



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0096755  
(43) 공개일자 2012년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0016040  
(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

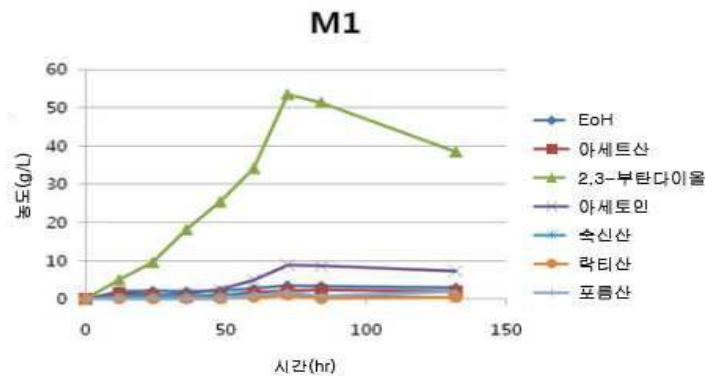
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 크렙시엘라 옥시토카 M1

(57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 크렙시엘라 옥시토카 M1균주에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 2,3-부탄다이올을 짧은 시간내에 높은 수율로 제조하여 이를 이용하여 2,3-부탄다이올의 대량생산이 가능하다. 한편, 본 발명의 균주를 이용하여 2,3-부탄다이올의 전구물질인 아세트인을 생산할 수도 있다.

대표도 - 도4b



(72) 발명자  
**상병인**  
서울특별시 성북구 정릉로 404 (돈암동)  
**안재형**  
서울특별시 영등포구 선유로43가길 24, 104동 50  
1호 (양평동3가, 거성파스텔아파트)

**김경덕**  
경기도 의정부시 회룡로105번길 30, 101동 303호  
(호원동, 쌍용아파트)

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 우수한 크렙시엘라 옥시토카 M1(KCCM11177P) 균주.

### 청구항 2

다음의 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올의 제조방법:

- (a) 상기 제 1 항의 크렙시엘라 옥시토카 M1 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 25℃ 내지 35℃ 인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 배양은 호기성 조건에서 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

아세트인의 생산 수율이 우수한 크렙시엘라 옥시토카 M1(KCCM11177P)균주.

### 청구항 6

다음의 단계를 포함하는 아세트인의 제조방법:

- (a) 상기 제 5 항의 크렙시엘라 옥시토카 M1 균주를 탄소원을 포함하는 배지에서 호기성 조건에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배지에서 아세트인을 회수하는 단계.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서 상기 배지에서 배양하는 단계의 배양온도는 34℃ 내지 42℃ 인 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 크렙시엘라 옥시토카 M1 균주 및 이를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 아세트인 생산 수율이 우수한 크렙시엘라 옥시토카 M1 균주 및 이를 이용한 아세트인의 생산방법에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 최근 화석연료의 부족과 유류 가격의 상승, 환경보전을 위해 바이오 기술을 이용한 신재생에너지 생산이 크게 주목 받고 있다. 신재생에너지 중 2,3-부탄다이올은 산업적으로 다양한 분야에 적용 가능하다. 고옥탄 항공연료, 프린트 잉크, 래커, 합성향료, 합성고무, 약물, 의약, 혼중제 및 유화제의 구성성분 등 많은 분야에서 사용되는 화학 물질이다. 2,3-부탄다이올은 탈수(dehydration)에 의해 연료 첨가물인 메틸-에틸-케톤으로 생성될 수 있으며, 추가적인 탈수에 의해 1,3-부탄디엔을 생성할 수 있는데 이는 합성 고무의 원료로 사용된다.
- [0003] 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*), 락토바실러스헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스프랜타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토코코쿠스라티스(*Lactococcus lactis*), 류코노스코클락티스(*Leuconostoc lactis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 아종 크레모리스(subsp. *cremoris*), 오에노코코쿠스오에니(*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 있다.
- [0004] 이처럼 2,3-부탄다이올을 생산하는 미생물은 많지만 산업적으로 적용할 수 있는 균은 적어 기술의 다양화 및 2,3-부탄다이올의 대량 생산을 위해서는 2,3-부탄다이올의 생성효율이 높은 미생물의 발견 및 개발이 필요하다.
- [0005] 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**

- [0006] 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.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 크렙시엘라 옥시토키 M1을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 아세트인의 생산 수율이 높은 크렙시엘라 옥시토키 M1(KCCM11177P) 균주를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 아세트인의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

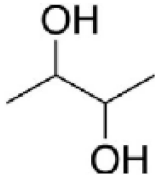
**과제의 해결 수단**

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 우수한 *크렙시엘라 옥시토카* M1(KCCM11177P) 균주를 제공한다.

[0013] 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.

[0014] 본 발명의 *크렙시엘라 옥시토카* M1 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:

[0015] **화학식 1**



[0016]

[0017] 본 발명의 *크렙시엘라 옥시토카* M1 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/g, 가장 바람직하게는 0.35 g/g 내지 0.5 g/g의 수율을 가지는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공한다:

[0019] (a) 상기 본 발명의 *크렙시엘라 옥시토카* M1 균주를 탄소원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[0020] (b) 상기 배지에서 2,3-부탄다이올을 회수하는 단계.

[0021] 본 발명의 방법에 사용되는 배지에 이용되는 탄소원은 배지에 탄소원으로 첨가될 수 있는 통상의 탄수화물을 포함하며, 바람직하게는 전분, 포도당, 초산, 파라핀, 탄화수소, 글루코즈, 갈락토오즈, 프룩토오즈, 자일로오즈, 수크로오즈, 아라비노스 또는 락토스이고, 보다 바람직하게는 글루코즈, 갈락토오즈, 프룩토오즈, 자일로오즈 또는 수크로오즈이고, 가장 바람직하게는 자일로오즈 또는 수크로오즈이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 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.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 탄소원으로 당이 사용되는 경우 당의 농도는 10 g/L 내지 120 g/L, 보다 바람직하게는 30 g/L 내지 110 g/L 보다 더 바람직하게는 50 g/L 내지 100 g/L, 보다 더욱 더 바람직하게는 60 g/L 내지 100 g/L 이다. 100 g/L 이상의 당을 사용하여도 균은 성장하나 그 정도가 미약하며 150 g/L 이상의 당 농도에서는 균 성장의 저해되기 때문이다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배지에서 배양하는 단계의 배양온도는 25℃ 내지 35℃ 이며, 보다 바람직하게는 26℃ 내지 34℃, 보다 더 바람직하게는 27℃ 내지 33℃ 보다 더욱더 바람직하게는 28℃ 내지 32℃ 가장 바람직하게는 29℃ 내지 31℃ 이다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배양은 호기성 조건에서 실시된다.

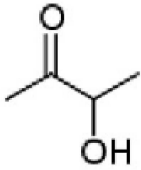
[0026] 본 명세서에서 용어 “호기성 조건”은 호기성 균주가 생존할 수 있을 정도의 산소량이 존재하는 환경을 의미하며, “혐기성 조건”은 호기성 균주가 생존할 수 없을 만큼 산소량이 적거나 산소가 존재하지 않는 환경을 의미한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아세트인의 수율이 높은 *크렙시엘라 옥시토카* M1(기탁번호

00000)균주를 제공한다.

[0028] 아세트인은 2,3-부탄다이올의 전구체로서 “3-하이드록시부탄논” 또는 “아세틸 메틸 카비놀” 이라고도 불린다. 아세트인의 화학식은  $C_4H_8O_2$  이고 화학구조는 다음과 같다:

[0029] 화학식 2



[0030]

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면 다음의 단계를 포함하는 아세트인의 제조방법을 제공한다:

[0032] (a) 상기 본 발명의 크렙시엘라 옥시토카 M1 균주를 탄소원을 포함하는 호기성 조건에서 배양하는 단계; 및

[0033] (b) 상기 배지에서 아세트인을 회수하는 단계.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 탄소원으로 당이 사용되는 경우 당의 농도는 10 g/L 내지 120 g/L, 보다 바람직하게는 30 g/L 내지 110 g/L 보다 더 바람직하게는 50 g/L 내지 100 g/L, 보다 더욱 더 바람직하게는 60 g/L 내지 100 g/L 이다.

[0035] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 배지에서 배양하는 단계의 배양온도는 32℃ 내지 42℃ 이며, 보다 바람직하게는 33℃ 내지 41℃, 보다 더 바람직하게는 34℃ 내지 40℃ 보다 더욱더 바람직하게는 35℃ 내지 39℃ 가장 바람직하게는 36℃ 내지 38℃ 이다.

### 발명의 효과

[0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0037] (i) 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산 수율이 높은 크렙시엘라 옥시토카 M1(KCCM11177P)균주를 제공한다.

[0038] (ii) 본 발명의 균주를 이용하면, 2,3-부탄다이올을 보다 증가된 생성 속도 및 수율로 제조할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 Mega 프로그램에서 크렙시엘라 옥시토카 M1의 염기서열과 유사도가 높은 균들의 16S rDNA 염기서열을 이용한 계통학적 분석을 한 결과를 보여주는 그림이다.

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

도 3a는 호기적 환경배지, 도 3b는 혐기적 환경배지에서 본 발명의 균주를 배양하면서 가스 크로마토그래피를 이용하여 생성물을 정량한 결과를 보여주는 그래프이다. 그래프의 값은 2회 실험한 결과의 평균을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 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.

[0041] 실시예

[0042] **생산 균주 선별, 2,3-부탄다이올 생산량 측정 및 개통분석**

[0043] **실시예 1: 시료 채취 및 2,3-부탄다이올 생산 균주 선별**

[0044] 실험 대상이 된 시료는 충청남도 태안군 소원면 모항리 만리포 갯벌토양에서 채취하였으며, 깊이 20 cm에서 흙을 채취하여 혐기성 통에 넣었다. *크렙시엘라 옥시토카* 균은 통성혐기성 균이므로 강화(enrichment) 과정을 실시할 때 만리포 토양 10 g을 선택배지( $K_2HPO_4$  0.5 g/L,  $KH_2PO_4$  0.5 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  3 g/L,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0.2 g/L,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0.02 g/L,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.00092 g/L, SL7 1mL, 1g/L, MES 19.52 g/L, 글리세롤 30 g/L, 5N KOH를사용하여pH를 6으로 적정, 판토텐산칼슘 0.0108 g/L, 니코틴산 0.0108 g/L, 미오이노시톨 0.2688 g/L, 티아민 0.0108 g/L, 피리독신 0.0108 g/L, 파라-아미노벤조산 0.0022 g/L, d-비오틴 0.0003 g/L)가 200 mL 들어 있는 500 mL의 플라스크에 넣고 혐기성 및 호기성 배양을 각각 실시하였다. 이틀간 교차 배양 후 배양액 1 mL을 0.85% NaCl 9 mL가 들어 있는 튜브에 넣고 단계희석(serial dilution)을 실시하고 농도 별로 2,3-부탄다이올 고체 선택배지(상기 액체 선택배지와 동일한 성분 + agar 14 g/L 첨가) 구성 성분 및 그 양을 추가하여 주시기를 바랍니다)에 도말 하였다. 30°C의 배양기에 배양 후 콜로니 모양별로 액체 선택배지에 접종하여 이틀간 배양 후 배양액을 불꽃이온화검출기(flame ionization detector, FID)가 장착된 가스크로마토그래피(Agilent technology 6890N Network GC system)를 이용하여 정량하였으며, 컬럼은 HP-INNOWAX (30 m x 250 $\mu$ m x 0.25 $\mu$ m, Agilent technology)를 사용하였다.

[0045] **실시예 2: 16S rDNA 유전자 염기서열 분석**

[0046] 선별된 2,3-부탄다이올을 생산 하는 균주에서 지놈 DNA를 주형으로 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction) 기법으로 16S rDNA 유전자를 증폭하였다. PCR 증폭에 사용된 프라이머는 27 정방향 프라이머(5' - AGAGTTTGATCTGCTCAG-3')와 1492 역방향 프라이머(5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')이다. PCR은 94°C 10분 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 구성된 사이클을 30회 반복하고 72°C에서 10분간 반응시키는 방법으로 실시하였다. 증폭된 16S rDNA 유전자 결과물은 바이오닉스(주)에 의뢰하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석결과는 서열목록 제1서열과 같다. 위의 염기 서열을 이용하여 Eztxon blast 프로그램을 이용한 결과 *크렙시엘라 옥시토카* JCM 1665 균주와 99.78% 일치함을 보였다. 위의 염기서열과 유사도가 높은 균들의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 Mega 프로그램에서 계통학적 분석을 실시하였다(도 1 참조). 동일하게 분석한 결과 *크렙시엘라 옥시토카* JCM 1665 균과 유사도가 높게 나왔고, 이 균주를 *크렙시엘라 옥시토카* M1으로 명명하고, 미생물기탁기관에 2011년 2월 21일자로 기탁하였으며, 기탁번호 KCCM11177P 를 부여받았다. 분리한 균주는 25% 글리세롤에 -70°C에서 보관하였다.

[0047]

[0048] **실시예 3: 다양한 탄소원에 따른 2,3-부탄다이올 생산 양상**

[0049] *크렙시엘라 옥시토카* M1 균주가 2,3-부탄다이올을 생산하는 양상에 있어서 다양한 탄소원의 이용 가능성 및 2,3-부탄다이올 생산양상을 관찰 하였다. 실험에 사용한 탄소원으로 단당류 육탄당인 글루코즈, 갈락토오즈, 프룩토오즈 이고 오탄당인 자일로오즈를 사용하였고 이당류인 수크로오즈도 실험에 사용하였다.

[0050] 글리세롤 50%에 동결된 미생물을 50 mL 논문배지에서 오버나이트 동안 씨드배양하였고, 100 mL 삼각플라스크에 각각의 당 50 g/L의 농도가 포함된 논문배지( $K_2HPO_4$  13.7 g/L,  $KH_2PO_4$  2 g/L,  $(NH_4)_2HPO_4$  3.3 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  6.6 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.001 g/L,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01 g/L 및 EDTA 0.05 g/L) 20 mL에 씨드배양된 균을 2-5%(v/v)씩 각각의 플라스크에 균일하게 접종하였다. 30°C의 배양기에서 150 rpm으로 호기성 배양을 실시하면서 규칙적으로 1 mL 씩 미생물 배양액을 취하여 생성물을 FID가 장착된 가스크로마토그래피(Agilent technology 6890N Network GC system)를 이용하여 정량하였으며, 컬럼은 HP-INNOWAX (30 m x 250 $\mu$ m x 0.25 $\mu$ m, Agilent technology)를 사용하였다. 위 실험은 2회 반복 실시하였다.



**표 1**

탄소원	글루코오스	갈락토오스	프룩토스	자일로즈	수크로오스
2,3-부탄다이올 생산 농도 (g/L)	12.9	12.8	14.2	15.0	15.2

[0051]

[0052]

표 1은 다양한 탄소원에 대한 2,3-부탄다이올 생산량을 보여준다.

[0053]

48 시간 동안 배양한 결과 위에서 보는 바와 같이 실험에 사용한 모든 탄소원에서 2,3-부탄다이올을 주요 생성물로 생성하였고 그 외에도 여러 물질을 생성했다. 글루코스에서 2,3-부탄다이올의 최종 농도는 12.9 g/L, 갈락토스에서 12.8 g/L, 프룩토스 14.2 g/L, 자일로즈에서는 15.0 g/L, 수크로오스는 15.2 g/L로 모든 탄소원을 이용하여 2,3-부탄다이올을 생산함을 알 수 있었고 생산된 농도는 큰 차이가 없었다.

[0054]

**실시예 4 : 배양온도에 따른 2,3-부탄다이올 생산 양상**

[0055]

탄소원을 수크로오스로 하여 글루코스 50 g/L 가 있는 논문배지 20 mL을 멸균된 100 mL 플라스크에 첨가하였다. 전날 동일한 배지에서 배양한 *크렙시엘라 옥시토카* M1 균주를 각각의 플라스크에 2-5% (v/v)씩 접종하였다. 30°C 및 37°C 배양기에서 150 rpm으로 배양하면서 규칙적으로 1 mL 씩 취하여 가스크로마토그래피 (Agilent technology 6890N Network GC system)를 이용하여 정량하였으며, 컬럼은 HP-INNOWAX (30 m x 250µm x 0.25µm, Agilent technology)를 사용하였다. 위의 실험을 2회 반복하여 실시하였다.

[0056]

30°C에서 2,3-부탄다이올을 15.2 g/L 생산하였고 37°C에서는 11.6 g/L 생산하였다. 따라서 30°C가 37°C보다 더 효율적으로 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 다른 부산물인 에탄올, 숙신산, 락테이트 및 포말레이트는 유사한 농도로 생산되었다. 아세트인은 2,3-부탄다이올의 전구물질이다. 2,3-부탄다이올이 생산됨에 있어서 서로 가역적인 반응이 일어날 수 있다. 즉, 2,3-부탄다이올 생산 후반에 2,3-부탄다이올의 양이 줄어들면서 아세트인의 양이 증가하는 경향을 볼 수 있다. 아세트인의 경우 37°C에서 배양을 할 때 생산되는 속도가 30°C보다 빨랐다(도 2a 및 도 2b 참조).

[0057]

**실시예 5 : 혐기적 및 호기적 배양에서 2,3-부탄다이올 생산 양상**

[0058]

*크렙시엘라 옥시토카* M1 균은 통성혐기성 균으로서 산소가 없는 혐기성 환경과 산소가 있는 호기성 환경에서 모두 자랄 수 있는 균이다. 그러므로 혐기성 환경에서와 호기성 환경에서 균의 성장 및 생성물의 관찰을 비교하는 실험을 했다. 호기성 배지는 수크로오스 50 g/L 가 있는 논문배지 20 mL을 멸균된 100 mL 삼각플라스크에 넣어 제작하였다. 혐기적 배지는 수크로오스 50 g/L가 있는 논문배지 20 mL을 멸균된 125 mL 혈청배틀 (Serum battle)에 넣고 산소를 제거 하기 위해 항균 필터를 통과한 아르곤 가스를 불어넣어 30 분간 주입 후 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 혈청배틀을 밀봉 한 후 멸균하여 사용하였다. 준비된 배지에 전날 같은 배지에 배양한 균을 200 µL씩 접종하였다. 30°C에서 150 rpm으로 배양하면서 규칙적으로 1 mL 씩 취하여 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 수크로오스를 이용하여 호기성 환경에서 *크렙시엘라 옥시토카* M1을 배양하였을 때 2,3-부탄다이올의 생산량은 15.15 g/L 였고 혐기성 환경에서 배양했을 때 9.31 g/L를 생산하여 호기성 환경에서보다 더 높은 수율로 2,3-부탄다이올을 획득 할 수 있다는 것을 알 수 있다. 혐기성 배양을 하였을 경우 아세트인이 생산되지 않았다(도 3a 및 도 3b 참조).

[0059]

**실시예 6 : 당 농도 구배에 따른 2,3-부탄다이올 생산 양상**

[0060]

탄소원 농도 구배가 된 글루코오스를 이용하여 2,3-부탄다이올의 생산양상을 관찰하였다. 글루코오스 농도는 각각 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L 및 100 g/L 였으며, 각각의 글루코오스 농도가 포함된 논문 배지 20 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 넣었다. 전날 같은 배지에서 배양한 것을 2-5%(v/v)씩 접종하였다. 30°C에서 150 rpm으로 배양하면서 규칙적으로 1 mL씩을 취하여 가스크로마토그래피 (Agilent technology 6890N Network GC system)를 이용하여 정량하였으며, 컬럼은 HP-INNOWAX (30 m x 250µm x 0.25µm, Agilent technology)를 사용하였다.



표 2

[0061]

초기 글루코오즈 농도(g/L)	실제 글루코오즈 농도 (g/L)	글루코오즈의 소비농 도 (g/L)	2,3-부탄다이올 생산 농도 (g/L)	수율 (g/g)
5	5.0	5.0	0.5	0.09
10	9.3	9.3	2.1	0.22
20	13.4	13.4	5.6	0.41
40	42.3	42.3	11.8	0.28
60	69.3	69.3	26.2	0.38
80	90.0	76.6	26.8	0.35
100	104.0	77.6	27.7	0.36

[0062]

균주를 접종한 후 48시간 동안 2,3-부탄다이올의 생산 농도를 측정된 결과 글루코오즈 농도 60 g/L 이상 일 때 2,3-부탄다이올의 농도는 25 g/L 이상의 농도를 보였다. 글루코오즈 농도 5 g/L 일때 최고 2,3-부탄 농도는 0.5 g/L 였고, 10 g/L 일때 2.1 g/L, 20 g/L 일때 5.6 g/L, 40 g/L 일때 11.8 g/L, 60 g/L 일때 26.2 g/L, 80 g/L 일때 26.8 g/L, 100 g/L 일때 27.7 g/L를 생성하였다. 이를 통하여 당 농도 100 g/L까지는 2,3-부탄다이올을 생성 하는데 있어서 큰 장애가 되지 않음을 알 수 있었고 적은 농도의 탄소원 5, 10 g/L 일때 2,3- BD 는 생산이 되었다가 사라짐을 알 수 있었는데, 이는 미생물 성장 및 생장에 있어서 탄소원이 부족할 경우 2,3-부탄다이올이 탄소원으로 이용되는 것에 기인 한 것으로 판단된다.

[0063]

**실시예 7 : 크렙시엘라 옥시토카 M1 과 크렙시엘라 옥시토카 DSM1686 균주의 2,3-부탄다이올 생산량 비교**

[0064]

탄소원을 글루코오스로하여 농도 100 g/L 일때 두 균주의 2,3-부탄다이올 생산량을 비교하였다. 크렙시엘라 옥시토카 KCTC1686은 균주 한국 생물자원센터에서 구입하였으며 표준균주(type strain)로써 우리가 분리 한 균과의 비교실험 대조균으로 사용하였다. 글루코오즈 100 g/L가 있는 논문배지 20 mL을 100 mL의 멸균된 플라스크에 넣고, 전날 같은 배지에 접종한 균을 2-5% (v/v)씩 접종했다. 이후 132 시간 동안 배양 하였다. 실험은 2회 반복 실시하였다. M1 균주의 최대 2,3-부탄다이올 생산량은 72시간 동안 53.4g/L 이고 KCTC 균주의 최대 생산량은 동 시간대에 45.3 g/L 로 M1 균주의 생산성이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

[0065]

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.

**수탁번호**

[0066]

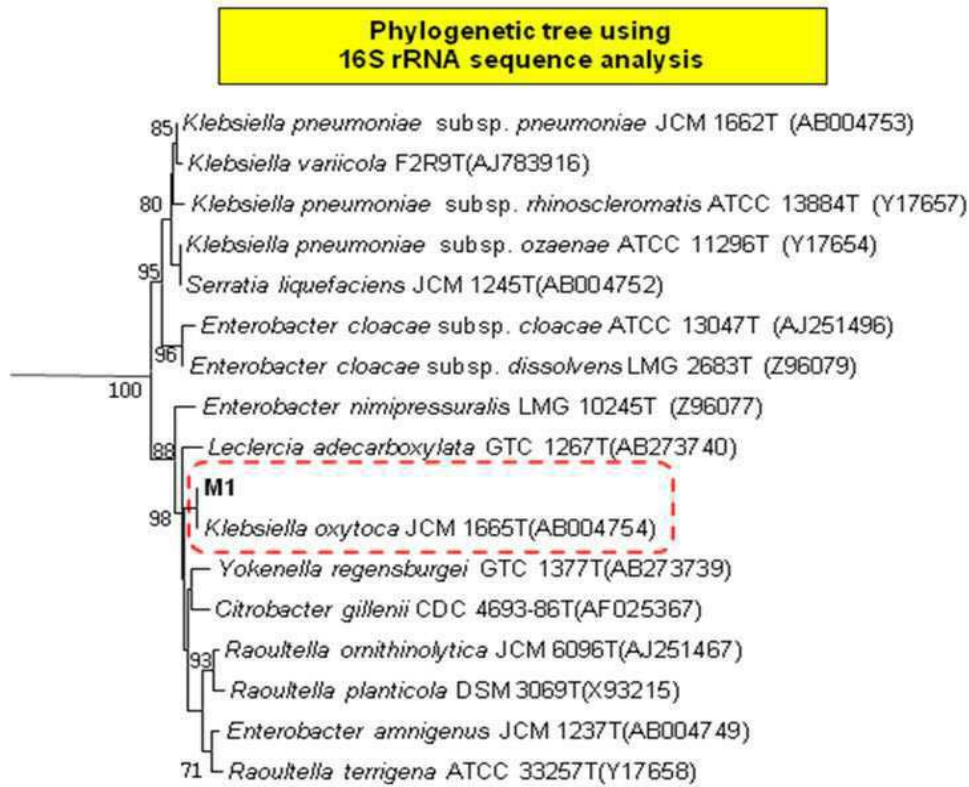
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11177P

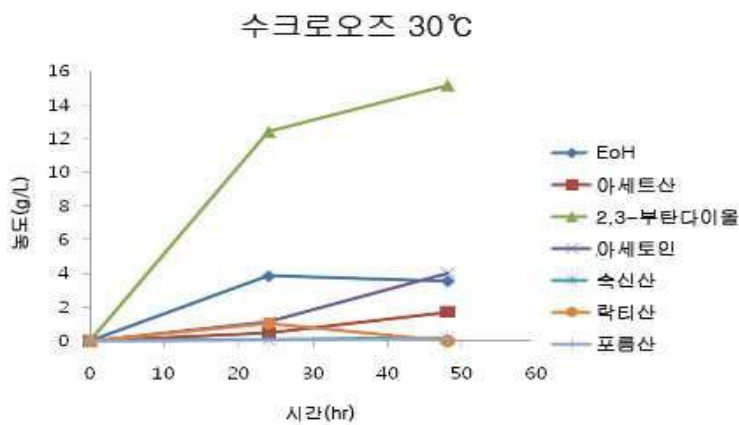
수탁일자 : 20110221

도면

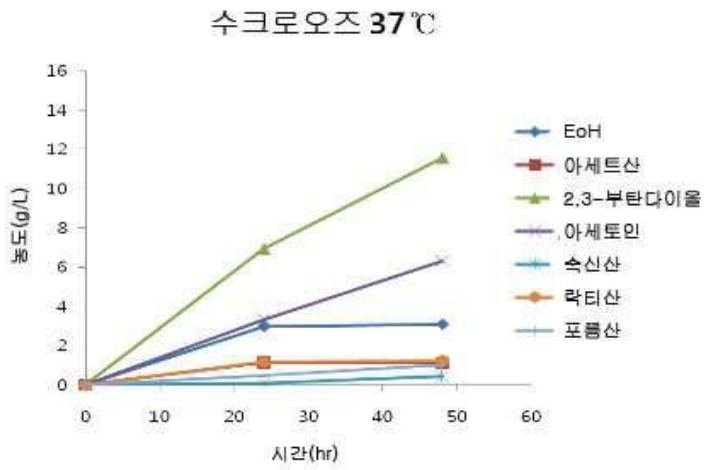
도면1



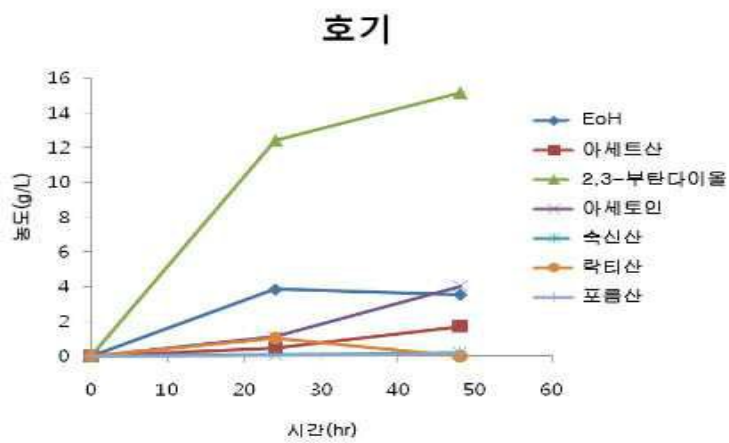
도면2a



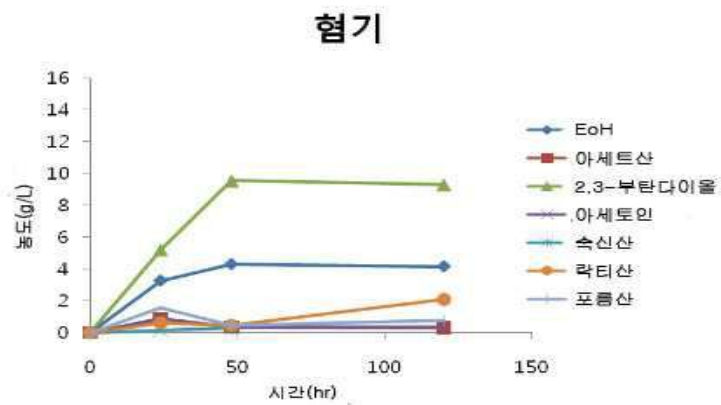
도면2b



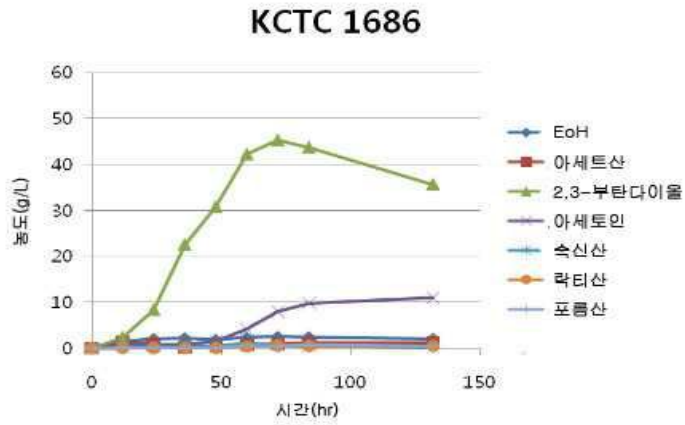
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

