

Azotobacter sp.에 의한 Butyric Acid와 Valeric Acid로부터 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)의 생산

송희주 · 이일석 · 방원기*
고려대학교 자원자원대학 농화학과

Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from Butyric Acid and Valeric Acid by *Azotobacter* sp. Hee-Ju Song, Il-Seok Lee and Won-Gi Bang*. Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea - For the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) from butyric acid and valeric acid, 10 strains of bacteria capable of producing P(3HB-co-3HV) were isolated from soil. Among them, the strain HJ-067 showed the best ability of producing P(3HB-co-3HV), and was identified as a *Azotobacter* sp. For the production of P(3HB-co-3HV), the optimum concentrations of butyric acid and valeric acid were 3.0 g/l, respectively. The most effective nitrogen source was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at an optimum concentration of 0.75 g/l, which was equivalent to 21.36 in C/N ratio. Deficiency of the cationic metal ions (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) in the production medium had stimulating effect on P(3HB-co-3HV) accumulation, especially in the manganese deficient medium. The optimum temperature for P(3HB-co-3HV) production was 27°C and the optimum initial pH was 7.0. Under the optimum conditions, 1.82 g/l of P(3HB-co-3HV) and 3.00 g/l of dry biomass were produced after 36 hour cultivation, and the P(3HB-co-3HV) yield and HV% were 60.60% (w/w), 15.92% (w/w), respectively.

오늘날 석유화학공업의 발달로 인하여 세계적으로 연간 1억톤의 플라스틱 물질이 생산되고 있으나 매년 수십톤의 플라스틱 물질이 해양에 버려지고 있을 뿐 아니라, 자연계에서 분해되지 않는 특성을 갖고 있기 때문에 합성고분자 물질에 의한 해양 생태계의 파괴 및 환경 오염 등의 문제가 제기되고 있다. 따라서 플라스틱 물질의 폐기 처리 문제와 대체 물질의 개발에 관심이 모아지고 있다(1).

합성고분자 물질의 대체 물질로 연구되고 있는 것이 생분해성 플라스틱으로 알려진 polyhydroxyalkanoic acid (PHA)로서 생물학적으로 합성되는 폴리에스테르(polyester)이다. 이러한 PHA는 원핵생물이 탄소 및 에너지 저장물질로서 세포내에 과립(직경 0.3~1.0 μm) 형태로 축적하는 생분해성 폴리에스테르이며, 이들의 단위 구성체는 D(-)-3-hydroxyalkanoic acid(C₄-C₁₂)이다(2, 3). 이러한 PHA 중에서 가장 널리 알려진 물질이 poly-β-hydroxybutyric acid(PHB)이며 특히, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(P(3HB-co-3HV))는 D(-)-3-hydroxy butyric acid와 D(-)-3-hydroxyvaleric acid가 불규칙적으로 배열된 광학 활성의 폴리에스테르 구조를 갖는 공중합체(copolymer)이다(1, 4, 5).

P(3HB-co-3HV)는 3-hydroxyvaleric acid(HV)의 mol%에 따라 다양한 물리적 특성을 갖게 되며, HV mol%의 증가(0~25%)는 녹는점(melting point)의 감소, Young's

Modulus의 감소, dynamic tensile modulus(DTM)의 감소 및 impact strength의 증가를 초래하고, P(3HB-co-3HV)를 PHB보다 더욱 더 유연하고 질기게 한다(1, 2, 5-8). 또한, 용도에 따라 HV mol%를 변화시킴으로써 물리적 특성을 조절할 수 있고, 합성고분자 물질과의 혼합에 의해서도 물리적 성질 및 생분해 정도를 조절할 수 있다(2, 7).

P(3HB-co-3HV)를 비롯하여 생물학적으로 합성되는 PHA는 자연계에서 박테리아나 곰팡이가 분비하는 extracellular PHB depolymerase에 의해 분해되는 특성을 지니고 있기 때문에 환경 오염의 문제가 없으며(1), PHA 중에서도 P(3HB-co-3HV)는 160°C 이하의 온도에서 안정한 상태로 녹기 때문에 전통적인 플라스틱 가공방법이 P(3HB-co-3HV)의 가공에 적용될 수 있다는 장점을 지닌다(9).

P(3HB-co-3HV)는 열 가소성이 있어서 실모양이나, 필름상으로 성형될 수 있으며, 이러한 P(3HB-co-3HV)의 필름은 투명하고 기체 차단 효과(특히, 산소에 대하여)가 polyolefin 필름보다도 우수하기 때문에, 농업용 비닐, 포장 재료와 같은 각종 필름들의 제조에 이용될 수 있다(10). 더우기, P(3HB-co-3HV)는 세포 독성 반응(cytotoxic response)이 없고, 생체 적합성(biocompatibility)이 우수하기 때문에, 살충제 또는 식물의 성장 조절 물질 등을 서서히 유출시키는 캡슐(controlled release capsule)로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 수술용 봉합사, 인공골절(bone plate) 등과 같이 의약 분야에도 다양하게 이용될 수 있다(1, 10).

이와같은 P(3HB-co-3HV)는 NH_4^+ , SO_4^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ,

*Corresponding author.

Key words: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), biodegradable plastic, butyric acid, valeric acid, *Azotobacter* sp.

Mn²⁺ 및 O₂ 등이 제한된 조건에서 생산되며(11), P(3HB-co-3HV)의 생산 방법에는 사용되는 탄소원의 종류에 따라 3가지로 대별될 수 있다.

첫째, propionic acid, butyric acid 및 valeric acid와 같은 alkanolic acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 방법이다.

둘째, glucose, fructose, sucrose, methanol 및 당밀의 배지에 제2의 탄소원으로 propionic acid 또는 valeric acid를 첨가하여 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 방법이다.

셋째, propionic acid나 valeric acid의 첨가없이 하나의 비관련 기질(unrelated substrate)로부터 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 방법이다.

본 실험에서는 P(3HB-co-3HV)를 생산하기 위하여 butyric acid를 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 생육할 수 있는 미생물을 토양으로부터 분리한 후, 균의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 우수한 균주를 선별, 동정하였다. 그리고 선별된 균주를 이용하여 butyric acid와 valeric acid로부터 P(3HB-co-3HV)의 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서는 경상남도 창원시 소재의 하천토양으로부터 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 생산균주 *Azotobacter* sp.를 분리, 선별하여 사용하였다.

사용배지

균주의 분리 및 선별을 위하여 사용한 분리배지(배지 I)로는 butyric acid 1.0 g/l, K₂HPO₄ 3.97 g/l, KH₂PO₄ 0.98 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.01 g/l, FeCl₃·6H₂O 0.0135 g/l, trace element 1.0 ml/l, H₃BO₃ 0.3 g/l, CoCl₂·6H₂O 0.2 g/l, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g/l, MnCl₂·4H₂O 0.03 g/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0.03 g/l, NiCl₂·6H₂O 0.02 g/l, CuSO₄·5H₂O 0.01 g/l, HCl 8.8 ml/l)를 함유하는 배지를 사용하였으며, 또한 분리균주의 전배양 및 본배양 배지(배지 II)는 분리배지에 butyric acid 3.0 g/l와 valeric acid 3.0 g/l가 같이 포함된 배지를 사용하였다.

균주의 분리

Butyric acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 생육할 수 있는 균주를 토양으로부터 분리하기 위하여 분리 배지(배지 I)를 사용하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

채취한 토양을 멸균한 0.9%(w/v) 생리 식염수에 잘 현탁시킨 후, 여과지를 사용하여 거르고 여과액을 배지 I에 1.0%(v/v)가 되도록 접종한 다음, 30°C에서 24시간 진탕 배양(120 strokes/min.)하였다. 이같은 과정을 3회

반복한 후, 배양액의 균체수를 10²~10⁴ cells/ml이 되도록 생리 식염수로 희석하였다. 희석액을 배지 I의 한천 평판 배지에 0.2 ml씩 도말한 후, 30°C에서 48시간 배양하여 생육된 균락을 백금니를 사용하여 순수 분리하였다.

P(3HB-co-3HV) 생산 균주의 선별

상기의 순수 분리한 균주들을 4.0 g/l의 butyric acid를 함유하는 배지 II가 100 ml씩 함유된 500 ml Erlenmeyer flask에 각각 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후, poly-3-hydroxybutyric acid(PHB)의 생산능력이 있는 균주들을 1차 선별하였다. 1차 선별된 10종의 균주들을 4.0 g/l의 butyric acid, 1.0 g/l의 valeric acid를 함유하는 배지 II에 상기와 같이 배양한 후, P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 우수한 균주를 2차 선별하였다.

이 균주들 중에서 P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 가장 우수한 균주를 선별하여 HJ-067로 명명하였다.

선별 균주의 배양

선별된 균주를 1.5%(w/v)의 한천이 포함된 전배양 배지에 한 백금니 접종하여 30°C에서 48시간 평판 배양한 후, 한 균락으로부터 20 ml의 전배양 배지를 함유하고 있는 100 ml Erlenmeyer flask에 한 백금니 접종하고 30°C에서 18시간 진탕 배양(120 strokes/min.)하여 전배양액으로 사용하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산을 위한 본배양은 배지 II를 100 ml 함유하는 500 ml Erlenmeyer flask에 전배양액을 1% (v/v) 되도록 접종하고 30°C에서 진탕 배양(120 strokes/min.)하였다.

정성 및 정량 분석

Butyric acid와 valeric acid의 정성 및 정량 분석은 Page 등(12)의 방법을 사용하였으며, flame ionization detector(FID)가 장착된 gas chromatography에 의해 수행하였다.

P(3HB-co-3HV)의 정성 및 정량 분석은 Braunegg 등(13)의 gas chromatography 법을 사용하였다. Column 물질은 Chromosorb GAW(60/80)에 2% Reoplex 400을 coating 하였고, 이것을 stainless steel column(2 m×2 mm i.d.)에 충전하여 사용하였다.

분석용 시료는 균체 배양액 5 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 3 ml의 증류수를 넣고 충분히 혼합해 준 후 유기용매층을 분석시료로 사용하였다.

배양액중에 잔존하는 ammonia태 질소의 양은 phenol-hypochlorite 반응(14)을 이용하여 정량하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액 0.1 ml을 취하고 5.0 ml의 A 용액(Phenol 10 g/l, Sodium nitroprusside 50 mg/l)과 5.0 ml의 B 용액(Sodium hydroxide 5 g/l, Sodium hypoch-

lorite 8.4 ml/l)을 혼합한 후, 37°C에서 20분간 반응시키고 625 nm에서의 흡광도를 측정하여 잔존 질소를 정량하였다.

균체량은 spectrophotometer(Novaspec II)를 사용하여 610 nm에서 배양액의 혼탁도(optical density)에 의해 측정하였다. 또한 배양액을 원심분리하여 얻어진 균체를 deep freezer에서 2시간 동안 냉동시키고, 냉동된 균체를 동결 건조기(freeze dryer)를 이용하여 건조시킨 후, 건조 균체량을 측정하였다.

균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(15)에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

P(3HB-co-3HV) 생산 균주의 분리 및 선별

Butyric acid 및 valeric acid와 같이 짧은 사슬 지방산(short-chain fatty acid)을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 분리하기 위하여, 1.0 g/l의 butyric acid를 유일한 탄소원으로 함유한 분리 배지(배지 I)를 사용하여 재료 및 방법에 따라 101종의 균주를 순수 분리하였다. 분리된 균주들을 4.0 g/l의 butyric acid가 함유된 생산 배지(배지 II)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후,

Table 1. Comparison of growth and PHB producing ability of isolated microorganisms

Strain No.	Growth (A_{610})	PHB (g/l)
HJ-017	1.763	0.25
HJ-024	2.000	—
HJ-025	1.830	—
HJ-028	1.980	0.07
HJ-031	2.015	0.08
HJ-037	2.543	0.07
HJ-040	2.310	0.08
HJ-049	1.530	0.15
HJ-053	2.566	—
HJ-054	3.011	—
HJ-055	1.883	0.05
HJ-056	3.160	—
HJ-058	1.725	—
HJ-060	2.097	—
HJ-067	5.929	1.20
HJ-069	2.946	—
HJ-086	1.650	0.05
HJ-093	5.123	0.94
HJ-099	2.693	—
HJ-101	2.502	—

Cultivation was carried out for 24 hours at 30°C in medium II containing 4.0 g/l butyric acid, 0.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0)

PHB의 생산능력이 있는 10종의 균주를 1차 선별하였다.

Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 균의 생육과 PHB의 축적이 일치하지는 않았으며, 이러한 결과는 Valentin 등(16)의 실험 결과와 일치하는 것이었다.

선별된 10종의 균주들을 4.0 g/l의 butyric acid, 1.0 g/l의 valeric acid가 함유된 생산 배지(배지 II)에 접종하여 상기와 같이 배양한 후, P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 있는 균주를 2차 선별하였다.

Table 2에서 나타난 것과 같이, PHB의 생산능력이 있는 10종의 균주들은 제2의 탄소원 및 에너지원으로서 valeric acid가 배지에 첨가될 경우에 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있었으며, 이러한 결과는 Haywood 등(3) 및 Ramsay 등(17)의 실험 결과와 일치하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 있는 10종의 균주들 중에서, HJ-067 균주가 다른 균주들에 비하여 균의 생육이 우수하였으며 P(3HB-co-3HV)의 생산능력도 가장 좋았기 때문에 HJ-067 균주를 본 실험에 사용할 균주로 최종 선별하였다.

분리 균주의 동정

순수 분리한 HJ-067 균주는 Fig. 1의 전자현미경 사진에서 볼 수 있는 바와같이 주모(peritrichous flagella)를 지닌 Gram 음성의 간균으로 관찰되었으며, 생리적 성질 및 생화학적 성질을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 상기와 같은 결과로부터 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8th ed.)(15)에 의해 HJ-067 균주를 *Azotobacter* sp.로 부분 동정하였다.

균의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 butyric acid와 valeric acid 농도의 영향

Table 2. Comparison of growth and P(3HB-co-3HV) producing ability of selected 10 strains

Strain No.	Growth (A_{610})	P(3HB-co-3HV) (g/l)	HV% ^(a)
HJ-017	1.970	0.23	15.07
HJ-028	1.597	0.05	5.72
HJ-031	2.231	0.13	9.49
HJ-037	2.774	0.05	17.00
HJ-040	2.318	0.07	11.43
HJ-049	1.799	0.18	8.53
HJ-055	2.150	0.05	15.38
HJ-067	4.812	1.07	10.85
HJ-086	1.782	0.07	17.70
HJ-093	5.011	0.85	8.21

Cultivation was carried out for 24 hours at 30°C in medium II containing 4.0 g/l butyric acid, 1.0 g/l valeric acid, 0.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0)

(a) HV%: 3-Hydroxyvaleric acid content in P(3HB-co-3HV) (w/w)

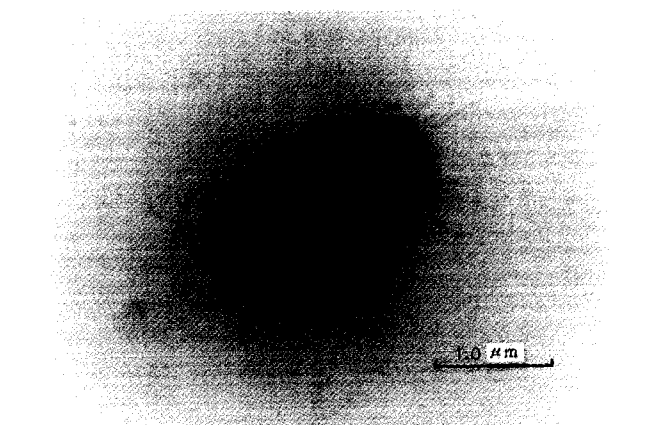


Fig. 1. Electron micrograph of *Azotobacter sp.* HJ-067 by TEM (Transmittance Electron Microscope, JEM 100CX-II, 80KV, Japan) after staining with 2% (w/v) phosphotungstic acid (pH 6.8). Magnification: 15,000 \times .

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the strain HJ-067

Assimilation of carbon compounds:					
D-glucose	+	maltose	+	acetate	+
D-mannose	+	sucrose	+	succinate	+
D-fructose	+	lactose	-	citrate	+
L-sorbose	-	melibiose	-	D-gluconate	+
D-xylose	+	trehalose	+		
D-ribose	+	L-rhamnose	-		
D-arabinose	+	D-melezitose	+		
L-arabinose	+	raffinose	+		
Flagella	:	peritrichous flagella			
Motility	:	+			
Shape	:	rod			
Gram test	:	-			
Oxidase test	:	+			
Catalase test	:	+			
Oxygen requirement	:	strictly aerobe			
O/F test	:	oxidative			
Nitrogen fixation under atmospheric partial pressure of O ₂	:	+			
Reduction of nitrates to nitrites	:	-			
Methyl red test	:	-			
Starch hydrolysis	:	-			
Gelatin hydrolysis	:	-			

Symbols: +; positive, -; negative

미생물을 이용하여 P(3HB-co-3HV)를 생산하는데 기질로 사용되는 butyric acid와 valeric acid는 독성이 강하여 균의 생육과 P(3HB-co-3HV)의 생산을 저해하는 것으로 알려져 있다(18). 따라서 배지 II를 기본 배지로 사용하여 butyric acid와 valeric acid 각각의 농도를 2.0 g/l에서 10.0 g/l까지 변화시키면서 각각의 butyric acid와 valeric acid가 HJ-067 균주의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의

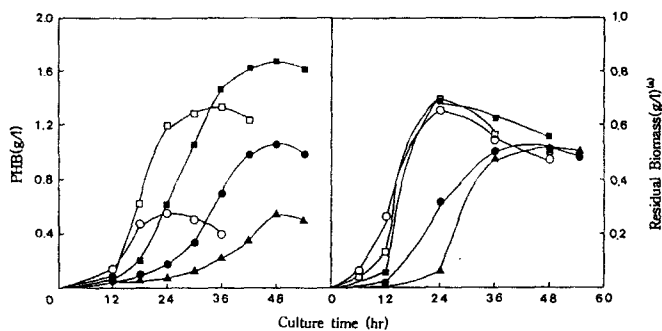


Fig. 2. Effect of butyric acid concentration on growth and PHB production by *Azotobacter sp.* HJ-067. Cultivation was carried out at 30°C in medium II containing 0.5 g/l (NH₄)₂SO₄.

(a) Residual biomass = Dry biomass - PHB
2.0 g/l: ○-○, 4.0 g/l: □-□, 6.0 g/l: ■-■, 8.0 g/l: ●-●, 10.0 g/l: ▲-▲

Table 4. Effect of butyric acid concentration on PHB production by *Azotobacter sp.* HJ-067

Butyric acid (g/l)	Dry biomass (g/l)	PHB (g/l)	PHB yield ^(a)
2.0	0.73	0.26	35.62
4.0	1.50	0.99	66.00
6.0	2.24	1.67	74.55
8.0	1.56	1.04	66.67
10.0	1.05	0.54	51.43

Cultivation was carried out for 48 hours at 30°C in medium II containing 0.5 g/l (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0).

(a) PHB yield: PHB content in total dry biomass (% (w/w)).

생산에 미치는 영향을 비교, 검토하였다. Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이, butyric acid의 농도가 2.0 g/l, 4.0 g/l, 6.0 g/l인 경우에는 생산된 최대 균체량이 비슷하였으며 8.0 g/l 이상의 경우에는 최대 균체량이 감소하였다. 그리고 butyric acid의 농도는 PHB의 생산에도 영향을 미쳤으며 butyric acid의 농도가 6.0 g/l일 경우에 최대량의 PHB가 생산되었다. 이때 생산된 PHB의 양은 1.67 g/l였으며, 건조 균체량에 대한 PHB yield는 74.55%(w/w)였다(Table 4).

Valeric acid의 경우에도 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 valeric acid의 농도에 따라 HJ-067 균주의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산이 영향을 받았으며, butyric acid를 사용하였을 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. 특히, valeric acid의 농도가 6.0 g/l일 경우에 최대량의 P(3HB-co-3HV)가 생산되었으며, 이때 생산된 P(3HB-co-3HV)의 양, HV%와 P(3HB-co-3HV) yield는 각각 1.22 g/l, 36.56% (w/w) 및 48.93%(w/w)이었다(Table 5).

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 butyric acid와 valeric acid 조성의 영향

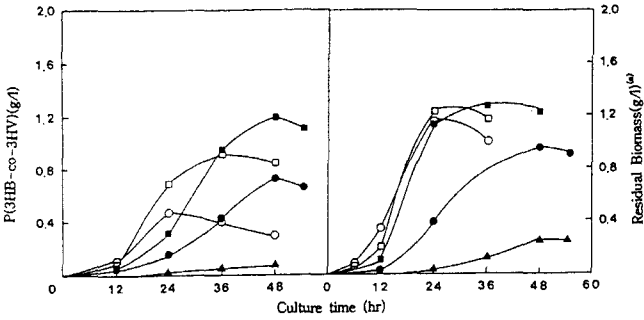


Fig. 3. Effect of valeric acid concentration on growth and P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067. Cultivation was carried out at 30°C in medium II containing 0.5 g/l (NH₄)₂SO₄.
 (a) Residual biomass = Dry biomass - P(3HB-co-3HV)
 2.0 g/l: ○-○, 4.0 g/l: □-□, 6.0 g/l: ■-■, 8.0 g/l: ●-●, 10.0 g/l: ▲-▲

Table 5. Effect of valeric acid concentration on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067

Valeric acid (g/l)	Dry biomass (g/l)	P(3HB-co-3HV) (g/l)	HV % ^(a)	P(3HB-co-3HV) yield ^(b)
2.0	0.86	0.30	21.95	34.49
4.0	1.76	0.86	26.65	48.78
6.0	2.49	1.22	36.56	48.93
8.0	1.73	0.73	36.95	42.40
10.0	0.35	0.06	49.75	16.38

Cultivation was carried out for 48 hours at 30°C in medium II containing 0.5 g/l (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0).
 (a) HV%: 3-Hydroxyvaleric acid content in P(3HB-co-3HV) (w/w)
 (b) P(3HB-co-3HV) yield: P(3HB-co-3HV) content in total dry biomass (% (w/w)).

P(3HB-co-3HV)의 생산을 위해서는 butyric acid 이외에 valeric acid가 기질로 첨가되어야 하며 두 기질의 조성에 따라 균의 생육, P(3HB-co-3HV)의 생산량 및 HV%(w/w)가 영향받는 것으로 알려져 있다(19). 따라서 butyric acid와 valeric acid의 최적 농도인 6.0 g/l를 전체 기질 농도로 고정하고 두 기질의 조성 비율을 변화시키면서 균의 생육, P(3HB-co-3HV)의 생산량 및 HV%에 미치는 영향을 비교, 검토하였다.

Table 6에서 볼 수 있는 바와 같이, butyric acid와 valeric acid로부터 생산된 P(3HB-co-3HV)의 양은 butyric acid 만으로부터 생산된 PHB의 양보다는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, valeric acid의 양이 증가할수록 HV%(w/w)가 36.56%까지 증가함을 보여 주었으며 건조 균체량에 대한 P(3HB-co-3HV) yield는 48.93%(w/w)까지 감소함을 보여 주었다.

상기의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, butyric acid와 valeric acid의 조성 비율에 따라 다양한 결과가 나타나며

Table 6. Effect of butyric acid and valeric acid composition on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067

Butyric acid (g/l)	Valeric acid (g/l)	Dry biomass (g/l)	P(3HB-co-3HV) (g/l)	HV % ^(a)	P(3HB-co-3HV) yield ^(b)
6.0	0.0	2.24	1.67	-	74.55
5.0	1.0	2.19	1.56	4.08	71.10
4.0	2.0	2.38	1.56	9.77	65.32
3.0	3.0	2.57	1.59	15.20	61.62
2.0	4.0	2.62	1.49	22.61	56.74
1.0	5.0	2.65	1.41	29.17	53.24
0.0	6.0	2.49	1.22	36.56	48.93

Cultivation was carried out for 48 hours at 30°C in medium II containing 0.5 g/l (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0).
 (a) HV%: 3-Hydroxyvaleric acid content in P(3HB-co-3HV) (w/w)
 (b) P(3HB-co-3HV) yield: P(3HB-co-3HV) content in total dry biomass (% (w/w)).

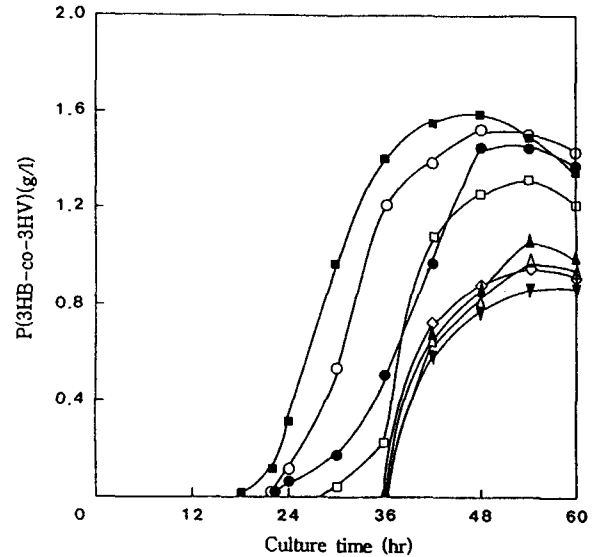


Fig. 4. Patterns of P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067 at various nitrogen sources. Cultivation was carried out at 30°C in medium II (C/N ratio=32).
 NH₄Cl: ●-●, (NH₄)₂SO₄: ■-■, (NH₄)₂CO₃: ○-○, NH₄NO₃: □-□, NaNO₂: ◇-◇, NaNO₃: ▲-▲, KNO₂: ▼-▼, KNO₃: △-△

butyric acid와 valeric acid의 농도가 각각 3.0 g/l에서 최대량의 P(3HB-co-3HV)가 생산되었으며 그 양은 1.59 g/l이었다. 그리고 HV%(w/w)는 15.20%로서 6.0 g/l의 valeric acid를 사용하였을 경우에 나타난 36.56%보다는 적은 것이었으나, 최대량의 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 기질농도를 선정하여 실험을 수행하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 질소원의 영향

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 butyric acid와 valeric acid가 각각 3.0

g/l씩 함유되어 있는 배지 II에 질소원으로 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_2 , NaNO_3 , KNO_2 및 KNO_3 를 첨가하고 배양 시간에 따른 균의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산량을 관찰하였다. 이때에 첨가되는 질소원은 C/N비(C/N ratio)가 32.0이 되도록 양을 조절하여 첨가하였다.

Fig. 4에서와 같이, 최대 P(3HB-co-3HV) 양에 이르는 배양 시간은 질소원의 종류에 따라 차이는 있으나, 48 시간에서 54시간 사이의 배양 시간에서 최대 P(3HB-co-3HV) 양에 도달하였다. 또한, 무기태 질소중에서 암모니아태 질소가 P(3HB-co-3HV)의 생산에 뛰어난 효과를 나타내었으며, 암모니아태 질소중에서도 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 가장 우수한 질소원으로 확인되었다. 그리고 암모니아태 질소 이외의 질소원중에서는 아질산염보다 질산염이 P(3HB-co-3HV)의 생산을 증대시킬 수 있었다. 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하였을 경우에 생산된 P(3HB-co-3HV)의 최대량은 1.59 g/l이었으며, 이때의 배양 시간은 48시간이었다. 따라서 본 실험에서는 질소원으로서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 선택하여 사용하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도의 영향

P(3HB-co-3HV)의 세포내 축적은 배지중에 존재하는 질소원의 농도, 즉 C/N비(C/N ratio)에 의해 크게 영향 받는 것으로 알려져 있다(10, 11, 20).

따라서 P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도의 영향을 조사하기 위하여 3.0 g/l의 butyric acid와 3.0 g/l의 valeric acid를 함유하는 배지 II(pH 7.0)에 $(\text{NH}_4)_2$

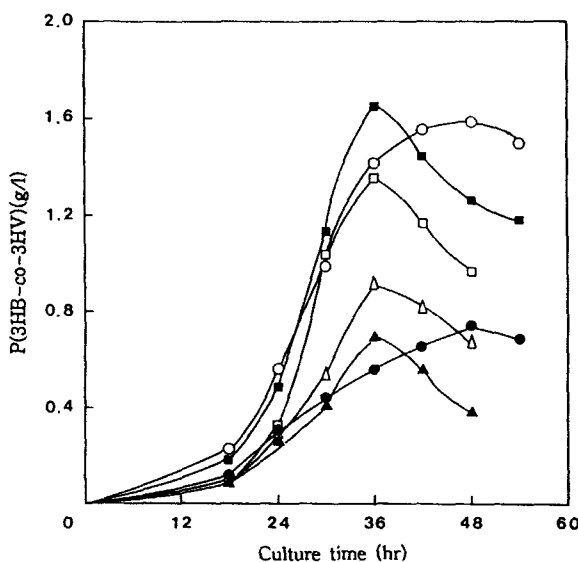


Fig. 5. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter sp.* HJ-067. Cultivation was carried out at 30°C in medium II.
 0.25 g/l: ●-●, 0.50 g/l: ○-○, 0.75 g/l: ■-■, 1.00 g/l: □-□, 1.25 g/l: △-△, 1.50 g/l: ▲-▲

SO_4 를 0.25 g/l에서 1.50 g/l까지 변화시켜 첨가하고 배양 시간에 따른 P(3HB-co-3HV)의 생산량을 비교, 검토하였다.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 0.75 g/l인 경우, P(3HB-co-3HV)의 생산량은 1.65 g/l로서 최대량을 나타내었으며 최대량에 이르는 배양 시간도 0.50 g/l 이하의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하였을 때보다 12시간 빨라진 36시간이었다(Fig. 5).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 0.25 g/l인 경우에는 생산된 균체의 절대량이 적어서 P(3HB-co-3HV)의 생산량도 감소하였으며, 1.0 g/l 이상인 경우에는 기질로 첨가된 butyric acid와 valeric acid가 P(3HB-co-3HV)의 생산에 이용되기 보다는 균의 생육에 더욱 많이 이용되기 때문에 생산된 건조 균체량은 비슷하였으나 P(3HB-co-3HV)의 생산량은 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 Table 7에 나타난 것처럼, P(3HB-co-3HV) yield가 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 증가에 따라 감소하는 사실로부터 알 수 있다.

상기의 결과로부터 P(3HB-co-3HV)의 생산을 위한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 최적 농도는 0.75 g/l(C/N ratio=21.36)임을 알 수 있었다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 금속 이온 결핍의 영향

일반적으로 세포내에 축적되는 P(3HB-co-3HV)의 양은 질소원의 결핍 이외에 금속 이온(Mg^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 및 Mn^{2+})의 결핍에 의해서도 영향받는 것으로 알려져 있다(11, 21, 22).

따라서 3.0 g/l의 butyric acid, 3.0 g/l의 valeric acid 및 0.75 g/l의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 함유하는 배지 II(pH 7.0)에 Mg^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 및 Mn^{2+} 을 첨가하지 않고 30°C에서 36시간 배양한 후, 균의 생육과 P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 금속 이온 결핍의 영향을 관찰하였다. Table 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 금속 이온을 첨가하지 않은 경우에 균의 생육은 금속이온이 함유된 대조구에

Table 7. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter sp.* HJ-067

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	C/N ratio	Dry biomass (g/l)	P(3HB-co-3HV) (g/l)	HV % ^(a)	P(3HB-co-3HV) yield ^(b)
0.25	64.09	1.01	0.50	22.76	49.16
0.50	32.04	2.36	1.41	16.07	59.74
0.75	21.36	2.86	1.65	14.40	57.69
1.00	16.02	2.79	1.35	13.78	48.44
1.25	12.82	2.73	0.91	12.61	33.32
1.50	10.68	2.56	0.70	15.24	27.22

Cultivation was carried out for 36°C in medium II (pH 7.0).
 (a) HV%: 3-Hydroxyvaleric acid content in P(3HB-co-3HV) (w/w)
 (b) P(3HB-co-3HV) yield: P(3HB-co-3HV) content in total dry biomass (% (w/w)).

Table 8. Effect of metal ion deficiency on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067

Deficient ion	Dry biomass (g/l)	P(3HB-co-3HV) (g/l)	HV % ^(a)	P(3HB-co-3HV) yield ^(b)
Control ^(c)	2.86	1.65	14.40	57.69
Fe ³⁺	1.33	0.31	34.58	55.09
Mg ²⁺	0.88	0.73	19.01	35.61
Zn ²⁺	2.85	1.67	14.27	59.18
Co ²⁺	2.84	1.69	14.31	58.80
Mn ²⁺	2.80	1.70	14.24	60.59

Cultivation was carried out for 36 hours at 30°C in medium II (pH 7.0).

(a) HV%: 3-Hydroxyvaleric acid content in P(3HB-co-3HV) (w/w)

(b) P(3HB-co-3HV) yield: P(3HB-co-3HV) content in total dry biomass (% (w/w)).

(c) Control: All metal ions contained

비하여 감소하는 경향을 나타내었으며 P(3HB-co-3HV)의 생산량은 증가하는 경향을 보였다. 특히, Mn²⁺을 첨가하지 않은 경우에 측정된 P(3HB-co-3HV)의 양은 1.70 g/l로서 최대량을 보였으며 이때의 HV%(w/w)는 14.24%였다. 그리고 P(3HB-co-3HV) yield도 대조구에 비하여 향상된 60.59%(w/w)를 나타내었다. 이러한 Mn²⁺ 결핍의 영향은 Suzuki 등(11)의 보고와 일치하는 결과였다.

또한 Mg²⁺, Fe³⁺을 첨가하지 않은 경우에는 균체량이 현격하게 감소하였으며, P(3HB-co-3HV)의 생산량도 감소하였다. 따라서 이후의 실험에서는 Mn²⁺을 첨가하지 않은 배지를 이용하여 실험을 수행하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 초기 pH의 영향

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 3.0 g/l의 butyric acid와 3.0 g/l의 valeric acid를 함유하는 배지 II의 초기 pH를 pH 6.0에서 pH 9.0까지 변화(2N NaOH 사용)시켜 36시간동안 배양한 후, P(3HB-co-3HV)의 생산량을 비교, 검토하였다.

Fig. 6에 나타난 것과 같이, P(3HB-co-3HV)의 생산량은 pH 변화에 따라 영향을 받았으며, 초기 pH 7.0에서 최대 생산량인 1.70 g/l의 P(3HB-co-3HV)가 생산되었다. 그리고 P(3HB-co-3HV) yield도 60.59%(w/w)로서 최대를 나타내었다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 배양 온도의 영향

P(3HB-co-3HV)의 생산에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 3.0 g/l의 butyric acid와 3.0 g/l의 valeric acid를 함유하는 배지 II에 균주를 접종하고 배양 온도를 24°C, 27°C, 30°C, 33°C 및 36°C로 하여 36시간 배양한 후, 균의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산량을 비교, 검토하였다.

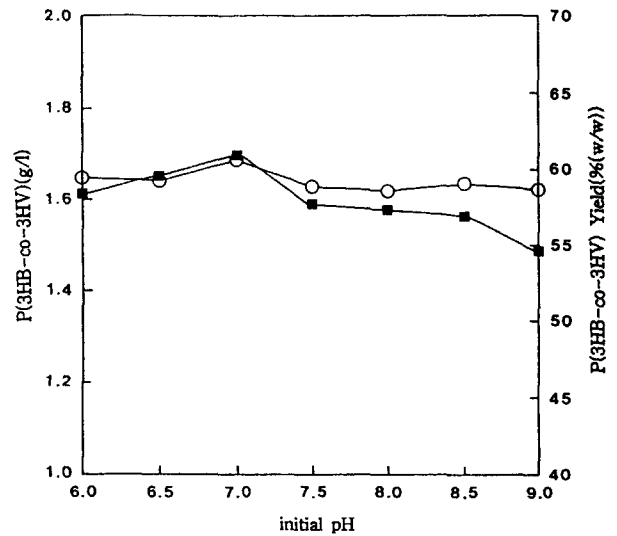


Fig. 6. Effect on initial pH on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067. Cultivation was carried out for 36 hours at 30°C in medium II.

P(3HB-co-3HV): ■-■, P(3HB-co-3HV) yield (% (w/w)): ○-○

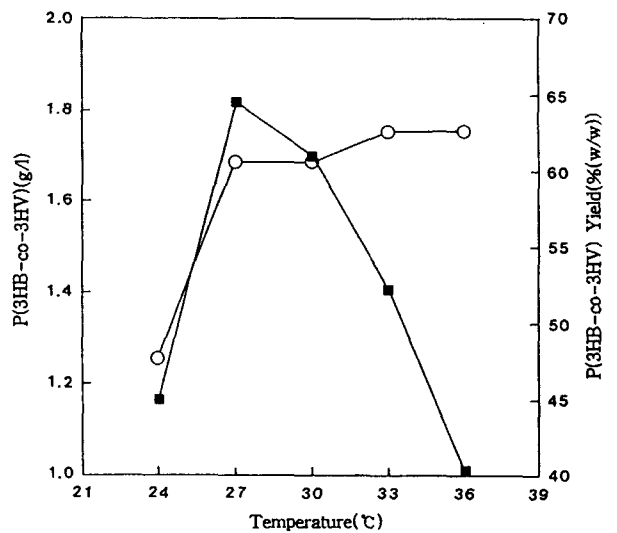


Fig. 7. Effect on temperature on P(3HB-co-3HV) production by *Azotobacter* sp. HJ-067. Cultivation was carried out for 36 hours in medium II (pH 7.0).

P(3HB-co-3HV): ■-■, P(3HB-co-3HV) yield (% (w/w)): ○-○

P(3HB-co-3HV)의 생산에 있어서 배양 온도의 변화는 초기 pH의 변화보다 더욱 큰 영향을 나타내었으며 배양 온도가 27°C일 때 균의 생육 및 P(3HB-co-3HV)의 생산량이 최대에 이르렀다. 이때에 생산된 P(3HB-co-3HV)의 양은 1.82 g/l이었고, P(3HB-co-3HV) yield와 HV%(w/w)는 각각 60.60%(w/w) 및 15.92%였다.

또한 Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 27°C에서부터 30°C 이외의 배양 온도에서는 P(3HB-co-3HV)의 생산량

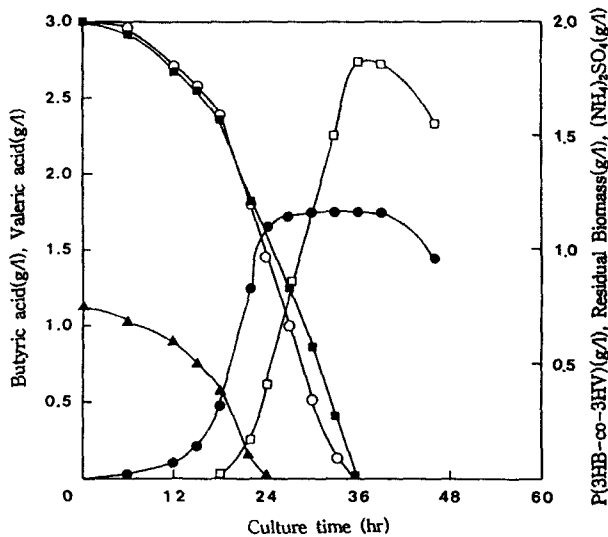


Fig. 8. Time course of the P(3HB-co-3HV) production from butyric acid and valeric acid by *Azotobacter* sp. HJ-067. Cultivation was carried out at 27°C in medium II (pH 7.0). Butyric acid: ■-■, Valeric acid: ○-○, P(3HB-co-3HV): □-□, (NH₄)₂SO₄: ▲-▲, Residual biomass (Dry biomass-P(3HB-co-3HV)): ●-●

이 현저하게 감소함을 알 수 있었다.

위 실험결과로부터 butyric acid와 valeric acid의 농도 각각 3.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0.75 g/l(C/N ratio=21.36), 배양 온도 27°C, 초기 pH 7.0의 최적 조건하에서, *Azotobacter* sp. HJ-067을 이용하여 butyric acid와 valeric acid로부터 P(3HB-co-3HV) 생산의 경시적 변화를 조사한 결과는 Fig. 8과 같았다. 첨가된 0.75 g/l의 (NH₄)₂SO₄는 24시간 경과후에 고갈되었으며, P(3HB-co-3HV)의 생산량이 최대가 되는 36시간 이후에는 butyric acid와 valeric acid가 고갈되었다. 또한 질소원이 고갈되기 전에 P(3HB-co-3HV)의 축적이 시작되었으며, 대수증식기의 말기에서부터 정지기의 초기에 P(3HB-co-3HV)의 생성 속도가 최대에 이르렀고, 정지기의 중반에 P(3HB-co-3HV)의 양이 최대에 도달함을 보여주었다. 그리고 최고 비증식 속도 (μ_{max})는 0.24 hr⁻¹이었으며 증배 시간(t_d)은 2.9시간이었다.

요 약

Butyric acid와 valeric acid로부터 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(P(3HB-co-3HV))를 생산하기 위하여, P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 있는 10종의 균주를 토양으로부터 분리하였으며 분리된 균주들중에서 P(3HB-co-3HV)의 생산능력이 가장 우수한 균주 HJ-067을 선별하였고, *Azotobacter* sp.로 부분 동정하였다.

P(3HB-co-3HV)의 생산에 있어서, butyric acid와 valeric acid의 최적 기질 농도는 각각 3.0 g/l이었다. 질소원으로는 (NH₄)₂SO₄가 가장 우수하였으며, 최적 농도는

0.75 g/l(C/N ratio=21.36)이었다. 금속 이온(Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺)의 결핍은 P(3HB-co-3HV)의 생산에 영향을 미치며, 특히 Mn²⁺을 첨가하지 않은 경우에 P(3HB-co-3HV)의 생산량이 증가하였다. P(3HB-co-3HV)의 생산을 위한 최적 배양 온도는 27°C였으며, 최적 초기 pH는 7.0이었다.

상기의 최적 조건하에서 36시간 배양하여 얻어진 건조 균체량 및 P(3HB-co-3HV)의 생산량은 각각 3.00 g/l, 1.82 g/l이었다. 이때의 P(3HB-co-3HV) yield는 건조 균체량의 60.60%(w/w)이었으며, HV%는 15.92%(w/w)이었다.

감사의 말

본 연구는 1994년 한국과학재단 핵심전문연구비(941-0600-010-1)의 지원에 의하여 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Doi, Y. 1990. Microbial Polyesters. VCH Publishers, Inc. New York.
- Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, Metabolism, Metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews* **54**: 450-472.
- Haywood, G.W., A.J. Anderson, and E.A. Dawes. 1989. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**: 471-476.
- Lageveen, R.G., G.W. Huisman, H. Preusting, P. Keteelaar, G. Eggink, and B. Witholt. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2924-2932.
- Bluhm, T.L., G.K. Hamer, R.H. Marchessault, C.A. Fyfe, and R.P. Veregin. 1986. Sodomorphism in bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules* **19**: 2871-2876.
- Bloembergen, S., D.A. Holden, G.K. Hamer, T.L. Bluhm, and R.H. Marchessault. 1986. Studies of composition and crystallinity of bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules* **19**: 2865-2871.
- Kunioka, M., A. Tamaki, and Y. Doi. 1989. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **22**: 694-697.
- Owen, A.J. 1985. Some dynamic mechanical properties of microbially produced Poly- β -hydroxybutyrate/ β -hydroxyvalerate copolymers. *Colloid & Polymer. Sci.* **263**: 799-803.
- Kunioka, M. and Y. Doi. 1989. Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **23**: 1933-1936.

10. 清水祥一, 鈴木高廣. 1987. 微生物によるメタノールからポリ-β-ヒドロキッ酪酸の生産. *發酵と工業* **45**: 1080-1087.
11. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of Poly-β-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
12. Page, W.J., J. Manchak, and B. Rudy. 1992. Formation of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2866-2873.
13. Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of Poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
14. Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**: 971-974.
15. Sneath, P.H.A., N.S. Nair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
16. Valentin, H.E., A. Schonebaum, and A. Steinbuchel. 1992. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 507-514.
17. Ramsay, B.A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille, and J.A. Ramsay. 1990. Production of Poly(β-hydroxybutyric-co-β-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2093-2098.
18. Fay, J.P. and R.N. Farias. 1975. The Inhibitory action of fatty acid on the growth of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **91**: 233-240.
19. Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka, and K. Soga. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 330-334.
20. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of Poly-β-hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 370-374.
21. Steinbuchel, A. and U. Pieper. 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 1-6.
22. Repaske, R. and A.C. Repaske. 1976. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 585-591.

(Received 18 September 1995)