

대사공학으로 제작된 재조합 *Klebsiella pneumoniae*를 이용한 아세토인 생산

장지웅 · 정휘민 · 김덕균 · 오민규[†]

고려대학교 화공생명공학과
02841 서울특별시 성북구 안암로 145
(2016년 9월 14일 접수, 2016년 12월 19일 수정본 접수, 2016년 12월 20일 채택)

Acetoin Production Using Metabolically Engineered *Klebsiella pneumoniae*

Ji-Woong Jang, Hwi-Min Jung, Duck Gyun Kim and Min-Kyu Oh[†]

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 145, Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 02841, Korea
(Received in 14 September 2016; Received in revised form 19 December 2016; accepted 20 December 2016)

요 약

아세토인(acetoin)은 식품과 화학산업에서 플랫폼 물질로 이용되며 산업적으로 다양한 응용이 가능한 물질이다. 본 연구에서는 대사공학(metabolic engineering)을 이용하여 아세토인의 생산량이 증가한 재조합 *Klebsiella pneumoniae*를 구축하였다. 우선 2,3-부탄디올(2,3-butanediol)생산을 위해 제작되었던 재조합 *K. pneumoniae* (KMK-05)에서 두 가지 2,3-butanediol dehydrogenase (*budC*, *dhaD*)를 유전체에서 제거하여 아세토인 생산량을 늘리고, 전사인자 중 하나인 AcoK를 제거하여 아세토인을 분해하는 효소의 발현량을 줄였다. 그리고 NADH oxidase를 발현시켜 세포 내 산화 환원 균형(redox balance)을 맞춰 대사흐름을 개선하였다. 이렇게 대사공학을 통해 구축된 재조합 *Klebsiella pneumoniae* (KJW-03-nox)로 아세토인 생산량과 수율을 높였고, 36시간 동안의 유가식 배양을 진행하여 51 g/L의 아세토인 농도와 최대 생산성 2.6 g/L/h를 달성하였다.

Abstract – Acetoin is variously applicable platform chemical in chemical and food industry. In this study, *Klebsiella pneumoniae* was engineered for acetoin production using metabolic engineering. From the recombinant *Klebsiella pneumoniae* (KMK-05) producing 2,3-butanediol, *budC* and *dhaD* genes encoding two 2,3-butanediol dehydrogenases were deleted to reduce 2,3-butanediol production. Furthermore, a transcriptional regulator, AcoK, was deleted to reduce the expression levels of acetoin degrading enzyme. Lastly, NADH oxidase was overexpressed for adjusting intracellular redox balance. The resulting strain (KJW-03-nox) produced considerable amount of acetoin, with concentration reaching 51 g/L with 2.6 g/L/h maximum productivity in 36 h fed-batch fermentation.

Key words: Metabolic engineering, Acetoin, 2,3-Butanediol dehydrogenase, NADH oxidase

1. 서 론

아세토인은 과일이나 발효 식품에 자연적으로 들어있는 물질로서 딸기, 코코아, 버터, 와인 등에 함유되어 있다[1]. 아세토인은 주로 식품 첨가제로써 음식의 향미를 내는 용도로 사용되며 비누나 세제, 로션 등의 제품의 향을 만드는 용도로도 이용된다. 이 외에도 아세토인은 킬레이트제, 의약품 및 화학 물질의 중간체 등 여러 화학산업에서 전구체로 이용되기도 한다[2]. 아세토인을 생산하기 위해서는 몇 가지 화학적 합성 방법이 존재한다. 그러나 이러한 방법은 화

학 약품을 사용함으로써 발생하는 환경오염과 식품에 이용될 때 안전성 문제, 온실가스 배출에 의한 지구 온난화 문제 등 여러 가지 문제점을 야기하고 있다[3]. 하지만 미생물 배양을 이용하면 친환경적으로 아세토인을 생산할 수 있다. *Serratia marcescens* [4], *Hansenia sporaguilliermondii* [5], *Bacillus subtilis* [3], *Paenibacillus polymyxa* [6], *Klebsiella pneumoniae* [7], *Enterobacter cloacae* [8] 등의 균주에서 미생물 발효를 통해 아세토인 생산이 연구되어 왔다. 본 연구에서는 선행 연구 결과에서 더 나아가 부산물(by-product)을 제거와 함께 아세토인 분해를 줄였으며 redox imbalance를 풀어주어 대사흐름을 증가시킴으로써 아세토인 생산량을 증가시켰다. 미생물 대사과정에서 아세토인은 두 분자의 pyruvate로부터 acetolactate synthase (BudA)와 α -acetolactate decarboxylase (BudB)에 의해 2-단계 반응으로 생산된다. 그리고 아세토인은 NADH 조효소를 NAD⁺로 전환하며 2,3-butanediol dehydrogenase (BudC)에 의해

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mkoh@korea.ac.kr

[‡]이 논문은 고려대학교 김성현 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

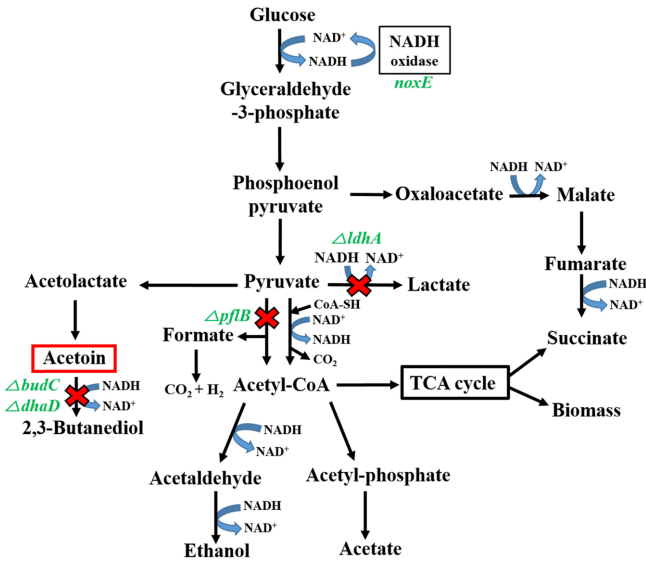


Fig. 1. Acetoin production pathway through glycolysis in *Klebsiella pneumoniae*. The red crosses represented the pathway steps deleted for metabolic engineering. The gene of *ldhA* and *pflB* were deleted in parental strain KMK-05 [9]. Additionally, *budC* and *dhaD* genes were deleted in this study.

2,3-부탄디올을 만든다(Fig. 1).

*K. pneumoniae*는 성장 속도가 빠르고 유전자 재조합이 용이하며 여러 가지 탄소원을 섭취할 수 있어 대사공학에 사용하기 적합한 균주로 많이 연구되었다. 또한 *K. pneumoniae*는 1,3-프로판디올과 2,3-부탄디올을 대량으로 생산하는 균주로 알려져 있다[11,12]. 2,3-부탄디올의 전구체가 바로 아세트인이기 때문에, 본 연구에서는 대사공학을 통해 *K. pneumoniae*에서 metabolic flux를 조절하여 아세트인을 생산하고자 하였다. 아세트인을 생산하기 위해 먼저 2,3-부탄디올 생산에 최적화된 재조합 *K. pneumoniae* KMK-05 ($\Delta wabG$, $\Delta ldhA$, $\Delta pflB$)를 모균주로 사용하여, 이에 추가적인 유전자 재조합을 진행하여 아세트인 생산에 최적화된 균주를 만들고자 하였다. 이 중 *wabG* 유전자는 Gram negative bacteria에서 lipopolysaccharide (LPS)의 결합을 형성하는 효소 중 하나이다. LPS는 병원성의 원인이 되기도 하기 때문에 *wabG* 유전자가 제거되면 LPS가 만들어지지 않고, 병원성을 현저히 줄일 수 있다[13,14]. 그리고 *ldhA*는 D-lactate dehydrogenase를 만드는 유전자로 그 발현산물은 pyruvate에서 D-lactate로 진행하는 반응을 매개한다. Wild type *K. pneumoniae*를 발효하였을 때 부산물 중 D-lactate가 가장 많은 비중을 차지하고 이로 인해 배지의 pH가 많이 내려가기 때문에, *ldhA* 유전자를 제거하여 수율을 높이고 pH를 보정하고자 하였다[9]. 마지막으로 *pflB*는 pyruvate formate lyase를 만드는 유전자로 pyruvate에서 acetyl-coA로 전환시키는 효소 중 혐기조건에서 주로 작용하는 효소이다. *K. pneumoniae*에서 *pflB* 유전자를 제거하였을 때 발효 부산물인 ethanol, acetate, succinate를 상당히 줄일 수 있다는 사전 연구가 있었다[9].

본 연구에서는 *K. pneumoniae*에서 아세트인을 생산하기 위해서 세가지 대사공학 전략을 세웠다. 우선 2,3-부탄디올 생산에 최적화된 재조합 *K. pneumoniae* KMK-05 [9]에서 아세트인을 2,3-부탄디올로 전환하는 효소들인 BudC와 DhaD를 제거하여 아세트인 생산량을 늘렸다(Fig. 1). 그리고 아세트인을 세포내에서 분해하는 효소의 발현량을 높여주는 AcoK를 제거하여 생성된 아세트인의 대사분해

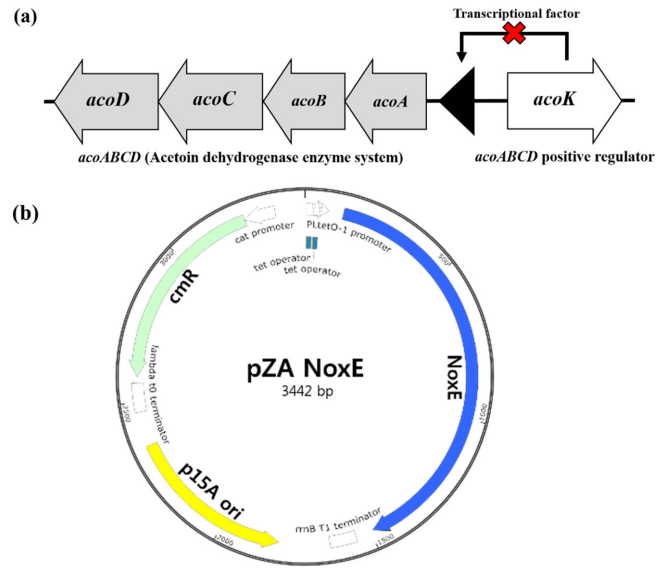


Fig. 2. Operon of acetoin dehydrogenase enzyme system (*acoABCD*) and the deleted transcriptional regulator (*acoK*) located on the genomic DNA (a) and plasmid map of pZANoxE for overexpression of NADH oxidase (b).

를 최소화 하였다(Fig. 2A). 또한 부산물(byproduct)을 없애기 위해 실시한 유전자 제거로 인해 발현한 NADH 효소의 양을 줄이기 위하여 NADH oxidase를 과발현시켰다(Fig. 2B). 만들어진 균주는 아세트인을 더 높은 농도와 수율로 만들었으며 유가식 배양을 통해 그 생산성을 극대화하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 재조합 균주, 플라스미드, 프라이머

본 실험에서는 *wabG*, *ldhA*, *pflB* 유전자가 제거된 재조합 *K. pneumoniae*인 KMK-05 [9]를 모균주로 사용하였다. 그리고 같은 방법으로 *budC*, *dhaD*, *acoK* 세가지 유전자를 모균주로부터 제거하였다. 우선, *budC* 유전자를 제거하기 위해 pRedET plasmid를 포함한 KMK-05 균주를 30 °C에 배양하고 optical density (OD₆₀₀)가 0.2 일 때 24 mM L-arabinose를 첨가한다. pKD4를 주형으로 사용하여 flp recombination target (FRT) sites 사이에 존재하는 kanamycin 저항성 유전자를 프라이머(*budC*-Kan-fw, *budC*-Kan-rv)를 이용해 PCR로 증폭시킨다. 프라이머 제작에는 기존에 발효된 *K. pneumoniae* 유전체 염기서열을 이용하였다[10]. PCR product는 pRedET 플라스미드와 함께 *K. pneumoniae*로 형질 전환되고, 25 μg/mL의 kanamycin이 함유된 Luria-Bertani (LB) agar 플레이트에서 선별된다. 마지막으로 *budC*의 상동 재조합은 *budC*-con-A, *budC*-con-B 프라이머를 포함한 콜로니 PCR에 의해 확인된다. 마지막으로 FRT site 사이에 존재하는 kanamycin 저항성 유전자를 제거하기 위해 707-FLP 플라스미드를 *budC* 유전자가 제거된 *K. pneumoniae* 균주에 형질 전환시키고 *budC*-con-A, *budC*-con-B 프라이머를 포함한 콜로니 PCR을 통해 kanamycin 저항성 유전자가 제거되었는지 확인한다. 이와 같은 방법을 통해 *dhaD*와 *acoK* 유전자 모두 순서대로 제거되었다. 이 실험에서 사용된 모든 재조합 균주와 플라스미드는 Table 1에 제시되어 있다.

Table 1. Strains and plasmids in this study

Strains and plasmids	Genotype, relevant characteristics or sequence	Source or reference
Strains		
KMK-05	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2242 Δ wabG, Δ ldhA, Δ pf1B	Jung <i>et al.</i> (2014)
KJW-01	KMK-05 Δ budC	This study
KJW-02	KJW-01 Δ dhaD	This study
KJW-03	KJW-02 Δ acoK	This study
KJW-03-nox	KJW-03 <i>noxE</i> plasmid expression	This study
Plasmids		
pRedET	λ -Red recombinase expression plasmid, <i>repA</i> , <i>pSC101ori</i> , <i>P_{BAD}</i> , <i>gam</i> , <i>beta alpha</i> , <i>recA</i> , <i>tet^R</i>	Gene Bridge
707FLP	Flippase expression plasmid, <i>pSC101ori</i> , <i>repA</i> , <i>cl578</i> , <i>FLPe</i> , <i>tet^R</i>	Gene Bridge
pKD4	FRT flanked resistance cassette involved vector, <i>oriRγ</i> , <i>Km^R</i>	Datsenko and Wanner (2000)
pZAnoxE	NADH oxidase plasmid, <i>p15Aori</i> , <i>Cm^R</i>	This study

그리고 *Lactococcus lactis* 유래의 NADH oxidase를 발현하기 위한 pZAnoxE 플라스미드 구축방법은 아래와 같다. KCTC 생물자원 센터로부터 분양받은 *Lactococcus lactis* (KCTC 3115)의 genomic DNA의 *noxE*를 Q5 polymerase를 사용하여 PCR 하였고(NEB, USA), pZA31 MCS 플라스미드 내의 Multiple cloning site 내에 위치하는 Sall-HindIII 위치에 제한효소 처리 하여 삽입하였다(NEB, USA). pZA31 MCS (Expressys, Germany)는 chloramphenicol 저항성 유전자 내재되어 있으며, lac promoter 기반의 tetracycline operator 인덕션 시스템을 가지고 있는 플라스미드이다. *noxE*의 발현효과를 확인하기 위해 *Klebsiella pneumoniae* 균주에 electroporation 방법을 활용한 형질변환을 수행했다. 형질변환 된 균주를 chloramphenicol (50 ug/ml)이 포함된 LB 고체배지에서 분리하였으며, 단일 콜로니를 선별하여 배양실험에 사용하였다. 배양 시 초기 exponential phase (OD~0.6)에 anhydrous tetracycline (20 ng/ml)을 첨가하여 *noxE*의 발현을 유도해주었다.

2-2. 배양액과 배양 환경

플라스크 수준의 회분식 배양과 배양기에서 진행한 유가식 배양에서 사용된 배양액은 80 g/L glucose, 3 g/L KH₂PO₄, 6.8 g/L Na₂HPO₄, 0.75 g/L KCl, 5.35 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.28 g/L Na₂SO₄, 0.26 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.42 g/L citric acid, 5 g/L yeast extract, 10 g/L casein hydrolysate, 0.3 mL microelement 용액을 함유하고 있다. Microelement 용액은 34.2 g/L ZnCl₂, 2.7 g/L FeCl₃·6H₂O, 10 g/L MnCl₂·4H₂O, 0.85 g/L CuCl₂·2H₂O, 0.31 g/L H₃BO₃을 함유하고 있다. 플라스크 회분식 배양에서는 알루미늄 마개로 막은 250 mL 플라스크에 25 mL 배양액을 넣어 250 rpm, 37 °C 배양기에서 배양하였다. 유가식 배양은 5% (v/v) seed를 접종하여 3 L 용량의 배양기(Bio Control and System, Korea)에서 1 L 배양액으로 진행하였다. 유가식 배양을 위해서 초기 glucose 농도는 90 g/L로 시작하였고, 온도는 37 °C, pH는 6.5, agitation speed는 500 rpm으로 맞추어 진행하였다. pH는 5 M NaOH로 조절하였고 antifoam 204 (Sigma, USA)을 필요 시 첨가하였다. 배양기에서 호기성 조건은 2.0 vvm으로 유지하였다. 플라스크 회분식 배양은 Luria Bertani (LB) 5% (v/v) seed를 종 배양(seed culture)으로 사용하였고, 배양기를 통한 유가식 배양은 본 배양과 종 배양에서 같은 배양액을 사용하였다. Feeding 용액은 700 g/L glucose, 20 g/L MgSO₄·7H₂O를 준비하였고, 전체 glucose 농도는 50 g/L 이하로 유지하였다.

2-3. 분석 방법 및 기기

OD₆₀₀는 DU370 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Caguas, Puerto Rico)를 사용하여 측정되었다. 대사물질 분석을 위해 배양액을 13,000 rpm에 10분간 centrifuge를 진행하고 상등액을 -20 °C에 저장하였다. 세포 외에 존재하는 대사체(2-ketogluconate, glucose, lactate, succinate, formate, acetate, acetoin, 2,3-butanediol, ethanol)는 SH1011 column (Shodex, Japan)을 장착한 ACME-9000 (Young-Lin instrument, Korea) high performance liquid chromatography (HPLC)에 의해 분석되었다. 이동상은 10 mM H₂SO₄ 농도로 만들어 졌고, 0.5 mL/min flow rate로 진행되었다. Column heater와 refractive index (RI) detector는 각각 75 °C와 45 °C로 맞췄다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 대사 공학(metabolic engineering)을 이용해 제작된 재조합 *Klebsiella pneumoniae*

먼저, KMK-05에서 아세트인으로 2,3-부탄디올을 만드는 2,3-butanediol dehydrogenase의 유전자인 *budC* 유전자를 제거하였고 이 균주를 KJW-01로 명명하였다. 플라스크의 회분식 배양을 실시한 결과, KJW-01은 KMK-05에 비해 아세트인 농도가 4.6 g/L에서 24.7 g/L로 약 5배 증가하였고, 2,3-부탄디올은 32.2 g/L에서 7.7 g/L로 약 76% 감소하였다. 아세트인의 수율은 0.05 g/g에서 0.33 g/g으로 약 6배 증가하였다(Fig. 3). 이 실험으로 *budC* 유전자를 제거하는 것이 아세트인을 생산하는 데 있어서 가장 중요한 과정임을 알 수 있었다. 그리고 *dhaD* 유전자가 glycerol dehydrogenase와 2,3-butanediol dehydrogenase의 역할을 동시에 한다는 사전 연구가 있었다[15]. 이에 따라 KJW-01균주의 유전자에서 *dhaD* 유전자를 제거한 후 이를 KJW-02로 명명하였다. 플라스크 배양 결과, 아세트인의 농도는 KJW-01에 비해 24.7 g/L에서 28 g/L로 약 13% 증가하고, 2,3-부탄디올은 7.7 g/L에서 6.5 g/L로 약 15% 감소하였다. 수율은 0.33 g/g에서 0.34 g/g으로 약 3% 증가하였다(Fig. 3).

이렇게 생산된 아세트인은 미생물 내에서 주요 탄소 원이 고갈되었을 때 acetoin dehydrogenase enzyme system (*acoABCD*)에 의해 acetyl-coA와 acetaldehyde로 분해되어 에너지로 사용될 수 있음이 알려져 있다[16]. 이 역할을 하는 효소의 유전자 조절을 살펴보면 *acoK* 유전자가 만든 전사인자가 *acoABCD* 발현의 positive regulator로서 역할을 한다(Fig. 2A)[16]. 따라서 아세트인이 분해되는 속도를 줄이기 위해 KJW-02에서 *acoK* 유전자를 제거하고 KJW-03으로 명명하

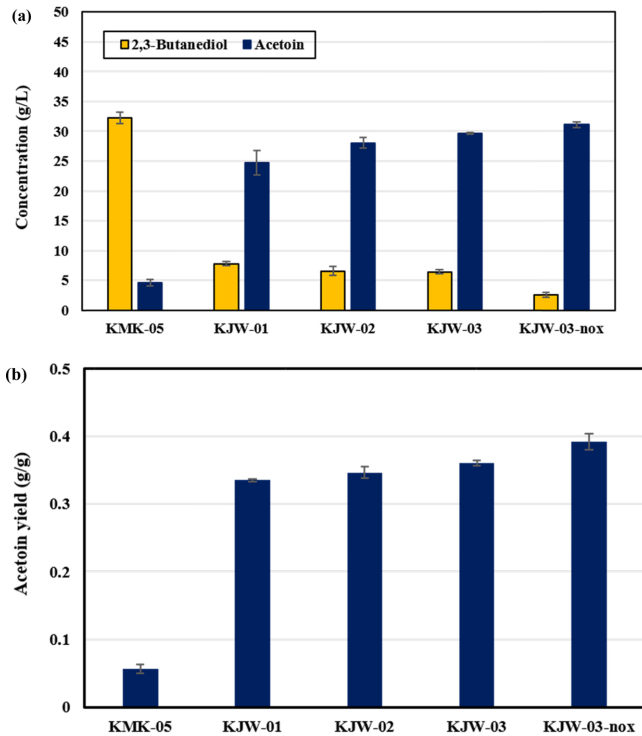


Fig. 3. Acetoin and 2,3-butanediol titer (g/L) (a) and acetoin yield (g/g) (b) of KMK-05, KJW-01, KJW-02, KJW-03 and KJW-03-nox in the flask cultivation. The flask cultivation was conducted for 24 h under aerobic conditions. Error bars indicate standard deviations (n=3).

였다. 이 균주로 플라스크 배양을 진행한 결과, 아세트산 농도는 KJW-02에 비해 28 g/L에서 29.6 g/L로 약 5% 증가하고 수율은 0.34 g/g에서 0.36 g/g으로 약 5% 증가하였다(Fig. 3).

이처럼 여러 유전자를 제거하여 아세트산 농도와 수율이 증가하였지만, *ldhA*, *budC* 등의 유전자가 NADH 조효소를 매개로 하는 반응이기 때문에 이러한 유전자들이 제거되면서 NADH가 쌓이게 되어 미생물 내에 redox imbalance 문제를 유발하게 된다. 이러한 redox imbalance 문제를 해결하면 세포 성장과 대사가 더 원활해 질 수 있을 것이고, 이는 아세트산 생산량 증가로 이어질 수 있을 것으로 예상하였다. 비슷한 예로 아세트산 생산균주 *Serratia marcescens*에서도 NADH oxidase를 발현시켜 아세트산 생산량을 증가시킨 사전 연구가 있었다[18]. 우리는 redox imbalance 문제를 해결하기 위해 *Lactococcus lactis* 유래의 NADH oxidase (*noxE*)를 포함한 plasmid를 구축하였고(Fig. 2B) 이를 KJW-03에 형질전환 시킨 후 이 균주를 KJW-03-nox로 명명하였다. 이 재조합 균주로 플라스크 배양을 진행한 결과, 아세트산 농도는 KJW-03에 비해 29.6 g/L에서 31.1 g/L로 약 5% 증가하고, 2,3-부탄디올은 6.4 g/L에서 2.5 g/L로 약 60% 감소하였다. 수율은 0.36 g/g에서 0.39 g/g으로 약 8% 증가하였다(Fig. 3). 따라서, NADH oxidase(*noxE*)의 과 발현은 예측한 바와 같이 NADH 축적을 완화하여 redox imbalance 문제를 해결하여 아세트산 생산량과 수율을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 그 결과, *K. pneumoniae* KJW-03-nox의 아세트산 농도는 4.6 g/L에서 31.1 g/L로 모 균주인 KMK-05보다 85% 증가하였고, 2,3-부탄디올은 32.2 g/L에서 2.5 g/L로 92% 감소하였다. 그리고 아세트산 수율은 0.05 g/g에서 0.39 g/g으로 87% 증가한 양상을 보였다.

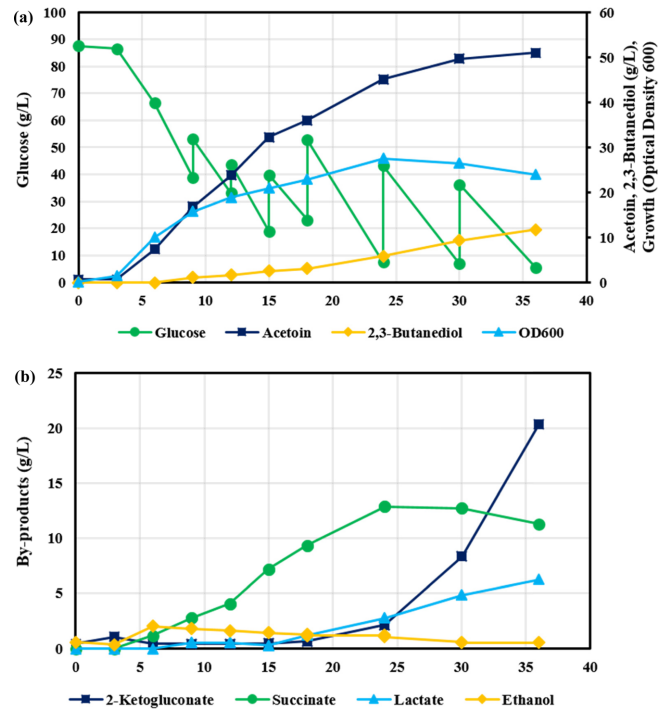


Fig. 4. Fed-batch fermentation profile of KJW-03-nox for 36 h. The concentration profiles of glucose (circle), acetoin (square), 2,3-butanediol (diamond) and optical density at 600 nm (triangle) (a) as well as the concentrations of byproducts, such as succinate (circle), 2-ketogluconate (square), lactate (triangle) and ethanol (diamond) (b).

3-2. 아세트산 생산량이 증가한 재조합 *Klebsiella pneumoniae* (KJW-03-nox)의 유가식 배양

플라스크 회분식 배양에서 아세트산 생산량을 증가시킨 재조합 *K. pneumoniae* (KJW-03-nox)를 이용하여 500 rpm, 2 vvm 조건에서 36시간 동안 유가식 발효를 진행하였다. 그 결과, 51 g/L의 아세트산을 생산하였고, 수율 0.22 g/g과 생산성 1.41 g/L/h를 나타내었다(Fig. 4A). 다음으로 부산물 살펴보면, 2,3-부탄디올은 36시간 동안 11.7 g/L를 생산하였고, succinate는 6시간부터 꾸준히 증가하여 11.2 g/L를 만들었다. 그리고 lactate는 18시간부터 증가하기 시작하여 6.2 g/L를 생산하였다. 그 중 가장 눈에 띄는 부산물 2-ketogluconate인데, 24시간부터 급격하게 증가하여 36시간에는 20.3 g/L까지 생산되었다(Fig. 4B). 세포 농도(OD₆₀₀)는 점차 증가하는 양상을 보이다가 2-ketogluconate가 나오기 시작한 24시간에 최고점인 27.5에 도달한 후, 감소하였다(Fig. 4A). 유가식 배양에서 최대 수율 및 생산성은 3~15시간 사이에 관측되었으며 각각 0.34 g/g glucose 및 2.6 g/L/h이다. 발효기에서 호기성 조건의 유가식 배양을 진행했을 때 24시간 이후에는 많은 탄소 원이 2-ketogluconate로 전환되었다. 이에 따라 아세트산 수율이 떨어지는 현상이 나타나므로 추후 2-ketogluconate pathway를 조절하는 방법이 연구되어야 할 것이다. 또한 2,3-butanediol dehydrogenase를 제거하였음에도 불구하고 유가식 배양에서 2,3-부탄디올이 11.7 g/L 생산되었으므로 *budC*, *dhaD* 이외의 추가적인 2,3-butanediol dehydrogenase를 만드는 유전자가 존재할 것으로 예상되며 이를 제거하는 것도 필요할 것이다.

4. 결 론

미생물 배양을 통한 아세트인 생산은 기존의 석유화학 공정을 대체할 수 있는 친환경적인 생산 공정이다. 본 연구에서는 대사공학을 이용하여 아세트인 생산량을 늘린 재조합 *K. pneumoniae*인 KJW-03-nox를 구축하였다. 재조합 균주를 제작하면서 대사 유전자 중 2,3-butanediol dehydrogenase (*budC*, *dhaD*)를 제거하는 것이 아세트인 생산에 있어 가장 중요한 요소라는 것을 알 수 있었고, 제거된 유전자로 인해 발생하는 redox imbalance 문제를 NADH oxidase (*noxE*)를 과발현하여 완화시키는 전략을 통해 아세트인 농도와 수율을 성공적으로 증가시킬 수 있었다. 최종적으로 유가식 배양을 통하여 아세트인 농도 51 g/L와 최대 수율 및 생산성 0.34 g/g glucose와 2.6 g/L/h 를 각각 달성하였다. 이처럼, 대사공학을 이용해 아세트인 생산성 및 수율 향상 연구를 계속 발전시키면 바이오 화학공정을 통한 아세트인 생산으로 석유화학 공정을 대체할 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 에너지기술평가원(KETEP)의 신재생에너지 지원사업에 의해 수행되었음(No. 20143030091040).

References

1. Xiao, Z., Ma, C., Xu, P. and Lu, J. R., "Acetoin Catabolism and Acetylbutanediol Formation by *Bacillus pumilus* in a Chemically Defined Medium," *PLoS One*, **4**, e5627(2009).
2. Xiao, Z. and Lu, J. R., "Strategies for Enhancing Fermentative Production of Acetoin: a Review," *Biotechnol. Adv.*, **32**, 492-503 (2014).
3. Xu, H., Jia, S. R. and Liu, J. J., "Development of a Mutant Strain of *Bacillus subtilis* Showing Enhanced Production of Acetoin," *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 779-788(2011).
4. Sun, J. N., Zhang, L. Y., Rao, B., Han, Y. B., Chu, J., Zhu, J. W., Shen, Y. L. and Wei, D. Z., "Enhanced Acetoin Production by *Serratia marcescens* H32 using Statistical Optimization and a Two-stage Agitation Speed Control Strategy," *Biotechnol. Bio-process. Eng.*, **17**, 598-605(2012).
5. Teixeira, R. M., Cavalheiro, D., Ninow, J. L. and Furigo, A., "Optimization of Acetoin Production by *Hanseniaspora guilliermondii* Using Experimental Design," *Braz. J. Chem. Eng.*, **19**, 181-186 (2002).
6. Zhang, L. Y., Chen, S., Xie, H. B., Tian, Y. T. and Hu, K. H., "Efficient Acetoin Production by Optimization of Medium Components and Oxygen Supply Control Using a Newly Isolated *Paenibacillus polymyxa* CS107," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **87**, 1551-

- 1557(2012).
7. Wang, D. X., Zhou, J. D., Chen, C., Wei, D., Shi, J. P., Jiang, B., Liu, P. F. and Hao, J., "R-Acetoin Accumulation and Dissimilation in *Klebsiella pneumoniae*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 1105-1115(2015).
8. Zhang, L. J., Liu, Q., Ge, Y., Li, L., Gao, C., Xu, P. and Ma, C., "Biotechnological Production of Acetoin, a Bio-based Platform Chemical, from a Lignocellulosic Resource by Metabolically Engineered *Enterobacter cloacae*," *Green. Chem.*, **18**, 1560-1570 (2016).
9. Jung, M. Y., Mazumdar, S., Shin, S. H., Yang, K. S., Lee, J. and Oh, M. K., "Improvement of 2,3-Butanediol Yield in *Klebsiella pneumoniae* by Deletion of the Pyruvate Formate-Lyase Gene," *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 6195-6203(2014).
10. Shin, S. H., Kim, S., Kim, J. Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M. K., Kim, Y. R., Lee, J. and Yang, K. S., "Complete Genome Sequencing of the 2,3-Butanediol-Producing *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242," *J. Bacteriol.*, **194**, 2736-2737(2012).
11. Jun S. A., Kong S. W., Sang, B. I. and Um, Y., "Optimization of Culture Conditions for 1,3-propanediol Production from Glycerol Using *Klebsiella pneumoniae*," *Korean Chem Eng Res.*, **47**(6), 768-774(2009).
12. Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H. and Xu, P., "Enhanced 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* SDM," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 49-57(2009).
13. Jung, S. G., Jang, J. H., Kim, A. Y., Lim, M. C., Kim, B., Lee, J. and Kim, Y. R., "Removal of Pathogenic Factors from 2,3-Butanediol-Producing *Klebsiella* species by Inactivating Virulence-Related *wabG* gene," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1997-2007(2013).
14. Izquierdo, L., Coderch, N., Pique, N., Bedini, E., Corsaro, M. M., Merino, S., Fresno, S., Tomas, J. M. and Regue, M., "The *Klebsiella pneumoniae wabG* Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence," *J. Bacteriol.*, **185**, 7213-7221 (2003).
15. Wang, Y., Tao, F. and Xu, P., "Glycerol Dehydrogenase Plays a Dual Role in Glycerol Metabolism and 2,3-Butanediol Formation in *Klebsiella pneumoniae*," *J. Biol. Chem.*, **289**, 6080-6090(2014).
16. Xiao, Z. J. and Xu, P., "Acetoin Metabolism in Bacteria," *Crit. Rev. Microbiol.*, **33**, 127-140(2007).
17. Hsu, J. L., Peng, H. L. and Chang, H. Y., "The ATP-binding Motif in *AcoK* is Required for Regulation of Acetoin Catabolism in *Klebsiella pneumoniae* CG43," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **376**, 121-127(2008).
18. Sun, J. A., Zhang, L. Y., Rao, B., Shen, Y. L. and Wei, D. Z., "Enhanced Acetoin Production by *Serratia marcescens* H32 with Expression of a Water-Forming NADH oxidase," *Bioresour. Technol.*, **119**, 94-98(2012).