



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0080709  
(43) 공개일자 2017년07월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07C 29/76 (2006.01) C07C 33/025 (2006.01)  
C12P 7/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07C 29/76 (2013.01)  
C07C 33/025 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7017719(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년06월03일  
심사청구일자 2017년06월27일
- (62) 원출원 특허 10-2012-7000120  
원출원일자(국제) 2010년06월03일  
심사청구일자 2015년06월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년06월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/037329
- (87) 국제공개번호 WO 2010/141780  
국제공개일자 2010년12월09일
- (30) 우선권주장  
61/184,292 2009년06월04일 미국(US)

- (71) 출원인  
게노마티카 인코포레이티드  
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 텍서스 센터  
드라이브 4757
- (72) 발명자  
클락 워렌  
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨  
클 10520  
캡스 마이클  
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨  
클 10520  
버크 마크 제이  
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨  
클 10520
- (74) 대리인  
제일특허법인

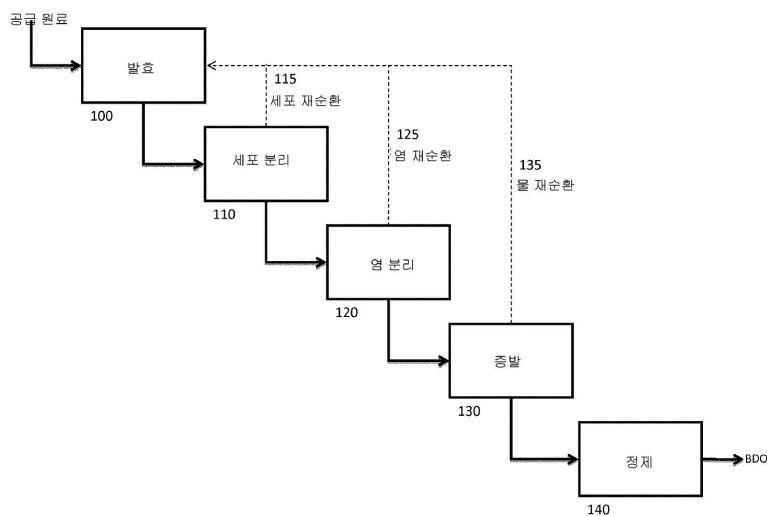
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 발효액 성분들의 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)이 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; 상기 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; 상기 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 1,4-BDO를 정제하는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 분리하는 방법에 관한 것이다. 1,4-BDO를 생성하는 방법은 1,4-BDO-생성 미생물을 발효조에서 1,4-BDO를 생성하기에 충분한 시간동안 배양하는 단계를 포함한다. 1,4-BDO-생성 미생물은 1,4-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 유전자 파괴를 갖는 1,4-BDO 경로를 갖는 미생물을 포함한다. 1,4-BDO의 생성 방법은 또한 1,4-BDO를 분리하는 단계를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류  
*C12P 7/18* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)이 농축된 액체 분획을 분리하는 단계;  
상기 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계;  
상기 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및  
1,4-BDO를 정제하는 단계  
를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
액체 분획을 분리하는 단계가 원심분리를 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,  
원심분리가 디스크-적층식 원심분리기를 사용하여 달성되는, 방법.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서,  
원심분리가 경사분리 원심분리기를 사용하여 달성되는, 방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,  
액체 분획을 분리하는 단계가 미세여과를 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제 5 항에 있어서,  
미세여과가 약 0.05 내지 약 5.0  $\mu\text{m}$ 의 공극 크기를 갖는 막을 통해 여과시키는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제 2 항 또는 제 5 항에 있어서,  
액체 분획을 분리하는 단계가 한외여과를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,  
한외여과가 약 0.005 내지 약 0.1  $\mu\text{m}$ 의 공극 크기를 갖는 막을 통해 여과시키는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,  
물을 제거하는 단계가 하나 이상의 효용기(effect)를 포함하는 증발기 시스템을 사용한 증발에 의해 달성되는,  
방법.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서,  
증발기 시스템이 이중- 또는 삼중-효용 증발기를 포함하는, 방법.

**청구항 11**

제 9 항에 있어서,  
증발기 시스템이 열 재압축기를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 12**

제 9 항에 있어서,  
증발기 시스템이 기계적 재압축기를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 13**

제 9 항에 있어서,  
증발기 시스템이 강하막 증발기, 단거리 강하막 증발기, 강제 순환 증발기, 판형 증발기, 순환 증발기, 유동층 증발기, 상승막 증발기, 역류-유하식 증발기, 교반 증발기 및 나선형 튜브 증발기로 이루어진 군으로부터 선택된 증발기를 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제 9 항에 있어서,  
증발기 시스템이 진공을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서,  
실질적으로 모든 염이 물이 제거되기 전에 제거되는, 방법.

**청구항 16**

제 1 항에 있어서,  
실질적으로 모든 염이 물의 일부가 제거된 후에 제거되는, 방법.

**청구항 17**

제 1 항에 있어서,  
염이 실질적으로 모든 물이 제거된 후에 제거되는, 방법.

**청구항 18**

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서,  
염의 적어도 일부가 나노여과에 의해 제거되는, 방법.

**청구항 19**

제 18 항에 있어서,  
나노여과가 약 0.0005 내지 약 0.005  $\mu\text{m}$ 의 공극 크기 범위를 갖는 막을 통해 여과시키는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 20**

제 15 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

염의 적어도 일부가 이온 교환에 의해 제거되는, 방법.

**청구항 21**

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서,  
염이 결정화에 의해 제거되는, 방법.

**청구항 22**

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서,  
염이 침전에 의해 제거되는, 방법.

**청구항 23**

제 1 항에 있어서,  
염이 결정화기 장치의 사용에 의해 제거되는, 방법.

**청구항 24**

제 23 항에 있어서,  
결정화기 장치가 강제 순환 결정화기, 오슬로형 결정화기, 드래프트 튜브 베플 결정화기 및 유도 순환 결정화기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 25**

제 1 항에 있어서,  
세포를 포함하는 고체 분획이 발효액내로 재순환되는, 방법.

**청구항 26**

제 1 항에 있어서,  
제거된 물이 발효액내로 재순환되는, 방법.

**청구항 27**

제 1 항에 있어서,  
제거된 염이 발효액내로 재순환되는, 방법.

**청구항 28**

제 1 항에 있어서,  
1,4-BDO의 정제가 증류를 포함하는, 방법.

**청구항 29**

디스크 적층식 원심분리로 고체의 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계;  
한외여과로 액체 분획으로부터 추가 분량의 고체를 제거하는 단계;  
증발 결정화로 액체 분획으로부터 염의 일부를 제거하는 단계;  
이온 교환으로 액체 분획으로부터 추가 분량의 염을 제거하는 단계; 및  
1,4-BDO를 증류시키는 단계  
를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법.

**청구항 30**

제 29 항에 있어서,

염의 일부를 제거하는 단계가 결정화기 장치를 사용하여 달성되고, 상기 결정화기 장치가 강제 순환 결정화기, 오슬로형 결정화기, 드래프트 튜브 배플 결정화기 및 유도 순환 결정화기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 31**

제 29 항에 있어서,

이온 교환으로 추가 분량의 염을 제거하는 단계가 양이온 교환 컬럼, 음이온 교환 컬럼, 혼합층 컬럼 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 이온 교환 컬럼에 액체 분획을 통과시키는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 32**

디스크 적층식 원심분리로 고체의 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계;

한외여과로 액체 분획으로부터 추가 분량의 고체를 제거하는 단계;

나노여과로 액체 분획으로부터 염의 일부를 제거하는 단계;

이온 교환으로 액체 분획으로부터 추가 분량의 염을 제거하는 단계;

물의 일부를 증발시키는 단계; 및

1,4-BDO를 증류시키는 단계

를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법.

**청구항 33**

제 32 항에 있어서,

이온 교환으로 추가 분량의 염을 제거하는 단계가 양이온 교환 컬럼, 음이온 교환 컬럼, 혼합층 이온 교환 컬럼 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 이온 교환 컬럼에 액체 분획을 통과시키는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 34**

제 32 항에 있어서,

물의 일부를 증발시키는 단계가 액체 분획을 증발기 시스템에 통과시키는 것을 포함하고, 상기 증발기 시스템이 강하막 증발기, 단거리 강하막 증발기, 강제 순환 증발기, 관형 증발기, 순환 증발기, 유동층 증발기, 상승막 증발기, 역류-유하식 증발기, 교반 증발기, 나선형 튜브 증발기 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 효용기를 포함하고, 상기 증발기 시스템이 선택적으로 열 재압축기, 기계적 재압축기 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 재압축기를 포함하는 재압축 시스템을 포함하는, 방법.

**청구항 35**

1,4-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 유전자 파괴를 포함하는 1,4-BDO 경로를 갖는 미생물을 포함하는 1,4-BDO-생성 미생물을 발효조에서 1,4-BDO를 생성하기에 충분한 시간동안 배양하는 단계; 및

제 29 항 또는 제 32 항에 따른 방법으로 1,4-BDO를 단리하는 단계

를 포함하는, 1,4-BDO를 생성하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 출원은 본원에 그 전체가 참고로 인용된, 2009년 6월 4일자로 출원된 미국 가출원 제 61/184,292 호를 우선권 주장한다.

[0001]

[0002] 본 발명은 일반적으로 발효액의 성분들의 분리에 관한 것이며, 보다 특히 다른 발효액 성분들로부터 물보다 높은 비점을 갖는 수산화성 화합물의 단리에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 세포 덩어리, 잔류 배지 및 배지 염, 슈크로스 및/또는 글루코스와 같은 잔류 기질, 및 물을 포함하는 발효에서 성분들을 분리하고 선택적으로 재순환시키는 능력을 갖는 공정 양식을 설계하기 위해 환경 및 비용 감소 장려책이 존재한다. 발효 생산성을 개선하기 위한 수단으로서 세포 덩어리를 재순환시키기 위한 노력도 또한 기울여왔다. 잔류 배지 및 배지 염을 발효에 재사용하기 위해 회수하는 분야에서의 노력은 덜하였다. 이와 관련하여, 대부분의 노력은 후속의 회수보다 초기 배지 비용을 감소시키는데 초점을 맞추었다. 그 결과 얻어진 "저비용" 배지는 종종 세포 성장 및 생성물 생산에 최적이지 않다. 배지 성분들의 회수에 효과적인 방법을 개발함으로써, 초기 낮은 재료 비용에 대한 제한이 보다 덜하면서 보다 최적의 배지 배합법을 이용할 수 있다.

[0004] 유용한 순도하에 대규모로 화합물의 단리는 공정 화학에서 복잡한 문제이다. 규모 단독에서의 차이는 실험실 벤치탑 규모로 개발된 단리 절차를 비실용적으로 만들거나 심지어 파일럿 또는 상업적 규모에서 실행할 수 없게 만들 수 있다. 복잡한 혼합물로부터 화합물의 단리는 화합물이 주위 온도에서 고체인지 액체인지 여부, 화합물 비점, 밀도, 극성, pH 민감성 작용기의 존재 또는 부재, 및 유기 용매 대 물에서의 용해도를 포함한 많은 요인들에 따라 달라진다. 이들 요인들은 또한 그로부터 해당 화합물이 단리될 혼합물의 모든 다른 성분들에 적용된다. 상기 요인들이 화합물, 특히 유기 화합물의 단리에 미치는 또 다른 성질은 그것이 두 비혼화성 상 사이에, 예를 들면, 물과 유기 용매 사이에 어떻게 분배되는가이다. 특히 극성인 화합물은 종종 추출 과정에서 사용되는 통상적인 유기 용매중에서보다 물에서 더 가용성이다. 일부 화합물들이 그의 양친매성 특성으로 인해 추출 방법에 의해 물로부터 단리하기 위해 특별히 도전중이다. 양친매성 물질은 극성 부분과 친유성 부분 둘 다를 갖는 화합물이다. 이들 화합물은 다루기 어려운 유화액을 야기함으로써 추출에 의한 단리를 복잡하게 할 수 있다.

[0005] 또한, 화합물이 발효로부터 제조되는 경우, 물의 양은 해당 화합물보다 실질적으로 더 높아서 복잡한 혼합물로부터 미량 성분의 단리를 필요로 할 수 있다. 물보다 더 고온에서 비등하는 화합물의 단리는 또한, 상기 화합물이, 예를 들면, 에탄올 발효 과정에서의 경우에서와 같이 발효액으로부터 직접 증류될 수 없기 때문에, 복잡성 및 분리 비용을 부가시킨다. 이와 관련하여, 해당 화합물과 물 사이의 상호작용은 두 물질이 두 정제된 성분들과 상이한 비점에서 공비혼합물로서 공-증류되게 할 수 있다. 공비혼합물의 생성은 용이하게 예측할 수 없다. 이것은 해당 화합물을 물로부터 분리하고자 하는 경우 상기 화합물의 회수를 감소시킬 수 있다. 화합물이 극성 작용기를 갖는 경우, 또 다른 관심은, 예를 들어, 임의의 염 및 금속 이온을 포함하여 수성 상에 존재하는 다른 화합물과 어떻게 상호작용할 수 있는 가이다.

[0006] 해당 화합물에 존재하는 작용기의 성질은 염의 분리를 복잡하게 만들 수 있다. 예를 들면, 화합물의 하나 이상의 작용기는 양이온 또는 음이온과 상호작용하거나 이들을 킬레이트화시킬 수 있다. 킬레이트화는 양이온 또는 음이온과 관련하여 크기 의존 방식으로 일어나며, 또한 해당 화합물 상에 작용기의 침착에 의존적이다. 킬레이트화 및 기타 상호작용은 일부 염을 물의 부재하에서도 액체 화합물에 가용성이 되게 만들 수 있는 반면, 다른 염은 염과 상호작용할 수 있는 작용기를 갖는 화합물의 존재에도 불구하고 물의 부재하에서 불용성일 수 있다. 화합물 및 염 사이의 상호작용의 복잡성에 더 부가되는 것은 임의의 공-용매의 성질이다. 예를 들면, 수-혼화성인 해당 화합물의 단리시에, 수소 결합 및 물과의 다른 상호작용은 염과 해당 화합물 사이의 상호작용을 파괴할 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 염은 일정량의 물의 존재하에서 화합물로부터 보다 용이하게 분리될 수 있다. 그러나, 예를 들면, 해당 화합물과 염의 염 사이의 킬레이트화 및 기타 상호작용을 파괴하는 물의 능력은 유지하면서 결정화에 의해 염 분리를 허용하는 염 과포화화 균형을 이루는 물의 양은 예상하기 어렵다.

[0007] 단리 방법을 개발하는데 있어 또 다른 문제는 유기산, 과량의 기질 등과 같은 생합성 부산물의 잠재적 반응성이다. 가열 조건하에서, 과량의 기질은 분해되고 바람직하지 않은 생성물의 착색을 야기할 수 있다. 또한, 일부 부산물은 해당 화합물과 반응하여 단리 수율을 효과적으로 저하시킬 수 있다. 이들 부산물은 발효시 생성된 것들 뿐 아니라, 증류, 수분 증발 등의 과정동안 승온에서의 분해 공정으로 인해 단리 절차 자체의 단계동안 생성된 부산물을 포함할 수 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 따라서, 다른 발효 성분들을 재순환시키는 것의 환경 및 비용 이점을 유념하면서, 미생물 발효물로부터 물보다 높은 비점을 갖는 수-혼화성 화합물의 단리를 가능케 하는 공정을 개발하는 것이 필요하다. 본 발명은 상기 필요를 충족시키며 또한 관련된 이점들을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 일부 양태에서, 본원에 개시된 태양은 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-BDO가 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; 상기 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; 상기 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 1,4-BDO를 정제하는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)을 단리하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 다른 양태에서, 본원에 개시된 태양은 디스크 적층식 원심분리에 의해 고체 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계; 한외여과에 의해 상기 액체 분획으로부터 추가 분량의 고체를 제거하는 단계; 액체 분획으로부터 증발 결정화에 의해 염의 일부를 제거하는 단계; 이온 교환에 의해 액체 분획으로부터 추가 분량의 염을 제거하는 단계; 및 1,4-BDO를 증류시키는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 태양은 디스크 적층식 원심분리에 의해 고체 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계; 한외여과에 의해 상기 액체 분획으로부터 추가 분량의 고체를 제거하는 단계; 나노여과에 의해 상기 액체 분획으로부터 염 일부를 제거하는 단계; 이온 교환에 의해 액체 분획으로부터 추가 분량의 염을 제거하는 단계; 물의 일부를 증발시키는 단계; 및 1,4-BDO를 증류시키는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법에 관한 것이다.

**발명의 효과**

[0012] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 태양은 1,4-BDO-생성 미생물을 발효조에서 1,4-BDO를 생성하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는, 1,4-BDO의 생성 방법에 관한 것이다. 1,4-BDO-생성 미생물은 1,4-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 유전자 파괴를 포함하는 1,4-BDO 경로를 갖는 미생물을 포함한다. 상기 방법은 또한 기술된 단리 방법에 따라서 1,4-BDO를 단리하는 단계를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0013] 도 1은 발효액으로부터 1,4-BDO를 정제하는 방법에서 단계들의 블록 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 2는 디스크-적층식 원심분리기의 횡단면도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 경사분리 원심분리기의 횡단면도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 강제 순환 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 5는 활성 부피에 수평 열교환기 및 배플을 갖는 강제 순환 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 6은 드래프트 튜브 및 배플 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 7은 유도 순환 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 8은 폐쇄형 오슬로(0s1o) 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 9는 개방형 오슬로 결정화기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 10은 강하막 증발기의 부분 횡단면도를 나타낸 것이다.
- 도 11은 강제 순환 증발기의 부분 횡단면도를 나타낸 것이다.
- 도 12는 관형 증발기의 부분 횡단면도를 나타낸 것이다.
- 도 13은 순환 증발기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 14는 유동층 증발기의 다이어그램을 나타낸 것이다.
- 도 15는 1,4-BDO의 생성 및 분리를 위한 완전한 설계의 흐름도를 나타낸 것이다.
- 도 16은 1,4-BDO의 생성 및 분리를 위한 또 다른 완전한 설계의 흐름도를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0014] 자원 화학물질의 발효 생산은 재생가능한 화석 연료 공급원료를 사용한 전통적 생산에 유용한 대안이다. 재순환된 바이오매스 등과 같은 재생가능한 공급원료를 사용하는 능력에 의해, 상기 공정은 화석 연료계 생산보다 더 경제적이고 환경적으로 건강함을 입증할 수 있다. 발효로부터 생성된 생성물은 많은 용도에 유용할 수 있다. 특정 태양에서, 본 발명은 1,4-BDO의 제조 방법을 제공한다. 1,4-부탄다이올(BDO)은 중합 중간체이며 공업 용매이다. 하류부문의 부탄다이올은 더 전환될 수 있다; 예를 들면, 감마-부티로락톤으로의 산화에 의해, 이것은 피롤리돈 및 N-메틸-피롤리돈으로 더 전환될 수 있거나, 테트라하이드로푸란으로 가수소분해될 수 있다. 이들 화합물은 중합 중간체, 용매 및 첨가제로서 다양한 용도를 갖는다.
- [0015] 본 발명은 부분적으로, 발효액의 다른 성분들의 재순환을 선택적으로 허용하면서 발효액으로부터 물보다 높은 비점을 갖는 수혼화성 화합물을 단리하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 유전자 삽입, 유전자 파괴 또는 삽입과 파괴의 조합에 의해 조작처리된 미생물 유기체를 포함할 수 있는 세포 덩어리를 분리시켜 적합한 공급원료로부터 유용한 수율로 화합물을 생성한다.
- [0016] 무세포 배양액 또는 액체 분획은 염의 제거에 의해 더 처리될 수 있다. 이것은 발효액으로부터 일부 또는 실질적으로 모든 물을 제거하기 전이나 후에 여러 방법에 의해 달성될 수 있다. 전술한 바와 같이, 염은 종종 발효 공정에서 재순환을 위해 회수되지 않는다. 통상적으로, 염의 회수는 배지 염 등보다는, 락테이트, 시트레이트 또는 다른 카복실레이트 생성물, 또는 아민-함유 생성물의 암모늄염과 같은 목적하는 생합성 생성물의 염 형태를 포함한다. 본원에 기술된 방법은 배지 염의 회수 및 발효공정으로 선택적 재순환을 가능케 한다. 상기 단리 방법은 또한 물의 제거를 수반하고, 이것은 발효 시스템으로 재도입될 수 있다. 최종 정제시, 발효에 의해 생성된 화합물은 증류되거나, 고체인 경우 세포, 염 및 물의 제거후에 남은 액체 분획으로부터 재결정화될 수 있다. 액체인 경우, 최종 정제는, 예를 들면, 분별 증류에 의해 수행될 수 있다.
- [0017] 일부 태양에서, 본 발명은 발효액으로부터 물보다 높은 비점을 갖는 해당 수혼화성 화합물을 단리하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (1) 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; (2) 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; (3) 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 (4) 증류 또는 재결정화에 의해 해당 화합물을 정제하는 단계를 포함한다. 상기 단계 (2) 및 (3)은 차례대로 또는 함께 수행할 수 있다.
- [0018] 발효에 의해 수득할 수 있는 물보다 높은 비점을 갖는 해당 화합물은 물보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 및 300 °C 이상 더 높은(그 사이의 모든 값 포함) 비점을 가질 수 있다. 물보다 높은 비점을 갖는 해당 화합물은, 예를 들면, 1,4-BDO, 1,3-BDO, 2,3-BDO, 1,3-PDO, 1,2-PDO(메틸 에틸 글라이콜), 1,2-에탄다이올(에틸렌 글라이콜), 감마-부티로락톤(GBL), 1,5-펜탄다이올, 1,6-헥산다이올을 포함할 수 있다. 또한, 해당 화합물은 수혼화성인 화합물을 포함한다. 일부 태양에서, 상기 수혼화성 화합물은 통상적인 추출 절차에 까다로울 수 있다. 또한, 해당 화합물은 중성인 화합물을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 중성 화합물은 아민, 카복실산, 설폰산, 보론산 등과 같이 전하를 가질 수 있는 작용기를 갖지 않는 화합물을 말한다. 마지막으로, 해당 화합물은 하기에 더 설명하는 바와 같이, 나노여과 막에 투과가능하도록 충분히 작을 수 있다. 대표적인 화합물 부류로는 알콜, 다이올, 트라이올, 예를 들면, 글리세린, 테트라올, 폴리올 등이 포함된다.
- [0019] 한 특정 태양에서, 해당 화합물은 1,4-BDO이다. 1,4-BDO는 약 230 °C의 비점을 가지며 물과 완전히 혼화성이다. 또한, 물로부터 1,4-BDO를 경제적으로 추출할 수 있는 것으로 확인된 용매는 없다. 중성 분자로서, 염 형태의 결정화에 의한 분리는 배제된다. 1,4-BDO는 하기의 실시예 III에서 기술된 바와 같은 나노여과 막을 통과하기에 충분히 낮은 분자량을 갖는다. 또한, 순수한 1,4-BDO중에서의 다양한 발효 배지 염의 용해도는 하기 실시예 VI에서 기술된 바와 같이, 비교적 낮다.
- [0020] 일부 태양에서, 본 발명은 (1) 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-BDO가 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; (2) 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; (3) 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 (4) 1,4-BDO를 정제하는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)을 단리하는 방법을 제공한다.
- [0021] 당해 분야에 숙련된 자는, 대표적 화합물 1,4-BDO와 관련하여 본원에 개시된 교지의 지침에 따라서, 물보다 높은 비점을 갖는 다른 수혼화성 해당 화합물을 동일한 절차를 이용하여 단리할 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 방법은 1,3-부탄다이올의 단리를 가능케 하도록 용이하게 변형된다. 그러므로, 많은 태양들이 1,4-BDO로 예시되지만, 상기 방법은 물보다 높은 비점을 갖는 다른 수혼화성 해당 화합물에도 용이하게 적용될 수 있음을 이해해야 한다.

- [0022] 일부 태양에서, 본 발명은 발효액으로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)을 단리하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-BDO가 농축된 액체 분획을 분리하는 것을 포함한다. 물은 액체 분획으로부터 염을 분리하기 전이나 후에 액체 분획으로부터 증발된다. 일부 태양에서, 1,4-BDO는 하기에서 더 기술하는 바와 같이 물을 제거한 후 결정화된 염으로부터 분리된다. 상기 염은 1,4-BDO 중에서 낮은 용해도를 가져, 분리된 1,4-BDO는 약 98% 무염이다. 일부 태양에서, 염은 하기에서 더 기술하는 바와 같이 물을 제거하기 전에 특정한 여과 방법 및/또는 이온 교환, 또는 크로마토그래피 방법에 의해 분리된다.
- [0023] 본원에서 사용된 바와 같이, "단리"는 충분히 정제된 해당 화합물을 수득하는 정제 단계를 포함하는 공정을 말한다. 특정 태양에서, 해당 화합물은 1,4-BDO를 포함한다. 충분히 정제된 화합물은 일부 태양에서 98% 이상 무염, 다른 태양에서 99% 이상 무염, 또 다른 태양에서는 99.5% 이상 무염이다. 충분히 정제된 화합물은 또한 염 이외에 다른 불순물도 또한 함유하지 않으므로 해당 화합물은 일부 태양에서 98% 이상, 다른 태양에서 99% 이상, 또 다른 태양에서는 99.5% 이상 순수한 화합물을 포함한다.
- [0024] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "액체 분획"은 발효액으로부터 고체 덩어리의 제거시 수득되는 농축물 또는 상등액 액체를 말한다. 고체 덩어리 제거는 고체 덩어리의 일부, 실질적으로 전부, 또는 전부를 포함한다. 예를 들면, 원심분리시, 액체 분획은 고체로부터 분리되는 농축물 또는 상등액이다. 액체 분획은 또한 막을 통한 여과후에 수득되는 투과액 또는 상등액인 부분이다. 액체 분획은 또한 하나 이상의 여과 방법이 적용된 후에 수득되는 여액 또는 상등액인 부분이다.
- [0025] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "고체 분획"은 불용성 물질을 함유하는 발효액의 일부를 말한다. 상기 불용성 물질로는, 예를 들면, 세포, 세포 파편, 침전된 단백질, 미세입자 등이 포함된다. 미세입자는 작은, 통상적으로는 무정형의 고체를 말한다. 미세입자는 또한 결정화시에 또는 발효액으로부터 물의 제거시에 생성될 수 있다. 미세입자는 용해되고 재결정화될 수 있는 해당 화합물로 이루어질 수 있다. 미세입자는 막 여과에서 포획되기에 너무 작은 고체 분획의 부분을 포함할 수 있다.
- [0026] 본원에서 사용된 바와 같이, 배지 염 및 발효 배지 염과 상호교환적으로 사용되는 용어 "염"은 발효액에 사용된 용해된 이온 화합물을 말한다. 발효액 중의 염은, 예를 들면, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화암모늄, 황산마그네슘, 황산암모늄 및 완충제, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트 및 보레이트의 나트륨 및/또는 칼륨 및/또는 암모늄염을 포함할 수 있다.
- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 물 또는 염의 제거에 대해 사용되는 경우, 용어 "실질적으로 모든"은 95% 이상의 물 또는 염의 제거를 말한다. "실질적으로 모든"은 또한 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9% 이상의 제거 또는 그 사이의 임의 값을 포함할 수 있다.
- [0028] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 파괴" 또는 이의 문법적 동의어는 암호화된 유전자 산물을 불활성으로 만드는 유전자 변이를 의미하는 것이다. 유전자 변이는, 예를 들면, 전체 유전자의 결실, 전사 또는 번역에 필요한 조절 서열의 결실, 절두 유전자 산물을 야기하는 유전자의 일부분의 결실이거나 암호화된 유전자 산물을 불활성화시키는 임의의 다양한 돌연변이 방법에 의한 것일 수 있다. 유전자 파괴의 특히 유용한 한 방법은 완전 유전자 결실로, 이것이 본 발명의 비-천연 미생물에서 유전자 복귀돌연변이의 발생을 감소시키거나 배제시키기 때문이다.
- [0029] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "미생물"은 현미경 크기를 갖는 원핵 또는 진핵 세포 또는 유기체를 의미하는 것이다. 상기 용어는 효모 및 진균류와 같이 모든 종의 세균 및 원핵생물 유기체를 포함하는 것이다. 상기 용어는 또한 생화학물질의 생산을 위해 배양될 수 있는 임의 종의 세포 배양물을 포함한다.
- [0030] 본원에서 사용된 바와 같이, "1,4-BDO-생성 미생물"은 1,4-BDO를 유용한 양으로 생합성하도록 조작된 미생물을 의미하는 것이다. 상기 조작된 유기체는 플라스미드 삽입물 및/또는 염색체 삽입을 포함한 유전자 삽입을 포함할 수 있다. 조작된 유기체는 또한 1,4-BDO의 생성을 위한 목적 경로를 통해 탄소 유출을 더 최적화하기 위해 유전자 파괴를 포함할 수 있다. 1,4-BDO-생성 유기체는 삽입과 결실의 조합을 포함할 수 있다.
- [0031] 본원에서 사용된 바와 같은 "외인성"은 언급된 분자 또는 언급된 활성이 숙주 미생물 유기체내에 도입된 것을 의미하는 것이다. 상기 분자는, 예를 들면, 숙주 염색체내에 통합됨으로써 또는 플라스미드와 같은 비-염색체 유전 물질로서 통합되는 것에 의해서와 같이 숙주 유전자 물질내에 암호화 핵산의 숙주 유전자의 도입에 의해 도입될 수 있다. 그러므로, 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용된 바와 같은 상기 용어는 암호화 핵산이 발현 가능한 형태로 미생물 유기체내에 도입되는 것을 말한다. 생합성 활성과 관련하여 사용되는 경우, 상기 용어는 숙주 표준 유기체내에 도입되는 활성을 말한다. 공급원은, 예를 들면, 숙주 미생물 유기체내에 도입후 언급된

활성을 발현하는 동종 또는 이종 암호화 핵산일 수 있다. 그러므로, 상기 용어 "외인성"은 숙주에 존재하는 언급된 분자 또는 활성을 말한다. 유사하게, 상기 용어는 암호화 핵산의 발현에 대해 사용되는 경우, 미생물 유기체내에 함유된 암호화 핵산의 발현을 말한다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 공급원으로부터 유래된 분자 또는 활성을 말하는 반면, "동종"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 분자 또는 활성을 말한다. 따라서, 본 발명의 암호화 핵산의 외인성 발현은 이종 또는 동종 암호화 핵산 어느 하나 또는 둘 다를 사용할 수 있다.

[0032] 일부 태양에서, 본 발명은 발효액으로부터 해당 화합물을 정제하는 방법을 제공한다. 적용가능한 화합물로는 물보다 높은 비점 및 낮은 염 용해도를 갖는 화합물이 포함된다. 해당 화합물은 또한 수산화성인 것들을 포함한다. 대표적인 해당 화합물은 1,4-BDO이다. 상기 방법은 해당 생성물을 함유하는 액체 분획을 세포 덩어리를 포함하는 고체 분획으로부터 분리하는 것을 포함한다. 해당 생성물은 물보다 높은 비점을 갖는 화합물일 수 있다. 세포 덩어리는 해당 화합물의 생성에 사용된 미생물 유기체를 포함한다. 고체 분획은 또한 세포 파편, 미세입자, 단백질, 및 발효공정으로부터의 다른 불용성 물질을 포함한다.

[0033] 분리 방법은 또한 액체 분획으로부터 염 및 물을 제거하는 것을 포함한다. 이들이 제거되는 순서는 중요하지 않다. 일부 태양에서, 염의 부분적 제거후에 실질적으로 모든 물을 제거하고 이어서 남은 염을 제거할 수 있다. 다른 태양에서는, 물을 부분적으로 제거한 후 실질적으로 모든 염을 제거하고 이어서 남은 물을 제거할 수 있다. 다른 태양에서, 물은 발효액으로부터 고체 분획의 분리 이전에 부분적으로 제거될 수 있다. 또 다른 태양에서, 실질적으로 모든 물의 최종 제거는, 예를 들면, 증류에 의해 정제 단계의 일부로서 수행될 수 있다. 하기 실시예 VI에 개시되어 있듯이, 순수한 1,4-BDO는 전형적인 발효 배지 염을 감지할 수 있을 정도로 가용화시키지 않는다. 따라서, 1,4-BDO는 액체 분획으로부터 물의 증발에 의해 염으로부터 분리될 수 있다. 하기 실시예 V에서 나타낸 바와 같이, 염은 1,4-BDO 농도가 약 30 중량%일 때 결정화되기 시작한다. 일부 태양에서, 1,4-BDO는 물의 제거에 의해 결정화되거나 침전된 염으로부터 1,4-BDO의 분리시 98% 이상 무염이다. 실시예 VI에서 볼수 있듯이, 밀접하게 관련된 동종 에탄다이올 및 프로판 다이올은 여전히 감지할 수 있을 정도로 발효 염을 가용화시킨다. 따라서, 실질적으로 모든 물을 제거한 후에도 염을 제거하기 위해 다른 방법을 이용할 수 있다.

[0034] 결국, 염 및 물이 제거된 경우, 남은 액체 또는 고체는 최종 정제에 적용될 수 있다. 해당 생성물이 액체인 경우, 정제는, 예를 들면, 분별 증류 또는 다중 증류를 포함하여 증류에 의해 수행될 수 있다. 해당 생성물이 고체인 경우, 정제는 재결정화에 의해 수행될 수 있다.

[0035] 해당 화합물을 생성 및 분리하고 발효액의 다양한 성분들을 재순환시키기 위한 전체 과정은 도 1의 블록 흐름도에 요약되어 있다. 단계 (100)은 해당 화합물을 생성하기 위한, 슈크로스과 같은 탄소 공급원료를 사용한 발효이다. 단계 (110)은, 세포의 선택적 재순환으로서 단계 (115)하에, 발효액으로부터 세포를 분리하여 액체 분획을 제공하는 과정이다. 단계 (110)은 실시예 I 및 II에 예시되었는데, 여기서는 세포 및 고체를 원심분리 및 한외여과에 의해 발효액으로부터 분리한다. 단계 (120)에서는, 염의 선택적 재순환으로서 단계 (125) 하에, 액체 분획으로부터 염을 분리한다. 단계 (120)은 실시예 III 내지 V에 예시되었는데, 여기서는 나노여과(실시예 III) 및 이온 교환(실시예 IV)을 기술하고 있으며, 물은 여전히 액체 분획에 존재한다. 실시예 V는 물의 증발시에 결정화를 통한 염의 분리를 나타낸다. 단계 (130)은 물의 선택적 재순환으로서 단계 (135) 하에, 증발에 의한 물의 제거이다. 단계 (130)은 실시예 V에 의해 예시되며, 여기서는 침전에 의한 염 분리를 촉진하는 물의 증발을 나타내고 있다. 단계 (120) 및 (130)의 순서는 하기에서 더 기술하는 바와 같이 상호교환가능하다. 최종적으로, 단계 (140)에서 해당 화합물이 최종적으로 정제된다.

[0036] 일부 태양에서, 발효액으로부터 1,4-BDO를 포함한 해당 화합물의 단리 방법은 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는 것을 포함한다. 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는데 있어서, 발효액의 부피 전체까지 및 그 사이의 모든 값을 포함하고, 추가로 발효액의 총 부피의 1% 미만의 부피를 포함하여, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%를 포함하는 임의의 양의 발효액을 가공할 수 있다. 당해 분야에 숙련된 자라면 가공되는 발효액의 양이 하기에서 상술하는 바와 같이, 배치식, 유가식 또는 연속식과 같은 발효 공정의 유형에 따라 달라질 수 있음을 인지할 것이다. 세포 및 발효액으로부터의 다른 고체 부산물 및 불순물을 포함하는 고체의 분리는 원심분리, 여과 또는 이들 방법의 조합에 의해 수행될 수 있다.

[0037] 일부 태양에서, 원심분리는 세포 덩어리를 포함하는 고체를 실질적으로 함유하지 않는, 1,4-BDO와 같은 해당 화합물을 포함하는 액체 분획을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 원심분리기 형태 및 크기에 따라, 작동 속도는 중력의 15,000배 이하의 원심력을 제공하는 500 내지 12,000 rpm으로 변할 수 있다. 발효액으로부터 세포 및

고체를 제거하기 위한 많은 원심분리기 형태가 당해 분야에 공지되어 있다. 하나의 상기 형태는, 예를 들면, 도 2에 나타난 디스크-적층식 원심분리(200)이다.

- [0038] 디스크-적층식 원심분리에서의 분리는 회전 보울(210) 내에서 일어난다. 공급물은 고정 유입관(220)을 통해 상단으로부터 회전 보울에 도입되고, 디스크 적층체(240)에 유입되기 전에 분배기(230)에서 가속화된다. 분배기는 공급 액체를 가속화하도록 설계된다.
- [0039] 액체-고체 또는 액체-액체-고체의 분리는 디스크들 사이에서 일어난다. 비혼화성 오일 및 수성 상과 같은 2상 시스템에서, 디스크 적층체를 통해 중앙으로 이동하는 오일 상은 배관(250)을 통해 배출되어 수거 프레임내로 분무될 수 있다. 오일로부터 분리된 물과 고체는 주변부로 이동하고, 물은 상부 디스크(260)중의 채널을 통해 페어링(pairing) 챔버로 유도되고, 여기서 물이 내장 페어링 디스크(270)에 의해 로터로부터 펌핑된다.
- [0040] 고체는 주변부에서 수거되고, 이로부터 원심분리기 사이클론을 통해 간헐적으로 배출될 수 있다. 고체 배출은, 존재하는 적당한 간격으로, 이동하는 보울 바닥(280)을 강제로 강하시켜 보울 주변부에서 고체 배출구를 개방하는 유압 시스템에 의해 달성될 수 있다.
- [0041] 디스크 적층식 원심분리는 전형적으로는 연속 공정으로, 고체 및 1 또는 2개의 액체 상을 서로로부터 분리시킨다. 보다 치밀한 고체는 원심력에 의해 강제로 바깥쪽으로 이동하는 반면, 덜 치밀한 액체 상은 내부 동심 층을 형성한다. 특정한 판(디스크 적층체)을 삽입함으로써 분리 효율이 증가된다. 고체는 간헐적으로 또는 연속적으로 수동으로 제거될 수 있다. 일부 태양에 따르면, 세포 덩어리는 발효내에 다시 도입될 수 있다. 전형적인 디스크-적층식 원심분리기 장치에서, 액체 상은 보울의 상단의 유출 영역에서 별도의 챔버내로 흘러넘친다.
- [0042] 디스크-적층 원심분리기의 작동시에, 공급물은 보울의 축에서 도입되고, 종종 방사상 베인(vane) 조립체에 의해 속도를 내도록 가속화되고, 밀접하게 이격배치된 원추형 디스크의 적층체를 통해 유동된다. 디스크 간격은 종종 유체로부터 침강 입자를 분리하기 위해 필요한 거리를 감소시키기 위해 0.5 내지 3 mm이다. 디스크 각도는 종종 고체 유지 공간내에 디스크 표면 아래로 고체 운반을 촉진하기 위해 40 내지 50도이다.
- [0043] 분리 메카니즘은 디스크의 하면에 대한 원심력의 영향하에 고체의 침강 및 고체 유지 공간내에 디스크 아래로의 미끄러짐을 기초로 한다. 동시에, 정화된 유체가 디스크 사이의 채널 위로 이동하고 구심 펌프에 의해 원심분리기로부터 유출된다. 침강된 고체는 노즐을 통해 연속적으로 또는 보울 주변부의 배출구를 통해 간헐적으로 배출된다.
- [0044] 디스크-적층식 원심분리기는 발효액중 세포의 낮은 농도 및 입자 크기에서 사용될 수 있다. 디스크-적층식 원심분리기는 세포 및 기타 고체 덩어리가 발효액의 약 0.2 내지 약 3 중량% 정도로 적게 포함될 때 사용될 수 있다. 디스크-적층식 원심분리기는 또한 세포 및 기타 고체 덩어리가 약 0.2 중량% 미만, 예를 들면, 그 사이의 모든 값을 포함하여, 0.01, 0.05 및 0.1 중량%일 때 사용될 수 있다. 디스크-적층식 원심분리기는 또한 세포 및 기타 고체 덩어리가 3 중량%보다 많을 때, 예를 들면, 그 사이의 모든 값을 포함하여, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 15 중량%일 때 사용될 수 있다. 세포 덩어리 및 기타 고체가 합하여 약 3 중량% 이상 내지 약 15 중량%인 경우, 경사분리 원심분리기와 같은 다른 원심분리를 사용할 수 있다.
- [0045] 유연하고 가소성이며 마찰이 없는, 약 0.5 내지 약 500  $\mu\text{m}$  범위의 세포 및 기타 고체 입자는 일반적으로 디스크-원심분리에 적합하다. 약 0.5  $\mu\text{m}$  미만의 미립자 물질의 경우, 한외여과가 유용하다. 유사하게, 약 500  $\mu\text{m}$  이상인 경우, 경사기-유형 원심분리기가 유용할 수 있다. 1,4-BDO를 포함하여 해당 화합물을 생성하기 위해 배양될 수 있는 전형적인 원핵 세포의 크기는 약 0.5 내지 약 10  $\mu\text{m}$ 의 크기 범위로 디스크-적층식 원심분리가 적합한 방법이 될 수 있다.
- [0046] 배치 후에, 또는 유가식 또는 연속식 발효동안, 세포 및 불용성 고체는 디스크-적층식 원심분리기에 의해 발효액으로부터 제거될 수 있다. 디스크-적층식 원심분리기로부터의 유출물은 정화된(무세포) 농축액 및 약 5 내지 50% 고체를 함유하는 언더플로우(underflow) 스트림이다. 디스크 적층식 원심분리기로부터의 언더플로우 고체 스트림은 회수될 수 있는 상당량의 해당 생성물을 함유할 수 있다. 고체로부터 추가의 해당 화합물을 회수하는 한가지 방법은 추가의 원심분리 단계를 포함시키는 것이다. 해당 화합물의 보다 많은 회수를 제공하는 것 이외에, 다중 원심분리는 또한 세포 및 고체를 더 농축시키는 작용을 한다. 농축된 세포는 발효로 다시 재순환될 수 있다. 세포 재순환은 유용한 조작된 미생물이 사용되는 경우 특히 유용하다.
- [0047] 일부 태양에서, 경사분리 원심분리기는 세포와 고체를 분리하기 위해 사용될 수 있다. 경사분리 원심분리기에 의한 우수한 성능은 정상적으로 약 10  $\mu\text{m}$ 에 근접한 하한치를 갖는 입자 크기를 갖는 고체에서 실현되지만, 더 작은 입자도 하기에 더 기술하는 바와 같이 그의 침강 속도에 따라 가공될 수 있다. 상기 원심분리기 형태는

배양물의 세포가 전형적인 원핵생물 유기체의 보다 큰 크기 범위에 속할 때 사용될 수 있다. 당해 분야에 숙련된 자라면 진핵 세포는 종종, 평균 진핵 세포가 약 10 내지 약 100  $\mu\text{m}$  이상의 크기 범위를 가져, 원핵 세포보다 훨씬 더 큰것을 인지할 것이다. 디스크-적층 원심분리기는 상기 크기 범위에서 잘 작동할 수 있지만, 경사분리 원심분리기가 보다 대량의 고체를 취급할 수 있으므로 경사분리 원심분리기가 유용하다. 따라서, 세포 덩어리와 기타 고체가 합하여 덩어리의 약 3 내지 약 50 중량% 이상인 경우, 경사분리 원심분리기를 사용할 수 있다. 상기 농도는 전술한 디스크 적층 원심분리기의 언더플로우에 적용되어, 경사분리 원심분리기가 세포 덩어리를 추가로 농축하고 추가의 생성물을 회수하기에 적합한 방법이 된다.

[0048] 경사분리기, 또는 고체 보울 원심분리기는 침전의 원리로 작동한다. 대표적인 장치는 본원에 그 전체로 참고로 인용된 미국 특허 제 4,228,949 호 및 제 4,240,578 호에 기술되어 있다. 도 3에 도시된 바와 같이, 상기 장치 (300)에서, 기계의 중심 부분은 회전 드럼(310)으로 이것은 독립적으로 회전하는 스크류(320)를 함유한다. 발효액 또는 고체-함유 공급물, 예를 들면, 디스크 적층식 원심분리기로부터의 언더플로우는 유입관(330)을 통해 스크류의 제 1 부분의 중심부에 있는 혼합 챔버(340)로 공급된다. 이어서, 발효액은 혼합 챔버의 배출구를 통과하여 드럼의 외벽쪽으로 이동한다. 탈수된 발효액은 스크류에 의해 기계를 통해 운반된다. 농축액(350) 또는 상등액은 농축액 배관을 통해 저수조(pond)의 내부 표면으로부터 경사분리된다. 드럼내 물 수준은 처리될 물질의 특성에 따라 조정될 수 있다.

[0049] 드럼 및 스크류는 기계의 유형 및 크기에 따라서 약 3,600 rpm 이하의 속도에서 서로 독립적으로 회전한다. 사용된 탈수 원리는 당해 분야에 "병류" 또는 "역류" 방법으로 알려져 있다. 차동 속도는 드럼의 속도와 스크류의 속도 간의 차이이다. 낮은 차동 속도는 원심분리기에서 보다 긴 체류 시간을 의미하며, 이것은 건조기 슬러지 및 훨씬 더 낮은 내구성을 야기한다. 역류 원리가 탈수되기에 용이한 공급물에 대해서 및 고용량이 바람직한 경우에 더 적합할 수 있다.

[0050] 고체는 고체 보울 원심분리기에서 분리될 수 있으나, 공급물의 액체상 부분에서 그의 침전 속도가 충분해야 한다. 침전 속도에 영향을 미치는 요인들로는, 예를 들면, 입자 크기, 형태, 세포/고체 및 발효액 액체상 사이의 밀도 차이, 및 점도가 포함된다. 보울의 기하구조, 특히 길이와 직경의 관계는 특정 조건에 적합하도록 개조될 수 있다. 일부 태양에서, 우수한 결과는 약 2:1 내지 약 3:1 범위의 길이 직경 비에서 수득될 수 있다.

[0051] 작동시, 분리는 스크류 컨베이어가 장착된 수평 원추 원통형 보울에서 일어난다. 발효액은 고정 유입관을 통해 보울내에 공급되고 유입 분배기에 의해 가속화된다. 원심력은 보울의 벽상에 고체의 침전을 위한 수단을 제공한다. 차동 속도하에 보울과 동일한 방향으로 회전하는 컨베이어는 고체를 원추형 말단으로 운반한다. 이어서, 고체는 액체 상이 없도록 제거되고 원심분리적으로 탈수된 후 수거 채널내로 배출된다. 남은 액체 상은 이어서 보울의 원통형 말단의 개구부를 통해 하우징 내로 유동된다.

[0052] 전술한 바와 같이, 세포 및 고체는 해당 화합물의 단리 수율을 증가시키기 위해 다중 원심분리에 의해 분리될 수 있다. 다중 원심분리는 원심분리를, 예를 들면, 2회, 3회, 4회 및 5회 포함할 수 있다. 중간 언더플로우 스트림은 물로 희석되어 액체 생성물의 회수를 더 증가시킬 수 있다. 다중 원심분리를 수행하기 위해 원심분리의 임의의 조합, 예를 들면, 전술한 디스크-적층식 및 경사분리 원심분리의 조합도 또한 사용될 수 있다. 원심분리에 의해 분리할 수 없는 추가의 고체는 여과 공정, 예를 들면, 한외여과를 통해 제거될 수 있다.

[0053] 한외여과는 약 145 psi(10 바) 이하의 압력을 사용하여 막을 통과하는 선택적 분리 공정이다. 유용한 원심분리는 나선형-권취 중공 섬유를 사용한 직교류 여과, 또는 평판(카트리지) 한외여과 요소를 포함한다. 상기 요소는 약 200,000 달톤 미만의 분획 분자량(molecular weight cut-off)을 갖는 중합체 또는 세라믹 막, 예를 들면, 하기 실시예 I에서 사용된 바와 같은 하이드라노틱스(Hydranautics) 5K PES 막으로 이루어진다. 세라믹 한외여과 막은 또한 이들이 대략 10 년의 긴 작동 수명을 갖기 때문에 유용하다. 세라믹은 중합체 막보다 훨씬 더 고가인 단점을 갖는다. 한외여과는 현탁된 고체 및 약 1,000 달톤보다 큰 분자량을 갖는 용질을 농축시킨다. 한외여과는 약 1,000 내지 약 200,000 달톤의 공칭 분획 분자량(MWCO)(약 0.005 내지 0.1  $\mu\text{m}$ 의 공극 크기)을 갖는 막을 통한 여과를 포함한다. 용어 분획 분자량은 막에 의해 약 90% 보유되는 단백질의 크기를 정의하기 위해 사용된다. 한외여과를 사용하여, 투과 액체는 1,4-BDO와 같은 저분자량 유기 용질, 배지 염 및 물을 함유한다. 포획된 고체는, 예를 들면, 잔류 세포 파편, DNA 및 단백질을 포함할 수 있다.

[0054] 원심분리 후속의 한외여과를 이용하는 것 이외에, 한외여과는 또한 미세여과의 후속으로 사용될 수 있다. 미세여과는 세포를 분리하기 위한 원심분리에 대안적인 수단을 제공한다. 미세여과는 통상적으로 약 0.05 내지 10  $\mu\text{m}$  범위의 콜로이드성 및 현탁 입자를 분리하기 위한 저압 직교류 막 공정을 수반한다. 미세여과는 약 0.05 내지 약 5.0  $\mu\text{m}$ 의 공극 크기를 갖는 막을 통한 여과를 포함한다. 중합체, 세라믹 또는 스틸 미세여과 막을 사용

하여 세포를 분리할 수 있다. 세라믹 또는 스틸 미세여과막은 대략 10 년을 포함한 긴 작동 수명을 갖는다. 미세여과는 발효액의 정화에 사용될 수 있다. 한외여과와 달리, 미세여과는 일반적으로 잔류 세포 파편, DNA 및 단백질을 포획하지 않는다. 그러나, 필터 막의 오염을 방지하기 위해 공극 크기를 점차 감소시키면서 일련의 여과 단계를 이용하는 것이 유용하다. 이것은 필터 막의 재사용을 최적화하는데 유용하다. 일부 태양에서, 단일 한외여과 단계를 이용하여 세포 덩어리(원심분리 또는 미세여과 대신에) 및 잔류 세포 파편, DNA, 단백질 등을 제거할 수 있다. 세라믹 한외여과 요소들은, 상기 방식의 작동에 사용되는 빈번한 세정 주기를 견디는 그의 능력으로 인해 상기 용도에 유용하다.

[0055] 일부 태양에서, 나노여과로 불리는 또 다른 여과 방법을 이용하여 특정 염을 분리할 수 있다. 상기 공정 단계는, 예를 들면, 사전의 수분 증발없이 특정 배지 염의 회수를 가능케 한다. 나노여과는 염을 분리하고, 색소를 제거하고, 탈염을 제공할 수 있다. 나노여과에서, 투과 액체는 일반적으로 1가 이온 및 1,4-BDO로 예시되는 바와 같은 저분자량 유기 화합물을 함유한다. 나노여과는 약 100 내지 약 2,000 달톤(약 0.0005 내지 0.005  $\mu\text{m}$ )의 공칭 분획 분자량(MWCO)을 갖는 막을 통한 여과를 포함한다. 나노여과를 위한 한가지 방법은 나선-권취 요소를 이용한 직교류 여과이다. 여러 나노여과 막, 예를 들면, 하기 실시예 III에서 사용되는 박막 복합 나노여과 막 GE DK가 이용가능하다. 나노여과에서 물질 전달 메카니즘은 확산이다. 나노여과 막은 특정 이온성 용질(예를 들면, 나트륨 및 클로라이드), 주로 1가 이온, 및 물의 부분 확산을 허용한다. 2가 및 다가 이온, 및 보다 복잡한 분자를 포함하여 보다 큰 이온 종은 실질적으로 남아있다.

[0056] 1가 이온은 물과 함께 나노여과 막을 통해 부분적으로 확산되기 때문에, 막의 각 측면상의 용액 사이의 삼투압 차이는 크지 않으며, 이것은 전형적으로, 예를 들어, 역삼투압에 비해 나노여과에 다소 더 낮은 작동 압력을 야기한다.

[0057] 나노여과는 무기 염의 일부를 제거할 뿐 아니라, 또한 유기산의 염을 제거할 수 있다. 유기산 부산물의 제거는, 상기 산이 해당 생성물과의 바람직하지 않은 부반응을 촉진하거나 상기 부반응에서 반응물로 작용할 수 있기 때문에, 단리 공정에서 중요할 수 있다. 1,4-BDO의 단리에 관한 특정 태양에 있어서, 예를 들면, 유기산의 제거는, 임의의 후속 증발 또는 증류 단계의 승온시에 하이드록실기의 에스터화와 같은 반응을 방지할 수 있기 때문에 특히 유용하다. 이들 에스터 부산물은 전형적으로 BDO보다 높은 비점을 가져 증류에서 중질 스트림으로 수율 손실을 야기한다.

[0058] 나노여과는 또한 해당 생성물로부터 글루코스 또는 슈크로스 기질을 분리하여, 증발 및 증류시 분해 반응을 방지할 수 있다. 이들 분해 반응은 해당 화합물의 착색을 야기할 수 있다. 염 및 기질이 풍부한 나노여과 잔류물은 증발 결정화로부터 회수된 염 스트림에 비해 발효로 재순환하기에 더 적합할 수 있다. 예를 들면, 열의 적용을 수반하는 방법 대신 여과 방법의 사용은 보다 적은 분해 생성물을 야기할 수 있다. 상기 분해 생성물은 발효 유기체에 독성일 수 있다.

[0059] 나노여과 및 이온 교환은 둘 다 색소 형성 화합물 및 UV 흡수 화합물을 제거할 수 있다. 이것은 일부 해당 화합물과 관련하여 유용할 수 있다. 예를 들면, 색소 제거는 중합체 등급의 1,4-BDO의 생성에 유용하다.

[0060] 다중 여과막은 보유된 고체 크기의 점차 증가하는 정련하에 순차적으로 사용될 수 있다. 이것은 막의 오염을 감소시키는데 유용할 수 있으며, 재순환을 위해 발효액의 개개 성분들을 회수하는 것을 촉진할 수 있다. 예를 들면, 일련의 여과는 미세여과에 이어 한외여과에 이어 나노여과를 이용할 수 있다. 따라서, 미세여과는 세포 덩어리의 회수를 촉진하며, 한외여과는 세포 파편, DNA 및 단백질과 같은 거대 성분을 제거하고, 나노여과는 염의 회수를 촉진한다.

[0061] 당해 분야에 숙련된 자는 임의의 다양한 여과 유형이 본원에 제공된 교지 및 지침에 따라서 다양한 발효 생물반응기 형태의 맥락 안에서 통합될 수 있음을 인지할 것이다. 일부 태양에서, 여과는 생물반응기 외부에서 일어난다. 상기 방식에서, 임의의 양의 발효액이 생물반응기로부터 제거되고 별도로 여과될 수 있다. 여과는 진공 방법의 사용, 또는 양압의 사용에 의해 촉진될 수 있다. 일부 태양에서, 세포 여과는 생물반응기 내부의 여과 요소에 의해 달성될 수 있다. 상기 형태는 막 세포-재순환 생물반응기(MCRB)에서 발견된 형태를 포함한다. Chang 등의 미국 특허 제 6,596,521 호는 2단계 세포-재순환 연속 반응기를 기술하였다.

[0062] 일부 태양에서, 세포는 분리되어 문헌 [Yang et al., Biotechnol. Bioprocess. Eng., 7:357-361 (2002)]에 기술된 바와 같이 어쿠스틱(acoustic) 세포 침강기에 의해 발효 혼합물내로 재순환될 수 있다. 어쿠스틱 세포 침강은 발효액중 세포 현탁액을 농축하기 위해 초음파를 이용한다. 상기 방법은 생물반응기로의 세포의 용이한 복귀를 허용하며, 때때로 여과-유형 세포 재순환 시스템을 복잡하게 하는 막 오염 문제를 배제한다.

- [0063] 수분 증발에 앞서 염의 단리와 관련하여, 다른 방법을 단독으로, 또는 상기 예시적 여과 공정과 함께 사용할 수 있다. 상기 다른 방법으로는, 예를 들면, 이온 교환이 포함된다. 예를 들면, 문헌 [Gong et al., Desalination 191:1-3, 192-199 (2006)]은 전기투석에 의한 1,3-프로판다이올 발효액의 탈염에 대한 이온-교환막의 운반 특성의 영향을 기술하였다.
- [0064] 이온 교환 요소는 수지 비드 및 막의 형태를 취할 수 있다. 흔히, 수지는 다공성 비드의 형태로 구조된다. 수지는 전기 하전된 부위의 형태로 활성기를 갖는 가교결합 중합체일 수 있다. 상기 부위에, 반대 전하의 이온이 유입되지만, 그의 상대 농도 및 상기 부위에 대한 친화도에 따라 다른 이온으로 치환될 수 있다. 이온 교환장치는, 예를 들면, 양이온성 또는 음이온성일 수 있다. 주어진 이온 교환 수지의 효율을 결정하는 요인으로는 주어진 이온에 대한 호의성 및 이용가능한 활성 부위의 수가 포함된다. 활성 부위를 최대화하기 위해, 일반적으로 큰 표면적이 유용하다. 따라서, 작은 입자들이 그의 큰 표면적으로 인해 유용하다.
- [0065] 수지 중합체는, 예를 들면, 약 0.5 내지 약 15% 정도의 가교결합을 포함할 수 있다. 온도 및 pH도 또한 이온 교환 효율에 영향을 미친다. 예를 들면, pH는 교환에 이용가능한 이온의 수에 영향을 미칠 수 있으며, 온도는 공정의 동역학에 영향을 미친다. 일부 태양에서, 이온 교환에 의한 염 제거는 유기산 및 유기산의 염의 제거를 포함한다. 유기산의 음이온 형태는 음이온 교환 활성 부위에 결합할 수 있다. 일부 태양에서, 유기산과 결합하기 위한 pH는 상기 산에 대한 pKa 미만이다. 예를 들어, 락트산의 pKa는 약 3.1이다. 유기산의 염을 제거하기에 효과적인 방법은 양이온 교환 후 음이온 교환이다. 양이온 수지는 먼저 유기산 상대-이온(칼슘, 나트륨, 암모늄 등)을 제거하여 용액의 pH를 저하시킨다. 이어서, 음이온 수지는 유리 산과 결합한다.
- [0066] 이온 교환의 유용한 측면은 그에 의해 수지를 재생할 수 있는 용이성이다. 수지는 교환된 이온이 없도록 플러싱되고 그를 대신할 바람직한 이온의 용액과 접촉될 수 있다. 재생에 의해, 동일한 수지 비드를 계속하여 다시 사용할 수 있으며, 단리된 이온은 폐기 용출액중에 농축될 수 있다. 많은 여과 방법에서와 같이, 실시예 IV에 예시된 바와 같이, 연속 이온 교환을 수행할 수 있다. 따라서, 공급물은 임의의 수의 음이온 및 양이온 교환장치, 또는 혼합층 교환장치를 임의의 순서로 둘 다 통과할 수 있다.
- [0067] 일부 태양에서, 증발에 의한 수분 제거는 염 회수를 촉진하기 위해 사용된다. 일부 태양에서, 염은 수분 제거 전에 제거되었다. 어느 경우에서도, 증발된 물은 발효공정에 보충수로 재순환되어, 공정을 위한 전체 물 요구량을 최소화할 수 있다. 염이 제거되지 않은 경우, 1,4-BDO가 농축된 액체 상에서의 그의 용해도는 충분히 낮아서 이들은 수분 제거후에 결정화될 수 있다. 일부 태양에서, 염은 1,4-BDO에서 충분히 낮은 용해도를 가져 분리된 1,4-BDO는 약 98% 무염이다.
- [0068] 증발 결정화기를 사용하여 침전된 염을 생성할 수 있고, 이것은 원심분리, 여과 또는 다른 기계적 수단에 의해 제거될 수 있다. 1,4-BDO 분리의 맥락에서, 증발 결정화기는 발효액으로부터 물을 제거하는 작용을 하여 충분한 물이 제거된 액체 상을 생성하여 발효 배지 염의 과포화 및 잔류하는 액체상 또는 모액에서 후속 결정화를 야기한다. 하기 실시예 V에서 입증된 바와 같이, 염의 결정화는 약 30 중량%의 1,4-BDO 농도에서 시작된다.
- [0069] 모액은 결정화에서의 벌크 용매를 말한다. 흔히, 모액은 다양한 용질을 가용화시키거나 용해시키는 상이한 능력을 갖는 용매의 혼합물이다. 발효액으로부터 1,4-BDO의 정제의 맥락에서, 예를 들면, 모액은 발효액으로부터 세포 및 기타 고체의 제거후에 수득된 액체 분획을 포함한다. 발효액으로부터 해당 화합물의 단리의 맥락에서, 1차 용질은 발효 배지 염 및 유기산을 포함한다.
- [0070] 결정화에서 과포화는 용질이 주어진 온도 및 압력 조건하에서 정상적으로 가능한 것보다 벌크 용매중에서 더 농축되는 조건을 말한다. 발효액의 벌크 용매는, 예를 들면, 비교적 소량의 1,4-BDO 및 용해된 염 및 기타 배지를 함유하는 물이다.
- [0071] 대표적인 증발 결정화기는 도 5 및 6에 도시된 바와 같은 강제 순환(FC) 결정화기이다. FC 결정화기는, 예를 들면, 본원에 그 전체로 참고로 인용된 미국 특허 제 3,976,430 호에 기술되었다. FC 결정화기는 물을 증발시켜 화합물-농축(예를 들면, 1,4-BDO) 액체 분획중 염의 증가된 과포화를 야기하므로 염이 결정화되게 한다. FC 결정화기는 높은 증발률을 달성하는데 유용하다. FC 결정화기는 4개의 기본 성분으로 이루어진다: 원추형 바닥 부분을 갖는 결정화기 용기, 순환 펌프, 열교환기, 및 결정화기에서 생성되는 증기를 처리하는 진공 장치. 결정화기 용기로부터의 슬러리는 열교환기를 통해 순환되며, 결정화기 용기로 다시 복귀되어, 여기에서 슬러리에 존재하는 결정 상에 염의 침착에 의해 과포화가 해결된다. 증발된 물은 진공 시스템에 연결되며, 여기서 상기 물은 응축되어 바람직한 대로 발효액에 재순환된다. 일부 태양에서는 낮은 진공상태이지만, 대략 대기압에서 FC 결정화기를 사용하는 것도 또한 가능하다. 일부 태양에서, FC 결정화기는 단일 증발 냉각을 이용하여 염의

과포화를 제공한다. 상기 태양에서, FC 결정화기는 열교환기가 장착될 필요가 없다.

- [0072] 일부 태양에서, FC 결정화기는 또한, 액체 상의 오버플로우를 처리하고 결정 성장을 저해할 수 있는 미세입자를 감소시키기 위해, 도 6에 도시된 바와 같이 내부 배플이 장착될 수 있다. FC 결정화기에서 생성된 염은 또한 선택적 일루트리에이션 다리(elutriation leg)를 사용하여 크기 선별될 수 있다. FC 결정화기의 상기 부분은 결정화기 용기의 원추형 구획의 바닥에서 나타난다. 크기 선별은 특정 침강 속도를 갖는 입자만이 발효 유체의 흐름에 대해 이동하게 하는 다리 위로 발효 유체의 흐름을 제공함으로써 달성된다. 침강 속도는 결정의 크기 및 형태 뿐 아니라 유체 점도와도 관련된다. 또 다른 태양에서, FC 결정화기는 또한 생성물 손실을 감소시키기 위해 내부 스크러버가 장착될 수 있다. 이것은 휘발성 생성물의 회수를 용이하게 할 수 있다.
- [0073] 도 7에 도시된, 난류 또는 드래프트 튜브 및 배플 "DTB" 결정화기는 2개의 배출 스트림을 제공하는데, 하나는 결정을 함유하는 슬러리이고 다른 하나는 소량의 미세입자를 갖는 액체상이다. DTB 결정화기의 형태는 결정 성장을 촉진하고 FC 결정화기를 사용하여 수득된 것보다 큰 평균 입자를 갖는 결정을 생성할 수 있도록 하는 형태이다. 일부 태양에서, DTB 결정화기는 진공하에 또는 약간 초대기압에서 작동한다. 일부 태양에서, DTB 결정화기는 냉각을 위해 진공을 이용한다.
- [0074] 일부 태양에서, DTB 결정화기는 낮은 과포화에서 작동한다. 당해 분야에 숙련된 자라면 상기 방식하에서 거대 결정이 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 시스템은 선택적으로 미세입자를 용해시키거나 결정 크기를 더 증가시키도록 구성될 수 있다. DTB 결정화기가 발효 배지 염 회수에 사용되는 경우, 결정 크기가 반드시 우선적이지는 않다.
- [0075] DTB 결정화기는 결정화에서 광범위하게 연구되었으며 정확하게 모형화될 수 있다. 그의 명확한 성장 대역 및 정화된 액체상은 동역학 파라미터를 정의하는 것을 용이하게 하므로, 성장 및 핵형성 속도를 용이하게 산출할 수 있다. 이들 특징은 DTB 결정화기를 수학적 설명에 적합하게 만들므로, 우수한 작동 조건에 따르게 한다. DTB 결정화기는 FC 결정화기와 같이 혼합 현탁 혼합 생성물 제거(MSMPR) 디자인의 한 예이다.
- [0076] DTB 결정화기는 활성 부피에 대해 주변부인, 침강 대역으로 작용하는 배플 영역을 포함한다. 상기 대역은 액체 상 및 미세입자를 더 가공하는데 사용된다. 일부 태양에서, 배플 영역은, 미세입자의 추가 가공이 덜 중요한 경우에 그럴 수 있듯이, 존재하지 않는다. 상기 형태는 당해 분야에 드래프트-튜브 결정화기로 알려져 있다. DTB 결정화기는 통상적으로 공급 용액의 유입부 부근에서 장치의 바닥에 교반기가 장착될 수 있다. FC 결정화기와 유사하게, DTB 결정화기는 선택적으로 일루트리에이션 다리가 장착된다. 일부 태양에서, 선택적인 외부 가열 루프를 사용하여 증발 속도를 증가시킬 수 있다.
- [0077] 또 다른 결정화기 형태는 도 8에 도시된 바와 같은 유도 순환 결정화기이다. 상기 형태는 활성 부피에 추가의 교반 수단을 제공한다. 상기 장치는 드래프트 튜브의 사용과 관련하여 DTB 결정화기와 유사하다. DTB 장치와 달리, 내부 교반기가 없다. 대신, 용기의 원추 부분에서 유도기는 재순환 펌프로부터 가열된 용액을 도입시킨다. 다른 결정화 장치 형태에서와 같이, 유도 순환 결정화기는 선택적으로 일루트리에이션 다리가 장착된다. 배플도 또한 상기 유형의 결정화기에 선택적으로 사용될 수 있다.
- [0078] 또 다른 태양에서, 결정화기는 도 9 및 10에 도시된 바와 같은 오슬로-형(Oslo-type) 결정화기일 수 있다. 상기 유형의 결정화기는 또한 "성장-", "유동층-" 또는 "크리스탈(Krystal)-" 유형 결정화기로 지칭된다. 오슬로 결정화기는 기계적 순환에 적용되지 않는 유동층에서의 결정의 성장을 가능케 한다. 오슬로 유닛에서의 결정은 유동층에서의 그의 체류 시간에 비례하는 크기로 성장한다. 결과는 오슬로 결정화기가 대부분의 다른 결정화기 유형보다 큰 결정을 성장시킬 수 있다는 것이다. 슬러리는 결정화기의 유동층에서 제거되어, 예를 들면, 원심 분리 구획으로 보내질 수 있다. 1,4-BDO를 함유하는 투명한 액체상은 결정화기의 정화 대역으로부터 퍼징될 수 있다.
- [0079] 분류 결정화 챔버는 유닛의 하단부이다. 상단부는 물의 제거에 의해 과포화가 진전되는 액체-증기 분리 영역이다. 약간 과포화된 액체상은 중앙 배관을 통해 흘러 내려가며 과포화는 결정의 유동층과의 접촉에 의해 해결된다. 과포화제거는, 순환하는 액체상이 챔버의 최상부에서 수거되기 전에 분류층을 통해 위쪽으로 이동함에 따라 점진적으로 일어난다. 잔류 액체는 순환 배관을 통해 유출되며, 새로운 공급물의 첨가후에 열보충이 제공되는 열교환기를 통해 이동한다. 이어서, 상기 잔류 액체는 상단부로 재순환된다.
- [0080] 일부 태양에서, 오슬로형 결정화기는 또한 선택적으로 전술한 바와 같이 배플, 일루트리에이션 다리 및 스크러버가 장착될 수 있다. 결정 성장이 어떤 교반 장치와도 접촉하지 않으므로, 파괴될 미세입자의 양은 일반적으로 보다 낮다. 오슬로형 결정화기는 결정 제거 기간들 사이에 긴 생성 주기를 허용한다.

- [0081] 오슬로형 결정화기는 발효 배지 염에서 발견되는 바와 같은 여러 화학 종의 분리-결정화에 유용하다. 한 태양에서, 오슬로형 결정화 유닛은 도 9에 도시된 바와 같이 "폐쇄"형이다. 다른 태양에서, 오슬로형 결정화기는 도 10에 도시된 바와 같이 "개방"형이다. 후자의 형태가, 예를 들어, 큰 침강 영역이 필요할 때 유용하다.
- [0082] 많은 상기 증발 결정화 장치가 제어된 결정 성장을 가능케 한다. 세포 제거후 액체 부분으로부터 발효 배지 염의 회수시, 정확한 결정 형태, 크기 등은 일반적으로 중요하지 않다. 사실상, 무정형 배지 염의 회수는 1,4-BDO를 포함하여 임의의 해당 화합물의 정제에서 충분할 수 있다. 따라서, 일부 태양에서, 자체로 결정 성장을 제어하지 않는 다른 증발 방법을 사용할 수 있다.
- [0083] 염을 나노여과 및/또는 이온 교환에 의해 제거하는 경우, 역삼투압(RO) 막 여과를 사용하여 증발전 물의 일부를 제거할 수 있다. 물은 RO 막을 투과하는 반면, 1,4-BDO는 잔류된다. 일부 태양에서, RO 막은 1,4-BDO와 같은 생성물을 약 20%까지 농축할 수 있다. 당해 분야에 숙련된 자라면 생성물 1,4-BDO로부터의 삼투압이 RO 막을 사용한 추가의 농축이 더이상 가능하지 않은 지점까지 증가함을 인지할 것이다. 그럼에도 불구하고, RO 막의 사용은 보다 많은 에너지 집약 수 증발 공정에 앞서 해당 생성물을 농축시키기 위한 유용한 저에너지 투입 방법이다. 따라서, 대규모에서 RO 막을 사용하는 것이 특히 유용하다.
- [0084] 일부 태양에서, 실질적으로 모든 염이 물을 제거하기 전에 제거된다. 다른 태양에서는, 실질적으로 모든 염이 물의 일부를 제거한 후에 제거된다. 제거되는 물의 부분은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 및 그 사이의 모든 값을 포함한 임의의 양일 수 있다. 일부 태양에서, 염은 실질적으로 모든 물의 제거후에 제거된다. 실질적으로 모든 물은 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 및 그 사이의 모든 값 및 모든 물을 포함한다.
- [0085] 많은 유형 및 형태의 증발기가 수분 제거에 이용가능하다. 증발 시스템을 설계하는데 한가지 고려사항은 에너지 필요량을 최소화하는 것이다. 다중 효용기(effect) 또는 기계적 증기 재압축과 같은 증발 형태는 감소된 에너지 소비를 가능케 한다. 일부 태양에서, 물을 제거하는 것은 하나 이상의 효용기를 포함하는 증발기 시스템을 사용한 증발에 의해 달성된다. 일부 태양에서, 이중- 또는 삼중-효용 증발기 시스템을 사용하여 1,4-BDO와 같은 해당 화합물로부터 물을 분리할 수 있다. 임의의 수의 다중-효용 증발기 시스템을 물의 제거에 사용할 수 있다. 상기 장치들은 또한 물보다 높은 비점을 갖는 임의의 발효 생성물에 적용될 수 있다. 삼중 효용 증발기 또는 기타 증발 장치 형태는 염 회수를 위한 증발 결정화기인 전용 효용기, 예를 들면, 삼중 효용기 형태의 최종 효용기를 포함할 수 있다.
- [0086] 증발기는 액체가 비등되어 증기를 생성하는, 또한 저압 스팀 생성기인 열교환기이다. 상기 스팀은 또 다른 "효용기"로 불리는 또 다른 증발기에서 추가의 가열을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 한 증발기로부터의 증기 라인이 다른 증발기의 스팀 용기에 연결되어 2개 또는 이중-효용 증발기를 제공하도록 2개의 증발기가 연결될 수 있다. 상기 형태는, 예를 들면, 삼중-효용 증발기를 생성하도록 제 3의 증발기로 이어질 수 있다.
- [0087] 그러므로, 증발은 효용기의 수에 의해 분류될 수 있다. 단일-효용 증발기에서, 스팀은 기화를 위한 에너지를 제공하며, 증기 생성물은 시스템으로부터 응축되고 제거된다. 이중-효용 증발기에서, 첫 번째 효용기로부터 증기 생성물을 이용하여 두번째 기화 유닛을 위한 에너지를 제공한다. 효용기의 연속전달은 임의의 수의 단계동안 계속될 수 있다. 다중-효용 증발기는 단일 효용 증발기에 비해 다량의 용매를 보다 효과적으로 제거할 수 있다.
- [0088] 다중 효용기 배열에서, 한 효용기로부터의 증기 생성물의 잠열을 이용하여 후속 효용기를 가열한다. 효용기는 스팀에 의해 가열된 것, 효용기 I로 시작하여 번호를 매긴다. 첫번째 효용기는 최고 압력하에 작동한다. 효용기 I로부터의 증기를 이용하여 효용기 II를 가열하며, 상기 효용기 II는 결과적으로 더 낮은 압력에서 작동한다. 이것은 각각의 추가 효용기를 통해 계속되어, 차례를 통한 압력 강하 및 뜨거운 증기가 한 효용기로부터 다음 효용기로 이동된다.
- [0089] 일부 태양에서, 증발기에서의 모든 효용기는 크기, 구성 및 열 전달 영역에 있어 물리적으로 유사할 수 있다. 열 손실이 심각하지 않는 한, 이들은 또한 동일한 용량을 가질 수 있다. 연속으로 연결된 효용기인 증발기 트레인은 공급물을 여러 상이한 방식으로 수용할 수 있다. 순류 공급 배열은 패턴 I, II 및 III을 따른다. 이들은 단일 공급 펌프를 사용한다. 상기 형태에서, 공급물은 효용기 I에서 사용된 바와 같은 최고 작동 온도로 상승된다. 최저 작동 온도는 최종 효용기에서 나타나며, 여기서 생성물은 또한 최대로 농축된다. 그러므로, 상기 형태는 열 민감성인 생성물에 또는 부반응을 감소시키는데 유용하다.
- [0090] 다른 태양에서, 역류 공급 배열 III, II, I을 사용한다. 상기 형태에서는, 다중 펌프를 사용하여 시스템의 압

력 강하에 대해 작업하지만, 공급물이 점차적으로 가열되기 때문에 이들은 순류 공급 형태보다 더 효과적일 수 있다. 상기 배열은 또한 시스템을 통한 점도 차이를 감소시키며, 따라서 점성 발효액에 유용하다. 일부 태양에서, 혼합 공급 배열을 사용할 수 있는데, 여기서는 공급물이 시스템의 중앙으로 유입되거나 효용기 II, III 및 I이다. 최종 증발은 최고 온도에서 수행된다. 또한, 역류 공급 배열에서보다 펌프가 덜 필요하다. 또 다른 태양에서, 병렬 공급 시스템을 사용하여 공급 스트림을 분배하여 각 효용기에 일부를 공급한다. 상기 형태는 생성물이 슬러리일 것으로 예상되는 결정화 증발기에서 통상적이다.

[0091] 많은 증발기 디자인이 존재한다. 디자인들의 임의의 조합을 전술한 바와 같은 효용기로 사용할 수 있다. 한 증발기 디자인은 강하막 증발기이다. 상기 장치는 도 11에 나타난 바와 같은 측방향 또는 동심원 배열된 원심 분리기와 함께, 수직 셀-튜브식 열교환기를 포함한다.

[0092] 증발될 액체는 튜브의 내부 표면상에 고르게 분배된다. 액체는 아래쪽으로 흘러 박막을 형성하고, 이로부터 스팀에 의해 적용된 열로 인해 증발이 일어난다. 스팀은 튜브의 외부 표면 상에 응축되어 아래쪽으로 흘러내린다. 많은 튜브가 나란히 함께 구성된다. 각각의 말단에서 튜브는 튜브 플레이트에 고정되고 최종적으로 튜브 다발은 재킷에 의해 둘러싸인다.

[0093] 스팀은 재킷을 통해 도입된다. 튜브 사이의 공간은 가열 구획을 형성한다. 튜브의 내면은 비등 구획으로 불린다. 이들은 함께 칼란드리아(calandria)를 형성한다. 농축된 액체 및 증기는 칼란드리아로부터 바닥 부분에서 유출되며, 여기로부터 농축된 액체의 주요 부분이 배출된다. 남은 부분은 후속 분리기에 접하여 증기와 함께 유입된다. 분리된 농축물은, 통상적으로 칼란드리아로부터 농축물의 주요 부분과 동일한 펌프에 의해 배출되며, 증기는 상단으로부터 분리기에서 유출된다. 튜브의 외부 표면상에서 응축되는 가열 스팀은 응축물로서 가열 구획의 바닥 부분에서 수거되며 여기에서 배출된다.

[0094] 강하막 증발기는 가열 매체와 비등 액체간에 매우 낮은 온도 차이하에 작동될 수 있으며, 이들은 또한 전형적으로 통과당 수초의 매우 짧은 생성물 접촉 시간을 갖는다. 이러한 특성들은 강하막 증발기를 열-민감성 생성물에 특히 적합하게 만든다. 작은 온도 차이를 갖는 강하막 증발기의 작동은 다중 효용기 형태에서 또는 기계적 증기 압착 시스템과 함께 그의 사용을 조장한다.

[0095] 칼란드리아의 튜브내 가열 표면의 충분한 습윤은 튜브를 막히게 할 수 있는 건조한 파편 및 물때를 방지하는 것을 돕는다. 일부 태양에서, 습윤 속도는 증발기 효율을 확장하거나 분할함으로써 증가될 수 있다. 강하막 증발기는, 예를 들면, 에너지 공급, 진공, 공급 속도 및 농도와 같은 파라미터들의 변형에 매우 반응한다. 일부 태양에서, 단일, 이중, 삼중, 사중 또는 기타 다중-효용 강하막 증발기 형태는 상기에서 상술한 바와 같은 나노 여과 공정을 통해 여과된 발효 공급물을 이용할 수 있다. 수분 증발에 앞서 염을 감소시키는 것은 또한 칼란드리아 튜브내의 물때를 방지하는 것을 돕는다.

[0096] 일부 태양에서, 강하막 증발기는 단거리 증발기이다. 작동시 액체 분획은 분배 시스템에 의해 칼란드리아의 가열 튜브위에 고르게 분배된다. 액체 분획은 통상적인 강하막 증발기와 유사한 방식으로 내부 벽 상의 박막중에서 흘러 내린다. 칼란드리아 튜브내에 생성된 증기는 응축 튜브의 외부 벽 상에 증류액으로 응축된 후 아래쪽으로 흐른다. 수 증류액 및 농축된 액체 분획은 증발기의 하단부로부터 별도로 배출된다.

[0097] 또 다른 증발기 형태는 강제 순환 증발기이다. 상기 디자인에서, 플래시 용기 또는 분리기는 도 12에 도시된 바와 같이 칼란드리아 및 순환 펌프 위에 배치된다. 작동시, 액체 분획은 순환 펌프에 의해 칼란드리아를 통해 순환된다. 액체는 정상 비등압보다 높은 증압에서 칼란드리아내에서 과열된다. 분리기에 유입될 때, 압력은 급속히 감소되어 액체의 플래싱 또는 급속 비등을 야기한다. 순환 펌프에 의해 제어되는 유속 및 온도를 이용하여 수 제거 공정을 제어할 수 있다. 상기 형태는 칼란드리아 튜브의 오염을 방지하는데 유용하다.

[0098] 일부 태양에서, 다중 강제 순환 증발기 효용기를 전술한 바와 같이 이용할 수 있다. 예를 들면, 단일 효용 강제 순환 증발기 이외에, 이중, 삼중 및 다중 효용 강제 순환 증발기를 발효액의 액체 분획으로부터 물을 분리하는데 사용할 수 있다. 일부 태양에서, 하나 이상의 강제 순환 증발기는 하나 이상의 강하막 증발기와 함께 사용될 수 있다.

[0099] 또 다른 태양에서, 증발기는 도 13에 도시된 바와 같은 관형 증발기일 수 있다. 상기 증발기는 관형 열교환기 및 하나 이상의 분리기를 사용한다. 판틀형 형태는 가열 매체 및 발효액의 액체 분획을 운반하기 위해 교번하는 채널을 이용한다. 작동시, 액체상 및 가열 매체는 그의 각각의 채널을 역류로 통과한다. 정의된 판 거리 및 형태는 난류를 생성하여 효과적인 열 전달을 제공한다. 액체 분획을 갖는 채널로의 열 전달은 물이 비등하게 한다. 상기와 같이 생성된 증기는 잔류 액체를 상승하는 막으로서 판 조립체의 증기 덕트내로 유도한다.

잔류 액체 및 증기는 후속의 원심분리기에서 분리된다. 넓은 유입 덕트 및 상향 이동은 열교환기의 횡단면에 걸쳐 우수한 분포를 촉진한다. 관형 증발기는 오염을 피하기 위한 나노여과막을 통한 예비-여과에 유용하게 작동될 수 있다. 따라서, 물때에 관해 강하막 증발기와 유사한 고려사항들이 타당하게 적용된다.

- [0100] 일부 태양에서, 다중-효용 관형 증발기는 강하막 및 강제 순환 증발기에 대해 전술한 바와 매우 동일한 방식으로 사용될 수 있다. 다중 효용기 형태로 사용될 때, 당해 분야에 숙련된 자라면 관형 증발기에 액체 분획을 도입하기 전에 강제 순환 증발기 및/또는 나노여과 단계를 사용하는 이점을 인지할 것이다. 따라서, 분리 방안은, 예를 들면, 나노여과에 이어, 하나 이상의 강제 순환 증발기의 다중-효용 증발 형태에 이어, 하나 이상의 관형 및/또는 강하막 증발기를 포함할 수 있다. 또 다른 태양에서, 전술한 임의의 증발 결정화기도 또한 다중-효용기 형태와 함께 사용될 수 있다.
- [0101] 일부 태양에서, 도 14에 도시된 바와 같이 순환 증발기를 사용하여 액체 분획으로부터 물을 제거할 수 있다. 순환 증발기는 열교환기의 상단에 배치된 측면 분리기와 함께 짧은 튜브 길이를 갖는 수직 칼란드리아를 사용한다. 작동시 액체 분획은 칼란드리아의 바닥에서 공급되어 상단으로 상승한다. 칼란드리아의 튜브에서 가열시, 물이 비등하기 시작하여 증기를 방출한다. 액체는 상향 이동 증기에 의해 비말동반되는 칼란드리아의 상단으로 운반된다. 액체는 분리기에 유입될 때 증기로부터 분리된다. 액체는 순환 배관을 통해 증발기내로 다시 흘러 들어가 연속 순환을 가능케 한다. 칼란드리아의 가열 요소와 분리기 챔버 사이의 온도 차이가 클수록 액체 분획으로부터 수 증발 정도가 더 크다. 액체 부분에 1,4-BDO가 충분히 농축될 때, 염이 액체 분획으로부터 침전되기 시작한다.
- [0102] 일부 태양에서, 순환 증발기의 분리기는 각각 그 자체의 액체 순환 시스템이 장착된 여러 분리 챔버로 분할될 수 있다. 이것은 액체 분획으로부터 물을 제거하기 위해 필요한 가열 표면을 감소시킬 수 있다.
- [0103] 유동층 증발기는 액체 분획으로부터 물의 제거를 위해 사용될 수 있는 또 다른 형태이다. 도 15에 도시된 상기 시스템은 수직 유동층 열교환기가 장착된다. 열교환기의 튜브 측면상에 유리 또는 세라믹 비드 또는 스틸 와이어 입자와 같은 고체 입자들이 존재한다.
- [0104] 유동층 증발기는 강제 순환 증발기와 유사한 방식으로 작동한다. 액체의 상향 이동은 고체 입자를 비말동반하여 정련 또는 세정 작용을 제공한다. 액체 분획과 함께 고체 입자들은 칼란드리아 튜브를 통해 전달된다. 칼란드리아의 선단에서, 고체 입자는 액체와 분리되어 칼란드리아 유입 챔버로 재순환된다. 과열된 유체는 분리기에서 비점으로 플래시되어 증발을 통한 물의 제거를 가능케 한다. 칼란드리아 튜브내에서 고체의 정련 작용은 연장된 작동 시간을 가능케 하며 또한 튜브의 오염을 저지한다. 이것은 오염 고체의 생성이 통상적인 강제 순환 증발기 시스템의 사용을 제한할 때 유용할 수 있다.
- [0105] 상승막 증발기는 발효액으로부터 수거된 액체 분획으로부터 물을 제거하는데 유용한 또 다른 유형의 증발기이다. 상기 시스템 형태는 수직 셀-튜브식 열교환기(칼란드리아) 상에 상부-장착된 증기 분리기를 갖는다. 작동시, 칼란드리아의 바닥에서 액체 분획은 증기 분리기의 상부로 상승한다. 외부 가열은 액체 분획중 물이 칼란드리아 튜브의 내벽에서 비등하게 한다. 스팀의 상향 이동은 액체 분획이 칼란드리아의 상부로 운반되게 한다. 튜브를 통한 상승시에 또한 증기가 생성된다. 분리기내에 유입시에 증기 및 액체상이 분리된다. 상승막 증발기는 점성 액체와 함께 사용될 때 및/또는 대량의 오염 고체가 예상될 때 특히 유용하다.
- [0106] 역류-유하식 증발기는 발효액의 액체 분획으로부터 물을 제거하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 증발기이다. 상기 장치는 상승막 증발기보다 큰 칼란드리아의 하단부를 갖는 셀-튜브식 열교환기(칼란드리아)를 갖는다. 상승막 증발기와 유사하게 분리기는 칼란드리아의 상단에 배치된다. 상기 증발기에서 분리기에는 액체 분배 시스템이 또한 장착된다.
- [0107] 작동시, 액체는 강하막 증발기와 유사하게 증발기의 상단에 제공된다. 액체는 증발기 튜브를 통해 분배되지만, 증기는 액체에 대해 역류로 상단으로 유동한다. 일부 태양에서, 상기 공정은 또한, 예를 들면, 비말동반을 향상시키기 위해 불활성 가스의 스트림을 포함할 수 있다. 상기 가스는 칼란드리아의 하단부에서 도입될 수 있다.
- [0108] 교반 증발기는 발효액의 액체 분획으로부터 물을 제거하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 유형의 증발기이다. 상기 장치는 교반기가 장착된, 외부 재킷-가열 용기를 포함한다. 작동시, 액체 분획은 선택적으로 배치내에 용기에 위치한다. 물은 연속 교반하에 비등에 의해 목격하는 농도로 증발된다. 상기 장치는 선택적인 투입식 가열 코일을 사용하여 가열 표면을 증가시킴으로써 그의 증발 속도를 증가시킬 수 있다. 상기 유형의 증발기는 발효가 매우 점성일 때 특히 유용하다.

- [0109] 마지막으로, 나선형 튜브 증발기는 발효액의 액체 분획으로부터 물을 제거하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 유형의 증발기이다. 디자인은 나선형 가열 튜브 및 바닥-탑재 원심분리기가 장착된 열교환기를 포함한다. 작동 시, 액체 분획은 비등막을 상부로부터 바닥으로 증기에 대해 평행류로 유동한다. 팽창 증기는 액체 막상에 전단 또는 추진 효과를 제공한다. 흐름 경로의 굴곡은 튜브 축을 따른 이동을 방해하는 2차 흐름을 유도한다. 상기 난류는 열 전달을 개선하며 점성 액체에 특히 유용하다. 가열 튜브의 나선 형태는 유용하게 비-나선형의 직선 튜브 디자인에 비해 큰 가열 표면적 대 높이를 제공한다. 상기 장치는 단일 통과 작업을 가능케 하는 큰 증발 비를 제공한다.
- [0110] 전술한 바와 같이, 이중, 삼중 및 다중-효용기 형태의 전술한 임의 유형의 다중 증발기의 사용은 증발 효율을 증가시킬 수 있다. 작업의 효율을 개선하는 다른 방법으로는, 예를 들면, 열 및 기계적 증기 재압축이 포함된다. 일부 태양에서, 다중-효용기 형태, 열 재압축 및 기계적 재압축의 임의의 조합을 사용하여 증발 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0111] 열 증기 재압축은 비등 챔버(또는 분리기)로부터의 증기를 보다 고압으로 재압축시킴을 포함한다. 가열 챔버 압력에 상응하는 포화 스팀 온도는 더 높아서 증기가 가열에 재사용될 수 있다. 이것은 스팀 제트 펌프 원리로 작동하는 스팀 제트 증기 재압축기에 의해 달성된다. 간략하게, 스팀 제트 원리는 진공을 제공하고 가공 가스를 처리하기 위해 스팀의 에너지를 사용한다. 가압하에 스팀은 노즐에 유입되어 고속 제트를 생성한다. 상기 제트 작용은 가스를 끌어당겨 비말동반하는 진공을 발생시킨다. 스팀과 가스의 혼합물은 대기압에서 배출된다. 구동 증기로 불리는 다량의 스팀을 사용하여 열 재압축기를 작동시킨다. 구동 증기는 다음 단계 효용기로 또는 응축기로 전달된다. 과잉 증기의 에너지는 사용되는 구동 증기량과 대략 같다.
- [0112] 열 증기 재압축기가 장착된 다중-효용 증발기에서, 제 1 칼란드리아에서의 가열 매체는 스팀 배출기에 의해 더 높은 온도 수준으로 압축된, 결합된 효용기 중 하나로부터의 생성 증기이다. 임의의 후속 효용기에서의 가열 매체는 이전 칼란드리아에서 생성된 증기이다. 최종 효용기로부터의 증기는, 선택적으로 필요에 따라 냉각수 보충하에 유입 생성물과 함께 응축된다. 모든 회수된 물은 용이하게 발효액으로 재순환된다.
- [0113] 기계적 재압축은 하나의 증발기에서 유출되는 모든 증기를 사용한다. 상기 증기는 증발기의 상응하는 가열 스팀 온도의 압력으로 재압축된다. 작동 원리는 가열 펌프와 유사하다. 증기 응축물의 에너지는 선택적으로 발효액의 액체 분획의 추가분을 예열하기 위해 사용될 수 있다. 기계적 재압축은 고압 팬 또는 터보압축기의 사용에 의해 제공된다. 상기 팬은 고속으로 작동하며, 약 1:1.2 내지 약 1:2의 증기 압축비에서 많은 유량에 적합하다. 합리적인 속도는 약 3,000 내지 약 18,000 rpm일 수 있다. 일부 태양에서, 특히 고압이 유용한 경우, 다단계 압축기를 사용할 수 있다.
- [0114] 기계적 증기 압축기가 장착된 증발기에서, 제 1 효용기에서의 가열 매체는 고압 팬에 의해 보다 고온으로 압축된, 동일 효용기에서 발생된 증기이다. 고열 구획으로부터의 임의의 과잉 증기는 선택적으로 응축되거나 고농축기에 사용될 수 있다.
- [0115] 전술한 바와 같이, 다중 효용기, 열 증기 재압축, 기계적 증기 재압축 또는 이들의 조합을 포함한 다양한 에너지 효용기 형태로 배열될 수 있는 많은 가능한 증발 유형이 존재한다. 최적의 형태는, 예를 들면, 배지 염이 증발전에 제거되는지 또는 증발시에 결정화에 의해 제거되는지 여부를 포함하여 많은 요인들에 따라 달라진다. 염이 증발 전에 제거되는 경우, 저비용 형태가 유용하다. 대표적인 형태로는 강하막 삼중 효용 증발기 시스템 또는 기계적 증기 재압축 시스템이 포함된다. 염이 증발시 결정화되는 경우는 염의 침전에 의한 열교환기 표면의 스케일링 가능성으로 인해 더 복잡하다. 이 경우에 대표적인 형태로는, 예를 들면, 처음 두 효용기는 강하막 증발기(결정화 개시전)이고 최종 단계는 강제 순환 증발 결정화기인 삼중 효용기가 포함된다.
- [0116] 1,4-BDO 정제는 특히, 일련의 2개 증류 컬럼에서 일어날 수 있지만, 더 많은 컬럼을 사용할 수도 있다. 제 1 컬럼은 물과 1,4-BDO로부터의 다른 경질 성분들을 분리하기 위해 사용되는 반면, 제 2 컬럼은 임의의 잔류하는 중질 성분들로부터 1,4-BDO를 증류하기 위해 사용된다. 증류 컬럼은 필요한 온도를 감소시키고 원치않는 반응, 생성물 분해 및 색소 형성을 감소시키기 위해 진공하에 작동될 수 있다. 컬럼 전체에 걸쳐 압력 강하는 바닥의 리보일터에서 저온을 유지하기 위해 최소화될 수 있다. 리보일터에서의 체류 시간은, 예를 들면, 강하막 리보일터를 사용함으로써 또한 원치않는 반응, 생성물 분해 및 색소 형성을 방지하기 위해 최소화될 수 있다.
- [0117] 당해 분야에 숙련된 자라면 열거된 형태, 여과, 이온 교환, 증발 결정화, 증발기 및 증류 장치의 다양한 형태들이 1,4-BDO를 포함하여 해당 화합물의 정제에 유용함을 인지할 것이다. 대표적인 한 형태로는, 예를 들면, 도 16의 흐름도에 도시된 바와 같은 디스크 적층 원심분리, 한외여과, 증발 결정화, 이온 교환 및 증류가 포함

된다. 따라서, 일부 태양에서, 본 발명은, 디스크 적층 원심분리에 의해 고체의 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계; 한외여과에 의해 액체 분획으로부터 추가분의 고체를 제거하는 단계; 증발 결정화에 의해 액체 분획으로부터 염의 일부를 제거하는 단계; 이온 교환에 의해 액체 분획으로부터 추가분의 염을 제거하는 단계; 및 1,4-BDO를 증류시키는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법을 제공한다.

[0118] 도 16에 나타낸 바와 같이, 세포와 고체가 디스크 적층 원심분리에 의해 먼저 제거된다. 세포는 선택적으로 발효로 다시 재순환될 수 있다. 한외여과는 세포 파편, DNA 및 침전된 단백질을 제거한다. 증발 결정화후, 잔류하는 액체상은 이온 교환 컬럼을 통과하여 추가의 염을 제거한다. 이온 교환 후에, 물의 일부가 전술한 바와 같이 증발기에서 증발될 수 있다. 경질 분획의 증류에 이어 1,4-BDO의 증류에 의해 실질적으로 순수한 1,4-BDO가 수득된다.

[0119] 또 다른 대표적인 형태로는 도 17에 도시된 바와 같은 디스크 적층 형태, 한외여과, 나노여과, 이온 교환, 증발 및 증류가 포함된다. 따라서, 일부 태양에서, 본 발명은 디스크 적층 원심분리에 의해 고체의 일부를 제거하여 액체 분획을 제공하는 단계; 한외여과에 의해 액체 분획으로부터 추가분의 고체를 제거하는 단계; 나노여과에 의해 액체 분획으로부터 염의 일부를 제거하는 단계; 이온 교환에 의해 액체 분획으로부터 추가분의 염을 제거하는 단계; 물의 일부를 증발시키는 단계; 및 1,4-BDO를 증류시키는 단계를 포함하는, 발효액으로부터 1,4-BDO를 단리하는 방법을 제공한다.

[0120] 도 17에 나타낸 바와 같이, 세포와 고체가 디스크 적층 원심분리에 의해 먼저 제거된다. 세포는 선택적으로 발효로 다시 재순환될 수 있다. 한외여과는 세포 파편, DNA 및 침전된 단백질을 제거한다. 나노여과는 배지 염의 일부를 제거하며, 이것은 선택적으로 발효로 다시 재순환될 수 있다. 나노여과후, 투과액을 이온 교환 컬럼을 통과시켜 추가의 염을 제거한다. 이온 교환 후에, 물의 일부가 전술한 바와 같이 증발기에서 증발될 수 있다. 경질 분획의 증류에 이어 1,4-BDO의 증류에 의해 실질적으로 순수한 1,4-BDO가 수득된다.

[0121] 해당 화합물은 그를 위해 생성물이 미생물에서의 생합성을 위해 조작될 수 있는 임의의 화합물일 수 있다. 본원에 개시된 공정은 물보다 높은 비점을 갖는 해당 화합물에 적용가능하다. 특히, 해당 화합물은 약 120 내지 400 °C의 비점을 가질 수 있다. 다른 성질로는 물에서의 높은 용해도 또는 혼화성 및 염을 감지할 수 있을 정도로 가용화시키지 못함(증발 결정화를 이용하는 경우), 및 약 100 내지 150 달톤 미만의 분자량을 갖는 중성 화합물(나노여과에 적합하도록)이 포함된다.

[0122] 본원에 기술된 공정 및 원리는 발효액으로부터 해당 화합물을 분리하기 위해 적용될 수 있으며, 이때 해당 화합물은 전술한 일반적인 성질을 갖는다. 상기 공정은 세포 덩어리를 포함하는 고체 분획으로부터 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리한 후 물 및 염을 제거한 후 정제하는 것을 포함한다.

[0123] 일부 태양에서, 본 발명은 또한 발효액의 성분들을 재순환시키기 위한 방법을 제공한다. 발효액은 1,4-BDO 또는 물보다 높은 비점을 갖는 임의의 해당 화합물, 1,4-BDO 또는 해당 화합물을 생성할 수 있는 세포, 배지 염 및 물을 포함할 수 있다. 상기 방법은 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 1,4-BDO 또는 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는 것을 포함한다. 이어서, 세포는 발효액으로 재순환된다. 물은 액체 분획으로부터 염의 분리 전이나 후에 제거될 수 있다. 액체 분획으로부터 증발된 물은 발효액으로 재순환된다. 액체 분획으로부터의 염은, 염이 결정화되게 하는 액체 분획으로부터의 물의 제거에 의해 또는 나노여과 및/또는 이온 교환에 의해 제거되어 발효액으로 재순환될 수 있다. 이어서, 나노여과로부터 분리된 염은 발효액으로 재순환된다. 상기 방법은 1,4-BDO 또는 기타 해당 화합물을 제공하며, 이들은 예를 들면, 증류에 의해 더 정제될 수 있다.

[0124] 일부 태양에서, 1,4-BDO와 같은 해당 화합물을 생성하는 방법은 화합물-생성 미생물을 발효조에서 해당 화합물을 생성하기에 충분한 시간동안 배양하는 것을 포함한다. 유기체는 화합물 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 유전자 파괴를 포함하는 화합물 경로를 갖는 미생물을 포함한다. 상기 화합물을 생성하는 방법은 또한 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 해당 화합물을 정제하는 단계를 포함하는 공정에 의해 화합물을 단리하는 것을 포함한다. 해당 화합물은 물보다 높은 비점을 갖는다.

[0125] 특정 태양에서, 1,4-BDO를 생성하는 방법은 1,4-BDO-생성 미생물을 발효조에서 1,4-BDO를 생성하기에 충분한 시간동안 배양하는 것을 포함한다. 유기체는 화합물 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 유전자 파괴를 포함하는 1,4-BDO 경로를 갖는 미생물을 포함한다. 1,4-BDO를 생성하는 방법은 또

한 세포를 포함하는 고체 분획으로부터 해당 화합물이 농축된 액체 분획을 분리하는 단계; 액체 분획으로부터 물을 제거하는 단계; 액체 분획으로부터 염을 제거하는 단계; 및 해당 화합물을 정제하는 단계를 포함하는 공정에 의해 화합물을 분리하는 것을 포함한다.

- [0126] 해당 생성물이 1,4-BDO인 특정한 태양에서, 생성은 일련의 1,4-BDO 경로 효소들에 의해 1,4-BDO를 생성할 수 있는 미생물 유기체의 배양으로 시작된다. 대표적인 미생물 유기체로는 제한하지 않고 본원에 그 전체로 참고로 인용된 US 2009/0075351 호 및 US 2009/0047719 호에 기술된 것들이 포함된다.
- [0127] 1,4-BDO 경로의 효소를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 유기체가 제공될 수 있다. 상기 유기체로는, 예를 들면, 완전 1,4-BDO 생합성 경로를 갖도록 조작된 비-천연 미생물 유기체가 포함된다. 상기 경로는 내인성 및 외인성 핵산 둘 다에 의해 암호화된 효소를 포함할 수 있다. 정상적으로 미생물 숙주에 존재하지 않는 효소는, 예를 들면, 하나 이상의 외인성 핵산을 포함시킴으로써 경로를 완성시키기 위한 작용성을 포함시킬 수 있다. 상기 한 1,4-BDO 경로는 4-하이드록시부타노에이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, CoA-의존성 숙신산 세미알데하이드 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트:CoA 트랜스퍼라제, 4-부티레이트 키나제, 포스포트랜스부티릴라제, α-케토글루타레이트 데카복실라제, 알데하이드 데하이드로게나제, 알콜 데하이드로게나제 또는 알데하이드/알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 효소를 포함한다.
- [0128] 또 다른 경로는 4-아미노부티레이트 CoA 트랜스퍼라제, 4-아미노부티릴-CoA 하이드롤라제, 4-아미노부티레이트-CoA 리가제, 4-아미노부티릴-CoA 옥시도리덕타제(탈아민화), 4-아미노부티릴-CoA 트랜스아미나제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.
- [0129] 또 다른 경로는 4-아미노부티레이트 CoA 트랜스퍼라제, 4-아미노부티릴-CoA 하이드롤라제, 4-아미노부티레이트-CoA 리가제, 4-아미노부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-아미노부티릴-CoA 리덕타제, 4-아미노부탄-1-올 데하이드로게나제, 4-아미노부탄-1-올 옥시도리덕타제(탈아민화) 또는 4-아미노부탄-1-올 트랜스아미나제를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.
- [0130] 또 다른 경로는 4-아미노부티레이트 키나제, 4-아미노부티르알데하이드 데하이드로게나제(포스포틸화), 4-아미노부탄-1-올 데하이드로게나제, 4-아미노부탄-1-올 옥시도리덕타제(탈아민화), 4-아미노부탄-1-올 트랜스아미나제, [(4-아미노부탄올릴)옥시]포스폰산 옥시도리덕타제(탈아민화), [(4-아미노부타노일)옥시]포스폰산 트랜스아미나제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 데하이드로게나제 또는 4-하이드록시부티르알데하이드 데하이드로게나제(포스포틸화)를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.
- [0131] 또 다른 경로는 알파-케토글루타레이트-5-키나제, 2,5-다이옥소펜타노산 세미알데하이드 데하이드로게나제(포스포틸화), 2,5-다이옥소펜타노산 리덕타제, 알파-케토글루타레이트 CoA 트랜스퍼라제, 알파-케토글루타릴-CoA 하이드롤라제, 알파-케토글루타릴-CoA 리가제, 알파-케토글루타릴-CoA 리덕타제, 5-하이드록시-2-옥소펜타노산 데하이드로게나제, 알파-케토글루타릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 5-하이드록시-2-옥소펜타노산 데카복실라제 또는 5-하이드록시-2-옥소펜타노산-데하이드로게나제(탈카복실화)를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.
- [0132] 또 다른 경로는 글루타메이트 CoA 트랜스퍼라제, 글루타밀-CoA 하이드롤라제, 글루타밀-CoA 리가제, 글루타메이트-5-키나제, 글루타메이트-5-세미알데하이드 데하이드로게나제(포스포틸화), 글루타밀-CoA 리덕타제, 글루타메이트-5-세미알데하이드 리덕타제, 글루타밀-CoA 리덕타제(알콜 생성), 2-아미노-5-하이드록시펜타노산 옥시도리덕타제(탈아민화), 2-아미노-5-하이드록시펜타노산 트랜스아미나제, 5-하이드록시-2-옥소펜타노산 데카복실라제 또는 5-하이드록시-2-옥소펜타노산 데하이드로게나제(탈카복실화)를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.
- [0133] 또 다른 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 비닐아세틸-CoA Δ-이소머라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 리

덕타제 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.

[0134] 또 다른 경로는 호모세린 데아미나제, 호모세린 CoA 트랜스퍼라제, 호모세린-CoA 하이드롤라제, 호모세린-CoA 리가제, 호모세린-CoA 데아미나제, 4-하이드록시부트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부트-2-에노일-CoA 하이드롤라제, 4-하이드록시부트-2-에노일-CoA 리가제, 4-하이드록시부트-2-에노에이트 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리가제 또는 4-하이드록시부트-2-에노일-CoA 리덕타제를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.

[0135] 또 다른 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제(알콜 생성), 4-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리가제 또는 4-하이드록시부탄올 데하이드로게나제(포스포릴화)를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 숙시닐-CoA 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성) 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.

[0136] 또 다른 경로는 글루타메이트 데하이드로게나제, 4-아미노부티레이트 옥시도리덕타제(탈아민화), 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제, 글루타메이트 데카복실라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리가제 또는 4-하이드록시부탄올 데하이드로게나제(포스포릴화)를 암호화하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 상기 경로는 또한 알파-케토글루타레이트 데카복실라제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜 생성) 또는 1,4-부탄다이올 데하이드로게나제를 포함할 수 있다.

[0137] 유전자 삽입 이외에 또는 그 대신에, 유기체는 탄소 흐름을 1,4-BDO를 합성하는 방향으로 유도하는 유전자 파괴를 포함할 수 있다. 상기 유기체는, 예를 들면, 1,4-부탄다이올 생성을 성장과 연결시키는 일련의 대사 변형을 갖는 비-천연 미생물을 포함한다. 일부 태양에서, 1,4-부탄다이올 생성은 성장과 연결되지 않는다. 일련의 대사 변형은 하나 이상의 유전자 또는 그의 이종상동체(ortholog)의 파괴를 포함할 수 있다. 파괴는 일부 태양에서 완전 유전자 결실을 포함할 수 있다. 파괴는 또한 프로모터 서열의 제거 등에 의한 변형을 포함할 수 있다. 1,4-BDO 생성의 경우, 일련의 대사 변형은 *adhE* 및 *ldhA*의 파괴를 포함할 수 있다. 다른 파괴는 유전자 *mdh*를 포함할 수 있다. 또 다른 파괴는 *mgo*, *aspA*, *sfcA*, *maeB*, *pntAB* 및 *gdhA*를 포함한 유전자 조합으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 또 다른 파괴는 *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC* 및 *gsk*를 포함한 유전자 조합으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 또 다른 파괴는 *pf1AB*의 파괴를 포함할 수 있다. 파괴의 대표적 조합은 유전자 *adhE*, *ldhA*, *pf1A*, *mdh* 및 *aspA*의 각각의 파괴를 포함하여, *adhE*, *ldhA*, *pf1AB*, *mdh* 및 *aspA*를 포함한 유전자 조합으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다.

[0138] 파괴의 또 다른 대표적인 조합은 *adher*, *nadh6*; *adher*, *ppck*; *adher*, *sucd4*; *adher*, *atps4r*; *adher*, *fum*; *adher*, *mdh*; *adher*, *pfli*, *ppck*; *adher*, *pfli*, *sucd4*; *adher*, *ackr*, *nadh6*; *adher*, *nadh6*, *pfli*; *adher*, *aspt*, *mdh*; *adher*, *nadh6*, *ppck*; *adher*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *ppck*; *adher*, *mdh*, *thd2*; *adher*, *fum*, *pfli*; *adher*, *ppck*, *sucd4*; *adher*, *glcpts*, *ppck*; *adher*, *gludy*, *mdh*; *adher*, *gludy*, *ppck*; *adher*, *fum*, *ppck*; *adher*, *mdh*, *ppck*; *adher*, *fum*, *gludy*; *adher*, *fum*, *hex1*; *adher*, *hex1*, *pfli*; *adher*, *hex1*, *thd2*; *adher*, *frd2*, *ldh\_d*, *mdh*; *adher*, *frd2*, *ldh\_d*, *me2*; *adher*, *mdh*, *pgl*, *thd2*; *adher*, *g6pdhy*, *mdh*, *thd2*; *adher*, *pfli*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *ackr*, *akgd*, *atps4r*; *adher*, *glcpts*, *pfli*, *ppck*; *adher*, *ackr*, *atps4r*, *sucoas*; *adher*, *gludy*, *pfli*, *ppck*; *adher*, *me2*, *pfli*, *sucd4*; *adher*, *gludy*, *pfli*, *sucd4*; *adher*, *atps4r*, *ldh\_d*, *sucd4*; *adher*, *fum*, *hex1*, *pfli*; *adher*, *mdh*, *nadh6*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *mdh*, *nadh6*; *adher*, *atps4r*, *fum*, *nadh6*; *adher*, *aspt*, *mdh*, *nadh6*; *adher*, *aspt*, *mdh*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *glcpts*, *sucd4*; *adher*, *atps4r*, *gludy*, *mdh*; *adher*, *atps4r*, *mdh*, *ppck*; *adher*, *atps4r*, *fum*, *ppck*; *adher*, *aspt*, *glcpts*, *mdh*; *adher*, *aspt*, *gludy*, *mdh*; *adher*, *me2*, *sucd4*, *thd2*; *adher*, *fum*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *mdh*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *gludy*, *mdh*, *thd2*; *adher*, *hex1*, *pfli*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *g6pdhy*, *mdh*; *adher*, *atps4r*, *mdh*, *pgl*; *adher*, *ackr*, *frd2*, *ldh\_d*; *adher*, *ackr*, *ldh\_d*, *sucd4*; *adher*, *atps4r*, *fum*, *gludy*; *adher*, *atps4r*, *fum*, *hex1*; *adher*, *atps4r*, *mdh*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *frd2*, *ldh\_d*; *adher*, *atps4r*, *mdh*, *pgdh*; *adher*, *glcpts*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *gludy*, *ppck*, *thd2*; *adher*, *fum*, *kex1*, *thd2*; *adher*, *atps4r*, *me2*, *thd2*; *adher*, *fum*,

me2, thd2; adher, glcpts, gludy, ppck; adher, me2, pgl, thd2; adher, g6pdhy, me2, thd2; adher, atps4r, frd2, ldh\_d, me2; adher, atps4r, frd2, ldh\_d, mdh; adher, aspt, ldh\_d, mdh, pfli; adher, atps4r, glcpts, nadh6, pfli; adher, atps4r, mdh, nadh6, pgl; adher, atps4r, g6pdhy, mdh, nadh6; adher, ackr, fum, gludy, ldh\_d; adher, ackr, gludy, ldh\_d, succ4; adher, atps4r, g6pdhy, mdh, thd2; adher, atps4r, mdh, pgl, thd2; adher, aspt, g6pdhy, mdh, pyk; adher, aspt, mdh, pgl, pyk; adher, aspt, ldh\_d, mdh, sucoas; adher, aspt, fum, ldh\_d, mdh; adher, aspt, ldh\_d, mals, mdh; adher, aspt, icl, ldh\_d, mdh; adher, frd2, gludy, ldh\_d, ppck; adher, frd2, ldh\_d, ppck, thd2; adher, ackr, atps4r, ldh\_d, succ4; adher, ackr, acs, ppc, ppck; adher, gludy, ldh\_d, ppc, ppck; adher, ldh\_d, ppc, ppck, thd2; adher, aspt, atps4r, glcpts, mdh; adher, g6pdhy, mdh, nadh6, thd2; adher, mdh, nadh6, pgl, thd2; adher, atps4r, g6pdhy, glcpts, mdh; adher, atps4r, glcpts, mdh, pgl; 및 adher, ackr, ldh\_d, mdh, succ14를 포함한다. 상기 언급한 유전자는 하기 표 1a에, 상기 유전자가 촉진하는 반응들과 함께, 보다 광범위한 녹아웃 후보 리스트에 포함된다.

[표 1a]

에스케리키아 콜라이(이. 콜라이)에서 유전자 녹아웃 후보

반응 약자	반응 화학량론 *	각 반응을 촉진하는 효소(들)을 암호화하는 유전자
<b>ACKr</b>	[c] : ac + atp <=> actp + adp	(b3115 또는 b2296 또는 b1849 )
<b>ACS</b>	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
<b>ACT6</b>	ac[p] + h[p] <=> ac[c] + h[c]	비-유전자 결합
<b>ADHER</b>	[c] : etoh + nad <=> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <=> accoa + h + nadh	(b0356 또는 b1478 또는 b1241) (b1241 또는 b0351)
<b>AKGD</b>	[c] : agk + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 및 b0726 및 b0727 )
<b>ASNS2</b>	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
<b>ASPT</b>	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
<b>ATPS4r</b>	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <=> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 및 b3737 및 b3738) 및 (b3731 및 b3732 및 b3733 및 b3734 및 b3735 )) 또는 ((b3736 및 b3737 및 b3738) 및 (b3731 및 b3732 및 b3733 및 b3734 및 b3735) 및 b3739))
<b>CBMK2</b>	[c] : atp + co2 + nh4 <=> adp + cbp + (2) h	(b0521 또는 b0323 또는 b2874 )
<b>EDA</b>	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
<b>ENO</b>	[c] : 2pg <=> h2o + pep	b2779
<b>FBA</b>	[c] : fdp <=> dhap + g3p	(b2097 또는 b2925 또는 b1773 )
<b>FBP</b>	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 또는 b3925)
<b>FDH2</b>	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 및 b3893 및 b3894) 또는 (b1474 및 b1475 및 b1476))
<b>FRD2</b>	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 및 b4152 및 b4153 및 b4154)
<b>FTHFD</b>	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
<b>FUM</b>	[c] : fum + h2o <=> mal-L	(b1612 또는 b4122 또는 b1611 )
<b>G5SD</b>	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
<b>G6PDHy</b>	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph	b1852

[0139]

[0140]

<b>GLCpts</b>	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 및 b1101 및 b2415 및 b2416) 또는 (b1817 및 b1818 및 b1819 및 b2415 및 b2416) 또는 (b2417 및 b1621 및 b2415 및 b2416))
<b>GLU5K</b>	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
<b>GLUDy</b>	[c] : glu-L + h2o + nadp <=> akh + h + nadph + nh4	b1761
<b>GLYCL</b>	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 및 b2903 및 b2905 및 b0116)
<b>HEX1</b>	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
<b>ICL</b>	[c] : icit --> glx + succ	b4015
<b>LDH_D</b>	[c] : lac-D + nad <=> h + nadh + pyr	(b2133 또는 b1380)
<b>MALS</b>	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 또는 b2976)
<b>MDH</b>	[c] : mal-L + nad <=> h + nadh + oaa	b3236
<b>ME2</b>	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
<b>MTHFC</b>	[c] : h2o + methf <=> 10fthf + h	b0529
<b>NADH12</b>	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109
<b>NADH6</b>	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 및 b2277 및 b2278 및 b2279 및 b2280 및 b2281 및 b2282 및 b2283 및 b2284 및 b2285 및 b2286 및 b2287 및 b2288 )
<b>PFK</b>	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 또는 b1723)
<b>PFLi</b>	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 및 b0903 ) 및 b2579) 또는 (b0902 및 b0903) 또는 (b0902 및 b3114) 또는 (b3951 및 b3952))
<b>PGDH</b>	[c] : 6pge + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
<b>PGI</b>	[c] : g6p <=> f6p	b4025
<b>PGL</b>	[c] : 6pgl + h2o --> 6pge + h	b0767
<b>PGM</b>	[c] : 2pg <=> 3pg	(b3612 또는 b4395 또는 b0755 )
<b>PPC</b>	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
<b>PPCK</b>	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
<b>PRO1z</b>	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
<b>PYK</b>	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 또는 b1676)
<b>PYR12</b>	h[p] + pyr[p] <=> h[c] + pyr[c]	비-유전자 결합
<b>RPE</b>	[c] : ru5p-D <=> xu5p-D	(b4301 또는 b3386)
<b>SO4t2</b>	so4[e] <=> so4[p]	(b0241 또는 b0929 또는 b1377 또는 b2215)

[0141]

<b>SUCD4</b>	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 및 b0722 및 b0723 및 b0724)
<b>SUCOAS</b>	[c] : atp + coa + succ <=> adp + pi + succoa	(b0728 및 b0729)
<b>SULabc</b>	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 및 b2425 및 b2424 및 b2423) 또는 (b0763 및 b0764 및 b0765) 또는 (b2422 및 b2424 및 b2423 및 b3917))
<b>TAL</b>	[c] : g3p + s7p <=> e4p + f6p	(b2464 또는 b0008)
<b>THD2</b>	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 및 b1603)
<b>THD5</b>	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 또는 (b1602 및 b1603))
<b>TPI</b>	[c] : dhap <=> g3p	b3919

[0142]

[0143] 표 1a에서 대사물에 대한 약자를 하기 표 1b에 나타내었다.

[0144] [표 1b]

표 1a에 사용된 약자에 상응하는 대사물 명칭

대사물 약자	대사물 명칭
10fthf	10-포밀테트라하이드로폴레이트
1pyr5c	1-피롤린-5-카복실레이트
2ddg6p	2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 6-포스페이트
2dmmq8	2-데메틸메나퀴논 8
2dmmq18	2-데메틸메나퀴놀 8
2pg	D-글리세레이트 2-포스페이트
3pg	3-포스포-D-글리세레이트
6pgc	6-포스포-D-글루코네이트
6pgl	6-포스포-D-글루코노-1,5-락톤
ac	아세테이트
acald	아세트알데하이드
accoa	아세틸-CoA
actp	아세틸 포스페이트
adp	ADP
akg	2-옥소글루타레이트
amp	AMP
asn-L	L-아스파라긴
asp-L	L-아스파테이트
atp	ATP
cbp	카바모일 포스페이트
co2	CO2
coa	코엔자임 A
dhap	다이하이드록시아세톤 포스페이트
e4p	D-에리트로스 4-포스페이트

[0145]

etoh	에탄올
f6p	D-프럭토스 6-포스페이트
fad	산화된 플라빈 아데닌 다이뉴클레오티드
fadh2	환원된 플라빈 아데닌 다이뉴클레오티드
fdp	D-프럭토스 1,6-바이포스페이트
for	포메이트
fum	퓨마레이트
g3p	글리세르알데하이드 3-포스페이트
g6p	D-글루코스 6-포스페이트
glc-D	D-글루코스
glu5p	L-글루탐메이트 5-포스페이트
glu5sa	L-글루탐메이트 5-세미알데하이드
glu-L	L-글루탐메이트
glx	글리옥살레이트
gly	글리신
h	H+
h2o	H2O
icit	이소시트레이트
lac-D	D-락테이트
mal-L	L-말레이트
methf	5, 10-메틸렌테트라하이드로폴레이트
mlthf	5, 10-메틸렌테트라하이드로폴레이트
mq18	메나퀴놀 8
mqn8	메나퀴논 8
nad	니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드
nadh	환원 니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드
nadp	니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드 포스페이트
nadph	환원 니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드 포스페이트
nh4	암모늄
oaa	옥살로아세테이트
pep	포스포엔올피루베이트
pi	포스페이트
ppi	다이포스페이트
pro-L	L-프롤린
pvr	피루베이트
q8	유비퀴논-8
q8h2	유비퀴놀-8
ru5p-D	D-리블로스 5-포스페이트
s7p	세도헥툴로스 7-포스페이트
so4	설페이트
succ	숙시네이트
succoa	숙시닐-CoA
thf	5,6,7,8-테트라하이드로폴레이트
xu5p-D	D-자일룰로스 5-포스페이트

[0146]

[0147]

상기 유전자 파괴의 임의의 조합을 포함하는 임의의 비-천연 미생물은 하나 이상의 외인성 핵산의 유전자 삽입을 포함할 수 있다. 진술한 임의의 유전자 삽입 경로는 유전자 파괴와 통합될 수 있다. 예를 들면, 유전자 *adhE*, *ldhA*, *pf1AB*, *mdh* 및 *aspA*의 파괴를 포함하는 경로는 또한 4-하이드록시부타노에이트 테하이드로게나제, CoA-비의존성 숙신산 세미알데하이드 테하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, CoA-의존성 숙신산 세미알데하이드 테하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트:CoA 트랜스퍼라제, 글루탐메이트:숙신산 세미알데하이드 트랜스아미나제, 글루탐메이트 데카복실라제, CoA-비의존성 알데하이드 테하이드로게나제, CoA-의존성 알데하이드 테하이드로게나제 또는 알콜 테하이드로게나제의 삽입을 포함할 수 있다. 하기 표 2는 유전자 파괴 및 유전자 삽입의 조합을 혼입한 1,4-BDO의 생성을 위해 조작된 대표적인 유기체를 요약한 것이다. 유전자 삽입은 염색체 삽입 또는 플라스미드를 제공하는 형태일 수 있음을 유의해야 한다.

표 2

1,4-BDO 생성을 위한 파괴-삽입 조합 디자인

균주#	숙주 염색체	숙주 설명	플라스미드-계
1	$\Delta$ ldhA	<i>이. 콜라이</i> MG1655의 단일 결실 유도체	<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
2	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B	숙시네이트 생성 균주; <i>이. 콜라이</i> MG1655의 유도체	<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
3	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322	피루베이트 테하이드로게나제 플럭스를 증가시키기 위한 lpdA의 개선	<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
4	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322		<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> ptb, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
5	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA	산화성 TCA 사이클을 통해 플럭스를 유도하기 위한 mdh 및 arcA에서의 결실	<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
6	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA		<i>엠. 보비스</i> sucA, <i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
7	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA gltAR163L	혐기성 활성을 개선하기 위한 시트레이트 신타제에서의 돌연변이	<i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
8	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA gltAR163L		<i>엠. 보비스</i> sucA, <i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 아세토부틸리컴</i> adhE2
9	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA gltAR163L		<i>엠. 보비스</i> sucA, <i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd, <i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 베이저린키</i> Ald
10	$\Delta$ adhE $\Delta$ ldhA $\Delta$ pf1B $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322 $\Delta$ mdh $\Delta$ arcA gltAR163L:: <i>이. 콜라이</i> sucCD, <i>피. 진지발리스</i> sucD, <i>피. 진지발리스</i> 4hbd	ECKh-422에 통합된 상위 경로의 숙시네이트 가지	<i>피. 진지발리스</i> Cat2, <i>썸. 베이저린키</i> Ald

[0148]

11	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD::이. 콜라이 sucCD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd	ECKh-422에 통합된 숙시네이트 및 알파-케토글루타레 이트 상위 경로 가지	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
12	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD::이. 콜라이 sucCD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd		씨. 아세토부틸리컴 buk1, 씨. 아세토부틸리컴 ptb, 씨. 베이저린키 Ald
13	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L $\Delta$ ackA fimD::이. 콜라이 sucCD, 피. 진 지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베 리 4hbd	ECKh-432의 아세테 이트 키나제 결실	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
14	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L $\Delta$ ackA $\Delta ppc::H.i.ppc$ fimD::이. 콜라 이 sucCD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd	ECKh-432의 아세테 이트 키나제 결실 및 PPC/PEPCK 치환	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
15	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::fnr-$ pf1B6-K.p.IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR 163L fimD::이. 콜라이 sucCD, 피. 진 지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베 리 4hbd	ECKh-432에서 혐기 성 프로모터에 의한 IpdA 프로모터의 치환	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
16	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta pdhR::fnr-pf1B6 \Delta mdh \Delta$ arcA gltAR163L fimD::이. 콜라이 suc CD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발 리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd	ECKh-432에서 혐기 성 프로모터에 의한 pdhR 및 aceEF 프로 모터의 치환	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
17	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fim D::이. 콜라이 suc CD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd fimD:: 씨. 아세토부틸리컴 buk1, 씨. 아세토부틸리컴 ptb	ECKh-432내로 BK/PTB의 통합	씨. 베이저린키 Ald
18	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fim D::이. 콜라이 suc CD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd fimD:: 씨. 아세토부틸리컴 buk1, 씨. 아세토부틸리컴 ptb		씨. 베이저린키 Ald, 지. 티모글루코시다사우스 adh1

[0149]

19	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fim D::이. 콜라이 suc CD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd rrnC::cscAKB	ECKh-432에 삽입된 비-PTS 슈크로스 유전자	피. 진지발리스 Cat2, 씨. 베이저린키 Ald
20	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.$ IpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fim D::이. 콜라이 suc CD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd fimD:: 엡. 보비스 sucA, 씨. 클루이베리 4hbd rrnC::cscAKB		씨. 아세토부틸리컴 buk1, 씨. 아세토부틸리컴 ptb, 씨. 베이저린키 Ald

[0150]

\* 델타 기호( $\Delta$ )는 유전자 결실을 나타낸다.

[0151]

표 2에 요약된 균주는 다음과 같다: 균주 1: 외인성 *ldhA*의 결실; 이. 콜라이 sucCD, 피. 진지발리스 sucD, 피. 진지발리스 4hbd, 피. 진지발리스 Cat2, 씨. 아세토부틸리컴 AdhE2의 플라스미드 발현을 갖는 이. 콜라이

MG1655의 단일 결실 유도체. 균주 2: 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실; 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현을 갖는 이. 콜라이 MG1655의 유도체인 숙시네이트 생성 균주인 숙주 균주 AB3.

[0152] 균주 3: 숙주 균주 ECKh-138, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입; 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현; 균주는 피루베이트 데하이드로게나제 플럭스를 증가시키기 위한 *lpdA*의 개선을 제공한다. 균주 4: 숙주 균주 ECKh-138, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B* 및 *lpdA*의 결실, Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입; 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 씨. 아세트부틸리컴 *buk1*, 씨. 아세트부틸리컴 *ptb*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현.

[0153] 균주 5: 숙주 균주 ECKh-401, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실; 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현; 균주는 산화성 TCA 사이클을 통해 플럭스를 유도하기 위해 *mdh* 및 *arcA*의 결실을 갖는다. 균주 6: 숙주 균주 ECKh-401, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실; 엠. 보비스 *sucA*, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현.

[0154] 균주 7: 숙주 균주 ECKh-422, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환; 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현; 균주는 혐기성 활성을 개선하기 위해 시트레이트 신타제에 돌연변이를 갖는다. 균주 8: 숙주 균주 ECKh-422, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환; 엠. 보비스 *sucA*, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *AdhE2*의 플라스미드 발현. 균주 9: 숙주 균주 ECKh-422, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환; 엠. 보비스 *sucA*, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*, 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 베이저린키 *Ald*의 플라스미드 발현.

[0155] 균주 10: 숙주 균주 ECKh-426, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 베이저린키 *Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 *fimD* 유전자좌에서 균주 ECKh-422 내에 통합된 상위 경로의 숙시네이트 가치를 갖는다. 균주 11: 숙주 균주 ECKh-432, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, 엠. 보비스 *sucA*, 씨. 클루이베리 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 베이저린키 *Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 ECKh-422 내에 통합된 숙시네이트 및 알파-케토글루타레이트 상위 경로 가치를 갖는다. 균주 12: 숙주 균주 ECKh-432, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, 엠. 보비스 *sucA*, 씨. 클루이베리 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; 피. 진지발리스 *Cat2*, 씨. 아세트부틸리컴 *ptb*, 씨. 베이저린키 *Ald*의 플라스미드 발현.

[0156] 균주 13: 숙주 균주 ECKh-439, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, 외인성 *ackA*의 결실, 이. 콜라이 *sucCD*, 피. 진지발리스 *sucD*, 피. 진지발리스 *4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, 엠. 보비스 *sucA*, 씨. 클루이베리 *4hbd*의 *fimD*

유전자좌에서 염색체 삽입; *피. 진지발리스 Cat2*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432에 아세테이트 키나제 결실을 갖는다. 균주 14: 숙주 균주 ECKh-453, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, 외인성 *ackA*의 결실, 외인성 *ppc*의 결실 및 *ppc* 유전자좌에서 헤모필러스 인플루엔자 *ppck*의 삽입, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; *피. 진지발리스 Cat2*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432에서 아세테이트 키나제 결실 및 PPC/PEPCK 치환을 갖는다.

[0157] 균주 15: 숙주 균주 ECKh-456, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *fnr* 결합 부위, *pf1B*-p6 프로모터 및 *pf1B*의 RBS에 의한 *lpdA* 프로모터의 치환; *피. 진지발리스 Cat2*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432에서 혐기성 프로모터에 의한 *lpdA* 프로모터의 치환을 갖는다. 균주 16: 숙주 균주 ECKh-455, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *fnr* 결합 부위, *pf1B*-p6 프로모터 및 *pf1B*의 RBS에 의한 *pdhR* 및 *aceEF* 프로모터의 치환; *피. 진지발리스 Cat2*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432에서 혐기성 프로모터에 의한 *pdhR* 및 *aceEF* 프로모터의 치환을 갖는다.

[0158] 균주 17: 숙주 균주 ECKh-459, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *씨. 아세트부틸리컴 buk1*, *씨. 아세트부틸리컴 ptb*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432내에 BK/PTB의 통합을 갖는다. 균주 18: 숙주 균주 ECKh-459, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *씨. 아세트부틸리컴 buk1*, *씨. 아세트부틸리컴 ptb*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입; *씨. 베이저린키 Ald*, *지. 터모글루코시다시우스 adh1*의 플라스미드 발현.

[0159] 균주 19: 숙주 균주 ECKh-463, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, 비-PTS 슈크로스 오페론 유전자 슈크로스 퍼미야제(*cdcB*), D-프럭토키나제(*cscK*), 슈크로스 하이드롤라제(*cscA*) 및 LacI-관련 슈크로스-특이 억제제(*cdcR*)의 *rrnC* 유전자좌에서의 삽입; *피. 진지발리스 Cat2*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현; 균주는 균주 ECKh-432내에 삽입된 비-PTS 슈크로스 유전자를 갖는다. 균주 20: 숙주 균주 ECKh-463, 외인성 *adhE*, *ldhA*, *pf1B*의 결실, 외인성 *lpdA*의 결실 및 *lpdA* 유전자좌에서 Glu354Lys 돌연변이하에 클렙시엘라 뉴모니에 *lpdA*의 염색체 삽입, 외인성 *mdh* 및 *arcA*의 결실, *gltA* Arg163Leu 돌연변이체에 의한 *gltA*의 염색체 치환, *이. 콜라이 sucCD*, *피. 진지발리스 sucD*, *피. 진지발리스 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, *엠. 보비스 sucA*, *씨. 클루이베리 4hbd*의 *fimD* 유전자좌에서 염색체 삽입, 비-PTS 슈크로스 오페론의 *rrnC* 유전자좌에서의 삽입; *씨. 아세트부틸리컴 buk1*, *씨. 아세트부틸리컴 ptb*, *씨. 베이저린키 Ald*의 플라스미드 발현

[0160] 포스포트랜스퍼라제(PTS) 시스템에 의한 슈크로스의 사용을 위해 조작된 균주는 상당량의 피루베이트를 부산물로서 생성한다. 그러므로, 비-PTS 슈크로스 시스템의 사용을 이용하여 피루베이트 생성을 감소시킬 수 있는데, 그 이유는 슈크로스의 유입이 포스포엔올피루베이트(PEP)의 피루베이트로의 전환에 수반되지 않기 때문이다.

이것은 PEP 풀, 및 PPC 또는 PEPCK를 통한 옥살로아세테이트로의 플럭스를 증가시킬 것이다.

[0161] *rrnC* 영역내에 비-PTS 슈크로스 오페론의 삽입을 수행할 수 있다. *rrnC* 영역에 상동성인 영역에 인접한 비-PTS 슈크로스 유전자를 함유하는 PCR 생성물을 생성하기 위해, 2개의 올리고를 사용하여 매치1(Mach1, 등록상표)(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼즈배드)로부터의 *csc* 유전자를 PCR 증폭시켰다. 상기 균주는 슈크로스를 대사 분해시킬 수 있는 것으로 알려진 *이. 콜라이* 균주인 W 균주의 파생물이다[Orencio-Trejo et al., *Biotechnology Biofuels* 1:8 (2008)]. 서열은 *이. 콜라이* W 균주 K011(등록번호 AY314757)로부터 유도되었으며[Shukla et al., *Biotechnol. Lett.* 26:689-69 (2004)], 슈크로스 퍼미아제(*cscB*), D-프럭토키나제(*cscK*), 슈크로스 하이드롤라제(*cscA*) 및 LacI-관련 슈크로스-특이 억제제(*cscR*)를 암호화하는 유전자를 포함한다. *cscR*의 처음 53개 아미노산은 프라이머의 배치에 의해 효과적으로 제거되었다. 정제후에, PCR 생성물을, MG1655 pRedET(tet)로 형질전환되고 제조사의 지시에 따라 제조된 MG1655 일렉트로컴피트 세포내로 전기천공시킨다(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modificaition%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). PCR 생성물은 염색체의 *rrnC* 영역내에 게놈내에 통합되도록 설계된다. 이것은 *rrlC*(23S rRNA)의 상위의 191개 뉴클레오티드, *rrlC* rRNA 유전자 모두 및 *rrlC*의 하위의 3개 뉴클레오티드를 효과적으로 결실시키며, 슈크로스 오페론으로 치환시킨다. 전체 *rrnC::cscAKB* 영역은 P1 형질유도에 의해 BDO 숙주 균주 ECKh-432 내로 전이되어[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)] ECKh-463( $\Delta$ adhE  $\Delta$ ldhA  $\Delta$ pflB  $\Delta$ lpdA::K.p.lpdA322  $\Delta$ mdh  $\Delta$ arcA  $\Delta$ gltAR163L  $\Delta$ fimD:: *이. 콜라이* *sucCD*, *피. 진지발리스* *sucD*, *피. 진지발리스* *4hbd*  $\Delta$ fimD:: *엠펜. 보비스* *sucA*, *씨. 클루이베리* *4hbd* *rrnC::cscAKB*)을 제공한다. 재조합체를 슈크로스 상에서의 성장에 의해 선별하고 진단 PCR에 의해 확인하였다.

[0162] 화합물-생성 또는 1,4-BDO-생성 유기체를 배양하기 전에, 슈크로스 시럽 및 배지 성분과 같은 원료물질 공급원료를, 예를 들면, 생성 생물반응기에 첨가하기에 앞서 열 살균으로 처리하여 임의의 생물 오염물을 제거할 수 있다. 일부 태양에 따르면, 공급원료는, 예를 들면, BDO의 발효를 위해 슈크로스 또는 글루코스를 포함할 수 있다. 일부 태양에서, 공급원료는 합성가스를 포함할 수 있다. 미생물의 성장을 촉진하기 위해 사용되는 추가의 배지 성분으로는, 예를 들면, 염, 질소 공급원, 완충제, 미량 금속 및 pH 조절용 염기가 포함된다. g/L 발효액으로 나타내는, 대표적 배지 패키지의 주 성분을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

항목	농도
N-공급원	3 g/L
완충제	5 g/L
염	0.65 g/L
염기	1.4 g/L
	10.1 g/L

[0164] 탄소 공급원의 유형은 상당히 다양할 수 있으며, 글루코스, 프럭토스, 락토스, 슈크로스, 말토덱스트린, 전분, 이눌린, 글리세롤, 대두유와 같은 식물성유, 탄화수소, 메탄올 및 에탄올과 같은 알콜, 아세테이트와 같은 유기산, 합성가스, 및 CO, CO<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub>의 유사한 혼합물을 포함할 수 있다. 용어 "글루코스"는 글루코스 시럽, 즉, 글루코스 올리고머를 포함하는 글루코스 조성물을 포함한다. 식물 및 식물-유래 바이오매스 물질은 저비용 공급원료의 공급원일 수 있다. 상기 공급원료는, 예를 들면, 옥수수, 대두, 면, 아마씨, 홍화씨, 사탕수수 및 팜유를 포함할 수 있다. 바이오매스는 효소 또는 화학적 매개 가수분해에 적용되어 기질을 유리시키고, 상기 기질은 생체촉매반응에 의해 더 가공되어 해당 화학적 생성물을 생성할 수 있다. 상기 기질은 탄수화물의 혼합물 뿐만 아니라, 방향족 화합물 및 바이오매스의 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 리그닌 부분으로부터 총괄적으로 유도된 기타 생성물을 포함한다. 바이오매스로부터 생성된 탄수화물은, 예를 들면, 슈크로스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스 및 프럭토스를 포함한, 5 및 6탄당의 농후 혼합물이다.

[0165] 탄소 공급원은 배양물에 고체, 액체 또는 가스로서 첨가될 수 있다. 탄소 공급원은 과잉공급으로 인한 세포상의 스트레스를 방지하기 위해 제어된 방식으로 첨가될 수 있다. 이와 관련하여, 유가식 및 연속식 배양이 하기에 더 논의하는 바와 같이 유용한 배양 방식이다.

[0166] 질소 공급원의 유형은 상당히 다양할 수 있으며, 우레아, 수산화암모늄, 암모늄염, 예를 들면, 암모늄 설페이트, 암모늄 포스페이트, 암모늄 클로라이드 및 암모늄 니트레이트, 기타 니트레이트, 아미노산, 예를 들

면, 글루타메이트 및 라이신, 효모 추출물, 효모 자가분해물, 효모 질소 염기, 단백질 가수분해물(펩톤, 카제인 가수분해물, 예를 들어, 트립톤 및 카사미노산을 포함하나, 이로 한정되지 않는다), 대두박, 하이-소이(Hy-Soy), 트립틱 소이 브로스(tryptic soy broth), 면실박, 맥아 추출물, 옥수수 침지액 및 당밀을 포함할 수 있다.

- [0167] 배양물의 pH는 산 또는 알칼리의 첨가에 의해 조절될 수 있다. pH는 배양중에 저하될 수 있으므로, 알칼리를 필요에 따라 첨가할 수 있다. 적합한 알칼리의 예로는 NaOH 및 NH<sub>4</sub>OH가 포함된다.
- [0168] 1,4-BDO와 같은 해당 화합물의 생성에 사용되는 대표적인 세포 성장 절차로는 배치식 발효, 배치 분리하의 유가식 발효; 연속 분리하의 유가식 발효 및 연속 분리하의 연속식 발효가 포함된다. 이들 공정은 모두 당해 분야에 공지되어 있다. 유기체 디자인에 따라, 발효는 호기성 또는 혐기성 조건하에서 수행될 수 있다. 일부 태양에서, 배양물의 온도는 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 및 44 °C를 포함하여 약 30 내지 약 45 °C로 유지된다.
- [0169] 배치식 발효에서, 탱크 발효조(또는 생물반응기)는 성장을 촉진하도록 제조된 배지로 충전된다. 미생물 발효를 위한 온도 및 pH는 적절히 조정되며, 임의의 추가 보충물이 첨가된다. 1,4-BDO-생성 유기체의 집중물을 발효조에 첨가한다. 배치식 발효시, 발효는 일반적으로 고정된 시간동안 작업한 후 발효 생성물을 분리한다. 상기 공정은 배치 작업으로 반복될 수 있다.
- [0170] 유가식 발효에서는, 새로운 배지를 발효 생물반응기에 연속적으로 또는 주기적으로 첨가한다. 고정-부피 유가식 발효는 탄소 공급원이 배양물을 희석하지 않고 첨가되는 유가식 발효의 한 유형이다. 배양 부피는 또한 농축액 또는 가스로서 성장용 탄소 공급원을 공급함으로써 거의 일정하게 유지될 수 있다. 때때로 주기적 유가식 배양으로 불리는 또 다른 유형의 고정-부피 유가식 배양에서는, 배양물의 일부가 주기적으로 회수되어 또 다른 유가식 공정을 위한 출발점으로 사용된다. 일단 발효가 특정 단계에 도달하면, 배양물을 꺼내고 바이오매스를 멸균수 또는 탄소 공급 기질을 함유하는 배지로 원래 부피로 희석한다. 희석은 바이오매스 농도를 감소시키며 비성장물의 증가를 야기한다. 계속해서, 공급이 계속됨에 따라, 성장물은 바이오매스가 증가함에 따라 점차적으로 감소되며 용기에서 지속가능한 최대치에 다시 한번 접근하며, 이 시점에서 배양물을 다시 희석할 수 있다. 또는, 유가식 발효는 가변 부피 방식일 수 있다. 가변 부피 방식에서는, 발효액의 부피가, 영양소 및 배지가 발효액 일부의 제거없이 배양물에 연속적으로 첨가될 때 발효 시간에 따라 변화된다.
- [0171] 연속식 발효에서는, 일반적으로, 생성물이 분비될 때, 1,4-BDO와 같은 해당 생성물을 포함할 수 있는 소비된 배지를 연속적으로 분리하면서 새로운 배지를 연속적으로 첨가한다. 연속식 배양의 한 특징은 시간에 무관한 정상 상태가 달성될 수 있어서 미생물 양태와 환경 조건사이의 관계를 결정할 수 있게 한다는 것이다. 상기 정상 상태의 달성은 케모스타트 또는 유사한 생물반응기에 의해 이루어진다. 케모스타트는, 배양액이 연속적으로 제거되어 배양 부피를 일정하게 유지하면서 새로운 배지의 연속 첨가를 가능하게 한다. 배지가 케모스타트에 첨가되는 속도를 변화시킴으로써, 미생물의 성장률이 조절될 수 있다.
- [0172] 1,4-BDO와 같은 해당 화합물의 연속 및/또는 근-연속 생성은 화합물-생성 유기체를 지수기에서 성장을 지속시키고/시키거나 거의 지속시키기에 충분한 영양소 및 배지중에서 배양하는 것을 포함한다. 상기 조건하에서의 연속 배양은, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일 이상을 포함할 수 있다. 또한, 연속 배양은 1, 2, 3, 4 또는 5 주 이상 및 수개월 이하까지를 포함할 수 있다. 또는, 해당 화합물을 생성하는 유기체는 특정 용도에 적합한 경우, 수시간동안 배양될 수 있다. 연속 및/또는 근-연속 배양 조건은 또한 상기 예시적인 기간 사이의 모든 시간 간격을 포함할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 화합물-생성 미생물 유기체를 배양하는 시간은 원하는 목적에 충분한 양의 생성물을 생성하기에 충분한 기간동안인 것으로 이해된다.
- [0173] 일부 태양에서, 배양은 호기성 조건하에서 수행될 수 있다. 배양물에 산소 공급은 조절될 수 있다. 산소는 공기, 농축 산소, 순수 산소 또는 이들의 임의의 조합으로 공급될 수 있다. 산소 농도를 모니터링하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 산소는 특정한 공급속도로 전달될 수 있거나 배양물의 용존 산소 함량을 측정하고 일정한 용존 산소 함량을 유지할 의도에 따라 공급함으로써 필요한 대로 전달될 수 있다. 다른 태양에서, 배양은 실질적으로 혐기성 조건하에서 수행될 수 있다. 실질적으로 혐기성이란 산소량이 액체 배지중 용존 산소에 대한 포화도의 약 10% 미만인 것을 의미한다. 혐기성 조건은 약 1% 미만의 산소 대기하에 유지되는 액체 또는 고체 배지의 밀폐 챔버를 포함한다.
- [0174] 발효는 혐기성 조건하에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 배지를 질소로 먼저 스프라잉한 후 배양 용기를 밀봉(예를 들면, 플라스크는 격막 및 크립프-캡으로 밀봉될 수 있다)함으로써, 배양물은 실질적으로 산소를 함유하지

않게 될 수 있다. 상업적 규모에서는, 호기성 경우에서와 같지만 훨씬 낮은 속도 및 엄격하게 조절되는 교반하에 공기 또는 산소로 발효조를 스파징함으로써 미세호기성 조건이 달성된다.

[0175] 일부 태양에서, 1,4-BDO를 포함한 해당 화합물은 유전자 변형된 *이. 콜라이*를 사용하여 혐기성 배치 발효에서 생성될 수 있다. 발효시, 공급원료 기질의 일부는 세포 성장에 사용되고, 추가의 기질은 다른 발효 부산물로 전환된다. 염, 완충제, 질소 등과 같은 배지 성분들은 세포 성장을 촉진하기 위해 과량으로 발효에 첨가될 수 있다. 따라서, 발효액은 물, 해당 화합물, 부산물, 잔류 배지, 잔류 기질 및 공급원료/배지 불순물의 복합 혼합물이다. 상기 발효액으로부터 해당 화합물이 분리되고 정제된다. 예시적 발효액 조성은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0176]	양	성분
	약 100 g/L	1,4-BDO
	약 5 g/L	세포 덩어리
	약 10 g/L	부산물(에탄올, 아세트산, 4-하이드록시부티르산, GBL, 단백질)
	<10 g/L	잔류 배지/염
	<1 g/L	잔류 슈크로스/글루코스
	<2 g/L	"미발효물"(공급원료/불순물)

[0177] \* 나머지 물

[0178] 약 5 내지 15 중량%의 1,4-BDO의 생성물 농도가 발효 기본 생합성 생성 공정을 통해 달성될 수 있다.

[0179] 본 발명의 다양한 태양의 활동에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형은 또한 본원에 제공된 본 발명의 정의내에 포함되는 것으로 이해된다. 따라서, 하기의 실시예는 본 발명을 제한하지 않고 예시하기 위한 것이다.

[0180] 실시예 I

[0181] 발효액의 원심분리

[0182] 본 실시예는 발효액으로부터 세포 덩어리 및 기타 고체를 제거하기 위한 디스크-적층 원심분리기의 사용을 나타낸다.

[0183] 유전자 변형된 *이. 콜라이*에 의해 생성된 1,4-부탄다이올 발효액을 원심분리에 의해 정제하였다. GEA-웨스트팔리아(GEA-Westfalia) 디스크 적층식 원심분리기를 상기 단계에 사용하였다. 실험실 규모의 원심분리기인 모델 CTC 1 휘스페퓨즈(Whispefuse)는 1.0 L의 보울 용량 및 0.55 L의 고체 유지 공간을 갖는다. 보울 후드, 분배기, 디스크 적층체 및 모든 공정 습식 부품들은 높은 인장강도의 스테인리스 스틸로 구성된다. 원심분리 유닛으로의 공급은 약 0.25 L/분으로 일정하게 유지되는 유량하에 연동 펌프를 사용하여 조절되었다. 유출 농축물 흐름상에 조절 밸브를 봉쇄함으로써 시스템내에 약 15 psi의 배압을 유지시켰다. 원심분리기는 12,000 rpm에서 작동하였으며 공급물은 주위 실온으로 유지되었다. 원심분리는 발효액으로부터 세포 바이오매스 및 불용성 물질을 제거하였다. 세포 바이오매스 및 불용성 물질의 농도는 600 nm에서의 흡광도(OD)로 측정할 때 혼탁도에 의해 나타내었다. 공급 발효액 및 정화된 농축액에 대한 혼탁도 데이터는 표 5에 나타내었다. 공급물은 눈에 띄게 혼탁하였으며 13.3의 측정된 OD값을 나타내었다. 정화된 농축액은 시각적으로 훨씬 더 맑았으며, 0.18의 측정된 OD 값을 나타내었다. 전체적으로 혼탁도는 약 99% 감소하여, 디스크 적층 원심분리에 의한 탁월한 정화를 나타내었다.

표 5

[0184] 600 nm에서의 흡광도(OD)에 의해 측정된 혼탁도

	600 nm에서의 OD
공급물, 발효액	13.3
정화된 농축액	0.18

[0185] 실시예 II

[0186] **발효액의 한외여과**

[0187] 본 실시예는 실시예 I에서 수행된 원심분리에 의해 세포 덩어리 및 기타 고체의 제거후 발효액의 한외여과를 나타낸다.

[0188] GEA 실험실 규모 여과 유닛, 모델 L을 사용하여 실시예 I에서 생성된 생성물을 더 정화시켰다. 모델 L 여과 유닛에 하이드라노틱스 5K PES 평판막을 장착하였다. 전체 설치된 막 영역은 0.144 m<sup>2</sup>이었다. 막관통 압력은 유입 흐름 및 배압 조절 밸브를 조정함으로써 약 36 psi에서 유지시켰다. 공급물의 온도는 유입 열교환기를 사용하여 약 27 °C에서 유지시켰다. 투과액 유량은 플럭스를 측정하기 위해 실험 과정 전체에 걸쳐 측정하였다. 표 6은 부피측정 농도 인자(VCF)의 함수로서 투과액 플럭스(L/m<sup>2</sup>/h)를 나타낸 것이다.

**표 6**

한외여과 플럭스 대 VCF

VCF	플럭스
	L/m <sup>2</sup> /h
1.18	15.02
1.44	15.37
1.86	15.29
2.60	15.34
4.33	15.06
6.50	14.79

[0189]

[0190] 샘플은 또한 투과액의 질을 측정하기 위해 실험 전체에 걸쳐 취하였다. 공급물 및 투과액 중 단백질 농도는 브래드포드(Bradford) 분석을 이용하여 측정하였다. 표 7은 공급물, 투과액 및 잔류물 중의 단백질 농도를 나타낸 것이다. 단백질 농도는 공급물에 비해 투과액에서 약 68% 감소되었다.

**표 7**

브래드포드 분석을 이용하여 측정된 단백질 농도

	단백질 농도 (mg/L)
공급물, 원심분리된 발효액	84.09
UF 투과액	27.11
UF 잔류물	248.90

[0191]

[0192] **실시예 III**

[0193] **발효액의 나노여과**

[0194] 본 실시예는 실시예 II에서 수행된 한외여과후 발효액의 나노여과를 나타낸다.

[0195] GEA 실험실 규모 여과 유닛, 모델 L에 GE DK 나노여과 평판막을 장착하였다. 전체 설치된 막 영역은 0.072 m<sup>2</sup>이었다. 상기 장치를 사용하여 실시예 II에서 수득된 UF 투과액을 여과시켰다. 막관통 압력은 유입 흐름 및 배압 조절 밸브를 조정함으로써 약 270 psi에서 유지시켰다. 공급물의 온도는 유입 열교환기를 사용하여 약 38 °C에서 유지시켰다. 투과액 유량은 플럭스를 측정하기 위해 실험 과정 전체에 걸쳐 측정하였다. 표 8은 부피측정 농도 인자(VCF)의 함수로서 플럭스(L/m<sup>2</sup>/h)를 나타낸 것이다.

**표 8**

나노여과 플럭스

VCF	플럭스
	L/m <sup>2</sup> /h
1.33	14.69
1.74	13.41
2.50	10.42

[0196]

[0197]

샘플을 또한 투과액 질을 측정하기 위해 실험 전체에 걸쳐 취하였다. 유기산은 LC-MS를 사용하여 측정하였고, 염 이온은 크로마토그래피(IC)를 사용하여 분석하였으며, 글루코스는 아날록스(Analox) G6 분석기를 사용하여 측정하였다. 표 9는 글루코스, 이온 및 유기 산에 대한 폐기%를 나타낸 것이다. 공급물의 pH에서 유기산은 그의 염 형태로 존재하는 것으로 예상된다. 나노여과 투과액은 또한 공급물에서 뚜렷한 황색으로부터 투과 생성물에서 매우 연한 황색으로 색에 가시적 감소를 나타내었다.

**표 9**

나노여과에 의한 글루코스, 이온 및 유기산의 폐기%

글루코스	1가 양이온	2가 양이온	음이온	유기산
88.57%	72.80%	100.00%	82.45%	64.39%

[0198]

[0199]

**실시예 IV**

[0200]

**발효액의 이온 교환**

[0201]

본 실시예는 실시예 III에서 수행된 나노여과후 발효액의 이온 교환 크로마토그래피 정제를 나타낸다.

[0202]

실시예 III에서 수득된 나노여과 투과액을 이온교환 단계를 통해 처리하여 남은 이온을 제거하고 생성물을 더 정화시켰다. 강산 양이온 교환 수지인 앰버라이트(Amberlite) IR 120H 및 약염기 음이온 교환 수지인 앰버라이트 IRA 67을 이 단계에 사용하였다. 2 ft 높이 x 1 in 직경의 개개 양이온 및 음이온 교환 컬럼에 5.3 x 10<sup>3</sup> ft<sup>3</sup>의 양이온 및 음이온을 각각 부하시켰다. 나노여과 투과액을 10 ml/분 및 40 °C에서 먼저 양이온 교환 컬럼에 공급한 후 음이온 교환 컬럼에 공급하였다. 이온 교환은 IC에 의해 이온 함량에 대해 분석하였다. 잔류 이온 전부를 0.1 mEq/L 미만의 농도로 제거하였다. 잔류 유기산 전부를 또한 이 단계에서 제거하였다. 생성물은 뚜렷한 황색을 갖지 않고 매우 투명하였다.

[0203]

**실시예 V**

[0204]

**합성 공급물의 증발 결정화**

[0205]

본 실시예는 회전 증발기를 사용하여 실험실 규모로 증발 결정화에 의해 합성 공급물로부터 염의 제거를 나타낸다.

[0206]

증발은 50 °C의 배치 온도 및 약 100 mmHg의 진공에서 부치 로타vap(Buchi Rotavap) R-205를 이용하여 수행하였다. 합성 공급 물질은 약 92 mEq/L의 1가 양이온, 5 mEq/L의 2가 양이온 및 125 mEq/L의 음이온을 함유하는 물중에 약 8% BDO를 사용하여 제조하였다. 염 이온을 동시에 용액으로부터 침전시키면서 물을 상기 혼합물로부터 증발시켰다. 용액중 이온 농도는 이온 교환 크로마토그래피에 의한 분석을 위해 소량의 샘플을 취하여 증발 전체에 걸쳐 모니터링하였다. 분석전에, 침전된 고체를 여과시켰다. 표 10은 BDO가 약 10%에서 95%로 농축되었을 때 용액중 이온 농도(공급물 샘플중 100%로 표준화된)를 나타낸 것이다. 이온 농도는 용액중에서(약 30% BDO에서) 포화점 이하까지 증가되었다. 상기 포화점 이후에 추가의 증발로 염을 결정화(침전)시켰다. 전체적으로, 상기 증발 결정화 단계는 염 이온의 97.5%가 BDO 용액으로부터 침전되게 하였다.

표 10

시간(h)	BDO(중량%)	1가 양이온(%)	2가 양이온(%)	음이온(%)
0	10.00	100.00	100.00	100.00
0.25	15.74	159.75	132.32	161.25
0.5	33.79	344.61	159.73	353.02
0.75	81.32	35.49	0.00	47.24
1.5	94.25	22.43	0.00	20.17

[0207] 실시예 VI

[0208] 염 용해도

[0209] 본 실시예는 1,4-BDO를 포함하여 다양한 소 탄소쇄 다이올 중에서 염 용해도의 프로필을 나타낸다.

[0210] 다양한 양의 1,4-부탄다이올(BDO), 1,3-프로판다이올(PDO) 또는 1,2-에탄다이올(모노 에틸렌 글라이콜, MEG)을 함유하는 상이한 용액에서의 염 용해도를 측정하였다. 용액이 포화될 때까지 10 ml의 용액에 염을 가하였다. 포화된 염 용해도는 이온 크로마토그래피를 사용하여 측정하였다. 표 11은 실온(약 20 °C)에서 4개의 상이한 염의 염 용해도를 나타낸 것이다. 염 용해도는 BDO 농도의 증가에 따라 상당히 감소하여 증발 결정화를 사용한 염 제거의 실행가능성을 입증하였다. 표 12는 실온에서 상이한 농도의 1,4-BDO, PDO 또는 MEG 용액 중에서 3개의 상이한 염의 염 용해도를 나타낸 것이다. 결과는 MEG로부터 PDO로, 1,4-BDO로 가면서 염 용해도의 감소를 나타내어, 3개 화합물중에서 증발 결정화에 1,4-BDO가 가장 적합함을 입증하였다.

표 11

0 내지 100%의 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)을 함유하는 용액중에서 4개의 상이한 염의 용해도

용액 (1,4-BDO %)	약 20 °C에서 평균 측정 용해도(중량%)			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaCl	MgSO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0(물)	20.101	32.300	34.354	57.375
33	3.296	10.803	7.346	11.639
80	0.056	2.529	0.035	0.173
90	0.011	0.314	0.015	0.022
95	0.005	0.314	0.028	0.008
98	0.031	0.175	0.011	0.005
100	0.003	0.050	0.009	0.004

표 12

50, 80 또는 100%의 1,4-부탄다이올(BDO), 1,3-프로판다이올(PDO) 또는 1,2-에탄다이올(MEG)중에서 3개의 상이한 염의 용해도

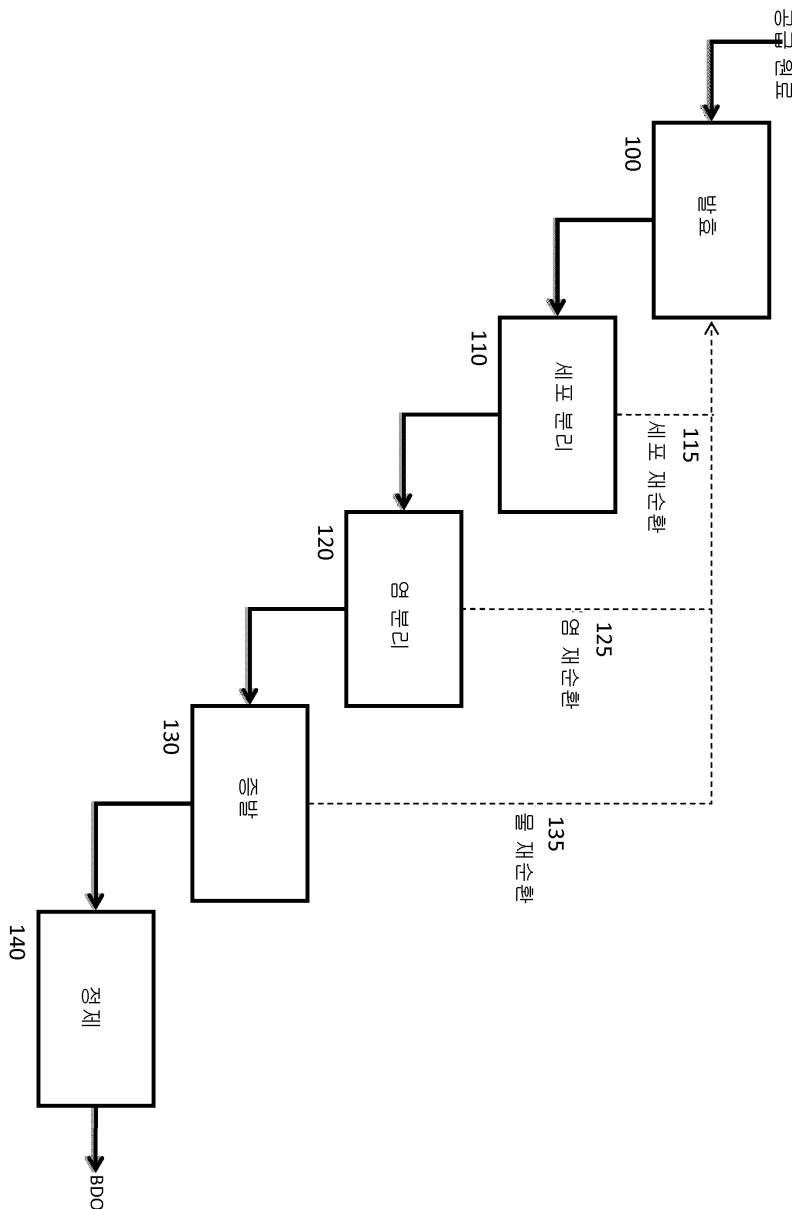
용매	용액 (용매%)	약 20 °C에서 평균 측정 용해도(중량%)		
		KCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
BDO	50	8.21	0.63	2.97
	80	0.94	0.04	0.16
	100	0.05	0.00	0.01
PDO	50	8.70	2.38	3.62
	80	1.45	0.10	0.46
	100	0.30	0.01	0.09
MEG	50	14.11	9.42	8.06
	80	7.72	1.81	2.90
	100	4.76	0.69	1.22

[0214] 본 출원 전체에 걸쳐 다양한 출판물이 괄호안에 참조되었다. 이들 출판물의 개시내용은 그 전체로, 본 발명이 관련된 당해 분야의 상황을 더 자세히 설명하기 위해 본원에 참고로 인용된다.

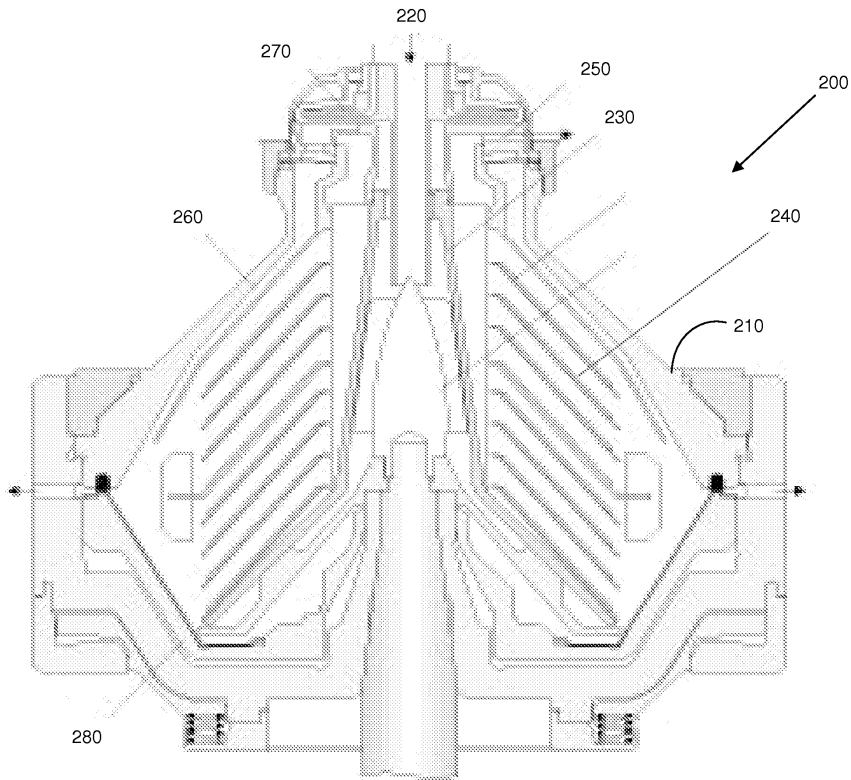
[0215] 본 발명은 개시된 태양들과 관련하여 기술되었지만, 당해 분야에 숙련된 자라면 상기에 상술된 특정 예 및 연구가 단지 본 발명을 예시하는 것일 뿐임을 용이하게 인지할 것이다. 본 발명의 진의로부터 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 주지해야 한다. 따라서, 본 발명은 하기의 특허청구범위에 의해서만 제한된다.

도면

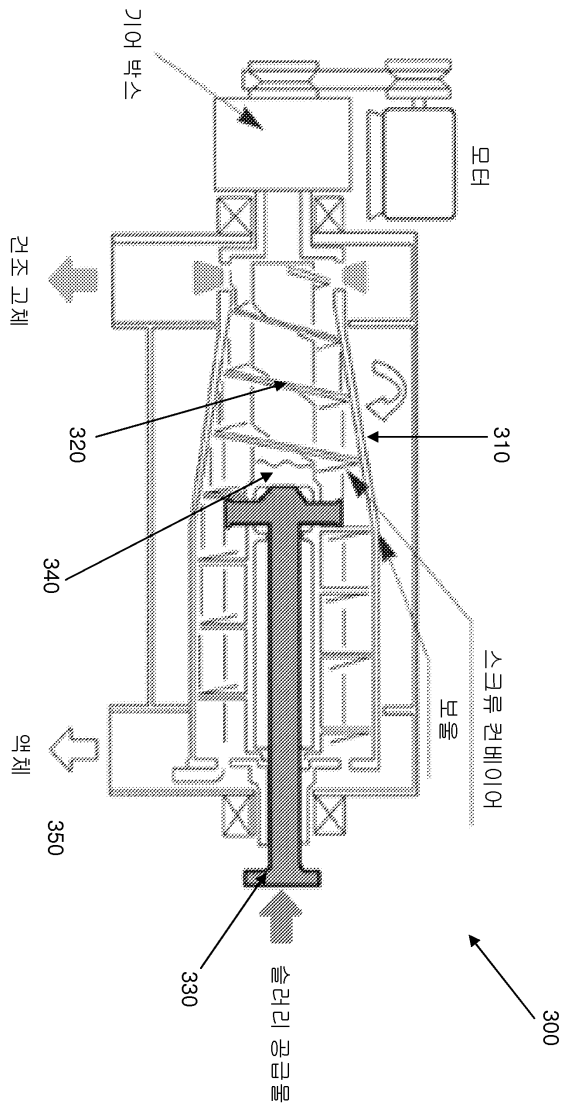
도면1



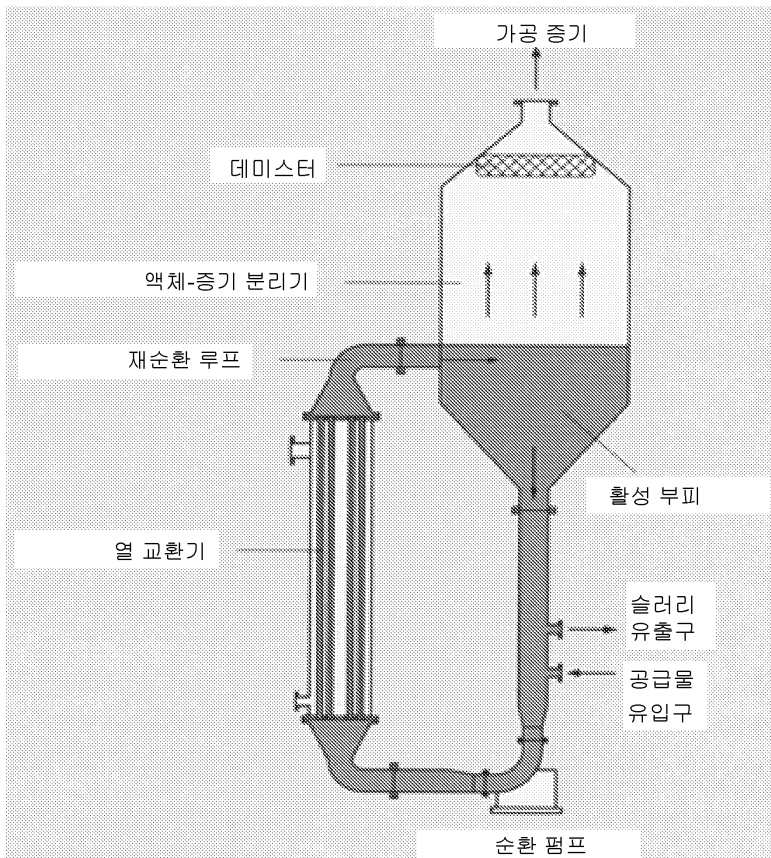
도면2



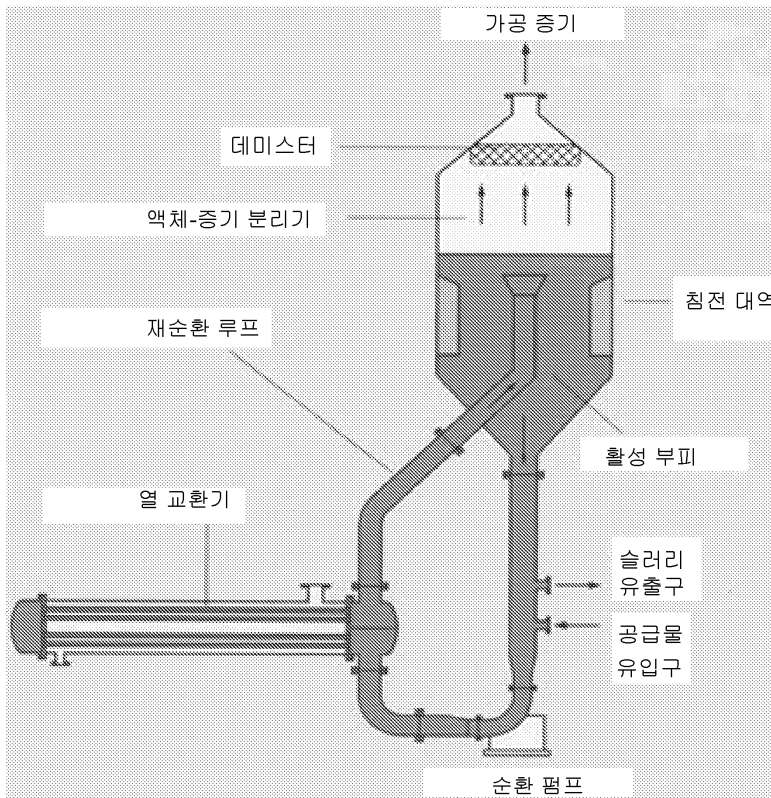
도면3



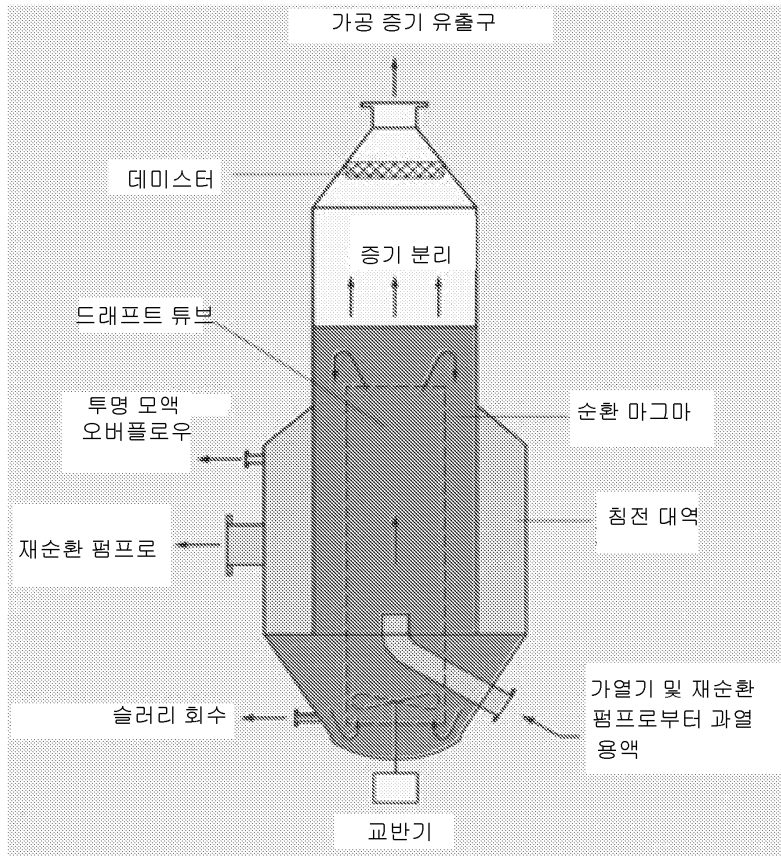
도면4



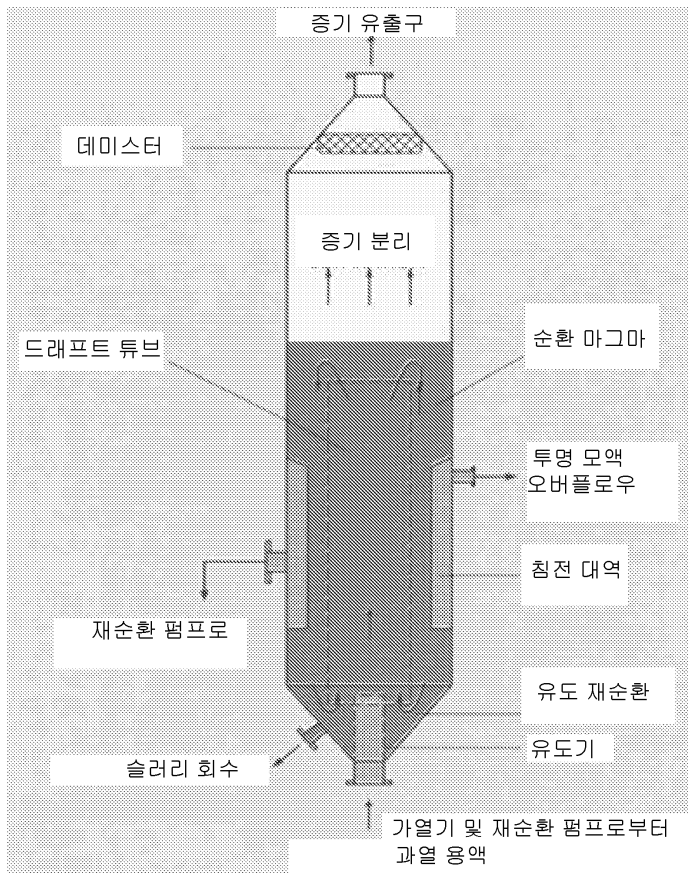
도면5



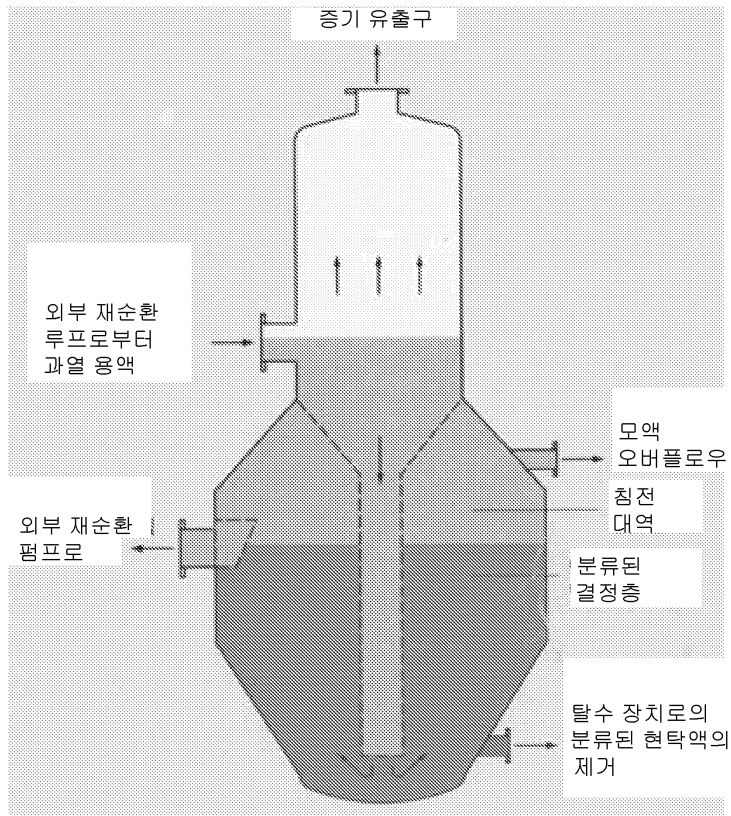
도면6



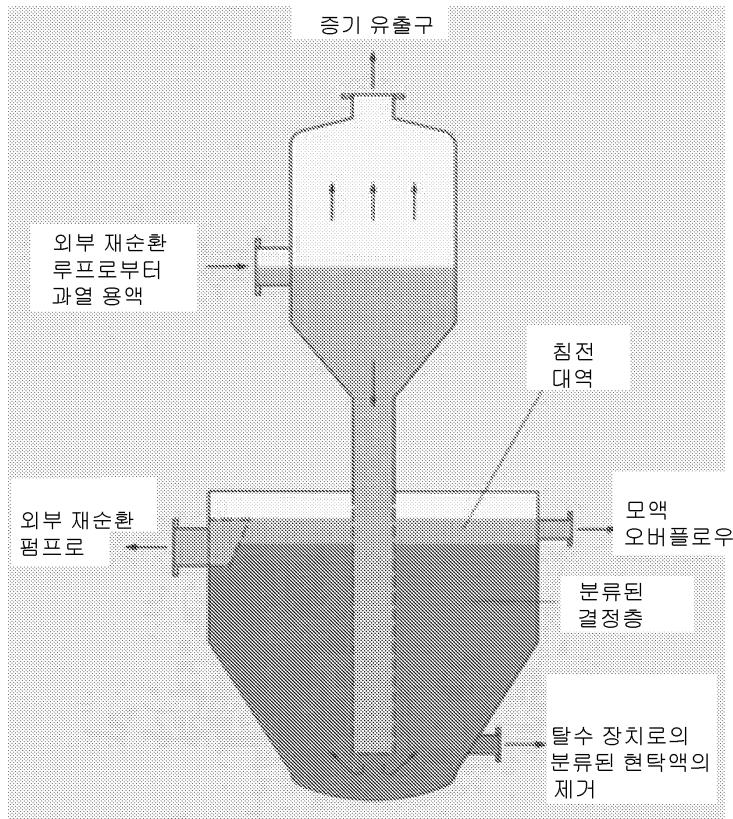
도면7



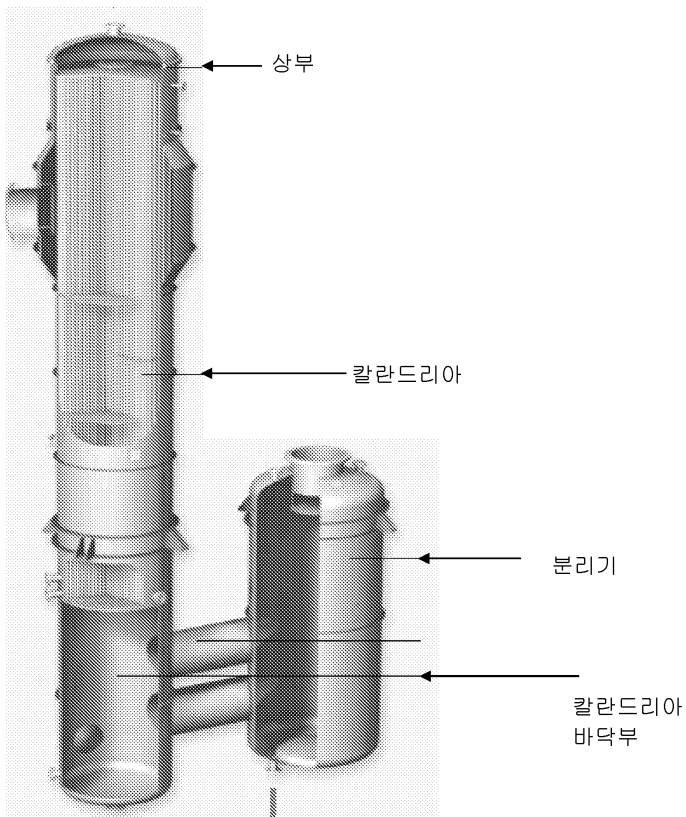
도면8



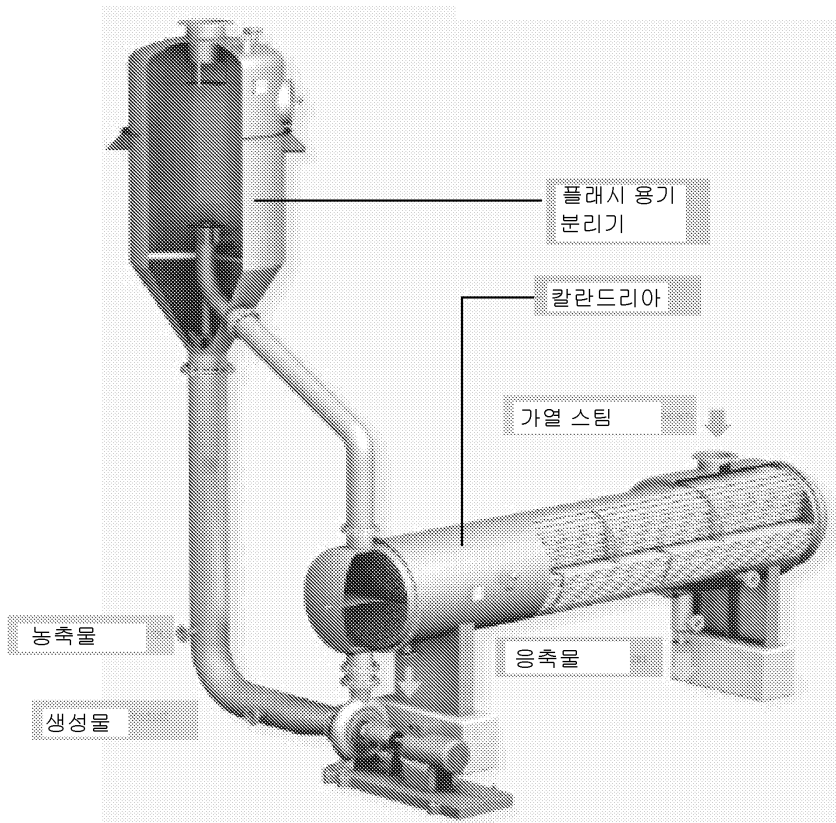
도면9



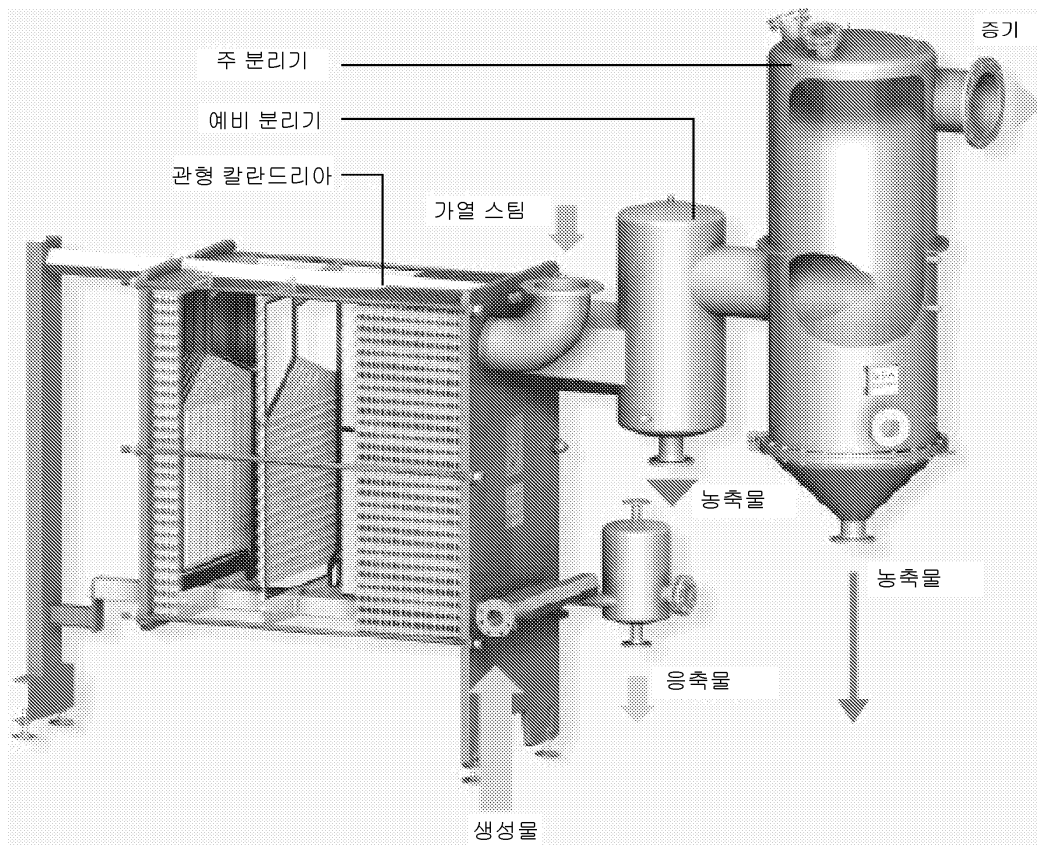
도면10



도면11

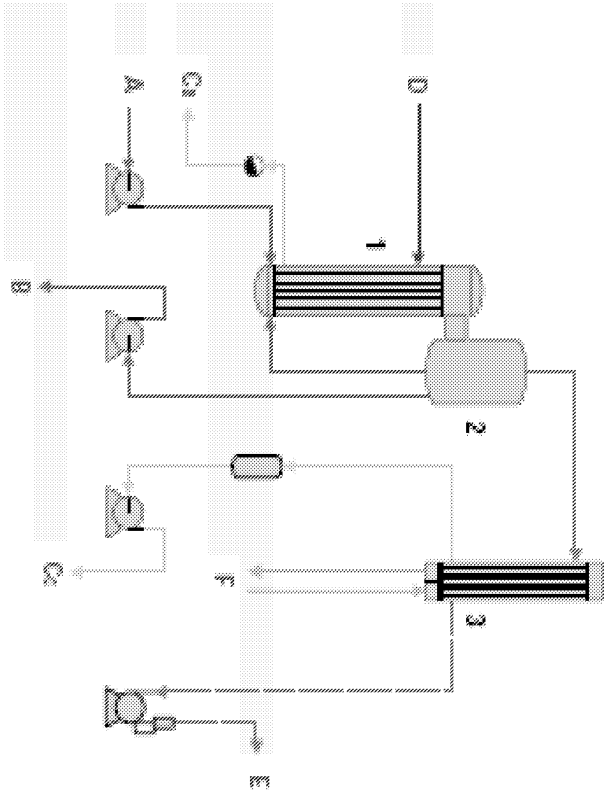


도면12

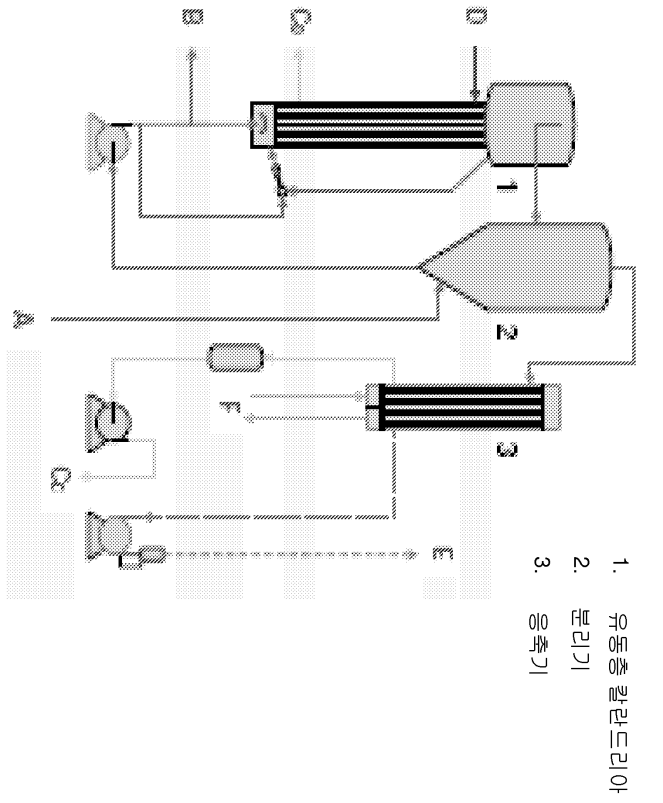


도면13

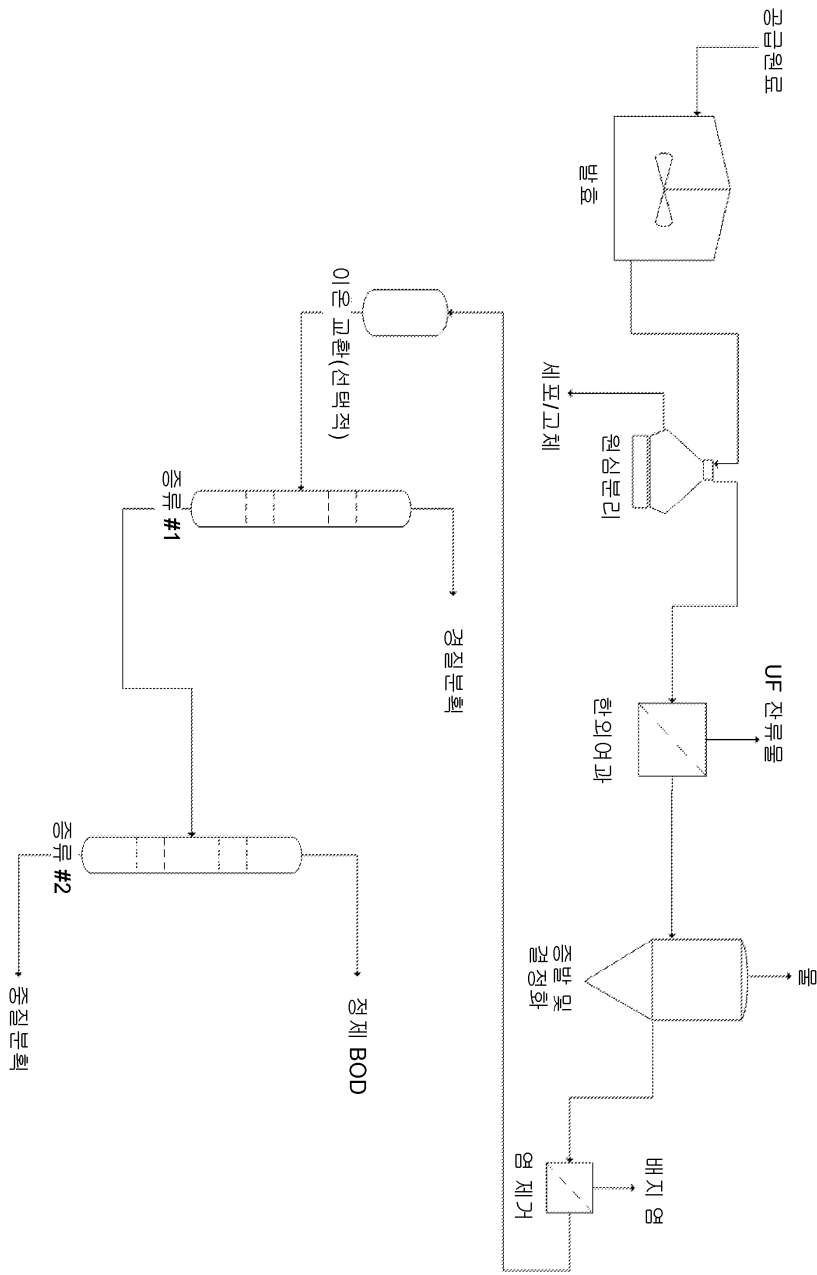
1. 칼란드리아
2. 롤러기
3. 응축기



도면14



도면15



도면16

