

미생물에 의한 Biopolymer 생산공정기술 개발 및 응용연구(Ⅱ)

Study on Development of Biopolymer Production Process
by Microorganisms and its Application(Ⅱ)

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “미생물에 의한 Biopolymer 생산공정기술 개발 및 응용연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 7. 29.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

연구책임자 : 정윤철(환경연구센터)

연구원 : 박대원(환경연구센터)

안대회(환경연구센터)

이승연(환경연구센터)

위탁연구책임자 : 박정극(동국대학교 화학공학과)

김태진(수원대학교 화학공학과)

요 약 문

I. 제 목

미생물에 의한 Biopolymer 생산공정기술개발 및 응용연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 생명과학의 발달과 함께 구미, 일본 등지에서는 미생물에 의하여 분해되는 생분해성고분자(Biopolymer) 생산을 위하여 연구개발에 많은 인력과 비용을 투자하고 있다. 생물고분자는 생분해성, 원료로서 재생가능한 자원의 사용, 구조의 다양성 등의 장점을 가지고 있어 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. 대표적인 제품으로는 PHB, Xanthan gum, pullulan 등을 들 수 있다.

선진국에서는 생분해성의 점성이 강하고 중금속 흡착능력이 높은 생물고분자를, 폐수처리에 사용되는 기존 수처리제 대용 및 중금속 흡착제로 사용하려는 연구가 진행되고 있다. 생물고분자를 응집제로 사용할 경우에 응집력이 높을 뿐만 아니라 유출수에 잔류되는 생물고분자는 자연적인 분해로 이차공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다. 기존 수처리제를 대체할 수 있는 생분해성 고분자로는 생물응집제, 중금속 흡착제로 사용가능한 *Z. ramigera* 등에 생성되는 점성의 세포외다당류, 슬릿지의 탈수 및 중금속 흡착제로 사용될 수 있는 chitosan 및 alginate류, superabsorbent로 유망시되는 천연 polypeptide류를 들 수 있다.

본 연구의 목적은 생분해성 생물고분자 생산을 위한 국내 기반기술 확립을 위해, 특히 환경분야에서 국내개발이 요청되는 생분해성 수처리제와, 선진국의 경우 이미 생분해성 고분자로 상업화 단계에 있는 PHB(Polyhydroxybutyrate)와 히아론산 (Hyaluronic acid)의 독자적인 국내생산을 위한 생산공정기술 및 분리기술 개발에 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

연구결과의 주요내용은

- 1) 문헌조사를 통한 생분해성고분자의 기술개발 현황 조사
- 2) *Zoogloea ramigera*에 의한 생물고분자(Zooglan) 생산을 위한 배양공정 연구
- 3) 저가의 산업기질을 이용한 생물고분자 생산 연구
- 4) 생물고분자 생산의 최적화 및 반응기 설계를 위한 모델링 연구
- 5) 생물고분자의 수처리제 활용을 위한 응집 및 중금속 흡착 연구
- 6) PHB 분리정제 연구를 위한 생성실험 및 효과적인 분리정제 방법 연구
- 7) 히아론산의 생산 및 분리연구

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 생분해성 고분자 생산기술개발 및 환경분야 응용 연구를 위한 2차년도 연구로서, 1차년도의 문헌조사에 의한 생분해성 고분자의 기술개발 현황 조사와 생물응집제 생산을 위한 *Z. ramigera* 미생물 배양 및 생물고분자 생산 기초연구에 이어서, 미생물 배양 및 생물고분자 생성조건 확립, 반응기 운전, 분리정제, 최적화를 위한 동력학적 모델링 연구를 수행하였고, 개발된 수처리제의 폐수처리 응용 시험을 실시하였다.

또한 유사 점성 고분자인 PHB의 생산 및 분리정제 실험을 통하여 기존의 분리 정제 방법을 응용한 새로운 방법을 개발하여 효율을 비교하였고, 고급화장품, 의료용등으로 사용되는 히아론산의 생산량 증가를 위한 연구와 활성탄을 이용한 불순물 제거 연구를 수행하였다.

향후 생물학적 수처리제의 상품화를 위해서는 pilot 규모의 대형 생물반응기 시험에 의한 최적화 및 실제 폐수 적용 시험이 필요하며, PHB 및 히아론산 연구결과는 생분해성 고분자의 생산과 분리기술의 국산화를 위한 기술개발 기초자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Study on the development of biopolymer production process by microorganisms and its application

II. Purpose of the study

With the development of life science, the USA, European countries and Japan are investing in R/D for biopolymer production. Biopolymer can be degraded by microorganism in nature and has diversity in its structure. Therefore the use of biopolymers, PHB, Xanthan gum, pullulan, is expected to increase.

In developed countries, research is being focused on application of biopolymers to wastewater treatment as a coagulant or an adsorbent for heavy metals. When used as a coagulant, biopolymers are able to accelerate flocculation process and the remain after reaction does not cause secondary pollution problem. The biopolymers applicable to water treatment are the extracellular polysaccharide produced by *Z. ramigera*, chitosan, alginate and polypeptide found in nature. These biopolymers may be used as a superadsorbent for heavy metals.

The purpose of this study is to develop the fermentation

technique for production and separation of biopolymers, extracellular polymer produced by *Z. ramigera*, PHB and hyaluronic acid. The biopolymers are in great demand for pollution control.

III. Content and Scope of the Study

The main results of the study are about:

- 1) State of art review on biopolymer
- 2) The fermentation process to produce biopolymer (Zooglan) using *Z. ramigera*
- 3) Use of cheap carbon source to produce biopolymer using *Z. ramigera*
- 4) Optimization of biopolymer production process using *Z. ramigera* and mathematical modeling for reactor design.
- 5) Use of biopolymer as a coagulant and an adsorbent for heavy metals
- 6) Production and separation of PHB
- 7) Production and separation of hyaluronic acid

IV. Results of the study and recommendations

During the first year of this study, the state of art of biopolymer production technique was reviewed and the fermentation

technique for biopolymer production using *Z. ramigera* was developed. During the second year, the optimum culture condition for biopolymer production was investigated and fermentation process including production and separation of biopolymer was optimized using a mathematical model. Biopolymer was applied to water treatment.

Another research had been focused on production and separation of PHB. Simple, efficient separation technique was developed and compared with others. Optimum condition for hyaluronic acid production was investigated and separation technique using activated carbon as well. Hyaluronic acid is being used for cosmetic and medical purpose.

In order to apply biopolymer to water treatment, pilot test for biopolymer production is recommended. Further study is needed on process optimization and test for real wastewater. The techniques developed herein for production and separation of biopolymers, PHB and hyaluronic acid, are expected to be used as basis for further study.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	25
Chapter 2. Introduction to Biodegradable Polymer	28
I. Current status and definition	28
1. Current status of wasted plastic production	28
2. Definition of biodegradable polymer	29
3. Degradation mechanism of biodegradable polymer	30
II. Classification of degradable polymer and its development ...	33
1. Biodegradable polymer	33
2. Starch additive	34
3. Photodegradable polymer	34
4. State of art of biodegradable polymer	34
Chapter 3. Biopolymer production by Zoogloea and its application	36
I. Structure and physical properties of biopolymer	36
II. Production of biopolymer	37
1. Materials and methods	37
2. Results and discussion	42
III. Mathematical model for biopolymer production	53

1. Mathematical models of batch fermentation for biopolymer	53
2. Parameter estimation strategies	56
3. Results and discussion for batch fermentation	65
4. Results and discussion for two-stage fermentation	74
IV. Application of biopolymer to water treatment	85
1. Introduction	85
2. Flocculation experiment	87
3. Adsorption of heavy metals	100
Chapter 4. Production and separation of PHB	109
I. Introduction to PHB	109
1. Structure and physical properties	110
2. Microorganism	111
3. Fermentation technique	112
4. Application of PHB	123
5. State of art	124
II. Production of PHB	126
1. Materials and methods	127
2. Results and discussion	128
III. Separation and purification of PHB	130
1. Introduction to analytical method of PHB	130
2. Introduction to separation and purification process of PHB	132

3. Experiment for separation and purification of PHB	135
Chapter 5. Production of hyaluronic acid	143
I. Introduction	143
1. Introduction	143
2. Background	144
II. Application of hyaluronic acid	147
1. Polymers for medical purpose	147
III. State of art	149
1. Introduction	149
2. Fermentation process	150
IV. State of art review of HA for cosmetic purpose	154
V. Fermentation process of HA	157
VI. Purification of HA using activated carbon	163
1. Introduction	163
2. Experimental method	164
3. Results	165
References	168
Chapter 6. Conclusions and future plan	172
References	177
Appendix	183

목 차

제1장 서 론	25
제2장 생분해성 고분자의 개요	28
제1절 현황 및 정의	28
1. 폐플라스틱 발생현황	28
2. 생분해성 고분자의 정의	29
3. 생분해성 고분자의 분해기작	30
제2절 생분해성 고분자의 종류 및 개발 현황	33
1. 생분해성 플라스틱	33
2. 생분괴성 플라스틱	34
3. 광분해성 플라스틱	34
4. 생분해성 고분자의 개발현황	34
제3장 Zoogloea에 의한 생물고분자 생산과 응용	36
제1절 생물고분자의 구조와 물성	36
제2절 생물고분자 생산	37
1. 재료 및 방법	37
2. 실험결과 및 고찰	42
제3절 생물고분자 생산에 대한 모델링	53
1. Biopolymer 생산의 회분식 공정에 대한 모델 개요	53

2. Parameter 측정방법	56
3. 회분식 공정 모델링 결과 및 고찰	65
4. 2단계 연속공정에 대한 모델링	74
제4절 생물고분자의 수처리제 활용 실험	85
1. 개요	85
2. 응집성능 실험	87
3. 중금속 흡착실험	100
제4장 PHB 의 생산과 분리 정제	109
제1절 PHB (poly- β -hydroxybutyrate)의 개요	109
1. 구조 및 물성	110
2. 생산균주	111
3. 생산기술	112
4. PHB 의 적용분야	123
5. 개발현황	124
제2절 PHB 생성실험	126
1. 재료 및 방법	127
2. 실험결과 및 고찰	128
제3절 PHB분리 정제 방법	130
1. PHB 분석 방법의 개요	130
2. PHB 분리 정제 공정의 개요	132
3. PHB 분리 정제 실험	135
제5장 히아론산(Hyaluronic Acid) 생산 기술 연구	143

제1절 서론	143
1. 총론	143
2. 배경	144
제2절 상황 분석	147
1. 의료용 고분자 재료	147
제3절 개발 현황	149
1. 개요	149
2. 주요생산공정	150
제4절 화장품용 HA의 제조 현황	154
제5절 HA의 발효방법	157
제6절 HA의 활성탄을 이용한 정제법	163
1. 개요	163
2. 실험방법	164
3. 실험결과	165
참고문헌	168
제6장 결론 및 향후계획	172
참고문헌	177
부록	183

표 목 차

표 2-1 국내연도별 페플라스틱 발생량	29
표 3-1 Effects of C/N ratio	43
표 3-2 Results of exopolymer production in the batch culture ...	46
표 3-3 Estimation μ (growth rate) and A (colonization rate) of Equation (10) via the Gaussian Method [Equation (15)].	63
표 3-4 기질과 C/N비에 따른 model paramete value	67
표 3-5 기질이 Glucose 일 때 C/N 30에서 $Q_2 / Q_1 = 1$, $V_2 / V_1 = 1$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling 결과 ...	78
표 3-6 기질이 Glucose 일때 C/N 30에서 $Q_2 / Q_1 = 1$, $V_2 / V_1 = 3$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling 결과 ...	79
표 3-7 기질이 Glucose 일때 C/N 30에서 $Q_2 / Q = 1$, $V_2 / V_1 = 5$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling 결과 ...	80
표 3-8 기질이 glucose 일때 C/N 30에서 $Q_2 / Q_1 = 0.01$, $V_2 / V_1 = 5$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling 결과 ...	81
표 3-9 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2 / Q_1 = 0.1$, $V_2 / V_1 = 5$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling 결과 ...	82
표 3-10 기질이 Glucose 일때 C/N 60에서 $Q_2 / Q_1 = 0.1$, $V_2 / V_1 = 5$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling결과	83
표 3-11 기질이 Glucose 일때 C/N 90dptj $Q_2 / Q_1 = 0.1$,	

$V_2 / V_1=5$ 일때의 2단계 연속공정의 modeling결과	84
표 3-12 잉크페수의 성상	87
표 3-13 도금페수의 성상	90
표 3-14 중금속 처리 실험결과	91
표 3-15 Result of flocculation test	92
표 3-16 Results of cheese whey jar test	93
표 3-17 Determination of q_0 and b in Langmuir isotherm model	104
표 3-18 Determination of $\log k$ and $1/n$ in Fruendrich isotherm model	105
표 3-19 Adsorption of Cd by biopolymer immobilized into Ca- alginate beads	106
표 3-20 Adsorption of Zn by biopolymer immobilized into Ca- alginate beads.	107
표 3-21 Adsorption of Zn by biopolymer immobilized into Ca- alginate beads	107
표 3-22 Adsorption of Cu by biopolymer immobilized into Ca- alginate beads	107
표 4-1 PHB와 polypropylene의 물성비교	111
표 4-2 PHB의 생산균주와 주원료	112
표 4-3 Effect of medium component deficiency on PHB production	117
표 4-4 PHB의 적용분야 및 용도	123
표 4-5 Purification of native PHB Granules from Alcaligenes	

eutrophus	136
표 5-1 시약용으로 공급되는 HA	146
표 5-2 의료용 고분자의 개발목표 및 단계	147
표 5-3 의료용 고분자 재료의 시장 현황	148
표 5-4 Hyaluronic acid moisture lotions	155
표 5-5 Sodium hyaluronate(cosmetic Grade I)	156

그림 목차

그림 2-1 고분자재료의 미생물 분해과정	31
그림 3-1 <i>Z. ramigera</i> 115의 생성다당류의 추정구조	37
그림 3-2 Growth and exopolymer production of <i>Z. ramigera</i> 115 using glucose as substrate during batch culture in the fermentor.	45
그림 3-3 Growth and exopolymer production of <i>Z. ramigera</i> 115 using molasses as substrate during fed-batch culture ...	48
그림 3-4 Growth and exopolymer production of <i>Z. ramigera</i> 115 using molasses as substrate during two-stage continuous culture	49
그림 3-5 IR photograph of exopolymer using glucose as substrate.	51
그림 3-6 DSC photograph of exopolymer using lactose as substrate.	52
그림 3-7 기질이 glucose일때 C/N 30의 modeling결과	68
그림 3-8 기질이 glucose일때 C/N 60의 modeling 결과	69
그림 3-9 기질이 glucose일때 C/N 90의 modeling 결과	70
그림 3-10 기질이 lactose일때 C/N 30의 modeling 결과	71
그림 3-11 기질이 lactose일때 C/N 60의 modeling 결과	72
그림 3-12 기질이 cheese whey 일때 C/N 30의 modeling	

결과	73
그림 3-13 2단계 연속공정의 반응기 모사도	74
그림 3-14 응집 비교 실험	89
그림 3-15 Biopolymer의 kaolin 현탁액 응집실험(biopolymer broth:2.5mL)	95
그림 3-16 Biopolymer의 kaolin현탁액 응집실험(biopolymer broth: 5mL)	95
그림 3-17 Biopolymer의 kaolin현탁액 응집실험(biopolymer broth: 7.5mL)	96
그림 3-18 Biopolymer의 kaolin현탁액 응집실험(biopolymer broth: 10mL)	96
그림 3-19 Biopolymer의 잉크페액 응집실험(biopolymer broth:2. 5mL)	98
그림 3-20 Biopolymer의 잉크페액 응집실험(biopolymer broth: 5mL)	98
그림 3-21 Biopolymer의 잉크페액 응집실험(biopolymer broth:7. 5mL)	99
그림 3-22 Biopolymer의 잉크페액 응집실험(biopolymer broth:2. 5mL)	99
그림 3-23 바이오매스에 따른 Cd 흡착등온선	103
그림 3-24 Schematic diagram of the differential reactor.	103
그림 3-25 Schematic diagram of the differential reactor	106
그림 4-1 System for computer-aided fed-batch culture.	116

그림 4-2	수소세균 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 에 의한 P(3HB)의 발효합성.....	120
그림 4-3	균체로부터의 P(3HB)의 추출방법	121
그림 4-4	Cell로부터의 PHB 생산공정도	122
그림 4-5	Glucose를 기질로 사용했을 때 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 의 성장 및 PHB 생성	129
그림 4-6	Sequence of operations for pilot-scale production of Poly-HB(or Poly-HAK) from microbial biomass using propylene carbonate for extraction after partial cell destruction with a high pressure homogenizer	134
그림 5-1	Pharmacia의 1985년도 매출 내역	148
그림 5-2	소눈을 이용한 HA생산의 정제도	152
그림 5-3	배지중의 인산염 농도 차이에 따른 시간별 균체성장 및 HA생산	160
그림 5-4	인산염 농도 차이에 따른 시간별 균체성장 및 HA생산	162
그림 5-5	Concentration ratio as a function of time	166
그림 5-6	Removal(protein, color) and recovery (biopolymer) vs. amount of activated carbon used	167
그림 5-7	Regeneration of activated carbon by 0.1 N NaOH and water	167

제 1 장 서 론

20세기 초 막이 오른 플라스틱 산업은 수많은 우수한 기능을 가진 고분자 소재의 개발에 의해 크게 발전해 왔고 그 소비도 매년 증가 추세에 있어서 이에 따른 폐플라스틱의 발생도 증가하고 있다. 그동안 세계 각국은 플라스틱을 포함한 각종 폐기물에 의한 환경 오염문제를 해결하기 위해 매립, 소각 및 재생이라는 방법을 주로 활용해 왔다. 그러나 재생은 물론 매립과 소각을 통한 폐기물 처리로는 환경 오염 문제를 완전히 처리할 수 없었다. 최근 들어 매립지의 부족으로 소각을 주로 하고 있지만 유독가스의 배출과 타고남은 잔유물의 처리등이 문제가 되고 있다. 또한 재생을 통한 재활용의 경우도 대중의 공공교육을 꾸준히 전개하여야만 하는 어려움이 있으며, 최근 급증하는 일회용 플라스틱 제품의 사용증가로 이들 사용 플라스틱을 수집 재생하는데 인적자원과 물적자원이 재투입되어야 하는 문제가 있어 문제해결에 한계점이 있다.

세계각국에서는 플라스틱 폐기물로 인한 환경오염문제의 해결을 위해, 플라스틱에 관한 사용규제를 하고 있는데, 미국의 경우 30개 이상의 주에서 이미 그 사용을 규제하거나 검토중에 있으며, 플라스틱 식품포장에 과세를 부여하고 있다. 이탈리아에서는 이미 폐기물 수집법을 제정하여 자치구 단위로 폐기물을 통제하여 PVC 제 shopping bag의 사용규제와 생분해성 플라스틱 사용 의무화규정

등을 두고 있다. 이밖에, 서독, 스위스, 덴마크등 유럽에서도 생분해성 플라스틱 사용 의무화규정등을 두고 있다. 국내에서는 아직 환경보존 차원의 움직임이 활성화 되지 못하였으나 일회용 플라스틱제품 등을 수출해 오던 업체들은 상대국의 플라스틱 사용규제로 인한 파급효과를 체감하기 시작하여 자연환경 속에서 분해되는 고분자 소재의 개발이 필요하게 되었다.

국내의 플라스틱 원료 제조 업체들은 물론 관련 연구기관에서도 분해성 플라스틱에 관한 연구개발과 상업화 움직임을 보이고 있으며 최근 신세계 백화점에는 전분함유 polyethylene계를 수입하여 상품포장용기에 사용하기 시작했고, 고려합성(주)은 PHB 개발에 성공하여 상업화 준비를 하고 있으며, 선일 포도당(주)은 한양대 연구소와 공동으로 전분혼합성 플라스틱을 만들어 일반에 보급할 계획이다. 이밖에도 한양화학(주)은 이미 5년전에 광분해성 PE를 개발하였고, 호남석유화학(주)도 분해성 HDPE를 개발하였다.

일반적으로 미생물이나 빛에 의해 썩거나 분해되는 고분자를 “생분해성고분자”라고 하며 이는 생분해성 고분자(미생물생산 고분자와 천연 고분자로 합성-포장재, 의료용), 생분괴성 고분자(전분 함유 분해성 플라스틱-trash bag, 범용수지), 광분해성 고분자(태양광선의 자외선에 의한 분해-포장재, 농업용 필름등)로 대별된다.

분해성 고분자는 환경적합성 재료나, 새로운 타입의 가능성재로로서 커다란 가능성이 잠재해 있다. 21세기에는 우수한 물성을 가진 분해성 플라스틱이 개발되어 자연과의 조화를 지향하는 고분자재료로서 실용화가 기대된다. 또한 생분해성 고분자 물질에 관한

연구개발과 병행하여 환경보존에 관련되는 관계부처, 민간단체 및 기업체, 학계 등의 공동노력으로 우리 실정에 가장 적합한 환경기준 및 제도를 확립하여 분해성 플라스틱 사용을 꾸준히 실시해가는 것도 필요하겠다.

본 연구의 목적은 생분해성 생물고분자 생산을 위한 국내 기반기술 확립을 위해, 특히 환경분야에서 국내개발이 요청되는 생분해성 수처리제와, 선진국의 경우 이미 생분해성 고분자로 상업화 단계에 있는 PHB (Polyhydroxybutyrate)와 히아론산(Hyaluronic acid)의 독자적인 국내생산을 위한 생산공정기술 및 분리기술 개발에 있다. 즉 문헌에 의한 생분해성 고분자의 기술개발현황을 조사하고, 적합한 균주의 선택, 배양조건 실험, 반응기 운전, 분리정제, 최적화를 위한 동력학적 모델링 연구를 수행하고, 개발된 수처리제의 폐수처리 실험을 실시할 계획이다.

본 연구 결과는, 향후 선진국의 경우와 같은 국내 산학연이 공동 참여하는 이분야의 국가적인 연구개발 확대 추진시에, 특히 환경분야에서 개발에 요청되는 생분해성 수처리제 개발과 포장재 및 의료용등으로 수요증가가 예상되는 생분해성 고분자의 생산과 분리기술의 국산화를 위한 기본자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

제 2 장 생분해성 고분자의 개요

제 1 절 현황 및 정의

1. 폐플라스틱 발생현황

현재, 플라스틱은 합성수지, 합성섬유, 합성고무 등으로 세계적으로 연간 1억톤이나 화학합성되고 있다. 그런데, 생산되고 있는 합성고분자의 다수는 자연환경 속에서 분해되지 않기 때문에, 대량의 플라스틱 폐기물의 처리가 세계 각국의 사회문제가 되고 있다.

우리나라에서의 연도별 폐플라스틱 발생량은 매년 큰 폭으로 증가하고 있어, 1988년에는 569,500톤으로 국내수요량의 약 29%가 폐기되는 것으로 집계되었다.^{1),2),3)}

국내 산업폐기물 중 폐합성수지의 발생량은 1989년 269,064톤으로, 전체 산업폐기물량의 1% 정도이다. 도시폐기물중 플라스틱과 섬유류가 차지하는 분량은 무게비로 약 16.5%인 것으로 집계되었다.^{1),2)}

한편 국내 농업용 PE 필름과 PP 포대의 폐기물량은 각각 15만톤과 1만5천톤인 것으로 밝혀졌으며(농수축산 신문, 1990년 2월 12일자), 연간 국내 농약 빈병 생생량은 4,465만개인데, 이중 210만개의 PET병이 한국자원재생공사에 의해 수집될 것으로 보인다(농약공업협회, 1990).

우리나라에서도 환경 오염문제에 관심이 고조되어 자연환경

속에서 분해되는 고분자 소재의 개발이 요망되기 시작했다.

표 2-1 국내 연도별 페플라스틱 발생량

단위: 1,000톤

종류	1984	1985	1986	1987	1988
LDPE	119	133.5	148	162.6	179.6
HDPE	38.6	43.9	49.8	52.5	52.3
PP	106	114.9	116.2	117	113
PVC	81.6	84.3	99.5	127.9	146.4
PS	15.4	22.9	33.8	50.9	58.7
ABS	10.1	12.2	14.2	16.9	19.5
합 계	370.7	411.7	461.5	527.9	569.5

2. 생분해성 고분자의 정의

일반적으로 미생물이나 빛에 의해 썩거나 분해되는 고분자를 “생분해성 고분자”라고 하며 이는 생분해성 플라스틱(미생물 생산 고분자와 천연 고분자로 합성-포장재, 의료용), 생분괴성 플라스틱(전분 함유 분해성 플라스틱-trash bag, 범용수지), 광분해성 플라스틱(태양광선의 자외선에 의한 분해-포장재, 농업용 필름등)으로 대별된다.

최근 세계각국에서 활발한 연구가 개시된 생분해성 플라스틱 연구상황에 대해서 살펴보면, 연구의 대상이 되고 있는 생분해성 플라스틱을 다음 세가지로 대별할 수 있다.⁴⁾

- 1) 미생물이 만드는 고분자
- 2) 식물, 동물, 해양생물유래의 천연고분자
- 3) 합성 고분자

미생물이 만드는 고분자에는, 다당류(cellulose, pullulan, xanthangum, 등), Polyamino acid (polyglutaminacid, polylysine), Polyester 등이 있으며, 식물유래의 고분자로 amylose, cellulose 등, 동물유래의 고분자로서 chitin, chitosan 등, 해양생물 유래의 것으로 argin acid 등을 들 수 있다.

이와같은 천연고분자의 플라스틱화에 대해서도 활발한 연구가 행하여지고 있다. 이러한 생물유래의 고분자물질은 여러가지 효소에 의해서 분해되어 자연계의 미생물에 의해 쓰인다.

3. 생분해성 고분자의 분해기작

일반적으로, 고분자물질의 미생물분해는 그림 2-1에서 보인것 같은 분해과정으로 진행된다. 고분자재료의 분해는, 우선 미생물이 균체밖으로 분비하는 분해효소가 재료 표면에 흡착하여 고분자쇄의 에스테르 결합, 글리코시드 결합, 펩티드 결합 등 화학결합을 가수 분해 반응에 의해서 절단한다. 고분자 물질의 저분자량화에 의해서 재료는 붕괴되고, 생성물은 효소 분해에 의해서 monomer 단위로 일

양체 이양체의 저분자량 분해 생성물이 된다. 균체의 분비 효소에 의해서 고분자의 주쇄가 절단되어 저분자화한 과정이 일차분해 (Primary degradation)과정이라고 칭해진다.

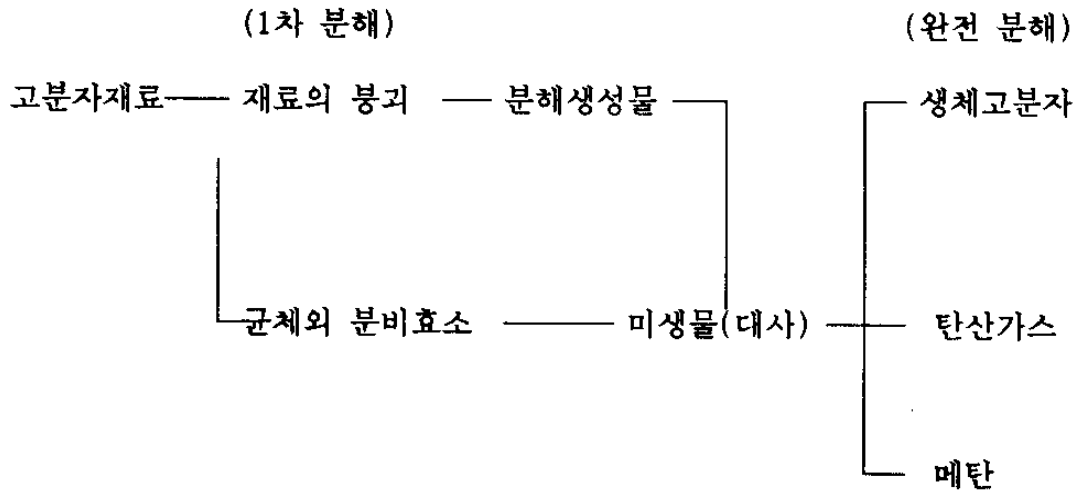


그림 2-1. 고분자재료의 미생물 분해과정¹⁾

효소의 촉매작용은 높은 기질특성을 가리킨다는 점이 큰 특징이다. 즉, 특정한 분자구조의 반응물에 대한 높은 반응성을 나타내는 특성이다. 그러므로, 고분자물질의 효소분해성을 조절할 수 있는 방법론을 만들기 위해서는 각 분해효소를 이용해서 가지각색의 고분자 구조를 가진 특성고분자의 효소분해 실험을 행하여 각 효소의 기질특이성을 정량화할 필요가 있다.

자연환경 속에서 신속히 분해되는 고분자재료의 개발을 지향하는 경우에는, 효소분해실험에 더하여, 환경하에서의 실험도 필요하다. 왜냐하면, 고분자재료의 분해속도는 효소 활성(단위 효소당의 분해속도)과 효소량과의 곱으로 결정되기 때문이다. 어떤 고분자물질이 A라는 효소에 의해서 분해 되었어도, 효소 A를 분비하는

미생물이 자연계에 보편적으로 존재하는 경우에는 환경속에서의 고분자재료의 분해는 극히 늦어진다. 그러므로, 기질 특이성과 함께 분해효소의 환경속에서의 분포를 정량적으로 파악하는것도 중요한 연구과제이다.

광분해성 플라스틱에 있어서는, 태양광의 작용으로 화학결합이 절단되어 고분자쇄가 저분자화한다. 이 과정은 생분해성 플라스틱의 1차 분해과정에 상당한다.

분해성 플라스틱이 효소와 태양에 의해서 저분자량 화합물로 분해된 후, 분해 생성물은 미생물체내에 받아들여진다. 일반적으로, 분자량이 수백 이하의 화합물로 되면 미생물의 세포내로 투과할 수 있다. 분해생성물은 미생물체내의 여러가지 대사경로를 거쳐 각종 생체고분자를 합성하기 위해서 사용되기도하고, 또는 에너지 생산을 위해서 사용되어 탄산가스(호기적환경)와 메탄(혐기적환경)으로 변환된다. 이 과정이 완전분해(Ultimate Degradation)과정이라고 칭해진다.

분해성 플라스틱에서 요구되는 가장 중요한 성질은 분해생성물이 자연환경속에서 유해물질로 되지않는 것일 것이다. 생분해성 플라스틱과 광분해성 플라스틱의 개발에서는 자연과의 조화라는 시점을 항상 염두에 둘 필요가 있다.

제 2 절 생분해성 고분자의 종류 및 개발현황

1. 생분해성 플라스틱

가. 미생물 생산 고분자

미생물이 만드는 생물고분자를 활용하여 플라스틱과 같은 기능을 갖는 물질을 만드는 것으로, 생물고분자는 PHB(poly- β -hydroxybutyrate), PHB/PHV 등의 polyalkanoates인 세포내 고분자와 pulluran, xanthan, dextran 등과 같은 세포외 고분자로 크게 나뉜다.

나. Biochemical 고분자

발효기술에 의해 자가적으로 제조된 아미노산, 당, polyester 등의 원료로 고분자합성기술로 만들어져 미생물에 의해 분해되는 고분자이다. 의료용으로 주로 이용되는 것으로 polyglycolic acid (PG), polycaprolactone (PCL), polydioxanone, polycyanoacrylates 등이 수술용 봉합사, 이식재료, drug delivery system 등에 쓰인다.

다. 천연고분자를 원료로한 고분자

이것은 미생물 또는 효소에 의해 분해되는 것으로 식물에서 유래하는 것 (cellulose, hemicellulose, pectin, lignin 및 전분)과 동물 유래의 것 (chitin질)이 있다.

2. 생분해성 플라스틱

전분과 같은 자연분해 고분자 물질을 polyethylene, polypropylene, polystyrene과 같은 플라스틱에 섞어서 만드는 것이다. PE에 적게는 6%에서 많게는 90%까지 섞는 플라스틱이 실용화되고 있는데 이는 잉여 농산물의 이용과 석유자원의 절약이라는 측면에서 기대가 크다.

3. 광분해성 플라스틱

자외선에 의해 고분자결합이 끊어지는 것으로, 금속이온계 polymer M/B 첨가형, Vinyl-ketone계 공중합물 M/B 첨가형, Ethylene-CO 공중합체 (ET-CO 형) 등이 있다.

4. 생분해성 고분자의 개발현황

세계각국에서는 플라스틱 폐기물의 오염문제의 해결을 위해, 비분해성 플라스틱에 관한 사용규제를 하고 있는데, 미국의 경우 30개 이상의 주에서 이미 그 사용을 규제하거나 검토중에 있으며, 플라스틱 식품포장에 과세를 부여하고 있다. 이탈리아에서는 이미 폐기물 수집법을 제정하여 자치구 단위로 폐기물을 통제하며 PVC 제 shopping bag의 사용규제와 생분해성 플라스틱 사용 의무화규정 등을 두고 있다. 이밖에, 서독, 스위스, 덴마크 등 유럽에서도, 국내에서는 아직 환경보존 차원의 움직임이 활성화 되지 못하였으나 일회용 플라스틱제품 등을 수출해 오던 업체들이 상대국의 비분해성 플라스틱의 사용규제를 함에 따라 이로 인한 파급효과를 체감

하고 있다.

이제 국내 플라스틱 원료 제조 업체들은 물론 관련 연구기관에서도 분해성 플라스틱에 관한 연구개발과 상업화 움직임을 보이고 있으며 최근 신세계백화점에서는 전분함유 polyethylene계를 수입하여 상품포장용기에 사용하기 시작했고, 고려합성(주)은 PHB 개발에 성공하여 상업화 준비를 하고 있으며, 선일 포도당(주)은 한양대 연구소와 공동으로 전분혼합성 플라스틱을 만들어 92년부터 일반에 보급할 계획이다.

이밖에도 한양화학(주)은 이미 5년전에 광분해성 PE를 개발하였고, 호남석유화학(주)도 분해성 HDPE를 개발하여 일본의 쓰레기주머니를 수출하는 국내가공업체에 원료공급을 해왔으나 가격경쟁상의 문제로 중단되었다고 한다. 또한, 여러사회 단체가 소비자 단체와 환경처의 강력한 요구로 '주 1회 포장 안하는 날' 제정방침이 공식화 되었다.

분해성 고분자는 환경적합성 재료나, 새로운 타입의 가능성재료로서 커다란 가능성이 잠재해 있다. 21세기에는 우수한 물성을 가진 분해성 플라스틱이 개발되어 자연과의 조화를 지향하는 고분자재료로서 실용화되는 것을 기대한다. 따라서 계속되고 있는 생분해성 고분자 물질에 관한 연구개발과 병행하여 환경보존에 관련되는 관계부처, 민간단체 및 기업체, 학계 등의 여러분야에서 공동노력하여 우리나라의 실정에 가장 적합한 미래지향적인 제도를 확립하여 꾸준히 실시해가는 것도 절실히 요구된다고 하겠다.

제 3 장 Zoogloea에 의한 생물고분자 생산과 응용

제 1 절 생물고분자의 구조와 물성

Zoogloea는 활성슬러지에 서식하는 주요 미생물로서 여러종류의 탄소, 질소원에서 다당류를 생성한다. 생성된 다당류는 세포의 응집과 중금속 흡착능력등 슬러지의 물성에 영향을 미쳐, 슬러지의 분리, 궁극적인 폐수중의 BOD 저감에 주요한 기능을 담당하고 있다(5,6,7). Friedman(1968) 등이 하수로부터 분리하여 Zoogloea ramigera로 분리하였다.⁸⁾

Z. ramigera에 의하여 생성된 고분자 물질은 아직 정확한 구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galactose pyruvate 등으로 구성되어 fibrillar cellulose 형태인 Z. ramigera 1-16-M 종류와 달리 수용성 capsule 형태의 다당류인 것으로 알려져 있다. Ikeda (1982) 등은 그림. 3-1에서와 같이 glucose, galactose, pyruvate 등이 11 : 3 : 1.5의 molar ratio로 구성되어 있는 것으로 보고하였다.⁹⁾

gum의 점도는 25°C, 0.75% 수용액에서 2,000 cP. 에 이르는 높은 점도를 나타낸다. 또한 높은 hydrodynamic volume을 가지며 분자량은 $2.5-9 \times 10^6$ 으로 Xanthan gum의 3×10^6 보다 높은 값을 갖는다. 그리고 낮은 농도(0.1-0.5%)에서 pseudoplastic 성질을 가지며, 아울러 pH, 열, 기계적 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 알려져 있다.^{10), 11), 12)}

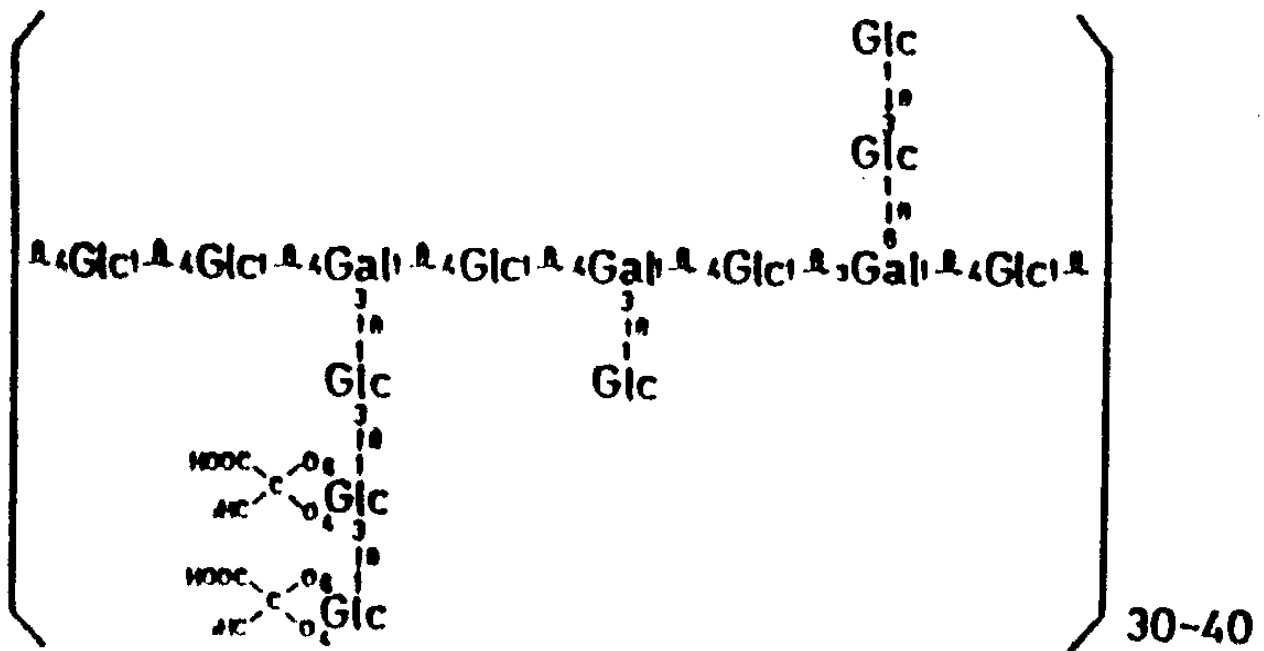


그림 3-1. *Z. ramigera* 115의 생성다당류의 추정구조⁹⁾

Zoogloea 생산 다당류는 Zooglan로 부르고 있으며, 이상의 장점으로 인하여 여러 문헌에서 응집제로서의 사용가능성을 제시하고 있다.^{11), 13), 14)} 또한 생성 flocc의 중금속 흡착능력을 이용하는 실험실적 규모의 연구도 진행되고 있다.^{6), 15), 16)}

제 2 절 생물고분자 생산

1. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 배지

대표적 flocc 생성균인 *Zoogloea ramigera* 115(ATCC 25935)를 미국 ATCC로 부터 구입 사용하였다.

균주 은행으로 부터 분양받는 *Zoogloea ramigera* 115의 보관

을 위하여는 Arginine medium(Arginine Hydrochloride 0.5 g/L, Alanine 1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, Glucose 5~25 g/L, Vitamin B₁₂ 1.5 × 10⁻⁶ g/L)을 사용하였고,¹⁷⁾ 균체 배양을 위한 기질의 조성은 다음과 같다.⁶⁾

Glucose 25 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NaNO₃ 0.5~1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, Yeast extract 0.01 g/L.

나. 회분식 발효실험

500mL 삼각 플라스크에 100mL의 배지를 넣고 Arginine medium 에서 26°C로 3일 배양한 seed 1%를 접종하여 26°C에서 150 rpm 으로 rotary shaker 에서 배양하였다. 탄소원으로 glucose, fructose, sucrose, 에탄올등을 사용하여 실험하였고, 기질농도의 영향을 조사하기 위해 glucose 량을 달리하여 실험하였다. 영양원을 달린 실험에서는 arginine medium 중 alanine, arginine과 같은 유기 영양원 대신 0.15%씩의 casamino acid, yeast extract, malt extract와 peptone등을 사용해 실험하였다. 또한 배양기질을 질소원으로 NH₄Cl, (NH₄)₂Co, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄를 사용하여 각각 비교하였으며, 초기 pH의 영향실험으로 pH를 5~10으로 변화시켜 배양실험을 하였다.

보관중인 균주중 single colony를 분리하여 접종용 배지를 넣은 250mL Erlenmyer flask에 접종하여 26°C incubator에서 72시간 배양한 후 발효조에 접종하였다.

접종량은 5%(V/V)로 접종하였으며 발효조건은 다음과 같다.

working volume : 3L, 온도 : 26°C, aeration : 1 vvm, stirring : 300-800 rpm 특히 발효가 진행되는 과정에서 점도의 증가로 인해 교반 속도는 초기 300 rpm에서 최대 800 rpm까지 증가시켰다.

기질은 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 사용하였다. 기질로 사용한 molasses는 glucose 8%, fructose 11%, sucrose 36%의 조성을 갖는 것으로 total sugar는 molasses의 55%이다. 기질로 사용한 cheese whey는 35%(w/v)의 lactose를 함유하고 있다.

다. 유가배양식 발효 실험

기질저해요인을 감소시키기 위하여 세포의 성장을 증가시킨 다음 연속적으로 기질을 공급해주는 유가식 발효방법을 사용하였다.

molasses를 기질로 한 유가배양식 실험은 먼저 회분식 발효법으로 working volume 1L, aeration 1 vvm, 온도 26°C, 교반속도 300 rpm의 반응조건에서 40시간 발효시켰다. 이때 발효액의 조성은 다음과 같다. molasses 11.35 g/L, NaNO₃ 1.01 g/L K₂HPO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L. 40시간 이후부터 molasses의 농도를 달리해 가면서, 외부로부터 발효조에 연속적으로 feeding하여 발효조의 working volume이 3.2L가 될때까지 발효를 진행시켰다. 발효시간 40시간 이후부터 공급해 준 발효액의 조성은 다음과 같다. molasses 22.7 g/L, Na K₂HPO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, 즉 세포의 생물고분자 생산을 유도하기 위해서 공급해 주는 공급액에서는 질소원을 사용하지 않았다.

라. 2단계 연속 발효실험

반응을 두 단계로 나누어 첫단계에서는 세포의 성장을 극대화시키고 다음 단계에서 질소원을 제한하여 다당류 생성을 높이는 2단계 연속발효방법을 수행하였다.

molasses를 기질로 한 2단계 연속 배양방법은 다음과 같다. growth phase용 2.5L와 production phase용 5L의 jar fermentor를 사용하여, 먼저 유가배양 방법으로 각각 working volume 1.5L, 2.5L, aeration 1vvm, temp. 26C, stirring speed 300 rpm의 반응 조건에서 53시간 발효시켰다. 이때 발효액의 조성은 다음과 같다. growth phase용, production phase용 공히 molasses 11.35 g/L, NaNO₃ 1.01 g/L K₂HPO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L 이다. 53시간 이후 연속 배양시 공급해준 발효액의 조성은 다음과 같다. growth phase용 발효조에 공급한 발효액의 조성은 다음과 같다. molasses 45.45 g/L, NaNO₃ 1.908 g/L K₂HPO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L 이고, production phase용 발효조에는 외부로부터 질소원이 제거된 공급액과 growth phase용 발효조에서의 발효액을 같이 공급해 주었다.

마. 분석방법

(1) 생성된 생물고분자 및 건조 세포 정량

생성된 생물고분자는 autoclave 방법과 ultrasonication과 high speed centrifuge 방법을 병행하여 추출하였으며 그 방법은 아래와

같다.⁶⁾

시료를 autoclave에서 10분간 steaming 한 후 시료를 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate 한다. sonicate된 시료와 증류수를 1:3의 비율로 섞은 다음 12,000g에서 40분간 원심분리하며 pellet은 제거하고 상등액만 채취한다.

채취된 상등액을 2차 centrifuge하여 pellet은 제거하고 남은 상등액만 채취하여 KCl을 함유한 propanol과 1:2의 비율로 섞은 후 4°C 냉장고에서 1시간 이상 보관한다. 응집된 물질은 55°C vaccum oven에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜서 그 값을 측정한다. 위 과정에서 생성된 pellet에 원래의 volume 만큼 증류수를 첨가한 후 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate 한다. 위 과정중 시료와 증류수를 1:3의 비율로 섞은 것에서부터 55°C vaccum oven에서 건조시키는 과정을 반복하여 생물고분자량을 특정한다.

생성된 pellet은 105°C에서 2시간 동안 desiccation 시킨 후 0.2 μ m의 pore size를 갖는 membrane filter를 사용하여 건조시킨 다음 측정된 무게를 건조 세포무게로 결정하였다.

(2) 잔류기질의 농도측정

발효중 잔류기질의 농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다.

HPLC : Varian 2510, Column : Merck, Licrosorb NH₂ (10 μ m),

Detector : Varian RI-40, flow rate : 1ml/min.

(3) 용액상의 점도측정

기초실험에서 낮은 점도의 경우 상온에서 Cannon Fenske 점도계를 이용하여 측정하였고, 발효조 실험시 Brookfield helipath stand type 점도계를 사용하였다.

2. 실험결과 및 고찰

가. 회분식 발효

탄소원으로 glucose 이외에 lactose를 사용하여 C/N비를 30에서 100까지 변화시켜 균체중식과 점도를 비교한 결과를 표 3-1에 나타내었다. C/N비가 낮을수록 균체중식도가 높게 나타나며 점도는 C/N비의 증가와 함께 높게 나타났다. 그러나 glucose와 lactose는 각각 130과 90 이상에서 균체중식에 제한을 받으면서 점도가 떨어지는 것으로 관찰되었다. 가장 높은 점도를 나타내는 것은 glucose 경우 90, lactose의 경우 60으로 나타났다. 따라서 생물고분자의, 형성에 있어서 C/N비가 중요한 요소가 된다는 것을 알 수 있었다.

Z. ramigera 115를 이용하여 생물고분자를 생산하는 방법에 있어서 기존의 보고된 자료에 의하면 C/N비가 높을 경우가 C/N비가 낮은 경우에 비하여 생물고분자 생산이 훨씬 잘 되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 또한 발효시간 150시간 되었을 때 세포벽으로부터 capsule이 release 되어 fermentation broth의 점도를 높이는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 그러나 지금까지의 연구는 C/N비가 38이하

표 3-1. Effects of C/N ratio.

C/N ratio	Glucose		Lactose	
	O.D	Viscosity(cP.)	O.D	Viscosity(cP.)
30	4.1	532	4.1	3938
60	3.6	1264	4.1	11531
90	3.1	36146	2.9	62
130	1.7	109		

의 영역에서 실험을 수행하였고, 총 발효시간도 200시간 정도 걸리는 것으로 보고되었다⁶⁾. 따라서 본 실험에서는 C/N비를 38이상으로 올렸을 경우의 생물고분자 생산추이와, 아울러 발효시간을 단축시킬 수 있는 가능성을 검토하기 위해서 기초실험을 바탕으로 C/N비를 30, 60, 90으로 높여가면서 생물고분자 생산실험을 수행하였다.

탄소원이 glucose인 경우, C/N 60의 경우는 C/N 30에 비하여 질소원이 상대적으로 부족하여 균체량은 C/N 30의 경우보다 낮았으며, 당소모 또한 C/N 30에 비하여 천천히 이루어지고, 생물고분자가 생산되는 구간에서도 계속 소모되는 것으로 보아, 당소모가 C/N 30에 비하여 세포성장 또는 세포의 maintenance에 이용되기 보다는 생물고분자 생산에 많이 이용되는 것으로 추측된다.

또한 53시간 이후부터의 점도의 급격한 증가로 보아 capsule이 세포벽으로부터 release 되는 시간도 C/N 30에 비하여 질소원이 훨씬 제한된 C/N 60의 경우가 release되는 시간도 빠른 것으로 나타났다.

C/N 90의 경우, C/N 30, C/N 60의 경우보다 질소원이 훨씬 제한되어 균체량은 낮았지만, 고분자의 생산은 C/N 30, C/N 60의 경우보다 훨씬 짧은 발효시간에서부터 시작되어 계속 활발하게 이루어지는 것으로 나타났다. 따라서 질소원이 제한됨으로 인하여 세포의 활동이 생물고분자 생산방향으로 빨리 전환되었음을 알 수 있다. glucose의 농도를 25 g/L로 하고 C/N비를 90으로 했을 경우의 실험결과는 그림 3-2에 나타내었다. 기질이 lactose의 경우는 C/N비가 30일 때, 기질의 molasses의 경우는 C/N비가 60일 때, 기질이 cheese whey인 경우는 C/N비가 60일 때, 생물고분자 생산이 가장 좋았다. 실험결과 특이한 것은 molasses나 cheese whey를 기질로 사용할 경우에는 용액상의 점도가 glucose나 lactose를 탄소원으로 사용했을 때 보다 현저히 낮아진다는 점이다. 실험결과는 표 3-2에 나타내었다.

또한, 배지의 최적화를 위하여 미량원소에 의한 생물고분자 생산에 관한 효과를 조사한 결과, 적당량의 철 이온의 첨가로 인하여 생물고분자 생산성이 향상되는 것으로 나타났다.

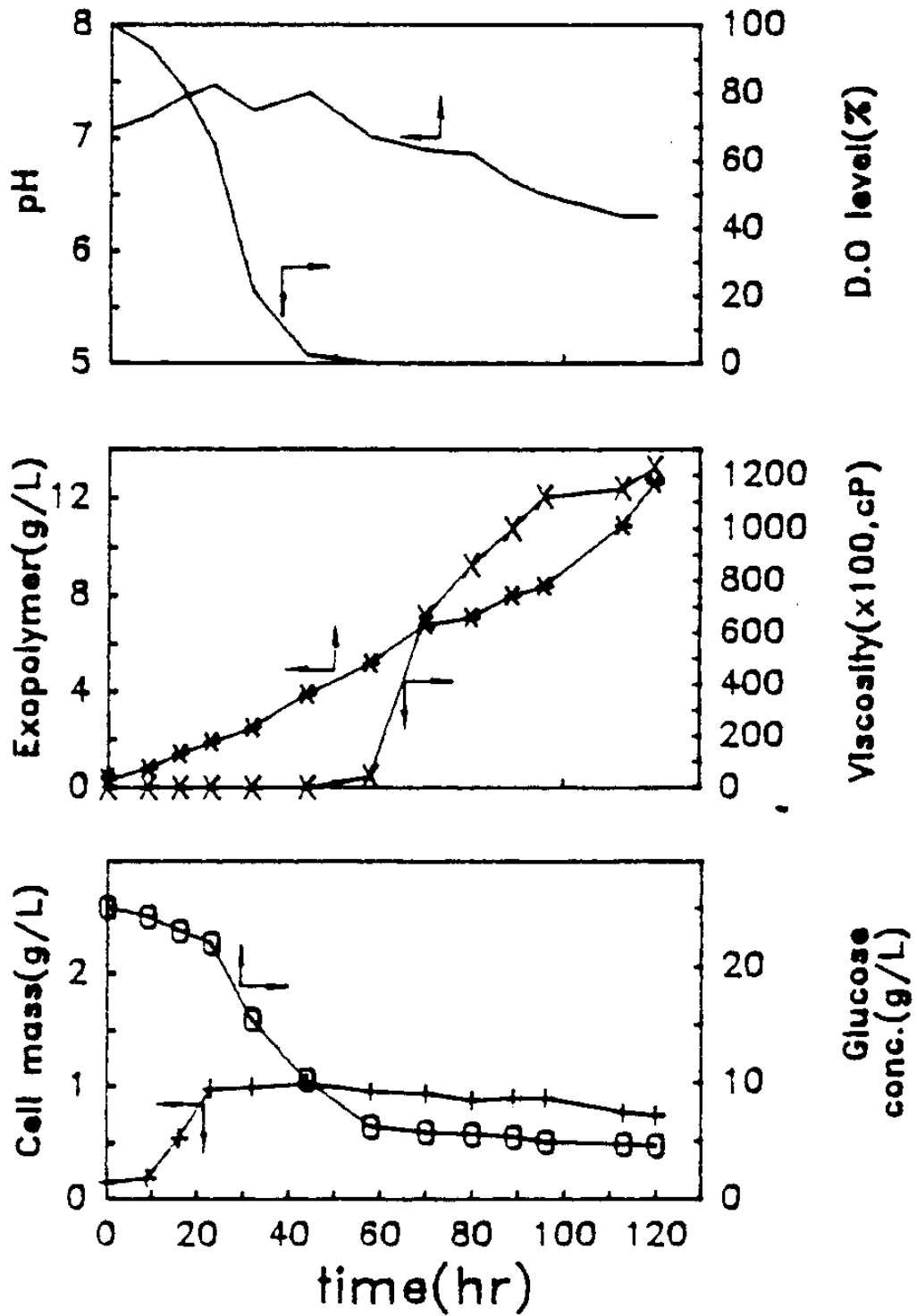


그림 3-2 Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using Glucose as substrate during batch cultuer in the fermentor.(C/N 90)

표 3-2 Reults of exopolymer production in the batch culture.

탄 소 원	철소원NaNO ₃ 의 양	C / N ratio	고분자농도 (g/ℓ)	cell농도 (g/ℓ)	apparent viscosity (cp)	Y _{p/s}	Y _{x/s}	Productivity (g/ℓ/h)	비 고
glucose (25g/ℓ)	2g/L	30	8.8	3.16	64,000	0.35	9.6	0.073	
	1g/L	60	11.4	1.53	100,000	0.46	9.3	0.095	
	0.68g/L	90	12.6	0.99	103,000	0.50	8.9	0.105	
Lactose (25g/L)	2g/L	30	10.9	3.3	129,000	0.44	10.0	0.091	
	1g/L	60	8.4	1.63	132,000	0.34	9.9	0.070	
	0.68g/L	90	4.5	0.96	14,700	0.18	8.6	0.036	
Molasses 45.5g/ℓ (total 25g/ℓ)	1.9g/L	30	7.8	1.86	6.8	0.31	5.9	0.065	
	0.95g/L	60	10.3	0.9	19.3	0.41	5.7	0.086	
	0.64g/L	90	7.2	0.66	9.1	0.29	6.3	0.060	
Cheese whey (Lactose 35g/ℓ 함유)	2.83g/L	30	11.7	2.94	34	0.33	6.4	0.098	
	1.41g/L	60	19.62	1.47	380	0.56	6.3	0.164	
	0.94g/L	90	5.6	0.85	9.1	0.16	5.5	0.047	
Molasses 22.7g/ℓ (total sugar 12.5g/ℓ)	0.5g/L	60	7.2	0.47	11.3	0.58	5.7	0.06	
	1.98g/L	60	10.0	1.31	13.3	0.20	4.0	0.083	

*: 위표중 기질이 molasses와 cheese whey의 경우는 cell농도(g/ℓ)가 protein농도(g/ℓ)를 나타내며, Y_{X/N}도 Y_{product}를 나타내는 것임.

나. 유가배양식 발효

유가배양식 발효실험결과는 그림 3-3에 나타내었다. molasses를 기질로 하여 실험한 결과, 세포성장을 돕고 기질의 저해현상을 줄인 유가식 발효 방법으로 인하여 molasses 22.7 g/L를 사용한 회분식 발효보다 생산성이 3.54배 증가됨을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 세포의 성장이 빨리 일어나도록 질소원을 많이 공급해 준 다음, 외부로부터 공급해 주는 공급액에는 질소원을 제한시킴으로써 기질이 세포의 성장보다는 고분자를 생산하는 방향으로 이용된 결과로 생각된다.

다. 2단계 연속발효

molasses를 기질로 하여 발효를 두 단계로 나누어, 첫단계에서는 세포의 성장을 극대화 시키고 다음 단계에서 질소원을 제한하여 생물고분자 생성을 높이는 2단계 연속발효 실험결과, protein의 양은 회석속도를 0.048 1/h까지 증가시켜도 회석속도에 관계없이 거의 일정한 값을 나타내었고, 회석속도가 증가함에 따라 생물고분자의 배출농도는 증가하였으며, 이로 인하여 생물고분자의 생산성은 회석속도 0.048 1/h에서 0.402 g/L로 최대였다. 전환수를 또한 회석속도 0.048 1/h에서 33.52%로 최대였다. 회석속도를 0.072 1/h로 증가시켰을 때에는 세포의 wash-out 현상이 일어나며 생산성도 감소하였다.(그림 3-4)

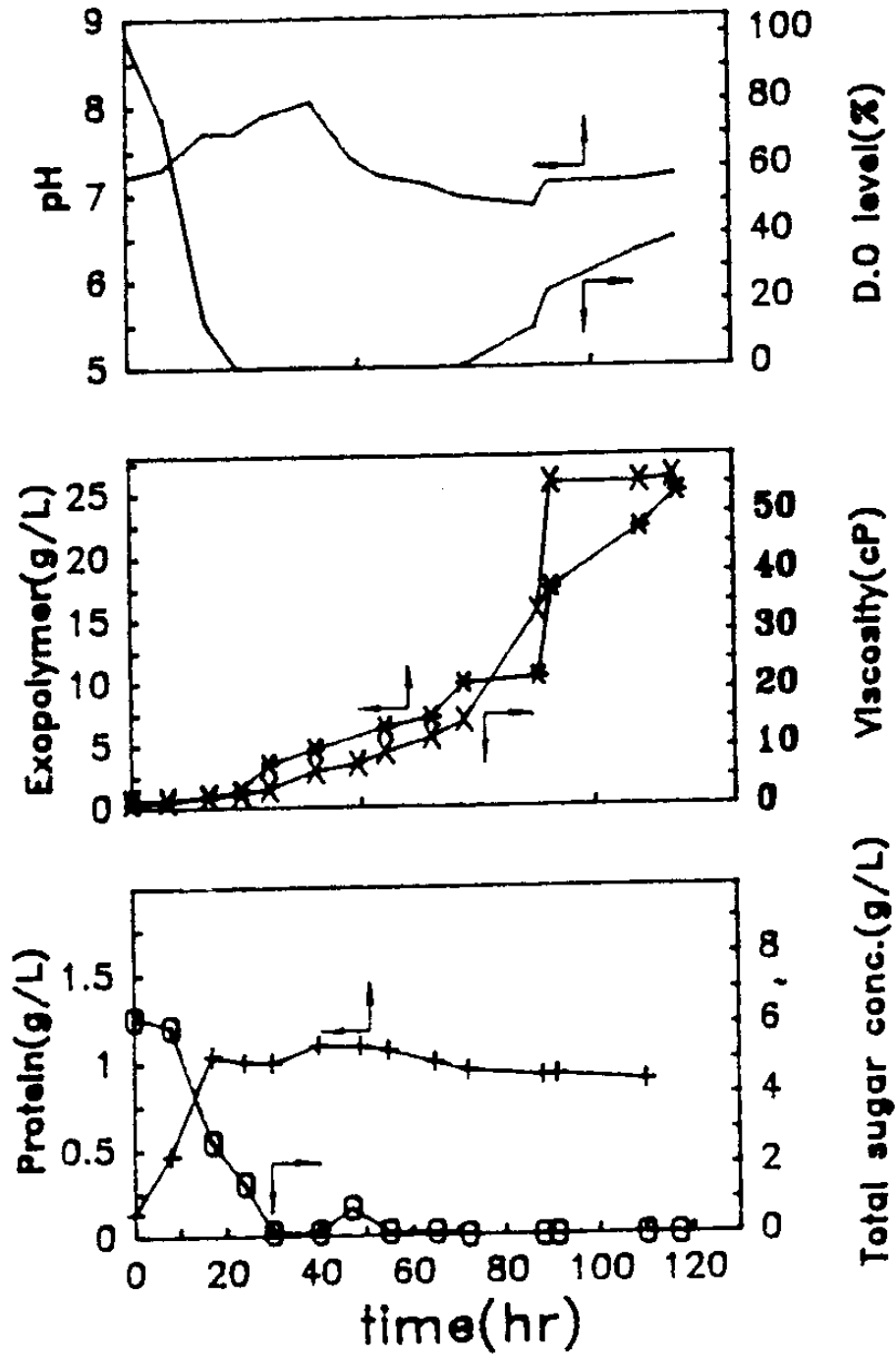


그림 3-3 Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using Glucose as substrate during fed-batch cultuer.

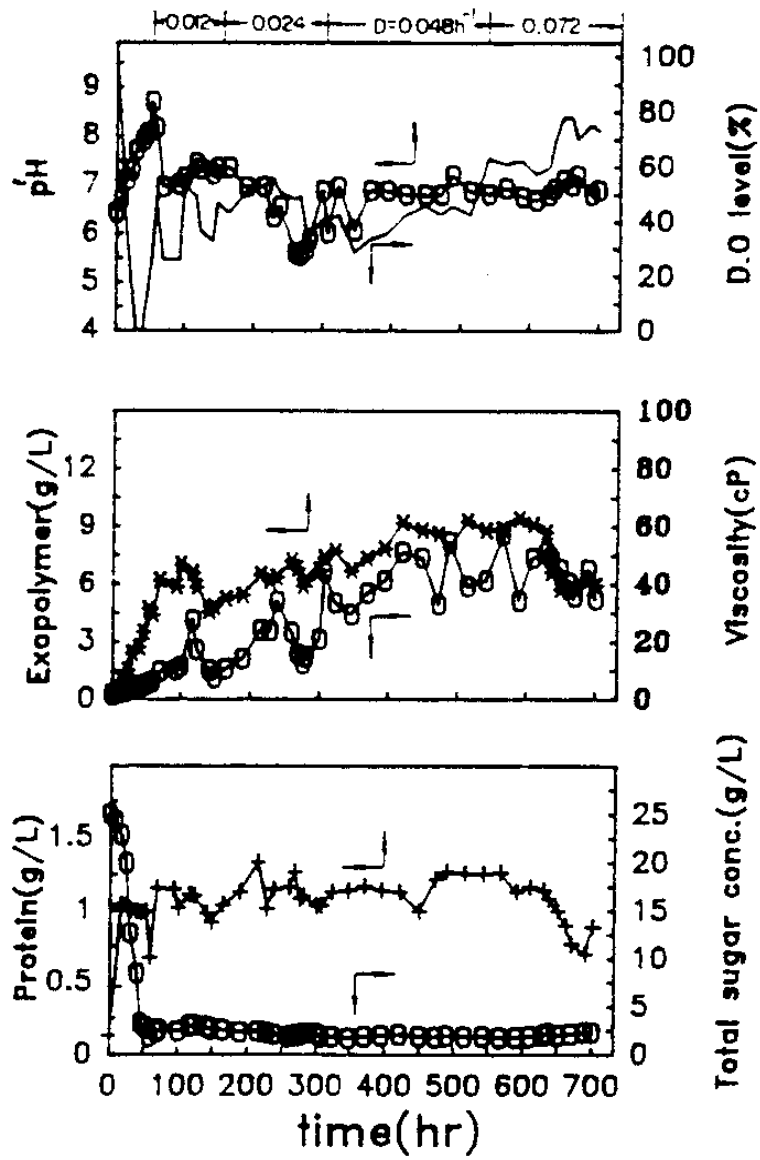


그림 3-4 Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using Glucose as substrate during two-stage cultuer.

라. 생물고분자의 분석

(1) IR 분석

glucose를 기질로 하여 생산한 생물고분자의 IR 분석 결과는 그림 3-5에 나타내었다. glucose를 기질로 하여 생산한 생물고분자와 molasses를 기질로 하여 생산한 생물고분자의 IR peak가 유사하게 나타났으며, lactose를 기질로 하여 생산한 생물고분자와 cheese whey를 기질로 하여 생산한 생물고분자가 유사한 peak를 나타내는 것으로 나타났다. 이와같은 결과는 cheese whey가 lactose를 35 g/L 함유하고 있기 때문에 lactose를 기질로 사용했을 경우와 유사한 functional group을 갖는 고분자를 생산하는 것으로 생각된다. molasses의 경우는 구성당이 glucose, fructose, sucrose 등으로 되어 있기 때문에 glucose를 기질로 사용했을 때와 유사한 생물고분자가 생산된 것으로 생각된다.

(2) DSC 분석

Lactose를 기질로 하여 생산된 생물고분자의 DSC 결과는 그림 3-6에 나타내었다. 용해는 125.88°C에서 일어나고, 220°C 이후부터 분해가 일어나는 것으로 생각된다.

Sample: 8
Size: 4.9600 mg
Method: DSC 6

File: C3.02
Operator: EBY
Run Date: 28-Sep-90 10:16

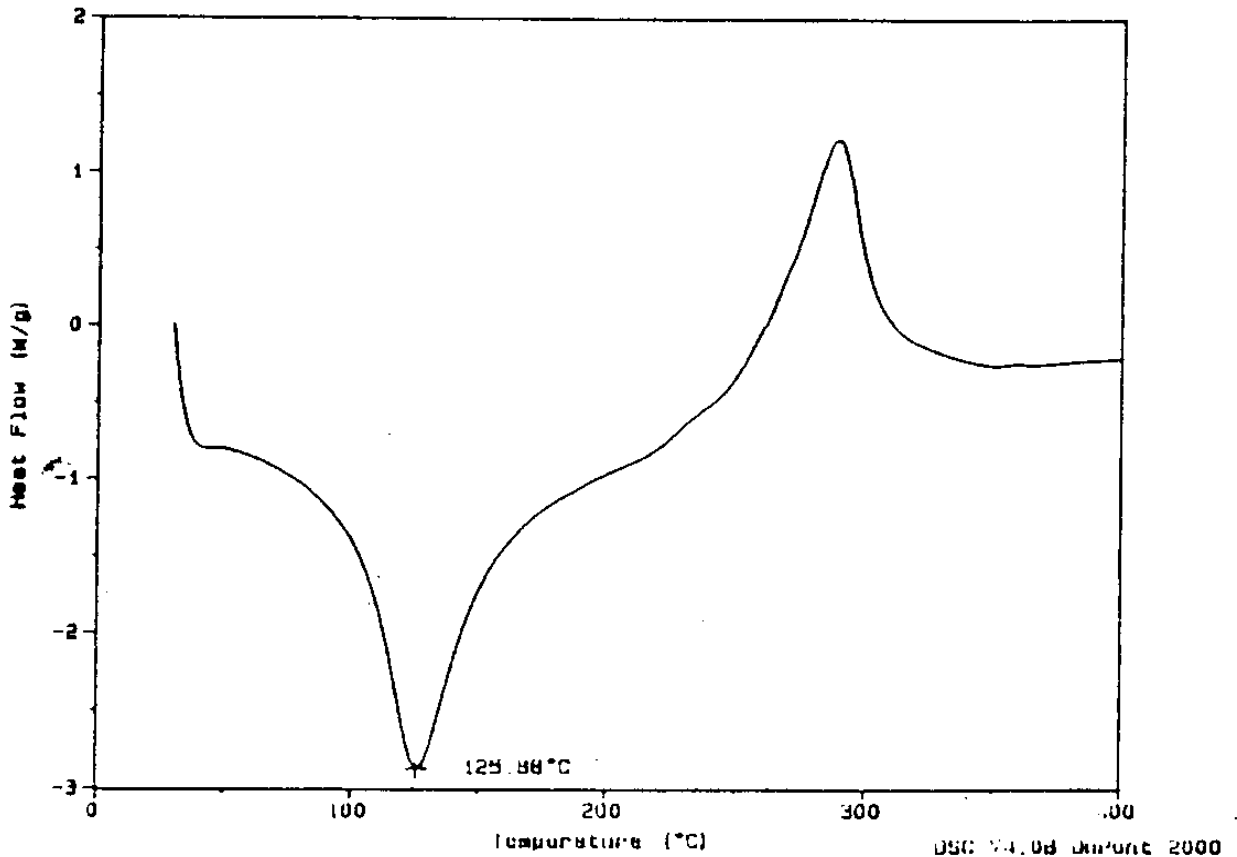


그림 3-6 DSC photograph of exopolymer using lactose as substrate.

glucose를 기질로 하여 생산한 생물고분자는 용해가 144.5°C에서 일어나고, 250°C에서 또 하나의 peak가 나타나는데, 이 peak는 oligomer나 monomer들이 녹는 것인지, 또는 고분자에 포함된 불순물에 의한 것인지 명확하지 않다. 250°C 이후로는 분해가 일어

나는 것으로 추정된다. molasses를 기질로 하여 생산한 생물고분자의 경우는 122.05°C에서 용해가 일어나고, 220°C 이후에 분해가 일어나다가 267.59°C에서 다시 용해점이 나타나는데, 이 점에서 나타나는 peak는 polymer matrix 속의 oligomer나 monomer 들이 녹는 것으로 볼 수 있고, 아니면 고분자의 purity가 문제가 되어 나타나는 peak로 추정할 수 있다. cheese whey를 기질로 하여 생산한 생물고분자는 16325°C에서 용해가 일어나고, 221.29°C에서 또 하나의 peak가 나타난 다음 그 이후 곧 바로 분해가 되는 것으로 나타났다. 이 경우는 위의 세가지 경우와 달리 연이어 나타나는 peak가 고분자의 matrix로 인해서 나타나는 것이 아닌가 추정된다.

위의 네가지 결과, 생성된 생물고분자는 혼합물 분포가 넓은 것으로 생각되어 지고, 생산되는 고분자의 구조가 약간씩 다른 것이 아닌가 추측된다.

제 3 절 생물고분자 생산에 대한 모델링

1. 생물고분자 생산의 회분식 공정에 대한 모델 개요

발효과정에서 생산되는 세포외생물고분자(exopolysaccharides)의 연구에 있어서 동력학적 연구는 중요한 부분을 차지하고 있다. 동력학적 모델은 data 분석 및 산업적인 발효공정에서 접하게 되는 여러가지 문제점을 해결하는데 중요한 단서를 제공해 준다.

생물고분자 생산 발효에 있어서의 동력학적 고찰을 위한 모

델은 기질과 균체량, 생산물 변화들의 추이를 효과적으로 예측할 수 있어야만 한다.

Zoogloea ramigera는 생물고분자를 생산하는데 있어서 세포가 성장하는 동안에는 거의 생산물을 생산하지 않다가 세포가 성장을 멈춘 후에도 잔여 기질을 소화하여 생물고분자를 생산하는 비증식 연관관계를 보여준다. 이러한 형태의 미생물의 발효특성을 모사하기 위하여 Weiss and Ollis (1980)는 logistic equation과 Luedeking-Piret equation을 사용하여 성장 및 생산 특성을 발표하였다.¹⁹⁾

가. 균체 : Logistic Equation

일반적인 속도식은 다음과 같은 logistic form으로 나타낼 수 있다.

$$\frac{dX}{dt} = X\mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \dots\dots\dots(1)$$

이 때 μ_{max} 와 X_{max} 는 각각 초기 탄소원 및 질소원의 양에 따른 최대 비성장 속도와 얻어질 수 있는 최대 세포 농도를 나타낸다.

$X_0 = X(t=0)$ 를 사용한 (1)식의 적분식은 $X(t)$ 의 sigmoidal 변화로 나타나며(eq. 2), 이 식으로서의 exponential phase와 stationary phase의 변화를 모두 나타낼 수 있다.

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\lambda t}}{1.0 - (X_0/X_{max})(1.0 - e^{\lambda t})} \dots\dots\dots(2)$$

위식에서 $\lambda = \mu_{max}$, $\tau = t$ 이다.

나. 생산물 발생 : Luedeking-Piret

Zoogloea ramigera에 의하여 생산되는 생물고분자의 생산속도와 기질의 소비속도는 다음과 같이 표시된다.

$$\frac{dP}{dt} = n X + m \frac{dX}{dt} \dots\dots\dots(3)$$

$$\frac{dC}{dt} = N X + M \frac{dX}{dt} \dots\dots\dots(4)$$

이 때, m 과 M 은 각각 생산과 소비에 대한 증식연관 parameter이고 n 과 N 은 비증식 연관 parameter이다.

위의 parameter인 (n , m , N , M)은 온도, pH 등의 발효조건에 따라서 변화하는 실험상수이다.

이 모델의 유용성은 (n , N)은 stationary phase data ($dX/dt = 0$)로 부터 구해지며, 초기 exponential phase에서의 dP/dt , dC/dt 를 결정하기 위한 (m , M)만을 결정하면 된다.

식 (2)를 이용하여 (3)식을 적분하면 두개의 초기조건 (X_0 , P_0)과 최종조건(X_{max}), 세 개의 parameter (λ , n , m)를 포함하는 식으로 나타난다.

$$P(t) = P_0 + m X_0 \left(\frac{e^{\lambda t}}{1.0 - (X_0/X_{max})(1.0 - e^{\lambda t})} - 1.0 \right) + n \frac{X_{max}}{\lambda} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1.0 - e^{\lambda t}) \right) \dots\dots\dots(5)$$

$X(t)$ 로 부터 X_0 , X_{max} , λ 값이 주어지면, P_0 와 n 은 초기조건 ($P_0=P(t=0)$)으로 부터 구할 수 있고 m 은 식 (4)로 구할 수 있다.

다. 기질 : Modified Leudeking-Piret Equation

다당류 생산 발효에 있어서 기질은 균체와 생산물로 전환되고, 또한 maintenance를 위해서도 기질이 소모되는 것으로 알려져 있다.

따라서 위의 세가지 요소를 모두 고려한 기질소비의 동력학적 모델은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} - k_e X \quad \dots\dots\dots(6)$$

(growth) (product) (maintenance)

(3)식을 사용하면 위식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_x} + \frac{m}{Y_p} \right) \frac{dX}{dt} - \left(\frac{n}{Y_p} + k_e \right) X \quad \dots\dots\dots(7)$$

$$= A \frac{dX}{dt} - B X \quad \dots\dots\dots(8)$$

2. Parameter 측정방법

가. 목적함수(Objective function)

선형, 비선형 모델을 막론하고, 특별한 모델에 있어서 data fitting시에 해결해야 할 첫번째 문제중의 하나는 목적함수를 선택하는 것이다. 선택된 목적함수는 대개의 경우, 다음과 같은 squared deviation의 합계이다.

$$RSS = \text{SUM}(Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}})^2 \dots\dots\dots(1)$$

Rss : sum of squares of the deviations

Y_{obs} : observed values of the dependent variable

Y_{pred} : predicted Y value

Y_{pred} 값은 parameter estimation을 위하여 선택된 모델을 이용하여 계산되어 지고, Y_{obs} value로 부터 얻어질 수 있는 독립변수이다. 즉 RSS는 선택된 모델을 fitting시 나타나지 않는 Y_{obs} 를 포함하는 모든 정보를 제공할 수 있다.

위의 (1)식이 최소화 시키기 위해 선택된 전형적인 목적함수의 형태를 나타내지만, 다음과 같은 또 다른 모델도 제시되고 있다.

$$RSAD = \text{SUM ABS}(Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}}) \dots\dots\dots(2)$$

RSAD : residual sum of the absolute differences

ABS : absolute value of the difference between Y_{obs} and Y_{pred}

나. 최소자승법

(1) 선형모델

선형모델에 있어서의 minimum RSS를 보장하는 parameter를 위한 명확한 함수가 이미 유도되어 있다.

(2) 비선형모델

선형모델과는 대조적으로 비선형 모델에 있어서는 parameter estimation을 위한 최상의 명확한 함수는 존재하지 않는다.

RSS를 최소화하기 위한 parameter value는 반복적으로 얻어져야 한다. 즉, 초기의 parameter estimate set는 비선형 모델의 선형화된 형태로 사용하든지 또는 guesswork를 통하여 결정되어 질 수 있다.

초기의 RSS값이 계산되어지고 새로운 parameter value들이 동일한 방법으로 계산되어 진다.

새로운 RSS가 초기의 parameter estimate로부터 식 (1)을 최소화 할 수 있는 값을 갖게 하기 위한 경로에 있어서 보편적인 방법이 있는 것은 아니다.

비선형 최소자승 문제를 풀기 위한 많은 방법들이 있는데 그 중 NPE 방법이 효과적이다.

선형모델에 있어서의 식(1)에 의해서 표현되는 curve는 포물선을 이루고, RSS의 최소값(global minimum)을 나타내는 하나의 parameter estimate 값만이 존재하게 된다. $Y=BX$ 에서 $dRSS/dB=0$ 인 B값은 오직 하나 존재하게 되는 것이다.

비선형모델에 있어서는 RSS curve를 따라 기울기가 0이 되는

많은 점들이 존재한다.

미생물학적인 관점에서 보면 이러한 모델은 global minimum에 상응하는 의미있는 parameter estimate 값이 있는 반면, local RSS minimum 들을 나타내는 실제하지 않거나 음의 값을 가지는 parameter value 들이 존재하게 된다.

다. 비선형 목적함수 모델의 최소화 방법

비선형 목적함수 모델의 최소화 방법에는 크게 Trial and Error Techniques과 Gaussian Technique을 들 수 있다. Trial and Error Techniques은 비록 비효과적이긴 하나 RSS를 최소화 하는데 있어서 가장 간단한 방법이다.

Trial and error method는 초기의 parameter estimate set를 가지고 시작하며 RSS 값이 계산된다. 다소 임의적이긴 하지만 또다른 parameter value set이 선택되고, 다음 RSS 값이 계산된다.

두번째 RSS 값이 초기의 RSS 값보다 작으면, 다음번에는 두번째 RSS parameter estimate set이 초기의 RSS parameter estimate set 을 대신하게 된다.

이 과정은 RSS 값이 “convergence criterion” (e.g. 1×10^{-8}) 값에 도달할 때까지 계속된다.

이 trial and error method는 초구나 현재의 값으로 부터 어떻게 비선형 parameter 들이 RSS 값을 감소시키는지 예측할 수 있는 일정한 규칙을 알 수가 없어 비효율적이다.

이러한 computational inefficiency 뿐만 아니라, 선택된 모델이

그의 parameter 들을 변화시키는데 얼마나 민감한지에 대한 선행지식을 필요로 하지 않는다는 점이다.

따라서 trial and error method를 적용하는데 있어서 sensitivity equation을 필요로 하지 않기 때문에, 비록 선택된 모델이 이러한 sensitivity equation을 가지고 있다 할지라도 unique parameter estimate는 결정되지 못한다.

Trial and error method와 비교해서 대부분의 NPE method는 반복적인 computational parameter estimate process에 있어서 방향(증가 또는 감소)과 변화량을 특정할 수 있다.

NPE method는 목적함수를 최소화하는 parameter value를 구하는데 있어서 최적 경로를 찾아낸다.

이러한 NPE method의 향상된 여러 방법 중에서 가장 간단한 방법은 Gaussian method이다. 게다가 Gaussian method는 광범위한 범위의 NPE 문제 해결에 이용되고 있다.

Gaussian method를 개량한 Levenberg-Marquardt method와 같은 여러가지 방법들이 있다.

Gaussian method의 수학적인 element 들은 Taylor series expansion 응용을 통하여 유도된다.

이러한 expansion은 필수적으로 비선형 RSS 함수를 선형화시킨다. One-parameter nonlinear model을 고려할 때, 초기치 b에 대한 best parameter estimate B의 Taylor series expansion은 다음과 같이 표현된다.

$$RSS(B) = RSS(b) + (B-b)dRSS(b)/db \dots\dots\dots(3)$$

RSS(B) : RSS curve as a function of B

RSS(b) : RSS curve as a function of b

dRSS(b)/db : first derivative of the RSS function with respect to the provisional estimate of B, namely b

실제적으로, 식 (3)은 truncated taylor series을 나타낸다. (3) 식은 다음과 같이 다시 쓸 수 있다.

$$Y_{obs} - Y_{pred} = C dY_{obs}/db \dots\dots\dots(4)$$

dY_{obs}/db : equals the sensitivity equation for the model parameter B, evaluated for b

C : correction term that equals the difference between B and b.

하나의 parameter 이상을 갖는 모델에 있어서는 식 (4)의 우변은 개개의 parameter에 대한 sensitivity equation과 correction term을 포함하는 것으로 개량할 수 있다.

식 (4)는 Gaussian method을 수행하는데 있어서 필요한 기초 식이다. Gaussian method의 응용의 예로써, 표 3-3에 주어진 u와 A의 초기값 estimation과 data set를 위해 Caldwell et al. (1981)에 서 제안된 surface colonization equation에서와 parameter를 estimation 하고자 한다.

이 비선형 모델은 다음과 같은 형태이다.

$$N = (A/u)e^{ut} - (A/u) \dots\dots\dots(5)$$

N : number of cells as a function of time t

u : growth rate

A : colonization rate

(5)식은 양변에 자연로그를 취하면 선형화 되지 않는 비선형 모델의 예이다. Gaussian method를 사용하여 식 (5)의 data를 fitting 하기 위해서는 parameter를 구하기 위한 sensitivity equation 이 필요하다. 즉,

$$dN/dA = (A/u)t e^{ut} + (A/u^2) (1 - e^{ut}) \dots\dots\dots(7)$$

와

$$dN/dA = (e^{ut} - 1)/u \dots\dots\dots(8)$$

이다.

만약 matrix notation을 사용하면, Gaussian method를 사용하여 A와 u를 구하는 방법은 간단해진다. 세가지의 행렬이 필요한데 그 중 하나는 sensitivity matrix (SM) 이다. SM은 행과 열의 수가 관계되는 parameter 수와 같은 square matrix이다.

$$SM = \begin{vmatrix} SM_{11} & SM_{12} \\ SM_{21} & SM_{22} \end{vmatrix} \dots\dots\dots(9)$$

$$SM_{11} : \text{SUM}[(dN/du) \times (dN/du)]$$

$$SM_{22} : \text{SUM}[(dN/dA) \times (dN/dA)]$$

$$SM_{12} : \text{SUM}[(dN/du) \times (dN/dA)]$$

$$SM_{21} = SM_{12}$$

u와 A의 초기치 결정을 위한 SM의 element 값들을 표 3-3에 나타내었다.

표 3-3. Estimation of u (growth rate) and A (colonization rate) of Equation (10) via the Gaussian Method [Equation (15)]^a

t	N _{obs}	dN/du	dN/dA	Residuals N _{obs} - N _{pred}
1	1.51	0.950287	1.1973	-0.286004
2	3.7	4.84744	2.8964	-0.644654
4	12	32.1071	8.7291	-0.093714
6	28.6	122.238	20.4748	-2.112157
8	65	374.698	44.1276	-1.191343
10	141	1025.98	91.7584	3.362349

Initial estimates : u = 0.35 and A = 1.5

Initial RSS : 18.8795

$$SM = \begin{vmatrix} 108720891 & 113475.383 \\ 11345.383 & 1209037.86 \end{vmatrix} \quad RV = \begin{vmatrix} 200,950024 \\ 2706.62009 \end{vmatrix}$$

$$CM = \begin{vmatrix} 4,509571 \times 10^3 - 4.232500 \times 10^4 & \\ -4.232500 \times 10^4 & 5.0551632 \times 10^5 \end{vmatrix} \quad RTV = \begin{vmatrix} -0.2393786 \\ 0.0247058 \end{vmatrix}$$

First update for u : 0.025 = 0.37

First update for A : 1.5 - 0.24 = 0.24 = 1.26

New RSS : 4.00

^aThe above error-containing N versus /data were generated using a Monte Carlo simulation (Harbaugh and Bonbam-(arter. 1970) for u and A values of 0.38 and 1.24. respectively.

필요한 다른 두개의 matrix는 사실상 column vector 이다. 이들 vector 들의 처음항은 sensitivity equation과 uncorrected sums of cross-products of the residuals을 포함하고 있으며, 이를 residual vector라 하면,

RV는

$$RV = \begin{pmatrix} RV_{11} \\ RV_{21} \end{pmatrix} \dots\dots\dots(10)$$

$$RV_{11} : \text{SUM}[(N_{\text{obs}} - N_{\text{pred}}) \times dN/du]$$

$$RV_{21} : \text{SUM}[(N_{\text{obs}} - N_{\text{pred}}) \times dN/du]$$

N_{obs} 와 N_{pred} 는 N 의 Y_{obs} 와 Y_{pred} 값과 각각 동일하다.

마지막으로 필요한 matrix (second column matrix)는 correction term vector(CTV)이다.

CTV는 다음과 같은 형태로 표현되어진다.

$$CTV = (SM)^{-1} \times RV \dots\dots\dots(11)$$

SM의 역행렬은

$$CM(\text{covariance matrix}) = \begin{pmatrix} CM_{11} & CM_{12} \\ CM_{21} & CM_{22} \end{pmatrix}$$

$$CM_{11} = SM_{22}/DET, \quad CM_{22} = SM_{11}/DET$$

$$CM_{12} = -SM_{12}/DET, \quad CM_{21} = CM_{12}$$

DET는 Determinant of the above 2×2 이고, 이는 $SM_{11} \times SM_{22} -$

SM^2_{12} 와 동일하다.

(11)식에 따르는 CTV는

$$CTV = \begin{vmatrix} RV_{11} \times CM_{11} + RV_{21} \times CM_{12} \\ RV_{11} \times CM_{21} + RV_{21} \times CM_{22} \end{vmatrix}$$

일단 CTV가 계산되면, 이 vector의 first element는 u에 더해지고 second element는 A에 더해져서 first iteration (표 1)을 마치게 된다.

새로이 estimate된 u와 A는 SM와 RV의 새로운 element를 계산하는데 이용되고, (11)식에 따른 CTV가 계산된다.

위의 일련의 단계들이 Gaussian recursion process의 mathematical elements를 구하는 방법이다.

3. 회분식 공정 모델링 결과 및 고찰

위와 같은 방법을 이용하여 *Zoogloea ramigera* 115의 회분식 발효에서의 결과를 이용하여 회분식 공정에 대한 모델링을 수행하였다.

탄소원을 glucose로 한 실험에 있어서의 C/N 30, 60, 90일 때의 회분식 결과를 가지고 모델링을 하였으며, lactose를 기질로 한 실험에 있어서의 C/N 30, 60일 때, cheese whey의 경우에는 C/N 30일 때의 실험결과를 이용하여 모델링을 하였다.

균체 기질, 생산량의 변화량이 모델링 항목이며, 모델링 결과

예측된 변수의 값은 표 3-4에 요약해서 나타냈고, 실측치와 예측치와의 비교는 그림 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12에 나타냈다.

표 3-4에 나타난 *Zoogloea ramigera* 115의 최대 비성장속도 (μ_m)는 0.2 hr^{-1} 로서 기질의 관계없이 거의 일정한 값을 얻었다. Stationary phase에서의 세포 단위무게당 생물고분자 생산성은 C/N 비가 높을수록 증가하고 세포 단위무게당 기질 소비속도도 함께 증가하는 것으로 나타났다.

실험장치와 예측치와 비교에서 탄소원을 glucose로 한 실험 결과의 모델링에 있어서 C/N 30, 60, 90의 경우, 균체량의 변화는 모델링 결과와 실험결과가 거의 일치하였으며, 기질의 변화량, 생산량의 변화량은 실측치와 예측치 사이에 다소 차이를 볼 수 있었다. lactose를 기질로 한 실험에 있어서의 C/N 30, 60일 때, 균체량의 변화, 생산량의 변화에 대한 실측치와 예측치는 거의 일치하였으며, C/N 30의 경우는 C/N 60의 경우에 비해서 기질의 변화 추이에 있어서 실측치와 예측치의 차이가 상대적으로 크게 나타났다. cheese whey의 경우에, C/N 30일 때의 실험치와 예측치의 결과에 있어서도 균체량의 변화는 거의 일치하였으며, 기질의 변화량, 생산량의 변화에 있어서는 다소 차이가 있었다.

이와같은 차이는 잔류기질과 생성된 생물고분자의 분리에 어려움이 있어서 분석에서의 오차발생에 기인한다고 본다.

표 3-4. 기질과 C/N비에 따른 model parameter value

	Glucose C/N 30	Glucose C/N 60	Glucose C/N 90	Molasses C/N 30	Molasses C/N 90	Lactose C/N 30	Lactose C/N 60	Cheese whey C/N 30
Biomass								
X_{max}	2.9	1.45	1.0	0.8	0.6	3.0	1.6	2.8
μ_{max}	0.193	0.11	0.2	0.2	0.2	0.26	0.2	0.2
Product								
n	0.0189	0.059	0.1	0.08	0.06	0.028	0.047	0.0267
m	0.0082	0.254	0.1	0.085	0.19	0.021	0.172	0.0178
Substrate								
A	5.6554	3.615	7.906	2.694	5.84	3.943	4.735	5.255
B	0.0468	0.163	0.168	0.282	0.33	0.062	0.110	0.100

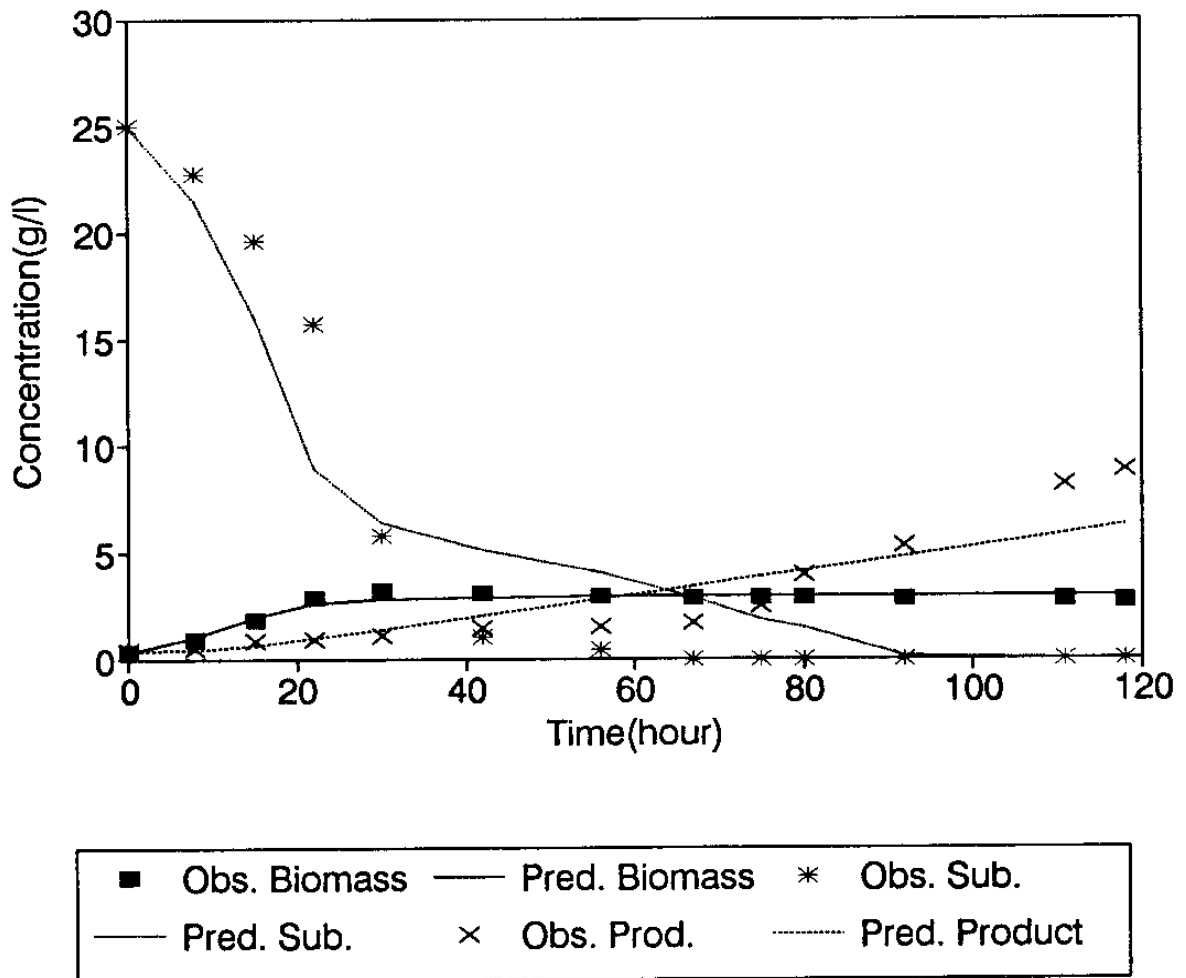


그림 3-7 기질이 Glucose일때 C/N 30의 modeling 결과

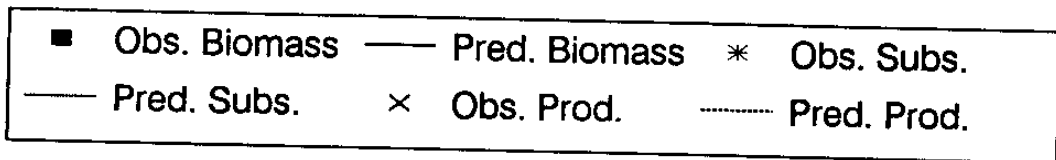
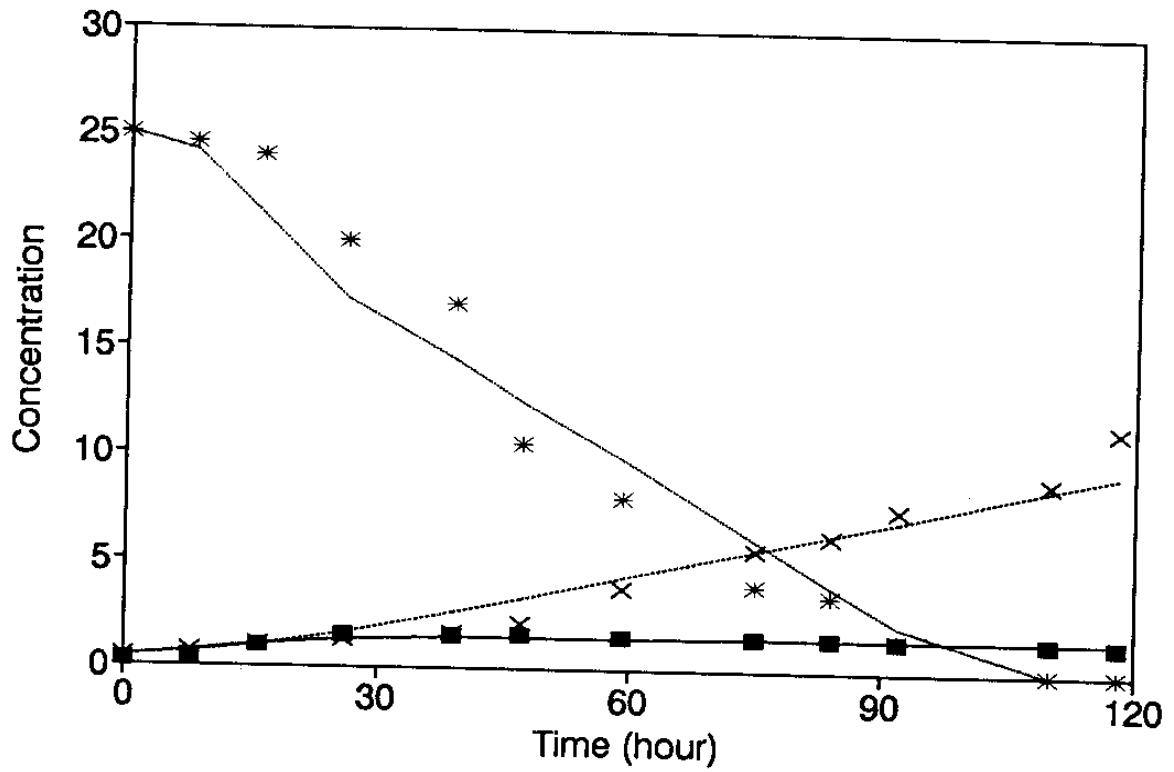


그림 3-8 기질이 Glucose일때 C/N 60의 modeling 결과

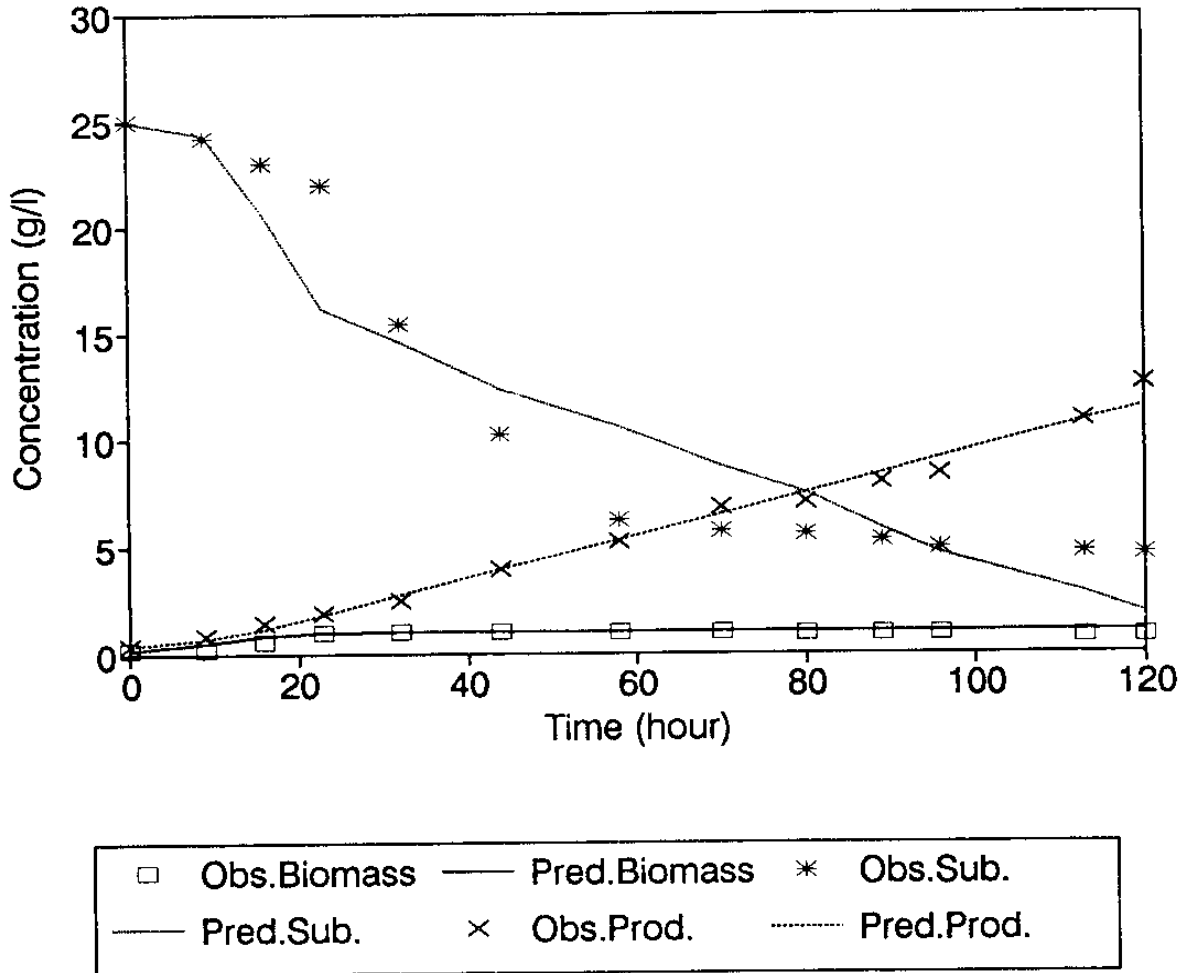
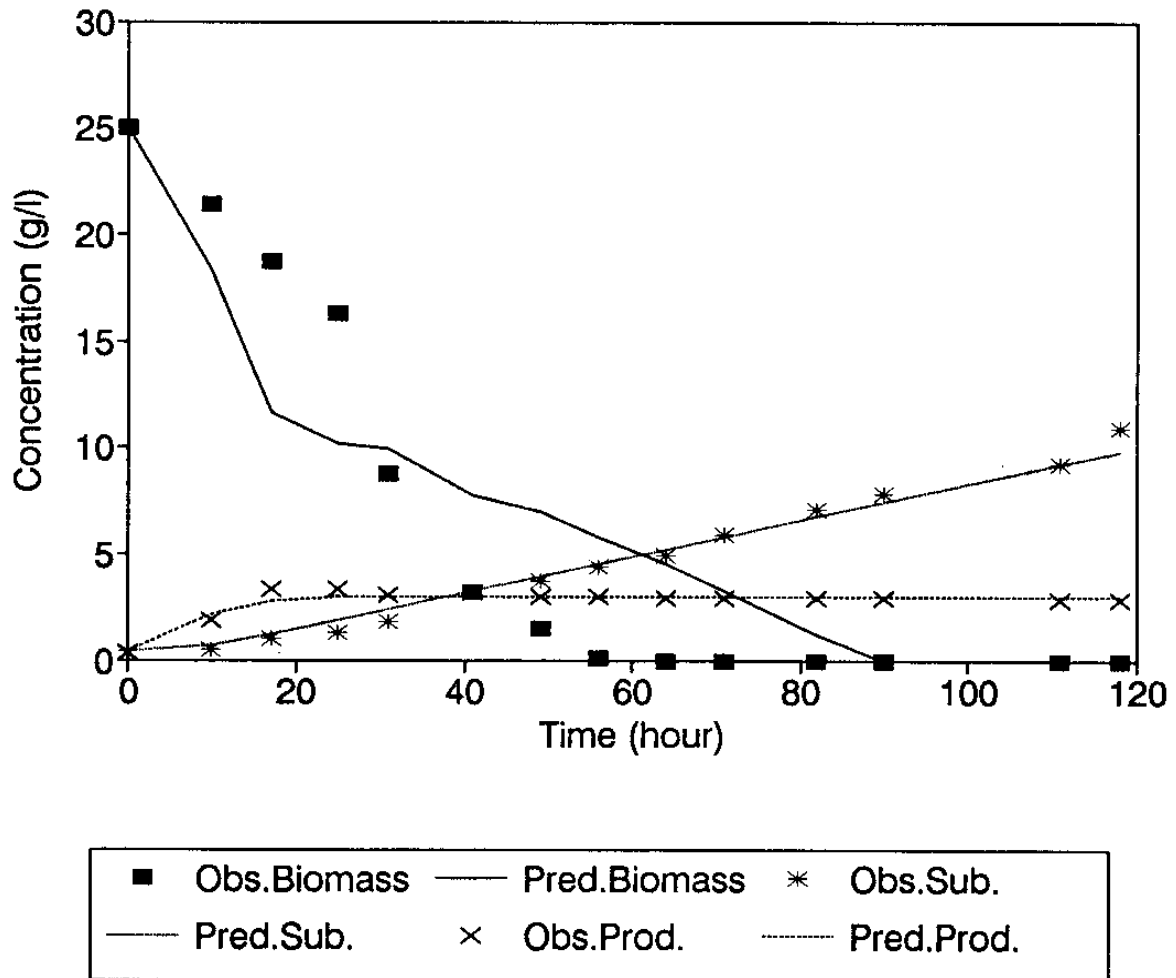


그림 3-9 기질이 Glucose일때 C/N 90의 modeling 결과



216
 그림 3-10 기질이 Lactose일때 C/N 30의 modeling 결과

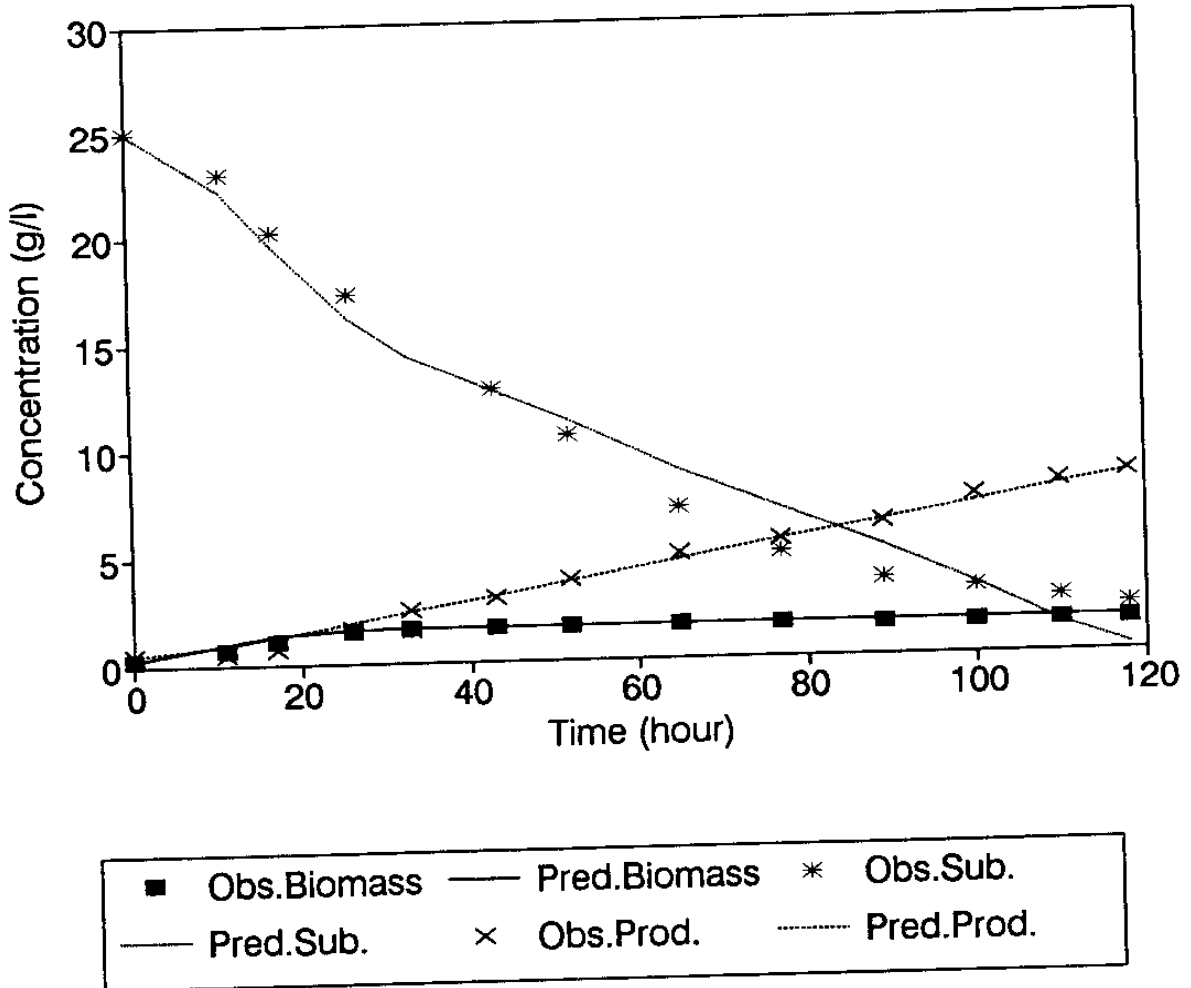
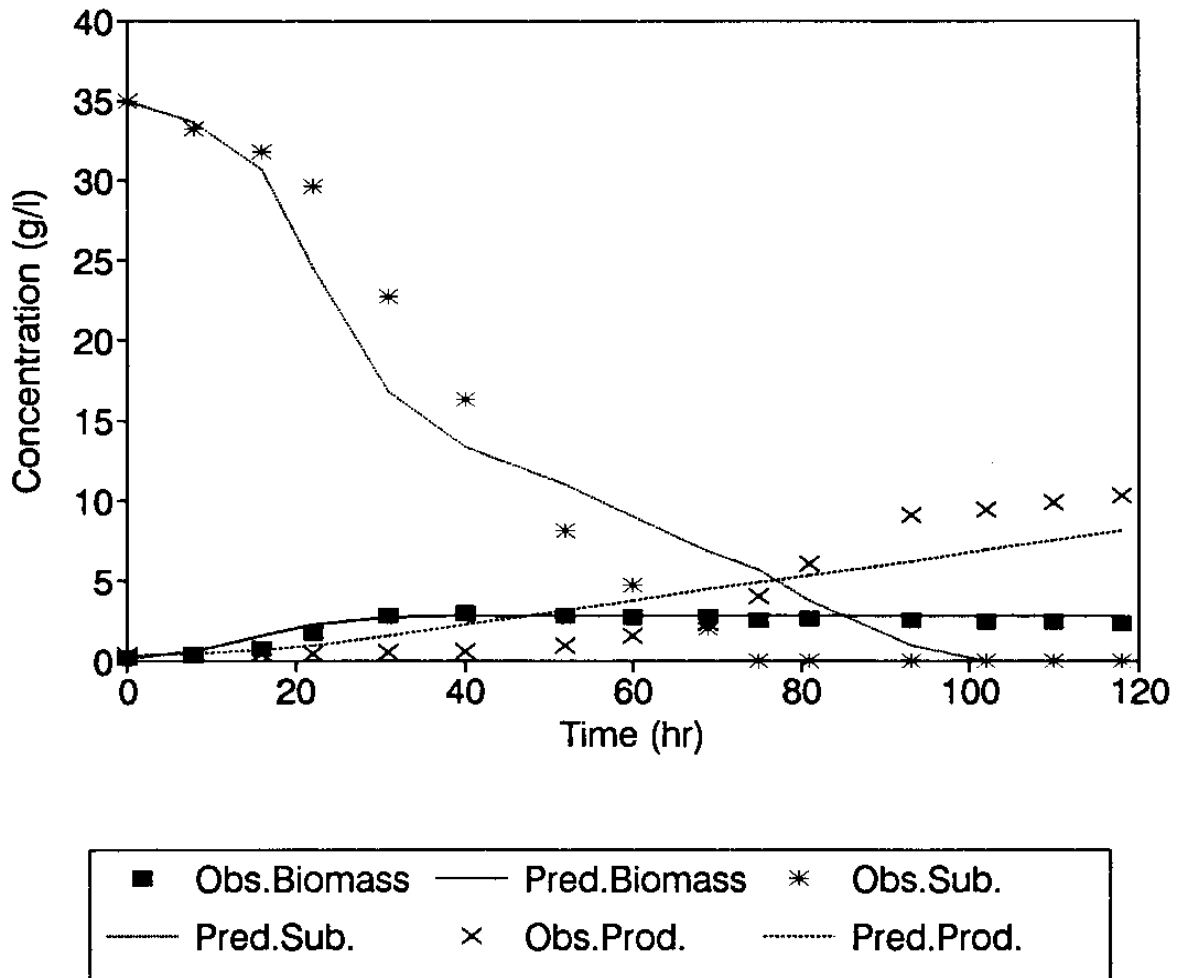


그림 3-11 기질이 Lactose일때 C/N 60의 modeling 결과



226
 그림 3-12 가질이 Cheese whey 일때 C/N 30의 modeling 결과

4. 2단계 연속공정에 대한 모델링

가. 2단계 연속공정의 모델링

2단계 연속공정의 모델링은 두개의 반응기로 나누어, growth phase용 발효조와 production phase용 발효조에 대한 물질수지식을 세워 모델링을 수행하였다. 그림 3-13에 이와같은 2단계 연속공정의 반응기 모사도를 나타냈다. Q_1 은 growth phase용 발효조 (Reactor I)에 유입되는 유입수의 양을 나타내고 Q_2 는 production phase용 발효조 (Reactor II)에 유입되는 질소원이 결여된 기질을 공급하여 주는 유입수의 양을 나타내고 있다. $X_1, S_1, P_1, X_2, S_2, P_2$ 는 각각 growth phase용 발효조와 production phase용 발효조에 있어서의 균체농도, 기질농도, 생산물농도를 나타낸다.

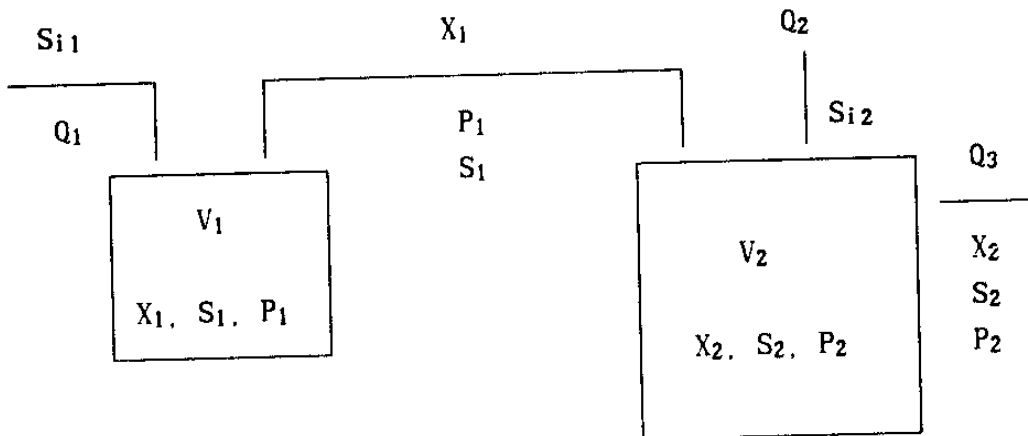


그림 3-13 2단계 연속공정의 반응기 모사도

Reactor I에 대한 물질수지식은 다음과 같다.

$$V_1 \frac{dX_1}{dt} = \mu X_1 V_1 - Q_1 X_1$$

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu X_1 - \frac{Q_1}{V_1} X_1 \dots\dots\dots(1)$$

$$= \mu X_1 - D_1 X_1$$

기질에 대한 물질수지식

$$V_1 \frac{dS_1}{dt} = (Q_1 S_{i1} - Q_1 S_1) - (A \mu + B) X_1 V_1$$

$$\frac{dS_1}{dt} = D_1 (S_{i1} - S_1) - (A \mu + B) X_1 \dots\dots\dots(2)$$

생산물에 대한 물질수지식

$$V_1 \frac{dP_1}{dt} = -Q_1 P_1 + (n X_1 + m \mu X_1) V_1$$

$$\frac{dP_1}{dt} = -D_1 P_1 + (n X_1 + m \mu X_1)$$

단, $A = \left(\frac{1}{Y_x} + \frac{m}{Y_p} \right)$, $B = \left(\frac{n}{Y_p} + k_e \right)$

Reactor II에 대한 물질수지식은 다음과 같다.

균체에 대한 물질수지식

$$V_2 \frac{dX_2}{dt} = (Q_1 X_1 - Q_3 X_2) + \mu X_2 V_2$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \left(\frac{Q_1}{V_2} X_1 - \frac{Q_3}{V_2} X_2 \right) + \mu X_2$$

기질에 대한 물질수지식

$$V_2 \frac{dS_2}{dt} = (Q_1 S_1 - Q_2 S_{i2}) - Q_3 S_2 - (A\mu + B) X_2 V_2$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \left(\frac{Q_1}{V_2} S_1 - \frac{Q_2}{V_2} S_{i2} \right) - \frac{Q_3}{V_2} S_2 - (A\mu + B) X_2$$

생산물에 대한 물질수지식

$$V_2 \frac{dP_2}{dt} = -Q_3 P_2 + (n X_2 + m \mu X_2) V_2$$

$$\frac{dP_2}{dt} = -D_2 P_2 + n X_2 + m \mu X_2$$

$$\text{단, } A = \left(\frac{1}{Y_x} + \frac{m}{Y_p} \right), \quad B = \left(\frac{n}{Y_p} + k_e \right)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$$

나. 2단계 연속공정의 모델링 결과 및 고찰

Glucose를 탄소원으로 하여 2단계연속반응의 경우 조절 가능

한 변수 (operating variable)는 growth phase용 발효조 (Reactor I)와 production phase용 발효조 (Reactor II)의 용적 (V_2/V_1), 반응기에 유입되는 유입수의 양 (Q_1 과 Q_2)과 유입수에 있어서 C/N비 등을 들수있다. 따라서 모델링을 통하여 이들변수를 변화시켰을때 생물고분자 생산에 미치는 영향을 예측하므로서 최적반응기 설계에 필요한 정보를 얻을 수 있다.

두반응기의 크기를 알아보기 위해 유량비(Q_1/Q_2)를 1로 고정하고 용적비를 1, 3, 5로 변화시켰을때의 결과를 표 3-5, 3-6, 3-7에 나타냈다. 용적비가 클수록 Reactor II에서 생물고분자의 생산성($P_2 \cdot P_2$)이 증가하는 것으로 예측되는 용적비 3에서 5로 증가시 생산성의 증가는 용적비 1에서 3으로 변화시 생산성 증가량보다 적다. 따라서 경제성 (economic analysis)을 고려한 최적의 용적비를 찾을 수 있다. 또한 용적비가 증가하면서 wash-out 되는 회석률(D)이 커짐으로써 운전범위가 넓어지는 것을 알 수 있다.

유입수 유량의 영향을 알아보기 위해 발효조의 용적비를 5로 고정하고 유량비(Q_2/Q_1)를 0.01, 0.1, 1로 변화시켰을때 결과는 표 3-7, 3-8, 3-9에 나타냈다. 유량비에 따라 Reactor II에서의 생물고분자 생산성이나 운전범위에 큰차이가 없다. C/N의 영향을 알아보기 위해 발효조의 용적비를 5, 유량비를 0.1로 고정했을때 C/N비를 30, 60, 90으로 변화시켰을때의 결과는 표 3-9, 3-10, 3-11에 나타냈다. C/N비가 클수록 Reactor II에서의 생물고분자 생산성은 증가하나 균체량이 질소원으로 인해 제한되기 때문에 운전범위가 좁아지는 것을 알 수 있다.

표 3-5. 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2/Q_1=1$, $V_2/V_1=1$ 일
 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.
 CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30
 $Q_2/Q_1=1.000$
 $V_2/V_1=1.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00965	.01930	2.7550	2.7188	.0000	.0000	5.4184	2.67634	.05165
.01930	.03860	2.6100	2.5375	3.9146	2.4137	2.5773	1.25546	.04846
.02895	.05790	2.4650	2.3563	7.0771	5.8068	1.6295	.78122	.04523
.03860	.07720	2.3200	2.1750	9.0684	8.0288	1.1550	.54363	.0419
.04825	.09650	2.1750	1.9031	10.5912	9.4737	.8698	.38347	.03700
.05790	.11580	2.0300	1.8125	11.8798	11.3013	.6793	.30511	.03533
.06755	.13510	1.8850	1.4953	13.0344	12.6479	.5429	.21767	.02941
.07720	.15440	1.7400	1.4500	14.1055	13.9883	.4403	.18493	.02855
.08685	.17370	1.5950	1.0875	15.1207	15.4965	.3602	.12452	.02163
.09650	.19300	1.4500	.8156	16.0969	17.0354	.2959	.08468	.01634
.10615	.21230	1.3050	.7250	17.0447	18.0671	.2431	.06860	.01456
.11580	.23160	1.1600	.3625	17.9712	19.9175	.1988	.03175	.00735
.12545	.25090	1.0150	.0453	18.8814	21.7382	.1612	.00370	.00093
.13510	.27020	.8700	.0000	19.7786	22.3893	.1288	.00000	.00000
.14475	.28950	.7250	.0000	20.6656	22.8328	.1006	.00000	.00000
.15440	.30880	.5800	.0000	21.5442	23.2721	.0758	.00000	.00000
.16405	.32810	.4350	.0000	22.4159	23.7079	.0537	.00000	.00000
.17370	.34740	.2900	.0000	23.2818	24.1409	.0339	.00000	.00000
.18335	.36670	.1450	.0000	24.1430	24.5715	.0161	.00000	.00000
.19300	.38600	.0000	.0000	25.0000	25.0000	.0000	.00000	.00000

표 3-6. 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2/Q_1=1$, $V_2/V_1=3$ 일
 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.
 CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30
 $Q_2/Q_1=1.000$
 $V_2/V_1=3.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00965	.00643	2.7550	2.8335	.0000	.0000	5.4184	8.34018	.05366
.01930	.01287	2.6100	2.7641	3.9146	.0000	2.5773	4.07611	.05245
.02895	.01930	2.4650	2.7188	7.0771	.0000	1.6295	2.67634	.05165
.03860	.02573	2.3200	2.6281	9.0684	1.8072	1.1550	1.94540	.05006
.04825	.03217	2.1750	2.5375	10.5912	3.3433	.8698	1.50655	.04846
.05790	.03860	2.0300	2.4469	11.8798	4.6642	.6793	1.21376	.04685
.06755	.04503	1.8850	2.3563	13.0344	5.8622	.5429	1.00442	.04523
.07720	.05147	1.7400	2.2656	14.1055	6.9832	.4403	.84724	.04360
.08685	.05790	1.5950	2.1750	15.1207	8.0531	.3602	.72484	.04197
.09650	.06433	1.4500	2.1750	16.0969	9.7419	.2959	.65235	.04197
.10615	.07077	1.3050	1.9258	17.0447	9.7713	.2431	.52880	.03742
.11580	.07720	1.1600	1.8125	17.9712	10.7778	.1988	.45767	.03533
.12545	.08363	1.0150	1.6539	18.8814	11.7410	.1612	.38721	.03238
.13510	.09007	.8700	1.4500	19.7786	12.8503	.1288	.31701	.02855
.14475	.09650	.7250	1.3141	20.6656	14.0676	.1006	.26915	.02597
.15440	.10293	.5800	.0000	21.5442	23.2720	.0758	.00000	.00000
.16405	.10937	.4350	.0000	22.4159	23.7079	.0537	.00000	.00000
.17370	.11580	.2900	.0000	23.2818	24.1409	.0339	.00000	.00000
.18335	.12223	.1450	.0000	24.1430	24.5714	.0161	.00000	.00000
.19300	.12867	.0000	.0000	25.0000	25.0000	.0000	.00000	.00000

표 3 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2/Q_1=1$, $V_2/V_1=5$ 일
 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.
 CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30
 $Q_2/Q_1=1.000$
 $V_2/V_1=5.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00965	.00386	2.7550	2.8604	.0000	.0000	5.4184	14.0214	.0541
.01930	.00772	2.6100	2.8207	3.9146	.0000	2.5773	6.9214	.0534
.02895	.01158	2.4650	2.7754	7.0771	.0000	1.6295	4.5461	.0526
.03860	.01544	2.3200	2.7244	9.0684	.0000	1.1550	3.3519	.0518
.04825	.01930	2.1750	2.6738	10.5912	.0000	.8698	2.6355	.0509
.05790	.02316	2.0300	2.6281	11.8798	1.5210	.6793	2.1616	.0501
.06755	.02702	1.8850	2.5828	13.0344	3.1351	.5429	1.8232	.0493
.07720	.03088	1.7400	2.5375	14.1055	4.4983	.4403	1.5693	.0485
.08685	.03474	1.5950	2.4469	15.1207	4.7541	.3602	1.3486	.0469
.09650	.03860	1.4500	2.3789	16.0969	5.5788	.2959	1.1823	.0456
.10615	.04246	1.3050	2.3563	17.0447	7.0700	.2431	1.0653	.0452
.11580	.04632	1.1600	2.2656	17.9712	7.5195	.1988	.9414	.0436
.12545	.05018	1.0150	2.1750	18.8814	8.0861	.1612	.8364	.0420
.13510	.05404	.8700	2.1750	19.7786	9.5244	.1288	.7766	.0420
.14475	.05790	.7250	1.9938	20.6656	9.4771	.1006	.6678	.0387
.15440	.06176	.5800	1.9031	21.5442	10.2692	.0758	.5992	.0370
.16405	.06562	.4350	.0000	22.4159	23.7078	.0537	.0000	.0000
.17370	.06948	.2900	.0000	23.2818	24.1408	.0339	.0000	.0000
.18335	.07334	.1450	.0000	24.1430	24.5714	.0161	.0000	.0000
.19300	.07720	.0000	.0000	25.0000	24.9999	.0000	.0000	.0000

표 3-8. 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2/Q_1=0.01$, $V_2/V_1=5$ 일 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.

CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30

$Q_2/Q_1 = .010$

$V_2/V_1 = 5.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00965	.00195	2.7550	2.8887	.0000	.0000	5.4184	28.0172	.0546
.01930	.00390	2.6100	2.8773	3.9146	.0000	2.5773	13.9582	.0544
.02895	.00585	2.4650	2.8575	7.0771	.0000	1.6295	9.2466	.0541
.03860	.00780	2.3200	2.8377	9.0684	.0000	1.1550	6.8908	.0537
.04825	.00975	2.1750	2.8150	10.5912	.0000	.8698	5.4722	.0533
.05790	.01170	2.0300	2.8094	11.8798	.0000	.6793	4.5517	.0532
.06755	.01365	1.8850	2.7641	13.0344	.0000	.5429	3.8436	.0524
.07720	.01559	1.7400	2.7301	14.1055	.0000	.4403	3.3250	.0519
.08685	.01754	1.5950	2.7188	15.1207	.0000	.3602	2.9443	.0517
.09650	.01949	1.4500	2.6734	16.0969	.0000	.2959	2.6091	.0509
.10615	.02144	1.3050	2.6281	17.0447	.0000	.2431	2.3347	.0501
.11580	.02339	1.1600	2.5828	17.9712	.0000	.1988	2.1060	.0493
.12545	.02534	1.0150	2.5375	18.8814	.5968	.1612	1.9124	.0485
.13510	.02729	.8700	2.5375	19.7786	2.7955	.1288	1.7758	.0485
.14475	.02924	.7250	2.4469	20.6656	2.5228	.1006	1.6023	.0469
.15440	.03119	.5800	2.3563	21.5442	2.5839	.0758	1.4503	.0452
.16405	.03314	.4350	2.2883	22.4159	3.3135	.0537	1.3282	.0440
.17370	.03509	.2900	.0000	23.2818	23.2987	.0339	.0000	.0000
.18335	.03704	.1450	.0000	24.1430	24.1513	.0161	.0000	.0000
.19300	.03899	.0000	.0000	25.0000	24.9998	.0000	.0000	.0000

표 3-9. 기질이 Glucose일때 C/N 30에서 $Q_2/Q_1=0.1$, $V_2/V_1=5$ 일
 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.
 CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30
 $Q_2/Q_1 = .100$
 $V_2/V_1 = 5.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00965	.00212	2.7550	2.8887	.0000	.0000	5.4184	25.7248	.0546
.01930	.00425	2.6100	2.8689	3.9146	.0000	2.5773	12.7815	.0543
.02895	.00637	2.4650	2.8547	7.0771	.0000	1.6295	8.4824	.0540
.03860	.00849	2.3200	2.8320	9.0684	.0000	1.1550	6.3154	.0536
.04825	.01062	2.1750	2.8094	10.5912	.0000	.8698	5.0152	.0532
.05790	.01274	2.0300	2.7754	11.8798	.0000	.6793	4.1328	.0526
.06755	.01486	1.8850	2.7428	13.0344	.0000	.5429	3.5041	.0521
.07720	.01698	1.7400	2.7188	14.1055	.0000	.4403	3.0413	.0517
.08685	.01911	1.5950	2.7188	15.1207	.0000	.3602	2.7034	.0517
.09650	.02123	1.4500	2.6310	16.0969	.0000	.2959	2.3604	.0501
.10615	.02335	1.3050	2.5885	17.0447	.0000	.2431	2.1137	.0494
.11580	.02548	1.1600	2.5403	17.9712	.4483	.1988	1.9042	.0485
.12545	.02760	1.0150	2.5375	18.8814	2.5934	.1612	1.7559	.0485
.13510	.02972	.8700	2.4469	19.7786	2.3628	.1288	1.5763	.0469
.14475	.03185	.7250	2.3789	20.6656	2.9146	.1006	1.4331	.0456
.15440	.03397	.5800	2.3563	21.5442	4.4179	.0758	1.3316	.0452
.16405	.03609	.4350	2.2656	22.4159	4.7264	.0537	1.2082	.0436
.17370	.03821	.2900	.0000	23.2818	23.4379	.0339	.0000	.0000
.18335	.04034	.1450	.0000	24.1430	24.2207	.0161	.0000	.0000
.19300	.04246	.0000	.0000	25.0000	24.9999	.0000	.0000	.0000

표 3-10. 기질이 Glucose일때 C/N 60에서 $Q_2/Q_1=0.1$, $V_2/V_1=5.0$

일 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.

CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=30

$Q_2/Q_1 = .100$

$V_2/V_1 = 5.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.00550	.00121	1.3775	1.4387	.0000	.0000	15.0315	69.9580	.0846
.01100	.00242	1.3050	1.4273	.0000	.0000	7.2859	34.8323	.0843
.01650	.00363	1.2325	1.4104	.9814	.0000	4.6918	23.0723	.0838
.02200	.00484	1.1600	1.4047	5.2573	.0000	3.3855	17.2664	.0836
.02750	.00605	1.0875	1.3820	8.1017	.0000	2.5944	13.6901	.0828
.03300	.00726	1.0150	1.3594	10.2304	.0000	2.0608	11.3031	.0821
.03850	.00847	.9425	1.3594	11.9500	.0000	1.6744	9.6884	.0821
.04400	.00968	.8700	1.3141	13.4140	.0000	1.3801	8.3133	.0805
.04950	.01089	.7975	1.2914	14.7075	.0000	1.1470	7.3139	.0796
.05500	.01210	.7250	1.2688	15.8818	.0000	.9569	6.5128	.0788
.06050	.01331	.6525	1.2688	16.9693	.0000	.7980	5.9208	.0788
.06600	.01452	.5800	1.2008	17.9918	.0000	.6625	5.2449	.0762
.07150	.01573	.5075	1.1781	18.9641	.0000	.5450	4.7828	.0752
.07700	.01694	.4350	.0000	19.8972	20.3607	.4417	.0000	.0000
.08250	.01815	.3625	.0000	20.7988	21.1803	.3496	.0000	.0000
.08800	.01936	.2900	.0000	21.6748	21.9768	.2668	.0000	.0000
.09350	.02057	.2175	.0000	22.5298	22.7540	.1916	.0000	.0000
.09900	.02178	.1450	.0000	23.3672	23.5154	.1227	.0000	.0000
.10450	.02299	.0725	.0000	24.1899	24.2632	.0591	.0000	.0000
.11000	.02420	.0000	.0000	25.0000	24.9997	.0000	.0000	.0000

표 3-11. 기질이 Glucose일때 C/N 90에서 $Q_2/Q_1=0.1$ $V_2/V_1=5$ 일
 때의 2단계 연속공정의 modeling 결과.
 CARBON SOURCE=GLUCOSE, C/N=90
 $Q_2/Q_1 = .100$
 $V_2/V_1 = 5.000$

D1	D2	X1	X2	S1	S2	P1	P2	P2*D2
.01000	.00220	.9500	.9885	1.5673	.0000	9.5950	45.0364	.0991
.02000	.00440	.9000	.9766	10.3426	.0000	4.5900	22.2988	.0981
.03000	.00660	.8500	.9688	13.5312	.0000	2.9183	14.7699	.0975
.04000	.00880	.8000	.9531	15.3232	.0000	2.0800	10.9326	.0962
.05000	.01100	.7500	.9375	16.5565	.0000	1.5750	8.6293	.0949
.06000	.01320	.7000	.9375	17.5105	.0000	1.2367	7.1911	.0949
.07000	.01540	.6500	.9063	18.3048	.3278	.9936	5.9951	.0923
.08000	.01760	.6000	.8755	18.9994	1.4149	.8100	5.0983	.0897
.09000	.01980	.5500	.8750	19.6275	3.9752	.6661	4.5297	.0897
.10000	.02200	.5000	.8438	20.2090	4.7416	.5500	3.9551	.0870
.11000	.02420	.4500	.0000	20.7567	21.1419	.4541	.0000	.0000
.12000	.02640	.4000	.0000	21.2789	21.6167	.3733	.0000	.0000
.13000	.02860	.3500	.0000	21.7817	22.0738	.3042	.0000	.0000
.14000	.03080	.3000	.0000	22.2691	22.5169	.2443	.0000	.0000
.15000	.03300	.2500	.0000	22.7442	22.9488	.1917	.0000	.0000
.16000	.03520	.2000	.0000	23.2093	23.3717	.1450	.0000	.0000
.17000	.03740	.1500	.0000	23.6662	23.7871	.1032	.0000	.0000
.18000	.03960	.1000	.0000	24.1163	24.1963	.0656	.0000	.0000
.19000	.04180	.0500	.0000	24.5606	24.6002	.0313	.0000	.0000
.20000	.04400	.0000	.0000	25.0000	24.9997	.0000	.0000	.0000

제 4 절 생물고분자의 수처리제 활용 실험

1. 개요

최근 생명과학의 발달과 함께 구미, 일본등지에서는 미생물에 의하여 분해되는 생분해성 고분자 (biopolymer) 생산을 위하여 연구개발에 많은 인력과 비용을 투자하고 있다. 생물고분자는 생분해성, 원료로서 재생가능한 자원의 사용, 구조의 다양성 등의 장점을 가지고 있어 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. 대표적인 제품으로는 PHB, Xanthan gum, Pullulan 등을 들 수 있다.

선진국에서는 생분해성의 점성이 강하고 중금속 흡착능력이 높은 생물고분자를 폐수처리에 사용되는 기존 수처리제 대용 및 중금속 흡착제로 사용하려는 연구가 진행되고 있다. 현재 사용중인 응집제의 경우 무기응집제와 고분자 응집제로 크게 나눌수 있는데, 투여 후 처리수 중에 잔류하는 합성고분자 응집제의 생체에 미치는 영향의 불확실성과 무기응집제에 의한 과량의 침전물 형성등의 이차적인 공해문제를 야기시킨다. 그러나 생물고분자를 응집제로 사용할 경우에 응집력이 높을 뿐만 아니라 유출수에 잔류되는 생물고분자는 자연적인 분해로 이차공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다. 기존 수처리제를 대체할 수 있는 생분해성 고분자로는 생물응집제, 중금속 흡착제로 사용가능한 *Z. ramigera* 등에 생성되는 점성의 세포외 다당류, 슬러지의 탈수등 중금속 흡착제로 사용될 수 있는 chitosan 및 alginate류, superabsorbent로 유망시되는 polypeptide류를 들 수 있다.

Zoogloea ramigera 115는 약산성의 carbohydrate polymer를 생산하는 Gram-negative bacterium으로 알려져 있다. 이 다당류 고분자는 polyelectrolyte로써 작용하고, Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , UO_2^{2+} , Fe^{3+} 등의 금속 이온들을 흡착하는 것으로 알려져 있다. 금속 양이온은 세포 벽에서 발견되는 phosphoryl, carboxyl, sulphhydryl, hydroxyl group과 proteins, lipids등에 의해서 흡착될 수 있는 것으로 알려지고 있다. Zoogloea ramigera에 의한 금속이온의 흡착은 주로 생물고분자에 의해서 이루어지고 있다.

D-glucose, D-galactose, pyruvic acid가 11:3:1.5의 몰 비율로 구성되어 있는 이 고분자의 약한 negative charge와 많은 hydroxyl group으로 인하여 풍부한 결합을 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 산업폐수의 정화를 위해서 bacteria, yeasts, algae등의 미생물의 금속 결합 능력을 이용한 연구가 이루어지고 있다.

Norberg과 Persson(1984)은 용액으로 부터, Cd^{2+} , Cu^{2+} , UO_2^{2+} 를 제거하기 위하여 flocculated된 dead Zoogloea ramigera를 이용하는 연구를 수행하였다. 또한 Kuhn과 Pfister(1989)는 Zoogloea ramigera 115를 calcium alginate에 고정화시켜, air-bubbled column에서 여러가지 중금속을 흡착시키는 실험을 수행하였다.⁴⁶⁾

본실험에서는 Zoogloea ramigera 115에서 추출한 생물고분자와 여러가지 sorbent materials의 금속 흡착능력을 정량적으로 비교실험하기 위하여 sorption isotherms를 결정하였고, 기존 수처리제와의 비교를 통한 생물고분자의 활용가능성을 조사하였다.

2. 응집성능 실험

가. 응집성능 비교실험

새로운 biopolymer의 응집특성을 파악하기 위하여 기존의 고분자 응집제와 함께 잉크페액을 이용하여 응집성능 비교실험을 행하였다. 본실험에 사용된 잉크페액은 표 3-12에서와 같이 SS가 30,000mg/L을 넘는 매우 진한 페액이어서 본실험에서는 100배 희석한 1% 잉크페수를 사용하였다.

표 3-12 잉크페수의 성상

(단위 : mg/L)

항 목	잉크원액	1% 잉크페수
SS	32,940	329
VSS	25,140	251
TSS	35,705	357
TCOD	204,724	2,047
SCOD	102,362	1,024
pH	8.14	

비교실험에 사용된 고분자응집제는 시중에서 널리 사용되고 있는 SFA(강음이온), Rayafloc A-210A(RF, 강양이온)등을 사용하였다. 일반적인 응집실험을 실험실에서 Jar-Test를 통하여 행하여지

는데 실험순서는 다음과 같다.

1. 200mL의 폐수에 0.5% FeCl₃를 주입하여 5분간 급속교반(5,000rpm)하여 flocc이 형성되도록 하며,
2. NaOH를 이용하여 pH를 조정 (pH 7-8)하고,
3. 0.2% 고분자응집제 또는 0.2% biopolymer를 주입한 후 flocc이 충분히 커질 때까지 5분간 완속교반(100rpm)을 한 후,
4. 10분간 침전시킨 후,
5. 상등액을 원심분리(3,700rpm, 5분)하여 채취한 다음,
6. Spectrophotometer, 550nm에서 O. D.를 측정하였다.

한편, 본 실험의 주요 판단기준으로는 응집성 flocc이 가능한 크도록 유도하여 침전이 잘 되도록 하는데 있으며, 이와같은 최적 응집반응이 일어날 수 있도록 각 처리조건을 변화하여 가면서 실험을 수행하였으며, 본 실험결과는 그림 3-14과 같다. 이 그림에서 알 수 있듯이 O.D. 값 0.1을 기준으로 할 때 기존의 0.2% 고분자 응집제는 9mg/L를 주입하면 응집침전이 완료되는데 비하여 0.2% biopolymer는 13mg/L, 그리고 20% biopolymer broth는 12mg/L를 주입하여야 함을 알 수 있었다. 한편, 본 실험에 사용된 biopolymer broth와 biopolymer의 관계는 1L의 biopolymer broth로부터 약 5-10g의 biopolymer를 추출할 수 있다고 한다.

여기서 추출과정이 따로 필요없는 biopolymer broth의 경우 우수한 응집능력을 가지고 있어, 수질향상을 위한 최적화 연구를 통해 기존고분자 응집제와 대등한 또는 그 이상의 응집력을 갖는

생물고분자응집제 개발도 가능할 것으로 판단된다.

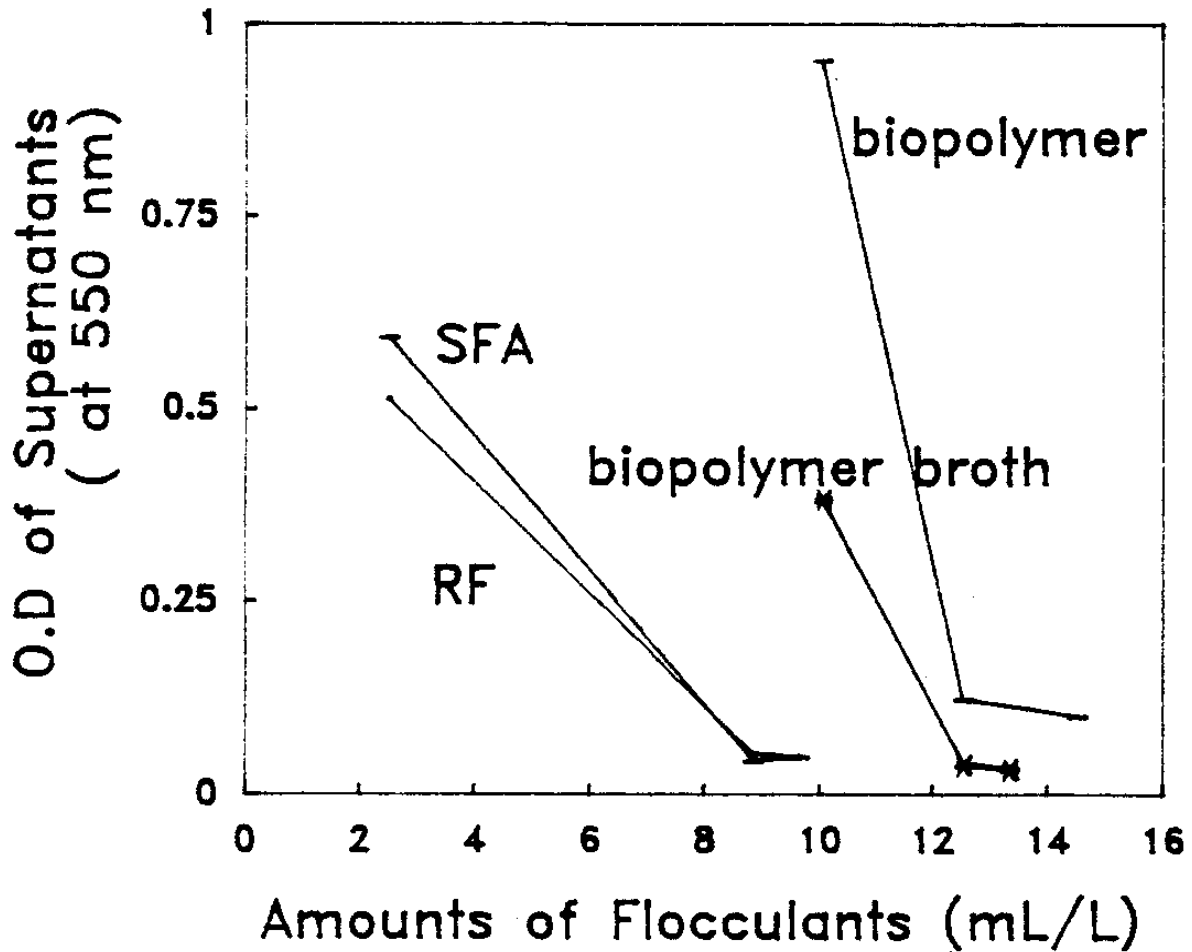


그림 3-14 응집 비교 실험

나. 중금속폐수 처리성능 비교실험

새로운 biopolymer의 중금속 처리성능을 파악하기 위하여 기존의 중금속 처리성능을 파악하기 위하여 기존의 중금속 응집 처리 보조제(Epofloc, Orital-S) 및 고분자 응집제(Rayafloc A-210A, RF)와의 성능비교 실험을 하였다. 사용된 폐수는 도금공장의 원폐수로서 폐수의 성상은 표 3-13와 같다.

표 3-13 도금폐수의 정상

항목	농도(mg/L)
T-Cr	120
TS	11,206
COD	452

실험순서는 다음과 같다.

1. 폐수 200mg/L에 중금속 처리 보조제를 주입한 후,
2. 5분간 급속교반(5,000rpm)한 다음,
3. 5% FeCl₃ 주입 후 5분간 급속교반(5,000rpm)하여 flocc이 형성되도록 하며,
4. NaOH를 이용하여 pH를 조정(pH 7-8)하고,
5. 0.2% 고분자응집제 또는 biopolymer를 주입한 후 flocc이 충분히 커질 때까지 5분간 완속교반(100rpm)을 한 후,
6. 10분간 침전 시킨 후,
7. 상등액을 채취하여 Atomic Absorption Spectrophotometer를 이용하여 Cr농도를 측정하였다.

한편 본 실험에서 주요 판단으로는 응집성 flocc이 가능한 크도록 유도하여 침전이 잘 되도록 하는데 있으며, 이와같은 최적 응집반응이 일어날 수 있도록 각 처리 조건을 변화하여 가면서 실험을 수행하였으며, 실험결과는 표 3-14와 같다.

표 3-14 중금속 처리 실험결과

실험조건			실험결과
O/E*	2% FeCl ₃	응집제/biopolymer	T-Cr
O 140 L	10mL	0.2% RF 0.5mL	ND
O 140 L	21mL	20% Biopolymer broth 3mL+0.2% RF 2mL	ND
O 140 L	21mL	2% Biopolymer 6mL+0.2% RF 2mL	ND
E 50 L	9.5mL	0.2% RF 1mL	ND
E 50 L	24mL	20% Biopolymer broth 5mL+0.2% RF 1mL	6.7mg/L
		20% Biopolymer broth 11mL	94mg/L
		2% Biopolymer 33.5mL	86mg/L
	30mL	20% Biopolymer broth 10mL	ND
		2% Biopolymer 20mL	0.4mg/L

*O : Oritol-S

E : Epofloc

이 실험의 결과, 기존의 중금속 처리보조제 및 고분자응집제를 병용한 중금속 처리가 가장 효과적임을 알 수 있으며, 중금속 처리보조제를 사용하지 않을 경우에는 FeCl₃와 Biopolymer/Biopolymer broth를 사용하여도 좋은 중금속 제거 효과를 얻을 수 있을 것으로 나타났다. 단 이 경우 처리에 필요한 무기염 및 Biopolymer양이 기존의 방법보다 많이 소요된다는 단점이 있어 최적 배양 및 응집조건을 찾기 위한 지속적인 연구가 필요하겠다.

다. Biopolymer broth의 최적 응집실험

(1) kaolin응집실험

Jar test를 이용한 응집실험(5,14)은 추출된 점성의 고분자 용액을 각각 0.5mL, 1mL, 3mL, 5mL씩 다른 양을 취해 응집실험을 하였다. 시료로는 5,000ppm의 Kaolin이며 10% CaCl₂를 첨가하여 전체량을 200mL로 하였다. 처음 2분간은 소량의 고분자 용액을 시료에 첨가하여 150rpm의 급속으로 혼합한 다음 다시 50rpm으로 속도를 줄여 20분간 정지후 그 결과를 관찰하였다.

또한, CaCl₂ 용액을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우의 응집효과를 같이 비교하였다. 응집효과는 분광광도계(Hitachi U-2000)로 550nm에서 상등액의 optical density를 측정하여 추정하였다.

표 3-15의 OD값에서와 같이 0.5mg-3mg에서 거의 완전한 정화능력을 보여주었다.

표 3-15 result of flocculation test

시료	Biopolymer(mg)	상등액 O.D(550nm)
Kaolin+Ca ⁺⁺	0	0.42
	0.2	0.04
	0.5	0.01
	0.7	0.02
	1.0	0.03
	3.0	0.03
	5.0	0.09
	10.0	0.16
	25.0	0.41

(2) cheese whey 응집 실험

cheese whey에 대한 생물고분자의 응집효과를 보기 위하여, CaCl₂, Aluminium Potassium Sulfate, 생물고분자의 양을 변화시키면서, 응집실험을 수행하였다.(표 3-16)

생성된 고분자는 cheese whey 응집 실험에서, 6% CaCl₂, 2% AlK(SO₄)₂12H₂O를 첨가한 cheese whey 용액에서 높은 응집력을 보였다.

표 3-16 Results of cheese whey jar test

시료	Biopolymer	CaCl ₂	APS	SS	SS 제거율	pH
Cheese Whey (TS : 72260mg/L) (SS : 7290mg/L)	1.5%	10%	2%	1222	83%	7.10
			4%	3283	55%	7.27
			6%	533	93%	6.97
			8%	814	89%	7.20
			10%	2036	72%	7.15
			12%	448	94%	6.89
	0.35%	10%	2%	276	96%	5.67
	0.7%			254	97%	5.72
	1.0%			710	90%	5.59
	1.35%			316	96%	5.78
	1.7%			202	97%	6.01
	0.35%	10%	2%	2812	61%	5.73
				2432	67%	5.64
				290	96%	5.43
				274	96%	5.62
268				96%	5.46	
1396				81%	5.57	

*APS : Aluminium Potassium Sulfate

SS : Suspended Solids

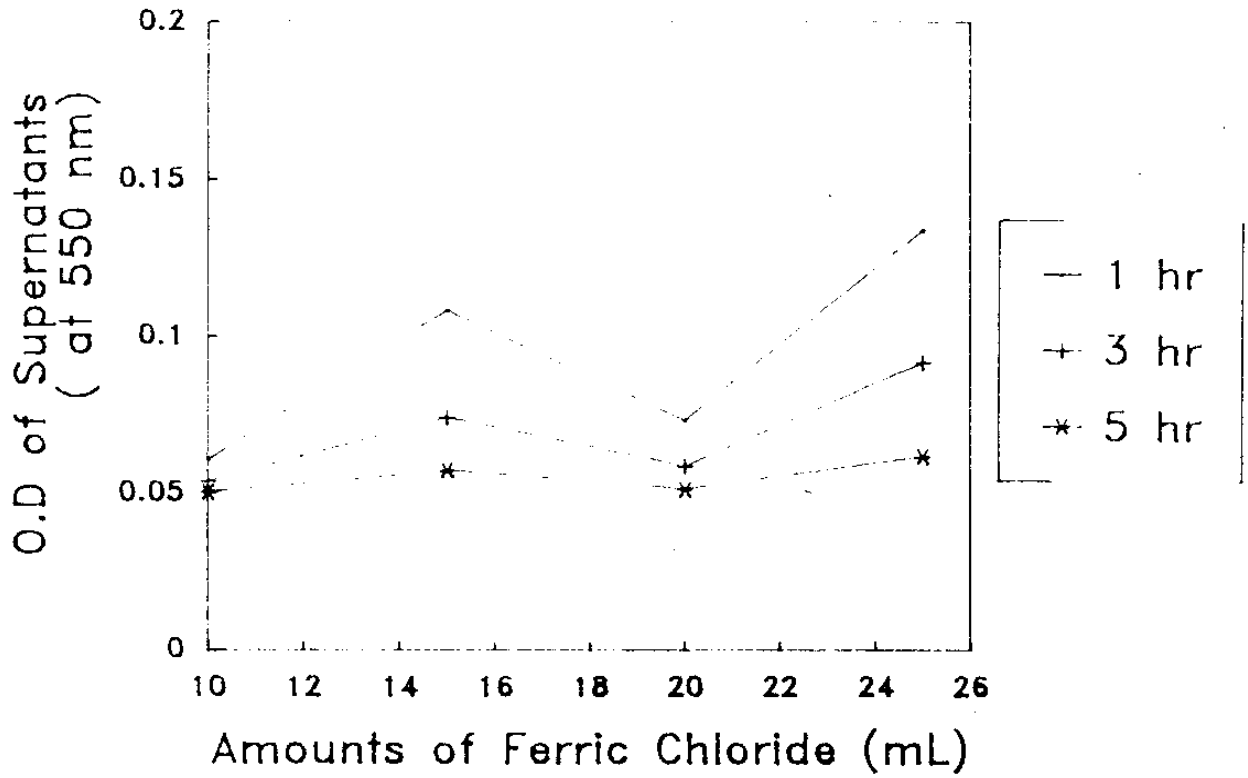
Biopolymer, CaCl₂, AlK(SO₄)₂12H₂O 첨가량은 cheese whey의 TS를 기준으로 한 것임

(3) 보조응집제 사용시의 Kaolin 응집실험

응집보조제인 FeCl_3 와 Biopolymer broth의 첨가량에 따른 kaolin 응집효과를 보기 위하여, 일정량의 kaolin용액(5g/L)에 FeCl_3 (0.5%) 10ml, 15ml, 20ml, 25ml씩을 첨가하고 생물고분자 용액을 각각 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml 첨가하여 jar test를 실시하여 일정한 시간별로 상등액의 O.D값을 측정하여 응집효과를 비교하였다.

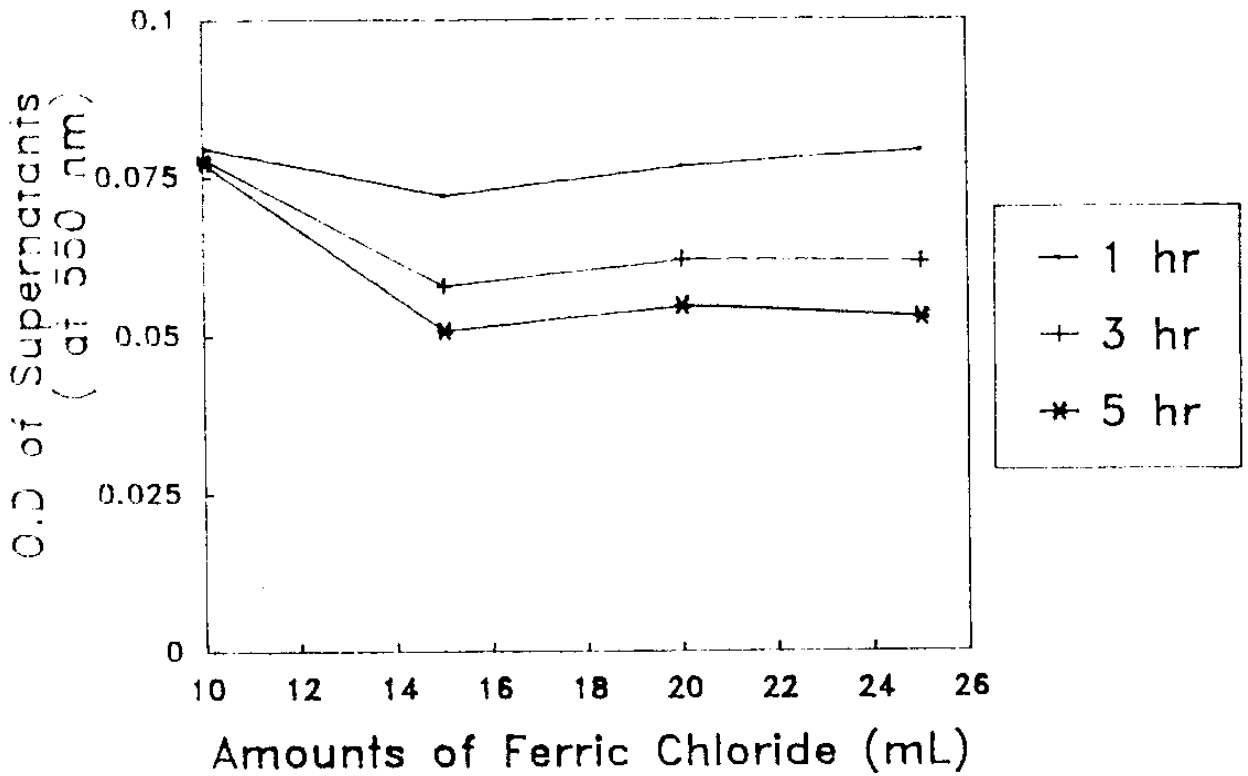
실험결과, 생물고분자 용액의 첨가량 및 FeCl_3 의 첨가량에 따라서 응집속도 및 생성된 floc의 크기등이 변하였다. 생물고분자 용액을 2.5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 10ml 첨가시 응집효과가 좋았으며, 생물고분자 용액을 5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 첨가량에 따라 상등액의 O.D값은 별 차이가 없었으나 FeCl_3 의 첨가량이 많아짐에 따라 생성된 floc의 크기가 증가하였다. 생물고분자 용액을 7.5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 용액을 10ml 첨가하였을 때와 15ml 이상 첨가하였을 때의 결과는 현저한 차이를 나타내었다. 생물고분자 용액을 10ml 첨가하였을 때에는 7.5ml 첨가하였을 때와 비교하여 볼 때 FeCl_3 의 첨가량이 10ml, 15ml 일때는 응집효과가 떨어지나 FeCl_3 첨가량이 20ml, 25ml 일때는 응집효과가 우수하였다.

따라서 Kaolin 응집실험에 있어서는 생물고분자 용액 7.5ml, 10ml와 보조첨가제로써 FeCl_3 20ml, 25ml 첨가시 우수한 응집효과를 볼 수 있었다. 시간별 kaolin 응집실험 결과를 그림 3-15, 3-16, 3-17, 3-18에 나타내었다.



Amounts of Ferric Chloride (mL)

그림 3-15 Biopolymer의 Kaolin 현탁액 응집실험
(biopolymer broth : 2.5ml)



Amounts of Ferric Chloride (mL)

그림 3-16 Biopolymer의 Kaolin 현탁액 응집실험
(biopolymer broth : 5ml)

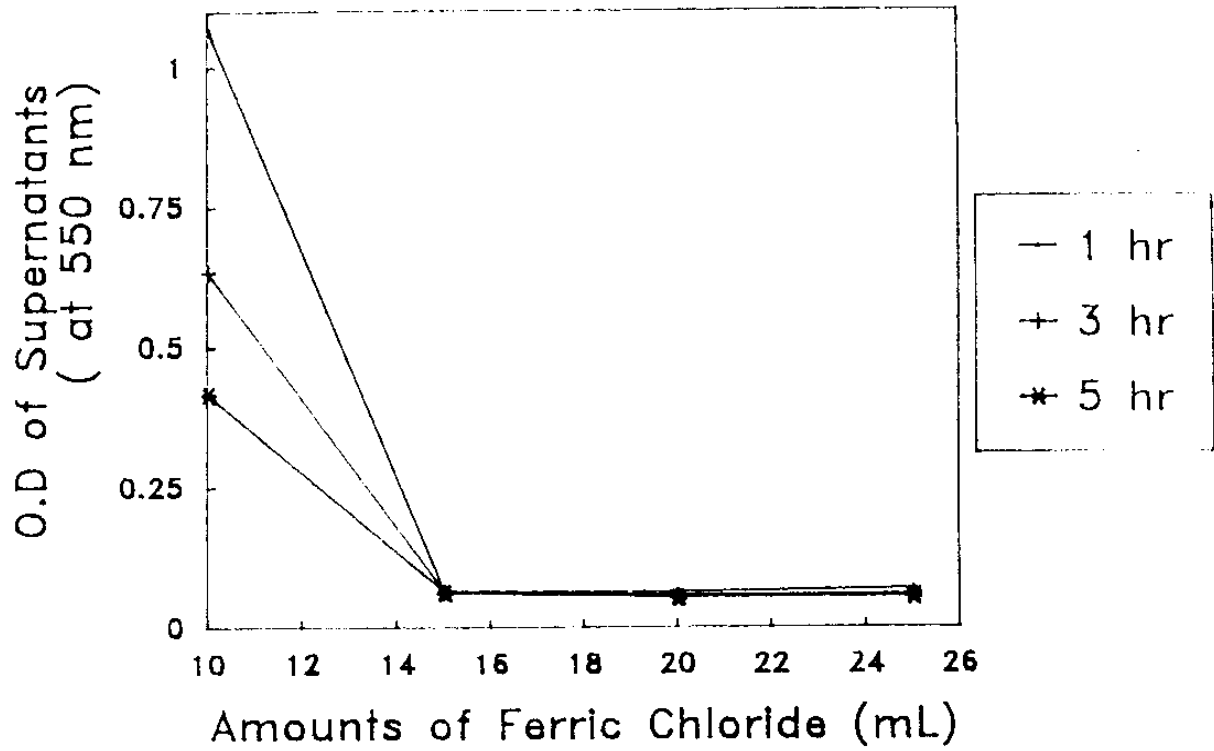


그림 3-17 Biopolymer의 Kaolin 현탁액 응집실험
(biopolymer broth : 7.5ml)

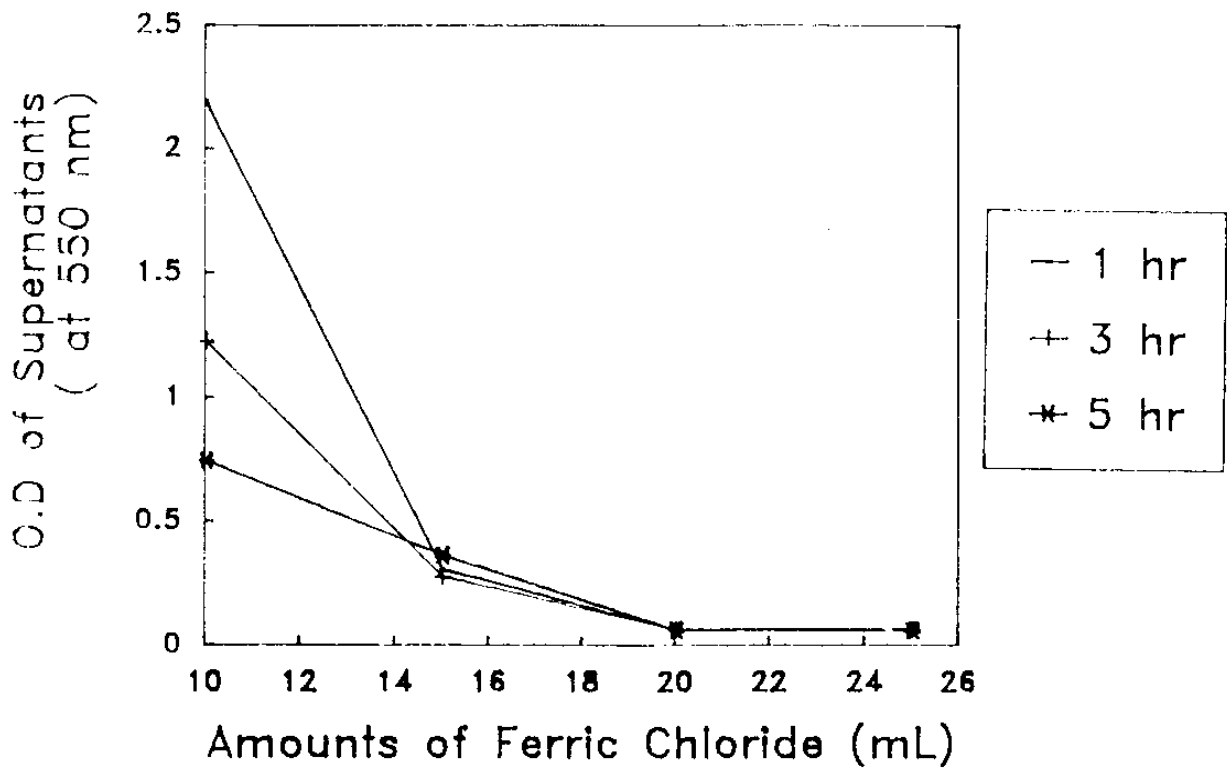


그림 3-18 Biopolymer의 Kaolin 현탁액 응집실험
(biopolymer broth : 10ml)

(4) 보조 응집제 사용시의 잉크페액 응집실험

응집보조제인 FeCl_3 와 Biopolymer broth의 첨가량에 따른 잉크페액의 응집효과를 보기 위하여, 1% 잉크페액 200mL에 FeCl_3 (0.5%) 10ml, 15ml, 20ml, 25ml씩을 첨가하고 생물고분자 용액을 각각 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml 첨가하여 jar test를 실시하여 일정한 시간별로 상등액의 O.D값을 측정하여 응집효과를 비교하였다.

실험결과, 생물고분자 용액의 첨가량 및 FeCl_3 의 첨가량에 따라서 응집속도 및 생성된 floc의 크기 등이 변하였다. 생물고분자 용액을 2.5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 10ml 첨가시 응집효과가 좋았으며, 생물고분자 용액을 5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 10ml, 15ml 첨가시 응집효과가 좋았으며 첨가량이 증가함에 따라 오히려 응집효과가 떨어졌다.

생물고분자 용액을 7.5ml 첨가하였을 때에는 FeCl_3 용액을 10ml 첨가하였을 때와 15ml 이상 첨가하였을 때의 결과는 현저한 차이를 나타내었다. 생물고분자 용액을 10ml 첨가하였을 때에는 7.5ml 첨가하였을 때와 비교하여 볼 때 FeCl_3 의 첨가량이 10ml, 15ml일때는 응집효과가 떨어지나 FeCl_3 첨가량이 20ml, 25ml일때는 응집효과가 우수하였다.

따라서 잉크페액 응집실험에 있어서는 생물고분자 용액 7.5ml, 10ml와 보조첨가제로써 FeCl_3 20ml, 25ml 첨가시 우수한 응집효과를 볼 수 있었다. 시간별 잉크페액 응집실험 결과를 그림 3-19, 3-20, 3-21, 3-22에 나타내었다.

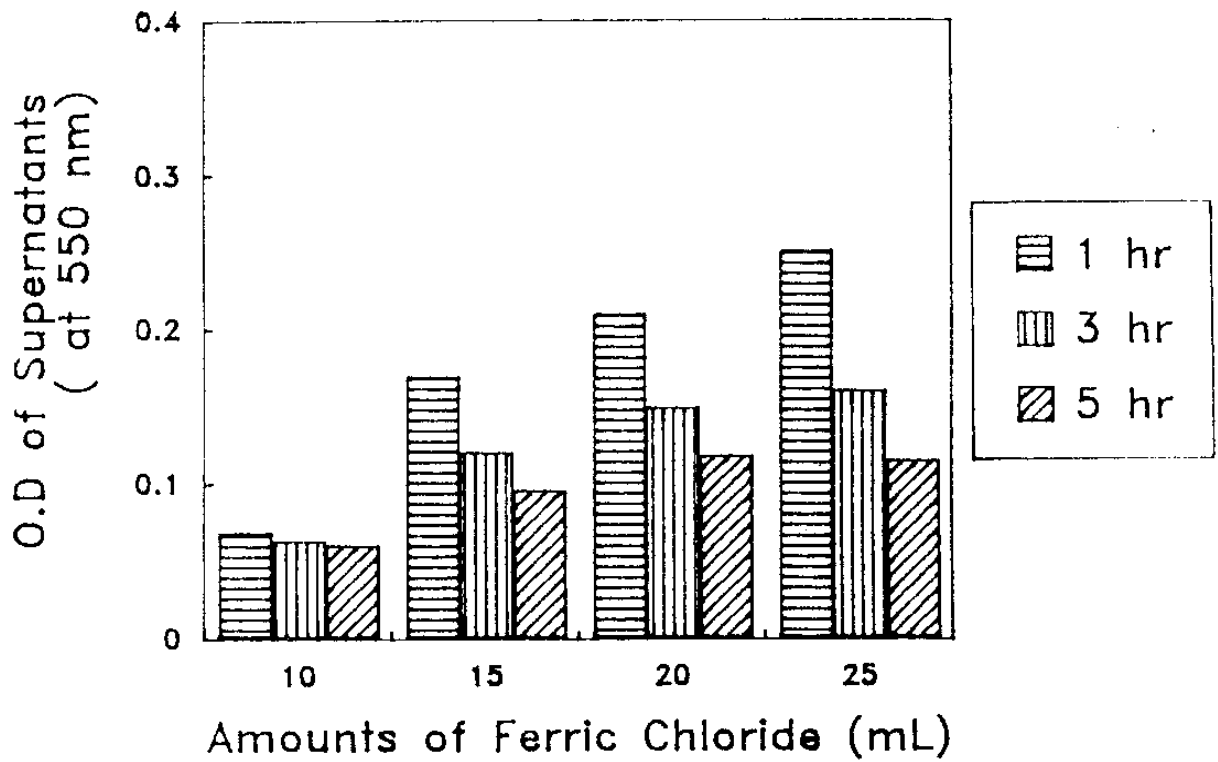


그림 3-19 Biopolymer의 잉크페액 응집실험
(biopolymer broth : 2.5ml)

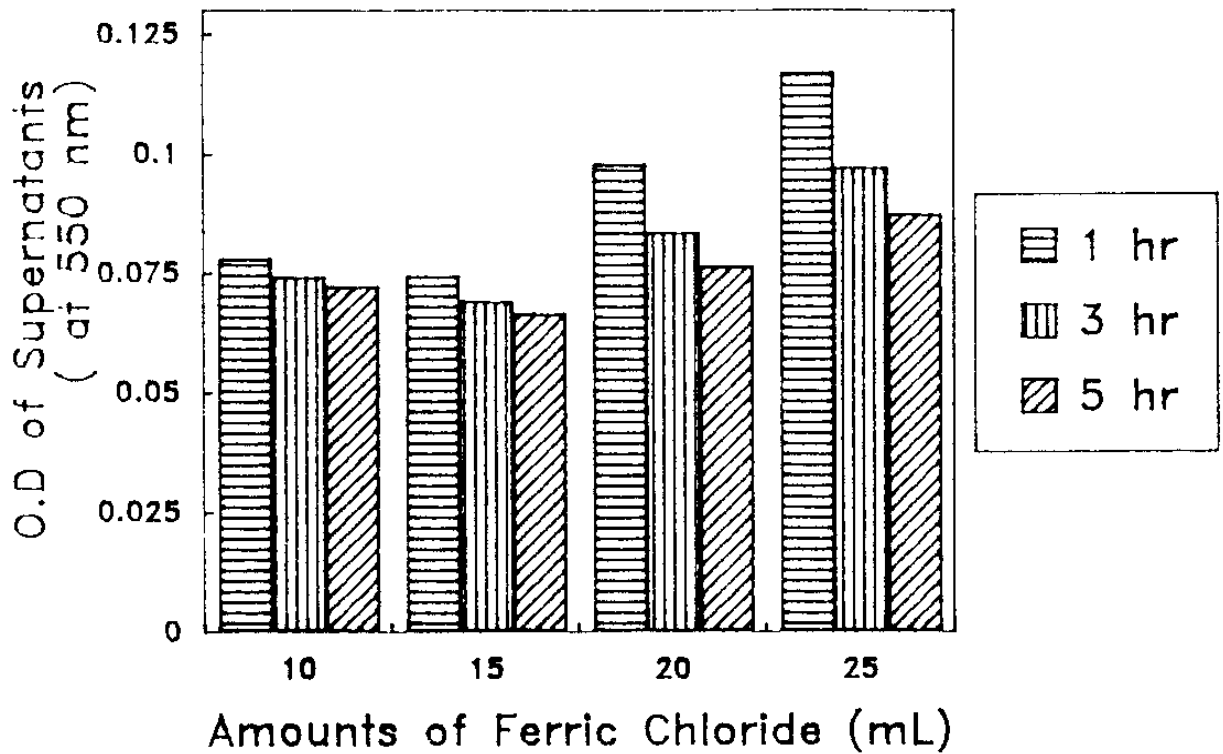


그림 3-20 Biopolymer의 잉크페액 응집실험
(biopolymer broth : 5ml)

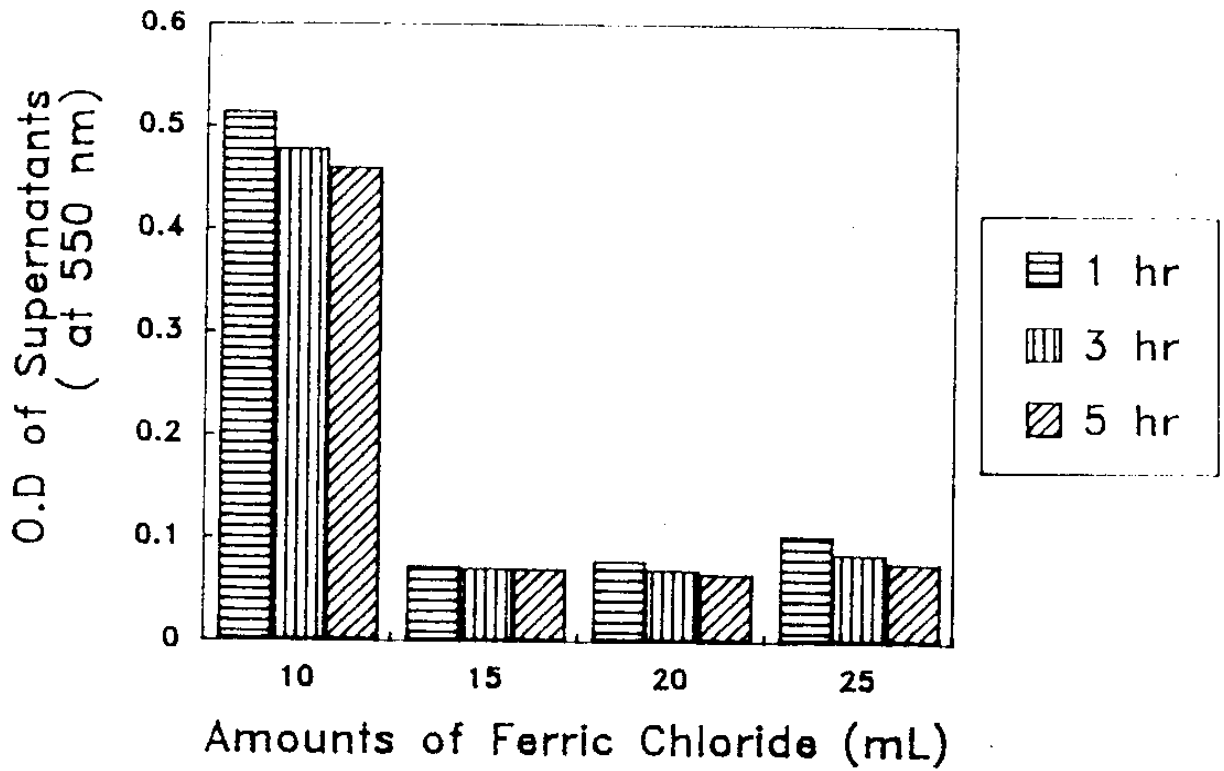


그림 3-21 Biopolymer의 잉크페액 응집실험
(biopolymer broth : 7.5ml)

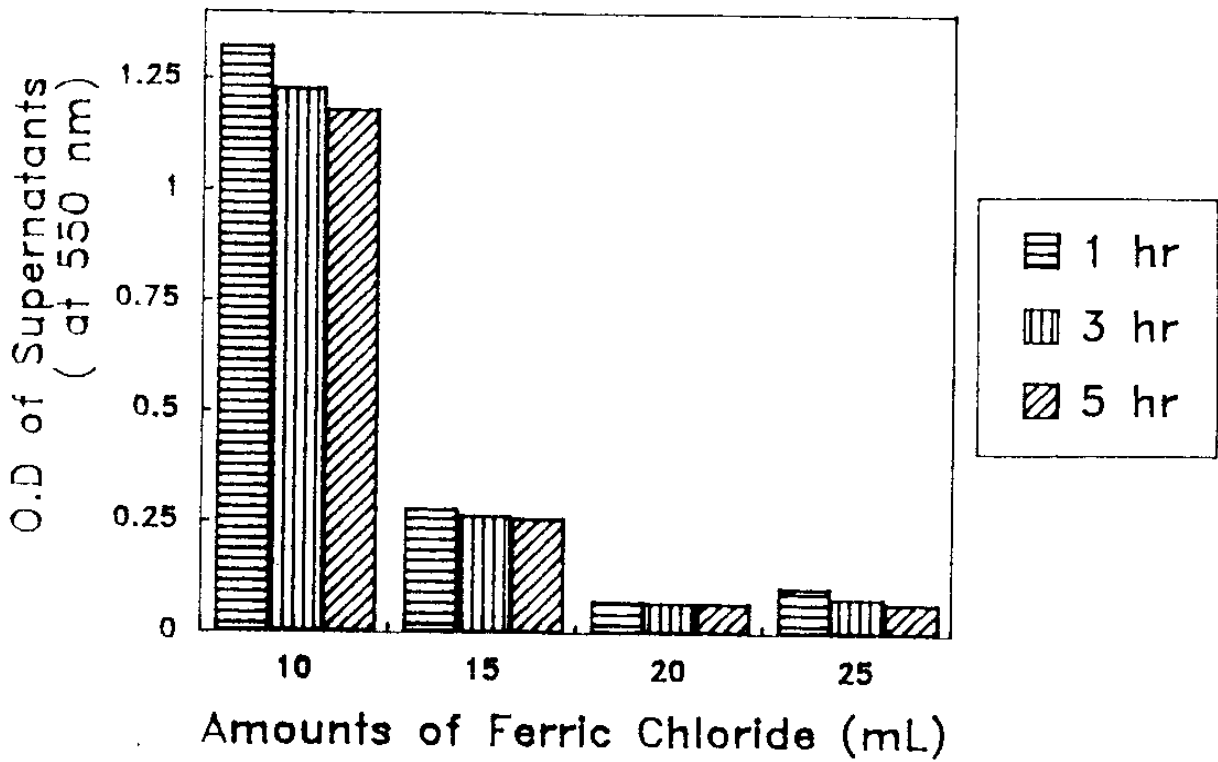


그림 3-22 Biopolymer의 잉크페액 응집실험
(biopolymer broth : 10ml)

(5) 결론

생물고분자의 kaolin과 잉크페액에 응집실험 결과 보조제의 첨가량의 변화 및 생물고분자의 첨가량에 따라서 응집효과에 현저한 차이가 나타남을 알 수 있었다. 위의 실험결과 보조첨가제로서 FeCl₃의 첨가량은 20ml, 25ml이고 생물고분자의 첨가량은 7.5ml, 10ml일 때 응집효과가 우수함을 알 수 있었다.

3. 중금속 흡착실험

가. 실험재료

중금속 흡착실험을 위한 재료로서는 *Zoogloea ramigera*로 부터 생산한 생물고분자를 사용하였으며, 이 생물고분자와 다른 biomass와의 흡착성능을 비교하기 위하여 여러가지 방법으로 고정화된 biomass 및 이온교환수지등을 사용하여 흡착성능을 비교하였다.

(1) 생물고분자

실험에 사용한 생물고분자는 cell로 부터 추출한 후 건조시켜 사용한 건조 생물고분자 형태와 cell과 생물고분자를 함께 건조시킨 형태, 생물고분자를 따로 추출하지 않고 broth상태 그대로 사용하는 방법 및 Calcium alginate에 고정화시켜 사용하는등, 여러가지 형태로 사용하여 흡착성능을 비교하였다.

(2) 이온교환수지

양이온, 음이온 교환수지는 국내에서 시판되고 있는 삼양 다
이아 이온(SFA, RA)을 사용하였다.

나. Batch test

(1) 등온 흡착선 결정 개요

본 실험에서는 *Zoogloea ramigera* 115에서 추출한 생물고분자
의 중금속 흡착특성을 조사하기 위하여 1) 발효조 broth 2) 건조
세포 및 생물고분자 3) 생물고분자 각각의 경우의 중금속 흡착실험
을 실시하여 등온 흡착선을 결정하였다. 흡착곡선은 Langmuir 및
Freundlich model을 이용하여 나타내었다.²⁰⁾

○ Langmuir model의 일반식

$$q = \frac{q_0 b C}{1 + b C}$$

q_0 = maximum uptake

C = equilibrium(final) concentration in solution

b = constant related to energy of adsorption

○ Freundlich adsorption isotherm model

$$q = k C^{1/n}$$

$$\ln q = \ln k + \frac{1}{n} \ln C$$

q = uptake of species (mg/g)

C = equilibrium (final) concentration in solution (mg/L)

$\ln k$ = measure of adsorbent capacity

$1/n$ = intensity of adsorption

(2) Jar test에 의한 생물고분자 흡착실험

(가) 실험방법

*Zoogloea ramigera*가 생산한 생물고분자의 흡착성능을 비교하기 위하여, 1) 발효조 broth 2) 건조 세포 및 생물고분자 3) 생물고분자 4) 이온교환수지와 흡착 성능 비교실험을 실시하여 등은 흡착선을 결정하였다.

실험조건은 상온에서 1시간 동안 300rpm으로 회전시킨 후 각 flask에서 일정량씩 sampling하여 filtering한후, filtrated된 것을 Atomic adsorption spectrophotometer를 이용하여 분석하였다.

(나) 실험결과

카드뮴 인공폐수를 시료로 사용하였을때 각 흡착 물질의 흡착평형은 반응시간 1시간 정도에서 이루어졌으며 용액의 pH가 증가함에 따라 흡착도 증가하였다. 그림 3-23는 카드뮴의 농도변화에

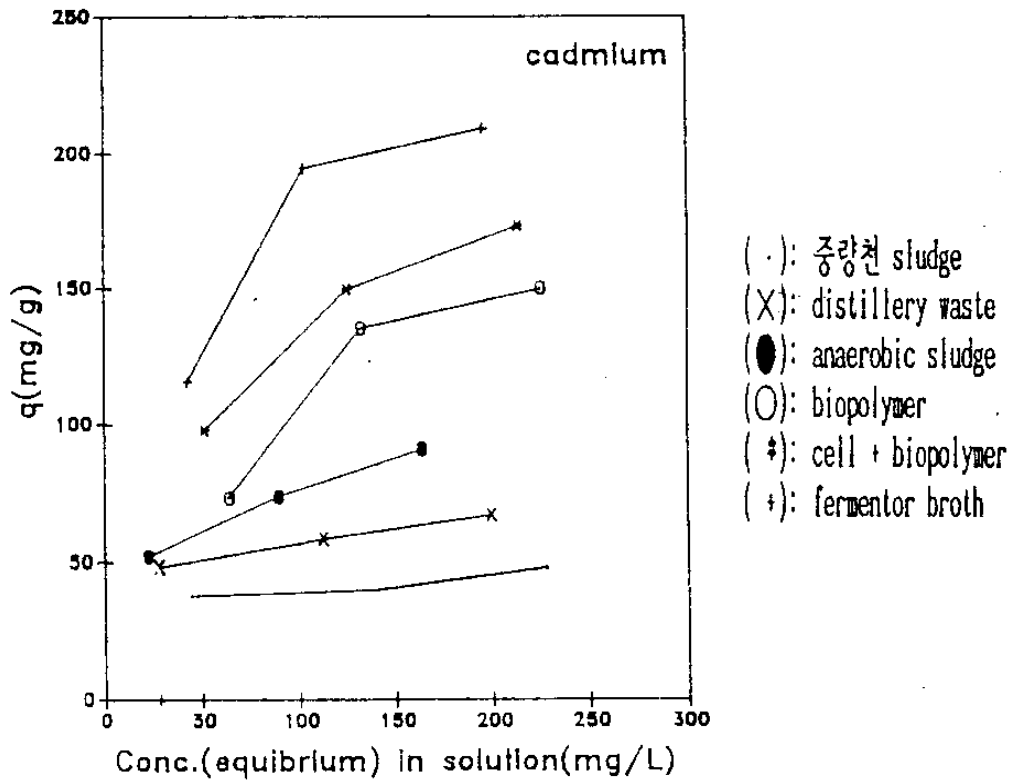


그림 3-23 바이오매스에 따른 Cd 흡착등온선

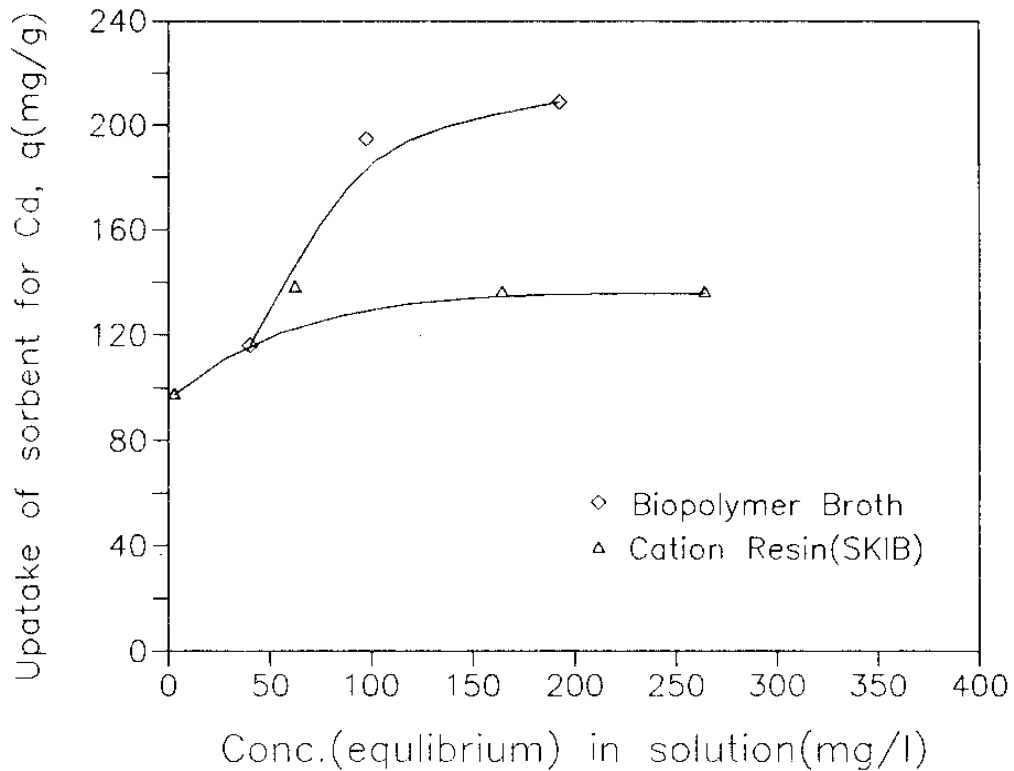


그림 3-24 생물고분자와 이온교환수지의 Cd 흡착 비교

따른 각 흡착물질의 흡착등온선을 나타내고 있다. 흡착량은 발효조 broth, 건조세포/생물고분자, 생물고분자 순서로서 나타났다. broth상 태로 투여한 생물고분자가 가장 높은 흡착율을 나타내고 있는데, 생물고분자의 추출경비를 절감하며 직접 투여 사용할 수 있을 결 로 기대된다. 그림 3-24는 발효조 broth와 중금속 흡착제로 시중 에서 판매하고 있는 이온교환수지와 의 중금속 흡착성능을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 실험결과 Cd에 대하여 발효조 broth가 이 온교환수지에 비하여 우수한 흡착성능을 나타내었다. 이러한 결과는 생물고분자의 수처리제로서의 사용가능성을 제시하는 결과로 생각된 다.

각 실험 data를 이용하여 langmuir 및 Freundlich식의 상수 를 결정하여 표 5-6, 5-7에 나타내었다.

표 3-17 Determination of log k and 1/n in Freundlich isotherm model

sorbent materials	log k	1/n
biopolymer	1.23	0.58
cell + biopolymer	1.86	0.41
fermentor broth	2.00	0.40

표 3-18 Determination of q_0 and b in Langmuir isotherm model

sorbent materials	maximum uptake capacity (q_0)	constant related to energy of adsorption (b)
biopolymer	294.12	0.005
cell + biopolymer	232.56	0.015
fermentor broth	303.03	0.015

(3) 흡착반응기 실험

유기금속회수를 대상으로 하는 흡착반응기 개발을 위한 기초 연구로서, *Zoogloea ramigera* 115 배양액으로 부터 추출한 생물고분자를 calcium alginate에 고정화 시킨 후 packed bed column을 이용한 여러가지 중금속 흡착실험을 수행하였다. 그림 3-24은 고정화된 bead의 packed bed column을 보여주고 있다. 여러금속에 대하여 1시간씩 30 batch실험을 한 후, bead에 흡착되어 있는 금속은 0.48% NTA(nitrilotriacetic acid)를 이용하여 탈착시켰다. packed bed column에서의 고정화된 bead에 의한 Cd, Zn, Mn, Cu의 흡착실험을 실시하였다. 흡착실험결과는 표 3-19, 3-20, 3-21, 3-22에 나타내었다.

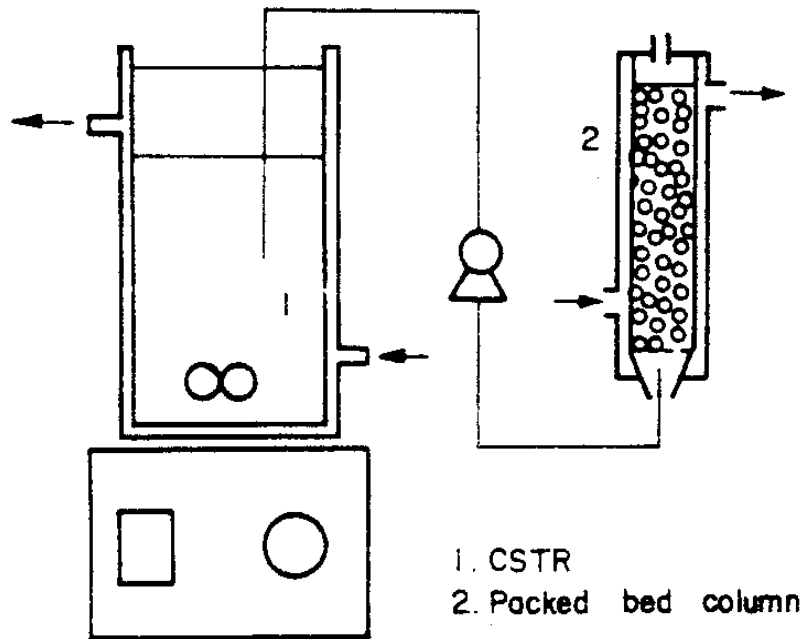


그림 3-25 Schematic diagram of the differential reactor

표 3-19 Adsorption of Cd by biopolymer immobilized into Ca-alginate beads

Batch number	concentration of Cd in initial solution (mg/L)	Cd adsorbed in column (mg/L)	% removed
1	107	98.7	92.2
5		98.4	92.0
15		96.2	89.9
20		97.4	91.0
25		89.6	84.3
30		87.7	82.0

Æ 3-20 Adsorption of Zn by biopolymer immobilized into Ca-alginate beads

Batch number	concentration of Cd in initial solution (mg/L)	Cd adsorbed in column (mg/L)	% removed
1	112	107.1	95.6
5		106.1	94.7
15		100.4	89.6
20		93.7	83.7
25		97.7	87.2
30		95.6	85.4

Æ 3-21 Adsorption of Mn by biopolymer immobilized into Ca-alginate beads

Batch number	concentration of Cd in initial solution (mg/L)	Cd adsorbed in column (mg/L)	% removed
1	104	95.9	92.2
5		95.7	92.0
15		92.8	89.2
20		91.7	88.2
25		89.6	85.0
30		81.1	78.0

Æ 3-22 Adsorption of Cu by biopolymer immobilized into Ca-alginate beads

Batch number	concentration of Cd in initial solution (mg/L)	Cd adsorbed in column (mg/L)	% removed
1	109	102.9	94.4
5		100.3	92.0
15		98.0	89.9
20		99.2	91.0
25		95.7	87.4
30		91.8	84.2

Calcium alginate에 고정화된 생물고분자를 충전물질로 사용하는 packed bed column를 통한 중금속 흡착실험에 있어서, Cd의 경우는 30batch후 82%의 흡착율을 나타냈으며, Zn의 경우는 85.4%, Mn의 경우는 78%, Cu의 경우는 84.2%의 흡착율을 나타냈다. 각 중금속의 흡착실험이후 NTA를 이용한 탈착실험의 결과는 각 금속별로 차이를 나타내어, Zn, Cu의 경우는 3hr이후 70%이상의 탈착율을 나타냈으며, Cd의 경우는 60%, Mn의 경우는 20%의 낮은 탈착율을 보였다. 탈착이후의 bead의 흡착성능을 조사하기 위하여 각 금속별로 흡착실험을 수행하였다. Cd의 경우 78%, Zn의 경우 81%, Mn의 경우 75%, Cu의 경우 81%의 흡착율을 나타냈다. 즉, Cd의 경우 4%, Zn의 경우 5%, Mn의 경우 2.5%, Cu의 경우 3%정도씩 탈착시킨 후의 흡착실험에 있어서 흡착성능이 떨어지는 것으로 나타났다.

제 4 장 PHB의 생산과 분리 정제

제 1 절 PHB(poly- β -hydroxybutyrate)의 개요

합성폴리에스테르의 역사는 수십년이지만 미생물은 몇억년이나 태고적부터 자연계에서 폴리에스테르를 만들어왔다. 수많은 원핵생물은 여러가지 먹이의 탄소원으로부터 폴리에스테르를 합성하고, 그것을 에너지 저장물질로서 체내에 축적하고 있다. 생활환경이 취약해 탄소원이 없으면, 폴리에스테르를 분해하여 생명활동의 에너지로 썼다. 따라서, 폴리에스테르는 동물의 지방이나, 식물의 전분에 상응하는 것이다.

미생물이 만드는 최고의 전형적인 폴리에스테르는, D (-)體의 3-Hydroxy butylide (3HB) unit가 1만개 이상이나 결합한 고분자량의 광학활성폴리에스테르, P(3HB)이다. P(3HB)는, 1925년에 파스퇴르연구소의 Lemolbne에 의해서 *Bacillus megaterium*으로부터 추출되어, 1927년에는 3HB unit로된 고분자로 同定되었다.^{21).22)}

미생물들은 당류, 유기산, 알콜, 탄산가스 등 여러가지 탄소원으로부터 폴리에스테르를 생합성한다. 탄소원들은 미생물의 체내에서 여러가지 대사경로를 거쳐, 아세틸-補酵素-A(Acetyl-Co A)로 변환한다.

Acetyl-Co A는, Tricarmonicacid(TCA)회로에 들어가, 에너지 생산이나 아미노산 합성에 사용된다. 그러나 과잉량의 Acetyl-Co

A가 생성되면, 이 일부는 P(3HB)로 되고 에너지나 탄소저장물질로서 장래를 위해 축적된다.

P(3HB) 생합성은, 우선 2분자의 acetyl-Co A가, 효소 3-keto tiolase의 작용에 의해 축합되고, Acetacetyl Co가 된다. 그리고, 미생물은 환경에서 얻을 수 있는 탄소원이 없으면 체내의 P(3HB)를 Acetyl Co A로 분해하고 에너지 생산이나 아민합성을 위해서 사용하는 것이다.

1. 구조 및 물성

박테리아를 이용한 발효과정으로 얻을 수 있는 PHA중에서 제일 처음으로 알려진 것은 3-hydroxybutyric acid의 반복단위를 가지는 폴리에스테르인 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]가 있다.¹⁾

미생물이 합성하는 생분해성 polyester인 PHB는 많은 fungi와 bacteria에 의해 에너지저장물질로 사용되는 고분자로서, ICI에서는 생물분해되는 열가소성 플라스틱으로서 이것의 생합성에 대한 pilot 생산을 해왔으며, 그 물성의 특성이 다음과 같이 polypropylene과 비교된다. PHB의 장력과 융점등은 범용 플라스틱인 폴리카로필렌과 아주 비슷하나 파괴신도는 폴리프로필렌보다 훨씬 적으며 따라서 PHB는 폴리프로필렌보다 더 딱딱하고 부서지기 쉽다. 그러나 겔방사(gel spinning)법에 의하여 섬유로 만들 수 있다.^{23), 24), 25)}

표 4-1 PHB와 polypropylene의 물성 비교²³⁾

property	PHB	polypropylene
Crystalline melting point, °C	175	176
Crystallinity, %	80	70
Molecular weight, daltons	5×10^5	2×10^5
Glass transition temp., °C	15	-10
Density, g/cm ³	1.25	0.905
Flexural modulus, GPa	4.0	1.7
Tensile strength, MPa	40	38
Extension break, %	6	400
UV resistance	Good	Poor
Solvent resistance	Poor	Good

2. 생산균주

여러 균주로부터 PHB를 생산하는 연구가 활발한데, 그생산 균주와 주원료로는 다음표와 같다. 탄소원으로 glucose, maltose, fructose, manitol, lactate, methane과 이산화탄소 등을 사용했고, 배양 방법으로는 batch와 continuous 모두를 사용했으며 생성고분자 함량은 다음과 같다.

표 4-2 PHB의 생산 균주와 주원료¹⁾

균 주	탄소원	배양방법	PHB함량(% -dry cell)
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	glucose	batch	74
<i>Azospirillum braeilense</i>	malate	"	75
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H1b	fructose	"	5
<i>Chromobacterium violaceum</i>	glucose	"	37
<i>Pseudomonas salanacearum</i>	glucose	"	30
<i>Rhizobium</i> sp.	manitol	"	57
<i>Spirillum</i> sp.	lactate	contiuous	18
<i>Hydrogenomoas</i> sp.	CO ₂	batch	65
<i>Metylocystis parvus</i> OBBP	methane	"	70

3. 생산기술

가. fed-batch배양에 의한 PHB의 대량생산법

(1) 요약

어떤 미생물들은 이 polymer를 전체질량의 80%이상까지 축적할 수 있으며, CO₂나 methanol, ethanol과 같은 상대적으로 더 값싼 기질로부터 생산할 수 있다. Solid PHB는 지금 사용되고 있는 많은 편리한 가소성 플라스틱과 같은 특성을 가지는 생분해되는 열가소성 폴리에스테르이다. 즉 이것은 주형할 수 있고, 무기물을 채워넣어 보강할 수 있고, fiber나 뛰어난 기체 차단 특성을 갖는

film 형태를 만들 수 있으며, 공중합체를 가질 수 있다.^{26), 27)}

PHB의 생산은 batch, fed-batch, continuous법 등으로 이루어지고 있는데, 그 중 생산성이 높고 보편적으로 연구되어지는 fed-batch법에 대해 소개하기로 한다.

T.Suzuki, T.Yaamane, S.Shimizu 등은 *Pseudomonas* sp. K 균주를 사용하여 PHB 농도를 136g/l까지 얻었다고 보고하고 있다.²⁶⁾ 이것의 대량생산을 methyltroph의 fed-batch culture에 의한 방법으로 수행했으며, 이 방법은 microcomputer지원이 되고, 온도는 30°C, 용존산소의 농도(DO)는 2.5 ± 0.5 ppm, 배양액 내의 methanol농도는 0.5 ± 0.2 g/l로 수행한다. 고농도의 cell(160g/l)에 도달했을 때, 암모니아와 미네랄 공급을 중단하면, PHB가 성공적으로 축적되어 175시간이면 PHB의 높은 농도(136g/l)를 얻고 이때 총 cell농도는 206g/l이다. PHB생산 phase일때 DO를 임계값 이상으로 유지시키면, methanol로부터의 PHB 생산 수율은 0.18이고 PHB의 최대량은 건조무게의 66%에 달한다. 이 PHB의 녹는 점은 176°C이고, 그 평균 분자량은 3.0×10^5 이다.

(2) 재료 및 방법

PHB생산균인 *Pseudomonas* AM-1, *Pseudomonas* sp.K, *Protaminobacter ruber* NR-1, *Methylomonas clara*, 그리고 soil로부터 분리해낸 명명되지않은 47가지의 종을 세포내 생산 고분자 PHB의 축적능력과 탄소원으로 사용된 methanol에서의 성장속도에 대해서 screening 했다.

초기 methanol농도는 1%로 하고, 배양 25시간후에 O.D를 측정해서 성장속도에 미치는 배지 조성의 영향을 조사한다.²⁸⁾

배지 조성의 분포는 Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mo^{6+} , Na^+ 등을 하나씩 제거하면서 그 조성을 정한다. 초기 methanol은 10g/l이고, 매 2일이 지날때마다 0.5g씩을 각 100ml 배양액에 첨가한다. 이 배양은 150-200시간을 30°C에서 수행한다.²⁶⁾

fed-batch배양의 초기배지 조성은 batch배양의 성장 최적 배지와 같다. 이것은 25시간 배양후 그 배양액의 optical density를 측정해서 정하는데, 각각의 10ml배지마다 0.1ml의 seed culture로 했다. 그리고 각 성분을 세포성장에 제한 또는 금지해서 배지 조성의 농도에 대한 세포성장을 profiles해서 그 최적조건을 정한다. 초기 methanol농도는 0.5g/l이다.

seed culture는 10개의 500ml 플라스크를 shaker에서 30°C로 3일간 한다. seed를 멸균상태로 원심분리하여 반응기에 접종하는데, 이 Bioreactor(Type MB, Iwashiy Co., Ltd., Tokyo)는 four-bladed disk turbine impeller($D_i/D_T=0.5$)와 3개의 baffle이 달린 것이다. 배양액의 초기부피는 0.75L이고, 온도와 pH는 최적값으로 (30°C, 7.0) 자동으로 조절된다.

methanol의 농도가 $0.5 \pm 0.2g/l$ 로 자동조절되는데, 이것은 다공질의 Teflon tubing sensor와 flame ionization detector(in a Hitachi gas chromatograph, Model 163), 그리고 microcomputer로 구성된 control system을 사용하였다. 그리고 미리 set된 PID control 프로그램을 이용하였다.

배양액의 DO는 microcomputer를 사용하여 2-3ppm으로 조절한다. 공기와 유리산소의 공급속도의 비와 교반속도는 PID프로그램으로 자동조절된다.

각각의 미네랄이온은 건조세포의 조성과 배양변수값에 따라 계산되었다. 그 계산으로부터 두 종류의 미네랄용액, 산과 알칼리용액이 준비되었다. 산용액은 메탄올의 공급과 함께 주어진다. 알칼리용액은 암모니아를 가함으로써 배양액의 pH를 유지시키며 메탄올과 함께 사용한다. 암모니아용액의 pH의존도 또는 알칼리용액의 pH조절은 자동으로 이루어진다. 암모니아수가 공급될때 산용액과 알칼리용액은 메탄올의 공급과 함께 같은 종류의 모터와 펌프를 사용해서 조절한다. 즉, $(\text{ml}-\text{minerals feed})/(\text{ml}-\text{methanol feed})=0.063$ 이고, $(\text{ml}-\text{ammonia feed})/(\text{ml}-\text{methanol feed})=0.125$ 이다. fed-batch culture의 exponential phase동안에는 암모니아수와 미네랄용액이 연속적으로 공급되어 nutrient농도를 맞추도록 해야한다. exponential growth phase의 끝부분에서는 세포농도가 150g/l까지 되며, 이때 nutrient 공급은 중단된다. 그리고 나서 단지 메탄올만 연속적으로 공급해준다. 완전 fed-batch배양의 이러한 nutrient공급방식의 모식도는 다음과 같다.

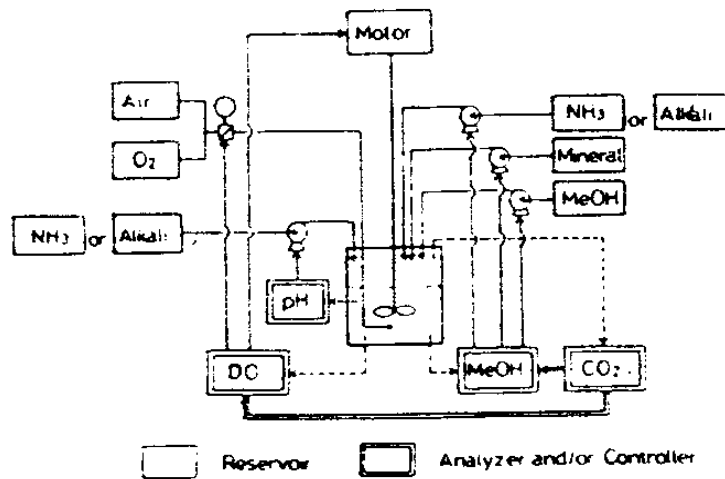


그림 4-1 System for computer-aided fed-batch culture¹⁾

(3) 결과

많은 미생물이 세포내에 PHB를 축적하고 있지만, 그 양은 각기 다양하다. 세가지 종류가 PHB를 건조세포 무게의 50% 이상 생산한다. *Pseudomonas* sp. K는 최소의 합성배지에서 좋은 성장을 나타내고 앞으로 실험적으로 훨씬 더 적응시킬 수 있다.

fed-batch 배양을 최적화 하기위해서 초기 배지의 조성을 적당하게 알아내야하고 미네랄 공급 용액도 배양조건과 마찬가지로 적당히 맞출필요가 있다. 최대 비 성장속도는 온도 30°C와 pH 7.0에서 얻어졌다. 성장속도에 대한 여러가지 조성의 농도의 영향이 조사되었다. 즉, 질소원으로는 여섯개의 암모늄화합물의 세포성장에 대한 영향을 조사했는데, 그 종류로는 NH₄Cl, NaNH₄HPO₄ · 4H₂O, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄HCO₃, NH₄NO₃이 사용되었다. 모든 암모늄화합물의 영향은 비슷한데 모든 경우 최적농도는 0.2g/l의 암모늄이온농도이고 1.0g/l를 초과하면 심각하게 성장이 억제된다.

인산이온의 농도는 K_2HPO_4 , 또는 $NaHPO_4$ 와 KH_2PO_4 를 혼합해서 변화시켰다. 세포성장은 여러가지 양이온, Na^+ , K^+ 에 무관하지만 PO_4^{3-} 의 농도에 대해서는 상당히 영향을 받는다. 그 최적농도는 2g/l이다.

표 4-3 Effect of medium component deficiency on PHB production¹⁾

Deficiention	Final cell concentration(g/l)	Final PHB content(%)
$NH_4^{+a)}$	0.6	52-57
$SO_4^{2-b)}$	1.3	48-53
$Mg^{2+b)}$	1.1	45-50
Fe^{2+}	1.6	43-48
Ca^{2+}	0.9	0-10
Zn^{2+}	1.3	0-10
Mn^{2+}	1.9	50-55
Co^{2+}	1.6	0-10
Cu^{2+}	1.7	0-10
Mo^{6+}	1.7	0-10
Na^+	1.2	0-10
Control	1.7	0-10

a) The basal medium was Medium A. Initial methanol concentration was 10g/l and 0.5g of methanol was added into each 100ml of the culture every 2 days during cultivation

b) These ions were not completely eliminated form the initial medium

Pseudomonas sp. K는 11종류의 배지에 대해 분리하여 배양하였다. 여기에서는 NH_4^{2-} , SO_4^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} , Na^+ 등을 배지 A에 제거하거나 제한하였다. 그 세포 성장속도와 PHB양은 표 4-3과 같다.

이 경우에는, NH_4^+ , SO_4^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} 가 분포된 배지는 PHB의 축적량이 많고, 반면에 다른 원소가 분포된 배지는 PHB는 거의 합성되지 않았다. Na^+ 또는 Ca^{2+} 의 경우는 PHB의 축적이 없었다. 원소들의 이런 경향은 배지의 순수성만큼 각 배지에 충분히 고려되어야만 할 것이고, 그 염의 상태로 첨가되지 않더라도 접종과 동시에 공급해주어야만 했다.

많은 미생물의 배양공정에서 암모니아수는 pH를 조절할 뿐만 아니라, 질소의 공급원으로서도 사용된다. 그러나, 세포의 exponential growth phase에서는 암모니아수를 낮은 농도로 사용해야 한다(0.2g/l). 만일, 암모니아수를 탄소원과 함께 동시에 공급하면 가능할 수도 있다(Suzuki et al. 1985). 이 방법에서는 pH 조절은 질소공급과는 분리되며, 알칼리용액과 효과가 있다. 배양의 결과가 다음 그림에 나타나 있다. 암모니아의 농도는 growth phase동안 낮은 농도를 유지하며 공급하면, 세포의 성장은 떨어지지 않는다. 72시간의 배양에서 DO는 2-3ppm에서 더 이상 유지할 수 없었고, 생물반응기의 산소 전달속도 제한에 의해 사용된다. (교반 속도와 순수산소기체의 흐름 속도는 각각 1400rpm, 11/min이다.) cell mass농도는 160g/l에 달하고 배양액의 양은 1.2L이다. 이때, 암모니아수와 mineral용액의 공급이 멈춰졌다. 세포내 분비 PHB 양은 배양액의

암모니아 농도가 떨어지면 증가하기 시작한다. PHB의 최대량 136g/l에 도달하면서, 세포농도 206g으로 하기 위해서는 100h에 질소원 공급을 멈춘다. 이것은 PHB의 최대농도를 66%로 만든다. 그 배양액은 1.7L까지 늘어난다.

Methanol로부터 완전자동 fed-batch의 *Pseudomonas* sp. K배양에 의해 생산된 고체 PHB의 녹는점은 176°C이다. 그 Infrared spectrum은 확증된 sample의 녹는점과 같다. 평균 분자량은 약 3.0×10^5 이고, 그 범위는 꽤 넓다.

다음에는, 수소세균 *Alcaligenes eutrophus*를 사용해서 탄산가스(CO₂)와 수소가스(H₂)로부터 P(3HB)를 발효합성한 연구결과가 나타나 있다⁴⁹⁾. 이 발효 합성법에 대해서는, 다량의 인산이온과 소량의 암모니아 이온을 함유한 미네랄 배지로, *A. eutrophus*를 Batch-배양하고, H₂(에너지원)와 CO₂(탄소원)를 공급하고, 증식과 P(3HB)합성을 행하고 있다. 그 결과는 그림 4-2와 같은데, 배양 개시 후 15시간까지는 증식에 의한 총균체량과 단백질량이 증가하고 증식기에 대해서는 P(3HB)생합성량은 감소한다. 그런데 배지의 NH₄⁺이온이 소비된 배양 15시간 이후에는 증식(단백질 합성)이 정지되고, 대신에 P(3HB)의 양이 대량으로 합성(축적)되기 시작한다. 배양 60시간 후에는 P(3HB)량이 건조균체 중량의 80%에 달하고 있다. 이와같이, 탄소원이 풍부하게 있고 증식을 위한 영양원(예, 질소원)이 부족한 제한 배양조건 하에서는 폴리에스테르가 효율적으로 발효합성되는 것이다.

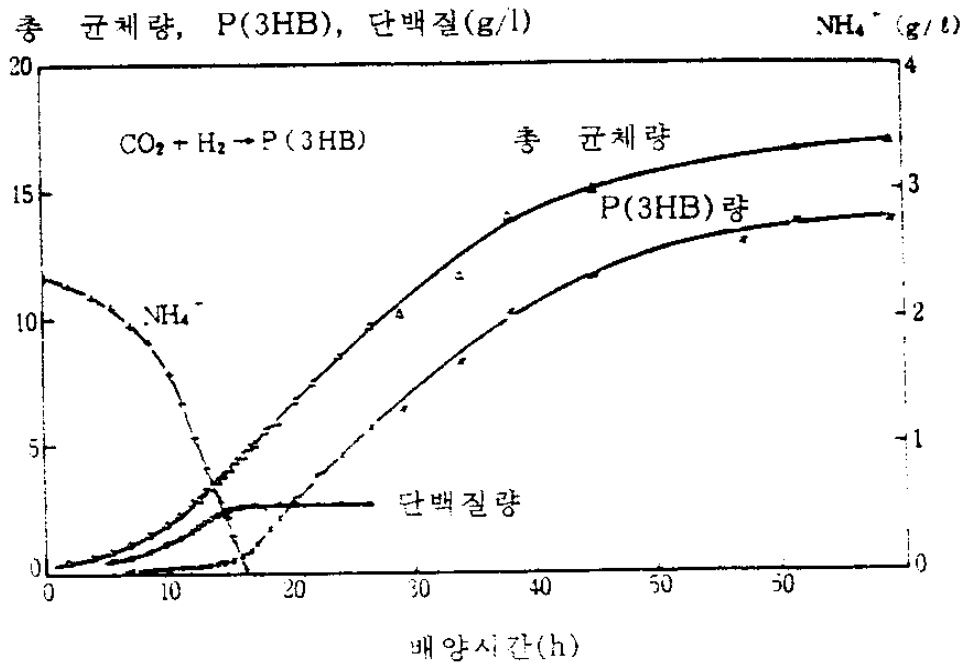


그림 4-2 수소세균 *Alcaligenes eutrophus*에 의한 P(3HB)의 발효합성³⁾

나. 세포로부터 PHB의 Isolation

미생물은 폴리에스테르를 입자직경이 0.5-1.0 μ m 정도의 과립으로서 체내에 축적하고 있다. 이 과립의 성분은 폴리에스테르가 약 98% 있고, 단백질과 지질이 2%로 있다. 이러한 폴리에스테르 과립은 균체를 각종의 효소나 차아염소산나트륨으로 처리한 것에 대해서 세포벽이나 세포성분이 용해되기때문에, 미립자로서 취하는 것이 가능하다.²⁹⁾ 또, 클로로포름 등은 유기용매를 사용하는 추출법에 의해서도, 세균체내로부터 고순도로 폴리에스테르를 취해 내는 것이 가능하다. 이와같이 해서 만들어낸 P(3HB)는 극히 고분자량(수십만에서 이백만)의 고결정성 폴리에스테르이고, 더우기 180 $^{\circ}$ C 전후에서 용융하는 성질(열가소성 플라스틱)도 있다. P(3HB)의 분자쇄는 전체

가 D-체의 3HB unit로부터 된 고분자이기때문에, 오른쪽감기의 2helix구조를 취한다. 그렇기 때문에 P(3HB)는 고체상태로는, 고결정성의 광학활성 폴리에스테르가 된다. P(3HB)의 물성치는 밀도가 1.25g/cm³, glass전이온도 T_g가 5°C이고, 융점이 180°C이다. 인장강도는 43MPa(23°C)이고, 이 수치는 polypropylene의 인장강도 38MPa와 같은 정도이다. 그러나, P(3HB)의 파괴신장은 5%로 극히 작아, 딱딱하면서도 부드러운 재료이다. 그러므로, 미생물이 P(3HB)를 높은 생산효율로 만드는것은 알려져 있지만, 구조재로서 실용화 되지는 않았다. 균체로부터 고분자를 추출하는 것을 도식화하면 다음과 같다.

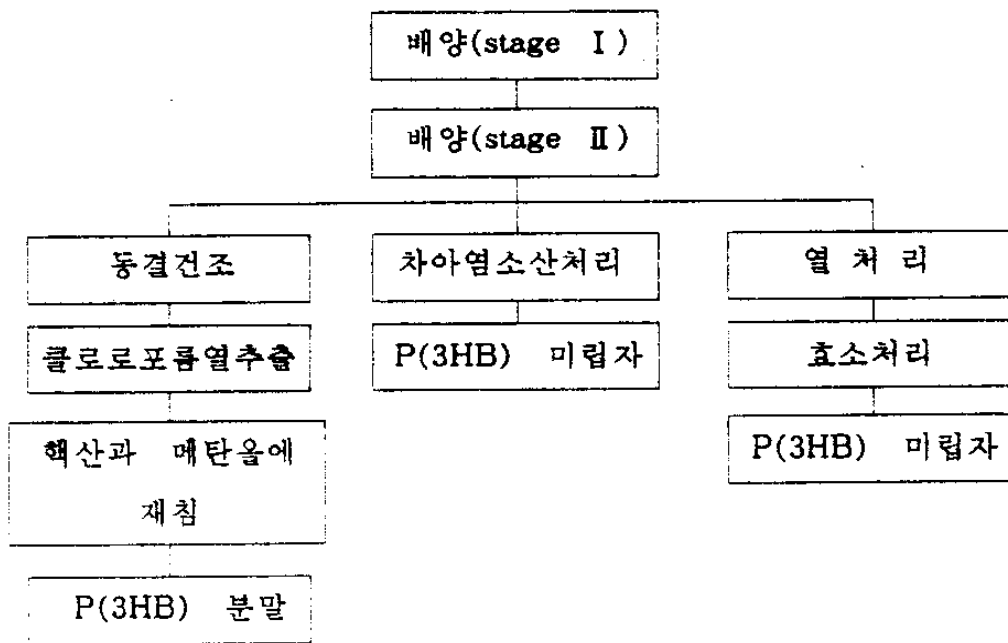


그림 4-3 균체로부터 P(3HB)의 추출방법⁴⁾

Cell로부터 PHB를 isolating하는 방법으로는 수많은 공정이 있다. 그중 미국 특허를 출원한 한 공정이 다음그림과 같다.^{24),30)} 이 공정에서, PHB입자를 포함하고 있는 cell은 원심분리해서 제거하고 acetone, methylene chloride, ethanol등으로 washing한다. 비슷한 연속 추출 공정으로 PHB-PHV polymer의 생산과 용매회수가 가능하다. 현재의 생산비용은 \$7/kg이지만, 가까운 미래에 상업plant를 사용하면, 그 비용은 50cents/kg으로 기대할 수 있다.^{24),31),32),33)}

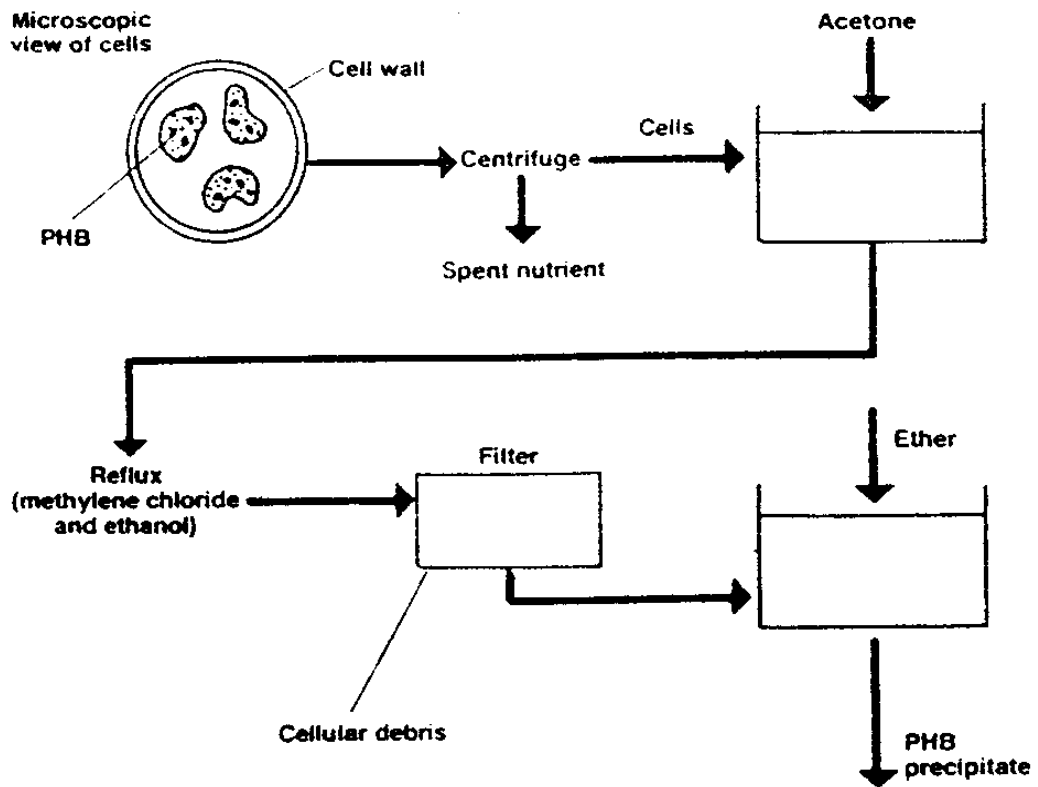


그림 4-4 Cell로부터의 PHB 생산 공정도³⁴⁾

4. PHB의 적용분야

PHB의 특성과 용도는 다음표와 같으며 bio-medical 분야, 의약품, 식품, 화장품등에 이용되고 있다.^{24), 1), 34)}

표 4-4 PHB의 적용분야 및 용도¹⁾

응용분야	특 성	용 도
Bio-medical분야	공기, 수분, 자외선에 대한 안정성 인체무독성 생체조직과의 용화성	수술용 봉합사, 수술용솜, 접골이음쇄 가제, 유화제 1회용 의료기, 부인위생용품 인공장기(인공신장, 인공폐), 항의혈성 생체고분자막(혈장, 체액등의 여과와 투석), 인공피부
의약품 식품 화장품	서방성(controlled release) 무독성, 다공성, 기체차단효과 압전성 자외선 차단효과	약품전달 수단(서서히 방출-효과의 극대화) 식품포장용 필름, 특수포장제 압력감지 장치 합성향료, 홀몬, 항생제, 의약품등에 광학이성체 이용 다이어트 식품(포만감) sun screen용 cream류
공업용	생물분해성 PE, PP와 물리, 화학, 기계적 유사성	polyester대체용 polypropylene대체용

위의 표에서 보듯이, PHB는 인체에 무독성이며, 생체조직과 용화성이 있어 수술용 봉합사, 수술용 슝, 접골 이음체 등의 의료용품(bio-medical)에 사용되며, 압전성(piezoelectricity)을 가지고 있어서 압력감지 장치등에 사용가능하다. 또한 서방성(controlled release)을 이용하여 농약의 코팅제로 사용하거나 약품전달 수단으로도 응용가능하며, 다이어트 식품으로도 이용할 수 있다. 그러나 무엇보다도 가장 중요한 특성은 생물분해가 가능한 것으로 식품포장용 및 일회용제품포장용 등의 재료로 사용된다면, 현재까지 천연고분자물질을 대체하여 사용되어 온 여러 합성고분자물질의 난분해성 성질로 인한 심각한 공해문제를 해결할 수 있게 된다. 더구나 PHB는 합성 고분자인 polypropylene과 유사한 물리, 화학, 기계적 성질을 가지고 있으므로 biotechnology분해에서 그 산업적인 활용가능성에 대해 많은 주목을 받고 있는 것이다.³⁵⁾

5. 개발현황

영국의 ICI 사는 PHB 생산균주로 *Alcaligenes eutrophus*를 이용하여 2차배양시 glucose나 유기산을 첨가하는 2단계 배양법으로 균체건조 중량의 80%까지 PHB를 축적할 수 있었다. 그 당시는 10kg/week의 속도로 PHB를 생산해 내었는데 최근들어 난분해성 합성고분자의 사용에서 발생하는 환경문제 때문에 ICI 사는 그들의 공정을 200,000L fermenter의 규모로 확장하였으며, PHB의 순도를 95%까지 증가시켰다고 한다.^{5), 26), 35)} 반면, Massachusetts대학의 연구진은 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*과 *Pseudomonas oleovorans*

를 포함한 몇종의 새로운 미생물을 이용하여 PHB를 생산하고 있으나 ICI 사에 비해 훨씬 초기단계에 있어 40% 정도의 PHB를 얻고 있다.^{1),36)}

Suzuki등은 microcomputer를 이용한 유가식 배양법에 의해서 methanol로부터 *Pseudomonas* sp. K를 이용, PHB를 세포무게의 66%인 136g/l의 수준으로 축적시키는데 성공하였다.^{4),1),37)}

국내에서의 PHB 생산에 관한 기초 및 연구개발 현황은 아직 초기단계에 머물러 있다. 1982년 질소고정 세균인 *Rhizobium japonicum*을 분리하여 최대 생체중량의 40%, 5.6g/l의 PHB를 얻었고^{1),38)}, 태평양화학은 fructose를 유가식으로 첨가하는 배양법으로 균체농도의 70%인 12.0g/l의 PHB를 얻었다고 한다.^{1),39)} 또한 (주)고려합섬에서는 미생물을 이용한 발효법으로 현재 자체소유의 pilot plant를 이용, 상업화를 위한 scale-up연구와 함께 신제품을 생산하여 국내 및 일본의 여러 업체와 공동으로 용도개발에 나서고 있는 것으로 알려졌다.^{1),40)}

경북대 유전공학과에서는 methanol산화세균인 *Methylobacterium* sp. GL-10을 새롭게 분리하여 PHB의 대량생산을 위한 기초적 연구를 수행하여, 세포건조중량의 40%까지 PHB를 축적하였다. 그리고 methanol에 의한 기질 저해성을 극복하고 균체를 고농도로 배양함과 더불어 PHB를 최대한 축적시키기 위하여 기질을 간헐적으로 첨가하는 fed-batch법으로 배양한 결과, 균체량은 14g/l까지, 그리고 PHB는 5.5g/l까지 생성시킬 수 있었으며^{5),39)}, 배양액내의 용존산소농도를 지표로한 intermittent feeding fed-batch방법으로 배양

한 결과 균체량의 50%까지 PHB를 축적할 수 있었다.⁴¹⁾ 김정희 등은 *Methylobacterium organophilum*을 이용하여 methanol을 기질로 하여 PHB의 축적 조건을 조사한 연구에서 K⁺이온이 결핍되었을 때 세포중량의 58.2%인 7.1g/l의 PHB를 얻었다고 한다.⁴²⁾

제 2 절 PHB생성실험

PHB는 D(-)3-hydroxybutyric acid가 직선상으로 연결된 단일 중합체의 천연 polyester이며, 각종 prokaryotes의 세포내에 에너지 저장물질로 축적된다. 일반적으로 PHB는 불균형한 생육조건, 산소, 질소, 황, 인 또는 칼륨등의 결핍상태에서 생성된다. PHB는 생분해성 플라스틱 제조원료, 서방성을 이용한 농약의 코팅제나 약품전달수단, 또한 우수한 생체적합성을 이용한 의료용등 많은 분야에 응용될 수 있어, 대량생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. PHB 생산에 있어서 ICI 사는 Fed-Batch culture에서 *Alcaligenes eutrophus*를 이용하고 탄소원으로 CO₂를 사용하여 세포농도 17g/L, PHB농도 14g/L를 생산하였고, 탄소원으로 포도당을 사용할 때에는 건조세포 농도의 70%정도의 PHB를 생산하는 것으로 보고하였다. PHB 생산에 관한 특허권은 영국의 ICI 사가 가지고 있고, 국내의 여러 대학과 연구기관에서 연구중에 있으며 당 연구기관에서는 생산된 PHB의 효과적인 분리 정제에 관한 연구를 수행하고자 한다.

1. 재료 및 방법

가. 균주 및 배지 조성

사용균주는 *Alcaligenes eutrophus* (NCIB 11599)를 분양받아 사용하였다. 균체 생육용 기본 배지조성은 glucose 20g/L, NH_4Cl 1.0g/L, KH_2PO_4 2.5g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4g/L MgSO_4 0.1g/L, trace metal solution 1.0ml/L이었다. MgSO_4 와 trace metal solution은 살균시 일어나는 phosphate와의 침전을 방지하기 위하여 각각 분리 살균하여 첨가하였다.

나. 회분식 배양

회분식 배양은 5.0L용량의 발효조를 사용하였고, 접종량은 5.0%(V/V), 통기속도는 1.0vvm, 교반속도는 500rpm, 그리고 pH는 6.9~7.0으로 유지하였다.

다. 포도당 농도 측정

발효중 잔류기질의 농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다.

HPLC : Varian 2510, Column : Merck, Licrosorb NH_2 (10 μm),

Detector : Varian RI-40, flow rate : 1ml/min

라. 균체농도 측정

균체를 dry oven에서 105 $^{\circ}\text{C}$ 로 24시간동안 건조시켜 균체건조

중량을 얻어 결정하였다. 균체농도는 경우에 따라 균체 현탁액의 탁도를 측정하여 간접적으로 결정하였다.

마. PHB의 추출 및 정량

PHB는 Braunegg GC method를 이용하여 정량하였다. 순서는 다음과 같다.

- (1) 발효액 2mL을 원심분리한다.
- (2) 상등액을 버리고 침전물에 1mL chloroform, 0.85mL methanol, 0.15mL sulfuric acid, 0.005mL butyric acid를 첨가한다.
- (3) 위의 혼합액을 100°C에서 140min.동안 가열하여 세포를 lysis시키고 PHB를 추출한다.
- (4) 위의 혼합액에 0.5mL 증류수를 첨가한다.
- (5) 1min. 동안 shaken한다.
- (6) 층이 분리되면 PHB가 포함된 액을 GC를 통하여 정량한다.

2. 실험결과 및 고찰

Alcaligenes eutrophus(NCIB 11599)를 회분식 배양으로 pH control을 하면서 실험한 결과는 그림 4-5에 나타내었다. 약 16시간 배양후 대수증식기가 시작되었으며, 30시간 이후부터 기질의 소

모가 활발히 일어났으며, PHB는 32시간 이후부터 급격히 축적되어

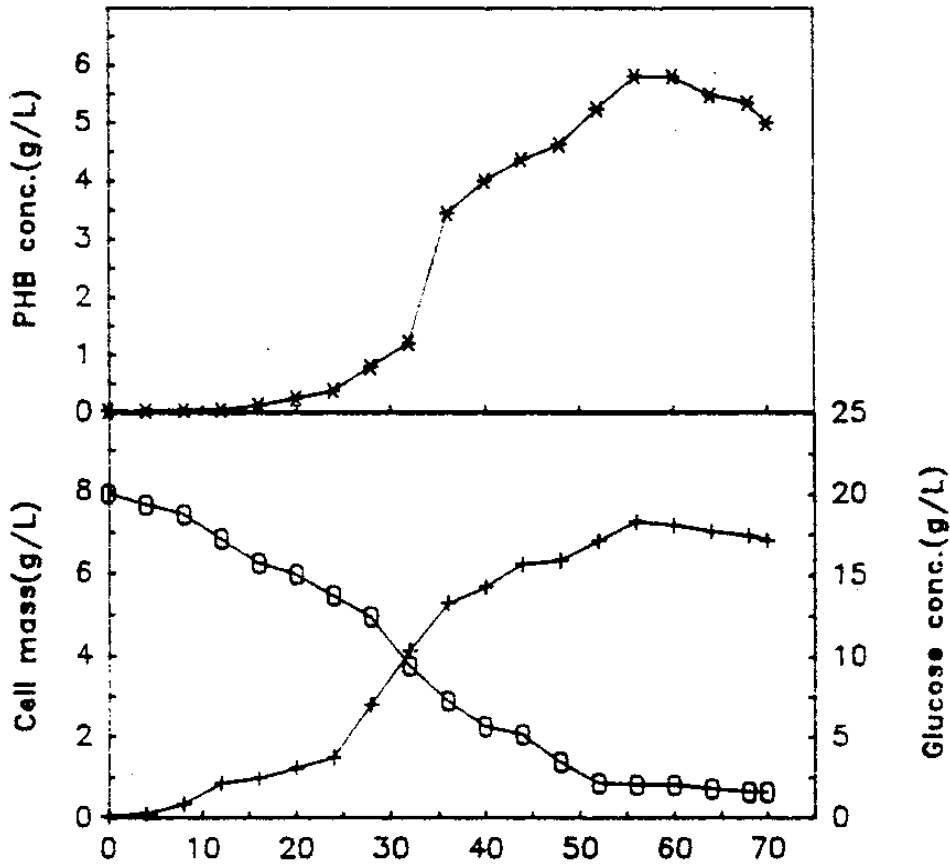


그림 4-5 Glucose를 기질로 사용했을 때 *Alcaligenes eutrophus*의 성장 및 PHB 생성.

배양시간 60시간에는 건조세포의 80% 정도까지 PHB가 축적되었다. 대수증식기 동안에는 PHB가 많이 떨어져 pH control하는데 있어서 NaOH의 소모가 많아졌다. 배양시간 50시간 이후부터는 세포의 정지기가 시작되었다. 배양시간 70시간 까지 생성된 PHB양은 5.8g/L로써 PHB수율($Y_{p/s}$)은 0.29였고, 배양시간 70시간까지 생성된 균체량은 7.25g/L로써, 균체 생성 수율($Y_{x/s}$)은 0.36이었다. PHB생산에 있어서 ICI 사는 Fed-Batch culture에서 *Alcaligenes eutrophus*를 이

용하고 탄소원으로 CO₂를 사용하여 세포농도 17g/L, PHB농도 14g/L를 생산하였고, 탄소원으로 포도당을 사용할 때에는 건조세포 농도의 70%정도의 PHB를 생산하는 것으로 보고하였다.

제 3 절 PHB 분리 정제 방법

1. PHB 분석 방법

지금까지 각국의 연구진에 의하여 미생물이 생산하는 PHB의 분석 및 분리 정제에 관한 연구가 수행되어 왔다. 그중 대표적인 분석 및 분리정제에 관한 방법으로는 다음과 같은 것을 들 수 있다.⁴³⁾

Lemoigne등이 제시한 방법인 세포를 chloroform으로 추출하고 diethyether나 acetone으로 침전시켜 PHB를 분석하는 방법이 계속 사용되어 왔다.

Williamson등은 박테리아에서의 PHB의 간단한 분석 방법으로 적당한 온도와 시간 조건에서 sodium hypochlorite용액을 사용하여 박테리아를 용해하여 PHB를 측정하는 방법을 제시하였다.

Slepecky등은 추출된 PHB를 진한 황산을 사용하여 crotonic acid로 전환시켜 spectrophotometer를 이용하여 정량적으로 측정하는 방법을 제시하였다.

위의 방법과 약간 다른 방법으로 Juttner는 chloroform에 용해시켰을 때의 PHB의 5.75 μ m에서의 흡광도를 이용하여 박테리아에서의 PHB의 측정에 관한 방법을 제시하였다.

위의 여러방법이 제시되었지만, 많은 미생물들은 한가지 형태 이상의 poly-hydroxyalkanoate를 광범위하게 합성하는 것이 알려져 있다. 따라서 기존의 방법들에 의해서 PHB로 측정된 량에는 실제적으로 poly-hydroxyalkanoate의 복합적인 형태들도 포함되어 있을 수 있다.

위와 같은 결점을 보완한 방법으로 Braunegg는 추출단계를 생략하고, 박테리아에서 PHB를 측정할 수 있는 좀 더 정확하고 시간 절약적인 방법인 직접 기-액 분리 방법을 제시하였다.

Findlay등은 개선된 기-액 분리 방법과 질량분석기를 사용하여 *Bacillus megaterium*으로부터 poly-hydroxyalkanoate를 분리하였다.

또한 효소적 방법을 사용한 분석방법으로서 Korneti는 hydrobutylate dehydronase와 NAD의 분광분석 방법과의 조합을 통하여, 효소적으로 PHB를 monomer형태로 분리하고 정량적으로 측정하는 방법을 제시하였다. Nichols는 PHB의 상세한 구조를 결정하기 위하여 FI-IR Spectroscopy를 사용하여 PHB의 파괴되지 않는 결정 부분에 대한 분석을 시도하였다. De Mola등은 분자량과 점도와의 관계를 이용하여 PHB의 분자량을 측정하였다.

그러나 위의 방법은 PHB에 대한 평균분자량만을 알 수 있으므로 steric exclusion chromatography(SEC)를 이용하여 Poly-HB/Poly-HAK의 분자량 분포를 측정하는 방법이 Jorde등에 의하여

제시되었다. 이 방법은 densimetric detector와 컴퓨터 프로그래밍이 결합된 Gel chromatography 방법을 이용하여 PHB의 분자량 분포를 측정하는데도 사용되었다.

SEC를 사용한 PHB의 분자량 분포의 분산도(M_w/M_n)값은 Trathnigg에 의하면 1.666, Holmes에 의하면 2.433으로 보고되었다. PHB homopolymer, PHB/PHV copolymer, PHAK copolymer의 잠재적인 응용수요의 증가로 인하여 이러한 고분자들의 구조와 물성의 조사 연구도 증가하였다.

Bauer등은 이러한 고분자의 열적 팽창도, 밀도와 결정성과의 관계를 연구하였고 Doi는 PHB monopolymer, PHB/PHV copolymer의 NMR조사를 수행하였다.

그 후 계속하여 X-ray diffraction, solution NMR, solid state ^{13}C -NMR, differential scanning calorimetry를 사용한 PHB/PHV의 구조 분석 등에 대한 연구가 행해졌다.

2. PHB분리 정제 공정의 개요

일반적인 PHB 분리 정제 공정은 원심분리나 응집과 같은 일반적인 절차에 의하여 poly-hydroxyalkanoate를 내포한 biomass를 분리한 다음, 분리한 biomass로부터 PHB/PHAK를 회수하는 공정으로 구성되어 있다.

특별히 PHB를 얻기 위하여 건조시킨 미생물로 부터 PHAK를 추출하는 방법에 관하여는 많은 연구가 행해졌다.

PHB는 여러가지 유기용매에 용해되는바, 미생물로 부터 PHB

를 추출하는데 Chloroform이 전통적으로 사용되어 왔다. Baptist에 의하면 methylene chloride, ethylene, chloride, pyridine, dichloromethane /ethanol 혼합용매에서의 PHB의 추출도 제시되었다. Lafferty등은 propylene carbonate, ethylene carbonate를 적당한 시간과 온도하에서 용매로 사용할 경우 고분자량을 가지는 높은 수율의 PHB를 추출할 수 있다고 보고하였다.

PHB를 내포한 박테리아를 분사건조 시켜 acetone을 사용하여 지방을 추출한 다음, 1,2-dichloroethane, dichloromethane, chloroform 등으로 PHB를 추출하는 방법이 Holmes에 의하여 보고되었다.

효소를 이용하여 세포벽을 파괴하여 PHB를 얻는 효과적인 방법이 Gram 음성 세균의 lysis에 오랫동안 사용되어 왔다. 그러나 lysozyme처리는 PHB를 분리정제 하는 상업적인 공정에서는 너무 비싸므로, 최근에는 가격면에서 lysozyme보다 싼 pepsin, trypsin, bromelain, papain등의 효소를 사용하여 PHB를 얻는 방법이 광범위하게 연구되고 있다.

High-pressure homogenizer가 PHB를 내포한 세포를 파괴하는데 효과적으로 이용되고 있으나 이는 미생물의 농도, 사용한 압력, 유량, 조작횟수등이 최적화 되어야 한다.

미생물로 부터 PHB granule의 분리는 원심분리, 추출, 향류여과 등의 공정을 통하여 행해진다. acetone이나 ethanol 같은 유기용매와 물을 사용하여 PHB/PHAK를 최종적으로 정제하는 공정이 수행된다. 위의 공정의 대략적인 흐름도를 나타내면 그림 4-6과 같다.

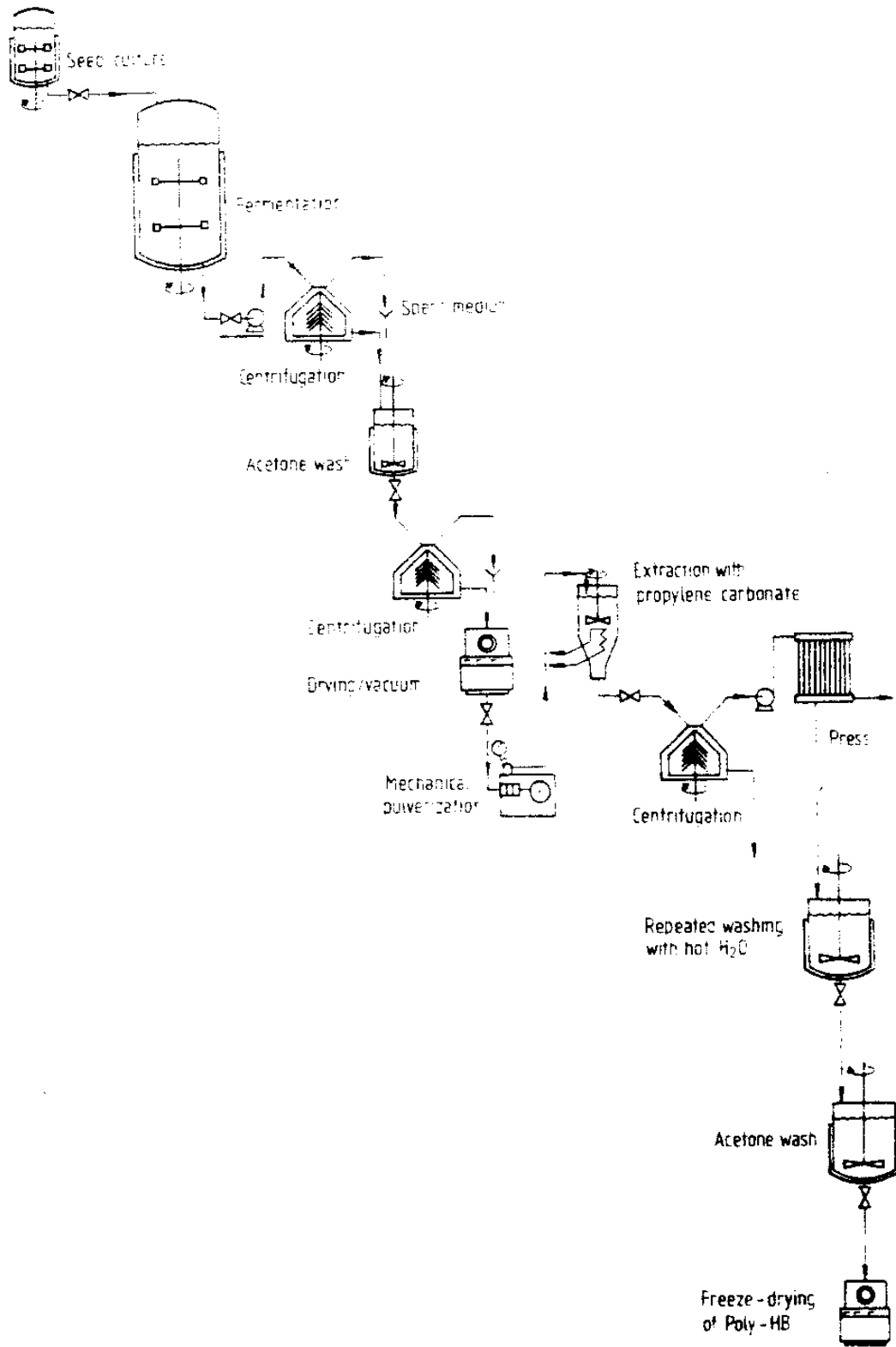


그림 4-6 Sequence of operations for pilot-scale production of Poly-HB(or Poly-HAK) from microbial biomass using propylene carbonate for extraction after partial cell destruction with a high-pressure homogenizer.

3. PHB 분리정제 실험

대표적인 분석방법인 Law와 Slepeckey 방법, Griebel 과 Merrick의 CRUDE PHB GRANULE의 정제에 의한 방법, DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION 방법, POLYMER TWO-PHASE SYSTEM을 이용하는 방법을 통하여 PHB 분리 회수율을 비교하고, Griebel 과 Merrick의 CRUDE PHB GRANULE의 정제에 의한 방법에서는 여러가지 효소 (Lysozyme, Trypsin, Pepsine)를 사용하여 PHB 분리에 대한 각 효소별 효과를 고찰하였다.

본 연구에서는 Modified solvent extraction 방법을 개발하여 기존의 방법보다 경제적인 PHB분리를 할 수 있는 가능성을 제시하였다. 이하는 대표적인 분석방법절차와 Modified solvent extraction 방법에 의한 PHB 분리절차를 나타냈고 각 방법에 의한 실험결과를 나타냈다.

가. 분석 방법

(1) Law 와 Slepeckey 방법⁴⁾

Law 와 Slepeckey에 의하여 개발된 PHB 분리방법은 다음과 같다.

- a. Williamson 과 Wilkinson방법에 의하여 고분자 granule을 분리한다.
- b. Granule을 acetone, alcohol, ether로 철저히 세척한다.

- c. 세척 후 잔류물질을 건조 후, 끓는 chloroform을 사용하여 고분자를 추출한다.
- d. Celite pad를 사용하여 여과한 후, chloroform용액과 5배의 acetone를 사용하여 20°C에서 냉각시켜 고분자를 재침전시킨다.
- e. 미량의 세포로부터 고분자를 분석하는 방법은 다음과 같다.
- f. Ethanol과 hot chloroform으로 plasticizer를 제거한 세포를 원심분리한다.
- g. Cell paste를 처음 사용액과 같은 양의 5% Sodium hypochlorite용액으로 37°C에서 1hr동안 resuspend시킨다.
- h. Lipid granule를 4°C, 15000rpm으로 15min간 원심분리한 후, 증류수로 세척한 후 acetone과 alcohol로 재세척한다.
- i. 고분자 물질은 끓는 chloroform을 사용하여 추출한다.
- j. chloroform을 증발시킨 후 진한 황산 10mL첨가하여 100°C 항온조에서 10분간 가열한다.
- k. 그 용액을 냉각한 후 완전히 mixing하여 황산 기준액에 대해 235nm에서의 흡광도를 측정한다.
- l. Crotonic acid의 양은 molar extinction인 1.55×10^4 으로부터 계산.

(2) Griebel 과 Merrick 방법⁴⁵⁾

Griebel 과 Merrick에 의하여 개발된 PHB 분리방법은 다음과 같다.

① CRUDE PHB GRANULE의 정제

- a. 시료 10mL를 취해서 약 1시간 10분동안 원심분리한 후 무게를 재어 cell wet weight를 측정.(Cell wet weight가 20g 의 경우)
- b. 1.67×10^{-2} M $MgCl_2$ 함유된 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 60ml에 suspend 시킨다.
- c. Lysozyme(66mg)과 Deoxyribonuclease(0.7mg)을 더하고 그 현탁액을 상온에서 30분간 유지시킨다.
- d. 60ml의 현탁액을 3min간 Sonic oscillation시킨다.
- e. Glycerol상에 현탁액을 취하여 4°C에서 1600g로 15min간 원심분리한다.
- f. 상등액을 제거, 계면에서 얻어진 granule을 0.05M TRIS-HCl(pH 8.0) 60ml에 resuspend시킨다.

② DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION 방법

- a. 시료를 순차적으로 1000g, 650, 450g에서 45min동안 원심분리하면 granule을 계면에서 얻을 수 있다.
- b. 매번 원심분리하기 전에, granule을 0.05M tris-HCl(pH 8.0) 60ml으로 재현탁 시킨다.
- c. 마지막 원심분리 후에 granule은 0.05M tris-HCl(pH 8.0) 10.0ml에 재현탁시키고, 0.02M tris-HCl(pH 8.0)- 5×10^{-4} M EDTA 2.01로 15시간 dialysis시킨다.

- d. Dialysis 후에 상등액은 제거, 가라앉은 granule은 0.02M tris-HCl(pH 8.0)에서 재현탁시킨다.

③ POLYMER TWO-PHASE SYSTEM 방법

- a. 시료 20ml에 300-500mg의 PHB가 포함될 수 있도록 0.02M tris-HCl으로 희석시킨 granule 현탁액을 1분간 sonic oscillation시킨다.
- b. 이 polymer two-phase system은 5.0% w/w dextran-500 과 3.5% w/w polyethyleneglycol으로 구성되며 0.02M tris-HCl(pH 8.0)이 완충역할을 한다.
- c. 정제될 PHB 10mg에 이 polymer two-phase system의 1ml를 사용한다.
- d. 20-30번 완만하게 혼합한 후 4°C에서 30-60분간 보관한다. 이 조건에서 PHB granule part는 아래층의 dextran-rich상으로 이동하고 그 이외의 물질부분은 위층의 polyethyleneglycol rich phase로 이동한다.
- e. 위층의 물질을 제거하고, 동일한 양의 새로운 위층상으로 대체한다.
- f. 다시 완만하게 흔들어서 혼합해주면 two-phase로 다시 분리된다. 다시 한번 위층의 부분을 제거하고 동일한 양의 새로운 상으로 대체한다.
- g. Granule로 부터 아래상을 분리하기 위해 0.02M tris-HCl (pH 8.0)을 가지고 4배 희석시킨다.

- h. 상등액을 제거하고, 제거된 양과 동일한 양의 완충용액에서 재현탁시키는 과정을 되풀이 하여 반복한다.

④ POLYMER의 SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY

위의 CRUDE PHB GRANULE의 정제, DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION방법, POLYMER TWO-PHASE SYSTEM방법을 거친 후의 고분자의 양을 최종적으로 분리하는 방법은 다음과 같다.

- a. 고분자 물질을 끓는 chloroform으로 추출한다.
- b. chloroform을 증발시킨 후, 10ml의 진한 황산을 첨가한다.
- c. 100°C 항온조에서 10분간 가열한다.
- d. 이 용액을 냉각한 후 완전히 혼합한 후 235nm에서 흡광도를 측정한다.

(3) Modified Solvent Extraction방법

- a. 시료를 원심분리한 후, sodium hyperchlorite(5% solution)에 분산시킨다.
- b. Chloroform과 시료가 혼합된 sodium hyperchlorite용액을 1:1용적비로 혼합시킨다.
- c. 두층이 형성되면, 35°C에서 1시간 동안 sonic oscillation시킨다.

d. 분별 깔때기로 chloroform층을 회수한 후, chloroform을 증발시켜 PHB를 회수한다.

나. 실험 결과 및 고찰

*Alcaligenes eutrophus*로 부터 PHB를 분리 정제하는 대표적 방법들과 용매추출법을 통한 PHB분리 정제실험 결과를 표 4-5에 나타내었다.

실험결과 Griebel 과 Merrick 방법 중 differential centrifugation에 의한 PHB 분리정제 방법이 가장 효과가 좋았으며, Griebel 과 Merrick방법 중 polymer two phase system에 의한 방법은 낮은 회수율을 보인 바 이는, 실험과정상 위층의 물질을 제거하고, 동일한 양의 새로운 위층상으로 대치하는 과정이 여러번 반복되는 과정으로 인하여 미량의 PHB가 계속 유출됨에 따라 회수된 PHB양이 감소된 것으로 보인다.

Griebel 과 Merric방법 중 crude PHB granule을 Lysozyme, Trypsin, Pepsin으로 처리하는 과정을 비교하는 실험에 있어서는 PHB의 회수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 crude PHB granule을 Lysozyme처리만 하고 sonic oscillation treatment을 하지않은 경우가, crude PHB granule을 Lysozyme처리 하지 않고, sonic oscillation treatment을 한 것에 비하여, 약 5배 정도 PHB 회수율이 좋은 것으로 보아도 효소처리만의 단일공정에 의한 PHB 회수율의 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 또한 chloroform과 sodium hyperchlorite을 이용한 용매추출법에 의한 PHB

表 4-5 Purification of Native PHB Granules from *Alcaligenes eutrophus*

Purification method of native PHB granules	Dry cell (g/L)	PHB (g/L)	% recovery of PHB
① Slepecky method	7.65	5.85	100.0
② Crude PHB granules	7.68	4.09	69.9
③ Differential centrifugation	7.66	6.49	110.9
④ Polymer two phase system	7.66	1.65	28.2
⑤ Crude PHB granules (Lysozyme)	7.66	3.52	60.2
⑥ Crude PHB granules (Trypsin)	7.69	4.71	80.5
⑦ Crude PHB granules (Pepsin)	7.66	4.17	71.3
⑧ Crude PHB granules (sonic oscillation) without Lysozyme treatment	7.66	4.11	70.3
⑨ Crude PHB granules (Lysozyme) without sonic oscillation treatment	7.67	0.87	14.9
⑩ Solvent extraction	7.66	5.84	99.8

의 회수율이 공정의 처리단계의 간소화에 비하여 우수하게 나타남
으로 인하여, PHB의 순도를 높이기 위한 정제 단계를 추가하면
전체적으로 공정의 간소화 및 순도의 증가를 가져올 것으로 생각
된다.

제5장 히아론산(Hyaluronic Acid) 생산기술 연구

제1절 서론

1. 총론

본 연구는 Hyaluronic Acid(HA)의 생산에 따른 현황을 검토하고 기초생산 공정을 제시하는데 그 목적이 있다. HA는 고점도, 보습성 및 Biocompatibility 등의 특성을 갖고 있어서 고급 화장품 및 안과 수술용으로 이용되고 있다. 세계적 추세로 보아서, HA의 상품화 및 연구는 1980년대 이후 부터 활발하였으므로 예상되는 기술의 격차가 적다. 주요 생산 및 연구 개발 회사로써는 Pharmacia, Bio-Technology General, Genzyme, 자생당, 일본 녹십자 등이 있다. 예상 기술 이전 비용은 10억원 내외로 추정되며, 국내에는 태평양화학 및 제철화학이 수년전부터 개발하였고 그 생산 능력은 초보적 단계이다.

세계 시장은 스웨덴의 Pharmacia가 장악하고 있으며 그 시장 규모는 1000억원 이다. 그중 840 억원은 안과 수술용으로 Healon이란 상표로 국내에는 연간 20억원을 수입하고 있다. 나머지 100억원에서 150억원은 화장품이다. 2000천년대의 HA의 세계 및 국내 시장 규모는 각각 7,676억원 및 154억원으로 추산된다. 그러나 HA의 용도의 다변화로 통하여 그 시장 규모는 괄목할 것으로 예상된다. HA의 생산에는 균주 및 동물 조직을 이용한 방법이 있는데, 그 분리 공정은 상호 유사하다. HA의 개발 현황은 이미 논문에서 상술하였으

므로(김태진, 1990) 생략하고, 다소 미진한 부분을 보완 설명하면서 기초적 실험 공정을 본 연구를 통하여 제시한다.

2. 배 경

HA는 소눈의 초자체액(bovine vitreous humour)으로 부터 최초로 분리되었으며 (Meyer and Palmer, 1934), 또는 박테리아 (group A and of hemolytic sterptococci)에도 존재함이 밝혀졌다. (Kendall et al, 1937). 표1에 나타난 바와 같이, HA는 주로 동물 조직으로 부터 추출하며, 이에 대한 연구는 Biomatrix(NJ) 사장이자 Columbia 대학의 교수인 Balazs에 의해 활발히 진행 되어 왔다. (미국특허 4141973, 1979).

개발된 기술은 스웨덴의 Pharmacia에 의해 Healon이란 상표로 세계 안과 시장에 시판 중이다.

한편, 보다 값싼 발효법에 의한 HA의 생산이, 유태계로써 New York에 본사를 두고 있는 Bio-Technology General(BTG)를 중심으로 1980년부터 진행되어 왔다. BTG기술은 Pharmacia에 양도되어 상품화 되었으며, 신일본 무역은 1983년에 발효법에 의한 HA를 수입시작 하였다. Diagnostic, Inc(MN) 및 Genzyme(MN)등도 독자적으로 HA의 발효공정을 개발 하였다. (미국특허 4517295, 1985). 일본의 자생당은 5년간에 걸친 연구투자 끝에, 1985년 6월에 25억원 투자하여 연산 250³의 고급 화장품용 HA를 발효공정으로 생산 시작하였다. 이외에도 일본에서는 종방, Mitori십자, 삼천제약, 생화학 공업 등이 화장품 및 안과용 약의 주성분으로, HA의 생산을 닭벼슬 혹은 박테리아 공정으로

개발 하거나 시판 중에 있다. (한국 유전 공학 조합, 1986). 한편 영국의 Fermetech은 Batch process가 아닌, Continuous fermentation으로 HA의 생산을 개발 하였다. (Ellwood, 1986). 현재 Fermetech이 2년 동안이나 동업자를 찾고 있는 상황을 감안할 때, 그 공정의 상품성은 희박한 것으로 예측된다. 이상의 역사적 배경을 간략히 요약하면 다음과 같다.

첫째, 국내외의 HA의 생산 혹은 연구는 불과 수년 이전부터 상품화가 시작되었으므로, 예상되는 기술의 격차가 타품목의 개발에 비하여 적을 것이다.

둘째, HA는 닭벼슬이나 Bacteria로 부터 얻어지는데, 근래의 Biotechnology의 기술향상 덕분으로 Bacteria를 이용한 Fermentation 방법이 선호되고 있다. 후자의 생산 공정은 Batch가 선호되고 있다.

표5-1. 시약용으로 공급되는 HA (Sigma, 1986).

HYALURONIC ACID			
H 1751	Grade I(pfs)	10mg	6.80
	From Human Umbilical	50mg	22.60
	Cord	100mg	37.80
	Free acid or salt as	250mg	82.95
	available.	500mg	153.30
H 1504	Grade III-P (pfs)	50mg	9.00
	Potassium Salt	100mg	13.10
	From Human Umbilical	500mg	43.30
	Cord	1g	72.25
	Impurities usually include Protein, Polypeptides and chondroitin sulfate.	10g	623.70
H 1876	Grade III-S(pfs)	50mg	9.00
	Sodium Salt	100mg	13.10
	From Human Umbilical	500mg	43.30
	Cord	1g	72.25
	Impurities usually include Proteins, polypeptides and chondroitin sulfate	10g	623.70
H 7630	Grade IV	10mg	19.95
	From Bovine Vitreous	50mg	66.15
	Humor	100mg	118.40
	Free acid or salt as available.	500mg	395.85
H 5388	Grade V-S	50mg	5.85
	Sodium Salt	100mg	10.50
	From Rooster Comb	250mg	23.10
		1g	75.00
H 2259	From Bovine Umbilical Cord		Inquire
H 7262	Grade V(pfs)	50mg	6.15
	Potassium Salt	100mg	11.00
	From Rooster Comb	1g	78.75

제2절 상황 분석

1. 의료용 고분자 재료

의료용 고분자 재료 산업은 고 부가가치의 기술집약형 미래 산업이다. 세계의 보건 위생비가 100조원(1979)에서 300조원(1995)로 급증하는 점과 (김은영, 1985), 국내에서의 의료보험 혜택이 급격히 신장되고 있는 점 등을 고려할 때, 타소재가 갖고 있지 않은 특수 생체 기능의 의료용 고분자 재료의 산업화가 절실히 요구된다.

현재 과기원, 화학연, 서울대, 한양대 등에서 의료용 고분자 재료에 대하여 연구중이며, 녹십자 의공 및 코오롱 등에서 인공 장기 등을 개발 하였거나 혹은 초보적인 연구 단계에 있다. (표 5-2참조).

표 5-2. 의료용 고분자의 개발목표 및 단계 (김은영, 1985).

구분 \ 단계	제 1 단계 (86-91)	제 2 단계 (92-96)	제 3 단계 (97-2001)
단계별 목표	치료용고분자제품 인공장기기초연구	고급치료용고분자 재료, 인공장기응용	첨단고분자재료 인공장기, 인공 조직개발
연구개발단계	1회용기구의품질 향상 및 치료용제 품개발(콘택트렌 즈 봉합사)	고분자치료제품 (카테타, 혈액고분 자약제)	첨단제품개발 (특수카테라, 미사 일형 고분자약제)
인공장기개발	생체적합성재료 연구	인공장기개발 및 응용(신장, 심폐기)	체내이식장기 및 인공장기 개발(박동 기, 관절, 혈관, 심장)
인공조직개발	조직용화성재료	인공조직응용연구	인공조직 개발 (치아, 뼈, 피부, 힘줄, 기관)

의료용 고분자 재료의 표5-3과 같으며, 연증가율은 14%를 나타내고 있다.

표5-3. 의료용 고분자 재료의 시장 현황 (김은영, 1985)

단위 : 억원

시장 \ 년도	1984	1990	2000
세 계	31,450	68,850	255,850
국 내	139	360	5,117

HA는 천연물로부터 추출되는 고분자 물질의 일종으로써, HA가 갖고 있는 non-immunogenic and inflammatory 특성 때문에, 각종의 합성 고분자물을 HA로 보강하면 그 혼합물의 Biocompatibility를 향상시킬 수 있어서, HA는 의료용으로 크게 기대된다. HA는 치료용 고분자 혹은 인공조직의 소재로써, 병참품등의 방위 산업과 의료 진단기기, 체내

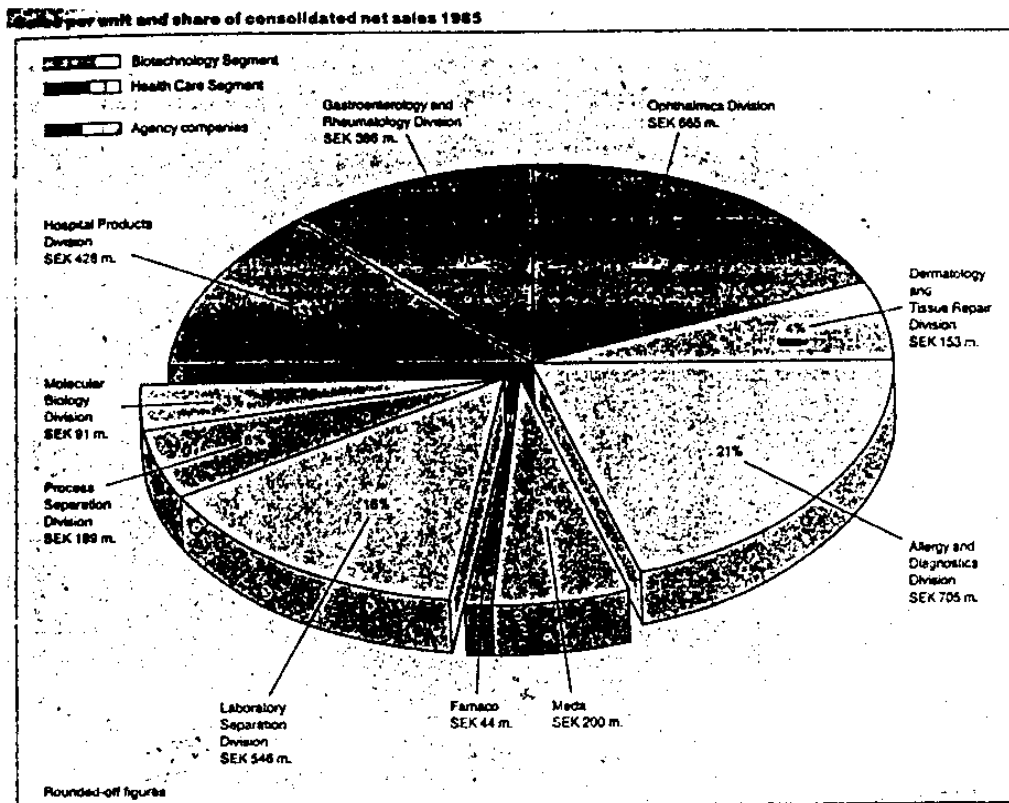


그림 5-1. Pharmacia의 1985년도 매출 내역(Annual Report of Pharmacia, 1985)

장기, 치과재료등의 의료 산업으로 응용 가능하다.

HA가 가지고 있는 높은 보수성 때문에 고급화장품 및 안과용으로 쓰이며, 1,000억원 정도의 세계 안과용 시장은 Pharmacia가 석권하고 있으며, Pharmacia의 전체 판매량의 34%가 HA와 연관된 점을 감안할때, 이의 상품화의 매력성은 상당히 높다.(그림 5-1 참조)

제3절 개발 현황

1. 개 요

HA의 용도는 크게 의약용 및 화장품용으로 구분되는데, 세계적으로 HA의 상업화 역사는 불과 수년전 이어서, 선진국과의 기술 경쟁에서 적은 격차를 유지하며 수행할 수 있다. Pharmacia는 스웨덴, 미국, 일본에 그 계열회사를 두고 HA의 연구 개발 및 판매를 수행중이나, 국내에는 다만 Pharmacia 관련의 기기 구입 Agency(상정상사)만 있을 뿐이다. 한편 태평양화학이 HA를 생산할 수 있는 수준에 이르렀다고는 하나 (장이섭 및 정교민, 1987), 그 상업적 기술은 여전히 미지수이다.

HA는 안과 수술용 및 피부 화장용으로 주로 쓰이고 있으나, 개발 여지에 따라 그 용도가 다양하다. 예를들면 합성수지 보강제(미국특허 4487865, 1984), 의료용 고분자 소재(미국 특허4500676, 1985), 수용성 thickner (일본 특허 57185208, 1982), 화상 피부 치료용(미국 특허 4272522, 1981), 항생체 담체(일본 특허 61236732, 1985), 모발 보호제(일본 특허 59199622, 1984), 안약(미국 특허 5417295, 1985),

잇몸 및 이빨 보호제(일본 특허 60501311, 1985) 등이 있다.

이와 같은 HA의 다양성은 HA가 갖고 있는 고점도성, Biocompatibility 및 보습성 등의 특성 때문이다. 국내에는 미국의 FDA 규정에 비하여 까다롭지가 않아서 제품이 일단 생산 가능 하다면 이의 상품화에 걸리는 시간은 짧다.

그림7-1에서 보듯이 Pharmacia 전 매출액의 34%(4,400억원)가 HA의 관련 제품인 점을 보더라도, HA의 시장성이 상당함을 알 수 있다.

HA는 unbranched, non-cross linked, water containing molecule이어서 쉽게 shear force로 파괴된다. 또한 고온 가열, 자외선 조사, 방사선 조사, 산화 환원제, 강산, 강알칼리등의 처리로 인하여 HA의 분자량이 낮아진다. 따라서 천연상의 순도 및 분자량(수백만)을 유지하는 HA의 정제법은 대단히 어렵고 비싼 공정이다. (일본 녹십자, 1983 : Balaza, 1984).

2. 주요 생산 공정

HA개발 및 상품화가 성공하기 위하여, 원료의 선택, 발효공정의 선택, 균주 관리 및 정제 공정의 개발이 선행 되어야 한다.

가. 동물조직 추출법은 값비싼 고분자량의 HA를 생산하므로 의약 용으로 쓰이거나, 피부 흡수성이 높아서 고급 화장품용으로 사용한다. 한편 균주를 이용한 발효법은 주로 값싼 저분자량이 HA를 생산하므로 주로 화장품으로 사용된다.

나. 발효 공정의 선택

발효 공정은 Batch 및 Continuous로 양분되는데, 비록 Continuous 공정의 생산성이 높다고 하나 (Ellwood, 1985), 현재의 세계시장 규모와 (Van Brunt, 1986) 실험실의 일반적 설치를 감안할 때 Batch process가 바람직하다.

다. 정제 공정의 개발

HA의 정제법은 원료에 따라 크게 구분되는데 균주로 생산된 HA 및 소눈을 이용한 HA 생산 방법이 있다.

(I) 균주로 생산된 HA의 정제법

끓는 물에 열처리하거나 trichloroacetic acid를 이용하여 균주에 의한 HA 생성 반응을 정지 시킨다. 이를 원심분리하여 생긴 상등액에 에탄올을 첨가함으로써, HA의 에탄올 불용성을 이용하여 침전물 HA를 구한다. HA는 통상 protein과 공존하므로 이를 분리키 위하여 papain 등의 protease 및 cetylpyridinum (CPC) 등의 chemical을 사용한다. 원하는 HA의 순도에 따라 처리 방법이 변할 수 있는데, 보다 자세한 내용은 발간된 논문(김태진, 1990)에 기술되어 있다.

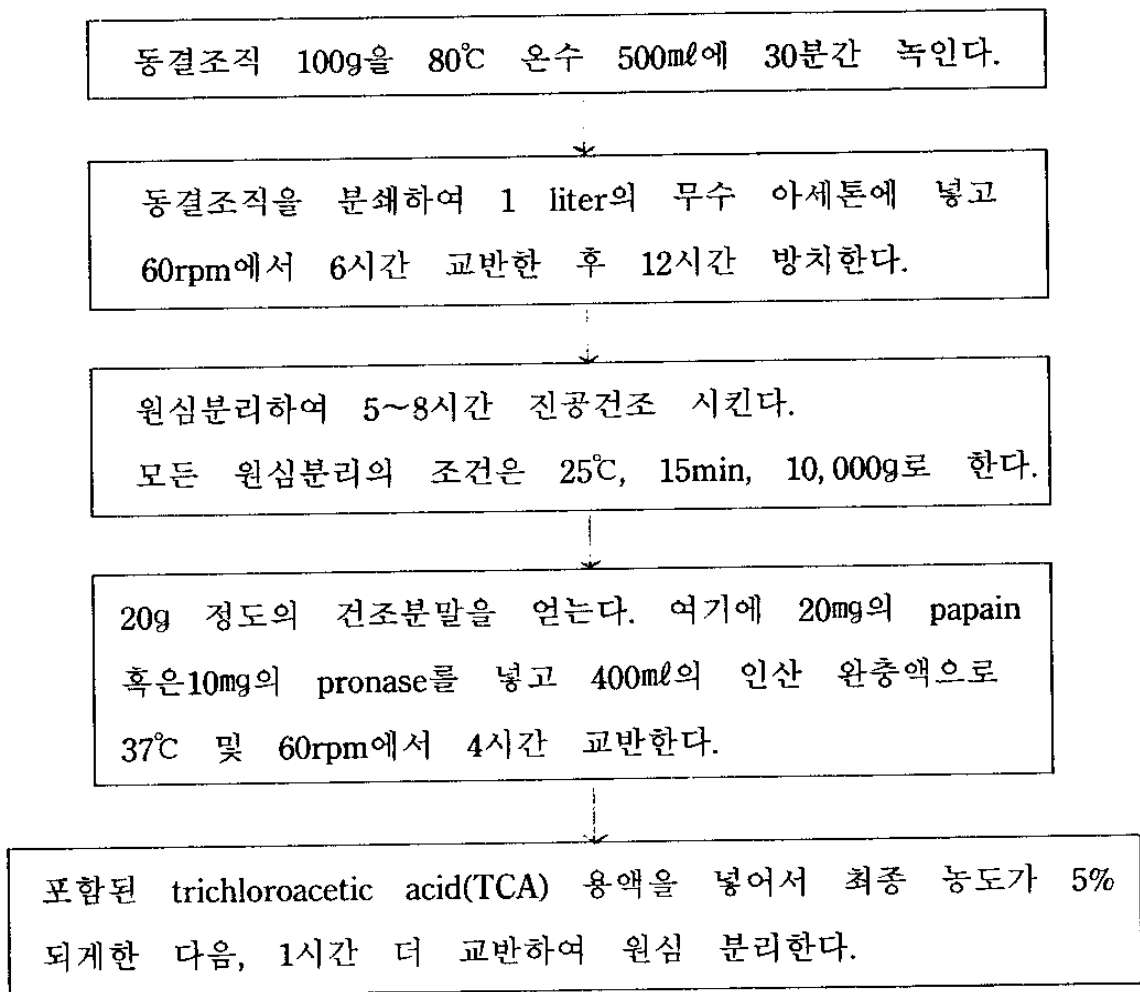
(II) 소눈으로 생산된 HA의 정제법

동물조직으로 부터 HA를 생산하는 방법으로써, 통상 닭벼슬 (rooster comb)을 이용한다. 그러나 최초로 HA를 분리시킨 방법이 소눈을 이용한 것이었다. (Meyer and Palmer, 1934).

한편 닭벼슬을 이용한 공정은 소눈을 사용하는 HA생산법으로 이용할 수 있으며, 무엇보다도 소눈을 도축장 등에서 쉽게 구할 수 있다는 것이 큰 장점이다. 만약 소눈을 이용하여 HA를 생산할 수 있다면 생산된 HA는 의료용으로 활용 가능하므로, 균주에 의한 HA 생산보다 고부가적이다.

정제법은 균주로 생산된 HA의 정제법과 유사하나, 동물 조직에 붙어 있는 다량의 protein으로 부터 HA를 분리시키기 위하여, 다소 복잡한 공정을 거친다. 방법은 그림5-2에 같다.

그림5-2 소눈을 이용한 HA 생산의 정제도



상등액을 모으고, 침전물에는 1 N NaCl을 넣고 원심 분리하여 상등액을 모은다.

상등액들을 ultrafiltration (MW>30,000)에 넣고 0.5 N NaCl로 최초 부피의 5~6배 사용하여 여과한다. 최종부피를 40~50ml로 줄인다.

Sepharose 4B에 넣고서 0.5 N NaCl로 정제한다.

high viscous ($Ur > 1.3$) 하거나, HA assay에 의한 농도가 높은 부분을 선택한다.

Ultrafiltration에 넣고 5~6배의 증류수로써 여과하여, 최종부피를 40~50ml로 줄인다.

Q Sepharose Fast Flow를 이용하여 0.1 N 및 2 N NaCl로 gradient를 걸어서 0.5~0.65N 부분을 모은다.

Ultrafiltration에 넣고 5~6배의 증류수로써 여과하여, 최종부피를 40~50ml로 줄인다.

농축액을 3배 부피의 에탄올(95%)에 넣고 25°C, 60rpm에서 1시간 교반한다.

원심 분리하여 침전물을 모은다. 침전물을 0.1 N 200ml 에탄올(95%)에 넣고 25°C, 60rpm에서 1시간 교반한다.

원심 분리하여 모은 침전물을 3배의 무수 에탄올로 씻고, 마지막에 무수 아세톤으로 씻는다.

원심 분리하여 진공 건조시키면, 600mg 정도의 순수한 HA 건조 분말을 얻는다. viscosity 및 농도를 측정하여 분자량을 구한다.

제4절 화장품 HA의 제조현황

HA의 강한 친수성 때문에 피부를 부드럽게 유지하므로 노화 방지용 화장품으로 사용되는데 formulation은 일본 특허들에 잘 나와 있다. 대표적인 formulation 방법은 표5-4에 나타나 있으며, 그에 따른 specification을 표5-5에 명시되어 있다.

Æ5-4 HYALURONIC ACID MOISTURE LOTIONS

	Anionic/ Nonionic	Nonionic
	Wt. Percent	
Oil phase-		
Stearic acid, Triple Pressed	1.0	0
Polawax	2.0	0
Sunflower Seed Oil	4.0	4.0
Sorbitan Stearate	1.0	1.5
Aldo MSH-High Mono Glyceryl Stearate	0	3.0
Super Sterol Ester	0.5	0.5
Shark Liver Oil	2.5	2.5
Isocetyl Stearate	1.0	1.0
Polysorbate 60	0	0
Crodafos N10-Acid	0.5	0
Dimethicone 350 cs.	0.5	0
Buthlated Hydroxy Anasole	0.05	0.05
Propylparaden	0.1	0.1
Water Phase		
Butylene Glycol	4.0	4.0
Methylparaben	0.3	0.3
Triethanolamine	0.4	0.1
Phenoxyethanol	0.3	0.3
1.5% Carbopol 940 Soln.	7.4	6.7
Sodium RNA	0.2	0
Revitalin	0	3.0
Distilled or Deionized Water q. s.	54.1	48.8
Sodium Hyaluronate,(1% soln)	20.0	20.0
Fragranca 12371-185(Belmay)	0.15	0.15

Manufacturing Procedure : Sdd the oil phase to the water phase at 76-78 degrees Centigrade, with vigorous agitation. Maintain 75 degrees Centigrade for five minutes and then begin cooling to 40-45 degrees under moderate agitation. Add the fragrance and continue cooling to 28 degrees. Fill off.

5.5. SODIUM HYALURONATE (Cosmetic Grade I)

STANDARDS FOR

QUALITY CONTROL SPECIFICATIONS FOR QUALITY CONTROL
BIOLOGICAL

Sterility testing NMT 200 microorganisms per gram of

CHEMICAL material

Appearance Dry, hygroscopic, light, amorphous

Color powder white

Odor Odorless

Clarity NMT 0.1 at 660nm for a 4.00mg/ml
solution

%Hyaluronate NLT 97.0% via cardazole sulfate method
(after exhaustive drying)

Conductance NMT 40 MHOS/cm for a 0.2mg/ml aqueous
solution

Sodium Content NMT 3.0% (w/w)

UV Adsorption NMT 1.0 at 257nm a 1.0% aqueous
solution

Protein Content NMT 1.0% (w/w)

Mean Molecular Weight NLT 1.5×10^6 Daltons

NOT FOR DRUG DIAGNOSTIC OR HUMAN USE.

제5절 HA의 발효 방법

본 연구는 HA 및 그 염의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세히는 스트렙토코커스 균주를 이용한 발효과정 중에 각각 다른 농도의 인산염을 배지에 첨가해 줌으로써 HA생산이 증가되는 인산염 조절에 의한 방법에 관한 것이다.

발효가 진행됨에 따라 각기 다른 농도의 인산염 화합물을 첨가해 배양배지를 사용하여 스트렙토코커스 균주를 2단계로 발효시킬때, 놀랍게도 HA을 고수율로 생산한다는 것을 본 연구에 의해 알게 되었다. 상세하게 설명하면, 본 연구의 방법은 2단계로 나눌 수 있다. 균체번식 단계라고 부리는 제1단계는 발효공정의 제1분절으로써 성장속도의 증가를 통하여 균체성장을 계속한다. HA 생성단계라고 부리는 제2단계는 발효 공정의 제2분절으로써, 비성장속도를 줄이면서 HA의 생성을 증가시키는 단계이다.

제1단계인 균체번식 단계 중에서 제한된 농도의 인산염 화합물, 즉, 배지 100ml중 10.1g 내지 1.5g, 바람직하게는 배지 100ml중 0.1g 내지 1.3g, 더욱 바람직하게는 0.8g 내지 1.2g을 발효배지에 공급한다. 이 제한된 농도에서는 균체가 최적속도로 성장하는 것이 관찰 되었다.

비성장속도가 감소하기 시작하는 제2단계인 HA 생성단계 중에는, 강화된 농도의 인산염 화합물을 함유하는 새로운 배지를, 발효배지의 5용량% 내지 40용량%, 바람직하게는 10% 내지 30%, 더욱 바람직하게는 12.5% 내지 25% 양으로, 발효배지에 간헐적으로 첨가하여 인산염 화합물의 최종농도가 총배지 100ml중 1.5g 내지 5g, 바람직

하계는 1.5g 내지 3.5g, 더욱 바람직하게는 2g 내지 2.5g이 되게 한다. 이와 같은 인산염 강화 배지에서는 HA 생성이 최적속도로 진행되면서, 균체성장은 비교적 일정하다.

HA 생성단계중에 인산염 강화배지를 간헐적으로 첨가하면 발효배지를 희석시키므로 HA 합성의 진행에 따라 점성으로 되는 배지의 혼합문제도 줄어들어 산소공급을 용이하게 한다.

본 연구의 새로운 방법은 다음과 같다. 균체번식 단계에서 제한된 양의 인산염(배지 100ml당 0.8g 내지 1.2g)이 포함된 배지에서 HA 생산균주인 스트렙토코커스 균주를 먼저 배양한후, 강화된 양의 인산염(최종농도 2-2.5%)이 포함된 새로운 배지를 예들들어, 발효배지의 12.5% 내지 25%양으로 발효배지에 간헐적으로 첨가하여 인산염의 최종 농도가 예들들어 총배지 100ml중 2g 내지 2.5g이 되게 함으로써 HA 생산을 증가시킨다. 본 공정에 사용되는 대표적인 배지는 송아지고기 추출액(veal infusion broth) (1-2.5%), 포도당(2-5%), 트립톤(0.5%), 효소엑기스(0.5-1.5%), 인산염(0.2-2.5%), 황산 암모늄(0.01-1.8%) 등으로 구성되어 있다. 스트렙토코커스 그룹 A 와 C의 어느 균주도 HA를 생산할 수 있지만, 높은 생산성 때문에 스트렙토코커스 이퀴 (Streptococcus equi) ATCC 9528이 바람직 하였다.

본 연구에는 어떤 종류의 인산염이건 사용할 수 있다. 예들들어, 이인산나트륨(Na_2HPO_4), 일인산나트륨(NaH_2PO_4), 이인산칼륨(K_2PO_4), 인산마그네슘 및 그 혼합물등이 있으며, 바람직하게는 이인산나트륨, 일인산나트륨, 이인산칼륨, 일인산칼륨 및 그 혼합물이며 더욱 바람직하게는 이인산나트륨, 이인산칼륨 및 그 혼합물이다.

미생물을 유지하기 위해 한천평판에서 37°C를 유지하며 하룻동안 배양한 후 사용할 때까지 4°C로 보관한다. 접종균을 준비하기 위해 한천평판의 균을 5ml 배지가 든 시험관에 옮겨 밤새 정체 배양한다. 그후 100ml 배지가 든 500ml 플라스크에 옮겨 37°C, 200rpm으로 밤새 교반 배양한다. 이 배양액을 주 배양의 접종액으로 사용했다. 모든 경우에 있어서 접종액은 발효 부피의 5%로 사용했다. 발효는 37°C, pH6.5-7.5에 조건을 유지했다. 교반속도는 용존 산소가 약 50% 포화되게끔 200rpm에서 800rpm 사이로 조정했으며 공기 공급율은 발효동안 1-2vvm을 유지했다.

HA을 측정하기 위해 D-글루클론산을 정량하는 방법인 카바졸 반응법을 이용했다. 균체 농도는 파장 650nm에서 흡광도에 대한 건조 균체 무게값을 결정하여, 650nm에서의 흡광도를 측정함으로써 관찰했다. 시료는 끓는 물에서 10분동안 가열한 후 5,000rpm에서 원심 분리하고 상등액을 취한후 4°C에 보관하여 분석했으며 잔여포도당의 농도는 DNS 방법으로 측정했다.

실 험1

이 실험은 배지내에 인산염 농도의 차이, 특히 발효배지내에 인산염을 첨가해주는 시간에 따라 균체성장이나 HA 생산에 있어 아주 다른 결과를 나타냄을 보여주기 위한 것이다. 2% 포도당과 2.5% 송아지고기 추출액으로 구성된 5ml 배지를 3개를 준비하여 각각에 스트렙토크커스 이퀴 ATCC9528을 접종한후 37°C에서 밤새도록 정체 배양 하였다.

FIG. A

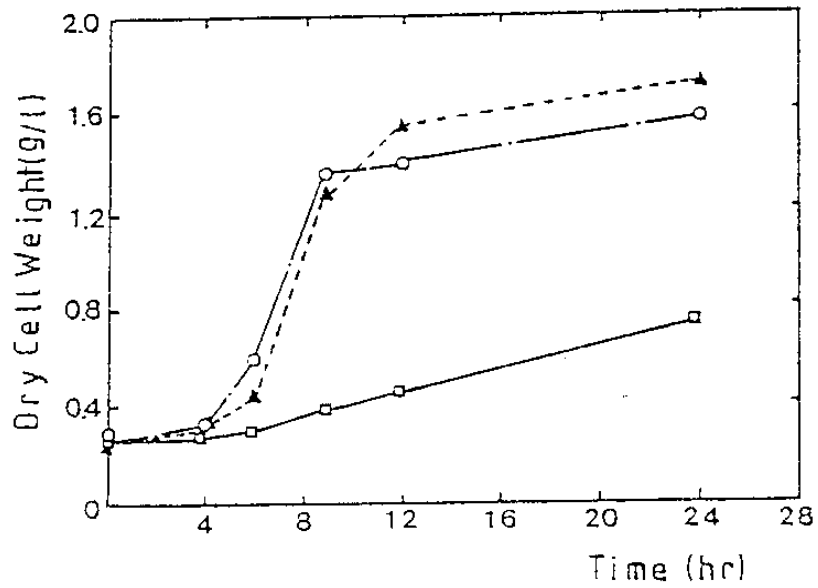


FIG. B

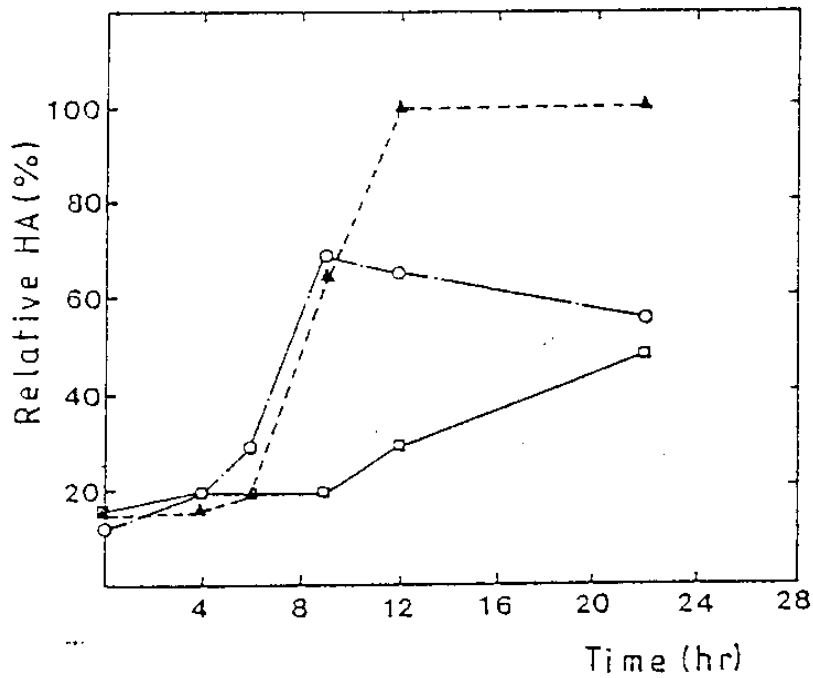


그림5-3 배지중의 인산염 농도차이에 따른 시간별 균체성장 및 HA생산

□: 초기에 인산염을 추가해 준 경우

○: 초기에 인산염을 추가하지 않은 경우

△: 배양 4시간후 인산염을 추가해 준 경우

배지조정(3% 포도당, 1% 효모엑기스, 2.5% 트립톤, 0.06% 황산암모늄, 0.28% 탄산나트륨, 1.2% 이인산나트륨)으로 플라스크에 100 ml씩 각각 준비하여 전체 배양한 균들을 옮겨준다. 이때 두번째 플라스크에는 배양 초기부터 이인산나트륨(1.3%)을 더 넣어주고, 세번째 플라스크에는 배양 후 4시간쯤에 이인산나트륨(1.3%)를 추가해 준다.

그림5-3에 그 실험결과가 나타나 있다.

실 험2

이 실험은 인산염을 최소량 함유한 배지의 경우 HA 생성이 억제되는 것을 보여주기 위한 것이다. 스트렙토코커스 이퀴 ATCC 9528을 이용하여 37°C에서 24.5시간 동안 배양 하였다. 실험1에서와 같은 방법으로 접종액과 배지를 준비하여 1리터 배지에 접종하여 pH6.5에서 7.5사이로 유지하며 발효 시켰다. 원 배지성분에서 인산염만을 제거한 새로운 배지를 약 100ml씩 준비하여 발효 4시간, 8시간 및 12시간 때에 각각 추가했다. 그림5-4에 그 실험결과가 나타나 있다.

실 험3

이 실험은 제한된 양의 인산염이 포함된 초기 배지에 발효도중 강화된 양의 인산염이든 배지를 첨가해 줄때, 균체성장의 억제없이, HA 생산을 촉진하는 것을 보여주기 위한 것이다.

실험 2에서와 같은 방법으로 스트렙토코커스 이퀴 ATCC9528을 이용하여 배지 1리터 에서 발효 하였다. 원 배지성분에서 인산염을

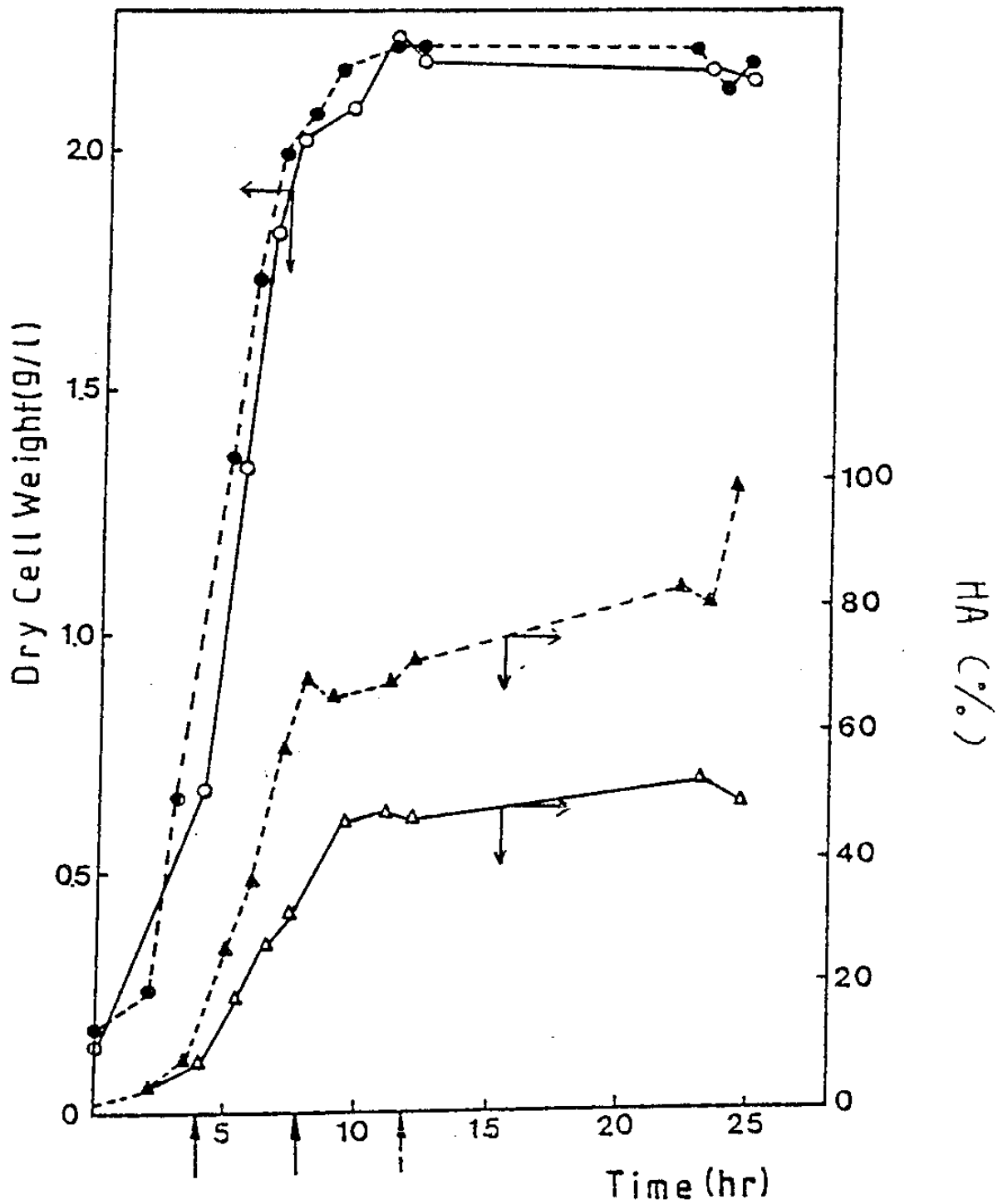


그림5-4. 인산염 농도차이에 따른 시간별 균체성장 및 HA 생산
 ○, △ : 실험2의 데이터
 ●, ■ : 실험 3의 데이터
 ↓ : 인산염 추가시기

제거한 새로운 배지를 100ml 준비하여 균체성장 초기에 첨가해 주었다. 그런다음, 원 배지성분에 강화된 양의 인산염(2.4%)을 포함한 새로운 배지를 HA 생산단계 동안 4시간 간격으로 두번 첨가해 주었다.

이결과를 그림5-4에서 실험 2의 결과와 비교 하였다.

제6절 HA의 활성탄을 이용한 정제법

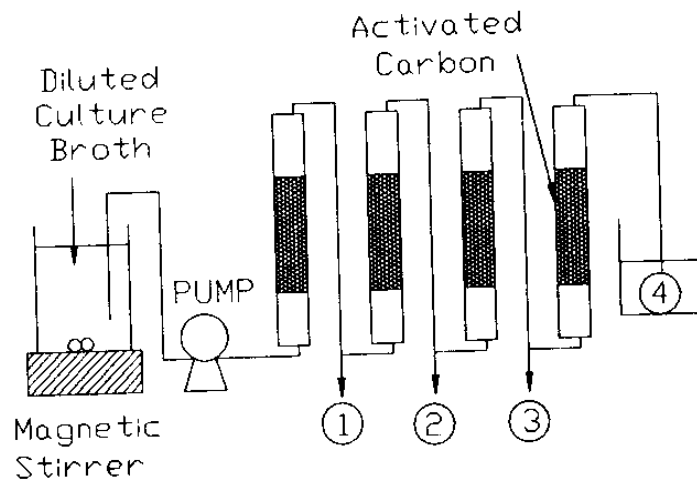
1. 개 요

활성탄은 폐수 및 정수 공정에서 보편적으로 사용되는 물질이나 발효액의 처리 과정에서는 별로 사용되지 않고 있다. 그러나 HA 같은 값비싼 생체 고분자일 경우에는 활성탄 사용으로 인한 정제 공정의 부담을 감소할 수 있다. HA를 발효공정으로 생산 한 후에는 pyrogenic한 균주의 특성상 열처리 공정을 거치게 된다. 일반적으로 배양액에서는 잔류 포도당을 비롯한 다량의 불순물이 존재하는데 이들을 열처리함으로써 배양액이 갈색을 띄게된다. Xanthan Gum 이나 Pululan 등은 식품 첨가물 혹은 접착제 등으로 쓰여져 그다지 색깔의 유무가 문제시 되지 않고, 또한 저렴한 가격으로 공급되나 HA는 무색 청정한 용액 혹은 하얀 가루 상태로 존재하며 주로 고가의 화장품 원료로 널리 쓰이고 있다. 그러므로 색깔의 존재는 생산한 HA 제품의 질을 저하시키므로 적절한 방법으로 열처리후 발생한 색깔을 제거할 필요가 있다. 일반적으로 HA의 정제는 에칠알코올에 수차례 반복하여 침전시킴으로써 이뤄지지만 이는 고가의 알콜을 사용해야하고 또한

알콜의 재사용을 위한 증류 공정으로 인하여 많은 에너지 비용을 요구하는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 HA를 함유한 배양액을 활성탄으로 정제하는 방법을 실험적으로 제시하고자 한다.

2. 실험 방법

1). 아래 그림처럼 활성탄(Norit Rox 08)이 충전된 column을 series로 연결하여 up-ward flow 방식으로 배양액을 흘려 주었다.



2). 균일한 내경의 column에 10g의 활성탄을 전처리하여 충전하고 증류수로 일정시간 washing 하였다. 5~6배 희석한 culture broth 1.5 liter 를 mixing 하면서 일정 flow rate로 column내로 흘려보내면서 1), 2), 3) 및 4)의 위치에서 시간별로 Sampling하고 sampling하지 않는 동안 sample은 4)의 위치에서 모았다.

3). sample의 color, protein 및 HA를 정량하여 처리전 배양액과 비교하고 시간에 따른 이들 값의 추이를 관찰 하였다.

4). 모든 sample이다. loading된 후, 활성탄을 0.1 N NaOH와 hot water를 사용하여 washing 했다.

3. 실험 결과

1). flow rate=7ml/min

$$\begin{aligned} \text{final pool의 color removal} &= \frac{(\text{O.D } 330) \text{ in} - (\text{O.D } 330) \text{ out}}{(\text{O.D } 330) \text{ in}} \times 100 \\ &= \frac{(1.11 - 0.305)}{(1.11 - 0.305)} \times 100 \\ &= 72.5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{final pool의 HA recovert} &= \frac{(\text{O.D } 530) \text{ out}}{(\text{O.D } 530) \text{ in}} \times 100 \\ &= \frac{0.87}{0.92} \times 100 \\ &= 95.6\% \end{aligned}$$

2). flow rate=5ml/min

$$\begin{aligned} \text{final pool의 color removal} &= \frac{0.795 - 0.150}{0.795} \times 100 \\ &= 81.1\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{final pool의 protein removal} &= \frac{0.665 - 0.070}{0.665} \times 100 \\ &= 89.5\% \end{aligned}$$

$$\text{final pool의 HA recovery} = \frac{0.975}{0.993} \times 100 = 98.2\%$$

3). 앞의 결과에서 처럼 낮은 flow rate에서 color와 removal은 보다 높았으며 HA의 reconvert 역시 낮은 flow rate에서 더 좋은 것으로 나타났다.

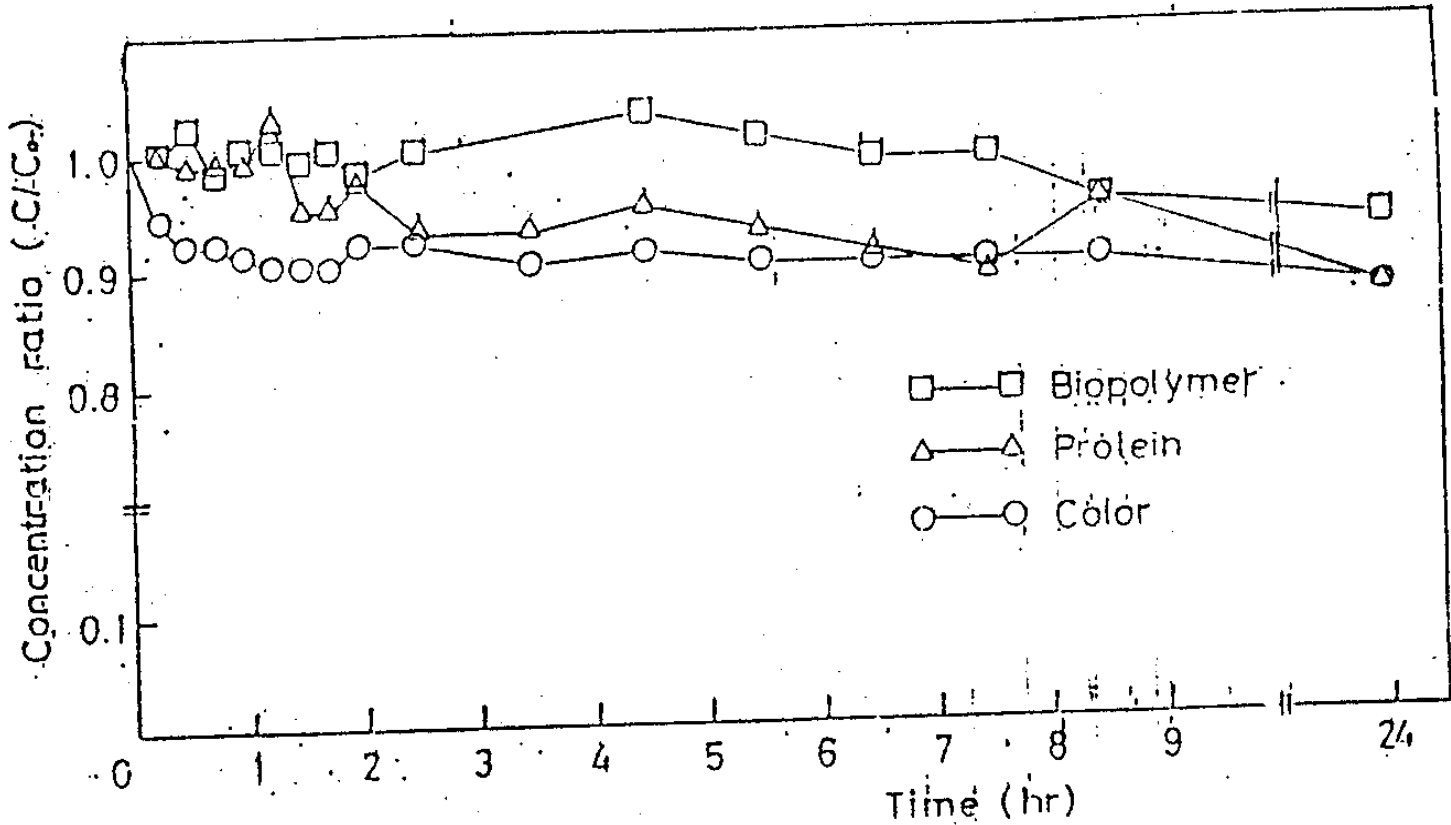


그림5-5 Concentration ratio as a function of time

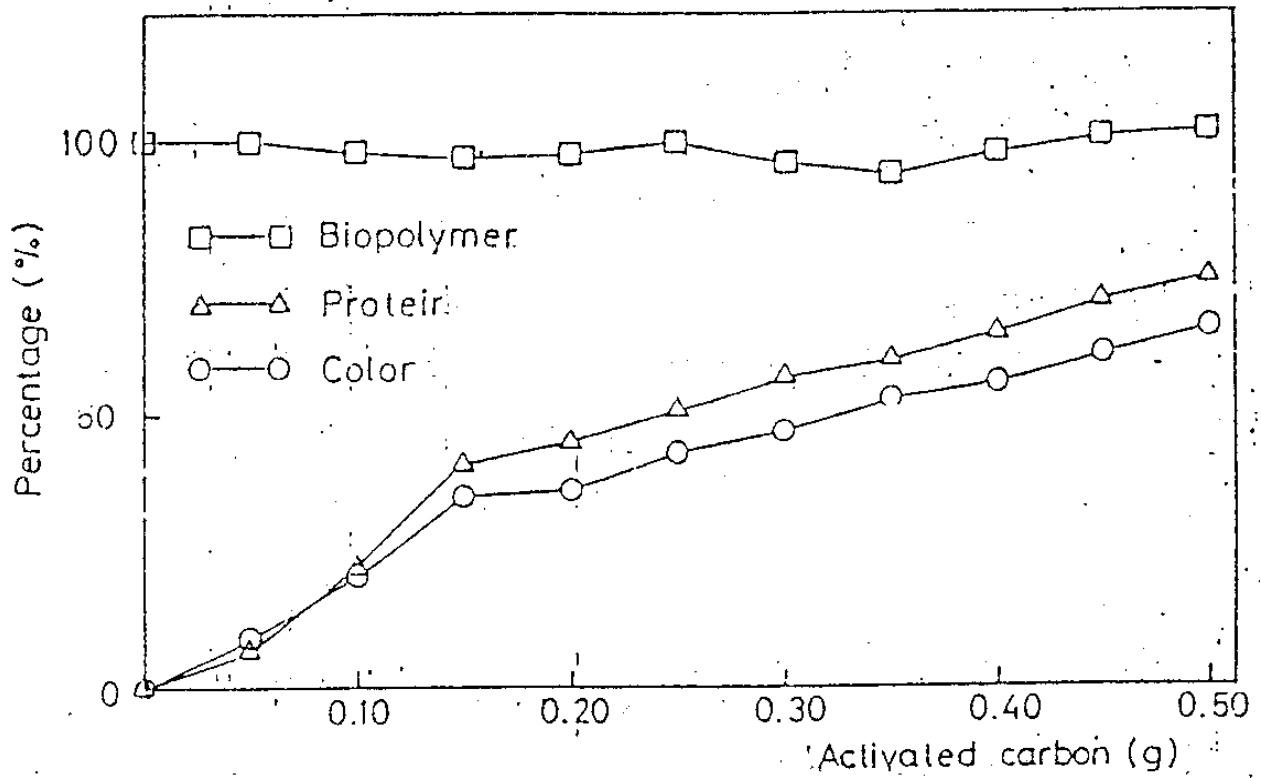


그림5-6. Removal(protein, color) and recovery (biopolymer) vs. amount of activated carbon used.

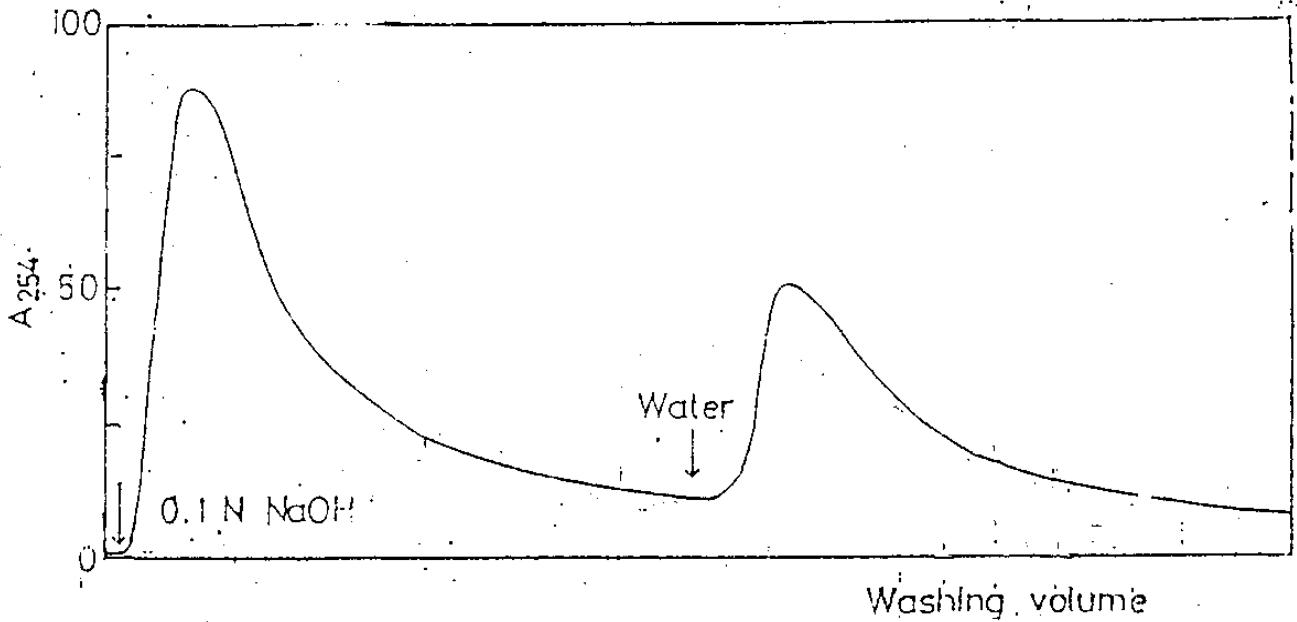


그림5-7. Regeneration of activated carbon by 0.1 N NaOH and water

히아론산 관련 참고문헌

- 김은영 (1985) 고분자 재료, 2000년대를 향한 과학기술 장기계획 협의회 자료집(II), p269, 한국과학 기술원
- 김태진 (1990) 히아론산의 개발 현황과 그의 발효 생산에 관한 연구, 생물 화공, 4(1), p55-63
- 김태진 (1990) 한국특허 90-5774
- 일본특허 57183707 (1982)
- 일본특허 57185208 (1982)
- 일본특허 58848017 (1983) Hyaluronic Acid 제조법, 녹십자
- 일본특허 59116207 (1984)
- 일본특허 59199622 (1984) 모발 화장품 조성물
- 일본특허 60501311 (1985)
- 일본특허 61167610 (1986)
- 일본특허 61236732 (1986) 신규 국소용 의약
- 자생당 (1981) 피부 화장품, 일본특허 57185208
- 자생당 (1983) 일본특허 5856692
- 장이섭, 정교민 (1987) Chemostat Culture에서의 Hyaluronic Acid 생산에 관한 연구, 한국생물공학회지, 1, 25-28
- 종방주식회사 (1984) 일본특허 59219200
- 한국유전공학조합 (1986) Hyaluronic Acid, II 제품편
- 한문희 (1985) 생명공학, 2000년대를 향한 과학기술 발전 장기계획 협의회 자료집(II), p298, 한국과학기술원

- Balazs, E. A. (1979) 미국특허 4141973
- Balazs, E. A. (1981) Methods for stimulating phagocytic activity and synergistic compositions therefor, 미국특허 4272522
- Balazs, E. A. and Band, p. (1984) Hyaluronic Acid; Its structure and use, *Cosmetics & Toiletries*, 99, 65-72
- Balazs, E. A. (1984) Polymeric articles modified with hyaluronate, 미국특허 with hyluronate, 미국특허 4487865
- Balazs, E. A. (1985) Hyaluronate modified polymeric articles, 미국특허 4500676
- Bitter, T. and Muir, H. M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction *Analytical Biochemistry*, 4, 330-334.
- Bracke, J. W. and Thacker, K. (1985) Hyaluronic acid from bacterial culture 미국특허 4517295
- Cleland, R. L. and Wang, J. L. (1970) Ionic polysaccharides. III. dilute solution properties of hyaluronic acid fractions, *Biopolymers* 9, 779-810.
- Denlinger, J. L. and Balazs, E. A. (1980) Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys, *Exp. Eye Res.* 31, 81-99
- Ellwood, D. C. (1986) Hyaluronic acid, *BIOTECH* 86, 193-199
- Fischer-Szafarz, B. (1984) Hyaluronidase polymerism detected by polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 143, 76-81

- Freshney, R. I. (1983) Culture of animal cells, Alan R. Liss, Inc., New York
- Hashimoto, K. and Kanzaki, I. (1975) Surface ultrastructure of human skin, *Acta Dermatovener (Stockholm)* 55, 413–430
- Healon (1985) Technical information and clinical experience, Pharmacia
- Hershenson, B. B. (1955) Obstetrical anesthesia: its principles and practice, Thomas, Springfield, IL
- Highley, D. R. (1984) The evaluation of skin care products, *Cosmetics & Toiletries*, 99, 89–91
- Hoerger, F. (1984) The need for risk assessment of chemicals in corporate decision making, ACS Symposium Series 239, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Holmstrom, B. and Ricics, J. (1967) Production of hyaluronic acid by a streptococcal strain in batch culture, *Applied Microbiology*, 15, 1409–1413
- Kendall, F. E., Heidelburger, M, and Dawson, M, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 118, 61.
- Kiems, E. and Lebech, K. (1976) Isolation of hyaluronic acid from cultures of streptococci in a chemically defined medium, *Acta Path. Microbiol. Sect. B* 84, 162–164
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265

- Meyee, K. and Palmer, J. W. (1934) *J. Biol. Chem.*, 107, 629
- Miller, G. L. (1959) *Analytical Chemistry*, 31, 426–428
- Perry, R. H. and Chilton, C. H. (1973) *Chemical Engineers' Handbook*, 5th ed., 5–3
- Peters, M. S. and Timmerhaus, K. D. (1968) *Plant design and economics for Chemical Engineers*, McGraw–Hill Book Company, New York
- Pharmacia (1985) *Annual Report of Pharmacia*
- Schmut, O. and Hofmann, H. (1981) A method for the purification of bovine vitreous body hyaluronic acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, 673, 192–196
- Sigma (1986) *Sigma catalog*
- Stoolmiller, A. C. and Dorfman, A. (1969) The Biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus, *Journal of Biological Chemistry*, 224, 236–246
- Welsh, E. J., Rees, D. A., Morris, E. R., and Maddan, J. K. (1980) Competitive inhibition evidence for specific intermolecular interactions in hyaluronate solutions, *J. Mol. Biol.* 138, 375–382

제6장 결론 및 향후계획

최근 생명과학의 발달과 함께 구미, 일본 등지에서 미생물에 의하여 분해되는 생분해성고분자 (Biopolymer) 생산을 위하여 연구개발에 많은 인력과 비용을 투자하고 있다. 생물고분자는 생분해성, 원료로써 재생가능한 자원의 사용, 구조의 다양성 등의 장점을 가지고 있어 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. 대표적인 제품으로는 PHB, Xanthan gum, Pullulan등을 들수 있다.

선진국에서는 생분해성의 점성이 강하고 중금속 흡착능력이 높은 생물고분자를, 폐수처리에 사용되는 기존 수처리제 대용 및 중금속 흡착제로 사용하려는 연구가 진행되고 있다. 생물고분자를 응집제로 사용할 경우에 응집력이 높을 뿐만 아니라 유출수에 잔류되는 생물고분자는 자연적인 분해로 이차공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다. 기존 수처리제를 대체할 수 있는 생분해성 고분자로는 생물응집제, 중금속 흡착제로 사용가능한 *Z. ramigera*등에 생성되는 점성의 세포외 다당류, 슬러지의 탈수 및 중금속 흡착제로 사용될 수 있는 chitosan alginate류, superabsorbent로 유망시 되는 천연 polypeptide류를 들 수 있다.

본 연구는 생분해성 고분자 생산 기술개발 및 환경분야 응용연구를 위한 2차년도 연구로써, 1차년도의 문헌조사에 의한 생분해성 고분자의 기술개발 현황 조사와 생물응집제 생산을 위한 *Z. ramigera* 미생물 배양 및 생물고분자 생산 기초연구에 이어서, 미생물 배양

및 생물고분자 생성조건 확립, 반응기 운전, 분리정제, 최적화를 위한 동력학적 모델링 연구를 수행 하였고, 개발된 수처리제의 폐수처리 응용 실험을 실시하였다. 또한 유사 점성 고분자인 PHB의 생산 및 분리정제 실험을 통하여 기존의 분리 정제 방법을 응용한 새로운 방법을 개발하여 효율을 비교하였고, 고급화장품, 의료용 등으로 사용되는 히아론산의 생산량 증가를 위한 연구와 활성탄을 이용한 불순물 제거 연구를 수행하였다.

대표적인 flocc 생성균인 *Zoogloea ramigera* 115 (ATCC 25935)를 이용하여 탄소원으로 Glucose, lactose, molasses, cheese whey를 선택하여 C/N ratio를 변화시키면서 생물고분자 생산실험을 수행하였다. 회분식 실험에서 각 탄소원의 종류에 따라서 최적 C/N 비의 차이를 보이며 molasses 및 cheese whey를 사용하였을 경우, 미생물 분해가 용이한 glucose나 lactose보다 용액상의 점도가 현저히 낮게 관찰 되었다. 유가식 발효실험 결과 molasses 27g/L를 사용시 회분식 발효보다 생산성이 3.5배 증가 되었다. 2단계 연속 발효실험 결과, molasses를 기질로 한 경우 생산성은 희석속도 0.048 1/h에서 0.40 g/L로써 최적치를 나타내었다.

생성된 고분자는 jar test를 통한 Kaolin 현탁액과 잉크폐수 등의 응집 실험에서 높은 침강속도와 응집력을 보였다. 추출된 생물고분자는 카드뮴, 아연 등의 중금속 흡착실험에서 높은 흡착율을 나타내었고, 특히 발효조 broth 자체도 높은 흡착성능을 나타내어 별도의 추출 과정이 필요없이 생물 고분자가 함유된 broth를 직접 흡착제로 사용할 수 있음을 보여주었다. 또한 생물고분자를 고정화시킨 packed

column에서 중금속 흡착/탈착 실험을 실시한 결과 높은 흡착률과 안정성, 탈착을 통한 회수 및 재사용 가능성을 확인할수 있었다.

*Z. ramigera*에 의한 세포외 고분자 생산을 growth와 nongrowth로 나누어 묘사한 결과 미생물의 비성장속도(μ_m)는 0.2hr^{-1} 로써 기질에 관계없이 거의 같은값을 얻었다. Stationary phase에서의 세포단위 무게당 생물고분자 생산성은 C/N 비가 높을수록 증가하고 세포단위 무게당 기질 소비속도도 함께 증가하는 것으로 나타났다. 최적 반응기 설계를 위한 2단계 연속공정 모델링에서 growth phase용 발효조와 production phase용 발효조의 용적비(V_2/V_1)를 1, 3, 5비율로 증가할수록 production phase용 반응조에서 고분자 생산속도는 증가하나 용적비 증가에 따른 생산성증가량이 비례로 증가하지않고 감소하는 것으로 예측되어 economic analysis를 통해 최적의 용적비를 찾을 수 있다. 유입수 유량 변화에 따른 생물고분자의 생산성이나 운전범위에 영향은 없었고 C/N 비가 클수록 production phase용 반응조에서 생물고분자 생산성은 증가하나 균체량이 질소원으로 인해 제한되기 때문에 운전범위가 좁아지는 것으로 예측되었다.

IR을 이용하여 여러 기질에서 생성된 고분자를 분석한 결과 기질에 관계없이 유사한 functional group을 가진것으로 추정되었다.

도금공장 폐수를 이용한 중금속 처리능력 비교에서 기존의 중금속 처리 보조제 및 고분자 응집제를 병용한 경우에 가장 효과적임을 보여주었다. Cadmium에 대한 등은 흡착선에서 생물고분자는 기존의 이온 교환수지보다 높은 흡착능력을 보여 주었다.

미생물내에서 에너지원이나 탄소원으로 저장되는 PHB (poly

-hydroxybutyrate)는 생분해성 열가소성 플라스틱의 원료로 넓은 응용범위를 가지고 있다. 많은 종류의 미생물 (bacteria, fungi)들이 PHB를 세포내에 축적하는 것으로 알려져 있으나 미생물에 따라 사용하는 기질이 다르고 축적하는 PHB의 양의 차이가 있어서 균주의 개발이 필요시 되고있다. 또한 PHB가 세포내에 축적 되기때문에 이를 분리하는 기술의 개발이 중요한 연구과제가 되고있다.

본 연구에서는 PHB의 축적량이 많은 *Alcaligenes eutrophus*를 선택하여 배양하고 세포내에 축적된 PHB의 분리 정제에 중점을 두고 연구를 진행하였다. 회분식 반응기에서 glucose를 탄소원으로 배양결과 세포내에 축적된 PHB의 양은 건조세포의 80%까지 얻을수 있었다. 분리정제 방법으로 세포벽을 파괴하기 위하여 효소(lysozyme, trypsin, pepsin)와 용매를 사용 비교한 결과 효소에 따른 PHB 수율에 차이는 없었지만 용매를 이용하는 방법이 간단하면서도 우수한 것으로 나타났다. 효소나 용매처리와 sonication를 병행하는것이 회수율을 증가시키는 것으로 관찰되었다.

히아론산은 균주와 동물조직(닭벼슬, 소눈)을 이용하여 생산되는데 최근 생물공학의 균주를 이용한 발효방법이 주로 이용되고 있다. 본 연구에서는 높은 생산성을 가진 *Streptococcus equi*를 2단계로 발효시켜 첨가해주는 인산염의 양과 시기에 다른 히아론산의 생산량의 변화를 관찰 하였다. 1단계인 균체번식 단계에서는 8-12 g/l 정도로 인산염을 제한시키고 비성장 속도가 감소하는 2단계 히아론산 생산단계에서 인산염강화 배지 (20-50 g/l)를 사용한 결과 2단계 배양에서 4시간후에 인산염을 추가한 경우에 히아론산 생산량이 증가하는것을 관

찰할수 있었다. 또한 강화된 양의 인산염을 첨가해줄때 4, 8, 12시간 추가 첨가할 경우에도 균체성장의 억제없이 히아론산 생산을 증가시켰다. 이렇게 생산된 배양액에는 잔류 포도당을 비롯한 다량의 불순물이 존재하기 때문에 갈색을 띄게되는데 활성탄으로 충전된 column을 이용하여 60%정도 까지 색소를 제거할 수 있었다. 사용된 활성탄은 0.1N NaOH를 이용하여 재생할 수 있었다.

향후 생물학적 수처리제의 상품화를 위해서는 pilot 규모의 대형 생물반응기 시험에 의한 최적화 및 실제 폐수 적용 실험이 필요하며, PHB 및 히아론산의 국산화를 위해, 기초연구 결과를 바탕으로 보다 경제적이고 효율적인 생산공정 및 분리기술 개발이 필요하다.

아울러 본 연구 결과는, 향후 일본등 선진국의 경우와 같은 국내 산학연이 공동 참여하는 국책적인 연구개발 추진시에, 특히 환경분야에서 개발이 요청되는 생분해성 수처리제 개발과 포장재 및 의료용 등으로 수요증가가 예상되는 생분해성 고분자의 생산과 분리기술 개발을 위한 기본자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- (1) T. Suzuki, T. Yamane, S. Shimizu, "Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methyltroph", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 23 ; 322-329 (1986).
- (2) 최준호, 김정희, "메탄올로부터 생산되는 고점성을 갖는 신규 다당류 Methylan의 용액특성.", 생물화공 5, 75, (1991).
- (3) 김영하, "생체분해성 고분자의 발전동향", 생물화공 4, 48, (1990).
- (4) 土肥義治 등, 分解性プラスチック, (1990).
- (5) Crabtree, K. and W. Boyle et al., A "Mechanism of flocculation by *Zoogloea ramigera*." J. Water Pollut. Control Fed. 38 : (1968).
- (6) Norberg, A. B. and S. Enfors. "Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*." Appl. Environ. Microbiol. 44 : 1231, (1982).
- (7) Parker, D. S., Kaufman, W. J., "Physical conditioning of activated sludge floc." J. Water Pollut. Control Fed. 43 : 1817, (1971).
- (8) Friedman, B. A., Dugan, P. R. : J. Bacteriol., 95, 1903 (1968).
- (9) Ikeda, F., et al. "An Extracellular Polysaccharide Produced by *Zoogloea Ramigera* 115." Eur. J. Biochem., 123, 437 (1982).

- (10) Cooper, T. A., et al. "Exopolysaccharide Production from Lactose by Wild type and Polyhydroxybutylate minus Strains of *Zoogloea Ramigera*." Presented as poster 10. Cooper, T. A., et al. : Presented as poster paper at ACS 198th National meeting, Miami, USA, (1989).
- (11) Sinskey, A., et al. "Biopolymers and Modified Polysaccharides." Biotechnology in Food Processing(3ed. Harlander S.K., and Labuza, T. P.) Noyes Publ., New Jersey, Ch. 6 (1986).
- (12) Nakamura, T., et al. "Solution Properties of Polysaccharide Flocculant Produced by *Zoogloea Ramigera*." Elsevier Science Publ., Amsterdam, 399 (1987).
- (13) Esser, K. and U. Kues. "Flucculation and its implication for biotechnology.", Process Biochem. 21, (1983).
- (14) Magaritis, A. and G. W. Pace. "Microbial polysaccharide.", pp 1005 Comprehensive Biotechnology. Vol. 3. M. Moo-Young ed. Pergamon Press, New York, 3, 1005, (1985).
- (15) Brown, M. J. and Lester, J. N. "Comparison of bacterial extracellular polymer extration methods." Appl. Environ. Microbiol., 40 : 179, (1980).
- (16) Norberg, A., Rydin, S. "Development of a Continuous Process for Metal Accumulation by *Zoogloea Ramigera*." Biotech. Bioeng., 26, 265, (1984).
- (17) 신정래, "수처리 약품." 녹원출판사 (1987).

- (18) Weiss, R. M and D. F. Ollis. "Extracellular microbial polysaccharide. I. substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation." *Biotechnol. Bioeng.* 22. 859–873. (1980).
- (19) Joseph A. Robinson : "Determining Microbial Kinetic Parameters Using Nonlinear Regression Analysis", *Nonlinear Regression Analysis in Microbiology Ecology*. New York. (1985).
- (20) Sabine P. Kuhn, Robert M. Pfister., "Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium alginate immobilized *Zoogloea Ramigera*." *Appl. Microbiol. Biotech.*, 31 : 613–618 (1989).
- (21) M. Denac, "Modeling dynamic experiments on the anaerobic degradation of Molasses wastewater.", *BIOTECH/BIOENG.*, 31, 1, (1988).
- (22) P. Renard, "Adaptive control of anaerobic digestion processes – A pilot-scale application.", *BIOTECH/BIOENG.*, 31, 287, (1988).
- (23) G. Sudesh Kumar, V. Kalpagam, U. S. Nandi, "Biodegradable polymers : prospects, problems, andProgress", *JMS – REV. MICROMOL. CHEM. PHYS.*, 22 (1983).
- (24) Janis D. Evans, Subhas K. Sikdar, "Biodegradable plastics : An idea whose time has come?", *CHEMTECH.*, 38–42, Jan. (1990).
- (25) 이용현 등, "제1회 생분해성고분자연구회 심포지움 : 생분해성고분자의 개발과 응용", 생분해성고분자 연구회, May (1991).

- (26) 土肥義治, 化學 と 工業, “공중합 polyester의 발효합성과 생물분해성”, 42권 7호, 96-98 (1989).
- (27) Heinzle E., Lafferty, “A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H 16.” EUR J. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 11 : 8-16 (1980).
- (28) 송미연, 이호재, 이용현, “분홍색 통성 메탄올 자화세균이 생산하는 PHB.”, 산업미생물학회지, 18, 273, (1990).
- (29) T. Endo, “Radical ring-opening polymerization of 3,9-dimethylene-1,5,7,11-tetraoxaspiro-[5,5] Undecane.” POLYMER LETT EDI. 13, 193, (1975).
- (30) 이호재, 이용현, “*Methylobacterium* sp. GL-10의 유가배양에 의한 Methanol로부터 PHB의 생산”, 한국생물공학회지, 6, (1991).
- (31) LeDuy, “Enhanced production of Pullulan from Lactose by Adaptation and by mixed culture techniques.”, BIOTECH LETT, 5, 49, (1983).
- (32) 최준호, 김정희, “메탄올로부터 생산되는 고점성을 갖는 신규다당류 Methylan의 용액특성.”, 생물화공 5, 75, (1991).
- (33) 김영하, “생체분해성 고분자의 발전동향”, 생물화공 4, 48, (1990).
- (34) Yamane T, BIOTECHNOL BIOENG., “Applications of porous Teflon tubing method to automatic fed-batch culture of

- microorganisms. II. Automatic constant valve control of fed substrate (ethanol) concentration in semibatch culture of yeast." 23 : 2509–2524 (1980).
- (35) Henryk S., "Microcrystalline Chitosan. I. Preparation and Properties of Microcrystalline Chitosan.", J. APPL. POLYMER SCI., 33, 177, (1987).
- (36) Albertsson, A. C. "Biodegradation of syntehic polymers. II. Alimited microbial conversion of ^{14}C in polyethylene to $^{14}\text{CO}_2$ by some soil fungi." J. APPL. POLYMER SCI., 22, 3419, (1978).
- (37) Albertsson, A. C. "Biodegradation of synthetic polymers. IV. the $^{14}\text{CO}_2$ method applied to linear polyethylene cotaining a biodegradable additive.", J. APPL. POLYMER SCI., 35, 423, 1979 G. Sudesh Kumar, V. Kalpagam, U. S. Nandi, "Biodegradable polymers :] prospects, problems, and Progress", JMS–REV. MICROMOL. CHEM. PHYS., 22 (1983).
- (38) Bernard M., "Recycling plastics and fibers.", CHEMTECH, June (1990).
- (39) Rodricguez, F. "The prospects for biodegradable plastics." CHEMTECH, July (1971).
- (40) Olli K., "Microcrystalline Chitosan—Some Areas of Application", BRITISH POLYMER JOURNAL, 23, 261, (1990).
- (41) 伊祭和夫, "ムラサキイガイ을 이용한 해양의 부착생물의 부착 기피물질 검색법." 化學 と 生物, VOL 28.

- (42) Repaske, R. "Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*." APPL ENVIRON MICROBIOL, 32, 585 Oct., (1976).
- (43) Robert M. Lafferty, "Microbial production of Poly- β -hydroxybutyric acid" Biotechnology, vol, 6b. New York (1988).
- (44) John, H. Law and Ralph, A. Slepecky, : "Assay of Poly- β -hydroxybutyric acid" Anal. Chem. Vol : 82 (1961).
- (45) R. Griebel, Z. Smith, and J. M. Merrick, : "metabolism of poly- β -hydroxybutyrylate, purification, composition, and properties of native poly- β -hydroxybutyrylate Granules from *Bacillus megaterium*." vol. 7, biochemistry, no. 10, october (1968).
- (46) Sabine. P. Kuhn, Robert M. Pfister., "Adsorption of Mixed metals and cadmium by calcium alginate immobilized *Zoogloea Ramigera*." Appl. Microbiol. Biotech., 31 : 613-618. (1989).

부

부


```

C THIS PROGRAM IS TO DETERMINE MICROBIAL KINETIC PARAMETER
C USING NONLINEAR AND LINEAR REGRESSION
C
C  $dX/dt = \mu X(1-X/X_{max})$ 
C  $dP/dt = nX + m dX/dt$ 
C  $dS/dt = -1/Y_x dX/dt - 1/Y_p dP/dt - K_e X$ 
C
C SM = SENSITIVITY MATRIX
C RV = RESIDUAL VECTOR
C CTV = CORRECTION TERM VECTOR
C CM = COVARIANCE VECTOR
C
C IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
C DIMENSION T(30), X(30), XP(30), C(30), PC(30)
C DIMENSION P(30), PP(30), A(30), B(30)
C WRITE(*,110)
C READ(*,*) XO
C WRITE(*,111)
C READ(*,*) UGUESS
C WRITE(*,112)
C READ(*,*) XMAX
C WRITE(*,113)
C READ(*,*) DPDT
C WRITE(*,114)
C READ(*,*) PO
C WRITE(*,115)
C READ(*,*) CO
110 FORMAT(1X, 'INITIAL BIOMASS =')
111 FORMAT(1X, 'SPECIFIC GROWTH RATE GUESSED =')
112 FORMAT(1X, 'MAXIMUM BIOMASS CONCENTRATION =')
113 FORMAT(1X, 'PRODUCT FORMATION RATE (G/L/HR) =')
114 FORMAT(1X, 'INITIAL PRODUCT AMOUNT =')
115 FORMAT(1X, 'INITIAL SUBSTRATE CONC. =')
C XGUESS=XO
C OPEN (UNIT=2,FILE='IN',STATUS='OLD')
C READ(2,*) N
C DO 13 K=1,N
C READ(2,*) T(K), X(K), C(K), P(K)
13 CONTINUE
C CLOSE (2)
C
C TO CALCULATE THE VALUE OF CONSTANT IN LOGISTIC EQUATION USING
C NONLINEAR REGRESSION
C

```

```

DO 14 I=1,100
SM11=0
SM12=0
SM22=0
RV1=0
RV2=0
EQ1=0
EQ2=0
EQ3=0
EQ4=0
EQ5=0
EQ6=0
DO 15 J=1,N
EQ1=T(J)*XOGUESS*EXP(UGUESS*T(J))*(1-XOGUESS/XMAX*(1-
*EXP(UGUESS*T(J))))
EQ2=XOGUESS*EXP(UGUESS*T(J))*XOGUESS/XMAX*T(J)*EXP(UGUESS*T(J))
EQ3=(1-XOGUESS/XMAX*(1-EXP(UGUESS*T(J))))**2
DXDU=(EQ1-EQ2)/EQ3
EQ4=EXP(UGUESS*T(J))*(1-XOGUESS/XMAX*(1-EXP(UGUESS*T(J))))
EQ5=XOGUESS*EXP(UGUESS*T(J))*(1-EXP(UGUESS*T(J)))/XMAX
EQ6=(1-XOGUESS/XMAX*(1-EXP(UGUESS*T(J))))**2
DXDXO=(EQ4-EQ5)/EQ6
SM11=SM11+DXDU**2
SM12=SM12+DXDU*DXDXO
SM22=SM22+DXDXO**2
XP(J)=XOGUESS*EXP(UGUESS*T(J))/(1-XOGUESS/XMAX*(1-
*EXP(UGUESS*T(J))))
RV1=RV1+(X(J)-XP(J))*DXDU
RV2=RV2+(X(J)-XP(J))*DXDXO
15 CONTINUE
DET=SM11*SM22-SM12**2
CM11=SM22/DET
CM22=SM11/DET
CM12=-SM12/DET
CM21=CM12
CTV1=RV1*CM11+RV2*CM12
CTV2=RV1*CM21+RV2*CM22
IF(CTV1 .LT. 1.E-4 .AND. CTV2 .LT. 1.E-4) GOTO 17
UGUESS=UGUESS+CTV1
XOGUESS=XOGUESS+CTV2
14 CONTINUE
17 OPEN (UNIT=3, FILE='OUT', STATUS='UNKNOWN')
DIF=0
DO 21 J=1,N

```

```

DIF=(X(J)-XP(J))**2+DIF
21 CONTINUE
C
C TO CALCULATE THE VALUE OF CONSTANTS IN LUEDEKING-PIRET EQUATION
C
DN=DPDT/XMAX
SUM1=0
SUM2=0
DO 22 I=1,N
B(I)=XMAX/UGUESS*DLOG(1-XO/XMAX*(1-
*EXP(UGUESS*T(I))))
A(I)=XO*(EXP(UGUESS*T(I)))/(1-XO/XMAX*(1-
*EXP(UGUESS*T(I))))-1)
SUM1=SUM1+(P(I)-PO-DN*B(I))*A(I)
SUM2=SUM2+A(I)**2
22 CONTINUE
DM=SUM1/SUM2
DO 26 I=1,N
TE=5*I
PP(I)=PO+DM*A(I)+DN*B(I)
26 CONTINUE
C
C TO CALCULATE THE VALUE OF CONSTANTS IN MODIFIED LUEDEKING-PIRET
C EQUATION
C
SUMXY=0
SUMXZ=0
SUMYZ=0
SUMX2=0
SUMY2=0
SUMZ2=0
DO 23 J=1,N
Y=C0-C(J)
XX=X(J)-XO
Z=XMAX/UGUESS*(DLOG(1-XO/XMAX*(1-EXP(UGUESS*T(J)))))
SUMXY=SUMXY+XX*Y
SUMXZ=SUMXZ+XX*Z
SUMYZ=SUMYZ+Y*Z
SUMX2=SUMX2+XX**2
SUMY2=SUMY2+Y**2
SUMZ2=SUMZ2+Z**2
23 CONTINUE
AA=(SUMXY*SUMZ2-SUMXZ*SUMYZ)/(SUMX2*SUMZ2-SUMXZ**2)
BB=(SUMXY*SUMXZ-SUMYZ*SUMX2)/(SUMXZ**2-SUMZ2*SUMX2)

```

```

DO 24 K=1,N
PC(K)=CO-AA*(X(K)-XO)-BB*(XMAX/UGUESS*(DLOG(1-
*XO/XMAX*(1-EXP(UGUESS*T(K))))))
24 CONTINUE
WRITE(3,101) UGUESS, XOGUESS, XMAX, DIF, DM, DN, AA, BB
101 FORMAT('SPECIFIC GROWTH RATE =',2X,F15.8,/,
*'INITIAL BIOMASS (G/L) =',2X,F15.8,/,
*'MAXIMUM BIOMASS CONCENTRATION (G/L) =',F15.8,/,
*'RESIDUAL SQUARE =',F15.8,/,
*'M =',F15.8,5X,'N =',F15.8,/,
*'A =',F15.8,5X,'B =',F15.8)
WRITE(3,102)
TI=0
WRITE(3,103) TI, XO, XOGUESS, CO, CO, PO, PO
DO 18 I=1,N
WRITE(3,103) T(I), X(I), XP(I), C(I), PC(I), P(I), PP(I)
18 CONTINUE
CLOSE(3)
102 FORMAT(/,'TIME(HR)',4X,'OBS BIOMASS',2X,'PRED BIOMASS',
*2X,'OBS CONC',2X,'PRED CONC',2X,'OBS PRODUCT',2X,
*'PRED PRODUCT',/)
103 FORMAT(3X,F5.1,5X,F6.3,7X,F6.3,6X,F6.3,4X,F6.3,4X,F6.3,4X,F6.3)
OPEN (UNIT=2, FILE='OUT1', STATUS='UNKNOWN')
WRITE(2,200)
DO 33 I=1,50
TT=(I-1)*5
XT=XOGUESS*EXP(UGUESS*TT)/(1-XOGUESS/XMAX*(1-EXP(UGUESS*TT)))
DXDT=UGUESS*XT*(1-XT/XMAX)
DPDT=DN*XT+DM*DXDT
DSDT=-AA*DXDT-BB*XT
WRITE(2,201) TT, XT, DXDT, DPDT, DSDT
33 CONTINUE
200 FORMAT('TIME',4X,'BIOMASS',4X,'DX/DT',4X,'DP/DT',4X,'DS/DT',/)
201 FORMAT(F5.1,3X,F7.3,3X,F7.3,2X,F7.3,2X,F7.3)
CLOSE(2)
STOP
END

```

C
 C THIS PROGRAM IS TO PREDICT REACTOR RESPONSE TO GIVEN
 C OPERATION VARIABLE AT STEADY STATE IN TWO STAGE CONTINUOUS
 C BIOREACTOR

C
 C Reactor I

$$C \quad \frac{dX_1}{dt} = \mu X_1 - Q_1 X_1$$

$$C \quad = \mu X_1 - D_1 X_1$$

$$C \quad \frac{dS_1}{dt} = (Q_1 S_{i1} - Q_1 S_1) - (A\mu + B) X_1 V_1$$

$$C \quad \frac{dS_1}{dt} = D_1 (S_{i1} - S_1) - (A\mu + B) X_1 \quad (2)$$

$$C \quad \frac{dP_1}{dt} = -Q_1 P_1 + (n X_1 + m \mu X_1) V_1$$

$$C \quad \frac{dP_1}{dt} = -D_1 P_1 + (n X_1 + m \mu X_1)$$

C Reactor II

$$C \quad \frac{dX_2}{dt} = (Q_1 X_1 - Q_3 X_2) + \mu X_2 V_2$$

$$C \quad \frac{dX_2}{dt} = \left(\frac{Q_1}{V_2} X_1 - \frac{Q_3}{V_2} X_2 \right) + \mu X_2$$

$$C \quad \frac{dS_2}{dt} = (Q_1 S_1 - Q_2 S_{i2}) - Q_3 S_2 - (A\mu + B) X_2 V_2$$

$$C \quad \frac{dP_2}{dt} = -Q_3 P_2 + (n X_2 + m \mu X_2) V_2$$

C

```

IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
EXTERNAL BISEC
WRITE(*,110)
READ(*,*) XMAX
WRITE(*,111)
READ(*,*) UMAX
WRITE(*,112)
READ(*,*) DN
WRITE(*,113)
READ(*,*) DM
WRITE(*,114)
READ(*,*) A
WRITE(*,115)
READ(*,*) B
WRITE(*,116)
READ(*,*) S11
WRITE(*,117)
READ(*,*) R1
WRITE(*,118)
READ(*,*) R2
write(*,119)
READ(*,*) SI2
OPEN(UNIT=2,FILE='O',STATUS='UNKNOWN')
WRITE(2,130) R1, R2
WRITE(2,120)
DO 11 I=1,20
D1=UMAX/20*I
X1=XMAX*(1-D1/UMAX)
U=UMAX*(1-X1/XMAX)
S1=S11-(A*U+B)*X1/D1
IF (S1 .LE. 0) S1=0
P1=(DN*X1+DM*U*X1)/D1
D2=D1*(1+R1)/R2
C1=-(1+R1-UMAX*R2/D1)
C2=-(UMAX*R2/(XMAX*D1))
CALL BISEC (C1, C2, X1, XMAX, X2)
U=UMAX*(1-X2/XMAX)
S2=S1/(1+R1)+R1*SI2/(1+R1)-(A*U+B)*X2/D2
IF (S2 .LE. 0) S2=0
P2=(DN*X2+DM*U*X2)/D2
PD=P2*D2
WRITE(2,121) D1, D2, X1, X2, S1, S2, P1, P2, PD
11 CONTINUE
110 FORMAT (1X, 'MAXIMUM BIOMASS =')

```

```

111 FORMAT (1X, 'MAXIMUM GROWTH RATE =')
112 FORMAT (1X, 'N =')
113 FORMAT (1X, 'M =')
114 FORMAT (1X, 'A =')
115 FORMAT (1X, 'B =')
116 FORMAT (1X, 'SUBSTRATE CONCENTRATION (S11)=')
117 FORMAT (1X, 'Q2/Q1 =')
118 FORMAT (1X, 'V2/V1 =')
120 FORMAT (3X, 'D1', 7X, 'D2', 8X, 'X1', 8X, 'X2', 8X, 'S1', 8X, 'S2',
      *8X, 'P1', 8X, 'P2', 8X, 'P2*D2')
119 FORMAT (1X, 'SUBSTRATE CONCENTRATION (S12) =')
121 FORMAT (F7. 5, 2X, F7. 5, 2X, F8. 4, 2X, F8. 4, 2X, F8. 4, 2X, F8. 4,
      *2X, F8. 4, 2X, F8. 4, 2X, F8. 4)
130 FORMAT (1X, 'Q2/Q1 =', F8. 3, /, 1X, 'V2/V1 =', F8. 3)
      STOP
      END
      SUBROUTINE BISEC (C1, C2, X1, XMAX, X2)
      IMPLICIT REAL*8 (A-H, O-Z)
      TOL=1.E-5
      A1=0
      A2=XMAX
      DO 30 I=1 , 100
      P=A1+(A2-A1)/2
      FP=C1*P+C2*P**2+X1
      DIF=(A2-A1)/2
      IF (FP .EQ. 0 .OR. DIF .LT. TOL) GOTO 33
      FA1=C1*A1+C2*A1**2+X1
      MULT=FA1*FP
      IF(MULT .GT. 0) GOTO 31
      A2=P
      GOTO 30
31  A1=P
30  CONTINUE
33  X2=P
      RETURN
      END

```

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.