

메탄자화균 *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용한 액화 천연가스로부터 poly- β -hydroxybutyric acid(PHB)의 생산

황재웅, 박성훈
부산대학교 공과대학 화학공학과

Production of Poly- β -hydroxybutyric acid(PHB) from Liquefied Natural Gas using an Obligatory Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b

Jae-Woong Hwang and Sunghoon Park†

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

An obligatory methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b was cultivated for the production of poly- β -hydroxybutyric acid(PHB) in shake-flask using liquefied natural gas(LNG) as the sole source of carbon and energy. The maximal specific growth rate decreased by 40% using LNG compared with that obtained with pure methane. This is attributed to the inhibition by ethane and propane present in the LNG as impurities. For the production of PHB, two-stage culture separating the production stage from the growth stage was carried out. PHB accumulation was observed after switching nutrient-sufficient to nutrient-limited condition of non-carboneous component(NO_3^- , PO_4^{3-} , K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , or Mg^{2+}). The limitation of K^+ or Mg^{2+} resulted in relatively high PHB content, but the highest content was obtained by nitrate limitation. The optimal pH and temperature for PHB accumulation was 7.0 and 30°C. Under the optimal condition the maximal PHB content was about 45% after 4-day cultivation.

서 론

지구 환경문제에 대한 인식이 날로 높아 가는 최근의 경향을 볼 때 기존의 석유 화학 원료로부터 생산되는 합성 고분자 사용량의 상당 부분이 머지않아 생분해성 고분자로 대체될 전망이다. 이미 알려진 생분해성 고분자 중에서도 polyhydroxyalkanoate (PHA)는 열가소성 polyester로 물성이 polypropyl-

ene이나 polyethylene 등과 유사하여 가장 유망한 품목이다(1, 2). 그러나 아직까지 상용화된 PHA가 폭넓게 사용되지 못하는 이유는 기존의 석유 화학 제품보다 생산 원가가 높기 때문이다. 단적인 예로 영국의 ZENECA BioProducts에서 생산하는 3HB와 3HV의 공중합체인 Biopol의 경우 현재 가격이 약 \$ 17/kg이나 이와 물성이 유사한 polypropylene은 \$ 1/kg 정도에 불과하다(3). 따라서 생분해성 고분자의 생산 가격을 낮추기 위해서는 값싼 원료의 사용, 고성능 균주나 효율적인 발효 공정의 개

† Corresponding Author

발, 정제 공정의 최적화 등에 관한 연구가 매우 시급하다.

이 중 원료의 측면에서는 원료 가격의 대부분을 차지하고 있는 탄소원이 제일 중요하다. 값싼 탄소원으로 메탄올이나 설탕 등을 이용하는 것이 연구된 바 있는데, 먼저 일본의 Yamane 교수팀은 메탄올 자화균인 *Protomonas extorquens* K를 이용하여 136g/ℓ 라는 고농도의 P(3HB)를 생산하였다고 보고하였다(4, 5). 그러나 PHB의 축적율이나 생산성이 *Alcaligenes eutrophus*보다 낮고, 또 PHB 평균 분자량이 낮은 것도 문제점으로 지적되었다. 설탕을 원료로 하는 공정에 대해서는 1980년대 중반 오스트리아의 Chemie Linz AG사에서 집중적으로 연구하였는데 이들은 *Alcaligenes latus* 배양을 통해 60g/ℓ 이상의 P(3HB) 생산이 가능하다고 보고하였다(6).

원료의 가격을 고려할 때 가장 값이 싼 탄소원은 메탄이다. 대장균이 풍부하고 폐기물의 혐기성 처리 시에도 다양으로 얻어지므로 그 어느 탄소원보다 안정적인 공급이 가능하다는 장점을 갖고 있다. 폐기물 처리공정에 PHB 생성 공정을 연결시킬 경우 폐기물로부터 유용한 고분자를 얻을 수 있으므로 폐기물의 자원화에도 일조를 할 수 있다. 한편 메탄자화균은 1906년 Söhngen에 의해 처음 발견된 후 1970년대 영국의 Whittenbury 등(7)에 의해 다수가 발견되었고 간단한 기질에서 오염의 염려없이 비교적 쉽게 배양할 수 있다는 장점이 있다. 메탄자화균은 또한 난분해성 염소화 용매에 대해 탁월한 분해능을 가지고 있음이 알려지면서 최근 환경 미생물 분야에서 활발한 연구가 진행되고 있다(9, 10).

그러나 PHA 생산과 관련한 메탄자화균의 연구는 1985년 Suk 등의 연구를 제외하고는 거의 전무한 실정이다. Suk 등은 *Methylocystis*, *Methylosinus* 등의 메탄자화균을 이용하여 주로 PHB 생성의 수학적 model을 개발하고자 하였고, 균체 성장을 균체와 PHB 축적 등 2가지 향으로 나누어 수식화함으로써 실험치와 잘 일치하는 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다(11). 그러나 이들은 PHB 생성에 미치는 여러 환경요인이나 배지요인의 영향을 체계적으로 연구하지 않았고, 메탄자화효소 등 메탄자화균에 대한 생리적인 연구도 별로 진척되지 않았던 터라 PHB 생산 균주로서 메탄자화균의 가능성을 제시하기에는 어려움이 있었다. 이에 본 연구에서는 대표적인 메탄자화균의 하나인 *Methylosinus trichosporium*

OB3b를 이용하여 여러 환경조건 및 배지조건에서 메탄으로부터 PHB를 생산하는 공정의 가능성을 조사하였다. 먼저 값싼 산업 기질인 액화 천연 가스(liquefied natural gas, LNG)에서의 균의 배양 특성을 조사하여 이를 순수 메탄 배지에서의 배양 특성과 비교 검토하였고, 이어서 2단 배양을 통하여 환경요인이나 여러 가지 영양원의 결핍에 따른 PHB 축적능이 어떠한가를 알아 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 *M. trichosporium* OB3b는 미국 Lawrence Livermore 국립연구소 생물의학연구부(Biomedical Sciences Division)의 R. T. Taylor 박사로부터 제공받았으며 균체 배양에 사용된 배지는 Higgins 무기 질산염 최소배지(12)의 성분의 양을 약간 조정하여 사용하였다(Table 1). 탄소원으로는 99.99%의 순수 메탄(Iwatani, Japan)과 액화천연가스(LNG, 한국가스공사)를 사용하였다. 한국가스공사가 분석한 LNG의 조성은 Table 2에 나타내었다.

배양은 진탕배양기(Model KMC-8480sf, Vision 과학, 서울)에서 교반속도를 250rpm으로 하여 행하였다. 사용된 플라스크는 300ml 용량의 마개 달린 플라스크였고 플라스크내 균체량을 직접 측정하기 위해 side-arm을 부착하였다(Fig. 1). 배양액 부피는 30ml이었고 균체의 접종량은 0.5ml이었다. 순수 메탄과 공기 또는 LNG와 공기는 종균 접종 후 1:1의 부피비로 0.22 μ m 필터를 통해 주입하였고 각각의 유량은 gas proportioner(Cole-Parmer, U.S.A.)를 통하여 조절하였다.

PHB 축적

PHB의 축적을 위해 2단 배양 방식을 이용하였다. 즉, 1단계에서는 세포의 증식을 목적으로 최적 성장 조건에서 배양하였고 2단계에서는 PHB의 축적을 유도하고자 탄소원 이외의 다른 영양분을 결핍시켰다. 2단계 배양시 배양액 부피는 30ml이었으며 1단계 배양에서 세포농도 0.5~0.7mg/ml의 배양액 30ml를 원심분리하여 각 영양원이 결핍된 배지 30ml에 재현탁하여 30 $^{\circ}$ C에서 진탕하였다. 배양시간은 1단계에서는 48시간, 2단계에서는 36시간으로 고정하였다.

Table 1. Composition and concentration of stock solutions for modified Higgins nitrate minimal salt medium.^a

	g/l
1. 100× salt solution ^b	
NaNO ₃ [or (NH ₄) ₂ SO ₄]	85 [65.8]
K ₂ SO ₄	17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.7
2. 100× Phosphate buffer solution ^b	
KH ₂ PO ₄	53
Na ₂ HPO ₄	86
Adjust solution to pH 7.0	
3. 500× Trace metals solution ^b	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.287
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.223
H ₃ BO ₃	0.062
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.048
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.048
KI	0.083
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
1ml of 1mM H ₂ SO ₄ per liter of trace metals	
4. 500× Iron solution ^b	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	22.4
5ml of 1mM H ₂ SO ₄ per 100ml of iron	

^aCulture medium was made up as follows: Appropriate aliquots of concentrated solutions 1-3 were added to the desired volume of double distilled water and the combined diluted mixture was sterilized by passage through a 0.22µm membrane filter. Separate and filter-sterile iron solution 4 was added aseptically to this mixture.

^bEach stock solution was stored at 4°C after sterilization, except for the phosphate buffer which was stored at room temperature.

Table 2. Typical composition of liquefied natural gas(LNG) used in the present study.

Component	Percentage (v/v)	Component	Percentage (v/v)
Methane	88.99%	n-Butane	0.24%
Ethane	8.64%	i-Pentane	0.02%
Propane	1.81%	n-Pentane	0.01%
i-Butane	0.25%	Nitrogen	0.04%

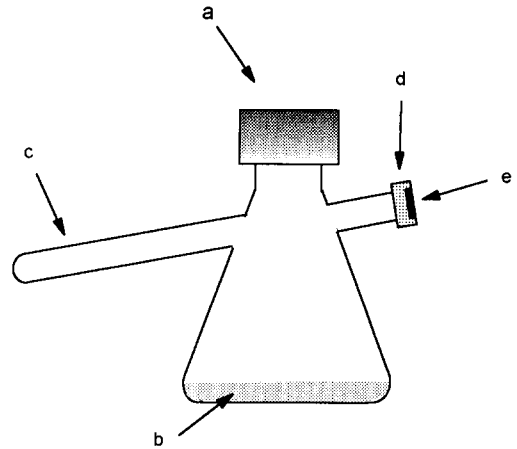


Fig. 1. Schematic diagram of culture flask : a. teflon-sealed cap, b. culture medium(30ml), c. 11mm side-arm, d. open-top-closure cap, e. silicon rubber septum.

분석방법

세포 농도의 측정

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., U.S.A.)를 이용, 파장 660nm에서 흡광도(Absorbance, A660)를 측정하고 미리 구한 검량선으로 보정하여 결정하였다. 1 absorbance unit는 건조 균체중량(dry cell weight, DCW)으로 0.55mg/ml이었다. 건조 균체중량은 배양액 시료를 3번 증류수로 세척하고 100°C에서 12시간 이상 건조시켜 측정하였다.

PHB 분석

Braunegg 등의 방법에 따라 gas chromatography(680D, 영인과학)로 분석하였다(13). 오븐과 검출기의 온도는 각각 130°C와 200°C였고 운반기체는 20ml/min의 질소를 사용하였다. 표준물질로는 D,L-3-hydroxybutyric acid(Sigma Chemical Co., U.S.A.)의 methyl ester를 사용하였다.

결과 및 고찰

LNG에서의 균체성장

메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)는 ethane(LNG 중 약 8.6% v/v)이나 propane(LNG 중 약 1.6% v/v) 등에 의해 경쟁 저해작용

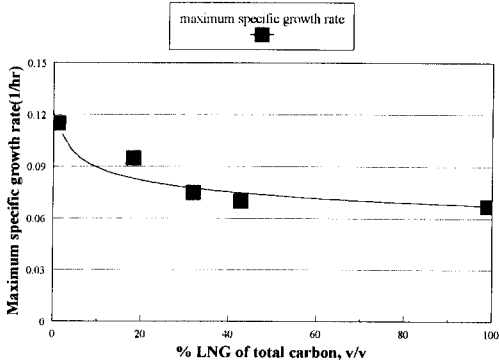


Fig. 2. Effect of inhibitors(mainly, ethane and propane) on maximum specific growth rate of *M. trichosporium* OB3b. Inhibition constant(competitive) was estimated to be 0.12%(v/v).

을 받는다고 알려져 있다(14). MMO는 메탄대사에 관여하는 첫번째 효소이므로 MMO 활성이 낮아지면 균체 성장속도의 감소를 예상할 수 있다. Fig. 2는 LNG 기질에서의 균체 성장속도를 보여준다. 전체적으로 순수메탄 기질에서보다 LNG 기질에서 비성장속도가 감소하였고, 그 정도는 LNG의 조성이 증가할수록 더 컸다. 특히 메탄이 전부 LNG로 대체되었을 때 비성장 속도는 0.07hr⁻¹로 순수 메탄기질의 60% 수준이었다.

LNG 중의 저해제에 대한 저해상수(inhibition constant) K_i는 ethane과 propane 각각에 대하여 측정하여야 하나, ethane과 propane에 대한 K_i 값이 거의 비슷하다는 가정 아래 LNG 전체에 대한 K_i 값을 계산하였다. 경쟁 저해라고 가정하면(14) 비성장 속도는 식 (1)과 같이 주어지고, 여기서 기지의 값인 μ, μ_{max}, S(메탄농도) 그리고 K_s=1.61% (15)를 대입하여 각각의 농도에서 K_i를 구하였다.

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_s(1 + \frac{I}{K_i}) + S} \quad (1)$$

LNG 중 ethane 및 propane은 합한 양이 약 10%이므로, K_i 값을 순수 ethane 및 propane에 대해 환산하면 0.12%이다. 이 값을 Henry constant를 이용하여 용존농도로 계산하면 0.69μM인데 NH₃에 대해 구해진 19.8μM(15)과 비교하면 현저히 낮은 값이다.

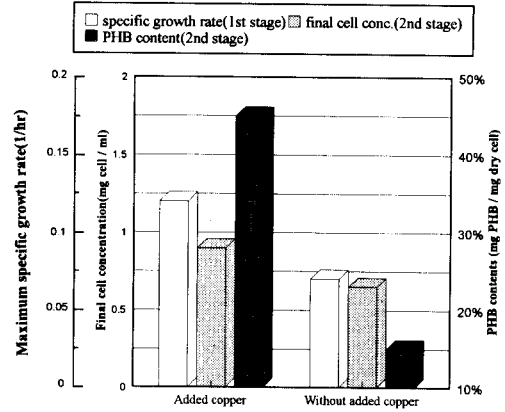


Fig. 3. Effect of copper on cell growth and PHB accumulation with pure methane as carbon source.

PHB 생성에 미치는 구리 이온의 영향

M. trichosporium OB3b와 같은 몇몇 메탄자화균 배양에 있어서 가장 중요한 배지 성분 중의 하나는 구리 이온이다. 이는 배양액 중의 구리 이온의 존재 유무에 따라 methane의 산화에 관여하는 효소인 MMO의 세포내 위치가 달라지기 때문이다(16). 즉 구리가 존재하는 경우에는 MMO가 세포막에서만 생성되고(particulate MMO, pMMO), 반대로 구리 이온이 결핍된 조건에서는 MMO가 세포질 내에서만 생성된다(soluble MMO, sMMO). 이러한 MMO의 세포내 위치에 따라 세포생장에 필요한 NADH 요구량 및 MMO의 활성, 그리고 비성장 속도가 달라진다는 것은 이미 여러 차례 보고된 바 있다(17). 본 실험에서는 MMO의 세포내 위치가 PHB 축적에 미치는 영향을 알아보기 위해 순수 메탄 및 LNG에서 PHB 축적능을 살펴 보았다. PHB 축적을 유도하기 위해서 질소원을 결핍시켰다. Fig. 3은 순수 메탄 배양의 결과를 보여주는데 10μM의 구리 이온이 첨가된 경우, 비성장 속도, 최종 세포농도 그리고 PHB 축적능이 구리 이온이 첨가되지 않은 경우와 비교하여 현저히 증가함을 알 수 있었다. 특히, PHB 축적의 경우 구리 결핍조건에서는 15%, 구리 첨가조건에서는 45%로 구리 이온을 첨가한 경우가 3배 가량 높았다. LNG에서 배양하였을 때도 PHB 축적량은 Fig. 3과 유사한 결과를 보였다(Fig. 4 참조). 이는 PHB 축적이 생체내 에너지가 풍부한 조건에서 합성이 잘되기 때문에 상대적으로 NADH

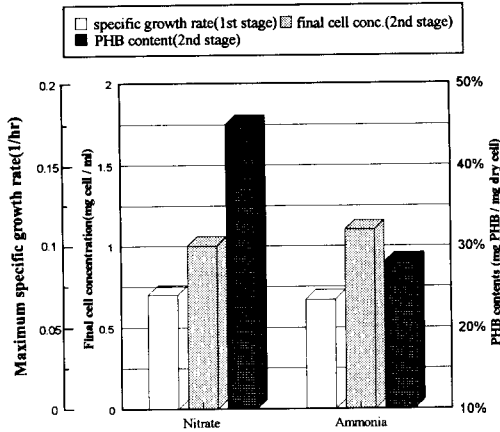


Fig. 4. Effect of type of nitrogen source on cell growth and PHB accumulation with LNG as carbon source.

소모량이 증가하는 sMMO에서는 PHB 합성이 잘 이루어지지 않는 것으로 추정된다. 이 결과를 바탕으로 이후의 모든 실험에서는 배양액 중에 구리 이온을 첨가하였다.

질소원과 기질전환에 따른 PHB 축적

Fig. 4는 질소원의 종류가 *M. trichosporium* OB3b의 성장 및 PHB 축적에 미치는 영향을 보여 준다. 탄소원으로는 LNG가 사용되었고, 1단계 배양은 질소원이 풍부한 조건에서 그리고 2단계 배양에서는 질소원이 결핍된 조건에서 진행되었다. Fig. 4가 보여주는 대로 1단계 배양에서의 균체 성장 속도나 2단계 배양 후 최종 균체량은 질소원의 종류에 관계없이 거의 동일하였다. 그러나 2단계 배양시 PHB 축적량은 질산염 배지의 경우 약 45%이고 암모늄 배지의 경우 약 30%로 질산염 배지가 월등히 좋은 결과를 보였다. 이러한 PHB 축적량의 차이는 메탄 대사의 첫 단계에 관여하는 균체내 MMO 활성이 암모늄 배지에서는 질산염 배지의 경우보다 약 50% 낮아지는 것과 어떤 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다(7, 8). 왜냐하면 낮은 MMO 활성은 2단계 배양에서 메탄의 uptake 속도를 낮추게 하는 요인이 되고 그만큼 PHB 축적율을 나쁘게 할 수 있기 때문이다. 그러나 보다 근본적으로 PHB 생합성에 관여하는 효소들이 질소원의 종류에 영향을 받을 가능성도 배제할 수 없다.

Fig. 4에서 또 한 가지 지적할 수 있는 것은 LNG

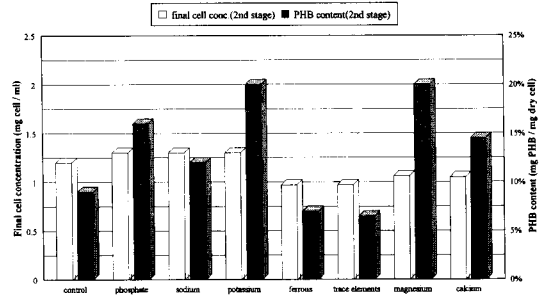


Fig. 5. Effect of the elimination of phosphate, sodium, potassium, ferrous, trace elements, magnesium or calcium on cell growth and PHB accumulation. For the medium composition, see Table 1.

기질에서 2단 배양 후 PHB 축적량이 순수 메탄의 경우와 거의 차이가 없다는 사실이다. 앞서 Fig. 2에서 언급한 대로 1단계 배양시 균체 성장속도는 감소하였으나 2단계 배양 후 균체량이나 PHB 축적량은 순수 메탄의 경우와 비슷한 수준으로 이는 PHB 생산을 목적으로 할 때는 값싼 산업기질인 LNG를 별도의 정제과정없이 사용하여도 좋다는 증거가 된다. 이후의 실험은 모두 LNG를 사용하였다.

각종 영양원 결핍에 따른 PHB 축적

대부분의 미생물에서 PHB 합성을 유도할 때 질소원 결핍조건을 가장 많이 이용한다(18, 19). 이는 질소원이 결핍되었을 때 PHB 축적율이 가장 높기 때문이다. 그러나 몇몇 미생물에서는 질소원보다 나트륨, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘 결핍조건이 더 높은 PHB 축적율을 보여준다고 알려져 있다(20). 본 실험에서도 2단계 배양을 통해 인산염, 나트륨, 칼륨, 마그네슘 등을 결핍시켜가며 질소원 이외의 영양원 결핍에 따른 PHB 축적의 영향을 조사하였다(배지조성에 관하여는 Table 1을 참조). Fig. 5가 보여주는 대로 영양원이 결핍되지 않은 배지에서 배양한 비교 표준의 경우 최종 균체 농도는 1.3mg DCW/ml로 높았으나 PHB 축적율은 8%로 저조하였다. 칼륨이나 마그네슘 결핍의 경우 PHB 축적율이 20%로 다른 영양원 결핍 조건보다는 상대적으로 높은 값을 보였으나 앞서 Fig. 3이나 4의 질소원 결핍 조건에 비해 낮은 값을 보였다.

한편 Fig. 6에서는 영양원이 2중 결핍(dual defi-

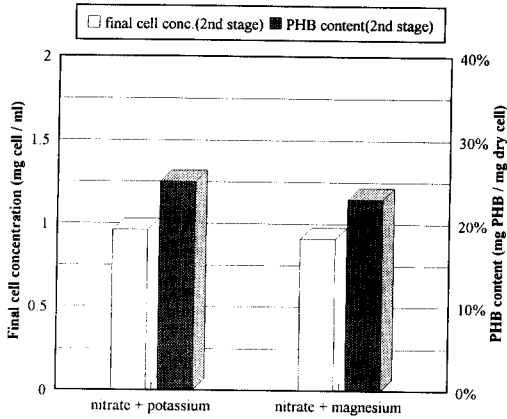


Fig. 6. Effect of dual deficiency in potassium plus nitrate and magnesium plus nitrate on cell growth and PHB accumulation.

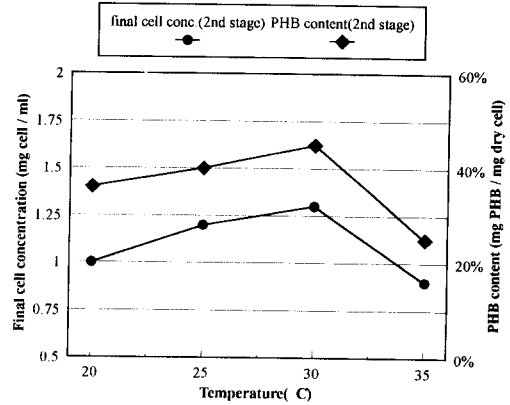


Fig. 8. Effect of temperature on PHB synthesis in nitrogen-limited cultivation of *M. trichosporium* OB3b.

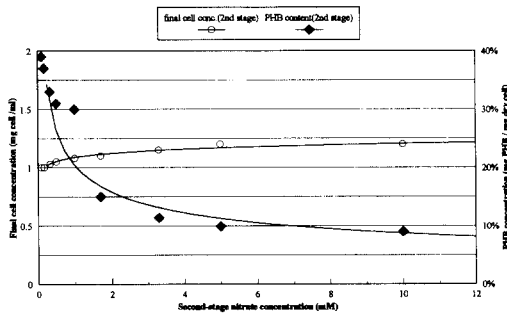


Fig. 7. Effect of the second-stage nitrate concentration on cell growth and PHB accumulation.

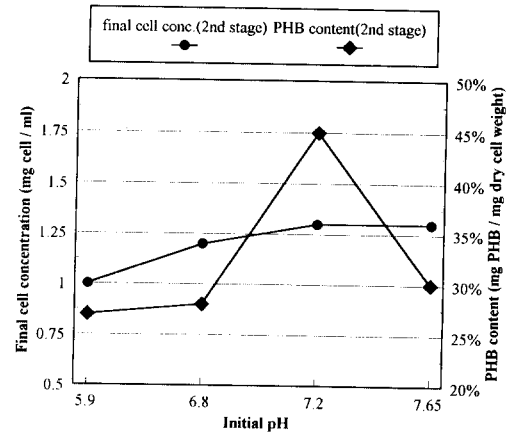


Fig. 9. Effect of pH on PHB synthesis in nitrogen-limited cultivation of *M. trichosporium* OB3b.

ciency)되었을 때 PHB 축적을 변화를 알아보기 위해 PHB 축적율이 높은 칼륨 혹은 마그네슘을 질소원과 동시에 결핍시켜 보았으나 PHB 축적율은 25% 내외로 질소원 단독 결핍조건보다 낮았고, 최종 세포농도 역시 1.0mg DCW/ml로 저조하였다.

초기 질소원 농도에 따른 PHB 축적

*A. eutrophus*는 질소원이 완전히 결핍된 경우보다 미량의 질소원이 첨가된 경우에 오히려 PHB를 더 많이 축적한다고 알려져 있다(18, 19). 이에 본 실험에서는 2단계 배양의 초기 질소원 농도의 영향을 0.1mM~10mM 범위에서 실험하였다. Fig. 7에서 나타난 바와 같이 질소원의 농도가 감소할수록 PHB 축적율은 증가하였으며 특히 질소원을 1mM

이하로 줄여 준 경우 급속히 PHB 축적율이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 질소원을 완전히 결핍시킨 경우에 비해 축적율이 저조하였다. 또한 질소원이 감소하여도 최종 세포 농도는 크게 변화하지 않음이 관찰되었는데, 이는 본 균주에 존재하는 nitrogenase의 영향 때문으로 추정된다. 즉 *M. trichosporium* OB3b는 배지 중에 질소원이 완전히 결핍된 경우에도 세포 성장과 PHB 합성을 위한 질소원을 공기 중의 질소가스로부터 직접 공급받기 때문에 (21) 그렇지 못한 미생물과는 달리 질소원이 완전히 결핍된 조건에서도 균의 성장이 가능하며, PHB 축

적을 위한 대사활성도 충분히 유지된다는 뜻이다. 일반적으로 PHB 생산을 위해 최적의 질소원 농도를 유지시켜 주는 것이 어렵다는 사실을 감안할 때 메탄자화균이 질소고정 능력을 가지고 있다는 것은 산업적인 응용면에서 볼 때 상당한 장점이라고 할 수 있다.

온도와 pH에 따른 PHB 축적

질소원 결핍조건에서 2단 배양을 하며, 각각의 온도에 대한 PHB 축적율과 최종 세포농도를 알아 보았다(Fig. 8). PHB 축적율과 최종 세포농도는 30°C에서 최적을 나타냈는데, 이는 균체 최적 성장 온도인 30°C에서 PHB 축적율도 가장 좋다는 뜻이다. pH 역시 성장 최적 조건인 pH 7.0 부근에서 최적의 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 9). 2단 배양 기간 동안 배지내 pH의 변화는 무시할 정도로 작았다.

요 약

생분해성 고분자의 생산 단가를 낮추기 위해 값싼 원료인 LNG와 강제성 메탄자화균인 *M. trichosporium* OB3b를 이용하여 PHB 생산 가능성을 검토하였다. 중요한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 산업용 기질인 LNG를 메탄 원료로 사용한 경우 LNG 중의 에탄과 프로판에 의해 비성장 속도가 감소하였으나(저해상수 $K_i=0.12\%$) PHB 생성에는 영향을 주지 않았다.

2. 배양액 중 구리 이온이 결핍되면 PHB 축적은 현저히 감소하였다.

3. 각종 영양원 결핍조건에서 PHB 축적능을 시험하였을 때, 칼륨, 마그네슘, 그리고 질소원 결핍이 높은 PHB 축적율을 보였고, 특히 질소원의 경우 최고 45%의 축적율을 보였다.

4. 최적의 질소원/탄소원의 비는 존재하지 않았고, 질소원의 농도가 낮을수록 PHB 축적율은 증가하였다.

5. PHB 축적을 위한 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 7.0이었다.

감 사

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **54**(4), 450.
2. Y. Doi(1990), *Microbial polyester*, VCH, New York.
3. D. Byrom(1987), *Trends Biotechnol.*, **5**, 246.
4. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.
5. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370.
6. U. J. Hangii(1990), Pilot Scale Production of PHA with *Alcaligenes latus*. In : *Novel Biodegradable Microbial Polymers*(Ed. Dawes E. A.), p. 65, Kluwer Publishers, Dordrecht.
7. R. Whittenbury, K. C. Phillips, and J. F. Wilkinson(1970), *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205.
8. J. G. O'Neill, and J. F. Wilkinson(1977), *J. of Gen. Microbiol.*, **100**, 407.
9. H. C. Tsien, G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228.
10. L. Alvarez-Cohen and P. L. McCarty(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228.
11. J. A. Asenjo and J. S. Suk(1986), *J. Ferm. Technol.*, **64**, 271.
12. A. Cornish, K. M. Nicholls, D. Scott, B. K. Hunter, W. J. Atton, and I. J. Higgins(1984), *J. Gen. Microbiol.*, **38**, 127.
13. G. Brauneegg, B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty(1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29.
14. C. Anthony(1985), *The Biochemistry of Methylotrophs*, Academic Press, N. Y.
15. 황재웅(1996), *Methylosinus trichosporium* OB3b를 이용한 poly- β -hydroxybutyric acid의 생산. 석사학위논문, 부산대 대학원.
16. K. J. Davis, A. Cornish, and I. J. Higgins (1987), *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 291.
17. M. S. Kang, J. W. Hwang, and S. Park (1994), p. 109, *Proceeding of Bioprocess Engineering Center International Symposium*, Taejeon.
18. Y. W. Lee and Y. J. Yoo(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 607.

19. Y. W. Lee and Y. J. Yoo(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 186.
20. J. H. Choi, J. H. Kim, M. Daniel, and J. M. Lebeault(1989), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 392.
21. N. N. Shah, S. Park, P. T. Taylor, and M. W. Droege(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 705.