



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월01일  
(11) 등록번호 10-1763820  
(24) 등록일자 2017년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/81 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)  
C12P 7/18 (2006.01) C12R 1/865 (2006.01)

(73) 특허권자  
서울대학교 산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(52) CPC특허분류  
C12N 15/81 (2013.01)  
C12P 7/16 (2013.01)

(72) 발명자  
서진호  
서울특별시 서초구 방배로 239, 101동 903호 (방배동, 현대멤피시아파트)

(21) 출원번호 10-2015-0160617

(22) 출원일자 2015년11월16일

심사청구일자 2015년11월16일

(65) 공개번호 10-2017-0057023

(43) 공개일자 2017년05월24일

(74) 대리인  
특허법인태동

(56) 선행기술조사문헌

Sujin Kim 등. Metabolic Engineering. Vol. 31, 페이지 94-101 (2015.07.28.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 11 항

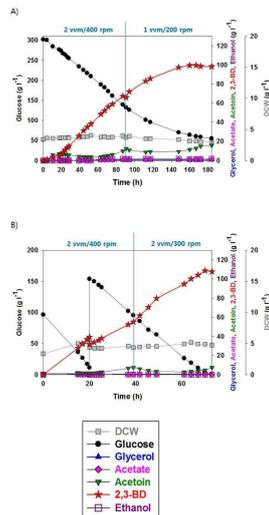
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 글리세롤의 생성이 억제된 2,3-부탄다이올이 생산방법

(57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것으로, 기존의 사카로마이세스 세레비지에 (효모)를 이용한 2,3-부탄다이올 생산 기술은 2,3-부탄다이올의 생산과 함께 부산물로 글리세롤이 다량 생산되었다. 하지만, 본 발명의 효모 균주는 부산물인 글리세롤의 생산이 억제된 상태에서, 2,3-부탄다이올을 고순도, 고수율, 고생산성으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

- C12P 7/18* (2013.01)
- C12Y 101/01004* (2013.01)
- C12Y 101/01008* (2013.01)
- C12Y 101/05003* (2013.01)
- C12Y 202/01006* (2013.01)
- C12Y 401/01005* (2013.01)
- C12R 1/865* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0652-20140021
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어연구개발사업
연구과제명	Saccharomyces cerevisiae 기반 C6/C5 통합형 바이오화학소재 생산
기여율	1/1
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2010.10.22 ~ 2019.08.31
공지예외적용	: 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

2,3-부탄다이올 생산용 사카로마이세스 세레비지애에 있어서,  
 글리세롤 생합성에 관여하는 *GPD1* 유전자 및 *GPD2* 유전자가 모두 제거되고,  
 NADH 옥시다아제 (NADH oxidase)를 암호화하는 유전자가 도입되며,  
 자체 보유의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되고,  
 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*이 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*).

**청구항 2**

제1항에 있어서,  
 상기 2,3-부탄다이올 생산용 사카로마이세스 세레비지애는,  
 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되어 있으며,  
 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되어 있고,  
 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

**청구항 3**

제2항에 있어서,  
 상기 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환하는 것은 알파-아세토락테이트 신타아제 (alpha-acetolactate sythase)를 암호화하는 유전자 *alsS*를 도입함으로써 달성되며,  
 상기 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환하는 것은 알파-아세토락테이트 데카르복실라아제 (alpha-acetolactate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *alsD*를 도입함으로써 달성되고,  
 상기 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 하는 것은 사카로마이세스 세레비지애 자체 보유의 2,3-부탄다이올 데하이드로지나아제 (2,3-butanediol dehydrogenase)를 암호화하는 유전자 *BDH1*를 과발현함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서,  
 상기 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능 소실은,  
 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* 중 선택되는

어느 하나 이상의 유전자를 일부 파쇄하거나, 전부 제거함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 피루베이트 데카르복실라아제를 암호화하는 유전자 *PDC1*은,

*GPD2* 프로모터 하에서 발현되는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 NADH 옥시다아제는,

락토바실러스 락티스 (*Lactobacillus lactis*) 유래의 NADH 옥시다아제인 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 NADH 옥시다아제를 암호화하는 유전자는,

다중 카피 플라스미드 (multi copy plasmid)인 p426GPD 플라스미드에 삽입되어 있고, 프로모터로 *TDH3* 유전자의 프로모터를 사용하는 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애.

#### 청구항 9

아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되어 있고,

아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되어 있으며,

부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되어 있고,

글리세롤 생합성에 관여하는 *GPD1* 유전자 및 *GPD2* 유전자가 제거되고,

NADH 옥시다아제 (NADH oxidase)를 암호화하는 유전자가 도입되며,

자체 보유의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되고,

칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*이 도입된; 재조합 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 포도당이 첨가되어 있는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

제9항에 있어서,

상기 2,3-부탄다이올의 생산방법은,

산소를 지속적으로 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 산소의 지속적 공급은,

발효 중간에 공급되는 산소의 양을 발효 초기에 비해 낮추어 지속적으로 공급하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

**청구항 13**

제9항에 있어서,

상기 배양은,

포도당을 지속적으로 공급하는 유가식 배양인 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 2,3-부탄다이올 생산의 부산물인 글리세롤의 생성이 억제된 2,3-부탄다이올이 생산방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 바이오화확소재 생산 기술이란, 바이오매스를 원료로 하여 각종 화학물질 및 고분자의 원료를 생산하는 기술이다.

[0003] 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol)은 자동차 타이어의 소재가 되는 합성고무 1,3-부타디엔(butadiene)으로 전환 가능한 물질이다. 또한, 탈수소화 과정을 통하여 액체 연료 첨가제인 메틸 에틸 케톤 (methyl ethyl ketone, MEK)의 생산에도 이용될 수 있다. 그 외에 에스테르화 반응을 통하여 제약, 화장품 등에 사용되는 소재로 전환이 가능하다.

[0004] 2,3-부탄다이올을 생물학적 방법을 통하여 생산하고자 할 때, 대사공학기법을 이용하여 2,3-부탄다이올 생산용 균주와 이를 이용한 발효 공정의 개발이 필요하다. 특히, 2,3-부탄다이올의 산업적, 경제적 생산을 위해, 높은 수율, 생산성, 순도로 생산 가능한 균주 개발이 필요하다.

[0005] 미생물 발효를 통한 2,3-부탄다이올 생산은 주로 크렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 등의 박테리아 균주를 이용한 방법이다. 하지만, 이들 박테리아 균주는 대부분 병원성 미생물로 분류되어 안전 및 산업화에 제약이 있다.

[0006] 따라서, 최근에는 GRAS 미생물인 효모를 이용한 2,3-부탄다이올 생산 방법이 개발되었다. 이 기술에서는 효모로부터 에탄올이 생산되는 것을 막고, 2,3-부탄다이올의 생산을 증가시키기 위하여 핵심 유전자인 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase) 유전자를 제거하거나 발현량을 조절하고, 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 도입함으로써, 고농도의 2,3-부탄다이올을 생산하는데 성공하였다.

[0007] 그런데, 상기 2,3-부탄다이올 생산 균주는 2,3-부탄다이올과 함께 부산물로 글리세롤이 생산되며, 발효 산물에 글리세롤이 포함되어 있을 경우 정제 공정상에 추가적인 비용이 발생하는 문제가 있다.

[0008] 따라서, 2,3-부탄다이올을 좀 더 경제적이고, 상업적으로 생산하기 위해서는 글리세롤의 생산이 억제된 2,3-부탄다이올 생산 균주의 개발이 필요하다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2015-0068581호 (공개일자 2015. 06. 22)에는, 2,3-부탄다이올 (2,3-Butanediol)의 생합성 경로가 대사공학적으로 조절된 재조합 효모를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것으로, 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 효소 활성이 억제되고, 2,3-부탄다이올 생합성 관련 외래 유전자와 자일로스 대사 관련 외래 유전자가 도입된 재조합 효모를 이용하여 글루코스 또는 자일로스로부터 2,3-부탄다이올을 고생산성으로 생산할 수 있는 기술이 기재되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산시 발생하는 부산물인 글리세롤의 생산이 억제된 상태에서 2,3-부탄다이올을 고순도, 고생산성으로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산용 사카로마이세스 세레비지에에 있어서, 글리세롤 생합성에 관여하는 *GPD1* 유전자 및 *GPD2* 유전자가 모두 제거되고, NADH 옥시다아제 (NADH oxidase)를 암호화하는 유전자가 도입된 것을 특징으로 하는 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 제공한다. *GPD1* 유전자 및 *GPD2* 유전자를 모두 제거하고, NADH 옥시다아제 (NADH oxidase)를 암호화하는 유전자를 도입하면, 글리세롤의 생산없이 2,3-부탄다이올을 고순도, 고수율, 고생산성으로 생산할 수 있음이 하기 본 발명의 실험을 통해 확인되었다.

[0012] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 사카로마이세스 세레비지에는 다양한 유전적 조작을 통해 2,3-부탄다이올의 생산을 위한 경로가 도입된 사카로마이세스 세레비지애를 의미하는 것으로, 이와 같은 목적으로 그 기재 발된 공지의 균주들 (Ng et al., Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by *in silico* aided metabolic engineering, *Microbial Cell Factories*, 2012, 11:68)을 이용할 수도 있는데, 바람직하게는 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되어 있으며, 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되어 있고, 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되어 있는 것을 사용하는 것이 좋다.

[0013] 이때, 상기 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환하는 것은 바람직하게 알파-아세토락테이트 신타아제 (alpha-acetolactate sythase)를 암호화하는 유전자 *alsS*를 도입함으로써 달성되며, 상기 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환하는 것은 바람직하게 알파-아세토락테이트 데카르복실라아제 (alpha-acetolactate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *alsD*를 도입함으로써 달성되고, 상기 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 하는 것은 바람직하게 사카로마이세스 세레비지에 자체 보유의 2,3-부탄다이올 데하이드로지나아제 (2,3-butanediol dehydrogenase)를 암호화하는 유전자 *BDHI*를 과발현함으로써 달성되는 것이 좋다.

[0014] 한편, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 상기 2,3-부탄다이올 생산용 사카로마이세스 세레비지에는, 자체 보유의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 상실되고, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*이 도입되어 있는 것이 좋다. 이때, 더욱 바람직하게 상기 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능 상실은, 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 일부 과쇄하거나, 전부 제거함으로써 달성되는 것이 좋다. 또한, 상기 피루베이트 데카르복실라아제를 암호화하는 유전자 *PDC1*은, 바람직하게 *GPD2* 프로모터 하에서 발현되는 것이 좋다.

[0015] 사카로마이세스 세레비지에 자체 보유 피루베이트 데카르복실라아제 (Pdc)보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 유래의 Pdc를 균체 내로 도입함으로써, 에탄올 생성이 안 되면서도 아세틸-CoA의 합성은 가능해 균체의 성장속도 및 기질 소모 속도를 증가시킬 수 있고, 궁극적으로 2,3-부탄다이올의 생산성을 크게 향상시킬 수 있기 때문이다 (대한민국 특허출원 제10-2015-0124845호 참조요망).

[0016] 한편, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 상기 NADH 옥시다아제는 바람직하게 락토바실러스 락티스 (*Lactobacillus lactis*) 유래의 NADH 옥시다아제인 것이 좋다.

[0017] 또한, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 상기 NADH 옥시다아제를 암호화하는 유전자는 바람직하게 다중 카피 플라스미드 (multi copy plasmid)인 p426GPD 플라스미드에 삽입되어 있고, 프로모터로 *TDH3* 유전자의 프로모터를 사용하는 것이 좋다. 이와 같은 조건에서 NADH 옥시다아제의 활성이 매우 높게 나타났기 때문이다.

[0018] 한편, 본 발명은 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되어 있고, 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되어 있으며, 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되어 있고, 글리세롤 생합성에 관여하는 *GPD1* 유전자 및 *GPD2* 유전자가 제거되고, NADH 옥시다아제 (NADH oxidase)를 암호화하는 유전자가 도입된; 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 포도당이 첨가되어 있는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법을 제공한다. 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산방법에 의할 경우, 부산물인 글리세롤의 생산 없이 2,3-부탄다이올을 고순도, 고수율, 고생산성으로 생산할 수 있다.

[0019] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올의 생산방법에 있어서, 상기 재조합 사카로마이세스 세레비지에는 바람직하게 자체 보유의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되고, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*이 도입되어 있는 것을 사용하는 것이 좋다.

[0020] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올의 생산방법은, 바람직하게 산소를 지속적으로 공급하면서 수행하는 것이 좋다. 산소가 공급됨으로써, NADH를 소비하게 되어 세포질 내 NADH 농도를 낮출 수 있다. 즉, *GPD1* 및 *GPD2*의 제거로 인해 세포질 내에 쌓인 NADH를 소비할 수 있는 것이다. 이때, 상기 산소의 지속적 공급은 더욱 바람직하게 발효 중간에 공급되는 산소의 양을 발효 초기에 비해 낮추어 지속적으로 공급하는 것이 좋다. 발효 초기엔 세포 성장 및 포도당 소모 속도가 크기 때문에, 세포질 내 공급되는 NADH의 양이 많아 많은 양의 산소를 공급하여 NADH를 소모시켜야 하지만, 발효 초기 이후에는 세포 성장속도 저하 및 포도당 소모 속도가 감소하여 NADH를 소모시키기 위해 필요한 산소의 양이 줄어든다. 이때 과량의 산소가 공급되었을 경우, 2,3-부탄다이올의 산화된 형태인 아세트인이 부산물로 축적될 수 있으므로, 발효 초기 이후에는 산소의 양을 낮추는 것이 좋다.

[0021] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산방법에 있어서, 상기 배양은 바람직하게 포도당을 지속적으로 공급하는 유가식 배양인 것이 좋다. 유가식 배양을 통해 2,3-부탄다이올의 생산량을 극대화할 수 있다.

**발명의 효과**

[0022] 기존의 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (효모)를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산 기술은 2,3-부탄다이올의 생산과 함께 부산물로 글리세롤이 다량 생산되었다. 하지만, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지에 균주를 이용할 경우, 글리세롤의 생산이 억제된 상태에서, 2,3-부탄다이올을 고순도, 고수율, 고생산성로 생산할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0023] 도 1은 NADH 옥시다아제 발현 균주의 *in vitro* 역가 측정 결과로서, Con; BD5\_p426TDH3, G1; BD5\_p406GPD2\_L1nox, C2; BD5\_p426CYC1\_L1nox, T1; BD5\_p406TDH3\_L1nox, G2; BD5\_p426GPD2\_L1nox, T2; BD5\_p426TDH3\_L1nox이다.

도 2는 회분식 배양을 통해 NADH 옥시다아제 발현 균주의 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화를 확인한 결과이다. A; BD5\_p426TDH3 (대조군), B; BD5\_p426TDH3\_L1nox.

도 3은 산소 공급량에 따른 BD5\_Ctnox 균주의 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화를 보여준다. A) 25% 공기 주입, B) 50% 공기 주입, C) 100% 공기 주입.

도 4는 산소 공급량에 따른 세포 내 보효소 NADH 및  $NAD^+$  농도 변화 측정 결과이다.

도 5는 BD5\_Ctnox 균주를 이용한 유가식 배양 프로파일이다.

도 6은 Cas9 발현용 플라스미드의 맵이다.

도 7은 *GPD1* 유전자 제거를 위한 점 돌연변이 (point mutation) 과정을 보여주는 모식도이다.

도 8은 *GPD2* 유전자 제거를 위한 점 돌연변이 과정을 보여주는 모식도이다.

도 9는 활성이 제거된 *GPD1* 유전자 서열을 보여주는데, 밑줄 부분은 돌연변이된 부분을 나타낸다.

도 10은 활성이 제거된 *GPD1* 유전자 서열을 보여주는데, 밑줄 부분은 돌연변이된 부분을 나타낸다.

도 11은 *GPD* 유전자 제거 균주의 발효 프로파일이다. A, BD5\_p426TDH3\_L1nox; B, BD5\_T2nox\_dGPD1; C, BD5\_T2nox\_dGPD2; D, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2.

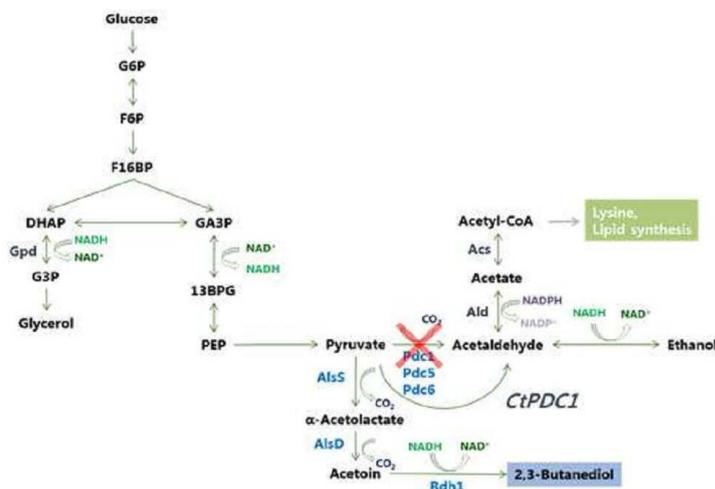
도 12는 BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주를 이용한 고농도 2,3-부탄다이올 생산 발효 프로파일이다. A, 회분식 배양; B, 유가식 배양.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0024] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0025] 기존 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지에 균주는 2,3-부탄다이올 생합성 경로 도입을 위해, 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래의 알파-아세토락테이트 신타아제 (alpha-acetolactate synthase, *alsS*), 알파-아세토락테이트 데카르복실라아제 (alpha-acetolactate decarboxylase, *alsD*)가 도입되고, 효모 자체의 2,3-부탄다이올 데하드로지나아제 (2,3-butanediol dehydrogenase, *Bdh1*) 유전자가 과발현되는 것을 기본으로 하는데, 본 발명자는 이와 같은 기본 2,3-부탄다이올 생성 균주에, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주가 자체 보유하고 있는 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase, *Pdc*) 유전자 *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*가 과쇄된 균주('BD5' 균주)를 개발한 바 있고, 더 나아가 자체 보유 *Pdc*보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 암호화하는 유전자 *PDC1*이 도입된 균주('BD5\_G1CtPDC1' 균주)를 개발한 바 있다 (하기참고도 1).

[0026] [참고도 1]



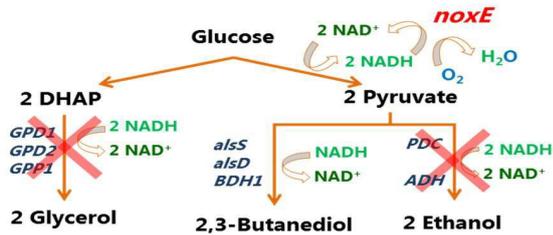
[0027]

[0028] 그런데, 본 발명에서는 상기 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주에 추가로 락바실러스 락티스 (*Lactobacillus lactis*) 유래의 NADH 옥시다아제 (NADH oxidase, *NoxE*) 유전자를 발현하였고, 글리세롤 생합성 (glycerol biosynthesis)에 관여하는 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *GPD1*, *GPD2*) 유전자를 과쇄함으로써, 새롭게 제작된 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주를 제작하였다 (하기 참고도 2).

[0029] NADH를 보조소로 사용하여 글리세롤 생합성에 관여하는 *GPD1* 또는 *GPD2* 유전자를 제거할 경우, 글리세롤 생산량이 감소할 수는 있으나, NADH가 소비되지 못하여, 세포질 내에 NADH가 축적되고, 이로 말미암아 균주가 원활히 성장하지 못하는 문제가 발생한다. 하지만, 본 발명에서는 NADH를 산화시킬 수 있는 NADH 옥시다아제가 과발현되어 있기 때문에 NADH를 소비할 수 있다.

[0030] 따라서, 본 발명에서는 *GPD1*과 *GPD2* 유전자 모두를 제거하여 글리세롤의 생산을 완전히 억제시키면서도, 2,3-부탄다이올을 고순도, 고수율, 고생산성을 생산할 수 있는 것이다. (참고도 2).

[0031] [참고도 2]



[0032]

[0033] 한편, 본 발명에서는, 본 발명에서 구축한 NADH 옥시다아제 도입 균주가 배양기 내로 공급되는 산소량에 따라 활성도가 조절되고, 2,3-부탄다이올 생산량에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한, 당농도 및 산소공급 조절 등의 배양공정 최적화를 통하여 고농도/고수율/고생산성의 2,3-부탄다이올 생산 기술을 개발하였다.

[0034] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0035] [실시예 1: NADH 옥시다아제 발현 균주 제작]

[0036] 본 발명자들의 선행 연구(대한민국 특허공개번호 제10-2015-0068581호, 대한민국특허출원 제10-2015-0124845호)에서 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주가 제작되었으며, 본 발명자는 이 균주를 모균주('BD5' 균주)로 하여 진행하였다. 모균주는 사카로마이세스 세레비지에 (*S. cerevisiae*) 균주에 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase, Pdc) 유전자 *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*가 제거되었으며, 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래의 알파-아세트락테이트 신타아제 (alpha-acetolactate synthase, AlsS)와 알파-아세트락테이트 데카르복실라아제 (alpha-acetolactate decarboxylase, AlsD) 그리고 사카로마이세스 세레비지에의 2,3-부탄다이올 데하이드로지나아제 (2,3-butanediol dehydrogenase, Bdh1)가 도입 또는 강화되어, 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 형성되어 있다.

[0037] 한편, 상기 모균주에 추가로 NADH 옥시다아제를 도입하기 위해 발현용 플라스미드 제작 및 유전자 클로닝을 진행하였다. 발현을 위하여 총 5종의 발현용 플라스미드를 제작하였다.

[0038] 단일 카피 플라스미드 (single copy plasmid)인 pRS406 (Mumberg et al., Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156 (1), 119-122) 플라스미드의 *SacI*, *BamHI* 제한효소 자리에 사카로마이세스 세레비지에의 *GPD2* 유전자 프로모터 1144 bp, *SacI*, *XbaI* 제한효소 자리에 *TDH3* 유전자 프로모터 655 bp를 삽입하였다.

[0039] 또한, 다중 카피 플라스미드 (multi copy plasmid)인 p426GPD 플라스미드 (Mumberg et al., Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156 (1), 119-122)의 *SacI*, *BamHI* 자리에 사카로마이세스 세레비지에 *CYC1* 유전자 프로모터 289 bp, *GPD2* 유전자 프로모터 1144 bp, *SacI*, *XbaI* 자리에 *TDH3* 유전자 프로모터 655 bp를 삽입하였다.

[0040] 이렇게 제작된 총 5종의 발현용 플라스미드 (p406GPD2, p406TDH3, p426CYC1, p426GPD2, p426TDH3)에 락토바실러스 락티스 서브스페시 크레모리스 (*Lactobacillus lactis* subsp. cremoris) MG1363균주로부터 PCR 방법을 통하여 클로닝 한 NADH 옥시다아제 유전자 (서열번호 1)를 삽입하였다.

[0041] 이와 같은 과정을 통하여 NADH 옥시다아제가 발현된 2,3-부탄다이올 생산 균주 5종 (BD5\_p406GPD2\_L1nox, BD5\_p406TDH3\_L1nox, BD5\_p426CYC1\_L1nox, BD5\_p426GPD2\_L1nox, BD5\_p426TDH3\_L1nox)을 제작하였다.

[0042] 또한, 선행 연구에서 Pdc-결여 효모 균주의 포도당 소모 속도 및 세포 성장 속도를 증가시키는데 사용된 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase) 유전자를 도입하였다. 이를 위하여 항생제인 아우레오바시딘 A (aureobasidin A)에 대해 저항성 유전자를 가지는 단일 카피 플라스미드로 *TDH3* 프로모터와 *CYC1* 터미네이터를 이용하여 NADH 옥시다아제를 발현하였고, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase, CtPDC1)를 *GPD2* 프로모터 하에서 발현시켰다. 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase, CtPDC1)를 암호

화하는 유전자는 서열번호 2에 기재하였다.

[0043] 상기의 과정으로부터, NADH 옥시다아제와 피루베이트 데카르복실라아제가 동시에 발현된 BD5\_Ctnox 균주를 구축할 수 있었다.

**표 1**

[0044] NADH 옥시다아제 발현 플라스미드 구축을 위해 사용한 프라이머

Primers	Restriction site	Sequence
Cloning of <i>S.cerevisiae</i> promoters		
F_CYC1P	<b>SacI</b>	cGAGCTCatttggcgagcgttg
R_CYC1P	<b>BamHI</b>	cgcGGATCCttagtgtgtgtattgtgtttgc
F_GPD2P	<b>SacI</b>	cGAGCTCaaaaacgacatatctattatagtg
R_GPD2P	<b>BamHI</b>	cgcGGATCCctttgagtgagttgtgttt
Cloning of <i>L.lactis noxE</i>		
F_nox	<b>BamHI</b>	cgcGGATCCaaaatgaaaatcgtagttatcggta
R_XhoI_nox	<b>XhoI</b>	cggCTCGAGttttatttggcattcaaagct
R_SalI_nox	<b>SalI</b>	acgcGTCGACtttatttggcattcaaagct

[0045] *CYC1* 프로모터는 서열번호 3에 기재하였고, *GPD2* 프로모터는 서열번호 4에 기재하였으며, *TDH3* 프로모터는 서열번호 5에 기재하였다.

[실시예 2: NADH 옥시다아제가 발현된 균주의 *in vitro* 효소 역가 측정]

[0047] 실시예 1에서 제작한 NADH 옥시다아제 발현용 플라스미드는 서로 다른 활성도를 가질 수 있도록 설계하였다. 따라서, 제작한 균주의 실제 NADH 옥시다아제의 발현량을 비교하기 위하여 *in vitro* 효소 역가 측정을 진행하였다.

[0048] YNB 배지 (Yeast nitrogen base 6.7 g/L, amino acid mixture 1.4 g/L)에 80 g/L의 포도당과 0.5 g/L의 에탄올이 포함된 배지에서 배양한 약  $1 \times 10^9$ 의 대수증식기의 세포를 이용하였다.

[0049] 'Yeast Protein Extraction Reagent(Y-PER, Thermo Scientific, MA)'를 이용하여 세포 내 효소를 추출한 후 상등액을 NADH 옥시다아제의 측정에 이용했다. NADH 옥시다아제 측정은 30°C에서 진행하였고, 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼 (pH 7.0)에 0.4 mM NADH, 0.3 mM EDTA가 포함된 조건에서 반응을 하여 340 nm에서 감소한 흡광도를 이용하여 측정하였다. 조 추출물 내의 단백질 농도는 'bradford' 방법을 통하여 측정하였다. 1 unit은 분당 산화되는 1 μmol의 NADH로 표시하였다.

[0050] 실험 결과, 도 1과 같이, 발현에 사용된 프로모터와 카피 수에 따라서 다른 NADH 옥시다아제 활성도를 나타내었다. 대조군은 BD5 균주 (Kim et al., Expression of *Lactococcus lactis* NADH oxidase increases 2,3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*, Bioresource Technology 191 (2015) 512-519)에, p426TDH3 공백터가 삽입된 균주를 이용하였다. 대조군의 경우 4.8 mU/mg protein의 활성도를 나타낸 것에 비하여, BD5\_p406GPD2\_Llnox 균주의 경우 11.2 mU/mg protein의 활성도를 나타내었고, BD5\_p426TDH3\_Llnox 균주의 경우, BD5\_p406GPD2\_Llnox 균주에 비하여 약 900배 향상된 9153 mU/mg protein의 활성도를 나타내었다.

[0051] 도 1은 NADH 옥시다아제 발현 균주의 *in vitro* 역가 측정 결과로서, Con; BD5\_p426TDH3, G1; BD5\_p406GPD2\_Llnox, C2; BD5\_p426CYC1\_Llnox, T1; BD5\_p406TDH3\_Llnox, G2; BD5\_p426GPD2\_Llnox, T2; BD5\_p426TDH3\_Llnox이다.

[실시예 3: NADH 옥시다아제 활성도에 따른 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화 확인]

[0053] Pdc-결여 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주는, 당으로부터 2,3-부탄다이올을 생산할 때 세포질 내에 NADH가 축적되는데, 이를 호흡을 통하여 산화하는 것은 제한적이며, 이로 말미암아 과량의 글리세롤이 부산물로

생성된다.

[0054] 따라서, 본 발명에서는 NADH 옥시다아제를 도입하여 추가로 NADH를 산화할 수 있는 경로를 도입하고자 하였다. 이와 같은 예측이 성공할 경우, 부산물인 글리세롤의 축적을 감소시키고, 2,3-부탄다이올의 생산량을 증가시킬 수 있을 것이다.

[0055] 이를 확인하기 위하여 회분식 발효 실험을 진행하였다. YNB에 초기 포도당 80 g/L와 0.5 g/L의 에탄올이 있는 배지를 사용하였고, 발효 온도는 30℃로 유지하였다. 250 mL 플라스크에서 50 ml 워킹 볼륨 (working volume)으로 80 rpm 속도로 교반하였다. 초기 세포 접종 농도는 600 nm 파장에서의 OD (optical density)값이 1.0이었다.

[0056] 실험 결과는 도 2 및 표 2와 같이 나타났다. 대조군과 실험군 모두 약 76 시간 이내에 80 g/L의 포도당을 모두 소모하였다. 대조군의 경우 글리세롤의 생산 수율이 0.278 g<sub>Glycerol</sub>/g<sub>Glucose</sub>인 것에 반해, BD5\_p426TDH3\_Llnox 균주의 경우, 0.209 g<sub>Glycerol</sub>/g<sub>Glucose</sub>로 감소하였다. 이와 함께 2,3-부탄다이올 생산 수율이 대조군의 경우, 0.332 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/g<sub>Glucose</sub>인 것에 반해, BD5\_p426TDH3\_Llnox 균주의 경우, 0.367 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/g<sub>Glucose</sub>로 증가하였다. 이와 같이 NADH 옥시다아제의 발현을 통하여 글리세롤의 생산수율이 감소하였고, 2,3-부탄다이올의 생산수율이 증가하였다. 이때, NADH 옥시다아제 발현량이 증가할수록 그 효과도 증대하였다.

[0057] 도 2는 회분식 배양을 통해 NADH 옥시다아제 발현 균주의 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화를 확인한 결과이다. A; BD5\_p426TDH3 (대조군), B; BD5\_p426TDH3\_Llnox.

**표 2**

[0058] NADH 옥시다아제 발현 균주를 이용한 회분식 발효 결과

Parameter *	Value (mean ± standard deviation)					
	BD5_p426TDH3	BD5_p406GPD2_Llnox	BD5_p426CYC1_Llnox	BD5_p406TDH3_Llnox	BD5_p426GPD2_Llnox	BD5_p426TDH3_Llnox
DCW (g/L)	2.09 ±0.10	1.93 ±0.07	1.74 ±0.11	1.55 ±0.09	1.68 ±0.04	1.69 ±0.03
Y <sub>glycerol</sub> (g/g)	0.278 ±0.011	0.266 ±0.010	0.229 ±0.001	0.231 ±0.005	0.216 ±0.009	0.209 ±0.004
Y <sub>2,3-BD</sub> (g/g)	0.332 ±0.000	0.338 ±0.001	0.359 ±0.000	0.359 ±0.001	0.364 ±0.003	0.367 ±0.002
Y <sub>acetoin</sub> (g/g)	0.010 ±0.001	0.009 ±0.001	0.012 ±0.001	0.011 ±0.001	0.010 ±0.000	0.012 ±0.001
V <sub>glucose</sub> (g/L · h <sup>-1</sup> )	1.10 ±0.03	1.11 ±0.02	1.06 ±0.01	1.13 ±0.00	1.07 ±0.02	1.10 ±0.00
P <sub>2,3-BD</sub> (g/L · h <sup>-1</sup> )	0.364 ±0.011	0.374 ±0.008	0.381 ±0.003	0.404 ±0.002	0.391 ±0.006	0.403 ±0.002

[0059] [실시예 4: 산소 공급 차이에 의한 2,3-부탄다이올 발효 양상의 변화 확인]

[0060] 본 연구에서 사용한 NADH 옥시다아제는 산소를 기질로 하여 NADH와 반응하고 물과 NAD<sup>+</sup>를 생성한다. 따라서, NADH 옥시다아제 효소 발현량을 조절하는 것과 함께, 발효 중인 배지 내부로 공급하는 산소량을 통하여 NADH 옥시다아제의 활성도를 조절할 수 있다.

[0061] 본 실시예에서는 산소의 공급에 따라 NADH 옥시다아제의 활성도가 변화하고 이것이 2,3-부탄다이올 발효에 미치는 영향을 확인하기 위하여 산소 조건을 다르게 한 회분식 배양 실험을 실시하였다.

[0062] 배지는 YP (Yeast extract 10 g/L, Peptone 20 g/L)에 90 g/L의 포도당이 포함되어있는 배지를 이용하였다. 배지 내로 공급되는 공기에 질소 섞어 줌으로써 25%, 50%, 100% 공기가 유입되도록 산소 공급 조건을 달리하였다. 발효 온도는 30도로 유지하였고 2 vvm으로 공기 및 공기/질소 혼합가스를 주입하였으며, 500 rpm으로 교반하였다. 1 L 크기의 발효기를 이용하였고, 워킹 볼륨 (working volume)은 500 mL이었다. 균주는 BD5\_Ctnox

균주를 이용하였다.

[0063] 실험 결과는 표 3 및 도 3과 같이 나타났다. 표 3과 같이 공급하는 산소량에 따라 2,3-부탄다이올 생산 양상이 바뀌었다. 산소 공급량을 증가할수록, 글리세롤 생산량이 감소하였고, 아세토인의 생산량이 증가하였다. 2,3-부탄다이올의 생산 수율은 50%의 공기가 포함된 조건에서 가장 큰 값을 나타내었다. 세포 성장량은 세 조건에서 큰 차이를 보이지 않았지만, 100% 공기를 주입한 조건에서는 다른 두 조건에 비하여 포도당 소모 속도가 감소하는 것으로 나타났다.

[0064] 도 3은 산소 공급량에 따른 BD5\_Ctnox 균주의 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화를 보여준다. A) 25% 공기 주입, B) 50% 공기 주입, C) 100% 공기 주입.

**표 3**

[0065] 산소 공급량에 따른 BD5\_Ctnox 균주의 2,3-부탄다이올 발효 양상 변화

Parameters	DCW <sub>max</sub>	Glycerol	Acetoin	2,3-BD	Glycerol yield	2,3-BD Yield	2,3-BD productivity
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/g)	(g/L · h <sup>-1</sup> )
25%	3.0	19.2	2.0	31.4	0.216	0.363	1.42
50%	3.3	11.3	2.2	33.1	0.128	0.374	1.44
100%	3.4	3.7	14.2	17.7	0.050	0.237	0.71

[0066] [실시예 5: 산소 공급량에 따른 세포 내 NADH/NAD<sup>+</sup> 보효소 농도 변화 측정]

[0067] 실시예 4에서 취득한 20시간째의 세포를 이용하여 세포 내의 NADH 및 NAD<sup>+</sup> 농도를 측정하였다. 약 4 × 10<sup>7</sup> 개의 세포를 측정에 사용하였고, NAD<sup>+</sup>/NADH 측정용 kit (BioAssay Systems, CA)를 이용하여 측정하였다.

[0068] 실험 결과는 도 4와 같았다. 도 4에서 보듯이 25%의 공기 비율이었을 경우에 비하여, 100%의 공기 비율 일 경우에 NADH의 농도가 감소하고, NAD<sup>+</sup> 농도가 증가하였다. 즉, 산소 공급이 증가할수록 세포 내 NADH 옥시다 아제의 활성이 증가하며, 이것이 직접적으로 세포 내의 NADH에 작용하여 NADH를 산화하는 반응을 진행했음을 알 수 있었다.

[0069] 도 4는 산소 공급량에 따른 세포 내 보효소 NADH 및 NAD<sup>+</sup> 농도 변화 측정 결과이다.

[0070] [실시예 6: 유가식 배양 공정의 산소 공급 조절을 통한 고농도 고생산성 2,3-부탄다이올 발효]

[0071] BD5\_Ctnox 균주가 2,3-부탄다이올 대량 생산용 균주로 이용 가능성을 판단하기 위하여 발효 중간에 포도당을 첨가하는 유가식 배양을 수행하였다. NADH 옥시다아제의 활성을 조절하여 글리세롤의 생산량을 줄이고 2,3-부탄다이올의 생산량을 최대화하기 위하여 발효 중간 산소 공급량을 전환하였다. 배지는 YP 배지를 사용하였고, 초기 포도당 농도는 330 g/L이며, 발효 중반에 800 g/L의 포도당 용액을 추가하였다. 초기 세포 집중 농도는 2.0 g/L 였고, 발효 온도는 30도로 유지하였다. 처음부터 발효 중반까지 2 vvm, 500 rpm의 조건으로 산소를 공급하였고, 이후에는 1 vvm, 200 rpm의 조건으로 산소를 공급하였다. 그 결과, 78시간의 배양 시간 끝에 154.3 g/L의 2,3-부탄다이올을 생산하여 생산성은 1.98 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/L/h였다 (도 5 및 표 4 참조). 이때, 2,3-부탄다이올 생산 수율은 0.404 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/g<sub>Glucose</sub>였다.

[0072] 도 5는 BD5\_Ctnox 균주를 이용한 유가식 배양 프로파일이다.

**표 4**

[0073] BD5\_Ctnox 균주를 이용한 유가식 배양 결과

Parameters	DCW <sub>Max</sub>	Glucose consumed	Glycerol	2,3-BD	Ethanol	Glycerol yield	2,3-BD yield	2,3-BD productivity
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/g)	(g/L · h <sup>-1</sup> )
BD5_Ctnox	6.2	404.3	32.5	154.3	0.1	0.088	0.404	1.98

[0074] [실시예 7: GPD1, GPD2이 제거된 2,3-부탄다이올 생산용 균주 제작]

[0075] 사카로마이세스 세레비지에에서 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Gpd)는 글리세롤 생산을 위한 핵심적인 대사 효소이며, GPD1, GPD2 유전자에 의하여 발현된다.

[0076] 본 발명에서는 2,3-부탄다이올 생산시, 발생하는 글리세롤을 완전히 억제하기 위하여 GPD1 및 GPD2 유전자를 제거한 재조합 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주를 구축하였다. 이를 위해 Cas9-CRISPR 방법을 적용하였고, GPD1과 GPD2 유전자의 ORF 중간의 코돈을 종결 코돈으로 전환하는 방법으로 GPD1과 GPD2의 유전자 활성을 제거하였다. Cas9-CRISPR 방법을 적용하기 위하여 아우레오바시딘 A (Aureobasidin A) 항생제에 대해 내성을 가진 AUR1-C 유전자가 포함된 플라스미드에 Cas9 유전자 서열을 넣어 효모에 발현시켰고, GPD1, GPD2 각각의 돌연변이 부분을 목표로 하는 guide DNA와 repair DNA를 NADH 옥시다아제가 발현된 2,3-부탄다이올 생산 균주에 형질전환하여 GPD1, GPD2의 활성이 제거된 균주 BD5\_T2nox\_dGPD1, BD5\_T2nox\_dGPD2, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2를 제작하였다.

[0077] 또한, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주에 GPD2 프로모터에 의해 발현된 캔디다 트로피칼리스 (Candida tropicalis) 유래 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)를 도입하여 BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2-CtPDC1 균주를 제작하였다.

[0078] 도 6은 Cas9 발현용 플라스미드의 맵이다. 도 7은 GPD1 유전자 제거를 위한 점 돌연변이 (point mutation) 과정을 보여주는 모식도이다. 도 8은 GPD2 유전자 제거를 위한 점 돌연변이 과정을 보여주는 모식도이다. 도 9는 활성이 제거된 GPD1 유전자 서열을 보여주는데, 밑줄 부분은 돌연변이된 부분을 나타낸다. 도 10은 활성이 제거된 GPD1 유전자 서열을 보여주는데, 밑줄 부분은 돌연변이된 부분을 나타낸다.

[0079] [실시예 8: NADH 옥시다아제 활성이 없는 GPD1 및 GPD2 제거 균주의 제작]

[0080] 실시예 7에서 제작한 BD5\_T2nox\_dGPD1, BD5\_T2nox\_dGPD2, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주에서 NADH 옥시다아제 발현 플라스미드를 제거하는 방법으로 NADH 옥시다아제 활성이 없는 2,3-부탄다이올 생산 균주를 제작하고자 하였다.

[0081] 이를 위하여 BD5\_T2nox\_dGPD1, BD5\_T2nox\_dGPD2, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주를 NADH 옥시다아제 발현 플라스미드의 마커(marker)인 우라실(uracil)이 포함된 배지에서 반복 계대 배양하였고, 우라실이 포함된 배지와 우라실이 포함되지 않은 배지에 리플리카 플레이팅 (replica plating)을 통하여 NADH 옥시다아제 플라스미드가 제거된 균주를 선별하였다.

[0082] 그 결과, BD5\_T2nox\_dGPD1 균주의 경우, 총 16개의 균주 중 5개의 균주에서 NADH 옥시다아제가 제거되었고, BD5\_T2nox\_dGPD2 균주의 경우 총 16개의 균주 중 6개의 균주에서 NADH 옥시다아제가 제거된 것을 확인하였다 (표 5 및 도 11).

[0083] 하지만, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주의 경우, 총 120개의 균주에서 NADH 옥시다아제가 제거된 균주를 얻을 수 없었다. 이는 NADH 옥시다아제가 Pdc-결여 Gpd-결여 2,3-부탄다이올 효모 균주가 성장하는 데 필수적인 효소임을 뜻한다. NADH 옥시다아제는 GPD 유전자의 제거로 인하여 발생하는 추가의 NADH를 NAD<sup>+</sup>로 산화하는 역할을 함으로써, 이 재조합 균주가 성장할 수 있도록 하는 것으로 최종 결론을 내릴 수 있었다. 도 11은 BD5\_T2nox\_dGPD1, BD5\_T2nox\_dGPD2, BD5\_T2nox\_dGPD1\_dGPD2 균주의 플라스미드 큐어링 (plasmid curing) 실험 결과이다.

표 5

[0084] BD5\_T2nox\_dGPD1, BD5\_T2nox\_dGPD2, BD5\_T2nox\_dGPD1\_dGPD2 균주의 플라스미드 큐어링 (plasmid curing) 실험 결과

Strains	Ura- cell / Total cells	
BD5_T2nox_dGPD1	5/16	-
BD5_T2nox_dGPD2	6/16	-
BD5_T2nox_dGPD1_dGPD2	0/24	0/96

[0085] [실시예 9: GPD가 제거된 균주를 이용한 2,3-부탄다이올 발효]

[0086] 실시예 7에서 제작된 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주를 이용하여 회분식 배양을 실시하였다. YP배지를 이용하였고, 초기 100 g/L의 포도당과 0.7 g/L의 에탄올을 탄소원으로 공급하였다. 접종세포 농도, 배양온도, 배양조건 등은 실시예 3과 동일하게 하였다.

[0087] 배양 결과, 글리세롤 수율의 경우, 대조군의 0.166 g<sub>Glycerol</sub>/g<sub>Glucose</sub>에서 GPD1을 제거한 균주는 0.086 g<sub>Glycerol</sub>/g<sub>Glucose</sub>로 감소하였고, GPD2를 제거한 균주는 0.083 g<sub>Glycerol</sub>/g<sub>Glucose</sub>로 감소하였다. 또한, GPD1과 GPD2 모두를 제거한 균주의 경우, 글리세롤이 관찰되지 않았으며, 2,3-부탄다이올의 수율이 대조군에 비하여 10% 증가한 0.363 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/g<sub>Glucose</sub>를 나타내었다 (도 11, 표 6).

[0088] 도 11은 GPD 유전자 제거 균주의 발효 프로파일이다. A, BD5\_p426TDH3\_L1nox; B, BD5\_T2nox\_dGPD1; C, BD5\_T2nox\_dGPD2; D, BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2.

표 6

[0089] GPD 유전자 제거 균주의 발효 결과

Parameters	DCW <sub>max</sub>	Glycerol	Acetoin	2,3-BD	Glycerol yield	2,3-BD yield	2,3-BD productivity
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/g)	(g/L · h <sup>-1</sup> )
BD5_T2nox	1.3	15.7	1.9	31.5	0.166	0.333	0.33
BD5_T2nox_dGPD1	1.1	6.4	5.6	22.3	0.086	0.302	0.19
BD5_T2nox_dGPD2	1.1	6.4	5.1	24.3	0.083	0.317	0.20
BD5_T2nox_dGPD1_dGPD2	1.0	0	1.7	16.5	0	0.363	0.14

[0090] [실시예 10: 회분식, 유가식 배양방법과 산소 공급 조절을 통한 고농도 고생산성 2,3-부탄다이올 생산]

[0091] 실시예 9에서 제작한 2,3-부탄다이올 생산 균주의 산업적 응용 가능성을 알아보기 위하여 회분식, 유가식 배양방법을 통하여 고농도 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 균주는 BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2\_CtPDC1를 이용하였고, 초기 세포 접종 농도는 3.4 gDCW/L였다. 발효 온도는 30℃를 유지하였다. YP배지에 회분식 배양의 경우, 초기 300 g/L의 포도당을 넣어주었고, 유가식 배양의 경우, 100 g/L의 포도당을 넣고, 발효 중반에 150 g/L의 포도당을 추가하였다. 발효 초기 산소 공급은 2 vvm, 400 rpm으로 해 주었고, 발효 중반에 산소 공급을 1 vvm, 200 rpm과 2 vvm 300 rpm으로 낮추어 주었다.

[0092] 실험 결과는 도 12 및 표 7과 같았다.

[0093] 회분식 배양의 결과, 300 g/L의 포도당 중 237.9 g/L의 포도당을 소모하였으며, 이로부터 99.4 g/L의 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 이때, 2,3-부탄다이올 수율은 0.418 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/g<sub>Glucose</sub>였으며, 생산성은 0.62 g<sub>2,3-Butanediol</sub>/L/h였다.

[0094] 유가식 배양의 결과, 70시간의 배양 동안 108.6 g/L의 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 이때, 2,3-부탄다이올 수율은 0.495로, 이론 수율의 99%의 값을 나타내었다. 글리세롤, 아세트산, 에탄올의 부산물은 전혀 생성되지 않았으며, 아세트오인이 3.5 g/L 생산되었다. 유가식 배양을 통하여 Gpd가 제거된 균주의 고농도의 포도당에 의한 저해 효과를 최소화하여, 2,3-부탄다이올 생산성을 향상시킬 수 있었다. 또한, 배지 내로 공급되는 산소의 양을 통해 NADH 옥시다아제 활성을 조절하여 균주의 성장을 돕고 아세트오인의 부산물 생성을 최소화할 수 있었다.

[0095] 도 12는 BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주를 이용한 고농도 2,3-부탄다이올 생산 발효 프로파일이다. A, 회분식 배양; B, 유가식 배양.

표 7

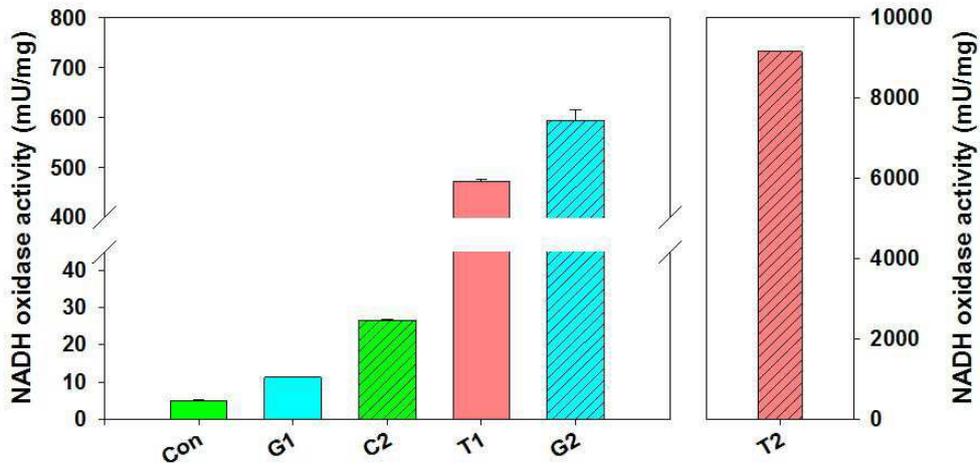
[0096]

BD5\_T2nox\_dGPD1dGPD2 균주의 고농도 2,3-부탄다이올 생산 발효 결과

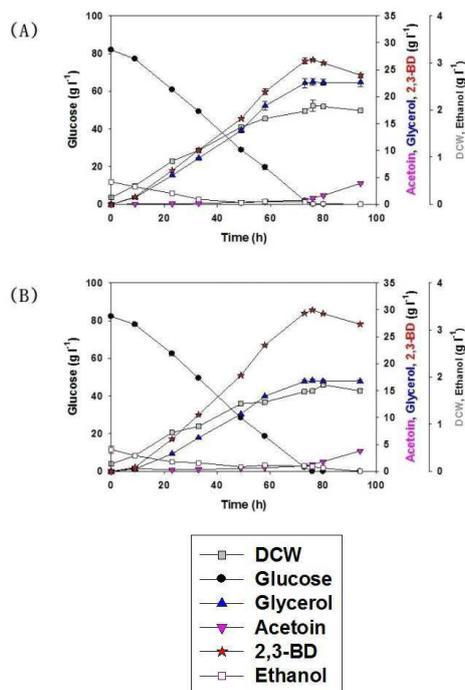
Condition	Glucose consumed	Glycerol	Acetoin	2,3-BD	Acetate	Ethanol	Glycerol yield	2,3-BD yield	2,3-BD productivity
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/g)	(g/L · h <sup>-1</sup> )
Batch	237.9	0.5	11.3	99.4	1.3	0.2	0.002	0.418	0.62
Dumping	235.1	0.2	3.5	108.6	0.1	0	0.001	0.495	1.55

도면

도면1

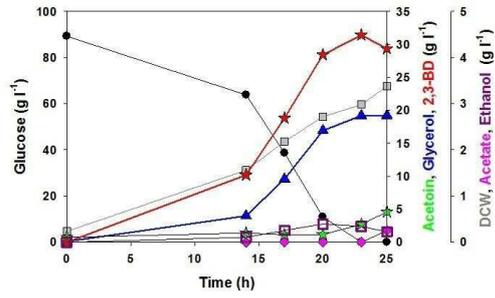


도면2

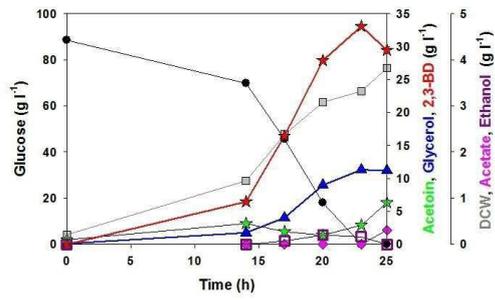


도면3

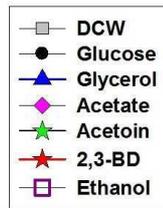
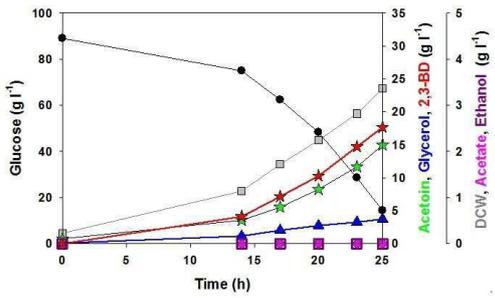
A)



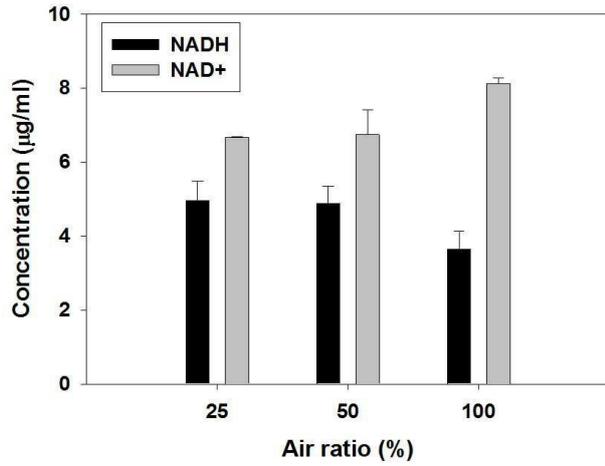
B)



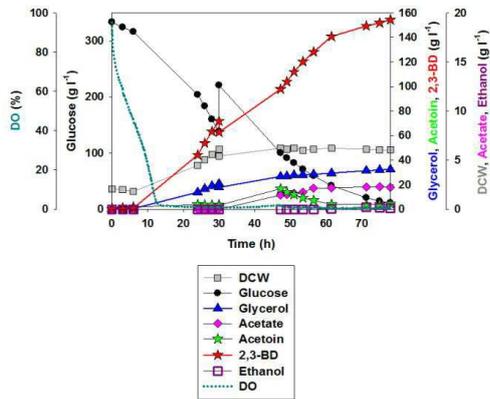
C)



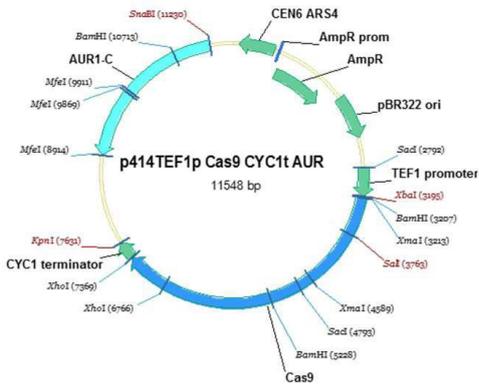
도면4



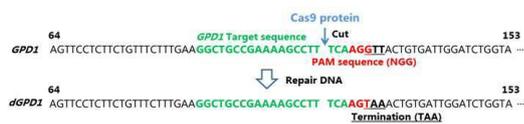
도면5



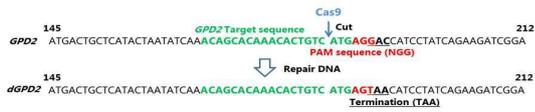
도면6



도면7



도면8



도면9

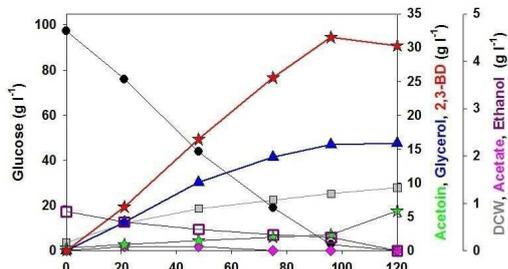
ATGCTGCTGCTGCTGATAGATTAAACTTAACTCCGGCCACTTGAATGCTGGTAGAAAGAGAAGTTCCTCTT  
 CTGTTTCTTTGAAGGCTGCCGAAAAGCCTTCAAGTAACTGTGATTGGATCTGGTAACTGGGGTACTACTA  
 TTGCCAAGGTGGTTGCCGAAAATGTAAAGGGATACCCAGAAGTTTTCGCTCCAATAGTACAAATGTGGGTG  
 TCGAAGAAGAGATCAATGTTGAAAAATGACTGAAATCATAAATACTAGACATCAAAACGTGAAATACTTGC  
 CTGGCATCACTTACCCGACAATTTGGTTGCTAATCCAGACTTGATTGATTCAGTCAAGGATGTCGACATCAT  
 CGTTTTCAACATTCCACATCAATTTTGCCTCGTATCTGTAGCCAATTGAAAGGTCATGTTGATTCACACGTCA  
 GAGTATCTCCTGTCTAAAGGTTTTGAAGTTGGTGCTAAAGGTGCCAATTGCTATCCTCTTACATCACTGA  
 GGAAGTACTGATTCAATGTGGTCTCTATCTGGTGCTAACATTGCCACCGAAGTCGCTCAAGAACACTGGTC  
 TGAAACAACAGTTGCTTACCACATTCCAAAGGATTCAGAGGGCAGGGCAAGGACGTCGACCATAAGGTT  
 CTAAGGCCCTTGTCCACAGACCTTACTTCCACGTTAGTGTCTCGAAGATGTTGCTGGTATCCTCATCTGTGG  
 TGCTTTGAAGAAGCTTGTTCCTTAGGTTGGTTCGTCGAAGGTCAGGCTGGGGTAACAACGCTTCTGC  
 TGCCATCCAAAGAGTCGGTTTTGGGTGAGATCATCAGATTCGGTCAAATGTTTTCCAGAATCTAGAGAAGA  
 AACATACTACCAAGAGTCTGCTGGTGTGCTGATTTGATCACCACCTGCGCTGGTGGTAGAAAACGTC AAGG  
 TGCTAGGCTAATGGCTACTTCTGTAAGGACGCCTGGGAATGTGAAAAGGAGTTGTTGAATGGCCAATCCG  
 CTAAGGTTTAAATACCTGCAAAAGAGTTACGAATGTTGGAAAACATGTGGCTCTGTCGAAGACTTCCCAT  
 TATTTGAAGCCGTATACCAATCGTTTACAACAACCTCCAATGAAGAACCTGCCGGACATGATTGAAGAAT  
 TAGATCTACATGAAGATTAG

도면10

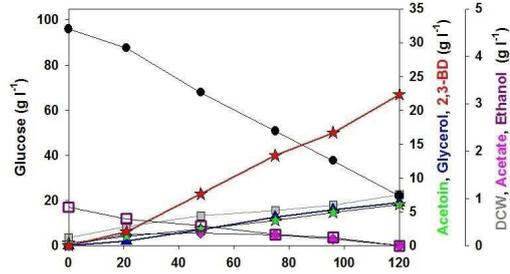
ATGCTTGCTGTCAGAAGATTAACAAGATACACATTCCTTAAGCGAACGCATCCGGTGTATATACTCGTCGTG  
 CATATAAAATTTGCTTCAAGATCTACTTTCTTAAGAAGATCATTATTACAACACAACCTGCACTCAAAGAT  
 GACTGCTCATACTAATATCAAACAGCACAAACACTGTCATGAGTAACTCCTATCAGAAGATCGGACTCTGC  
 CGTGCAATTGTACATTTGAAACGTGCGCCCTTCAAGGTTACAGTGATTGGTTCTGGTAACTGGGGACCAC  
 CATCGCCAAAGTCATTGCGGAAAACACAGAATTGCATTCCTATCTTCGAGCCAGAGGTGAGAATGTGGG  
 TTTTGTGAAAAGATCGGCGACGAAAATCTGACGGATATCATAAATACAAGACCCAGAACGTTAAATATC  
 TACCAATATTGACCTGCCCATAACTAGTGGCCGATCCTGATCTTTTACATCCATCAAGGGTGTGACATC  
 CTTGTTTTCAACATCCCTCATCAATTTTACCAAAACATAGTCAAACAATTGCAAGGCCACGTGGCCCTCATG  
 TAAGGGCCATCTCGTGTCTAAAAGGGTTGAGTTGGGCTCCAAGGGTGTGCAATTGCTATCCTCCTATGTTAC  
 TGATGAGTTAGGAATCCAATGTGGCGCACTATCTGGTCAAACCTGGCACCGGAAGTGGCCAAGGAGCATT  
 GGTCCGAAACCCAGTGGCTTACCAACTACCAAAGGATTATCAAGGTGATGGCAAGGATGTAGATCATAAG  
 ATTTTGAATGTCTGTCCACAGACCTTACTTCCACGTCATGTCATCGATGATGTTGCTGGTATATCCATTGCC  
 GGTGCCTTGAAGAAGCTGCTGGCACTTGCATGTGTTTCGTAGAAGGTATGGGATGGGTAACAATGCCTCC  
 GCAGCCATTCAAAGGCTGGGTTTAGGTGAAATTATCAAGTTCGGTAGAATGTTTTCCCAAGATCCAAAGTC  
 GAGACCTACTATCAAGAATCCGCTGGTGTGAGATCTGATCACCACCTGCTCAGGCGGTAGAAAACGTCAA  
 GGTGGCCACATACATGGCCAAGACCGGTAAGTCAGCCTTGAAGCAGAAAAGGAATTGCTTAACGGTCAAT  
 CCGCCAAGGGATAATCATATGCAGAGAAGTTCACGAGTGGCTACAAACATGTGAGTTGACCCAAGAATTC  
 CCATTATTCGAGGCGACTACCAGATAGTCTACAACAACCTCCGATGGAAGACCTACCGGAGATGATTGAA  
 GAGCTAGACATCGATGACGAATAG

도면11

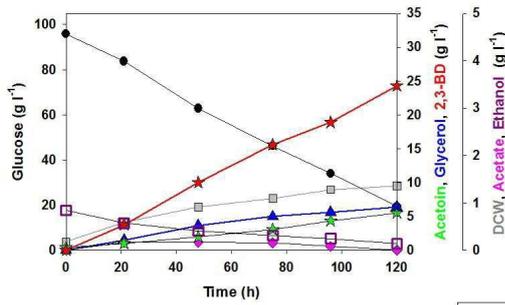
A)



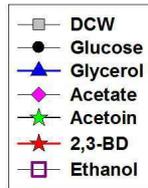
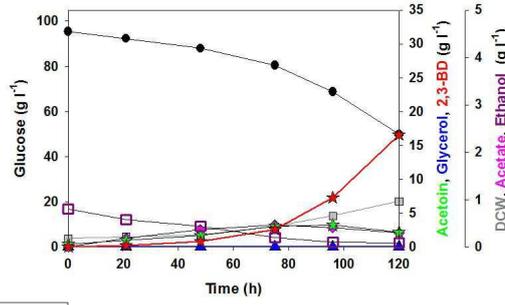
B)



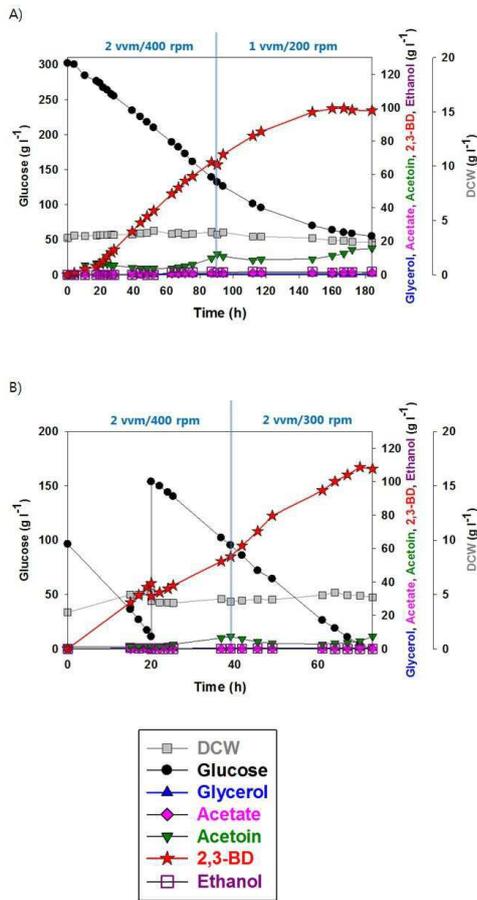
C)



D)



도면12



서열목록

- <110> SNU R&D FOUNDATION
- <120> Method for production of 2,3-butanediol with suppressed production of glycerol
- <130> AP-2015-0193
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1341
- <212> DNA
- <213> Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363
- <400> 1

atgaaatcg tagttatcgg tacaaccac gcaggcattg ctacagcgaa tacattactt 60

gaacaatc cgggcatga aattgtcatg attgaccgta atagcaacat gagttatcta 120

ggttggca cagcaatttg ggttgaaga caaattgaaa aaccagatga attattttat 180  
  
 gccaaagcag aggattttga ggcaaaagg gtaaaaattt tgactgaaac agaagtttca 240  
 gaaattgatt ttgctaataa gaaagtttat gcaaaaacta aatctgatga tgaataaatt 300  
 gaagcttacg acaagcttgt tttagcaaca ggttcacgtc caattattcc taatctacca 360  
 ggcaaagacc ttaagggaat tcattttctg aaacttttcc aagaaggtca agcaattgac 420  
 gcagaatttg ccaagaaaa agtcaagcgt atcgcagtca ttggtgcagg atatatcggt 480  
 acagagattg cggaagcagc taaacgtcgg ggtaaagaag ttcttctctt tgacgtgaa 540  
 aatacttcac ttgcatcata ttatgatgaa gaatttgcca aaggaatgga tgaaacctt 600  
  
 gctcaacatg gaattgaact tcattttgga gaactggcca aagaatttaa agcgaatgag 660  
 gaaggttatg tatcacaat cgtaaccaac aaggcgactt atgatgttga tcttgtcatc 720  
 aattgtattg gttttactgc caacagtgc ttggcaagtg ataagttagc taccttcaaa 780  
 aatggcgcaa tcaaggtgga taagcatcaa caaagtagtg atccagatgt ttacgcggtg 840  
 ggtgatgttg cgacaattta ttctaagcc ttgcaagatt ttaacttatat cgctcttgcc 900  
 tcaaacgctg ttcggtcagg aattgtcgca ggacacaata ttggtggaaa agaattagaa 960  
 tctgttgggt ttcaaggttc taatggtatt tcgatttttg gttacaatat gacttctaca 1020  
  
 ggactttctg ttaaagctgc taaaaaatta gttttagaag tttcatttag tgattttgaa 1080  
 gataaaciaa aagcttgggt tcttcatgaa aacaacgata gtgtgaaat tcgtatcgta 1140  
 tatgagaciaa aaagtcgagc aattattgga gcacaacttg ctagtaaaag tgagataatt 1200  
 gcaggaaata taatatgtt cagtttagcg attcaagaga aaaaaacaat tgatgaacta 1260  
 gctttgcttg atttattctt tctccccac ttcaacagtc catataatta tatgacagtt 1320  
 gcagctttga atgccaata a 1341  
  
 <210> 2  
 <211> 1704  
 <212> DNA  
  
 <213> *Candida tropicalis*  
 <400> 2  
 atgtctgaaa ttactttggg tagattcttc tttgaaagat tgcaccaatt gcaagttgac 60  
 accgttttctg gtttaccagg tgattttaac ttggctttat tagataaaat ctacgaagtc 120  
 gatggtatga gatgggctgg taacgccaat gaattgaac ctggttacgc tgctgatggt 180  
 tacgccagag ttaatccaaa tggtttggct gctttagtct ccaccttcgg tgttggtgaa 240  
 ttgtctttga ctaacgcat tgctggttct tactctgaac acgttggat cattaacttg 300

gttgggttgc caicttcttc tgctcaagct aaacaattgt tgttgacca caccttgggt 360

aacggtgatt tcaactgttt ccacagaatg ttcaagaaca tttctcaaac ttctgcttcc 420

atctccgacc caaacactgc tgcttctgaa attgacagat gtatcagaga tgcttacgtt 480

taccaaagac cagtttacct tggtttgcca tctaacttgg ttgatgttaa agttcaaaa 540

tctttgttgg acaaaaaaat tgacttgtcc ttgcatcaa atgaaccaga atcccaagct 600

gaagtgttg aaaccgtga aaaattcatt tctgaagctt ctaaccagc tatcttgggt 660

gatgcttgtg ctatcagaca caactgtctt aaagaattg ctgaattgat tgctgaaact 720

caattcccag tcttcaccac tccaatgggt aatcaagtg ttgatgaatc caaccaaga 780

ttcgggtgtg ttiacgttgg ttctttgtct tctccagatg ttaagaagc cgttgaaagt 840

gctgacttgg tcttacctgt tgggtctatg ttgtctgatt tcaacactgg tgctttctct 900

tacaactaca agaccagaaa tgttttgaa ttccactctg attacaccaa gatcagacaa 960

gctactttcc caggtgtcca aatgaagaa gctttgcaag ttttgtttaa gactgtcaag 1020

aaatctgtca atccaaaata cgtcccagct ccagttccag ctaccaaagc tattaccact 1080

ccagtaaca acgaccagc ctctcaagaa tacttggga gaaaagttc tgactggttc 1140

caagaagggt atgttatcat ttctgaaacc ggtacctctg ctttcggtat tgtccaatct 1200

aaattccaa agaatgcat tggatattcc caagtctgt ggggttctat tggttacgct 1260

actggtgcta ctigtgtgc tgctatggct gctcaagaaa ttgacccaaa gaagagagtt 1320

atcttgttca ctggtgatgg ttctttgcaa ttgactgtcc aagaatctc taccatgtgt 1380

aatgggatt gttacaacac ctatctttac gttttgaaca acgatggtta caccattgaa 1440

agattgattc acggtgaaaa agctcaatat aacgacattc aacatggaa caacttgcaa 1500

cttttgccat tgttcaacgc taagaatac gaaaccaaga gaatttctac tgttgggtgaa 1560

ttgaacgatt tgttcaactaa caaagaattt gctgttccag acagaattag aatggtttaa 1620

attatgttgc cagttatgga tgctccagct aacttgggtg cccaagctaa acaatctgct 1680

gctaccaacg ctgctcaaga ataa 1704

<210> 3

<211> 289

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

atitggcgag cgttgggttg tggatcaagc ccacgcgtag gcaatcctcg agcagatccg 60

ccaggcgtgt atatatagcg tggatggcca ggcaacttta gtgctgacac atacaggcat 120

atatatatgt gtgcgacgac acatgatcat atggcatgca tgtgctctgt atgtatataa 180  
 aactcttggt ttcttctttt ctctaaatat tctttcctta tacattagga cctttgcagc 240  
  
 ataaattact ataacttetat agacacgcaa acacaaatac acacactaa 289  
 <210> 4  
 <211> 1144  
 <212> DNA  
 <213> Saccharomyces cerevisiae  
 <400> 4  
 caaaaacgac atatctatta tagtggggag agtttcgtgc aaataacaga cgcagcagca 60  
 agtaactgtg acgatatcaa ctcttttttt attatgtaat aagcaaaca gcacgaatgg 120  
 ggaaagccta tgtgcaatca ccaaggtcgt cccttttttc ccatttgcta atttagaatt 180  
 taaagaaacc aaaagaatga agaaagaaaa caaatactag ccctaaccct gacttcgttt 240  
 ctatgataat accctgcttt aatgaacggt atgccctagg gtatatctca ctctgtacgt 300  
  
 tacaaaactcc ggttatttta tcggaacatc cgagcacccg cgccttctc aacceaggea 360  
 ccgccccag gtaaccgtgc gcgatgagct aatcctgagc catcaccac ccacccggtt 420  
 gatgacagca attcgggagg gcgaaaaata aaaactggag caaggaatta ccatcacctt 480  
 caccatcacc atcatatcgc cttagcctct agccatagcc atcatgcaag cgtgtatctt 540  
 ctaagattca gtcatcatca ttaccgagtt tgttttctt cacatgatga agaaggtttg 600  
 agtatgctcg aaacaataag acgacgatgg ctctgccatt gttatattac gcttttgagg 660  
 cgaggtgccg atgggttgct gaggggaaga gtgttttagct tacggacctt ttgccattgt 720  
  
 tattccgatt aatctattgt tcagcagctc ttctctacc tgcattcta gtattttttt 780  
 tttttttttt tggttttact tttttttctt cttgcctttt tttcttgta cttttttctt 840  
 agtttttttt cttccacta agcttttttc ttgatttate cttgggttct tctttctact 900  
 ccttttagatt tttttttat atattaattt ttaagtttat gtattttggt agattcaatt 960  
 ctctttccct ttcttttcc ttegetcecc ttctttatca atgettgctg tcagaagatt 1020  
 aacaagatac acattcctta agcgaacgca tccggtgtta tatactcgtc gtgcatataa 1080  
 aattttgctt tcaagatcta ctttcttaag aagatcatta ttacaaacac aactgcactc 1140  
  
 aaag 1144  
 <210> 5  
 <211> 655  
 <212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 5

agtttatcat tatcaatact cgccatttca aagaatacgt aaataattaa tagtagtgat	60
tttcctaact ttatttagtc aaaaaattag ccttttaatt ctgctgtaac cgtacatgc	120
ccaaaatagg gggcgggtta cacagaatat ataacatcgt aggtgtctgg gtgaacagtt	180
tattcctggc atccactaaa tataatggag cccgcttttt aagetggcat ccagaaaaaa	240
aaagaatccc agcaccaaaa tattgttttc tccaccaacc atcagttcat aggtccattc	300
tcttagcgca actacagaga acaggggcac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat	360
ggagtgatgc aacctgcctg gagtaaatga tgacacaagg caattgacc acgcatgtat	420
ctatctcatt ttcttacacc ttctattacc ttctgctctc tctgatttgg aaaaagctga	480
aaaaaaaggt tgaaccagt tcctgaaat tattccccta cttgactaat aagtatataa	540
agacggtagg tattgattgt aattctgtaa atctatttct taaacttctt aaattctact	600
tttatagtta gtcttttttt tagtttttaa acaccagaac ttagtttcga cggat	655