(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0123108
(43) 공개일자 2016년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/16 (2006.01) *C12P 7/18* (2006.01)
C12R 1/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/16 (2013.01)
C12P 7/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0053256
(22) 출원일자 2015년04월15일
심사청구일자 2015년04월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김승욱
서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호
박철환
서울특별시 노원구 광운로 20
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

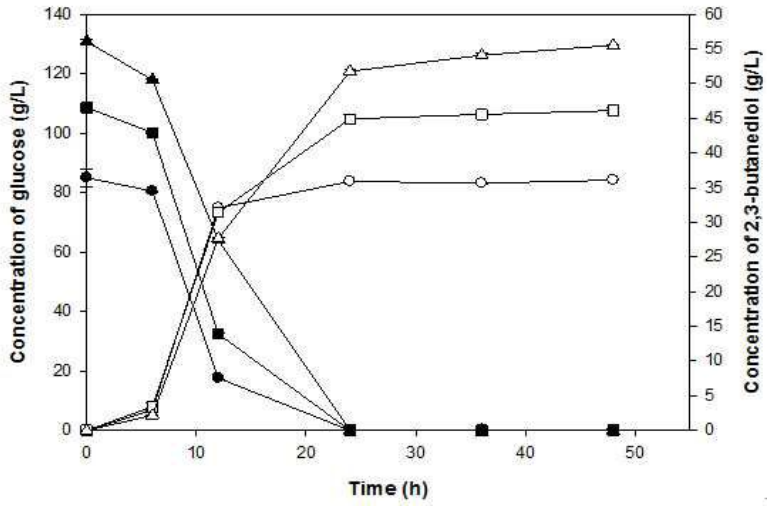
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **아세테이트 첨가를 통한 2,3-부탄다이올 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 생산 방법은 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 균주에 첨가함에 따라 상기 균주의 생육조건에 영향을 미치지 않으면서 2,3-부탄다이올의 생산량과 생산성을 향상시키는 것이 특징이며, 이에 따라 지속적인 2,3-부탄다이올의 생산이 가능하다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12R 1/22 (2013.01)
(72) 발명자
이상준
서울특별시 성북구 인촌로7길 16-3, 고려대학교 공학관 734호
최한석
서울특별시 성북구 인촌로7길 16-3, 고려대학교 공학관 734호
이주훈
서울특별시 성북구 인촌로7길 16-3, 고려대학교 공학관 734호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 ABC-2011-0031360
부처명 미래창조과학부 (연구재단)
연구관리전문기관 (재)차세대바이오매스연구단
연구사업명 글로벌프론티어 연구개발사업
연구과제명 미세조류 유래 혼합당 전환공정 및 ß-lactam 중간체/아미노산 전구체 생산 시스템 구축
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.21

명 세 서

청구범위

청구항 1

2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금속 아세테이트는 포타시움아세테이트($CH_3COO^-K^+$) 및 소디움아세테이트($CH_3COO^-Na^+$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주는 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*) 및 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배지에는 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스 및 프럭토오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 탄소원이 포함된 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트는 배지에 대하여 3 내지 9 g/L로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트는 배지에 대하여 3 내지 15 g/L로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 탄소원은 배지에 대하여 60 내지 200 g/L로 포함되는 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가함에 따라 *budA*, *budB*, *budC* 및 *bdh*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 발현량이 증가되는 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가한 후 12시간 및 24시간 후에 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 재첨가하는 것을 특징으로 하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 리파이너리(Bio refinery)는 기존 산업 체계에서 석유가 담당하던 역할을 재생가능한 자원인 바이오매스로 대체하려는 개념으로 지금까지 오일 리파이너리(Oil Refinery, 석유 정제)를 통해 휘발유, 경유와 같은 연료와 수많은 화학제품을 생산했듯이, 바이오매스를 원료로 하는 바이오 리파이너리를 통해 바이오에탄올, 바이오디젤 등과 같은 연료와 바이오플라스틱 등의 각종 화학제품을 생산하려는 시도이다. 최근에는 화학 물질로서뿐만 아니라 연료 물질로도 사용이 가능한 부탄올(Butanol), 연료 및 다양한 화학물질로 전환이 가능한 부티르산(Butyric aicd)과 부탄다이올(Butanediol)의 바이오리파이너리를 통한 생산에 관한 연구가 많은 관심을 받고 있다(대한민국 공개특허 2012-0082141호). 2,3-부탄다이올의 경우, 탈수화 반응을 통해 디아세틸(diacetyl)로 전환될 수 있으며, 이는 buttery taste를 가지므로 식품산업에서 각광을 받고 있고, 2,3-부탄다이올은 합성고무의 제조에 있어 중요한 원료물질로 사용되는 1,3-부타디엔과 연료물질의 첨가제로 시용 가능한 MEK(methyl ethyl ketone)으로 전환이 가능한 산업적으로 매우 중요한 화학물질로 알려져 있다.

[0003] 미생물을 이용한 2,3-부탄다이올 생산은 1900년대 초에 이미 *Klebsilla*와 *Bacillus* 계열의 미생물을 이용한 파일럿 스케일(pilot scale) 규모의 발효공정이 개발되었으나, 석유화학공정 기반의 1,3-부타디엔의 생산공정이 개발되면서 미생물을 이용한 2,3-부탄다이올 생산 연구는 중단되었다. 그러나, 바이오리파이너리 기술 개발에 대한 관심 증대와 유전자조작을 통한 미생물 개량기술, 발효기술, 분리 및 정제 기술의 발전과 함께 미생물을 이용한 2,3-부탄다이올 생산에 관한 연구가 다시 주목을 받고 있는 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2012-0082141호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 2,3-부탄다이올의 생산량 및 생산성이 향상된 2,3-부탄다이올의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산 방법을 제공한다.

[0007] 일 구현예는 금속 아세테이트가 포타시움아세테이트($CH_3COO^-K^+$) 및 소디움아세테이트($CH_3COO^-Na^+$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0008] 다른 일 구현예는 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumonia*) 및 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*)로 이루어진 군으로부터 선택되는

1종 이상인 것일 수 있다.

[0009] 또 다른 일 구현예는 배지에 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스 및 프럭토오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 탄소원이 포함된 것일 수 있다.

[0010] 또 다른 일 구현예는 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트가 배지에 대하여 3 내지 9 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.

[0011] 또 다른 일 구현예는 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트가 배지에 대하여 3 내지 15 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.

[0012] 또 다른 일 구현예는 탄소원이 배지에 대하여 60 내지 200 g/L로 포함되는 것일 수 있다.

[0013] 또 다른 일 구현예는 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가함에 따라 *budA*, *budB*, *budC* 및 *bdh*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 발현량이 증가되는 것일 수 있다.

[0014] 또 다른 일 구현예는 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가한 후 12시간 및 24시간 후에 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 재첨가하는 것일 수 있다.

[0015] 또 다른 일 구현예는 상기 배지의 pH는 6 내지 7인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 생산 방법은 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 균주에 첨가함에 따라 상기 배지의 pH 조건을 포함하여 균주의 생육조건에 영향을 미치지 않으면서 2,3-부탄다이올의 생산량과 생산성을 향상시키는 것이 특징이며, 이에 따라 지속적인 2,3-부탄다이올의 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 12시간 배양 후의 2,3-부탄다이올의 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 24시간 배양 후의 2,3-부탄다이올의 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 탄소원을 다르게 하여 배양한 결과로서, 2,3-부탄다이올 등의 생산량을 나타낸 것이다.

도 4는 2,3-부탄다이올 생산 유전자인 *budA*, *budB*, *budC* 및 *bdh*의 발현량을 전기영동 결과로 나타낸 것이다.

도 5는 글루코오스 농도 별 포타시움아세테이트가 첨가된 배지에서의 2,3-부탄다이올 생산량 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 글루코오스 농도 별 포타시움아세테이트가 첨가된 배지에서 12시간째에 추가적으로 포타시움아세테이트를 첨가하여 2,3-부탄다이올 생산한 실험결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 생산 방법은 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 균주에 첨가함에 따라 상기 균주의 생육조건에 영향을 미치지 않으면서 2,3-부탄다이올의 생산량과 생산성을 향상시키는 것이 특징이며, 이에 따라 지속적인 2,3-부탄다이올의 생산이 가능하다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 단계를 포함하는, 2,3-부탄다이올 생산 방법을 제공한다.

[0021] 상기 금속 아세테이트는 일반적으로 아세테이트가 첨가되는 아세트산($CH_3COO^-H^+$)과 달리 수소이온(H^+)을 포함하지 않아 상기 균주의 생육조건, 예컨대 pH 조건에 영향을 주지 않는 것이 특징이다. 상기 금속 아세테이트는 알칼

리 금속 아세테이트인 것이 바람직하며, 구체적으로 포타시움아세테이트($CH_3COO^-K^+$) 및 소디움아세테이트($CH_3COO^-Na^+$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상 것이 더 바람직하다.

[0022] 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가하는 경우 상기 균주의 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 발현량이 증가되어 2,3-부탄다이올 생산량이 증가하게 되며, 구체적으로 2,3-부탄다이올 생산 유전자로서 *budA*, *budB*, *budC* 및 *bdh*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 발현량이 증가됨에 따라 2,3-부탄다이올 생산량이 증가하는 것이 특징이다.

[0023] 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트는 배지에 대하여 3 내지 9 g/L로 첨가되는 것일 수 있다. 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트가 상기 범위 내로 첨가되는 경우 12시간 내에 많은 양의 2,3-부탄다이올이 생산되며, 단시간내에 2,3-부탄다이올을 생산해야 하는 공정에 유용하게 적용될 수 있다.

[0024] 또한, 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트는 배지에 대하여 3 내지 15 g/L로 첨가되는 것일 수 있다. 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트가 상기 범위 내로 첨가되는 경우, 2,3-부탄다이올의 향상된 총생산량을 보이는 것이 특징이다.

[0025] 또한, 상기 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주가 접종된 배지에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가한 후 12시간 및 24시간 후에 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 재첨가하는 것일 수 있다. 12시간 및 24시간 후에 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 재첨가함에 따라 지속적으로 아세테이트가 공급되어 2,3-부탄다이올의 생산량이 지속적으로 극대화될 수 있다.

[0026] 상기 2,3-부탄다이올을 생산하는 균주는 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*) 및 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하며, 특히 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*)가 가장 바람직하다. 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*)가 접종된 균주에 금속 아세테이트를 첨가하는 경우 2,3-부탄다이올의 생산량을 극대화시킬 수 있다.

[0027] 상기 배지에는 2,3-부탄다이올의 생산량을 극대화시키기 위하여, 탄소원이 추가로 포함될 수 있다. 상기 탄소원은 2,3-부탄다이올의 생산량을 극대화 시키는 것이라면 특별히 제한이 없으나, 바람직하게는 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스 및 프럭토오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0028] 상기 탄소원은 배지에 대하여 60 내지 200 g/L로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 범위에 있는 경우, 아세테이트의 농도가 10 g/L 이하의 범위로 유지된다면 균주의 생육에 영향을 주지 않고 2,3-부탄다이올의 생산을 지속할 수 있으며, 생산량 또한 극대화 시킬 수 있다.

[0029] 상기 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트와 탄소원을 제외한 배지의 성분들은 상업적으로 실시가능한 수준으로 2,3-부탄다이올의 생산 및 상기 균주의 성장을 촉진하는 것으로 알려진 성분들을 추가적으로 더 포함할 수 있다. 예컨대, 질소 공급원으로 질산염, 우레아, 암모늄염, 및 아미노산 등이 포함될 수 있다.

[0030] 상기 생산방법은 금속 아세테이트 또는 암모늄 아세테이트를 첨가한 후 적절한 시간 또한 배양을 진행할 수 있으며, 상기 배양 후 2,3-부탄다이올을 회수할 수 있다.

[0031] 상기 배양은 상기 균주의 특정한 생명-지속 온도에서 수행될 수 있으며, pH 조건 또한 균주의 바람직한 조건에서 수행될 수 있다. 바람직하게는 배지의 pH는 6 내지 7인 것이 바람직하다.

[0032] 상기 2,3-부탄다이올은 원심분리, 응집 또는 여과와 같이 당업계의 기술자에게 알려진 통상적인 수단으로 회수될 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예를 이용하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 다양하게 수정 및 변경될 수 있다.

[0034] **실시예 1. 아세테이트가 첨가된 배지에서의 2,3-부탄다이올 생산**

[0035] 엔테로박터 에어로제네스 균주를 영양배지(nutrient broth: 2 g/L yeast extract, 1 g/L meat extract, 5 g/L peptone, 5 g/L NaCl)에서 37℃, 180 rpm의 조건으로 진탕배양기(shaking incubator)에서 12시간 동안 종균배

양하였다. 상기 종균배양한 균주를 2,3-부탄다이올 생산을 위한 생산 배지에 접종한 후 37 ℃, 180 rpm의 조건으로 진탕배양기(shaking incubator)에서 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 상기 생산배지의 조성은 3 g/L 제1인산수소칼륨(KH_2PO_4), 6.8 g/L 제2인산나트륨(Na_2HPO_4), 5 g/L 효모추출물(yeast extract), 5.35 g/L 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$), 10 g/L 카사미노산(casamino acid), 0.75 g/L 염화칼륨(KCl), 0.28 g/L 황산나트륨(Na_2SO_4), 0.42 g/L 구연산(citric acid), 0.26 g/L 황산마그네슘($MgSO_4$)에 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스 및 프록토오스 등의 탄소원을 첨가하였으며, 2,3-부탄다이올의 생산량을 증가시키기 위해 생산배지에 소디움아세테이트 9-11 g/L의 농도로 첨가하였다. 생산배지의 초기 pH는 6.5에서 6.8의 범위이며, 2,3-부탄다이올 생산을 위한 최적의 pH범위는 6-7의 범위이다.

[0036] 또한, 소디움아세테이트 대신 포타시움아세테이트를 동일한 농도로 첨가한 생산배지 조성으로도 2,3-부탄다이올을 생산하였다.

[0037] 생산배지에서 소디움아세테이트와 포타시움아세테이트를 아세테이트 공급원으로 이용하여 다양한 농도에서의 2,3-부탄다이올 생산량을 비교하였다. 구체적으로 글루코오스(60 g/L)를 포함하는 생산배지에 소디움아세테이트와 포타시움아세테이트 각각을 0~19 g/L의 범위에서 첨가하였으며, 엔테로박터 에어로제네스 (*E.aerogenes*) 균주를 이용하여 37 ℃, 180 rpm의 동일한 조건에서 12시간 또는 24시간 동안 배양을 실시하였다. 소모된 글루코오스, 2,3-부탄다이올 및 그 외의 부산물들의 생산량은 고속 액체 크로마토그래피(HPLC: high performance liquid chromatography)를 이용하여 측정하였으며, Aminex HPX-87H column (300×7.8 mm, Bio-Rad, USA)과 refractive index detector (RID-10A, Shimadzu, Japan)을 사용하여 컬럼 온도 50℃, 5 mN H_2SO_4 이동상을 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주는 조건하에서 분석하였고, 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0038] 도 1은 12시간 배양 후의 2,3-부탄다이올의 생산량을 그래프로 나타낸 것이며, 도 2는 24시간 배양 후의 2,3-부탄다이올의 생산량을 그래프로 나타낸 것이다.

[0039] 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 소디움아세테이트와 포타시움아세테이트를 첨가하여 실험을 수행한 결과 대조군과 비교하여 2,3-부탄다이올의 생산량이 각각 약 2.4배 및 2.5배 정도 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 1을 통해 소디움아세테이트와 포타시움아세테이트를 11g/L까지 첨가한 경우 초기 2,3-부탄다이올의 생산량이 현저히 높음을 확인하였다.

[0040] 글루코오스 대신 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스 및 프록토오스를 각각의 탄소원(60g/L)으로 사용하여 상기와 동일한 조건으로 24시간동안 배양 하였으며, 아세테이트는 포타시움아세테이트를 사용하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0041] 도 3은 탄소원을 다르게 하여 배양한 결과로서, 2,3-부탄다이올 등의 생산량을 나타낸 것이다.

[0042] 도 3에 나타난 바와 같이, 2,3-부탄다이올의 생산량은 글루코오스 뿐만 아니라 다른 탄소원을 이용하였을 때에도 향상된다는 것을 확인할 수 있었으며, 포타시움아세테이트 첨가는 글루코오스 이외의 다른 탄소원을 이용하였을 때에도 2,3-부탄다이올 생산량을 향상효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0043] **실시예 2. 2,3-부탄다이올 생산관련 유전자의 발현수준 확인**

[0044] 아세테이트가 첨가된 배지에서의 2,3-부탄다이올 생산 유전자들(budA, budB, bud C 및 bdh)의 발현 정도를 확인하기 위하여 생산배지에 10 g/L의 포타시움아세테이트를 첨가하여 12시간 동안 배양을 하여 세포를 회수하여 RNA를 추출하였으며, 대조군으로는 아세테이트를 첨가하지 않은 배지에서 배양한 세포를 이용하여 비교실험을 수행하였다. 세포의 회수는 12시간 배양한 배지에서 시료를 채취한 후 600nm의 파장에서 OD값이 1이 되도록 조정을 한 후에 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포로부터 easy-REDTM BYF total RNA extraction kit (Intron, Cat. No. 17064, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 그 후에 추출한 RNA를 template로 하여 cDNA를 합성하였으며, 이 경우에는 Maxime RT premix (oligo dT primer) kit (Intron, Cat. No. 25081, Korea)를 이용하였다. 최종적으로 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 발현수준을 확인하기 위하여, 합성된 cDNA를 가지고 Maxime PCR premix kit (Intron, Cat. No. 25025, Korea)를 이용하여 하기의 조건으로 PCR을 수행하였다:

[0045] 변성(denaturation) 30싸이클, 94 ℃, 30 초,

[0046] 결합(annealing) 51-59 ℃, 20초,

[0047] 합성(extension) 72 ℃ 40초 (72℃ 5분에서의 마지막 합성 후 진행).

[0048] 최종적으로 PCR 결과물을 전기영동을 통해 확인하였으며, 전기영동 한 결과를 비교하여 포타시움아세테이트가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서의 2,3-부탄다이올 생산 유전자의 상대적인 발현 수준을 비교하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0049] 도 4는 2,3-부탄다이올 생산 유전자인 *budA*, *budB*, *budC* 및 *bdh*의 발현량을 전기영동 결과로 나타낸 것이다.

[0050] 도 4에 나타난 바와 같이, 생산배지에 포타시움아세테이트를 첨가한 경우에는 첨가하지 않은 경우에 비해 2,3-부탄다이올 생산 유전자가 더 많이 발현되는 것을 확인하였으며, 특히, *budB*의 경우 발현량에서 현저한 차이를 보였다.

[0051] **실시예 3. 아세테이트 중간 첨가를 통한 2,3-부탄다이올 생산량 증가 실험**

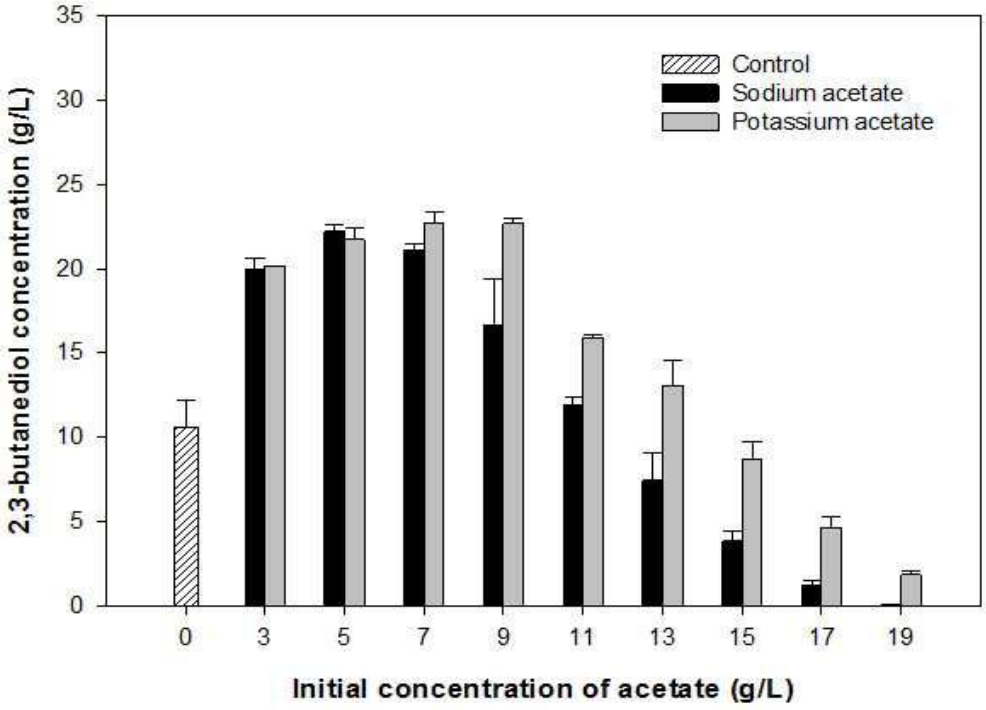
[0052] 처음에 포타시움아세테이트(10 g/L)의 첨가를 통해 공급된 아세테이트가 12시간 정도의 발효 후에는 그 농도가 줄어들어 2,3-부탄다이올의 생산이 정체되는 현상을 보였다. 이 문제를 해결하기 위해서 발효시작 후 12시간 후에 다시 배지내의 아세테이트 농도를 증가시키기 위해 10 g/L의 포타시움아세테이트를 첨가하여 주었으며, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 2,3-부탄다이올의 생산량을 측정하였고, 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0053] 도 5 는 초기에 배지에 10 g/L의 포타시움아세테이트를 첨가하여 2,3-부탄다이올을 생산한 실험 결과를 나타낸 것이며, 도 6은 도 5에서 12시간이 되면 아세테이트 농도가 감소하여 글루코오스의 소모와 2,3-부탄다이올의 생산이 정체되므로 12시간째에 다시 배지에 10 g/L의 아세테이트를 첨가하여 2,3-부탄다이올의 생산성과 생산량을 다시 향상시킨 실험결과를 나타낸 것이다 (글루코오스 농도, ○; 90, □; 110 △; 130 g/L).

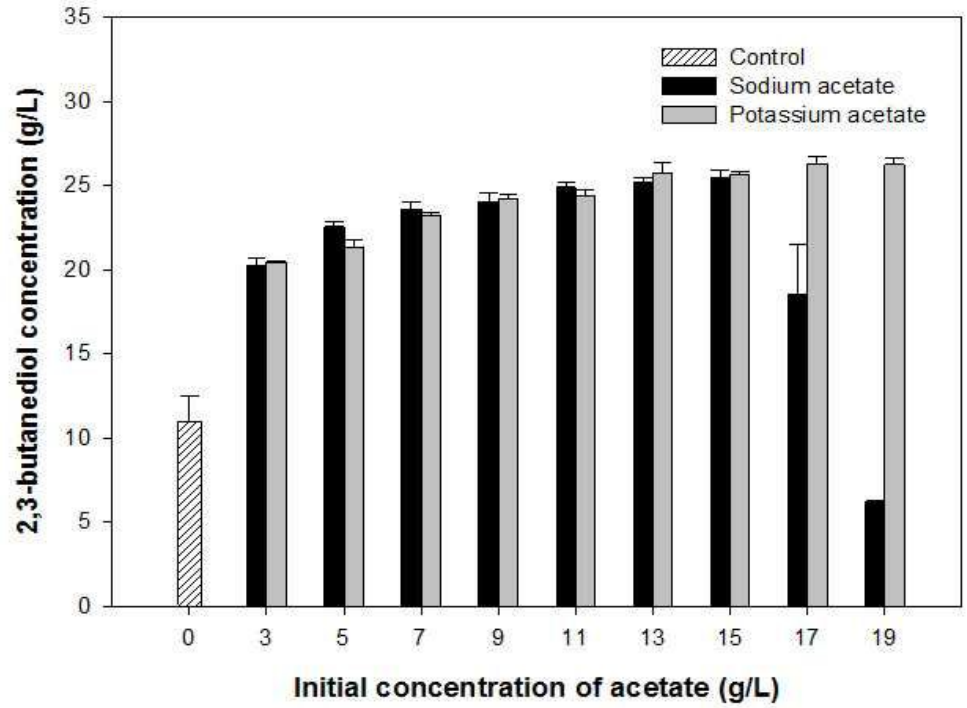
[0054] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 12시간째에 아세테이트를 첨가하였을 때, 3-부탄다이올의 생산성과 생산량이 향상되었음을 확인하였다.

도면

도면1


Control
Sodium acetate
Potassium acetate
2,3-butanediol concentration (g/L)
Initial concentration of acetate (g/L)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
3
5
7
9
11
13
15
17
19

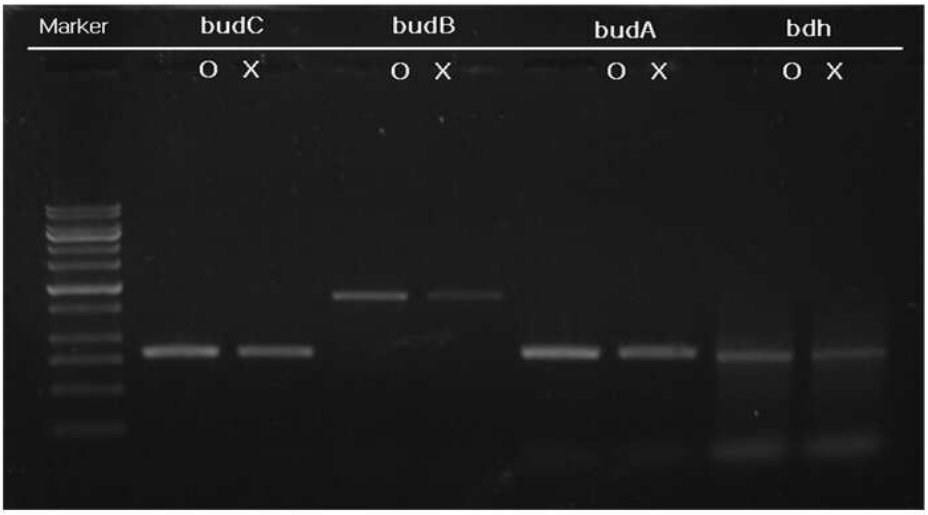
도면2


Control
Sodium acetate
Potassium acetate
2,3-butanediol concentration (g/L)
Initial concentration of acetate (g/L)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
3
5
7
9
11
13
15
17
19

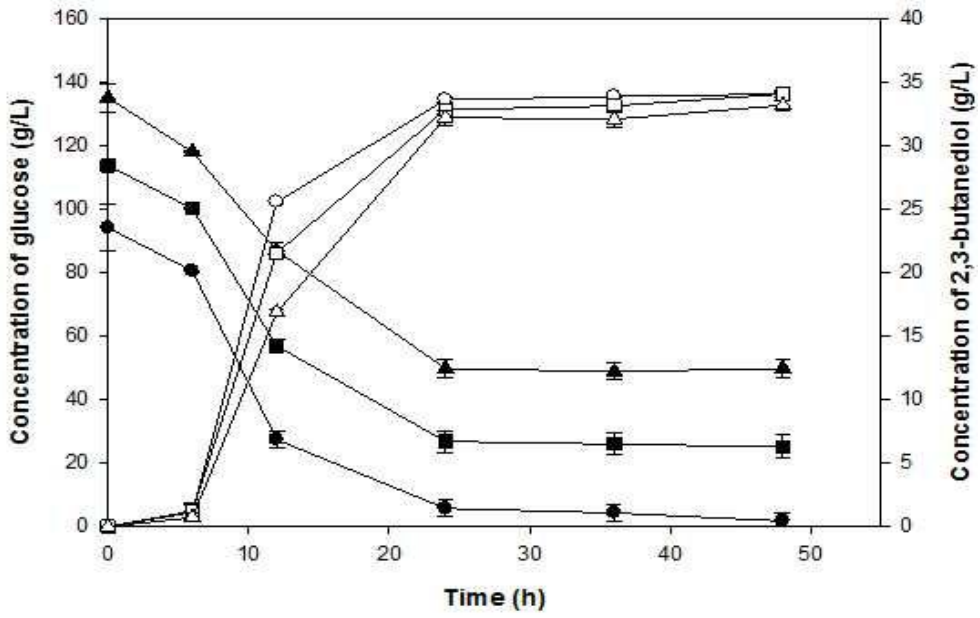
도면3

Carbon sources (60 g/L)	Xylose		Mannose		Galactose		Fructose	
Acetate Concentration (g/L)	0	10	0	10	0	10	0	10
Sugar consumption (g/L)	57.81 (±0.63)	60 (±0.00)	50.71 (±0.00)	60 (±0.00)	60 (±0.00)	60 (±0.00)	54.40 (±0.52)	57.59 (±2.69)
Cell mass (g/L)	3.45 (±0.00)	3.98 (±0.21)	4.21 (±0.11)	4.58 (±0.05)	3.45 (±0.30)	4.20 (±0.33)	4.38 (±0.26)	5.42 (±0.20)
Succinate (g/L)	3.18 (±0.10)	4.78 (±0.08)	1.96 (±0.03)	3.60 (±0.22)	2.38 (±0.15)	3.55 (±0.31)	2.52 (±0.02)	3.23 (±0.14)
Lactate (g/L)	0 (±0.00)	0 (±0.00)	2.44 (±0.31)	0.64 (±0.82)	1.55 (±0.82)	0.62 (±0.74)	1.88 (±0.13)	0 (±0.00)
Acetate (g/L)	2.03 (±0.16)	4.20 (±0.02)	2.97 (±0.25)	3.97 (±0.26)	2.32 (±0.38)	3.64 (±0.57)	3.02 (±0.04)	3.81 (±0.21)
Ethanol (g/L)	7.58 (±0.26)	8.02 (±0.52)	7.40 (±0.18)	7.44 (±0.67)	9.24 (±0.25)	9.19 (±1.87)	7.71 (±0.05)	6.81 (±0.82)
2,3-butanediol (g/L)	20.61 (±0.23)	23.86 (±0.51)	15.66 (±0.41)	25.05 (±0.34)	20.87 (±0.13)	25.62 (±0.20)	17.03 (±0.06)	26.14 (±0.17)
2,3-butanediol yield (g/g sugar)	0.36 (±0.01)	0.39 (±0.02)	0.31 (±0.00)	0.39 (±0.00)	0.33 (±0.01)	0.42 (±0.01)	0.31 (±0.00)	0.45 (±0.02)

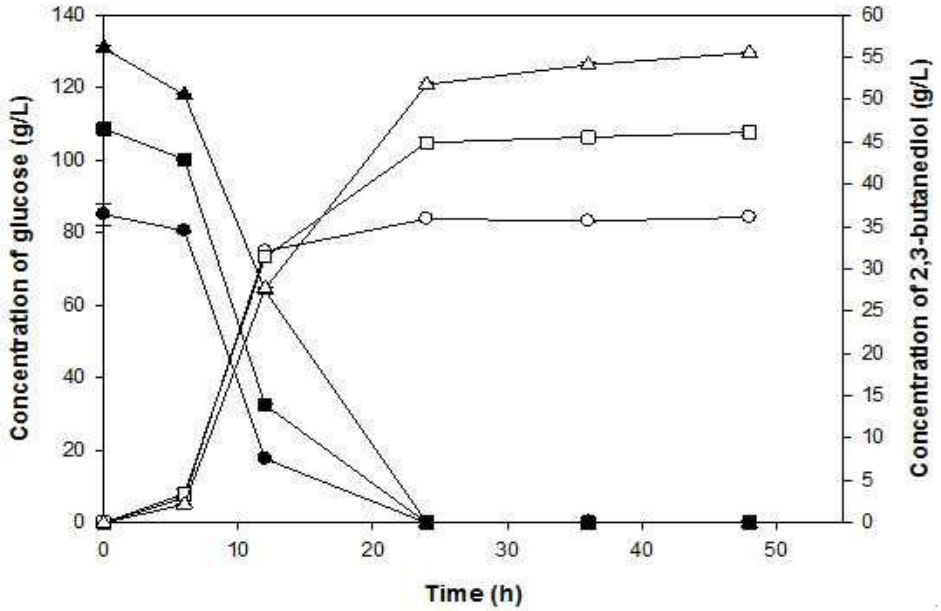
도면4



도면5


Concentration of glucose (g/L)
Concentration of 2,3-butanediol (g/L)
Time (h)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
10
20
30
40
50

도면6


Concentration of glucose (g/L)
Concentration of 2,3-butanediol (g/L)
Time (h)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
0
10
20
30
40
50