한국생물공학회지 제15권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 6, 670-672(2000)

포도당 및 유기산을 이용한 *Azotobacter vinelandii* UWD 의 생장 특성

김 태 용 · †박 창 호
경희대학교 화학공학과, 경희대학교 산학협력기술연구원
(접수 : 2000. 7. 28., 게재승인 : 2000. 9. 15.)

Growth Characteristics of *Azotobacter vinelandii* UWD Using Glucose and Organic Acids as Substrates

Tae-Yong Kim and Chang-Ho Park†
Dept. of Chemical Eng. and Industrial Liaison Research Institute, Kyung Hee University, Yongin-si, Kyunggi-do 449-701, Korea
(Received : 2000. 7. 28., Accepted : 2000. 9. 15.)

Azotobacter vinelandii UWD synthesizes poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), one of the biodegradable polymers, when odd and even number carbon sources are simultaneously added to a medium. In this study, we investigated the specific growth rate of *Azotobacter vinelandii* UWD on propionic acid and valeric acid. The specific growth rates were 0.183 hr^{-1} and 0.137 hr^{-1}at 1.0~1.5 g/L of propionic acid and 1.0 g/L of valeric acid, respectively. When a mixture of 0.75 g/L of propionic acid and 0.5 g/L of valeric acid was added to the medium, the specific growth rate was 0.196 hr^{-1}, which was equal to or higher than those of the individual organic acids. Among 10~50 g/L of glucose cell growth was best at 20 g/L.

Key Words : *Azotobacter vinelandii* UWD, PHA, PHBV, organic acid mixtures

서 론

생활에 유용하게 사용되는 고분자 제품은 분해성이 거의 없어 사용 후 폐기하였을 때 심각한 환경오염을 유발하기 때문에 인류는 이 문제를 해결하기 위해서 폐기 후 쉽게 분해되는 분해성 고분자의 개발 및 사용에 노력해 왔다. 현재 난분해성 고분자는 가격이 비교적 저렴한 녹말과 석유화학공업으로부터 얻어진 난분해성 고분자 물질을 혼합 및 가공하여 만드는 방법이 사용되고 있다. 그러나 자연계에 방치될 경우 난분해성 성분은 그대로 남게 되어 근본적인 해결이 모색되고 있다.

Polyhydroxyalkanoates (PHA)는 자연계 일부 미생물에 의해 N, P, S, Mg, K 등 일부 영양소 제한 상태에서 생성되는 것으로 생분해성 및 생체적합성을 갖는 물질이다(1). PHA 중 가장 잘 알려진 예는 polyhydroxybutyrate (PHB) 와 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)이다. PHB는 1926년 *Bacillus megaterium* 에서 최초로 분리되었고 그 후 여러 종류의 박테리아를 이용해 세포 건조중량의 80% 이상 얻을 수 있음이 알려졌다. 그 후 1974년 PHB보다 물성이 좋은 PHBV가 발견되었다(2).

†Corresponding Author : Dept. of Chemical Eng., Kyunghee University, Yongin-Si, Kyunggi-Do 449-701, Korea
Tel : 82-31-201-2531, Fax : 82-31-202-1946
E-mail : chpark@khu.ac.kr

한편 PHBV 생산에 주로 사용된 *Alcaligenes eutrophus* 나 methylotroph 균주들은 우선 탄소원이 충분한 배지에서 생장한 후 질소, 인, S, Mg, K, Fe 등의 비탄소 성분중 어느 하나의 농도가 고갈되어야만 PHBV를 생산할 수 있다(9). 따라서 기존의 연구에서는 세포 생장을 위한 배지를 만들 때 임의로 어느 한 성분의 첨가량을 필요량보다 감소시켜 세포 생장 후 그 성분이 제한 상태에 들어가도록 하였다. 그리고 기존의 균주를 사용하기 위해서는 어느 한 성분을 분리 제거하여 그 양이 제한된 상태까지 감소시켜야 하는데 이것은 경제성이 없다고 판단된다.

그러나 *Azoteobacter vinelandii* UWD 균주는 유전공학적으로 변형되어 특정 영양소 제한을 가하지 않고도 PHA보다 물성이 뛰어난 PHBV를 생산한다(3). PHB는 포도당 등 탄소수가 짝수인 기질만을 사용하였을 때 만들어지지만 PHBV는 propionic acid와 같은 홀수의 탄소수를 가진 기질이 첨가되어야 생산될 수 있다(4,5). 본 연구에서는 홀수 탄소원인 C_3와 C_5 유기산을 배지 중에 첨가하여 균주생장에 유리한 농도 조건을 탐색하였다.

재료 및 방법

배지 및 균주 유지

PHBV 생산에 관한 연구는 대부분 *Alcaligenes eutrophus*

와 methylotroph를 균주로 이용하고 있으나, 이 균주들은 우선 탄소원이 충분한 배지에서 생장한후 질소, 인, S, Mg, K, Fe등의 비탄소 성분중 어느 하나의 농도가 고갈되어야만 PHB(V)를 생산할 수 있으므로, 본 연구에서는 PHB(V) 생산을 위해 영양소 제한이 필요 없는 것으로 알려진 *Azotobacter vinelandii* UWD (ATCC 53799)를 ATCC에서 동결건조 상태로 구입하였다. 배지는 기본적으로 Burk 배지를 이용하지만 *A. vinelandii* UWD에 적합하도록 변형된 Burk 배지(6)를 사용하였다. 주요 구성성분은 KH_2PO_4(0.2 g/L), K_2HPO_4(0.8 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$(0.2 g/L), $CaSO_4 \cdot 2H_2O$(0.1 g/L), $FeCl_3$(18 μmol), Na_2MoO_4(1 μmol), 그리고 탄소원으로서 포도당 및 유기산을 연구의 목적에 부합하도록 첨가하였다. 균주의 배양과 보존을 위해 포도당 배지를 사용하여 pH 7.3, 30℃ 조건에서 계대 배양하였으며 균주는 30℃조건에서 배양시키고 4℃에서 냉장보관하며 유지시켰다.

유기산 첨가 실험

균주의 생장에 있어서 공급할 수 있는 탄소원은 여러 가지가 있지만 경제성 등을 고려하여 각종 식품가공 폐기물 등으로부터 얻을 수 있는 유기산을 이용하였다. 본 실험에서는 *A. vinelandii* UWD 균주의 생장에 필요한 탄소원으로 acetic acid, propionic acid, valeric acid 를 사용하고 각각의 유기산 농도를 최적화 하였다. 실험 배지중에 첨가한 acetic acid, propionic acid, valeric acid 의 농도범위는 각각 1~5 g/L, 0.5~3 g/L, 0.2~3 g/L 이었다. 유기산을 첨가한 후의 균주 생장은 진탕배양기를 이용하여 실험하였다. 한편, 실험에 사용한 접종배양액은 진탕배양기를 이용하여 16~18시간 동안 250 rpm, 30℃에서 미리 배양하여 준비하였다. 그런 다음 접종액 4 ml을 취하여 각각의 유기산 또는 이들 유기산이 일정 비율로 혼합되어 첨가된 배지에 접종하였다. 실험은 배지 80 ml이 담긴 250 ml 삼각 플라스크에서 18~24시간 동안 생장시키며 진행되었다. 생장조건은 250 rpm, 30℃로 24시간 동안 배양하며 일정시간 간격으로 시료 채취하였다. 시료는 spectrophotometer를 이용하여 620 nm 조건에서 O.D.를 측정하였고, O.D. 와 시간을 표시한 semi-log 표를 이용하여 대수성장기에서의 비생장속도를 측정하였다.

그리고 본 연구에서는 propionic acid 와 valeric acid의 최적농도를 앞의 실험을 통하여 알아낸 뒤 이들 유기산 혼합액을 세 가지 만들어(propionic acid : valeric acid=0.15 g/L : 0.9 g/L, 0.75 g/L : 0.5 g/L, 1.35 g/L : 0.1 g/L) 플라스크 진탕실험에서 생장 속도를 측정하였다.

포도당 첨가 실험

유기산 이외에 포도당을 이용하여 균주의 생장을 살펴보았다. 본 실험에서는 탄소원으로서 유기산과 포도당의 영향을 비교해봄으로써 추후 실험의 기초자료로 이용할 수 있다. 배지중에 포도당을 첨가하는 것이 균주 생장측면에서 유리하며 포도당 농도가 30 g/l 일 때 비교적 좋은 결과를 나타낸 문헌(7)을 이용하여 농도범위를 선택하였다. 플라스크 진탕배양조건으로 진행하고 포도당 농도는 변형된 Burk 배지 1L에 대하여 각각 10 g, 20 g, 30 g, 40 g 및 50 g을 첨가하여 시간에 따른 생장을 비교하였다. 포도당을 첨가한 후의 균주 생장은 진탕배양기를 이용하여 실험하였다. 그리고 균주 생장에 관한 분석은 유기산 첨가 실험 모두 동일한 조건에서 진행되었다.

결과 및 고찰

많은 미생물의 경우 유기산은 포도당에 비하여 선호도가 떨어지는 기질이다(8). 유기산의 농도가 너무 높거나 낮은 경우 세포생장이 저해된다(7). 본 연구에서 사용된 acetic acid, propionic acid, valeric acid의 농도범위는 각각 1~5 g/L, 0.5~3 g/L, 0.2~3 g/L 이었다. 측정된 O.D.를 대수성장기의 비생장속도로 환산한 결과 acetic acid는 3.0 g/L일 때 0.33 hr^{-1}, propionic acid는 1.0~1.5 g/L일 때 0.183 hr^{-1} 그리고 valeric acid는 1.0 g/L일 때 0.137 hr^{-1}의 가장 높은 비생장속도를 나타냈다(Figure 1).

Propionic acid를 농도별로 배지에 첨가하여 균주의 생장을 관찰하였다(Figure 2). Propionic acid의 경우 1.5~3.0 g/L을 첨가한 배지에서의 균주 생장은 비슷한 양상을 나타내었으나 농도가 0.5~1.0 g/L인 경우는 약 15시간 배양 후 거의 일정하게 세포 농도가 유지되었다. 이것은 탄소원으로서의 propionic acid가 포도당이나 acetic acid에 비하여 균주가 이용하기에 유리하지 않으며 또한 배양 초기부터 농도가 낮아서 나타난 현상이라 생각된다(3).

균주 생장에 있어서 valeric acid는 5가 탄소원이므로 3가 탄소원인 propionic acid 보다 불리하여 비생장속도가 낮게 나오리라는 예상과 일치하였다. 그리고 propionic acid와 valeric acid 각각의 최고 비생장속도를 나타내는 유기산 농도의 절반씩을 혼합하여(즉 propionic acid 0.75 g/L와 valeric acid 0.5 g/L의 혼합) 실험한 결과 생장속도는 0.196 hr^{-1} 이었다.

포도당을 농도별(10~50 g/L)로 배지에 첨가하여 균주의 생장을 관찰한 결과 포도당 농도가 20 g/L일 때 생장이 최대값을 보였다(Figure 3). 그러나 포도당 농도가 30 g/L 이상인 배지에서는 균주의 생장이 저조하였는데, 이것은 유기산의 경우처럼 기질이 고농도로 공급되었을 때 균주생장이 저해되었음을 의미한다. 본 연구는 유기산이 풍부한 폐기물을 이용

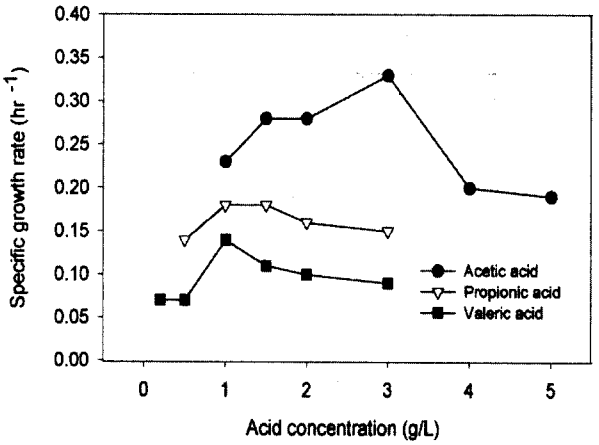

Figure 1. Specific growth rate of *A. vinelandii* UWD using organic acids as substrates.

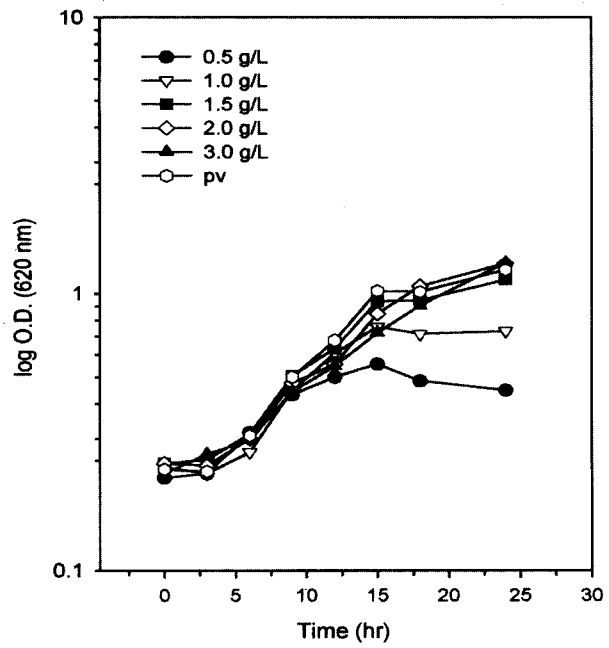

Figure 2. Effect of propionic acid concentration on the growth of *A. vinelandii* UWD (pv means a mixture of 0.75 g/L of propionic acid and 0.5 g/L of valeric acid).

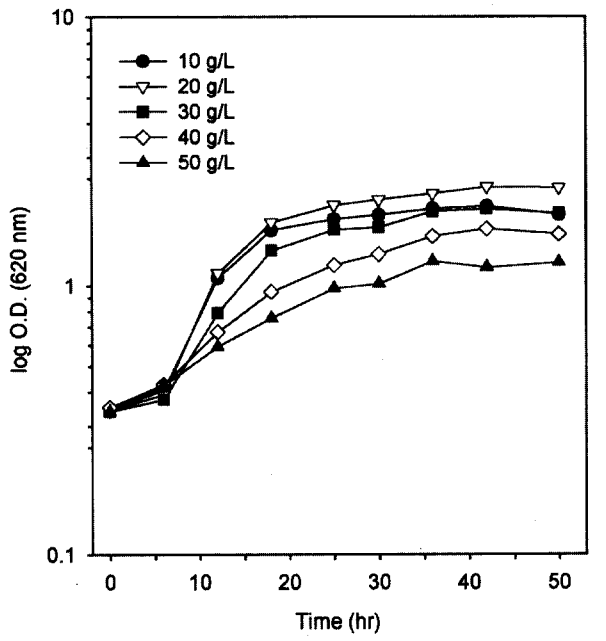

Figure 3. Effect of glucose concentration on the growth of *A. vinelandii* UWD.

하여 PHBV를 생산할 때 포도당과 같은 탄소원을 추가로 첨가하면 효과적으로 PHBV를 생산할 수 있다는 것을 보여주었다.

요 약

Azotobacter vinelandii UWD는 배지에 짝수의 탄소원외에 홀수의 탄소원을 첨가했을 때 생분해성 고분자인 PHBV를 합성한다. 본 실험에서는 propionic acid와 valeric acid를 첨가한 후 세포생장과 비생장속도를 관찰하였다. Propionic acid 농도가 1.0~1.5 g/L, valeric acid 농도가 1.0 g/L일 때 세포생장이 다른 농도에서보다 높았으며, 이때의 비생장속도는 각각 0.183 hr^{-1}, 0.137 hr^{-1}이었다. 그리고 이들 유기산을 각각 0.75 g/L, 0.5 g/L 혼합하여 배지중에 넣었을 때 비생장속도는 유기산을 단독으로 첨가한 경우보다 높게 나타났다. 포도당 농도가 10~50 g/L 에서 실험한 결과 20 g/L 일 때 생장속도가 가장 높았다.

감 사

이 논문은 1998년도 학술진흥재단 자유공모과제(1998-001-E01383)에 의하여 연구되었으며 이에 감사 드립니다. 이 연구는 또한 2000년도 경희대학교 지원을 받았습니다.

REFERENCES

1. Doi, Y. (1990), Micobial Polyesters, VCH publishers, New York.
2. Wallen, L. L., and W. K. Rohwedder (1974), Poly-β-hydroyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* **8**, 576-579.
3. Cho, K.-S., H. W. Ryu, C.-H. Park, and P. R. Goodrich (1997), Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyralerate) from swine waste liquid by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 7-10.
4. Page, W. J. (1989), Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 329-333.
5. Page, W. J., J. Manchak, and B. Rudy (1992), Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **58**, 2866-2873.
6. Page, W. J. and O. Knosp (1989), Hyperproduction of poly-β-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1334-1339.
7. Qian, L. (1995), Production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobactor vinelandii* UWD from swine waste and organic acid mixtures, M.S. Thesis, Univ. of Minnesota, Minnesota, U.S.A.
8. Gettschalk, G. (1985), Bacterial Metabolism, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
9. Park, C.-H. and V.K. Damodaran (1994), Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate), *Biotech. Bioeng.*, **44**, 1306-1314.