

## 균형 생육조건하에서 *Actinobacillus* sp. EL-9에 의한 Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate의 생산

손홍주 · 이상준\*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

**Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate by *Actinobacillus* sp. EL-9 under Balanced-Growth Conditions.**  
**Hong-Joo Son and Sang-Joon Lee\***. Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - Microorganisms growing alcoholic distillery wastes were isolated from soil. Of them, the selected strain EL-9 had a capability of accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) when grown in alcoholic distillery wastes. The strain EL-9 was identified as a genus *Actinobacillus* based on the morphological, cultural, and biochemical characteristics. The strain EL-9 was named temporarily as *Actinobacillus* sp. EL-9. The optimal temperature and pH for cell growth of *Actinobacillus* sp. EL-9 were 30°C and 7.0, respectively. The optimal medium compositions for cell growth comprised glucose 2%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.15%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.25%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.003% and trace element solution 5 ml/l. To investigate the optimal conditions for PHB production, two-stage culture technique was used. The result showed that the optimal conditions for PHB production are identical those for cell growth. When propionic acid was added as a cosubstrate, PHB/HV copolymer was produced.

현대문명을 소위 '플라스틱 문명'이라 일컬을 만큼 우리의 일상생활에서 플라스틱은 없어서는 안될 재료로서 이용되고 있으나, 현재 합성플라스틱 폐기물에 의한 환경오염문제가 심각해 짐에 따라 합성플라스틱을 자연계에서 생분해가 가능한 물질로 대체하기 위한 기초적인 연구가 많이 진행되고 있다. 많은 생분해성 고분자중에서 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB)는 우수한 생분해성, 인체조직 적합성, 서방성, 자외선에 대한 안정성을 가지고 있기 때문에 일찌기 합성플라스틱의 대체 물질로서 각광을 받고 있으며, 화장품 산업 등에서 활용 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(1).

다양한 세균을 대상으로 PHB를 생산하려는 연구가 많이 진행(2)되고 있는데 대부분이 포도당, 메탄올, propionate 등과 같이 화학적으로 합성된 기질을 대상으로 그 연구가 진행되고 있으며, 산업폐기물을 발효기질로 하여 PHB를 생산하려는 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. Ramsay 등(3)은 나일론 제조시 배출되는 폐액을 발효기질로 하여 *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium lepus*, *Pseudomonas cepacia* 등으로부터 생물유화제, biopolymer, 효소의 합성 가능성을 타진하였다. 그러나 0.35%(v/v) 이상의 농도에서 세균의 생육이 저해됨을 밝힌 후, 나일론 제조시 배출되는 폐액이 제한된 산업공정에서 잠재적 발효기질로서 이용할 수 있을 것이라고 보고하였다. Bertrand 등(4)은 *Pseudo-*

*monas pseudoflava*에 의하여 lignocellulosic biomass의 구성당인 5탄당으로부터 건조균체량의 17~22%에 해당하는 PHB 축적율을 얻을 수 있었다고 보고하였다. 미국에서는 연간 435백만 파운드의 농업폐기물과 280억 파운드의 liquid cheese whey가 폐기된다. Young 등(5)은 농업폐기물과 liquid cheese whey의 주성분인 xylose와 lactose를 기질로 하여 *Pseudomonas cepacia*로부터 건조균체량의 50%에 해당하는 PHB를 얻을 수 있었다고 하였다.

이와같이 산업폐기물을 이용하여 PHB를 생산하려는 연구가 몇 편이 있으나 산업폐기물에 직접 세균을 증식시켜 PHB를 생산한 것이 아니고, 앞에서 서술한 바와 같이 화학적으로 합성된 각각의 구성성분을 기질로 하여 PHB의 생산성을 검토하였기 때문에 실제로 산업폐기물에 적용시켰을 때에는 동일한 효과를 나타내지 못할 것으로 사료된다.

그러므로 산업폐기물로부터 직접적으로 PHB를 생산할 수 있는 세균의 검색은 값싼 원료의 사용으로 인한 생산원가의 감소와 함께 환경정화(bioremediation) 및 유용물질의 생산이라는 여러가지 장점이 있을 것으로 사료된다.

여러가지 산업폐기물중 특히, 주정공장에서 배출되는 폐액에는 고농도의 유기물이 함유되어 있으나 수질오염 방지시설의 설치비, 운전비의 부담 및 설치 부지 확보의 어려움 등으로 인하여 산업체에서는 이를 완벽하게 처리하지 못하고 있는 실정인만큼 심각한 수질오염의 원인이 되고 있다. 현재 국내의 약 10여개의 주정공장에서 연간 배출되는 폐기물량은 1,300만 D/M으로서, 폐수의

\*Corresponding author.

Key words: *Actinobacillus* sp., poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), balanced-growth conditions, alcoholic distillery wastes

수질은 폐수의 종류에 따라 다르지만 BOD, COD 등이 모두 20,000 mg/l 이상이기 때문에 환경보전법 기준치 이하로 정화하는데 많은 어려움과 비용을 요구한다. 따라서 주정종류 폐액을 미생물의 배지로 이용하면 폐액중의 유기물을 미생물이 흡수하여 생육에 필요한 에너지원으로 이용함으로써 폐액중의 유기물 및 COD, BOD를 줄이게 된다. 동시에 미생물의 균체성분을 대량으로 회수하여 동물의 사료에 첨가하는 단세포 단백질 등의 유용자원 및 미생물이 생산하는 유용 대사산물을 획득할 수 있으므로 일석이조의 경제적인 방법이 될 것이다(6).

이러한 목적을 가지고 본 연구실에서는 주정종류 폐액을 기질로 하여 PHB를 생산하는 세균을 자연계로부터 분리하였다. 따라서 본 연구에서는 주정종류 폐액에서의 PHB 생산을 검토하기 전에 우선 분리균주의 기초적인 생리적 특성을 파악하기 위하여 무기염 배지에서의 생육특성 및 PHB 생산 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### PHB 생산균의 분리

경남 양산 및 울주지역의 토양과 하천수, 부산 하수종말처리장의 활성오니 등을 무작위로 채취하여 PHB 생산균주를 분리하기 위한 시료로 사용하였다. 시료를 적당하게 희석하여 YM 배지에 배양하여 형태가 다른 집락들을 분리한 후, 생육이 빠른 집락들을 선별하고, 다시 농화배양에 의하여 순수분리하였다. 순수분리된 각 집락들을 주정종류 폐액(pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 24시간 회전진탕배양한 후, 생육이 우수한 균주를 다시 선별하였다. 선별된 균주는 각각의 배양액으로부터 균체를 수거하여 GC로 PHB 생산능을 조사하고, 그 중에서 PHB 생산능이 가장 우수한 균주를 공시균으로 선정하였다.

### 분리균의 분류 및 동정

공시균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 Cowan(7)의 방법, Macfaddin(8)의 방법에 준하여 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(9)에 따라 동정하였다.

### 균체 생육 최적조건의 검토

일반적으로 PHB는 질소, 인, 황, 산소 등의 특정 영양원이 결핍된 불균형 영양조건에서 균체의 내부에 축적되는 것으로 알려져 있다(2, 10). 따라서 PHB 생산을 증가시키기 위해서는 일차적으로 균체를 대량으로 증식시켜야 한다. 이에 따라 균체의 생육 최적조건을 검토하기 위하여 배양온도, pH, 탄소원, 질소원 및 각종 무기염의 변화에 따른 생육도를 측정하였다. 이때

사용한 기본배지의 조성은 glucose 1%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.2%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.45%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0005%, 미량원소 4 ml( $\text{H}_3\text{BO}_3$  600 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  400 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  60 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  60 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  20 mg per liter)이었다.

### PHB 생산 최적조건의 검토

PHB 생산에 영향을 미치는 요인을 검토하기 위하여 2단계 배양법을 사용하였다. 즉 생육 최적배지에서 21 시간동안 배양한 후, 원심분리에 의하여 무균적으로 균체를 회수하였다. 이 균체를 멸균된 생리식염수로 2번 세척한 후, 각종 영양원의 결핍에 따른 2차 배양을 실시하고 최종적으로 얻어진 균체를 회수하여 균체내에 축적된 PHB를 정량하였다.

### 생육 최적조건하에서의 PHB 생산의 검토

상기 실험결과에 의해 2단계 배양을 실시하지 않고, 생육 최적배지를 기본배지로 하여 회분배양하면서 건조균체량, PHB의 축적율을 조사하였다. 또한 1차 배양시 PHB 생산에 대한 C/N molar ratio의 영향 및 propionic acid를 2차 탄소원으로 첨가하여 PHA copolymer 합성유무를 검토하였다.

### 분석방법

생육도의 측정은 분광광도계를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 측정하였거나, membrane filtration method에 의한 건조균체량(dry cell weight : DCW)으로 직접 cell mass를 측정하였다. PHB 정량은 GC로 실시하였으며, GC 분석을 위한 균체의 전처리는 Braunnegg(11)의 방법에 준하여 실시하였다. 이때 사용한 GC는 HP-5890A였으며, 컬럼은 10% Carbowax 20M-ON glass를 사용하였고, 운반기체는  $\text{N}_2$ , oven temperature는 160°C, 유속은 30 ml/min, 시료의 주입량은 2  $\mu\text{l}$ 였으며, 불꽃이온화검출기를 사용하였다. 표준 PHB는 Sigma 제품을 사용하였다.

### PHB의 정제 및 조성분석

균체를 아세톤으로 건조시킨 후, 유발에서 파쇄하여 클로로포름(60°C)에 정치하여 PHB를 추출시켰다. 추출액을 여과지에서 여과한 후, 여액에 메탄올(4°C)을 첨가하여 PHB를 침전시키고 다시 아세톤과 에테르로 세척하였다. 이 과정을 수회 반복하여 PHB를 정제하고, GC로 시료의 정제피크를 확인한 후,  $^{13}\text{C}$ -NMR로 PHB의 조성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### PHB 생산균의 분리 및 동정

Table 1. Taxonomical characteristics of EL-9 strain

Contents	Characteristics
<i>Morphological characteristics</i>	
Cell shape	Rod with rounded ends
Cell size ( $\mu\text{m}$ )	2.0~2.5 by 3.0~3.5
Gram stain	Negative
Spore formation	Not formed
Motility	Non-motile
Cell division	Simple division
<i>Cultural characteristics</i>	
Colony shape on nutrient agar plate	Irregular, flat, undulate
Colony surface color	Smooth to rough
opacity	White to light brown
Gelatin liquefaction	Opaque
<i>Biochemical characteristics</i>	
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalase	+
Cytochrome oxidase	+
OF	Fermentation
Acid production from glucos	+
Growth on MacConkey agar	-
Growth in KCN broth	+
Starch hydrolysis	+
Nitrate reduction	+
Casein hydrolysis	-
Urease	+
Arginine dehydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
ONPG	-
Esculin hydrolysis	+
Indole production	-
H <sub>2</sub> S production	-
VP reaction	-
Methyl red reaction	-
Growth at 4.5% NaCl	-

토양시료로부터 주정종류 폐액에서 생육하는 7균주를 분리하였는데, 그중 3균주는 효모였으며 나머지 4균주는 세균이었다. 분리한 세균중 우수한 생육을 나타내고, 건조균체량당 가장 많은 PHB를 생산하는 EL-9를 공시균으로 선정하여 분류학적 위치를 검토한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 공시균 EL-9는 그람 음성의 간균으로서 연쇄상으로 배열하였으며, 운동성을 나타내지 않았다. 포자는 형성하지 않았고, simple division으로 분열하였다. 배양기간이 경과함에 따라 간균

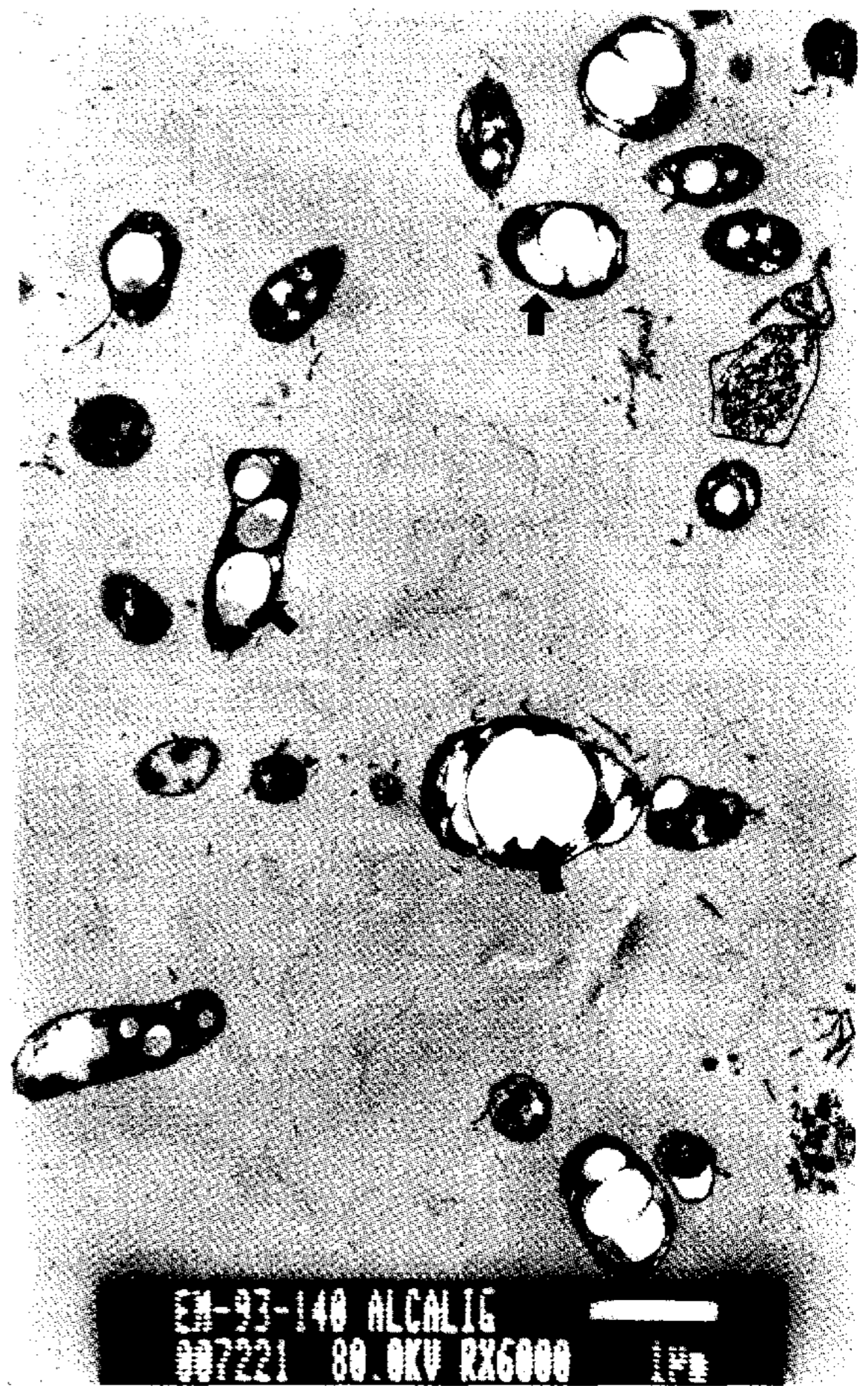


Fig. 1. Electron micrograph of ultrathin section of EL-9 strain containing PHB granules. Arrows indicated PHB granules.

에서 구균에 가까운 단간균의 형태를 나타내어 본 균주는 pleomorphism임을 알 수 있었다. 영양한천 평판배지에서의 집락은 불규칙한 irregular(露積狀)으로서 표면 전체가 편평한 flat형이었고, 주변부는 undulate(波狀)이었다. 집락의 표면은 배양기간이 경과할수록 smooth에서 rough로 변화하였다. 또한 균체내에 PHB 과립이 축적되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). Arginine dehydrolase, catalase, oxidase, urease 등을 가지고 있었으며 indole, H<sub>2</sub>S 등은 생산하지 못하였다. Lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase 등은 가지고 있지 않았으며 VP, MR test에서는 음성을 나타내었다. 전분과 esculin은 가수분해할 수 있었으나, casein은 가수분해하지 못하였다. 질산염을 환원할 수 있었고, oxidation-fermentation test에서 fermentation을 나타내었다. 이상의 실험결과를 비교 검토한 결과 본 공시균은 *Actinobacillus* 속으로 동정되어 편의상 *Actinobacillus* sp. EL-9로 명명하였다.

따라서 *Actinobacillus* sp. EL-9를 이용하여 주정종류 폐액으로부터 PHB를 생산함은 폐자원을 이용한 유용물질의 생산 즉, 산업 폐기물에 의한 환경오염원(수질오염원)의 1차적인 제거와 환경오염 대체물질의 생산

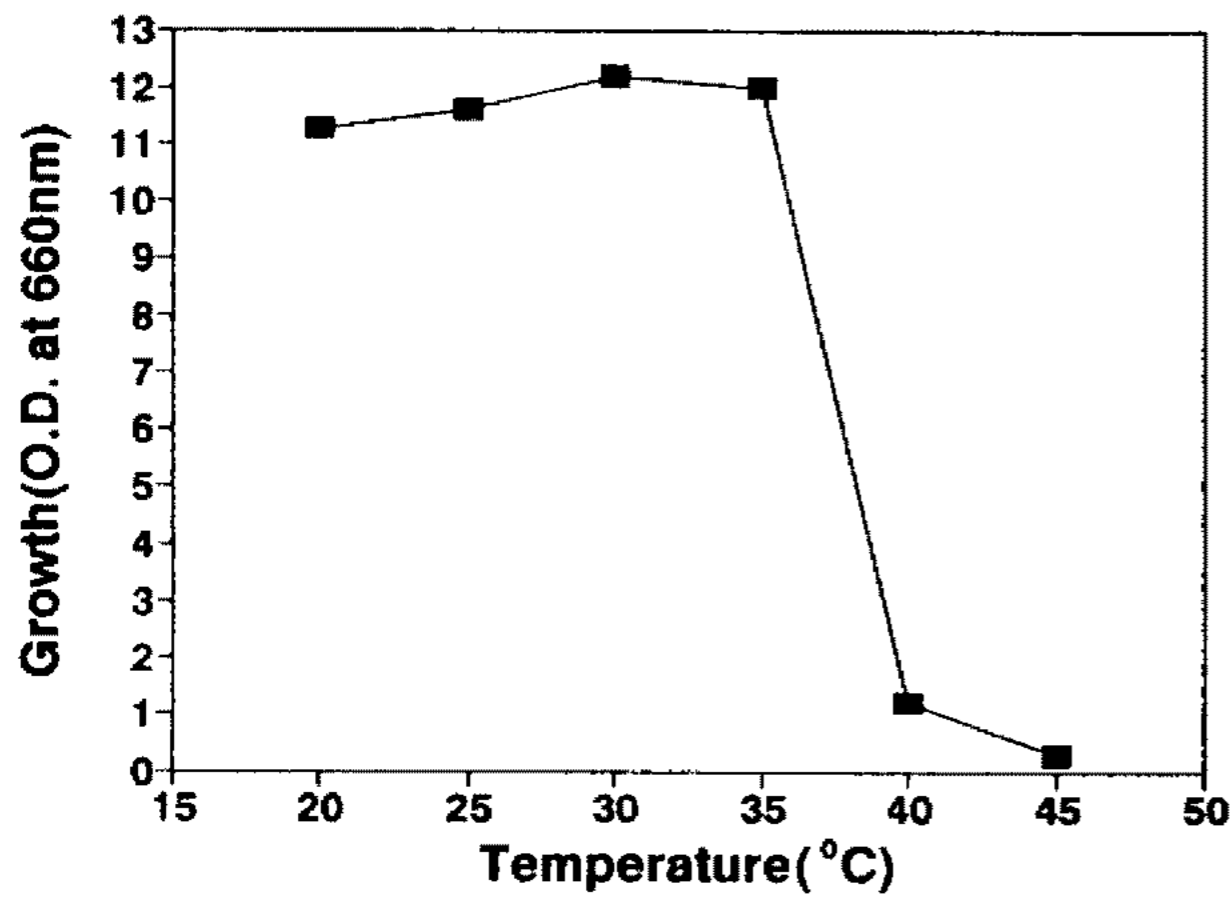


Fig. 2. Effect of temperature of the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

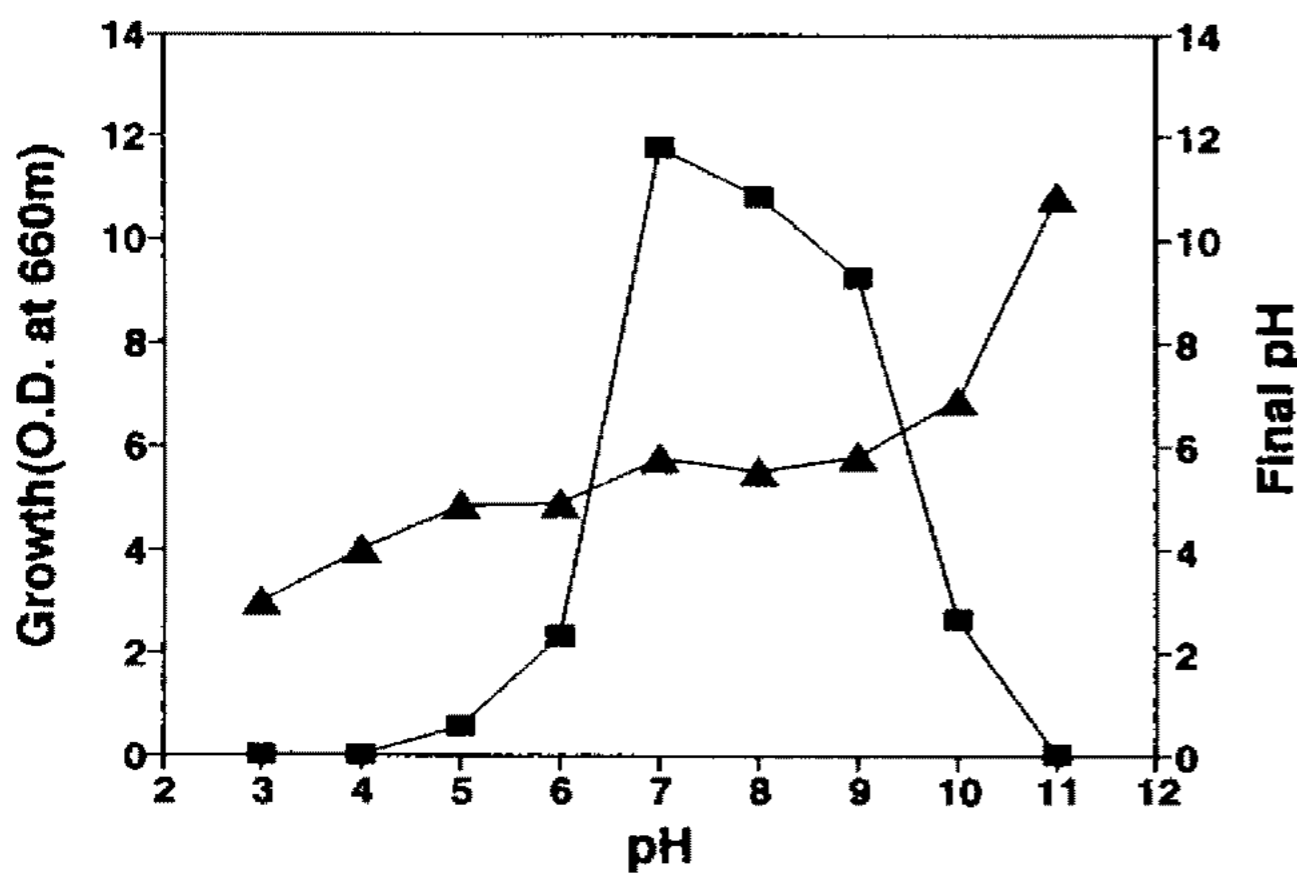


Fig. 3. Effect of pH of the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

—■—; growth, —▲—; final pH.

이라는 여러가지의 가능성을 제시하고 있다고 하겠다.

**균체 생육 최적조건**

세포내 에너지 저장물질인 PHB의 생산을 위하여 먼저 균체의 생육 최적조건을 검토하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 본 공시균은 20~35°C의 범위에서 생육이 우수하였고, 40°C 이상에서는 생육이 급격히 감소하는 경향을 보였으며 최적 배양온도는 30°C였다(Fig. 2). 또한 pH 7.0에서 가장 우수한 생육을 나타내었으며, pH 4.0 이하와 11.0 이상에서는 전혀 생육하지 못하였다. 22시간동안 배양한 후 최종 pH를 측정된 결과, 생육이 양호하였던 pH 7.0과 8.0의 경우 pH가 5.0대로 감소(Fig. 3)하였는데, 이것은 공시균의 대사결과 생성된 산에 기인하는 것으로 사료된다.

생육 최적 탄소원을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 기본배지에 1%씩 첨가하여 pH 7.0, 30°C에서 배양한 후, 생육도를 측정된 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 알코올류에서는 거의 생육하지 못했으며 mannose, lactose, sorbitol 등도 낮은 생육을 보였다. 가장 우수한

Table 2. Effect of carbon sources on the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

Carbon sources (1%)	OD at 660 nm
None	0.096
Glucose	11.16
Fructose	5.568
Galactose	4.608
Mannose	1.21
Arabinose	7.793
Xylose	2.432
Lactose	1.088
Maltose	9.733
Sucrose	10.76
Cellobiose	2.108
Trehalose	11.98
Starch	7.72
Sorbitol	1.488
Mannitol	6.784
Glucosamine	0.495
Methanol	0.513
Ethanol	0.491
Propanol	0.492

Culture was carried out in basal salt medium containing 0.2% NH<sub>4</sub>Cl as a nitrogen source at 30°C and pH 7.0.

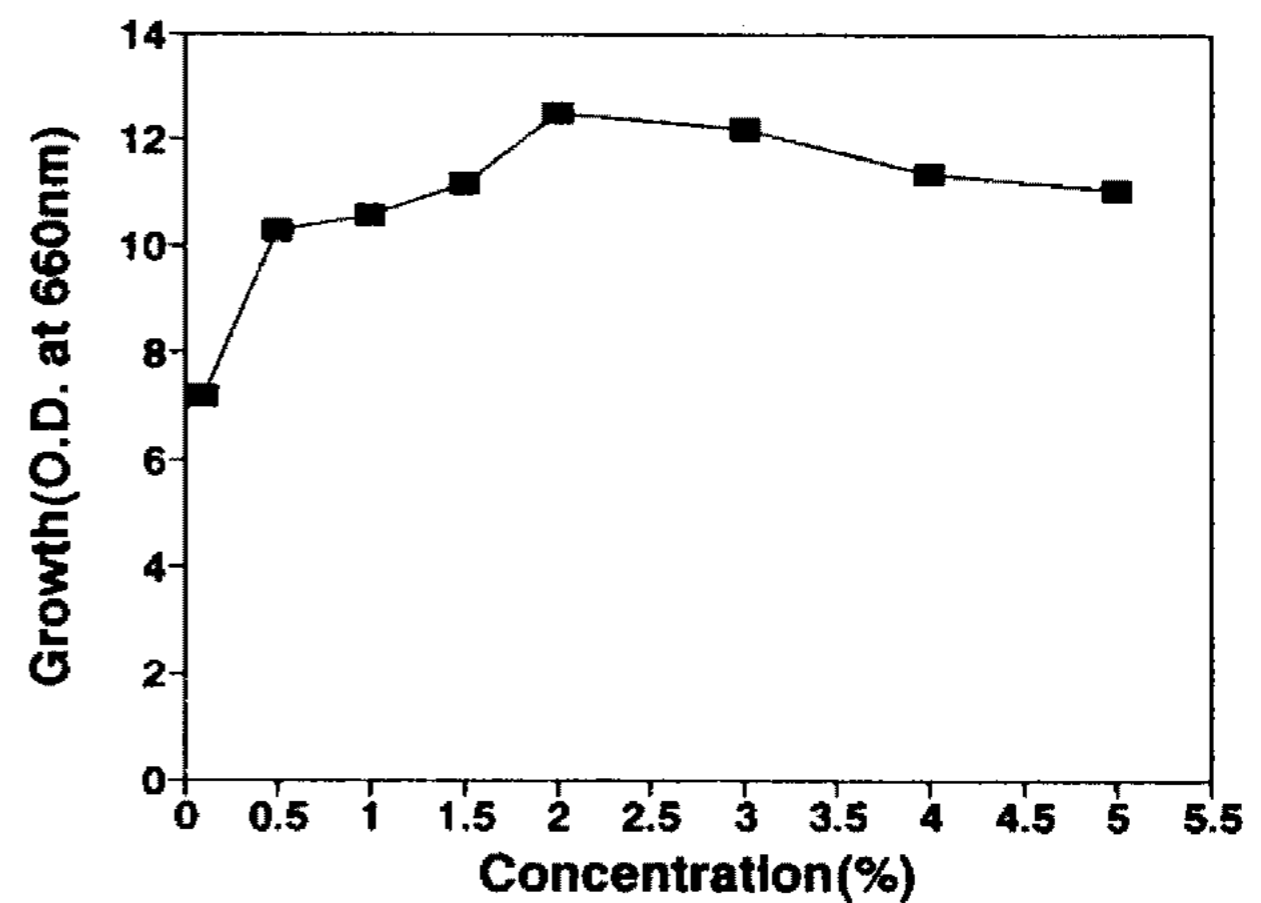


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

생육은 trehalose에서 나타났으며 포도당, sucrose, maltose 등에서도 높은 생육을 나타내었다. Trehalose와 거의 같은 수준의 생육을 나타내며 가격이 비교적 저렴한 포도당을 최적 탄소원으로 선정하여 생육 최적농도를 측정된 결과, 2%에서 가장 생육이 우수하였다(Fig. 4). 생육 최적 질소원을 조사하기 위하여 탄소원으로 2%의 포도당이 함유된 기본배지에 각종 질소원을 0.2%씩 첨가하여 배양한 후, 생육도를 측정 한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 yeast extract, polypeptone, bactopectone 등의 유기 질소원에서 생육이 우수하였

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

Nitrogen sources (1%)	OD at 660 nm
None	0.102
NH <sub>4</sub> Cl	10.84
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.944
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12.208
KNO <sub>3</sub>	1.944
NaNO <sub>2</sub>	0.788
NaNO <sub>3</sub>	2.209
Malt extract	1.422
Yeast extract	16.728
Polypeptone	16.256
Bactopeptone	12.943
Urea	7.408
Arginine	1.984

Culture was carried out in basal salt medium containing 2% glucose as a carbon source at 30°C and pH 7.0.

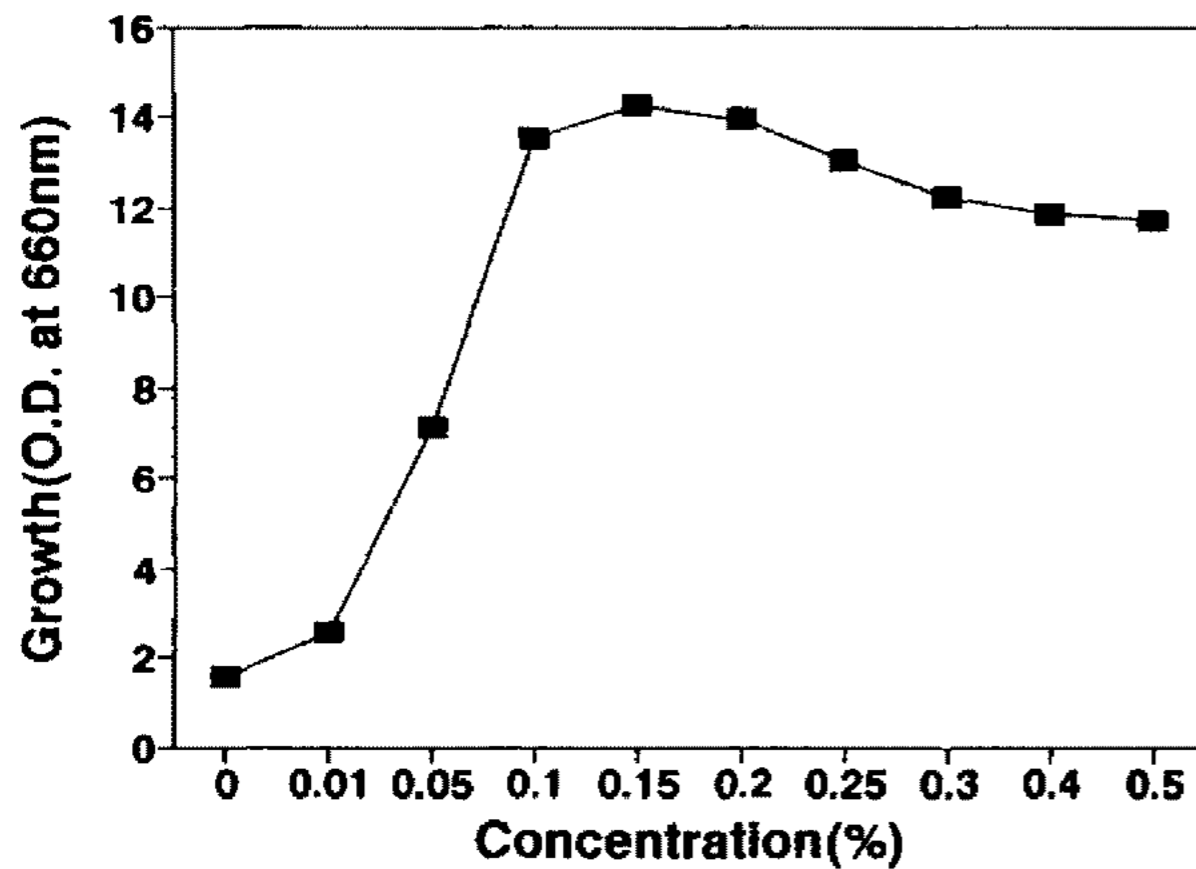


Fig. 5. Effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentration on the growth of *Actinobacillus* sp. EL-9.

으며, 무기 질소원인 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl 등에서도 비교적 생육이 양호하였다. 대량발효시 경제적인 측면을 고려하여 선정된 질소원인 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 생육 최적농도를 측정된 결과 0.05% 이하에서는 생육이 저조하였으나, 0.1% 이상의 농도에서는 비교적 생육이 양호하였다. 그중 가장 생육이 우수한 0.15%를 최적 질소원 농도로 선정하여 이후의 실험을 실시하였다(Fig. 5). 기본배지를 구성하는 각종 무기염 및 미량원소 용액의 최적농도를 조사한 결과, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 모두 0.25%에서 최적 생육을 나타내었으며, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 경우 0.15%에서 가장 우수한 생육도를 나타내어 기본배지보다 상당히 높은 농도가 생육에 필요함을 알 수 있었다. 반면 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O와 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O는 각각 0.005%, 0.003%를 최적농도로 요구하였으며, 미량원소 용액은 5 ml/l일 때 생육이 가장 우수하였다(미제시).

Table 4. Effect of deficient-nutrients on cell mass and PHA production of *Actinobacillus* sp. EL-9.

Deficient-nutrients	Dry cell weight (g/l)*	PHB content (wt.%)**	PHB weight (g/l)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1.859	19.5	0.361
Na <sup>+</sup>	3.676	23.9	0.879
K <sup>+</sup>	3.905	22.3	0.863
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4.21	22.5	0.947
Mg <sup>2+</sup>	4.178	22.9	0.959
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4.264	22.5	0.961
Ca <sup>2+</sup>	4.159	22.3	0.927
Control	4.285	22.6	0.968

\*Initial concentration of resuspended cells was adjusted to 1.2 g/l and the culture as carried for 24 hours.

\*\*Indicated as the percentage per dry cell weight.

### PHB 생산 최적조건

PHB 생산에 영향을 미치는 제한요인을 조사하기 위하여 균체 생육 최적배지에서 1차 배양한 후 균체를 집균하여 각종 영양원이 결핍된 배지에 접종하여 2차 배양하는 2단계 배양을 실시한 결과, 질소원이 결핍되었을 때 PHB가 축적된다(2, 10)는 일반적인 현상과는 상반되었다. 즉 영양원이 결핍된 배지에서의 PHB 축적율과 영양원이 결핍되지 않은 대조구에서의 PHB 축적율이 20% 정도로 서로 비슷하였으며, 오히려 질소원이 결핍되었을 경우가 균체량과 PHB 축적율이 대조구보다 낮았다(Table 4). 따라서 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9는 질소원을 포함한 각종 영양원의 결핍에 의해서 PHB를 생산하지 않고, balanced-growth condition에서 PHB를 합성함을 알 수 있었다. 일반적으로 대부분의 세균에 있어서 PHB 생산은 질소, 산소, 인산 등의 영양원이 결핍되었을 때 일어나는 것으로 밝혀져 있다(12, 13). 즉 특정 영양원의 결핍이 과다한 NADH나 NADPH의 축적을 유도함으로써 TCA cycle의 효소작용이 억제되고, 이때 해당경로를 통해서 탄소원이 산화된 결과 생성된 acetyl-CoA로부터 PHB가 합성된다. 그러나 최근 *Azotobacter vinelandii* UWD는 balanced-growth condition에서 PHB를 생산하는 것(14)으로 밝혀졌으며, *Alcaligenes latus*의 경우, 질소원의 결핍이 PHB 생산을 다소 향상시키기는 하지만 constitutive 하게 PHB를 생산하는 것으로 보고되었다(4). *Azotobacter vinelandii* UWD는 respiratory NADH oxidase가 결여되어 있기 때문에 각종 영양원이 결핍되지 않은 상태에서도 NAD의 recycling 수단으로 PHB를 합성하는 것으로 추측되고 있다. 따라서 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9도 NADH oxidase가 결여되어 있거나, 또는 그 활성의 발현에 이상이 있는 특이한 성질을 가진 균주라 사료된다.

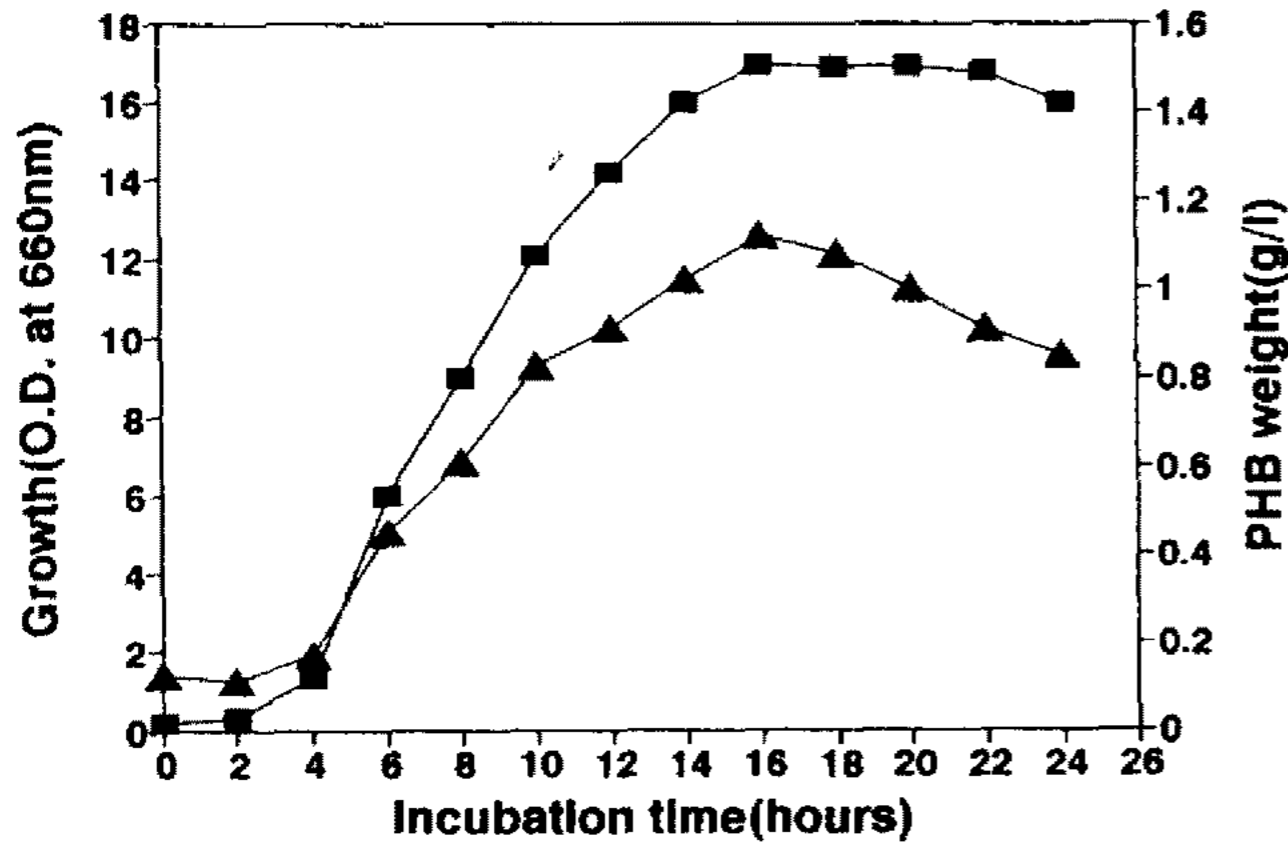


Fig. 6. Time course of batch culture of *Actinobacillus* sp. EL-9 in optimal growth medium. Culture was carried out in 5 l jar fermentor at pH 7.0, 30°C, 2 vvm, and 400 rpm; glucose 2% and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.15%. -■-; growth, -▲-; PHB weight.

생육 최적조건에서의 PHB 생산

상기 실험에서 질소원을 포함한 각종 영양원 결핍에 따른 PHB 생산의 향상을 기대할 수 없었으므로, 생육 최적배지를 기본배지로 하여 회분배양을 실시하면서, 균체 생육에 따른 PHB 축적율을 조사하여 *Actinobacillus* sp. EL-9에 의한 PHB 생산시기와 양상을 검토하였다. 그 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 즉 기존의 알려진 대부분의 PHB 생산균들이 질소원이 결핍된 대수기 말기부터 PHB를 생산하기 시작하는 것과는 달리, *Actinobacillus* sp. EL-9는 대수증식기 초기부터 균체량 증가에 비례하여 PHB를 생산하였다. 따라서 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9에 의한 PHB 생산은 growth-associated type임을 알 수 있었다. 또한 본 공시균의 생육을 유지할 정도의 질소원이 존재할 때 잉여의 탄소원이 어떻게 소비되며, 또한 특정 C/N molar ratio에서 PHB 생산 양상이 어떠한가를 조사하기 위하여, 초기 C/N molar ratio를 달리한 1차 배지에서 배양한 후, 건조균체량과 균체내 PHB 함량을 측정된 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 즉 생육 최적농도의 C/N molar ratio인 15.2에서 가장 높은 균체 생육과 PHB 생산량을 나타내어 질소원의 결핍에 의하여 PHB 축적율이 증가되지 않는 본 공시균의 특성을 다시 한번 확인할 수 있었다. 이것은 본 공시균으로부터 PHB의 생산은 발효공정의 단축뿐만 아니라 발효공정의 조절이 용이하다는 가능성을 내포하고 있어, 산업적 대량배양시 매우 유리한 조건임을 알 수 있었다. 따라서 이후 모든 실험은 2단계 배양의 필요성이 없어짐에 따라 1단계 배양조건으로만 PHB의 축적율을 조사하였다.

PHB 합성에 관여하는 일련의 효소군들은 기질에 대한 특이성이 낮기 때문에 기질을 달리하거나 기질을 혼합하여 배양할 경우, 다양한 종류의 polyhydroxyalkanoate(PHA) copolymer를 합성하는 것으로 알려져

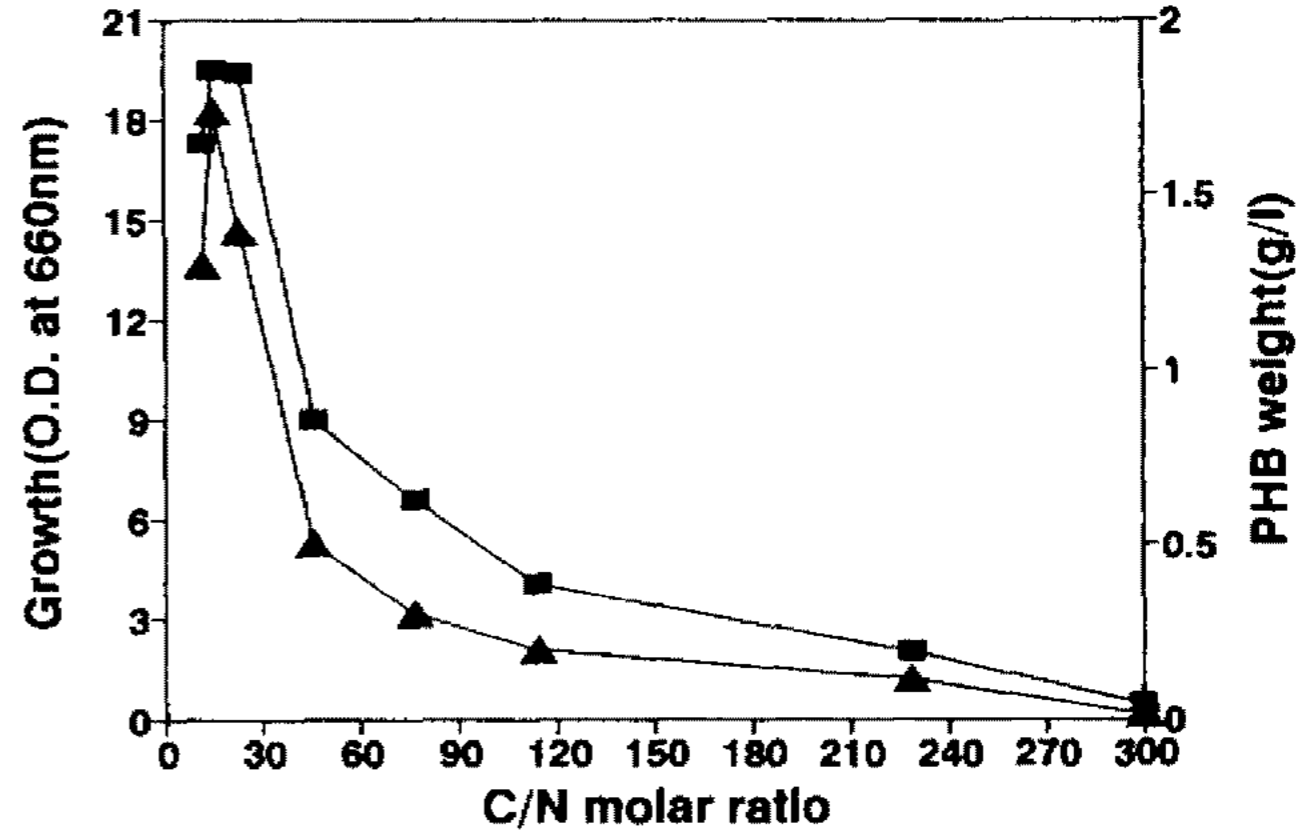


Fig. 7. Effect of C/N molar ratio on growth and PHB production of *Actinobacillus* sp. EL-2 at the first stage. -■-; growth, -▲-; PHB weight.

Table 5. Effect of propionic acid concentration on PHB/HV production by *Actinobacillus* sp. EL-9.

Propionic acid (%)	Dry cell weight (g/l)	PHB/HV (g/l)	PHB/HV content (wt.%)	HV (%)
0	4.28	1.04(PHB)	24.3	-
0.05	3.75	0.51	13.6	21.5
0.1	2.62	0.27	10.3	33.3
0.15	2.35	0.14	5.9	42.9
0.2	1.90	0.11	5.8	54.5
0.25	1.20	0.05	4.2	60
0.3	0.79	0.04	5.1	75
0.35	0.50	0.02	2.5	50

Cell were cultivated in optimal growth medium containing 2% of glucose as a primary carbon source and each concentration of propionic acid as a secondary carbon source (HV precursor).

있다(15). *Alcaligenes eutrophus*를 포함한 많은 세균들은 1차 탄소원 외에 2차 탄소원으로 propionic acid를 혼합하여 배양할 때 PHB/HV를 균체내에 생산하는 것으로 알려져 있는데(16), 이때 PHB/HV내의 HV monomer의 비율은 배지내의 포도당에 대한 propionic acid의 농도를 변화시킴으로서 조절이 가능하며, HV monomer의 함량이 증가할수록 PHB/HV의 녹는점이 낮아짐과 동시에 기계적인 특성이 크게 향상되는 것으로 알려져 있다(17). 이에 따라 2% 포도당이 함유된 생육 최적배지에 propionic acid를 각각 0%에서 0.35%까지 단계적으로 조절하여 36시간동안 배양한 후 건조균체량, PHB/HV 축적률 및 HV monomer의 함량을 측정하였다. 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 즉 propionic acid를 첨가함으로써 PHB/HV copolymer가 합성되어, 본 공시균에 있어서 propionic acid가 HV monomer의 전구물질로 작용함을 알 수 있었다. Propionic acid 0.3%가 첨가되었을 때 HV 함량이 75%로 가장

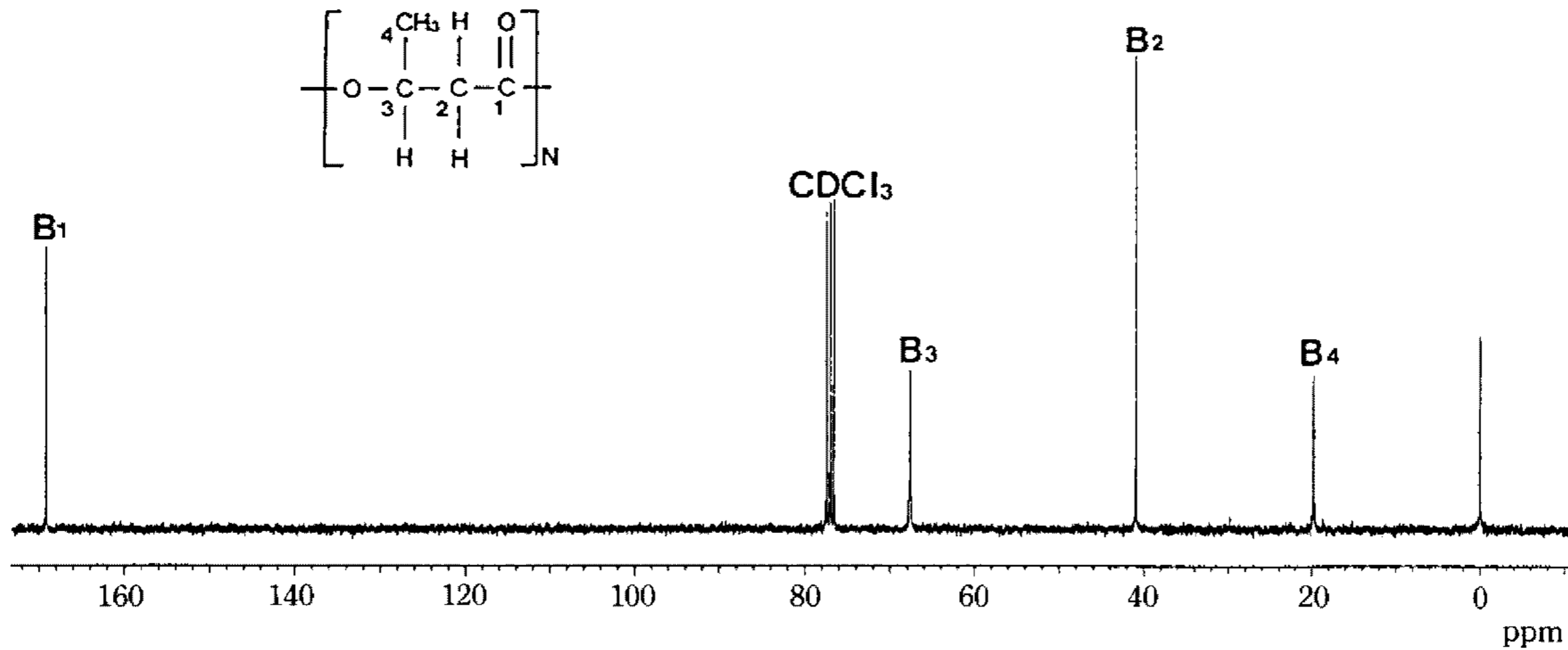


Fig. 8. 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PHB produced by *Actinobacillus* sp. EL-9.

높았으며, PHB/HV의 축적율은 0.05%일 때 가장 높았다. 그러나 조사한 전 농도에서 PHB/HV의 축적율은 2.5~13.6%로 현저히 낮았으며, propionic acid의 농도가 증가될수록 균체 생육은 비례적으로 감소하였다. 비록 PHB/HV copolymer내의 HV monomer의 비율은 21.5%~75% 정도로 매우 높아 bottle이나 film 등의 용도로 이용가능할 만큼 물성의 향상을 가져다 줄 수 있었으나, 본 공시균은 *Alcaligenes eutrophus*의 경우와 마찬가지로 0.1% 이상의 propionic acid 농도에서 균체 생육이 상당히 저해되었다. 따라서 본 공시균을 이용한 PHB/HV copolymer의 대량생산과 다양한 비율의 HV monomer를 가진 PHB/HV의 생산을 위해서는 유가배양을 통하여 propionic acid의 농도를 생육 저해농도 이하로 적당하게 유지시켜 주어야 함을 알 수 있었다.

#### PHB의 조성분석

*Actinobacillus* sp. EL-9로부터 추출, 정제된 PHB의 조성을 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR로 분석한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 proton decoupling 없이 4개의 peak signal이 나타났다. 즉, 19.8 ppm, 40.08 ppm, 67.7 ppm, 169.2 ppm에서 각각 methyl, methylene, methine, carbonyl에 해당하는 carbon resonance가 나타나 공시균 으로부터 생산된 고분자는 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer(PHB)임을 알 수 있었다.

#### 요 약

토양으로부터 PHB를 생산하는 세균들을 농화배양에 의하여 순수분리하였다. 이들중 주정종류 폐액을 기질로 하여 PHB를 생산하는 균주를 공시균으로 선정하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 검토한 결과 *Actinobacillus* sp.로 동정되었다. 균체생육을 위한 최적 배양온도 및 pH는 각각 30°C, 7.0이었다. 최적 생육배

지의 조성은 포도당 2%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.15%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.25%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.003%, 미량원소 용액 5 ml/l이었다. *Actinobacillus* sp. EL-9의 PHB 생산 최적조건은 균형 생육조건(balanced-growth conditions) 즉, 생육 최적조건과 일치하였으며, 보조기질로 propionic acid를 첨가시 PHB/HV copolymer가 합성되었다.

#### 참고문헌

1. Griffin, M. and A.M. Magor. 1986. Possible uses of microorganisms in the manufacture of plastics and synthetic fibres. *Biotechnol. Genetic Engineer. Reviews* 4: 263-290.
2. Dawes, E.A. and P.J. Senior. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganism. *Adv. Microb. Physiol.* 10: 135-266.
3. Ramsay, A.B., G.M. Znoj, and D.G. Cooper. 1986. Use of a nylon manufacturing waste as an industrial fermentation substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 152-156.
4. Bertrand, J.L., B.A. Ramsay, J.A. Ramsay, and C. Chavarie. 1990. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10): 3133-3138.
5. Young, F.K., J.R. Kastner, and S.W. May. 1994. Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4195-4198.
6. Kim, D.S., H.J. Jang, K.H. Hwan, M.G. Suh, and S.K. Song. 1991. The treatment of concentrated organic alcoholic distillery wastewater by fluidized-bed biofilm reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 6(4): 345-350.
7. Cowan, S.T. 1974. *Manual for The Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press.
8. Macfaddin, J.F. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

9. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. Brandl, H., R.A. Gross, R.W. Lenz, and R.C. Fuller. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoate) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **41**: 77-93.
11. Braunegg, G., B. Sonneleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
12. Jackson, F.A. and E.A. Dawes. 1976. Carboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.* **97**: 303-312.
13. Senior, P.J. and E.A. Dawes. 1973. The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**: 225-238.
14. Page, W.J. and O. Knop. 1989. Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(6): 1334-1339.
15. Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
16. Doi, Yoshiharu, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1986. Nuclear magnetic resonance studies on poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) and a copolyester of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules* **19**: 2860-2864.
17. Doi, Yoshiharu, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1987. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from  $^{13}\text{C}$ -labelled acetate and propionate. *Macromolecules* **20**: 2988-2991.

(Received 8 December 1995)