



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149666
(43) 공개일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/625 (2022.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/625 (2022.01)
C12N 1/20 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2023-0045519
(22) 출원일자 2023년04월06일
심사청구일자 2023년04월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호
강승기
경기도 수원시 권선구 서수원로183번길 2, 201동1301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

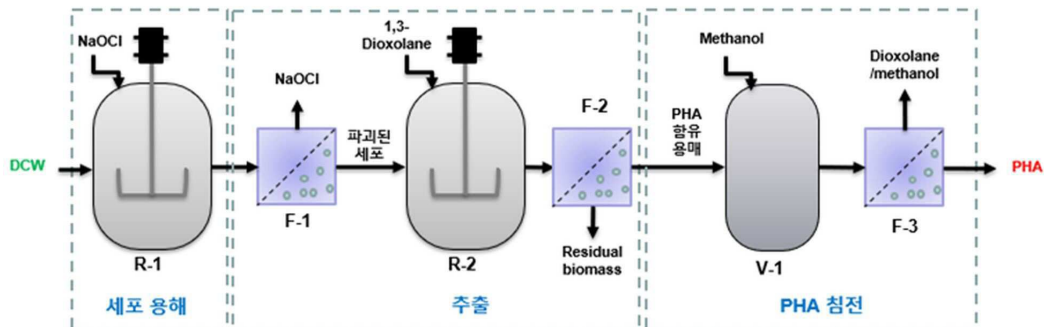
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메탄자화균인 메틸로시스티스 속 균주를 이용한 고농도의 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 생산방법 및 추출방법

(57) 요약

본 발명은 메탄자화균인 메틸로시스티스 속 균주를 이용한 고농도의 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 생산방법 및 추출방법에 관한 것으로, 본 발명에 생산방법 및 추출방법에 따르면 25 mol% 이상의 3HV를 포함하는 PHBV 공중합체를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 생산된 PHBV 공중합체는 생분해성 플라스틱으로 기존의 석유기반 플라스틱인 폴리프로필렌(Polypropylene, PP)과 열적 특성이 유사하기 때문에 석유기반 플라스틱의 대체체로서 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 온실가스인 메탄을 사용하고, 친환경 용매인 1,3-다이옥살레인을 추출용매로 사용함으로써 환경친화적인 생분해성 플라스틱 생산 기술로 평가받을 수 있을 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동
402호

트란하미

경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 210호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157126
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	기획재정부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 군주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 메탄을 포함하는 배양배지에서 메틸로시스티스 속 균주를 배양하는 유도기(lag phase) 단계;
- b) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양배지에서 상기 a) 단계의 균주를 배양하는 대수증식기(exponential phase) 단계;
- c) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양배지에서 상기 b) 단계의 균주를 배양하는 정지기(stationary phase) 단계; 및
- d) 상기 c) 단계의 균주 또는 이의 배양산물로부터 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 회수하는 단계;를 포함하는, 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 b) 단계의 발러레이트는 0.05 내지 0.15 g/L 농도의 발러레이트인 것을 특징으로 하는, 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 c) 단계의 발러레이트는 0.15 내지 0.25 g/L 농도의 발러레이트인 것을 특징으로 하는, 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배양은 pH 6.0 내지 7.0의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 메틸로시스티스 속 균주는 메틸로시스티스 속 MJC1(Methylocystis sp. MJC1)인 것을 특징으로 하는, 생산방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법은 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 3-하이드록시발러레이트 물분율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 생산방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된, 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)).

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 공중합체는 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate, 3HV)를 20 내지 30 mol%를 포함하는 것을 특징으로 하는, 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)).

청구항 9

- a) 메틸로시스티스 속 균주를 배양하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 생산하는 단계;
- b) 상기 a) 단계의 균주를 차아염소산나트륨(NaOCl)와 반응시켜 세포를 용해하는 단계;
- c) 용해된 세포에 다이옥살레인(dioxolane)을 첨가하여 환류(reflux) 추출하는 단계; 및
- d) 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체가 포함된 다이옥살레인에 메탄올을 첨가하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 침전시키는 단계;를 포함하는, 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 환경친화적 추출방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 메틸로시스티스 속 균주는 메틸로시스티스 속 MJC1(*Methylocystis* sp. MJC1)인 것을 특징으로 하는, 추출방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체 {poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV 공중합체}를 생산하기 위해 신규균주 메틸로시스티스 속 균주로부터 메탄(CH₄)와 발러레이트(valerate)를 공동탄소원으로 공급하여 3HV의 함량이 높은 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 생산하는 방법에 관한 것이다. 더욱 자세하게는 탄소원으로 메탄을 사용하는 메틸로시스티스 속 MJC1 균주(*Methylocystis* sp. MJC1)을 생물배양기에서 배양하면서 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate, 3HV)의 전구체인 발러레이트(valerate)의 주입 시기 및 농도를 조절하며, pH를 조절함으로써 PHBV 공중합체의 함량 및 3-하이드록시발러레이트의 물분율을 향상시키고자 함이다. 또한, MJC1 균주를 통해 생성된 PHBV 공중합체를 환경친화적 추출과정을 최적화함으로써 높은 순도의 PHBV 공중합체를 얻는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

전 세계 석유 기반 페플라스틱의 발생량은 2018년 기준 3억 5900만 톤에 달했으며, 플라스틱의 재활용률은 9%에 불과하다. 페플라스틱 발생량의 79%가 매립되고 있다. 대부분의 페플라스틱은 미생물이 분해할 수 없는 화학구조를 가지고 있기 때문에 분해되는데 오랜 시간이 걸린다. 생분해성 플라스틱은 매립시 6개월 내지 1년 안에 미생물에 분해될 수 있어 기존의 석유계 기반의 플라스틱을 대체할 수 있는 수단으로 각광받고 있다. 생분해성 플라스틱의 일종인 폴리하이드록시 알카노에이트(Polyhydroxyalkanoates, PHA)는 미생물에 의해서 생산될 수

있다. 이러한 PHA는 석유기반 플라스틱을 대체하여 각종 필름, 봉합사, 보관용기, 또는 의약품의 코팅제 등의 용도로 널리 이용될 수 있다.

[0003] 메탄자화균 또는 메틸로시스티스 속 균주(*Methylocystis* sp.)는 기존의 PHA를 생산하는 다른 미생물인 슈도모나스(*Pseudomonas*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 바실러스(*Bacillus*)와 달리, 탄소원으로 당을 사용하지 않고 메탄을 사용하여 생분해성 플라스틱을 생산할 수 있다. 지구온난화의 주범인 메탄을 사용하여 PHA를 합성하는 것은 온실가스 저감뿐만 아니라 석유계 플라스틱으로 야기되는 미세플라스틱 등의 환경오염 문제를 동시에 해결할 수 있다.

[0004] 한편, 메탄자화균에 속하는 메틸로시스티스(*Methylocystis*) 속 균주는 메탄을 산화시켜 에틸말로닐-코에이(Ethylmalonyl-coA) 경로를 통해 아세틸-코에이(Acetyl-coA)를 이용하여 메탄으로부터 PHA의 일종인 폴리하이드록시부티레이트(Polyhydroxybutyrate, PHB)를 생합성할 수 있다. 이러한 PHB는 열적 특성과 물리적 특성이 취약하여 사용에 한계점이 있다. 따라서 다른 단량체의 혼입을 통해 PHB의 특성을 개선하고자 하는 연구들이 진행되어 왔다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 3HV의 몰분율이 높은 PHBV 공중합체 생산방법 및 PHBV 공중합체 추출 방법을 개발하고자 하였으며, 메틸로시스티스 속 MJC1 균주 배양 시 발러레이트(valerate)를 보조기질로 공급하는 경우 메틸로시스티스 속 MJC1 균주가 메탄과 발러레이트로부터 3HV의 몰분율이 높은 PHBV 공중합체를 고농도로 생산하는 것을 확인하고, 친환경 용매인 1,3-다이옥살레인(1,3-Dioxolane)을 사용하여 PHBV 공중합체를 추출하는 경우 추출 효율이 현저히 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2020/0115724호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) 생산방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 생산된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate))를 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 메틸로시스티스 속 균주로부터 생산된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 환경친화적 추출방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 a) 메탄을 포함하는 배양 배지에서 메틸로시스티스 속 균주를 배양하는 유도기(lag phase) 단계; b) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양 배지에서 상기 a) 단계의 균주를 배양하는 대수증식기(exponential phase) 단계; c) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양배지에서 상기 b) 단계의 균주를 배양하는 정지기(stationary phase) 단계; 및 d) 상기 c) 단계의 균주 또는 이의 배양 산물로부터 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 회수하는 단계;를 포함하는 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) 생산방법을 제공한다.

[0011] 이어서, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate))를 제공한다.

[0012] 나아가, a) 메틸로시스티스 속 균주를 배양하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 생산하는 단계; b) 상기 a) 단계의 균주를 차아염소산나트륨(NaOCl)과 반응시켜 세포를 용해하는 단계; c) 용해된 세포에 다이옥살레인을 첨가하여 환류(reflux) 추출하는 단계; 및 d) 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체가 포함된 다이옥살레인에 메탄올을 첨가하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발

러레이트 공중합체를 침전시키는 단계;를 포함하는 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 환경친화적 추출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 메틸로시스티스 속 MJC1을 이용하여 PHBV 공중합체 생산방법 및 이의 추출 방법은 25 mol% 이상의 3HV를 포함하는 PHBV 공중합체를 제공할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생산된 PHBV 공중합체는 생분해성 플라스틱으로 기존의 석유기반 플라스틱인 폴리프로필렌(Polypropylene, PP)과 열적 특성이 유사하기 때문에 석유기반 플라스틱의 대체재로서 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 온실가스인 메탄을 사용하고, 친환경 용매인 1,3-다이옥살레인을 추출용매로 사용함으로써 환경친화적인 생분해성 플라스틱 생산 기술로 평가받을 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 배지의 pH에 따른 메틸로시스티스 속 MJC1의 바이오매스 수율을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 배지의 pH에 따른 메틸로시스티스 속 MJC1의 PHBV 공중합체 수율 및 3-하이드록시발러레이트 물분율을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 발러레이트 주입농도에 따른 메틸로시스티스 속 MJC1의 바이오매스 수율을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 발러레이트 주입 농도 구간을 0.1g/L, 0.2g/L 순으로 2구간으로 나누고, 주입 시간을 6시간 간격, 3시간 간격으로 하여 바이오매스 수율 및 PHBV 공중합체 수율, 3-하이드록시발러레이트의 물분율을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, PHBV 공중합체의 환경친화적 추출과정을 도식화하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0016] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0017] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0018] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0020] 일 측면에서, 본 발명은 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) 생산방법을 제공한다.

[0021] 상기 생산방법은 a) 메탄을 포함하는 배양배지에서 메틸로시스티스 속 균주를 배양하는 유도기(lag phase) 단계; b) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양배지에서 상기 a) 단계의 균주를 배양하는 대수증식기(exponential phase) 단계; c) 메탄 및 발러레이트를 포함하는 배양배지에서 상기 b) 단계의 균주를 배양하는 정지기(stationary phase) 단계; 및 d) 상기 c) 단계의 균주 또는 이의 배양산물로부터 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 회수하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 “유도기(lag phase)”는 미생물의 성장곡선(growth curve)에서 세포가 새로운 환경

에서 증식하는데 필요한 RNA, 효소 및 기타 물질들을 생합성하고 있는 준비기간으로 대사활동이 왕성하고 세포는 커지지만 분열은 하지 않는 구간으로 세포가 새로운 환경에 적응하는 시기를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는 바이오매스(biomass)가 5 내지 8g DCW/L에 도달하는 시점까지를 말한다.

- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “대수증식기 (exponential phase)”는 미생물의 성장곡선(growth curve)에서 미생물의 세포가 최대 속도로 분열 증식하는 구간으로 미생물 세포수가 증가하는 속도와 전체 미생물 세포의 질량이 증가하는 속도가 같은 균형성장을 하는 시기를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는 바이오매스(biomass)가 5 내지 8g DCW/L에 도달하는 시점부터 23 내지 27g DCW/L에 도달하는 시점까지를 말한다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계의 발러레이트는 0.05 내지 0.15 g/L 농도의 발러레이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 “정지기 (stationary phase)”는 미생물의 성장곡선(growth curve)에서 전체적인 세포 개체 수의 증가나 감소가 없는 구간으로 영양소의 고갈이나 생육저해물질의 축적, 공간의 부족 등 개체군의 성장을 제한하는 요소들에 의해 대수성장이 저하되는 시기를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는 바이오매스(biomass)가 23 내지 27g DCW/L에 도달하는 시점 이후를 말한다.
- [0026] 또한, 상기 c) 단계의 발러레이트는 0.15 내지 0.25 g/L 농도의 발러레이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 상기 배양은 pH 6.0 내지 7.0의 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 상기 메틸로시스티스 속 균주는 메틸로시스티스 속 MJC1(Methylocystis sp. MJC1)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 일 측면에서, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate))를 제공한다.
- [0031] 상기 공중합체는 3-하이드록시발러레이트(3-hydroxyvalerate, 3HV)를 20 내지 30 mol%로 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 일반적으로 PHBV 공중합체의 3HV의 몰분율이 25 mol%를 넘는 경우 기존의 석유기반 플라스틱인 폴리프로필렌(Polypropylene, PP)과 열적 특성이 유사해져, 사용범위가 늘어나게 된다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 메틸로시스티스 속 균주로부터 생산된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체의 환경친화적 추출방법을 제공한다.
- [0035] 상기 추출방법은 a) 메틸로시스티스 속 균주를 배양하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 생산하는 단계; b) 상기 a) 단계의 균주를 차아염소산나트륨(NaOCl)와 반응시켜 세포를 용해하는 단계; c) 용해된 세포에 친환경 용매 다이옥살레인을 첨가하여 환류(reflux) 추출하는 단계; 및 d) 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체가 포함된 다이옥살레인에 메탄올을 첨가하여 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 침전시키는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 미생물로부터 생산된 PHA를 추출하기 위한 종래 기술은 클로로포름을 이용한 추출 시스템을 사용한다. (1단계: 클로로포름을 이용한 추출 과정, 2단계: PHA가 용해된 클로로포름을 메탄올을 이용하여 침전시키는 과정) 하지만 본 발명에서는 PHA의 추출과정에서 더 높은 회수율을 얻기 위해서 3단계의 시스템을 개발하였다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b)단계는 메틸로시스티스 속 균주 중량 대비 10~30배 부피, 바람직하게는 15~25배 부피, 더욱 바람직하게는 18~22배 부피의 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액을 첨가하여 30~45℃, 바람직하게는 35~39℃, 더욱 바람직하게는 36.5~37.5℃에서 40~80분, 바람직하게는 50~70분, 더욱 바람직하게는 55~65분간 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 또한, 상기 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액의 농도는 6 내지 10%(w/w), 바람직하게는 7 내지 9%(w/w), 더욱 바람직하게는 7.5 내지 8.5%(w/w)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 c)단계는 메틸로시스티스 속 균주 중량 대비 10~70배 부피, 바람직하게는 20~60배 부피, 더욱 바람직하게는 25~50배 부피의 다이옥살레인(dioxolane)을 첨가하여 80~100℃, 바람직하게는

85~95℃, 더욱 바람직하게는 88~92℃에서 50~70분, 바람직하게는 50~70분, 더욱 바람직하게는 55~65분간 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 또한, 상기 다이옥살레인(dioxolane)은 1,3-다이옥살레인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 d)단계는 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체가 포함된 다이옥살레인의 2~4배 부피, 바람직하게는 2.5~3.5배 부피의 메탄올(methanol)을 첨가하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄올은 70~100%(v/v), 바람직하게는 95~100%, 더욱 바람직하게는 100% 메탄올일 수 있다.

[0043] 또한, 상기 추출방법은 e) 침전된 3-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체를 건조시키는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 e)단계는 80~100℃, 바람직하게는 85~95℃, 더욱 바람직하게는 88~92℃에서 20~28시간, 바람직하게는 22~26시간, 더욱 바람직하게는 23~25시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0048] <실시예 1> 생물반응기에서의 메틸로시스티스 속 MJC1의 고농도 배양 및 PHBV 공중합체 생산을 위한 pH 최적화, 발러레이트 주입시기 및 주입량 결정

[0049] 1-1. 메틸로시스티스 속 MJC1의 배양

[0050] 메틸로시스티스 속 MJC1 (Methylocystis sp. MJC1, NCBI genbank accession number : CP107558)는 생물 반응기(bio reactor)에서 고농도 세포 배양을 위해 3X NMS 배지 (1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3g KNO_3 , 0.2g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.0000038g Fe-EDTA, 0.0000005g $NaMo \cdot 4H_2O$ per liter); 1ml of trace elements solution(500mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 400mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20mg $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 50mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 15mg H_3BO_3 , 250mg EDTA per liter), 2ml of phosphate stock solution (26g KH_2PO_4 , 62g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ per liter), 2ml of vitamin stock (1×) (2mg biotin, 2mg folic acid, 5mg thimine HCl, 5mg Ca pantothenate, 0.1mg vitamin B12, 5mg riboflavin, 5mg nicotinamide per liter) and 10uM copper)를 사용하여 배양하였다.

[0052] 1-2. pH 조건 결정

[0053] 기존의 연구에서 균주마다 PHB 축적률과 바이오매스가 향상되는 최적의 pH가 있다는 점에 주목하여 메틸로시스티스 속 MJC1 균주 배양 시 pH에 따른 바이오매스 및 PHBV 공중합체 생산 수율을 조사하였다.

[0054] 구체적으로, 메틸로시스티스 속 MJC1 균주 배양은 1.5 L의 NMS 배지가 포함된 마이크로스파저(BioCNS, Korea)와 6날 임펠러가 장착된 5L 생물발효기에서 30° C로 수행되었다. 생물발효기에 10%(v/v) 접종물로 접종하고 배양액의 pH는 1N HCl을 첨가하여 pH를 조절하였다. 기체 기질, CH_4 및 공기 혼합 기체(3:7, v/v)는 질량 흐름 제어기(Brooks, Hatfield, PA)를 사용하여 0.2~0.4vvm으로 연속적으로 공급되었다. 세포농도 및 용존산소량(DO)에 따라 임펠러 교반속도 (500~900rpm)를 조절하였다.

[0055] 상기 기재된 3X NMS 배지를 이용하여 pH를 5.5, 6.0, 6.5, 6.8로 조절하였다.

[0056] 그 결과, 도 1, 도 2 및 표 1에 나타낸 바와 같이 pH 5.5 조건에서는 PHBV 공중합체가 생산되지 않았고, pH 6.5 조건 하에서 바이오매스 27g/L, PHBV 공중합체 함량 50.9 wt%, 3HV 물분을 10%를 얻었으며, 4가지 pH 조건 중 pH 6.5 조건이 바이오매스 수율이 가장 높으며, PHBV 공중합체 함량도 가장 높은 것으로 나타났다.

표 1

pH	바이오매스(g/L)	PHBV 합량(wt%)	3HV 합량(mol%)
5.5	-	-	-
6.0	12.78	47.75	18.77
6.5	26.68	50.98	9.73
6.8	19.136	43.64	11.99

1-3. 발러레이트 주입농도 및 주입시기 결정

먼저, 메틸로시스티스 속 MJC1 균주의 생장과정 중 대수증식기 (exponential phase)에서 발러레이트 주입량에 따른 바이오매스 수율 및 PHBV 생산 수율을 조사하였다. 발러레이트 주입량은 0.1, 0.15, 0.2 g/L로 조절하였다.

구체적으로, 발러레이트 주입시기는 배양 36시간 경과하였을 때 (바이오 매스 수율이 6g DCW/L를 기준), 0.1g/L의 발러레이트를 주입하고 6시간 간격으로 동일한 양의 발러레이트를 96h까지 주입하였다. 그 외 다양한 농도의 발러레이트 주입도 동일한 방법으로 수행되었다.

그 결과, 도 3 및 표 2에 나타난 바와 같이 바이오매스 수율은 저농도(0.1 g/L)의 발러레이트를 주입하는 경우 바이오매스 수율이 가장 높으며, 고농도(0.2 g/L)의 발러레이트를 주입하는 경우 오히려 바이오매스 수율이 낮아지는 것으로 나타났다(도 3).

이러한 결과는 대수증식기 (exponential phase)에 고농도의 발러레이트를 주입할 경우 발러레이트의 세포독성으로 인해 미생물의 성장에 저해를 줄 수 있어 대수증식기 (exponential phase)에 주입되는 발러레이트의 양을 조절해야 한다는 것을 의미한다.

표 2

발러레이트 농도(g/L)	바이오매스(g/L)	PHBV 합량(wt%)	PHBV(g/L)	3HV 합량(mol%)
0.1	26.68	50.98	13.60	9.73
0.15	20.32	54.34	11.04	11.31
0.2	15.17	59.25	8.99	22.44

이어서, 대수증식기 (exponential phase) 이후 정지기 (stationary phase)에는 발러레이트의 주입량을 늘려 3HV의 물분율을 증가시키기 위해, 발러레이트 주입 농도 구간을 0.1g/L, 0.2g/L 순으로 2 구간(대수증식기 및 정지기)으로 나누고, 대수증식기에는 6시간 간격, 정지기에는 3시간 간격으로 주입하여 메틸로시스티스 속 MJC1 균주의 바이오매스 수율 및 PHBV 공중합체 수율, 3-하이드록시발러레이트(3HV)의 물분율을 확인하였다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 바이오매스를 기준으로 6g DCW/L의 시점에서 발러레이트를 0.1g/L 씩 6시간 간격으로 72시간까지 주입하면 세포의 성장에 저해를 받지 않고, 이후 0.2g/L 씩 3시간 간격으로 96시간까지 주입하여 96 시간동안 바이오매스 22.05g/L, PHBV 공중합체 합량 40.91wt%, 3HV 물분율 27.12 mol%에 도달함을 확인하였다.

<실시예 2> 메틸로시스티스 속 MJC1 균주로부터 생산된 PHBV 공중합체 추출 방법 최적화

메틸로시스티스 속 MJC1 균주로부터 생산된 PHBV 공중합체의 추출 순도와 회수율을 향상시키기 위해서, 도 5를 참조하여 차아염소산 나트륨의 양을 조절하고, 동결건조된 세포와 1,3-다이옥살레인의 비율을 조정하였으며, 마지막으로 추출온도를 조절하여 메틸로시스티스 속 MJC1 균주 내 축적된 PHBV 공중합체를 추출하였다.

구체적으로, 건조된 메틸로시스티스 속 MJC1 세포 2g에 8% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액 30 또는 40ml을 첨가

한 후 37℃ 조건하에서 1시간 반응시켰다. 이후 10,000rpm 10분간 원심분리기를 돌려 파괴된 세포를 얻었다. 그 후, 세포에 50 또는 100ml의 100%(w/w) 1,3-다이옥살레인을 첨가한 후 90℃에서 1시간 동안 환류 추출하였다. 이어서, PHBV 공중합체가 함유된 1,3-다이옥살레인 용액에 3배 부피에 해당하는 100% 메탄올을 첨가하여 PHBV를 침전시켰다. 이후 필터 과정을 통해 추출된 PHA를 회수한 후 80 또는 90℃의 오븐에서 24시간 건조하였다. 각 시료의 추출조건은 하기 표 3에 나타내었다.

[0075]

그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이 3HV 몰분율이 낮은 PHBV 공중합체를 포함하는 균주(시료 1-3)는 40mL NaOCl, 100mL Dioxolane, 300ml MeOH 및 90℃의 추출조건으로 추출하였을 때 PHA 순도 96.19%, PHA 회수율은 99.88%로 가장 우수한 추출 수율을 나타내었다. 또한, 3HV 몰분율이 높은 PHBV 공중합체를 포함하는 균주(시료 4-6)에서도 마찬가지로 40mL NaOCl, 100mL Dioxolane 및 90℃의 추출조건으로 추출하였을 때 PHA 순도 91.72 %, PHA 회수율은 66.42 %로 가장 우수한 추출 수율을 나타내었다.

[0076]

이와 같이 3HV 몰분율에 상관없이 8% 차아염소산나트륨 용액 40mL, Dioxolane 100mL 및 90℃의 추출조건으로 메틸로시스티스 속 MJC1 균주로부터 생산된 PHBV 공중합체를 추출하였을 때 가장 우수한 추출 수율을 나타내었으므로, 상기 추출조건을 최적 추출조건으로 선정하였다.

표 3

[0078]

시료	PHA 함유량	추출조건	PHA 순도(%)	PHA 회수율(%)
1	41 wt% PHBV -12%mol 3HV	40mL NaOCl 60mL Dioxolane 80℃	92.53 %	83.11 %
2	41 wt% PHBV -12%mol 3HV	40mL NaOCl 60mL Dioxolane 90℃	90.26 %	91.04 %
3	41 wt% PHBV -12%mol 3HV	40mL NaOCl 100mL Dioxolane 90℃	96.19 %	99.88 %
4	26 wt% PHBV -47% mol 3HV	40mL NaOCl 60mL Dioxolane 90℃	89.06 %	46.98 %
5	26 wt% PHBV -47% mol 3HV	40mL NaOCl 100mL Dioxolane 90℃	91.72 %	66.42 %
6	26 wt% PHBV -47% mol 3HV	50mL NaOCl 100mL Dioxolane 90℃	88.72 %	63.36 %

[0080]

기존 PHA 추출용매로 널리 사용되는 클로로폼과 같은 독성 유기용매는 환경오염 문제를 야기하여 산업용 추출용매로 사용이 금지되어 있다. 상기 PHBV 공중합체 추출방법에서 사용된 추출용매 1,3-다이옥살레인은 친환경 용매로서, 메탄자화균으로부터 생산된 PHBV 공중합체의 환경친화적 추출법이라 할 수 있다.

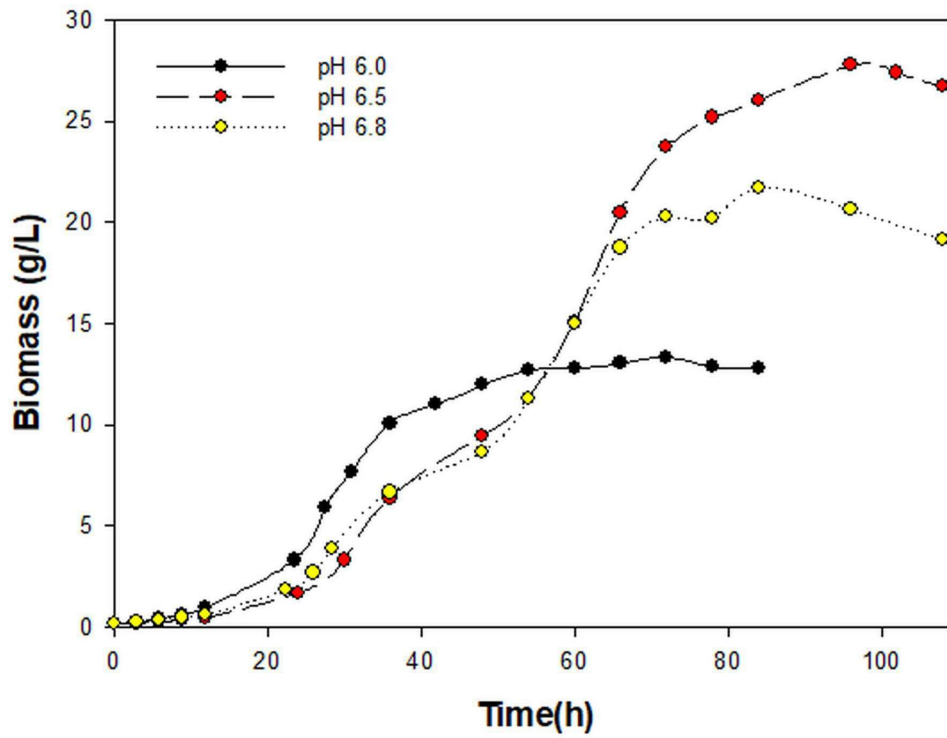
[0082]

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 상

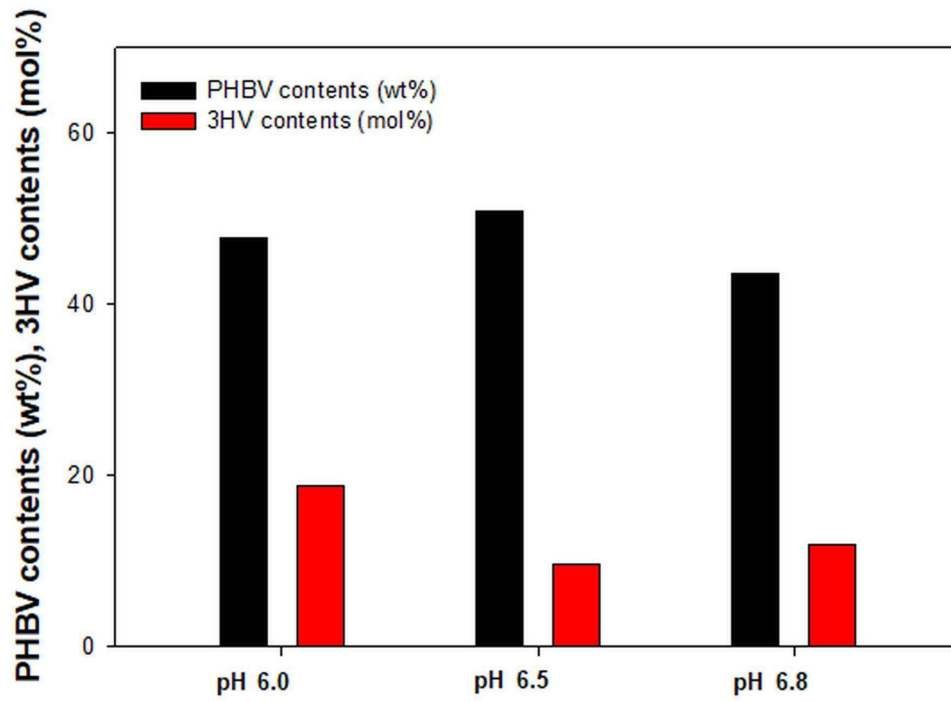
세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

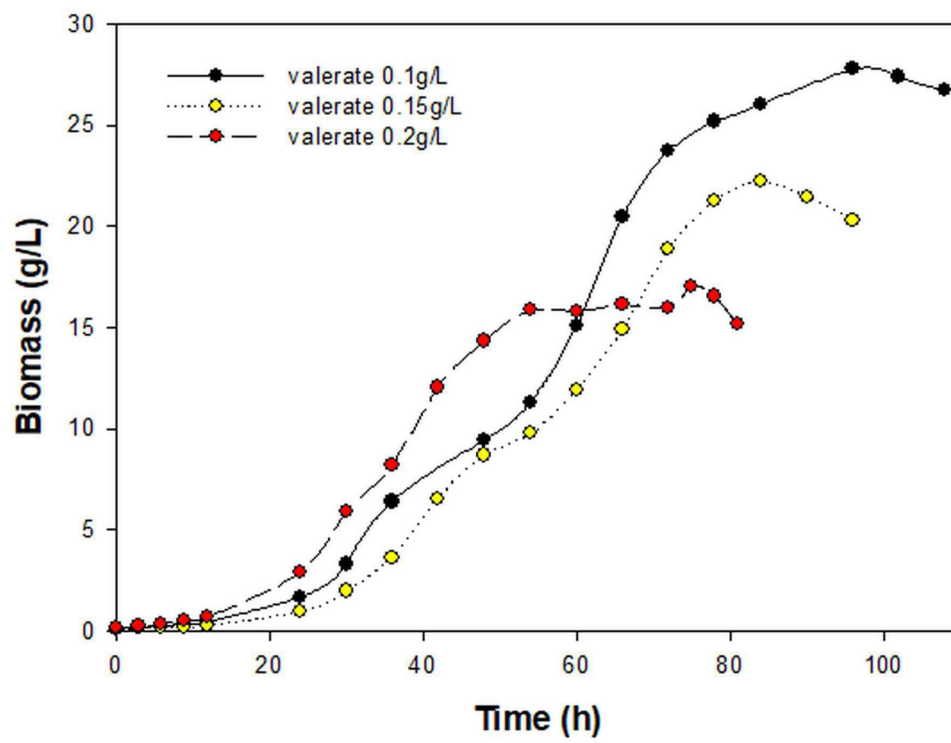
도면1



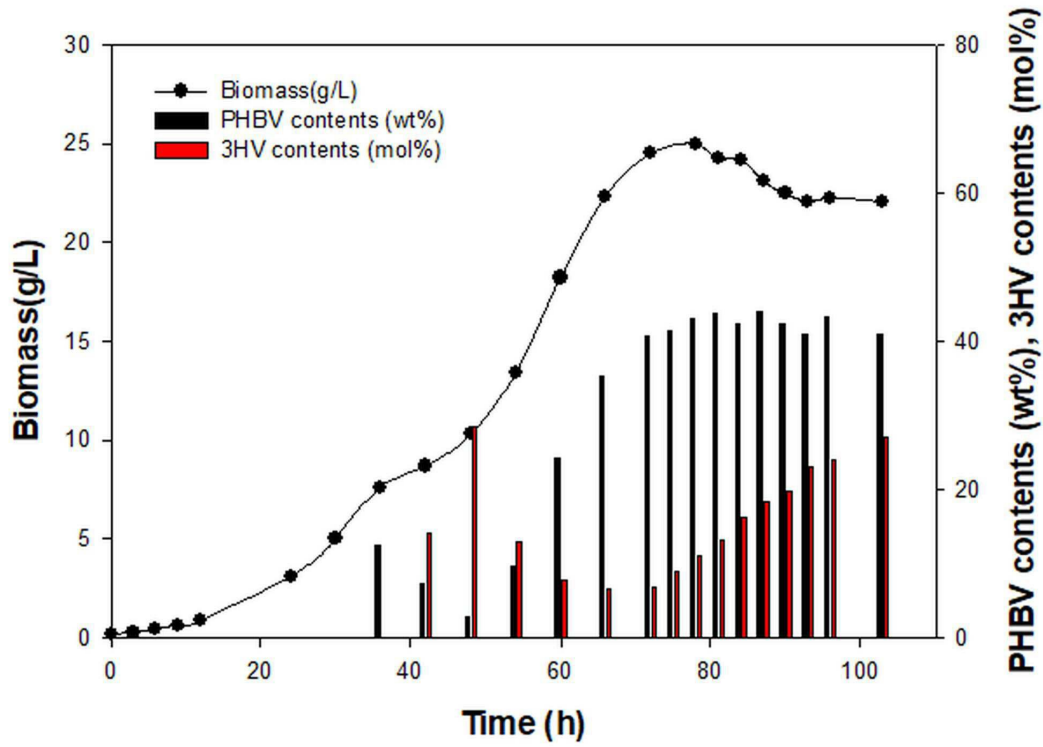
도면2



도면3



도면4



도면5

