

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁸

C08G 63/00 (2006.01)
C08G 63/688 (2006.01)
C12P 17/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년01월20일
(11) 등록번호 10-0543993
(24) 등록일자 2006년01월10일

(21) 출원번호	10-2003-0011679	(65) 공개번호	10-2003-0071514
(22) 출원일자	2003년02월25일	(43) 공개일자	2003년09월03일

(30) 우선권주장	JP-P-2002-00054907	2002년02월28일	일본(JP)
	JP-P-2003-00036819	2003년02월14일	일본(JP)

(73) 특허권자 캐논 가부시끼가이샤
일본 도쿄도 오오따꾸 시모마루코 3쵸메 30방 2고

(72) 발명자 야노테츠야
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

켄모쿠타카시
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

혼마츠토무
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

스가와에츠코
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

후쿠이타츠키
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

이마무라타케시
일본국토쿄도오오타구시모마루코3-30-2캐논가부시끼가이샤나이

(74) 대리인 신중훈
임옥순

심사관 : 성영환

(54) 분자의 결사슬에 페닐구조, 티에닐구조 혹은 시클로헥실구조의 잔기를 함유하는 유닛으로 이루어진 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법

요약

유닛: $-[\text{OCH}((\text{CH}_2)_m\text{R}_1)\text{CH}_2\text{C}(\text{O})]-(m = 1-8; \text{R}_1 \text{은 페닐구조 및 티에닐구조의 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기임})$ 및
 유닛: $-[\text{OCH}((\text{CH}_2)_k\text{C}_6\text{H}_{10}\text{R}_2)\text{CH}_2\text{C}(\text{O})]-(k = 0-8; \text{R}_2 \text{는 H, CN, NO}_2, \text{ 할로젠원자, CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{CF}_3, \text{C}_2\text{F}_5 \text{ 또는 } \text{C}_3\text{F}_7 \text{을 포함하는 시클로헥실기상의 치환기를 나타냄})$ 의 적어도 한쪽을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법에 있어서, 미생물을 수산기함유 화합물의 존재하에 배양해서, $\text{R}_3(\text{CH}_2)_q\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}(q = 1-8; \text{R}_3 \text{은 페닐 또는 티에닐의 고리구조를 지닌 잔기를 함유함})$ 또는 $\text{R}_4\text{C}_6\text{H}_{10}(\text{CH}_2)_r\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}(r = 0-8; \text{R}_4 \text{는 H, CN, NO}_2, \text{ 할로젠, CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{CF}_3, \text{C}_2\text{F}_5 \text{ 또는 } \text{C}_3\text{F}_7 \text{을 포함하는 시클로헥실기상의 치환기를 나타냄})$ 로부터 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 생산가능하게 하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법이 제공된다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 폴리에스테르의 일종인 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 분자량을 제어하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, 균체내에 PHA를 생산해서 축적하는 것이 가능한 미생물을 이용한 PHA의 분자량의 제어방법에 관한 것이다.

지금까지, 많은 미생물이 폴리-3-하이드록시부티르산(PHB) 혹은 기타 PHA를 생산하여 그 균체내에 축적하는 것이 보고되어 있다("생분해성 플라스틱 핸드북", 생분해성 플라스틱연구회편, 일본국 (주) 엔티에스(NTS)발행, p178-197(1995)). 종래의 플라스틱의 경우와 마찬가지로, 이들 폴리머는, 용융처리 등을 통해서 각종 제품을 제조하는 데 사용될 수 있다. 또한, 이들 폴리머는, 생분해성이므로, 자연계에 있어서 미생물에 의해 완전히 분해되어, 종래의 합성 고분자와는 달리 자연환경의 오염을 일으키지 않는다고 하는 이점이 있다. 또, 이들 생분해성 폴리머는, 생체적합성이 우수하므로, 의료용 연질부재 등에도 이용될 것으로 기대되고 있다.

이러한 미생물에 의해 생산된 PHA는, 그 생산에 사용되는 미생물의 종류나 배지조성, 배양조건 등에 따라 각종 조성이나 구조를 지니는 것으로 알려져 있고, 또, 이제까지, 주로 PHA의 물성의 개량이라고 하는 관점에서, 이들 PHA의 조성이나 구조의 제어에 관한 많은 연구가 행해져 왔다.

미생물에 의해 생산된 PHA는 생합성기구에 따라 크게 2개의 그룹으로 분류된다. PHA의 한 그룹은, 폴리하이드록시부티르산(PHB), 폴리하이드록시발레르산(PHV) 및 그의 공중합체로 대표되는 짧은 사슬길이 PHA(이하, 간단히 "scl-PHA(s)"라 칭함)이고; 다른 그룹이, 유닛으로서 탄소수 약 6 내지 14의 중간사슬길이 3-하이드록시알칸산을 지닌 중간사슬길이 PHA(이하, "mcl-PHA(s)"라 칭함)이다

전자의 scl-PHA는, 출발물질로서의 글루코스, 글루콘산 등의 당류, 또는 락트산, 피루브산 및 말산 등의 유기산의 생체내 대사물질인 아세틸-CoA로부터 효소 2량화 및 환원에 의해 폴리머로 형성된다.

후자의 mcl-PHA는, 출발물질로서의 알칸산으로부터 지방산분해계의 β -산화경로를 통한 CoA첨가, 탈수소화 및 수첨가에 의해 폴리머로 형성된다.

전술한 바와 같이, 각각의 그룹의 PHA는, 상세한 연구결과에 따라 생체내의 상이한 효소작용에 의한 상이한 생합성경로를 통해 합성된다.

후자의 mcl-PHA를 생산하는 미생물중에서, 일부 미생물은, 각종 작용기와 잔기를 지닌 PHA를 생산하는 것이 공지되어 있다.

이들 중, 유닛내에 방향고리를 지닌 PHA의 생산은, 근년 활발하게 연구되고 있다.

"Makromol, Chem.", 191, 1957-1965(1990) 및 "Macromolecules", 24, 5256-5260(1991)에는, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)가, 5-페닐발레르산을 기질로 해서, 3-하이드록시-5-페닐발레르산을 유닛으로서 함유하는 PHA를 생산하는 것이 보고되어 있다.

또, "Macromolecules", 29, 1762-1766(1996)에, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)가 5-(4'-톨릴)발레르산을 기질로서 이용해서 3-하이드록시-5-(4'-톨릴)발레르산을 유닛으로서 함유하는 PHA를 생산하는 것이 보고되어 있다.

또한, "Macromolecules", 32, 2889-2895(1999)에는, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)가 5-(2',4'-디니트로페닐)발레르산을 기질로서 이용해서 3-하이드록시-5-(2',4'-디니트로페닐)발레르산 및 3-하이드록시-5-(4'-니트로페닐)발레르산을 유닛으로서 함유하는 PHA를 생산하는 것이 보고되어 있다.

"Macromol. Chem. Phys.", 195, 1665-1672(1994)에는, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)가 11-페녹시운데칸산을 기질로서 이용해서 3-하이드록시-5-페녹시발레르산과 3-하이드록시-9-페녹시노난산과의 PHA공중합체를 생산하는 것이 보고되어 있다.

또, 일본국 공고특허 제 2989175호 공보에는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)(슈도모나스 속)에 의해 합성된 3-하이드록시-5-(모노플루오로페녹시)펜타노에이트(3H5(MFP)P)유닛 혹은 3-하이드록시-5-(디플루오로페녹시)펜타노에이트(3H5(DFP)P)유닛을 지닌 호모폴리머 및 적어도 3H5(MFP)P유닛 또는 3H5(DFP)P유닛을 함유하는 코폴리머; 이들 폴리머의 합성방법이 개시되어 있다. 이것에 의해, 치환기를 지닌 긴 사슬지방산을 자화해서 겔사슬말단에 1 또는 2개의 불소원자가 치환된 페녹시기를 지닌 폴리머를 합성할 수 있고, 또, 이러한 폴리머는 용점이 높은 데다가, 가공성이 양호하고, 또한, 입체규칙성과 발수성을 지닌 것으로 기재되어 있다.

또한, 상기 불소치환폴리머외에 시아노 또는 니트로기가 치환된 폴리머도 연구되고 있다.

또, "Can. J. Microbiol.", 41, 32-43(1995) 및 "Polymer International", 39, 205-213(1996)에는, 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347균주 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT 2442균주가, 각각, 옥탄산과 p-시아노페녹시헥산산 또는 p-니트로페녹시헥산산을 기질로 사용해서, 3-하이드록시-p-시아노페녹시헥산산 또는 3-하이드록시-p-니트로페녹시헥산산을 모노머유닛으로서 함유하는 PHA를 생산하는 것이 보고되어 있다.

"Macromolecules", 32, 8315-8318(1999) 및 "Polymer Preprints, Japan", 49(5), 1034(2000)에는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 27N01균주가 11-티오펜옥시발레르산을 기질로 해서 3-하이드록시-5-티오펜옥시발레르산과 3-하이드록시-7-티오펜옥시헥탄산을 함유하는 PHA공중합체를 생산하는 것이 기재되어 있다.

PHA의 실용화를 위해, 그의 적용분야를 확대시키기 위해 분자량의 제어가 시도되어 있다.

미국 특허 공보 제 6,156, 852호 공보에는, 생산용 미생물균주로서 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*), 랄스토니아 라투스(*Ralstonia latus*) 및 코마모나스 테스토스테로니(*Comamonas testosteroni*)를 이용해서, 에틸렌 글리콜, 네오펜틸 글리콜, 프로필렌 글리콜, 부탄디올, 헥산디올, 옥탄디올 등의 디올류; 부탄트리올, 폴리프로필렌 글리콜, 글리세롤, 하이드로퀴논, 벤젠-디메탄올, 펜타에리트리톨 및 그 유도체; 또는 소르비톨, 만니톨 등의 당류를 배지에 첨가함으로써, PHB의 생합성시 수평균분자량을 저감시키는 것이 기재되어 있다. 이들 항목은, "Biotechnology and Bioengineering", 62, 106-113(1999) 및 "International Journal of Biological Macromolecules", 25, 43-53(1999)에 화학논문으로서 상세히 기재되어 있다.

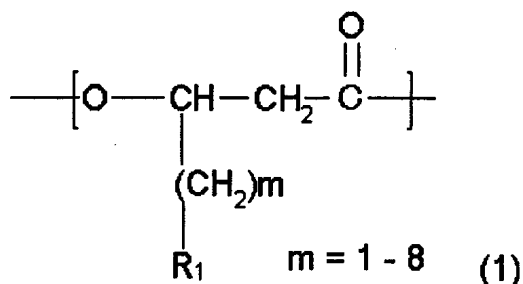
이들 기술은, 산 혹은 염기 등의 화학물질을 이용하는 일없이 PHA생합성과정에서 분자량을 제어하는 이점이 있다. 상기와 같이 페닐기 등의 작용기를 지닌 PHA도, 실용분야를 확대시키기 위해서는 분자량을 제어할 필요가 있다. 그러나, 이러한 기술은 아직 개발되어 있지 않다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

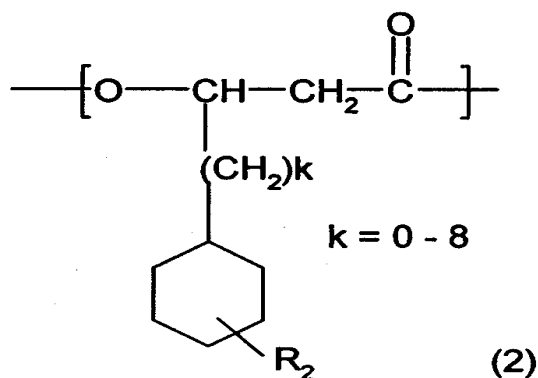
본 발명의 목적은, 분자의 겔사슬에 페닐구조, 티에닐구조 혹은 시클로헥실구조를 함유하는 잔기의 유닛을 지닌 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량을 제어하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 이하의 발명에 이르렀다.

본 발명은, 하기 화학식(1):

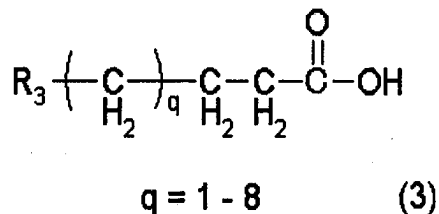


(식중, m은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₁은 페닐구조 및 티에닐구조로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, m 및 R₁은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 3-하이드록시- ω -치환 알칸산유닛 및 하기 화학식(2):

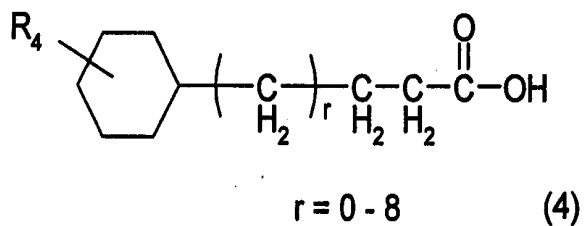


(식중, R₂는 H원자, CN, NO₂, 할로젠원자, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, CF₃, C₂F₅ 및 C₃F₇로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; k는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, k 및 R₂는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 3-하이드록시- ω -시클로헥실알칸산유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량을 제어하는 방법에 있어서,

미생물을 수산기함유 화합물의 존재하에 배양해서, 하기 화학식(3):



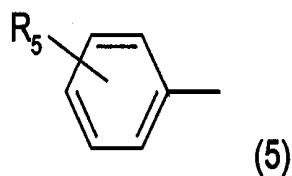
(식중, q는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₃은 페닐구조 및 티에닐구조로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, q 및 R₃은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)으로 표시되는 ω -치환 알칸산 또는 하기 화학식(4):



(식중, R_4 는 H원자, CN, NO_2 , 할로젠원자, CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; r 은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, R_4 및 r 은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 ω -시클로헥실알칸산으로부터 상기 화학식(1) 또는 (2)로 표시되는 유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산가능하게 하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법을 제공한다.

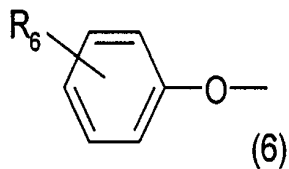
여기서, 화학식(1) 및 (3)중의 R_1 및 R_3 , 즉, 페닐구조 또는 티에닐구조를 지닌 잔기로서는, 구체적으로는, 하기 화학식(5) 내지 (15)로 표시되는 기를 들 수 있다:

하기 일반식(5)



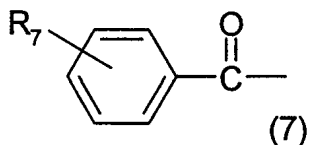
[식중, R_5 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , 비닐, COOR_{51} (R_1 에 대해서만; R_{51} 은 H원자, Na원자 및 K원자로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐기;

하기 일반식(6):



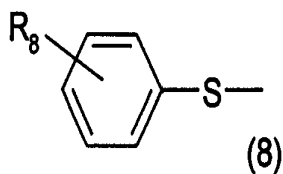
(식중, R_6 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , SCH_3 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페녹시기;

하기 일반식(7):



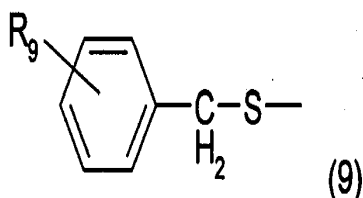
(식중, R_7 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)로 표시되는 치환 혹은 무치환의 벤조일기;

하기 일반식(8):



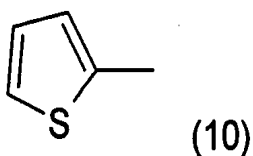
[식중, R_8 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , COOR_{81} , SO_2R_{82} (R_{81} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{82} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 및 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기;

하기 일반식(9):



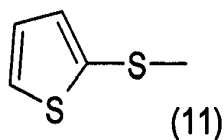
[식중, R_9 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , COOR_{91} , SO_2R_{92} (R_{91} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{92} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 및 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 (페닐메틸)설파닐기;

하기 화학식(10):



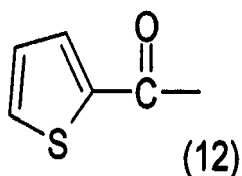
으로 표시되는 2-티에닐기;

하기 화학식(11):



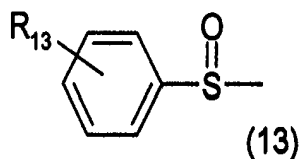
로 표시되는 2-티에닐설파닐기;

하기 화학식(12):



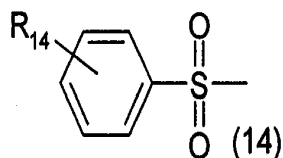
로 표시되는 2-티에닐카르보닐기;

하기 일반식(13):



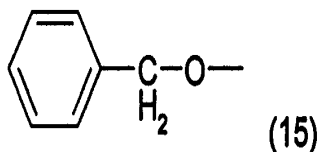
[식중, R_{13} 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{131}$, SO_2R_{132} (R_{131} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{132} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기(R_1 에 대해서만);

하기 일반식(14):



[식중, R_{14} 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{141}$, SO_2R_{142} (R_{141} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{142} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설폰닐기(R_1 에 대해서만); 및

하기 화학식(15):



로 표시되는 (페닐메틸)옥시기.

수산기 함유 화합물은, 알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종이다.

구체적으로는, 알콜류, 디올류 및 트리올류로서는, 탄소수 3 내지 14의 직선 및 분기형의 알콜류, 디올류 및 트리올류를 들 수 있다.

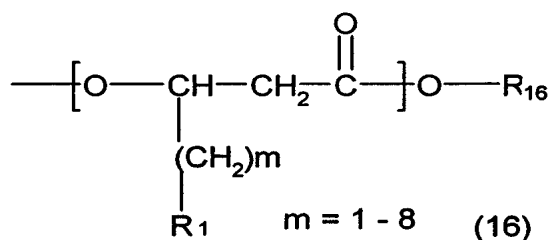
알킬렌 글리콜류 및 알킬렌 글리콜 모노에스테르류는, 직선형 혹은 분기형 구조를 지닌 탄소수 2 내지 10의 화합물을 들 수 있다.

폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류의 수평균분자량의 범위는 100 내지 20000이면 된다.

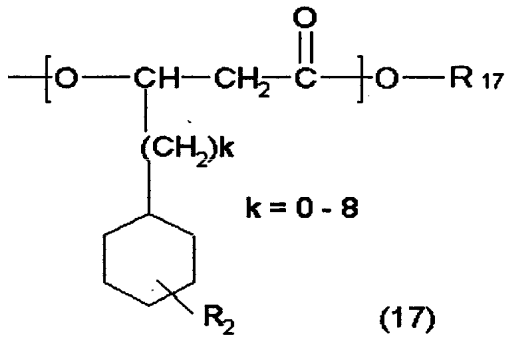
수산기함유 화합물은, 바람직하게는, 0.01 내지 10%(w/v), 보다 바람직하게는, 0.02 내지 5%(w/v)의 농도로 미생물의 배양용 배지에 첨가한다. 상기 화합물은 배양의 초기단계에 일괄적으로 혹은 배양기간동안 일부분씩 첨가해도 된다.

본 발명에서 이용되는 미생물은, 전술한 바와 같이, 원료로서 화학식(3)으로 표시되는 ω -치환 알칸산 혹은 화학식(4)로 표시되는 ω -시클로헥실알칸산으로부터 화학식(1)로 표시되는 3-하이드록시- ω -치환 알칸산 유닛 및 화학식(2)로 표시되는 3-하이드록시- ω -시클로헥실알칸산 유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있는 능력을 지닌 것이다.

본 발명의 폴리하이드록시알카노에이트는, 하기 화학식(16):



(식중, m은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₁은 상기 정의한 바와 같으며, 바람직하게는, 화학식(5) 내지 (15)로 이루어진 군으로부터 선택된 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, m 및 R₁은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택되며; R₁₆은 알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 화학종으로부터 유도된 기임)으로 표시되는 3-하이드록시- ω -치환알칸산 유닛; 및 하기 일반식(17):



(식중, R_2 는 H원자, CN, NO_2 , 할로젠원자, CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; k 는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, k 및 R_2 는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택되고; R_{17} 은 알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 화학종으로부터 유도된 기임)로 표시되는 3-하이드록시- ω -시클로헥실알칸산유닛의 적어도 1종을 함유한다.

상기 미생물의 사용은, 본 발명의 필수구성요건이다. 구체적으로는, 미국 특허 공보 제 6,156,852호, "Biotechnology and Bioengineering", 62, 106-113(1999) 및 "International Journal of Biological Macromolecules", 25, 43-53(1999)에서 이용하는 미생물은, 화학식(3) 또는 (4)로 표시되는 화합물로부터 출발하는 화학식(1) 또는 (2)로 표시되는 유닛의 1종 이상을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 능력을 지니지 못하고 있다.

상기 일본국 특허공보 및 기술문헌에 표시된 미생물은, 통상 호모폴리머 및 폴리 3-하이드록시부티르산(이하, "PHB"라 칭함) 또는 폴리 3-하이드록시발레르산(이하, "PHV"라 칭함)의 공중합체를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 대표적으로, PHB용의 생합성 경로를 요약하면 다음과 같다:

- (1) 아세틸-CoA \rightarrow 아세토아세틸-CoA
- (2) 아세토아세틸-CoA \rightarrow 3-하이드록시부티릴-CoA
- (3) 3-하이드록시부티릴-CoA \rightarrow 폴리 3-하이드록시부티르산.

한편, 본 발명에서 이용하는 미생물은, 화학식(3) 또는 (4)로 표시되는 화합물을, 이하의 표시한 바와 같은 전환에 의한 " β -산화경로"라 불리는 지방산 분해경로에 투입시킴으로써 화학식(1) 및 (2)로 표시되는 유닛의 1종 이상을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생합성한다:

- <1> 화합물(2) \rightarrow 아세틸-CoA
- <2> 아세틸-CoA \rightarrow 에노일-CoA
- <3> 에노일-CoA \rightarrow 3-하이드록시아실-CoA
- <4> 3-하이드록시아실-CoA \rightarrow 화학식(1)의 폴리하이드록시알카노에이트.

상기 공정(3)에서 직접 관여하는 효소는, PHB합성효소 또는 짧은 사슬길이 PHA합성효소인 반면, 본 발명의 공정<4>에서 이용되는 효소는, PHA합성효소 혹은 중간사슬길이 PHA합성효소이다. 이들 양 효소는, 기질특이성에서 서로 다르다. 이것은, "FEMS microbiology Reviews", 103, 217-230(1992) 및 "Journal of Biotechnology", 65, 127-161(1998)에 표시되어 있다.

즉, 본 발명에서 이용되는 미생물은, 본 특허 명세서에서 종래기술의 서두에서 인용한 미국 특허 공보 제 6,156,852호, "Biotechnology and Bioengineering", 62, 106-113(1999) 및 "International Journal of Biological Macromolecules", 25, 43-53(1999)에서 이용하는 미생물과는 완전히 다르다.

본 발명의 방법에서 이용되는 미생물은, 화학식(3) 또는 (4)로 표시되는 원료 화합물로부터 분자중에 화학식(1) 또는 (2)로 표시되는 유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 능력을 지닌 것인 한 특허 제한은 없다. 이들중, 특히 바람직한 것은, 슈도모나스속의 미생물로, 구체적으로는, 예를 들면, 슈도모나스 치코리이(*Pseudomonas cichorii*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescense*), 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 젯세니이(*Pseudomonas jessenii*) 등을 들 수 있다. 보다 상세하게는, 예를 들면, 특히 바람직한 균주로서는, 슈도모나스 치코리이 YN2(FERM BP-7375), 슈도모나스 치코리이 H45(FERM BP-7374), 슈도모나스 젯세니이 P161(FERM BP-7376), 슈도모나스 푸티다 P91(FRRM BP-7373) 등을 들 수 있다. 이들 4종의 미생물은, 일본국의 산업기술종합연구소(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology: AIST)(전신은 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소임)의 국제특허생물기탁소(International Patent Organism Depository: IPOD)에 기탁되어 있고, 이들은, 또한, 일본국 공개특허 제 2001-371863호 공보에 기재되어 있다.

본 발명에 있어서의 미생물배양조건에 대해 하기 설명한다.

각종 필요한 기질과, 영양소를, 후술하는 바와 같이, 기본적으로 인산염 완충액과, 암모늄염 또는 질산염으로 이루어진 무기염배지에 첨가한다.

소망의 폴리하이드록시알카노에이트의 제조용의 기질로서, 배지는, 화학식(2)로 표시되는 화합물을, 바람직하게는, 0.01% 내지 1%(w/v), 보다 바람직하게는, 0.02% 내지 2%(w/v)의 범위로 함유한다.

통상, 배지는, 미생물 증식을 위한 탄소원과 질소원으로서의 하기 공존 기질과 폴리알카노에이트 제조용의 에너지를 바람직하게는, 0.1% 내지 5%(w/v), 보다 바람직하게는, 0.2% 내지 2%(w/v)의 범위로 함유한다.

공존 기질:

·영양배양성분: 효모엑스, 고기엑스, 맥아엑스, 카자민산, 카세인가수분해물, 폴리펩톤, 트립톤, 펩톤 등;

·당류: 글리세르알데하이드, 에리트로즈, 아라비노스, 크실로스, 글루코스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스 등의 알도스류;

글리세롤, 에리트리톨, 크실리톨 등의 알디톨;

글루콘산 등의 알돈산류;

글루쿠론산, 갈락투론산 등의 우론산류;

말토스, 수크로스, 락토스 등의 이당류;

·유기산 및 그의 염류: 피루브산, 말산, 락트산, 시트르산, 숙신산,

옥살로아세트산, 이소시트르산, 케토글루타르산, 푸마르산 및 그들의 염류;

·아미노산류: 글루탐산, 아스파라긴산 및 그들의 염류 등;

·알칸산류: 탄소수 4 내지 12의 직선 혹은 분기형 알칸산류.

본 발명에 있어서는, 암모늄 혹은 질산염 등의 질소원과 인산염을 함유하는 무기배지이면 어느 것이라도 사용할 수 있다. PHA의 생산성은, 질소원의 농도를 제어함으로써 향상시킬 수 있다.

배양온도는, 상기 미생물 균주의 증식에 적합하게 제어하면 되고, 바람직하게는, 15 내지 37℃, 보다 바람직하게는, 20 내지 30℃의 범위이다.

배양방법은, PHA를 생산하는 미생물의 증식을 가능하게 하는 것이면 어느 것이라도 사용할 수 있으며, 액체배양이나 고체배양 등을 들 수 있다. 배양은, 배치(즉, 회분식) 배양, 패드배치배양, 반연속배양 또는 연속배양 등의 어느 방법으로 행해진다. 액체배양 방법으로서, 산소 공급을 위한 플라스크진탕방법이나, 산소공급을 위한 자(jar)발효기에 의한 통기교반방법 등을 들 수 있다.

미생물에 PHA를 생산 및 축적시키는 다른 방법에 있어서는, 미생물을 충분히 증식시킨 후, 미생물 덩어리(즉, 미생물 균체)를 염화암모늄과 같은 질소원을 제한된 양 함유하는 별도의 배지로 옮기고, 목적으로 하는 유닛의 기질용의 화합물을 첨가해서 배양을 계속함으로써 생산성을 가능한 한 향상시킨다.

목적으로 하는 PHA는 본 발명의 종래의 프로세스에서 상기 설명한 바와 같이배양후 미생물 균체로부터 분리할 수 있다. 예를 들면, 가장 간단한 방법은, 클로로포름, 디클로로메탄, 아세톤 등의 유기용매에 의한 추출이다. 디옥산, 테트라하이드로푸란, 아세토니트릴 등의 다른 유기용매도 사용가능하다. 유기용매가 사용되기 어려운 환경에 있어서는, SDS 등의 계면활성제에 의한 처리; 리소자임 등의 효소에 의한 처리; 차아염소산염, 암모니아, EDTA 등의 약제에 의한 처리; 초음파분쇄법, 균질화법, 가압분쇄법, 비드충격법, 분쇄법, 분말화법, 동결-해빙법 등에 의한 미생물 균체의 물리적인 파쇄법 등의 어느 하나의 방법에 의해, 미생물균체를 파쇄해서 PHA이외의 균체성분을 제거함으로써 PHA를 회수할 수 있다.

또한, 본 발명에 있어서는, 상기 방법은, 미생물의 배양, 미생물균체에의 PHA의 생산 및 축적, 그리고, PHA이외의 미생물 균체성분의 제거에 의한 PHA의 회수에 대한 상기 방법으로 제한되지 않는다.

이하의 실시예에 표시한 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하면, 분자의 결사슬에 페닐구조, 티에닐구조 또는 시클로헥실구조를 함유하는 잔기를 지닌 유닛을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어가 가능하다.

발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명의 바람직한 실시형태에 대해 상세히 설명한다.

본 발명의 방법에서 사용된 무기염배지(M9배지)의 조성은 다음과 같다.

<M9배지>

Na_2HPO_4 : 6.3

KH_2PO_4 : 3.0

NH_4Cl : 1.0

NaCl : 0.5 g/ℓ, pH = 7.0

또한, 양호한 균체의 증식 및 높은 PHS생산성을 얻기 위해서, 배지에 하기 조성의 미량원소의 성분용액을 0.3%(v/v)정도 첨가할 필요가 있다.

<미량성분용액>

니트릴로트리아세트산: 1.5; MgSO_4 : 3.0; MnSO_4 : 0.5; NaCl : 1.0;

FeSO_4 : 0.1; CaCl_2 : 0.1; CoCl_2 : 0.1; ZnSO_4 : 0.1; CuSO_4 : 0.1;

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1; H_3BO_3 : 0.1; Na_2MoO_4 : 0.1; NiCl_2 : 0.1(g/ℓ).

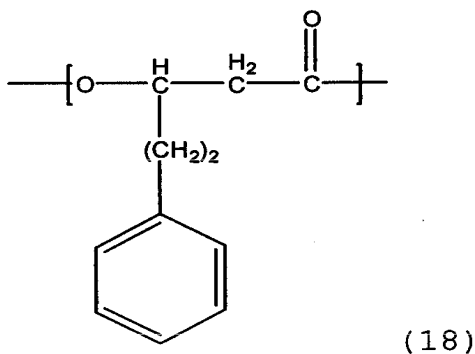
<실시예>

<실시예 1>

폴리에틸렌 글리콜에 의한 폴리 3-하이드록시-5-페닐발레르산(PHPV)의 분자량제어(1):

폴리펩톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를, 폴리펩톤(와코순야쿠사 제품) 0.5%(w/v), 5-페닐발레르산 0.1%(w/v) 및 분자량제어제로서의 폴리에틸렌 글리콜 200(PEG200: 수평균분자량 190-210; 키시다 카가쿠사 제품) 0%, 1%, 2% 또는 5%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200 ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 미생물 균체를 회수하고, 메탄올로 세정한 후 동결건조하였다. 건조된 미생물 균체를 칭량후, 클로로포름중에서 50℃에서 24시간 교반하여, 폴리머를 추출하였다. 추출된 폴리머를 함유하는 클로로포름을 여과하고, 증발기에서 농축한 후, 냉메탄올을 가하고, 해당 메탄올의 첨가에 의해 형성된 고형 침전물을 모아, 감압건조해서 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

상기에서 얻어진 폴리머의 구조결정은, $^1\text{H-NMR}$ (FT-NMR: 브루커 DPX400; ^1H 공명주파수: 400MHz; 측정핵종: ^1H ; 사용된 용매: CDCl_3 ; 기준: 모세관봉입 TMS/ CDCl_3 ; 측정온도: 실온)에 의해 행하였다. 그 결과, 각각의 폴리머는, 3-하이드록시-5-페닐발레르산(이하, "PHPV"라 칭함)(이하의 화학식(18))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 겔투과크로마토그래피(GPC)(토소사 제품인 HLC-8220 GPC, 컬럼: 토소사 제품인 TSK-GEL Super HM-H, 용매: 클로로포름, 폴리스티렌 기준)에 의해 측정하였다.

표 1에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 1]

PEG200(%)	CDW(mg/ℓ)	PDW(mg/ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1238	603	48.7	92000	1.9
1	1022	523	51.1	26000	2.0
2	1007	513	50.9	18000	2.1
5	625	343	54.8	15000	2.1

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 2>

폴리에틸렌 글리콜에 의한 PHPV의 분자량제어(2):

실시예 1에 있어서 분자량 제어제로서 PEG200대신에 PEG600(평균분자량: 570-630)을 사용한 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 실험을 행하였다. $^1\text{H-NMR}$ 분석에 의하면, 얻어진 폴리머는, 각각 실시예 1과 마찬가지로 주로 PHPV로 이루어진 것으로 확인되었다. 표 2에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 2]

PEG600(%)	CDW(mg/ℓ)	PDW(mg/ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1205	600	49.8	92000	1.9
1	1100	533	48.5	70000	1.9
2	1090	533	48.9	55000	2.1
5	605	321	53.1	49000	2.0

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 3>

폴리에틸렌 글리콜에 의한 PHPV의 분자량제어(3):

실시예 1에 있어서 분자량 제어제로서 PEG200대신에 PEG2000(평균분자량: 1800-2200)을 사용한 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 실험을 행하였다. $^1\text{H-NMR}$ 분석에 의하면, 얻어진 폴리머는, 각각 실시예 1과 마찬가지로 주로 PHPV로 이루어진 것으로 확인되었다. 표 3에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 3]

PEG2000(%)	CDW(mg/ℓ)	PDW(mg/ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1225	602	49.1	92000	1.9
1	1090	519	47.6	80000	2.1
2	1070	522	48.8	67000	2.0
5	618	320	51.8	61000	1.9

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

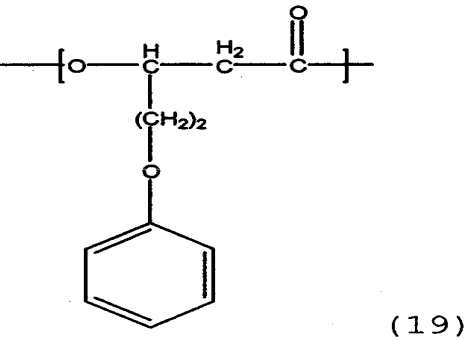
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 4>

폴리에틸렌 글리콜에 의한 폴리 3-하이드록시-5-페녹시발레르산의 분자량제어:

폴리캡톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주 및 슈도모나스 푸티다 P161균주를 개별적으로 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1ml를, 폴리캡톤(와코순야쿠사 제품) 0.5%(w/v) 및 5-페녹시발레르산 0.1%(w/v)를 함유하고, 또한, 분자량제어제로서 PEG200을 함유하지 않거나 또는 PEG200 1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 45시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-5-페녹시발레르산(이하의 화학식(19))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 4에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 4]

미생물	PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
YN2	함유안함	760	360	47.4	225000	2.1
	함유됨	750	175	23.3	92000	2.0
P161	함유안함	680	150	22.1	160000	1.9
	함유됨	530	40	7.5	40000	2.0

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 5>

각종 분자량제어제에 의한 PHPV의 분자량제어:

폴리펩톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를, 폴리펩톤 0.5%(w/v) 및 5-페닐발레르산 0.1%(w/v)를 함유하고, 또한 분자량제어제를 함유하지 않거나 또는 분자량제어제로서 PEG200 혹은 이소프로판올(키시다 카가쿠사 제품) 혹은 n-부탄올(키사 카가쿠사 제품) 0.1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 40시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, PHPV로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.

또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 5에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 5]

분자량제어제	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	1170	705	60.3	94000	1.9
PEG200	1100	540	49.1	65000	2.1
IPA	1210	600	49.6	79000	1.9
BA	1470	635	43.2	36000	2.3

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

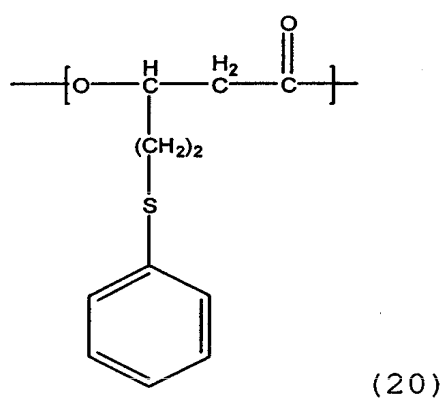
IPA: 이소프로판올, BA: n-부탄올

<실시예 6>

각종 분자량제어제에 의한 폴리 3-하이드록시-5-(페닐설파닐)발레르산의 분자량제어:

폴리펩톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를, 폴리펩톤 0.5% 및 5-(페닐설파닐)발레르산 0.1%를 함유하고, 또한 분자량제어제를 함유하지 않거나, 또는 분자량제어제로서 1,2-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올, 1,2,3-부탄트리올, 에틸렌 글리콜 혹은 에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 0.1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-5-(페닐설파닐)발레르산(이하의 화학식(20))의 호모 폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 6에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 6]

분자량제어제	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	1210	590	48.8	150000	2.3
1,2-BD	1200	570	47.5	42000	2.2
1,3-BD	1215	565	46.5	44000	2.1
1,6-HD	1150	575	50.0	29000	2.1
1,2,3-BT	1090	505	46.3	45000	2.3
EG	1230	600	48.8	50000	2.2
MEG	1200	590	49.2	53000	2.2

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

1,2-BD: 1,2-부탄디올; 1,4-BD: 1,4-부탄디올; 1,6-HD: 1,6-헥산디올;

1,2,3-BT: 1,2,3-부탄트리올; EG: 에틸렌 글리콜;

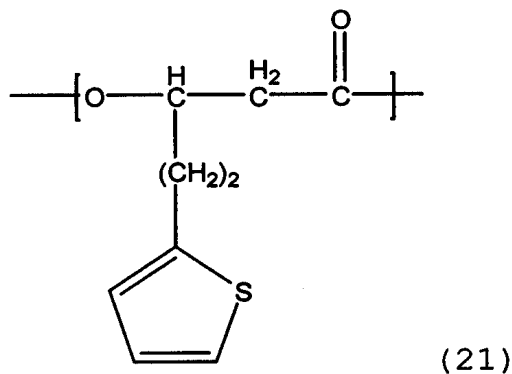
MEG: 에틸렌 글리콜 모노메틸에테르

<실시예 7>

PEG에 의한 폴리 3-하이드록시-5-(2-티에닐)발레르산의 분자량제어:

효모엑스(디프코사 제품) 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 푸티다 P91균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1ml를, 효모엑스 0.5% 및 5-(2-티에닐)발레르산 0.1%를 함유하고, 또한 분자량제어제를 함유하지 않거나, 또는 분자량제어제로서 PEG200 0.1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 45시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-5-(2-티에닐)발레르산(이하의 화학식(21))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 7에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 7]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	600	15	2.5	72000	3.2
함유됨	540	16	3.0	30000	2.8

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

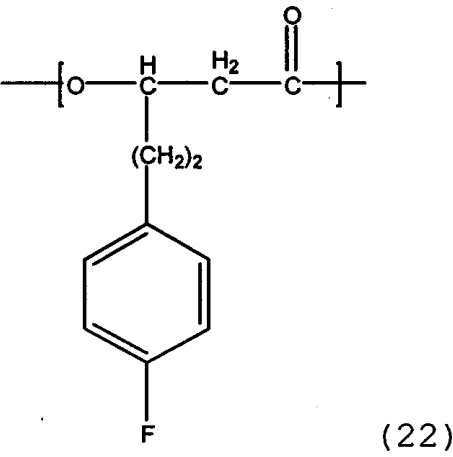
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 8>

PEG에 의한 폴리 3-하이드록시-5-(4-플루오로페닐)발레르산의 분자량제어:

폴리펩톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를, D-글루코스(키시다 카가쿠사 제품) 0.5% 및 5-(4-플루오로페닐)발레르산 0.1%를 함유하고, 또한 분자량제어제로서 PEG200을 함유하지 않거나, 또는 PEG200 0.1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-5-(4-플루오로페닐)발레르산(이하의 화학식(22))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 8에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 8]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	790	430	54.4	90000	2.1
함유됨	700	390	55.7	22000	2.0

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

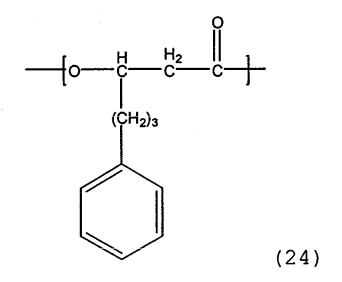
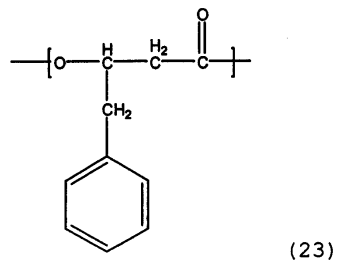
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 9>

PEG에 의한 폴리 3-하이드록시-4-페닐부티르산과 폴리 3-하이드록시-6-페닐헥산산의 분자량제어:

폴리머합성 기질을, 4-페닐부티르산 또는 6-페닐헥산산으로 변경한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 방법으로 PEG200의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-4-페닐부티르산(이하의 화학식(23))의 호모폴리머 또는 3-하이드록시-6-페닐헥산산(이하의 화학식(24))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 9에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 9]

폴리머	PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
PHPB	함유안함	420	66	15.7	78000	2.2
	함유됨	420	69	16.4	19000	2.1
PHPHx	함유안함	700	72	10.3	80000	2.3
	함유됨	660	69	10.5	23000	2.1

PHPB: 폴리 3-하이드록시-4-페닐부티르산

PHPHx: 폴리 3-하이드록시-6-페닐헥산산

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

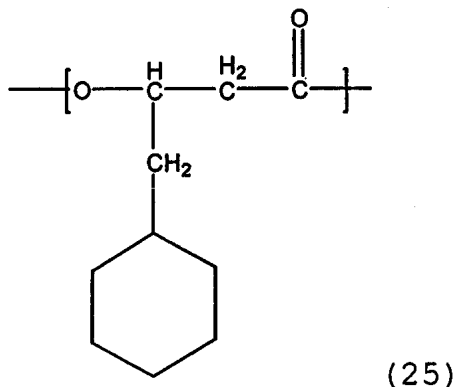
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 10>

PEG에 의한 폴리 3-하이드록시-4-시클로헥실부티르산의 분자량제어:

증식용 기질을, D-글루코스에서 폴리펩톤으로 변경한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 방법으로 PEG200의 분자량제어효과를 평가하였다.

^1H -NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 3-하이드록시-4-시클로헥실부티르산(이하의 화학식(25))의 호모폴리머로 주로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 10에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 10]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	820	480	58.5	71000	2.2
함유됨	820	430	52.4	18000	2.1

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

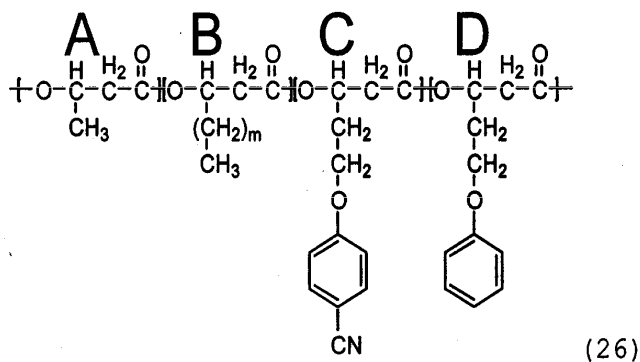
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 11>

PEG에 의한 폴리 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 유닛과 3-하이드록시-5-(4-시아노페녹시)발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리펩톤 0.5%를 함유하는 M9배지에서 슈도모나스 치코리이 YN2균주를 30℃에서 8시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를, 폴리펩톤 0.5% 및 5-(4-시아노페녹시)발레르산 0.05%를 함유하고, 또한 분자량제어제를 함유하지 않거나, 또는 분자량제어제로서 PEG200 0.1%(v/v)를 각각 함유하는 M9배지 200ml에 첨가하고, 500ml 진탕플라스크에서 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양후, 실시예 1과 마찬가지로 방법의 정제와, 아세톤용해성 성분만의 회수에 의해 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

^1H -NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 하기 화학식(26)으로 표시되는 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-시아노페녹시)발레르산의 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C:D=2:25:5:68(PEG함유하지 않는 배지) 및 3:24:7:66(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 11에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 11]

PEG200: 1%	CDW(mg/ℓ)	PDW(mg/ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	680	110	16.2	72000	2.3
함유됨	660	100	15.2	20000	2.1

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

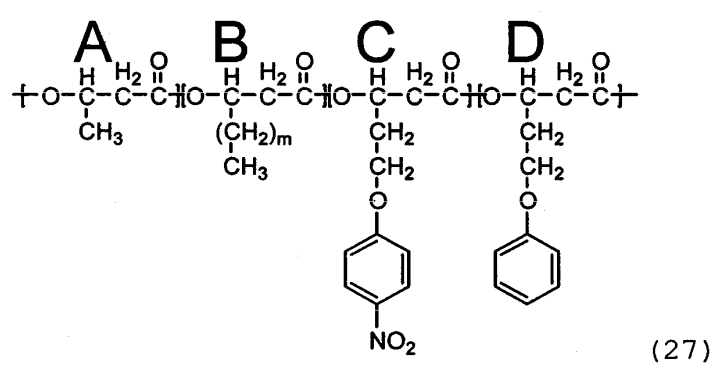
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 12>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 유닛과 3-하이드록시-5-(4-니트로페녹시)발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머생산용 기질에서 5-(4-시아노페녹시)발레르산을 5-(니트로페녹시)발레르산으로 변경한 이외에는, 실시예 11과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 하기 화학식(27)로 표시되는 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-니트로페녹시)발레르산의 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C:D=2:22:4:72(PEG함유하지 않는 배지) 및 4:23:5:68(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 12에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 12]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	590	95	16.1	70000	2.2
함유됨	570	80	14.0	17000	2.1

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

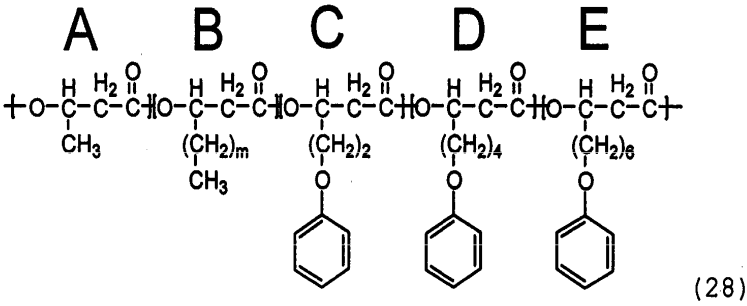
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 13>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 유닛과 3-하이드록시-7-페녹시헵탄산 유닛과 3-하이드록시-9-페녹시노난산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 11-페녹시운데칸산을 이용하고, 생산용 균주로서 슈도모나스 치코리이 H45균주를 이용한 이외에는, 실시예 10과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(28)로 표시되는 3-하이드록시-5-페녹시발레르산 유닛과 3-하이드록시-7-페녹시헵탄산 유닛과 3-하이드록시-9-페녹시노난산 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C:D:E=3:1:34:51:11(PEG함유하지 않는 배지) 및 3:1:35:52:9(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 13에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 13]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	820	290	35.4	33000	1.9
함유됨	815	280	34.4	10000	1.9

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

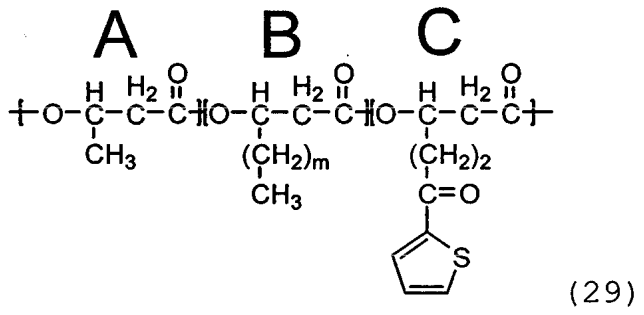
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 14>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-(2-티에노일)발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-(2-티에노일)발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어 효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(29)로 표시되는 3-하이드록시-5-(2-티에노일)발레르산 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C=1:37:62(PEG함유하지 않는 배지) 및 1:35:64(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 14에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 14]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	870	95	10.9	110000	2.4
함유됨	875	100	11.4	45000	2.2

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

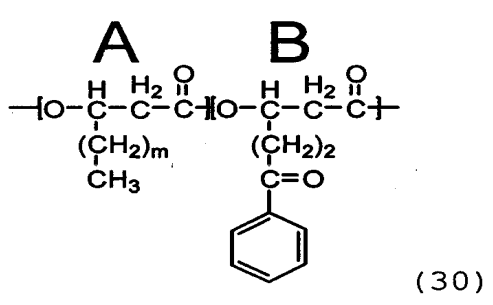
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 15>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-벤조일발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-벤조일발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(30)으로 표시되는 3-하이드록시-5-벤조일발레르산 유닛을 함유하는 PHA(식중, A:B=16:84(PEG함유하지 않는 배지) 및 15:85(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 15에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 15]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	660	170	25.8	330000	3.9
함유됨	665	180	27.1	95000	3.7

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

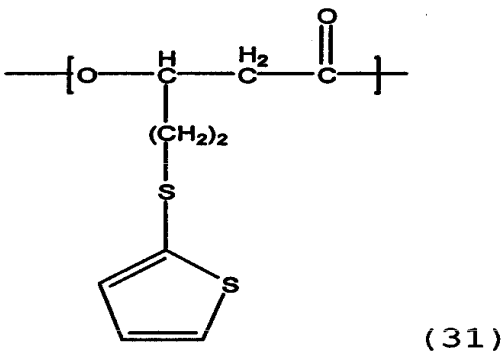
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 16>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-(2-티에닐티오)발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-(2-티에닐티오)발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 11과 마찬가지로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 하기 화학식(31)로 표시되는 3-하이드록시-5-(2-티에닐티오)발레르산의 호모폴리머로 주로 이루어진 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 16에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 16]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	1100	350	31.8	196000	2.9
함유됨	1050	350	33.3	74000	2.6

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

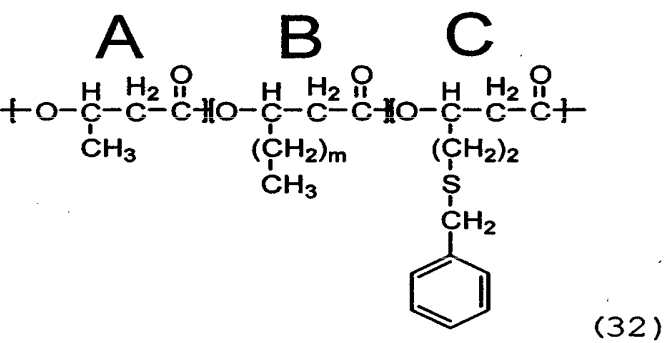
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 17>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-[(페닐메틸)설파닐]발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-[(페닐메틸)설파닐]발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(32)로 표시되는 3-하이드록시-5-[(페닐메틸)설파닐]발레르산 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C=2:8:90(PEG함유하지 않는 배지) 및 2:9:89(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 17에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 17]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	980	440	44.9	15000	3.6
함유됨	990	400	40.4	9000	3.2

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

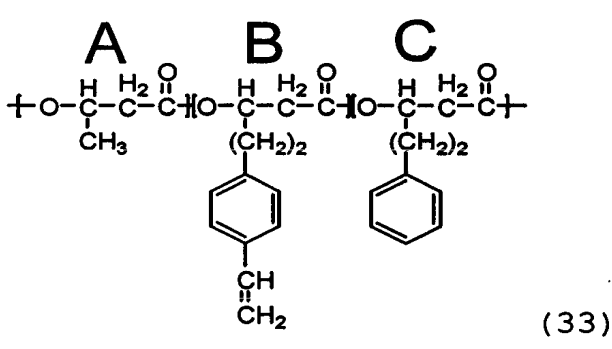
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 18>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-페닐발레르산 유닛 및 3-하이드록시-5-(4-비닐페닐)발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-페닐발레르산(0.09%) 및 5-(4-비닐페닐)발레르산(0.02%)을 이용하고, 클로로포름추출조건을 23.5℃, 72시간으로 변경한 이외에는, 실시예 10과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(33)으로 표시되는 3-하이드록시-5-페닐발레르산 유닛과 3-하이드록시-5-(비닐페닐)발레르산 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C=1:14:85(PEG함유하지 않는 배지) 및 1:15:84(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 18에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 18]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	1200	600	50.0	59000	2.0
함유됨	1150	580	50.4	19000	1.9

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

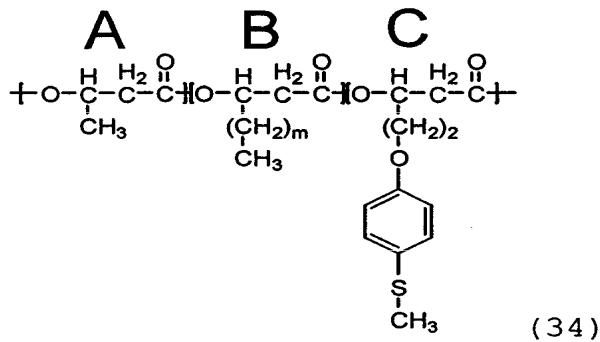
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 19>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-[(메틸설파닐)페녹시]발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-[(메틸셀파닐)페녹시]발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 10과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 각각 하기 화학식(34)로 표시되는 3-하이드록시-5-[(메틸설파닐)페녹시]발레르산 유닛을 함유하는 PHA(식중, 유닛비 A:B:C=8:68:24(PEG함유하지 않는 배지) 및 7:66:27(PEG함유 배지)인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 19에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[丑 19]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	990	150	15.2	16000	2.3
함유됨	1000	130	13.0	9000	2.1

CDW: 미생물 군체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

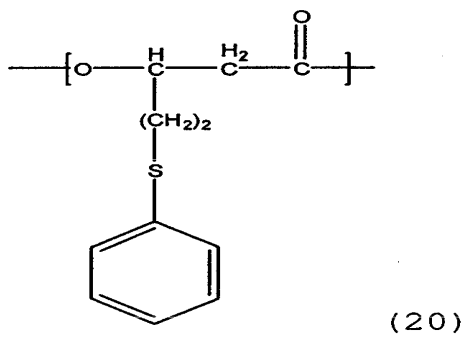
P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 20>

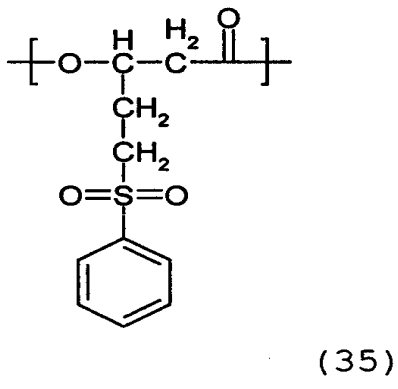
분자량제어된 폴리 3-하이드록시-5-(페닐설파닐)발레르산에서 폴리 3-하이드록시-5-(페닐설폰닐)발레르산으로의 전
화:

실시예 6에서 얻어진 3-하이드록시-5-(페닐설폰닐)발레르산(이하의 화학식(20))의 호모폴리머를, 산화처리에 의해 폴리 3-하이드록시-5-(페닐설폰닐)발레르산으로 전환시켰다.



상기 폴리하이드록시알카노에이트 400mg을, 10ml 가지형 플라스크내에서 클로로포름 10ml에 용해시켰다. 해당 플라스크를 빙욕에 넣고, 여기에 클로로포름 20ml중의 메타클로로퍼벤조산 1386mg의 용액을 서서히 첨가하고, 이 혼합물을 천천히 교반하였다. 빙욕에서 75분간 교반후, 물 100ml와 아황산수소나트륨 3020mg을 가하고, 해당 혼합물을 클로로포름으로 추출하여 폴리머를 회수하였다. 이 폴리머를 에탄올 100ml로 2회 세정하고, 진공건조하여 목적으로 하는 폴리머를 얻었다.

얻어진 폴리머의 구조결정은, 각각 $^1\text{H-NMR}$ (FT-NMR: 브루커 DPX400; ^1H 공명주파수: 400MHz; 측정핵종: ^1H ; 사용된 용매: CDCl_3 ; 기준: 모세관봉입 TMS/ CDCl_3 ; 측정온도: 실온)에 의해 행하였다. 그 결과, 각각의 폴리머는, 하기 화학식(35)로 표시된 3-하이드록시-5-(페닐설폰닐)발레르산의 호모폴리머인 것으로 확인되었다.



또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 20에, 상기에서 얻어진 폴리머의 중량과, 해당 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 20]

분자량제어제	중량 (mg)	Mn	Mw/Mn
함유안함	378	1350000	2.0
1,2-BD	366	37000	1.9
1,3-BD	389	35000	2.1
1,6-HD	384	26000	1.9
1,2,3-BT	375	42000	2.1
EG	369	48000	2.0
MEG	382	49000	2.1

PDW: 폴리머의 건조중량

Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

1,2-BD: 1,2-부탄디올; 1,4-BD: 1,4-부탄디올; 1,6-HD: 1,6-헥산디올;

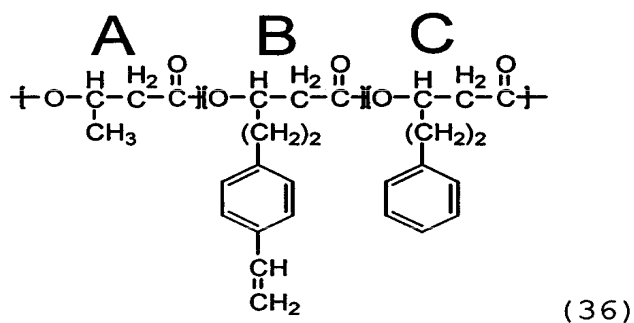
1,2,3-BT: 1,2,3-부탄트리올; EG: 에틸렌 글리콜;

MEG: 에틸렌 글리콜 모노메틸에테르

<실시예 21>

3-하이드록시-5-페닐발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-비닐페닐)발레르산의 유닛을 함유하는 분자량 제어된 PHA의 산화처리에 의해 3-하이드록시-5-페닐발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-카르복시페닐)발레르산의 유닛을 함유하는 PHA로의 전환:

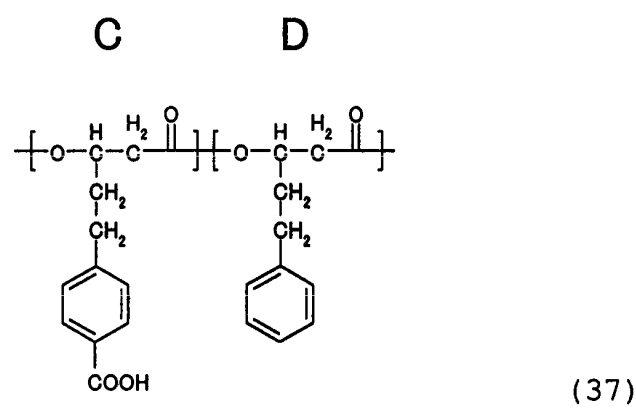
실시예 18에서 얻어진 3-하이드록시-5-페닐발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-비닐페닐)발레르산의 유닛을 함유하는 PHA(화학식(36))를, 산화처리해서, 3-하이드록시-5-페닐발레르산 및 3-하이드록시-5-(4-카르복시페닐)발레르산의 유닛을 함유하는 PHA로 전환시켰다.



산화분열반응은 다음과 같이 행하였다. 100ml 플라스크에, 3-하이드록시-ω-(4-비닐페닐)알칸산 유닛을 함유하는 폴리 에스테르 0.3g, 18-크라운-6-에테르 0.1923g 및 디클로로메탄 10.0ml를 넣고, 해당 혼합물을 교반하였다. 상기 플라스크를 빙욕에 넣고, 반응계를 0℃로 유지하였다. 30분후, 여기에 과망간산칼륨 0.1517g을 첨가하였다. 해당 반응기 플라스크를 알루미늄박으로 싸고 반응혼합물을 21시간 교반하였다. 반응완료후, 해당 반응혼합물에 아황산수소나트륨의 수용액을 첨가하고, 해당 반응혼합물을 메탄올에 부어, 폴리머를 재침전시켜 회수하였다. 얻어진 폴리머를 클로로포름을 이용한 투석에 의해 정제하였다.

얻어진 폴리머를, 푸리에변환 적외분광분석기(FT-IR)(Niclet AV ATAR360 FR-IR)에 의해 분석한 결과, 1693cm⁻¹에서 카르복시산의 새로운 흡수피크가 관찰되었다. 이것은, 얻어진 PHA에 있어서 3-하이드록시-ω-(4-카르복시페닐)알칸산 유닛의 존재를 나타낸다.

얻어진 폴리머를 트리실릴디아조메탄과 반응시켜, 반응생성물을 ¹H-NMR(FT-NMR: 브루커 DPX400; ¹H공명주파수: 400MHz; 측정핵종: ¹H; 사용된 용매: CDCl₃; 기준: 모세관봉입 TMS/CDCl₃; 측정온도: 실온)에 의해 분석한 결과, 해당 폴리머는, 하기 화학식(37)로 표시된 유닛을 함유하는 하이드록시알카노에이트 공중합체인 것으로 확인되었다.



또, 얻어진 폴리머의 트리메틸실릴디아조메탄과의 반응생성물의 평균분자량은, 겔투과크로마토그래피(GPC: 토소사 제품인 HLC-8220, 컬럼: 토소사 제품인 TSK-GEL Super HM-H, 용매: 클로로포름, 폴리스티렌 기준)에 의해 평가하였다.

표 21에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 21]

PEG200: 1%	중량 (mg)	Mn	Mw/Mn
함유안함	285	32000	1.9
함유됨	279	10500	1.7

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

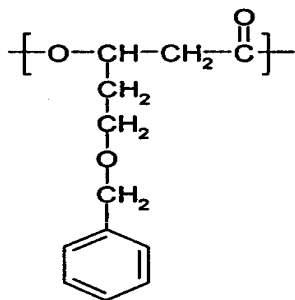
Mw/Mn: 분자량분포

<실시예 22>

PEG에 의한 3-하이드록시-5-[(페닐메틸)옥시]발레르산 유닛을 함유하는 PHA의 분자량제어:

폴리머합성용 기질로서 5-[(페닐메틸)옥시]발레르산을 이용한 이외에는, 실시예 8과 마찬가지로 방법으로 PEG의 분자량 제어효과를 평가하였다.

¹H-NMR분석에 의하면, 상기에서 얻어진 폴리머는, 하기 화학식(38)로 표시되는 3-하이드록시-5-[(페닐메틸)옥시]발레르산의 호모폴리머인 것으로 확인되었다.



(38)

또, 폴리머의 분자량은, 실시예 1과 마찬가지로 방법으로 GPC에 의해 측정하였다.

표 22에, 상기에서 얻어진 미생물 균체의 중량과, 얻어진 폴리머의 중량과, 미생물 균체에 대한 폴리머의 중량비와, 폴리머의 분자량 및 분자량분포를 표시한다.

[표 22]

PEG200: 1%	CDW(mg/ ℓ)	PDW(mg/ ℓ)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
함유안함	1350	165	12.2	128000	2.4
함유됨	1140	125	11.0	52000	2.0

CDW: 미생물 균체의 건조중량

PDW: 폴리머의 건조중량

P/C: PDW/CDW, Mn: 수평균분자량

Mw/Mn: 분자량분포

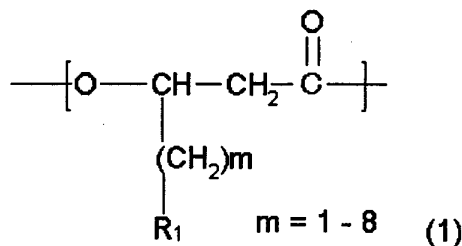
발명의 효과

이상, 본 발명에 의하면, 분자의 결사슬에 페닐구조, 티에닐구조 혹은 시클로헥실구조를 함유하는 잔기의 유닛을 지닌 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량을 제어하는 방법을 제공하는 것이 가능하다.

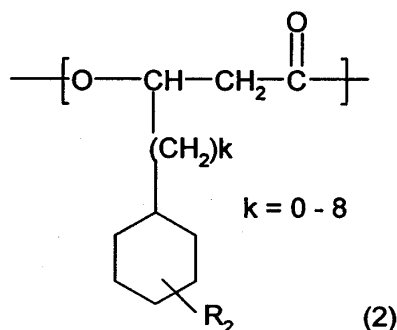
(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식(1):

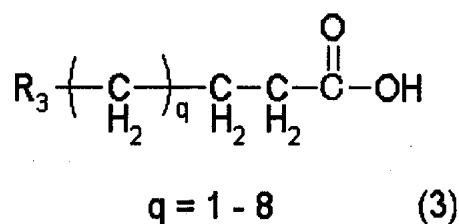


(식중, m은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₁은 페닐구조 및 티에닐구조로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, m 및 R₁은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 3-하이드록시- ω -치환 알칸산유닛 및 하기 화학식(2):

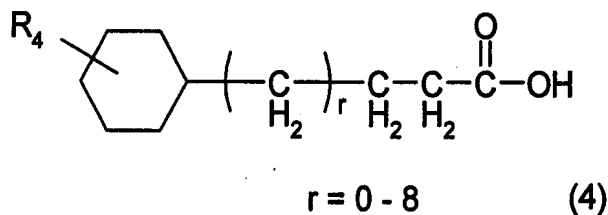


(식중, R₂는 H원자, CN, NO₂, 할로겐원자, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, CF₃, C₂F₅ 및 C₃F₇로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; k는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, k 및 R₂는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 3-하이드록시- ω -시클로헥실알칸산유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량을 제어하는 방법에 있어서,

알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 수산기함유 화합물의 존재하에, 미생물을 배양해서, 하기 화학식(3):



(식중, q는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₃은 페닐구조 및 티에닐구조로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, q 및 R₃은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)으로 표시되는 ω -치환 알칸산 또는 하기 화학식(4):

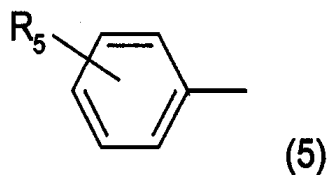


(식중, R_4 는 H원자, CN, NO_2 , 할로젠원자, CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; r 은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, R_4 및 r 은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택됨)로 표시되는 ω -시클로헥실알칸산으로부터 상기 화학식(1) 또는 (2)로 표시되는 유닛의 적어도 1종을 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산가능하게 하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 2.

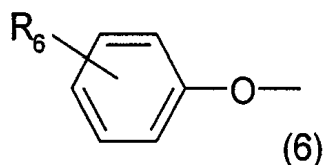
제 1항에 있어서, 화학식(1) 및 (3)중의 R_1 및 R_3 은 각각, 하기 화학식(5) 내지 (15)로 표시되는 잔기로 이루어진 군으로부터 각각 선택된 잔기인 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법:

하기 일반식(5):



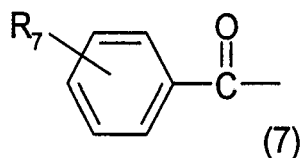
[식중, R_5 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , 비닐, COOR_{51} (R_1 에 대해서만; R_{51} 은 H원자, Na원자 및 K원자로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐기;

하기 일반식(6):



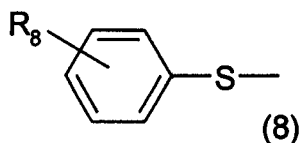
(식중, R_6 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , SCH_3 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페녹시기;

하기 일반식(7):



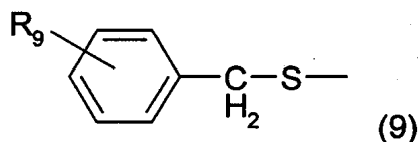
(식중, R_7 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)로 표시되는 치환 혹은 무치환의 벤조일기;

하기 일반식(8):



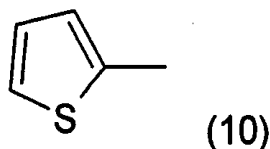
[식중, R_8 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , COOR_{81} , SO_2R_{82} (R_{81} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{82} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 및 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기;

하기 일반식(9):



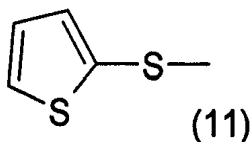
[식중, R_9 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , COOR_{91} , SO_2R_{92} (R_{91} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{92} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 및 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 (페닐메틸)설파닐기;

하기 화학식(10):



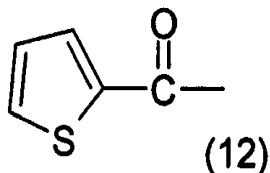
으로 표시되는 2-티에닐기;

하기 화학식(11):



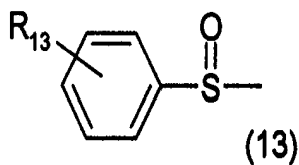
로 표시되는 2-티에닐설파닐기;

하기 화학식(12):



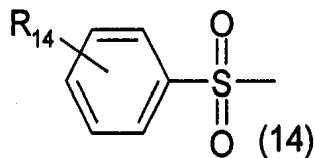
로 표시되는 2-티에닐카르보닐기;

하기 일반식(13):



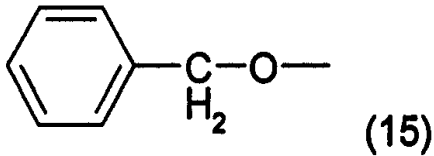
[식중, R_{13} 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{131}$, SO_2R_{132} (R_{131} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{132} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기(R_1 에 대해서만);

하기 일반식(14):



[식중, R_{14} 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{141}$, SO_2R_{142} (R_{141} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{142} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기(R_1 에 대해서만); 및

하기 화학식(15):



로 표시되는 (페닐메틸)옥시기.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 알콜류, 디올류 및 트리올류는 탄소수 3 내지 14의 직선형 혹은 분기형 구조를 지닌 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 알킬렌 글리콜류 및 알킬렌 글리콜 모노에스테르류는, 탄소수 2 내지 10의 직선형 혹은 분기형 구조를 지닌 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류의 수평균분자량의 범위는 각각 100 내지 20000인 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 수산기함유 화합물은, 미생물의 배양시, 0.02 내지 5%(w/v)의 농도로 이용하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 8.

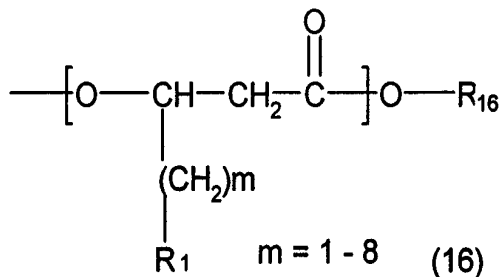
제 1항에 있어서, 상기 미생물이 슈도모나스(*Pseudomonas*)속에 속하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 9.

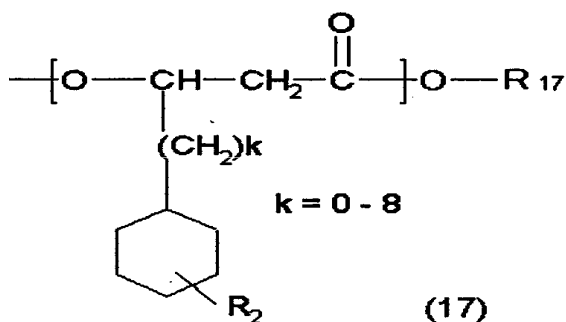
제 8항에 있어서, 상기 미생물이, 슈도모나스 치코리이(*Pseudomonas cichorii*) YN2균주(FERM BP-7375), 슈도모나스 치코리이(*Pseudomonas cichorii*) H45균주(FERM BP-7374), 슈도모나스 젯세니이(*Pseudomonas jessenii*) P161균주(FERM BP-7376) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) P91(FERM BP-7373)의 1종이상인 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 분자량의 제어방법.

청구항 10.

하기 화학식(16):



(식중, m은 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; R₁은 페닐구조 및 티에닐구조로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 고리구조를 지닌 잔기이고; 복수의 유닛의 존재시, m 및 R₁은 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택되며; R₁₆은 알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 화학종으로부터 유도된 기임)으로 표시되는 3-하이드록시-ω-치환알칸산 유닛; 및 일반식(17):

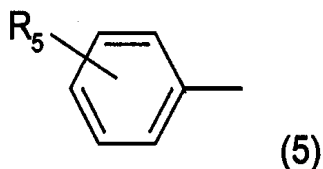


(식중, R₂는 H원자, CN, NO₂, 할로젠원자, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, CF₃, C₂F₅ 및 C₃F₇로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로헥실기상의 치환기를 나타내며; k는 해당 화학식중에 표시된 수치범위내에서 선택된 정수이고; 복수의 유닛의 존재시, k 및 R₂는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 선택되고; R₁₇은 알콜류, 디올류, 트리올류, 알킬렌 글리콜류, 폴리에틸렌 글리콜류, 폴리에틸렌 옥사이드류, 알킬렌 글리콜 모노에스테르류, 폴리에틸렌 글리콜 모노에스테르류 및 폴리에틸렌 옥사이드 모노에스테르류로 이루어진 군으로부터 선택된 화학종으로부터 유도된 기임)로 표시되는 3-하이드록시-ω-시클로헥실알칸산유닛의 적어도 1종을 함유하는 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트.

청구항 11.

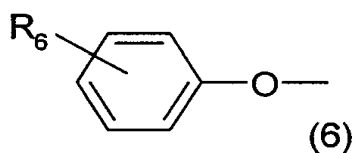
제 10항에 있어서, 화학식(16)중의 R₁은, 하기 화학식(5) 내지 (15)로 표시되는 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 잔기인 것을 특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트:

하기 일반식(5):



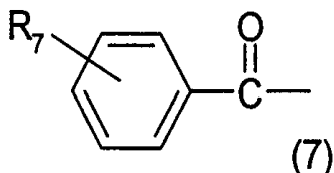
[식중, R_5 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , 비닐, $COOR_{51}$ (R_1 에 대해서만; R_{51} 은 H원자, Na원자 및 K원자로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐기;

하기 일반식(6):



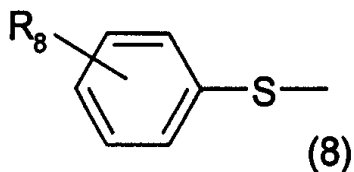
(식중, R_6 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , SCH_3 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페녹시기;

하기 일반식(7):



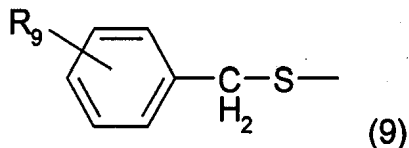
(식중, R_7 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , CF_3 , C_2F_5 및 C_3F_7 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨)로 표시되는 치환 혹은 무치환의 벤조일기;

하기 일반식(8):



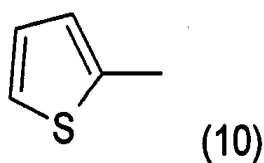
[식중, R_8 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{81}$, SO_2R_{82} (R_{81} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{82} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설파닐기;

하기 일반식(9):



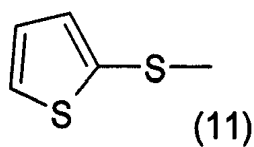
[식중, R_9 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{91}$, SO_2R_{92} (R_{91} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{92} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기이며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 (페닐메틸)설파닐기;

하기 화학식(10):



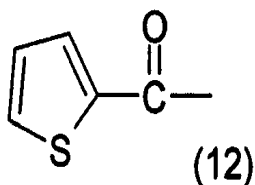
으로 표시되는 2-티에닐기;

하기 화학식(11):



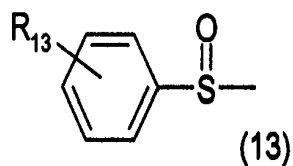
로 표시되는 2-티에닐설파닐기;

하기 화학식(12):



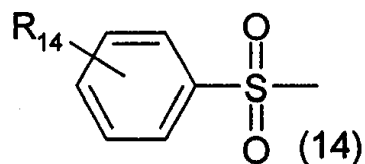
로 표시되는 2-티에닐카르보닐기;

하기 일반식(13):



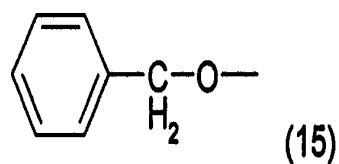
[식중, R_{13} 은 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{131}$, SO_2R_{132} (R_{131} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{132} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]으로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설폰닐기(R_1 에 대해서만);

하기 일반식(14):



[식중, R_{14} 는 H원자, 할로젠원자, CN, NO_2 , $COOR_{141}$, SO_2R_{142} (R_{141} 은 H, Na, K, CH_3 및 C_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기이고; R_{142} 는 OH, ONa, OK, 할로젠원자, OCH_3 및 OC_2H_5 로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기임), CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , $(CH_3)_2-CH$ 및 $(CH_3)_3-C$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 방향고리상의 치환기를 나타내며; 복수의 유닛의 존재시, 상기 정의는 각각의 유닛에 대해서 독립적으로 적용됨]로 표시되는 치환 혹은 무치환의 페닐설폰닐기(R_1 에 대해서만); 및

하기 화학식(15):



로 표시되는 (페닐메틸)옥시기.