

*Alcaligenes eutrophus*의 유가식 배양에 의한 Poly- β -hydroxybutyrate 및 Poly- β -(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)의 생산

최은수* · 이인영¹ · 강충경 · 홍승서 · 이현수
대전시 유성구 삼양그룹 선일연구소, ¹대전시 유성구 생명공학연구소

Production of Poly- β -hydroxybutyrate and Poly- β -(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by Fed-batch Culture of *Alcaligenes eutrophus*

Eun-Soo Choi*, In-Young Lee¹, Choong-Kyung Kang,
Seung-Suh Hong and Hyun-Soo Lee

SamYang Group SunHill Research Lab., Yusong, Taejon 305-348, Korea
¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST,
Yusong, Taejon 305-600, Korea

Abstract — Fed-batch fermentation was used to produce the high concentrations of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and poly- β -(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB/V). Specific growth rate (μ), yield of cell from glucose ($Y_{x/s}$) were calculated from the two samples in 3 to 5 hours of interval and they were reflected on the determination of glucose feeding rate to maintain the glucose concentration at around 10 g/l in the culture broth. PHB was accumulated after the nitrogen became limited at 60 g/l of dry cell weight by changing ammonia water to 4N-NaOH solution. As results, the final dry cell weight (DCW) of 170 g/l, PHB of 115 g/l were obtained in 50 hours and the overall productivity was 2.4 g/l·h. After PHB accumulation, cosubstrate of glucose and propionic acid (PA) was fed to accumulate PHB/V. But, PA feeding rate was decreased from 3 g/l·h to 1 g/l·h to prevent PA from accumulating to high level in the broth, which is very inhibitory to the cells. As results, DCW, PHB and PHV were 147.5 g/l, 90 g/l and 8 mole % of hydroxyvalerate, respectively.

PHB(poly- β -hydroxybutyrate)는 미생물들이 탄소 원은 풍부하고, 질소, 인, 황, 마그네슘 등의 여러 성장제한 조건하에서 세포내에 에너지 및 탄소 저장물질로 합성하는 고분자 물질이다(1). PHB는 폴리프로필렌 등의 석유화학제품의 물성과 비슷하고, 완전 생분해성이라는 장점으로 이를 생산하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다(2). 또한 PHB와 PHV(poly- β -hydroxyvalerate)의 공중합체인 PHB/V는 PHV의 몰분율의 증가에 따라 유연성, 녹는점 등 가공물성이 폴리에틸렌과 유사해짐으로써, 보다 넓은 분야로의 응용이 가능하게 된다(3). 그렇지만, 기존의 화학합성 고분자들에 비하여 PHB의 생산단가가 너무 높으므로 이를 보다 경제적으로 생산하기 위한 연구들이 이루어

어지고 있다. 많은 PHB 축적 미생물들 중 *Alcaligenes eutrophus*는 PHB의 생합성 경로가 완전히 파악되고, 단순배지에서도 고농도의 PHB 생산성을 가지는 장점으로 산업적 응용군주로 이용되고 있다. 실제로 영국의 Zeneca사는 Biopol이라는 이름으로 PHB 및 PHB/V를 시험 생산·판매를 하고 있다(3).

PHB의 고농도 생산을 위해서는 배양도중 영양분을 간헐적 또는 계속 주입하여 주는 유가식 배양법이 주로 이용된다. 이러한 유가식 배양법 중 DO-stat 또는 pH-stat에 의한 방법은 포도당 고갈에 의한 DO나 pH의 갑작스런 변화를 인식하여 탄소원의 일시적인 공급을 해 주는 방식이기 때문에 탄소원의 농도가 일정하게 유지되지 않아 고농도 배양을 하기 어렵다(4). 따라서 배양도중 탄소원과 다른 영양분의 농도를 일정하게 조절함으로써 배지내의 환경을 일정하게 유지시켜 주는 유가식 배양법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. Suzuki 등(5)과 Kim 등(6)은

Key words: *Alcaligenes eutrophus*, poly- β -(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), fed-batch, high cell density culture

*Corresponding author

메탄올과 포도당을 on-line 측정하여 탄소원을 일정 농도로 유지하는 방법으로 각각 160 g/l 이상의 세포 농도를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 3~5시간 간격으로 샘플채취를 하여 비성장속도와 세포수율값을 구하고 이들을 매개변수로 하는 식에 대입하여 다음 시간의 유속을 결정해주는 방법으로 배지내의 포도당 농도를 일정하게 유지시켜 고농도의 세포배양과 PHB와 PHB/V의 생산에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

균주는 포도당을 탄소원으로 이용하는 *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599를 사용하였다.

사용된 배지는 1l 당 glucose 35 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, Na_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g, 미량원소 2 ml이었고, 이때 미량원소는 2N-HCl 용액 1l 당 H_3BO_3 0.3 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g, Na-citrate 3 g이었다. 유가식 배양을 위한 공급용액중의 배지로는 1l 당 glucose 700 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, Na_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 g, 미량원소 15 ml이었다. PHB/V를 생산하기 위한 공급배지는 1l 당 포도당 500 g, propionic acid 125 g이었다. 배양 온도 및 pH는 각각 30°C와 7.0이었으며, pH 조절은 암모니아수(28%)를 사용하여 조절하고 이는 또한 질소원으로도 이용되었다. PHB는 세포가 원하는 농도까지 성장한 후 암모니아수를 4N-NaOH 용액으로 바꾸어 질소원 제한 및 pH 조절을 함으로써 얻을 수 있었다. 배양에 사용한 발효조는 한국발효기 5l 이었고, 초기부피는 접종량 10%를 포함하여 2l이었고, 교반속도 및 통기량은 초기에 600 rpm, 1.0 vvm으로 시작하여 최고 1300 rpm, 1.5 vvm까지 증가시켰다.

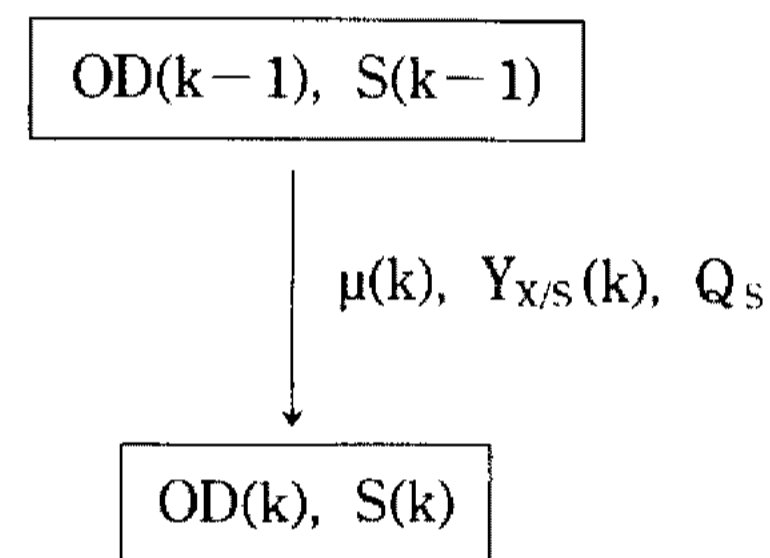
분석방법

세포의 성장은 600 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였고, 건조세포농도는 100°C에서 무게가 변하지 않을 때까지 건조시켜 측정하였다. 포도당농도는 포도당 분석장치(YSI 2700, Ohio, USA)를 이용하였고, 암모늄 이온의 농도는 indolphenol 방법(7)에 의하였다. PHB 및 PHB/V의 농도는 GC(Hewlett Packard, Avondale, USA)로 측정하였고 이때 표준물질로는

시판되는 PHB/V(Aldrich Chemical Co.)를, 내부표준 물질로 benzoic acid를 이용하였다(8). 유기산의 정량은 Aminex 87H(Bio-Rad, USA) column이 부착된 HPLC(Waters, USA)를 사용하였고, 검출기는 UV detector(436 nm), 이동상으로는 0.006N H_2SO_4 를 사용하였다.

포도당 공급속도의 결정

기존의 지수적 공급방식에 의한 공급속도의 결정(식(1))은 비성장속도(μ), 세포수율($Y_{S/X}$) 등을 상수로 하여 계산하는 방법이었다. 그렇지만 시간이 지남에 따라 값들은 변하게 되고(식(3, 4)), 이를 공급속도 결정에 반영해야만 한다. 따라서 본 연구에서는 수 시간 간격으로 샘플채취를 하여 OD_{600} 과 포도당 농도를 측정하고, 현재($\mu(k)$, $Y_{S/X}(k)$)의 값과 직전 샘플($\mu(k-1)$, $Y_{S/X}(k-1)$)의 결과를 비교한 후 샘플 간격간의 μ 와 $Y_{S/X}$ 를 갖도록 하는 새로운 유속을 결정해 주도록 하는 방식을 이용하였다.



$$F = \frac{\mu X_0 V_0}{Y_{S/X}(S_0 - S_s)} e^{\mu t} \quad (1)$$

$$V = V_0 + F \cdot \Delta t \quad (2)$$

$$\mu = \ln(\text{OD}(k)/\text{OD}(k-1)) \quad (3)$$

$$Y_{S/X} = \Delta X / \Delta S \quad (4)$$

$$X = \frac{V_0}{V} e^{\mu t} \quad (5)$$

결과 및 고찰

DO-stat 방법에 의한 배양

Fig. 1은 가장 간단한 유가식배양법중의 하나인 DO-stat 방법을 이용한 배양결과를 나타내었다. 이 방법은 탄소원의 고갈에 의해 미생물의 성장이 저하되고 이에 따라 용존산소량이 갑자기 증가하게 되며, 그 값이 포화용존산소값의 90% 이상으로 갑자기 증가하는 것을 기준으로 약 15 g/l의 포도당이 3분안에 공급되

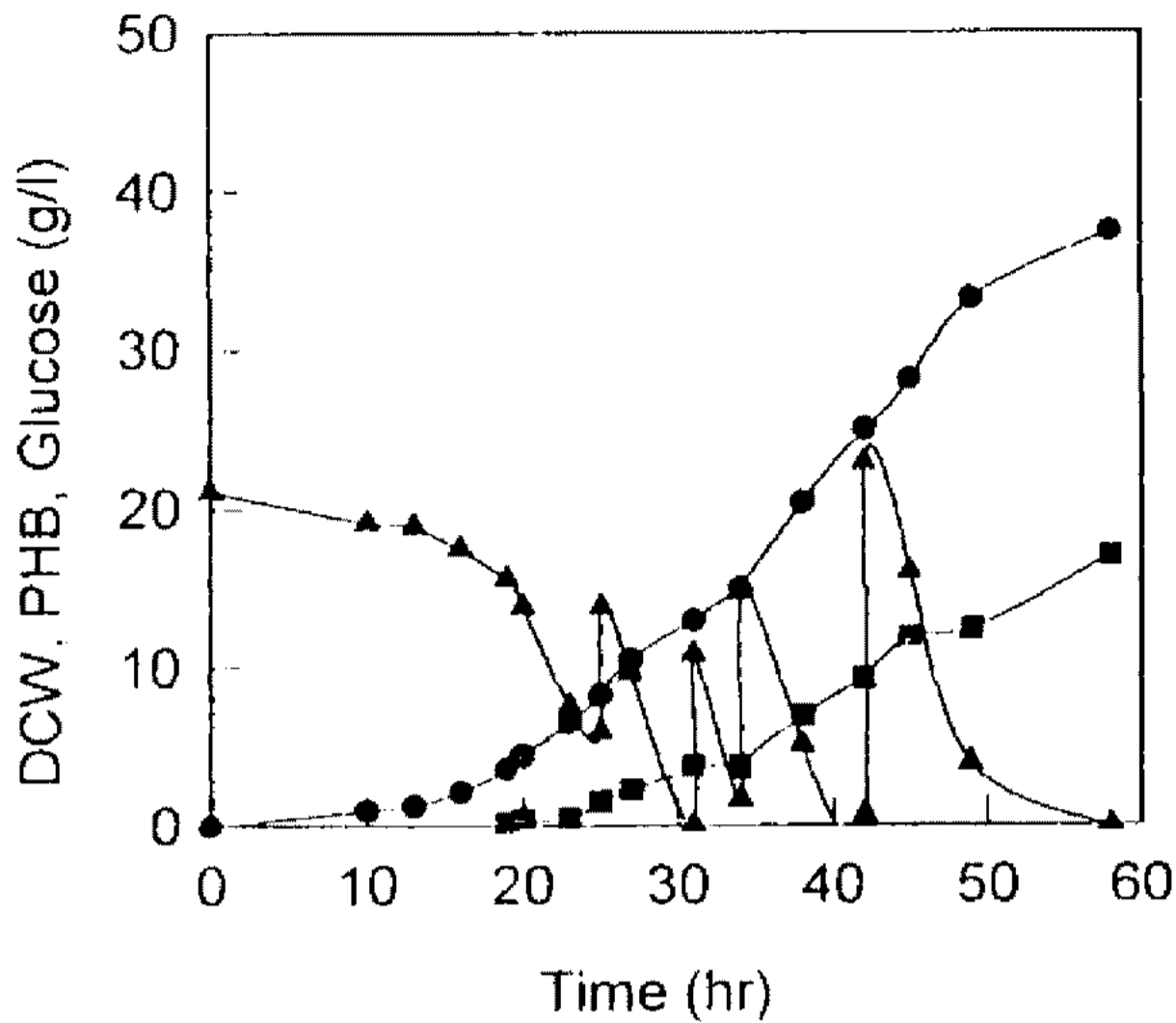


Fig. 1. Fed-batch culture of *A. eutrophus* by DO-stat. ●, DCW; ■, PHB; ▲, Glucose

도록 장치함으로써 배양을 한 것이다. 이 결과로 최종세포농도는 38 g/l, PHB 18 g/l로 축적률 48%를 얻을 수 있었다. 또한 PHB의 생산성은 0.31 g/l·h로써 아주 낮다. 이러한 결과는 DO-stat의 경우 배지내의 포도당농도의 변화가 너무 크므로(0~25 g/l), 미생물에게 미치는 환경요인이 일정하지 못하고 이에 따른 세포성장이 이루어지지 않은 것으로 판단된다.

포도당 농도조절에 의한 배양 및 PHB의 축적

DO-stat의 단점인 포도당농도의 변화를 극복하기 위한 방법으로 포도당농도를 약 10 g/l로 유지하면서 배양하였다. 배양방법은 앞에서 설명한 방법과 같이 3~5시간 전의 샘플과 현재 샘플을 비교하여 비성장 속도와 세포수율 등을 결정하고 이 값들을 식 (1)에 대입하여 포도당 공급속도를 결정하는 방법으로 하였다. 이 경우 Fig. 2(a)에 나타난 것처럼 포도당 농도는 약 10 g/l로 일정하게 유지됨을 알 수 있으며, 이는 수시간 간격(3~5시간)의 샘플링으로부터 얻은 각 변수들이 세포들의 성장환경을 잘 나타내 주는 것으로 판단된다. 질소원 제한은 회분식배양을 통해 얻은 축적률 약 70%를 기준으로 세포농도 60 g/l에서 암모니아수를 4N-NaOH로 바꾸어 주는 방법으로 하였다. 이러한 방법으로 50시간에 세포농도 170 g/l, PHB 115 g/l(세포내 축적률 67.6%)를 얻을 수 있었으며, PHB의 생산성은 2.4 g/l·h를 얻음으로써, DO-stat에 의한 방법보다 7.7배의 생산성 향상을 보였고 이는 Kim(6) 등의 결과와 같은 수준이다. Fig. 2(b)는 배양도중 포도당 소모속도, 세포로의 전환율 그리고 성장속도(Q_s , $Y_{x/s}$, μ)의 변화를 나타내고 있다. 성장

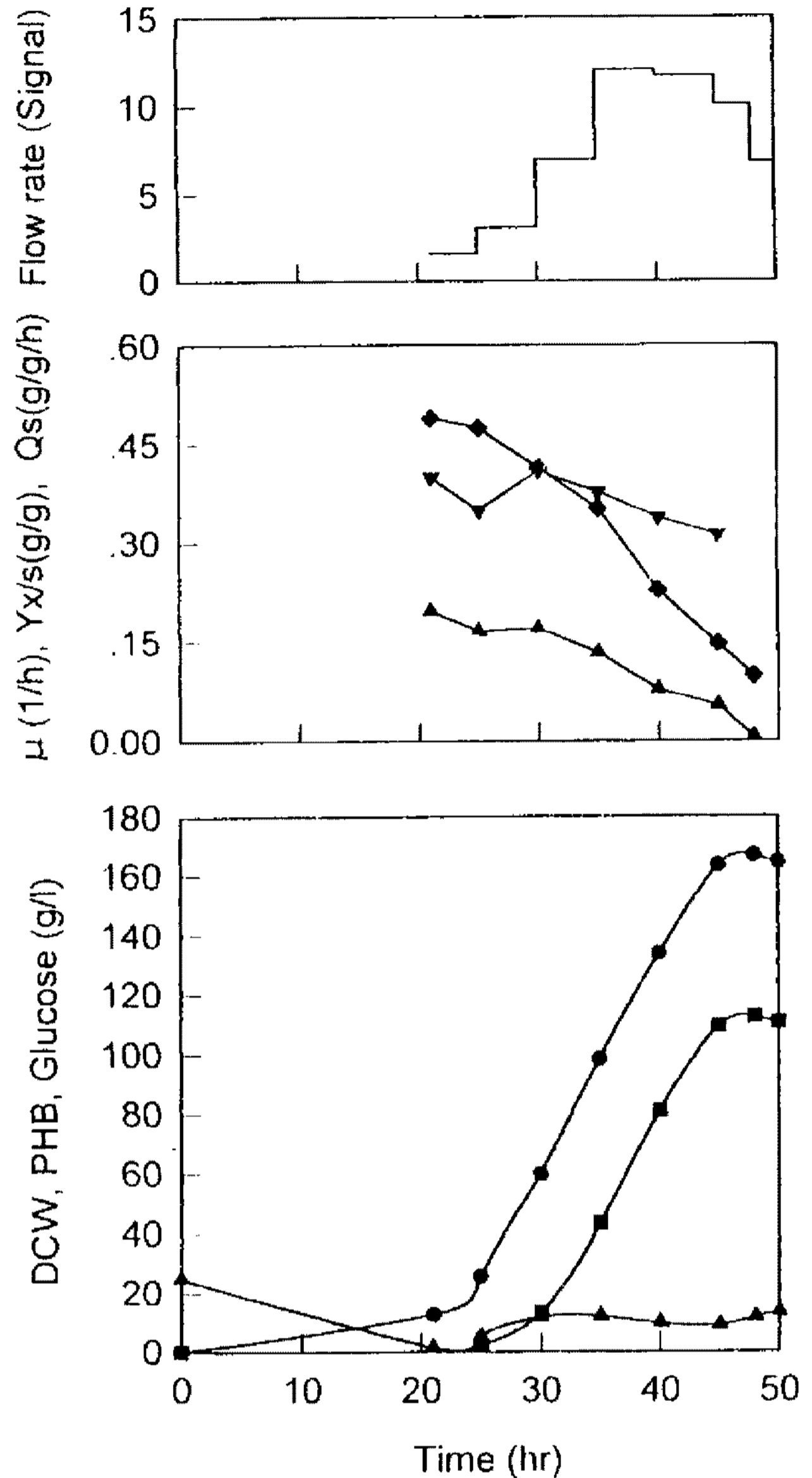


Fig. 2. PHB production of *A. eutrophus* by fed-batch culture with control of glucose feeding.

- (a) Time courses of fermentation ●, DCW; ■, PHB; ▲, Glucose
- (b) Changes of parameters during culture ▲, Specific growth rate (μ); ▼, Cell yield from glucose ($Y_{x/s}$); ◆, Specific glucose consumption rate (Q_s)
- (c) Profile of glucose feeding rate

속도와 포도당 소모속도는 시간에 따라 세포의 노화, 질소원의 제한으로 말미암아 감소하는 경향을 볼 수 있다. 그러나 PHB를 포함한 세포로의 전환율은 0.35 정도로 유지되어 고농도의 세포 및 PHB를 얻을 수 있었다. Fig. 2(c)의 경우 시간에 따른 포도당 공급속도의 변화를 보여주며, 질소원 제한 전단계의 세포 성장단계에는 지속적으로 증가하지만, 질소원을 제한한 후부터는 점차 감소경향을 보인다. 이는 세포성장의 둔화에 따른 포도당 소모속도의 감소에 따른

결과이다.

PHB/V 공중합체의 생산

PHB/V의 생산에는 세포성장 단계, 질소원 제한에 의한 PHB 축적 단계와 propionic acid(PA) 첨가에 의한 PHB/V 축적의 3단계 배양이 필요하다. PHB/V를 축적하기 위해 중요한 점은 배지내에 포도당이 고갈되지 않고, PA가 축적되지 않도록 PA의 공급속

도를 조절하는 것이다. 포도당과 PA의 공급비율을 2 : 1, 3 : 1 그리고 4 : 1의 비율로 공급한 실험을 하였을 때 2 : 1, 3 : 1의 경우 포도당이 완전히 고갈되어 세포의 활성이 현저히 감소됨을 알 수 있었다(data not shown). 따라서 포도당과 PA를 4 : 1의 비율로 공급하여, 포도당의 완전고갈을 방지하고 PA의 소모 속도와 배지내의 축적정도를 조사한 후 시간에 따라 이의 공급속도를 조절하였다. 이에 따라 초기 3시간 동안은 3 g/l·h로 PA를 공급하였을 경우 PA가 배지내에 과량으로 축적되지 않고 PHV의 생성 또한 계속 증가함을 알 수 있다. 이후에는 PA의 공급속도를 2 g/l·h로 3시간, 1 g/l·h로 3시간 동안 공급하여 PHB/V의 축적을 유도하였다(Fig. 3(b)), 이때, 최종 PHV의 축적량은 9 g/l까지 선형적으로 증가함을 보여, 배지내에 축적된 5.5 g/l의 PA가 세포에 큰 독성을 미치지 않는 것으로 판단된다(Fig. 3(c)). 이러한 방법으로 배양한 결과로써, Fig. 3(a)는 배양기간 중 세포, PHB와 PHV의 변화를 나타내며, 세포농도는 147.5 g/l, PHB 90 g/l 그리고 PHV 9 g/l(PHV 8 mol%)를 얻었다. 이 경우 PHB의 생산성은 1.64 g/l·h이었고, PHV의 축적유도 9시간을 기준으로 할 때 이의 생산성은 1 g/l·h로써 아주 높은 생산성을 보임을 알 수 있다.

요 약

유가식 배양방법을 통하여 고농도의 PHB 및 PHB/V를 생산하였다. 3~5시간 간격의 샘플로부터 구한 세포성장속도와 세포수율을 포도당의 공급속도 계산에 반영하여 배지내의 포도당농도를 약 10 g/l로 유지하였다. PHB는 세포농도 약 60 g/l에서 암모니아수를 4N-NaOH로 바꾸어 주는 질소원 제한방법으로 생산하였다. 이에 따라 배양 50시간만에 세포농도 170 g/l, PHB 115 g/l(축적률 67.6%)를 얻었고, 이때 PHB의 생산성은 약 2.4 g/l·h이었다. PHB/V 생산을 위해서 PHB 생성이 끝난 후 배양 50시간째부터 포도당과 propionic acid(PA)의 비를 4 : 1로 하고 세포에 독성을 미칠 수 있는 PA의 공급을 3 g/l·h에서 1 g/l·h로 공급속도를 줄여가면서 배양을 하여 약 60 시간에 세포농도 147.5 g/l, PHB 90 g/l, PHB/V 9 g/l (HV 8 mol%)를 얻을 수 있었다.

약어

- OD : 흡광도 (600 nm)
- $Y_{x/s}$: 세포수율 (g/g)
- X : 세포농도 (g/l)

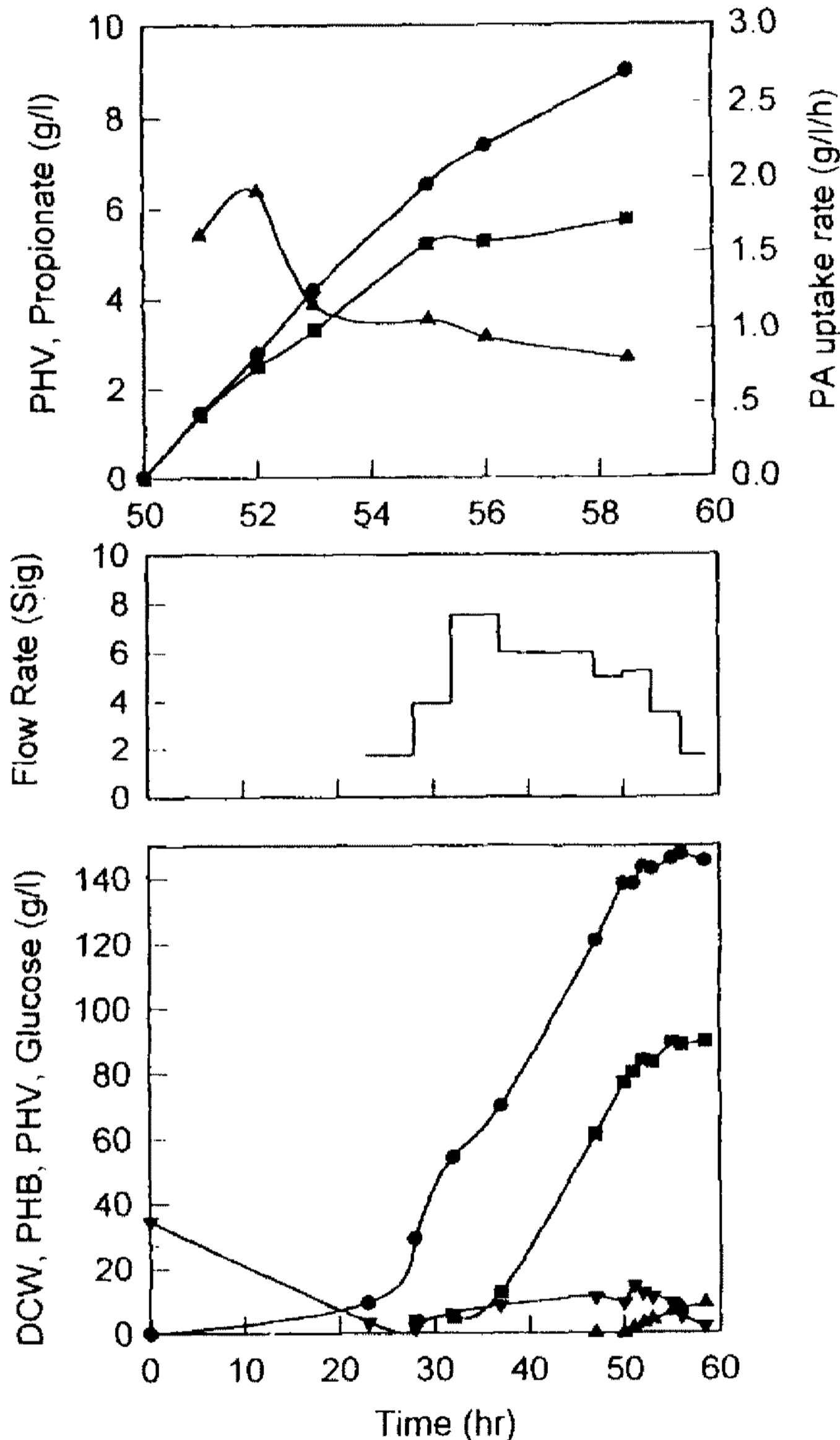


Fig. 3. PHB/V production of *A. eutrophus* by fed-batch culture with control of glucose and propionic acid feeding.

- (a) Time courses of fermentation
- , DCW; ■, PHB; ▼, Glucose; ▲, PHV
- (b) Profile of feeding rate of glucose and glucose+PA solution
- (c) Changes of PHV, PA concentration and PA uptake rate
- , PHV; ■, PA; ▲, PA uptake rate

- S : 탄소원의 농도 (g/l)
 S₀ : feeding solution의 포도당농도 (g/l)
 S_s : 포도당 조절농도 (g/l)
 Q_s : 포도당 소모속도 (g/g-X/h)
 V₀ : 초기 배지 부피 (g/l)
 V : 배지의 부피 (l)
 F : 탄소원 공급속도 (g/h)
 t : 시간 (h)
 k-1, k : 직전 및 현재의 샘플

참고문헌

- Doi, Y. 1990. Microbial polyesters. VCH Publishers, New York.
- Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. *Trends Biotechnol.* **5**: 246-250.
- Byrom, D. 1992. Production of PHB:PHV copolymers. *FEMS Microbiol. Reviews.* **103**: 247-250.
- Yano, T., T. Kobayashi, and S. Shimizu. 1978. Fed-batch culture of methanol-utilizing bacterium with DO-stat. *J. Ferment. Technol.* **56**: 416-420.
- Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly-β-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
- Kim, B.S., S.C. Lee and H.N. Chang. 1994. Production of poly(3-hydroxy butyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 882-898.
- Srienc, F., B. Arnold, and J.E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 982-987.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Rafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxy butyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.

(Received 20 May 1995)