

Review

Clostridium 속 미생물 대사공학을 통한 butanol 생산

우지은¹ · 김민지¹ · 노현지¹ · 황누리¹ · 김진효¹ · 이상엽² · 장유신^{1*}

¹경상대학교 농업생명과학원, ²한국과학기술원 생명화학공학과

Metabolic engineering of the genus *Clostridium* for butanol production

Ji Eun Woo¹, Minji Kim¹, Hyeon Ji Noh¹, NuRi Hwang¹, Jin-Hyo Kim¹, Sang Yup Lee², and Yu-Sin Jang^{1*}

¹Institute of Agriculture & Life Science (IALS), Department of Agricultural Chemistry and Food Science Technology, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

²Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 plus program), Bioinformatics Research Center, BioProcess Engineering Research Center, Center for Systems and Synthetic Biotechnology, KAIST, Daejeon 34141, Republic of Korea

(Received September 23, 2016; Revised October 11, 2016; Accepted October 12, 2016)

ABSTRACT: *Clostridium* is a genus of Gram-positive, rod shape, spore-forming obligate anaerobe. Recently, *Clostridium* has been attracted as a host for bio-based chemical production, due to its diversity of substrate utilization and the production ability for metabolites which can be used as a building block for chemical production. Especially, butanol produced from *Clostridium* has been considered as an alternative fuel. As a transportation fuel, butanol has a higher energy density and lower hygroscopicity compared to ethanol, the first generation biofuel. Recently, metabolic engineering of *Clostridium* has been massively conducted for butanol production. In this study, the metabolic engineering strategy of *Clostridium* for butanol production has been reviewed with a brief perspective.

Key words: *Clostridium*, acetogen, butanol, metabolic engineering

최근 화석연료의 과다 사용으로 인하여 지구 온난화와 같은 기후변화가 발생하고 있으며, 화석연료 또한 가까운 시일 내에 고갈 될 것으로 예상되고 있다. 전 세계적으로 기후변화 및 화석연료의 고갈을 대비하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 바이오화학 및 바이오에너지 분야가 대두되는 것 또한 앞서 언급한 노력의 결과이다. 이러한 관점에서 butanol은 바이오화학 산업 및 차세대 수송용 연료 산업에서 중요하게 고려되고 있다. Butanol은 에너지 밀도가 높아 연료로서 특성이 gasoline과 거의 유사하기 때문에 차세대 수송용 연료로도 입지를 확고히 하고 있다. 그리고 화학용매 및 주요 화합물 합성의 전구체로 사용되고 있다. 현재 대부분 butanol은 석유화학공정으로부터 만들어 지고 있으며, 아주 소량만이 생물공정을 통하여 생산되고 있다.

생물공정에서는 butanol 생합성 대사회로를 가지는 *Clostridium* 속 미생물들을 이용하고 있다(Jones and Woods, 1986). 산생

성기(acidogenic phase) 및 용매생성기(solventogenic phase)와 같은 biphasic 특성을 나타내는 *Clostridium* 속 미생물들은 산생성기 때에는 acetic acid와 butyric acid를 생합성하고 용매 생성기 동안은 butanol을 포함하여 acetone 및 ethanol을 생합성하는 것으로 잘 알려져 있다(Jang *et al.*, 2014a, 2014b). Biphasic 특성을 가지는 *Clostridium* 속 미생물에는 *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum* 등이 있다. 특히, *C. acetobutylicum*은 1910년대에 butanol 및 acetone의 산업적 생산을 위한 발효 공정에 사용된 미생물이다(Moon *et al.*, 2016). 하지만, 자연에서 분리한 야생형 *Clostridium* 속 미생물은 경제성 있는 butanol 생산성을 담보하지 않는다. Butanol 생산성을 향상시키기 위하여 발효 및 분리정제에 대한 수 많은 연구들이 오랜 기간 동안 수행되었다(Friedl, 2016; Li *et al.*, 2016). 대사공학을 통한 연구에 있어서는 대사공학을 위한 도구들의 미비와 함께 biphasic 특성을 가지는 복잡한 대사흐름으로 인하여 우수한 균주들을 개발하기에 많은 어려움

*For correspondence. E-mail: jangys@gnu.ac.kr;
Tel.: +82-55-772-1964; Fax: +82-55-772-1969

이 있었다(Jang and Lee, 2015; Chen and Liao, 2016). 최근, 대사공학을 위한 다양한 도구의 개발과 대사회로의 재해석 등을 통하여 butanol의 대량 생산을 위한 solventogenic *Clostridium*의 대사공학이 활발히 진행되고 있다(Cho et al., 2015; Liao et al., 2016). 또한, *Clostridium tyrobutyricum*과 같은 acidogenic *Clostridium*을 대사공학적으로 개량하여 butanol을 생합성하는 연구와 더불어 이산화탄소, 일산화탄소, 수소와 같은 합성 가스(syngas)로부터 butanol을 생합성하기 위한 대사공학 전략도 개발되어 보고 되었다(Yu et al., 2011, 2012).

본 총설에서는 *Clostridium* 속 미생물을 (1) solventogenic, (2) acidogenic, 그리고 (3) acetogen으로 구분하고, 이들이 가진 대사회로 및 butanol 증산을 위한 대사공학 전략을 리뷰하였다. 또한, 향후 butanol 생합성 향상을 위한 대사회로 최적화 전략을 전망하였다.

Butanol 생산을 위한 대사회로

Clostridium 속 미생물은 지난 100년 동안 butanol 및 acetone 생산을 위하여 사용되었다. 1900년대 초의 연구에서는 *Clostridium* 속 미생물의 butanol 생합성 경로를 알 수는 없었으나 유기산이 생산된 이후에 butanol 및 acetone과 같은 용매가 생산된다는 것은 잘 알려져 있었다. 유기산 생합성 및 용매 생합성에 관

여하는 유전자들에 대해서 일부 밝혀진 후, 전체 genome 정보들이 밝혀져 정확한 butanol 생합성 대사회로에 대해서 정의되었다(Fig. 1). Glucose를 대사하여 최종 산소호흡을 통하여 ATP를 확보하는 호기성 미생물의 대사와 달리, *Clostridium* 속의 혐기성 미생물들은 acetic acid 및 butyric acid를 생합성함으로써 ATP를 확보하는 것으로 알려져 있다(Jones and Woods, 1986). 이미 잘 알려진 것과 같이, *Clostridium*은 해당과정을 거쳐 1몰의 glucose로부터 2몰 ATP, 2몰 pyruvate, 2몰 NADH를 생산한다. 호기성 호흡 대비 부족한 ATP는 산생성기 동안 acetic acid와 butyric acid 생합성 과정에서 보충하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). Acetic acid 생합성 대사회로를 이용하게 된다면, acetyl CoA 분자당 1몰의 ATP 생합성이 가능하지만, butyric acid 생합성 대사회로를 이용하는 경우는 0.5몰의 ATP만을 생합성한다(Fig. 1). ATP 생산 측면에서만 본다면, butyric acid 생합성 경로보다 acetic acid 생합성 경로를 이용하는 것이 더 유리하다고 판단할 수 있다. 하지만, 산생성기 동안 NAD⁺ 재생 및 산화/환원 균형을 맞추기 위해서는 butyric acid 생합성 경로의 활용도 필요한 것으로 알려져 있다. Butyric acid 생합성 경로는 2몰의 acetyl CoA로부터 2몰의 NADH를 소비하여 2몰의 NAD⁺를 재생 가능하기 때문이다. Solventogenic *Clostridium*의 중심 대사회로를 살펴보면, 1몰의 glucose로부터 4몰의 NADH가 생합성된다. Glycolysis를 통하여 만들어진 2몰의 NADH를 제외하고, 추가적으로 pyruvate-ferredoxin

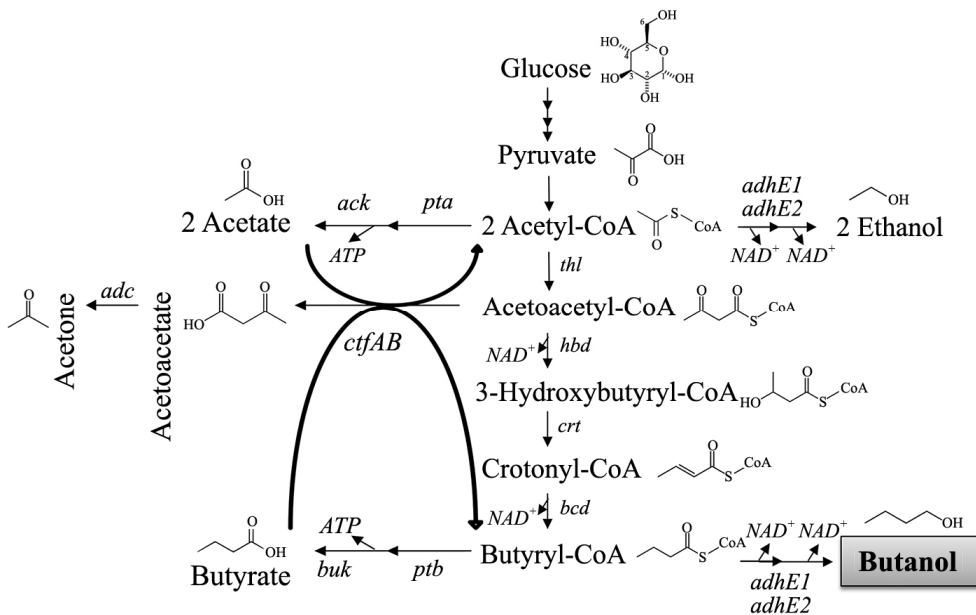


Fig. 1. Representative metabolic pathway of the solventogenic clostridia for butanol production. Enzymes encoded by the genes are as follows: *ack*, acetate kinase; *thl*, acetyl-CoA acetyltransferase (thiolase); *pta*, phosphotransacetylase; *adhE1*, aldehyde/alcohol dehydrogenase 1; *adhE2*, alcohol dehydrogenase 2; *hbd*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; *crt*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (crotonase); *bcd*, butyryl-CoA dehydrogenase; *buk*, butyrate kinase; *ptb*, phosphotransbutyrylase; *ctfAB*, CoA transferase.

oxidoreductase의 활성을 통하여 2몰의 pyruvate가 2몰의 CO₂와 2몰의 acetyl CoA로 전환되는 과정에서 2몰의 NAD(P)H가 만들어지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 산생성기 동안은 세포 내에서 적절한 NADH/NAD⁺ 비율을 유지하기 위해서 ATP 생산 측면에서는 수율이 낮지만 butyric acid 생합성 경로를 활용하여 산화/환원 균형을 맞추는 것으로 알려져 있다. 산화/환원 조절을 위한 또 다른 경로는 hydrogenase를 이용하는 것이 있다. Hydrogenase를 이용하여 NAD(P)H를 산화시켜 수소 생산과 동시에 NAD(P)⁺로 재생시킬 수 있지만, 이 대사회로를 이용할 경우는 ATP 생산에 전혀 이득은 없다(Fig. 1).

한편, C4 화합물인 butanol 생합성은 acetyl CoA 두 분자의 축합 반응으로부터 시작된다고 할 수 있다(Fig. 1). 이 반응은 thiolase에 의해서 매개되는 반응이며, 최근 연구에 따르면 thiolase가 산생성기에서 용매생성기로의 전환에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2015). Acetyl CoA 두 분자의 축합 반응으로 만들어진 acetoacetyl CoA는 두 가지의 대사 경로를 통하여 대사될 수 있다. 한 경로에서는 acetoacetyl CoA가 환원되어 3-hydroxybutyryl CoA로 전환될 수 있으며, 이 반응은 hydroxybutyryl CoA dehydrogenase에 의해서 매개된다. 나머지 경로는 acetic acid 및 butyric acid를 세포 내부로 재흡수 후, acetyl CoA 및 butyryl CoA를 생합성하는 과정에서 CoA 공여체로서 역할을 하는 것이다. 이 경로로 계속 대사 되면 최종적으로 acetone이 생합성 된다. 또한, 3-hydroxybutyryl CoA는 crotonyl CoA를 거쳐 최종 butyryl CoA로 환원되어 aldehyde/alcohol dehydrogenase를 통하여 butanol로 전환된다.

Butanol 증산을 위한 solventogenic clostridia 대사공학 전략

Butanol 증산을 위한 대사공학 연구에 가장 많이 활용된 균주는 *C. acetobutylicum*과 *C. beijerinckii*이다. *C. acetobutylicum*은 butanol 생합성 대사회로를 가지는 가장 대표적인 미생물이며, genome 서열 또한 solventogenic *Clostridium* 중 가장 먼저 밝혀졌다(Hou *et al.*, 2013). 이를 기반으로 유기산 생합성 대사에 관여하는 유전자들(*pta* 및 *buk*)을 상동성재조합(homologous recombination)기법으로 knockout 시키는 대사공학 전략을 수립하였다(Ventura *et al.*, 2013). Acetic acid 생합성 경로에 관여하는 phosphotransacetylase를 암호화하는 *pta* 유전자를 knockout 시킨 균주는 butanol 생합성 능력이 향상되지 않았으나, butyrate kinase를 암호화하는 *buk* 유전자를 knockout한 경우는 butanol 생합성 능력(10.8 g/L, pH 5.5 발효조건)이 야

생형(9.7 g/L, pH 5.5 발효조건) 대비 증가하는 결과를 나타내었다(Green *et al.*, 1996). 다른 연구에서는 butanol 생합성을 위한 최적 조건(pH 5.0)에서 batch 발효를 수행하여 16.7 g/L butanol을 생산하였다(Harris *et al.*, 2000). Butyric acid 생합성에 관여하는 주요 유전자(*buk*)가 knockout 되었음에도 불구하고 여전히 butyric acid의 생합성은 계속 되는 것으로 보고되었다(Harris *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2013). 그 이유는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않으나, 잘 알려지지 않은 isozyme 또는 acyl CoA를 기질로 이용 가능한 잘 알려지지 않은 효소들의 영향으로 추정된다. 상기 보고 이후 2010년대 초까지, butanol 생산을 향상시킨 solventogenic *Clostridium* 대사공학 전략은 보고된 바 없다.

최근 mobile group II intron을 이용한 유전자 knockout 기법이 *Clostridium* 속 미생물에 성공적으로 도입됨에 따라 *pta* 및 *buk* 유전자 knockout의 재연 뿐만 아니라, 유기산 생합성 경로에 있는 또 다른 유전자인 *ack* 및 *ptb* 유전자(각각 acetate kinase 및 phosphotransbutyrylase 암호화)의 knockout도 시도되었다. Mobile group II intron을 이용하여 만들어진 *pta* 또는 *buk* 유전자가 각각 knockout된 돌연변이들의 경우도 모두 acetic acid와 butyric acid의 생합성을 막지는 못하는 것으로 보고되었다(Cooksley *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Kuit *et al.*, 2012). 그 이유에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀진 바 없어서, 향후 연구가 더욱 진행되어야 할 분야이다. Mobile group II intron을 이용하여 *pta* 유전자를 knockout한 균주는 상동성 재조합을 통하여 만들어진 균주와 달리 butanol 생산성이 17.2 g/L까지 향상되는 것으로 보고되었다(Jang *et al.*, 2012). Acetic acid 및 butyric acid 생합성 경로를 형성하는 효소들을 암호화하는 *pta*, *ack*, *ptb*, *buk* 유전자의 single knockout 전략을 통하여 만들어진 균주들은 batch 발효에서 농도 및 수율은 17.2 g/L 및 0.21 g/g glucose를 상회하지는 못하는 것으로 보고되었다(Cooksley *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Kuit *et al.*, 2012).

획기적인 butanol 생산 농도 및 수율 향상은 butanol 생합성 경로를 간접경로와 직접경로로 나누어 분석하여 직접경로를 강화시킴으로써 달성할 수 있었다. 유기산 생합성 경로를 거치지 않고, acetyl CoA로부터 butyryl CoA로 cascade 반응을 거친 후, butanol이 합성되는 경로를 직접경로, 유기산 생합성 경로를 돌아서 butanol이 만들어지는 경로를 간접경로로 구분하였다. 이러한 butanol 생합성 경로 모델은 metabolic flux 분석 및 mass balance 분석을 통하여 확립하였으며, 이를 기반으로 직접경로가 강화되는 방향으로 대사흐름을 조절하여 butanol 농도와 수율을 향상시킨 것으로 보고되었다(Jang *et al.*, 2012). 해당 보고에서는 *pta* 및 *buk* 유전자를 동시에 knockout한 후, point

mutation으로 만들어진 돌연변이 aldehyde/alcohol dehydrogenase를 암호화하는 *adhE1^{D485G}* 유전자를 증폭시키는 대사공학 전략을 보고하였고, 이 균주는 batch 발효에서 butanol 농도 18.9 g/L 및 0.29 g/g glucose 수율을 나타낸 바 있다(Jang et al., 2012). Butanol을 흡착할 수 있는 모듈을 이용한 연속발효 공정에서는 130 g/L butanol 농도와 0.31 g/g의 수율을 나타내었다(Jang et al., 2012). 또한, 최근 acetyl CoA로부터 butyryl CoA로 전환을 위한 4개의 효소 thiolase, 3-hydroxybutyryl CoA dehydrogenase, crotonase, butyryl CoA dehydrogenase를 암호화하는 유전자인 *thl*, *hbd*, *crt*, *bcd*와 *adhE1*, *ctfAB* 유전자를 모두 과발현하고, acetone 생합성에 관여하는 *adc* 유전자를 knockout하는 대신 glutathione 생합성을 위한 대장균의 *gshAB* 유전자를 도입하는 대사공학 전략이 보고되었다(Hou et al., 2013). 해당 연구에서는 batch 발효결과, butanol 14.9 g/L를 생산하였으며 0.34 g/g glucose 수율을 보고하였다(Hou et al., 2013). 상기 두 연구 모두 유기산 생합성 경로를 이용한 butanol 생합성을 최소화하기 위한 전략을 공통으로 적용하였으며, NADH와 같은 세포내의 redox 공급을 원활히 하기 위한 전략을 사용하였다. Jang 등(2012)의 경우는, aldehyde/alcohol dehydrogenase의 NADH-조효소 특이성을 NADH뿐만 아니라 NADPH까지 조효소로 사용가능 하도록 효소공학적 기법으로 효소를 개량하였으며, Hou 등(2013)의 경우는, 세포내의 redox 조절에 기여하는 glutathione을 생합성할 수 있는 유전자를 도입하여 더욱 원활한 산화/환원 반응을 유도한 것으로 설명할 수 있다. 따라서, *C. acetobutylicum*을 이용한 butanol 증산 목적의 대사공학을 위해서는 butanol 생산을 위한 직접경로의 강화와 함께 원활한 산화/환원이 가능하도록 해야할 것으로 보인다.

Butanol 생합성 직접경로의 강화가 아닌 butanol 증산을 위한 대사공학 전략은 6-phosphofructokinase를 암호화하는 *pfkA*와 pyruvate kinase를 암호화하는 *pykA* 유전자를 동시에 과발현시키는 방법이 보고되었다(Ventura et al., 2013). 이들 *pfkA* 및 *pykA*의 과발현은 세포 내의 ATP 및 NADH 농도를 증가시키고 butanol 독성에 대한 저항성을 높여주는 것으로 보고되었다(Ventura et al., 2013). 해당 보고에서는, *C. acetobutylicum*을 이용한 batch 발효에서 최고 농도인 19.1 g/L butanol이 생산되었으나, 수율은 0.21 g/g glucose로 비교적 낮은 값을 보고하였다(Ventura et al., 2013).

C. beijerinckii 또한 가장 활발히 연구된 solventogenic clostridia 중 하나로 알려져 있으며, *C. acetobutylicum*과 동일한 CoA의 존적 대사회로로부터 1-butanol을 생합성하는 것으로 알려져 있다. 또한, 유기산 생합성 경로도 거의 동일한 경로를 나타내고 있다. 다만, *C. acetobutylicum*과 비교하여 *C. beijerinckii*의

genome 크기가 약 2 Mbp 정도 크고, isozyme들이 더 많이 존재하는 특징을 가지는 것으로 알려져 있다(Little et al., 2015). 이러한 이유 등으로 비교적 *C. acetobutylicum* 보다 *C. beijerinckii*를 이용한 대사공학 결과가 조금 더 늦게 도출되고 있으며, 대사공학을 이용한 butanol 생산성 또한 *C. acetobutylicum*을 넘어지지 못하고 있다(Kim et al., 2015). 유기산 생합성에 관여하는 유전자원들의 결실 결과도 *C. acetobutylicum*의 결과와 일치하는 경향을 보이고 있다. 하지만, 최근 다양한 *C. beijerinckii*의 대사공학을 위한 도구들이 개발되어 발표 됨으로써 향후 전망을 밝게 하고 있다.

Butanol 생산을 위한 acidogenic clostridia 대사공학 전략

과거에 acidogenic clostridia는 butanol 생산에 있어서 solventogenic clostridia에 비하여 상대적으로 주목을 크게 받지 못했다. 대표적 acidogenic clostridia인 *C. tyrobutyricum*이 butanol에 대하여 내성이 높다고 보고된 후, 이를 이용한 butanol 생산 연구가 활발히 진행되었다. *C. tyrobutyricum*은 solventogenic clostridia와 달리 butanol을 생합성 못하고 butyric acid만을 생합성하는 것으로 알려져 있다. 최근까지 *C. tyrobutyricum*의 butyric acid 생합성은 solventogenic clostridia와 같이 phosphotransbutyrylase와 butyrate kinase의 작용으로 생합성이 가능한 것으로 추정되었다. 하지만, 최근 *C. tyrobutyricum*의 전체 genome 분석 결과(Lee et al., 2016), 상기 두 효소를 사용하지 않고 *cat1* 유전자가 암호화하는 CoA transferase에 의해서 butyryl CoA와 acetate가 CoA를 맞교환하여 butyric acid를 생합성 하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2).

C. tyrobutyricum 대사공학은 acetic acid 생합성 경로에 관여하는 효소를 암호화하는 *ack* 유전자를 결실하여 butyric acid을 증산 시키는 것이 초기 연구들의 목적이었고, 이를 통하여 butyric acid의 증산이 확인된 바 있다(Liu et al., 2006). 이후 연구에서는 목적 화합물을 butyric acid에서 butanol로 전환하였으며, 목적을 달성하기 위하여 *C. acetobutylicum*의 *adhE2* 유전자를 도입하는 전략을 취하였다(Yu et al., 2011). 그 결과, mannitol을 탄소원으로 사용하여 16.4 g/L의 butanol을 0.30 g/g의 수율로 생산하는 것에 성공하였다(Yu et al., 2011). 동일한 균주의 glucose를 이용한 발효 결과는 10 g/L 및 0.27 g/g의 butanol 농도 및 수율을 보였다(Yu et al., 2011). 후속 연구에서는 *adhE2* 유전자 발현용 plasmid의 origin을 pIM13 기반에서 pBP1으로 변경하여 mannitol을 탄소원으로 사용하여 20.5 g/L

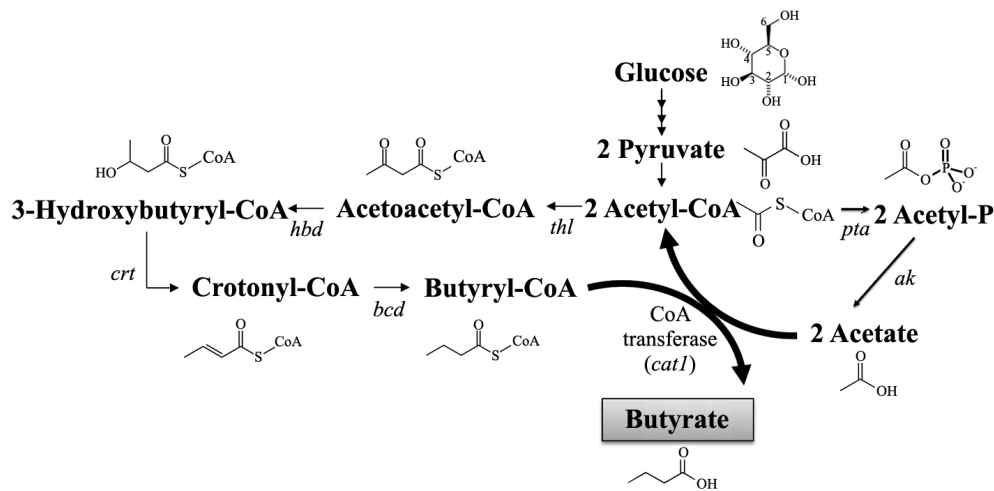


Fig. 2. Central metabolic pathway of *C. tyrobutyricum*. Enzymes encoded by the genes are as follows: *thl*, acetyl-CoA acetyltransferase (thiolase); *hbd*, β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; *crt*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (crotonase); *bcd*, butyryl-CoA dehydrogenase; *pta*, phosphotransacetylase; *ak*, acetate kinase; *cat1*, CoA transferase.

Table 1. Fermentation performance of the metabolically engineered *Clostridium* strains

Type of clostridia	Strain	Genotype	Butanol		Fermentation and carbon source	Reference
			Titer (g/L)	Yield (g/g)		
Solventogenic clostridia	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Δbuk	10.8	-	Batch fermentation (pH 5.5), Glucose	Green <i>et al.</i> (1996)
			16.7	-	Batch fermentation (pH 5.0), Glucose	Harris <i>et al.</i> (2000)
		Δpta	17.2	-	Batch fermentation, Glucose	Jang <i>et al.</i> (2012)
		$\Delta buk, \Delta pta, adhE1^{D483G^+}$	18.9	0.29	Batch fermentation, Glucose	Jang <i>et al.</i> (2012)
			130	0.31	Fed-Batch fermentation, Glucose	Jang <i>et al.</i> (2012)
Acidogenic clostridia	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	$gshAB^+, thl^+, hbd^+, crt^+, bcd^+, adhE1^+, ctjAB^+$	14.9	0.34	Batch fermentation, Glucose	Hou <i>et al.</i> (2013)
		$pfkA^+, pykA^+$	19.1	0.21	Batch fermentation, Glucose	Ventura <i>et al.</i> (2013)
		$adhE2^+$ (pIM13 origin)	16.4	0.30	Batch fermentation, Mannitol	Yu <i>et al.</i> (2011)
Acetogen	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	$thlA^+, hbd^+, crt^+, bcd^+, adhE^+, bdhA^+$	0.15	-	Batch fermentation, Glucose	Kopke <i>et al.</i> (2010)
		$adhE2^+$ (pBP1 origin)	20.5	0.33	Batch fermentation, Mannitol	Yu <i>et al.</i> (2012)

의 butanol 농도와 0.33 g/g의 수율을 달성하였다(Yu *et al.*, 2012). 대사공학을 통하여 만들어진 *C. tyrobutyricum*이 glucose를 탄소원으로 한 경우보다 환원된 당인 mannitol을 이용할 때, butanol 생합성을 더욱 효율적으로 하는 것을 보여준다. 이는 야생형 *C. tyrobutyricum*의 산화/환원 전위가 butyric acid 생합성에 최적화 되어 있기 때문인 것으로 보이며, butanol 생합성을 위해서는 더 많은 환원력의 공급이 필요한 것으로 보인다. 따라서, 향후 butanol 생합성을 위한 *C. tyrobutyricum*의 대사공학에서는 이들 산화/환원 전위 균형을 조절하기 위한 전략이 필요할 것으로 생각된다.

Butanol 생산을 위한 acetogen 대사공학 전략

Acetogen은 혐기성조건에서 생존하는 미생물로, Wood-Ljungdahl 대사회로를 통해서 합성가스(syngas; CO₂, CO, H₂)로부터 acetyl CoA를 생합성하고, 이로부터 acetic acid을 생합성하는 균주들로 대표되고 있다. 최근 다양한 바이오매스를 이용하여 고효율 바이오 연료 및 바이오 화합물 생합성을 위한 노력이 활발히 진행되고 있지만, 바이오매스 feedstock의 전처리 기술 및 비용적 측면에서 상당한 제약이 된다. 이들 모든 바이오매스를 가스화한 합성가스를 이용하는 기술은 feedstock

활용성 및 경제성에 있어서 장점이 큰 유망 기술로 평가받고 있다. 이와같이 가스 자원의 활용 측면에서 acetogen은 최근 큰 관심을 받고 있다. Acetogen은 특정 genus에 속하지 않고 다양한 genus에 포함되어 있다. *Clostridium* 속에도 이와 같은 유용한 acetogen들이 일부 있어서, 이들을 이용한 butanol 생합성을 위한 연구가 비교적 최근에 시작되었다. 예를 들어, *Clostridium ljungdahlii*를 이용한 butanol 생산을 위한 대사공학 연구가 대표적이다. *C. acetobutylicum*의 주요 butanol 생합성 대사 회로, 즉 thiolase로부터 aldehyde/alcohol dehydrogenase를 암호화하는 유전자들을 *C. ljungdahlii*에 도입하여 발현 시켰다 (Kopke et al., 2010). 그 결과, 발효과정에서 합성가스(CO, CO₂ H₂)로부터 0.15 g/L의 butanol을 생합성 하였다(Kopke et al., 2010). 하지만, 발효 종료 후에는 0.015 g/L 이하의 butanol만이 생산된 것으로 보고된 바 있다(Kopke et al., 2010). 이와같이 Wood-Ljungdahl 대사회로를 이용하여 butanol을 생산할 경우, 다양한 feedstock을 활용할 수 있을 뿐만 아니라 이용 효율을 크게 증가 시킬 것으로 기대되지만, 합성가스로부터 butanol 생합성을 위한 대사회로 최적화 연구가 필요한 실정이다.

전 망

Clostridium 속 미생물을 이용한 butanol 생산은 100년이 넘는 오랜 역사를 가지고 있으며, 최근 인류가 해결해야 할 문제들에 대한 해법을 제공해 줄 수 있는 방법 중 하나로 손꼽히고 있다. 또한, 최근 대사공학 및 시스템대사공학 기술의 발달과 더불어 난공블락으로 여겨졌던 *Clostridium* 속 미생물의 대사공학 전략들이 활발하게 개발되어 보고되고 있다. 이러한 흐름은 더욱 경제적으로 효율성이 높은 균주의 제공 가능성을 예상할 수 있게 해주고 있다. 특히, genome 정보에 기반하여 시스템 수준에서 *Clostridium* 속 미생물의 대사흐름을 분석하고 예측할 수 있는 기술들의 발전은 더욱 우수한 균주의 개발 전망을 밝게하고 있다. 지나간 최근 10년 동안, 과거로부터 축적한 정보들을 기반으로 대사공학 및 시스템대사공학 연구가 활발히 수행되어 국내의 경우 butanol의 상업적 생산을 눈앞에 두고 있다. 앞으로는 우리가 알고 있는 정보에 기반한 대사공학을 수행하기에는 정보들이 많이 부족할 것으로 예상된다. *Clostridium* 속 미생물의 대사공학을 이용한 butanol 증산을 위해서는 더욱 효율적인 대사공학 전략의 개발이 필요할 것으로 생각된다. 예를 들자면, 이미 개발된 *in silico* 대사 네트워크 모델의 개선 및 활용과 더불어 주요 효소의 기능을 정확히 밝히는 연구들이 필요할 것으로 전망된다.

적 요

*Clostridium*은 그람양성, 장간균으로 포자를 형성하는 절대혐기성 균이다. *Clostridium*은 다양한 기질을 이용할 수 있고, 유용 화합물 합성을 위한 building block으로 사용 가능한 대사산물을 생산할 수 있어, 최근 많은 관심을 끌고 있다. 특히, *Clostridium*을 이용하여 생산된 butanol은 차세대 연료로서 고려되고 있다. 수송용 연료로서 butanol은 1세대 바이오연료인 ethanol과 비교하여 더 높은 에너지 밀도와 낮은 흡습성을 보이는 것으로 알려져 있다. 최근, butanol 생산을 위한 *Clostridium* 대사공학이 활발히 진행되어 상당한 진보를 보이고 있다. 본 연구에서는 butanol 생산을 위한 *Clostridium*의 대사공학 전략을 리뷰하고, 관련 분야에 대해서 간략히 전망하였다.

감사의 말

본 연구는 한국연구재단의 C1가스 리파이너리 사업단(NRF-2015M3D3A1A01064918)과 2016년도 경상대학교 신입교원 연구기반조성 사업(2016-0199) 지원으로 수행하였습니다.

References

- Chen, C.T. and Liao, J.C. 2016. Frontiers in microbial 1-butanol and isobutanol production. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw020.
- Cho, C., Jang, Y.S., Moon, H.G., Lee, J., and Lee, S.Y. 2015. Metabolic engineering of clostridia for the production of chemicals. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **9**, 211-225.
- Cooksley, C.M., Zhang, Y., Wang, H., Redl, S., Winzer, K., and Minton, N.P. 2012. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab. Eng.* **14**, 630-641.
- Friedl, A. 2016. Downstream process options for the ABE fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw073.
- Green, E.M., Boynton, Z.L., Harris, L.M., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., and Bennett, G.N. 1996. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology* **142**, 2079-2086.
- Harris, L.M., Desai, R.P., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. 2000. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 1-11.
- Hou, X., Peng, W., Xiong, L., Huang, C., Chen, X., Chen, X., and Zhang, W. 2013. Engineering *Clostridium acetobutylicum* for alcohol production. *J. Biotechnol.* **166**, 25-33.

- Jang, Y.S., Han, M.J., Lee, J., Im, J.A., Lee, Y.H., Papoutsakis, E.T., Bennett, G., and Lee, S.Y. 2014a. Proteomic analyses of the phase transition from acidogenesis to solventogenesis using solventogenic and non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5105-5115.
- Jang, Y.S., Im, J.A., Choi, S.Y., Lee, J.I., and Lee, S.Y. 2014b. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butyric acid production with high butyric acid selectivity. *Metab. Eng.* **23**, 165-174.
- Jang, Y.S. and Lee, S.Y. 2015. Recent advances in biobutanol production. *Ind. Biotechnol.* **11**, 316-321.
- Jang, Y.S., Lee, J.Y., Lee, J., Park, J.H., Im, J.A., Eom, M.H., Lee, J., Lee, S.H., Song, H., Cho, J.H., et al. 2012. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* **3**, e00314-12.
- Jones, D.T. and Woods, D.R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
- Kim, S., Jang, Y.S., Ha, S.C., Ahn, J.W., Kim, E.J., Lim, J.H., Cho, C., Ryu, Y.S., Lee, S.K., Lee, S.Y., et al. 2015. Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. *Nat. Commun.* **6**, 8410.
- Kopke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wierzer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., and Durre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 13087-13092.
- Kuit, W., Minton, N.P., Lopez-Contreras, A.M., and Eggink, G. 2012. Disruption of the acetate kinase (*ack*) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 729-741.
- Lee, J., Jang, Y.S., Han, M.J., Kim, J.Y., and Lee, S.Y. 2016. Deciphering *Clostridium tyrobutyricum* metabolism based on the whole-genome sequence and proteome analyses. *mBio* **7**, e00743-16.
- Li, S.Y., Chiang, C.J., Tseng, I.T., He, C.R., and Chao, Y.P. 2016. Bioreactors and *in situ* product recovery techniques for acetone-butanol-ethanol fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw107.
- Liao, C., Seo, S.O., and Lu, T. 2016. System-level modeling of acetone-butanol-ethanol fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw074.
- Little, G.T., Winzer, K., and Minton, N.P. 2015. Genome sequence of the solvent-producing *Clostridium beijerinckii* strain 59B, isolated from staffordshire garden soil. *Genome Announc.* **3**, e00108-15.
- Liu, X., Zhu, Y., and Yang, S.T. 2006. Construction and characterization of *ack* deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1265-1275.
- Moon, H.G., Jang, Y.S., Cho, C., Lee, J., Binkley, R., and Lee, S.Y. 2016. One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw001.
- Ventura, J.R.S., Hu, H., and Jahng, D. 2013. Enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by double overexpression of 6-phosphofructokinase and pyruvate kinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7505-7516.
- Yu, M.R., Du, Y.M., Jiang, W.Y., Chang, W.L., Yang, S.T., and Tang, I.C. 2012. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 881-889.
- Yu, M.R., Zhang, Y.L., Tang, I.C., and Yang, S.T. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metab. Eng.* **13**, 373-382.