

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0133616 (43) 공개일자 2013년12월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/88 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01) C12R 1/22 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0057013 (22) 출원일자 2012년05월29일 심사청구일자 2012년05월29일		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수,기자촌 아파트 201-1601호 이수진 서울특별시 마포구 염리동 삼성래미안아파트 105 동 1504호 김보림 서울특별시 금천구 시흥동 209번지 현대아파트 507호 (74) 대리인 양부현

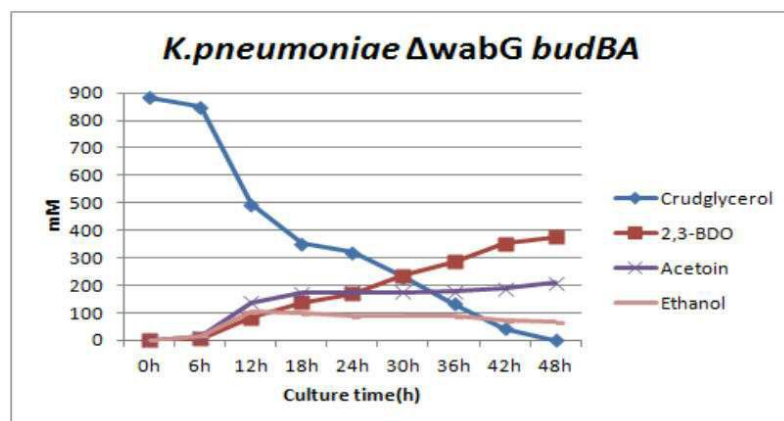
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **형질전환 크렙시엘라 뉴모니아를 이용하여 산업용 탄소원으로부터 2,3-부탄다이올의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올의 제조방법에 관한 것으로, 보아 상세하게는 (a) 크렙시엘라의 wabG를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 불활성화 하는 단계; (b) 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; (c) 상기 재조합 벡터를 상기 크렙시엘라에 도입하여 형질전환 크렙시엘라를 제조하는 단계; (d) 상기 형질전환 크렙시엘라를 배양 배지에서 배양하여 2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및 (e) 상기 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계를 포함하는 형질전환 크렙시엘라(*Klebsiella*)를 이용한 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 종래의 기술보다 경제적인 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 2,3-부탄다이올을 제조할 수 있다.

대표도 - 도12



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

다음의 단계를 포함하는 형질전환 크렙시엘라(*Klebsiella*)를 이용한 2,3-부탄다이올의 제조방법:

- (a) 크렙시엘라의 wabG를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 불활성화 하는 단계;
- (b) 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (c) 상기 재조합 벡터를 상기 크렙시엘라에 도입하여 형질전환 크렙시엘라를 제조하는 단계.
- (d) 상기 형질전환 크렙시엘라를 배양 배지에서 배양하여 2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및
- (e) 상기 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 크렙시엘라는 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 크렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 wabG를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이고, 단계 (b)의 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열이며, 아세토락테이트 신타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 크렙시엘라는 캡슐 폴리사카라이드(capsule polysaccharide)가 없는 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 크렙시엘라는 비병원성인 것을 특징으로 하는 변이 균주.

청구항 6

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

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 배양 배지는 탄소원, 질소원 및 에너지를 포함하며, 상기 탄소원으로 카사바, 당밀 및 글리세롤로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 탄소원을 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 배양 배지는 글리세롤을 10-200 g/l로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

상기 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 2,3-부탄다이올.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 형질전환 크렙시엘라 뉴모니아를 이용하여 산업용 탄소원으로부터 2,3-부탄다이올의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[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. 예컨대, 2,3-부탄다이올(butanediol; BDO)는 화학 물질의 공급원료, 액체 연료 및 생합성 기본요소로 다양하게 사용되는 경제적으로 중요한 원료이다. 탈수반응은 2,3-BDO를 액체 연료의 첨가제로 사용되는 메틸에틸 케톤으로 전환할 수 있고, 2,3-BDO는 합성 고무의 중요 기본요소인 1,3-부타디엔(butadiene)으로 전환할 수 있다. 산업적으로 이용할 수 있는 2,3-BDO의 생물학적 제조는 애로박터 애로제네스(*Aerobacter aerogenes*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 및 바실러스 폴리믹사(*Bacillus plymyxa*)를 포함하는 몇몇 미생물의 2,3-BDO 생합성 경로를 통해 달성되어왔다. 크렙시엘라는 폭넓은 기질 스펙트럼 및 배양 적응성을 갖으며, 2,3-BDO의 효율적으로 생산하는 것으로 보고된다. 크렙시엘라는 2,3-BDO 생합성을 위한 유망한 미생물이지만, 크렙시엘라 독성, 낮은 생산성, 이성체 분리 및 글루코오스와 같은 고가의 탄소원 요구와 같은 단점이 있다.

[0003] 하지만 크렙시엘라 뉴모니아는 기회감염성 특성을 가지고 있으며, 병원 감염의 주요 원인 균이다. 호흡기 감염을 통해 폐렴을 유발하고 균혈증, 요로감염, 상처감염을 일으킨다. 이러한 여러 가지 질병을 일으키는 크렙시엘라의 병원성을 제거한다면 2,3-부탄다이올 생산에 있어서 안전하게 이용할 수 있을 것이다. 크렙시엘라가 가지는 병원성의 주원인은 캡슐 폴리사카라이드(Capsulopolysaccharide), 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide), 편모(Fili)등이 있다. 이 중 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide)는 외막의 구성 성분 중에 하나이고 내독소를 가지며 여러 가지 화학적인 공격으로부터 크렙시엘라를 보호 하는 역할을 한다.

[0004] 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

[0005] 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 생성하는 크렙시엘라의 *wabG* 유전자를 불활성화하고, 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현

벡터를 도입한 형질전환 크렙시엘라를 개발하고, 산업용 탄소원을 이용하여 2,3-부탄다이올을 제조함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 2,3-부탄다이올을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 형질전환 크렙시엘라(*Klebsiella*)를 이용한 2,3-부탄다이올의 제조방법을 제공한다:

[0009] (a) 크렙시엘라의 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 불활성화 하는 단계;

[0010] (b) 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[0011] (c) 상기 재조합 벡터를 상기 크렙시엘라에 도입하여 형질전환 크렙시엘라를 제조하는 단계.

[0012] (d) 상기 형질전환 크렙시엘라를 배양 배지에서 배양하여 2,3-부탄다이올을 제조하는 단계; 및

[0013] (e) 상기 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

[0014] 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 생성하는 크렙시엘라의 *wabG* 유전자를 불활성화하고, 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현 벡터를 도입한 형질전환 크렙시엘라를 개발하고, 산업용 탄소원을 이용하여 2,3-부탄다이올을 제조하였다.

[0015] 본 발명의 2,3-부탄다이올 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0016] 단계 (a): *wabG*의 불활성화

[0017] 먼저, 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종의 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 불활성화한다. 상기 *wabG*는 크렙시엘라의 외막을 구성하는 성분 중 하나인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)의 코어(core) 생합성에 관련된다.

[0018] 불활성화 대상이 되는 *wabG*는 다양한 크렙시엘라에서 발견되고 동정되었다. 하기의 실시예에서는 서열목록 제 1서열의 크렙시엘라 뉴모니에의 *wabG*가 예시되어 있으나, 이외에도 다양한 *wabG*가 본 발명에 포함된다. 예를 들어, GenBank 접근번호 JN377744 (*Klebsiella pneumoniae*), 접근번호 NC_013508(*Edwardsiella tarda*), 접근번호 A6RW62(*Botryotinia fuckeliana*), 접근번호 NC_014378(*Acetohalobium arabaticum*) 및 접근번호 JH417870(*Yokenella regensburgei*)에 개시된 *wabG*가 본 발명에서 불활성화 대상이 될 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “불활성화(inactivation)”란 유전자의 전사 또는 해독, 유전자 산물의 활성의 손상(impairment)을 초래하는 *wabG*의 지놈 열상에서의 변형(modifications)을 의미한다. 이런 유전자 변형은 *wabG* 코딩 서열의 불활성화뿐만 아니라 이의 프로모터의 불활성화도 포함될 수 있다. 효모 지놈 상에서 목적인 유전자만의 특이적 불활성화는 코딩하는 유전자의 전체 또는 하나 이상의 부분 영역에서 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 돌연변이시킴으로서 가능하다. 예를 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 이형 서열(heterogenous sequence)의 삽입은 유전자의 절단(truncation), 넌센스 돌연변이(nonsense mutation), 프레임쉬프트 돌연변이(frameshift mutation), 미스센스 돌연변이(missense mutation) 등을 초래할 수 있다. 이러한 유전자의 특이적 불활성화는 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “결실(deletion)”은 *wabG*의 기능을 상실케 하는 모든 결실

변이를 포함하는 의미를 갖는다. 예를 들어, *wabG* 유전자의 결실은 *wabG* 코딩 서열의 부분 결실 또는 전체 결실을 모두 포함한다.

- [0021] 이러한 *wabG* 코딩 서열의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발(mutagenesis) 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예컨대, *wabG* 코딩 서열의 결실은 PCR 돌연변이 유발법 및 카세트 돌연변이 유발법으로 실시할 수 있다 (Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).
- [0022] 바람직하게는, 상기 크렙시엘라는 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 크렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*), 보다 바람직하게는, 크렙시엘라 뉴모니에 또는 크렙시엘라 옥시토카이고, 보다 더 바람직하게는, 크렙시엘라 뉴모니에이다.
- [0023] 바람직하게는, *wabG* 유전자를 불활성화한 크렙시엘라 변이 균주는 캡슐 폴리사카라이드(capsule polysaccharide)가 없다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 *wabG* 유전자가 결실된 크렙시엘라 변이 균주는 크렙시엘라 야생형과 비교하여, 군집 형태가 균일하지 않고 캡슐 폴리사카라이드가 결실된다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라는 비병원성이다.
- [0026] 단계 (b): 제조합 벡터의 제조
- [0027] 본 발명의 meso-2,3-부탄다이올을 제조하기 위한 두 번째 단계로, 크렙시엘라의 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 제조합 벡터를 제조한다.
- [0028] 본 발명에서 크렙시엘라에 도입하고자 하는 효소는 아세토락테이트 디카르복실라아제 및 아세토락테이트 신타아제이다. 바람직하게는, 상기 아세토락테이트 디카르복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열이고, 상기 아세토락테이트 신타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열이다.
- [0029] 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 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 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 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 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, blasm, 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.
- [0030] 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.
- [0031] 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.

- [0032] 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.
- [0033] 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, *tac* 프로모터, *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.
- [0034] 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 개량하여 사용한다.
- [0035] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 *lac* 프로모터 서열, 아세토락테이트 디카복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아세토락테이트 신타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동적으로(operatively) 결합된다.
- [0037] 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.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용된 선택표지는 카나마이신이다.
- [0039] 본 발명의 벡터는 아세토락테이트 디카복실라아제 유전자 및 아세토락테이트 신타아제 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 pUC18에 카나마이신 내성 유전자를 도입하여 사용하였다.
- [0040] 단계 (c): 형질전환 크렙시엘라의 제조
- [0041] 이어, 상기 단계 (a)의 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라에 상기 단계 (b)의 재조합 벡터를 도입하여 형질전환 크렙시엘라를 제조한다.
- [0042] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. 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.
- [0043] 본 발명의 아세토락테이트 디카복실라아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 알코올 디히드로제나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환 될 수 있는 크렙시엘라는, *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라 뉴모니에, *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라 옥시토카, *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라 그레놀로마티스 또는 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 불활성화된 크렙시엘라 테리제나를 이용할 수 있으며, 이에 한정되지

않는다.

[0044] 단계 (d): 2,3-부탄다이올의 제조

[0045] 본 발명의 형질전환 크렙시엘라를 배양배지에서 배양하여 2,3-부탄다이올을 제조한다.

[0046] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 상기 배양배지는 탄소원, 질소원 및 에너지를 포함하며, 상기 탄소원은 카사바(cassava), 당밀(molasses) 및 글리세롤로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 탄소원이다.

[0047] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배양배지는 탄소원으로 카사바, 당밀 또는 글리세롤을 포함하고, 보다 바람직하게는, 10-200 g/l 탄소원을 포함한다.. 크렙시엘라 뉴모니에는 대사 경로가 잘 발달된 균주로 혐기성 상태 및 호기성 상태일 때 각각 다른 경로가 활성화된다. 혐기성 상태에서 배양할 때는 글리세롤로부터 3-HPA(3-Hydroxypropanaldehyde)를 거쳐 1,3-PDO(1,3-propanediol)를 주로 생산하며, 호기성 상태에서는 피루브산을 거쳐 2,3-BDO를 주로 생산한다. 이것은 글루코오스를 탄소원으로 배양했을 때, 1,3-PDO를 거의 생산하지 않는 것과 가장 크게 구분되는 차이점이라 할 수 있다.

[0048] 단계 (e): 2,3-부탄다이올의 수득

[0049] 마지막으로, 본 발명의 형질전환 대장균을 배양하여 제조된 *meso*-2,3-부탄다이올을 수득한다.

[0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 *meso*-부탄다이올 제조방법을 통해 제조되는 2,3-부탄다이올 수율은 0.2-0.4이다.

[0051] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 제조된 2,3-부탄다이올을 제공한다.

[0052] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0054] (a) 본 발명은 비병원성 크렙시엘라(*Klebsiella*)를 제조하고, 아세트락테이트 카르복실라아제 및 아세트락테이트 신타아제를 크렙시엘라에 도입하여 형질전환 크렙시엘라에 의한 *meso*-2,3-부탄다이올의 생산을 가능하게 하였다.

[0055] (b) 본 발명의 재조합 대장균은 산업용 탄소원을 포함하는 배양배지에 배양하여 보다 경제적인 2,3-부탄다이올의 생산이 가능하며, 비병원성 크렙시엘라를 통해 보다 안전하게 이용할 수 있다.

[0056] (c) 본 발명은 화학공업에 유용한 기초가 될 플랫폼용 화합물인 2,3-부탄다이올을 생물학적 제조방법을 통해 대량 생산하는 것은 친환경적이며 경제적으로도 큰 강점을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 *wabG* 유전자의 제거 과정을 나타낸 도식도이다.

도 2는 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242의 *wabG* 유전자가 제거된 것을 전기영동을 통해 확인한 결과이다.

도 3은 크렙시엘라의 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol; 2,3-BDO) 생산경로를 나타낸다.

도 4는 크렙시엘라의 기질에 따른 대사 경로를 나타낸다.

도 5는 pUC18 벡터에 카나마이신 유전자를 도입한 벡터 지도를 나타낸다. 카나마이신 유전자가 도입된 벡터를 pUC18K로 명명하였다.

도 6은 pUK18C 벡터에 *budB* 및 *budA* 유전자를 도입한 재조합 벡터의 지도를 나타낸다. pSB4로 명명하였다.

도 7은 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*의 글리세롤 원액을 탄소원으로 첨가하여 비연속식 배양한 결과를 보여준다.

도 8은 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*의 글리세롤 원액을 탄소원으로 첨가하여 비연속식 배양한 결과를 보여준다.

도 9은 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*의 당밀을 탄소원으로 첨가하여 비연속식 배양한 결과를 보여준다.

도 10은 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*의 카바사를 탄소원으로 첨가하여 비연속식 배양한 결과를 보여준다.

도 11은 80 g/L 글리세롤 원액을 탄소원으로 첨가하여 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*를 비연속식 배양한 발효 결과를 보여준다.

도 12은 80 g/L 글리세롤 원액을 탄소원으로 첨가하여 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*를 비연속식 배양한 발효 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 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.

[0059] 실시예 1: *wabG* 유전자 결실

[0060] 선형 유전자 제작

[0061] 양쪽에 34 bp(base pair)의 FRT(Flip-Recombinase Targets) 염기서열 및 20 bp의 클로람페니콜의 염기서열을 갖는 프라이머(표 1) 및 클로람페니콜 저항성 염기서열을 갖는 pKOV 플라스미드를 주형으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하여 FRT-클로람페니콜-FRT를 갖는 카세트(FCF)를 제작하였다. 클로람페니콜은 상동재조합이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위한 항생제저항성 단백질이고, FRT는 목표 유전자를 불활성화(knock-out) 시킨 후 클로람페니콜 유전자를 결실 해주는 역할을 한다(도 1). FCF를 제작하기 위한 중합효소연쇄반응 조건은 먼저 95℃에서 5분 반응 후 95℃ 30초, 66℃에서 55초 및 72℃에서 60초 반응을 25회 반복 하였다. 891 bp의 염기서열을 갖는 FCF를 T-벡터에 삽입 후 *wabG*의 시작 부분과 끝 부분에 상보적인 각각 50 bp 염기서열과, FRT와 상동 하는 염기서열을 가진 프라이머(표 1)로 중합효소 연쇄 반응을 하여 *wabG* 유전자 결실에 필요한 선형 유전자(WFCFW)를 제작하였다. 반응 조건은 95℃에서 5분 반응 후 95℃에서 30초, 65.2℃에서 60초 및 72℃에서 60초 반응을 25번 반복하였다. 얻어진 WFCFW는 991 bp의 염기서열을 갖는다.

표 1

프라이머	서열
FCF 정방향	GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTCTGAGACGTTGATCGGCACGT
FCF 역방향	GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAGTTCATTCAGGCGTAGCACCAGGC
WFCFW 정방향 (2242)	ATGAGTAAATTCAGGCTGGCTCTGGTGCGGCAGAAGTACCGCCCGACGGGAAGTTCCTATTCTCTAGAA
WFCFW 역방향 (2242)	TTAATTCACCAGATCCTGATAAAGAGAAAGCAGCTGGGTTGAGAGTCGCTGAAGTTCCTATACTTTCTAG
WFCFW 정방향 (1686, 43863)	ATGAGTAAATTCAGGCTGGCTCTGGTACGCCAGAAGTATCGCCCGACGGGAAGTTCCTATTCTCTAGAA
WFCFW 역방향 (1686, 43863)	TTATTTACCAAATCCTGATAGAGGGAGAGCAGCTGCGCCGAGAGACGTTGAAGTTCCTATACTTTCTAG

[0063] 상동재조합의 효율을 높이기 위한 레드 람다(Red lambda) 재조합

[0064] 세포 내부로 유입된 선형 유전자의 분해를 방지하고 상동재조합 효율을 높여주는 알파, 베타 및 감마 단백질을 발현하는 플라스미드인 pRedET를 사용하였다(Daiguan Yu, Hilary M. Ellis, E-Chiang Lee, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, and Donald L. Court. PNAS May 23, 2000 vol. 97 no. 11 5978-5983). 이러한 pRedET 플

라스미드를 이용하여 돌연변이를 제조하기 위해 야생 크렙시엘라에 pRedET를 형질전환 하였다. 이를 위해서 크렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*, KCTC 2242)를 37℃ 및 광학 밀도(600 nm)에서 0.2-0.3이 될 때까지 배양하였고, 액체 LB 배지의 총량에 0.7 mM이 되도록 에틸렌디아민사아세트산(EDTA)을 첨가하였다. 에틸렌디아민사아세트산을 첨가할 경우, 전기천공법 효율이 높아지게 된다(Fournet-Fayard, S., B. joly, and C.Forestier J. Microbiol Meth, 1995. 24: p.49-54). 배양한 크렙시엘라 뉴모니에를 10% 글리세롤이 포함되어 있는 차가운 멸균수로 3번 세척하여 불순물을 제거하고 마지막 세척은 40 μ l의 차가운 멸균수에 담겨 있는 크렙시엘라 뉴모니에에 150 ng pRedET를 혼합하여 냉각된 전기천공법용 큐벳에 넣은 후 1.8 kV, 5 msec의 펄스를 주었다. 30℃에서 한 시간 동안 배양 후 테트라사이클린(3 μ g/ml)을 포함하는 고체 LB 배지에 도말하여 30℃에서 16시간 동안 배양하였다. 30℃의 테트라사이클린을 포함하는 LB 배지에 배양하는 이유는 pRedET 플라스미드가 테트라사이클린 저항성을 갖으며 30℃에서 복제되기 때문이다. 다음으로 알파, 베타 및 감마 단백질을 발현하기 위해 pRedET 플라스미드로 형질전환된 크렙시엘라를 액체 LB 배지에 넣고 600 nm 광학 밀도가 0.2-0.3 값이 될 때까지 배양하였다. 이때 액체 LB 배지의 총량에 0.5%에 해당하는 L-아라비노스(L-arabinose)를 첨가하여 주었다. 그 후 pRedET로 형질전환 때와 마찬가지로의 과정으로 150 ng의 WFCFW와 혼합한 후 상기 언급한 조건으로 전기 천공법을 실시하였다. 37℃에서 3시간 동안 배양 후 클로람페니콜(20 μ g/ml)을 포함하는 고체 LB 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 클로람페니콜 배지에서 자란 크렙시엘라 뉴모니에를 다시 클로람페니콜(20 μ g/ml)을 포함하는 액체 배지에 배양 후 지노믹 DNA 추출 키트를 사용하여 지노믹 DNA 추출하고 중합효소 연쇄 반응을 통해 돌연변이를 확인하였다.

[0065] FRT-클로람페니콜-FRT의 결실

[0066] 크렙시엘라 뉴모니에 돌연변이에 삽입되어있는 FRT-클로람페니콜-FRT의 결실을 위해 플립과아제 재조합 효소를 발현 하는 707-Flpe 플라스미드(Thomas Schlake and Jurgen Bode' Biochemistry 1994, 33, 12746-12751)를 사용하였다. 크렙시엘라 뉴모니에에 pRedET을 형질 전환했던 방법과 동일하게 707-Flpe 플라스미드 및 WFCFW가 삽입 된 크렙시엘라 뉴모니에를 형질전환 하고 30℃에서 한 시간 배양 후 테트라사이클린(3 μ g/ml)을 포함하는 고체 배지에 도말 하였다. 707-Flpe는 30℃에서 복제가 되기 때문에 30℃에서 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 자란 크렙시엘라 뉴모니에 돌연변이의 균집을 따서 항생제가 첨가되지 않은 1 ml 액체 LB 배지에 접종 후 3시간 동안 배양하였다. 배양한 크렙시엘라 뉴모니에 돌연변이를 다시 37℃에서 16시간 동안 배양 하는데 이는 플립과아제 재조합 효소가 37℃에서 발현이 되기 때문이다. 배양한 크렙시엘라 뉴모니에 돌연변이의 일부를 클로람페니콜이 들어있는 액체 LB 배지에 배양 후 자라지 않는 것을 확인하고 지노믹 DNA 추출 키트를 이용하여 지노믹 DNA를 추출하였다. 중합효소연쇄반응을 통해 클로람페니콜 저항성 유전자가 결실 되었는지 확인 하였다(도 2).

[0067] 실시예 2: *budA* 유전자 및 *budB* 유전자 도입

[0068] 실시예 1에 의해 제조된 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*의 발효를 통해 2,3-부탄다이올(BDO) 생산성이 가장 뛰어난 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*를 선정하였다. 표적 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 1에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자들은 *budA*는 780 bp, *budB*는 1536bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건[10 mM Tris-HCl(pH9.0), 50 mM KCl, 0.1% 트리톤 X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)] 하에서 95℃/5분(변성), 66℃/1분(어닐링), 72℃/1분(신장)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 66℃/30초(어닐링) 및 72℃/1분(신장)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(변성), 66℃/1분(어닐링) 및 72℃/5분(신장) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-vector 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa, 일본)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA* 및 pGEM-T::*budB*, pGEM-T::*budA::budB*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균 (*E. coli* DH5a 컴피턴트 세포, RBS)에서 형질 전환하여 형질전환 균주를 제조하였다. 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*, pGEM-T::*budB* 및 pGEM-T::*budA::budB*를 대장균과 크렙시엘라의 서틀 벡터인 pUC18K를 표 1에 열거된 제한효소들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 여기서 사용한 pUC18K는 기존의 pET28a 벡터에 카나마이신에 저항성을 갖는 유전자를 클로닝한 후 pUC18 벡터에 삽입하여 제작하였다. 위의 열거한 제한 효소들로 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUC18K 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16℃에서 반응, 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된

유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균 (*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0069] 증폭된 산물을 표 1에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUC18K 벡터에 도입하여 pUC18K::*budA*::*budB* 제조하였다. *budB*는 피루브산을 아세토락테이트로 전환시키는 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)를 코딩하며, *budA*는 아세토락테이트를 아세트인으로 전환시키는 아세토락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)를 코딩한다(도 3 내지 도 6).

[0070] 실시예 3: 탄소원별 2,3-BDO 생산에 관한 생리학적 검토

[0071] 현재 실험실에서 많이 사용하는 탄소원인 글루코오스(glucose)는 2,3-BDO(2,3-butanediol)을 생산하기에 고효율 기질이나 단가가 높아 경제성 측면에선 최적의 탄소원이라고 할 수 없다. 산업용 탄소원으로 사용하기 위해서는 단가가 저렴하면서도 높은 생산성이 가능해야 한다. 산업용으로 많이 사용되는 탄소원으로 첫 번째는 글리세롤(glycerol)을 꼽을 수 있는데, 특히 글리세롤 원액(crude glycerol)의 경우에는 산업용 폐기물로 글루코오스는 물론이고 정제된 글리세롤보다도 저렴해 각광받는 탄소원이다. 크랩시엘라 뉴모니에는 글리세롤 대사경로가 잘 발달된 균주로 혐기성 상태 및 호기성 상태일 때 각각 다른 경로가 활성화된다. 혐기성 상태에서 배양할 때는 글리세롤로부터 3-HPA(3-Hydroxypropionaldehyde)를 거쳐 1,3-PDO(1,3-propanediol)를 주로 생산하며, 호기성 상태에서는 피루브산을 거쳐 2,3-BDO를 주로 생산한다. 이것은 글루코오스를 탄소원으로 배양했을 때 1,3-PDO를 거의 생산하지 않는 것과 가장 크게 구분되는 차이점이라 할 수 있다. 대장균의 경우에는 상대적으로 크랩시엘라보다 글리세롤 흡수 능력이 떨어지며, 주로 호기성 상태일 경우에 글리세롤 대사경로가 작동하고 혐기성 상태일 경우에는 pH를 낮춰주면 글리세롤 흡수는 가능하나 성장하는데 오랜 시간이 걸린다. 글리세롤 이외에도 전분질계 바이오매스인 카사바(cassava, Sigma Aldrich) 및 당질계 바이오매스인 당밀(molasses, GS 칼텍스)가 산업용 탄소원으로 사용이 가능하다. 카사바를 탄소원으로 이용하는 경우에는 글루코오스를 많이 함유하고 있어 글루코오스를 탄소원으로 이용했을 때 만큼의 2,3-BDO 생산이 가능하나 전분질계라 점도가 높아 많은 양을 넣고 발효를 진행하는데 어려움이 있으며, 당밀을 탄소원으로 이용하는 경우에는 2,3-BDO 생산수율이 글루코오스보다 떨어지며 유기산이 많이 생산되는 단점이 있다.

[0072] 탄소원의 종류에 따른 2,3-BDO 생산

[0073] 크랩시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*::pUC18K::*budB*::*budA*에 대한 산업용 균주로서의 유용성을 확인하기 위하여 산업용 탄소원을 이용하여 발효실험을 수행했다. 발효실험의 배지 조성은 표 2과 같으며, 비연속식 배양법으로 5 L 발효기에 2 L의 배지 부피로 200 rpm, pH 5.5(고정) 조건에서 실시하였다. 첫 번째로 가격이 저렴하고 산업 공정에서 많이 배출되는 글리세롤 원액을 탄소원으로 이용하여 비연속식 배양을 진행하였다. 배지 조성 과 배양 조건은 기존의 비연속식 배양과 동일하며 글리세롤 원액은 우선 시범적으로 40 g/L 첨가하였다. 생장은 0.D(Optical density) 600 nm에서 12시간 동안 12-14 정도로 하였고, 이는 글루코오스를 탄소원으로 할 때와 비슷한 수치이다. 발효 샘플을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 분석한 결과는 도 7과 같이 12-18시간 안에 넣어준 탄소원을 모두 소모하였고 13-16 g/L 정도의 2,3-BDO를 생산하였다. 이는 수율로 환산하며 약 0.34-0.40 g/g에 해당하며 글루코오스를 탄소원으로 배양한 결과와 비슷한 경향성을 보인다. 또한 *budA* 및 *budB* 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 형질전환하지 않은 균주와 형질전환한 균주를 비교해 볼 때 글루코오스를 탄소원으로 사용하였을 때와 유사하게 벡터를 삽입한 균주의 2,3-BDO 생산성이 더 향상되었다. 이 결과를 통해 개량 균주가 산업용 균주로서 산업용 탄소원을 이용하여 2,3-BDO를 생산할 수 있음이 확인되었다.

표 2

성분	농도(g/L)
효모추출물	5
K ₂ HPO ₄	2.9
KH ₂ PO ₄	11.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.001
탄소원	100

[0075] 다음으로 당질계 바이오매스인 당밀을 탄소원으로 첨가하여 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*의 발효 실험을 진행하였다. 우선적으로 당밀을 통해 2,3-BDO 생산이 가능한지를 알아보기 위하여 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG*를 사용하였다. 실험은 비연속식 배양으로 진행하였고, 조건은 기재된 방법과 동일하다. 실험 결과 당밀은 48시간 동안 25 g/L 정도의 탄소원을 소모하고 8 g/L 2,3-BDO를 생산했으며, 수율은 0.32% 정도였다(도 9). 이는 글리세롤 원액을 탄소원으로 첨가한 경우와 비교하면 수율은 비슷하나 글리세롤 원액의 경우는 12-18시간 동안 첨가된 탄소원을 전부 소모하고 2,3-BDO를 생산한 반면 당밀은 48시간 동안 첨가된 탄소원의 절반만을 소모하였다. 마지막으로 전분질계 바이오매스인 카바사를 탄소원으로 하여 동일한 조건에서 발효를 진행하였다. 발효 결과 카바사는 48시간 동안 17 g/L 정도의 탄소원을 소모하고 4 g/L 2,3-BDO를 생산했으며, 수율은 0.24% 정도였다(도 10). 이 결과는 당밀보다 생산성이나 수율 측면에서 비교적 낮았다. 따라서 경제성 측면에서 봤을 때 빠른 시간 동안 소모할 수 있는 글리세롤 원액이 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*의 발효에는 당밀이나 카바사보다 더 효율적이라 할 수 있다.

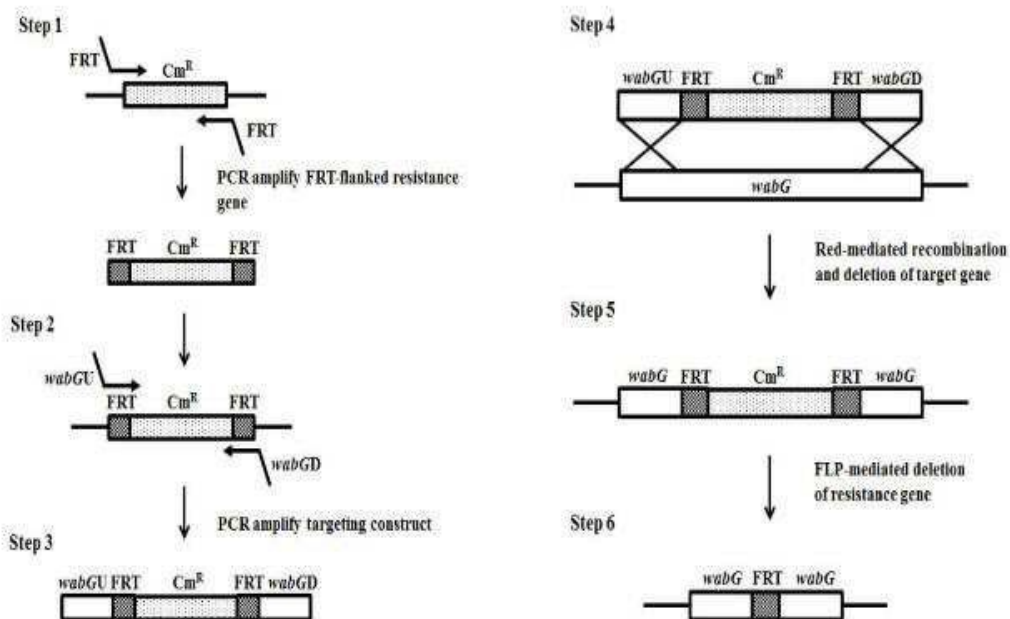
[0076] 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*의 2,3-BDO 생산 효율 증대

[0077] 다양한 산업용 탄소원을 이용하여 크렙시엘라 뉴모니에 KCTC 2242 *wabG::pUC18K::budB::budA*의 발효를 진행한 결과 글리세롤 원액이 글루코오스를 탄소원으로 이용한 경우의 2,3-BDO 생산 효율과 유사한 효율을 나타냄을 확인하였다. 2,3-BDO 생산성을 높이기 위해 글리세롤 원액의 농도를 80 g/L로 증가시켜 동일한 균주로 같은 조건에서 비연속식 배양을 진행하고 생산성 증가 여부를 확인하였다(도 11 및 도 12). 실험 결과는 HPLC로 분석하였고, 분석결과 넣어준 탄소원은 42-48시간 사이에 모두 소모되었고, 2,3-BDO 생산량은 31-34 g/L로 수율은 0.38-0.42% 정도였다. 이는 글루코오스를 넣고 발효를 진행했을 때와 유사한 정도의 생산성이며 글리세롤 원액 80 g/L가 생장에 저해를 일으키지 않으며 이에 따라 생산량이 증가됐음을 확인했다. 이를 통해 더 많은 양의 글리세롤 원액을 이용하여 발효를 진행하여 최대 생산량을 확인하고 산업용 탄소원을 이용한 배양 조건을 최적화 할 예정이다.

[0078] 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

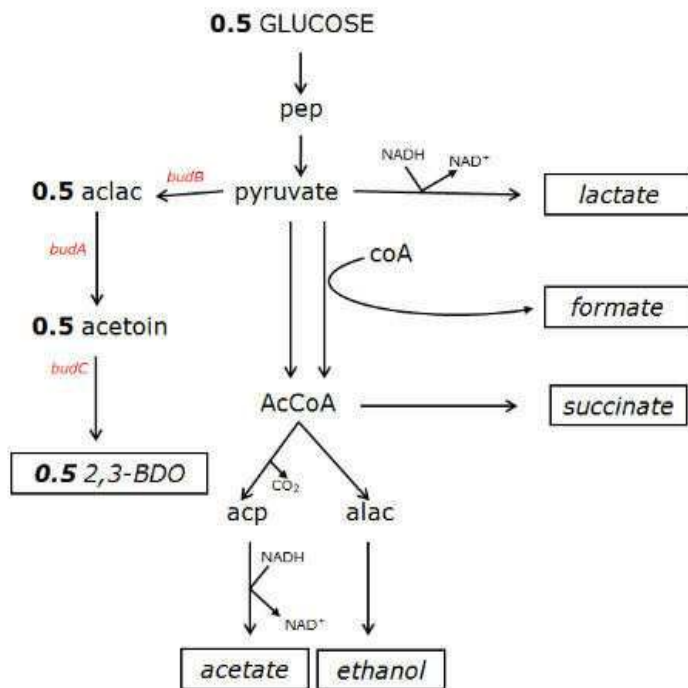
도면1



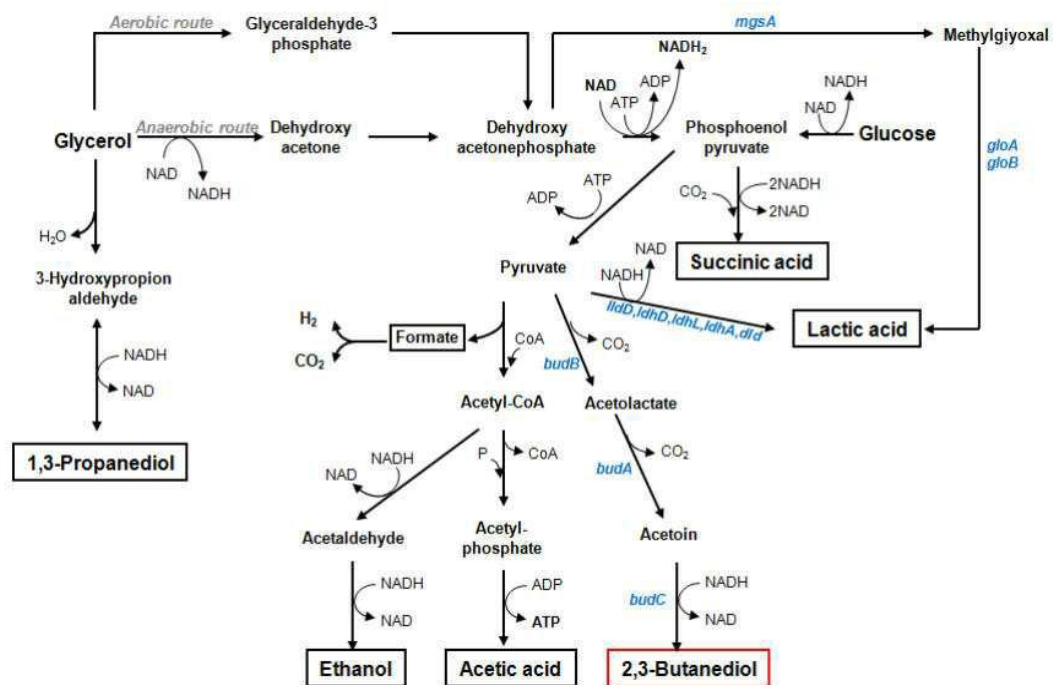
도면2



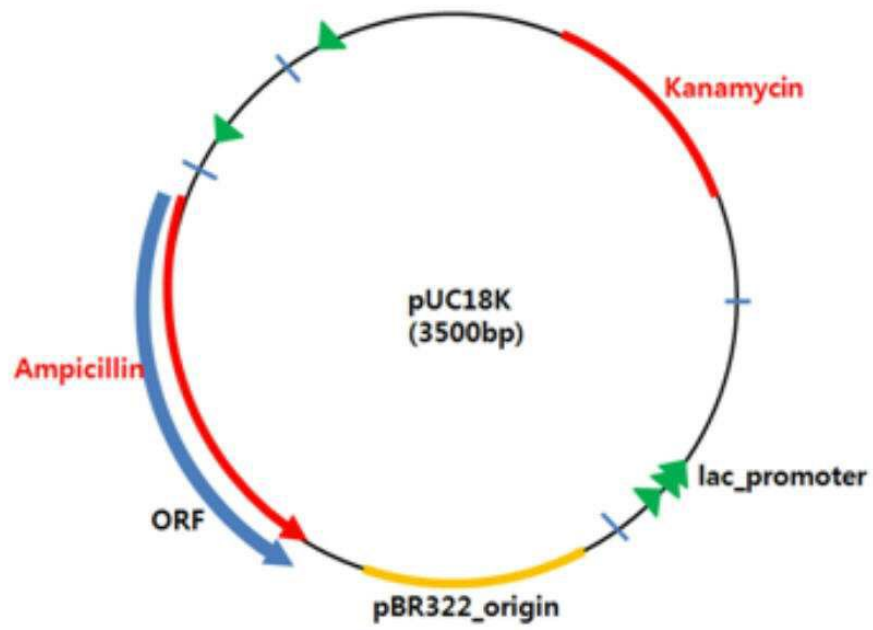
도면3



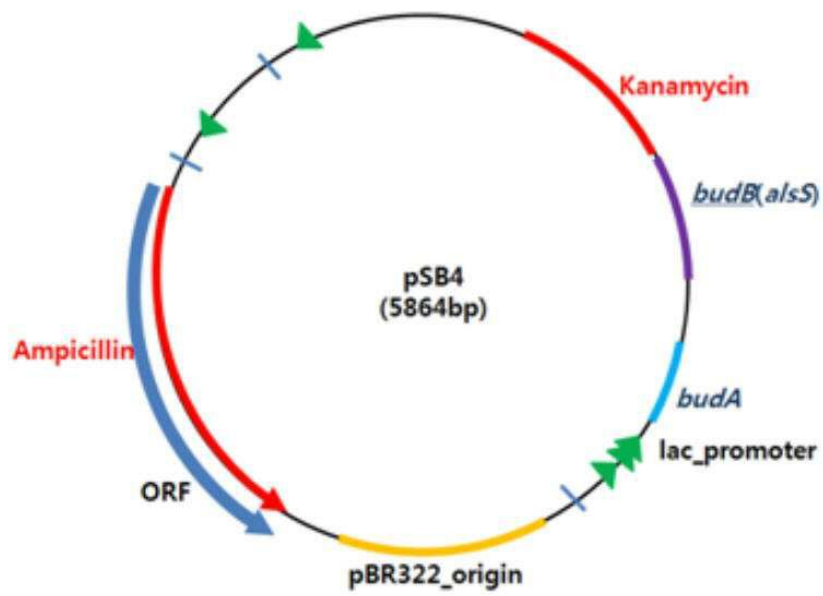
도면4



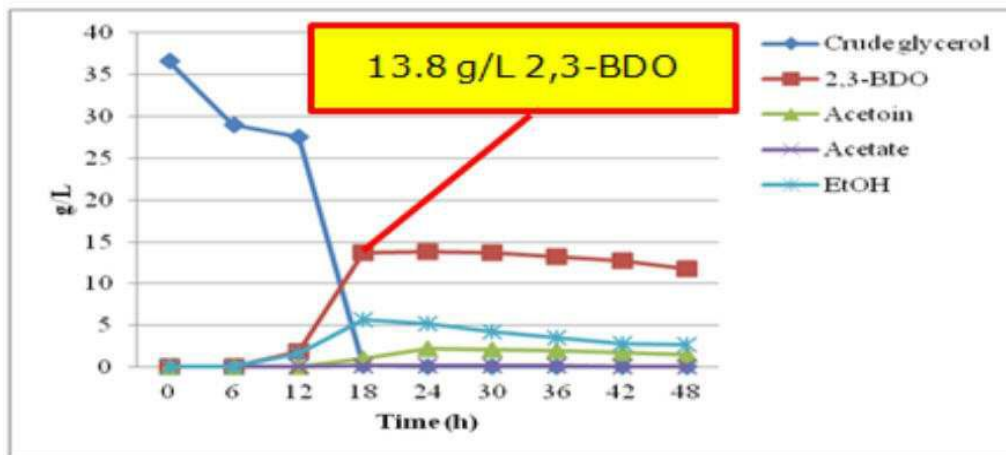
도면5



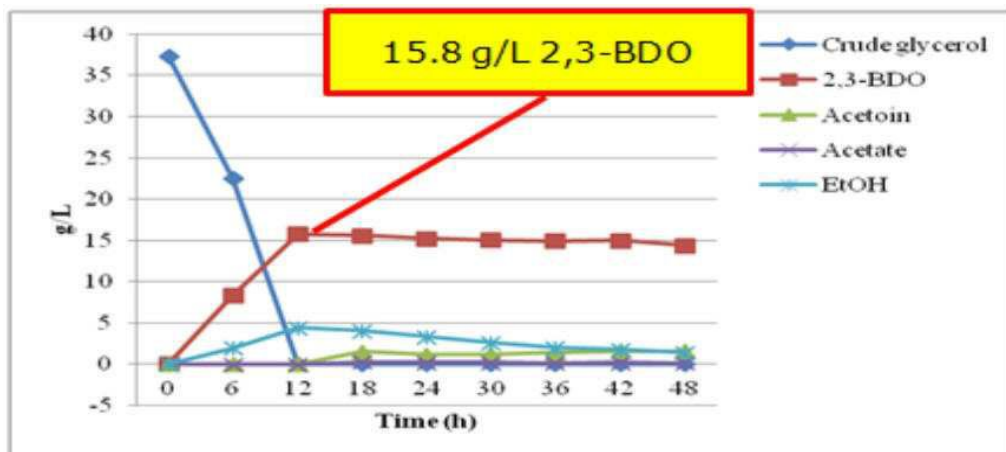
도면6



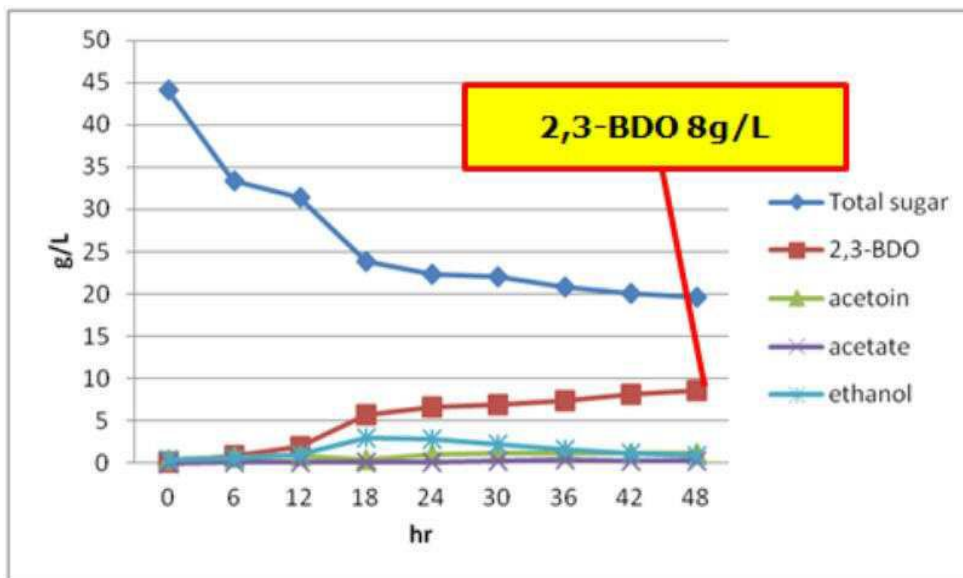
도면7



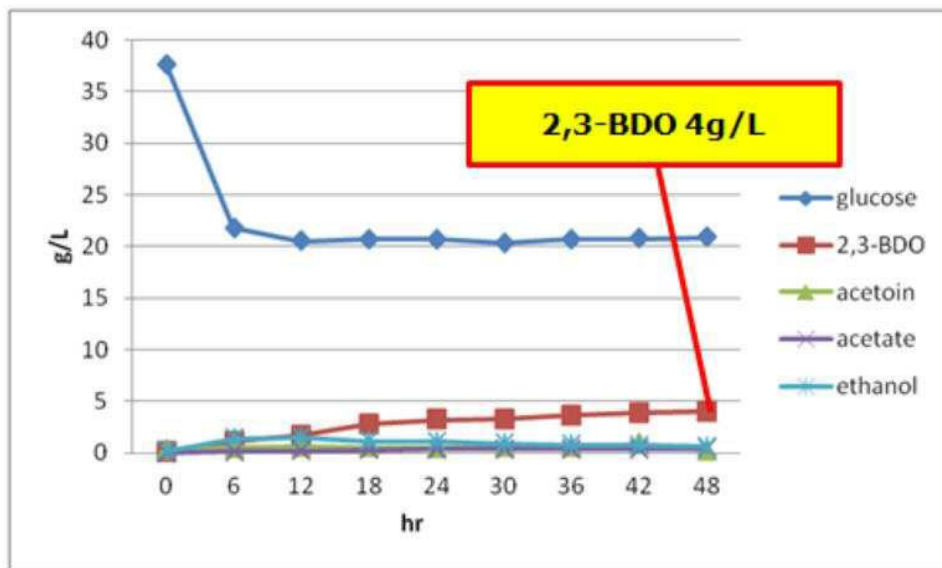
도면8



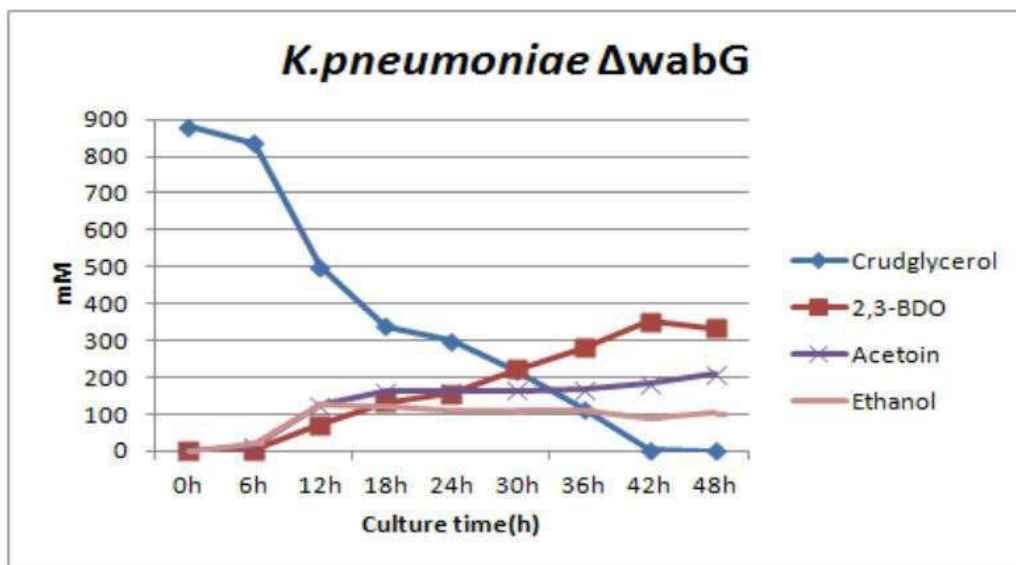
도면9



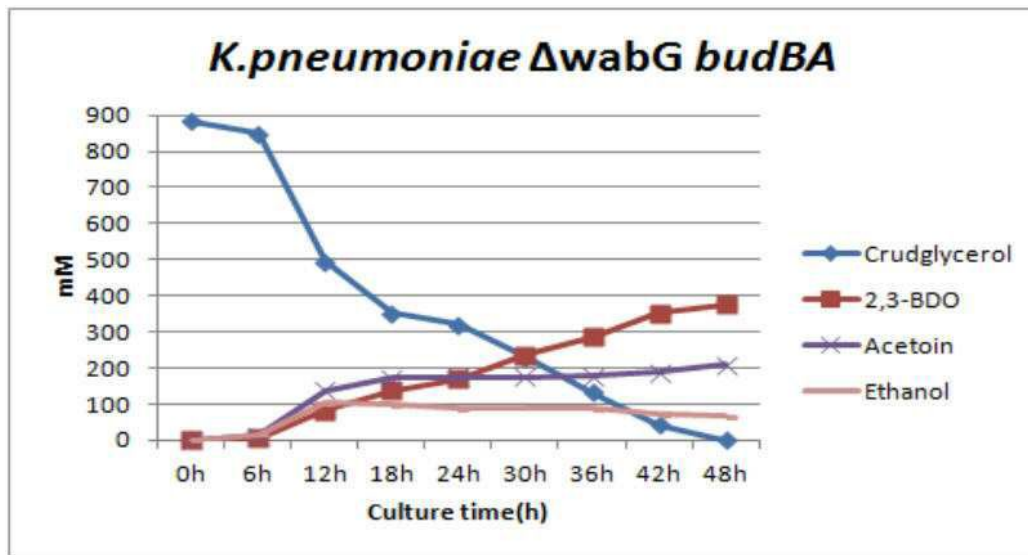
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Method for Preparing 2,3-butanediol from Commercial carbon source
by Transformed Klebsiella pneumoniae
- <130> PN120261
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1128
- <212> DNA
- <213> Klebsiella pneumoniae wabG
- <400> 1

atgagtaa at tcaggctggc tctggtgcgg cagaagtacc gcccgacgg cggcgcagaa	60
cggtttgtct cccgcgcgct ggaagccctc gacagcagtc atctgcaact gaacgtcatc	120
accgcgaat ggcaggggcc ggtgaaaccg gactggcaga tccatattctg taaccacgt	180
aaatgggggc gcatcagccg cgagcgcggc ttgccaacg ccgcgcgcgc gctctggcag	240
cgcgagtcct tcgacctggt cgagagccat gaacgtattc ccggtgcga tctctaccgc	300
gctggcgatg gcgttcacg ccgctggctg cagcagcgct cgcgcathtt accggcctgg	360
aaaagccgcc tgctgttcgc cgaccgttac caccgctacg tcatgcaggc ggagcgcgag	420
atgtatgaag actcacacct gcgcggggtg atctgcaacg ccgagatgat caagcgcgag	480
atcatcgaag actttggcct gccggcggag aagatccacg ttatttataa cgccattgat	540

aaccagcgct tctgcccgc ggacgaagag acctttgccg ccttacgcgc caaatggcag 600

ctaccgtgc aggcgacctg cctgatctac gtcggctccg gctttgagcg caaggggctg 660

gcggcggcga tccgcgccat cgctcccacc gatcgctacc tgctggtggt cggcaaagat 720

aaggatcagc ctcgctatca ggcgctggcg aagagcctga actgtgaagc gcgggtgcgc 780

ttcttcggca tgcagtcgga gacattgccc ttctatcaaa tggccgatgg tctgttgctg 840

ccgacctct acgatecgtt ccccaacgtc atcctcgagg caatggcctg cggctctgccg 900

gtgatcacca ctaccggctg cggcggggcg gagtttatcg tcgacggcca caacggttac 960

gtctgcgacg ctctggatat cccggcgcta cagcaggcgg taatggcctt gcccgcgcg 1020

gcgctgggct ccgcgaagg cggtcacgcc cgcgagcgca ttatggcctg caccagcgag 1080

cgactctcaa ccagctgct ttctctttat caggatctgg tgaattaa 1128

<210> 2

<211> 780

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae budA

<400> 2

atgaatcatt ctgctgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaaccct gcgggcgttt 60

tccgcgcagc atcccagagc cgtgctctat cagacatgc tcatgagcgc cctgctgagc 120

ggggtttacg aaggcagcac caccatgcc gacctgtga aacacggcga ttccggcctc 180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atcgcttca gcagtcaggt ctatcagctg 240

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg 300

acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc ttgaccatc cggtagcgcc ccagcagctg 360

cacgaggtga tcgaccagca aatcccctct gacaacctgt tctgcgcctt gcgcatcgac 420

ggccatttcc gccatgccca taccgcacc gtgccgcgcc agacgccgcc gtaccgggcg 480

atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttccgcttta accagcgca aggggtgctg 540

gtcggttcc ggaccccgca gcataatgcaggatcaacg tcgcccggta tcacgagcat 600

tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggt cacctgtggt attaccagct cgaccacggg 660

gtgctgacct tcggcgaaat tcacaagctg atgatcgacc tgcccgcga cagcgcttc 720

ctgcaggcta atctgcatcc cgataatctc gatgccgcca tccgttccgt agaaagttaa 780

780

<210> 3

<211> 1584

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae budB

<400> 3

atgaaaaacac gaaaaattgg actggctaac tatctggcct acggcgcggg cgattttctc	60
ggcgccggca cgacggcggtt aaccgccgca tggctgctct acttttacac gaccttttgc	120
ggactgacct cgattgaggc cacgcttatt ttgtctgccg cccgcgtgct ggacgcggtg	180
gtaagcccg tgatgggctt tctcaccgat aactttggca ccacctggct tggtaagcgc	240
ttcgcccgca gaaaattctt tattctgctc ggcatccct gcgtattcag ctattcagcg	300
atgtgggtcg gcgagatggg ctcttggtac tacctggcga cctatctgct gtttgatatg	360
gtctatacca tgattctggt gccctatgag acgctggtgc cggagatgac cgatgacttt	420
aaacagaaaa ccaaattctc cggcgcgcgc atttcgatgg cgcagatgac ggcgatttta	480
gcctccttcc tgccggggat ctttctctcc tggctcggca aagataatgc cagctcgttc	540
ttctatgcca gtctggtgtt ctcggtgctg tgcgcggtga tgcctgactct ggtctggtgt	600
ttcacctggg aacgaccgcg ggaggcgtgg tcggaagcgg cctgcgggc ggaagcggaa	660
aaacaaaact taaccttgc tcagagcctc aatcgcttgg tgattgagct gagttctacg	720
ctgcggataa aaattttccg ccagcacctc ggcatgtatc tggggggcta tatcgcccag	780
gacgtcttca atgcccgtgt tacctattac gtggtctttg ttctgatgca ggaagccgcc	840
gtcgccctga acctgctggg gacgatggcc atcttcaggt ttattgcggt aatcgccatg	900
atcccgtgt gcattcggtt tggccccgcg ccgtcgtacc gcatggtggt ggtcctgttt	960
ggcctgagct cactctcta cgcgtgctc tattacgccg gactgagcga cgtctattcc	1020
ttattgctgc tcattctgc tgtcgccgga ctgggacgcg gcgggataaa ttacgtaccg	1080
tggaatacct acacctatat tgccgacgtc gacgaagcga tcaccggcca gcgccgggag	1140
gggatttttg ccggcatcat gactctgacc cgcaaagcct cgcaggcggg ggcggtgatg	1200
ctggtgggga tcattatgca gttgtcgggg ttgtttccg ggcaaaaaat acagcctgaa	1260
ggggtcagcc ataccattct gctgatctc agcgtcggca ctctggtggt gttagcctgc	1320
ggcttctctg tctcgctgcg cttcaaacct aacctgcaca cccacagcgt cctgcgcagc	1380
gagacctca gaatgcgcga gctcggctac gctcagtcgg aacagaccag tgcggaacac	1440
cgctgcggtgg tcgagctgct ggccgggatg ccttacgact gtcgtgggg caataacaat	1500
attggctatc tgaatcgta taaacctgct gccccgcgc tcattaaggg cggcgctttg	1560
aattcgacat atacccgagg ttaa	1584