

탄소원과 질소원의 비가 PHB 발효특성치 수율에 미치는 영향

백 예 영 · 허 병 기
인하대학교 공과대학 생물공학과

Effect of Ratios of Carbon Source to Nitrogen Source on the Yields of PHB Fermentation Variables

Yei-Young Baek and Byung-Ki Hur

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

The effects of ratios of initial concentration of carbon source to the initial concentration of nitrogen source in the fermentation media on both the yields of PHB fermentation variables and the accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid(PHB) were investigated. The fermentation media were composed of the combination of varying glucose concentrations, 10, 20, 25, 30, 40, 50g/l and the NH_4Cl concentrations, 0.33, 0.4, 0.5, 1.5, 3, 5g/l. The yield of biomass on glucose, $Y_{X/S}$, decreased very slowly according to the increase of the ratio of C to N. And the yield became constant at 0.35(g biomass/g glucose) with the ratio higher than 70. The yield of residual biomass, $Y_{RX/S}$, also decreased with the ratio of C to N and finally showed a constant value of 0.065(g residual biomass/g glucose) when the ratio was higher than 65. In accordance with the augmentation of the ratio, the yield of PHB, $Y_{PHB/S}$, however, increased and showed the maximum value of 0.35 (g PHB/g glucose) between 40 and 60 of the ratio. The maximum yield of PHB to the change of biomass, $Y_{PHB/X}$, was 0.87(g PHB/g biomass), and the yield, $Y_{PHB/RX}$, was 4.2(g PHB/g residual biomass). The maximum accumulation percent of PHB to the final biomass was 81% when the ratio was higher than 67.

서 론

현대 산업문명의 발달에 따라 크게 기여한 분야 중의 하나가 고분자 산업이다. 그러나 석유화학 공정에서 생산되는 고분자는 거의 대부분 난분해성 물질이기 때문에 한번 사용 폐기된 고분자 물질은 천연적으로 영위히 분해되지 않는 오염물질로 변모하게 된다. 따라서 인류는 현재 사용하고 있는 고분자 물질을 가능한 분해성 고분자 물질로 대체함으로써 환경오염 유발 원인을 제거하려고 노력하고 있다.

현재 개발 중이거나 상품화되어 있는 분해성 고분

자 물질은 분해 특성에 따라 광분해성, 생분해성, 생분괴성으로 분류된다. 이중 합성플라스틱을 대체할 수 있는 대표적인 생분해성 고분자는 대부분의 박테리아가 특정 영양 성분이 제한된 조건하에서 탄소원과 에너지원으로 축적하는 PHB(Poly- β -hydroxybutyric acid)이다.

PHB 생산수율은 생산균주, 배양방법, 배양조건, 배지조성 등에 영향을 받는다. 영국의 ICI사는 이차 배양시 포도당과 유기산을 첨가하는 2단계 배양법에 의하여 *Alcaligenes eutrophus* 균주를 배양함으로써 균체 건중량의 80%까지 PHB를 축적할 수 있었을

뿐만 아니라 연간 1000톤 규모의 PHBV(상품명 Biopol)를 생산, 시판 중에 있다(1). Massachusetts 대학의 연구진은 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*과 *Pseudomonas oleovorans*를 포함한 몇 종류의 새로운 미생물로부터 건조 균체량의 40% 까지 PHB를 축적할 수 있었다(2). 일본의 Suzuki 등은 microcomputer를 이용한 유가식 배양법에 의하여 *Pseudomonas sp. K* 균주를 175시간 배양함으로써 균체 건조량에 대한 PHB 축적률이 66%이며 배양액 중의 농도가 136g/l 인 PHB를 생산하였다(3).

국내에서는 장호남 등이 균주로는 *Alcaligenes eutrophus*, 탄소원으로는 포도당, 질소원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하고, 탄소원과 질소원의 비를 32.8로 조절함으로써 건조 균체량에 대한 PHB 함량이 90%에 이르는 연구결과를 얻을 수 있었을 뿐만 아니라 유가식 배양법에 의하여 균체농도 93g/l, PHB 농도 71g/l, PHB 함량 76%, PHB 생산성 2.42g/l · h인 우수한 결과를 얻었다(4-5). 또한 유영제 등은 회분식 배양에 의하여 *Alcaligenes eutrophus*를 배양하여 건조 균체 무게에 대한 PHB 함량이 80%에 이르는 연구결과를 얻었다(6).

PHB($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$)_n)는 탄소, 수소, 산소의 원소로만 구성되어 있기 때문에 탄소원에 대한 PHB 수율 및 건조 균체량에 대한 PHB의 축적률 및 생산성(productivity)이 PHB를 상업적으로 생산하기 위한 가장 중요한 인자가 된다(7). PHB 축적에 영향을 미치는 인자에는 pH, 금속이온농도, 기질의 첨가 방법, 배양방법, 탄소원과 질소원의 함량비 등이 있다. 이중 pH와 탄소원과 질소원의 비가 다소 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(8).

현재까지 탄소원과 질소원의 조성비가 PHB 축적률에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 수행되었으나 회분식 배양에서 탄소원과 질소원의 비와 PHB 축적률 사이의 함수관계가 체계적으로 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 탄소원과 질소원을 제외한 다른 조성과 발효조건을 고정시키고 탄소원과 질소원의 함량비를 다양하게 변화시켜가면서 발효 실험을 수행하여 탄소원과 질소원의 함량비가 발효변수 변화량 사이의 비(균체 생성량에 대한 기질 소모량, 질소원의 소모량, PHB 생성량의 비 등)에 미치는 영향은 물론 탄소원과 질소원의 비와 PHB 축적률 사이의 함수관계를 규명하여 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

사용균주는 *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 이었다. 4℃ 사면배지상에 냉장보관된 균주를 YM 액체배지에 접종한 후 35℃, 150rpm에서 24시간 진탕배양한 후 PHB 발효용 배지에 5%(v/v)를 접종하였다. PHB 생산을 위한 발효실험은 500ml 삼각 플라스크에서 작동부피 250ml로 하여 수행하였다. 이 경우 발효온도는 35℃, 150rpm, 총 발효시간은 초기 당농도에 따라서 80시간 또는 140시간으로 하였다. 발효가 진행됨에 따라 매 10시간마다 10ml의 시료를 채취하여 발효 특성치 분석에 사용하였다.

발효배지의 탄소원은 포도당, 질소원은 NH_4Cl 을 사용하였다. 탄소원의 조성은 10, 20, 25, 30, 40, 50 (g/l), 질소원의 조성은 0.33, 0.4, 0.5, 1.5, 3, 5 (g/l)로 하였으며 이 두 성분의 조합인 24가지의 각 경우에 대한 미량금속이온의 조성은 Siegel과 Ollis(9)의 조성을 이용하였다.

분석방법

세포농도는 85℃에서 20시간 건조한 후의 무게를 측정하여 구하였으며 포도당의 농도는 Glucose Analyzer(TOA, Glu-11, Japan)를 사용하여 분석하였다. 암모늄 이온의 농도는 Berthelot 반응(10)을, PHB의 농도는 Emeruwa와 Hawirko(11)의 방법을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원과 질소원의 초기 조성비 C/N과 $Y_{X/S}$, $Y_{PHB/S}$, $Y_{\text{NH}_4^+/S}$ 사이의 함수관계

Table 1은 초기 당농도가 10 내지 50g/l이며, 초기 NH_4Cl 농도가 0.33 내지 5.0g/l 인 경우에 대한 PHB생산 실험결과이다. 초기 당농도가 10 내지 20g/l 인 경우 총발효시간은 80시간이었으며 초기 당농도가 25g/l 인 경우의 발효시간은 100시간, 30 내지 50g/l 인 경우는 140시간이었다.

탄소원의 초기농도 10, 20, 25, 30, 40, 50g/l 와 질소원의 초기농도 0.33, 0.4, 0.5, 1.5, 3, 5g/l 의 조합으로 형성된 발효배지를 사용하여 탄소원과 질소원의 초기 조성비, C/N이 탄소원의 소모량에 대한 세포의 수율, 질소원 소비량, PHB 수율 등에 미치

Table 1. Effect of C/N ratios on cell growth and biosynthesis.

C/N 비	초기농도(g/l)		최종농도(g/l)		cell mass (g/l)	PHB (g/l)	PHB content
	glucose	NH ₄ Cl	glucose	NH ₄ Cl			
2	10	5.0	0.9	4.13	4.91	2.23	0.45
3.33	10	3.0	2.0	2.24	4.85	1.96	0.4
4	20	5.0	8.88	3.01	5.78	2.77	0.48
6	30	5.0	12.5	3.1	9.2	4.43	0.48
6.67	10	1.5	0.3	0.41	5.41	2.77	0.51
6.67	20	3.0	5.52	1.02	7.41	4.08	0.55
10	30	3.0	13	1.4	8.84	4.85	0.55
10	50	5.0	31.9	3.5	9.6	4.9	0.51
13.3	20	1.5	5.45	0.32	7.41	3.63	0.49
20	10	0.5	0.9	0	5.14	3.27	0.64
20	30	1.5	4.5	0	11.16	7.17	0.64
33.3	50	1.5	25	0.3	15.9	10.8	0.68
40	20	0.5	7.06	0	8.98	6.13	0.70
50	25	0.5	0.98	0	9.12	6.78	0.74
60	30	0.5	9.9	0	9.64	7.37	0.76
75	30	0.4	4.91	0	10.01	7.96	0.80
91	30	0.33	4.9	0	9.38	7.59	0.81

치는 영향을 규명하여 보았다.

Fig. 1은 C/N의 변화가 식(1)로 정의되는 균체수율, $Y_{X/S}$ 에 미치는 영향을 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 C/N의 값이 0 근방에서는 균체수율이 0.5를 나타내나 C/N이 증가하면 균체수율은 서서히 감소하여 0.35로 접근함을 알 수 있다.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{g/g}) \quad (1)$$

위 식에서

ΔX = 균체의 최종농도 - 균체의 초기농도

ΔS = 탄소원의 초기농도 - 탄소원의 최종농도

Fig. 2는 식(2)로 정의되는 잔여균체수율 $Y_{RX/S}$ 와 C/N 사이의 함수관계를 나타내고 있다. C/N값이 0에 접근하면 $Y_{RX/S}$ 값은 0.28 근방의 값을 나타내며, C/N값이 증가하면 $Y_{RX/S}$ 값은 감소한다. 그러나 C/N값이 65 이상에서는 $Y_{RX/S}$ 값이 일정한 값 0.065를 나타내었다.

$$Y_{RX/S} = \frac{\Delta RX}{\Delta S} \quad (\text{g/g}) \quad (2)$$

여기서

RX = 균체농도 - PHB 농도

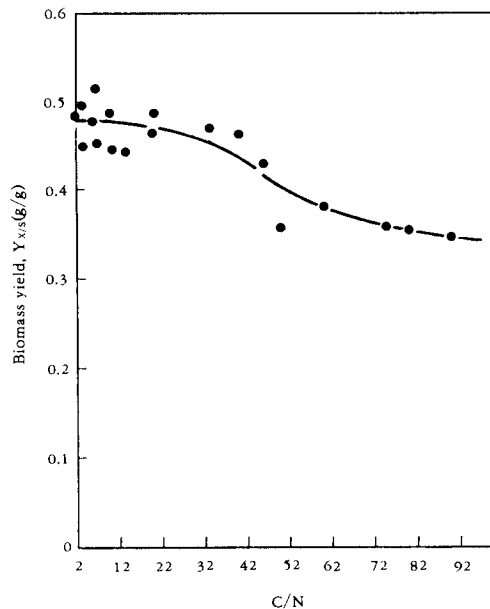


Fig. 1. The effect of various initial molar C/N ratios on the yield of biomass ($Y_{X/S}$).

ΔRX = 잔여균체의 최종농도 - 잔여균체의 최초농도

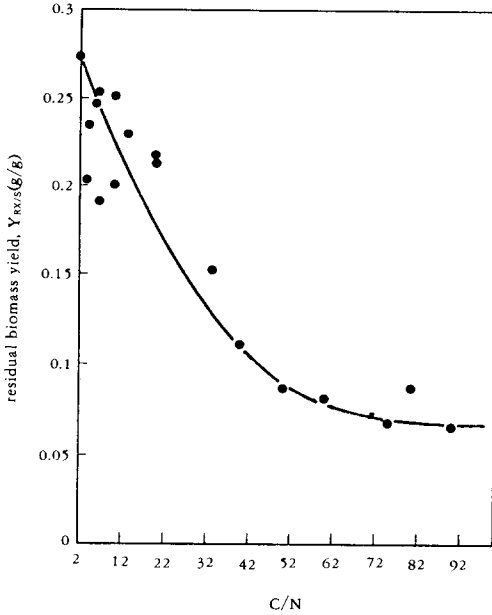


Fig. 2. The effect of various initial molar C/N ratios on the yield of residual biomass($Y_{RX/S}$).

이 결과로부터 C/N 비가 낮을 경우 탄소원 단위 소비량에 대한 순수균체의 성장률은 C/N비가 높을 경우보다 크다는 것을 알 수 있다.

Fig. 3은 식(3)으로 정의되는 PHB의 수율, $Y_{PHB/S}$ 와 C/N 사이의 함수관계를 표시하고 있다. C/N비가 증가하면 PHB의 수율도 증가하여 C/N비 40 내지 60 사이에서 최대수율 0.35를 나타낸다. C/N비가 60 이상으로 증가하면 $Y_{PHB/S}$ 의 값은 다소 감소 경향을 나타내고 있다. 본 연구의 수율은 장호남 등 (4)의 결과 0.4보다 다소 낮으며 이용우와 유영제 (6)의 연구결과 0.3보다는 약간 높은 값을 나타내었다.

$$Y_{PHB/S} = \frac{\Delta PHB}{\Delta S} \quad (\text{g/g}) \quad (3)$$

여기서

ΔPHB = PHB의 최종농도 - PHB의 초기농도

질소원의 농도가 낮고 탄소원의 농도가 높아지면 PHB를 제외한 순수균체 성장은 제한되는 반면 순수균체당 축적할 수 있는 PHB는 증대됨을 알 수 있다.

Fig. 4는 C/N의 값이 탄소원의 소비량에 대한 질소원의 소비량의 비 $Y_{NH_4^+/S}$ 에 미치는 영향을 나타내

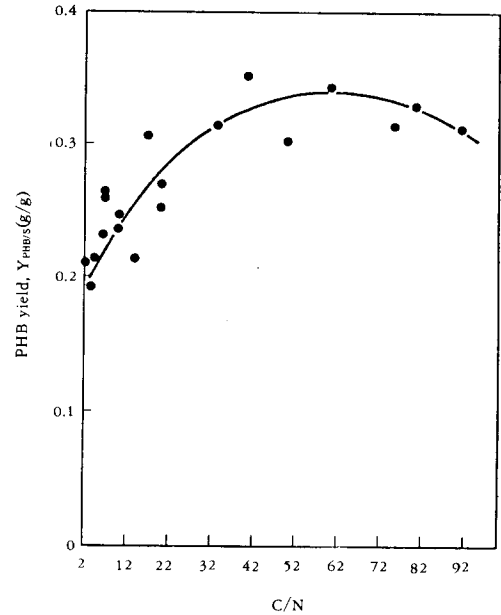


Fig. 3. The effect of various initial molar C/N ratios on the yield of PHB($Y_{PHB/S}$).

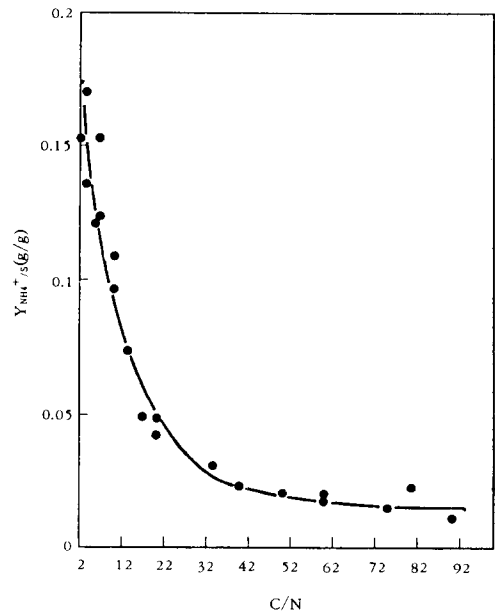


Fig. 4. The effect of various initial molar C/N ratios on the ratios of the consumption of nitrogen source to the consumption of carbon source($Y_{NH_4^+/S}$).

고 있다. C/N의 비 20까지는 이 비 값이 증가함에 따라 $Y_{NH_4^+/S}$ 의 값은 급격히 감소하나 20과 40 사이에서는 완만하게 감소하며 C/N비가 42 이상이면 C/N비의 변화에 관계없이 $Y_{NH_4^+/S}$ 는 일정한 값 0.02가 되었다.

$$Y_{NH_4^+/S} = \frac{\Delta NH_4^+}{\Delta S} \quad (g/g) \quad (4)$$

위 식에서

ΔNH_4^+ = 질소원의 초기농도 - 질소원의 최종농도

탄소원과 질소원의 초기 조성비 C/N과 $Y_{PHB/X}$, $Y_{PHB/RX}$ 사이의 함수관계

탄소원과 질소원의 초기 조성비가 균체 단위 증가량 또는 잔여균체 단위 증가량당 축적되는 PHB의 량에 미치는 영향을 규명하여 보았다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 균체증가량에 대한 PHB 증가량의 비 $Y_{PHB/X}$ 는 C/N의 값이 증가함에 따라 증가하나 C/N비 60 이상에서는 일정한 값 0.83을 유지함을 알 수 있었다. PHB를 제외한 잔여균체의 증가량에 대한 PHB 증가량의 비 $Y_{PHB/RX}$ 와 C/N비 사이의 함수관계는 Fig. 6에서 찾아볼 수 있다. C/N비가 증가하면 $Y_{PHB/RX}$ 값도 상승하여 잔여균체 단위변화량

에 대한 PHB의 최대 축적량 4.2에 도달하게 된다. 환언하면 C/N비가 70 이상에서는 C/N값에 관계없이 $Y_{PHB/RX}$ 는 일정한 값 4.2를 나타내었다.

탄소원과 질소원의 초기 조성비 C/N과 $Y_{(PHB)/X}$, $Y_{(PHB)/(RX)}$ 사이의 함수관계

건조 균체량 및 잔여 건조 균체량당 축적할 수 있는 PHB와 탄소원과 질소원의 초기 조성비 C/N과의 사이에 어떤 함수관계가 있는지 규명하여 보았다. Fig. 7과 Fig. 8의 수율 $Y_{(PHB)/X}$ 와 $Y_{(PHB)/(RX)}$ 은 다음 식으로 정의된다.

$$Y_{(PHB)/X} = \frac{(PHB)_f}{(X)_f} \quad (g/g) \quad (5)$$

$$Y_{(PHB)/(RX)} = \frac{(PHB)_f}{(RX)_f} \quad (g/g) \quad (6)$$

위 식에서

$(PHB)_f$ = PHB의 최종농도

X_f = 균체의 최종농도

$(RX)_f$ = 잔여균체의 최종농도

Fig. 7은 미생물이 탄소원을 더 이상 섭취하지 않을 때의 건조균체량과 건조균체량 내에 축적되어

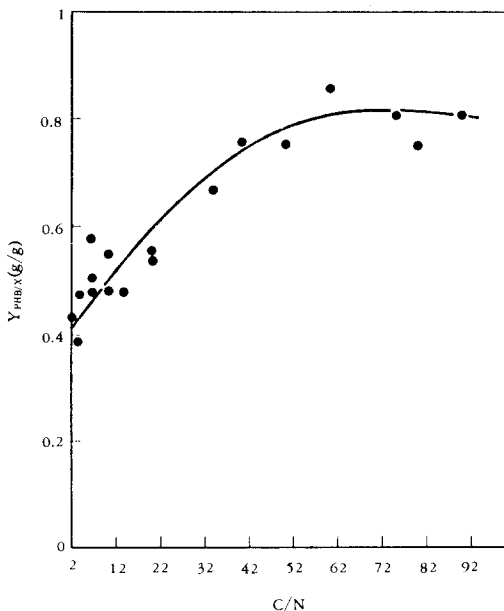


Fig. 5. The effect of various initial molar C/N ratios on the ratios of the increase of PHB to that of biomass($Y_{PHB/X}$).

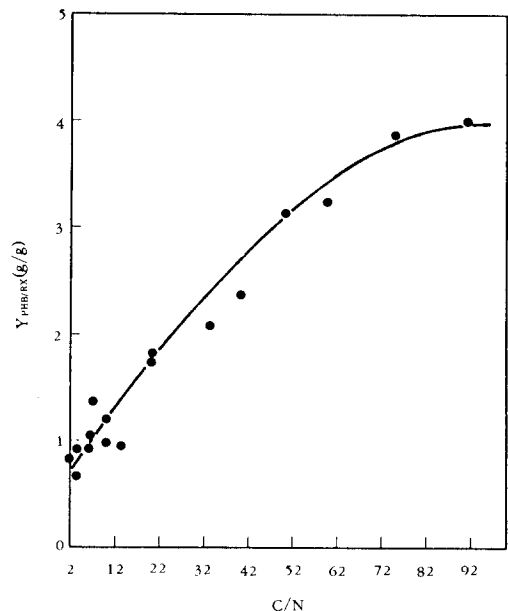


Fig. 6. The effect of various initial molar C/N ratios on the ratios of the increase of PHB to that of residual biomass($Y_{PHB/RX}$).

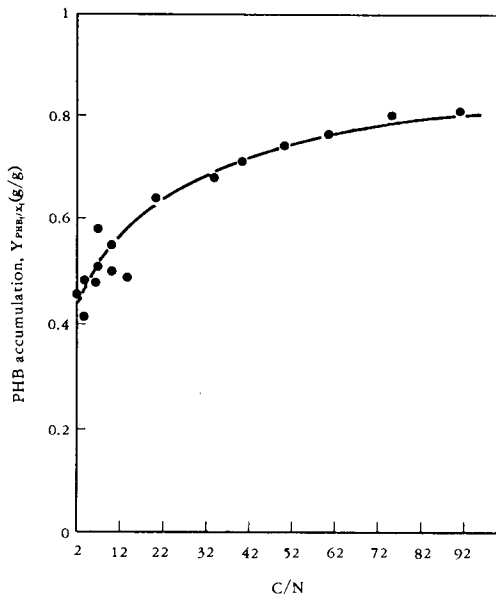


Fig 7. The effect of various initial molar C/N ratios on the ratios of PHB accumulated in the cell.

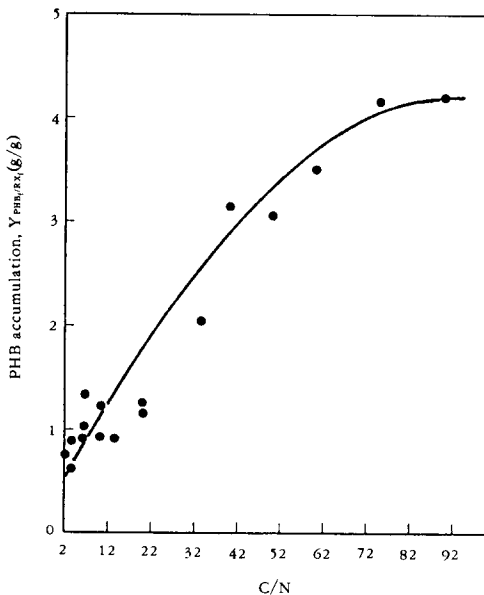


Fig 8. The effect of various initial molar C/N ratios on the ratios of PHB accumulated in the cell to the residual biomass.

는 PHB의 함량비를 C/N의 함수로 표시한 결과이다. 이 결과에 의하면 C/N비가 증가하게 되면 건조균체량에 대한 PHB의 축적량도 증가하나 C/N비 67 이상에서는 이 비에 무관하게 일정한 값 0.81을 나타내었다. 본 연구의 균주를 facultative fermentation 방식에 의하여 배양할 경우 C/N비의 조절에 의하여 축적할 수 있는 최대 PHB는 건조균체량의 81%임을 알 수 있었다.

Fig. 8은 잔여 균체량에 대한 PHB 축적량의 비와 C/N비 사이의 함수관계이다. 탄소원과 에 너지원으로 저장되는 PHB를 제외한 순수 균체량 당 저장되는 PHB 축적량은 C/N비에 따라서 서로 다른 수치를 나타내며 이 축적량은 C/N비가 증가하면 상승하여 잔여 균체량의 4배까지 균체 내에 축적할 수 있다는 연구 결과를 얻었다.

요 약

포도당의 초기농도 10, 20, 25, 30, 40, 50g/l 와 NH₄Cl의 초기농도 0.33, 0.4, 0.5, 1.5, 3, 5g/l 의 조합으로 형성된 발효배지를 사용하여 탄소원과 질소원의 초기 조성비 C/N이 각종 발효 변수의 수율 및 PHB 축적량에 미치는 영향을 규명하여 보았다.

탄소원의 소비량에 대한 균체 수율 $Y_{X/S}$ 는 C/N비가 증가함에 따라 대단히 완만하게 감소하였으며 C/N비 70 이상에서는 일정한 값 0.35(g cell biomass/g glucose)를 나타내었다. 잔여균체 수율 $Y_{RX/S}$ 역시 C/N비가 증가하면 감소하며 C/N비 65 이상에서는 일정한 값 0.065(g residual biomass/g glucose)를 나타내었다. 그러나 PHB의 수율 $Y_{PHB/S}$ 는 C/N비의 증가에 따라 상승하여 C/N비 40 내지 60 사이에서 최대수율 0.35(g PHB/g glucose)를 나타내었다.

균체증가량에 대한 PHB의 생성수율 $Y_{PHB/X}$ 는 C/N비의 증가에 따라 증가하나 C/N비 70 이상에서는 일정한 값 0.83(g PHB/g cell mass)을 유지하였다. 또한 잔여균체량에 대한 PHB의 생성수율도 C/N비의 증가에 따라 증가하였으며 탄소원이 더이상 소모되지 않는 상태에서의 건조균체량에 대한 PHB 축적률은 C/N비에 따라 상승하여 최대값 81%에 도달하였다. 이 경우에 대한 C/N값은 67 근방이었으며 이 이상의 C/N비에 대한 PHB의 축적률은 81%로 일정하였다.

감 사

본 연구는 1994년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 대하여 학교 당국에 감사드립니다.

참고문헌

1. P. P. King(1992), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 2.
2. 유전공학(1988), *News Letters*, 252호, 한국유전공학연구소.
3. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Bioeng.*, **24**, 322.
4. In Young Lee, Soo Wan Nam, Eun Soo Choi, Ho Nam Chang and Young Hoon Park (1993), *J. Fermen. Bioeng.*, **76**(5), 416.
5. Beom Soo Kim, Seung Chul Lee, Sang Yup Lee and Ho Ham Chang(1994), *Biotech. Bioeng.*, **43**, 892.
6. 이용우, 유영제(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**(6), 607.
7. Tsuneo Yamane(1993), *Biotech. Bioeng.*, **41**, 165.
8. 이용현, 송미연(1990), *생물화공*, **4**(1), 39.
9. Robert S. Siegel and David F. Oliis(1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 764.
10. F. Srienc, B. Arnold and J. E. Bailey(1984), *Biolech. Bioeng.*, **26**, 982.
11. A. C. Emeruwa and R. Z. Hawirko(1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 989.