

# Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by *Bacillus* sp. EMK-5020 Using Makgeolli Lees Enzymatic Hydrolysate and Propionic Acid as Carbon Sources

Kyungjin Kwon<sup>1</sup>, Jong-Sik Kim<sup>1</sup> and Chung-Wook Chung<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>2</sup>The Institute of Basic Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received March 22, 2022 /Revised July 1, 2022 /Accepted July 11, 2022

In this study, to biosynthesize PHA with properties more similar to polypropylene, a *Bacillus* sp. EMK-5020 strain that biosynthesized poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) was isolated from soil. *Bacillus* sp. EMK-5020 strain biosynthesized PHBV containing 1.3% 3-hydroxyvalerate (3HV) using reducing sugar contained in Makgeolli lees enzymatic hydrolysate (MLEH) as a single carbon source. As the amount of propionic acid, which was added as a second carbon source, increased, the content of 3HV also increased. PHBV containing up to 48.6% of 3HV was synthesized when 1.0 g/l of propionic acid was added. Based on these results, the strain was cultured for 72 hr in a 3 l fermenter using reducing sugar in MLEH (20 g/l) and propionic acid (1 g/l) as the main and secondary carbon sources, respectively. As a result, 6.4 g/l DCW and 50 wt% of PHBV (MLEH-PHBV) containing 8.9% 3HV were biosynthesized. Through gel permeation chromatography and thermogravimetric analysis, it was confirmed that the average molecular weight and the decomposition temperature of MLEH-PHBV were 152 kDa and 273°C, respectively. In conclusion, the *Bacillus* sp. EMK-5020 strain could biosynthesize PHBV containing various 3HV fractions when MLEH and propionic acid were used as carbon sources, and PHBV-MLEH containing 8.9% 3HV was confirmed to have higher thermal stability than standard PHBV (8% 3HV).

**Key words :** *Bacillus* sp. EMK-5020, MLEH, PHBV, poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), propionic acid

## 서 론

현대사회에서 플라스틱은 가볍고 견고하며 내구성, 열안정성 등의 장점으로 일회용품, 포장, 가구, 의료 및 산업 분야에서 광범위하게 응용되고 있는 매우 중요한 재료이다[13]. 그러나 플라스틱 폐기물의 환경에 대한 축적과 그에 따른 오염문제를 줄이기 위해 플라스틱과 유사한 성질을 갖는 poly (lactide), polyhydroxyalkanoates (PHAs), poly (propiolactone), poly (ε-caprolactone), poly (ethylene succinate), poly (butylene succinate) 등 여러 biopolymer의 개발이 진행되고 있다[23]. 특히 다양한 미생물에 의해 생산되는 PHAs는 구성하는 단위체에 따라 열가소성 플라스틱, 고무탄성체, 접착성 등의 다양한 물성과 생분해성, 생체

적합성 및 해양에서 분해가 가능한 특성으로 인해 석유 기반 합성플라스틱에 대한 중요한 대안으로 고려되고 있다[8].

PHAs는 과량의 탄소원이 존재하고 다른 필수영양소가 제한되는 불균형 환경에서 미생물이 탄소원 또는 에너지원 저장을 위한 지질 내포체로 합성하는 고분자 물질이다[8]. 산업 규모로 생산되고 있는 PHAs는 *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas* sp., 재조합 *Escherichia coli* 등 Gram 음성 세균을 이용하여 생산되고 있다[28]. 인체에서 면역반응을 유도하는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 내독소를 갖고 있는 Gram 음성 미생물이 생합성하는 PHAs는 고분자 정제 과정에서 LPS가 잔류하고 있을 가능성을 배제할 수 없으며 따라서 생체, 의료적 사용에는 적합하지 않다[4]. 반면 *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp., *Bacillus* sp. 등 Gram 양성 세균들은 LPS가 존재하지 않아 인체에 사용된 후 면역반응을 유도하지 않기 때문에 의학 또는 상업적으로 중요한 biopolymer인 PHAs를 생합성하는 균주로서 이용 가능성이 높다[20].

3-hydroxybutyrate (3HB)의 중합체로 이루어진 poly (3HB) (PHB)는 현재 가장 널리 연구되고 있는 PHAs의 한 종류

### \*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5465, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : chung1409@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이나 결정성이 높고 부서지기 쉬운 성질로 인해 사용 및 응용범위에 제한적이다[20]. 따라서 PHB에 다른 단위체(monomer)인 3-hydroxyvalerate (3HV), 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxyoctanoate 등을 중합한 copolymer를 형성하여 PHB의 단점을 보완한 결정성, 녹는점, 강성, 인성과 같은 고분자의 특성이 향상된 copolymer 합성 연구가 진행되고 있다[1]. Copolymer 중 가장 잘 알려진 poly (3HB-co-3HV) (PHBV)는 PHB보다 결정성과 녹는점이 낮고 강성이 감소하여 유연성을 가지고 있어 보다 광범위하게 응용될 수 있다[1]. 이전의 연구에서 PHBV 생합성을 위한 보조탄소원 비 의존 돌연변이 *Alcaligenes* sp. [26]와 제조합 *E. coli*에 의해[25] 보조탄소원의 첨가 없이 PHBV를 생합성함을 보고하였다. 그러나 대부분의 미생물에서 PHBV를 생합성하기 위해서는 3HV의 전구체인 propionic acid, valeric acid, 또는 levulinic acid 등과 같은 보조탄소원을 배지 내에 첨가해 주어야 한다[20]. PHBV는 세포내에서 3-hydroxybutyryl-CoA와 3-hydroxyvaleryl-CoA의 단량체가 PHA polymerase에 의해 각각 3HB와 3HV 단량체가 되어 중합되며, 3-hydroxyvaleryl-CoA를 합성하기 위해서 propionyl-CoA를 생성할 수 있는 전구체의 첨가가 필요하다. 전구체는 홀수의 탄소수를 갖는 지방족 지방산(propionic acid, valeric acid, levulinic acid)이 3HV의 합성을 위한 전구체로 사용되나 이들은 독성이 강하여 세포의 성장을 억제한다는 단점이 있다[17].

PHAs는 기존 합성 플라스틱과 유사한 특성을 지니고 있는 동시에 생분해성의 특징을 갖고 있어 환경에 배출되어도 분해가 가능하며, 박테리아가 생합성하는 생체적합성 소재로서 인체에 사용되는 의료, 제약 분야에서도 주목받고 있다[10]. 이러한 장점에도 불구하고 PHAs가 기존 합성 플라스틱을 완전히 대체하지 못하는 가장 큰 이유는 석유기반 플라스틱과 비교하여 5~10배 높은 생산 비용이며, PHAs 생산을 위한 탄소원이 전체 생산비용의 약 50%를 차지하고 있다[15]. 따라서 유청[14], 감자전분[9], 사탕수수[24], 폐식용류[22] 등의 버려지는 탄소원을 이용한 PHAs 생합성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 유기 폐기물 중 하나인 막걸리 주박(Makgeolli less, ML)은 막걸리 생산공정의 부산물로서 전분의 함량이 높아[11] PHAs 생합성을 위한 탄소원으로 이용하기 적합한 것으로 보고된 바 있다[7].

막걸리는 한국의 전통 쌀 발효주이며 막걸리 양조 후 ML 찌꺼기가 나오게 된다. ML은 현재 산업폐기물로 지정되어 전량 폐기되거나 비료 및 사료로 일부 이용되고 있다[16]. ML은 탄수화물, 당, 핵산 및 유기산이 풍부하여 고부가가치 산업의 원료로 이용될 수 있으며, 현재까지 ML을 이용한 식품 첨가물, 발효 산업 및 ML의 생리활성에 대한 연구가 주를 이루고 있다[12]. ML을 고부가가치 산업의 소재로 이용하기 위하여 화장품이나 숙신산 생산

을 위한 세균의 발효 기질로서의 연구가 진행되고 있으나, ML을 PHAs 생산을 위한 탄소원으로서는 이용한 연구는 미미한 상황이다.

지난 연구에서 본 연구진은 ML을 효소가수분해하여 생성된 환원당(ML enzymatic hydrolysate, MLEH)을 기질로 사용하여 *Ralstonia eutropha* H-16 균주로부터 PHB 생합성을 위한 최적 배양 조건 확립에 관한 연구 결과를 발표하였다[7]. 본 연구에서는 PHB의 단점을 보완할 수 있는 PHBV copolymer를 생합성 하는 균주를 토양에서 분리한 뒤 MLEH와 보조탄소원을 탄소원으로 이용하여 PHBV 생합성양상 및 PHBV의 물성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주인 *Bacillus* sp. EML-5020은 안동시 송천동 신여골에서 채취한 토양 시료를 20 g/l glucose가 포함된 basal medium에서 37°C, 200 rpm으로 3일 배양한 뒤 순수분리 하였다. 균주의 보관을 위해 nutrient broth에서 24시간 배양 후 배양액 400 µl와 50% glycerol 600 µl를 섞어 -80°C에서 보관하였다. Basal medium 1 l의 조성은 다음과 같다: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.00 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.00 g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.70 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.10 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.02 g, 및 microelement solution 2 ml. Microelement solution은 ZnSO<sub>4</sub> 0.20 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.60 g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.06 g, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.40 g, CuSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.02 g, 및 NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.06 g을 distilled water (DW) 1 l에 녹여 제조하였다.

### 16S rDNA sequencing

분리 균주의 동정을 위해 *Bacillus* sp. EML-5020 균주의 염색체 DNA를 G-spin™ Total DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 분리하였다. 분리된 염색체 DNA의 증폭을 위해 T100™ Thermal Cycler PCR machine (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)와 TaKaRa Ex Taq® DNA polymerase (Takara, Shiga, Tokyo), 그리고 8F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하였다. 염기서열을 확인한 뒤 BALST search를 이용하여 균주를 동정하였다.

### ML 효소 가수분해

ML은 국순당(Hoeng seong, Korea)에서 제공받은 대박 막걸리 주박을 사용하였다. ML의 가수분해를 위해 flask에 ML과 DW를 1:1로 첨가한 뒤 3 N NaOH를 이용하여 pH 6으로 조정 후 ML g 당 20 U의 α-amylase를 첨가하여 25°C에서 200 rpm으로 shaking incubator에서 3 hr 반응시

켰다[7]. 반응이 끝난 후 3 N HCl을 이용하여 pH 4.5로 조정된 후 ML g 당 13 U의 glucoamylase를 첨가하여 55°C에서 200 rpm으로 shaking incubator에서 3 hr 반응시켰다[7]. 이후 centrifugal separator를 이용하여 1,632 g에서 10 min centrifugation 한 후 상등액을 MLEH라고 명명한 뒤 탄소원으로 이용하였다.

### Flask 배양 조건

배양배지는 YPM과 basal medium을 이용하였다. *Bacillus* sp. EML-5020을 YPM media에서 배양하여 optical density (OD) 값이 600 nm에서 0.6에 도달하였을 때 접종량이 10% (v/v)가 되도록 MLEH에 포함된 환원당(환원당<sub>MLEH</sub>, reduced sugar<sub>MLEH</sub>) 20 g/l가 포함된 100 ml의 basal medium으로 옮겼다. 모든 실험은 pH 7.0, 37°C, 200 rpm의 기본 조건으로 3회 수행하였다. 배양시간, pH, 온도, 질소농도는 *Bacillus* sp. EML-5020을 각각 12~72 hr, pH 4~ , 25~40°C, 0.0~4.0 g/l의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리한 조건에서 배양하여 확립하였다. 최적 배양 조건 확립 후 PHBV 생합성을 위한 보조탄소원의 종류 및 농도를 확인하기 위해 propionic acid, valeric acid, levulinic acid를 각각 0.4~1.0 g/l를 첨가한 뒤 배양하여 균주의 성장과 PHBV 축적을 확인하였다.

### Fermentation 조건

대량 배양 조건은 3 l jar fermentator를 사용하여 *Bacillus* sp. EML-5020을 37°C, 200 rpm, 1.5 vvm의 조건으로 20 g/l 환원당<sub>MLEH</sub>과 1 g/l의 보조탄소원 propionic acid를 첨가하여 72 hr 배양하였다. Fermentation 진행중 6 hr 간격으로 배양액 15 ml을 표집하여 10,000 g로 10분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리하였으며, 80°C 건조 오븐에서 24 hr 건조 후 건조세포중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

### ML, MLEH 성분 분석

Lane-Eynone 방법을 이용한 glucose 소비량을 측정하여 ML 및 MLEH에 포함된 환원당의 농도를 측정하였다[7]. 질소는 Kjeldahl method의 분해 방법을 통해 질소원을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 변환 후 ammonia Nessler's method를 수행하여 측정하였다[7]. ML의 수분함량은 건조 전 ML의 무게를 측정 후 ML을 105°C 건조오븐에서 24 hr 동안 건조하여 나온 ML의 무게를 측정하여 건조 전 후의 무게를 비교하여 수분함량을 측정하였다[5].

### Gas chromatography (GC) 분석

PHBV 측정은 flame ionization detector (FID)가 장착된 GC-2010 plus Capillary GC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용하였으며 column은 HP-1 (25 m × 0.2 mm × 0.5 μm)을 이용하였으며, PHBV standard는 Sigma-Aldrich (Missouri,

MO, USA)사의 PHBV (natural origin, 3HV content 8%)를 사용하였다. PHBV 조성과 수율은 GC 분석을 통해 결정하였으며, 내부 표준물질(internal standard)로 2 mg/ml의 benzoic acid를 사용하였다. GC 측정 전처리를 위하여 시료 20 mg에 GC base solution (1 l당 methanol 850 ml, 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150 ml, benzoic acid 2 g) 538 μl와 chloroform 538 μl를 첨가하여 88°C에서 18 hr 반응시켰다. 증류수 200 μl를 첨가하여 층 분리한 후 chloroform 층만 GC vial에 옮겨 GC를 측정하였다.

### PHBV 물성분석

물성분석은 thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), gel permeation chromatography (GPC)를 사용하여 진행하였으며 TGA는 TG-DTA 8122 (Rigaku Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 확인하였으며, PHBV 시료 20 mg을 질소 40 ml/min와 승온속도 10°C/min으로 900°C까지 상승시켜 무게 감량 변화를 확인하였다. DSC 분석은 DSC 200 Phox (Natzsch, Selb, Germany)를 사용하여 수행하였으며, 20 mg의 정제된 PHBV를 분석온도 10°C/min의 속도로 20~300°C까지 증가시켜 분석하였다. GPC는 detector-RI가 장착된 Refractive Index detector Alliance e2695 (Waters Inc., Milford, MA, USA)을 사용하였으며 정제된 PHBV 시료 20 mg을 유출용매 CHCl<sub>3</sub> 10 ml을 사용하여 1 ml/min의 속도로 주입시켜 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### ML과 MLEH 조성 비교

ML의 가수분해 과정은 ML 100 mg 당 2,000 U의 α-amylase와 1,300 U의 glucoamylase를 사용하여 액화와 당화의 두 단계로 진행하였다[7]. ML은 수분함량이 약 85%로 가장 많은 부분을 차지하였으며, glucose 22 g/l, total-N 41 g/l, starch 및 다양한 성분 74 g/l 등이 함유되어 있는 전분성 복합물로 분석되었다. ML에 함유된 glucose의 함량이 낮기 때문에 ML을 탄소원으로 사용하기 위해 효소를 이용하여 가수분해를 진행하였다. 가수분해 결과 glucose 용액으로 적정한 MLEH에 포함된 환원당(환원당<sub>MLEH</sub>) 함량이 103 g/l로 ML에 비해 약 5배가량 증가한 것을 확인하였으며 약 27 g/l의 total-N이 포함되어 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 환원당<sub>MLEH</sub> 함량이 103 g/l로 증가한 MLEH를 탄소원으로 사용하였다.

### 균주 분리 및 동정

PHBV를 생합성하는 균주를 분리하기 위해 안동시 송천동 신여골의 토양 시료를 채취하여 glucose 20 g/l가 포함된 basal medium에서 37°C, 200 rpm에서 3일간 배양한 결과 3HV를 함유하는 PHBV를 생합성하는 1종의 균주를

분리하였다. 분리된 균주는 보조탄소원의 첨가없이 glucose를 탄소원으로하여 48시간 배양한 결과 1.5 g/l의 DCW를 보였으며 GC분석으로 DCW의 33%를 PHBV로 축적함을 확인하였다. PHBV의 조성은 8%의 3HV를 함유하는 standard PHBV와 비교하여 3HB (retention time, RT: 5.77 min)와 3HV (RT: 7.35 min)의 peak가 동일함을 확인하였다(Fig. 1). 16S rDNA 염기서열 분석과 BLAST search를 통해 *Bacillus* species와 96%의 similarity를 확인하여 분리균주를 *Bacillus* sp. EMK-5020으로 명명하였다.

**MLEH를 탄소원으로 이용한 flask 배양 PHBV 생합성을 위한 최적 배양조건 확립**

MLEH를 탄소원으로 사용하여 *Bacillus* sp. EMK-5020의 성장 및 PHBV 생합성 양상을 평가하기 위해 20 g/l glu-

Table 1. Comparison of PHBV production by *Bacillus* sp. EMK-5020 using glucose or MLEH as a sole carbon source

Carbon	DCW (g/l)	PHBV (g/l)	PHBV (%)	PHBV composition (%)	
				3HB	3HV
Glucose	1.4	0.5	40.6	99.5	0.5
MLEH	1.7	0.1	8.9	98.5	1.3

cose와 20 g/l 환원당<sub>MLEH</sub>을 각각 단일 탄소원으로 사용하여 37°C에서 48시간 배양하였다(Table 1). 대조군인 glucose를 단일 탄소원으로 하여 배양한 결과 DCW와 0.5% 3HV를 함유하는 PHBV가 각각 1.4g/l와 40.6% (wt/wt)로 측정되었다. 반면 20 g/l 환원당<sub>MLEH</sub>을 단일 탄소원으로 사용한 배양에서 1.7 g/l DCW와 1.3% 3HV를 함유하는

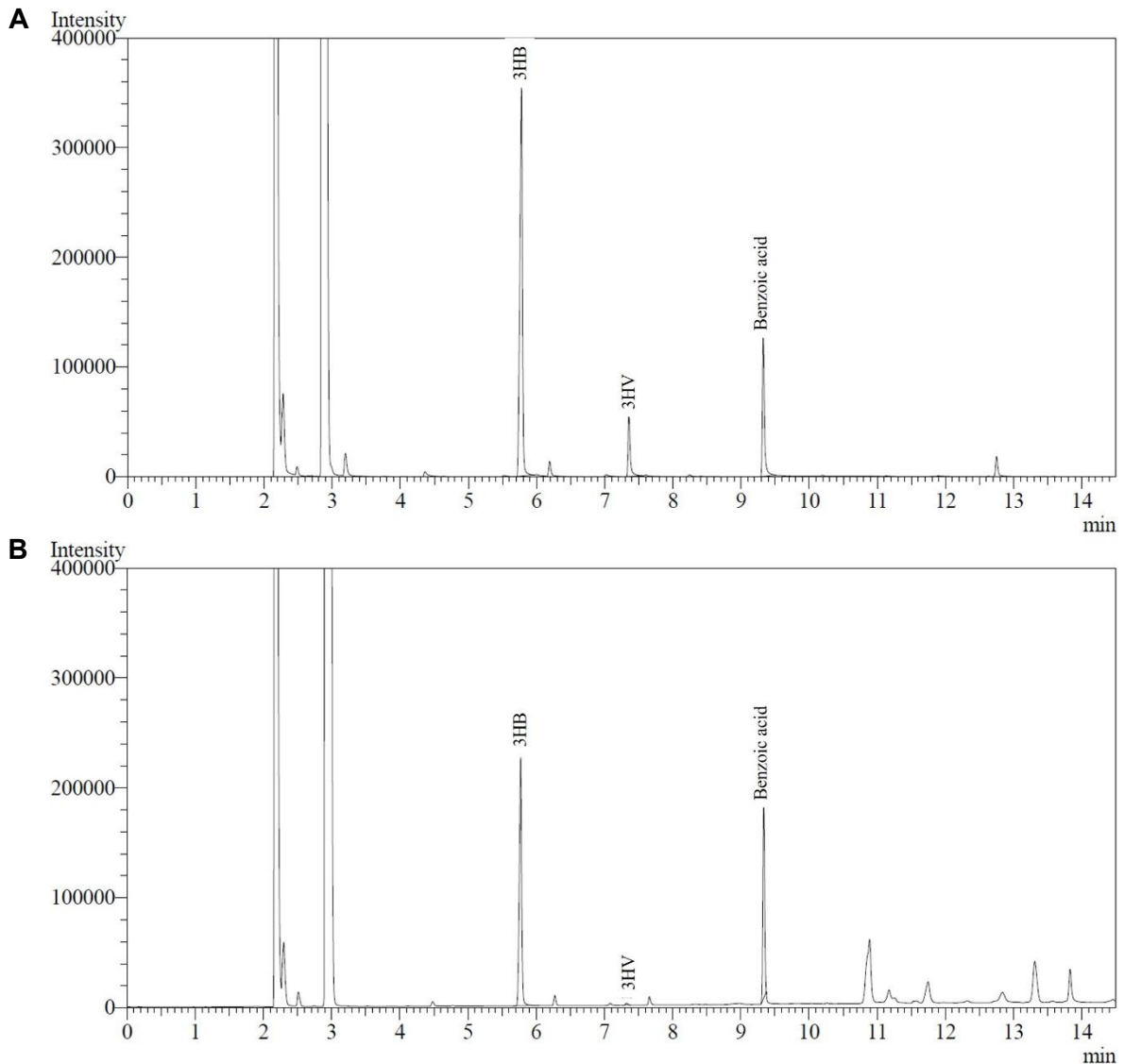


Fig. 1. GC analysis of PHBV. (A) Standard PHBV (8% 3HV) from Sigma-Aldrich, (B) PHBV produced by isolated *Bacillus* sp. EMK-5020 using 20 g/l glucose as a sole carbon source.

PHBV를 8.9% (wt/wt) 생합성 하였으며, 이는 대조군에 비해 DCW는 20% 증가하였으나 PHBV 축적이 80% 감소하는 양상을 보였다. 일반적으로 PHAs의 생합성은 배지 내 질소원의 고갈 등 불균형 성장조건에서 이루어지며 따라서 C/N ratio가 낮아질수록 PHAs 축적률이 감소하는 것으로 보고된 바 있다[6, 21]. 또한 Gang 등의 연구에 의하면 MLEH에는 glucose와 protein 등이 함유되어 있어 높은 DCW를 달성할 수 있지만 MLEH에 존재하는 protein에 의해 낮은 PHAs 축적률을 보인다고 보고된 바 있다[7]. 따라서 MLEH에 존재하는 다양한 영양소와 질소원의 영향으로 *Bacillus sp.* EMK-5020 균주의 생장은 활발히 이루어지나 PHBV 축적률이 낮아지는 결과를 보였으며, MLEH를 탄소원으로 사용하는 경우 질소원의 조절이 필요할 것으로 사료된다.

MLEH를 탄소원으로 하여 *Bacillus sp.* EMK-5020의 최적 성장 및 PHBV 생합성 조건을 확립하기 위해 질소 농도, 배양시간, pH, 온도 등 배양 조건을 변화시킨 후 DCW와 PHBV 생합성을 확인하였다(Fig. 2). MLEH에 포함된 total-N 외에 여분의 질소원이 세포의 성장과 PHBV 축적에 필수인가를 평가하기 위해 환원당<sub>MLEH</sub> 함량을 20 g/l로

고정한 뒤 질소원인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도를 0.0~4.0 g/l로 다양하게 조절하여 최적 C/N ratio (g/g)를 확인하였다. 배양 결과 배지 내 첨가한 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도가 증가할수록 DCW와 PHBV 축적률이 급격히 감소하는 양상을 보였으며 질소원을 첨가하지 않은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0 g/l에서 가장 높은 DCW인 2.5 g/l와 35% (w/w)의 PHBV 축적을 확인하였다(Fig. 2A). 이는 MLEH에 포함된 total-N이 질소원으로 사용된 것으로 사료되며 실험 결과를 바탕으로 추후 모든 연구에서 질소원을 추가하지 않는 조건으로 배양을 진행하였다.

Fig. 2B는 최적 배양시간을 평가한 것으로 36시간에서 가장 높은 2.2 g/l DCW를 확인할 수 있었으며 36시간 이후 DCW가 감소하는 것을 확인하였다. PHBV 축적률은 시간이 지날수록 증가하여 72시간에서 43% (w/w)까지 축적하였으나 PHBV 생합성량은 배양 42시간 이후 꾸준히 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 2.2 g/l의 DCW와 가장 높은 PHBV 생합성량(0.6 g/l)을 확인한 42시간을 최적 배양시간으로 확립하였다.

최적 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조정하여 *Bacillus sp.* EMK-5020 균주를 배양한 결과

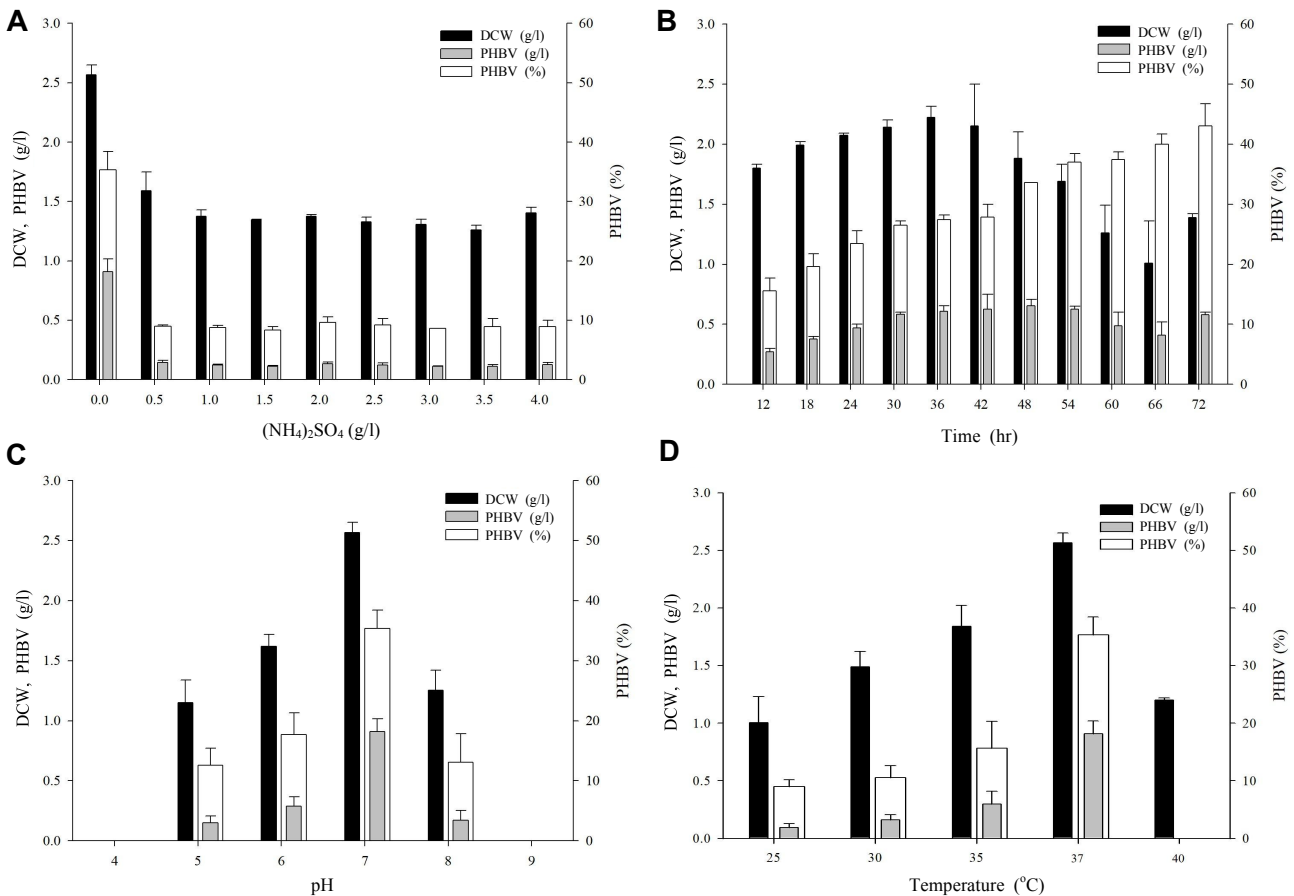


Fig. 2. Effect of different growth conditions on DCW, PHBV content, and PHBV composition in *Bacillus sp.* EMK-5020. (A) Nitrogen source concentration, (B) Incubation time, (C) pH, and (D) Temperature.

를 Fig. 2C에 나타내었다. *Bacillus* sp. EMK-5020균주는 pH 4에서 성장하지 않았으며 pH가 증가할수록 세포의 성장과 PHA 축적률이 증가하는 경향을 보였으며 pH 7에서 가장 높은 2.6 g/l의 DCW와 37% (w/w)의 PHBV 축적 및 0.96 g/l의 PHBV 생합성량을 확인하여, pH 7을 균주의 성장 및 PHBV 생합성을 위한 최적 pH로 선정하였다.

25, 30, 35, 37, 40°C의 조건에서 배양한 *Bacillus* sp. EMK-5020 균주의 DCW와 PHBV 축적률을 측정된 결과 온도가 증가할수록 DCW와 PHBV 축적률이 증가하는 것을 확인했으며 37°C에서 가장 높은 DCW (2.6 g/l)와 32% (w/w)의 PHBV 축적을 확인하였다. 40°C에서 배양한 경우 세포의 성장을 일어났으나 PHBV 축적은 확인되지 않았다. 따라서 37°C를 최적 배양 온도로 확립하였다.

**PHBV 생합성을 위한 보조탄소원**

*Bacillus* sp. EMK-5020 균주를 이용하여 3HV %가 높은 PHBV를 생합성 하기 위해 20 g/l의 환원당<sub>MLEH</sub> 및 포도당을 각각 탄소원으로 사용한 뒤 3HV의 전구체로 사용되는 보조탄소원인 propionic acid, valeric acid, levulinic acid를 첨가하여[19] 최적 배양 조건(pH 7, 37°C, 42 hr)을 바탕으로 배양하였다.

보조탄소원을 첨가하지 않고 20 g/l의 환원당<sub>MLEH</sub>을 탄소원으로하여 배양한 결과 1.58 g/l의 DCW와 약 43%의 PHBV 축적률을 보였으나 3HV (0.9%)함량이 낮은 것을 확인하였다(Table 2). Table 2에서 볼 수 있듯이 세 종류의 보조탄소원을 각각 농도별(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l)로 첨가한 경우 그렇지 않은 경우에 비해 모두 세포 생장이 증가함을 확인할 수 있었다. Valeric acid를 첨가한 경우 보조탄소원의 농도가 증가할수록 DCW와 PHBV 축적률이 감소하는 경향을 보였으며 3HV의 %는 크게 변동이 없는 것을

확인하였다. 특히 propionic acid를 보조탄소원으로 첨가한 경우 보조탄소원의 농도가 0.4 g/l에서 1.0 g/l로 증가할수록 PHBV 축적률은 약간 감소하나 높은 세포 성장을 볼 수 있었으며 3HV함량이 21.9%에서 48.6%로 증가하는 경향을 확인하였다. Levulinic acid를 농도별로 첨가한 경우, 다른 두 종류의 보조탄소원을 첨가한 경우와 비교하여 가장 낮은 세포 성장 및 3HV 함량을 보였으나 가장 높은 PHBV 축적률이 확인되었다. 따라서 *Bacillus* sp. EMK-5020 균주는 20 g/l의 환원당<sub>MLEH</sub>과 1.0 g/l의 propionic acid를 각각 주 탄소원 및 보조탄소원으로 이용하여 2.11 g/l의 DCW와 48.6%의 3HV를 포함하는 PHBV를 생합성 할 수 있었다.

대조군으로 glucose (20 g/l)를 탄소원으로 하고 3종류의 보조탄소원을 농도별로 첨가하여 동일한 조건으로 배양을 진행하였다(Table 3). 배양 결과 MLEH를 탄소원으로 사용한 경우에 비해 보조탄소원의 농도가 높아질수록 세포 생장이 현격히 감소하는 경향을 보였으며 보조탄소원을 1.0 g/l 농도로 첨가한 경우 세포 생장이 불가능함을 확인하였다. 또한 MLEH를 탄소원으로 사용하는 경우와 동일하게 보조탄소원으로 propionic acid를 첨가한 경우에서 42 hr 배양 후 3HV %가 증가하는 것을 확인하였으며 다른 보조탄소원인 valeric acid 또는 levulinic acid를 농도별로 첨가하여 배양한 경우 3HV %가 감소하거나 변동이 없는 것을 확인하였다.

앞서 언급했듯이 3-hydroxyvaleryl-CoA를 합성하기 위해서 propionyl-CoA가 필요하며 PHBV를 생합성하는 균주에 따라 propionyl-CoA가 3-ketovaleryl-CoA로 전환된 뒤 생합성경로를 따라 3-hydroxyvalerayl-CoA를 형성하거나 [3], valeric acid를 보조탄소원으로 이용하여 이를 valerayl-CoA로 변환 한 뒤 이를  $\beta$ -oxidation 경로를 통해 3-hydrox-

Table 2. Effect of secondary carbon concentration on PHBV production by *Bacillus* sp. EMK-5020 with 20 g/l reduced sugar<sub>MLEH</sub> as the main carbon source

Secondary carbon	Concentration (g/l)	DCW (g/l)	PHBV (g/l)	PHBV (%)	PHBV composition (%)	
					3HB	3HV
-	-	1.58	0.7	43.7	99.1	0.9
Valeric acid	0.4	2.08	0.9	43.7	99.7	0.3
	0.6	2.11	0.7	34.4	99.3	0.7
	0.8	1.96	0.6	31.1	99.3	0.7
	1.0	1.93	0.6	29.1	99.2	0.8
Propionic acid	0.4	2.12	0.8	39.7	78.1	21.9
	0.6	2.22	0.9	40.0	70.4	29.6
	0.8	2.01	0.6	31.9	65.7	34.3
	1.0	2.11	0.8	37.4	51.4	48.6
Levulinic acid	0.4	1.63	0.7	45.9	99.8	0.2
	0.6	1.62	0.7	44.7	99.9	0.1
	0.8	1.79	0.9	47.9	99.8	0.2
	1.0	1.85	0.8	45.9	99.8	0.2

Table 3. Effect of secondary carbon concentration on PHBV production by *Bacillus* sp. EMK-5020 with 20 g/l glucose as the main carbon source

Secondary carbon	Concentration (g/l)	DCW (g/l)	PHBV (g/l)	PHBV (%)	PHBV composition (%)	
					3HB	3HV
—	—	1.35	0.5	40.6	99.6	0.4
Valeric acid	0.4	1.75	0.5	30.8	89.0	11.0
	0.6	1.19	0.6	52.5	89.2	10.8
	0.8	0.23	0.0	16.7	90.4	9.6
	1.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
	—	—	—	—	—	—
Propionic acid	0.4	1.63	0.9	55.8	88.6	11.4
	0.6	1.18	0.5	42.8	75.9	24.1
	0.8	0.82	0.2	22.8	67.6	32.4
	1.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
	—	—	—	—	—	—
Levulinic acid	0.4	1.68	0.3	17.9	99.4	0.6
	0.6	1.11	0.4	37.0	99.5	0.5
	0.8	0.80	0.3	42.2	99.4	0.6
	1.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
	—	—	—	—	—	—

yvaleryl-CoA로 전환하는 것으로 알려져 있다[27]. *Bacillus* sp. EMK-5020는 탄소원으로 MLEH와 glucose를 각각 사용하는 경우 모두 propionic acid의 농도가 증가함에 따라 3HV %가 증가하는 것을 확인할 수 있으며 이를 통하여 *Bacillus* sp. EMK-5020가 3HV 생합성의 전구체로 propionic acid를 선호하는 것을 확인하였다. *Bacillus* sp. EMK-5020는 valeric acid를  $\beta$ -oxidation 경로를 통해 3-hydroxyvaleryl-CoA로 전환하는 과정보다 propionic acid를 propionyl-CoA로 변환하여 3-hydroxyvalerayl-CoA를 형성하는 경로를 선호하는 것으로 사료된다. 따라서 *Bacillus* sp. EMK-5020의 성장 및 3HV %가 높은 PHBV 생합성을 위해서 MLEH를 주 탄소원으로 사용하고 propionic acid를 보조탄소원으로 사용하는 것이 3HV %가 높은 PHBV 생

합성에 유리하다는 것을 확인하였다. 또한 propionic acid의 농도가 증가할수록 3HV %가 증가하는 것을 확인하였으며 propionic acid의 농도에 따라 3HV %가 조절될 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 3).

### Fermentation

대량 배양 조건을 확립하기 위하여 주 탄소원으로 20 g/l의 환원당<sub>MLEH</sub>과 보조탄소원으로 1 g/l의 propionic acid를 첨가하여 pH 7, 37°C에서 72시간 동안 fermentation을 진행하였다(Fig. 4). Fermentation이 진행됨에 따라 배지 내 환원당(glucose)이 지속적으로 소비되었으며 배양 30 hr에서 총 glucose의 87.5%가 소비되어 2.5 g/l의 glucose가 잔류하는 것을 확인하였다. 배지 내 환원당(glucose) 소비와

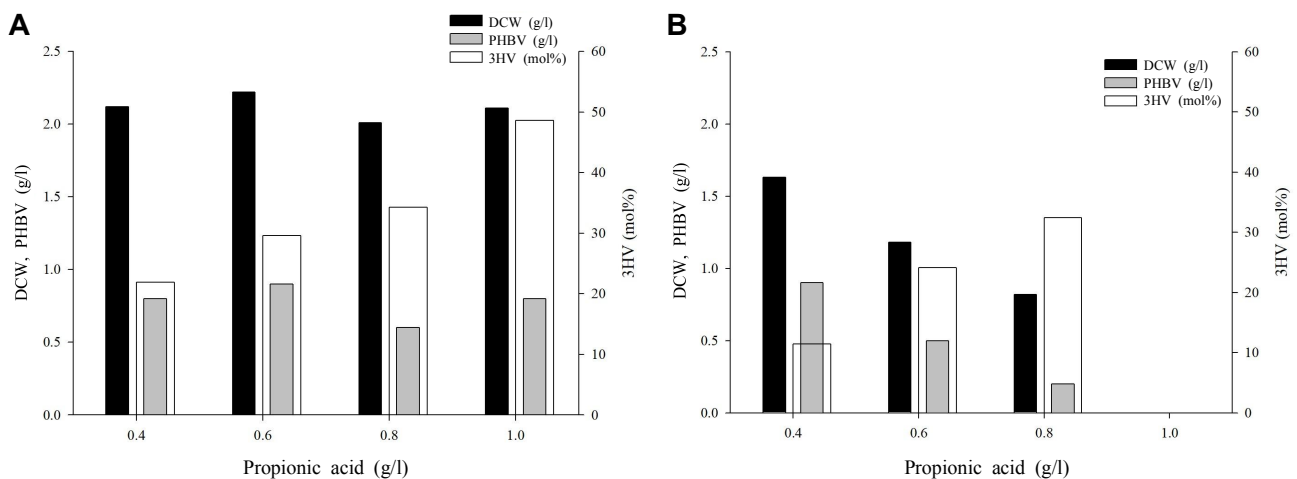


Fig. 3. Effect of the concentration of propionic acid as a secondary carbon source on cell growth (DCW), PHBV content, and PHBV composition in *Bacillus* sp. EMK-5020. The strain was incubated with (A) MLEH or (B) glucose as the main carbon source.

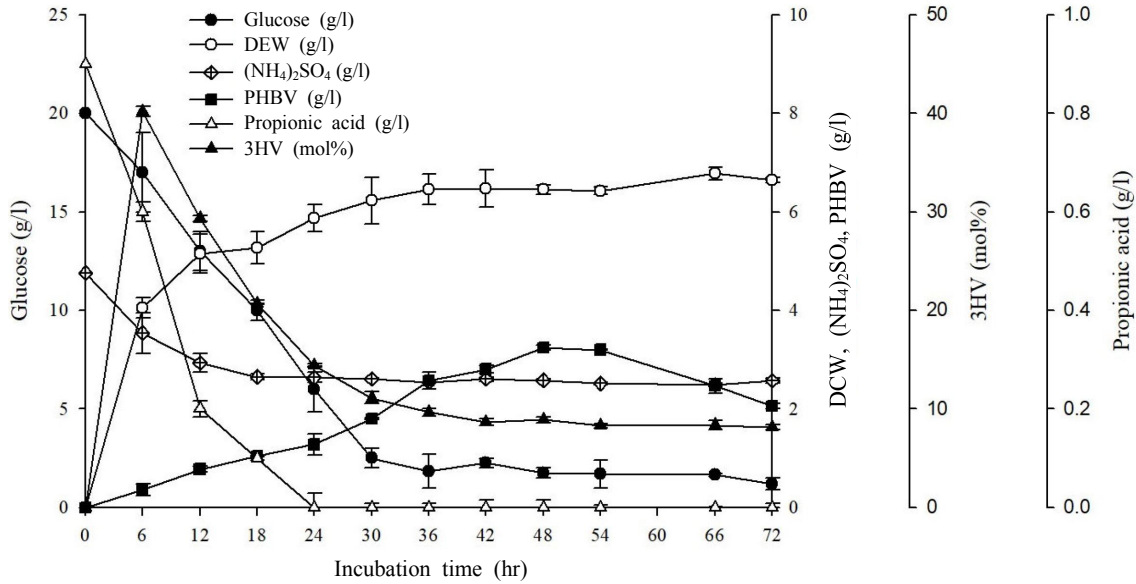


Fig. 4. Biosynthesis of PHBV by *Bacillus* sp. EML-5020 at batch fermentation. The strain was cultivated at 37°C in a 3 l jar fermenter containing 2 l of basal medium with 20 g/l reduced sugar<sub>MLEH</sub> and 1 g/l propionic acid (pH 7, 200 rpm, 1.5 vvm, and no additional N-source).

함께 세포 생장이 증가하여 배양 30 hr에서 6.25 g/l의 DCW를 확인하였으며 배양이 끝나는 72 hr에서 6.6 g/l의 DCW를 얻을 수 있었다. 질소원은 18 hr까지 급격한 소비되는 양상을 보였으며 배양 종료 후 2.6 g/l가 잔류함을 확인하였다. PHBV는 배지 내 질소원의 존재와 관계없이 배양 시작과 동시에 꾸준히 합성되어 48 hr에서 최대 50% (w/w)의 PHBV 생합성을 확인하였으며 배양 54 hr까지 유지되었으나 배양이 진행될수록 감소하여 배양이 종료되는 72 hr에서 30% (w/w)의 PHBV가 축적됨을 확인하였다. 이는 배양액 속의 탄소원이 고갈됨에 따라 생합성된 고분자를 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 것으로 사료된다. 또한 배양액 내 propionic acid 소비와 맞물려 PHBV 내 3HV 함량은 배양 6 hr까지 급격히 증가하는 양상(40%)을 보였으나 배양이 진행 될수록 배양액 내 propionic acid의 감소 경향과 비슷하게 3HV함량은 감소하는 경향을 보여 배양 36 hr 이후 8.9%의 3HV를 함유한 PHBV가 생합성됨을 확인할 수 있었다.

**PHBV 물성분석**

MLEH와 propionic acid를 각각 주 탄소원 및 보조탄소원으로 사용하여 fermentation을 통해 생합성 된 8.9% 3HV 함량을 지닌 PHBV (MLEH-PHBV)를 물성분석에 이용하

였으며 standard PHBV (natural origin, 8% 3HV)와 비교하였다.

열 분해온도(temperature decomposition, *T<sub>d</sub>*)를 확인하기 위해 TGA 분석을 시행한 결과 standard PHBV의 *T<sub>d</sub>*는 253 °C였으며 MLEH-PHBV의 *T<sub>d</sub>*는 273°C로 20°C가량 증가한 것을 확인하였다(Fig. 5). DSC 분석결과 *T<sub>g</sub>*는 측정되지 않았으며 standard PHBV의 *T<sub>m</sub>*은 148°C, *ΔH<sub>m</sub>*은 47 J/g으로 MLEH PHBV의 *T<sub>m</sub>* 156°C, *ΔH<sub>m</sub>* 58 J/g과 비교하여 MLEH-PHBV의 *T<sub>m</sub>*과 *ΔH<sub>m</sub>*가 소량 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 분자량 분석을 위해 GPC분석을 진행한 결과 (Fig. 7) standard PHBV의 number average molecular weight (*M<sub>n</sub>*)는 133,708 Da, MLEH-PHBV의 *M<sub>n</sub>*은 60,691 Da으로 절반가량 감소하는 것을 확인하였다. Weight average molecular weight (*M<sub>w</sub>*)는 standard PHBV가 314,123 Da, MLEH-PHBV가 152,613 Da으로 *M<sub>n</sub>*과 동일하게 절반 감소한 것을 확인하였다. Polydispersity index (PDI)는 standard PHBV 2.35, MLEH PHBV 2.51로 확인되었다(Fig. 7). Standard PHBV와 MLEH PHBV의 물성을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. Standard PHBV에 비해 MLEH-PHBV의 열 안정성이 20°C 더 높아 MLEH-PHBV는 열에 안정한 고분자임을 확인하였으며, Simon Bengtsson 등의 연구에 의하면 분자량의 차이가 나는 것은 PHAs 축적 속도와 관련이 있

Table 4. Characteristics of standard PHBV and MLEH-PHBV

	<i>T<sub>d</sub></i> (°C)	<i>T<sub>g</sub></i> (°C)	<i>ΔH<sub>m</sub></i> (J/g)	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	<i>M<sub>n</sub></i> (Da)	<i>M<sub>w</sub></i> (Da)	PDI
Standard PHBV (8% 3HV)	253.8	–	47	148.7	133,708	314,123	2.35
MLEH-PHBV (9% 3HV)	273.2	–	58	156.8	60,691	152,613	2.51



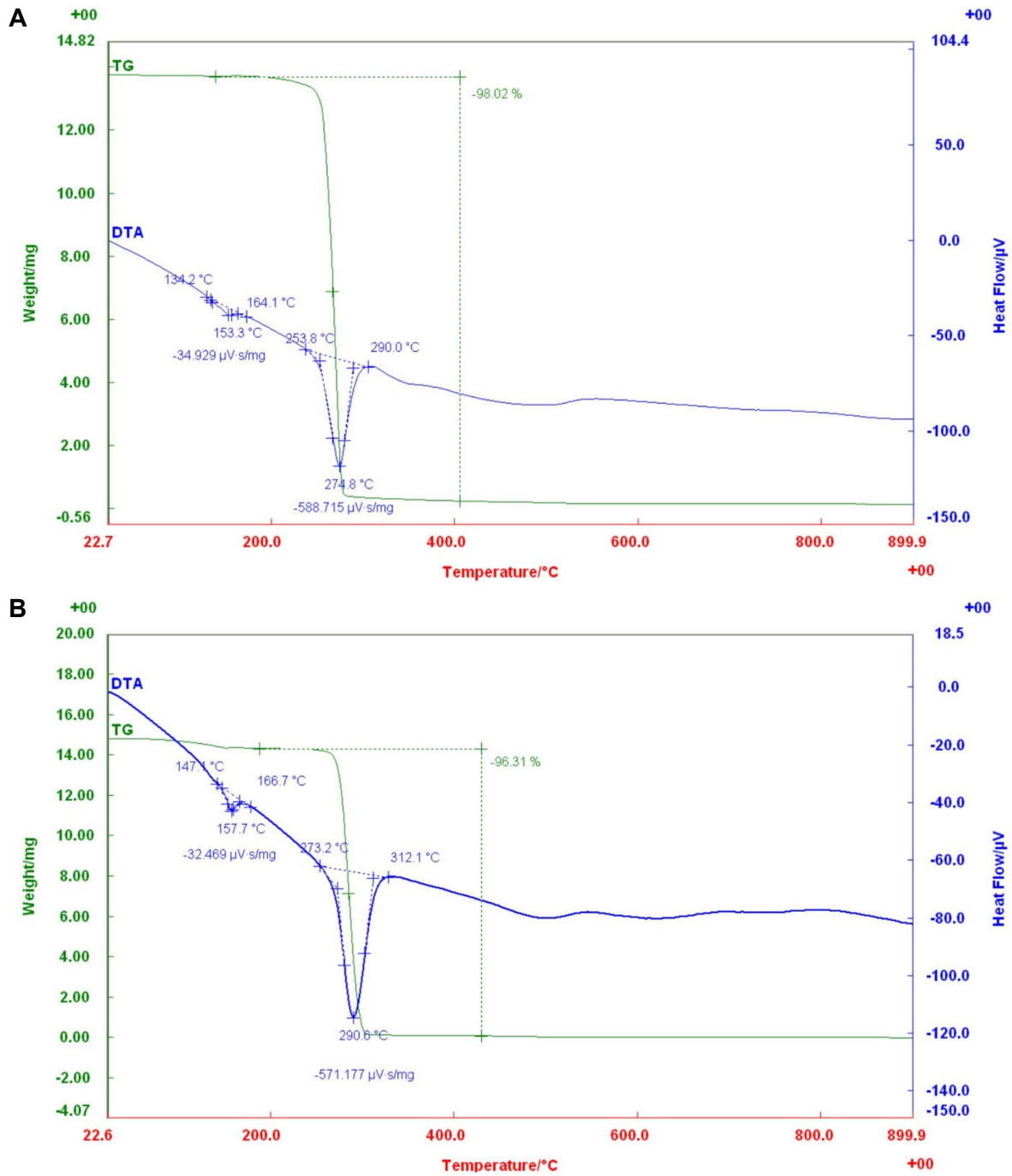


Fig. 5. TGA analysis of PHBV. (A) Original PHBV (8% 3HV) and (B) MLEH-PHBV (9% of 3HV) synthesized by *Bacillus* sp. EMK-5020 using 20 g/l reduced sugar<sub>MLEH</sub> and 1 g/l propionate as carbon sources.

으며 PHAs 축적 속도가 빠를수록 PHAs 과립의 크기가 증가하고 단량체 사슬의 길이가 길어져 높은 분자량을 가지는 PHAs가 축적되는 것으로 보고된 바 있다[2]. 또한 S. Luo 등의 연구에 의하면 PHBV의 분자량이 감소함에 따라 결정성이 증가하지만, 인장강도가 같이 증가하여 분자량 차이로 인한 PHBV 물성의 차이가 없다고 보고된 바 있다[18]. 이를 통해 *Bacillus* sp. EMK-5020 균주가 생합

성한 MLEH-PHBV는 기존의 standard PHBV에 비해 열에 안정한 특성을 지닌 고분자로 확인된다.

### 감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었습니다.

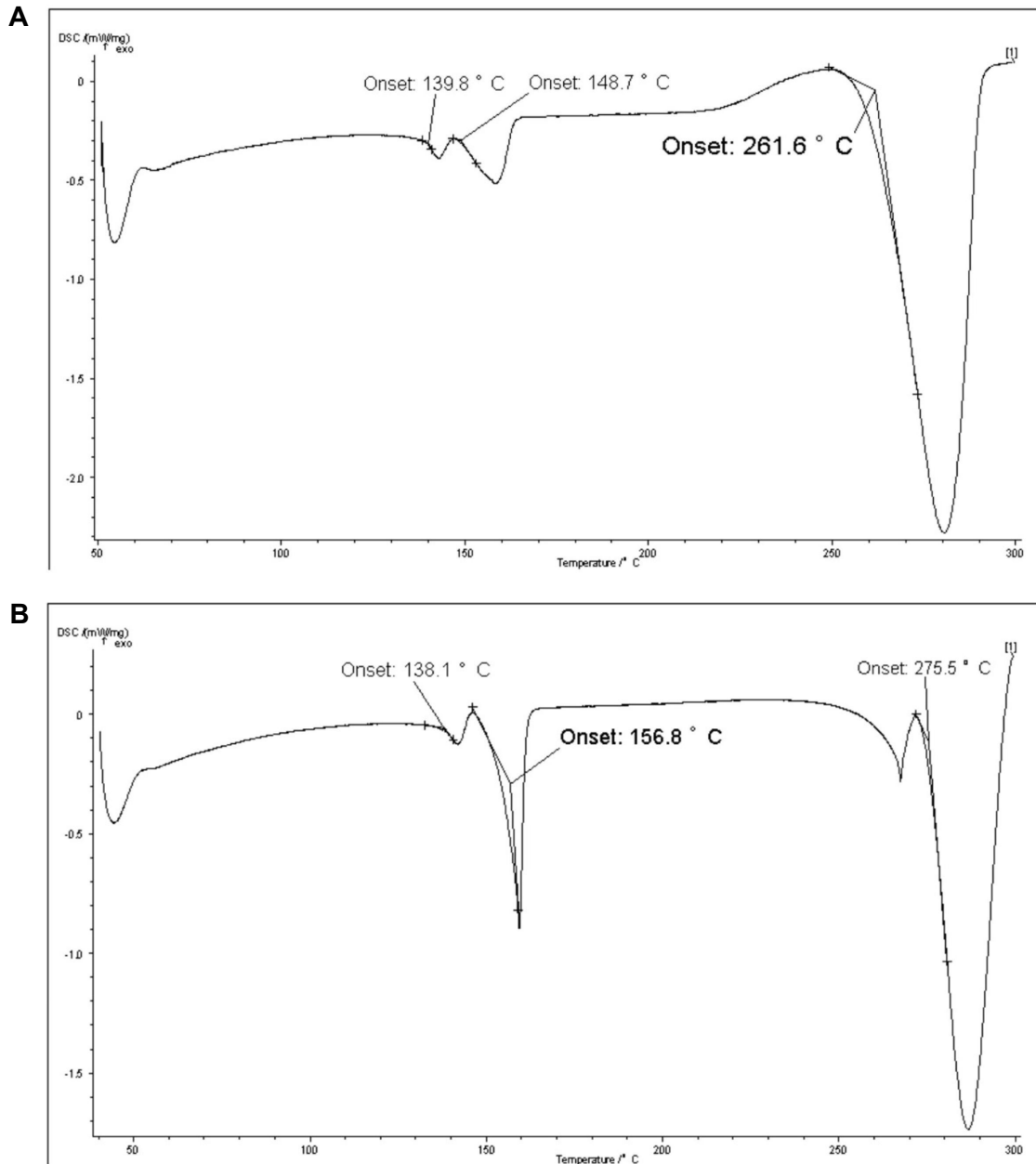


Fig. 6. DSC analysis of PHBV. (A) Original PHBV (8% 3HV) and (B) MLEH-PHBV (9% of 3HV) synthesized by *Bacillus* sp. EMK-5020 using 20 g/l reduced sugar<sub>MLEH</sub> and 1 g/l propionate as carbon sources.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

1. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N. and Tabasum, S. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 161-174.
2. Bengtsson, S., Pisco, A. R., Johansson, P., Lemos, P. C. and Reis, M. A. 2010. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *J. Biotechnol.* **147**, 172-179.
3. Catalan, A. I., Malan, A. K., Ferreira, F., Gill, P. R. and Batista, S. 2018. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate production by a *prpC* mutant of *Herbaspirillum seropedicae* Z69. *J. Biotechnol.* **286**, 36-44.
4. Chen, G. and Wu, Q. 2005. The application of polyhydrox-

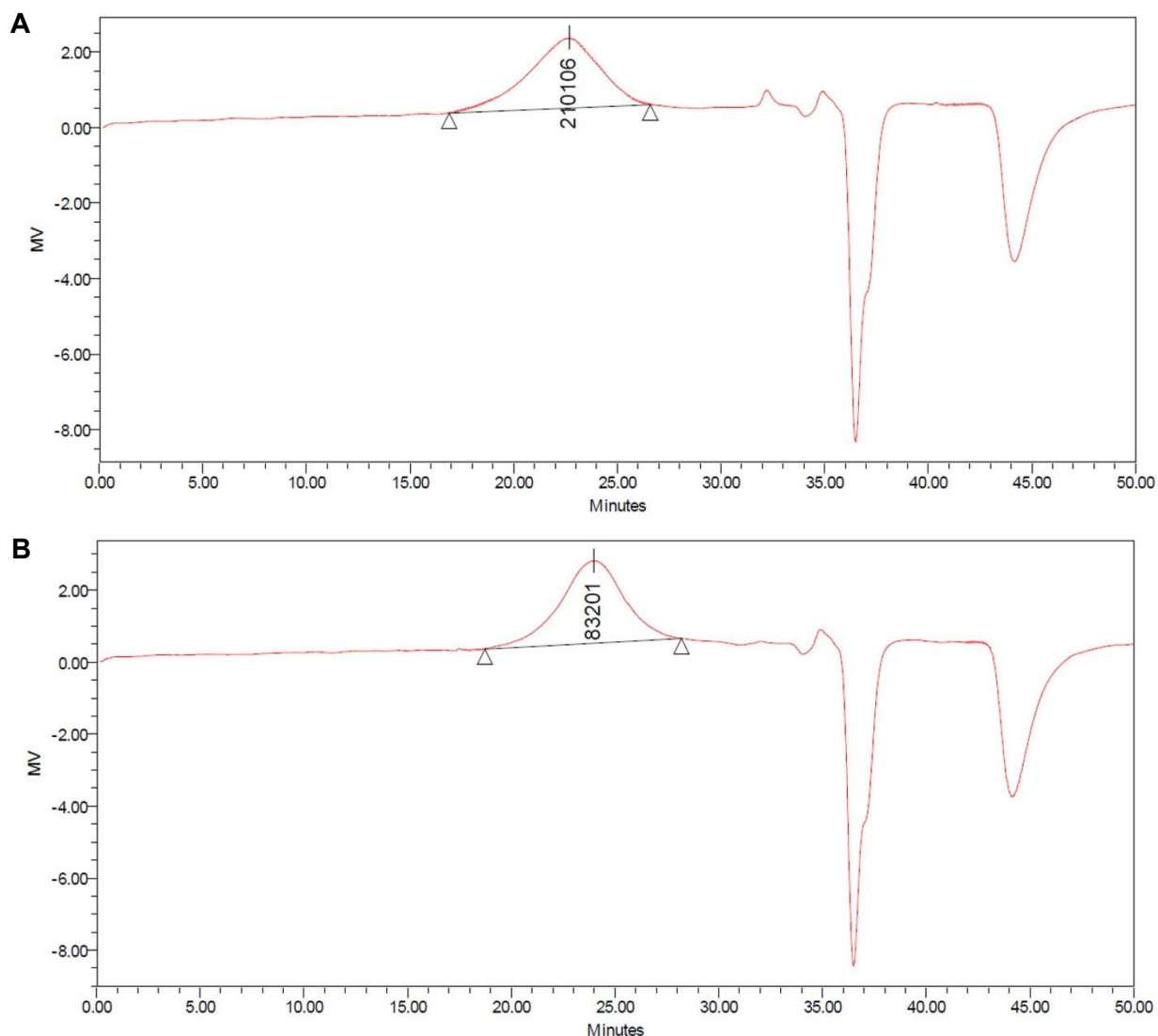


Fig. 7. GPC analysis of PHBV. (A) Original PHBV (8% 3HV) and (B) MLEH-PHBV (9% of 3HV) synthesized by *Bacillus* sp. EMK-5020 using 20 g/l reduced sugar<sub>MLEH</sub> and 1 g/l propionate as carbon sources.

- yalkanoates as tissue engineering materials. *Biomater* **26**, 6565-6578.
- Chen, K., Zhang, H., Miao, Y., Jiang, M. and Chen, J. 2010. Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Enzyme Microb. Technol.* **47**, 236-240.
  - Cui, Y., Shi, Y. and Gong, X. 2017. Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances* **7**, 18953-18961.
  - Gang, S. H., Lee, W. S., Kwon, K. J., Kim, T. K., Kim, J. S. and Chung, C. W. 2019. Production of Polyhydroxybutyrate from *Ralstonia eutropha* H-16 using Makgeolli Lees enzymatic hydrolysate. *J. Polym. Environ.* **27**, 2182-2188.
  - Gregory, D. A., Taylor, C. S., Fricker, A. T. R., Asare, E., Tetali, S. S. V., Haycock, J. W. and Roy, I. 2022. Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications. *Trends Mol. Med.* **28**, 331-342.
  - Haas, R., Jin, B. and Zepf, F. T. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 253-256.
  - Kim, H. W., Chung, C. W. and Rhee, Y. H. 2005. UV-induced graft copolymerization of monoacrylate-poly(ethylene glycol) onto poly(3-hydroxyoctanoate) to reduce protein adsorption and platelet adhesion. *Int. J. Biol. Macromol.* **35**, 47-53.
  - Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2015. Evaluation of *in-vitro* antithrombosis and anti-oxidation activity of lees of takju (Wookukseng). *J. Life Sci.* **25**, 425-432.
  - Kim, M. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2016. Application of the lees of domestic traditional wine and its useful bio-

- logical activity. *J. Life Sci.* **25**, 1072-1079.
13. Koller, M. 2019. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *The EuroBiotech J.* **3**, 32-44.
  14. Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P. and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresour. Technol.* **99**, 4854-4863.
  15. Lee, G. N. and Na, J. 2013. Future of microbial polyesters. *Microb. Cell Fact.* **12**, 54.
  16. Lee, H. S., Hong, K. H., Yoon, C. H., Kim, J. M. and Kim, S. M. 2009. Effect of Korean turbid rice wine (Takju) lees extract on blood glucose in the db/db mouse. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **24**, 219-223.
  17. Loo, C. Y. and Sudesh, K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polym. J.* **2**, 31-57.
  18. Luo, S., Grubb, D. and Netravali, A. 2002. The effect of molecular weight on the lamellar structure, thermal and mechanical properties of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerates). *Polymer* **43**, 4159-4166.
  19. Masood, F., Hasan, F., Ahmed, S. and Hameed, A. 2012. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* FA11 isolated from TNT-contaminated soil. *Ann. Microbiol.* **62**, 1377-1384.
  20. Moorkoth, D. and Nampoothiri, K. M. 2016. Production and characterization of poly (3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresour. Technol.* **201**, 253-260.
  21. Neelamegam, A., Al-Battashi, H., Al-Bahry, S. and Nal lusamy, S. 2018. Biorefinery production of poly-3-hydroxybutyrate using waste office paper hydrolysate as feedstock for microbial fermentation. *J. Biotechnol.* **265**, 25-30.
  22. Raza, Z. A., Abid, S. and Banat, I. M. 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **126**, 45-56.
  23. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S. 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* **26**, 246-265.
  24. Shasaltaneh, M. D., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S. and Fooladi, J. 2013. Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. *Iran. J. Microbiol.* **5**, 285-292.
  25. Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D. 1992. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1089-1094.
  26. Steinbüchel, A. and Pieper, U. 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 1-6.
  27. Yu, J. and Sato, L. X. L. 2009. Biopolyester synthesis and protein regulations in *Ralstonia eutropha* on levulinic acid and its derivatives from biomass refining. *J. Biobased Mater. Bio.* **3**, 113-122.
  28. Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H. and Gozan, M. 2019. Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus suaeda* B-001. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **18**, 101019.

## 초록 : 막걸리 주박 가수분해 산물과 propionic acid를 탄소원으로 이용한 *Bacillus* sp. EML-5020 균주로부터 poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 생합성

권경진<sup>1</sup> · 김종식<sup>1</sup> · 정정욱<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>국립안동대학교 생명과학과, <sup>2</sup>국립안동대학교 기초과학연구소)

Poly (3-hydroxyalkanoates) (PHA)는 탄소원과 에너지원으로서 미생물이 과립형태로 생합성하는 열가소성 플라스틱이다. PHA 중 가장 연구가 많이 된 polyhydroxybutyrate (PHB)는 높은 결정성과 부서지기 쉬운 성질로 인해 사용 및 응용범위가 제한적이다. 따라서 본 연구에서는 polypropylene과 좀 더 유사한 성질을 지닌 PHA를 생합성하고자, 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerat의 공중합체인 poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV)를 생합성하는 *Bacillus* sp. EMK-5020 균주를 토양에서 분리하였다. 플라스크로 배양한 결과, *Bacillus* sp. EMK-5020 균주는 효소를 이용한 막걸리 주박 가수분해산물(enzymatic makgeolli less hydrolysate, MLEH)에 포함된 환원당(환원당<sub>MLEH</sub>)을 단일 탄소원으로 이용하여 1.3%의 3HV가 함유된 PHBV를 생합성하였으며, 보조탄소원으로 첨가한 propionic acid의 양이 증가할수록 3HV의 함량이 증가하여 최대 48.6%의 3HV가 포함된 PHBV를 합성하였다. 이 결과를 바탕으로 환원당<sub>MLEH</sub> (20 g/l)와 propionic acid (1 g/l)를 각각 주 탄소원 및 보조탄소원으로 이용하여 3 l 발효기에서 균주를 72시간 배양한 결과 6.4 g/l DCW와 8.9% 3HV를 함유하는 PHBV (MLEH-PHBV)를 50 wt% 생합성함을 확인하였다. 겔 투과 크로마토그래피 분석을 통해 MLEH-PHBV의 평균 분자량은 152 kDa으로 standard PHBV의 평균 분자량 (314 kDa)에 비해 절반으로 감소한 것을 확인하였으며, 열중량을 분석한 결과 MLEH-PHBV의 분해 온도가 standard PHBV보다 20°C 높은 273°C임을 확인하였다. 결론적으로 본 연구에서는 *Bacillus* sp. EMK-5020 균주를 이용하여 MLEH 및 propionic acid를 탄소원으로 사용하여 다양한 3HV 분획을 함유하는 PHBV생합성할 수 있었으며, 대량배양을 통해 생합성된 8.9% 3HV를 함유한 PHBV-MLEH는 standard PHBV (8% 3HV)에 비해 높은 열 안전성을 지닌 것을 확인하였다.