



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월31일  
(11) 등록번호 10-1291217  
(24) 등록일자 2013년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 7/52 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)  
C12N 13/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0015420  
(22) 출원일자 2012년02월15일  
심사청구일자 2012년02월15일  
(56) 선행기술조사문헌  
Enzyme and Microbial Technology, 2006,  
Vol.38, pp.521-528  
Journal of Biotechnology. 2004, Vol.110,  
pp.143-157

(73) 특허권자  
한국과학기술연구원  
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)  
(72) 발명자  
엄영순  
서울특별시 동대문구 전농동 10 전농 SK아파트  
110동 1501호  
상병인  
서울특별시 성북구 돈암1동 1-3  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김 순 영, 김영철

전체 청구항 수 : 총 13 항

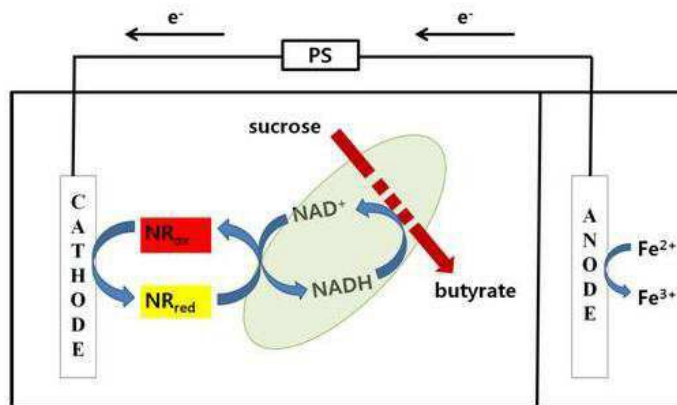
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 타이로부티리쿰 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법**

**(57) 요약**

본 명세서에 개시된 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법은, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산에 있어서, 전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하여 발효시키거나, 환원 전극(cathode)을 이용하여 전자를 배지에 제공하여 발효시킴으로써 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함할 수 있다. 이를 통해 효과적으로 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산을 증진시킬 수 있다.

**대표도 - 도3**



(72) 발명자

**김연제**

서울특별시 중랑구 신내동 622번지 동성아파트 13  
동 208호

**최옥경**

서울특별시 성북구 상월곡동 28-78번지 1층

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산에 있어서,  
전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하여 발효 시키거나,  
환원 전극(cathode)을 이용하여 전자를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 제공하여 발효시킴으로써 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함하는,  
클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 방법은, 부티르산의 생산을 증진시키되, 부산물의 생산은 감소하거나 전혀 생산되지 않는 것인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 부산물은 아세트산인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,  
상기 전자 전달 매개체는 메틸 비올로겐(Methyl Viologen, MV)인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,  
메틸 비올로겐의 농도는 균주의 초기 접종량(O.D.)이 0.1일 때 전체 배지 중에서 0.01 내지 4.0 mM인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,  
메틸 비올로겐의 농도는 균주의 초기 접종량(O.D.)이 0.1일 때 전체 배지 중에서 0.1 내지 2.0 mM인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 부티르산 생산의 증진 방법은,

전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하고, 환원 전극(cathode)을 이용하여 배지에 전자를 제공하여 발효시킴으로써, 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함하는, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 방법은, 사이클릭 볼타모그램(cyclic voltammogram)을 이용하여, 사용하고자 하는 전자 전달 매개체에 따라 상기 환원 전극에 공급되는 환원 전위를 결정하고,

상기 결정된 환원 전위를 공급하는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 부티르산 생산의 증진 방법은,

산화 전극(anode) 및 환원 전극(cathode)을 포함한 전극 시스템에서 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 배양하는 것을 포함하며,

상기 환원 전극은 전자 전달 매개체를 첨가한 배지를 포함하는 것을 특징으로 하는, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 전극 시스템은 양이온 교환 막을 더 포함하며,

상기 산화 전극 및 환원 전극이 양이온 교환 막으로 분리되어 있는 것인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

#### 청구항 11

제7항에 있어서,

상기 전자 전달 매개체는, 뉴트럴 레드(Neutral Red, NR)인, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

#### 청구항 12

제7항에 있어서,

상기 방법은, 상기 부티르산을 생산하는 동안 상기 전극 시스템에서 pH를 조절하는 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 방법은, 상기 부티르산을 생산하는 동안 상기 전극 시스템에서 pH를 조절하지않는 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산의 생산을 증진시키는 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주에 환원력을 공급함으로써 그 균주가 생산하는 환원물인 부티르산의 생성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미생물의 발효과정을 통한 친환경 바이오 연료 생산은 에너지 고갈 문제와 함께 그 활용성이 점점 증가되고 있다. 바이오 연료로 쓰이고 있는 대부분의 발효 산물은 기질로부터 전자를 받아 생성된 환원물이다. 대상 발효물질의 생산을 높이기 위해, 미생물의 대사과정 안에서 기질로부터 시작되어 환원물의 생성까지 이르는 전자의 흐름을 원하는 발효산물로 흐르게 하는 것이 필요하다.

[0003] 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*) 균주를 이용하여 1,3-프로판디올을 생산함에 있어서 전자전달 매개체(electron transfer mediators)를 통해 그 생산을 증진시킨 보고가 있었다(Reimann A, Biebl H, Deckwer W. 1996. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45(1):47-50). 한편, 메틸 비올로겐(Methyl Viologen, MV)가 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium Acetobutylicum*)에 의한 부탄올 생산을 증가시킨다는 보고가 있었다(Tashiro Y, Shinto H, Hayashi M, Baba S-i, Kobayashi G, Sonomoto K. 2007. Novel high-efficient butanol production from butyrate by non-growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with methyl viologen. J. Biosci. Bioeng. 104(3):238-240).

[0004] 최근 들어 환원전극으로부터 미생물에 전자를 공급하여 환원력을 제공하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Lovley DR. 2011. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. Environ. Microb. Rep. 3(1):27-35.). 우라늄 6가를 4가로 환원시켜 비유동성 상태로 처리하는 것, 탈질화과정, 탈할로젠화과정 등 환원전극을 통해 전자를 미생물에게 공급하여 환원력을 공급하는 여러 시도들이 이루어지고 있으며 그 응용 범위를 확대하고 있다.

[0005] 그러나, 아직까지는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주에 환원력을 부여하여 부티르산의 생산을 증진시키는 방법에 대해서는 알려진 바가 없었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Reimann A, Biebl H, Deckwer W. 1996. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45(1):47-50.
- (비특허문헌 0002) Tashiro Y, Shinto H, Hayashi M, Baba S-i, Kobayashi G, Sonomoto K. 2007. Novel high-efficient butanol production from butyrate by non-growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with methyl viologen. J. Biosci. Bioeng. 104(3):238-240.
- (비특허문헌 0003) Lovley DR. 2011. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. Environ. Microb. Rep. 3(1):27-35.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 명세서에 개시된 기술은 일 측면에서 미생물을 이용한 부티르산 생산을 증진시키는 것이다.
- [0008] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산을 증진시키는 것이다.
- [0009] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주에 환원력을 부여하여 부티르산 생산을 증진시키는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 본 명세서에 개시된 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법은, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산에 있어서, 전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하여 발효시키거나, 환원 전극(cathode)을 이용하여 전자를 배지에 제공하여 발효시킴으로써 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0011] 본 명세서에 개시된 기술을 이용하면, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산의 생산을 효과적으로 증진시킬 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0012] 도 1은 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 계통수이다.
- 도 2은 전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 배지에 첨가하여 발효시켰을 경우 나타난 부티르산과 바이오 가스의 생산량을 나타낸 도이다. MV; methyl viologen, NR; neutral red, AQ; Anthraquinone.
- 도 3는 환원 전극 시스템에서 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)이 수크로스로부터 부티르산의 생산을 증가시키는 개략적인 과정을 나타낸 도이다.
- 도 4은 뉴트럴 레드(Neutral red)를 사용한 환원 전극 시스템에서 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*C. tyrobutyricum*)이 부티르산의 생산을 증가시킨 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 환원전극을 통해 환원된 NR(노랑색)과 미생물 안에서 전자를 내어놓고 산화된 NR(빨강색)의 변화를 보여주는 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 본 명세서에 개시된 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산의 증진 방법은, 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산에 있어서, 전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하여 발효시키거나, 환원 전극(cathode)을 이용하여 전자를 배지에 제공하여 발효시킴으로써 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 부티르산 생산의 증진 방법은, 부티르산의 생산을 증진시키되, 부산물의 생산은 감소하거나 전혀 생산되지 않는 방법일 수 있다. 액체 부산물로는 아세트산을 들 수 있다. 그 외의 기체 부산물로는 수소 및 이산화탄소를 들 수 있다. 부산물, 특히 액체 상의 부산물의 생산이 감소하거나 전혀 생산이 되지 않는다면, 부티르산의 분리와 정제가 보다 용이하고, 부티르산 생산 수율이 높아질 수 있는 장점이 있다. 또한, 아세트산 등의 부산물의

생산이 현저히 감소되거나 전혀 생산되지 않으면서 부티르산 생산을 증진시키는 방법이므로, 여러 다양한 용도로 이용될 수 있다. 예컨대, 아세트산 등의 부산물의 생산을 피해야 하는 경우에는 본 발명이 효과적으로 이용될 수 있다.

[0015] 상기 전자 전달 매개체는 메틸 비올로겐(Methyl Viologen, MV)일 수 있다. 어떠한미생물 균주를 사용하느냐에 따라 그리고 어떠한 생산물을 생산하느냐에 따라 사용될 수 있는 전자 전달 매개체는 다르다. 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산에 있어서 적합한 전자 전달 매개체는 메틸 비올로겐(Methyl Viologen, MV)이다. MV를 배지에 첨가하는 것만으로 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산을 현저하게 증진시킬 수 있다. 이와 대조적으로 뉴트럴 레드 (NR)나 안트라퀴논-1,5-다이설포산(Anthraquinone-1,5-disulfonic acid, AQDS)를 배지에 첨가하는 것만으로는 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 이용한 부티르산 생산을 증진시킬 수 없다.

[0016] 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 균주의 초기 접종량 (O.D.=0.1) 기준으로 0.01 mM이상, 0.05 mM 이상, 0.1 mM이상, 0.2 mM이상, 0.4 mM이상일 수 있다. 한편, 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 4.0 mM이하, 3.0 mM이하, 2.0 mM이하, 1.0 mM이하, 0.6 mM이하일 수 있다. 예컨대, 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 0.01 내지 4.0 mM일 수 있다. 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 0.05 내지 3.0 mM일 수 있다. 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 0.1 내지 2.0 mM일 수 있다. 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 0.2 내지 1.0 mM일 수 있다. 상기 메틸 비올로겐의 농도는 전체 배지 중에서 0.4 내지 0.6 mM일 수 있다. MV의 농도가 너무 낮으면 효과가 미미하고 너무 높으면 미생물의 성장이 저해되기 때문이다.

[0017] 한편, 상기 부티르산 생산의 증진 방법은, 전자 전달 매개체를 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주의 배지에 첨가하고, 환원 전극(cathode)을 이용하여 배지에 전자를 제공하여 발효시킴으로써, 부티르산 생산을 증진시키는 것을 포함할 수 있다.

[0018] 상기 부티르산 생산의 증진 방법은, 사이클릭 볼타모그램(cyclic voltammogram)을 이용하여, 사용하고자 하는 전자 전달 매개체에 따라 상기 환원 전극에 공급되는 환원 전위를 결정하고, 상기 결정된 환원 전위를 공급하는 것을 포함할 수 있다. 최적 환원 전위는 환경 조건에 따라 달라질 수 있는 것이므로, 해당 조건에 최적인 환원 전위를 미리 결정하고 결정된 환원 전위를 공급함으로써 부티르산 생산을 더욱 증진시킬 수 있게 된다.

[0019] 상기 전자 전달 매개체는, 뉴트럴 레드(Neutral Red, NR)일 수 있다. NR의 경우 단순한 첨가로는 부티르산 생산의 증진 효과를 보지 못하는 반면, 환원 전극 시스템에서는 오히려 부티르산의 증가를 나타낸다. 이와 대조적으로, 단순히 배지에 넣은 MV는 부티르산 생산을 증가시키지만, 환원 전극 시스템에서는 MV가 환원 전극을 통해 환원은 되나, 균주(*C. tyrobutyricum*)의 부티르산 생산 증가에는 기여하지 못한다. 즉, 미생물로의 전자 전달은 이루어지지 않는다.

[0020] 상기 부티르산 생산의 증진 방법은, 산화 전극(anode) 및 환원 전극(cathode)을 포함한 전극 시스템에서 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 배양하는 것을 포함하며, 상기 환원 전극은 뉴트럴 레드(Neutral Red, NR)등의 전자 전달 매개체를 첨가한 배지를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 전극 시스템은 양이온 교환 막을 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 산화 전극 및 환원 전극이 양이온 교환 막으로 분리되어 있는 것일 수 있다.

[0022] 상기 환원 전극은 혐기 조건의 챔버일 수 있다.

[0023] 상기 NR의 첨가량은 전체 배지 중에서 균주의 초기 접종량 (O.D.=0.1) 기준으로 0.01 mM이상, 0.05 mM이상, 또는 0.08 mM이상일 수 있다. 한편, 상기 NR의 농도는 전체 배지 중에서 1.0 mM이하, 0.5 mM이하, 또는 0.2 mM이하일 수 있다. 예컨대, 상기 NR의 농도는 전체 배지 중에서 0.01 내지 1.0 mM일 수 있다. 또한, 상기 NR의 농도는 전체 배지 중에서 0.05 내지 0.5 mM일 수 있다. 또한 상기 NR의 농도는 전체 배지 중에서 0.08 내지 0.2 mM일 수 있다. NR의 농도가 너무 낮으면 효과가 미미하고 너무 높으면 미생물의 성장이 저해되기 때문이다. 균주(*Clostridium tyrobutyricum*)의 초기 접종량(O.D.)이 0.1일 때의 최적 NR의 농도는 0.1 mM 이다.

[0024] 상기 전극 시스템은 산화 전극, 환원 전극 및 참조 전극을 포함하는 삼전극 시스템일 수 있다. 상기 산화 전극은 백금 전극일 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 상기 참조 전극은 Ag/AgCl 전극일 수 있지만 이에 한정되지

는 않는다.

[0025] 상기 방법은, 상기 부티르산을 생산하는 동안 상기 전극 시스템에서 pH를 조절할 수 있다. 적절한 pH의 범위는 5 내지 7, 5.5 내지 6.5, 또는 5.7 내지 6.3일 수 있다. 최적 pH는 약 6일 수 있다.

[0026] 한편, 상기 방법은, 상기 부티르산을 생산하는 동안 상기 전극 시스템에서 pH를 조절하지 않을 수 있다. pH를 조절하지 않더라도 부티르산의 생산은 일정한 수준까지 증진될 수 있다.

[0027] 이하에서는 본 발명의 실시예들을 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하는 것은 아니다.

[0028] 1. 부티르산 생산 균주 분리

[0029] 대한민국 서울특별시 성동구에 위치한 중량물재생센터에서 혐기성 슬러지 1 g을 채집하고 이를 90℃에서 30분간 열처리하여 그람 음성균을 제거하였다. 상기 열처리된 혐기성 슬러지를 제한배지인 MP2 액체배지(sucrose 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, Yeast extract 1 g, Ammonium acetate 2.2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, MnSO<sub>4</sub> 0.01 g, l-cysteine HCl 0.5 g)에 접종하여 37℃에서 3일간 증균 배양시켰다. 증균 배양한 배양액은 20 g의 소듐 부티레이트(sodium butyrate)가 포함된 MP2 배지에 도말하여 부티르산에 저항성이 있는 콜로니들을 선발하였다. 선발된 각각의 콜로니들을 MP2 액체 배지에 접종하여 37℃에서 3일간 배양 후, 기체 크로마토그래피(Gas chromatography, GC)를 이용하여 부티르산 생산량을 측정하였다. 그 결과, 가장 많은 양의 부티르산을 생산하는 미생물을 분리하였다. 상기 분리된 클로스트리디움 속 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과 도 1의 계통수에 나타난 바와 같이 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)에 속하는 것을 확인하였다 (도 1 참조).

[0030] 2. 실험예 1: 전자 전달 매개체의 첨가에 의한 부티르산 생산 증진 효과

[0031] [실시예 1-1 내지 실시예 1-7]

[0032] 글루코스 대신 20g/L의 수크로스를 함유한 pH 6.4±0.1의 P2 배지(Qureshi and Blaschek 1999)를 멸균시켰다. 멸균된 P2 배지에 각각 0.1 mM (실시예 1), 0.4 mM (실시예 2), 0.5 mM (실시예 3), 1.0 mM (실시예 4), 2.0 mM (실시예 5), 5.0 mM (실시예 6) 및 10.0mM(실시예 7)의 농도로 메틸 비올로젠 (MV) (E<sup>0'</sup> = -446 mV) (Aldrich, South Korea)을 첨가하였다. 상기 메틸 비올로젠이 첨가된 P2 배지에 상기 분리된 클로스트리디움 타이로부티리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*) 균주를 접종하고 37℃, 150rpm으로 배양하였다.

[0033] [비교예 1]

[0034] 메틸 비올로젠을 첨가하지 않은 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1 내지 실시예 1-7과 동일한 조건에서 균주를 배양하였다.

[0035] [비교예 2-1 내지 비교예 2-2]

[0036] 메틸 비올로젠 대신 뉴트럴 레드 (NR) (E<sup>0'</sup> = -325 mV) (Aldrich, South Korea)를 0.1mM, 0.5mM 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1 내지 실시예 1-7과 동일한 조건에서 균주를 배양하였다.

[0037] [비교예 3-1 내지 비교예 3-7]

[0038] 비올로젠 대신 안트라퀴논-1,5-다이설포산(Anthraquinone-1,5-disulfonic acid, AQDS)(E<sup>0'</sup> = -184 mV) (Aldrich, South Korea)을 0.5mM 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1 내지 실시예 1-7과 동일한 조건에서



균주를 배양하였다.

[0039] 상기 실시예 1-1 내지 실시예 1-7, 비교예 1, 비교예 2-1 내지 비교예 2-7, 비교예 3-1 내지 비교예 3-7 각각에 의해 얻어진 부티르산과 아세테이트를 HP-INNOWax 컬럼(30 m x 250 μm x 0.25 μm, Agilent Technologies) 및 플레임-이온화된 디텍터가 구비된 기체 크로마토그래피(GC, Agilent technology 6890N Network GC System)로 분석하였다. 수소 및 이산화탄소는 기체 조성을 증가된 기체 부피와 곱함으로써 정량화되었다. 기체 조성 퍼센트는 열 전도도 디텍터가 구비된 GC에 의해 분석하였다. 소비된 수크로스 농도는 0.5mLmin<sup>-1</sup>의 유속으로 이동상으로서 5mM 황산을 사용하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) (Hi-plex H, Agilent, Santa Clara, CA)로 정량화하였다. 미생물 성장은 Shimadzu UVmini-1240 스펙트로포토미터를 사용하여 600 nm의 흡광도에서 체크하거나, COD vials (C-mac, South Korea, concentration range of 10-1,500 mg/L) 을 이용하여 총 COD로부터 기질 용해성 COD에 의해 유도된 화학적 산소 요구량 (COD, mg/L unit)에 의해 체크하였다. 결과 값들은 각 조건에 대해 3번 반복 또는 4번 반복한 값의 평균이다.

[0040] 그 결과는 하기 표 1 및 도 2에 나타나 있다.

표 1

Methyl viologen (mM)	OD (600nm)	Butyrate		Bio-gas	
		final conc. (g/L)	% vs. control	vol (mL)	% vs. control
0 (비교예1)	5.9 (±0.4)	5.7 (±0.6)	100	134 (±8)	100
0.1(실시예1-1)	6.2 (±0.4)	6.5 (±0.5)	115 (±9)	110 (±9)	82 (±7)
0.4(실시예1-2)	6.3 (±0)	7.3 (±0.1)	128 (±2)	107 (±11)	80 (±8)
0.5(실시예1-3)	5.8 (±0.3)	8.5 (±0.4)	150 (±7)	87 (±4)	65 (±3)
1(실시예1-4)	5.4 (±0.8)	6.2 (±1.7)	109 (±30)	67 (±1)	50 (±1)
2(실시예1-5)	3.9 (±0.9)	6.4 (±1.2)	112 (±22)	46 (±0)	34 (±9)
5(실시예1-6)	1.5 (±1.9)	0.8 (±0)	14 (±0)	4 (±0)	3 (±0)
10(실시예1-7)	0.2 (±0.1)	0.7 (±0)	12 (±0)	4 (±0)	3 (±0)

[0042] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, MV는 적정 농도일 때 부티르산 생산량이 높아짐을 알 수 있다.

[0043] 또한, 도 2은 MV, NR 및 AQDS를 각각 0.5mM의 농도로 배지에 넣은 실시예 1-3, 비교예 2-3 및 비교예 3-3의 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 전자 전달 매개체로서 MV를 사용한 경우 가장 부티르산 생산량이 높았다. 대부분의 균주는 환원 전극으로부터 전자를 받기 위해서는 전자 전달 매개체가 필요한데, 상기 결과는 환원 전극 없이도 단순한 전자 전달 매개체의 첨가만으로도 부티르산의 증가가 가능함을 나타내는 것이다. 즉, 전자 전달 매개체로 메틸 비올로젠을 사용하였을 때, 단순한 첨가만으로도 수소 생산을 저해하여 잉여 전자가 부티르산 생산에 관여하게 하여 부티르산의 최종 농도를 높일 수 있었다 (약 1.5 배 향상)(도1).

[0044] 3. 실험예 2: 환원전극을 이용한 부티르산 생산 증진

[0045] [실시예 2]

[0046] 혐기성 세균 배양을 위해 특별히 고안된, 듀얼 챔버(각각 450 mL)를 갖는 H-타입 반응기로부터 약간 변형된 것으로 Pyrex로 이루어진 생전기 반응기(bioelectrical reactor, BER)를 제조하였다. 환원 전극(cathode)은 그래파이트 펠트 전극 (4.5 cm x12 cm)이었고, 산화 전극(anode)은 Pt 판 전극(2.5 cm x 5 cm)이었다. 참조 전극은 Ag/AgCl, 3 M KCl (BASi, West Lafayette, IN)이었고 이는 환원 전극 부위에 침지시켰다. 산화 전극 부위와 환원 전극 부위는 Nafion 117 양이온-교환 막 (Naracell-tech, South Korea)에 의해 분리하였다. 바이오 가스는 환원 전극 스탑퍼(stopper)에 삽입된 스테인레스 스틸 피팅과 연결된 하나의 Tedlar 백에 의해 수집하였다. 반응기의 온도는 히팅 테일 (Daihan, South Korea)에 의해 37±1°C로 유지하였고, 온도 센서를 스테인레스 스텐드

로드를 통해 산화 전극 칸에 삽입하였다.

[0047] 상기 반응기의 환원 전극 부위는 뉴트럴 레드를 0.1mM 첨가한 P2 배지로 채우고 산화 전극 부위는 0.2 M 헥사시아노페레이트(hexacyanoferrate)  $[K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O]$ 로 채웠다. BER은 -400 mV (vs. Ag/AgCl)의 일정한 환원 전극 포텐셜 하에서 작동하였다. 상기 포텐셜은 퍼스널 컴퓨터로 조절되는 potentiostat/galvanostat (EG&G Princeton Applied Research, Model 273A, Princeton, NJ) 로 세팅하였고, 이를 통해 산화 전극 및 환원 전극 사이의 전류를 모니터링하였다. 환원전극으로 걸어주는 환원 전압은 환원 전극 versus Ag/AgCl를 20 mV/s 의 스캔 속도로 뉴트럴 레드가 첨가된 배양액의 사이클릭 볼타로그래프(cyclic voltammogram) 중의 레독스 피크 (redox peak)로부터 결정하였다. 환원 전극에 의한 뉴트럴 레드의 환원은 5~30분 이내에 상기 언급된 네거티브 포텐셜로 평형될 때 레드 (NR<sub>ox</sub>)로부터 옐로우 (NR<sub>red</sub>) 로 용액의 색상이 변하는 것으로 나타난다. pH가 조절된 BER 가동을 위해, 3 M NaOH을 간헐적으로 첨가하여 pH를 6으로 유지하였다.

[0048] [실시예 3]

[0049] pH를 조절하지 않은 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 수행하였다.

[0050] [실시예 4]

[0051] 상기 반응기의 환원 전극 부위를 0.5mM의 농도의 MV를 첨가한 P2 배지로 채우고 BER을 -750 mV (vs. Ag/AgCl)의 일정한 환원 전극 포텐셜 하에서 작동시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 수행하였다. MV의 경우 환원은 용액의 색상이 무색 (MV<sub>ox</sub>) 에서 보라색 (MV<sub>red</sub>)로 변하는 것으로 나타난다.

[0052] 상기 비교예 1, 실시예 2 내지 실시예 4의 결과는 하기 표 2 및 도 3 내지 도 5에 나타내었다.

표 2

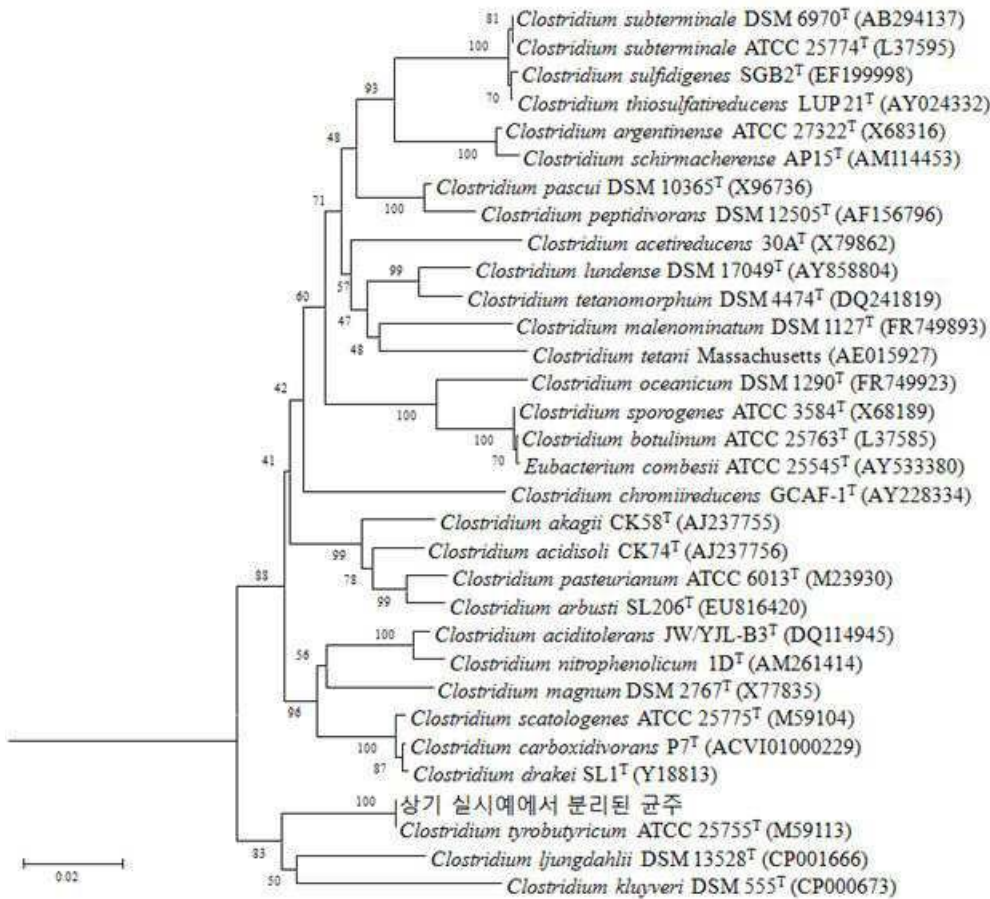
[0053]	비교예 1	실시예 2 (BER <sup>4</sup> ) (pH 6) <sup>5</sup>	실시예 3 BER (no pH control)	실시예 4 (MV <sup>3</sup> )
Final pH	4.3±0.1	6.0±0.1	4.3±0.1	4.3±0.1
Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	0.10±0.01	0.87±0.64	0.11±0.01	0.10±0.01
Sucrose uptake rate <sup>1</sup> (g/L, h <sup>-1</sup> )	0.94±0	0.67±0	0.64±0.31	0.85±0.05
Butyrate productivity <sup>2</sup> (g/L, h <sup>-1</sup> )	0.27±0	0.28 ±0.01	0.31±0.07	0.34±0.01
Acetate productivity <sup>2</sup> (g/L, h <sup>-1</sup> )	0.44 ±0	0	0	0.25±0
Maximum O.D. (600 nm)	6.4±0.3	5.1±0.7	5.0 ±0.4	5.3±0.4
Final butyrate concentration (g/L)	5.0±0.2	8.8±0.9	6.7 ±0.3	7.1±0.4
Butyrate yield (g butyrate/g sucrose)	0.33±0.02	0.44±0.04	0.45±0.02	0.43±0.02

[0054] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 환원 전극 시스템에서는(실시예 2 및 실시예 3) 아세트산이 전혀 생산되지 않았으며, 액체 발효산물로는 부티르산이 유일했다. 이는 부티르산 생산으로 보다 많은 전자가 흘렀음을 의미한다. 또한, 단순히 배지에 넣은 MV는 부티르산 생산을 증가시켰으나(상기 실시예 1), 환원 전극 시스템에서는(실시예 4) MV가 환원 전극(-750 mV vs. Ag/AgCl)을 통해 환원은 되었으나(즉 환원이 되어 보라색으로 변했으나), 균주

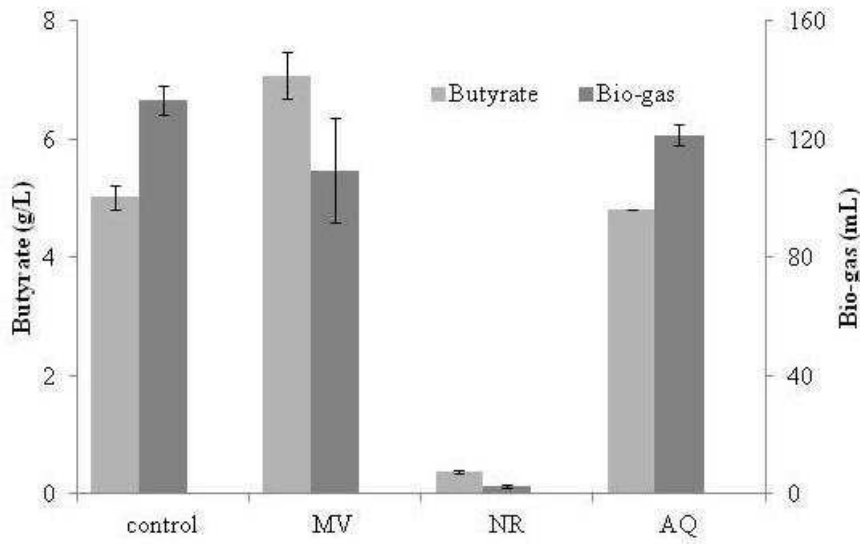
(*C. tyrobutyricum*)의 부티르산 생산 증가에는 기여하지 못했다. 즉, 미생물로의 전자 전달에는 실패하였다. 이와 대조적으로, 단순한 첨가로는 효과를 보지 못한 뉴트럴 레드는 (비교예 2), 환원 전극 시스템에서 오히려 부티르산의 증가를 보여주었다(실시예 2 및 실시예 3). 뉴트럴 레드에 의한 환원 전극 시스템은 도 3에 나타나 있다. 실시예 2의 결과는 도 4의 그래프에 도시되어 있다. 최종적으로 5 g/L의 부티르산 생산이 8.8 g/L로 증가되었다(도 4). 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 환원전극 (-400 mV vs. Ag/AgCl)을 통해서 빨강색의 산화 형태의 NR에서 노란색의 환원 형태로 반응했다 (도 5).

도면

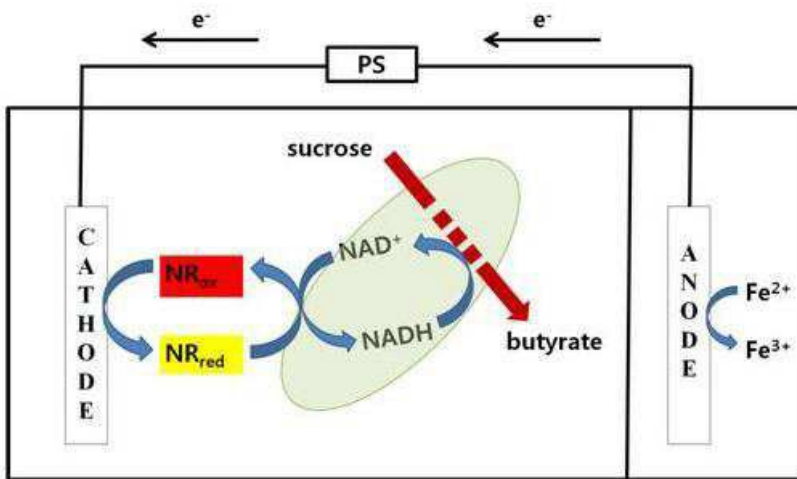
도면1



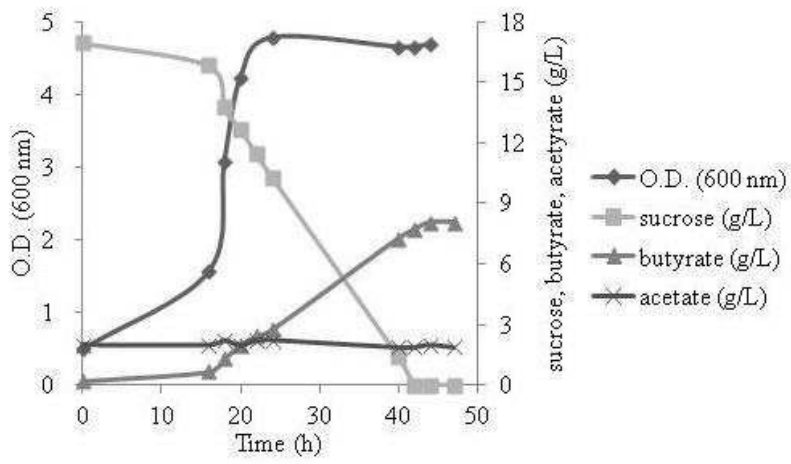
도면2



도면3



도면4



도면5

