



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월13일
(11) 등록번호 10-1666236
(24) 등록일자 2016년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/08 (2006.01) C12M 3/02 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) C12R 1/145 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7020129
(22) 출원일자(국제) 2010년01월29일
심사청구일자 2014년04월22일
(85) 번역문제출일자 2011년08월29일
(65) 공개번호 10-2011-0139205
(43) 공개일자 2011년12월28일
(86) 국제출원번호 PCT/NZ2010/000009
(87) 국제공개번호 WO 2010/093262
국제공개일자 2010년08월19일
(30) 우선권주장
61/148,282 2009년01월30일 미국(US)
61/259,887 2009년11월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020030036638 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
란자테크 뉴질랜드 리미티드
뉴질랜드 오클랜드 오네훙가 오네훙가 몰 239 제
이피씨 어소씨에이즈 내
(72) 발명자
심슨 셀 데니스
뉴질랜드 오클랜드 1052 파넬 발포어 로드 24 란
자테크 뉴질랜드 리미티드 내
티자르 죠셉 헨리
뉴질랜드 오클랜드 1052 파넬 발포어 로드 24 란
자테크 뉴질랜드 리미티드 내
(74) 대리인
김진희

전체 청구항 수 : 총 9 항

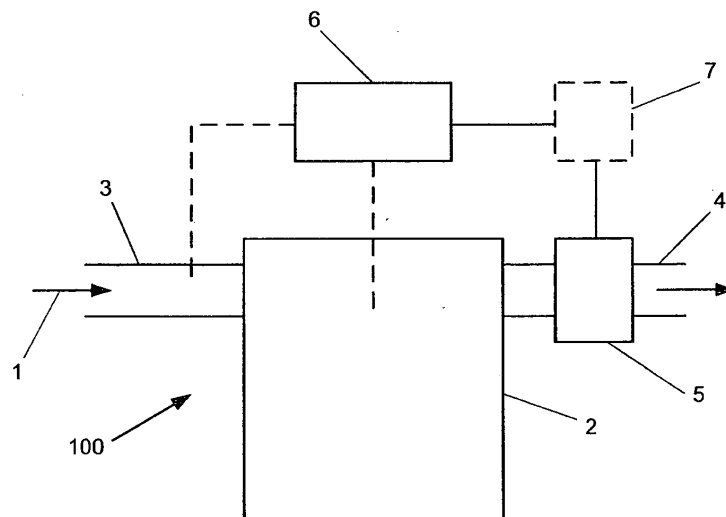
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 알코올의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 미생물 발효, 특히 CO를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 알코올 및 산과 같은 생성물의 생성에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 미생물 발효를 통해 생성물의 효율을 개선하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다. 특정의 구현예에서, 본 발명은 CO₂로 전환된 CO의 비율을 확인하는 단계를 포함하는 원하는 생성물의 생성을 최적화하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

CO를 포함하는 기질의 미생물 발효의 효율을 개선하는 방법으로서,

상기 방법은 CO의 제1 부분이 산, 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원하는 생성물로서 고정되고, CO의 제2 부분이 CO₂로 변환되도록 미생물 배양물에 기질을 공급하는 것을 포함하고,

CO₂로 변환되는 CO의 비율을 정량하여, 1종 이상의 원하는 생성물의 생성을 촉진하기 위한 기질 공급 속도를 결정하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기질 공급 속도를,

i. CO₂로 변환되는 CO의 비율이 최적값 또는 최적범위 미만인 것으로 정량되는 경우에는 증가시키고, 또는

ii. CO₂로 변환되는 CO의 비율이 최적값 또는 최적범위를 초과하는 것으로 정량되는 경우에는 감소시키고, 또는

iii. CO₂로 변환되는 CO의 비율이 실질적으로 최적값 또는 최적범위인 것으로 정량되는 경우에는 유지하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 기질 공급 속도는 CO₂로 변환되는 CO의 비율이 실질적으로 최적값 또는 최적범위에서 유지되도록 자동으로 조절되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CO를 포함하는 기질이 5 부피% 미만의 H₂를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알코올은 에탄올인 방법.

청구항 6

소정의 조작 파라미터에 기초하여 CO를 포함하는 기질의 미생물 발효에 의한 1종 이상의 산 및/또는 알코올을 생성하는 효율을 개선하는 방법으로서,

상기 방법은 1종 이상의 생성물로 고정되는, CO에서의 탄소의 비율을 정량하고, 그 정량 결과에 따라,

i. 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 증가하도록, 1종 이상의 조작 파라미터를 조절하는 것, 또는

ii. 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 실질적으로 일정하게 유지되도록, 조작 파라미터를 유지하는 것을 포함하고,

상기 1종 이상의 생성물로 고정되는 탄소의 비율은 CO₂로 변환되는 CO의 비율을 정량함으로써 정해지는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 1종 이상의 상기 조작 파라미터는

발효액의 pH; 발효액의 산화환원 전위; 발효액의 CO 농도; 기질 공급 속도; 기질 흐름의 조성; 기질 흐름의 압력; 발효액 교반 속도; 생성물 제거 속도; 발효액의 산 및/또는 알코올의 농도; 액체 배양액 내의 1종 이상의

영양물의 종류; 1종 이상의 영양물의 공급 속도로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제1항, 제2항, 제3항, 제6항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

발효는 클로스트리디아(*Clostridia*), 무렐라(*Moorella*), 파이로코커스(*Pyrococcus*), 유박테리움(*Eubacterium*), 데설향박테리움(*Desulfobacterium*), 카복시도써무스(*Carboxydotherrnus*), 아세토게눔(*Acetogenium*), 아세토박테리움(*Acetobacterium*), 아세토안에어로븀(*Acetoanaerobium*), 부티리박테리움(*Butyribacterium*) 및 펩토스트렙토코커스(*Peptostreptococcus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 클로스트리디아(*Clostridia*) 미생물은 클로스트리듐 오토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*)인 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로, 가스상 기질에서 미생물 발효를 통해 미생물 성장 효율 및 생성물의 생성 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 일산화탄소를 함유하는 가스의 미생물 발효를 통해 알코올류, 특히 에탄올을 생성하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 미생물 발효 동안 CO의 생성물로의 총괄 순수 전환율(overall net conversion)을 측정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 에탄올은 전세계에서 급속하게 주요 수소 풍부 액체 수송 연료가 되고 있다. 2005년에 에탄올의 세계 소모량은 122억 갤런인 것으로 평가되었다. 또한, 연료 에탄올 산업에 대한 세계 시장은 유럽, 일본, 미국 및 몇몇 개발도상국에서 에탄올에 대한 관심의 증가로 인해 미래에 급속하게 계속 성장할 것으로 예측되어 왔다.

[0003] 예를 들어, 미국의 경우, 에탄올은 가솔린에 함유된 에탄올의 10% 혼합물인 E10을 제조하기 위해 사용되고 있다. E10 블렌드에서, 에탄올 성분은 산화제(oxygenating agent)로 작용하여, 연소 효율을 개선하고 대기 오염물의 생성을 감소시킨다. 브라질에서, 에탄올은 가솔린에 배합된 산화제 및 순수 연료로서 수송 연료 요구량의 약 30%를 차지하고 있다. 또한, 유럽에서, 그린 하우스 가스(GHG) 방출에 따른 환경 문제는 유럽 연합(EU) 국가들이 바이오매스 유래의 에탄올과 같은 재활용가능한 수송 연료의 소모에 대한 목표를 설정하게 하는 자극제가 되어왔다.

[0004] 연료 에탄올의 대부분은 사탕수수로부터 추출한 수크로스 또는 곡물로부터 추출한 전분과 같은 곡물 유래 탄수화물을 주요 탄소원으로 이용하는 전통적인 효모 기반 발효 공정을 통해 제조되고 있다. 그러나, 이러한 탄수화물 공급 원료의 가격은 인간용 식품 또는 동물 사료로서의 그 가치에 의해 영향을 받고, 에탄올 제조용 전분 또는 수크로스 함유 곡물의 재배가 모든 지역에서 경제적으로 실행가능한 것은 아니다. 따라서, 가격이 낮고 더욱 풍부한 탄소 자원을 연료 에탄올로 전환하는 기술을 개발하는 것이 중요하다.

[0005] CO는 석탄 또는 오일과 같은 유기 물질 및 오일 유래 제품의 불완전 연소의 주요한 에너지 풍부 부산물이다. 예를 들어, 호주의 철강 산업은 매년 500,000 톤 이상의 CO를 생성하여 대기중으로 방출하는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 촉매적 공정을 이용하여 CO 및/또는 CO 및 수소(H₂)로 주로 구성되는 가스를 연료 및 농약으로 전환할 수 있다. 또한, 미생물을 이용하여 상기 가스를 연료 및 농약으로 전환할 수 있다. 이러한 생물학적 공정들은 화학 반응보다 느리긴 하지만, 촉매적 공정과 비교하여 높은 특이성, 높은 수율, 낮은 에너지 비용 및 중독에 대한 큰 저항성을 비롯한 몇 가지 장점이 있다.

[0007] CO를 단독 탄소원으로 이용하여 성장하려는 미생물의 능력이 1903년에 최초로 발견되었다. 나중에 이는 독립영양 성장의 아세틸 조효소 A (아세틸 CoA) 생화학 경로(Woods-Ljungdahl 경로 및 일산화탄소 탈수소효소/아세틸 A 합성효소 (CODH/ACS) 경로라고도 함)을 이용하는 유기체의 특성인 것으로 확인되었다. 일산화탄소 영양, 광합성, 메탄생성 및 초산생성 유기체를 비롯한 다수의 혐기성 유기체들이 CO를 여러 가지 최종 생성물, 즉, CO₂, H₂, 메탄, n-부탄올, 초산염 및 에탄올로 대사하는 것으로 확인되어 왔다. CO를 단독 탄소원으로 이용하면서, 모든 이러한 유기체들은 상기 최종 생성물들 중 적어도 두 가지를 생성한다.

[0008] 클로스트리듐(*Clostridium*) 속에서 유래한 것들과 같은 혐기성 세균은 아세틸 CoA 생화학 경로를 통해 CO, CO₂ 및 H₂로부터 에탄올을 생성하는 것으로 확인되어 왔다. 예를 들어, 가스로부터 에탄올을 생성하는 클로스트리듐 룡달리이(*Clostridium ljungdahlii*)의 여러 가지 균주가 WO 00/68407호, EP 117309호, 미국 특허 제 5,173,429호, 5,593,886호 및 6,368,819호, WO 98/00558호 및 WO 02/08438호에 기재되어 있다. 또한, 세균인 클로스트

리튬 오토에타노게눔 종(*Clostridium autoethanogenum* sp)도 가스로부터 에탄올을 생성하는 것으로 알려져 있다 (Abrini 외, Archives of Microbiology 161, pp 345-351 (1994)).

[0009] 그러나, 가스의 미생물 발효를 통한 에탄올 제조는 초산염 및/또는 초산의 동시 제조와 일반적으로 관련이 있다. 이용가능한 탄소중 일부는 에탄올보다는 초산염/초산으로 전환되기 때문에, 이러한 발효 공정을 이용한 에탄올의 제조의 효율은 원하는 수준보다 낮을 수 있다. 또한, 상기 초산염/초산 부산물이 일부의 다른 목적에 사용될 수 없다면, 폐기물 처리 문제를 야기할 수 있다. 초산염/초산은 미생물을 통해 메탄으로 전환되기 때문에, GHG 방출에 기여할 가능성이 있다.

[0010] 단독 탄소 및 에너지원으로서 일산화탄소를 사용하기 위한 미생물의 능력과 관련이 있는 것으로 알려져 있는 몇 가지 효소들은 그 활성을 위해 금속 보조인자를 필요로 하는 것으로 알려져 있다. 활성을 위해 금속 보조인자를 필요로 하는 중요한 효소들의 예로는 일산화탄소 탈수소효소 (CODH) 및 아세틸-CoA 합성효소(ACS)가 있다.

[0011] 그 개시내용이 본 원에 참조로 포함되는 W02007/117157호, W02008/115080호, W02009/022925호, W02009/058028호, W02009/064200호, W02009/064201호 및 W02009/113878호는 일산화탄소 함유 가스의 혐기성 발효를 통해 알코올류, 특히 에탄올을 생산하는 공정을 기재하고 있다. W02007/117157호에 기재된 발효 공정의 부산물로서 생성되는 초산염은 혐기성 발효 공정에 사용될 수 있는 수소 가스 및 일산화탄소 가스로 전환된다. W02009/022925호는 발효를 통한 산 및 알코올과 같은 생성물로 CO 함유 기질의 전환에 미치는 pH 및 ORP의 효과를 개시하고 있다. W02009/058028호는 발효를 통한 알코올과 같은 생성물의 제조를 위한 공업적 폐기물 가스의 사용을 기재하고 있다. W02009/064201호는 CO에 대한 캐리어 및 발효에서 CO의 사용을 개시하고 있다. W02009/113878호는 CO 함유 기질의 발효 동안 산(들)로부터 알코올(들)로의 전환을 개시하고 있다.

[0012] CO 함유 가스를 이용하여 성장할 수 있는 미생물은 당에서 성장하는 미생물과 대표적으로 관련이 있는 것보다 느린 속도로 성장하는 것으로 알려져 있다. 상업적인 관점에서, 발효 공정에서는 미생물 개체군이 충분히 높은 세포 밀도까지 성장하여 경제적으로 실행가능한 수준의 생성물이 합성되도록 하는데 필요한 시간은 상기 공정의 수익성에 영향을 미치는 중요한 인자이다. 배양 성장 속도 및/또는 생산성을 향상시켜서 원하는 세포 밀도 및/또는 원하는 생성물 수준에 도달하는데 필요한 시간을 감소시키는 기술을 이용하여 총괄 공정의 상업적인 실시 가능성을 개선할 수 있다.

[0013] 가스상 공급원료로부터 알코올을 제조하기 위해 이용되는 발효 공정에서, 미생물 성장 및/또는 알코올 생성을 위한 적절한 조건을 확보하는 것은 최적 미생물 생산 및/또는 알코올 생산성을 유지하는데 중요할 수 있다. 그러나, 원하는 세포 밀도가 달성되는 경우, 그 일차적인 목표는 알코올의 생성일 수 있다. 발효 과정 동안 특히 조작 조건의 변화에 따라 생성물 프로파일 어떻게 변화하는 지를 이해하면 조작자는 생산성을 최적화할 수 있다. CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질을 최적 수준 또는 신속한 성장 및/또는 알코올 제조와 같은 특정 요건을 위한 최적 범위내에서 공급하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 US7,285,402호에 기재된 바와 같이 너무 많은 CO는 CO의 억제에 이어질 수 있다. 또한, 너무 적은 CO는 미생물 성장 및 알코올 생산을 포함한 대사 속도의 감소로 이어질 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 전술한 단점들 중 적어도 일부를 극복하는 방법을 제공하거나 적어도 공중에게 유용한 선택을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0015] [발명의 요약]

[0016] 일반적으로 본 발명은 CO를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 산 및/또는 알코올을 비롯한 생성물을 제조하는 방법으로서, 미생물 배양체의 적어도 일부가 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분을 미생물 바이오매스, 및/또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분을 산(들), 및/또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분을 알코올(들), 및/또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분을 알코올(들)로 전환하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 미생물 배양체는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들) 및/또는 알코올(들)로

전환시킨다.

- [0018] 또 다른 구현예에서, 상기 미생물 배양체는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들) 및/또는 알코올(들)로 전환시키고, 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환시킨다.
- [0019] 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 기질은 CO 및 H₂를 포함한다. 그러나, 본 발명에 따라, 전체 탄소 고정을 위한 불충분한 H₂가 세포질 및/또는 생성물로 전환된다. 특정 구현예에서, H₂는 2:1 미만의 H₂:CO, 예를 들어, 약 1:1; 또는 약 1:2, 또는 약 1:3, 또는 약 1:4, 또는 약 1:5, 또는 약 1:10의 H₂:CO가 배양액을 통해 전환되도록 공급된다. 특정 구현예에서, H₂는 공급되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 제 1 양태에서는, CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질의 미생물 발효의 효율을 개선하는 방법으로서, CO의 제1 부분이 산(들) 및/또는 알코올(들)을 포함하는 1종 이상의 원하는 생성물로서 고정되고 CO의 제2 부분이 CO₂로 전환되도록 미생물 배양체에 기질을 공급하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, CO₂로 전환된 CO의 비율의 측정치를 이용하여 1종 이상의 원하는 생성물의 생성을 위한 기질 공급 속도를 결정한다.
- [0021] 특정 구현예에서, 상기 기질 공급 속도는
- [0022] i. CO₂로 전환된 CO의 비율이 최적 값 또는 범위 미만인 것으로 측정되는 경우에는 증가시키거나,
- [0023] ii. CO₂로 전환된 CO의 비율이 최적 값 또는 범위를 초과하는 것으로 측정되는 경우에는 감소시키거나,
- [0024] iii. CO₂로 전환된 CO의 비율이 실질적으로 최적 값 또는 범위에 있는 것으로 측정되는 경우에는 그대로 유지한다.
- [0025] 특정 구현예에서, 상기 기질 공급 속도는 자동적으로 조절하여 CO₂로 전환된 CO의 비율이 실질적으로 최적 값 또는 범위로 유지되도록 한다.
- [0026] 특정 구현예에서, 상기 최적 값 또는 범위는 원하는 발효 생성물을 기준으로 실험적으로 확인할 수 있다. 특정 구현예에서, 알코올이 원하는 생성물인 경우, 상기 기질은 고정된 탄소의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%가 알코올로서 고정되도록 공급될 수 있다. 추가적으로 또는 대안으로, 원하는 생성물이 초산염인 경우, 상기 기질은 고정된 탄소의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%가 초산염으로 고정되도록 공급될 수 있다.
- [0027] 특정 구현예에서, 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율은 실질적으로 일정하게 유지될 수 있다. 특정 구현예에서, 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 예정 범위로부터 벗어나는 경우, 기질의 공급은 그 비율이 예정 범위로 복귀되도록 조절된다. 특정 구현예에서, 상기 예정 범위는 약 ±1%, 또는 약 ±2%, 또는 약 ±3%, 또는 약 ±4%, 또는 약 ±5%이다.
- [0028] 특정 구현예에서, 기질 공급은 상기 예정 범위로부터의 편차에 따라 자동적으로 조절된다.
- [0029] 본 발명의 제 2 양태에서는, CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 1종 이상의 산 및/또는 알코올을 제조하는 효율을 개선하는 방법으로서, 미생물 배양체의 적어도 일부가 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들), 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들), 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환하는 것에서, 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들), 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들), 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환하는 것으로 전이되는 방법을 제공한다.
- [0030] 특정 구현예에서, 상기 미생물 배양체의 적어도 일부는 미생물 배양체 및/또는 기질 흐름을 조절함으로써 전이될 수 있다. 특정 구현예에서, 미생물 배양체가 액체 영양 배지를 포함하는 발효액에 적어도 부분적으로 현탁되는 경우, 미생물 발효는 생물 반응기에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 미생물 배양체의 적어도 일부분은 발효액 및/또는 액체 영양 배지를 조절함으로써 전이될 수 있다.
- [0031] 특정 구현예에서, 상기 조절은 상기 발효액의 pH를 변화시키는 것, 상기 발효액의 산화환원 전위를 변화시키는 것, 상기 발효액의 CO 농도를 변화시키는 것, 상기 기질 흐름의 조성을 변화시키는 것, 발효액 교반 속도를 변화시키는 것, 생성물의 제거, 상기 발효액의 산 및/또는 알코올 농도를 변화시키는 것, 상기 액체 영양 배지의 하나 이상의 영양물을 변화시키는 것, 하나 이상의 영양물의 공급 속도를 변화시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

다.

- [0032] 특정 구현예에서, 상기 CO를 포함하는 기질은 H₂도 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 상기 발효액의 H₂ 농도를 변화시키고 및/또는 상기 발효액의 CO:H₂ 비율을 변화시키는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질은 가스상이다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 생물반응기에서 CO 및/또는 H₂의 부분압을 변화시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 방법은 CO₂로 산화되는 CO의 비율을 측정하여 미생물 배양체에 의한 순전환율이 측정될 수 있도록 하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 미생물 발효의 총괄 순전환율은 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부의 산(들)로의 전환, 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부의 알코올(들)로의 전환, 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분의 알코올(들)로의 전환이다.
- [0034] 제 3 양태에서는, 예정(소정) 조작 파라미터 하에서 CO를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 1종 이상의 산 및/또는 알코올을 생성하는 효율을 개선하는 방법으로서, 1종 이상의 생성물로 전환되는 탄소의 비율을 측정하고, 그 측정 결과에 따라, i. 하나 이상의 조작 파라미터를 조절하여 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 증가하도록 하거나, ii. 조작 파라미터를 유지하여 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 실질적으로 일정하게 유지되도록 하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0035] 특정 구현예에서, 상기 조절은 상기 발효액의 pH를 변화시키는 것, 상기 발효액의 산화환원 전위를 변화시키는 것, 상기 발효액의 CO 농도를 변화시키는 것, 기질 공급 속도를 변화시키는 것, 상기 기질 흐름의 조성을 변화시키는 것, 기질 흐름의 압력을 변화시키는 것, 발효액 교반 속도를 변화시키는 것, 생성물의 제거, 상기 발효액의 산 및/또는 알코올 농도를 변화시키는 것, 상기 액체 영양 배지의 하나 이상의 영양물을 변화시키는 것, 하나 이상의 영양물의 공급 속도를 변화시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.
- [0036] 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 CO를 포함하는 기질은 H₂도 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 상기 발효액의 H₂ 농도를 조절하고 및/또는 상기 발효액의 CO:H₂ 비율을 조절하는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질은 가스상이다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 생물반응기에서 CO 및/또는 H₂의 부분압을 변화시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 제 1, 제 2 및 제 3 양태의 특정 구현예에서, 상기 효율을 개선하는 방법은 알코올, 특히 에탄올과 같은 하나 이상의 생성물이 제조되는 속도를 개선하는 것을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 제 4 양태에서는, CO를 포함하는 기질의 발효에서 총괄 순수 전환율을 측정하는 방법으로서, 미생물 배양체에 의해 특정 생성물로 고정되는 탄소의 비율을 측정하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 특정 생성물로 고정되는 탄소의 비율은 CO₂로 산화된 CO의 비율을 측정함으로써 확인할 수 있다.
- [0038] 특정 구현예에서, 상기 미생물 발효에서의 총괄 순수 전환율은 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분의 산(들)로의 전환, 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분의 알코올(들)로의 전환, 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부분의 알코올(들)로의 전환이다.
- [0039] 특정 구현예에서, CO₂로 전환된 CO의 비율은 미생물 배양체가 소모한 CO 및 임의적으로 H₂ 및 미생물 배양체가 생성한 CO₂를 측정함으로써 결정된다.
- [0040] 상기 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 양태의 특정 구현예에서, 생물반응기로 유입 및/또는 유출되는 CO, H₂ 및/또는 CO₂는 실질적으로 연속해서, 또는 조절이 이루어지기 전 및/또는 후와 같은 불연속적인 시점에서 측정할 수 있다. 일부의 구현예에서, 생물 반응기로 유입 및/또는 유출되는 CO, CO₂ 및/또는 H₂의 양은 가스 크로마토그래피를 이용하여 측정할 수 있다. 특정 구현예에서, 가스 크로마토그래피를 이용하여 CO₂로 전환된 CO의 비율을 측정한다. 일 구현예에서, 상기 가스 크로마토그래피는 마이크로 GC를 이용하여 수행된다.
- [0041] 미생물 배양체의 부분들이 여러 가지 전환에 관여하는 것으로 이해되지만, 전체 배양물에 의한 총괄 순수 전환율이 측정될 수 있다. H₂가 실질적으로 제한되는 본 발명의 특정 구현예, 예를 들어 기질 흐름이 5% 미만의 H₂, 또는 4% 미만의 H₂, 또는 3% 미만의 H₂, 또는 2% 미만의 H₂, 또는 1% 미만의 H₂를 포함하는 구현예에서, 0.5의 CO₂생성/CO소모의 비율은 CO를 포함하는 기질의 산(들) 및 임의적으로 미생물 세포로의 순수 전환율을 나타낸다. 0.667의 CO₂생성/CO소모의 비율은 CO를 포함하는 기질의 알코올(들)로의 순수 전환율을 나타낸다. 0.5 내지 0.667의 CO₂생성/CO소모의 비율은 CO를 포함하는 기질의 산(들) 및 알코올(들) 및 임의적으로 미생물 세포로의 순수 전환율을 나타낸다. 0.667의 CO₂생성/CO소모의 비율은 CO 및 산(들)을 포함하는 기질의 알코올(들)로의 순수 전환율

을 나타낸다.

- [0042] 상기 양태들의 여러 가지 구현예에서, 미생물 배양체의 적어도 일부분은 알코올(들)을 산(들) 및 일산화탄소로 전환시킬 수 있는 것으로 인정된다. 그러나, 특정 구현예에서, 혐기성 발효는 CO를 포함하는 기질의 생성물로 의 총괄 순수 전환을 초래한다. 다른 구현예에서, CO_2 생성/ CO 소모의 비율이 0.5 미만인 경우, 알코올(들)의 산(들)으로의 순수 전환 및 CO_2 및/또는 H_2O 의 환원은 바람직하지 않을 수 있다.
- [0043] 본 발명의 제 5 양태에서는, CO를 포함하는 기질 흐름을 산(들) 및/또는 알코올(들)과 같은 생성물로 미생물 발효하기 위한 장치로서, 미생물 배양체를 함유하는 생물반응기와, 특정 생성물로 고정된 탄소의 비율을 측정하기에 적합한 측정 수단과, 미생물 배양체 및/또는 기질 흐름에 대한 하나 이상의 조절을 수행하기에 적합한 적어도 하나의 조절 수단을 포함하는 장치를 제공한다.
- [0044] 특정 구현예에서, 상기 측정 수단은 생물반응기로부터 배출되는 배출 흐름 및 임의적으로 생물반응기로 유입되는 기질 흐름의 조성을 측정하기에 적합한 적어도 하나의 수단을 포함한다. 상기 측정 수단은 처리 수단에 임의적으로 연결되어 원하는 생성물로 고정되는 탄소의 비율이 측정되도록 할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 측정 수단은 가스 크로마토그래프이다.
- [0045] 특정 구현예에서, 상기 조절 수단은 상기 측정 수단이 원하는 생성물로 고정된 탄소의 비율이 예정 값 또는 범위를 벗어난 것으로 판정하는 경우 하나 이상의 조절을 수행하도록 구성된다. 특정 구현예에서, 상기 조절 수단은 상기 발효액의 pH를 변화시키는 것, 상기 발효액의 산화환원 전위를 변화시키는 것, 상기 발효액의 CO 농도를 변화시키는 것, 상기 발효액의 H_2 농도를 변화시키는 것, 상기 기질 흐름의 조성을 변화시키는 것, 기질 흐름의 압력을 변화시키는 것, 발효액 교반 속도를 변화시키는 것, 생성물의 제거, 상기 발효액의 산 및/또는 알코올 농도를 변화시키는 것, 상기 액체 영양 배지의 하나 이상의 영양물을 변화시키는 것, 하나 이상의 영양물의 공급 속도를 변화시키는 것에 의해서 조절을 수행하도록 구성된다.
- [0046] 특정 구현예에서, 상기 장치는 하나 이상의 조절 수단을 제어하는데 적합한 처리 수단을 포함하여, 원하는 생성물로 고정된 탄소의 비율이 예정 값 또는 범위를 벗어난 것으로 판정되는 경우 하나 이상의 조절(들)이 미생물 배양체 및/또는 기질 흐름에 대하여 이루어질 수 있도록 한다. 다른 구현예에서, 상기 장치는 조작자에 대한 시각적 및/또는 청각적 피드백을 포함하여, 상기 조작자가 상기 조절 수단을 수동으로 제어할 수 있도록 한다.
- [0047] 상기 여러 가지 양태의 특정 구현예에서, 상기 기질은 공업적 공정의 부산물로 얻어지는 가스를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 공업적 공정은 철금속(ferrous metal) 생성물 제조, 비철(non-ferrous) 생성물 제조, 석유 정제 공정, 바이오매스의 가스화(gasification), 석탄의 가스화, 전력 생산, 카본 블랙 생산, 암모니아 생산, 메탄을 생산 및 코크스 제조로 구성되는 군에서 선택된다. 특정 구현예에서, 상기 가스상 기질은 제강 공장에서 얻은 가스를 포함한다.
- [0048] 특정 구현예에서, 상기 기질은 20 내지 100 부피% CO, 예를 들어, 40 내지 95% 부피% CO, 60 내지 90 부피% CO, 또는 70 내지 90 부피% CO를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 기질은 25 부피%, 30 부피%, 35 부피%, 40 부피%, 45 부피%, 또는 50 부피% CO를 포함한다.
- [0049] 상기 기질이 수소를 함유하는 것은 필수적인 것을 아니지만, H_2 의 존재가 본 발명의 방법에 따른 생성물의 형성에 해롭지 않아야 한다. 특정 구현예에서, 수소가 존재하면 알코올 제조의 총괄 효율이 개선되는 결과가 얻어진다. 상기 가스상 기질은 일부의 CO_2 , 예를 들어 약 1 내지 약 80% 부피 CO_2 또는 1 내지 약 30 부피% CO_2 를 함유할 수도 있다.
- [0050] 상기 여러 가지 양태의 특정 구현예에서, 상기 CO를 포함하는 기질은 가스상이다. 특정 구현예에서, 상기 발효 공정을 통해 제조되는 알코올은 에탄올이다. 상기 발효 반응은 초산염을 생성할 수도 있다.
- [0051] 특정 구현예에서, 상기 발효 반응은 일산화탄소 영양 세균(carboxydophilic bacteria)의 1종 이상의 균주를 이용하여 수행된다. 바람직하게, 상기 일산화탄소 영양 세균은 클로스트리듐(*Clostridium*), 무렐라(*Moorella*) 및 카복시도씨무스(*Carboxydotherrmus*), 예를 들어, 클로스트리듐 오토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 클로스트리듐 룡달리이(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리듐 라그스달레이(*Clostridium ragsdalei*), 클로스트리듐 카복시디보란스(*Clostridium carboxydivorans*) 및 무렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 일산화탄소 영양 세균은 클로스트리듐 오토에타노게눔이다.
- [0052] 본 발명은 위에서 정의한 바와 같이 광범위하게 기재되지만, 본 발명은 이에 제한되지 않고 하기의 설명에서 제공되는 구현예들도 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0053]

본 발명을 첨부 도면을 참조로 상세히 설명하기로 한다.

도 1은 알코올을 비롯한 생성물들을 제조하기 위한 CO를 포함하는 기질의 회분식 발효에서 초산염 및 알코올 생성 및 CO₂생성/CO소모의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2는 알코올을 비롯한 생성물들을 제조하기 위한 CO를 포함하는 기질의 회분식 발효에서 초산염 및 알코올 생성 및 CO₂생성/CO소모의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 특정 구현예에 따른 CO₂생성/CO소모의 비율을 측정하기 위한 수단을 포함하는 장치의 개략도이다.

도 4는 실시예 3에서 미생물 배양체가 소모한 CO 및 H₂의 양을 나타내는 그래프이다.

도 5는 실시예 3에서 미생물 배양체의 대사산물 생성 및 성장을 나타내는 그래프이다.

도 6은 실시예 4에서 미생물 배양체가 소모한 CO의 양을 나타내는 그래프이다.

도 7은 실시예 4에서 미생물 배양체의 대사산물 생성 및 성장을 나타내는 그래프이다.

도 8은 실시예 5에서 미생물 배양체의 대사산물 생성 및 성장을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054]

예상치 않게, 클로스트리듐 오토에타노게눔과 같은 일산화탄소 영양 세균은 다수의 여러 가지 기질을 통해 CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질의 혐기성 발효를 통해 산(들) 및 알코올(들)과 같은 생성물들을 동시에 생성한다. 놀랍게도, 일산화탄소 영양 미생물들에 의한 산(들) 및 알코올(들)의 생산은 물의 생성이 없이 이루어질 수 있는 것으로 판단되었다. CO 및 H₂를 포함하는 기질의 예전에 보고된 발효에서는, 알코올 및/또는 산과 같은 생성물은 물과 함께 생성되는 것으로 보인다. 그러나, 놀랍게도, 불충분한 H₂가 세포질 및 알코올 및/또는 산과 같은 생성물로의 완전한 탄소 고정에 이용되는 경우, 그 발효는 물의 동시적인 생성이 없이 진행되는 것으로 판단되었다. 특정 구현예에서, H₂ 및 CO가 2:1 미만, 예를 들어, 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:4, 약 1:5 또는 1:10 미만의 H₂: CO 비율로 미생물 배양체에 의해 소모되는 경우 불충분한 H₂가 완전한 탄소 고정 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, H₂는 미생물 배양에는 실질적으로 이용될 수 없다.

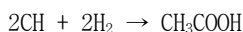
[0055]

이론으로 구축되는 것을 바라는 것은 아니지만, 초산염 및 에탄올과 같은 생성물은 하기의 매커니즘들 중 적어도 하나, 적어도 둘, 적어도 셋 또는 전부에 의해 생성된다:

[0056]

1. 초산에 일산화탄소의 고정

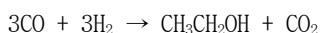
[0057]



[0058]

2. 에탄올에 일산화탄소의 고정

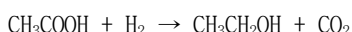
[0059]



[0060]

3. 에탄올로 초산의 환원

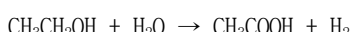
[0061]



[0062]

4. 초산으로 에탄올의 산화

[0063]



[0064]

대표적으로 동화작용 또는 미생물 세포 질량 축적은 적어도 기작 1과 동시에 일어난다. 그러나, 다른 대사산물과 비교하여 작은 비율의 탄소만이 동화작용하는 것으로 보인다. 미생물은 수성 가스 이동 반응($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$)을 통해 그 자신의 H₂를 효과적으로 생성할 수 있다. 따라서, 초산염 및 에탄올을 비롯한 대사산물은 하기 A 내지 C에 따라 생성된다:

- A) $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$
- B) $6\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{CO}_2$
- C) $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$

[0065]

[0066]

미생물 배양체는 동적인 것으로 판단되고, 이론에 구속되는 것을 바라는 것은 아니지만, 미생물 배양체는 상기 식 1 내지 3 및 A 내지 C 중 하나 이상에 따라 CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질의 적어도 일부분을 생성물로 전환하는 것으로 보인다. 따라서, 상기 동적 미생물 배양체에서, 몇 개의 상이한 기작이 장치내에서 일어나서 CO의 알코올 및 산으로의 총괄 순수 전환을 생성할 수 있다. CO가 얼마나 대사되는 지를 측정하기 위하여, H₂의 영향 및 식 A 내지 C에 대한 식 1 내지 3의 가중치를 결정할 필요가 있다. 결정되면, 생성되는 CO₂ 및 소모되는 H₂ 및 CO를 측정하여 식 1 내지 3 및 A 내지 C의 개개의 상대적 영향을 확인할 수 있다.

[0067]

본 발명의 일 양태에 따라, 본 발명은 CO를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 산 및/또는 알코올을 비롯한 생성물을 제조하는 방법으로서, 미생물 배양체의 적어도 일부가 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 미생물 바이오매스, 및/또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들), 및/또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들), 및/또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환하는 방법을 제공한다.

[0068]

놀랍게도, CO₂로 전환된 CO의 비율을 측정함으로써, CO 대사 세균에 대한 알코올 및/또는 산과 같은 생성물의 생성 프로필을 예측하기 위한 모델링 시스템(modelling system)을 개발할 수 있는 것으로 확인되었다. 생성물에서 산화의 정도는 세균이 유기산을 합성하는지 또는 알코올을 합성하는 지에 따라 다르므로, 화학적 공정의 화학양론을 기준으로, 세균이 용매발생(solventogenesis)(예컨대 알코올 생성)에 사용하는 탄소의 비율을 예측할 수 있다.

[0069]

시스템의 생성물 프로필이 얼마나 변화하는 지를 이해하면 시스템의 조작 조건에 대한 조절 또는 변경을 통해 알코올 생산의 증가와 같은 원하는 결과를 촉진할 수 있다. 또한, 특정 구현예에서, 본 발명은 알코올(들) 및/또는 산(들)을 비롯한 생성물을 제조하기 위한 CO를 포함하는 기질의 발효의 효율을 개선하는 방법으로서, 기질을 최적 수준으로 또는 최적 범위 내에서 공급하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, CO가 H₂ 없이 또는 제한된 양의 H₂와 함께 공급되는 경우, 식 1 내지 3의 영향이 최소화된다. 기질 흐름에서 H₂의 양이 5% 미만, 예를 들어, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만인 경우 제한된 양의 H₂가 이용가능한 것으로 판단된다. 이와 같이, $y = 2/3x + 0.5$ 에 따라 CO₂생성/CO소모의 비율을 계산함으로써 식 A 내지 C의 상대적 영향을 확인할 수 있다. 이러한 구현예에서, 식 A는 0.5의 비를 나타내고, 식 B는 0.667의 비를 나타내고, 식 C는 >0.667의 값을 나타내고, 식 4는 < 0.5의 값을 나타내게 된다. 상기 계산된 값으로부터, 각각의 식의 상대적 영향을 결정할 수 있다.

[0070]

또한, 본 발명은 CO 및 임의적으로 H₂를 포함하는 기질의 미생물 발효를 통해 1종 이상의 산 및/또는 알코올을 제조하는 효율을 개선하는 방법으로서, 미생물 배양체의 적어도 일부가 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들) 및 미생물 세포, 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들), 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들), 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환하는 것에서, 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들) 및 미생물 세포, 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 산(들), 또는 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들), 또는 산(들) 및 상기 CO를 포함하는 기질의 적어도 일부를 알코올(들)로 전환하는 것으로 전이되는 방법을 제공한다.

[0071]

정의

[0072]

달리 정의하지 않는 경우, 본 명세서에서 사용되는 하기의 용어들은 하기와 같이 정의된다:

[0073]

발효 공정에 대하여 사용되는 용어 "효율을 증가시키는", "증가된 효율" 등은 하기의 것들 중 하나 이상을 증가시키는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 발효를 촉매하는 미생물의 성장 속도, 소모되는 기질(예, 일산화탄소)의 체적 당 생성되는 원하는 생성물(예, 알코올)의 체적, 원하는 생성물의 생성 속도 또는 생성 수준, 및 발효의 다른 부산물과 비교한 원하는 생성물의 상대적 비율.

[0074]

용어 "일산화탄소를 포함하는 기질" 등은 일산화탄소가 예를 들어 성장 및/또는 발효를 위한 1종 이상의 균주에 이용가능하게 되는 어떠한 기질을 포함하는 것으로 이해된다.

- [0075] 용어 "일산화탄소를 함유하는 가스상 기질"은 일산화탄소를 포함하는 어떠한 가스를 포함한다. 일반적으로, 상기 가스상 기질은 충분한 비율, 바람직하게는 적어도 약 5 부피% 내지 약 100 부피%의 CO를 함유하게 된다.
- [0076] 발효 생성물의 문맥에서, 본 원에서 사용되는 용어 "산"은 카르복시산 및 관련 카르복시산염 음이온, 예를 들어, 본 원에서 기재한 바와 같이 발효액에 존재하는 유리 초산과 초산염의 혼합물을 포함한다. 상기 발효액에서 카르복시산염에 대한 분자 산의 비율은 그 시스템의 pH에 의존한다. 용어 "초산염"은 초산염 단독 및 분자 또는 유리 초산과 초산염의 혼합물, 예를 들어, 본 원에서 기재한 바와 같이 발효액에 존재하는 초산염과 유리 초산의 혼합물 모두를 포함한다. 상기 발효액에서 초산염에 대한 분자 초산의 비율은 그 시스템의 pH에 의존한다.
- [0077] 용어 "생물반응기"는 하나 이상의 용기 및/또는 탭 또는 배관 장치로 구성되는 발효 장치로서, 연속 교반 탱크 반응기(CSTR), 고정 셀 반응기(ICR), 살수층 반응기(TBR), 버블 칼럼, 가스 리프트 발효조, 중공 섬유 막 반응기(HFMBR)와 같은 막 반응기, 정적 혼합기, 또는 기-액 접촉에 적당한 다른 용기 또는 장치를 포함한다.
- [0078] 달리 나타내지 않는 경우, 본 원에서 사용되는 용어 "발효하는", "발효 공정" 또는 "발효 반응" 등은 공정의 성장 단계 및 생성물 생합성 단계를 모두 포함하는 의미이다. 본 원에서 더욱 설명하는 바와 같이, 일부 구현예에서 상기 생물반응기는 제 1 성장반응기 및 제 2 발효 반응기를 포함할 수 있다. 이와 같이, 발효 반응에 금속 또는 조성물을 첨가하는 것은 이러한 반응기중 어느 하나 또는 둘 모두에 첨가하는 것을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0079] 본 원에서 사용되는 용어 "총괄 순수 전환"(overall net conversion)은 특정 시점에서 미생물 배양체에 의한 산(들) 및/또는 알코올(들)을 비롯한 생성물로 CO와 같은 기질의 전환을 설명하기 위한 것이다. 미생물 배양체의 부분들은 특정 시점에서 서로 다른 기능을 수행할 수 있고 다수의 생성물들이 생성될 수 있는 것으로 판단된다. 또한, 발효액에 존재하는 생성물들 중 하나 이상은 다른 생성물로 전환될 수 있다. 따라서, 총괄 순수 전환은 특정 시점에서 미생물 배양체에 의해 생성된 생성물들을 모두 포함한다.
- [0080] 하기의 설명은 본 발명의 특정 구현예, 즉, 일차 기질로서 CO를 이용한 에탄올/초산염의 제조에 초점을 둔 것이지만, 본 발명은 다른 알코올 및/또는 산의 제조에 적용할 수 있고 당업자가 알고 있는 바와 같이 다른 기질을 이용할 수 있다는 것을 알아야 한다. 예를 들어, 이산화탄소 및 수소를 함유하는 가스상 기질을 사용할 수도 있다. 또한, 본 발명은 부틸산염, 프로피온산염, 카프로산염, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 제조하기 위한 발효에 적용될 수도 있다. 또한, 상기 방법은 수소를 제조하는데 이용될 수도 있다. 예를 들어, 이러한 생성물들은 무렐라(*Moorella*), 클로스트리디아(*Clostridia*), 루미노코커스(*Ruminococcus*), 아세트박테리움(*Acetobacterium*), 유박테리움(*Eubacterium*), 부티리박테리움(*Butyribacterium*), 옥소박터(*Oxobacter*), 메타노사시나(*Methanosarcina*), 및 데선포토마큐럼(*Desulfotomaculum*) 유래의 미생물을 이용한 발효를 통해서 제조될 수도 있다.
- [0081] 본 발명의 특정 구현예는 하나 이상의 공업적 공정을 통해 제조되는 가스 흐름을 사용하는데 적합하다. 이러한 공정으로는 제강 공정, 특히 높은 CO 함량 또는 예정 수준(즉, 5%) 이상의 CO 함량을 갖는 가스 흐름을 제조하는 공정이 있다. 이러한 구현예에 따라, 초산생성 세균을 이용하여 하나 이상의 생물반응기에서 산 및/또는 알코올, 특히 에탄올 또는 부탄올을 제조하는 것이 바람직하다. 당업자는 본 발명이 내연 기관을 갖는 엔진의 가스 흐름을 비롯한 여러 가지 산업 및 폐가스 흐름에 적용될 수 있다는 것을 알게 된다. 또한, 당업자는 본 발명이 동일 또는 상이한 미생물들을 이용하는 것들을 비롯한 다른 발효 반응에도 적용될 수 있다는 것을 알게 된다. 따라서, 본 발명의 범위는 설명한 특정 구현예 및/또는 적용으로 제한되지 않고 더욱 넓은 의미로 이해되어야 하는데, 예를 들어, 가스 흐름의 소오스는 제한되지 않고, 그의 적어도 한 성분이 발효 반응을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 자동차 배기 가스 및 고체적 CO-함유 공업적 배연 가스와 같은 가스상 기질로부터 에탄올 및 다른 알코올의 제조 및/또는 총괄 탄소 포착을 개선하기 위한 특별한 이용가능성이 있다.
- [0082] **발효**
- [0083] 가스상 기질로부터 에탄올 및 다른 알코올을 제조하는 방법이 알려져 있다. 예시적인 공정으로는 그 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 WO2007/117157호, WO2008/115080호, US 6,340,581호, US 6,136,577호, US 5,593,886호, US 5,807,722호 및 US 5,821,111호에 기재된 것들이 있다.
- [0084] 다수의 혐기성 세균은 n-부탄올 및 에탄올을 비롯한 알코올 및 초산으로의 CO의 발효를 수행할 수 있는 것으로 알려져 있고 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 본 발명에서 사용하기에 적당한 이러한 세균의 예로는 WO 00/68407호, EP 117309호, US 특허 제 5,173,429호, 5,593,886호 및 6,368,819호, WO 98/00558호 및 WO

02/08438호에 기재된 것들을 비롯한 클로스트리듐 룡달리이, 클로스트리듐 카복시디보란스(Liou 외, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33: pp 2085-2091), 클로스트리듐 라그스달레이(WO/2008/028055) 및 클로스트리듐 오토에타노게눔(Abrini 외, Archives of Microbiology 161: pp 345-351)의 균주와 같은 클로스트리듐 속의 세균이 있다. 다른 적당한 세균으로는 무렐라 속 HUC22-1(Sakai 외, Biotechnology Letters 29: pp 1607-1612)를 비롯한 무렐라 속 및 카복시도써무스 속(Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G. et al (1991), Systematic and Applied Microbiology 14: 254-260)의 세균이 있다. 다른 예로는 무렐라 써모아세티카, 무렐라 써모오토트로피카(*Moorella thermoautotrophica*), 루미노코커스 프로덕터스(*Ruminococcus productus*), 아세토박테리움 우디이(*Acetoacterium woodii*), 유박테리움 리모숨(*Eubacterium limosum*), 부티리박테리움 메틸로트로피킴(*Butyribacterium methylotrophicum*), 옥소박터 페니기이(*Oxobacter pfennigii*), 메티노사시나 바케리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노사시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*), 데설펬토마쿨럼 쿠즈네토비이(*Desulfotomaculum kuznetsovii*)가 있다(Simpa 외, Critical Reviews in Biotechnology, 2006 Vol. 26. Pp41-65). 또한, 당업자가 이해하고 있는 바와 같이 다른 초산생성 혐기성 세균이 본 발명에 적용될 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 본 발명은 두 종 이상의 세균의 혼합 배양액에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0085] 본 발명에 사용하기에 적당한 한가지 예시적인 미생물은 클로스트리듐 오토에타노게눔이다. 일 구현예에서, 상기 클로스트리듐 오토에타노게눔은 기탁번호 19630하에서 독일 생물자원 센터(DSMZ)에 기탁된 균주의 특성을 갖는 클로스트리듐 오토에타노게눔이다. 또 다른 구현예에서, 상기 클로스트리듐 오토에타노게눔은 DSMZ 기탁번호 DSMZ 10061의 특징을 갖는 클로스트리듐 오토에타노게눔이다. 본 발명의 방법에 사용되는 세균을 배양하는 것은 혐기성 세균을 이용하여 기질을 배양 및 발효하는 분야에서 알려진 임의의 수의 공정들을 이용하여 수행될 수 있다. 예시적인 기법들이 하기의 실시예에서 기재되어 있다. 예를 들어, 발효에 가스상 기질을 이용하는 하기의 논문들에 일반적으로 기재된 공정을 이용할 수 있다: (i) K. T. Klasson 외, (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling, 5; 145-165; (ii) K. T. Klasson 외, (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel. 70. 605-614; (iii) K. T. Klasson 외, (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology. 14; 602-608; (iv) J. L. Vega 외, (1989). Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech. Bioeng. 34. 6. 785-793; (v) J. L Vega 외, (1989). Study of gaseous substrate, fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. Biotechnology and Bioengineering. 34. 6. 774-784; (vi) J. L Vega 외, (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. Resources, Conservation and Recycling. 3. 149-160. 상기 논문들은 모두 본 원에 참조로 포함된다.

[0086] 발효는 연속 교반 탱크 반응기(CSTR), 고정 셀 반응기, 가스 리프트 반응기, 버블 칼럼 반응기(BCR), 막 반응기, 예를 들어 중공 섬유 막 반응기 (HFMBR) 또는 살수층 반응기(TBR)와 같은 어떤 적당한 생물반응기를 이용하여 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 일부 구현예에서, 상기 생물 반응기는 미생물이 배양되는 제 1 성장 반응기, 및 상기 성장 반응기로부터의 발효액이 공급되고 발효 생성물(예, 에탄올 및 초산염)의 대부분이 생성되는 제 2 발효 반응기를 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명의 여러 가지 구현예에 따라, 발효 반응을 위한 탄소원은 CO를 함유하는 가스상 기질이다. 상기 기질은 공업적 공정의 부산물로 얻어지거나 자동차 배기 가스와 같은 또 다른 소오스로부터 얻어지는 CO-함유 폐가스일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 공업적 공정은 제강 공장과 같은 철금속 생성물 제조, 비철 생성물 제조, 석유 정제 공정, 석탄의 가스화, 전력 생산, 카본 블랙 생산, 암모니아 생산, 메탄올 생산 및 코크스 제조로 구성되는 군에서 선택된다. 이러한 구현예에서, 상기 CO-함유 가스는 대기로 방출되기 전에 임의의 편리한 방법을 이용하여 공업적 공정으로부터 포착할 수 있다. 상기 CO-함유 기질의 조성에 따라, 상기 기질을 발효 공정에 도입하기 전에 이를 처리하여 분진 입자와 같은 임의의 원치 않는 불순물들을 제거하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, 상기 가스상 기질은 공지된 방법을 이용하여 여과 또는 세정할 수 있다.

[0088] 그렇지 않으면, 상기 CO-함유 기질은 바이오매스의 가스화로부터 얻어질 수 있다. 상기 가스화 공정은 공기 또는 산소를 제한적으로 공급하면서 바이오매스를 부분적으로 연소하는 것을 포함한다. 일반적으로, 얻어지는 가스는 주로 CO 및 H₂를 포함하고, 최소 체적의 CO₂, 메탄, 에틸렌 및 에탄올을 포함한다. 예를 들어, 사탕수수로부터 설탕 또는 옥수수 또는 곡물로부터 전분과 같은 식량의 추출 및 가공 동안에 얻어지는 바이오매스 부산물 또는 임업에서 발생하는 비식품 바이오매스를 가스화하여 본 발명에서 사용하기에 적당한 CO-함유 가스를 생성할 수 있다.

- [0089] 일반적으로, 상기 CO-함유 기질은 대부분 CO, 예를 들어 적어도 약 20 부피% 내지 약 100 부피%, 40 내지 95 부피%, 60 내지 90 부피%, 및 70 내지 90 부피% CO를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 기질은 25 부피%, 30 부피%, 35 부피%, 45 부피%, 또는 50 부피% CO를 포함한다.
- [0090] 상기 기질이 수소를 함유할 필요는 없지만, H₂의 존재는 본 발명에 따른 생성물 형성에 해롭지 않아야 한다. 특정 구현예에서, 수소가 존재하면 알코올 제조의 총괄 수율이 개선되는 결과가 얻어진다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 상기 기질은 2:1 이하, 1:1 이하 또는 1:2 이하 비율의 H₂:CO를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 기질 흐름은 저농도의 H₂, 예를 들어, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 H₂를 포함하거나 수소가 실질적으로 없다. 또한, 상기 기질은 일정량의 CO₂, 예를 들어 약 1 부피% 내지 약 80 부피% CO₂, 또는 1 부피% 내지 약 30 부피% CO₂를 함유할 수도 있다.
- [0091] 일반적으로, 일산화탄소를 가스 상태로 발효 반응에 첨가하게 된다. 그러나, 본 발명의 방법은 이러한 상태의 기질의 첨가로 제한되지 않는다. 예를 들어, 일산화탄소는 액체 상태로 첨가될 수 있다.
- [0092] 예를 들어, 액체를 일산화탄소 함유 가스로 포화시키고 그 액체를 생물반응기에 첨가할 수 있다. 이는 표준 방법을 이용하여 달성할 수 있다. 예를 들어, 이러한 목적을 위해 마이크로버블 분산 발생기(Hensirisak 외, Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Number 3 / October, 2002)를 사용할 수 있었다.
- [0093] 세균의 성장 및 CO에서 알코올로의 발효를 일으키기 위하여, CO 함유 기질 가스 외에도 적당한 액체 영양 배지를 생물반응기에 공급할 필요가 있다는 것을 알 수 있다. 영양 배지는 사용되는 미생물의 성장을 가능하게 하기에 충분한 비타민 및 미네랄을 함유한다. 단독 탄소원으로 CO를 이용한 에탄올의 발효에 적당한 혐기성 배양액이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 적당한 배양액이 전술한 미국특허 제 5,173,429호 및 593,886호 및 WO 02/08438호, WO2007/115157호 및 WO2008/115080 호에 기재되어 있다. 본 발명은 발효 공정에서 미생물의 성장 및/또는 알코올 제조를 지지하는데 있어서 증가된 효능을 갖는 새로운 배지를 제공한다. 이러한 배지는 아래에 더욱 상세히 설명하기로 한다.
- [0094] 발효는 원하는 발효가 일어나는 적절한 조건하에서 수행되는 것이 바람직하다(예를 들어, CO에서 에탄올로의 발효). 고려되어야 하는 반응 조건은 압력, 온도, 가스 유속, 액체 유속, 배지의 pH, 배지의 산화환원 전위, 교반 속도(연속 교반형 탱크 반응기를 이용하는 경우), 접종 수준, 액체상의 CO를 확실히 제한하지 않도록 하는 최대 가스 기질 농도, 및 생성물 억제물 회피하기 위한 최대 생성물 농도가 있다. 적당한 조건은 WO02/08438호, WO07/117157호 및 WO08/115080호에 기재되어 있다.
- [0095] 최적 반응 조건은 사용되는 특정 미생물에 부분적으로 의존하게 된다. 그러나, 일반적으로, 발효는 상압보다 높은 압력에서 수행되는 것이 바람직하다. 증가된 압력에서 조작하면, 에탄올의 제조를 위한 탄소원으로 미생물에 의해 흡수될 수 있는 기체상에서 액체상으로의 CO 전달 속도가 유의적으로 증가할 수 있다. 이는 생물반응기가 상압이 아닌 승압에서 유지되는 경우 체류 시간(입력 가스 유량으로 나눈 생물반응기내 액체 체적으로 정의됨)이 감소될 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 소정의 CO에서 에탄올로의 전환율은 기질의 체류 시간에 부분적으로 의존하고, 원하는 체류 시간을 달성하는 것이 반응기의 필요한 체적을 나타내므로, 가압 장치를 이용하면 필요한 생물반응기의 체적이 크게 감소될 수 있고 따라서 발효 설비의 자본 비용이 감소될 수 있다. 미국특허 제 5,593,886호에 기재된 실시예에 따르면, 반응기의 체적이 반응기 조작 압력의 증가에 선형으로 비례하여 감소될 수 있다. 즉, 10 기압의 압력에서 조작되는 생물반응기는 1 기압에서 조작되는 생물반응기의 체적의 1/10일 필요가 있다.
- [0096] 또한, 승압에서 가스에서 에탄올로의 발효를 수행하는 이점이 설명되어 왔다. 예를 들어, WO 02/08438호는 150 g/l/day 및 369 g/l/day의 에탄올 생산성을 가정하여 각각 30 psig 및 75 psig의 압력하에서 수행되는 가스에서 에탄올로의 발효를 기재하고 있다. 그러나, 대기압에서 유사한 배지 및 입력 가스 조성을 이용하여 수행되는 발효는 하루에 리터당 10 내지 20 배 적은 에탄올을 생성하는 것으로 확인되었다.
- [0097] 또한, CO-함유 가스 기질의 도입 속도는 액상에서 CO의 농도가 확실히 제한되지 않을 정도인 것이 바람직하다. 이는 CO가 제한된 조건의 결과 에탄올이 배양액에 의해 소모될 수 있기 때문이다.
- [0098] **생성물의 회수**
- [0099] 발효 반응의 생성물은 알려진 방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예시적인 방법으로는 WO07/117157호, WO08/115080호, US 6,340,581호, US 6,136,577호, US 5,593,886호, US 5,807,722호 및 US 5,821,111호에 기재

된 것들이 있다. 그러나, 간략히 예를 들면, 분별 증류 또는 증발 및 추출 발효와 같은 방법을 통해 발효액으로부터 에탄올만을 회수할 수 있다.

[0100] 발효액으로부터 에탄올을 증류하면 에탄올과 물의 공비 혼합물(즉, 95% 에탄올 및 5% 물)이 얻어진다. 무수 에탄올은 당업계에서 알려져 있는 분자체 에탄올 탈수 기술을 이용하여 차후에 얻어질 수 있다.

[0101] 추출 발효 과정은 발효 유기체에 대한 저독성 위험을 방지하는 수산화성 용매를 이용하여 묽은 발효액으로부터 에탄올을 회수하는 것을 포함한다. 예를 들어, 이러한 형태의 추출 공정에서 사용될 수 있는 용매는 올레일 알코올이다. 올레일 알코올은 발효조에 연속적으로 도입되기 때문에, 이러한 용매는 발효조의 상부에 층을 형성하고, 상기 층은 원심분리기를 통해 연속적으로 추출 및 공급된다. 다음에, 물 및 세포가 상기 올레일 알코올로부터 용이하게 분리되고 발효조로 귀환되는 반면에 올레일 함유 용매가 플래시 증발 장치로 공급된다. 상기 에탄올의 대부분은 증발 및 응축되는 반면에 상기 올레일 알코올은 비휘발성이고 회수되어 발효에 재사용된다.

[0102] 또한, 발효 반응에서 부산물로 생성되는 초산염은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 발효액으로부터 회수할 수도 있다. 예를 들어, 활성탄 필터를 포함하는 흡착 장치를 이용할 수도 있다. 이러한 경우, 적당한 분리 장치를 이용하여 발효액으로부터 미생물 세포를 우선 제거하는 것이 바람직하다. 생성물 회수를 위해 세포가 없는 발효액을 발생하는 다수의 여과 기반 방법들이 알려져 있다. 다음에, 얻어지는 세포가 없는 에탄올 함유 및 초산염 함유 투과물은 활성탄을 함유하는 칼럼을 통과하여 초산염이 흡착된다. 염 형태(초산염)이 아닌 산 형태(초산)의 초산염은 활성탄에 더욱 용이하게 흡착된다. 따라서, 발효액의 pH는 활성탄 칼럼에 통과하기 전에 3 미만으로 감소시켜서 초산염의 대부분을 초산 형태로 전환하는 것이 바람직하다. 활성탄에 흡착된 초산은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 용리시켜 회수할 수 있다. 예를 들어, 에탄올을 이용하여 결합 초산염을 용리시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 발효 공정 그 자체에 의해 생성되는 에탄올을 이용하여 초산염을 용리시킬 수 있다. 에탄올의 비점은 78.8 °C 이고 초산의 비점은 107 °C 이므로, 에탄올 및 초산염은 증류와 같은 휘발성 기반 방법을 이용하여 서로 쉽게 분리될 수 있다.

[0103] 또한, 발효액으로부터 초산염을 회수하기 위한 다른 방법들이 당업계에 알려져 있고 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,368,819호 및 6,753,170호는 발효액으로부터 초산의 추출을 위해 사용될 수 있는 용매 및 공용매계를 기재하고 있다. 에탄올의 추출 발효에 대하여 기재된 올레일 기반 용매계의 예로서, 미국특허 제 6,368,819호 및 6,753,170호에 기재된 계는 초산 생성물을 추출하기 위하여 발효 미생물의 존재 또는 부재하에서 발효액과 혼합될 수 있는 수비혼화성 용매/공용매 계이다. 다음에, 상기 초산 생성물을 함유하는 용매/공용매는 증류를 통해 발효액으로부터 분리된다. 다음에, 제2 증류 단계를 이용하여 용매/공용매 계로부터 초산을 정제할 수 있다.

[0104] 발효 반응의 생성물(예를 들어, 에탄올 및 초산염)은 발효 생물반응기로부터 발효액의 일부를 제거하고, 발효액으로부터 미생물 세포를 분리하고(편리하게는 여과를 통해), 발효액으로부터 1종 이상의 생성물을 동시에 또는 순차적으로 회수함으로써 회수할 수 있다. 에탄올의 경우 증류를 통해 회수하는 것이 편리할 수 있고, 초산염은 전술한 방법을 이용하여 활성탄에의 흡착을 통해 회수할 수 있다. 분리된 미생물 세포는 발효 생물반응기로 귀환하는 것이 바람직하다. 또한, 에탄올 및 초산염이 제거된 후 세포가 없는 투과물도 발효 생물반응기로 귀환시키는 것이 바람직하다. 생물반응기에 귀환시키기 전에 추가의 영양물(예를 들어, 비타민 B)을 세포가 없는 투과물에 첨가하여 영양 배지를 보충할 수 있다. 또한, 발효액의 pH를 전술한 바와 같이 조절하여 활성탄에의 초산의 흡착을 향상시킨 경우, 생물반응기에의 귀환 전에 그 pH를 발효 생물반응기의 발효액과 유사한 pH로 다시 조절하여야 한다.

[0105] 발효시 탄소 고정(carbon fixation)의 측정

[0106] CO₂로 전환된 CO의 비율을 측정함으로써, CO 대사 세균에 대한 생성물의 제조 프로필을 예측하기 위한 모델링 시스템(modelling system)이 개발되었다. 생성물에서 산화의 정도는 세균이 유기산을 합성하는지 아니면 알코올을 합성하는 지에 따라 변화하므로, 세균이 용매발생에 이용하는 탄소의 비율은 그 화학 공정의 화학양론을 기준으로 예측할 수 있다. 산화된 부산물(CO₂)의 정도를 분석 및/또는 정량하면 미생물 배양체에 의한 총괄 생성물 전환율이 실시간으로 효과적으로 나타내어 진다.

[0107] 상기 시스템은 그 화학양론으로부터 계산된 하나 이상의 이상 상태의 합성물인 반응기의 상태를 모델링한다. 그 모델링 시스템은 특정 가스 시료를, 이용가능한 수소에 따라 두 개의 2차 혼성 반응을 발생하는 변경 조건 및 두 개의 일차 상태 및 두 개의 이차 상태 사이에 최적 조화(best fit) 절충을 할당한다.

[0108] 상기 일차 상태는 다음과 같다:

- [0109] 아세트산으로 일산화탄소의 고정
- [0110] $2\text{CO} + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$ (0의 CO_2/CO 비)
- [0111] 에탄올에 일산화탄소의 고정
- [0112] $2\text{CO} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2$ (0.3333의 CO_2/CO 비)
- [0113] 유리 수소 가스의 부재하에서, 이러한 일차 반응은 모두 하기의 물-가스 이동 반응에 의해 보충된다:
- [0114] $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$
- [0115] 이러한 물-가스 이동은 유리 수소의 부재하에서 탄소 고정이 수행되는 경우 탄소 고정과 동시에 일어나는 것으로 생각될 수 있다.
- [0116] 상기 물-가스 이동을 상기 두 개의 2차 반응과 결합하면 유리 수소 가스의 부재하에서 일어나는 한 쌍의 2차 혼성 반응이 일어난다.
- [0117] 유리 수소의 존재하에서 일산화탄소의 고정
- [0118] $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ (0.5의 CO_2/CO 비)
- [0119] 유리 산소의 부재하에서 에탄올에 일산화탄소의 고정
- [0120] $6\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{CO}_2$ (0.6667의 CO_2/CO 비)
- [0121] 그 밖에, 두 개의 가능한 3차 상태가 있다.
- [0122] 에탄올로 초산의 환원
- [0123] $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$ (1의 CO_2/CO 비)
- [0124] 초산으로 에탄올의 산화
- [0125] $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$ (0의 CO_2/CO 비)
- [0126] $\text{CO}_2(\text{생성})/\text{CO}(\text{소모})$ 의 비를 관찰함으로써, 배양액의 상태를 추측할 수 있고, 그 생성물의 양을 계산할 수 있다. 100% 수소 소모 특성의 배양액의 경우, 상기 비율은 0 내지 1/3의 사이에서 변화한다. 이는 식 $y = 1/3x$ 를 이용하여 선형 함수로 그래프화될 수 있다. 100% 물-가스 이동 특성의 배양액의 경우, 상기 비율은 1/2와 2/3의 사이에서 변화하게 되고, 이는 식 $y = 2/3x + 0.5$ 를 이용하여 선형 함수로 그래프화할 수 있다.
- [0127] 수소 소모가 무시될 수 있는 경우, 상기 첫 번째 선형 함수가 모델링의 목적에 효과적으로 무시될 수 있고, 관찰된 CO_2/CO 값을 이용하여 두 번째 식만을 품으로써, 계산된 x 값은 에탄올 비율에 대한 탄소의 비율이 된다. 전체 탄소 유입량으로부터 배출된 전체 CO_2 를 감하면 고정에 이용가능한 탄소량이 얻어지고, 이에 미리 계산한 비율로 곱하면 에탄올로 고정된 예측 탄소량이 얻어진다. 하나의 에탄올 분자에 두 개의 탄소 원자가 고정되므로, 이 값을 이등분하여 Mol 입력 탄소를 Mol 출력 탄소를 전환하여야 한다.
- [0128] 수소 소모가 무시될 수 없지만 생성물 및/또는 세포질로의 완전한 탄소 고정에 불충분한 경우, CO_2/CO 비율 및 수소의 양은 배양액의 상태를 직접 추측하는데 이용될 수 없다.
- [0129] 수소로부터의 에탄올 생성은 하기식들 사이에 연속체(continuum)를 형성한다:
- [0130] $3\text{CO} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2$ (0.3333의 CO_2/CO 비) 및 $2\text{CO} + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$ (0의 CO_2/CO 비).
- [0131] 둘 모두 1:1 비율의 CO 및 H_2 를 이용한다. 이러한 연속체에서 미생물 배양체의 수소 소모 부분이 차지하는 위치를 알지않고는, 수소 소모 미생물에 의한 CO_2 의 상대적 산출량을 알 수 없다. 물 가스 이동 이용 개체군이 생성하는 CO_2 를 알지않고는 정확한 CO_2/CO 비를 계산할 수 없고, 그 값은 수소 소모자의 CO_2/CO 비율 및 수소 소모자가 생성하는 CO_2 의 상대량을 알지않고는 계산할 수 없다.
- [0132] 그러나, 이러한 문제점은 수소 소모 상태에서 H_2 소모량은 CO 소모량과 같고 제2 상태 식은 하기와 같이 x 값보

다는 z 값으로 나타낸 CO_2/H_2 비율 수도 있다는 것을 고려함으로써 회피될 수 있다:

[0133]

$$y = 2/3x + 0.5 \text{ 및 } y = 1/3z$$

[0134]

그러나, x 및 z 를 연결하기 위한 제 3 식이 없으면, 그 동시적인 식을 풀 수 없다. 배양액의 상태는 변화할 수 있기 때문에, 이러한 제 3 식 $y = ax + bz$ 은 실제로 변화될 수 있는데, 이는 배양액이 발효 과정 동안 초산염 또는 에탄올을 생성하는 정도가 상기 변화에 따라 변화한다는 것을 가정하여 예상된다.

[0135]

배양액이 수소를 완전히 소모하는 경우, CO 소모량 및 수소 소모량은 1:1 이므로 CO_2/CO 비율 및 CO_2/H_2 비율은 서로 동일하게 된다. 이로부터, CO_2/CO 비율 및 CO_2/H_2 비율을 이용하여 계산한 점 사이에 그려진 선은 미생물 개체군의 수소 소모 특성이 증가함에 따라 수평선이 되려는 경향이 있다는 것을 추측할 수 있고, 수소 소모 상태에서 CO_2 는 에탄올을 기준으로 1:1로 생성되므로 상기 선이 완전히 수평인 경우 z 축 절편은 에탄올로 고정되는 탄소의 비율과 정비례한다는 것을 추측할 수 있다.

[0136]

이러한 정보로부터, 근사치를 추가하여 제3의 혼성 식을 계산할 수 있다.

[0137]

CO_2/CO 와 CO_2/H_2 비율 사이의 선의 기울기를 이용하여 이러한 혼성 선의 z 절편에 가중치를 주고, 이러한 선이 수평인 경우, 상기 기울기($[\text{CO}_2/\text{CO}]/[\text{CO}_2/\text{H}_2]$)는 1이어서, 모든 에탄올이 수소 소모자로부터 생성되는 순수한 수소 소모 배양액을 알 수 있어서, 고려할 유일한 식은 수소 식이라는 것을 알 수 있다.

[0138]

이러한 선이 수평에서 멀어짐에 따라, 그 기울기($[\text{CO}_2/\text{CO}]/[\text{CO}_2/\text{H}_2]$)는 0에 접근하게 된다. 이를 곱셈 가중치로 이용하여 z 절편으로 곱하면, 수소 소모자에 의해 생성되는 CO_2 (및 에탄올)의 추정된 양은, CO_2/CO 와 CO_2/H_2 비율 사이의 선이 수평에서 멀어짐에 따라 0에 근접하게 된다.

[0139]

기울기 유래의 가중치 인자를 곱한 z 절편은 수소 소모 미생물이 생성하는 총괄 CO_2 의 근사치를 주고, 수소 소모자가 소모한 CO 는 수소 소모와 1:1이고, 이러한 값을 대입하여 식 $y = 1/3x$ 를 풀 수 있다. 수소 소모 미생물이 소모한 CO 및 생성한 CO_2 를 전체 소모량 및 생성량으로부터 감해서, 물-가스 이동 개체군에 원인이 있는 잔류 CO 및 CO_2 의 양을 얻을 수 있고, 이러한 나머지의 비율을 대입하여 식 $y = 2/3x + 0.5$ 를 풀 수 있다. 따라서, 산(들) 및/또는 알코올(들)과 같은 특정 생성물에 고정되는 탄소의 비율을 측정할 수 있다.

[0140]

당업자는 소모되는 CO 및 임의적으로 H_2 의 양 및 생성되는 CO_2 의 양은 원하는 대로 연속적으로 불연속적인 시점에서 측정할 수 있다. 당업계에 알려진 임의의 수단을 이용하여 CO_2 , CO 및 H_2 의 양을 측정할 수 있지만, 본 발명의 일 구현예에서는, 가스 크로마토그래피(GC)를 이용하여 생물반응기로부터 유출되는 기류에 존재하는 CO_2 , CO 및 H_2 의 양을 측정한다. 생물반응기로 유입되는 기질 흐름의 조성을 알고 있는 경우, 알코올 및/또는 산으로 고정된 탄소의 양을 계산할 수 있다. 이러한 기질 흐름의 조성을 알 수 없는 경우, 추가의 가스 크로마토그래프를 이용하여 조성을 측정할 수 있다. 생성되는 CO_2 및 소모되는 기질의 양을 측정하기 위한 다른 수단으로는 질량 분광분석기(MS), GCMS 및 인라인 센서가 있다.

[0141]

따라서, 본 발명에 따라, 초산염 및/또는 에탄올과 같은 특정 생성물로 고정된 탄소의 비율은 생성된 CO_2 , 소모된 CO 및 임의적으로 소모된 H_2 를 측정함으로써 결정할 수 있다. 기질(예를 들어 CO 및 임의적으로 H_2)이 미생물 배양체에 이용가능하게 되는 속도는 생성물들의 상대적인 비율뿐 아니라 이들의 생성 속도에도 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 초산염 생성 배양액에 대한 기질 공급량을 증가시키면, 알코올을 생성하는 탄소의 비율이 증가할 수 있다.

[0142]

CO 및 임의적으로 H_2 를 포함하는 기질은 일반적으로 가스 형태로 공급되고, 미생물 배양체에의 CO 및 H_2 의 이용가능성은 발효 장치의 물질 전달 특성에 의존하게 된다. 예를 들어, 발효액에 현탁된 미생물 배양체에의 CO 및/또는 H_2 의 이용가능성은 온도, 발효액 조성, 가스 공급 속도, CO 증기압, H_2 증기압, 혼합을 비롯한 당업자에게 알려진 인자에 의존한다. 따라서, 미생물 발효에의 CO 및/또는 H_2 의 이용가능성을 증가시키는 데는, 기질 공급속도를 증가시키고 및/또는 기계적 교반 생물반응기의 교반을 증가시키는 것과 같은 장치의 물질 전달 특성을 개선할 필요가 있다. 본 발명의 방법에 따라, CO 및 임의적으로 H_2 를 포함하는 기질을 최적 수준 또는 범위로 공급함으로써 발효 효율을 개선할 수 있다. 최적 비율은 원하는 발효 생성물을 기준으로 확인할 수 있다. 예를 들어, 알코올 및 미생물 성장을 원하는 경우, CO 및 임의적으로 H_2 를 포함하는 기질을 공급하여 탄소는 주로 알코올로 고정되고 일부가 미생물 성장에 이용될 수 있도록 한다. 예를 들어, CO 를 포함하는 기질을 미생물 배양체에 공급하여 미생물 성장 및 알코올 생성이 일어나도록 한다.

- [0143] 조건, 특히 기질 공급 속도 및/또는 상대적인 CO 및 H₂ 농도는 미생물 성장 및 알코올 생성이 조작자의 의도대로 최적화될 때까지 변화될 수 있다. 생성물에 대한 이러한 탄소 고정 경로의 영향이 결정될 수 있으므로, 기질 공급을 조절하여 발효 동안 바람직한 조건을 달성 및/또는 유지할 수 있다. 예를 들어, 기질 흐름은 변동하는 CO 및/또는 H₂ 성분을 포함할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나, 본 발명의 방법을 이용하면, 기질 공급을 조절함으로써 생성물의 순수 생산량을 실질적으로 일정한 비율로 유지할 수 있다.
- [0144] 추가적으로 또는 대안으로, 미생물 배양체가 성장하거나 미생물 밀도가 변화함에 따라, 생성된 CO₂ 및 소모된 CO 및 H₂의 측정치를 기준으로 미생물 배양 조건에 따라 기질 공급을 변화시킬 수 있다.
- [0145] 이 경우, 특정 생성물이 되는 탄소의 비율은 기질 공급 및/또는 미생물 밀도에 대한 변화에 불구하고 실질적으로 일정하게 유지될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 특정 생성물이 되는 탄소의 비율이 조작자에 의해 선택될 수 있고, 조건을 조절하여 그 비율을 실질적으로 일정하게 유지할 수 있다. 예를 들어, 조작자가 에탄올 생성에 이용되는 탄소의 90%를 필요로 하는 경우, 기질을 공급하여 그 비율이 $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, 또는 $\pm 5\%$ 와 같은 예정 범위를 벗어나지 않도록 할 수 있다. 특정 구현예에서, 특정 생성물이 되는 탄소의 비율의 측정치에 따라 기질 공급을 제어할 수 있다. 특정 구현예에서, 특정 생성물이 되는 탄소의 비율의 변화에 따라 기질 공급을 자동으로 조절할 수 있다. 특정의 구현예에서, CO가 인지가 가능한 양의 H₂의 부재하에서 공급되는 경우, CO₂생성/CO소모 비율을 측정할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 초산염이 동시에 생성되는 경우 미생물 성장 및 알코올 생성이 최적화될 수 있다. 이 경우, 0.667 미만, 예를 들어, 약 0.66, 약 0.65, 약 0.64, 약 0.63, 약 0.62, 약 0.61, 또는 약 0.60 이하의 CO₂생성/CO소모 비율이 예상된다. 그렇지 않으면, 미생물의 성장은 초산염이 생성되는 경우 최적일 수 있다. 이 경우, 0.667 초과, 예를 들어, 약 0.67, 약 0.68, 약 0.69, 또는 약 0.70 이상의 CO₂생성/CO소모 비율이 예상된다.
- [0146] 최적 수준 또는 범위가 결정되면, 발효 또는 추가의 발효가 유사한 조건하에서 수행될 수 있는데, 실험적으로 결정된 고정 탄소 및/또는 CO₂생성/CO소모 비율이 실질적으로 유지되도록 기질이 공급된다. CO 및 H₂를 포함하는 기질의 발효의 최적 조건이 유사하게 결정되어 적용될 수 있다.
- [0147] 추가 또는 대안의 구현예에서, 상기 방법을 이용하여, 미생물 배양체가 언제 및/또는 어떻게 하나의 순수 총괄 전환으로부터 또 다른 전환으로 전이될 수 있거나 전이되어야 하는지를 알 수 있다. 예를 들어, 전술한 바와 같이, 성장이 일차적인 목표인 경우, 탄소의 대부분이 초산염으로 생성되도록 미생물 배양체를 유지하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, CO 및 최소량의 H₂를 포함하거나 H₂를 포함하지 않는 기질의 경우, CO₂생성/CO소모 비율은 0.5 정도로 유지된다. CO₂생성/CO소모 비율이 약 0.45 내지 0.55, 또는 0.48 내지 0.52와 같은 예정 범위 또는 한계를 벗어나는 경우, 배지 및/또는 기질 흐름에 대한 조절을 수행함으로써, 미생물 배양체의 적어도 일부분을 전이시켜서 전체 배양액에 의한 총괄 순수 전환이 원하는 바와 같도록 할 수 있다. 예를 들어, CO₂/CO 비율이 약 0.5 이도록 배양액을 전이시킨다. H₂의 존재하에서, 마찬가지로의 조절을 수행하여 탄소 고정이 실질적으로 일정하게 유지되도록 할 수 있다.
- [0148] 본 발명의 특정 구현예에서, 미생물 배양체 및/또는 기질 흐름에 대한 조절을 수행하여 미생물 배양체의 적어도 일부분을 전이시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 혐기성 발효를 생물반응기에서 수행하는데, 이 경우 미생물 배양체를 액체 영양 배지를 함유하는 발효액에서 적어도 부분적으로 현탁한다. 특정 구현예에서, 발효액 및/또는 액체 영양 배지에 대한 조절을 수행하여 미생물 배양체의 적어도 일부분을 전이시킬 수 있다.
- [0149] 특정 구현예에서, 상기 조절은 발효액의 pH를 변화시키는 것, 발효액의 산화환원 전위를 변화시키는 것, 발효액의 CO 농도를 변화시키는 것, 발효액의 H₂ 농도를 변화시키는 것, 기질 흐름의 조성을 변화시키는 것, 기질 흐름의 압력을 변화시키는 것, 발효액 교반 속도를 변화시키는 것, 생성물 제거, 발효액의 산 및/또는 알코올 농도를 변화시키는 것, 액체 영양 배지의 하나 이상의 영양물을 변화시키는 것, 하나 이상의 영양물의 공급 속도를 변화시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.
- [0150] 추가적으로 또는 대안으로, 알코올 생성이 일차적인 목표인 경우, 기질은 실질적으로 모든 탄소가 에탄올로 고정되도록 공급될 수 있다. H₂가 이용될 수 없는 특정 구현예에서, CO₂생성/CO소모 비율은 약 0.667로 유지하는 것이 바람직할 수 있다. CO₂생성/CO소모 비율이 0.58 내지 0.73 또는 0.63 내지 0.7과 같은 예정 범위를 벗어나는 경우, 배지 및/또는 기질 흐름에 대한 조절을 수행하여 미생물 배양체의 적어도 일부분을 전이시켜서 전체 배양액에 의한 총괄 순수 전환이 원하는 바와 같도록 할 수 있다. 예를 들어, 약 0.667의 CO₂생성/CO소모 비율로 귀환시

킬 수 있다.

- [0151] 추가 또는 대안의 구현예에서, 약 0.667의 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율을 유지한 알코올 생성 배지는 이전의 성장 단계에서 유래한 상당한 양의 원치않는 초산염, 예를 들어, 잔류 초산염을 함유할 수 있다. 이러한 초산염은 초산염에서 알코올로의 환원의 적어도 일부분을 전이시켜서 알코올로 전환시킬 수 있다(식 3). 이 경우, $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율이 0.667 이상으로 증가하여 원하는 전환이 달성될 때까지 배지를 조절할 수 있다.
- [0152] CO_2 로 산화된 C0의 비율을 이용하여 미생물 배양체의 총괄 순수 전환율을 결정할 수 있다. 또한, 배양체가 소모하는 C0의 양은 배양체의 생존성을 나타낸다(비흡수율: C0 흡수 속도/세포 밀도). 따라서, 본 발명의 방법은 비흡수율(specific uptake)를 측정하면서 이용될 수 있다. 예를 들어, 특정 생성물로 고정된 탄소의 비율 및/또는 비흡수율이 예정 한계 또는 범위를 벗어나는 경우, 배양액에 대한 하나 이상의 조절을 수행하여 생존성 또는 원하는 전환율을 유지한다. 특정 구현예에서, H_2 가 제한되거나 실질적으로 이용될 수 없는 경우, C0 비흡수율은 적어도 0.5 mmol/g 건조중량 미생물 세포/분(mmol/g/min), 예를 들어 약 0.6 mmol/g/min, 약 0.7 mmol/g/min, 약 0.8 mmol/g/min, 약 0.9 mmol/g/min, 약 1.0 mmol/g/min으로 예상된다.
- [0153] 이 경우, C0의 비흡수율과 함께 특정 생성물로 고정된 탄소의 비율을 이용하여 산 및/또는 알코올과 같은 특성의 원하는 대사산물이 생성되는 속도를 결정할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법을 이용하여, 하나 이상의 생성물(예, 알코올)이 생성되는 속도를 최적화(즉, 개선)함으로써 미생물 발효의 효율을 개선할 수 있다. 예를 들어, 약 0.667의 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율을 유지하면서 C0의 비흡수율을 증가시키는 미생물 배양체에 대한 하나 이상의 조절을 수행함으로써 에탄올 생성을 개선할 수 있다. 추가적으로 또는 대안으로, 하나 이상의 조절을 수행하여 C0 흡수 및 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율을 예를 들어 0.5에서 0.667로 증가시켜서 알코올 생성 속도를 개선할 수 있다.
- [0154] 본 발명의 특정 구현예에서, C0 및 임의적으로 H_2 를 포함하는 기질의 연속적 발효는 적어도 2일, 예를 들어, 적어도 3일, 적어도 5일, 적어도 1주, 또는 적어도 1개월에 걸쳐서 달성될 수 있다. 연속적 발효는 발효액에 새로운 배지를 공급하고 생성물 및 미생물 세포를 포함하는 발효액을 제거하여 실질적으로 일정한 발효액 체적을 유지하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 알코올(들) 및 임의적으로 산(들) 및 미생물 세포를 포함하는 생성물의 농도는 연속 공정에서 실질적으로 일정하게 유지된다. 본 발명의 특정 구현예에서, 연속 발효를 장시간에 걸쳐서 지속하기 위하여, 미생물 배양체는 탄소의 적어도 일부분을 초산염과 같은 산으로 고정시킨다. 상기 초산염은 5g/L 미만의 농도로 생성될 수 있다. 그러나, 본 발명에 따라, 고정된 탄소의 대부분은 10g/L 또는 15g/L를 초과하는 에탄올과 같은 알코올로 고정된다. 따라서, 연속 조작을 유지하기 위하여, 기질은 탄소가 초산염, 에탄올 및 바이오매스로 고정되도록 공급할 필요가 있다.
- [0155] 특정 구현예에서, 에탄올 및 소량의 초산염을 장시간에 걸쳐서 연속적으로 생성하는 발효는 약 0.61 내지 0.65, 예를 들어 0.62 내지 0.64의 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율 범위내에서 유지된다. 이러한 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율은 대부분의 고정 탄소가 알코올 생성에 이용되도록 하면서, 나머지는 초산염 및 세포질이 되어 미생물 성장을 유지함으로써, 연속적 배양이 지속되도록 한다. 특정 구현예에서, 기질은 C0 비흡수율이 적어도 0.8 mmol/g/min, 예를 들어 1.0 mmol/g/min에서 유지되도록 공급된다. 또 다른 구현예에 따라, 부수적인 산의 생성이 없이 알코올이 생성되도록 불연속(회분식) 발효를 수행할 수 있다. 이러한 구현예에서, 기질은 알코올 및 임의적으로 세포질(바이오매스)이 생성되도록 공급된다. 본 발명에 따라, 기질은 약 0.667의 $\text{CO}_2\text{생성}/\text{CO소모}$ 비율이 유지되도록 공급된다. 미생물 배양체가 성장함에 따라 필요한 C0 (및 임의적으로 H_2)의 양은 증가하는 것으로 판단된다. 그러나, 본 발명에 따라, 기질 공급 속도가 증가함에 따라 $\text{CO}_2/\text{C0}$ 의 비율을 유지함으로써 최적량의 C0를 공급할 수 있다.
- [0156] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 장치(100)의 개략도이다. 기질 흐름(1)은 적당한 도관(3)을 통해 생물반응기(2)로 유입된다. 기질 흐름(1)은 C0 및 임의적으로 CO_2 및/또는 H_2 를 포함하고, 특정 구현예에서 상기 기질 흐름은 강재의 탈탄과 같은 공업적 공정 유래의 폐가스 스트림이다. 기질 흐름(1)은 일정하게 공급된다는 의미에서 일정한 흐름일 수 있으나, 그 흐름의 내용물은 시간에 따라 변할 수 있다. 상기 기질 흐름의 조성, 특히 C0 및 CO_2 의 농도는 알 수 있거나, 또는 임의적인 측정 수단(미도시)을 통해 측정할 수 있다.
- [0157] 생물반응기(2)는 원하는 발효 반응을 수행하여 생성물을 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에 따라, 생물반응기(2)는 C0를, 1종 이상의 산 및/또는 알코올을 포함하는 생성물로 전환하도록 구성된다. 생물반응기(2)는 하나 이상의 탱크를 포함할 수 있는데, 각각의 탱크는 하나 이상의 공통 단계를 포함할 수 있는 상이한 발효 반응들을 비롯한, 특성의 발효 공정 및/또는 상이한 반응들에서 동일한 반응 및/또는 상이한 단계들을 수행하도록 구성된다. 산 및/또는 알코올과 같은, 생물반응기(2)에서 생성된 생성물은 당업계에 알려진 임의의 회수 공정을

통해 회수될 수 있다.

[0158] 발효 반응에서 소모되지 않는 기질 흐름의 성분 및 CO₂와 같은 발효 반응의 임의의 부산물은 배출구(4)를 통해 생물반응기(2)에서 배출된다. 본 발명의 특정 구현예에서, 측정 수단(5)은 배출구(4)를 통해 생물반응기(2)로부터 배출되는 배기 스트림에서 CO, CO₂ 및 임의적으로 H₂ 농도를 측정하도록 적합하다. 특정 구현예에서, 산(들) 및/또는 알코올(들)이 되는 탄소의 비율은 생물반응기(2)에 공급되는 CO, CO₂ 및 H₂의 양 및 생물반응기로부터 유출되는 양으로부터 측정할 수 있다. 따라서, 조작자는 조절 수단(6)을 이용하여 생물반응기(2) 및/또는 기질 흐름(1)내의 미생물 배양체를 임의적으로 조절하여 미생물 배양체를 원하는 생성 상태로 유지하거나 전이시킬 수 있다. 배양액을 유지 또는 전이시키기 위한 조절은 발효액의 pH를 변화시키는 것, 발효액의 산화환원 전위를 변화시키는 것, 발효액의 CO 농도를 변화시키는 것, 발효액의 H₂ 농도를 변화시키는 것, 기질 흐름의 조성을 변화시키는 것, 기질 흐름의 압력을 변화시키는 것, 발효액 교환 속도를 변화시키는 것, 생성물 제거, 발효액의 산 및/또는 알코올 농도를 변화시키는 것, 액체 영양 배지의 하나 이상의 영양물을 변화시키는 것, 하나 이상의 영양물의 공급 속도를 변화시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

[0159] 추가적으로 또는 대안으로, 장치(100)는 특정 생성물이 되는 탄소의 비율을 측정하고 조절 수단(6)을 제어하는데 적합한 임의적인 처리 수단(7)을 포함하여, 배양액이 원하는 상태에서 유지 또는 전이되도록 할 수 있다.

[0160] 특정 구현예에서, 생물반응기(2)로 유입 및/또는 유출되는 CO₂, H₂ 및 CO는 연속적으로 또는 동시에 측정할 수 있고, 탄소 고정을 측정할 수 있다. 또한, 조절 수단(6)은 연속적인 조절 또는 필요한 경우 불연속적인 시점에서 조절을 수행하도록 구성될 수 있다. 그러나, 특정 구현예에서는, CO₂생성/CO소모 비율을 측정하기 위한 임의의 수단을 사용할 수 있고, 하나 이상의 가스 크로마토그래프를 이용하여 생물반응기(2)로부터 유출되는 흐름 및 임의적으로 기질 흐름(1)의 CO₂ 및 CO 농도를 측정한다. 일 구현예에서, 생물반응기(2)로부터 유출되는 흐름에서 CO 및 CO₂ 농도를 측정하기 위한 수단은 Varian CP-4900 micro GC 이다.

[0161] 실시예

[0162] 재료 및 방법(실시예 1 및 2)

용액 A			
NH ₄ Ac	3.08g	KCl	0.15g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.61g	NaCl	0.12g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.294g	증류수	1 리터까지
용액(들) B			
성분/0.1M 용액(aq)	1L 배지중의 양(ml)	성분/0.1M 용액(aq)	1L 배지중의 양(ml)
FeCl ₃	10ml	Na ₂ MoO ₄	1 ml
CoCl ₂	5 ml	Na ₂ WO ₄	1 ml
NiCl ₂	5ml	ZnCl ₂	1 ml
H ₃ BO ₃	1ml	MnCl ₂	1 ml
Na ₂ SeO ₃	1ml		
용액 C			
비오틴	20.0 mg	칼슘 D-(*)-파노테네이트	50.0 mg
엽산	20.0 mg		
피리독신 HCl	10.0 mg	비타민 B12	50.0 mg
티아민 HCl	50.0 mg	p-아미노벤조산	50.0 mg
리보플라빈	50.0 mg	티옥트산	50.0 mg
니코틴산	50.0 mg	증류수	1 리터까지
용액(들) D			
FeCl ₃	2.5 ml	Na ₂ MoO ₄	0.25 ml
CoCl ₂	1.25 ml	Na ₂ WO ₄	0.25 ml
NiCl ₂	1.2 ml	ZnCl ₂	0.25 ml
H ₃ BO ₃	0.25 ml	MnCl ₂	0.25 ml
Na ₂ SeO ₃	0.25 ml		

[0163]

[0164] 배지의 제조 (실시예 1 및 2)

[0165] 배지를 하기와 같이 제조했다. 85% H_3PO_4 (20mmol)를 용액 A의 1L 용액에 첨가했다. 다음에 NaOH의 5M 용액을 첨가하여 그 배지의 pH를 5.3으로 조절했다. 다음에, 금속염을 용액(들) B에 따라 임의적으로 첨가했다. 그 배지 용액을 사용에 앞서 121 °C에서 30 분간 고압처리하거나 여과하여 멸균했다. 산화환원 지시약으로 레자주린(Resazurin)을 첨가하고 10ml의 B-비타민 용액(용액 C)을 첨가했다.

[0166] Na_2S_x 의 제조

[0167] 500ml 플라스크에 Na_2S (93.7g, 0.39mol) 및 200ml H_2O 를 채웠다. 그 용액을 염이 용해될 때까지 교반하고 황 (25g, 0.1mol)을 일정 N_2 흐름하에서 첨가했다. 실온에서 2 시간 교반한 후, " Na_2S_x " 용액 ([Na]을 기준으로 약 4M 및 [S]를 기준으로 약 5M)(투명한 적갈색 액체)를 N_2 로 퍼지한 혈청병에 옮기고, 알루미늄 포일로 감쌌다.

[0168] 재료 및 방법(실시예 3, 4 및 5)

용액 A			
NH ₄ Ac	3.083g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.294g
MgCl · 6H ₂ O	0.61g	KCl	0.15g
증류수	1리터까지		
용액(들) B			
성분	Mo1/L H2O	성분	Mo1/L H2O
FeCl ₃	0.1	Na ₂ SeO ₃	0.01
CoCl ₂	0.05	Na ₂ MoO ₄	0.01
NiCl ₂	0.05	ZnCl ₂	0.01
H ₃ BO ₃	0.01	MnCl ₂	0.01
용액 C			
비오틴	20.0 mg	니코틴산	50.0 mg
엽산	20,0 mg	칼슘 D-(*)-파노테네이트	50.0 mg
피리독신 HCl	10.0 mg	비타민 B12	50.0 mg
티아민 HCl	10.0 mg	p-아미노벤조산	50.0 mg
리보플라빈	50.0 mg	티오토산	50.0 mg
증류수	1 리터까지		

[0169]

[0170] Cr(II) 용액의 제조

[0171] 1 리터 용량의 삼구목 플라스크에 가스가 셀 수 없는 입구 및 출구를 장착하여 비활성 가스하에서의 작업 및 나중에 원하는 생성물의 적당한 저장 용기로의 운반을 가능하게 하였다. 상기 플라스크에 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (40g, 0.15 mol), 아연 분말 [20 메시] (18.3g, 0.28 mol), 수은 (13.55g, 1mL, 0.0676 mol) 및 500 mL의 증류수를 채웠다. N_2 를 이용하여 1 시간 동안 플러싱한 후, 그 혼합물을 약 80 °C까지 가열하여 반응을 개시했다. 일정한 N_2 흐름하에서 2 시간 동안 교반한 후, 그 혼합물을 실온으로 냉각하고 반응 혼합물이 진한 청색 용액이 될 때까지 48 시간 동안 연속적으로 교반했다. 그 용액을 N_2 로 퍼지한 혈청병에 옮기고 사용시까지 냉장고에서 보관했다.

[0172] 세균: 사용된 클로스트리듐 오토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*)은 DSMZ 19630의 기탁번호로 독일 생물 자원 센터(DSMZ)에 기탁된 것이다.

[0173] 시료채취 및 분석 과정

[0174] CSTR 반응기로부터 20 일동안 간격을 두고 배지 시료를 취했다. 각각의 경우마다, 가스가 반응기로 유입되거나 유출되지 않도록 주의하면서 배지를 샘플링했다.

[0175] HPLC:

[0176] HPLC 시스템 Agilent 1100 Series. 이동상: 0.0025N 황산. 유량 및 압력: 0.800 mL/min. 칼럼: Alltech 10A; Catalog # 9648, 150 x 6.5 mm, 입자크기 5 μm . 칼럼의 온도: 60 °C. 검출기: Refractive Index. 검출기의 온도: 45 °C.

[0177] 시료 제조 방법:

- [0178] 400 μl 의 시료 및 50 μl 의 0.15M ZnSO_4 및 50 μl 의 0.15M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 를 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에 로딩한다. 상기 튜브를 12,000rpm 및 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분간 원심분리한다. 200 μl 의 상층액을 HPLC 바이알에 옮기고, 5 μl 를 HPLC 기기에 주입한다.
- [0179] 헤드스페이스(Headspace) 분석:
- [0180] 측정은 두 개의 채널이 설치된 Varian CP-4900 micro GC 상에서 수행했다. 채널 1은 70 $^{\circ}\text{C}$, 200kPa 아르곤 및 4.2 초의 백플러시 시간(backflush time)으로 작동하는 10m Mol-sieve 칼럼인 반면, 칼럼 2는 백플러시없이 90 $^{\circ}\text{C}$, 150kPa 헬륨에서 작동하는 10m PPQ 칼럼이었다. 두 채널에 대한 주입 온도는 70 $^{\circ}\text{C}$ 였다. 런타임은 120초로 설정하였지만, 모든 중요 피크는 일반적으로 100초 전에 용리하였다.
- [0181] **실시예 1: CSTR에서 회분식 발효**
- [0182] 용액(들) B를 함유하는 1.5 리터의 배지 용액을 2 리터 CSTR 용기에 무균 및 혐기적으로 옮기고, N_2 를 이용하여 연속적으로 스파지(sparge)했다. 발효조에 옮겨지면, 그 옮겨진 배지의 환원 상태 및 pH를 프로브를 통해 직접 측정할 수 있었다. 그 배지를 37 $^{\circ}\text{C}$ 까지 가열하고 300rpm에서 교반했다. 다음에, 그 배지를 0.3M Cr(II) 클로라이드 용액의 첨가를 통해 -130mV까지 더욱 감소시켰다.
- [0183] 상기 용액에 폴리설파이드 용액(0.1% v/v, 1.5mL)을 첨가하고, 검은 침전물을 배지에서 관찰했다. 또한, -300mV 까지 전위의 초기 감소가 관찰되었는데, 이는 몇 시간 동안 -150mV 까지 안정하였다. N_2 를 상기 용액을 통해 연속적으로 스파지한 후, 폴리설파이드 용액을 첨가했다.
- [0184] 접종에 앞서, 가스를 70% CO , 1% H_2 , 15% CO_2 및 14% N_2 의 예비혼합물에 스위칭하여, 실험 동안 발효액에 연속적으로 스파지했다. 활발하게 성장하는 클로스트리듐 오토에타노게눔 배지를 약 7.5% (v/v)의 수준으로 CSTR에 접종했다. 실험 동안, pH는 약 5.5로 유지했다.
- [0185] 결과:
- [0186] 대사산물 생성 및 CO_2 생성/ CO 소모 비율간의 비교를 도 1에서 볼 수 있다. 배지가 유의적인 양의 가스를 소모하지 않는 지연 시간 후, 가스 소모 및 대사산물 생성을 약 5 일후에 시작했다.
- [0187] 처음 3일간, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 0.55 및 0.62 사이에서 유지되었는데, 이 값에서 에탄올이 초산염과 동시에 생성되고, 에탄올 및 초산염 모두의 증가가 HPLC 분석을 통해 동시에 관찰된다. 9일째에, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 0.66으로 상승하는데, 이 값은 거의 모든 흡수 탄소가 초산염의 생성이 거의 없이 에탄올 생성에 이용된다는 것을 나타내는 것이다. 이러한 날의 HPLC 분석 결과는 배양에 의해 에탄올의 생성이 계속되지만 초산염의 수준이 저하된다는 것을 보여준다. 약간 더 높은 비율은 초산염 소모를 나타내는데, 이러한 초산염 소모는 가스 헤드스페이스 분석이 수행되지 않는 HPLC 분석으로부터 11일 및 12일 사이의 밤 기간에 발생한 것으로 관찰된 현상이다.
- [0188] 12일 및 13일째에, 그 비율은 0.6에 근접하게 이동하여, 약간의 초산염이 생성되면서 에탄올이 계속 생성되는 것을 알 수 있으며, 이는 HPLC 측정 결과와 일치한다. 14 일 내지 16일 사이에, 그 비율은 0.667로 상승하여, 초산염 생성으로부터 에탄올 생성을 나타낸다. 이러한 날에서의 HPLC 분석 데이터는 에탄올의 계속적인 축적을 나타내지만, 초산염 수준이 소량으로 증가 및 감소한다. 10일째에, 그 비율은 0.5 미만으로 급격히 감소하여, 에탄올의 소모를 나타내고, 그 기간 동안의 HPLC 분석 결과는 에탄올 농도의 감소를 보여준다. 19일째에, 반응기에 의한 가스 소모는 0에 근접했고, 그 배지는 비활성인 것으로 판단되었다.
- [0189] **실시예 2: CSTR에서의 회분식 배양**
- [0190] 용액(들) B가 없는 1.5 리터의 배지 용액을 2 리터의 CSTR 용기에 무균 및 혐기적으로 옮기고, N_2 를 이용하여 연속적으로 스파지했다. 발효 용기에 옮겨지면, 그 옮겨진 배지의 환원 상태 및 pH는 프로브를 통해 직접 측정할 수 있었다. 그 배지를 37 $^{\circ}\text{C}$ 까지 가열하고 300rpm에서 교반했다. 다음에, 그 배지를 0.3M Cr(II) 클로라이드 용액의 첨가를 통해 -130mV까지 더욱 감소시켰다.
- [0191] 상기 용액에 폴리설파이드 용액(3M, 1.0mL)을 첨가했다. 또한, -220mV 까지 전위의 초기 감소가 관찰되었는데, 이는 몇 시간 동안 -100mV 까지 안정하였다. N_2 를 이용하여 12 시간 동안 연속적으로 스파지한 후, 용액(들) D를 상기 용액에 첨가하고 Cr(II)의 첨가를 통해 ORP를 약 -200mV로 조절했다.

- [0192] 접종에 앞서, 가스를 70% CO, 1% H₂, 15% CO₂ 및 14% N₂의 예비혼합물에 스위칭하여, 실험 동안 발효액에 연속적으로 스파지했다. 활발하게 성장하는 클로스트리듐 오토에타노게눔 배지를 약 7.5% (v/v)의 수준으로 CSTR에 접종했다. 실험 동안, pH는 외부적으로 조절하지 않았다.
- [0193] 결과:
- [0194] 대사산물 생성 및 CO₂생성/CO소모 비율간의 비교를 도 2에서 볼 수 있다. 배지가 유의적인 양의 가스를 소모하지 않는 지연 기간 후, 가스 소모 및 대사산물 생성을 약 3 일후에 시작했다. 초기에, CO₂생성/CO소모 비율은 매우 높은 것으로 관찰되는데, 실제로 약 1:1 이상이다. 1:1 이상의 계산값은 모델에 의해 1:1과 같은 것으로 처리된다. 이러한 높은 비율은 초산염의 소모 및 에탄올의 생성을 나타낸다. 이러한 기간 동안의 HPLC 분석 결과는 초산염의 수준의 감소 및 에탄올의 증가를 나타냈다. 5일 및 9일 사이에, 그 비율은 0.6 및 0.5 사이로 떨어져서, HPLC 분석 결과와 일치하게, 초산염의 생성과 동시에 에탄올의 생성을 나타낸다. 8일 및 11일 사이에, CO₂생성/CO소모 비율은 0.5 미만으로 떨어져서, 에탄올 소모를 나타낸다. 9일 및 10일에서의 HPLC 분석 결과는 에탄올 농도의 저하를 나타낸다. 11일에, 그 비율은 0.667 이상으로 상승하여, 초산염 소모로부터 에탄올 생성을 나타내는데, 이는 HPLC 분석 결과에서의 초산염의 감소의 관찰과 일치한다. 이러한 소모는 13일 및 14일째에 더욱 두드러졌는데, 그 비율은 1:1 이상으로 상승했다.
- [0195] 15일째 및 18일째의 기간 동안, 가스 헤드스페이스는 수행하지 않았으나, HPLC 분석 결과는 에탄올 수준의 점차적인 감소 및 초산염의 약간의 증가를 나타낸다. 헤드스페이스 분석이 다시 수행된 19일째에, 그 비율은 0.667 이상이었어서, 에탄올 생성 및 초산염 소모를 나타낸다. HPLC 분석 결과, 에탄올 수준은 시료채취가 수행되지 않은 기간 동안에 현저히 상승했지만, 초산염 수준은 다소 정적으로 유지된 것으로 확인되었다. 20일 이후, 배지에 대한 추가의 데이터 수집은 수행하지 않았다.
- [0196] **실시예 3: CSTR에서의 회분식 발효**
- [0197] 배지를 하기와 같이 제조했다. 85% H₃PO₄ (45mmol)을 용액 A의 1.5 리터 용액에 첨가했다. 그 배지의 pH를 NaOH의 5M 용액의 첨가를 통해 5.3 으로 조절했다. 그 배지 용액을 사용에 앞서 121 °C에서 30 분간 고압처리하거나 여과하여 멸균했다. 산화환원 지시약으로 레자주린(Resazurin)을 첨가했다. 그 배지 용액을 1.5 리터의 CSTR 용기에 무균 및 혐기적으로 옮기고, N₂를 이용하여 연속적으로 스파지했다. 발효 용기에 옮겨지면, 그 옮겨진 배지의 환원 상태 및 pH는 프로브를 통해 직접 측정할 수 있었다. 그 배지를 37 °C까지 가열하고 300rpm에서 교반했다.
- [0198] 아황산나트륨 용액(3.75mL의 0.2M 용액)을 첨가한 다음, 니트릴로아세트산(1.5mL의 0.1M 용액), 미량 금속 용액 B (1.5mL) Na₂WO₄ (1.5mL의 0.01M 용액) 및 B-비타민 C (15mL)를 첨가했다. 상기 용액의 ORP를 Cr(II) 용액을 이용하여 약 -200mV로 조절했다.
- [0199] 접종에 앞서, 가스를 33% H₂, 23% N₂, 31%CO 및 13% CO₂의 블렌드에 스위칭했다.
- [0200] 활성적으로 성장하는 클로스트리듐 오토에타노게눔 배양액을 약 10% (v/v)의 수준으로 CSTR에 접종했다. 이 실험 동안에, pH를 약 5.3으로 유지하고, Na₂S 용액을 약 0.16mMol/day의 속도로 첨가했다. 발효 동안, 생물반응기로부터 유출되는 가스 흐름의 변화에 따라 가스 공급 및 교반을 증가시켰다. 본 발명의 방법에 따라, 70% 초과 100% 미만의 파괴점(breakpoint)을 유지함으로써 알코올로 이용된 탄소의 비율을 높은 수준으로 유지했다. CO, H₂ 흡수 및 파괴점은 도 4에서 나타내고, 미생물 성장 및 대사산물 생성은 도 5에서 나타낸다. 알코올 생성을 촉진하는 수준으로 기질 공급을 유지함으로써, 초산염은 생성되지 않는 반면에, 에탄올 및 바이오매스는 급속히 축적된다.
- [0201] **실시예4: CSTR에서의 회분식 발효**
- [0202] 배지를 하기와 같이 제조했다. 85% H₃PO₄ (45mmol)를 용액 A의 1.5L 용액에 첨가했다. 그 배지의 pH를 NaOH의 5M 용액의 첨가를 통해 5.3으로 조절했다. 그 배지 용액을 사용에 앞서 121 °C에서 30 분간 고압처리하거나 여과하여 멸균했다. 산화환원 지시약으로 레자주린(Resazurin)을 첨가했다. 그 배지 용액을 1.5 리터의 CSTR 용기에 무균 및 혐기적으로 옮기고, N₂를 이용하여 연속적으로 스파지했다. 발효 용기에 옮겨지면, 그 옮겨진 배지의 환원 상태 및 pH는 프로브를 통해 직접 측정할 수 있었다. 그 배지를 37 °C까지 가열하고 300rpm에서 교반했다.
- [0203] 아황산나트륨 용액(3.75mL의 0.2M 용액)을 첨가한 다음, 니트릴로아세트산(1.5mL의 0.1M 용액), 미량 금속 용액

B (1.5mL) Na_2WO_4 (1.5mL의 0.01M 용액) 및 B-비타민 C (15mL)를 첨가했다. 상기 용액의 ORP를 Cr(II) 용액을 이용하여 약 -200mV로 조절했다.

[0204] 접종에 앞서, 가스를 50% CO 및 50% N_2 의 블렌드에 스위칭하여, 실험 동안 발효액에 연속적으로 스파지했다. 활성적으로 성장하는 클로스트리듐 오토에타노게눔 배지를 약 10% (v/v)의 수준으로 CSTR에 접종했다. 발효 동안에, pH를 약 5.3으로 유지하고, Na_2S 용액을 약 0.16mol/day의 속도로 첨가했다. 발효 동안, 생물반응기로부터 유출되는 가스 흐름의 변화에 따라 가스 공급 및 교반을 증가시켰다. 본 발명에 따라, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 약 0.667로 유지하여, 실질적으로 모든 탄소가 알코올 생성에 이용되도록 하였다. CO 흡수율 및 CO_2 생성/ CO 소모 비율은 도 6에서 나타내는 반면에, 미생물 성장 및 대사산물 생성은 도 7에서 나타낸다. 알코올 생성을 촉진하는 수준으로 기질 공급을 유지함으로써, 초산염은 생성되지 않는 반면에, 에탄올 및 바이오매스는 급속히 축적된다.

[0205] 실시예 5: CSTR에서의 연속적 발효

[0206] 2리터 CSTR을 하기의 조건하에 두었다. 배지를 하기와 같이 제조했다. 85% H_3PO_4 (30mM)를 용액 A의 1.5L 용액에 첨가했다. 그 배지의 pH를 NH_4OH 의 첨가를 통해 5.3으로 조절했다. 그 배지 용액을 사용에 앞서 121 °C에서 30 분간 고압처리하거나 여과하여 멸균했다. 산화환원 지시약으로 레자주린(Resazurin)을 첨가했다. 그 배지 용액을 1.5 리터의 CSTR 용기에 무균 및 혐기적으로 옮기고, N_2 를 이용하여 연속적으로 스파지했다. 발효 용기에 옮겨지면, 그 옮겨진 배지의 환원 상태 및 pH는 프로브를 통해 직접 측정할 수 있었다. 그 배지를 37 °C까지 가열하고 300rpm에서 교반했다. 다음에, 0.3mol/L 니트릴로아세트산을 포함하는 미량 금속 용액 B(1.5mL), Na_2WO_4 (1.5mL의 0.01M 용액), 및 용액C (15mL)를 순차적으로 첨가했다. 접종에 앞서, 가스를 2% H_2 , 28% N_2 , 48% CO , 및 22% CO_2 에 스위칭했다. 클로스트리듐 오토에타노게눔 배양액을 약 10% (v/v)의 수준으로 CSTR에 접종했다. 실험 동안, Na_2S (0.2M) 용액을 약 0.3ml/hr의 속도로 첨가했다.

[0207] 그 미생물 배양체를 약 1 일간 회분식으로 성장시켰다. 1일째에, 발효를 연속적인 조작으로 스위칭했는데, 새로운 배지를 공급하여 약 1 내지 1.8의 희석비를 달성했다. 미생물 배양체의 요건에 따라 기질 공급을 증가시켰다.

[0208] 발효의 결과는 도 8에서 나타낸다. 발효 동안, CO_2 로 전환된 CO 의 비율에 따라 기질 공급 속도 및 교반 속도를 증감시켰다. 본 발명에 따라, 약 0.62 내지 0.64의 CO_2 / CO 비를 유지하여 지속가능한 연속적 조작을 달성했다. 지속가능한 연속 조작 결과, 약 3g/L의 안정한 바이오매스, 약 5g/L의 실질적으로 안정한 초산염 농도 및 적어도 10g/L의 실질적으로 안정한 에탄올 농도가 얻어졌다. 미생물 배양체에 의한 CO 의 비흡수율은 약 1.0mmol/g/min으로 유지했다.

[0209] 실시예 6: 예측(Prophetic)

[0210] 조건(당업계에 알려진 것들과 같은)이 초산염을 생성하면서 배양액의 신속한 성장을 촉진하는 것으로, 액체 영양 배지에 포함된 일산화탄소 영양 미생물 배양체에 의한 CO 를 포함하는 기질의 발효. 이러한 조건하에서, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 약 0.5로 최적으로 유지된다. 그러나, 조작자가 배양액을 초산염 생성에서 알코올 생성으로 스위칭하기를 원하는 단계에서, 하나 이상의 조절을 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, 액체 영양 배지의 pH를 감소시켜서, 미생물 배양체의 적어도 일부가 알코올이 생성되는 상태로 전이되도록 할 수 있다. 원하는 전이가 수행됨에 따라, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 약 0.667로 증가하게 된다. 또 다른 구현예에서, pH를 수동으로 변화시키기 보다는 pH의 제어를 중지함으로써, 미생물 배양체 그 자체가 pH를 조절하도록 할 수 있다.

[0211] 실시예 7: 예측

[0212] 조건(당업계에 알려진 것들과 같은)이 알코올의 생성을 촉진하는 것으로, 액체 영양 배지에 포함된 일산화탄소 영양 미생물 배양체에 의한 CO 를 포함하는 기질의 발효. 이러한 조건하에서, CO_2 생성/ CO 소모 비율은 약 0.667로 최적으로 유지된다. 그러나, CO_2 생성/ CO 소모 비율이 이러한 값을 벗어나는 경우, 예를 들어 약 0.5로 떨어지는 경우, 하나 이상의 조절을 수행하여 그 비율을 다시 최적값으로 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 가스 흐름의 수소 성분을 증가시켜서 알코올 생성이 촉진되도록 할 수 있다.

[0213] 본 발명은 특정의 바람직한 구현예를 참조로 설명함으로써, 독자가 과도하게 실험하지 않고 본 발명을 실시할 수 있도록 하고자 하였다. 당업자는 구체적으로 기재된 것들 외에도 본 발명이 다른 여러 가지로 변화 및 변경

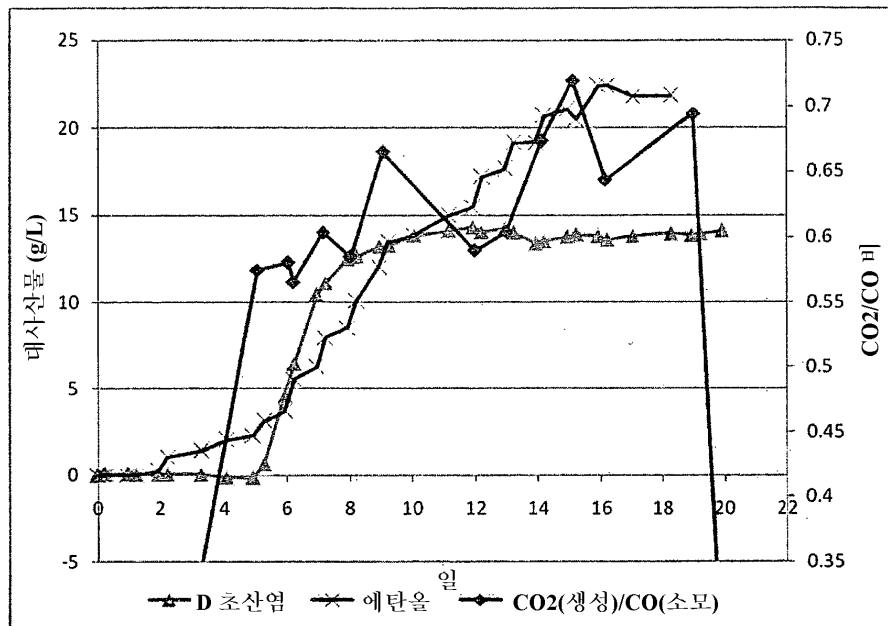
될 수 있다는 것을 알 수 있다. 본 발명은 이러한 모든 변화 및 변경을 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 명칭, 표제 등은 본 서류의 독자 이해를 강화하기 위해 제공되는 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 판단하지 말아야 한다. 위 및 아래에서 열거하는 모든 출원, 특허 및 간행물의 전체 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0214] 본 명세서에서 어떤 종래 기술에 대한 언급은 그 종래 기술이 전세계의 어느 국가에서 노력의 분야에서 공통되는 일반 상식의 일부를 구성한다는 판단이나 암시가 아니고 이러한 판단이나 암시로 간주하지도 않아야 한다.

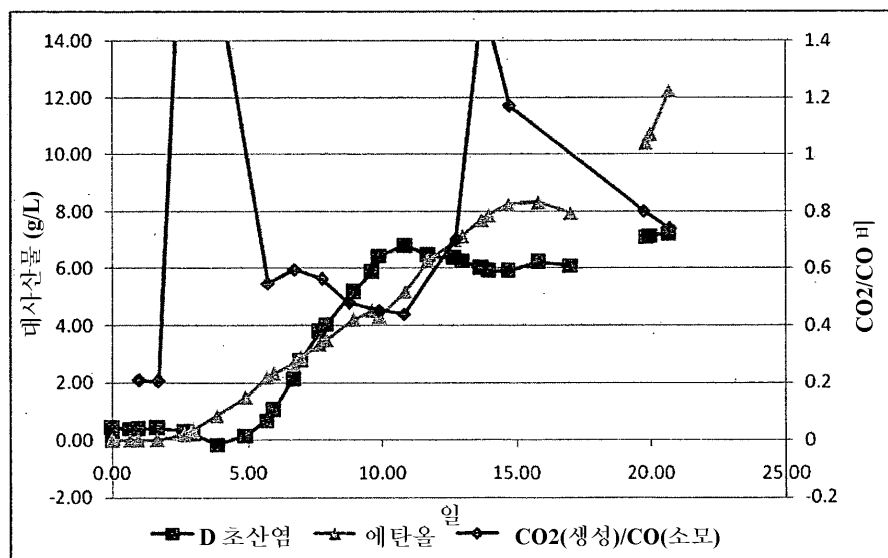
[0215] 본 명세서 및 후술하는 특허청구범위에서, 달리 나타내지 않는 경우, 단어 "포함한다", "포함하는" 등은 배타적인 의미에 반대되는 포괄적인 의미, 즉, "포함하나 이에 제한되지 않는다"의 의미로 해석하여야 한다.

도면

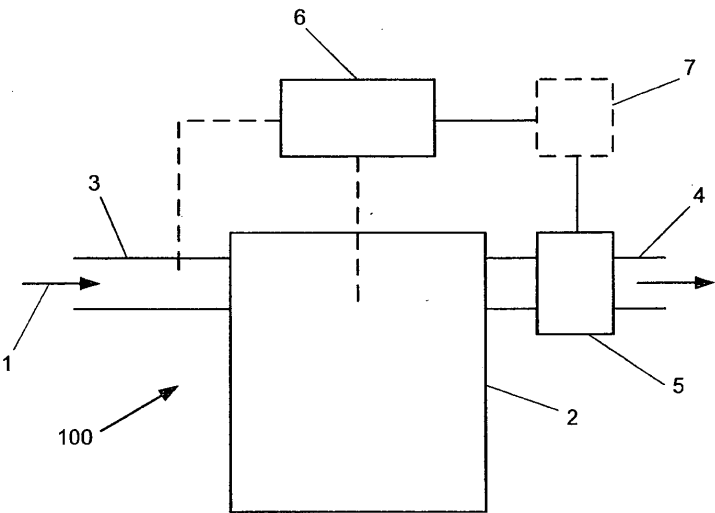
도면1



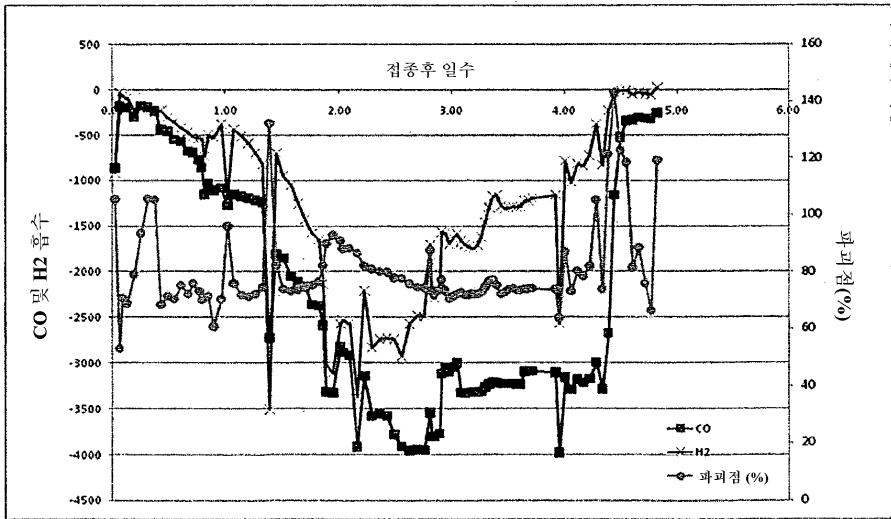
도면2



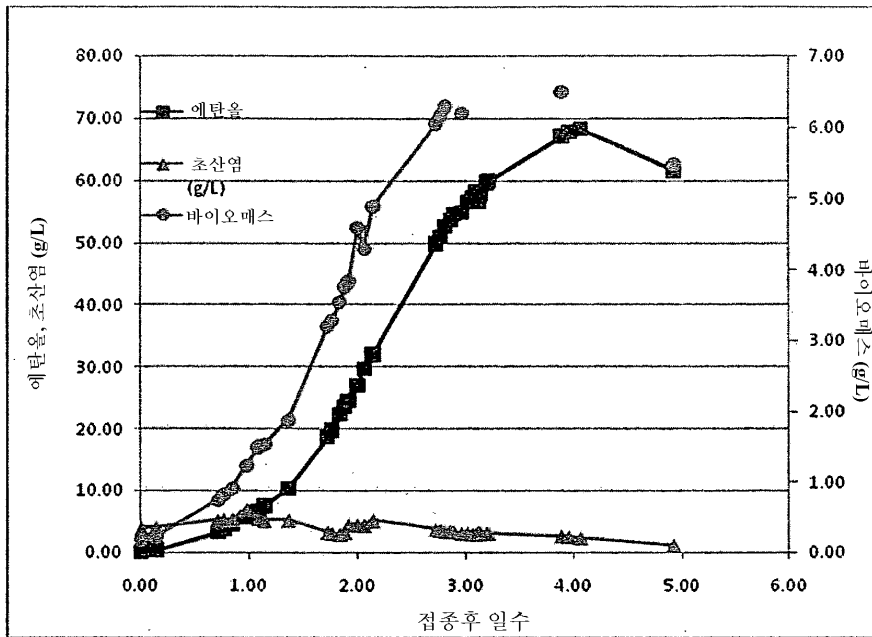
도면3



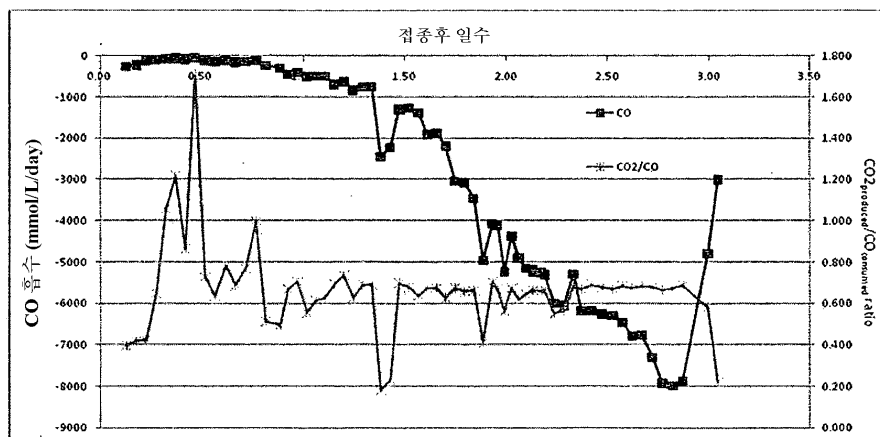
도면4



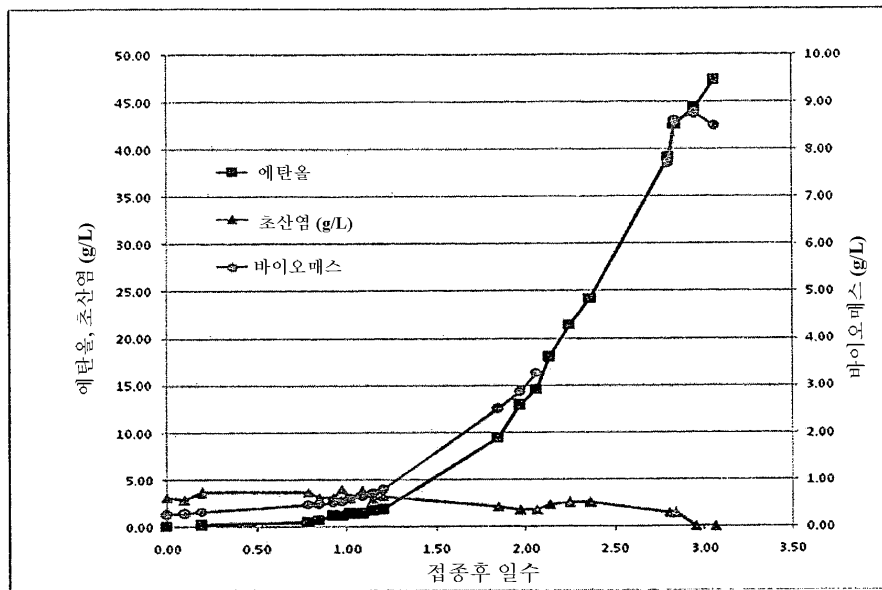
도면5



도면6



도면7



도면8

