



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0019804
(43) 공개일자 2025년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/625 (2022.01) C12N 1/38 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/625 (2022.01)
C12N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0100834
(22) 출원일자 2023년08월02일
심사청구일자 2023년08월02일

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
전용재
부산광역시 남구 수영로325번길 12, 102동 1503호
(대연동, 부산대연동푸르지오)
김선민
부산광역시 동구 망양로610번길 16, 3층 (초량동)
이혜인
경상남도 창원시 진해구 안창북로 15, 304동 704호 (청안동, 부영아파트 (3차))
(74) 대리인
최규환

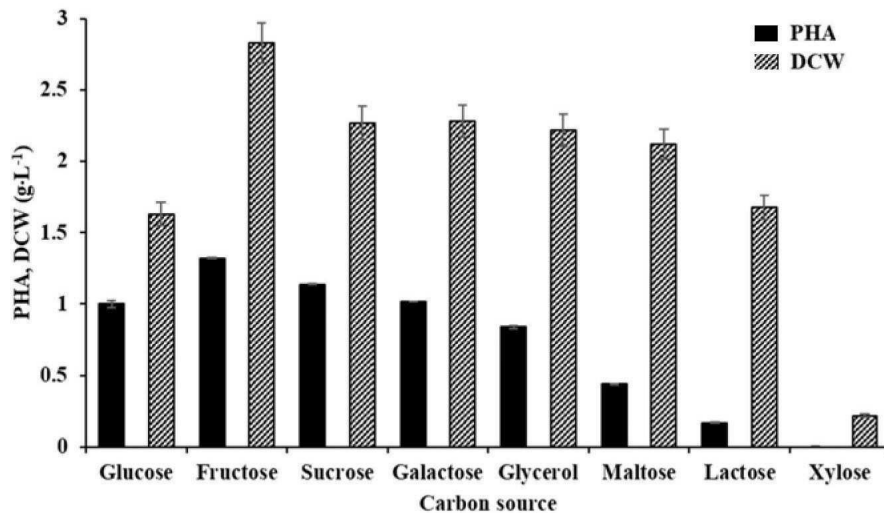
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 파라코커스 해운덴시스를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*)를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates)의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는 배지에 파라코커스 해운덴시스 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711191461
과제번호	2021R1F1A1052782
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	Lignin의 직접적인 미생물전환을 통한 생분해 플라스틱(Polyhydroxyalkanoates,PHA)
생산에 관한 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는 배지에 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates)의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 멀티비타민은 각각 0.8~1.2 μg/ℓ의 피리독신염산염(pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(riboflavin), 판토텐산(pantothenic acid) 및 니코틴산(nicotinic acid)으로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탄소원은 글루코스(glucose), 프럭토스(fructose), 수크로스(sucrose), 갈락토스(galactose) 또는 글리세롤(glycerol)인 것을 특징으로 하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리하이드록시알카노에이트는 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate)와 3-하이드록시발리레이트(3-hydroxyvalerate)의 공중합체인 것을 특징으로 하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법.

청구항 5

10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는, 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에서 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates)를 생산하기 위한 배지 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*)를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates, PHA)의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화석 자원에서 나온 플라스틱은 포장, 의료, 농업, 자동차 및 식품 산업 등에 사용되는 재료들을 포함하여 다양한 용도로 활용되어 일상 생활에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 이와 같은 광범위한 적용 가능성에도 불구하고, 플라스틱은 매우 낮은 생분해성으로 인해 심각한 환경 문제를 야기하고 있다. 현재 재활용, 매립, 소각 방식에 의존하는 석유 플라스틱 쓰레기의 처리는 재활용률이 낮고 폐기물 처리 과정에서 다이옥신 등의 오염물질이 추가로 발생하기 때문에 근본적인 해결책이 될 수 없다. 따라서, 생분해성 플라스틱은 미세 플라스틱에 의해 유발되는 잠재적인 위험성을 최소화하기 위한 효과적인 수단으로 상업 제품 생산에 전략적으로 채택되어 왔다. 현재 다양한 유형의 생분해성 고분자가 재생 가능한 자원으로부터 생산되고 있으나, 높은 생산 비용은 대중화를 어렵게 하는 주요 요인이다.

[0003] 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates, PHA)는 제한된 영양 조건에서 세포 내 에너지 저장 화합물로서 다양한 미생물에 의해 생산되는 생분해성 바이오플라스틱이다. 자연 환경에서 많은 미생물에 의해 쉽게 분해되는 PHA의 특성 때문에, 바이오플라스틱은 친환경적인 생분해성 고분자로 간주된다. 또한, PHA 단량체의 종류와 비율을 조절하여 기계적 특성과 녹는점을 조절할 수 있기 때문에, 의학, 식품, 에너지 등과 같은 다양한 산업 분야에서 석유 플라스틱의 대안으로 사용되고 있다. 현재 약 150종의 다른 유형의 PHA 단량체가 확인되었다. PHA는 구성된 단량체의 길이에 따라 C₃-C₅ 단량체를 포함하는 짧은 사슬 길이 PHAs(SCL-PHAs), C₆-C₁₄ 단량

체를 포함하는 중간 사슬 길이 PHAs(MCL-PHAs) 및 C₁₅ 이상의 탄소 단량체를 포함하는 긴 사슬 길이 PHAs(LCL-PHAs)로 분류할 수 있다. SCL-PHA는 폴리프로필렌(polypropylene, PP) 및 폴리에틸렌(polyethylene, PE) 등의 기존 플라스틱과 유사하지만, 결정성이 높고 영률(Young's modulus) 및 인장 강도 측면에서 기계적 특성이 좋지 않아 뻣뻣하고 부서지기 쉬운 특성으로 인해 널리 응용하기에 불리하다. 특히 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]는 다양한 종류의 박테리아에 의해 생성되는 SCL-PHA의 가장 일반적인 동중중합체(homopolymer)이다. 그러나, 공중합체 형성에 의해 3HB에 통합된 상이한 하이드록시알카노에이트(hydroxyalkanoate) 단량체 단위는 기계적 특성을 향상시키며, 그 중에서도, 3HB 및 3HV (3-hydroxyvalerate) 단량체 단위의 다양한 몰비로 구성된 공중합체인 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)]는 PHB (polyhydroxybutyrate)와 같이 잘 부러지지 않기 때문에 산업적 적용에 이점이 있다.

[0004] 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*)는 아스타잔틴 생산에 대해 비교적 잘 알려진 호염성(halophilic)의 해양 박테리아이다. 산업 분야에서 호염성의 PHA 생산자는 물 사용 및 정화 단계와 관련된 생산 비용 절감 측면에서 장점이 있음이 알려져 있다. 이에 본 발명에서는 인실리코 합성 경로의 예측을 통해 파라코커스 해운덴시스가 PHA 생산의 잠재적 가능성이 있음을 확인하였고, 질소원 제한 조건에서 수행된 여러 배치 발효 실험을 통해 PHA의 생산을 위한 탄소원의 종류 및 농도 최적화를 수행하였으며, 그 외 PHA 생산 증진을 위한 첨가원에 대해 조사하였다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2018-0128654호에는 '파라코커스 해운덴시스와 유산균의 혼합 배양을 통한 아스타잔틴 생산방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2022876호에는 '폴리히드록시알카노에이트 및 카로티노이드의 동시 생산방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '파라코커스 해운덴시스를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 호염성 해양 세균 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주의 폴리하이드록시알카노에이트(PHA) 생산 여부를 확인하기 위해, 인실리코 방법으로 관련 대사 경로를 예측하였고, 질소원 제한 조건에서 탄소원의 농도 및 탄소원의 종류에 따른 PHA 생산능을 분석한 결과, 12 g/ℓ의 탄소원, 0.5 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는 배지에서 파라코커스 해운덴시스 균주의 PHA 생성능이 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는 배지에 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates)의 생산방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는, 파라코커스 해운덴시스 균주에서 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하기 위한 배지 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 해양 호염성 세균인 파라코커스 해운덴시스 균주부터 폴리히드록시알카노에이트를 효율적으로 대량 수득할 수 있는 배양 조건을 제시함으로써, 폴리히드록시알카노에이트가 적용가능한 다양한 산업 분야에 널리 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 파라코커스 해운덴시스의 세포 성장 및 글루코스 소비 경향을 확인한 것으로, (A)는 M9 액체배지 조건이고 (B)는 멀티비타민을 보충한 M9MV 액체배지 조건의 결과이다.

도 2는 파라코커스 해운덴시스에서 PHA 및 아스타잔틴 생합성에 대해 제안된 대사 경로를 보여준다. PhaC: PHA synthase, PhaB: acetoacetyl-CoA reductase, PhaA: β-ketothiolase, FadJ: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, SucD: succinate semialdehyde, MUT: methylmalonyl-CoA mutase, MCEE: methylmalonyl-CoA epimerase, PCCA: propionyl-CoA carboxylase alpha chain, Acs: acetyl-CoA synthetase, PrpE: propionyl-

CoA synthetase, CrtE: FPP/GGPP synthase family, CrtB: Phytoene synthase, CrtI: Phytoene desaturase, CrtW: Beta-carotene ketolase, CrtZ: Beta-carotene hydroxylase, FPP: farnesyl pyrophosphate, GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate.

도 3은 고정된 질소원(0.5 g/ℓ NH_4Cl) 조건에서 글루코스 농도별 배지 발효 시 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생산 프로파일을 나타낸다. 배지 발효는 200 ml M9MV을 이용하여 30℃, 160 rpm의 조건으로 수행되었다. (A) 4 g/ℓ glucose; (B) 8 g/ℓ glucose; (C) 12 g/ℓ glucose; (D) 16 g/ℓ glucose, (E) 20 g/ℓ glucose.

도 4는 파라코커스 해운덴시스의 TEM 이미지로, 세포 내 PHA 과립체를 보여준다. (A)는 변형된 LB 배지에서 배양된 세포이고 (B)는 12 g/ℓ의 글루코스 및 0.5 g/ℓ의 염화암모늄을 보충한 M9MV 배지에서 배양된 세포이다.

도 5는 12 g/ℓ 글루코스 및 0.5 g/ℓ 암모늄 존재 하에서 수행된 배지 실험의 샘플을 사용한 GC/MS 분석의 총 이온 크로마토그램 및 전자화 질량 스펙트럼을 GC-MS 라이브러리 검색 보고서와 비교한 결과이다.

도 6은 다양한 탄소원 조건 하에서 배양된 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생산 및 세포 바이오매스 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는 배지에 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates, PHA)의 생산방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 따른 PHA의 생산방법에 있어서, 상기 파라코커스 해운덴시스 균주는 바람직하게는 파라코커스 해운덴시스 BC74171^T(=KCCM 10460^T=LMG P-21903^T) 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0013] 또한, 본 발명에 따른 PHA의 생산방법에 있어서, 상기 멀티비타민은 각각 최종(final) 농도 0.8~1.2 μg/ℓ의 피리독신염산염(pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(riboflavin), 판토텐산(pantothenic acid) 및 니코틴산(nicotinic acid)으로 이루어진 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 각각 최종 농도 1.0 μg/ℓ의 피리독신염산염, 리보플라빈, 판토텐산 및 니코틴산으로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 멀티비타민은 파라코커스 해운덴시스 BC74171^T 균주가 세포성장을 위해 탄소원을 소비할 때 필요한 성분이다.
- [0014] 또한, 본 발명에 따른 PHA 생산방법에 있어서, 상기 탄소원은 바람직하게는 글루코스(glucose), 프럭토스(fructose), 수크로스(sucrose), 갈락토스(galactose) 또는 글리세롤(glycerol)일 수 있고, 보다 바람직하게는 12 g/ℓ의 글루코스, 프럭토스, 수크로스, 갈락토스 또는 글리세롤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 또한, 본 발명에 따른 PHA 생산방법에 있어서, 상기 질소원은 바람직하게는 0.5 g/ℓ의 암모늄염, 바람직하게는 염화암모늄일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한, 본 발명에 따른 PHA 생산방법에 있어서, 상기 배지는 7~8 g/ℓ 제2인산나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2~4 g/ℓ 인산2수소칼륨(KH_2PO_4), 25~35 g/ℓ 염화나트륨(NaCl), 0.4~0.6 g/ℓ 염화암모늄(NH_4Cl), 0.2~0.3 g/ℓ 황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 35~45 mg/ℓ 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.5~1.5 μg/ℓ 비오틴, 0.5~1.5 μg/ℓ 티아민 및 미량 원소로 이루어진 M9 배지에 10~14 g/ℓ의 탄소원; 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원; 및 각각 0.8~1.2 μg/ℓ의 피리독신염산염(pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(riboflavin), 판토텐산(pantothenic acid) 및 니코틴산(nicotinic acid)으로 이루어진 멀티비타민;이 보충된 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 본 발명에 따른 PHA 생산방법에 있어서, 상기 PHA는 바람직하게는 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate, 3HB)와 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate, 3HV)의 공중합체일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 PHA 생산방법은 보다 구체적으로, 12 g/ℓ의 탄소원, 0.5 g/ℓ의 질소원 및 각각 최종 농도 1.0 μg/ℓ의 피리독신염산염, 리보플라빈, 판토텐산 및 니코틴산으로 이루어진 멀티비타민을 포함하는 M9 배지에 파라코커스 해운덴시스(*P. haeundaensis*) BC74171^T 균주를 28~30℃에서 194~198 시간동안 교반하며 배양하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 PHA 생산방법은 PHA의 3HB와 3HV 비율 조절을 위해 프로피온산(propionic

acid)을 추가로 배지에 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명은 또한, 10~14 g/ℓ의 탄소원, 0.4~0.6 g/ℓ의 질소원 및 멀티비타민을 포함하는, 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에서 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates, PHA)를 생산하기 위한 배지 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 배지 조성물에 있어서, 상기 탄소원, 멀티비타민, 파라코커스 해운덴시스 균주 및 PHA는 전술한 것과 같다.

[0022] 본 발명에 따른 배지 조성물을 이용하면 파라코커스 해운덴시스 BC74171^T 균주로부터 3HB와 3HV의 공중합체 형태인 PHA를 생산할 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 재료 및 방법

[0027] 1. 균주 및 배양 배지

[0028] 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) BC74171^T(=KCCM 10460^T=LMG P-21903^T) 균주는 한국미생물 보존센터(KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms)로부터 분양받아 사용하였다. 상기 균주는 30℃, M9 배지[7.52 g/ℓ 제2인산나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Duksan, Korea), 3.0 g/ℓ 인산2수소칼륨(KH_2PO_4 , Sigma, USA), 30 g/ℓ 염화나트륨 (Samchun, Korea), 0.5 g/ℓ 염화암모늄 (Daejung, Korea), 0.25 g/ℓ 황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Shinyo chemicals, Japan), 40 mg/ℓ 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Duchefa Biochemie, Netherlands), 1 μg/ℓ 비오틴 (Duchefa Biochemie), 1 μg/ℓ 티아민 (Hayashi, Japan), 10 ml/ℓ 미량 원소 용액 (pH 7.5)]에서 배양되었다. 상기 M9 배지에 사용된 미량 원소(trace element) 용액은 5 g/ℓ EDTA (Duchefa Biochemie), 0.83 g/ℓ 염화제이철(염화철Ⅲ) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Daejung), 84 mg/ℓ 염화아연 (ZnCl_2 , Daejung), 13 mg/ℓ 염화구리·2수화물($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Duksan), 10 mg/ℓ 염화코발트·2수화물($\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Junsei, Japan), 10 mg/ℓ 붕산(H_3BO_3 , Shinyo chemicals), 1.6 mg/ℓ 염화망간·4수화물($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Junsei)로 구성되어 있다.

[0029] 파라코커스 해운덴시스의 성장을 촉진하기 위해서, M9 배지 1ℓ 기준 1 ml의 멀티비타민[각각 1 mg/ℓ의 피리독신염산염(pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(riboflavin), 판토텐산(pantothenic acid) 및 니코틴산(nicotinic acid) 포함]을 보충하고(이하, M9MV), 배지의 pH를 8.0으로 조정하였다. 계대 배양을 위해 8 g/ℓ 글루코스 및 15% 한천을 포함하는 M9MV 고체 배제를 사용하였다.

[0031] 2. 파라코커스 해운덴시스에서 PHA 대사 경로의 인실리코(*In silico*) 예측

[0032] 파라코커스 해운덴시스에서 PHA (polyhydroxyalkanoate) 생성에 관련된 경로와 유전자는 GenBank(assembly accession: GCA_006239215.1)와 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) 데이터베이스(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)에서 이용 가능한 게놈 시퀀스를 분석하여 확인하였다. 균주의 게놈에 대한 경로 예측은 BlastKOALA를 통해 이루어졌다.

[0034] 3. 다양한 탄소원을 이용한 PHA 생산

[0035] M9MV 플레이트 상의 파라코커스 해운덴시스 단일 콜로니를 8 g/ℓ 글루코스로 보충된 30 ml M9MV 배지가 포함된 플라스크에 접종한 후, 광학 밀도(OD_{600})가 2.0에 도달할 때까지 30℃, 160 rpm의 교반 속도로 진탕배양기(Vision Scientific, Westland)에서 배양하였다. 모든 배지 발효는 PHA 생성을 평가하기 위해 30℃ 및 160 rpm에서 250 ml의 M9MV 배지가 들어 있는 500 ml 삼각 플라스크에 상기 평균 배양액 10%(v/v)를 접종하여 수행되었

다. 질소 제한 조건으로서, 염화암모늄(NH_4Cl)은 0.5 g/l 보충되었다. PHA 생산을 위한 탄소 과잉 조건을 결정하기 위해, $4\sim 20 \text{ g/l}$ 범위의 글루코스를 M9MV에 보충하였다.

[0036] 탄소원 종류에 따른 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생산능을 확인하기 위해 글루코스, 프럭토스, 락토스, 갈락토스, 수크로스, 글리세롤 또는 자일로스를 12 g/l 의 농도로 M9MV 배지에 각각 보충하였다.

[0038] 4. 이차 탄소원으로서 프로피온산(propionic acid)을 포함하는 PHA 생산

[0039] 파라코커스 해운덴시스에서 생산된 PHA에서 3-hydroxyvalrate의 단량체 단위의 비율을 개선하기 위해 인실리코에서 예측된 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생합성 경로에서 3-hydroxyvalrate의 전구체로 확인된 프로피온산을 추가로 M9MV 배양액에 보충하였다. 이를 위해, 프로피온산 농도는 사전 결정된 포도당 농도와 함께 $0\sim 4 \text{ g/l}$ 사이의 범위로 보충되었다.

[0041] 5. PHA 정량

[0042] PHAs 농도는 이전에 보고된 메탄올 분석 방법(Juengert JR, et al., 2018, Bio Protoc. 8: e2748)을 사용하여 가스 크로마토그래피에 의해 결정되었다. 배지 발효 실험에서 채취한 세포를 탈이온수로 세 번 세척한 후 세포 펠릿은 동결 건조기를 사용하여 동결 건조하였다. 15 ml Pyrex 유리관의 건조된 세포는 $15\%(\text{v/v})$ 황산을 함유한 1 ml 클로로포름과 1 ml 메탄올로 처리되었다. 건조된 세포가 들어 있는 15 ml Pyrex 튜브는 PTFE 씰 캡으로 씌우고 100°C 의 수조에서 2.5시간 동안 배양하였다. 그 후 튜브를 얼음 위에서 10분간 식힌 후 내부 표준으로서 $0.2\%(\text{v/v})$ 메틸 벤조에이트를 포함하는 1 ml 의 클로로포름과 1 ml 의 탈이온수를 튜브에 추가하고 30초 동안 볼텍싱하였다. 아래의 용매상(solvent phase)을 수집하여 PHA 정량화에 사용하였다. Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]와 Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)를 각각 3HB 및 3HV 단량체 단위 정량화 교정을 위한 표준품으로 사용하였다. 이를 위해, 표준품 또한 상기에서 언급한 PHA 정량화를 위한 샘플 준비와 동일한 절차를 수행하였다. 이 절차를 따르는 모든 샘플과 표준품은 최종적으로 PTFE/H 수소성 주사기 필터(CHMLAB, $0.2 \mu\text{m}$)를 통해 여과되었고 GC 또는 GC/MS를 통해 PHA의 정량화에 사용되었다.

[0044] 6. 투과전자현미경법(transmission electron microscopy)

[0045] 세포는 4°C 에서 하루 동안 $2\%(\text{v/v})$ 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 포함하는 0.1 M 인산완충제(pH 7.0)를 사용하여 전고정하고, 0.1 M 인산완충제로 3회 세척한 후, 4°C 에서 1시간 동안 $1\%(\text{w/v})$ OsO_4 (osmium tetroxide)에 후고정하였다. 고정된 세포는 증류수로 세 번 세척하였다. 탈수는 4°C 에서 50, 60, 70, 80, 90%의 에탄올 시리즈를 사용하여 각각 10분씩, 3회에 걸쳐 수행되었다. 그 후 펠릿을 상온에 방치한 후 50%의 프로필렌 옥사이드로 포매된 Suppr's 수지(embedding resin)에 각각 20분 동안 두 번씩 반응시킨 후 다시 75%의 프로필렌 옥사이드에 각각 1시간씩 반응시키고, 최종 100%에 밤새 반응시켰다. 다음 날, 펠릿은 새로운 순수 수지로 옮겨졌고 70°C 에서 중합되었다. 블록은 PT-X 초마이크로톰(RMC Products, Beckeler Instruments, AZ)에서 얇게 섹션하였다. 70 nm 두께의 섹션을 슬롯 구리 그리드에 올리고 UranylLess 용액(Electron Microscopy Sciences, USA)과 Reynold's lead citrate로 염색한 후 120 kV 에서 작동하는 JEM-2100F 투과전자현미경(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰 및 촬영하였다.

[0047] 7. 분석 기술

[0048] 세포성장은 분광광도계(Unicam UV-VIS GB/UV 540, US)를 이용하여 600 nm 에서의 광학밀도로 측정하였으며, 세포 바이오매스 농도의 동적 평가를 위하여 세포건조중량(CDW)을 중력측정법으로 측정하였다. 10 ml 배양액을 채취하여 $9,000 \text{ rpm}$ 으로 10분간 원심분리한 후 수득한 세포는 탈이온수로 3회 세척 후 105°C 의 오븐에서 하룻밤 동안 건조하였다.

[0049] 파라코커스 해운덴시스에 의한 탄소 공급원 소비를 결정하기 위해, 이전에 보고된(Saratale GD, Oh MK. Int J Biol Macromol. 2015; 80:627-635) HPLC 방법을 사용하여 글루코스, 프럭토스, 락토스, 갈락토스, 글리세롤 및 자일로스를 각각 정량화하였다. 분석은 Aminex HPX-87H (BioRad, USA) 컬럼과 refractive index 검출기가 장착

된 HPLC (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 이동상으로는 5 mM 황산(H_2SO_4)을 준비하여 사용하였다. 탄소농도 분석을 위해 시료 1개당 20 $\mu\ell$ 를 5 mM 황산을 사용하여 오븐 온도 50°C에서 유속 0.6 $ml \cdot min^{-1}$ 로 30분간 HPLC 시스템에 주입하였다.

[0050] 메탄올 분석 후 PHA의 정량화는 GC-FID 방법으로 수행되었다(Juengert JR, et al., Bio Protoc. 2018; 8(5):e2748; Werker A, et al., Water Res. 2008; 42(10-11):2517-2526). 가스 크로마토그래프 시스템(Agilent 6890N)과 flame ionization detector (FID)가 사용되었다. 메탄올분해(methanolysis)에서 생성된 PHA 단량체를 분석하기 위해 Aligent DB-WAX Ultra Inert capillary 컬럼 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)을 사용하였다. 분석은 split injection mode로 250°C의 주입 온도에서 수행하였다. 컬럼 온도 및 프로그램은 다음과 같다: 80°C에서 2분간 홀드(hold), 10°C/min으로 245°C까지 상승 후 1분간 홀드, 압력 14.9 psi, 총유량 26.5 $ml \cdot min^{-1}$, injection split 20:1, split flow 22.7 $ml \cdot min^{-1}$.

[0051] PHA의 단량체 조성을 확인하기 위해 가스 크로마토그래피 질량 분석법(GCMS QP-2010 Ultra, Shimadzu)이 추가로 사용되었다. 메탄올 분석에서 생성된 PHA 단량체를 분석하기 위해 모세관 컬럼(DB-5MS Ultra, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)을 사용하였다. 분석은 split injection mode로 260°C로 설정된 주입 온도를 조건으로 수행하였다. 컬럼 온도 및 프로그램은 다음과 같다: 80°C에서 2분간 홀드(hold), 10°C/min으로 120°C까지 상승, 45°C/min으로 270°C까지 상승 후 3.67분간 홀드. 260°C의 주입 온도, 압력 65.2 kPa, 총유량 104.0 $ml \cdot min^{-1}$, injection split 100:1, split flow 3.0 $ml \cdot min^{-1}$.

[0053] 8. 동력학적 계수(kinetic parameters)의 계산

[0054] 배치 발효를 위한 동력학적 변수는 다음 방정식에 의해 결정되었다.

[0055] 바이오매스 수율($Y_{x/s}$)은 다음 방정식을 사용하여 계산되었다:

$$Y_{x/s} = \frac{x_f - x_i}{s_i - s_f}$$

[0056]

[0057] 여기서 x 와 s 는 각각 바이오매스와 당의 초기(i) 및 최종(f) 농도를 의미한다.

[0058] PHAs 함량(C_p)은 다음 방정식을 사용하여 계산되었다:

$$C_p = \frac{p_f}{x_f}$$

[0059]

[0060] 여기서 p 와 x 는 각각 PHA와 바이오매스의 최종 농도이다. 즉, PHAs 함량은 세포 건조중량 당 PHA의 양을 의미한다.

[0061] PHA 수율($Y_{p/s}$)은 다음 방정식을 사용하여 계산되었다:

$$Y_{p/s} = \frac{p_f - p_i}{s_f - s_i}$$

[0062]

[0063] 여기서 p 와 s 는 각각 PHA와 당의 초기(i) 농도와 최종(f) 농도이다. 즉, PHA 수율은 소모된 탄소원(당) 1 g 당 생산된 PHA의 양을 의미한다.

[0064] PHA 생산성($P_{p/t}$)은 다음 방정식을 사용하여 계산되었다:

$$P_{p/t} = \frac{\Delta p}{\Delta t}$$

[0065]

[0066] 여기서 p 와 t 는 PHA의 농도 및 시간이다.

[0068] **실시예 1. 파라코커스 해운덴시스의 영양 요구성**

[0069] 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haundaensis*)의 PHA 생산 잠재력을 조사하기 전에, 세포 성장 성능을 조사하기 위해 화학적으로 정의된 영양 조건을 제공하는 8 g/ℓ 글루코스로 보충된 M9 액체배지를 선택하였다. 도 1A에 개시된 바와 같이, 168시간의 배양 동안 8 g/ℓ의 글루코스는 소비되지 않았으며, 세포 바이오매스의 광학 밀도(OD₆₀₀)는 0.1에만 도달하여, 파라코커스 해운덴시스의 세포 성장을 위해 M9 배지가 추가 성장 인자를 필요로 함을 알 수 있었다. 이러한 추가 성장 요구 사항을 식별하기 위해 다양한 비타민 및 기타 성장 인자 조합을 사용하여 여러 성장 연구를 수행하였다(데이터 미제시). 그 중 M9 액체배지에 피리독신염산염, 리보플라빈, 판토텐산 및 니코틴산을 포함하는 멀티 비타민을 보충한 경우(M9MV 배지) 세포 성장이 크게 향상되었다(도 1B). 배양이 종료된 시점에 4 g/ℓ의 글루코스가 소비되지 않은 상태로 남아 있었지만, 광학 밀도(OD₆₀₀)는 4.0에 도달하였으며, 이는 파라코커스 해운덴시스가 피리독신염산염, 리보플라빈, 판토텐산 및 니코틴산을 포함하는 비타민을 필요로 하는 보조영양생물임을 의미하였다. 이전의 연구에서 30 g/ℓ 염화나트륨을 포함하는 LB 배지가 파라코커스 해운덴시스에 대한 효율적인 아스타잔틴 생산을 위한 완전한 세포 성장 요구사항을 제공할 수 있다고 보고되었지만, 트립톤과 효모 추출물을 포함한 복잡한 유기 질소 공급원을 포함하는 배지는 파라코커스 해운덴시스의 질소 한계와 초과 탄소 조건을 도입하기에 적합하지 않은 것으로 확인되었다.

[0071] **실시예 2. 파라코커스 해운덴시스에서 PHA 생합성 경로의 바이오인포매틱스 예측**

[0072] Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)에서 얻은 파라코커스 해운덴시스의 게놈 시퀀스(assembly accession: GCA_006239215.1)는 KEGG 데이터베이스를 사용하여 PHA의 생합성 경로를 예측하는 데 사용되었다. 도 2는 파라코커스 해운덴시스 게놈에 존재하는 해당 효소에 기반한 제안된 PHA 생성 경로를 보여준다. BlastKOALA를 통해 얻은 대사 경로 중에서, 파라코커스 해운덴시스에 사용된 PHB (Polyhydroxybutyrate) 생합성 경로는 파라코커스 데니트리칸스(*P. denitrificans*), 큐프리아비비두스 네케터(*Cupriavidus necator*) 및 크로모박테리움(*Chromobacterium*) sp. USM2와 같은 알려진 다른 PHB 생성 박테리아의 PHB 합성 경로 및 단백질과 관련된 아미노산 유사성 비교를 사용하여 예측되었다. 피루브산은 포도당으로부터 해당과정을 통해 생성되고, PHA 생합성은 C₃ 중간체 피루브산으로부터 시작된다. 그런 다음 피루브산은 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase; WP_011015247.1)에 의해 아세틸-CoA(Acetyl-CoA)로 전환된다. 피루브산으로부터 생성된 아세틸-CoA의 두 분자는 β-ketothiolase (PhaA: WP_139598808)에 의해 응축되어 아세토아세틸-CoA가 된다. 중간 생성물은 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH) 의존적 아세토아세틸-CoA 환원효소(PhaB: TNH37875.1)에 의해 추가로 환원되고, 이어서 PHB 전구체로서 (R)-3-hydroxybutyl-CoA로 전환된다. 이 경로를 통해 생성된 PHB 단량체는 PHA polymerase (PhaC: TNH40935.1)에 의해 기질로 사용되어 최종적으로 PHB 중합체로 중합된다. 또한 프로피온산과 TCA 회로의 중간체 숙신산은 이어서 3-ketovaleryl CoA로 전환된다. 3-ketovaleryl CoA는 PhaB에 의해 최종적으로 3-hydroxyvaleryl CoA로 전환되고 PhaC에 의해 기질로 사용되어 poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate [P(3HB-co-3HV)]를 중합한다.

[0073] 일반적으로 PHA의 종류는 PhaC 효소가 기질로 사용하는 단량체의 종류에 따라 달라진다. 일반적으로 PhaC 효소는 기질 특이성, 아미노산 서열로부터 유도된 1차 구조 및 서브유닛 구성에 따라 4가지 등급으로 분류된다. 파라코커스 해운덴시스의 PhaC의 효소적 기능과 기질 특이성을 예측하기 위해 PhaC의 아미노산 서열 상동성을 분석하고 다른 PHA 생성 세균에서 알려진 클래스 I PhaC 효소와 비교하였다. 그 결과, 파라코커스 해운덴시스의 PhaC 효소는 파라코커스 데니트리칸스의 PhaC에 가장 높은 동일성(62.92%)을 보여주었다. 파라코커스 데니트리칸스는 P(3HB) 및 P(3HB-co-3HV)를 생성하는 것으로 보고되었다. 상기 분석을 통해 파라코커스 해운덴시스가 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)를 모두 생성할 가능성이 있음을 유추할 수 있었다.

[0075] **실시예 3. 파라코커스 해운덴시스의 성장 동안 글루코스로부터 PHA의 합성 분석**

[0076] PHA 생산을 위한 탄소 공급원 초과 및 질소 공급원 제한 조건에 파라코커스 해운덴시스를 도입하기 위해 글루코스를 기본 모델 탄소 공급원으로 사용하였다. 이를 위해 질소 공급원이 0.5 g/ℓ 염화암모늄(NH₄Cl) 농도로 고정된 상태에서 4~20 g/ℓ 범위에서 미리 결정된 글루코스 농도를 M9MV 배지에 보충하였다.

[0077] 그 결과, 배지에 보충된 글루코스의 양은 파라코커스 해운덴시스의 세포 바이오매스와 PHA 농도에 극적으로 영향을 미쳤음을 확인할 수 있었다. 특히, 4 g/ℓ의 글루코스를 포함하는 배지 조건에서, 최종 세포 바이오매스

농도가 168 시간의 배양 동안 0.68 g/ℓ 까지 증가하였고 120 시간째에 글루코스를 완전히 소비하였음을 알 수 있었다(도 3A). 총 PHAs 농도는 120 시간째에 0.29 g/ℓ 로 최대 농도에 도달하였으나, 120 시간 후 배지 내의 글루코스 고갈로 인해 0.05 g/ℓ 로 감소하였으며, 이는 생성된 PHA가 에너지 및 탄소 공급원으로 사용하기 위해 세균에 의해 분해되었음을 나타낸다. 8 g/ℓ 의 글루코스가 포함된 배지 조건에서, 파라코커스 해운덴시스는 4 g/ℓ 의 글루코스만 소비하였으며, 바이오매스와 총 PHAs 농도는 각각 1 g/ℓ 과 0.34 g/ℓ 로 확인되었다(도 3B). 그러나, 12 g/ℓ 이상의 글루코스가 배지에 존재하는 경우, 최종 세포 바이오매스는 평균 0.89 g/ℓ . 총 PHAs 농도는 평균 1.6 g/ℓ 로 상대적으로 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다(도 3C, 3D 및 3E). 이 결과는 세포 성장에 사용할 수 있는 질소 공급원의 한계 때문인 것으로 유추되었다.

표 1

PHA 생산을 위한 파라코커스 해운덴시스 배지 배양(168시간) 결과

Glucose concentration (g ℓ ⁻¹)	Biomass (g ℓ ⁻¹)	3HB content (g g ⁻¹)	3HV content (g g ⁻¹)	3HB:3HV molar ratio (%)	PHA (g ℓ ⁻¹)	PHA yield (g g ⁻¹)	PHA productivity (g ℓ ⁻¹ h ⁻¹)
4	0.7 ± 0.03	0.08 ± 0.006 ^a	N/D ^b	100:0	0.05	0.01	0.001
8	1.0 ± 0.05	0.36 ± 0.027	N/D	100:0	0.34	0.09	0.002
12	1.6 ± 0.08	0.61 ± 0.090	0.02 ± 0.014	97:3	1.03	0.17	0.006
16	1.5 ± 0.08	0.47 ± 0.044	0.02 ± 0.020	96:4	0.75	0.12	0.004
20	1.6 ± 0.08	0.56 ± 0.079	0.02 ± 0.022	97:3	0.90	0.15	0.005

^a: average values generated from triplicates

^b: Not detected

상기 표 1을 통해 확인할 수 있는 것과 같이, 0.5 g/ℓ 의 염화암모늄이 고정된 상태에서는 12 g/ℓ 의 글루코스 조건에서 세포 바이오매스, PHA 함량, PHA 수율 및 PHA 생산성이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

본 배지 실험에서 수확한 세포들을 투과전자현미경으로 분석한 결과, 파라코커스 해운덴시스에 PHA 축적이 효율적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다(도 4). 이에 본 발명자는 질소 제한 조건 하에서 유일한 탄소 공급원으로서 글루코스가 제공될 때 12 g/ℓ 농도에서 PHA의 생산이 최대치에 달성되었다고 결론을 내렸다.

실시예 4. 파라코커스 해운덴시스에 의해 생산되는 PHA의 확인

파라코커스 해운덴시스에 의해 생성된 PHA의 품질과 양을 결정하기 위해, GC 및 GC/MS 분석은 이전의 모든 배지 발효 실험에서 수확된 세포를 사용하여 수행되었다. 12 g/ℓ 글루코스 및 0.5 g/ℓ 암모늄 존재 하에서 수행된 배지 실험의 샘플을 사용한 GC/MS 분석의 총 이온 크로마토그램의 대표적인 예는 도 5와 같다. 분석 결과 3-하이드록시부틸레이트 메틸 에스테르(3-hydroxybutyrate methyl ester; 도 5A), 3-하이드록시발러레이트 메틸 에스테르(3-hydroxyvalerate methyl ester; 도 5B) 및 내부표준으로 벤조에이트 메틸 에스테르(benzoate methyl ester; 도 5C)를 나타내는 피크가 확인되었다. 전자화 질량 스펙트럼을 GC-MS 라이브러리 검색 보고서와 비교한 결과, C4 및 C5 알킬 단량체는 총 이온 크로마토그램(TIC)에서 각각 2.537분에서 3-hydroxybutyrate methyl ester (3-HBME), 3.587분에서 3-hydroxyvalerate methyl ester (3-HVME)로 검출되었다(도 5). 2.537분의 보유 시간(RT)에서 나타난 피크는 분자량 118, 스펙트럼 일치 지수(SI)가 95인 3-hydroxybutyric acid-methyl ester와 일치하였다. 3.587분의 RT에서 나타난 피크는 분자량이 132, SI가 90인 3-hydroxyvaleric acid-methyl ester와 일치하였다. 이 GC/MS 분석에 기초하여, 파라코커스 해운덴시스는 질소 공급원 제한 조건 하에서 단일 탄소 공급원으로서 포도당이 존재할 때 두 가지 다른 유형의 PHAs를 생성하는 것을 알 수 있었다(표 1). 특히, 4 g/ℓ 에서 8 g/ℓ 까지의 글루코스 존재 하에서, 파라코커스 해운덴시스는 poly(3-hydroxybutyrate)의 동종 중합체(homopolymer)를 생성하였다. 그러나, 12 g/ℓ 이상의 높은 글루코스가 존재하는 경우, 파라코커스 해운덴시스는 97%의 3-hydroxybutyrate와 3%의 3-hydroxyvalerate로 구성된 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 생산하였다.

실시예 5. PHA 생산에 미치는 탄소원의 영향

12 g/ℓ 글루코스가 존재할 때 가장 높은 세포 바이오매스와 PHA 생산이 달성되었기 때문에, 상기 농도를 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생성을 평가하기 위한 다른 종류의 탄소 공급원의 보충 농도로 선택하였다. 사용된 탄소원은 프럭토스, 수크로스, 갈락토스, 글리세롤, 말토스, 락토스, 자일로스의 총 7개가 선택되었다.

탄소원의 종류에 따른 세포 바이오매스와 PHA 생산을 비교한 결과, 자일로스를 제외한 탄소원은 파라코커스 해

운덴시스에 의해 탄소 및 에너지원으로 효율적으로 사용되었음을 알 수 있었다. 또한, 도 6에 개시된 바와 같이 프럭토스는 파라코커스 해운덴시스가 PHA를 생산하기 위해 가장 선호하는 탄소 공급원으로 확인되었다. 프럭토스를 사용한 조건에서 최종 세포 바이오매스는 2.8 g/ℓ로, 총 PHA 농도는 1.29 g/ℓ로 확인되었다.

[0088] 생산된 PHAs를 분석한 결과, 말토스를 제외하고 테스트된 탄소원으로부터 생산된 PHA는 P(3HB-co-3HV)의 공중합체 유형임을 알 수 있었다(표 2). 특히, 락토스를 단일 탄소 공급원으로 사용한 경우, 더 높은 비율의 3HV(7%)를 포함하는 공중합체를 합성하는 것을 알 수 있었다.

표 2

탄소원에 따른 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생산 비교

Carbon source	Biomass (g ℓ ⁻¹)	3HB content (g g ⁻¹)	3HV content (g g ⁻¹)	Total PHAs contents (g g ⁻¹)	3HB:3HV molar ratio (%)	PHA (g ℓ ⁻¹)	PHA yield (g g ⁻¹)	PHA productivity (g ℓ ⁻¹ h ⁻¹)
Glucose	1.6 ± 0.08	0.61 ± 0.090 ^a	0.01 ± 0.014	0.62	99:1	1.03	0.17	0.006
Fructose	2.8 ± 0.01	0.44 ± 0.004	0.01 ± 0.001	0.45	98:2	1.29	0.16	0.008
Sucrose	2.3 ± 0.01	0.48 ± 0.002	0.01 ± 0.020	0.49	98:2	1.11	0.12	0.007
Galactose	2.3 ± 0.01	0.43 ± 0.010	0.01 ± 0.001	0.43	98:2	0.99	0.17	0.006
Glycerol	2.2 ± 0.01	0.35 ± 0.005	0.01 ± 0.001	0.35	98:2	0.82	0.14	0.005
Maltose	2.1 ± 0.01	0.20 ± 0.008	N/D	0.20	100:0	0.44	0.14	0.003
Lactose	1.7 ± 0.01	0.08 ± 0.004	0.01 ± 0.021	0.09	93:7	0.16	0.02	0.001
Xylose	0.2 ± 0.01	N/D ^b	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

^a: average values generated from duplicates

^b: Not detected

[0089]

[0091] 실시예 6. 이차 탄소원으로서 PHA 생산에 대한 프로피온산의 영향

[0092] 기존 연구에서 짧은 사슬 지방산은 3HV의 더 높은 물비를 포함하는 다양한 공중합체 유형의 P(3HB-co-3HV)를 합성하기 위해 사용된 바 있다. 본 발명에서 인실리콘 예측 분석 또한 프로피온산이 P(3HB-co-3HV)의 공중합체 유형을 생산하기 위해 2차 기질로 사용될 수 있음을 시사하였다. 이에 2차 탄소 공급원으로서의 프로피온산의 영향을 평가하기 위해, 12 g/ℓ 글루코스를 포함하는 M9MV 배지에 0.5~4 g/ℓ 범위의 농도로 프로피온산을 첨가한 후 세포 바이오매스와 PHA 생산을 조사하였다.

[0093] 그 결과, 표 3에 개시된 바와 같이, 파라코커스 해운덴시스는 PHA에서 다양한 3HV 물비를 포함하는 P(3HB-co-3HV)의 다양한 공중합체를 생성하였다. 또한, 프로피온산이 많이 보충될수록 3HV의 물비가 높아지는 것을 알 수 있었다. 특히, 파라코커스 해운덴시스는 3 g/ℓ 프로피온산과 12 g/ℓ 글루코스의 존재 하에서 3HB 및 3HV의 물비율이 50%인 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 생성하였다.

표 3

이차 탄소원으로서 프로피온산의 사용에 따른 파라코커스 해운덴시스의 PHA 생산 비교

Propionic acid (g·L ⁻¹)	Biomass (g·L ⁻¹)	3HB content (g·g ⁻¹)	3HV content (g·g ⁻¹)	Total PHA content (g g ⁻¹)	HB:HV molar ratio (%)	3HB (g·L ⁻¹)	3HV (g·L ⁻¹)	PHA (g·L ⁻¹)
0	1.6 ± 0.08 ^a	0.63 ± 0.090	0.02 ± 0.014	0.65	97:3	1.00	0.03	1.03
0.5	2.0 ± 0.10	0.39 ± 0.005	0.01 ± 0.002	0.40	98:2	0.78	0.01	0.79
1	1.7 ± 0.08	0.21 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.22	95:5	0.36	0.02	0.38
2	1.4 ± 0.07	0.05 ± 0.002	0.03 ± 0.002	0.08	67:33	0.06	0.04	0.10
3	1.2 ± 0.06	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.04	50:50	0.02	0.03	0.05
4	0.9 ± 0.04	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.04	53:47	0.02	0.02	0.04

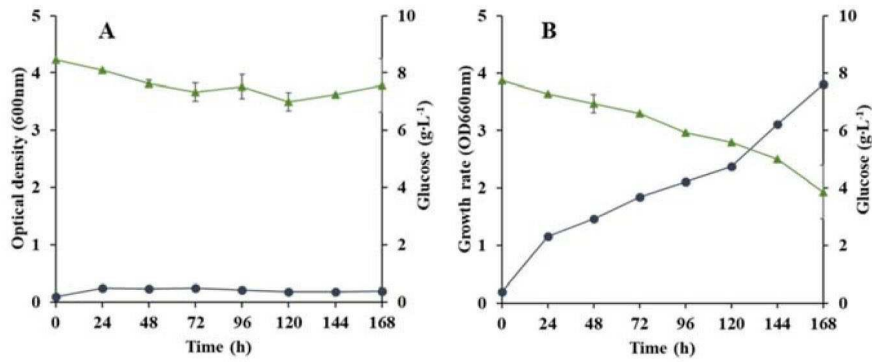
^a: average values generated from duplicates

[0094]

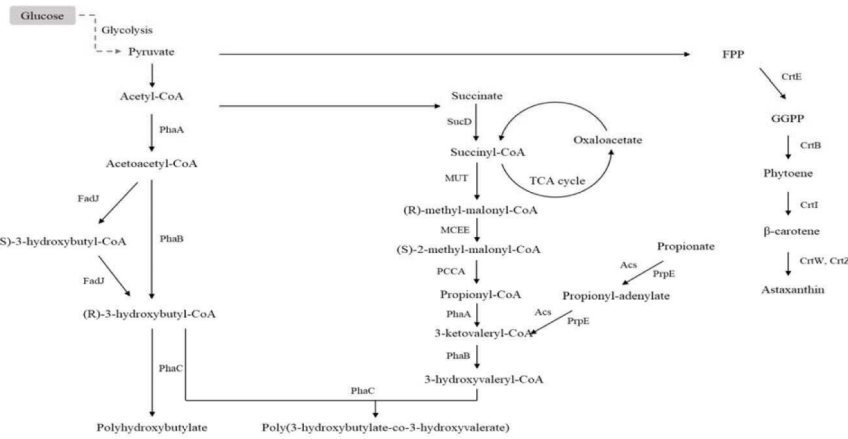
[0095] 그러나 프로피온산의 추가 보충은 1 g/ℓ 이상의 농도에서는 총 PHA 함량뿐만 아니라 세포 성장을 억제하는 것을 알 수 있었다.

도면

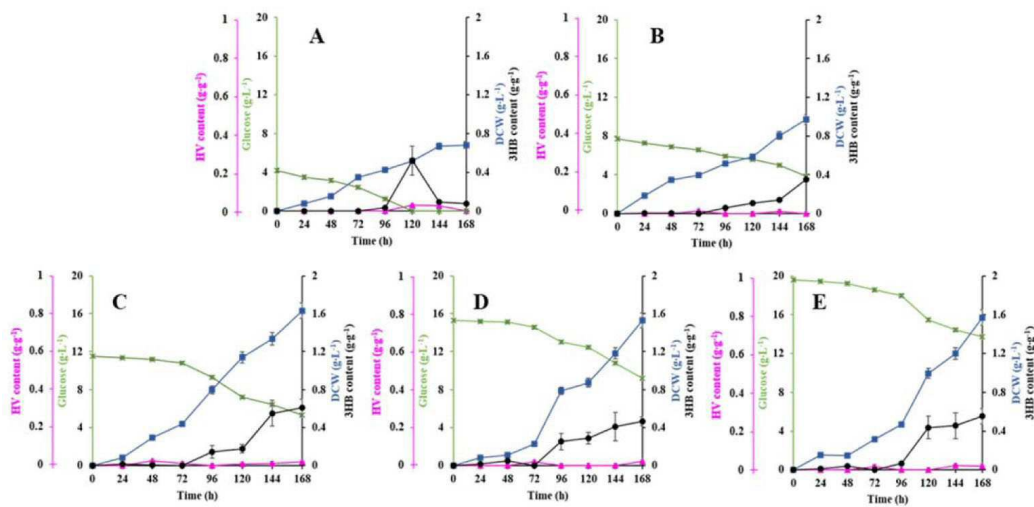
도면1



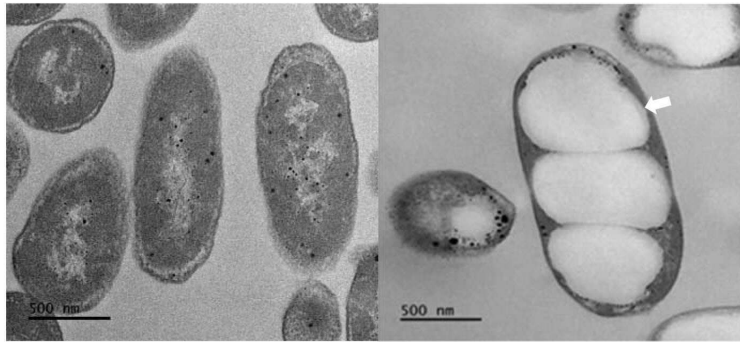
도면2



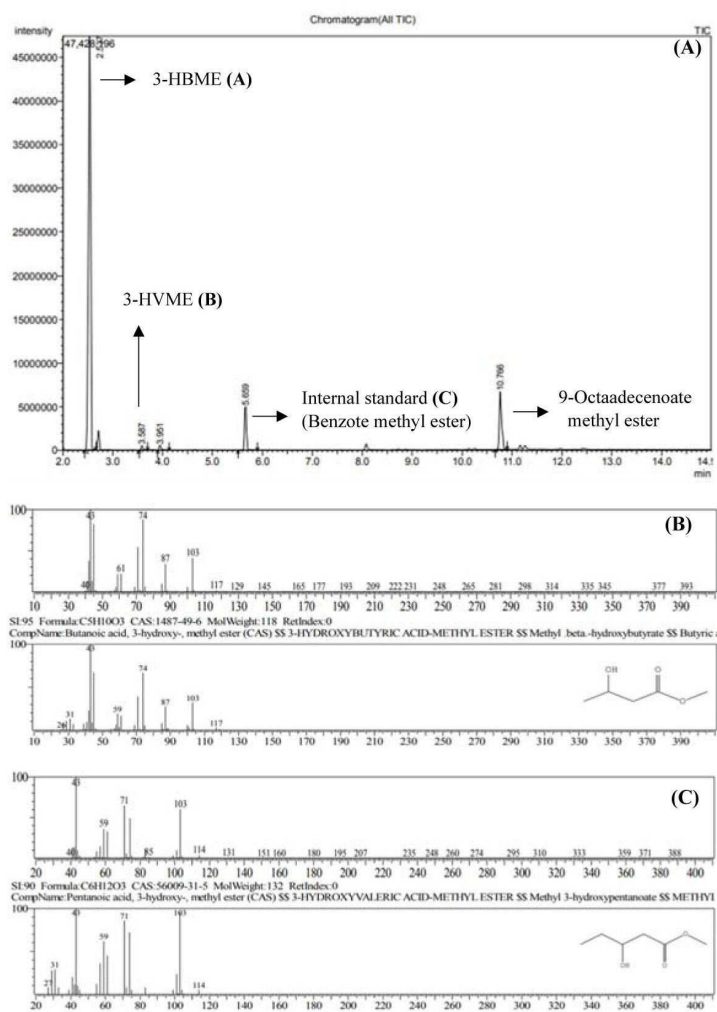
도면3



도면4



도면5



도면6

