



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0053786
(43) 공개일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/04 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/04 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0150772
(22) 출원일자 2016년11월14일
심사청구일자 2016년11월14일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이정결
서울특별시 광진구 능동로 50, A동 2401호(자양동, 이튼타워리버 2차)
산자이
서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 글로벌홀 415호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

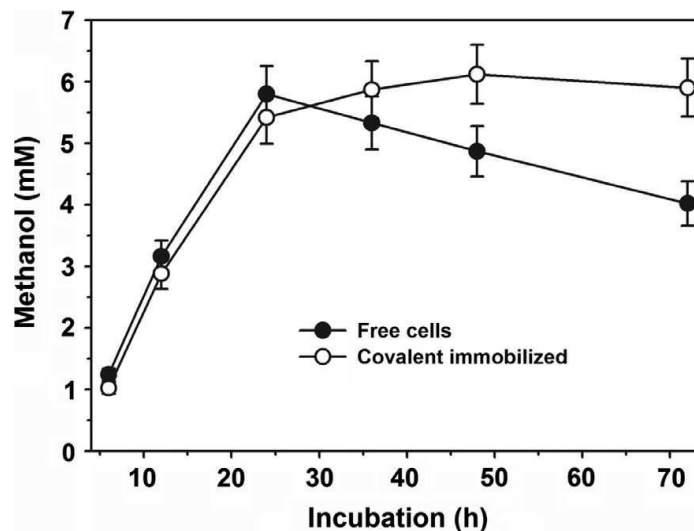
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 고수율 메탄올 생산 방법 및 그 조성물

(57) 요약

본 발명은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 고수율 메탄올 생산 방법 및 그 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 키토산에 공유 고정화된 *M. sporium* 세포를 사용함으로써, 메탄올 생산 동안 안정성을 높여주고, 6 사이클의 재사용 후에도 메탄올 생산 효율이 크게 저하되지 않으므로 여러 번 재사용할 수 있다. 또한, 배지의 pH, 배양온도, 교반속도, 인산염의 농도 등의 공정 파라미터의 최적화 및 MDH 저해를 통해 종래 미생물을 사용한 메탄올 생산 방법에 비해 메탄올 생산이 약 6.7배 향상되었고, 순수한 CH₄ 뿐만 아니라 합성가스 혼합물로부터 효율적으로 메탄올을 생산할 수 있어 온실가스를 효과적으로 감축할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 11/10 (2013.01)

(72) 발명자

강윤찬

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 재료 공
학과

프리마타 마디나

자란 멘타오스 라야 넘버.3 알티.03 알더블유.03
반자르바루

정재훈

경기도 하남시 하남대로802번길 51, 202동 1103호
(신장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015A0110031

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 [단독][RCMS](3차)나노바이오촉매 기반 메탄 전환기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움(*Methylosinus sporium*)을 이용한 메탄 또는 합성 가스 혼합물로 부터 고수율 메탄올 생산 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 메탄올 생산 방법은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포와, 공급원료 로서 메탄 또는 합성 가스 혼합물을 배양액에 넣고 교반시키면서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 배양액은 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 배양액은 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제 및 포름산염으로 이루어지는 군으로부터 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 인산 완충액의 농도는 100 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 Cu 이온은 5 μ M이고, 상기 포름산염의 농도는 40 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 MDH 저해제는 EDTA, $MgCl_2$, NaCl 및 NH_4Cl 로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 이때 최적 농도는 EDTA가 1.0 mM, $MgCl_2$ 가 20 mM, NaCl이 80 mM, 및 NH_4Cl 이 15 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 상기 배양은 pH 6.8-7.0 및 25-30 $^{\circ}C$ 에서 150-180 rpm의 교반 속도로 24 시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 2 항에 있어서, 최적 반응 부피 대 상부 공간 비율은 1:5이고, 공급원료 주입 농도는 30-50%인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 2 항에 있어서, 상기 합성 가스 혼합물은 CH_4 , CO_2 , 및 H_2 를 6:3:1의 비율로 혼합하여 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 메탄올을 제조하는 배양 배지에 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스폐리움 세포, 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 유효성분으로 포함하는 고수율의 메탄올 생산용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 조성물은 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제 및 포름산염으로 이루어지는 군으로부터 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스폐리움(*Methylosinus sporium*)을 이용한 고수율 메탄올 생산 방법 및 그 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메탄(CH_4) 및 이산화탄소(CO_2)와 같은 온실 가스(GHG)의 농도 증가는 세계적인 환경 문제이다. CH_4 는 가장 풍부한 천연 가스 중 하나로서, 풍부한 에너지원이지만, 상기 CH_4 는 1차 온실가스로서 심각하게 유해한 환경적 영향 때문에 최근 CO_2 보다 더 관심을 받고 있다. 따라서, CH_4 의 유해한 온실가스 효과를 줄이기 위해, CH_4 를 메탄올과 같은 부가가치 제품으로 전환하는 공정의 실행가능성을 탐색하는 것이 필요하다.

[0003] 메탄올은 넓은 범위의 화학적 합성 반응을 위한 기본 기질이며, 가솔린 혼합물 내의 연료로서 사용된다. 메탄올 보관 및 이동과 관련된 낮은 비용과 더불어, 상기 메탄올은 높은 에너지 밀도를 가지는데, 이는 CH_4 보다 약 400 배 높다.

[0004] 그런데, CH_4 에서 메탄올로의 화학적 전환은 공정의 높은 비용 및 낮은 에너지 효율성 등의 문제가 있다. 이러한 화학적 방법과 비교할 때, 생물학적 공정은 더욱 자연친화적이고, 높은 전환율, 선택성, 및 낮은 자본/에너지 비용의 이점을 가진다. 따라서, CH_4 에서 메탄올로의 생물학적 전환을 위한 방법을 개발하기 위한 노력이 최근 증가되고 있다.

[0005] 메탄산화세균(Methanotrophic bacteria)은 메탄을 탄소원 및 에너지원으로 사용하여 성장하는 세균집단을 통칭하는 것으로, 메틸로모나스(*Methylomonas*), 메타노모나스(*Methanomonas*), 메틸로코쿠스(*Methylococcus*), 메틸로시너스(*Methylosinus*), 메틸로박터(*Methylobacter*), 메틸로미크로비움(*Methylomicrobium*) 및 메틸로시스티스(*Methylocystis*) 등이 있다. 상기 메탄산화세균은 메탄을 메탄올로 산화시키는 메탄 일원자산화효소(methane monooxygenase, 이하 'MMO'라 칭함.) 및 메탄올을 포름알데히드로 산화시키는 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, 이하 'MDH'라 칭함.) 등을 포함하고 있어 메탄가스를 산화시켜 이산화탄소로 전환시키는 역할을 한다. 구체적으로, 메탄산화세균은 메탄을 메탄올로 산화시키고, 메탄올을 다시 포름알데히드로 산화시킨다. 그리고 포름알데히드를 포름산으로 산화시켜 최종적으로 유해성이 적은 이산화탄소로 전환한다. 또한 상기 메탄산화세균은 다탄소 결합을 갖는 유기화합물을 성장물질로는 이용하지 못하지만 메탄을 산화할 때 생성되는 효소인

MMO의 효소작용으로 많은 알칸족과 방향족 화합물도 산화시킬 수 있다.

[0006] 상기 MMO는 이들이 생산하는 MMO의 형태를 기초로 하기의 3개의 군으로 분류된다 - (i) I형 메탄산화세균, 이 메탄산화세균은 오직 미립자 MMO (pMMO)를 생산함, (ii) II형 메탄산화세균, 이 메탄산화세균은 pMMO 및 가용성 MMO (sMMO) 모두를 생산함, 및 (iii) X형 메탄산화세균, 이 메탄산화세균은 I형 및 II형 유기체에서 공통적인 특정 속성을 가진 MMO를 생산함[Fei Q, et al., Biotechnol Adv 2014;32:596-614]. pMMO는 막-결합 미립자 효소 시스템과 관련되는 반면, sMMO는 세포질 복합체 내에 위치한다. 이들 효소의 발현은 성장 배양액 내의 구리 (Cu) 농도에 매우 의존한다. pMMO 발현은 Cu 수준이 높을수록 우세하고, sMMO는 Cu 농도가 낮을수록 우세하다. pMMO는 sMMO보다 CH₄ 산화에 대한 더 높은 친화력을 가진다.

[0007] IMV3011 [Xin J-Y, et al., Biocatal Biotransf 2004;22:225-9], NCIB 11131 [Mehta PK, et al., Biotechnol Bioeng 1991;37:551-6], 및 OB3b [Hwang IY, et al., J Microbiol Biotechnol 2015;25:375-80]를 포함하는 다양한 메틸로시너스 트리코스포르리움(*Methylosinus trichosporium*) 종에 의한 순수한 CH₄로부터 메탄올의 생전환이 널리 연구되어 왔다. 그러나, 초기 메탄올 생산은 매우 낮았고, 최대 수율이 0.16-1.84 mM의 범위였다. 따라서, 메탄산화세균에 의한 메탄올의 생산 방법에 있어서, 메탄올 생산을 향상시킬 수 있는 개선된 방법이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 공개번호 제1020110006964호
(특허문헌 0002) 대한민국 특허 공개번호 제1020160026087호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Xin J-Y, et al., Biocatal Biotransf 2004;22:225-9,
(비특허문헌 0002) Mehta PK, et al., Biotechnol Bioeng 1991;37:551-6,
(비특허문헌 0003) Hwang IY, et al., J Microbiol Biotechnol 2015;25:375-80

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 메탄산화세균에 의해 메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 메탄올을 고수율로 생합성하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 고수율의 메탄올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움(*Methylosinus sporium*)을 이용한 메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 고수율 메탄올 생산 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 바람직하게는 상기 메탄올 생산 방법은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포와, 공급원료로서 메탄 또는 합성 가스 혼합물을 배양액에 넣고 교반시키면서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 바람직하게는 상기 배양액은 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 바람직하게는 상기 배양액은 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제 및 포름산염으로 이루어지는 군으로부터 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0016] 또한, 바람직하게는 상기 인산 완충액의 농도는 100 mM일 수 있다.

- [0017] 또한, 바람직하게는 상기 Cu 이온은 5 μ M이고, 상기 포름산염의 농도는 40 mM일 수 있다.
- [0018] 또한, 바람직하게는 상기 MDH 저해제는 EDTA, $MgCl_2$, NaCl 및 NH_4Cl 로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 이때 최적 농도는 EDTA가 1.0 mM, $MgCl_2$ 가 20 mM, NaCl이 80 mM, 및 NH_4Cl 이 15 mM일 수 있다.
- [0019] 또한, 바람직하게는 상기 배양은 pH 6.8-7.0 및 25-30 $^{\circ}C$ 에서 150-180 rpm의 교반 속도로 24 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0020] 또한, 바람직하게는 최적 반응 부피 대 상부 공간 비율은 1:5이고, 공급원료 주입 농도는 30-50%일 수 있다.
- [0021] 또한, 바람직하게는 상기 합성 가스 혼합물은 CH_4 , CO_2 , 및 H_2 를 6:3:1의 비율로 혼합하여 제조할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 메탄올을 제조하는 배양 배지에 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포, 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 유효성분으로 포함하는 고수율의 메탄올 생산용 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한, 바람직하게는 상기 조성물은 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제 및 포름산염으로 이루어지는 군으로부터 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따르면, 키토산에 공유 고정화된 *M. sporium* 세포를 사용함으로써, 메탄올 생산 동안 안정성을 높여 주고, 6 사이클의 재사용 후에도 메탄올 생산 효율이 크게 저하되지 않으므로 여러 번 재사용할 수 있다. 또한, 배지의 pH, 배양온도, 교반속도, 인산염의 농도 등의 공정 파라미터의 최적화 및 MDH 저해를 통해 종래 미생물을 사용한 메탄올 생산 방법에 비해 메탄올 생산이 약 6.7배 향상되었고, 순수한 CH_4 뿐만 아니라 합성 가스 혼합물로부터 효율적으로 메탄올을 생산할 수 있어 온실가스를 효과적으로 감축할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 인산염 완충액의 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 인산염 완충액 내의 MDH 저해제의 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 (a) 최적 저해제의 농도에서 MDH의 상대적 저해, (b) 포름산염 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 상이한 메탄 농도 및 배양 시간에 따른 메탄올 생산 프로파일을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)의 주사전자현미경(SEM) 사진이다((a) 단일 입자, (b) 고해상도 사진).
- 도 6은 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 자유로운 또는 고정화된 메틸로시너스 스포리움의 재사용성을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예의 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium*)에 의한 메탄올 생산에 있어서 합성 가스 혼합물로부터 메탄올 생산 프로파일을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0029] 본 발명에 따른 고수율 메탄올 생산 방법은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움(*Methylosinus sporium*; *M. sporium*)을 이용하는 것을 특징으로 한다.

- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 메틸로시너스 스포리움은 메탄산화세균 중의 하나로서, 대한민국 특허 공개번호 제 1020160026087호에서 메탄올 생산 잠재력을 확인하기 위해 다양한 메탄산화세균들로부터 메탄올 생산량을 확인한 결과, 메틸로시너스 스포리움이 가장 높은 메탄올을 생산함으로써 최적 균주로 선별되었다.
- [0031] 그러나, 이때 메틸로시너스 스포리움에 의한 최대 메탄올 생산수율은 473 μ M로서, 매우 낮은 수치였으며, 다른 메탄산화세균인 다양한 메틸로시너스 트리코스포리움(*Methylosinus trichosporium*) 종에 의한 순수한 CH_4 로부터 메탄올의 생 전환 또한 최대 수율이 0.16-1.84 mM의 범위였다.
- [0032] 따라서, 메탄산화세균에 의한 메탄올의 생산 방법에 있어서, 메탄올 생산을 향상시킬 수 있는 개선된 방법이 요구되었으며, 이에 본 발명자는 메틸로시너스 스포리움의 성장 조건, 생산 조건, 공정 파라미터, 및 MDH 저해제의 농도의 최적화를 통해 CH_4 로부터 메탄올 생산 수율을 향상시킬 수 있음을 확인하였고(도 1 내지 4 참조), 특히, 지지체 물질로서 키토산을 사용하여, 키토산 상에 상기 세포를 메틸로시너스 스포리움 세포를 고정화함으로써 메탄올 생산 수율 향상 뿐만 아니라 안정성 및 재사용성이 향상됨을 발견하였다(도 6 및 7 참조).
- [0033] 본 발명에 있어서, 키토산에 메틸로시너스 스포리움 세포를 고정화하는 방법은 공유 고정화가 바람직하며, 상기 공유 고정화는 먼저 키토산을 글루타르알데히드로 기능화시켜 알데히드기를 키토산 입자에 붙인 후, 인산 완충액 내에 기능화된 키토산과 메틸로시너스 스포리움 세포를 넣고 교반시킴으로써 수행할 수 있다. 상기 공유 고정화는 주사전자현미경 등을 통해 확인할 수 있다(도 5 참조).
- [0034] 본 발명에 따른 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포는 공급원료로서 순수한 CH_4 를 사용한 경우, 메탄올 수율이 4.61 mM로써 지지체로서 고분자 매트릭스를 사용하여 캡슐화된 종래 방법(1.37-2.34 mM)에 비해 2-3.5배의 메탄올 수율 향상을 보였다. 또한, 공급원료로서 합성 가스 혼합물을 사용한 경우에는 6.12 mM의 메탄올 수율을 나타냄으로써 자유 세포에 의한 생산(5.80 mM)보다도 더 높은 메탄올 생산 수율을 나타내었다(표 3 참조).
- [0035] 따라서, 본 발명에 따른 키토산에 공유 고정된 *M. sporium*을 사용한 메탄올 생산 방법은 순수한 CH_4 및 합성 가스 혼합물 둘다로부터 현저하게 더 높은 메탄올 생산에 이르게 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 메탄올 생산 방법은 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포와, 공급원료로서 메탄 또는 합성 가스 혼합물을 배양액에 넣고 교반시키면서 배양하는 단계를 포함한다.
- [0038] 이때, 배양액은 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 포함하며, 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제, 포름산염 등을 더 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 인산 완충액의 농도는 100 mM인 것이 바람직하고, 상기 Cu 이온은 5 μ M인 것이 바람직하며, 상기 포름산염의 농도는 40 mM인 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 MDH 저해제로는 EDTA, MgCl_2 , NaCl 또는 NH_4Cl 을 사용할 수 있으며, 이때 최적 농도는 EDTA가 1.0 mM, MgCl_2 가 20 mM, NaCl이 80 mM, 그리고 NH_4Cl 이 15 mM인 것이 바람직하다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 배양액의 pH는 6.8-7.0인 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 25-30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 150-180 rpm의 교반 속도로 24 시간 동안 수행하는 것이 바람직하다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 최적 반응 부피 대 상부 공간 비율은 1:5인 것이 바람직하고, 공급원료 주입 농도는 30-50%인 것이 바람직하다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 합성 가스 혼합물은 CH_4 , CO_2 , 및 H_2 를 6:3:1의 비율로 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0046] 또한, 본 발명은 메탄 또는 합성 가스 혼합물로부터 메탄올을 제조하는 배양 배지에 키토산에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움 세포, 인산 완충액 및 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS)을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고수율의 메탄올 생산용 조성물을 제공한다.

- [0047] 상기 조성물은 추가적으로 Cu 이온, MDH 저해제, 포름산염 등을 더 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물은 전술한 고수율의 메탄올 생산 방법에 사용되는 조성물로서, 양 발명의 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0050] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0052] <실시예 1> 키토산 상에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 메탄올로부터 메탄올의 생산
- [0053] (1) 키토산 상에 메틸로시너스 스포리움의 공유 고정화
- [0054] 메틸로시너스 스포리움(*M. sporium* DSMZ 17706)을 독일 미생물 및 세포 배양 수집센터(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)로부터 입수하였고, (g^L⁻¹) 단위의 KH₂PO₄ (0.26), Na₂HPO₄·12H₂O (0.716), KNO₃ (1.0), CaCl₂ (0.20), MgSO₄·7H₂O (1.0), Fe-EDTA (0.38), 및 Na₂MO₄·2H₂O (0.026)를 포함하는 질산 무기염(nitrate mineral salt; NMS) 상에서 배양시켰다. 다음으로, ZnSO₄·7H₂O (0.40)(g^L⁻¹), H₃BO₃ (0.015), CoCl₂·6H₂O (0.050), Na₂-EDTA (0.250), MnCl₂·4H₂O (0.020), 및 NiCl₂·6H₂O (0.010)를 함유하는 배양액(medium)에 미량 원소 용액(1 mL)을 첨가하였다. 1M H₂SO₄ 및 1M NaOH를 이용하여 상기 배양액의 pH를 7.0으로 조정하였다. 모든 시약 제조에, 그리고 모든 측정에 밀리포어(Millipore) 수 (18 MX)를 사용하였다. 모든 화학물질은 분석등급이었고, Sigma-Aldrich 또는 다른 시판원에서 구입하였다. 상기 *M. sporium* 균주를 2주마다 2차 배양 함으로써 유지시켰고, NMS 아가 플레이트상에서 4 °C에 저장하였다. R2 아가(Fluka, USA) 상에서 오염물질의 존재를 체크하였다.
- [0055] 다음으로, 지지체로서 키토산(90% 탈아세틸화, 게 껍질)을 Bio Basic Inc.(Canada)로부터 구입하였다. 상기 키토산(20 g)을 증류수로 2회 세척하고, 다음으로 인산 완충액(50 mM, pH 7.0)으로 세척하였다. 문헌[Patel SKS, et al., J Microbiol Biotechnol 2014;24:639-47]에 개시된 바와 같이 상기 키토산을 글루타르알데히드로 기능화시켜 알데히드기를 입자에 붙였다. 이후 키토산을 4000 rpm에서 30분 동안 원심분리로 분리시키고, 잔여 글루타르알데히드를 증류수로 3회 및 다음으로 인산 완충액(20 mM)으로 세척하여 제거하였다. 인산 완충액(50 mM, pH 7.0) 내에 기능화된 키토산 g당 100 mg의 *M. sporium* 세포를 넣고 4 °C에서 100 rpm으로 밤새 교반시킴으로써 전체 세포들이 상기 키토산 상에 고정되었다. 미결합된 세포들은 4000 rpm로 20분 동안 원심분리하여 분리되었고, 고정된 세포들은 MgCl₂(5 mM)을 함유하는 인산 완충액 (20 mM, pH 7.0)으로 2회 세척한 다음, 사용할 때까지 4 °C에서 보관하였다.
- [0056] 1차 고정화를 위해 키토산 상에 공유적으로 고정된 *M. sporium* 세포를 카르노브스키 집착제 용액(Karnovsky's fixative solution)에 이동시켰다. 다음으로, 시료들을 등급이 나뉜 에탄올(Duksan, South Korea; 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 및 100%; 각 4 °C에서 10분 동안)로 탈수시키고, 실온에서 12 시간 동안 건조시키고, 백금으로 코팅시켰다. 전계 방출 주사전자현미경(JEOL, Japan)을 이용하여 영상들을 분석하여 도 5에 나타내었다.
- [0057] 도 5에서, (a)는 단일 입자를 나타내며, (b)는 고해상도 이미지를 나타낸다.
- [0058] 도 5에 나타난 바와 같이, 키토산 입자 상에 *M. sporium* 세포가 안정적으로 공유 고정화되었음을 확인하였다.
- [0060] (2) 키토산 상에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 메탄올로부터 메탄올의 생산
- [0061] 30% CH₄를 함유하는 분위기 하에서 200 mL의 질산 무기염을 함유하는, 밀폐 스크류캡(screw cap) (Suba seal)이 장착된 1L의 플라스크 (Duran-Schott, Germany) 내에서 세포를 양성하였고, 30 °C에서 200 rpm의 회전식 진동기(Lab Champion IS-971R, USA) 상에서 7일 동안 배양하여 메탄올을 생산하였다. 배양하는 동안, 30% CH₄를 이틀 간격으로 첨가하였다.

- [0062] 생산된 메탄올 농도를 문헌[Wood PJ, et al., Anal Biochem 1971;39:418-28]에 따라 알코올 산화효소(Sigma-Aldrich, USA)에 의한 효소적 산화를 통해 분석하였다. 구체적으로, 상기 메탄올 농도를 HP-5 컬럼(Agilent 19091J-413, USA) 및 FID 검출기가 장착된 기체 크로마토그래피(GC; Agilent 7890A, USA)를 이용하여 분석하였다. 25 mL min⁻¹의 유속의 H₂ 및 공기(300 mL min⁻¹)와 함께 헬륨이 캐리어 가스로서 사용되었다. 오븐 온도는 초기에는 35℃에서 5분 동안 유지하다가 5℃ min⁻¹의 속도로 150℃까지 상승시켰고, 마지막으로 20℃ min⁻¹의 속도로 250℃까지 상승시켰다. 주입기 및 검출기 온도를 각각 220℃ 및 250℃으로 세팅하였다.
- [0063] 그 결과, 키토산 상에 공유적으로 고정화된 *M. sporium* 세포에 의한 최대 메탄올 생산 수율은 4.61 mM 이었다 (표 3 참조).
- [0065] <실시예 2> 키토산 상에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 합성 혼합 가스로부터 메탄올의 생산
- [0066] (1) 합성 혼합 가스의 제조
- [0067] NK Co. Ltd.(Busan, South Korea)로부터 얻은 순수한 CH₄, CO₂, 및 H₂를 6:3:1의 비율로 혼합하여 합성 가스 혼합물을 제조하였다.
- [0069] (2) 키토산 상에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움을 이용한 메탄올로부터 메탄올의 생산
- [0070] 제조된 합성 가스 혼합물을 키토산에 공유적으로 고정화된 *M. sporium* 세포들에 의해 72시간까지 메탄올 생산을 하기 위한 공급원료로서 사용되었다. 메탄올 생산 동안 상부 공간에는 공기로 (1:1) 희석하여 유사한 CH₄ 양 (30%)이 유지되었다.
- [0071] 그 결과, 키토산 상에 공유적으로 고정화된 *M. sporium* 세포에 의한 최대 메탄올 생산 수율은 6.12 mM 이었다 (도 7, 표 3 참조).
- [0073] <비교예 1> 다른 메탄산화세균에 의한 메탄올의 생산
- [0074] 키토산에 공유적으로 고정화된 *M. sporium* 세포 대신 DEAE 셀룰로오스 상에 공유적으로 고정화된 *M. trichosporium* NCIB 111311 세포를 이용한 것을 제외하고는 동일한 조건하에서 CH₄로부터 메탄올 생산량을 측정한 결과, 20 mM 및 80 mM 인산 완충액 내에서 각각 0.40 및 2.10 μmol의 메탄올 h⁻¹ mg⁻¹을 생산하였다.
- [0076] <실험예 1> 메탄올 생산 공정 파라미터의 최적화
- [0077] (1) 금속의 영향
- [0078] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산에 있어서, 두 금속 이온, Cu²⁺ (1-10 μM) 및 Fe²⁺ (2.5-20 μM)의 보충에 대한 영향을 20 mM 인산 완충액 (pH 7.0) 내에서 알아보았다. 그 결과, Cu 농도가 0에서 5 μM으로 증가함에 따라 메탄올 생산은 0.86 mM에서 1.14 mM로 현저하게 향상되었다. 10 μM Cu에서는 생산량이 약간 감소하였으나(1.03 mM까지), 10 μM에서 Fe는 메탄올 생산을 1.02 mM까지 증가시켰다. 따라서, 두 금속 이온들 모두 메탄올 생산에 영향을 미치며, 이들 효과는 향상된 MMO 활성 때문인 것 같다.
- [0079] 또한, *M. sporium* 세포 성장 및 sMMO 활성에 대한 Cu²⁺ 농도 (0-10 μM)의 영향을 이들 동일한 조건하에서 평가하였다.
- [0080] 먼저, UV/Vis 분광광도계(JENWAY Scientific, UK)로 595 nm에서 흡광도(OD)를 결정함으로써 세포 성장을 측정하였다. 충분히 자란 세포들을 10,000 rpm의 원심분리(Gyrozen 1580 MGR, South Korea)를 통해 4℃에서 15분 동안 수집하였고, 다음으로 인산 완충액(20 mM, pH 7.0)으로 2번 세척하였다. 수집된 세포들을 사용할 때까지 4℃에서 저장하였다. 건조 세포 질량(DCM)을 70℃에서 48시간 배양 후 계산하였다.
- [0081] 다음으로, 문헌[Brusseau GA, et al., Biodegradation 1990;1:19-29]에 따라 수정된 분석법을 사용하여 상대적

인 sMMO 활성을 평가하기 위해 나프탈렌 산화가 사용되었다. 먼저, sMMO에 의해 나프탈렌이 산화되어 나프톨이 생성되었다. 나프톨 및 테트라아조화 o-디아니시딘(Sigma-Aldrich, USA)을 함유하는 보라색의 복합체의 존재를 UV/Vis 분광광도계를 사용하여 530 nm에서 분광광도법으로 측정하였다. 요약하면, 포름산 나트륨(2 mM)을 함유하는 인산 완충액(50 mM, pH 7.0) 내에 DCM의 휴지기 세포를 함유하는 현탁액을 사용하여 상기 분석법을 수행하였다. 다음으로, 소량의 나프탈렌 결정들을 첨가하였고, 반응물을 180 rpm에서 교반하면서 30 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 mg mL⁻¹ 테트라아조화 o-디아니시딘을 첨가하여 색 변화를 관찰하였다.

[0082] 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0083]

Cu (μ M)	건조 세포 질량 (mg mL ⁻¹)	비성장속도 (h ⁻¹)	나프탈렌 산화 ^a	메탄올 생산량 (mM)
0	0.281±0.021	0.019±0.002	++++	1.44±0.12
1	0.300±0.023	0.020±0.002	+++	1.65±0.13
2.5	0.320±0.025	0.020±0.002	++	2.16±0.17
5	0.358±0.028	0.021±0.002	+	2.52±0.21
10	0.241±0.020	0.018±0.001	-	2.18±0.19
^a 보라색 발달의 강도: +(존재) 및 -(부재)				

[0084] 표 1에 나타낸 바와 같이, 5 μ M Cu에서, 비성장속도(specific growthrate)가 0.019 h⁻¹ (0 μ M Cu에서)에서 0.021 h⁻¹로 증가하는 것이 관찰되었고, 이 Cu 농도에서, 메탄올 생산 수율은 2.52 mM까지 증가하였다. 10 μ M Cu에서, 상기 비성장속도는 0.018 h⁻¹까지 감소하였다. 5 μ M Cu에서 *M. sporium*의 최대 비성장 속도는 공급원료로서 동일한 농도의 CH₄(30%)에서 *M. trichosporium* OB3b에 대하여 보고된 0.059 h⁻¹ 값보다 낮았다[Hwang IY, et al., J Microbiol Biotechnol 2015;25:375-80]. pMMO의 우세 때문에 나프탈렌산화에서 상대적 환원에 대한 Cu 농도의 유사한 효과가 관찰되었다[Takeguchi M, et al., Catal Surv Jpn 2000;4:51-63].

[0086] (2) 공정 파라미터의 최적화

[0087] 메탄산화세균의 생리적 특성은 다양한 공정 파라미터 가령 pH, 온도, 및 성장 및 메탄올 생산 동안의 교반에 의해 강하게 영향을 받는다. 이에, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산에 있어서, 공정 파라미터의 최적화를 수행하기 위해 pH, 온도 및 교반 조건에 대한 메탄올 생산량을 측정하여 최적 값을 결정하였다.

[0088] 구체적으로, 24 시간 동안의 배양 후, pH 5.5-8.0의 아세트산 나트륨(pH 5.5) 및 인산염(pH 6.0-8.0) 완충액 내에 30% CH₄를 공급원료로서 넣고, 150 rpm에서 교반하면서 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산을 평가하였다.

[0089] 그 결과, pH 6.8에서 최대 메탄올 생산량인 2.7 mM이 관찰되었다. 상기 pH를 벗어나는 경우, 예컨대 pH 5.5 및 8.0에서, 메탄올 생산량은 각각 최대값이 대략 12% 및 28% 으로 감소되었다. 이들 결과는 메탄올 생산이 거의 중성인 pH에서 최적화되었음을 시사하였다.

[0090] 또한, 배양물을 pH 6.8 및 상이한 온도(25-40 °C)에서 배양시켰다.

[0091] 그 결과, 최적 온도는 30 °C였으며, 상기 온도를 벗어나는 경우, 구체적으로, 30 °C에서 25 °C로의 온도 변화는 이동은 2.5 mM의 약간 낮은 수율을 초래하는 반면, 35 °C 및 40 °C에서, 메탄올 수율은 최대값이 각각 44% 및 23%까지 현저히 감소하였다.

[0092] 24 시간의 배양 후 pH 6.8 및 30 °C에서 메탄올 생산에 대한 상이한 교반 속도(90-200 rpm)의 영향을 평가하였다.

[0093] 그 결과, 최적 교반 조건은 150 rpm이었다. 만일 마찬가지로, 각각 150 rpm 및 180 rpm의 교반 속도에서 2.70 mM 및 2.68 mM 메탄올의 매우 유사한 수율이 관찰되었으나, 더 낮거나 (90) 및 더 높은 (200) rpm에서, 메탄올 수율의 감소가 관찰되었다.

- [0094] 따라서, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산의 최적 조건은 pH 6.8-7.0, 25-30 °C 및 150-180 rpm 인 것을 알 수 있다.
- [0096] (3) 메탄올 생산에 대한 인산 완충액 농도의 영향
- [0097] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산에 있어서, 인산 완충액 농도의 영향을 평가하였다.
- [0098] 구체적으로, 상이한 농도의 인산염 완충액(10-120 mM, pH 6.8)을 사용하여 최적 조건하에서 메탄올 생산에 대한 이의 영향을 측정하여 도 1에 나타내었다.
- [0099] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 인산 완충액 농도가 20 mM에서 100 mM로 증가함에 따라 메탄올 생산은 2.70 mM에서 3.66 mM로 증가하였다. 그러나, 더 높은 농도(120 mM)에서, 메탄올 생산의 약간의 감소(3.48 mM)가 관찰되었다.
- [0100] 따라서, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산의 최적 인산 완충액 농도는 100 mM임을 알 수 있다.
- [0102] (4) 메탄올 생산에 대한 MDH 저해제의 영향
- [0103] 메탄올로부터 메탄올을 고효율로 생합성하기 위해서는 MMO의 활성을 증가시킴과 동시에 생산된 메탄올이 포름알데히드로 산화되는 것을 억제하여야 한다. 즉 메탄올의 산화를 막기 위해서는 MDH의 활성을 저해시켜야 한다.
- [0104] 이에, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산에 있어서, 메탄올 생산을 향상시키기 위해 MDH 저해제의 영향을 평가하였다.
- [0105] 구체적으로, 24 시간 동안 배양 후 최적 조건하에서 30% CH₄를 사용하여 상이한 MDH 저해제: EDTA (0.1-1.5 mM), MgCl₂ (5-50 mM), NaCl (10-120 mM), 및 NH₄Cl (5-25 mM)를 인산염 완충액(100 mM, pH 6.8)에 넣고, 메탄올의 생산량을 측정하여 도 2에 나타내었다.
- [0106] 도 2에 나타난 바와 같이, MDH 저해제의 최적 농도(mM)는 EDTA가 1.0 mM, MgCl₂가 20 mM, NaCl이 80 mM, 그리고 NH₄Cl이 15 mM인 것으로 나타났다.
- [0107] 상기, MDH 저해제의 저해 활성을 측정하기 위해, MDH 활성을 문헌[Kalyuzhnaya MG, et al., J Bacteriol 2008;190:3817-23]에 따라 600 nm에서 2,6-디클로로페놀린도페놀(DCPiP)의 페나진 메토설페이트-매개된 환원에 의해 유도된 흡광도의 변화에 따라 분광광도법으로 모니터링하여 그 결과를 도 3a에 나타내었다.
- [0108] 도 3a에 나타난 바와 같이, 인산 완충액 내에서, 이들 저해제는 MDH 활성을 각각 38.7%, 32.5%, 30.2%, 및 26.4%까지 저해하였다. 이와 대조적으로, 인산 완충액 (100 mM) 단독으로는 MDH 활성을 단지 17.6%밖에 저해하지 못했다. 이들 저해제는 상이한 농도에서 메탄올 생산에 대한 혼합된 영향을 미쳤으며, 최적 조건하에서 24 시간의 배양 후, 메탄올 생산이 3.66 mM에서 4.20 mM로 증가하였다. 시험된 저해제 중에서, MgCl₂(20 mM)의 첨가는 최대 메탄올 생산을 4.20 mM까지 이끌었다. 흥미롭게도, *M. sporium*에서 MDH 활성의 더 큰 저해(38.7%)는 EDTA의 존재를 유도하여 메탄올 생산을 향상시키지 못했으며, 이는 MMO 내의 금속 이온의 킬레이트화 때문인 것 같다.
- [0110] (5) 포름산염의 영향
- [0111] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄올 생산에 있어서, 메탄올 생산 동안 (10-120 mM에서) 공동 인자(NADH) 재생을 위한 포름산염의 가능한 지원 역할을 평가하였다.
- [0112] 구체적으로, MgCl₂(20 mM) 및 인산 완충액(100 mM)의 존재에서 포름산 나트륨의 농도(mM)에 따른 메탄올 생산량을 측정하여 도 3b에 나타내었다.
- [0113] 도 3b에 나타난 바와 같이, 포름산염은 메탄올 생산에 대해 긍정적인 영향을 가지며, 40 mM의 포름산염에서 최대 메탄올 생산(5.4 mM)이 관찰되었다. 그러나, 포름산염 농도가 120 mM까지 증가하는 것은 메탄올 생산에 현저한 영향을 미치지 않았다.

[0114] Mehta 등[Biotechnol Bioeng 1991;37:551-6]은 내인성 NADH₂의 소모 때문에 시간이 지날수록 메탄을 생산 속도는 감소한다고 언급했다. 따라서, 고수율의 생전환을 유지하기 위해서는 보조인자 재생이 필요하다. 따라서, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, 40 mM의 포름산염의 첨가는 메탄을 생산을 1.3배 향상시킬 수 있다.

[0116] (6) 반응 부피 대 상부 공간 비율의 영향

[0117] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, 메탄을 생산에 있어서, 5개의 상이한 비율(1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 및 1:9)에서 반응 부피 대 상부 공간 비율의 영향을 평가하였다. 공급원료로서 30% CH₄를 사용하여 최적 조건하에서 실험을 수행하였다. 이들 비율은 세럼 보틀(serum bottle) 내에서 반응 부피를 12 mL에서 60 mL로 변화시킴으로써 달성하였다.

[0118] 그 결과, 상이한 비율에서, 3.63-5.40 mM 메탄올이 생산되었고, 최적 반응 부피 대 상부 공간 비율은 1:5였다. 흥미롭게도, 1:1 및 1:3의 더 높은 비율은 메탄을 생산을 각각 33% 및 23%로 감소시켰다. 1:7 및 1:9의 더 낮은 비율에서, 메탄을 생산은 일정했다. 이러한 결과는 높은 메탄을 생산을 달성하는데 적절한 반응 부피 대 상부 공간 비율이 필요함을 시사했다.

[0120] (7) 공급원료의 주입 농도의 영향

[0121] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, 공급원료의 주입 농도의 영향을 평가하였다.

[0122] 다양한 농도(10-50%)의 CH₄를 주입하여 96 시간까지 배양시킴에 따라 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산을 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0123] 도 4에 나타낸 바와 같이, 배양 시간이 12 시간에서 24 시간으로 증가함에 따라 메탄을 생산은 증가하였고, 이후 96 시간의 배양에서는 급격하게 감소하였다. 또한, 30% CH₄에서, 메탄을 생산은 2.78 mM (10% CH₄에서)에서 5.40 mM로 급격하게 증가했고, 40% 및 50%의 더 높은 농도에서는, 24 시간의 배양 후 수율이 각각 5.74 mM 및 5.80 mM이었다. 이로부터 공급원료 주입 농도는 30-50%인 것이 바람직하고, 배양 시간은 24 시간이 바람직함을 알 수 있다.

[0125] <실험예 2> 지지체 및 고정화 방법이 메탄을 생산에 미치는 영향

[0126] 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, 지지체 및 고정화 방법의 영향을 평가하였다.

[0127] 구체적으로, 회분식 배양 조건 하에서 흡착 또는 공유 결합의 상이한 고정화 방법에 의해 다양한 지지체들, 가령 Amberlite XAD-2, XAD-4, 및 XAD-7HP 뿐만 아니라 Duolite A7 및 키토산 상에 *M. sporium*을 고정화하였다.

[0128] 고정된 세포들은 MgCl₂ (5 mM)을 함유하는 인산 완충액 (20 mM, pH 7.0)으로 2회 세척한 다음, 사용할 때까지 4 °C에서 보관하였다. 고정화 수율(IY)은 하기 수학적 1에 따라 계산되었다:

[0129] [수학적 1]

[0130] IY (%) = 지지체 상에 결합된 세포의 양/로딩된 전체 세포의 양×100

[0132] 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0133]

지지체	크기 (μm)	표면적 (m ² g ⁻¹)	고정화 수율(IY) (%) ^a	상대적 메탄올 (%) ^b
Amberlite XAD-2	682	336	19.5±1.4	70.8±5.0
Amberlite XAD-4	564	725	17.4±1.2	64.9±4.7
Amberlite XAD-7HP	580	450	18.1±1.3	73.5±5.2

Duolite A7	600-800	36	27.2±2.2	80.0±5.5
키토산	45-165	180	33.5±3.4	85.4±4.6
^a 지지체 g당 세포 로딩은 100 mg의 DCM임 ^b 5.40±0.42 mM의 자유 세포 메탄을 생산을 100%로 고려됨.				

[0134] 표 2에 나타난 바와 같이, *M. sporium*의 최대 IY는 17.4-33.5%의 범위였다. 이들 세포 로딩 수율은 동일한 조건 하에서의 흡착(IY: 7.15-13.4%)보다 훨씬 더 높았다. 공유적으로 고정화된 세포들의 메탄을 생산 효율은 64.9-85.4%였다. 흡착된 세포들의 생산은 자유 세포들(100%)보다 훨씬 더 낮았다(40.7-69.3%). 이들 지지체들 중에서, 흡착 및 공유 고정화를 통해 키토산-고정화된 세포들은 가장 높은 메탄을 생산을 하였고, 이때 최대 세포 로딩량은 지지체 g당 각각 13.4 및 33.5 mg의 DCM이었다. 고정화된 세포들은 96 시간까지의 배양 동안 지지체들 상에서 안정하였다.

[0135] 이로부터, 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, 공유 고정화를 통해 키토산에 고정된 *M. sporium*을 사용할 때, 종래 방법에 비해 향상된 고수율의 메탄을 생산을 할 수 있음을 알 수 있다.

[0137] 종래 기술 및 본 발명에 따른 *M. sporium*에 의한 메탄을 생산에 있어서, *M. sporium*의 종류, 고정화 방법 및 공급원료의 종류, 공정 파라미터에 따른 메탄을 수율을 정리하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

균주	공급원료 (%)	고정화		모드	온도 (°C)	pH	메탄을 수율(mM)
		지지체	방법				
<i>M. sporium</i> B2119	CH ₄ (22)	고분자 매트릭스	캡슐화	회분식	28	7.0	1.68
<i>M. sporium</i> B2120	CH ₄ (22)	고분자 매트릭스	캡슐화	회분식	28	7.0	1.43
<i>M. sporium</i> B2122	CH ₄ (22)	고분자 매트릭스	캡슐화	회분식	28	7.0	1.37
<i>M. sporium</i> B2123	CH ₄ (22)	고분자 매트릭스	캡슐화	회분식	28	7.0	1.84
<i>M. sporium</i> B2121	CH ₄ (22)	자유세포	^a	회분식	28	7.0	1.56
<i>M. sporium</i> B2121	CH ₄ (22)	고분자 매트릭스	캡슐화	연속식	28	7.0	2.34
<i>M. sporium</i> B2121	CH ₄ (22)	자유세포	-	회분식	28	7.0	0.35
<i>M. sporium</i> B2121	CH ₄ (22)	폴리비닐 알코올	캡슐화	회분식	28	7.0	1.94
<i>M. sporium</i> KCTC 22312	CH ₄ :CO ₂ (40)	자유세포	-	회분식	35	7.0	0.71
<i>M. sporium</i> DSMZ 17706	CH ₄ (50)	자유세포	-	회분식	30	6.8	5.80
<i>M. sporium</i> DSMZ 17706	CH ₄ :CO ₂ :H ₂ (50)	자유세포	-	회분식	30	6.8	5.80
<i>M. sporium</i> DSMZ 17706	CH ₄ (30)	키토산	공유	회분식	30	6.8	4.61
<i>M. sporium</i> DSMZ 17706	CH ₄ :CO ₂ :H ₂ (50)	키토산	공유	회분식	30	6.8	6.12
^a 해당 없음							

[0139] 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 키토산에 공유 고정된 *M. sporium*을 사용한 메탄을 생산 방법은 공급원료를 순수한 CH₄를 사용할 경우, 메탄을 수율이 4.61 mM로써 지지체로서 고분자 매트릭스를 사용하여 캡슐화된 종래 방법(1.37-2.34 mM)에 비해 2-3.5배의 메탄을 수율 향상을 보였다. 또한, 공급원료로서 합성 가스 혼합물을 사용한 경우에는 6.12 mM의 메탄을 수율을 나타냄으로써 자유 세포에 의한 생산(5.80 mM)보다도 더 높은 메탄을 생산 수율을 나타내었다.

[0140] 따라서, 본 발명에 따른 키토산에 공유 고정된 *M. sporium*을 사용한 메탄을 생산 방법은 순수한 CH₄ 및 합성 가스 혼합물 둘다로부터 현저하게 더 높은 메탄을 생산에 이르게 할 수 있다.

[0142] <실험예 3> 키토산 상에 공유 고정화된 메틸로시너스 스포리움의 재사용성

[0143] 본 발명에 따른 *M. sporium*의 메탄을 생산에 있어서, 키토산 상에 고정화된 *M. sporium*의 재사용성을 평가하였다.

[0144] 구체적으로, 자유 *M. sporium* 세포, 흡착을 통해 고정화된 *M. sporium* 세포, 및 공유 결합을 통해 고정화된 *M. sporium* 세포들에 의한 메탄을 생산의 각 사이클 후, 이들을 원심분리로 분리하여 인산 완충액으로 세척하여 다음 사이클에 접종원(inoculums)으로서 사용하였다. 메탄을 생산 효율은 초기(0) 사이클이 100%인 것으로 간주되었다.

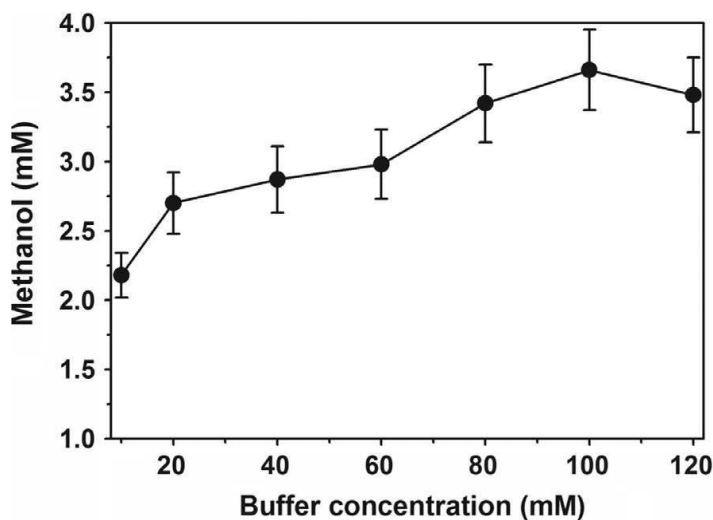
[0145] 결과를 도 6에 나타내었다.

[0146] 도 6에 나타낸 바와 같이, 6 사이클의 재사용 후, 흡착 또는 공유 방법을 통해 고정화된 *M. sporium* 세포들은 각각 26.6% 및 63.4%의 생산 효율을 유지하였다. 그러나, 동일한 조건하에서, 자유 세포들은 17.3%의 메탄을 생산율로 현저히 더 낮은 수율을 나타냈다. 이러한 결과들로부터 *M. sporium*의 공유 고정화는 향상된 안정성 및 재사용성에 매우 효과적임을 알 수 있다.

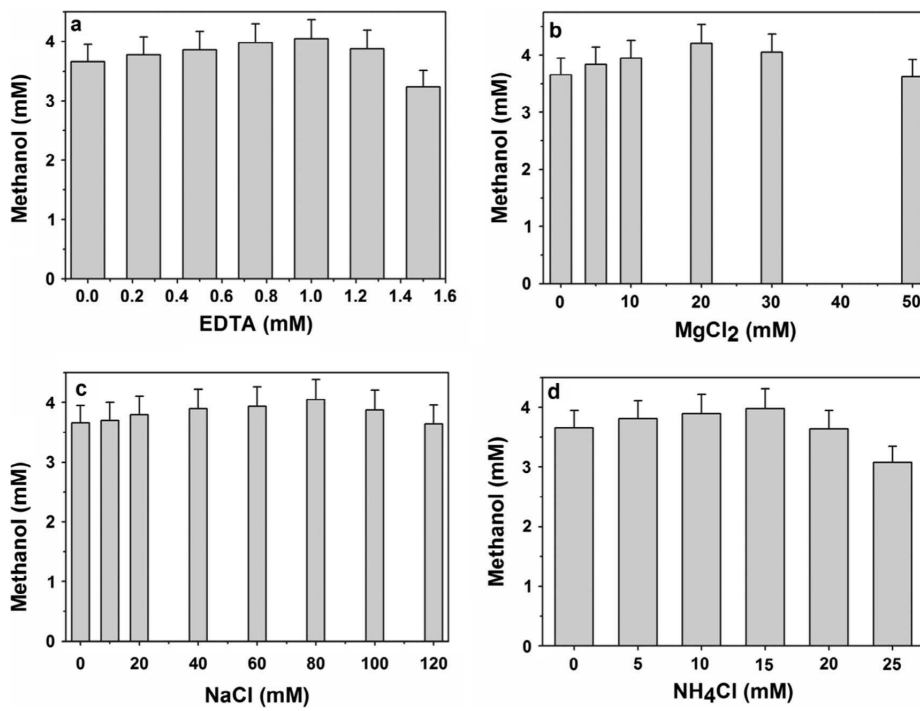
[0148] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

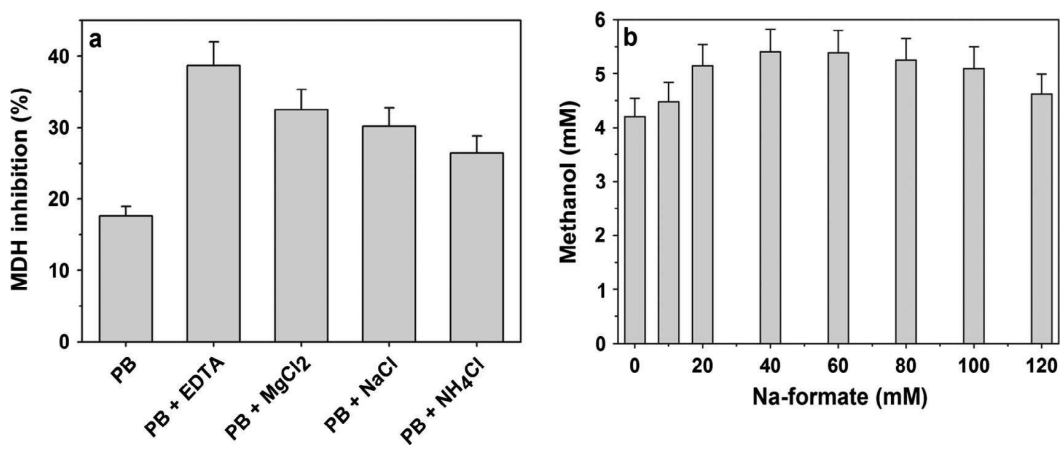
도면1



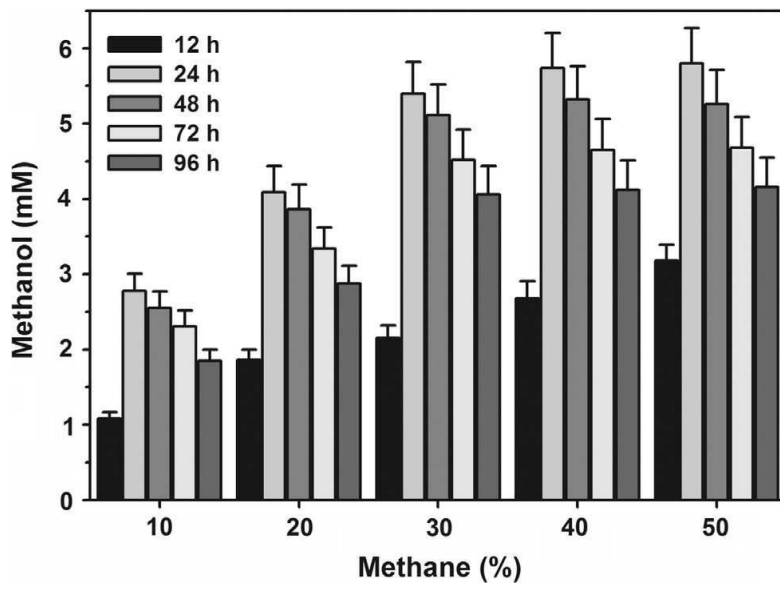
도면2



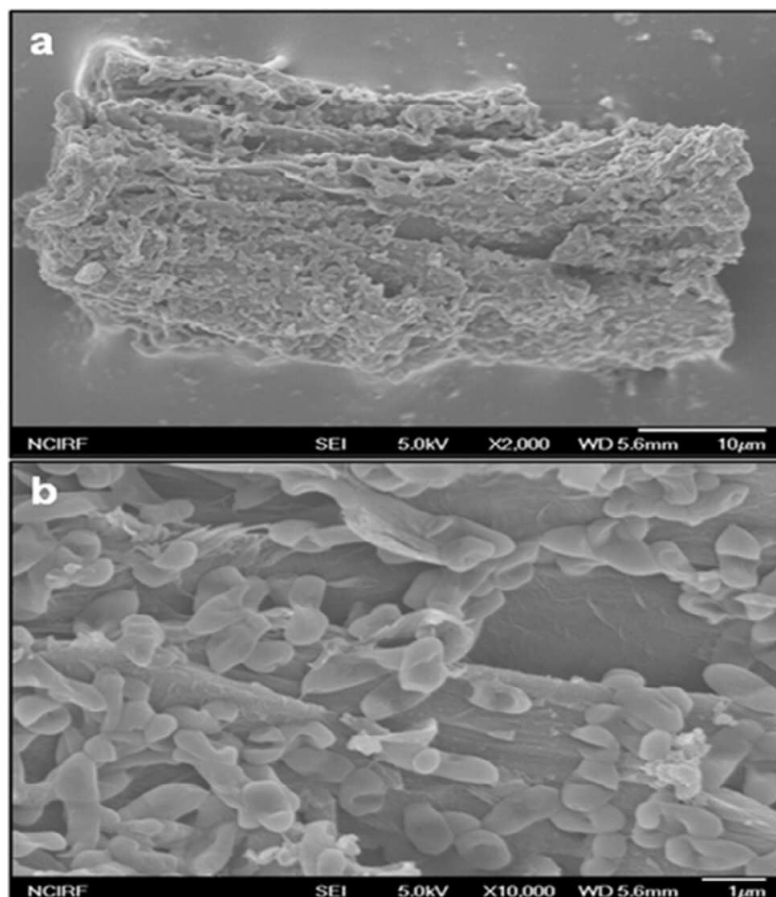
도면3



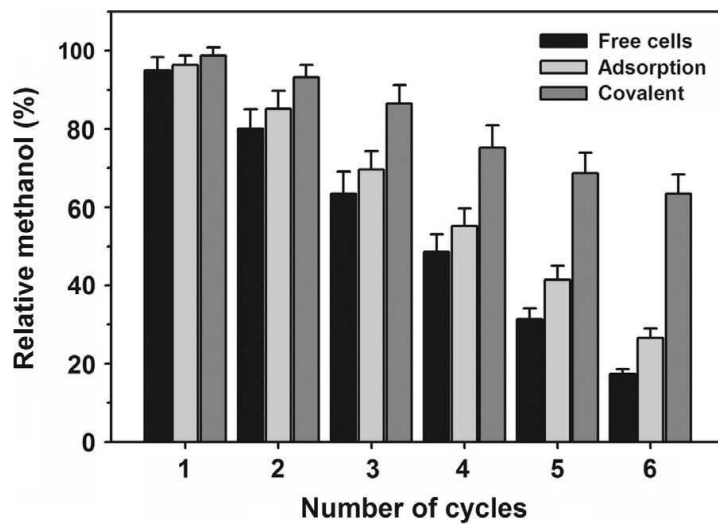
도면4



도면5



도면6



도면7

