creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학석사 학위논문

*Cupriavidus necator*의 포집된 이산화탄소 전환을 통한 생체적합성 의료용 플라스틱의 생산

Transformation of Captured CO_2 to Biocompatible Medical Plastics Using *Cupriavidus necator*

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

건설환경공학부

박 인 선

*Cupriavidus necator*의 포집된 이산화탄소 전환을 통한 생체적합성 의료용 플라스틱의 생산

Transformation of Captured CO_2 to Biocompatible Medical Plastics Using *Cupriavidus necator*

지도교수 남 경 필

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

건설환경공학부

박 인 선

박인선의 석사 학위논문을 인준함

2013 년 2 월

위 원 장 정 태 학 (인)

부위원장 남 경 필 (인)

위 원 김 재 영 (인)

국문초록

주요 온실가스 감축에 대한 교토의정서가 채택됨에 따라 모든 국가의 온실가스 감축이 현실화되고 있는 가운데, 우리나라도 2020년 배출전망치 대비 30%를 감축하기로 목표를 설정하고 국가 CCS (Carbon Dioxide Capture and Sequestration) 종합 추진계획을 발표하였다. CCS는 이산화탄소 (CO_2)의 포집 및 처리 기술로, 최근 산업공단 등에서 CCS 사업의 일환으로 포집된 CO_2의 친환경적 처리와 재생 가능한 고부가가치 자원으로의 전환에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 바이오기술을 활용한 CO_2의 PHA로의 전환은 CO_2를 유용물질로 전환하는 생물학적 전환이용 기술로써 이용될 수 있다.

본 연구에서는 CO_2를 이용하여 PHA를 생산함에 있어 주요 기질로 사용되는 CO_2 농도가 미치는 영향을 살펴보고자, 수소산화균인 *Cupriavidus necator*를 이용하여 PHA 합성 실험을 수행하였다. CO_2 농도를 각각 1, 3, 10, 20%로 변화시키며 미생물의 성장과 P(3HB)의 축적 양상을 관찰하였고, 그 결과로 최적 이산화탄소 농도를 도출하였다. 2단계로 이루어진 배양 실험의 첫 번째는 미생물 성장을 목적으로 했고, 미생물 개체수의 증가는 CO_2 농도와 관계없이 일정했지만, 미생물 내 축적된 P(3HB)의 양은 CO_2 농도가 높아질수록 감소하였다. 두 번째는 P(3HB) 축적 단계로 합성된 P(3HB)의 양은 3% CO_2에서 가장 많았고, 첫 번째, 두 번째 단계에서 축적된 총 P(3HB)의 양은 1% CO_2에서 가장 많았다. 하지만 1, 3% 사이의 차이가 크지 않았고, 10, 20%로 농도가 올라가야 저해 현상이 뚜렷이 나타났다. 이를 통해 고농도의 CO_2를 사용할 경우 P(3HB)의 합성에 저해 현상이 일어날 수 있음을 확인하였다.

보조기질로 사용한 발레르산이 PHA의 합성에 미치는 영향을 확인하고자 발레르산을 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% (v/v)의 농도로 변화시켜 주입하며 PHA 축적 실험을 수행하였다. 실험 결과, CO_2에 의해 3HB가 합성되고 발레르산에 의해 3HV가 합성되어 P(3HB-co-3HV)의 공중합체가 생성되었다. 3HV의 경우 발레르산 농도가 0.1% 이하에서는 합성에 저해를 받지 않고, 농도가 증가함에 따라 합성량도 증가하였지만, 3HV 수율은 농도가 낮을수록 더 높았다. 3HB 역시 발레르산 농도에 영향을 받아, 발레르산 농도가 0.05% 이상일 때 축적에 저해를 받았다. 최종적으로 합성된 P(3HB-co-3HV)의 3HV 함량은 0.05, 0.075, 0.1, 0.2%에서 각각 17, 21, 33, 46 mol%였다. 이를 종합해 볼 때, P(3HB-co-3HV)의 축적을 위한 발레르산의 주입 농도는 0.05% 이하가 적절하고, 더 높은 3HV 함량을 얻기 위해서는 높은 농도의 단일 주입보다 연속 주입을 하는 것이 효율적일 것으로 판단하였다.

위의 결과를 바탕으로 발레르산 주입 방식에 변화를 주어 다양한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 합성하는 실험을 수행하였다. 주입 방식은 연속주입으로 t=0, 48시간일 때 각각 0.05% 발레르산을 주입하는 것과, t=0시간일 때는 0.05%, t=48시간일 때는 0.025% 발레르산을 주입하는 것, 두 가지로 진행하였다. 3HV의 경우 두 가지 방식에서 주입한 발레르산의 양이 차이가 있었음에도 불구하고 합성된 3HV의 양은 같았다. 3HB의 경우 48시간 후에 0.05%의 발레르산을 한번 더 추가하자 축적에 저해현상을 보였지만 총 축적량은 유사하게 나타났다. 또한 최종적으로 생성된 P(3HB-co-3HV)에서 3HV의 함량은 각각 31, 28 mol%로 큰 차이가 없었다. 연속 주입의 결과를 0.05% 발레르산의 단일 주입과 비교해 보면, 3HB의 합성량은 줄어들었지만 3HV의 합성량이 늘어나면서 총 P(3HB-co-3HV)의 양은 통계적으로 차이가 없었다. 하

지만 3HV의 함량은 약 2배로 늘어났다. 따라서 약 30 mol%의 3HV 함량을 얻기 위해서는 t=0, 48시간에 각각 0.05, 0.025%의 발레르산을 연속 주입하고, 그의 절반인 약 15 mol%의 3HV 함량을 얻기 위해서는 0.05% 발레르산을 t=0시간에 단일 주입하는 것이 효율적임을 확인하였다.

마지막으로, 일정한 품질 (일정한 3HV 함량)의 P(3HB-co-3HV)를 지속적으로 생산할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 연속식 배양을 수행하였다. 첫 번째 미생물 성장 단계를 연속식으로 진행하여 약 36% (w/w)의 P(3HB) 함량을 갖는 미생물이 0.9 g/L의 농도로 유지되는 것을 확인한 후, 이 미생물을 이용하여 0.05% 발레르산의 단일 주입 방식으로 PHA 축적 단계를 3회 반복 수행한 결과, 3회 모두 16 mol%의 HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)가 생산되었다. 또한 연속식 배양으로 얻은 P(3HB-co-3HV)의 구조, 분자량, 물성 분석도 수행하여 일반적인 미생물 합성 P(3HB-co-3HV)의 특성을 갖고 있음을 확인하였다.

본 연구를 통해 CO_2와 발레르산의 농도 및 주입 방식이 P(3HB-co-3HV) 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 생산된 P(3HB-co-3HV)는 체내에서 이물반응이 일어나지 않는다고 알려져 있는 3HV 함량이 30 mol% 이하로 의료용 플라스틱으로의 활용 목적에도 부합한다. 이는 포집된 CO_2를 의료 용도의 PHA로 전환시키는 최적 조건들을 찾는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

주요어 : 이산화탄소 전환, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyv-alerate), *Cupriavidus necator*, 생체적합성 플라스틱
학 번 : 2011-20976

목 차

1. 서론 ····· 1
1.1. 연구의 배경 ····· 1
1.2. 연구의 목적 ····· 4
1.3. 연구의 범위 ····· 5

2. 문헌 연구 ····· 6
2.1. 미생물 합성 P(3HB) ····· 6
2.1.1. P(3HB)의 특성 ····· 6
2.1.2. CO_2 를 이용한 P(3HB)의 합성경로 ····· 9
2.1.3. CO_2 를 이용한 P(3HB)의 합성에 관한 기존 연구 ····· 11
2.2. 미생물 합성 P(3HB-co-3HV) ····· 12
2.2.1. P(3HB-co-3HV)의 특성 ····· 12
2.2.2. P(3HB-co-3HV)의 합성 경로 ····· 15
2.2.3. P(3HB-co-3HV)의 합성에 관한 기존 연구 ····· 17
2.3. P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)의 의료용 활용 ····· 17

3. 실험 재료 및 방법 ····· 21
3.1. 실험 재료 ····· 21
3.1.1. 미생물 ····· 21
3.1.2. 배지 ····· 21
3.1.3. 탄소원 ····· 22
3.2. 실험 방법 ····· 22
3.2.1. CO_2 농도에 따른 미생물 성장과 P(3HB) 축적 변화 ····· 22
3.2.2. 발레르산 첨가에 의한 P(3HB-co-3HV)의 합성 ····· 24

3.2.3. 연속식 배양을 통한 P(3HB-co-3HV)의 합성 ····· 24

3.3. 분석 방법 ····· 26
3.3.1. 미생물 분석 ····· 26
3.3.2. PHA추출 및 분석 ····· 26
3.3.3. P(3HB-co-3HV) 구조, 분자량 및 물성 분석 ····· 28
3.3.4. 발레르산 농도 분석 ····· 30

4. 실험 결과 및 고찰 ····· 31
4.1. P(3HB) 생산을 위한 최적 CO_2 농도 결정 ····· 31
4.1.1. 첫 번째 단계 배양기간 중 CO_2 농도에 따른 *C. necator*의 성장 ····· 31
4.1.1. 두 번째 단계 배양기간 중 CO_2 농도에 따른 P(3HB) 축적 변화 ····· 33
4.1.3. CO_2 농도가 *C. necator*의 성장과 P(3HB) 합성에 미치는 영향 고찰 ····· 37
4.2. 발레르산 첨가에 의한 P(3HB-co-3HV)의 합성 ····· 38
4.2.1. 발레르산 주입 농도 결정 ····· 38
4.2.2. 발레르산 주입 방법에 따른 다양한 3HV 함량의 P(3HB-co-3HV) 합성 ····· 45
4.3. 연속식 배양을 통한 P(3HB-co-3HV)의 합성 ····· 49
4.3.1. 미생물 성장을 위한 첫 번째 단계 연속식 배양 ····· 49
4.3.2. 일정한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)의 생산 ····· 49
4.3.3. 일정한 3HV 함량의 P(3HB-co-3HV) 물성 분석 ····· 52

5. 결론 ····· 56

참고문헌 ····· 59

표 목 차

Table 2.1. P(3HB) production by various bacteria and culture methods (Anderson and Dawers, 1990) ····· 8
Table 2.2. Physical and thermal properties for some common polymers (Doi, 1990) ····· 9
Table 2.3. P(3HB-co-3HV) production by various bacteria and culture methods (Anderson and Dawers, 1990) ····· 13
Table 2.4. Thermal and mechanical properties of P(3HB-co-3HV) copolymers (Reddy et al., 2003) ····· 14
Table 2.5. Potential applications of PHA in medicine (Zinn et al., 2001) ····· 19
Table 2.6. Biomedical application of P(3HB-co-3HV) with different 3HV content ····· 20
Table 3.1. Operation conditions of FID gas chromatograph for determining PHA concentrations ····· 27
Table 3.2. Operation conditions of GPC for determining the molecular weight of PHA ····· 28
Table 3.3. Operation conditions of FID gas chromatograph for determining the valeric acid concentrations ····· 30
Table 4.1. Optical density (OD), cell number, and P(3HB) content in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) at the end of the 1st stage ····· 32
Table 4.2. Production of 3HV in P(3Hb-co-3HV) with various initial valeric acid concentrations of 0.05, 0.075, 0.1, and 0.2% (v/v) during the 2nd stage growth ····· 44

Table 4.3. The concentration of 3HB, 3HV, P(3HB-co-3HV), and 3HV molar fraction with different feeding methods during the 2nd stage growth ····· 48

Table 4.4. Optical density (OD), Dry cell weight (DCW), cell number, and P(3HB) content in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2,, 1% CO_2, and 91% N_2) during the continuous 1st stage ····· 49

Table 4.5. 3HV content in P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with CO_2 as a carbon source in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2,, 1% CO_2, and 91% N_2) after the 2nd PHA accumulation stage followed by the continuous 1st stage for microbial growth ····· 51

Table 4.6. Thermal and mechanical properties of P(3HB-co-3HB) ····· 54

Table 4.7. Table 4.7. Molecular weight of P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* during the continuous 1st stage for microbial growth followed by the batch 2nd stage for PHA accumulation ···· 55

그 림 목 차

Fig. 1.1. Schematic diagram of Carbon Dioxide Capture and Sequestration (CCS) (한국이산화탄소포집및처리연구개발센터). ····· 2

Fig. 2.1. The general structure of polyhydroxyalkanoates (Lee, 1996). · 6

Fig. 2.2. The biosynthetic pathway of P(3HB) in *Cupriavidus necator* (Ojumu et al., 2004). ····· 10

Fig. 2.3. The biosynthetic pathway of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in *Cupriavidus necator* (Ojumu et al., 2004). ····· 15

Fig. 2.4. Schematic representation of PHA production from different fatty acids (Joao et al., 2006). ····· 16

Fig. 3.1. Reactor setup used in the present study. ····· 23

Fig. 3.2. Continuous culture reactor used in the present study. ····· 25

Fig. 4.1. Changes in the optical density of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 1st stage growth. ····· 32

Fig, 4.2. Changes in the concentrations of dry cell weight (DCW), P(3HB), and residual [DCW−P(3HB)] of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 2nd stage growth. ····· 35

Fig. 4.3. Changes in the initial and final P(3HB) concentrations, and the final P(3HB) content in *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 2nd stage growth. ····· 36

Fig. 4.4. Changes in the concentrations of dry cell weight (DCW), P(3HB),

and residual [DCW−P(3HB-co-3HV)] of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media fed with 1% CO_2 and 0.05, 0.075, 0.1, or 0.2% valeric acid during the 2nd stage growth. ····· 40

Fig. 4.5. Changes in the 3HB and 3HV concentrations of P(3HB-co- 3HV) with various initial valeric acid concentrations (a) 0.05%, (b) 0.075%, (c) 0.1%, (d) 0.2% (v/v) during the 2nd stage growth. ····· 43

Fig. 4.6. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB-co- 3HV) with addition of 0.05% valeric acid at t=0 h and t=48 h during the 2nd stage growth. ····· 43

Fig. 4.7. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB-co-3HV) with addition of 0.05% valeric acid at t=0 h and 0.025% valeric acid at t= 48 h during the 2nd stage growth. ····· 46

Fig. 4.8. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB_co- 3HV) with the initial valeric acid concentration of 0.05% during the 2nd stage growth with *Cupriavidus necator* grown in the continuous reactor. ····· 47

Fig. 4.9. 600 MHz ^{1}H NMR spectrum of P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* during the continuous 1st stage for microbial growth followed by the batch 2nd stage for PHA accumulation. This spectrum shows that the P(3HB-co-3HV) has 3HV of 16 mol%. ····· 50

1. 서 론

1.1. 연구의 배경

지난 1997년 기후변화협약의 구체적 이행방안으로 온실가스 감축 목표 규정에 관한 교토의정서가 채택됨에 따라, 협약에 비준한 선진국 및 개발도상국은 온실가스 저감 의무를 부담하게 되었다. 우리나라는 의무감축대상국은 아니지만, 2009년 기준으로 온실가스 배출량이 세계 9위를 차지하고 있고(IEA, 2011), 나아가 Post-교토시대를 대비할 때 온실가스 저감 문제가 당면한 현실의 문제로 다가오게 되었다. 이에 따라 우리나라는 국무회의를 통하여 2020년 배출전망치 (Business As Usual) 대비 30%를 감축하기로 목표를 설정하였고, 이산화탄소 저감에 대한 압박을 받고 있는 상황이다 (한종훈, 2011).

이러한 국가 온실가스감축량 목표에 기여하고자 국내에서는 이산화탄소의 포집 및 저장을 위한 핵심 원천기술 개발과 통합 플랜트 건설 및 실증사업을 포함하는 국가 CCS (Carbon Dioxide Capture and Sequestration) 종합 추진계획을 발표하였다. CCS는 이산화탄소를 대량 발생원으로부터 포집한 후, 압축·수송 과정을 거쳐 육상 또는 해양지중에 안전하게 저장하거나 유용한 물질로 전환하는 일련의 과정으로(교육과학기술부 외, 2010), 화석연료를 사용하면서도 온실가스를 줄일 수 있는 현실적인 기술적 대안으로 부각되고 있다 (Fig. 1.1.). 크게 포집, 수송, 처리(저장, 전환 등)의 세 단계로 진행되는 CCS는 장기적 관점에서 볼 때 포집된 대량의 이산화탄소를 유용물질로 전환하여 재이용하는 전환분야의 중요성이 커질 것으로 사료된다.

이산화탄소의 전환이용기술은 크게 화학적 방법과 생물학적 방법으로 나뉜다. 이 중 생물학적 전환이용 기술로, 국내에서는 조류를 사용한 바이오 연료 생산에 관한 연구와 메탄으로의 전환을 통한 에너지 확보에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 또 다른 생물학적 전환연구로 미생물을 이용하여 생분해성 플라스틱인 polyhydroxyalkanoates (PHA)를 생

산하는 연구가 최근 각광을 받고 있다. PHA는 다양한 미생물이 체내에 축적하는 에너지 저장물질로, 생분해성 플라스틱의 원료물질이다 (Madison and Huisman, 1999; Verlinden et al., 2007). 생산된 PHA는 폴리프로필렌, 폴리에틸렌과 같은 기존 석유계 플라스틱의 대체가 가능할 뿐 아니라 생체적합성이 우수하여, 의료용 봉합사, 임플란트, 약물전달 등의 고부가가치 의료용 플라스틱으로도 사용이 가능하다 (Chen and Wu, 2005; Akaraonye et al., 2010). 이처럼 이산화탄소를 이용한 PHA의 생산은 대기환경부산물을 고부가가치의 유용한 물질로 전환시킨다는 점에서 환경적, 경제적 의미가 크다.

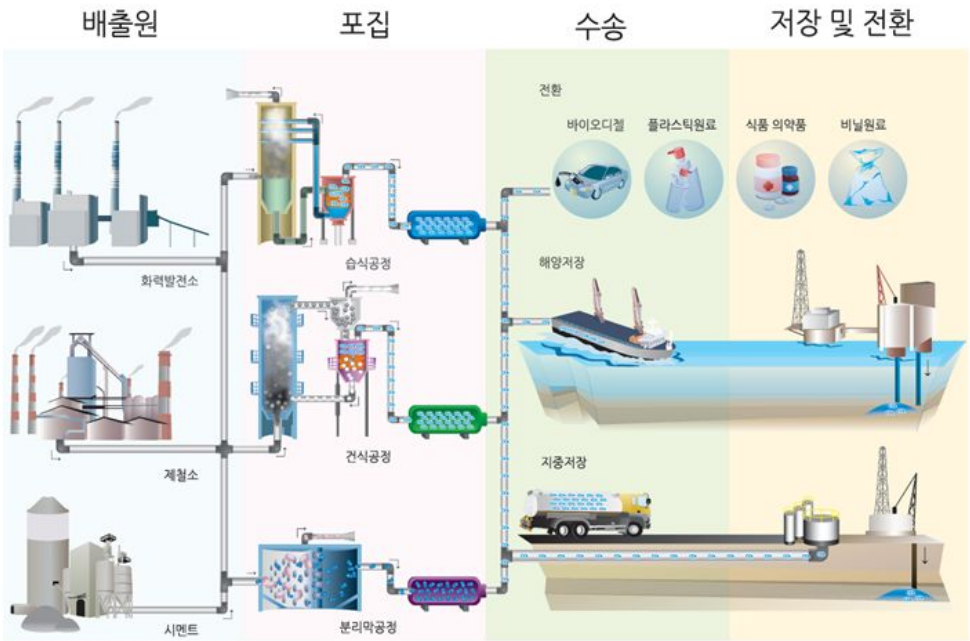


Fig. 1.1. Schematic diagram of carbon dioxide capture and sequestration (CCS) (한국이산화탄소포집및처리연구개발센터).

이산화탄소를 이용해 생산된 PHA는 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]로, 높은 결정화도와 깨지기 쉽고 딱딱한 성질들을 가지고 있어 상업적 이용에 제한을 받는다 (Lee, 1996). 따라서 프로피온산이나 발레

르산과 같은 3-hydroxyvalerate (3HV)의 전구물질을 첨가하여 이를 보다 유연하게 만든 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] 공중합체를 생산해 물성의 개선을 시도할 수 있다. P(3HB-co-3HV)는 3HV의 함량에 따라 딱딱한 결정성 플라스틱에서 탄성이 큰 고무에 이르기까지 다양한 물성을 나타내며 (Lee, 1996), 생체 내 가수분해 속도도 3HV 함량에 따라 조절이 가능한 것으로 알려져 있다 (Philip et al., 2007). 따라서 P(3HB-co-3HV)는 의료 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

1.2. 연구의 목적

본 연구는 CCS 사업의 일환으로 포집된 이산화탄소를 미생물을 사용해 전환하여 고부가가치의 의료용 PHA를 생산함에 있어, 주요 기질로 사용되는 이산화탄소의 농도와 물성 개선을 위해 보조기질로 사용할 수 있는 발레르산의 첨가가 PHA 생산에 미치는 영향을 확인하고자 한다. 본 연구의 세부적인 목적은 다음과 같다.

(1) 이산화탄소의 농도가 *Cupriavidus necator*의 성장과 P(3HB) 축적에 미치는 영향을 확인하여, P(3HB)의 생산을 위한 최적 이산화탄소 농도를 결정한다.

(2) 이산화탄소와 함께 보조기질로 사용한 발레르산의 주입 농도와 주입 방법이 P(3HB-co-3HV) 합성에 미치는 영향을 확인하고 다양한 3HV 함량을 가지는 P(3HB-co-3HV)를 생산한다.

(3) 지속적으로 일정한 품질의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 연속식 배양을 수행하여 반복적으로 생산된 P(3HB-co-3HV)의 일관성을 확인한다.

1.3. 연구의 범위

본 연구는 수소산화균의 하나인 *C. necator*를 이용하여 PHA를 생산함에 있어서 주요 기질들이 미치는 영향을 확인하고 최적 운전 조건을 찾는 것으로, 세부적인 범위 및 내용은 다음과 같이 구성된다.

(1) 이산화탄소 농도 영향 실험

이산화탄소를 이용하여 P(3HB)를 생산함에 있어서 이산화탄소의 농도가 미치는 영향을 알아보기 위해 이산화탄소의 농도를 1, 3, 10, 20%로 변화시키며 미생물의 성장과 P(3HB)의 축적 양상을 관찰하였고, 최적 이산화탄소 농도를 도출하였다.

(2) 발레르산 주입 실험

PHA 축적 단계에 발레르산을 보조기질로 주입하여 그 농도와 주입 방식이 PHA 축적에 미치는 영향을 확인하였다. 발레르산의 주입 농도는 0.05~0.2%로 하였고, 주입 방식은 단일 주입과 연속 주입을 비교하였다.

(3) 연속식 배양 및 물성 분석

지속적으로 일정한 품질의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 연속식 배양을 수행하였다. 약 15 mol% 3HV 함량을 가진 P(3HB-co-3HV) 생산을 목적으로 진행하였고, 이를 통해 생산된 P(3HB-co-3HV)의 물성 분석을 수행하여 생산된 P(3HB-co-3HV)의 일관성을 확인하였다.

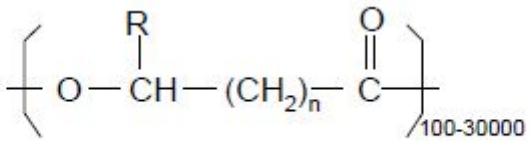
2. 문헌 연구

2.1. 미생물 합성 P(3HB)

2.1.1. P(3HB)의 특성

PHA는 다양한 미생물이 세포내에 축적하는 에너지 저장물질로서, 미생물이 불균형적인 생장조건, 즉 특정 영양원인 산소, 질소, 황, 인 또는 칼륨 등이 결핍된 반면 탄소원이 충분량 존재할 때 축적된다 (Reddy et al., 2003; Verlinden et al., 2007). 특히 에너지원인 탄소원은 충분하지만 질소원이 결핍된 환경에서 핵산과 단백질의 합성이 저해되므로 동화되는 탄소원이 PHA로 대부분 저장된다 (Anderson and Dawers, 1990).

PHA는 카복실기, 수산기, 알킬기가 부제탄소(chiral carbon)를 중심으로 결합되어 있는 hydroxyalkanoate 단량체 100~30,000개 정도가 에스테르 결합으로 연결되어 있는 불용성 공중합체이며, 구조식은 Fig. 2.1.과 같다 (Lee, 1996). PHA는 메틴기의 n값과 수산기의 R기에 따라 다양한 종류가 존재하고 그에 따라 PHA의 명명이 결정되어진다.



n =1	R =	hydrogen	poly (-3-hydroxypropionate)
		methyl	poly (-3-hydroxybutyrate)
		ethyl	poly(3-horoxyvalerate)
		propyl	poly (-3-hydroxyhexanoate)
		pentyl	poly (-3-hydroxyoctanoate)
		nonyl	poly (-3-hydroxydodecanoate)
n = 2	R =	hydrogen	poly (-4-hydroxybutyrate)
n = 3	R =	hydrogen	poly (-5-hydroxyvalerate)

Fig. 2.1. The general structure of polyhydroxyalkanoates (Lee, 1996).

PHA 중 가장 대표적인 것은 P(3HB)로서, 3-hydroxybutyrate (3HB)가 직선상으로 연결된 단일 중합체이다. P(3HB)는 포도당, 과당, 아세트산, 이산화탄소 등이 탄소원으로 사용될 때 합성되며 (Khanna and Srivastava, 2005), 생분해성 외에 생체적합성, 압전성, 내습성, 기체 차단성 등의 특성을 가지고 있어 다양한 응용이 가능하다 (Ojumu et al., 2004). Table 2.1.은 P(3HB) 생산 균주와 기질, 배양조건, 생산된 P(3HB)의 양과 함량, 생산력 (생산된 P(3HB)g/L/h) 등을 정리한 표이다 (Anderson and Dawers, 1990; Kim, 2000).

P(3HB)의 기계적 특성은 Table 2.2.에 나타나있다. 탄성계수나 인장 강도와 같은 기계적 특성은 폴리프로필렌 (PP)과 유사하나 파괴신도는 약 6%로 PP보다 훨씬 낮다. 따라서 P(3HB)는 PP보다 딱딱하고 부서지기 쉽다 (Doi, 1990). 또한 녹는점과 결정화도가 높아 상업적 이용에 제한을 받는다고 알려져 있다 (Lee, 1996).

Table 2.1. P(3HB) production by various bacteria and culture methods (Anderson and Dawers, 1990)

Bacteria	Culture method	Major substance	Culture time(h)	Cell conc. (g/L)	P(3HB) conc. (g/L)	P(3HB) content(%)	Productivity (g/L/h)
Cupriavidus. necator	Glucose control fed batch	Glucose	50	164	121	76	2.42
Ccupriavidus. necator	Recycled gas culture system	CO_2/H_2	40	85	62	72	1.54
Ccupriavidus. necator	Fed batch	Ethanol	50	64	47	74	0.94
Azotobacter vinelandii	Glucose control fed batch	Glucose+fish peptone	47	40	32	80	0.68
Azotobacter chroococcum	Fed batch	Starch	70	54	25	46	0.35
Pseudomonas extorquens	Fully automatic fed batch	Methanol	170	233	149	64	0.88
Recombinant Escherichia coli	pH-stat fed batch	Glucose+LB medium	42	117	89	76	2.11
Recombinant Klebsiella aerogenes	Fed batch	Molasses	32	37	24	65	0.75

Table 2.2. Physical and thermal properties for some common polymers (Doi, 1990)

Properties	P(3HB)	Poly propylene	Poly(Ethylene Terephthalate)	Nylon-6,6
Melting temperature(°C)	180	176	267	265
Glass-transition temperature(°C)	4	-10	69	50
Crystallinity(%)	60-80	50-70	30-50	40-60
Young's modulus(Gpa)	3.5	1.7	2.9	2.8
Tensile strength(Mpa)	40	38	70	83
Extension need to break(%)	6	400	100	60

2.1.2. CO_2를 이용한 P(3HB)의 합성경로

*C. necator*에 의한 P(3HB)의 합성 경로는 Fig. 2.2.에 나타나있다. 먼저 3-ketothiolase (PhaA)가 두 개의 acetyl-CoA를 축합반응에 의해 acetoacetyl-CoA로 바꾼다. 두 번째 관여하는 효소는 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)만을 보조인자로 쓰는 acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)인데 이 효소는 acetoacetyl-CoA를 입체선택적(stereoselective)으로 (R)-3-hydroxybutyryl-CoA로 바꾼다. P(3HB) 합성의 마지막 효소는 P(3HB) synthase (PhaC)로서 (R)-3-hydroxybutyryl group을 폴리에스테르 사슬에 에스테르 결합에 의해 붙여 나간다 (Ojumu et al., 2004).

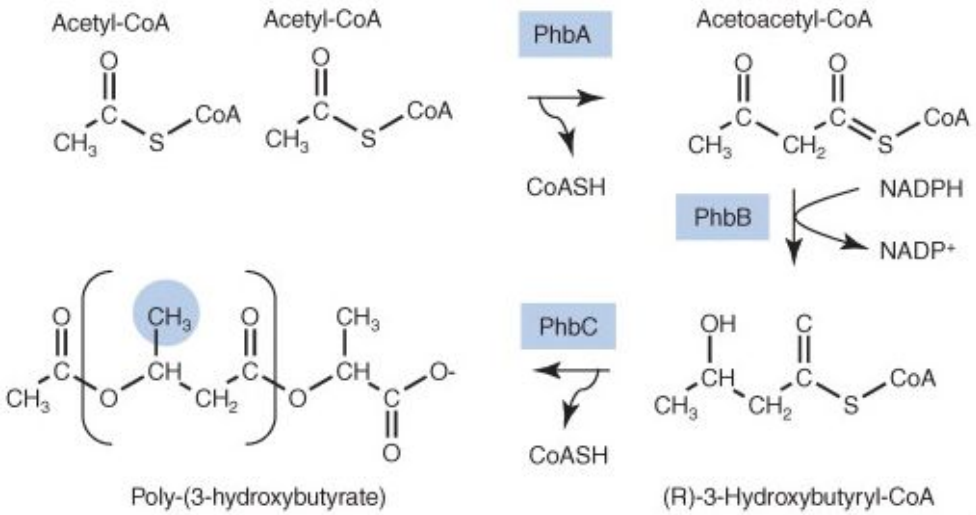


Fig. 2.2. The biosynthetic pathway of P(3HB) in *Cupriavidus necator* (Ojumu et al., 2004).

P(3HB)의 합성 경로를 Eq. (2.1)과 같이 나타낼 수 있다. CO_2를 이용한 P(3HB)의 합성은 캘빈 회로(Calvin cycle)를 통한 CO_2 고정에서 시작한다 [Eq. (2.2)]. Phosphoglyceric acid (PGA)가 phosphoenol pyruvate, pyruvate를 거쳐 acetyl-CoA로 바뀌면 위와 같은 경로로 P(3HB)가 합성된다 [Eq. (2.3)]. 이를 종합한 총괄반응식은 Eq. (2.4)와 같다 (Volova, 2004).

$$2\,acetyl-CoA + NAD(P)H + P(3HB)_n \rightarrow NAD(P)^+ + 2CoASH + P(3HB)_{n+1}$$

Eq. (2.1)

$$6\,CO_2 + 16\,ATP + 10\,NADPH \rightarrow 2\,PGA + 10\,NADP^+ + 16\,ADP + 16\,P_i$$

Eq. (2.2)

$$P(3HB)_n + 2PGA + NAD + 2ADP + 2P_i \rightarrow$$
$$\rightarrow P(3HB)_{n+1} + 2ATP + 2NADH + 2CO_2$$

Eq. (2.3)

$$P(3HB)_n + 4CO_2 + 14ATP + 10NADPH + NAD^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow P(3HB)_{n+1} + 14ADP + 14P_i + 10NADP^+ + NADH$$

Eq. (2.4)

2.1.3. CO_2를 이용한 P(3HB)의 합성에 관한 기존 연구

미생물을 이용한 P(3HB) 생산에 관한 연구는 종속영양배양조건에서 수행된 것이 대부분으로 독립영양배양조건에 관한 연구는 미흡한 실정이다. *C. necator* ATCC 17697^{T}은 독립영양배양과 종속영양배양이 모두 가능한 균주로, 이를 이용한 기존 독립영양배양조건의 연구에서 CO_2의 비율이 1일 때 H_2와 O_2의 비율이 7.5 : 1.5 (v/v)에서 가장 많은 P(3HB) 축적을 보이며, 50 g/L의 미생물 농도와 53% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다 (Ishizaki and Tanaka, 1991). 또한 H_2와 함께 사용될 때 폭발이 일어나지 않는 기체 조성(O_2 6.9% (v/v) 이하) 내에서 미생물 농도를 높이기 위해 산소용해계수가 큰 반응조를 이용하여 기체 용해도를 높여 91 g/L의 미생물 농도와 68% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다 (Tanaka and Ishizaki, 1995). 일반 반응조에서는 종속영양배양과 독립영양배양의 2단계 배양방법을 이용하여 26-43 g/L의 건조세포중량과 56-82% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다 (Tanaka and Ishizaki, 1994). *C. necator* B5786 균주를 이용한 연구에서는 H_2, O_2, CO_2의 비율이 6 : 2 : 1 (v/v)인 혼합가스를 기질로 17.4 g/L의 미생물 농도와 90% (w/w)의 P(3HB)을 얻었다 (Volova et al., 2004; Volova and Kalacheva, 2005). 이는 종속영양배양 조건에서의 P(3HB) 생산 (37~223 g/L의 미생물 농도, 46~80% (w/w) P(3HB) 함량)과 비교해도 충분히 효율적이며 (Table 2.1.), CO_2가 PHAs 생산에 유용한 기질로 이용될 수 있음을 시사한다.

2.2. 미생물 합성 P(3HB-co-3HV)

2.2.1. P(3HB-co-3HV)의 특성

P(3HB-co-3HV)는 3HB와 3HV가 무작위로 연결된 공중합체로, 3HV 합성의 전구물질인 프로피온산이나 발레르산 등이 공급되었을 때 합성된다 (Lee et al., 2000). 따라서 포도당이나 과당과 같이 3HB를 합성하는 기질에 프로피온산이나 발레르산을 보조기질로 첨가하여 공중합체를 생산하는 방법이 많이 사용되었다 (Lee et al., 2000; Shang et al., 2004). Table 2.3.은 P(3HB-co-3HV) 생산 미생물과 기질, 배양조건, 생산된 P(3HB)의 양과 함량, 3HV 함량 등을 정리한 표이다 (Anderson and Dawers, 1990).

P(3HB-co-3HV)는 공중합체에서 3HB와 3HV의 조성에 따라 물성이 다르다. Table 2.4.은 각 단량체의 함량에 따른 물성의 변화를 보여준다 (Reddy et al., 2003). 즉, 3HV의 함량이 증가함에 따라 유연하고 부드러워진다. 이와 같은 특성은 P(3HB)가 가진 물성의 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 3HV 함량에 따라 다양한 활용도 가능하게 한다 (Shang et al., 2004).

Table 2.3. P(3HB-co-3HV) production by various bacteria and culture methods (Anderson and Dawers, 1990)

Bacteria	Culture method	Major substance	Culture time(h)	Cell concentration (g/L)	P(3HB-co-3HV) concentration (g/L)	P(3HB-co-3HV) content (%)	3HV molar fraction (mol %)
Cupriavidus. necator	Glucose control fed batch	Glucose+ propionic acid	46	158	117	74	4
Cupriavidus. necator	Fed batch	Glucose+ valeric acid	66	110	37	34	63
Cupriavidus. necator	Fed batch	Fructose+ valeric acid	66	10	6	65	59
Cupriavidus. necator	Fed batch	Olive oil+ propionic acid	72	6	5	78	8
Paracoccus denitrificans	Fed batch	n-pentanol	30	7	1	16	99
Paracoccus denitrificans	Fed batch	Methanol+ n-pentanol	120	9	2	26	60

Table 2.4. Thermal and mechanical properties of P(3HB-co-3HV) copolymers (Reddy et al., 2003)

Composition (mol%)		Melting temperature (°C)	Glass temperature (°C)	Heat Distortion temperature (°C)	Young's modulus (Gpa)	Tensile strength (Mpa)	Impact strength (Mpa)
3HB	3HV						
100	0	179	10	157	3.5	40	50
97	3	170	8	140	2.9	38	60
91	9	162	6	125	1.9	37	95
86	14	150	4	112	1.5	35	120
80	20	145	-1	99	1.2	32	200
75	25	137	-6	92	0.7	30	400

2.2.2. P(3HB-co-3HV)의 합성 경로

*C. necator*에 의한 프로피온산과 포도당을 이용한 P(3HB-co-3HV)의 합성 경로는 Fig. 2.3.에 나타나있다. 프로피온산이 propionyl-CoA가 되고, 이것과 acetyl-CoA가 3-ketothiolase (PhaA)에 의한 축합 반응에 의해 3-ketovaleryl-CoA로 바뀐다. acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)는 3-ketovaleryl-CoA를 (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA로 바꾼다. 마지막 효소인 PHA synthase (PhaC)는 (R)-3-hydroxybutyryl-CoA와 (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA를 에스테르 결합에 의해 무작위로 붙여 나가며 P(3HB-co-3HV)를 합성한다 (Ojumu et al., 2004).

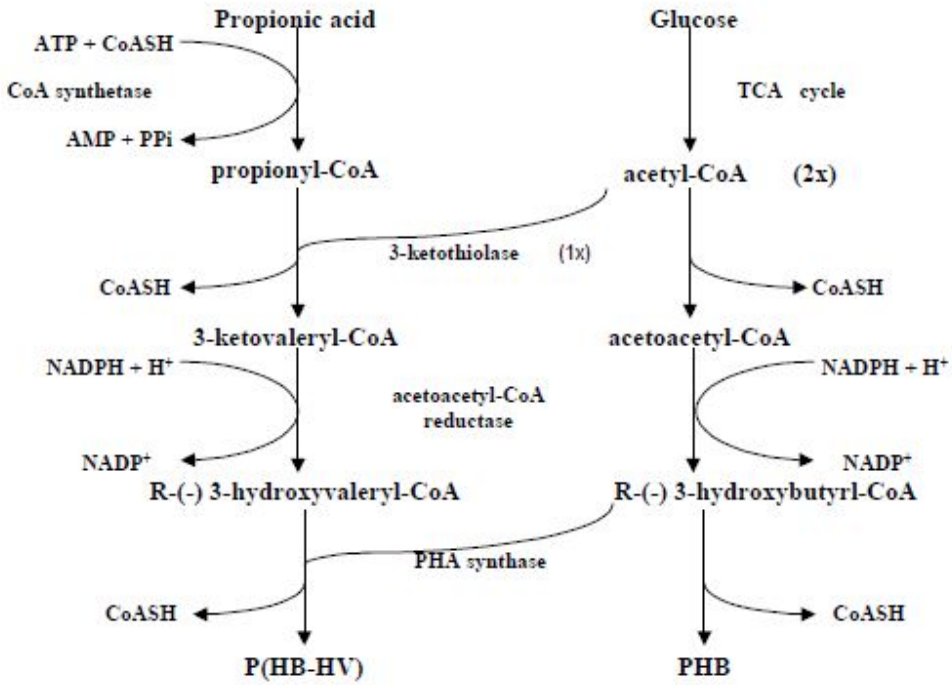


Fig. 2.3. The biosynthetic pathway of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in *Cupriavidus necator* (Ojumu et al., 2004).

마찬가지로 발레르산이 사용되었을 때도 비슷한 합성 경로를 따르게 된다. 본 연구에서 사용할 발레르산의 경우 탄소가 다섯 개이므로 프로피온산과는 달리 바로 hydroxyvaleryl-CoA 형태가 될 수 있고, 이것이 3HV의 합성으로 이어진다 (Fig. 2.4.). 다른 지방산들 역시 다양한 PHA를 합성하는데, Fig. 2.4.은 그 경로를 도시한 것으로, hydroxyacyl-CoA는 탄소수에 따라 hydroxybutyl-CoA와 hydroxyvaleryl-CoA 모두를 포함한다 (Ojumu et al., 2004).

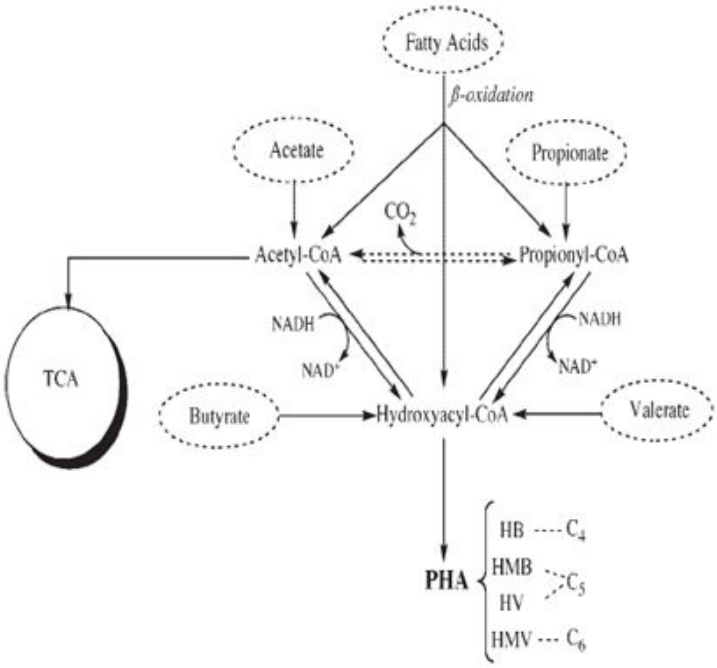


Fig. 2.4. Schematic representation of PHA production from different fatty acids (Joao et al., 2006).

2.2.3. P(3HB-co-3HV)의 합성에 관한 기존 연구

Table 2.3.에서 보듯이 P(3HB-co-3HV) 합성에 관한 연구는 대부분 유기탄소를 사용하고, 3HB를 합성하는 기질에 3HV 전구물질을 보조기질로 첨가하여 공중합체를 생산하는 방식으로 배양하고 있다. 이것은 3HV의 전구물질들이 대부분 프로피온산이나 발레르산과 같은 지방산으로, 일정 농도 이상에서는 미생물에 독성을 나타낼 수 있기 때문이다. 따라서 3HV를 생산하기 위한 보조기질을 주입하는 방법 등을 조절하여 다양한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 생산하려는 연구가 많이 이루어졌다 (Kim et al., 1994; Du et al., 2001; Shang et al., 2004; Lee et al, 2008).

무기탄소를 이용하여 P(3HB-co-3HV)를 합성하는 연구로는, Volova와 Kalacheva가 발레르산 첨가 횟수가 많을수록 3HV의 함량이 증가하는 것을 확인한 정도로 (Volova and Kalacheva, 2005) 여전히 미흡한 시점이다.

2.3. P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)의 의료용 활용

의료 및 의약용 재료로서 고분자를 사용할 경우에 문제점이 되는 것은 생체가 자기방어를 위해 일으키는 이물 반응이다. 따라서 의료용 고분자로 사용되기 위해서는 용도에 맞는 물성은 물론 체내에서 이물 반응을 일으키지 않아야 한다. 이 중 전통적으로 사용되던 실리콘 같은 물질은 인체에 해로운 영향을 주거나 암을 유발하는 것으로 의심이 되고 있어 새로운 물질들이 필요하게 되었다 (윤중현, 2012). PHA는 생분해성과 더불어 의료 및 의약용 생체 내 고분자 재료로서 가장 중요한 조건인 생체적합성을 가지고 있어 의학적 적용에 중요한 물질이 될 수 있는 잠재력을 지니고 있다. Table. 2.5.는 PHA가 다양한 의료 용도로 활용될 수 있음을 보여준다 (Zinn et al., 2001).

하지만 PHA가 항상 생체적합성을 갖는 것은 아니다. PHA 종류나 조성, 사용 부위, 용도에 따라 체내에서 이물 반응을 일으키는 정도가 다르다. P(3HB-co-3HV)의 경우, 체내에서 이물 반응을 일으키는지를 알아보기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 일반적으로 세포나 조직에 P(3HB-co-3HV)가 삽입되었을 때 면역 반응이 일어나는 정도는 3HV 함량에 영향을 받는다고 알려져 있으며, 3HV 함량이 높을수록 체내에서 이물 반응을 일으킬 가능성이 커진다. 이것 외에 P(3HB-co-3HV)가 쓰인 용도나 합성된 방법, 표면 특성 등에 의해서도 영향을 받을 수 있으나 주 영향 인자는 3HV 함량이다 (Volova et al., 2003). 최근 연구 결과에 따르면 3HV 함량이 약 30 mol%까지는 별 다른 이물 반응이 없이 생체적합성을 갖는 것으로 나타났다 (Shishatskaya et al., 2004).

Table 2.5. Potential applications of PHA in medicine (Zinn et al., 2001)

Type of application	Products
Wound management	Sutures, skin substitutes, nerve cuffs, surgical meshes, staples, swabs
Vascular system	Heart valves, cardiovascular fabrics, pericardial patches, vascular grafts
Orthopaedy	Scaffolds for cartilage engineering, spinal cages, bone graft substitutes, meniscus regeneration, internal fixation devices(e.g., screws)
Drug delivery	Micro- and nanospheres for anticancer therapy
Urology	Urological stents
Dental	Barrier material for guided tissue regeneration in periodontitis
Computer assisted tomography and ultrasound imaging	Contrast agents

의료용 용도로 사용됨에 있어서 3HV 함량의 조절은 그 활용을 다양하게 한다. 3HV 함량에 따라 물성이 바뀜은 물론 (Table 2.4.), 분해시간까지 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 15 mol%의 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)가 체내에서 P(3HB)보다 약 1.4-2.0배 정도 더 빨리 분해된 것을 확인한 연구 결과가 있다 (Shishatskaya et al., 2005). 이를 볼 때, 3HV 함량의 다양성은 물성과 함께 분해시간도 조절할 수 있는 인자로 의료용 활용에 중요하다 (Philip et al., 2007). Table 2.6.은 3HV 함량에 따른 P(3HB-co-3HV)의 의료용 활용을 나타낸 표이다.

Table 2.6. Biomedical application of P(3HB-co-3HV) with different 3HV content

3HV content in P(3HB-co-3HV) (3HV mol%)	application	Comments	Reference
4-30	suture	No adverse effect on physiological, biochemical and functional parameters of the rat's skin and muscle	Volova et al., 2003
8	bone tissue	P(3HB-co-3HV) with 8 HV mol%/HA(hydroxly apatite) blending is similar with human bones	Galego et al., 2000
22	drug carrier	The antibiotic-loaded carrier implanted into rabbit tibia and almost complete remission was observed on day 30	Yagmurlu et al., 1999
5-22	nonporous disks and cylinders implants	No acute inflammation, abscess formation, or tissue necrosis of the mice was observed	Gogolewski et al., 1993

3. 실험 재료 및 방법

3.1. 실험 재료

3.1.1. 미생물

PHA를 합성하는 균주로써 수소산화균인 *Cupriavidus necator* ATCC 17697^{T}를 사용하였다. *C. necator*는 독립영양배양 조건에서 기질로 수소, 산소, 이산화탄소를 이용하는데 수소를 산화할 때 얻은 에너지로 이산화탄소를 고정시키고 P(3HB)를 축적한다 (Ishizaki et al., 2001). 또한 종속영양배양 조건에서도 다양한 유기 탄소를 이용하여 성장할 수 있다 (Schlegel and Lafferty, 1971).

3.1.2. 배지

미생물의 증식을 위한 배양은 NH_4Cl을 질소원으로 사용한 최소영양배지 (이하 영양배지)를 사용하였으며, KH_2PO_4 2.3 g/L, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 2.9 g/L, NH_4Cl 2 g/L, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0.5 g/L, $NaHCO_3$ 0.5 g/L, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 0.01 g/L, $Fe(NH_4)$ citrate 0.05 g/L, 미량원소용액 1 mL/L로 구성되어 있다. 미량원소용액은 $ZnSO_4 \times 7H_2O$ 0.1 g/L, $MnCl_2 \times 4H_2O$ 0.03 g/L, H_3BO_3 0.3 g/L, $CoCl_2 \times 6H_2O$ 0.2 g/L, $CuCl_2 \times 2H_2O$ 0.01 g/L, $NiCl_2 \times 6H_2O$ 0.02 g/L, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ 0.03 g/L로 조성되어 있다. 또한 P(3HB) 축적을 위한 배양에는 질소원으로 사용된 NH_4Cl을 제거한 최소영양배지 (이하 축적배지)를 사용하였다.

3.1.3. 탄소원

PHA를 합성하기 위한 탄소원으로 CO_2와 발레르산을 사용하였다. CO_2를 이용해 P(3HB)를 합성할 때 CO_2 농도가 미치는 영향을 확인하기 위해, H_2, O_2, CO_2, N_2를 포함한 혼합가스 내 다양한 농도의 CO_2 (1, 3, 10, 20%)를 사용하였다 [H_2 (7% v/v), O_2 (1% v/v), CO_2 (1, 3, 10, 20% v/v), N_2 (나머지)]. P(3HB-co-3HV) 합성을 위해서는 CO_2를 포함한 혼합가스와 함께 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% (v/v)의 발레르산을 사용하였다.

3.2. 실험 방법

*C. necator*의 미생물 내 PHA 축적은 미생물 성장을 위한 첫 번째 단계와 PHA 축적을 위한 두 번째 단계로 이루어진 2 단계 배양 방법을 이용하여 수행하였다. 첫 번째 미생물 성장 단계는 영양분이 충분한 조건에서 미생물을 배양함으로써 개체수를 늘리고, 이어지는 두 번째 PHA 축적 단계에서는 PHA가 탄소원은 충분하지만 특정 영양원이 결핍된 환경에서 잘 합성되는 특성을 이용하여 N, P, O와 같은 영양분이 결핍된 조건을 조성하여 미생물을 배양한다 (Anderson and Dawers, 1990). 이 배양 방법은 미생물 농도를 증가시킨 후 미생물 내의 PHA 함량을 증가시킴으로써 PHA 생산력(g/L/h)을 높일 수 있다.

3.2.1. CO_2 농도에 따른 미생물 성장과 P(3HB) 축적 변화

*C. necator*의 미생물 성장을 위한 첫 번째 단계 회분식 배양은 탄소원으로 다양한 농도의 CO_2 (1, 3, 10, 20%)를 포함하는 혼합가스 50 mL/min를 연속적으로 공급하며 3.1.2.에 설명되어 있는 영양배지에서 수행되었다. *C. necator*를 접종한 배지 600 mL를 1 L 삼각 플라스크에 넣

고 30°C 항온수조에서 140 rpm으로 6일 동안 Fig. 3.1.과 같은 장치에서 배양하였다. 배양 중 배지의 pH는 6.9±0.1로 유지하였고 2일에 한번 원심분리하여 미생물만 분리한 후 다시 영양배지에 접종하였다. 첫 번째 단계 배양 후 일정량의 미생물을 회수하여 흡광도(Optical density, OD at 600 nm) 값 약 1.6의 농도(ca. 건조세포농도(Dry cell weight, DCW) 0.8 g/L)로 두 번째 단계 배양을 시작하였다. 두 번째 단계 배양은 P(3HB)의 합성을 유도하는 단계로, 첫 번째 단계와 같은 조건으로 4일 동안 진행되었다. 2일 후, 3.1.2.에서 설명한 축적배지에서 배지의 25% (v/v)를 원심분리한 후 미생물만 같은 부피의 새 축적배지에 접종하여 다시 배양액에 주입하여 P(3HB) 축적을 진행하였다.

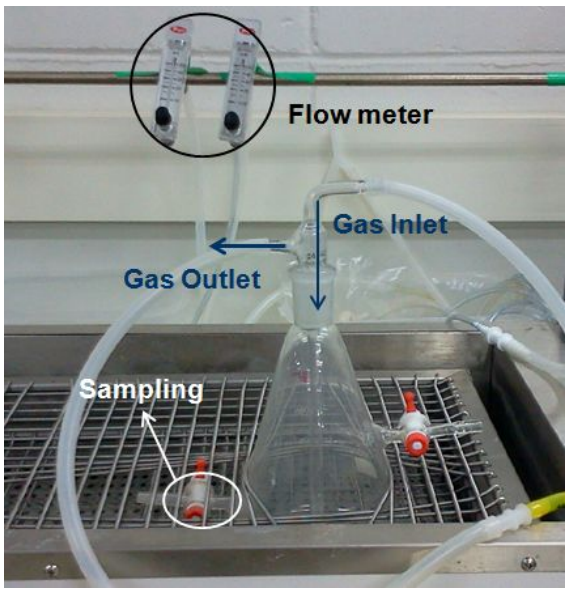


Fig. 3.1. Reactor setup used in the present study.

3.2.2. 발레르산 첨가에 의한 P(3HB-co-3HV) 합성

공중합체인 P(3HB-co-3HV)를 합성하기 위해 두 번째 단계 배양 때 보조기질로 발레르산을 첨가하는 실험을 진행하였다. 첫 번째 단계 배양은 앞선 실험에서 가장 높은 효율을 나타냈던 CO_2 농도를 이용하여 3.2.1.의 첫 번째 단계와 같은 조건으로 수행하였다. 두 번째 단계 배양에서는 먼저 P(3HB-co-3HV) 합성에 적합한 발레르산 농도를 결정하고, 선정된 적정 농도의 발레르산 주입 방식을 변화하여 P(3HB-co-3HV) 합성에 미치는 영향을 살펴보았다.

먼저 P(3HB-co-3HV) 합성을 위한 발레르산의 적정 농도를 찾기 위해 두 번째 단계 배양 초기에 다양한 농도의 발레르산 [0.05, 0.075, 0.1, 0.2% (v/v)]을 주입하여 그 영향을 살펴보았다. 발레르산을 제외한 다른 조건들은 3.2.1.에서 설명한 두 번째 단계 배양과 같다.

3HB의 합성을 저해하지 않으면서 3HV의 수율 (3HV g/발레르산 g)이 가장 높은 발레르산 농도를 찾은 후, 발레르산의 주입 방식에 변화를 주어 다양한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 합성하는 실험을 수행하였다. 주입 방법은 단일 주입과 연속 주입으로, 연속 주입의 경우 주입 시 농도에 따라 변화시켰다.

3.2.3. 연속식 배양을 통한 P(3HB-co-3HV) 합성

P(3HB-co-3HV)를 일정한 품질 (일정한 3HV 함량)로 지속적으로 생산할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 연속식 첫 번째 미생물 성장 단계와 회분식 두 번째 PHA 축적 단계로 배양을 진행하였다. 첫 번째 단계 연속식 배양을 통해 두 번째 단계에 사용할 미생물을 같은 상태 (OD, DCW, P(3HB) 함량)로 지속적으로 얻을 수 있는지 확인하고, 두 번째 단계 배양 후 생산된 P(3HB-co-3HV)가 일정한 3HV 함량을 나타내는지 확인하였다.

*C. necator*의 미생물 성장을 위한 첫 번째 단계 연속식 배양은 탄소

원으로 1% CO_2를 포함하는 혼합가스 50 mL/min를 연속적으로 공급하며 영양배지에서 수행되었다. *C. necator*를 접종한 배지 1.8 L를 3 L 둥근 플라스크에 넣고 30°C 항온수조에서 115 rpm으로 배양하였다. 처음 4일 동안은 회분식 배양으로 진행하여 미생물 농도를 높였고, 4일 후 OD (at 600 nm) 값이 약 1.5가 된 후에 연속식으로 배양을 시작하였다. 연속식 반응조의 수리학적 체류시간 (HRT)은 앞선 실험 (3.2.1.과 3.2.2. 참고)에서와 마찬가지로 6일로 유지하였다. 24시간 마다 300 mL의 배양액을 빼고 300 mL의 영양배지를 넣어주었다.

두 번째 단계 배양은 첫 번째 단계 배양액의 약 10%를 원심분리 한 뒤, 축적배지 600 mL에 분산시켜 1 L 삼각플라스크에 넣고 OD (at 600 nm) 값이 약 1.6이 되도록 한 후, 30°C 항온수조에서 135 rpm으로 4일 동안 회분 배양하였다. 생산하고자 하는 P(3HB-co-3HV)는 약 15%의 3HV 함량을 갖는 것으로 정하였고, 배양 조건은 3.2.2.의 결과를 바탕으로 결정하였다. 같은 방식으로 두 번째 단계 회분식 배양을 3회 반복하여 같은 품질의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있는지 확인하였다.

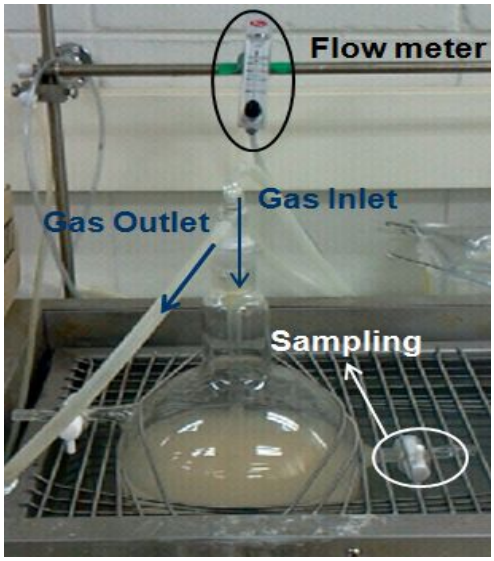


Fig. 3.2. Continuous culture reactor used in the present study.

3.3. 분석 방법

3.3.1. 미생물 분석

첫 번째 단계 배양에서 미생물의 성장은 OD와 개체수를 24시간마다 확인하였다. 두 번째 단계 배양에서는 정해진 시간 (배양 후 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간)에 미생물의 DCW를 측정하였다. 배양액의 OD는 분광광도계(2120UV, Optizen, 한국)로 600 nm에서 측정하였고, 미생물의 DCW는 배양액 8 mL를 원심분리 (7000 g, 5 min)한 후 60°C에서 24시간 건조하여 측정하였다. *C. necator*의 개체수는 PBS (Phosphate-Buffered saline)로 배양액을 10^2, 10^4, 10^6 배 희석시킨 후, 배양원액과 희석된 배양액을 고체영양배지 (Nutrient agar)에 도말하여 각각 24시간 배양한 후 개수하였다. 모든 실험은 2~3개 측정값의 평균값을 사용하였다.

3.3.2. PHA 추출 및 분석

두 번째 단계 배양에서 정해진 시간 (배양 후 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간)에 축적된 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)의 농도, 배양액 중 잔류하는 발레르산의 농도를 측정하였다. 미생물 내 축적되어 있는 PHA를 추출하기 위해 DCW 11±3 mg에 부탄올 1.5 mL와 염산 (37%) 0.5 mL를 첨가한 뒤, 100°C에서 8시간 반응시켜 부탄올화 (butanolysis) 시켰다. 반응물을 상온으로 식힌 후, 헥산 2.5 mL와 증류수 4 mL를 각각 첨가하여 교반한 후, 층분리 된 위층을 분석에 사용하였다.

PHA는 FID가 장착된 가스크로마토그래피(GC, 6100, Young Lin Instrument Co., 한국)로 HP-1 (30 m x 0.32 mm, 1.00 μm) 컬럼을 사용하여 정량하였다. GC의 조작 조건은 Table 3.1.과 같다.

Table 3.1. Operation conditions of FID gas chromatograph for determining PHA concentrations

Parts	Conditions
Column	HP-1 (30 m x 0.32 mm, 1.00 μm)
Injection volume	1 μm
Initial column temperature	70°C for 5 min
Temperature rising rate	20°C/min
Final column temperature	240°C for 1 min
Carrier gas & flow rate	Helium, 30 mL/min
Temperature of injection port	250°C
Temperature of detection port	250°C

PHA의 함량은 세포 내에 PHA가 축적된 정도를 나타내는 것으로, Eq. (3.1)을 사용하여 구하고, P(3HB-co-3HV) 내의 3HV 함량은 Eq. (3.2)로 구하였다 (임설희 2001).

$$PHA\,\text{함량}\,(\%) = \frac{\text{분석한 샘플 내의}\,PHA\text{의 중량}\,(mg)}{\text{건조미생물중량}\,(mg)} \times 100$$

Eq. (3.1)

$$3HV\,mol\% = \frac{\dfrac{3HV(g)}{100.117(g/mol)}}{\dfrac{3HB(g)}{86.09(g/mol)} + \dfrac{3HV(g)}{100.117(g/mol)}}$$

Eq. (3.2)

3.3.3. P(3HB-co-3HV) 구조, 분자량 및 물성 분석

P(3HB-co-3HV)의 구조와 분자량 및 물성을 확인하기 위한 용매 추출법을 이용하여 PHA를 추출하였다. 배양액을 원심분리 하여 동결건조 후 얻은 미생물 1 g 당 클로로포름 100 mL를 첨가하여 60°C에서 14시간 반응시켜 PHA를 용매 추출한 후, 세포 찌꺼기를 여과하여 제거하였다. 분리된 여액을 증발시켜 P(3HB-co-3HV)를 침전시킨 후, 과량의 메탄올에 침전된 PHA를 회수하여 건조시켰다. P(3HB-co- 3HV)에서 단량체들의 구성을 확인하기 위해 ^{1}H-NMR 분광분석을 수행하였다. 회수한 P(3HB-co-3HV) 0.02 g을 0.7 mL의 클로로포름-D에 용해시켜 Bruker AVANCE 600 MHz 핵자기 공명기를 사용하여 분석하였다. P(3HB-co-3HV)를 클로로포름에 용해시켜 0.45 μm PTFE 필터로 여과한 후, Waters GPC를 이용하여 P(3HB-co-3HV)의 분자량 분석을 수행하였다. GPC의 조작 조건은 Table 3.2.과 같다.

Table 3.2. Operation conditions of GPC for determine the molecular weight of PHA

Parts	Conditions
Detector	Waters 410 RI
Column	2×Shodex LF-804 (7.8×300 mm)
Eluent	$CHCl_3$
Temperature of oven	35°C
Eluent flow rate	1 mL/min
Injection conditions	100 μL, 3 mg/mL
Molecular weight standards	Polystyrene

P(3HB-co-3HV)의 열적 특성을 확인하기 위한 DSC 분석 [녹는 온도(melting temperature, T_m), 유리전이 온도(glass transition temperature, T_g), 결정화 온도(crystallization temperature, T_c), 용융 엔탈피(melting enthalpy, $\triangle H_m$)]은 Perkin-Elmer Pyris 1 DSC with cooler를 이용하였다. 질소 기류 하에서 분석온도의 범위는 -40～200°C이고, 승온속도와 냉각속도는 20°C/min으로 유지하였다. P(3HB-co-3HV)의 결정화도(crystallinity, X_c)는 Eq. (3.3)으로 구하였다.

$$X_c = \frac{\triangle H_m}{\triangle H^0_{PHB}} \qquad \text{Eq. (3.3)}$$

여기서 $\triangle H_m$은 시료의 용융 엔탈피이고, $\triangle H^0_{PHB}$는 순수 P(3HB)의 이론적 용융 엔탈피(146 J/g)이다 (Gunarante et al., 2004). 인장시험은 ASTM D 882에 준하여 수행되었다. 시험기기는 WITHSAB 사의 UTM을 사용하였고, 시험속도 5 mm/min, 로드셀 200 N, 그립간 거리 50 mm, 시험온도 (23±2)°C, (45±5)% RH 조건에서 수행되었다.

3.3.4. 발레르산 농도 분석

발레르산은 FID가 장착된 가스크로마토그래피(GC, 6100, Young Lin Instrument Co., 한국)와 HP-INNOWAX (30 m x 0.32 mm, 0.50 μm) 컬럼을 사용하여 분석하였다. GC의 조작 조건은 Table 3.3.과 같다.

Table 3.3. Operation conditions of FID gas chromatograph for determining valeric acid concentrations

Parts	Conditions
Column	HP-INNOWAX (30 m x 0.32 mm, 0.50 μm)
Injection volume	1 μm
Initial column temperature	120°C for 2 min
Temperature rising rate	10°C/min
Final column temperature	190°C for 2 min
Carrier gas & flow rate	Helium, 30 mL/min
Temperature of injection port	240°C
Temperature of detection port	250°C

4. 실험 결과 및 고찰

4.1. P(3HB) 생산을 위한 최적 CO_2 농도 결정

4.1.1. 첫 번째 단계 배양기간 중 CO_2 농도에 따른 *C. necator*의 성장

혼합가스 내 CO_2 농도가 *C. necator*의 성장에 미치는 영향은 Fig. 4.1.과 Table 4.1.에 나타나있다. 배양기간 중 시간에 따른 CO_2 농도와 상관없이 배양 초기 OD 값은 0.01로 6일 후 OD 값이 1, 3, 10, 20% CO_2에서 각각 2.3, 2.1, 2.1, 1.9로 증가하였다. 질소원을 제한하지 않은 최소영양배지에서의 첫 번째 단계 배양기간 동안 *C. necator*의 성장이 일어났음을 나타낸다. 혼합가스 내 CO_2 농도의 증가에 따라 6일 배양 후 최종 OD 값은 2.3에서 1.9로 감소했고 (Table 4.1.), DCW로 환산해보면 CO_2가 1과 20%일 때 각각 1.6과 1.2 g/L로 약 0.4 g/L의 차이가 난다. 이는 낮은 농도의 CO_2에서 미생물 성장이 더 잘 일어났음을 의미한다. 미생물 개체수는 초기에 약 5.0×10^6 CFU/mL에서 첫 번째 단계 배양 후 평균 3.0×10^9 CFU/mL로 600배 정도 증가하였으며, CO_2 농도에 따른 차이는 크지 않았다 (Table 4.1.). 첫 번째 단계 배양 후 P(3HB)의 함량은 CO_2 농도가 증가함에 따라 감소했고, 결국 OD 값의 차이는 미생물 내에 축적된 P(3HB) 함량 차이에 의한 것으로 볼 수 있다. *C. necator*는 체내에 P(3HB)를 축적량이 증가하면 그에 비례하여 미생물의 부피가 커진다. 따라서 미생물 개체수 뿐만 아니라 미생물 내의 P(3HB) 축적량도 OD 값의 차이로 나타날 수 있다(Anderson, 1990). 첫 번째 성장 단계에서 미생물 개체수는 CO_2 농도에 영향을 받지 않았지만 성장하면서 체내에 축적된 P(3HB) 양은 CO_2 농도가 낮을수록 더 높았다.

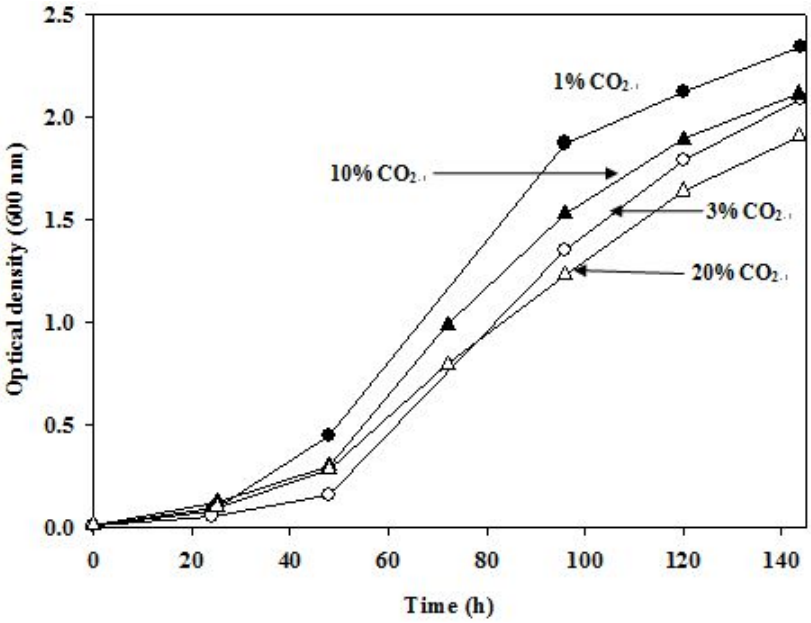


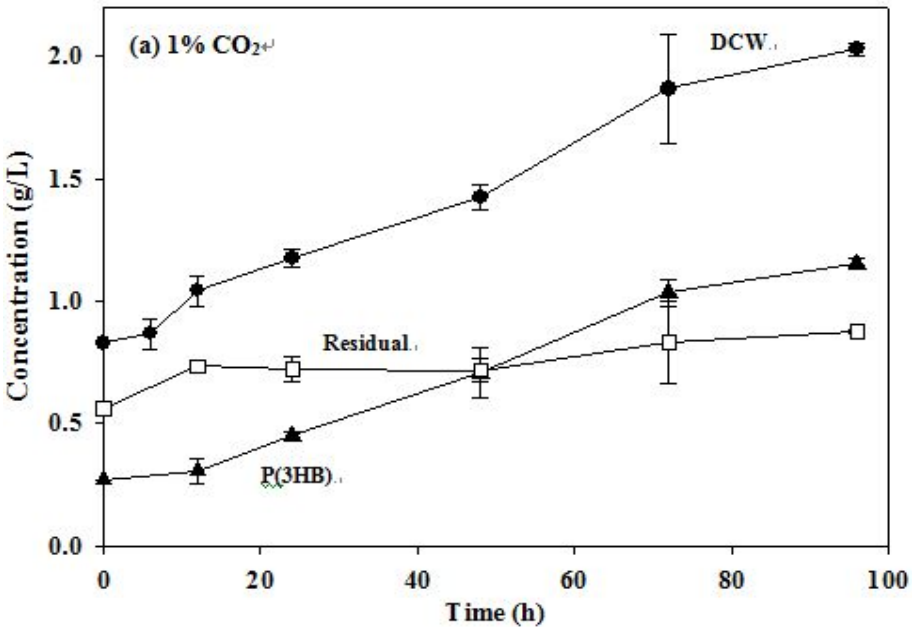
Fig. 4.1. Changes in the optical density of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 1st stage growth.

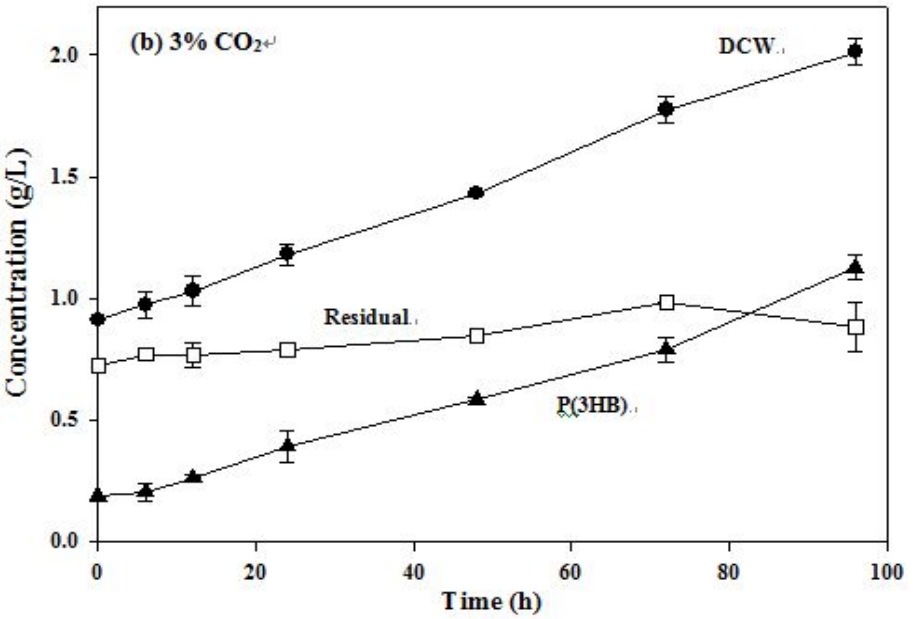
Table 4.1. Optical density (OD), cell number, and P(3HB) content in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) at the end of the 1st stage

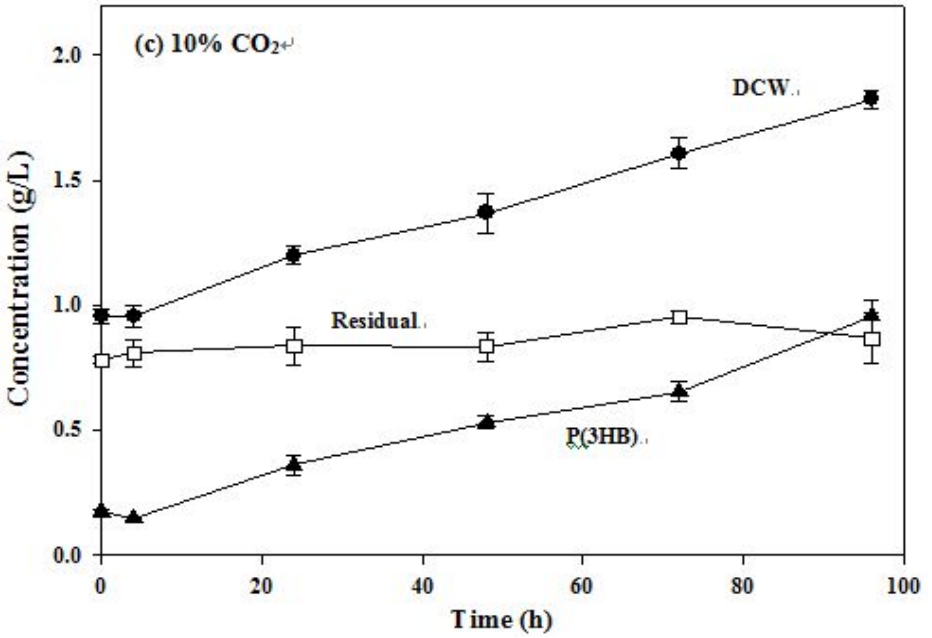
	CO_2 concentration (%)			
	1	3	10	20
OD (at 600 nm)	2.3	2.1	2.1	1.9
Cell number (CFU/mL)	3.0×10^9	2.8×10^9	3.1×10^9	2.9×10^9
P(3HB) content (%)	32	21	18	14

4.1.2. 두 번째 단계 배양기간 중 CO_2 농도에 따른 P(3HB) 축적 변화

Fig. 4.2.는 두 번째 단계 배양에서 1, 3, 10, 20% CO_2를 사용했을 때, 시간에 따른 DCW, P(3HB), 잔류물(Residual)의 변화량을 보여주고 있다. 여기서 잔류물이란 DCW에서 P(3HB)의 양을 뺀 값으로 미생물에서 P(3HB)를 제외한 나머지 부분을 의미한다. 두 번째 단계 배양이 수행되는 질소원이 결핍된 환경에서는 핵산과 단백질의 합성이 저해되므로 동화되는 탄소원은 대부분 PHA로 저장된다 (Anderson and Dawers 1990). 따라서 4일 간의 배양 기간 동안 거의 일정한 값을 유지하는 잔류물은 DCW의 변화가 대부분 P(3HB)의 증가에 의해서 일어남을 의미한다.




(b) 3% CO2
DCW
Residual
P(3HB)
Concentration (g/L)
Time (h)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
20
40
60
80
100


(c) 10% CO2
DCW
Residual
P(3HB)
Concentration (g/L)
Time (h)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
20
40
60
80
100

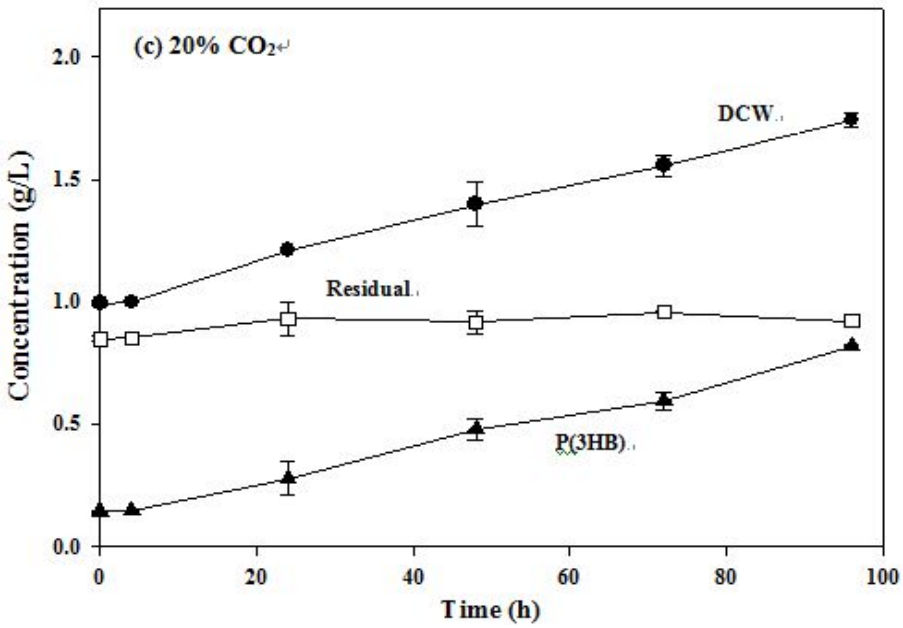


Fig. 4.2. Changes in the concentrations of dry cell weight (DCW), P(3HB), and residual [DCW−P(3HB)] of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 2nd stage growth.

Fig. 4.3.은 CO_2 농도 별로 배양 초기와 배양 후에 축적된 P(3HB)의 양을 보여준다. 초기 P(3HB) 농도가 일정하지 않은 것은 첫 번째 단계 배양 후 세포 내에 축적된 P(3HB) 양이 CO_2 농도 별로 다르기 때문이다 (Table 4.1.). P(3HB)는 대부분 두 번째 단계에서 축적되었는데 두 번째 단계 배양기간 동안 증가한 P(3HB)의 양은 3% CO_2에서 가장 많았고 (0.94 g/L, 전체 농도의 83%가 두 번째 단계에서 축적), 그 다음은 1, 10, 20% CO_2의 순으로 나타났다. 1, 3% CO_2를 사용하였을 경우, 두 번째 단계 배양에서 축적된 P(3HB)의 양의 차이는 크지 않았지만, CO_2 농도가 10, 20%로 높아지면서 그 양이 감소하였다. 20% CO_2에서 두 번째 단계 배양 중 P(3HB) 축적량은 3% CO_2의 70% 수준으로 나타났다. 이

는 높은 농도의 CO_2 (10, 20%)가 기질로 공급될 경우 1, 3% CO_2가 공급될 때보다 P(3HB)의 합성에 저해 현상을 일으킬 수 있음을 의미한다. 총 P(3HB) 축적량은 1, 3, 10, 20% CO_2 순으로 나타났다. 이 값 역시 1, 3% CO_2에서는 차이가 거의 없지만 10, 20%로 CO_2 농도가 증가하면서 감소하는 경향이 뚜렷해진다. 첫 번째 성장 단계와 두 번째 축적 단계를 같이 볼 때, CO_2 농도에 따른 P(3HB) 합성은 고농도 (10, 20%)에서보다 저농도 (1, 3%)에서 효율적임을 확인할 수 있었다. 두 번째 단계 배양 결과 P(3HB)의 함량은 약 47~57% 정도로 1, 3, 10, 20% CO_2 순으로 나타났으나 통계적으로 볼 때 비슷한 수준이었다 (Fig. 4.3.). 따라서 주어진 배양조건에서 최종적인 P(3HB)의 합성량이 가장 많았던 1% CO_2가 가장 효율적인 것으로 보인다.

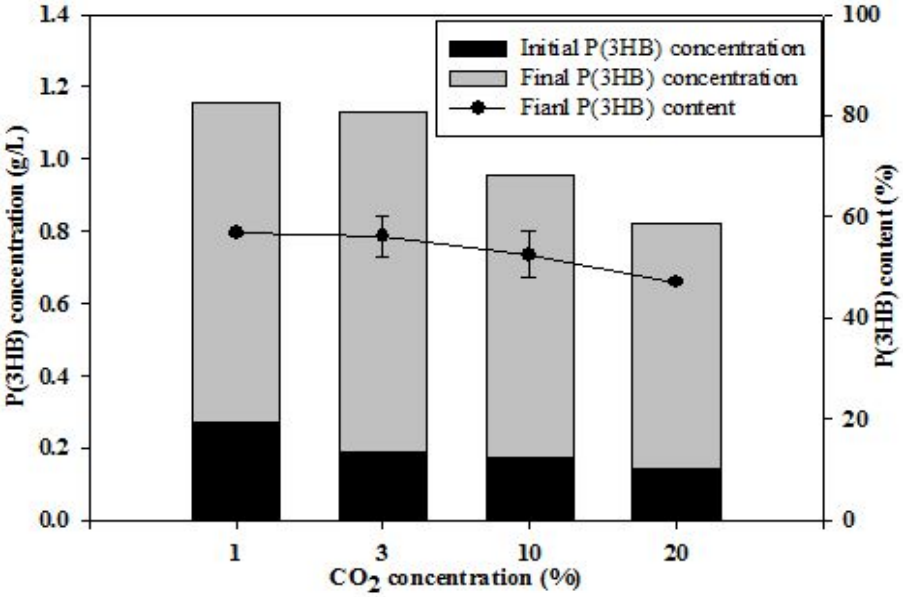


Fig. 4.3. Changes in the initial and final P(3HB) concentrations, and the final P(3HB) content in *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2, varying CO_2 concentration, and N_2 balanced) during the 2nd stage growth.

4.1.3. CO_2 농도가 *C. necator*의 성장과 P(3HB) 합성에 미치는 영향 고찰

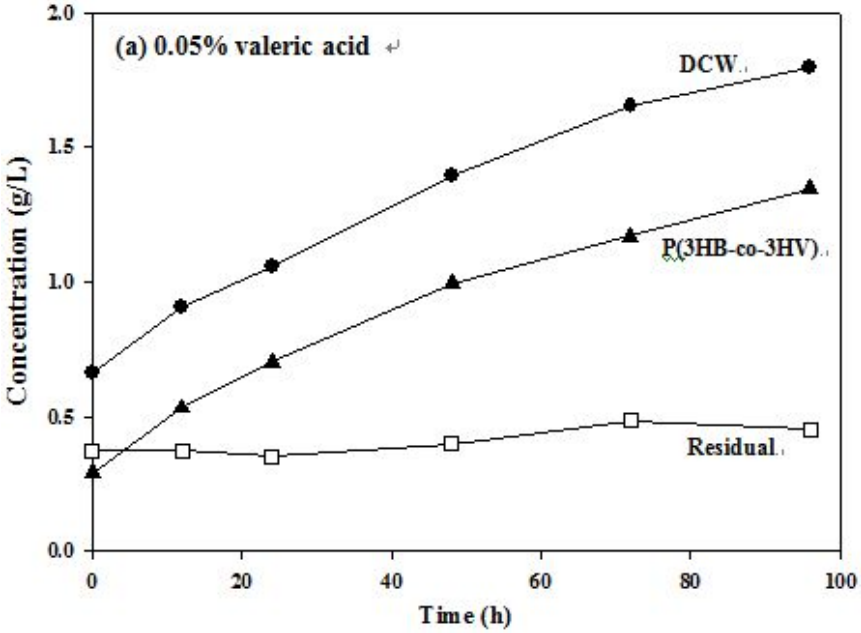
본 연구에서는 1% CO_2를 기질로 사용했을 때가 가장 많은 미생물 성장과 P(3HB) 합성을 보였다 (Fig. 4.1과 Fig. 4.3). 이는 기질로 주어진 혼합가스 내 CO_2 농도가 증가함에도 P(3HB) 전환에 사용된 CO_2 양은 증가하지 않았음을 의미한다. 이러한 결과는 여러 가지 이유로 설명할 수 있다. 먼저 H_2와 O_2 같은 다른 기질들이 제한되었기 때문이다. 수소 산화균은 H_2와 O_2로부터 CO_2 고정에 필요한 에너지를 얻는다 (Pohlmann, 2006; Reinecke and Steinbuchel, 2009). H_2의 산화로부터 ATP 형태의 에너지를 얻어 CO_2를 이용하는데, 본 연구에서 사용한 H_2와 O_2는 절대적인 양 뿐 아니라 (7% H_2, 1% O_2), 용해도(H_2 용해도 0.0040 g/물 100 g, O_2 용해도 0.00016 g/물 100 g, 20°C, 1 기압)도 낮아 미생물이 이용할 수 있는 양이 제한적이었을 것으로 판단된다. 이렇게 CO_2 고정에 필요한 에너지가 제한되면서 CO_2 공급량이 늘어나도 사용할 수 없는 환경이 되어 P(3HB)로 전환되는 CO_2 양은 1% CO_2를 공급할 때 이상이 되지 못한 것으로 볼 수 있다. 기존 연구에서 H_2, O_2, CO_2가 각각 75, 15, 10% (v/v)로 혼합되어 있는 가스를 탄소원으로 이용하여 약 50 g/L의 DCW와 53% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다 (Ishizaki and Tanaka, 1991). 이는 본 연구에서 사용한 H_2, O_2 농도의 10배 수준으로 H_2, O_2와 같은 다른 기질들의 농도를 높임으로써 더 높은 농도의 CO_2를 이용하여 더 많은 양의 DCW와 P(3HB)를 얻을 수 있음을 보여준다. 또한 H_2, O_2, CO_2의 비율을 6 : 2 : 1로 (각각 약 67, 22, 11% (v/v))하는 혼합가스를 이용하여 17.4 g/L의 DCW와 90% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻은 연구결과도 있다 (Volova et al., 2004; Volova and Kalacheva, 2005). 이를 볼 때 기존 연구에서 최적 가스 비율은 H_2, O_2, CO_2가 각각 7 : 1 : 1 ~ 6 : 2 : 1이고, 본 연구에서는 CO_2가 1에서 20%로 늘어나면서 이 비율이 바뀌어 DCW와 P(3HB)의 생산량이 줄어든 것으로 볼 수도 있다.

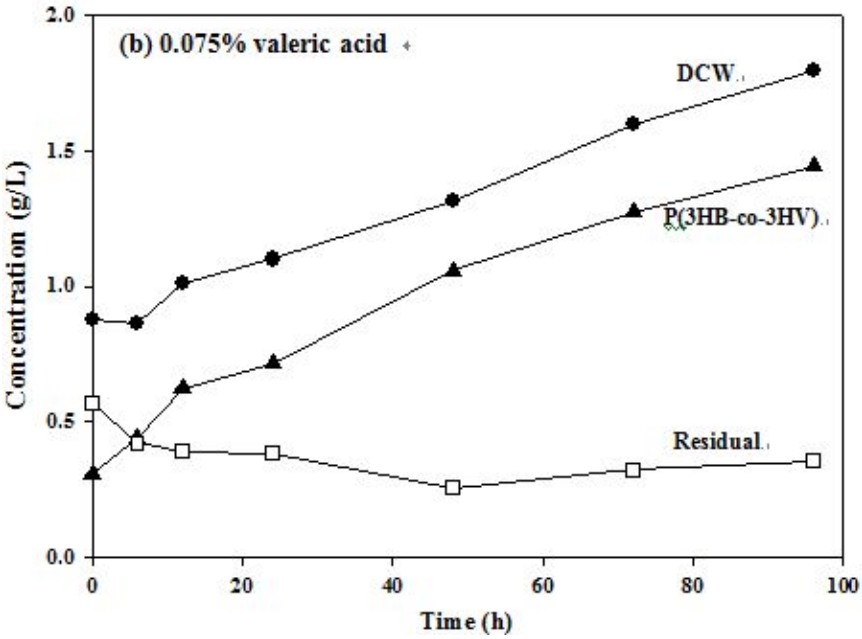
또한 CO_2 농도가 증가함에도 사용량은 증가하지 않고 배양액 내에 잔류하는 CO_2 농도는 커지게 되어, 이것이 미생물에 저해 작용을 나타내면서 CO_2 농도 증가에 따라 수율이 낮아지는 현상을 나타나게 할 수 있다. 종속영양배양조건에서 CO_2가 미생물 성장과 P(3HB) 축적에 미치는 저해 영향에 관한 기존연구에서, 미생물의 성장 단계와 P(3HB) 축적 단계에서 22% (v/v) CO_2를 pulse로 주입하여, 주입한 시기(지체기, 대수기, 정체기)와 기간(3 h and 6 h CO_2 pulse)에 따라서 CO_2 pulse를 주입하지 않았을 때 보다 성장의 지체기가 길어지거나 최종 미생물 농도와 P(3HB)의 농도가 낮아지는 등의 저해 현상을 확인하였다 (Reinecke, 2009). 이와 같이 사용되지 않고 잔류하는 고농도의 CO_2는 미생물의 성장이나 P(3HB)의 축적에 영향을 미칠 수 있으므로, H_2, O_2의 농도에 따라 기질로 주어지는 CO_2 농도를 적절하게 선정하는 것이 중요할 것이다.

4.2. 발레르산 첨가에 의한 P(3HB-co-3HV)의 합성

4.2.1. 발레르산 주입 농도 결정

Fig. 4.4.는 두 번째 단계 배양에서 탄소원으로 1% CO_2와 함께 0.05, 0.075, 0.1, 0.2%의 발레르산을 사용했을 때, 시간에 따른 DCW, P(3HB-co-3HV), 잔류물의 변화량을 보여주고 있다. 두 번째 단계 배양은 질소원이 결핍된 환경에서 수행되므로, 앞선 실험에서와 마찬가지로 DCW의 변화는 대부분 P(3HB-co-3HV)의 증가에 의해서 일어나고 잔류물은 배양기간 동안 일정하게 유지된다.


(a) 0.05% valeric acid
DCW
P(3HB-co-3HV)
Residual
Concentration (g/L)
Time (h)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
100


(b) 0.075% valeric acid
DCW
P(3HB-co-3HV)
Residual
Concentration (g/L)
Time (h)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
100

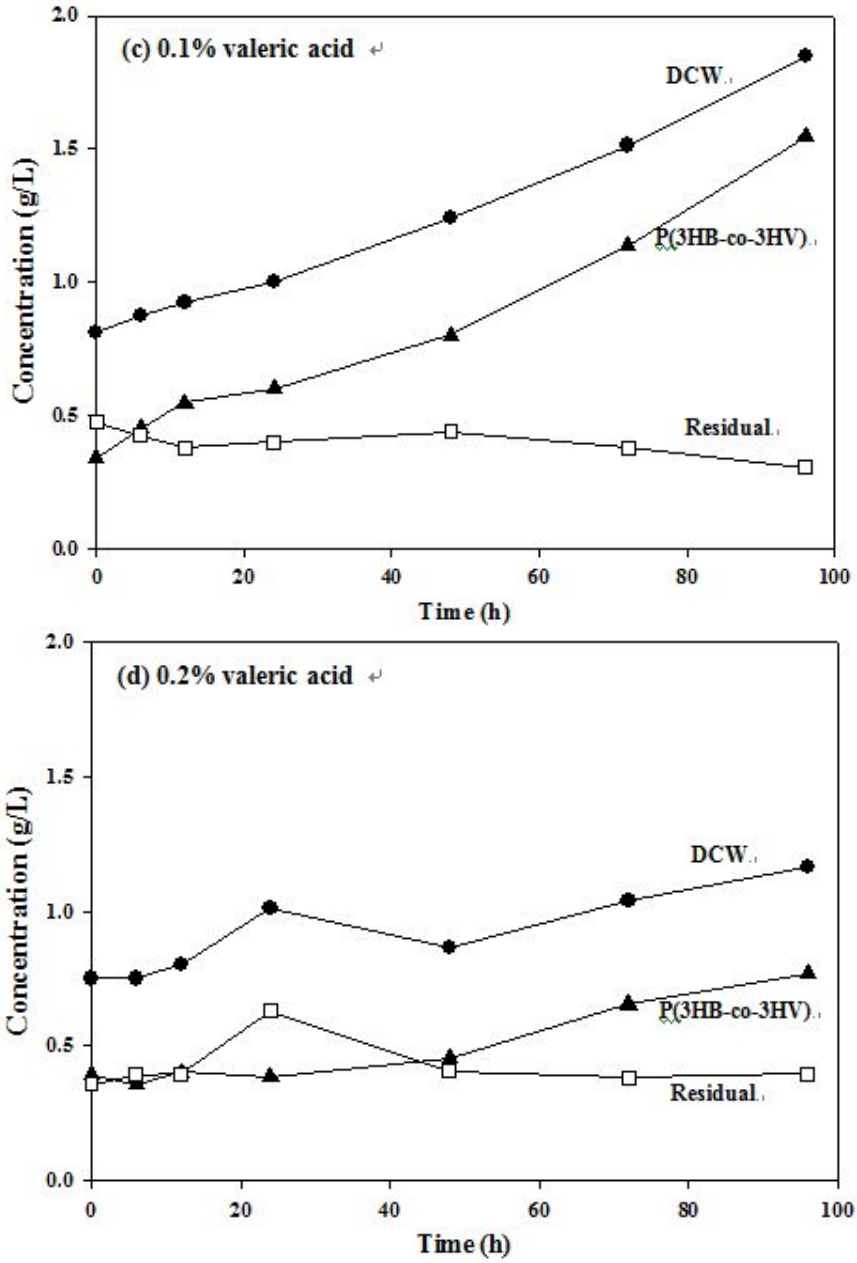
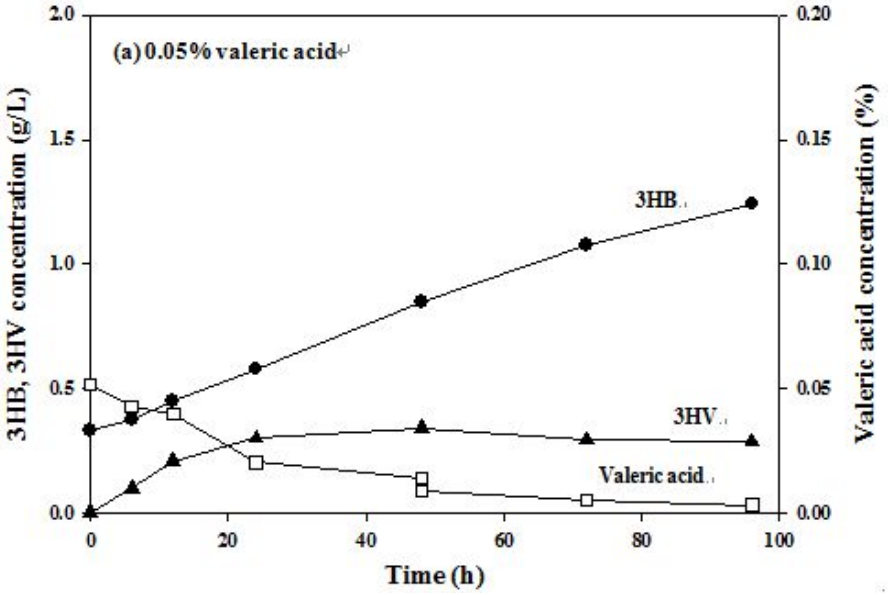
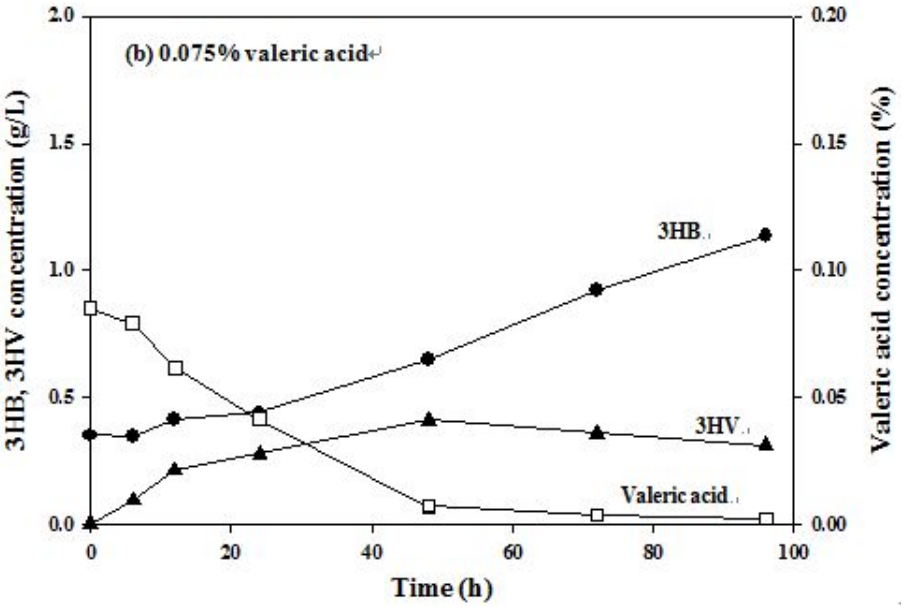


Fig. 4.4. Changes in the concentrations of dry cell weight (DCW), P(3HB), and residual [DCW−P(3HB-co-3HV)] of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media fed with 1% CO_2 and 0.05, 0.075, 0.1, or 0.2% valeric acid during the 2nd stage growth.

첨가된 발레르산의 농도가 3HB와 3HV의 합성에 미치는 영향을 각각 알아보기 위해 합성된 P(3HB-co-3HV) 중 3HB와 3HV의 농도를 나누어서 살펴보았다. Fig. 4.5.는 두 번째 단계 배양에서 1% CO_2와 함께 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% (각각 0.46, 0.69, 0.93, 1.85 g/L)의 발레르산을 사용했을 때, 시간에 따른 3HB, 3HV, 발레르산 농도의 변화량을 보여주고 있다. 4일 간의 배양기간 동안 3HB와 3HV의 축적 농도가 증가하였는데, 그 정도는 첨가한 발레르산의 농도에 따라 차이가 있었다. 3HB의 합성량은 발레르산의 농도가 증가할수록 감소하였고, 3HV의 합성량은 0.2% 발레르산을 첨가한 경우를 제외하고는 발레르산의 농도가 증가할수록 증가하였다.

Table 4.2.는 초기 주입한 발레르산 농도에 따른 3HV의 합성량과 3HV의 수율을 나타낸 표이다. 3HV의 수율은 합성된 3HV의 양을 사용된 발레르산의 양으로 나눈 값으로 발레르산이 3HV로 전환되는 효율을 말한다. 각 결과는 발레르산이 모두 소진되는 시점을 기준으로 나타낸 것으로, 0.05와 0.075%는 48시간, 0.1과 0.2%는 96시간의 결과 값을 이용하여 나타내었다. 발레르산의 농도가 0.1% 이하에서는 주입한 발레르산의 농도가 높아질수록 3HV 합성량이 증가하였으나, 발레르산 농도가 0.2%가 되자 그 양이 감소하였다 (Table 4.2.). 이것은 Fig. 4.5.(d)에서 보듯이, 높은 발레르산 농도가 초기의 3HV의 합성을 저해했기 때문이다. 이는 48시간 이후 발레르산 농도가 약 1 g/L (약 0.1%) 이하로 감소하고 난 후부터 3HV의 합성량이 증가하는 것에 의해 뒷받침된다. 3HV의 수율은 발레르산 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다 (Table 4.2.). 이는 발레르산에서 3HV로 전환되는 효율이 가장 저농도였던 0.05%에서 가장 높았다는 것을 의미한다. 0.2%에서는 0.05%일 때 수율의 약 47% 수준으로 가장 낮은 값을 보였다. 이를 볼 때, 3HV를 합성하기 위해 발레르산 농도는 0.1% 이하로 유지하는 것이 적절하며, 발레르산 농도가 낮을수록 3HV로의 전환효율이 높아지므로 많은 양의 3HV를 합성하기 위해서는 저농도로 여러 번 주입하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.


(a) 0.05% valeric acid
3HB, 3HV concentration (g/L)
Valeric acid concentration (%)
Time (h)
3HB
3HV
Valeric acid
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
20
40
60
80
100


(b) 0.075% valeric acid
3HB, 3HV concentration (g/L)
Valeric acid concentration (%)
Time (h)
3HB
3HV
Valeric acid
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
20
40
60
80
100

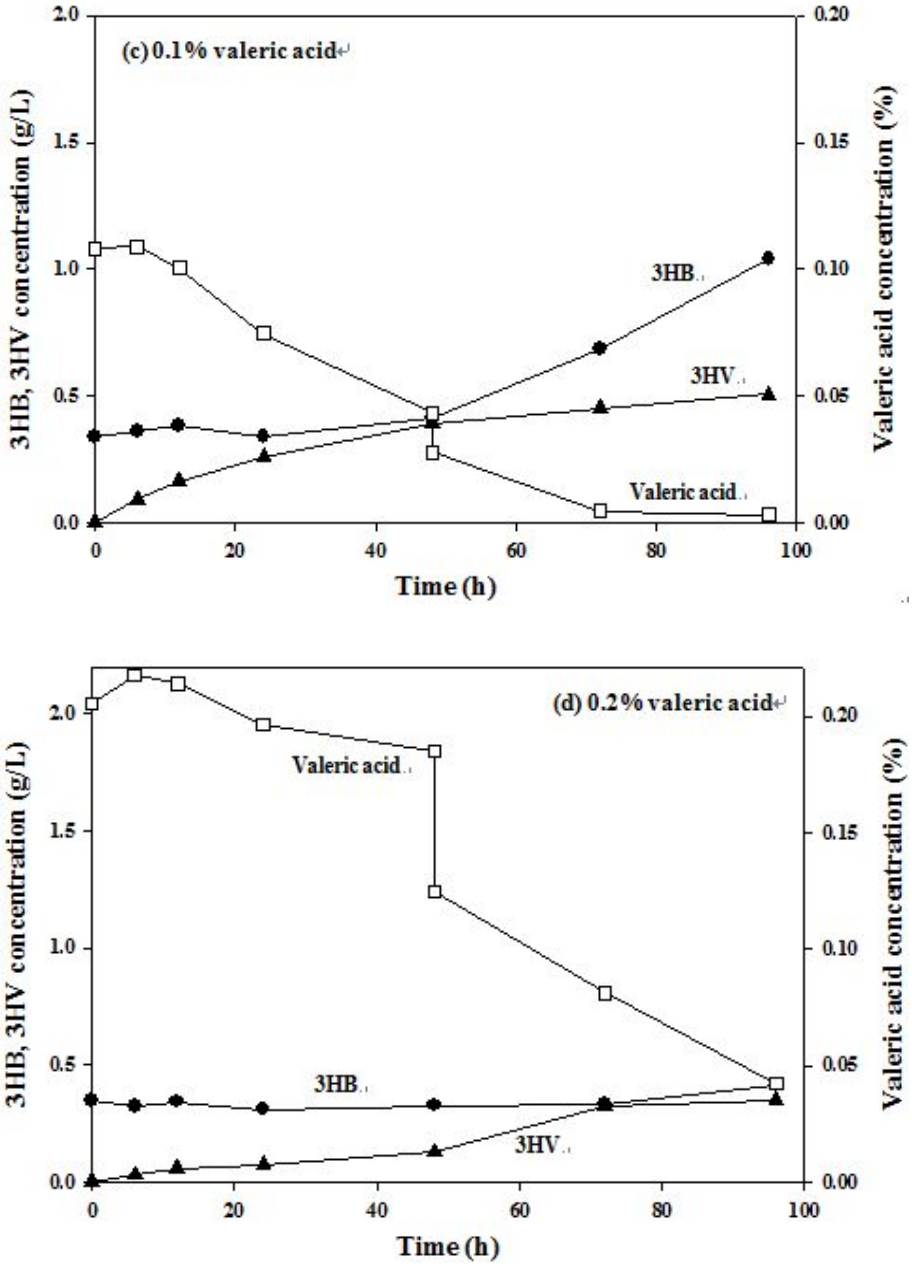


Fig. 4.5. Changes in the 3HB and 3HV concentrations of P(3HB-co-3HV) with various initial valeric acid concentrations (a) 0.05%, (b) 0.075%, (c) 0.1%, (d) 0.2% (v/v) during the 2nd stage growth.

Table 4.2. Production of 3HV in P(3Hb-co-3HV) with various initial valeric acid concentrations of 0.05, 0.075, 0.1, and 0.2% (v/v) during the 2nd stage growth

	Valeric acid concentration (%)			
	0.05	0.075	0.1	0.2
3HV (g/L)	0.30	0.45	0.56	0.38
3HV yield (3HV g/g of valeric acid)	0.92	0.70	0.73	0.43
3HV molar fraction (%)	17	21	33	46

발레르산 농도에 따른 3HB의 합성 특성은 Fig. 4.5.을 통해 확인할 수 있다. 3HV와는 달리 3HB는 초기농도가 존재하는데 이것은 첫 번째 단계 미생물 성장 단계를 1% CO_2를 포함한 혼합가스를 단일 기질로 하여 수행하였기 때문이다. 두 번째 단계 배양 역시 1% CO_2를 계속 공급하므로 3HB가 합성되면서 그 농도가 증가한다. 3HB의 합성 정도는 배지 내의 발레르산의 농도에 영향을 받았다. 0.2% 발레르산을 주입한 경우는 4일 동안의 배양기간 내내 발레르산 농도가 약 0.05% 이상을 유지하며 3HB가 축적되지 않았고 [Fig. 4.5.(d)], 0.1% 발레르산을 주입한 경우는 48시간 이후 발레르산 농도가 약 0.05% 이하로 감소하고 나서야 3HB가 합성되기 시작했다 [Fig. 4.5.(c)]. 0.075% 발레르산 첨가의 경우에도 같은 경향이 나타나고 있다 [Fig. 4.5.(b)]. 반면 0.05%의 경우에는 별다른 저해현상 없이 배양기간 동안 3HB가 합성되고 있다 [Fig. 4.5.(a)]. 이를 통해 3HB의 합성이 저해 받지 않는 발레르산의 농도는 약 0.05% 이하인 것을 확인하였다.

4일 후 합성된 P(3HB-co-3HV)에서 3HV 함량은 Table 4.2.과 같다. 주입한 발레르산의 농도가 높아짐에 따라 합성된 P(3HB-co-3HV)의 3HV 함량은 높아졌다. 이것은 발레르산의 농도가 높을수록 합성된 3HV의 양이 많아지기도 했지만, 더 큰 이유는 일정 농도 이상에서 발레르산에 의해 3HB의 합성이 저해되면서 상대적인 3HV의 양이 많아졌기 때문이다.

4.2.2. 발레르산 주입 방식에 따른 다양한 3HV 함량의 P(3HB-co-3HV) 합성

4.2.1.에서 결정된 적정 발레르산 농도 (0.05% 이하)의 주입 방식을 변화시켜가며 이것이 P(3HB-co-3HV) 합성에 미치는 영향을 살펴보았다. 0.05%의 발레르산 주입 실험에서 발레르산이 모두 소진되는 시점인 48시간에 발레르산(0.05, 0.025%)을 한번 더 주입함으로써 연속 주입의 영향을 확인하였다. Fig. 4.6.은 두 번째 단계 배양에서 1% CO_2와 함께 0.05% 발레르산을 0, 48 시간에 연속 주입했을 때의 3HB와 3HV의 농도 변화를 보여주고 있다. 발레르산을 48시간 후 한번 더 주입해 줌으로써 3HV 합성이 48시간 이후에도 일어나고 있음을 볼 수 있다. 하지만 같은 양의 발레르산을 추가로 주입했음에도 추가적으로 합성되는 3HV의 양은 0~48시간 사이에 합성된 3HV의 양보다 적었다. 0~48시간 동안은 0.32 g/L의 3HV를 합성했지만, 발레르산 추가 주입 후 48~96시간 동안은 0.10 g/L 만을 합성했다. 이것은 배양 초기의 30% 수준으로 48시간 후 발레르산을 사용하여 3HV를 합성하는 미생물의 활성도가 떨어졌음을 보여준다. 3HB는 초기 0.05% 발레르산 주입으로 인한 별다른 저해 영향 없이 48시간 동안 합성이 되었다. 하지만 48시간 이후 0.05% 발레르산을 한번 더 주입하자, 주입 후 24시간 동안 3HB의 합성이 저해를 받았다. 그 이후 72~96시간에는 발레르산 추가 주입 이전과 같은 생산력 (0.01 g/L/h)으로 다시 3HB가 합성되었다.

Fig. 4.7.은 두 번째 단계 배양에서 1% CO_2와 함께 0.05% 발레르산을 배양 초기에, 0.025% 발레르산을 48시간 후에 추가적으로 주입했을 때의 3HB와 3HV의 농도변화를 보여주고 있다. 3HV는 배양 초기 0.05% 발레르산 주입에 의해 48시간 동안 0.32 g/L가 합성되었고 48시간 이후 0.025% 발레르산 주입에 의해 0.10 g/L가 합성되었다 이것은 배양 초기의 약 30% 수준으로 줄어들었다. 0.05% 발레르산을 두 번 연속 주입 한 결과와 비교해 볼 때, 두 번째 주입한 발레르산의 농도가 반으로 줄었음에도 합성된 3HV의 양은 같았다. 즉, 4일 동안 같은 양의

3HV (약 0.42 g/L)를 합성시키기 위해서 두 번째에 0.025% 발레르산을 주입하는 것이 더 경제적이다. 반면, 3HB의 합성은 발레르산의 두 번째 추가 주입에도 합성이 저해 영향을 받지 않고, 4일 간의 배양기간 동안 일정하게 증가하였다.

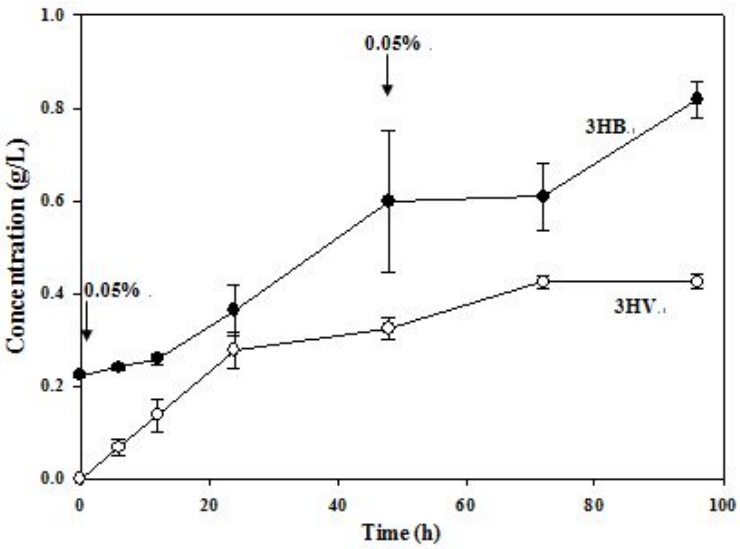


Fig. 4.6. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB-co-3HV) with addition of 0.05% valeric acid at t=0 h and t=48 h during the 2nd stage growth.

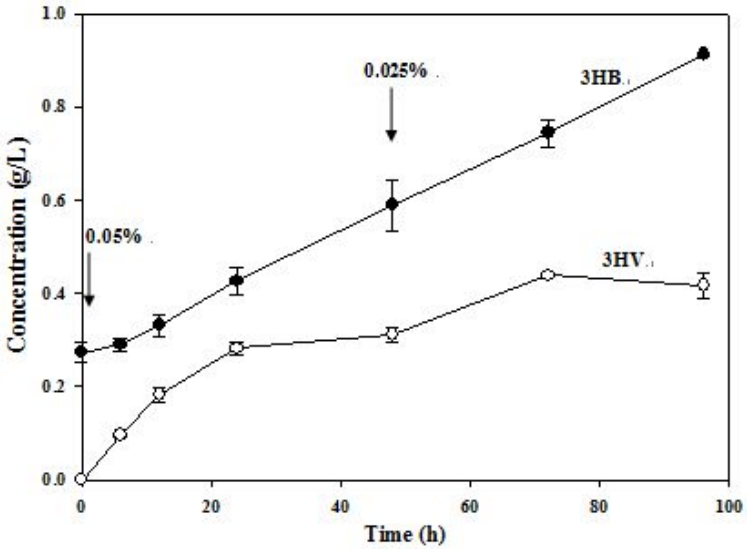


Fig. 4.7. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB-co-3HV) with addition of 0.05% valeric acid at t=0 h and 0.025% valeric acid at t=48 h during the 2nd stage growth.

Table 4.3.는 발레르산 주입 방식에 따라 두 번째 단계 배양 4일 후에 합성된 3HB, 3HV, P(3HB-co-3HV), 3HV 함량을 나타낸 표이다. 발레르산의 주입은 0.05% 두 번(t=0, 48시간), 0.05%와 0.025% (t=0, 48시간), 0.05% 한 번 (t=0시간), 주입하지 않은 것, 네 가지로 나눠서 살펴보았다. 3HB 합성량은 발레르산 주입량이 많아질수록 감소하는 경향을 보였다. 1% CO_2 만을 사용했을 때가 가장 많은 3HB 합성량을 보였고, 0.05% 발레르산을 한번 주입하였을 때 그 양이 감소하였으며, 0.05% 발레르산을 두 번 연속 주입했을 때가 가장 적은 3HB 합성량을 보였다. 발레르산의 연속 주입에서는 두 번째 주입 농도의 0.025%에서 0.05%로의 증가가 3HB 합성량에 미치는 영향은 통계적으로 거의 차이가 없었다. 반면, 3HV 합성량은 발레르산 주입양이 늘어남에 따라 증가하였다. 발레르산을 주입하지 않았을 때 3HV는 합성되지 않았고, 0.05% 발레르산을 한번 주입했을 때 0.25 g/L, 0.05% 발레르산을 두 번 주입했을 때는 약 1.7 배인 0.43 g/L를 합성하였다. 발레르산을 두 번 연속 주입한

경우에 두 번째 주입 농도에 따른 3HV 합성량의 차이는 없었다. P(3HB-co-3HV)의 양은 3HB와 3HV의 양을 합한 값으로 두 번째 단계 배양기간 동안 합성된 총 P(3HB-co-3HV) 양이다. 발레르산을 주입한 경우 총 합성량은 주입 방법에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 1% CO_2만을 사용한 경우와 비교해 봤을 때, 총 P(3HB-co-3HV) 합성량은 발레르산을 주입하지 않은 경우의 약 1.2배 정도 높았다. 이것은 발레르산 주입에 따라 3HB의 합성량이 감소하지만 그에 비해 생성된 3HV 양이 상대적으로 더 많았기 때문이다. 3HV 함량의 경우, 발레르산 연속 주입 시 약 30 mol%로 단일 주입 시 보다 약 2배 정도 높았고, 주입 농도에 따른 차이는 거의 없었다. 이를 종합해 볼 때, 0.05% 발레르산의 단일 주입으로 약 17 mol%의 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 얻을 수 있었고, 3HV 함량을 높이기 위한 발레르산의 연속 주입 방식을 통해 30 mol%의 3HV 함량을 얻을 수 있었다.

Table 4.3. The concentration of 3HB, 3HV, P(3HB-co-3HV), and 3HV molar fraction with different feeding methods during the 2nd stage growth

Valeric acid concentration (time added)	3HB (g/L) (A)	3HV (g/L) (B)	P(3HB-co-3HV) (g/L) (A+B)	3HV mol%
0.05 and 0.05% (0 and 48 h)	0.59±0.04	0.43±0.02	1.02±0.05	31
0.05 and 0.025% (0 and 48 h)	0.64±0.03	0.42±0.03	1.06±0.05	28
0.05% (0 h)	0.81±0.05	0.25±0.01	1.06±0.04	17
No addition (only 1% CO_2)	0.88±0.02	0	0.88±0.02	0

4.3. 연속식 배양을 통한 P(3HB-co-3HV)의 합성

4.3.1. 미생물 성장을 위한 첫 번째 단계 연속식 배양

첫 번째 단계 배양을 시작한지 15일 후 반응조가 안정화되었고, Table 4.4.는 안정화 된 후 배양액의 OD, DCW, 개체수, P(3HB) 함량을 보여주고 있다. 4.1.과 4.2.에서 첫 번째 단계 배양을 6일 동안 회분식으로 진행하였을 때와 비교해 볼 때, 미생물 농도와 개체수, P(3HB) 함량 모두 비슷한 수준을 유지하고 있다. 이는 첫 번째 단계 연속식 배양을 통해 두 번째 단계 동안 P(3HB-co-3HV)를 축적할 수 있는 *C. necator*를 균일하게 지속적으로 공급할 수 있음을 의미한다.

Table 4.4. Optical density (OD), Dry cell weight (DCW), cell number, and P(3HB) content in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH_4Cl/L) with CO_2 in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2,, 1% CO_2, and 91% N_2) during the continuous 1st stage

OD (at 600 nm)	DCW (g/L)	Cell number (CFU/mL)	P(3HB) content (%)
2.1±0.1	0.9±0.1	$(2.4\pm0.2)\times10^9$	36±2.6

4.3.2. 일정한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)의 생산

Fig. 4.8.은 첫 번째 단계에서 연속식 배양을 통해 얻은 미생물을 사용해 두 번째 단계 배양에서 1% CO_2와 함께 0.05% 발레르산을 주입했을 때의 3HB와 3HV의 농도 변화를 보여주고 있다. 농도 증가 양상은 첫 번째 단계를 회분식으로 수행하고 난 후 두 번째 단계를 진행했을 때와 같았다. 48시간 후 합성된 P(3HB-co-3HV)의 HV 함량은 약 16%로

의도했던 HV 함량 (약 15%의 HV 함량)을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있었다.

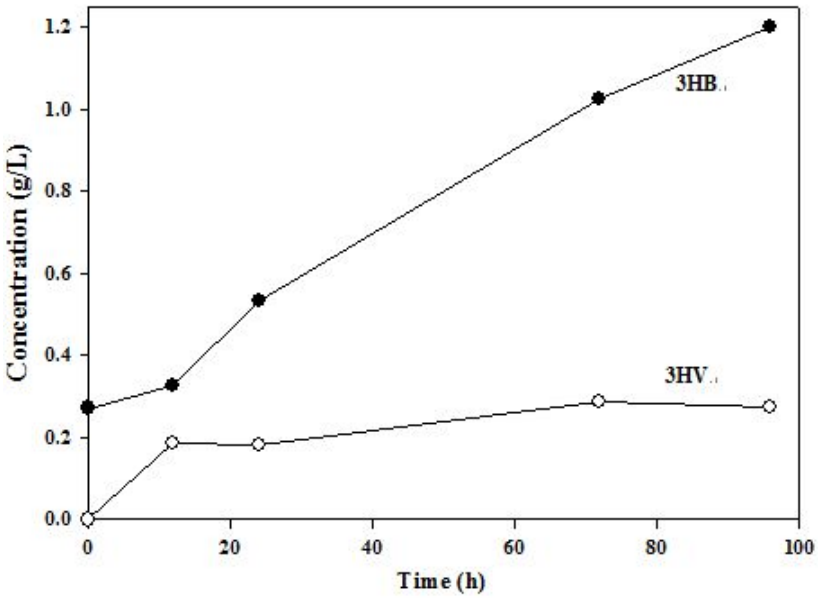


Fig. 4.8. Changes in the 3HB and 3HV concentrations in P(3HB_co-3HV) with the initial valeric acid concentration of 0.05% during the 2nd stage growth with *Cupriavidus necator* grown in the continuous reactor.

Table 4.5.은 같은 조건에서 세 번 수행하여 얻은 3HV 함량을 보여주고 있다. 세 번의 반복된 실험에서 모두 16%의 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)가 생산되었고, 이것은 지속적으로 일정한 품질의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있음을 의미한다.

Table 4.5. 3HV content in P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with CO_2 as a carbon source in gas mixtures (7% H_2, 1% O_2,, 1% CO_2, and 91% N_2) after the 2nd PHA accumulation stage followed by the continuous 1st stage for microbial growth

Replicate Number	1	2	3
3HV content (mol%)	16	16	16

4.3.3. 일정한 HV 함량의 P(3HB-co-3HV) 물성 분석

NMR 스펙트럼을 통해 P(3HB-co-3HV) 내 두 개의 단량체 (3HB와 3HV)가 존재하는 것을 확인하여, 합성된 PHA가 P(3HB-co-3HV)임을 확인할 수 있었다 (Fig. 4.9.). 3HV 함량은 CH_3(1)과 CH_3(5)의 피크 면적을 통해 결정할 수 있다. 피크 면적은 각각 51.379와 10.035였고, 이를 통해 계산된 3HV 함량은 약 17%로 GC 분석 결과 (16%)와 매우 유사하였다.

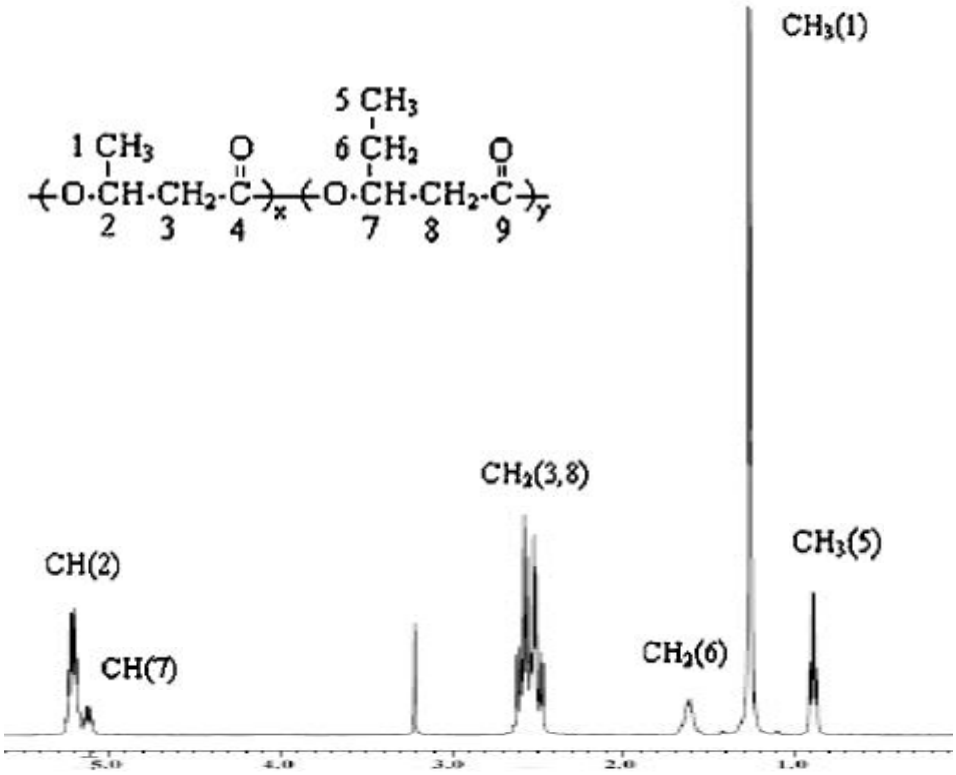


Fig. 4.9. 600 MHz ^{1}H NMR spectrum of P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* during the continuous 1st stage for microbial growth followed by the batch 2nd stage for PHA accumulation. This spectrum shows that the P(3HB-co-3HV) has 3HV of 16 mol%.

Table 4.6.은 P(3HB-co-3HV)의 열적, 기계적 특성과 분자량을 나타낸 표이다. 비슷한 3HV 함량을 가진 다른 연구 결과들의 물성과 비교해 볼 때, 본 연구에서 생산한 P(3HB-co-3HV)는 유사한 범위 내의 값을 가지고 있었다. Table 2.4.의 P(3HB)의 특성과 비교하여 살펴보면, 열적 특성에서는 녹는 온도와 유리전이 온도가 감소하였다. 결정화도 역시 일반적인 P(3HB)의 결정화도(55-80%)에 비해 감소하였다. 기계적 특성에서는 인장강도와 탄성계수 모두 감소하였다. 이와 같은 물성들의 변화는 일반적으로 HV의 함량이 증가하면서 나타난다고 알려져 있는 경향들과 일치한다. 하지만, 물성의 변화 정도는 P(3HB)의 높은 결정화도와 깨지기 쉽고 딱딱한 성질들이 P(3HB-co-3HV)로 공중합체를 이루면서 결정화도와 탄성계수가 감소하여 유동적이고 유연한 성질로 바뀌게 된다. 일반적으로 미생물에 의해 생성된 PHA의 분자량 (M_w)은 500～1000 kDa 정도로, 분산도 (M_w/M_n)는 2.0 이상의 값에서 다양하게 나타나며 분자량과 분산도는 3HV 함량과는 관계가 없다 (Kim et al., 2009). 본 연구에서 생성된 P(3HB-co-3HV)의 분자량과 분산도는 일반적으로 미생물에 의해 합성되는 PHA와 비슷한 값을 가지고 있었다 (Table 4.6.).

Table 4.6. Thermal and mechanical properties of P(3HB-co-3HV)

HV mol%	Thermal properties					Mechanical properties		Reference
	Melting temperature (°C)	Glass transition temperature (°C)	Crystallization temperature (°C)	Melting enthalpy (J/g)	Crystallinity (%)	Tensile strength (MPa)	Young's modulus (MPa)	
16	165	5	74	44	30	11	550	this study
21	171	2	73	28	19	-	-	Shang et al., 2012
19	143	-6	-	-	48	20	1100	Sankhla et al., 2010
12	154	4	-	58	40	54	510	Misra et al., 2006
18	161	-3	80	35	24	23	404	Madden and Anderson, 1998

Table 4.7. Molecular weight of P(3HB-co-3HV) produced by *Cupriavidus necator* during the continuous 1st stage for microbial growth followed by the batch 2nd stage for PHA accumulation

Number average molecular weight (M_n, kDa)	Weight average molecular weigh (M_w, kDa)	Polydispersity (M_w/M_n)
247	749	3.0

5. 결론

본 연구에서는 포집된 CO_2와 발레르산을 이용하여 의료 용도의 PHA를 생산함에 있어, 기질로 사용되는 CO_2의 농도와 물성 개선을 위해 보조기질로 사용되는 발레르산의 첨가가 미치는 영향을 확인하였다. 본 연구를 통해 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 수소산화균인 *C. necator*를 이용한 P(3HB) 합성 실험에서 탄소원으로 사용된 CO_2 농도를 1, 3, 10, 20%로 변화시키며, CO_2 농도가 미생물 성장과 P(3HB)의 축적에 미치는 영향을 관찰하여 최적 CO_2 농도를 결정하였다. 2단계 배양방법을 사용하여 미생물 성장을 목적으로 한 첫 번째 단계에서 미생물 개체수의 증가는 CO_2 농도와 관계없이 일정했지만, 체내에 축적된 P(3HB)의 양은 CO_2 농도가 높아질수록 감소하였다. 두 번째 P(3HB) 축적 단계에서 합성된 P(3HB)의 양은 3% CO_2에서 가장 많았으나, 첫 번째, 두 번째 단계에서 축적된 총 P(3HB)의 양은 1% CO_2에서 가장 많았다. 총 P(3HB) 양은 CO_2 농도가 1, 3% 일 때 차이가 크지 않았고, 10, 20%로 CO_2 농도가 증가했을 때 저해 현상이 나타나, 고농도의 CO_2를 사용할 경우 P(3HB)의 합성에 저해 현상이 일어날 수 있음을 확인하였다.

(2) 1% CO_2와 함께 보조기질로 발레르산을 첨가할 때, 발레르산이 PHA 축적에 미치는 영향을 확인하고자, 발레르산 농도를 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% (v/v)로 변화시키며 PHA 축적 실험을 수행하였다. 실험 결과, CO_2에 의해 3HB가 합성되고 발레르산에 의해 3HV가 합성되어 P(3HB-co-3HV)의 공중합체가 생성되었다. 3HV의 경우, 발레르산 농도가 0.1% 이하에서는 합성에 저해를 받지 않고 농도가 증가함에 따라 합성량도 증가하였지만, 3HV 수율은 농도가 낮을수록 더 높았다. 3HB 역시 발레르산 농도에

영향을 받았는데, 발레르산 농도가 0.05% 이상에서 축적에 저해를 받았다. 최종적으로 합성된 P(3HB-co-3HV)의 3HV 함량은 0.05, 0.075, 0.1, 0.2%에서 각각 17, 21, 33, 46 mol%였다. 따라서 3HV와 3HB의 합성을 모두 저해하지 않고 3HV의 수율도 가장 높았던 0.05% 농도 이하가 P(3HB-co-3HV)의 축적에 가장 적절하고, 더 높은 3HV 함량을 얻기 위해서는 연속 주입을 하는 것이 효율적일 것으로 판단하였다.

(3) P(3HB-co-3HV) 축적을 위한 적정 발레르산 농도 결정 후, 발레르산의 주입 방식에 변화를 주어 다양한 3HV 함량을 갖는 P(3HB-co-3HV)를 합성하는 실험을 수행하였다. 주입 방식은 연속 주입으로 t=0, 48시간일 때 각각 0.05% 발레르산을 주입하는 것과 t=0시간일 때 0.05%, t=48시간일 때 0.025% 발레르산을 주입하는 것 두 가지 방법으로 진행하였다. 3HV의 경우 두 가지 방식에서 주입한 발레르산의 양이 차이가 있었음에도 불구하고 합성된 3HV의 양은 같았다. 3HB의 경우 48시간 후에 0.05%의 발레르산을 한번 더 추가하자 축적에 저해현상을 보였지만, 배양기간 동안 축적된 총 P(3HB-co-3HV)의 양과 3HV의 함량은 통계적으로 주입 방식에 따른 차이가 없었다. 연속 주입의 결과를 0.05% 발레르산의 단일 주입과 비교해 보면, 총 P(3HB-co-3HV)의 양은 통계적으로 차이가 없었지만, 단일 주입에 비해 3HB의 합성량은 줄고 3HV의 합성량이 늘어나면서 3HV의 함량은 약 2배로 늘어났다. 따라서 30 mol%의 3HV 함량을 얻기 위해서는 t=0, 48시간일 때 각각 0.05, 0.025%의 발레르산을 연속 주입하고, 그의 절반인 약 15 mol%의 3HV 함량을 얻기 위해서는 0.05% 발레르산을 t=0시간일 때 단일 주입하는 것이 효율적임을 확인하였다.

(4) 일정한 품질 (3HV 함량)의 P(3HB-co-3HV)를 지속적으로 생산

할 수 있는 가능성을 확인하기 위해 2단계 배양 중 첫 번째 단계를 연속식 배양을 수행하였다. 첫 번째 미생물 성장 단계를 연속식으로 배양하여 약 36% (w/w)의 P(3HB) 함량을 갖는 미생물이 농도가 0.9 g/L로 유지되는 것을 확인하였다. 이 후 이 미생물을 이용하여 0.05% 발레르산의 단일 주입방식으로 P(3HB-co-3HV) 축적 단계를 3회 반복 수행하며 최종적으로 16 mol%의 3HV 함량을 갖는 일정한 품질의 P(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 연속식 배양으로 얻은 P(3HB-co-3HV)의 물성도 확인하였다.

이상, CO_2와 발레르산을 이용하여 PHA를 생산함에 있어서 기질들의 농도와 주입 방식이 미치는 영향을 확인하고, 이를 통해 목적으로 하는 PHA 생산의 최적 조건을 찾아보았다. 본 연구 결과, 생산된 P(3HB-co-3HV)는 체내에서 이물반응이 일어나지 않는다고 알려져 있는 3HV 함량 30 mol% 이하로 확인되었고, 이는 의료용 플라스틱으로의 활용 목적에도 부합한다. CO_2의 의료용 플라스틱으로의 전환은 앞으로 고령화 사회의 도래와, 세대구성 변화에 의해 수요증가가 예상되는 의료제품 생산을 위한 바이오플라스틱용 소재의 공급이라는 측면에서도 의미가 크다. 하지만 여전히 기존 플라스틱들에 비해 낮은 수율과 가격 경쟁력 등으로 대량 생산과 상업화에 어려움이 남아있기는 하다. 하지만 2013년 발효된 교토의정서에 따른 탄소세 도입으로 CO_2 발생 문제가 환경오염 방지 차원에서 경제적인 문제로 발전되고 있고, 바이오플라스틱의 적용분야가 다양해지며 고부가가치 소재로의 응용이 가능하므로, CO_2의 PHA로의 전화 효율을 높이기 위한 기술들의 발전을 감안한다면 PHA 생산의 미래는 밝다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

교육과학기술부, 기획재정부, 지식경제부, 환경부, 국토해양부, 녹색성장위원회 (2010) 국가 CCS 종합추진계획(안), 제8차 녹색정상위원회 보고대회

윤중현 (2012) 휘발성 지방산으로부터 Ralstonia eutropha에 의한 Polyhydroxyalkanoates의 생산, 석사학위논문, 충북대학교

임설희 (2001) 생분해성 플라스틱의 분리·정제 및 생분해도 평가에 관한 연구, 석사학위논문, 이화여자대학교

한국이산화탄소포집및처리연구센터, CCS 기술정의 개념도, http://www.kcrc.re.kr/infomation_01_02 (accessed December 10, 2012)

한종훈 (2011) 국내외 CCS 산업동향 및 실태 분석을 통한 CCS 기반 연구, 녹색기술동향보고서, 제1호, pp. 131-147

Akaraonye, E., Keshavarz, T., and Roy, I. (2010) Production of Polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 732-743

Anderson, A. J. and Dawers, E. A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54, 450-472

Chen, G. Q. and Wu, Q. (2005) The application of Polyhydroxy-alkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26, 6565-

6578

Du, G. C., Chen, J., Yu, J., and Lun, S. (2001) Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*, *Biochemical Engineering Journal*, 8, 103-110

Doi, Y. (1990) Microbial Polyesters, VCH Publisher, New York, Chap. 7

EIA (2011) CO_2 Emissions from Fuel Combustion, U.S. Energy Information Administration, Department of Energy: Washington, DC.

Galego, N., Rozsa, C., Sanchez, R., Fung, J., Vazquez, A., and Tomas J. S. (2000) Characterization and application of poly(3-hydroxy-alkanoates) family as composite biomaterials, *Polymer Testing*, 19, 485-492

Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G., and Hughes, M. K. (1993) Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxy-butyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA), *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 1135-1148

Gunarante, L., Shanks, R., and Amarasinghe, G. (2004) Thermal history effects on crystallisation and melting of poly(3-hydroxy-butyrate), *Thermochim Acta*, 423, 127-135

Ishizaki, A. and Tanaka, K. (1991) Production of poly-3-hydroxy

-butyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697^{T}, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 254-257

Ishizaki, A., Tanaka, K. and Taga, N. (2001) Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate form CO_2, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 6-12

Joao, M., Paulo, C., Suisa, S., Cristina, O., Marta, E., Naria, G., Ana, M., Rui, O., and Maria, A. (2006) Recent advances in polyhydroxy -alkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product, *Macromolecular Bioscience*., 6, 885-906

Khanna, S. and Srivastava, A. K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40, 607-619

Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., and Woo, S. I. (1993) Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892-898

Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., and Woo, S. I. (1994) Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyv -aleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer, *Enzyme Microbial Technology,* 16, 556-561

Kim, B. S. (2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, *Enzyme Microbial Technology,* 10, 774-777

Kim, D. Y., Park, D. S., Kwon, S. B., Chung, M. G., Bae, K. S., Park, H. Y., and Rhee, Y. H. (2009) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate -co-3-hycroxyvalerate) copolyesters with a high molar fraction of 3-hydroxyvalerate by an insect-symbiotic *Burkholderia* sp. IS-01, *Journal of Microbiology*, 47, 651-656

Lee, S. Y. (1996) Plastics bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, *Trend in Biotechnology*, 14, 431-438

Lee, S. Y., Choi, J. I., and Lee, S. H. (2000) Production of polyhydroxyalkanoates by fermentation of bacteria, *Macromolecular Symposia*, 159, 259-266

Lee, W. H., Loo, C. Y., Nomura, C. T., and Sudesh, K. (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oil and 3-hydroxyvalerate precusors, *Bioresource Technology,* 99, 6844-6851

Madden, L. A. and Anderson, J. A. (1998) Synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxy -butyrate-co-3-hydroxyvalerate) polymer mixtures produced in high-density fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), *Macromolecules*, 31, 5660-5667

Madison, L. L. and Huisman, G. W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) : from DNA to plastic, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21-53

Misra, S. K., Valappil, S. P., Roy, I., and Boccaccini, A. R. (2006) Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 7, 2249-2258

Ojumu, T. V., Yu, J., and Solomon, B. O. (2004) Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, *African Journal of Biotechnology*, 3, 18-24

Philip, S., Keshavarz, T., and Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *Journal of Chemical Technoogy and. Biotechnology*, 82, 233-247

Pohlmann, A. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallagas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16, *Nature Biotechnology*, 24, 1257-1262

Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V. C. (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview, *Bioresource Technology*, 87, 137-146

Reinecke, F. and Steinbuchel, A. (2009) *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16, 91-108

Sankhla, I. S., Bhati, R., Singh, A. K., and Mallick, N. (2010) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039, *Bioresource Technology*, 101, 1947-1953

Schlegel, H. G. and Lafferty, R. M. (1971) Novel energy and carbon sources A. The production of biomass from hydrogen and carbon dioxide, *Advances in Biochemical Engineering*, 1, 143-168

Shang, L., Yim, S. C., Park, H. G., and Chang, H. N. (2004) Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvaerate fraction, *Biotechnology Progress*, 20, 140-144

Shang, L., Fei, Q., Zhang, Y. H., Wang, X. Z., Fan, D. D., and Chang, H. N. (2012) Thermal properties and biodegradability studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), J*ournal of Polymer Environment*, 20, 23-28

Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., Puzyr, A. P., and Mogilnaya O. A. (2004) Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 719-728

Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., Gordeev, S. A., and Puzyr, A. P. (2005) Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media, *Journal of Biomaterials Science*, 16, 643-657

Tanaka K. and Ishizaki, A. (1994) Production of poly-D-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by a two-stage culture method employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697^{T}, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 425-427

Tanaka, K. and Ishizaki, A. (1995) Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO_2, H_2, and O_2 by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 268-275

Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Willians, C. D., and Radecka, I. (2007) "Bacterial systhesis of biodegradable Polyhydroxy -alkanoates," *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1437- 1449

Vololva, T. G., Shishatskaya, E. I., Sevastianov, V., Efremov, S., and Mogilnaya O. A. (2003) Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers, *Biochemical Engineeing Journal*, 16, 125-133

Volova, T. G. (2004) Polyhydroxyalkanoates－plastic materials of the 21st century: production, properties, applications, Nova Science Publishers, New York, Chapter 1

Volova, T. G., Kalacheva, G. S., Gorbunova, O. V., and Zhila, N. O. (2004) Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 170-177

Volova, T. G. and Kalacheva, G. S. (2005) The synthesis of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate copolymers by the bacterium *Ralstosia eutropha*, *Microbiology*, 74, 54-59

Yagmurlu, M., Korkusuz, F., Gursel, I., Korkusuz, P., Ors, U., and Hasirci, V. (1999) Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-

hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: *In vivo* effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46, 494-503

Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 5-21

Abstract

Transformation of Captured CO_2 to Biocompatible Medical Plastics Using *Cupriavidus necator*

Inseon Park
Civil and Environmental Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Polyhydroxyalkanoates (PHA), raw materials for biodegradable plastics, are synthesized by numerous bacteria as carbon and energy storage compounds under certain nutrient limited conditions. A hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus necator* (formerly, *Alcaligenes eutrophus*) is known to grow autotrophically using H_2, O_2, and CO_2, and accumulate poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], which is the most common type of PHA, in the cell. The production of P(3HB) using CO_2 has a potential for transforming wastes, captured CO_2, into useful materials. The biocompatibility and biodegradability of PHA make PHA the attractable candidate for production of various high value-added bioplastics intended for medical applications such as surgery, transplantology, tissue engineering, and pharmacology. However, for commercial uses, the copolymer like poly(3-

hydroxybutyrrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] has wider applications than the homopolymer like P(3HB), because P(3HB-co-3HV) is more ductile, easier to mold, and tougher than P(3HB). P(3HB-co-3HV) can be produced by adding co-substrates such as propionic acid and valeric acid that can be used as the precursor molecule of 3-hydroxyvalerate (3HV).

This thesis consists of three chapters with each chapter having one objective. In the first chapter, the effects of CO_2 concentrations on the growth of *C. necator* and the accumulation of P(3HB) are investigated by increasing the CO_2 concentration in the substrate gas mixture. During the first stage, *C. necator* was cultivated for 6 d in a minimal medium with NH_4Cl as a nitrogen source, the microbial growth followed the order of 1, 3, 10, and 20% CO_2. During the second stage of 96 h cultivation in the nitrogen-limited minimal medium, the P(3HB) accumulation in the cells decreased with increasing CO_2 concentrations. The reduced efficiency of P(3HB) production at higher CO_2 concentrations can probably be attributed to the limited amount of other substrate gasses (H_2 and O_2) as well as CO_2 toxicity.

In the second chapter, the effects of valeric acid concentrations and feeding methods on the growth of *C. necator* and the accumulation of P(3HB-co-3HV) were studied. The results showed that the valeric acid concentration should be maintained under 0.05% for the effective accumulation of the 3HB and 3HV at the same time. By changing the feeding method, P(3HB-co-3HV) having different contents of 3HV could be produced. P(3HB-co-3HV) with about 15 mol% of 3HV can be produced by adding 0.05% valeric acid once at the beginning of the cultivation. P(3HB-co-3HV) with about 30 mol% of 3HV can be produced by adding 0.05% and 0.025% valeric acid at

0 h and 48 h, respectively.

In the third chapter, the possibility of continuous production of the P(3HB-co-3HV) with specific 3HV content using continuous culture was investigated. The two-step culture method consisted of the continuous growth stage and the PHA accumulation stage. The continuous culture was stabilized after about 15 d producing 0.9 g/L of cells with 36% (w/w) P(3HB) content. These cells could produce P(3HB-co-3HV) with 16 mol% of 3HV consistently over three repeated tests. The mechanical properties of the produced P(3HB-co-3HV) with 16 mol% of 3HV in this study showed the similar properties exhibited by other microbial based P(3HB-co-3HV). It was also more elastic, flexible, and tougher than P(3HB).

Based on the previous studies, P(3HB-co-3HV) with up to 30 mol% of 3HV can be used in contact with blood without negative effects and the produced P(3HB-co-3HV) in this study meets this criteria. Overall, the results report that the optimal cultivation conditions for P(3HB-co-3HV) production using CO_2 and valeric acid.

keywords : CO_2 conversion, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydro-xyvalerate), *Cupriavidus necator*, Biocompatible plastics
Student Number : 2011-20976

감사의 글

2006년 설레는 마음으로 서울대학교에 입학하였던 지도 어느덧 7년이 지나 이제는 석사 과정 졸업을 하게 되었습니다. 저에게 서울대학교 환경공학연구실은 언제나 너무도 따뜻하고 즐거운 곳이었습니다. 이번 기회를 통해 작은 결실을 낳게 도와준 많은 분들께 지면을 빌어서 감사의 뜻을 전하고 싶습니다.

부족한 저희를 온화한 미소로 대해주시고 연구에 대한 조언을 아끼지 않으셨던 정태학 교수님, 언제나 유쾌하시고 엔지니어의 새로운 길을 알려주신 한무영 교수님, 특유의 카리스마와 넘치는 유머를 바탕으로 연구자의 참모습을 보여주신 김재영 교수님, 하나부터 열까지 제 2년을 돌봐주신 조은혜 박사님, 마지막으로, 부족한 저에 대해 지도를 아끼지 않으시고 배려해주신 저의 지도교수님이신 남경필 교수님께 진심으로 감사드립니다. 학문과 연구뿐만 아니라 인생에 대해 많은 것을 배우고 느끼게 해주셔서 감사드리며 언제 어디에서나 부끄럽지 않은 제자가 되도록 노력하겠습니다.

바쁘다는 핑계로 함께 시간도 많이 보내지 못하고 마음을 표현하는 데에 서투른 저를 항상 믿고 지켜봐주신 사랑하는 부모님께 진심으로 감사하고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 언제 어디서나 부끄럽지 않은 자랑스러운 딸이 될 수 있도록 최선을 다하겠습니다.