

Pseudomonas sp. HJ로부터 Polyhydroxyalkanoate 대량생산을 위한 유가식 배양

손홍주 · †이상준

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Fed-Batch Culture for Polyhydroxyalkanoate Overproduction by *Pseudomonas* sp. HJ

Hong-Joo Son and Sang-Joon Lee[†]

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

ABSTRACT

The production of polyhydroxyalkanoate(PHA) from glucose by batch and fed-batch culture of *Pseudomonas* sp. HJ was studied. In batch culture using fermentor, 400 rpm of agitation speed, 2 vvm of aeration rate, 18 hours of inoculum age, and 5% (v/v) of inoculum size were optimal. PHA production was not increased by deficiency of oxygen. In a batch culture, the final cell mass was 6.251g/ℓ, and PHA content was 20% of dry cell weight. In a constant feeding fed-batch culture, cell mass increased to 33.24 g/ℓ, and PHA content reached 48.9% of dry cell weight. In an intermittent feeding fed-batch culture, cell mass increased to 37.89g/ℓ, and PHA content reached 53.5% of dry cell weight.

서 론

합성 플라스틱에 의한 환경오염이 심각해짐으로서 environmental stress를 극복할 수 있는 합성 플라스틱의 대체물질에 관한 연구가 현재 많이 진행되고 있다. 이러한 환경오염원의 대체물질로서 미생물 기원의 다당류, polycaprolactone, polylactic acid 및 chitin, pectin 등의 천연 화합물을 원료로 한 고분자 등 많은 생분해성 고분자들이 있는데, 그 중에서 가장 주목을 받고 있는 것이 바로 polyhydroxyalkanoate(PHA) 계열의 천연 플라스틱이다. PHA 중 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)는 합성 플라스틱인 polyester와 polypropylene의 중간적인 물성을

지닌 천연 폴리에스터 계열의 신소재로서 가장 각광을 받고 있다. PHB는 1925년 Lemoigne이 *Bacillus megaterium*으로부터 최초로 분리해 내었는데(1), 대부분의 세균들이 질소, 인, 산소 등이 부족한 영양 불균형 상태에서 세포내에 축적하는 탄소원 및 에너지 저장물질로서, 인체조직과의 용화성(2, 3), 서방성(4), 압전성(5), 기체차단 효과(6), 광학활성(7), 생물 분해성(8) 등의 우수한 성질을 가지고 있다.

그러나 PHB는 녹는점이 180°C 정도로 너무 높아 melting processing동안 분자량의 감소를 초래하여 물성이 저하되는 단점이 있으며, 또한 필름, 섬유 등으로 성형시 용도에 제한을 받을만큼 부쉬지기 쉬운 bulk plastic으로 사용되기가 어렵다(9). 따라서 최근 PHB 외에 hydroxybutyric acid monomer와 C₃~C₁₀ 정도의 β-hydroxyacid monomer로 구성된

† Corresponding Author

PHA에 대한 연구가 활발히 진행중인데, 이러한 PHA는 유연성이 높고, 녹는점이 120~140°C 정도이기 때문에 PHB homopolymer가 가지는 단점을 극복할 수 있어 bulk plastic으로서의 산업적 이용가치가 매우 높다(10).

PHA를 생산하기 위해서는 PHA의 전구체로 작용하는 propionic acid, valeric acid 등의 보조 탄소원을 사용해야 하는데, 이들은 저농도에서도 세균의 생육을 저해하며(11), 가격 또한 PHA의 산업적 생산의 경제성을 제고할 만큼 비싸서 저가의 단일 탄소원으로부터 PHA를 생산할 수 있는 세균을 자연계로부터 분리하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 그러나 자연계로부터 PHA 생산균의 분리뿐만 아니라 단일 탄소원으로부터 PHA를 생산하는 균주의 분리에 대한 보고는 극히 소수이다. 즉, Dawes 등(10, 12)은 *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp. 등의 세균이 여러 종류의 탄수화물로부터 비교적 높은 함량의 HV monomer를 가지는 PHB/HV를 건조균체량의 30% 정도 생산하였다고 보고하였으며, Kim 등(13)은 단일 탄소원으로 포도당을 이용하여 *Alcaligenes* sp. SH-69로부터 3HV 함량이 3mol%인 poly(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있었다고 보고하였을 뿐이다. 그러나 이러한 보고들은 개략적인 PHA 축적에만 초점이 맞추어졌을뿐, PHA 대량생산을 위한 균체의 생육특성에 대해서는 거의 연구가 되어있지 않다. 또한 PHB의 생산을 위한 배양조건에 대한 연구는 다수 있으나, 단일 탄소원으로부터 PHA의 대량생산을 위한 발효공학적 측면에서의 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

앞서 본 실험실에서는 포도당을 단일 탄소원으로 하여 PHB/HV copolymer를 생산하는 *Pseudomonas* sp. HJ를 활성오니로부터 분리하여 균체 생육 및 PHA 생산조건 등을 보고하였는데, 단일 탄소원으로부터 PHA를 생산하는 본 균주의 특성으로 보아 대량배양시 PHA 생산원가의 절감뿐만 아니라 발효공정의 조절을 용이하게 할 수 있다는 장점이 있을 것으로 사료된다(14).

따라서 본 실험에서는 *Pseudomonas* sp. HJ를 이용하여 발효조 배양조건을 조사한 후, 유가배양을 실시하여 PHA의 대량배양 가능성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Pseudomonas* sp. HJ이

며, 발효배양을 위한 기본배지로 손 등(14)이 확립한 배지조성을 사용하였으며, 보존용 배지로 YM 배지를 사용하였다. 보존용 사면배지로부터 1 백금이를 취하여 YM 평판배지에 3분 도말한 후, 24 시간 동안 배양하였다. 분리된 단일 집락 1개를 기본배지에 접종하여 20 시간동안 배양한 후, 본배양액에 접종하였다.

발효조 배양조건 검토

발효조 배양을 위해서 shaker flask 배양에서 결정된 최적 배양조건(14)을 기초로 하여, 최적 교반 속도, 최적 통기량, 종균의 최적 접종량, 종균의 최적 배양시간 등에 대해서 조사하였다. 또한 유가배양시 용존산소가 PHA 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 1차 배양한 균체 1.5g/l를 용존산소가 포화도의 5%, 20%, 40%, 60%로 각각 단계적으로 조절된 2차 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 건조균체량과 균체내의 PHA 함량을 측정하였다. 이때 통기량과 교반속도는 미리 설정한 용존산소의 포화도를 유지할 수 있도록 자동적으로 조절되었으며, 사용된 발효조는 B. Braun Co.의 Biostat[®] E였다.

배양방법

생육 최적조건에서의 균체 생육특성과 PHA 축적을 등을 검토하고, 유가배양에 필요한 기초자료를 얻기 위하여 1% 포도당, 0.2%(NH₄)₂SO₄가 함유된 생육 최적배지에 종배양액을 5%(v/v) 접종하여 24 시간동안 회분배양하였다. 이때의 배양조건은 37°C, 400rpm, 2vvm이었으며, pH는 조절하지 않았다.

탄소원에 의한 균체 생육과 PHA 생산에 대한 저해효과를 방지하기 위하여 발효조내에 각종 영양원을 추가적으로 공급하는 constant feeding fed-batch culture와 intermittent feeding fed-batch culture를 실시하였다. 이때 발효조내로 공급되는 각 feeding medium의 조성은 Table 1과 같았다. Constant feeding fed-batch culture의 경우, 생육 최적배지에 종배양액을 5%(v/v) 접종하여 배양하다가 배양액내의 포도당이 거의 고갈되었을 때 medium I과 II를 각각 2ml/min의 속도로 공급하였으며, 또한 균체 생육을 향상시키기 위하여 medium III를 2ml/min의 속도로 공급하다가, PHA 생산조건으로 전환시키기 위하여 medium IV를 2ml/min의 속도로 공급하였다. 이때의 배양조건은 37°C,

Table 1. Composition of feeding media for fed-batch culture

Medium I	Glucose	10%
Medium II	Glucose	10%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%
Medium III	Glucose	30%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6%
Medium IV	Glucose	30%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6%
Medium V	Glucose	70%
	K ₂ HPO ₄	1.5%
	KH ₂ PO ₄	0.9%
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.06%
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.006%
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.003%
Medium VI	(NH ₄) ₂ SO ₄	20%
Medium VII	Glucose	70%

400rpm, 2vvm이었으며, 3N NaOH와 3N KOH를 1 : 2(v/v)의 비율로 혼합한 알칼리 용액과 2 N HCl을 사용하여 pH 7.0이 자동적으로 유지되도록 하였고, 소포체로는 10% silicone oil을 사용하였다. Intermittent feeding fed-batch culture의 경우, 상기와 동일한 조건으로 배양하다가 배양액내의 잔존 포도당의 농도가 5g/l 이하가 될 때마다 medium V를 간헐적으로 일시에 공급하였으며(배양액내의 glucose 농도가 10~16g/l 가 되도록 하였다), PHA 생산조건으로 전환시키기 위하여 medium VII을 배양액내의 잔존 포도당 농도를 공급 지표로 하여 간헐적으로 일시에 공급하였다. 이때 배양 조건은 37°C, 400~800rpm, 2~5vvm이었으며, pH는 7.0으로 자동적으로 조절되도록 하였다.

Residual biomass는 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$X_{\text{residual}} = X_{\text{total}} - X_{\text{PHA}}$$

여기서 X_{total} 은 total dry cell weight(g/l)를, X_{PHA} 는 total dry cell mass 내에 함유된 PHA weight(g/l)를 나타낸다.

분석방법

생육도의 측정을 위해 분광광도계를 이용하여

660nm에서의 흡광도를 측정하였거나, membrane filtration method에 의한 건조균체량으로 직접 cell mass를 측정하였다. 건조균체량은 배양액중의 균체를 생리적 식염수로 2 번 세척한 후, 0.2µm의 pore size를 가진 membrane filter로 집균하여 100°C에서 항량이 될때까지 건조함으로써 그 중량을 측정하였다. 경우에 따라서는 균체 현탁액의 OD와 건조균체량과의 표준곡선으로부터 간접적으로 측정하였다. 배양액의 포도당의 정량은 DNS에 의한 환원당 정량법(15)으로, 암모늄 이온의 정량은 indophenol blue method(16)로 실시하였다. 균체의 PHA 및 HV mol%의 정량은 GC로 실시하였으며, GC 분석을 위한 전처리 방법은 Braunegg(17)의 방법을 이용하였다. GC 작동조건 및 PHA의 추출정제는 전보(14)와 동일하였다. 이때 PHA의 HV mol%는 PHB/HV중 HV fraction의 몰함량을 나타낸다.

결과 및 고찰

발효조 배양 조건

교반속도는 oxygen transfer rate(OTR)에 영향을 미칠뿐만 아니라 미생물이 이용할 수 있는 각종 영양원의 mass transfer rate에도 큰 영향을 미친다(18, 19). 따라서 교반속도에 따른 균체 생육을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 교반속도가 증가함에 따라 균체의 생육도 증가하였으며, 300rpm 이하에서는 400rpm 이상보다 상대적으로 균체 생육이 저조하였다. 이것은 아마 300rpm 이하의 교반속도로는 생육에 충분한 정도의 OTR을 나타내지 못하며, 또한 세포에 의해 이용될 수 있는 미세한 산소를 충분히 만들수 없기때문에 상대적인 생육이 저조한 것으로 판단된다. 가장 우수한 균체 생육을 나타내었던 400rpm을 최적 교반속도로 결정하였다.

일반적으로 호기성 미생물의 배양에 있어서, 물에 대한 산소의 용해도는 8 ppm 정도로 매우 작기때문에 용존산소가 결핍되는 현상이 발생하게 되며 특히, 고농도 세포배양을 하는 반응조내에서는 산소의 부족이 심각한 문제가 될 수도 있다(20). 따라서 최적 통기량을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 2 및 3 vvm에서 최적의 균체 생육을 나타내었으며, 4vvm 이상에서는 foam이 대량으로 발생하여 상당량의 균체가 발효조 벽면에 부착하는 현상과 함께 균체 생육이 감소되었다. 이것은 높은 초기

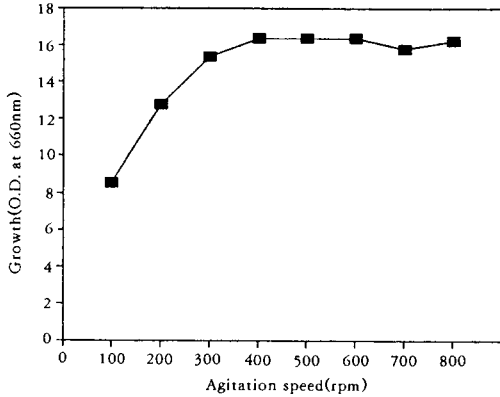


Fig. 1. Effect of agitation speed (rpm) on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out at 1vvm.

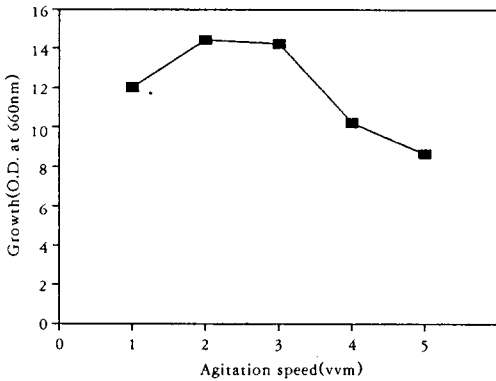


Fig. 2. Effect of aeration rate on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out at 400rpm.

산소농도에서 본 공시균이 생육저해를 받는다는 것을 의미한다. 따라서 2vvm을 최적 통기량으로 결정하였다.

발효조내의 균체량의 증가는 종배양액의 균체량에 비례하지만, 종배양액을 적당량 이상 접종하면 배지내의 각종 영양원이 희석될 뿐만 아니라, 종배양액 내에 축적된 노폐물이 많이 혼입되어 세포의 노화를 촉진하게 되므로 성공적인 배양을 수행할 수 없다 (19). 따라서 발효조 배양시 종균의 접종량에 의한 균체 생육의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 1% (v/v)의 종균을 접종한 경우 약 7시간 정도의 유도기가 관찰되었으며, 5% (v/v) 이상의 종균을 접종하였을 때에는 유도기가 관찰되지

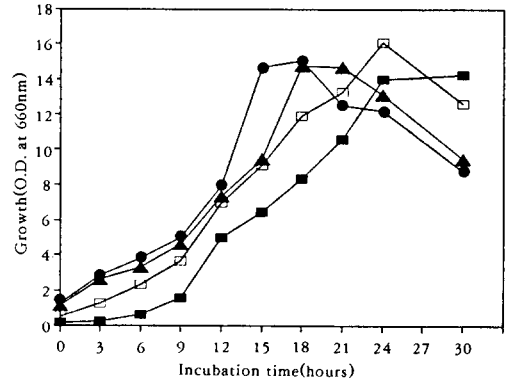


Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ. ■, 1%; □, 5%; ▲, 10%; ●, 15%.

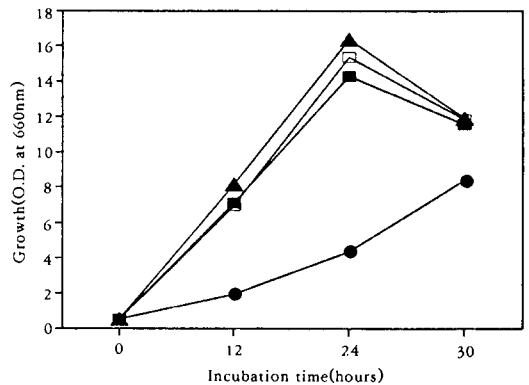


Fig. 4. Effect of inoculum age on the growth of *Pseudomonas* sp. HJ. Inoculum size was 5%. ■, 11 hours; ▲, 18 hours; □, 24 hours; ●, 30 hours.

않고 접종과 동시에 곧 바로 대수증식기로 이행되었다. 10% (v/v) 및 15% (v/v)의 종균을 접종하였을 경우, 5% (v/v)의 종균을 접종하였을 때보다 배양시간은 6시간 정도 단축되었으나 최종세포농도는 다소 낮았다. 이것은 종균량이 많아짐으로서 배양초기에 포도당을 비롯한 각종 영양원이 희석된 결과에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 최적 종균 접종량은 5% (v/v)로 결정하였다.

아울러 최적 종균 배양시간을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 대수기 초기, 중기, 말기 및 정지기인 배양 11, 18, 24, 30시간대의 종균을 각각

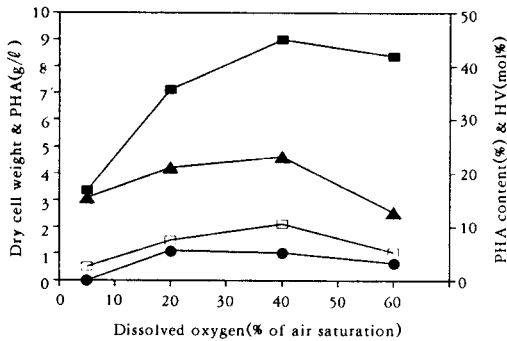


Fig. 5. Effect of dissolved oxygen on the PHA production with optimal growth medium. The cell concentration of 1.5g/l grown in optimal condition at the first stage was inoculated to optimal growth medium.
 -■-, dry cell weight; -▲-, PHA content;
 -□-, PHA weight, -●-, HV.

5% (v/v)씩 접종하여 배양하였을 경우, 균체 생육의 큰 차이는 나타나지 않았다. 그러나 정지기에 돌입한 배양 30시간대의 종균을 접종한 경우 균체 생육은 크게 감소하였는데, 정지기에서는 세포의 노화와 동시에 사균(dead cells)이 존재하므로 새로운 배지에 적응하는데 시간이 많이 소요되고, 상대적으로 균체 생육이 저조한 것으로 판단된다. 따라서 가장 우수한 균체 생육을 나타내었으며, 종배양 시간을 단축할 수 있는 대수기 중기인 배양 18시간대의 종균을 최적 종균 배양시간으로 결정하였다.

용존산소가 PHA 생산에 미치는 영향

호기성 세균에 있어서 최종 전자수용체가 충분히 공급되지 않는다면 PHA가 합성됨으로써 reducing equivalent 공급을 위한 "electron sink"로서 작용한다고 알려져 있으며, 또한 일부 세균의 경우, limited aeration condition에서 배양할 때 PHA 합성이 촉진된다고 알려져 있다(21). 따라서 용존산소가 균체 생육과 PHA 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 용존산소의 농도를 포화도의 40~60%로 조절하였을 경우에 균체 생육이 우수하였으며, 5%로 조절하였을 때에는 균체 생육이 상당히 저조하였다. 또한 PHA 축적율은 용존산소의 농도를 포화도의 20%와 40%로 조절하였을 경우에 21% 및 23%를 나타내었으나 5% 및 60%로 조절하였을 때에는 15.4% 및 12.8%로 나

타났다. 그리고 HV monomer는 용존산소의 농도를 포화도의 5%로 조절하였을 경우 합성되지 않았으며, 20~60%의 경우는 3.2~5.6mol%로 HV 함량의 증가가 크게 변화하지 않았다. 이것은 Steinbuechel 등(22)의 연구와 비슷한 결과를 보여주었다. Suzuki 등(23)은 *Pseudomonas* sp. K의 경우 용존산소를 제한하였을 때 균체 생육과 PHB 축적율이 매우 저조하였다고 보고하였는데, 본 공시균 역시 비슷한 결과를 보여주었다. 호기성 세균에 있어서 용존산소의 부족은 세포내의 에너지 대사가 원활하게 운영되는 것을 저해함으로써 균체 생육에 필요한 생합성 에너지 및 여러가지 중간 대사산물, PHA 합성에 필요한 에너지 및 acetyl-CoA, propionyl-CoA 등의 PHA comonomer 전구물질을 충분히 공급할 수 없게 하는 것으로 사료된다. 따라서 용존산소의 농도를 포화도의 5%로 제한했을 경우, 균체 생육과 PHA 축적율이 매우 저조했던 것으로 판단된다. *Azotobacter beijerinckii*의 경우 PHB 축적율이 가장 큰 영향을 미치는 요인은 질소원의 제한이 아니라 용존산소의 제한이라고 보고(21)되었는데 즉, 용존산소의 농도를 제한하였을 때 PHB 축적율이 높았으나 균체 생육은 대단히 저조하였던 반면, 용존산소를 충분한 농도로 유지하였을 때 PHB 축적율은 낮았으나 균체 생육은 우수하였다. 그러나 본 공시균에 있어서는 용존산소의 농도를 포화도의 5% 정도로 제한시켰던 경우, 균체 생육과 PHA 축적율이 모두 낮았기 때문에 용존산소의 제한이 PHA 생산을 향상시키는 요인이 아님을 알 수 있었다. 따라서 상기의 결과로 보아 본 공시균은 *Azotobacter beijerinckii*의 PHA 합성경로와 다소 차이가 있을 것으로 사료된다. 결론적으로 생육단계뿐만 아니라 PHA 생산단계에서도 용존산소를 포화도의 40% 정도로 충분하게 유지시켜 주어야 함을 알 수 있었다.

회분배양

생육 최적배지에서 본 공시균을 회분배양하면서 균체 생육, residual biomass, PHA 및 HV 함량을 경시적으로 측정할 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 명확한 유도기가 관찰되지 않았는데, 이것은 생리활성이 가장 활발한 18시간대의 종균을 접종하였기 때문에, 균이 새로운 배지에 곧바로 적응하여 대수증식기로 이행된 것으로 사료된다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 거의 고갈되었고 포도당은 약 4g/l가 잔존하고 있는 16시간대부터 PHA가 생산되기 시작하여 배양

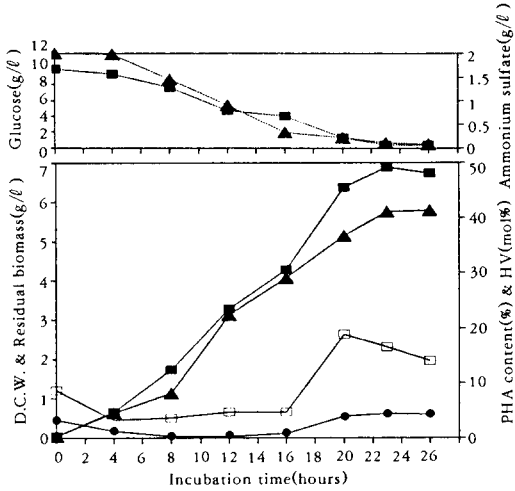


Fig. 6. Time course of batch culture of *Pseudomonas* sp. HJ.

Culture was carried out in 7ℓ jar fermentor at pH 7.0, 37°C, 2vvm, and 400rpm; glucose 1%; (NH₄)₂SO₄ 0.2%.

■, dry cell weight; ▲, residual biomass; □, PHA content; ●, HV; ■, glucose; ▲, (NH₄)₂SO₄.

20시간에 건조균체량의 약 20%에 해당하는 PHA가 생산되었다. 배양 20시간 이후부터 PHA 함량이 감소하기 시작하였는데, 이때 포도당이 완전히 고갈된 것으로 보아 세포내에 축적된 PHA가 다시 탄소원으로 이용된 것으로 사료된다. 이것은 PHA 함량이 감소하지만 residual biomass는 약간 증가하는 것으로서 알 수 있었다. HV 함량은 PHA 함량과 동시에 증가하기 시작하여 배양 26시간만에 약 4.3mol%까지 축적되었다. 배양 24시간만에 건조균체량은 6.87g/ℓ를 얻었다. 배양초기에 PHA 함량이 높은 것은 종균 세포내에 축적된 PHA에 기인하는 것으로 추측된다.

Constant feeding fed-batch culture

Pseudomonas sp. HJ에 의한 PHA 생산을 향상시키기 위하여 유가배양을 실시하였다. Constant feeding fed-batch culture는 feeding medium의 종류와 그 구성성분에 따라 3 type으로 구분하여 실시한 결과는 다음과 같다.

포도당 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%가 함유된 생육 최적배지에서 배양하면서 배양액내의 잔존 포도당의

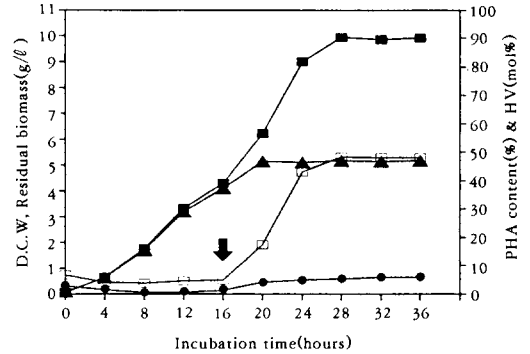


Fig. 7. Time course of constant feeding fed-batch culture type I of *Pseudomonas* sp. HJ.

Culture was carried out in 7ℓ jar fermentor with optimal growth medium and then constant feeding(2ml/min) of medium I after 16 hour. Arrow indicates starting point of feeding.

■, dry cell weight; ▲, residual biomass; □, PHA content; ●, HV.

농도가 4g/ℓ 이하인 16시간대부터 medium I을 2ml/min의 속도로 일정하게 공급하여 PHA 생산을 유도한 결과(type I)는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 명확한 유도기가 없이 배양 16 시간만에 4.29g/ℓ의 건조균체량을 얻을 수 있었고, PHA 생산량은 건조균체량의 4.8%이었다. 이때부터 medium I은 공급하였는데, 이와 동시에 PHA 생산량은 증가하기 시작하여 배양 28시간만에 9.92g/ℓ의 건조균체량과 48.1%의 PHA 축적율을 나타내었다. 배양 20시간부터 residual biomass의 증가없이 건조균체량은 9.92g/ℓ까지 증가한 것으로 보아 공급된 포도당이 세포 구성물질의 합성에 이용되지 않고, PHA 합성에만 이용된 것으로 판단된다. 즉 질소원이 완전히 고갈된 후, 새로이 질소원을 공급하지 않았기 때문에 residual biomass는 전혀 증가하지 않았던 것으로 사료된다. HV 함량은 배양 32시간만에 5.8mol%까지 축적되어 회분배양에 비하여 약간 높은 함량을 나타내었다.

각 C/N molar ratio에서의 PHA 축적율을 검토한 결과, PHA 축적율은 탄소원만 첨가하였을 때 보다도 C/N molar ratio 95.2로 조절된 경우 향상(14)되었음을 알 수 있었다. 따라서 상기와 동일한 조건으로 배양하면서 배양액내의 잔존 포도당의 농도가 4g/ℓ 이하인 16시간대부터 C/N molar ratio

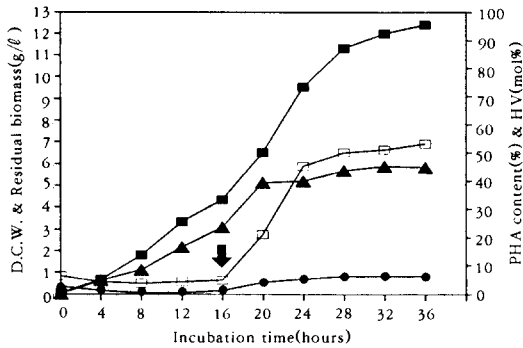


Fig. 8. Time course of constant feeding fed-batch culture type II of *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out in 7 l jar fermentor with optimal growth medium and then constant feeding(2ml/min) of medium II after 16 hour. Arrow indicates starting point of feeding. -■-, dry cell weight; -▲-, residual biomass; -□-, PHA content; -●-, HV.

가 95.2인 medium II를 2ml/min의 속도로 일정하게 공급하여 PHA 생산을 유도한 결과(type II)는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 상기의 포도당 용액만 공급한 경우와 마찬가지로 배양 16시간부터 PHA 축적율이 증가하기 시작하여 배양 36시간만에 12.40g/l의 건조균체량과 53.2%의 PHA 축적율을 나타내었다. 배양 24시간부터 residual biomass의 완만한 증가가 있었고, PHA 축적율도 포도당만 함유된 medium I만을 공급하였을 때보다 약 5% 정도 증가하였다. 이러한 결과는 질소원을 세포의 생리활성을 최소한으로 유지할 수 있을 정도로 공급할 때 PHA 축적율은 증가한다는 Suzuki 등(23)의 보고와 일치하였으며, 각 C/N molar ratio에서의 PHA 축적율 검토 결과를 다시 한번 확인 할 수 있었다.

위와 같이 PHA 축적을 위한 조건으로만 배양시 생성된 건조균체량은 9~12.4g/l 정도로 미약하였다. 따라서 균체 생육을 향상시키기 위하여 공급되는 배지의 종류를 이원화하였다. 즉 상기와 동일한 조건으로 배양하면서 배양액내의 포도당 농도가 4g/l 이하인 15시간부터 C/N molar ratio가 9.5로 조절된 medium III를 2ml/min의 속도로 공급하면서 배양하다가, 건조균체량이 19.83g/l에 도달하였을 때 인 배양 30시간부터 C/N molar ratio가 95.2로

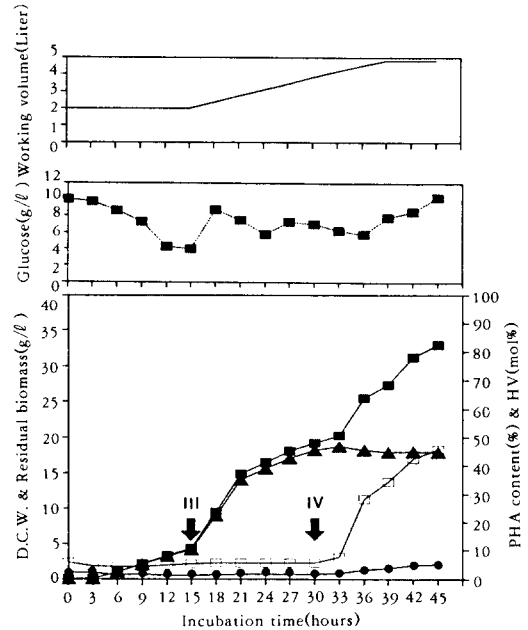


Fig. 9. Time course of constant feeding fed-batch culture type III of *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out in 7 l jar fermentor with optimal growth medium and then constant feeding(2ml/min) of medium III after 15 hour, and constant feeding(2ml/min) of medium IV after 30 hour. Arrows indicates starting points of feeding. -■-, dry cell weight; -▲-, residual biomass; -□-, PHA content; -●-, HV; -■-, glucose; —, working volume.

조절된 medium IV를 2ml/min의 속도로 공급하였다. 그 결과(type III)는 Fig. 9에서 보는 바와 같다. 배양 30시간만에 19.83g/l의 건조균체량과 16.72g/l의 residual biomass를 얻을 수 있었으며, 이때의 PHA 축적율은 5~9%이었다. 배양 30시간 이후부터 medium IV를 공급했을 때 residual biomass의 큰 증가없이 건조균체량은 증가하기 시작하였는데, 배양 45시간만에 33.24g/l를 얻을 수 있었고 이때 PHA 축적율은 48.9%이었다. 배양 24시간 이후부터 배양액내의 잔존 포도당의 농도는 5~8g/l로 비교적 일정하게 유지되었으나 배양 39시간부터 증가하기 시작하였다. 비록 건조균체량과 residual biomass가 앞의 결과보다 크게 향상되었으나 초기

Table 2. Comparison of batch and fed-batch cultures by *Pseudomonas sp.* HJ

Culture type	Cell mass (g/ℓ)	PHA wt. (g/ℓ)	P/X ^a (%)	Y _{X/S} ^b	Y _{P/S} ^c	Productivity ^d (g/ℓ/h)	Culture time ^e (h)
Batch	6.251	1.25	20	0.62	0.125	0.0625	20
Fed-batch							
Constant feeding							
type I	9.916	4.769	48.1	0.23	0.109	0.3814	26
II	12.401	6.597	53.2	0.21	0.11	0.3445	36
III	32.241	16.254	48.9	0.32	0.168	0.7165	45
Intermittent feeding	37.893	20.273	53.5	0.38	0.207	0.8421	45

^a PHA content(% of dry cell weight).

^b Yield coefficient for cell mass formation with respect to carbon consumption(g cell/g glucose).

^c Yield coefficient for PHA formation with respect to carbon consumption(g PHA/g glucose).

^d Gram produced PHA/ℓ/h.

^e Time to reach maximal amount of PHA.

배지부피 2ℓ에 약 3ℓ의 새로운 배지가 공급되었고, 또한 pH를 자동으로 조절하기 위해 사용된 NaOH가 약 600ml 정도 공급됨에 따른 균체 회석 효과가 있었다. 따라서 이러한 균체 회석효과를 제거하면 더욱 많은 균체량이 생산되리라 사료된다.

Intermittent feeding fed-batch culture

균체 회석효과를 감소시키기 위하여 고농도의 포도당이 함유된 용액을 일정하게 공급하는 방법을 생각할 수 있으나, 포도당을 고농도로 농축시 용액의 점도로 인해서 일정한 공급속도를 유지할 수 없었고, 또한 고농도 용액을 발효조내로 공급시키기 위해서는 연동펌프의 rpm이 굉장히 적어야 하는데, 연동펌프의 기계적 한계로 인하여 저속의 rpm을 유지할 수 없었다. 그리고 constant feeding fed-batch culture로는 배양액내의 포도당과 (NH₄)₂SO₄의 농도를 균체 생육과 PHA 축적에 최적인 농도로 각각 유지할 수 없었다.

따라서 배양액내의 포도당이 거의 고갈되었을때마다 고농도의 포도당이 함유된 배지를 간헐적으로 공급하는 intermittent feeding fed-batch culture를 실시하였다. 포도당이 완전히 고갈되었을때, 고농도의 포도당이 첨가되면 세포의 활성에 영향을 미쳐 균체의 생육도가 저하되는 것으로 알려져 있다(18). 따라서 배양액내의 잔존 포도당의 농도가 0.5% 이하가 되었을때마다, 70% 포도당 용액과 질소원을 제외한 각종 무기염의 농도가 생육 최적농도보다 3배 농축된 medium V를 최종농도 1~1.5%가 되도록

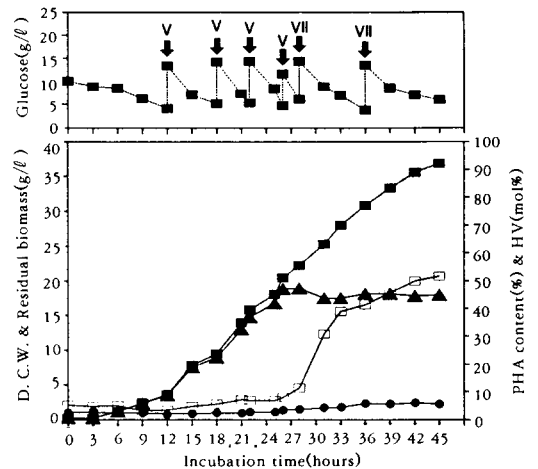


Fig. 10. Time course of intermittent feeding fed-batch culture of *Pseudomonas sp.* HJ.

Culture was carried out in 7ℓ jar fermentor with optimal growth medium and then intermittent feeding of medium V, VI, VII for cell mass and PHA production.

-■-, dry cell weight; -▲-, residual biomass; -□-, PHA content; -●-, HV; -■-, glucose.

록 일시에 공급하였으며, 배양액내의 잔존 (NH₄)₂SO₄의 농도가 0.5% 이하가 되었을때마다, 20% (NH₄)₂SO₄로 구성된 medium VI를 최종농도 0.1~0.4%가 되도록 일시에 공급하였다. 그리고 전조균

체량이 24.83g/l 에 도달하였을때인 배양 29시간부터 PHA 생산조건으로 전환하기 위하여, 배양액내의 잔존 포도당의 농도가 0.5% 이하가 되었을때마다, 70% 포도당으로 구성된 medium VII을 최종농도 1~1.5%가 되도록 일시에 공급하였으며, 배양액내의 잔존 (NH₄)₂SO₄의 농도가 0.01% 이하가 되었을때마다, medium VI을 최종농도 0.02~0.04%가 되도록 일시에 공급하였다. 그 결과는 Fig. 10에서 보는 바와 같다. 배양 45시간만에 37.89g/l 의 건조균체량과 53.5%의 PHA 축적율을 얻을 수 있었다. PHA 생산조건으로 전환하자 residual biomass의 증가없이 PHA 축적율은 증가하기 시작하였으므로, 공급된 포도당이 균체 생육보다는 PHA 합성에 이용된 것으로 사료된다. 이때 HV 함량은 약 7.5mol %까지 증가하였다. 따라서 고농도의 배지를 간헐적으로 공급함으로써, constant feeding fed-batch culture보다 균체 및 PHA의 생산성이 더욱 향상되었음을 알 수 있었다.

각 배양방법에 따른 균체와 PHA의 생산량 및 수율은 Table 2에서 보는 바와 같다. 이때 발효조내로 첨가된 acid 및 alkali solution과 소포제에 의한 희석효과는 고려하지 않았다. 유가배양이 회분배양에 비하여 균체량, PHA 생산량 및 축적율이 높았으나, 회분배양이 소비된 탄소원에 대한 균체 생산수율 (Y_{vs})은 가장 높았다. 그리고 constant feeding fed-batch culture type III과 intermittent feeding fed-batch culture의 경우, PHA 생산수율 (Y_{ps})은 회분배양보다 높았으나, constant feeding fed-batch culture type I, II의 경우는 비교적 낮았다. PHA 생산이라는 측면에서 보면, intermittent feeding fed-batch culture가 가장 기질 이용성이 높았다. 따라서 유가배양에 의하여 PHA를 생산할 때에는 constant feeding fed-batch culture보다 intermittent feeding fed-batch culture가 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 단일 탄소원인 포도당으로부터 PHA를 생산하는 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ의 유가배양을 검토함으로써, PHA 대량생산을 위한 기초자료를 얻는데 그 목적을 두었으며 그 결과는 다음과 같다. 7l 발효조를 이용하여 배양시 교반속도 400rpm, 통기량 2vvm, 평균 배양시간 18 시간 및 평균 접종량 5%(v/v)일때 최적 생육을 나타내었

다. 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ는 용존산소의 결핍에 의해서 PHA 축적율이 향상되지 않았으며, PHA 생산단계에 충분한 수준으로 용존산소를 유지시켜 주어야 함을 알 수 있었다. 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ를 회분배양했을 때 24시간만에 6.251g/l 의 건조균체량과 20%의 PHA 축적율을 나타내었으며, constant feeding fed-batch culture로 배양 45시간만에 최고 32.24g/l 의 건조균체량과 48.9%의 PHA 축적율을 나타내었다. 또한 intermittent feeding fed-batch culture로 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ를 배양했을때, 배양 45시간만에 37.89g/l 의 건조균체량과 53.5%의 PHA 축적율을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. E. A. Dawes and P. J. Senior(1973), *Adv. Microb. Physiol.*, **10**, 135.
2. 土肥 義治(1990), 生分解性高分子材料, 工業調査會(日本), 11.
3. S. J. Holland, A. M. Jolly, M. Yasin, and B. J. Tighe(1987), *Biomaterials*, **8**, 289.
4. N. L. Uttley(1986), *BIOTECH*, **86**, 171.
5. E. Fukuda and Y. Ando(1986), *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 361.
6. F. Eiichi(1984), *Biorheology*, **21**, 75.
7. M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi, and H. Tani(1973), *Polymer*, **14**, 267.
8. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
9. B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, and D. G. Cooper(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 584.
10. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **53**, 450.
11. Y. H. Rhee, J. H. Jang, and P. L. Rogers (1993), *Biotech. Lett.*, **15**, 377.
12. G. W. Haywood, A. J. Anderson, D. R. Williams, E. A. Dawes, and D. F. Ewing(1991), *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**, 83.
13. G. J. Kim, K. Y. Yun, K. S. Bae, and Y. H. Rhee(1992), *Biotech. Lett.*, **14**, 27.
14. 손홍주, 민관필, 이상준(1995), 한국생물공학회지, **10**, 349.
15. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(1986), *Carbohydrate Analysis*, IRL Press.

16. M. W. Weatherburn(1967), *Anal. Chem.*, **39**, 971.
17. G. B. Braunegg, Sonneleitner, and R. M. Lafferty(1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29.
18. M. M. Kole, I. Draper, and D. F. Gerson (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 404.
19. S. J. Pirt(1975), *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, John wiley & Sons, New York.
20. B. G. Thompson and T. L. Walter(1986), *J. Ferment. Technol.*, **66**, 335.
21. F. A. Jackson and E. A. Dawes(1976), *J. Gen. Microbiol.*, **97**, 303.
22. A. Steinbuchel and U. Pieper(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 1.
23. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.
24. H. Zhang, V. Obias, K. Gonyer, and D. Dennis(1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1198.