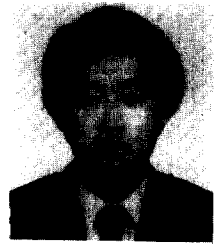


Biopolymer 생산공정의 개발



서울대학교 공과대학 화학공학과 유 영 제

생물고분자

생물고분자(biopolymer)의 범위를 생물이 생산하는 고분자, 생물체에 사용할 수 있는 고분자 등으로 구분하면 상당히 광범위하나, 본고에서는 미생물이 생산하는 생분해성 고분자를 중심으로 다루고자 한다. 최근 합성 플라스틱에 의한 공해와 관련하여 자연에서 분해되는 플라스틱에 대한 관심이 높아지고 있고 생분해성 고분자의 산업화도 하나 둘씩 수행되어 가고 있으며, 이 분야에 대한 연구가 무척 활발하다(표 1).

전분이 함유된 플라스틱 및 광분해성 플라스틱을 제외하고 순수하게 생분해되는 생분해성 고분자의 시장은 세계적으로 연간 140만톤으로 추정되고 있다. 이 중에서 생물공학과 직접적으로 관계가 있는 것은 polylactide계 polymer의 원료가 되는 lactic acid, pullulan과 같은 polysaccharide 그리고 PHA와 같은 polyester 등으로서 본고에서는 PHA(polyhydroxyalkanoate)를 중심으로 생산공정이 어떻게 개발되어 오고 있는가 간단히 고찰하고자 한다. 이러한 생산공정의 원리는 pullulan 및 xanthan gum과 같은 타 생물고분자의 경우에도 유사하게 적용될 수 있다.

PHA 생합성 공정

미생물이 생산하는 polyester로 대표되는 PHA 중 PHB(polyhydroxybutyrate)가 제일 먼저 알려졌으며, HV(hydroxyvalerate) 조성을 갖는 PHB/PHV 공중합물이 우수한 물성 및 기계적 특성을 가진 것으로 알려지면서 PHA를 산업적으로 생산하고자 많은 연구가 수행되고 있다. 현재 범용 플라스틱과

비교하여 생산원가가 5~10배 높기 때문에 실용화에 최대 장애요인으로 되어 있으므로 생산원가를 낮출 수 있는 새로운 기술을 개발하는 것이 필수적이다. 생산원가 중에서는 원료비, 장치감가상각비, utilities 비용 및 인건비 등이 주요한 인자들이다. 이 중 원료비 및 감가상각비 등 생물공정의 측면에 대하여 간단히 살펴보고자 한다.

원료비

PHA를 생합성 할 수 있는 미생물의 종류는 많으나 경제성을 고려할 때 몇 가지 미생물이 산업화의 대상으로 연구되고 있다. Azotobacter는 glucose 또는 sucrose 등을 이용할 수 있으며, Methylobacterium은 methanol 또는 acetate를, Alcaligenes는 hydrogen, ethanol, 또는 glucose 등을 이용할 수 있는데 PHB의 세포내 축적률이 제일 높은 것은 Alcaligenes로서 세포건조 무게의 80%까지 저장하는 것으로 보고되었다. Alcaligenes 균의 경우 처음에는 fructose를 이용하는 균이 소개되었으나, 그 후 mutation에 의하여 glucose를 탄소원으로 이용할 수 있는 균이 얻어졌다. 원료비에 영향을 주로 미치는 것은 탄소원의 종류 및 탄소원에 대한 PHB의 수율(yield)이다. 최근 일본에서 발표된 보고서(1)에 의하면 glucose는 수율이 0.40~0.47이며 시장가격을 720원/kg 정도로 계산하면 주원료비는 PHB kg당 1,500~1,800원 정도가 되며 methanol을 원료로 사용하면 수율이 0.23, 가격을 330원/kg으로 계산하면 1,400원/kg 정도가 된다. methanol을 사용하는 것이 glucose를 사용하는 것보다 원료비면에서 약간 유리하나 methanol을 이용하면 생성된 PHB의 분자량이 상대적으로 낮아지는 것으로 보고(2) 되고 있어, 간단히 어떠한 원료가 경제적인지 판단하기

표 1. 생분해성 고분자의 산업화 동향

고분자	산업화	비 고
Polyactides	미국 Du Pont에서 공장건설 중	원료는 lactic acid
Starch-based polymers	이태리 Novamont 등	
Polycaprolactone	미국 Union Carbide	의료용으로 사용
Polyvinylalcohol	공장 다수	분해성으로 용도개발 중
Acrylic copolymer	스위스 Belland	1회용 기저귀 등의 용도
Pullulan	일 본	식품첨가물 등의 용도
Polyhydroxyalkonate(PHA)	영국 ICI	

곤란하다. Sucrose를 이용할 수 있으면 원료비를 360~420원/kg 정도까지 낮출 수 있는 것으로 예상되어 새로운 균주의 screening, 기존 균주의 mutation 및 유전자 재조합 방법에 대하여 많은 연구가 수행되고 있다.

최근 PHV/PHV 이외의 공중합물의 생합성에 대하여 많은 연구결과가 보고되고 있다. 공중합물을 생산하는 일반적인 방법은 1단계로 미생물을 배양하여 세포농도를 높게 한 다음 propionic acid, pentanoic acid, 4-chlorobutyric acid, 1,4-butandiol, γ -butyrolactone과 같은 탄소원을 glucose와 같이 공급하는 것이다. *Alcaligenes eutrophus*를 이용하여 PHB/PHV 공중합물을 생산하는 경우 PHV의 조성은 propionic acid의 농도를 변화시켜 주므로서 조절 가능한 것으로 보고(3) 되었다. propionic acid는 약 2,700 원/kg 정도로서 glucose에 비하여 상대적으로 고가이므로 공중합물의 경우 원료비 중 탄소원이 차지하는 비중은 더 높아진다. 고가의 탄소원을 사용하지 않던가 또는 적은 사용량으로 공중합물을 생산하는 균주의 개발 또한 중요한 과제이다. 최근 propionic acid와 같은 고가의 기질을 사용하지 않고도 glucose와 같은 일반적인 탄소원을 이용하여 PHB/PHV 공중합물을 생산할 수 있는 균주가 보고(4) 되었는데 균주의 screening 측면에서 바람직하다고 하겠다.

감가상각비

감가상각비는 주로 장치비에 의하여 결정된다. 장치를 작게할 수 있도록 하기 위하여 실험실적으로 중요한 데이터는 배양액 주의 PHB의 농도 및 PHB의 생산성(productivity)이다. 즉, PHB를 단 시간에 고농도로 얻는 것이 중요하다. 이와 관련하여

많은 연구결과가 보고되고 있는데, 우선 미생물에 적당한 영양원을 공급하고 pH, 온도 등 모든 배양 조건을 최적으로 하여 미생물의 농도를 증가시키고 적당한 시점에 PHB 생합성에 최적인 조건으로 유지시켜 주어 PHB 축적률이 최대가 되게 하는 방식을 선택하게 된다. methanol을 이용한 *Pseudomonas* 또는 glucose를 이용하는 *Alcaligenes* 보다 빠르게 성장하는 *E. coli* 등에 PHB관련 유전자를 cloning하여 생산성을 향상시키고자 하는 연구가 많이 수행되고(5) 있으나 실제 산업화까지는 장시간 소요될 것으로 예상된다. 어떠한 균주를 사용하던지 최적의 상태로 배양하는 것이 중요하다.

1986년 일본 Nagoya 대학의 Yamane 교수팀은 *Pseudomonas*균에 탄소원으로 methanol을 공급하여 세포를 배양한 후에 배출가스 중의 carbon dioxide 농도를 기준하여 세포농도가 160 g/l에 달하였을 때 질소원을 limiting 조건으로 유지하여 PHB 생합성을 유도하였는데 그 결과 175시간에 136 g/l의 PHB(생산성 0.78 g/l·hr)를 얻었다. 질소원을 완전히 limiting 시키는 것 보다는 소량의 질소원을 공급하는 것이 세포의 대사작용에 필요하므로 PHB 생합성 기간 중 C/N의 비율을 변화시켜 가며 배양한 결과 121시간에 136 g/l의 PHB(생산성 1.12 g/l·hr)를 얻었다(6, 7). 국내에서도 PHB 생합성 기간 중 질소원을 소량 공급하는 방식이 보고되고 있으며 최근 다음 그림 1에서와 같이 탄소원 및 질소원을 각각 최적의 상태로 유지시켜 주는 2단계 최적 유가배양(fed-batch culture) 방식이 제안(8) 되었는데 실험적으로 입증되면 생산성면에서 매우 유리한 것으로 전망된다.

연속배양(continuous culture)은 생성물의 생산

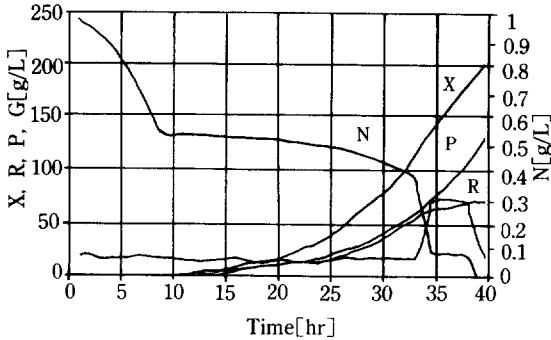
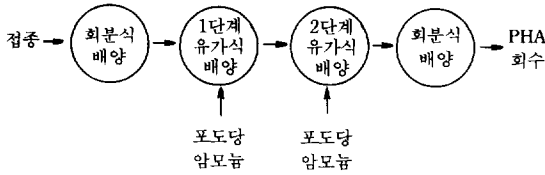


그림 1. 최적 2단 유기식 배양의 computer simulation. X=cell mass, R=residual cell mass, P=product, G=glucose.

성을 증대시키며 공정을 연속화 할 수 있다는 장점을 갖고 있어 잠재력이 매우 큰 배양방법의 하나이다. PHB의 경우에도 1967년에 *Bacillus megaterium*을 이용하여 회색속도를 0.4 hr^{-1} 로 하여 PHB를 연속적으로 생산하는데 성공하였지만 PHB의 축적률은 12%이었다. 그 이후에도 연속배양 방식에 대하여 미생물의 생리적인 특성 규명 등의 목적으로 연구가 많이 수행되었으나, 현 단계로서는 PHB의 농도 및 생산성 모두를 높일 수 있는 공정의 개발은 보고되어 있지 않다.

분자량(molecular weight) 및 분자량 분포는 PHA 또는 pullulan과 같은 생물고분자의 경우 제품의 물성에 크게 영향을 미치는 요소이다. PHA의 경우에도 대략적인 분자량은 보고되었으나 분자량을 변화시킬 수 있는 생물공정에 대하여 보고는 매우 드물다. *Protomonas extorques*를 이용하여 PHB를 생산하는 경우에 methanol의 농도를 0.05 g/l 로 하여 공급하였을 때는 평균분자량 80만, 32 g/l 로 공급한 결과 평균분자량 5만의 PHB가 얻어졌다(9). 상세한 내용은 아직 연구결과가 보고되어 있지 않으나 탄소원의 농도 및 pH가 PHB 생합성 pathway상의 효소에 영향을 미치고 효소의 활성이 PHB의 분자량에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수

있다. 최근 유사한 결과가 pullulan의 경우에 보고(10) 되었는데 pullulan을 생합성하는 경우에 배양액의 pH가 중성이면 생합성된 pullulan이 가수분해되어 분자량이 낮아지며, sucrose의 농도가 높은 경우가 sucrose의 농도가 낮은 경우에 비하여 높은 분자량의 pullulan을 얻을 수 있음이 알려졌다.

Biopolymer를 효율적으로 생산하기 위해서는 생합성 kinetics를 규명하여 수학적으로 모델링하는 것이 필요하다. 배양시간에 따라 탄소원, 질소원 및 중요한 기질을 최적의 농도로 공급해 주며 생물반응공정을 최적화하며 제어하기 위하여 필요한 것이다. 이와 관련하여 1988년에 biopolymer 생합성 kinetics에 관한 연구내용이 review(11) 되었다. 주로 unstructured model이 사용되었는데 세포의 성장에는 일반적으로 logistic model이, 생물고분자의 생합성에는 Luedeking-Piret 모델이 사용되었다. xanthan gum과 같은 polysaccharide를 생합성하는 경우에 모델식의 변수를 초기질소원의 농도로 나타내므로서 질소원의 영향을 모델식에 포함시킨 경우도 있으며, 또한 logistic식에 Monod식을 포함시키므로서 미생물의 성장에 영향을 미치는 제한기질의 농도항을 포함시킨 경우도 있다. 최근 탄소원 및 질소원 농도의 영향 모두를 포함하고 있는 모델식이 제안(12) 되었는데 향후 주요 metabolic 기능을 포함하는 structured model이 기대된다.

PHA 분리공정

박테리아로부터 PHB를 분리하는 방법으로는 박테리아를 건조한 다음 chloroform 등으로 추출하는 방법이 오래 전에 보고되었으나 이 방법은 수율이 낮은 것으로 알려졌으며 수율을 증가시키기 위하여는 건조된 세포를 sodium chlorite로 파괴한 다음 chloroform으로 추출할 수 있으나 이 방법을 사용하면 polymer의 분자량이 낮아지게 되어 실용적인 의미가 없어진다. 1962년에는 세포를 acetone과 1:1~1:10 비율로 혼합하여 세포를 용해시킨 다음 acetone을 제거시키고 세포 residue를 건조시켜 PHB를 pyridine으로 추출하는 방법이 특허화(13) 되었다. 이 때 acetone은 물과 수용성 지방(lipids, phospholipid) 등을 제거시키는 역할을 하는 것으로 알려졌다. 또한 propylene carbonate 또는 ethylene

carbonate 등을 사용하면 분리수율 및 분자량 면에서 유리하며(14), 1,2-dichloroethane이나 dichloromethane 등 용매의 선정이 매우 중요한 것으로 보고되고 있다.

1984년 영국의 ICI의 특허(15)에는 배양 후 세포를 원심분리한 후에 Dyno mill 또는 French press 등을 이용하여 세포를 파괴하는 방법이 보고되었으며 1988년 일본 Mitsubishi Gas의 특허(16)에는 acetone으로 세포를 세척/파괴한 다음 chloroform으로 PHB를 추출하고 hexane을 이용하여 침전시킨 다음 여과하여 분리하고 건조시키는 공정이 보고되었다.

용매를 사용하여 추출/침전시켜 분리하는 방법은 용매의 사용량이 많아지고 따라서 용매회수에 소요되는 비용이 전체 생산원가에 상당한 부분을 차지하기 때문에 최근에는 용매의 사용을 최소화 하는 방향으로 연구개발이 진행되고 있다. xanthan gum 생산의 경우에도 배양액의 점도가 높기 때문에 먼저 물을 가하여 배양액의 점도를 낮추어 균체를 제거한 다음 propanol을 가하여 생성된 xanthan gum을 침전시켜 분리하며 용매를 회수한다. 이 경우 용매 회수 비용이 전체 제조원가에 미치는 영향이 매우 높으므로 최근에는 효소를 이용하는 새로운 균체 제거방법이 채택되고 있는 것으로 알려졌다.

효소에 의한 세포의 lysis/파괴(17)는 세포내 대사산물, 세포막에 부착된 효소 등의 분리에 매우 중요하다. 산업적인 규모로 세포를 파괴할 수 있는 방법은 고압 homogenizer 또는 bead mill 이다. 이러한 장치를 사용하여 세포를 파괴한 다음 cell debris의 혼합물로부터 원하는 생성물을 분리하여야 하는데 원하는 생성물이 PHA와 같이 고형물인 경우에는 용제를 가하여 분리하는 것이 일반적이다. 효소는 값이 비싸지만 세포를 선택적으로 용해시킬 수 있어 최종적으로 원하는 생성물만을 고형분으로 얻을 수 있다는 장점이 있다. lysozyme은 효과적이거나 대규모로 사용하기에는 너무 고가이므로 pepsin이나 trypsin 같은 값싼 효소를 이용하는 방법이 제안되고 있다. yeast 세포를 파괴하는 경우에는 β (1-3)glucanase, protease, β (1-6)glucanase, mannanase 또는 chitinase 등의 효소의 혼합물을 사용할 수 있다. bacteria인 경우에는 peptidoglycan이 세포벽의 주성분이므로 gram 양성 박테리아의 경우

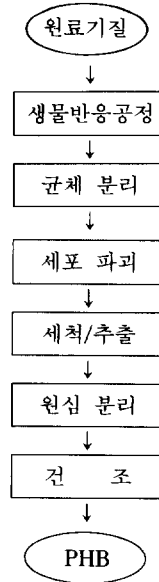


그림 2. PHB 생산공정도

에는 단일효소를 이용하여, gram 음성 박테리아는 계면활성제를 이용하여 외부 세포벽을 제거한 후 효소를 처리하므로써 세포를 파괴할 수 있다. 세포를 보다 효과적으로 파괴하기 위하여는 polysaccharide chains, polypeptide chain 및 polysaccharide-polypeptide junction을 끊어주는 효소를 사용하면 된다.

PHA의 분리비용을 줄이고자 유전공학적인 방법이 시도되고 있다. Bacteriophage의 lysis gene을 *E. coli*에 cloning시켜 *E. coli* 세포벽의 transmembrane tunnel 위치에서 발현시킴으로써 생성된 PHB 입자가 lysis된 tunnel structure 사이로 빠져 나오게 하려는 연구가 수행(18)되었는데 생성된 PHB의 50~80% 정도가 분리되는 것으로 알려졌다.

지금까지의 연구결과를 종합하여 보면 일반적인 PHB 생산 및 분리의 공정도는 다음 그림 2와 같이 구성할 수 있다.

결 어

환경에 대한 국민의 관심이 점차 높아지고 있으므로 환경보전의 차원에서 생분해성 생물고분자의 산업화가 매우 중요한 것으로 판단되며 이를 목표로 미생물학자, 생물화학공학 및 고분자응용에 관련되는 인력이 협동하여 연구개발에 힘을 기울여야 할

것이다.

생물배양 공정의 경우 일반적으로 장치와 관련된 투자비는 외국에 비하여 20~30%정도 절감할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 생산성이 높은 균주 및 생물공정(분리공정 포함)을 개발하면 국제 경쟁력 있게 산업화할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 生分解性 Plastic Symposium '91 Proceedings, 1991, 10. 東京
2. D. Byrom, *TIBTECH* **5**, 246 (1987).
3. B. A. Ramsay *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2093 (1990).
4. G. J. Kim *et al.*, *Biotechnol. Letters*, **14**, 27 (1992).
5. S. Slater *et al.*, *J. Bacteriol.* **170**, 4431 (1988).
6. T. Suzuki *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 370 (1986).
7. T. Suzuki *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 322 (1986).
8. 이용우 등, 생분해성 고분자에 개발과 응용 심포지움 논문집, 1991, 5. 서울.
9. T. Suzuki *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1988).
10. 이기영, 서울대학교 박사학위 논문, 1992.
11. J. H. T. Luong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 326 (1988).
12. Y.-W. Lee and Y. J. Yoo, *Kor. J. Anal. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 186 (1991).
13. USP 3036959 (1962).
14. E. Heinzle, Ph. D. Thesis, Technische Universität, Graz, Austria.
15. USP 4477655 (1984).
16. EPA 88106399.4 (1988).
17. B. A. Andrews and T. A. Asenjo, *TIBTECH* **5**, 273 (1987).
18. S. Kalousek *et al.*, Proceedings International Symposium on Biodegradable. Polymers, 1990, Japan.