

# *Saccharomyces cerevisiae* M3G3를 이용한 1,2-Propanediol의 생산 최적화

구자룡<sup>1</sup>, Nancy A. DaSilva<sup>2</sup>, 윤현식<sup>1\*</sup>

## 1,2-Propanediol Production by Using *Saccharomyces cerevisiae* M3G3

Ja-Ryong Koo<sup>1</sup>, Nancy A. DaSilva<sup>2</sup>, and Hyun Shik Yun<sup>1\*</sup>

접수: 2011년 8월 24일 / 게재승인: 2011년 10월 25일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** 1,2-propanediol (1,2-PD) is a commodity chemical that is currently produced from petrochemical derivatives. *Saccharomyces cerevisiae* is well characterized and a successful industrial microorganism to enable the improvement of the 1,2-propanediol production by metabolic engineering. A recombinant *S. cerevisiae* M3G3 was used to produce 1,2-propanediol. *S. cerevisiae* M3G3 is the diploid strain that contains 3 copies of *mgs* (methylglyoxal synthase) and *gldA* (glycerol dehydrogenase). *S. cerevisiae* M3G3 was cultivated at various culture conditions by changing culture temperature, glucose concentration, and inducer concentration. Also the effect of induction time was studied to optimize the production of 1,2-propanediol. Batch and fed-batch cultivation of *S. cerevisiae* M3G3 was performed by using a 5 L jar fermenter. The highest concentration of 1,2-propanediol in batch cultivation was 0.86 g/L and it was further improved to 1.33 g/L in fed-batch cultivation.

**Keywords:** 1,2-Propanediol, *Saccharomyces cerevisiae*, *mgs*, *gldA*, fermentation

<sup>1</sup>인하대학교 생물공학과

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, Inha University 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea  
TEL: +82-32-860-7517, FAX: +82-32-876-8751  
e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

<sup>2</sup>UC Irvine 재료과학·화학공학과

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of California, Irvine

### 1. 서론

1,2-propanediol (1,2-PD, propylene glycol)은 무색, 무취이며 약간 쓴맛을 내는 물질로서 물과 아세톤, 클로로포름, 벤젠 등의 용매에 잘 녹는다. 비대칭적 탄소 구조를 띠고 있으며 입체 이성질체로 존재한다. 산업적으로 얻어지는 생산물은 라세미 1,2-propanediol이다. 1,2-propanediol은 끓는점이 매우 높으며 강한 소수성을 띠고 있다 [1]. 1,2-propanediol은 주로 플라스틱과 레진, 항공기 방빙제, 페인트와 코팅제 그리고 기능성 화장품 제조에 사용되고 있다 [1-4]. 1,2-propanediol의 전 세계 소비량은 2003년에 1천 200만 톤이며 [5], 가격은 2004년 기준 파운드당 \$0.66이다 [6]. 산업적으로 1,2-propanediol은 propylene oxide의 수화반응에 의해 만들어지는데 [7], 독성을 가진 물질이 중간 산물로 생산되며 처리과정에도 상당한 비용이 들어간다는 단점이 있다 [4,8]. 그리고 다단계 공정 개발과 최종 회수가 간단하지 않아 생산 초기 비용을 높이는 문제가 있다 [4]. 재생자원을 이용하여 1,2-propanediol을 생산하는 방법에는 여러 가지가 있지만 고열과 고압에서 당류를 수소첨가분해 (hydrogenolysis)하는 방법은 생산될 때 1,2-propanediol과 다른 polyol이 혼합되어 있어서 1,2-propanediol의 정제를 필요로 한다 [1,9,10]. 최근 글루코오스와 같은 당류를 이용하여 1,2-propanediol을 생산하는데 여러 가지 미생물이 이용되고 있으며 *E. coli*와 *S. cerevisiae*를 이용하여 글리세롤을 1,2-propanediol로 전환 생산하도록 대사공학적인 기법을 이용한 연구도 진행되고 있다 [1,4,8,11,12].

*Saccharomyces cerevisiae*는 높은 생산성과 비병원성, 빈약한 영양 상태에서도 잘 자라는 능력 그리고 대사공학적인 유용성 때문에 산업적으로 매우 유용한 미생물로 분류된다 [2].

Hoffman에 의해 *E. coli*의 methylglyoxal synthase (*mgs*)와 glycerol dehydrogenase (*gldA*)를 이용하여 *S. cerevisiae*에서 처음으로 1,2-propanediol이 생산되었다 [2]. *S. cerevisiae* M3G3 역시 1,2-propanediol을 생산하기 위해 개발된 균주이다 [13]. 두 유전자, *mgs*와 *gldA*를 각각 균주에 통합시키고 교배시켜 *mgs*와 *gldA*의 여러 가지 조합을 갖는 균주를 만들었는데 *S. cerevisiae* M3G3는 이들 조합중 *mgs* 유전자 3개와 *gldA* 유전자 3개가 포함된 것이다. 본 연구에서는 *S. cerevisiae*에서 1,2-propanediol을 생산하는데 필요한 methylglyoxal synthase와 glycerol dehydrogenase 유전자를 3개씩 포함하고 있는 *S. cerevisiae* M3G3를 이용하여 배양 온도, 글루코오스 농도, 유도물질 농도, 그리고 유도시기를 조절하여 1,2-propanediol의 생산을 위한 최적 조건을 얻고 회분식 배양과 유가식 배양을 이용하여 1,2-propanediol을 생산하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주

*S. cerevisiae* M3G3는 1,2-propanediol을 생산하기 위해 유전적으로 변형시킨 균주이다 [13]. *S. cerevisiae* NOY386aA (*MATa ura3052 lys2-801 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*)와 BWG1-7a (*MATa adel-100 his4-519 leu2-3, 112 ura3-52 GAL<sup>+</sup>*) 균주에 *E. coli*에서 유래한 유전자인 *mgs*와 *gldA*를 pMH47과 pMH51에 클로닝 시킨 후 pδUB를 통합벡터 (integration vector)로 사용하여 염색체에 통합시켜 두 균주를 교배 기법을 통해 제작되었다 [2]. 균주는 20% 글리세롤을 혼합하여 -70°C에서 보관하였다.

### 2.2. 배지

*S. cerevisiae* M3G3의 배양은 YPD 배지를 이용하였는데 조성은 yeast extract (Difco Co., U.S.A.) 10 g/L, bacto-peptone (Difco Co., U.S.A.) 20 g/L, 글루코오스 20 g/L이다 [14]. *S. cerevisiae* M3G3의 균주 선별에는 SDC (U) 배지를 이용하였다. SDC (U) 배지의 조성은 6.7 g/L bacto-yeast nitrogen base (without amino acids) (Difco Co., U.S.A.), 20 g/L 글루코오스, 5 g/L casamino acid (Difco Co., U.S.A.), 20 mg/L uracil (Sigma Chemical Co., U.S.A.)이다 [13,15]. 전 배양은 24시간동안 본 배양 전에 수행되었고, 본 배양은 100시간 동안 이루어졌다. 250 mL 삼각플라스크에 50 mL의 배지를 넣어 30°C에서 회전식 진탕기 (Vision Science Co., Korea)에서 200 rpm으로 배양하였다.

### 2.3. 배양 온도의 영향

*S. cerevisiae* M3G3에 의한 1,2-propanediol의 생산을 위한 최적 온도를 정하기 위한 실험을 수행하였다. 배양 온도 27°C, 30°C, 33°C, 36°C에서 배양하였다.

### 2.4. 글루코오스 농도의 영향

일반적으로 *S. cerevisiae*는 탄소 공급원으로 글루코오스를

사용한다 [2,16]. 배양 배지내의 글루코오스 농도를 조절하여 *S. cerevisiae* M3G3의 최적성장과 1,2-propanediol의 최대 생산 조건을 고찰하였다. YPD 배지 내 글루코오스의 농도를 1%, 2%, 3%, 4%로 조절하여 배양하였다.

### 2.5. 유도물질 농도의 영향

재조합된 *S. cerevisiae* M3G3의 *mgs*와 *gldA*는 copper metallothionine을 인코딩하는 *CUP1* 프로모터에 의하여 발현이 조절되는데 [17], *CUP1* 프로모터는 유전자 발현을 위해 구리 이온이 필요하다. 구리 이온의 농도가 1,2-propanediol 생산에 미치는 영향을 확인하고 유도물질의 최적 농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 유도물질로  $\text{CuSO}_4$ 를 사용하였으며 농도는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM로 조절하였다 [18].

### 2.6. 유도 시기의 영향

최적 유도시기를 결정하기 위해 유도시기에 따른 1,2-propanediol의 생산을 고찰하기 위한 실험을 수행하였다. 배양시작과 함께 유도물질 ( $\text{CuSO}_4$ )을 첨가하거나 배양 시작 후 *S. cerevisiae* M3G3의 성장에 따라 유도물질을 첨가하며 실험을 수행하였다.

### 2.7. 배양

회분식 배양과 유가식 배양은 5 L jar fermentor (KoBioTech Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 배양온도는 30°C, 교반 속도는 200 rpm, 통기속도는 1 vvm이었다. 유가식 배양은 배양 중 HPLC 분석을 통하여 글루코오스가 모두 소비된 것을 확인한 후, 2%씩 2회 추가하였다.

### 2.8. 분석

배양 종료 후 배양액을 Centrifuge 5403 (Eppendorf Co., Germany)을 이용하여 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 회수한 배양액을 증발기 SB-1000 (EYELA, Japan)를 이용하여 60°C에서 1/10로 농축한 후, 0.2 μm RC filter (Sartorius, Germany)를 이용하여 여과하였다. 1,2-propanediol의 분석은 LC-10AD HPLC system (Shimadzu, Japan)에서 Aminex HPX-87H 컬럼 (BioRad, U.S.A.)을 이용하여 수행하였다. 컬럼의 오븐 온도는 40°C로 유지하였다. 검출기는 RID-10A (Shimadzu, Japan)를 이용하였고, 이동상은 0.05 M sulfuric acid를 유속 0.5 mL/min으로 공급하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 배양 온도의 영향

배양 온도는 세포 대사에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [19]. 30°C에서 가장 많은 1,2-propanediol (0.15 g/L)이 생산되었다 (Table 1). 이는 다른 온도 조건인 27°C와 33°C에서 생산된 1,2-propanediol의 양과 비교하여 각각 2.24, 2.31배 더 높은 값이다. 30°C는 *S. cerevisiae* 성장 최적 온도이며 1,2-propanediol 생산은 세포 성장과 크게 연관되어 있음을 알 수 있다.

**Table 1.** Effect of temperature on 1,2-propanediol production

Temperature (°C)	1,2-propanediol concentration (g/L)
27	0.067
30	0.150
33	0.065
36	0.041

### 3.2. 글루코오스 농도의 영향

YPD 배지는 2%의 글루코오스를 포함하고 있다. 글루코오스는 *S. cerevisiae*의 주요한 탄소원이고 배양에 있어서 중요한 영양인자이다 [2]. *S. cerevisiae* M3G3의 배양과 1,2-propanediol의 생산을 위한 최적 글루코오스 농도를 결정하기 위한 실험을 하였다. YPD 배지의 글루코오스 농도를 1%, 2%, 3%, 4%로 조절하였다. 2% 글루코오스 YPD 배지에서 *S. cerevisiae* M3G3는 전체중량이 가장 높았으며 4% 글루코오스 YPD 배지는 2% 글루코오스 YPD 배지의 전체중량의 약 48% 정도 밖에 되지 않았다. 1,2-propanediol의 생산량도 2% 글루코오스 YPD 배지에서 가장 많이 생산되었다 (Table 2). 1,2-propanediol의 생산량은 2% 글루코오스 YPD 배지에서 생산된 양보다 4% 글루코오스 YPD 배지에서 생산된 양이 3.06배 감소하였다.

**Table 2.** Effect of glucose concentration on 1,2-propanediol production

Glucose Concentration (%)	1,2-propanediol concentration (g/L)
1	0.080
2	0.150
3	0.075
4	0.049

### 3.3. 유도물질 농도의 영향

*CUPI* 프로모터는 효모발현벡터에 이용되는 프로모터이다 [17]. 구리 이온은 세포 내의 다양한 단백질의 보조인자로서 필수적인 영양인자이며 가격은 비싸지 않으며 낮은 농도에서는 세포의 대사에 무해하다. 본 연구에서는  $\text{CuSO}_4$ 를 *CUPI* 프로모터의 유도물질로 사용하여 1,2-propanediol의 생산에서 구리 이온의 농도에 따른 영향에 대하여 연구를 수행하였다. 일반적으로 유도를 위한 구리이온의 농도는 1~10 mM이지만 구리이온의 농도가 높아지면 세포막과 목적물질의 생산량에 영향을 줄 수 있다 [20,21].  $\text{CuSO}_4$ 의 농도를 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM로 수행한 결과, 1.0 mM  $\text{CuSO}_4$ 의 농도에서 생산된 1,2-propanediol의 양이 0.5 mM과 1.5 mM  $\text{CuSO}_4$ 의 농도에서 생산된 1,2-propanediol의 양보다 각각 1.81배와 1.95배 높았다 (Table 3).

**Table 3.** Effect of inducer concentration on 1,2-propanediol production

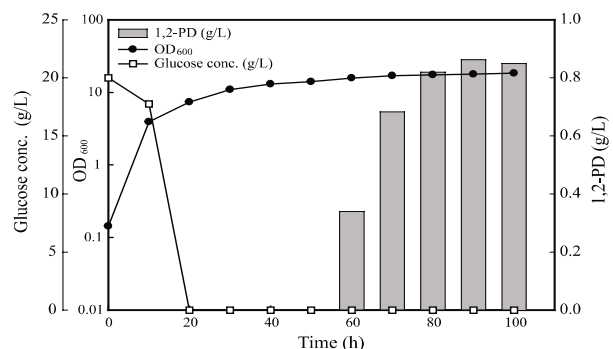
Inducer Concentration (mM)	1,2-propanediol concentration (g/L)
0.5	0.083
1.0	0.150
1.5	0.077
2.0	0.073

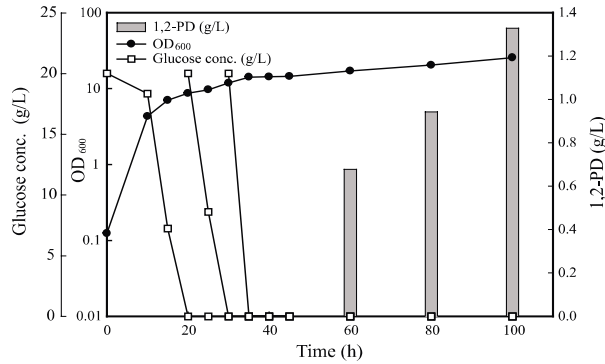
### 3.4. 유도시기의 영향

유도시기를 변화시키면서 1,2-propanediol의 생산량을 측정하였다. 유도시기는 접종과 함께 하거나 여러 성장 시기에 수행하였다. 그 결과, 배양시작과 동시에 유도하였을 때보다 지수기, 정체기에 유도하였을 때 더 많은 1,2-propanediol이 생산되는 것을 확인할 수 있었다 (data not shown). 구리가 미량 급속이어서 세포성장에 큰 영향을 미치지 않는지만 외부 유전자 발현의 유도과정에 따라 세포성장에 영향을 끼쳐서 배양 초기부터 유도를 시켰을 때에는 1,2-propanediol 생산량이 감소한 것으로 추정된다. 회분식 배양에서 실질적인 세포성장이 거의 없는 시간대인 배양개시 40시간 내지 50시간부터는 1,2-propanediol 농도에 큰 변화가 없어서 1,2-propanediol 생산은 글루코오스 고갈 시기와는 크게 관련이 없었으며, 세포성장시 세포 농도가 높을수록 더 많은 양의 1,2-propanediol이 생산되었다. 세포농도가 더 높은 시기에 유도를 하면 더 많은 1,2-propanediol이 생산된다는 것을 알 수 있었다. 글루코오스는 배양 개시 후 20시간 경과 후 고갈되었으며 유도시기를 배지중의 글루코오스 고갈 직후, 4시간 간격으로 16시간까지 조절한 결과 16시간 후 유도시켰을 때 1,2-propanediol의 농도가 가장 높았다.

### 3.5. 회분식 배양과 유가식 배양에 의한 1,2-propanediol 생산

온도와 pH가 조절되고 산소가 충분하게 공급될 수 있는 배양기에서 회분식 배양을 수행하였다. 회분식 배양을 하면서 정체기 (배양개시후 45시간)에서 유도시켰을 때 1,2-propanediol의 최종농도는 0.86 g/L이었다 (Fig. 1). 세포농도를 높이고 1,2-propanediol의 농도를 증가시키기 위하여 글루코오스를 추가적으로 공급하는 유가식 배양을 수행하였다. 유가식 배양을 하면서 세포농도를 높이고 유도시킨 결과, 회분식 배양보다 약 40% 증가한 1.33 g/L의 1,2-propanediol이 생산되었다 (Fig. 2). 이는 처음 보고되었던 *S. cerevisiae* M3G3 배양결과와 비교하면 5.54배 높았으며 [13], *S. cerevisiae*에서 high copy 플라스미드인 pMH47과 pMH51을 이용하여 각각 *mgs*와 *gldA*를 발현시켜 1,2-propanediol 생산한 Hoffman의 결과보다는 2.56배 높았다 [2]. 그리고 *S. cerevisiae*의 상호 전환 유전자인 *tpi1* 유전자를 결실하여 1,2-propanediol의 생산량을 1.11 g/L를 생산한 연구 결과에 비하여 0.22 g/L가 더 많이 생산되었다 [11].

**Fig. 1.** Production of 1,2-propanediol during batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* M3G3.



**Fig. 2.** Production of 1,2-propanediol during fed-batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* M3G3.

#### 4. 결론

1,2-propanediol의 생산을 위한 배양 온도, 배지 내의 글루코스 농도, 유도물질의 농도, 유도시기를 조절하여 그 영향을 고찰하였다. 얻어진 조건을 기본으로 하여 5 L 발효기를 이용한 회분식 배양에서 0.86 g/L의 1,2-propanediol의 생산량을 얻었다. 세포농도를 증가시키기 위하여 유가식 배양을 수행하였으며 세포농도가 증가하면서 1,2-propanediol 농도가 1.33 g/L로 증가하여 회분식 배양보다 생산량이 1.54배 증가하였다.

#### 감사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

#### References

- Saxena, R. K., P. Anand, S. Saran, J. Isar, and L. Agarwal (2010) Microbial production and applications of 1,2-propanediol. *Ind. J. Microbiol.* 10: 2-11.
- Hoffman, M. L. (1999) Metabolic engineering of 1,2-propanediol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin, Madison, WI, USA.
- Altaras, N. E. and D. C. Carmeron (2000) Enhanced production of (R)1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16: 940-946.
- Carmeron, D. C., N. E. Altaras, M. L. Hoffman, and A. J. Shaw (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol. Prog.* 14: 116-125.
- Behr, A., J. Eilting, K. Irawadi, J. Leschinski, and F. Lindner (2007) Improved utilization of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chem.* 10: 13-30.
- Anonymous. *Chemical profile propylene glycol (PG)*. www.icis.com.
- Anonymous. (1998) Propylene glycol: Chemical profile. *In Chemical Marketing Reporter* 254: 33.
- Bennett, G. N. and K. Y. San (2001) Microbial formation, biotechnological production and applications of 1,2-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 1-9.
- Altaras, N. E. and D. C. Carmeron (1999) Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1180-1185.
- Lenth, C. W. and R. N. D. Puis (1945) Polyhydric alcohol production by hydrogenolysis of sugars in the presence of copper-aluminum oxide. *Ind. Eng. Chem.* 37:152-157.
- Jung, J. Y., E. S. Choi, and M. K. Oh (2008) Enhanced production 1,2-propanediol by *tpi1* deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotech.* 18: 1797-1802.
- Clomburg, J. M. and R. Gonzalez (2010) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.* 108: 867-879.
- Lee, W. and N. A. DaSilva (2006) Application of sequential integration for metabolic engineering of 1,2-propanediol production in yeast. *Metabol. Eng.* 8: 58-65.
- Amberg, D. C., D. J. Burke, and J. N. Strathern (2005) pp. 199-209 *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, USA.
- Sherman, F. (2002) *Getting started with yeast*. pp. 3-41. In: Guthrie, C. and G. R. Fink (eds.). *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, Academic Press. San Diego, California.
- Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 202-207.
- Etcheverry, T. (1990) pp. 319-329. In: Goeddel, D. V. (ed.) *Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. Methods in Enzymology: Gene Expression Technology*, Academic Press. San Diego, California.
- Koller, A., J. Valesco, and S. Subramani (2000) The *CUPI* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast.* 16: 651-656.
- Torija, M. (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 47-53.
- Lee, F. W. F. (1996) *Amplification and expression of heterologous genes in Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis. University of California, Irvine, CA, USA.
- Avery, S. V., N. G. Howlett, and S. Radice (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3960-3966.