



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0133615
(43) 공개일자 2013년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/88 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0057012

(22) 출원일자 2012년05월29일

심사청구일자 2012년05월29일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수,기자촌아파트 201-1601호

김보림

서울특별시 금천구 시흥동 209번지 현대아파트 507호

이수진

서울특별시 마포구 염리동 삼성래미안아파트 105동 1504호

(74) 대리인

양부현

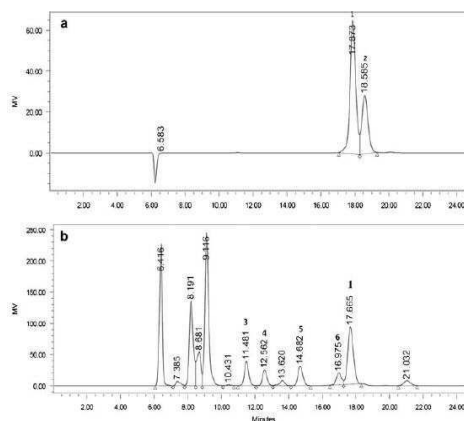
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 산업용 탄소원을 이용한 meso-2,3-부탄다이올의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 산업용 탄소원을 이용한 meso-2,3-부탄다이올 제조방법에 관한 것으로, (a) 크랩시엘라 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계; (c) 상기 형질전환 대장균을 배양 배지에서 배양하여 meso-2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및 (d) 상기 meso-2,3-부탄다이올을 수득하는 단계를 포함하는 형질전환 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 meso-2,3-부탄다이올 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 형질전환 대장균은 산업용 탄소원을 포함하는 배양배지에 배양하여 보다 경제적인 meso-2,3-부탄다이올의 생산이 가능하다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10035578
부처명	지식경제부
연구사업명	산업기술개발사업
연구과제명	2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2015.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	201143002
부처명	지식경제부
연구사업명	산업 바이오 특성화대학원 운영사업
연구과제명	산업 바이오 특성화대학원 운영사업
기 여 율	1/2
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 형질전환 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 *meso*-2,3-부탄다이올 제조방법:

- (a) 크랩시엘라 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계;
- (c) 상기 형질전환 대장균을 배양 배지에서 배양하여 *meso*-2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 *meso*-2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이며, 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 재조합 벡터는 *lac* 프로모터 서열, 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동적으로 (operatively) 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 배양배지는 탄소원, 질소원 및 에너지를 포함하며, 상기 탄소원은 글루코스(glucose), 프럭토오스(fructose), 아라비노오스(arabinose), 자일로오스(xylose) 및 글리세롤(glycerol)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 탄소원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 배양배지는 최소 배지(minimal medium)이며, 1-20 중량% 탄소원 및 1-50 mM 아세트인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 배양은 호기성 비연속식 배양인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 *meso*-2,3-부탄다이올 효율은 10-20 g/l 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 *meso*-2,3-부탄다이올.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 *meso*-2,3-부탄다이올은 순도 97-100%인 것을 특징으로 하는 *meso*-2,3-부탄다이올.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 산업용 탄소원을 이용한 *meso*-2,3-부탄다이올의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지구온난화 및 원유 보유량의 부족으로 인해, 재생 가능한 원료로부터 생물학적 방법을 이용하여 연료 및 화학 물질을 생산하기 위한 바이오매스 전환과정 및 전략이 세계적으로 개발되고 있다.^{1,2} 예컨대, 2,3-부탄다이올(*butanediol*; 부탄다이올)은 화학 물질의 공급원료, 액체 연료 및 생합성 기본요소로 다양하게 사용되는 경제적으로 중요한 원료이다. 탈수반응은 2,3-부탄다이올을 액체 연료의 첨가제로 사용되는 메틸에틸 케톤으로 전환할 수 있고, 2,3-부탄다이올은 합성 고무의 중요 기본요소인 1,3-부타디엔(*butadiene*)으로 전환할 수 있다.^{3,4}

산업적으로 이용할 수 있는 2,3-부탄다이올의 생물학적 제조는 애로박터 애로제네스(*Aerobacter aerogenes*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 및 바실러스 폴릭스(*Bacillus polymyxa*)를 포함하는 몇몇 미생물의 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 통해 제조되어왔다. 크렙시엘라 종은 폭넓은 기질 스펙트럼 및 배양 적응성을 갖고, 2,3-부탄다이올의 효율적으로 생산하는 것으로 보고된다.⁵⁻⁷ 크렙시엘라 종은 2,3-부탄다이올 생합성을 위한 유망한 미생물이지만, 크렙시엘라 독성, 낮은 생산성, 이성체 분리 및 글루코오스와 같은 고가의 탄소원 요구와 같은 단점이 있다.⁸⁻¹² 크렙시엘라 종을 대체하고자, 대장균(*Escherichia coli*)를 사용할 수 있다. 그러나, 대장균은 2,3-부탄다이올 생합성과 관련된 몇몇 유전자가 결핍되어 있어, 대사공학을 통해 2,3-부탄다이올을 생산하기 위한 재조합 균주를 제조하여야 한다.

[0003] 2,3-부탄다이올을 생산하는 야생형 미생물은 이성질체의 혼합물을 야기하고 이러한 이성체를 분리하기 위해서는 추가적인 단계를 요구한다.⁴ 크렙시엘라 종은 단당류 기질로부터 2,3-부탄다이올을 고농도로 생산하고, (*R,R*)-, (*S,S*)-, 및 *meso*-2,3-부탄다이올을 포함하는 이성체가 혼합된 2,3-부탄다이올을 생산한다.⁷ 2,3-부탄다이올 이성체의 비율은 숙주와 배양 조건에 따라 매우 다르다.

[0004] *BudC* 유전자에 의해 코딩되는 이차알코올 탈수소효소(*Secondary Alcohol Dehydrogenase*; *SADH*)는 2,3-부탄다이올의 특정 이성체를 생산하는 2,3-부탄다이올 생합성 효소이다.^{4,11,14,18-20} 2,3-부탄다이올의 혼합된 이성체와 달리, 약제학적 또는 농학적 화합물인 이성질체적으로 순수한 2,3-부탄다이올을 합성할 수 있다.⁴ 따라서, 이성질체적으로 순수한 2,3-부탄다이올의 생물학적 제조는 화학적 합성에 요구되는 고가의 분리 단계를 없앨 수 있다.⁴

[0005] 2,3-부탄다이올 제조용 대장균에 대한 이전의 많은 연구에서, 2,3-부탄다이올을 생합성하는데 글루코오스와 같은 고가의 탄소원이 이용되었다.^{4,11,14,18-20} 그러나 이러한 방법은 높은 생산비를 야기하여 산업적으로 적용하는데 주요한 장애가 되어왔다.¹⁶

[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 천연 원유 감소로 인한 에너지 위기를 극복하기 위해 경제적이고 생물학적인 방법을 이용하여 2,3-부탄다이올을 제조하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 2,3-부탄다이올을 자연적으로 생산하는 크렙시엘라 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현 벡터를 도입한 형질전환 대장균을 개발하고, 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 meso-2,3-부탄다이올을 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 meso-2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 meso-2,3-부탄다이올을 제공하는 데 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 다음 단계를 포함하는 형질전환 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 meso-2,3-부탄다이올 제조방법을 제공한다:
- [0012] (a) 크렙시엘라 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- [0013] (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계;
- [0014] (c) 상기 형질전환 대장균을 배양 배지에서 배양하여 meso-2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및
- [0015] (d) 상기 meso-2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.
- [0016] 본 발명자들은 천연 원유 감소로 인한 에너지 위기를 극복하기 위해 경제적이고 생물학적인 방법을 이용하여 2,3-부탄다이올을 제조하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 2,3-부탄다이올을 자연적으로 생산하는 크렙시엘라 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase) 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현 벡터를 도입한 형질전환 대장균을 개발하고, 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 meso-2,3-부탄다이올을 제조하였다.
- [0017] 본 발명의 meso-2,3-부탄다이올 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0018] 단계 (a): 재조합 벡터의 제조
- [0019] 본 발명의 meso-2,3-부탄다이올을 제조하기 위한 첫 번째 단계로, 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase) 및 알코올 디히드로제나아제(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.
- [0020] 본 발명에서 2,3-부탄다이올을 제조하기 위해 이용한 숙주는 크렙시엘라 종이고, 바람직하게는, 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)이다.
- [0021] 본 발명에서 대장균에 도입하고자 하는 효소는 아세토락테이트 디카르복실라아제 및 알코올 디히드로제나아제이다. 바람직하게는, 상기 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서

열이고, 상기 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열이다.

- [0022] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0023] 상기 유전자들은 발현 벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0024] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0025] 본 발명의 meso-2,3-부탄다이올의 제조에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0026] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, pL^{λ} 프로모터, pR^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0027] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세트산 환원효소를 얻게 된다.
- [0028] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pUC18, pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ gt4? λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pUC18를 사용한다.
- [0029] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기

서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

- [0030] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 *lac* 프로모터 서열, 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동적으로(operatively) 결합된다.
- [0031] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용된 선택표지는 암피실린이다.
- [0033] 본 발명의 벡터는 아세토락테이트 디카르복실라아제 유전자 및 알코올 디히드로제나아제 유전자가 효소 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(Ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하며, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 pUC18 벡터를 사용하였다.
- [0034] 단계 (b): 형질전환 대장균의 제조
- [0035] 이어, 상기 단계 (a)의 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조한다.
- [0036] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0037] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0038] 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환 될 수 있는 미생물로는, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주를 이용할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 단계 (c): meso-2,3-부탄다이올의 제조
- [0041] 본 발명의 형질전환 대장균을 배양배지에서 배양하여 meso-2,3-부탄다이올을 제조한다.
- [0042] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 상기 배양배지는 탄소원을 포함하며, 상기 탄소원은 글루코오스(glucose), 프럭토오스(fructose), 아라비노오스(arabinose), 자일로오스(xylose) 및 글리세롤(glycerol)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 탄소원이다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 배양 시, 글루코오스, 프럭토오스, 아라비노오스, 자일로오스 및 글리세롤로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1 종의 탄소원을 포함하며, 보다 바람직하게는, 글리세롤 또는 글루코오스이다.
- [0044] 바람직하게는, 상기 배양배지는 최소 배지(minimal medium)이고, 1-20 중량% 탄소원 및 1-50 mM 아세트인을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 최소 배지는 1 L 탈염수를 기준으로하여 1-10 g 황산나트륨, 1-10 g 황산암모늄, 1-10 g 염화암모늄, 1-10 g 이칼슘인산염, 1-10 g 인산이수소일나트륨일수화물, 1-10 g 구연산나트륨

를, 1-10 g 황산마그네슘, 0.001-0.01 g 티아민 및 6 중량% 탄소원을 포함하며 pH는 7-8이다.

[0046] 바람직하게는, 상기 배양은 호기성 비연속식(batch) 배양이다.

[0047] 단계 (d): meso-2,3-부탄다이올의 수득

[0048] 마지막으로, 본 발명의 형질전환 대장균을 배양하여 제조된 meso-2,3-부탄다이올을 수득한다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 meso-2,3-부탄다이올 제조방법을 통해 제조되는 meso-2,3-부탄다이올 효율은 10-20 g/l이다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 meso-2,3-부탄다이올을 제공한다.

[0051] 바람직하게는, 상기 meso-2,3-부탄다이올은 순도 97-100%이다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053] (a) 본 발명은 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종의 아세트락테이트 카르복실라아제 및 알코올 디히드로제나아제를 대장균에 도입하여 제조할 대장균에 의한 meso-2,3-부탄다이올의 생산을 가능하게 하였다.

[0054] (b) 본 발명의 형질전환 대장균은 산업용 탄소원을 포함하는 배양배지에 배양하여 보다 경제적인 meso-2,3-부탄다이올의 생산이 가능하다.

[0055] (c) 본 발명은 화학공업에 유용한 기초가 될 플랫폼용 화합물인 meso-2,3-부탄다이올을 생물학적 제조방법을 통해 대량 생산하는 것은 친환경적이며 경제적으로도 큰 강점을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 pUC18K 벡터에 카나마이신 유전자를 도입하여 제조한 pUC18K의 벡터지도를 나타낸다.

도 2는 pUC18K에 budC 및 budA를 도입하여 제조한 pSB5의 벡터지도를 나타낸다.

도 3는 2,3-부탄다이올의 합성 경로를 보여준다. 아세트락테이스에서 아세트인으로 전환되는 반응을 촉매하는 1번 효소는 아세트락테이트 디카르복실라아제이고, 아세트인에서 2,3-부탄다이올이 합성되는 반응을 촉매하는 2번 효소는 알코올 디히드로제나아제이다.

도 4a 및 도 4b는 대장균 SGSB02의 meso-budC의 효소 활성 및 전환율을 나타낸다. 도 4a는 pH 4, pH 5, pH 6 및 pH 7 에서 meso-bud의 효소 활성을 보여주며, 도 4b는 25, 30, 37 및 42℃에서 효소 활성 및 15 mM 아세트인이 meso-2,3-부탄다이올로 전환하는 효율을 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 비연속 발효 실험으로, 도 5a는 대장균 SGSB0의 meso-2,3-부탄다이올 생성을 2 l 비연속 발효(호기성 조건, 6% 글루코오스, 37℃ 및 초기 pH 7)를 나타낸다. 그래프의 닫힌 원형은 글루코오스의 농도를, 열린 원형은 건조세포중량, 닫힌 사각형은 아세트인의 농도, 열린 사각형은 락테이트, 열린 삼각형은 석시네이트 및 닫힌 삼각형은 2,3-부탄다이올을 나타낸다. 도 5b는 대장균 SGSB03의 meso-2,3-부탄다이올 생성을 2 l 비연속 발효(호기성 조건, 6% 글리세롤 원액, 37℃ 및 초기 pH 7)를 나타낸다. 그래프의 닫힌 원형은 글리세롤의 농도를, 열린 원형은 건조세포중량, 닫힌 사각형은 아세트인의 농도, 열린 사각형은 락테이트, 열린 삼각형은 석시네이트 및 닫힌 삼각형은 2,3-부탄다이올을 나타낸다.

도 6a 및 도 6b는 HPLC를 이용하여 2,3-부탄다이올을 확인한 결과를 보여준다. 도 6a는 2,3-부탄다이올 이소머(isomer)의 표준 피크를 나타내며, 도 6b는 대장균 SGSB03의 배양 분석한 결과로, 1번 피크는 meso-2,3-부탄다이올; 2번 피크는 (R,R)-2,3-부탄다이올 및 (S,S)-2,3-부탄다이올의 혼합물; 3번 피크는 석시네이트; 4번 피크는 락테이트; 5번 피크는 아세테이트 및 6번 피크는 아세트인을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 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.
- [0058] **실시예**
- [0059] **실험재료 및 실험방법**
- [0060] *박테리아 균주 및 플라스미드*
- [0061] 대한민국 생물자원센터로부터 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC2242를 분양받아 *budA* 및 *budC* 유전자를 클로닝하는데 이용하였다. 대장균(*Escherichia coli*) W3110(생물자원센터, 대한민국)을 숙주로 이용하였다. *meso*-2,3-BOD 생합성 경로와 관련된 유전자를 클로닝하는데 pUC18 플라스미드(다카라 슈조, 일본)를 이용하였다.
- [0062] *배지 및 배양 조건*
- [0063] 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242, 대장균 W3110 및 재조합 대장균 균주는 LB 배지[10 g 트립톤(Difco, 미국), 5 g 효모추출물(Difco, 미국), 10 g NaCl 및 1 g 글루코오스를 포함하는 1 L 증류수, pH 7.2]에서 종배양하였다. 필요시에 20 g 아가(agar)를 첨가하여 고체 배지를 제조하였다. 항생 배지를 위해 암피실린(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하였다.
- [0064] 플라스크 배양을 위해, 500 ml 플라스크에 200 ml의 배지를 첨가하고 종배양물을 10% 부피로 접종하였다. 재조합 대장균 클론은 별도의 기제가 없으면 최소배지[4 g 황산나트륨, 5.36 g 황산암모늄, 1.0 g 염화암모늄, 7.3 g 이칼륨인산염, 1.3 g 인산이수소일나트륨일수화물, 1.2 g 구연산암모늄, 4.0 g 황산마그네슘, 0.02 g 티아민 및 6% 탄소원(모든 양은 1 L 탈염수를 기준으로 함, pH 7.2)]에서 배양하였다. 플라스크를 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 항생제 배지에서 선별을 위해 암피실린 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하였다. 500 ml 둥근바닥 플라스크를 봉인하여 혐기 상태로 배양하였다. 발효 조건을 최적화하기 위해, 대장균에서 *meso*-2,3-부탄다이올 제조 시 다음의 다양한 조건으로 배양하였다: 탄소원(글루코오스, 자일로오스, 프럭토오스, 수크로오스 및 아라비노오스); 글루코오스 농도(2%, 4%, 6% 및 8%); 온도(25, 30 및 37°C); 초기 pH(pH 5, pH 6 및 pH 7); 및 호기 상태/혐기 상태(표 2). 500 ml 플라스크에서 최적의 배양조건으로 3회 반복실험하였다.
- [0065] 비연속배양을 위해, 종배양물을 5 L 발효기(바이오트론, 대한민국)에 2 L 배지를 첨가하고 10% 접종하였다. 재조합 대장균 클론을 최소배지[4 g 황산나트륨, 5.36 g 황산암모늄, 1.0 g 염화암모늄, 7.3 g 이칼륨인산염, 1.8 g 인산이수소일나트륨일수화물, 1.2 g 구연산암모늄, 4.0 g 황산마그네슘, 0.02 g 티아민 및 6% 탄소원(모든 양은 1 L 탈염수를 기준으로 함, pH 7.2)]에서 배양하였다. 항생제 배지에서 선별을 위해 암피실린 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하였다. 용해산소는 1.5 L/분의 유속으로 여과 공기를 주입하고, 교반 속도는 200 rpm으로 유지하였다. pH는 6.8로 5 N NaOH 및 5 N HCl을 자동첨가하여 유지하였다. 글리세롤 원액은 GS 칼텍스(대한민국)로부터 수득하였다. 비연속배양을 3회 반복하였다.
- [0066] *효소 및 화학물질*
- [0067] 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242로부터 지노믹 DNA를 DNeasy 조직 키트(Qiagen, 미국)를 사용하여 분리하였다. 제한효소 및 T4 DNA 라이가아제는 다카라 슈조(일본)으로부터 구매하였다. 박테리아의 플라스미드 DNA를 분리하는데 Axy 프랩™ 키트(Axygen, 미국)을 사용하였다. 젤로부터 플라스미드 DNA를 대량 분리하기 위해 젤 추출 키트(다카라, 일본)를 사용하였다.
- [0068] *플라스미드 컨스트럭션 및 형질전환*
- [0069] 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 아세트락테이트 디카복실라아제(*budA*) 및 SADH(*budC*)를 코딩하는 유전자에

대한 DNA 서열을 규명하고 마크로젠(대한민국)으로부터 제공받았다. *BudA* 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머는 다음과 같다:

[0070] 정방향 프라이머(5'-GAA TTC ATG AAC CAT TCT GTT GAA TGC TC-3') 및 역방향 프라이머(5'-GGA TCC TTA GTT TTC GAC TGA GCG AAT G-3')이고, 용융 온도(Melting Temperature; T_m)는 67.5 °C로 실시하였다.

[0071] *BudC* 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머는 다음과 같다:

[0072] 정방향 프라이머(5'-GGA TCC ATG AAA AAA GTC GCA CTT GTT ACC-3') 및 역방향 프라이머(5'-TCT AGA TTA GTT AAA CAC CAT GCC GC-3')이고, 용융 온도는 62.3°C로 실시하였다(표 1). 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 지노믹 DNA를 다음의 PCR 조건으로 각 유전자를 증폭하였다:

[0073] 94°C로 30초, 용융 온도로 30초 및 72°C로 30초를 한 사이클로하여 30 사이클 실시하였다. *BudA* PCR 산물을 *EcoR* I 및 *BamH* I로 절단하고 pUC18의 동일 부위에 삽입하였다. *BudC* PCR 산물을 *BamH* I 및 *Xba* I로 절단하여 pUC18의 동일한 부위에 삽입하였다.

표 1

[0074]

박테리아 균주, 플라스미드 또는 프라이머 명	관련 서열	기관 또는 효소 부위
균주		
크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242	Ap ^r , trpR	KCTC
대장균(<i>Escherichia coli</i>) W3110	F-λ-rph-1 INV(rrmD,rrmE)	RBC
플라스미드		
pUC18	Ap ^r	Takara
pSB01	Ap ^r , Kan ^r , 크렙시엘라 뉴모니아의 <i>budA</i> 유전자를 포함하는 pUC18K	본 발명
pSB02	Ap ^r , Kan ^r , 크렙시엘라 뉴모니아의 <i>budC</i> 유전자를 포함하는 pUC18K	본 발명
pSB03	Ap ^r , Kan ^r , 크렙시엘라 뉴모니아의 <i>budA</i> 및 <i>budC</i> 유전자를 포함하는 pUC18K	본 발명
프라이머		
<i>budA</i> -F	5'-GAATTCATGAACCATTCTGTTGAATGCTC-3'	<i>EcoR</i> I
<i>budA</i> -R	5'-GGATCCTTAGTTTTCGACTGAGCGAATG-3'	<i>BamH</i> I
<i>budC</i> -F	5'-GGATCCATGAAAAAGTCGCACTTGTTAC-3'	<i>BamH</i> I
<i>budC</i> -R	5'-TCTAGATTAGTTAAACACCATGCCGC-3'	<i>Xba</i> I

[0075] *Meso-SADH* 분석 및 입체특이성

[0076] *meso*-SADH를 수득하기 위해 종배양물을 500 ml 플라스크에 첨가된 200 ml 배지에 10%로 접종하였다. 배양배지에 1 mM IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하고 6시간 후에 세포를 수확하였다. 필요시에 50 μg/ml 암피실린을 첨가하였다. 수확한 세포를 0.01 M PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)에 현탁하고 얼음 배스에서 초음파 분해(Sonosmasher, Ulssso Hi-Tech, 대한민국)하여 세포벽을 파쇄하였다. 균질 현탁액을 10분 동안 4,500 rpm으로 원심분리를 실시하고 효소 활성 분석용 상층액을 수득하였다. *meso*-SADH의 효소 활성을 UV-Vis 분광광도계(Shimadzu, 일본)로 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide의 환원형)의 산화를 측정하여 정량하였다. 분석용 혼합물은 15 mM 아세트인, 0.2 mM NADH 및 100 μl 세포상층액을 포함하며 최종 부피는 1 ml이다. 다양한 온도(25, 30, 37 및 42°C) 및 pH(pH 4, 5, 6 및 7)에서 30분 동안 반응한 후에 *meso*-SADH의 특이 활성을 측정하였다. 단백질 농도는 단백질 분석 키트(Bio-Rad, 미국)를 이용하여 측정하였다. 건조세포중량을 광학밀도 600 nm에서 측정하여 산출하였다. 활성 1 유닛(unit)는 효소 단백질의 양(mg)으로 정의된다. *meso*-SADH의 특이 효소 활성은 효소 단백질의 양에 의해 나뉘지는 효소 유닛(unit; U)로 정의된다.

- [0077] *meso*-2,3-부탄다이올 제조의 최적 배양 조건을 검색하기 위해, 형질전환 대장균의 *meso*-SADH의 효소활성을 조사하고 대장균 SGSB02의 전체 세포 전환율($\text{g}_{\text{meso-2,3-부탄다이올}}/\text{g}_{\text{아세트인}}$)을 결정하였다. 플라스크 배양을 위해 종배양물을 500 ml 플라스크에 첨가된 200 ml 배지에 10%로 접종하였다. 1 mM IPTG 및 15 mM 아세트인을 첨가하고 24시간 동안 배양한 후에 세포를 수확하였다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린을 필요시 첨가하였다. 지정한 시간에 샘플을 빼내어 10분 동안 4,500 rpm으로 원심분리를 실시하였다. 원심분리된 샘플로부터 상층액을 수득하였다. 수율($\text{g}_{\text{meso-2,3-부탄다이올}}/\text{g}_{\text{아세트인}}$) 및 입체 특이성을 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)로 측정하였다.
- [0078] 분석 방법
- [0079] 지정한 시간에 수득한 샘플을 10분 동안 4,500 rpm으로 원심분리를 실시하였다. 상층액 내 탄소원, *meso*-2,3-부탄다이올 및 유기산의 양을 RI2414 검출기(워터스, 미국) 및 아미넥스 HPX-87H 유기산 컬럼(300 mm $\times$ 7.8mm; 바이오-레드, 미국)을 장치한 HPLC로 측정하였다. 0.01 M 유황산을 이동상으로 0.6 ml/분으로 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 사용하였다. 모든 용액은 사용 전에 0.2 μm 막을 통과시켜 여과하였다.
- [0080] 결과
- [0081] 유전자 클로닝 및 플라스미드 컨스트럭션
- [0082] 2,3-부탄다이올 생합성하는데 3 종류의 효소, 아세토락테이트 신타아제(*budB*), 아세토락테이트 디카르복실라아제(*budA*) 및 SADH(*budC*)는 중요하다. 대부분의 야생형 대장균은 *budA* 및 *budC*에 의해 코딩되는 효소를 갖고 있지 않다. 본 연구에서, 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC24242의 *budA* 및 *meso-budC*를 규명하고 클로닝하여 pUC18 발현벡터에 도입하였다. *budC* 유전자를 포함하는 플라스미드 pSB02를 대장균 W3110에 형질전환하여 대장균 SGSB02를 제조하였다(표 1). 대장균 SGSB02는 대장균의 2,3-부탄다이올 경로에서 *meso*-SADH의 효소 활성을 측정하는데 사용하였다(도 2). *budA* 및 *meso-budC*를 발현하는 플라스미드 pSB03을 대장균 W3110에 형질전환하여 대장균 SGSB03을 제조하였다(표 1). 최적 조건하에 비연속식 발효는 대장균 SGSB03으로 실시하였다.
- [0083] 대장균에서 *meso*-SADH의 효소활성 및 전환율
- [0084] 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242는 9(*meso*-2,3-부탄다이올):1(*R,R*)-2,3-부탄다이올]를 제공한다. 따라서, 효율적으로 *meso*-2,3-부탄다이올을 제조하기 위해, *meso-budC* 유전자를 클로닝하여 pUC18 발현벡터에 도입하였다. IPTG-유도된 대장균 SGSB02의 추출원액은 30-37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7 조건에서 30.5-41.5 U/mg의 높은 *meso*-SADH 활성을 보여준다(도 2). 효소 활성에 있어 온도 및 pH는 주요 조절인자이므로, 최적 배양 조건을 결정하기 위해, *meso*-SADH활성을 다양한 온도(25, 30 및 37 $^{\circ}\text{C}$) 및 초기 pH(pH 5, pH 6 및 pH 7)에서 시험하였다(도 2).
- [0085] 대장균 SGSB02의 *meso*-2,3-부탄다이올 경로에서 *meso*-SADH 활성이 중요하기 때문에, 전체 세포의 촉매작용을 전환율($\text{g}_{\text{meso-2,3-부탄다이올}}/\text{g}_{\text{아세트인}}$)을 측정하여 시험하였다. 온도(25, 30 및 37 $^{\circ}\text{C}$) 및 pH(pH 5, pH 6 및 pH 7)의 영향 또한 시험하였다(도 2).
- [0086] 플라스크 시험에서, 15 mM 아세트인을 첨가함으로써 대장균 SGSB02에서 아세트인이 *meso*-2,3-부탄다이올로 전환되었고, 이는 37-42 $^{\circ}\text{C}$ 및 pH 7에서 0.25-0.28 $\text{g}_{\text{meso-2,3-부탄다이올}}/\text{g}_{\text{아세트인}}$ 으로 가장 높게 나타났다(도 2). 입체이성체인 *meso*-2,3-부탄다이올, (*R,R*)-2,3-부탄다이올 및 (*S,S*)-2,3-부탄다이올을 HPLC로 확인하였다.
- [0087] 진탕 플라스크에서 *meso*-2,3-부탄다이올 제조를 위한 최적 배양 조건
- [0088] 대장균 SGSB03에서 최대 생전환 효율을 달성하기 위해, 진탕 플라스크에서의 배양조건을 최적화하였다. 플라스크 배양을 위해, 종배양물을 500 ml 플라스크에 첨가된 200 ml 최소 배양 배지에 10%로 접종하였다. 이는 파라미터에 의한 영향을 관찰하기 위해, LB 액체배지와 같은 부유배양배지 대신 최소 배양 배지를 사용하였다. 대장균 SGSB03에 의한 *meso*-2,3-부탄다이올 제조를 다음의 파라미터로 시험하였다: 탄소원(글루코오스, 자일로오스, 프럭토오스, 수크로오스 및 아라비노오스); 글루코오스 농도(2%, 4%, 6% 및 8%); 온도(25, 30 및 37 $^{\circ}\text{C}$); 초기 pH(pH 5, pH 6 및 pH 7); 및 호기/혐기조건(표 2).

표 2

	생물	2,3-BDO		전구물질	이성질체 농도 (g/L)	거울상이성질체 순도	참고	
		생합성	유전자					
천원 생산자	<i>K. pneumoniae</i>	Native		글루코오스	meso-	21.2	73.6%	14
					D(-)-	6.0	20.8%	
					L(+)-	1.6	5.6%	
비-천원 생산자	<i>Enterobacter cloacae</i>	Native		글루코오스	meso-	18.6	99%	15
	<i>K. oxytoca</i>	Native		글루코오스		87.67		7
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>budA, budB, budC</i>		글루코오스	meso-	17.7	98%	3
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>budA, budB</i> <i>T. brockii budC</i>		글루코오스	(R,R)-	6.1	99%	4
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis budA, budB,</i> <i>K. pneumonia budC</i>		글루코오스	meso-	14.5	99%	10
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>budA, budC</i>		글루코오스	meso	15.3	99%	본 발명

[0089]

[0090]

글루코오스는 박테리아 배지에 널리 이용되나, 순수 글루코오스는 고가이다. 대장균 SG5B03에 의한 다양한 탄소원의 소모량 및 meso-2,3-부탄다이올 전환율을 조사하기 위해, 산업적으로 많이 이용되는 5 종류의 탄소원을 선별하였고 각 탄소원 6%를 200 ml의 최소배지에 첨가하였다. 5 종류의 탄소원(글루코오스, 자일로오스, 프럭토오스, 수크로오스 및 아라비노오스) 중, 프럭토오스를 이용하는 경우에 대장균 SG5B03의 최대 성장(5.12 ± 0.07 세포건조중량/l_{culture})을 나타냈으나, 글루코오스를 이용하는 경우에 48시간에 meso-2,3-부탄다이올의 최고량(14.3 g/l culture , 효율 $0.33 \text{ g/g}_{\text{glucose}}$)을 생산하였다(표 2). 소량의 아세트인($1.46 \pm 0.08 - 1.70 \pm 0.01$) 및 락테이트($0.20 \pm 0.09 - 2.43 \pm 0.06$)가 검출되었다. 아세트에이트, 석시네이트 및 에탄올을 포함하는 다른 물질은 검출되지 않거나 미량이었다.

[0091]

증가된 글루코오스 농도는 meso-2,3-부탄다이올의 제조를 증가시킬 뿐 아니라, 세포 성장을 억제할 수 있다. 대장균 SG5B03에 의한 meso-2,3-부탄다이올 제조 및 효율에 글루코오스 농도의 영향을 관찰하기 위해, 질소원 농도를 고정하고 글루코오스 농도를 20, 40, 60 및 80 g/L로 다양하게 하였다(표 2). 대장균 SG5B03은 6% 글루코오스를 첨가하는 경우에 최고의 meso-2,3-부탄다이올 효율 및 제조를 나타내었다(표 2). 글루코오스 농도 이 증가는 meso-2,3-부탄다이올의 효율 및 제조를 증가시켰다. 그러나, 탄소원이 8%를 초과하는 경우에 세포 성장의 억제를 나타내었고, 6% 글루코오스 배양배지와 비교하였을 때, 세포건조중량이 약 2.1% 감소하였다(표 2). 글루코오스 농도가 1% 이하일 경우, 대장균 SG5B03은 meso-2,3-부탄다이올을 생산하지 않았으며, 이는 탄소원이 세포 성장에 매우 중요함을 말한다. 최소배지 내 1% 글루코오스는 대장균 SG5B03의 생존에 필수적인 글루코오스 농도로 판단된다.

[0092]

대장균 SG5B03의 meso-2,3-부탄다이올 촉매 작용에 온도(25, 30 및 37℃) 및 pH(pH 5, pH 6 및 pH 7) 조건이 영향을 주는지 조사하였다(표 2). 결과에 따르면, 6% 글루코오스를 주탄소원으로 첨가한다. 대장균 SG5B03에서 2,3-부탄다이올의 생산은 대장균 SG5B02의 최적 온도 및 pH 값과 같은 경향을 나타내었다(표 2 및 도 2). 이러한 결과는 meso-SADH의 효소 활성이 meso-2,3-부탄다이올의 생물전환에 중요한 역할을 하는 것을 말한다.

[0093]

2,3-부탄다이올 제조에 있어 또다른 중요한 파라미터는 호기 조건이다.⁴ 혐기 배양은 측면 암(arm)을 갖는 500 ml 둥근 바닥 플라스크를 이용하여 모든 출입구의 뚜껑을 닫아서 실시하였다. 결과에 따르면, 6% 글루코오스를 주탄소원으로 첨가하고 온도를 37℃로, 초기 pH를 pH 7로 고정하였다. 대장균 SG5B03은 호기성 조건에서 $14.33 \text{ g/l culture}$ ($0.33 \text{ g/g}_{\text{glucose}}$)로, 혐기성 조건에서 1.72 g/l culture ($0.03 \text{ g/g}_{\text{glucose}}$)로 meso-2,3-부탄다이올을 생산하였다(표 2). 이러한 결과는 대장균 SG5B03이 meso-2,3-부탄다이올을 생산하는데 혐기 배양보다 호기 배양을 선호하는 것을 말한다. 혐기 배양의 세포건조중량은 호기 배양과 비교하여 약 2% 감소하였다. 또한, 혐기 배양에 의한 meso-2,3-부탄다이올 제조는 호기 배양과 비교하여 약 1.4% 증가하였으며, 아세트에이트가 상당

히 검출(3.62 ± 0.04)되었다. 대장균은 선택적 혐기성 균주이다. 이는 두 가지 경로(호흡 및 발효)를 통해 에너지를 얻을 수 있다. 따라서, 산소가 제한적인 경우, 글루코오스 대사는 유기산 발효하게 된다.²⁰ 결과적으로, 락테이트 및 아세테이트와 같은 유기산을 형성하고 대장균 SGSB03의 경우에, meso-2,3-부탄다이올 제조가 감소하게 된다.

[0094] 최적 조건 하에 비연속식 배양에 의한 meso-2,3-부탄다이올 제조

[0095] 최적의 배양 조건 하에서, 대장균 SGSB03은 $15.7 \text{ g/l}_{\text{culture}}$ 의 meso-2,3-부탄다이올을 수득하였다(순도>99%). 최적 조건(호기 조건, 6% 탄소원, 37°C 및 초기 pH 7)을 기반으로 2 l 비연속 배양을 실시하였다. 2 l 비연속 발효는 48시간동안 매 6시간마다 관찰하였다. 세포건조중량은 글루코오스를 소모하면서 점진적으로 증가하였고, 대장균 SGSB03은 49.9 g 글루코오스가 소모된 48시간 후에 최고 $15.7 \text{ g/l}_{\text{culture}}$ 를 나타내었고, $0.31 \text{ g/g}_{\text{glucose}}$ 효율로 meso-2,3-부탄다이올을 생산하였다(도 5 및 도 6).

[0096] 대장균 SGSB03의 글리세롤 원액을 탄소원으로 하는 경우 meso-2,3-부탄다이올로의 생물전환을 확인하기 위해, 최적 조건(호기 조건, 6% 탄소원, 37°C 및 초기 pH 7)에서 2 l 비연속식 발효를 실시하였다. 2 l 비연속식 발효를 48시간동안 매 6시간마다 관찰하였다. 대장균 SGSB03은 $0.21 \text{ g/g}_{\text{crude glycerol}}$ 의 meso-2,3-부탄다이올을 생산하였고, 최고치는 48시간에 $6.9 \text{ g/l}_{\text{culture}}$ 이다(도 5). 이러한 결과는 글리세롤 원액이 대장균 SGSB03의 탄소원으로써 적합함을 말해준다. 그러나, 글리세롤은 글루코오스 및 다른 6탄당과 비교하여 낮은 에너지 값을 갖는다.^{16,17} 따라서, 글루코오스와 비교하여 글리세롤은 피루브산-유래 생화학 물질의 낮은 효율을 야기한다.²¹ 유전 공학 또는 배양 조건의 최적화는 대장균 SGSB03이 meso-2,3-부탄다이올을 고생산하는데 필수적일 것이다.

[0097] meso-, (R,R)- 및 (S,S)-2,3-부탄다이올 입체 이성체를 분석하기 위해, HPLC를 사용하였다(도 6). 입체 이성체 (R,R)-2,3-부탄다이올 및 (S,S)-2,3-부탄다이올의 HPLC 피크는 겹쳐지나, 이는 문제가 되지 않는다. (R,R)- 또는 (S,S)-2,3-부탄다이올은 48시간동안 검출되지 않았다(도 6).

표 3

조건	세포건조중량	2,3-BDO의 최대생산량	2,3-BDO의 부피생산성	락테이트	아세토인
	(g)	(g/L)	(g/L h)	(g/L)	(g/L)
탄소원 (60 g/L)	글루코오스	5.12 ± 0.07	14.3 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.46 ± 0.08
	프락토오스	7.30 ± 0.02	2.27 ± 0.04	0.03 ± 0.02	1.60 ± 0.05
	아라비노오스	5.00 ± 0.01	1.36 ± 0.01	0.01 ± 0.03	1.99 ± 0.02
	자일로오스	5.30 ± 0.02	1.85 ± 0.01	0.03 ± 0.01	1.70 ± 0.01
	수크로오스	3.10 ± 0.05	ND	ND	ND
글루코오스 농도 (g/L)	20	3.27 ± 0.04	6.57 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.55 ± 0.09
	40	3.78 ± 0.02	8.93 ± 0.09	0.16 ± 0.06	0.03 ± 0.02
	60	5.12 ± 0.07	14.3 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.46 ± 0.08
	80	2.42 ± 0.08	13.7 ± 0.09	0.25 ± 0.04	0.02 ± 0.01
온도 (°C)	25	5.35 ± 0.05	3.10 ± 0.07	0.24 ± 0.03	0.44 ± 0.09
	30	6.45 ± 0.08	8.75 ± 0.09	0.49 ± 0.05	0.60 ± 0.09
	37	5.12 ± 0.07	14.3 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.46 ± 0.08
pH	5	3.77 ± 0.08	6.79 ± 0.05	0.13 ± 0.05	1.45 ± 0.02
	6	3.96 ± 0.05	8.95 ± 0.08	0.17 ± 0.05	1.65 ± 0.04
	7	5.12 ± 0.07	14.3 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.46 ± 0.08
대기	호기	5.12 ± 0.07	14.3 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.46 ± 0.08
	혐기	2.57 ± 0.03	2.72 ± 0.02	0.05 ± 0.02	2.22 ± 0.07

[0098]

[0099] 상기 표 3의 세포건조중량은 배양 48시간의 세포건조중량이며, 'ND'는 검출되지 않음(Not detected)를 나타낸다

다. 혐기성 배양에서는 아세테이트가 3.62 ± 0.04 g/l로 상당히 검출되었다.

[0100] **참고**

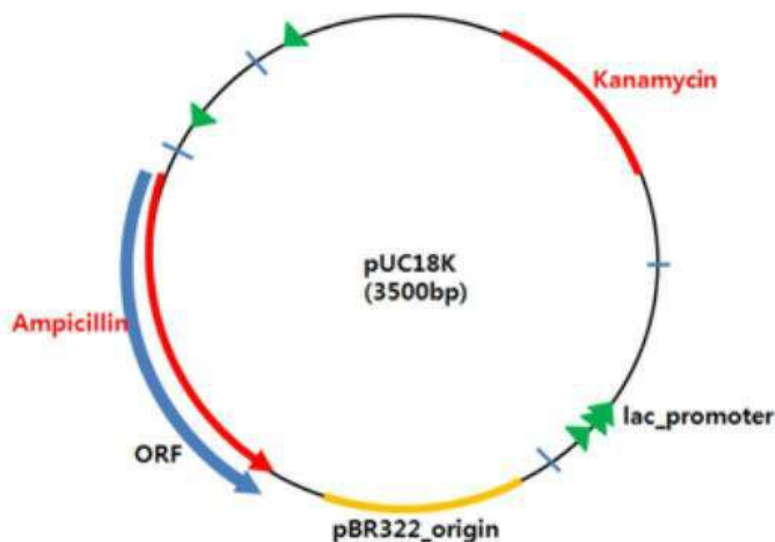
- [0101] 1. Garg, S. K., & Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol. A review. *Bioresource Technology*, 51, 103-109.
- [0102] 2. Kaloyan, P., & Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 659-665.
- [0103] 3. Sadahar, U. U., Okajima, Y., Mimura, A., Kanai, H., Kobayashi, T., & Kudo, T. (1997). Sequence analysis of the gene for and characterization of D-acetoin forming meso-2,3-butanediol dehydrogenase of *Klebsiella pneumonia* expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83 (1), 32-37.
- [0104] 4. Yan, Y., Lee, C.-C., & Liao, J. C. (2009). Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7, 3914-3917.
- [0105] 5. Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 10-18.
- [0106] 6. Blomqvist, K., Nicola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M.-L., Airaksien, U., Strabe, K. B., Knowles, J. C., & Penttila, M. E. (1993). Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 175 (5), 1392-1404.
- [0107] 7. Xiao-Jun, J., Huang, H., Zhu, J. -G., Ren, Lu-Jing, Nie, Z. -K., Jun, Du, & Li, S. (2009). Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde hydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1751-1758.
- [0108] 8. Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.
- [0109] 9. Ledingham, G. A., & Neish, A. C. (1954). Fermentative production of 2,3-butanediol. In L. A. Underkofler & R. J. Hickey (Eds.), *Industrial fermentations* (Vol. 2, pp. 27-93). New York: Chemical Publishing.
- [0110] 10. Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin metabolism in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(2), 127-140.
- [0111] 11. Sadahar, U. U., Okajima, Y., Mimura, A., Kanai, H., Kobayashi, T., & Kudo, T. (1997). Molecular generation of an *Escherichia coli* strain producing only the meso-isomer of 2,3-butanediol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(3), 185-189.
- [0112] 12. Wayne, L. N. (2008). The *Bacillus subtilis* ydjL (부탄다이올hA) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6832-6838.
- [0113] 13. Celinska, E., & Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol. current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27, 715-725.
- [0114] 14. Sadahar, U. U., Masuda, H., & Muraki, H. (1983). Laboratory-scale production of 2,3-butanediol isomers (D(-), L(+), and meso) by bacterial fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 61, 253-259.
- [0115] 15. Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 321-326.
- [0116] 16. Yang, G., Tian, J., & Li, J. (2007). Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of

Klebsiella oxytoca under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1017-1024.

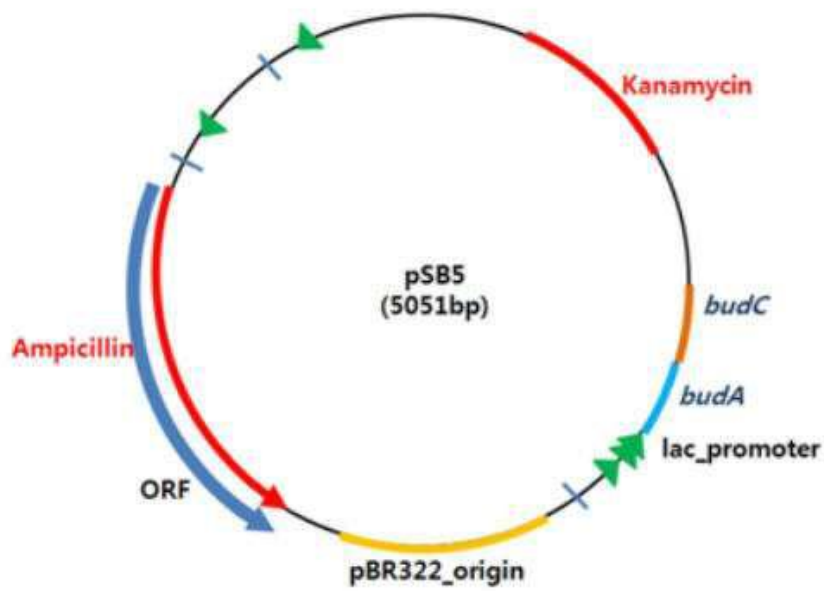
- [0117] 17. Pauloda Silva, G., Mack, M., & Contiero, J.(2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30-39.
- [0118] 18. Li, L., Wang, Y., Zhang, L., Ma, C., Wang, A., Tao, F., & Xu, P.(2011). Biocatalytic production of (2S,3S)-2,3-butanediol from diacetyl using whole cells of engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.097.
- [0119] 19. Ui, S., Takusangawa, Y., Sato, T., Ohtsuki, T., Mimura, A., Ohkuma, M., & Kudo, T.(2004). Production of L-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 533-537.
- [0120] 20. Li, Z., Jian, J., Wei, X., Shen, X., & Chen, G.(2010). Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2001-2009.
- [0121] 21. Zhu, Y., Eiteman, M. A., Lee, S. A., & Altman, E.(2010). Conversion of glycerol to pyruvate by *Escherichia coli* using acetate- and acetate/glucose-limited fed-batch processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 307-312.
- [0122] 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

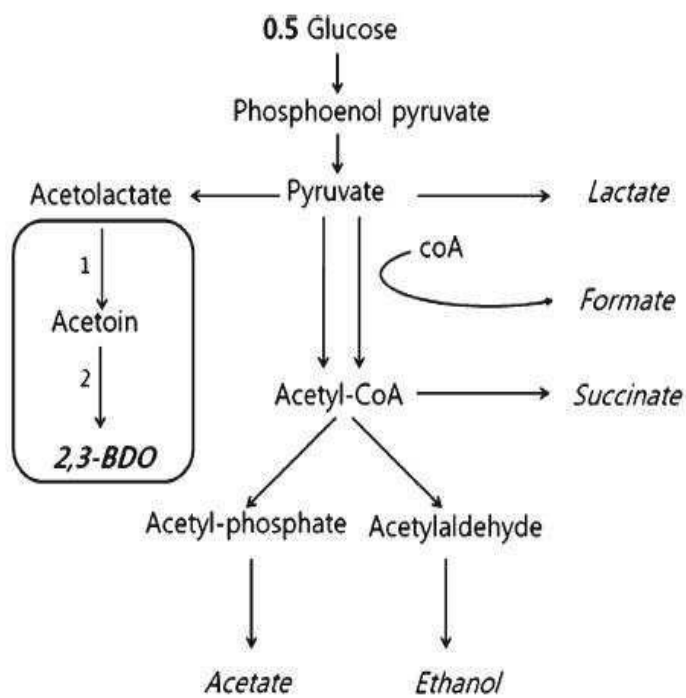
도면1



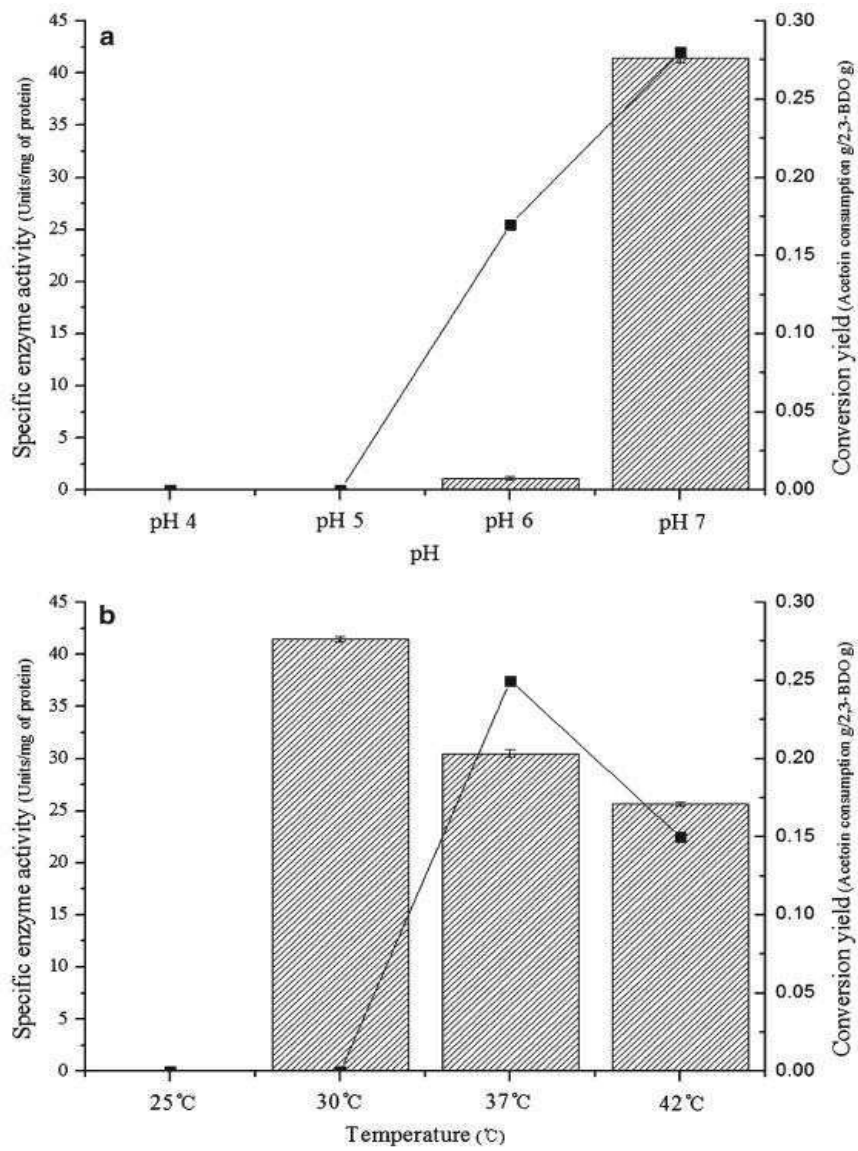
도면2



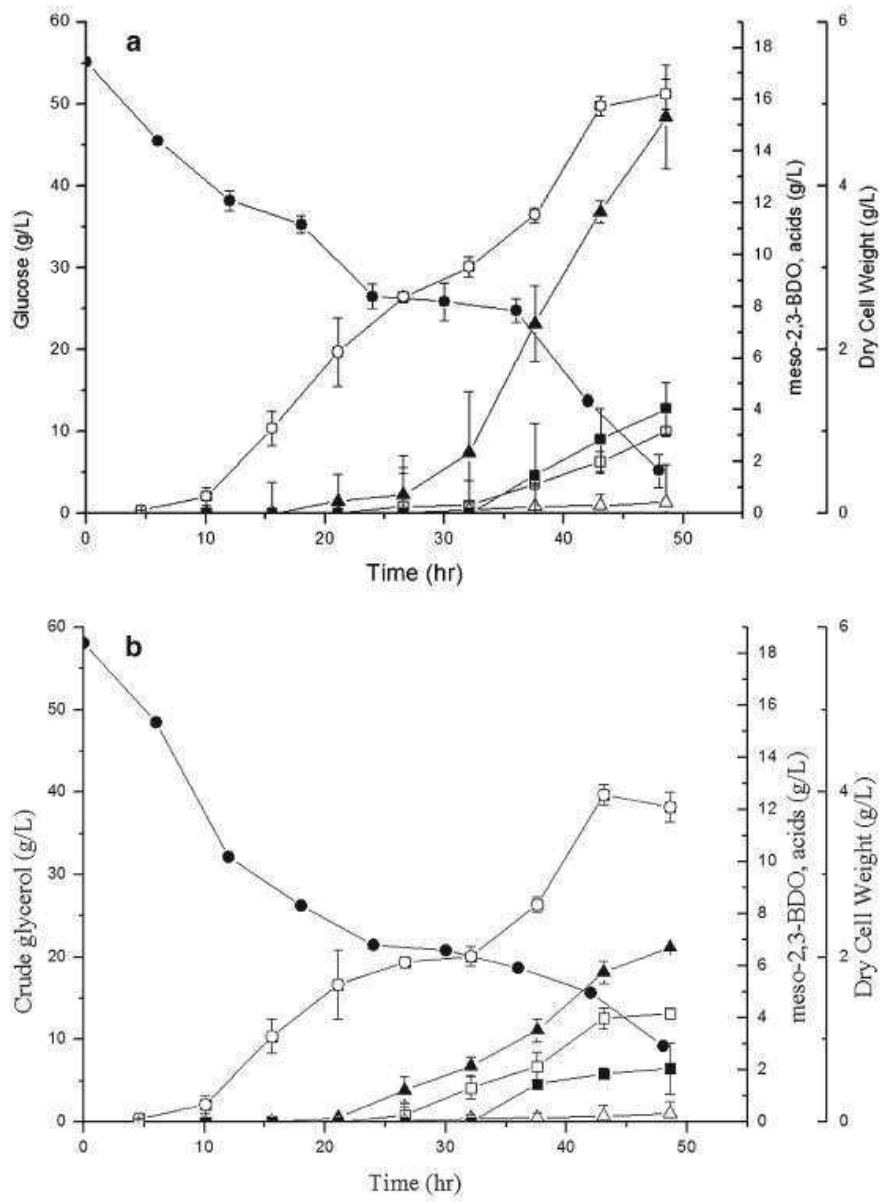
도면3



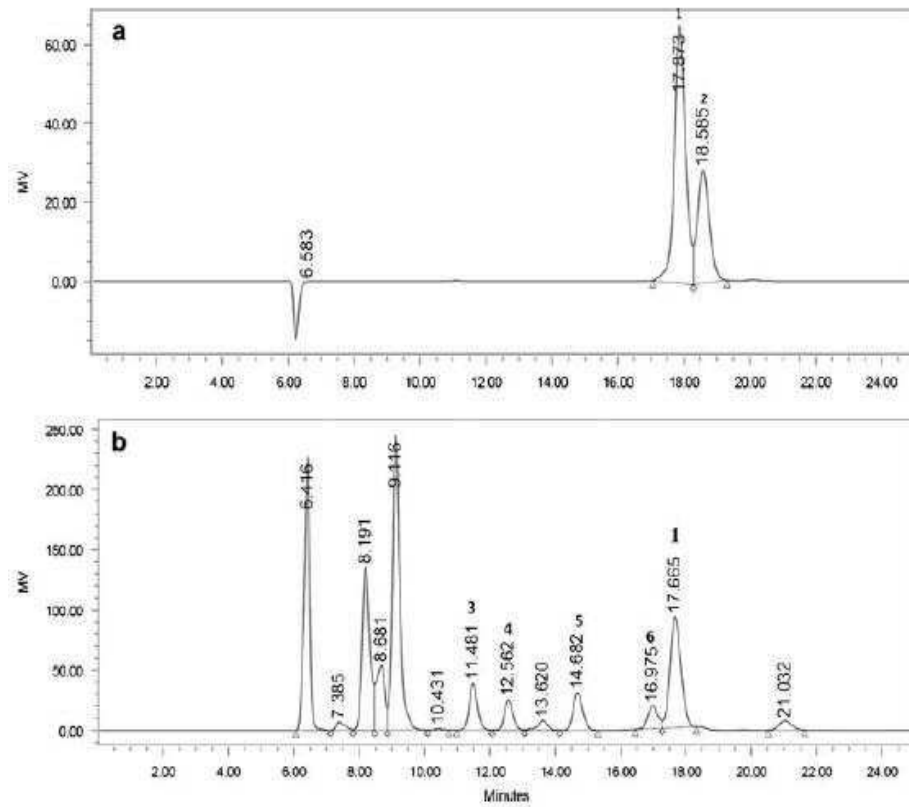
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Method for Preparing of meso-2,3-butanediol using Industrial Carbon Source
- <130> PN120260
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 780
- <212> DNA
- <213> Klebsiella pneumoniae budA
- <400> 1

```

atgaatcatt ctgtcgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaccct gcgggcgttt      60
tccgcgcagc atcccagag cgtgctctat cagacatgc tcattgagcgc cctgctgagc      120
ggggtttacg aaggcagcac caccatgcc gacctgctga aacacggcga tticggcctc      180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atgccttca gcagtcaggt ctatcagctg      240
  
```

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg	300
acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc ttgaccatc cggtagccg ccagcagctg	360
cacgaggtga tcgaccagca aatccccctc gacaacctgt tctgcgcct gcgcacgac	420
ggccatttcc gccatgccca taccgcacc gtgccgcgcc agacgccgc gtaccgggcg	480
atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttccgcttta accagcgca aggggtgctg	540
gtcggttcc ggaccccgca gcatagcag gggatcaacg tcgccgggta tcacgagcat	600
tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggg cacctgtgg attaccagct cgaccacggg	660
gtgctgacct tcggcgaat tcacaagctg atgatgacc tgcccgcga cagcgcttc	720
ctgcaggcta atctgatcc cgataatctc gatgcccca tccgttccgt agaaagttaa	780
	780
<210> 2	
<211> 771	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae budC	
<400> 2	
atgaaaaag tcgcacttgt taccggcgcc ggccaggga ttggtaaagc tatgccctt	60
cgtctggtga aggatggatt tgccgtggcc attgccgatt ataacgacgc caccgcaaa	120
gcggtcgcct ccgaaatcaa ccagccggc ggccgcgcca tggcggtgaa agtggatgtt	180
tctgaccgcg accaggtatt tgccgccgtc gaacaggcg gcaaacgct gggcggttc	240
gacgtcatcg tcaacaacgc cggcgtggcg ccatccacgc cgatcgagtc cattacccg	300
gagattgtcg acaaagtcta caacatcaac gtcaaagggg tgatctgggg catccaggca	360
gcggtcgagg ctttaagaa agagggtcac ggcgggaaaa tcatcaacgc ctgttcccag	420
gccggccacg tcggcaacce ggagctggcg gtatatagct cgagtaaatt cgcggtacgc	480
ggcttaacce agaccgccg tcgcgacctc gcgccgtgg gcatcacgt caacggctac	540
tgcccgggga ttgtcaaac gccgatgtgg gccgaaattg accgccaggt gtccgaagcc	600
gccggtaaac cgctgggcta cggtagccg gagttcgcca aacgcatcac cctcgccgc	660
ctgtccgagc cggaagatgt gcgcgctgc gtctctatc ttgccagccc ggattctgat	720
tatatgaccg gtcagtcatt gctgatcgac ggcgcatgg tgtttaacta a	771