

## Alcaligenes latus에 의한 PHB의 생합성에 관한 연구

조근도\* · 윤정열 · 오준택\*\* · 김우식†

연세대학교 공과대학 화학공학과 및 생물산업소재연구센터

\*LG 엔지니어링(주)

\*\*델라웨어대학교 화학공학과

(1996년 11월 28일 접수, 1997년 5월 2일 채택)

## Study on the Biosynthesis of PHB with *Alcaligenes latus*

Geun-Do Cho\*, Jeong-Yeol Yoon, Joon Taek Oh\*\* and Woo-Sik Kim†

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, and Bioproducts Research Center,  
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

\*LG Engineering Co., Ltd., Seoul 121-721, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, University of Delaware, Newark, DE 19716, U.S.A.

(Received 28 November 1996; accepted 2 May 1997)

### 요 약

본 논문은 *Alcaligenes latus* DSM 1123 균주의 최적 증식조건 및 PHB 생합성을 위한 효과적인 배양방법에 관한 연구이다. 최적 균증식 조건에 대한 실험은 진탕배양기를 이용하였으며, 얻어진 최적 조건 하에서 2.5 L 용량의 호기성 배양장치를 사용하여 회분식 배양과 pH 조절 용액을 달리한 유가식 배양을 행하였다. 배양에 있어 탄소원 및 질소원은 각각 저가의 탄소원인 sucrose 및  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용한 경우가 가장 효율적이었다. 최적의 C/N비는 탄소원 및 질소원 농도에 비례하여 증가하였으며, sucrose 농도 30 g/L일 경우 C/N비 30에서 최대의 비증식속도를 보였다. Yeast extract 0.5 g/L와 polypeptone 1.0 g/L를 배지 중에 첨가한 결과 지연시간의 감소 및 2배 이상의 비증식 속도 향상을 보였다. 또 *A. latus*는 *A. eutrophus*와 달리 균증식기에도 PHB를 합성하였다. 초기에는  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액을, 균증식기 중반부터는 NaOH 용액을 이용하여 2단 유가식 배양을 하였을 경우가  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액과 NaOH 용액을 각각 이용하여 pH를 조절한 경우에 비하여 비증식속도와 균체량 및 PHB 축적량이 증가하였으며, 이때의 최종 균체량, PHB 합성량 및 최종 균체량에 대한 PHB 축적률은 각각 17.6 g/L, 8.04 g/L 및 46%이었다.

**Abstract**— Culture conditions for the optimum growth and biosynthesis of PHB in *Alcaligenes latus* DSM 1123 were investigated. Optimum carbon and nitrogen sources and their concentrations for growth were determined, and batch and fed-batch fermentations were performed in a 2.5 L jar type aerobic fermenter with various pH control solutions. Sucrose and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were found to be the most effective carbon and nitrogen sources for the growth of *A. latus*, respectively. Optimum C/N ratio was found to be varied with the concentrations of carbon and nitrogen sources. The maximum specific growth rate was obtained at the sucrose concentration of 30 g/L and C/N ratio of 30. The specific growth rate increased more than two times and lag time was reduced when yeast extract and polypeptone were added. PHB could be synthesized in the logarithmic growth phase. By using  $\text{NH}_4\text{OH}$  and NaOH solutions in the first and second stage as pH control solution, significant increases in the specific growth rate, biomass and PHB concentrations were observed. Under the optimal conditions, the maximum biomass and PHB accumulation yield( $Y_{PHB}$ ) attained after 40 hours were 17.6 g/L and 46%, respectively.

**Key words** : *Alcaligenes latus*, PHB, Biodegradability, pH Control Solution

### 1. 서 론

최근 환경문제가 부각되면서 분해성 플라스틱에 대한 연구개발 및 산업화가 활발히 진행되고 있다. 이러한 미생물 분해성 고분자를 생산하기 위한 한 가지 방법으로서 polybutadiene과 polyester 등의

고분자 물질에 전분을 공중합체로 성형하여 분해성을 도모하는 방법이 있는데, 이는 경제적인 면에서는 유리하나 제품의 물성이 난분해성 플라스틱에 비해 많이 떨어진다는 단점을 안고 있다. 이에 반하여 여러 종류의 박테리아가 불균형 영양상태(N, O, P의 결핍상태)에서 축적하는 것으로 알려져 있는 poly-3-hydroxybutyrate(PHB)는

기존의 플라스틱과 유사한 성질을 유지하면서도 성형, 용융, 방사가 자유로운 뿐 아니라 기존의 고분자와 blending이 가능하며 체내에서 대사물질로 사용되어 생체적합성이 우수하고 부작용이 없는 등 수많은 잠재적 응용 가능성으로 인해 가장 많은 주목을 받고 있다[1].

생분해성 고분자에 대한 많은 관심과 밝은 전망으로 인하여 이와 관련된 연구 결과가 많이 발표되고 있다. 문헌에 발표되고 있는 연구를 대략적으로 살펴보면 크게 생분해성 고분자의 합성 기구 해석, PHA(polyhydroxy alkanates) 공중합체의 물성 측정 및 분자량 변화에 관한 연구, 그리고 여러 분석기기를 이용한 PHA의 분석에 관한 연구 등으로 분류할 수 있다[2, 3]. 또한 최근에는 PHB 합성에 관여하는 유전자들 *E. coli*에 cloning하여 효율적 합성을 피하는 등의 연구도 관심을 끌고 있다[4-6]. 그러나 생분해성 고분자의 생산 연구에 사용되고 있는 균주는 비교적 제한적이어서 *A. eutrophus* 등의 몇몇 균주를 이용한 실험이 대부분을 차지하고 있다. 그러나 사용하는 균주에 따라 측정된 고분자의 분자량 및 물성치가 변하는 것을 고려할 때[7] 여러 균주에 대한 고찰, 균주 개발 그리고 균 증식 및 고분자 축적에 대한 kinetics 연구가 있어야 할 것이다.

본 연구에서는 비교적 싼 탄소원인 sucrose를 대사하여 PHB를 축적시킬 수 있다고 알려져 있는[8] *Alcaligenes latus* DSM 1123을 이용하여 PHB를 합성하였다. *A. latus*는  $N_2$ 를 고정화하여 사용할 수 있다고 알려져 있으며, 질소나 산소 제한시 체내 에너지 저장 물질로서 PHB를 합성하는 것으로 알려져 있다[9, 10]. 탄소원으로는 glucose, fructose 등의 당당류와 sucrose 등의 값싼 이당류를 대사할 수 있고, propionic acid 등을 첨가하면 PHB와 PHV의 공중합체인 PHA를 합성하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 경우에는 PHV 함량을 다른 균주에서보다도 높게 얻을 수 있어 고분자의 물성 향상에 유리하다고 학계에 보고된 바 있다[11, 12]. 또한 고분자의 합성단계에서는 효소반응 속도상수가 분해단계의 상수보다 커서 지수증식에 도 PHB를 합성하므로, 고분자 축적을 위해 영양 불균형 상태를 조성할 필요가 없는 one-stage 배양이 가능하며 장시간 보존하여도 활성을 잃지 않는다[13]. *Alcaligenes* 균주의 경우 주로 ferrous, phosphate, ammonium, magnesium, sulfate 이온이 결핍된 부적절한 성장 조건(unbalanced growth condition)에서 과다한 세포내 reduction equivalents를 제거하기 위한 전자공여체(electron sink)로서 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate를 축적하게 되는데, 특히 본 실험에서 사용한 *A. latus*는 산소결핍 조건 하에서 좋은 PHB 축적률을 보이는 것으로 알려져 있다[14].

본 연구에서는 *A. latus*의 최적 균성장 조건의 확립을 위하여 기본적인 조건인 온도와 pH, 탄소원과 질소원의 종류 및 농도, C/N비, 합성배지 조성 등의 최적조건을 연구하였다. 이와 함께 균주의 성장에 영향을 미칠 수 있다고 생각되는 미량원소 등을 배지에 첨가하여 그 영향도 살펴보고자 하였다. 이러한 일련의 실험을 통하여 얻은 정보를 토대로 기존의 배양방법인 회분식 배양법(batch fermentation), 유가식 배양법(fed-batch fermentation) 등의 실험을 행하고, 효과적인 기질의 공급법, pH 조절법 및 다단 배양법을 통하여 PHB 수율을 향상시키는 방법을 제시하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2-1. 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Alcaligenes latus* DSM 1123이었다. 균주의 활성을 유지하기 위해 1주일에 한 번씩 사면배지에서 계대 배양하였다. 이때 고상 사면배지(slant culture)의 조성은 yeast extract 10 g/L, polypeptone 10 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g/L, sucrose 20 g/L로 하였다. 고상 사면배지에 종균을 보존하는 한편, 200 mL 삼각 플라스크

에 일부의 균을 접종시켜 20시간 동안 진탕배양기(shaking incubator)에서 예비배양을 한 후, 이를 원심분리하고 식염수로 세척하여 무균상태에서 삼각 플라스크(회분식 실험) 또는 미생물 배양기(반회분식 실험)에 접종하였다. 예비배양의 복합배지 조성은 고상 사면배지 중 agar를 제외한 조성으로 하였다[15]. 본 배양에 사용된 합성배지의 조성은 Lafferty[14] 및 Ramsay 등[16]의 것과 같게 하였으며, 미량원소 중의 trace 제조시에는 1 M HCl에 trace 원소들을 용해시켜 사용하였다. 고압멸균기내에서 일어나는 첨가된 원소들간의 반응을 억제하기 위하여 sucrose,  $(NH_4)_2SO_4$ , phosphate buffer 및 미량원소 등으로 따로 나누어 멸균한 후, 상온에서 혼합하였다.

### 2-2. 배양장치 및 방법

연구에 사용된 호기성 미생물 배양장치(fermenter)는 한국발효기 주식회사의 2.5L 용량의 jar type 반응기로, pH 제어기와 소포 제어기(antifoam controller) 및 온도 제어기, 교반속도 제어기, 공기공급 유량기 등을 구비하였으며, 이외에도 용존산소 측정기(dissolved oxygen detector)를 연결하여 사용하였다. 초기 발효배지의 부피는 1L로 하였으며, 배양온도는 기초 실험을 통해 얻어진 최적 온도인 37 °C를 온도 제어기로 유지하였고, pH는 20%의 NaOH, 28%의  $NH_4OH$ , sodium phosphate buffer를 pH 조절기의 연동펌프로 투입하여 6.8-7.0으로 일정하게 유지하였다. 산소의 공급은 압축공기와 교반속도를 각각 0.5-2.5 vvm과 100-500 rpm으로 조절하여 용존산소 수율을 10-50%로 실험의 조건에 따라 공급하였다. 소포제는 silicone계인 Sigma사의 antifoam 204를 3%로 희석하여 사용하였으며, 소포 제어기를 통해 투입량을 조절하였다. 균주 증식의 최적조건에 대한 비교실험은 진탕배양기에서 300 mL 삼각플라스크에 균을 접종시킨 배양액 100 mL를 넣은 후 실험을 행하였으며, 배양기의 온도는 34 °C를 유지하였다(이 실험은 최적 배양 온도가 결정되기 전에 실험한 것으로, 일반적인 미생물의 최적 증식온도 30-34 °C에 맞춘 것이다).

### 2-3. PHB의 추출 방법

PHB를 함유한 균체로부터 PHB를 회수하기 위해서 hypochlorite 용액(NaOCl solution)을 사용하여 세포벽을 제거한 후 soxhlet을 이용하여 dichloroethane이나 chloroform으로 추출하였다[17-19].

### 2-4. 분석방법

건조균체의 질량은 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 배양액을 적당히 순수로 희석한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선으로부터 건조균체 질량으로 환산하였다. 실제의 건조균체는 배지를 10000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 0.9%의 식염수로 세척한 후, 다시 90 °C에서 수분을 증발시켜 얻을 수 있다[17-22].

배양액 중의 암모늄 농도는 Berthelot 반응을 이용하여 측정하였으며[18], 탄소원인 sucrose의 농도는 HPLC(Waters 510 HPLC Pump, Waters 410 Differential Refractometer)을 이용하여 측정하였다[19]. HPLC 분석은 원심분리 후 상등액을 주입하여 행하였으며, 사용된 column은 Waters의 Nova-Pak  $C_{18}$ , 이동상은 acetonitrile이었다. 배양액 중의 용존 산소 농도는 TOA사의 DO-11P 용존 산소 측정기로 측정하였다.

PHB의 정량분석은 Riis와 Mai의 방법을 따라[3] Shimadzu Gas Chromatography 7A(FID 검출기)를 이용하여 분석하였다. GC 분석 전에 건조 균체는 2 mL DCE(1,2-dichloroethane) 및 염산(HCl)과 n-propanol을 1:4로 혼합한 용액 2 mL를 가하고 내부 표준시료로 benzoic acid ethylester 200  $\mu$ L를 가하고 중탕, 냉각하여 heavier phase를 주입하여 분석하였다[17-22].

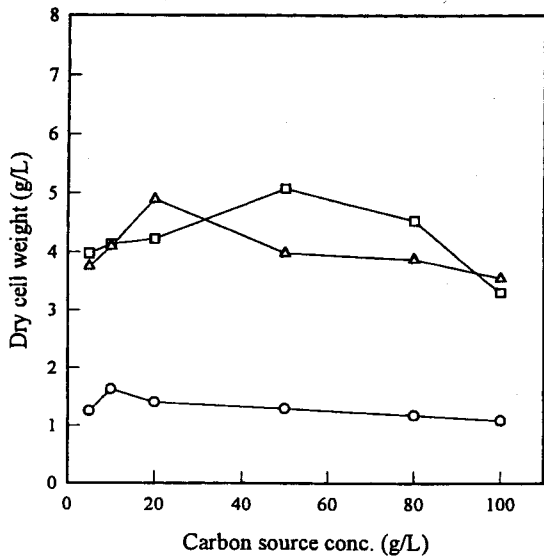


Fig. 1. Effect of carbon sources on cell growth after 67 hrs.  
[Shaking incubator,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.0 g/L, temperature 34 °C, ○: fructose, □: glucose, △: sucrose]

정성분석은 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$  및 DTA(Differential Thermal Analysis) 등을 통하여 확인하였다. 균체내에 합성된 PHB 및 PHA의 용점은 Shimadzu사의 DTA-50을 이용하여 측정하였다[18].

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 3-1. 최적 균종식 조건의 결정

##### 3-1-1. 탄소원의 종류에 따른 영향

*Alcaligenes latus* DSM 1123 균주가 대사할 수 있다고 알려져 있는 여러 탄소원 중에서 glucose, fructose 및 sucrose를 선택하여 농도의 변화에 따른 균성장 및 PHB 축적에 대한 영향을 관찰하였다.

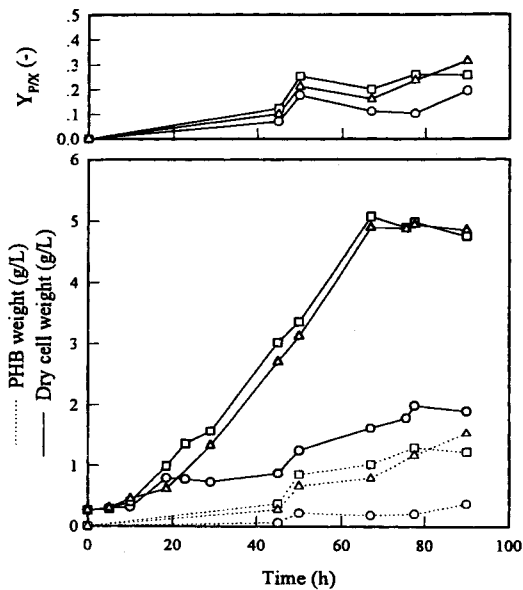


Fig. 2. Time courses of dry cell weight, PHB and  $Y_{P/K}$  according to carbon sources.  
[Shaking incubator,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.0 g/L, temperature 34 °C, ○: fructose 10 g/L, □: glucose 50 g/L, △: sucrose 20 g/L]

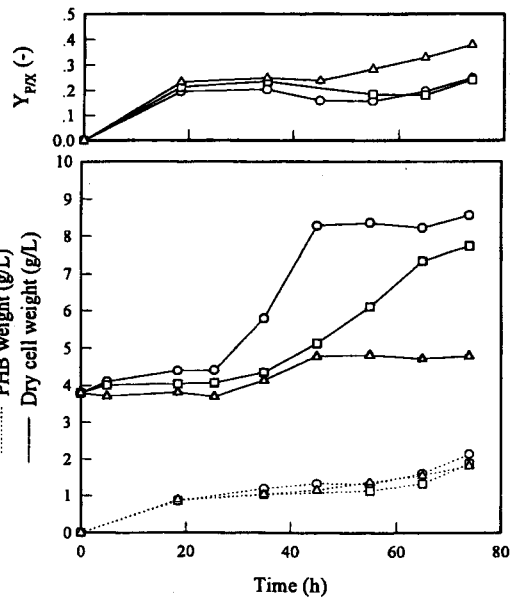


Fig. 3. Time courses of dry cell weight, PHB and  $Y_{P/K}$  according to nitrogen sources.

[Shaking incubator, Sucrose 20.0 g/L, temperature 34 °C, ○:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , □:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , △:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ]

Fig. 1은 배양 67시간일 때의 탄소원 농도에 따른 균체량의 변화를 나타낸 것으로, glucose는 50 g/L, fructose는 10 g/L, sucrose는 20 g/L일 때 최대 균체량을 얻을 수 있었다. 이 농도에서의 시간에 따른 균체량과 PHB 양을 Fig. 2에 나타내었다. 지수성장기에서 계산된 탄소원에 따른 비증식속도는(이하 모든 비증식속도는 지수성장기에서만 계산하였다) glucose 50 g/L, fructose 10 g/L 및 sucrose 20 g/L에 대하여 각각 0.013, 0.009 및 0.015이었고, 탄소원에 대한 PHB의 수율( $Y_{P/K}$ )은 모든 탄소원에 대해 0.2-0.35로 큰 차이가 없었으나  $Y_{X/C}$  면에서는 sucrose가 가장 높았다. 따라서 측정된 PHB 양 및 비증식속도를 고려하여 볼 때 sucrose를 주탄소원으로 선택하는 것이 가장 경제적이고 효율적임을 알 수 있었다.

##### 3-1-2. 질소원의 종류에 따른 영향

일반적으로 *A. latus*의 질소원으로는 순수  $\text{N}_2$  gas[9, 10],  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [11, 14],  $\text{NH}_4\text{Cl}$ [23] 및  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액을 이용할 수 있다고 보고된 바 있으며 회분식 실험에서는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [11, 14]를, 연속공정에서는 값싼  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액[8]을 사용한 바 있다. 본 연구에서는 일반적으로 미생물이 질소원으로 소비하는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  및  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 대상으로 하여 *A. latus*의 질소원 동화 특성을 실험하였다. 탄소원으로는 sucrose 20 g/L를 사용하였으며, 초기 질소원 농도는 모두 2.0 g/L로 하였다. Fig. 3을 보면  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 과  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 에 비해 초기 균성장이 빨라 더 효율적이었다. 그러나 균체량에 대한 PHB의 수율( $Y_{P/K}$ )면에서는 큰 차이가 없었다. 질소원에 따른 비증식속도와  $Y_{X/N}$ 은  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  및  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에 대하여 각각 0.014, 0.007, 0.010과 4.25, 2.32, 3.80이었다. 따라서 비증식속도 및  $Y_{X/N}$ 면에서  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 최적의 질소원임을 알 수 있었다. Lafferty 등[14]은 *A. latus*의  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 대한 수율( $Y_{X/N}$ )을 3.98로 보고한 바 있는데 본 연구의 수율보다는 다소 작았다.

##### 3-1-3. C/N비 변화의 영향

일반적으로 회분식 배양에서는 C/N비 초기값을 약 10-15로 실험한 연구보고[11, 14]가 있으나 *A. latus*의 자유균체 발효에 있어 C/N비에 대한 연구는 아직 문헌에 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 앞의 실험에서 주탄소원과 질소원으로 선택한 sucrose와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,

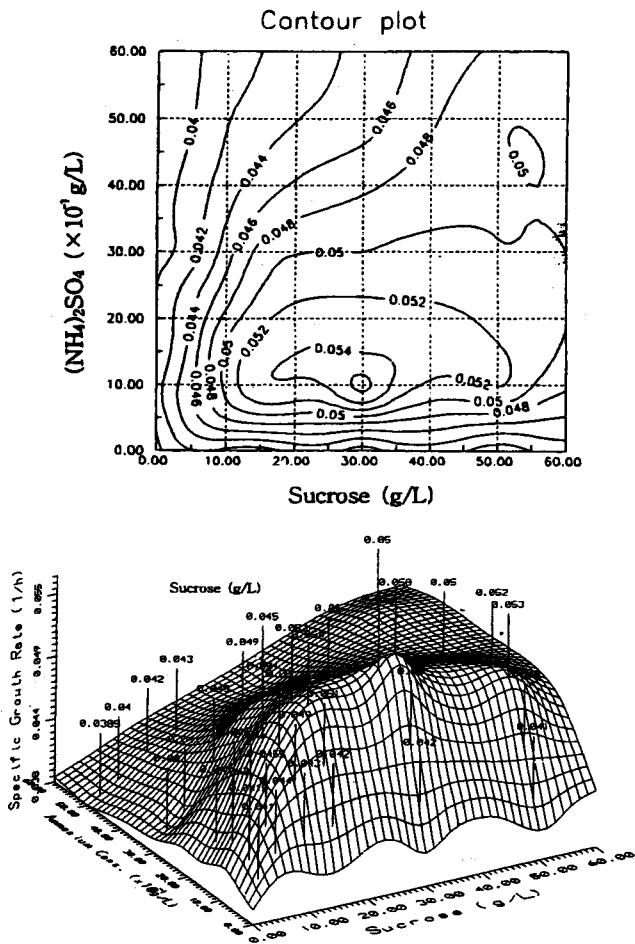


Fig. 4. 3-D surface and contour plot of specific growth rate as a function of  $(NH_4)_2SO_4$  (0.2, 0.5, 1.0, 3.0 g/L) and sucrose (2, 5, 10, 30 g/L) concentration (Temperature 34 °C).

를 대상으로 하여 균성장에 있어서의 최적 탄소원의 농도 및 질소원의 비(C/N비)를 구하기 위한 실험을 행하였다. Sucrose는 각각 2-50 g/L까지,  $(NH_4)_2SO_4$ 는 0.2-5 g/L까지 초기값을 여러 C/N비로 달리하여 비증식속도를 살펴보았다. 그 결과 비증식속도에 대한 최적의 C/N비가 탄소원과 질소원 초기 농도의 함수임을 확인할 수 있었으며, 탄소원과 질소원의 초기 농도가 증가할수록 최대 비증식속도를 나타내는 C/N비도 함께 증가하는 것으로 나타났다. 실험으로부터 얻어진 data를 바탕으로 탄소원과 질소원의 농도에 대한 비증식속도를 Fig. 4의 3차원 그림으로 나타내었다. Fig. 4의 탄소원과 질소원 평면의 등고선에서 보여지는 바와 같이 비증식속도는 sucrose 30 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1 g/L일 때 즉, 초기 C/N비 30에서 최대 비증식속도를 나타내며, 탄소원과 질소원의 농도가 이보다 낮을 때는 급격하게, 그리고 클 때는 비교적 서서히 감소하였다. 탄소원의 농도가 최적값보다도 높은 경우에도 비증식속도에 미치는 영향이 적게 나타나 PHB의 대량생산을 위한 유가식 배양이나 연속식 배양에 있어 탄소원의 농도를 보다 넓은 범위에서 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

3-1-4. 첨가물의 영향

Seed 배양시 복합배지를 이용하여 20시간 가량의 예비배양 후 최소배지(합성배지)로 옮겨진 균체는 달라진 배양 영양조건에 적응하기 위하여 비교적 긴 지연시간(lag time)을 가진다. 이를 줄이기 위하여 배양초기에 미량의 첨가물을 배지에 첨가하여 지연시간과 비증식속도에 미치는 영향을 검토하였다. 일반적으로 비증식속도의 증

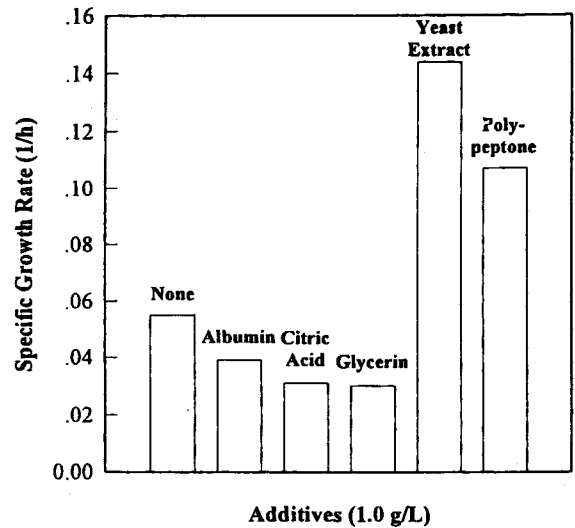


Fig. 5. Effect of additives in the medium on specific growth rate.

가와 지연시간의 감소를 위해 사용하는 물질들 중에서 본 연구에서도 단백질류인 albumin, 미생물 중간 대사물질인 citric acid, 알콜류 탄소원인 glycerin, yeast extract, polypeptone 등의 영향을 관찰하였으며, 동일한 배지에 각각 1.0 g/L의 농도로 첨가하여 비증식속도를 비교하여 보았다. 이 결과를 Fig. 5에 나타내었으며, yeast extract와 polypeptone을 첨가한 경우 비증식속도가 2배 이상 증가하였다. 그 이외의 첨가물의 경우는 첨가하지 않은 경우와 같거나 오히려 감소하는 것으로 보아 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한 yeast extract와 polypeptone의 최적 첨가량을 결정하기 위해 각각의 농도를 0-3 g/L로 변화시켜가며 실험을 행하여 이를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 나타난 바와 같이 yeast extract의 농도가 높을수록 비증식속도도 증가하였으나 polypeptone의 경우는 1.0 g/L까지 증가하다가 이후 감소하였다. 본 연구의 회분식 및 유가식 배양실험에서는 yeast extract와 polypeptone을 각각 0.5 g/L, 1.0 g/L로 첨가하여 실험을 행하였다.

3-2. 1단 회분식 배양에서의 균성장 및 PHB 축적

진탕배양기를 통하여 얻은 최적의 균성장 조건하에서 발효기를

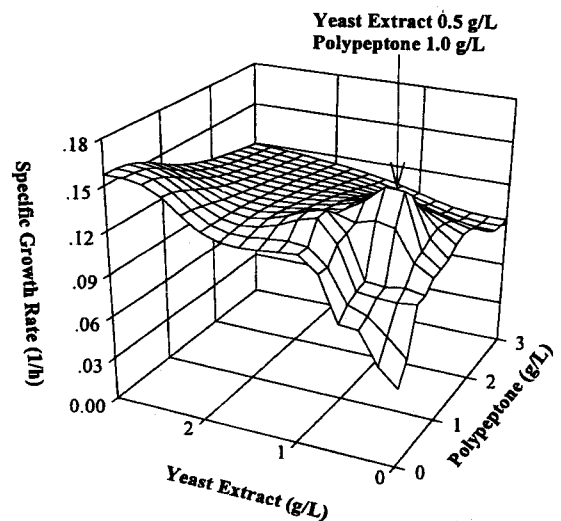


Fig. 6. Effect of yeast extract and polypeptone ratio in the medium on specific growth rate.

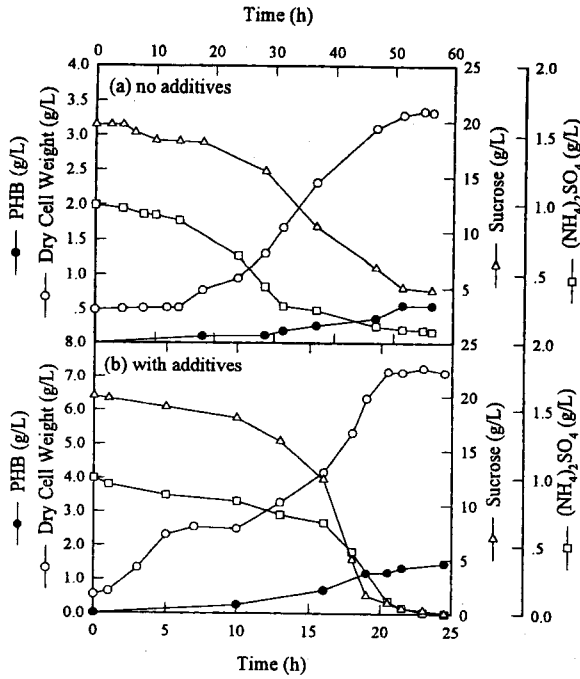


Fig. 7. Time courses of dry cell weight, PHB, and substrates of batch fermentation of *A. latus* in the medium containing; (a) no additives, (b) yeast extract 0.5 g/L and polypeptide 1.0 g/L.

이용한 회분식 배양실험을 행하였다. 실험은 균증식기에도 PHB를 축적하는 것으로 알려진 *A. latus*의 특성을 고려하여 one-stage 배양법을 행하였다. Sucrose 및  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 초기농도는 각각 20.0 g/L 및 1.0 g/L로 하였고, 초기 배양부피는 1L, 용존 산소량(dissolved oxygen)은 25-30%, pH는 20% NaOH 수용액을 이용하여 6.8-7.0을 유지하였으며 배양시간에 따른 건조균체량, PHB 축적 및 sucrose와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 소비량을 고찰하였다. Fig. 7은 각각 yeast extract 0.5 g/L와 polypeptide 1.0 g/L를 넣지 않은 합성배지와 첨가시켜 준 경우(반화학배지)의 실험결과이다. 이 결과 첨가물이 없는 경우에는 초기부터 15시간 정도의 긴 지연시간 후 서서히 균체량과 PHB량이 증가하는 경향을 보인 반면, yeast extract와 polypeptide를 첨가한 경우는 지연시간이 매우 짧아 초기부터 균체량이 급격히 증가하여 배양시간을 단축시킬 수 있었으며, 이 첨가물이 거의 소비된 것으로 보여지는 시간인 5시간 이후에 지연상(lag phase) 5시간 정도를 거친 후 균체량이 급격히 증가하여 균체량 수율 및 PHB량이 증가하였다. 이는 질소 고정화 능력이 있는 *A. latus*의 성질에 비추어 질소 고정화를 위한 지연상으로 여겨진다. 또한 첨가물이 있는 경우에는 균의 지수증식기에도 PHB를 축적시키는 경향을 보임으로서 문헌[14]에 알려진 바와 일치함을 알 수 있었다. 실험결과 얻은 최종균체량은 Hiramitsu 등[11, 12]이 30 °C에서 48시간 배양 후 얻은 4-5 g/L보다 향상된 7.11 g/L(25시간 배양)이었으며,  $\mu$ ,  $Y_{P/X}$ ,  $Y_{X/C}$  및  $Y_{P/C}$ 는 첨가물이 없는 경우와 있는 경우에 대하여 각각 0.03, 0.17, 0.23 및 0.04와 0.04, 0.21, 0.37 및 0.08이었다. 이는 타 문헌[14, 23]의 two-stage 배양 결과인  $Y_{P/X}=0.69$ 와  $Y_{X/C}=0.45$ 에 비해 작은 수치인데, 이는 one-stage 배양이 PHB의 축적과 균체량의 증가를 동시에 시킬 수 있는 장점이 있는 반면 PHB 수율면에서는 two-stage 배양보다 효율이 떨어지기 때문인 것으로 사료된다.

3-3. 2단 유가식 배양에서의 균성장 및 PHB 축적

유가식 배양은 기질을 연속 혹은 간헐적으로 배양액에 첨가하여 균체량과 대사물질을 효율적으로 생산하는 배양방식으로서 PHB를

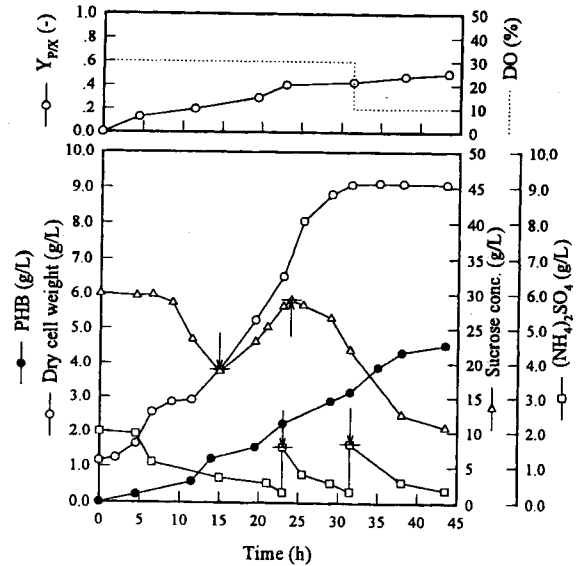


Fig. 8. Time courses of dry cell weight, PHB,  $Y_{P/X}$  and substrates of two-stage fed-batch fermentation of *A. latus* in case of pH-control by NaOH.

(↓ : start of substrate feeding, ↑ : end of substrate feeding)

효율적으로 생산하기 위한 방법으로 많이 연구되고 있다. 유가식 배양을 통해 PHB를 생산하는 연구에는 주로 균증식기 이후에 배지 중의 일부 영양소를 제한하여 PHB를 집중적으로 축적시키는 2단 배양법을 행하게 된다. 본 실험에서는 균증식기 이후  $\text{O}_2$  혹은 질소원을 제한하여 PHB의 축적을 도모하는 한편, pH 조절을 위해 사용하는 용액의 영향 및 효과적인 사용법에 대하여 실험하였다. 배양의 초기 배지조성은 sucrose와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 30.0 g/L 및 2.0 g/L로 하였으며, 배양액 중의 C/N비를 배양 내내 일정하게 유지하기 위하여 탄소원으로 sucrose 400 g/L 용액과 질소원으로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  200 g/L를 간헐적으로 공급하였다. pH를 6.8-7.0으로 일정하게 유지하기 위하여 20%의 NaOH 용액 및 28%의  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액을 온라인 센서에 의해 미량연동펌프로 공급하였으며, 배양 중의 DO는 교반속도와 주입공기의 유량을 조절하여 균증식기에는  $30 \pm 5\%$ 로 증식기 이후의 정상상(stationary phase)에는  $10 \pm 5\%$ 로 유지시켜 PHB의 축적을 도모하였다. 그 결과를 Fig. 8, 9에 도시하였다. 그림 중의 기질 공급 시작 시기는 ↓로, 공급 중단 시기는 ↑로 표시하였다.

3-3-1. NaOH 용액을 이용한 pH 조절

Fig. 8은 배양 중의 pH 조절에 NaOH 용액을 사용한 경우이다. 초기의 12시간 동안은 균주가 첨가물을 대사하는 동안으로 생각되며 질소원은 감소하지만 주탄소원인 sucrose의 감소는 거의 없었다. 2차 지연상(lag time) 이후에는 sucrose 및  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  농도가 지속적으로 감소하면서 동시에 균주도 증식기에 접어들었고, sucrose는 20 g/L 이하의 농도로 감소한 15시간 후에 연동펌프로 공급을 시작하여 농도가 30 g/L에 도달한 25시간에서 공급을 중단하였으며,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 23시간 후와 32시간 후에 1g씩을 주입하였다. 균증식기가 끝나는 32시간 이후의 DO는 10%로 낮추어 PHB 축적을 촉진시키고자 하였다. 균증식이 없는 가운데에서도 탄소원과 질소원은 계속 소비되었는데, 이때 소비된 기질은 PHB 합성과 균체의 생명유지만만 쓰이는 것으로 보이며,  $\text{O}_2$ 의 제한이 Lafferty 등의 연구보고[14]에서처럼 축적률( $Y_{P/X}$ )을 크게 증가시키지는 않았으나 정상기에서 다소 PHB 축적량을 증가시켰다. 균체량은 회분식 실험결과와 비교할 때 큰 증가는 없었는데, 이는 투여된 NaOH에 의해 높아진 배지 중의  $\text{Na}^+$  이온 농도에 의한 삼투압 효과 때문에 균체내로의 영양소 공급

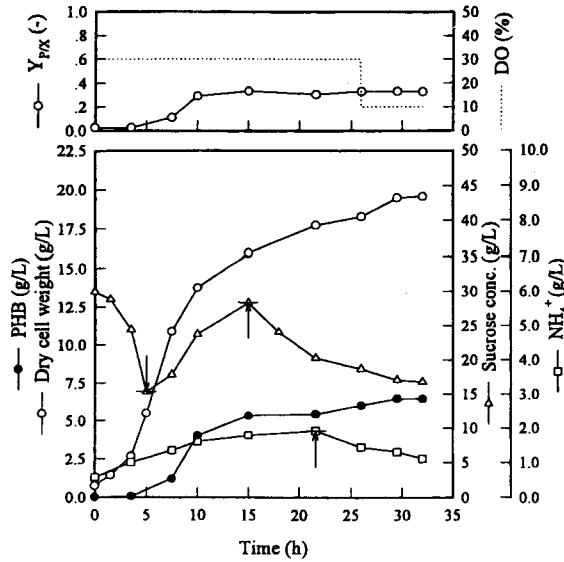


Fig. 9. Time courses of dry cell weight, PHB,  $Y_{PX}$  and substrates of two-stage fed-batch fermentation of *A. latus* in case of pH-control by  $NH_4OH$ . (↓ : start of substrate feeding, ↑ : end of substrate feeding)

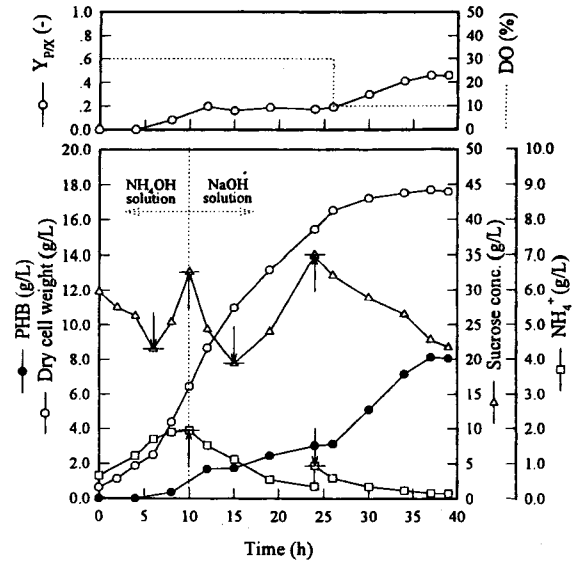


Fig. 10. Time courses of dry cell weight, PHB,  $Y_{PX}$  and substrates of two-stage fed-batch fermentation of *A. latus* in case of pH-control by NaOH and  $NH_4OH$ . (↓ : start of substrate feeding, ↑ : end of substrate feeding)

이 원활하지 못했기 때문인 것으로 사료된다. 최종 배양액의 부피는 공급된 기질과 pH 조절을 위해 투여된 NaOH 용액으로 인하여 1.4 L로 증가하였으며 균체량은 9.08 g/L,  $Y_{PX}$ 는 0.50이었다.

3-3-2.  $NH_4OH$  용액을 이용한 pH 조절

Fig. 9는 배양 중의 pH 조절에 28%의  $NH_4OH$  용액을 사용한 경우이다.  $NH_4OH$  용액을 pH 조절에 사용할 경우에는 pH가 낮아지는 것을 방지할 수 있다는 점 이외에 미생물이 이를 질소원으로 소비하게 할 수 있다는 장점이 있으나 PHB 축적을 위해 질소원을 제한하는 일반적인 2단 유가식 배양[17, 18, 20, 21]에서는  $NH_4OH$  용액을 사용할 수가 없다. 반면  $O_2$ 를 제한하는 2단 배양의 경우에는  $NH_4OH$  용액을 질소원 공급과 pH 조절에 사용 가능하기 때문에 균증식기에도 PHB를 축적하는 *A. latus*의 특성을 고려하여 이를 실험에 사용하였다. 그림에서 보여지는 바와 같이  $NH_4OH$  용액이 pH 조절을 위해 초기부터 투여된 결과 질소원을 소비하는 균증식기에도  $NH_4^+$  농도는 계속 증가하였다. 이 경우 첨가물의 소비 이후 지연시간이 없이 배양초기부터 sucrose가 소비되어 균체량이 지속적으로 증가하였으며, NaOH 용액을 사용한 경우에 비해 배양시간은 10시간 정도가 단축되었고, 최종 균체량이 2배 이상 증가하였다. 균증식이 끝난 22시간 이후에는 질소원의 공급을 중단하였고, 26시간 이후에는 DO를 10%로 낮추었으나 이 경우  $O_2$  제한에 따른 PHB 축적률의 향상은 적었다. 이 실험의 경우 균체량과 PHB량은 배양 10-15시간까지는 급격히 증가하다가 일정해지기 시작하는데, 이는 *A. eutrophus*의 경우와 마찬가지로  $NH_4OH$  용액의 공급으로 인한 배지 중의 과다한  $NH_4^+$ 의 농도에 의하여 기질 저해가 생겨 비증식속도 및 PHB 축적속도가 감소하였기 때문으로 사료된다[20]. 최종배양액의 부피는 1.35 L, 균체량 19.5 g/L 및  $Y_{PX}$  0.33이었다.

3-3-3. NaOH 및  $NH_4OH$  용액을 이용한 pH 조절

Fig. 10은 배양 중의 pH 조절에 28%의  $NH_4OH$  용액과 20% NaOH 용액을 사용한 경우이다. 배양초기에는 지연시간을 감소시키기 위하여  $NH_4OH$  용액을 질소원으로 투여하면서 pH 조절을 하다가  $NH_4^+$  농도가 2.0 g/L까지 상승한 10시간 이후부터는 과다해지는 질소원 농도에 의한 기질저해를 방지하기 위하여 pH 조절용액을 NaOH 용액으로 바꾸어서 실험을 행하였다. 이후의 질소원으로는  $(NH_4)_2$

$SO_4$ 를 24시간 후 1.0 g 가하였으며, 균증식기 이후인 26시간부터 DO를 10%로 낮추었다. 실험결과 DO는 높으나 질소원 농도가 낮은 18-24시간일 경우에는 PHB 증가가 적으나 DO를 낮추고 질소원 농도도 낮은 26시간 이후에는 급격히 그 양이 증가하는 모습을 볼 수가 있었다. 따라서  $O_2$ 와 질소원의 결핍이 PHB 축적을 촉진시킴을 알 수 있었다. 최종배양액의 부피는 1.35 L, 균체량은 17.6 g/L 및  $Y_{PX}$  0.46이었다. 따라서 pH 및 질소원의 공급 측면에서  $NH_4OH$  용액을 균증식기의 초기에 사용하고 NaOH 용액을 증식기 중반 이후에 사용하여 질소원을 0.5 g/L 이하로 유지시키면서  $O_2$ 를 제한하는 방법이 PHB를 효과적으로 축적시킬 수 있음을 알 수 있었다. 반면 Lafferty 등[14]은 같은 균주를 사용하여 2단 유가식 배양에서 배양 39시간 후에 균체량 47.6 g/L,  $Y_{PX}$  0.69의 결과를 얻었는데, 이는 염

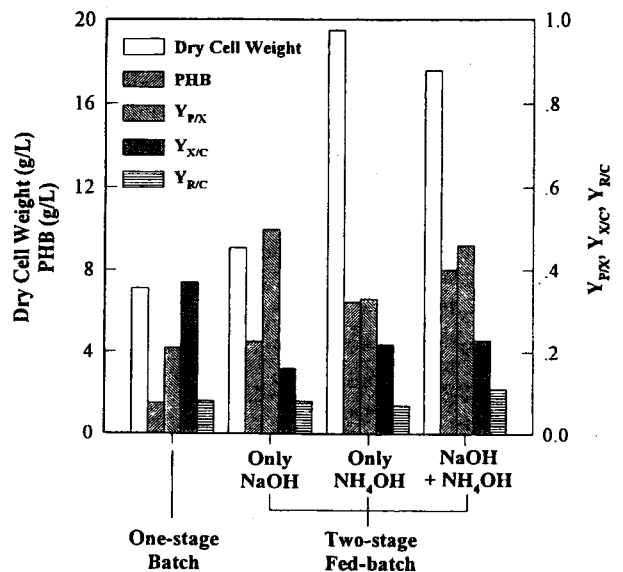


Fig. 11. Comparisons of dry cell weight and PHB yield on sucrose according to fermentation methods.

격한 기질 및 제한요소 조절의 결과로서, 온라인 센서와 연결된 컴퓨터를 이용한 제어가 배양에 있어 매우 중요한 요소임을 의미한다고 하겠다.

Yeast extract와 polypeptone을 각각 0.5 g/L 및 1.0 g/L로 첨가하였을 경우의 회분배양 및 유기식 배양의 결과를 비교하여 Fig. 11에 나타내었다.

#### 4. 결 론

*A. latus*의 최적 증식조건 및 PHB 생합성을 위한 효과적인 배양방법에 관한 연구결과 다음과 같은 결론들을 얻을 수 있었다.

(1) 균증식에 있어 탄소원 및 질소원은 각각 sucrose 및  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용한 경우가 가장 효율적이었다.

(2) 최대의 비증식속도를 보이는 C/N비는 탄소원 및 질소원 농도에 비례하여 증가하였으며 sucrose 농도가 30 g/L일 경우 C/N비 30에서 최대의 비증식속도를 보였다. 또한 비증식속도는 기질농도가 최적값보다 작을 때는 급격하게 감소하고, 클 때는 완전히 감소하였다.

(3) Yeast extract 0.5 g/L와 polypeptone 1.0 g/L를 배지 중에 첨가한 결과 지연시간이 감소되고 2배 이상의 비증식속도 향상을 보였다. 또 *A. eutrophus*와 달리 *A. latus*는 균증식기에도 PHB를 합성하였다.

(4) 초기에는  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액을, 균증식기 중반부터는  $\text{NaOH}$  용액을 이용하여 2단 유기식 배양을 행한 결과  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액과  $\text{NaOH}$  용액을 각각 이용하여 pH를 조절한 경우에 비하여 지연기(lag phase)가 크게 감소했고, 균체량 및 PHB 축적량이 증가하였으며, 이때 균체량 17.6 g/L, PHB 8.04 g/L 및 균체량에 대한 PHB 축적률 46%의 결과를 얻었다.

#### 사용기호

$Y_{PIC}$  : PHB yield based on carbon source [g PHB/g carbon source]

$Y_{PIX}$  : PHB yield based on biomass [g polymer/g biomass]

$Y_{RIC}$  : residual biomass yield based on carbon source [g residual biomass/g carbon source]

$Y_{RIN}$  : residual biomass yield based on nitrogen source [g residual biomass/g nitrogen source]

$Y_{XIC}$  : biomass yield based on carbon source [g biomass/g carbon source]

$Y_{XIN}$  : biomass yield based on nitrogen source [g biomass/g nitrogen source]

#### 참고문헌

- Ahn, K. D.: *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **3**(3), 395(1992).
- McLellan, D. W. and Halling, P. J.: *J. Chromatogr.*, **445**, 251(1988).
- Riis, V. and Mai, W.: *J. Chromatogr.*, **445**, 285(1988).
- Saito, T., Suzuki, K., Yamamoto, J., Fukui, T., Miwa, K., Tomita, K., Nakashini, S., Odani, S., Suzuki, J. and Ishikawa, K.: *J. Bacteriol.*, **171**(1), 184(1989).
- Schubert, H. G., Steinbuechel, A. and Schlegel, H. G.: *J. Bacteriol.*, **170**(12), 5837(1988).
- Slater, S., Voige, W. H. and Dennis, D. E.: *J. Bacteriol.*, **170**(10), 4431(1988).
- Lafferty, R. M., Korsatko, B. and Korsatko, W.: in "Biotechnology", Rehm, H. J., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, **6B**(1988).
- Hrabak, O.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**(2-4), 251(1992).
- Malik, K. A. and Jung, C.: *Arch. Microbiol.*, **129**, 254(1981).
- Malik, K. A. and Schlegel, H. G.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **11**, 63(1981).
- Hiramitsu, M.: *Biotechnol. Lett.*, **15**(5), 461(1993).
- Hiramitsu, M. and Doi, Y.: *Polymer*, **34**(22), 4782(1993).
- Maekawa, B. and Koyama, N.: *Biotechnol. Lett.*, **15**(7), 691(1993).
- European Patent, 0149744.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunoika, M. and Soga, K.: *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **8**, 631(1987).
- Ramsay, N. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P. and Ramsay, J. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(7), 2093(1990).
- 이동건: 석사학위논문, 연세대학교, 서울(1992).
- 오준택: 박사학위논문, 연세대학교, 서울(1994).
- 조근도: 석사학위논문, 연세대학교, 서울(1995).
- 유 승: 석사학위논문, 연세대학교, 서울(1991).
- Yoo, S. and Kim, W.-S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1043(1994).
- Oh, J. T. and Kim, W.-S.: *J. Chem. Eng. Japan*, **29**(5), 893(1996).
- Plastic Sci.*, **Aug.**, 5(1990).