibnitz Institute DSMZ 독일생물자원센터(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)에 DSM 26198로 기탁된 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속의 야생형 미생물에 관한 것이다. 상기 미생물은 PHA의 제조방법에 매우 유용한 것으로 증명되었다. 상기 미생물은 유전자 변형되지 않았으며, 불포화기 및 방향족기를 포함하는 탄소 공급원을 흡입하여 특성을 조정할 수 있는 신규 PHA 변이체들을 제공할 수 있다는 것이 관찰되었다. 또한, 중쇄 또는 장쇄 PHA의 제조방법에서의 상기 미생물의 용도, 및 상기 방법에 의해 획득될 수 있는 PHA에 관한 것이다.

배경기술

[0002] PHA는 넓은 산업적 및 생의학적 응용범위를 갖는 재생가능한 공급원으로부터 제조된 생분해성 및 생체적합성인 열가소성 물질(3-히드록시 지방산의 폴리에스테르)이다(Williams & Peoples, 1996, Chemtech. 26: 38-44). PHA는 광범위한 박테리아에 의해 합성되고, 플라스틱 폐기물의 해로운 효과로부터 환경을 보호하기 위해 종래의 석유화학 기반 플라스틱을 대체하는 잠재적 용도 때문에 광범위하게 연구되어왔다.

[0003]

PHA는 이들의 측쇄 길이 및 이들의 생합성 경로에 따라 2개의 군으로 분리될 수 있다. (R)-3-히드록시부티르산 유닛의 호모폴리머인 PHB와 같이 짧은 측쇄를 갖는 것들은 결정성 열가소성 플라스틱이고, 반면에 긴 측쇄를 갖는 PHA는 더 높은 탄성을 갖는다. 전자는 약 90년 동안 알려져 왔고(Lemoigne & Roukhelman, 1925, Ann. Des Fermentation, 527-536), 반면에 후자는 상대적으로 최근에 발견되었다(deSmet et al., 1983, J. Bacteriol. 154: 870-878). 그러나, 상기와 같이 지정되기 전에, (R)-3-히드록시부티르산 유닛 및 5 내지 16개의 탄소원자를 포함하는 더 긴 측쇄 (R)-3-히드록시산 유닛을 모두 포함하는 미생물 기원의 PHA가 식별되었다(Wallen & Rohweder, 1974, Environ. Sci. Technol. 8: 576-579). (R)-3-히드록시부티르산 및 5 내지 16개의 탄소원자를 포함하는 하나 이상의 긴 측쇄 히드록산 유닛의 코폴리머를 생산하는 다수의 박테리아가 식별되었다(Steinbuchel & Wiese, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 691-697; Valentin et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 507-514; Valentin et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40: 710-716 ; Abe et al., 1994, Int. J. Biol. Macromol. 16: 115-119; Lee et al., 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 901-909; Kato et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 363-370; Valentin et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 261-267; US Patent No. 4,876,331). 상기 코폴리머는 PHB-co-HX(여기서, X는 3-히드록시알카노에이트 또는 6개 이상의 탄소의 알카노에이트 또는 알케노에이트임)로 지칭될 수 있다. 구체적인 2성분 코폴리머의 유용한 예는 PHB-co-3-히드록시헥사노에이트(PHB-co-3HH)이다(Brandl et al., 1989, Int. J. Biol. Macromol. 11: 49-55; Amos & McInerney, 1991, Arch. Microbiol. 155: 103-106; US Patent No. 5,292,860).

[0004]

PHA가 상기한 바와 같이 생분해성 열가소성 플라스틱 및 바이오플리머를 위한 재생가능한 공급원으로서의 이들의 잠재적 용도 때문에 광범위하게 연구되어 왔고, 상업적으로 개발되고 광고되어 왔지만(Hrabak, 1992, FEMS Microbiol. Rev. 103: 251-256), 이들의 제조비용은 종래의 석유화학 기반 플라스틱에 비해 매우 높고, 이는 이들이 더욱 널리 사용되는 것에 있어서 주된 장애에 해당한다(Choi & Lee, 1997, Bioprocess Eng. 17: 335-342). 상기한 바와 같이, 다양한 박테리아, 예를 들어 알칼리제네스 유티로푸스(*Alcaligenes eutrophus*), 알칼리제네스 라투스(*Alcaligenes latus*), 아조박터 빈란디(*Azotobacter vinlandii*), 슈도모나스 액시도필라(*Pseudomonas acitophila*), 슈도모나스 올레오바란스(*Pseudomonas oleovarans*), 대장균(*Escherichia coli*), 로도코쿠스 유프로파(*Rhodococcus eutropha*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 크로마튬 비노섬(*Chromatium vinosum*), 알카니보락스 보르쿠멘시스(*Alcanivorax borkumensis*) 등이 PHA를 생산한다. 해당 분야에 알려진 PHA를 생산하는 모든 박테리아는 세포내 PHA를 생산하고, 이를 PHA 과립에 축적시킨다(Steinbuchel, 1991, Biomaterials, pp. 123-213). PHA 생산을 비싸게 하고, 이에 따라 석유화학-기반 플라스틱에 비해 바람직하지 않게 만드는 주된 문제점은 높은 수율로 물질을 생산하고, 물질이 추적되는 박테리아 세포 내에서 생산된 PHA를 회수하기 어렵다는 점이다. PHA의 총 제조비용을 감소시키기 위해, 일반적으로 i) 적절한 용매, ii) PHA의 차아염소산 추출, 및/또는 iii) 비-PHA 세포물질의 소화에 의한 세포파괴를 목적으로 하는, 효율적인 회수방법의 개발이 필수적인 것으로 생각되었다(Lee, 1996, Biotech. Bioeng. 49: 1-14).

[0005]

산업규모에서, 이용가능한 미생물은 여전히 상대적으로 적은 PHA를 제공하고, 이는 이와 같은 미생물에 의해 PHA의 제조를 경제적으로 실현불가능하게 한다. 해당분야에 알려진 모든 방법은 제조 동안에 많은 양의 물, 및 추가적으로 이들의 회수를 위한 화학약품 및/또는 효소를 필요로 하고, 이는 제조비용을 감소시키는 것에 있어서 장애물이다. 따라서, PHA 제조를 위한 대체전략이 급히 필요하다.

[0006]

최근에, 예를 들어 미생물이 더 많은 양의 PHA를 생산할 수 있도록 하기 위해, PHA를 생산하는 미생물의 유전자 변형을 위한 전략이 개발되었다. EP 1 913 135 A1는 예를 들어 PHA 제조를 위한 중간물질에 PHA 신타아제와 경쟁적으로 작용하는 유전자를 놓아웃(knock-out)함으로써 유전자 변형된 미생물을 개시한다. 중간물질을 위한 PHA 신타아제를 방해하는 효소의 미생물을 결핍시킴으로써, 중간물질의 전환이 PHA를 향하도록 할 수 있었다.

[0007]

다른 방법은, 야생형에서는 PHA를 생산할 수 없는 대장균과 같은 미생물에게 PHA 신타아제를 도입하는 것이다(문헌 [Qi et al., 2007, FEMS Microbiol. Lett. 157: 155-162] 참조). 이와 같은 경우, 데카노에이트가 탄소 공급원으로 사용될 때, 약 15% CDW(세포 건조 중량: cell dry weight)의 최대 PHA 축적이 *E. coli* LS1298 균주에서 관찰되었다.

[0008]

또 다른 방법에서는, PHA 디폴리머라제 유전자의 놓아웃에 의해 PHA 제조가 증가되었는데, 이는 미생물 *P. putida* KT2440에서 약 PHA가 CDW 중에 최고 80%를 차지하는 약 4 g/L CDW의 수율을 달성하였다(Cai et al., 2009, Bioresource Techn. 100: 2265-2270).

[0009]

상기 발전사항에도 불구하고, 상기 미생물에서 제조된 PHA의 양은 이의 제조에 필요한 자원과 비교하여 여전히

상대적으로 낫다. 또한, 일부 국가에서는 일반적으로 유전자 공학 미생물에 대한 공중의 의구심이 있으며, 이는 상기 물질을 수용하는 측면에서 문제점을 야기한다. 특히, 상기 국가에 대해서는 높은 수율로 PHA를 제조하는, 야생형, 즉 유전자 변형되지 않은 미생물을 갖는 것이 유리하다.

[0010] 지금까지 PHA 제조에 대해 개시된 대부분의 미생물은 PHA 제조를 위한 탄소 공급원으로서 포화 지방산만을 수용 한다. 약 6 내지 20개의 탄소원자의 사슬 길이를 갖는 직쇄 지방산과 같은 보통의 기질로부터 제조된 PHA는 주로 -30°C 내지 -50°C의 폴리머 유리전이온도를 나타낸다. 이는 상기 유리전이온도와 호환가능한 응용예로 이들의 활용성을 제한한다. PHA 내로 혼입시키기 위한 대응 미생물에 의해 수용되는 기질의 범위가 연장된다면, 이와 같은 미생물로부터 이용가능한 PHA 특성의 다양성에 큰 영향이 있을 것이다. 특히, PHA가 변형된 특성을 나타내게 하는 탄소 공급원을 혼입시킬 수 있는 미생물이 이용가능하다면, 상기 소재가 종래의 석유화학계 플라스틱을 대체할 수 있는 것으로 사용될 수 있어 응용의 범위에 큰 영향을 끼칠 것이다.

[0011] 본 발명은 상기와 같은 필요성에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 Leibnitz Institute DSMZ, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany에 DSM26198로 슈도모나스 속의 유전자 변형되지 않은(즉, 야생형) 미생물을 제공하는 것이다. 미생물 슈도모나스 *sp.* IPB-A36은 기질로서 석유 T138(1%) 내의 캐나다 및 호주로부터의 다양한 오염된(탄화수소, 디젤 및 석유에 의해) 토양 샘플로부터 획득된 농축 배양체로부터 분리되었다. 상기 미생물은 예상외로 높은 수율로 PHA를 제조할 수 있고, 예를 들어 방향족기 및/또는 불포화기를 포함하는 통상적이지 않은 기질을 PHA로 혼입시킬 수 있다는 점이 관찰되었다.

[0013] 최적화된 조건에서, 상기 미생물은 43 wt%의 PHA 함량을 갖는 22 g/L를 초과하는 CDW(세포 건조 중량)(이는 9 g/L 초과의 총 PHA 수율에 대응함)의 바이오매스를 제공하였다.

[0014] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 중쇄 및/또는 장쇄 PHA의 제조방법에 관한 것이다:

[0015] - DSMZ에 DSM26198로 기탁된 슈도모나스 속의 미생물을 탄소 공급원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[0016] - PHA를 상기 미생물로부터 분리시키는 단계.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로부터 제조될 수 있는 PHA로서 바람직하게는 불포화기 및/또는 방향족기를 포함하는 PHA, 및 중쇄 또는 장쇄 PHA의 제조방법에 있어서 상기 미생물의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명에서 사용되는 중쇄라는 용어는 5 내지 13개의 탄소원자를 갖는 히드록시산 유닛((R)-3-히드록시산 유닛)을 의미하기 위한 것이다. "중쇄 PHA"라는 용어는 모노머 당 14개 이상의 탄소원자를 갖는 PHA를 포함한다.

[0019] 본 출원인의 연구에서, 본 발명의 미생물의 발효에 사용된 배지가 미생물의 PHA 생산성에 유의적인 영향을 미친다는 점이 발견되었다. 시험된 다수의 제조 배지로부터, 0.1% 이스트 추출물에 의해 개질된 MM 배지(문헌 [Martinez-Blanko et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 7084-7090]에 개시된 바와 같음)는 10-운데세노에이트가 탄소 공급원으로서 사용된 경우에 가장 낮은 PHA 생산성을 제공하였다. 동일한 조건에서, Reasoner & Geldreich(1985, Appl. Environ. Microbiol. 49: 1-7)에 의해 개시된 바와 같은 R2A 배지는 유의적으로 더 높은 수율의 PHA를 제공하였고, 반면 문헌 [Choi et al.] (1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 1245-1254)에 개시된 바와 같은 C-Y 배지는 PHA 생산성의 측면에서 가장 높은 수율을 제공하였다. 상기 배지로부터의 PHA 수율은 MM 배지에 의해 획득된 수율을 4배 이상 초과하였다. 따라서, 본 발명의 실시에 있어서 배지는 문헌 [Choi et al.]에 의해 개시된 바와 같은 C-Y 배지인 것이 바람직하다.

[0020] 바이오매스 및 PHA 수율을 더욱 개선하기 위해, 배지의 질소(N) 및 탄소(C)의 함량이 조절되었다. 바람직한 C-Y 배지(5 mM 암모늄 철페이트 및 27 mM 10-운데세노에이트)에 의해 제공된 조건을 표준조건으로 고려하여, 2가지의 질소 공급원 및 탄소 공급원 농도가 분석되었다. 질소 및 탄소 공급원의 농도를 2배 증가시키고, C/N 몰비를 30으로 유지시킴으로서, PHA 제조가 2배 이상 증가할 수 있었다. 이에 따라, 본 발명의 다른 바람직한 구현예에서 탄소 및 질소 공급원의 농도가 증가된 개질된 C-Y 배지가 사용되고 있다.

[0021]

PHA의 제조를 위해 사용되는 탄소 공급원과 관련하여, 본 발명의 방법은 제한되지 않는다. 글리세롤, 당류, 피루베이트 및 종래의 지방산, 특히 4 내지 20개의 탄소원자, 바람직하게는 8 내지 18개의 지방 탄소 원자를 포함하는 지방산과 같이, PHA의 제조를 위해 보통 사용되는 탄소공급원이 본 발명의 방법에서 본 발명의 미생물과 사용될 수 있다. 그러나, 지방산 또는 이의 혼합물이 탄소 공급원으로서 사용된 경우, 가장 우수한 PHA 수율(단위: mg/L)이 획득된다는 점이 발견되었다. 결론적으로, 바람직한 본 발명의 방법은 하나 이상의 C4 내지 C20 지방산, 바람직하게는 C8 내지 C18 지방산을 포함하는 탄소 공급원을 포함한다. 본 발명에 사용될 바람직한 포화 지방산은 부티르산, 발레르산, 헥산산, 헵탄산, 카프릴산, 노난산, 데칸산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 햅타데칸산, 스테아르산 및 아라키드산이다.

[0022]

또한, 본 발명의 미생물은 기질로서 올레산 및 10-운데센산과 같은 불포화 지방산도 수용한다는 것이 발견되었다. 따라서, 본 발명의 방법의 바람직한 구현예는 하나 이상의 불포화기, 바람직하게는 단일 불포화기(unsaturated moiety)를 포함하는 지방산을 탄소 공급원으로서 포함한다. 대표적인 불포화 지방산은 미리스트올레산, 팔미트올레산, 사피엔산(sapienic acid), 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α -리놀레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산 및 운데센산이다.

[0023]

또한, 본 발명의 미생물 슈도모나스 *sp.* IPB-A36은 방향족기를 포함하는 카르복시산을 PHA로 혼입(incorporation)시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 방법에서 상기 탄소 공급원은 방향족기를 포함하는 하나 이상의 카르복시산을 포함할 수 있다. 상기 "카르복시산"은 상기 지방산과 조합하여, 또는 단독 기질로서 사용될 수 있다.

[0024]

방향족기를 포함하는 카르복시산은 바람직하게는 지방산, 더욱 바람직하게는 ω -아릴 치환 지방산, 가장 바람직하게는 ω -페닐 치환 지방산이다. 상기 지방산은 바람직하게는 지방산 사슬에 4 내지 10개의 탄소원자를 포함한다. 따라서, 상기 종류의 바람직한 지방산은 예를 들어 4-페닐부티르산, 5-페닐발레르산, 6-페닐헥산산, 7-페닐헵탄산, 8-페닐옥탄산, 9-페닐옥탄산 및 10-페닐데칸산을 포함한다. 놀랍게도, 발효를 위해 사용되는 농도에서 카르복시산이 미생물에 대해 비독성이라는 것이 발견되었다.

[0025]

방향족기 및 지방산을 포함하는 카르복시산의 혼합물이 사용되는 경우, 방향족기를 포함하는 카르복시산을 하나 이상의 C4 내지 C14 지방산과 혼합하여, 상기 혼합물의 약 5 내지 45%를 차지하도록 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 방향족기를 포함하는 방향족 카르복시산의 농도가 지시된 범위를 초과하는 경우, g/L 및 wt% 단위의 PHA 제조에 있어서, PHA의 수율은 방향족기를 포함하는 카르복시산이 탄소 공급원 혼합물의 약 5 내지 45 wt%를 차지하는 대응 혼합물에 비해 유의적으로 더 낮다는 것이 발견되었다. 또한, 방향족기를 포함하는 카르복시산이 지시된 범위내인 경우, 총 PHA 제조 및 세포 건조 중량에 대한 함량 모두에 있어서, PHA 수율은 방향족기를 포함하는 카르복시산이 사용되지 않은 발효에 필적한다는 것이 발견되었다.

[0026]

상기 카르복시산에 부가하여, 예를 들어 튜베르큘로스테아르산 또는 7-메틸-7-헥사데칸산과 같은 분지형 카르복시산을 PHA에 포함시킬 수 있다.

[0027]

바람직한 구현예에서, 상기 분지형 카르복시산은 바람직하게는 카르복시산기로부터 4개 이상의 탄소 원자, 바람직하게는 카르복시산기로부터 5개 이상의 탄소 원자에 의해 분리된 탄소 원자에서 분지되고, 상기 카르복시산에서 더 가까운 탄소 원자는 비치환된다.

[0028]

배지 내의 탄소 공급원은 상기 탄소 공급원 중 단 하나, 또는 상기 카르복시산 중 둘 이상의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 포화 및/또는 불포화 지방산 및 하나 이상의 불포화기를 포함하는 하나 이상의 카르복시산의 혼합물이 사용된다. 이와 같은 경우, 각각의 탄소 공급원을 분리하여 또는 혼합물로서 첨가 할 수 있다. 발효에 하나 이상의 탄소 공급원, 특히 포화기, 불포화기 및 방향족기를 포함하는 카르복시산의 혼합물을 사용하는 것을 이점은 제조되는 PHA의 특성을 정밀하게 미세 조정할 수 있다는 점이다.

[0029]

또한, 발효 동안에 다수의 개별적인 덩어리 중에서 발효의 초기에만 탄소 공급원의 혼합물을 첨가하거나, 또는 상기 혼합물을 연속적으로 함께 공급할 수 있다. 후자는 탄소 공급원이 상당한 조성 변화 없이 PHA 내로 혼입된다는 이점이 있다(즉, 발효의 초기에 형성된 PHA는 발효의 말기에 형성된 PHA와 동일한 조성을 가짐). 따라서, 본 발명의 방법에서는 탄소 공급원을 함께 공급하는 것이 바람직하다.

[0030]

본 발명의 방법이 쉐이크-플라스크 또는 배치-콩정으로 이용되는 경우, 배지 내의 탄소 대 질소비(C/N)는 약 20 내지 45, 바람직하게는 약 25 내지 35인 것이 바람직하다. (C/N)비가 20 미만 또는 45 초과인 경우, 제조된 생성물의 PHA 수율은 바람직한 범위 내에 있는 것보다 더 낮았다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에서, 탄소 공급원은 배양의 초기에 배양 혼합물에 단일 덩어리로 첨가된다. 이와 관련하여, 탄소 공급원이 예를 들어 2개의 부분으로 첨가되는 경우, 즉 하나는 배양의 초기에 첨가되고, 두번째는 그 후의 단계에 첨가되는 경우, 탄소 공급원이 단일 덩어리로 첨가된 공정에 비해 g/L 및 wt% 단위 모두의 PHA 수율이 일반적으로 더 낮았다는 것이 발견되었다.

[0032] 쉐이크-플라스크 또는 배치-공정에 있어서, 배양 혼합물에 첨가되는 탄소 공급원의 양은 배양 혼합물 내의 탄소 공급원의 농도가 약 20 내지 60 mM, 특히 약 45 내지 55 mM이 되도록 하는 것이 더욱 바람직하다. 20 mM 미만의 농도를 제공하도록 탄소 공급원이 첨가되는 경우, PHA의 수율은 탄소 공급원의 농도가 지시된 범위 내인 발효에 비해 더 낮았다. 탄소 공급원 농도가 60 mM 초과인 경우, 환경이 세포에 대해 점점이 독성이 되고, 이는 이들의 성장에 부정적인 영향을 미친다.

[0033] 본 발명의 방법의 다른 중요한 파라미터는 배지 내 질소 함량이고, 이는 질소가 미생물에 있어서 중요한 영양분이고, 탄소가 과잉되고 예를 들어 질소가 결핍되는 조건에서 PHA 제조가 보통 바람직하기 때문이다. 본 발명의 바람직한 방법에서, 예를 들어 황산암모늄 또는 수산화암모늄과 같은 암모늄염이 질소 공급원으로서 사용된다.

[0034] 본 발명의 바람직한 방법에서, 배양 배지 내의 암모늄 농도(NH_4^+)는 약 8 내지 30 mM, 특히 약 10 내지 20 mM이었다. 그러나, 균주의 성장 및 PHA 제조에 가장 큰 영향을 미치는 것은 궁극적으로 질소 공급원은 실제 농도보다는 C/N 비이다.

[0035] 본 발명의 다른 중요한 측면은 발효에서의 산소 농도인데, 이는 미생물이 카르복시산을 3-히드록시카르복시산으로 전환시키기 위해 산소를 소비하기 때문이다. 본 발명의 실시에 있어서, 배양 배지에서 산소 분압(p_{O_2})은 약 25% 내지 45%, 바람직하게는 약 30%로 유지되는 것이 바람직하고, 여기서 %는 mol%이고, 배양 배지에 용해된 기체 전체에 기반하여 계산된다.

[0036] 배양 시간과 관련하여, 본 발명에는 어떠한 제한도 가해지지 않는다. 그러나, 통상의 기술자라면 배양 동안에 제조된 PHA의 양이 어떤 단계에서 그 후로는 PHA-함량이 감소하거나 더 이상 변화하지 않는 최고점에 도달할 것이라는 점을 인식할 것이다. 통상의 기술자는 미생물 내의 PHA 축적량이 최고가 되는 시간을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 경험에 비추어 보면, 배치 공정에서의 최고 PHA 축적은 보통 약 40시간 후 내지 약 100시간 전에 도달하였다. 따라서, 배양은 바람직하게는 48 h 이상 및 96 h 이하, 바람직하게는 60 h 이상 및 84 h 이하, 가장 바람직하게는 약 72 h 동안 수행된다.

[0037] 본 발명의 미생물에 있어서, 약 30°C의 온도가 PHA 제조를 위한 최적의 온도로 측정되었다. 따라서, 본 발명의 방법은 바람직하게는 약 15°C 내지 45°C, 바람직하게는 약 20°C 내지 40°C의 온도에서 수행된다.

[0038] 전술한 배치-공정과는 다른 본 발명의 구현예에서, 탄소 공급원은 페드-배치(fed-batch) 방식, 즉 발효의 초기화 시간 후에 지수적으로(exponentially) 증가하는 탄소 투여량이 보충되는 방식으로 배양 배지에 공급된다. 지수적으로 증가하는 탄소 투여량의 계산으로부터의 파라미터는 하기의 식에 기반하여 계산되었다:

$$F(t) = \mu \cdot \frac{V_0 \cdot X_0}{S_0 \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{-\mu_{set} \cdot t}$$

[0039] 여기서, $F(t)$ 는 배양에 걸친 탄소 공급원의 유량, V_0 은 배양의 부피, $Y_{X/S}$ 는 바이오매스의 수율, X_0 은 배치 배양 후의 초기 바이오매스, μ_{set} 은 원하는 비성장속도(specific growth rate) 및 S_0 은 공급물 내 기질 농도를 나타낸다.

[0040] 본 발명에서, μ_{set} 은 바람직하게는 약 0.05 내지 0.1 h^{-1} , 더욱 바람직하게는 약 0.06 내지 0.085 h^{-1} 이다.

[0042] 상기 페드-배치 공정은 최고 수율에 도달하는 발효 시간을 실질적으로 감소시킬 수 있고, 이때 발효에서 최적의 PHA 농도는 약 40 내지 48h로 감소될 수 있다. 이는 최적의 PHA 농도가 보통 약 72 h 후에만 획득되는 종래의 배치 공정에 비해 유의적인 이점을 나타낸다.

[0043] 상기 공정에서, 지수적으로 증가하는 탄소 공급원 투여량을 첨가하기 전에, 초기 덩어리의 탄소 공급원이 배양 배지에 첨가되고, 배양체는 그 후 초기 탄소 공급원이 완전히 소비되도록 보장하는 충분한 시간 동안 유지되는 배치 단계에서 발효가 초기화되는 것이 바람직하다. 본 발명을 실시할 때, 초기 배치 단계가 약 12 내지 22 h의

시간 동안 적합하게 수행된다는 점이 관찰되었다. 바람직하게는, 페드-배치 공정의 초기 단계는 약 12 내지 15 h 동안 수행된다.

[0044] 또한, 페드-배치 공정에서, 탄소 공급원의 초기 덩어리는 배양 배치에 약 10 내지 20 mM, 바람직하게는 약 12 내지 17 mM의 탄소 공급원 농도를 제공하는 것이 바람직하다. 상기 범위는 지수적 공급 공정이 시작되기 전에 최적의 초기 배양을 제공하기 위해 결정되었다.

[0045] 배치 또는 페드-배치 공정에서 발효 혼합물의 교반 속도는 산소 압력이 상기에 지시된 범위 내에서 유지되기에 충분해야 한다는 것을 제외하고는, 제한되지 않는다. 적합한 교반 속도는 발효의 요건에 의존하지만, 보통 약 200 내지 1400 rpm이다.

[0046] 예상외로, 본 발명의 미생물은 초기에 복수의 PHA 과립들이 형성되었지만, 발효 동안에 PHA 과립이 단일 과립으로 융합된다는 것이 발견되었다.

[0047] 미생물로부터 PHA를 분리함에 있어서, 비-염소화 용매, 바람직하게는 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 케톤에 의해 추출되는 것이 바람직하다. 비-염소화 용매는 클로로포름 및 디클로로메탄과 같은 종래의 염소화 용매와 비교하여 유의적으로 낮은 폐기물 처리 문제 및 비용을 나타낸다는 장점이 있다. 본 발명의 실시를 위해 사용되는 케톤의 예로서는 아세톤, 2-메틸에틸케톤, 디에틸케톤, 2-메틸프로필케톤 등이 있다. PHA의 고립을 위해 사용하기 위한 가장 바람직한 케톤은 아세톤이다.

[0048] 또한, PHA는 약 60°C 미만, 바람직하게는 약 20°C 내지 40°C의 온도에서 추출되는 것이 바람직하다. 상기 온도에서의 본 발명의 미생물의 추출이 더 높은 온도에서의 유사한 추출과 비교하여 실질적으로 동일한 PHA 수율을 제공하는 것이 예상외로 발견되었다. 이는 높은 탄소 농도에서의 단일 PHA 과립 형성, 및 발효 공정의 말기에 미생물 세포벽의 관찰가능한 과괴로부터의 직접적인 결과라고 여겨진다. 따라서, 본 발명의 미생물에서는, 종래 발효의 미생물의 복수의 과립들보다 상기 용매에 대해 PHA에 접근하는 것이 더 용이하다. 또한, 약 0.5 내지 5 h 동안의 추출 후에는 실질적으로 동일한 수율의 추출된 PHA가 획득될 수 있다는 것이 관찰되었다. 용매 추출은 약 1 내지 3 시간, 바람직하게는 약 1 시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조될 수 있는 PHA이다. 바람직하게는, 상기 방법은 방향족기 및/또는 불포화기를 포함하는 카르복시산의 혼입을 포함한다. 더욱 바람직하게는 상기 방법에 의해 제조된 PHA는 5 내지 20%mol의 포화, 30 내지 70%mol의 불포화 및 20 내지 60%mol의 방향족 모노머를 포함한다.

[0050] 또한, 본 발명은 중쇄 또는 장쇄 PHA의 제조방법에서 상기 미생물의 용도에 관한 것이다. 상기 방법의 바람직한 구현예는 상기 중쇄 또는 장쇄 PHA의 제조방법에 대해 기재된 것과 동일하다.

[0051] 마지막으로, 본 발명은 PHA의 제조에 있어서 유전자 은행(NCBI)에 JN651419(*phaC1*) 또는 JN216884(*phaC2*)의 수탁번호로 기탁된 PHA 신타아제 또는 이의 유사체의 용도에 관한 것이다. 상기 PHA 신타아제 또는 이의 유사체는 단독으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 "유사체"라는 용어는 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 가장 바람직하게는 약 98% 이상의 서열 동일성을 갖고, 적절한 조건에서 PHA를 합성하고 방향족기를 포함하는 불포화 카르복시산 및/또는 카르복시산을 수용하고 PHA로 혼입시킬 수 있다는 점에서 유사한 특성을 가지는 웹터드 또는 단백질을 의미한다. 바람직한 구현예에서, 상기 용도는 하나 이상의 불포화 탄소-탄소 이중결합 및 방향족기, 바람직하게는 페닐기를 포함하는 PHA의 제조를 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1: 다양한 공급조건에서 C-Y 배지에서 배양된 균주 슈도모나스 *sp.* IPB-A36의 투과전자현미경(TEM) 이미지: (1A-B), 27 mM C11:1; (2A-B), 27+27 mM C11:1; (3A-B), 54 mM C11:1. 30°C 및 200 rpm에서 72h의 인큐베이션 후에, 세포가 PHA 추출을 위해 수집되었고, 각각 1 mL의 샘플이 TEM을 위해 제조되었다.

도 2: 기질로서 10-운데세노에이트를 사용한 균주 슈도모나스 *sp.* IPB-A36의 페드-배치 발효. 바이오매스 및 PHA 제조의 동역학(A), 암모늄 소비(B) 및 OD_{550nm} 측정결과(C). 상기 값들은 2번 측정한 값의 평균이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 하기에서는, 본 발명이 실시예에 의해 더 설명될 것이지만, 이는 어떻게 듣지 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0054] 실시예 1

[0055] PHA 제조를 위한 최고의 배지를 선택하기 위해, 슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 30°C 및 200 rpm의 500 ml 플라스크 (100 ml 배양체)에서 10-운데세노에이트(27 mM)를 탄소 공급원으로 하여, 3가지의 다른 배지(MM+0.1%YE, R2A 및 C-Y)에서 배양되었다.

표 1

[0056] 다양한 배지들을 사용한 슈도모나스 *sp.* IPB-A36으로부터의 바이오매스 및 PHA 제조

	MM+0.1%YE ¹	R2A ²	C-Y ³
CDW (g/L)	0.65±0.10	1.41±0.06	1.69±0.15
PHA (g/L)	0.17±0.03	0.58±0.03	0.83±0.14
PHA (wt%)	25.7±3.9	41.0±1.9	48.8±3.6

[0057] 상기 값들은 30°C 및 200 rpm에서 72 h의 인큐베이션 후에 획득되었고, 3번 측정한 값의 평균 ± 표준편차임.

[0058] ¹ Martinez-Blanco *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 7084-7090

[0059] ² Reasoner & Geldreich, 1985, *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7

[0060] ³ Choi *et al.*, 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3245-54

[0061] C-Y 배지가 사용된 경우에 각각 1.69 g/L 및 48.8 wt%의 바이오매스 및 PHA 축적률로 최고의 결과가 획득되었다.

[0062] 실시예 2

[0063] 바이오매스 및 PHA 수율을 개선시키기 위해, 질소(N) 및 탄소(C)의 함량이 조정되었다. 본 실험은 30°C 및 200 rpm에서 200 ml의 배양체를 포함하는 1L 플라스크에서 수행되었다. 2가지 농도의 질소(N 및 2N) 및 탄소 공급원 (27 mM 및 54 mM)이 분석되었다. 표준조건은 C-Y 배지에서 0.66 g/L 또는 5 mM의 (NH₄)₂SO₄(N) 및 27 mM의 탄소 공급원의 질소 및 탄소 공급원 농도를 사용한다. 2N에서, (NH₄)₂SO₄는 1.32 g/L 또는 10 mM였다.

표 2

[0064] 다양한 (C/N)비에서 슈도모나스 *sp.* IPB-A36 바이오매스 및 PHA 제조

C11:1 (mM)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	비율 (C/N)	CDW (g/L)	PHA (g/L)	PHA (wt%)
27	0.66	30	2.10	0.82	39.0
54	0.66	60	1.26	0.47	37.3
27+27‡	0.66	~30	1.40	0.76	54.3
54	1.32	30	3.50	1.77	50.6
27+27‡	1.32	~15	2.86	1.23	43.0

[0065] (27+27)‡는 초기 탄소 공급원 농도가 27 mM이고, 24 h의 배양 후에 27 mM의 탄소 공급원의 새로운 펠스가 첨가되었음을 지칭함. 상기 값들은 30°C 및 200 rpm에서 72 h의 인큐베이션 후에 획득되었고, 2번 측정한 값의 평균임.

[0066] 표 2에서 볼 수 있듯이, 54 mM의 C11:1 및 1.32 g/L의 (NH₄)₂SO₄를 사용한 경우에 최고의 수율이 획득되었고, 이는 탄소 및 질소의 농도를 2배 증가시키고 C/N 비를 30으로 유지시키면, PHA 제조가 2배 증가한다는 것을 나타낸다.

[0067] 27 mM C11:1, 27 + 27 mM C 11:1 및 54 mM C11:1, 및 0.66 g/L (NH₄)₂SO₄에 의한 발효 후에 획득된 샘플이 현미 경에 의해 조사되었다. 도 1은 초기 단계 및 72 h의 배양 후에 과립 형성에 대한 탄소 공급원의 효과를 나타낸

다. 배양체에 27 mM의 기질이 공급되는 경우에 여러 과립들이 관찰되었고(도 1-1A 및 1B), 반면에 더 높은 탄소 공급원 농도(도 1-2A 및 2B, 및 도 3-3A 및 3B)에서 대부분의 세포는 세포질 공간 전체를 차지하는 유일한 대형 과립을 포함하였다. 형태학적 관찰결과는 과립의 크기가 세포 용해에 기여할 수 있다는 점을 시사한다.

[0068] 또한, 과립 형성에 대한 질소 공급원 농도의 효과가 조사되었다. 1.32 g/L의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2N)에서, 세포 당 복수개의 대형 과립들이 관찰되었고, 박테리아 세포는 초기 발효 단계의 보통 C-Y 배지에서 배양된 것보다 건강해 보였다. 일반적으로, 뛰어난 PHA 축적률이 관찰되었고, 이미지는 표 2에서 보고된 정량적 결과에 잘 부합하였다. 72 h의 배양에서 과립 형성 공정의 변화는 과립의 크기가 다운스트림 공정 동안 PHA 회수에 긍정적인 영향을 줄 수 있다.

실시예 3

[0070] PHA 구조에서 공-기질(co-substrate)의 영향을 조사하기 위해, 슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 다양한 기질을 사용하여 30°C 및 200 rpm의 C-Y 배지 20 mL를 포함하는 100 mL의 플라스크에서 배양되었다. 10-운데세노에이트에서의 PHA 제조가 대조군으로 사용되었고, 2개의 다른 방향족 기질[5-페닐발레르에이트(5-PheVal) 및 8-페닐옥타노에이트(8-PheOct)], 및 불포화/방향족 기질의 조합이 분석되었다(표 3).

[0071] 방향족 기질은 우선 박테리아 세포에 대한 이들의 독성에 대해 시험되었다. 표 3은 유일한 탄소 공급원으로서 5-페닐발레르에이트 또는 8-페닐옥타노에이트에서 배양되는 경우, 균주가 성장하고 PHA를 축적시킬 수 있었다는 것을 보여준다. 그러나, 5-페닐발레르에이트 및 8-페닐옥타노에이트에 대해 각각 15-18 wt% 및 7 wt%의 낮은 PHA 수율이 획득되었다. 방향족 기질이 10-운데세노에이트(14 또는 27 mM)와 동시에 공급되는 경우, PHA 수율은 40-50 wt%까지 증가하였다.

표 3

방향족 기질을 사용한 슈도모나스 *sp.* IPB-A36 바이오매스 및 PHA 제조

기질	CDW (g/L)	PHA (g/L)	PHA (wt%)
C11:1 (14 mM)	0.97	0.4	36.2
C11:1 (27 mM)	2.45	1.2	49.7
5-PheVal (2 mM)	0.88	0.1	15.1
5-PheVal (5 mM)	0.65	0.1	17.9
5-PheVal (10 mM)	1.47	0.3	17.0
C11:1 (14 mM)+5-PheVal (2 mM)	2.17	0.9	43.1
C11:1 (14 mM)+5-PheVal (10 mM)	2.40	0.9	38.2
C11:1 (27 mM)+5-PheVal (2 mM)	2.00	0.7	36.7
C11:1 (27 mM)+5-PheVal (5 mM)	2.20	0.9	42.4
C11:1 (27 mM)+5-PheVal (10 mM)	2.45	1.2	49.7
8-PheOct (5 mM)	1.02	0.1	6.6
C11:1 (14 mM)+8-PheOct (5 mM)	2.03	0.9	42.6

[0073] 상기 값들은 30°C 및 200 rpm에서 72 h의 인큐베이션 후에 획득되었음.

[0074] 5-Pheval: 5-페닐발레르에이트

[0075] 8-PheOct: 8-페닐옥타노에이트

[0076] C11:1: 10-운데세노에이트

[0077] 5-페닐발레르에이트가 10-운데세노에이트(27 mM)와 조합하여 사용되는 경우, 슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 2 내지 5% 방향족 모노머를 포함하는 PHA 폴리머를 축적시킨다는 것이 관찰되었다. 상기 퍼센트는 낮았지만, 획득된 폴

리머의 열적 특성에 유의적인 변화가 있다는 점이 관찰되었다.

[0078] PHA가 NMR-분광법 및 GC-MS에 의해 조사되었고, 결과는 표 4에 제공된다.

표 4

10-운데세노에이트 및 5-페닐-발레르에이트의 혼합물이 기질로서 사용되는 경우에 획득된 PHA 폴리머의 모노머 조성

기질	불포화 모노머(비닐기), 상대적 %mol			방향족 모노머, 상대적 %mol			다른 물질, 상대적 %mol
	30HC7:1	30HC9:1	30HC11:1	5-Phe-30HC 5	6-Phe-30H C6	8-Phe-30HC 8	
C11:1 (14mM)+ 5-PheVal (2 mM)	10.4	32.0	19.5	26.0			12.0
C11:1 (14mM)+ 5-PheVal (5 mM)	5.9	21.0	10.1	53.0			10.0
C11:1 (14mM)+ 8-PheOct (5 mM)	13.0	32.2	19.8		13.3	9.7	12.0

[0080] 30HC11:1: 3-히드록시-10-운데세노에이트

[0081] 30HC9:1: 3-히드록시-8-노네노에이트

[0082] 30HC7:1: 3-히드록시-6-헵테노에이트

[0083] 5-Phe-30HC5: 5-페닐-3-히드록시-발레르에이트

[0084] 8-Phe-30HC8: 8-페닐-3-히드록시-옥타노에이트

[0085] NMR 분석 결과는 3-히드록시옥타노에이트 및 3-히드록시데카노에이트로 식별된 10-12%의 포화 모노머의 존재를 나타낸다. 포화 모노머의 존재는 균주가 폴리히드록시알카노에이트를 합성하는 β -산화 외에 다른 대사 경로(예를 들어, 지방산의 드노보(*de novo*) 합성을 하는 것의 결과일 것이다. 2 mM의 5-페닐발레르에이트가 동시에 공급물로서 공급되는 경우에 방향족 모노머의 상대적 %mol은 26%mol에 달하였고, 반면에 5 mM의 5-페닐발레르에이트가 공급되는 경우에 상기 퍼센트는 53%mol까지 증가하였다.

[0086] 5 mM의 8-페닐발레르에이트가 공-기질로서 사용된 경우, 폴리머 조성은 23%mol의 방향족 모노머, 65%mol의 불포화 모노머 및 12%mol의 포화(C8:0 및 C10:0) 모노머로 변화했다.

[0087] 제조된 PHA의 추가적인 분석 데이터가 하기의 표 5에 나타난다.

표 5

균주 IPB-A36에 의해 제조된 다양한 폴리머의 분자량 분포

	M_n (kDa)	M_w (kDa)	M_p (kDa)	분산도 (PDI)
슈도모나스 <i>sp.</i> IPB-A36 CY C11-1 (27 mM)	308	662	601	2.2
슈도모나스 <i>sp.</i> IPB-A36 CY C11:1 (27 mM)+5PheVal(2 mM)	201	440	334	2.2
슈도모나스 <i>sp.</i> IPB-A36 CY C11:1 (14 mM)+5PheVal(5 mM)	70	198	99	3.0
슈도모나스 <i>sp.</i> IPB-A36 CY C11:1 (14 mM)+8PheOct(5 mM)	236	429	376	1.8

[0089] 상기 값들은 GPC(universal calibration)에 의해 측정됨: M_p 는 피크 최고점에서의 분자량; M_n 는 수평균분자량, M_w 는 질량분자량, 및 PDI는 다분산지수(polydispersity index)임.

[0090] 유의적으로 더 낮은 분자량을 갖고 가장 높은 PDI를 나타내는 슈도모나스 *sp.* IPB-A36 C11:1(14 mM) + 5

PheVal(5 mM)을 제외하고, 다양한 기질 조합에서 배양된 슈도모나스 *sp.* IPB-A36에 의해 제조된 폴리머들은 유사한 분자량 분포를 나타내었다. 또한, 표 6에 나타난 DSC 분석결과는 분석된 나머지 PHA 폴리머와 다른 상기 폴리머의 거동을 시사한다.

표 6

균주 IPB-A36에 의해 제조된 다양한 폴리머의 열적 특성

	$T_{g,1}$ (°C)	$T_{g,2}$ (°C)	$\Delta c_{p,1}$ (J g ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta c_{p,2}$ (J g ⁻¹ K ⁻¹)	$T_{g,c}$ (°C)	$T_{d,1}$ (°C)	$\Delta H_{d,1}$ (J g ⁻¹)
IPB-A36 CY C11:1 (27mM)	-51		0.49		-58	299	550
IPB-A36 C-Y C11:1 (27 mM)+5PheVal (2 mM)	-49	-18	0.15	0.19		300	560
IPB-A36 C-Y C11:1 (14 mM)+5PheVal (5 mM)	-52	-1	0.11	0.23	-5	301	620
IPB-A36 C-Y C11:1 (14 mM)+8PheOct (5 mM)	-47	-24	0.28	0.10		301	510

[0092] T_g : 유리전이온도, $T_{g,c}$: 쿨링런(cooling run) 온도, Δc_p : T_g 에서 열용량의 변화, T_d : 용해온도, 및 ΔH_d : 용해엔탈피. 모든 데이터는 DSC 두번째 히팅런(heating run) 또는 첫번째 쿨링런으로부터 획득됨.

실시예 4

[0094] 슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 기질로서 올레산(1%)을 사용하여 C-Y 및 C-Y(2N) 배지에서 배양되었다. 양 조건 모두에서 유사한 비율의 PHA 축적(~50 wt%)이 관찰되었지만, C-Y(2N)가 사용되는 경우 최고의 바이오매스 CDW(4.5 g/L) 및 PHA(2.1 g/L) 수율이 획득되었다.

[0095] GC-MS 및 NMR 분석결과에 따르면, 제조된 PHA 폴리머는 8 mol% 30HC6:0, 44.2 mol% 30HC8:0, 24.5 mol% 30HC10:0, 10.7 mol% C30HC12:0 및 12.6 mol% 30HC14:1로 구성되었다(30HC = 3-히드록시카르복시산, 예를 들어 14:1의 첫번째 숫자는 탄소 원자의 총 수, 두번째 숫자는 이중결합의 수를 지칭함). 상기 폴리머의 추가적인 특성은 하기의 표 7에 나타난다.

표 7

IPB-A36에 의해 제조된 PHA-폴리머의 분자량 분포

균주/배지-기질	M_n (kDa)	M_w (kDa)	M_p (kDa)	분산도 PDI	
IPB-A36/ C-Y- 올레산	94	194	147	2.1	
	$T_{g,1}$ (°C)	$\Delta c_{p,1}$ (J g ⁻¹ K ⁻¹)	$T_{g,c}$ (°C)	$T_{d,1}$ (°C)	$\Delta H_{d,1}$ (J g ⁻¹)
IPB-A36/ C-Y- 올레산	-48	0.42	-52	298	520

[0097] 상기 값들은 GPC(범용 보정(universal calibration))에 의해 측정됨: M_p 는 피크 최고점에서의 분자량; M_n 는 수평균분자량; M_w 는 질량분자량; PDI는 다분산지수; T_g : 유리전이온도, $T_{g,c}$: 쿨링런 온도, Δc_p : T_g 에서 열용량의 변화, T_d : 용해온도, 및 ΔH_d : 용해엔탈피. 모든 데이터는 DSC 두번째 히팅런 또는 첫번째 쿨링런으로부터 획득됨.

됨.

[0098] 실시예 5

슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 400 rpm의 초기 교반, 3 L/min의 공기 유량 및 (배지에 용해된 총 기체에 상대적으로) 30%에 고정된 산소의 분압(pO₂)를 사용하고, 캐스케이드 제어(cascade control)를 사용하여 유지된, C-Y(2N) 배지의 페드-배치 공정에서 배양되었다. 동역학 파라미터가 계산되었고, 0.075 h⁻¹의 μ_{set} 가 선택되었다. 또한, NH₄⁺ 공급을 위한 외부 펌프가 첨가되었다. 상기 계산에 따르면, 완전한 탄소-공급원 소비를 보장하기 위해 초기 배치는 15h까지 연장되었고, 그 후 44h의 지수적 공급(exponential feeding)이 이어졌다.

[0100] 15h의 초기 배양 후에, 탄소 공급원이 완전히 소비되었고(HPLC 분석에 의해 측정됨), 지수적 공급이 시작되었다. 배양체가 즉시 반응하였고, 산소의 수요가 더 높은 대사활성에 따라 증가하였다. 교반 속도가 900 rpm의 최고 속도까지 증가하였고, 순수 산소가 공급될 필요가 있다. 공기 흐름에 혼합된 순수 산소의 퍼센트는 공정의 종결까지 증가되어야 했고, 28%mol의 값에 도달하였다.

[0101] 바이오매스 및 PHA 제조 데이터가 표 8에 요약되었다. 상기 데이터는 40h의 배양 후에 세포가 성장을 정지하였지만, 계속 축적하였음을 보여주고, 이는 질소 소비에 문제가 있을 수 있다는 점을 나타낸다.

표 8

페드-배치 공정 BR-5.12에 대한 바이오매스 및 PHA 제조, 및 OD 측정 결과

시간(h)	CDW (g/L)	CDW-lif (g/L)	잔여 바이오매스(g/L)	PHA (g/L)	PHA (%wt)	OD _{550 nm}
0	0.02	0.00	0.02	0.00	0.0	0.200
11	1.15	1.07	0.57	0.58	50.4	5.698
13	1.72	1.72	0.95	0.77	44.8	8.704
17	2.72	2.68	1.50	1.22	44.9	13.853
20	4.70	4.50	2.59	2.11	44.9	26.677
22	5.31	4.95	2.64	2.67	50.3	36.192
25	5.61	4.84	2.68	2.93	52.3	39.715
29	6.31	6.29	2.48	3.83	60.7	37.944
32.5	6.77	6.67	2.77	4.00	59.1	33.738
36.5	8.36	8.54	3.53	4.83	57.8	45.348
38.5	9.67	9.21	4.73	4.94	51.1	55.219
42	10.25	10.68	4.18	6.07	59.2	65.295
46	11.10	11.08	4.56	6.54	58.9	73.44
50	11.21	11.51	4.35	6.86	61.2	65.418
54	11.30	11.22	4.16	7.14	63.2	62.420
70	11.77	11.57	4.36	7.41	63.0	76.095

[0102]

상기 값들은 2번 측정한 값의 평균임.

[0103] PHA(wt%) 축적은 전체 공정에 걸쳐 45-60 wt%의 값에 도달함으로써, 발효의 초기 단계에서 더 높았다. 놀랍게도, 상기 배양 조건에서 세포주 슈도모나스 *sp.* IPB-A36은 성장하는 것보다 더 많은 PHA(7.41 g/L)를 합성할 수 있었고, 잔여 바이오매스(PHA가 없는 바이오매스)는 약 4.5 g/L였다.

[0104] 실시예 6

슈도모나스 *sp.* IPB-A36은 400 rpm의 초기 교반, 3 L/min의 공기 유량 및 캐스케이드 제어를 사용하여 30%mol에 고정된 pO₂를 사용하여, 배지 C-Y(2N)에 의한 실시예 5와 동일한 조건에 따라 추가적인 개선 페드-배치 공정에서 배양되었다. 동역학 파라미터가 재계산되었고, 0.075 h⁻¹의 μ_{set} 이 고정되었다. 초기 14 h의 배치 발효 동안 2.5 g/L의 C11:1을 갖는 배치 배양체에 의해 시작되었고, 45h 초과의 지수적 공급이 이어졌다.

[0105] 초기 14h의 배양 후에, 탄소 공급원이 완전히 소비되었고(HPLC 분석에 의해 검출됨), 지수적 공급이 시작되었다. 배치 배양체의 성장 공정은 배양 10h 후에 예상보다 일찍 완료되었다. 그러나, 지수적 공급이 시작되자마자, 더 높은 대사활성에 따라 필요한 교반 및 산소 소비의 급격한 증가에 의해 관찰된 바와 같이 배양체

가 즉시 반응하였다. 교반 속도는 1,400 rpm까지 증가하였고, 기체 흐름은 60%의 순수 산소 혼합물이 P_2O_5 를 30%에 유지하도록 할 필요가 있었다.

[0108] 암모늄 공급은 폴리머 축적에 직접적인 영향을 주었다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 최대 성장 단계(24h 내지 36h의 배양) 동안 PHA가 상당히 감소하였다. 박테리아 성장을 보장하기 위해, 배지의 암모늄 함량은 약 400 mg/L(약 22 mM)로 유지되었다(도 2B). 암모늄 소비의 감소에 의해 나타난 바와 같이, 36h의 배양 후에 PHA 축적이 다시 시작되었다.

[0109] 배양 42h에서, 거품 형성의 증가가 관찰되었다. 배양은 45 h에 정지되었다. 미생물에 의해 제조된 PHA의 분리는 각각 22.5 g/L의 세포 건조 중량 및 8.9 g/L의 PHA 수율을 제공하였다.

실시예 7

[0111] PHA 회수에서 PHA 과립 병합(coalescence)의 영향은 용매추출법에 의해 평가되었다. PHA 추출은 2가지 용매(아세톤 및 클로로포름), 다른 추출 온도(실온 및 80°C) 및 다른 추출 시간(1h 및 3h)에 수행되었다. 과립 형성에서 관찰된 2가지의 형태 (i) 세포질에 따라 분포된 복수의 과립 형성 및 (ii) 박테리아 세포 전체를 차지하는 유일한 대형 과립의 형성을 평가하기 위해, 2가지의 배양조건이 선택되었다.

[0112] 슈도모나스 *sp.* IPB-A36이 2가지 탄소 공급원 농도 (a) 27 mM의 C11:1 및 (b) 27+27 mM(24 h의 배양 후에 27 mM의 C11:1 필스가 첨가됨을 의미함)을 사용하여, C-Y 배지에서 30°C 및 200 rpm에서 배양되었다. 상기의 다양한 추출 조건을 사용하여 그 후에 추출되기 위해, 세포가 72 h의 배양 후에 채취(harvest) 및 동결건조되었다. 40 mg의 동결건조된 바이오매스 샘플이 추출관에 배치, 대응되는 용매에 재현탁 및 추출되었다. PHA 회수의 퍼센트가 표 9에 요약되었다.

표 9

다양한 추출 조건을 사용하여 획득된 PHA 회수의 퍼센트

기질	용매	1h-RT	3h-RT	1h-80°C	3h-80°C
27 mM C11:11	클로로포름	44.2±1.8	44.9±1.0	48.1±0.2	47.3±1.1
	아세톤	43.1±2.4	38.7±1.0		
27+27 mM C11:11	클로로포름	58.6±2.5	60.4±8.1	59.9±0.9	58.2±1.9
	아세톤	55.1±1.6	54.8±0.6		

[0113] 상기 결과는 3번 측정한 값의 평균 ± 표준편차. RT: 실온

[0115] 양 배양조건 모두에서 가장 높은 PHA 회수율은 추출 용매로서 클로로포름을 사용한 경우에 획득되었고, 이는 27 mM의 C11:1을 갖는 배양체에서 44-48% 및 27+27 mM의 C11:1을 갖는 배양체의 경우에 58-60%이었다.

[0116] 2가지의 과립 형태 중에 어떠한 차이가 있는지 판단하기 위해, 클로로포름에 의한 종래의 추출법(3 h 및 80°C)이 최대 PHA 회수율(100%)로 여겨지고, 상대적 PHA 회수율을 계산하기 위해 대조군으로서 사용되었다. 실온에서의 클로로포름 추출은 추출 시간과는 독립적으로 2가지의 과립 형태 중에서 약간의 차이(약 5%)를 나타내었다. 상대적 회수율은 27 mM의 C11:1을 갖는 배양체의 경우(복수의 과립들)에 95%, 및 27+27 mM의 C11:1을 갖는 배양체의 경우(유일한 대형 과립)에 100%였다. 그러나, 클로로포름이 80°C에서 사용된 경우, 상대적 회수율(rel.%)에서는 차이가 관찰되지 않았다. 아세톤을 용매로서 사용한 경우, 상대적 회수율은 클로로포름에 의해 획득된 것(95-100 rel.%) 보다 더 낮았고(85-95 rel.%), 2가지의 형태 사이에 약간의 차이(5-8 rel.%)가 관찰되었다. 5-8 %의 상대적 회수율 증가가 발견되었다.

수탁번호

[0117]

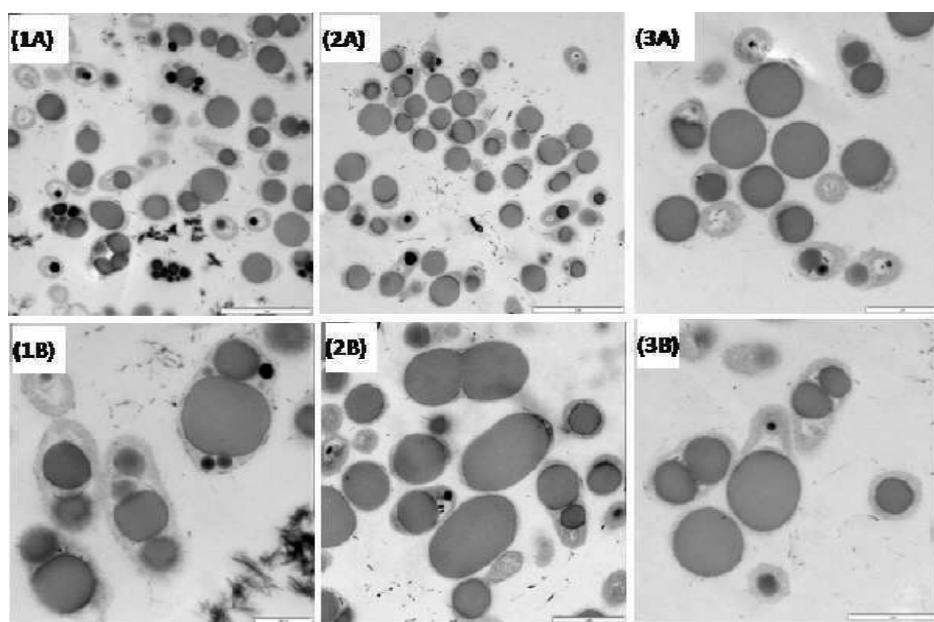
기탁기관명 : Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

수탁번호 : DSM26198

수탁일자 : 20120724

도면

도면1



도면2

