

Alcaligenes sp. GB-77에 의한 Polyhydroxyalkanoic Acid의 생산

김근배 · 손홍주 · 이상준*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Polyhydroxyalkanoic Acid Production by *Alcaligenes* sp. GB-77

Keun-Bae Kim, Hong-Joo Son and Sang-Joon Lee*

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — For polyhydroxyalkanoic acid (PHA) production, several microorganisms were isolated from sewage sludge. One of them, GB-77 strain, was chosen from its PHB/HV copolymer production on only fructose without cosubstrate. The isolated strain GB-77 was identified as the genus *Alcaligenes*. Optimal temperature and pH for cell growth were 36°C and 6.8. Optimal medium composition was 10 g/l of fructose and 5 g/l of polypeptone, 1×10^{-2} M Na_2HPO_4 , 1.3×10^{-2} M KH_2PO_4 . To investigate the optimal condition for polyhydroxyalkanoic acid production two-stage culture technique was used; first stage for cell growth and second stage for PHA production on unbalanced growth conditions. Optimal conditions for high PHA production were C/N ratio 50, temperature 36°C and pH 6.8. To overcome fructose inhibition on cell growth, intermittent feeding fed-batch culture technique was used. Total cell concentration was 17.4 g/l with 9.1 g/l of PHA. The purified PHA was identified PHB/HV copolymer by NMR analysis.

지금까지 알려진 생분해성 플라스틱중 poly- β -hydroxybutyric acid(이하 PHB라 약칭)가 합성 플라스틱인 polyester와 polypropylene의 중간적인 물성을 지니 가장 각광을 받고 있다(1, 2). PHB는 1925년 Lemoigne이 세포로부터 처음 분리하였으며 일부 미생물이 영양 불균형 상태(질소, 인, 산소 등의 결핍)에서 생육할 때 세포내에 축적하는 에너지 저장물질의 일종으로 우수한 생분해성, 인체조직 적합성, 서방성, 압전성, 광학활성을 지닌 천연 폴리에스테르계열의 신소재로서 토양내에서 탄산가스와 물로 완전히 분해되어지는 특성을 가지고 있다(3). 그러나 PHB는 녹는점(180°C)이 너무 높아 melt processing 동안 분자량의 감소를 초래하며, 용도에 제한을 받을 만큼 부쉬지기가 쉬워서 bulk plastic으로 사용되기는 어려운 불안정 요인을 가지고 있다(4, 5). 따라서 최근 PHB 사슬에 C₅-C₁₀ 정도의 β -hydroxyacid substitute가 첨가된 다른 hydroxyalkanoate comonomer를 가지게 함으로서 물성이 크게 개량되고 용도에 제한을 받지 않는 polyhydroxyalkanoic acid(이하 PHA라 약

칭)가 개발 진행 중에 있다.

PHA중 가장 연구가 많이 진행되어 있는 것은 PHB 사슬에 valeric acid가 공중합되어 있는 PHB/HV로서, HV monomer의 비율은 배지내의 glucose에 대한 propionic acid의 비율을 변화시킴으로서 조절 가능하며(6) HV monomer의 함량이 증가함으로서 PHB/HV의 녹는점이 낮아짐과 동시에 기계적 특성이 크게 향상된다(7).

PHA는 최초 하구 침전물과 그 속의 일부 미생물에서 발견된 이후(8) 많은 연구가 이루어졌다. Ramsay 등(4)은 *Pseudomonas cepacia*를 질소원을 제한한 상태로 연속배양하여 PHB/HV 공중합체를 세포 건조중량의 30%까지 높였으며, *Pseudomonas resinovorans*의 long-side-chain PHA 합성능에 대한 질소원의 영향에 대하여 보고하였다.

또한 Haywood 등(9)은 *Bacillus* spp., *Pseudomonas oleovorans*, *Alcaligenes eutrophus* 등에서 탄소원을 변화시켰을 때 축적되는 PHA의 양상을 관찰한 바 있다.

한편 국내의 연구동향을 살펴보면 윤성철 등(10)은 *Alcaligenes eutrophus* H16을 이용하여 saccharide, monocarboxylic acid, dicarboxylic acid로부터 PHA가

Key words: *Alcaligenes* sp., polyhydroxyalkanoic acid (PHA), PHB/HV

*Corresponding author

합성됨을 확인하였고, 이용현 등(11)은 자연계로부터 분리한 *Methylobacterium* sp.를 이용하여 메탄올로부터 PHB/HV를 합성하여 대량배양에 관한 기초연구를 수행중에 있다고 한다.

일반적으로 PHB/HV copolymer 합성은 1차 탄소원 외에 HV monomer의 전구체로 작용하는 2차 기질을 첨가하여 배양시 관련된 효소가 정확한 특이성을 갖지 못할 때 무작위하게 monomer 들이 중합되면서 일어나는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 본 연구에서는 자연계로부터 단일기질에 의하여 PHA를 생산하는 각각 다른 속의 세 균주를 분리하여 그 중 한 균주의 생리학적 특징 및 분류학적 위치를 밝히고, PHA 합성을 위한 최적 배양조건을 검토하였으며 생산된 PHA의 조성분석을 실시하였다.

재료 및 방법

PHA 생산균의 분리 및 동정

PHA 생산균의 분리를 위하여 수영 하수처리장의 활성오니를 시료로 사용하였다. 영양한천 평판배지에 희석된 시료를 배양하여 각각 형태가 다른 콜로니들을 분리하여 각각의 콜로니들을 영양 액체배지에서 30°C, 48시간 배양하여 다시 영양한천 평판배지에서 순수분리하였다. 순수분리된 콜로니들은 YM 배지에서 1차 배양시킨 후 원심분리하여 nutrient-free 배지에서 2차 배양하였고, 2차 배양 후 균체를 원심분리하여 건조시켜 가스 크로마토그래피법으로 PHA의 합성여부를 확인하였다(15). PHA의 합성여부를 확인하기 위하여 사용한 nutrient-free 배지의 조성은 10 g/l glucose, 6.7 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/l KH_2PO_4 , 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, 미량원소 1 ml/l(H_3BO_3 300 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, Na_2MoO_4 30 mg, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg per liter)이었다. 분리균의 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 Cowan과 Steel의 방법(12), Macfaddin의 방법(13)에 준하여 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I(14)에 따라 속까지 동정하였다.

균체 생육 최적조건의 조사

분리균의 최적 생육조건을 조사하기 위하여, PHA 합성여부를 확인하기 위하여 사용하였던 nutrient-free 배지에 질소원으로 NH_4Cl 를 0.3% 첨가한 것을 기본배지로 하여 200 rpm으로 24시간동안 회전진탕 배양하면서 각종 탄소원, 질소원, 무기염 농도와 pH

및 배양온도에 대한 생육도를 측정하였다. 생육도의 측정은 흡광광도계(Shimadzu UV-120-2)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도나 건조균체량으로 측정하여 조사하였다.

PHA 생산 최적조건의 조사

PHA 생산 최적조건을 조사하기 위하여 2단계 배양법을 이용하였다. 생육 최적조건에서 20시간 1차 배양하여 원심분리한 균체를 멸균 증류수로 세척한 후 각종 영양원 결핍, C/N 비, pH 및 배양온도에 따른 2차 배양을 실시하고 최종적으로 얻어진 균체를 회수하여 균체내에 축적된 PHA를 정량하였다.

발효조 배양

과당 10 g/l, polypeptone 3 g/l이 함유된 멸균배지 3l를 5l 용량의 발효조(B. Braun, Biostat[®] E)를 이용하여 배양온도 36°C, pH 6.8, 교반속도 300 rpm, 산소공급량 1 vvm으로 배양하면서 건조균체량은 막여과법으로, 배양액 중의 탄소원 농도는 DNS 법으로 측정하였고, PHA 정량분석은 GC로 실시하였다. 또한 탄소원의 균체생육 및 PHA 축적 억제효과를 방지하기 위하여 간헐적으로 과당을 첨가하면서 유가배양하였다. 즉 균체생육을 최대로 하기 위하여 배양 후 18시간 및 30시간대에 C/N 비 15의 배지를 첨가하였고, 배양 후 43시간대에 C/N 비 50의 배지를 첨가하여 PHA 합성을 유도하였다.

PHA 분석

배양액 20 ml를 원심분리한 후 증류수와 아세톤으로 세척 및 건조하였다. 얻어진 균체를 2 ml의 클로로포름과 2 ml의 메탄올(3% 황산 함유)이 들어 있는 screw cap tube에 넣어 110°C에서 3시간 30분 반응시킨 후 상온으로 냉각시킨 다음, 1 ml의 증류수를 첨가하여 수분간 강하게 진탕하였다. 두층으로 분리될 때까지 방치하였다가 PHA가 methylester화 되어 있는 유기용매층을 GC로 정량하였다(15). 이때 사용한 GC는 HP-5890A이었으며, column은 Carbowax 20M-TPA 유리(6 feet)를 사용하였고, carrier gas는 N_2 , oven 온도는 160°C, flow rate는 60 ml/min, 시료의 주입량은 2 μl 였으며, 불꽃이온화검출기(FID)를 사용하였다. 표준 PHA는 Aldrich사 제품을 사용하였다.

PHA의 정제 및 구조확인

균체를 아세톤으로 건조시킨 후 유발에 갈아 뜨거운 클로로포름(60°C)에서 진탕, 정지하는 과정을 수회 반복하여 PHA를 추출시켰다. 추출액을 여과지(What-

man No.1)에서 여과한 후 여액에 차가운 메탄올(4°C)을 동량(v/v) 첨가하여 PHA를 침전시키고 다시 아세톤과 에테르로 세척하였다. 이 과정을 수회 반복하여 PHA를 정제하고, GC로 확인한 뒤, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 이용하여 PHA의 구조를 확인하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

PHB 생산이 확인된 50여 균주를 분리하였으며, PHB 이외에 단일기질에서 HB/HV를 생산하는 세 균주를 발견하였고 그 중에서 GB-77로 명명한 균주를 공시균으로 선정하였다. 이 균주가 생산한 PHA의 확인은 Fig. 1에서 보는 바와 같으며 그 분류학적 위치를 검토한 결과, Gram 음성의 간균으로서 포자를 형성치 않고 운동성을 가지고 있었으며, 또한 OF test, indole 생산능, 질산염 환원능, 색소 생성능은 음성 반응을 나타내었고, catalase 생산능, cytochrome oxidase 생산능, urease 생산능, gelatin 액화시험에서는 양성반응을 나타내었다(Table 1). 이상의 실험결과를



Fig. 1. Electron microscope of ultrathin section of *Alcaligenes* sp. GB-77 containing polyhydroxyalkanoic acid (PHA) granules.

(←); PHA granules

검토한 결과 본 공시균은 *Alcaligenes* 속으로 동정되었다.

균체 생육 최적조건

Alcaligenes sp.의 PHA 생산량을 증가시키기 위해서는 일차적으로 균체가 대량으로 증식해야 하므로 이에 대한 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 균체 생육에 최적인 배양온도는 36°C 였으며, 30°C 미만과 40°C 이상에서는 생육이 크게 감소하는 경향을

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain GB-77

Examination	Characteristics of GB-77
<i>Morphological characteristics</i>	
Cell shape	Rods
Cell size	1.5~2×0.4 μm
Motility	Motile
Spore formation	Negative*
Gram staining	Negative
<i>Cultural characteristics</i>	
Colony shape	Convex, round
Colony color	Milky, white
Colony surface	Smooth
Gelatin liquefaction	Positive**
<i>Biochemical characteristics</i>	
Catalase production	Positive
Cytochrome oxidase production	Positive
Utilization on KCN	Positive
Utilization on MacConky agar	Negative
H ₂ S production	Negative
Indole production	Negative
Lysine decarboxylase production	Positive
Arginine dehydrolase production	Positive
Ornithine decarboxylase production	Positive
Methyl red reaction	Negative
Voges-Proskauer reaction	Negative
Nitrate reduction to nitrite	Positive
Nitrite reduction to N ₂	Negative
Starch hydrolysis	Negative
Urease production	Positive
Oxidation Fermentation test	O(inert)/ Negative

*Negative; non-production, **Positive; production.

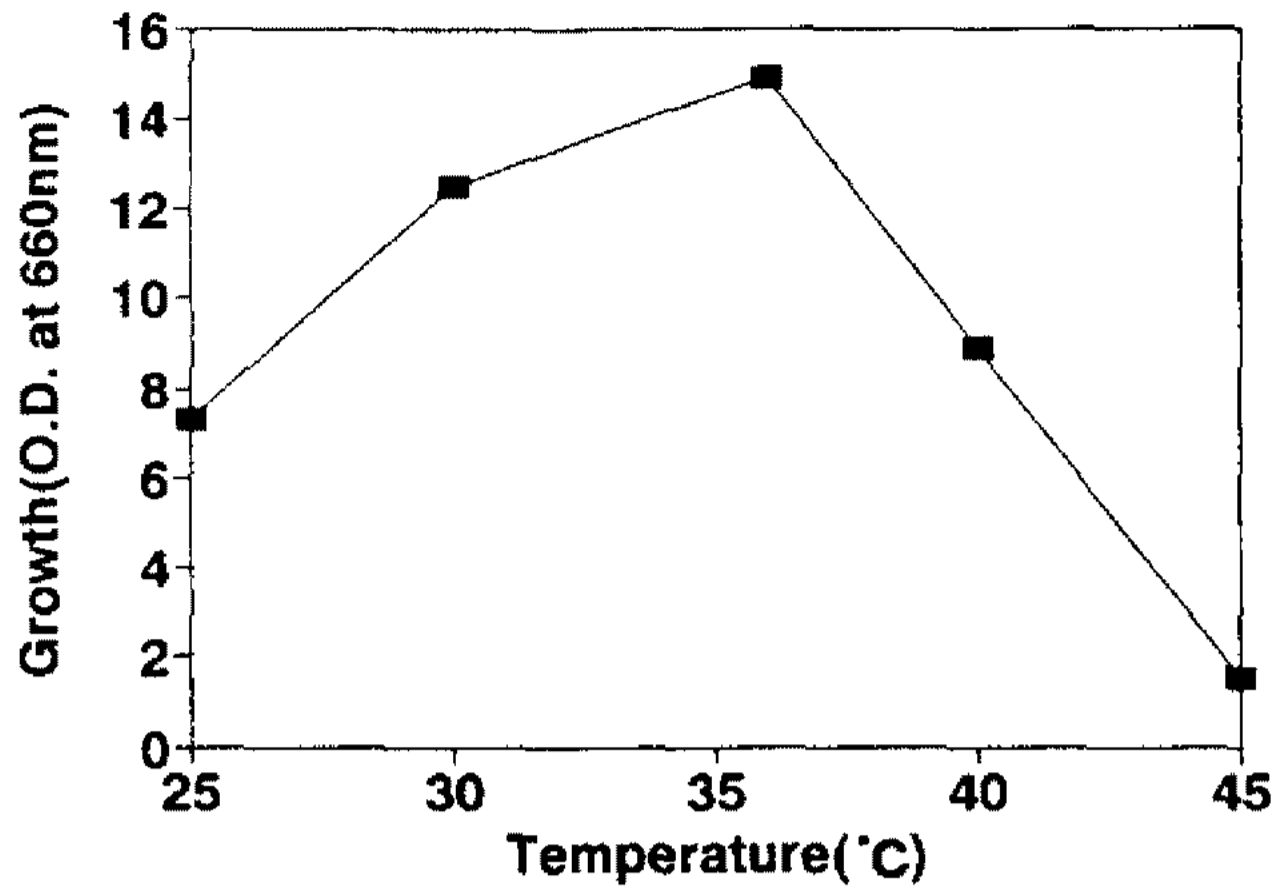


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77.

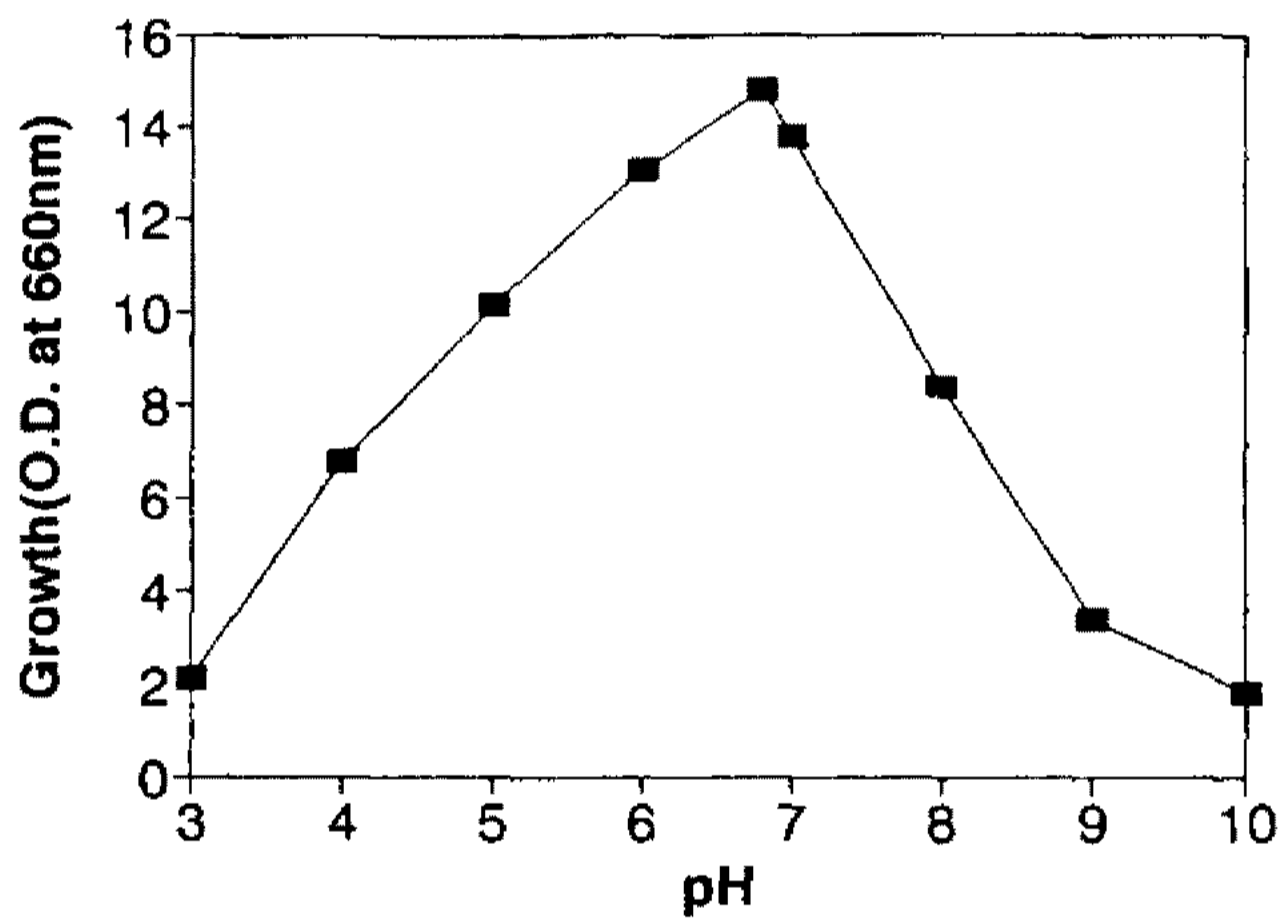


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77.

보였다(Fig. 2). 균체 생육 최적 pH는 6.8 정도로 약 산성이며 혐기성보다는 산성쪽에서 생육이 더 양호한 것으로 나타났다(Fig. 3). 탄소원의 종류에 따른 균체 생육을 조사하기 위하여 단당류, 이당류, 당-알콜, 유기산 등을 각각 1% 씩 첨가하여 24시간 배양한 결과 단당류, 당-알콜에서는 대부분 좋은 생육을 보였으며 그 중에서도 과당이 가장 좋은 생육을 보였고(Table 2), 과당의 최적농도는 1%로서 그 이상의 농도에서는 생육이 감소하였다(Fig. 4). 최적 질소원을 선정하기 위하여 각종 질소원을 각각 0.3% 씩 첨가하여 배양한 결과 무기질소원 및 유기질소원에서는 생육이 상대적으로 낮았으며, 복합질소원 중 polypeptone이 가장 우수한 생육을 나타내었고(Table 3) 최적농도는 0.5% 였다(Fig. 5). 또한 무기염의 경우 Na_2HPO_4 와 KH_2PO_4 는 농도변화에 따라 생육의 차이를 보였으나 다른 무기염의 경우 큰 차이는 나타내지 않았다. 생육에 필요한 각 무기염의 최적농도는 Na_2HPO_4 1×10^{-2} M, KH_2PO_4 1.3×10^{-2} M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8×10^{-2}

Table 2. Effect of carbon sources on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77

Carbon sources (1%)	Dry cell weight (g/l)	Accumulated PHA (g/l)	HV (g/l)
Glucose	4.0	0.31	0.04
Fructose	4.3	0.43	0.12
Maltose	1.2	0.06	0.05
Lactose	1.1	0.01	0.009
Sucrose	1.1	0.01	0.001
Mannitol	3.5	0.28	0.03
Sorbitol	3.8	0.26	0.03
Glycerol	2.6	0.06	0.02
Propanol	0.7	0.02	0.01
Methanol	—	—	—
Butanol	0.7	0.02	0.01
Ethanol	—	—	—

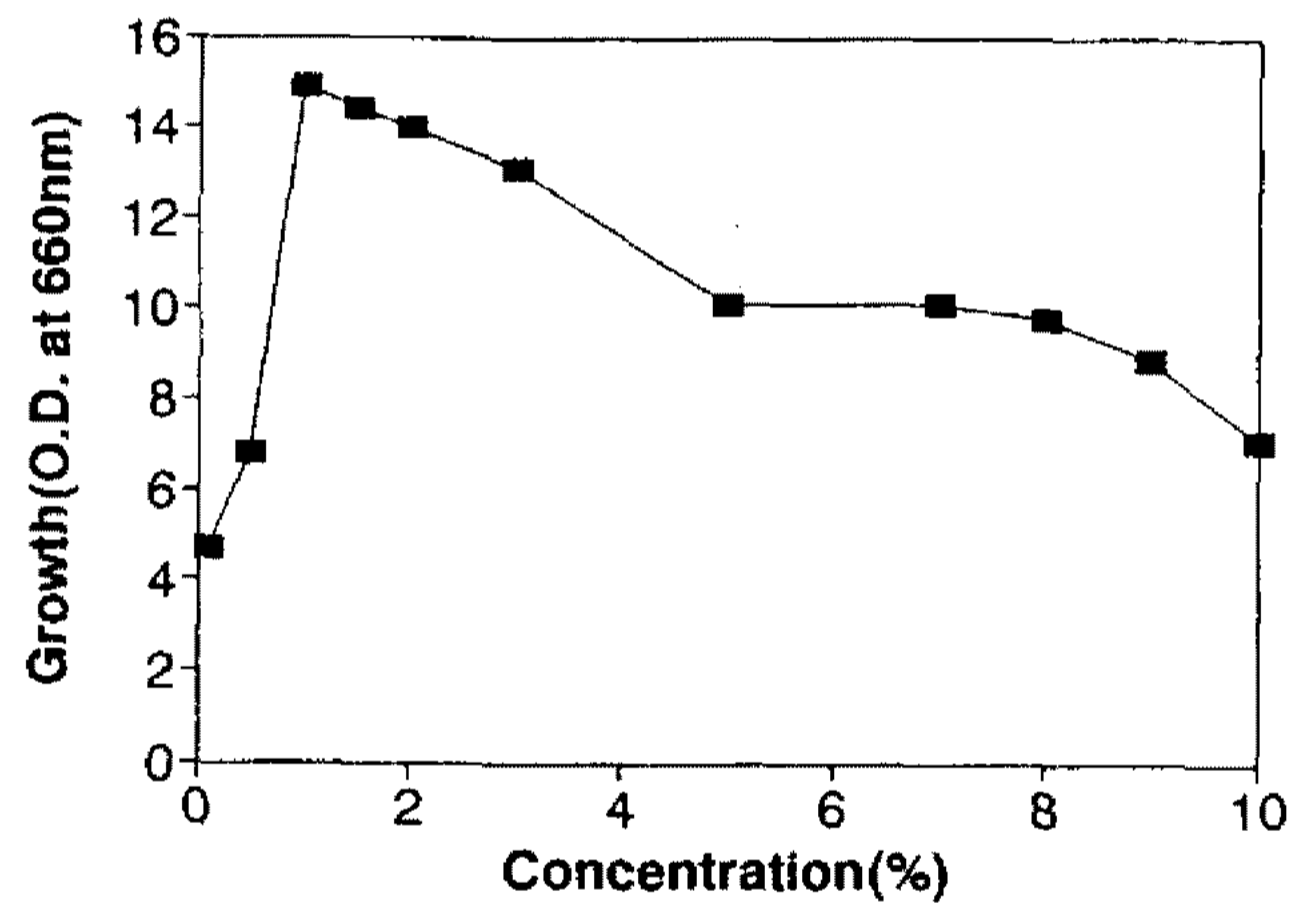


Fig. 4. Effect of fructose concentration on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77

Carbon sources (0.3%)	Dry cell weight (g/l)	Accumulated PHA (g/l)	HV (g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.8	0.14	0.05
NH_4Cl	1.7	0.2	0.12
NH_4OH	1.5	0.12	0.1
Urea	0.4	0.04	0.01
Glutamate	3.4	0.1	0.02
Yeast extrac	4.4	0.34	0.12
Polypeptone	4.8	0.49	0.15
C.S.L	0.9	0.03	0.01

Cells were cultivated in mineral salts medium containing 1% fructose as a carbon sources at 36°C and pH 6.8.

M, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-4} M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-4} M이었다.

PHA 축적 최적조건

각종 영양원의 결핍이 PHA 축적에 미치는 영향을 조사한 결과 Mg^{2+} , SO_4^{2-} 및 PO_4 가 결핍되었을 때도 대조구에 비해 PHA 축적률이 다소 증가하였으나 NH_4^+ 이 결핍된 경우가 건조균체량에 대한 PHA 축적율이 32.6%로 가장 높았다(Table 4). 배양한 균체를 C/N 비가 3부터 120까지인 2차 배지에서 각각 24시간 배양하여 PHA 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 C/N 비가 15 이하에서는 생육이 우세하였고,

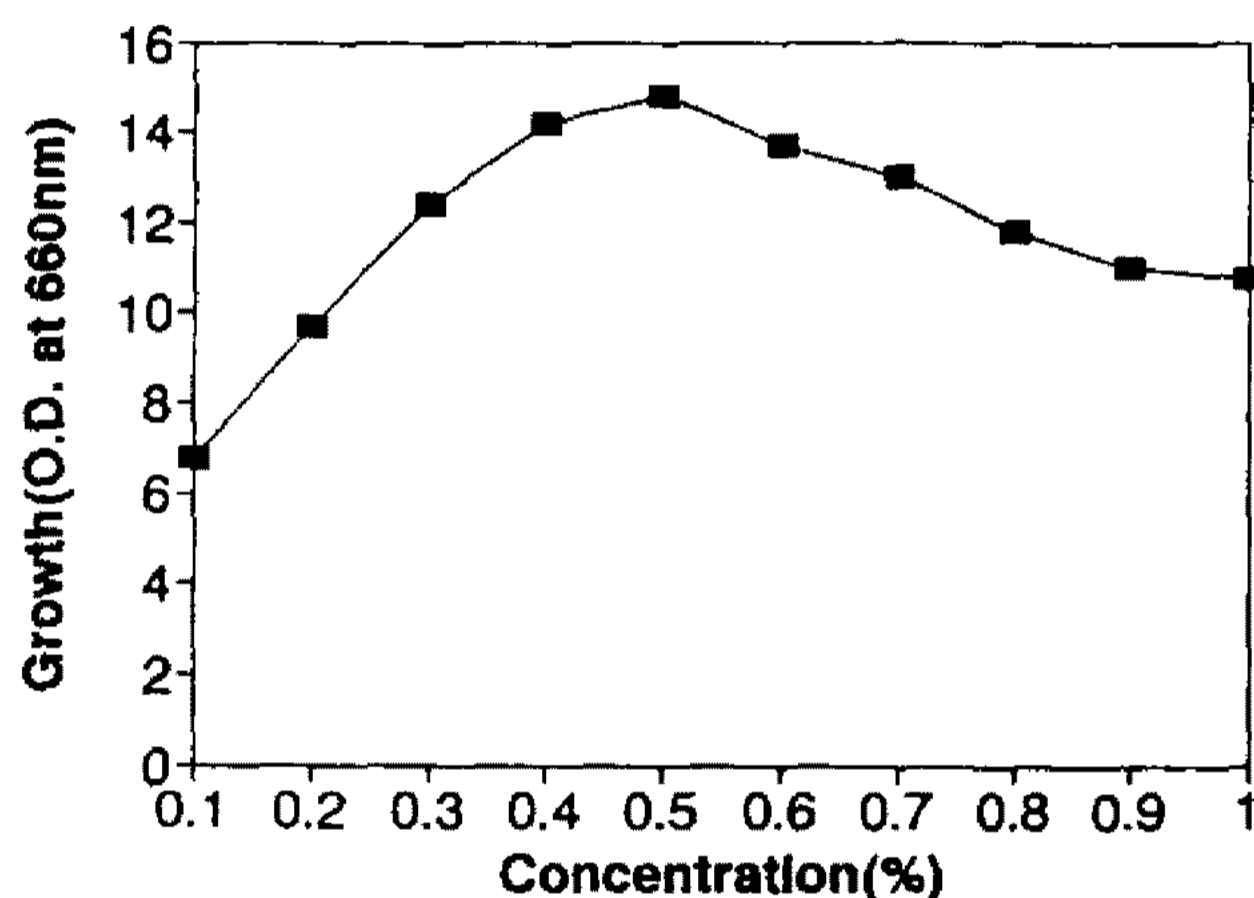


Fig. 5. Effect of polypeptone concentration on the growth of *Alcaligenes* sp. GB-77.

Cells were cultivated in mineral salts medium containing 1% fructose as a carbon sources at 36°C and pH 6.8.

50 이상에서는 PHA의 축적에 유리한 조건임을 알 수 있었다(Fig. 6). 특히 PHA 함량은 C/N비 50에서 HV 함량과 함께 증가되었는데 이 시점이 증식과 PHA 합성의 분기점일 것으로 생각된다. 앞의 결과에서 균체 생육과 PHA 합성능 모두 polypeptone에서 가장 양호한 것으로 나타났으나 무기질소원인 NH_4Cl 의 경우 PHA 합성능이 다소 높았다(Table 3). 따라서 polypeptone과 NH_4Cl 을 각각 다른 비율로 혼합하여 배지에 첨가하고 24시간 배양한 후 2차적으로 1%의 과당을 무균적으로 첨가하여 균체생육단계와 PHA 축적단계에서의 균체생육과 PHA 축적을 조사한 결과, 생육단계에서 0.5%까지 polypeptone의 농도 증가는 생육에 영향을 미치나 NH_4Cl 의 농도 증가는 큰 영

Table 4. Effect of deficient nutrients on cell mass and PHA production of *Alcaligenes* sp. GB-77

Deficient nutrients	Dry cell weight* (g/l)	Accumulated PHA (g/l)	HV (g/l)	PHA content** (%)
Ca^{2+}	3.98	0.62	0.11	15.6
Na^{2+}	3.92	0.64	0.09	16.3
PO_4	3.85	0.82	0.18	21.2
NH_4^+	3.75	1.21	0.31	32.6
Mg^{2+}	3.95	0.87	0.17	23.0
SO_4^{2-}	2.84	0.61	0.09	25.2
Control	4.05	0.65	0.12	16.0

*Initial concentration of resuspended cells was adjust to 2 g/l and the culture were carried out for 24 hours.

**Indicated as the percent per dry cell weight.

Table 5. Effect of polypeptone concentration to NH_4Cl concentration on PHA production of *Alcaligenes* sp. GB-77

Nitrogen source		Growth stage			PHA production stage		
Polypeptone (%)	NH_4Cl	D.C.W* (g/l)	PHA** (g/l)	HV (g/l)	D.C.W* (g/l)	PHA** (g/l)	HV (g/l)
0.1	0.3	1.172	0.137	0.025	1.219	0.215	0.025
0.2	0.2	1.794	0.18	0.031	1.98	0.232	0.028
0.3	0.1	3.685	0.238	0.028	3.72	0.292	0.031
0.4	0.2	3.714	0.255	0.022	3.97	0.318	0.048
0.5	0.1	4.5	0.57	0.078	4.618	0.69	0.095
0.6	0.1	3.702	0.031	0.02	4.313	0.153	0.023
0.7	0.1	3.653	0.032	0.01	4.512	0.139	0.022
0.8	0.1	1.912	0.002	0.005	3.511	0.131	0.023
0.4	0	3.785	0.257	0.041	3.929	0.321	0.021
0	0.4	0.34	0.131	0.03	0.5	0.212	0.07

*Dry cell weight. **Accumulated PHA(g/l).

After cells were cultivated in mineral salts medium containing NH_4Cl and polypeptone for 24 hours, 1% of fructose was added aseptically. Then cultivation was carried out for 24 hours.

향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 5). 그리고 2차적으로 과당을 첨가한 PHA 합성단계에서는 NH₄Cl의 첨가가 균체생육과 PHA 축적의 향상에 큰 영향을 미치지 못하였다. pH와 배양온도에 따른 PHA 합성능을 검토한 결과 생육범위와 마찬가지로 36°C, pH 6.8±0.2에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

발효조 배양

상기의 조건을 바탕으로 발효조에서 회분배양을 실시한 결과는 Fig. 7과 같이 균체 접종 후 10시간부터 대수증식기에 돌입하였으며, 20시간 이후는 균의 증식이 둔화되었고, 과당의 농도는 균증식에 따라 감

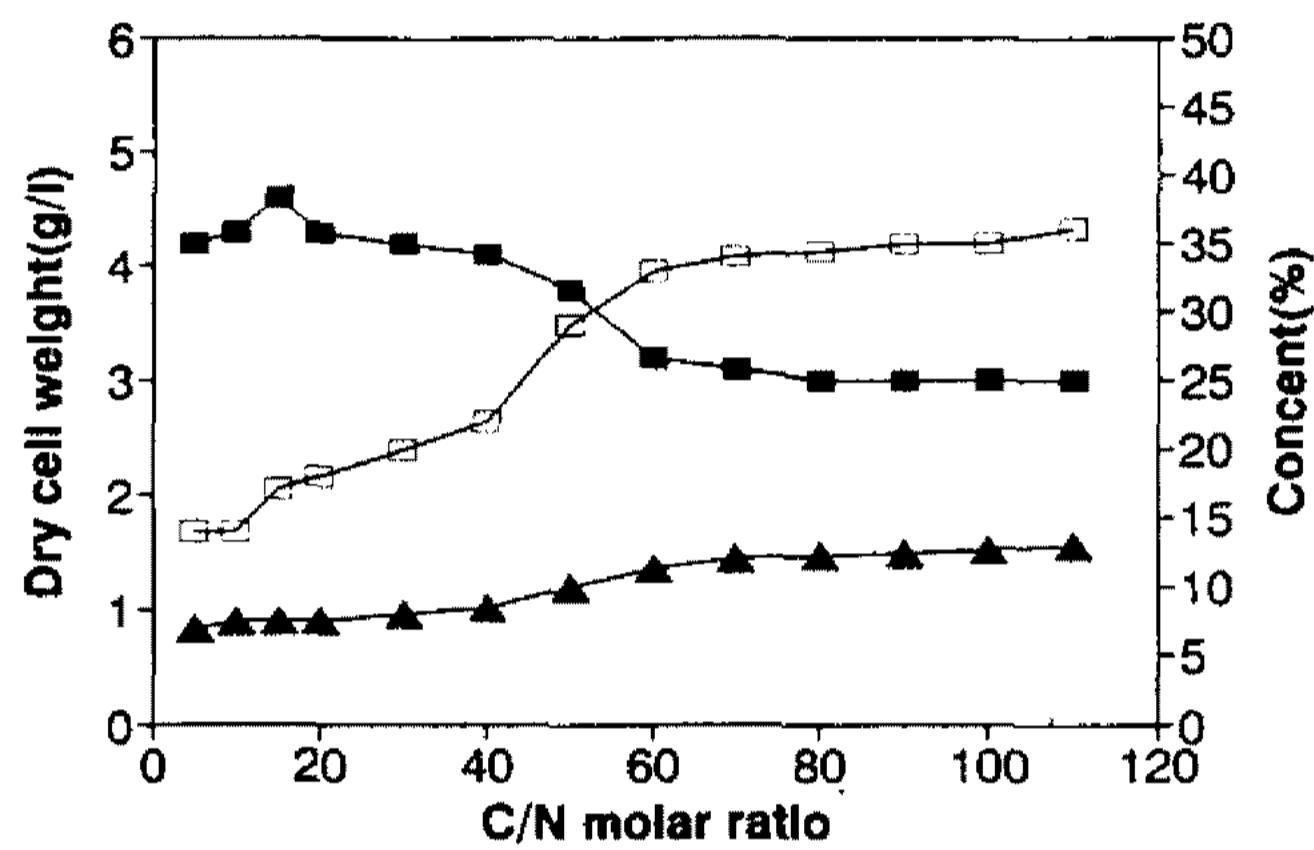


Fig. 6. Effect of C/N molar ratio on the cell growth and polyhydroxyalkanoic acid (PHA) production of *Alcaligenes* sp. GB-77 at the second stage.
The cell concentration of 2.5 g/l grown in optimal condition at the first stage was subjected to PHA accumulation.
(■): Dry cell weight, (□): PHA, (▲): HV

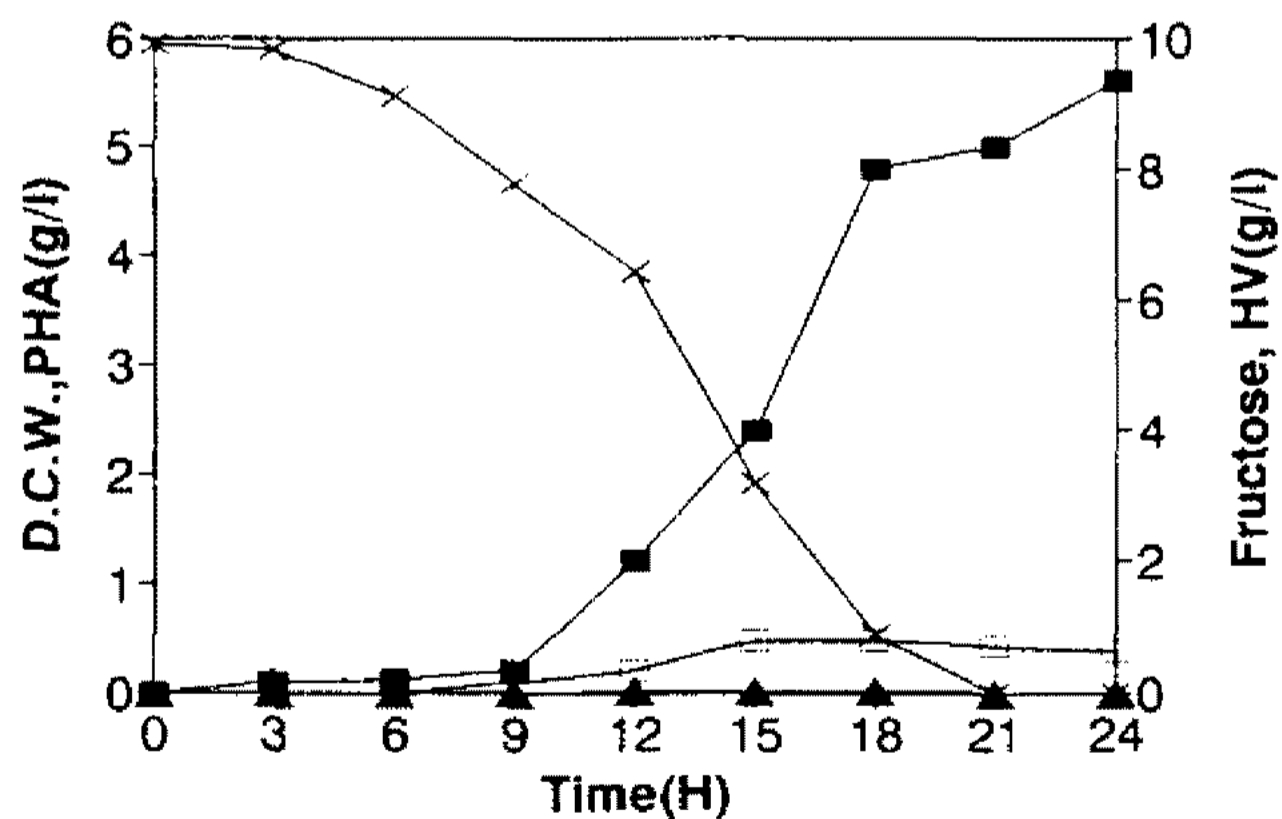


Fig. 7. Time course of *Alcaligenes* sp. GB-77 in batch culture.
The culture was carried out in 5 l jar fermentor at pH 6.8, 36°C, 1 vvm and 300 rpm; fructose 1.0% and polypeptone 0.5%.
(■): Dry cell weight, (□): PHA, (▲): HV, (×): Fructose

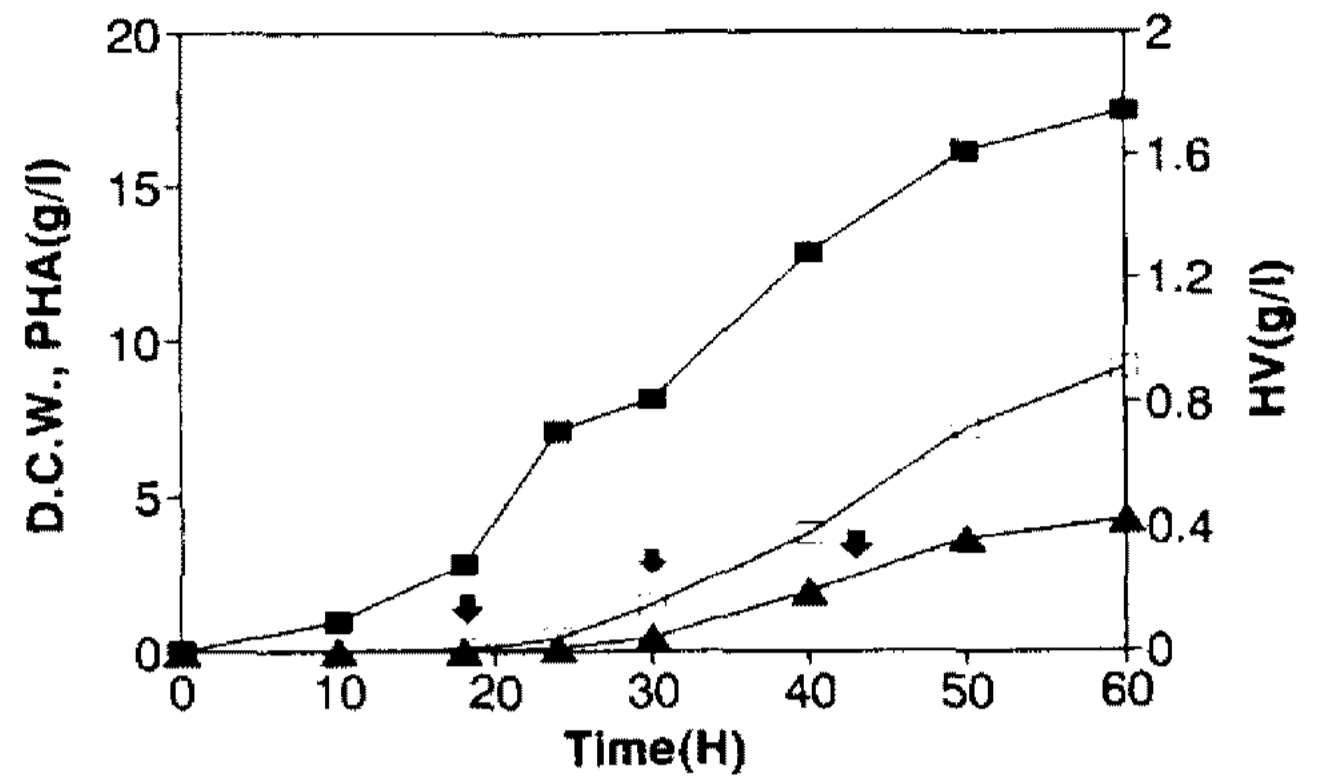


Fig. 8. Changes of cell growth and amount of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) during intermittent feeding fed-batch culture.
The culture was carried out in 5 l jar fermentor changes C/N molar ratio from 15 to 50 at pH 6.8, 36°C and 300 rpm.
(■): Dry cell weight, (□): PHA, (▲): HV, (↓): feeding point

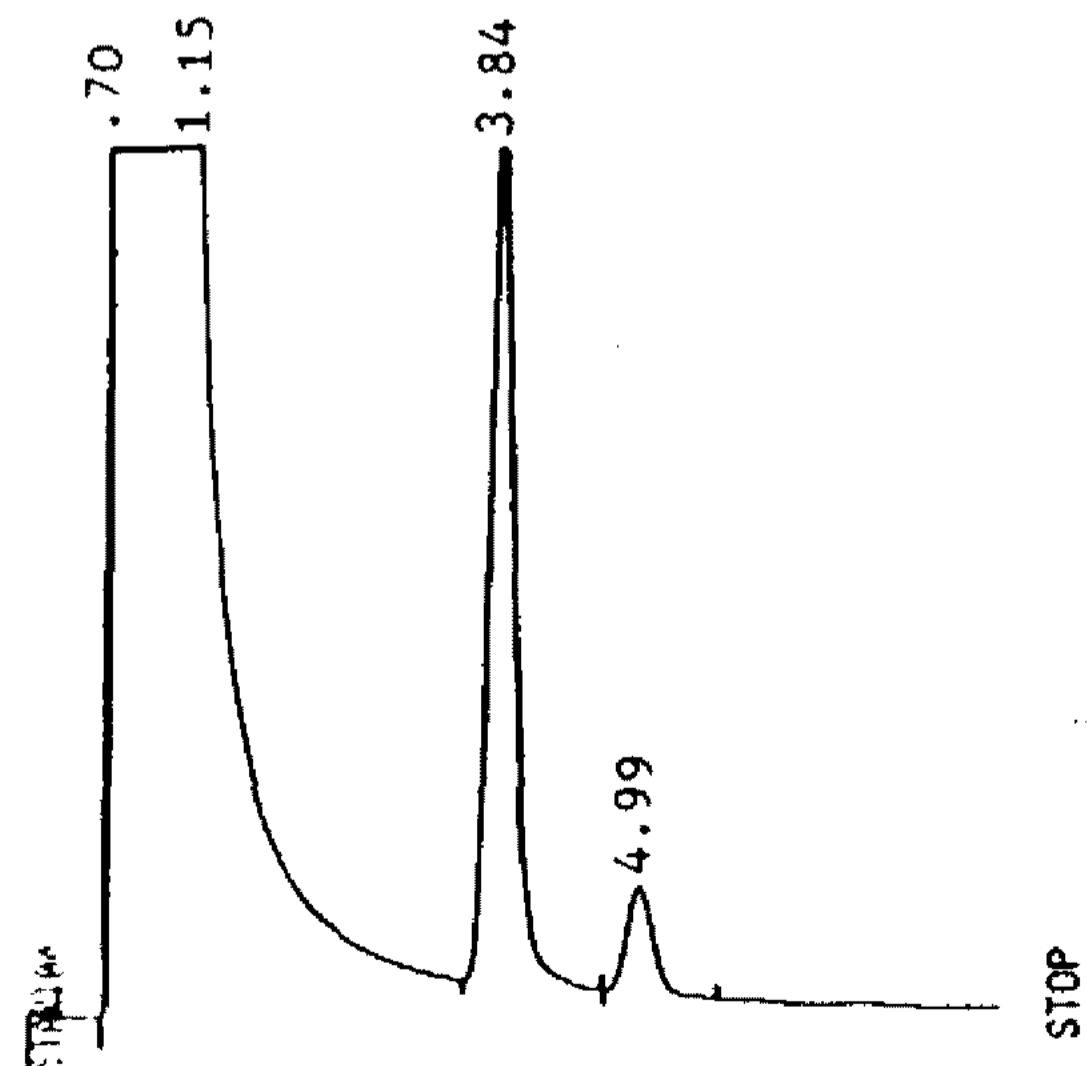
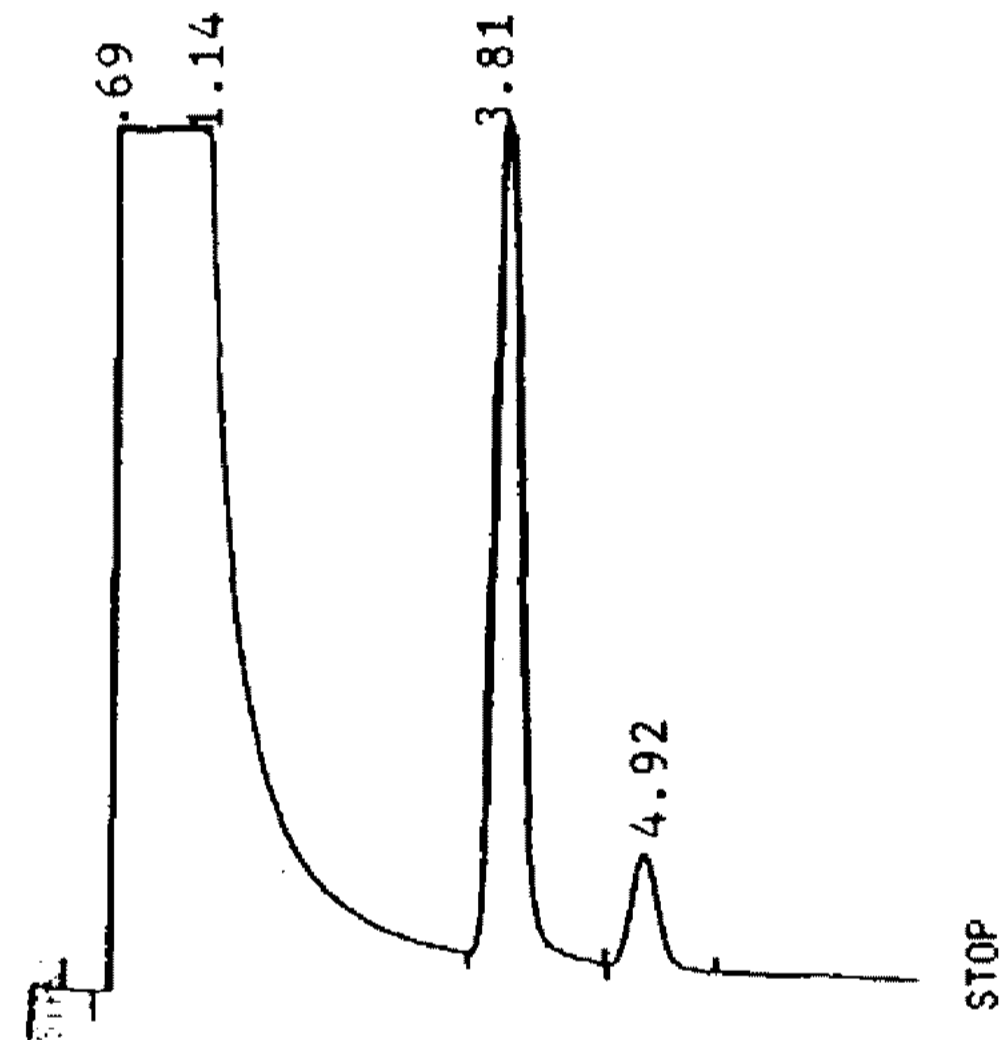


Fig. 9. Gas chromatogram of PHB/HV standard (a) and PHA (b) produced by *Alcaligenes* sp. GB-77.

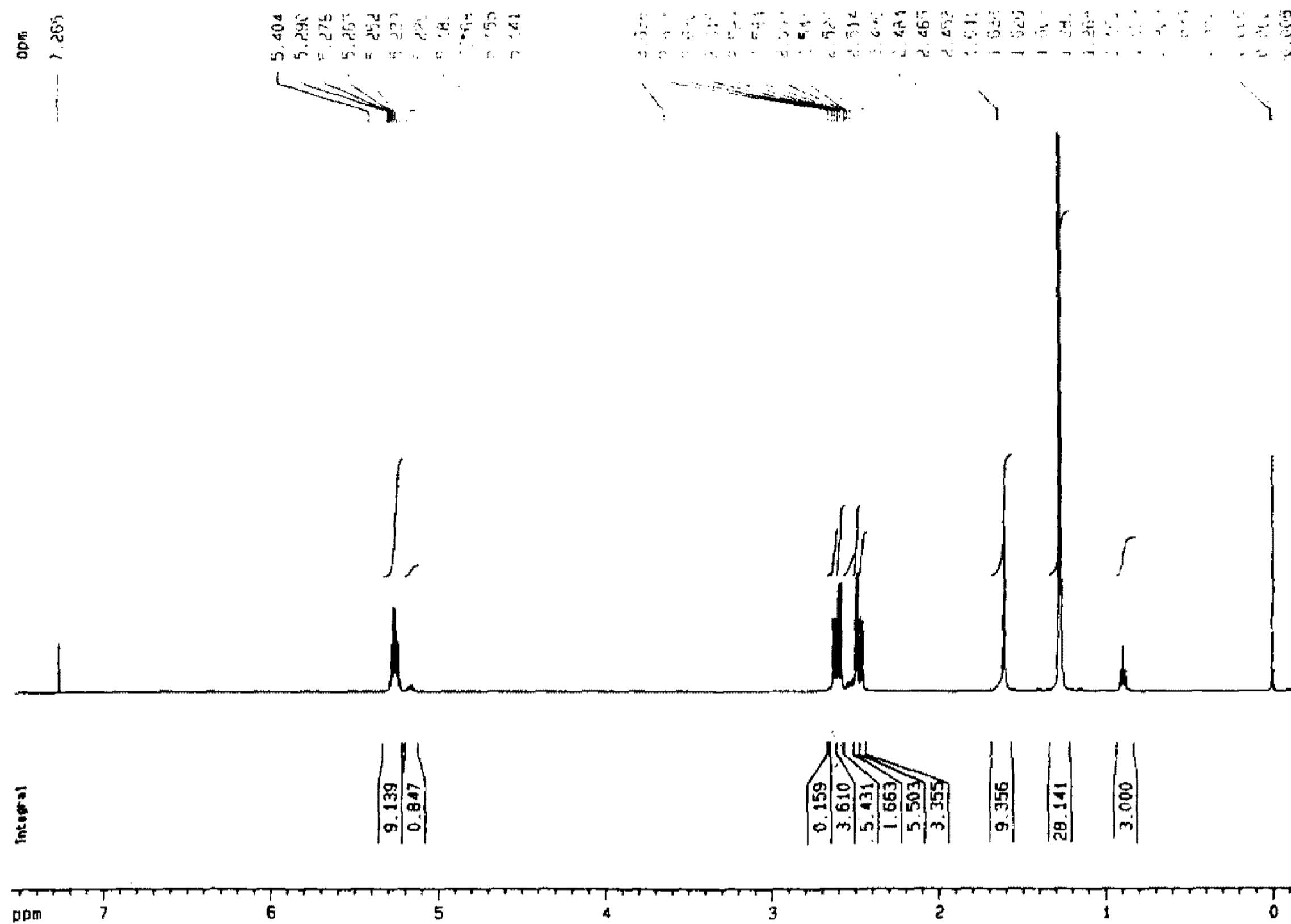


Fig. 10. 500 MHz ¹H-NMR spectrum of PHA produced by *Alcaligenes* sp. GB-77.

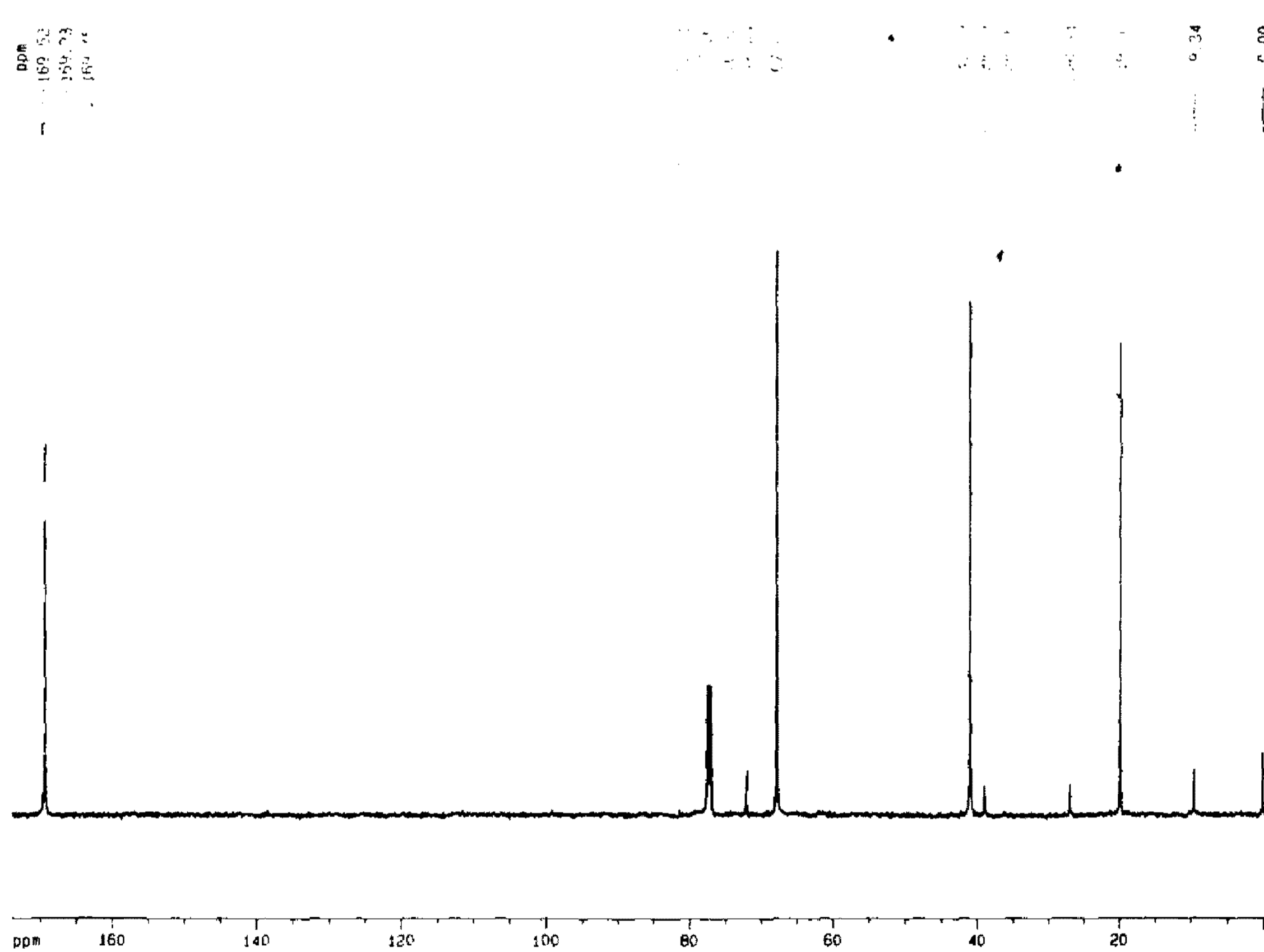


Fig. 11. 125 MHz ¹³C-NMR spectrum of PHA produced by *Alcaligenes* sp. GB-77.

소하여 17시간 이후부터는 거의 고갈되었으며 PHA 함량은 증가하는 양상을 보였다. 24시간 배양 후의 건조균체량은 5.6 g/l였고, PHA 함량은 0.5 g/l, HV 함량은 0.016 g/l였다. 과당만을 간헐적으로 첨가하면서 유가배양을 실시한 결과는 Fig. 8과 같이 60시간 만에 건조균체량은 17.4 g/l였으며, PHA는 9.1 g/l였다.

PHA 구조확인

본 분리균에서 합성된 PHA구조는 GC와 NMR을 이용하여 검토되었다. GC chromatogram에 나타난 본 분리균이 합성한 PHA 피크의 retention time은 표준 3HB/HV와 거의 일치함을 알 수 있었으므로, 추출된 PHA가 이와 유사한 구조를 가질 것으로 추정되었다(Fig. 9). 500 MHz ^1H -NMR에 의한 PHA 구조분석 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 1.28 ppm에서 hydroxybutyrate(HB)의 methyl proton의 공명피크가 나타났고, 5.26~5.29 ppm 범위에서 HB의 비대칭 탄소에 연결된 methine proton이 6개의 피크 모임(sextet)으로 나타났으며 그리고 2.33~2.65 ppm에서는 2개의 전자기적으로 inequivalent 한 수소에 의해 생기는 8개의 peak로 구성된 다중 peak(multiplete)가 나타났다. 그리고 hydroxyvalerate(HV)의 methyl proton(HV5)이 0.89 ppm에, methylene proton(HV4)은 1.63 ppm에 나타났으며 HV2의 methylene proton과 HV3의 methine proton은 HB2,3과 중첩되어 각기 5.26, 1.28 ppm에서 나타났었다(Fig. 10). 그러므로 spectrum에 나타난 PHA중 HV는 10%에 이르는 것으로 사료된다. 125 MHz ^{13}C -NMR에 의한 PHA 구조분석 결과 HB의 methyl carbon(B4)은 19.7 ppm에서, HV의 methyl carbon은 9.34 ppm에서 나타났고, HV의 methylene carbon은 26.8 ppm, carbonyl carbon(B1, V1)은 169.3 ppm에서, B3, V3의 methine carbon은 각기 67.2, 71.8 ppm에서 나타났으며 마지막으로 B3와 V3 methylene carbon은 40.79와 38.6 ppm에서 나타났었다(Fig. 11). 따라서 본 분리균에 의하여 분리, 정제된 PHA는 3HB와 3HV의 copolymer임을 확인할 수 있었다.

요 약

Polyhydroxyalkanoic acid(PHA)를 생산하는 세균들을 하수처리장의 활성오니로부터 농화배양에 의하여 분리하였다. 이들 중 단일기질로부터 PHA를 생산하는 균주의 생리학적 성질을 검토한 결과 *Alcaligenes* 속으로 동정되었다. 균체 생육에 최적인 배양온도, pH는 각각 36°C, pH 6.8로 나타났으며, 탄소원으로

과당 10 g/l, 질소원으로 polypeptone 5 g/l, Na_2HPO_4 1×10^{-2} M, KH_2PO_4 1.3×10^{-2} M이었다. PHA 합성을 위한 최적조건을 조사하기 위하여 2단계 배양법을 이용한 결과, 배양온도 36°C, pH 6.8, C/N 비 50이 PHA 합성에 최적인 것으로 나타났다. 탄소원을 간헐적으로 첨가하는 유가배양에 의하여 배양 60시간 만에 건조균체량 17.4 g/l, PHA 9.1 g/l를 얻을 수 있었다. 추출, 정제된 PHA는 NMR에 의하여 분석한 결과 PHB/HV copolymer임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Lafferty R.M. and B. Korsatko. 1988. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. *Biotechnol.* **6b**: 136-176.
- Suzuki T., T. Yamane, and S. Shimidzu. 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
- Tombolin R. and M.P. Nuti. 1989. Poly (β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiology Letters* **60**: 299-304.
- Ramsay B.A., J.A. Ramsay, and D.G. Cooper. 1989. Production of poly- β -hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, **3**: 584-589.
- Alistair J. Anderson, and E. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **54**(4): 450-472.
- Byrom D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* **5**: 246-250.
- Doi Y., M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1986. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ^{13}C -labeled acetate and propionate. *Macromolecules* **20**: 2988-2991.
- Wallen L.L. and R.K. RohWedder. 1974. Pol- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* **8**(6): 576-579.
- Haywood G.W., A.J. Anderson, and E.A. Dawes. 1989. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotech. Lett.* **11** (7): 471-476.
- Song J.J., Y.C. Shin, and S.C. Yoon. 1993. P(3HB) accumulation in *Alcaligenes eutrophus* H16 (ATCC 17699) under nutrient-rich condition and its induced production from saccharide and their derivatives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2): 115-122.
- 이호재, 박진서, 이용현. 1991. *Methylobacterium* sp. GL-10이 생산하는 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerate의 copolymer. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*

- 19(1): 91-99.**
12. Cowan J. and M. Steel. 1987. Manual for the identification of medical bacteria Second edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
 13. Jean F. Macfaddin. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria Second Edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
 14. Noel R. Krieg, and J.H. Holt. 1984. Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. The Williams and Wilkins Co. U.S.A.
 15. Braunegg G., B. Sonneleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of polyhydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol.* **6:** 29-37.

(Received 25 October 1994)