

유기산 혼합물 및 돈사폐수를 이용한 Poly (3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate)의 생산

†박 창 호

경희대학교 화학공학과, 환경연구소
(접수 : 1998. 8. 1., 게재승인 : 1998. 9. 15.)

Production of Biodegradable Plastics, Poly (3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) from Organic Acid Mixtures and Swine Waste

Chang-Ho Park†

Department of Chemical Engineering and Institute of Environmental Science, Kyung Hee University, Yongin-Si 449-701, Korea
(Received : 1998. 8. 1., Accepted : 1998. 9. 15.)

The readily fermentable carbon sources in swine waste were acetic acid, propionic acid and butyric acid at the average concentrations of 7.2 g/L, 2.2 g/L and 2.7 g/L, respectively. The swine waste also contained excess nitrogen and other mineral sources. In shake flask experiments, the optimal range of cell growth for *Azotobacter vinelandii* UWD were 1.0~3.5 g/L of acetic acid, 0.7~2.0 g/L of propionic acid and 0.5~2.0 g/L of butyric acid. A mixture of these three acids simulating two times diluted swine waste supported the best cell growth but the amount of carbon sources was limited. In shake flask and fermentor experiments, an addition of 30 g/L of glucose increased the final cell dry weight 8 times while the final poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) concentration increased 86 times compared with using acid mixture only. *A. vinelandii* UWD preferred organic acids in the sequence of acetic acid, propionic acid, butyric acid, and valeric acid.

Key Words: swine waste, organic acids, *Azotobacter vinelandii* UWD, PHBV

서 론

고분자 제품은 현재 전 세계적으로 매년 1억 톤 이상이 생산되어 인류의 생활에 유용하게 사용되고 있으나 분해성이 거의 없어 사용 후 폐기하였을 때 환경오염을 유발한다. 이 문제를 해결하기 위해서 polyhydroxyalkanoates (PHA), polysaccharides, polylactide 등의 생분해성 고분자에 관한 연구가 수행되어왔고 이중 PHA의 생산을 위해 *Alcaligenes eutrophus* 이외의 다양한 종류의 박테리아가 이용되었다.

본 연구는 돼지분뇨등 유기산을 다량 함유한 원료로부터 PHA의 일종인 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)의 생합성 가능성을 모색하기 위해 돼지분뇨와 유사한 농도로 이루어진 유기산 혼합액 및 실제 돼지분뇨를 이용한 고분자 생산 가능성에 대한 실험을 수행하였다.

지금까지 PHBV 생산에 주로 사용되는 *A. eutrophus* (1-9) 나

methylophil 등 균주들은 우선 탄소원이 충분한 배지에서 성장한 후 질소, 인, S, Mg, K, Fe 등의 비탄소 성분 중 어느 하나의 농도가 제한된 상태에서 PHBV를 생산할 수 있으나(10) 본 연구에서는 배지를 연구자 임의로 만드는 것이 아니라 이미 각 성분의 양이 주어져 있는 폐기물질의 이용 가능성을 확인하기 위하여 비탄소성분의 제한상태가 아니라도 PHBV를 생산하는 새로운 균주인 *Azotobacter vinelandii* UWD 균주를 사용하였으며(11,12) 7 L 규모의 발효조에서 희분식 배양에 의한 PHBV 생성에 관한 연구를 수행하였다. 본 연구는 돼지분뇨를 환경오염원이라는 고정관념에서 벗어나 그 중에 함유되어있는 유기물 및 각종 영양분으로부터 유용한 생분해성 고분자 (PHBV)를 생산하며 동시에 환경오염물질을 처리하는 방법을 제안하였다.

재료 및 방법

균 주

동결 건조된 *Azotobacter vinelandii* UWD (ATCC 53799)를 American Type Culture Collection으로부터 구해서 Burk 배지에 적응 배양시킨 후 agar plate로 옮겼다. 균주는 30°C 조건에서 배양시키고 일주일에 한 번씩 계대하였다.

† Corresponding Author . Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-Si 449-701, Korea
Tel . (0331) 201-2531. Fax : (0331) 202-1946
e-mail : chpark@nms.kyunghee.ac.kr

생장 배지

제한 배지를 사용하는 실험에서 *A. vinelandii* UWD는 여러 가지 탄소와 질소원을 함유한 변형된 Burk 배지에서 생장시켰다. 변형된 Burk 배지는 147 mM KH_2PO_4 , 460 mM K_2HPO_4 , 0.81 mM MgSO_4 , 0.58 mM CaSO_4 , 18.0 μM FeSO_4 , 10 μM Na_2MoO_4 그리고 42.0 μM $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 을 포함하고 있다. pH는 교압 멸균한 후에 7.3으로 조절하였다. 각종 시약은 Sigma Chemical Company에서 구입하였다.

플라스크 배양 실험

유기산을 이용한 *A. vinelandii* UWD의 생장 특성 및 유기산에 대한 내성을 연구하기 위해 진탕배양기 실험을 하였다. 여러 농도의 acetic acid를 함유한 플라스크에 접종시키기 위해 seed culture를 준비할 때 colony 하나를 agar plate로부터 80 mL 포도당 배지를 포함한 250 mL 삼각플라스크로 옮겼다. 이 seed 플라스크는 진탕배양기에서 16-18시간동안 250 rpm 및 30°C에서 배양하였다. 이후 약 4 mL 배양균을 0.7 g/L의 acetic acid를 함유한 80 mL 유기산 배지로 옮겼다. 그리고 균주는 대수 증식기 말기에 도달할 때까지 250 rpm, 30°C 조건에서 배양한 후 배양균 4 mL를 각 플라스크에 접종시켰다. 접종 전에 세포를 특정한 산 또는 산 혼합물에 잘 적응시킨 것을 제외하고는 propionic acid, butyric acid 또는 산 혼합물의 생장 특성을 연구하기 위해 접종을 준비할 때도 위와 동일한 절차를 사용하였다.

플라스크 진탕 배양 실험에서 사용된 배지는 15 mM NH_4Cl 과 서로 다른 유기산으로 구성된 Burk 배지였다. 4 mL의 seed culture를 80 mL 배지가 담긴 250 mL 플라스크에 각각 접종하였다. 균주는 정지기에 도달할 때까지 30°C, 250 rpm에서 배양되었으며 optical density (O.D.), pH 그리고 산 농도를 관찰하였고 비생장속도를 계산하였다.

7 L 발효기 System

날개를 내개 가진 3개의 터빈과 3개의 baffle을 갖춘 7 L top drive 발효기 (한국발효기)가 이 연구에 사용되었다. 발효기 공정은 486 microcomputer에 Labtech Notebook software를 이용하여 조절되고 수집되었다. 배지온도는 물 순환 펌프, 전기히터 그리고 온도조절기를 갖춘 항온 수조속에 발효기를 놓음으로써 30°C를 유지하였고 pH는 컴퓨터에 의해 자동으로 7.3으로 유지하였다. 거품은 자동 액체 수위 조절기를 사용하여 10%의 silicone antifoam 용액을 주입하여 조절하였다. Agitation 속도는 500 rpm로 유지되었다.

돼지분뇨 성분 분석

경기도 일원의 돼지 사육장에서 돼지분뇨를 채취하여 -20°C에서 저장하였고 성분 분석은 2~3회 반복 실험을 했다. 얼린 돼지분뇨 시료는 사용 전 열탕 수조에서 녹였다. 돼지분뇨의 무기질 성분은 ICP (Inductively Coupled Atomic Spectroscopy) 분석법을 이용하여 분석했다. 그리고 돼지 분뇨중 유기산은 유기산 분석 내용에 기술된 절차에 따라 gas chromatograph (HP 5890)로 분석하였다.

시료 분석

발효 공정동안 세포생장, 기질소비, 생성물을 분석하기 위해 1

시간 내지 10시간 간격으로 시료를 채취하였다. 7 L 발효조로부터 35 cc 무균 주사기를 이용하여 10 mL씩 두 개의 시료물 시료구를 통해 취하여 즉시 원심 분리하였다. 원심분리하는 동안 시료 한 방울을 1000배 배율의 phase contrast 현미경을 이용하여 관찰하고 620nm에서 optical density를 측정하였다. 발효 후 씻어서 말려진 모든 pellet는 100°C oven에서 24~48시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 건조된 pellet들은 건조세포량을 결정한 후 PHBV 분석에 사용되었다.

포도당 농도 분석

고정화 효소막(YSI 2365 glucose(dextrose) membrane)이 설치된 포도당 분석기(Yellow Spring Instrument Co.)로 포도당 농도를 측정하였다.

PHBV 분석

PHBV는 acid propanolysis 법(13)으로 분석했다. 이 방법은 propanol과 염산을 이용한 가수분해와 transesterification에 근거하고 있다. PHBV는 단량체로 분해되고 propyl ester로 더욱 전환되어 gas chromatography에 의해 분석된다. Flame ionization detector (FID)가 장착된 GC (HP 5890)를 사용하였고 benzoic acid (Sigma)를 internal standard로 이용하여 PHBV 분석을 하였다. DB-wax가 충전된 silica capillary 칼럼(Chrom Tech)을 사용했다. 칼럼규격은 길이 30 m, 내경 0.32 mm, 두께 0.5 μm 이다. Oven 온도는 초기 60°C에서 0.5분 동안 유지한 후 10°C/min으로 최종 200°C까지 증가시켰다. Oven 온도를 이 값에서 5분 동안 유지하며 각 시료는 19.5분 간 분석하였다. 주입구 온도는 200°C이고 검출기 온도는 225°C이었다. 칼럼 head 압력은 149 psi이며 운반기체로 헬륨(50 psi)을 사용하였다. 검출기에는 수소(19 psi)와 공기(40 psi)를 사용하였고 시료는 1 μl 를 주입하였다.

유기산 농도 분석

유기산 농도의 분석은 sample 0.5 mL에 0.5 N HCl 0.5 mL를 첨가한후 PHBV 분석과 동일한 조건에서 동일한 GC (HP 5890)를 사용하였다. Internal standard로 hexanol 0.2 g (Sigma)과 농축된 염산 40 mL를 증류수에 가하고 그 부피를 1000 mL로 조정하여 사용하였다.

결 과

1. 각 유기산 및 유기산 혼합액을 이용한 *A. vinelandii* UWD 균주의 생장

• 개별 유기산을 이용한 균주의 생장

돼지분뇨 원액내에 들어있는 주요 탄소원은 분석결과 acetic acid, propionic acid 및 butyric acid 이고 평균 농도는 각각 7.2 g/L, 2.2 g/L 및 2.7 g/L 이었다. 이러한 돼지분뇨 원액 또는 희석된 상태의 농도에 해당하는 acetic acid, propionic acid, butyric acid를 각각 단독 탄소원으로 포함하는 Burk 배지를 이용하여 *A. vinelandii* UWD 균주를 플라스크 배양하였다. 각 유기산의 농도범위는 acetic acid 0.38~8.0 g/L, propionic acid 0.3~3.0 g/L 및 butyric acid 0.3~3.0 g/L 이었다.

세 가지 유기산의 경우 모두 너무 낮은 유기산 농도에서 세포

생장이 저조하였고, 너무 높은 농도에서는 세포 생장이 저해되었다(14,15). 이 때 Burk 배지 농도 2배 또는 세 배에 해당하는 비탄소원 영양소를 추가하여도 세포생장이 증가하지 않은 것으로 보아 성장저하가 영양소 제한 때문이 아니었다. pH 측정 결과 세포의 성장저하는 유기산의 소모로 인한 pH의 상승 때문이었다. 예를들어 초기 acetic acid의 농도가 6.25 g/L일 때 pH는 세포가 성장함에 따라 초기값 6.9에서 8.4로 증가하였고 그 후 세포생장이 감소하다가 정지하였는데 배지에는 acetic acid가 약 2.5 g/L정도 남아있었다(Figure 1) Acetic acid의 경우 0.38~4.0 g/L의 농도범위에서 산이 전량 소모되었으나 이보다 더 높은 경우 1.5~35 g/L의 acetic acid가 소모되지 않고 배지중에 잔류하였다. 반면 propionic acid와 butyric acid의 경

우는 실험에 사용된 농도범위에서 전량 소모되었다.

A. vinelandii UWD의 비성장속도를 각 유기산 농도의 함수로 나타내었다(Figure 2). 앞절에서 언급한 pH 증가로 인한 성장저하 영향을 배제하기 위하여 비성장속도는 지수생장기의 초기부분의 값을 사용하였다. Acetic acid의 경우 세포생장에 적합한 농도범위는 1.0~3.5 g/L이었다. 비성장 속도는 산 농도가 3.0 g/L일 때 0.33 hr^{-1} 로 최대였고 아세트산 농도가 3.5 g/L 이상일 때 감소하였다. Propionic acid의 경우 세포생장에 적절한 농도범위는 0.7~2.0 g/L였는데, 이는 acetic acid에 비하여 더 낮고 범위가 좁았다. 비성장속도는 propionic acid의 농도가 1.0~1.5 g/L일 때 0.3 hr^{-1} 로 최대였고 농도가 높은 영역에서 acetic acid의 경우보다 비성장속도가 급격히 감소하였다. 생장에 적절한 butyric acid의 농도범위는 0.5~2.0 g/L로서 propionic acid의 적정농도범위와 유사하였다. Butyric acid의 농도가 1.5 g/L 일 때 비성장속도는 0.24 hr^{-1} 로 최대였다.

• 유기산 혼합액을 이용한 균주의 생장

세포 생장에 가장 적합한 돼지분뇨의 희석 배율을 결정하기 위해서 유기산 혼합물을 탄소원으로 하는 플라스크 배양실험을 수행하였다. 돼지분뇨의 원액 또는 희석액을 모사한 유기산 혼합물을 기질로하여 *A. vinelandii* UWD 균주를 배양하였다. 돼지분뇨 원액을 모사한 유기산 혼합물의 농도는 acetic acid 7.5 g/L, propionic acid 2.0 g/L 및 butyric acid 2.0 g/L 이었다. 탄소원 이외의 성분이 제한되는 것을 방지하기 위해 Burk 배지의 2배에 해당하는 농도를 사용하였다. 돼지분뇨 희석 비율에 따른 비성장속도와 최대 O.D.의 변화를 Figure 3에 나타내었다. 돼지분뇨를 4배로 희석한것에 해당하는 유기산 혼합물을 기질로 하였을 때, 비성장속도가 0.293 hr^{-1} 로 가장 높았다. 두배로 희석한 돼지분뇨에 해당하는 유기산 혼합물을 사용하였을 때 비성장속도는 0.263 hr^{-1} 로 조금 낮았으나 O.D.는 거의 두 배 높았는데 (이 두 가지 경우 유기산이 모두 완전 소모되었음), 이는 두 배 희석까지는 생장을 크게 저하시키지 않는 것을 의미한다. 비생

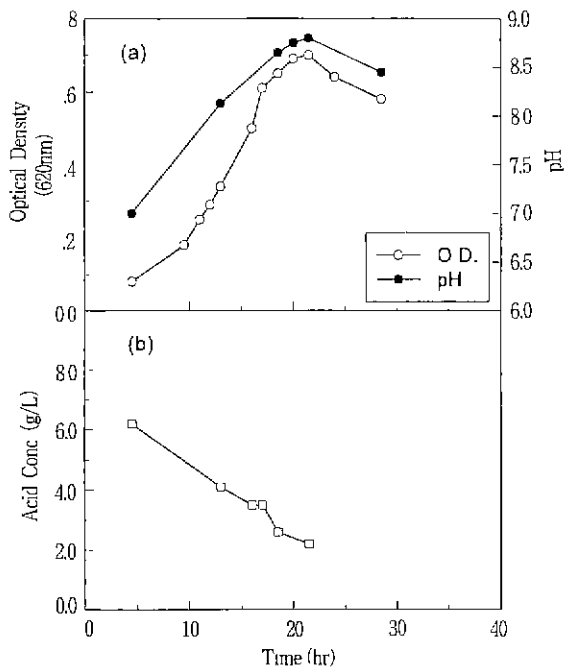


Figure 1 Growth of *A. vinelandii* UWD on 6.25 g/L of acetic acid with Burk medium: (a) optical density (at 620nm) and pH change with time. (b) acid concentration change with time.

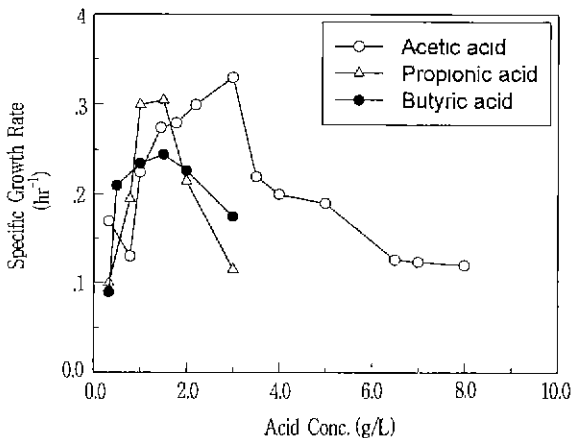


Figure 2. Specific growth rate of *A. vinelandii* UWD on acetic acid, propionic acid and butyric acid.

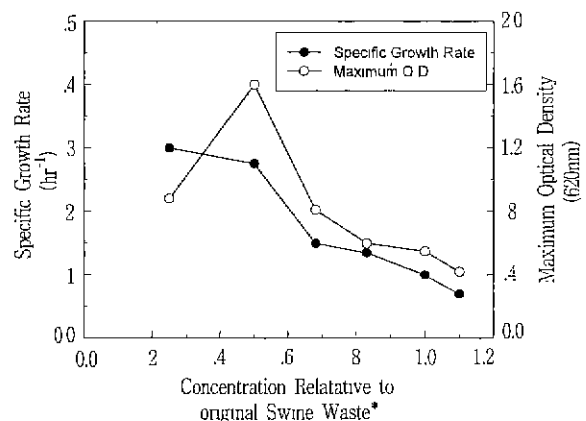


Figure 3 Specific growth rate and maximum optical density of *A. vinelandii* UWD grown on acid mixtures simulating different concentrations of swine waste.

*1.0 on the X-axis means an acid mixture containing 7.5 g/L of acetic acid, 2.0 g/L of propionic acid and 2.0 g/L of butyric acid.

장속도와 최대 세포농도를 보아, 두배로 희석된 돼지분뇨에 해당하는 유기산 혼합액이 세포생장에 최적 농도임을 알 수 있었다.

2. 돼지분뇨를 이용한 *A. vinelandii* UWD 성장과 고분자 생산

돼지분뇨를 모사한 유기산 혼합물보다 더 복잡한 조성을 가진 실제 돼지분뇨를 이용하여 *A. vinelandii* UWD 균주가 고분자를 생산하는가를 연구하였다. 두 배로 희석한 돼지분뇨만을 탄소원으로 이용하는 배양을 2 L 발효기에서 1 L를 조업부피로 하여 수행하였다. 통기량을 충분히 하기 위해 1 L/min의 공기 공급과 500 rpm의 교반속도를 사용하였다. pH는 7.3으로 제어하였으며 온도는 30°C를 유지하였다.

두 배로 희석한 돼지분뇨에는 주 탄소원으로 acetic acid, propionic acid, butyric acid가 각각 3.87 g/L, 1.14 g/L 및 1.28 g/L 함유되어 있고 이 유기산들은 배양 28.4 시간후 전량 소모되었다. *A. vinelandii* UWD 균주는 acetic acid를 우선 사

용하였고 그 농도가 대략 2.4 g/L로 감소되었을 때 propionic acid를 사용하였고 butyric acid는 더 시간이 지나서 소모되었다(Figure 4a).

두배로 희석된 돼지분뇨를 이용한 *A. vinelandii* UWD 성장을 Figure 4b에 나타내었다. 집중후 18시간이 지나 본격적으로 성장하였는데, 이는 돼지분뇨를 모사한 유사한 농도의 유기산 혼합물을 이용한 플라스크 실험의 경우 보다 8시간이 더 지연된 것이다. 돼지분뇨를 기질로 한 비생장속도는 0.173 hr^{-1} 이었는데, 이 역시 플라스크 실험에서의 0.263 hr^{-1} 보다 낮은 것이었다. 이는 배양조건의 차이와 돼지분뇨의 복잡한 조성때문으로 추정된다. 최종의 총건조세포량은 1.17 g/L이었으며, 세포질량 수율은 $0.173 \text{ g 세포/g 총 유기산}$ 이었다.

돼지분뇨로부터 생산된 고분자는 HB와 HV로 구성되고 HV의 함량은 매우 낮았다. Acetic acid만이 이용되는 기간에는 고분자가 거의 축적되지 않았다(Figure 4c). 세포건조질량중의 고분자 함량 (PHBV wt%)은 propionic acid와 butyric acid가 소모되면서 증가되기 시작하였다. 그러나 최종 PHBV 양(wt%)은 약 5%에 불과하였으며, 생산수율은 $0.010 \text{ (g·PHBV)/(g·총 유기산)}$, 최종 고분자농도는 0.06 g/L이었다.

3. 돼지분뇨와 포도당이 혼합된 배지에서의 기질의 이용과 세포 성장

앞의 실험결과에서 두 배로 희석한 돼지분뇨만을 탄소원으로 이용했을 때에는 세포의 성장과 고분자 생산이 잘 이루어지지 않았다. 이는 돼지분뇨내에 탄소원의 양이 한정되어 있기 때문이므로 돼지분뇨만을 기질로 한 배양조건의 최적화로는 세포생장에 더 이상 큰 향상을 기대할 수 없다. 배양이 끝난후 돼지분뇨중에 암모늄, 인, 무기염 등은 여전히 남아있는 것으로 보아 고분자 생산의 증대와 폐기물의 효율적 처리라는 관점에서 보면 돼지분뇨에 탄소원을 다량 함유한 다른폐기물을 첨가하면 상호 보완된 적절한 배지가 될것으로 보인다. 본연구에서는 다른 탄소원의 대표격으로 포도당을 가정하고 두 배로 희석한 돼지분뇨와 30 g/L 포도당 혼합물에서의 *A. vinelandii* UWD의 성장과 고분자 생산실험을 7 L 발효조에서 수행하였다. 이는 두 배로 희석한 돼지분뇨를 모사한 유기산 혼합물에 여러농도의 포도당을 첨가한 실험에서 30 g/L의 포도당 첨가시 균 성장과 PHB 생산이 가장 우수하다는 연구결과에 근거하였다(Ryu, Personal communication).

A. vinelandii UWD 균주는 acetate와 포도당이 혼합된 배지에서 diauxic 성장 형태를 나타내는 균주로 알려져 있다(16). Acetate가 우선 탄소원으로 이용되며 이때 포도당 이용에 필요한 효소 합성이 억제되어 포도당의 대사작용은 acetate가 고갈되고 포도당을 섭취하는데 필요한 효소가 합성되는 지연기 이후에 이루어진다. 돼지분뇨와 포도당의 혼합물에서 *A. vinelandii* UWD가 성장할 때에도 diauxic 성장형태가 관찰되었다(Figure 5a). 두배로 희석한 돼지분뇨에는 acetic acid, propionic acid, butyric acid가 각각 3.50 g/L, 1.14 g/L, 1.36 g/L 함유되었으며 valeric acid도 0.36 g/L 검출되었다. 유기산은 포도당보다 먼저 이용되며 유기산중에 acetic acid가 가장 먼저 이용되었다. Propionic acid는 acetic acid의 농도가 2.0 g/L 이하로 감소한 이후 사용되었고 butyric acid는 propionic acid가 이용된 후 valeric acid는 butyric acid가 이용된 후에 사용되었다. 유기산

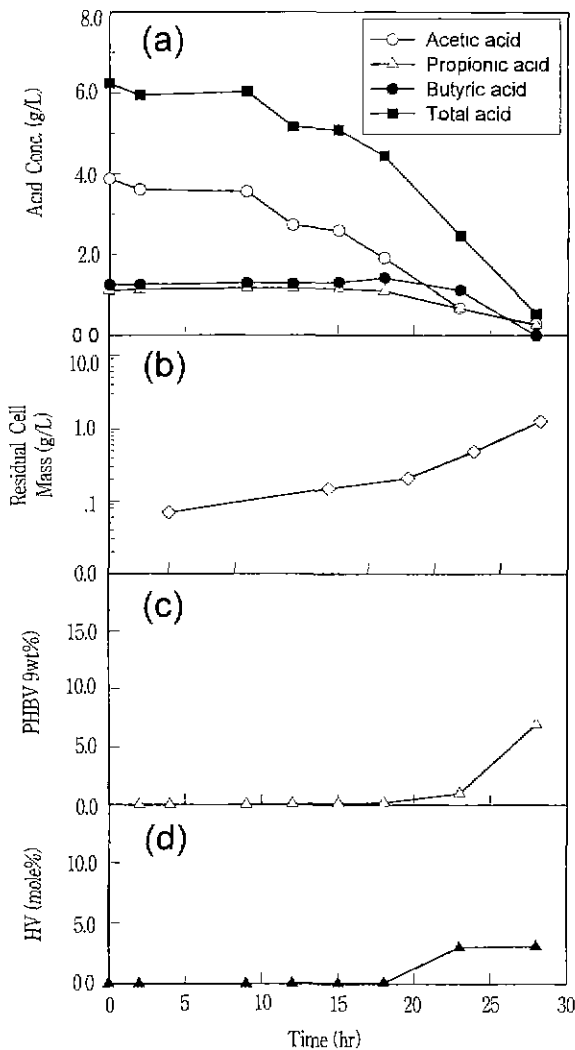


Figure 4 Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in two times diluted swine waste; (a) carbon substrates utilization; (b) biomass production; (c) polymer production; (d) HV production.

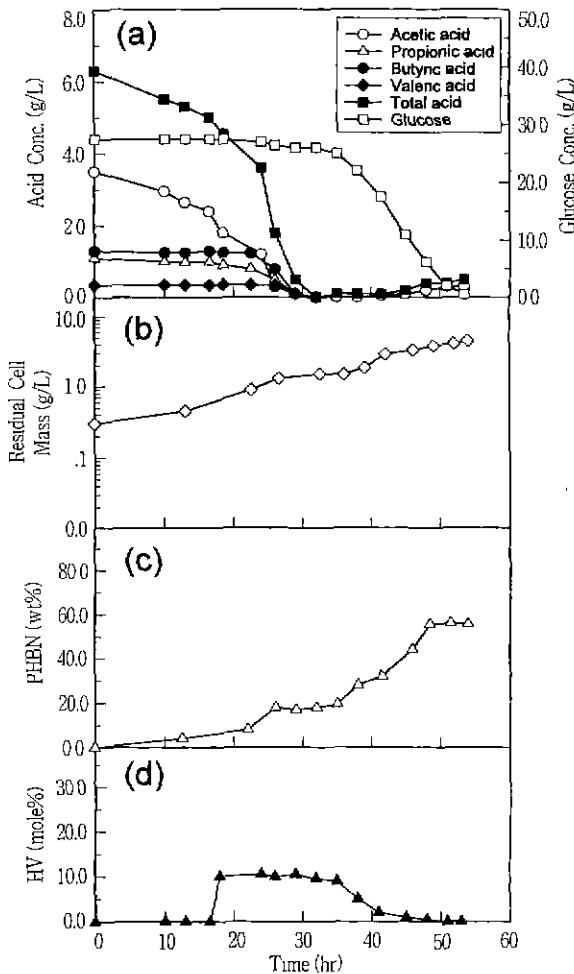


Figure 5. Substrates utilization, cell growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in the mixture of two times diluted swine waste and 30g/L of glucose: (a) carbon substrates utilization; (b) cell growth; (c) PHBV production; (d) HV content (mole%) in the polymer

을 이용하는 후반기에는 네 가지 유기산이 동시에 섭취되어, 30 시간 정도 경과되었을 때 모두 고갈되었다. 그 후 4시간의 지연 이후 포도당이 감소하기 시작하였다. 포도당 이용단계에서 acetic acid와 butyric acid가 소량 생산되어 pH가 낮아졌으며 포도당은 53시간 경과 후 완전히 소모되었다

Figure 5b는 Figure 5a에서의 기질이용 패턴에 대응하는 *A. vinelandii* UWD 세포량 변화를 보여준다. 산(acid) 소모 단계에서 비성장속도는 약 0.073 hr⁻¹로 일정하였다 산 소모 단계에서 뚜렷한 지연기가 관찰되지 않았다 이는 비록 유기산을 사용하는 우선순위에 차이가 있기는 하지만 유기산간의 전이 순조롭다는 것을 의미한다. 이것은 아마도 C₂-C₅ 지방산들의 대사 경로에 관여하는 효소들이 동일하기 때문일 것이다(17). 유기산이 고갈되었을 때 세포생장은 일시 정지하였다가 포도당을 이용하여 다시 성장을 시작하여 비성장속도가 0.090 hr⁻¹가 되었다. 용존산소량은 지연기 동안 증가하였고 포도당 이용이 시작되었을 때 다시 감소되었다(data not shown). 유기산 소모단계에서 세포량(RM) 수율은 이전 실험결과인 0.173 g/(g·유기산)과 비슷한 0.167 g/(g·유기산)이었다. 포도당 소모단계에서의 세포량 수율은 0.117 g/(g·포도당)이었다. 최종 건조 세포량은 9.36

g/L 였다.

4. 돼지분뇨와 포도당이 혼합된 배지에서의 고분자 생산

Acetic acid만이 소모되는 기간동안 PHBV는 거의 생성되지 않았다. 이는 acetate 대사작용이 NADH-소비 형태이기 때문에 PHBV 생산과정과 경쟁적으로 일어나기 때문인 것으로 보인다 (14,17). Propionic acid, butyric acid, valeric acid가 소모됨에 따라 PHBV 양은 18.3 wt% 까지 증가하였다(Figure 5c). 유기산 소모단계의 후반기에서 PHBV의 비생산속도는 0.084 (g PHBV)/(g·RM-hr)였다. 생산수율은 0.049 (g·PHBV)/(g·유기산)이었다. 지연기동안 세포내의 PHBV 양(wt%)은 거의 일정하게 유지되었다. 포도당 대사가 시작된 이후 PHBV의 양은 급격히 증가하였고, 최대값인 55.6 wt%에 이르렀으며, 최종 PHBV 농도는 5.16 g/L였다. PHBV의 비생산속도는 45시간까지 0.133 (g·PHBV)/(g·RM-hr)로 증가되었다가 포도당이 고갈됨에 따라 감소하였다. 포도당 소모단계에서의 총생산 수율은 0.2 (g·PHBV)/(g·포도당)이었고 이는 유기산 소모단계의 4배이다.

Copolymer 형성을 위한 HV 생산은 유기산 소모단계에선 최대값 10.0 mol%에 이르렀다. 포도당 소모단계에선 HB의 증가로 인해 HV 양(mol%)은 계속 감소하였으나(Figure 5d) 총 HV 양은 0.045 g/L에서 유지되었다. HV 생산은 돼지 분뇨내의 valeric acid로부터 주로 생성되었다. 그러나 22 시간이 경과되었을 때까지 valeric acid가 거의 소모되지 않았음에도 불구하고 이미 HV가 0.8 wt% 생산되어 있었는데 이는 흡수 탄소원인 propionic acid로부터 유래된 것이다.

두 배로 희석된 돼지분뇨에 포도당 30 g/L이 첨가됨으로써 최종 총 세포량은 두배로 희석한 돼지분뇨만을 사용할 때 보다 8배가 더 높은 9.36 g/L로 증가 되었다. 최종 PHBV 농도도 5.16 g/L으로 두배로 희석한 돼지분뇨에서 얻어진 농도보다 86배가 더 높았다. 이러한 결과는 돼지분뇨로부터 PHBV를 생산할 때 탄소원이 풍부한 다른 폐기물원료를 동시에 사용하면 미생물 및 고분자 생산에 적절히 균형잡힌 배지가 되어 생산량을 증대시킬 수 있다는 것을 의미한다.

요 약

돼지분뇨내의 주요 탄소원은 acetic acid, propionic acid 그리고 butyric acid로 각각의 농도는 7.2 g/L, 2.2 g/L 그리고 2.7 g/L이었고 충분한 양의 질소원과 무기질원을 함유하고 있었다 개별 유기산을 이용한 shake flask 실험에서 *Azotobacter vinelandii* UWD균주 성장에 필요한 최적의 유기산 농도는 acetic acid 1.0~3.5 g/L, propionic acid 0.7~2.0 g/L, butyric acid 0.5~2.0 g/L 였다. 진탕배양기 및 발효조 실험에서 2배로 희석된 돼지분뇨나 이와 유사한 농도의 유기산 혼합물이 세포생장에 최적이었다. 그러나 희석된 돼지분뇨만으로는 탄소원의 양이 제한되었기 때문에 포도당 30 g/L를 첨가하여 세포조건증량 및 PHBV 량을 각각 8배 및 86배 증가시켰다. *A. vinelandii* UWD의 탄소기질 선호도에 차이를 나타냈다. 유기산이 포도당보다 먼저 이용되었고 유기산의 이용은 acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid 순이었다.

감 사

본 연구는 한국과학기술재단의 '96 핵심전문 연구과제(과제번호 . 961-1105-031-2)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 논문작성을 도와준 생물화학실험실 김태용군에게 감사한다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Doi, Y., Y. Kawaguchi, N. Koyama, S. Nakamura, M. Hiramitsu, Y. Yoshida and H. Kimura (1992). Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 103~108.
3. 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-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.
4. 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.
5. 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, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **8**, 631~635.
6. 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.
7. Asenjo, J. A., A. S. Schmidt, P. R. Andersen and B. A. Andrews (1995), Effect of Single Nutrient Limitation on poly- β -hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 497~502.
8. Park, C. H. and V. K. Damodaran (1994), Biosynthesis of poly-3-hydroxy-butyrate-co-3-hydroxyvalerate from Ethanol and Pentanol by *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Prog.*, **10**, 615~620.
9. Kalousek, S., G. Schrot, W. Lubitz and U. Blas (1994), Expression of the *Alcaligenes eutrophus phbD* Gene in *Escherichia coli* using a Positive Selection Vector Based on Phage Lambda Lysis Genes, *J. Bacteriol.*, **33**, 15~19.
10. Doi, Y. (1990), *Microbial Polyesters*, p.11~32, CVH, New York.
11. Page, W. J., (1992), Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in Beet Molasses Culture, *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 149~158.
12. Page, W. J. and O. Knosp (1989), Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1334~1339.
13. Riss, V. and W. Mai (1988), Gas Chromatographic Determination of poly- β -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass after Hydrochloric Acid Propanolysis, *J. Chromatogr.*, **445**, 285~289.
14. 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.
15. Page, W. J., Manchak, J. and Rudy, B. (1992), Formation of poly(hydroxy-butyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2866~2873.
16. George, S. E., C. J. Costenbader and T. Melton (1985), Diauxic Growth in *Azotobacter vinelandii*, *J. of Bacteriol.*, **164**, 866~871.
17. Gottschalk, G. (1985), *Bacterial Metabolism*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.