

유기산 및 포도당 혼합배지에서 *Azotobacter vinelandii* UWD의 성장 및 생분해성 고분자 생산에 대한 질소원의 영향

†박 장 호

경희대학교 화학공학과, 환경연구소
(접수 : 1998. 8. 6., 게재승인 : 1998. 9. 15.)

Effect of Nitrogen Source on the Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD and Production of Biodegradable Plastics in the Mixture of Organic Acids and Glucose

Chang-Ho Park†

Department of Chemical Engineering and Institute of Environmental Science, Kyung Hee University, Yongin-Si, 449-701, Korea
(Received : 1998. 8. 6., Accepted : 1998. 9. 15.)

Ammonium limitation did not promote poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production of *Azotobacter vinelandii* UWD. In acid phase, ammonium limitation during utilization of propionic acid and butyric acid led to 35% decrease in product yield. In glucose phase, both biomass yield and polymer yield decreased about 22% under ammonium limitation. However, in nitrogen-fixing culture glucose was consumed 25% faster and the final PHBV wt% decreased slightly. Under nitrogen limitation a portion of the carbon sources was used for nitrogen fixation rather than biomass and polymer formation, resulting in a decrease in biomass yield and polymer yield

Key Words: ammonium limitation, nitrogen fixation, *Azotobacter vinelandii* UWD, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

서 론

사용후 폐기되는 플라스틱으로 인한 환경오염을 방지하는 대체물질로서 polyhydroxyalkanoates (PHA)가 유용할 것이라는 판단하에 미생물에 의한 PHA 생산이 꾸준히 연구되어 왔고 탄소원으로는 포도당 등이 주로 사용되고 균주로는 *Alcaligenes eutrophus* 등이 주로 연구되었다(1). 본연구는 폐지분뇨내의 유기물을 처리함과 동시에 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)를 생산하는 기술에 관한 연구의 일환이다(2). PHA의 일종인 PHBV를 생산하는 대부분의 미생물은 영양소 제한을 필요로 하며 그중 질소를 제한하는 방법이 가장 흔히 사용되었다(3). 그러나 폐지분뇨는 질소, 인 등의 각종 영양소가 많이 들어있어서 영양소 제한으로 PHBV를 생산하는 방법은 적합하지 않다. *Azotobacter vinelandii* UWD균주는 NADH oxidase의 결함으로 인해 PHBV생산시 질소제한 등의 영양소제한을 필요로하지 않으며 균형된 세포생장과 동시에 PHBV를 축적하기 때문에 본 연구에 유용하게 사용될수 있다.

그런데 이 균주는 산소가 존재하는 배양조건에서도 다량의 환원력을 소모하는 질소고정 작용이 가능하다(4). 그러므로 *A. vinelandii* UWD의 성장시 배지중의 질소원의 농도가 PHBV 생산에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 폐지분뇨내에 질소원인 ammonium이 다량으로 존재하는 것을 고려할 때 *A. vinelandii*가 폐지분뇨를 이용해 PHBV를 생성할 때 질소원인 ammonium의 농도가 어떠한 영향을 미치는가를 아는 것이 중요한 것으로 보인다

문헌상의 보고에 의하면 질소를 고정하는 *A. vinelandii*가 배지내의 ammonium을 이용하는 세포보다 포도당의 소모속도가 약 2배 빠르고 세포내의 PHB 함량도 10% 높았다(5). 따라서 Page는 질소를 고정하는 세포가 ammonium을 이용하여 생장한 세포보다 PHB 수율이 높을 것이라는 결론을 내리고 그 이유로서 질소를 고정하는 세포는 빠른 속도로 포도당을 소모하는 과정에 PHB 형성을 촉진하는 잉여환원력(excess reducing power)을 생성하기 때문이라고 생각하였다. 따라서 Page의 실험에서는 PHBV를 생산시 질소를 고정하는 대사를 유도하기 위하여 15mM의 ammonium acetate를 30 g/L의 포도당 또는 50 g/L의 사탕무우 당밀 (beet molasses)과 함께 사용하여 배양 12시간후에 ammonium이 고갈되게 하였다(6). 그러나 Page의 실험 데이터를 자세히 들여다 보면, 질소고정세포가 PHBV수율이 더 높다는 그의 추론과 상반되게, 질소를 고정하는 세포의 PHB

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-Si 449-701, Korea
Tel : (0331) 201-2531, Fax : (0331) 202-1946
e-mail : chpark@nms.kyunghee.ac.kr

수율은 0.19 (g PHB/g 포도당)으로서 15mM의 ammonium이 공급된 조건에서 성장한 세포의 PHB 수율인 0.25 (g PHB/g 포도당) 보다 24% 낮았다(5).

본연구는 질소를 고정해야하는 배양조건이 배지내에 질소원이 공급되는 조건보다 PHBV 생산에 유리한가 아닌가에 대한 문헌상의 불명확성을 확인하기 위하여 배지내의 초기암모늄 농도가 UWD 균주의 성장 및 PHBV 생산에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

균 주

동결 건조된 *Azotobacter vinelandii* UWD (ATCC 53799)를 American Type Culture Collection으로부터 구해서 Burk 배지에 적용 배양시킨 후 agar plate로 옮겼다. 균주는 30°C 조건에서 배양시키고 일주일애 한 번씩 계대하였다.

생장 배지

제한 배지를 사용하여 *A. vinelandii* UWD를 탄소원으로 acetic acid 3.75 g/L, propionic acid 1.10 g/L, butyric acid 1.30 g/L 및 포도당 30 g/L를 함유한 변형된 Burk 배지에서 성장시켰다. 이 탄소원의 농도는 배지분뇨를 2배로 희석한 용액에 30 g/L의 포도당을 혼합한 것에 해당한다. 변형된 Burk 배지는 1.47 mM KH₂PO₄, 4.60 mM K₂HPO₄, 0.81 mM MgSO₄, 0.58 mM CaSO₄, 18.0 μM FeSO₄, 1.0 μM Na₂MoO₄ 그리고 42.0 μM FeC₆H₅O₇를 포함하고 있다. pH는 고압 멸균한 후에 7.3으로 조절하였다. 각종 시약은 Sigma Chemical Company에서 구입하였다. 초기 암모늄의 농도가 12mM 과 48mM인 두 종류의 배지가 사용되었다

7 L 발효기 System

날개를 네개 가진 3개의 터빈과 3개의 baffle을 갖춘 7 L top drive 발효기 (한국발효기)가 이 연구에 사용되었다. 발효기 공정은 486 microcomputer에 Labtech Notebook software를 이용하여 조절되고 수집되었다(Figure 1). 배지온도는 물 순환 펌프, 전기히터 그리고 온도조절기를 갖춘 항온 수조속에 발효기를 놓음으로써 30°C를 유지하였고 pH는 컴퓨터에 의해 자동으로 7.3으로 유지하였다. 거품은 자동 액체 수위 조절기를 사용하여 10%의 silicon antifoam 용액을 주입하여 조절하였다. Agitation 속도는 500 rpm로 유지되었고 3 liter 배지 부피에 3 L/min의 공기를 공급하였다. 다른 발효조건은 모두 동일하고 초기암모늄의 농도가 12 mM인 경우와 48 mM인 경우의 두가지 실험을 하였다.

시료 분석

발효 공정동안 세포성장, 기질소비, 생성물을 분석하기 위해 1-2 시간 간격으로 시료를 채취하였다. 7 L 발효조로부터 35 cc 무균 주사기를 이용하여 10 mL씩 두 개의 시료를 시료구를 통해 취하여 즉시 원심 분리하였다. 원심분리하는 동안 시료 한 방울을 1000배 배율의 phase contrast 현미경을 이용해서 관찰하고 620nm에서 optical density(O.D.)를 측정하였다. 발효 후 씻어서 말려진 모든 pellet는 100°C oven에서 24~48시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 건조된 pellet들은 건조세포량을 결

정한 후 PHBV 분석에 사용되었다.

포도당 농도 분석

고정화 효소막(YSI 2365 glucose(dextrose) membrane)이 설치된 포도당 분석기(Yellow Spring Instrument Co.)로 포도당 농도를 측정하였다.

PHBV 분석

PHBV는 acid propanolysis 법(7)으로 분석했다. 이 방법은 propanol과 염산을 이용한 가수분해와 transesterification에 근거하고 있다. PHBV는 단량체로 분해되고 propyl ester로 더욱 전환되어 gas chromatography에 의해 분석된다. Flame ionization detector (FID)가 장착된 GC (HP 5890)를 사용하였고 benzoic acid (Sigma)를 internal standard로 이용하여 PHBV 분석을 하였다. DB-wax가 충전된 silica capillary 칼럼 (Chrom Tech.)을 사용했다. 칼럼규격은 길이 30 m, 내경 0.32 mm, 두께 0.5 μm 이다. Oven 온도는 초기 60°C에서 0.5분 동안 유지한 후 10°C/min으로 최종 200°C까지 증가시켰다. Oven 온도를 이 값에서 5분 동안 유지하며 각 시료는 19.5분간 분석하였다. 주입구 온도는 200°C이고 검출기 온도는 225°C이었다. 칼럼 head 압력은 14.9 psi이며 운반기체로 헬륨(50 psi)을 사용하였다. 검출기에는 수소(19 psi)와 공기(40 psi)를 사용하였고 시료는 1 μl를 주입하였다.

유기산 농도 분석

유기산 농도의 분석은 sample 0.5 mL에 0.5 N HCl 0.5 mL를 첨가한후 PHBV 분석과 동일한 조건에서 동일한 GC (HP 5890)를 사용하였다. Internal standard로 hexanol 0.2 g (Sigma)과 진한 염산 40 mL를 증류수에 가하고 그 부피를 1000 mL로 조정하여 사용하였다.

암모늄 분석

샘플 상등액내의 암모늄 농도는 암모니아 전극(Orion Research Inc.)을 pH meter(Orion Research Inc.)에 연결하여 mV로 측정하였다. 표준물질은 분석등급 NH₄Cl과 nitrogen-free 탈이온수를 이용하여 준비하였다. 5mL의 표준용액 또는 샘플을 함유하고 있는 10mL 튜브에 ISA용액(Ionic Strength Adjuster, 5M NaOH, 0.05M disodium EDTA, 10% methanol and color indicator로 구성되어있음) 100 μL (2% v/v)를 가했다. 전극을 튜브안에 넣고 안정화 된 mV값을 기록하였다. 용액은 측정되는 동안 stir bar로 철저히 교반되었다. 표준곡선은 선형축에 mV값을 기록하고 표준 농도값을 log 축에 기록한 semi log chart에 작성되었다. 발효sample의 암모늄 농도를 이 표준곡선으로부터 결정하였다.

결과 및 고찰

질소를 고정하는 경우와 고정하지않는 경우의 *Azotobacter vinelandii* UWD 세포의 성장과 PHBV 생산을 비교하였다. 배지내의 초기 암모늄의 농도를 12mM (실험 1)과 48mM (실험 2)로 하고 그의 다른 모든 조건을 동일하게 하고 7 L 발효조에서 두번씩 반복 실험하였다. 탄소원으로는 2배로 희석된 배

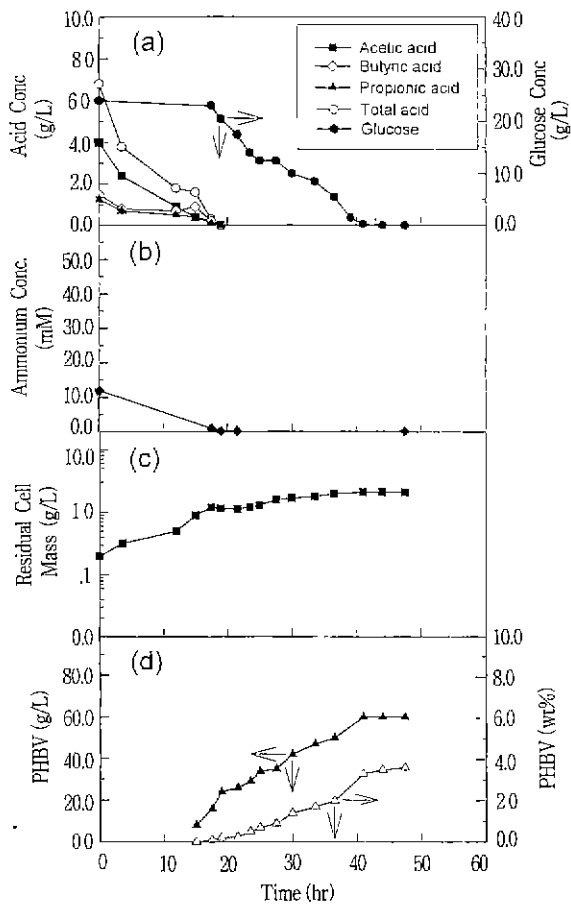


Figure 1. Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD under nitrogen limitation (run 1). (a) carbon substrate utilization, (b) ammonium consumption; (c) biomass production; (d) polymer production.

지분뇨에 상당하는 유기산에 30 g/L의 포도당을 추가한 혼합액을 사용하였다

실험 1과 실험 2의 경우 모두 세포는 유기산을 우선 소모하여 성장하고 (acid phase) 그후 포도당을 소모하는 (glucose phase) diauxic 성장 형태를 보였다 (Figures 1 and 2). 실험 1에서는 배양을 시작할 때 배지내에 공급된 ammonium (12mM)은 acid phase가 끝날 무렵인 17-18 시간후에 소진되고 그 이후 배양액 내에는 ammonium이 거의 검출되지 않았으나 세포생장이 지속되는 것으로 보아 세포가 질소를 고정하고 있는 것으로 판단된다 (Figure 1) 실험 2에서 발효 종료후 잔류 ammonium의 농도가 약 8mM인 것으로 보아 실험기간 내내 ammonium이 제한되지 않고 질소고정이 일어나지 않았음을 의미한다 (Figure 2). 실험 1과 2에서 acid phase 기간에 소모된 ammonium의 양은 약 11mM로 거의 동일하였고 실험 2에서 glucose phase기간에 약 30mM의 ammonium이 소모되었다.

Acid phase에서의 비성장속도는 실험 1에서 0.166hr^{-1} , 실험 2에서 0.165hr^{-1} 으로 세포생장은 두실험에서 거의 유사하였다 (Figures 1 and 2, Table 1). 실험 1의 biomass 수율과 (0.135g/g acid) 실험 2의 수율도 (0.142g/g acid) 거의 유사하였다. 이상의 결과는 실험에 사용한 초기 ammonium 농도가 (12mM ~ 48mM) UWD 균주의 성장을 저해할 정도로 지나치

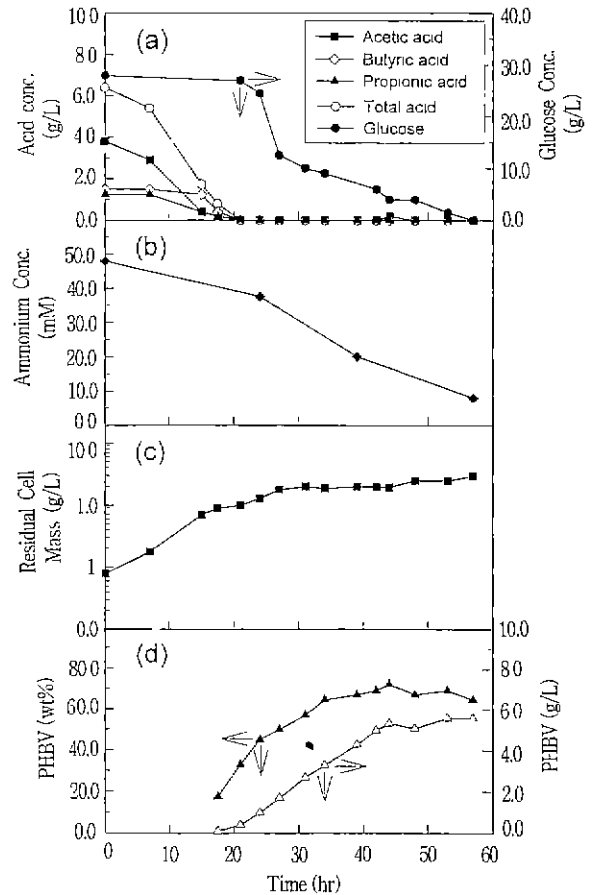


Figure 2. Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD without nitrogen limitation (run 2). (a) carbon substrate utilization, (b) ammonium consumption; (c) biomass production; (d) polymer production

게 낮거나 높지 않음을 의미한다.

반면 acid phase에서 PHBV생산은 초기 암모늄의 양이 적을 때 (실험 1) 저조하였다. 실험 1의 acid phase 말기에 PHBV생산은 23.5 wt%로서 실험 2의 33.4 wt% 보다 낮았다. PHBV수율도 실험 1 (0.051g PHBV/g acids)이 실험 2 (0.078g PHBV/g acids)보다 35% 낮게 나타났고 PHBV 생산속도도 실험 1 (0.035g PHBV/g RM-hr)이 실험 2 (0.057g PHBV/g RM-hr)보다 39% 낮게 나타났다.

Glucose 소모기에는 초기 암모늄량의 차이로 인한 세포생장과 PHBV 생산의 차이가 두드러 졌다 (Figures 1 and 2, Table 1) 질소제한 조건하 (실험 1)에서 포도당 소비속도는 0.992g/L-hr 로 실험 2에서의 소비속도(0.791g/L-hr)보다 25% 빨랐고 이는 Page의 실험결과와 유사하였다(5) 실험 1의 포도당 비소비속도 (specific glucose consumption rate)는 0.569g/g RM-hr 로 실험 2의 0.396g/g RM-hr 보다 44% 높았다. 그러나 biomass 수율은 실험 1 (0.059g/g 포도당)이 실험 2 (0.076 g/g 포도당)보다 22% 낮았다. 한편 Page의 보고와는 달리 질소고정 배양 (실험 1)에서의 최종 PHBV wt%는 60.5 wt%로 ammonium을 이용한 조건 (실험 2)에서 성장한 세포의 PHBV함량 (65.1 wt%)보다 조금 낮았다. 또한 실험 1에서 PHBV 수율(0.158 g PHBV/g 포도당)은 실험 2에서의 수율

Table 1. Effect of ammonium supply on the growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD.

		Run 1	Run 2
Initial ammonium concentration (mM)		11.84	48.18
Ammonium consumption (mM)	Acid phase	11.68	10.72
	Glucose phase	N ₂ fixation	29.75
	Overall	11.84	40.47
Biomass yield (g RM/g C sources)	Acid phase	0.135	0.142
	Glucose phase	0.059	0.076
PHBV yield (g/g C source)	Acid phase	0.051	0.078
	Glucose phase	0.158	0.203
Average PHBV production rate (g PHBV/g RM-hr)	Acid phase	0.035	0.057
	Glucose phase	0.073	0.080

(0.203g PHBV/g 포도당)보다 22% 낮았으며 이는 Page가 해석은 잘못하였으나 제시된 실험데이터와 유사하였다 (5). 실험 1에서의 평균 비중합체 생산속도(0.073g PHBV/g RM-hr)는 실험 2(0.080g PHBV/g RM-hr) 보다 9% 낮았다

질소를 고정하기 위해서는 에너지(ATP), 환원력(reducing power)과 in vivo 혐기성 조건등 3가지가 요구된다(4) 실험 1의 경우 탄소원의 일부가 질소고정을 위한 에너지 생산을 위해 이용되기 때문에 biomass와 PHBV 형성에 사용되는 탄소원이 감소되어 biomass 수율과 PHBV 수율의 감소로 나타났다. 그리고 질소고정은 환원력을 소모시키므로 역시 환원력을 소모하는 PHBV 합성과 경쟁하게 된다. Nitrogenase를 산소의 피해로부터 보호하기 위해 *A. vinelandii* UWD 균주는 생체내 혐기 조건을 달성해야하며 이를 위해 호흡속도를 증가시켜야 한다. UWD 세포내에 NADH oxidase가 결여되어 있음에도 불구하고 이 호흡률의 증가는 보다 많은 환원동등체(reducing power equivalent)가 산소로 전달되게 한다. 예를 들어 NADH에서 유래된 전자는 nicotinamide nucleotide transhydrogenase와 활성이 강한 NADPH oxidase의 작용으로 산소로 전달된다(8, 9).

두 실험에서 glucose phase를 비교하면 질소를 고정하는 경우에 (실험 1) 포도당 소모속도가 25% 증가하였고 biomass와 PHBV는 22% 감소하였다. 한편 PHBV wt%는 8% 감소하였고 PHBV 생산속도는 9% 감소하였다. 그러므로 질소제한 조건하에서는 biomass와 PHBV 생산이 아닌 질소고정화를 위해 약 22%의 포도당이 소모되었다

Acid phase에서는 3가지 acids 중에서 acetic acid가 먼저 소모되며 biomass가 형성되었으나 PHBV는 생산되지 않았다. Propionic acid와 butyric acid의 양은 acetic acid보다 적었고

acid phase 후반부에서 biomass와 PHBV 생산에 이용되었다. 따라서 biomass는 주로 acetic acid에서 유래된 반면 PHBV는 propionic acid와 butyric acid에서 유래되었다. 실험 1에서 질소를 고정해야하는 질소제한 조건은 acid phase 말기에 발생하였는데 이때 세포는 대부분의 acetic acid를 소모하였고 propionic acid와 butyric acid를 이용하기 시작하였다. 이것이 아마 PHBV 수율과 평균 비생산속도가 각각 35% 및 39% 감소한데 비해 biomass 수율은 단지 5% 감소한 이유일 것이다.

A. vinelandii UWD 균주에 있어서 질소제한은 소위 "환원력 과잉현상"을 초래하지 않고 탄소원을 소모시킬 뿐이었다. 질소를 고정하는 배양에서 각 세포의 PHBV 생산량은 크게 줄지 않는다고 하더라도 전체적인 PHBV 수율은 감소할 것이다. 그러므로 PHBV 생산을 증가시키기 위해서는 충분한 양의 ammonium이 탄소원과 더불어 배지내에 공급되어야 한다.

요 약

분헌상의 보고(5)와는 반대로, 본 실험에서는 ammonium의 제한 (질소고정 조건)이 *A. vinelandii* UWD에 의한 PHBV 생산을 증가시키지 않았다. Acid phase에서 PHBV 생성에 이용되는 propionic acid와 butyric acid가 사용되는 동안 ammonium이 제한되었을 때 PHBV 수율이 35% 감소하였다. Glucose phase 에서는 질소를 고정하는 조건에서 biomass 수율과 PHBV 수율이 22% 감소하였다. 질소를 고정하는 배지에서는 포도당의 소모속도가 25% 빠른 반면 최종 PHBV의 중량%는 약간 감소하였다. 이것은 질소고정이 에너지와 환원력을 다량 소비하는 과정이기 때문일 것이다. 질소제한 상태에서는 탄소원의 일부가 세포량이나 PHBV 형성이 아니라 질소고정에 이용되며 따라서 biomass 수율과 PHBV 수율이 감소한다 따라서 충분한 양의 질소원이 공급되어야 *A. vinelandii* UWD의 균형된 생장이 가능하고 이로 인해 PHBV 생산도 많아질 수 있다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 '96 핵심전문 연구과제(과제번호 : 961-1105-031-2)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 논문작성을 도와준 생물화학실험실 김태용군에게 감사한다.

참 고 문 헌

1. Doi, Y. (1990). Microbial Polyesters, VCH Publishers, New York.
2. Cho, K.-S., H.W. Ryu, C.-H. Park, and P.R. Goodrich (1997), Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, 19, 7-10
3. Stembüchel, A. and H. G. Schlegel (1991), Physiology and Molecular Genetics of poly(3-hydroxyalkanoic acid) Synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Mol Microbiol.* 5, 535-542.
4. Yates, M. G., and C. W. Jones (1974), Respiration and

- Nitrogen Fixation in *Azotobacter*, *Adv. Microb. Physiol.*, **11**, 97-135.
5. Page, W. J., and O. Knosp (1989), Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **55**, 1334-1339
 6. Page, W. J., J. Manchak, and B. Rudy (1992). Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **58**, 2866-2873.
 7. Riis, V., and W. Mai (1988). Gas Chromatographic Determination of poly-3-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass after Hydrochloric Acid Propanolysis, *J. Chromatogr.*, **445**, 285-289
 8. Ackrell, B. A. C., S. K. Erickson, and C. W. Jones (1972). The Respiratory-chain NADPH Dehydrogenase of *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.*, **26**, 387-392.
 9. Chung, A. E. (1970). Choice of Substrate in Polyhydroxybutyrate Synthesis, *Spec Publ Soc. General Microbiol.*, **21**, 161-168.