

*Pseudomonas oleovorans*의 유가식 배양에 의한 medium chain length Polyhydroxyalkanoates (MCL-PHA) 생산

김범수, 임희연

건양대학교 생명환경공학부

전화 (0461) 730-5249, FAX (0461) 736-4078

Abstract

Pseudomonas oleovorans was cultivated to produce medium chain length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHA) from octanoic acid and ammonium nitrate as carbon and nitrogen source, respectively, by a pH-stat fed-batch culture technique. The octanoate concentration of the culture broth was maintained below 4 g/L by feeding the mixture of octanoic acid and ammonium nitrate when the culture pH rose above high limit. The effect of the ratio of octanoic acid to ammonium nitrate (C/N ratio) in the feed on the PHA production was examined. The final cell concentrations of 62.5, 54.7, and 9.5 g/L, PHA contents of 62.9, 75.1, and 67.6% of dry cell weight, and productivities of 1.03, 0.632, and 0.161 g/L/h were obtained when the C/N ratios in the feed were 10, 20, and 100 g octanoic acid/g ammonium nitrate, respectively.

서론

미생물이 불균형적 성장조건에서 체내에 축적하는 PHA는 합성 고분자와 유사한 성질을 가지면서 자연계에서 완전히 생분해되므로 많은 관심의 초점이 되어왔다. 특히 *Pseudomonas* 계열의 미생물이 합성하는 MCL-PHA는 T_g 가 $-35\text{ }^\circ\text{C}$ 로 상온 또는 생리온도에서 고무특성을 가진다. 현재 PHA가 기존의 범용 고분자를 대체하지 못하고 있는 이유는 생산단가가 범용 고분자보다 훨씬 비싸기 때문이다. 1994년 11월 현재, polyethylene, polypropylene, polystyrene과 같은 범용 고분자의 가격은 톤당 \$620-960으로 알려져 있다. 반면 PHA의 가격은 비교적 값싸게 생산할 수 있는 short chain length PHA (SCL-PHA)인 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/V)의 경우에도 연간 10,000 톤 규모로 생산시 톤당 \$4400로 범용 고분자 가격의 4.5 - 7 배에 달한다.¹⁾ MCL-PHA는 더 비싼 기질을 이용하여야 하고, 미생물로부터 합성수율, 균체내 PHA 함량 등이 낮으므로 PHB/V 가격보다도 더 비쌀 것으로 예측된다. 따라서 MCL-PHA의 경우, 현재로서는 범용 플라스틱을 대체하기 보다는 생산단가에 영향을 덜 받는 의료용 재료 또는 특수용도

로의 활용이 더 적합할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 MCL-PHA의 경제적 생산을 위한 *Pseudomonas oleovorans*의 고농도 유가식 발효공정을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

사용한 균주는 *P. oleovorans* (ATCC 29347)이었다. 종배양 및 유가식 배양의 초기 배지조성은 octanoic acid 4 g/L, NH_4NO_3 1 g/L, KH_2PO_4 7 g/L, citric acid 0.8 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, 미량원소용액⁴⁾ 3 ml/L였다. 배지의 pH는 10 N NaOH를 사용, 7.0으로 조절하였다.

배양

종배양은 50 ml 배지가 들어있는 250 ml 플라스크를 진탕배양기에서 24 - 48 h 동안 수행하였다. 유가식 배양은 2.5 L 발효조 (한국발효기)에서 초기 1 L의 배지에 종배양 50 ml을 접종하였다. 온도는 30 °C, 공기유속은 1 vvm으로 조절하였다. 발효조의 교반속도는 1300 rpm까지 증가시켰다. 유가식 배양에서의 기질공급방식은 pH-stat 방법이었다. 즉 배양액의 pH가 7.1 이상으로 올라가면 pH 제어용 산펌프에 octanoic acid와 NH_4NO_3 혼합기질이 자동으로 공급되도록 하였다. 공급배지조성은 탄소원/질소원 비 (C/N 비)를 각각 10, 20, 100 (g octanoic acid/g NH_4NO_3)으로 변화시켜 C/N 비에 따른 균체성장 및 PHA 합성효과를 고찰하였다. 균일한 배지를 공급하기 위하여 magnetic bar로 공급배지용액을 교반시켰다.

분석

균체성장을 알아보기 위해 발효도중 소량의 배양액을 취하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 균체농도는 배양액 3 - 5 ml을 원심분리하여 세척한 후 동결건조기에서 24 h 이상 건조시켜 질량을 측정하여 결정하였다. PHA는 기체크로마토그래피 방법으로 분석하였다. 배양액중 octanoic acid 농도는 Ramsay 등의 방법²⁾으로 기체크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

탄소원으로 octanoic acid를 이용하여 *P. oleovorans*를 배양할 경우 4 g/L 이상의 octanoic acid 농도에서는 균체성장이 저해됨이 알려져 있다.²⁾ 또한 배양액중 탄소원이 고갈되면 균체내에 합성된 PHA가 분해되므로 본 연구에서는 배양액중의 octanoic acid 농도를 0 - 4 g/L 로 유지하고자 하였다. 지금까지 문헌에 보고된 *P. oleovorans*의 PHA 함량은 30 - 40% 정도로 낮은 편이며, 질소원 제한이 PHA 합성을 촉진시킨다는 보고³⁾와 그렇지 않다는 보고²⁾가 동시에 있었다. 일반적으로 SCL-PHA를 합성하는 *Ralstonia eutropha*의 경우 질소원 제한은 PHA 합성을 촉

진시키며,⁴⁾ 배양액중 질소원의 완전한 고갈보다는 PHA 합성을 최대로 하는 최적 농도가 있음도 보고되었다.⁵⁾ 본 연구에서는 *P. oleovorans*의 경우에도 질소원이 완전 고갈되었을 경우에는 PHA 함량이 30 - 40%에 불과했던 기존의 결과³⁾를 참고해서 배양도중 질소원을 탄소원과 함께 공급하는 것이 PHA 함량을 증가시킬 수 있을 것이라고 생각하였다. 탄소원과 질소원이 동시에 자동으로 공급되기 위해 배양액의 pH 변화를 이용하는 새로운 pH-stat 방법을 개발하였다. 배양액의 pH를 감소시키는 요인에는 유기산과 같은 대사산물의 생성이나 질소원으로 암모니아를 이용하는 경우 등이 있다. 반면 탄소원으로 octanoic acid와 같은 산을 사용하는 것은 배양액의 pH를 증가시키는데 기여한다. 따라서 *P. oleovorans*와 같이 유기산 생성이 많지 않은 경우 질소원에 의한 pH 변화요인이 없다면 pH 제어를 위한 산펌프에 octanoic acid를 연결하여 탄소원 농도를 처음 농도와 비슷하게 유지할 수 있다. 만일 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 나 NH_4Cl 등을 질소원으로 사용하게 되면 질소원이 소모됨에 따라 pH가 감소하게 되므로 위의 전략을 따를 수 없다. 본 연구에서는 질소원중 NH_4NO_3 가 배양액의 pH를 일정하게 유지시키는 효과가 있다는 사실⁶⁾로부터 질소원으로 NH_4NO_3 를 이용하였다. 즉 탄소원인 octanoic acid가 소모되면서 pH가 설정치보다 0.1 이상 증가하게 되면 산펌프가 작동되면서 octanoic acid와 NH_4NO_3 의 혼합용액이 공급되도록 하였다. 공급기질용액의 탄소원/질소원 비 (C/N 비)를 10, 20, 100 (g octanoic acid/g NH_4NO_3)의 세가지로 달리하여 C/N 비에 따른 균체성장과 PHA 합성에 미치는 효과를 관찰하였다.

표 1에 유가식 배양결과를 정리하였다. 질소원이 많이 공급될수록 균체생장이 활발하여 최종 균체농도가 높았고, 최종 PHA 농도나 함량은 C/N 비가 20일 때가 가장 높았다. 즉 PHA 합성을 최적으로 하는 C/N 비가 있음을 알았다. 본 연구에서 얻은 균체농도, PHA 농도 및 함량은 기존에 문헌에 보고된 *P. oleovorans*를 이용한 결과중 모두 가장 높은 수치이다. 지금까지 가장 높은 결과는 Dufresne와 Samain⁷⁾이 얻은 47 g/L의 균체와 55%의 PHA 함량이었다. 다른 균주인 *P. putida*를 이용하여 26 h에 45%의 PHA를 포함하는 균체농도 92 g/L를 얻은 것이 보고되었으나,⁸⁾ *P. putida*가 *P. oleovorans*와 같이 다양한 구조의 PHA를 합성할 수 있을지는 의문이다. 따라서 본 연구는 side chain에 functional group을 가진 PHA를 합성할 수 있는 *P. oleovorans*를 별다른 부대장치 없이 비교적 간단한 방법으로 고농도, 고함량으로 생산할 수 있다는 점이 장점이라 하겠다.

요약

*P. oleovorans*의 유가식 배양에서 탄소원으로 octanoic acid, 질소원으로 NH_4NO_3 를 이용한 혼합기질을 배양액의 pH 변화에 따라 공급하는 pH-stat 기질공급전략을 개발하였다. 공급기질의 탄소원/질소원 비 (C/N 비)를 변화시킴으로써 최종 균체농

도, PHA 농도, PHA 함량 등을 변화시킬 수 있었으며, 최대 균체농도는 C/N 비가 10 (g octanoic acid/g NH₄NO₃)일 때 65 g/L, 최대 PHA 농도는 C/N 비가 20일 때 41 g/L, 최대 PHA 함량은 C/N 비가 20일 때 75%였으며 최대 PHA 생산성은 C/N 비가 10일 때 1.03 g/L/h였다.

참고문헌

1. Ramsay JA, Hassan MA, Ramsay BA (1995) Can. J. Microbiol. 41(Suppl. 1), 262-266.
2. Ramsay BA, Saracovan I, Ramsay JA, Marchessault RH (1991) Appl. Environ. Microbiol., 57, 625-629.
3. Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B (1988) Appl. Environ. Microbiol., 54, 2924-2932.
4. Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI (1994) Biotechnol. Bioeng., 43, 882-888.
5. Suzuki T, Yamane T, Shimizu S (1986) Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 370-374.
6. Lee IY, Stegantseva EM, Savenkova L, Park YH (1995) J. Microbiol. Biotechnol., 5, 100-104.
7. Dufresne A, Samain E (1998) Macromolecules, 31, 6426-6433.
8. Huijberts GN, van der Wal H, Weusthuis RA, Eggink G (1996) Abstracts of International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Davos, Switzerland.

감사

본 연구는 과학재단 1998 국산연구기기 활용 지원사업 (98-1105-022-1)에 의하여 수행되었음.

표 1 *P. oleovorans*의 유가식 배양결과 정리

공급기질용액의 C/N 비 (g octanoic acid/ g NH ₄ NO ₃)	균체농도 (g/L)	PHA 농도 (g/L)	PHA 함량 (%)	PHA 생산성 (g/L/h)
10	62.5	39.3	62.9	1.034
20	54.7	41.1	75.1	0.632
100	9.5	6.4	67.6	0.161