

# Cupriavidus necator를 이용한 Poly(3-hydroxybutyrate) 생산에 이산화탄소의 농도가 미치는 영향

## Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by Cupriavidus necator at Various Concentrations of Carbon Dioxide

박인선 · 조은혜 · 남경필<sup>†</sup>

Inseon Park · Eun Hea Jho · Kyoungphile Nam<sup>†</sup>

서울대학교 건설환경공학부

Department of Civil and Environmental Engineering, Seoul National University

(2012년 11월 1일 접수, 2013년 2월 8일 채택)

**Abstract :** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are synthesized by numerous bacteria as carbon and energy storage compounds and are raw materials for biocompatible plastics. In this paper, the effect of CO<sub>2</sub> concentrations on the growth of *C. necator* and the accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) are investigated by increasing the CO<sub>2</sub> concentration in the substrate gas mixture. During 6 d cultivation in a nitrogen-present mineral medium, the CO<sub>2</sub> concentration did not affect the growth of the cells, while the Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) content decreased with increasing CO<sub>2</sub> concentrations from 1% to 20%. During 4 d cultivation in the nitrogen-limited medium, the P(3HB) accumulation was the greatest at 3% CO<sub>2</sub>; however, the total amount of accumulated P(3HB) was the greatest at 1% CO<sub>2</sub>, which decreased with increasing CO<sub>2</sub> concentrations. The results indicate that the gas mixture with 1% CO<sub>2</sub> is the most effective in both growing the cells and accumulating P(3HB) under our experimental conditions.

**Key Words :** CO<sub>2</sub> Conversion, Poly(3-hydroxybutyrate), *Cupriavidus necator*, Biocompatible Plastics

**요약 :** Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 다양한 미생물이 세포 내에 저장하는 에너지 저장물질로 생체적합성 플라스틱의 원료 물질이다. 본 연구에서는 *Cupriavidus necator*를 사용하여 독립영양배양조건으로 poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB))를 생산함에 있어서 CO<sub>2</sub> 농도가 미생물의 성장과 P(3HB)의 축적에 미치는 영향을 확인하였다. 첫 번째 질소원을 포함한 배지에서의 6일 간의 배양 단계에서 *C. necator*의 균체수는 CO<sub>2</sub> 농도와 관계없이 증가했지만, 균체 내에 축적된 P(3HB)의 양은 CO<sub>2</sub> 농도가 1-20%로 증가함에 따라 감소하였다. 두 번째 질소원이 제거된 배지에서의 4일 간의 배양 단계에서 P(3HB)의 축적량은 3% CO<sub>2</sub>에서 가장 많았다. 하지만 전체 10일 간의 배양기간 동안 합성된 총 P(3HB)의 양은 1, 3, 10, 20% 순으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 CO<sub>2</sub>를 사용하여 P(3HB)를 축적할 때 1-20% CO<sub>2</sub> 중에서 1% CO<sub>2</sub>가 가장 효율적임을 확인하였다.

**주제어 :** 이산화탄소 전환, Poly(3-hydroxybutyrate), *Cupriavidus necator*, 생체적합성 플라스틱

### 1. 서론

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 다양한 미생물이 세포 내에 저장하는 에너지 저장물질로 미생물이 불균형한 영양조건, 즉 N, P, S, O, Mg 등이 결핍된 반면 탄소원이 충분량 존재할 때 축적된다.<sup>1,2)</sup> 축적된 PHAs는 생분해성 플라스틱의 원료물질로, 석유계 플라스틱의 대체가 가능할 뿐 아니라 생체적합성이 우수하여 의료용 봉합사, 임플란트, 약물 전달 등의 고부가가치 의료용 플라스틱으로도 사용이 가능하다.<sup>3,4)</sup> 하지만 높은 생산 단가로 인해 상용화에 어려움이 있어, 최근 값 싼 탄소원을 이용한 PHAs 생산이 주목을 받고 있다.<sup>5)</sup> *Cupriavidus necator*는 수소산화균으로서 수소를 산화할 때 얻은 에너지로 이산화탄소를 고정시키고 poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB))를 축적한다.<sup>6)</sup> P(3HB)는 PHAs 중 가장 대표적인 것으로 포도당, 과당, 아세트산, 이산화탄소 등이 탄소원으로 사용될 때 합성되며,<sup>7)</sup> 생분해성 외에 생체적합성, 압전성, 내습성, 기체차단성 등의 특성을 가지고 있

어 다양한 응용이 가능하다.<sup>8)</sup> 이산화탄소를 이용한 P(3HB)의 생산은 대기환경부산물을 고부가가치의 유용한 물질로 전환시킨다는 점에서 환경적, 경제적 의미가 크다.

미생물을 이용한 PHAs 생산에 관한 연구는 종속영양배양조건에서 수행된 것이 대부분으로 독립영양배양조건에 관한 연구는 미흡한 실정이다. *C. necator*는 독립영양배양과 종속영양배양이 모두 가능한 균주로, 이를 이용한 기존 독립영양배양조건의 연구에서 이산화탄소의 비율이 10일 때 수소와 산소의 비율이 75 : 15 (v/v)에서 P(3HB)의 축적이 가장 효율적으로 이루어졌다. 또한 폭발이 일어나지 않는 기체 조성(산소 6.9% (v/v) 이하) 내에서 균체농도를 높이기 위해 산소용해계수가 큰 반응조를 이용하여 기체 용해도를 높여 91 g/L의 균체농도와 68% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다. 일반 반응조에서는 종속영양배양과 독립영양배양의 2단계 배양방법을 이용하여 26~43 g/L의 건조세포중량과 56~82% (w/w)의 P(3HB) 함량을 얻었다.<sup>9-11)</sup> 마찬가지로 같은 균주를 이용하여 수소, 산소, 이산화탄소의 비율이 6 : 2 : 1

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: kpnam@snu.ac.kr Tel: 02-880-1448 Fax: 02-889-0032

(v/v/v)인 혼합가스를 기질로 건조세포중량의 90% (w/w)까지 P(3HB)를 생산했다.<sup>12,13)</sup> 이는 종속영양배양 조건에서의 PHAs 생산과 비교해도 충분히 효율적이며, 이산화탄소가 PHAs 생산에 유용한 기질로 이용될 수 있음을 시사한다.

위와 같이 독립영양배양조건에서 P(3HB) 합성의 수율을 높이기 위해 여러 인자들이 P(3HB)의 합성에 미치는 영향을 살펴보고 그것을 최적화하는 연구가 주로 수행되었다. 그러나 그 중 주요 기질인 이산화탄소의 농도가 P(3HB) 합성에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 최근 산업공단 등에서 CCS (Carbon Dioxide Capture and Sequestration) 사업의 일환으로 포집된 이산화탄소의 친환경적 처리와 재생 가능한 고부가가치 자원의 전환에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 이산화탄소를 이용한 PHAs 생산은 포집된 대량의 이산화탄소를 바이오기술을 활용하여 유용물질로 전환하는 생물학적 전환이용 기술의 하나로 이용될 수 있고, 이 때 주요 기질로 사용될 이산화탄소의 농도를 어느 수준으로 유지해야 할지는 중요한 문제이다. 본 연구에서는 독립영양배양조건으로 PHAs를 생산함에 있어서 이산화탄소의 농도가 미치는 영향을 확인하기 위해, 기질로 사용된 수소, 산소, 이산화탄소의 혼합가스에서 이산화탄소의 농도를 변화시켜 가며 *C. necator* 균주를 배양하였다. 총 2단계의 회분식 배양을 통해 이산화탄소 농도가 *C. necator*의 성장과 P(3HB) 축적에 미치는 영향을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 배지

본 실험에서는 P(3HB)를 생합성하는 균주로서 수소산화세균인 *C. necator* (ATCC 17697)를 사용하였다. 균체량의 증식을 목표로 한 1단계 배양에는 질소원으로 NH<sub>4</sub>Cl을 사용한 최소영양배지를 사용하였으며, 그 조성은 다음과 같다. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.3 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O 2.9 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, Fe(NH<sub>4</sub>) citrate 0.05 g/L, 미량원소용액 1 mL/L. 미량원소용액의 조성은 다음과 같다. ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O 0.03 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.3 g/L, CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, CuCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, NiCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O 0.03 g/L. 또한 P(3HB) 축적을 위한 2단계 배양에는 질소원으로 사용된 NH<sub>4</sub>Cl을 제거한 최소영양배지를 사용하였다. 탄소원으로는 다양한 농도의 CO<sub>2</sub>를 포함하는 혼합가스를 사용하였다. 혼합가스의 조성은 7% H<sub>2</sub> (v/v), 1% O<sub>2</sub> (v/v), 1, 3, 10, 20% CO<sub>2</sub> (v/v), 나머지는 N<sub>2</sub>로 구성하였다.

### 2.2. 미생물 배양

*C. necator*의 균체생육을 위한 1단계 회분식 배양은 탄소원으로 CO<sub>2</sub>를 포함하는 혼합가스 50 mL/min를 연속적으로 공급하며 질소원이 포함된 최소영양배지에서 수행되었

다. *C. necator*를 접종한 배지 600 mL를 1 L 삼각 플라스크에 넣고 30°C 항온수조에서 140 rpm으로 6일 동안 배양하였다. pH는 6.9 ± 0.1로 유지하였고 2일에 한번 질소원이 포함된 최소영양배지[100% (v/v)]로 갈아주었다. 샘플링은 24시간마다 이루어졌고, 흡광도(Optical density, OD)와 개체수를 측정하였다. 1단계 배양 후 일정량의 균체를 회수하여 OD (600 nm)값 약 1.6의 농도(ca. 0.8 g/L)로 2단계 배양을 시작하였다. 2단계 배양은 P(3HB)의 합성을 유도하는 단계로 질소원이 제거된 최소배지에서 1단계와 같은 조건으로 4일 동안 진행되었다. 2일 후 질소원이 제거된 최소배지[25% (v/v)]로 갈아주었고, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간에 샘플링하여 건조세포농도(Dry Cell Weight, DCW)와 P(3HB)의 농도를 측정하였다.

## 2.3. 분석 및 정제방법

### 2.3.1. 미생물 분석

균체성장은 분광광도계(2120UV, Optizen, Korea)로 600 nm에서 OD를 측정하여 결정하였다. DCW는 배양액 8 mL를 원심분리한 후 60°C에서 24시간 건조하여 질량을 측정하였다. *C. necator*의 개체수를 확인하기 위해 PBS (Phosphate-Buffered Saline)로 배양액을 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>배 희석시키고, 배양원액과 희석된 배양액을 고체영양배지에서 각각 24시간 배양한 후 개수하였다. 모든 실험은 duplicate로 진행되었고, 측정값의 평균값을 사용하였다.

### 2.3.2. P(3HB) 추출 및 분석

P(3HB)는 FID가 장착된 가스크로마토그래피(GC, 6100, Young Lin Instrument Co.)로 정량하였고 HP-1 (30 m × 0.32 mm, 1.00 μm) 컬럼을 사용하였다. GC 측정을 위한 시료의 전처리하는 시료 11 ± 3 mg에 butyl alcohol 1.5 mL와 HCl (37%) 0.5 mL를 각각 첨가한 뒤 100°C에서 8시간 반응시켰다. 그 후 상온에서 hexane 2.5 mL와 증류수 4 mL를 각각 첨가하여 교반시키고 층분리 된 위층을 1 μm 주입하여 사용하였다. GC의 조작 조건은 Table 1과 같다. P(3HB)의 함량은 세포 내에 P(3HB)가 축적된 정도를 나타내는 것으로, 식은 다음과 같다.<sup>14)</sup>

$$P(3HB) \text{ 함량}(\%) = \frac{\text{분석한 샘플 내의 P(3HB)의 중량(mg)}}{\text{건조미생물중량(mg)}} \times 100$$

Table 1. Operation conditions of FID gas chromatograph for determining P(3HB) concentrations

Parts	Conditions
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

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 1단계 배양기간 중 C. necator의 균체성장

혼합가스 내의 CO<sub>2</sub> 농도가 C. necator의 균체 성장에 미치는 영향은 Fig. 1과 Table 2에 나타나있다. CO<sub>2</sub> 농도와 상관 없이 배양 초기 OD값은 0.01로 6일 후 OD값이 1, 3, 10,

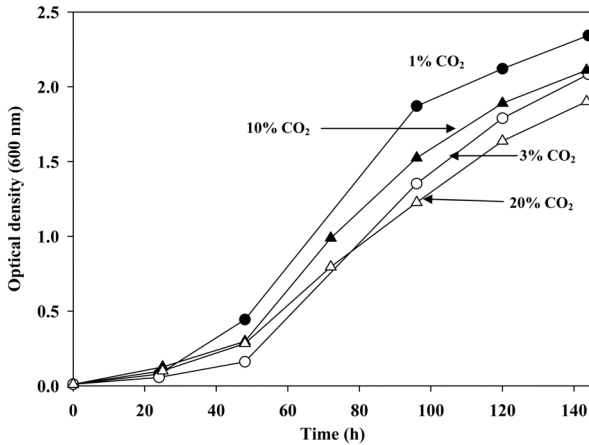


Fig. 1. Changes in the optical density of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH<sub>4</sub>Cl/L) with varying concentrations of CO<sub>2</sub> in gas mixtures (7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, varying CO<sub>2</sub> concentration, and N<sub>2</sub> balanced) during the 1st stage growth.

Table 2. Optical density (OD), cell number and P(3HB) content in the nitrogen-amended mineral media (2 g NH<sub>4</sub>Cl/L) with varying concentrations of CO<sub>2</sub> in gas mixtures (7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, varying CO<sub>2</sub> concentration, and N<sub>2</sub> balanced) at the end of the 1st stage

	CO <sub>2</sub> concentration (%)			
	1	3	10	20
OD (at 600 nm)	2,3	2,1	2,1	1,9
Cell number (CFU/mL)	3,0×10 <sup>9</sup>	2,8×10 <sup>9</sup>	3,1×10 <sup>9</sup>	2,9×10 <sup>9</sup>
P(3HB) content (%)	32	21	18	14

20% CO<sub>2</sub>에서 각각 2.3, 2.1, 2.1, 1.9로 증가하였다(Fig. 1 and Table 2). 1단계 배양은 영양분(N)을 제한하지 않은 최소배지에서 수행되므로, 배양기간 동안 C. necator의 성장이 일어나고, 이는 OD값의 증가로 나타났다. 혼합가스 내의 CO<sub>2</sub> 농도가 1에서 20%로 증가할수록 6일 배양 후 최종 OD값은 2.3에서 1.9로 감소했고(Table 2), DCW로 환산해보면 CO<sub>2</sub>가 1과 20%일 때 각각 1.6과 1.2 g/L로 약 0.4 g/L의 차이가 난다. 이는 낮은 농도의 CO<sub>2</sub>에서 균체 성장이 더 잘 일어났다는 것을 의미한다. 균체수는 초기에 약 5.0 × 10<sup>6</sup> CFU/mL에서 1단계 배양 후 평균 3.0 × 10<sup>9</sup> CFU/mL로 600배 정도 증가하였으며, CO<sub>2</sub> 농도에 따른 차이는 크지 않았다(Table 2). 1단계 배양 후 P(3HB)의 함량은 CO<sub>2</sub> 농도가 증가함에 따라 감소했고, 결국 축적된 P(3HB)에 의한 균체의 부피 변

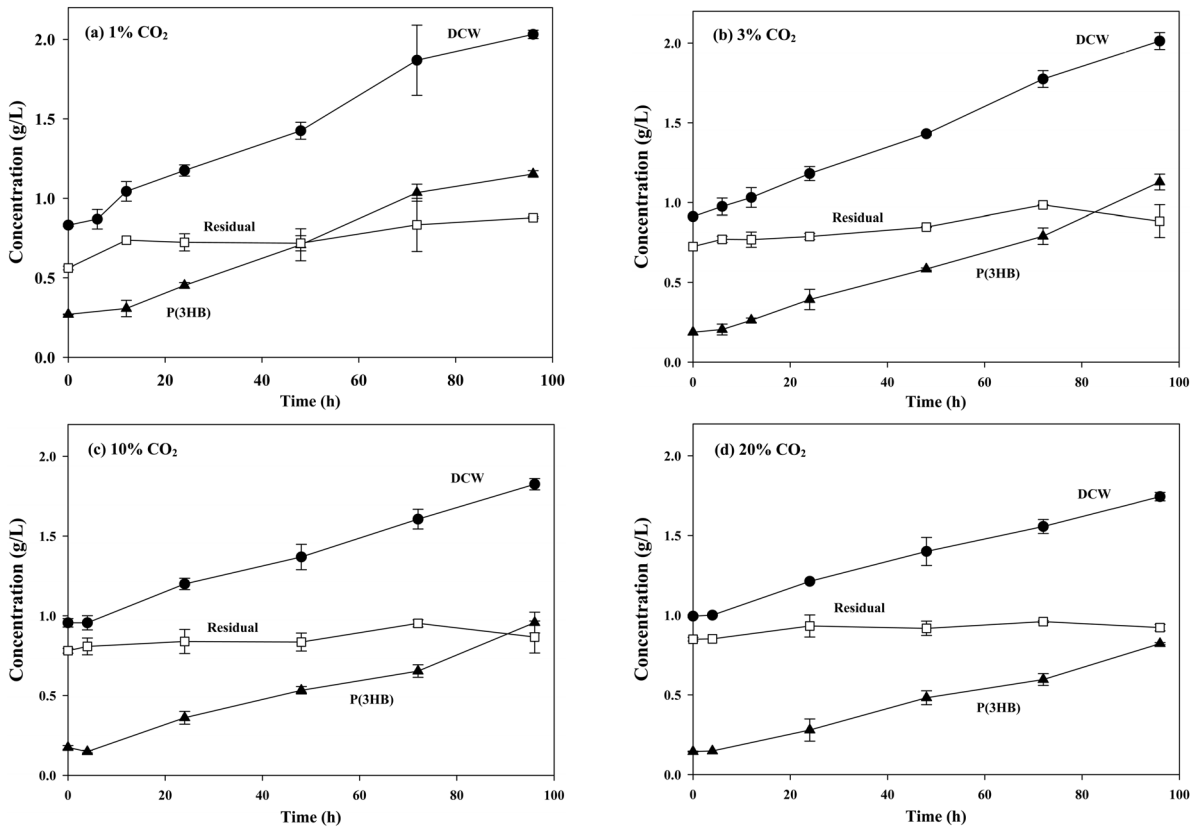


Fig. 2. Changes in the concentrations of dry cell weight (DCW), P(3HB), and residual (DCW - P(3HB)) of *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO<sub>2</sub> in gas mixtures (7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, varying CO<sub>2</sub> concentration, and N<sub>2</sub> balanced) during the 2nd stage growth.

화가 OD값의 차이를 나타나게 한 것으로 볼 수 있다.<sup>15)</sup> 1단계 성장 단계에서 균체수는 CO<sub>2</sub> 농도에 영향을 받지 않았지만 성장하면서 체내에 축적된 P(3HB) 양은 CO<sub>2</sub> 농도가 낮을수록 더 높았다.

### 3.2. 2단계 배양기간 중 CO<sub>2</sub> 농도에 따른 P(3HB) 축적 변화

Fig. 2는 2단계 배양에서 1, 3, 10, 20% CO<sub>2</sub>를 사용했을 때, 시간에 따른 DCW, P(3HB), 잔류물(Residual)의 변화량을 보여주고 있다. 여기서 잔류물이란 DCW에서 P(3HB)의 양을 뺀 값으로 균체에서 P(3HB)를 제외한 나머지 부분을 의미한다. 2단계 배양이 수행되는 질소원이 결핍된 환경에서는 핵산과 단백질의 합성이 저해되므로 동화되는 탄소원은 대부분 PHAs로 저장된다.<sup>15)</sup> 따라서 4일 간의 배양 기간 동안 거의 일정한 값을 유지하는 잔류물은 DCW의 변화가 대부분 P(3HB)의 증가에 의해서 일어남을 의미한다.

Fig. 3은 CO<sub>2</sub> 농도 별로 배양 초기와 배양 후에 축적된 P(3HB)의 양을 보여준다. 초기 P(3HB) 농도가 일정하지 않은 것은 1단계 배양 후 세포 내에 축적된 P(3HB) 양이 CO<sub>2</sub> 농도 별로 다르기 때문이다(Table 2). P(3HB)는 대부분 2단계에서 축적되었는데 2단계 배양기간 동안 증가한 P(3HB)의 양은 3% CO<sub>2</sub>에서 가장 많았고(0.94 g/L), 그 다음은 1, 10, 20% CO<sub>2</sub>의 순으로 나타났다. 1과 3% CO<sub>2</sub>를 사용하였을 경우 2단계 배양에서 축적된 P(3HB)의 양의 차이는 크지 않았지만, CO<sub>2</sub> 농도가 10, 20%로 높아지면서 그 양이 감소하였다. 20% CO<sub>2</sub>에서 2단계 배양 중 P(3HB) 축적량은 3% CO<sub>2</sub>의 70% 수준으로 나타났다. 이는 높은 농도의 CO<sub>2</sub> (10, 20%)가 기질로 공급될 경우 1, 3% CO<sub>2</sub>가 공급될 때보다 P(3HB)의 합성에 저해 현상을 일으킬 수 있음을 의미한다. 마찬가지로 총 P(3HB) 축적량은 1, 3, 10, 20% CO<sub>2</sub> 순으로 나타났다. 이 값 역시 1과 3% CO<sub>2</sub>에서는 차이가 거의

없지만 10, 20%로 CO<sub>2</sub> 농도가 증가하면서 감소하는 경향이 뚜렷해진다. 1단계 성장 단계와 2단계 축적 단계를 같이 볼 때, CO<sub>2</sub> 농도에 따른 P(3HB) 합성은 저농도에서(1, 3%) 효율적이었고, 고농도에서는(10, 20%) 그 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 2단계 배양 결과 P(3HB)의 함량은 약 47~57% 정도로 1, 3, 10, 20% CO<sub>2</sub> 순으로 나타났으나 그 차이는 크지 않았다(Fig. 3). 따라서 주어진 배양조건에서 최종적인 P(3HB)의 합성량이 가장 많았던 1% CO<sub>2</sub>가 가장 효율적인 것으로 보인다.

## 4. 고찰

본 연구에서는 1% CO<sub>2</sub>를 기질로 사용했을 때가 가장 많은 균체성장과 P(3HB) 합성을 보였다(Fig. 1, 3). 이는 기질로 주어진 혼합가스 내 CO<sub>2</sub> 농도가 증가함에 따라 P(3HB) 전환에 사용된 CO<sub>2</sub> 양이 오히려 감소했다는 것을 의미한다. 더 많은 CO<sub>2</sub>를 공급했음에도 균체들이 사용하지 못한 이유를 살펴보면, 먼저 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub> 같은 다른 기질들이 제한되었기 때문이다. 수소산화균은 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>로부터 CO<sub>2</sub> 고정에 필요한 에너지를 얻는다.<sup>16,17)</sup> H<sub>2</sub>의 산화로부터 ATP 형태의 에너지를 얻어 CO<sub>2</sub>를 이용하는데, 실험에 사용한 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>의 절대적인 양도 적었고(7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>), 가스들의 용해도(H<sub>2</sub> 용해도 0.0040 g/물 100 g, O<sub>2</sub> 용해도 0.00016 g/물 100 g, 20°C, 1 기압)도 낮아 이용할 수 있는 양이 더 제한적이었을 것으로 판단된다. 실험 결과 1% CO<sub>2</sub>에서 가장 높은 효율이 나타난 것은 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub> 양의 제한에 의한 것으로도 볼 수 있기 때문에, 이보다 높은 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub> 양에서는 더 많은 CO<sub>2</sub>를, 낮은 양에서는 더 제한적인 양의 CO<sub>2</sub>를 사용할 것으로 예상된다. 본 연구는 문헌 연구에 따라 *C. necator*의 성장에 가장 효율적이라고 보고된 H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> = 7:1:1의 비율을 사용하여 폭발위험성이 없는 한도 내에서 혼합가스를 제작하였고, 이로 인해 제조할 수 있는 최대 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>의 양은 각각 전체 부피의 7%와 1%였다. 이렇게 이산화탄소 고정에 필요한 에너지가 제한되면서 CO<sub>2</sub> 공급량이 늘어나도 사용할 수 없는 환경이 되어 P(3HB)로 전환되는 CO<sub>2</sub> 양은 1% CO<sub>2</sub>를 공급할 때 이상이 되지 못한 것으로 볼 수 있다. 기존 연구에서 H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>가 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.<sup>9)</sup> 이는 본 연구에서 사용한 H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> 농도의 10배 수준으로 H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>와 같은 다른 기질들의 농도를 높임으로써 더 높은 농도의 CO<sub>2</sub>를 이용하여 더 많은 양의 DCW와 P(3HB)를 얻을 수 있음을 보여준다. 또한 H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>의 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.<sup>12)</sup> 이를 볼 때 기존 연구에서 최적 가스 비율은 H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>가 각각 7:1:1 ~ 6:2:1이고, 본 연구에서는 CO<sub>2</sub>가 1에서 20%로 늘어나면서 이 비율이 깨져 DCW와 P(3HB)의 생산량이 줄어든 것으로 보인다.

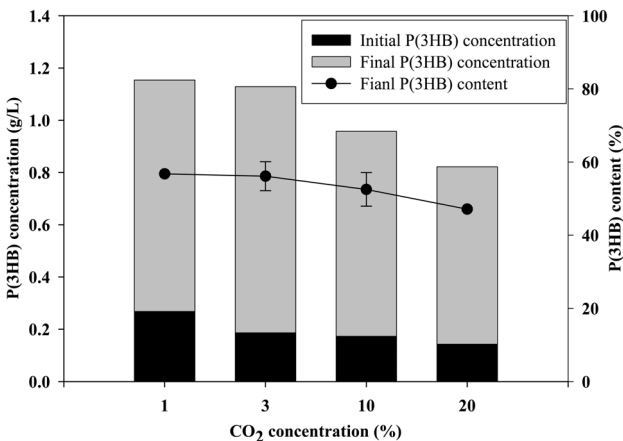


Fig. 3. Changes in the initial and final P(3HB) concentrations, and the final P(3HB) content in *Cupriavidus necator* grown in the nitrogen-limited mineral media with varying concentrations of CO<sub>2</sub> in gas mixtures (7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, varying CO<sub>2</sub> concentration, and N<sub>2</sub> balanced) during the 2nd stage growth.

또한 본 연구의 실험조건에서 1% CO<sub>2</sub>가 최적인 것은 CO<sub>2</sub> 농도가 증가함에도 사용량은 증가하지 않고 배양액 내에 잔류하는 CO<sub>2</sub> 농도는 커지게 되기 때문이다. 잔류하는 CO<sub>2</sub>는 균체의 생산계수(yield coefficients)나 유지요구량(maintenance requirement)을 감소시키면서 대사에 저해작용을 나타낼 수 있고, 효소에 영향을 주어 기질 섭취나 사용에 저해를 줄 수 있기 때문에,<sup>18)</sup> CO<sub>2</sub> 농도 증가에 따라 수율이 낮아지는 현상을 나타나게 할 수 있다. 종속영양배양조건에서 CO<sub>2</sub>가 균체성장과 P(3HB) 축적에 미치는 저해 영향에 관한 기존연구에서, 균체의 성장 단계와 P(3HB) 축적 단계에서 22% (v/v) CO<sub>2</sub>를 pulse로 주입하여, 주입한 시기(지체기, 대수기, 정체기)와 기간(3 h and 6 h CO<sub>2</sub> pulse)에 따라서 CO<sub>2</sub> pulse를 주입하지 않았을 때 보다 성장의 지체기가 길어지거나 최종 균체농도와 P(3HB)의 농도가 낮아지는 등의 저해 현상을 확인하였다.<sup>19)</sup> 이와 같이 사용되지 않고 잔류하는 고농도의 CO<sub>2</sub>는 균체의 성장이나 P(3HB)의 축적에 영향을 미칠 수 있으므로, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>의 농도에 따라 기질로 주어지는 CO<sub>2</sub> 농도를 적절하게 선정하는 것이 중요할 것이다.

## 5. 결론

CO<sub>2</sub>를 이용하여 P(3HB)를 생산함에 있어서, 기질로 주어진 혼합가스 내의 CO<sub>2</sub> 농도 변화가 *C. necator*의 성장과 P(3HB) 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원을 제한하지 않는 1단계 배양 (6일)에서 *C. necator*의 개체량의 변화는 CO<sub>2</sub> 농도와 관계없이 일정했지만 체내에 축적된 P(3HB)의 양은 CO<sub>2</sub> 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 질소원을 제한한 2단계 배양 (4일) 동안 합성된 P(3HB)의 양은 3% CO<sub>2</sub>에서 가장 많았고, 1, 2단계에서 합성된 P(3HB)의 총 양은 1% CO<sub>2</sub>를 사용한 경우 가장 많았다. 본 연구는 제한된 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>가 (7% H<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) 공급될 때, 1% CO<sub>2</sub>가 균체성장과 P(3HB)(g/L) 합성에 가장 효율적임을 확인하여, 제한된 H<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>의 양과 연계된 적정 CO<sub>2</sub> 양을 제시한다. 궁극적인 목표인 CO<sub>2</sub>를 이용한 PHAs 대량생산을 위해서는 연속적인 배양과 CO<sub>2</sub> 전환효율을 높이기 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

## 사 사

본 연구는 서울대학교 건설환경종합연구소의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사의 뜻을 표합니다.

KSEE

## 참고문헌

1. Madison, L. L. and Huisman, G. W., "Metabolic engineering

- of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(1), 21~53(1999).
2. Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D. and Radecka, I., "Bacterial synthesis of biodegradable Polyhydroxyalkanoates," *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 1437~1449(2007).
3. Chen, G.-Q. and Wu, Q., "The application of Polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomater.*, **26**, 6565~6578(2005).
4. Akaraonye, E., Keshavarz, T. and Roy, I., "Production of Polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 732~743(2010).
5. Kim, B. S., "Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates," *Enzyme Microbial Technol.*, **27**, 774~777(2000).
6. Ishizaki, A., Tanaka, K. and Taga, N., "Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 6~12(2001).
7. Khanna, S. and Srivastava, A. K., "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Proc. Biochem.*, **40**, 607~619(2005).
8. Ojumu, T. V., Yu, J. and Solomon, B. O., "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer," *African J. Biotechnol.*, **3**(1), 18~24(2004).
9. Ishizaki, A. and Tanaka, K., "Production of poly-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697<sup>T</sup>," *J. Fermentation Bioeng.*, **71**(4), 254~257(1991).
10. Tanaka, K. and Ishizaki, A., "Production of poly-D-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by a two-stage culture method employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697<sup>T</sup>," *J. Fermentation Bioeng.*, **77**(4), 425~427(1994).
11. Tanaka, K. and Ishizaki, A., "Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*," *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 268~275(1995).
12. Volova, T. G., Kalacheva, G. S., Gorbunova, O. V. and Zhila, N. O., "Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786," *Appl. Biochem. Microbiol.*, **40**(2), 170~177(2004).
13. Volova, T. G. and Kalacheva, G. S., "The synthesis of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate copolymers by the bacterium *Ralstonia eutropha*," *Microbiol.*, **74**(1), 54~59(2005).
14. Lim, S. H., "A Study on the purification and recovery of Poly(b-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using SDS and NaOH and biodegradability," M. S. Dissertation, Ewha Womans University, Seoul(2001).
15. Anderson, A. J. and Dawers, E. A., "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates," *Microbiol. Rev.*, **54**, 450~472(1990).
16. Pohlmann, A., "Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16," *Nature Biotechnol.*, **24**, 1257~1262(2006).
17. Reinecke, F. and Steinbuchel, A., "*Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopoly-

- mers," *J. Molecular Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 91~108(2009) .
18. Dixon, N. M. and Kell, D. B., "The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms," *J. Appl. Bacteriol.*, **67**, 109~136(1989).
19. Shang, L., Jiang, M., Ryu, C. H., Chang, H. N., Cho, S. H. and Lee, J. W., "Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO<sub>2</sub> pulse injection and autogenous CO<sub>2</sub> methods," *Biotechnol. Bioeng.*, **83**(3), 312~320(2003).