

## 대사공학적으로 설계된 재조합 효모를 이용한 2,3-부탄다이올의 최신 생산 전략

김수정\*

전남대학교 농업생명과학대학 농식품생명공학부

### Recent Strategies for 2,3-Butanediol Production Using Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Soo-Jung Kim\*

Division of Food Technology and Biotechnology, Chonnam National University

\*Corresponding author: [bioksj@jnu.ac.kr](mailto:bioksj@jnu.ac.kr)

#### ABSTRACT

2,3-Butanediol (2,3-BDO) is a chemical building block with wide industrial applications for food flavors, cosmetics, synthetic rubber and biosolvents. *Saccharomyces cerevisiae* can be used as a host which is an alternative to 2,3-BDO producing bacteria. To produce 2,3-BDO with high yield and titer, it is required to engineer *S. cerevisiae* by intensifying 2,3-BDO biosynthetic pathway and deleting competing pathway such as ethanol and glycerol pathway. Also, 2,3-BDO production from lignocellulosic and marine-algae biomass can make the 2,3-BDO production more economical and sustainable. These processes can be obtained by facilitating assimilation of carbon sources including xylose, cellobiose and galactose in *S. cerevisiae* along with 2,3-BDO biosynthetic pathway. These cutting-edge technologies of metabolic engineering enable *S. cerevisiae* to be a promising microbial host for 2,3-BDO production with industrial applications.

**Additional key words:** 2,3-Butanediol, 2,3-BDO, *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic engineering

#### 서 론

2,3-부탄다이올(2,3-Butanediol, 2,3-BDO)은 탄소수 4개로 구성되고 2번, 3번 탄소에 하이드록실기를 가지는 이중알코올(diol) 물질로(Fig. 1), 산업체에 주요 전구체로 널리 사용되고 있는 물질이다(Ji et al., 2011).

2,3-BDO의 수화를 통하여 합성고무의 원료인 1,3-부타디엔(1,3-butadiene)을 만들 수 있으며, 탈수소반응을 통하여 식품 산업에서 향기 성분으로 쓰이는 아세토인(acetoin)과 다이아세틸(diacetyl)을 만들 수 있다(Zeng and Sabra 2011). 2,3-BDO는 2,3-butene oxide의 가수분해를 통하여 화학적으로 합성할 수 있다. 하지만 이

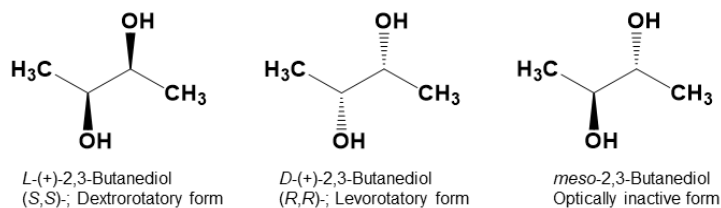


Fig. 1. Stereoisomers of 2,3-butanediols.

러한 방법은 가혹한 조건(160℃-220℃ and 50bar)에서 진행되어야 하며, butadiene, MEK, butenes과 같은 부산물을 생성하여 2,3-BDO를 정제하는데 추가 비용을 발생시킨다(Kim et al., 2017a).

따라서 산업에서는 주로 미생물 발효를 이용한 생물학적 방법을 통하여 2,3-BDO를 생산하고 있다(Bialkowska, 2016). 이때 *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus polymyxa*가 주로 이용된다. 이 미생물은 고수율, 고생산성으로 2,3-BDO를 생산할 수 있지만, 몇 가지 단점을 지닌다(Kim et al., 2017a). 첫째, *Klebsiella* spp.는 생물안전등급 2등급으로 분류되어 산업적 공정에 적용 시 많은 제약 및 규제를 받게 된다. 둘째, 대부분의 2,3-BDO 생산 박테리아는 광학이성질체인(2*R*,3*R*)-2,3-BDO, (2*S*,3*S*)-2,3-BDO, meso-2,3-BDO가 혼합된 형태를 생성하는데, 이는 산업적 활용의 제한사항이 될 수 있다.

최근 이에 대한 대안으로 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. *S. cerevisiae*는 GRAS(Generally Recognized As Safe) 균주로 예로부터 주정용, 제빵용으로 사용될 정도로 안전하며, 유전적 정보가 잘 알려져 있고, 유전자 도구가 많이 개발되어 있다. 또한 진핵세포로 박테리오파지에 대한 감염의 위험성이 없기 때문에 산업적 활용 가치가 높다. 이러한 장점에도 불구하고, 효모는 2,3-BDO를 거의 생산하지 못하기 때문에 2,3-BDO를 효율적으로 생산하기 위해서는 대사공학적으로 재설계된 *S. cerevisiae*의 구축이 필요하다(Kim et al., 2017a). 본 논문은 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO의 생산에 관련된 최근 연구에 대하여 소개할 것이다. 첫째, 2,3-부탄다이올을 생산하기 위한 외래 경로의 도입, 둘째, 에탄올, 글리세롤과 같은 2,3-BDO 외의 부산물의 생성을 억제시키기 위한 대사공학적 접근 방법, 셋째, 경제성 확보를 위한 다양한 탄소원으로부터 2,3-BDO의 생산에 대하여 논의할 것이다.

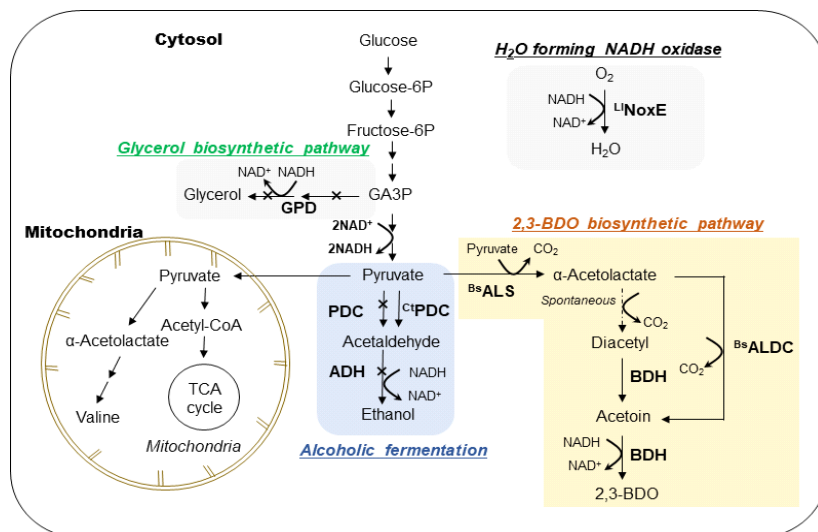
## 본 론

### 1. 2,3-BDO 대사 경로의 강화

*S. cerevisiae*에서 2,3-BDO 생합성에 관여하는 대부분의 효소는 세포질에 존재한다. 하지만 피루브산(pyruvate)을  $\alpha$ -acetolactate로 전환시키는  $\alpha$ -acetolactate synthase가 미토콘드리아에 존재하여 위치적으로 불리한 생합성 경로를 가지고 있다(Fig. 2). 또한  $\alpha$ -acetolactate를 acetoin으로 전환시키는 반응이 효소 반응이 아닌 자발적 반응에 의지하고 있어 생촉매 반응에 비해 비효율적이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 외래 유래 효소인  $\alpha$ -acetolactate synthase,  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase를 도입하여 효율적으로  $\alpha$ -acetolactate를 acetoin으로 전환시킬 수 있는 생합성 경로가 구축되었다(Kim et al., 2017a). *Bacillus subtilis* 유래의  $\alpha$ -acetolactate synthase와 *E. aerogenes*의  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase와 acetoin reductase를 도입하여 0.02 g/g의 수율로 2,3-BDO를 생산하였고(Ng et al., 2012), *B. subtilis* 유래의  $\alpha$ -acetolactate synthase와  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase를 도입 및 *S. cerevisiae* 자체의 2,3-butanediol dehydrogenase의 과발현을 통하여 야생 *S. cerevisiae*의 생산량의 10배 이상의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2013).

### 2. 2,3-BDO 수율 향상을 위한 부산물(에탄올, 글리세롤) 저감 전략

하지만 이러한 경우에도 *S. cerevisiae*는 주로 에탄올을 생성하고 상대적으로 적은 양의 2,3-BDO를 생산한다. 따라서 2,3-BDO 생산에 핵심 전구체인 피루브산이 에탄올로 전환되는 경로를 차단하여 피루브산을 축적시키고, 축적된 피루브산을 2,3-BDO로 효율적으로 전환시키는 생합성 경로의 재구축이 필요하다(Kim et al., 2017a). 피루브산으로부터 생성된 아세트알데하이드



\* The superscripts in the enzyme names present as follows:

Bs, *B. subtilis*; Ct, *C. tropicalis*; Ll, *L. latiss*

\* The names of enzymes are abbreviated as follows:

ALS,  $\alpha$ -acetolactate synthase; ALDC,  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase; BDH, 2,3-BDO dehydrogenase; PDC, pyruvate decarboxylase; ADH, alcohol dehydrogenase; GPD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NoxE, NADH oxidase

**Fig. 2.** Strategies for 2,3-butanediol production using metabolically engineered *S. cerevisiae*.

드(acetaldehyde)를 에탄올로 전환시키는 효소 alcohol dehydrogenase를 암호화하는 *ADH1*, *ADH3*, *ADH5*를 파쇄하여 천연 *S. cerevisiae* 대비 47배 향상된 2,3-BDO 생산 수율(0.113 g/g)을 나타냈다(Ng et al., 2012). 또, 다른 연구에서는 *ADH1*의 파쇄와 함께 2,3-BDO 생합성 경로에 관여하는 효소의 집적화를 통하여 29.1 g/L의 2,3-BDO 생산량을 나타냈다(Kim and Hahn, 2014). 에탄올의 생성을 억제하기 위한 가장 효과적인 방법은 *S. cerevisiae*의 pyruvate decarboxylase(Pdc)의 활성을 제거하는 방법이다. 하지만 Pdc가 결여된 *S. cerevisiae*는 포도당을 대사하지 못하는 문제점을 가진다. 진화공법의 시행을 통하여 포도당 대사능이 개선된 *S. cerevisiae*를 선별하였고, 이 대사능 개선에 포도당 감지에 관여하는 전사 조절자를 암호화하는 *MTH1* 유전자의 돌연변이가 존재함을 밝혔다(Kim et al., 2013; Lian et al., 2014). Pdc가 불활성화된 *S. cerevisiae*에 2,3-BDO 생합성 경로 강화를 통하여 최종적으로 96.2 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2013).

*S. cerevisiae*는 포도당으로부터 피루브산 생성 시 두 분자의  $NAD^+$ 를 NADH로 전환시킨다. 전환된

NADH는 피루브산이 에탄올로 전환되는 과정에서  $NAD^+$ 로 재산화된다. 또, 다른 NADH 재산화 경로는 글리세롤 생산이며, 이러한 NADH 재산화를 통하여 *S. cerevisiae*는 효율적으로 포도당을 에탄올로 전환시킬 수 있다(Flikweert et al., 1996; Pronk et al., 1996). 하지만 대사공학적으로 재구축된 2,3-BDO 생합성 경로에서는 피루브산이 2,3-BDO로 전환될 때 한 분자의 NADH만 재산화되므로 세포 내에는 한 분자의 NADH가 잉여로 남게 되고, 이를 해결하기 위하여 에탄올 생합성 경로가 차단된 재조합 *S. cerevisiae*는 글리세롤을 과량 생산한다(Kim et al., 2013). 글리세롤의 과량 생산은 2,3-BDO 생산에 있어 생산 수율의 저하뿐만 아니라, 분리 정제 비용의 발생과 같은 문제점을 발생한다. 따라서 세포 내에 축적되는 NADH를 산화시킬 수 있는 다른 경로의 활성화가 필요하다.

가장 간단한 방법은 발효 조건 중 산소의 공급을 증가시켜, 세포의 호흡을 통하여 NADH를 재산화하는 방법이다. 산소 공급 농도를 증가시켜 글리세롤의 양을 줄이고, 2,3-BDO의 생산을 증대시킨 연구가 보고되었다. 하지만 과량의 산소 공급은 글리세롤의 축적을 감

소시킬 수 있지만 2,3-BDO의 전구체인 acetoin이 쌓이는 문제점을 나타냈다(Kim et al., 2013). 따라서 이를 극복하고자 세포 성장기와 2,3-BDO 생산 시기를 산소 공급 농도로 구분하는 2단계 산소공급 시스템을 도입하였다. 예를 들면, 세포 성장 시에는 높은 산소 농도를 유지하며, 축적된 acetoin을 2,3-BDO로 전환할 때는 상대적으로 낮은 산소 농도를 유지하여 글리세롤의 축적을 74% 감소시켰다(Kim et al., 2016). 세포 내 NADH를 재산화시키는 두 번째 방법은 *Lactococcus lactis* 유래의 water-forming NADH oxidase(NoxE)를 *S. cerevisiae* 내에 도입하는 방법이다. 2,3-BDO 생합성 경로가 강화된 Pdc 결여 균주에 이 효소를 도입한 경우, 이 효소가 도입되지 않은 균주에 비해 2,3-BDO 수율이 24% 향상되었고, 글리세롤 축적이 65% 완화되었다(Kim et al., 2015). 하지만 글리세롤의 축적을 막는 가장 적극적인 방법은 글리세롤 생합성 경로를 차단하는 것이다. 글리세롤 생합성 경로의 차단과 NoxE 효소의 도입을 통하여 이론 수율 82%의 2,3-BDO를 1.43 g/L/h의 생산성으로 총 73 g/L 생산하였다(Kim and Hahn 2015). 마지막으로 흥미로운 NADH 재산화의 방법으로 Crabtree-negative 효모의 Pdc를 도입하는 것이다. *S. cerevisiae*와 같은 효모는 포도당에 의해 호흡에 관여한 효소의 발현이 억제되므로 산소 조건에서도 호흡 대신 에탄올 생성과 같은 발효과정을 통하여 해당과정에서 생성된 NADH를 재산화시킨다. 이러한 효모를 Crabtree-positive yeast라고 하며, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*와 같은 crabtree-negative yeast에 비해 높은 Pdc 활성을 나타낸다(Flikweert et al., 1996; Pronk et al., 1996). 따라서 낮은 활성을 나타내는 *C. tropicalis* 유래의 Pdc를 Pdc가 결여된 *S. cerevisiae*에 도입하면 적정 농도의 에탄올을 생성하며, NADH를 재산화시킬 수 있다. NoxE 도입 및 2단계 산소공급 시스템을 함께 도입하여 0.40 g/g의 2,3-BDO 수율과 1.98 g/L/h의 생산성으로 154.3 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2016).

최근 빠른 성장 속도를 보이며 혹독한 조건에서 내성을 지닌 산업용 polyploid *S. cerevisiae*를 모균주로 하여 2,3-BDO를 생산한 결과가 보고되었다(Lee and Seo, 2019). CRISPR-Cas9를 이용하여 polyploid *S. cerevisiae*의 에탄올 생성에 관여하는 *PDC1*, *PDC6*, *ADH1* 유전자를 파쇄하였고, 2,3-BDO 생합성 경로 및 NoxE를 과발현하여 최종적으로 178 g/L의 2,3-BDO를

생산하였고, 이는 현재 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산 공정 중 최대 생산량을 나타낸다.

### 3. 다양한 탄소원으로부터 2,3-BDO 생산

저가의 폐자원(목질계, 해조류 바이오매스 등)으로부터 2,3-BDO를 생산하는 공정은 환경적, 경제적 의미에서 많은 장점을 가진다. 하지만 *S. cerevisiae*는 목질계 바이오매스에 다량으로 존재하는 자일로스를 대사하지 못하며, 해조류에 존재하는 갈락토스를 효율적으로 대사하지 못하는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 탄소원을 효율적으로 이용하여 2,3-BDO를 생산하기 위해서는 *S. cerevisiae* 내 해당 탄소원의 대사 경로의 재구축이 수반되어야 한다.

재조합 *S. cerevisiae*를 이용하여 자일로스로부터 2,3-BDO를 생산하기 위하여, *Scheffersomyces stipitis* 유래의 xylose reductase(XR), xylitol dehydrogenase(XDH)와 *S. cerevisiae*의 xylulose kinase(XK)의 과발현을 통하여 자일로스로부터 피루브산을 축적하는 *S. cerevisiae*를 구축하였다. 이 균주에 추가적으로 2,3-BDO 대사경로를 도입하여 자일로스로부터 44 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2014). 추가적으로 돌연변이 XR, Tal1, *L. lactis* NoxE, *C. tropicalis* Pdc를 재조합 *S. cerevisiae* 내에 추가 과발현하여 0.58 g/L/h의 생산성으로 자일로스로부터 96.8 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2017b). 또한 cellobiose로부터 2,3-BDO를 생산한 연구가 보고되었다. Cellobiose transporter와  $\beta$ -glucosidase가 2,3-BDO 생합성 경로와 함께 도입된 재조합 *S. cerevisiae*는 cellobiose를 기질로 사용하여 5.3 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Nan et al., 2014).

*Gelidium amansii*와 같은 해조류 유래의 바이오매스에는 포도당 외에 갈락토스가 다량 존재하며, 이는 2,3-BDO 생산에 좋은 탄소원이 될 수 있다. 포도당과 갈락토스의 동시 대사를 위하여 돌연변이 Mth1을 과발현하였고, 2,3-BDO 생합성 경로를 도입하여 약 100 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Lian et al., 2014). 포도당과 갈락토스 대사에 있어 두 탄소원의 비율은 중요한 요소이므로 최적의 탄소원 조건(60 g/L 포도당과 60 g/L 갈락토스)을 탐색하였고, 이 조건에서 돌연변이 Mth1을 가진 *S. cerevisiae*는 100 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Choi et al., 2016).

산업적 활용을 위해서는 바이오매스 당화액을 이용한 2,3-BDO 생산 공정의 구축이 중요하다. BD5\_

T2nox\_dGPD1,2\_CtPDC1균주를 이용하여 121 g/L의 포도당을 함유한 Cassava 당화액을 탄소원으로 이용하는 유가식 배양을 통하여 47.4 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Kim et al., 2019). 또한 산업용 균주를 이용하여 구축한 2,3-BDO 생산 *S. cerevisiae*는 Cassava 당화액로부터 최종 132 g/L의 2,3-BDO를 생산하였고, 이는 향후 재생가능한 바이오매스의 활용 측면에서 의의가 크다(Lee and Seo, 2019).

#### 4. 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산 공정의 장점

*S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산 공정은 박테리아를 이용한 공정과 달리 박테리오파지에 대한 감염의 위험성이 없으므로 공정상의 안정성을 제공한다. 또

한 대부분의 박테리아가 2,3-BDO를 광학 이성질체의 혼합물로 생산하는 반면, 재조합 *S. cerevisiae*는 단일 형태의 광학이성질체를 선택적으로 생산할 수 있어 생산된 2,3-BDO는 향후 의약품과 같이 고부가가치의 물질로 활용될 수 있다(Kim et al., 2014). 하지만 세포 내 NADH 불균형으로 인한 글리세롤의 축적과 세포 성장 저해 현상을 조금 더 개선한다면, 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산공정은 산업적으로 충분히 활용될 수 있는 가치를 지닐 것으로 사료된다.

#### 요 약

최근 몇 년간 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산 기술이 상당히 발전하였다(Table 1). 외래 유래의

**Table 1.** 2,3-Butanediol production from different carbon sources using engineered *S. cerevisiae*

Mother strain	Genetic modification	Overexpressed genes	Culture		2,3-BDO			Reference
			Carbon source	Cluture mode	Productivity (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L/h)	
CEN.PK2-1C	$\Delta adh1$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i>	Glucose	Fed-batch	29.1	N.M.	0.29	[7]
CEN.PK2-1C	$\Delta adh1$ , $\Delta adh2$ , $\Delta adh3$ , $\Delta adh4$ , $\Delta adh5$ , $\Delta gpd1$ , $\Delta gpd2$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i>	Glucose	Fed-batch	72.9	0.41	1.43	[13]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , <i>MTH1_A81P</i>	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i>	Glucose	Fed-batch	96.2	0.28	0.39	[6]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , <i>MTH1_A81P</i>	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Ea</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i>	Glucose	Fed-batch	132.4	0.34	0.41	[18]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , $\Delta pdc6$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i>	Glucose	Batch	29.4	0.37	0.40	[12]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , $\Delta pdc6$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDHI</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i> , <sup>Ct</sup> <i>PDC1</i>	Glucose	Fed-batch	154.3	0.40	1.97	[11]

**Table 1.** Continued

Mother strain	Genetic modification	Overexpressed genes	Culture		2,3-BDO			Reference
			Carbon source	Cluture mode	Productivity (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L/h)	
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , $\Delta pdc6$ , $\Delta gpd1$ , $\Delta gpd2$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i> , <sup>Ct</sup> <i>PDC1</i>	Glucose	Fed-batch	108.6	0.46	1.55	[19]
JHS200	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc6$ , $\Delta adh1$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i>	Glucose	Fed-batch	178.0	0.36	2.64	[14]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , <i>MTH1_A81P</i>	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ss</sup> <i>XYL1</i> , <sup>Ss</sup> <i>XYL2</i> , <sup>Sc</sup> <i>XYL3</i>	Glucose, xylose	Fed-batch	43.6	0.27	0.20	[15]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ ,	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ss</sup> <i>XYL1</i> , <sup>Ss</sup> <i>XYL2</i> , <sup>Sc</sup> <i>XYL3</i> , <sup>Ss</sup> <i>XYL1</i> <sup>mut</sup> , <sup>Sc</sup> <i>TAL1</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i> , <sup>Ct</sup> <i>PDC1</i>	Glucose, xylose	fed-batch	96.8	N.M	0.58	[16]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , <i>MTH1_A81P</i>	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Nc</sup> <i>cdt1</i> , <sup>Nc</sup> <i>ghl-1</i> ,	Cellobiose	Batch	5.3	0.29	0.22	[17]
CEN.PK2-1C	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , $\Delta pdc6$	<sup>Sc</sup> cytoILV2, <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , truncated <i>MTH1</i>	Glucose, galactose	Fed-batch	100	N.M.	N.M.	[8]
D452-2	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc5$ , $\Delta pdc6$ , $\Delta gpd1$ , $\Delta gpd2$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i> , <sup>Ct</sup> <i>PDC1</i>	Cassava hydrolysate	Fed-batch	47.4	0.39	1.03	[19]
JHS200	$\Delta pdc1$ , $\Delta pdc6$ , $\Delta adh1$	<sup>Bs</sup> <i>alsS</i> , <sup>Bs</sup> <i>alsD</i> , <sup>Sc</sup> <i>BDH1</i> , <sup>Ll</sup> <i>noxE</i>	Cassava hydrolysate	Fed-batch	132	0.32	1.92	[14]

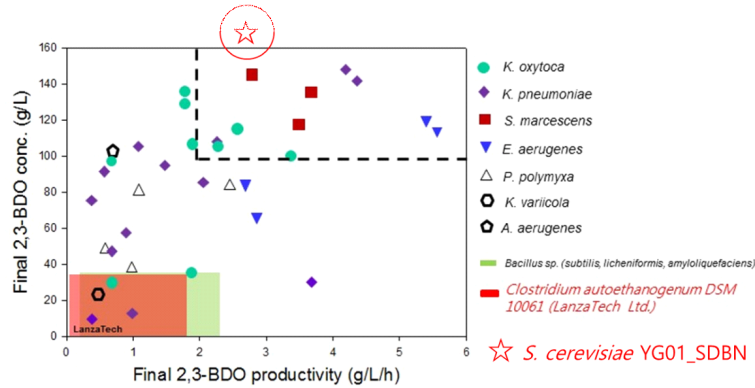
\* The superscripts in the enzyme names present as follows:

Bs, *B. subtilis*; Ct, *C. tropicalis*; Ea, *E. aerogenes*; Ll, *L. latiss*; Nc, *N. crassa*; Sc, *S. cerevisiae*; Sccto, *S. cerevisiae cytosolic*; Ss, *S. stipitis*.

\* Genes coding for enzymes as follows:

*adh1*, *adh2*, *adh3*, *adh4*, and *adh5* genes, alcohol dehydrogenase; *gpd1* and *gpd2* genes, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; *pdc1*, *pdc5*, and *pdc6* genes, pyruvate decarboxylase; *alsS* and *ILV2* genes,  $\alpha$ -acetolactate synthase; *alsD* gene,  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase; *BDH1* gene, 2,3-BDO dehydrogenase; *noxE* gene, NADH oxidase; *XYL1* gene, xylose reductase; *XYL2* gene, xylitol dehydrogenase; *XYL3* gene, xylulose kinase; *TAL1* gene, transaldolase; *cdt1* gene, cellodextrin transporter; *ghl-1* gene, intracellular  $\beta$ -glucosidase; *MTH1* gene, transcriptional regulator involved in the glucose-sensing signal transduction pathway.

\* N.M. not mentioned.



A. P. Zeng et al., Current Opinion in Biotechnology, 22, 749-757 (2011); M. A. Shultz et al., US 2015/0167025, 2015; A. A. Koutinas et al., Bioresource Technology, 204, 55-64, 2016; S. D. Simpson et al., US 8,673,603, 2014; S. D. Simpson et al., US 2011/0144393, 2011; D. Jianying et al., Chin. J. Chem. Eng., 19(4), 682-686, 2011; M. Kopke et al., Appl. Environ. Microbiol., 5467-5475, 2011; X. J. Ji et al., Biotechnology Advances, 29, 351-364, 2011; Q. Jiayang et al., Chinese Journal of Chemical Engineering, 14(1), 132-136 (2006); S. K. Garg et al., Bioresource Technology, 51, 103-109, 1995; J. M. Park et al., Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 40(9), 1057-1066 (2013); KRIBB, KR 10-2015-0019086, 2015

**Fig. 3.** Comparison of 2,3-butanediol production by metabolically engineered *S. cerevisiae* with that by other 2,3-BDO-producing bacteria.

2,3-BDO 생합성 경로 도입, 에탄올과 글리세롤 생합성 경로와 같은 경쟁 경로의 차단, 세포 내 NADH 불균형 해소를 위한 노력, 빠른 세포 성장을 보이는 산업용 *S. cerevisiae*의 사용 등을 통하여 재조합 *S. cerevisiae*는 2.64 g/L/h의 생산성으로 178 g/L의 2,3-BDO를 생산할 수 있다. 이러한 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산량은 2,3-BDO 생산 박테리아와 비교했을 때에도 충분한 경쟁력을 가진다(Fig. 3). GRAS 균주인 *S. cerevisiae*를 이용한 공정상의 장점이 충분히 존재하므로 재조합 *S. cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산공정은 향후 산업적으로 활용하기에 가치가 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구주제를 수행할 수 있도록 지도해 주시고 지원해 주신 서울대학교 서진호 교수님께 감사드립니다. 그리고 본 연구주제를 수행할 수 있도록 재정적으로 지원해 준 한국연구재단과 전남대학교에 감사를 표합니다.

### 참고문헌

- Ji, X. J., Huang, H. and Ouyang, P. K. 2011. Mi-

crobial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. Biotechnol. Adv. 29: 351-364.

- Zeng, A. P. and Sabra, W. 2011. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. Curr. Opin. Biotechnol. 22: 749-757.
- Kim, S. J., Kim, J. W., Lee, Y. G., Park, Y. C. and Seo, J. H. 2017. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2,3-butanediol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101: 2241-2250.
- Bialkowska, A. M. 2016. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. World J. Microbiol. Biotechnol. 32.
- Ng, C. Y., Jung, M. Y., Lee, J. and Oh, M. K. 2012. Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by *in silico* aided metabolic engineering. Microb. Cell Fact, 11: 68.
- Kim, S. J., Seo, S. O., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2013. Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol. 146: 274-281.
- Kim, S. and Hahn, J. S. 2014. Synthetic scaffold

- based on a cohesin-dockerin interaction for improved production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 192: 192-196.
8. Lian, J. Z., Chao, R. and Zhao, H. M. 2014. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol. Metab. Eng. 23: 92-99.
  9. Pronk, J. T., Steensma, H. Y. and vanDijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 12: 1607-1633.
  10. Flikweert, M. T., Vander Zanden, L., Janssen, W. M. T. M., Steensma, H. Y., VanDijken, J. P. and Pronk, J.T. 1996. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. Yeast. 12: 247-257.
  11. Kim, J. W., Kim, J., Seo, S. O., Kim, K. H., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2016. Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through fine-tuning of pyruvate decarboxylase and NADH oxidase activities. Biotechnology for Biofuels. 9: 1-12.
  12. Kim, J. W., Seo, S. O., Zhang, G. C., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2015. Expression of *Lactococcus lactis* NADH oxidase increases 2,3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol. 191: 512-519.
  13. Kim, S. and Hahn, J. S. 2015. Efficient production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating ethanol and glycerol production and redox rebalancing. Metab. Eng. 31: 94-101.
  14. Lee, Y. G. and Seo, J. H. 2019. Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels. 12: 204.
  15. Kim, S. J., Seo, S. O., Park, Y. C., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2014. Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 192: 376-382.
  16. Kim, S. J., Sim, H. J., Kim, J. W., Lee, Y. G., Park, Y. C. and Seo, J. H. 2017. Enhanced production of 2,3-butanediol from xylose by combinatorial engineering of xylose metabolic pathway and cofactor regeneration in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol. 245: 1551-1557.
  17. Nan, H., Seo, S. O., Oh, E. J., Seo, J. H., Cate, J. H. D. and Jin, Y. S. 2014. 2,3-Butanediol production from cellobiose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: 5757- 5764.
  18. Choi, E. J., Kim, J. W., Kim, S. J., Seo, S. O., Lane, S., Park, Y. C., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2016. Enhanced production of 2,3-butanediol in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* through optimizing ratio of glucose/galactose. Biotechnology Journal. 11: 1424-1432.
  19. Kim, J. W., Lee, Y. G., Kim, S. J., Jin, Y. S. and Seo, J. H. 2019. Deletion of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes improved 2,3-butanediol production by reducing glycerol production in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 304: 31-37.