



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097432
(43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

C12P 7/16 (2006.01) C12P 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0017274

(22) 출원일자 2010년02월25일

심사청구일자 2010년02월25일

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울 성북구 하월곡동 39-1

(72) 발명자

엄영순

서울특별시 성북구 하월곡동 39-1 한국과학기술연구원 과학자아파트 B동 301호

상병인

서울 성북구 돈암1동 1-3

안재형

서울특별시 영등포구 양평동3가 거성파스텔아파트 104동 501호

(74) 대리인

김 순 영, 김영철

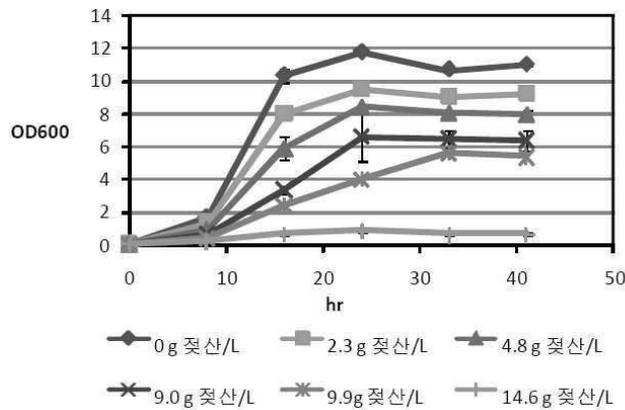
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 바이오에탄올 폐발효액을 이용한 부탄올의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 바이오에탄올 생산 과정에서 발생하는 폐발효액에 부탄올 생산 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법에 관한 발명으로, 바이오에탄올 생산 과정에서 발생하는 폐발효액 내의 글리세롤은 혐기성 상태에서 미생물에 의해 부탄올로 전환된다. 본 발명은 바이오에탄올 생산 후 발생하는 폐발효액을 바이오연료의 원료로 사용함으로써 환경과 에너지 문제를 동시에 해결하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

바이오에탄올 생산 과정에서 발생하는 폐발효액 배지에서 부탄올 생산 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 부탄올의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 부탄올 생산 미생물은 클로스트리듐(*Clostridium*) 속인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 부탄올 생산 미생물은 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*)인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 부탄올 생산 미생물은 유전자 조작에 의해 얻어진 부탄올을 생산하는 미생물인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 배양 단계 이전에 폐발효액 배지를 제조하는 단계를 포함하며,

상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는,

효모가 포함된 배양액에서 바이오매스를 발효시키는 단계; 및

상기 발효된 발효액을 증류시키고 증류여액을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는,

상기 증류여액을 수득하는 단계에서 수득한 증류여액을 발효 단계의 배양액에 재주입하여 1회 이상 재순환시킨 후 증류여액을 재수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는,

상기 증류여액을 수득하는 단계에서 수득한 증류여액을 효모를 제거한 여과액을 수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는,

상기 여과액을 수득하는 단계에서 수득한 여과액을 발효 단계의 배양액에 재주입하여 1회 이상 재순환시킨 후 증류여액 또는 여과액을 재수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,
상기 배양 단계에서,
글리세롤을 포함하는 폐발효액 배지를 사용하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,
상기 글리세롤 농도는 10g/L ~ 40g/L 인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서,
상기 배양 단계에서,
알칼리제를 사용하여 폐발효액 배지의 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,
상기 알칼리제는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘 및 암모니아수로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 13

제 1항에 있어서,
상기 배양 단계에서,
폐발효액 배지는 젖산을 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,
상기 젖산 농도는 10g/L 이하인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 15

제 1항에 있어서,
상기 배양 단계에서,
폐발효액 배지는 아세트산, 에탄올 또는 아세트산 및 에탄올을 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,
상기 아세트산 농도는 10g/L 이하인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 17

제 15항에 있어서,
상기 에탄올 농도는 10g/L 이하인 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 18

제 1항에 있어서,
 상기 배양 단계에서,
 이온교환 수지를 사용하여 젖산을 제거하는 전처리단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 19

제 5항에 있어서,
 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계에서,
 당류 바이오매스, 목질계 바이오매스 및 해조류 바이오매스로 이루어진 군에서 선택된 바이오매스를 사용하는 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

청구항 20

제 19항에 있어서,
 상기 당류 바이오매스는 옥수수, 사탕수수, 밀, 현미 및 타피오카로 이루어진 군에서 선택된 것이고, 상기 목질계 바이오매스는 나무, 옥수수대 및 벚짚으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 부탄올의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 바이오에탄올 생산과정에서 에탄올을 증류하고 남은 폐발효액에 부탄올 생산 미생물을 배양하여 부탄올을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 고유가 및 화석연료의 사용으로 인한 기후 변화로 인해 전 세계적으로 바이오연료 생산이 급증하고 있다. 이 중 상업적 발효 공정이 개발된 바이오에탄올 생산이 급증하였는데, 국제적으로는 미국, 브라질, 캐나다, 스웨덴 등에서 바이오에탄올을 자동차 연료로서 사용하고 있으며, 중국, 호주, 일본 등에서도 적극적으로 바이오에탄올 사용을 도입하고 확대하는 움직임을 보이고 있다. 국내에서도 1988년 이후 “대체에너지 기술 개발 촉진법”에 따라 바이오에탄올에 대한 연구개발이 이루어져 왔고 바이오에탄올을 휘발유에 3~5% 섞는 것은 문제가 없다는 결론이 나온 상태다.

[0003] 한편, 바이오에탄올 제조 플랜트에서는 에탄올 제조량에 대해 최대 20배의 폐발효액이 발생되므로 이의 효과적인 처리가 요구된다. 일반적으로 폐발효액은 원심분리한 다음 농축하거나 고형분과 혼합/건조하여 사료화하고, 폐발효액의 일부는 원료의 회석수에, 나머지는 메탄발효 처리하고 있으며 본 발명에서와 같이 폐발효액을 이용한 부탄올 생산은 아직 시도된 바 없다.

[0004] 글리세롤은 효모의 발효산물 중 하나로서 포도당 100g 당 3~5.3g의 글리세롤이 발생한다. 에탄올 폐발효액은 글리세롤과 그 외에 젖산, 아세트산, 에탄올 등 다른 부산물들을 포함하고 있어, 이들을 이용하여 폐발효액을 효과적으로 처리할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기 바이오에탄올 생산량의 최대 20배 발생하는 폐발효액을 효과적으로 처리하고, 환경과 에너지문제를 동시에 해결하기 위해 폐발효액을 이용하여 부탄올을 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 바이오에탄올 생산 과정에서 발생하는 폐발효액 배지에서 부탄올 생산 미생물을 배양하는 단계를 포

함하는 부탄올의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명의 부탄올 제조방법은 바이오에탄올 생산 공정에서 발생하는 폐기물을 이용하여 부탄올을 생산함으로써 바이오연료로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 바이오에탄올 생산의 단점으로 지적되는 낮은 경제성 문제를 해결하고, 폐발효액의 높은 유기물 농도를 낮춤으로써 환경에 미치는 영향을 감소시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0008] 도 1은 젖산이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 2는 아세트산이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 3은 에탄올이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 4는 젖산이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올의 농도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 아세트산이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올의 농도를 나타낸 것이다.
- 도 6은 에탄올이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올의 농도를 나타낸 것이다.
- 도 7는 실시예 2에서 에탄올 폐발효액 증류여액에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올 농도를 나타낸 것이다.
- 도 8은 실시예 2에서 에탄올 폐발효액 여과액에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올 농도를 나타낸 것이다.
- 도 9은 실시예 3에서 에탄올 폐발효액 여과액에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 초기 pH에 따른 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 10은 실시예 3에서 에탄올 발효를 하기 전 배지(에탄올 생산배지)에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 초기 pH에 따른 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 11은 실시예 1의 배지에 10 g/L의 젖산을 첨가한 후 각각의 알칼리제를 이용하여 pH를 조절하고 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 세포 성장을 나타낸 것이다.
- 도 12는 실시예 1의 배지에 10 g/L의 젖산을 첨가한 후 각각의 알칼리제를 이용하여 pH를 조절하고 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올 등 생산물의 농도를 나타낸 것이다.
- 도 13는 이온교환수지를 이용한 젖산 제거 실험의 결과를 나타낸 것이다. 이온교환수지는 Optipore SD-2, AMP, 또는 CMP를 사용하였으며 pH는 4 또는 6으로 조절하였다. 대조군은 이온교환수지를 첨가하지 않은 경우의 배양 전후의 젖산 농도 변화이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0010] 본 발명은 바이오에탄올 생산 과정에서 발생하는 폐발효액 배지에서 부탄올 생산 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 부탄올의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 실시태양의 상기 배양 단계에서 부탄올 생산 미생물은, 제한되지는 않으나, 클로스트리듐 (*Clostridium*) 속 또는 유전자 조작에 의해 얻어진 부탄올을 생산하는 미생물일 수 있고, 바람직하게는 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*)일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계 이전에, 폐발효액 배지를 제조하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는 효모가 포함된 배양액에서 바이오매스를 발효시키는 단계; 및 상기 발효된 발효액을 증류시키고 증류여액을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 바이오매스는 미생물의 탄소원인 유기물을 포함한 것으로, 제한적이지는 않으나, 당류 바이오매스, 목질계 바이오매스 및 해조류 바이오매스로 이루어진 군에서 선택된 바이오매스를 사용할 수 있고, 상기 당류 바이오매스는 옥수수, 사탕수수, 밀, 현미 및 타피오카로 이루어진 군에서 선택된 것이고, 상기 목질계 바이오매스는 나

무, 옥수수대 및 벚짚으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [0014] 상기 증류여액은 발효액을 증류하고 남은 여액으로 효모가 제거되지 않은 상태이다.
- [0015] 또, 본 발명의 일 실시태양에서 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는, 상기 수득한 증류여액을 원심분리하거나 필터로 여과하여 효모를 제거한 여과액을 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 증류여액을 원심분리하거나 필터로 여과하여 슬러지와 여과액으로 분리하고, 이 여과액은 효모가 제거된 상태이다.
- [0016] 상기 에탄올 폐발효액 증류여액 또는 여과액은 전처리 없이 직접 부탄올 생산배지로서 사용가능하다.
- [0017] 또, 본 발명의 일 실시태양에서 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는, 상기 수득한 증류여액을 발효 단계의 배양액에 재주입하여 1회 이상 재순환시킨 후 증류여액 또는 여과액을 재수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 또, 본 발명의 일 실시태양에서 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계는, 상기 수득한 여과액을 발효 단계의 배양액에 재주입하여 1회 이상 재순환시킨 후 증류여액 또는 여과액을 재수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계에서, 글리세롤을 포함하는 폐발효액 배지를 사용할 수 있다.
- [0020] 상기 폐발효액에 포함된 글리세롤 농도는 3g/L ~ 60g/L, 바람직하게는 10 g/L ~ 40g/L일 수 있다. 글리세롤 농도가 40 g/L 이상에서는 미생물의 성장 속도가 감소하고 부탄올 생산과 글리세롤 소모가 더 이상 증가하지 않으며 3 g/L 미만이면 부탄올 생성에 충분하지 않다. 상기 폐발효액 배지를 제조하는 단계에서 수득한 증류여액 또는 여과액을 발효 단계의 배양액에 재주입하여 1회 이상 재순환 시킨 후 증류여액 또는 여과액을 재수득하는 단계를 포함하여 제조하는 방법의 실시와 같은 폐발효액의 재순환을 통해 폐발효액의 글리세롤 농도를 증가시킬 수 있다. 또한, 폐발효액 증류여액과 여과액을 전기투석, 침전 등 기술을 이용하여 글리세롤 농도를 증가시키고, 수득한 글리세롤 용액을 부탄올 발효배지로 사용하는 것을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계에서, pH가 5~7인 폐발효액 배지를 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계에서, 알칼리제를 사용하여 폐발효액 배지의 pH를 조절할 수 있다. 상기 알칼리제는 제한되지는 않으나, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘 및 암모니아수로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있고, 바람직하게는 수산화칼슘 또는 수산화칼륨일 수 있다. 에탄올 폐발효액의 pH는 통상적으로 3~5 이며, 상기 알칼리제를 이용하여 5~7로 조절할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계에서, 폐발효액 배지는 젖산을 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 폐발효액에 포함된 젖산 농도는 10g/L 이하일 수 있다. 특히, 폐발효액 내 포함되어 있는 젖산은 그 농도가 10 g/L 이하인 경우, 젖산이 없는 경우보다 부탄올 생산이 더 향상되는 결과를 보여주므로(도 4), 폐발효액이 부탄올 사용에 효과적임을 알 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 배양 단계에서, 폐발효액 배지는 아세트산, 에탄올 또는 아세트산 및 에탄올을 포함할 수 있다. 바람직하게 폐발효액 내 아세트산 농도는 10 g/L이하일 수 있고, 에탄올 농도는 10 g/L 이하일 수 있다. 아세트산 농도가 10 g/L초과인 경우 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*)의 성장에 저해가 되며, 뷰티릭산과 같은 다른 부산물의 생성량이 증가하여 부탄올이 생성량이 감소한다. 또, 에탄올 농도가 10g/L 초과인 경우 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*) 성장에 저해가 된다.
- [0026] 본 발명의 일 실시태양의 상기 배양 단계에서, 이온교환 수지를 사용하여 젖산을 제거하는 전처리단계를 포함할 수 있다. 그 외 젖산을 제거하는 기술인 침전법, 추출, 흡착, 반응증류, 전기투석, 나노여과 등으로 젖산 농도 조절이 가능하다
- [0027] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0028] [실시예1] 젖산, 아세트산, 에탄올에 의한 부탄올 생산 저해 영향 분석
- [0029] 부탄올 생산 균주인 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum* DSM 525)은 독일 DSMZ에서 구입하였고 시험에 사용된 배지는 일차증류수 1 L를 기본으로 하여 다음과 같은 조성으로 조제하였다: 30 g 글리세롤; 0.5 g K₂HPO₄; 0.5 g KH₂PO₄; 0.01 g MnSO₄ · H₂O; 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O; 0.01 g FeSO₄ · 7H₂O; 0.01 g NaCl; 1 g 효모추출물; 2 g (NH₄)₂SO₄; 19.52 g MES; 0.00001 g 바이오틴; 0.001 g 티아민; 0.001 g *p*-aminobenzoic acid.

- [0030] 위 배지에 젖산($C_3H_6O_3$) 0~14.6 g/L, 아세트산($C_2H_4O_2$) 0~10 g/L, 또는 에탄올(C_2H_6O) 0~20 g/L를 첨가하고 수산화칼륨(KOH) 또는 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH를 6.5로 조절하였다. 125 mL 세럼 보틀(serum bottle)에 위 배지 50 mL를 첨가하고 아르곤 가스를 불어넣어 산소를 제거한 후 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 고압 멸균시킨 후 1~2일 배양한 클로스트리듐 파스테우리아눔을 5% (v/v)로 접종하고 37°C에서 130 rpm으로 진탕 배양하였다.
- [0031] 실시예 1의 결과로 젖산(도 1), 아세트산(도 2), 에탄올(도 3)이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후의 세포 성장도 도 1~3에 나타내었다. 세포 성장은 흡광도(Optical density at 600 nm, OD_{600})로 나타내었다. 젖산은 10 g/L까지, 아세트산은 10 g/L까지, 에탄올은 10 g/L까지 클로스트리듐 파스테우리아눔의 성장에 심각한 저해를 일으키지 않았으며 30 g/L 글리세롤로부터 3.5~8 g/L의 부탄올을 생산하였다. 특히, 젖산을 첨가한 경우 그렇지 않은 경우보다 부탄올 생산이 더 향상되는 결과를 보여줌으로써, 페발효액이 부탄올 사용에 효과적임을 알 수 있다.
- [0032] 또한, 젖산 농도가 0인 경우 1,3 프로판다이올은 3.9 ± 0.0 (g/L) 생성되었고, 1,3 프로판다이올의 글리세롤 소모량 당 생산량은 0.16 ± 0.00 (g/g)이었다.
- [0033] 또, 실시예1의 결과로서 젖산(도 4), 아세트산(도 5), 에탄올(도 6)이 포함된 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종한 후 부탄올의 농도를 도 4~6에 나타내었다.
- [0034] <실시예2> 바이오에탄올 페발효액 증류여액과 여과액 사용시의 부탄올 생산
- [0035] 에탄올 생산 균주인 효모 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7296)는 한국 KCTC에서 구입하였고 에탄올 생산에 사용된 배지는 일차증류수 1 L를 기본으로 하여 다음과 같은 조성으로 조제하였다: 220 g 포도당; 3.0 g KH_2PO_4 ; 7.5 g $(NH_4)_2SO_4$; 1.19 g Na_2HPO_4 ; 2.18 g L-글루타민 산; 5 g 젖산(DL-lactic acid); 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.04 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.0052 g $MnSO_4 \cdot 4 \sim 5H_2O$; 0.0005 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.0009 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.00006 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0.023 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.023 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_6 \cdot 6H_2O$; 0.003 g H_3BO_3 ; 0.0108 g calcium pantothenate; 0.0108 g 니코틴 산; 0.2688 g myo-이노시톨; 0.0108 g 티아민; 0.0108 g 피리독신; .00022 g *p*-aminobenzoic acid; 0.00003 g d-바이오틴. pH는 수산화칼륨(KOH)을 이용하여 5로 조절하였다.
- [0036] 500 mL 삼각플라스크에 위 배지 250 mL를 첨가하고 면진 등으로 밀봉한 후 고압멸균하였다. 이 배지에 1~2일 배양한 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 10% (v/v)로 접종하고 30°C에서 130 rpm으로 4일간 진탕배양하여 106.4 g/L의 에탄올을 생산하였다. 이 배양액을 분별증류하여 에탄올 1.3 g/L, 아세트산 2.5 g/L, 2,3-부탄다이올 4.1 g/L, 포도당 0.13 g/L, 젖산 3.7 g/L, 글리세롤 19.2 g/L, pH 3.9의 페발효액(증류여액)을 얻었다.
- [0037] 위 페발효액 일부를 0.45 μm 필터로 여과하여 효모를 제거한 여과액을 얻는다. 페발효액 증류여액과 여과액 각각에 대하여 5N 수산화칼륨(KOH) 용액을 이용하여 pH를 4.9, 5.9, 6.9로 조절한 페발효액을 조제한다. 각각의 페발효액 50 mL를 125 mL 세럼 보틀(serum bottle)에 첨가하고 아르곤 가스를 불어넣어 산소를 제거한 후 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 고압멸균시킨 후 1~2일 배양한 클로스트리듐 파스테우리아눔을 5% (v/v)로 접종하고 37°C에서 130 rpm으로 진탕배양하였다.
- [0038] 실시예 2의 결과로 페발효액 증류여액(도 7)과 여과액(도 8)에 대하여 클로스트리듐 파스테우리아눔을 접종 후 부탄올의 농도를 도 7와 도 8에 나타내었다.
- [0039] pH를 조절하지 않은 경우, 즉 초기 pH 3.9에서는 클로스트리듐 파스테우리아눔은 성장하지 않았으며 초기 pH 4.9, 5.9, 6.9에서는 성장하였고 5~9 g/L의 부탄올을 생산하였다. 페발효액 증류여액과 여과액에서 클로스트리듐 파스테우리아눔의 성장은 큰 차이를 보이지 않았다.
- [0040] 하기 표 1은 페발효액 증류여액과 여과액을 사용한 경우의 분석값으로 에탄올 페발효액에서 초기 pH에 따른 클로스트리듐 파스테우리아눔의 글리세롤 소모량 및 부탄올, 뷰티릭산, 1,3-프로판다이올 생산량을 나타낸 것이다 (단위 : g/L).

표 1

[0041]

	에탄올 폐발효액 증류여액			에탄올 폐발효액 여과액(0.45 μm 필터로 여과)		
	4.9	5.9	6.9	4.9	5.9	6.9
글리세롤 소모량	16.4 ± 4.3	18.8 ± 0.3	19.6 ± 0.7	18.0 ± 0.2	17.9 ± 0.4	18.9 ± 0.2
부탄올	6.0 ± 0.1 (0.38±0.10)* *	5.9 ± 0.2 (0.31±0.01)* *	5.1 ± 0.0 (0.26±0.01) **	7.3 ± 0.1 (0.41±0.00) **	7.1 ± 0.2 (0.40±0.02)* *	6.4 ± 0.1 (0.34±0.01)**
뷰티릭산	0.5 ± 0.1 (0.030 ±0.004)**	0.6 ± 0.0 (0.032 ±0.002)**	1.2 ± 0.1 (0.061 ±0.001)**	0.3 ± 0.0 (0.017 ±0.002)**	0.6 ± 0.1 (0.035 ±0.006)**	1.5 ± 0.1 (0.081 ±0.005)**
1,3-프로판다이올	0.0 ± 0.0 (0.000 ±0.000)**	0.0 ± 0.0 (0.00 ±0.00)**	0.6 ± 0.0 (0.029 ±0.002)**	0.0 ± 0.0 (0.000 ±0.000)**	0.4 ± 0.0 (0.023 ±0.001)**	0.7 ± 0.1 (0.036 ±0.002)**

[0042]

* 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum*) DSM 525 접종 후 121 시간 경과 후 측정값.

[0043]

** 생산량/글리세롤 소모량(g/g).

[0044]

상기 표 1에서, 실험실에서 제조한 에탄올 폐발효액을 이용했을 때 1,3-프로판다이올은 거의 생성되지 않았거나, 1g/L이하로 생성되었으며, 글리세롤 소모량 당 1,3-프로판다이올 생산량은 0.000-0.036이었다. 이는 실시예 1의 배지를 이용할 경우의 0.16 의 1/4이하이다. 이는 에탄올 폐발효액의 경우 1,3-프로판다이올 생성이 감소되고, 따라서 부탄올로 전환될 수 있는 글리세롤의 양을 증가함을 의미하므로 부탄올 생산에 유리하다는 것을 나타낸다.

[0045]

<실시예 3> 바이오에탄올 폐발효액의 세포 성장에 미치는 영향 분석

[0046]

에탄올 폐발효액이 클로스트리듐 파스테우리아눔의 성장을 촉진시켰는지 알아보기 위하여 에탄올 발효를 하기 전 배지와 에탄올 발효를 한 후 배지에 클로스트리듐 파스테우리아눔을 각각 접종하고 그 성장을 관찰하였다. 에탄올 발효를 하기 전 배지(에탄올 생산배지)는 <실시예2>에서 사카로마이세스 세레비지에의 배양을 위해 사용된 배지에서 탄소원으로서 포도당 대신 글리세롤 12~14 g/L를 첨가한 후 수산화칼륨을 이용해 pH를 5~7으로 조절하여 제조하였다. 에탄올 발효를 한 후 배지(에탄올 폐발효액)는 글리세롤 12 g/L를 포함하고 있었으며 수산화칼륨을 이용해 pH를 5~7로 조절하였다.

[0047]

실시예 3의 결과로, 에탄올 폐발효액에서 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)의 세포 성장을 도 9에 나타내었고, 에탄올 발효를 하기 전의 배지(에탄올 생산 배지)에서의 성장을 도 10에 나타내었다. 발효 후 발효산물의 농도를 표2에 나타내었다. 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)은 에탄올 생산배지에 비해 에탄올 폐발효액에서 보다 빠른 성장을 보였으며 부탄올 생산량 역시 증가하는 것으로 나타났다.

표 2

[0048]

초기 pH	배지	5.0	6.0	7.0
글리세롤 소모량	에탄올 폐발효액*	10.5 ± 1.1.	11.8 ± 0.7	11.7 ± 0.2
	에탄올 생산배지**	14.0 ± 0.4	12.1 ± 0.4	12.7 ± 0.4
부탄올	에탄올 폐발효액*	4.0 ± 0.5	4.0 ± 0.0	3.0 ± 0.2
	에탄올 생산배지**	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.0	2.9 ± 0.1

뷰티릭산	에탄올 폐발효액*	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0
	에탄올 생산배지**	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.1
1,3-프로판다이올	에탄올 폐발효액*	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	1.7 ± 0.2
	에탄올 생산배지**	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1

[0049] * 132 시간 경과 후 측정값.

[0050] ** 100 시간 경과 후 측정값.

[0051] <실시에 4> 배지의 pH 조절을 위한 알칼리제 선택

[0052] 젖산, 아세트산, 에탄올이 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위한 실험에서 배지의 pH는 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 조절하였다. 에탄올 폐발효액의 pH는 4~5로서 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)에 의한 부탄올 생산을 위해서는 알칼리제를 첨가하여 pH를 조절해야 한다. 수산화나트륨 이외의 알칼리제로서 수산화칼륨(KOH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂), 암모니아수(NH₄OH) 등이 있다. 따라서 이들 알칼리제에 의해 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)의 성장이 영향을 받는지 조사하였다. 이를 위해 실시예 1의 배지에 10 g/L의 젖산을 첨가 후 각각의 알칼리제를 이용하여 pH를 6.5까지 조절하였다.

[0053] 도 11는 10 g/L의 젖산 첨가 후 각각의 알칼리제를 이용하여 pH를 조절한 배지에서 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)의 세포 성장을 나타낸 것이고, 도 12는 부탄올 등 생산물의 농도를 나타낸 것이다. 세포 성장은 수산화칼슘, 수산화칼륨, 암모니아수, 수산화나트륨 순으로 빠른 것으로 나타났지만, 부탄올 생산량은 수산화나트륨과 암모니아수를 사용한 경우 1~1.5 g/L 향상되었다. 나트륨이 칼륨에 비해 미생물 성장을 저해함을 알 수 있다.

[0054] <실시에 5> 이온교환수지를 이용한 젖산 제거

[0055] 도 13는 글리세롤 20 g/L, 젖산 10~13 g/L을 포함한 용액 20 mL에 이온교환수지 1g을 첨가하고 37°C에서 교반한 후 젖산 농도 변화를 나타낸 것이다. 이온교환수지를 첨가하지 않은 경우 젖산 농도는 배양 전후 3~8% 감소한 반면 이온교환수지를 첨가한 경우에는 Optipore SD-2의 경우 36~39%, AMP의 경우 43~45%, CMP의 경우 11~19% 젖산이 감소하였다. pH 4 또는 6으로 변화시켰을 때, pH에 따른 제거 효율의 변화는 관찰되지 않았고, 글리세롤 흡착은 발생하지 않았다. 따라서 에탄올 폐발효액의 젖산 농도가 높을 경우, 이온교환수지 Optipore SD-2 또는 AMP를 이용하여 젖산 농도를 감소시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

[0056] <실시에 6> 실제 산업 폐발효액 이용 부탄올 생산

[0057] 하기 표 3은 에탄올 폐발효액의 성분 분석을 나타낸 것이다(단위 : g/L).

표 3

[0058]

성분	실험실 제조*	(주)진로발효
에탄올 (증류 전)	102.2 ± 12.9	결정되지 않음
에탄올	0.6 ± 0.7	0.29
pH	3.7 ± 0.2	3.65
글리세롤	19.0 ± 3.9	5.06
아세트산	1.3 ± 0.8	1.01
2,3-부탄다이올	4.6 ± 0.9	0.43
포도당	0.4 ± 0.4	검출되지 않음
젖산	5.0 ± 1.2	4.8

[0059] * 3회 평균값 ± 표준편차.

[0060] 상기 표 3에서 pH, 아세트산, 잔류 에탄올, 포도당 역시 본 실험실에서 얻은 페발효액과 진로 페발효액에서 유사한 값으로 나타났다. 젖산의 경우 진로 페발효액에서 4.8 g/L가 검출되었다. 글리세롤과 2,3-부탄다이올의 경우 실험실에서 조제한 경우가 4배 이상 높았다.

[0061] 하기 표 4는 (주)진로발효에서 채취한 에탄올 페발효액에서 초기pH에 따른 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525) 접종 후 글리세롤 소모량 및 부탄올, 뷰티릭산, 1,3-프로판다이올 생산량을 나타낸 것이다(단위 : g/L). 클로스트리듐 파스테우리아눔(*C. pasteurianum* DSM 525)은 (주)진로 페발효액에서 6.5~7.2 g/L의 부탄올을 생산했다. 실험실에서 제조한 에탄올 페발효액을 사용한 경우와 같이 글리세롤 소모량 당 부탄올 생산량은 초기 pH가 감소할수록 증가했으나 뷰티릭산과 1,3-프로판다이올의 경우 실험실 제조에 비해 그 생산량이 많았으며 글리세롤 소모량 당 생산량의 경우에도 실험실 제조시와 같은 경향은 관찰되지 않았고, 글리세롤 소모량 당 부탄올 생산량은 0.32~0.44이었다(표 4).

표 4

초기 pH	5.0 [*]	6.0 ^{**}	7.0 ^{**}
글리세롤 소모량	15.9 ± 0.7	18.9 ± 0.9	20.2 ± 0.2
부탄올	6.9 ± 0.0 (0.44±0.02) ^{***}	7.2 ± 0.0 (0.38±0.02) ^{***}	6.5 ± 0.1 (0.32±0.00) ^{***}
뷰티릭산	1.7 ± 0.0 (0.11±0.01) ^{***}	2.9 ± 0.1 (0.15±0.01) ^{***}	2.7 ± 0.0 (0.13±0.00) ^{***}
1,3-프로판다이올	2.7 ± 0.1 (0.17±0.01) ^{***}	2.5 ± 0.0 (0.13±0.01) ^{***}	2.5 ± 0.2 (0.12±0.01) ^{***}

[0063] ^{*} 72 시간 경과 후 측정값.

[0064] ^{**} 48 시간 경과 후 측정값.

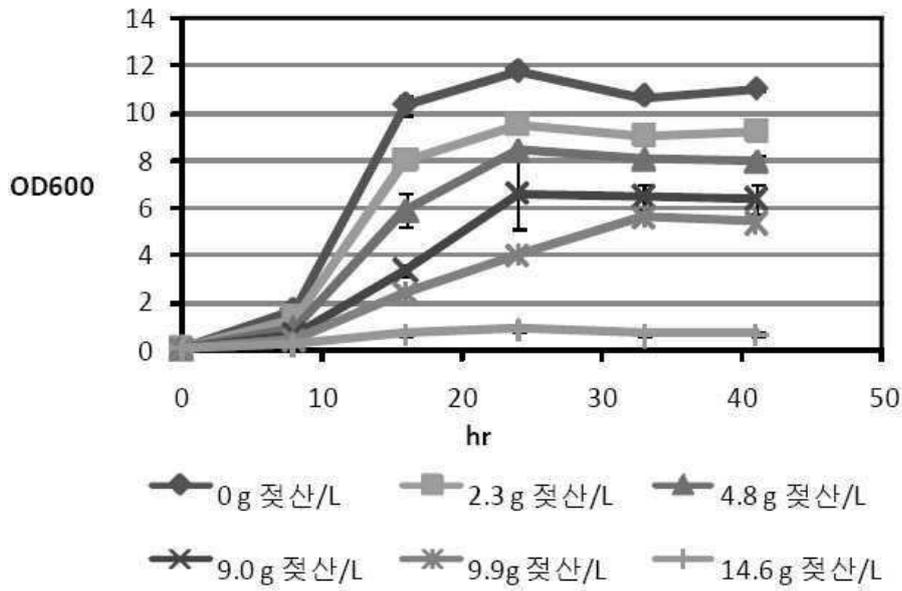
[0065] ^{***} 생산량/글리세롤 소모량(g/g).

[0066]

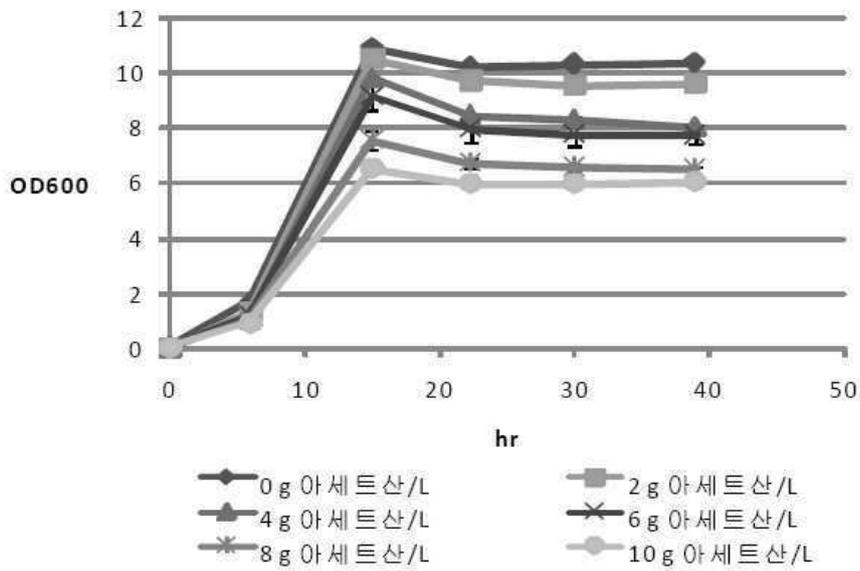
[0067] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

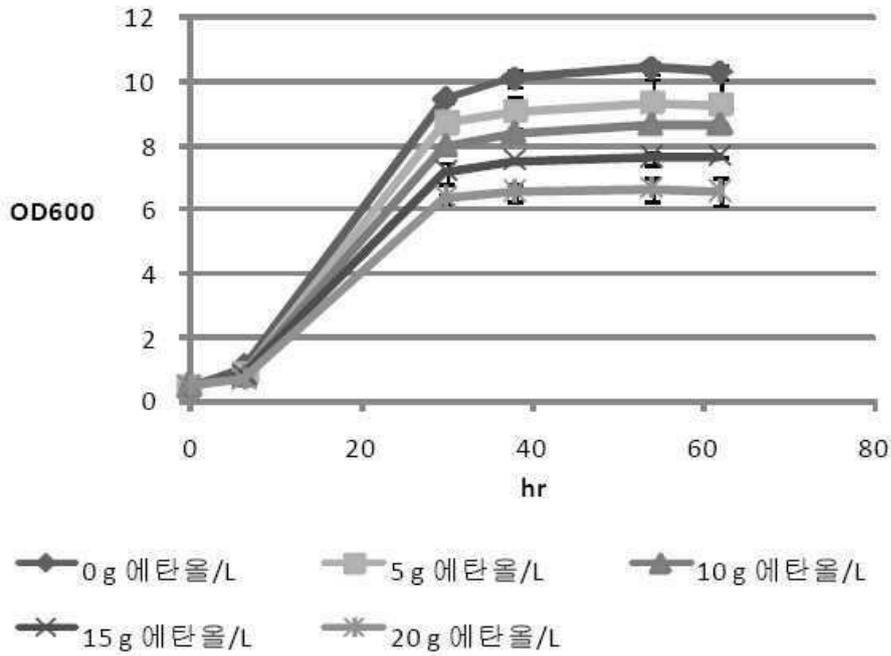
도면1



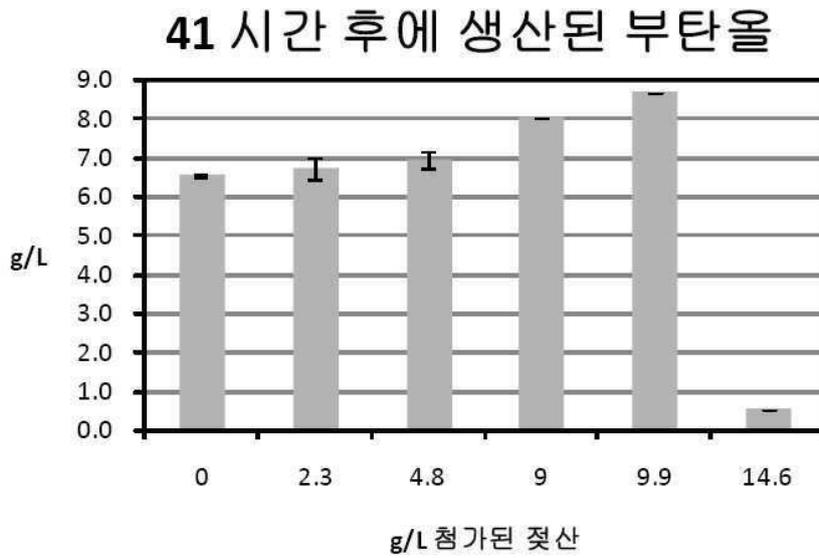
도면2



도면3

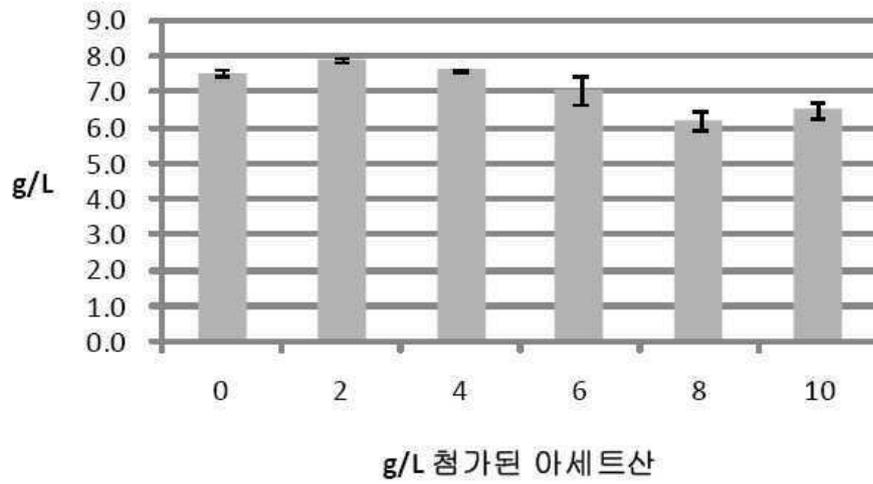


도면4



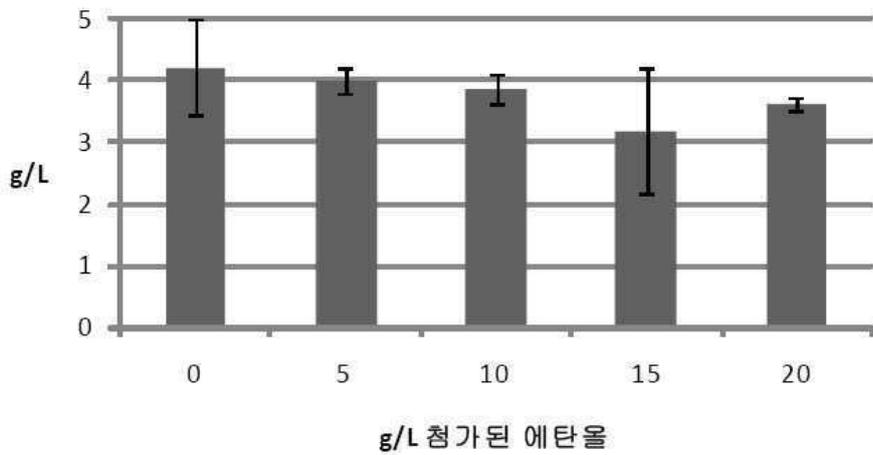
도면5

39시간 후에 생산된 부탄올

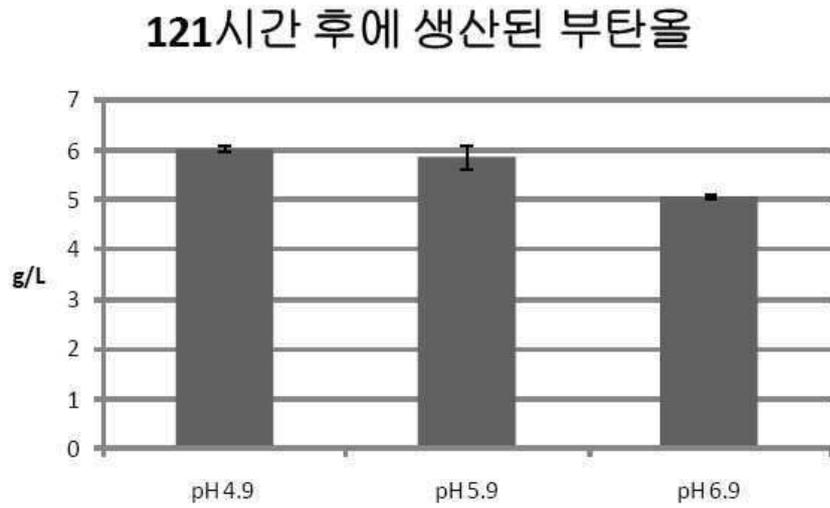


도면6

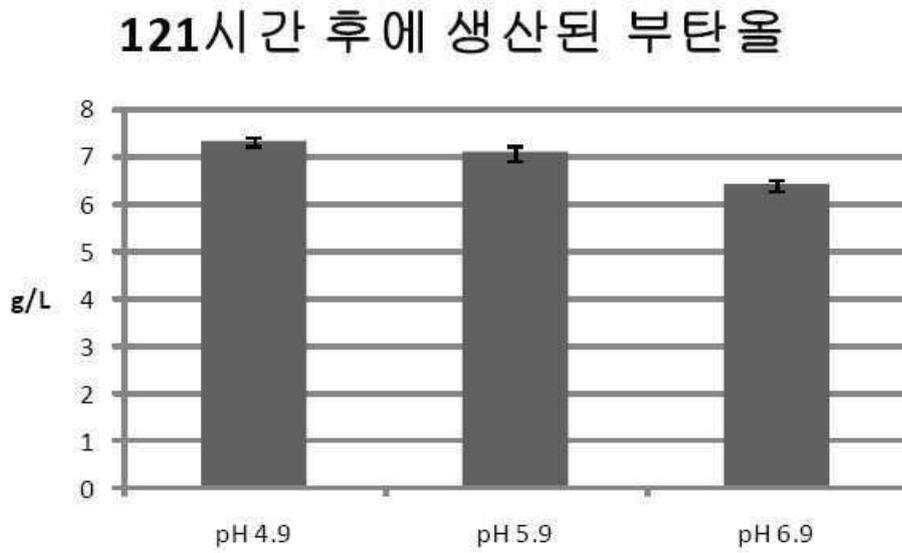
54시간 후에 생산된 부탄올



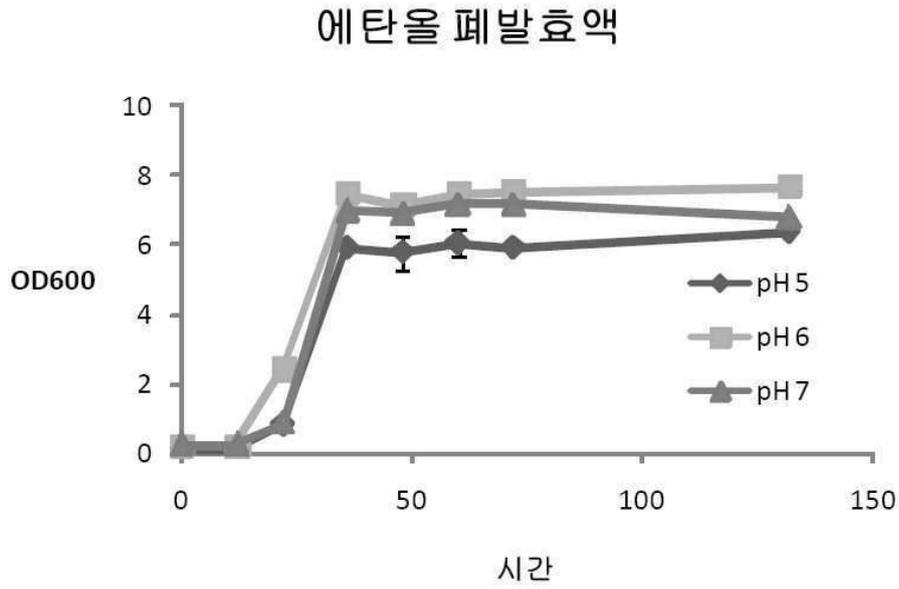
도면7



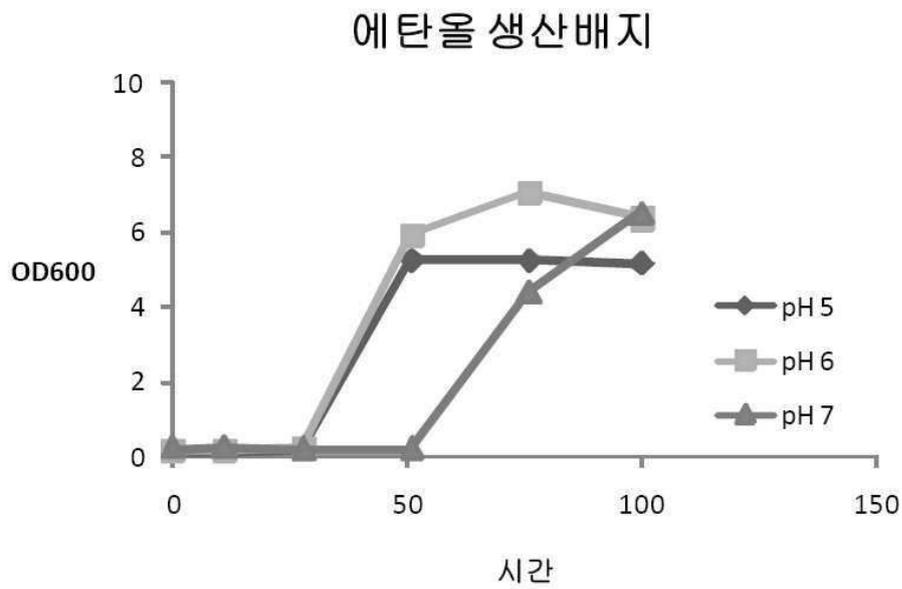
도면8



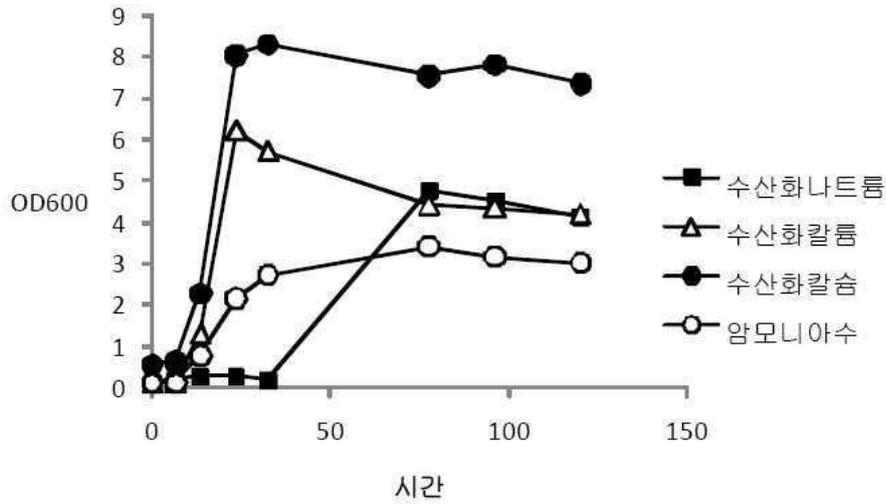
도면9



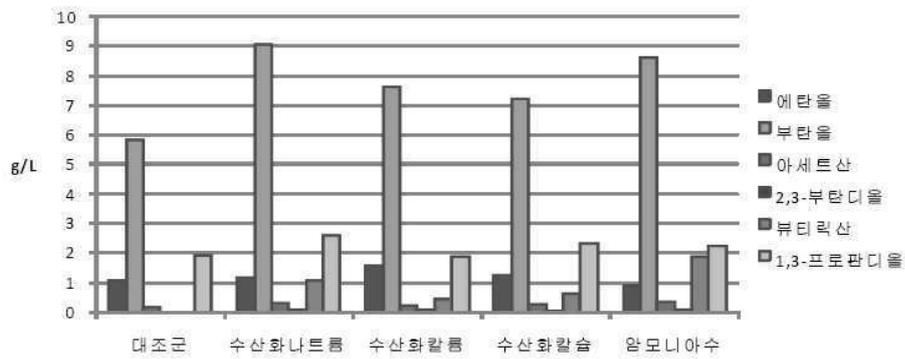
도면10



도면11



도면12



도면13

