

Poly- β -hydroxybutyrate 생산을 위한 연속배양에서 포도당 및 암모늄 농도의 영향

이용우 · 유영제*
서울대학교 공과대학 화학공학과

Effects of Glucose and Ammonium Concentrations in Continuous Culture for Poly- β -hydroxybutyrate Production

Lee, Yong-Woo and Young Je Yoo*

Dept. of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract— Effects of dilution rate, inlet glucose and ammonium chloride concentrations on the performance of continuous culture of *Alcaligenes eutrophus* for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production were investigated. When inlet substrate concentrations were maintained constant (inlet glucose concentration=20 g/l, inlet ammonium chloride concentration=2 g/l), growth rate of residual biomass and PHB production rate showed its maximum at 0.1 h⁻¹ and 0.06 h⁻¹, respectively, and washout at 0.13 h⁻¹. PHB content decreased from 50% to 25% by increasing dilution rate, while specific PHB production rate increased continuously. Cell mass and PHB concentration gave its maximum values at inlet ammonium chloride concentration of 2 g/l and thereafter decreased, which showed the existence of substrate inhibition by ammonium. When inlet glucose concentration was 30 g/l, cell mass reached its maximum value, while PHB concentration increased continuously. The parameters of kinetic model were evaluated by the graphical and parameter estimation methods. The computer simulation results for the effects of dilution rate, inlet glucose and ammonium chloride concentrations fitted the experimental data very well.

지금까지 기존의 천연고분자를 대체할 수 있는 합성고분자를 개발하는 방향으로 고분자공업이 발전되어 왔다. 그러나 석유화학 물질로부터 만들어진 합성고분자플라스틱 및 합성섬유 등은 거의 생분해가 일어나지 않는 난분해성 물질로서 이의 폐기물은 심각한 공해문제를 유발시키고 있다. 그 중에서 합성플라스틱인 polyester 계통의 합성고분자 물질인 polypropylene과 유사한 성질을 가지면서 생분해도가 우수한 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)는 가장 주목받는 생분해성 플라스틱으로서 그 잠재적 응용 가능성이 매우 크다고 할 수 있다. PHB는 미생물의 특정 영양분이 고갈되었을 때 탄소원과 에너지원으로서 체내에 축적하는 물질이다(1).

PHB를 경제적인 방법으로 생산하기 위하여 유가식

배양이나 연속배양방법이 많이 연구되고 있다. PHB를 생산하는데 연속배양이 사용된 것은 PHB축적비를 증가시키는 제한인자를 밝히거나(2-5), 비성장속도와 비생성물생성속도와 관계, 그리고 탄소원/질소원의 비율이 생성물에 미치는 영향을 조사하는데 주로 사용되어 왔다(6). 연속배양은 회석비율에 의하여 성장속도를 조절하면서 대사산물을 연속적으로 생산할 수 있다는 장점으로 미생물 공정에 많이 이용되고 있는데, 1930~40년대에 젖산, 부탄올, 에탄올, 효모 그리고 아세톤을 생산하는데 연속배양을 사용하기 시작했고, 같은 시기에 공학적 측면에서 연속배양을 연구하기 시작했다(7). 1950년대에 이르러서는 항생제, toxin, 스테로이드, 그리고 백신을 생산하는 산업적인 분야에도 이용되기 시작하였다. 그러나 본격적으로 관심을 끌게 된 것은 Monod(8)와, Novick과 Szilard(9)가 연속배양에 관한 기본적 이론을 발표한 이후부터였다.

Key words: Biopolymer, poly-hydroxybutyrate, *Alcaligenes eutrophus*, continuous culture, modeling

*Corresponding author

Senior 등(2)은 *Azotobacter beijerinckii* 균주로 탄소원, 산소 그리고 질소를 각각 제한하면서 연속배양을 하여 PHB축적비에 미치는 영향을 조사하였다. 정상상태에서 질소를 제한하였을 때는 거의 PHB가 축적되지 않았지만 산소를 제한하였을 때는 포도당의 세포생성 수율이 증가하였고 건조세포무게의 50%까지 PHB가 축적되었다. 탄소원을 제한한 조건에서 PHB축적비는 3% 이하이었지만 산소를 제한하였을 때는 희석비율에 따라 PHB가 건조세포무게의 20~50%까지 축적되었다. 반면에 질소를 제한하였을 때는 PHB축적비가 1.5% 이하이었다. 질소를 제한한 상태에서 산소공급을 중단하였을 때는 PHB축적비와 포도당의 세포성장 수율이 급격히 증가하였다.

Jackson과 Dawes(3)는 *A. beijerinckii* 균주를 비정상 상태에서 연속배양하면서 질소나 산소제한의 효과를 조사하였다. 산소공급이 없는 산소제한 상태에서 산소를 공급하여 질소제한 상태가 되면 PHB축적비가 50%에서 10%로 감소하였지만 다시 산소공급을 중단하면 PHB축적비가 다시 50%로 증가하였다.

Ward 등(4)도 *A. beijerinckii* 균주로 정상상태에서 질소원과 산소제한의 효과를 조사하였다. 산소를 제한한 상태에서 암모늄을 제한하면 PHB축적비가 5~10%로 감소하였고, 용존산소 농도가 증가함에 따라 PHB축적비가 희석비율에 따라 20~40%로 증가하다가 무시할 정도의 값으로 급격히 감소하였다. 반면에 질소고정 균주는 산소농도가 증가함에 따라 PHB축적비가 계속 감소하였다.

Tal과 Okon(5)은 *Azospillilum brasillense* 균주로 연속배양하면서 산소와 질소가 PHB생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이들은 PHB생성을 최대로 할 수 있는 최적 산소분압이 존재하고 탄소원과 질소원의 비(C/N)가 증가할수록 PHB축적비가 증가한다고 보고하였다.

최근에 Ramsay 등(6)은 *Pseudomonas oleovorans*를 연속배양하여 긴 결사슬 PHA를 생산하면서 희석비율과 주입 탄소원농도, 그리고 C/N비의 영향을 조사하였다. 그러나 세포생장과 PHA 생합성에는 질소원도 중요한 영양분이므로 질소원농도의 영향도 고려해야 한다.

본 연구에서는 PHB생산을 위하여 *Alcaligenes eutrophus*를 연속배양하면서 희석비율, 주입 질소원과 탄소원 농도가 생체성장 및 PHB합성에 미치는 영향을 살펴보고, 매개변수를 추정하여 PHB를 생산하는 연속배양 공정에 대한 모사를 행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

PHB를 생합성하는 균주로서 포도당을 탄소원으로 이용하는 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599를 사용하였다. 배지의 조성은 탄소원으로 포도당, 질소원으로 염화암모늄(NH_4Cl)을 사용하였고 MgSO_4 0.1 g/l, KH_2PO_4 2.5 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4 g/l, NaHCO_3 1 g/l, 미량원소 100 $\mu\text{l/l}$ 로 하였다. 미량원소들은 Siegel과 Ollis(10)의 조성대로 사용하였다. 포도당은 Sigma, 그 외는 Duksan, Junsei, Nakarai 등의 시약을 사용하였다.

배양

연속배양은 1.5 l-연속배양기(New Brunswick Scientific Co., Bioflo model C-1)를 사용하였고 교반속도는 400 rpm, 통기속도는 1 vvm, 온도는 35°C, 그리고 pH는 6.8~7.0으로 유지하였다. 정상상태는 발효조 부피의 3배 정도 기질이 주입되었을 때, 2시간 간격으로 3회 시료를 채취하여 세포농도가 거의 일정하면 정상상태로 간주하였다.

분석

세포농도는 660 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의하여 환산하였다. 포도당농도는 DNA 방법(11)을, 암모늄농도는 Berthelot 반응을 이용한 방법(12)을 사용하였다. PHB농도는 Ward와 Dawes(13)가 제안한 disk assay법을 사용하여 측정하였다.

수치해석 및 모사

공정모델식의 계산은 비선형 연립방정식을 풀 수 있는 IMSL library의 NEQNF package를 이용하였다. 매개변수 값을 구하기 위하여 simplex method를 사용한 EUREKA software(Borland Co.)를 사용하였다.

결과 및 고찰

희석비율의 영향

정상상태에서 세포성장 및 PHB합성 그리고 생물 반응기내의 기질농도에 미치는 희석비율의 영향과, 주입 기질농도가 일정할 때 생체성장속도나 PHB생성속도를 최대로 할 수 있는 최적 희석비율을 알아보기 위하여 주입기질의 포도당농도가 20 g/l이고 암모늄농도가 2 g/l인 조건에서 정상상태에서의 희석비

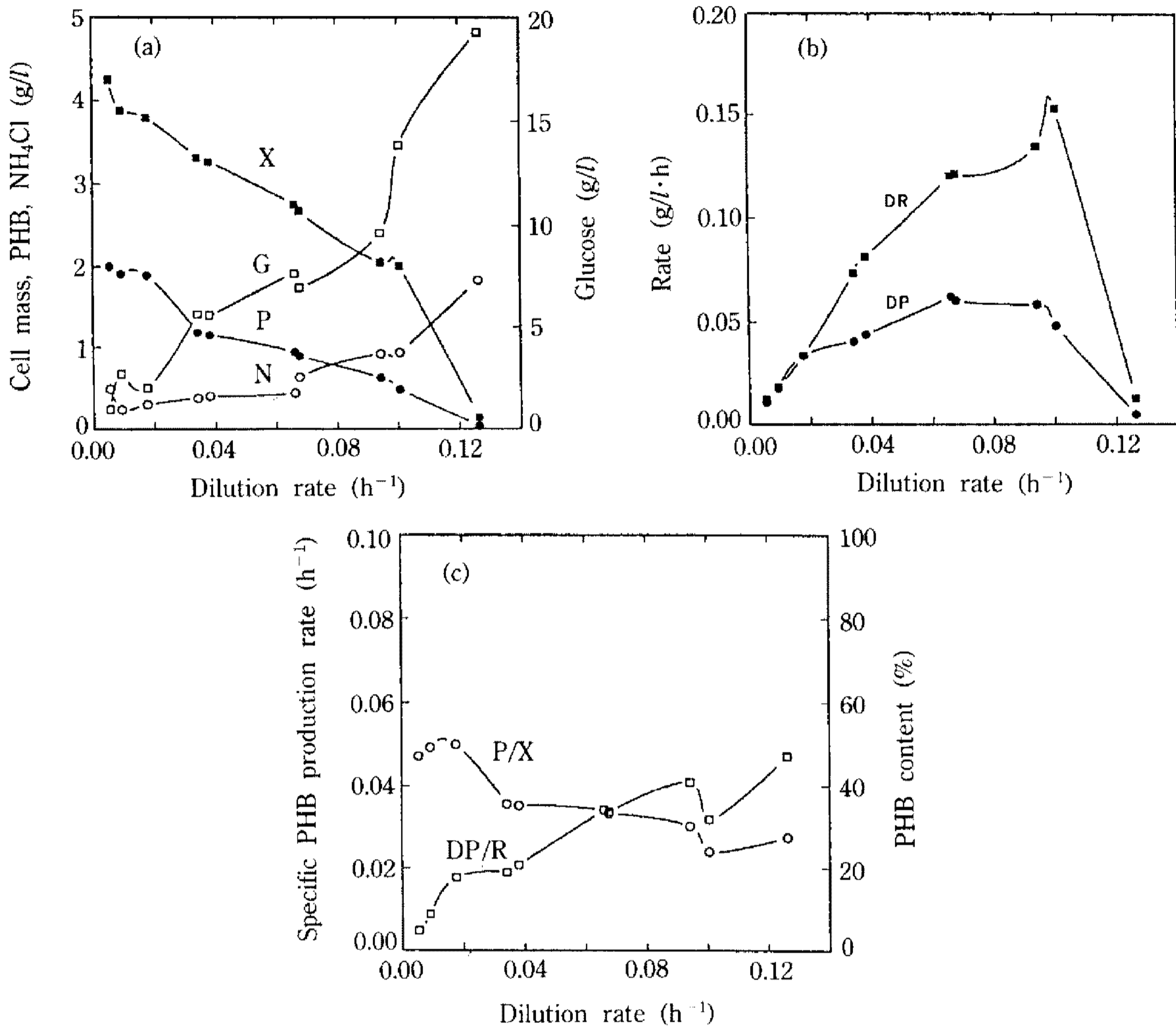


Fig. 1. Effects of dilution rate (a) on concentration of cell mass (■), PHB (●), glucose (□), and NH₄Cl (○), (b) on growth rate of residual biomass (■) and PHB production rate (●), (c) on PHB content (○) and specific PHB production rate (□) in continuous culture of *A. eutrophus*. Inlet glucose and ammonium chloride concentrations were 20 g/l and 2 g/l, respectively.

율에 따른 세포와 PHB농도 그리고 기질농도를 측정하였다. 여기에서 X는 세포농도, R은 생체농도(세포 무게-PHB무게), P는 PHB농도, G는 포도당농도, N은 암모늄농도, 그리고 D는 회석비율을 나타낸다. Fig. 1(a)에 실험결과를 나타내었는데 세포농도는 회석비율이 0.005~0.1 h⁻¹인 범위에서 회석비율이 증가함에 따라 감소하다가 0.1 h⁻¹ 이상이 되면 급격히 감소하여 회석비율이 0.13 h⁻¹에서 세포가 전부 배출되었다. PHB농도는 회석비율의 증가에 따라 일정하게 감소하였다. 포도당농도는 회석비율이 증가할수록 증가하다가 회석비율이 0.1 h⁻¹ 이상이 되면서 세포농도가 감소함에 따라 급격히 증가하였다. 암모늄농도는 회석비율이 0.01 h⁻¹ 될 때까지 감소하다가 증가하였다.

회석비율이 증가함에 따라 세포농도가 감소하다가

세포가 전부 배출되는 회석비율에 접근할수록 세포농도가 급격히 감소하고 기질농도는 그와 반대로 증가하는 것은 연속배양 공정에서 일반적인 현상이다 (14). 회석비율이 0.01 h⁻¹ 이하의 영역에서 회석비율이 증가할수록 포도당농도는 증가하지만 암모늄농도는 오히려 감소하는 이유는 회석비율이 극히 낮은 영역에서는 회석비율의 증가에 따른 암모늄 기질 공급의 증가가 생체합성 속도를 촉진시키기 때문으로 생각된다.

생체나 PHB생산을 최대로 하는 최적 회석비율을 구하기 위하여 회석비율에 따른 생체성장속도(DR)와 PHB생성속도(DP)를 계산하여 Fig. 1(b)에 나타내었다. 생체성장속도는 회석비율이 0.1 h⁻¹에서 최대가 되었고 PHB생성속도는 0.06 h⁻¹에서 최대가 되었으며 생체성장속도가 PHB생성속도보다 회석비율에 크게

영향을 받았다. Hillinger(15)도 독성이 없는 생성물을 생산하는 연속배양에 대하여 모사하여 세포성장속도와 생성물생성속도가 최대가 되는 희석비율이 존재함을 보고하였다.

비PHB생성속도(specific PHB production rate)와 PHB축적비에 미치는 비생체성장속도(specific residual biomass growth rate)의 영향을 조사하기 위하여 Fig. 1(c)에 비생체성장속도(=희석비율)에 따른 비PHB생성속도(=DP/R)와 PHB축적비(=P/X)를 나타내었다. 비생체성장속도가 증가함에 따라 비PHB생성속도가 증가하였고 PHB축적비는 50%에서 25%로 점차 감소하였다. 비PHB생성속도가 증가하는데 PHB축적비가 감소하는 것은 비생체성장속도가 증가할수록 비PHB생성속도의 증가 정도는 둔화되어 비PHB생성속도/비생체성장속도의 비율이 낮아지기 때문이다. Ramsay 등(6)은 희석비율이 증가함에 따라 PHB축적비가 감소하고 비PHB생성속도는 증가하다가 감소한다고 보고하였다. 회분식 배양으로 PHB가 최고 건조세포무게의 80%까지 축적되었지만(16) 연속배양으로는 최고 건조세포무게의 50%까지 축적되었다. Senior 등(2)도 회분식 배양으로는 건조세포무게의 74%까지 축적하였지만 연속배양으로는 산소제한조건에서 최고 45%까지 축적하였다. 회분식 배양보다 연속식 배양의 PHB 축적비가 더 낮은 이유에 대하여 Senior 등(2)은 회분식 배양에서 세포분열이 중단되었거나 연속배양에서 세포가 가장 낮은 성장속도보다 더 낮게 성장하기 때문이라고 하였다.

주입 염화암모늄농도의 영향

주입 포도당농도가 20 g/l, 주입 염화암모늄농도를 1 g/l로 하여 희석비율에 따른 세포 및 PHB농도 그리고 포도당 및 염화암모늄농도들을 조사하여 Fig. 2에 나타내었다. 주입 염화암모늄농도가 2 g/l인 경우와 비교해 보았을 때, 희석비율이 0.03 h⁻¹ 이하에서는 주입 염화암모늄농도가 2 g/l일 때보다 PHB농도가 낮았지만 0.03 h⁻¹ 이상에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 생체농도(R=X-P)는 희석비율에 관계없이 주입 염화암모늄농도가 2 g/l일 때보다 낮았다. PHB축적비는 전 희석비율 영역에서 건조세포무게의 약 10% 정도 증가하였다. 이로부터 생체농도는 낮추더라도 PHB축적비를 높이기 위해서는 주입 염화암모늄농도를 낮추어야 함을 알 수 있었다.

Ramsay 등(6)은 질소원 고갈로 PHB축적비가 증가하는 것은 비PHB생성속도가 증가하는 것이 아니고

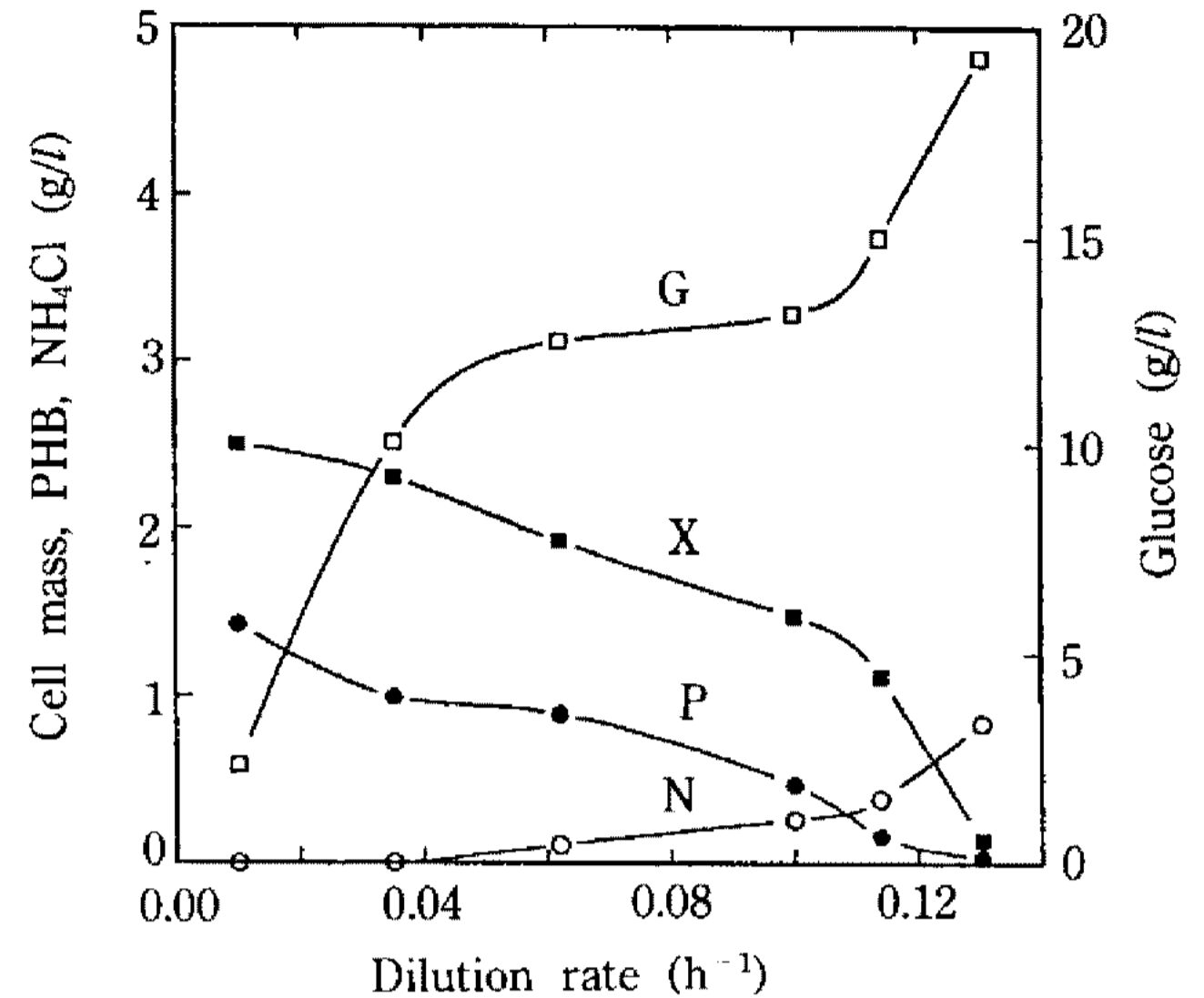


Fig. 2. Effects of dilution rate on concentrations of cell mass (■), PHB (●), glucose (□), and ammonium chloride (○) in continuous culture of *A. eutrophus*. Inlet glucose and ammonium chloride concentrations were 20 g/l and 1 g/l, respectively.

비생체성장속도가 감소하기 때문이라고 하였는데, 희석비율이 0.03 h⁻¹ 이하에서 주입 염화암모늄농도가 낮을 때 PHB농도도 낮아지는 것으로 볼 때, 암모늄농도는 비PHB생성속도에도 영향을 줄 수 있었다.

정상상태에서 세포성장 및 PHB합성에 미치는 주입 염화암모늄농도의 영향을 조사하기 위하여 포도당농도를 20 g/l로 고정하고 염화암모늄농도를 0.5 g/l에서 3 g/l까지 변화시키면서 세포와 PHB농도 그리고 기질농도들을 측정하여 Fig. 3에 결과를 나타내었다. 염화암모늄농도가 2 g/l일 때 세포농도는 최대로 되었고 그 이상의 농도에서는 감소하였는데, 이로부터 암모늄기질에 의하여 세포성장 저해현상이 있음을 알 수 있었다. 이 현상은 회분식 배양으로 초기 염화암모늄농도가 2 g/l일 때는 확인하지 못한 것으로(17) 주입 염화암모늄농도가 3 g/l이고 반응기내 암모늄농도가 약 2 g/l일 때 암모늄이온에 의한 세포성장 저해작용이 나타났다.

포도당농도는 주입 염화암모늄농도가 1 g/l까지는 감소하였지만, 그 이상에서는 일정 농도를 유지하였다. 암모늄농도는 주입 염화암모늄농도가 1 g/l까지는 약간 감소하다가 주입 염화암모늄농도가 높아지면서 거의 직선적으로 증가하였다. PHB축적비는 Table 1에서 보듯이 주입 염화암모늄농도가 1 g/l에서 건조세포무게의 32%로 최대값을 나타냈고 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 이것은 Ramsay 등(6)이 C/N

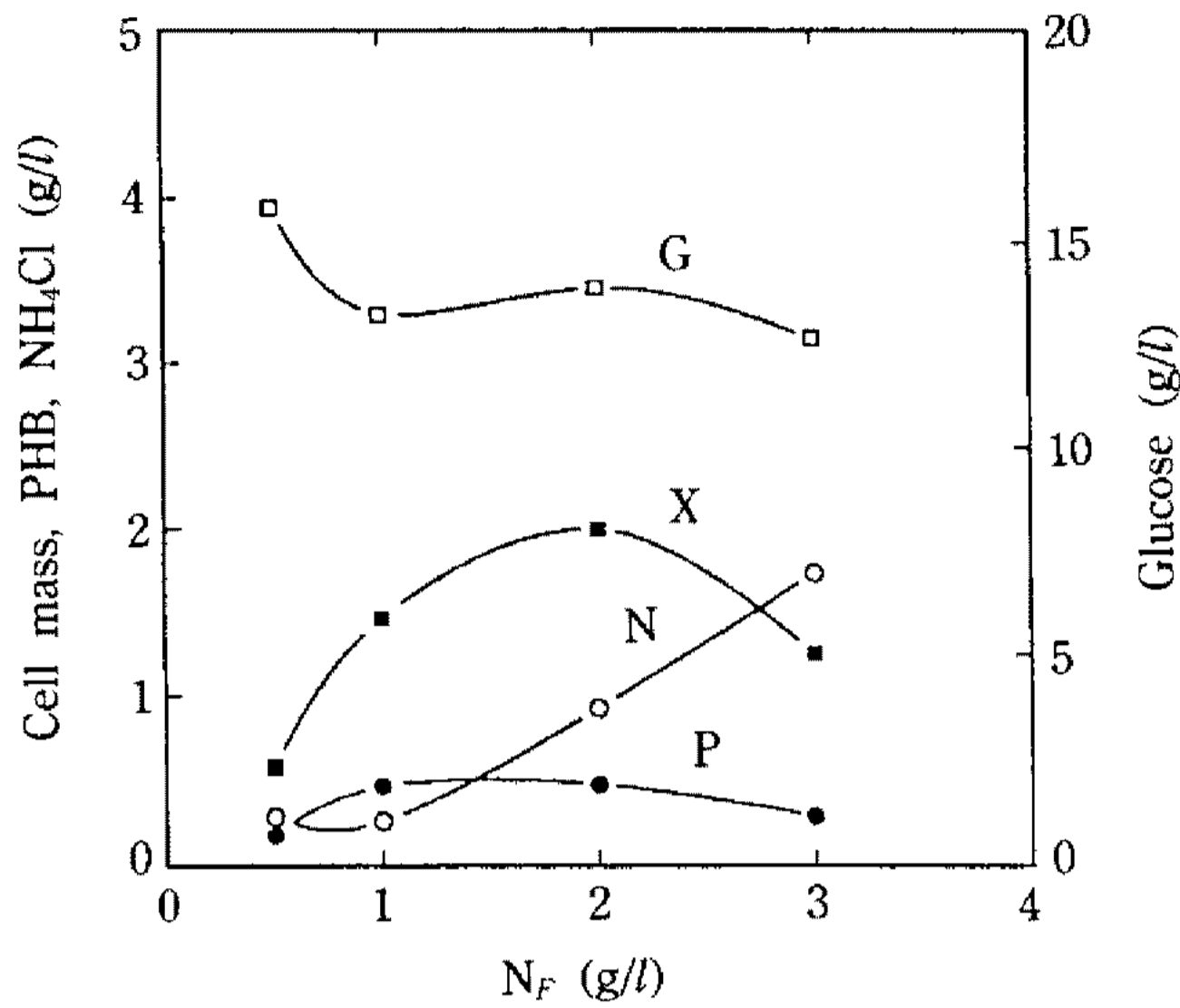


Fig. 3. Effects of inlet ammonium chloride concentration in continuous culture of *A. eutrophus*.

Table 1. Effects of inlet ammonium chloride concentration with dilution rate of 0.1 h^{-1} and inlet glucose concentration of 20 g/l

N_F (g/l)	P/X (%)	DR (g/l·h)	DP (g/l·h)	$v(=DP/R)$ (h^{-1})
0.5	31.03	0.0402	0.0181	0.0453
1.0	31.97	0.1006	0.0473	0.0473
2.0	24.0	0.1529	0.0483	0.0318
3.0	23.02	0.0976	0.0292	0.0301

비가 PHB축적비와 무관하다는 것과 다른 결과이고, 오히려 PHB축적비는 C/N비에 영향을 받음을 알 수 있었다. 생체성장속도(DR)와 PHB생성속도(DP)는 주입 염화암모늄이 2 g/l 일 때 최대값을 나타냈지만, 비PHB생성속도는 주입 염화암모늄농도가 1 g/l 에서 최대값을 나타냈다. 이 실험에 의하여 PHB생산속도를 최대로 하기 위해서는 주입 염화암모늄농도를 2 g/l 로, PHB축적비를 최대로 하기 위해서는 주입 염화암모늄농도를 1 g/l 로 하는 것이 유리함을 알 수 있었다.

주입 포도당농도의 영향

정상상태에서 세포성장 및 PHB합성에 미치는 주입 포도당농도의 영향을 알아보기 위하여 염화암모늄농도를 2 g/l 로 하고 포도당농도를 20 g/l 에서 60 g/l 까지 변화시키면서 세포와 PHB농도 그리고 포도당농도와 암모늄농도를 측정하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 주입 포도당농도가 증가할수록 세포농도는 급격히 증가하여 주입포도당농도가 30 g/l 에서는 세포농도가

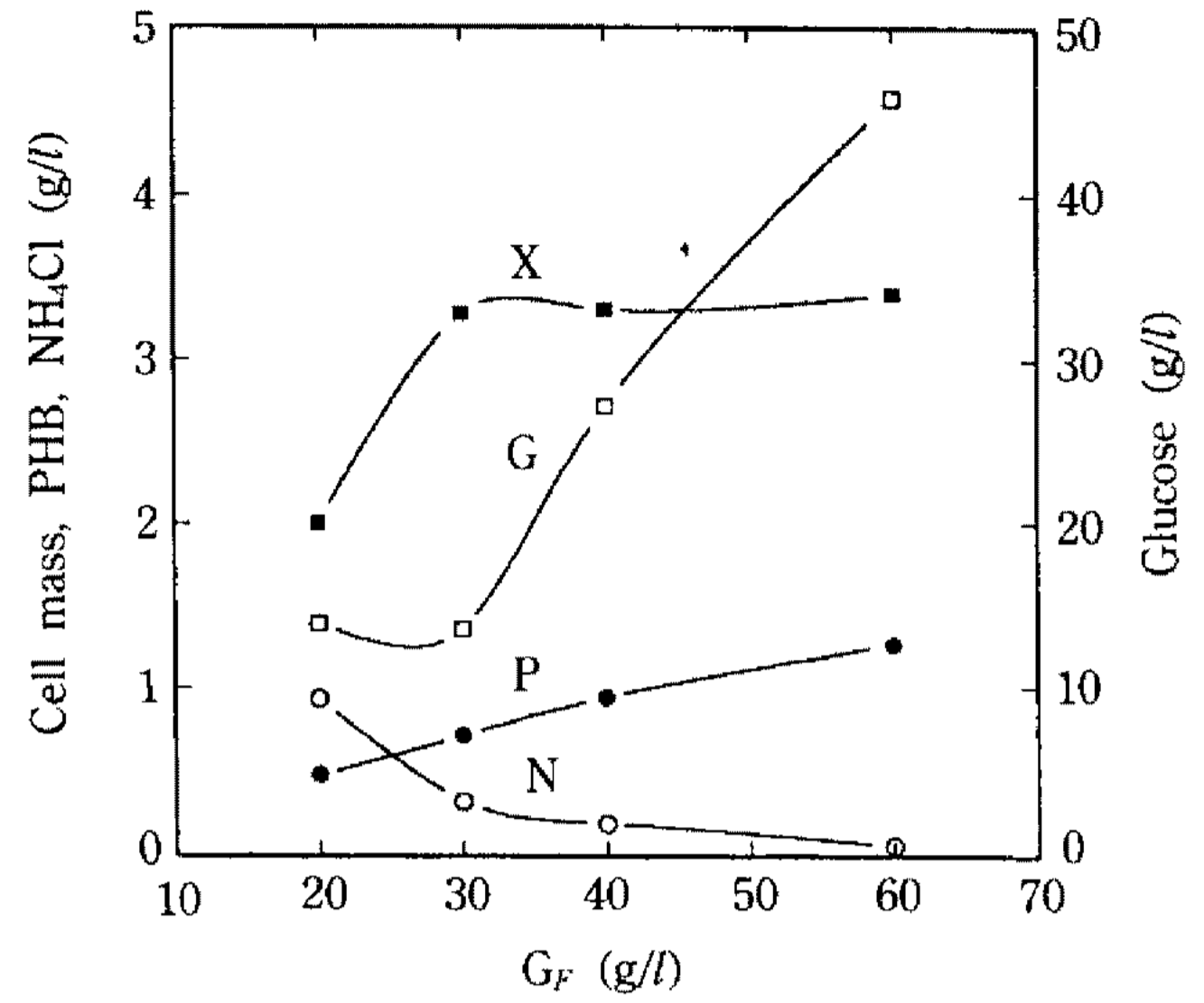


Fig. 4. Effects of inlet glucose concentration in continuous culture of *A. eutrophus*.

Table 2. Effects of inlet glucose concentration with dilution rate of 0.1 h^{-1} and inlet ammonium chloride concentration of 2 g/l

G_F (g/l)	P/X (%)	DR (g/l·h)	DP (g/l·h)	$v(=DP/R)$ (h^{-1})
20	24.0	0.152	0.048	0.0316
30	21.65	0.257	0.071	0.0276
40	28.40	0.237	0.094	0.0397
60	36.95	0.215	0.126	0.0586

거의 증가하지 않았다. 반면에 PHB농도는 계속적으로 증가하였다. Table 2를 보면 알 수 있듯이, 주입 포도당농도가 증가할수록 비PHB생성속도가 증가하였고 따라서 PHB축적비도 증가하였다. 그리고 암모늄농도와 같이 기질에 의한 저해작용은 나타나지 않았다. 포도당농도는 주입 포도당농도가 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하였고 암모늄농도는 주입 포도당농도가 30 g/l 까지 급격히 감소하다가 30 g/l 이상에서는 완만하게 감소하여 주입 포도당농도가 60 g/l 일 때 고갈되었다.

모델링

세포는 단백질과 핵산을 포함하는 촉매적 활성을 가진 생체와 PHB로 구분할 수 있기 때문에 세포생장은 생체생장과 PHB생성의 합으로 나타낼 수 있다. PHB를 생산하는 연속배양에서 생체, PHB, 탄소원, 그리고 질소원 각각에 대한 비정상상태에서의 물질수지를 (1)~(4)식에 나타내었고 비생체성장속도식

과 비PHB생성속도식은 (5)식과 (6)식에 각각 나타내었다.

정상상태일 때 (1)식에 의하여 비생체성장속도(μ)가 희석비율과 같음을 알 수 있고, (2)식에 의하여 비PHB생성속도(v)는 DP/R 로 표현됨을 알 수 있다. 비생체성장속도식은 (5)식과 같이 암모늄에 의한 기질저해를 고려하여 Lee와 Yoo(17)가 제안한 생체성장속도식에서 암모늄농도의 함수로 된 Monod식을 기질저해가 있는 식으로 표현하였다.

비PHB생성속도식은 (6)식과 같이 Lee와 Yoo(17)가 제안한 식을 사용하였고, 포도당은 생체와 PHB 합성 그리고 maintenance energy로 사용되고, 암모늄이온은 생체 생합성에만 사용된다고 가정하였다.

$$\frac{dR}{dt} = \mu R - DR \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = vR - DP \quad (2)$$

$$\frac{dG}{dt} = D(G_F - G) - \left(\frac{1}{Y_{R/G}} \mu + \frac{1}{Y_{P/G}} v + m \right) R \quad (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = D(N_F - N) - \frac{1}{Y_{R/N}} \mu R \quad (4)$$

여기에서

$$\mu = \frac{dR}{R dt} = \mu_m \left(\frac{G}{K_G + G + G^2/K_{GI}} \right) \left(\frac{N}{K_N + N + N^2/K_{NI}} \right) \quad (5)$$

$$v = \frac{dP}{R dt} = v_m \left(1 - \frac{P/X}{(P/X)_m} \right)^n \left(\frac{G}{K_{GP} + G} \right) \left(\frac{K_I}{K_I + N} \right) \quad (6)$$

매개변수 추정 및 모사

*Alcaligenes eutrophus*를 회분식 배양하면서 생체성장속도식과 PHB합성속도식 그리고 기질소모속도식에 관계된 매개변수들을 Table 3에 나타내었다(17). 그러나 회분식 배양 실험데이터로 추정된 속도식의 매개변수들을 연속배양에 그대로 사용할 수 없기 때문에(18) 회분식 배양에서의 속도식을 연속배양에 적용할 때는 공정에 영향을 받는 매개변수들을 다시 결정해야 한다. 따라서 본 연구에서는 도식적 방법과 전산모사에 의한 추정으로 매개변수들을 결정하였다.

전체 14개 매개변수 중 수율($Y_{R/G}$, $Y_{P/G}$, $Y_{R/N}$)과

Table 3. Evaluated parameters for the proposed model

Parameter	Value	Dimension	Remarks
μ_m	0.84	(h ⁻¹)	estimated
v_m	0.085	(h ⁻¹)	estimated
K_G	78.09	(g/l)	estimated
K_{GI}	42.53	(g/l)	estimated
K_N	0.07	(g/l)	estimated
K_{NI}	11.91	(g/l)	estimated
K_{GP}	8.045	(g/l)	estimated
K_I	9.0	(g/l)	estimated
$(P/X)_m$	0.85	(g/g)	batch culture
α	0.89		batch culture
$Y_{R/G}$	0.24	(g/g)	experimental
$Y_{P/G}$	0.26	(g/g)	experimental
$Y_{R/N}$	1.26	(g/g)	experimental
m	0.01	(h ⁻¹)	experimental

maintenance energy(m)는 연속배양 실험데이터로부터 도식적 방법으로 구하였고, 생체성장속도식과 PHB생성 속도식에 관계된 μ_m , v_m , K_G , K_{GI} , K_N , K_{NI} , K_{GP} , 그리고 K_I 는 도식적인 방법으로 구할 수 없기 때문에 전산모사로 구하였으며, $(P/X)_m$ 과 n 은 미생물의 고유한 값이기 때문에 회분식 배양에서의 값으로 정하였다.

(3)식으로부터 정상상태에서 희석비율이 일정하면 (7)식과 같은 기울기가 $1/Y_{P/G}$ 이고 절편이 $\mu/Y_{R/G} + m$ 인 직선식을 구할 수 있다. (7)식의 기울기로부터 $Y_{P/G}$ 를 구할 수 있다.

$$\frac{D}{R}(G_R - G) = \left(\frac{1}{Y_{R/G}} \mu + m \right) + \frac{1}{Y_{P/G}} v \quad (7)$$

Fig. 5에 (7)식에 의한 결과를 나타내었는데 기울기로부터 $Y_{P/G}$ 는 0.26(g/g)이었다. 비생체성장속도가 변화할 때 (7)식은 (8)식과 같이 기울기가 $1/Y_{R/G}$ 이고 절편이 m 인 직선식으로 다시 나타낼 수 있다. (8)식의 기울기와 절편으로부터 $Y_{R/G}$ 와 m 을 구할 수 있다.

$$\frac{D}{R}(G_F - G) - \frac{1}{Y_{P/G}} v = \frac{1}{Y_{R/G}} \mu + m \quad (8)$$

Fig. 6에 결과를 나타내었는데 기울기와 절편으로부터 $Y_{R/G}$ 는 0.24(g/g), m 은 0.01 h⁻¹이었다. 지금까지 계산된 매개변수를 Table 3에 나타내었다. 여기에서 μ_m 은 μ 의 최고값을 나타내는 것은 아니고 비례상수일 뿐이다. μ 의 최고값은 (9)식에 의하여 계산되는데

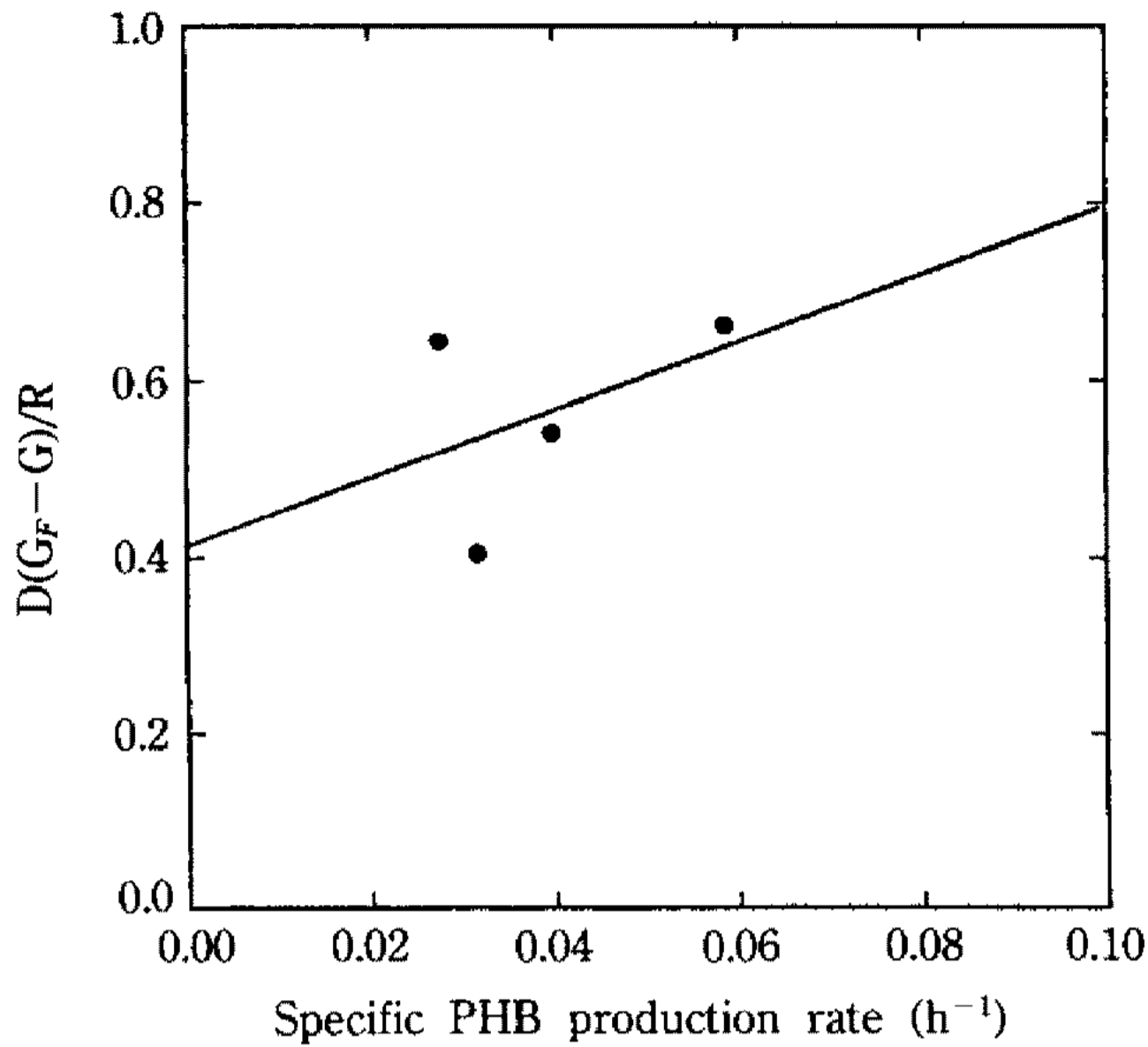


Fig. 5. Calculation of $Y_{P/G}$.

(19), 매개변수 값을 대입한 결과 0.196 h^{-1} 이었다. 이 값은 회분식 배양의 경우에 구한 값(0.205 h^{-1})과 거의 일치하였다.

$$(\mu)_{MAX} = \frac{\mu_m}{[1 + 2(K_G/K_{GI})^{1/2}][1 + 2(K_N/K_{NI})^{1/2}]} \quad (9)$$

그러나 Siegel과 Ollis(10)가 *Alcaligenes eutrophus*를 수소-산소-이산화탄소 혼합기체로 연속배양하는 경우에 보고된 값(0.31 h^{-1})보다는 다소 낮았다. 이는 기질이 다르고 액체와 기체 기질의 물질전달 차이로 생각된다. 이것으로 μ 의 최대값은 회분식 배양이나 연속배양이나 공정에 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

v_m 값은 회분식 배양의 경우보다 약 1/8 정도 작았고, *Alcaligenes eutrophus*를 수소-산소-이산화탄소 혼합기체로 연속배양한 Heinzle과 Lafferty(20)의 실험 데이터를 모사하기 위해 Asenjo와 Suk(21)이 얻은 값(0.33 hr^{-1})보다 작았다. 실험으로 확인한 v 의 최고치를 비교해 보면, 연속배양의 경우(0.05 h^{-1})가 회분식 배양의 경우(0.20 h^{-1})보다 약 1/4 정도 낮은 값을 나타냈다(17). 연속배양에서의 비PHB생성속도가 회분식 배양의 경우보다 낮은 것은 회분식 배양에서는 배양시간이 경과함에 따라 질소원농도가 고갈되면서 세포내의 NADH/NAD⁺ 비율, 탄소 흐름, 그리고 acetyl-CoA 농도가 변하게 되어(4) 비PHB생성속도가 증가함에 따라 PHB가 세포내에 다량 축적되지만, 연속배양에서는 생체성장을 위해서 암모늄이

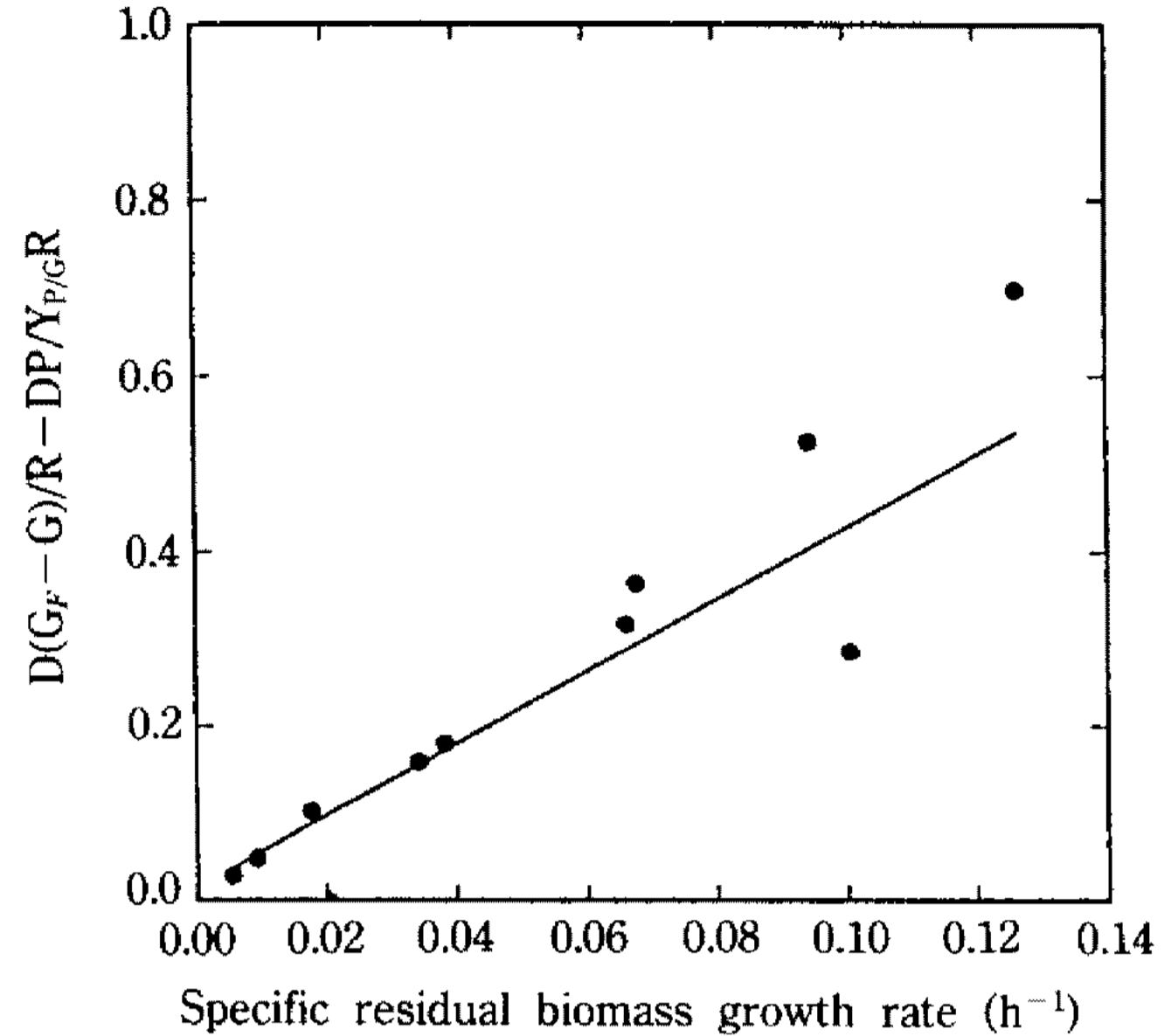


Fig. 6. Calculation of $Y_{R/G}$ and m .

계속적으로 공급되기 때문에 발효조내 암모늄이 고갈되지 않고, 비PHB생성속도는 비교적 높지만 비생체성장속도가 희석비율보다 낮아 분열이 느린 세포는 배출되기 때문으로 생각된다.

K_N 값(0.07 g/l)은 회분식 배양 때의 값(0.06 g/l) (17)과 유사하였고, 회분식 배양 때의 값은 Bitar와 Underhill(22)이 *Alcaligenes eutrophus* H16 균주를 질소원 기질이 NH₄Cl인 배지에서 배양한 실험결과로부터 구한 값(0.0588 g/l)과 거의 같았다. K_{GP} 값(8.045 g/l)은 회분식 배양의 경우와 같았고, K_I 값(9.0 g/l)은 회분식 배양의 경우(1.04 g/l)보다 큰 값을 나타냈다. Ward 등(4)은 세포배양시 산소제한에서 암모늄제한으로 전환하면 K_S 값($=0.5 \mu_{MAX}$)이 변하는데, 산소기질에 대한 K_S 는 시토크롬(cytochrome) 조성의 변화에 의하여, 암모늄기질에 대한 K_S 는 섭취용량이나 동화기작의 변화에 의하여 영향을 받을 수 있다고 하였다. $Y_{R/G}$, $Y_{P/G}$, $Y_{R/N}$ 값과 maintenance energy(m)는 회분식 배양 때의 값보다 절반 정도 낮은 값을 나타냈다. Senior 등(5)도 *A. beijerinckii*를 연속배양하여 질소제한이나 산소제한에 따라 포도당에 의한 생체의 생산수율이 변하고, 희석비율에 따라서도 산소제한 조건에서 $Y_{R/G}$ 는 $0.16 \sim 0.26 \text{ (g/g-glucose)}$, 그리고 $Y_{P/G}$ 는 $0.059 \sim 0.125 \text{ (g/g-glucose)}$ 로 값이 달라짐을 보고하였다. Ward 등(4)도 주입되는 산소농도에 따라 $Y_{R/G}$, $Y_{R/N}$, 그리고 호흡속도가 달라지는 것을 실험으로 확인하였다. Siegel과 Ollis(10)는 수소제한이나 산소제한에 따라 *Alcaligenes eutrophus*의 maintenance energy가 각각 $0.002 \text{ (g-H}_2\text{/l}\cdot\text{h)}$, 0.205

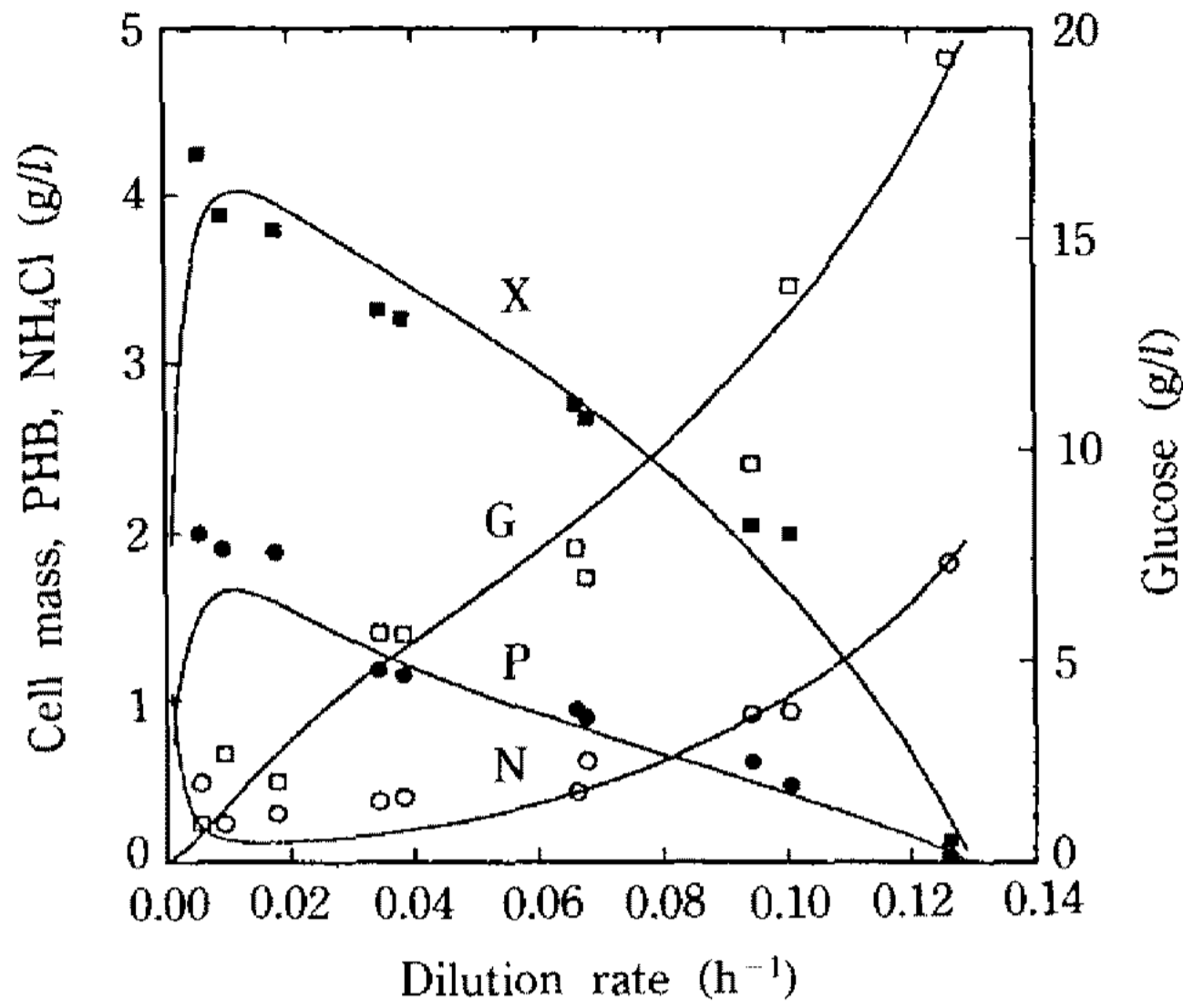


Fig. 7. Comparison of computer simulation and experimental data when dilution rate varied. Inlet glucose and ammonium chloride concentrations were 20 g/l and 2 g/l, respectively.

(g-O₂/l·h)로 다른 값을 갖는다고 하였다. 이와같은 문헌들을 참고해 볼 때, 연속배양과 회분식 배양의 매개변수가 차이가 나는 것은 배양방식과 반응기 geometry가 달라서 질소농도나 산소농도가 달라지게 되고, 따라서 제한조건이 차이가 나게 되어 수율과 maintenance energy 등의 매개변수들이 영향을 받는 것으로 추측된다. 앞으로 배양방식에 따라 대사과정에 어떻게 영향을 미쳐서 어떤 매개변수가 어느 정도 민감하게 변하는지 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

모델식이 실험결과와 일치하는지 확인하기 위하여 결정된 매개변수들을 모델식에 대입하여 회석비율과 주입 탄소원 및 질소원 농도의 변화에 따른 세포농도와 PHB농도 그리고 기질농도들을 모사하여 실험결과와 비교하였다. 회석비율 변화에 대하여 모사한 결과를 실험결과와 비교하여 Fig. 7에 나타내었는데 세포농도는 실험범위인 회석비율이 0.005~0.13 h⁻¹에서 실험결과와 잘 일치하였다. 그러나 회석비율 0.005 h⁻¹ 이하에서는 회석비율이 증가할수록 세포농도가 급격히 증가하는 현상을 나타냈다. 이는 회석비율의 증가로 기질공급이 증가하여 고갈된 기질을 보충하여 주기 때문으로 생각된다. PHB농도는 회석비율이 0.03 h⁻¹ 이상에서는 실험결과와 잘 일치하였지만 그 이하의 회석비율에서는 실험값보다 낮은 농도로 모사되었다. 회석비율이 0.005 h⁻¹ 이하에서는 세포농도와 마찬가지로 회석비율이 증가함에 따라

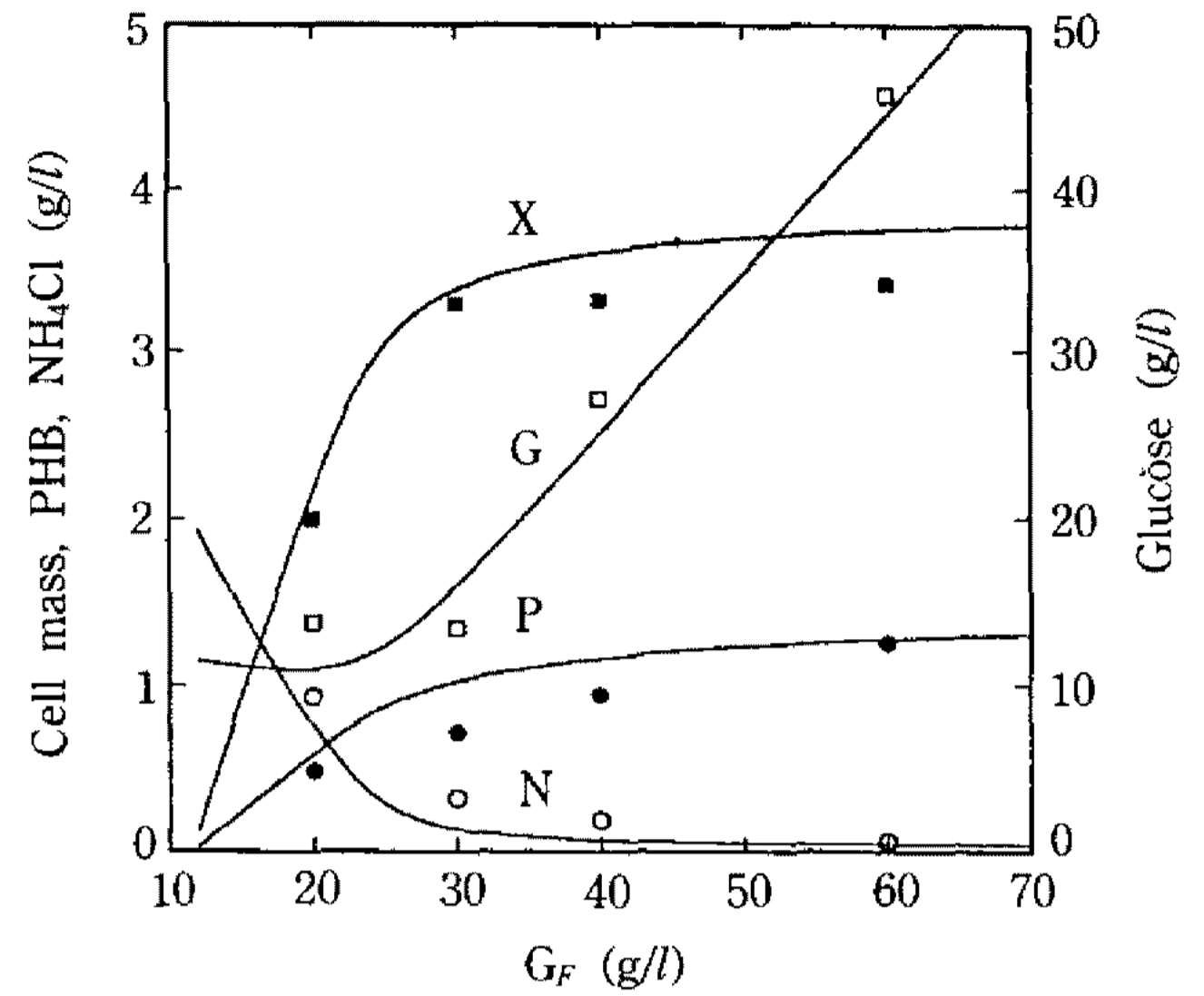


Fig. 8. Comparison of computer simulation and experimental data when inlet glucose concentration varied. Dilution rate and inlet ammonium chloride concentration were 0.1 h⁻¹ and 2 g/l, respectively.

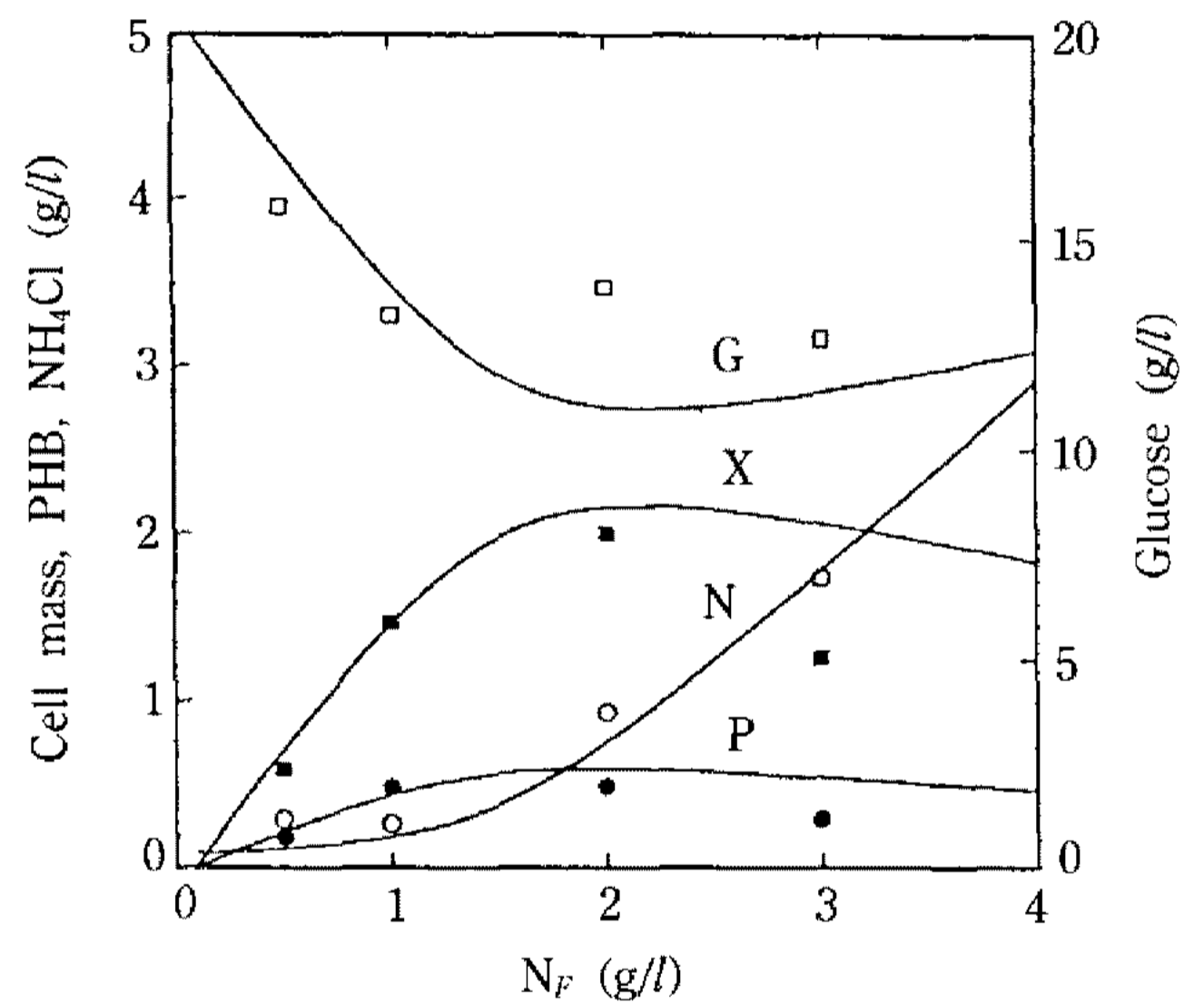


Fig. 9. Comparison of computer simulation and experimental data when inlet ammonium chloride concentration varied. Dilution rate and inlet glucose concentration were 0.1 h⁻¹ and 20 g/l, respectively.

급격히 증가하였다. 포도당농도는 실험결과와 마찬가지로 회석비율이 증가함에 따라 증가하였고, 암모늄 농도는 회석비율이 0.01 h⁻¹ 이하에서는 회석비율이 증가함에 따라 감소하고 그 이상의 회석비율에서는 증가하는 실험결과를 잘 모사해주고 있음을 알 수 있었다.

주입 포도당농도 변화에 대하여 모사하고 실험결과와 비교하여 Fig. 8에 나타내었다. 주입 포도당농도

가 30 g/l 이상에서 모사결과가 실험결과보다 높게 모사되었지만 그 외는 실험결과와 매우 잘 일치하였다. 주입 염화암모늄농도 변화에 대하여 모사하고 실험결과와 비교하여 Fig. 9에 나타내었다. 주입 염화암모늄농도가 증가할수록 생체와 PHB농도가 증가하다가 2 g/l 이상에서 감소하는 실험결과를 잘 모사하였다.

PHB를 생산하기 위한 연속배양 공정의 회석비율과 주입 탄소원 및 질소원 농도의 영향에 대한 실험결과와 모델식은 연속배양에서 2가지 기질이 주입되는 공정을 최적화하는데 이용될 수 있으며, PHB를 생산하는 2단 연속배양 공정의 각 단계에서의 회석비율과 최적 주입 탄소원과 질소원 농도를 결정하여 공정을 최적화하고 제어하는데 매우 중요한 자료를 제공할 수 있다.

요 약

Alcaligenes eutrophus 균주로 poly- β -hydroxybutyrate(PHB) 생산을 위한 연속배양 공정의 성능에 미치는 회석비율, 주입 포도당 및 염화암모늄농도의 영향에 대하여 연구하였다. 주입 기질농도가 일정할 때(주입 포도당농도=20 g/l, 주입 염화암모늄농도=2 g/l), 생체성장속도와 PHB생성속도는 회석비율이 각각 0.1, 0.06 h⁻¹에서 최고값을 나타냈고, 0.13 h⁻¹에서 세포가 전부 배출되었다. 회석비율이 증가함에 따라 비PHB생성속도는 계속 증가하였지만 PHB축적비는 50%에서 25%로 감소하였다. 세포농도는 주입 염화암모늄농도가 2 g/l일 때 최고값을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 이 실험결과로 암모늄에 의한 기질저해가 있음을 알 수 있었다. 주입 포도당농도가 30 g/l에서 세포농도는 최고값을 나타냈지만 PHB농도는 계속 증가하였다. 모델속도식에 대한 매개변수는 도식적 방법과 매개변수 추정으로 구하였고 회석비율, 주입 포도당농도, 주입 염화암모늄농도의 영향에 대하여 모사한 결과 실험데이터와 잘 일치하였다.

사용기호

G : glucose concentration (g/l)
 G_F : inlet glucose concentration (g/l)
 K_G : saturation constant of glucose for the growth rate of residual biomass (g/l)

K_{GI} : inhibition constant of glucose for the growth rate of residual biomass (g/l)
 K_{GP} : saturation constant of glucose for the PHB production rate (g/l)
 K_I : inhibition constant of ammonium chloride for the PHB production rate (g/l)
 K_N : saturation constant of ammonium chloride for the growth rate of residual biomass (g/l)
 K_{NI} : inhibition constant of ammonium chloride for the growth rate of residual biomass (g/l)
 m : maintenance energy (h⁻¹)
 N : ammonium chloride concentration (g/l)
 N_F : inlet ammonium chloride concentration (g/l)
 n : exponent in specific PHB production rate
 P : PHB concentration (g/l)
 (P/X)_m : maximum PHB content (g PHB/g cell)
 R : residual biomass concentration (g/l)
 t : culture time (h)
 X : cell mass concentration (g/l)
 Y_{P/G} : yield of PHB based on glucose (g/g)
 Y_{R/G} : yield of residual biomass based on glucose (g/g)
 Y_{R/N} : yield of residual biomass based on ammonium chloride (g/g)
 Greek letters
 μ : specific growth rate of residual biomass (h⁻¹)
 μ_m : proportional coefficient of specific growth rate of residual biomass (h⁻¹)
 v : specific PHB production rate (h⁻¹)
 v_m : maximum specific PHB production rate (h⁻¹)

참고문헌

1. Dawes, E.A. and P.J. Senior. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **10**: 135-266.
2. Senior, P.J., G.A. Beech, G.A.F. Ritchie and E.A. Dawes. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during

- batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **128**: 1193-1201.
3. Jackson, F.A. and E.A. Dawes. 1976. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.* **97**: 303-312.
 4. Ward, A.C., B.I. Rowley and E.A. Dawes. 1977. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 61-68.
 5. Tal, S. and Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* **31**: 608-613.
 6. Ramsay, B.A., I. Saracovan, J. A. Ramsay, and R.H. Marchessault. 1991. Continuous production of long-side-chain poly- β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 625-629.
 7. Roger, L.A. and E.V. Whittler. 1930. The growth of bacteria in continuous flow broth. *J. Biotechnol.* **20**: 126-134.
 8. Monod, J. 1950. La technique de culture continue: Theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur(Paris)*. **79**: 390-399.
 9. Novick, A. and L. Szilard. 1950. Description of the chemostat. *Science* **112**: 715-725.
 10. Siegel, R.S. and D.F. Ollis. 1984. Kinetics of growth of the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* (ATCC 17707) in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 764-770.
 11. Miller, G. 1959. Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 12. Srienc, F., B. Arnold, and J.E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 982-987.
 13. Ward, A.C. and E.A. Dawes. 1973. A disk assay for poly- β -hydroxybutyrate. *Anal. Biochem.* **52**: 607-613.
 14. Bazin, M.J. 1981. Theory of continuous culture, pp. 27-62. In P.H. Calcott(ed), *Continuous Cultures of Cells*, Vol. 1, CRC press, Boca Raton, Florida.
 15. Hillinger, M. 1985. Continuous cultivation, p. 293. In H. Brauer(ed), *Biotechnology*, Vol. 2, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
 16. Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1990. Effects of glucose and ammonium concentrations on cell growth and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 607-612.
 17. Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1991. Kinetics for the growth of *Alcaligenes eutrophus* and the biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 186-192.
 18. Hong, Y.C., T.P. Labuza, and S.K. Harlander. 1989. Growth kinetics of strawberry cell suspension cultures in shake flask, airlift, stirred-jar, and roller bottle bioreactors. *Biotechnol. Prog.* **5**: 137-143.
 19. Humphrey, A.E. 1985. Kinetics of batch fermentation. p. 257. In H. Brauer (ed), *Biotechnology*, Vol. 2, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
 20. Heinzle, E. and Lafferty, R.M. 1980. A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 8-16.
 21. Asenjo, J.A. and J.S. Suk. 1985. Kinetics and models for the bioconversion of methane into an intracellular polymer, poly- β -hydroxybutyrate (PHB). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 15: 225-234.
 22. Bitar, A. and S. Underhill. 1990. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol. Lett.* **12**: 563-568.

(Received August 14, 1992)