

인산염 제한하에서 *Alcaligenes eutrophus*의 유가식 배양에 의한 Polyhydroxyalkanoates의 대량생산과 축적특성

† 류 희 옥 · ¹조 경 숙 · ²장 용 근

송실대학교 환경·화학공학과, ¹이화여자대학교 환경공학과,

²한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 1. 9.)

Mass Production and Accumulation Characteristics of Polyhydroxyalkanoates by Fed-batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* under Phosphate Limitation

Hee Wook Ryu[†], Kyung Suk Cho¹, and Yong Keun Chang²

Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea

¹Dept. of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

²Dept. of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received : 1997. 12. 12., Accepted : 1998. 1. 9.)

For mass production of polyhydroxyalkanoates (PHA), high cell density cultures of *Alcaligenes eutrophus* by fed-batch culture under phosphate-limitation condition has been investigated. PHA accumulation by the regulation of initial phosphate concentration could be automatically induced, and high density cell culture above 200 g/L also could be successfully produced. The production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and dry cell weight increased with increasing the initial phosphate concentration. When the initial concentrations of phosphate were in the ranges of 1.5~4.5 g-PO₄/L, PHB and dry cell weight obtained were 83~266 g/L and 61~214 g/L, respectively, and PHB productivity was in the ranges of 1.35~3.10 g/L·h. When a mixture of glucose and propionic acid is used as carbon sources, poly(3-hydroxybutyrate-co-poly-3-hydroxyvalerate), P(3HB-co-3HV), could be also successfully produced under phosphate limitation condition. When the mole ratio of propionic acid to glucose in the feeding solution is 0.22, a final dry cell weight of 150 g/L and a P(3-HB-co-3HV) of 90 g/L were produced. Morphological changes and size distribution of PHB granules synthesized in *A. eutrophus* under phosphate-limitation condition are determined by TEM during the course of fed-batch. Mean granule diameters of PHB produced are in the range of 0.36~0.39 μ m, and mean cell size was elongated from 0.54~0.59 μ m \times 1.3~1.5 μ m to 0.83~0.89 μ m \times 2.0~2.3 μ m. Phosphate concentration in media did not affect size distributions of PHB granule and cell.

Key Words : polyhydroxyalkanoates, phosphate limitation, PHB granule, cell size

서 론

생분해성 고분자인 polyhydroxyalkanoates (PHA)는 생장에 필요한 영양소가 부족한 환경에서 다양한 종류의 박테리아들이 탄소원을 에너지나 탄소 저장 물질로서 체내에 합성 축적하는 polyester 구조의 저장 물질이다(1-3). PHA 내의 ester 구조는

일반적으로 널리 사용되고 있는 합성 고분자와 유사한 성질을 가지므로 합성고분자의 대체 물질로서 이용될 수 있다. PHA의 생산에 관한 연구는 poly-3-hydroxybutyrate P(3HB)와 poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate P(3HB-co-3HV)에 대하여 주로 이루어 졌다(4-12). 대표적인 PHA의 합성 박테리아는 *Alcaligenes eutrophus* (5-6, 9-14), *Azotobacter vinelandii* (14-16), *Methylobacterium sp.* (7, 17), *Pseudomonas olivorans* (18-20)와 *Escherichia coil* (4, 21, 22)와 같은 재조합 균주가 있다. 특히 *A. eutrophus*는 건조 균체량으로 약 80% 정도의 P(3HB)를 다량 축적할 수 있어서 지금까지 가장 많은 연구가 진행되었다. 박테리아의 종류와 배지중의 탄소원에 따라 다양한 종류의 PHA 공중합체도 합성이 가능하다(6, 9-11). 예

† Corresponding author: Department of Chemical and Environmental Engineering, Soongsil University, Sangdo-Dong 1-1, Dongjak-Gu, Seoul 156-743, Korea.
Tel: 02-820-0611, Fax: 02-812-5378
e-mail: hwryu@saint.soongsil.ac.kr

를 들면, *A. eutrophus*를 사용하여 포도당과 propionic acid로부터 P(3HB-co-3HV) 공중합체의 합성이 가능하다(6). 탄소원으로 사용된 propionic acid는 P(3HB-co-3HV)에서 HV를 합성하는데 사용된다.

생분해성 고분자의 상용화에 있어서 가장 큰 장애요인중의 하나는 석유화학 플라스틱인 polyethylene이나 polypropylene보다 생산단가가 훨씬 비싸다는 점이다. 따라서, 생산 단가를 줄이기 위해서는 다음과 같은 세 방향의 연구가 필요하다. 첫 번째는 생산성을 높이기 위하여 고농도 세포배양을 통한 대량생산기술의 개발이고, 두 번째는 값싼 탄소원을 이용하여 PHA를 생산할 수 있는 새로운 균주의 개발이다. 마지막으로 PHA의 분리 정제 비용을 절감할 수 있는 분리공정 기술의 개발이 필요하다. 위 세 연구중 지금까지 PHA의 생산성을 높이기 위한 많은 연구가 진행되었다. 대량생산에 가장 적합한 배양법은 유가식 배양에 의한 고농도 세포 발효로, 여러 종류의 유가식 배양법을 사용하여 생산균주에 따라 70~140 g-P(3HB)/L과 50~120 g P(3HB-co-3HV)/L의 생산이 가능하다(5). PHA를 생산하기 위해 사용되는 유가식 배양법으로는 pH-stat법, CO₂ evolution rate (CER)를 이용하여 기질공급속도를 결정하는 방법, automatic on-line monitoring system을 이용하는 방법 등이 사용되고 있다(4-6). PHA의 생산은 유가식 배양법을 사용하여 일정 농도로 세포를 성장 시킨 후 특정 영양소를 제한시켜 미생물이 PHA를 세포내에 합성 축적하도록 유도하고 있다. 거의 모든 연구에서 질소원을 제한 영양소로 사용하고 있으며, 생산량은 140 g/L 이하로 제한을 받고 있어 대량생산의 어려움이 있다.

배양 중간에 영양소를 제한하는 기존 PHA 생산법과는 달리 배양 초기에 제한 영양소의 농도를 조절할 수 있다면, 영양소의 제한 시기를 조절할 필요가 없기 때문에 조업이 간편해질 뿐만 아니라 초기 제한 영양소의 농도에 의해 최종 세포농도와 PHA의 생산량이 결정 될 것이다. 즉, 초기 제한 영양소의 농도 조절을 통해서 대략적인 PHA 생산량의 예측 또는 조절이 가능하다면 발효조의 산소전달 능력이나 용량에 맞게 배양농도와 생산규모를 결정할 수 있을 것이다. 가장 이상적인 제한 영양소의 조건으로는 세포 성장시 그 요구량이 적어서 고농도 세포 배양에 필요한 양을 초기 배지에 공급하여도 세포 성장을 저해하지 않는 것이다. 인산염은 세포 성장시 그 요구량이 적다. 따라서, 적은 양의 인산염으로도 고농도의 세포 배양이 가능하기 때문에 제한 영양소로 인산염을 사용하는 것이 가장 적합한 것으로 추정된다. 본 연구에서는 인산염을 제한 영양소로 사용하여 DO-stat 유가식 배양법을 통하여 PHB와 P(3-HB-co-3HV)의 대량 생산기술 개발에 관하여 연구하였다. 인산염의 초기 농도를 조절하여 세포와 PHA의 생산량 조절가능성을 조사하였고, PHA의 생산과 인산염 제한하에서 세포의 성장 특성과 세포내에서의 PHB 입자 크기 분포, 세포의 형태적 변화등을 관찰하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 PHA의 생산에 사용한 균주는 *Alcaligenes eutrophus* (NCIMB 11599)이다. 종균 배양을 위해 사용된 배지의 조성(1L 당)은 포도당 15 g, MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; (NH₄)₂

SO₄, 1 g; KH₂PO₄, 1.5 g; NaHPO₄·12H₂O, 9 g; citric acid, 1 g; trace element solution, 1 mL이다. Trace element solution의 조성(1L 당)은 FeSO₄·7H₂O, 10 g; ZnSO₄·7H₂O, 2.25 g; CuSO₄·7H₂O, 1 g; MnSO₄·4-5H₂O, 0.5 g; CaCl₂·2H₂O, 2 g; Na₂B₄O₇·7H₂O, 0.23 g; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1 g; 35% HCl, 10 mL이다. 배지의 초기 pH는 6.8로 조절하였고, 배지 성분중 포도당과 MgSO₄·7H₂O는 멸균과정에서의 갈색 침전 생성을 방지하기 위하여 다른 배지 성분과 별도로 분리하여 멸균기에서 121℃에서 20분 동안 살균하였다. 종균의 배양은 100 mL의 배지가 들어있는 250 mL 삼각 플라스크에 균을 접종하여 30℃, 150rpm에서 18~24시간 동안 진탕 배양하여 사용하였다.

유가식 배양법에 의한 PHB의 생산

유가식 배양에 의한 PHB의 생산은 인산염 제한하에서 수행하였다. 배지의 초기 인산염의 농도를 조절하여 세포가 성장함에 따라 인산염을 소비하여 고갈되도록 하여 PHB를 생산하도록 유도하였다. 유가식 배양에 사용한 배지의 조성(1L 당)은 포도당 15 g; MgSO₄·7H₂O, 1.2 g; (NH₄)₂SO₄, 4 g; citric acid, 1.7 g; Trace element solution, 10 mL인 phosphate-free salt 배지에 인산염의 초기 농도를 KH₂PO₄의 첨가량을 조절하여 1.5, 1.8, 2.9, 3.2, 4.5 g-PO₄/L로 변화 시켰다. PHB 생산을 위한 유가식 배양은 2.5L 용량의 발효기(한국발효기)를 사용하였다. 유가식 배양의 초기 배양액의 부피는 접종액을 포함하여 0.8L가 되도록 하였다. 배양하는 동안에 배양액의 pH는 2N HCl 용액과 28% 암모니아 용액을 사용하여 pH 6.8로 일정하게 조절하였고, 배양온도는 34℃ 이었다. 배양하는 동안에 용존 산소의 농도는 10~40% 포화농도로 유지하였고, 필요시 순수 산소를 부가적으로 공급하였다.

유가식 배양에서 기질 공급은 DO-stat 방법을 사용하였다. DO-stat 유가식 배양은 공급된 기질이 고갈되어 감에 따라 배양액의 용존산소의 농도가 80% 이상의 포화농도까지 증가할 때 일정량의 기질 공급액(700 g/L의 포도당 용액)이 정량 pump에 의해 공급되도록 하는 방법이다. 본 연구에서는 포도당 농도가 15 g/L 정도로 유지되도록 일정량의 기질을 공급하였다. 배양하는 동안에 세포의 농도, 기질의 농도, PHB의 함량, 무기염 이온염 이온의 농도 변화 등을 측정하기 위하여 매 2~3시간마다 1~2 mL의 배양액을 채취하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산

P(3HB-co-3HV)를 생산하기 위하여 기질로 포도당 대신에 propionic acid(P)와 포도당(G)의 혼합액을 유가식 배양의 공급액으로 사용하였다. 공급액의 조성은 포도당 700 g/L와 propionic acid 62 g/L (P/G 몰비: 0.22) 이다. 기질의 공급은 PHB의 생산에서 사용한 기질공급방식과 동일 방법을 사용하였다.

분석 방법

배양액 1 mL를 채취하여 7,000~10,000 rpm에서 원심 분리한 후에 상등액은 포도당과 이온 분석 등에 사용하기 위하여 냉동 보관하였고, 회수 세포는 증류수로 2~3회 세척한

후에 70°C의 건조기에서 24~28시간동안 건조시켜 건조세포 증량을 측정하였다.

PHA의 분석은 FID가 부착된 gas chromatography (Hewlett packard Model 5890, USA)로 측정하였고, 분석 칼럼은 capillary column DB-WAX (30m long, Film thickness 0.5µm, Chrom Tech Inc.)를 사용하였다. 내부 표준 물질로 benzoic acid를 사용하였고, PHA의 표준물질로는 Biopols사에서 생산된 PHB/PHV 공중합체(19.1 mol% HV)를 사용하였다. GC분석을 위한 시료의 전처리에는 40 mg 정도의 건조 세포 증량을 10 mL vial에 넣고 2 mL의 1,2 Dichloroethane(Sigma), 2 mL의 HCl/propanol (1:4 v/v)와 0.2 mL의 benzoic acid/propanol (0.04 wt/v)를 첨가하여, 100°C에서 oven안에서 2시간동안 가열하였다. 가열후에 실내온도에서 공냉시킨후 증류수를 4mL첨가하고, 20-30초 동안 혼합한 후 상분리가 일어나도록 방치한 후에 하층을 1µL 채취하여 분석하였다.

배양액의 포도당 농도는 포도당 분석기(model 2700, Yellow Springs Instruments, USA)를 사용하여 매 시간마다 분석하였다. 배양액 중의 인산염의 농도와 암모늄의 농도는 각각 음이온과 양이온 column을 사용하여 Ion Liquid Chromatography(ILC, Waters431, conductivity detector, Column IC-Pack A, IC-Pack C, USA)를 사용하였다.

세포의 형태적 변화를 위상차 현미경(1500배)을 사용하여 관찰하였고, 세포내의 PHA 입자의 크기를 측정하기 위하여 투과전자현미경(Philips CM 20, Eindhoven, Netherlands)을 사용하여 13,000배에서 관찰하였다. 투과전자현미경(TEM) 촬영을 위한 시료의 전처리 과정은 다음과 같다. 세포의 고정에는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 2% (v/v) paraformaldehyde가 함유된 2% (v/v) glutaraldehyde에서 수행하였고, 1% (wt/v) osmium tetroxide로 예비고정화 했다. 시료의 탈수는 에탄올의 농도를 30% (v/v)에서 100%까지 단계적으로 높이면서 각 농도에서 10분간 수행하였고, Epon 812 (Agar Co., Cambridge, U.K.)에 고정화하여 박편을 준비하였다.

결과 및 고찰

인산염 제한하에서의 PHB의 생산

본 연구에서 사용한 초기 인산염 농도 중 가장 높은 농도인 4.5 g/L에서 유가식 배양을 하는 동안에 세포의 성장과 PHB의 생산 및 인산염 농도의 변화를 Figure 1에 도시하였다. 인산염의 농도는 배양 20시간 이후에 급격하게 감소하였으며, 약 37시간 이후에 완전 고갈되었다. 인산염이 고갈되었을 때 건조균체량과 순수균체량 (residual cell mass, RCM)은 각각 117 g/L과 62.2 g/L 이었다. 인산염이 고갈되어 가는 32시간 이후에 세포내의 PHB 함유량은 25%에서 62%로 급격하게 증가하였으며, 약 50시간 배양이후에는 74% 이상의 PHB 함량을 보였다. 68시간 배양 후에 생산된 건조균체량은 약 266 g DCW/L이었다. 생산된 PHB의 양과 PHB 함량은 각각 214 g/L과 81% 이었다. 따라서, PHB를 제외한 순수균체량은 약 52 g/L 이다.

초기 인산염 농도변화가 1.5 g/L에서 4.5 g/L일 때 배양동안에 시간변화에 따른 세포의 성장과 PHB의 생산을 Figure 2에 도시하였고, 초기 인산염 농도 변화에 따른 세포성장, PHB의

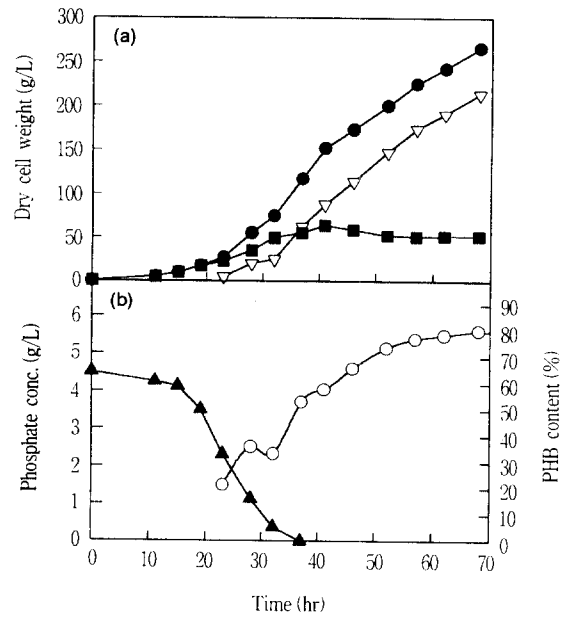


Figure 1. The time profiles of (a) dry cell weight, PHB, and residual cell mass and (b) PHB content and phosphate during the fed-batch culture in the medium containing 4.5 g-PO₄/L. Symbols: ●: dry cell weight, ∇: PHB, ■: residual cell mass, ○: PHB content, ▲: phosphate.

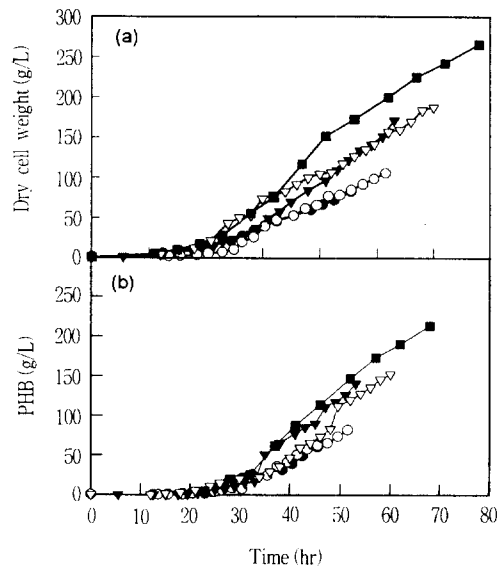


Figure 2. The time profiles of (a) dry cell weight and (b) PHB during the fed-batch cultures under phosphate limitation. Phosphate concentration (g-PO₄/L): ●: 1.5, ○: 1.8, ▼: 2.9, ∇: 3.2, ■: 4.5.

생산량과 PHB 함량, PHB 생산성을 Figure 3에 제시하였다. 생산된 건조균체량과 PHB 생산량은 초기 인산염 농도가 증가함에 따라 선형적으로 증가하였다. 인산염의 초기 농도가 1.5,

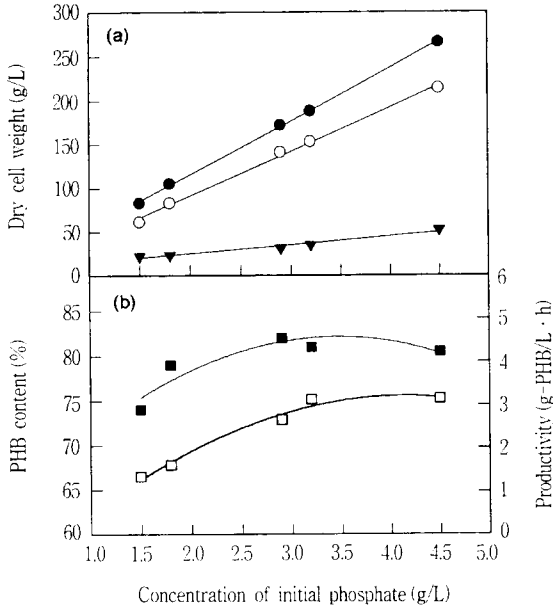


Figure 3. Effect of initial phosphate concentration on the production of dry cell weight and PHB. Symbols: ●: dry cell weight, ○: PHB, ▼: residual cell mass, ■: PHB content, □: productivity.

1.8, 2.9, 3.2, 4.5 g-PO₄/L일 때 최종 생산된 건조균체량은 각각 83, 105, 172, 188, 266 g/L 이었고, PHB는 각각 61, 83, 141, 153, 214 g/L를 생산할 수 있었다. 각각의 조건에서 순세포 중량은 각각 22, 23, 31, 35, 52 g/L이다. 인산염의 농도가 1 g-PO₄/L 증가함에 따라 건조균체량이 약 61 g/L 증가하였고, PHB 생산량도 51 g/L 증가하였다. 건조균체 중 PHB의 함량도 인산염 제한하에서 건조균체량의 75%~82%의 PHB 축적율을 얻을 수 있었으며, 인산염의 농도가 높을수록 PHB 함량이 다소 증가하는 경향이 있었다. PHB 생산성은 인산염의 농도가 1.5 g-PO₄/L일 때 1.34 g-PHB/L·h이었고, 인산염의 농도가 증가함에 따라 PHB 생산성이 선형적으로 증가하여 3.2 g-PO₄/L에서 약 3.13 g-PHB/L·h에 도달하였고 그 이상의 인산염 농도에서는 생산성의 향상은 없었다. 위와 같이 초기 인산염의 농도를 조절함으로써 고농도의 세포 배양을 통하여 높은 PHB 생산성을 얻을 수 있었다. 또한, Figure 3에서 보는바와 같이 인산염의 초기 농도 변화에 따라 세포와 PHB의 생산량이 거의 선형적으로 증가하기 때문에 초기 인산염 농도 조절에 의해 PHB의 생산량을 조절할 수 있음을 의미한다.

인산염 제한하에서의 P(3HB-co-3HV)의 생산

PHA를 생산할 수 있는 미생물의 종류와 사용 탄소원에 따라 다양한 종류의 PHA의 생산이 가능하다. Propionic acid와 포도당의 몰비(P/G)가 0.22인 기질을 사용하여 인산염 제한하에서 P(3HB-co-3HV)의 공중합체의 생산을 유도하였다. 인산염의 초기 농도를 4.5 g-PO₄/L로 제한한 배지에서 유가식 배양을 하는 동안에 시간에 따른 세포의 성장과 P(3HB-co-3HV)와 HV의 함량을 Figure 4에 도시하였다. 유가식 배양을 통하여 약 69 시간 동안에 건조균체량은 150

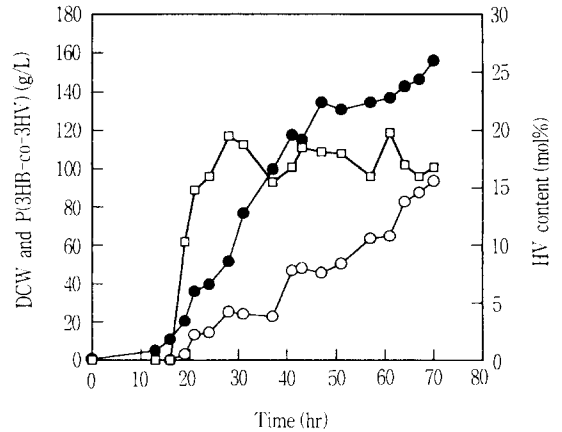


Figure 4. The time profiles of dry cell weight, P(3HB-co-HV), and HV content during a fed-batch culture in the medium containing 4.5 g-PO₄/L. Symbols: ●: dry cell weight, ■: P(3HB-co-3HV), □: Hydroxyvalerate content.

g/L을 생산하였다. 생산된 P(3HB-co-3HV)는 HV의 함량이 15~20 mol%인 P(3HB-co-3HV)를 90 g/L 생산할 수 있었고, 순수균체량은 60 g/L 이었다. P(3HB-co-3HV)의 총 함량은 건조균체량의 약 60% 이었고, P(3HB-co-3HV)의 생산성은 1.3 g/L·h이었다. 한편, Figure 1에서 보는바와 같이 PHB 생산의 경우 인산염의 초기 농도가 4.5 g-PO₄/L일 때 생산된 건조균체량은 266 g-DCW/L이었고, PHB의 양과 PHB 함량은 각각 214 g/L과 80%이었다. 이와 비교하면 propionic acid와 포도당 혼합액을 기질로 사용한 경우 P(3HB-co-3HV)의 생산성이 훨씬 낮다. 이는 propionic acid와 같은 유기산들을 기질로 사용할 경우 세포의 성장과 P(3HB-co-3HV)의 합성을 저해함을 의미한다. 이와 유사한 결과가 암모니움을 기질 제한 영양소로 사용한 P(3HB-co-3HV)의 공중합체 생산과정에서도 관찰되었다(6). P/G의 비가 증가할수록 건조세포중의 P(3HB-co-3HV)의 함량이 감소하였고, P/G의 비가 0.35 이상에서 P(3HB-co-3HV)의 함량은 60% 미만이었다.

세포 크기의 변화

발효를 하는 동안에 세포의 직경분포를 위상차 현미경과 TEM 사진으로부터 관찰하였다. 사진으로 측정된 균체의 직경분포를 Figure 5에 도시하였다. 배양초기에는 세포의 입경 분포가 0.4~1.0 μm 범위이었고, 배양시간이 증가하여 PHB의 함량이 증가함에 따라 세포의 입경 분포가 0.4 μm부터 1.1~1.6 μm까지 넓어졌다. 유가식 배양하는 동안에 세포의 평균 크기 변화를 Figure 6에 제시하였다. 초기 인산염의 농도가 2.9 g/L 일 때, PHB 함량이 낮은 배양 초기인 20-30 시간 배양 후 세포의 평균 크기가 0.62~0.65 μm × 1.3~1.4 μm이었다. PHB의 세포내 축적량이 급격하게 증가하는 배양 30~45시간 사이에서 세포의 크기가 현저하게 증가하였다. PHB 함량이 75~80% 전후인 배양 45시간 이후의 균체의 평균 크기는 0.80~0.82 μm × 2.2~2.3 μm 이었다. 배양초기의 세포에 비하여 세포의 평균 직경과 세포 길이가 각각 약 1.33 배와 1.7배 증가하였다. 마

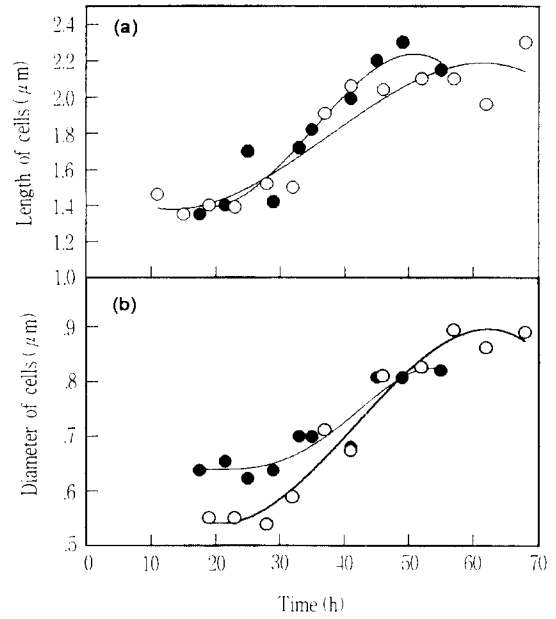
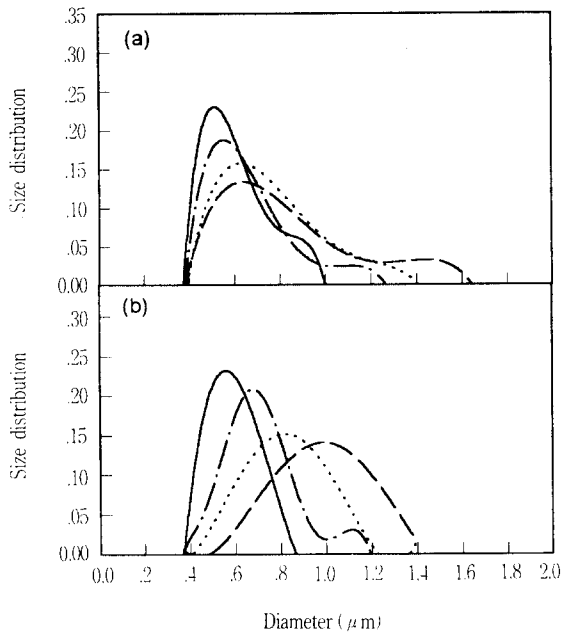


Figure 5. Size distributions of cell diameter during fed-batch cultures in media containing (a) 2.9 g-PO₄/L and (b) 4.5 g-PO₄/L. Culture time (hours): (a) — : 18, - - - : 25, ···· : 40, - · - · : 55. (b) — : 20, - - - : 46, ···· : 52, - · - · : 60.

Figure 6. Mean length and diameter of cells during fed-batch cultures grown in media containing (a) 2.9 g-PO₄/L and (b) 4.5 g-PO₄/L. Symbols: ● : 2.9 g-PO₄/L, ○ : 4.5 g-PO₄/L.

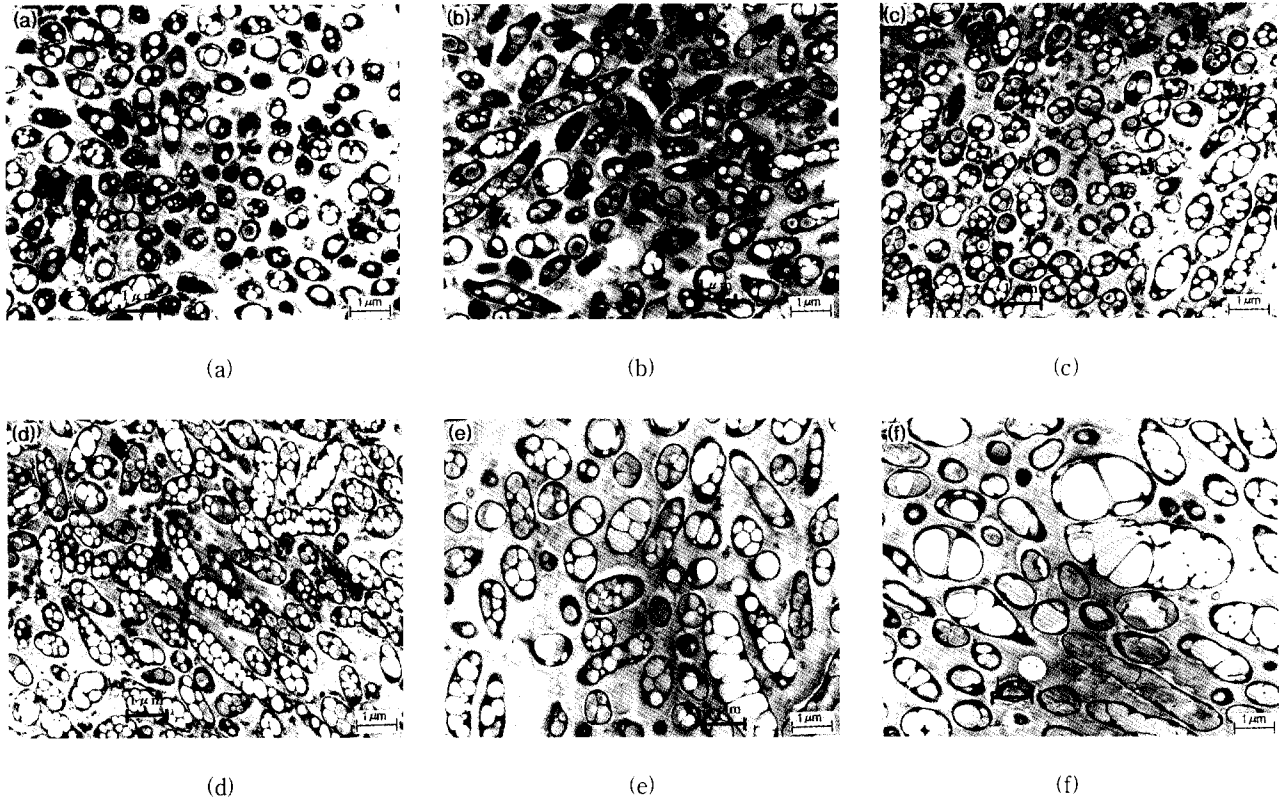


Figure 7. Transmission electron micrographs of *A. eutrophus* cultured for (a) 20 hr, (b) 28 hr, (c) 37 hr, (d) 46 hr, (e) 52 hr, and (f) 60 hr in medium containing 4.5 g-PO₄/L.

찬가지로 초기 인산염의 농도가 4.5 g/L 인 경우에도, 초기 세포의 크기 0.54~0.59 $\mu\text{m} \times 1.3\sim 1.5 \mu\text{m}$ 에서 PHB 함량이 증가함에 따라 세포의 크기가 현저하게 증가하였다. 57~68시간 배양후인 PHB 함량이 약 80% 일 때 세포의 크기가 0.83~0.89 $\mu\text{m} \times 2.0\sim 2.3 \mu\text{m}$ 으로 증가하였다. 초기 세포에 비해 직경과 길이가 약 1.5~1.6 배 증가하였다. 결과적으로 PHB를 축적하는 과정에서 세포의 면적을 기준으로한 *A. eutrophus*의 크기는 인산염의 초기 농도에 관계없이 PHB 축적량이 적은 배양 초기에 비하여 약 2.1~2.4배 증가하였다.

PHB 입자크기의 변화

초기 인산염의 농도가 2.9 g/L에서 세포를 배양하는 동안 세포내에 PHB 입자를 축적한 *A. eutrophus*의 TEM 사진을 Figure 7에 제시하였다. 초기에 적은 수의 PHB 입자들이 세포내에 있었으나 (Figure 7 (a)) 배양시간이 증가함에 따라 세포내에 축적한 PHB 입자의 수가 급격하게 증가함을 알 수 있다 (Figure 7 (d)).

배양하는 동안에 세포내의 평균 PHB 입자의 수를 TEM 사진으로부터 조사하였다(Figure 8). 배양초기에는 세포내의 PHB 입자의 수는 평균 약 3개 정도를 가지고 있으며, 배양 시간이 증가함에 따라 PHB 입자의 수가 거의 선형적으로 증가하였다. 배양 후기에는 세포당 평균 9 개 전후의 PHB 입자를 축적하고 있는 것으로 관찰되었다. 세포내의 PHB 입자의 수는 많게는 15~23개까지도 관찰되었다. *A. eutrophus*의 PHB 입자의 축적은 세포의 중심에서부터 시작되는 것을 Figure 7 (a)와 (b)로부터 알 수 있다. 일반적인 PHA 합성 박테리아들인 *Pseudomonas oleovorans* (19, 23), *A. latus* (25), *Azotobater* sp. 등도 PHB의 축적은 세포의 중심에서부터 축적이 된다. 반면에, 재조합 대장균의 경우 PHB 입자의 생성은 세포의 한쪽 끝으로부터 시작되는 것으로 알려져 있다(24).

TEM 사진으로부터 세포내에 축적된 PHB 입자의 크기를 측정하였고, 측정된 PHB 입자는 TEM 사진으로부터 측정된 면적을 구형 입자로 환산하였다. 배양 시간에 따른 PHB 입자 분포를 Figure 9에 도시하였다. PHB 축적 초기에는 인산염의 초기

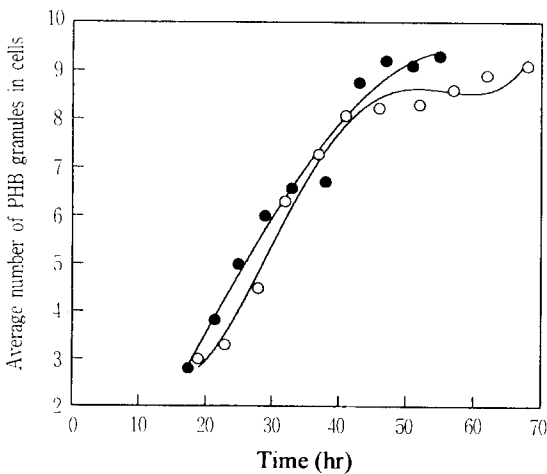


Figure 8. Average number of PHB granules synthesized by *A. eutrophus* grown under phosphate limitation. Symbols: ●: 2.9 g-PO₄/L, ○: 4.5 g-PO₄/L.

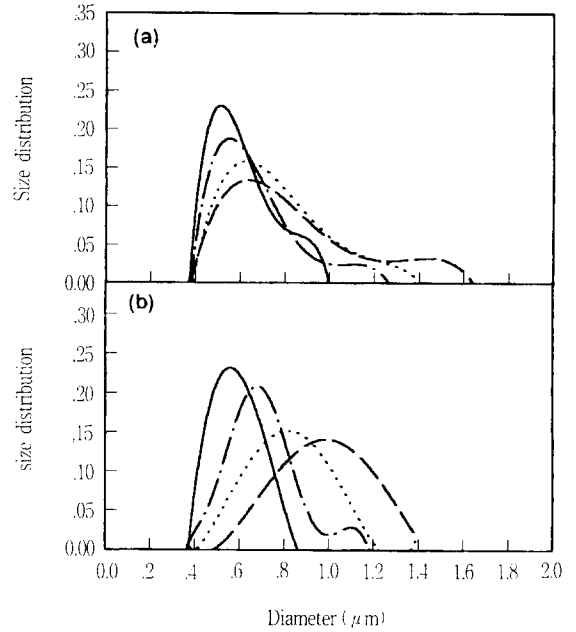


Figure 9. Size distribution of PHB granules synthesized by *A. eutrophus* grown in media containing (a) 2.9 g-PO₄/L and (b) 4.5 g-PO₄/L. Culture time (hours): (a) — : 18, - · - : 25, · · · : 40, - - - : 55. (b) — : 20, - · - : 46, · · · : 52, - - - : 60.

농도에 관계없이 0.04~0.4 μm 이하의 좁은 범위에서 PHB 입자 크기 분포를 보였다. 배양시간이 증가하여 PHB의 축적량이 증가함에 따라 PHB 입자 크기 분포가 넓어졌다. 인산염의 초기 농도가 2.9 g/L일 때 PHB 함량이 80%인 50시간(Figure 9 (a)) 이후에는 0.04~1.10 μm 의 PHB 입자 크기 분포를 보였고, 인산염의 초기 농도가 4.5 g/L일 때 PHB 함량이 약 80%인 Figure 9(b)의 60시간 이후에는 0.04~1.50 μm 까지의 넓은 PHB 입자크기 분포를 가졌다. 일반적으로 *A. latus*와 *Bacillus megaterium*은 0.1~0.8 μm 의 분포를 갖는다(25).

배양하는 동안에 세포내의 PHB의 평균입자크기의 변화를 Figure 10에 도시하였다. 초기 인산염의 농도가 4.5 g/L인 Figure 1의 배양시간에 따른 PHB 함량과 Figure 8의 PHB 입자크기의 변화를 살펴보면, PHB 함량이 30% 이하로 낮은 배양 초기에는 PHB의 평균 입자크기는 약 0.15~0.20 μm 이하이었다. PHB의 축적량이 급격하게 증가하는 30~50시간에서 PHB 입자크기가 현저하게 증가하여 0.35 μm 이상으로 증가하였다. 50시간 배양이후 PHB 함량이 75%에서 80% 까지 증가하였을 때, 배양이 종료된 상태에서의 PHB 입자 크기는 약 0.39 μm 이었다. 마찬가지로, 초기 인산염의 농도가 2.9 g-PO₄/L일 때에도 배양시간이 증가함에 따라 즉, PHB의 축적량이 증가함에 따라 PHB 입자의 크기가 급격하게 증가하였으며 최종 생산된 PHB 입자의 크기는 약 0.36 μm 이었다. Lee 등의 연구에 의하면, 세포의 크기가 0.4~1.5 $\mu\text{m} \times 1.5\sim 8.0 \mu\text{m}$ 인 재조합 대장균에 의해 생산된 PHB 입자의 평균 직경이 1.13~1.25 μm 인 것으로 보고되고 있다(22). *A. eutrophus*에 의해 생산된 PHB 입자의 평균 직경은 대장균에 의해 생산된 PHB 입자 직경의 약 31%로 작다.

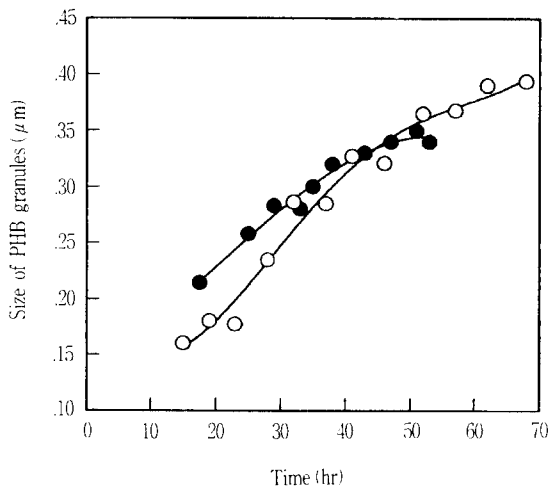


Figure 10. Variations of mean diameter of PHB granules synthesized by *A. eutrophus* grown in media containing (a) 2.9 g-PO₄/L and (b) 4.5 g-PO₄/L. Symbols: ●: 2.9 g-PO₄/L, ○: 4.5 g-PO₄/L.

결론

2.5 L의 실험실 규모의 발효기에서 제한 기질로 배지의 인산염의 농도를 조절하여서 유가식 배양에 의해서 *A. eutrophus*를 이용한 PHA의 대량 생산에 대하여 연구하였다. 건조균체량과 PHB 생산량은 초기 인산염의 농도가 증가함에 선형적으로 증가하였고, 인산염의 농도가 1 g-PO₄/L 증가함에 따라 건조균체량이 약 61 g/L 증가하였고, PHB 생산량도 51 g-PHB/L 증가하였다. 결과적으로 인산염의 초기 농도 조절에 의해 PHB의 생산량을 조절할 수 있음을 밝혔다. 인산염의 초기 농도가 1.5~4.5 g-PO₄/L일 때, PHB의 농도와 건조균체량은 각각 61~175 g/L와 86~210 g/L를 얻었고, PHB의 생산성은 1.34~3.15 g/L·h 이었다. 또한, 포도당과 propionic acid를 기질로 사용하여 P(3HB-co-3HV)를 생산하였다. 생산된 PHA는 HV의 함량이 15~20 mol%인 P(3HB-co-3HV)를 90 g/L 생산할 수 있었고, 건조균체량은 150 g/L 이었다. 인산염 제한 하에서 유가식 배양하는 동안의 세포의 형태변화와 PHB 입자의 크기 분포를 TEM과 위상차 현미경을 사용하여 측정하였다. *A. eutrophus*는 세포당 평균 9개 전후의 PHB 입자를 형성하며, 많게는 15~23개까지도 PHB 입자를 형성하였다. PHB의 평균 입자크기는 0.36~0.39 μm이었고, PHB를 축적하는 과정에서 세포의 면적을 기준으로한 *A. eutrophus*의 크기는 인산염의 초기 농도에 관계없이 PHB 축적량이 적은 배양 초기에 비하여 약 2.1~2.4배 증가하였다.

감사

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Anderson, A. J. and E.A. Dawes (1990), Occurrence, Meta-

bolism, Metabolic Role, and Industrial uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, **54**, 450-472.

2. Bennett, R. A. (1991), Recycled Plastics: Product Applications and Potential, (G. D. Andrews and P. M. Subramanian eds.), pp. 26-38, *Emerging Technologies in Plastics Recycling*. American Chemical Society, Washington, D. C.

3. Byrom, D. (1987), Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics, *Trends in Biotechnol.*, **5**, 216-250.

4. Kim, B. S., S. Y. Lee, and H. N. Chang (1992), Production of Poly-β-hydroxybutyrate by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **14**, 814-816.

5. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of Poly-3-hydroxybutyric Acid by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892-898.

6. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of 3-Hydroxybutyric-co-3-Hydroxyvaleric Acid by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Substrate Control using On-line Glucose Analyzer, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **16**, 556-561.

7. Kim, S. W., P. Kim, H. S. Lee, and J. H. Kim (1996), High Production of Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under Potassium Limitation, *Biotechnol. Lett.*, **18**, 25-30.

8. Byrom, D. (1991), *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. Stockton, New York.

9. Doi, Y., K. M. Tamaki, and K. Soga (1987), Biosynthesis of Terpolyesters of 3-Hydroxybutyrate, 3-Hydroxyvalerate, and 5-Hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-Chloropentanoic and Pentanoic Acids, *Makromolekulare Chem. Rapid Commun.*, **8**, 631-635.

10. Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka, and K. Soga (1988), Production of Copolyesters of 3-Hydroxybutyrate and Pentanoic Acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330-334.

11. Doi, Y., M. Kunioka, and Y. Kawaguchi (1989), Production of Biodegradable Copolyesters of 3-Hydroxybutyrate and 4-Hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 569-573.

12. Park, C.H. and V. K. Damodaran (1994), Effect of Alcohol Feeding Mode on the Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1306-1314.

13. Park, C. H. and V. K. Damodaran (1994), Biosynthesis of Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate from Ethanol and Pentanol by *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Prog.*, **10**, 615-620.

14. Cho, K.S., H.W. Ryu, C. H. Park, and P. R. Goodrich (1997), Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from

- Swine Waste Liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 7-10.
15. Page, W. J. (1989), Production of Poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* Strain UWD during Growth on Molasses and Other Complex Carbon Sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 329-333.
 16. Page, W. J., J. Manchak, and B. Rudy (1992), Formation of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2866-2873.
 17. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu (1988), Mass Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid by Fully Automatic Fed-Batch Culture of Methylotroph, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322-329.
 18. Preusting, H., R. van Houten, A. Hoefs, E. K. van Langenberghe, O. Favre-Bulle, and B. Witholt, (1993), High Cell Density Cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: Growth and Production of Poly(3-hydroxybutyrates) in Two-liquid Phase Batch and Fed-batch Systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 550-556.
 19. Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt (1988), Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-hydroxyalkanoates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 2924-2932.
 20. Lee, S.Y. (1996), High Cell Cultivation of *Pseudomonas oleovorans* for the Production of Poly(3-Hydroxyalkanoates), *Biotechnol. Prog.*, **1**, 51-53.
 21. Lee, S. Y., H. N. Chang, and Y. K. Chang (1994), Construction of Plasmids, Estimation of Plasmid Stability, and Use of Stable Plasmids for the Production of Poly-3-hydroxybutyric Acid by Recombinant *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **32**, 203-211.
 22. Middelberg, A. P. J., S. Y. Lee, J. Martin, D. R. G. Williams, and H. N. Chang (1995), Size Analysis of Poly(3-hydroxybutyric Acid) Granules Produced in Recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **17**, 205-210.
 23. Huisman, G. W., O. De Leeuw, G. Eggink, and B. Witholt (1989), Synthesis of Poly-3-hydroxyalkanoates is a Common Feature of Fluorescent *Pseudomonas*, **55**, 1949-1954.
 24. Lee, S. Y., K. M. Lee, H. N. Chang, and A. Steinbuechel (1994), Comparison of Recombinant *Escherichia coli* Strains for Synthesis and Accumulation of Poly(3-hydroxybutyric Acid) and Morphological Changes, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337-1347.
 25. Lafferty, R. M., B. Korsatko, and W. Korsatko (1988), Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid, (Rehm, H.J. and G. Reed, eds.), *Biotechnology* Vol. 6b: p.136-176, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.