

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2013년 1월 24일 (24.01.2013)



(10) 국제공개번호  
WO 2013/012293 A9

- (51) 국제특허분류:  
C12P 7/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)  
C12P 7/18 (2006.01) C12R 1/22 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/005832
- (22) 국제출원일: 2012년 7월 20일 (20.07.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2011-0072431 2011년 7월 21일 (21.07.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국 생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김철호 (KIM, Chul Ho) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR). 서정우 (SEO, Jeong-Woo) [KR/KR]; 305-333

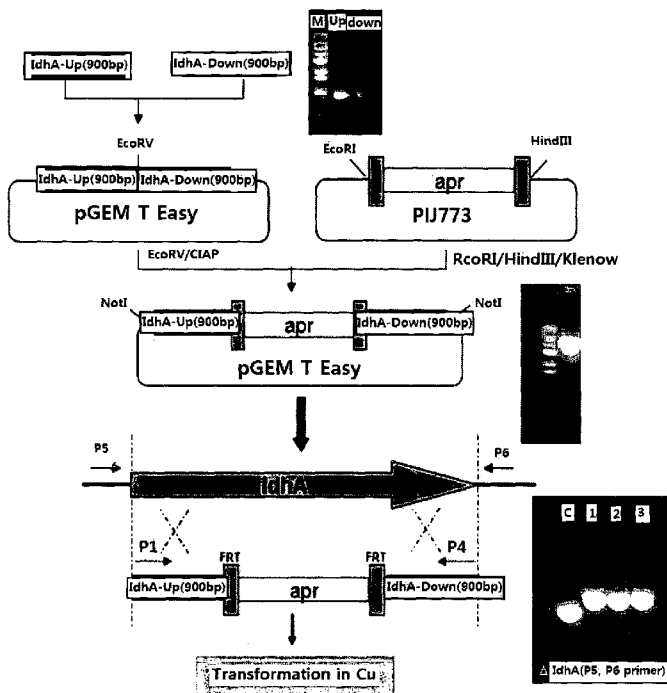
대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR). 오백록 (OH, Baek Rock) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR). 허선연 (HEO, Sun Yeon) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR).

- (74) 대리인: 이치영 (LEE, Cheo Young); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 역삼빌딩 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING DIOL COMPOUND AT HIGH YIELD USING GLYCEROL FERMENTATION MICROORGANISM VARIANT

(54) 발명의 명칭 : 글리세롤 발효 미생물 변이체를 이용하여 디올화합물을 고수율로 생산하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a diol compound from glycerol using a variant strain, and more specifically to a method for producing 1,3-propanediol and 2,3-butanediol at a high yield by using a variant of a microorganism capable of fermenting glycerol that lacks a gene for coding lactate dehydrogenase. According to the present invention, the production amount of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol can be significantly improved through a novel culturing method of a glycerol fermentation microorganism variant.

(57) 요약서: 본 발명은 변이균주를 이용하여, 글리세롤로부터 디올화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 글리세롤 발효능력을 보유한 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 결손시킨 변이체를 이용하여 고수율로 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 글리세롤 발효 미생물 변이체의 새로운 배양 방법을 통하여 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 생산량을 월등히 개선할 수 있다.

WO 2013/012293 A9



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못된 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2013년 3월 28일

(48) 본 정정판 공개일: 2013년 5월 16일

(15) 정정사항에 관한 정보: 2013년 5월 16일 자 공지 참조

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 글리세롤 발효 미생물 변이체를 이용하여 디올화합물을 고수율로 생산하는 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 변이균주를 이용하여, 글리세롤로부터 디올 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 글리세롤 발효능력을 보유한 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 결손시킨 변이체를 이용하여 고수율로 디올화합물인 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 현행 바이오 디젤 제조 공정의 주된 부산물로서 전체 생산의 약 10%(w/w)에 해당하는 양의 폐글리세롤 (crude glycerol)이 발생한다 (Johnson and Taconi, *Environ Prog*, 26:338,2007). 이러한 폐글리세롤은 기존의 전통적인 글리세롤 시장의 가격에 영향을 미칠 뿐 아니라, 직접 환경에 방출될 수 없기 때문에 처리 비용 등 중요한 환경 문제 요인으로 대두되고 있다 (da Silva *et al. Biotechnol Adv*, 27:30,2009). 따라서 저가의 폐글리세롤을 이용하여 연료 및 생리 활성 물질을 포함한 산업적으로 가치 있는 물질로 전환하기 위한 방법의 개발이 활발하게 진행 중이다.

- [4] 글리세롤은 미생물 발효에 의해 다양한 화학원료 전환이 가능하며, 대표적인 예가 1,3-프로판디올이다. 1,3-프로판디올은 폴리에스터(polyester), 폴리에테르(polyether), 혹은 폴리우레탄(polyurethanes) 등의 합성원료로 사용될 수 있는 물질로, 고기능성 의류, 카펫, 자동차직물 등의 섬유와 플라스틱 필름 등의 다양한 용도로 쓰이고 있다. 특히 1,3-프로판디올과 테레프탈릭산(terephthalic acid)의 중합반응에 의해 생성되는 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트(polytrimethylene terephthalate, PTT)는 물성이 우수하고 유점이 228°C로 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 보다 낮아 실질적인 효용성이 높아 향후 PET를 대체할 수 있는 차세대 섬유재료로서 주목을 받고 있다. 또한, 1,3-프로판디올을 단량체로 하여 만든 플라스틱과 중합체는 부탄디올, 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)로 만든 제품보다 더 우수한 광학 안정성을 가지는 특성을 나타낸다. 또한 1,3-프로판디올은 폴리글리콜 형태(polyglycol-type)의 윤활제와 용매로 사용될 수 있어 글리세롤에 비해 그 상업적 가치를 높게 평가 받고 있다. 또한 글리세롤의 미생물 발효에 의해 합성고무의 제조 원료로 활용이 가능하 2,3-부탄디올이 생산될 수 있다.

- [5] 글리세롤의 발효 대사가 가능한 미생물로는 클로스트리디움(*Clostridium*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 크렙시엘라(*Klebsiella*), 락토바실러스(*Lactobacillus*)

)등이 알려져 있으며, 이들을 이용하여 1,3-프로판디올을 생성하는 방법(미국특허 제 5,254,467호), 유전공학적인 방법으로는 글리세롤디하이드로게나아제 유전자를 증폭 또는 녹아웃시킨 변이체를 이용하여 1,3-프로판디올의 생성능을 향상시킨 경우가 있으나(US 2007/0148749), 상용화를 위해서는 생산 수율의 개선이 필요한 실정이다.

[6] 이에, 본 발명자들은 글리세롤을 이용하여 1, 3-프로판디올과 같은 화학원료를 고수율로 생산하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 글리세롤 발효미생물 균주에서 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결손된 변이체의 배양 조건을 개선하여 디올 화합물인 1,3-프로판디올 및 2,3-부탄디올의 생산수율을 크게 증가시킬수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

[8] 발명의 요약

[9] 본 발명은 글리세롤 발효 미생물 변이체를 배양하여 디올화합물을 고수율로 생산하기 위한 방법을 제공하는 데 있다.

[10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글리세롤로부터 1, 3-프로판디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 글리세롤 함유 배지에서 배양하여 1, 3- 프로판디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 1, 3-프로판디올을 수득하는 단계를 포함하는 1, 3-프로판디올의 제조방법을 제공한다.

[11] 본 발명은 또한, 글리세롤로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 글리세롤 함유 배지에서 배양하여 2,3-부탄디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2,3-부탄디올을 수득하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올의 제조방법을 제공한다.

[12]

### 도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 *K.pneumoniae*  $\Delta$ ldhA 변이 균주의 제작 과정을 나타낸 것이다.

[14] 도 2는 중성 배양조건 (pH 7.0)에서 글리세롤 발효 배양결과를 나타낸 것이다.

[15] 도 3은 산성 배양조건 (pH 6.0)에서 글리세롤 발효 배양결과를 나타낸 것이다.

[16] 도 4는 공기주입량 1.0 (A), 2.0 (B), 3.5 (C)에서 글리세롤 발효 배양결과를 나타낸 것이다.

[17] 도 5는 글리세롤 농도 30-80 g/l에서 글리세롤 발효 배양결과를 나타낸 것이다.

[18]

[19] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

[20] 본 발명은 변이균주를 이용하여, 글리세롤로부터 디올 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로 구체적으로는 변이균주를 이용하여 글리세롤로부터 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[21] 일관점에서, 본 발명은 글리세롤로부터 1, 3-프로판디올을 생산하는 능력을

가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 30~80 g/l의 글리세롤 함유하고, pH 5.5~6.5인 배지에서 1.5~2.5vvm의 공기주입량으로, 배양하여 1, 3- 프로판디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 1, 3-프로판디올을 수득하는 단계를 포함하는 1, 3-프로판디올의 제조방법에 관한 것이다.

- [22] 본 발명에 있어서, 상기 글리세롤로부터 1, 3-프로판디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물은 크렙시엘라 뉴모니아인 것이 바람직하며, 글라이세롤을 유일 탄소원으로 함유하는 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.
- [23] 본 발명의 일 실시예에서는 *K. pneumoniae*의 염색체상에서 D-락테이트 디하이드라아제(lactate dehydrogenase) 유전자 (*ldhA*)가 제거된 균주를 30~80g/L의 글리세롤 농도로 유지되는 pH 6.0의 배지에서 2.0vvm의 공기주입량으로 배양하여, 102.7g/L의 1,3 프로판디올을 생산하였다.
- [24] 이는 기존의 *ldhA* 유전자가 제거된 변이체 균주를 20 g/l 글리세롤 함유 pH 7.0 배지에서, 0.5vvm의 공기공급량으로 배양하여, 1, 3 프로판디올을 생산할 때의 1, 3 프로판디올의 생산량이 69.3g/L이었던데 비하여 월등히 향상된 양이라고 할 수 있다.
- [25] 다른 관점에서, 본 발명은 글리세롤로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 10~60g/l의 글리세롤 함유하고, pH 5.5~6.5인 배지에서 3.0~4 vvm의 공기주입량으로, 배양하여 2,3-부탄디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2,3-부탄디올을 수득하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올의 제조방법에 관한 것이다.
- [26] 본 발명에서 상기 글리세롤로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물은 크렙시엘라 뉴모니아인 것이 바람직하며, 글라이세롤을 유일 탄소원으로 함유하는 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에서는 *K. pneumoniae*의 염색체상에서 D-락테이트 디하이드라아제(lactate dehydrogenase) 유전자 (*ldhA*)가 제거된 균주를 10~60g/L의 글리세롤 농도로 유지되는 pH 6.0의 배지에서 3.5vvm의 공기주입량으로 배양하여, 71.5g/L의 2,3-부탄디올을 생산하였다.
- [28] 이는 기존의 *ldhA* 유전자가 제거된 변이체 균주를 20 g/l 글리세롤 함유 pH 7.0 배지에서, 0.5vvm의 공기공급량으로 배양하여, 2,3-부탄디올을 생산할 때의 생산량이 38.0g/L이었던데 비하여 월등히 향상된 양이라고 할 수 있다.
- [29] 본 발명에 있어서, 유전자의 "결실"이란 상기 유전자가 염색체상 또는 플라스미드 상에서 삭제되어 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 생산할 수 없게 된 상태를 의미하고, 유전자의 "불능화"란 상기 유전자가 삽입, 전좌, 일부결실 등에 의하여, 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하지 못하게 된 상태를 의미한다.
- [30] 본 발명에 따른 변이체의 배양은 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있으며, 배양 온도 및 시간, 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다. 상기

변이체의 배양액으로부터의 1,3-프로판디올의 회수는 통상적인 분리 기술, 예를 들어 증류, 전기투석, 투과증발, 크로마토그래피, 용매추출, 반응추출 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 물질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용할 수 있다.

[31] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[32]

[33] 실시예 1: 크렙시엘라 뉴모니아에서 젖산 생성이 결손된 변이주의 제조

[34]

[35] *K. pneumoniae*의 염색체 상에 존재하는 D-락테이트 디하이드라아제(lactate dehydrogenase) 유전자 (*ldhA*)를 항생제 아프라마이신(apramycin) 내성 유전자로 치환하여 염색체상에서 제거하였다.

[36] 이를 위하여, 먼저 *ldhA* 유전자의 상류 부위와 하류 부위를 각 900bp 정도 PCR법으로 증폭하여 연결한 후, 그 중간에 apramycin 내성유전자가 삽입된 DNA 단편을 제작하였다. 제작된 DNA 단편을 *K. pneumoniae* 균주(ATCC 20071)에 도입한 후 항생제 apramycin이 첨가된 배지에서 콜로니를 형성하는 재조합 균주를 획득하였다. 얻어진 재조합 균주의 염색체 DNA를 PCR로 분석하여 상동성재조합(homologous recombination)이 정확하게 일어났음을 확인하여 최종적으로 *ldhA* 유전자가 결손된 변이 균주 ( $\Delta ldhA$ )를 확보하였다.

[37]

[38] 표 1

[Table 1]

*Klebsiella pneumoniae*  $\Delta ldhA$  변이균주의 제조 과정에 사용된 올리고 뉴클레오타이드 서열

Primer	Sequence
ldhA up	F: CAGCCAGACGGGAATAGCTT(서열번호 1)
	R: CGCCAAATTTTCTGGTGCTTCAGATATCGCCTCAAGGTCGACGTTGTTAA(서열번호 2)
ldhA down	F: TTAACAACGTCGACCTTGAGGCGATATCTGAAGCACCAGAAAATTGGCG(서열번호 3)
	R: AGCTCGATGGTTCGGCGATT(서열번호 4)

[39]

[40] 실시예 2: 젖산 생성 결손 변이균주의 배양

[41]

[42] 유일 탄소원으로 글리세롤을 포함하는 배지에서 실시예 1에서 제작된  $\Delta ldhA$  균주를 유가식 발효 배양하여 대사물질을 분석하였다.

[43] 배지조성은 20 g/l 글리세롤, 3.4g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.3g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2g/l MgSO<sub>4</sub>,

0.002g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1g/l 효모추출물, 1ml/L 철용액 [5g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4ml HCl(37%,w/v)] 및 1ml/L 미량원소용액 [70mg/l ZnCl<sub>2</sub>, 100mg/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 60mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200mg/l CoCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 20mg/l CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25mg/l NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 35mg/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4ml HCl(37%,w/v)]이다.

[44] 상기 배지 2 L를 첨가한 5-L 발효조에 균체 접종량 10%, 배양온도 37°C, 교반속도 200 rpm, pH 7.0, 공기 공급속도는 0.5 vvm)을 수행하였을 때, 대조 균주는 배양 후반부에 젖산의 생산량이 급격히 증가하여 35.2 g/L 이상인 반면,  $\Delta ldhA$  균주는 젖산이 거의 생성되지 않았으며, 1,3-프로판디올의 생산량은 약 69.3 g/L로 야생형 균주인 대조구(Cu)에 비해 약 10%의 높은 것으로 나타났다. 이때 시간당 생산성과 전환율은 각각 1.33 g/h, 0.42 mol/mol (1,3-프로판디올/글리세롤)이었다 (도 1). 한편 2,3-부탄디올의 생산량은 32.5 g/l 이었다.

[45]

[46] 표 2

[Table 2]

중성 배양조건 (pH 7.0)에서 글리세롤 발효 배양

	Cu	$\Delta ldhA$
Glycerol consumed (g/l)	182.6	199.5
1,3-Propanediol (g/l)	63.4	<b>69.3</b>
2,3-Butanediol (g/l)	15.4	<b>32.5</b>
Lactate (g/l)	35.2	0.0
Succinate (g/l)	5.7	14.9
Acetate (g/l)	3.0	2.2
Ethanol (g/l)	7.8	8.9
1,3-PD conversion (mol/mol)	0.42	0.42
1,3-PD productivity (g/l.h)	1.32	1.33

[47]

[48] 실시예 3.  $\Delta ldhA$  변이균주의 최적 배양 pH 조건

[49]

[50] 본 실시예에서는  $\Delta ldhA$  변이균주에 의한 1,3-프로판디올 생산에 최적인 배양액의 pH를 확인하였다. 일반적으로 *K. pneumoniae* 균주들이 중성의 pH에서 최고의 1,3-프로판디올 생산을 보이는 것과는 대조적으로  $\Delta ldhA$  변이균주는 배양액의 pH를 6으로 낮추어 주었을 때, 더 많은 1,3-프로판디올을 생산하는 것으로 나타났다 (도 2). 최종적으로 1,3-프로판디올의 생산량은 80.8 g/L였으며, 글리세롤로부터 전환율과 시간당 생산성은 각각 0.50 mol/mol과 1.39 g/h였다. 마찬가지로 2,3-부탄디올의 생산량 또한 38.0 g/l로 증가하였다.

[51]

[52] 표 3

[Table 3]

산성 배양조건 (pH 6.0)에서 글리세롤 발효 배양

	Cu	$\Delta IdhA$
Glycerol consumed (g/l)	169.5	196.7
1,3-Propanediol (g/l)	56.9	80.8
2,3-Butanediol (g/l)	18.0	38.0
Lactate (g/l)	13.6	0.0
Succinate (g/l)	3.5	8.6
Acetate (g/l)	3.0	2.4
Ethanol (g/l)	4.0	4.8
1,3-PD conversion (mol/mol)	0.42	0.50
1,3-PD productivity (g/l.h)	1.17	1.39

[53]

[54] 실시예 4. 최적 공기주입량 조건

[55]

[56]  $\Delta IdhA$  변이균주를 다양한 공기 주입량 조건에서 배양하여, 1,3-프로판디올 생산량을 조사하였다 (도 4 1.0vvm: 도 4A, 2.0vvm: 도 4B, 3.5vvm: 도 4C).

[57] 배양 조건은 2% 글리세롤을 함유 2 L 배지, 접종량 10%, pH 6, 배양온도 37°C, 교반속도 200 rpm이었다. 공기 주입량이 2.0 vvm일 때 1,3-프로판디올의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났으며 (94.3 g/L), 3.5 vvm에서는 다시 감소하는 것으로 나타났다 (52.6 g/L). 한편, 글리세롤로부터 2,3-부탄디올의 생산량은 3.4 vvm일 때 가장 높은 것을 나타냈다 (71.5 g/L) (표 4).

[58]

[59] 표 4

[Table 4]

$\Delta IdhA$  변이균주의 글리세롤 발효에 대한 공기주입량과 glycerol 농도의 영향

	Cu	$\Delta IdhA$				
	C1	C1	C2	C3	C4	C5
Glycerol consumed (g/l)	169.5	196.7	240.0	255.8	306.3	251.0
1,3-Propanediol (g/l)	56.9	80.8	90.6	94.3	52.6	102.7
2,3-Butanediol (g/l)	18.0	38.0	62.7	57.9	71.5	54.0
Lactate (g/l)	13.6	ND	ND	ND	ND	ND
Succinate (g/l)	3.5	8.6	14.5	11.8	12.5	11.4
Acetate (g/l)	3.0	2.4	6.1	3.5	7.0	6.1
Ethanol (g/l)	4.0	4.8	5.0	5.5	4.1	0.8
1,3-PD conversion (mol/mol)	0.42	0.50	0.46	0.45	0.21	0.50
1,3-PD productivity (g/l.h)	1.17	1.39	1.51	1.55	1.28	1.53

C1; pH 6.0, 0.5 vvm, glycerol feed 10-60 g/l.

C2; pH 6.0, 1.0 vvm, glycerol feed 10-60 g/l.

C3; pH 6.0, 2.0 vvm, glycerol feed 10-60 g/l.

C4; pH 6.0, 3.5 vvm, glycerol feed 10-60 g/l.

C5; pH 6.0, 2.0 vvm, glycerol feed 30-80 g/l.

ND, not detected.

[60]

[61] 실시예 5. 글리세롤 농도의 영향

[62]

[63] *ΔldhA* 변이균주의 발효배양에서 글리세롤 농도의 영향을 조사하였다 (도 5). 배양 조건은 2% 글리세롤을 함유 2 L 배지, 접종량 10%, pH 6, 배양온도 37°C, 교반속도 200 rpm, 공기주입량은 2.0 vvm이었다. 발효배양액 중의 글리세롤 농도를 30~80 g/l 수준으로 높여주었을 때, 1,3-프로판디올의 생산량은 최대로 증가하는 것으로 나타났다 (102.7 g/l) (표 4).

[64]

[65] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[66]

#### 산업상 이용가능성

[67] 본 발명에 따르면, 글리세롤 발효 미생물 변이체의 새로운 배양 방법을 통하여 1,3-프로판디올 혹은 2,3-부탄디올의 생산량을 월등히 개선할 수 있다.

[68]

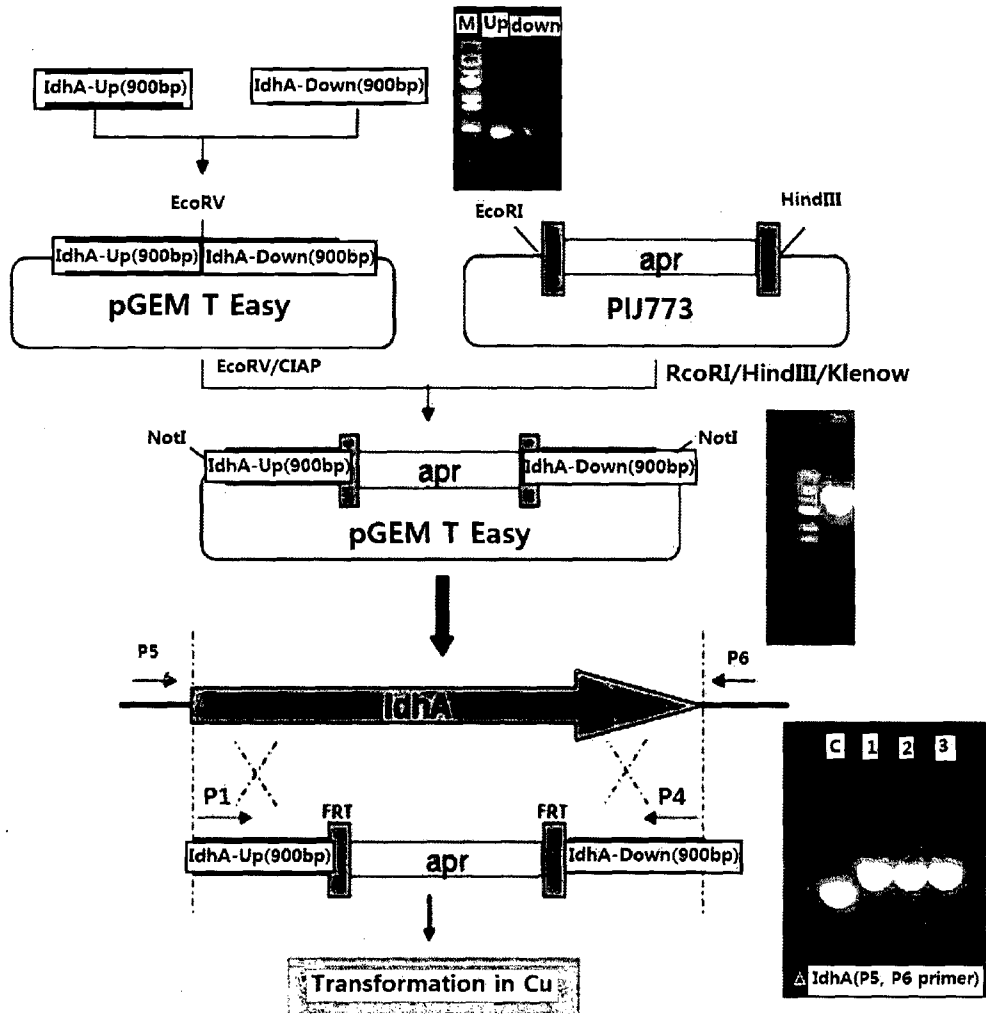
#### 서열목록 Free Text

[69] 전자파일 첨부하였음.

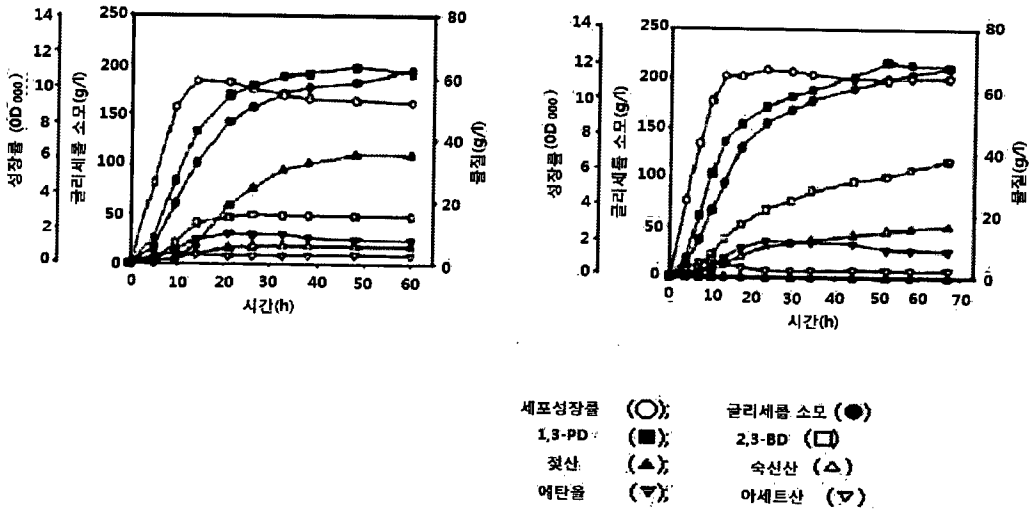
## 청구범위

- [청구항 1] 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 30~80 g/l의 글리세롤 함유하고, pH 5.5~6.5인 배지에서 1.5~2.5vvm의 공기주입량으로, 배양하여 1,3-프로판디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 1,3-프로판디올을 수득하는 단계를 포함하는 1,3-프로판디올의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물은 크렙시엘라 뉴모니아인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 배지는 글라이세롤을 유일 탄소원으로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 글리세롤로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물에서 락테이트 디하이드로게나아제 유전자를 결실시킨 균주를 10~60g/l의 글리세롤 함유하고, pH 5.5~6.5인 배지에서 3.0~4 vvm의 공기주입량으로, 배양하여 2,3-부탄디올을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2,3-부탄디올을 수득하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올의 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 글리세롤로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 능력을 가지는 미생물은 크렙시엘라 뉴모니아인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 배지는 글라이세롤을 유일 탄소원으로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

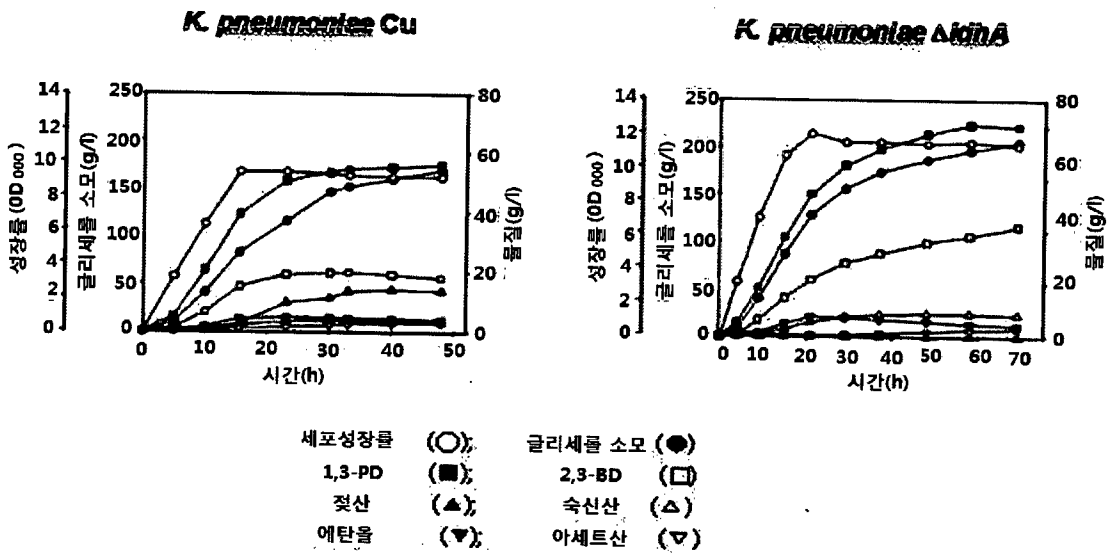
[Fig. 1]



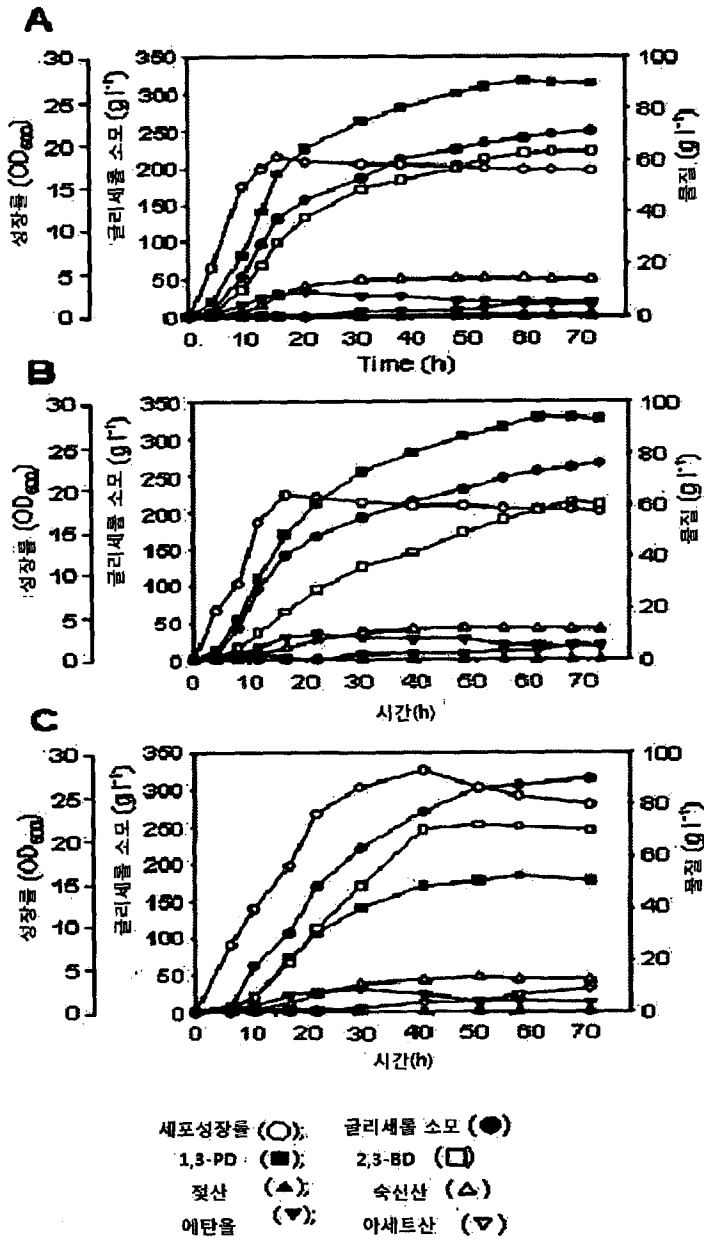
[Fig. 2]



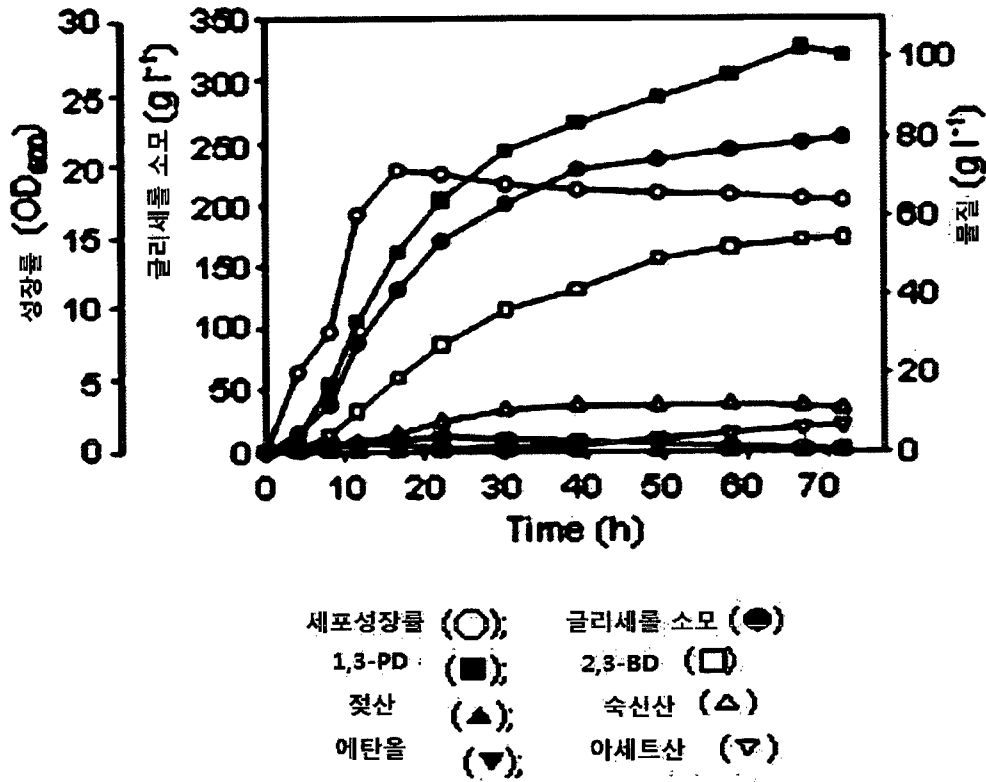
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2012/005832**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12P 7/02(2006.01)i, C12P 7/18(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12R 1/22(2006.01)n**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 7/02; C12N 15/63; C12P 7/18; C07C 31/20; C12N 15/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, lactate dehydrogenase, glycerol

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU, Y. et al., Metabolism in 1,3-Propanediol Fed-Batch Fermentation by a D-Lactate Deficient Mutant of Klebsiella pneumoniae, Biotechnology & Bioengineering, 2009, Vol. 104, No. 5 (965-972) See abstract, pages 967-968.	1-6
Y	YANG, G. et al., Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of Klebsiella oxytoca under microaerobic conditions, Appl Microbiol Biotechnol, 2007, Vol. 73 (1017-1024) See abstract, pages 1018-1021.	1-6
A	US 2010-0137655 A1 (SOUCAILLE PHILIPPE) 03 June 2010 See abstract, claims 1, 4, 10.	1-3
A	KR 10-2010-0102928 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 27 September 2010 See abstract, page 8, claim 2.	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 JANUARY 2013 (30.01.2013)

Date of mailing of the international search report

**31 JANUARY 2013 (31.01.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/005832**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0137655 A1	03.06.2010	AR065833A1 BR P10622099A2 CA 2665448 A1 CN 101528936 A EP 2084288 A1 EP 2400027 A1 JP 2010-508013 A JP 2010-508013 T KR 10-2009-0090319 A MX 2009004659 A TW 200835793 A US 8236994 B2 WO 2008-052595 A1	08.07.2009 27.12.2011 08.05.2008 09.09.2009 05.08.2009 28.12.2011 18.03.2010 18.03.2010 25.08.2009 22.05.2009 01.09.2008 07.08.2012 08.05.2008
KR 10-2010-0102928 A	27.09.2010	NONE	

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
  
*C12P 7/02(2006.01)i, C12P 7/18(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12R 1/22(2006.01)n*

**B. 조사된 분야**  
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12P 7/02; C12N 15/63; C12P 7/18; C07C 31/20; C12N 15/52

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, lactate dehydrogenase, glycerol



**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	XU, Y. et al., Metabolism in 1,3-Propanediol Fed-Batch Fermentation by a D-Lactate Deficient Mutant of Klebsiella pneumoniae, Biotechnology & Bioengineering, 2009, Vol.104, No.5 (965-972) 초록, 페이지 967-968 참조	1-6
Y	YANG, G. et al., Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of Klebsiella oxytoca under microaerobic conditions, Appl Microbiol Biotechnol, 2007, Vol.73 (1017-1024) 초록, 페이지 1018-1021 참조	1-6
A	US 2010-0137655 A1 (SOUCAILLE PHILIPPE) 2010.06.03 요약, 청구항 1, 4, 10 참조.	1-3
A	KR 10-2010-0102928 A (한국생명공학연구원) 2010.09.27 요약, 페이지 8, 청구항 2 참조.	1-6

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌  
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2013년 01월 30일 (30.01.2013)	국제조사보고서 발송일 <b>2013년 01월 31일 (31.01.2013)</b>
--------------------------------------------	--------------------------------------------------

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 한지혜 전화번호 82-42-481-3335 
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0137655 A1	2010.06.03	AR065833A1 BR PI0622099A2 CA 2665448 A1 CN 101528936 A EP 2084288 A1 EP 2400027 A1 JP 2010-508013 A JP 2010-508013 T KR 10-2009-0090319 A MX 2009004659 A TW 200835793 A US 8236994 B2 WO 2008-052595 A1	2009.07.08 2011.12.27 2008.05.08 2009.09.09 2009.08.05 2011.12.28 2010.03.18 2010.03.18 2009.08.25 2009.05.22 2008.09.01 2012.08.07 2008.05.08
KR 10-2010-0102928 A	2010.09.27	없음	