



- (51) 국제특허분류:
C12M 1/06 (2006.01) B01D 15/22 (2006.01)
C12M 3/02 (2006.01) C12P 7/04 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002841
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 13일 (13.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0034883 2011년 4월 14일 (14.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **지에스칼텍스(주) (GS CALTEX CORPORATION)** [KR/KR]; 서울특별시 강남구 역삼동 679번지, 135-916 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): **이상현 (LEE, Sang-Hyun)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 410-207, 305-762 Daejeon (KR). **엄문호 (EOM, Moon-HO)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 신수동 457번지 벽산솔렌스힐 101동 702호, 121-856 Seoul (KR). **이율리아 (LEE, Julia)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전

민동 세종아파트 109동 906호, 305-728 Daejeon (KR). **전상준 (JEON, Sang-Jun)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 462-5 세종아파트 103-101, 305-728 Daejeon (KR). **조정희 (CHO, Jung-Hee)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 정든마을 한진아파트 805-1001, 463-758 Gyeonggi-do (KR). **최진달래 (CHOI, Jin Dal Rae)** [KR/KR]; 대전시 유성구 구성동 한국과학기술원 다습관 201호, 305-701 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 대아 (DAE-A INTERNATIONAL IP & LAW FIRM); 서울특별시 강남구 역삼동 830-71 한양빌딩 3, 4층, 135-936 Seoul (KR).

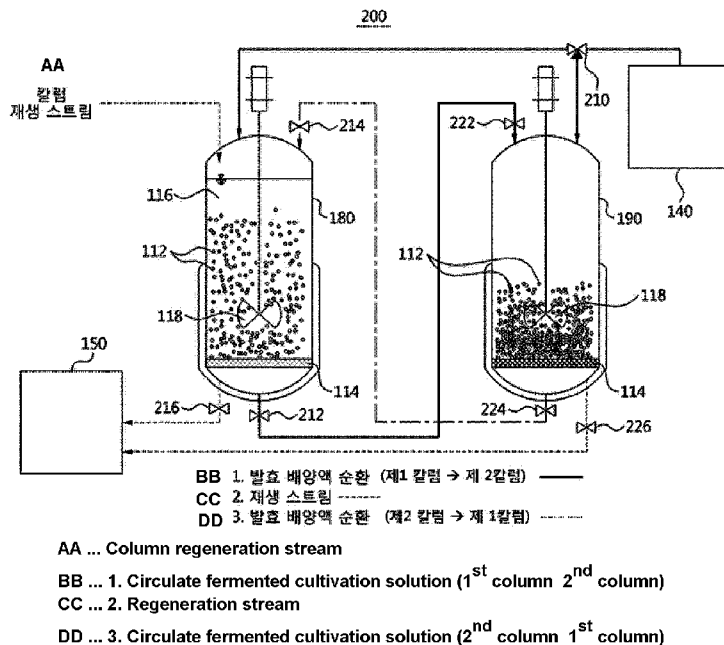
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR SEPARATING AND REFINING FERMENTATION OF PRODUCT MANUFACTURED BY FERMENTING MICROORGANISM BY USING ADSORBENT

(54) 발명의 명칭 : 미생물 발효를 통해 제조된 생성물을 흡착제를 이용하여 분리 정제하는 장치 및 방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to an apparatus and a method for fermenting, separating, and refining a product, which is produced by cultivating a microorganism. The apparatus and the method for fermenting, separating, and refining, of the present invention, can separate and refine the product that is produced by cultivating the microorganism in a simple, continuous manner and with high efficiency.

(57) 요약서: 본 발명은 미생물 배양을 통하여 생산한 생성물의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법에 대한 것이다. 본 발명의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법은 미생물 배양을 통하여 생산한 생성물을 간편하고 연속적이면서도 높은 효율로 분리 정제할 수 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 미생물 발효를 통해 제조된 생성물을 흡착제를 이용하여 분리 정제하는 장치 및 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 미생물을 발효 배양하여 생산한 생성물을 연속적으로 분리 정제하는 장치 및 분리 정제 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 부탄올은 화장품, 향수, 호르몬, 위생제, 산업용 코팅제, 페인트 첨가제, 섬유, 플라스틱 모노머, 의료용품, 비타민, 항생제, 농약 등 활용범위가 매우 넓은 중간체 화합물로 그 효용성이 매우 크다(문헌 [Durre, Biotechnol J, 2:1525-1534, 2007]).
- [3] 기존의 부탄올 제조방법은 클로스트리디움(*Clostridium*) 균주로 당을 발효하여 부탄올, 아세톤 및 에탄올을 생산하는 방법(문헌 [미국공개특허 제1,315,585호])이 80년대까지 이용되었으나 이후로는 석유로부터 얻어진 프로필렌으로부터 부탄올을 합성하는 옥소법(oxo process)이 널리 이용되어 왔다. 그러나 석유 기반의 부탄올 제조법은 고온 고압을 사용하여 공정이 복잡하며 다량의 유해성 폐기물과 이산화탄소를 배출하는 문제점(문헌 [Tsuchida 등, Ind. Eng. Chem.Res., 45:8634, 2006])으로 최근에는 다시 재생가능 자원으로부터 미생물의 발효를 통해 친환경적으로 부탄올을 생산하기 위한 요구가 증가하고 있다.
- [4] 그러나 앞서 언급한 바와 같이 현재 부탄올은 대부분 화학합성법에 의해 생산되고 있다. 유가 상승과 환경 문제 야기 등으로 세계 각국에서는 바이오부탄올 연구에 대한 관심이 급속하게 증가되고 있는 상황이나, 아직까지 바이오 부탄올을 효율적으로 생산한 예는 없었다.
- [5] 부탄올의 경우 지금까지 발효를 통하여 생산한 예는 대부분 클로스트리디움을 이용하여 생산한 것으로, 벡터에 *adc*(아세트아세트산 탈탄산 효소), *ctfA*(CoA 전달 효소 A) 및 *ctfB*(CoA 전달 효소 B)의 3가지 유전자를 넣고 *adc*의 프로모터를 사용하여 인위적 오페론을 제작하고, 이 플라스미드(pFNK6)를 클로스트리디움 아세트부틸리쿰 ATCC 824 균주에 도입한 결과, 야생형에 비해 아세톤, 부탄올 및 에탄올의 생산성을 각각 95%, 37% 및 90% 증가시킨 예가 있다(문헌 [Mermelstein 등, Biotechnol. Bioeng., 42:1053, 1993]). 또한, *aad*(알코올/알데히드 탈수소 효소)를 클로닝한 후 발현시켜 야생형과 비교한 결과, 아세톤의 생성량에 비해 부탄올 및 에탄올의 생성량이 높게 나타낸 예(문헌 [Nair 등, J. Bacteriol., 176:871, 1994])가 있다. 이 외에 유전자의 기능을 불활성화시키는 방법으로 *buk*(부티르산 인산화 효소)와 *pta*(인산화아세트산 전달 효소)를 불활성화시킨 예가 있는데 *buk* 유전자를 불활성화한 균주(PJC4BK)를 pH 5.0 이상으로 발효한

결과, 부탄올 생성량이 16.7 g/L까지 상당히 증가하는 것으로 보고되었다(문헌 [Harris 등, *Biotechnol. Bioeng.*, 67:1, 2000]). 그러나, pta 불활성화의 경우는 야생형과 비교하였을 때 용매 생산에서 유의한 차이를 보이지 못한 것으로 보고되어 있다(문헌 [Harris 등, *Biotechnol. Bioeng.*, 67:1, 2000]). 또한, 무작위 돌연변이로 유발된 돌연변이주 클로스트리디움 바이에링키(*Clostridium beijerinckii*) BA101 균주를 이용하여 탄소원으로 말토덱스트린(maltodextrin)을 사용하여 발효한 결과, 18.6 g/L의 부탄올이 생성된다는 것을 보고한 예도 있다(문헌 [Ezeji 등, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63:653, 2004]). 하지만, 상기의 이러한 재조합 균주를 이용하더라도 모두 최종 산물인 부탄올의 독성으로 인하여 배양액 내 부탄올 생산량이 20g/L이하로 매우 낮아 산업적 이용이 불가능하다. 따라서 배양 과정에서 생산되는 부탄올을 인-시츄로 추출하여 배양액 내에 부탄올 농도를 세포독성을 야기하지 않는 수준으로 유지하기 위한 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들어, 연속배양 동안 생산되는 부탄올을 활성탄을 이용해 흡착하여 생산성을 높인 결과가 보고되었다(문헌 [미국등록특허 제4520104호]).

- [6] 그러나 이 방법은 활성탄에 부탄올만 선택적으로 흡착되고, 흡착되는 부탄올의 농도도 낮아 부탄올의 회수가 힘들고 활성탄의 물리적 안정성이 부족하여 재사용할 수 없기 때문에 부탄올 추출에 많은 비용이 드는 단점이 있다. 흡착되는 부탄올의 양이 부탄올의 농도에 비례하는데 연속배양에 의해 생산되는 부탄올의 농도가 낮아 흡착되는 부탄올의 양 또한, 매우 적다. 이런 문제로 인하여 연속 배양공정임에도 불구하고 생산성이 1g/L/h를 넘지 못한다. 또한, 균주의 응집으로 인하여 활성탄이 충전된 칼럼이 물리적으로 막히는 문제로 인하여 공정상의 문제를 야기할 수 있다. 이 방법은 세포들의 응집 덩어리가 칼럼을 막고, 배양액의 흐름에 채널을 형성하여 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물이 흡착제 전체에 흡착되는 것을 어렵게 하여 흡착 효율이 낮아진다. 활성탄 외에 흡착제를 이용하여 용매의 생산성과 농도를 높이고, 재생 가능한 흡착제를 이용하는 방법이 보고되었다(문헌 [Nielsen 등, *Bioeng. Biotech.* 102:811-821, 2009]). 이 방법은 흡착제를 배양액 내에 첨가하여 배양과정에서 생성되는 부탄올을 흡착제로 흡착하여 회수하는 방법이다. 이 방법에 의하면, 배양액 내에서 다시 흡착제를 회수해야 하며 회수 과정에서 필연적으로 흡착제의 손실이 발생한다. 또한, 배양과정에서 미생물이 생성하는 불순물과 원료물질인 당이 동시에 흡착되어 부탄올 회수 시 순도 및 생산성이 낮다. 또한, 흡착되는 부탄올의 양은 배양액 내에 첨가하는 흡착제의 양에 비례하는데, 이 방법은 배양액 내에 흡착제를 첨가하는 양에 한계가 발생한다. 또한, 이 방법은 상대적으로 에탄올과 아세톤의 농도가 높아지면서 흡착된 부탄올을 탈착시키는 작용을 하므로 부탄올의 농도를 높이는 방법으로는 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 미생물 발효 배양액으로부터 생성물을 연속적으로 분리 정제할 수 있는 장치 및 분리 정제 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [9] 배지를 칼럼에 공급하는 공급조;
- [10] 미생물이 배양되어 생성물을 생성하고, 흡착제가 충전된 2개 이상의 칼럼; 및
- [11] 배지가 공급되는 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 상기 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고, 제 2 칼럼으로 배지가 공급되도록 배지의 흐름을 변경하는 하나 이상의 변환부를 포함하는, 생성물의 연속적 발효 분리 정제 장치를 제공한다.
- [12]
- [13] 또한 본 발명은,
- [14] 흡착제가 충전된 제 1 칼럼으로 배지를 공급하는 단계;
- [15] 상기 제 1 칼럼에서 미생물을 배양하여 생성물을 생산하는 단계; 및
- [16] 상기 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고 흡착제가 충전된 제 2 칼럼으로 배지를 공급하는 단계를 포함하는,
- [17] 생성물의 연속적인 발효 분리 정제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법을 이용하여, 미생물이 발효를 통하여 생산한 생성물을 간단하면서도 빠른 속도로 분리, 정제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명의 미생물 발효를 통해 제조된 생성물의 발효 분리 정제 장치를 나타내는 개념도이다.
- [20] 도 2는 흡착제들의 부탄올 흡착 성능을 상대적으로 나타낸 비교 그래프이다.
- [21] 도 3은 다양한 농도의 부탄올이 흡착제에 흡착하는 속도를 분석한 결과이다.
- [22] 도 4는 배양 시간에 따른 생성물의 누적 생산량을 나타낸다.
- [23] 도 5는 배양 시간에 따른 구간별 부탄올 및 총 생성물의 생산성을 나타낸다.
- [24] 도 6는 배양 시간에 따른 구간별 수율 변화를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며,

본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성요소를 지칭한다.

[26]

[27] 본 발명은,

[28] 배지를 칼럼에 공급하는 공급조;

[29] 미생물이 배양되어 생성물을 생성하고, 흡착제가 충전된 2개 이상의 칼럼; 및

[30] 배지가 공급되는 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 상기 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고, 제 2 칼럼으로 배지가 공급되도록 배지의 흐름을 변경하는 하나 이상의 변환부를 포함하는, 생성물의 연속적 발효 분리 정제 장치에 대한 것이다(도 1).

[31]

[32] 또한 본 발명은,

[33] 흡착제가 충전된 제 1 칼럼으로 배지를 공급하는 단계;

[34] 상기 제 1 칼럼에서 미생물을 배양하여 생성물을 생산하는 단계; 및

[35] 상기 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고 흡착제가 충전된 제 2 칼럼으로 배지를 공급하는 단계를 포함하는,

[36] 생성물의 연속적인 발효 분리 정제 방법에 대한 것이다.

[37]

[38] 또한 본 발명은

[39] 흡착제가 충전된 제 1 칼럼으로 배지를 공급하는 단계;

[40] 상기 제 1 칼럼에서 미생물을 배양하여 생성물을 생산하는 단계;

[41] 상기 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고 흡착제가 충전된 제 2 칼럼으로 배지를 공급하는 단계; 및

[42] 배지가 공급되는 제 2 칼럼에서 발효가 진행되는 동안 배지의 공급이 중단된 제 1 칼럼의 흡착제로부터 생성물을 탈착시켜 생성물을 분리하는 단계를 포함하는,

[43] 생성물의 연속적인 발효 분리 정제 방법에 대한 것이다.

[44]

[45] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 미생물 발효를 통하여 생산된 생성물의 발효 분리 정제 장치(이하, '발효 분리 정제 장치'라 한다) 및 본 발명에 따른 미생물 발효를 통하여 생산된 생성물의 발효 분리 정제 방법(이하, '발효 분리 정제 방법'이라 한다)을 상세히 설명하기로 한다.

[46]

[47] 본 발명의 발효 분리 정제 장치는 흡착제가 충전된 칼럼을 2개 이상 포함한다.

바람직하게는 본 발명의 발효 분리 정제 장치는 상기 흡착제가 충전된 칼럼을 2 내지 20개 포함하며, 더욱 바람직하게는 2 내지 10개 포함하고, 더더욱 바람직하게는 2 내지 5개 포함하며, 가장 바람직하게는 2 내지 3개 포함한다. 상기 칼럼들은 제 1 칼럼, 제 2 칼럼, 제 3 칼럼, 제 4 칼럼, 제 5 칼럼, 제 6 칼럼...과 같은 식으로 나타낼 수 있다. 그러나 이하에서는 설명의 편의를 위하여 2개의 칼럼을 이용하여 설명하기로 한다. 하기의 설명에서 사용하는 제 1 칼럼, 제 2 칼럼이라는 용어는 설명의 편의를 위하여 임의로 넘버링한 것이며 본 발명의 발효 분리 정제 장치가 칼럼을 2개만 포함한다는 것을 의미하는 것은 아니다. 또한 본 발명은 배양액을 여러 칼럼에 연속적으로 공급하는바, 한 칼럼에 대한 설명은 다른 칼럼에도 동일하게 적용된다.

[48]

[49] 공급조(140)에서는 칼럼에 배지를 공급하며, 상기 배지에는 원료 물질이 포함되어 있다. 그 결과, 배지를 공급받는 칼럼에서는 미생물이 배양되며, 상기 원료 물질로부터 미생물 발효를 통하여 생성물을 생산하게 된다.

[50]

[51] 제 1 칼럼에는 흡착제(112)가 충전되어 있으며, 공급조(140)로부터 배지를 공급받아, 배지에 흡착제(112)가 혼합된 혼합물이 된다. 이 후, 제 1 칼럼(180)에 미생물, 즉 균주를 접종하여 배양한다. 미생물의 발효 배양에 의하여 발효 산물인 생성물이 생성되며, 이와 동시에 상기 생성물이 흡착제(112)에 흡착된다.

[52]

이 때, 본 발명의 발효 분리 정제 장치는 상기 칼럼 내에서 흡착제 및 생성물을 교반하는 교반기(118)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 교반기(118)를 이용하여, 제 1 칼럼(110) 내부의 배지 및 흡착제가 골고루 혼합됨으로써, 칼럼 내, 특히 배지가 공급되는 부분 또는 칼럼 밖으로 배양액이 배출되는 부분 등에 배지, 배양액, 균주 및 흡착제가 묻치는 것을 방지할 유지할 수 있다. 미생물의 배양액은 제 1 칼럼(110)의 위쪽에서 아래쪽으로 순환될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[53]

[54] 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 2 변환부(212) 및 제 5 변환부(222)를 개방하여 제 1 칼럼(180) 내의 배양액(116)을 제 2 칼럼(190)으로 이동시킨다. 이로써, 제 1 칼럼(180)의 배양액(116)이 제 2 칼럼(190)으로 공급된다. 이 때, 제 2 변환부(212) 및 제 5 변환부(222)는 개방되고, 제 3 변환부(214) 및 제 6 변환부(224)는 차단되므로, 제 1 칼럼(180) 내의 배양액(116)이 제 2 칼럼(190)으로 유입될 수 있다. 이 때, 제 4 변환부(216)가 개방되어 제 1 칼럼(180)에서 탈착된 생성물이 저장조(150)로 유입될 수 있다.

[55]

그리고 제 1 변환부(210)가 공급조(140)와 제 1 칼럼(180)이 연결되는 방향을 차단하여, 제 1 칼럼(180)에 배지의 공급이 중단된다. 제 1 칼럼(180)으로의 배지의 공급이 중단되면, 제 1 변환부(210)는 공급조(140)와 제 2 칼럼(190)이 연결되는 방향으로 개방된다. 그 결과, 공급조(140)로부터 제 2 칼럼(190)으로

배지가 공급된다.

[56]

[57] 제 2 칼럼(190)에서는 공급조(140)에서 공급되는 배지, 원료물질 및 제 1 칼럼(180)에서 유입된 배양액(116)에 포함된 미생물에 의해 발효가 계속 진행된다. 제 2 칼럼(190)에서 생성물의 생성 및 흡착이 이루어지는 동안 공급조(140)로부터 새로운 배지가 지속적으로 공급될 수 있다. 이 때 교반기(118)를 이용하여 제 2 칼럼(190) 내부의 배양액(116) 및 흡착제(112)가 골고루 혼합될 수 있도록 교반할 수 있다.

[58]

[59] 상기 생성물이 충분히 흡착된 경우란 제 1 칼럼에서의 미생물 발효 배양 및 생성물이 충분히 이루어져, 제 1 칼럼에서 미생물을 계속 배양하여 생성물을 생산, 흡착시키는 것보다는 제 1 칼럼에서의 생성물의 생산 및 분리를 중단하고, 제 2 칼럼에서 미생물을 배양하여 생성물을 생산하는 것이 낫다고 판단되는 경우이다. 예컨대, 미생물 발효 배양액에는 미생물이 생산한 부탄올이 누적되게 되는데, 배양액 내 부탄올의 농도가 약 12g/L에 도달하면, 미생물이 부탄올의 독성에 치명적인 영향을 받을 수 있다. 또한 흡착제에 대한 생성물의 흡착률이 낮아지는 경우, 칼럼 내 미생물의 생장이 생성물에 의하여 저해되는 경우 또는 미생물의 생성물 생산성이 낮아지는 경우 역시 제 1 칼럼에서의 미생물 발효 배양을 중단하고, 제 2 칼럼으로 배양액을 이동시켜 제 2 칼럼에서 배양을 연속하는 것이 전체적인 생산 효율에 유리하다. 그러므로 상기 생성물이 충분히 흡착된 경우는, 흡착제에 대한 생성물의 흡착률이 낮아지는 경우, 칼럼 내 미생물의 생장이 생성물 농도 증가에 의하여 저해되는 경우 또는 미생물의 생성물 생산성이 낮아지는 경우 등이 될 것이며, 이는 미생물의 종류, 흡착제의 종류, 생성물의 종류 및 조성 등에 따라 당업자가 적절히 판단할 수 있을 것이다.

[60]

[61] 한편, 배지가 공급되는 제 2 칼럼에서 배양이 진행되는 동안, 배지의 공급이 중단된 제 1 칼럼(180)에서는 탈착이 진행된다. 탈착이란, 흡착제에 흡착된 생성물을 흡착제로부터 용출시켜, 흡착제를 재흡착이 가능한 상태로 만드는 것이다.

[62]

상기 탈착은 열 또는 용출제를 이용하여 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 공정 조건에 적합한 한 그 종류는 제한되지 않는다. 상기 탈착이 열 또는 용출제를 이용하여 수행됨으로써 수시로 탈착하는 것이 가능하며, 적은 양의 흡착제(112)로도 충분히 많은 양의 생성물을 분리 정제할 수 있다.

[63]

예컨대, 본 발명의 탈착은 흡착된 생성물에 열을 가하여 생성물을 기화시킴으로써 수행될 수 있는데, 상기 열은 공정 상에서 발생하는 열인 것이 비용 상 바람직하며, 스팀 또는 뜨거운 공기의 형태로 가해질 수 있다. 상기 스팀은 수증기 상태이며, 0.01~6.bar의 압력으로 가해질 수 있다. 또한 상기 뜨거운 공기는 0.01~6 bar의 압력으로 가해질 수 있으며, 칼럼 및 흡착제를

손상시키지 않으면서도 생성물을 용출시킬 수 있는 온도를 갖는다. 예컨대, 상기 뜨거운 공기의 온도는 100~200 °C이며, 바람직하게는 110~150 °C이고, 더욱 바람직하게는 120~140 °C이고, 가장 바람직하게는 130 °C이다. 또한 본 발명의 탈착은 용출제를 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 용출제는 유기 용매, 산성 수용액 또는 염기성 수용액이 될 수 있다. 상기 유기 용매는 테트라하이드로퓨란, 알코올, 케톤, 에테르 또는 에스테르일 수 있으며, 바람직하게는 메탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 디에틸에테르 또는 메틸에틸 케톤이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 상기 탈착의 한 예는 테트라하이드로퓨란 용매를 흘려주거나, 수증기를 통과시키는 것이다. 예컨대, 흡착제 부피의 2배의 테트라하이드로퓨란 용매를 10mL/min의 유량으로 흘려주거나, 바람직하게는 2bar의 압력으로 130 °C의 증기를 통과시켜 탈착을 수행할 수 있다.

[65] 상기 탈착은 제 1 칼럼(180) 내부의 흡착제를 외부로 꺼내지 않은 상태, 즉 인-시츄(in-situ) 상태에서 진행된다. 이렇게 생성물이 흡착제(112)에 인-시츄로 흡착되면, 제 1 칼럼(180)에 존재하는 배양액 내에 부탄올이 미생물의 생장이나 생성물의 생산성에 저해를 주지 않는 수준의 농도로 유지된다. 제 1 칼럼(180)에서 탈착이 진행되는 동안, 제 2 칼럼(190)에는 배지가 계속해서 공급되며, 제 1 칼럼(180)으로부터 공급받은 제 1 칼럼의 배양액을 이용하여 배양이 연속적으로 이루어질 수 있다. 또한 배양액이 공급되는 제 2 칼럼(190)에서는 연속적으로 흡착이 진행됨으로써, 결국, 생성물의 생산, 분리 및 정제가 연속적으로 이루어지게 된다.

[66]

[67] 본 발명의 발효 분리 정제 장치는 흡착제(112)가 용출되어 유실되는 것을 방지하기 위하여 컬럼의 상부 또는 하부에 필터(114)를 추가로 포함할 수 있다.

[68]

[69] 그 후 제 2 칼럼(190)에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 2 칼럼(190) 내의 배양액(116)을 다른 칼럼으로 이동시키게 된다. 상기 '다른 칼럼'은 제 1 칼럼(180)일 수도 있고, 제 3 칼럼일 수도 있다. 이는 발효 분리 정제 장치 내 포함되는 칼럼의 개수에 따라 달라질 수 있다. 즉, 발효 분리 정제 장치 내 칼럼이 3개 이상인 경우, 상기 '다른 칼럼'은 제 3 칼럼이 되며, 제 2 칼럼(190) 내 배양액(116)이 제 3 칼럼으로 이동하게 된다.

[70] 만약 발효 분리 정제 장치 내 칼럼이 2개인 경우, 상기 '다른 칼럼'은 제 1 칼럼(180)이 될 것이며, 상기 제 1 칼럼(180)은 상기 제 2 칼럼(120) 내 생성물의 흡착이 진행되는 동안 탈착이 완료된 상태일 것이다. 이 경우, 제 3 변환부(214) 및 제 6 변환부(224)를 개방하여 제 2 칼럼(190) 내의 배양액(116)을 제 1 칼럼(180)으로 이동시킨다. 이후, 제 1 변환부(210)는 공급조(140)와 제 2 칼럼(190)이 연결되는 방향을 차단하여, 제 2 칼럼(190)에 배지의 공급이 중단된다.

[71]

[72] 이후, 제 2 칼럼(190)의 탈착이 진행되고, 이때 제 7 변환부(226)가 개방되어 탈착된 생성물이 저장조(150)로 유입될 수 있다. 상기 저장조(150)에는 필터에서 탈착된 생성물이 유입되어 저장되게 된다. 그 동안 제 2 칼럼(190)의 배양액(116)이 공급된 상기 다른 칼럼에서는 미생물의 발효 배양, 생성물 생산 및 생산된 생성물의 흡착이 연속하여 이루어지게 된다.

[73]

[74] 상기 과정을 반복함으로써 배양액(116)은 본 발명의 발효 분리 정제 장치 내 칼럼들 사이에서 순환될 수 있으며, 칼럼들 내 흡착제를 재사용할 수 있을 뿐 아니라, 생성물을 연속적으로 생산, 분리 및 정제할 수 있다.

[75]

[76] 상기에서 본 발명의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법에 대하여 간략히 설명하였다. 이하, 본 발명에 대하여 더욱 자세히 설명한다.

[77]

[78] 본 발명의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법은 미생물 배양을 통하여 생산한 생성물을 간편하면서도 연속적으로 분리 정제할 수 있으며, 흡착제의 탈착이 적절히 이루어지기 때문에 흡착 효율 역시 높다. 그러므로 본 발명의 발효 분리 정제 장치 및 발효 분리 정제 방법은 미생물 배양을 통하여 생산한 생성물을 높은 효율로 분리 정제할 수 있다.

[79]

[80] 본 발명의 미생물은 원료물질로부터 바이오 연료인 생성물을 생산할 수 있는 능력을 가진 미생물이면 되고, 특별히 제한되지 않는다. 예컨대, 본 발명의 미생물은 박테리아, 효모 또는 곰팡이 등이 될 수 있으며, 바람직하게는 박테리아 또는 효모이다. 본 발명의 미생물은 야생형 미생물일 수도 있고 유전자 조작 미생물일 수도 있다. 바람직하게는 본 발명의 미생물은 야생형 또는 특정 생성물의 생산성이 높도록 유전자가 재조합된 클로스트리디움(*Clostridium*)속 또는 대장균 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니라는 점은 당업자에게 자명할 것이다.

[81]

[82] 예컨대, 본 발명의 미생물로서 부티레이트 키나아제 효소를 코딩하는 유전자(buk)가 결실된 클로스트리디움속 미생물을 이용하는 경우, 부틸산을 많이 생성하지 않으면서도, 혐기적 조건에서 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물을 고농도로 생성할 수 있는 장점이 있다. 예컨대, 본 발명의 미생물로서 부티레이트 키나아제 효소를 코딩하는 유전자(buk), 포스포트랜스아세틸라아제를 코딩하는 유전자(pta) 및 아세트산 카나아제를 코딩하는 유전자(ackA) 등이 결실된 클로스트리디움속 미생물을 이용하는 경우, 다른 유기산은 많이 생성하지 않으면서, 혐기적 조건에서 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물을 고농도로 생성하는 장점이 있다. 또한

본 발명의 미생물로서, 아세토아세트산 탈탄산효소(acetoacetic acid decarboxylase)를 코딩하는 유전자(adc)가 결실된 클로스트리디움속 미생물을 이용하는 아세톤을 생성하지 않으면서, 부탄올을 선택적으로 고농도로 생성할 수 있는 장점이 있다. 또한, 아세톤으로부터 이소프로필알콜로 전환시키는 효소인 2차 알코올 디하이드로게나아제(ald)를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질 전환된 클로스트리디움 속 미생물을 이용하는 경우, 고부가가치의 부탄올, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물을 생성할 수 있는 장점이 있다.

[83]

[84] 상기 유전자 조작 클로스트리디움은 발행논문(문헌 [Microbiology (1996), 142, 2079-2086])에 개시된 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)에서 부티레이트 키나아제 유전자(buk)를 결실시켜 변이주인 PJC4BK 또는 BKM19(KCTC 10558BP)를 제조한다. 이후, 상기 균주에서 포스포트랜스아세틸화효소 유전자(pta)와 아세트산 키나아제 유전자(ackA)가 각각 결실되도록 하여 변이균주들을 제조한다. 이후, 이를 혐기적 조건에서 배양하면 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물을 고농도로 생성되는 것을 확인할 수 있다.

[85]

[86] 본 발명의 미생물은 유가식 또는 연속식 배양 방법으로 배양될 수 있다. 연속식 배양법은 신선한 배지를 일정한 속도로 배양조로 공급하면서 동시에 같은 양의 미생물 발효 배양액을 배출시켜 배양조 내의 배양액을 항상 일정하게 유지하면서 발효하는 방법이다. 한편, 유가식 배양법은 배지를 간헐적으로 공급하는 배양법으로서 배양액 중의 기질농도를 임의로 제어하는 방법이다.

[87]

[88] 본 발명의 원료 물질은 미생물이 발효 시에 이용하여 생성물을 생산할 수 있는 것이면 되고, 그 종류가 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 본 발명의 원료 물질은 바이오매스, 당류 또는 지방산 등이 될 수 있다. 상기 바이오매스는 목질, 곡류 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 당류는 단당류, 다당류, 다당류 등이 될 수 있으며, C3~C12로 이루어진 당류일 수 있고, 바이오매스의 가수분해 과정에서 생성되는 다당류를 포함한다. 예컨대, 상기 당류는 글리세롤, 글루코오스, 수크로오스, 자일로오스, 전분, 셀룰로오스 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 지방산은 C2~C24의 지방산일 수 있으며, 아세트산, 부틸산, 프로피온산 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[89]

[90] 본 발명의 생성물은 미생물이 생산한 발효 산물이다. 바람직하게는 본 발명의 생성물은 바이오 연료로, 알코올, 케톤, 에스테르 또는 카르복실산 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것이 아니다. 예컨대, 상기 알코올은 C2~C6의 알코올일 수 있으며, 바람직하게는 C4 이하의 알코올이고, 더욱 바람직하게는 에탄올,

프로판올, 이소프로판올(2-프로판올), 1,2-프로판다이올, 1,3-프로판다이올, 1,3-부탄다이올, 1,4-부탄다이올, 부탄올 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 케톤은 C3~C8 케톤일 수 있으며, 예컨대, 아세토아세테이트, 아세톤 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 에스테르는 C4~C8 에스테르일 수 있으며, 예컨대, 에틸 아세테이트, 에틸 부틸레이트, 부틸 아세테이트, 부틸 부틸레이트 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 카르복실산은 C2~C8 카르복실산일 수 있으며, 예컨대, 아세트산, 부틸산, 프로피온산 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 본 발명의 생성물은 부탄올, 이소프로판올, 에탄올 또는 아세톤이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[91]

[92] 본 발명의 흡착제(112)는 그것이 포함된 칼럼의 용량, 즉 부피 대비 0.1% 내지 99%의 부피로 충전될 수 있다. 흡착제(112)가 칼럼의 부피 대비 0.1 부피% 미만일 경우에는 흡착제(112)의 양이 부족하여 흡착이 제대로 이루어지지 않을 수 있다. 또한 흡착제(112)가 99 부피% 이상일 경우에는 칼럼 내부에 흡착제(112) 또는 세포의 응집덩어리가 형성되어 흡착이 제대로 이루어지지 않을 수 있다.

[93]

[94] 배양액이 공급되는 칼럼 형태는 슬러리 반응기, 유동 반응기 또는 충전 반응기 형태일 수 있다. 상기 유동(fluidized) 반응기 형태란 흡착제의 양이 적고, 유동성이 높은 형태이며, 상기 슬러리(slurry) 반응기 형태란 흡착제가 배양액 내 현탁된 형태이고, 상기 충전 반응기 형태란 칼럼 내 흡착제가 실질적으로 가득 찬(packed) 형태이다. 이 때, 상기 세 상태의 중간인 형태들은 그것들이 상기 세 형태 중 어느 쪽에 가까운지에 따라 상기 세 형태로 분류될 수 있으며, 칼럼 형태가 상기 세 형태의 중간 형태라고 하여 상기 세 형태 중 어디에도 속하지 않는 것은 아니라 할 것이다. 예컨대, 유동성의 정도에 따라 실질적으로 유동성이 없을 정도로 흡착제가 찼다고 판단되면, 충전 반응기 형태로 분류할 수도 있고, 어느 정도 현탁된다고 판단되면, 슬러리 반응기 형태로 분류할 수도 있다.

[95]

[96] 본 발명의 변환부는 배지 또는 배양액(116)의 흐름을 변경 및 조절하는 것으로, 배지가 공급조(140)로부터 특정 칼럼으로 공급되도록 조절하거나, 특정 칼럼으로부터 배출된 배양액을 다른 칼럼으로 보낼 수 있다. 상기 변환부는 하나 또는 복수 개 사용할 수 있으며, 이는 본 발명의 발효 분리 정제 장치의 설계에 따라 당업자가 적절히 설치할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[97] <실험예 1>

[98] 본 발명의 일 실시예에 사용되는 적절한 흡착제를 선정하기 위하여

미쓰비시(Mitsubishi)사의 다양한 흡착제의 부탄올 흡착 성능을 비교하였다. 2% 부탄올을 포함하는 50mM 인산 버퍼용액 50mL에 여러 종류의 흡착제를 첨가하고 교반하면서 1시간 방치 후, 용액에 잔류하고 있는 부탄올의 농도를 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 흡착제 SP850가 가장 우수한 성능을 가지는 것으로 분석되었으나(도 2), 흡착제의 종류가 SP850에 제한되는 것은 아니다. 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물의 분석은 가스 크로마토그래피(Agilent, USA)를 이용하였으며, 분석 조건은 아래의 표 1과 같다.

[99] 표 1

[Table 1]

인젝터(injector) 온도	320°C
감지기 온도	320°C
인젝터 스플릿 비(injector split ratio)	20/1
주입 부피	0.1μL
오븐 조건	80°C/20분
공기 유량	300mL/분
H ₂ 유량	30mL/분
칼럼: Supelco CarboWAX	

[100] 가스크로마토그래피 분석 조건

[101]

[102] <실험예 2>

[103] 흡착제 SP850에 부탄올이 흡착하는 속도를 확인하기 위해 부탄올의 흡착에 대하여 역학적 분석을 수행하였다. 본 발명의 실시예에서 사용되는 배양에서는 배양액이 칼럼을 통과하는 짧은 시간 동안 부탄올을 흡착해야 하기 때문에 부탄올의 흡착 속도는 매우 중요하다. 먼저 부탄올이 다양한 농도로 포함된 CGM 액체배지 50mL에 3g(건조중량)의 흡착제를 첨가하고 200rpm으로 교반하면서 30초, 1분, 2분, 5분, 10분, 30분, 1시간 단위로 샘플링하여 용액에 잔류하고 있는 부탄올 농도를 가스 크로마토그래피 분석을 통해 확인하였다.

[104] 그 결과, 다양한 농도 범위에서 부탄올이 약 1분 이내에서 흡착되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[105]

[106] <실험예 3>

[107] 유가식 발효에 적절한 흡착제의 양과 발효 조건을 확인하기 위하여 재조합 클로스트리디움 균주를 제조하였다. 미생물 발효에 필요한 2차 알코올 디하이드로게나아제를 함유하는 재조합 클로스트리디움 미생물(C.

acetobutylicum PJC4BK-IPA2)을 제조하였다. 클로스트리디움 균주를 CGM(Chlostridium Growth Media) 액체배지(0.75g/L K₂HPO₄, 0.75g/L KH₂PO₄, 0.7g/L, MgSO₄H₂O, 0.017g/L MnSO₄H₂O, 0.01g/L, FeSO₄H₂O, 2g/L (NH₄)₂SO₄, 1g/L NaCl, 2g/L 아스파라긴(asparagine), 0.004g/L p-아미노 벤조산(p-aminobenzoic acid), 5g/L 효소 추출물(yeast extract), 4.08g/L CH₃COONaH₂O, 및 80g/L 글루코오스) 60mL에서 OD₆₀₀=0.5가 될 때까지 혐기 조건에서 배양하였다. 이후, 배양액을 얼음에서 10분 동안 방치하고, 배양액을 7000G로 10분 동안 4 °C에서 원심 분리한다. 270mM 수크로오스 15mL 및 686mM NaH₂PO₄(pH 7.4임) 0.11mL를 혼합하여 전기천공(electroporation) 완충용액을 제조하였다. 세포 펠렛을 상기와 같이 제조된 전기천공 완충용액으로 3회 씻은 다음, 같은 완충용액 2mL에 현탁하여 형질전환용 세포를 제작하였다. 이렇게 제작된 형질전환용 세포 500l에 2차 알코올 디하이드로게나아제 유전자를 포함하는 0.5~2.0g의 플라스미드를 첨가하여 Bio-Rad사의 Gene pulser II를 이용하여 전기천공(4mm 큐벳, 2.5kV, ∞Ω, 25uF)을 수행하고 항생제가 첨가된 배양액에서 혐기 배양한 후 형질전환 균주를 완성하였다. 형질 전환을 위해 사용한 플라스미드는 모두 전기천공 전에 pAN1 벡터로 형질 전환된 대장균 ER2275에서 메틸화되어 클로스트리디움 균주의 제한 시스템(restriction system)에 작용을 받지 않게 제작된 것들이다.

- [108] 위에서 배양한 클로스트리디움 균주 PJC4BK-IPA2를 CGM/클로람페니콜(Chloramphenicol) 평판 배지에 도말하여 37 °C에서 밤새 혐기 배양하였다. 배양된 콜로니 2개를 CGM/클로람페니콜 배양액 20mL가 포함된 50mL 일회용 튜브에 접종하고, 37 °C에서 정치하며 OD₆₀₀=3이 될 때까지 혐기 배양하였다. 배양된 종균을 다시 8% 글루코오스 100mL를 포함하는 CGM 액체배지에 접종하고 37 °C에서 정치하며 OD₆₀₀=2~3이 될 때까지 혐기 배양하여 CGM 액체배지 1L와 흡착제가 각각 0(0g/L, 건조중량), 200(60g/L), 250(75g/L), 300(90g/L), 350(105g/L), 400mL(120g/L)이 포함된 배양조에 접종하여 배양을 시작하였다. 배양 시작 후 20g/L 이상의 포도당 농도를 계속 유지하면서 3시간 마다 생성되는 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 농도를 분석하였다. 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물의 분석은 가스 크로마토그래피(Agilent, USA)를 이용하였으며, 분석 조건은 표 1의 조건과 동일하게 수행하였다.

[109]

- [110] 당과 유기산의 농도는 배양액을 원심 분리한 후, 상등액을 수득하고, 고압 액체 크로마토그래피(High Pressure Liquid Chromatography; HPLC), 가스 크로마토그래피(gas chromatography), 당분석기를 이용해 확인할 수 있다. HPLC 조건은 이동상으로 0.01N 황산을 함유한 물을 이용하였으며 유속은 0.6mL/min이다. 칼럼은 Aminex87H 및 Aminex87P(Bio-rad, USA)가 이용되었으며, 생성되는 당과 유기산은 반사율(Reflective Index; RI) 검출기를

이용하여 분석하였다.

[111]

[112] 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 위에서 배양된 재조합 및 돌연변이 균주는 흡착제를 포함하는 배양액에서 더 많은 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물을 생성하는 것을 확인할 수 있으며 흡착제의 양이 250mL/L일 때 최적임을 확인할 수 있었다.

[113]

[114] 표 2

[Table 2]

흡착제의 양(mL/L)	생성물 (g/L)					수율(%)	생성속도(g /L/시간)	글루코오스 소비량(g/L)
	아세 톤	에 탄 올	부 탄 올	IPA	합계			
0	0.4	4.1	16.8	3.3	25	35	0.6	70
200	0.6	7.7	23.1	9.6	40	33	1.35	120
250	3.6	8.4	27.6	6.2	46	34	1.2	132
300	2.3	6.2	27.1	7.8	43.3	30	1.09	153
350	7.0	7.2	25.1	5.4	44.7	28	1.06	161
400	6.4	8.53	27.2	7.6	49.7	30	1.10	166

[115]

[116] <실험예 4>

[117] 상기 실험예에서와 동일한 배양액과 배양 방법 및 분석방법을 이용하고, 흡착제는 200mL를 사용하여, 흡착제의 반복 사용 가능성을 시험하였다. 배양 완료 후 흡착제에 흡착된 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올의 생성물을 탈착용 칼럼으로 회수하여 테트라하이드로푸란 용매를 10mL/min의 유량으로 흡착제 부피의 2배에 해당하는 부피로 흡착된 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 또는 에탄올 등의 생성물을 용출하여, 생성물의 총 양을 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하고, 매회 흡착된 생성물의 총 양을 비교하여 흡착제의 성능을 분석하였다.

[118]

[119] 그 결과, 흡착제를 반복하여 재사용하더라도 생성물의 흡착이 양호하게 이루어지는 것을 확인하였다(표 3).

[120]

[121] 표 3

[Table 3]

재사 용회 수	생성물(g/L)					수율(%)	생성속 도(g/L/h)	배양시 간(h)	포도 당소 모량(g/L)
	아세톤	에탄올	부탄올	IPA	합계				
1	2.2	6.6	26.9	6.6	42	36	1.02	41	117
2	1.8	6.4	20.0	7.7	36	35	1.20	30	104
3	0.6	7.7	23.1	9.6	40	33	1.35	30	120
4	1.8	7.1	23.2	7.6	40	33	1.32	30	121
5	1.7	4.7	23.4	6.5	37	34	1.23	30	110
6	1.5	7.3	22.9	9.0	41	37	1.03	40	110
7	1.4	6.9	22.3	8.5	39	33	1.02	39	118
8	3.3	5.6	21.4	5.5	36	32	1.00	36	110
9	1.5	6.7	20.9	7.1	36	32	1.01	36	112
10	2.1	6.3	22.9	6.5	38	36	1.26	36	104

[122]

[123] <실험예 5> 유가식 배양 방법을 통한 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물의 제조

[124] 상기 실험예들에서 최적화된 결과를 바탕으로 유가식 배양 방법을 이용해 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물을 제조하였다. 실험 방법 및 분석은 <실험예 3>과 동일하게 수행하였으나 250mL의 흡착제를 포함하는 CGM 배양액의 농도를 각각 1배와 2배로 하여 배양액에 포함된 글루코오스를 발효하면서 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물이 제조된 양을 비교하였다.

[125]

[126] 그 결과, 표 4에 나타난 것과 같이, 위에서 배양된 재조합 및 돌연변이 균주는 배양과정에서 영양분(nutrient)의 양에 의존하여 더 많은 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등을 제조하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 본 발명의 실시예의 배양방법으로 배양 시 영양분과 탄소원을 동시에 투여할 경우 유가식 배양은 물론 연속배양으로 고농도의 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물을 높은 수율로 생합성 할 수 있다는 것을 의미한다.

[127]

[128] 표 4

[Table 4]

배양조건		생성물 (g/L)					용매 증가율(%)	수율(%)	생성속 도(g/L/h)
흡착 제	CGM 농도	아세 톤	에탄올	부탄올	IPA	합계			
O	2	0.77	9.70	32.4	9.06	52	108	33	1.24
O	1	3.63	8.4	27.6	6.2	46	84	35	1.21
X	1	0.43	4.1	16.8	3.3	25	0	35	0.6

[129] <실험예 6> 유가식 배양 장치의 제작 및 배양방법을 이용한 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물의 제조

[130] 도 1에 나타낸 유가식 배양 장치를 제작하였으며, 이 때, 칼럼은 2 개 포함하도록 하였다. 5L의 부피를 가지는 칼럼의 상부 혹은 하부에 흡착제가 용출돼 유실되는 것을 방지하기 위하여, 약 150 μ m 정도의 필터를 장착한 후에 교반기를 장착하였다. 이후, SP850 흡착제 400ml을 칼럼 2개(각각 제 1 칼럼, 제 2 칼럼)에 충전하였다. 이것을 실리콘 튜브를 이용하여 배양조에 연결하고, 배양액이 칼럼을 순환하도록 펌프를 장착하였다. 칼럼의 투입구 및 배출구에 밸브를 장착하여, 배양 과정에서 칼럼내의 흡착제에 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물이 충분히 흡착된 때 용출제를 흘려 실시간으로 탈착할 수 있도록 하였다. 제 1 칼럼에 생성물이 충분히 흡착된 때, 밸브를 조정하여 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시켰다. 상기 칼럼으로부터 배출되는 배양액 내에는 흡착제에 미처 흡착되지 않은 생성물들도 포함되어 있다. 상기 배양액이 제 2칼럼으로 이동된 제 1 칼럼에서는 내부의 흡착제를 외부로 꺼내지 않은 상태에서 생성물의 탈착이 진행되었다. 제 1 칼럼에서 탈착이 진행되는 동안, 이동된 배양액에 공급된 제 2 칼럼에서는 연속적으로 공급조(140)로부터 당과 영양분을 공급되고, 미생물에 의하여 생성물의 생산 및 상기 생산된 생성물의 흡착이 진행되었다.

[131] 그 후, 마찬가지로 제 2 칼럼에 생성물이 충분히 흡착된 때, 밸브를 조정하여 배양액을 제 1 칼럼으로 이동하였다. 상기 과정을 반복함으로써 제 1 칼럼 및 제 2 칼럼의 흡착제를 재사용할 수 있었다. 배양액의 순환 방향은 칼럼의 위쪽에서 아래로 순환하였으나 그 방향은 문제가 되지 않는다.

[132]

[133] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 발효 분리 정제 장치에서 유가식 배양장치를 이용하여 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성 능력을 가지는 C. 아세토부틸리쿰(*C. acetobutylicum*) PJC4BK 종균 균주를 배양하였다. 먼저 3.2L의 CGM 액체배지가 포함된 반응기에 밤새 CGM 액체배지에서 혐기 배양한 종균 800mL를 접종하면서 배양을 시작하였다. 본 발명의 실험예에서는 일반 배치(batch) 발효로 종균을 배양하였으나, 더 높은 세포 농도로 고농도의 부탄올,

아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물을 제조하기 위해서는 세포 고정화 형태로 배양할 수 있을 것이다.

- [134] 배양이 시작되고 제 1칼럼의 흡착제에 생성물이 충분히 흡착된 때 배양액과 생성물을 펌프를 통해 150mL/min의 유속으로 제 2 칼럼으로 이동시켰다. 제 1 칼럼의 배양액이 필터를 통과될 때 흡착제 SP850이 배양액에 현탁되어 슬러리상을 형성하면서 배양액의 흐름이 세포의 응집 덩어리에 의해 막히지 않고 제 1 칼럼을 통과하는 것을 확인하였다. 또한, 제 1 칼럼의 배양액 시료를 약 2시간마다 채취하여 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 농도를 가스 크로마토그래피를 통해 분석하였다. 배양 과정 동안 20% 글루코오스를 포함하는 CGM 액체배지를 배양조에 공급함으로써 배양액의 당 농도를 20g/L로 유지하였고, 배양액 부피는 4L를 유지하기 위해 일부의 배양액과 생성물은 지속적으로 제거하였다. 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물의 양은 가스 크로마토그래피를 통해 확인하였다.

[135]

- [136] 그 결과, 도 4 내지 도 6에서 보는 바와 같이 약 53시간 안정적으로 유가식 배양을 수행하였다(ABE: 아세톤, 부탄올 및 에탄올). 제 1 칼럼에서 생성물이 흡착제에 흡착되다가 그것이 제 1 칼럼에 충분히 흡착되면, 배양액을 제 2칼럼으로 이동시켜 공급하고, 제 2칼럼의 흡착제에 생성물이 연속적으로 생산, 흡착되어 배양액에서는 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물이 항상 낮은 농도로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 칼럼 내에서 생성물이 흡착제에 흡착되어 낮은 농도로 유지되기 때문에, 미생물이 부탄올의 독성에 영향을 받지 않아 일정한 균체농도(OD)를 유지하면서 안정적으로 생성물을 제조할 수 있다는 것이 확인되었다.

- [137] 제 1 칼럼에 흡착된 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물을 130 °C의 수증기로 탈착하였다. 그 결과, 부탄올, 아세톤, 이소프로판올 및 에탄올 등의 생성물이 우수하게 흡착 및 탈착되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 20회 이상 칼럼의 교체를 반복하여도, 칼럼의 흡착 성능이 크게 감소되지 않는 것을 확인할 수 있었다(표 5 및 표 6).

- [138] 표 5

[Table 5]

	생성물 (g)				수율 (%)	생성속도 (g/L/h)	배양시간 (h)	글루코오스 소비량(g)
	아세톤	에탄올	부탄올	합계				
최종 배양액	9.8	20.3	42.4	72.3	31	2.06	53	1478
탈착액	27.9	20.2	292.5	340.7				
제거된 배양액	7.6	9.9	27.3	44.9				
합계	45.3	50.5	362.3	458.0				

[139] 표 6

[Table 6]

칼럼 교체	사용 칼럼	배양 시간	OD	부피	배양액내 농도 (g/L)				탈착(g)				배출용매량(g)				누적총용매량(g)				
					포도당	Acetone	EtOH	BuOH	ABE	Acetone	EtOH	BuOH	ABE	Acetone	EtOH	BuOH	ABE	Acetone	EtOH	BuOH	ABE
	1	0	1.2	40	77.6	0.0	0.0	0.0	0.1									0.1	0.1	0.0	0.2
	1	13	9.6	39	42.4	0.8	0.7	5.8	7.3									3.4	2.7	4.50	51.1
	1	15	14.8	39	34.4	1.0	0.8	7.8	9.6									4.6	3.1	5.34	61.1
1	1	16	15.1	39	30.6	1.2	0.6	8.7	10.5	0.7	0.2	17.6	18.5	0.0	0.0	0.3	0.4	5.4	3.0	5.08	59.2
2	2	17	13.1	42	31.4	1.3	0.9	7.2	9.3	0.9	0.3	16.2	17.4	0.0	0.0	0.1	0.1	7.0	4.1	6.14	72.6
3	1	19	18.1	42	17.8	1.7	1.0	6.7	9.4	1.1	0.3	15.0	16.4	0.0	0.0	0.1	0.2	9.9	5.3	7.60	91.1
4	2	21	13.1	43	20.4	2.0	1.2	6.9	10.1	1.4	0.4	15.8	17.6	0.4	0.2	1.3	1.9	13.5	6.8	9.49	115.1
5	1	23	18.5	43	21.6	2.4	1.4	7.4	11.2	1.4	0.5	15.7	17.6	0.6	0.4	1.6	2.6	17.0	8.5	11.4.9	140.3
6	2	25	20.2	43	22.0	2.4	1.5	7.8	11.8	1.7	0.6	17.7	19.9	0.6	0.4	1.6	2.7	19.5	10.2	13.5.7	165.4
7	1	27	22.8	43	20.6	2.4	1.8	8.2	12.4	1.5	0.5	16.7	18.8	0.7	0.5	2.3	3.6	22.0	12.2	15.6.8	191.0
8	2	28	22.3	42	20.6	2.3	1.8	7.3	11.4	1.6	0.8	15.6	17.9	0.2	0.2	0.8	1.2	22.4	13.2	16.6.5	202.1
9	1	30	23.9	43	20.8	2.2	2.1	7.8	12.2	1.3	0.7	13.1	15.1	0.5	0.5	1.7	2.7	24.5	15.7	18.5.0	225.3
10	2	32	26.1	43	22.0	2.1	2.2	8.1	12.5	1.4	0.8	15.0	17.2	0.5	0.5	1.8	2.7	26.2	17.3	20.2.5	246.0
11	1	33	23.1	42	20.6	2.0	2.2	7.1	11.3	1.3	0.9	13.3	15.5	0.2	0.3	0.8	1.3	26.7	18.4	21.1.2	256.4
12	2	35	19.5	43	21.6	2.4	3.0	9.4	14.8	1.3	0.9	14.2	16.5	0.6	0.7	2.2	3.4	31.2	24.4	24.1.5	297.1
13	1	36	18.0	42	22.2	2.0	2.8	7.6	12.4	2.1	1.9	13.0	17.0	0.3	0.4	1.0	1.6	30.8	24.3	24.3.5	298.6
14	2	37	18.0	42	22.2	1.9	2.9	7.1	11.9	1.8	1.9	12.1	15.8	0.3	0.4	0.8	1.5	32.5	27.2	25.2.8	312.5
15	1	39	19.1	43	21.4	2.0	3.4	8.0	13.4	1.9	2.1	13.1	17.1	0.7	1.1	2.8	4.6	36.5	33.8	27.7.7	348.0
16	2	41	21.3	43	26.0	2.0	3.6	7.8	13.3	1.3	1.3	16.7	19.3	0.2	0.4	0.8	1.4	37.3	35.7	29.3.1	366.0
17	1	43	19.1	43	28.8	1.7	3.4	5.8	10.9	1.3	1.4	14.0	16.7	0.6	1.2	2.3	4.0	38.5	38.6	30.4.9	382.0
18	2	45	18.6	43	30.8	1.8	3.9	5.8	11.5	1.2	1.3	13.1	15.6	0.3	0.7	1.2	2.3	39.8	41.8	31.7.4	399.0
19	1	47	18.1	43	38.8	1.6	3.7	6.2	11.6	1.5	1.9	12.7	16.1	0.3	0.8	1.2	2.3	41.0	43.7	33.1.3	416.0
20	2	53	22.0	48	39.0	2.0	4.2	8.9	15.1	1.2	1.3	12.1	14.7	0.6	1.2	2.6	4.4	45.3	50.5	36.2.3	458.0

[140] <부속의 설명>

- [141] 200: 발효 분리 정제 장치
- [142] 180: 제 1 칼럼 190: 제 2 칼럼
- [143] 112: 흡착제 114: 필터
- [144] 116: 배양액 118: 교반기
- [145] 140: 공급조 150: 저장조
- [146] 210: 제 1 변환부 212: 제 2 변환부
- [147] 214: 제 3 변환부 216: 제 4 변환부
- [148] 222: 제 5 변환부 224: 제 6 변환부
- [149] 226: 제 7 변환부
- [150]

청구범위

- [청구항 1] 배지를 칼럼에 공급하는 공급조;
미생물이 배양되어 생성물을 생산하고, 흡착제가 충전된 2개 이상의 칼럼; 및
배지가 공급되는 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의 배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 상기 제 1 칼럼으로의 배지의 공급을 중단하고, 제 2 칼럼으로 배지가 공급되도록 배지의 흐름을 변경하는 하나 이상의 변환부를 포함하는, 생성물의 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 생성물이 충분히 흡착된 경우는, 흡착제에 대한 생성물의 흡착률이 낮아지는 경우, 칼럼 내 미생물의 생장이 생성물 농도 증가에 의하여 저해되는 경우 또는 미생물의 생성물 생산성이 낮아지는 경우인 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 생성물은 알코올, 케톤, 에스테르 또는 카르복실산인 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 배지는 원료 물질을 포함하며, 상기 원료 물질은 지방산 또는 당류인 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 배양액은 칼럼들 사이를 순환하는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
배지가 공급되는 제 2 칼럼에서 발효가 진행되는 동안 배지의 공급이 중단된 제 1 칼럼에서는 탈착이 진행되는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 탈착은 열 또는 용출제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서,
상기 탈착은 흡착제에 흡착된 생성물에 열을 가하여 기화시켜 수행되는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 9] 제 6항에 있어서,
상기 탈착은 유기 용매, 산성 수용액, 또는 염기성 수용액인 용출제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.

- [청구항 10] 제 1항에 있어서,
상기 흡착제는 상기 칼럼의 부피 대비 0.1% 내지 99%의 부피로
충진되는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 11] 제 1항에 있어서,
배양액이 공급되는 칼럼의 형태는 슬러리 반응기, 유동 반응기
또는 충전 반응기 형태인 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리
정제 장치.
- [청구항 12] 제 1항에 있어서,
흡착제로부터 탈착되는 생성물을 저장하는 저장조를 추가로
포함하는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 13] 제 1항에 있어서,
상기 칼럼 내에서 흡착제 및 생성물을 교반하는 교반기를 추가로
포함하는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 14] 제 1항에 있어서,
흡착제가 용출되어 유실되는 것을 방지하는 필터를 추가로
포함하는 것을 특징으로 하는 연속적 발효 분리 정제 장치.
- [청구항 15] 흡착제가 충전된 제 1 칼럼으로 배지를 공급하는 단계;
상기 제 1 칼럼에서 미생물을 배양하여 생성물을 생산하는 단계; 및
상기 제 1 칼럼에서 생성물이 충분히 흡착된 경우, 제 1 칼럼의
배양액을 제 2 칼럼으로 이동시키고, 또한 제 1 칼럼으로의 배지의
공급을 중단하고 흡착제가 충전된 제 2 칼럼으로 배지를 공급하는
단계를 포함하는,
생성물의 연속적인 발효 분리 정제 방법.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,
상기 생성물이 충분히 흡착된 경우는, 흡착제에 대한 생성물의
흡착률이 낮아지는 경우, 칼럼 내 미생물의 생장이 생성물 농도
증가에 의하여 저해되는 경우 또는 미생물의 생성물 생산성이
낮아지는 경우인 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 배지는 원료 물질을 포함하며, 상기 원료 물질은 지방산 또는
당류인 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.
- [청구항 18] 제 15항에 있어서,
상기 생성물은 알코올, 케톤, 에스테르 또는 카르복실산인 것을
특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.
- [청구항 19] 제 15항에 있어서,
상기 배양액은 칼럼들 사이를 순환하는 것을 특징으로 하는 발효
분리 정제 방법.
- [청구항 20] 제 15항에 있어서,

배지가 공급되는 제 2 칼럼에서 발효가 진행되는 동안 배지의 공급이 중단된 제 1 칼럼의 흡착제로부터 생성물을 탈착시켜 생성물을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.

[청구항 21]

제 20항에 있어서,

상기 탈착은 열 또는 용출제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.

[청구항 22]

제 20항에 있어서,

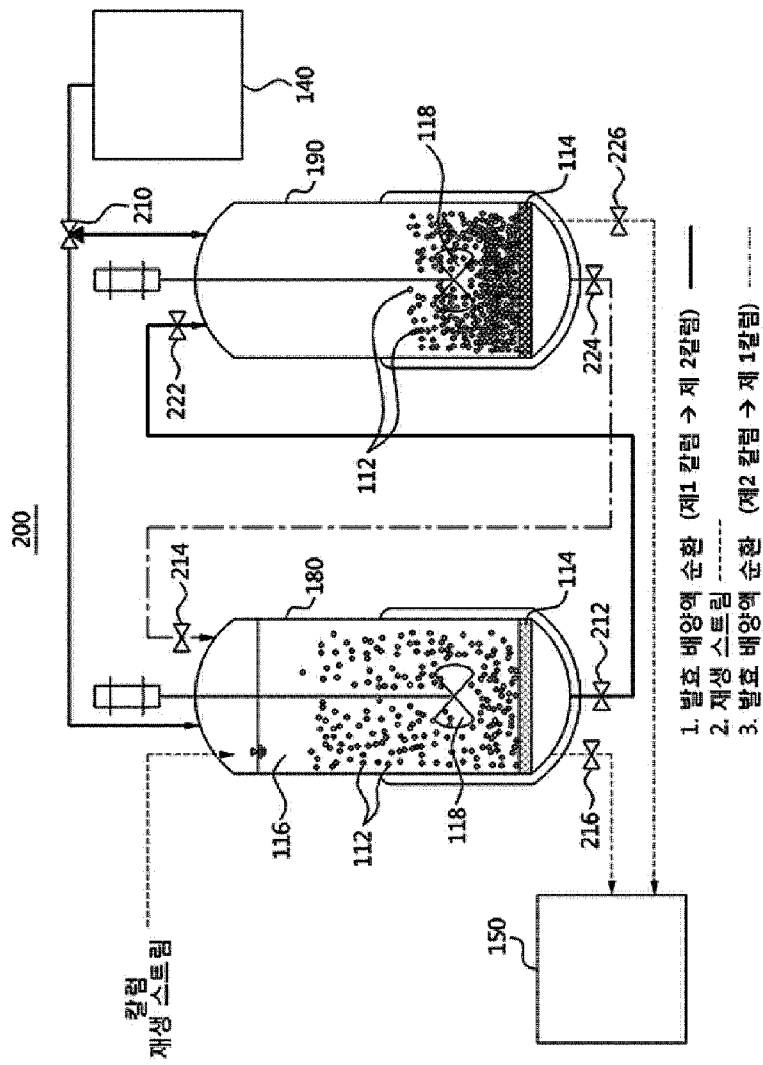
상기 탈착은 흡착제에 흡착된 생성물에 열을 가하여 기화시켜 수행되는 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.

[청구항 23]

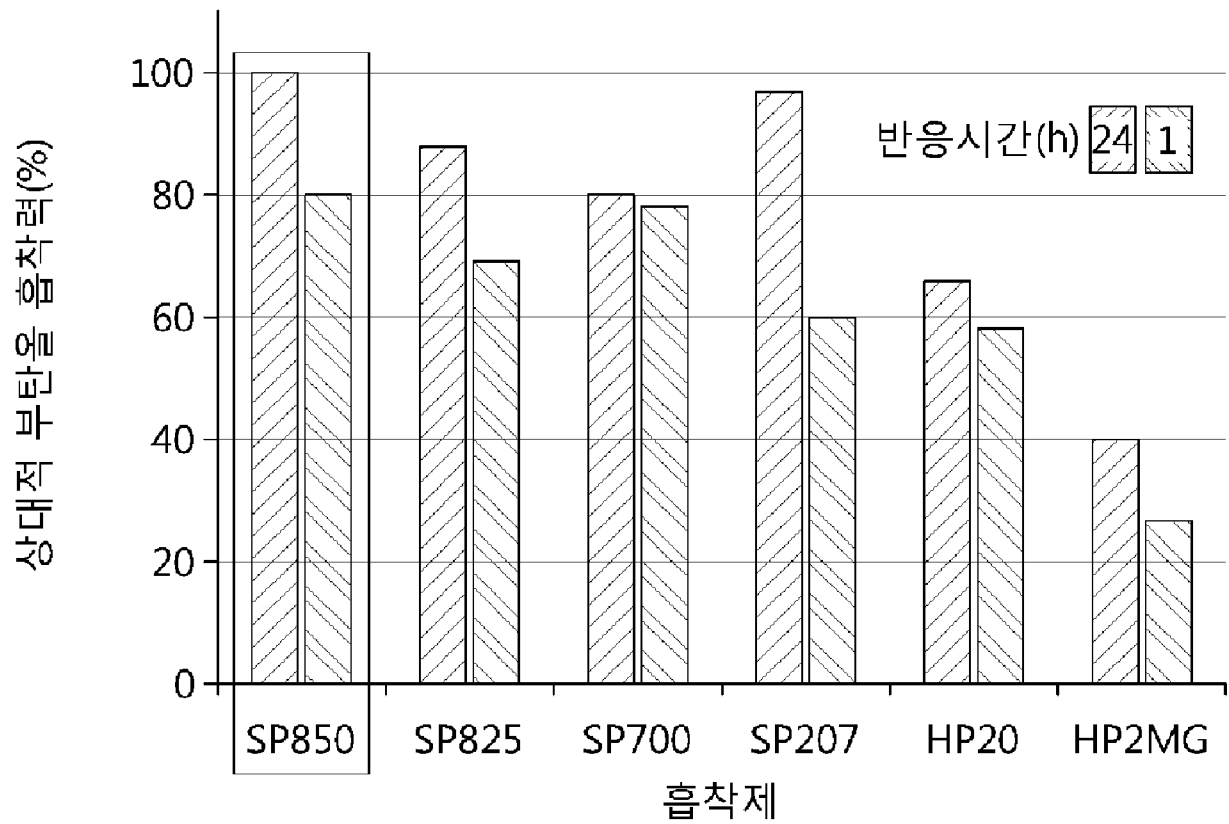
제 20항에 있어서,

상기 탈착은 유기 용매, 산성 수용액, 또는 염기성 수용액인 용출제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 발효 분리 정제 방법.

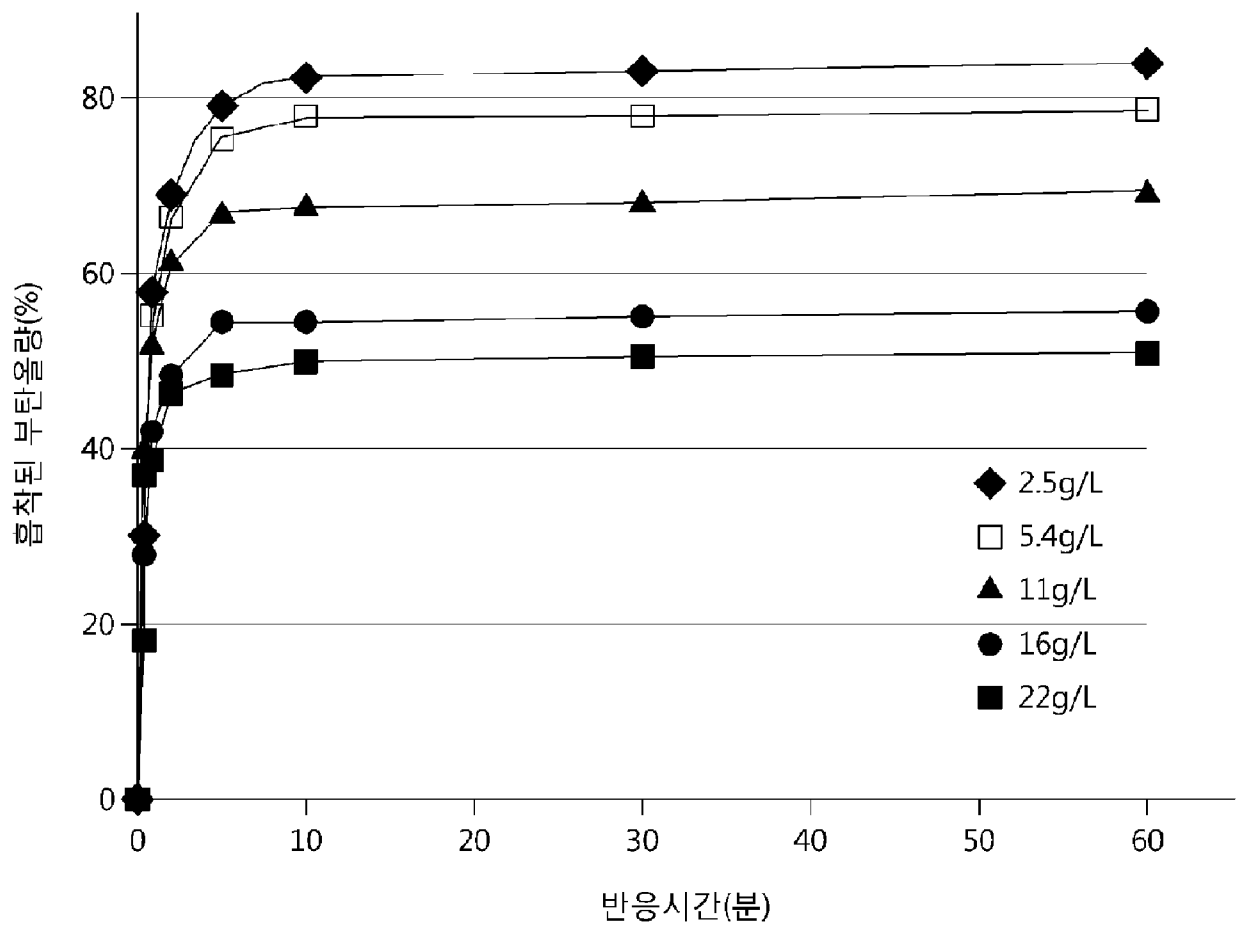
[Fig. 1]



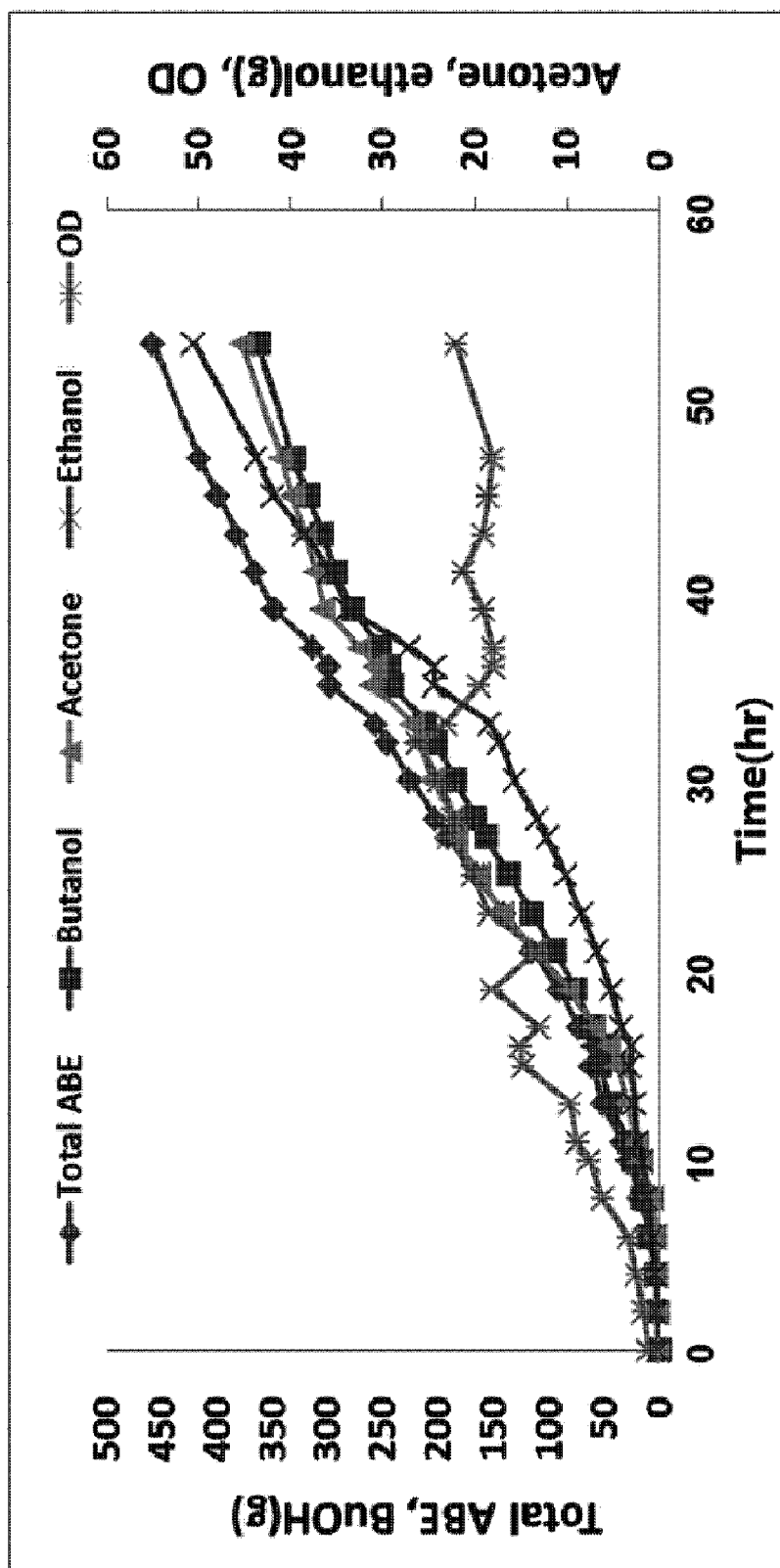
[Fig. 2]



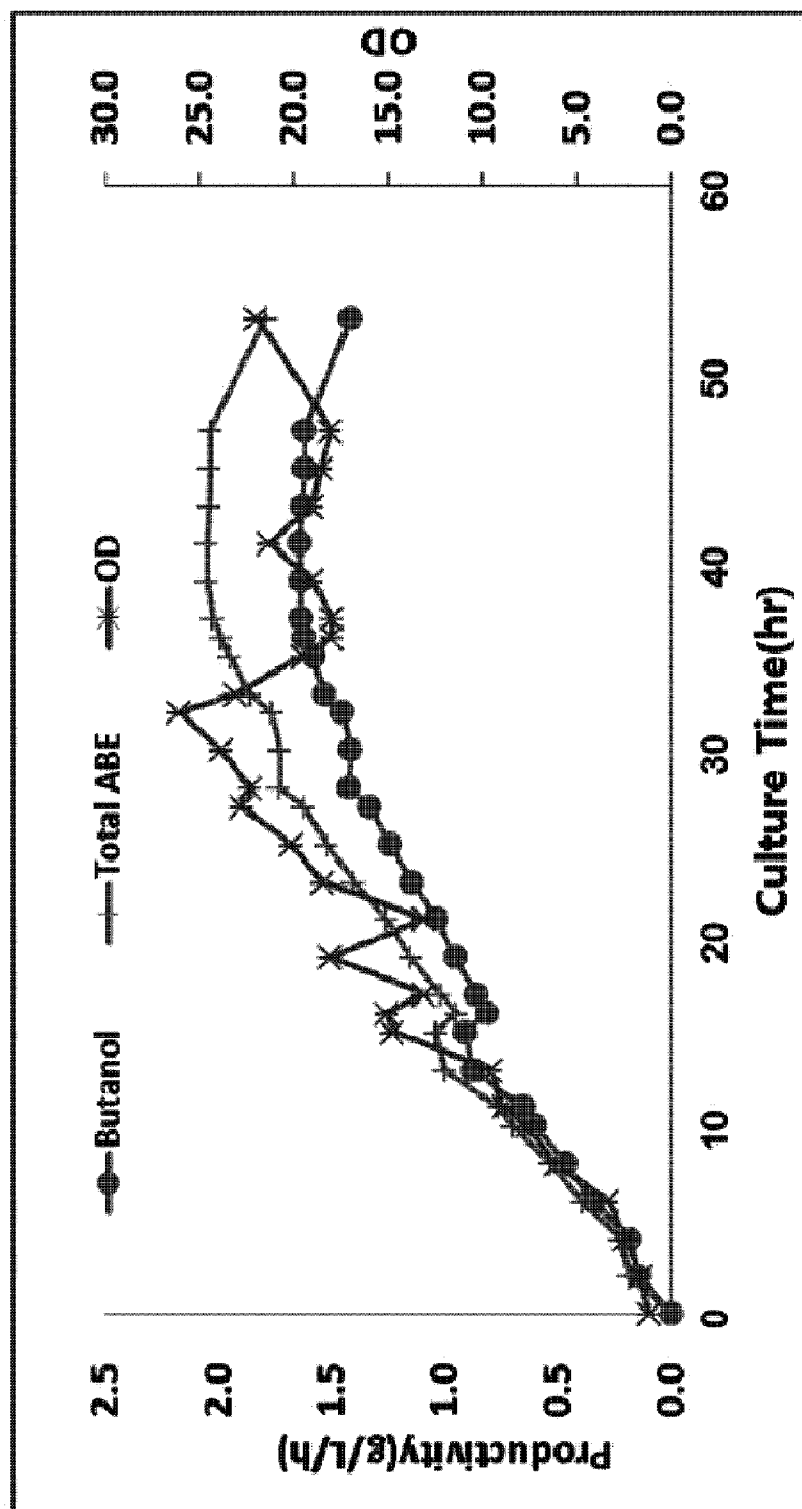
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

