

## 분홍색 통성 메탄올 자화세균이 생산하는 Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate

송미연 · 이호재 · 이용현\*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Produced by Pink-Pigmented Facultative Methylophilic Bacterium from Methanol

Song, Mi-Yeon, Ho-Jae Lee and Yong-Hyun Lee\*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

For poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production, a pink-pigmented facultative methylophilic bacterium (PPFM) P-10 was newly isolated from soils through methanol-enrichment culture. The optimal medium composition for cell growth was 1.0% (v/v) of methanol as carbon source and 1.0g/l of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , equivalent to C/N ratio of 13.2 at pH 7.0 and 30°C. To investigate the optimal condition for PHB accumulation, two-stage culture technique was adopted; first stage for cell growth and second stage for accumulation of PHB providing unbalanced growth conditions. The optimal PHB accumulation was 1.0% (v/v) of methanol and 0.26g/l of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , C/N of 50.8 at pH 6.0. To overcome methanol inhibition on cell growth, intermittent feeding fed-batch culture technique was employed, and the cell concentration as high as 14g/l with 40% of PHB was achieved. The purified PHB was identified using IR and  $^1\text{H}$  NMR as homopolymer of 3-hydroxybutyric acid. The absorption spectrum of extracted pink colored microbial pigment was also investigated.

Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB)는 D-3-hydroxybutyric acid가 직선상으로 연결된 homopolymer로서, 다양한 세균들의 세포내에 에너지 저장물질로 합성되는 천연 polyester이며, 원핵 미생물에서만 독특히 발견되고 Gram 양성세균과 Gram 음성세균 모두에서 넓게 축적되는 것으로 알려져 있다(1, 2). PHB는 탄소원 이외의 다른 영양원이 결핍될 때, 즉 불균형한 영양 조건일 때 축적이 촉진되며, 특히 질소원이 제한되고 탄소원이 충분한 환경에서는 핵산과 단백질의 합성이 저해되므로 동화되는 탄소원의 대부분이 PHB로 전환되어 저장된다(1, 3).

PHB는 합성고분자인 polypropylene과 물리·화학적 성질이 유사할 뿐만 아니라 생분해성이 있어 합성고분자와 대체사용할 경우 난분해성으로 인한 심각한 공해문

제를 해결할 수 있게 된다. 또한 서방성을 이용하여 농약의 코팅제로 또는 약품 전달수단으로 사용할 수 있으며, 광학적으로 활성이며 독성이 없고 인체 적합성도 뛰어나 의료용으로도 많은 용도가 있어 산업적인 활용 가능성에 대해 큰 주목을 받고 있다(4-8).

메탄올은 여러 탄화수소 자원에서 쉽게 합성되어 다른 탄소원에 비해 양적으로 풍부하고, 값이 싸며, 물과 잘 혼합되고, 한정된 미생물만이 이용하므로 배양 중 오염을 방지할 수 있는 등 발효 기질로서 많은 장점이 있어 single cell protein의 생산기질로 이용되고 있고(5, 9), 이와 같이 메탄올 자화성 세균을 이용하여 PHB를 생산할 경우 경제성을 제고시킬 수 있을 것이 예상된다. 최근 Suzuki 등은 메탄올 자화성 *Protomonas extorquens* 균주를 이용하여 PHB 대량생산을 위한 배양조건을 검토한 바 있으며(10-13), 국내에서는 *Methylobacterium organophilum*을 이용하여 PHB 축적에 영향을 미치는 요인을 조사한 바 있다(14).

**Key words:** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), methanol, pink-pigmented facultative methylophilic (PPFM)

\*Corresponding author

본 연구에서는 하천수와 토양으로부터 PHB 축적량이 높은 메탄올 자화성 균주를 선별하여 형태학적, 생화학적, 그리고 배양학적 특성을 규명하였다. 분리된 균체의 증식과 PHB 축적에 적합한 배지조성과 배양조건을 검토하였다. 메탄올의 기질저해성을 경감시키고 균체의 고농도 배양을 위하여 기질을 간헐적으로 첨가하면서 배양하는 fed-batch 식 배양을 시도하였다. 또한 생성된 PHB를 추출·분리·정제하여 구조를 확인하였고, 균체내의 pink-pigment의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### Methylotrophic bacteria의 분리

토양, 하천수, 연못, 퇴비 등에서 채취한 시료 1g을, 메탄올을 유일한 탄소원으로 하는 액체선택배지: methanol 10.0 ml/l, NaNO<sub>3</sub> 1.0g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.4g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/l, yeast extract 0.2g/l, trace mineral 1.0 ml/l (CaCl<sub>2</sub> 150 mg : FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg : CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.1 mg : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.2 mg : MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.2 mg : ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.4 mg : MoO<sub>3</sub> 0.2 mg : (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.7 mg : KCl 400 mg per liter) 50 ml에 접종하고 30°C에서 이틀간 진탕 배양한 후 1.0% (v/v) 메탄올이 함유된 한천배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 성장이 빠른 colony를 새로운 한천배지에 다시 streaking하여, 같은 방법으로 여러 차례 계대 배양하여 균주를 분리하였고, 균체내의 PHB granule의 존재를 위상차현미경으로 확인하여 우수균주 5종을 선별하였다. 선별된 균주를 액체 배양하여 PHB 함량이 높은 균주를 최종 선별하였다.

### 분리균주의 특성 규명

최종 선별된 균주의 형태학적, 생화학적, 또한 배양학적 특성을 분류, 동정법에 준하여 규명하였다(15).

### 균체 성장을 위한 배지 및 배양조건 검토

균체의 성장에 적절한 메탄올의 농도와 독성에 대한 안정성 검토를 위해 메탄올 농도를 0.1% (v/v)에서 6.0% (v/v)까지 변화시켰다. 메탄올 농도를 1.0% (v/v)로 고정한 후 질소원의 종류별, 농도별 영향을 결정하였으며 또한 온도, pH 그리고 trace element의 영향도 아울러 검토하였다.

### PHB 축적에 영향을 끼치는 요인과 배양조건 검토

PHB 축적을 위해 먼저 균체를 최적 배양하여 원심분리한 후 동일 부피의 불균형 영양배지에서 배양하여 PHB 축적 효과를 비교하는 two-stage 배양법을 이용하여 검토하였다.

### PHB의 정량

PHB 함량은 균체를 5% sodium hypochlorite solution으로 lysis시킨 뒤 hot chloroform으로 PHB를 여러 차례 추출한 후 황산으로 PHB를 가수분해시켜 210~235nm 사이에 absorbance peak를 갖는 crotonic acid로 변화시킨 후 210nm에서 absorbance를 측정하거나 또는 PHB를 hexane으로 침전시켜 정제한 후 건조중량을 측정하여 함량을 결정하였다(16-18).

### 발효조에서의 배양

2.5l 용량의 발효조(Korea Fermentor Co. model SY-260, working volume은 1.5l)를 이용하여 메탄올 초기농도 1.0% (v/v), pH 7.0, 1.0 vvm, 그리고 300 rpm에서 배양하였다. 고농도 배양을 위한 fed-batch 배양에는 발효조내의 DO 농도를 참고하여 메탄올 주입시기를 결정하는 intermittent feeding fed-batch법을 이용하였다(10-13).

### PHB의 정제

균체를 lysis한 후 hot chloroform으로 여러번 추출해낸 PHB 용액을 chloroform의 5~10배 volume의 n-hexane으로 침전시켜 glass filter로 여과하였다(18). 이 과정을 수차 반복하여 얻은 정제된 PHB를 건조시켜 시료로 하였다.

### Electron microscopy에 의한 PHB granule의 관찰

균체를 Karnovsky's fixative(8% glutaraldehyde)로 고정하고 1% OsO<sub>4</sub>로 post-fix하여 0.5% uranyl acetate로 prestaining한 후 ethanol로 탈수하고 Spurr resin으로 embedding하였다. Microtome(LKB 2088)으로 초박절편한 후 lead citrate로 electron staining하여 transmission electron microscope(109 TEM, Zeiss, West Germany)로 균체내에 축적된 PHB granule을 관찰하였다. 또한 정제된 PHB powder는 백금으로 ion coating(Eiko IB-5 ion coater)한 후 scanning electron microscope(ESI-SS SEM, Akashi, Japan)로 관찰하였다.

### PHB의 particle size 분포의 측정

PHB powder의 particle size 분포는 Elzone 280 PC (Particle Data Inc., USA)에서 전기저항법으로 측정하였다. 이 때 분산상의 aggregation을 방지하기 위하여 시료를 2회 분산시켰으며 전해액은 9% NaCl 용액, Triton X-100으로 30초간 분산시켜 측정하였다.

#### PHB의 Infra-Red(IR) spectra

완전 건조된 PHB powder 2mg과 IR spectroscopic grade KBr 198mg을 혼합·마쇄하여 10ton의 압력하에서 film을 제조하였다(19). IR spectra 측정에는 Jasco double-beam spectrophotometer(Jasco IR-810, Japan)를 이용하였고, scanning speed는 1로, slit는 M으로 조정하였다.

#### PHB의 nuclear magnetic resonance(NMR) spectra

$^1\text{H-NMR}$ 은 BRUKER AM 300MHz NMR spectrometer를 사용하였고, PHB의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum은  $27^\circ\text{C}$   $\text{CDCl}_2$  solution에서, 250MHz로,  $35^\circ$  pulse (pw4  $\mu\text{sec}$ )로, 0.7sec의 pulse repetition으로 기록하였다(18-20).

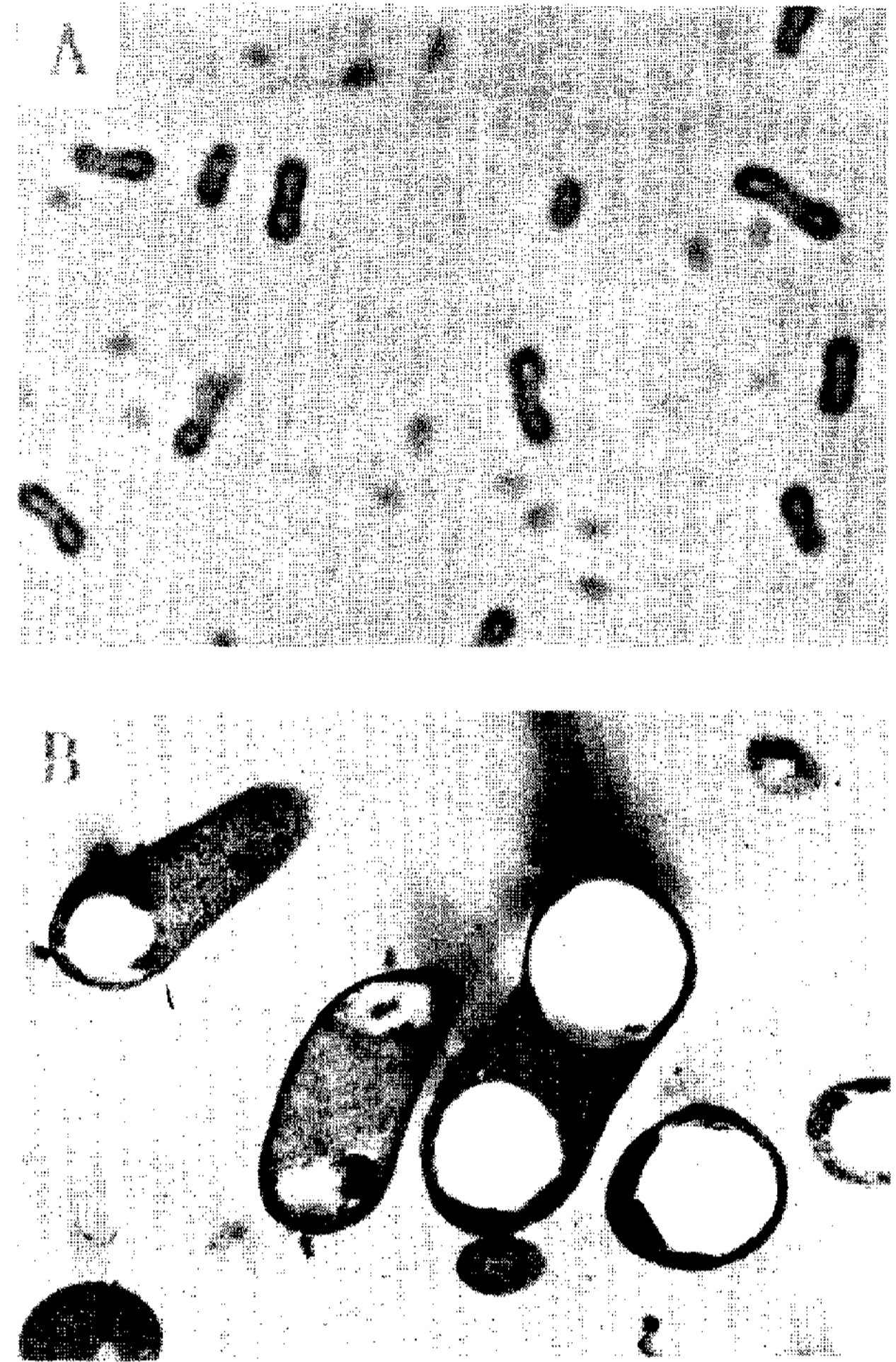
#### Pigment의 추출과 absorption spectra

균체의 pigment는 균체를 5%의 sodium hypochlorite solution으로 lysis시킨 뒤 ethanol로 추출하였다. 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer (pH 5.0)로 침전시켜 각종 용매로 용해시켜 UV/Visible Spectrophotometer (PYE UNICAM PU 8800, U.K.)로 absorption spectrum을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 분리 및 특성

선별된 메탄올 자화성 균주는 밝은 분홍색 색소를 갖고 있는 rod상 세균으로 선별배지에서 약 15~20%의 PHB를 축적하였는데 균체의 광학현미경 사진과 축적된 PHB granule의 전자현미경 사진은 Fig. 1과 같다. 액체배지에서 균체는 배양이 진행됨에 따라 pellet상으로 coagulation되어 배양액 바닥에 침전되었다. 균주의 형태학적, 생화학적, 배양학적 생육 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 위와 같은 균주의 특성을 종합하여 볼 때 분리된 분홍색 메탄올 자화성 균주는 facultative methylotrophic bacterium으로 *Methylobacterium*속으로 판정되나 명확한 분류와 동정을 위해서는 추가적인 실험적 자료가 필요할 것으로 판단된다.



**Fig. 1. Phase-contrast and electron microscopy of PPFM P-10 containing PHB granules.**

(A) Phase-contrast light micrograph ( $\times 1,000$ ).

(B) Thin-section transmission electron micrograph ( $\times 12,000$ ).

#### 균체성장을 위한 배지 및 배양조건

**메탄올 농도의 영향**: 탄소원인 메탄올은 어느 농도 이상에서 substrate inhibition을 일으켜 균체 생육을 저해하므로 적정 메탄올의 농도를 조사하기 위해서 농도를 0.1~6.0% (v/v)로 각각 달리하면서 장시간 배양하여 균체 농도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 사용 메탄올 농도가 1.0% (v/v), 즉 7.9g/l일 때 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었으며 2.0% (v/v)까지는 균체증식에 큰 지장이 없었으나 4.0% (v/v) 이상에서는 균체의 생육이 상당히 저해 받았다.

각 메탄올 농도에 따른 cell yield ( $Y_{x/s}$ )를 살펴보면 메탄올 농도가 증가할수록 cell yield가 점차적으로 감소하였다. 그러나 메탄올 농도가 0.3% (v/v)을 초과하지 않을 때에는 0.3 이상의 cell yield를 얻을 수 있으므로 발효조내에서 fed-batch 배양시 배양액의 메탄올의 농도를 0.3% (v/v) 이하로 조절함이 필요할 것이다.

**Table 1. Morphological and biochemical characteristics of isolated methylophilic microorganism**

Morphological characteristics	
Cell shape	Rods
Cell size	0.45 μm × 1.5-2.0 μm
Motility	Nonmotile
Colony shape	Convex, glistening
Gram staining	-
Spore staining	-
Biochemical characteristics	
Relation to oxygen	Obligate aerobe
Oxidase test	+
Catalase test	+
Gelatin liquefaction	-
Starch hydrolysis	-
PHB accumulation	+
Pigmentation	+ (pink)
Utilization of organic compounds	
Glucose, Fructose, Ethanol, Succinate	+
Galactose, Sucrose, Maltose	-
Acetate, Propionate, Butyrate, Citrate	-

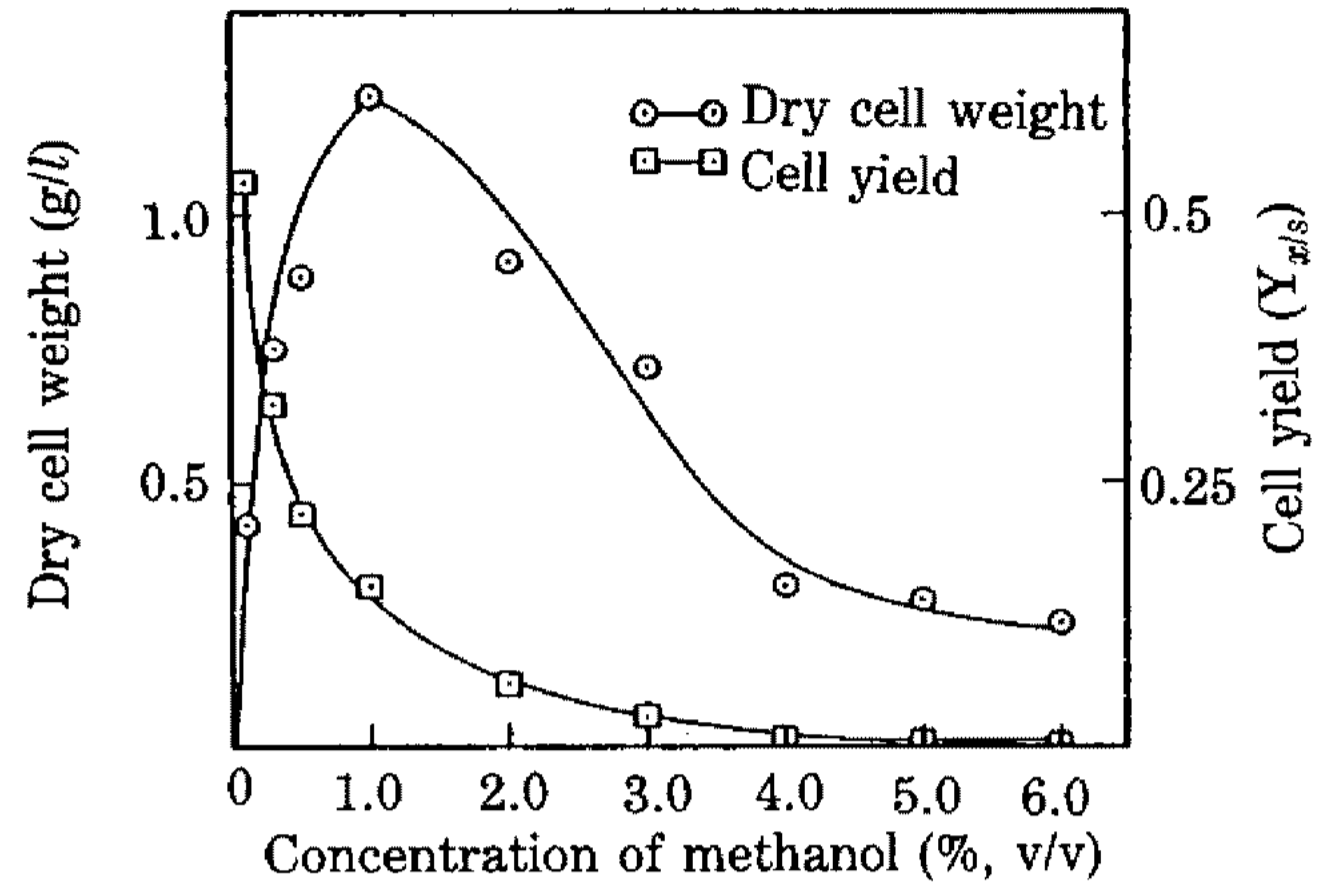
**질소원과 그 농도의 영향** : 균체 생육의 최적 질소원을 선택하기 위하여 다양한 질소원을 넣어 살펴본 결과 NH<sub>4</sub>Cl를 질소원으로 사용하였을 경우 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었고, 최적 농도는 1.0g/l였다.

**pH 및 배양온도의 영향** : 균체 생육에 대한 pH의 영향을 살펴보기 위해 pH를 5.0에서 9.0까지 변화시키면서 배양한 결과 pH 7.0에서 균체의 생육이 가장 우수하였고, 최적 배양온도는 30°C였다.

**PHB 축적을 위한 배지 및 배양조건**

**Deficient nutrients의 영향** : PHB의 축적에 영향을 끼치는 요인을 조사하기 위하여 균체 생육배지인 first stage에서 성장한 균체를 모아 각종 영양소원이 결핍된 배지에 재현탁시켜 배양하는 two-stage 배양법을 이용하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 K<sup>+</sup>과 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>이 결핍되었을 때도 PHB의 축적률이 증가하지만 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>이 결핍되었을 때 균체 건조중량에 대한 PHB의 축적률이 31%로 가장 높았다.

**C/N molar ratio의 영향** : C/N molar ratio는 균체의 생육과 PHB의 축적에 중요한 요인 중의 하나로 알려져



**Fig. 2. The effect of methanol concentration on cell growth; cultivated at optimal growth conditions for 60 hr.**

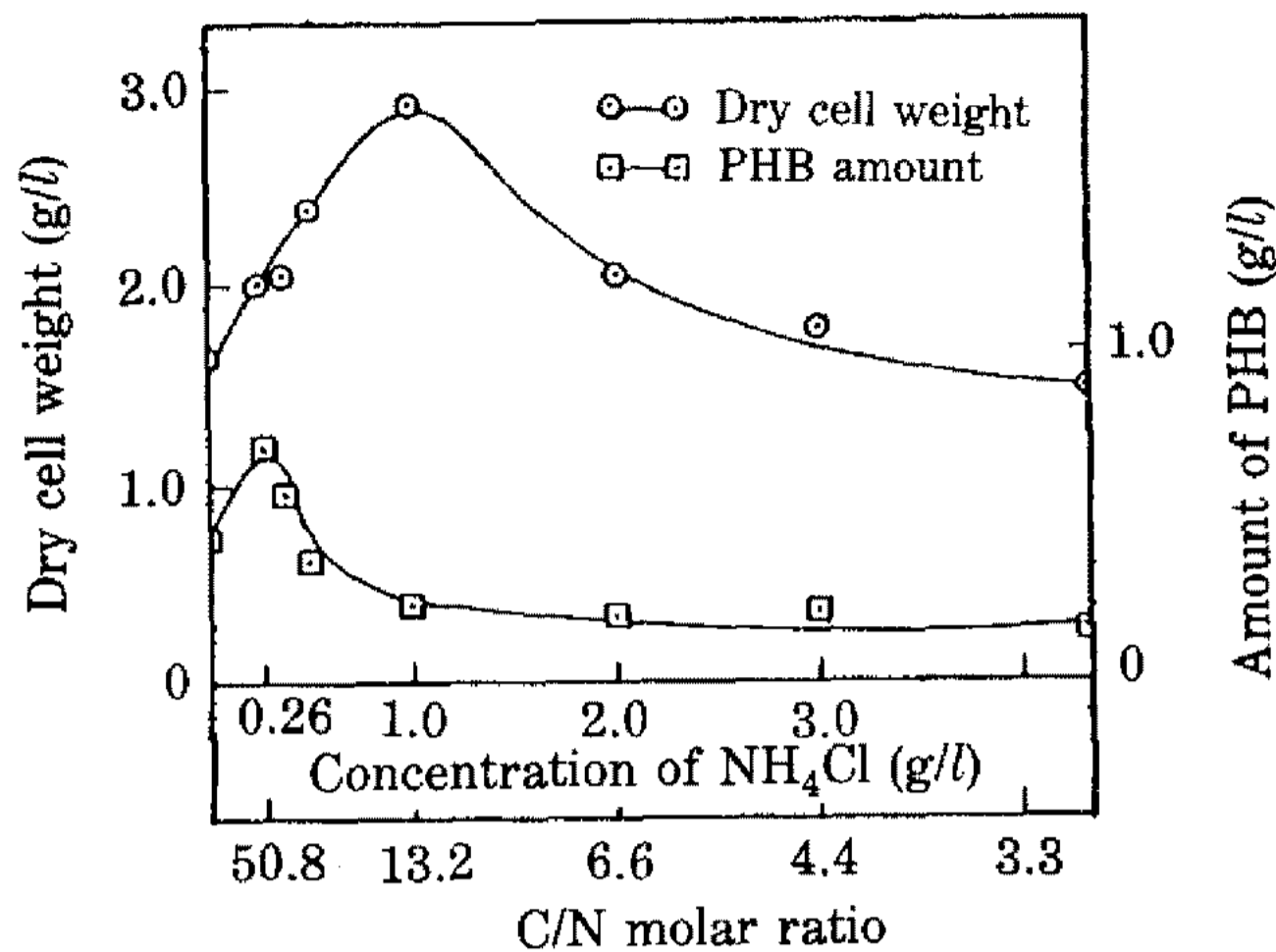
**Table 2. Effect of medium component deficiency on cell mass and PHB production in second stage culture**

Deficient Nutrient	Dry cell weight* (g/l)	Accumulated PHB (g/l)	PHB content (%)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2.125	0.654	30.8
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.015	0.457	22.7
K <sup>+</sup>	2.186	0.524	24.0
Mg <sup>2+</sup>	2.514	0.464	18.5
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.146	0.350	16.3
Na <sup>+</sup>	2.280	0.406	18.0
Fe <sup>2+</sup>	2.469	0.438	20.2
Control	2.624	0.412	15.7

\*Initial concentration of resuspended cells in first stage was 1.424g/l and the cultures were carried out in 250 ml culture flask (100 ml of working volume) for 24 hours.

있으며(12), 위의 결과에서와 같이 본 균주의 PHB 축적은 질소원의 농도에 크게 영향을 받으므로 탄소원인 메탄올은 최적 농도인 1.0%(v/v)로 고정시키고 NH<sub>4</sub>Cl의 양을 변화시키면서 균체량과 PHB 축적량을 조사한 결과, NH<sub>4</sub>Cl 농도가 1.0g/l인 C/N molar ratio 13.2에서 최대 균체량인 1.5g/l를 얻었다. 또한 PHB 축적에 적합한 C/N molar ratio를 결정하기 위해서 위의 균체증식 조건에서 배양된 균체 1.0g/l를 second stage에서 NH<sub>4</sub>Cl의 첨가량을 4.0g/l까지 달리한 배지에서 two-stage 배양법으로 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. C/N molar ratio가 13.2일 때 균체의 생육이 가장 좋은 반면, NH<sub>4</sub>Cl의 농도가 0.26g/l일 때, 즉 C/N molar ratio가 50.8일 때 PHB 축적이 가장 높았다. 이 때 second stage에서 증식된 균체량은 1.3g/l이며 축적된





**Fig. 3. The effect of ammonium chloride concentration or C/N molar ratio on the cell growth and PHB production at the second stage.**

The cell concentration of 1.0g/l grown in optimal condition at the first stage was subjected to PHB accumulation.

PHB는 균체 건조중량의 40%였다.

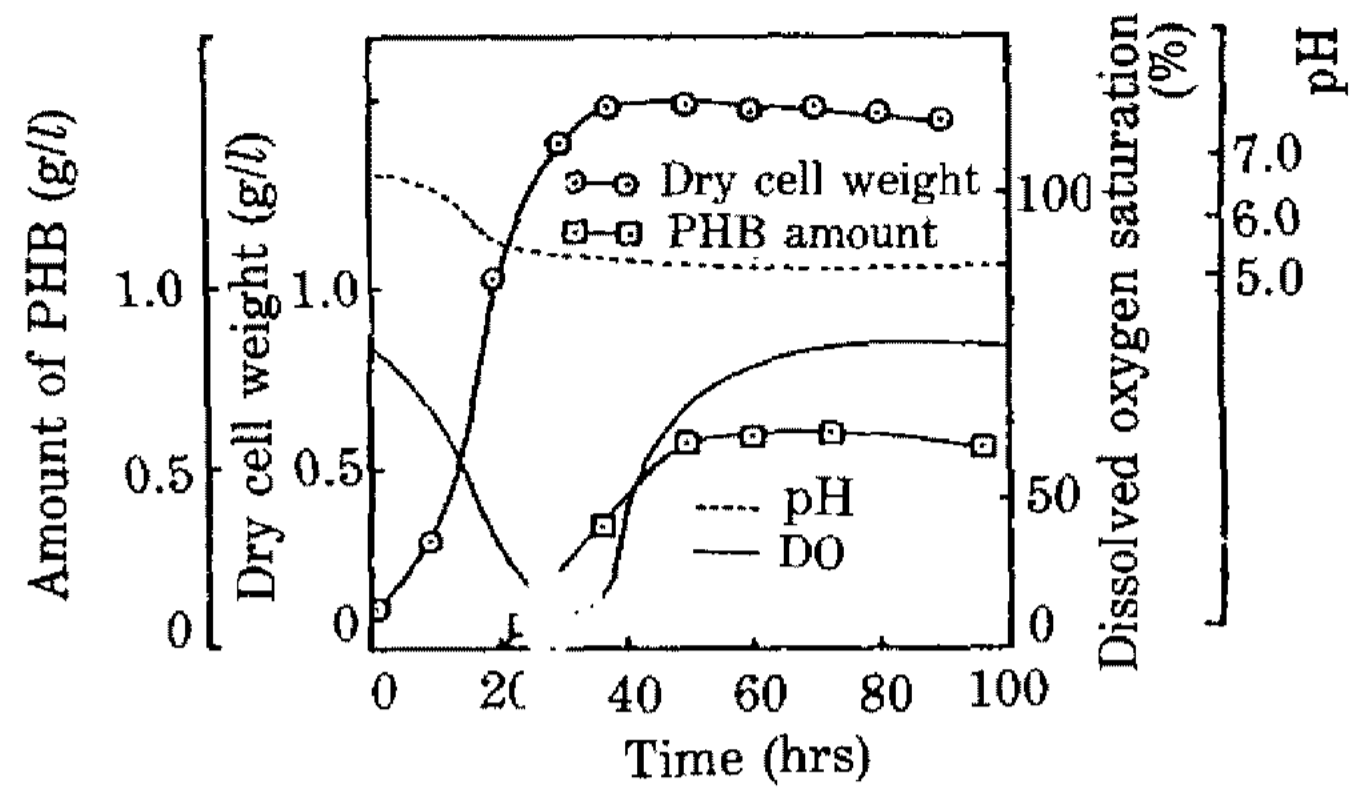
**pH 및 기타 요인의 영향:** pH의 변화에 따른 PHB 축적률을 살펴본 결과 균체의 생육에는 pH 7.0에서 가장 좋았으나 PHB의 축적은 다소 산성인 pH 6.0에서 우수한 것으로 나타났다. 그 외에 온도나 trace elements 들은 PHB의 축적에 큰 영향을 주지 못하였다.

**균체의 생육특성**

발효조 배양시 균체는 접종 후 12시간 후부터 대수 증식기로 들어가 활발한 성장이 이루어졌고, 48시간 이후부터는 정지기에 들어갔다. 유도기와 대수 증식기에서는 PHB의 축적이 낮았고, 정지기인 48시간 후 PHB가 점차적으로 증가되었다(Fig. 4). 균주의 specific growth rate는 0.22 hr<sup>-1</sup>로 mass doubling time은 3.2hr이었다. 또한 발효조에서의 배양시 DO 변화를 조사한 결과 발효 후반기 메탄올의 양이 고갈되면서 DO level은 급속히 증가하였으므로 DO level의 변화를 메탄올의 고갈과 균체의 생육 상태를 나타내는 지표로 이용하였다.

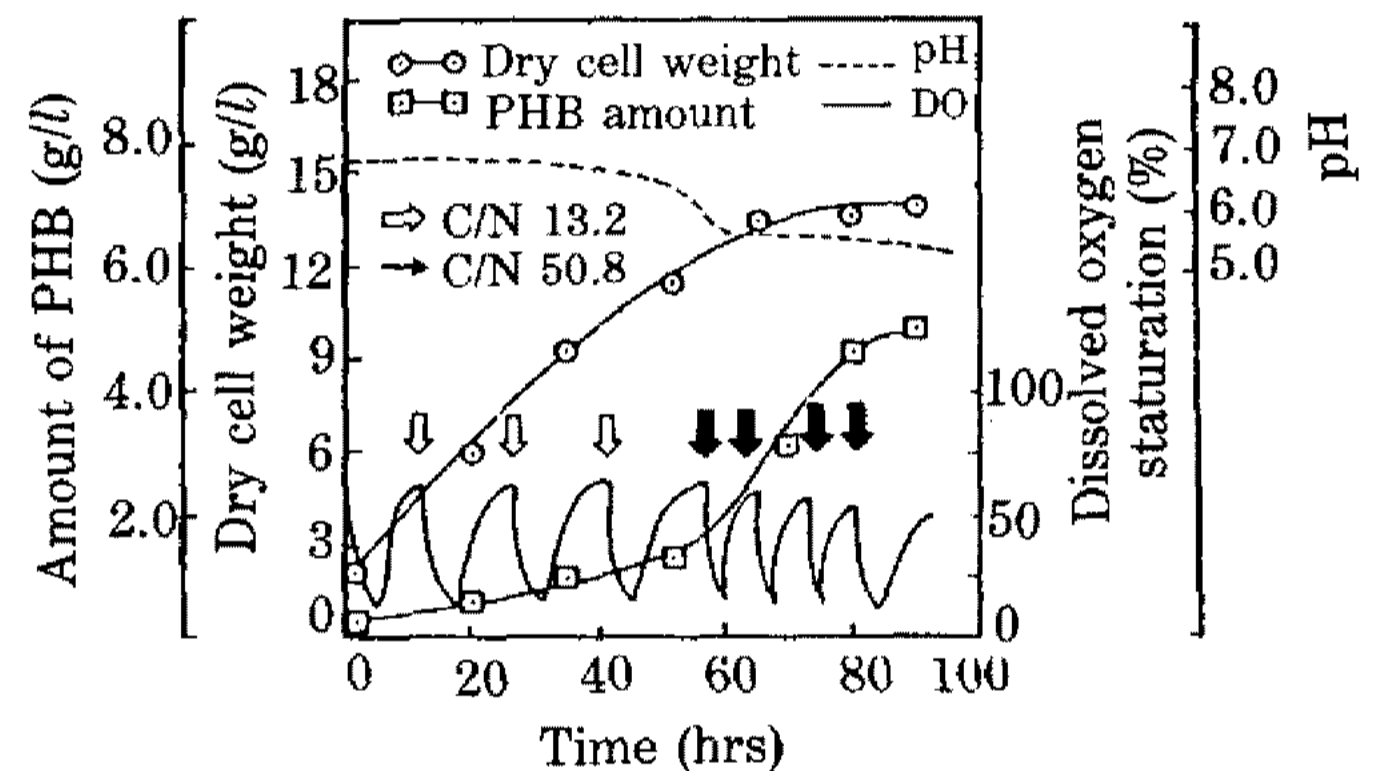
**Fed-batch 법을 활용한 고농도 배양**

메탄올의 저해작용을 극복하기 위해 DO level을 control indicator로 삼아 메탄올을 간헐적으로 넣어 주는 intermittent feeding fed-batch culture를 시도하였다. 초기 60시간 동안은 DO level이 증가할 때마다 메탄올 3.45g/l, NH<sub>4</sub>Cl 0.5g/l(C/N molar ratio 13.2)를 주입하고, pH는 7.0으로 조절하여 균체를 증식시켰다. 그 후 60시간 동안은 메탄올 3.45g/l, NH<sub>4</sub>Cl 0.13g/l



**Fig. 4. Changes of cell density, the amount of PHB, dissolved oxygen, and pH during batch culture.**

The culture was carried out in 2.5 l jar fermentor at pH 7.0, 30°C, 1.0 vvm, and 300 rpm; methanol 1.0% (v/v) and NH<sub>4</sub>Cl 1.0g/l.



**Fig. 5. Changes of cell density and the amount of PHB during intermittent feeding fed-batch culture.**

The culture was carried out in 2.5 l jar fermentor change C/N molar ratio from 13.2 to 50.8 and pH from 7.0 to 6.0 at 30°C and 300 rpm. Arrows indicate the feeding of nutrient by considering DO level.

(C/N molar ratio 50.8)를 주입하고, pH는 6.0으로 조절하여 PHB의 축적을 유도하여, Fig. 5에서 보는 바와 같이 최종 균체량은 14g/l를 얻었으며 PHB를 균체 건조중량의 40%인 5.5g/l까지 축적시킬 수 있었다.

**PHB의 IR 및 NMR spectra를 이용한 PHB의 구조확인**

생산된 PHB를 분리·정제하여 IR과 NMR로 분석한 spectrum을 Fig. 6과 7에 나타내었다. 1,740 cm<sup>-1</sup>에서 carbonyl stretching(-C=O-)을 보여주는 최대 흡수 peak가, 2,970 cm<sup>-1</sup>에서 C-H stretch region인 peak가 IR spectrum 상에 관찰되었고, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 PHB의 -CH-, -CH<sub>2</sub> 그리고 -CH<sub>3</sub>기를 보여주는 3개의 peak가 4.8, 2.5 그리고 1.67 ppm에서 나타

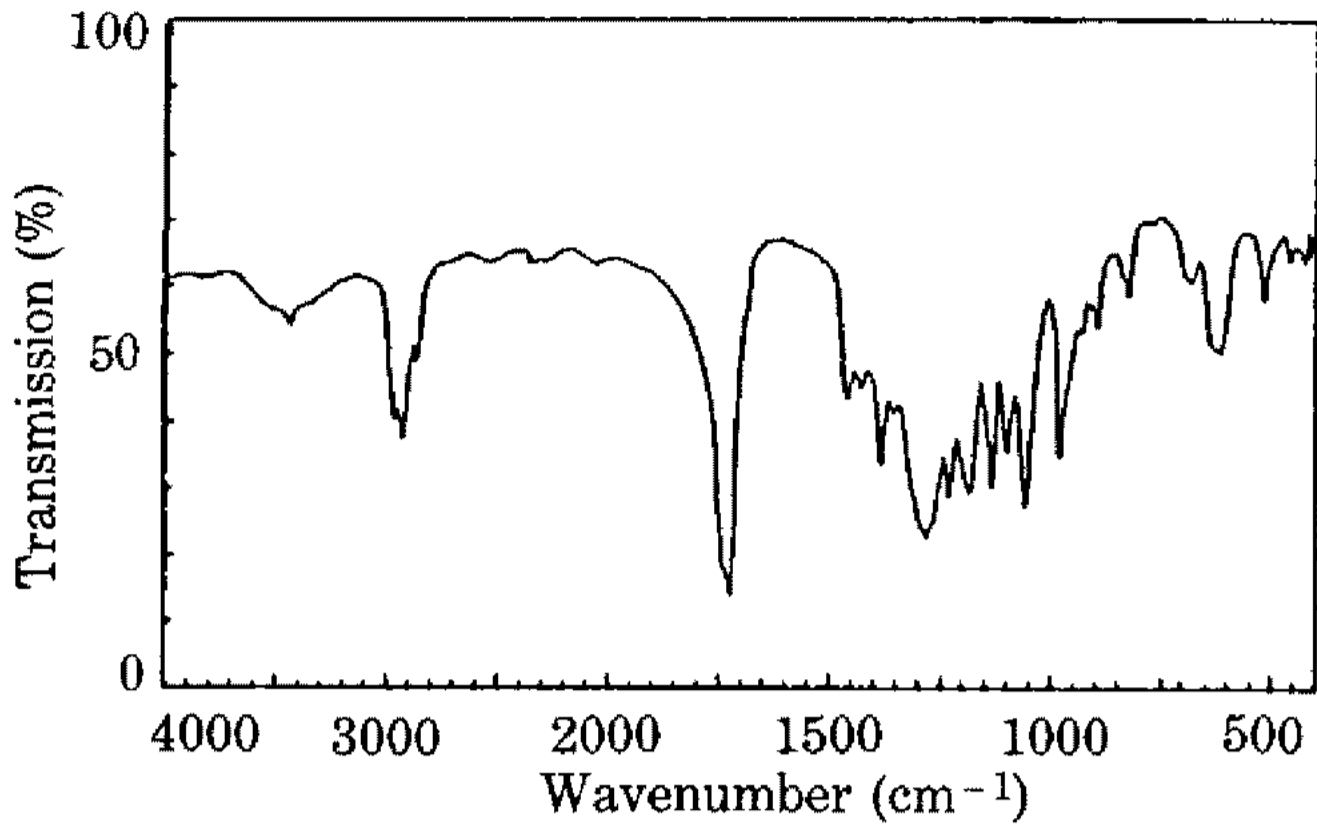


Fig. 6. Infra-red spectrum of PHB from PPFM P-10.

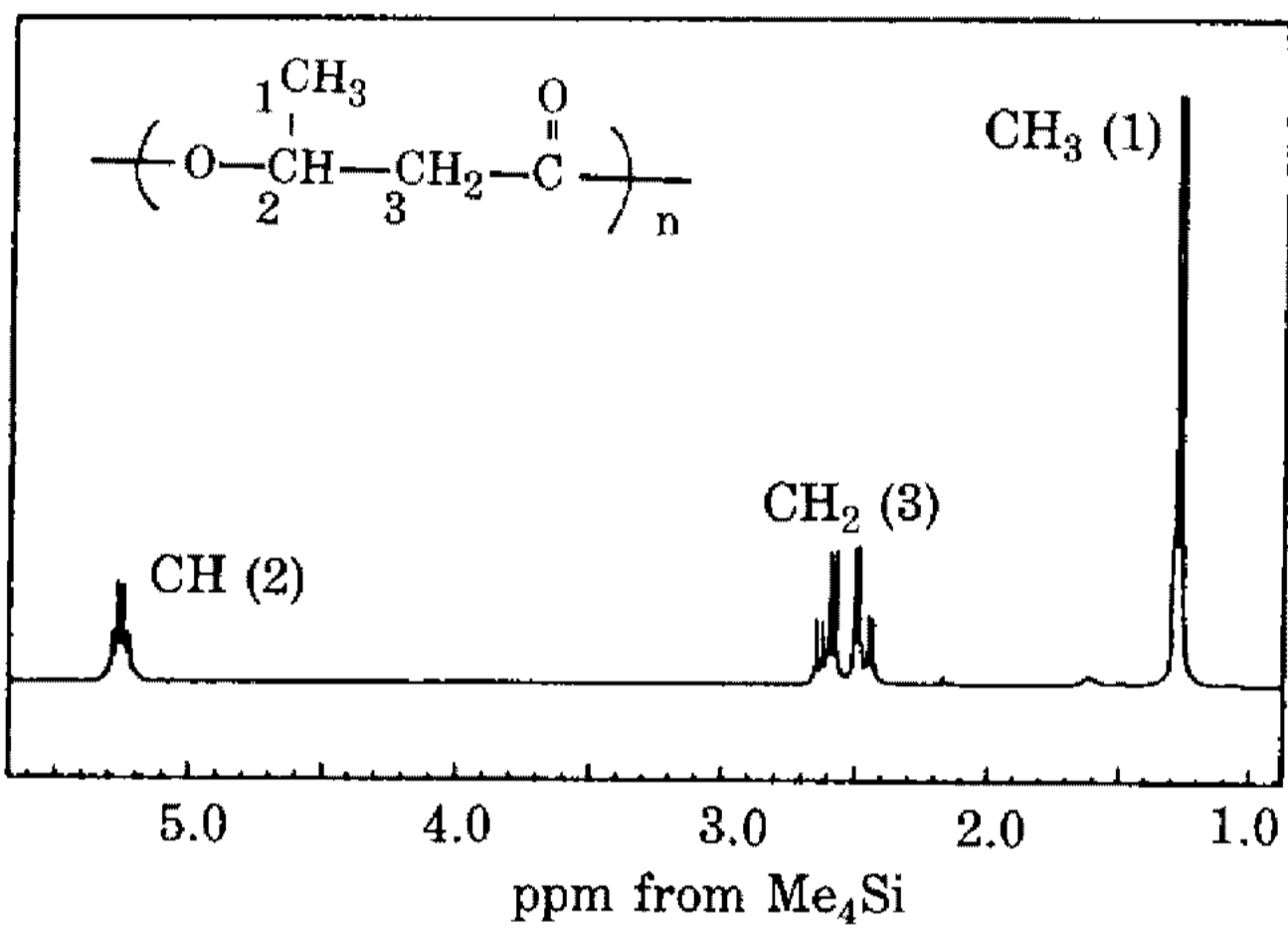


Fig. 7. 250-MHz <sup>1</sup>H NMR spectrum of PHB from PPFM P-10.

나 분리·정제된 PHB는 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer임을 알 수 있었다.

**PHB의 particle size 분포와 SEM에 의한 구조관찰**

Fig. 8은 정제된 PHB powder의 전자현미경 사진으로 Fig. 8(A)는 1,000 배로 확대한 PHB particle의 형태를 보여주고 있으며 particle size analyzer로 particle size를 측정된 결과에 의하면 geometric mean size는 21.69 μm였다. Fig. 8(B)는 PHB powder를 7,000 배로 확대한 scanning electron micrograph로서 많은 빈공간을 갖는 다공질성 fiber 구조를 갖고 있음을 보여주고 있으며, 이와 같이 PHB의 미세구조는 생성균주, 배양조건 그리고 PHB의 추출방법에 의하여 다소 변동되게 된다.

**Microbial pink pigment의 absorption spectra**

분리된 메탄올 자화성 균주로부터 추출한 분홍색 색소의 absorption spectra는 Fig. 9와 같다. 생산된 색소는 ethanol, acetone, pyridine, CS<sub>2</sub>, benzene, hexane,

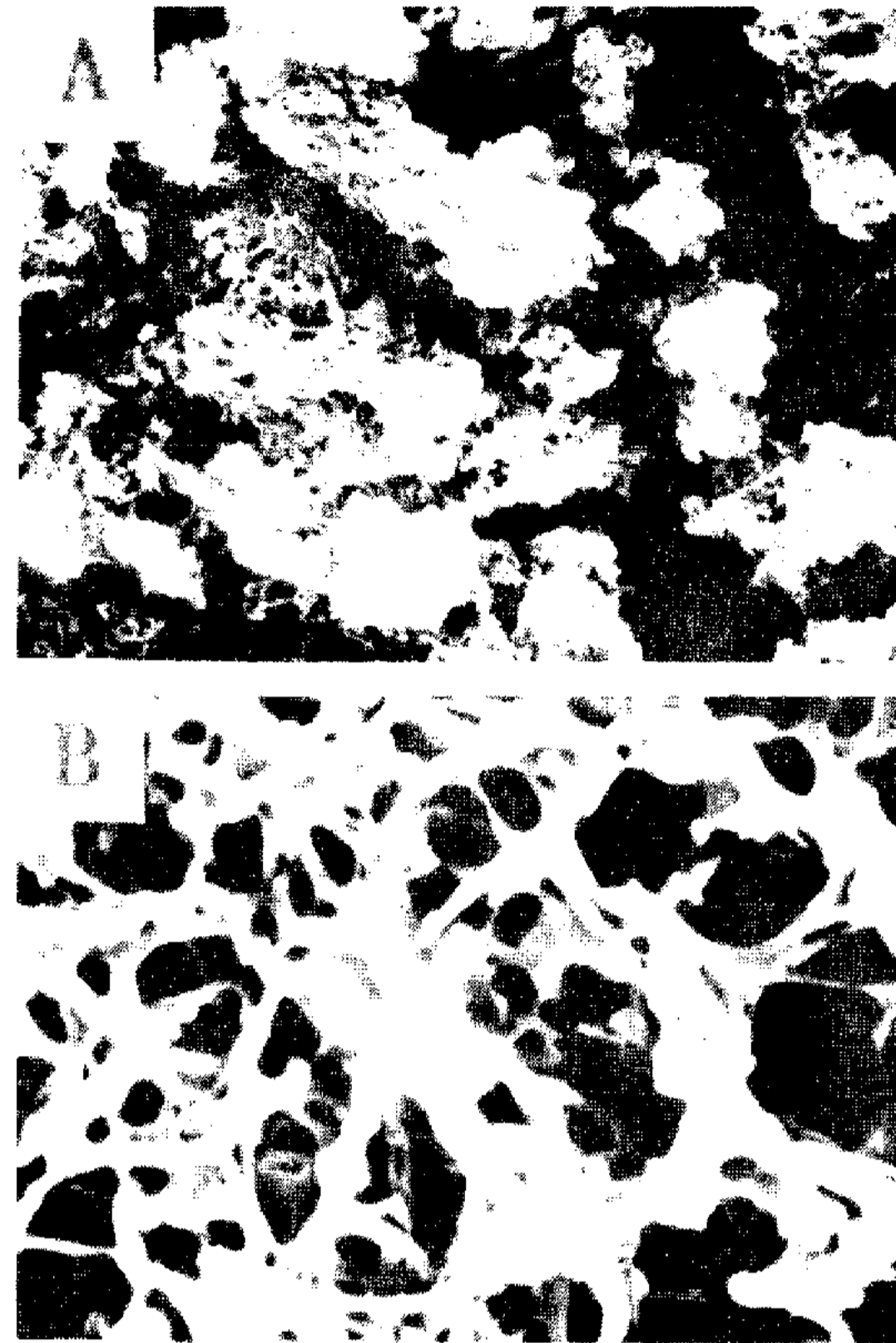


Fig. 8. Scanning electron microscopy of extracted PHB powder from PPFM P-10. (A) ×1,000, (B) ×7,000.

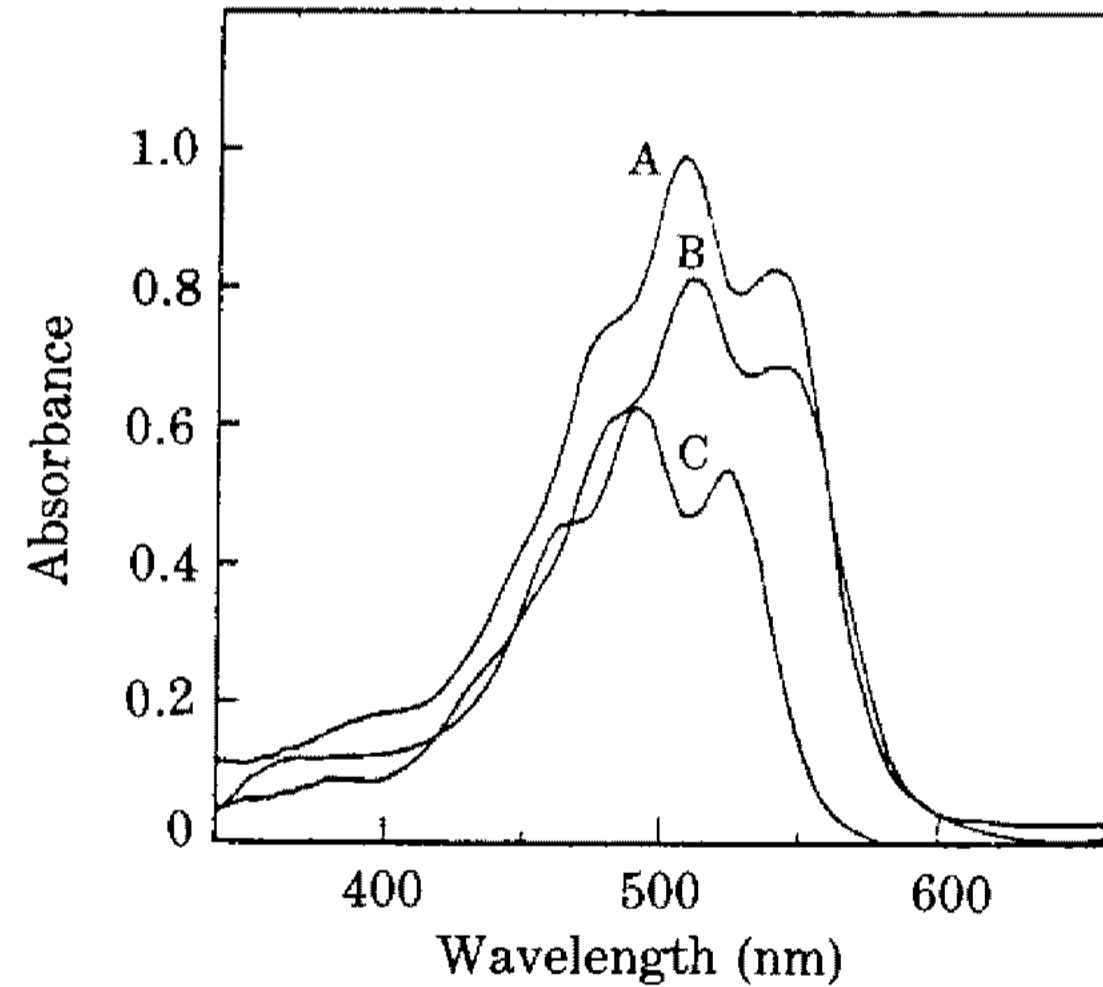


Fig. 9. The absorption spectra of pink-pigment from PPFM P-10.

Extracted pigment was dissolved with chloroform (A), pyridine (B) and ethyl ether (C).

methanol, chloroform 그리고 ethyl ether에 잘 용해되었다. Fig. 9에서처럼 chloroform, pyridine, ethyl ether 등 사용용매에 따라 각각 507, 510, 491 nm에서 최대 흡수 peak를 나타내었으나 사용용매에 따른 absorption spectrum pattern에는 큰 차이가 없이 대부분 3개의

특징적인 흡수 peak 를 가지고 있었다. 색소는 상온에서 수주간 안정하였다.

## 요 약

PHB 생산을 위하여 메탄올을 기질로 한 선별배지에서 토양, 하천수, 퇴비 등으로부터 분홍색 색소를 가지는 PHB 축적 facultative methylotroph 를 분리하여, 균주의 특성을 검토하였다. 분리균주의 최적 생육조건과 PHB 축적을 위한 최적 배양조건을 조사한 결과 균체의 생육은 메탄올 농도 1.0%(v/v), 질소원인 NH<sub>4</sub>Cl 농도 1.0g/l, 즉 C/N ratio 13.2 일 때 그리고 pH 7.0 과 30°C 에서 가장 좋았으며, PHB 는 C/N ratio 가 50.8, 즉 메탄올 농도 1.0%(v/v), NH<sub>4</sub>Cl 0.26g/l 일 때, 그리고 pH 6.0 일 때 건조중량의 약 40% 까지 축적되었다. 고농도 메탄올에 의한 생육저해를 극복하기 위하여 기질을 간헐적으로 계속 공급해주는 fed-batch 배양을 시도한 결과 균체량은 14g/l, PHB 축적량은 5.5g/l 까지 증가시킬 수 있었다. 생산된 PHB 를 분리·정제하여 IR 과 <sup>1</sup>H-NMR 로 구조를 분석한 결과 3-hydroxybutyric acid 의 homopolymer 임이 확인되었다. 또한 균주의 pink-pigment 를 추출하여 absorption spectrum 를 조사하여 그 특성을 규명하였다.

## 참고문헌

1. Dawes, A.E.: *Microbiol Energetics*, Blackie Chapman and Hall, N.Y., 158-164 (1986).
2. Lundgren, R.A., C. Schnaitman and R.H. Marchessault: *J. Bacteriol.*, **89**, 245 (1965).

3. Herron, J.S., J.D. King and D.C. White: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 251 (1978).
4. Yokouchi, M., Y. Hatani, H. Adokoro, K. Evanishi and H. Ani: *Polymer*, **14**, 267 (1973).
5. Howells, E.R.: *Chem. and Ind.*, **7**, 508 (1982).
6. Holmes, P.A.: *Phys. Technol.*, **16**, 32 (1985).
7. 이용현, 유전공학, 26 호, 48 (1989).
8. 이용현, 송미연, 생물화공, **4**(1), 39 (1990).
9. Large, P.J.: *Methylotrophy and Methanogenesis*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1 (1983).
10. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322 (1986).
11. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 366 (1986).
12. Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370 (1986).
13. Suzuki, T., H. Deguchi, T. Yamane, S. Shimizu and K. Gekko: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 487 (1988).
14. 김정희, 최준호, 다니엘, 르보: 산업미생물학회지, **17**(4), 329 (1989).
15. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, Volume 1, 256 (1986).
16. Karr, D.B., J.K. Water and D.W. Emerich: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1339 (1983).
17. Law, J.H. and R.A. Slepecky: *J. Bacteriol.*, **82**, 33 (1960).
18. Doi, Y., M. Kunioka and A. Tamaki: *Macromolecules*, **20**, 298 (1987).
19. Bloembergen, S. and D.A. Holden: *Macromolecules*, **19**, 2865 (1986).
20. Bluhm, T.L., G.K. Hamer and R.H. Marchessault: *Macromolecules*, **19**, 2872 (1986).

(Received April 19, 1990)