



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0077501

(43) 공개일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/04 (2006.01) C12R 1/26 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 7/04 (2013.01)

C12R 2001/26 (2021.05)

(21) 출원번호 10-2021-0164834

(22) 출원일자 2021년11월25일

심사청구일자 2022년11월02일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

나정걸

서울특별시 서초구 고무래로 89, 107동 302호

김률호

경기도 용인시 수지구 풍덕천로181번길 8, 203호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인에스알비, 윤대웅

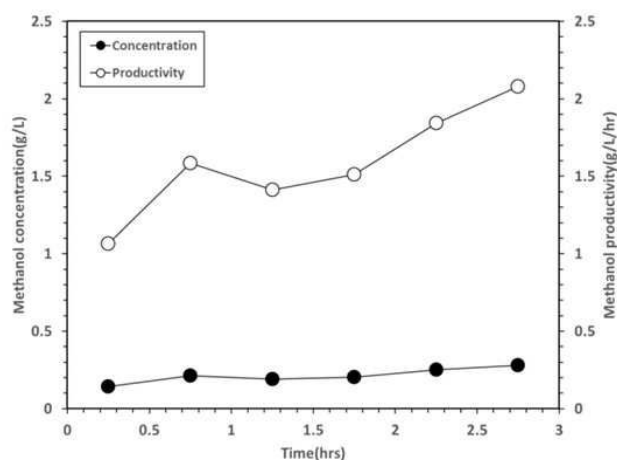
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메탄자화균 전세포 촉매 제조 방법 및 이를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 메탄자화균 전세포 촉매 제조 방법 및 이를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면 메탄자화균 전세포 촉매의 메탄 전환 및 메탄올 생산 활성은 유지한 채로, 메탄올 탈수소화 효소 활성은 억제하는 동시에 메탄올에 의한 산물저해 효과를 방지할 수 있어 메탄올 생산성을 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄올 생산 공정에 이용할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

오병근

서울특별시 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131177
과제번호	2015M3D3A1A01064926
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	가스 전달 한계를 극복하는 고효율 C1 가스 전환 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주; 및

에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)를 0.3 내지 0.7 mM로 포함하는, 메탄을 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 제1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것인, 메탄을 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물의 세포당 EDTA 농도는 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)인 것인, 메탄을 생산용 조성물.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 메탄산화균 전세포 촉매의 제조 방법:

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주를 배양하여 수득하는 수득 단계; 및

수득된 균주를 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)과 접촉시키는 반응 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 수득 단계는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1을 배양하여 수득하는 것인, 메탄산화균 전세포 촉매의 제조 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 반응 단계는 균주와 에틸렌다이아민테트라아세트산을 36분 내지 42분 동안 접촉시키는 것

인, 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 반응 단계는 균주를 0.3 mM 내지 0.7mM의 에틸렌다이아민테트라아세트산과 접촉시키는 것인, 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 반응 단계는 균주를 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)의 세포당 EDTA 농도로 에틸렌다이아민테트라아세트산과 접촉시키는 것인, 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 수득 단계는 상기 균주의 지수성장기 (exponential growth phase)에서 수득하는 것인, 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법:

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylophobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노뎀 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주를 배양하여 수득하는 수득 단계;

수득된 균주를 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)과 접촉시켜 메탄자화균 전세포 촉매를 제조하는 제조 단계; 및

상기 메탄자화균 전세포 촉매를 메탄과 접촉시켜 메탄올을 생산하는 전환 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄자화균 전세포 촉매 제조 방법 및 이를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 메탄자화균 수확 시점, 메탄올 탈수소 효소 저해제의 농도와 저해제 처리 시간을 최적화하여 성능이 우수한 메탄자화균 전세포 촉매를 제조하고, 이를 세포체유형 전환시스템에서 활용하여 메탄으로부터 메탄올의 생산속도를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 보고된 메탄자화균 전세포 촉매를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법은 메탄올 탈수소화 효소 저해제를 사용하여 메탄으로부터 생산된 메탄올이 대사되지 않도록 하여 반응액에 축적시키는 방법을 사용하고 있다.

[0003] 이러한 방법은 상온, 상압의 온화한 조건에서 메탄을 전환하고 메탄올을 생산할 수 있는 장점이 있으나, 생산된 메탄올의 농도가 증가하면, 메탄자화균 전세포 촉매의 활성이 저해되어 일정 농도 이상 메탄올을 생산할 수 없는 문제가 존재한다. 이러한 산물 저해 현상을 극복하기 위하여 생산된 메탄올을 연속적으로 회수함으로써 생산성을 올리는 방법을 도입할 수 있으나, 연속 조업 과정에서 반응액에 포함된 메탄올 탈수소화 효소 저해제의 영향으로 이에 장기간 노출된 메탄자화균 전세포 촉매의 메탄 전환 활성 역시 저해되게 된다.

[0004] 또한, 전세포 촉매 제조를 위한 메탄자화균 배양에 있어서도 충분한 촉매량을 수득하기 위하여 오랜 기간 동안 배양을 진행하고 세포 농도가 최대가 되는 지점에서 메탄자화균을 회수하고 이를 이용하여 전세포 촉매로 만든

는 방법들이 사용되고 있으나, 메탄자화균의 활성이 배양 기간에 따라 달라짐에 따라 안정적인 효율적인 운전이 어렵다는 문제 역시 지적되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 이에 본 발명자들은 메탄자화균 전세포 촉매를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 반응의 효율을 증대하고자, 메탄자화균 전세포의 성능을 극대화할 수 있는 전처리 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 공정이 진행되는 동안 메탄올 탈수소화 효소 저해제를 지속적으로 사용하는 것이 아니라 메탄자화균 세포를 수득한 다음 일정한 농도에서 일정 시간만 노출하여 전세포 촉매를 만들 경우 메탄전환과 메탄올 생산 능력이 유지됨을 확인하였다.
- [0006] 또한, 메탄자화균 전세포 촉매 제조를 위한 메탄자화균 배양에 있어서도 메탄자화균 세포의 활성이 전세포 촉매 제조 후 메탄올 생산 과정에서도 영향을 미치는 바, 메탄자화균의 회수 시기가 지수성장기일 때 메탄올 생산 성능이 최대화됨을 확인하였다.
- [0007] 이에, 본 발명의 목적은 메탄올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 메탄올 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 메탄자화균 전세포 촉매 제조 방법 및 이를 이용한 메탄 이용 메탄올 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 메탄자화균 세포 당 EDTA 비율을 조절한 조건에서 일정한 시간만 노출하여 전세포 촉매의 활성이 저하되지 않는 수준에서 메탄올의 분해를 방지함으로써 메탄올의 안정적인 생산을 가능케 한다. 또한, 본 발명은 연속 운전을 통하여 메탄올의 축적에 의한 산물저해 현상을 방지하였고, 연속 운전 과정에서 전세포 촉매의 유출을 방지할 수 있도록 세포 체류형 효소 전환 장치를 구성하였다. 또한, 지수성장기에서 수확한 메탄자화균 세포를 전세포로 활용함으로써 메탄올 비생산성을 극대화하여 발명을 완성하였다.
- [0011] 본 발명의 구현을 위하여 1) 메탄자화균을 지수성장기까지 배양한 다음 수득하여 메탄올 생산성을 극대화하고, 2) 수득한 메탄자화균을 세포당 특정 농도의 EDTA로 특정 시간만 노출하여 메탄올 생산성은 유지하면서 메탄올 분해 능력은 억제된 전세포 촉매를 제조하고, 3) 제조한 전세포 촉매를 세포 체류형 효소 전환 시스템에서 운전하였다.
- [0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0014] 본 발명의 일 양태는 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로 비움 속(Methylomicrobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarimum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노뎀 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주; 및 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)를 0.3 내지 0.7 mM로 포함하는, 메탄올 생산용 조성물이다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에서, 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1인 것일 수 있다.
- [0016] 본 명세서 상의 "메틸로모나스 속(Methylomonas sp.) DH-1 균주"란, 하수슬러지로부터 유래되는 메틸로모나스 속(Methylomonas sp.)에 속하는 균주를 의미한다. DH-1 균주는 2016년 4월 8일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하고, 기탁번호 KCTC13004BP를 부여받은 균주를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물의 세포당 EDTA 농도는 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)인 것일 수 있다.

- [0018] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 방법이다:
- [0019] 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속 (Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속 (Methylovulum), 메틸로마리노븀 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속 (Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속 (Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주를 배양하여 수득하는 수득 단계; 및 수득된 균주를 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)과 접촉시키는 반응 단계.
- [0020] 본 발명의 용어 "메탄자화균(Methanotroph)"은 메탄산화세균이라고도 호칭되며, 메탄을 유일탄소원으로 이용하여 생육하는 원핵생물을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 수득 단계는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1을 배양하여 수득하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서, 반응 단계는 균주와 에틸렌디아민테트라아세트산을 36분 내지 42분 동안 접촉시키는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에서, 반응 단계는 균주를 0.3 mM 내지 0.7mM의 에틸렌디아민테트라아세트산과 접촉시키는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서, 반응 단계는 균주를 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)의 세포당 EDTA 농도로 에틸렌디아민테트라아세트산과 접촉시키는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에서, 수득 단계는 상기 균주의 지수성장기 (exponential growth phase)에서 수득하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법이다:
- [0027] 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박 테리움 속(Methylobacterium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로 박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속 (Methyloglobus), 메틸로사르시나 속 (Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속 (Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속 (Methylomarinum), 메틸로벌럼 속 (Methylovulum), 메틸로마리노븀 속 (Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속 (Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속 (Methylocystis), 메틸로셀라 속 (Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속 (Methylacidiphilum) 및 메틸아 시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 균주를 배양하여 수득하는 수득 단계; 수득된 균주를 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)과 접촉시켜 메탄자화균 전세포 촉매를 제조하는 제조 단계; 및 메탄자화균 전세포 촉매를 메탄과 접촉시켜 메탄올을 생산하는 전환 단계.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에서, 수득 단계는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1을 배양하여 수득하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에서, 제조 단계는 균주와 에틸렌디아민테트라아세트산을 36분 내지 42분 동안 접촉시키는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 제조 단계는 균주를 0.3 mM 내지 0.7mM의 에틸렌디아민테트라아세트산과 접촉시키는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 제조 단계는 균주를 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)의 세포당 EDTA 농도로 에틸렌디아민테트라아세트산과 접촉시키는 것일 수 있다.

- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 수득 단계는 상기 균주의 지수성장기 (exponential growth phase)에서 수득하는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에서, 전환 단계는 25 내지 35 ℃의 온도에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에서, 전환 단계는 10 내지 50%(v/v)의 메탄을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에서, 전환 단계는 세포채류형 효소전환 시스템에서 수행될 수 있다. 구체적으로, 전환단계는 중공사막을 통하여 세포가 유출되지 않도록 함으로써 전세포 촉매는 고농도 상태를 유지하면서 메탄을 축적에 의한 저해 효과는 최소화할 수 있다. 이때, 반응장치에서 액체의 체류시간은 5분 내지 15분으로 조절될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에서, 세포채류형 효소전환 시스템에는 21.66%의 메탄과 그 외 공기로 이루어진 기체가 시스템 부피 기준 분당 0.2 부피(0.2 vvm) 내지 0.5 부피(0.5 vvm)로 공급될 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명은 메탄자화균 전세포 촉매 제조 방법 및 이를 이용한 메탄 이용 메탄을 생산 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면 메탄자화균 전세포 촉매의 메탄 전환 및 메탄을 생산 활성은 유지한 채로, 메탄을 탈수소화 효소 활성은 억제하는 동시에 메탄올에 의한 산물저해 효과를 방지할 수 있어 메탄을 생산성을 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 메탄을 생산 공정에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 메탄 이용 메탄을 생산에 있어 초기 메탄올 농도의 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 메탄올 탈수소 효소 저해제인 EDTA의 지속적인 노출에 따른 메탄올 생산성 감소를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 세포 채류형 연속반응 시스템에서의 메탄 이용 메탄올 생산 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1. 메탄올에 의한 산물저해 효과 확인

- [0042] 메탄올에 의한 산물저해 효과를 확인하기 위하여 150 mL 부피의 시럼 바이얼을 사용하여 메틸로모나스 속 DH-1 전세포 촉매를 사용한 메탄 전환 실험을 실시하였다. 이 때 시럼 바이얼의 head space에는 30%의 메탄과 70%의 공기를 충전하였고, 반응액의 초기 메탄올 농도를 각각 0 g/L와 0.575 g/L로 조절하고 4시간 동안 메탄 전환 실험을 실시하였다. 각 조건 모두 동일하게 4.5 g/L의 전세포 촉매를 투입하였다. 메탄올이 존재하지 않을 때와 초기 메탄올 농도가 0.575 g/L일 때를 비교하면 초기 1시간까지 메탄올 생산성은 메탄올이 존재하지 않을 때에는 0.405 g/L/hr인 반면, 0.575 g/L의 초기 메탄올 농도에서는 0.028 g/L/h로서 메탄올이 없을 때 생산성이 약 14.3배 높았다. 또한 메탄올이 축적될수록, 초기에 메탄올이 없는 실시예에서도 메탄올 생산성이 급격하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (도 1 참조). 따라서, 높은 메탄올 생산성을 얻기 위해서는 반응액 내 메탄올 농도를 0.1 g/L 내지 0.4 g/L로 적절하게 유지하는 것이 바람직함을 확인하였다.

[0044] 실시예 2. 메탄올 탈수소화 효소 저해제 노출시간의 영향

- [0045] 메탄올 탈수소효소 저해제인 EDTA의 노출시간이 메탄올 생산성에 미치는 영향을 보기 위하여 동일한 조건에서 배양한 메틸로모나스속 DH-1을 수확한 후 원심분리와 세척을 반복하며 배지 성분을 제거한 다음, 메틸로모나스 세포를 0.5 mM의 EDTA가 포함된 반응용액에 투입하고 1시간 동안 교반하였다. EDTA 노출이 종료된 다음 일부 세포는 원심분리를 통하여 EDTA를 제거한 다음 150 mL의 시럼바이얼에 10 mL 투입하고, 21.66%의 메탄과 78.34%의 공기의 조성을 갖는 기체로 headspace를 치환한 다음 메탄 전환 실험을 실시하였다. 동량의 세포는 대조군으로서 EDTA 노출이 끝난 이후에도 이를 제거하지 않고 150 mL의 시럼바이얼에 10 mL 투입하고, 동일한 조건에서 메

탄 전환 실험을 실시하였고, 이를 도 2에 나타내었다.

[0046] 실험 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 지속적으로 EDTA에 노출된 메탄자화균 전세포의 메탄을 생산성은 급격히 감소하였고, 최종적으로는 메탄올을 생산하지 못하였다. 반면, EDTA에 1시간 노출한 다음 이를 제거하고 메탄 전환 실험을 실시한 예에서는 4시간 동안 메탄을 생산성이 0.36 내지 0.39 g/L/h로 일정하게 유지되었다. 따라서, EDTA에 오랫동안 노출될 경우 메탄올 탈수소 효소의 저해는 물론, 메탄 전환 효소의 활성 역시 저해된다는 것을 알 수 있다.

[0048] 실시예 3. 메탄자화균 전세포 촉매의 제조 및 메탄올 생산성 비교

[0049] 최적의 메탄올 생산 조건을 찾기 위해 EDTA 농도, EDTA 노출시간, 세포농도 당 EDTA 농도를 변수로 설정하고 표 1과 같이 총 17개의 조건에서 메탄전환 실험을 실시하였다.

표 1

[0051] EDTA 농도 (mM)	0.5	2.0	3.5
세포당 EDTA 농도 (mM-EDTA/(g-세포/L))	0.080	0.10	0.12
EDTA 노출시간	38	58	78

[0052] 동일한 배양에서 수득한 메틸로모나스속 DH-1 세포를 원심분리하여 상등액을 제거하고, 90 mM의 sodium formate, 20 mM sodium phosphate buffer로 이루어진 pH 6.7 반응용액을 투입하고, 원심분리와 세척을 반복하며 배지 성분을 완전히 제거하였다. 이후 150 mL 시림 바이얼에 10 mL의 반응부피를 갖도록 DH-1 세포를 재현탁한 후, 일정시간 동안 EDTA에 노출하였다. 일정시간이 지나면, 원심분리하여 EDTA를 제거하고 상기 반응용액에 재현탁하였다. 이후 21.66%의 메탄과 78.34%의 공기로 이루어진 기체를 투입하여 headspace의 가스 조성을 조절한 다음 30도에서 30분간 반응을 진행하였다.

[0053] 총 17회의 실시예 중 EDTA 노출시간 38분, EDTA 농도 0.5 mM, 세포당 EDTA 농도 0.080 mM-EDTA/(g-세포/L)일 때 가장 우수한 메탄을 생산성을 나타내었고, 이 때 메탄올 생산성은 0.542 g/L/hr를 기록하였다.

[0055] 실시예 4. 메탄자화균 세포 수득시기 결정

[0056] 메틸로모나스속 DH-1 세포에 대한 배양 실험을 진행하고, 지수성장기일 때와 정지기에 도달하였을 때 각각 수득하여 상기 실시예 3에서 결정한 최적 조건에서 30분간 메탄을 생산 실험을 진행하였다. 실험 결과, 지수성장기에서 수확한 세포의 메탄을 생산성은 정지기 대비 10% 우수하였다. 또한, 실험에 사용한 세포의 메탄산화효소인 pMMO와 메탄을 탈수소효소를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 메탄을 생산성이 우수하였던 지수성장기의 세포에서 효소 발현이 활발하였음을 알 수 있었다.

[0058] 실시예 5. 메탄 이용 메탄올 연속생산

[0059] 지수성장기에서 수득한 메틸로모나스속 DH-1 세포를 실시예 3의 조건에서 처리하여 메탄자화균 전세포 촉매를 제조하고, 이를 이용하여 메탄 이용 메탄올 생산실험을 실시하였다. 실시예 4에서 얻은 조건에 따라 배양한 메틸로모나스속 DH-1 세포를 160 mL의 운전부피를 갖는 메탄올 연속생산시스템에 19.9 g/L의 농도가 되도록 투입하고, 20 mL/min의 유량으로 90 mM의 sodium formate와 20 mM sodium phosphate buffer로 이루어진 pH 6.7 용액을 공급하면서 연속운전을 실시하였다. 시스템의 부피를 일정하게 유지하기 위해 공급 유량과 동일한 유량으로 반응용액을 제거하였다. 시스템 내 전세포 촉매의 유출을 방지하기 위하여 중공사막을 이용하여 메탄올이 포함된 액체만을 배출하고, 세포는 시스템 내에 머무를 수 있도록 하였다. 21.66%의 메탄과 78.34%의 공기로 이루어진 기체를 300 cc/min에서 600 cc/min까지 변화시켜 가며 메탄 전환을 실시하였다.

[0060] 실험 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이 최대 메탄을 생산성은 2.08 g/L/h를 기록하였고, 이 때 메탄올 농도는 0.281 g/L를 나타내었다. 이러한 값은 이전 문헌에 보고된 결과들의 생산성 대비 40배 이상으로 본 발명의 전세

포 촉매 제조 방법과 연속생산 시스템의 효과를 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0061]

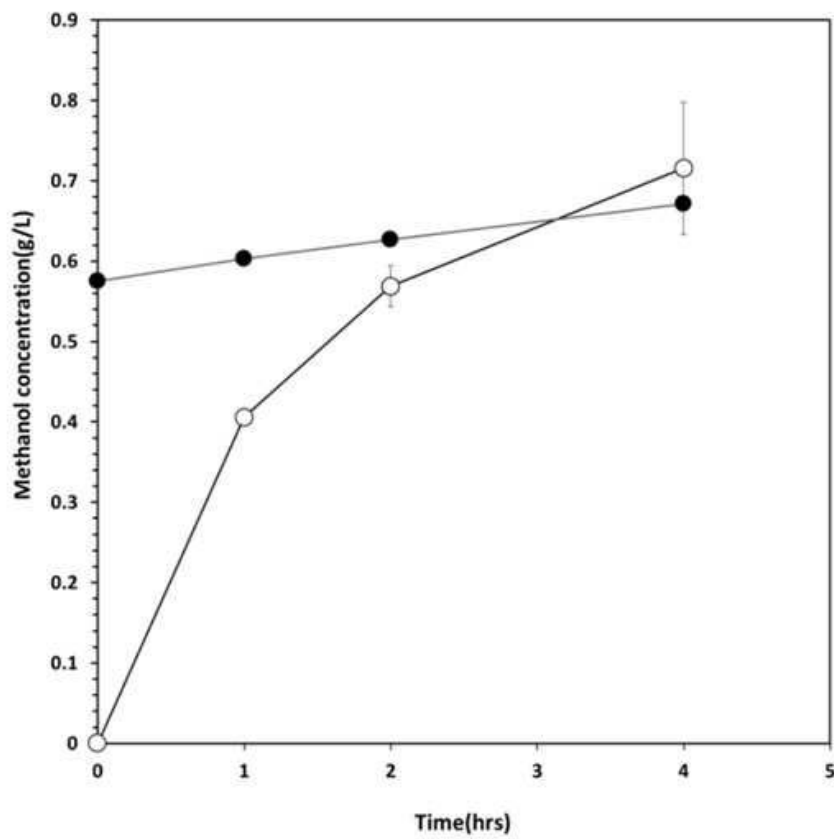
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13004BP

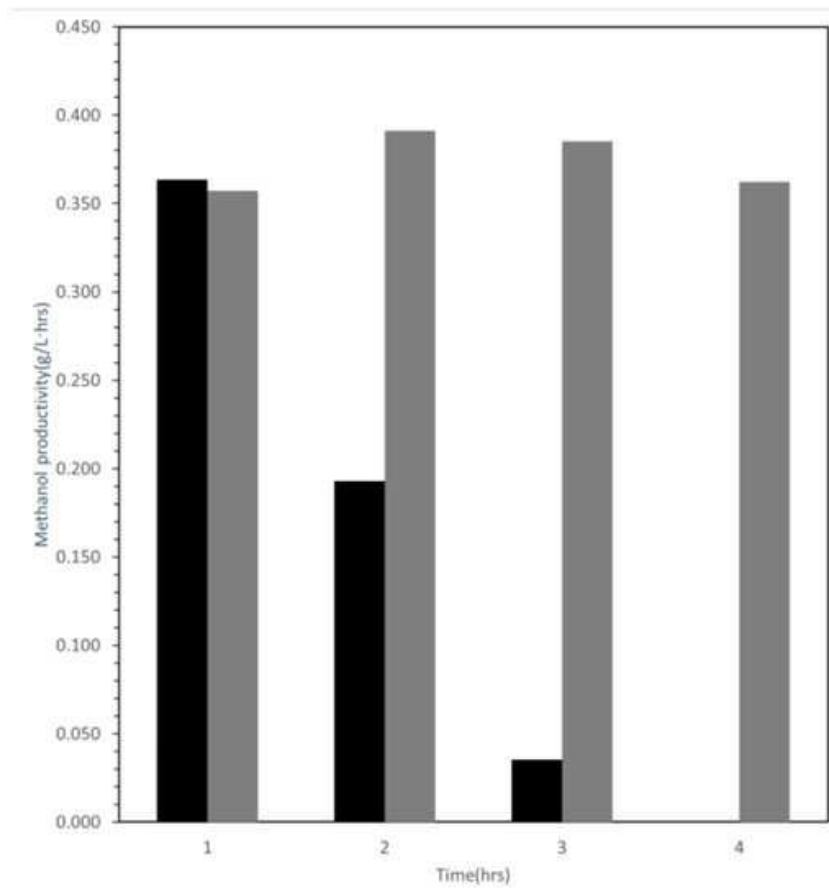
수탁일자 : 20160408

도면

도면1



도면2



도면3

