



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월28일
(11) 등록번호 10-1466223
(24) 등록일자 2014년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0053684
(22) 출원일자 2012년05월21일
심사청구일자 2012년05월21일
(65) 공개번호 10-2013-0129654
(43) 공개일자 2013년11월29일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession Number AF157307
(2005.03.09.)
Guang-Shan Li. The Virginia Polytechnic
Institute and State University 박사학위논문
(1998.)

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
이승환
대전 유성구 유성대로821번길 4-11, 202호 (장대
동, 이현빌라)
박시재
대전 유성구 어은로 57, 127동 307호 (어은동, 한
빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

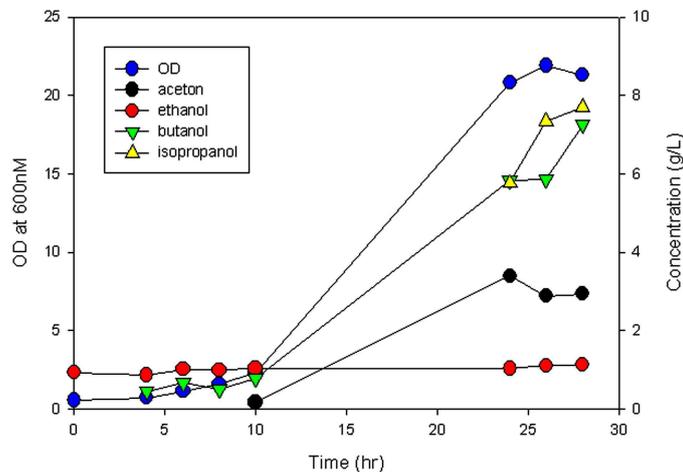
심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 이소프로판올 생성 변이 균주 및 이를 이용한 이소프로판올 생산방법

(57) 요약

본 발명은 이소프로판올 생성 변이 균주 및 이를 이용한 이소프로판올 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)가 도입된 재조합 미생물은 이소프로판올 및 부탄올을 고농도로 생산하는 반면, 부산물인 아세트산은 거의 생산하지 않으므로, 바이오연료의 상업화 기술에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

오영훈

경기 광주시 오포읍 신현로 65-24, 206동 802호 (현대모닝사이드1차아파트)

제갈종건

대전 유성구 엑스포로 448, 106동 1601호 (전민동, 엑스포아파트)

송봉근

대전 유성구 가정로 43, 103동 1203호 (신성동, 삼성한울아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SI-1209

부처명 기획예산처

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 정부출연 일반사업

연구과제명 산업바이오 화학기술 기반구축 사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 서열번호: 9로 기재되는 염기서열을 갖는 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 pKBE411SADH 벡터를 제조하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 벡터를 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 8052(*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052)에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 아세톤(acetone) 생산을 억제하고, 부탄올(butanol) 및 이소프로판올(isopropanol)을 고농도로 생산하는 미생물의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항의 제조방법으로 제조된 아세톤 생산을 억제하고, 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산하는 미생물.

청구항 6

삭제

청구항 7

- 1) 서열번호 9로 기재되는 염기서열을 갖는 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 pKBE411SADH 벡터를 제조하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 벡터를 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 8052에 형질전환시켜 아세톤 생산을 억제하고, 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산하는 재조합 균주를 제조하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 재조합 균주를 배양한 후, 배양액으로부터 부탄올 및 이소프로판올을 수득하는 단계를 포함하는 부탄올 및 이소프로판올 대량 생산방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 이소프로판올(isopropanol) 생산 제조합 미생물 및 이를 이용한 이소프로판올 생산방법에 관한 것으로, 구체적으로 부탄올(butanol)을 생산하는 균주로부터 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 균주를 제조한 다음, 상기 균주를 이용하여 이소프로판올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 전 세계적인 국제원유 가격 상승에 의해 수송용 연료인 휘발유를 대체할 수 있는 대체에너지원의 개발이 가속되고 있다. 이에 미국 및 브라질을 중심으로, 전분당 또는 원당을 이용한 바이오에탄올 생산이 2007년 말 기준 100조 갤런을 넘어서며, 점차 그 시장이 확대되고 있다. 또한, 유럽 및 동남아시아를 중심으로, 기존의 원유 유래 경유를 대체하기 위한, 식물성 오일을 원료로 하는 바이오디젤도 급속히 성장하고 있다.

[0003] 바이오에탄올과 더불어 최근 다양한 대체에너지원에 대한 관심이 증가하고 있는데, 그중 가장 대표적인 것이 부탄올이다. 부탄올은 연료로서 에탄올보다 많은 장점을 가진다. 먼저, 에너지 함량이 에탄올보다 월등히 높아 거의 휘발유 수준에 근접하고, 증기압이 낮아 휘발성이 적으며, 흡습성이 낮고, 부식성이 덜해서 기존의 가솔린 수송 인프라인 파이프라인을 이용한 전송이 가능하다. 이러한 연료로서의 부탄올의 장점은, 현재까지 기술 면에서 에탄올에 비해 열세에 있지만 차세대 대체에너지로서 많은 관심을 불러일으키고 있다. 부탄올은 에탄올과 더불어 가장 오래된 미생물 발효 산물의 하나로, 1861년 파스티르에 의해 대사특성이 알려진 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 미생물에 의해 아세톤, 부탄올 및 에탄올이 동시에 생성되므로 ABE 발효라고 일컬어져 왔다. 부탄올 발효의 경우 1950년대까지는 석유화학대비 경제성을 확보하고 있었으나 이후 석유화학의 급속한 발전으로 더 이상 경쟁력을 상실하게 되었다. 하지만, 1990년대부터 미래의 대체에너지원으로서 관심이 재조명되면서 많은 연구개발이 진행되고 있다.

[0004] 이소프로판올은 부탄올에 비하여 상대적으로 높은 옥탄가를 가진다. 따라서, 에탄올 및 이소프로판올 및 부탄올로 구성된 그룹에서 2가지 이상 포함한 혼합 알코올은 순수 부탄올에 비하여 상대적으로 더 높은 옥탄가의 장점을 가지고, 에탄올에 비하여는 상대적으로 더 높은 에너지 밀도의 장점을 가진다. 또한, 이들 혼합 알코올을 동시에 적정 비율로 생산하게 될 경우, 각각을 별도로 생산한 후, 다시 섞는 공정보다 비용적 측면에서 더욱 유리하다.

[0005] 현재 시판되는 이소프로판올 역시 대부분 석유로부터 얻은 프로필렌(propylene)으로부터 직접 수화 또는 황산을 이용한 산화반응을 통해 생산된다.

[0006] 상술한 바와 같이 지금까지 생산되는 부탄올 및 이소프로판올의 경우 화학합성법에 의해 대부분 생산되고 있으며, 유가 상승과 환경 문제 야기 등으로 세계 각국에서는 이들 바이오 알코올 연구에 대한 관심이 급속하게 증가되고 있는 상황이나, 아직까지 바이오 부탄올 및 이소프로판올만을 효율적으로 동시에 생산한 예는 없었다.

[0007] 발효를 통한 부탄올, 에탄올 및 이소프로판올의 생산은 클로스트리디움 베이저링키(*Clostridium beijerinckii*) NRRL B592, *C. beijerinckii* NRRL B593, *C. beijerinckii* IAM 19015, *C. beijerinckii* ATCC 14823, *C. beijerinckii* NCIMB 9581 등 일부 클로스트리디움 균주에서 가능하다(Shaheen et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2: 115, 2000). 하지만, 상기의 균주들이 생산하는 부탄올, 에탄올 및 이소프로판올을 포함한 전체 유기용제 생산 농도는 11.3 g/l(*C. beijerinckii* NRRL B592), 11.5 g/l(*C. beijerinckii* NRRL B593), 12.0 g/l(*C. beijerinckii* IAM 19015), 4.4 g/l (*C. beijerinckii* ATCC 14823), 3.3 g/l(*C. beijerinckii* NCIMB 9581)로 매우 낮아 산업적 이용이 불가능하다.

[0008] 한편, 부탄올, 아세톤 및 에탄올을 생산하는 클로스트리디움 속의 미생물은 아세톤을 필수적으로 생산하여, 알코올 생산에 있어서 분리정제비용을 상승하게 하는 원인이 된다. 따라서, 아세톤 생산을 감소시키기 위한 다양한

연구가 진행되어 왔다. Tummala 등은 *C. acetobutylicum* ATCC 824 균주의 coenzyme A transferase의 발현을 감소시켜 아세톤의 생산을 감소시키고자 했으나, 약 20%의 아세톤의 감소에 그쳤고(2003, J Bacteriol 185:1923-1934), Jiang 등은 *adc*(acetoacetate decarboxylase)를 제거하여 90% 아세톤을 감소할 수 있었다. 그러나 부탄올 생산량이 50%로 줄어들었고, 아세트산(acetic acid)가 7배 늘어나는 부작용이 있었다(2009, Metab. Eng. 11:291-294). 최근 Han 등의 연구에서 *C. beijerinckii* NCIMB 8052의 경우 *adc*의 활성을 100% 억제시켜도 아세톤이 생성된다는 보고가 있었다(2011, Appl Microbiol Biotechnol 91:565-576).

[0009] 따라서 당업계에서는 아세톤과 같은 부산물의 생성 없이 연료로 바로 이용 가능한 부탄올, 이소프로판올 또는 이들의 혼합 알코올을 고효율로 생산하는 미생물의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 아세톤과 같은 부산물의 생성 없이 부탄올 및 이소프로판올을 고효율로 생산하는 미생물을 개발하기 위하여 부탄올 생산 미생물에 이소프로판올에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 도입시켜 제조한 재조합 미생물이 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산하는 반면, 부산물인 아세톤은 거의 생산하지 않는다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 목적은
- [0012] 1) 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 백터를 제조하는 단계; 및
- [0013] 2) 단계 1)의 백터를 부탄올 생산 균주에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 이소프로판올(isopropanol) 고농도 생산용 미생물의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 이소프로판올 고농도 생산용 재조합 미생물을 제공하기 위한 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 재조합 미생물을 이용하여 이소프로판올 대량 생산방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0017] 1) 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 백터를 제조하는 단계; 및
- [0018] 2) 단계 1)의 백터를 부탄올 생산 균주에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 이소프로판올(isopropanol) 고농도 생산용 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 이소프로판올 고농도 생산용 미생물을 제공한다.
- [0020] 아울러, 본 발명은
- [0021] 1) 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 백터를 제조하는 단계; 및
- [0022] 2) 단계 1)의 백터를 부탄올 생산 균주에 형질전환시켜 재조합 균주를 제조하는 단계; 및
- [0023] 3) 단계 2)의 재조합 균주를 배양한 후, 배양액으로부터 이소프로판올을 수득하는 단계를 포함하는 이소프로판올 대량 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 재조합 미생물은 유의적인 이소프로판올(isopropanol) 생산이 가능하고, 상기 균주를 배양하여 간단

하고 신속하게 혼합알코올의 대량 생산이 가능하며, 나아가, 본 발명에 따라 제조된 혼합알코올을 생산하는 재조합 미생물을 사용하여 생산된 혼합알코올은 바이오 연료로 사용될 수 있으므로, 바이오연료의 상업화 기술에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 벡터를 나타낸 도이다.
- 도 2는 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 벡터가 도입된 재조합 미생물의 전기영동 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 벡터가 도입된 재조합 미생물의 이소프로판올(isopropanol) 생산능을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은
- [0028] 1) 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- [0029] 2) 단계 1)의 벡터를 부탄올 생산 균주에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 이소프로판올(isopropanol) 고농도 생산용 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 상기 단계 1)의 이차 알코올 탈수소효소는 서열번호: 9로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 미생물은 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 8052(*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052), 클로스트리디움 베이저링키 NRRL B592, 클로스트리디움 베이저링키 NRRL B593, 클로스트리디움 베이저링키 IAM 19015, 클로스트리디움 베이저링키 ATCC 14823 및 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 9581로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 단계 2)의 벡터는 pKBE411SADH 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 벡터는 형질전환된 미생물 또는 재조합된 벡터(vector)의 선별을 위한 마커로서 항생제 내성 유전자, 보다 구체적으로는 에리트로마이신(erythromycin resistance gene)을 사용할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 상기 제조방법은 부산물 생산을 억제하는 것이 바람직하고, 아세톤 생산을 억제하는 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 이소프로판올을 생산하는 재조합 미생물을 제조하기 위하여, 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 벡터를 제조한 다음, 상기 벡터를 균주에 도입하여 이소프로판올을 생산하는 재조합 미생물을 제조하였다(도 1 및 도 2 참조).
- [0036] 또한, 본 발명자들은 상기 방법으로 제조한 재조합 미생물의 이소프로판올 생산능을 확인한 결과, 본 발명의 재조합 균주는 배양시간 의존적으로 이소프로판올이 유의적으로 생산하는 것을 확인하였다(표 1 참조).
- [0037] 또한, 본 발명자들은 상기 방법으로 제조한 재조합 미생물의 이소프로판올의 고농도 생산능 확인한 결과, 본 발명의 재조합 균주는 배양 30시간 후, 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산한 반면, 부산물인 아세톤은 거의 생산하지 않는 것을 확인하였다(도 3).
- [0038] 따라서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 재조합 미생물은 이소프로판올 및 부탄올을 고농도로 생산하는 반면, 부산물인 아세톤은 거의 생산하지 않으므로 바이오연료의 상업화 기술에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 1) 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- [0040] 2) 단계 1)의 벡터를 부탄올 생산 균주에 형질전환시켜 재조합 균주를 제조하는 단계; 및

- [0041] 3) 단계 2)의 재조합 균주를 배양한 후, 배양액으로부터 이소프로판올을 수득하는 단계를 포함하는 이소프로판올 대량 생산방법을 제공한다.
- [0042] 상기 단계 1)의 이차 알코올 탈수소효소는 서열번호: 9로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 미생물은 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 8052(*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052), 클로스트리디움 베이저링키 NRRL B592, 클로스트리디움 베이저링키 NRRL B593, 클로스트리디움 베이저링키 IAM 19015, 클로스트리디움 베이저링키 ATCC 14823 및 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 9581로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 벡터는 pKBE411SADH 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 벡터는 형질전환된 미생물 또는 재조합된 벡터의 선별을 위한 마커로서 항생제 내성 유전자, 보다 구체적으로는 에리트로마이신을 사용할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 제조방법은 부산물 생산을 억제하는 것이 바람직하고, 아세톤 생산을 억제하는 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명자들은 상기 방법으로 제조한 재조합 미생물의 이소프로판올 생산능을 확인한 결과, 본 발명의 재조합 균주는 배양시간 의존적으로 이소프로판올이 유의적으로 생산하는 것을 확인하였다(표 1 참조).
- [0048] 또한, 본 발명자들은 상기 방법으로 제조한 재조합 미생물의 이소프로판올의 고농도 생산능 확인한 결과, 본 발명의 재조합 균주는 배양 30시간 후, 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산한 반면, 부산물인 아세톤은 거의 생산하지 않는 것을 확인하였다(도 3).
- [0049] 따라서, 본 발명의 재조합 미생물은 이소프로판올 및 부탄올을 고농도로 생산하는 반면, 부산물인 아세톤은 거의 생산하지 않으므로 바이오연료의 상업화 기술에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0050]
- [0051] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0052] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0053] **<실시예 1> 재조합 균주의 제조**
- [0054] **<1-1> 이차 알코올 탈수소효소(secondary alcohol dehydrogenase)를 과발현하는 벡터의 제조**
- [0055] 이소프로판올을 고효율로 생산하는 재조합 균주를 제조하기 위하여, 이차 알코올 탈수소효소가 과발현되는 벡터를 제조하였다.
- [0056] 구체적으로, 발현벡터 pKBE411-MCS는 pKE12-MCS(Park et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 273-283, 2012)을 주형 벡터로 사용하여 제작하였다. pAMB origin을 얻기 위하여, pMTL-500E(Outtram et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 83-88, 1988)를 주형DNA로 사용하고, 정방향 프라이머(Forward Primer): 5'-ctcgag TATTT AAT CAC TTT GAC TAG CAA ATA CTA AC-3'(서열 번호: 1)와 역방향 프라이머(Reverse Primer): 5'-gacgtc CCAAC TAA CTC AAC GCT AGT AGT GG-3'(서열 번호: 2)를 이용하여 최종부피가 20 μ l가 되도록 20 pmol 프라이머, 100 ng의 플라스미드 DNA를 혼합한 다음 상기 혼합액을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 54 $^{\circ}$ C에서 60초간 재결합, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 신장 과정을 30회 반복하였다. 그런 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 확장한 다음 반응을 종료하였다. 수득한 pAMB 오리진(origin)을 XhoI/AatII 사이트(site)에 삽입하였고, 형질전환 균주를 선별하기 위한 마커인 에리트로마이신 내성 유전자(erythromycin resistance gene)를 얻기 위하여, pMTL-500E를 주형으로 하고, 정방향 프라이머: 5'-ATG ACG TCC ATT TAT CAG GGT TAT TGT CTC ATG-3'(서열 번호: 3)와 역방향 프라이머: 5'-GCA CTA GTT AGC AGC ACG CCA TAG TGA C-3'(서열 번호: 4) 이용하여 최종부피가 20 μ l가 되도록 20 pmol 프라이머, 100 ng의 플라스미드 DNA를 혼합한 다음 상기 혼합액을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 54 $^{\circ}$ C에서 60초간 재결합, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 신장 과정을 30회 반복하였다. 그럼 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 확장한 다음 반응을 종료하였다. 상기 방법으로 수득한 에리트로마이신 내성 유전자를 이용하여, pKE12-MCS의 압피실린 저항성 유전자(Ampicillin resistance gene)를 치환하였다(AatII/SpeI 이용). 또한 클로스트리디

움 베이저링키 NCIMB8052(NCIMB Ltd, 스코틀랜드) 염색체(chromosome)로부터 pta 유전자의 프로모터(promoter)를 정방향 프라이머: 5'-ctcagatattcagaacattaaaagaatggtg-3'(서열 번호: 5)와 역방향 프라이머: 5'-GAATCCCTCCAACATTTCTATATCTATCTAATAAC-3'(서열 번호: 6) 이용하여 같은 PCR 조건으로 증폭하였다. 상기 방법으로 수득한 pta 프로모터를 이용하여 pKE12-MCS의 P_{LacO-1}를 치환하여, pKBE411-MCS 벡터를 제조하였다(XhoI/EcoRI 이용). 그런 다음, 이차 알코올 탈수소효소를 과발현하는 벡터를 제작하기 위하여 클로스트리디움 베이저링키 NRRL B593 균주의 염색체로부터 정방향 프라이머: 5'-gaattc atggcacgttttactttacc-3'(서열 번호: 7) 및 역방향 프라이머: 5'-ggtacc ttacaattaactttagttc-3'(서열 번호: 8)를 이용하여, 최종부피가 20 µl가 되도록 20 pmol 프라이머, 100 ng의 플라스미드 DNA를 혼합한 다음 상기 혼합액을 30회 반복하였다. 그럼 다음, 72°C에서 10분간 확장한 다음 반응을 종료하였다. 각 절편을 수득한 후, 제한효소인 EcoRI/KpnI으로 절단하였다. EcoRI/KpnI 으로 절단한 단편을 pKBE411-MCS에 삽입하여, pKBE411SADH 벡터를 제조하였다(도 1).

[0057] <1-2> 재조합 균주의 제조

[0058] 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 플라스미드를 클로스트리디움 베이저링키 NCIMB 8052(NCIMB Ltd, 스코틀랜드) 균주에 도입하여 재조합 균주를 제조하였다.

[0059] 구체적으로, Oultram 방법(Oultram et al. FEMS Microbiol. Lett. 56,83, 1988)을 이용하여, 클로스트리디움 베이저링키 컴피턴트 세포(competent cell)를 제조한 후, 형질전환은 전기침공(electroporation)으로 Gene PulserII(Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)장치를 사용하여, 1.3kV, 200Ω, 25 µF의 전기 충격을 주었다. 그런 다음, 8 mL의 2YTG배지(트립톤(Trypton) 16g/L, 효모 추출물(Yeast Extract) 10g/L, 글루코스(Glucose) 5 g/L, NaCl 5g/L)를 첨가하여 3시간 배양한 후, 항생제인 Erm을 첨가한 2YTG 한천배지에 도달한 다음, 37°C에서 1일간 배양 후 분리된 균을 얻어서 RCM(Reinforced Clostridial Medium, BD 218081) 액체 배지에 접종, 배양한 후 플라스미드를 추출하고 상기 서열번호 7 및 8번의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 한 후 전기영동으로 그 크기를 확인하여 해당 플라스미드의 형질도입을 확인하였다(도 2).

[0060] <실험예 1> 재조합 균주를 이용한 이소프로판올 생산능 확인

[0061] 상기 <실시예 1>에서 제조한 재조합 균주를 이용하여 부탄올 및 이소프로판올 생성능을 확인하였다.

[0062] 구체적으로, 2YTG 배지 5 mL 을 함유한 10 mL 시험관을 혐기 챔버에서 실온까지 식힌 후 에리트로마이신(erythromycin) 5 ug/mL를 첨가하고, 상기 재조합 균주를 접종하여 37°C에서 흡광도(600 nm)가 1.0이 될 때까지 혐기조건에서 전배양을 수행하였다. 그런 다음, 포도당 60 g/L로 변형된 P2 배지(Annous A & Blaschek HP, Appl. Environ. Microbiol. 56:2559-2561, 1990)를 100 mL을 함유한 250 mL 플라스크를 멸균 후 동일한 처리를 한 후, 상기 전배양액 1 mL을 접종하여, 37°C 혐기조건에서 배양하였다. 상기 배지 중의 글루코스를 글루코스 분석기(glucose analyzer)(model2700 STAT, Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, Ohio, 미국)로 측정하였고, 시간별로 상기 배지를 채취하고, 이로부터 생성되는 용매의 농도를 충전 컬럼(packed column)(Supelco Carboxpack™ B AW/6.6% PEG 20M, 2 m ×2 mm ID, Bellefonte, PA, 미국)이 장착된 가스크로마토그래피(gas chromatography)(Agilent 6890N GC System, Agilent Technologies Inc., CA, 미국)를 이용하여 측정하였다.

[0063] 그 결과, [표 1]에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 재조합 균주는 배양시간 의존적으로 이소프로판올이 유의적으로 생산하는 것을 확인하였다(표 1).

[0064] .

표 1

[0065]

시간 (hr)	OD	글루코스 (g/L)	아세톤 (g/L)	에탄올 (g/L)	부탄올 (g/L)	이소프로판올 (g/L)
24	1.03	49.38	0.16	1.09	1.20	0.69
48	2.50	47.93	0.42	0.20	2.88	1.14
72	6.67	29.03	1.90	1.10	6.34	1.75

[0066] <실험예 2> 재조합 균주를 이용한 이소프로판올의 고농도 생산능 확인

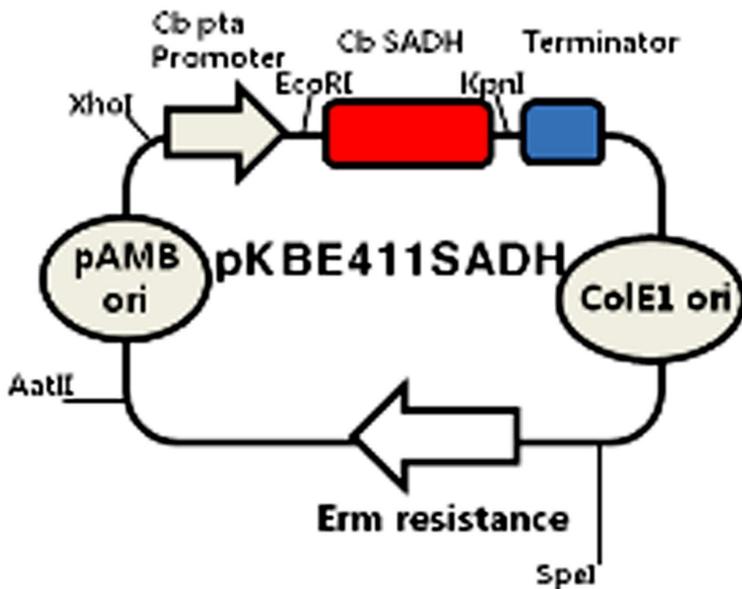
[0067] 상기 <실시예 1>에서 제조한 제조합 균주를 이용하여 부탄올 및 이소프로판올의 대량생산을 확인하였다.

[0068] 구체적으로, 2YTG 배지 5 mL를 함유한 10 mL 시험관을 혐기 챔버에서 실온까지 식힌 후 에리트로마이신 5 ug/mL를 첨가하고, 상기 배지 미생물을 접종하여 37°C에서 흡광도(600 nm)가 1.0이 될 때까지 혐기조건에서 전배양을 수행하였다. 그런 다음, 글루코스 60 g/L와 YE 10g/L로 변형된 P2 배지를 100 mL을 함유한 250 mL 플라스크를 멸균 후 동일한 처리를 한 후, 상기 전배양액 1 mL을 접종하여, 37°C, 혐기조건에서 2차 전배양 하였다. 그런 다음, 상기 성분으로 구성된 배지 900 mL를 함유한 2.0 L 발효기를 멸균 후 80°C 이상에서부터 질소를 0.5 vvm으로 10시간 공급하면서 실온까지 온도를 낮춘 후 에리트로마이신 5 ug/mL을 첨가하고 상기 2차 전배양액 100 mL 을 접종하여, 37°C, 200 rpm에서 28시간 배양하였다. pH 보정은 암모니아수를 이용하였으며 자동 급이 (automatic feeding)에 의해 5.0 이상으로 유지하였고, 배양 중에는 질소를 0.2 vvm(air volume/working volume/minute)으로 공급하였다. 상기 배지중의 글루코스를 글루코스 분석기(model2700 STAT, Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, Ohio, 미국)로 측정하였고, 시간별로 상기 배지를 채취하고, 이로부터 생성되는 용매의 농도를 충전 컬럼(Supelco Carbo-pack™ B AW/6.6% PEG 20M, 2 m ×2 mm ID, Bellefonte, PA, 미국)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 6890N GC System, Agilent Technologies Inc., CA, 미국)로 측정하였다.

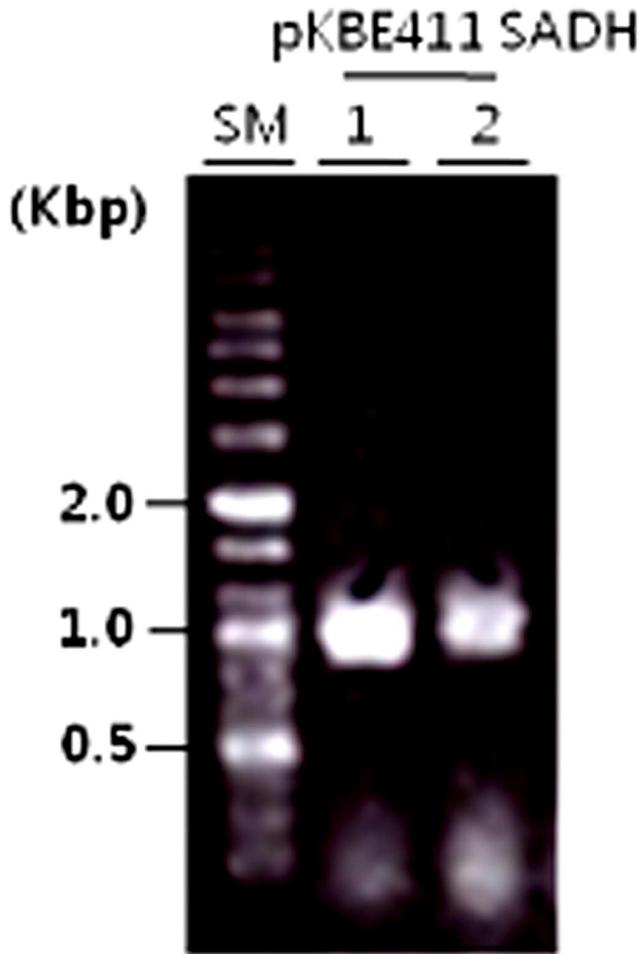
[0069] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 배양 30시간 후, 부탄올 및 이소프로판올을 고농도로 생산한 반면, 부산물인 아세트온은 거의 생산하지 않는 것을 확인하였다(도 3).

도면

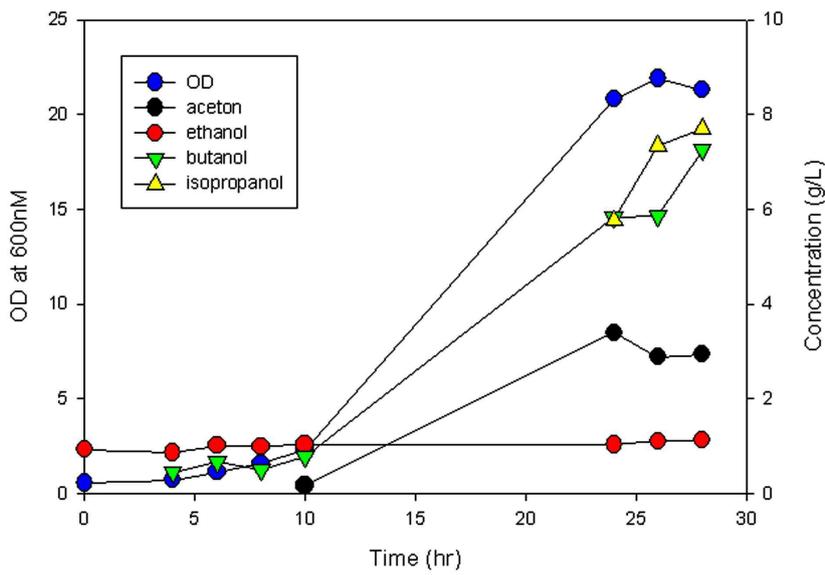
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Korea Research Institute of Chemical Technology

<120> Genetically modified isopropanol producing microorganisms and the method for preparing isopropanol using the same

<130> 12p-05-03

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

ctcgcagtatt taatcacttt gactagcaaa tactaac 37

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 2

gacgtcccaa ctaactcaac gctagtagtg g 31

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

atgacgtcca tttatcaggg ttattgtctc atg 33

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

gcactagtta gcagcagccc atagtgac 28

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 5
 ctcgagtatt cagaacatta aaagaatggt g 31
 <210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 6
 gaattccctc caacatttct ctataccta tctctaatac 40
 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 7
 gaattcatgg cacgttttac ttacc 26
 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 8
 ggtaccttac aaattaactt tagttc 26
 <210> 9
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> C. beijerinckii B593 secondary alcohol dehydrogenase sequence

<400> 9

atgaaaggtt ttgcaatgct aggtattaat aagttaggat ggatcgaaaa agaaaggcca	60
gttgcgggtt catatgatgc tattgtacgc ccattagcag tatctccgtg tacatcagat	120
atacatactg tttttgaggg agctcttggg gataggaaga atatgatttt agggcatgaa	180
gctgtaggtg aagtgttga agtaggaagt gaagtgaagg attttaaacc tggtagacaga	240
gttatagttc ctgtacaac tccagattgg agatctttgg aagtcaagc tggttttcaa	300
cagcactcaa acggtatgct cgcaggatgg aaattttcaa attcaagga tggagttttt	360
ggtgaatatt ttcatgtaa tgatgcggat atgaatcttg cgattctacc taaagacatg	420
ccattagaaa atgctgttat gataacagat atgatgacta ctggatttca tggagcagaa	480
cttgcagata ttcaaatggg ttcaagtgtt gtgtaattg gcattggagc tgttgctta	540
atgggaatag caggtgctaa attacgtgga gcaggtagaa taattggagt ggggagcagg	600
ccgatttgtg ttgaggctgc aaaattttat ggagcaacag atattctaaa ttataaaaat	660
ggtcatatag ttgatcaagt tatgaaatta acgaatggaa aaggcgttga ccgcgtaatt	720
atggcaggcg gtggttctga aacattatcc caagcagtat ctatggttaa accaggagga	780
ataatttcta atataaatta tcatggaagt ggagatgctt tactaatacc acgtgtagaa	840
tgggatgtg gaatggctca caagactata aaaggaggtc tttgtcctgg gggacgtttg	900
agagcagaaa tgtaagaga tatggtagta tataatcgtg ttgatctaag taaattagtt	960
acacatgtat atcatggatt tgatcacata gaagaagcac tgttattaat gaaagacaag	1020
ccaaaagact taattaaagc agtagttata ttataa	1056