



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0008756
(43) 공개일자 2016년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0088851

(22) 출원일자 2014년07월15일

심사청구일자 2014년12월18일

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)

(72) 발명자

박정호

대전광역시 유성구 노은서로 130-12

임용배

대전광역시 동구 계족로 137 새들피휴먼시아1단지
아파트 105동 1004호

(74) 대리인

특허법인 플러스

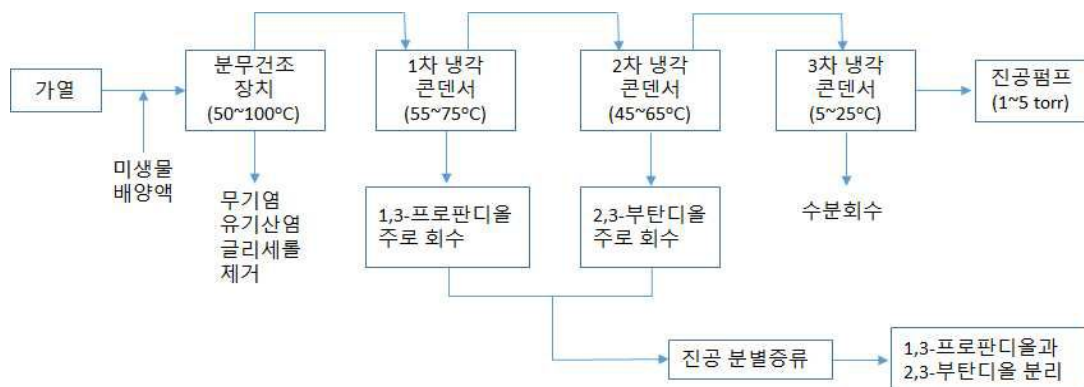
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 미생물 배양액으로부터 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올의 분리 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액으로부터 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올을 분리 및 정제하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액을 증발시킨 후 콘덴서를 순차적으로 통과시켜 탈수 및 제염을 동시에 진행하며 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명 따른 분리방법을 사용함으로써, 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 및 2,3-부탄디올(2,3-butanediol)을 생산하는 미생물의 배양액으로부터 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 고효율, 저비용으로 분리 및 정제할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415126321

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 지식경제부

연구사업명 연구개발특구육성

연구과제명 미생물변이체를 이용한 1,3-프로판디올 생산기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)젠닥스

연구기간 2012.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액을 80 내지 100 ℃의 스팀라인(steam line)에서 가열한 뒤 분무하여 50 내지 100 ℃의 분무건조장치에 유입시켜 글리세롤 및 염을 제거하는 단계;
- b) a) 단계의 분무건조장치에서 증발된 혼합물을 상기 장치에 연결된 55 내지 75 ℃의 1차 콘덴서에 유입시켜 1,3-프로판디올을 냉각회수하고 2,3-부탄디올을 포함하는 혼합물은 증발시키는 단계;
- c) b) 단계에서 1차 콘덴서를 통과한 2,3-부탄디올을 포함하는 혼합물을 45 내지 65 ℃의 2차 콘덴서에 유입시켜 2,3-부탄디올을 냉각회수하고, 물을 포함하는 혼합물은 증발시켜 5 내지 25 ℃의 3차 콘덴서에 유입시켜 물을 회수하는 단계;
- d) b) 단계 및 c) 단계에서 냉각회수한 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올의 혼합액을 감압 분별증류하여 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 얻는 단계;
- 를 포함하는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*), 엔테로박터 애로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클로스트리듐 브티리쿰(*Clostridium butyricum*) 및 클로스트리듐 파스트리아눔(*Clostridium pasteurianum*)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 분리 및 정제방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 a) 내지 d) 단계의 반응은 1 내지 10 torr의 감압 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 분리 및 정제방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액으로부터 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올을 분리 및 정제하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액을 증발시킨 후 콘덴서를 순차적으로 통과시켜 탈수 및 제염을 동시에 진행하며 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

1,3-프로판디올(1,3-propanediol; PDO)과 2,3-부탄디올(2,3-butanediol; BDO)은 바이오매스로부터 발효를 통해 생산되는 화합물이다.

[0003]

1,3-프로판디올은 인쇄용 잉크, 염색제, 코팅제, 윤활제 및 내한제(anti-freeze agent) 생산 분야와 같은 산업에서 유기용매로 이용될 뿐만 아니라, PTT Poly-trimethylene terephthalate) 수지 생산에 이용되는 단량체이다. PTT는 TPA(Terephthalic acid)나 DMT(Dimethyl terephthalate)와 1,3-프로판디올의 축합물로서 PET(Polyethylene terephthalate)와 중합 방법 및 화학적 구조가 매우 유사하며, 스판텍스와 같은 신축성 및 폴리에스터와 같은 내구성을 동시에 갖는다. 또한, PET에 필적하는 화학적 안정성과 생물학적 분해성을 갖고, 자외선 저항성, 환경 저항성, 연성 및 탄성 복원력 면에서는 더 유리한 특성을 갖는다.

- [0004] 2,3-부탄디올은 합성 고무, 가소제, 부동액 및 연료 첨가제와 같은 다양한 화합물의 전구체로 사용되며, 최근에는 석유 대체 자원인 바이오매스에서 생산된 2,3-부탄디올로부터 부타디엔(butadiene), 2-부탄온(2-butanone) 및 2,3-디메틸옥시란(2,3-dimethyloxirane)을 제조하기 위한 연구에 이용되고 있다.
- [0005] 따라서 바이오매스의 발효(fermentation)에 의한 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 생산은 지속적으로 증가할 것으로 전망되며, 이를 더 효율적으로 생산할 수 있는 기술에 대한 요구도 높아지고 있다.
- [0006] 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*) 또는 엔테로박터 애로게네스(*Enterobacter aerogenes*) 등의 발효 균주에 글리세롤이나 당당류 등의 원료를 제공하고 최적화된 배양 조건(온도, pH, 배지 조성 및 탄소원 등)에서 반응시켜 생산된다. 생산된 발효액의 분리 정제에는 다단계 감압분별증류, 용매 추출 및 미세기공 테프론막 분리 등의 방법이 이용된다.
- [0007] 일반적으로 바이오매스의 발효에 의해 생산된 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 순차적 분리 공정은 여과(filtration), 전기투석법(electrodialysis), 증발(evaporation), 감압증류(vacuum distillation)의 4단계를 거치게 된다. 여과과정에서는 발효액으로부터 세포가 제거되며, 전기투석법을 통해 발효액 내에 포함된 숙신산, 아세트산 및 젖산과 같은 불순물이 제거된다. 증발 공정에서 수분이 증발함에 따라 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올이 농축되고, 최종적으로 감압증류에 의해 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올이 분리된다. 그러나 상기와 같은 일반적인 분리 공정은 높은 에너지 소비 및 고가의 장비로 인해 경제성 측면에서 한계를 나타내고 있다. 따라서 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 효과적으로 분리 정제할 수 있는 경제적인 대체 공정의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 1314707 (2013.09.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 상기 문제점의 해결을 위해 본 발명에서는 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 및 2,3-부탄디올(2,3-butanediol)을 생산하는 미생물의 배양액을 증발시킨 후 온도를 변화시키며 콘덴서를 통과시키고, 이를 진공 분별증류함으로써, 수분, 불순물 및 염이 효과적으로 제거되는 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제방법을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 a) 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물 배양액을 80 내지 100 °C의 스팀라인(steam line)에서 가열한 뒤 분무하여 50 내지 100 °C의 분무건조장치에 유입시켜 글리세롤 및 염을 제거하는 단계; b) a) 단계의 분무건조장치에서 증발된 혼합물을 상기 장치에 연결된 55 내지 75 °C의 1차 콘덴서에 유입시켜 1,3-프로판디올을 냉각회수하고 2,3-부탄디올을 포함하는 혼합물은 증발시키는 단계; c) b) 단계에서 1차 콘덴서를 통과한 2,3-부탄디올을 포함하는 혼합물을 45 내지 65 °C의 2차 콘덴서에 유입시켜 2,3-부탄디올을 냉각회수하고, 물을 포함하는 혼합물은 증발시켜 5 내지 25 °C의 3차 콘덴서에 유입시켜 물을 회수하는 단계; d) b) 단계 및 c) 단계에서 냉각회수한 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올의 혼합액을 감압 분별증류하여 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 얻는 단계; 를 포함하는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제방법에 관한 것이다. 상기 분리 및 정제방법에 대한 일 예시로 제한되지는 않으나 도 1과 같은 장치의 연결을 통한 분리 및 정제방법을 사용할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 상기 a)단계의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 미생물은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*), 엔테로박터 애로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클로스트리듐 브티리쿰(*Clostridium butyricum*) 및 클로스트리듐 파스트리아눔(*Clostridium pasteurianum*)으로 구성되는 균으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 미생물의 배양은 당업계에 공지된 임의의 방법으로 이루어질 수 있다.

[0012] 본 발명에서 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 포함하는 미생물 배양액 내에 존재하는 수분을 제거하기 위한 방법은 제한되지는 않으나 투과증발 방법이 사용될 수 있으며, 바람직한 투과증발 조건은 여과액 내 물의 혼합 비율 70~90% 및 50~90℃일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 여과액 내 물의 혼합 비율 75 내지 90% 및 65 내지 75℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 상기 b) 및 c)단계에서 회수된 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올에는 미량의 불순물이 포함되어 있을 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 d)단계의 증류는 제한되지는 않으나 1,3-프로판디올(끓는점: 211~217℃)과 2,3-부탄디올(끓는점: 177℃)의 끓는점 차이를 이용한 분별 증류일 수 있으며, 바람직하게는 강하막식 박막 증발기(falling thin film evaporator)를 이용한 박막 증류일 수 있다. 그러나, 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 및 2,3-부탄디올(2,3-butanediol)을 고수율로 분리 및 회수할 수 있는 증류 방법이라면 상기 방법으로 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명에서 상기 a) 내지 d) 단계의 반응은 제한되지는 않으나 1 내지 10 torr의 감압 조건 하에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명 따른 분리방법을 사용함으로써, 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 및 2,3-부탄디올(2,3-butanediol)을 생산하는 미생물의 배양액으로부터 고순도의 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 고효율, 저비용으로 분리 및 정제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 분리 및 정제 순서도이다.
 도 2는 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올을 포함하는 배양액의 액체크로마토그램(HPLC) 분석 결과이다.
 도 3은 분무건조 후 반응기내 남아 있는 글리세롤과 무기염 및 유기염 사진이다.
 도 4는 분무건조 후 감압증류로 회수한 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올의 혼합증류액 액체크로마토그램(HPLC) 분석 결과이다.
 도 5는 분무건조 후 컨테서에 회수된 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올의 혼합증류액 TLC분석 결과이다.
 도 6은 분무건조후 감압증류로 회수한 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올이다.
 도 7은 분무건조후 감압증류로 회수한 1,3-프로판디올의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼이다.
 도 8은 분무건조후 감압증류로 회수한 2,3-부탄디올의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼이다.
 도 9는 분무건조후 감압증류로 회수한 1,3-프로판디올의 GC 스펙트럼이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0019] [실시예 1] 미생물 변이체로부터 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 생산

[0020] 제조합 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)에 유일한 탄소원으로 글리세롤을 공급하여 유가식 발효 배양을 실시하였다. 배지 조성은 20 g/L 글리세롤, 3.4 g/L K_2HPO_4 , 1.3 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L MgSO_4 , 0.002 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L 효모추출물, 1 mL/L 철 용액 [5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mL HCl (37%, w/v)] 및 1 mL/L 미량 원소 용액 [70 mg/L ZnCl_2 , 100 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 60 mg/L H_3BO_3 , 200 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 35 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mL HCl (37%, w/v)]이다.

[0021] 5 L 발효조에 2 L의 배지를 첨가하고, 배지 10% 부피의 종균 배양액(seed culture)을 접종한 후, 배양 온도 37℃, 공기공급 2.0 vvm, pH 6 및 교반 속도 300 rpm의 조건으로 배양을 실시하였다. 배양 종료 후 배양액은 고속

액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였으며, 분석결과는 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[표 1]

성분	1,3-프로판디올	2,3-부탄디올	아세테이트	글리세롤
농도 (g/L)	97.72	57.225	8.62	18.05

[실시예 2] 분무건조 방법에 의한 배양액내 수분과 유기산 및 글리세롤 제거

글리세롤을 탄소원으로 하여 재조합 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)균주를 통해 생산된 배양액에는 목적으로 하는 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올과 함께 다량의 물과 유기산 및 글리세롤이 포함이 되어있다. 통상적인 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올 분리 정제에서 공정에서 많은 분리 비용을 차지하는 물의 제거와 순도에 영향을 미치는 유기산 및 글리세롤을 분무건조 방법을 통해 분리하였다.

1차로 셀을 제거한 배양액을 정량펌프를 통해 분무건조 장치로 투입시켰으며 이때 가열기를 통해 90 ℃로 가열시켜 분무건조기로 투입하였다. 분무 건조장치내 조건은 온도를 75~95 ℃로 압력을 1~10 torr로 유지 시켰다. 진행 결과 다량의 물은 제거가 되고 무기염, 글리세롤 및 유기산염 등은 도 3과 같이 분무건조 반응기 하부로 침전이 되었으며 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올은 분무상태에서 1차 냉각 컨덴서로 이동하였다. 표 2와 도 4는 1차 냉각 컨덴서에서 회수된 용액을 분석한 결과를 나타내었다.

[표 2]

성분	1,3-프로판디올	2,3-부탄디올	아세테이트	글리세롤
농도 (g/L)	62.51	20.91	0	0

[실시예 3] 감압분별증류를 통한 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올 분리

분무 건조 반응기로부터 회수된 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 혼합용액은 진공 분별증류 장치를 사용하여 분리한다. 진공압력 3 torr 조건에서 컨덴서 온도 55 ℃에서 2,3-부탄디올을 회수하고 순차적으로 온도 70 ℃에서 1,3-프로판디올을 분리하였다. 분리 후 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 순도를 측정하여 표3과 도5 ~ 도9에 나타내었다.

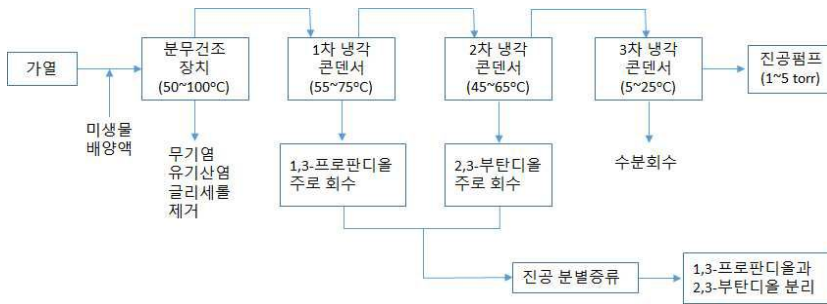
[표 3]

구분	1차 감압 증류 회수액	2차 감압 증류 회수액
성분	1,3-프로판디올	2,3-부탄디올
순도(%)	99.7%	>98%

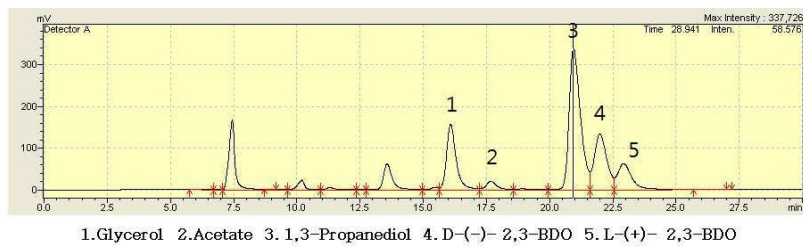
상기 결과로부터, 본 발명의 분리방법을 통하여 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 각각 99.7% 및 98% 이상의 순도로, 고효율, 저비용으로 회수할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

도면

도면1



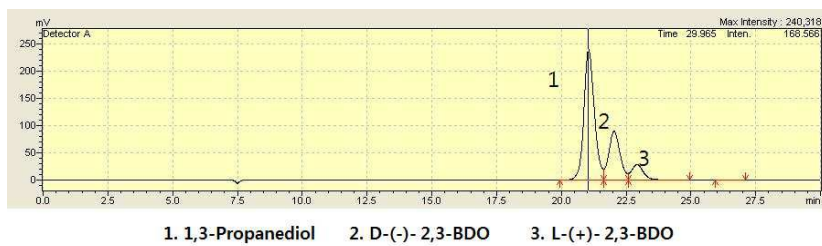
도면2



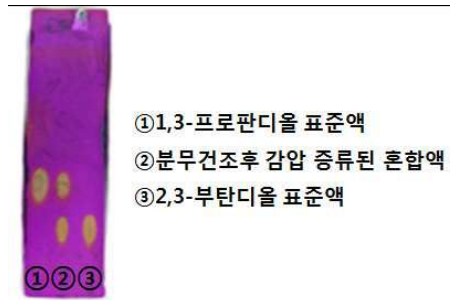
도면3



도면4



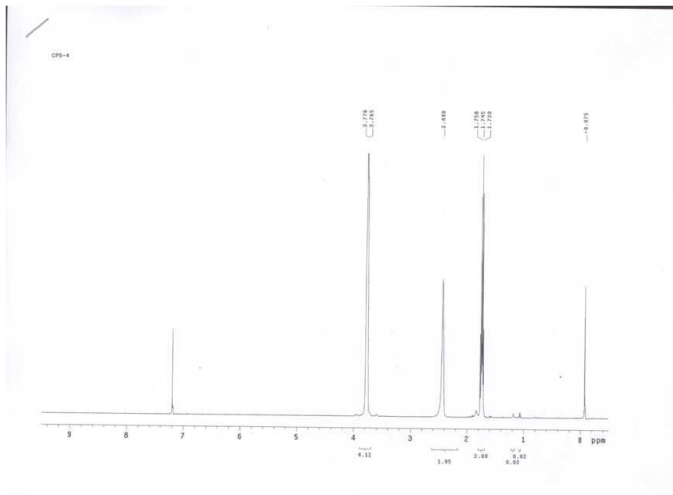
도면5



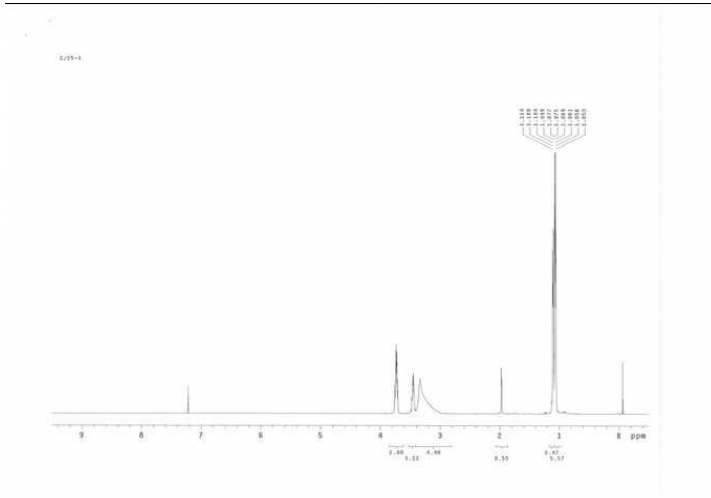
도면6



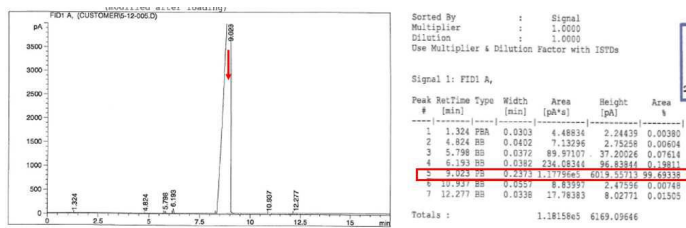
도면7



도면8



도면9



한국화학연구원
화학분석센터
2014-05-03 - 별첨4