(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0049575
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/04 (2013.01)
C12Y 114/13025 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0131174
(22) 출원일자 2018년10월30일
심사청구일자 2018년10월30일
(30) 우선권주장
1020170142126 2017년10월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
나정걸
서울특별시 마포구 백범로 28 서강제2빌딩 702호
오병근
서울특별시 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

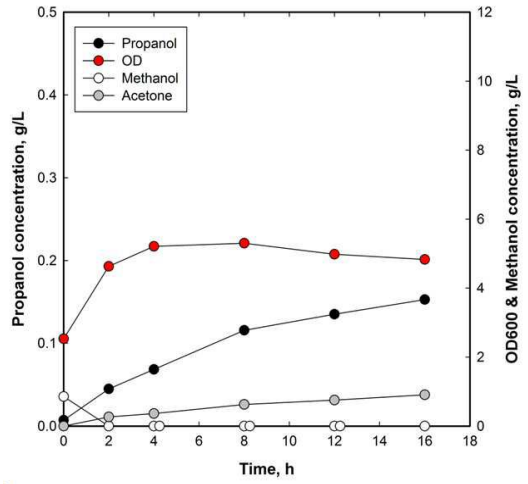
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **메탄자화균을 포함하는 프로판올 생산용 조성물 및 프로판올 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 메탄올을 공급하고 프로판이 포함된 가스 존재하에서 메탄자화균을 배양함으로써 프로판올을 고농도로 생산하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따라 고농도의 프로판올을 안정적으로 생산하는 것이 가능하므로, 이를 효과적으로 고농도의 프로판올을 생산하는 데 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도18



(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호

이은열

서울특별시 강남구 수서동 강남데시앙포레 아파트 104동 802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064929

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064926

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구 & 가스 전달 한계를 극복하는 고효율 C1 가스 전환 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 프로판올 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1 또는 기탁번호 DSM 19304로 기탁된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼(Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z인 것인, 프로판올 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 0.5 내지 4.0 g/L의 메탄올을 추가적으로 포함하는 것인, 프로판올 생산용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 5 내지 30%(v/v)의 프로판을 포함하는 가스를 추가적으로 포함하는 것인, 프로판올 생산용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 가스는 5 내지 30%(v/v)의 메탄을 포함하는 것인, 프로판올 생산용 조성물.

청구항 6

메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액에서 전환 반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 프로판올 생산 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1 또는 기탁번호 DSM 19304로 기탁된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼(Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z인 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 전환 단계는 배양액에 0.5 내지 4.0 g/L의 메탄올을 첨가하여 수행되는 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 전환 단계는 배양액의 구성성분 중 메탄올이 고갈되면 배양액에 0.5 내지 4.0 g/L의 메탄올을 추가로 첨가하여 수행되는 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 전환 단계는 5 내지 30%(v/v)의 프로판을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 가스는 5 내지 30%(v/v)의 메탄을 포함하는 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 전환 단계는 상기 가스를 10 내지 900분 동안 배기하여 수행되는 것인, 프로판올 생산 방법.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 전환 단계는 25 내지 35℃의 온도에서 수행되는 것인, 프로판올 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메탄자화균을 포함하는 프로판올 생산용 조성물 및 프로판올 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 메탄올 및 프로판 함유 가스 존재하에서 메탄자화균을 배양하여 고농도의 프로판올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메탄자화균이 가지고 있는 메탄 산화 효소(methane monooxygenase; MMO)는 기질 특이성이 약하여 프로판으로부터 프로판올 생산이 가능하다. 그러나, 생산된 프로판올은 메탄올 탈수소화 효소(dehydrogenase; MDH)에 의하여 아세톤 등으로 추가 전환되므로 고농도의 프로판올 생산이 불가능하다.

[0003] 프로판올 생산 공정은 프로판을 산화시키기 위한 환원력을 저렴한 메탄이나 메탄올로부터 얻고, 프로판올을 선택적으로 회수하는 개념이다. 메탄자화균이 보유한 메탄올 수소화효소는 생성된 알코올을 분해하여 환원력을 생산하기 때문에 환원력 공급 측면에서 도움이 되나, 생산된 프로판올 역시 분해할 수 있으므로 적절한 운전 전략이나 균주 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 메탄올을 공급하고 프로판이 포함된 가스 존재하에서 메탄자화균을 배양한 결과, 프로판올의 생산 효율이 우수한 것을 확인하였다.

[0005] 이에, 본 발명의 목적은 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속

(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 프로판올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 메틸로모나스 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로썰머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼룰라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 프로판올 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 메탄자화균을 포함하는 프로판올 생산용 조성물 및 프로판올 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 고농도의 프로판올을 생산하는 데 활용할 수 있다.

[0008] 본 발명자들은 메탄올 및 프로판 함유 가스를 이용하여 메틸로모나스 속 DH-1 또는 메틸로마이크로비움 알칼리필럼(Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z을 배양하였고, 경쟁적 기질 저해에 의하여 메탄올 탈수소화 효소는 메탄올을 우선적으로 이용하므로 배양액에 프로판올이 축적되는 것을 확인하였으며, 메탄올 대사를 통하여 생촉매는 지속적으로 활성이 유지되기 때문에 고부가가치의 프로판올을 안정적으로 생산 가능함을 발견하였다.

[0009] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0010] 본 발명의 일 양태는 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로썰머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 프로판올 생산용 조성물이다.

[0011] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1 또는 기탁번호 DSM 19304로 기탁된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼(Methylomicrobium alcaliphilum) 20Z인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 상기 조성물은 0.5 내지 4.0 g/L, 0.5 내지 3.0 g/L, 0.5 내지 2.0 g/L, 1.0 내지 4.0 g/L 또는 1.0 내지 3.0 g/L, 예를 들어, 1.0 내지 2.0 g/L의 메탄올을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 상기 조성물은 5 내지 30%(v/v), 5 내지 25%(v/v), 5 내지 20%(v/v), 10 내지 30%(v/v), 10 내지 25%(v/v), 10 내지 20%(v/v), 15 내지 30%(v/v) 또는 15 내지 25%(v/v), 예를 들어, 15 내지 20%(v/v)의 프로판을 포함하는 가스를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상기 가스는 메탄을 5 내지 30%(v/v), 5 내지 25%(v/v), 5 내지 20%(v/v), 10 내지 30%(v/v), 10 내지 25%(v/v), 10 내지 20%(v/v), 15 내지 30%(v/v) 또는 15 내지 25%(v/v), 예를 들어, 15 내지 20%(v/v) 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 다른 양태는 메틸로모나스 속, 메틸로마이크로비움 속, 메틸로박터 속, 메틸로코커스 속, 메틸로스페라 속, 메틸로칼덤 속, 메틸로글로버스 속, 메틸로사르시나 속, 메틸로프로펀더스 속, 메틸로썰머스 속, 메틸로할로비우스 속, 메틸로게아 속, 메틸로마리넘 속, 메틸로벌럼 속, 메틸로마리노범 속, 메틸로러브럼 속, 메틸로파라코커스 속, 메틸로시너스 속, 메틸로시스티스 속, 메틸로셀라 속, 메틸로캡사 속, 메틸로퍼룰라 속, 메틸아시디필럼 속 및 메틸아시디마이크로비움 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 또는 상기 균주의 배양액에서 전환반응을 유도하는 전환 단계를 포함하는 프로판올 생산 방법이다.

[0016] 본 명세서상의 용어 "전환"은, 배양액 내의 물질을 이용하여 균주가 특정 물질을 생산하는 과정을 의미한다.

[0017] 상기 균주는 기탁번호 KCTC 13004BP로 기탁된 메틸로모나스 속 DH-1 또는 기탁번호 DSM 19304로 기탁된 메틸로마이크로비움 알칼리필럼 20Z인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 전환 단계는 배양액에 0.5 내지 4.0 g/L, 0.5 내지 3.0 g/L, 0.5 내지 2.0 g/L, 1.0 내지 4.0 g/L 또는 1.0 내지 3.0 g/L, 예를 들어, 1.0 내지 2.0 g/L의 메탄올을 첨가하여 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 상기 전환 단계는 상기 배양액의 구성성분 중 메탄올이 고갈되면 배양액에 0.5 내지 4.0 g/L의 메탄올을 추가로 첨가하여 수행되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 전환 단계는 5 내지 30%(v/v), 5 내지 25%(v/v), 5 내지 20%(v/v), 10 내지 30%(v/v), 10 내지 25%(v/v), 10 내지 20%(v/v), 15 내지 30%(v/v) 또는 15 내지 25%(v/v), 예를 들어, 15 내지 20%(v/v)의 프로판을 포함하는 가스 존재하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 가스는 메탄을 5 내지 30%(v/v), 5 내지 25%(v/v), 5 내지 20%(v/v), 10 내지 30%(v/v), 10 내지 25%(v/v), 10 내지 20%(v/v), 15 내지 30%(v/v) 또는 15 내지 25%(v/v), 예를 들어, 15 내지 20%(v/v) 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 전환 단계는 상기 가스를 10 내지 900분 동안 배기하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가스의 배기에 소요되는 최적 시간은 전체 배양액의 부피, 공정 수행 시간, 사용하는 균주의 종류 및 배지 조성을 포함하는 조건의 변동에 따라 적절히 조정될 수 있다.

[0023] 상기 전환 단계는 25 내지 35℃, 27 내지 35℃, 29 내지 35℃, 25 내지 32℃, 또는 27 내지 32℃, 예를 들어, 29 내지 32℃의 온도에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 메탄올 및 프로판 함유 가스 존재하에서 메탄자화균을 배양함으로써 프로판올을 고농도로 생산하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 따라 고농도의 프로판올을 안정적으로 생산하는 것이 가능하므로, 이를 효과적으로 고농도의 프로판올을 생산하는 데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 메탄자화균을 이용한 프로판올의 생산 경로를 나타낸 모식도이다.

도 2는 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하고 리터당 1 g의 프로판올을 추가로 공급한 조건에서 *Methylomonas* sp. DH-1 균주로부터의 프로판올의 생장 저해 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하고 리터당 0.5 g, 1 g, 2 g (0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L)의 메탄올을 추가로 공급한 조건에서 *Methylomonas* sp. DH-1 균주로부터의 메탄올의 생장 저해 영향을 나타낸 그래프이다.

도 4는 메탄올 2 g/L와 프로판 30%을 기질로 하였을 때 DH-1 균주의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 5는 메탄올 2 g/L와 프로판 30%을 기질로 하였을 때 대사 산물의 양을 나타낸 그래프이다.

도 6은 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하는 실험을 수행하고 다양한 농도의 메탄올을 단독 탄소원으로 하였을 때 DH-1 균주의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 7은 초기 OD가 10인 DH-1 균주의 배양액에 메탄올을 2 g/L 투입하고 30%의 프로판을 공급하며 6시간마다 프로판올 및 아세톤, 메탄올 농도를 측정한 그래프이다.

도 8은 초기 OD가 4인 DH-1 균주의 배양액에 메탄올을 2 g/L 투입하고 30%의 프로판을 공급하며 3시간마다 프로판올 및 아세톤, 메탄올 농도를 측정한 그래프이다.

도 9는 DH-1 균주의 배양액에 메탄올을 1 g/L 투입하고 30%의 프로판을 공급하며 2시간마다 프로판올 및 아세톤, 메탄올 농도를 측정한 그래프이다.

도 10은 DH-1 균주의 배양액에 메탄올을 1 g/L 투입하고 30%의 프로판을 공급하며 2시간마다 프로판올 및 아세톤, 메탄올 농도를 축적 패턴으로 나타낸 그래프이다.

도 11은 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1 g/L를 공급하여 프로판올 생산을 나타낸 그래프이다.

도 12는 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1 g/L를 공급하여 프로판올 생산을 축적 패턴으로 나타낸 그래프이다.

도 13은 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1.5 g/L를 0.5 g/L씩 공급하여 프로판올 생산을 나타낸 그래프이다.

도 14는 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1.5 g/L를 0.5 g/L씩 공급하여 프로판올 생산을 축적 패턴으로 나타낸 그래프이다.

도 15는 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1.5 g/L를 0.3 g/L씩 공급하여 프로판올 생산을 나타낸 그래프이다.

도 16은 DH-1 균주의 배양액에서 메탄올이 고갈된 후 추가로 메탄올 1.5 g/L를 0.3 g/L씩 공급하여 프로판올 생산을 축적 패턴으로 나타낸 그래프이다.

도 17은 DH-1 균주의 배양액에 메탄과 프로판을 동시 공급하여 프로판올의 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 18은 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주의 배양액에 메탄과 프로판을 동시 공급하여 프로판올의 생산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1: 균주의 준비 및 실험방법**

[0029] 1-1. *Methylomonas* sp. DH-1

[0030] 50 mL NMS 배지가 포함된 500 mL 배플 플라스크(baffled flask)에 1 mL의 DH-1 스탁(stock, KCTC 13004BP)을 접종한 후 주기적으로 메탄/공기를 주입하며 원하는 세포 농도까지 진탕배양기에서 30℃, 230 rpm으로 배양하였다. 배양 시 외부 공기의 유입과 내부 메탄 또는 프로판의 유출을 방지하기 위하여 플라스크에 부틸 고무(butyl rubber) 재질의 셉텀(septum)이 있는 마개를 사용하였다. NMS 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0031]

NMS 조성	Amount for 1L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
KNO_3	1 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.228 g
Fe-EDTA	0.0038 g
Na_2MoO_4	0.0006 g
$FeSO_4.7H_2O$	0.5 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	0.4 mg
$MnCl_2.7H_2O$	0.02 mg
$CoCl_2.6H_2O$	0.05 mg
$NiCl_2.6H_2O$	0.01 mg
H_3BO_3	0.015 mg
EDTA	0.25 mg
KH_2PO_4	0.26 g
$Na_2HPO_4.7(H_2O)$	0.62 g
바이오틴(Biotin)	0.02 mg
폴산(Folic acid)	0.02 mg

티아민 HCl(Thiamine HCl)	0.05 mg
Ca 판토텐산염(pantothenate)	0.05 mg
비타민(Vitamin) B12	0.001 mg
리보플라빈(Riboflavin)	0.05 mg
니코틴아마이드(Nicotiamide)	0.05 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2.5 mg

[0032] 초기 OD가 10 이상인 경우에는 OD 4인 배양액을 원심분리하여 농축한 후 NMS 배지를 추가하여 세포 농도를 조절하였다.

[0033] 프로판올 생산 실험은 상기 언급한 DH-1 배양액에 환원력인 메탄올을 일정량 공급하고, 프로판:공기=3:7 비율의 가스를 30분간 배기한 다음 진탕배양기에서 30℃에서 230 rpm으로 교반하며 진행하였다.

[0034] 메탄을 환원력으로 제공하는 경우에는 메탄올을 추가하지 않고 메탄:프로판:공기=1.5:1.5:7의 가스를 30분간 배기한 다음 진탕배양기에서 30℃에서 230 rpm으로 교반하며 진행하였다.

[0036] 1-2. *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z

[0037] 상기 1-1과 동일한 조건으로 준비하되, 배지의 조성은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0038]

배지조성	Amount for 1L
NaCl	30 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
KNO_3	1 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02 g
EDTA	5 mg
$CuCl_2 \cdot 5H_2O$	0.1 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mg
Na_2MoO_4	0.03 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.03 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.02 mg
H_3BO_3	0.03 mg
KH_2PO_4	0.28 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12(H_2O)$	0.6 g
1M $NaHCO_3$	50 mL
1M Na_2CO_3	5 mL

[0039] **실시예 2: 균주로부터의 프로판올 대사 여부 분석**

[0040] 도 1에서와 같이, *Methylomonas* sp. DH-1 균주는 메탄 대사 균주로, MMO를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환하는 특성이 있다. 해당 균주를 동정하고, 해당 균주에 프로판 또는 메탄-프로판 혼합가스 또는 메탄올-프로판을 공급했을 때 프로판올의 생산 여부를 분석하였다.

[0041] 프로판올의 생산 연구에 앞서, 해당 균주가 프로판을 대사할 수 있는지, 그리고 생산된 프로판올에 의해 균주의 생장이 저해되지 않는지를 확인하기 위해 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하고 리터당 1 g(1 g/L)의 프로판올을 추가로 공급한 뒤, 균의 생장곡선을 확인하였다.

[0042] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 약간의 성장 저해가 발생하였으나, 정도가 크지 않다고 판단, 이후의 실험을 진행하였다.

[0043] 최적 메탄올 공급 농도를 확인하기 위해 초기 OD 2에서 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하고 리터당 0.5 g, 1 g, 2 g (0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L)의 메탄올을 추가로 공급한 뒤 균의 생장곡선을 확인하였다.

[0044] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 아래 그림과 같이 2 g/L의 메탄올 농도에서도 메탄올에 의한 저해 영향이 거의 없는 것으로 판단되었다.

[0046] **실시예 3: 균주로부터의 프로판올 생산 여부 분석**

[0047] 초기 OD를 10으로 하여 프로판과 메탄올을 공급, 해당 균주에서 실제로 프로판올이 생산되는지를 확인하기 위해 2 g/L의 메탄올과 30%의 프로판을 기질로 주었다.

[0048] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 시간이 지남에 따라 세포 농도가 감소하였다.

[0049] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 116 mg/L의 프로판올이 생산되었으나, 배양 6시간 이후로는 대사 산물의 변화가 거의 없는 것으로 보여 이후에 생장 및 대사 저해 요인에 대한 추가 실험을 진행하였다. 분석 결과 이소프로판올의 분해 산물인 아세톤의 생산이 확인되었다.

[0051] **실시예 4: 대사 산물 또는 메탄올에 의한 생장 저해 확인**

[0052] 메탄올을 단독 탄소원으로 하였을 때의 대사 산물 또는 메탄올로 인한 생장 저해가 있는지 확인하기 위해 다양한 농도(2 g/L, 3 g/L, 4 g/L)의 메탄올과 공기만을 공급하여 배양을 진행하였다. 비교를 위하여 메탄과 공기를 부피비 3:7로 공급하는 실험을 수행하고 메탄올을 단독 탄소원으로 하였을 때 이 결과와 비교하였다.

[0053] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 초기 OD 0.1, 최종 OD 1 이하의 낮은 세포 농도에서는 전체적인 대사 산물의 농도가 높지 않아 4 g/L의 메탄올에서도 저해를 받지 않는 것처럼 보였으나, 중간대사산물이 축적되면서 DH-1 균주의 대사와 생장이 저해되는 것이 확인되었다. 초기 OD 2에서 실험을 시작한 경우 이 두 산물의 영향이 더욱 명확하게 나타났다.

[0054] 프로판올 생산에 있어 초기 세포 농도의 영향을 관찰하였다. 초기 OD가 각각 10과 4인 세포에 대하여 메탄올을 2 g/L 투입하고 30%의 프로판을 공급하며 6시간마다 프로판올 및 아세톤, 메탄올 농도를 측정하였다.

[0055] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 초기 OD가 10일 때에는 배양 6시간째에 프로판올 농도가 0.11 g/L를 기록한 이후 큰 변화를 나타내지 않았다. OD는 배양 초기부터 계속 감소하여 24시간째에는 6까지 떨어졌다.

[0056] 도 8에서 확인할 수 있듯이, 초기 OD가 4일 때에도 프로판올은 배양 6시간째 0.08 g/L로 최대값에 도달한 이후 더 이상 증가하지 않았다. 이러한 결과로부터 판단할 때, 과량의 메탄올에 대한 저해 효과가 초기 세포 농도보다 큰 영향을 미친 것으로 보인다.

[0057] 과량의 메탄올이 세포 활성은 물론 프로판올 생산에도 영향을 미치기 때문에 초기 메탄올 농도를 1 g/L로 줄이고 프로판올 생산 실험을 진행하였다.

[0058] 도 9에서 확인할 수 있듯이, 프로판올 농도는 배양 4시간 째에 최고 농도인 0.18 g/L를 기록하고 더 이상 늘어나지 않았다. 초기 메탄올 농도가 2 g/L일 때보다 두 배 정도 증가하였는데, 과량의 메탄올이 세포 활성에 영향을 주는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 배양 4시간 이후로 메탄올은 고갈되었고, 메탄올이 고갈되면서 MDH 효소가 생산된 프로판올을 분해함에 따라 더 이상의 프로판올 생산은 이루어지지 않았고 아세톤이 축적되는 현상이 발생하였다.

[0060] **실시예 5: DH-1 생촉매의 특성 분석**

[0061] 프로판올과 아세톤을 몰 농도로 표시하여 메탄올 소모 및 프로판 전환 관련 DH-1 생촉매의 특성을 분석하였다.

[0062] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 메탄올이 고갈된 이후 프로판올과 아세톤의 총량은 일부 증가하나 대부분 아세톤에 의한 것이고, 메탄올이 고갈되더라도 배양액에 축적된 포름알데히드나 포름산의 산화에 의하여 환원력을 제

공할 수 있다.

[0063] 메탄올이 고갈되었을 때 추가로 공급하여 프로판올의 지속적인 증가를 도모하였다.

[0064] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 메탄올이 고갈된 4시간째에 추가로 메탄올 1 g/L를 공급하고 프로판올 생산을 관찰하였다. 배양 4시간째 메탄올을 추가 공급한 결과, 프로판올의 감소를 막아 최종 프로판올 농도가 0.20 g/L를 기록하였으나, 그 증가폭은 크지 않았다.

[0065] 도 12에서 확인할 수 있듯이, 오히려 아세톤의 축적이 보다 활발해졌으며 아세톤의 축적 또는 메탄올 부산물인 포름알데히드의 축적으로 인하여 세포량이 줄어들어 메탄올 추가 공급의 효과가 크지 않음을 알 수 있었다.

[0066] 총 메탄올 투입량을 1.5 g/L로 하고, 1회 투입량의 농도를 0.5 및 0.3 g/L로 달리하여 프로판올 생산을 관찰하였다.

[0067] 도 13 내지 16에서 확인할 수 있듯이, 메탄올 농도의 영향은 크지 않아 두 경우 모두 0.17 g/L 정도의 프로판올을 생산하였다.

[0069] **실시예 6: 메탄과 프로판 동시 공급을 통한 프로판 분해의 저해 방법 확인**

[0070] 메탄과 프로판을 동시에 공급하여 프로판올 생산에 필요한 환원력은 메탄에서 얻고 동시에 메탄올의 존재를 통해 프로판올 분해를 막고자 하였다.

[0071] 도 17에서 확인할 수 있듯이, 메탄과 프로판을 동시에 공급할 경우 프로판올이 생산됨을 알 수 있다. 최종 프로판올 농도는 0.021 g/L로서 메탄올을 환원력으로 공급했을 때 대비하여 수율이 매우 낮았다. 아세톤 농도는 0.08 g/L를 나타내었는데, 메탄 이용시에는 충분한 환원력이 공급되지 않고, 축적되는 메탄올 농도가 낮아 MDH 효소의 활성을 막기 어려운 것으로 보였다.

[0073] **실시예 7: *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 균주를 이용한 프로판올 생산**

[0074] DH-1 균주는 비성장속도가 0.25 h^{-1}에 달할 만큼 생장이 빠르고 메탄 소모속도가 높은 장점이 있는 반면, 프로판 전환 결과에서 알 수 있듯이 메탄올에 대한 소모 특성은 좋지 않았고, MDH 효소의 특이성이 떨어져 생산된 프로판올을 아세톤으로 분해하는 문제가 있었다.

[0075] *Methylomonas* sp. DH-1 외에 다른 균주에서 프로판올 생산 가능성을 타진하기 위하여, 동일한 type 1 균주이면서 메탄올을 잘 소모하는 메틸로마이크로비움 알칼리필럼(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z(DSM 19304)를 이용하여 동일한 실험을 진행하였다.

[0076] 먼저 초기 메탄올 농도가 프로판올 생산에 미치는 영향을 살펴보고자 메탄올 농도를 1 내지 4 g/L로 달리 하여 프로판 전환을 실시하여 하기 표 3과 같이 나타내었다.

[0077] 최종 OD는 3 g/L 메탄올일 때 가장 높았으나, 프로판올 생산 측면에서는 1 g/L가 가장 높은 프로판올 농도인 1.10 mM(65 mg/L)을 기록하여 초기 메탄올 농도를 1 g/L로 하고 후속 실험을 수행하였다.

표 3

[0078]

메탄올 농도	1 g/L	2 g/L	3 g/L	4 g/L
초기 OD(g/L)	3.30	3.24	3.18	3.47
최종 OD(g/L)	5.06	5.70	5.98	5.29
초기 프로판올(mM)	0.13	0.18	0.15	0.16
최종 프로판올(mM)	1.10	0.55	0.42	0.38

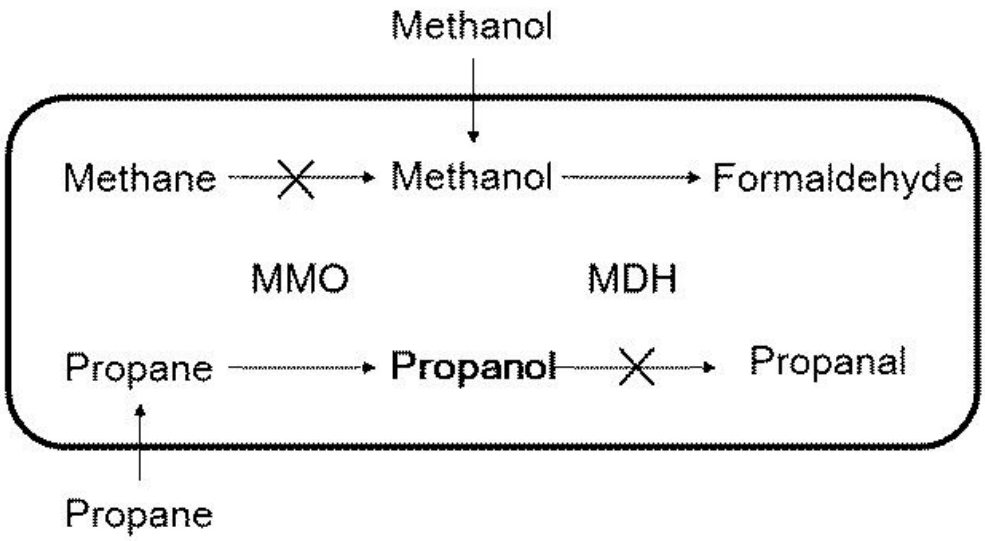
[0079] 초기 메탄올 농도가 1 g/L일 때 프로판 전환에 의한 프로판올 생산 실험을 실시하였다.

[0080] 도 18에서 확인할 수 있듯이, 배양 16시간째까지 프로판올은 지속적으로 증가하여 최종 0.15 g/L를 기록하였다. 아래 그림을 보면 메탄올이 고갈된 이후로도 프로판올이 계속 생산됨을 알 수 있는데, 앞서 언급하였듯이 메탄올이 분해되어 발생한 포메이트가 프로판 산화에 필요한 환원력을 제공한 것으로 보인다.

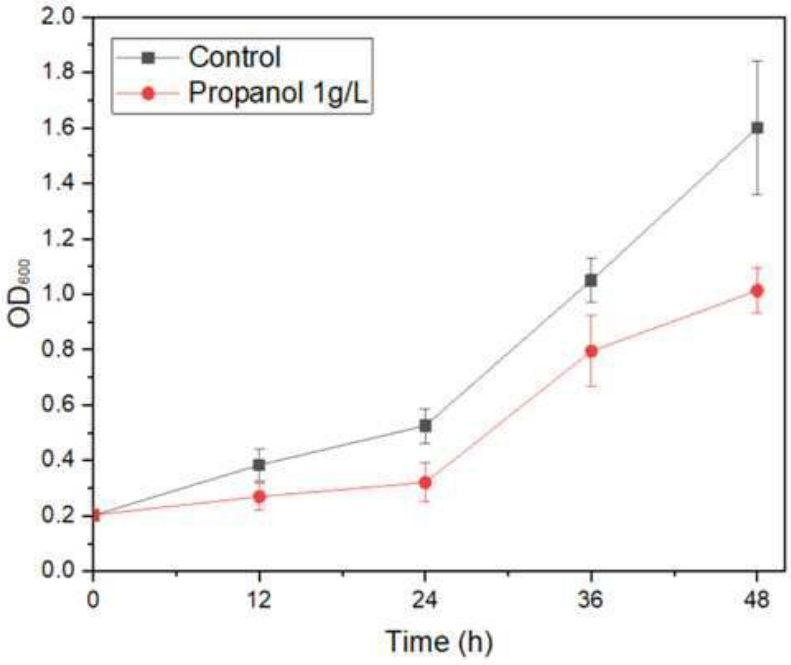
[0081] DH-1과 비교하였을 때 20Z를 이용한 프로판올 생산에서 주목할 점은 아세톤 축적이 비교적 덜하다는 것이다. 메탄자화균 균주에 따라 MDH 특이성이 다르기 때문에 나타나는 현상으로 추정되며, 적절한 메탄올 공급을 통해 메탄올 농도를 최적으로 유지할 경우 프로판올 생산성을 높게 유지할 수 있음을 시사하는 결과이다.

도면

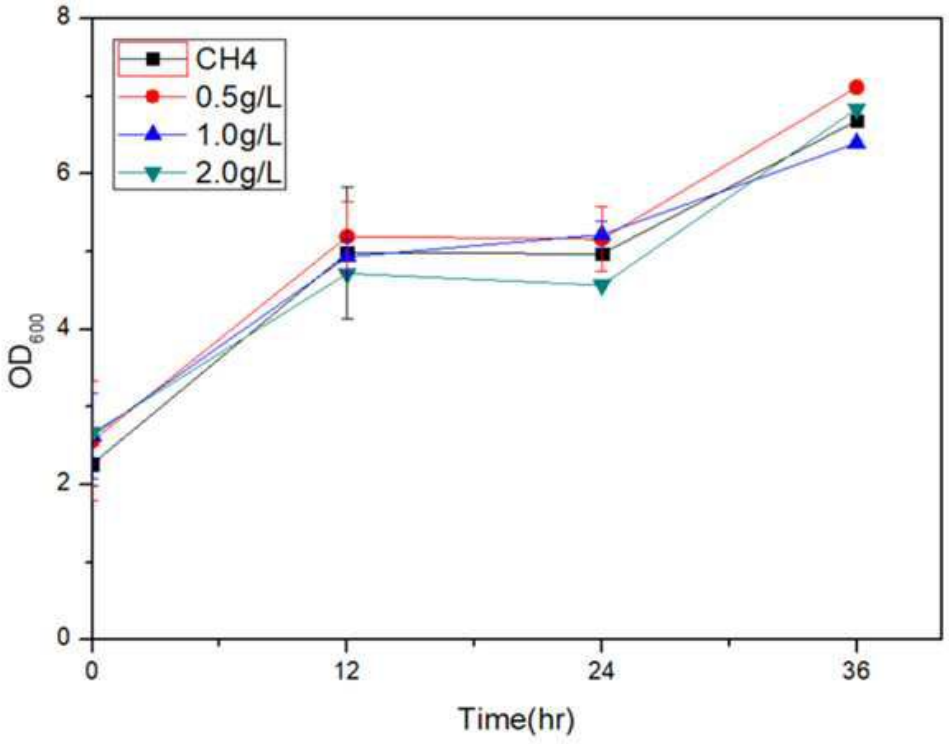
도면1



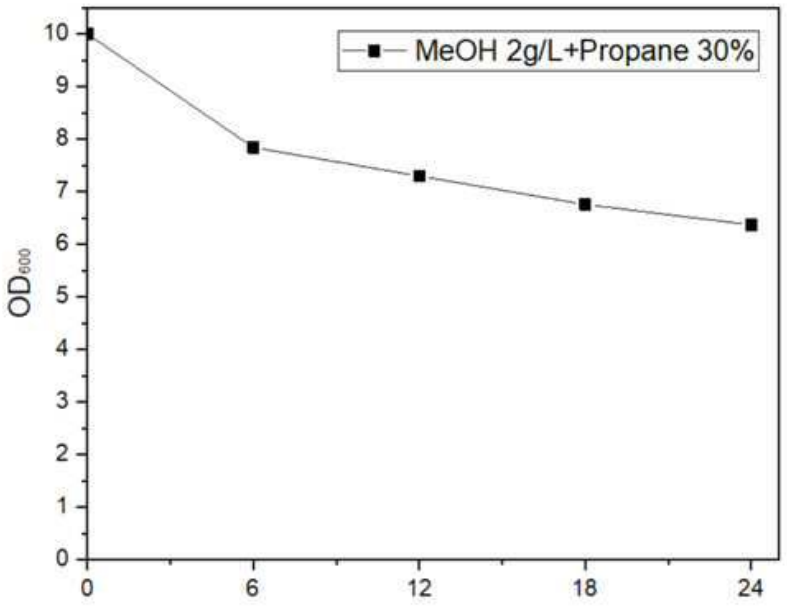
도면2



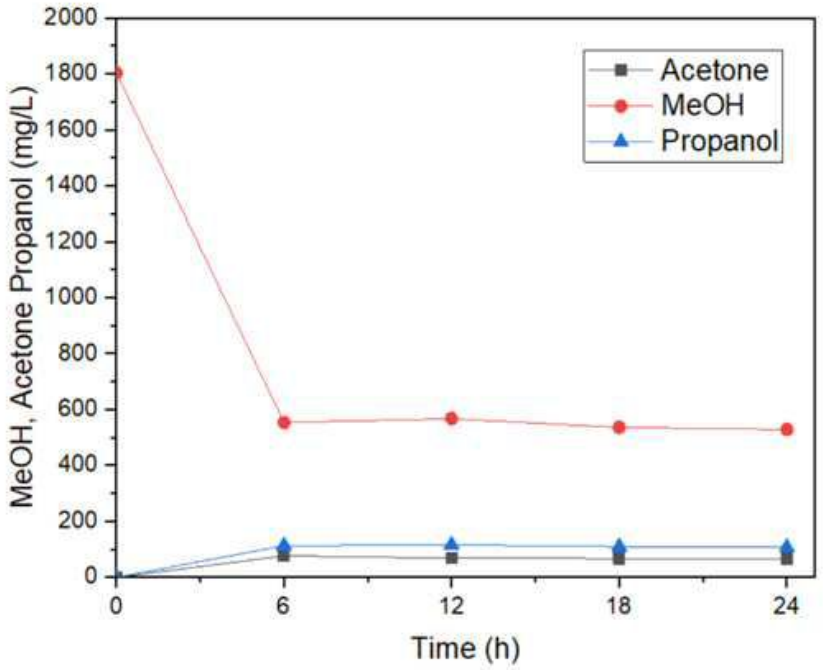
도면3


CH4
0.5g/L
1.0g/L
2.0g/L
OD600
Time(hr)
0
2
4
6
8
0
12
24
36

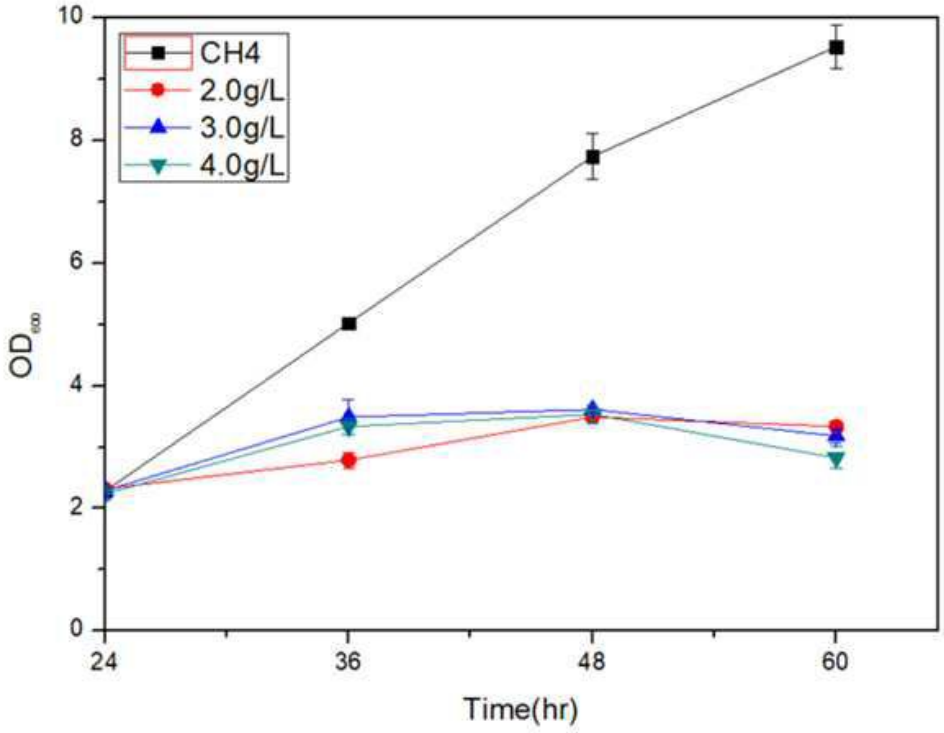
도면4


MeOH 2g/L+Propane 30%
OD600
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
6
12
18
24

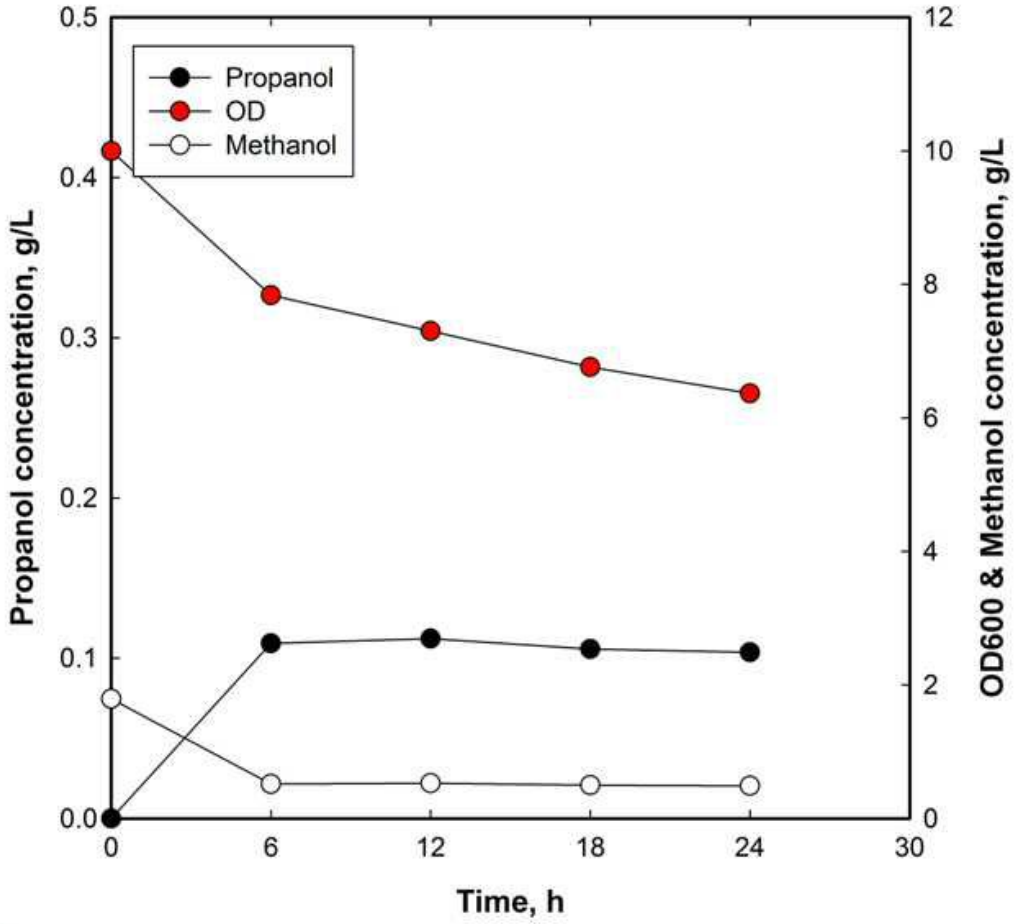
도면5


Acetone
MeOH
Propanol
MeOH, Acetone Propanol (mg/L)
Time (h)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
0
6
12
18
24

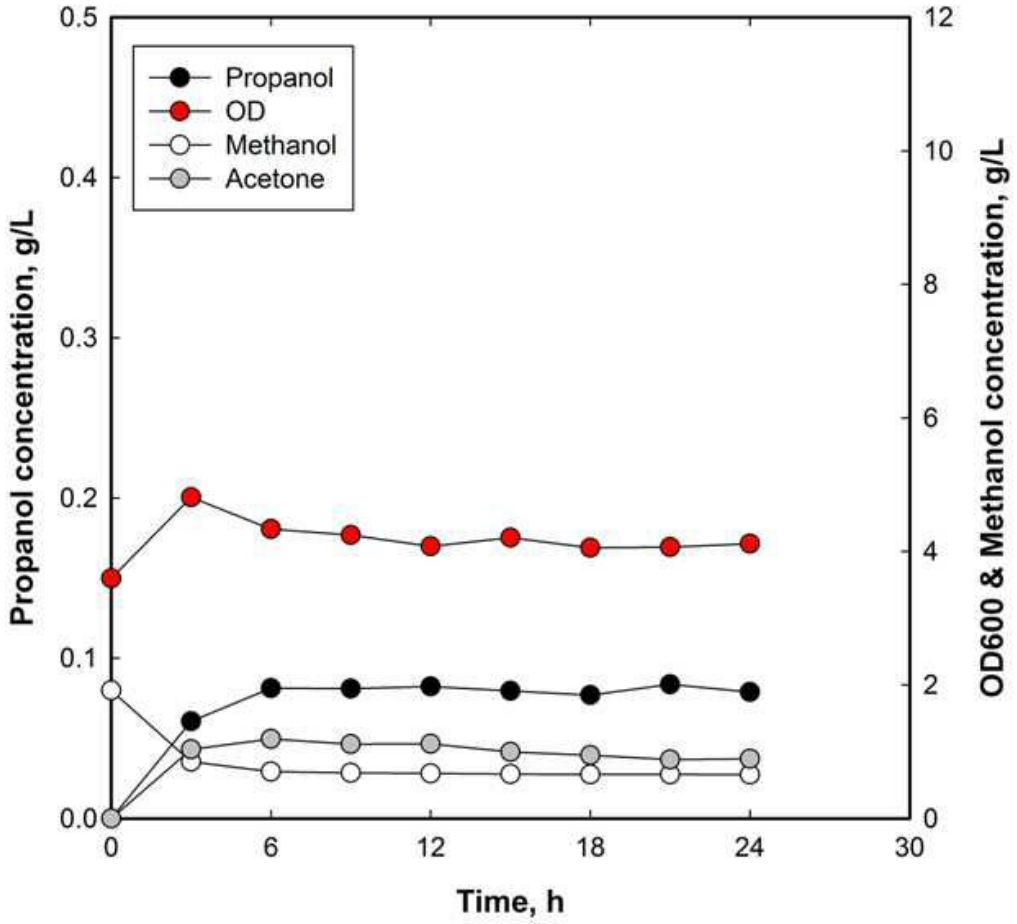
도면6


CH4
2.0g/L
3.0g/L
4.0g/L
OD600
Time(hr)
0
2
4
6
8
10
24
36
48
60

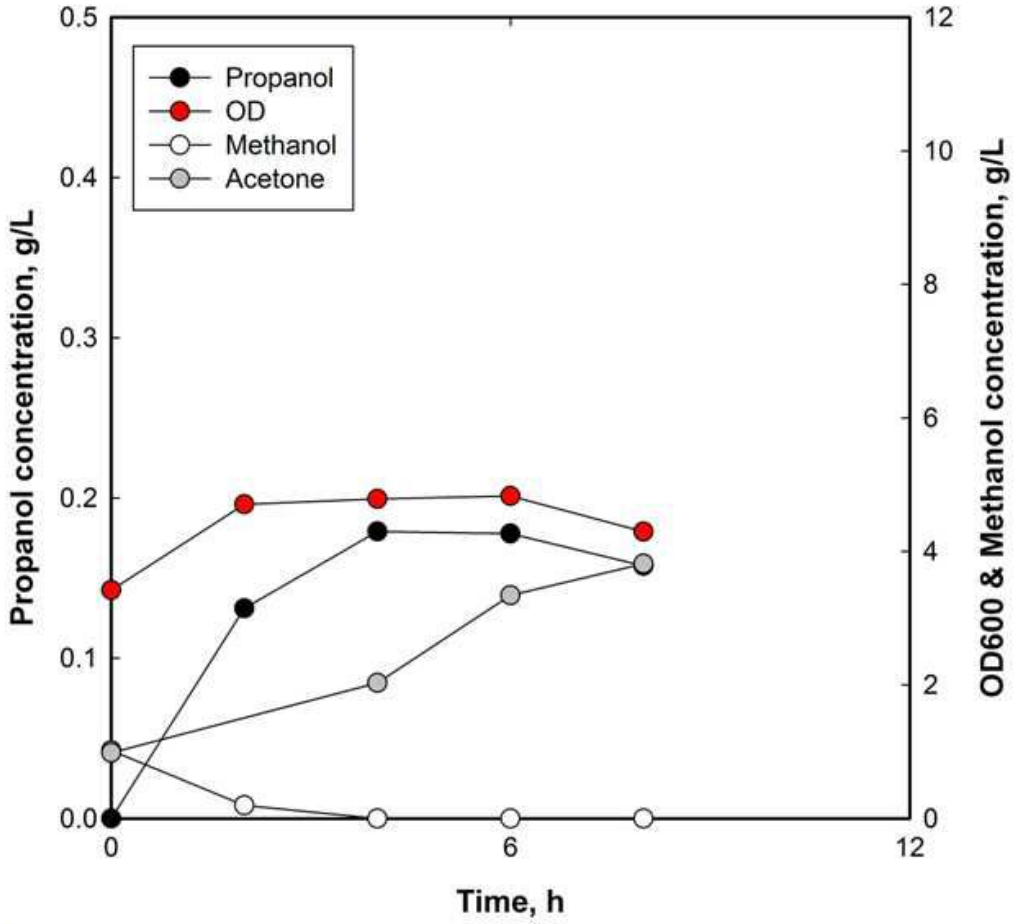
도면7


Propanol
OD
Methanol
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12
0
6
12
18
24
30

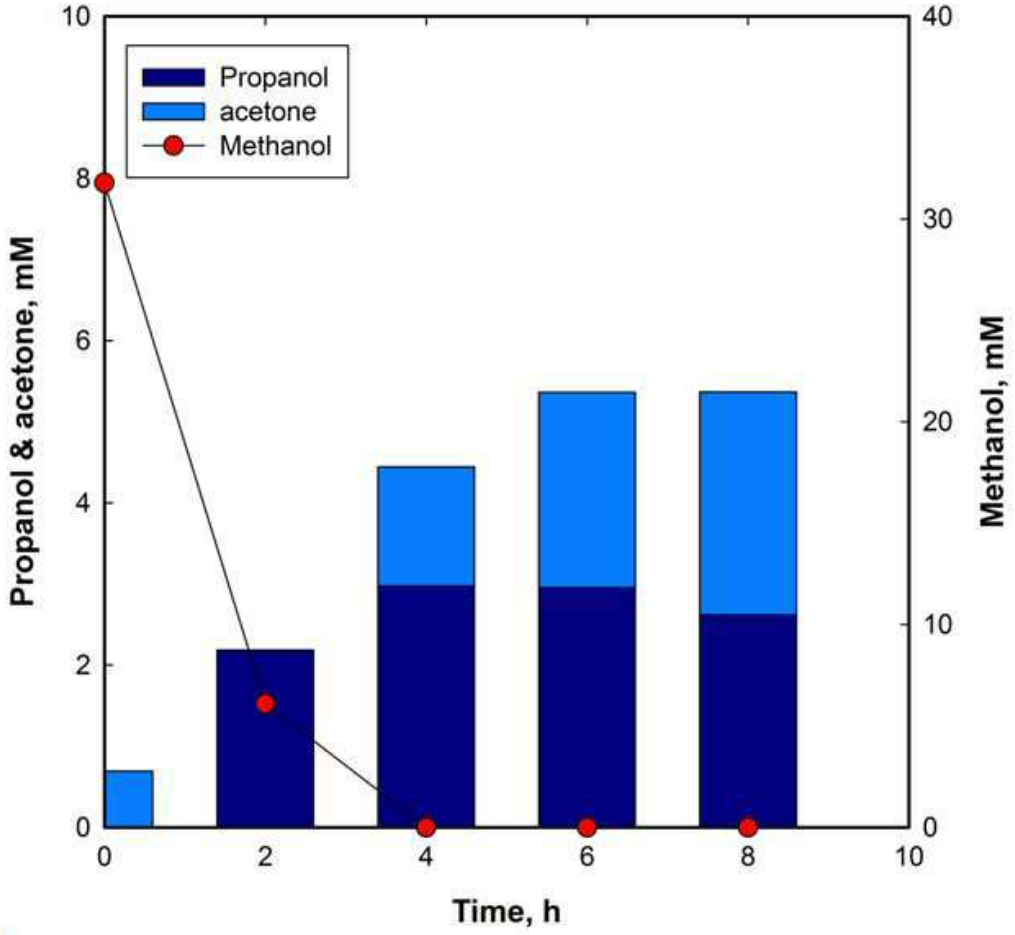
도면8


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12
0
6
12
18
24
30

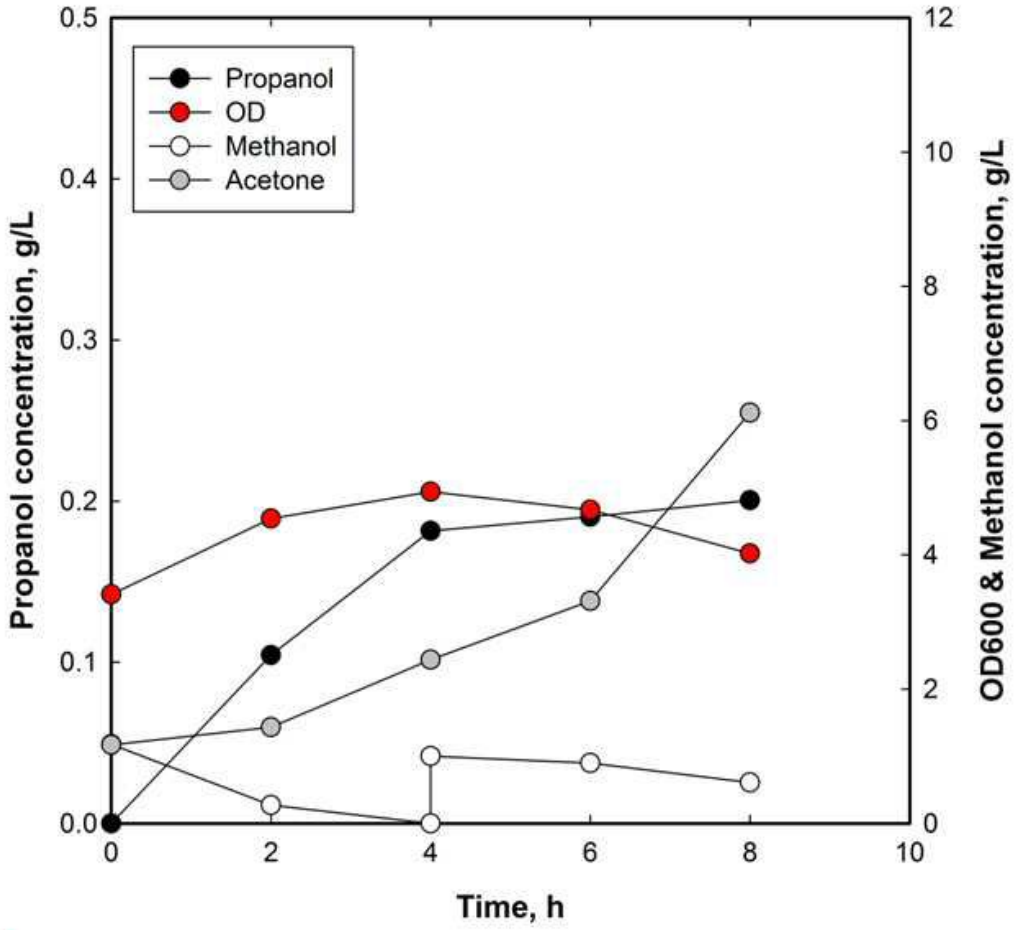
도면9


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12
0
6
12

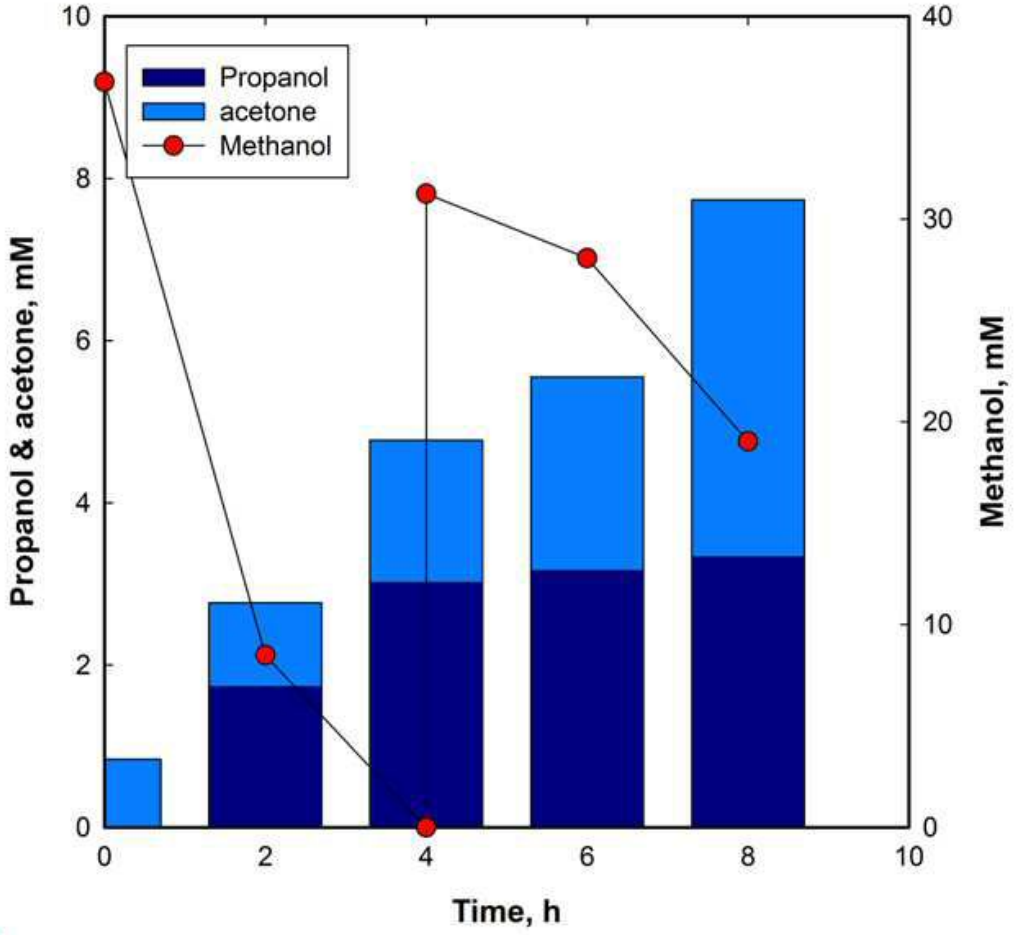
도면10


Propanol
acetone
Methanol
Propanol & acetone, mM
Methanol, mM
Time, h
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40

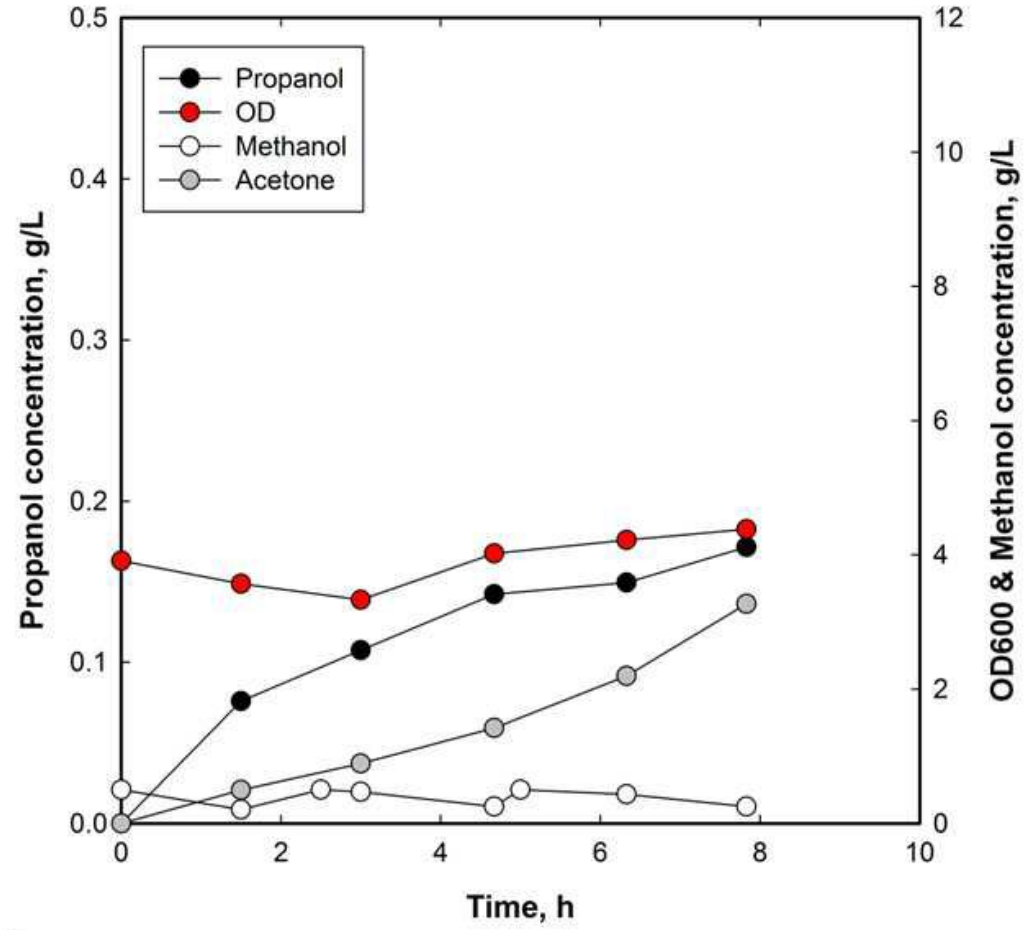
도면11


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12

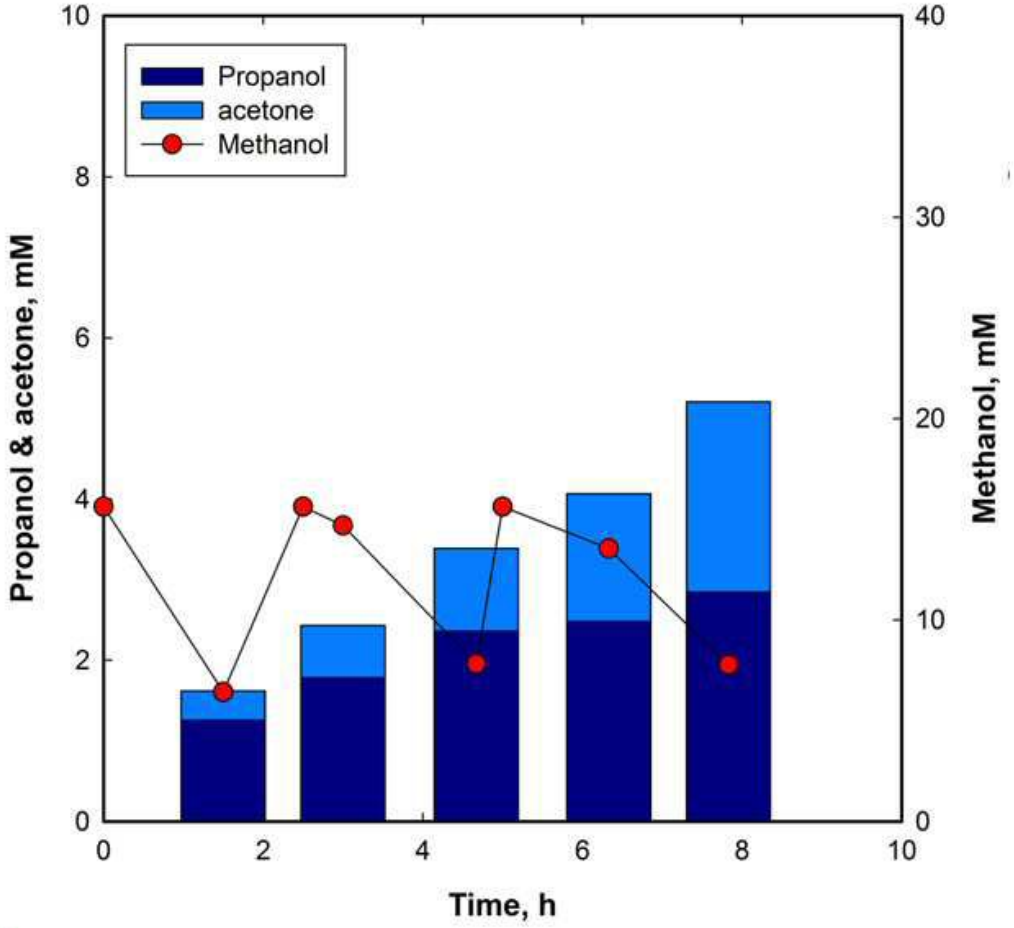
도면12


Propanol
acetone
Methanol
Propanol & acetone, mM
Methanol, mM
Time, h
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40

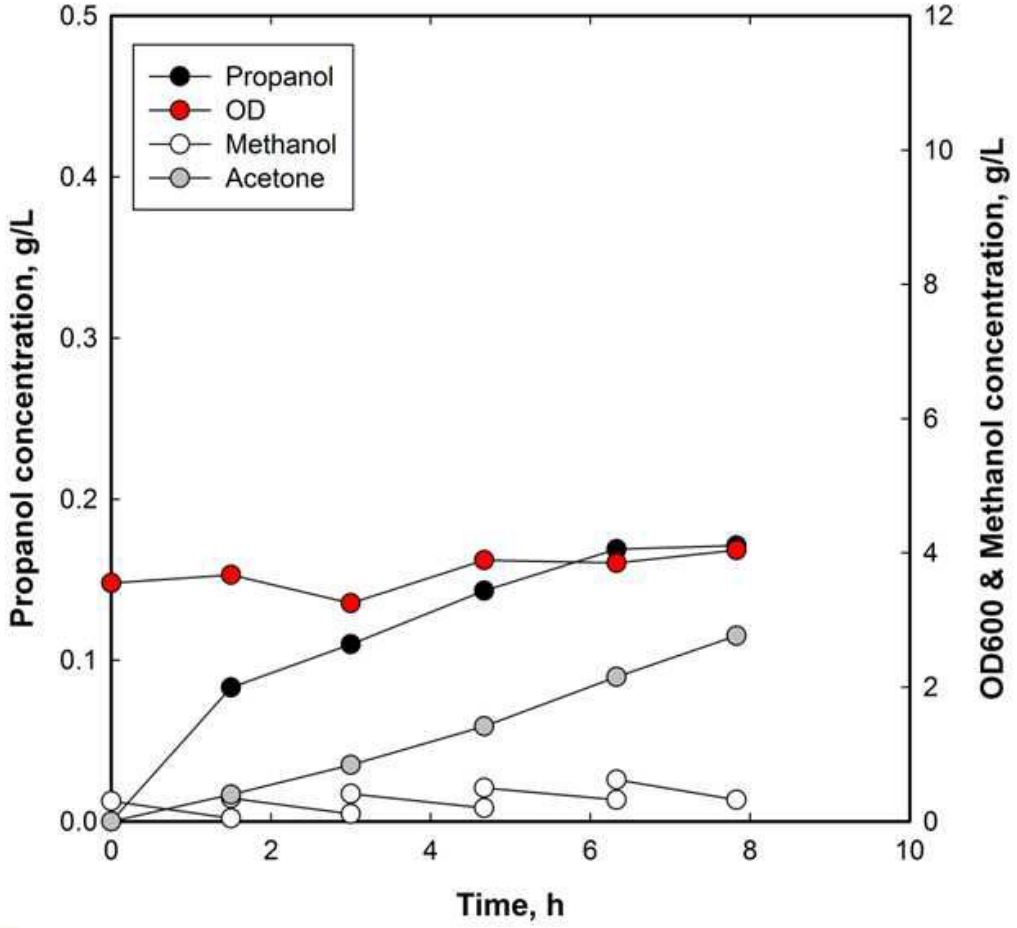
도면13


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12

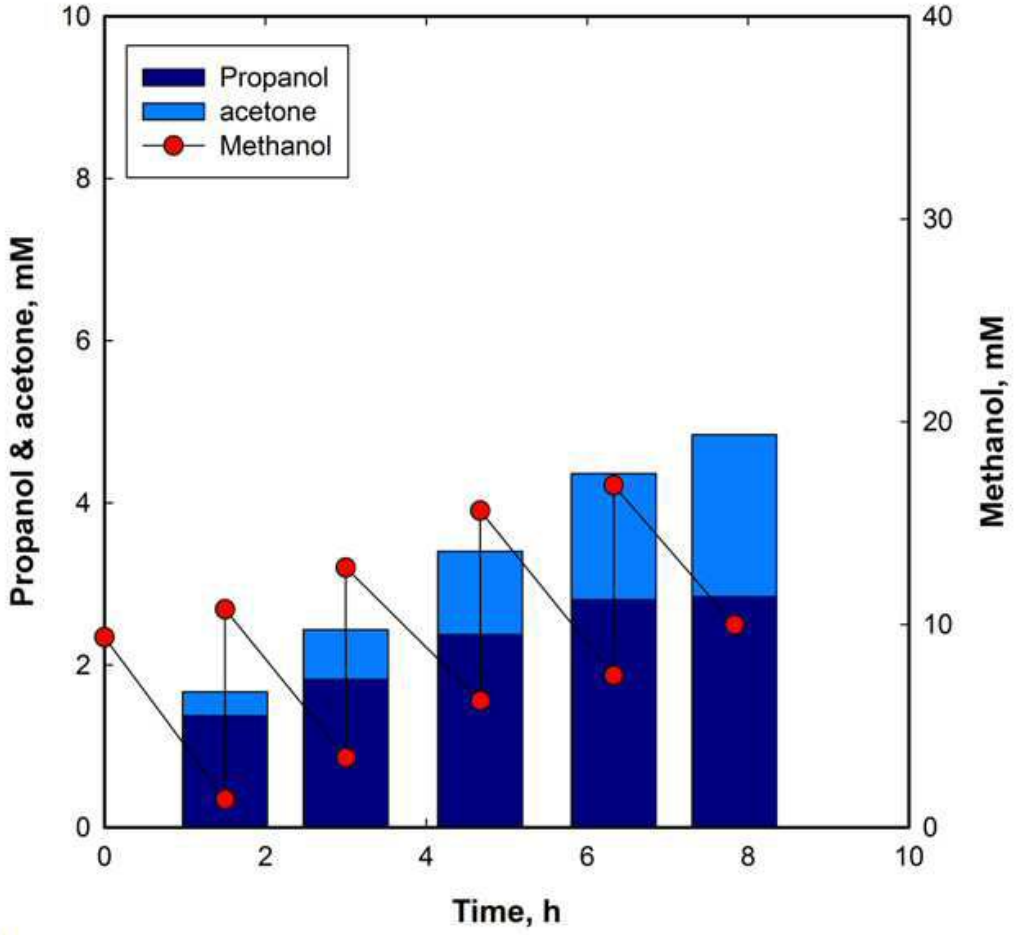
도면14


Propanol
acetone
Methanol
Propanol & acetone, mM
Methanol, mM
Time, h
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40

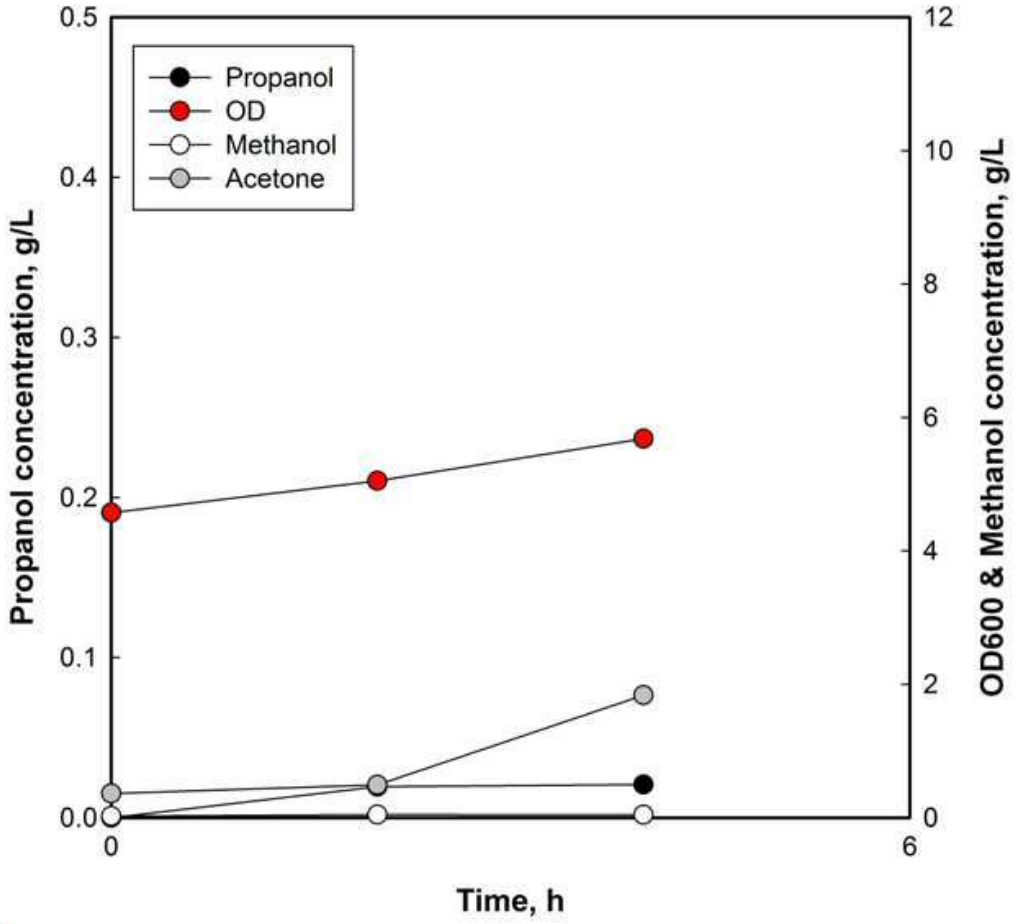
도면15


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12

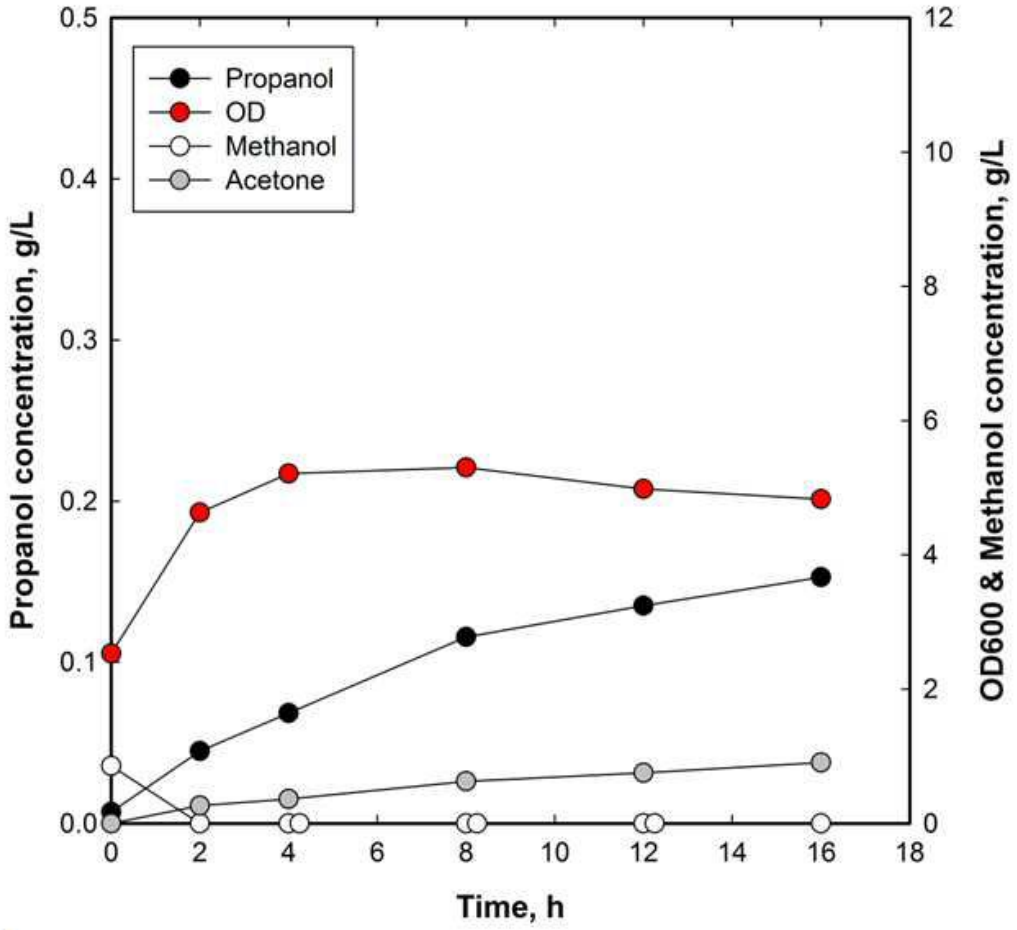
도면16


Propanol
acetone
Methanol
Propanol & acetone, mM
Methanol, mM
Time, h
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40

도면17


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
12
10
8
6
4
2
0
0
6

도면18


Propanol
OD
Methanol
Acetone
Propanol concentration, g/L
OD600 & Methanol concentration, g/L
Time, h
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18