



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0032482
(43) 공개일자 2011년03월30일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.
<i>C12P 7/02</i> (2006.01) <i>C12M 1/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-0089993
(22) 출원일자 2009년09월23일
 심사청구일자 2009년09월23일</p> | <p>(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울 성북구 하월곡동 39-1</p> <p>(72) 발명자
엄영순
서울특별시 성북구 하월곡동 39-1 한국과학기술연
구원 아파트 B-301</p> <p>상병인
서울특별시 성북구 돈암1동 1-3
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김 순 영, 김영철</p> |
|--|---|

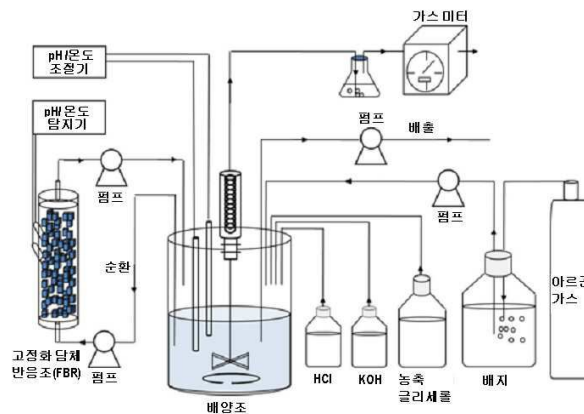
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 글리세롤을 이용한 1,3-프로판디올 생산 방법 및 장치

(57) 요약

교반기를 포함하는 배양조 및 내부에 소수성 다공성 담체를 포함하는 반응조를 연결하여 배양액을 순환시킴으로써 1,3-프로판디올 생산 미생물을 담체에 고정시키고, 고농도의 1,3-프로판디올을 생산하는 미생물 고정화 반복 유가식 배양 방법 및 장치가 개시된다. 상기 1,3-프로판디올 생산 방법 및 장치를 이용하면, 담체에 고밀도로 고정된 미생물에 의하여 고농도의 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다. 또한, 순수글리세롤 뿐만 아니라 바이오디젤 생산 공정으로부터 발생하는 폐글리세롤을 전처리 없이 사용하여 안정적이고 고농도의 1,3-프로판디올을 생산할 수 있으므로, 공정 간소화 및 경제적 생산을 도모할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자
전선애
충청남도 천안시 동남구 신부동 동남로알아파트
다-307

공성욱
서울특별시 송파구 방이2동 50-8

특허청구의 범위

청구항 1

교반기를 포함하는 배양조 및 상기 배양조에 연결된 반응조를 포함하고,

상기 반응조는 내부에 소수성 다공성 담체를 포함하고,

상기 반응조의 입구와 상기 배양조, 및 상기 반응조의 출구와 상기 배양조가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 반응조의 입구와 배양조 사이, 반응조의 출구와 배양조 사이, 또는 상기 두 곳 각각에 펌프를 포함하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 배양조는 글리세롤 저장조와 연결되는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 배양조는 배지 저장조와 연결되고, 배출구를 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 소수성 다공성 담체는 폴리우레탄 또는 폴리염화비닐로 구성된 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 배양조는 CSTR(continuous-flow stirred-tank reactor)이고, 반응조는 FBR (fixed bed reactor)인 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치.

청구항 7

배지, 미생물 및 글리세롤을 배양조에 주입하며 배양조를 교반하는 단계;

소수성 다공성 담체를 반응조에 채우는 단계;

상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키는 단계; 및

상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 포함하고,

상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키고, 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 반복하여, 반응조 내 담체에 미생물을 고정시키고 1,3-프로판디올을 생산하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

배양조 내 1,3-프로판디올 농도가 30 ~ 60 g/L 이면, 배양조의 내용물을 제거하고 글리세롤을 포함한 배지를 배양조에 재주입하는 것을 반복하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 반응조 내 담체 및 담체에 고정된 미생물을 제거하지 않고 사용하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서, 배양조 내 처음 주입되는 글리세롤의 농도는 10~60 g/L인 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 11

제7항 또는 제8항에 있어서, 배양조 내 글리세롤의 농도를 10~30 g/L으로 유지하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 12

제7항 또는 제8항에 있어서, 글리세롤은 순수한 글리세롤, 폐글리세롤, 또는 불순물 제거 처리된 폐글리세롤이고, 상기 폐글리세롤은 바이오디젤 생산공정에서 발생하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 폐글리세롤은 pH가 10 이상이고, 1,3-프로판디올 생산 반응의 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

청구항 14

제7항에 있어서, 소수성 다공성 담체는 폴리우레탄 또는 폴리염화비닐로 구성된 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 글리세롤 또는 글리세롤 포함 물질을 이용한 1,3-프로판디올 생산 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글리세롤은 화학적/생물학적 방법에 의하여 프로판올, 글리세르산, 프로필렌 글리콜, 1,3-프로판디올(1,3-PD) 등으로 전환될 수 있다. 이 중에서 1,3-프로판디올은 최근 상용화되어 용도가 확대되고 있는 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트 (polytrimethylene terephthalate, PTT)의 단량체로 이용될 수 있는 중요한 원료물질이며, 또한 윤활제와 용매로도 사용될 수 있다. 1,3-프로판디올의 현재 생산공정은 acrolein(DuPont사)이나 ethylene oxide(Shell사)로부터 화학적 합성법에 의해 생산되고 있다. 글리세롤로부터 화학축매를 이용하여 1,3-프로판디올로 전환하는 연구도 진행되고 있으나, 지금까지 보고된 바에 의하면 주로 고온·고압 조건에서 유해한 화학용제를 사용하고, 특히 수율이 5~15% 정도로 매우 낮으며, 1,2-프로판디올 (1,2-PD) 등의 부산물이 다량 생성되어 상업적 생산공정 적용에는 어려움이 있다. 이에 반해 생물학적인 1,3-프로판디올 전환공정은 화학공정에 비해 환경친화적이고 저온·저압에서 이루어져 경제적으로 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다는 장점이 있어 최근 많은 관심을 받고 있다. DuPont사와 Genencor사는 대사공학기술을 이용하여 대장균으로부터 포도당을 이용하여 높은 농도(135 g/L)의 1,3-프로판디올을 생산하는 기술을 개발한 바 있다. 하지만, 포도당과 같은 곡물성 기질을 이용하는 경우 식량부족 문제와 연계되어 논란의 여지가 있고, 곡물의 가격이 향후 상승할 것이 예상되므로 비곡물성 기질, 특히 폐자원을 이용한 1,3-프로판디올 생산을 통한 경제성 확보가 필요하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0003] 본 발명의 일 측면은 비곡물성기질인 글리세롤 또는 글리세롤을 함유한 물질을 이용하여 고농도의 1,3-프로판디올을 생산하는 방법 및 장치를 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0004] 본 발명의 일 측면은 교반기를 포함하는 배양조 및 상기 배양조에 연결된 반응조를 포함하고, 상기 반응조는 내부에 소수성 다공성 담체를 포함하고, 상기 반응조의 입구와 상기 배양조, 및 상기 반응조의 출구와 상기 배양

조가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 장치를 제공한다.

[0005] 본 발명의 다른 측면은 배지, 미생물 및 글리세롤을 배양조에 주입하며 배양조를 교반하는 단계; 소수성 다공성 담체를 반응조에 채우는 단계; 상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키는 단계; 및 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 포함하고, 상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키고, 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 반복하는 것을 특징으로 하는 1,3-프로판디올 생산 방법을 제공한다.

[0006] 본 발명의 일 측면은, 기질인 글리세롤을 간헐적으로 공급하여 농도를 낮게 유지하는 유가식 배양 방법을 포함하고, 생산된 1,3-프로판디올의 농도가 일정 수준이 되면 배양조와 반응조 내 배양액을 배출하고 새 배양액을 주입하는 반복 유가식 배양 방법을 포함한다. 이 때, 고정되어있는 미생물을 이용하므로 미생물을 재접종할 필요가 없다. 본 발명의 일 측면에서는, 반응조에서 고농도로 생산된 1,3-프로판디올이 포함된 배양액을 배양조에서 완전히 혼합하여 다시 반응조로 빠르게 순환시킴으로써, 반응조 내 혼합을 수행하고, 반응조와 배양조 내 1,3-프로판디올 농도, 글리세롤 농도 및 pH 차이가 없도록 할 수 있다.

효 과

[0007] 본 발명의 일 측면에 따른 1,3-프로판디올 생산 방법 및 장치를 이용하면, 담체에 고밀도로 고정된 미생물에 의하여 고농도의 1,3-프로판디올을 생산할 수 있고, 반복 유가식 배양 방법에서 글리세롤 농도를 낮게 유지함으로써 미생물 활성 저해를 방지할 수 있으며, 배양 초기에 미생물 접종이 필요 없는 경제적이고 간단한 공정이 가능하다. 또한, 순수글리세롤 뿐만 아니라 바이오디젤 생산 공정으로부터 발생하는 폐글리세롤을 전처리 없이 사용하여 안정적이고 고농도의 1,3-프로판디올을 생산할 수 있으므로, 공정 간소화 및 경제적 생산을 도모할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0008] 본 발명의 일 측면에 따른 1, 3-프로판디올 생산 장치는, 교반기를 포함하는 배양조 및 상기 배양조에 연결된 반응조를 포함하고, 상기 반응조는 내부에 소수성 다공성 담체를 포함하고, 상기 반응조의 입구와 상기 배양조, 및 상기 반응조의 출구와 상기 배양조가 연결되어 있다. 본 발명의 일실시예에서, CSTR(continuous-flow stirred-tank reactor) 배양조와 FBR (fixed bed reactor) 반응조가 연결된 형태일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산 장치를 이용하여, 배양조의 내용물을 반응조에 주입하여 반응조 내 담체를 통과시키고, 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 반복함으로써, 반응조 내 담체에 배양액 내 미생물을 고정시킬 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 배양조의 내용물을 반응조에 주입하여 반응조 내 담체를 통과시키고, 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하기 위하여, 반응조의 입구와 배양조 사이, 반응조의 출구와 배양조 사이, 또는 상기 두 곳 각각에 펌프를 포함할 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산 장치는 유가식(fed-batch) 배양 장치로서, 배양조는 배지 저장조와 연결되고, 배출구를 포함할 수 있다. 유가식 배양은 발효공정의 최적 운전 방법의 하나로서, 기질 또는 영양소의 공급을 단속 또는 연속적으로 공급하여 배양조 내부의 환경을 생산물을 생산하기 위한 최적조건으로 만들기 위하여 사용하는 배양공정이다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산 장치의 배양조는 글리세롤 저장조와도 연결될 수 있다. 유가식 배양으로 탄소원인 글리세롤을 간헐적으로 공급하여 글리세롤 농도를 낮게 유지함으로써 미생물 활성 저해를 방지할 수 있다. 탄소원으로 사용되는 글리세롤은 순수 글리세롤 또는 바이오디젤 생산 공정으로부터 발생한 폐글리세롤일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 폐글리세롤로서, 두유, 폐식용유 등을 사용한 바이오디젤 생산 공정(알칼리 촉매와 메탄올 또는 에탄올 사용)에서 발생한 폐글리세롤을 바이오디젤 생산업체로부터 제공받아 사용할 수 있다. 폐글리세롤의 경우, 사용된 알칼리 촉매로 인해 pH가 10이상일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 폐글리세롤은 순수 글리세롤과 달리 색깔이 검고 불투명하며, 상온에서 흐름성이 적은 점성이 높은 젤 형상을 나타낸다. 폐글리세롤은 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 적정 글리세롤 농도로 묽혀 사용할 수 있다. 본 발명의 또다른 실시예에서는, 폐글리세롤에 HCl과 같은 산을 첨가하여 생성되는 검은 불순물 층을 제거한 전처리된 폐글리세롤을 사용할 수 있다. 폐글리세롤 내 불순물 성분은 메탄올(17wt%), 물(0.05wt%), MONG(Matter Organic Non Glycerol, 비-글리세롤 유기 물질)(16.96wt%), 소듐(1.3wt%), 포타슘(0.07wt%), 및 마그네슘 (1.9 mg/kg) 등을 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 따른 반응조는 소수성 다공성 담체로 채워진 유리 칼럼일 수 있다. 상기 담체로는 폴리우

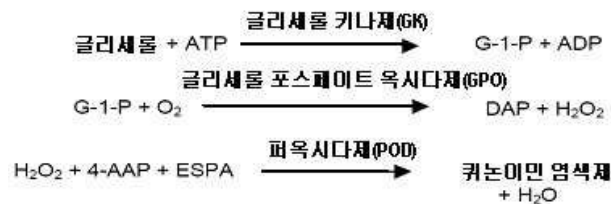
레탄, 폴리염화비닐 등으로 만들어진 다공성 담체를 비롯한 여러 재질의 다공성 담체를 사용할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 다른 측면은, 1,3-프로판디올 생산 방법으로서, 배지, 미생물 및 글리세롤을 배양조에 주입하며 배양조를 교반하는 단계; 소수성 다공성 담체를 반응조에 채우는 단계; 상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키는 단계; 및 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 포함하고, 상기 배양조의 내용물을 상기 반응조에 주입하여 담체를 통과시키고, 상기 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입하는 단계를 반복하는 방법을 제공한다. 이러한 재주입 및 순환공정을 이용하여 반응조 내 혼합을 수행하고, 반응조 내 담체에 미생물을 고정시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산 방법은 유가식(fed-batch) 배양 방법으로서, 배양조 내 1,3-프로판디올 농도가 30 ~ 60 g/L 이면, 배양조의 내용물을 제거하고 글리세롤을 포함한 배지를 배양조에 재주입할 수 있다. 1,3-프로판디올이 60 g/L 초과하는 양으로 존재하면 미생물의 성장 저해를 초래하기 때문이다. 본 발명의 일실시예에서, 매 10-48시간 배양 후 배양조의 내용물을 제거하고 배지 및 글리세롤을 배양조에 재주입할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에서, 초기 주입되는 글리세롤 농도는 10~60 g/L 일 수 있다. 또한, 유가식 배양동안 배양조 내 글리세롤의 농도는 10-30g/L으로 유지될 수 있다. 고농도의 1,3-프로판디올을 생산하기 위해서는 고농도의 글리세롤이 필요하지만, 배양 초기에 고농도의 글리세롤을 첨가하면 균주 성장에 저해가 될 수 있으므로 유가식 배양을 통해 글리세롤의 적정 농도를 유지시킬 수 있다.
- [0016] 1,3-프로판디올 생산을 위한 미생물은 *클렙시엘라 뉴모니애(Klebsiella pneumoniae)*, *클렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca)*, *엔테로박터 아글로메란스(Enterobacter agglomerans)*, *클로스트리디움 부티리쿰(Clostridium butyricum)* 또는 *시트로박터 프레운다이(Citrobacter freundii)* 등의 혐기성 및 통성 혐기성 미생물들이 사용될 수 있다
- [0017] 배양 온도는 26 °C 내지 33 °C일 수 있고, 특히 30°C일 수 있다. 33 °C 를 초과하면 1,3-프로판디올의 생산량이 감소되고, 성장률, 글리세롤 소모 또한 저해되는 경향을 보이기 때문이다. 배양 pH는 6.5 ~ 7.5 일 수 있다. pH가 상기 범위보다 낮아지면, 글리세롤 소모 및 1,3-프로판디올 생산량이 감소되는 경향을 보이기 때문이다. 본 발명의 일실시예에서, 알칼리 촉매를 사용한 공정에서 생산된 페글리세롤의 pH는 10이상이므로, 탄소원으로 페글리세롤을 사용하는 경우에는 페글리세롤 첨가시 배양 pH가 상승하므로 pH가 조절되고 KOH와 같은 염기성 용액의 사용량을 감소시킬 수 있다.
- [0018] 이하, 본 발명의 실시예에 관하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 후술하는 실시예는 본 발명의 일실시예일 뿐, 본 발명이 그러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] [실시예]
- [0020] 1. 균주, 배지 조성, 측정방법
- [0021] (1) 균주
- [0022] 미생물로서 통성 혐기성 미생물인 *클렙시엘라 뉴모니애(K. pneumoniae)* DSM2026 균주와 *클렙시엘라 뉴모니애(K. pneumoniae)* DSM4799 균주를 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Branunschweig, Germany)에서 구입하여, DSMZ에서 제공된 종배양용 배지 및 배양온도(37°C, 26°C)에 따라 6시간 배양시킨 후, 25% 글리세롤이 포함된 상태로 -80°C 냉동고에 보관하였다.
- [0023] (2) 배지 조성
- [0024] 균주의 1,3-프로판디올 생산배지 조성은, 증류수 1 L 에 K₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 3 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g, 효모추출물 2 g, 펩톤 0.5 g, 소고기 추출물 0.3 g (Difo Laboratories, Becton, Dickinson & Co., USA), 미량원소(FeCl₂ · 4H₂O: 27.0g/L, MnCl₂ · 4H₂O: 10.0g/L, ZnCl₂:3.42g/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O: 2.18g/L, CoCl₂ · 6H₂O: 1.19g/L, CuCl₂ · 2H₂O: 0.85g/L, H₃BO₃: 0.31g/L, NiCl₂ · 6H₂O: 0.05g/L) 1 ml 를 포함하며, 초기 pH는 7.0 으로 조절하였다.
- [0025] 탄소원으로는 순수 글리세롤 (J.T.Baker, 99.9%)과 두유 및 폐식용유를 사용한 바이오디젤 생산 공정(알칼리 촉매와 메탄올 또는 에탄올 사용)에서 발생한 페글리세롤 2가지를 바이오디젤 생산업체로부터 제공받아 사용하였

다. 폐글리세롤은 실험실에서 알칼리 촉매와 메탄올을 이용하여 획득할 수도 있다. 두유를 이용한 바이오디젤 생산공정에서 발생한 폐글리세롤 (G-SO)과 폐식용유 유래 폐글리세롤 (G-WO)은 순수 글리세롤과 달리 색깔이 검고 불투명했으며, 특히 G-SO의 경우 상온에서 흐름성이 적은 점성이 높은 젤 형상을 나타내었다. 폐글리세롤은 500 g/L의 농도의 스탁 용액을 만들고 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 적정 글리세롤 농도로 묻혀 사용하였다. 폐글리세롤 내 불순물 성분은 메탄올(17wt%), 물(0.05wt%), MONG(Matter Organic Non Glycerol, 비-글리세롤 유기 물질)(16.96wt%), 소듐(1.3wt%), 포타슘(0.07wt%), 및 마그네슘 (1.9 mg/kg) 등을 포함한다.

[0026] (3) 측정 방법

[0027] 균주의 증식은 UV-스펙트로포토미터(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm 에서 OD(optical density)를 측정하였다. 글리세롤, 생성된 발효 부산물은 16,000 x g 에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 0.2 μm 필터(Whatman)로 여과하여 측정하였다. 글리세롤의 정량 분석은 자유 글리세롤 반응제(Free glycerol reagent, Sigma, USA)를 이용하였다. 아래의 반응식에서 나타낸 바와 같이 글리세롤 1몰당 1몰의 퀴논 이민 염색제(quinoneimine dye)가 생성되므로, 흡수과장 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 글리세롤을 정량하였다. 이 분석방법의 정량범위는 글리세롤 농도 1 g/L이하이므로 시료를 정량범위내로 희석하여 분석하였다. pH 는 pH 미터(Orion Modil 290A)를 이용하여 측정하였다. 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올 (2,3-BD), 아세트산은 불꽃 이온화 검출기(FID)를 장착한 가스 크로마토그래피(Shimadzu GC-1200, Japan)를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 HP-INNOWax (Agilent, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)을 이용하였고, 오븐 온도는 초기 50 °C에서 30°C/min 씩 최종 240 °C까지 증가시켜 분석하였다. 주입부 온도는 200 °C, 검출부의 온도는 240 °C로 유지하였으며 캐리어가스는 질소 가스를 28 mL/min의 유속으로 주입하였다.



$$\text{글리세롤 함량} = \frac{(A_{\text{SAMPLE}} - A_{\text{BLANK}})}{(A_{\text{STANDARD}} - A_{\text{BLANK}})} \times \text{표준체 농도}$$

[0029] 2. 세럼 보틀(Serum bottle) 이용 혐기성 배양

[0030] 글리세롤 초기 농도가 1,3-프로판디올 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 순수글리세롤 및 폐글리세롤을 이용하여 세럼 보틀에서 1,3-프로판디올을 생산하였다.

[0031] 먼저 250 mL 플라스크에 50 ml 증배양용 배지를 넣고 글리세롤 25%에 동결된 *클렙시엘라 뉴모니애(K. pneumoniae)* DSM 4799 미생물을 접종하여 호기적으로 밤새 종(seed) 배양하였다.

[0032] 125 mL 세럼 보틀에 50 mL 생산배지를 넣은 후 질소가스를 불어넣어 산소를 제거한 후 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 세럼 보틀을 밀봉하였다. 배지가 들어있는 세럼 보틀을 멸균시킨 후 상기 종 배양한 미생물을 10% (v/v) 접종하고, 1,3-프로판디올 생산을 위해 탄소원으로서 순수글리세롤, 폐글리세롤을 최종농도 20, 40, 60, 80 및 100 g/L 되도록 첨가하였다. 이후 30°C 48시간 배양시켰다.

[0033] (1) 순수 글리세롤 사용시 결과

[0034] 표 1 및 도 1에 나타나는 바와 같이 초기 20 g/L, 40 g/L의 글리세롤을 첨가한 경우, 배양 24시간 동안 모두 소모하였으며, 48시간 후 각각 9.7 g/L 및 14 g/L의 1,3-프로판디올이 생산되었다. 초기 글리세롤 농도를 60 g/L 이상을 첨가한 경우에는 40 g/L를 첨가한 경우와 비교하면 24시간 배양 후 OD, 1,3-프로판디올 농도, 생산성 등에서 낮은 결과를 나타내었다. 이는 글리세롤 농도가 60 g/L 이상인 경우 균주의 성장 및 1,3-프로판디올 생산을 저해하기 때문인 것으로 생각되어진다. 표 1은 24시간 배양 후 초기 글리세롤 농도에 따른 결과를 나타낸 표

이다. 도 1은 48시간 배양 후 초기 글리세롤 농도에 따른 결과를 도시한 그림이다.

표 1

초기 글리세롤 농도 [g/L]	글리세롤 소모 [g/L]	OD ₆₀₀	1,3-프로 판디올 [g/L]	생산성 [g/L/h]	수율 (mol/mol)	pH
20	20.00	4.3	7.60	0.35	0.52	5.33
40	39.45	4.2	14.20	0.59	0.44	5.12
60	32.20	3.7	11.20	0.47	0.42	5.47
80	17.44	2.5	7.61	0.32	0.53	5.53
100	10.29	2	4.26	0.18	0.50	5.67

[0035]

[0036]

(2) 폐글리세롤 사용시 결과

[0037]

표 2 및 도 1에 나타나는 바와 같이, 초기 20 g/L, 40 g/L의 폐글리세롤 2 종류(G-SO 및 G-WO)를 각각 첨가한 경우 배양 48시간 동안 모두 소모되었으며, 48시간 후 40 g/L 글리세롤로부터 각각 17.0 g/L 및 17.4 g/L의 1,3-프로판디올이 생산되었다. 초기 글리세롤 농도를 60 g/L 이상(G-WO 의 경우) 또는 80g/L 이상 (G-SO 의 경우) 첨가한 경우에는 24시간 배양 후 1,3-프로판디올 농도, 생산성 등에서 낮은 결과를 나타내었다. 표 2는 24 시간 배양 후 초기 글리세롤 농도에 따른 영향을 나타낸 표이다.

표 2

폐글리세 롤	초기 글리세롤 농도 [g/L]	글리세롤 소모 [g/L]	1,3-프 로판디 올 [g/L]	생산성 [g/L/h]	수율 (mol/mol)	pH
G-SO	20	19.62	7.80	0.29	0.43	5.85
	40	26.86	8.04	0.33	0.36	6.03
	60	34.30	8.72	0.36	0.31	6.14
	80	24.82	2.17	0.09	0.11	6.97
	100	27.77	0.00	0.00	0.00	8.72
G-WO	20	20.00	7.30	0.36	0.52	5.92
	40	34.21	14.44	0.60	0.51	5.88
	60	33.67	11.15	0.46	0.40	5.77
	80	22.01	5.13	0.21	0.28	5.71
	100	47.82	5.20	0.22	0.13	5.98

[0038]

[0039]

(3) 순수글리세롤과 폐글리세롤의 비교

[0040]

표 1 및 2, 도 1에 나타나는 바와 같이 폐글리세롤 G-SO 40 g/L 이상을 사용한 경우 24시간 배양 후 순수 글리세롤을 사용한 경우보다 25~70% 감소된 1,3-프로판디올 농도를 나타내지만, 48시간 배양 후에는 순수 글리세롤을 사용한 결과의 76% 이상이거나, 글리세롤 농도 40 g/L에서는 오히려 더 높은 1,3-프로판디올 생산을 보였다. 폐글리세롤 G-WO를 사용한 경우에는 24시간 배양 후에도 80 g/L 글리세롤을 사용한 경우를 제외하고는 순수 글리세롤을 사용한 경우와 유사하거나 더 향상된 1,3-프로판디올 생산을 보였으며, 48시간 배양 후에도 비슷한 경향을 나타내었다. 즉, 폐글리세롤을 사용한 경우에도 순수 글리세롤에 비해 1,3-프로판디올 생산량이 저하되지 않았다. 따라서, 폐글리세롤을 이용하는 경우 불순물에 의한 1,3-프로판디올 생산 저해가 관찰되지 않았으므로, 바이오디젤 생산 부산물인 폐글리세롤을 전처리 없이도 1,3-프로판디올 생산용 기질로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[0041] 3. pH가 조절된 유가식 배양

[0042] 이번에는, 페글리세롤을 계속적으로 주입하는 경우 1,3-프로판디올 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 순수글리세롤과 페글리세롤을 이용한 유가식 배양을 수행하였다.

[0043] 1,3-프로판디올 생산성을 향상시키기 위해 배양온도를 30 °C, 교반속도 200 rpm, pH는 페글리세롤 주입 및 KOH를 이용하여 7.0으로 유지하였다. 소모되는 글리세롤 및 질소원을 공급하기 위해 배양액 1.5 L당 50 mL의 농축된 글리세롤과 복합질소원을 첨가하였으며, 유가식 배양동안 글리세롤의 잔류농도를 15~30 g/L로 유지하였다. 그 결과 도 2에 도시된 바와 같이, 배양 13 시간동안 25.8 g/L의 순수 글리세롤과 26.9 g/L의 G-SO가 소모되어 각각 15 g/L과 16 g/L의 1,3-프로판디올이 생산되었다. 이는 세럼 보틀에서의 회분식 배양에서와 마찬가지로, 페글리세롤 G-SO를 사용했을 때 순수글리세롤의 경우와 비슷하거나 향상된 1,3-프로판디올 생산성을 나타내는 것이다. 13시간 경과 후 20 g/L의 글리세롤을 첨가한 후에는 순수 글리세롤에 비해 G-SO의 경우 글리세롤 소모 및 1,3-프로판디올 생산이 빠르게 증가하였으며, 배양 47시간동안 순수글리세롤에서는 39.4 g/L의 1,3-프로판디올이 생성된 반면 G-SO에서는 71.1 g/L의 1,3-프로판디올이 생성되었다. 1,3-프로판디올 생산성도 페글리세롤 G-SO를 사용한 경우 순수글리세롤에 비해 79.8% 향상되었다(1.51 g/L/h vs 0.84 g/L/h). 이러한 결과를 바탕으로, 바이오디젤 생산 부산물인 페글리세롤을 전처리 없이도 1,3-프로판디올 생산용 기질로 사용할 수 있고, 페글리세롤을 기질로 사용하여 오히려 1,3-프로판디올 생산을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0044] 배양이 진행됨에 따라 1,3-프로판디올의 농도는 증가하였는데, 배양 70시간동안 순수 글리세롤에서는 63 g/L의 1,3-프로판디올이 생성된 반면, G-SO에서는 82 g/L의 1,3-프로판디올이 생성되었다. G-SO를 사용한 경우는 배양 50시간이후에는 1,3-프로판디올 생산속도가 감소하였는데, 이는 이미 고농도의 1,3-프로판디올에 의해 저해를 받기 때문인 것으로 사료된다. 상기 유가식 배양에서 pH 조절을 위하여 염기성 용액인 KOH를 사용하는데, 본 발명의 실시예에서 페글리세롤이 알칼리성을 띄므로, 페글리세롤 첨가시 pH가 상승하여 pH 조절 효과를 나타냈고, pH 조절을 위한 염기성 용액 KOH의 사용량이 감소되었다.

[0045] 4. 미생물 고정화 담체를 이용한 유가식 배양

[0046] 유가식 배양을 위한 3L 교반-배양조(stirred-vessel, Fermentec Co. Ltd., Korea) 발효기에 미생물 고정화 담체를 채운 반응조(FBR)를 결합시켜 1,3-프로판디올 생산장치를 구축하였다.

[0047] 도 3에는 본 발명의 실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산장치의 모식도가 도시되어 있다. 본 발명의 실시예에서, 담체가 채워진 반응조는 길이 29 cm, 내경 7 cm, 총 부피 1.1L인 유리 칼럼이고, 폴리우레탄으로 구성된 소수성 다공성 담체(크기: 5x5x5 mm)로 채워졌다. 총 2.5L의 배지를 포함하는 배양조 및 반응조를 멸균한 후, 반응조를 혐기성 조건으로 만들기 위하여 멸균 필터로 여과된 아르곤 기체로 처리된 배지를 30분동안 반응조를 통하여 순환시켰다. 그 후 1.5L의 배지는 배양조에, 1L의 배지는 반응조에 잔류시켰다. 배양조에 2.5 % [v/v] 미생물을 접종하고 30°C, 200 rpm 조건에서 1,3-프로판디올 생산장치를 운전시켰다. pH는 자동조절장치에 의하여 5 N KOH를 첨가함으로써 pH를 7.0으로 조절하였고, ORP (Oxidoreduction potential)는 -150에서 -450 mV로 혐기적으로 운전하였다. 소모되는 글리세롤 및 질소원을 공급하기 위해 배지 1.5 L당 50 mL의 농축된 글리세롤과 복합질소원을 첨가하였으며, 초기 글리세롤 농도는 40 g/L로 첨가하고 잔류 글리세롤의 농도가 5~20 g/L 일 때 600g/L 농도의 글리세롤(Stock solution)을 배양조에 첨가하여 유가식 배양동안 배양조 내 글리세롤의 농도가 10~30g/L로 유지되도록 하였다.

[0048] 배양조의 내용물(배양액)을 반응조를 통과하여 순환시키는 펌핑속도를 43 mL/분 또는 86 mL/분으로 하여 반복 순환시킴으로써, 배양액 내 미생물이 반응조 내 담체에 고정되도록 하였다. 또한, 상기 배양조와 반응조 간의 물질 순환에 있어서, 반응조로부터 배출된 물질을 배양조에 재주입시켜 순환시키는 과정을 통하여, 반응조 내 혼합 정도를 향상시키고, 반응조와 배양조 간의 글리세롤, 1,3-프로판디올 및 pH 조건의 차이를 감소시켰다.

[0049] 생산된 1,3-프로판디올 농도가 30~60 g/L에 도달하면, 배양조 내 배양액을 제거하고 새로운 배지(1.5 L)를 첨가하여 새로운 사이클을 시작하였다. 반응조 내 담체 및 담체에 고정된 미생물은 제거하지 않고 새로운 사이클에 사용하였다. 본 실시예에서는, 48시간마다 배지를 교체시키며, 4번 연속적으로 유가식 배양을 하여 1,3-프로판디올 생산성 증가를 얻을 수 있었다. 도 4에 의하면, 유가식 배양을 반복할수록 초기 20시간 생산성이 1.06 g/L/h에서 1.60 g/L/h로 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이는 고정화된 미생물에 의해 빠른 속도로 글리세롤이 소비되고 그 결과 1,3-프로판디올 생산속도가 증가되는 것으로 판단된다.

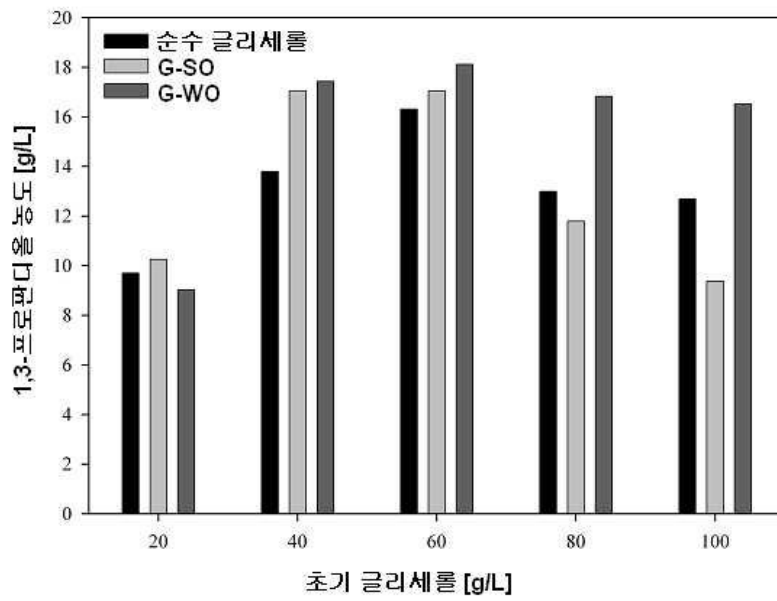
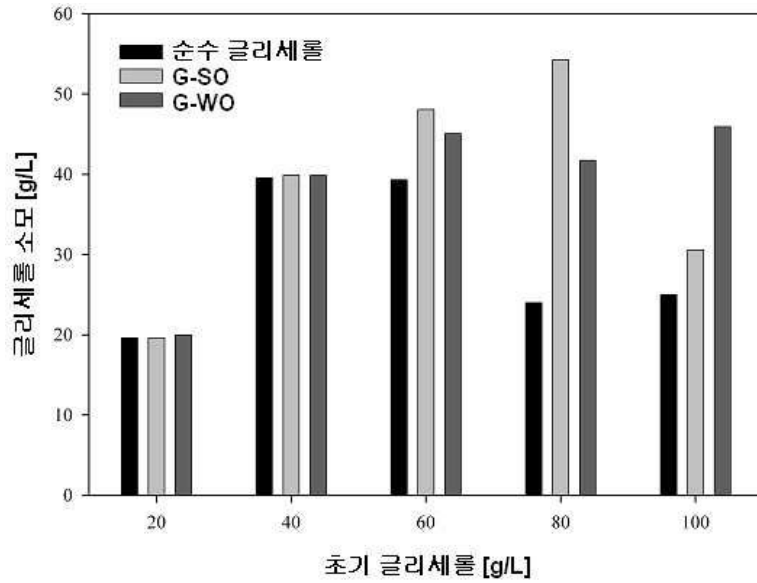
- [0050] 20~48 시간마다 유가식 배양하여 총 1460 시간 이상 동안 46 사이클을 운전한 후 생산된 1,3-프로판디올, 2,3-BD, 및 에탄올의 알짜 생산 농도는 도 5에 도시되어 있다. 46 사이클 이상 운전 후에도 안정적이고 재생산가능한 발효 성능을 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0051] 상기 실시예에서, 처음 5 사이클의 초기 생산성은 사이클 회수가 증가될수록 증가되었다. 제1사이클부터 제4사이클까지 20 내지 24시간 배양 후 생산성은 1.06 g/L/h에서 1.60 g/L/h로 증가하였다. 또한, 미생물 고정화 담체 반응조의 pH는 배양조의 pH보다 0.2~0.5 정도 낮았다. 이러한 반응조에서의 pH 강하는 각 사이클에서 새로운 배지를 넣은 후 0 내지 10 시간 후에 더욱 현저하게 나타났다. 1,3-프로판디올 생산과정에 의하여 pH가 감소하는 것이므로, 상기 생산성 증가와 pH 강하로부터 반응조 내에 고밀도의 미생물이 안정적으로 고정화되어 1,3-프로판디올을 생산함을 확인할 수 있다.
- [0052] 제5사이클 후에는, 배양액이 매 20~24 시간마다 새로운 배지로 교체되었다. 총 운전 기간 동안의 각 사이클 당 시간에 따른 1,3-프로판디올 농도 및 생산성 프로파일은 도 6에 도시되어 있다. 1,3-프로판디올은 새로운 배지를 첨가한 후 바로 왕성하게 생산되며, 고정된 미생물에 의하여, 각 사이클에서 0 내지 10 시간동안의 1,3-프로판디올 농도 및 생산성은 사이클의 회수가 증가함에 따라 증가되는 경향이 있다.
- [0053] 전체적으로 최종 1,3-프로판디올 농도는 상대적으로 안정한 30~40g/L 였으며, 20 내지 24시간 배양 후 생산성은 1.3~1.7 g/L/h 범위에서 안정하게 유지되었다.
- [0054] 5. 페글리세롤을 이용한 미생물 고정화 유가식 배양
- [0055] 순수글리세롤을 이용하여 고농도의 1,3-프로판디올을 생산한 1,3-프로판디올 생산장치(미생물 고정화되어 있음)를 이용하여 전처리하지 않은 페글리세롤을 40 g/L 농도로 생산배지에 첨가하여 운전하였다. 상기 실시예에서는 페글리세롤이 알칼리성을 띄므로, 페글리세롤 첨가시 pH 조절 효과를 나타내었고, 이로 인해 pH 조절을 위한 염기용액 KOH의 사용량이 감소되었다. 상기 실시예의 40~41 사이클(1275~1325 시간) 및 44~46 사이클(1390~1462 시간)에서 페글리세롤을 첨가하였다. 도 6에 의하면, 미생물 고정화 담체에서 전처리하지 않은 페글리세롤은 1,3-프로판디올의 생산성 및 수율이 순수글리세롤과 유사하거나 나은 결과를 보였다.
- [0056] 또한 도 6에서, 순수 글리세롤과 페글리세롤을 이용한 1,3-프로판디올 생산성을 살펴보면, 순수글리세롤을 이용하여 10시간 미만 배양시 1,3-프로판디올 생산성은 대부분 2~5 g/L/hr의 범위의 값을 가지며, 최대값 9 g/L/hr의 값을 나타내기도 하였으며, 페글리세롤의 경우에는 1,3-프로판디올 생산성은 대부분 4~6.5 g/L/hr이며, 최대값 8 g/L/hr를 나타내기도 하였다. 24시간 운전하였을 때의 1,3-프로판디올의 생산성을 살펴보면, 순수글리세롤과 페글리세롤로부터의 1,3-프로판디올 생산성은 대부분 1 g/L/hr 범위에 값을 나타내었다.
- [0057] 비록 본 발명이 상기 언급된 실시예와 관련하여 설명되었지만, 본 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 따라서 첨부된 특허청구의 범위는 본 발명의 요지에서 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함할 것이다.

도면의 간단한 설명

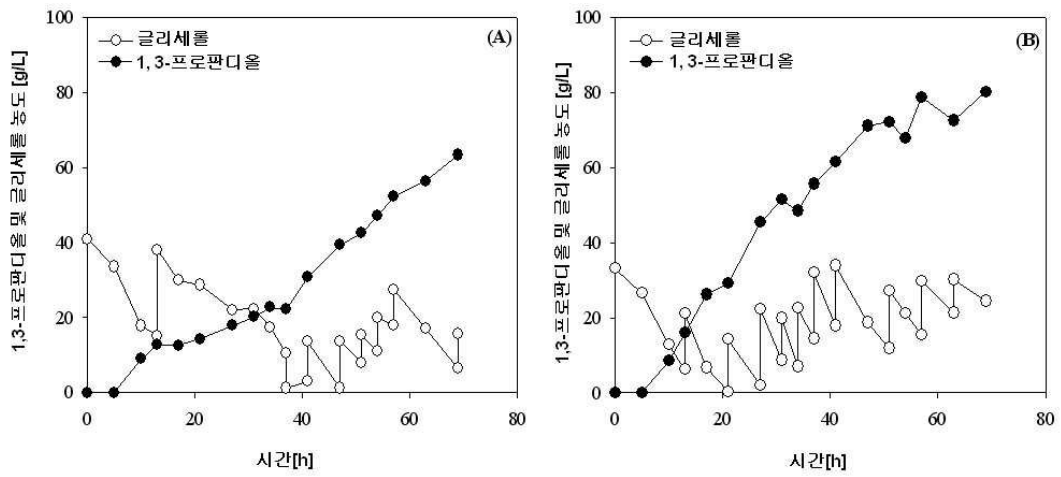
- [0058] 도 1은 순수 글리세롤과 페글리세롤 초기 농도가 1,3-프로판디올 생산에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.
- [0059] 도 2는 순수글리세롤(a)과 페글리세롤(G-SO)(b)을 pH가 조절된 유가식 배양 방법으로 계속적으로 주입하였을 때의 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0060] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 1,3-프로판디올 생산장치의 모식도이다.
- [0061] 도 4는 미생물 고정화 유가식 배양 반복 사이클에 따른 1,3-프로판디올의 생산성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0062] 도 5는 본 발명의 실시예에서 미생물 고정화 유가식 배양 반복한 후 각 사이클당 생산된 1,3-프로판디올, 2,3-BD, 및 에탄올의 알짜 생산 농도를 나타낸 그림이다. a 기간은 순수글리세롤이 사용되었고, b 기간은 페글리세롤이 사용되었다.
- [0063] 도 6은 총 46사이클 운전 기간 동안의 각 사이클 당 시간에 따른 1,3-프로판디올 농도 및 생산성 프로파일을 나타내는 그림이다.

도면

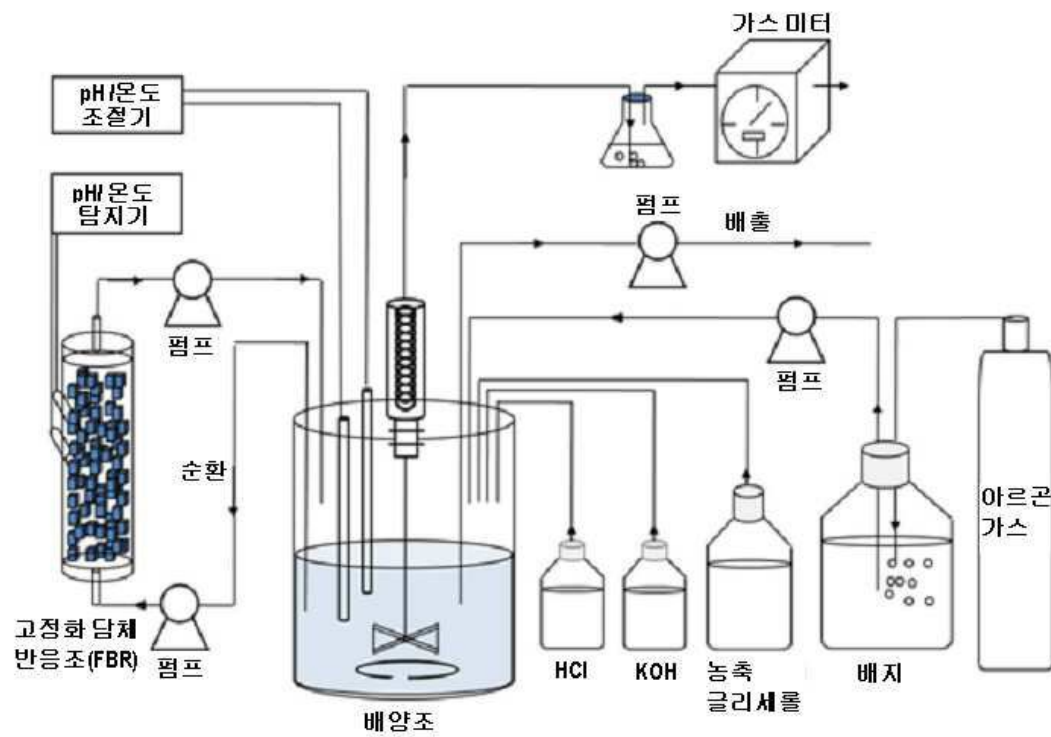
도면1



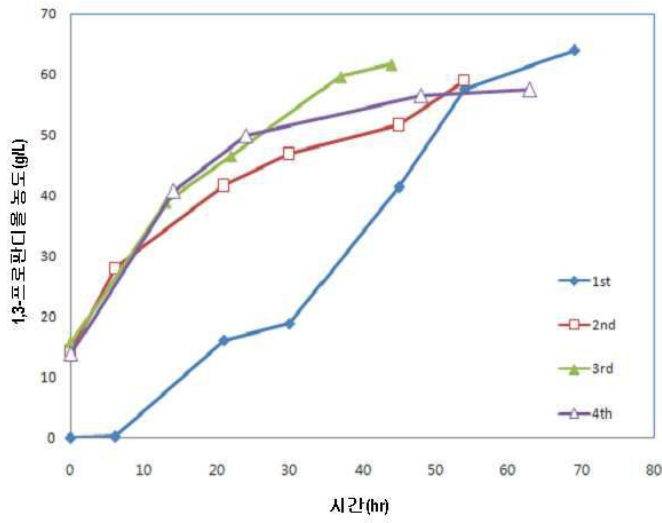
도면2



도면3

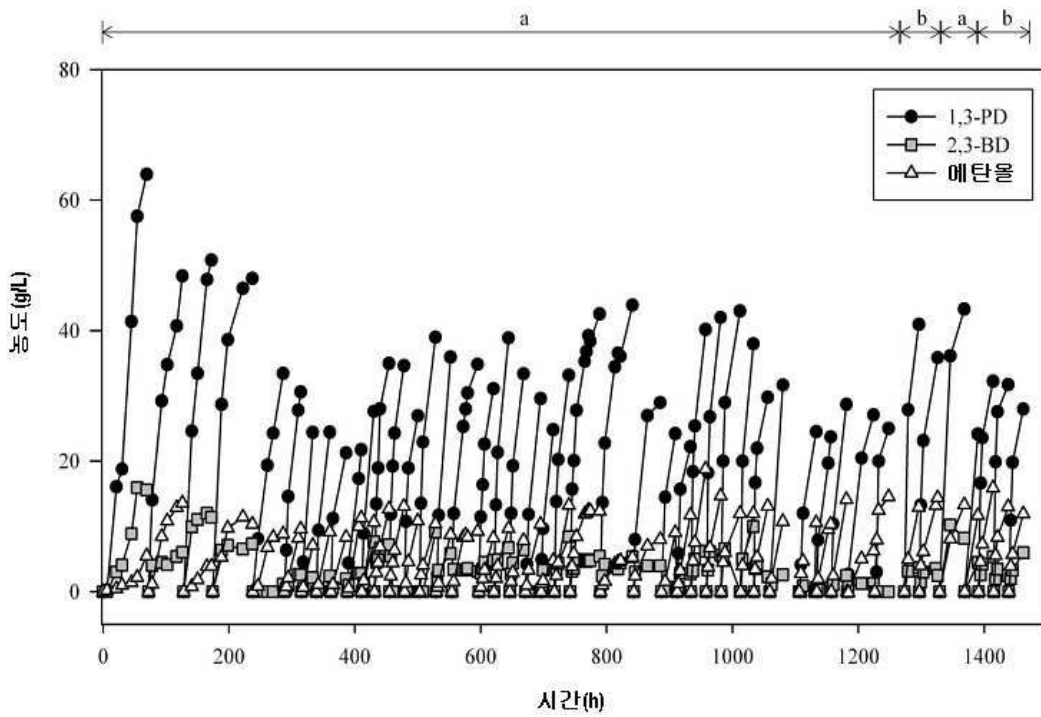


도면4



유가식 배양	20시간에서의 생산성 (g/L/h)
1st	1.06
2nd	1.39
3rd	1.52
4th	1.60

도면5



도면6

