



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0096756  
(43) 공개일자 2012년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0016041  
(22) 출원일자 2011년02월23일  
심사청구일자 2011년02월23일

(71) 출원인  
서강대학교산학협력단  
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)  
한국과학기술연구원  
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)  
(72) 발명자  
이진원  
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수  
기자촌아파트 201-1601호 (방이동)  
엄영순  
서울특별시 성북구 화랑로14길 5, 사택 B-301 (하월곡동, 한국과학기술연구원)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양부현

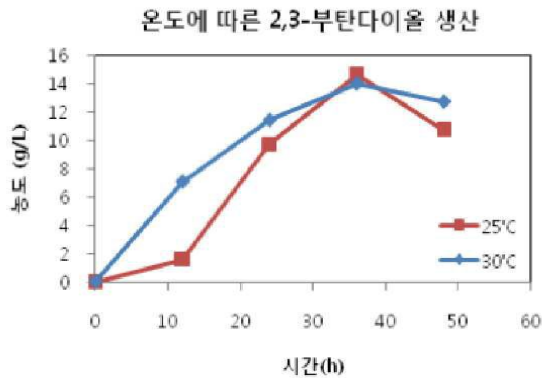
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 2,3-부탄다이올 생산수율이 우수한 라울렐라 s p. B6

(57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 라울렐라 sp. B6 균주에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 다양한 탄소원을 이용하여, 2,3-부탄다이올을 짧은 시간내에 우수한 수율로 제조할 수 있고, 통상의 2,3-부탄다이올 생성온도보다 낮은 온도에서 2,3-부탄다이올을 제조할 수 있어 전력소모량을 줄일 수 있으며, 이러한 온도에서 생장 가능한 균주가 많지 않으므로 생성물의 오염 가능성을 줄일 수 있다.

대표도 - 도6c



(72) 발명자

**상병인**

서울특별시 성북구 정릉로 404 (돈암동)

**안재형**

서울특별시 영등포구 선유로43가길 24, 104동 50  
1호 (양평동3가, 거성파스텔아파트)

**김태연**

서울특별시 종로구 종로 347, 롯데캐슬천지인 천  
동 1901호 (송인동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201041003

부처명 지식경제부

연구사업명 지식경제 기술혁신사업 (산업원천기술개발사업)

연구과제명 2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 *라울텔라* sp. B6(기탁번호 KCCM11176P)균주.

**청구항 2**

다음의 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올의 제조방법:

- (a) 상기 제 1 항의 *라울텔라* sp. B6 균주를 탄소원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배지에서 2,3-부탄다이올을 회수하는 단계.

**청구항 3**

제 2 항에 있어서 상기 배지에서 배양하는 단계의 배양온도는 20℃ 내지 30℃ 인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제 2 항에 있어서 상기 배지에서 배양하는 단계의 초기 pH는 6.5 내지 7.5 인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제 2 항에 있어서 상기 배지는 호기성 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 *라울텔라* sp. B6 균주 및 이를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 2,3-부틸렌글리콜, 디메틸에틸렌글리콜, 2,3-이하이드록시 부탄 등으로도 불리우는 2,3-부탄다이올은 무색 무취의 액체로, 탄화수소연료 생산에 사용될 수 있는 부텐, 부타디엔, 메틸에틸케톤 등 매개물과 폴리머, 합성 고무, 플라스틱, 섬유 같은 다양한 화학물질로 쉽게 변환 할 수 있는 전구체로서 그 활용가치가 높은 생분해성 화학물질이다.

[0003] 2,3-부탄다이올의 산업적 생산의 기반은 19세기 중반 제 2차 세계대전 때에 합성고무 생산을 위해 마련되었으나, 더 적은 비용으로 석유로부터 1,3-부탄디엔의 화학적 생산이 가능했기 때문에 계속되지는 못했다. 그러나 최근 10년간 석유의 가격의 상승으로 미생물 혹은 생물유래 물질을 이용하여 유용한 유기물질들을 생산하는 것에 대한 관심이 커지고 있다.

[0004] 최근 전 세계적으로 스판텍스 수요가 활황을 보이고 있으며 이에 원료가 되는 부탄다이올의 수요도 늘어나고 있으며, 석유화학산업 가운데 이소시아네이트, 석유수지등과 더불어 부탄다이올이 수출 유망 품목으로 꼽히고 있다. 따라서 높은 효율의 미생물 탐색 방법의 모색, 대사공학적 접근을 통한 2,3-부탄다이올의 생산성 향상 및 부산물의 제거, 다양한 기질을 이용한 2,3-부탄다이올 생산의 도모가 필요하다.

[0005] 현재까지 2,3-부탄다이올을 생산하는 것으로 알려진 미생물로는 *에로모나스 하이드로필라(Aeromonas*

*hydrophila*), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 브레비바실러스 브레비스 S1(*Brevibacillus brevis* S1), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*), 크렙시엘라 유모니아(*Klebsiella pneumoniae*; 에어로박터 에어로제네스(*Aerobacter aerogenes*)라고도 지칭), 크렙시엘라 옥시티카(*Klebsiella oxytica*), 락토바실러스브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스프랜타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토코쿠스라프티스(*Lactococcus lactis*), 류코노스코클락티스(*Leuconostoc lactis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 아중 크레모리스(*subsp. cremoris*), 오에노코쿠스오에니(*Oenococcus oeni*), 페디오코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 라울텔라 테리제나(*Raoultella terrigena*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) (Caspi, 2008), 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) (Nakashimada et al. 2000), 클렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*) (Blomqvist et al. 1993), 에어로박터 인돌로진스(*Aerobacter indologenes*) 및 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), (Nilegaonkar et al. 1992) 등이 알려져 있으며 일반적인 2,3-부탄다이올 생산경로는 도 1에 도시되어 있다. 이처럼 2,3-부탄다이올을 생산하는 미생물은 많지만 산업적으로 적용할 수 있는 균은 적고, 다양한 기질을 이용한 2,3-부탄다이올의 대량 생산을 위해서는 다양한 기질을 이용하여 2,3-부탄다이올을 높은 효율로 생성할 수 있는 미생물의 발견 및 개발이 필요하다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 2,3-부탄다이올 생산 능력이 우수한 신규 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 국내의 특정 토양에서 미생물을 분리하였으며, 이 미생물이 높은 수율로 2,3-부탄다이올 생산할 수 있는 능력을 가진다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 라울텔라 sp. B6을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

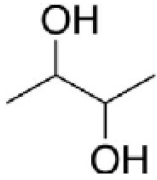
#### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 라울텔라 sp. B6(KCCM11176P) 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 2,3-부탄다이올 생산 능력이 우수한 신규 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 국내의 특정 토양에서 미생물을 분리하였으며, 이 미생물이 높은 수율로 2,3-부탄다이올 생산 능력을 가진다는 것을 규명하였다.

[0013] 본 발명의 라울텔라 sp. B6 균주는 2,3-부탄다이올 생성능이 매우 우수하다. 2,3-부탄다이올은 그 화학식이  $C_4H_{10}O_2$ 이며, 부탄다이올의 구조 이성질체 중 하나이고, 화학구조는 다음과 같다:

[0014] 화학식 1



[0015]

[0016]

본 발명의 *라울텔라* sp. B6 균주는 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수하다. 본 명세서에서, 2,3-부탄다이올을 언급하면서 사용되는 용어 “생산 수율이 우수”란, 미생물을 배양하면서 소비되는 당의 양과 대비하여 생산되는 2,3-부탄다이올의 양이 0.25 g/g 내지 0.3 g/g, 바람직하게는 0.3 g/g 내지 0.35 g/g의 수율을 가지는 것을 의미한다.

[0017]

본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공한다.

[0018]

(a) 상기 본 발명의 *라울텔라* sp. B6 균주를 탄소원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[0019]

(b) 상기 배지에서 2,3-부탄다이올을 회수하는 단계.

[0020]

본 발명의 방법에 사용되는 배지에 이용되는 탄소원은 배지에 탄소원으로 첨가될 수 있는 통상의 탄수화물을 포함하는 개념이나 바람직하게는 전분, 포도당, 초산, 파라핀, 탄화수소, 글루코오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 자일로오스, 수크로오스, 아라비노스 또는 락토스이고 보다 바람직하게는 글루코오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 수크로오스이고 가장 바람직하게는 수크로오스이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021]

본 발명의 방법에 사용되는 배지는 바람직하게는 질소원을 포함한다. 상기 질소원은 유기 질소원이 바람직하며, 보다 바람직하게는 이스트 추출물, 프로테오스 펩톤 No.3 및 펩톤이며, 가장 바람직하게는 이스트 추출물이다.

[0022]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배지에서 배양하는 단계의 배양온도는 20℃ 내지 30℃ 이며, 보다 바람직하게는 22℃ 내지 27℃, 보다 더 바람직하게는 23℃ 내지 26℃ 보다 더욱더 바람직하게는 24℃ 내지 26℃ 가장 바람직하게는 25℃이다.

[0023]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배양은 호기성 조건에서 실시된다.

[0024]

본 명세서에서 용어 “호기성 조건”은 호기성 균주가 생존할 수 있을 정도의 산소량이 존재하는 환경을 의미하며, “혐기성 조건”은 호기성 균주가 생존할 수 없을 만큼 산소량이 적거나 산소가 존재하지 않는 환경을 의미한다.

### 발명의 효과

[0025]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0026]

(i) 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 *라울텔라* sp. B6(KCCM11176P)균주를 제공한다.

[0027]

(ii) 본 발명의 균주를 이용하면, 2,3-부탄다이올을 보다 증가된 생성 속도 및 수율로 제조할 수 있다.

[0028]

(iii) 본 발명의 균주를 이용하면 이용되는 탄소원의 제약없이 2,3-부탄다이올을 제조할 수 있다.

[0029]

(iv) 본 발명의 균주를 이용하면 통상의 2,3-부탄다이올 생성을 위한 발효시 보다 낮은 온도에서 제조할 수 있어 전력소모량을 경감할 수 있다. 이러한 온도에서 성장 가능한 균주가 많지 않으므로 생성물의 오염의 가능성이 적다.

### 도면의 간단한 설명

[0030]

도 1은 글루코오스로부터 2,3-부탄다이올을 생산하는 대사경로를 나타내는 그림이다.

도 2는 30℃, 도 2b는 37℃ 배양기에서 각각 본 발명의 균주를 배양하면서 가스크로마토그래피를 이용하여 생성물을 정량한 결과를 보여주는 그래프이다. 그래프의 값은 2회 실험한 결과의 평균을 나타낸다.

도 3은 혐기성 조건에서 당 종류에 따른 균의 성장(도 3a) 및 2,3-부탄다이올의 생산(도 3b) 결과를 보여주는

그래프이다.

도 4는 호기성 조건에서 당 종류에 따른 균의 성장(도 4a) 및 2,3-부탄다이올 생산(도 4b) 결과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 호기성 조건에서 수크로오즈 공급시 온도별 균의 성장(도 5a) 및 2,3-부탄다이올 생산(도 5b) 결과를 보여주는 그래프이다.

도 6은 호기성 조건에서 온도별 균의 성장(도 6a), 온도에 따른 글루코오스 소모경향(도 6b) 및 2,3-부탄다이올 생산(도 6c) 결과를 보여주는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0032] **1. 균주의 일반적 특성**

[0033] *라울텔라*에 속하는 균주는 본래 *클렙시엘라*로 분류되었다. *클렙시엘라*는 질병과 직접적인 관련이 있는 병원성 균주이다. 이후 환경 시료에서 *클렙시엘라*와 유사한 특성을 지닌 균주가 발견되었고, *클렙시엘라*로 분류되는 네 개의 새로운 종으로서 제시되었다. 그러나 최근 *rpoB* 서열과 표현형의 차이, DNA-DNA 관련성 (relatedness) 에 근거하여 *라울텔라*속으로 따로 구분하게 되었다. 일반적으로 *클렙시엘라*에 속하는 균주는 그람음성이며 운동성이 없다. *라울텔라*속과 *클렙시엘라*에 속하는 균주의 가장 큰 생리학적 차이점은 10℃에서 성장 가능성 여부이며 *라울텔라*는 10℃에서도 생장이 가능한 것으로 알려져 있다.

[0034] 이번 실험을 통해 분리한 *라울텔라* sp. B6 는 통성혐기성 세균으로 호기조건과 혐기적 조건 모두에서 배양이 가능하며, 호기적 조건에서 배양시 주요 생산물은 2,3-부탄다이올이고 혐기적 조건에서 배양시 주요 생산물은 에탄올이다. 또한, 유기산류를 부산물로 생산하는데 24-36시간을 기점으로 감소한다

[0035]  
[0036] **2. *라울텔라* sp B6 균주의 분리**

[0037] 지난 2000년대 초에 유류에 의해 오염되었던 백운산 토양을 채취하여 암모니움 아세테이트 및 소듐 부틸레이트를 포함하는 최소배지에 글리세롤을 탄소원으로 공급하여 30℃, 혐기적 조건에서 반복적인 배양을 통해 2,3-부탄다이올이 많이 생산된 균주를 선별하였다. 표 1은 환경샘플에서 유용균주를 선별하기 위해 사용한 배지 조성을 나타낸다.

표 1

MB2AB media	g/L
글리세롤	30
MES	19.52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
효모추출물	1
암모늄 아세테이트	2.5
소듐 부티레이트	2.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0092
SL7*	1 mL
판토덴산칼슘	0.0108
니코틴산	0.0108
묘-이노시톨	0.2688
티아민	0.0108
피리독신	0.0108
파라-아미노벤조산	0.0022
d-비오틴	0.00003
<hr/>	
SL7*	mg/L
HCl (25%)	1 mL
ZnCl <sub>2</sub>	70
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	40

[0038]

[0039]

균주 분리 결과 혐기조건에서 글리세롤 30 g/L 공급시 에탄올을 약 5 g/L를 생산하고, 글루코스 20 g/L 공급시 2,3-부탄다이올을 약 5 g/L 생산하는 균주를 발견하여 16s rDNA 염기서열 분석결과 *라울텔라속*에 속하는 균주인 것으로 판명되었다. 미생물기탁기관 한국미생물보존센터에 2011년 2월 21일자로 기탁하였으며, 기탁번호 KCCM11176P를 부여받았다. 분리한 균주는 50% 글리세롤에 -70℃에서 보관하였다.

[0040]

### 3. 16s rDNA 유전자 염기서열 및 계통분류학적 특성

[0041]

선별된 2,3-부탄다이올 생산 균주에서 genome DNA를 추출 하였다. 이를 주형으로 사용하여 PCR법으로 16S rDNA 유전자를 증폭하였다. PCR 증폭에 사용된 primer는 27F (5'-AGAGTTGATCTGCTCAG-3')와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')이다. PCR 조건은 94℃ 10분 후, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초로 구성된 cycle을 30번 반복하고 72℃에서 10분간 반응하는 것으로 구성되었다. 증폭된 16S rDNA 유전자 결과물은 마크로젠(주)에 의뢰하여 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과 약 1400 개의 임의적인 염기서열을 얻었고 GenBank 안의 데이터와 비교하기 위해 이 염기서열을 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)하는 데 사용하였다. 이 염기서열과 계통유연관계가 유사한 염기서열은 EzTaxon 프로그램을 이용하여 얻었다. 위의 염기서열과 유사도가 높은 균들의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 Mega 프로그램에서 계통학적 분석을 실시해 본 결과 가장 유연관계가 높은 균주는 *라울텔라 오르니톨리티카*(JCM6096)로 분리된 B6 균주와 99% 이상

의 유사도를 나타냈다. *라울텔라*에 속하는 균주들은 글루코즈(Glucose)를 탄소원으로 공급하여 발효시키는 경우 2,3-부탄다이올과 유기산 및 가스를 최종생산물로 생산한다. 그러나 현재 2,3-부탄다이올의 생산 균주로서 현재까지 논문을 통해 보고된 균주 중 *라울텔라*에 속하는 균주로는 *라울텔라 테리제나*가 유일하며 2,3-부탄다이올 생산에 관여하는 유전자 연구에 관한 것으로서 산업적 이용을 위한 2,3-부탄다이올의 생산성과 관련하여 보고된 바는 없는 균주이다. *라울텔라* sp.B6의 16s rDNA 염기서열 및 계통 분류학적 위치는 도 2에 도시되어 있다.

[0042] 4. 다양한 조건에서 2,3-부탄다이올 생산성 실험 방법 및 분석방법

[0043] (1) 사용배지

[0044] *라울텔라* sp. B6 균주의 2,3-부탄다이올 생산을 위하여 사용한 배지는 이미 2,3-부탄다이올 생산과 관련하여 보고되어진 논문에서 기재되어 있는 클렙시엘라 발효배지를 사용하였으며 그 조성은 표 2에 표기하였다. 클렙시엘라 발효배지에 씨드접종 후 한 번의 계대배양 후에 실험을 실시하였으며, 접종량은 세포의 성장상태에 따라 2~5% 가량 접종하여, 150 rpm으로 교반하여 실험을 수행하였다.

표 2

클렙시엘라 발효배지의 조성	g per L
Glucose	50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.6
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.001
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
EDTA	0.05

[0045] (2) 분석방법

[0046] 균주의 증식은 UV-분광광도계(UVmini-1240, shimadzu, japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 2,3-부탄다이올, 아세테이트, 에탄올 및 아세트산은 불꽃 이온화 검출기(FID)를 장착한 가스크로마토그래피(shimadzu, GC-1200, Japan)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 HP-Innowax (agilent, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)를 이용하였고, 주입구 온도는 200℃ 검출기 온도는 240℃로 유지 하였으며 오븐온도는 초기 50℃에서 30℃/min 씩 올려서 최종 240℃ 까지 증가시켰다. 이동기체로 질소가스를 28 mL/min 의 유속으로 주입하였다. 락트산, 포름산, 숙신산의 분석은 UV 검출기를 장착한 액체 크로마토그래피 (물)를 이용하여 수행하였다 사용 컬럼은 유기산 분석 전용 컬럼인 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7.8 mm)컬럼을 사용하였고, 컬럼온도는 50℃, 이동상으로 5 mM 황산을 0.6 mL/min으로 흘려주었다. 유기산 검출을 위한 검출기의 UV 파장은 210 nm 이다.

[0048] 5. *라울텔라* sp. B6 성장 및 생산물 분석



[0049] (1) *라울텔라 sp. B6*의 혐기 조건에서 글루코스 농도에 따른 2,3-부탄다이올 생산 분석혐기조건에서 탄소원을 글리세롤로 공급하여 분리한 균주였으므로 당의 농도별 공급을 통하여 2,3-부탄다이올의 생산성을 알아보고자 하였다.

표 3

[0050]

글루코스 (g/L)	3-부탄다이올 최대농도의 시간	3-부탄다이올 최대농도에서 pH	3-부탄다이올 최대농도에서의 OD 600nm 값	3-부탄다이올의 최대농도 (g/L)	아세트산 (g/L)	에탄올 (g/L)	총유기산 <sup>a</sup> (g/L)	3-부탄다이올 수율 <sup>b</sup> (g/g 기질)
20	96	4.6	4.5	4.1	0	3.5	2.6	0.26
30	96	4.7	4.5	4.6	0.8	3.7	2.3	0.22
40	96	4.7	4.3	4.9	0.8	3.6	2.3	0.22
50	96	4.7	4.4	5.5	0.8	4.0	2.3	0.25

[0051] 표 3은 혐기조건에서 공급되는 당의 농도에 따른 2,3-부탄다이올의 생산결과를 보여준다. a)는 2,3-부탄다이올 수율과 2,3-부탄다이올의 농도가 최고일 때의 값, b) 유기산은 아세트산, 숙신산, 락트산, 포름산이다. 혐기 조건에서 공급되는 당의 농도를 달리하여 실험해 보았을 때 생산물에 있어 전체적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며 생산수율도 저조하였다.

[0052] (2) *라울텔라 sp. B6*의 혐기 조건에서 당 종류에 따른 2,3-부탄다이올 생산 분석

[0053] 당의 농도는 50 g/L 로 동일하게 공급되었다. 6탄당 공급시 대체적인 균주의 성장과 2,3-부탄다이올의 생산 경향이 거의 유사하게 나타났으며 오탄당(자일로스)공급시 유도기가 길게 나타났고, 육탄당을 공급했을 때보다 균의 성장 및 생산이 상대적으로 저조하였다. 글루코스와 갈락토스 공급시 주요 생산물은 2,3-부탄다이올이었으나 주요 생산물 대비 락트산을 비롯한 유기산의 생산률이 비교적 높게 나타났으며 더불어 에탄올의 상대적으로 생산률도 높았다. 프룩토스 공급시 주요 생산물은 락트산이었으며, 자일로스 공급시에는 특별히 주요 생산물이 무엇인지 규정하기 힘들었는데 이는 에탄올과 2,3-부탄다이올 및 유기산의 비율이 거의 유사하게 나타났기 때문이다.

[0054] (3) *라울텔라 sp. B6*의 호기 조건에서 당 종류에 따른 2,3-부탄다이올 생산 분석

[0055] 상기 실험과 같은 조건에서 당의 종류를 다양하게 공급하여 2,3-부탄다이올의 생산결과를 분석하였다. 당의 농도는 50 g/L 로 동일하게 공급되었다. 균의 성장과 함께 2,3-부탄다이올이 생산되었으며 오탄당 공급시 유도기가 길게 나타났다. 육탄당을 공급한 경우 그 종류에 상관없이 성장 및 생산 경향성이 유사하게 나타났다. 호기성 환경에서는 당의 종류와 상관없이 주요 생산물이 2,3-부탄다이올로 나타났다. 다양한 당류를 이용하여 2,3-부탄다이올을 생산 할 수 있다는 것은 산업적으로 중요한 장점중 하나인데, 이는 다양한 바이오매스를 이용한 유용물질의 대량 생산 방법을 모색하는 최근의 연구동향에 기인한다. 같은 이유로 분리 균주 *라울텔라 sp. B6*의 호기성 조건에서 수크로스 공급시 2,3-부탄다이올 생산능을 분석하였다.

[0056] (4) *라울텔라 sp. B6*의 호기 조건에서 수크로스 공급시 2,3-부탄다이올 생산 분석

[0057] 다른 배양 조건은 앞의 실험과 동일하였으며 수크로스를 단일 탄소원으로 50 g/L 공급 후 생산물을 분석하였다. 수크로스도 동일하게 소모하였으며 균의 성장 및 2,3-부탄다이올의 생산은 25℃에서 더 높게 나타났다.

[0058] (5) *라울텔라 sp. B6*의 호기 조건에서 당 농도에 따른 2,3-부탄다이올 생산 분석

표 4

글루코즈 (g/L)	2,3-부탄다이올 최대농도의 시간	2,3-부탄다이올 최대농도에서 pH	2,3-부탄다이올 최대농도에서의 OD 600nm 값	2,3-부탄다이올의 최대농도 (g/L)	아세트산 (g/L)	에탄올 (g/L)	총 유기산a (g/L)	2,3-부탄다이올 수율b (g/g 기질)
25	12	5.3	7.7	8.5	0.8	2.2	2.2	0.36
50	36	5.0	7.2	14.1	2.1	3.0	3.4	0.31
75	48	4.6	6.8	16.1	2.2	2.8	3.9	0.27
100	48	4.7	6.4	15.4	2.4	2.6	3.8	0.29

[0060] 표 4는 호기조건에서 글루코즈 농도에 따른 2,3-부탄다이올 농도 분석한 결과를 보여준다. a)는 2,3-부탄다이올 수율과 2,3-부탄다이올의 농도가 최고일 때의 값, b) 유기산은 아세트산, 숙신산, 락트산, 포름산이다.

[0061] 호기 조건에서 당 농도에 따른 2,3-부탄다이올의 생산 분석 실험을 수행한 결과 유기산의 생산은 당 농도에 의해 크게 영향을 받지 않았다. 즉, 2,3-부탄다이올 생산 대비 유기산의 생산은 당의 농도가 높을수록 낮게 나타난다. 탄소원을 고농도로 공급한 경우 48시간 이내에 모든 당을 소모하지 못했으며 당 농도에 따른 2,3-부탄다이올 생산수율은 크게 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 그러나 시간당 생산성은 25 g/L를 공급했을 때 0.71 g/L/h 로 당의 농도가 낮을수록 높은 것으로 나타났다.

[0062] (6) *라울텔라 sp. B6*의 호기 조건에서 온도에 따른 균주의 성장 및 2,3-부탄다이올 생산

[0063] 탄소원으로 글루코즈 50 g/L를 동일하게 공급하고, 다른 모든 배지조건이 같은 상태에서 배양 온도만 25℃ 및 30℃로 각각 다르게 하여 균의 성장 및 생산을 비교해 본 결과 25℃에서 배양 하였을 때 균의 생장이 더 높게 나타났다. 30℃ 배양시에는 균의 성장과 동시에 2,3-부탄다이올의 생산이 시작되었으며, 25℃ 배양시에는 대수증식기 중간부터 2,3-부탄다이올의 생산이 시작되었고 빠른 시간 안에 생산 가능한 2,3-부탄다이올 최고 농도에 도달하였다. 일반적으로 2,3-부탄다이올의 생산을 위한 발효시 최적온도는 30~37℃로 알려져 있는데 반해 *라울텔라 sp. B6* 균주는 25℃에서도 동량 생산이 가능하였다. 분리 균주의 이러한 특성은 첫째로 해당 온도에서 성장 가능한 균주가 많지 않으므로 오염의 가능성이 적다는 점과, 둘째로 발효기 운전 시 온도 조절을 위한 전력소모가 낮다는 점에서 장점으로 사료될 수 있다.

[0064] (7) *라울텔라 sp. B6*의 호기 조건에서 초기 pH에 따른 균주의 성장 및 2,3-부탄다이올 생산

[0065] 위에 기술된 실험에서 호기조건 기준 24시간을 기점으로 배지 내 유기산의 농도가 감소하고 pH가 회복됨과 동시에 2,3-부탄다이올의 아세트산으로의 전환이 유발되었다. 이에, 초기 pH의 변화가 2,3-부탄다이올 생산에 영향을 미치는지 확인하고자 다음과 같은 실험을 진행하였다. 탄소원으로 글루코즈 50g/L를 동일하게 공급하였으며, 다른 모든 배지조건 및 배양 온도가 25℃로 같은 상태에서 초기 pH의 조건을 5.5, 6.5 및 7.5 로 다르게 하여 실험을 수행하였다.

표 5

초기 pH	2,3-부탄다이올 최대농도의 시간	2,3-부탄다이올 최대농도에서 pH	2,3-부탄다이올 최대농도에서의 OD 600nm 값	2,3-부탄다이올의 최대농도 (g/L)	아세트산 (g/L)	에탄올 (g/L)	총 유기산a (g/L)	2,3-부탄다이올 수율b (g/g 기질)
5.5	36	3.8	3.3	0.9	0.8	0	5.7	0.14
6.5	36	4.0	9.7	14.2	1.8	2.1	3.6	0.34
7.5	36	5.8	11.6	17.7	1.6	2.8	1.4	0.32

[0067] 표 5는 호기조건에서 초기 pH에 따른 균의 성장 및 2,3-부탄다이올 농도 분석한 결과를 보여준다. a)는 2,3-부탄다이올 수율과 2,3-부탄다이올의 농도가 최고일 때의 값, b) 유기산은 아세트산, 숙신산, 락트산, 포름산이다.

[0068] 초기 pH를 낮게 조정한 결과 균의 생장이 저해를 받았으며 2,3-부탄다이올 생산 대비 유기산류의 생산이 높게 나타났다. 일반적으로 실험을 수행해온 pH6.5 조건보다 pH를 올려준 경우, 균의 성장 및 2,3-부탄다이올의 생산이 높았으며 상대적으로 pH가 떨어지는 비율은 유사하였으나 유기산의 생산이 현저히 떨어지는 것을 확인하였다.

[0069] **6. 결론**

[0070] 신 균주 *라울텔라 sp. B6*는 혐기 및 호기 조건에서 다양한 탄소원의 소모가 가능하며 특히 호기조건에서 배양 시 2,3-부탄다이올을 주요 생산물로 생산하며, 조건에 따라 고농도의 2,3-부탄다이올 생산이 가능하다. 현재 실험에 사용된 배지는 균주의 2,3-부탄다이올 생산을 위한 최적배지라고는 볼 수 없고 플라스크 실험이 수행된 상태임에도 불구하고 비교적 높은 생산성과 수율을 나타내었다. 따라서 현재 수집된 자료를 바탕으로 발효기 실험에 적용 시 기존 균주에 비해 높은 수준의 2,3-부탄다이올을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

[0071] **참고문헌**

[0072] 1. Appl Microbiol Biotechnol (2009) 84:659-665 High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumonia* G31

[0073] 2. Biotechnology Advances (2009) 715-725 Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects

[0074] 3. Prokaryotes (2006) 1:511-755 Organic Acid and Solvent Production Part I: Acetic, Lactic, Gluconic, Succinic and Polyhydroxyalkanoic Acids.

[0075] 4. Appl Microbiol Biotechnol (1999) 52: 321-326 Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*

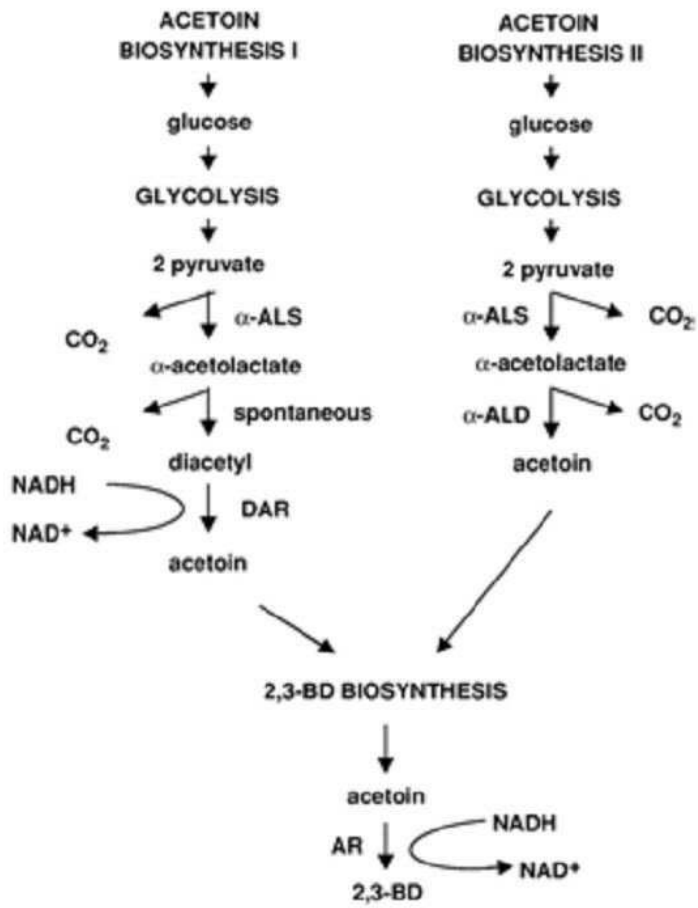
[0076] 5. IJSEM (2001) 51: 925-932 Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.

**수탁번호**

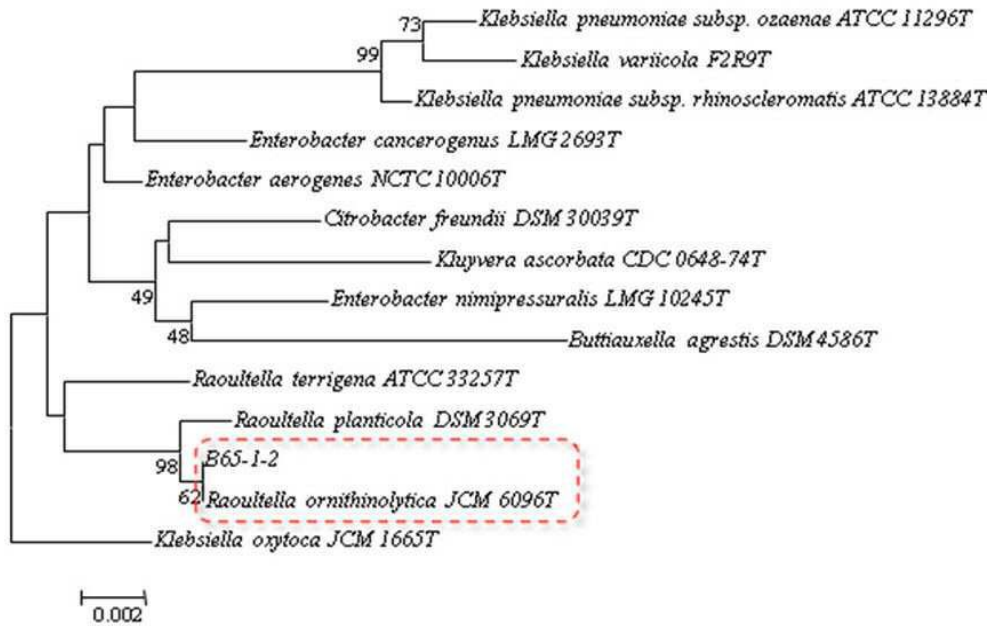
[0077] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)  
 수탁번호 : KCCM11176P  
 수탁일자 : 20110221

도면

도면1

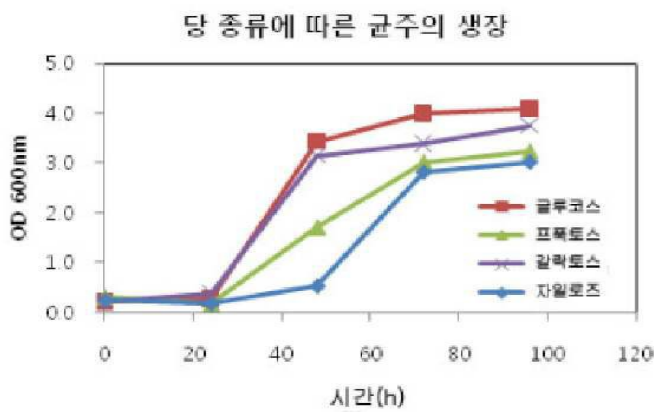


도면2

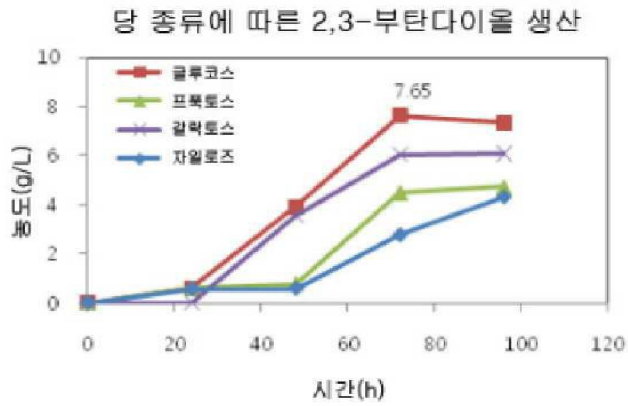


*Raoutella* sp. B6의 계통분류학적 위치

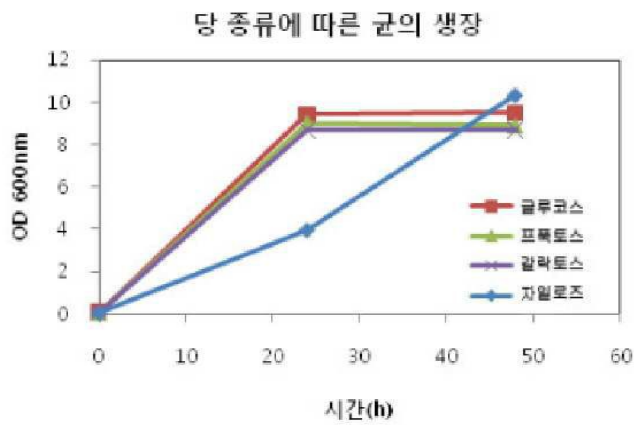
도면3a



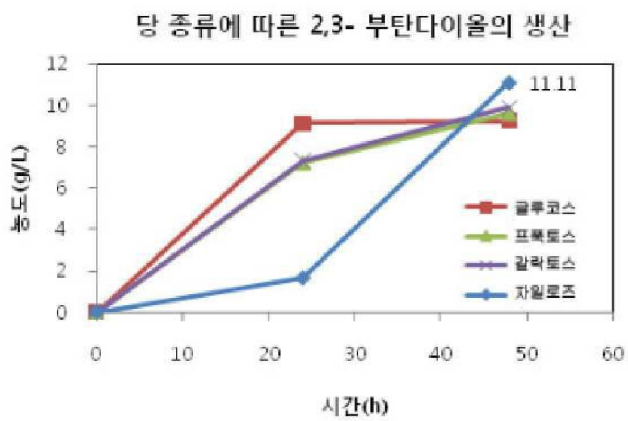
도면3b



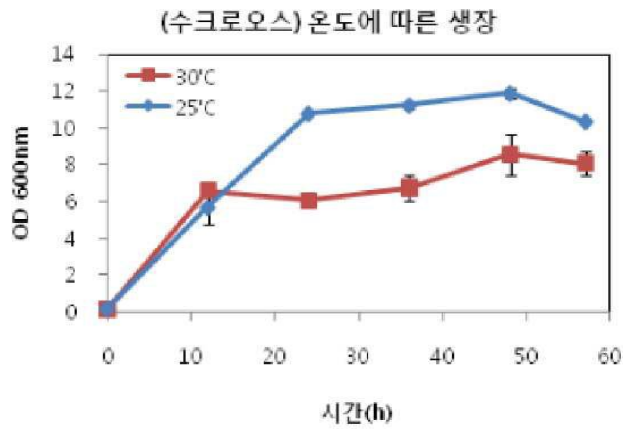
도면4a



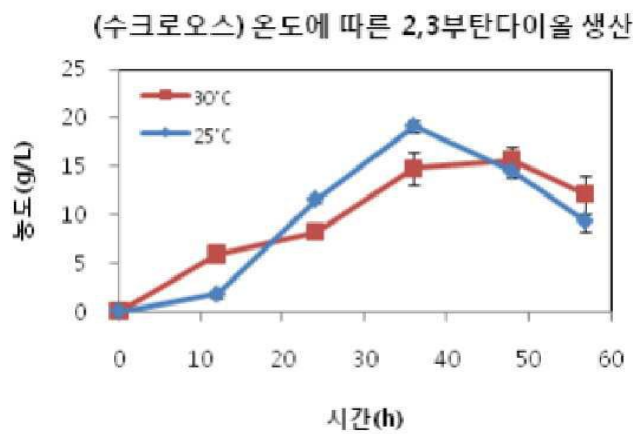
도면4b



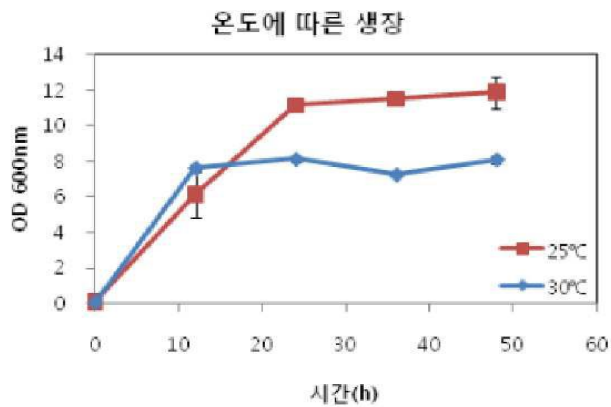
도면5a



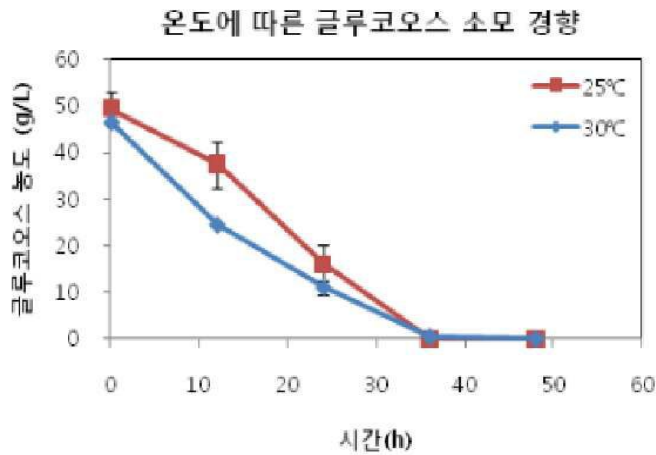
도면5b



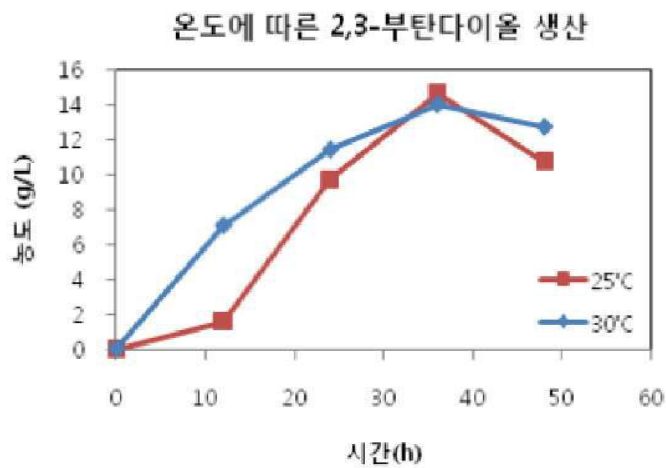
도면6a



도면6b



도면6c



**서열목록**

- <110> INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY
- <120> Raoultella sp. B6 Capable of Producing 2,3-buthandiol in High Yield
- <130> PN110060
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1354
- <212> DNA
- <213> Raoultella sp. B6



<400>	1	
		gctctcgggt gacgagcggc ggacgggtga gtaatgtctg ggaaactgcc tgatggaggg 60
		ggataactac tggaaacggt agctaatacc gcataacgtc gcaagaccaa agtgggggac 120
		cttcgggcct catgccatca gatgtgccca gatgggatta gctagtaggt ggggtaatgg 180
		ctcacctagg cgacgatccc tagctggtct gagaggatga ccagccacac tggaaactgag 240
		acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgcaagcc 300
		tgatgcagcc atgcccgctg tatgaagaag gccttcgggt tgtaaagtac tttcagcgag 360
		gaggaaggca ttaaggttaa taaccttagt gattgacgtt actcgcagaa gaagcaccgg 420
		ctaactccgt gccagcagcc gcggtatac ggagggtgca agcgttaatc ggaattactg 480
		ggcgtaaagc gcacgcaggc ggtctgttaa gtcagatgtg aaatccccgg gctcaacctg 540
		ggaactgcat ttgaaactgg caggcttgag tctttagag ggggtagaa ttccaggtgt 600
		agcggtgaaa tgcgtagaga tctggaggaa taccggtggc gaaggcggcc ccttgacaa 660
		agactgacgc tcaggtcgca aaagcgtggg gagcaaacag ggattagata ccttgtagt 720
		ccacgctgta aaacgatgtc gacttggagg ttgttcctt gaggagtggc ttccggagct 780
		aacgcgttaa gtcgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga 840
		cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta 900
		cctactcttg acatccagag aacttagcag agatgctttg gtgccttcgg gaactctgag 960
		acagtgctg catggctgtc gtcagctcgt gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgaac 1020
		gagcgcaacc cttatccttt gttgccagcg gttcggtcgg gaactcaaag gagactgcca 1080
		gtgataaact ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcac atggccctta cgagtagggc 1140
		tacacacgtg ctacaatggc atatacaaag agaagcgacc tcgcgagagc aagcggacct 1200
		cataaagtat gtcgtagtcc ggattggagt ctgcaactcg actccatgaa gtcggaatcg 1260
		ctagtaatcg tagatcagaa tgctacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc 1320
		cgtcacacca tgggagtggg ttgcaaaaga agta 1354
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	27 foward primer	
<400>	2	
		agagtttgat ctgctcag 18
<210>	3	

<211> 20

<212> DNA

<213> 1492 reverse primer

<400> 3

aaggaggtga tccagccgca

20