

*Methylobacterium* sp. GL-10의 유가식 배양에 의한 Methanol로  
부터 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate의 생산

이 호 재 · 이 용 현  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from Methanol  
by Fed-batch Cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10

Ho-Jae Lee and Yong-Hyun Lee

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

The production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) from methanol by batch and fed-batch cultivations of *Methylobacterium* sp. GL-10 was studied. PHB accumulation was stimulated by the nutrients deficiency including,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , and  $\text{K}^+$ . The nitrogen deficiency was the most critical factor for PHB accumulation. In batch cultivation, the maximum cell concentration and PHB content were 1.86g/l and 0.62g/l, respectively, with 1.0%(v/v) of methanol and 0.5g/l of ammonium sulfate. The mass doubling time of *Methylobacterium* sp. GL-10 was in the range of 4-5 hrs. The cell growth and PHB accumulation were severely inhibited at the methanol concentration over than 2% (v/v). To overcome methanol inhibition, constant feeding and intermittent feeding fed-batch cultivations were adopted, using C/N molar ratio as a control factor. In constant feeding fed-batch process, cell concentration was increased upto 2.67g/l, and PHB yield was enhanced from 0.33 of batch culture to 0.53. The relatively low cell concentration was caused by methanol accumulated in culture broth at late growth phase. To prevent methanol accumulation and to maximize PHB production, DO-stat intermittent fed-batch cultivation was attempted. The cell and PHB concentration was reached upto 4.55g/l and 1.80g/l, respectively. It was possible to maintain methanol concentration low and also to feed nutrient of desired C/N molar ratio.

서 론

PHB는 D(-)3-hydroxybutyric acid가 직선상으로 연결된 단일중합체의 천연 polyester이며, 각종 prokaryotes의 세포내에 에너지 저장물질로 축적된다(1). 일반적으로 PHB는 불균형한 생육조건, 산소, 질소, 황, 인 또는 칼륨

등의 결핍상태에서 생성된다(2-4). PHB는 생분해성 플라스틱 제조원료, 서방성을 이용한 농약의 코팅제나 약품전달수단, 또한 우수한 생체 적합성을 이용한 의료용 등 많은 분야에 응용될 수 있어, 대량생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(5, 6).

메탄올은 양적으로 풍부하며, 값이 싸고, 수용성이며

또한 제한된 일부 미생물만이 이용하므로 배양중 오염을 최소로 줄일 수 있는 등 발효기질로서 우수한 장점을 지니고 있다. 메탄올 자화성 세균인 methylophilic bacteria 는 single cell protein 생산을 목적으로 주로 연구 되어 왔으나(7), 최근에는 PHB나 polysaccharide와 같은 biopolymer의 생산 균주로서 주목받고 있다(8, 9).

PHB의 생산을 위한 배양방법으로는 2단계 배양법(two-stage culture)과 유가식 배양법(fed-batch culture)이 주로 활용되고 있다(10). 2단계 배양법은 먼저 각종 배지성분 및 배양조건을 균체 생육에 맞도록 최적화하여 균체를 고농도로 증식시킨 후, 다음 단계에서 PHB의 축적을 유도하는 특정기질이 제한된 조건에서 배양시켜 균체내에 PHB를 유도 축적시키는 방법이다(11, 12). 유가식 배양법은 균체 증식에 맞도록 영양소를 계속적으로 공급하지만 배양액을 빼내지 않는 배양방법으로, 영양소원의 첨가 방식(feeding mode)에 따라 여러 종류로 나눌 수 있다. 즉 기질의 첨가 속도를 일정하게 계속 유지하는 constant feeding fed-batch cultivation, 용존산소농도(DO)와 같은 미생물 증식 및 대사 상태를 나타내는 지표를 참고로 기질을 간헐적으로 넣어주는 intermittent feeding fed-batch cultivation, 그리고 기질 첨가속도를 변화시켜 가면서 비증식속도를 일정하게 유지하는 exponential feeding fed-batch cultivation 등이 있다(13-16).

전보에서는 PHB의 축적률이 우수한 분홍색 동성 메탄올 자화성 세균을 분리·선별하여 *Methylobacterium*속으로 동정하였고, 기초단계의 배양 실험을 수행한 바 있으며, 생성된 PHB의 물성과 구조를 확인 한 바 있다(17, 18).

본 연구에서는 메탄올 자화성 *Methylobacterium* sp. GL-10의 PHB의 축적에 영향을 미치는 요인들을 검토함으로써 PHB 축적을 위한 배양공학적 기초 자료를 확보하였다. 또한 탄소원인 메탄올에 의한 균체증식 저해를 방지하고 균체를 고농도로 배양하기 위하여 constant feeding fed-batch cultivation과 DO-stat intermittent feeding fed-batch cultivation법을 적용하였고, 공급되는 영양소의 C/N molar ratio를 조절함으로써 PHB의 생산에 적합한 배양법을 확립코저 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

사용균주는 본 연구실에서 분리한 *Methylobacterium* sp. GL-10이며(17), 균체생육용 기본 배지조성은 methanol 1.0%(v/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2$

$\text{H}_2\text{O}$  1.4 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.9 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l, 그리고 trace mineral stock solution 1.0ml/l ( $\text{CaCl}_2$  1.5 g :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1mg :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2mg :  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2mg :  $\text{ZnSO}_4$  14mg :  $\text{MoO}_3$  2mg :  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  17mg : KCl 4 g per 100ml) 이었다.  $\text{MgSO}_4$ 와 trace mineral은 살균시 일어나는 phosphate와의 침전을 방지하기 위하여 각각 분리 살균하여 첨가하였다.

### 2단계 배양(Two-stage cultivation)

PHB의 축적을 유도하는 배지성분 및 생육조건을 규명코저 1단계에서 증식시켜 원심분리한 균체를 2단계에서 실험코저하는 영양소가 결핍된 배지에 균일한 균체농도로 집중하여 PHB의 축적량을 조사하였다.

### 회분식 배양(Batch cultivation)

회분식 배양은 2.5와 5.0 l 용량의 발효조(Korea Fermentor Co. model SY-260)를 사용하였고, 접종량은 5.0%(v/v), 통기속도는 1.0 vvm, 교반속도는 300-500 rpm, 그리고 pH는 6.7-6.9로 유지하였다. 회분식 배양과 유가식 배양을 위한 발효조의 장치를 간략히 모식도로 나타내면 Fig. 1과 같다.

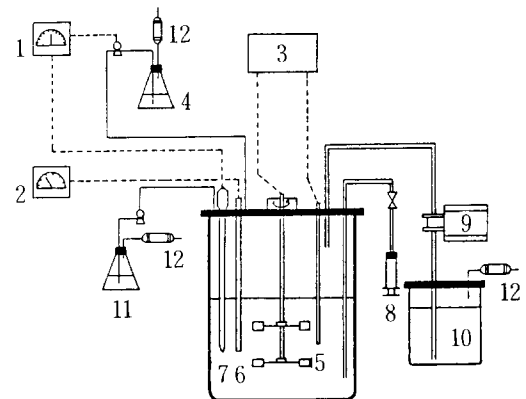


Fig. 1. Schematic diagram of system for batch or fed-batch cultivation

1. pH-controller
2. DO-indicator
3. RPM & Temp. controller
4. 1N NaOH / KOH (1:1)
5. Thermister.
6. DO-probe
7. pH-probe
8. Sampling port
9. Peristaltic controller
10. Nutrient reservoir
11. Antifoamer
12. Air filter

### Constant feeding fed-batch cultivation

Constant feeding fed-batch 배양은 5.0 l의 발효조를 이용하였으며, 먼저 초기부피 2.0 l에서 회분배양하다가 질소원과 메탄올이 고갈되었을 때 정량 peristaltic pump (Masterflex model No. 7523-10)로 각종 배지용액을 일정속도(1ml/min)로 공급하여 최종 배양액이 3.5 l가 될 때까지 배양하였다. 공급 배지 중의 메탄올 농도는 회분식 배양에서의 메탄올 소비속도를 고려하여 3% (v/v)로 고정하였고, 질소원(ammonium sulfate)은 첨가하지 않거나, 농도를 0.5, 1.0, 및 2.0 g/l로 달리하였다.

### DO-stat intermittent feeding fed-batch cultivation

DO-stat intermittent feeding fed-batch 배양은 위에서와 같이 초기부피 2.0 l에서 회분배양하다가 배양액내의 메탄올이 고갈되면서 DO가 급격히 상승할 때마다 메탄올을 초기 배양액 부피의 0.5%(v/v)에 해당하는 10ml씩 간헐적으로 첨가하였고, 질소원은 첨가하지 않거나 ammonium sulfate 농도를 0.13, 0.25, 그리고 0.5 g/l로 달리하면서 배양하였다.

### 메탄올 농도의 측정

메탄올의 농도는 gas chromatography(PYE UNICAM 304, Philips)로 측정하였으며, 이 때 column은 PEG 20M으로, carrier gas는 N<sub>2</sub>, combustion gas는 H<sub>2</sub>로 하였고 injector의 온도는 150°C, oven의 온도는 125°C로 하여 flame ionization detector로 측정하였다.

### 암모늄 이온 농도의 측정

Ammonium ion의 농도는 ammonia gas-sensing electrode (Phoenix Ammonia Electrode, Cat. No. NH31501)를 pH/mV meter에 연결하여 측정하였다. 먼저 0.1M NH<sub>4</sub>Cl 표준용액을 10<sup>-2</sup>에서 10<sup>-5</sup>까지 희석한 후 10M NaOH를 0.5ml을 첨가하고 ammonia gas로 전환시켜 mV를 측정하여 표준곡선을 얻었다. 배양액 중의 ammonium ion도 같은 방법으로 측정하였다.

### 균체농도의 측정

균체를 dry oven에서 105°C로 24시간동안 건조시켜 균체건조중량(DCW)을 얻어 결정하였다. 균체농도는 경우에 따라 균체 현탁액의 탁도를 측정하여 다음 상관관계로부터 간접적으로 결정하였다.

$$DCW(g/l) = 0.3941 \times A_{570nm} + 0.0125$$

### PHB의 추출 및 정량

축적된 PHB는 먼저 균체를 5% sodium hypochlorite solution으로 lysis 시킨 뒤 15,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 증류수, acetone, 그리고 ethanol 순으로 각각 현탁시켜 원심분리한 후, hot chloroform으로 수차례 추출하였다. 추출된 PHB의 함량은 황산으로 가수분해하여 crotonic acid로 변화시킨 후 210nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다(19, 20). 표준 물질은 PHB powder (P-8150, Sigma)로서, PHB의 농도와 흡광도사이에는 다음과 같은 상관관계가 있었다.

$$PHB \text{ amount } (\mu g) = 9.1477 \times A_{210} - 0.1383$$

또는 chloroform에 용해된 PHB를 5-10배의 cold n-hexane 으로 침전시켜 glass filter로 여과한 후 건조하여 중량을 직접 측정하여 결정하였다(21).

## 결과 및 고찰

### *Methylobacterium* sp. GL-10균주의 균체생육 및 PHB 합성 특성

Fig. 2는 *Methylobacterium* sp. GL-10 균주를 탄소원인 메탄올 농도가 1.0%(v/v, 7.9 g/l)이고, 질소원인 ammonium sulfate의 농도가 1.0 g/l인 조건에서 회분배양하면서 균체농도, 세포내에 축적된 PHB, 배양액내의 잔존메탄올, ammonium ion의 농도, 그리고 DO의 변화를 경시적으로 나타낸 것이다.

약 12시간 배양후 대수증식기가 시작되었으며, 이때부터 배양액 중의 DO도 급속히 감소하였다. 메탄올은 32시간 경과 후 거의 소비되었고, ammonium sulfate의

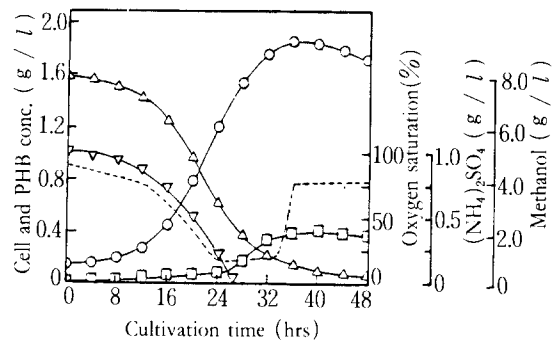


Fig. 2. Time course of batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 at methanol concentration of 1.0%(v/v) and initial (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration of 1.0 g/l (○, cell; □, PHB; ▽, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; △, Methanol; ---, DO).

소비경향도 메탄올과 유사하였으나 다소 일찍 고갈되었다. 균체 생육은 36시간 이후에 정지되었는데, 최종 균체 농도는 1.86 g / l 이었고, 첨가된 메탄올에 대한 균체 생성수율( $Y_{x,s}$ )은 0.24였다.

PHB 수율( $Y_{p,x}$ ), 즉 균체량에 대한 축적된 PHB량은 배양초기에는 0.23-0.25였으나, 대수증식기에서 0.08로 감소되었다가 배양후기 질소원인 ammonium sulfate가 0.1 g / l 이하로 소비되었을 때 다시 지속적으로 증가하여 배양말기 0.22가 되었고, 이때의 PHB 농도는 0.41 g / l 였다. PHB 수율이 배양 초기에 높은 것은 집중된 균체내에 축적되어 있는 PHB에 의한 것이며, 대수 증식기에는 PHB의 축적이 미미하였고, 질소원이 고갈되면서 다시 PHB의 축적이 촉진됨을 알 수 있었다.

또한 Fig. 2에서와 같이 DO는 발효조내의 메탄올이 거의 소비되어 생육제한 요인으로 작용할 때 급속히 증가되었으며, 균체의 기질 이용성과 균체생육 상태를 나타내는 중요한 지표로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

**균체생육과 PHB 축적에 미치는 각종 영양소원 결핍의 영향**

PHB축적에 영향을 주는 중요 조절인자를 규명하기 위하여 2단계 배양법으로, 먼저 균체생육배지에서 균체를 증식시킨 후, 2단계에서  $NH_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $PO_4^{2-}$  등 각종 영양소가 결핍된 배지에서 48시간 배양한 결과는 Table 1과 같다.

균체생육은 거의 모든 영양소의 결핍에 의해 저해를 받는 반면, PHB의 축적은  $K^+$ 와  $SO_4^{2-}$ 이 결핍되었을 때

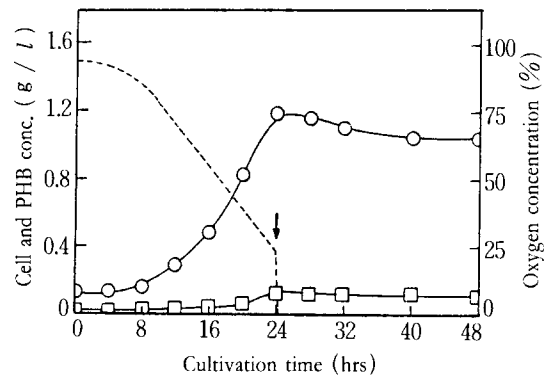
**Table 1. Effect of nutrients deficiency on cell growth and PHB production of *Methylobacterium* sp. GL-10**

Deficient Nutrient	Cell Conc.* (g / l)	PHB (g / l)	PHB Yield ( $Y_{p,x}$ )
$NH_4^+$	2.13	0.65	0.31
$SO_4^{2-}$	2.02	0.46	0.23
$Mg^{2+}$	2.51	0.46	0.18
$K^+$	2.19	0.52	0.24
$PO_4^{2-}$	2.15	0.35	0.16
$Na^+$	2.28	0.41	0.18
$Fe^{2+}$	2.47	0.44	0.18
Control	2.62	0.41	0.16

\*Initial concentration of resuspended cells in PHB accumulation stage was 1.42 g / l, and the cultivation was carried out at 250ml flask (100ml of working volume) for 48 hours.

축적이 유도되었지만,  $NH_4^+$ 이 결핍되었을 때 가장 큰 유도작용을 받아 균체건조중량에 대한 PHB의 축적률은 31%로 가장 높았다.

산소의 제한이 PHB의 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 균체 농도가 약 1.0 g / l 과 되었을 때 1.0 vvm 으로 공급하던 공기를 주입하지 않고 균체생육과 PHB의 축적량의 변화를 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. 공기공급을 중단한 경우 3분만에 DO가 완전히 고갈되었고, 균체의 생육은 더 이상 진척되지 않았으며, 또한 PHB의 축적도 더 이상 진척되지 않아 산소의 제한은 PHB의 축적을 유도하는 인자가 아님을 알 수 있었다.



**Fig. 3. Effect of imposition of oxygen limitation on batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 (○, cell; □, PHB; ---, DO).**

**각종 영양소원의 농도에 따른 PHB 축적효과  
질소원의 농도**

최적 질소원인  $(NH_4)_2SO_4$ 의 적정 농도를 결정하기 위하여 탄소원인 메탄올의 농도는 1.0%(v/v)로 고정하고, ammonium sulfate의 농도를 달리하여 희분배양하면서 균체농도와 PHB축적량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 또한 Table 2는 질소원의 농도에 따른 최종 균체건조 중량 및 PHB축적량 그리고 PHB 수율을 나타내었다. PHB의 최대축적은 ammonium sulfate의 농도가 0.5 g / l 일 때 얻어진 반면, 수율은 농도가 0.25 g / l 일 때 약 50%로서 가장 높았으나 균체농도는 낮았다. 따라서 PHB생산에 적합한 ammonium sulfate의 초기농도는 0.5 g / l 로 판단된다.

**기타 영양소원의 농도**

Phosphate, potassium, 그리고 sodium ion 농도의 변화가

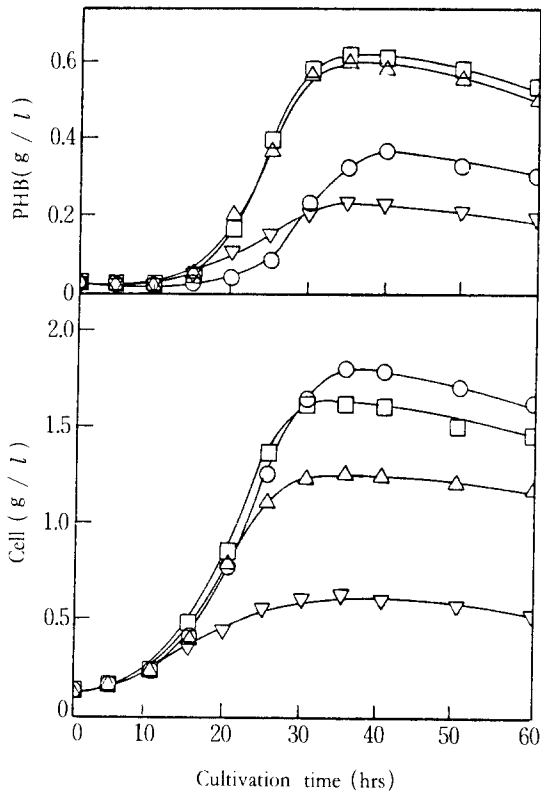


Fig. 4. Time course of batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 with different feeding concentrations of initial ammonium sulfate. The initial concentrations of ammonium sulfate were 1.0( $\circ$ ), 0.5( $\square$ ), 0.25( $\triangle$ ) and 0.13( $\nabla$ ) g / l.

균체의 생육과 PHB의 축적에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다.

균체 생육은 phosphate의 농도에 비례하여 증가하였다. 반면 PHB의 축적량은 phosphate의 농도가 20mM일 때 0.79 g / l로 가장 높았다. PHB 수율은 15mM일 때 0.50으로 가장 우수하였으나, 균체량이 1.31 g / l로 매우 낮아, PHB생산에 적합한 최적 phosphate 농도는 20mM로 사료된다.

Potassium ion의 영향은 기본 배지인 sodium potassium phosphate buffer를 sodium phosphate buffer로 대체한 후, KCl로 potassium ion의 농도를 조절하여 배양하였다. Potassium ion은 균체의 생육 및 PHB의 축적에 큰 영향을 주지 않았고, 0.2 g / l일 때 균체량의 51%의 PHB를 축적하였다. 또한 sodium ion도 균체생육이나 PHB의 축적에 큰 영향을 주지 않았다.

#### 메탄올 농도

초기 메탄올 농도를 0.1-5.0%(v/v)로 달리하면서 메탄올 농도에 따른 균체의 생성량과 수율을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 균체량은 메탄올의 농도가 1.0%(v/v)일 때 가장 높은 1.86 g / l를 얻었으며, 균체생성수율은 0.24였다. 반면 농도가 0.5%(v/v)일 때는 균체량은 1.45 g / l로 1.0%(v/v)의 경우보다는 적었으나, 균체생성수율은 다소 증가하여 0.37이었다. 또한 메탄올 농도가 2.0%(v/v) 이상 일 때는 균체의 생육이 상당히 저해 받았다. 대체적으로 메탄올 농도가 0.5%(v/v) 이하에서는 0.3 이상의 균체생성수율이 얻어졌고 균체증식속도가 빨라, 이 범위가 배양에 적합한 농도로 판단된다.

#### Constant feeding fed-batch cultivation

Table 2. Effect of initial nitrogen concentration on the cell growth and PHB production of *Methylobacterium* sp. GL-10

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g / l)	Cell Conc. (g / l)	PHB (g / l)	Cell Yield* (Y <sub>x,s</sub> )	PHB Yield (Y <sub>p,x</sub> )
0.13	0.64	0.24	0.08	0.38
0.25	1.25	0.61	0.16	0.49
0.50	1.66	0.62	0.21	0.37
0.75	1.75	0.47	0.22	0.27
1.00	1.82	0.37	0.23	0.20
1.50	1.62	0.28	0.21	0.17
2.00	1.52	0.23	0.19	0.15

\* Cell yield based on added 1.0%(v/v) of methanol.

Table 3. Effect of concentrations of phosphate, potassium and sodium ions on cell growth and PHB production of *Methylobacterium* sp. GL-10

Nutrients	Conc.	Cell Mass (g / l)	PHB (g / l)	PHB Yield ( $Y_{p,x}$ )
$H_3PO_4$ (mM)	5	0.37	0.09	0.24
	10	0.82	0.31	0.38
	15	1.31	0.66	0.50
	20	1.76	0.79	0.45
	40	1.82	0.67	0.37
KCl (g / l)	0.0	1.70	0.78	0.46
	0.2	1.72	0.88	0.51
	0.4	1.73	0.86	0.50
	0.6	1.78	0.86	0.48
NaCl (g / l)	0.0	1.67	0.62	0.37
	0.5	1.69	0.68	0.40
	1.0	1.75	0.67	0.38
	2.0	1.80	0.74	0.41

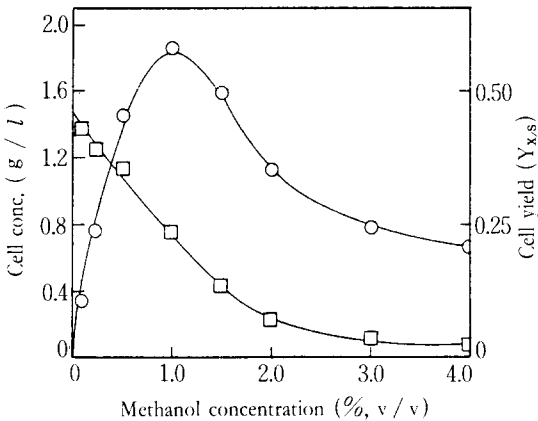


Fig. 5. Effect of methanol concentration on the cell growth and yield ( $\circ$ , cell;  $\square$ , cell yield).

PHB를 대량생산하기 위해서는 먼저 균체의 고농도 배양이 필요하다, 회분식 배양으로는 기질인 메탄올을 어느 농도 이상으로 첨가할 경우 기질저해를 일으키기 때문에 균체의 고농도 배양을 할 수 없어, 기질을 연속적으로 소량씩 첨가하는 유가식 배양법을 시도하였다. 특히 균체내의 PHB 축적에는 질소원의 결핍이 가장 중요하므로 먼저 nitrogen limited constant feeding fed-batch 배양을 시도하였다.

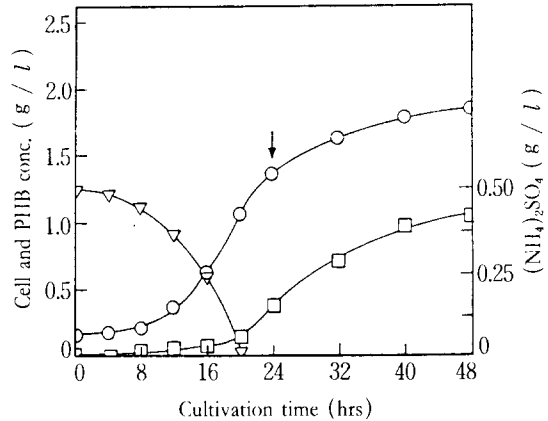


Fig. 6. Time course of constant feeding fed-batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10. The fermentation was carried out in a 5 l jar fermentor with initial volume of 2.0 l and then continuous feeding of a fixed rate of 1.0ml/min ( $\circ$ , cell;  $\square$ , PHB;  $\nabla$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ).

Fig. 6는 5 l의 발효조에서 초기 메탄올과 ammonium sulfate의 농도를 각각 0.5%(v/v)과 0.5 g/l로 하여 초기 부피 2.0 l로 배양하다가, 메탄올과 ammonium sulfate가 고갈된 24시간 후 부터 질소원이 첨가되지

많은 메탄올의 농도가 3%(v/v)인 배지용액을 1ml/min의 속도로 계속해서 공급하면서 균체의 생육과 PHB의 축적상태를 나타낸 것이다. 이 경우 회분식 배양에 비해 균체량과 PHB량이 어느 정도는 증가하였으나 질소원의 공급이 완전히 제한되어 있어 시간이 경과함에 따라 배양액내의 비 이용 메탄올이 축적되어 균체 생육이 저해되었다. 최종 균체량은 1.86 g/l였고, PHB량은 0.98 g/l로 균체 건조중량의 약 53% 축적되어 회분배양에 비해 증가하였으나, 첨가된 메탄올에 대한 균체생성수율( $Y_{x,s}$ )은 낮았다.

위와같은 배양조건에서 단지 공급하는 배지용액의 질소원 농도를 달리하여 균체량과 PHB축적량을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 질소원을 공급하지 않는 유기식 배양에 비해 균체량은 ammonium sulfate의 농도에 비례하

여 최대 2.67 g/l 까지 증가하였고, 이때 PHB는 0.94 g/l로써 균체건조중량의 35%까지 축적하였다. 공급되는 배지용액의 ammonium sulfate의 농도가 1.0 g/l일 때 PHB량은 1.20 g/l로 축적량이 가장 우수하였다. 그러나 PHB 수율은 0.5 g/l로 공급할 때 다소 높았다.

PHB를 대량생산하기 위해서는 균체를 먼저 고농도로 배양하는 것이 요망되므로 질소원을 완전히 결핍시키지 않고 생육에 필요한 최소한의 질소원을 공급하여야 함을 알 수 있다. Suzuki등(22, 23)도 PHB의 생산단계에서도 미량의 질소원을 계속적으로 공급하여 PHB의 축적에 필요한 세포의 anabolic activity를 유지함이 필요하다고 보고한 바 있다. 따라서 constant feeding fed-batch로 배양할 때 공급되는 배지의 C/N molar ratio를 50-100으로 조절하여 배양하는 것이 PHB의 생산에 적합함을 알 수 있었다.

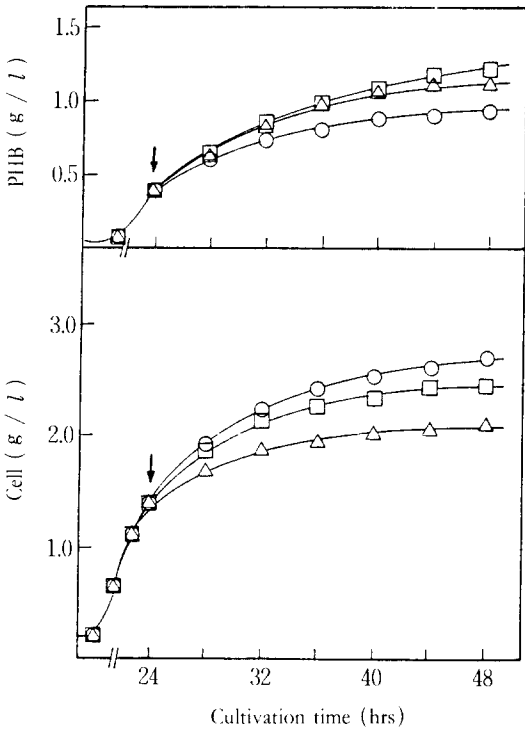


Fig. 7. Time course of constant feeding fed-batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 with different feeding concentrations of ammonium sulfate in feeding nutrient solution. The feeding concentrations of ammonium sulfate were 2.0 (○), 1.0(□), and 0.5(△) g/l.

### DO-stat intermittent feeding fed-batch cultivation

위에서와 같이 constant feeding fed-batch 배양의 경우는 배양액 중에 메탄올이 점차적으로 축적되어 균체의 고농도 배양이 어려웠다. 따라서 메탄올 이용성을 간접적으로 나타내는 축적이 용이한 용존산소농도(DO)를 지표로, 기질을 간헐적으로 공급하는 DO-stat intermittent feeding fed-batch 배양을 시도하였다.

먼저 용존산소농도를 지표로 하여 질소원은 공급하지 않고, 배양액 중에 메탄올의 농도가 0.5%(v/v) 되도록, 그리고 기타 영양소원은 초기배지농도의 반으로 조절하여 첨가 배양한 결과는 Fig. 8와 같다. 이때 최대 균체

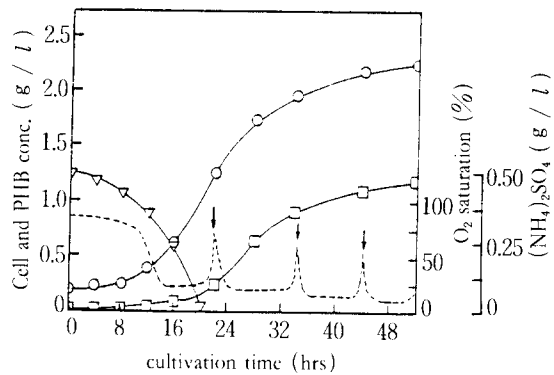


Fig. 8. Time course of DO-stat intermittent feeding fed-batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 (○, cell; □, PHB; ▽,  $(NH_4)_2SO_4$ ; ----, DO).

량은 2.25 g / l 였고, PHB는 균체량의 약 54%인 1.21 g / l 가 축적되었다. 그러나 배양 후기에는 질소원의 결핍으로 균체의 생육이 미비하였다.

균체생육과 더불어 PHB의 축적을 촉진시키기 위하여 공급배지 중의 ammonium sulfate 농도를 달리하면서 배양

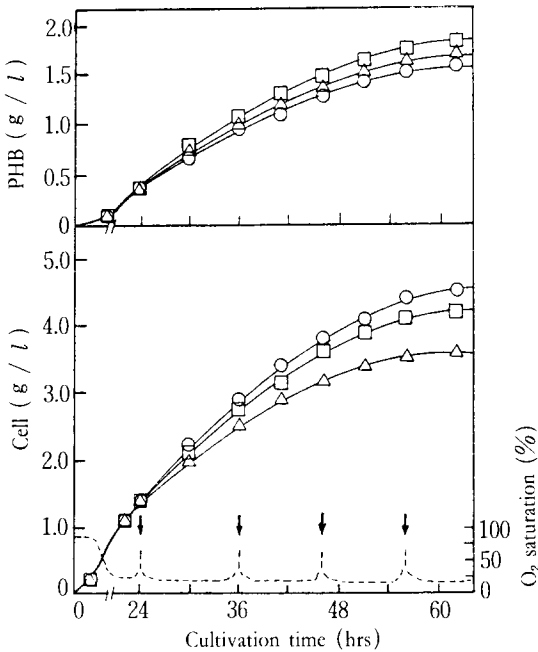


Fig. 9. Time course of DO-stat intermittent feeding fed-batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10 with different feeding concentrations of ammonium sulfate in nutrient solution. The feeding concentrations of ammonium sulfate were 0.5(○), 0.25(□), and 0.13(△) g / l.

한 결과는 Fig. 9과 같다. 첨가농도가 0.5 g / l 였을 때 최대 균체량인 4.55 g / l 을 얻을 수 있었고, PHB 축적량은 1.61 g / l 였다. 또한 ammonium sulfate 농도를 0.25 g / l 첨가하였을 때는 1.80 g / l 의 PHB가 축적되었다. 한편 균체건조중량에 대한 PHB 수율은 농도를 0.13 g / l 첨가했을 때 0.49로 가장 우수하였다. 이 경우 공급하는 배지의 적정 C / N molar ratio는 30-60의 범위로 유추된다. 위의 결과는 회분식이나 constant feeding fed-batch 배양과는 달리 배양중 메탄올이 소비되어 증식이 정지되었을 때 메탄올을 간헐적으로 첨가함으로써 균체의 증식과 PHB의 축적을 증가시킬 수 있음을 보여 주고 있다.

Table 4는 위에서 실험한 constant feeding fed-batch와 intermittent feeding fed-batch 배양에서 얻은 결과를 종합하고 있다. 즉 첨가한 탄소원과 질소원의 농도를 C / N molar ratio로 환산하여 기질 첨가방식에 따른 균체량, PHB 축적량, 그리고 PHB 수율을 비교하였다.

Constant feeding fed-batch 배양의 경우 최대 PHB 축적량은 C / N molar ratio가 48.9일 때 얻어진 반면, 최대 PHB수율은 97.9에서 얻어졌다. 또한 DO-stat intermittent feeding fed-batch의 경우는 최대 PHB 축적량은 32.6에서, 그리고 최대 PHB수율은 62.7에서 얻어졌다. 종합컨데, 전자의 경우 PHB생산을 위한 적정 C / N molar ratio는 50-100 범위내에 있으며, 후자의 경우는 30-60의 범위에 있음을 알 수 있다. 또한 메탄올과 같이 기질저해성이 강한 탄소원을 기질로 하여 배양할 경우 constant feeding fed-batch 배양보다는 intermittent feeding fed-batch 배양이 배양조건의 조절이 용이할 뿐만 아니라 균체량과 더불어 PHB의 축적량을 증가시킬 수 있는 배양방법임을 확인할 수 있었다.

## 요 약

Table 4. Comparison of performance of constant and intermittent feeding fed-batch cultivation of *Methylobacterium* sp. GL-10

Feeding Mode	C / N Molar Ratio	Cell Mass (g / l)	PHB (g / l)	PHB Yield ( $Y_{p,x}$ )
Constant	24.5	2.67	0.94	0.35
	48.9	2.47	1.20	0.49
	97.9	2.11	1.11	0.53
Intermittent	16.3	4.55	1.61	0.35
	32.6	4.24	1.80	0.42
	62.7	3.58	1.74	0.49



새로이 분리한 PHB 축적능이 우수한 분홍색 통성 메탄을 자화성 *Methylobacterium* sp. GL-10 균주의 PHB 축적을 위한 최적 배양조건을 확립하고 배양방법들을 비교 검토하였다. 상기 균주를 메탄을 1.0%(v/v)와 ammonium sulfate 농도 0.5 g/l에서 회분배양하였을 때 최대 균체농도는 1.86 g/l 그리고 PHB 축적량은 0.62 g/l였고, 이때 균체생성수율은 0.24, 균체량에 대한 PHB 수율은 0.4였다. PHB축적에 영향을 끼치는 중요 인자를 검토한 결과, K<sup>+</sup>나 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>의 결핍도 중요하였으나, 특히 질소원의 결핍이 가장 중요한 요인으로 작용하였다. 메탄을 농도가 2.0%(v/v)이상에서는 균체 생육이 상당히 저해되었다.

메탄올에 의한 기질 저해성을 극복하고 균체를 고농도로 배양함과 더불어 PHB를 최대한 축적시키기 위하여 fed-batch 배양을 시도하였다. Constant feeding fed-batch 배양 결과, 얻어진 최대 균체량은 2.67 g/l였고, 공급배지 중의 ammonium sulfate 농도를 1.0 g/l로 했을 때 1.20 g/l의 PHB가 축적되었다. 그러나 배양 후기에 배양액내의 메탄올이 축적되어 균체생육이 저해되었다. 이를 극복하기 위하여 배양액내의 용존산소농도(DO)를 지표로 기질을 간헐적으로 첨가하는 intermittent feeding fed-batch 방법으로 배양한 결과, 균체량은 4.5 g/l, 그리고 PHB는 1.80 g/l까지 증가시킬 수 있었다. Fed-batch 배양의 경우 최대 PHB 축적률을 얻을 수 있는 공급배지의 적정 C/N molar ratio는 60-90 범위로 판단되며, 이때 균체량에 대한 PHB 수율은 0.5였다.

### 참 고 문 헌

1. R. M. Lafferty, R. Korsatko and B. Korsatko (1988), *Biotechnology*, (H. J. Rehm and G. Reed, eds.), Vol. **6b**, p.137, Verlag Chemie, Weinheim.
2. E. A. Dawes (1986), *Microbial Energetics*, p. 158, Blackie, N. Y.
3. P. J. Senior, G. A. Beech, G. A. F. Ritchie and E. A. Dawes (1972), *Biochem. J.*, **128**, 1193.
4. I. S. Carter and E. A. Dawes (1979), *J. Gen. Microbiol.*, **110**, 393.
5. P. A. Holmes (1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
6. S. Vainionpaa, P. Rokkanen and P. Tormala (1989), *Prog. Polym. Sci.*, **14**, 679.
7. E. R. Howells (1982), *Chem. and Ind.*, **7**, 508.
8. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.
9. J. D. Linton, P. D. Watts, R. M. Austin, D. E. Haugh and H. G. D. Niekus (1986), *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 779.
10. 이용현 (1989), *유전공학*, 26호, 48.
11. P. P. King (1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 2.
12. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330.
13. T. Yamane and S. Shimizu(1984), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (A. Fiechter, ed.), Vol. **30**, p. 147, Springer-Verlag Berlin.
14. T. Yamane and S. Hirano (1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(4), 380.
15. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 416.
16. M. Andriantsoa, M. Laget, A. Cremieux and G. Dumenil (1984), *Biotechnol. Letters*, **6**(12), 783.
17. 송미연, 이호재, 이용현 (1990), *산업미생물학회지*, **18**(3), 273.
18. 이호재, 박진서, 이용현 (1991), *산업미생물학회지*, **19**(1), 94.
19. J. H. Law and R. A. Slepecky (1960), *J. Bacteriol.*, **82**, 33.
20. D. B. Karr, J. K. Water and D. W. Emerich (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1339.
21. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga (1987), *Macromolecules*, **20**, 2988.
22. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 366.
23. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370.

(Received; March 8, 1991, Accepted; April 30, 1991)