

PHB 합성을 위한 *A. eutrophus*의 최적 배양 조건 및 부생성물의 영향 고찰

오 준 택 · *이 동 건 · 김 우 식
연세대학교 공과대학 화학공학과 및 생물산업소재연구센터
*태평양화학 중앙연구소

The Study on the Optimum Culture Conditions and Effects of by-products of *A. eutrophus* for the Biosynthesis of PHB

Joon-Taek Oh, *Dong-Gun Lee and Woo-Sik Kim

Department of Chemical Engineering and Bioproducts Research Center,
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
*Pacific Chemical Co. R & D Center

ABSTRACT

To find out the optimum conditions for the cell growth and the synthesis of PHB in *A. eutrophus*, the effects of culture conditions and extracellular by-products were investigated. Glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were optimum carbon and nitrogen sources, respectively for cell growth of *A. eutrophus*. PHB accumulation was stimulated by deficiency of nutrients such as NH_4^+ , PO_4^{3-} , and Mg^{2+} in the medium. NH_4^+ deficiency was the most suitable for PHB accumulation and PHB accumulation ratio was reached 42% of dry cell weight. The specific growth rate was increased 1.5 times by addition yeast extract in the medium, and proteins and vitamins are supposed a main factor of that effect. The extracellular products such as ethanol and butanediol were excreted under anaerobic conditions. And ethanol was found to decrease the specific growth rate.

서 론

최근 우리 나라를 비롯한 세계 각국에서 환경보전에 관한 관심이 증대되면서 미생물에 의하여 분해 가능한 플라스틱을 개발하기 위한 연구가 증가되고 있다. 그중 하나의 방법으로서 폴리부타디엔, 폴리에스테르 등과 같은 기존의 플라스틱에 전분 또는 가공된 전분을 첨가하여 공중합물로 만드는 방법으로서 경제적인 면에서는 다른 생분해성 플라스틱에 비해 유리하나, 제품의 물성이 떨어지기 때문에 사용에 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 반면에 미생물

을 이용하여 생산되는 생분해성 고분자인 PHB와 그 혼성 중합체인 PHA는 기존의 플라스틱과 유사한 성질을 가지며 성형, 용융, 방사가 자유로울 뿐 아니라 기존의 고분자와 blending이 가능하며, 체내에서 대사물질로 사용되어 생체적합성이 우수하고 부작용이 없는 등 그 무한한 잠재적 응용 가능성으로 인해 가장 주목받는 bioplastics이다[1, 3, 4]. PHB는 몇 년 전부터 영국의 ICI사에 의하여 상품[5]으로 판매되기 시작하였으며, PHB 유사제품을 생물학적으로 생산하기 위하여 세계 우수 기업체 및 대학에서 연구를 수행하고 있다.

Table 1. Operating conditions of gas chromatography for PHB, ethanol, and butanediol analysis.

Condition	PHB	Ethanol	Butanediol
Column	2m × 4mm steel	2m × 4mm steel	2m × 4mm steel
Support	Chromosorb WHP 80/100 mesh	Chromosorb WHP 80/100 mesh	Chromosorb WHP 80/100 mesh
Coated material	10% AT-1200 + 1% H ₃ PO ₄	10% AT-1200 + 1% H ₃ PO ₄	10% AT-1200 + 1% H ₃ PO ₄
Injection temp.	200°C	120°C	200°C
Column temp.	180°C	100°C	180°C
Ar flow rate	40ml/min	40ml/min	40ml/min
Injection volume	0.8μl	1.0μl	1.0μl

본 연구에서는 상업화 균주인 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599를 이용하여 여러 기질에 따른 균 증식 속도의 영향을 살펴 보고, yeast extract 등의 첨가물이 성장속도에 미치는 영향을 살펴 보았다. 또한 배지 내 용존산소의 부족으로 생성되어 균증식 속도에 저해효과를 나타내는 부생성물 중 에탄올 및 butanediol의 영향을 정량적으로 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지 조성

본 실험에서 사용한 균주는 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599이다. 예비배양은 Doi 등[17]의 조성을 사용하였다. 본 배양의 배지 조성은 Na₂HPO₄·12H₂O 4.45g/l, KH₂PO₄ 1.11g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2g/l, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.6646g/l 였으며, 기타 미량원소는 Ramsay[14]의 조성파 같도록 하였다.

배양 방법

사면 배지에 보존된 균을 삼각 플라스크에 접종시켜 24시간 동안 예비배양시켰으며, 예비배양시킨 균을 원심분리하여 세척한 후 무균 상태에서 접종하였다. 배양은 250ml 삼각플라스크에 100ml의 배지로 진탕배양기에서 행하였으며, 온도 및 pH는 각각 34°C와 7.2를 유지하였다. 변수를 달리한 각 배지에 예비배양시켜 얻은 균체를 나누어 접종시켜 균체의 활성 등에 의한 영향을 무시할 수 있도록 하였다.

분석 방법

균체 건조 질량은 분광광도계(Shimadzu Double Beam Spectrometer UV-200S)를 사용하여 배양액을 0.9% NaCl 수용액으로 희석한 후 660nm에서 optical density를 측정하고 검량선을 사용하여 건조

균체 질량으로 환산하였다. 배양액 중의 질소원의 농도는 Berthelot 반응을 이용하여 측정하였으며, 글루코오스 농도는 효소법[22]을 이용하여 측정하였다. 효소법에 쓰이는 효소 및 시약은 영동제약(주)에서 나온 상업용을 사용하였으며 다음과 같은 방법으로 분석하였다. 배지용액을 5,000rpm으로 10분간 원심분리시킨 후, 상등액 20μl를 글루코오스 산화효소가 녹아 있는 완충용액 3ml에 넣는다. 이를 37°C에서 18분간 방치시킨 후 분광광도계를 이용하여 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

PHB, 에탄올 및 butanediol의 정량분석은 Gas Chromatography(Shimadzu-7A, FID)를 이용하여 측정하였으며, PHB의 정량은 Riis 등과 같은 방법[15]을 사용하였다. PHB 및 에탄올과 butanediol 이 분석조건을 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

주요 기질의 종류 및 농도에 따른 성장 속도 변화

CH₃COONa, fructose 및 글루코오스 등을 탄소원으로 사용하여 이에 따른 각각의 증식속도 및 지연 시간(lag time)을 살펴 보았다. Doi[23] 등은 *Alcaligenes*의 기질로 CH₃COONa를 이용하여 PHB의 합성에 이용한 바 있으며, fructose는 *Alcaligenes* 및 *Pseudomonas* 등의 기질로 이용되고 있다[24]. 또한 글루코오스는 대부분의 *Alcaligenes*의 기질로 이용되고 있다.

진탕배양기에서 삼각 플라스크를 이용하여 각 변수에 따라 초기 균체량 및 기타 조건을 같도록 유지시켰다. 초기 각 탄소원의 농도는 20g/l로 하였으며, 질소원으로는 (NH₄)₂HPO₄ 2g/l를 첨가하였다. 이 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 글루코오스를 탄소원으로 사용한 경우 비증식속도가 0.093 l/h으로

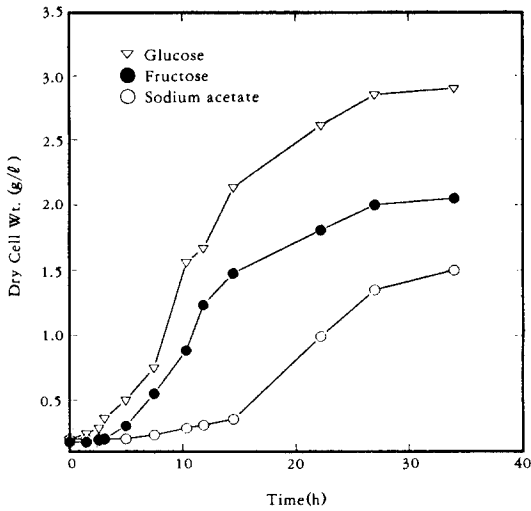


Fig. 1. Effects of carbon source on the specific growth rate of *A. eutrophus*.((NH₄)₂HPO₄ conc.=2.0g/l)

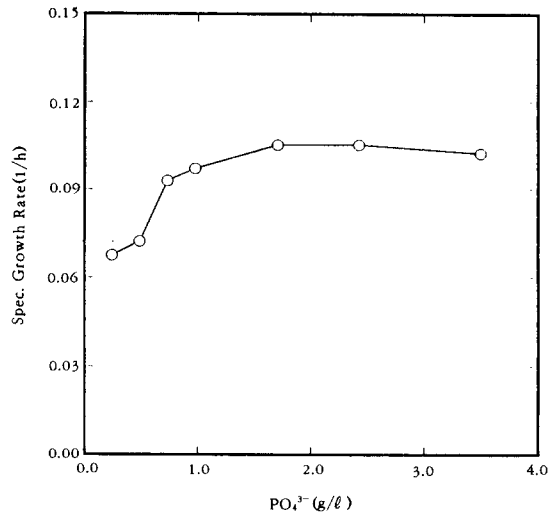


Fig. 2. Effects of PO₄³⁻ concentration on the specific growth rate of *A. eutrophus*.

Table 2. Effects of pH on growth rate and PHB synthesis rate.

	pH	5.7	6.3	6.8	7.2	8.2	9.2
0h	Dry cell wt.(g/l)	0.53					
	Dry cell wt.(g/l)	2.96	3.55	4.00	4.10	4.01	3.29
24h	PHB(g/l)	0.06	1.67	2.49	3.21	2.91	1.21
	Y _{PHB/X} (-)	0.02	0.47	0.62	0.78	0.73	0.37

- * Cultures were carried for 24 hours.
- * initial glucose and (NH₄)₂HPO₄ concentration were 20g/l and 1g/l, respectively.
- * Y_{PHB/X} is the ratio of PHB to total dry cell weight.

가장 높았으며 fructose 0.088 l/h, CH₃COONa 0.058 l/h의 순이었다. 또한 글루코오스를 사용하였을 경우 지연시간이 타 탄소 기질에 비하여 현저히 작아 본 균주의 증식에 가장 적합한 탄소원임을 확인하였다.

질소원의 종류에 따른 동화능력 및 PHB 축적에 주는 영향을 고찰하기 위하여 질소원이 각각 다른 배양액 중에서 균을 성장시키며 실험하였다. 질소원으로는 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ 그리고 NH₄Cl을 그 대상으로 하였으며 초기농도는 2g/l로 하였다. 초기 접종 농도가 같도록 하여 배양시켰을 때 24시간과 48시간 후의 균체량을 비교하였다. Table 2에

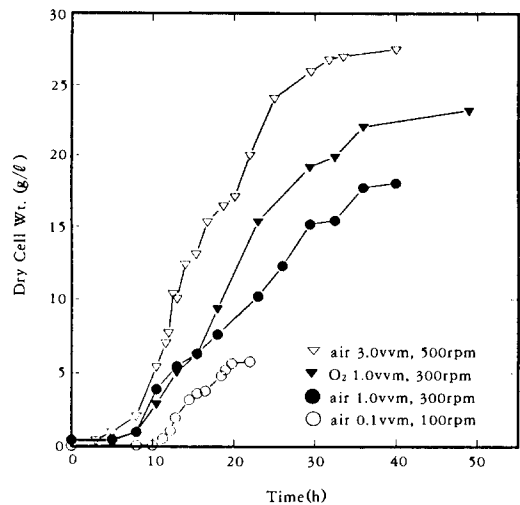


Fig. 3. Effects of aeration rate on the growth and rate and maximum attainable biomass of *A. eutrophus*.

나타낸 것과 같이 (NH₄)₂HPO₄를 사용하였을 때 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었으며 균체량에 대한 PHB 축적률은 NH₄Cl이 다소 높았으나 축적된 PHB의 절대량은 (NH₄)₂HPO₄가 큼을 알 수 있었다. 이러한 결과로 균성장속도를 고려할 때 질소원으로 (NH₄)₂HPO₄를 이용하는 것이 효율적임을 알 수 있었다.

인은 세포의 구성물질 중 C, O, N 및 H 다음으로 많은 비율을 차지하고 있고 그 질량분율은 약 3% 정도인 것으로 알려져 있으며[21], 또한 체내 구성물질 뿐만 아니라 에너지 대사에서 중요한 역할을 하고 있다. Phosphate 이온은 배지 중 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 로 이루어진 phosphate buffer의 형태로 공급하였으며, 이때 질소원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 대신 NH_4Cl 을 사용하여 질소원 중의 phosphate 이온의 영향을 제거하였다. Phosphate 이온의 농도에 따른 성장속도의 변화를 Fig. 2에 나타내었는 바, 이 결과 $1.7\text{g PO}_4^{3-}/\ell$ 에서 최고의 비증식속도를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 비증식속도에 큰 영향을 미치지 않았다.

산소 전달속도가 균 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2.5 l의 발효기를 이용하여 공급 유량 및 교반속도를 변화시켜가며 균 성장곡선을 나타내었다 (Fig. 3). 균체의 성장속도와 최대 균체량 모두 산소의 전달속도에 영향을 받았으며 최대 균체 도달량도 산소의 전달속도에 비례하여 증가하였다. 이는 균의 증식에 따라 산소 공급의 부족으로 생기는 부생성물로 인하여 균증식이 저해되는 것으로 사료된다.

제한 인자에 따른 PHB 축적률 변화

Alcaligenes 균주의 경우 ferrous, phosphate, ammonium, magnesium 및 sulfate 등의 이온이 결핍된 부적절한 성장조건(unbalanced growth condition)에서 전자공여체(electron sink)로서 poly- β -hydroxybutyrate를 축적하게 된다. 이때 PHB를 축적하기 위한 제한인자를 선택하는 것이 중요한 문제이다.

여러 제한 인자에 대한 PHB 축적률을 비교하기 위하여 예비배양을 24시간 행한 후 원심분리하여 각각의 인자를 제한한 배지에서 배양시켰다. 제한인자에 따른 PHB 축적 실험 결과를 Table 3에 나타내었다. 모든 영양분을 충분히 공급하여 주었을 경우 균 성장은 빠르나 PHB 축적률은 건조 균체량의 10% 정도로 미미하였다. PO_4^{3-} 를 제한하였을 경우 균 성장은 매우 둔화되나, PHB 축적률은 다른 경우에 비하여 비교적 높음을 알 수 있었다. Ammonium 이온과 phosphate 이온(PO_4^{3-})을 제외한 미량원소를 제한하였을 경우에는 균성장률은 높으나 PHB 축적률은 20% 내외로 비교적 낮은 축적률을 보이고 있다. Ammonium 이온을 제한하였을 경우에는 균 성장이 매우 미미하였으나 PHB가 축적되는 속도는 다른 인자를 제한하였을 때보다 빠름을 알 수 있었

Table 3. Comparisons of cell growth rate and accumulation rate of PHB according to ammonium source.

Ammonium ion source		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	NH_4Cl
Time				
0h	Dry cell wt.(g/ℓ)	1.39	1.41	1.43
	Dry cell wt.(g/ℓ)	2.52	2.76	2.69
	PHB(g/ℓ)	0.23	0.73	0.41
24h	$Y_{P/X}$	0.09	0.26	0.15
	Dry cell wt.(g/ℓ)	3.28	5.39	3.37
	PHB(g/ℓ)	0.75	1.39	1.00
48h	$Y_{P/X}$	0.23	0.26	0.30

* Initial level of ammonium source was 2g/ℓ.

으며 PHB 축적률은 42%로 타 제한인자에 비하여 비교적 높은 축적률을 나타내고 있다. 또한 ammonium 이온은 배양 중 신속하게 그 농도를 분석할 수 있으므로 시간지연이 적은 제어를 할 수 있다는 장점이 있어 PHB 축적 단계에서의 제한 인자로는 ammonium 이온이 가장 적합하였다. 본 실험에서는 질소원인 ammonium ion의 공급을 완전히 차단하여 균체 내 잔여세포질 부분의 성장을 저해하여 균 성장이 비교적 적었다. 그러나 Suzuki 등[25, 26]에 의하여 미량의 질소원을 공급하여 주는 것이 PHB 축적 향상에 도움을 줄 수 있다고 보고된 바 있다. *Pseudomonas*를 이용한 Suzuki 등[25-27]도 질소원을 제한하였을 경우, 가장 높은 축적률이 얻어진다고 보고한 바 있다.

균체 증식에 미치는 배지 첨가물의 영향

Yeast extract의 영향: 글루코오스 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 등으로 이루어진 Table 1의 배지에 yeast extract를 1g/ℓ의 농도로 첨가하여 균 성장 및 PHB 축적률을 비교하여 보았다. 초기 글루코오스 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 농도는 각각 20g/ℓ와 2g/ℓ로 하였으며, 두 개의 발효기에 예비배양을 시킨 균을 동시에 접종하여, 초기 접종 균의 활성을 같게 유지시켰다. 이 결과 yeast extract를 첨가하여 주었을 경우 첨가하지 않은 경우에 비하여 정체가 크게 줄어들었으며, 균의 비증식속도도 크게 증가하여 약 1.5배 정도 상승하였다(Fig. 4). 또한 균체량도 10g/ℓ까지 성장하여 글루코오스를 탄소원으로 사용한 경우에 비하여 매우 높은 균체량을 나타내었다.

Table 4. Accumulations of PHB according to limiting elements.

Limiting Element		PO ₄ ³⁻	Mg ²⁺	NH ₄ ⁺	Ca ²⁺	Trace	Control
Ini. dry cell wt.(g/ℓ)		4.22	3.53	3.74	3.89	4.10	4.10
27h	Dry cell wt.(g/ℓ)	4.36	5.23	3.04	4.69	4.98	6.80
	PHB(g/ℓ)	1.51	1.22	1.15	0.20	0.71	0.51
	Y _{PHB} (-)	0.35	0.23	0.38	0.04	0.14	0.08
51h	Dry cell wt.(g/ℓ)	5.41	5.41	3.61	5.12	6.55	8.91
	PHB(g/ℓ)	2.09	2.02	1.51	0.87	1.24	1.79
	Y _{PHB} (-)	0.39	0.37	0.42	0.21	0.19	0.20

Table 5. Effects of vitamins on growth rate of *A. eutrophus*.

Vitamin		Control	Vitamin B1	Riboflavin	Vitamin B6	Vitamin B12	Vitamin C
0h	Dry cell wt.(g/ℓ)	0.66					
24h	Dry cell wt.(g/ℓ)	4.21	5.22	4.87	4.30	5.07	5.14
	PHB(g/ℓ)	0.63	0.45	0.78	0.40	0.20	0.69
	Y _{PHB} (-)	0.15	0.09	0.16	0.09	0.04	0.13
48h	Dry cell wt.(g/ℓ)	9.93	9.43	9.21	9.57	9.57	9.39
	PHB(g/ℓ)	3.56	1.91	1.95	1.27	2.19	2.45
	Y _{PHB} (-)	0.36	0.20	0.21	0.13	0.23	0.26

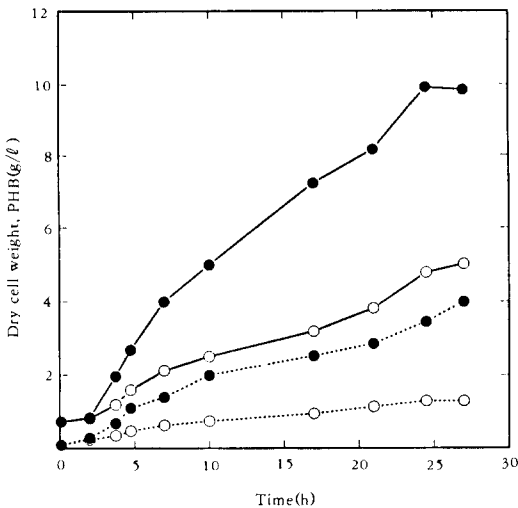


Fig. 4. Effect of yeast extract on biomass and PHB of *A. eutrophus* (●: Yeast extract containing medium, ○: Defined medium, —: Dry cell weight,: PHB)

또한 PHB 축적률에 있어서도 많은 차이가 나타남을 확인할 수 있었다. Yeast extract를 공급하여 주었을 경우에는 PHB 축적률이 건조 균체량의 50% 정도까지 축적되어 비교적 좋은 PHB 축적 결과

를 나타내었다. 이는 yeast extract의 구성 요소 중 합성 배지에는 존재하지 않으나 PHB의 축적을 촉진시키는 미량의 원소가 함유되어 있을 것으로 사료되어 비타민, 단백질 등을 비롯한 yeast extract에 함유되어 있는 원소를 배지에 첨가하여 균 성장 속도를 비교하여 보았다.

비타민, 단백질 및 기타 원소의 영향: 비타민이 균 성장 및 PHB 축적에 주는 영향을 검토하기 위해 Table 1의 배지에 비타민 B₁(thiamine), 비타민 B₂(riboflavine), 비타민 B₆(pyridoxine), 비타민 B₁₂(cyanocobalamin) 및 비타민 C(ascorbic acid) 등을 각각 0.05g/ℓ의 농도로 첨가한 후, 진탕배양기에서 배양시키며 균체량 및 PHB 축적량을 시간에 따라 측정하였다. 이 결과 24시간 배양 후 비타민을 첨가하지 않은 경우에 비하여 10% 내지 최고 25% 정도의 높은 균체량을 나타내어 균 증식을 촉진시키는 것으로 나타났다. 그러나 48시간 후의 균체량 및 PHB 축적량은 비타민의 첨가에 따라 크게 변화하지 않았다. 이는 균 성장으로 인하여 배지 내 pH가 낮아져 PHB 축적률이 낮아지기 때문으로 사료된다 (Table 5).

Egg albumin, BSA(Bovine serum albumin) 등의 단백질과 뉴클레오티드의 구성 요소가 되는 adenine, guanine 등의 질소염기, 아미노산인 alanine,

Table 6. Effect of proteins, amino acids and minor nutrients to growth rate of *A. eutrophus*.

	Control	Egg albumin	Bovine Serum Albumin	Cholesterol	Alanine	Nicotinic acid	Adenine	Guanine	Citric acid
Addition conc.(g/l)	—	1.0	1.0	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Initial dry cell wt.(g/l)	0.59	0.57	0.57	0.57	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59
Dry cell wt. at 24h(g/l)	3.94	6.22	7.52	4.08	4.35	4.03	3.68	4.50	3.88
$Y_{P/X}$ at 24(-)	0.25	0.31	0.37	0.27	0.28	0.17	0.27	0.24	0.30

* Initial Glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were 30g/l and 3g/l, respectively.

yeast extract 중에 함유되어 있는 것으로 알려진 citric acid 등을 첨가하여 24시간 후의 균체량을 측정하였다(Table 6). 이 결과 cholesterol을 제외한 egg albumin 및 BSA 등 단백질을 첨가한 경우 균체량이 첨가하지 않은 경우에 비하여 약 1.6~1.9배 정도 크게 나타난 단백질에 의하여 균 성장이 촉진되는 것으로 나타났다. Cholesterol의 경우는 물에 대한 용해도가 매우 작아(2mg cholesterol/l water) 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다. 또한 아미노산인 alanine을 첨가한 경우에도 약간의 성장 촉진 효과를 나타내었으며 다른 첨가물은 균 성장에 크게 영향을 미치지 못하였다.

이러한 결과로부터 yeast extract의 첨가에 의한 비증식속도의 증가는 주로 yeast extract 중의 단백질을 비롯한 비타민과 아미노산 등등의 미량원소의 영향임을 확인하였다.

부생성물의 영향

본 연구에서 사용된 균주인 *A. eutrophus*는 절대 호기성 균으로서, 산소가 부족할 경우 부생성물이 생기게 되며 이러한 부생성물은 균주의 성장을 저해하여 비증식속도를 감소시키며 이로 인하여 PHB의 생성속도에도 영향을 미치게 된다. 본 연구에서는 이러한 부생성물에 의한 영향을 규명하기 위하여 주요 부생성물의 확인 및 비증식속도에 미치는 영향을 조사하였다. *A. eutrophus*가 산소전달속도가 낮은 경우에 배출되는 부생성물을 확인하기 위하여 진탕 배양기에서 50rpm으로 교반시키며 24시간 배양시킨 후, 배양액을 15,000rpm으로 20분간 원심분리시켜 그 여액을 gas chromatography로 분석하였다. 그 결과 에탄올과 butanediol이 그 대부분을 이루고 있음을 확인하였으며, 이는 기존 문헌[2]의 결과와 일치한다.

부생성물 중 butanediol이 균의 증식에 미치는 영

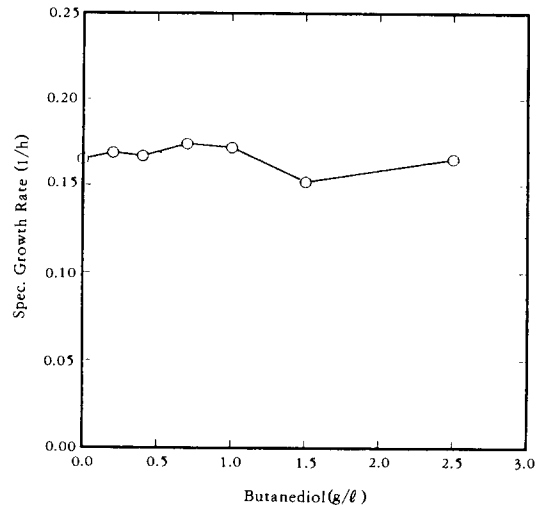


Fig. 5. Effect of butanediol concentration on specific growth rate of *A. eutrophus*.

향을 살피기 위하여 yeast extract를 2g/l 첨가한 배지에 butanediol의 초기 농도가 0.2~2.5g/l 되도록 첨가시켜 이 때 비증식속도를 측정하였다. 이 결과 butanediol의 농도가 2.5g/l 이하에서는 비증식속도에 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 5). 기존의 연구결과에 의하면 부생성물로 배출되는 butanediol 농도는 최대 2.4g/l로 알려져 있어[10] 본 연구에서는 부생성물로 생성되는 butanediol은 균성장속도에 크게 영향을 미치지 않음을 예측할 수 있었다.

다른 부생성물인 에탄올이 균의 성장에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 에탄올을 여러 농도로 배지에 첨가하여 균의 비증식속도를 비교하여 보았다(Fig. 6) 에탄올의 경우 0.4g ethanol/l 이하에서는 비증식속도에 미치는 영향을 무시할 수 있었으며 그

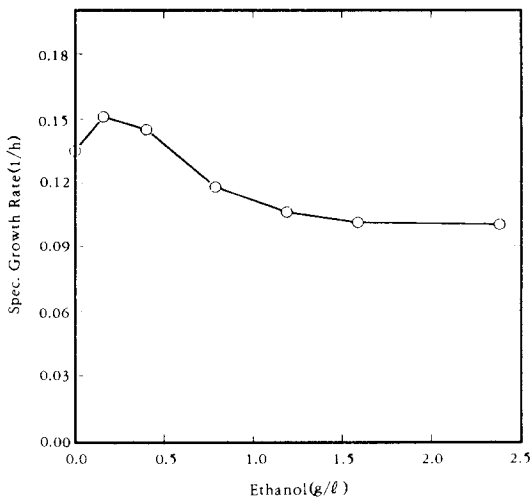


Fig. 6. Effect of ethanol concentration on specific growth rate of *A. eutrophus*.

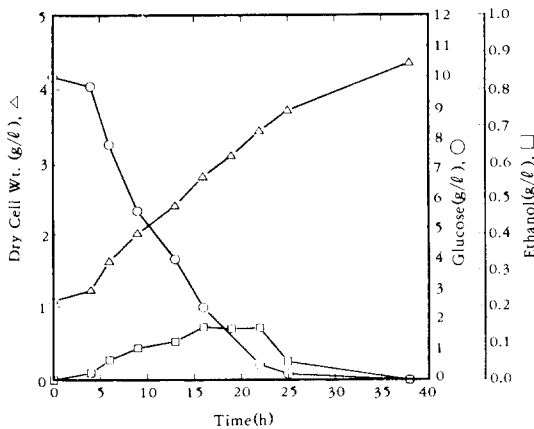


Fig. 7. Variation of ethanol concentration excreted by *A. eutrophus* according to cell growth.

이상의 농도에서는 그 농도가 커짐에 따라 비증식속도가 감소되는 것을 알 수 있다.

산소전달속도가 낮을 경우, 균 성장에 따른 에탄올의 생성속도를 측정하기 위하여 진탕배양기에서 50rpm으로 교반하며 시간에 따른 균체량과 에탄올의 생성량 등을 측정하여 보았다. Fig. 7과 같이 균이 성장함에 따라서 에탄올이 생성되었으며, 산소요구량이 낮은 배양초기부터 검출되었다. 생성된 에탄올의 농도는 균이 성장하는 시간동안 증가하다가 주 탄소원인 글루코오스가 고갈되는 시간인 배양 25시

간 후부터 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 균 성장 및 PHB 생산을 효율적으로 수행하기 위해서는 산소전달속도를 높여 부생성물인 에탄올의 생성을 억제하거나 생성된 에탄올을 연속적으로 제거할 수 있는 배양 방법의 개발 등이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

A. eutrophus 균주를 이용하여 여러 변수에 대한 균성장속도 및 PHB 축적 변화를 고찰하였다. 글루코오스 및 $(NH_4)_2HPO_4$ 를 탄소원 및 질소원으로 사용할 경우가 균 성장 및 PHB 함성에 있어서 다른 기질에 비해 효율적이었다. NH_4^{3-} , PO_4^{3-} , Mg^{2+} 등을 제한하였을 경우 PHB의 축적이 촉진되었으며, 그 중 NH_4^+ 가 가장 효율적인 제한 인자였다. Yeast extract를 기질 중에 첨가하였을 경우 성장속도가 1.5배 정도 증가하였는 바, 이는 단백질질을 비롯한 비타민과 아미노산 등의 미량원소의 영향으로 사료된다. 균 성장시 산소가 부족할 경우 배출되는 부생성물은 주로 butanediol과 에탄올이었으며, 그 중 에탄올이 균 성장에 저해 효과를 나타냄을 확인하였다.

참고문헌

1. P. P. King(1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**, 2.
2. D. Vollbrecht and H. G. Schlegel(1978), *European J. of Applied Microbiology and Biotechnology.* **6**, 157.
3. 이동호, Y. Doi and K. Soga(1988), *Polymer (Korea)*, **12**(2), 129.
4. 조종수(1986), *Polymer(Korea)*, **10**(1), 2.
5. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
6. T. Suzuki, H. Deguchi, T. Yamane, S. Shimizu and K. Gekko(1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 487.
7. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga(1986), *Macromolecules*, **19**, 1274(1986).
8. R. Repaske and A. C. Repaske(1987), *Applied and Environmental Microbiology*, **32**, 585.
9. A. J. Owen(1985), *Colloid & Polymer Sci.*, **263**, 799.
10. H. G. Schlegel and D. Vollbrecht(1980), *J.*

- Gen. Microbiol.*, **117**, 475.
11. L. W. Lowell and K. R. William(1974), *Environmental Science & Technology*, **8**(6), 575.
 12. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330.
 13. F. Srienc, B. Arnold and J. E. Bailey(1984), *Biotechnol. & Bioeng.*, **26**, 982.
 14. B. A. Ramsay, K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille and J. A. Ramsay(1990), *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**, 2093.
 15. V. Riis and W. Mai(1988), *J. Chromatography*, **445**, 295.
 16. S. Alexander and H. G. Schlegel(1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 168.
 17. Y. Doi, Y. Kawaguchi, Y. Nakamura and M. Kunioka(1989), *Appl. and Environ. Microbiol.*, **55**, 2932.
 18. R. Repaske and R. Mayer(1976), *Appl. and Environ. Microbiol.*, **32**, 592.
 19. R. Repaske(1962), *J. Bacteriol.*, **107**, 712.
 20. J. A. Asenjo and J. S. Suk(1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. **15**, 225.
 21. J. Bailey and D. F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p. 28, McGraw-Hill.
 22. G. D. Christian(1986), *Analytical Chemistry*, 4th ed., p. 625, John Wiley & Sons.
 23. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga(1986), *Macromolecules*, **19**, 2860.
 24. B. A. Ramsay, J. A. Ramsay and D. G. Cooper(1989), *Appl. and Environmental Microbiology*, **55**, 584.
 25. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 366.
 26. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370.
 27. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.