



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0055782
(43) 공개일자 2025년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/625 (2022.01) C12N 1/06 (2017.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/625 (2022.01)
C12N 1/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0139349
(22) 출원일자 2023년10월18일
심사청구일자 2023년10월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 (수서동, 강남대시앙포레)
이옥경
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 906동 203호 (영통동, 벽적골9단지 주공아파트)
트란 하 미
경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 17, 진영빌라 4동 210호 (서천동, 진영빌라 4동)
(74) 대리인
위병갑

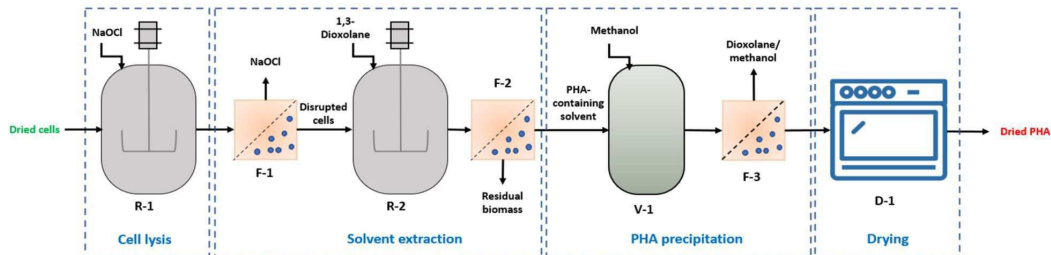
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트를 추출 및 회수하는 방법

(57) 요약

본 발명은 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트를 추출 및 회수하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 메탄자화균으로부터 PHA를 추출 및 회수하는 방법은 차아염소산나트륨을 사용한 세포 용해 공정과 친환경 용매를 이용한 용매 추출 공정을 포함하여 종래의 PHA 추출방법과 비교하여 PHA 순도 및 PHA 회수율을 현저히 향상시키는 효과가 있다. 또한 상기 방법을 통해 회수된 PHA는 높은 분자량을 가질 뿐만 아니라 열 특성 및 기계적 특성이 우수하여 포장, 상품 플라스틱, 식기 및 정형외과 장치 등의 분야에 다양하게 사용되는 석유화학 플라스틱의 재생 가능한 대안으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1055001159
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발 (3단계 3차년도)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 (국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 메탄자화균을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 생합성하는 단계;
- b) a) 단계가 완료된 메탄자화균을 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite)을 처리하여 세포를 용해시키는 단계;
- c) b) 단계가 완료된 메탄자화균과 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 혼합하여 용매 추출하는 단계; 및
- d) c) 단계가 완료된 추출액을 침전 및 여과하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 분리하는 단계;를 포함하는 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)는 폴리-3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate)), 3-하이드록시부틸레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)), 3-하이드록시부티레이트-4-하이드록시부티레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)), 폴리-4-하이드록시부티레이트 (poly(4-hydroxybutyrate)) 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시헥사노에이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate))으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 a) 단계가 완료된 메탄자화균은 건조균체 (dry cell) 또는 습윤균체 (wet cell)인 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 건조균체량 대비 13 내지 17배 부피의 차아염소산나트륨 용액과 혼합하는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 b) 단계의 배양은 30 내지 45℃에서 30 내지 90분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 메탄자화균의 세포벽을 파괴하고 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 제외한 바이오매스 (non-PHA cell mass)를 용해시키는 것인, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 c) 단계는 건조균체량 대비 40 내지 60 배 부피의 1,3-디옥솔란 용액과 혼합하는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 c) 단계의 추출은 75 내지 95℃에서 30 내지 300분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 d) 단계의 침전은 안티솔벤트 (antisolvent)로 메탄올 (methanol)을 사용하는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 유형 II 메탄자화균인 것을 특징으로 하는, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 유형 II 메탄자화균은 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*) 균주 및 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*) 균주로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법.

청구항 12

차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는, 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조성물은 메탄올 (Methanol)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이

트 (PHA) 추출용 조성물.

청구항 14

차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는, 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 키트는 메탄올 (Methanol)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트를 추출 및 회수하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리하이드록시알카노에이트 (Polyhydroxyalkanoates, PHA)는 다수의 생물체에 의해 생산되는 생분해성 폴리에스테르이다. PHA를 생산하는 미생물은 문헌에 기재된 대표 종만으로도 170 가지가 넘으며, 최근 연구에 따르면 *Methylocystis hirsuta* 또는 cyanobacteria를 이용하여 메탄 또는 CO₂로부터 폴리하이드록시알카노에이트 생산이 보고되고 있다. 가장 대표적인 PHA는 폴리-3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate), PHB), 3-하이드록시부틸레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV), 3-하이드록시부티레이트-4-하이드록시부티레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), poly(3HB-co-4HB), P3HB4HB), 폴리-4-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate), P4HB) 및 일부 PHAmcl (중간 사슬의 폴리하이드록시 알카노에이트)이며, 상기 마지막 부류의 전형적인 대표 종은 폴리하이드록시헥사노에이트 (poly(hydroxyhexanoate), PHHx)이다.

[0003] 한편, 폴리-3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate), PHB)는 미생물에 의해 합성되는 에너지 저장 고분자물질로서 기존의 플라스틱 원료가 되는 화학합성 고분자와 물리적 성질이 비슷하면서, 또한, 생분해성이 매우 우수하여 미생물에 의하여 짧은시간 내에 물과 이산화탄소로 완전분해되는 환경친화적 플라스틱 원료로서 많은 종류의 미생물에서 가장 많이 연구된 바이오 폴리에스테르이다.

[0004] 폴리 3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate), PHB) 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV)는 3-하이드록시부틸레이트 및 3-하이드록시부틸레이트와 3-하이드록시발러레이트의 중합체로서 수분과 토양을 모두 갖춘 환경, 산소가 없는 혐기성 상태에서도 생분해 가능하고, 물리적·기계적 성능이 폴리프로필렌 플라스틱과 비슷하여 고강도, 내열성이 뛰어나다는 장점이 있다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 미생물 발효를 통해 유형 II 메탄영양생물 (type II methanotroph)로부터 폴리하이드록시알카노에이트에 속하는 단일중합체 PHB 및 공중합 PHBV를 효율적으로 생산하여 세포 내부의 PHA 축적을 증가시키는 방법을 개발하고자 하였으며, 차아염소산나트륨을 사용하여 세포를 용해시킨 후 기존의 추출용 유기용매를 대체할 수 있는 친환경 용매인 1,3-디옥솔란을 사용하여 용매추출을 통해 PHA를 회수하는 경우 추출효율이 현저히 상승하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2006-0134005호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는, 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 키트를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 a) 메탄자화균을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 생합성하는 단계; b) a) 단계가 완료된 메탄자화균을 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite)을 처리하여 세포를 용해시키는 단계; c) b) 단계가 완료된 메탄자화균과 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 혼합하여 용매 추출하는 단계; 및 d) c) 단계가 완료된 추출액을 침전 및 여과하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 분리하는 단계;를 포함하는 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법을 제공한다.

[0011] 이어서, 본 발명은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 조성물을 제공한다.

[0012] 나아가, 본 발명은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 메탄자화균으로부터 PHA를 추출 및 회수하는 방법은 차아염소산나트륨을 사용한 세포 용해 공정과 친환경 용매를 이용한 용매 추출 공정을 포함하여 종래의 PHA 추출방법과 비교하여 PHA 순도 및 PHA 회수율을 현저히 향상시키는 효과가 있다. 또한 상기 방법을 통해 회수된 PHA는 높은 분자량을 가질 뿐만 아니라 열 특성 및 기계적 특성이 우수하여 포장, 상품 플라스틱, 식기 및 정형외과 장치 등의 분야에 다양하게 사용되는 석유화학 플라스틱의 대안으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 다양한 유기용매에서 PHB와 PHBV의 용해도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 진공 여과 후 여과 종이 위의 추출된 PHB (a)와 건조 후의 PHB 필름 (b)을 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 건조균체량/용매 비율 (a), 온도 (b), 시간 (c)에 따른 PHB 추출 수율을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 유형 11 메탄자화균에서 통합추출법을 이용한 PHA 추출 과정을 간단히 나타낸 공정 흐름도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *M. trichosporium* OB3b에서 합성된 PHB의 다양한 추출방법 (a), 추출 온도 및 시간 (b), 세포건조제/차아염소산나트륨의 비율 (c)에 따른 PHB 추출 수율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 다양한 추출 조건에 따른 *M. trichosporium* OK1 (a)과 *M. trichosporium* (b)에서 회수된 PHB 및 PHBV의 순도 및 회수율을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, *M. trichosporium* OB3b에서 생산된 PHB의 열 특성을 나타낸 그래프이다.

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 용어들로서, 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 메탄자화균으로부터 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 추출 및 회수하는 방법을 제공한다.
- [0021] 구체적으로 상기 방법은 a) 메탄자화균을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 생합성하는 단계; b) a) 단계가 완료된 메탄자화균을차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite)을 처리하여 세포를 용해시키는 단계; c) b) 단계가 완료된 메탄자화균과 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 혼합하여 용매 추출하는 단계; 및 d) c) 단계가 완료된 추출액을 침전 및 여과하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 분리하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)는 폴리-3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate)), 3-하이드록시부틸레이트 및 3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)), 3-하이드록시부티레이트-4-하이드록시부티레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)), 폴리-4-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate)) 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시헥사노에이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate))으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 폴리-3-하이드록시부티레이트 (poly(3-hydroxybutyrate)), 3-하이드록시부틸레이트 또는 3-하이드록시발러레이트 공중합체 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate))일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 a) 단계가 완료된 메탄자화균은 건조균체 (dry cell) 또는 습윤균체 (wet cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 건조균체 (dry cell)는 동결건조된 세포 (Lyophilized cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 건조균체량 대비 13 내지 17배 부피의 차아염소산나트륨 용액과 혼합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계의 배양은 30 내지 45℃, 바람직하게는 35 내지 39℃에서 30 내지 90분, 바람직하게는 50 내지 70분 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 메탄자화균의 세포벽을 파괴하고 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)를 제외한 바이오매스 (non-PHA cell mass)를 용해시키는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 c) 단계는 건조균체량 대비 40 내지 60 배 부피의 1,3-디옥솔란 용액과 혼합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 c) 단계의 추출은 75 내지 95℃에서 30 내지 300분 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 d) 단계의 침전은 안티솔벤트 (antisolvent)로 메탄올 (methanol)을 사용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄올은 추출용매 부피 대비 2 내지 10 배 부피, 바람직하게는 2 내지 4 배 부피로 첨가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄자화균은 유형 II 메탄자화균일 수 있으나, 폴리하이드록시알카노에이트를 생합성하는 것으로 알려진 메탄자화균이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 II 메탄자화균은 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*) 균주 및 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*) 균주로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis*) 균주는 메틸로시스티스 헤이에리 (*Methylocystis heyeri*), 메틸로시스티스 이오아오니스 (*Methylocystis iwaonis*), 메틸로시스티스 브리오필라 (*Methylocystis bryophila*), 메틸로시스티스 파르부스 (*Methylocystis parvus*), 메틸로시스티스 히르수타 (*Methylocystis hirsuta*), 메틸로시스티스 실비테라 (*Methylocystis silviterrae*), 메틸로시스티스 에키노이데스 (*Methylocystis echinoides*), *Methylocystis* sp. MJC1 또는 *Methylocystis* sp. OK1 균주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메틸로시너스 속 (*Methylosinus*) 균주는 메틸로시너스 트리코스포룸 (*Methylosinus trichosporium*), 바람직하게는 *Methylosinus trichosporium* OB3b일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 메탄올 (Methanol)을 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 나아가, 본 발명은 차아염소산나트륨 (Sodium Hypochlorite) 및 1,3-디옥솔란 (1,3-Dioxolane)을 포함하는 메탄자화균 내 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 추출용 키트를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 키트는 메탄올 (Methanol)을 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 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.
- [0045] <실시예 1> 메탄올 이용한 유형 II 메탄자화균에서의 PHA 생합성
- [0046] 메탄올로부터 PHB 또는 PHBV 공중합체를 생산하기 위해 II형 메탄자화균인 *Methylosinus trichosporium* OB3b (KCTC 12568), *Methylocystis* sp. MJC1 (KCTC 14362BP) 및 *Methylocystis* sp. OK1 (KCCM 13166P)을 배양하였다. *Methylocystis* sp. MJC1은 대한민국의 오대산에서 분리되었으며, *Methylocystis* sp. OK1은 *Methylocystis* sp. MJC1의 메탄올 적응 균주이다. 상기 3종의 균주는 NMS 배지에서 배양되었으며, *M. trichosporium* OB3b와 *Methylocystis* sp.의 최종 구리 농도는 각각 5 uM과 10 uM이며, 주요 배양은 온도, 교반 속도, 용존 산소 및 pH를 자동으로 제어하는 가스 생물반응기가 장착된 5 L 발효기를 사용하여 수행하였다. 공급되는 가스는 메탄과 공기의 비율이 3:7이고, 유속은 0.2-0.25 vvm, 배양온도는 30℃, pH는 2N HCl 및 5N NaOH 용액을 사용하여 6.5로 유지하였다.
- [0048] <실시예 2> PHA 함량 측정 방법
- [0049] 실시예 1에서 배양된 3종의 메탄자화균을 각각 5일 동안 배양한 후 세포를 수확하여 동결건조하여 PHA 추출용

시료로 사용하였다. 각 세포의 PHA 함량은 메탄자화균 바이오매스로부터 PHA를 분리하기 전에 측정하였으며, 동결건조한 세포를 이용하여 메탄올분해반응을 수행하고 각 세포의 PHA 함량을 계산하였다.

구체적으로, 동결건조 세포를 메탄올분해반응 수행하여 모노머인 3-하이드록시부틸레이트 또는 3-하이드록시발레르산을 정량하고 하기 식을 이용하여 각 세포의 PHA 함량을 계산하였다.

$$PHA\ content(\%) = \frac{m_{PHA_GC}}{m_{DCW}} \times 100$$

^mPHA_GC: 가스크로마토그래피 (GC) 분석을 통해 결정된 PHA의 무게

^mDCW: 메탄분해작용 반응에 사용된 건식 세포 무게

동결건조된 세포 (Lyophilized cell)들은 추가적인 PHA 분리를 용이하게 하기 위해 최대 표면적을 갖도록 다용도 믹서 (MIX-35G, SK Magic, 한국)를 사용하여 소분말로 완전하게 분쇄되었으며, GC 분석에는 methyl-(R)-(-)-3-hydroxybutyrate (TCI, 일본)와 poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (시그마 알드리치, 한국)를 표준물질로 사용하였다. Authentic PHB granule (BU396311)은 Goodfellow (한국)에서 구입하여 GPC 분석에 참조로 사용하였다. 모든 화학물질은 추가 정제 없이 받은 그대로 사용하였다.

동일 조건에서 상기 3종의 유형 II 메탄자화균에서 생산된 PHA 함량 측정 결과, *M. trichosporium* OB3b, *Methylocystis* sp. MJC1 및 *Methylocystis* sp. OK1에서 각각 건조 세포 중량의 25%, 38%, 27.6%에 해당하는 PHB를 포함하는 바이오매스를 수득하였다.

이어서, PHBV를 포함하는 메탄자화균 바이오매스에 친환경 PHB 추출방법을 적용할 수 있는지 조사하기 위해, *Methylocystis* sp. MJC1를 3g/L KNO₃가 함유된 NMS 배지에서 5일간 동안 배양하였으며, 세포밀도가 OD₆₀₀=20인 시점부터 0.1g/L 발레르산을 3시간 간격으로 추가 공급함으로써 (Lee et al. (2023), Bioresource Technol., 389, 129853), 다양한 비율의 3HV를 얻어 40-50% PHBV 함량의 다양한 PHBV를 수득하였다.

<실시예 3> PHA 추출 효율 측정 방법

메탄자화균으로부터 PHB 회수의 추출 성능을 사전 평가하기 위해, 건조 후 회수된 PHB의 중량을 기준으로 하기 식에 따라 추출 수율을 결정하였다.

$$Extractionyield(\%) = \frac{Extracted\ PHA\ content}{PHB\ content} \times 100$$

PHA 순도와 회수율은 메탄올분해반응 수행 후 각각의 표준물질을 사용한 GC 분석을 통해 측정하였다. 불꽃 이온화 검출기 (FID)가 장착된 Agilent 8890 GC 시스템을 이용하였고, PHA 함량은 각각의 표준물질을 사용하여 정량되었다.

구체적으로, 메탄분해반응에서는 50 mg의 건조균체량 또는 회수된 PHA가 2 mL의 클로로폼과 2 mL의 산성 메탄올 (농축 황산 15% 함유)과 벤조산 내부 표준물질을 함께 혼합하였다. 반응 용기는 밀폐되고, 오일 수조에서 105° C에서 4시간 동안 가열되었다. 반응을 종료한 후에는 2 mL의 정제수를 추가하고, 진동을 통해 혼합하였다. 몇 분 후, 두 개의 별도의 층이 관찰되었을 때 하단 클로로폼 층을 수집한 후, 0.22 μm 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 여과액은 HP-5 컬럼 (5% phenyl-methylpolysiloxane capillary, 30 m 길이 x 320 μm 지름 x 0.25 μm 필름) 및 FID가 장착된 Agilent 8890 gas chromatography (GC) 시스템을 사용하여 분석되었다. 분할 주입은 분할 비 1:10으로 수행되었으며, 질소가 캐리어 가스로 사용되었고, 주입 온도는 250° C로 설정하였다. 오븐 온도는 80° C에서 5분간 유지되고, 30° C/min의 가열 속도로 300° C까지 점진적으로 상승되었으며, holding time은 10분으로 설정하였다. FID 온도는 250° C로 유지되었으며, PHA 보정은 각각의 표준물질로 수행되었다. PHA 순도와 PHA 회수율은 각각 하기 식을 기반으로 결정되었다.

$$PHA \text{ purity}(\%) = \frac{m_{PHA_GC}}{m_{PHA_methanolysis}} \times 100$$

$$PHA \text{ recovery}(\%) = \frac{m_{recoveredPHA} \times PHA \text{ purity}}{m_{DCW} \times PHA \text{ content}} \times 100$$

<실시예 4> 유형 11 메탄자화균로부터 PHB 및 PHBV의 추출 및 회수

4-1. 다양한 용매에서 PHB 및 PHBV의 용해도 테스트

용매의 선택은 최종 PHA 추출 효율과 PHA의 품질뿐만 아니라 공정 전반의 안전성과 환경적 측면에도 영향을 주기 때문에 *M. trichosporium* OB3b의 바이오매스의 클로로포름 (Chl), 1,3-디옥솔란 (Dio), 에틸아세테이트 (EA), 초산 (AC), 디메틸카보네이트 (DMC) 및 아세톤 (Ace)과 같은 다양한 용매에 대한 PHB와 PHBV의 용해도를 확인하였다. 용해도 시험은 일정량의 PHB/PHBV 과립을 각각의 용매 1 mL에 용해시킨 후 다른 온도 (30, 60, 90 °C)에서 10분 동안 교반하여 수행하였다. 용해 후, 용액을 여과하여 남은 불용성 분획을 얻은 후 50°C 오븐에서 건조하고 10⁻⁴ g의 정밀도로 중량을 측정하였다.

그 결과 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이 동일한 시험 조건에서 PHBV의 용해도는 동중중합체 PHB에 비해 낮은 것으로 나타났다. 이는 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalate 두 개의 서로 다른 구조 단위로 구성된 공중합체이고 PHB는 단량체 단위로 3-hydroxybutyrate만으로 구성되어 있어서 구조에 내재적 이질성에 기인한 것으로 볼 수 있다.

또한, PHB와 PHBV의 용매와 온도에 따른 용해도 변화의 경우 용해도는 클로로포름 < 1,3-다이옥솔란 < 초산 ≈ 카보네이트 < 아세톤 ≈ 에틸아세테이트 순서대로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과를 통해 실험에 사용된 다양한 용매 중 1,3-디옥솔란은 높은 용해도와 친환경적인 특성을 가지고 있어, PHA 추출을 위한 친환경 용매로서 1,3-디옥솔란을 선정하였다.

표 1

Sample	Extraction condition	Antisolvent	PHB purity (%)	PHB recovery (%)
OB3b-PHB-1*	Cell lysis with SDS-EDTA-NaOCl	-	98.71	56.16
OB3b-PHB-2	Integrated method, 2 g DCW, 100 mL of dioxolane	Methanol	99.45	92.17
OB3b-PHB-3	Integrated method, 2 g DCW, 50 mL of dioxolane	Methanol	99.22	85.51
OB3b-PHB-4	Integrated method, 2 g DCW, 50 mL of dioxolane	Water	78.3	77.78
OB3b-PHB-5	Integrated method, 10 g wet cells, 50 mL of dioxolane	Methanol	99.29	89.76

OB3b-PHB-1*: PHB extracted from OB3b via simple cell digestion with sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and purified using NaOCl solution.

4-2. 친환경 용매를 이용한 용매 추출을 통한 PHB 추출 및 회수

PHB의 추출은 건조세포 (2 g)와 1,3-디옥솔란을 다양한 비율 (1/200, 1/100, 1/50, 1/25 ratio (w/v))로 혼합한 후 둥근 바닥 플라스크에 넣고 역류 응축기와 자기 교반기를 장착한 다음 핫 플레이트 교반기를 사용하여 정

해진 온도 (80, 90 또는 100℃)로 유지하고, 200 rpm으로 교반하였다. 정해진 추출 시간 (4, 8, 12 또는 24시간) 후, 반응 혼합물을 튜브로 옮기고 10,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 고체 분획을 제거하고 PHB를 포함하는 상등액을 수집하였다. 용매 안의 수용성 PHB는 차가운 메탄올 (300ml)로 침전시키고, 침전된 PHB는 진공 여과를 통해 얻은 다음, 드라이 오븐에서 50 ℃에서 건조하였다.

[0080] 건조된 PHB 필름을 무게를 측정하여 추출 수율을 결정하였다. 건조된 PHB 필름은 백색이며, 각각의 여과에 사용된 생성물 용액의 부피를 달리하여 무게를 조절할 수 있다 (도 2 참조). 3종의 유형 II 메탄자화균으로부터 추출된 PHB의 순도 및 회수를 결정하기 위해 실시예 2에 기재된 방법으로 PHB의 메탄올분해반응을 수행하고, 그 결과를 GC 분석에 기초하여 계산하였다.

[0081] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이 건조균체량/용매 비율이 증가함에 따라 PHB 추출 효율이 점차 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과는 주로 세포를 분해하고 세포 내 PHB 과립을 용해시키는 데 사용되는 용매가 부족하기 때문이다. 그러나 PHB 회수율과 추출 공정에 포함된 용매 비용을 고려하여 건조균체량/용매 비율 1/50 (w/v ratio)을 최적의 비율로 선정하였다.

[0082] 추출 온도의 경우 온도가 80℃에서 90℃로 증가함에 따라 추출수율은 52.25%에서 53.37%로 소폭 증가하였다. 그러나 온도를 100° C까지 더 높이면 추출 수율이 45.5%로 크게 감소하였다.

[0083] 추출 시간의 경우 4~24 시간 동안 측정하였으며, 4시간의 반응 시간이 추출 시간 중 52.25%의 가장 높은 추출 수율을 보인 반면, 추출 시간이 4시간보다 길어지는 경우 약 47-48%의 추출 수율이 나타났다.

[0084] PHB 추출 효율, 에너지 소비 및 재료비용을 고려하여 추출 온도에 따른 건조균체량/용매 비 1/50 (w/v ratio)에서 90° C에서 4시간 추출하는 것을 1,3-디옥솔란을 이용한 PHB 추출의 최적 조건으로 선정하였다.

[0085] 이러한 최적화된 조건에서 달성된 추출 효율 더욱 향상시키기 위해 차아염소산나트륨을 이용한 세포 용해 과정과 1,3-디옥솔란을 이용한 용매 추출 과정을 통해 PHB를 추출 및 회수하고자 하였다.

[0087] 4-3. 차아염소산나트륨 및 1,3-디옥솔란을 이용한 통합 PHB 추출 및 회수

[0088] 본 발명에서 개발된 통합 추출 공정은 차아염소산나트륨을 사용한 세포 용해 와 친환경 용매를 이용한 용매 추출의 두 가지 순차적 단계로 구성된다 (도 4 참조).

[0089] 먼저 건조균체량 (2 g)과 차아염소산나트륨을 1/10, 1/15, 1/20 또는 1/25의 건조균체량/NaOCl 비 (w/v ratio)로 포함하는 비커 (250 mL)에 완전히 분산시킨 후, 혼합물을 튜브로 옮기고 37 ℃에서 1 시간 동안 교반시킨 다음 10,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 용매 추출을 위해 일정 부피의 1,3-다이옥솔란을 포함하는 등근 바닥 플라스크에 옮겼다. 이후 PHB 용매 추출은 건조균체량/용매 비 1/50 (w/v ratio), 추출 온도 80 또는 90℃, 추출 시간 1, 2 또는 4시간의 조건으로 실시예 3-2에 기재된 용매 추출 방법과 동일하게 실시하였다. 용매 추출이 완료된 용매 안의 수용성 PHB는 차가운 메탄올 (300ml)로 침전시키고, 침전된 PHB는 진공 여과를 통해 얻은 다음, 드라이 오븐에서 50 ℃에서 건조하였다. 이어서 *M. trichosporium* OB3b에서 합성된 PHB의 다른 추출 방법에 따른 수율, 추출 온도와 시간에 따른 추출 수율 및 건조균체량/차아염소산나트륨의 비율에 따른 추출 수율 측정하였다.

[0091] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 차아염소산나트륨 용액 20 mL와 40 mL를 각각 사용하였을 때 추출 수율이 64.6%와 85.1%로 세포를 용해하지 않고 용매추출한 실험군과 비교하여 추출 수율이 크게 증가하는 것으로 나타났다 (도 5a).

[0092] 세포 용해 후 두 번째 단계 (1,3-다이옥솔란 추출)에서 추출 온도와 시간은 추출 수율에 큰 영향을 미치지 않으며 (도 5b), PHA를 제외한 잔여 세포의 강한 용해와 같은 세포 용해 과정은 메탄자화균으로부터 PHB 회수에 핵심적인 역할을 한다는 것을 보여주었다. 그 결과, 90℃에서 1시간 동안 세포 용해와 1,3-다이옥솔란 통합 추출 방법을 이용하여 87.43%의 추출 수율을 성공적으로 달성하였으며, PHB 분리 시간을 기존의 환류 시스템에 비해 4시간에서 2시간 (세포 용해 1시간, 다이옥솔란 추출 1시간)으로 크게 단축시켰다.

[0093] 이어서, 건조균체량/차아염소산나트륨 비율을 1/15으로 사용하였을 때 가장 높은 추출률을 보였다 (도 5c). 여기서 건조균체량/차아염소산나트륨 비율이 1/10 이하인 경우 건조균체량 내 PHA를 제외한 세포 구성체 함량이 약 75%를 차지하고 있기 때문에 차아염소산나트륨 용액의 양이 적어서 세포 용해에 불충분할 수 있으며, 차아염

소산나트륨 사용량을 30 mL까지 증가시키면 추출 수율이 약 87.68%로 크게 향상되나 이 시점을 넘어서면 차아염소산나트륨의 강한 산화 작용으로 PHB 단편을 분해할 수 있기 때문에 추출 수율이 점차 감소한다. 따라서 건조균체량 2 g의 일반적인 세포 용해에 대한 최적의 비율로 건조균체량/차아염소산나트륨 비율이 1/15로 선택하였다.

[0094] 이러한 결과를 통해 *M. trichosporium* OB3b 세포의 낮은 PHB 함량에도 불구하고, 세포 용해와 용매 추출을 통합적으로 병행하면 세포 용해 단독 사용에 비해 추출 성능을 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0096] 다양한 추출 조건에서 얻은 *M. trichosporium* OB3b로부터의 PHB의 순도 및 회수를 표 2에 나타내었다.

표 2

Sample	Extraction condition	Antisolvent	PHB purity (%)	PHB recovery (%)
OB3b-PHB-1*	Cell lysis with SDS-EDTA-차아염소산나트륨	-	98.71	56.16
OB3b-PHB-2	Integrated method, 2 g 건조균체량, 100 mL of 1,3-다이옥솔란	Methanol	99.45	92.17
OB3b-PHB-3	Integrated method, 2 g 건조균체량, 50 mL of 1,3-다이옥솔란	Methanol	99.22	85.51
OB3b-PHB-4	Integrated method, 2 g 건조균체량, 50 mL of 1,3-다이옥솔란	Water	78.3	77.78
OB3b-PHB-5	Integrated method, 10 g wet cells, 50 mL of 1,3-다이옥솔란	Methanol	99.29	89.76

OB3b-PHB-1*: PHB was extracted from OB3b by a simple cell digestion with sodium dodecyl sulfate (SDS) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and purified using an NaOCl solution.

[0098]

[0100] 표 2에 나타낸 바와 같이 회수된 OB3b-PHB-2는 가장 높은 PHB 순도와 회수율 각각 99.45%와 92.17%를 나타내었다. 용매 부피를 더 감소시킨 OB3b-PHB-3의 경우 PHB 회수율은 85.51%로 감소하였으나, PHB 순도는 거의 동일하게 유지되었다. 물을 Antisolvent로 사용한 OB3b-PHB-4의 경우 PHB 순도와 회수율은 78.3%와 77.78%로 메탄올을 Antisolvent로 사용한 실험군에 비해 PHB 순도와 회수율이 감소하는 것으로 나타났다.

[0101] 이러한 결과는 용매 추출 단계에 사용된 1,3-다이옥솔란의 부피는 주로 PHB 회수에 영향을 미치고, 반면에 antisolvent는 PHB의 순도에 영향을 미쳤음을 보여준다. 메탄올 대신 물을 antisolvent로 사용하면 PHB 뿐만 아니라 세포 내 다른 소수성 구성 물질들이 함께 침전되어 불순물의 함량이 높아져 순도가 떨어진다는 것을 의미한다.

[0102] 또한, 습식 세포 (OB3b-PHB-5)에서 추출된 PHB는 동결건조 세포 (OB3b-PHB-3)와 비교하여 유사한 순도 (99% 이상)와 높은 회수율을 나타냈으며, 이는 비용이 많이 드는 동결건조 단계가 PHB 추출 및 순도에 큰 영향을 미치지 않아 생략할 수 있음을 보여준다.

[0104] 세포 용해와 1,3-다이옥솔란 추출을 이용한 통합 추출 방법으로 얻은 PHB 회수 수율은 클로로포름 추출을 이용한 대조군 실험에 비해 약간 낮지만, 클로로포름과 같은 유독성 할로젠화 용매의 사용은 인간의 건강과 환경에 많은 부정적인 영향을 주므로 산업 공정에서의 적용은 제한적이다. 결과적으로 1,3-다이옥솔란과 같은 환경 친화적인 화학물질을 이용한 통합 추출 방법은 지속 가능한 PHB 분리 및 회수를 위한 유망한 방법임을 알 수 있다.

[0106] 4-4. 차아염소산나트륨 및 1,3-디옥솔란을 이용한 통합 PHBV 추출 및 회수

[0107] *Methylocystis* sp. MJC1 및 *Methylocystis* sp. OK1을 사용하여 최적화된 통합추출법을 통한 PHA 추출과 세포 용해를 위한 차아염소산나트륨, NaOH, SDS 등의 다양한 산화 시약을 사용하여 세포 용해 및 추출을 수행하여 추출 수율을 비교하였다.

[0108] 그 결과, 도 6 및 표 3에 나타난 바와 같이 PHB 함량이 27.6%인 *Methylocystis* sp. OK1 균주의 다양한 PHB 추출 방법 중 차아염소산나트륨과 1,3-다이옥솔란을 이용한 통합 추출이 가장 효율적인 방법으로 각각 93.45%와 91.5%의 현저히 높은 PHB 순도와 회수율을 보였다.

[0109] 또한, 3HV의 몰분율이 다른 PHA를 합성하는 *Methylocystis* sp. MJC1 균주의 PHB 추출 효율은 PHBV 추출 효율보다 약간 높은 것으로 나타났다. MJC1-PHBV-1, MJC1-PHBV-2 샘플의 우수한 추출 수율은 적절한 양의 세포 용해 시약의 사용이 통합 추출방법과 유사한 추출 효율을 초래할 수 있음을 보여준다. 60ml 차아염소산나트륨과 0.4g의 SDS를 사용한 건조균체량의 세포 용해는 각각 93.7% 높은 PHA 순도와 88.46% 회수율을 보였다. 따라서 유기용매를 사용하지 않는 추출법 또한 미생물 PHA의 생산 및 분리의 상업화와 대량화에 매력적인 접근 방법임을 알 수 있다.

표 3

Sample	PHA content	Extraction conditions	PHA purity (%)	PHA recovery (%)
OK1-PHB-1	27.6 % PHB	Cell digestion 40 mL NaOH-40 mL NaOCl	68.72	92.49
OK1-PHB-2	27.6 % PHB	Cell digestion 80 mL NaOCl-40 mL DW	87.01	82.13
OK1-PHB-3	27.6 % PHB	Cell digestion 80 mL NaOCl-40 mL Dioxolane	84.49	81.43
OK1-PHB-4	27.6 % PHB	Cell digestion 60 mL NaOCl-40 mL DW	86.05	81.77
OK1-PHB-5	27.6 % PHB	Cell digestion 40 mL NaOH-40 mL NaOCl-40 mL DW	90.02	81.22
OK1-PHB-6	27.6 % PHB	Cell digestion 40 mL NaOCl-0.4g SDS-40 mL DW	87.88	73.22
OK1-PHB-7	27.6 % PHB	Cell digestion 60 mL NaOCl-0.4g SDS-40 mL DW	90.05	69.01
OK1-PHB-8	27.6 % PHB	Integrated extraction NaOCl-Dioxolane	93.45	91.5
MJC1-PHBV-1	50%PHA-9%mol 3HV	Cell digestion 40ml NaOCl-0.4g SDS	91.99	88.72
MJC1-PHBV-2	50%PHA-9%mol 3HV	Cell digestion 60ml NaOCl-0.4g SDS	93.7	88.46
MJC1-PHBV-3	40.91%PHA-27.12%mol 3HV	Integrated extraction NaOCl-Dioxolane	92.77	70.53
MJC1-PHBV-4	43.03%PHA-29.71%mol 3HV	Integrated extraction NaOCl-Dioxolane	88.18	60.1
MJC1-PHBV-5	54%PHA-11.3%mol 3HV	Integrated extraction NaOCl-Dioxolane	83.36	45.25
MJC1-PHB	46.23%PHB	Integrated extraction NaOCl-Dioxolane	94.35	91.38

[0111]

[0113] <실시예 5> 유형 II 메탄자화균에 의해 생성된 PHB 및 PHBV의 특성화

[0114] **5-1. 분자량**

[0115] 상시 실시예 4의 통합 추출 방법을 통해 회수된 PHB 및 PHBV의 분자량과 물리적 특성을 측정하였다.

[0116] 추출된 PHB의 분자량은 RID 검출기가 장착된 K-G 4A 컬럼 (Guard 컬럼), K-804컬럼, K-805 컬럼으로 구성된 Shodex Gel Permeation Chromatography (GPC) 분석을 통해 결정되었다. 샘플 처리를 위해, 추출된 PHB는 100° C에서 2시간 동안 1 mL의 클로로폼에 용해되고 0.22 μm PVDF 필터로 여과하였다. 침전물을 얻기 위해서는 4° C의 HPLC water를 1 mL 사용하였다. 침전물은 1 mL의 클로로폼에서 다시 용해되고 GPC 분석을 위해 0.22 μm PVDF 필터를 사용하여 여과하였다. 분석 조건으로는 1회 주입에 20 μL의 샘플이 사용되었으며, 이동상으로는 클로로포름을 사용하였고, 유속은 1 mL/min, 작업 시간은 40° C에서 30분으로 설정하였다. 또한, GPC 분석을 위해 한국의 Goodfellow로부터 구매한 기준 PHB 입자도 참고자료로 사용되었다.

[0117] 그 결과, 표 4에 나타낸 바와 같이 분자량의 경우 SDS, EDTA와 차아염소산나트륨을 사용하여 세포 용해 단계만을 거친 OB3b-PHB-1 샘플은 PHB 표준물질 및 다른 조건으로 추출된 PHB 샘플에 비해 현저히 높은 분자량을 나타내었지만 낮은 PHB 회수율 (56.16%) 보였다.

[0118] 반면에, 통합 추출 방법을 통해 회수된 PHB (OB3b-PHB-2, OB3b-PHB-3, OB3b-PHB-4 및 OB3b-PHB-5)의 경우 분자량이 PHB 표준물질보다 낮은 것으로 나타났다. 하지만 분자량이 5×10^4 보다 큰 PHB가 대부분의 산업에서 이용되는 것으로 알려져 있고, 회수된 모든 PHB 샘플 (표 4)은 5×10^4 보다 높은 분자량을 나타내므로 제안된 통합 추출 방법은 높은 추출 수율 및 다양한 실제 산업에 유용하게 이용될 수 있는 PHB를 회수할 수 있다.

[0120] **5-2. 열 특성**

[0121] 추출된 PHB 필름의 열 중량분석 (TGA)은 미국 뉴캐슬의 TA Instruments 사의 TGA Q5000 IR을 이용하여 진행되었으며, 진공 상태에서 20° C에서 900° C의 온도 범위에서 20° C/min의 가열 속도로 진행되었다.

[0122] 그 결과, 도 7 및 표 4에 나타낸 바와 같이 열 특성의 경우 회수된 PHB의 TGA 곡선은 200° C까지 상당한 중량 손실의 없음을 보여준다. 또한, 모든 PHB 샘플의 DTG 곡선은 약 280° C에서 하나의 급격한 발열 피크를 보여 PHB 구조에 존재하는 탄화수소의 상 변화와 분해를 나타내었다. 그러나 세 샘플의 피크 강도는 서로 다르게 분석되었다. OB3b-PHB-2와 OB3b-PHB-3는 유사한 피크를 보인 반면 OB3b-PHB-4는 현저히 작은 분해 피크를 보였다. 이는 메탄올을 antisolvent로 사용하는 경우 보다 물을 사용하는 경우 PHB 뿐만 아니라 다른 소수성 세포 구성 물질이 침전되기 때문에 PHB 순도가 낮아지기 때문이다. OB3b-PHB-4는 물을 antisolvent로 사용하여 78.3%의 낮은 순도를 보이고 있다. 물을 PHB 침전의 방지제로 사용하면 추출 수율이 낮아지고 열적 특성이 약간 약해지기는 하지만 메탄올과 같은 유기용매보다 저렴하고 안전하기 때문에 유망한 접근법이나 이 경우 PHB 순도를 향상시키기 위해서 추가 정제 및 세척 단계가 필요하다.

[0123] 모든 PHB 샘플은 비슷한 DSC 커브를 보여준다. 첫 번째 약 170° C에서 나타나는 흡열성 피크는 PHB의 녹는점 때문이고, 두 번째 305° C에서의 흡열성 피크는 PHB의 열화를 나타내었다.

[0124] PHB의 열 안정성과 관련하여, T_{d5} , T_{d10} 및 T_{max} 는 열처리 동안 PHB 열화를 나타내는 중요한 지표이다. OB3b-PHB-2와 OB3b-PHB-3는 유사한 열 특성을 나타냈으며, OB3b-PHB-4는 앞서 논의한 바와 같이 낮은 PHB 순도 때문에 상대적으로 약한 열 안정성을 보였다 (도 7). 그러나 모든 회수된 PHB의 열 특성은 다른 방법과 상업용 등급 PHB를 통해 추출된 PHB의 열 특성과 비슷하거나 심지어 더 나은 값을 보였다.

[0125] 이를 통해 본 발명에서 제시된 세포 통합 추출 방법은 높은 추출 수율과 상업용 등급과 비교 가능한 품질을 가진 유형 II 메탄자화균으로부터 생합성된 PHB를 분리하기 위한 효율적이고 유망한 접근법임을 확인하였다. 또한, 회수된 PHB는 포장, 상품 플라스틱, 식기 및 정형외과 장치의 다양한 응용을 위해 석유화학 플라스틱의 재생 가능한 대안으로 사용될 수 있다.

표 4

Property	Sample					
	Authentic PHB	OB3b-PHB-1	OB3b-PHB-2	OB3b-PHB-3	OB3b-PHB-4	OB3b-PHB-5
M_n (x 10⁵ Da)	2.97	7.09	0.77	0.96	2.03	2.01
M_w (x 10⁵ Da)	4.42	9.31	2.70	2.47	3.98	3.71
M_v (x 10⁵ Da)	4.19	8.97	2.33	2.19	3.65	3.43
PD	1.49	1.31	3.51	2.58	1.96	1.85
T_{d5} (°C)	-	-	281.7	280.3	264.4	-
T_{d10} (°C)	-	-	290.1	288.3	277.4	-
T_{max} (°C)	-	-	303.4	302.4	299.5	-
T_m (°C)	-	-	175	173	170	-
Char yield (wt.%)	-	-	0.85	2.42	3.16	-

[0127]

[0128] M_n: Number average molecular weight

[0129] M_w: Weight average molecular weight

[0130] M_v: Viscosity average molecular weight

[0131] PD: Polydispersity

[0132] T_{d5}: temperature at 5% weight loss

[0133] T_{d10}: temperature at 10% weight loss

[0134] T_{max}: temperature of the maximum mass loss rate

[0135] T_m: melting point

[0136] Char yield: remaining mass after complete degradation

[0138] 5-3. 기계적 특성

[0139] 세 종류의 유형 II 메탄자화균으로부터 분리한 PHB 및 PHBV 필름을 준비하여 기계적 특성을 상업용 공급원에서 얻은 참고 시료와 함께 종합적으로 분석하였다.

[0140] 인장 강도는 탁상형 universal testing machine (UTM) (SHIMADZU EZ-SX, SHIMADZU, 교토, 일본)로 측정되었다. 실험은 TRAPEZIUM Lite X (SHIMADZU, <https://www.shimadzu.com/an/products/materials-testing/uni-ttm-software/trapezium-lite-x/index.html>) 분석 소프트웨어로 제어 및 분석되었다. 시험용 샘플은 필름을 10mm×60mm (가로×세로)의 직사각형 모양으로 절단하여 준비하였다. 두께는 기계에 평가하기 전 1111-100 A 미니 디지털 캘리퍼스 (Insize, Loganville, GA, USA)로 측정하였다. 적용된 샘플은 10mm/min의 변형 속도로 테스트되었으며, TRAPEZIUM X 소프트웨어는 두께 및 실험 결과를 포함한 샘플 정보를 사용하여 인장 강도 (tensile strength), 영률 (Young's modulus) 및 연신율 (elongation at break)을 계산하였다.

[0141] 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이 전형적으로 메탄자화균으로부터 분리한 PHB 및 PHBV는 표준물질과 유사한 인장강도와 파단 신도를 나타냈으며, 이러한 특성은 단량체 구성에 따라 다양하게 나타났다. 3HV를 혼입한 PHBV 필름은 PHB 필름에 비해 인장 강도와 영률 (Young's modulus)이 모두 감소하고 연신율이 증가하는 경향을 보였다. PHB 필름은 더 단단하고 부서지기 쉬운 반면, PHBV 필름은 더 부드럽고 탄력적이었으며, 이는 3HV에 기인하

여 더 낮은 mechanical load에서 체인 이동에 따른 것으로 예상된다.

표 5

	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Young's modulus (MPa)
PHB			
Goodfellow PHB	13	8 to 10	450
Sigma_PHB	9.99	35.12	156.25
MJCI_PHB	20.24	5.29	1182.48
OKI_PHB_8	15.65	13.08	330.95
PHBV			
Sigma_PHBV (3HB-8%3HV)	13.06	5.22	395.63
MJCI_PHBV_2 (PHB-9%HV)	13.05	291.73	278.97
MJCI_PHBV_5 (3HB-11%3HV)	15.60	26.90	379.97
MJCI_PHBV (3HB-22%3HV)	5.83	30.53	296.16

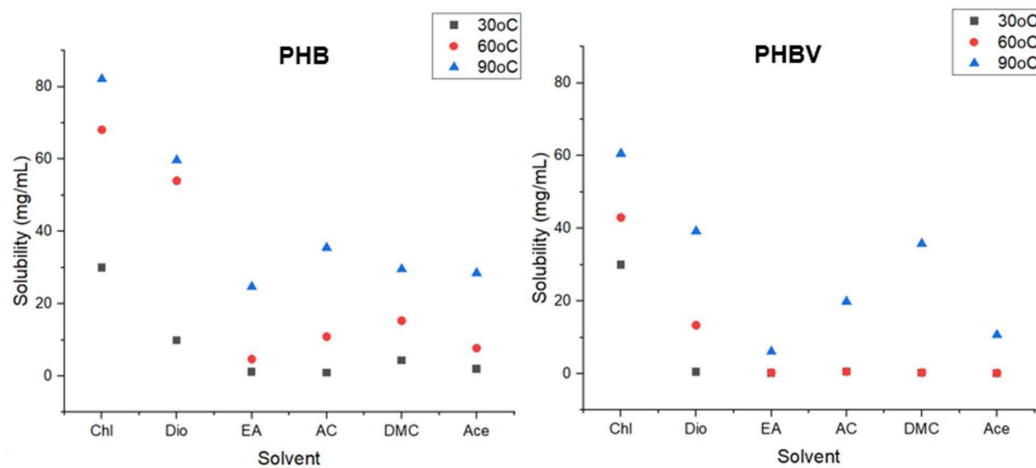
[0143]

[0145]

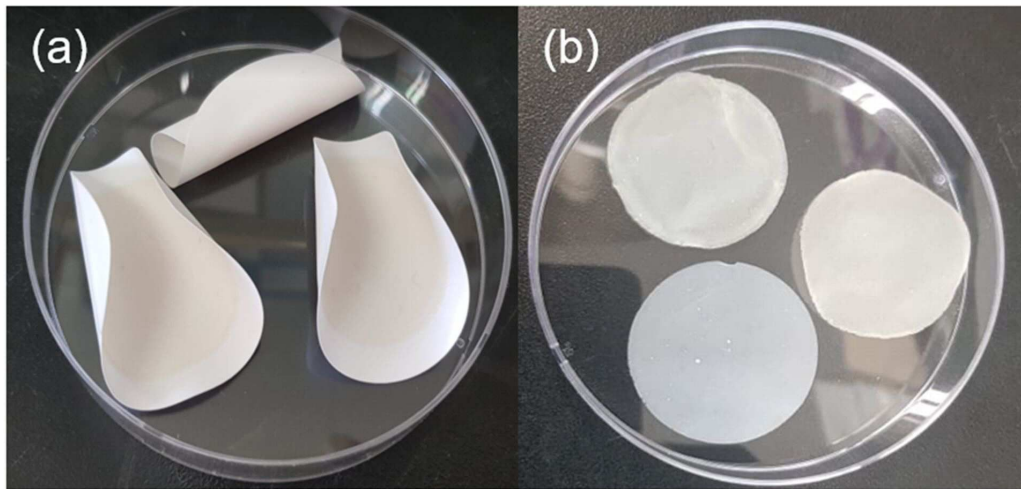
이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

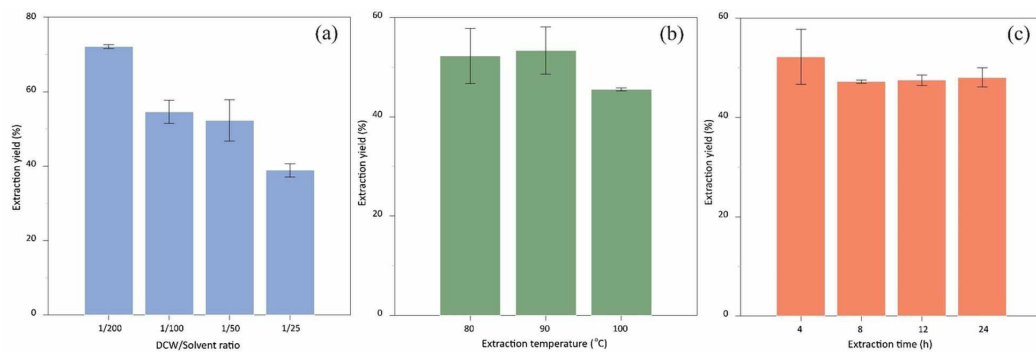
도면1



도면2



도면3



도면4

