

산소전달 속도와 용존산소가 *Azotobacter vinelandii* UWD의 생분해성 고분자(PHBV) 생산에 미치는 영향

박 창 호

경희대학교 화학공학과, 환경연구소

Effect of Oxygen Transfer Rate and Dissolved Oxygen on the Production of PHBV by *Azotobacter vinelandii* UWD. Park, Chang-Ho. Department of Chemical Engineering and Institute of Environmental Science, Kyung Hee University, YongIn-Si, 449-701, Korea - In a 20 L fermentor experiments the level of dissolved oxygen (D.O.) strongly affected growth and PHBV production of *Azotobacter vinelandii* UWD. A higher D.O. (5%) increased specific cell growth rate two folds but PHBV production was 17 folds higher (62.3 wt%) at a lower D.O.(1%) level. D.O. level was not a good criterion to evaluate the effect of aeration on fermentation characteristics of *A. vinelandii* UWD. This strain maintained an equal D.O. (5%) by decreasing its oxygen consumption rate when oxygen transfer rate (OTR) was decreased by changing agitation speed at a fixed aeration rate. OTR rather than D.O. was a criterion to explain the effect of aeration on the cell growth and PHBV production. At 5% D.O. with a lower OTR cell growth rate decreased but PHBV production (57.3 wt%) approached to that (62.3 wt%) of the lower (1%) D.O.

Key words: oxygen transfer rate, dissolved oxygen, aeration, *Azotobacter vinelandii* UWD, PHBV

생분해성 플라스틱중 polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV)는 충분한 탄소원 존재하에 박테리아 생장에 필요한 비탄소원 중 어느 한 성분(질소, 산소, 인 등)이 제한되면 생산되는 polyester 구조의 고분자 물질이다[7]. 이 PHBV 합성에 돼지분뇨등 유기산이 풍부한 폐기물을 사용할 수 있는데[4] 이 돼지분뇨에는 질소, 인 등의 비탄소 영양소가 많이 들어 있어서 이러한 성분의 제한없이 PHBV를 축적할 수 있는 *Azotobacter vinelandii* UWD 균주가 사용된다.

*Azotobacter*의 일종인 *A. beijerinckii*의 경우에는 다른 균주들의 경우와 마찬가지로[7] 산소 제한하에서 다량의 PHB를 생산하였다[8]. *A. vinelandii* UWD는 돌연변이 균주로서 호흡계내의 NADH oxidase의 활성이 보통 균주의 16분의 1 수준에 불과하여 균형된 성장을 하면서 PHB(V)를 합성하며 환원력을 소모시키는 것으로 알려져 있다. *A. vinelandii*는 또한 전자 전달사슬로 전자가 들어갈 수 있는 부위가 여러개 존재하는 고도의 효율적인 호흡계를 가진 것으로 알려져 있어[1, 5] 산소가 세포의 성장과 PHB(V) 생산에 미치는 영향을 겉보기 D.O. level 뿐만 아니라 실제 산소전달속도를 측정하여 연구할 필요가 있다. *A. vinelandii* UWD의 경우 산소공급이 낮을 때 polyhydroxybutyrate(PHB)의 수율이 높은 것으

로 알려져 있으나[9], 이 결과는 flask내의 배지 부피를 변화시킴으로써 산소 공급의 조건을 변화시킨 실험이어서 발효조 규모의 생산에는 유용한 자료가 되지 못한다. 본 연구에서는 20리터 발효조에서 용존산소(D.O.) level을 변화시키고 또한 동일한 D.O. level에서 산소전달속도를 변화시켜가면서 통기가 *A. vinelandii* UWD의 세포 성장과 PHBV 생산에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

균주

동결 건조된 *Azotobacter vinelandii* UWD(ATCC 53799)를 American Type Culture Collection으로부터 구해서 Burk 배지[9]에 적응 배양시킨 후 agar plate로 옮겼다. 균주는 30°C 조건에서 배양하고 일주일에 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 배지[9]에서 성장시켰다. 이 탄소원의 농도는 돼지분뇨를 2배로 희석한 용액에 30 g/L의 포도당을 추가한 것에 해당한다. 변형된 Burk 배지는 1.47 mM KH₂PO₄, 4.60 mM K₂HPO₄, 0.81 mM MgSO₄, 0.58 mM CaSO₄,

*Corresponding author
Tel. 82-331-202-9753, Fax. 82-331-202-1946
E-mail: chpark@nms.kyunghee.ac.kr

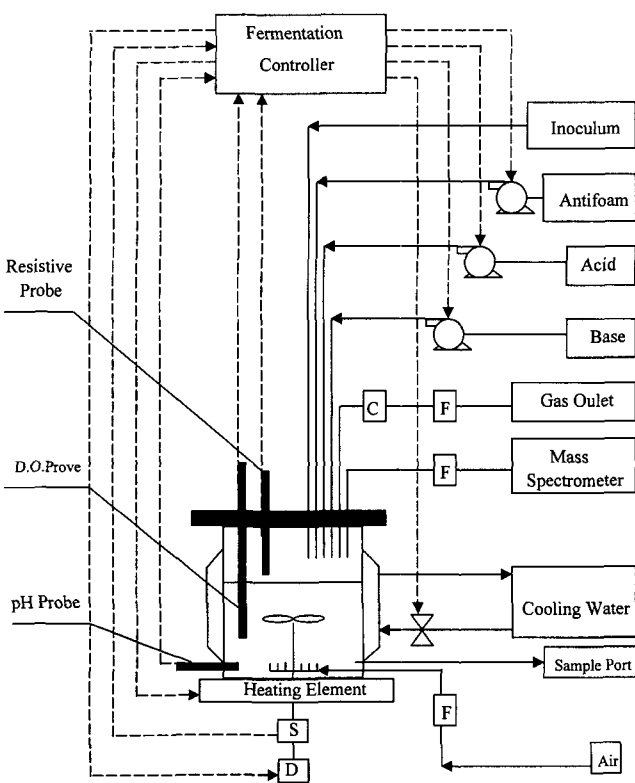


Fig. 1. Diagram of 20 liter fermentor system. F: 0.2 μm filter; C: condenser; S: agitation speed sensor; D: propeller driver; D.O.: dissolved oxygen. Solid lines: pipings; dashed lines: cables and control lines.

18.0 μM FeSO_4 , 1.0 μM Na_2MoO_4 그리고 42.0 μM $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 을 포함하고 있다. pH는 고압 멸균한 후에 7.3으로 조절하였다. 각종 시약은 Sigma Chemical Company에서 구입하였다. 세가지 실험(run 1, run 2 및 run 3) 모두 질소제한이 없는 조건에서 실험이 이루어지도록 하였다.

Run 1 및 2에서 초기 암모늄 농도는 59.2 mM이며 420 mmol의 암모늄이 glucose 소모기 중간에 추가되어 전체 암모늄 소모는 69.0 mM로 run 3와 유사하였고 최종 암모늄 농도는 20.2 mM로 질소 제한이 없는 조건에서 실험이 수행되었다. Run 3는 발효 초기 암모늄 농도가 65.7 mM이었고 glucose가 0.74 g/L 남았을 때 암모늄의 농도는 0.73 mM로 역시 질소 제한이 없는 조건에서 실험을 수행하였다.

20 L 발효기 system

네 개의 날개를 갖춘 교반 터빈 3개와 3개의 baffle을 갖춘 20 liter bottom drive 발효기(Biolafitte, Inc.)가 사용되었다(Fig. 1). 발효기를 출입하는 가스 성분은 Questor high-speed 공정분석기로 분석하였다. Asyst 2.0 software를 사용한 Rosemount computer system으

로 공정을 관찰하였다. 발효기의 head pressure는 출구에 있는 수동 압력조절 장치에 의해 18.9 psi로 유지되었다. 발효기 온도는 자동 온도 조절 장치에 의해 jacket에 온도가 조절된 물을 순환시켜 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. Gel이 충전되고 멸균가능한 pH probe로 pH를 측정하였다. pH는 proportional pH 조절 module에 의해 6N KOH 또는 3N H_2SO_4 를 투입하여 자동적 7.3으로 조절하였다. 거품은 top plate에 장치된 resistive probe에 연결된 증폭 조절 module을 이용하여 silicon based antifoam (Union Carbide) 10%(w/v) 용액을 자동적으로 추가하므로써 제거하였다. 통기는 공기에 의해서만 이루어졌다. 살균된 공기가 발효기의 바닥으로 들어가 교반축에 붙어 있는 회전 sparger를 통해 배지 속으로 분산되었다. 발효기 바깥쪽으로 나가는 공기는 배지의 증발을 막기 위해 찬물을 이용한 순환 응축기로 응축되었다. 용존산소는 2 mil의 teflon 막으로 Borkowski and Johnson 방법[3]에 의해 제작된 산소전극으로 측정하였다. 용존산소 level은 산소 전극으로부터 입력된 신호를 이용하여 PID control module에 의해 조절하였다. 정해진 값으로부터 실제 D.O.가 벗어난 정도에 따라 PID control module은 속도 조절 potentiometer를 작동시켜 agitation 속도를 자동적으로 증가 또는 감소시켰다. 공기흐름 속도는 수동으로 조절하였다. 발효기의 멸균은 *in-situ* 증기 멸균 system을 이용하였다. D.O. probe의 0% 눈금은 멸균 후 발효기로부터 모든 공기가 제거된 후에 정하였고, 100% 눈금은 한 시간 동안 14 L/min의 공기 흐름 속도로 배지를 sparging하고 700 rpm으로 교반한 후(모든 눈금이 안정될때까지) 얻었다.

On-line gas 성분분석

유입가스와 배출가스의 성분은 QuestorTM 고속 질량 분석기(Extrel Corporation, Pittsburgh, PA)에 의해 분석하였다. 이 분석기는 2에서 200 원자 질량단위(amu) 범위의 이온을 갖는 가스와 vapor내의 성분을 정량할 수 있는 quadrupole 질량 분석기로서 한번에 16개의 성분을 monitor할 수 있다. Faraday 검출기로 검출범위는 10 ppm에서 100%(pure gas)까지이다.

On-line 데이터 수집 시스템

pH, D.O., 교반속도 그리고 온도는 여러 개의 analog to digital, digital to analog 측정과 조절 system을 감시하는 컴퓨터로(μMAC 5000) 조절하였다. 이 system은 RS 232 interfacing을 통해서 ASYST package와 통신하였다. Asyst monitoring과 control package를 사용해서 on-line data를 얻었다. 이 프로그램은 FORTH informat에 연관된 compiled language로 작성되었으며 Questor Process 질량분석기와 컴퓨터(μMAC 5000)로부터 data

를 얻기 위해 사용하였다. 이 프로그램의 주요기능은 질량분석기로부터 투입된 gas와 배출된 gas에 관한 data를 얻고 또한 컴퓨터로부터 pH, D.O., 온도 그리고 교반속도 등의 물리적 변수들을 얻으며, 산소소모속도(mmol/L), CO₂ 발생속도, 호흡지수(RQ) 등을 계산에 의해 구하여 각종 data들을 실시간에 그래프로 나타내었다. 다음의 변수들은 측정되거나 계산되었다; 주입산소%, 배출구의 산소%, 배출구의 CO₂%, 산소소모속도, CO₂ 발생속도(CER, mmol/L-hr), 호흡지수, 전체 CO₂ 발생량(mmol/L), 암모니아%, 온도, pH, RPM, % D.O., 원료무게, 반응기 조업부피, 배출가스중의 % H₂O.

시료 분석

발효가 진행되는 동안 세포생장, 기질소비, 생성물을 분석하기 위해 1~2시간 간격으로 시료를 채취하였다. 7 L 발효조로부터 35 cc 무균 주사기를 이용하여 10 mL씩 두 개의 시료를 시료구를 통해 취하여 즉시 원심 분리하였다. 시료 한 방울을 1,000배 배율의 phase contrast 현미경(Zeiss)을 이용해서 관찰하고 620 nm에서 O.D.를 측정하였다. 발효 후 biomass pellet는 100°C oven에서 24~48시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 건조된 pellet들은 건조세포량을 결정한 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[12]으로 분석하였다. 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 PHBV를 분석하였다. DB-wax가 충전된 silica capillary 칼럼(Chrom Tech.)을 사용했으며 칼럼규격은 길이 30 m, 내경 0.32 mm, 두께 0.5 µm이다. 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 샘플 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. 5 mL의 표준용액 또는 샘플을 함유하고 있는 10 mL 튜브에 ISA용액(Ionic Strength Adjuster, 5M NaOH, 0.05 M disodium EDTA, 10% methanol and color indicator로 구성되어 있음) 100 µL(2% v/v)를 가했다. 전극을 튜브안에 넣고 안정화 된 mV 값을 기록하였다. 용액은 측정되는 동안 stirrer bar로 교반하였다. 표준곡선은 선형축에 mV 값을 기록하고 표준 농도값을 log scale로 기록한 semi log chart에 작성하였다. 발효 sample의 암모늄 농도를 이 표준곡선으로부터 결정하였다.

결과 및 고찰

용존산소(D.O.) level이 세포생장 및 PHBV 생성에 미치는 영향

용존산소(D.O.) level은 *A. vinelandii* UWD의 성장과 PHBV 생성에 큰 영향을 주었다. D.O. level을 1%(run 1) 및 5%(run 2)로 유지한 실험결과를 비교하면 용존

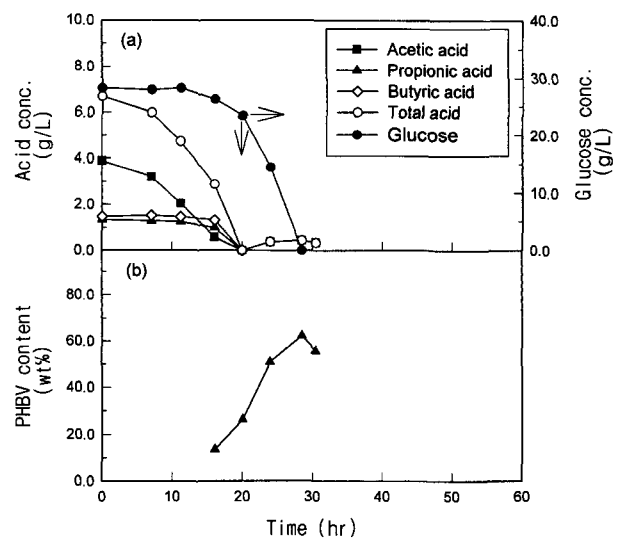


Fig. 2. Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in a 20 liter bioreactor with D.O. setting at 1% (run 1). (a) carbon substrate utilization; (b) polymer production.

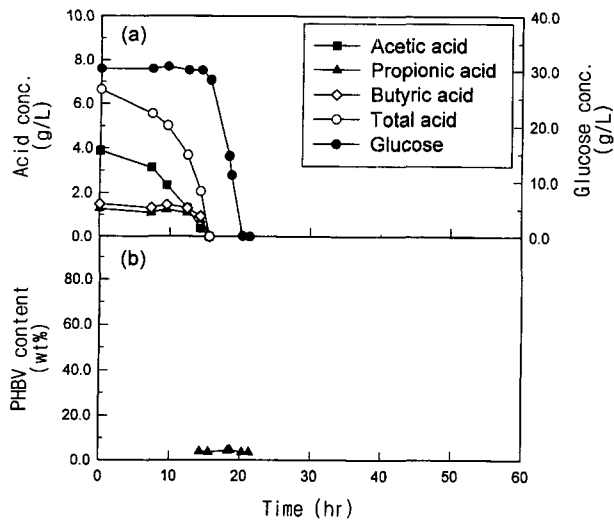


Fig. 3. Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in a 20 liter bioreactor. D.O. was controlled at 5% by changing air flow rate and agitation speed (run 2). Average air flow rate was higher than 2.7 L/min. (a) carbon substrate utilization; (b) biomass production; (c) polymer production.

산소 level이 높을 때 탄소기질을 빨리 소모하였다(Fig. 2 and 3). 전량 소모하는데 소요된 시간이 28시간에서 (1% D.O.) 20시간으로(5% D.O.) 단축되었다. 세포의 성장 역시 D.O.가 5%일 때(run 2) 더 빠른 속도를 나타내어 acid 소모기와 glucose 소모기의 비성장속도가 각각 0.555 hr⁻¹ 및 0.260 hr⁻¹로서 1% D.O.에 비해 각각 2.2배 및 2.0배이었다(Table 1).

Residual biomass 질량(세포 총중량에서 PHBV를 제외한 질량)은 D.O.의 영향을 받지 않고 두 실험 모두 약 4.5 g/L로 유사하였다. Residual biomass 생산 수율도 D.O.의 영향을 거의 받지 않았다. 유기산 소모기간에는

0.170 g RM/g acids(5% D.O.)와 0.165 g RM/g acids (1% D.O.)로 유사하였고 glucose 소모기간에도 0.110 g RM/g glucose(5% D.O.)와 0.115 g RM/g glucose (1% D.O.)로 유사하였다(Table 1).

세포생장이 용존산소의 level이 높을 때 유리한 것과 반대로 PHBV 생성 및 수율은 용존산소의 양이 적을수록 크게 유리하였다. D.O. level이 1%일 때 PHBV 함유량이 62.3 wt%로 5% D.O.일 때의 3.6 wt%에 비하여 17배이었고 PHBV 수율은 유기산을 소모하는 기간에는 0.073 g PHBV/g acids, 포도당 소모기간에는 0.266 g PHBV/g glucose로서 5% D.O.에 비하여 각각 9배 및 67배 증가하였다(Table 1).

두 실험에서 소모된 탄소원의 양은 동일하였으나 D.O. level이 높을 때(5% D.O.) PHBV 생성이 크게 불리하여 결국 총건조중량(PHBV+RM)이 감소하였다. Run 1과 run 2의 두 실험에서 질소원의 고갈을 피하기 위하여 420 mmol의 ammonium chloride를 glucose 소모기간에 추가하였고 발효 종료시 암모늄 농도는 20.1~20.2 mM이었다. 용존산소 level이 세포생장 및 PHBV 생성에 큰 영향을 미치는데 세포생장은 D.O.가 높을 때 유리하긴 하지만 PHBV 생성이 더 중요하기 때문에 *A. vinelandii* UWD에 의한 PHBV 생성시 D.O.를 낮추는 것이 유리함을 알 수 있었다.

용존산소 level이 소모된 탄소의 분배에 미치는 영향

탄소원이 *A. vinelandii* UWD에 의해 전환될 수 있는 세가지 주요 경로는 biomass의 형성, PHBV의 생성 및 CO₂ 발생이다. 탄소원의 mass balance를 확인하기 위하여 발효조 배출구의 CO₂량을 on-line 측정하고 UWD 균주의 구성성분을 CH_{1.666}N_{0.20}O_{0.27}로 가정하여[2], 탄소원의 biomass와 PHBV로의 전환율을 계산하였다(Table 2).

Table 1. Effect of dissolved oxygen and oxygen transfer rate on cell growth and PHBV production in a 20 L fermentor (RM=residual biomass)

Run		Run 1	Run 2	Run 3
		1%	5%	5%
% D.O. level and aeration method		varied both air flow rate and agitation speed	varied both air flow rate and agitation speed	fixed air flow rate and varied agitation speed
Average oxygen transfer rate (mmol/gRM-hr)	Acid phase	37.0	106.3	21.9
	Glucose phase	10.0	37.4	14.4
Yield _{RM/carbon sources} (g/g)	Acid phase	0.165	0.170	0.175
	Glucose phase	0.115	0.110	0.110
Specific growth rate of RM (hr ⁻¹)	Acid phase	0.248	0.555	0.181
	Glucose phase	0.127	0.260	0.153
Final PHBV wt%	Acid phase	26.2	3.70	36.4
	Glucose phase	62.3	3.61	57.3
Yield _{PHBV/carbon sources} (g/g)	Acid phase	0.073	0.008	0.082
	Glucose phase	0.266	0.004	0.140

Table 2. Effect of dissolved oxygen level on carbon distribution among PHBV, biomass and CO₂

Run		Run 1	Run 2
% D.O. level		1%	5%
Carbon sources converted to CO ₂ (%)	Acid phase	50.1	60.0
	Glucose phase	30.3	53.6
	Overall	32.8	54.5
Carbon sources converted to PHBV (%)	Acid phase	5.5	0.7
	Glucose phase	33.1	0.6
	Overall	26.2	0.6
Carbon sources converted to biomass (%)	Acid phase	20.1	20.1
	Glucose phase	16.7	16.0
	Overall	16.5	17.0
Carbon recovered (%)	Acid phase	75.7	81.7
	Glucose phase	80.1	70.2
	Overall	75.5	72.1

전체 탄소의 회수율은 1% 및 5% D.O.에서 각각 75.5%와 72.1%로 유사하였으나 세 가지 경로에 대한 D.O.의 개별적 영향은 서로 상이하였다(Table 2).

Biomass로 전환된 탄소량은 D.O. level의 영향을 거의 받지 않았다(1% D.O.일 때 16.5%, 5% D.O.일 때 17.0%). 반면 PHBV 또는 CO₂로 전환된 탄소원의 양에 대해서는 D.O. level의 영향이 두드러졌고 level이 높을수록 감소하였다. 즉 PHBV로 전환된 탄소량은 D.O. level이 낮을 때(1% D.O.) 26.2 wt%로서 D.O. level이 높은 경우(5% D.O.)에 비하여 44배이었으나 이와 반대로 CO₂로 전환된 탄소는 D.O. level이 높을 때(5% D.O.) 54.5 wt%로서 1% D.O.일 때에 비해 1.7배 높았는데 이는 높은 D.O. level에서 호흡활동이 증가하여 더 많은 양의 탄소가 CO₂로 전환된 때문으로 사료된다. 유기산소모기와 glucose 소모기를 구분하여 보면 D.O.가 높을 때(5% D.O.) CO₂ 발생량이 유기산 소모기 및 glucose 소모기에서 각각 1.2배 및 1.8배 이었다.

탄소원이 전환되는 세 가지 경로인 biomass형성, PHBV 생성 및 CO₂ 발생의 세 경우를 다 더해 소모된 탄소의 72.1~75.5%만이 회수되었다. 나머지 탄소원의 행방에 대하여 몇 가지 가능성을 생각할 수 있다. 우선 CO₂의 일부가 실험 pH인 7.3에서 배지에 용해되는데 그 양은 30°C, 1 atm의 head pressure에서 28.6 mM로서[10] 발효중 방출되는 전체 CO₂의 5~10%수준이다. 둘째로 회수되지 않은 탄소의 일부는 *A. vinelandii* UWD에 의한 색소(pigment) 생성에 소모된 것으로 보인다. 본 실험에서 agar plate와 발효액에서 갈색물질을 관찰할 수 있었다. 그 외에 세포가 부산물로 유기산 등을 생성하는데 일부의 탄소가 소모되었을 것으로 보인다.

결론적으로 용존산소 level은 소모된 탄소가 PHBV 생산 또는 CO₂발생 중 어느 쪽으로 사용되는가에 대해 큰

영향을 미쳐 많은 탄소가 D.O. level이 낮을 때는(1% D.O.) PHBV로 전환되었고 D.O. level이 높을 때는(5% D.O.) CO₂로 전환되었다. 반면 탄소원이 biomass로 전환되는 높은 D.O. level의 영향을 거의 받지 않았다.

통기의 기준으로서 비산소전달속도와 D.O. level의 비교

앞의 두 실험(run 1과 run 2) 결과로 볼 때 *A. vinelandii* UWD에 의한 PHBV 생산은 D.O. level에 매우 민감하였다. 그러나 겉보기 D.O. level은 동일하다 할지라도 서로 다른 통기법에 의해 산소전달 속도가 달라지면 세포생장 및 PHBV 생산이 크게 다르다는 것이 관찰되었다.

Run 3는 run 2와 동일하게 D.O. level을 5%로 유지하였으나 통기방법을 달리하였다. Run 3는 공기흐름속도를 2.7 L/min로 고정하고 교반속도만을 변화시킴으로써 용존산소를 5%로 조절하였다. 평균교반속도는 유기산 소모기에서 171 rpm이었고 glucose 소모기에서는 444 rpm이었다. Run 2는 공기흐름속도와 교반속도 두 가지 모두를 변화시키면서 D.O.를 5%로 조절하였다. 공기공급속도는 1~10 L/min 이었고 평균 공기공급속도는 run 3의 2.7 L/min 보다 높았다. 평균 교반속도는 유기산 소모기에서 435 rpm이고 glucose 소모기에서는 894 rpm이었다.

Run 2와 run 3의 겉보기 D.O. level은 5%로 동일하였으나 산소전달속도는 크게 차이가 났다(Fig. 5). 유기산 소모기에서 run 2의 평균비산소전달속도(average specific oxygen transfer rate)는 106.3 mmol/g RM-hr로서 run 3의(21.9 mmol/g RM-hr) 4.9배 이었고, glucose 소모기에서는 run 2의 평균비산소전달속도(37.4 mmol/g RM-hr)는 run 3(14.4 mmol/g RM-hr)의 2.6배이었다. D.O. level이 일정하거나 느리게 변한다면 비산소소모속도(specific oxygen uptake rate)는 비산소전달속도(specific oxygen transfer rate)와 거의 일치한다. 따라서 위의 결과는 UWD 균주에 의해 실제 소모된 산소의 양은 겉보기 D.O. level이 동일하더라도 크게 다를 수 있음을 보여 주었다.

산소전달속도의 차이는 *A. vinelandii* UWD의 생장과 PHBV 생성에 큰 영향을 주었다(Table 1, Fig. 3 및 4). 산소전달속도가 높을 때 탄소기질을 빨리 소모하였다. 전량 소모하는데 소요된 시간이 43시간에서(run 3) 20시간으로(run 2) 단축되었다. 세포의 생장 역시 산소전달 속도가 높은 run 2의 경우 더 빠른 속도를 나타내어 유기산소모기와 glucose 소모기의 비생장속도가 각각 0.555 hr⁻¹ 및 0.260 hr⁻¹로서 run 3에 비해 각각 3.1배 및 1.7배 이었다.

Residual biomass 생산 수율은 산소전달속도의 영향을 거의 받지 않았다. 유기산 소모기간에는 0.170 g RM/

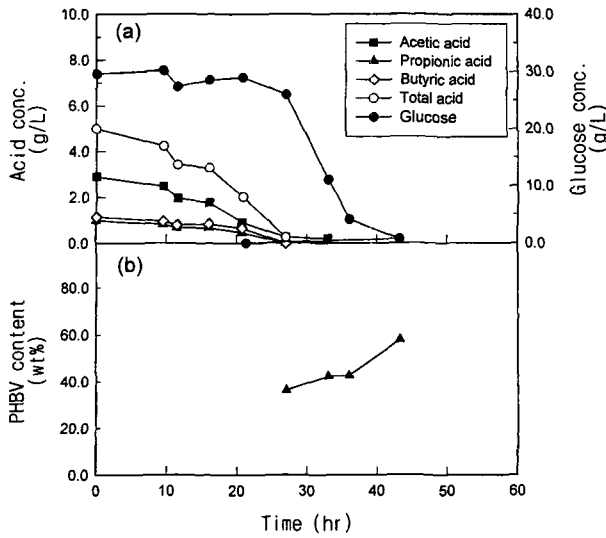


Fig. 4. Growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in a 20 liter bioreactor. Air flow rate was fixed at 2.7 L/min. D.O. was controlled at 5% by changing agitation speed only (run 3). (a) carbon substrate utilization; (b) biomass production; (c) polymer production.

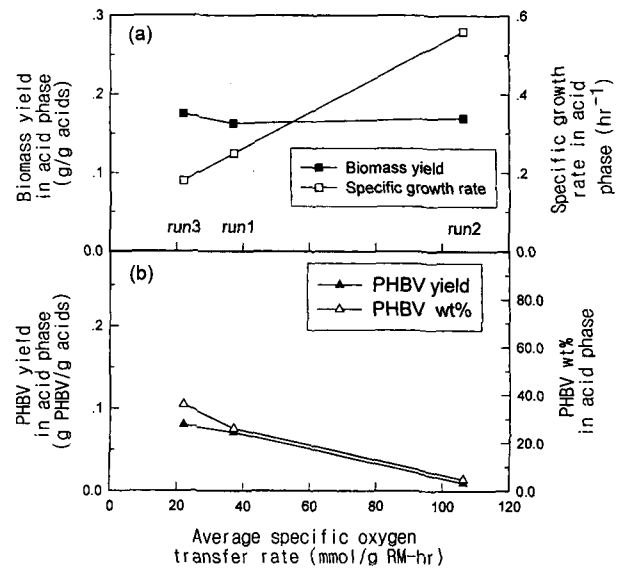


Fig. 6. Effect of specific oxygen transfer rate on growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in acid phase (run 1, 1% D.O.; run 2, 5% D.O. controlled with varied air flow rate and agitation speed; run 3, 5% D.O. controlled with fixed air flow rate and varied agitation speed).

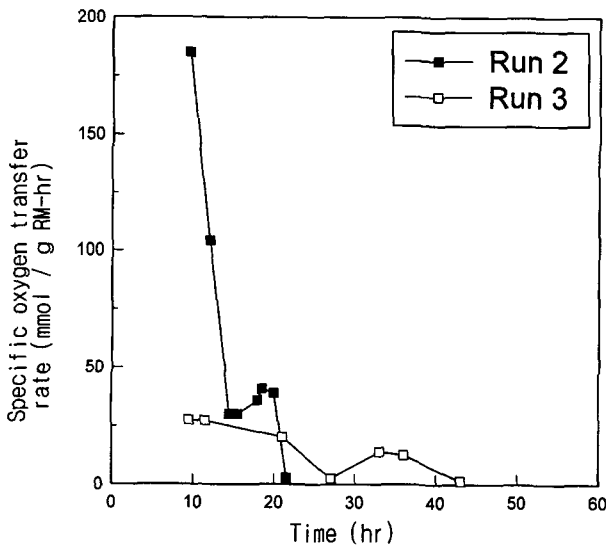


Fig. 5. Comparison of specific oxygen transfer rate. In both runs D.O. set point=5%. (a) D.O. was controlled by changing both air flow rate and agitation speed. Average air flow rate was higher than 2.7 L/min. (b) Air flow rate was fixed at 2.7 L/min and D.O. was controlled by changing agitation speed only (OTR=Oxygen transfer rate).

g acids(run 2)와 0.175 g RM/g acids(run 3)로 유사하였고 glucose 소모기간에도 0.110 g RM/g glucose로 동일하였다(Table 1).

세포생장이 산소전달속도가 높을 때 유리한 것과 반대로 PHBV 생성 및 수율은 산소전달속도가 작을수록 유리하였다(Table 1). 산소전달속도가 낮은 run 3의 PHBV

함유량이 57.3 wt%로 run 3의 3.6 wt%에 비하여 16배 이었고 PHBV 수율은 유기산을 소모하는 기간에는 0.082 g PHBV/g acids, 포도당 소모기간에는 0.140 g PHBV/g glucose로서 run 2에 비하여 각각 10배 및 35배 증가하였다.

두 실험에서 산소전달속도가 세포생장 및 PHBV 생성에 큰 영향을 미치는 것을 확인하였고 세포생장은 산소전달속도가 높을 때 유리하긴 하지만 PHBV 생성이 발효목적상 더 중요하기 때문에 *A. vinelandii* UWD에 의한 PHBV 생성시 산소전달속도를 낮추는 것이 유리한 것임을 알 수 있었다. 또한 이 실험 결과는 UWD 균주에 대하여 D.O. level로 통기의 영향을 평가하는 것은 불충분하고 세포에 실제 공급되는 산소의 양을 나타내는 비산소전달속도(specific oxygen transfer rate)가 더 적합한 parameter인 것을 나타낸다.

세포생장 및 PHBV 생산에 대한 산소전달속도의 영향 위의 세 실험(run 1, run 2 및 run 3)에서 서로 다른 값을 갖는 평균비산소전달속도가 biomass와 PHBV 생산에 주는 영향을 유기산 소모기간과 포도당 소모기간에 대하여 각각 Fig. 6 및 7에 표시하였다. Biomass 수율은 비산소전달속도의 영향을 받지 않았고 유기산 소모기에서는 약 0.170 g/g acid로 유지되었고 glucose소모기에서는 0.110 g/g glucose로 유지되었다. 비생장속도는 비산소전달속도에 비례하여 유기산 소모기에서는 0.181 hr⁻¹에서 0.555 hr⁻¹로 선형적으로 증가하였고 glucose 소모

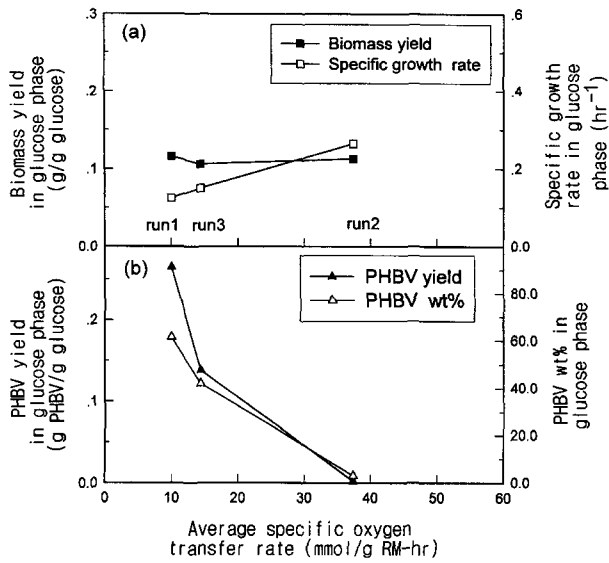


Fig. 7. Effect of specific oxygen transfer rate on growth and polymer production of *A. vinelandii* UWD in glucose phase (run 1, 1% D.O.; run 2, 5% D.O. controlled with varied air flow rate and agitation speed; run 3, 5% D.O. controlled with fixed air flow rate and varied agitation speed).

기에서도 0.127 hr⁻¹에서 0.260 hr⁻¹로 선형적으로 증가하였다. PHBV 수율과 최종 PHBV wt%는 유기산 소모기와 glucose 소모기 모두 비산소전달속도가 증가할수록 감소하였다. 유기산 소모기에서 PHBV 수율은 0.082 g PHBV/g acid에서 0.008 g PHBV/g acid로 감소하였고 PHBV wt%는 36.4 wt%로 부터 3.70 wt%로 감소하였다. 포도당 소모기에는 PHBV 수율은 0.266 g PHBV/g acid에서 0.004 g PHBV/g acid로 감소하였고 최종 PHBV wt%는 62.3 wt%에서 3.61 wt%로 감소하였다.

비산소전달속도가 증가하면 UWD 세포는 이에 상응하여 호흡속도를 증가시켜 보다 많은 환원력이 PHB(V) 합성보다는 산소에 의해 산화되므로 PHBV 생성은 감소한다. 이와 같이 전자 receptor가 바뀌더라도 에너지는 탄소원으로 부터 여전히 생산되므로 biomass 수율은 그다지 영향을 받지 않는다.

발효공정에서 산소전달이 제한(limiting) 되는 것은 두 가지 경우가 있다. 첫째, 산소가 배지내의 세포로 전달되는 속도가 느려서 이로인한 제한을 받는 경우와 둘째로 산소가 세포에 의해 소모되는 속도가 느려서 발생하는 제한이다. 후자의 경우 배지중에 녹아있는 산소의 양은 충분하기 때문에 D.O.가 통기의 기준으로 사용될 수 있다. 반면 전자의 경우는 세포가 높은 호흡용량을 가지고 있어 산소가 세포로 전달되는 속도가 제한단계가 되고 이때 D.O.는 적합한 통기의 기준이 아니다[2]. 본 연구에서 사용한 *A. vinelandii* UWD의 경우 전자전달사슬로 전자가 들어갈 수 있는 부위가 여러개 존재하는 고도의 효율적인 호흡계를 가지고 있어 세포가 다른 통기조건들

에 잘 적응할 수 있는 유연성을 갖고 있다[11, 14]. 결과적으로 어느 일정 범위의 산소전달속도에 대하여 산소소모속도는 산소전달 속도를 따라잡을 수 있고 이로인해 산소전달속도가 다름에도 불구하고 D.O. level이 겹보기에는 일정하게 유지되는 결과로 나타난다. 그러므로 본 실험의 경우에는 산소가 세포에 전달되는 속도가 느려서 이로 인한 제한을 받는 경우이며 따라서 산소전달속도가 D.O. level보다 명확한 통기기준이 된다.

이 돌연변이 UWD 균주는 respiratory NADH oxidase의 활성이 보통균주의 16분의 1 수준이므로[9] 산소 호흡으로 NADH를 산화할 수 없기 때문에 PHB(V) 합성으로 NAD(P)H를 산화하게 된다. 이 PHB(V) 합성은 Entner-Doudoroff pathway를 통해 단위 mol의 glucose당 각 1 mol씩의 ATP, NADPH, 그리고 NADH를 생성할 수 있다[6, 13]. 이와 같이 biomass 형성은 energy 생성의 한 방법인 PHB(V) 생산에 의존하는 것으로 보인다. 그러나 NADH oxidase가 결함이 있어도 다른 효소의 작용으로 산소에 의한 환원 동등체의 산화가 가능하다. 예를 들어 NADH로 부터 나온 전자는 nicotinamide nucleotide transhydrogenase의 활동을 통해 산소로 전달될 수 있다. NADH와 NADPH가 상호 전환되면 NADH는 높은 활성의 NADPH oxidase를 통해 산소에 의해 산화되기도 한다.

요 약

용존산소(D.O.) level은 유기산 및 포도당을 혼합한 배지에서 *Azotobacter vinelandii* UWD의 생장 및 생분해성 고분자(PHBV) 생성에 큰 영향을 주었다. 용존산소 level이 높은 경우(5% D.O.)는 낮은 경우(1% D.O.)에 비해 세포의 생장속도가 약 2배 증가하였으나 PHBV 생성은 D.O.가 낮은 경우 62.3 wt%로 D.O.가 높은 경우에 비해 약 17배 증가하였다. 그러나 D.O. level은 통기(aeration)에 의한 *A. vinelandii* UWD의 발효특성 연구에 적합한 기준이 아니었다. 공기공급속도를 고정하고 교반속도만을 변화시키는 통기법으로 산소전달속도를 감소시켰을 때 이 균주는 산소소모속도를 그에 따라 대응 감소시킴으로써 겹보기 D.O.를 높게(5%) 유지할 수 있었고 이 때 생장이 느려지고 PHBV 양은 57.3 wt%로 증가하였다. 통기가 세포생장 및 PHBV 생성에 미치는 영향을 일관성 있게 설명할 수 있는 기준은 D.O. level이 아니라 산소전달속도였으며 비생장속도는 산소전달속도에 비례하여 증가하였고 PHBV 생산량은 산소전달속도에 반비례하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 '96 핵심전문 연구과제(과

제번호: 961-1105-031-2)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 논문작성을 도와준 생물화공실 협실 김태용군 및 박찬엘군에게 감사한다.

REFERENCES

1. 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.
2. Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals* (2nd ed.). McGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A.
3. Borkowski, J. D. and M. J. Johnson. 1967. Long-lived steam sterilizable membrane probe for D.O. measurements. *Biotech. Bioeng.* **9**: 635–639.
4. Cho, K.-S., H. W. Ryu, C.-H. Park, and P. R. Goodrich. 1997. Poly(hydroxy-butyrates-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotech. Lett.* **19**: 7–10.
5. Chung, A. E. 1970. Choice of substrate in polyhydroxybutyrate synthesis. *Spec. Publ. Soc. General Microbiol.* **21**: 161–168.
6. Collins, S. H. 1987. Choice of substrate in polyhydroxybutyrate synthesis. *Spec. Publ. Soc. General Microbiol.* **21**: 161–168.
7. Doi, Y. 1990. *Microbial Polyesters*. VCH Publishers, New York.
8. Jackson, F. A. and E. A. Dawes. 1976. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.* **97**: 303–312.
9. Page, W. J. and O. Knosp. 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1334–1339.
10. Perry, R. H. and C. H. Chilton. 1984. *Chemical Engineers' Handbook* (6th ed.). McGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A.
11. Philips, D. H. and M. J. Johnson. 1961. Aeration in fermentation. *J. of Biochem. and Microbiol. Technol. and Eng.* **III**(3): 277–300.
12. 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.
13. Senior, P. J. and E. A. Dawes. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**: 55–66.
14. Yates, M. G. and C. W. Jones. 1974. Respiration and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Adv. Microb. Physiol.* **11**: 97–135.

(Received August 20, 1998)