

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C07C 29/76

(11) 공개번호 특2002 - 0037064
(43) 공개일자 2002년05월17일

(21) 출원번호 10 - 2002 - 7004372
(22) 출원일자 2002년04월04일
 번역문 제출일자 2002년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/27257
(86) 국제출원출원일자 2000년10월04일

(87) 국제공개번호 WO 2001/25178
(87) 국제공개일자 2001년04월12일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 중국, 이스라엘, 대한민국, 싱가포르, 미국,
 EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프
 랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

(30) 우선권주장 60/157,773 1999년10월05일 미국(US)
 60/158,204 1999년10월07일 미국(US)

(71) 출원인 이 아이 듀폰 디 네모아 앤드 캄파니
 메리 이. 보울러
 미합중국 데라웨어주 (우편번호 19898) 윌밍톤시 마마켓트 스트리트 1007

(72) 발명자 코빈,데이비드,리처드
 미국19380펜실바니아주웨스트체스터스왈로우레인600
 노튼,터커
 미국19311펜실바니아주아본데일설리반코트8

(74) 대리인 장수길
 김영

심사청구 : 없음

(54) 생물학적 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤,또는 그의 혼합물의 분리 방법

요약

본 발명은 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 생물학적 혼합물로부터 분자 시이브를 사용하여 분리하는 방법에 관한 것이다.

색인어

생물학적 혼합물, 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 분자 시이브, 제올라이트, 알루미늄, 실리카

명세서

기술분야

본 발명은 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 생물학적 혼합물로부터 분자 사이브를 사용하여 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

1,3 - 프로판디올은 의류, 카펫 등에 다양하게 응용되는 고성능 폴리에스테르인 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트 (3GT)의 주요한 단량체 성분이다. 1,3 - 프로판디올의 합성 및 분리 비용은 3GT 폴리에스테르의 총 비용에 중요한 역할을 한다.

1,3 - 프로판디올을 생성하는 다양한 화학적 경로가 문헌에서 발견된다. 이러한 경로로는 상업적으로 시행되는 화학적 합성 경로 (예컨대, 아크롤레인의 수화 후, 수소첨가) 및 비상업화된 생물학적 경로 (예컨대, 글루코오스로부터 글리세롤을 거쳐 1,3 - 프로판디올로)를 들 수 있다. 각 경우에, 1,3 - 프로판디올의 합성은 중합전에 제거되어야 하는 불순물을 초래한다. 아크롤레인 경로의 경우에, 이러한 불순물로는 물, 아크롤레인, 및 기타 유기 화합물을 들 수 있다. 유사하게, 글루코오스로부터의 생물학적 경로에는 물, 글루코오스, 유기산, 염, 글리세롤 및 기타 화합물과 같은 불순물이 있을 수 있다. 1,3 - 프로판디올의 높은 비점 및 친수성으로 인해, 1,3 - 프로판디올을 상기 불순물 및 반응 부생성물 및(또는) 반응 공생성물로부터 표준 방법으로 분리하는 것은 어렵다.

1,3 - 프로판디올을 정제하는 공지된 방법들은 심각한 제한이 있다. 수성 1,3 - 프로판디올 액체 - 액체 추출 (Malinowski, Biotech. Prog. 13(2), 127 - 30 (1999))은 " 간단한 추출을 효과적으로 하기엔 충분히 양호하지 않음" 으로 개시되었다. 다른 액체 - 액체 추출 (DE 86 - 3632397)은 1,3 - 프로판디올로부터 이량성 아크롤레인을 추출하기 위해 시클로헥산을 사용하지만, 이 방법은 1 시간 이상 걸리며, 아크롤레인 이외의 불순물을 제거하는 데에는 별로 유용하지 않다. 이온 - 배제 또는 역상 방법을 이용한 1,3 - 프로판디올의 HPLC 분리 (Mao 등, J. Liq. Chromatogr. 17(8), 1811 - 9 (1994))는 잘 알려져 있으나, 크로마토그래피 매질 및 고압 공정 비용 때문에 소규모로만 사용될 수 있다. 1,3 - 프로판디올을 정제하기 위한 한 표준 기술로는 공정 스트림의 증발에 이어지는 증류를 들 수 있으며, 이 둘은 대규모의 열 투입량을 필요로 하며 비용이 많이 들 수 있다.

또한, 1,3 - 프로판디올을 제조하는 방법에는 피드백 억제 문제가 있다는 것, 즉 특히 생물학적 경로의 경우에 고농도의 1,3 - 프로판디올 제조는 추가의 1,3 - 프로판디올 제조 또는 세포 성장의 속도를 감소시킬 수 있다는 것은 잘 알려져 있다 (Cameron 등, Biotech. Prog. 14, 116 - 25 (1998)). 따라서, 1,3 - 프로판디올 제조 동안에 동일반응기내에서 사용가능한 분리 방법은 추가의 가치가 있을 것이다.

탄소 및 제올라이트와 같은 선택적 흡착제가 1,3 - 프로판디올 분리에 제안되어 왔다. 이러한 흡착제를 사용한 분리의 효율성은 생물학적 혼합물의 성분 및 연관된 흡착제에 따라 좌우된다. 흡착제 기재 시스템의 성공적인 디자인은 분리 공정의 중요한 인자이다.

제올라이트는 일반적으로 이온 및 물 분자 (이 때, 이들 모두는 제올라이트 매트릭스내에서 상당히 자유롭게 이동할 수 있음)로 채워진 공동을 둘러싸는 삼차원 골격 구조로 특징지어 지는 착물 알루미늄실리케이트로 설명될 수 있다. 상업적으로 유용한 제올라이트의 경우에, 물 분자는 구조를 파괴하지 않고 골격으로부터 제거되거나 골격내에서 치환될 수 있다. 제올라이트는 식 $M_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$ (식 중, M은 n가 양이온이며, x는 2 이상이며, y는 제올라이트의 다공도 및 수화 정도에 따라 결정되는 수이며, 일반적으로 0 내지 8임)로 나타낼 수 있다. 천연적으로 발생하는 제올라이트의 경우에, M은 일반적으로 대략적인 지구화학적 존재비를 반영하는 Na, Ca, K, Mg 및 Ba 비율로 원칙적으로 나타낸다. 양이온 M은 구조에 느슨하게 결합되어 있으며, 종종 통상적인 이온 교환에 의해 다른 양이온으로 전체 또는 부분 치환될 수 있다.

제올라이트 구조는 Al 또는 Si 원자가 사면체의 중앙에 있고 산소 원자가 코너에 있는 코너 - 연결된 사면체로 구성된다. 이러한 사면체는 4-, 6-, 8-, 10- 및 12-원 고리의 다양한 조합을 포함하는 잘 규정된 반복 구조와 결합된다. 생성된 골격은 분리에 유용한 기공 구조를 제공하는 규칙적인 채널 및 케이지로 구성된다. 기공 크기는 제올라이트 채널 또는 케이지를 형성하는 알루미늄실리케이트 사면체의 기하학으로 결정되며, 공칭 개구가 6-고리의 경우에 0.26 nm, 8-고리의 경우에 0.40 nm, 10-고리의 경우에 0.55 nm, 12-고리의 경우에 0.74 nm (이 숫자들은 산소의 이온 반경을 나타냄)이다. 당업계의 숙련자라면 최대 기공이 8-고리, 10-고리 및 12-고리인 제올라이트는 각각 소, 중 및 대기공 제올라이트로 여겨진다는 것을 인식할 것이다. 기공 크기는 이러한 물질의 촉매적 및 분리 응용에서의 성능에 중요한데, 이 특성이 반응물/흡착제 분자가 제올라이트 골격에 들어가고 (촉매적 응용의 경우에) 생성물 분자가 골격을 빠져나올 수 있는지를 결정하기 때문이다. 실제적으로, 고리 크기가 매우 약간 감소하면 제올라이트 구조내 특정 반응물/흡착제 또는 촉매 반응 생성물의 이동을 효율적으로 방해 또는 차단할 수 있음이 관찰되었다.

제올라이트 내부로의 접근을 조절하는 기공 크기는 기공 개구를 형성하는 사면체에 의해서 뿐만 아니라 기공내 또는 근처 이온의 존재 여부에 의해서도 결정된다. 제올라이트 A의 경우에, 예컨대 접근은 6-고리 개구 뿐만 아니라 8-고리 개구내 또는 근방에 위치한 Na^+ 또는 K^+ 와 같은 일가 이온에 의해 제한될 수 있다. 접근은 6-고리내 또는 근방에만 위치하는 Ca^{2+} 와 같은 이가 이온에 의해 증진될 수 있다. 따라서, KA 및 NaA는 각각 약 0.3 nm 및 0.4 nm의 효과적인 기공 개구를 나타내는 반면, CaA는 0.5 nm의 효과적인 기공 개구를 갖는다.

제올라이트의 하부군인 분자 시이브는 최근 1,3-프로판디올 정제용으로 고려되어 왔다. 1,3-프로판디올 정제에 사용되는 제올라이트는 양성자 형태가 아니므로, 양이온의 침출을 통해 혼합물 또는 피흡착질을 오염시키기 쉬웠다. 구엔젤 (Guenzel) 등 (Chem. - Ing. - Tech. 62(9), 748-50 (1990))은 1,3-프로판디올/수용액의 분리용으로 탈알루미늄화 NaY 및 실리카라이트를 시험하였고, 1,3-프로판디올 0.12 g/제올라이트 1 g의 최대 부하를 얻었다. 그러나, 이들은 글리세롤 선택도를 조사하지 않았다. 슈리커 (Schlieker) 등 (Chem. - Ing. - Tech. 64(8), 727-8 (1992))은 활성화 탄소를 사용하였지만, 고비용의 중간체인 글리세롤의 상당히 비특이적인 흡착을 경험하였고, 단지 2.5 g/L hr의 1,3-프로판디올 발효 생산성을 성취하였다. 쇼엘너 (Schoellner) 등 (J. Prakt. Chem. 336(5), 404-7 (1994))은 두 개의 X, 두 개의 Y 및 Na-ZSM-5 제올라이트를 시험하였다. Na-ZSM-5가 X 및 Y 제올라이트보다 우월하다는 것을 발견하였지만, 혼합물 또는 피흡착질 스트림으로 염이 다시 침출될 수 있다. 제올라이트로부터 1,3-프로판디올의 회수는 논의되지 않았다.

실리카라이트는 묽은 수용액으로부터 에탄올을 회수하는 데 사용되어 왔다. 한 실험에서 (Sano 등, J. Membr. Sci. 95(3), 221-8 (1994)), 스테인레스 스틸 또는 알루미늄 지지체상 실리카라이트 막을 반투막 증류법 (pervaporization)에서와 같이 사용하여 60을 초과하는 에탄올 대 물의 선택도를 얻었다.

또한, H-ZSM-5 제올라이트는 수용액으로부터 류신 및 이소류신을 분리하는 수단으로서 사용되어 왔다 (EP 645371). H-ZSM-5 (Si/Al = 14)을 사용하여 수성 혼합물중 류신으로부터 이소류신을 분리한 후, 염기와 접촉시킴으로써 제올라이트를 재생하였는데, 이 공정은 폐기되거나 고비용의 전기투석 처리되어야 하는 폐염을 유발하였다. 류신 및 이소류신은 모두 부피가 큰 아민 및 산 기를 갖는 탄소수 6의 잔기이며, 단지 3 개의 탄소를 갖는 1,3-프로판디올보다 훨씬 큰 분자 크기를 갖는다. 연셀 (Yonsel, S.) 등은 원하는 피흡착질인 류신의 0.04 g 류신/1 g 제올라이트 미만에 이르는 매우 낮은 부하를 보고하였다. 제올라이트로부터 에탄올의 온도 변화에 의한 흡착 및 탈착은 당업계에 알려져 있지만, 제올라이트-흡착된 생성물을 에탄올로 탈착시키는 경우는 잘 알려져 있지 않다. JP 01153058에서는, 발효 생성물로부터의 향미제 분리는 제올라이트를 사용한 흡착 및 에탄올을 사용한 탈착에 의해 수행되지만, 이러한 생성물은 명백히 상이한 소수성 및 구조를 가지므로 이러한 방법은 본 발명에서 명백히 응용가능하지 않다.

발효 육즙으로부터 1,3-프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3-프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 정제하는 방법의 개선은

특히 생성물 회수, 에너지 소비 및 피드백 억제 면에서 필요하다. 발효 반응 동안에 1,3 - 프로판디올을 선택적으로 제거하는 기술은 매우 유용할 것이다. 이러한 기술은 이용가능한 1,3 - 프로판디올 농도를 감소시킴으로써 피드백 억제를 제거하고 1,3 - 프로판디올의 총 생산 속도를 증가시킬 것으로 기대된다. 그 결과, 보다 높은 자본 생산성 및 잠재적으로 보다 높은 반응 수율이 성취될 것이다.

< 발명의 요약 >

본 발명의 출원인은 (a) 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 함유하는 생물학적 혼합물을 MFI, MEL, BEA, MOR, FAU, LTL, GME, FER, MAZ, OFF, AFI, AEL 및 AET로 이루어진 군으로부터 선택된 충분한 양의 제올라이트 및 이러한 제올라이트와 동일한 형태의 물질과 접촉시키는 단계, (b) 단계 (a)의 제올라이트를 에탄올:수용액 또는 임의의 $C_1 - C_4$ 알콜:수용액과 같은 탈착제와 접촉시키는 단계, (c) 단계 (b)에서 제올라이트로부터 용리된 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 수집하는 단계, 및 (d) 임의로 일련의 단계 (a) 부터 (c)까지 1 회 이상 반복하는 단계를 포함하는, 혼합물로부터 물질을 분리하는 방법을 제공한다. 또한, 본 방법은 단계 (a)에서 제1 제올라이트를 선택하여 생물학적 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 선택적으로 흡착하고, 일련의 단계 (b), (c) 및 임의로 (d)를 수행한 후, (a)' 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 제2 제올라이트와 접촉시켜 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 선택적으로 흡착하는 단계, (b)' 단계 (a)'의 제올라이트를 에탄올:수용액 또는 임의의 $C_1 - C_4$ 알콜:수용액과 같은 탈착제와 접촉시키는 단계, (c)' 단계 (b)'에서 분자 시이브로부터 용리된 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 수집하는 단계, 및 (d)' 임의로 일련의 단계 (a)' 부터 (c)'까지 1 회 이상 반복하여 정제된 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 수득하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 제올라이트로 채워진 컬럼의, 무세포 발효 육즙으로부터 1,3 - 프로판디올의 흡착 및 에탄올:물을 사용한 탈착을 도시하고 있다.

도 2는 보다 큰 규모의 제올라이트 컬럼으로부터 1,3 - 프로판디올의 용리를 도시하고 있다.

도 3은 ISPR 장치 구조의 개략도이다. 발효기 (1)은 세포 덩어리 제거를 위한 교차흐름 여과막 (2)에 연결되어 있다. 농축액 (3)은 발효기 (1)로 재순환된다. 배출액 (4)는 제올라이트로 채워진 컬럼 (5)을 통해 보내지고, 폐유체 (6)은 발효기 (1)로 돌아온다. 이중 세포 여과기 및 제올라이트 컬럼은 여분으로 사용된다.

도 4는 두 주기의 ISPR 전, 동안 및 후의 2 L 1,3 - 프로판디올 발효의 역가를 나타내고 있다.

도 5a 및 5b는 무세포 발효 육즙으로부터 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤 각각의 배치 흡착 부하를 나타내고 있다. x - 축은 괄호안에 나타낸 Si/Al 비율의 제올라이트 유형을 나타내고 있다. 도 5a 및 5b에 사용된 단위는 동일하다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 생물학적 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 분자 시이브를 사용하여 분리하는 신규한 기술을 제공한다. 본 발명의 방법은 다른 이용가능한 방법에 비해 상대적으로 간단한 장치를 사용하며 유지가 용이하다. 또한, 현재 이용가능한 흡착제의 고비용 및 생성물 변이성의 주요한 문제를 해결한다.

본 발명에 따라 무세포 육즙을 분자 시이브의 군으로부터 선택된 제올라이트 - 흡착제와 흡착에 적합한 온도 및 유속에 서, 육즙과 관련된 불순물을 제거하고 1,3 - 프로판디올을 풍부하게 하기에 충분한 시간 동안 접촉시킴으로써 농축된 생성물이 선택적으로 제공된다.

1,3 - 프로판디올이 풍부해진 생성물이 요구되는 경우에, 본 발명은 또한 흡착된 1,3 - 프로판디올을 탈착하여 이로써 풍부해진 생성물을 제공하는 방법을 포함한다. 흡착/탈착을 기초로 하는 본 방법은 생성물을 물 대신에 에탄올 중에서 회수함으로써 증류 비용이 보다 낮은 생성물의 높은 회수에 특히 유용하다.

정제 공정에서, 추가의 불순물이 생성물중에 존재할 수 있다. 주요 화합물 (예컨대, 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤 모두)은 모두 발효물로부터 뿐만 아니라 다른 오염물질, 부생성물 또는 글루코오스, 글리세롤 등과 같은 공생성물로부터 선택적으로 제거되는 것이 바람직하다. 당업계의 숙련자라면 이러한 선택적 제거는 비통상적이라는 것을 이해할 것이다. 대부분의 경우, 흡착제는 표적 화합물 이상을 제거하는 능력을 가지므로 표적 화합물의 제거 비용이 증가하고 흡착제를 재생하는 경우에 2차 정제 문제가 발생한다. 적절한 분자 시이브(들)를 선택하고, 흡착된 1,3 - 프로판디올의 프로그램된 용매 탈착을 이용함으로써, 다른 육즙 성분으로부터 1,3 - 프로판디올, 글리세롤 또는 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤 모두의 분리가 성취될 수 있다.

본 명세서에서, 달리 구체적으로 명시되어 있지 않는 한, 하기 약어 및 정의가 적용된다.

" 동일반응기내 생성물 제거" 는 ISPR로 약칭된다.

" 부피 생산성" 이란 시간 당 소정의 부피로 생성된 생성물의 질량을 나타내며, 단위는 그램/(리터 시간), 약칭 g/(L h r)이다.

" 역가" 란 액상 중 생성물의 농도를 나타내며, 단위는 그램/리터, 약칭 g/L이다.

" 1,3 - 프로판디올" 은 3G로 약칭된다.

" Qmax" 및 " Km" 이란 각각 최대 흡착제 부하 및 Qmax/2에서의 피흡착질 농도의 랑뮈르(Langmuir) 매개변수를 나타낸다. 전형적인 단위는 각각 그램 피흡착질/그램 흡착제 (g/g), 및 그램/리터 (g/L)이다.

분자 시이브는 당업계에 잘 알려져 있으며, 문헌[R. Szosak, Molecular Sieves - Principles of Synthesis and Identification, Van Nostrand Reinhold (1989), page 2]에 정의되어 있다. 제올라이트 구조 및 특성을 나타내는 데 유용한 추가의 문헌으로는 [Meier 등, Atlas of Zeolite Structure Types (International Zeolite Assn. 1978); Muppton, " Natural Zeolites" in Reviews in Mineralogy 14:1 (1977); Smith, " Origin and Structure of Zeolites" in Zeolite Chemistry and Catalysis, ACS Monograph 171 (American Chemical Society, (1976); Breck, " Zeolite Molecular Sieves" (Wiley, 1974); Dyer, " An Introduction to Zeolite Molecular Sieves" (John Wiley & Sons, 1988); Szostak, " Handbook of Molecular Sieves" (Van Nostrand Reinhold, 1992)]을 들 수 있다.

본 발명의 방법에 사용된 제올라이트 종의 한 군은 ZSM - 5의 경우에 $(\text{Na}, \text{TPA})_n [\text{Al}_n \text{Si}_{96-n} \text{O}_{192}] \sim 16 \text{H}_2\text{O}$ 그리고 ZSM - 11의 경우에 $(\text{Na}, \text{TBA})_n [\text{Al}_n \text{Si}_{96-n} \text{O}_{192}] \sim 16 \text{H}_2\text{O}$ (식 중, TPA 및 TBA는 각각 테트라프로필암모늄 및 테트라부틸암모늄 양이온임)의 식으로 기재될 수 있는 합성 형태의 중간 - 기공 합성 제올라이트이다. 이러한 합성 제올라이트의 구조 및 합성은 관련 업계에 잘 알려져 있다. 그 후, 이러한 제올라이트는 당업계에 잘 알려진 표준 수순에 의해 수소 형태로 전환될 수 있다 (Donald W. Breck; Zeolite Molecular Sieves; 상기 문헌). 제올라이트내 평형 양이온이 H^+ 인 경우에, 골격은 제올라이트 기공 구조내 산성 양성자의 유폐로 인해 형태 - 선택적 촉매성 또는 흡착성 특성을 띌 수 있는 고체 산이다. H - ZSM - 5의 평균 기공 크기는 5.5 Å이다.

한 실시양태에서, 본 발명은 1,3 - 프로판디올을 무세포 육즙으로부터 분리하기 위해 H - ZSM - 5를 사용한다. 또한, 1,3 - 프로판디올을 ZSM - 5 제올라이트로부터 탈착시키는 데 에탄올/물을 사용한다. 예상밖으로, 흡착된 1,3 - 프로판디올은 에탄올/물 혼합물에 의해 치환되었다. 또한, 1,3 - 프로판디올의 수율은 에탄올의 농도를 증가시킴으로써 증가되었으며, 이는 1,3 - 프로판디올의 에탄올 - 풍부 혼합물에 의한 용리가 바람직한 것을 나타낸다. 1,3 - 프로판디올 생성물의 총 회수율은 94.7% 정도로 높은 것으로 계산되었다. 본 발명이 흡착된 1,3 - 프로판디올을 용리시키는 데 에탄올을 사용하지만, 임의의 C₁ - C₄ 알콜이 본 발명의 범위내에 있다. 1,3 - 프로판디올 탈착은 실온에서 수행된다. 그러나, 실온과 80 °C 사이의 온도가 기재된 유용한 효과를 줄 것으로 기대된다.

한 다른 실시양태에서, 2 단계 프로그램된 탈착은 컬럼에 증가하는 농도의 에탄올을 주입함으로써 성취된다. 첫 번째 저농도는 원치 않은 화합물을 용리시키는 반면에 두 번째 고농도는 주로 1,3 - 프로판디올을 용리시켰다. 이 방법은 1,3 - 프로판디올의 다른 성분에 의한 오염 수준을 감소시켰다.

한 바람직한 실시양태에서, 발효 반응기 (1)에는 육즙 재순환 루프가 설치되고, 이는 교차흐름 여과 장치 (2) 및 발효물로부터 1,3 - 프로판디올을 동일반응기내 제거하기 위한 H - ZSM - 5로 충전된 컬럼 (5)를 포함한다. 글루코오스로부터 1,3 - 프로판디올을 생성할 수 있는 이. 콜라이 (E. Coli) 접종물을 발효기 (1)에 주입하였다. 이 장치는 무세포 육즙이 제올라이트 컬럼 (5)를 통과하면서 1,3 - 프로판디올이 제거되는 동안에 생축매 세포가 발효기로 돌아오게 하여 발효기 (1)로부터 육즙을 제거하는 것을 가능케 한다. 육즙은 결국 발효기로 돌아온다 (도 3). 이 수순은 ISPR 두 주기로 수행되며, 이는 생산 속도를 전체 공정의 최고 속도로 증가시켰다. 이 결과는 ISPR의 바람직한 효과를 나타낸다. 발효 육즙을 사용하는 경우에, 육즙을 분자 시이브와 접촉시키기 전에 세포를 제거하는 데 교차흐름 여과를 사용한다. 원심분리, 전여과 방식 또는 접류(tangential flow) 여과와 같은 다른 고체 - 액체 분리 방법 또한 사용될 수 있다.

한 다른 실시양태에서, 무세포 발효물로부터 1,3 - 프로판디올을 배치식으로 제거하는 데 제올라이트 H - ZSM - 5 (Si/Al=140)가 사용된다. 증명된 1,3 - 프로판디올 흡착 수치 (0.132 g/g)는 당업계에서 얻어진 수치 (예컨대, Schollner 등)를 33% 이상 초과하며, 이론적 부하 (랑뮈르 식으로부터의 Q_{max} 0.17 g/g)는 당업계의 수치를 80% 이상 초과한다. 실질적으로 보다 큰 부하는 보다 적은 제올라이트 물질을 필요로 하므로 동일 공정에 대해 보다 적은 흡착제 및 자본 비용이 요구됨을 의미한다. 또는, 동일한 양의 제올라이트를 사용하여 요구되는 탈착 주기가 보다 적을 수 있으며, 보다 적은 양의 용매 사용은 공정 비용을 더욱 감소시킬 것이다.

다른 실시양태에서, 다수의 분자 시이브를 이들의 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤 부하 용량에 대해 시험하였다. 놀랍게도, H - ZSM - 5 제올라이트 (Si/Al=140) 및 H - ZSM - 5 제올라이트 (Si/Al=150)와 같은 분자 시이브는 두 개의 최고 총 부하를 나타내었고, 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤의 상대적 선택도는 분자 시이브의 선택에 의해 좌우됨을 발견하였다.

다른 실시양태에서, 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤은 H - ZSM - 5 제올라이트 (Si/Al=500) 또는 H - ZSM - 5 제올라이트 (Si/Al=15)를 사용함으로써 발효 육즙으로부터 동시에 제거되고, 각각은 높은 총 부하를 가지며 1,3 - 프로판디올 :글리세롤 선택도는 거의 동일하다. 그 후, 생성된 1,3 - 프로판디올/글리세롤 혼합물은 상기 기재된 바와 같은 구배 용리액을 사용하여 분리된다. 혼합물은 증류와 같은 통상적인 분리 방법을 사용하여 추가로 정제될 수도 있다.

다른 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 1,3 - 프로판디올/글리세롤에 대한 높은 선택도를 갖는 분자 시이브를 사용하여 1,3 - 프로판디올을 발효 육즙으로부터 제거한 후, 발효 육즙을 글리세롤의 고부하 분자 시이브 (예컨대, H - ZSM - 5 제올라이트, Si/Al=15)로 처리하여 유용한 글리세롤 성분을 제거한다. 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 연속적으로 또는 병행으로 회수하기 위한 상기 방법들의 조합은 본 발명의 범위내에 있다.

또한, 분리 단계에서 상기 언급된 임의의 분자 시이브를 사용하고 용리 단계에서 에탄올을 사용하면 90%를 초과하는 수율을 성취한다는 것이 발견되었다. 이러한 정제 수단으로 H-ZSM-5 (MFI의 특정 형태)가 선택되지만, 다양한 제올라이트가 적합할 것임은 숙련공에게 이해될 것이다. 본 발명의 목적을 위한 다른 제올라이트는 MFI, MEL, BEA, MOR, FAU, LTL, GME, FER, MAZ, OFF, AFI, AEL 및 AET로 이루어진 군 및 이러한 특정 제올라이트와 동일한 형태를 지닌 물질로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구조로는 FAU, MFI, MEL 및 BEA를 들 수 있다. 이러한 분자 시이브는 당업계에 잘 알려져 있으며 마이어(W. M. Meier) 등 (Atlas of Zeolite Structure Types, 4th edition, 상기 문헌)에 의해 기재되어 있다. 이러한 분자 시이브의 예로는 특정 제올라이트 골격의 산도, 소수도, 기공 크기 및 다른 특성을 나타내는 높은 Si/Al 비율 (예컨대, 5 이상)의 것들을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 선택도는 건조와 같은 물리적 처리 및 (또는) 분자 시이브를 코팅하여 변경하는 것과 같은 화학적 처리에 의해 추가로 개선될 수 있다. 구체적으로, 제올라이트를 비롯한 분자 시이브의 코팅은 (1) 분자 시이브의 샘플을 주변 대기에 노출시키고, 테트라에틸오르토실리케이트 (TEOS) 중에 2 시간 동안 침지시키고, (2) 상기 샘플을 여과하고, 실온에서 밤새 건조시킨 후, (3) 상기 샘플을 550 °C의 유동 질소중에서 3 시간 동안 가열시킴으로써 성취될 수 있다. 상기 처리는 실질적으로 0.05 중량 % 이상의 원소를 분자 시이브의 외부 표면에 퇴적시키기 위해 규소, 알루미늄, 붕소 및 인으로부터 선택된 1 종 이상의 원소를 함유하는 1 종 이상의 화합물로 수행될 수 있다. 코팅은 본 발명의 목적을 위한 흡착제를 생성할 수 있는 비열거된 분자 시이브상에 수행될 수도 있다. 분자 시이브 형태로는 분말, 압출물, 과립 또는 막의 일부 또는 전체 등의 형태를 들 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 본 발명의 사용에 있어서 장기간의 수성 노출에는 실리카 결합제가 더욱 안정함을 발견하였다.

상기 기재된 분자 시이브를 사용하는 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물의 분리는 상대적으로 간단한 장치를 이용하고, 공지된 분리 수순에 비하여 유지가 용이하다. 하기 나타내는 바와 같이, 상기 기재된 것들보다 훨씬 작은 기공 크기를 갖는 제올라이트는 매우 상이한 흡착 특성을 가질 것이며 1,3 - 프로판디올을 선택적으로 흡착하지 못 할 것이다.

요약하자면, 본 발명은 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 오염물질, 부생성물 및 공생성물 화합물의 혼합물로부터 특정 분자 시이브를 사용하여 선택적으로 분리한다. 본 발명은 또한 분리 동안에 특정 탈착제를 사용하여 이를 농축시킨다. 본 발명은 또한 이어지는 증류 또는 정제 비용을 최소화한다.

본 발명은 또한 하기 실시예에서 추가로 정의된다. 이러한 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 제시하는 것으로 단지 예시를 위한 것임이 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이러한 실시예로부터, 당업계의 숙련자는 본 발명의 본질적인 특성을 확인할 수 있으며, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않는 한 다양한 용법 및 조건에 맞게 다양한 변화 및 변경을 할 수 있다.

실시예

일반 방법:

박테리아 배양의 유지 및 성장에 적합한 물질 및 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 하기 실시예에 사용하는 데 적합한 기술은 문헌 [Manual of Methods for General Bacteriology; Philipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, Eds., American Society for Microbiology: Washington, DC (1994) or in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology; Brock, T. D., 2nd ed.; Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts (1989)]의 설명에서 찾을 수 있다. 박테리아 세포의 성장 및 유지에 사용한 모든 시약, 제한효소 및 물질은 알드리치 케미칼스 (Aldrich Chemicals (미국 위스콘신주 밀워키 소재)), 디프코 래보러토리스(DIFCO Laboratories (미국 미시건주 디트로이트 소재)), GIBCO/BRL (미국 메릴랜드주 가이더스버그 소재), 또는 시그마 케미칼스 캄파니 (Sigma Chemical Company (미국 미주리주 세인트 루이스 소재))로부터 입수하였다.

약어 "sec" 는 초(s), "min" 은 분(s), "h" 는 시간(s), "d" 는 일(s), "μL" 는 마이크로리터(s), "mL" 은 밀리리터(s), "L" 은 리터(s), "mM" 은 밀리몰농도, "M" 은 몰농도, "mmol" 은 밀리몰(s), "g" 는 그램(s), "μg" 은 마이크로그램(s) 및 "ng" 은 나노그램(s), "v:v" 는 부피/부피를 의미한다.

3G 및 글리세롤 농도의 증명 및 측정:

1,3 - 프로판디올 및 글리세롤은 배지를 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석시킴으로써 직접 증명할 수 있다. 본 발명에서 바람직한 방법은 발효 배지를 등용매 방식으로 0.01 N 황산 이동상을 사용한 분석 이온교환 컬럼상에서 분석하는 것이다. 모든 실시예의 경우에, 3G의 농도는 HPLC 또는 GC에 의해 측정하였다.

워터스(Waters) 717 자동표본추출기, 워터스 온도 조절 모듈 ($T=50^{\circ}\text{C}$), 워터스 410 시차 굴절계 및 워터스 486 흡광 탐지기 ($\lambda = 210\text{ nm}$)에 1,3 - 프로판디올 정량측정을 위한 쇼덱스(Shodex) HPLC 컬럼 (SH1011 당 컬럼, 300 mm x 8 mm)을 장착하였다. 이동상은 0.5 ml/분 등용매 유속의 0.005 M H_2SO_4 이었다. 피발산을 내부 표준 물질로 사용하였다. 이러한 조건하에, 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤은 각각 26.7 분 및 21.2 분에 용리된다.

1,3 - 프로판디올의 생성은 GC/MS에 의해 확인하였다. 분석은 GC/MS 업계의 숙련자가 이용가능한 표준 기술 및 물질을 사용하여 수행하였다. 1,3 - 프로판디올의 정량측정에 HP 이노왁스(Innowax) 폴리에틸렌 글리콜 컬럼 (HP1909I N - 133, 30 m x 250 mm x 0.25 mm)이 구비된 휴렛 팩커드 (Hewlett Packard (HP)) 6890 GC를 사용한 적합한 방법을 사용하였다. 탐지는 불꽃이온화검출기를 사용하여 수행하였다. 오븐 프로파일은 $t=0$ 에서 100°C 이었고, $t=3$ 분 동안에 250°C 로 구배시켰고, $t=5$ 분까지 250°C 로 유지시켰다. 헬륨 유속은 2 ml/분이었다. 샘플 주입 부피는 1 ml 였다. 이러한 조건하에, 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤은 각각 2.5 분 및 3.65 분에 용리된다.

배지 및 탄소 기질:

하기 기재된 모든 발효에 대장균 균주 FM5 pAH48/pDT29를 사용하였다.

본 발명의 발효 배지는 적합한 탄소 기질을 함유해야 한다. 적합한 기질로는 단당류 (예컨대, 글루코오스 및 프룩토오스), 올리고당류 (예컨대, 락토오스 또는 수크로오스), 다당류 (예컨대, 전분 또는 셀룰로오스 또는 그의 혼합물) 및 재생가능한 공급 원료로부터의 비정제된 혼합물 (예컨대, 치즈 유장 투과액, 옥수수 담금액, 사탕무 당밀 및 벗긴 맥아)을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 탄소 기질은 이산화탄소, 또는 메탄올과 같은 단일 탄소 기질일 수도 있으며, 이의 주요 생물학적 중간체로의 대사적 전환은 증명되었다. 단일 탄소 원료 (예컨대, 메탄올, 포름알데히드 또는 포르메이트)로부터 글리세롤의 생성은 메틸 요구성 효모 (Yamada 등, *Agric. Biol. Chem.* 53(2), 541 - 543 (1989)) 및 박테리아 (Hunter 등, *Biochemistry* 24, 4148 - 4155 (1985))에서 보고되었다. 이러한 유기체는 메탄의 포르메이트로의 산화 상태를 포함하여 단일 탄소 성분을 동화시켜 글리세롤을 생성할 수 있다. 탄소 동화의 경로는 리불로오스 모노포스페이트, 세린 또는 크실룰로오스 - 모노포스페이트를 거칠 수 있다 (Gottschalk, *Bacterial Metabolism*, Second Edition, Springer - Verlag: New York (1986)). 리불로오스 모노포스페이트 경로는 포르메이트와 리불로오스 - 5 - 포스페이트가 축합하여 6탄당을 형성하고 이것이 프룩토오스가 되고 결국에는 탄소수 3의 생성물인 글리세르알데히드 - 3 - 포스페이트가 되는 것을 포함한다. 마찬가지로, 세린 경로는 탄소수 1의 화합물을 메틸렌테트라히드로폴레이트를 거쳐 당분해 경로로 동화시킨다.

메틸 요구성 유기체는 1 내지 2 개의 탄소 기질 이외에 대사 활성을 위한 메틸아민, 글루코오스아민 및 다양한 아미노산과 같은 다른 다수의 탄소 함유 화합물을 이용하는 것으로 알려져 있다. 예컨대, 메틸 요구성 효모는 메틸아민으로부터의 탄소를 이용해 트레할로오스 또는 글리세롤을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Bellion 등, *Microb. Growth Compd. [Int. Symp.]*, 7th, 415 - 32 (1993). Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK). 유사하게는, 다양한 종의 캔디다(Candida)는 알라닌 또는 올레산을 대사할 것이다 (Sulter 등, *Arch. Microbiol.* 153(5), 485 - 9 (1990)). 따라서, 본 발명에서 사용된 탄소의 원료는 광범위한 탄소함유 기질을 포함할 수 있으며 유기체의 선택에 의해서만이 제한될 수 있는 것으로 생각된다.

상기 언급된 모든 탄소 기질 및 그의 혼합물이 본 발명에 적합한 것으로 생각되지만, 바람직한 탄소 기질은 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스 또는 메탄올이다.

적절한 탄소 원료 이외에, 발효 배지는 배양물의 성장 및 1,3 - 프로판디올 생성에 필요한 효소적 경로의 촉진에 적합한 것으로 당업계의 숙련자에게 알려진 적합한 무기물, 염, 조촉매, 완충액 및 다른 성분을 함유해야 한다. 특히 Co (II) 염 및(또는) 비타민 B₁₂ 또는 그의 전구체가 주목받는다.

배양 조건:

전형적으로, 세포는 적절한 배지중 30 °C에서 성장한다. 본 발명에서 바람직한 성장 배지는 루리아 버타니(Luria Bertani) (LB) 육즙, 사보라우드 덱스트로오스(Sabouraud Dextrose) (SD) 육즙 또는 효모 배지 (YM) 육즙과 같은 통상 상업적으로 제조되는 배지이다. 다른 규정된 또는 합성 성장 배지도 사용될 수 있으며 특정 미생물의 성장에 적절한 배지는 미생물학 또는 발효학 업계의 숙련자에게 알려질 것이다. 이화대사산물억제를 직접 또는 간접적으로 조절하는 것으로 알려진 시약 (예컨대, 시클릭 아데노신 2':3' - 모노포스페이트)을 반응 배지에 혼입할 수 있다. 유사하게는, 효소 활성을 조절하는 것으로 알려진 1,3 - 프로판디올 생성의 증진을 초래하는 시약 (예컨대, 메틸 바이올로겐)을 유전자 조작과 관련하여 또는 그의 대체로 사용할 수 있다.

발효에 적합한 pH 범위는 pH 5.0 내지 pH 9.0이며, 초기 조건으로 pH 6.0 내지 pH 8.0이 바람직하다.

반응은 호기 또는 혐기 조건하에 수행될 수 있으며, 혐기 또는 미량산소성호기 조건이 바람직하다.

배치식 및 연속식 발효:

본 발명의 방법은 배치식 발효 방법을 사용한다. 전형적인 배치식 발효는 배지의 조성이 발효의 초기에 정해지며 발효 동안의 인위적인 변경에 의한 영향을 받지 않는 폐쇄계이다. 따라서, 발효 초기에 배지를 원하는 유기체 또는 유기체들을 접종하고 상기 계에 추가의 첨가없이 발효를 발생시킨다. 전형적으로, 그러나 "배치식" 발효는 탄소 원료의 첨가에 관한 배치식이며 pH 및 산소 농도와 같은 인자 조절을 종종 시도해왔다. 배치식 시스템에서, 시스템의 대사산물 및 생체량 조성물은 발효가 종결될 때까지 계속 변한다. 배치식 배양에서, 세포는 정적 지체기(static lag phase)에서 고성장 대수 증식기(high growth log phase)를 통해 마침내 성장률이 감소되거나 멈춰지는 증식 정지기(stationary phase)로 완화된다. 비처리된 경우에, 증식 정지기의 세포는 결국 죽게될 것이다. 대수 증식기의 세포는 최종 생성물 또는 중간체의 다량 생성을 초래한다.

표준 배치식 시스템에 대한 변화는 공급 - 배치식 시스템이다. 공급 - 배치식 발효 공정은 또한 본 발명에 적합하며 발효가 진행됨에 따라 기질을 증분하여 첨가하는 것을 제외하고는 전형적인 배치식 시스템을 포함한다. 공급 - 배치식 시스템은 이화대사산물억제가 세포의 대사를 억제하기 쉬운 경우에 유용하며, 이 때 배지 중에 제한된 양의 기질을 갖는 것이 바람직하다. 따라서, 공급 - 배치식 시스템내 실제 기질 농도의 측정은 어려우므로, pH, 용해 산소 및 CO₂ 와 같은 폐기의 부분압과 같은 측정가능한 인자의 변화를 기초로 하여 측정된다. 배치식 및 공급 - 배치식 발효는 통상적이며, 당업계에 잘 알려져 있으며 예는 문헌 [Brock, 상기 문헌]에서 찾아볼 수 있다.

본 발명은 배치식으로 수행되지만 이 방법은 연속식 발효법도 수용가능한 것으로 생각된다. 연속식 발효는 제한된 발효 배지가 생반응기에 연속적으로 첨가되고 등량의 조절된 배지가 가공을 위해 동시에 제거되는 개방계이다. 연속식 발효는 일반적으로 세포가 주로 대수 증식기인 일정한 고농도로 배양을 유지한다.

연속식 발효는 세포 성장 또는 최종 생성물 농도에 영향을 미치는 한 인자 또는 임의의 수의 인자들을 조절한다. 예컨대, 한 방법은 탄소 원료와 같은 제한 영양물 또는 질소 수준을 고정된 비율로 유지하고 모든 다른 매개변수가 완화된게 할 것이다. 다른 계에서, 성장에 영향을 미치는 다수의 인자는 배지 혼탁도에 의해 측정되는 세포 농도가 일정하게 유지되는 동안 연속적으로 변경될 수 있다. 연속적인 계는 정류 상태의 성장 조건을 유지하려 하므로 배지의 배출로 인한 세포 손실은 발효에서의 세포 성장 속도에 대해 균형이 맞아야 한다. 연속적인 발효 공정에서 영양물 및 성장 인자를 조절하

는 방법 뿐만 아니라 생성물 형성 속도를 최소화하는 기술은 산업적 미생물학의 업계에 잘 알려져 있으며, 다양한 방법이 문헌 [Brock, 상기 문헌]에 상세히 기재되어 있다.

본 발명은 배치식, 공급 - 배치식 또는 연속식 공정을 사용하여 실행될 수 있으며, 임의의 공지된 발효 방식이 적합할 것으로 생각된다. 또한, 세포는 전체 세포 촉매로서 기질상에 고정화되고, 1,3 - 프로판디올 생성을 위한 발효 조건에 종속시킬 수 있다.

세포:

본 발명에 적합한 세포로는 탈수효소를 포함하는 것을 들 수 있다. 전형적으로 이 효소는 글리세롤 또는 1,2 - 프로판디올 각각에 대한 기질 특이성을 갖는 글리세롤 탈수효소 또는 디올 탈수효소일 것이다. 탈수효소는 글리세롤을 히드록시프로피온알데히드 (3 - HPA)로 전환시킬 수 있으며, 이는 그 후 1,3 - 프로판디올로 전환된다. 이 경로를 함유하는 세포로는 시트로박터(Citrobacter), 엔테로박터(Enterobacter), 클로스트리디움(Clostridium), 클렙시엘라(Klebsiella), 살모넬라(Samonella) 및 락토바실러스(Lactobacillus) 속에 속하는 변이된 또는 재조합 유기체를 들 수 있다. 발효에 의해 글리세롤을 생성하는 것으로 당업계의 숙련자에게 알려진 미생물, 예컨대, 아스페르길루스(Aspergillus), 사카로마이세스(Saccharomyces), 자이고사카로마이세스(Zygosaccharomyces), 피키아(Pichia), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 칸디다(Candida), 한센놀라(Hansenula), 듀나리엘라(Dunaliella), 데바리오마이세스(Debaryomyces), 무코르(Mucor), 토릴롭시스(Toryloopsis) 및 메틸로박테리아(Methylobacteria)는 재조합 탈수효소의 숙주가 될 수 있다. 본 발명의 숙주로서 적합한 다른 세포로는 간균(Bacillus), 대장균(Escherichia), 슈도모나스(Pseudomonas) 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)를 들 수 있다. 상기 언급된 군에 속하는 유기체는 천연으로 존재하며 본 발명에 적합한 것으로 믿어진다.

분자 시이브에 사용되는 제올라이트는 제올리스트(Zeolyst (과거 PQ), 미국 펜실바니아주 벨리 포지 소재), 쥐트 - 케미 (Sued - Chemie, 독일), UOP (미국 일리노이주 데스 플레인 소재), 우에티콘(Uetikon, 스위스)를 비롯한 다양한 생산자로부터 입수할 수 있다.

실시에 1

흡착/탈착 컬럼을 통한 1,3 - 프로판디올의 선택적 농축

H - ZSM - 5 ($\sim 75\% \text{H}^+$, $25\% \text{Na}^+$ 양이온 균형, Si:Al = 25, 70% 제올라이트, 30% 알루미늄 결합제)의 23 g 압출물 (직경 0.32 cm (1/8 인치))을 아미콘(Amicon) 컬럼 (미국 메사추세츠주 베드포드 소재의 밀리포어 코포레이션(Millipore Corporation)) (40 ml 컬럼 부피, $\sim 1"$ ID)내에 채우고, 무세포 육즙 (47 g/L 1,3 - 프로판디올)을 상기 컬럼을 통해 0.8 ml/분으로 펌프시켰다. 1,3 - 프로판디올이 컬럼을 빠져나오는 것이 관찰될 때 (즉, 1,3 - 프로판디올의 배출 농도가 주입 농도 ($t = 90$ 분)과 동등해질 때)까지 이 흐름을 계속하였다. $t = 120$ 분에서, 50:50 (v:v) 에탄올: H_2O 을 상기 컬럼을 통해 0.8 ml/분으로 펌프시켜 흡착된 1,3 - 프로판디올 생성물을 용리시켰다 (도 1).

흡착된 1,3 - 프로판디올의 질량은 2.10 g이었으며, 탈착된 1,3 - 프로판디올의 질량은 1.99 g이었으며, 생성물의 계산된 회수율은 94.7%였다.

실시에 2

흡착된 1,3 - 프로판디올의 프로그램된 용매 탈착

H-ZSM-5 제올라이트 (실시예 1 참조)로 채워진 컬럼 (1 L 부피, 1.875 " ID)을 먼저 1,3-프로판디올, 글리세롤, 글루코오스 및 다른 성분 (공급 농도: 8.0 g/L 1,3-프로판디올, 29.7 g/L 글리세롤)의 무세포 육즙 혼합물과 접촉시켰다. 상기 컬럼 (10 ml/분)에 5% EtOH/95% H₂O 및 50% EtOH/50% H₂O를 순서대로 주입시킴으로써 2 단계 프로그램된 탈착을 성취하였다. 5% EtOH/95% H₂O는 바람직하지 않은 글리세롤을 용리시킨 반면에, 50% EtOH/50% H₂O는 주로 1,3-프로판디올을 용리시켰다. 상기 5% EtOH/95% H₂O 단계 ($t < 23$ 분)는 글리세롤 5.8 g 및 1,3-프로판디올 1.8 g (질량비 글리세롤:1,3-프로판디올 = 3.17)으로 이루어진 분획을 생성하였다. 상기 50% EtOH/50% H₂O 단계 ($t > 23$ 분)는 글리세롤 9.29 g 및 1,3-프로판디올 13.5 g (질량비 1,3-프로판디올:글리세롤 = 1.46)으로 이루어진 분획을 생성하였다. 따라서, 50% EtOH/50% H₂O 단계는 1,3-프로판디올:글리세롤의 비율을 공급물 (질량비 1,3-프로판디올:글리세롤 = 0.27)에 비하여 현저히 증가시켰다. 또한, 이 50% EtOH:50% H₂O의 1,3-프로판디올 용리는 물에 비해 보다 낮은 에탄올의 잠열로 인해 보다 적은 열 주입을 요구하였다. 따라서, 본 실시예에서 2 단계로 수행된 프로그램된 용리는 글리세롤 풍부 분획 및 1,3-프로판디올 풍부 분획을 초래하였는데, 그렇지 않았다면 함께 용리되었을 것이다 (도 2).

실시예 3

발효 육즙으로부터 1,3-프로판디올의 동일반응기내 제거

도 3에 도시된 바와 같이, 2 L 발효 반응기 (1) (1.5 L 활성 부피)에 교차흐름 여과막 장치 (2) 및 H-ZSM-5 제올라이트 압출물 (실시예 1에 사용된 것과 동일한 조성임)로 충전된 컬럼 (5) (1 L 부피, 1.875" ID)을 포함하는 육즙 재순환 루프를 설치하였다. 글루코오스로부터 1,3-프로판디올을 생성할 수 있는 대장균 (FM5 pAH48pDT29)의 접종물을 발효기에 주입하였다. 상기 기재된 설치를 사용하여, 발효기 (1)을 ISPR 없이 35 시간 동안 운전시켰다. 35 시간에, 발효는 1,3-프로판디올 생성 (0.8 g/L hr) 및 세포 질량에 있어서의 감속을 나타내었고, 발효 실패가 임박하였음을 암시하였다. 첫 번째 ISPR 기간 (60 분 동안, 6 ml/분으로 여과하기 위한 흐름) 후, 1,3-프로판디올 생성 속도는 2.1 g/L hr로 거의 세 배로 증가하였다. 두 번째 ISPR 기간 (112 분 동안, 6 ml/분으로 여과하기 위한 흐름) 후, 생성 속도는 5 g/L hr 이상 추가로 증가하였다. 생성된 1,3-프로판디올의 총 농도는 흡착된 양을 포함하여 60 g/L를 초과하였다. 이 숫자는 기준 케이스 (36 시간에서 30 g/L)에 비해 100% 증가되었음을 나타내었다. 총 부피 생산성 (g/L h)은 기준 케이스에 비해 40% 증가하였다. 37 시간 후 최종 OD에 의해 측정된 바와 같이 적은 세포 성장과 함께 1,3-프로판디올의 추가 생성이 발생하였다 (도 4).

실시예 4

무세포 발효 육즙으로부터 1,3-프로판디올의 배치식 제거

H-ZSM-5 (Si/Al=140, 중량% Na₂O = 0.02, 0.5 μ m의 미세결정)를 무세포 발효 육즙으로부터 1,3-프로판디올의 흡착에 대해 시험하였다. 제올라이트를 실온에서 (일반적으로 22 °C) 교반하에 (200 rpm) 배치식으로 24 시간 동안 접촉시켰다. 그 후, 1,3-프로판디올 및 글리세롤의 정량측정을 위해 액체 샘플을 배출하였다.

[표 1]

[3G] 초기, (g/L)	[3G] 평형, (g/L)	[gly] 초기, (g/L)	[gly] 평형, (g/L)	3G 부하, (g/g)	글리세롤 부하, (g/g)	선택도 (3G/gly)
83.16	68.15	6.86	6.69	0.132	0.002	83.860
41.58	30.14	3.43	1.00	0.115	0.025	4.705
20.79	13.39	1.72	0.00	0.073	0.017	4.311
8.316	5.53	0.69	0.00	0.026	0.007	4.053

0.13 g 1,3-프로판디올/1 g 제올라이트를 초과하는 증명된 부하가 성취되었다. 데이터를 랑뮈르 식에 대입하면, 최대 이론 부하는 0.178 g/g ($r^2 = 0.996$)이고 Km이 20.4 g/L 3G이었다.

실시예 5

발효 육즙으로부터 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤의 배치식 흡착

평형 흡착 부하는 무세포 발효 육즙을 분자 시이브 또는 제올라이트와 접촉시킴으로써 배치식으로 측정하였다. 흡착제를 실온에서 (일반적으로 22 °C) 교반하에 (200 rpm) 배치식으로 24 시간 동안 접촉시켰다. 그 후, 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤의 정량측정을 위해 액체 샘플을 배출하였다.

도 5a에 나타난 바와 같이, H - ZSM - 5 (Si/Al=140) (실시에 4에서 추가로 정의됨)는 1,3 - 프로판디올 및 글리세롤의 총 부하 (총 부하 0.0179 g/g) 면에서 뿐만 아니라 1,3 - 프로판디올에 대한 선택도 (2.82:1 1,3 - 프로판디올:글리세롤)의 면에서도 시험한 제올라이트중 최고 성능을 나타내었다.

도 5b에 나타난 바와 같이, CMS 분자 시이브 (시판 입수가 가능한 분자 시이브) 및 H - 베타 제올라이트도 시험하였다. CMS, 작은 기공 탄소 분자 시이브는 탐지가 가능한 부하를 나타내지 않았으며, 큰 기공의 H - 베타 제올라이트는 적당한 부하 (총 부하 0.083 g/g) 및 양호한 선택도 (3.88:1 1,3 - 프로판디올:글리세롤)를 나타내었다.

실시에 6

수성 환경에서 장기간의 제올라이트 공정

충전 층 공정에서 기계적 강도를 위한 결합제와 함께 제올라이트를 사용하였다. 셀룰로오스 아세테이트 여과기를 이용한 진공 여과 전에 제올라이트 - 결합제의 질량을 교반하에 (200 rpm) 24 시간에 걸쳐 배치식으로 측정하였다. 최종 제올라이트 질량을 여과기상에 잔류하는 제올라이트의 건조 중량으로 측정하였다. 결과는 알루미나 결합제가 실리카의 경우에 비해 훨씬 더 용이하게 (1300%) 용해되었고, 수성 환경에서의 장기간 공정에 있어서 실리카 결합제가 바람직함을 나타내었다.

[표 2]

제올라이트	압출물 결합제	초기 제올라이트, (g)	최종 제올라이트, (g)	제올라이트 질량 손실 (%)
H - ZSM - 5 (I)	알루미나	2.641	2.2981	12.98
H - ZSM - 5 (II)	실리카	2.667	2.6406	0.99
NaZSM - 5 (III)	알루미나	2.67	2.3264	12.87

제올라이트 설명은 하기와 같다: H - ZSM - 5 (I) (Al 결합제 첨가 후 Si/Al = 14.8, %Na=0.08%), H - ZSM - 5 (II) (실리카 결합제); 10% NaNO₃ 수용액 2 L와 90 °C에서 한 번에 1 시간씩 3 회 접촉시킴으로써 형성된 Na - ZSM - 5 (III) (Si/Al=15). 온도를 60 °C/시로 500 °C로 상승시키고, 500 °C에서 10 분 동안 유지시키고, 온도를 다시 한 번 60 °C/시로 550 °C로 상승시키고, 550 °C에서 5 시간 동안 유지시키고, 110 °C로 냉각시킴으로써 생성된 물질을 소성시키고, 생성된 물질을 건조 유리병내에 넣고 봉했다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 함유하는 생물학적 혼합물을 MFI, MEL, BEA, MOR, FAU, LTL, GME, FER, MAZ, OFF, AFI, AEL 및 AET로 이루어진 군으로부터 선택된 충분한 양의 하나 이상의 제올라이트 및 이러한 제올라이트와 동일한 형태의 물질과 접촉시키는 단계,

(b) 단계 (a)의 제올라이트를 에탄올:수용액 또는 임의의 C₁ - C₄ 알콜:수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 탈착제와 접촉시키는 단계,

(c) 단계 (b)에서 분자 시이브로부터 용리된 1,3 - 프로판디올, 글리세롤, 또는 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 수집하는 단계, 및

(d) 임의로 단계 (a) 부터 (c)까지 1 회 이상 반복하는 단계를 포함하는, 혼합물로부터 물질을 분리하는 방법.

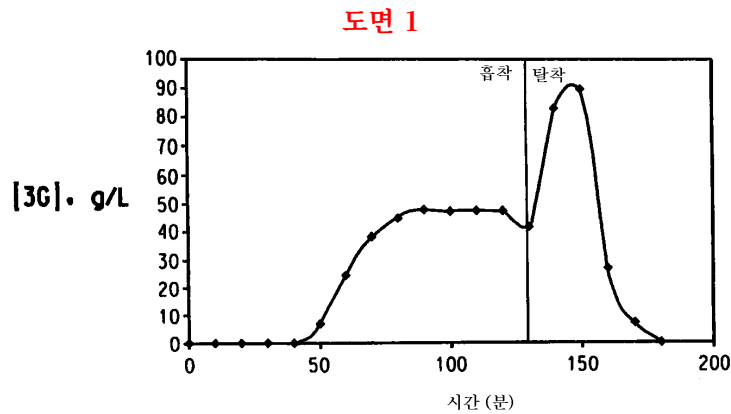
청구항 2.

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 제1 제올라이트를 선택하여 생물학적 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 선택적으로 흡착하고, 일련의 단계 (b), (c) 및 임의로 (d)를 수행한 후, (a)' 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물을 제2 제올라이트와 접촉시켜 1,3 - 프로판디올과 글리세롤의 혼합물로부터 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 선택적으로 흡착하는 단계, (b)' 단계 (a)'의 제올라이트를 에탄올:수용액 또는 임의의 $C_1 - C_4$ 알콜:수용액과 같은 탈착제와 접촉시키는 단계, (c)' 단계 (b)'에서 제올라이트로부터 용리된 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 수집하는 단계, 및 (d)' 임의로 일련의 단계 (a)' 부터 (c)'까지 1 회 이상 반복하여 정제된 1,3 - 프로판디올 또는 글리세롤을 수득하는 것을 추가로 포함하는 방법.

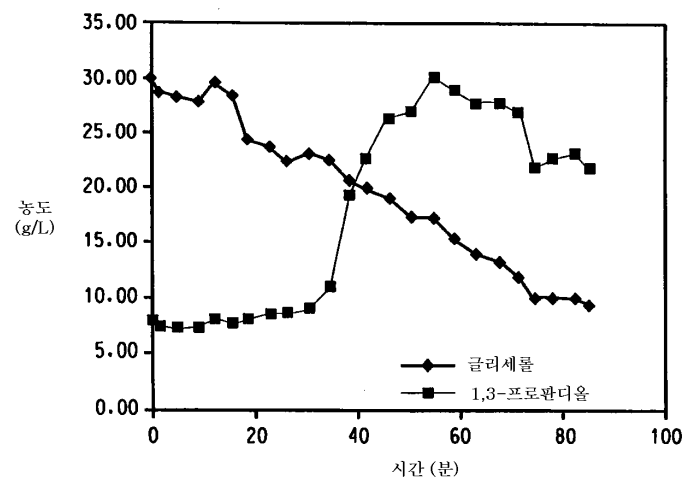
청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 제올라이트가 알루미늄 및 실리카로 이루어진 균으로부터 선택된 결합제를 추가로 포함하는 방법.

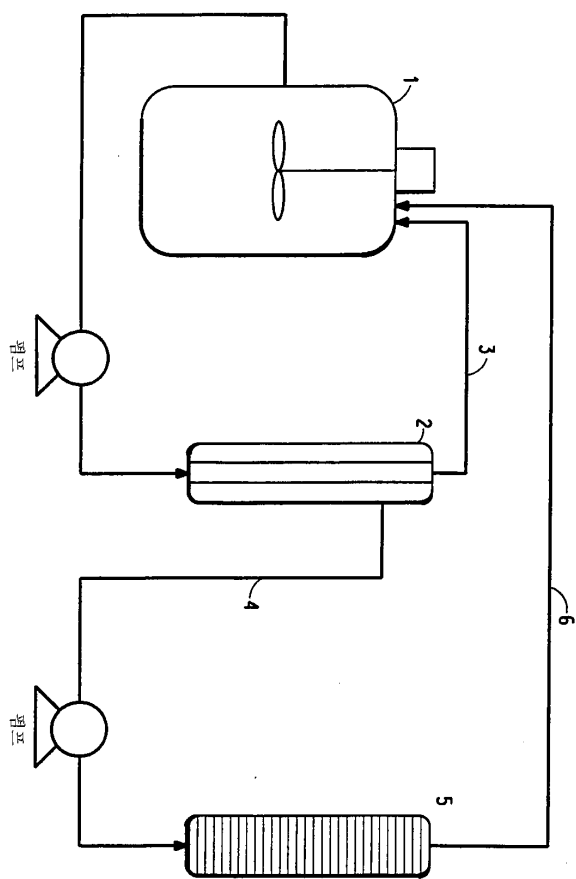
도면



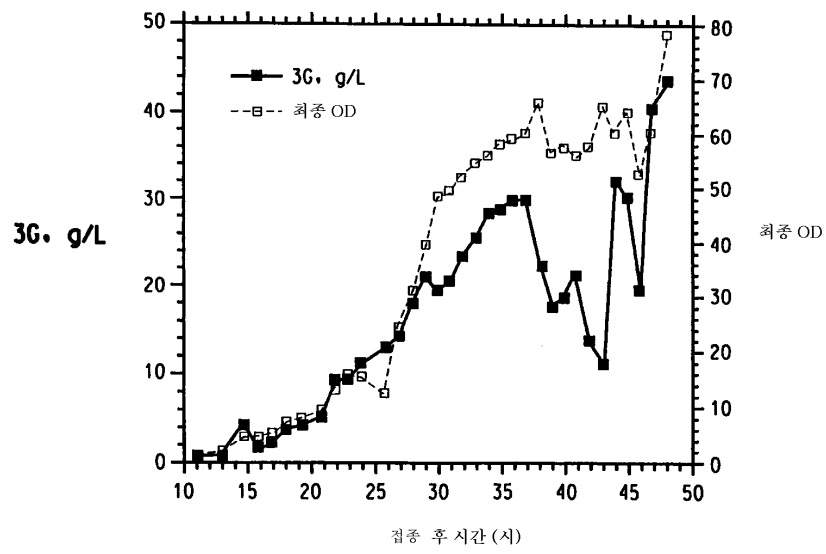
도면 2



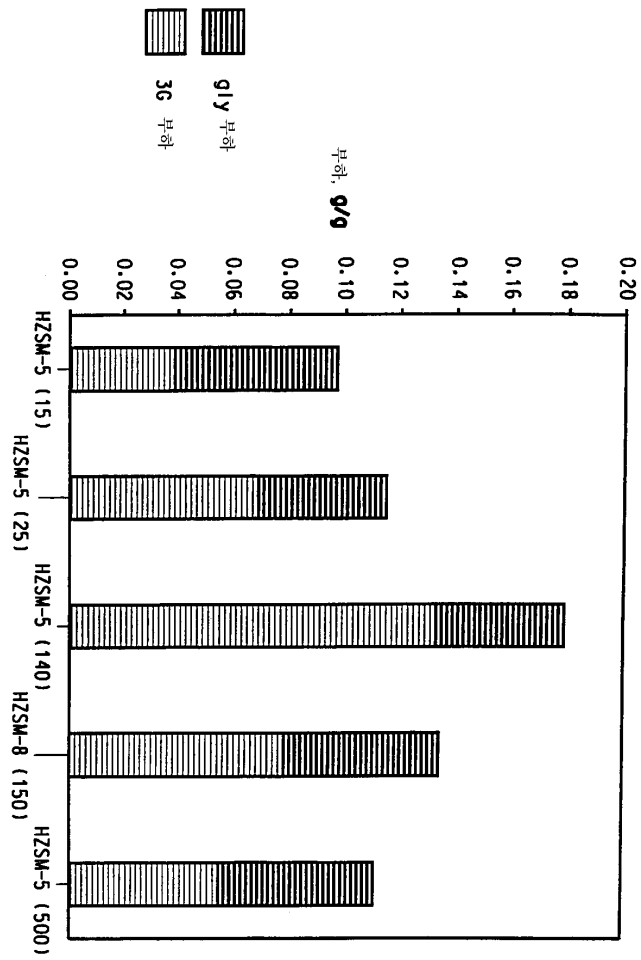
도면 3



도면 4



도면 5



도면 6

