



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월09일
(11) 등록번호 10-2704919
(24) 등록일자 2024년09월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 5/02 (2006.01) C10L 3/08 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 5/023 (2013.01)
C10L 3/08 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7014033
- (22) 출원일자(국제) 2019년10월28일
심사청구일자 2022년01월18일
- (85) 번역문제출일자 2021년05월10일
- (65) 공개번호 10-2021-0086643
- (43) 공개일자 2021년07월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/079433
- (87) 국제공개번호 WO 2020/089181
국제공개일자 2020년05월07일
- (30) 우선권주장
10 2018 126 953.6 2018년10월29일 독일(DE)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020150064018 A*
US20140377830 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
엘렉트로해아 게엠베하
독일 82152 플라넥 켐멜바이스슈트라쎄 3
- (72) 발명자
퐁텐 돌린
덴마크 8830 텔레 솔리스트페 3씨
회를 마누엘
독일 81541 뮌헨 아우어펠트슈트라쎄 22
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

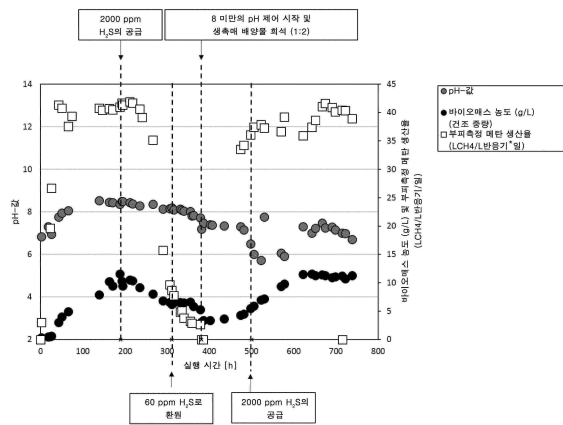
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 메탄 농축 가스 조성물의 생산을 위한 산업용 CO2 함유 가스의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 메탄 농축 가스 조성물의 생산을 위한 CO₂ 함유 배출물 또는 폐가스를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

(72) 발명자

페식 알렉산드라

독일 85540 뮌헨 야그드펠트링 60

하펜브라들 도리스

독일 82049 플라흐 기스탈쉬트라쎄 147

타파레스 실바 카렌

독일 80804 뮌헨 아이제나허 쉬트라쎄 5

아렌스 테레사

독일 81241 뮌헨 인스티튜트쉬트라쎄 19

명세서

청구범위

청구항 1

생물반응기에서 CO₂ 함유 가스로부터 메탄을 생산하는 방법으로서,

- a. 메탄생성 미생물을 연속 공정에서 배양하는 단계;
- b. H₂S 및 O₂ 중의 적어도 하나를 포함하는 CO₂ 함유 가스를 제공하는 단계;
- c. 메탄생성 미생물과 추가 H₂의 배양물을 1:0.6 내지 1:5의 CO₂:H₂의 화학량론적 비로 공급하는 단계;
- d. 산 및 염기 중의 적어도 하나를 첨가함으로써 pH 7.1 내지 10의 주어진 값에서 pH 값을 유지하도록 pH 값을 지속적으로 제어하고 조절하는 단계;
- e. 메탄 또는 메탄 농축 가스 조성물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물을 배양하는 단계가 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법:

- i. 상기 메탄생성 미생물을 질소원 및 염을 제공하는 액체 배양 배지에서 유지하는 단계;
- ii. 배양 조건을 혐기성 또는 조건적으로 혐기성으로 유지하는 단계;
- iii. 임의적으로 배양물을 교반하는 단계;
- iv. 상기 배양물로부터 지속적으로 대사수(metabolic water)를 제거하는 단계; 및
- v. 온도를 대기압에서 32℃ 내지 90℃ 또는 32℃ 내지 85℃ 범위에서 유지하는 단계.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물이 Na₂S 형태의 추가로 첨가된 황화물, 및 암모늄 중의 적어도 하나의 존재 하에 배양되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물이 적어도 14 및 최대 60이고 적어도 2.5 g/L 및 최대 20 g/L의 배양물에서 미생물의 건조 중량에 상응하는 OD₆₁₀으로 측정된 배양물에서 미생물의 최대 밀도까지 배양되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물 배양물이 산 및 염기 중의 적어도 하나를 첨가함으로써 pH 9 이하, 또는 pH 8 이하의 주어진 값에서 유지하도록 지속적으로 안정화 또는 조절되거나; 또는

상기 메탄생성 미생물 배양물이, NaOH 또는 NH₄OH 및 HCl 또는 H₂SO₄를 상기 메탄생성 미생물 배양물에 투입함으로써 상기 주어진 pH 값을 유지하도록 지속적으로 안정화 또는 조절되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 적어도 하나의 메탄생성 미생물이 메타노박테리움, 메타노브레비박터, 메타노씨모박터, 메타노코쿠스, 메타노사르시나, 메타노피루스 또는 이의 혼합물을 포함하는 고세균 또는 원시세균의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물이 혐기성 및 산소 중의 적어도 하나를 허용하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 단계 i의 액체 배양 배지에서 적당히 염분 환경이며, 여기서 염화물 음이온의 농도는 12 mmol/L 내지 300 mmol/L 범위이거나; 또는 NaCl의 농도가 0.4 g/L 내지 12 g/L 범위인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메탄생성 미생물이 자연적으로 선택되거나 또는 선천적으로 적응된 미생물, 적응된 호염성 미생물 및 유전적으로 조작된 미생물의 군으로부터 선택되며, 모두 적당한 염분 환경에서 살고 번식할 수 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CO₂ 함유 가스가 메탄 생산을 위한 탄소원이고 CO₂ 농축 배출물 및 폐가스 배출물 중의 적어도 하나로부터 유도되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CO₂ 함유 가스가 적어도 20% CO₂를 포함하거나 또는 상기 CO₂ 함유 가스가 최대 5.000 mg/L의 H₂S를 포함하거나 또는 상기 CO₂ 함유 가스가 5% 이하의 O₂를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단계 a 내지 단계 e의 전체 단계 또는 적어도 하나의 단계가 최대 16 또는 최대 420 bar의 대기압 조건 또는 가압 조건 하에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 수집된 메탄이 고체 오염물, 작은 고체 입자, 현탁액 중 고체 오염물, 그리스, 또는 가스 오염물, 휘발성 유기 화합물(VOC), 및 다른 미량 오염물이 없는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

생물반응기에서 CO₂ 또는 CO₂ 함유 가스로부터 메탄을 생산하는 방법으로서,

- a. 메탄 생성 미생물의 빠른 복제를 유도하기 위해 pH 5.5 내지 7.0 범위의 제1 주어진 pH 값에서 CO₂ 및 H₂로 메탄생성 미생물을 배양하는 단계, 이어서
- b. 단계 a의 메탄생산에 비해 메탄 생산을 증가시키기 위해 pH 7.1 내지 10 범위의 제2 주어진 pH 값에서 상기 미생물을 연속 배양하는 단계;
- c. 상기 제1 주어진 pH 및 상기 제2 주어진 pH의 값이 각각 상기 단계 a 및 단계 b에서 특정된 pH 값이 되도록 pH 값을 지속적으로 제어하고 조절하는 단계;
- d. 메탄 또는 메탄 농축 가스 조성물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이산화탄소-함유 배출물 및/또는 폐가스를 사용하여 생물기원 메탄을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환경을 위해 적은 비용으로 효율적인 에너지 공급 해결책을 추구하는 것은 유럽 위원회, 미국 기업 그룹 및 환경 및 정부 협회, 후쿠시마의 비극적인 사건의 여파로 전력 공급용 핵 에너지를 대체하려 시도하는 일본에서 7 개 신흥 경제국까지 전 세계에서 기후 행동 프로그램에 의해 제시된 도전과제이며, 따라서 기후 변화에 대응하고 궁극적으로 지구의 온도를 안정화시키기 위해 회원국이 전 세계적으로 착수한 노력이다. 궁극적인 목표는 저탄소 현대 경제로의 전환을 향한 기후 변화에 대응하면서 지속가능하고 재생가능한 에너지에 대해 점차 증가하는 필요성을 충족하는 것이다.

[0003] 화석 연료에 대한 필요성을 효과적으로 줄이기 위한 법적 및 기술적 조치를 가능하게 하는 개발은 또한 회원국들이 공동으로 동의한 2020년, 2030년 및 궁극적으로 2050년 에너지 및 기후 목표를 준수하고 각각의 체계 및 정책 내에서 더 넓은 에너지 연합 목적을 준수하는 데 도움이 될 것이다. 그런 다음 에너지 수요를 효과적으로 해결하기 위해 기존 에너지원 중에서 어떤 에너지원을 발견하든 조작하든 선택하든, 이 에너지원은 또한 환경에 미치는 영향을 낮추기 위한 요건을 완전히 해결해야 함이 분명하다.

[0004] 메탄은 화석 연료 중에서 탄소 원자 당 가장 높은 에너지 밀도를 가지며 에너지 전환 가능성은 산소의 존재 하에 연소에 의해 또는 전기를 생산하기 위해 연료 전지를 사용하여 직접 수득된 임의의 다른 천연 가스보다 훨씬 더 크다. 화석 연료로서 메탄은 심해 또는 지각의 깊은 곳에서 다른 가스 및 기질 중에서 이산화탄소를 전환하는 메탄생성 미생물의 대사 활성으로부터 유도된다: 지질학적 누출 및 자연 활동에서 비롯한 이러한 유형의 메탄은 천연 가스의 대부분을 구성하지만; 그럼에도 불구하고 전 세계 화석 연료 메탄 배출의 최근 상향 개정에 따르면 대기에 존재하는 메탄의 비교적 많은 부분이 인류발생의 파생물이며 농업, 축산업, 매립지 및 폐기물 분해, 뿐만 아니라 채탄업 또는 석유 시추, 및 화석 연료 산업에 의해 운영되는 일반적인 화석 연료 채굴, 운송, 정제, 및 연소의 결과로서 대기로 유리된다.

[0005] 메탄은 20 년 동안 물 기준으로 이산화탄소보다 38 배 이상 축열/차폐할 수 있다(McAnulty *et al.*, 2017).

[0006] 축열 능력으로 인해, 메탄은 온실 효과에 크게 기여한다. 연료로서 메탄을 사용하는 것은 에너지 수율 면에서 매우 편리하고 메탄의 연소는 저탄소 발자국(소량의 대부분 재사용가능한 CO₂)을 생성하여, 화석 연료 중에서 가장 깨끗하게 되며; 특히, 바이오메탄의 경우 연소에 의해 생산되는 배출된 이산화탄소의 양은 반복하는 거의 자급 자족 주기에서 상기 언급된 대사 공정을 공급하기에 충분하지만; 바이오메탄이 개발 현장에서 생산될 수 있는 동안, 연료로서 편리하게 사용될 수 있는 천연 가스에서 비롯된 메탄은 추가 정제 공정을 겪은 다음 많은 자원을 소비하여 운송되어야 한다.

[0007] 따라서, 천연 가스로서 메탄은 지속가능하고 재생가능한 에너지원을 구성하고 이미 오늘날 점점 더 석탄 및 다른 화석 연료를 대체한다. 그러나, 생산, 저장 및 운송의 환경적 영향 및 실행가능성을 극적으로 줄이는 측면 탐구는 아직 완료되지 않았다.

[0008] 대규모 메탄 개발의 주요 기술적 단점 중 하나는 예를 들어, 천연 가스 메탄에 남아있는 높은 수준의 오염물, 및 따라서 많은 비용이 드는 정제 절차의 필요성과 관련된다. 또한, 메탄에 대한 적절한 저장소에 대한 필요성, 더 나은 가압된 격납 시스템에 대한 관련 요구, 주로 천연 가스에서 황 농축된 오염물에서 비롯된 다량의 가스 축적으로 인한 냄새, 운송 및 저장 동안 폭발, 누출 위험, 및 최첨단 생산의 확장성에 대한 상대적 비효율성과 같은 여전히 해결되지 않은 문제의 긴 목록이 모두 현재 메탄의 개발을 방해하고 지연시킨다.

[0009] 그럼에도 불구하고, 메탄의 에너지 생성 가능성은 세계 시작에서 점점 더 관련성이 높아지고 있다.

[0010] 따라서 최근 연구는 이산화탄소 및 수소로부터 매우 효율적으로 메탄을 생산할 수 있는 메탄생성균, 예를 들어 고세균으로 메탄을 생산하는 방법을 개발하고 개선하는 데 초점을 맞추었다. 현재, 최신 기술은 메탄생성 미생물을 이용하여 생산된 메탄으로 가스 조성물을 농축하려는 여러 시도를 기재한다.

[0011] 이러한 유형의 메탄 생산은 적합한 반응기/셀에서 발생하며 임의의 부족한 인프라 설정에서 전 세계적으로 용이하게 설정될 수 있으며 일반적으로 대기에 존재하는 원료를 필요로 한다. 가장 중요하게는, 일반적으로 메탄 및 소량의 오염물로 농축된 가스 조성물을 산출하며, 여기서 이러한 조성물은 에너지 공급 시스템에 공급될 준비가 될 때까지 더 적은 노력을 필요로 할 것으로 예상된다. 더욱이, 이산화탄소 및 물만을 생산하는 에너지로의 전환은 화석 연료 중에서 가장 깨끗하다.

- [0012] 일부 시도는 예를 들어 WO 2014016815 A2에 기재된 바 있으며 여기서 수성 성장 기질에 제공되고 고온에서 배양된 혐기성 고세균의 배양을 통한 메탄 생산은 가스 조성물 중 약 20 Vol.%의 메탄 생성을 초래한다. 일부 고도로 특수화된 혐기성 메탄생성균은 최적화된 고압 및 고온 하에 이러한 가스 조성물 중 최대 30 Vol.%의 메탄을 전달한다. 이 공정은 메탄생성균에 대한 가압 수성 성장 기질 및 공급원으로서 이산화탄소를 함유하는 고도로 가압된 유체의 이용을 특징으로 한다. 상대적으로 낮은 메탄 생산물 이외에, 이 공정은 특수화된 메탄생성 고세균의 배양물을 가열 및/또는 가압하는 데 필요한 높은 에너지 유입으로 인해 비용 효과적이지 않다. 추가로, 가압 용기의 활용은 방법의 확장성 및 대규모 확산에 심각한 장애를 제기한다.
 - [0013] US 2011/0165667 A1은 메탄 생산을 위한 혐기성 고세균 중 하나 이상, 또는 심지어 혼합물을 함유하는 수성 현탁액의 추가 사용을 기재한다. 여기에 기재된 공정은 순수한 H₂ 가스 및 순수한 CO₂ 가스 공급원을 가스 조성물을 포함하는 메탄으로 변환하는 것을 특징으로 한다는 점에 유의해야 한다. 이 개시내용에 따르면, 임의의 화석 연료 또는 다른 재생가능한 에너지 연료 시설에서 비롯된 전력은 수소를 생산하도록 전환되며, 이후에 특수화된 메탄생성 고세균의 배양물을 공급하는 데 사용되어 최적화된 배양 조건 하에 CO₂ 가스에서 메탄을 생산한다. 개시내용은 배양 조건이 변경되고 공기 또는 다른 가스 성분이 배양물에 공급되는 경우, 본질적으로 혐기성인 전형적인 메탄생성 고세균이 침묵하고 메탄 생산을 중단한다는 것을 추가로 상술한다. 특히, 산소는 수소 흡수 및 메탄생성 둘 다에 수반되는 효소를 억제하는 것으로 알려져 있어서, 순 미생물의 메탄 생산, 이에 따른 기술의 효율성을 줄이고, 회복 시간을 필요하게 만들며, 여기서 고농도의 오염물에 의해 활성은 완전히 억제되지 않는다. 일산화탄소의 존재에 대해 유사한 효과가 기재되어 있다. 결과적으로, 산소 및 일산화탄소가 선별되었고 메탄 생산을 침묵하는 효과를 예시하고 설명하기 위한 실험 설정이 기재되었다.
 - [0014] 메탄생성 고세균이 이러한 가스 성분에 대한 노출에서 살아남고 결국 메탄 생산을 회복한다는 것을 나타낼 수 있지만, 이러한 결과는 표준 가스 분포 시설망에 공급하기 위한 메탄 생산의 높은 표준을 충족하기 위해 H₂ 및 CO₂만을 함유하는 공급 가스의 매우 순수한 공급원이 필요하거나 또는 새로운 공학 해결책이 가스 시설망 운영자의 국가 및/또는 지역 요건을 준수하는 가스 조성물에서 임계 값을 초과하는 메탄 함량 예를 들어 96% 순수 메탄을 농축하는 것을 찾아야 한다는 것을 예시한다.
 - [0015] 이와 관련한 추가 개발로서, US 2014/0377830 A1은 비엄격한 무산소 환경에서 특수화된 메탄생성 고세균과 관련하여 이전에 알려진 공정의 전개, 및 이에 따라 산업 공정에서 CO₂ 함유 배출물과 같은 공급 가스 대체 공급원으로 사용하게 하기 위한 메탄생성 공정을 조정하려는 시도를 기재한다. 이를 위해, 균주는 예를 들어, 대기압에서 메탄을 효과적으로 생산하도록 적응되었고, 추가로 생산 공정은 균주가 상이한 농도에서 산소, 황화수소 및 일산화탄소와 같은 오염물을 견디는 것을 지지하기 위해 조정되었다. 이러한 적합한 배양과 함께 US 2014/0377830은 메탄생성이 회복가능하고 배양물에 대한 수소 가스의 높은 공급률에 따라 심지어 지속되거나 또는 유지된다는 것을 입증할 수 있다. 이러한 교시는 실제로 일부 메탄 생산을 회복시키고 유지할 가능성을 나타내었지만, 불행하게도 동시에 제공된 해결책은 다음 단락에 보고된 바와 같이 더 많은 문제를 초래하고 있다.
 - [0016] 가스 오염물의 존재 하에 메탄 생산을 유지 또는 회복하게 하고, 예를 들어 높은 비율의 수소 가수 유입을 특징으로 하는 배양 조건 하에, 방출 가스가 상당량의 수소도 함유할 것이라는 점이 이전에 알려졌고 또한 US 2014/0377830에 기재되어 있다. 이러한 방출 가스 혼합물은 산소 및 수소 함량으로 인해 폭발할 수 있을 뿐만 아니라, 순도 부족으로 인해 가스 분배 시설망에 공급하기에 적합하지 않다.
 - [0017] 바이오메탄 생산을 확립된 확장가능하고 신뢰할 수 있는 재생가능한 에너지원으로 향상시키는 것은 특히 지속적인 공급 공정에 대한 요건으로 인해 도전과제로 남아있는 것으로 보인다.
 - [0018] 그럼에도 불구하고, 유망한 잠재력으로 인해, 바이오메탄의 대규모 활용은 기술을 수지타산이 맞고 비용 효과적으로 만들기 위해 세심한 정치적 및 경제적 조사를 진행중이며, 메탄을 활용하는 것은 생화학 공학의 가장 중요한 단기 목표로서 확인되었다. 따라서, 상기 단점에 대한 효과적인 해결책 및 메탄생성 고세균에 의해 구동된 생산 공정의 개선이 절실히 필요하다.
- 발명의 내용**
- [0019] 따라서 본 발명의 목적은 CO₂ 함유 배출물 및 폐가스를 주요 공급원으로 사용하면서 수행될 수 있는 메탄 농축 가스 조성물에 대한 확장가능하고 신뢰할 수 있고 연속적인 생산 공정을 제공하는 것이다.
 - [0020] 이전 간행물, 및 특히 US 2014/0377830은 메탄 생산 시스템에서 산소 또는 일산화탄소로 오염된 CO₂ 함유 가스

를 사용하려는 시도를 이미 기재하였다. 이 출원에서는 엄격히 혐기성 메탄생성 고세균에 공급되는 가스에서 산소 또는 일산화탄소의 존재로 인한 메탄 생산 중단 효과가 잘 기재되어 있다. 혐기성 메탄생성 고세균의 맥락에서, 산소 및 존재하는 경우 또한 일산화탄소는 일반적으로 수소 흡수에 수반되고 메탄생성을 방해하는 효소의 억제체로서 널리 알려져 있다. 상기 언급된 문서에서 메탄생성 배양물에 표준 공기를 공급하는 것은 결과적으로 메탄생성 중단, CO₂의 대체/감소 및 이에 따른 pH 값의 증가를 야기하는 것으로 밝혀졌다. 이와 관련하여, 순수한 수소 및 이산화탄소가 공정 공급물로서 사용되는 경우, 메탄화 공정은 보통 pH 7.5 내지 pH 8.5의 pH 값에서 작동한다. 이 pH 값 범위는 구체적으로 설정되거나 또는 조절되지 않는다. CO₂ 가스를 표준 공기로 대체하고 이에 따라 배양 배지로부터 CO₂를 대체/감소시키는 경우, 메탄생성이 중단된다. 또한, 순수한 CO₂ 가스가 공기로 대체되지 않지만 낮은 비율의 산소만을 함유하는 산업용 폐가스로 대체되는 상황에서, pH 값에 대한 결과는 배양물에서 메탄생성의 중단으로 인해 비슷하다.

[0021] 또한, 전형적으로 혐기성 질소원 암모니아의 공급이 메탄생성 고세균의 성장 및 생존에 필요하고, 또한 황화물이 황성 미생물의 대체를 위해 정지기에서 메탄 생산 배양물을 유지하기 위해 사용되고 필요하다고 간주되는 것으로 이전에 보고되었지만; 그럼에도 불구하고, 이들 보충물의 첨가는 새로운 도전과제를 야기한다. 예를 들어, 암모니아는 메탄생성 미생물 배양의 완충 능력을 증가시켜, 메탄 방출을 야기하는 대사 과정의 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 암모니아에 대한 민감도는 다량의 암모니아가 메탄화 활성을 억제할 수 있는 반면 소량의 암모니아는 아세트산 분해성(acetoclastic) 메탄생성 활성, 즉, 아세트산의 전환에 의한 메탄 생산을 억제할 수 있도록 메탄생성 미생물 배양물의 조성에 따르는 것으로 밝혀졌다(Prochazka *et al.*, 2012).

[0022] 인공 배양 조건 하에 본질적으로 순수한 H₂ 및 CO₂ 가스를 공급 계획을 적용하면 메탄화에 대한 유의한 효과가 관찰되지 않았기 때문에 pH 값을 최대 pH 9.00까지 증가시키는 것이 거의 평탄한 것처럼 보였다. 그러나, 본 발명자들은 가스 혼합물을 함유하는 가스를 공급하는 조건 하에, 폐기물 배출물 또는 지열 가스 조성물, 특히 황화수소의 함량 및 이에 따라 전형적인 pH 조건 하에 제어불가능한 불용성 황화물 염 형성이 먼저 메탄 생산성 감소로 이어지고 결국 메탄생성 고세균 배양물의 회복불가능한 붕괴로 이어질 것이라는 점을 발견하였다. 그럼에도 불구하고, 이러한 조건 하에 방출 가스는 증가된 H₂S 양이 연료로서 추가로 활용하기에 적합하지 않다는 것을 나타낸다.

[0023] 현재 기술 개발의 추가의 목적은 이러한 산업용 폐가스 또는 지열 가스 조성물을 이용하는 메탄 생산 공정을 안정화하고 개선하면서 가스 분배 시설망에 공급하기 위한 엄격한 요건을 충족하는 방출 메탄 가스를 여전히 보장하는 것이다.

[0024] 이러한 기술적 진보의 체계 내에서, 본 발명은 청구범위에 명백하게 명시된 바와 같이 메탄 생산 공정, 특히 CO₂ 함유 폐가스를 메탄 또는 고순도 메탄으로 농축된 가스 조성물로 전환하기 위한 고세균의 메탄생성을 개선하는 방법에 대한 교시를 제공한다.

[0025] 본 발명에 따르면 가스는 화석 연료 또는 농업 산업과 같은 산업 공정에서 수행된 활동 동안 예를 들어 에탄올 생산에서 미생물 발효, 예를 들어 석탄 연료 발전소에서 화석 연료의 연소의 부산물로서 또는 예를 들어 지열 발전소의 부산물로서 또는 예를 들어 가스 조성물의 배출을 초래하는 임의의 인간 산업 활동의 결과로서 발견되거나 또는 생산되며, 그렇지 않으면 축산업 및 다른 농업 활동과 같이 대기로 분산되는 CO₂ 농축 배출물 및/또는 폐가스로서 이해되어야 한다. 명확성을 위해 본원에서 이해되는 바와 같은 용어 가스, 폐가스 또는 배출물은 또한 지열 발전소에서 배출되거나 또는 사용되는 원료 또는 변형된/처리된 지열 가스를 지칭하고, 또한 원료 및/또는 처리된 지열 가스를 포함하는 것으로 추가로 이해되어야 하며, 여기서 예를 들어 H₂S 함량은 감소될 수 있다. 또한, 본원에서 이해되는 바와 같은 용어 가스, 폐가스 또는 배출물은 또한 매립지의 배출물, 석회 및 시멘트 공장의 배출물, 철강 생산 및 가공 발전소의 배출물, 쓰레기 또는 재생가능한 에너지 화력 발전소의 배출물 및 지열 발전소 및 바이오가스 발전소의 배출물을 지칭한다. 전형적으로, 이러한 배출물은 대기 중 추가 CO₂ 오염을 피하기 위해 비활성화, 재활용 또는 정제되어야 하는 폐기물로 간주되며; 따라서, 폐가스는 또한 본 출원의 범위에 대한 가스인 것으로 간주된다.

[0026] 이러한 가스는 공급원에 따라 매우 상이한 가스 조성물을 포함할 수 있다. 이들은 주로 공기와 비교하여 상대적으로 많은 양의 CO₂를 함유한다는 공통점이 있다. 이들은 표준 (공기-유사) 부분량의 산소 및/또는 질소를 함유할 수 있지만, 기원에 따라 또한 산소가 없을 수도 있다. 추가로, 이들은 상당량의 다음 중 적어도 하나,

특히 일산화탄소, 수소 및 황화수소, 다른 황 화합물(황화물, 이황화물, 티올), 실록산(유기 실리콘 화합물), 할로겐화 화합물, 암모니아, 및 유기염소, 즉, 살충제 및 염소화 방향족 분자를 갖는 다른 합성 유기 화합물을 함유할 수 있다.

- [0027] 산소 및 일산화탄소의 억제 효과는 메탄화 공정과 관련하여 잘 기재되어 있지만, 특히 상기 공정에 대한 H₂S의 효과는 이러한 메탄화 공정을 위한 공급 가스로서 폐가스의 사용에 유해하다.
- [0028] 상기 간단히 언급된 바와 같이, 용해된 황화물은 고세균의 수분영양 메탄생성, 즉, 환원제로서 수소를 사용한 이산화탄소 전환에 의한 메탄 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 형태의 메탄생성은 아세트산 분해성 메탄생성(상기 참조)에 비해 황화물 억제에 대해 확고한 것처럼 보이지만, Maillacheruvu *et al.*, 1996의 데이터는 수분영양 메탄생성이 황화물 독성에 의해 여전히 영향을 받고 있다는 것을 나타낸다.
- [0029] 또한, 메탄생성 미생물에 황화수소를 첨가하면 혐기성 슬러지 또는 단일 유기물을 활용하여 메탄생성의 비경쟁적 억제를 야기할 수 있다는 것이 입증되었다(Koster *et al.*, 1986; O'Flaherty *et al.*, 1998).
- [0030] 추가로, 황화수소 형태의 황화물은 이론에 얽매이지 않고 H₂S가 고세균의 세포 막을 가로지를 수 있는 유일한 형태라는 사실로 인해 해리된 황화물 이온보다 더 독성인 것으로 입증되었다. 이전에, 지열 가스에서 황화물 농도의 전형적인 양, 즉 100 내지 150 mg/L 범위의 양은 메탄생성을 심하게 억제하는 것으로 제시되었다(Koster *et al.*, 1986). 통상적인 하수 처리장(Vila Leopoldina-SP-Brazil)으로부터 혐기성 슬러지로 작동되는 혐기성 반응기에 다양한 황화물 첨가의 체계적 분석을 수행하여, Paula & Foresti (2009)는 특이적 기질 활용이 총 화합물 농도를 단지 50 mg/L까지 증가시켰다는 것을 제시하였다. 기질 활용은 잠시 동안 이 수준으로 머무른 다음 황화물 첨가 값이 높을수록 점차 감소하였다. 추가로, 고농도의 황화물은 금속-황화물 복합체 형성에 의해 금속의 독성 완화에 기여하는 것으로 알려져 있다(Edgcomb *et al.*, 2004).
- [0031] 상기 언급된 문서에 나열된 최신 기술의 단점을 적어도 부분적으로 극복하기 위해, 메탄화 공정은 청구범위에 기재된 방법에 따라 개선되었다.
- [0032] 본 발명에 따르면, CO₂를 함유하는 가스로부터 생물반응기에서 메탄을 생산하는 방법은 적어도 다음 단계를 포함한다: 메탄생성 미생물을 연속 공정에서 배양하는 단계; 추가로 예를 들어 H₂S 및/또는 O₂를 포함하는 CO₂ 함유 가스를 제공하는 단계; pH 값이 주어진 값이 되도록 연속적으로 제어하고 임의적으로 조절하는 단계; 임의적으로, 메탄생성 미생물의 배양물과 추가 H₂의 배양물을 1:0.6 내지 1:5의 CO₂:H₂의 화학량론적 비로 공급하는 단계, 및 메탄 또는 메탄 농축 가스 조성물을 수집하는 마지막 단계.
- [0033] 본 발명의 이해에서, 생물반응기는 생물학적 반응기를 의미하고, 생물반응 용기, 또는 생물반응 인클로저(enclosure), 또는 생물반응 탱크, 및/또는 적어도 생물반응 챔버, 및/또는 셀, 또는 이의 조합이며, 또한 최신 기술에서 의도된 바와 같이, 특히 예를 들어 온도 및/또는 압력 변경을 견딜 수 있고/있거나, 예를 들어 온도, 및/또는 압력의 부여된 값이 할당되든 반응 공정 전, 후 또는 도중에 유지되어야 하든 유지될 수 있으며, 여기서 본 발명을 수행하기에 적절한 의도된 반응이 발생할 수 있다. 이러한 반응은 미생물이 수반되는 반응의 영역과 관련되고, 본원에서 예를 들어 대사 발효, 또는 호기성 또는 혐기성 소화와 같은 정상적인 생리학을 지칭하며, 이와 같이 적합한 환경, 미생물의 적합한 배양물, 적합한 배양 배지 및 적합한 반응물이 발생할 필요가 있는 한 생물반응으로 이해된다. 본 발명의 의미에서 생물반응기는 개시된 바와 같은 방법을 가능하게 하기 위해 각 변수의 허용 값 내에서 신뢰할 수 있게 수행되고, 시간이 지남에 따라 나열된 단계가 신뢰할 수 있게 수행될 것으로 예상된다.
- [0034] 메탄생성 미생물을 배양하기 위한 적합한 반응기는 단지 예로써, 진탕 탱크 생물반응기, 연속 교반 탱크 생물반응기, 간헐적 교반 탱크 생물반응기, 중공 섬유 막 생물반응기, 기포 칼럼 생물반응기, 내부 루프 에어리프트 생물반응기, 외부 루프 에어리프트 생물반응기, 유동층 생물반응기, 충전층 생물반응기, 광-생물반응기, 침상층 생물반응기, 미생물 전기분해 셀, 및/또는 이의 조합일 수 있다.
- [0035] 생물반응기의 작동 모드는 배치 공정, 공급형 배치 공정 및 연속 공정으로 분류된다. 본원에 제시된 방법의 상이한 구현예에 따르면, 배양물의 특이적 역학 또는 이에 의해 메탄이 추출되는 편리함을 가장 밀접하게 다루는 반응기가 선택될 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 기포 칼럼 반응기, 또는 이의 변형, 예컨대 에어리프트 생물반응기, 또는 연속 교반 탱크 반응기, 및/또는 상기 중 임의의 것을 사용하여 기재된 바와 같은 방법을 편리하게 수행할 수 있고 연속 배양이 바람직하며, 여기서 영양소, 대사물, 세포 수 및 바이오매스의 변동이 거의 없

는 거의 균형잡힌 성장이 관찰된다.

- [0036] 본 발명의 의미에서, 이미 상기 논의된 바와 같이, 가스는 산업 및/또는 지열 활동의 생산물 및 부산물(예를 들어 폐기물) 가스를 포함하며, 여기서 상기 활동은 예를 들어 원료 지열 가스를 포함하여, 산업 공정에 따라 이산화탄소, 일산화탄소, 산소, 황화수소, 질소, 아르곤, 헬륨, 아세틸렌, 수소 및 여러 다른 것들을 다양한 양으로 포함하는 개별 가스 또는 가스 혼합물의 배출을 초래할 수 있다.
- [0037] 저에너지 밀도 가스를 메탄과 같은 고에너지 밀도 가스로 전환하기 위해 이용가능한 가스의 사용은 두 배의 이점을 제공한다: 한 측면에서는 대기로 유리되는 경우, 특히 추가 사용을 위한 가스의 생산을 집적 목표하지 않는 산업 활동의 부산물로 생성된 폐가스의 경우, 온실 효과에 기여할 수 있는 가스를 재사용하고; 다른 한편으로는 고순도의 에너지 농축 가스를 생성하며, 다른 오래된 에너지 공급 방법보다 환경에 미치는 영향이 적은 더 많은 바이오메탄의 생산을 위한 배양 공급물 또는 영양소로 추가로 활용될 수 있는 거의 동일한 양의 저에너지 밀도 가스를 폐기물로서 생산하는 추가 활동을 작동시키기 위해 즉시 활용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따르면, 메탄생성 미생물은 바이오메탄을 생산하기 위해 생물반응기에서 배양된다. 이러한 메탄생성 미생물, 또는 자가영양 메탄생성 미생물은 순수한 균주에서, 또는 복수의, 즉 2 종 이상의 균주와의 조합에서, 또는 메탄화가 또한 상이한 종에 걸친 영양공생 교환에 의해 촉진될 수 있는 혼합 배양물에서 혐기성 고세균일 수 있거나 또는 심지어 최근에 분류된 호기성 고세균일 수 있다.
- [0039] 메탄생성 고세균의 활성은 보통 엄격히 혐기성으로 간주되며, 예를 들어, 산소 오염이 발생할 때 생산성이 손실되고(메탄 수율 감소로 표현됨) 결국 배양물은 사멸한다. 엄격히 혐기성 조건에서 배양물을 작동하는 것은 필요한 장비와 관련하여 심각한 제한이 야기될 수 있지만; 그럼에도 불구하고 최근 발견은 산소 노출, 또는 극한 조건 하에 메탄화를 심각하게 감소시킬 가능성이 있는 다른 가스 오염물에 대한 노출을 주의깊게 제어하여 규제되게 할 때 및 작동 수준에서 중요한 매개변수를 유지하기 위해 대응 조치를 취할 때 메탄 수율, 및 이에 따른 배양물의 활성 수준이 또한 유지될 수 있다는 것을 제시하였다.
- [0040] 따라서 메탄 수율을 감소시키지 않으면서 배양물의 가스 오염 가능성을 포함하는 방법을 추구하는 것은 메탄생성 미생물 개발의 일반적인 분야에서 의미가 있다. pH 제어/조절된 배양물에서 호기성 조작이 상기 배양물의 생존력, 및 이에 따른 메탄 수율을 제한하지 않는다는 본 발명자들의 확실한 발견은 본 발명의 경우에서와 같이 가스 오염물의 존재 하에 다양한 메탄생성균을 배양할 가능성을 증가시켰다.
- [0041] 자가영양 메탄생성 미생물은 본원에서 예를 들어 이산화탄소를 환원시켜 메탄의 생합성을 수행함으로써 주변 환경과의 무기 반응에서 영양소를 유도하는 미생물로 의도된다. 자가영양 미생물의 예는 수소를 활용하여 영양소를 유도하는 수분영양 미생물에 의해 주어지며; 특히, 수분영양 메탄생성 미생물은 대사 과정의 일부로 수소 및 이산화탄소를 메탄으로 전환할 수 있다. 생태계에서 메탄생성 미생물의 역할은 유기 물질 붕괴의 마지막 단계에서 과도한 이산화탄소 및 발효 산물을 제거하는 데 도움이 되므로 고유하다. 메탄생성의 부재 하에 붕괴하는 물질로부터 화합물에 결합된 다량의 탄소는 혐기성 환경에서 축적될 것이다.
- [0042] 유리고세균 계(메탄생성균 및 이의 표현형적으로 다양한 관련종 포함)로부터 메탄생성 고세균의 부류는 본질적으로 대사 활성을 통해 수소 및 이산화탄소를 포함하는 작은 기질 세트로부터 메탄을 생산할 수 있는 단세포 미생물을 포함한다: 이러한 활성은 주로 이산화탄소를 수소 및/또는 다른 수소 화합물을 통해 메탄으로 환원시키는 것으로 이루어진다.
- [0043] 본 발명에 기재된 방법을 수행하기에 적합한 메탄생성 고세균의 배양물은 미생물의 공개 수집에서 이용가능하고/하거나 대안적으로 최신 기술에 보고된 바와 같이 다수의 환경 공급원으로부터 단리될 수 있다. 메탄생성 미생물의 적합한 환경 공급원의 예는 혐기성 토양 및 모래, 늪지, 습지, 소택, 어귀, 조밀한 조류 매트, 지상 및 해양 진흙 및 퇴적물 모두, 예를 들어 간석지 퇴적물의 표면하, 심해 및 깊은 우물 바닥, 하수 및 유기 폐기물 처리장 및 처리 시설, 및 동물 장관 및 배설물을 포함한다.
- [0044] 본 발명에 기재된 방법을 수행하기에 적합한 메탄생성 고세균은 하기 보고된 바와 같은 5 가지 상이한 부류(목) 하에 분류학적으로 기재되었으며, 즉 메타노박테리아(*Methanobacteria*), 메타노코치(*Methanococci*), 메타노미크로비아(*Methanomicrobia*), 메타노나트로나르카이아(*Methanonatronarchaeia*), 및 메타노피리(*Methanopyri*)이며, 이들 부류는 각각 다수의 속을 포함하며, 여기서 각각의 속은 과로 나뉘지고, 각각의 과는 분류된 의미에서 수많은 알려지고 광범위하게 연구된 종, 및 분류되지 않은 의미에서 알려지지 않은 종을 포함한다.
- [0045] 다음에서, 본 발명에 기재된 방법을 수행하기에 특히 적합한 메탄생성 고세균이 그들의 부류에 따라 조직되어 나열되며; 상이한 과에 속하는 종은 부류명 뒤에 괄호에 나열되고, 세미콜론으로 구분된 다음; 각각의 종은 쉽

표로 구분된다.

[0046]

본 발명에 따르면, 적합한 메탄생성 고세균은 메타노박테리아의 부류(예컨대, 예를 들어, 메타노박테리움 아루센스(*Methanobacterium aarhusense*), 메타노박테리움 아그레간스(*Methanobacterium aggregans*), 메타노박테리움 알칼리필룸(*Methanobacterium alcaliphilum*), 메타노박테리움 아르티쿰(*Methanobacterium arcticum*), 메타노박테리움 베이징젠스(*Methanobacterium beijingense*), 메타노박테리움 브리안티이(*Methanobacterium bryantii*), 메타노박테리움 콘골렌스(*Methanobacterium congolense*), 메타노박테리움 쿠르븀(*Methanobacterium curvum*), 메타노박테리움 에스파놀라(*Methanobacterium espanolae*), 메타노박테리움 페루기니스(*Methanobacterium ferruginis*), 메타노박테리움 플렉실(*Methanobacterium flexile*), 메타노박테리움 포르미시쿰(*Methanobacterium formicicum*), 메타노박테리움 이바노비이(*Methanobacterium ivanovii*), 메타노박테리움 카나기엔스(*Methanobacterium kanagiense*), 메타노박테리움 라쿠스(*Methanobacterium lacus*), 메타노박테리움 모벤스(*Methanobacterium movens*), 메타노박테리움 모빌렌스(*Methanobacterium movilense*), 메타노박테리움 오리재(*Methanobacterium oryzae*), 메타노박테리움 팔루디스(*Methanobacterium paludis*), 메타노박테리움 팔루스트레(*Methanobacterium palustre*), 메타노박테리움 페트롤레아리움(*Methanobacterium petrolearium*), 메타노박테리움 서브테라눔(*Methanobacterium subterraneum*), 메타노박테리움 썬마그레간스(*Methanobacterium thermaggregans*), 메타노박테리움 울리기노숨(*Methanobacterium uliginosum*), 메타노박테리움 베테룸(*Methanobacterium veterum*), 메타노박테리움 종(*Methanobacterium sp.*); 메타노브레비박터 아시디두란스(*Methanobrevibacter acididurans*), 메타노브레비박터 아르보리필루스(*Methanobrevibacter arboriphilus*), 메타노브레비박터 보비스코레아니(*Methanobrevibacter boviskoreani*), 메타노브레비박터 쿠르바투스(*Methanobrevibacter curvatus*), 메타노브레비박터 큐티쿨라리스(*Methanobrevibacter cuticularis*), 메타노브레비박터 필리포르미스(*Methanobrevibacter filiformis*), 메타노브레비박터 고츠칼키이(*Methanobrevibacter gottschalkii*), 메타노브레비박터 밀레레(*Methanobrevibacter millerae*), 메타노브레비박터 올레이애(*Methanobrevibacter olleyae*), 메타노브레비박터 오랄리스(*Methanobrevibacter oralis*), 메타노브레비박터 루미난티움(*Methanobrevibacter ruminantium*), 메타노브레비박터 스미티이(*Methanobrevibacter smithii*), 메타노브레비박터 타우에리(*Methanobrevibacter thaueri*), 메타노브레비박터 와세이(*Methanobrevibacter woesei*), 메타노브레비박터 울리니이(*Methanobrevibacter wolinii*), 메타노브레비박터 종(*Methanobrevibacter sp.*), 메타노스페라 쿠니쿨리(*Methanosphaera cuniculi*), 메타노스페라 스타츠마네(*Methanosphaera stadtmanae*), 메타노썬모박터 크리날레(*Methanothermobacter crinale*), 메타노썬모박터 데플루비이(*Methanothermobacter defluvii*), 메타노썬모박터 마르부르겐시스(*Methanothermobacter marburgensis*), 메타노썬모박터 마르부르겐시스 str. 마르부르그(*Methanothermobacter marburgensis str. Marburg*), 메타노썬모박터 테네브라룸(*Methanothermobacter tenebrarum*), 메타노썬모박터 썬마오토트로피쿠스(*Methanothermobacter thermautotrophicus*), 메타노썬모박터 썬마오토트로피쿠스 str. 델타 H(*Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H*), 메타노썬모박터 썬마오토트로피쿠스 str. 윈터(*Methanothermobacter thermautotrophicus str. Winter*), 메타노썬모박터 썬모플렉수스(*Methanothermobacter thermoflexus*), 메타노썬모박터 썬모필루스(*Methanothermobacter thermophilus*), 메타노썬모박터 울페이이(*Methanothermobacter wolfeii*), 메타노썬모박터 종(*Methanothermobacter sp.*), 메타노썬무스 페르비두스(*Methanothermus fervidus*)로부터; 및/또는 메타노코치의 부류(예컨대, 예를 들어, 메타노칼도코쿠스 바토아르데센스(*Methanocaldococcus bathoardescens*), 메타노칼도코쿠스 페르벤스(*Methanocaldococcus fervens*), 메타노칼도코쿠스 인디쿠스(*Methanocaldococcus indicus*), 메타노칼도코쿠스 인페르누스(*Methanocaldococcus infernus*), 메타노칼도코쿠스 야나시이(*Methanocaldococcus jannaschii*), 메타노칼도코쿠스 빌로수스(*Methanocaldococcus villosus*), 메타노칼도코쿠스 볼카니우스(*Methanocaldococcus vulcanius*), 메타노칼도코쿠스 종(*Methanocaldococcus sp.*); 메타노토리스 포르미시쿠스(*Methanotorris formicicus*), 메타노토리스 이그네우스(*Methanotorris igneus*), 메타노토리스 종(*Methanotorris sp.*); 메타노코쿠스 에올리쿠스(*Methanococcus aeolicus*), 메타노코쿠스 마리팔루디스(*Methanococcus maripaludis*), 메타노코쿠스 바니엘리이(*Methanococcus vanniellii*), 메타노코쿠스 볼태(*Methanococcus voltae*), 메타노코쿠스 종(*Methanococcus sp.*); 메타노썬모코쿠스 오키나와시스(*Methanothermococcus okinawensis*), 메타노썬모코쿠스 썬모리토티트로피쿠스(*Methanothermococcus thermolithotrophicus*), 메타노썬모코쿠스 종(*Methanothermococcus sp.*)로부터; 및/또는 메타노미크로비아의 부류(예컨대, 예를 들어, 메타노셀라 아르보리재(*Methanocella arvoryzae*), 메타노셀라 콘라디이(*Methanocella conradii*), 메타노셀라 팔루디콜라(*Methanocella paludicola*), 메타노셀라 종(*Methanocella sp.*); 메타노칼쿨루스 알칼리필루스(*Methanocalculus alkaliphilus*), 메타노칼쿨루스 청시젠시스(*Methanocalculus chunghsingensis*), 메타노칼쿨루스 할로톨레란스(*Methanocalculus halotolerans*), 메타노칼쿨루스 나트로노필

루스(*Methanocalculus natronophilus*), 메타노칼쿨루스 푸밀루스(*Methanocalculus pumilus*), 메타노칼쿨루스 타이와넨시스(*Methanocalculus taiwanensis*), 메타노칼쿨루스 종(*Methanocalculus sp.*); 메타노코르푸스쿨룸 아그레간스(*Methanocorpusculum aggregans*), 메타노코르푸스쿨룸 바바리쿰(*Methanocorpusculum bavaricum*), 메타노코르푸스쿨룸 바바리쿰, 메타노코르푸스쿨룸 라브레눔(*Methanocorpusculum labreanum*), 메타노코르푸스쿨룸 라브레눔, 메타노코르푸스쿨룸 파르븀(*Methanocorpusculum parvum*), 메타노코르푸스쿨룸 시넨스(*Methanocorpusculum sinense*), 메타노코르푸스쿨룸 종(*Methanocorpusculum sp.*); 칸디다투스 메타노쿨레우스 썬모하이드로게노트로피쿰(*Candidatus Methanoculleus thermohydrogenotrophicum*), 메타노쿨레우스 보우르겐시스(*Methanoculleus bourgensis*), 메타노쿨레우스 치쿠고엔시스(*Methanoculleus chikugoensis*), 메타노쿨레우스 치쿠고엔시스, 메타노쿨레우스 호로노벤시스(*Methanoculleus horonobensis*), 메타노쿨레우스 하이드로게니트로피쿠스(*Methanoculleus hydrogenitrophicus*), 메타노쿨레우스 마리스니그리(*Methanoculleus marisnigri*), 메타노쿨레우스 팔몰레이(*Methanoculleus palmolei*), 메타노쿨레우스 레셉타쿨리(*Methanoculleus receptaculi*), 메타노쿨레우스 세디미니스(*Methanoculleus sediminis*), 메타노쿨레우스 수브마리누스(*Methanoculleus submarinus*), 메타노쿨레우스 타이와넨시스(*Methanoculleus taiwanensis*), 메타노쿨레우스 썬모필루스(*Methanoculleus thermophilus*), 메타노쿨레우스 종(*Methanoculleus sp.*); 메타노폴리스 아쿠아에마리스(*Methanofollis aquaemaris*), 메타노폴리스 에타놀리쿠스(*Methanofollis ethanolicus*), 메타노폴리스 포르모사누스(*Methanofollis formosanus*), 메타노폴리스 리미니탄스(*Methanofollis liminatans*), 메타노폴리스 리미니탄스, 메타노폴리스 타티오니스(*Methanofollis tationis*), 메타노폴리스 종(*Methanofollis sp.*); 메타노게니움 부네이(*Methanogenium boonei*), 메타노게니움 카리아시(*Methanogenium cariaci*), 메타노게니움 프리기둠(*Methanogenium frigidum*), 메타노게니움 마리눔(*Methanogenium marinum*), 메타노게니움 오르가노필룸(*Methanogenium organophilum*), 메타노게니움 종(*Methanogenium sp.*); 메타놀라시니아 페인테리(*Methanolacinia paynteri*), 메타놀라시니아 페트롤레아리아(*Methanolacinia petrolearia*); 메타노플라누스 엔도심비오시스(*Methanoplanus endosymbiosus*), 메타노플라누스 리미콜라(*Methanoplanus limicola*), 메타노플라누스 종(*Methanoplanus sp.*); 메타노미크로비움 안티쿰(*Methanomicrobium antiquum*), 메타노미크로비움 모빌레(*Methanomicrobium mobile*); 메타놀리네아 메소필라(*Methanolinea mesophila*), 메타놀리네아 타르다(*Methanolinea tarda*); 메타노레굴라 부네이(*Methanoregula boonei*), 메타노레굴라 포르미시카(*Methanoregula formicica*); 메타노스페룰라 팔루스트리스(*Methanosphaerula palustris*); 메타노스피릴룸 훈가테이(*Methanospirillum hungatei*), 메타노스피릴룸 라쿠내(*Methanospirillum lacunae*), 메타노스피릴룸 사이크로두름(*Methanospirillum psychrodurum*), 메타노스피릴룸 스타미시(*Methanospirillum stamsii*), 메타노스피릴룸 종(*Methanospirillum sp.*); 칸디다투스 메타노페레덴스 니트로레두센스(*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*), 칸디다투스 메타노페레덴스 종(*Candidatus Methanoperedens sp.*) 등; 메타노새타 하룬디나새(*Methanosaeta harundinacea*), 메타노새타 펠라기카(*Methanosaeta pelagica*), 메타노트릭스 쇠겐에이(*Methanotrinx soehngeni*), 메타노트릭스 썬모아세토폴라(*Methanotrinx thermoacetophila*), 메타노새타 종(*Methanosaeta sp.*); 메타노미크로코쿠스 블라티콜라(*Methanimicrococcus blatticola*), 메타노미크로코쿠스 종(*Methanimicrococcus sp.*)로부터; 및/또는 메타노나트로나르체아의 부류(예컨대, 예를 들어, 메타노나트로나르체움(*Methanonatronarchaeum*), 메타노나트로나르체움 썬모필룸(*Methanonatronarchaeum thermophilum*), 칸디다투스 메타노할라르체움(*Candidatus Methanohalarchaeum*), 칸디다투스 메타노할라르체움 썬모필룸(*Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum*))로부터; 및/또는 메타노피리의 부류(예컨대, 예를 들어, 메타노피루스 칸들레리(*Methanopyrus kandleri*), 메타노피루스 종(*Methanopyrus sp.*))로부터, 또는 이의 조합으로부터의 메탄생성 고세균의 목록에서 선택된다.

[0047] 이들 별개의 속, 과 및 종은 각각 더욱 더 많은 종을 단리하기 위해 진행중인 서열분석 활동에 따라 다수의 확인되고 분류되지 않은 상이한 미생물, 또는 유전적으로 변형된 균주 및 관련 환경적 종을 포함한다. 본 발명을 수행하기에 적합한 언급된 미생물에 더하여, 이러한 분류의 완전한 목록은 국제 생화학 정보 센터(NCBI) 웹사이트의 분류학 브라우저에 의해 이용가능하다.

[0048] 더욱이, 종종 간단한 배양 조건 및 자연 선택 및 적응 메커니즘에 의해 상기 나열된 자연 발생 종 중 임의의 것을 선택하거나 또는 변형하는 것이 가능하다. 특정 구현예에서, 반응기의 배양물 중 최종 조성물은 특정 성장기에서 유기체가 휴면이든 작동/활성이든 다른 것에 대해, 또는 반응기의 상태에 따라 특권을 누리도록 변형될 수 있다.

[0049] 특정 조건에 적응시키기 위해 특정 균주의 유전자 조작에 대한 여러 연구가 존재한다. 일반적으로, 본 발명의 접근법은 오히려 자연 발생 미생물에 의존한다.

- [0050] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 메타노써모박터, 및 또한 메타노써모박터 써모오도트로피쿠스, 메타노써모박터 마르부르겐시스 및/또는 이의 혼합물, 및/또는 이의 유도체는 후속 실시예 1-7에 기재되거나 또는 입증된 바와 같이 본 발명의 방법을 수행하는데 특히 적합한 것으로 밝혀졌다.
- [0051] 추가로 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 메타노써무스 페르비두스, 메타노브레비박터 아르보리필리쿠스 (*Methanobrevibacter arboriphilicus*), 메타노코쿠스 및 메타노칼도코쿠스 종., 및 추가로 메타노칼도코쿠스 바토아르테센스, 메타노칼도코쿠스 페르벤스, 메타노칼도코쿠스 인디쿠스, 메타노칼도코쿠스 인페르누스, 메타노칼도코쿠스 야나시이, 메타노칼도코쿠스 빌로수스, 메타노칼도코쿠스 볼카니우스 및/또는 이의 혼합물, 및/또는 이의 유도체는 후속 실시예에 기재되거나 또는 입증된 바와 같이 본 발명의 방법을 수행하는데 특히 적합한 것으로 밝혀졌다.
- [0052] 이와 관련하여, 가장 흥미롭게도 본 발명의 발명자들은 메타노박테리아, 예를 들어 실시예 8에서 사용된 메타노써무스 페르비두스가 약 7.0 또는 약간 높은 조절된 pH에서 각각 배양될 때 안정하고 예상치 못한 우수한 메탄화를 수행할 수 있었다는 것을 추가로 밝혀냈다는 점에 유의한다(실시예 8 및 9 참조, pH 7.2 및 7.4가 제시됨). 이러한 발견은 메타노써무스 페르비두스가 "약간 산성 pH 및 6.5를 선호하지만, 7.0을 초과하는 pH에서 성장이 관찰될 수 없다"는 것을 교시하는 최첨단 지식과 뚜렷한 대조를 이룬다(Anderson et al. 2010, p. 316, 오른쪽 칼럼, 4 - 6 행 및 Stetter et al., 1981 참조).
- [0053] 원래 배양물은 배양이 수행된 특정 조건에 반응하여 자연 변형을 겪을 수 있다. 배양 조건은 여러 매개변수, 예컨대 온도, pH, 압력, 세포 밀도, 부피, 습도, 염 함량, 전도성, 탄소 함량, 질소 함량, 비타민 함량, 아미노산 함량, 미네랄 함량, 또는 이의 조합에 의해 영향을 받으며, 이들 조건 각각에 따라 특이적 적응 공정이 반응기 환경 내에서 임의의 수의 종에 의해 수행될 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따르면, 본원에 개시된 방법은 메탄생성 미생물을 연속 공정에서 배양하는 것에 관한 것이며, 여기서 이러한 연속성은 메탄 생산의 연속성 및 배양물에서의 연속성으로 이해되며, 여기서 콜로니의 활성 구성원으로부터 불활성 말단 바이오매스를 분리하는 단계는 필요하지 않다. 대신에 상기 바이오매스 또는 생체물질이 활성 배양물을 위한 추가 기질을 제공하여 영양 가용성을 강화하는 것이 유리한 것으로 밝혀졌기 때문에 죽은 생체물질은 여러 성장 단계에 걸쳐 활성 구성원과 함께 반응기에서 유지되는 것으로 조장된다. 메탄 생산 및 배양에 대한 이러한 연속성의 이해에서, 적합한 반응물(예를 들어 산업 가스, 지열 가스)이 배양물에 연속으로 공급되어, 배양물에 걸쳐 반응기의 작동 상 내에서 메탄생성 활동의 임의의 주기에서 수득된 메탄 생산 측정량(즉 메탄 수율)의 유의한 변형없이 메탄 생산 작업을 수행하게 한다는 이해가 또한 포함된다.
- [0055] 연속 메탄 생산을 보장하는 것은 본 발명의 관련 특징 및 기재된 바와 같은 방법의 단계를 구현하는 유리한 효과이다. 본 발명에 따르면, 메탄은 단일 균주로부터 또는 혼합된 배양물에서 메탄생성 고세균에 의해 생산되며, 여기서 혼합된 배양물은 복수의, 따라서 2 종 이상의 균주가 또한 이용될 수 있는 배양물, 또는 복수의 추가 종이 메탄생성 고세균과 상호작용하는 배양물, 또는 이의 임의의 조합이다.
- [0056] 본원에 개시된 방법에 따르면, 배양물에 제공되는 가스는 CO₂를 함유하고 또한 예를 들어 H₂S 및/또는 O₂를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 상기 정의된 바와 같이, 특히 이산화탄소 및 예를 들어 황화수소 농축된 가스 중에서 이러한 가스 조성물을 배제하지 않고 적합한 양의 이산화탄소 및 황화수소를 함유하며 또한 산소의 흔적 또는 오염물을 포함하는 원료 지열 가스가 또한 포함된다.
- [0058] 추가로, 특정 구현예를 언급하는 실험이 보고되어 있으며, 여기서 이러한 가스 조성물을 배제하지 않고 적합한 양의 이산화탄소 및 감소된 양의 황화수소를 함유하며 또한 산소의 흔적 또는 오염물을 포함하는 처리된 지열 가스가 사용된다.
- [0059] 따라서 본 발명의 범위에서 메탄생성 미생물의 배양물에 제공된 가스, 특히 CO₂는 예비로 정제될 필요 없이 소량의 추가 오염물을 함유할 수 있다는 점이 포함되는데, 상기 오염물이 방법의 효율성이 기여하기 때문이다.
- [0060] 본 발명의 방법은 이전에 기재되고 실무자에게 알려진 고세균에 대한 전형적인 배양 조건에 기초하여 메탄생성 고세균을 배양하는 단계를 포함한다. 이러한 조건은 온도, 압력, 부피, 습도, 염 함량, 전도성, 탄소 함량, 질소 함량, 비타민 함량, 아미노산 함량, 미네랄 함량, 또는 이의 임의의 조합을 포함하여 배양에 영향을 미치는 공통 매개변수에 의해 실무자의 기술에 따라 영향을 받고 제어된다.

- [0061] 본 발명에 따르면, 생물반응기에서 CO₂를 함유하는 가스로부터 메탄을 생산하는 방법에서 메탄생성 미생물을 배양하는 단계는 다음 단계를 포함한다: 상기 메탄생성 미생물을 예를 들어 질소원 및 염과 같은 적합한 영양소를 제공하는 적합한 액체 배양 배지에서 유지하는 단계; 배양 조건을 조건적으로 혐기성 및/또는 혐기성으로 유지하는 단계; 임의적으로 배양물을 교반하며, 여기서 배양물의 교반은 규칙적으로, 간격을 두고, 연속적으로 수행될 수 있거나, 또는 가용성 배양물을 적어도 특정한 느리고 일정한 움직임으로 유지하는 단계; 배양물로부터 대사수를 연속적으로 제거하는 단계; 및 온도를 32°C 내지 90°C 또는 32°C 내지 80°C; 바람직하게는 50-70°C 또는 약 62°C 범위에서 유지하는 단계.
- [0062] 또한, 메탄생성 유기체의 배양물에 제공될 공통 배양 또는 성장 배지는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 철, 니켈, 코발트, 망간, 아연, 구리, 붕소, 알루미늄, 폴리브덴, 텅스텐, 셀레늄, 염소, 황의 공급원, 예를 들어 황화수소 또는 원소 황, 인산 공급원, 예를 들어 인산염, 질소원, 예를 들어 암모늄, 질산염 또는 질소 가스의 군으로부터 선택된 원소 형태 또는 이의 임의의 적합한 무독성 염 중에 하나 또는 여러 공통 무기 원소를 포함할 수 있다. 본 발명에 따라 메탄생성 유기체를 배양하는 데 활용되는 전형적인 염은 NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ H₂O, Na₂S, NH₄OH, N₂, 및 NaO₃, H₂S, KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂, 및 황산제1철이다.
- [0063] 본 발명자들은 예를 들어, pH와 같은 다른 매개변수의 조절이 반응기의 전체 활성 주기에 걸쳐 메탄화를 허용하고 심지어 가스 오염물의 존재 하에 메탄의 연속 수율을 가능하게 하였다는 것을 밝혀내었다.
- [0064] 따라서, 본 발명은 pH 값을 연속으로 제어하는 단계를 특징으로 한다. 이 맥락에서, 제어는 일정한 모니터링을 유지하기에 충분하지 않아서 배양물의 pH만을 제어할 수 있기 때문에, 당업계에 알려진 공통 방법론 및 측정 기기를 사용하여 일정한 모니터링 하에 배양물과 관련된 매개변수를 유지하고 본질적으로 상기 매개변수 또는 상태 표시기를 측정하는 일반적인 공통의 의미로 이해되며; 따라서 본 발명의 추가 구현에는 특히 pH 값을 연속으로 조절하는 것을 포함한다. 본 출원의 이해에서, 조절은 그렇게 하기 위해 적절한 수단을 사용함으로써 매개변수, 예를 들어 배양물의 pH에 대한 주어진 값을 능동적으로 유지하는 것으로 의도된다.
- [0065] 본 발명의 일 구현예에 따르면 메탄생성 미생물 배양물은 연속으로 제어 및/또는 조절되며, 즉 적합한 양의 적합한 산 또는 염기를 연속으로 첨가함으로써 pH 10 이하의 주어진 값 또는 대안적으로 pH 9 이하의 주어진 값, 대안적으로 pH 8 이하 또는 pH 7의 주어진 값에서 pH 값을 유지하도록 안정화된다.
- [0066] 가설에 의해 엮매이지 않고 배양물의 pH를 조절하는 것은 청구된 방법의 효율성을 결정하는 메탄화 활성의 연속성을 보존하는 데 특히 중요한 것으로 여겨진다.
- [0067] 본 발명의 추가 구현예에 따르면 메탄생성 미생물 배양물은 예를 들어 적합한 양의 NaOH/HCl 또는 NH₄OH/HCl을 물에 투입함으로써 pH 값을 유지하도록 연속으로 안정화 및/또는 조절된다.
- [0068] 본 발명에 따른 "주어진 값"은 주어진 허용치, 측정 시스템 내의 허용치 또는 배양물 내의 가변성 또는 배양 다양성으로 인한 허용치로 정의된 값일 수 있으며, 여기서 상기 값은 메탄화를 가능하게 하기에 적합하거나; 또는 주어진 값은 메탄화에 대해 주어진 값과 동일한 효과를 달성하는 적합한 값의 범위일 수 있다.
- [0069] 본 출원의 맥락에서, 메탄화, 또는 메탄생성 또는 바이오메탄화는 상기 기재된 바와 같이 본 발명을 수행하기에 적합한 메탄생성 미생물의 목록에 포함된 것들과 같은 메탄생성 미생물에 의해 수행되는 한 메탄 또는 메탄 농축 가스 조성물의 생산으로 이해된다.
- [0070] 특히, 이전에 알려지고 본 발명에 따라 적합한 메탄화 반응은 H₂ 및 CO₂를 4:1의 화학량론으로 소비한다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 지열 가스로 언급되는 배양용 영양소로 제공되는 가스 및 폐가스는 H₂ 및 CO₂를 4:1과 상이한 비율로 함유할 수 있다. 이 경우, 원료 또는 처리된 지열 가스가 여전히 사용될 수 있지만, 과도한 기질은 메탄생성에 의해 완전히 소비되지 않을 수 있다. 공정 공급에서 4:1의 최적의 H₂:CO₂ 비를 달성하기 위해, (i) 지열 가스는 외부 H₂(전해질 등) 및/또는 CO₂(CO₂ 함유 가스 등에서 비롯됨)와 둘 중 어느 것이 누락되었는지에 따라 혼합될 수 있거나, 또는 (ii) H₂:CO₂ 비는 당업계에 널리 알려진 적합한 분리 기술에 의해 과도한 H₂ 또는 CO₂를 분리함으로써 4:1로 조정될 수 있다.
- [0072] 흥미롭게도, 본 발명에 따른 방법은 상당히 상이하고 0.6:1 내지 최대 5:1의 비, 특히 1:1, 2:1, 3:1, 3.5:1, 4.3:1의 H₂:CO₂의 화학량론적 비로 구별되는 공급 가스 조성물로 공급된 연속 공정에서 메탄생성 미생물 배양물

을 사용하여 수행될 때 놀랍게도 메탄화 활성의 지속성 측면에서 효과적으로 남아있는 것으로 입증된다.

- [0073] 추가적으로, 본 발명자들은 심지어 H₂:CO₂의 이러한 실질적으로 상이한 화학량론적 비가 0.6:1인 구현예에서 본 발명에 따른 가스 조성물에서 메탄을 농축하는 공정이 연속으로 pH 제어 및 조절을 적용할 때 여전히 안정되고 진행중이라는 것을 입증할 수 있다(실시예 6과 비교).
- [0074] 따라서, pH 값 제어 및/또는 조절을 포함하여 청구된 고정 최적화의 주요 이점 중 하나는 공급 가스의 부족 또는 공급 가스의 중단의 경우에도 메탄화를 줄일 수 있지만, 여전히 실행중이거나, 또는 심지어 일정하게 남아있을 수 있고 빠르게 회복될 수 있다는 점이다.
- [0075] 본 출원의 맥락에서, 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 생산된 메탄 농축 가스 조성물은 주로 메탄으로 구성되고/되거나, 메탄이 주요 성분인 가스 조성물, 및/또는 메탄 함량이 90 부피% 이상, 또는 최대 96 부피%인 가스 조성물로 의도되고, 특히 기재된 바와 같은 방법의 생산물은 열 및 전력의 생산을 위해 배관 시스템에 직접 공급될 수 있는 메탄을 주로 포함하는 가스 조성물이며; 따라서 본 발명의 메탄 농축 가스 조성물은 오염물의 함량이 매우 낮고, 천연 가스와 달리, 직접 연소될 수 없는 오염물로부터 정제를 진행해야 하며, 개시된 바와 같은 농축 메탄 조성물은 효율적인 열 및 전력 생성을 위해 산소와 직접 상호작용하여 국가 에너지 시설망에 직접 공급되게 할 수 있다.
- [0076] 본 출원의 의미에서, 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 메탄 농축 가스 조성물은 바이오메탄의 이해에 상응한다.
- [0077] 일반적인 지식으로 간주되지만, 그럼에도 불구하고 미생물 배양물에서 매개변수의 값을 제어 및/또는 조절하는 적절한 수단이 매개변수의 속성에 따라 달라진다는 점을 다시 언급해야 한다. pH 값의 경우, 주어진 pH 값에 도달하도록 보정된 정확한 양으로 알칼리성 또는 산성 용액을 제공함으로써 조절 및 또는 안정화가 발생한다. 적합한 용액의 예는 수산화칼륨, 수산화나트륨, 염산 및 황산 용액 및/또는 생물학적 공정과 호환되는 것으로 알려져 있거나 또는 사용되는 임의의 알칼리성 또는 산성 용액을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 따라서, 본 출원의 의미에서 배양물에 걸쳐 제 시간에 연속으로 메탄화 활성을 가능하게 하고 안정화시키기 위한 목적으로 조절은 연속으로 또는 연속 방식으로 달성되어 임의의 주어진 시간에 배양물의 매개변수, 예를 들어, 배양물의 pH가 측정되는 경우 주어진 값과 동일한 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0079] 또한, 본 발명에 따른 방법의 유리한 단계는 배양 배지로부터 과도한 수분 및/또는 과도한 대사수 또는 소위 유리수를 정기적으로 또는 연속으로 제거하여 배지 중 영양소의 정확한 회석 및/또는 분산을 보장하는 것이다. 본 발명에 따른 대사수는 대사 활성 및 메탄생성 공정 중에 메탄생성 유기체에 의해 생산된 물 또는 H₂O 분자를 지칭한다.
- [0080] 온도는 배양물 내의 선택된 미생물 종의 존재에 따라 달라질 수 있지만, 각각은 설정된 온도 범위 내에서 더 잘 번식하며, 대부분의 메탄생성 미생물의 경우 온도 증가는 유해하지 않고, 심지어 세포 대사의 최적화 및 이에 따른 대사 전환 또는 심지어 메탄화에도 도움을 줄 수 있다. 산업 공정에서 온도는 에너지 조절에 의해 제어되어야 하며; 이와 관련하여 온도 제어를 가능하게 함으로써 에너지 소비를 줄이는 귀중한 특징으로 고려되어야 한다.
- [0081] 결과적으로, 에너지 유입 비용에 대하여 최적화된 배양 온도 및 상응하는 수소 용해도의 균형을 맞추는 것이 실질적으로 중요하다. 흥미롭게도, 본 발명의 방법은 대기압에서 32°C 내지 90°C 또는 32°C 내지 85°C, 또는 대안적으로 50 내지 70°C 또는 추가 대안적으로 약 62°C의 온도 범위에서 가장 효율적인 것으로 밝혀졌다.
- [0082] 다른 온도 또는 압력 범위의 경우 수소 용해도가 비교 특징으로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 고압, 예를 들어 16 bar, 20 bar, 35 bar, 40 bar 또는 60 bar 및 상응하게는 대기압에서 32°C 내지 90°C 또는 32°C 내지 85°C, 또는 대안적으로 50 내지 70°C 또는 추가 대안적으로 약 62°C의 온도 범위에서와 동일한 수소 용해도를 허용하는 더 높은 온도에서의 배양 공정을 지칭한다.
- [0083] 메탄생성 미생물은 일반적으로 100°C를 훨씬 초과하는 복수의 다른 심지어 극한 온도 범위, 예를 들어 140°C에서 또한 살아있고 성장할 수 있으며; 따라서, 상기 온도 범위는 바람직한 범위를 표시하지만, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0084] 본 발명의 추가 구현예에 따르면 메탄생성 미생물은 바람직하게는 Na₂S 형태로 첨가되지만 이에 제한되지 않는 추가로 첨가된 황화물 및/또는 바람직하게는 NH₄OH 또는 염화암모늄 형태로 첨가되지만 이에 제한되지 않는 질소

원으로서 추가로 첨가된 암모늄의 존재 하에 배양된다.

- [0085] 수산화암모늄은 또한 암모니아수로 알려져 있으며 무색 수용액이다. 따라서, 수산화암모늄은 단독으로 또는 다른 질소 화합물 또는 심지어 가스과 조합하여 사용되어 콜로니 또는 배양물의 여러 성장 단계에서 생존가능한 질소원 배양 배지를 제공하는 데 기여할 수 있다.
- [0086] 일반적으로 배양 영양소, 또는 수산화암모늄과 같은 질소원에 첨가하는 단계는 특히 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안되지만 실무자에게 도움이 되는 것으로 간주되어야 한다. 일반적으로 메탄생성 미생물은 또한 다중 질소원의 존재하에 살아있고 성장할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 메탄생성 미생물은 OD₆₁₀(610 nm에서의 광학 밀도)의 배양물에서 미생물의 밀도가 적어도 1 및 최대 60이 될 때까지 배양되며, 여기서 이러한 광학 밀도는 적어도 0.25 g/L 및 최대 20 g/L, 특히 0.25 내지 15 g/L, 3 g/L 내지 10 g/L, 4 g/L 내지 7 g/L, 3 g/L 내지 7 g/L, 또는 3 g/L 내지 15 g/L 범위의 배양물 중 미생물의 건조 중량과 관련된다.
- [0088] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 메탄생성 미생물은 OD₆₁₀(610 nm에서의 광학 밀도)의 배양물에서 미생물의 밀도가 적어도 14 및 최대 60이 될 때까지 배양되며, 여기서 이러한 광학 밀도는 적어도 2.5 g/L 및 최대 20 g/L, 특히 2.5 g/L 내지 15 g/L, 3 g/L 내지 10 g/L, 4 g/L 내지 7 g/L, 3 g/L 내지 7 g/L, 또는 3 g/L 내지 15 g/L 범위의 배양물 중 미생물의 건조 중량과 관련된다.
- [0089] 배양물 중 미생물의 광학 밀도는 각 시점에서 세포 수 또는 농도를 측정하는 실행가능한 매개변수이다. 주어진 세포 수 및 배양물 중 미생물의 효율성 사이의 직설적인 관계는 보편적으로 확립된 것으로 보이지 않지만, 그럼에도 불구하고 본 발명에 따른 방법 결과의 이해에서, 고밀도 배양물은 메탄 생산 및 수율 면에서 유리한 결과를 생산한다.
- [0090] 특히 본 발명에 따른 배양물의 광학 밀도(OD)는 당업계에 알려진 공통 방법 및 표준을 활용하여 측정된다. 광학 밀도, 또는, 오히려, 세포 계수 형태가 분광광도계를 사용하여 수행된 바와 같은 탁도 측정은 전형적으로 약 600 nm에서 작동되지만, 따라서 다른 파장이 적합할 수 있다.
- [0091] 광학 밀도는 측정 설정에 따라 달라질 수 있기 때문에, 주어진 시점 또는 성장기에서 배양물에 존재하는 세포의 양을 측정할 때 배양물 중 미생물의 건조 중량 또는 바이오매스 밀도를 나타내는 것이 종종 유용하다. 당업계에 알려진 표준 방법을 사용하여, 상이한 농도에서 수득된 배양물의 다수의 상이한 OD 값의 곡선을 작성하고 이에 따라 배양물의 건조된 샘플의 건조 중량을 측정함으로써 주어진 성장 단계에서 주어진 배양물의 OD 측정값 및 건조 중량 사이의 상관관계를 확립하는 것이 가능하다. 이는 광학 밀도의 함수로서 건조 중량의 데이터 포인트 세트를 제공하며; 이러한 데이터 세트의 회귀선 기울기는 보통 건조 중량 및 광학 밀도 사이의 상관관계를 정의한다. 본 발명자들에 따르면, 본 출원에서 OD₆₁₀=4의 값은 대략 1 g/L의 바이오매스 밀도로 해석한다.
- [0092] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 높은 광학 밀도를 결정하는 배양물 중 많은 수의 미생물은 여러 성장 단계(활성 성장기, 고정 성장기, 거의 고정 성장기)에서 최종 단계까지 수명의 전체 단계에 걸쳐 반응기에서 배양물의 구성원을 유지함으로써 수득되어, 비활성 세포체의 나머지가 배양물의 활성 구성원에 영양소를 제공할 수 있도록 한다.
- [0093] 본 발명에 따르면 메탄생성 미생물의 배양물은 적어도 1의 OD₆₁₀을 갖는 밀도 배양물로 유도되거나 또는 야기될 수 있다. 대안적으로 메탄생성 미생물의 배양물은 충분한 영양소를 배양물에 첨가하고 동시에 배양물에서 유리수 또는 대사수를 제거함으로써 적어도 14, 그러나 바람직하게는 20 초과, 추가로 또한 30 초과, 추가로 40 초과 심지어 최대 60의 OD₆₁₀을 갖는 고밀도 배양물로 유도되거나 또는 야기될 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 다양한 발달 단계에 걸쳐 1 - 60 사이의 측정가능한 OD₆₁₀; 추가로 14 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 20 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 30 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 40 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 50 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 1 - 60 사이의 OD₆₁₀; 추가로 14 - 50 사이의 OD₆₁₀; 추가로 20 - 50 사이의 OD₆₁₀; 추가로 30 - 50 사이의 OD₆₁₀; 추가로 40 - 50 사이의 OD₆₁₀; 추가로 20 - 40 사이의 OD₆₁₀; 추가로 30 - 40 사이의 OD₆₁₀; 추가로 20 - 30 사이의 OD₆₁₀; 추가로 14 - 20 사이의 OD₆₁₀; 추가로 1 - 20 사이의 OD₆₁₀을 갖는 메탄생성 미생물의 하나 이상의 균주의 배양물에서 적절하게 수행될 수 있다.
- [0094] 본 출원에 기재된 바와 같은 방법의 발명자들은 본 발명의 추가 구현예에 따라, 기재된 바와 같은 방법이 고세

균 또는 원시세균 계로부터 선택된 메탄생성 미생물을 사용하여 특히 잘 작동된다는 것을 나타내었으며, 여기서 이 그룹은 메타노박테리움, 메타노브레비박터, 메타노써모박터, 메타노코쿠스, 메타노사르시나 (*Methanosarcina*), 메타노피루스, 메타노써무스 또는 이의 혼합물을 포함하고, 또한 본 발명자들은 특히 메타노써모박터 종, 메타노써무스 종 또는 메타노브레비박터 종이 매우 효과적임을 입증하였다.

- [0095] 본 발명의 추가 구현예에 따르면 선택된 메탄생성 미생물은 혐기성이지만, 예를 들어 적응에 의해 산소를 허용한다.
- [0096] 상기 설명된 바와 같이, 본 발명에 활용되는 메탄생성 고세균은 오염물의 존재 하에 메탄화 능력을 보존하는 호기성 및 엄격히 혐기성 종을 모두 포함할 수 있고, 배양물의 pH를 제어 및 조절하는 단계가 수행될 때, 다른 방법 또는 배양물에서 보여지는 침묵 단계를 우회하고 메탄화를 예상된 수준으로 유지한다. 본 출원의 맥락에서, 뿐만 아니라 분야의 일반적인 맥락에서, 침묵은 적대적인 환경에 대해 반응하는 한 메탄생성 미생물에 의한 메탄화 활성의 중단으로 의도된다.
- [0097] 본 발명에 따르면, 단계 i의 적합한 액체 배양 배지는 적당한 염분 환경이며 여기서 음이온 농도, 즉 Cl^- 농도는 12 mmol/L 내지 300 mmol/L 범위이다. 대안적으로, 단계 i의 적합한 액체 배양 배지는 적당한 염분 환경이며 여기서 NaCl의 농도는 0.4 g/L 내지 12 g/L 범위, 바람직하게는 3 g/L 내지 6 g/L 범위, 보다 바람직하게는 약 5.6 g/L이다.
- [0098] 염화물 음이온은 NaCl, MgCl, KCl, NH_4Cl 의 음이온 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 적합한 염화물 염으로서 염 용액에 존재할 수 있다. 특히, NaCl 농도에 의해 제공되는 음이온 농도와 비교하여 본 발명에 따른 적당한 염분 환경에서 염화물 음이온 농도는 0.05 g/L 이하 내지 7 g/L 범위, 바람직하게는 3 g/L 내지 6 g/L 범위, 보다 바람직하게는 약 5.6 g/L이다.
- [0099] 본 출원의 이해에서, 미생물의 성장 및 활성에 대한 하나의 추가 요인은 또한 바이오매스의 재생력 및 연속 증가, 연속으로 수행될 대사 활성, 및 이에 따라 이산화탄소를 메탄으로 환원하는 바람직한 전환 효율 및 연속적으로 높은 메탄 유출을 허용하는 액체 배양 배지에 통상적으로 존재하는 염의 양일 수 있다.
- [0100] 특히, 대부분의 메탄생성 미생물은 수면에서 사는 임의의 다른 유기체에 비해 염도가 매우 높은 해저에서 자연적으로 발견되지만, 본 발명자들은 놀랍게도 적당한 염분 환경에서 살고 번식할 수 있는 본 발명에 따른 메탄생성 미생물이 청구된 방법에 특히 적합하다는 것을 밝혀내었다.
- [0101] 적당한 염분 환경에서 살고 번식할 수 있는 본 발명에 따른 이러한 메탄생성 미생물의 사용은 현대 생물반응기 방법론을 사용하여 특히 유리하며; 예를 들어 적응되지 않은 호염균 메탄생성 종이 필요할 수 있고 복잡한 생물반응기 시설에 매우 유해한 것으로 드러난 높은 염분 환경과 관련된 심각한 부식, 산화 및 변색 손상과 같은 결과를 방지한다.
- [0102] 본 발명에서 메탄생성 미생물은 자연적으로 선택되거나 또는 선천적으로 적응된 미생물, 적응된 호염성 미생물, 유전적으로 조작된 미생물의 군으로부터 선택되며, 모두 이러한 적당한 염분 환경에서 살고 번식할 수 있으며, 여기서 NaCl 농도, 또는 염도는 그 다음에 해수에서 NaCl 농도의 약 절반보다 낮거나 또는 비슷하고, 전형적으로 약 12 - 14 g/L인 것으로 선택된다.
- [0103] 본 발명의 이해에서, 적응된 미생물은 초기 상태에서, 즉 배양물에 첨가될 때, 모든 동일한 속성 및/또는 능력, 또는 이의 임의의 정도를 보유하지 않았던 미생물로서 의도되며, 배양물에서 영구적인 일정 기간 후에 보유하게 된다. 동일한 이해에서, 이러한 속성 및/또는 능력은 원래 미생물 중에서 공통으로 발견되는 특징이 아닐 수 있고, 그럼에도 불구하고 배양물에서 일정 기간 후 또는 영구적으로 획득되며, 상기 기간은 예를 들어 미생물 및/또는 배양물에 따라 가변적이며, 여기서 상기 속성 및/또는 능력 또는 이의 임의의 정도는 배양물에 존재하는 다른 미생물 집단과의 상호작용 및/또는 배양 환경의 임의의 다른 매개변수 및/또는 요소, 예를 들어 특정 영양소 및/또는 특정 오염물의 농도 및/또는 이용가능성에 반응하여 달라지고/지거나 당업자에게 알려진 바와 같은 것들을 포함하여 임의의 다른 유사한 대사 공급원 또는 원래 미생물의 임의의 다른 변경과의 상호작용에 따라 달라진다.
- [0104] 본 발명의 구현예에 따르면 CO_2 함유 가스, 바람직하게는 CO_2 함유 배출물은 메탄 생산을 위한 탄소원이고 바람직하게는 천연 지열 가스 또는 처리된 지열 가스, 매립지 가스, 석탄 또는 화석 에너지 화력 발전소의 배출물, 석회 및 시멘트 공장의 배출물, 철강 생산 및 가공 발전소의 배출물, 쓰레기 또는 재생가능한 에너지 화력 발전소의 배출물 및 지열 발전소, 바이오가스 공장 및 발효 시설(예를 들어, 양조장, 음료 생산업체 및 가공업체)의

배출물로부터 유래하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0105] 전형적으로, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 가스 중 CO₂ 함량은 적어도 20% CO₂를 포함한다.
- [0106] 추가로, 본 발명의 추가 구현예에 따르면 CO₂ 함유 가스는 0 내지 50.000 ppm H₂S를 포함할 수 있고, 전형적으로 추가 구현예에 따르면 공급 가스로서 사용되는 가스 중 H₂S 함량은 200ppm 내지 2000ppm, 대안적으로 200ppm 내지 10000ppm; 대안적으로 300ppm 내지 30000ppm; 대안적으로 400ppm 내지 40000ppm; 대안적으로 500ppm 내지 5000ppm; 대안적으로 200ppm 내지 20000ppm; 대안적으로 500ppm 내지 20000ppm 또는 심지어 500ppm 내지 25000ppm 및 또한 최대 40.000 ppm H₂S이어야 한다.
- [0107] 추가로, 본 발명의 추가 구현예에 따르면 CO₂ 함유 가스는 0 내지 5000 mg/L H₂S를 포함할 수 있고 추가 구현예에 따르면 공급 가스로서 사용되는 가스 중 H₂S 함량은 1 내지 100 mg/L H₂S, 대안적으로 10 내지 250 mg/L H₂S; 대안적으로 150 내지 750 mg/L H₂S; 대안적으로 100 내지 1000 mg/L H₂S; 대안적으로 125 내지 850 mg/L H₂S; 대안적으로 50 내지 500 mg/L H₂S; 대안적으로 125 내지 500 mg/L H₂S; 대안적으로 125 내지 650 mg/L H₂S; 대안적으로 100 내지 2500 mg/L; 대안적으로 500 내지 1500 mg/L; 대안적으로 250 내지 3500 mg/L; 대안적으로 750 내지 3500 mg/L; 대안적으로 500 내지 4000 mg/L; 대안적으로 550 내지 4500 mg/L; 대안적으로 1000 내지 4500 mg/L; 및 또한 최대 5000 mg/L H₂S이어야 한다.
- [0108] 본 발명의 일부 추가 구현예에 따르면 CO₂ 함유 가스는 또한 미량의 산소를 포함한다. 전형적으로, 본 발명의 추가 구현예에 따르면 CO₂ 함유 가스는 1%, 2%, 3%, 4% 또는 심지어 5%의 산소를 포함할 수 있지만, 5% 이하의 O₂를 포함할 수 있다.
- [0109] 특히, 일 구현예에 따르면 본 발명에 따른 처리된 지열 가스는 헬리세이디(Hellisheiði) 지열 발전소에서 수행된 원료 지열 가스의 소위 설피스(Sulfix) 처리 공정에 따라 취득되며, 최대 30000 ppm 농도의 H₂S 및 최대 대략적으로 1% 내지 5%, 대안적으로 2%-4%, 대안적으로 1%-4%, 대안적으로 2%-4%, 대안적으로 2%-3%, 또는 대안적으로 1%-3% 농도의 산소(O₂)를 함유한다.
- [0110] 처리된 지열 가스의 추가의 전형적인 조성은 실시예 6에 포함된 표 1에 제공된다.
- [0111] 상당히 높은 수준의 H₂S가 잠재적으로 메탄생성을 심각하게 억제할 수 있는 것으로 알려져 있지만, 주어진 양의 산소의 존재와 함께 이러한 이미 고농도는 대신에 놀랍게도 pH 조절과 조합될 때 본 발명에 따라 배양된 고세균으로부터 연속으로 발생하는 메탄생성 활성을 가능하게 하는 데 있어서 유리한 것으로 입증되었다.
- [0112] 본 발명의 추가 구현예에 따르면 전체 절차 또는 적어도 하나의 단계는 대기압 조건 및/또는 가압 조건 하에 수행될 수 있다. 일부 구현예에 따라 본 발명에 따른 방법 중 하나 이상의 단계가 가압 대기에서 수행되면, 압력은 바람직하게는 최대 16 bar, 대안적으로 최대 20 bar, 대안적으로 최대 50 bar, 대안적으로 최대 68 bar, 대안적으로 최대 110 bar 또는 심지어 최대 420 bar인 것으로 선택된다.
- [0113] 본 발명에 따르면 수집된 메탄 또는 생산된 메탄 농축 가스 조성물은 예를 들어 현탁액 중 거품, 티끌 및 먼지 미립자와 같은 작은 고체 입자와 같은 고체 오염물, 그리스(grease), 또는 예를 들어 수증기, 황화수소, 실록산, 암모니아 및 할로젠 화합물(염화물, 불화물)과 같은 가스 오염물, 예를 들어 리모넨 및 다른 테르펜과 같은 휘발성 유기 화합물(VOC), 및 다른 미량 오염물이 실질적으로 없다. 이러한 미량 성분은 공장 및 배관 시스템에 쌓일 수 있고, 부식, 침전물 및 장비 손상을 일으킬 수 있으며, 따라서 방출 가스 수집 시 제거되어야 한다.
- [0114] 고순도 메탄 수집을 달성하기 위해, 예를 들어 여과, 초저온 분리, 제습, 생물 산화, 화학 흡착, 물리 흡착과 같은 여러 방법이 사용된다.
- [0115] 본 발명에 따라 생산된 고순도 바이오메탄은 연속 생산 주기에서 에너지원으로서 즉시 이용가능성을 결정하고, 따라서 현재 청구된 방법의 우수성을 입증한다.
- [0116] 고순도 메탄의 연속 생산은 본원에 기재된 바와 같은 방법의 결과이며, 여기서 임의적으로 심지어 산소를 포함할 수 있는 황화수소 농축 기질은 메탄생성 고세균 중 또는 종의 혼합물을 배양하여 오염물이 거의 없는 메탄

또는 에너지 주기에 즉시 재진입할 준비가 된 메탄 농축 가스를 수득하기 위해 활용되며, 에너지 수요가 높은 발전소 및 시설에서도 탄소 원자 당 에너지 수율이 가장 높은 깨끗한 연료를 제공하고, 탄소 원자 당 에너지 수율이 낮고 환경적 영향이 높은 다른 공급원도 부족하고 비용이 들고 실행불가능하다.

- [0117] 방법은 메탄 연소 생산물을 추가로 재활용하여 생물배양물에 추가로 기질을 제공하여, 메탄 생산 주기를 다시 시작한다.
- [0118] 상기 기재된 바와 같은 방법의 이러한 유망한 결과로 인해 본 발명자들은 본 발명의 또 다른 발견된 측면으로 이어지는 메탄화에 대해 상이한 pH 값에서 상기 메탄생성 미생물을 배양하는 효과를 추가로 연구하였다.
- [0119] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에서는 하기 단계를 포함하는 생물반응기에서 CO₂ 또는 CO₂ 함유 가스로부터 메탄을 생산하는 방법을 제공한다:
- [0120] a. 첫번째 pH에서 CO₂ 및 H₂와 함께 메탄생성 미생물에 대한 첫번째 배양 조건 세트 하에 배양하는 단계, 이어서
- [0121] b. 상기 미생물을 두번째 배양 조건 세트 하에, 즉 두번째 pH에서 연속으로 배양하는 단계;
- [0122] c. pH 값이 주어진 값이 되도록 제어하고, 임의적으로 조절하는 단계;
- [0123] d. 메탄 또는 메탄 농축 가스 조성물을 수집하는 단계.
- [0124] 본 발명의 또 다른 측면에 따른 제1 구현예에서, 첫번째 pH 값은 메탄생성 미생물의 빠른 복제 및 성장을 유도하기 위해 pH 5.5 내지 7.0 범위이며 여기서 두번째 pH 값은 단계 a의 메탄 생산에 비해 메탄 생산을 증가 및 최적화하기 위해 pH 7.1 내지 10 범위, 즉 더 낮은 pH 범위이다.
- [0125] 대안적으로, 두번째 pH 값은 pH 4.5 내지 6.5 범위일 수 있으며 임의적으로 첫번째 pH보다 낮다.
- [0126] 본 발명의 발명자들은 각각 산성 내지 중성 pH 범위인 초기 첫번째 pH, 및 알칼리성 내지 중성 pH 범위에 있는 두번째 pH 범위의 변화가 실질적으로 메탄 대사를 활성화하였으며, 따라서 배양 중에 사용된 첫번째 pH 범위에서 발견된 메탄 생산과 비교하여 메탄 생산의 현저한 증가를 야기하였음을 입증할 수 있었다.
- [0127] 따라서 본 발명에 따른 방법으로 메탄 생산을 실질적으로 증가시키는 것이 가능하였다. 이는 pH 값에 대한 변화인 것처럼 보이며, 메탄생성 유기체를 배양하는 단계 동안 메탄 대사를 실질적으로 유도하고 따라서, 두번째 pH 범위에서 첫번째 pH 범위에서의 비율에 비해 평균 메탄화율을 적어도 15% 내지 최대 100 %, 또는 적어도 30% 내지 최대 80 % 또는 적어도 50% 내지 최대 70 % 증가시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0128] 흥미롭게도, 중성인 첫번째 pH 범위에서 산성인 두번째 pH 범위로의 변화조차도 메탄화율의 이러한 비슷한 현저한 증가를 개시할 수 있었다는 것이 추가로 밝혀졌다.
- [0129] 본 발명의 상기 추가 구현예에 따르면 각각 산성 내지 중성 pH 범위인 초기 첫번째 pH 범위에서 알칼리성 내지 중성 pH 범위에 있는 두번째 pH 범위로의 상기 변화를 포함하는 메탄화 방법은 실질적으로 메탄 대사를 활성화시켰으며 따라서 배양 동안 사용되는 첫번째 pH에서 발견된 메탄 생산과 비교하여 메탄 생산의 현저한 증가를 야기하였다.

도면의 간단한 설명

- [0130] **도 1:** H₂S의 첨가 후 실시예 1 및 2에 따른 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물에서 pH 조절 후 메탄화 재확립. 배양물 붕괴(400 h)는 H₂S의 양만을 줄임으로써(300 h) 방지될 수 없음을 관찰할 수 있었다. 따라서 pH 조절은 메탄화 재확립 및 바이오매스 농도 증가에 적절한 역할을 한다.
- 도 2:** 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용하여 최대 24000 mg/L의 S²⁻ 첨가 후 메탄화 결과. 데이터는 pH 조절의 구현으로 인해 매우 다량의 오염물(Na₂S)의 첨가 후 배양물의 대사 활성 측면에서 놀라운 성능을 나타낸다.
- 도 3:** 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용하여 공정 공급 가스에 존재하는 CO₂ 전환율 및 황화수소 함량 및 산소 함량.
- 도 4:** CO₂에서 설피스 II로 공급 가스 전환 시 산소 및 황화수소를 함유하는 처리된 지열 가스의 메탄화 안정성. 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 메탄생성 미생물의 호기성 조작은 방법의 효율

에 기여한다.

도 5: 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용하여 실시예 5에 따른 처리된 지열 가스만을 사용한 메탄화의 지속성. 데이터는 본 발명의 방법의 구현예에 따라 H₂ 대 CO₂의 매우 낮은 화학량론적 비가 유지되고 추가의 오염물이 배양물에 첨가되었을 때조차 메탄화의 놀라운 지속성을 나타낸다.

도 6: 24 mg/L의 S²⁻(검은색으로 채워진 원), 121 mg/L의 S²⁻(회색으로 채워진 원) 최대 12.700 mg/L의 S²⁻(채워지지 않은 원)의 첨가 후 생촉매로서 메타노브레비박터 아르보리필루스를 사용한 메탄화 결과. 초기 pH 값이 표시된다. 초기 메탄화는 100%로 설정되었고 추가의 값은 이 값으로 정규화되었다. 그래프의 주어진 시간에서 각 측정점은 원으로 표시되며 1 회 반복 값 또는 2 회 독립적 반복 값의 평균을 나타낸다. 데이터는 pH 조절이 구현될 때 오염물(Na₂S)의 첨가 후 배양물의 대사 활성 측면에서 놀라운 성능 및 pH 조절이 구현되지 않을 때 명백한 성능 감소를 모두 나타낸다.

도 7: 24 mg/L의 S²⁻(검정색으로 채워진 원), 121 mg/L의 S²⁻(회색으로 채워진 원) 최대 12.700 mg/L의 S²⁻(채워지지 않은 원)의 첨가 후 생촉매로서 메타노써무스 페르비두스를 사용한 메탄화 결과. 초기 pH 값이 표시된다. 초기 메탄화는 100%로 설정되었고 추가 값은 이 값으로 정규화되었다. 그래프의 주어진 시간에서 각 측정점은 원으로 표시되고 1 회 반복 값 또는 2 회 독립적 반복 값의 평균을 나타낸다. 데이터는 pH 조절이 구현될 때 오염물(Na₂S)의 첨가 후 배양물의 대사 활성 측면에서 놀라운 성능 및 pH 조절이 구현되지 않을 때 명백한 성능 감소를 모두 나타낸다.

도 8: 첫번째 pH 값(pH< 7.2)에서 및 첫번째 pH 값보다 더 높은 알칼리성 두번째 pH 값(pH< 7.45)으로 pH 변화 후 메타노브레비박터 아르보리필루스 배양물의 평균 CO₂ 전환율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0131] 하기 실시예는 본 발명을 실시예로 제한하려는 의향 없이 의도된 대로 기재된 방법을 수행하는 실행가능한 방식을 예시한다.
- [0132] **실시예 1: 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 표준 메탄화 공정에 대한 황화수소 효과의 시뮬레이션**
- [0133] 실험 초기에 메탄생성 고세균(메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물)을 사용한 바이오메탄화 공정은 일정한 성능 조건으로 있었다(10 내지 12 g/L의 안정된 바이오매스 농도 및 대략 40 L_{CH₄}/L_{반응기}/일의 부피측정 메탄 생산성). 이러한 표준 조건 하에 공급 가스 유입(H₂ 및 CO₂), 메탄생성 고세균의 바이오매스(생촉매인자) 뿐만 아니라 pH 값(용해된 CO₂의 양에 따라 pH 8.0 내지 8.5)은 안정되었다.
- [0134] 정의된 시점에서 실험을 시작하기 위해(189 시간 실행 시간으로 도 1 참조) 2000 ppm H₂S를 공급된 수소 및 이산화탄소 가스에 연속으로 첨가하였다. 처음에 메탄 전환율은 60 ppm H₂S가 첨가될 때 예상된 수준이었지만 (~90% 전환), 2000 ppm H₂S의 첨가 후 192 시간 이내에 검출 한계 미만 값으로 떨어졌다. 배양물은 또한 2000 ppm H₂S의 첨가 시 검정색으로 변하였으며, 이는 배지 성분 니켈, 철 및 코발트로 알려진 비용해성 금속-황화물 복합체의 형성을 나타내었다.
- [0135] 따라서 2000 ppm H₂S의 첨가는 바이오매스 농도 부피측정 메탄 생산성을 모두 각각 약 50% 및 100%로 갑작스럽고 꾸준히 감소시킨다. 이 "붕괴"는 H₂S 농도를 공정에 의해 보통 허용되는 것으로 알려진 값인 단지 60 ppm H₂S로 줄임으로써 또한 회복될 수 없었다(도 1의 311 시간 실행 시간).
- [0136] 가설에 얽매이지 않고, 본 발명자들은 이러한 상대적으로 많은 양의 H₂S를 첨가하면 배양 배지에 존재하는 특정 금속과 함께 불용성 황화물 염을 형성한다는 것을 추측하였다. 이 가설은 H₂S의 첨가 시 생촉매 현탁액의 검은색 착색에 의해 뒷받침되었으며, 예를 들어 철은 황화물과 함께 검은색 불용성 염을 생성하는 것으로 알려져 있다. 이들 금속이 용해되지 않지만 침전되는 경우, 이들은 생촉매에 이용가능하지 않고 이러한 제한은 관찰된 바와 같이 생촉매 바이오매스 농도 감소 및 메탄화 생산성의 총 손실 효과를 야기할 것이다.
- [0137] **실시예 2: pH 조절은 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용하여 최대 24000 mg/L 고농도 황화물**

(S²⁻)의 허용치를 가능하게 한다

- [0138] 도 2에서 본 발명의 방법에 따른 메타노써모박터 썸마오토트로피쿠스 배양물의 메탄화 활성을 보고하는 그래프는 H₂ 환원(또는 전환)으로 측정된 바와 같이 제시되어 있다. 5 개 실험 결과가 그래프로 보고되어 있으며, 표에서 1-5에 상응하고 오른쪽에 모두 제시된 범례에서 기호로 식별된다.
- [0139] 처음 2 개 실험에서, 본 발명의 방법에 기재된 체계 내에서 pH를 조절하면서, 12000 mg/L 농도의 황화물(S²⁻)을 Na₂S의 형태로 배양물에 투여하였다. H₂의 높은 전환은 상기 12000 mg/L 농도의 황화물의 존재 하에 달성되고, 이러한 결과는 실험 기간 동안 꾸준히 유지된다는 것을 그래프에서 알 수 있었다.
- [0140] 실험 3은 24000 mg/L의 황화물(S²⁻)을 pH 조절 없이 배양물에 투여한 H₂의 전환 결과를 나타낸다: 배양물의 pH는 높은 알칼리성(>12)으로 이동하고 전환은 급격히 낮아진 후 정규화를 향해 느리게 상승한다.
- [0141] 실험 4 및 5는 24000 mg/L의 황화물(S²⁻)을 pH 조절하여 배양물에 투여한 H₂의 전환 결과를 나타낸다: 배양물의 pH는 본 발명의 방법에 기재된 체계 내의 값으로 능동적으로 유지되어, 실험 기간 동안 상기 24000 mg/L 농도의 황화물의 존재 하에 예상치 못한 놀라운 높은 H₂ 전환 및 배양물의 꾸준한 연속 성능을 초래한다.
- [0142] 실험 3의 결과와 실험 4 및 5의 결과를 비교하여 본 발명의 방법에 따른 pH 조절을 겪은 배양물은 메탄화 공정의 성능 또는 연속성의 손실 없이 고농도의 황화물을 견딜 수 있을 뿐만 아니라, 자체 성능을 개선시킬 수 있다는 것으로 출론될 수 있다.
- [0143] **실시예 3: 메타노써모박터 썸마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 pH 값 조절에 의한 공정 개선**
- [0144] H₂S의 첨가 시 시험 설정에서 메탄화 공정 성능을 유지하기 위해, 본 발명자들은 pH 값을 효과적으로 제어하는 추가의 공정 단계를 도입하여 전체 공정 동안 약 7의 pH가 획득되도록 보장하였다. 메타노써모박터 썸마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 이러한 공정 조건 하에, HS⁻ 및 S²⁻의 형성은 훨씬 더 낮은 것으로 밝혀졌으며 또한 불용성 염의 형성이 줄어드는 것처럼 보였다.
- [0145] 이를 위해, 실시예 1의 실험 설정 후 공정 배양물을 1:2 비율로 새로운 배양 배지로 희석하였다(도 1에서 381h 실행 시간). 이 실험에서 희석 접근법이 사용되었는데, 이는 공정을 완전히 재시작하지 않고 생축매 현탁액에서 이전에 침전된 금속 염과 같은 원치않은 성분의 농도를 감소시키는 쉬운 방식이기 때문이다. 추가로, pH 값은 7(약 0.3)의 범위로 설정되었다. 이 시작 단계에서 공급된 H₂S는 여전히 60 ppm이었다.
- [0146] 희석되고 pH 안정화된 배양 조건 하에, 생축매 배양물은 메탄 생산성 및 바이오매스 생산을 모두 재개시하였다(도 1; 실행 시간 450h).
- [0147] 501h 실행 시간에, H₂S 공급은 다시 2000 ppm으로 설정되었다. 신규 pH 설정으로 인해, 배양 성능 및 성장에 대한 H₂S 첨가의 부정적인 이전에 관찰된 효과가 해결될 수 있다.
- [0148] 대략 500 내지 630h 사이의 pH 변동은 pH 투입이 수동으로 조정되어야 하고 pH 7을 유지하기에 충분한 신규 투입 속도가 먼저 결정되어야 한다는 사실 때문이다. pH-제어 염기의 불충분한 공급은 pH 값을 약 pH 6의 pH 값으로 떨어뜨렸고, 또한 메탄 생산성 손실을 나타내었다.
- [0149] **실시예 4: 메타노써모박터 썸마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 최대 16000 ppm 농도의 H₂S에서 황화수소 허용치**
- [0150] 실시예 3에 따른 pH 제어 전략에 따라, 또한 훨씬 더 높은 농도 예를 들어 최대 16000 ppm H₂S가 또한 테스트 시스템에 연속으로 첨가되고 바이오메탄화 공정에 공급된 수소 및 이산화탄소 가스와 함께 공급될 수 있다.
- [0151] 이를 위해, 처음에 메타노써모박터 썸마오토트로피쿠스의 배양물에서 메탄 전환율은 60 ppm H₂S가 첨가될 때 예상된 수준으로 안정화되었지만(~90% 전환) 2000 ppm H₂S의 첨가 후 192 시간 이내에 검출 한계 미만 값으로 떨어졌다.
- [0152] 높은 수준의 H₂S의 존재 하에 메탄화는 본 발명자들이 공정을 재시작하고 수동으로 배양물의 pH 값을 감소시켰을

때만 안정화되어야 하며, 통상적으로 8 내지 8.5일 수 있으며, 약 7의 pH 값으로 적어도 1 로그 감소된다.

[0153] 이러한 변형은 놀랍게도 메탄 생산성과 어떠한 관련된 변화 없이 최대 16000 ppm H₂S의 첨가 메탄화 공정을 실행시켰다.

[0154] **실시예 5: 메타노씨모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 추가 산소의 영향 하에 메탄화 공정의 황화수소 허용치**

[0155] 실시예 4에 따른 결과는 최대 12000 ppm H₂S가 첨가된 메타노씨모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 실험 설정에서 재현되었다. 추가로, 이 실험에서 H₂S 이외에 O₂를 1000 ppm/일 및 최종 농도 5000 및 7000 ppm/일까지의 단계로 첨가하였다.

[0156] H₂S 및 O₂의 동시 첨가는 전환 효율에 상당한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(90%로 남아있음). 이 결과는 메탄화 공정에서 "실제" 또는 적어도 "처리된" 지열 가스를 사용하는 경우에도, 본 발명에 따른 pH 제어의 예상치 못한 이점을 근거로 하여 정확히 입증하고 있다.

[0157] **실시예 6: 메타노씨모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 전처리된 지열 가스에 의한 메탄화 공정**

[0158] 지열 가스의 원료 비응축성 분획은 전형적으로 언급된 30000 ppm H₂S보다 최대 10 배 더 많은 범위에서 상당히 많은 양의 H₂S를 함유할 수 있다. 일부 산업 설정에서와 같이 이러한 많은 양은 소위 설피크스 공정(예를 들어 아이슬란드 소재의 헬리세이드 지열 발전소)에서 원료 지열 가스를 전처리함으로써 30000 ppm으로 감소되며, 이 실험 설정에서 전처리된 가스는 메타노씨모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용하는 실험에 사용되었다. 이 가스는 "처리된 지열 가스"라고 한다.

[0159] 처리된 지열 가스는 전형적으로 최대 대략 2%의 농도로 산소(O₂)를 함유하며 압축기에 의해 생성되고 통상적으로 메탄생성 고세균의 자연 환경의 일부가 아닌 상황이라는 점에 유의해야 한다.

[0160] 이러한 높은 H₂S 또는 O₂ 수준, 및 특히 두 수준의 조합에 대한 장기 효과는 지금까지 체계적으로 조사되지 않았다. 그러나, 이러한 매개변수를 향한 본 발명에 따른 메탄화 공정의 허용치는 메탄 생산을 위해 처리된 지열 가스의 비응축성 분획에 존재하는 수소(H₂) 및 이산화탄소(CO₂)의 사용을 허용하기 위한 전제조건이다.

[0161] 처리된 지열 가스의 전형적인 조성은 표 1에 제시되어 있다:

[0162] 표 1. 처리된 지열 가스의 전형적인 조성.

처리된 지열 가스의 가스 조성	
조성 (vol%)	
H ₂ S	3.3%
CO ₂	51.5%
H ₂	36.1%
N ₂	6.6%
O ₂	1.1%
CH ₄	1.0%
H ₂ O	0.3%
합계	100.0%

[0163]

[0164] 공정은 3 일 동안 지열 가스로 전환하기 전에 배양을 시작하도록 순수한 CO₂ 및 전해질 H₂로 개시하였다. 이후에, "순수한" CO₂를 처리된 지열 가스에서 비롯된 CO₂로 대체하였고 따라서 0.4 L/분의 총 유입 유량 및 4.3:1의 화학량론을 유지하기 위해 유속을 조정하였다. 결과적으로, 처리된 지열 가스의 흐름은 대략 0.065 L/분의 CO₂ 흐름에 상응하는 0.125 L/분이었다(처리된 지열 가스 중 CO₂ 함량 53%). 추가의 전해질 H₂로 희석하여, 유입 시 H₂S, O₂ 및 N₂와 같은 다른 가스는 각각 0.6 vol.%, 0.4 vol.% 및 2.4 vol.%였다(도 4). 도 4에 예시된 바와

같이, CO₂에서 처리된 지열 가스로의 전환은 CO₂의 CH₄로의 전환을 98%에서 87%로 약간 떨어뜨렸으며, 이는 몇 시간 이내에 빠르게 회복되었고 다시 95% 초과 전환율을 초래하였다.

[0165] **실시예 7: 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물만을 사용한 처리된 지열 가스에 의한 메탄화 공정**

[0166] 전해질 H₂의 첨가가 완전히 중지된 실험이 특히 성공적이었기 때문에 여기서 한 가지 테스트가 특별히 언급되어야 한다.

[0167] 이를 위해, 상기 기재된 바와 같은 공정은 메타노써모박터 썬마오토트로피쿠스의 배양물을 사용한 처리된 지열 가스에서만 확립하였다. 이는 (처리된) 지열 가스에만 설치된 전해조 없이 메탄화 공정을 실행하게 하였다.

[0168] 처리된 지열 가스는 약 0.67:1의 H₂:CO₂의 비를 가졌으며 따라서 종종 믿고있던 최적 비 4:1보다 한참 아래이다. 결과적으로, 불완전한 CO₂ 전환이 예상되었다. 그러나, pH-제어로 적용된 공정은 전처리된 가스에서만 매우 성공적으로 실행되었다.

[0169] "총" CO₂ 전환은 약 13.6%였으며, 이 화학량론으로 주어진 (약 16.2%의) 이론적 최대 전환율의 약 80%에 상응한다. 이 매우 놀라운 효과는 처리된 지열 가스만 공정 공급으로 사용되었음에도 불구하고 메탄화 공정이 성공적으로 작동하였음을 입증하였다(도 5).

[0170] **실시예 8: 메타노브레비박터 아르보리필루스의 배양물을 사용한 고농도 황화물에서의 메탄화**

[0171] 도 6에서 본 발명의 pH 제어 및 조절 방법을 적용하거나 적용하지 않은 메타노브레비박터 아르보리필루스 배양물의 메탄화 활성을 보고하는 3 개의 그래프가 H₂ 환원(또는 전환)에서 측정된 바와 같이 제시되어 있다. 3 개의 상이한 황화물 농도를 테스트하였으며 각각은 단일 그래프로 나타낸다. 배양물의 평균 광학 밀도(OD₆₁₀)는 3 내지 5였다.

[0172] 첫번째 실험에서(검정색으로 채워진 원), 24 mg/L 농도의 황화물(S²⁻)을 본 발명의 방법에 기재된 체계 내에서 pH 조절을 제공하면서 Na₂S의 형태로 메타노박테리아 종의 배양물에 투여하였다. 높은 메탄 형성은 7.2의 초기 pH 값에서 조절된 상기 24 mg/L 농도의 황화물의 존재 하에 달성되고, 이러한 결과는 실험 기간 동안 꾸준히 유지된다는 것을 도 6의 상응하는 그래프에서 알 수 있다.

[0173] 약 7.2의 초기 pH 값에서 pH 조절을 제공하면서 5 배 더 높은 121 mg/L 농도의 황화물이 투여될 때, 두번째 실험(회색으로 채워진 원)에서 메타노브레비박터 아르보리필루스의 배양물을 사용함으로써 유사한 결과를 관찰하였다: 이들 조건은 상기 121 mg/L 농도의 황화물의 존재 하에 배양물의 예상치 못한 놀랍게도 높은 메탄화 및 연속 성능을 초래하였다.

[0174] 세번째 실험에서 임의의 pH 조절 없이 배양물에 각각 12.700 mg/L의 황화물이 투여될 때 메탄화를 분석하였다. 도 6은 8.7의 초기 pH 값, 즉 약 pH 값 9에서의 결과를 나타낸다(채워지지 않은 원 참조). pH 조절이 없는 이 시나리오에서 초기 pH는 9.0을 초과하는 pH 값으로 증가하였고 결과적으로 메탄화는 실험 기간 동안 극적으로 낮아진다.

[0175] **실시예 9: 메타노써무스 페르비두스의 배양물을 사용한 고농도 황화물에서의 메탄화**

[0176] 도 6과 비슷하게, 도 7에서 본 발명의 pH 제어 및 조절 방법을 적용하거나 적용하지 않고 메타노써무스 페르비두스 배양물의 메탄화 활성을 보고하는 3 개의 그래프가 H₂ 환원(또는 전환)에서 측정된 바와 같이 제시되어 있다. 3 개의 상이한 황화물 농도를 테스트하였으며 각각은 단일 그래프로 나타낸다. 배양물의 평균 광학 밀도(OD₆₁₀)는 1.5 내지 2.5였다.

[0177] 24 mg/L 농도의 황화물(S²⁻)로 주어진 첫번째 실험(검정색으로 채워진 원) 및 121 mg/L 농도의 황화물로 주어진 두번째 실험(회색으로 채워진 원)의 결과는 도 7에서 알 수 있는 바와 같이 메타노브레비박터 아르보리필루스를 사용할 때의 경우와 유사한 결과를 나타내었다. 즉, 이러한 농도의 황화물은 높은 메탄 형성을 초래하였고, 이러한 결과는 실험 기간 동안 꾸준히 유지된다.

[0178] 세번째 실험에서, 임의의 pH 조절 없이 각각 12.700 mg/L의 황화물을 배양물에 투여할 때 메탄화가 분석된 경우 메타노브레비박터 아르보리필루스의 배양물을 사용한 세번째 실험에서와 같은 유사한 결과를 받았다. 도 7은

결과를 나타낸다(채워지지 않은 원 참조). pH 조절이 없는 이 시나리오에서 8.7의 초기 pH는 9.0을 초과하는 pH 값으로 증가하였고 결과적으로 메탄화는 실험 기간 동안 극적으로 낮아졌다.

[0179] 실험 1 및 2의 결과와 메타노브레비박터 아르보리필루스 및 메타노써무스 페르비두스의 실험 3의 결과를 비교하여, 본 발명의 방법에 따라 pH 조절을 겪는 2 가지 추가 및 별개의 미생물 속의 배양물은 일관되게 메탄화 공정의 성능 또는 연속성의 손실 없이 고농도 황화물을 견뎌낼 수 있는 것으로 추론될 수 있다.

[0180] **실시예 10: 개선된 배양 방법**

[0181] 메탄화를 추가로 개선하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 또한 메탄생성 미생물의 배양 기술을 개선하였다. 간단히 말해서, 메타노브레비박터 아르보리필루스 배양물을 pH ≤7.2(평균 7.1)에서 대략 400 시간 동안 고정 조건에서 성장시켰다. 이러한 조건 하에, 23%의 평균 (CO₂) 전환이 관찰되었다.

[0182] 이 초기 배양을 시작한 후, pH는 지속적으로 7.45를 초과하여(평균 7.6) 증가하였다. 시간 경과에 따른 메탄화에 대한 놀라운 효과는 도 8에 도시되어 있다. 증가된 pH로의 이러한 pH 변화는 35%의 평균 (CO₂) 전환을 초래하였고 따라서 예상치 못하게 평균 메탄화율을 각각의 낮은 pH 조건에서 보다 유리하게는 약 50% 더 높게 개선시켰다(도 8 참조).

[0183] 유사한 실험에서, 메타노브레비박터 아르보리필루스 배양물이 pH ≤6.5에서 고정 조건에서 처음 성장한 경우 pH가 지속적으로 7.45를 초과하여 변화된 후 비슷한 예상치 못하게 유익한 메탄화 증가를 초래하였다(데이터는 제시되지 않음).

[0184] 이들 실험으로부터 본 발명의 발명자들은 이론에 얽매이지 않고 최신 기술 지식의 어떤 예측에도 불구하고 증가된 pH 값으로의 변화가 상이한 메타노박테리아 종에 대한 본 발명의 실시예에 제시된 바와 같은 메탄생성 미생물의 대사 및 메탄화 성능에 유익한 영향을 미친다는 결론을 내렸다.

[0185] **참고문헌:**

Maillacheruvu, K. Y., Parkin, G. F., Peng, C. Y., Kuo, W. C., Oonge, Z. I., Lebduschka, V., *Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics*, Water Environment Federation, Vol. 65 (2), pp. 100-109 (1993)

Koster, I. W., Rinzema, A., De Vegt, A. L., Letinga, G., *Sulfite inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH - levels*, Water Research, Vol. 20 (12), pp. 1561-1567 (1986)

[0186]

O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R., Colleran, E., *Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria*, Process Biochemistry, Vol. 33, Issue 5, pp. 555-569 (1998)

Paula Jr., D. R., Foresti, E., *Sulfide toxicity kinetics of a uasb reactor*, Braz. J. Chem. Eng., Vol. 26 no. 4, pp. 669-675 (2009)

Edgcomb, V. P., Molyneaux, S. J., Saito, M. A., Lloyd, K., Böer, S., Wirsén, C. O., Atkins, M. S., Teske, A., *Sulfide Ameliorates Metal Toxicity for Deep-Sea Hydrothermal Vent Archaea*, Appl. and Environmental Microbiol., Vol. 70, no. 4, pp. 2551-2555 (2004)

McAnulty, M. J., Poosarla, V.G., Kim, K.-Y., Jasso-Chávez, R., Logan, Br. E., Wood, T. K., *Electricity from methane by reversing methanogenesis*, Nat. Comm., Vol. 8, art. 15419 (2017)

Procházka, J., Dolejš, P., Máca, J. & Dohányos, M., *Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen*, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 93, pp. 439-447 (2012).

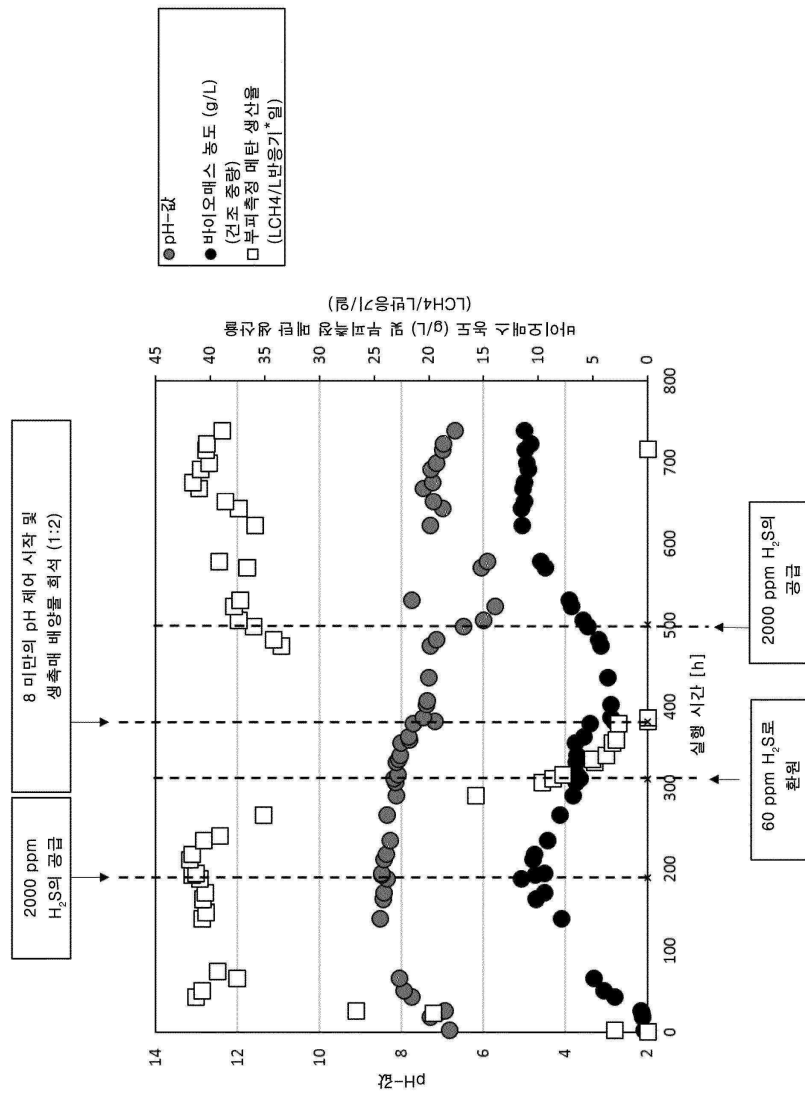
Anderson I, Djao OD, Misra M, Chertkov O, Nolan M, Lucas S, Lapidus A, Del Rio TG, Tice H, Cheng JF, Tapia R, Han C, Goodwin L, Pitluck S, Liolios K, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova N, Pati A, Brambilla E, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Sikorski J, Spring S, Rohde M, Eichinger K, Huber H, Wirth R, Göker M, Detter JC, Woyke T, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Klenk HP, Kyrpides NC.; *Complete genome sequence of Methanothermus fervidus type strain (V24S)*; Stand Genomic Sci. 2010 Nov 20;3(3):315-24

Stetter KO, Thomm M, Winter J, Wildgruber G, Huber H, Zillig W, Jané-Covic D, König H, Palm P, Wunderl S.. *Methanothermus fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig C2 1981; 2:166-178

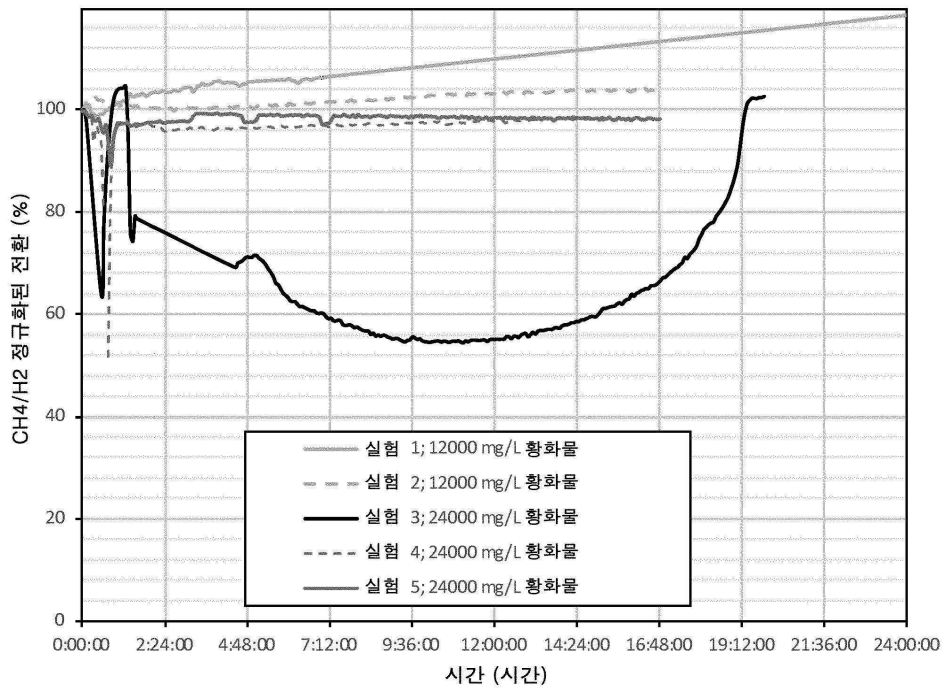
[0187]

도면

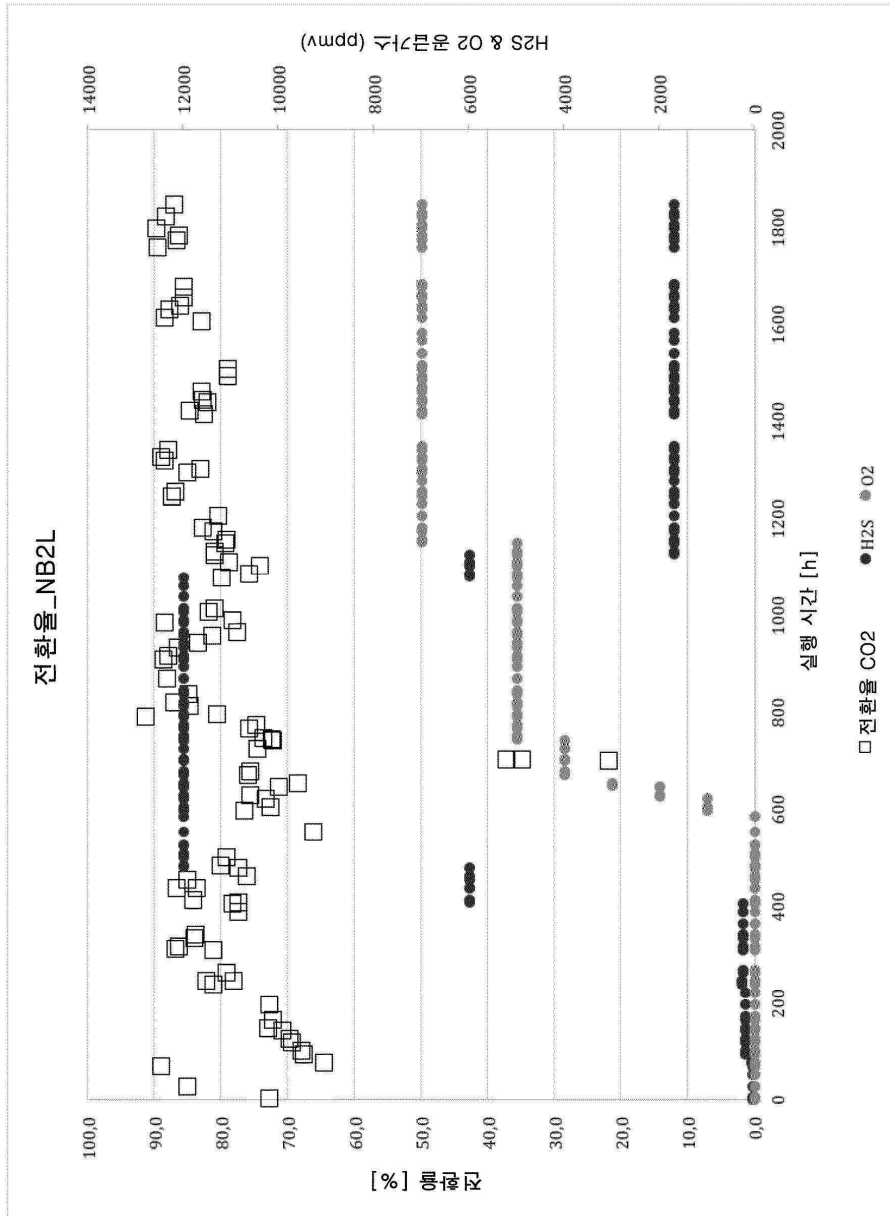
도면1



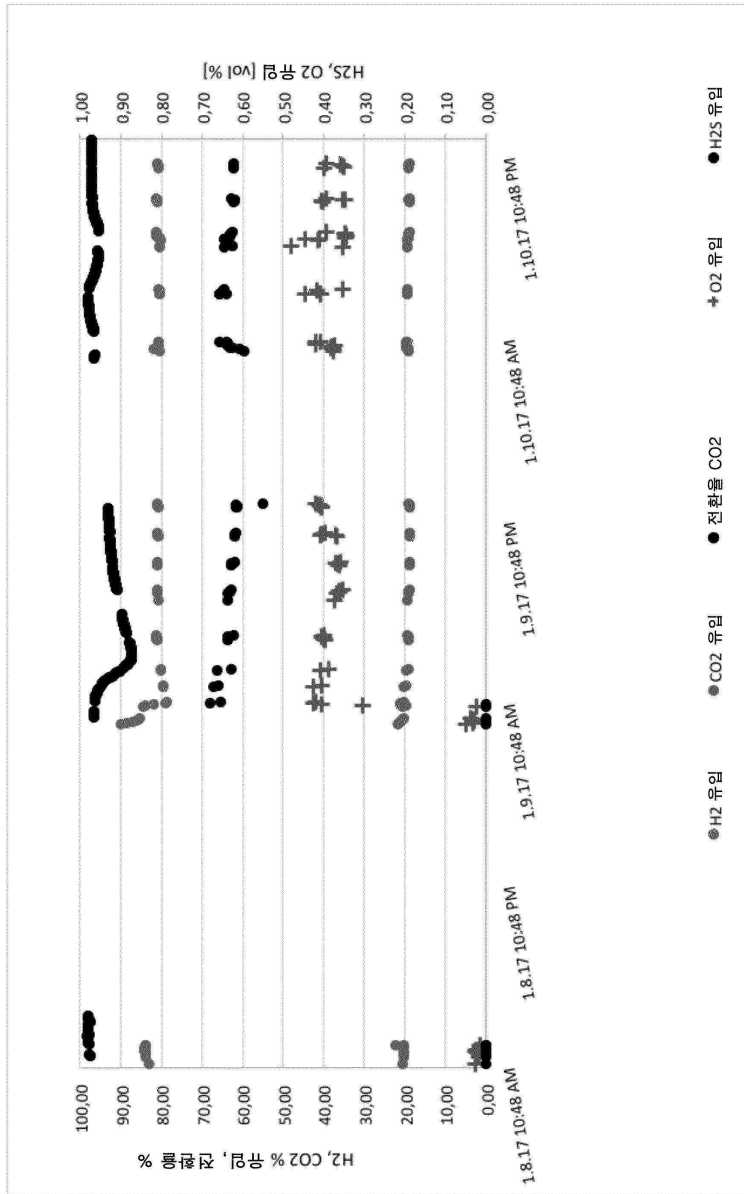
도면2



도면3



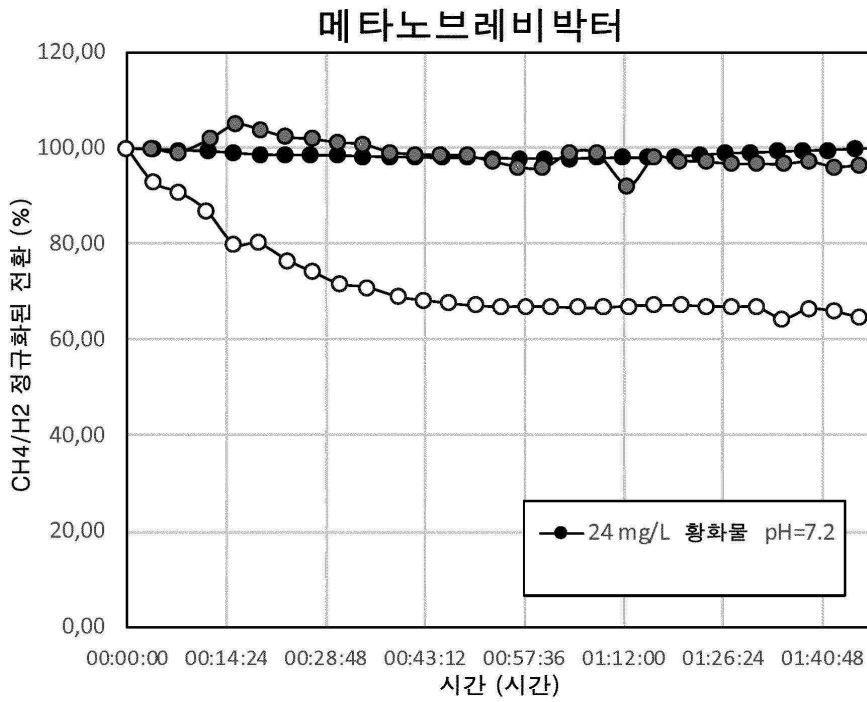
도면4



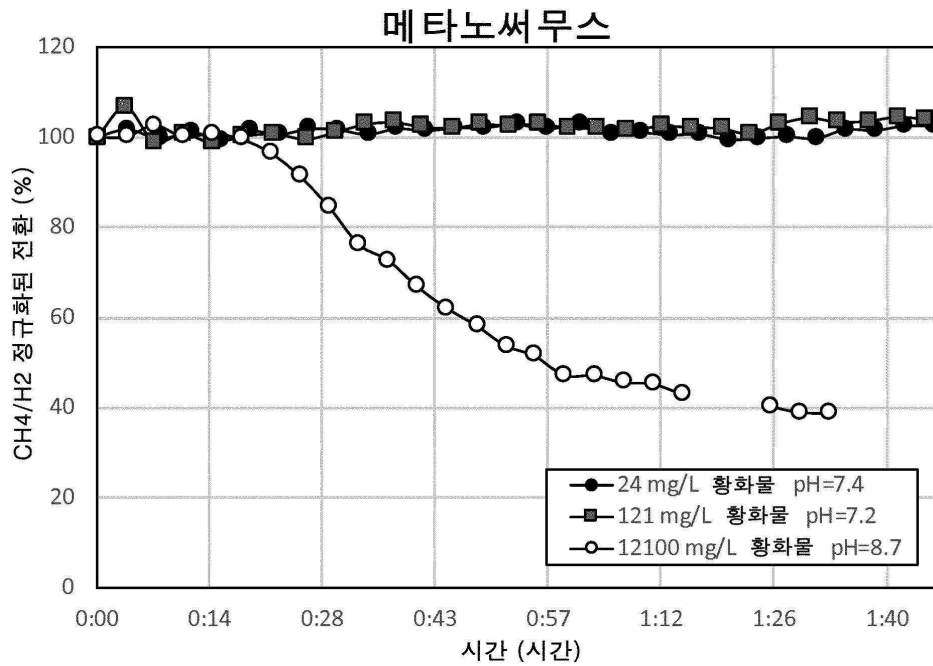
도면5



도면6



도면7



도면8

