(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
C12N 1/20
C12P 1/04

(45) 공고일자 1991년10월19일
(11) 공고번호 특1991-0008625

(21) 출원번호	특1984-0007539	(65) 공개번호	특1985-0004268
(22) 출원일자	1984년11월30일	(43) 공개일자	1985년07월11일

(30) 우선권주장 P33 43 5510 1983년12월01일 독일(DE)

(71) 출원인 페트로케미 다누비아 게젤샤프트 엠.베.하. 고트프리드 거스틀, 발터 카들

오스트리아연방공화국 아-2323 쉬베차트-만스뵈르트 다누비아 스트라세 21-25

(72) 발명자 로베르트 엠. 라퍼티

오스트리아연방공화국 에이-8051 그라쯔 돌레짤가세 21

게르하르트 브라우네그

오스트리아연방공화국 에이-8044 그라쯔 쿠르쩨거베그 14

(74) 대리인 이병호

심사관 : 김성완 (책자공보 제2530호)

(54) 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 미생물을 별도의 연속적인 2개의 발효단계를 거쳐 계속적으로 배양하여, 세균 세포 물질에서 고수율 및 고함량의 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산(PHB)를 생체 공학적으로 제조하는 방법에 관한 것이다.

다수의 원핵성 미생물은 비교적 장시간동안 그들의 세포내에 에너지 및 탄소 저장물질로서 PHB를 축적할 수 있음이 알려져 있다. 미생물의 세포물질로부터 분리되는 PHB는 유리한 물리적 성질을 갖는 열가소성 폴리에스테르이며, PHB는 폴리에틸렌 또는 폴리스티렌이 현재 이용되고 있는 바와 유사한 목적을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 오늘날 통상 사용되고 있는 이들 폴리머와 비교해보면, PHB는 생체공학적 경로를 통해 수득되며, 또한 생물학적 경로에 의해 다시 분해할 수 있는 잇점이 있다.

또한 PHB-저장 미생물의 호기적 배양은 세포분열 및 증식의 방향으로 또는 영양배지의 특이 조성물에 의한 세포내 PHB 저장의 방향으로 선택적으로 조정할 수 있음도 이미 알려져 있다. 공지의 방법에 있어서, 미생물 세포에서 고함량의 PHB는 영양배지중 탄소공급원의 농도가 성장에 필요한 다른 영양소, 예를 들면 질소 및 인의 공급에 비해 높고 미생물을 암모늄- 제한 성장 조건하에 배양하는 경우에 수득된다.

이러한 사실에 근거를 둔 PHB의 2단계 제조방법은 유럽특허 제A-15,669호에 기술되어 있다. 유럽특허 제A-15,669의 방법에서는, 먼저 메틸로 박테리움 오르가노필리움(Methylobacterium organophilium)속의 미생물을, 미생물 군집중 균체(biomass)의 양이 성장기에 일어나는 세포내 PHB 축적없이 배양액 1ℓ당 20 내지 25g에 달할때까지, 질소 및 인을 완전하고 적절히 공급하고 영양소의 공급을 제한하지 않으면서 배양한다. 다음에 제2발효단계에서 배지에 질소 및/또는 인을 완전히 차단 공급함으로써, 재생산 및 세균증식이 정지되며 처음으로 세포내에 PHB가 축적된다. 상기 유럽특허 제A-15,669호의 방법에 따르면, PHB 함량이 세포 건조 중량의 25 내지 47중량% 이하인 균체 물질이 수득된다.

유럽특허 제A-15,669호의 방법에 대해서 진보성이 있는 PHB를 제조하는 발효방법은 유럽특허 제A-46,344호에 기술되어 있으며, 이 방법은 알칼리게네스 유트로푸스(Alcaligenes eutrophus)종의 미생물을 연속적으로 호기배양하는 것이다. 유럽특허 제A-46,344호에 따르면, 그 방법으로 미생물 군집의 성장을 조절할 수 있으며 동시에, 유럽특허 제A-15,669호의 방법과는 대조적으로, 배양개시부터 성장에 필요한 영양소 및 미량물질, 특히 질소의 공급을 억제함으로써 세포내에서 고함량의 PHB를

얻을 수 있다.

또한 변형 방법에 있어서, 미생물을 함유하며 초기에 제한된 영양 공급조건하에서 이미 25중량%의 PHB를 축적한 배양액을 제2발효단계로 옮기고 PHB를 50 내지 80중량%까지 축적시키며, 이때 축적기 동안에는 더 이상 성장하는 것이 바람직하지 못하므로, 성장을 억제시키기 위해 제1단계에서 이미 제한했던 농도의 영양 조성물을 제2단계에서 발효액에 가하지 않는다.

유럽특허 제A-46,344호의 방법에 있어서, 영양배지에서 탄소 공급원이 더 많이 이용되며, PHB의 축적이 증가된다하더라도, 그 방법은 비성장율 및 PHB-생성율이 성장에 필요한 영양 공급의 결핍에 의해 유의적으로 감소되는 단점을 가지고 있다.

유럽특허 제A-46,344호에 따르는 방법의 또 다른 단점은 알칼리게네스 유트로푸스 종의 발효에 필요한 최적 온도 범위가 비교적 낮다는 점이다. 그러므로 알칼리게네스 유트로푸스종은 고온에서 배양될 수 있는 내열성이 높은 미생물의 경우보다 성장 및 PHB의 축적이 더욱 서서히 진행되는 온도 범위에서 30 내지 34℃로 급냉각하면서 배양해야 한다.

이러한 이유로, 공지의 방법에서는 발효조를 연속 조작하는 동안 잔류시간이 길며, 그에 상당하여 희석율이 낮으므로 PHB 제조의 수익성에 역효과를 나타낸다.

탄수화물중, 유럽특허 제A-46,344호의 방법에서의 탄소 공급원은 과당이며, 단지 알칼리게네스 유트로푸스 H 16 균주로부터 유도된 특정돌연변이체가 사용된 경우에는 영양 공급원으로서 포도당이 사용될 수 있다. 모균주로부터 돌연변이체를 배양하고 수확하는 일은 집약 노동이며, 포도당의 주공급원으로서, 다량의 이당류 예를들면 당밀 또는 공업용 당액에 함유된 자당도 또한 알칼리게네스 유트로푸스 H 16으로부터 유도된 돌연변이체의 경우에 이용될 수 없으므로, 이들 돌연변이체를 사용하여 수득할 수 있는 PHB를 경제적으로 제조하기 위한 영양 공급원의 사용량은 실질적으로 증가되지 않는다.

유럽특허 제A-46,344호에서 알칼리게네스 유트로푸스외에, 알칼리게네스 속의 다른 종 예를들어 알칼리게네스 페칼리스(Alc.faecalis), 알칼리게네스 룰랜디(Alc.ruhlandii), 알칼리게네스 라투스(Alc.latus) 및 알칼리 게네스 아쿠아마리누스(Alc.aquamarinus)가 PHB의 축적에 유용한 것으로 언급되어 있더라도, 배양 및 농축조건은 이들 종 가운데 어떠한 종에 대해서도 추가로 설명되어 있지 않으며, 단지 알칼리게네스 유트로푸스 균주에 대해서만 발명의 방법이 명세서 및 실시예에 기술되어 있을뿐이다.

대조적으로, 본 발명의 목적은 공지의 방법에 따른 단점을 피하고, 저렴한 탄소공급원을 이용하여 미생물의 세포물질에서 고수율 및 고함량의 PHB를 연속 발효법으로 제조하기 위한 더욱 경제적인 2단계 방법을 제공하는 것이다.

이러한 목적을 성취하는데 있어서, 놀라웁게도 높은 희석율에서 미생물 군집이 급속히 증식함과 동시에 PHB가 축적되는 효과가 있으며, 탄소 공급원의 이용성에 대한 미생물의 의존도는 알칼리게네스 라투스종 또는 그의 돌연변이체를 PHB의 발효 제조시에서 여태까지는 알려져 있지 않았던 조건하, 36 내지 42℃에서 2단계 발효공정으로 배양하는 경우에 크게 경감시킬 수 있다.

PHB의 신균 제조방법중 몇가지 특성은 공지의 선행기술과는 대조적으로 미생물 군집의 재생산 및 급성장이 질소 및 인을 적절하고 완전히 공급하면서 영양소를 무제한 공급하므로써 촉진되며, 놀라웁게도 동시에 성장-제한 조건하에 배양하지 않고서도 PHB의 유효적인 세포내 축적을 이룰수 있다는 점이다.

이들 조건하에 PHB는 특별한 생산방법으로 제조되며, 영양 배지중 탄소공급원의 이용성은 미생물을, 영양공급을 억제하지 않고 별도의 2개의 연속적인 배양단계로 계속 배양을 하지만 제2단계에서는 제1단계에서 보다 용존 산소함량이 낮은 영양 배지에서 계속 배양하는 경우에 우수하다.

본 발명의 방법에 있어서는, 선행분양에서도 보다 고함량의 PHB를 함유하는 균체가 단축된 잔류시간내에 발효조에 형성되며, PHB의 제조 및 분리방법은 여태까지의 방법보다 더욱 경제적으로 수행된다.

따라서, 본 발명은 알칼리게네스 속의 미생물을 동화성 탄소, 질소 및 인의 공급원과 미생물 성장에 필요한 미량영양소 공급원을 함유하는 수성배지 중에서 호기적으로 배양하여 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산를 제조하는 방법에 있어서, 알칼리게네스 라투스균주 또는 그로부터 유도된 PHB-축적돌연변이체를 무제한 성장조건하, 36 내지 42℃에서 미생물 성장을 위한 최적 영양소를 완전 공급하면서 멸균조건하의 별도의 연속적인 2개의 발효단계에 걸쳐, 즉 용존 산소함량이 공기 포화치의 25 내지 50%인 제1발효단계에서 배양한 PHB-함유 미생물 군집을 배양액과 함께 계속해서 제2발효단계로 옮겨 용존 산소 함량을 공기 포화치의 8 내지 15%로 하여 계속배양한 후, 수득된 균체(biomass)로부터 PHB를 통상의 방법으로 추출하여 분리시킴을 특징으로 하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 방법을 수행하기 위해서는 알칼리게네스 라투스균주, 예를들면 알칼리게네스 라투스 균주 DSM[독일연방공화국 미생물 기탁기관, German Collection of Microorganisms]1122(한국기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10131, 기탁일 : 1985.2.18.), DMS 1123(한국기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10132, 기탁일 : 1985.2.18.) 및 DMS 1124(한국기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10133, 기탁일 : 1985.2.18.)가 적절하다.

이들 균주의 형태학적 특성은 문헌 [참조 : Palleroni et al., in Int.Journ. of Systematic Bacteriology28, 416-428, 1978]에 기술되어 있으며, 미생물 기탁기관, 예를들면 ATCC(American Type Culture Collection)의 분류 목록에 기재되어 있다. DSM번호로 분류되는 미생물의 배양샘플은 생체 공학 연구회(Biotechnological Research Association)의 독일연방공화국 미생물 기탁기관, 독일연방공화국 스퇴크하임(Stockheim)의 MBH로부터 숙련가에 의해 자유로이 수득할 수 있다.

모균주로부터 통상의 방법에 의해 수득된 알칼리게네스 라투스 균주의 PHB-축적 돌연변이체도 또한

본 발명에 따르는 공정을 수행하는데 적절하다.

알칼리게네스 라투스균주는 경제적으로 PHB를 생산하는데 유리한 성질을 가지고 있으며, 성장 및 PHB 축적을 위해 광범위한 탄소공급원을 이용할 수 있다. 탄소공급원으로는 D-글루코즈, D-프락토즈, 락토즈, 말토즈, 자당, 전분, 당밀, 베타인, 그린 시럽(green syrup), 하이드롤 및 셀롤로즈 가수분해물과 같은 탄수화물; 글루콘산, 2-케토글루콘산, 포름산, 아세트산, 부티르산, 이소부티르산, L-말론산, D-(-)-타르타르산, 아코니트산, 이태콘산, m-하이드록시벤조산, p-하이드록시벤조산, 겐티스산, 프로토카테쿠산 및 만델산의 수용성 염과 같은 유기산 및 그의 에스테르 및 염; n-프로판올, 이소프로판올, 2,3-부틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 및 글리세롤과 같은 알코올; β-알라닌, L-알라닌, L-세린, L-트레오닌, L-로이신, L-시트룰린, L-오르니틴, L-아미노부티레이트, L-아스파르테이트, L- 아스파르긴, L-글루타메이트, L-프롤린, 히푸레이트, 사르코신 및 크레아틴과 같은 아미노산; 또는 부틸아민과 같은 아민이 있다.

화학무기영양 미생물로서의 성질에 따르면, 알칼리게네스 라투스 균주는 또한 상기에서 언급한 탄소공급원 외에도, 이산화탄소가 단일 탄소공급원으로서 수소 및 산소와의 혼합물로 이용되는 경우 이산화탄소를 이용할 수도 있다.

PHB의 생체공학적 제조방법의 수익성은 영양물질중에서 탄소공급원의 비용에 따라 크게 좌우되므로, 대부분의 화합물이 본 발명에 따르는 발효공정에 사용될 수 있는 사실이 큰 잇점이며, 따라서, 특히 저렴한 탄소공급원을 사용하여 공정을 개선시킬 수 있다.

본 발명에 따르는 방법의 놀랄만한 유리한 특징은 영양물질의 이용 및 PHB 제조의 수익성을 고려하여, 쉽게 구입할 수 있는 이당류를 이용하는 것이다. 바람직한 태양에 있어서, 공업용 당액(예를들면 그린 시럽), 또는 설탕생산의 폐기생성물(예, 당밀)에 함유된 자당이 미생물에 대한 탄소공급원으로 존재하며, 자당을 사용한 알칼리게네스 라투스 DSM 1123 균주(한국기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10132, 기탁일 : 1985.2.18.)의 배양은 고수율의 PHB를 생성할 수 있기 때문에 특히 유리하다.

미생물에 대해 존재하는, 동화성 탄소화합물이 분자에 질소를 동시에 함유한 그룹인 경우, 탄소 및 질소는 동일한 자당으로부터 요구될 수 있다. 알칼리게네스 라투스는 또한 질소공급원으로서 암모니아, 암모늄염(예, 염화암모늄 또는 황산암모늄) 및 질산염을 이용할 수 있다. 또한 필요한 질소요구량은 공업적 및 생물학적 유출물의 질소함량에 의해 크게 충족될 수 있다.

기타 무기 성분에 관한 발효액의 조성물에는 예를들면 인산 수소 나트륨 또는 인산 수소 칼륨 형태의 인; 황산 마그네슘과 같은 마그네슘; 염화칼슘과 같음 칼슘; 및 염화 제2철(III), 황산 제2철 또는 철(III) 암모늄 시트레이트와 같은 철등이 포함된다. 성장에 필요한 다른 미량 금속은 예를들어 다음의 조성을 갖는 미량원소 용액의 형태로 영양배지에 가하는 것이 바람직하다 :

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100mg/ℓ
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30mg/ℓ
H_3BO_3	300mg/ℓ
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200mg/ℓ
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10mg/ℓ
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	20mg/ℓ
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	30mg/ℓ

본 발명에 따르는 방법을 수행하는데 있어서, 먼저 하나이상의 예비 배양물을 예를들어 액체 배지중에서 제조하고, 생산 발효조에서 제조된, 지시된 조성의 발효액에 성장이 잘된 예비 배양물을 약 1 : 5 내지 1 : 15의 비율로 접종한다.

총 배양기간 동안 제1, 제2발효단계 모두에서 소비된 영양물질을 보충하여, 탄소, 질소 및 인의 공급원과 모든 유기 및 무기미량 영양소 공급원을 세균증식의 최적 농도내로 유지시킨다. 본 발명에서 최적영양공급이란 총 발효기간에 걸쳐 완전한 영양공급의 모든 성분들을 무제한 성장조건이 배양에서 효과가 있는 농도로 함유하며, 미생물이 성장에 필요한 영양소, 예를들면 질소 또는 인의 공급에 부족함이 없이 제한받지 않는 배지에서 미생물을 배양하는 것을 의미한다.

세균증식을 위한 질소의 최적 공급량은 워버그 호흡계를 사용하여 문헌[참조 : Manometric Technigues by Umbreit W.W., Burris R.H. Stauffer J.S., Burges Publishing Company Minneapolis, U.S.A. 1964]에 기술된 워버그의 방법에 따라 측정된다. 알칼리게네스 라투스 균주의 경우, 성장에 대한 제한조건 없이 최적 질소 공급량은 대체로 총 발효기간에 걸쳐 적어도 45㎎/ℓ의 질소 농도에 상응하는, 배양액 1ℓ당 황산암모늄 적어도 200㎎이 배지에 존재하는 경우이며, 제1발효단계에서는 약 50 내지 320㎎/ℓ의 질소농도가 특히 바람직하다.

인의 최적 공급량은 배양액 1ℓ당 인이 적어도 500㎎ 존재하는 것을 말하며, 600㎎내지 1.2g/ℓ의 농도를 유지하는 것이 특히 바람직하다.

본 공정의 최적 발효액은 예를들어 탄소 공급원으로서 배지 1ℓ당 1.5 내지 40g의 자당을 함유하며, 제1발효 단계에서는 4내지 10g/ℓ의 자당농도가 특히 바람직하다. 놀라웁게도, 본 발명에 따르는 조건하에 알칼리게네스 라투스 균주를 배양하는데 있어서, 두드러진 PHB 축적상태는 영양제한의 작용으로, 예를들면 질소의 불충분한 공급에 의해 나타나는 것이 아니라, 성장과 관련된 극히 유효한 PHB 측정은 미생물에 대한 유리한 성장 조건하에 완전한 영양공급으로 관찰된다.

영양공급을 제한하지 않은, 성장과 관련된 PHB 축적은 비성장율 및 PHB 생성율이 영양결핍에 의해 감소되지 않으므로, 영양공급을 제한하여 수행한 공지의 방법에서 보다 상당히 단축된 발효시간내에 PHB 함량이 높은 고농도의 균체를 수득할 수 있는 잇점이 있다.

높은 성장률 및 생성율을 기준으로, 본 발명에 따르는 공정의 제1발효단계에서의 희석율(D)은 0.3시간$^{-1}$ 내지 0.41시간$^{-1}$이며, 제2발효단계에서는 0.28시간$^{-1}$ 내지 0.33시간$^{-1}$의 희석율이 얻어진다.

$$(\text{희석율 } D=\frac{\text{발효조의 공급량 또는 배출량 } F(\ell/\text{시간})}{\text{발효조의 유효용적 } V(\ell)}$$

차원은 |시간$^{-1}$|이다).

제1발효 단계에서, 발효액을 발효조의 최대 유효용적에 달할때까지 연속공급법에 의해 발효조, 바람직하게는 발효솥에 주입시키는 것이 유리하다. 최대 유효용적에 달하면, 한편으로는 배양물에 일정 흐름의 새발효액을 가하고, 또 한편으로는 발효조로부터 공급량에 상당하는 양의 발효액을 회수하고, 생성된 PHB-함유 미생물 군집을 배양액과 함께 제2발효조로 옮겨 연속적으로 반응을 더 진행시킨다.

배양은 호기조건하, 예를들면 산소 또는 공기를 공급하면서 수행하며, 용존 산소함량은 제1발효단계에서 시간 단위당 도입된 공기 또는 산소의 양을 변화시켜 공기 포화치의 25 내지 50%의 범위로 유지시키는 것이 유리하다. 성장 및 PHB 축적을 장해없이 촉진시키기 위해서, 교반된 배지에 멸균 공기를 도입시키는 것이 유리하다. 또한 교반기 속도를 변화시켜 용존 산소함량을 바람직한 범위내로 유지시킬 수도 있다.

상기에서 언급된 조건하의 희석율은, 안정한 평형조건에 도달한 후, 제1발효조에서는 미생물 군집이 PHB 농도를 세포건조중량의 적어도 60중량%, 경제적인 제조방법의 경우 특히 유리하게는 적어도 70중량%로 하고, 배양액 1ℓ당 건조균체 약 15 내지 25g의 농도를 갖도록 조정한다.

제2발효조는 제1발효조와 동일한 형태를 취하며, 멸균 솥으로 고안될 수 있다. 제2발효단계에서 희석율은 대체로 제1발효단계에서 보다 낮으므로, 연속조작을 위해서 제2단계에서는 제1 및 제2단계에서의 희석율의 차이와 추가의 영양공급량을 고려한 유효용적을 갖는 더 큰 발효조에서 미생물을 계속 배양해야 한다.

제1발효조로부터 공급물에 함유된 잔유농도의 영양소는 제2단계에서 최적의 완전영양공급을 보장하는 정도까지 새영양소를 가하여 계속해서 보충한다. 이 측정치는 성장기를 총 발효기간에 걸쳐 유지시키고 세포내에서 고수율의 PHB를 성장과 관련된 방법으로 축적시키는 것을 의미한다. 또한, 성장조건하에 제2발효단계에서, 세포축적의 상대적 증가가 관찰되므로, 발효액으로부터 용이하게 균체를 제거할 수 있다. 따라서, 세포물질은 여과에 의해 쉽게 분리할 수 있으며, 고가의 장치, 예를들면 원심분리기를 사용하여 분리할 수 있다.

미생물 군집의 최대지수 성장점은 이미 제2발효단계에서 나타났으므로, 사용된 영양소를 효율적으로 이용하기 위해서 최적 영양 공급에 관해 상기에서 언급한 범위의 낮은 제한치로 영양소 농도를 유지시키는 것이 유리하다.

그러므로 영양 배지의 조성 및 제2발효단계에서 새영양소의 공급은 배양액에서 탄소 공급원의 농도가 배양액 ℓ당 자당 약 1.5g 이하로 떨어지지 않는 농도, 바람직하게는 1.5g 내지 2.5g의 농도로 조정하는 것이 유리하다. 질소 농도는 배양액 1ℓ당 적어도 45㎎, 바람직하게는 약 50 내지 60㎎이다.

제2발효단계에서는 발효액의 용존 산소 함량을 공기 포화치의 8 내지 15%, 바람직하게는 8내지 10%로 한다. 용존 영양소 함량의 감소로 산소 전달비용을 감소시킬 수 있는 한편 영양배지에서 탄소를 보다 많이 이용할 수 있다. 영양공급원의 보다 효율적인 이용은 발효 종료후 배출물에서 탄소의 잔유농도를 실질적으로 감소시킬 수 있기 때문에 특히 중요하다.

본 발명에 따르는 공정 조건하에서, 미생물은 PHB를 세포건조 중량의 약 84중량%까지 세포내에 축적할 수 있다. 실제로 방법을 수행하면, 제2발효단계에서 희석율은 미생물 군집이 PHB 농도를 세포건조중량의 70 내지 80중량%, 바람직하게는 75 내지 80중량%로 하고 배양액 1ℓ당 건조균체 15 내지 35g의 농도를 갖도록 조정하는 것이 유리하다.

알칼리게네스 유트로푸스종과는 달리, 알칼리게네스 라투스균주는 내열성이 더 크다. 이러한 증가된 내열성은 두 단계 모두에서 발효의 최적 온도 범위가 36 내지 42℃, 바람직하게는 37° 내지 39℃라는 사실로 명백해진다. 성장 및 PHB 축적에 대한 촉진 효과외에, 상기 온도 범위에서의 배양은 발효하는 동안 냉각비용을 상당히 감소시킬 수 있는 잇점이 있다. 냉각 비용이 대체로 발효기 조작동안에 소요되는 에너지 비용의 절반을 차지하므로, 더 단축된 잔류시간과 함께 고온에서 배양함으로써 냉각 비용을 절감하는 것이 특히 중요하다.

총발효기간에 걸쳐, 발효액의 pH값은 완충액(예, 인산염 완충액) 또는 수성염기(예, 수산화 칼륨용액 또는 수산화나트륨용액)을 계속 첨가하여 6.5내지 7.5, 바람직하게는 6.8 내지 7.2로 조정하는 것이 유리하다.

상기에서 언급한 조건하에, 연속공정조작은 수득된 균체의 조성 및 수율 계수에 아무런 변화없이 수주동안 유지시킬 수 있다.

탄수화물이 탄소공급원으로 사용되는 경우, 본 발명에 따르는 공정의 두단계 모두에서 0.42 내지 0.46의 수율 계수($Y_{X/S}$)가 얻어지며, 즉 사용된 탄수화물 g당 0.42 내지 0.46g의 건조세포가 PHB 함유 균체의 형태로 수득된다.

PHB 축적 미생물 군집을 함유하는 배양액을 공급물에 상당하는 율로 회수하여 제2발효조로 옮기고, 세포물질을 통상의 분리방법, 예를들면 경사법 또는 원심분리법, 바람직하게는 여과법으로 분리한 후, 이로부터 PHB를 통상의 방법으로 추출하여, 예를들면 미합중국 특허 제4,101,533호의 방법에 의해 단리시킨다.

균체를 제거한 발효액은 대체로 저농도의 영양소만을 함유한다.

나머지 영양소를 이용하기 위해, 세포를 제거한 발효액을 제1발효조로 재순환시킬 수 있으며, 최적 영양농도를 얻고, 더 배양시키기 위해 새 발효액을 가한다.

본 발명은 다음의 실시예로 더 상세히 설명한다 :

[실시예]

$(NH_4)_2SO_4$ 1.5g/ℓ와 자당 15g/ℓ를 함유하는 영양배지 I 10ℓ를 멸균 형태로 유효용적 15ℓ의 멸균 발효조에 주입하고, 알칼리게네스 라투스 균주 DMS 1123(한국기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10132, 기탁일 : 1985.2.18.)의 성장이 잘된 예비 배양물 1ℓ를 접종한다.

배지 I의 조성은 다음과 같다 :

KH_2PO_4	1.5g/ℓ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g/ℓ
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02g/ℓ
미량용액	2ml/ℓ
Fe(III) NH_4 시트레이트	0.05g/ℓ
*미량용액은 다음의 조성을 갖는다.	
$ZuSO_4 \cdot 7H_2O$	100mg/ℓ
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30mg/ℓ
H_3BO_3	300mg/ℓ
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200mg/ℓ
$CuCO_4 \cdot 5H_2O$	10mg/ℓ
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	20mg/ℓ
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	30mg/ℓ

용존 산소함량은 교반속도 및 통기율을 변화시킴으로써 공기 포화치의 28 내지 30%내로 유지시키고, 조작온도는 37℃이다. 발효시키는 동안, 발효액의 pH값은 10% 농도의 멸균 NaOH 수용액을 사용하여 자동적정에 의해 7.0으로 일정하게 유지시킨다.

추가의 배양과정에 있어서, 영양물질의 농도는 연속 공급법을 사용하여 소비율 및 희석에 상응하는 새 발효액을 공급하므로써 일정하게 유지시킨다. 새 발효액은 300g/ℓ 농도의 자당용액, 200g/ℓ 농도의 $(NH_4)_2SO_4$ 용액 및 새 배지 I로 구성된다.

반응기의 최대 유효 용적에 달하면, 한편으로는 일정 흐름의 새 발효액을 배양물에 공급하고, 또 한편으로는 배출물에 상당하는 양의 발효액을 회수하여 연속적으로 유효용적 25ℓ의 제2발효조에 옮겨 연속 방법을 수행한다. 새로 공급한 영양액은 상기 언급한 조성물에 자당 40g/ℓ, $(NH_4)_2SO_4$ 4.6g/ℓ 및 새 배지 I을 함유한다. 이러한 방법으로, 몇기간 후에 안정한 평형조건이 이루어지며, 제1발효단계에서 배양액은 71중량%의 PHB 함량을 갖는 건조균체 16.5g/ℓ을 함유한다.

제2발효조로의 유출물은 잔유농도 0.45g/ℓ의 $(NH_4)_2SO_4$와 잔유농도 약 4.1g/ℓ의 자당을 함유한다.

평형상태에서, 희석율(D)=0.4시간$^{-1}$에 상응하는 새 영양배지 6.0ℓ/시간을 공급한다.

제2발효조에서, 최대유효용적은 25ℓ이며, 온도 및 pH값은 제1발효단계에서와 동일하게 사용하여 일정하게 유지시킨다. 대조적으로, 용존 산소농도는 통기율 및 교반기 속도를 변화시킴으로써 공기 포화치의 8내지 10%로 감소시킨다. 제2발효조에는 제1발효단계로부터의 공급물외에 황산 암모늄 26.64g/ℓ 및 자당 236g/ℓ를 함유하는 멸균 발효액을 시간당 1.5ℓ 공급하여, 두물질이 이 상태에서 제한되지 않도록 한다. 이들을 척도로, 총 배양기간에 걸쳐 성장상태를 유지시킨다.

이들 조건하에서, 제2발효단계의 배출물에서는 79중량%의 PHB 함량을 갖는 건조균체 35.5g/ℓ를 함유하는 배양액이 수득된다. 제2단계에서, 총유량 7.5ℓ/시간에 상응하는, 희석율(D)=0.30시간$^{-1}$이 얻어진다.

연속발효는 수율계수 $Y_{X/S}$=0.46 또는 균체의 조성에 관해 어떠한 변화도 야기시키지 않고 3주간 문제없이 유지시킬 수 있다.

알칼리게네스 라투스 균주 DSM 1123(한국 기탁기관 : 한국 종균협회, 기탁번호 : KFCC-10132, 기탁일 : 1985.2.18.)을 사용한 PHB의 연속적인 2단계 제조방법에 대한 조작 조건은 다음의 표 I에 요약하였다.

[표 1]

	단계 1	단계 2
유효용적	15 l	25 l
교반	교차식날	교차식날
온도	37℃	37℃
pH값	7.0	7.0
O_2 농도 (공기포화율%)	28 내지 30%	8 내지 10%
희석율 D	0.4시간$^{-1}$	0.3시간$^{-1}$
탄소공급원	자당	자당
공급물중 자당농도	40g/l	--
질소공급원	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2SO_4$
공급물중 $(NH_4)_2SO_4$의 농도	4.6g/l	--
자당의 잔유농도	4.1g/l	2.1g/l
$(NH_4)_2SO_4$의 잔유농도	0.45g/l	0.085g/l
자당소비량	35.9g/l	--
$(NH_4)_2SO_4$ 소비량	4.15g/l	--
균체농도	16.5g/l	35.5g/l
균체의 PHB 함량	세포건조중량의 71%	79%
균체생산량	99g/시간	266.4g/시간
PHB 생산량	70.4g/시간	210.46g/시간
$Y_{x,}$ 자당	0.46g/g	0.46g/g
$Y_{x,}$ $(NH_4)_2SO_4$	3.98g/g	3.98g/g
제2발효조 분류중의		26.64g/g
$(NH_4)_2SO_4$ 농도	--	(1.5 l /시간)
제2발효조 분류중의 자당		236g/l
농도	--	(1.5 l /시간)
공급물중 균체농도	--	13.2g/l

(57) 청구의 범위

청구항 1

알칼리게네스 속의 미생물을 동화성 탄소, 질소 및 인의 공급원과 미생물 성장에 필요한 미량 영양소 공급원을 함유하는 수성배지에서 호기적으로 배양하여 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 제조하는 방법에 있어서, 알칼리게네스 라투스(Alcaligenes latus)균주 또는 그로부터 유도된 PHB-축적 돌연변이체를 무제한 성장조건하, 36 내지 42℃에서 미생물 성장을 위한 최적 영양소를 완전 공급하면서 멸균조건하의 별도의 연속적인 2개의 발효단계에 걸쳐, 즉 용존 산소 함량이 공기 포화치의 25 내지 50%인 제1발효단계에서 배양한 PHB-함유 미생물 군집을 배양액과 함께 계속해서 제2발효단계로 옮겨 용존 산소함량을 공기 포화치의 8 내지 15%로 하여 계속 배양한 후, 수득된 균체(biomass)로부터 PHB를 추출하여 분리시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 탄소 공급원으로서 자당을 사용하는 방법.

청구항 3

제1 또는 2항에 있어서, 자당을 단일 탄소 공급원으로 사용하여 알칼리게네스 라투스 균주 DSM 1123(한국기탁기관 : 한국종균협회, 기탁번호 : KFCC-10132, 기탁일 : 1985.2.18.)을 배양하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 탄소 공급원으로서 배양액 1ℓ당 1.5 내지 40g의 자당을 함유하는 영양배지중에서 배양하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 총 발효기간에 걸쳐 배양액 1ℓ당 적어도 45㎎의 질소를 함유하는 영양배지중에서 배양하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1발효단계에서는 배양액 1ℓ당 탄소 공급원으로서 자당 4 내지 10g과 질소 50 내지 320㎎을 함유하는 영양배지중에서 배양하고, 제2발효단계에서는 배양액 1ℓ당 탄소 공급원으로서

자당 1.5 내지 2.5g과 질소 50 내지 60㎎을 함유하는 영양배지 중에서 배양하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 배양액 1ℓ당 적어도 500㎎의 인을 함유하는 영양배지 중에서 배양하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 제1발효단계에서는 PHB 농도를 적어도 70중량%로 하고 배양액 1ℓ당 건조균체 15 내지 25g의 농도를 갖도록 미생물 군집을 배양하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2발효단계에서 용존 산소함량을 공기 포화치의 8 내지 10%로 하여 배양하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 제2발효단계에서 균체의 PHB 함량을 세포건조 중량의 75 내지 80중량%로 증가시키는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 37 내지 39℃에서 배양하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, pH 6.8 내지 7.2에서 배양하는 방법.