

## 배지조성 최적화를 통한 *Alcaligenes eutrophus*의 고농도 세포배양 및 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate 생산

이용우 · 유영제\*

서울대학교 공과대학 화학공학과

### High Cell Density Culture of *Alcaligenes eutrophus* and Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Production by Optimization of Medium Compositions

Lee, Yong-Woo and Young-Je Yoo\*

Department of Chemical Engineering, Seoul National University  
Seoul 151-742, Korea

**Abstract** — The medium compositions of *Alcaligenes eutrophus* were optimized for increasing PHB productivity. It is very important to optimize the concentrations of inorganic salts and trace elements as well as carbon and nitrogen sources to maximize cell growth rate and productivity. The fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* by dual feeding of ammonia water and glucose under optimized initial medium concentrations was carried out. Glucose was fed manually according to glucose consumption rate and ammonia water by pH-stat. The final cell concentrations and PHB content in 30 hours were 122 g/l and 65% of dry cell weight (yielding 79 g of PHB/l), respectively and 2.64 g/l/hr of PHB production rate was obtained.

Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB)는 생분해성 플라스틱으로서 석유화학 고분자의 난분해성으로 인한 환경문제를 해결할 수 있는 대체물질로 여겨져 최근에 관심을 끌고 있다. 또한 PHB는 생분해성 외에도 생체 적합성, 압전 효과, 기체 차단성, 광학적 활성, 자외선 안정성, 그리고 다른 고분자와의 공중합 용이성 등 여러가지 유용한 특성이 있어 응용 가능성이 매우 광범위하다(1). PHB는 질소원이나 미량 원소와 같은 특정 영양분이 고갈된 조건에서 미생물에 의하여 탄소원과 에너지원으로 세포 내에 생합성된다. 대부분의 원핵세포 미생물들이 세포 내에 PHB를 생합성하지만 축적되는 양이 매우 적다. 그러나 *Alcaligenes eutrophus*는 다른 균주에 비해 PHB 축적비가 매우 높아 PHB를 대량 생산하는데 대표적인 균주로 알려져 있다(2, 3).

PHB를 대량 생산할 수 있는 생물공정에 대한 많은 연구가 있었는데, 그 중 고농도 세포배양은 발효조 단위 부피당의 생산성을 증가시켜서 발효조 부피를

줄일 수 있고 폐기물 양을 줄일 수 있기 때문에 생산성 뿐만 아니라 downstream공정을 간편하게 할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 유가식배양 공정은 최적 기질농도를 유지하면서 기질의 고갈이나 기질이나 생성물에 의한 저해작용을 막을 수 있어서 단시간에 세포를 고농도 배양하는 데 용이하므로 고농도 세포 배양에 주로 이용되어 왔다(4, 5).

유가식 배양 시, 발효조 내 기질의 고갈이나, 기질의 과잉공급으로 인하여 기질에 의한 저해작용이 일어나지 않도록 세포성장에 따라 기질 주입속도를 조절해야 한다. 기질 주입속도를 자동 조절하기 위하여 Respiratory Quotient(6), 용존산소(7), 또는 pH(5) 등 여러가지 제어 전략이 시도되어 왔다.

Suzuki 등(8)은 주입하는 메탄올/암모니아 비율을 PHB 축적에 따라 조절하면서 *Pseudomonas*를 유가식 배양한 결과, 170시간만에 149 g/l의 PHB를 생산하였고, Lee 등(5)은 sucrose를 탄소원으로 하고 암모니아를 pH-stat으로 자동주입하면서 PHA생합성 gene을 가지고 있는 *Escherichia coli*를 유가식 배양하여 배양 48시간에 세포농도를 125 g/l까지 생산하였다.

**Key words:** *Alcaligenes eutrophus*, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, optimization, biodegradable polymer

\*Corresponding author

본 연구에서는 PHB를 생산하는 *Alcaligenes eutrophus*를 고농도 배양하기 위하여 세포성장에 최적인 기질들의 농도를 조사하였고, 이 기질들의 최적 농도를 초기 배지농도로 하고 암모니아수는 pH-stat으로, 포도당은 배양 도중 시료를 분석하여 포도당 소모속도에 따라 수동으로 유량을 조절하면서 유가식 배양을 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

PHB를 생합성하는 균주로서 포도당을 탄소원으로 이용하는 *Alcaligenes eutrophus*(NCIB 11599)를 사용하였다. 이 균주는 4°C로 보관하여 사용하였고 1개월마다 계대배양하였다.

### 배지

균주를 보관하는 데는 YM 배지를 사용하였고, 발효조에서의 배양배지는 제한배지(defined medium)를 사용하였다. 탄소원으로는 포도당, 질소원으로는 플라스크 배양과 유가식 배양의 초기배지는 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl)을 사용하였지만 발효조에 주입되는 질소원은 염화암모늄이나 암모니아수(28%)를 사용하였다. 유가식 배양의 초기 배지농도는 실험에 의하여 결정된 최적화된 농도로 하였다. 갈색반응을 막기 위하여 phosphate buffer에 염화암모늄과 NaHCO<sub>3</sub>를 첨가한 용액과 포도당에 MgSO<sub>4</sub> 및 미량원소들을 첨가한 용액을 분리하여 멸균한 뒤 혼합하였다. 배지조성을 최적화하기 전의 미량원소들의 농도는 Lee와 Yoo(9)의 조성을 근거로 최적 배지조성을 실험에 의하여 정하였고, 착화합물이 형성되는 것을 막기 위해 미량원소들을 citric acid 15.6 g/l가 용해된 1 N-HCl 용액에 녹였다.

### 배양 방법

배지조성을 최적화하기 위한 플라스크 배양은 미리 종균배양된 균주를 250 ml-삼각플라스크에 담긴 100 ml의 멸균된 배지에 500 µl씩 접종하여 진탕배양기에서 33°C, 150 rpm의 조건에서 15시간 배양하였다. 유가식 배양은 배지 1.5 l가 충전된 발효조에 종균배양된 균주 200 ml를 접종한 다음 시작하였고 최종 부피가 3.5 l 정도 되었을 때 종료하였다. 발효조는 5 l-발효조(한국발효기)를 사용하였다. 배양초기에 교반속도를 200 rpm, 공기유량은 2 l/min으로 하다가 용존산소(D.O.)가 감소함에 따라 교반속도를 900 rpm, 공기유량은 5 l/min까지 증가시켜 용존산소를 포화농도

의 20~30% 정도로 유지하였다. 교반속도와 공기유량을 최대로 해도 용존산소가 고갈이 될 때는 순수한 산소를 공급하였다. 배양온도는 33°C로 유지하였고 소포제는 실리콘오일(2%)을 사용하였다. 암모니아수는 pH-controller에 암모니아 주입펌프(peristaltic pump, Haake Buchler Co.)를 연결시켜 pH가 6.5 이하가 되면 자동 공급되도록 하였다. 포도당은 농도를 분석하여 발효조 내의 농도가 10~20 g/l가 되도록 수동으로 조절하였다.

### 분석 방법

세포농도는 UV-spectrophotometer(UVIKON 930)로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 검량선에 의하여 계산하였다. 포도당 농도는 효소발색법인 enzyme kit(영동제약)를 사용하여 분석하였고, 암모늄농도는 Berthelot 반응을 이용한 방법(10)을 사용하였다. PHB 농도는 FID가 부착된 GC(HP 5890)를 사용하여 분석하였고(11) 인산염 농도는 ascorbic acid법(12)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 배지 조성의 최적화

고농도 세포배양을 하기 위해서는 세포성장에 최적인 조건을 유지하면서 배양을 해야 하는데 그렇게 하기 위해서는 사용된 기질들의 세포성장에 대한 저해작용과 비세포 성장속도가 최대가 되는 최적농도를 아는 것이 중요하다. 사용되는 배지성분들의 최적농도를 구하기 위하여 각 성분들의 농도를 변화시키면서 플라스크 배양을 하여 정체기에 도달하지 않은 배양 15시간 때의 세포농도를 측정하여 비세포 성장속도를 각각 비교하였다. 정체기에 도달하지 않은 배양 15시간 때의 세포농도를 측정한 것은 가능하면 배양 초기의 기질농도 조건에서의 비세포 성장속도를 구하기 위해서였다.

Fig. 1에서와 같이 포도당 농도는 5~20 g/l 범위에서 비세포 성장속도가 거의 일정하였고 인산염 농도는 0.01 M에서 최적농도를 나타냈는데 이 농도는 Repaske와 Mayer(14)가 *A. eutrophus*의 배양 인산염농도를 0.03 M로 한 것보다 1/3 정도 낮은 농도였다. NaHCO<sub>3</sub>의 최적농도는 1 g/l로 Repaske와 Mayer(14)가 *A. eutrophus*의 배양농도로 한 것과 일치하였는데, 특히 NaHCO<sub>3</sub>는 1 g/l 이상에서 저해작용을 나타내 3 g/l에서는 세포가 전혀 성장하지 않는 강한 저해작용을 나타냈다. 따라서 유가식 배양에서는 배지 성분 중 특히 NaHCO<sub>3</sub>가 과잉이 되지 않도록 주의해야

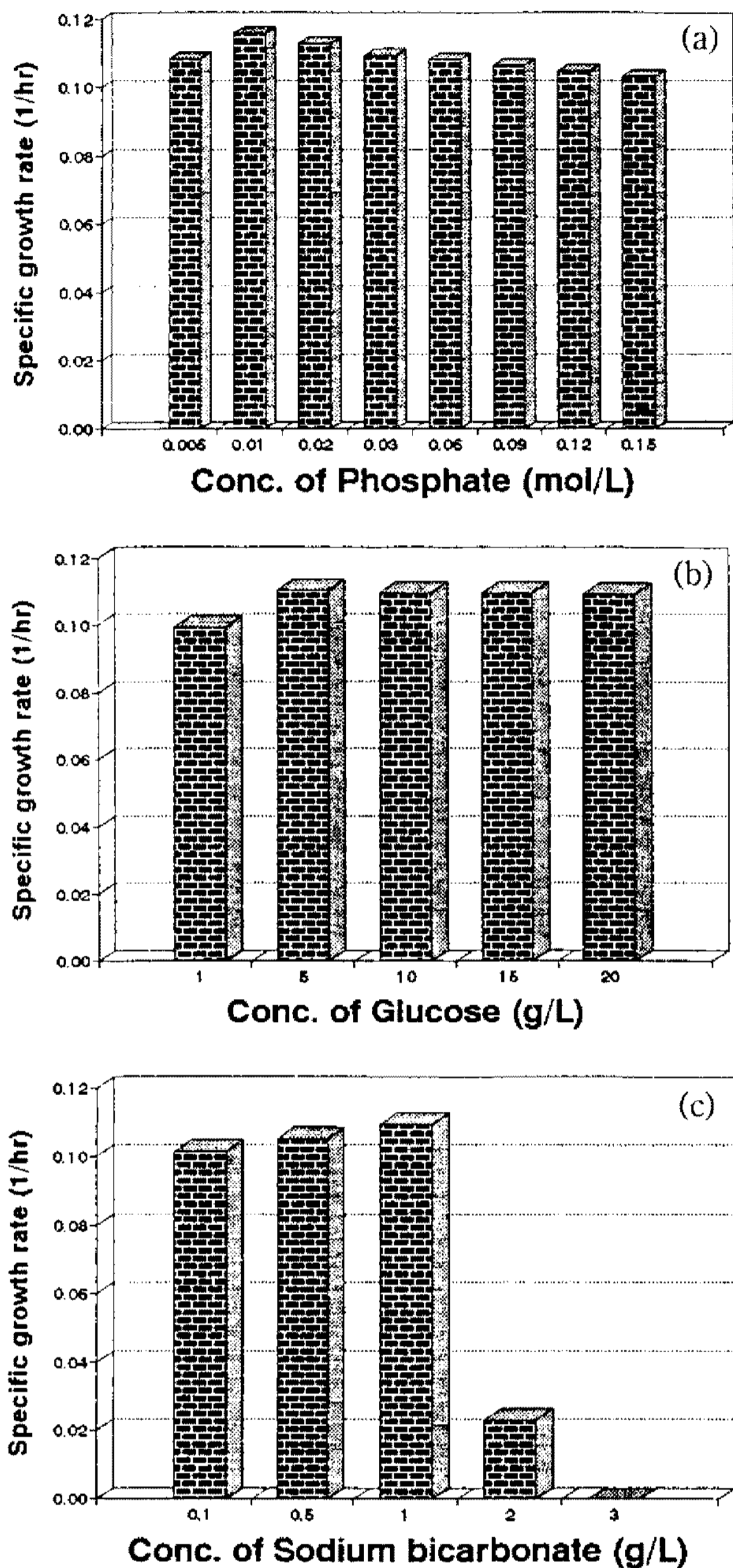


Fig. 1. The effects of culture medium concentrations on the specific growth rate of *Alcaligenes eutrophus*. (a) glucose, (b) phosphate, (c) NaHCO<sub>3</sub>.

함을 알 수 있었다. MgSO<sub>4</sub>는 실험 범위인 0.1~0.5 g/l에서 비세포 성장속도가 MgSO<sub>4</sub> 농도에 거의 영향을 받지 않았다(data 제시 생략). 염화암모늄 농도도 실험범위인 2 g/l 내에서 염화암모늄 농도가 비세포 성장농도에 별로 영향을 주지 않았다(data 제시 생략). 이는 Bitar와 Underhill(13)이 염화암모늄 농도에 따른 *A. eutrophus*의 비세포 성장속도가 저해작용이 없는 Monod식을 따른다는 것과는 다소 차이가 있지만 염화암모늄 농도가 0.5 g/l 이상에서는 저해작용이 없

Table 1. The effects of various trace elements on the growth of *Alcaligenes eutrophus*

Elements	Control conc. (mole/l)	Specific growth rate(hr <sup>-1</sup> )		
		(×1) <sup>a</sup>	(×2) <sup>a</sup>	(×3) <sup>a</sup>
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	9.16×10 <sup>-7</sup>	0.1097	0.0993	0.1166
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	5.99×10 <sup>-5</sup>	0.1097	0.1000	0.1300
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	7.01×10 <sup>-5</sup>	0.1097	0.0935	0.1266
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.96×10 <sup>-7</sup>	0.1097	0.0924	0.1131
CrCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.99×10 <sup>-7</sup>	0.1097	0.1131	0.1145
CuSO <sub>4</sub>	6.25×10 <sup>-7</sup>	0.1097	0.0759	0.0728

<sup>a</sup>Multiples of the control concentrations of various trace elements.

이 비세포 성장속도에 크게 영향을 주지 않는다는 Bitar와 Underhill(13)의 실험 결과와는 일치하였다.

미량원소 용액을 100 μ/l에서 500 μ/l까지 변화시켜 첨가하였을 때 큰 차이는 없었지만 300 μ/l일 때 비세포 성장속도가 0.11 h<sup>-1</sup>로 최대이었다(data 제시 생략). 이 농도는 Lee와 Yoo(9)가 미량원소 용액을 첨가한 것보다 3배 정도 높은 농도이었다. 세포 성장에 미치는 미량원소 각각의 농도의 영향을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 미량원소 중 CuSO<sub>4</sub>만 control 농도 이상에서 저해작용을 나타냈고 그 외의 미량원소들은 기준농도의 3배일 때가 세포 성장속도가 가장 높았다. Control 농도의 3배까지만 조사한 이유는 미량원소 혼합액을 control 농도의 3배인 300 μ/l로 첨가하였을 때가 비세포 성장속도가 가장 높았기 때문이다. 따라서 미량원소는 배양시에 control 농도의 3배인 300 μ/l를 첨가하고 CuSO<sub>4</sub>는 control 농도와 같이 첨가하는 것이 적합함을 알 수 있었다.

### 유가식 배양

고농도 세포배양을 하기 위하여 유가식 배양을 수행하였다. 초기배지 중의 포도당 농도는 20 g/l, 염화암모늄 농도는 0.5 g/l, 인산염 농도는 0.03 M(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 4 g/l), MgSO<sub>4</sub> 농도는 0.5 g/l, NaHCO<sub>3</sub>는 1 g/l, 그리고 미량원소들의 농도를 600 μ/l로 하여 유가식 배양을 하였다. 초기 배지 중의 인산염 농도와 미량원소들의 농도를 플라스크 배양에서 얻어진 기질들의 최적농도보다 높게 한 것은 발효조를 이용하는 고농도 배양의 경우 배양 도중 기질들이 고갈되어 세포성장이 중단되는 것을 방지하기 위해서였고 MgSO<sub>4</sub>는 저해작용이 나타나지 않았기 때문에 충분히 넣어주었다. NaHCO<sub>3</sub>는 저해작용이 심하기 때문에 최적농도로 하였다. 주입기질로서

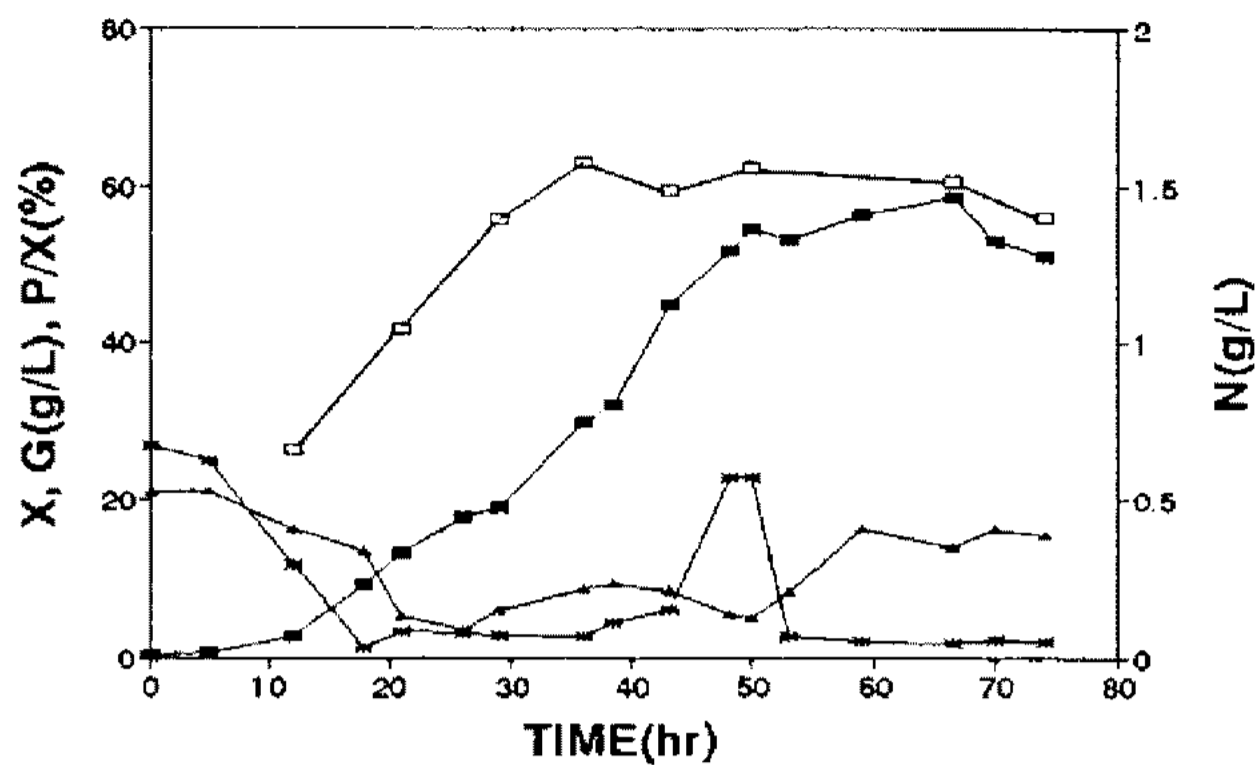


Fig. 2. The time courses of fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with dual feeding of glucose(400 g/l) and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (100 g/l).

■: cell mass(X), □: PHB content(P/X), ▲: glucose(G), \*: ammonium(N)

포도당 용액은 400 g/l, 염화암모늄 용액은 100 g/l로 하였고, 발효조 내의 포도당 농도는 10~20 g/l, 염화암모늄은 PHB 축적 단계에서 암모늄 고갈을 용이하게 하기 위해 0.1~0.5 g/l가 유지되도록 배양 도중 발효조 내의 포도당과 암모늄의 농도들을 분석하면서 기질 소모속도를 계산하여 주입 펌프의 유량을 조절하였다.

Fig. 2에 배양결과를 나타내었다. 포도당 농도는 유가식 배양동안 5~20 g/l로 유지되었고, 암모늄 농도는 유가식 배양 후 43시간까지 0.2 g/l로 유지되다가 암모늄 공급속도를 증가시키지 않았는데도 0.57 g/l로 높아져서 암모늄공급을 중단하였으나 암모늄이 소모되지 않는 현상이 나타났다. 이 때 배지 중의 한 성분이 고갈된 것으로 판단하여 인산염, 미량원소,  $\text{NaHCO}_3$  그리고  $\text{MgSO}_4$ 를 각각 소량씩 넣으면서 용존산소의 변화를 관찰하였는데 주입한 기질 중  $\text{MgSO}_4$ 를 발효조 내의 농도가 0.5 g/l가 되도록 1.5 g 주입하였더니 용존산소가 감소하면서 암모늄이 급격히 소모되어 고갈되었다. 이러한 현상은 배양 도중 마그네슘의 고갈로 인하여 세포벽과 세포막의 phospholipoproteins와 chelation할 수 있는 마그네슘이 부족하게 되어 세포를 생합성하는데 필요한 질소원을 uptake하지 못하기 때문에 생기는 현상(15)으로 해석할 수 있다.

질소원을 고갈시켜 PHB 축적비를 높이기 위하여 배양 후 48시간 때 암모늄공급을 중단하였는데 이후에 세포농도는 5 g/l 정도 증가하였지만 PHB 축적비는 증가하지 않았다. 이는 암모늄 공급을 중단했을 때 발효조 내의 질소원의 농도가 높았기 때문에 PHB 합성보다는 생체합성이 활발해졌기 때문으로 보이고 질소원 농도가 다시 낮아진 이후에 PHB 축적비가

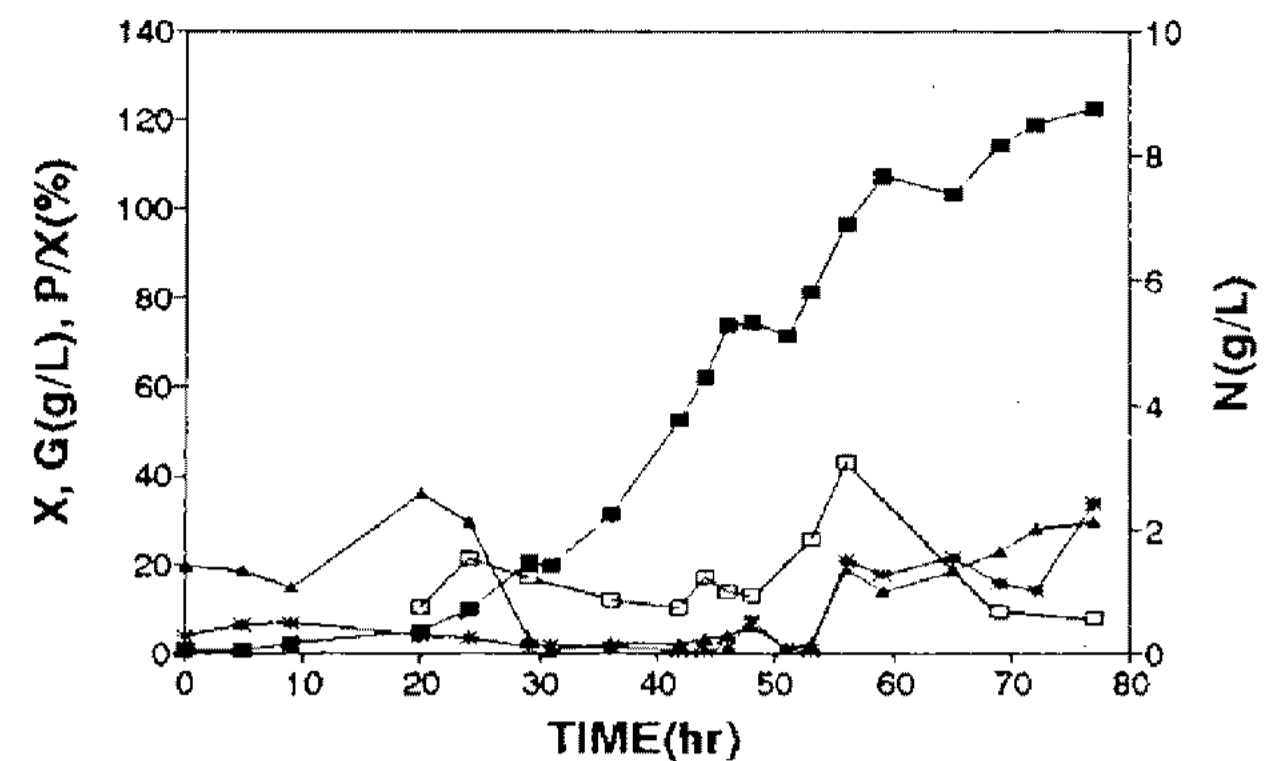
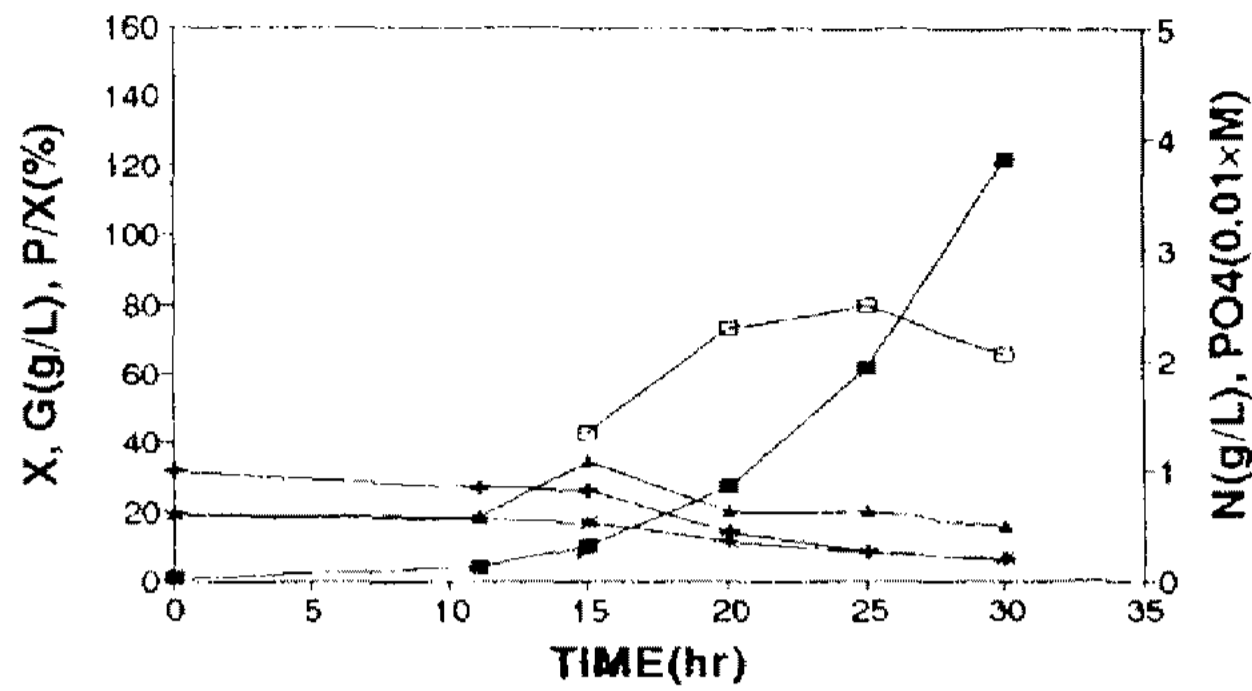


Fig. 3. The time courses of fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with dual feeding of glucose(400 g/l) and ammonia water(28%), ammonia water was fed by pH-stat.

■: cell mass(X), □: PHB content(P/X), ▲: glucose(G), \*: ammonium(N)

증가하지 않은 것은 질소원 농도의 급격한 변화가 세포활성에 영향을 준 것으로 추측된다. 또한 배양 도중 pH를 조절하기 위하여 사용된 2 N-NaOH도 포도당 용액과 염화암모늄 용액의 부피만큼 주입되어 외부에서 주입한 용액으로 인하여 배양액이 희석되어 세포농도 증가가 상쇄되었음을 알 수 있었다. 세포 농도는 배양시작 후 67시간만에 59 g/l이었고, 이 때 PHB 축적비는 건조세포 무게의 61%이었다.

NaOH 용액에 의한 희석을 막기 위하여 염화암모늄 용액과 NaOH 용액 대신 암모니아수(28%)를 질소원과 pH 조절 용액으로서 pH-stat으로 자동 주입되게 하여 다시 유가식 배양을 수행하였다. pH-stat으로 암모니아를 자동 주입한 것은 세포성장에 따라 질소원이 섭취되면서 pH가 감소하였으므로 질소원 농도와 pH 값이 상관관계가 있을 것으로 판단하였기 때문이다. 초기 염화암모늄 농도는 앞의 유가식 배양 실험에서 발효조 내의 농도가 0.1 g/l로 너무 낮게 유지되어 배양 초기에 세포성장보다는 PHB 합성이 이루어졌기 때문에 다소 높여 1 g/l로 하였고, 초기 인산염 농도는 배양 도중 인산염 농도 감소가 미약하였기 때문에(data 제시 생략) 최적농도인 0.01 M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.83 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.33 g/l)로 하였다. 그리고 초기 미량원소들의 농도도 최적농도인 300  $\mu\text{l/l}$ 로 하였다.  $\text{MgSO}_4$ 와  $\text{NaHCO}_3$  농도는 앞의 유가식 배양 실험 조건과 동일하게 하였다. 주입 포도당 용액은 포도당 400 g/l에 미량원소들을 300  $\mu\text{l/l}$ 를 첨가하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 최종 세포농도는 배양 후 77시간만에 130 g/l이었으나 최종 PHB 축적비는 10% 이하로 매우 낮았다. 특히 질소원 농도가 낮게 유지된 30~50시간 때에도 PHB 축적비가 낮은



**Fig. 4. The time courses of fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with dual feeding of glucose(600 g/l) and ammonia water(28%), ammonia water was fed by pH-stat.**

■: cell mass(X), □: PHB content(P/X), ▲: glucose(G), \* : ammonium(N), + : phosphate(PO<sub>4</sub>)

것은 포도당의 농도가 매우 낮았기 때문으로 생각된다.

PHB 축적비를 높이고 배양시간을 단축시키기 위하여 새로운 유가식 배양 실험을 하였다. 앞의 유가식 배양 실험에서 세포성장 단계에서 pH-stat으로 인해 암모늄 농도가 저해작용을 나타낼 정도로 높아지지는 않았기 때문에 초기 염화암모늄 농도는 2 g/l로 하였고, 그 외의 기질농도는 앞의 유가식 배양 실험 조건과 동일하게 하였다. 주입 포도당 용액에 의한 부피증가를 줄이기 위하여 포도당 농도를 너무 높게 되면 용액의 점도가 높아져 포도당 유량을 조절하는데 난점이 있기 때문에 600 g/l로 하였다. 배양 도중에 기질이 고갈되는 것을 방지하기 위하여 별도의 고농도 배양실험으로부터 얻은 결과를 토대로 주입 포도당 용액 1l에 MgSO<sub>4</sub> 7.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20.4 g, 그리고 미량원소들 1800 μl를 첨가하였다. 배양초기에 발효조 내의 pH가 pH-stat으로 주입되는 암모니아수에 민감하여 적정한 pH 이상으로 급상승하는 것을 막기 위하여 pH를 적정 pH 값인 6.8보다 낮게 유지하였다.

배양 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 세포농도는 지금까지의 S형의 성장곡선과는 달리 log-phase처럼 증가하다가 배양시작 후 30시간만에 122 g/l가 되었고, PHB 축적비는 25시간 때 건조세포무게의 80%까지 증가하다가 30시간 때 건조세포무게의 65%로 감소하여 실험을 중단하였다. pH-stat으로 주입되는 암모니아수의 공급을 중단하지 않았음에도 불구하고 PHB 축적비가 건조세포무게의 60% 이상 높아진 것은 pH가 적정 이상으로 급상승하는 것을 막기 위하여 pH를 보다 낮게 유지하였기 때문에 pH-stat으로 자동 주입되는 암모니아수의 양이 상대적으로 적어 암모늄이 PHB가 축적될 수 있을 정도의 낮은 농도로

유지되었기 때문으로 여겨진다. PHB 축적비가 25시간 이후에 감소한 것은 25시간 이후에 용존산소를 포화농도의 20~30% 수준으로 유지시키기 위하여 순수한 산소를 공급하였는데 PHB가 다량 축적된 미생물들이 산소의 독성 때문에 다소 lysis된 것으로 보인다. 배양 도중 포도당은 고갈되지 않고 약 20 g/l로 유지되었고 인산염 농도도 초기 인산염 농도보다 다소 시간에 따라 감소하는 경향을 나타냈다. Suzuki 등(8)이 *Pseudomonas*를 유가식 배양하여 배양 170시간만에 PHB를 149 g/l 생산한 것과 비교해 볼 때, PHB 농도는 Suzuki 등(8)의 결과보다 낮았지만 PHB 생산속도 면에서는 2.64 g/l/hr로 Suzuki 등(8)의 결과보다 약 3배 정도 높았다. Lee와 Chang(5)은 PHA를 생합성하는 재조합 *E. coli*를 유가식 배양하여 48시간만에 세포농도를 125 g/l까지 배양하였는데 본 연구에서는 배지최적화를 통한 *A. eutrophus*의 유가식 배양 실험으로 100 g/l 이상 고농도 세포배양을 하는데 배양시간을 30시간 이내로 단축할 수 있었고 PHB 축적비도 건조세포무게의 60% 이상 높일 수 있었다.

세포성장속도를 촉진시키기 위하여 발효조에 효모 추출물을 3 g/l 첨가한 경우에는 배양초기에 세포성장속도는 빨라지지만 세포농도가 증가함에 따라 미세한 기포가 과다하게 발생하여 이때 소포체를 다량 주입해도 기포가 계속 발생하여 배양을 중단하였다. DO-stat으로 암모늄 주입속도를 자동 조절하면서 유가식 배양을 하였을 때에는 세포성장 뿐만이 아니라 교반속도나 공기 또는 산소 주입속도에도 DO가 상당히 영향을 받기 때문에 발효조 내의 질소원 농도를 일정하게 유지하는데 난점이 있었다. 그러나 pH는 일반적으로 세포성장과 질소원인 암모니아수 외의 다른 공정변수에 영향을 받지 않기 때문에 pH-stat으로 암모니아수를 자동 주입하면서 발효조 내의 암모늄농도를 일정하게 유지하는 것이 매우 효과적이었다.

세포성장에 따른 각 기질들의 소모속도를 보다 정확히 규명하여 주입 포도당 용액에 첨가되는 기질들의 조성을 정하고 그 소모속도에 따라 기질 주입속도와 용존산소가 on-line으로 최적제어된다면 세포 및 PHB 농도를 더 높일 수 있을 뿐만 아니라, 배양시간도 보다 더 단축할 수 있어, PHB 생산속도를 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 연구 결과는 PHB 생산비를 낮추어 산업적으로 PHB를 생산하는데 기여할 뿐만 아니라 다른 산업미생물들을 고농도 배양하는데도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

PHB 생산성을 증가시키기 위하여 *Alcaligenes eutrophus*의 배지조성을 최적화하였다. 세포성장속도와 생산성을 최대화하는데 탄소원과 질소원 뿐만이 아니라 무기염과 미량원소의 농도를 최적화하는 것이 매우 중요하다. 초기 배지농도를 최적 농도로 하고 암모니아수와 포도당을 공급하면서 *Alcaligenes eutrophus*를 유기식 배양하였다. 포도당은 포도당 소모속도에 따라 수동으로 유량을 조절하였고 암모니아수는 pH-stat 방식에 의하여 주입하였다. 배양 30시간만에 세포농도가 122 g/l, PHB 축적비는 건조세포무게의 65%(PHB 농도 79 g/l)가 되었고, 이 때 PHB 생산성은 2.64 g/l/hr이었다.

## 감사의 말

본 연구를 지원하여 주신 한화그룹 연구소에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
- Schlegel, H.G. and G. Gottschalk. 1962. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersaure funktion und biosynthese. *Angew. Chem.* **74**: 342-346.
- Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1990. Effect of glucose and ammonium concentrations on cell growth and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 607-612.
- Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
- Lee, S.Y. and H.N. Chang. 1993. High cell density

- cultivation of *Escherichia coli* w using sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Lett.* **15**: 971-974.
- Wang, H.Y., C.L. Cooney, and D.I.C. Wang. 1977. Computer-aided baker's yeast fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 69-81.
- Cutayar, J.M. and D. Poillon. 1989. High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnol. Lett.* **11**: 155-160.
- Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 370-374.
- Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1992. Effects of glucose and ammonium concentrations in continuous culture for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 597-606.
- Srienc, F., B. Arnold, and J.E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 982-987.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
- American public health association. 1989. *Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater*, Pp. 4-177-178. 17th ed. Port City Press, Baltimore, Maryland.
- Bitar, A. and S. Underhill. 1990. Effect of ammonium supplementation on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol. Lett.* **12**: 563-568.
- Repaske, R. and R. Mayer. 1976. Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 592-597.
- Gottschalk, G. 1986. *Bacterial Metabolism*, Pp. 1-4. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.

(Received May 24, 1994)