

Methanol 자화성 세균 *Pseudomonas sp.* ILS-003에 의한 poly- β -hydroxybutyric acid의 생산

이일석 · 방원기

고려대학교 농화학과

초록 : Methanol 자화성 세균 *Pseudomonas sp.* ILS-003 균주를 이용하여 methanol로부터 PHB생산의 최적조건을 검토하였다. PHB 생산에 있어서 초기 pH 6.4, 온도 30°C 및 methanol 농도가 1.0%(v/v)일 때 최적이었으며, 질소원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 최적이었으며 농도는 0.8 g/l로서 C/N비가 17.4이었다. 또한 2가 금속이온의 결핍은 PHB축적효과를 나타내었다. Fed-batch culture에서 methanol 첨가의 효과는 0.25%(v/v)씩 첨가했을 때 가장 좋았다. 상기의 최적조건하에서 96시간 배양시 균체량은 2.78 g/l였고 PHB의 양은 1.94 g/l로서 건조균체량의 69.8%이었다(1991년 9월 2일 접수, 1991년 9월 19일 수리).

생물학적으로 생합성되는 생체고분자(biopolymer)는 석유화합물로부터 화학합성되는 고분자에 비해 생물학적 분해성, 성능, 저렴한 원료의 가격 및 명확한 구조의 변화성 등의 장점을 지녀 최근 미생물을 이용하여 값싼 기질로부터 생체고분자를 생산하고자하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁾ Poly- β -hydroxybutyric acid(PHB)의 일반적 구조는 D(-)- β -hydroxybutyric acid를 구성 단위로 하며 물에 불용성인 광학활성 polyester로서 용융점이 170~180°C로서 비교적 높고 결정성이 좋으며 강도가 높고, 열 가소성이 있어서 사(絲)상이나 필름상으로 성형할 수 있고, 생물학적 분해가 가능하다. 따라서 합성 플라스틱에 의한 오염이 심각한 사회문제가 되고 있는 오늘날 합성플라스틱의 대체 신소재로서의 용도가 기대되고 있다.^{2,3)} PHB는 가스의 차단효과가 우수하기 때문에 각종 필름의 제조에 사용될 수 있으며, 수술의 봉합사, 약제의 서방성(徐放性) 캡슐, 여러가지 포장재나 병, 그리고 의약합성의 전구체로서의 이용법 등이 검토되고 있다.²⁾

이러한 PHB의 생산에 있어서 탄소자원을 얼마나 경제성있는 자원을 사용하느냐 하는 점이 매우 중요한 요소가 되는데 methanol은 가격이 저렴하며, 자원이 풍부하여 기질공급이 원활하고, 순도가 높고, 물과의 혼합성이 좋은 장점을 가지고 있다.⁴⁾ 본 실험에서는 methanol을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 미생물인 *Pseudomonas sp.* ILS-003 균주를 이용하여 methanol로부터 PHB 생산의 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험실에서 토양으로부터 분리한 methanol을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Pseudomonas sp.* ILS-003 균주를 사용하였다.⁵⁾

배지

본 배양배지로는 methanol 0.79 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g/l, K_2HPO_4 3.0 g/l, KH_2PO_4 4.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l, Trace elements 10 ml/l(CaCl_2 1.1 g/l, ZnSO_4 0.4 g/l, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.24 g/l, H_3BO_3 0.06 g/l)를 함유하는 배지를 사용하였으며, 2가 금속이온의 영향조사 배지는 본 배양배지의 미량원소에 포함된 각각의 금속이온이 제외된 배지를 사용하였으며, 균주의 보관에는 본 배양배지에 1.7% 한천이 포함된 평판 및 사면배지를 사용하였다.

Methanol의 분석

Methanol의 분석은 gas chromatography⁶⁾를 사용하였다.

PHB의 정성 및 정량분석

PHB의 정성 및 정량분석은 Brauneegg 등⁷⁾의 gas chromatography 방법을 사용하였다. Column 물질은 chro-

Key words : Methanol, poly- β -hydroxybutyric acid(PHB)
Corresponding author : W. G. Bang

mosorb GAW(60/80)에 2.0% Reoplex 400을 coating하여 사용하였다. 분석용 시료는 균체 배양액 10 ml을 취해 원심분리한 후 2 ml의 chloroform과 2 ml의 acidified methanol(3.0% sulfuric acid in methanol)을 넣은 후 100°C에서 3.5시간 가열한 후 1 ml의 증류수를 넣고 충분히 혼합해 준 후 유기용매층을 분석시료로 사용하였다.

생성된 PHB의 확인

생성된 PHB는 Infra-Red(Perkim-Elmer 684 IR spectrophotometer) spectra와 nuclear magnetic resonance (BRUKER 200 MHz NMR spectrometer) spectra를 사용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

균체생육에 미치는 methanol 농도의 영향

PHB 생산의 기질로 사용되는 methanol이 균주의 생육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 본 배양 배지에 (NH₄)₂SO₄를 3.0 g/l 넣어 생육에 충분한 양의 질소원을 함유하도록 한 배지에 methanol 농도를 변화시켜 검토한 결과가 Fig. 1에 나타나 있다. Methanol의 농도가 0.5% (v/v)인 경우에는 초기의 생육속도가 다른 농도에 비해

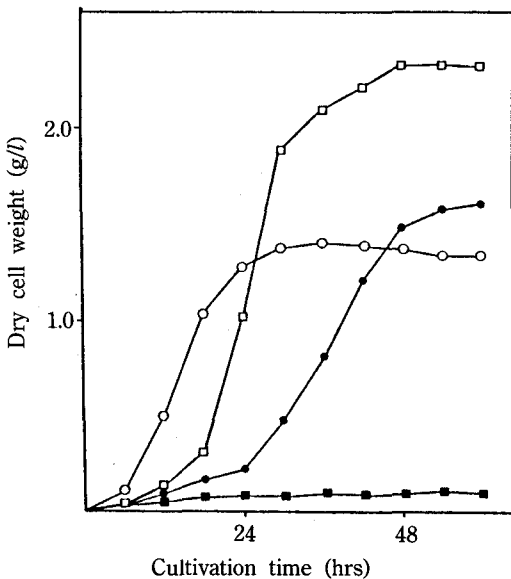


Fig. 1. Effect of methanol concentration on cell growth.

○—○ : 0.5% methanol, □—□ : 1.0% methanol, ●—● : 2.0% methanol, ■—■ : 3.0% methanol

상대적으로 빠르나 균체의 절대량이 적었으며, methanol 농도가 3.0%(v/v)이상인 경우에는 균체의 생육이 현저하게 저해됨을 알 수 있었다. Methanol 농도가 1.0%(v/v)의 경우에는 0.5%(v/v)보다 초기 생육속도는 느리나 최대 균체량은 2.37 g/l로서 1.7배 이상이었으며, 2.0%(v/v)의 methanol을 사용했을 때 보다 균체의 생육속도가 빠르고 최대 균체량도 많았다. 따라서 PHB 생산을 위한 methanol 농도는 1.0%(v/v)를 사용하였다.

PHB 생산에 미치는 질소원의 영향

PHB 생산에 미치는 질소의 영향을 살펴보기 위하여 배지의 methanol을 1.0%(v/v)로 고정한 다음 1.0%(v/v)의 methanol에 대해 질소량이 고갈되지 않도록 질소원을 C/N 비가 14.0이 되도록 첨가하여 배양한 후 PHB의 생산량을 비교 검토한 결과, Fig. 2와 같았다. 질소원으로 (NH₄)₂SO₄를 사용하였을 때, 최대 PHB 축적은 배양 52 시간째에 이루어졌으며 그 양은 0.27 g/l였다.

PHB 생산에 미치는 (NH₄)₂SO₄ 농도의 변화

미생물 균체내의 PHB 축적은 배지중의 질소원 농도, 즉 C/N 비에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다.^{2,9,10} PHB 생산에 미치는 (NH₄)₂SO₄ 농도의 영향을 조사한 결과 Fig. 3과 같았다. (NH₄)₂SO₄의 양이 0.6 g/l로서 C/N비가 23.2인 경우에는 균체량이 1.84 g/l이었으며, PHB의 양은 0.35 g/l이었으나, (NH₄)₂SO₄가 0.8 g/l 사용되어 C/N비가 17.4일 때는 균체량은 2.03 g/l였고 PHB의 양은 0.56 g/l로서 (NH₄)₂SO₄가 0.6 g/l사용되었을 때보다 균체량은 1.1배 증가하였고 PHB는 1.6배

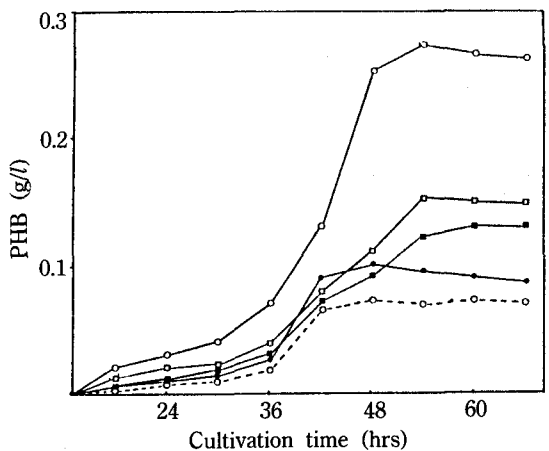


Fig. 2. Effect of nitrogen sources on PHB production.

○—○ : (NH₄)₂SO₄, □—□ : NH₄Cl, ■—■ : KNO₃, ●—● : NH₄NO₃, ○—○ : NaNO₃

증가하였다. 따라서 본 실험의 결과에서는 (NH₄)₂SO₄가 0.8 g/l로서 C/N비가 17.4일 때 최대량의 PHB가 생산되었다. 이와같은 결과는 질소결핍이 PHB를 축적시킨다는 Suzuki 등⁸⁾의 결과와도 일치하는 것이었다.

PHB 생산에 미치는 금속이온 결핍의 영향

미생물 내의 PHB의 축적은 질소결핍이나 고갈이외에 금속이온의 결핍에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 2가 금속이온의 영향을 검토하기 위하여, 충분히 질소가 존재하는 배지에 각각의 금속이온을 결핍시켜 실험한 결과, Table 1과 같았다. Table 1에서 볼 수 있는 바와같이, 2가 금속이온의 결핍은 대조구에 비해 균체의 생육은 8.5%에서 25%까지 감소하였지만, PHB 생성량은 40배에서 70배 정도 증가하는 경향을 보였다. 특히 Zn⁺⁺이온이 결핍된 경우에 균체량은 2.60 g/l로서 대조구에 비해 8.5%정도 감소하였지만 PHB의 양은 0.21 g/l로서 대조구에 비해 70배 정도 증가하여 가장 좋은

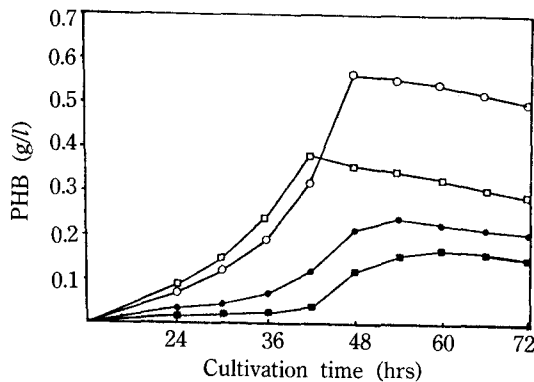


Fig. 3. Effect of concentration of (NH₄)₂SO₄ on PHB production.

□-□ : (NH₄)₂SO₄ 0.6 g/l, ○-○ : (NH₄)₂SO₄ 0.8 g/l, ●-● : (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/l, ■-■ : (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/l

Table 1. Effect of 2 valence metal ion deficiency on PHB production*

Deficient ion	Dry cell weight (g/l)	PHB (g/l)	Product yield** (%)
Control	2.84	0.03	1.1
Zn ⁺⁺	2.60	0.21	8.1
Cu ⁺⁺	2.47	0.18	7.3
Co ⁺⁺	2.31	0.16	6.9
Ca ⁺⁺	2.15	0.12	5.6

* Medium was used the nitrogen rich medium.

** Product yield : PHB/Dry cell weight×100

PHB 생산량을 보였다. 이 결과로부터 배지중에 질소원이 풍부하게 존재할지라도 금속이온이 결핍되면 PHB가 축적됨을 알 수 있었다.

PHB 생산에 미치는 pH의 영향

PHB 생산에 미치는 최적 pH를 검토하기위해 배지의 초기 pH를 6.0에서 7.0까지 변화시켰다. Fig. 4에 나타난 바와같이 균체의 생육과 PHB의 생산은 초기 pH 6.4일 때 0.56 g/l로 최적이었다.

PHB 생산에 미치는 온도의 영향

PHB 생산에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 25℃에서 35℃까지 변화시켜 균체의 생육 및 PHB 생산량을 검토한 결과 Fig. 5와 같았다. Fig. 5에서 나타난 바와같이 30℃에서 균체량은 2.03 g/l였고 PHB 양은 0.56 g/l로서 최대량 이었다.

PHB 생산에 미치는 기질 첨가의 영향

질소결핍상태에서 과량으로 존재하는 탄소원은 대부분

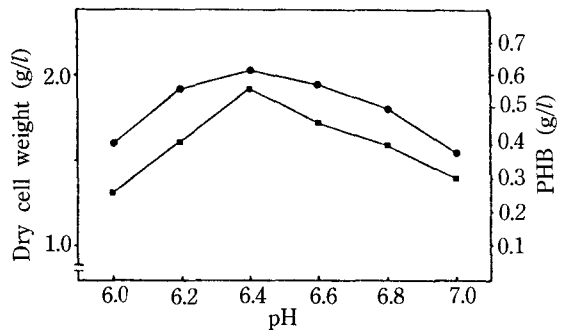


Fig. 4. Effect of initial pH on cell growth and PHB production.

●-● : Dry cell weight, ■-■ : PHB

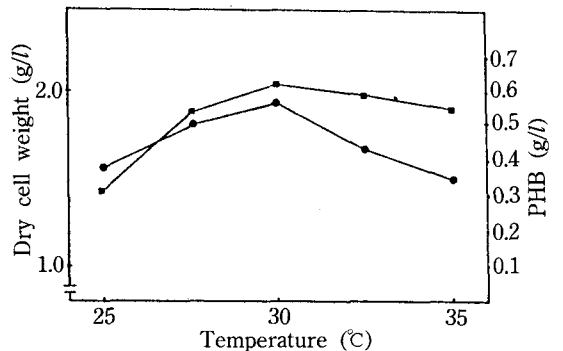


Fig. 5. Effect of temperature on PHB production.

■-■ : Dry cell weight, ●-● : PHB

PHB로 축적되는 것으로 알려져 있다.^{1,8,10)} PHB 생산에 미치는 methanol 첨가의 영향을 조사하기 위하여 methanol을 1.0%의 methanol이 거의 소모된 42시간에 0.25, 0.5, 1/0%씩 각각 최종농도가 2.0%가 되도록 첨가해주어 PHB 생산량을 비교검토하였다.

Table 2에서 볼 수 있는 바와같이, methanol을 0.25% (v/v), 12시간 간격으로 첨가해 주었을 때 균체량은 2.78 g/l로서 methanol을 첨가해 주지않은 균체량 2.03 g/l보다 약 1.4배 정도가 증가한 반면에 PHB의 생성량은 0.56 g/l에서 1.94 g/l로 증가해 약 3.4배 이상 증가하여 첨가해준 methanol중 대부분의 양이 PHB로 전환되었다. 96시간 배양한 후에 methanol의 잔량은 0.1%로서 더 이상 PHB로 전환되지 않고 남아 있었다.

PHB의 확인

생산된 PHB를 분리·정제한 후, IR 및 NMR로 분석한

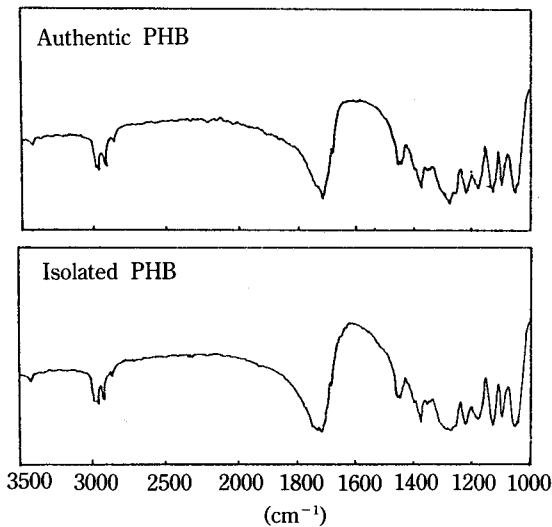


Fig. 6. Infra-red spectra of authentic and isolated PHB.

결과가 Fig. 6 및 Fig. 7에 나타나 있다. IR 분석에서는 carbonyl group(-C=O)을 나타내는 최대 흡수 peak가 1720 cm⁻¹에서 보였고 C-H peak는 2970 cm⁻¹에서 관찰되었다. 또한 ¹H-NMR 분석에서는, CH, CH₂, CH₃를 나타내는 peak가 5.2, 2.5, 1.3 ppm에서 나타나 생산된 PHB는 3-hydroxybutyric acid로 구성된 순수한 PHB로

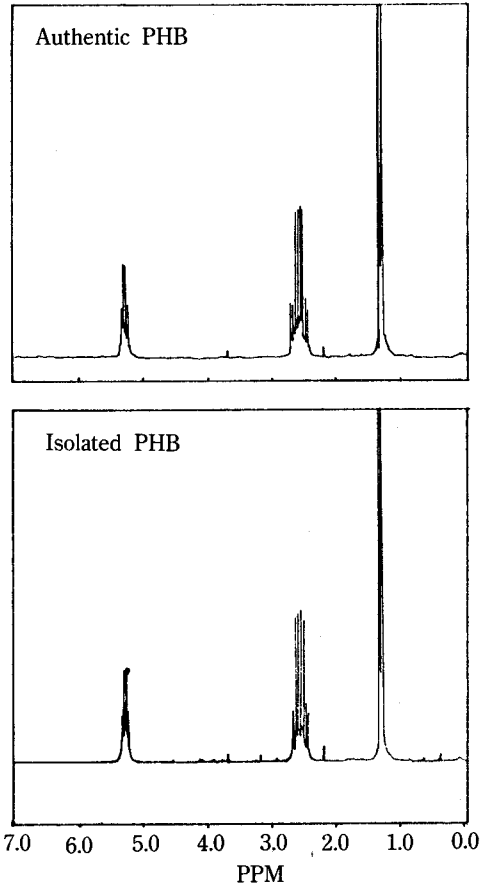


Fig. 7. ¹H-NMR spectra of authentic and isolated PHB.

Table 2. Effect of methanol feeding on production of PHB

Methanol feeding concentration (% , v/v)	No. of feedings	Feeding interval (hr)	Dry cell weight (g/l)	PHB (g/l)	Product yield* (%)
None	0	-	2.21	0.34	15.4
0.25	4	12	2.78	1.94	69.8
0.5	2	24	2.83	1.85	65.4
1.0	1	-	2.61	1.53	58.6

*Product yield : PHB/Dry cell weight×100

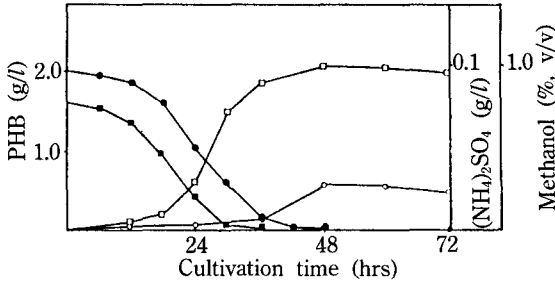


Fig. 8. Time course of PHB production by batch culture.

□-□ : Dry cell weight, ○-○ : PHB, ●-● : Methanol, ■-■ : (NH₄)₂SO₄

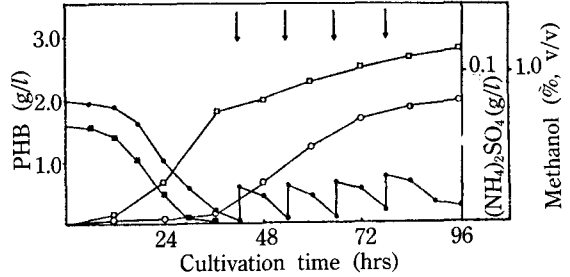


Fig. 9. Time course of PHB production by fed-batch culture with controlled methanol feeding.

□-□ : Dry cell weight, ○-○ : PHB, ●-● : Methanol, ■-■ : (NH₄)₂SO₄, —> : Methanol feeding

확인되었다.

최적 조건에서의 PHB의 생산

1) Batch culture

상기의 조건하에서 batch culture를 수행하여 배양 시간에 따른 균체 증식, 기질소모, 질소결핍 및 총 PHB 생산량을 조사한 결과가 Fig. 8에 나타나 있다. Fig. 8에서 볼 수 있는 바와같이, 기질인 methanol은 48시간에 전량 소모되었으며 질소결핍은 36시간에 형성되었고, 48시간 배양시 균체량은 2.03 g/l였고, PHB 생성량은 0.56 g/l로서 건조 균체량의 27.6%였으며 48시간이후에는 시간이 경과함에 따라 균체량 및 PHB 생산량은 점차 감소하는 경향을 보였다. 본 균주의 비증식 속도(μ_{max})는 0.14 hr⁻¹이었으며, 증배시간(td)은 5 hr였다.

2) Fed-batch culture

상기의 조건하에서 fed-batch culture를 수행하여 배양 시간에 따른 균체증식, 기질소모, 질소결핍 및 PHB 양을 조사한 결과가 Fig. 9에 나타나 있다. 질소결핍이 형성되고 기질인 methanol이 완전 소모된 36시간째 me-

thanol을 0.25%(v/v)씩, 12시간 간격으로 첨가해 주어 배양하였을 때, 첨가해 준 methanol이 더 이상 PHB로 축적되지 않는 96시간까지는 균체량 및 PHB 양이 증가하였으며, 96시간 배양시 균체량은 2.78 g/l로서 batch culture에 비해 1.4배 증가한 반면에, PHB의 생성량은 1.94 g/l로서 batch에 비해 3.4배 이상 증가하였으며, 건조균체량의 69.8%이었다. 이 결과는 *Pseudomonas sp. K*를 사용하여 206 g/l의 균체와 136 g/l의 PHB를 얻어 건조균체량의 66%의 PHB를 생산한 Suzuki 등⁸⁾의 보고에 비해 균체량은 적었지만 건조균체량에 대한 PHB의 생산량은 증가한 결과를 보였다.

사 사

이 논문은 1989년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며, 연구비를 지원하여 준 한국학술진흥재단에 깊은 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Byrom, D. : Trends. Biotechnol., 5 : 246(1987)
2. 清水祥一, 鈴木高廣 : 醱酵と工業, 45 : 1080(1987)
3. Lafferty, R. M. and Heinzle, E. : Chem. Rundsch., 30 : 14(1977)
4. Goldberg, I. : Process Biochemistry, 11 : 12(1977)
5. 이일석 : 고려대학교 석사학위논문(1988)
6. McNair, H. M. and Bonelli, E. J. : Basic gas chromatography, 5th Ed., p. 59, varian, U.S.A.(1969)
7. Braunegg, G., Sonnleitner, B. and Lafferty, R. M. : Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6 : 29(1978)
8. Suzuki, T., Yamane, T. and Shimizu, S. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 23 : 322(1986)
9. Suzuki, T., Yamane, T. and Shimizu, S. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 370(1986)
10. Powell, K. A., Collins, B. A. and Richardson, K. R. : Eur. Pat. Appl., 15669 : (1980)

Production of poly- β -hydroxybutyric acid by methanol assimilating bacterium, *Pseudomonas sp.* ILS-003

Il-Seok Lee and Won-Gi Bang(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : Methanol assimilating bacterium, *Pseudomonas sp.* ILS-003 was used to investigate the optimum conditions for the production of poly- β -hydroxybutyric acid from methanol. For PHB production, the optimum initial pH was 6.4 and the optimum temperature was 30°C. Also the optimum methanol concentration was found to be 1.0%(v/v). In the PHB production, (NH₄)₂SO₄ was the most effective nitrogen source and the optimum concentration was 0.8 g/l, which was equivalent to 17.4 in C/N ratio. Also, deficiency of the 2 valence metal ions in the medium had stimulating effect on PHB accumulation. Under the optimum substrate concentration, successive feeding of 0.25%(v/v) methanol was the most effective on PHB production. Under the optimum conditions, 1.94 g/l of PHB and 2.78 g/l of dry biomass were produced in 96 hours, and the yield was 69.8%(w/w).