

당화가 용이한 형질전환 바이오에너지 작물 및 재조합  
셀룰라제 저가생산기술 개발

(Development of transgenic bioenergy crops improving  
saccharification and cost-effective production system for  
recombinant cellulase )

2013. 09.

주관연구기관 : (주)젠닥스

협동연구기관 : 한국생명공학연구원

상명대학교

농 립 축 산 식 품 부



# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “당화가 용이한 형질전환 바이오에너지 작물 및 재조합 셀룰라제 저가생산 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9월 30일

주관연구기관명 : (주)젠닥스

주관연구책임자 : 정 화 지

세부연구책임자 : 정 화 지

연 구 원 : 박 은 준

연 구 원 : 배 현 경

연 구 원 : 차 재 호

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 손 정 훈

협동연구기관명 : 상명대학교

협동연구책임자 : 형 남 인



# 요 약 문

## I. 제 목

당화가 용이한 형질전환 바이오에너지 작물 및 재조합 셀룰라제 저가생산기술 개발

## II. 연구개발의 목적

당화가 용이한 섬유질계 비식용 및 비사료용 형질전환 에너지 작물개발과 재조합 효소의 대량생산 기술을 개발하여 에너지작물의 전처리 과정 중 Cellulose의 자가분해와 효소당화를 동시에 수행하는 경제적인 당화공정 개발하였다

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발

국내 비식용 비사료 작물 중 억새, 갈대, 물억새를 중심으로 유전자원을 수집하고 그것들의 특성을 분석하였다. 종자 또는 식물체 기관으로부터 캘러스 유기 및 재분화 조건을 탐색하여 조직배양 방법을 확립하였다. *Agrobacterium* 매개 형질전환을 위한 적정 조건을 확립하였고 이를 바탕으로 보고 유전자 도입 형질전환 식물체를 개발하였다. 최종적으로 셀룰라제 유전자 도입 형질전환을 실시하여 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 개발하고자 하였다.

### 2. 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화

재조합 셀룰라제를 발현하는 모델작물로 벼를 이용하였다. 먼저 셀룰라제 단백질을 생산하기 위하여 항시발현 및 건조유도성 프로모터를 선발하였으며, 효모 혹은 박테리아 유래의 셀룰라제 유전자를 선발하여 벼 핵게놈으로 도입하여 형질전환 벼를 제작하였다. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 전자현미경 관찰을 통한 물리적 분석을 실시하였고, 벧짚의 전처리 전·후의 성분분석, 당화를 통해 화학적 분석을 실시함으로써 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 식물이 바이오매스로서의 활용 가능성을 확인하였다.

### 3. 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

섬유소 바이오매스의 효소당화를 위해서 필요한 수입 효소의 국산화를 위해서 곰팡이 유래의 다수의 셀룰레이즈 유전자를 발굴하고 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 재조합 발현하였다. 셀룰레이즈의 고분비 생산을 위해 효모 단백질 맞춤형 분비생산 기술인 TFP 기술을 이용하여 6종의 효소(exoglucanase I, exoglucanase II, endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase 및  $\beta$ -xylosidase)를 1~5 g/L 수준으로 고분비 생산하고 이들의 복합체인 셀룰라제 cocktail을 제조하여 바이오매스의 당화효율을 확인하여 수입곰팡이 효소의 부분적인 대체가 가능함을 확인하였다. 또한 각각의 효소를 생산하는 효모균주의 복합체를 이용하여 바이오매스로부터 최소한의 외부효소를 사용하여 바이오에탄올의 효율적인 생산공정인

생물통합공정(consolidated bioprocessing) 가능성을 확인하였다.

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발

전국의 주요 자생지역을 중심으로 참억새는 8 곳, 물억새는 7 곳, 갈대는 4 곳에서 유전자를 수집하였고, *M. giganteus*는 (주)동부한농으로부터 근경을 분양받아 유지·관리하고 있다.

참억새와 갈대의 성숙 종자로부터 캘러스를 유도하고 증식하는데 적절한 배지조성, 성장조절제, 배지고형제 및 기타 첨가제처리를 통한 식물체 재생 시스템을 개발하였다. 참억새와 갈대의 미성숙 화기 이용 캘러스 유도와 식물체 재생을 위한 적정조건을 선정하여 참억새는 95.8%의 캘러스 유도율과 58.3%의 신초 재생 효율을 얻었으며, 갈대는 99.9%의 캘러스 유도율과 100%의 식물체 재생 효율을 확보하였다.

참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 참억새는 9계통, 갈대는 8계통의 *gfp* 도입 형질전환체를 생산하였고, PCR과 GFP 발현 검정을 실시하여 안정적인 형질전환이 이루어졌음을 확인하였다.

건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 개발하였다. 갈대에서 *rab21-gfp* construct 도입 형질전환 식물체 40계통을 생산하였으며, PCR과 건조처리 후 GFP 발현 검정으로 36계통에서 유전자의 안정적인 도입과 발현을 확인하였다.

Cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환 및 선발 과정을 통하여 참억새와 갈대에서 형질전환 캘러스를 확보하였다. 현재 형질전환 식물체 재생을 진행하고 있으며 형질전환체가 확보되면 특성 검정을 실시할 예정이다.

##### 2. 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화

벼로부터 건조유도성 프로모터 7종, 조직특이성 프로모터 6종, 항시발현 프로모터 3종 및 건조 유도성 유전자 3종을 분리하였다. 효모와 박테리아 유래의 셀룰라제 유전자 *cel2* (exo-glucanase), *cel4* (endo-glucanase),  $\beta$ -glu ( $\beta$ -glucosidase)를 단일 혹은 복합으로 벼 게놈에 도입한 형질전환체 및 프로모터::*gfp* 형질전환체 36종을 생산하였다. 벼에서 셀룰라제 유전자를 발현하기 위한 프로모터로는 항시발현용 프로모터 옥수수 유래 maize Ubiquitin과 벼로부터 분리한 972, 996 건조스트레스 유도성 프로모터를 사용하였으며 발현된 셀룰라제를 Apoplast로 집적되도록 하였다.

셀룰라제 유전자가 항시 발현되는 벼 중 일부는 성장 속도가 대조구에 비해 느렸으나, 유도성 프로모터로 발현시킨 경우는 정상적이었다. 형질전환 벼의 세포벽의 구조가 치밀하지 못하였으며, 당화율이 대조구 대비 두 배 이상 증가되었다. 형질전환 벼를 곰팡이와 함께 고상발효를 한 경우 셀룰라제 생산율이 대조구에 비해 2배 이상의 효율을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 셀룰라제 유전자를 벼에서 발현하므로써 당화에 사용되는 효소 사용량을 감소하고 동시에 전처리 공정이 용이한 바이오매스로서의 활용 가능성을 확인하였다.

##### 3. 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

신규 셀룰레이즈 유전자 뿐 아니라 논문 분석과 data base 검색을 통하여 재조합 발현을

위한 후보 유전자를 선별하였으며 각각의 균주에서 만든 cDNA library로 부터 직접 셀룰레이즈 유전자를 증폭하거나 합성하는 방법으로 exo type 분해 효소 유전자 12 종, endo type 분해 효소 유전자 11종, 헤미셀룰로즈 분해 효소 유전자 5종,  $\beta$ -glucosidase 유전자 5종, 기타 효소 2종을 확보하여 directed evolution 기술을 활용하여 효소의 개량, glycosylation 변이주 개발 등의 연구를 수행하였다. 효모를 이용한 효소의 재조합 대량생산을 위해 효모 TFP 기술을 이용하여 각 셀룰라제에 대한 고분비 생산균주 (1~5 g/L 수준)를 선별하였다.

선별된 생산균주를 5 L 발효조를 이용하여 유가식 발효 배양을 셀룰레이즈를 최적 생산할 수 있는 기술을 개발하고 효모에서 생산된 4가지 핵심효소인 exoglucanase (CBH1,2), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)를 이용하여 다수의 KRIBB Cellulase Cocktail (KCC)을 제작하여 다양한 기질 (Filter paper, Avicel, EFB, 볏짚)을 활용하여 효소 활성을 비교하고 바이오매스별 최적의 효소각테일을 확인하였다. 전처리된 볏짚, 억새를 사용하여 재조합 균주를 사용한 생물통합에탄올 발효 (consolidated bioprocessing)에서 외부 효소의 사용량을 50% 이상 절감하여 바이오에탄올의 생산 가능성이 확인되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발

본 연구를 통해 확립된 억새, 갈대의 조직배양 조건은 벼과 작물 및 다양한 식물의 특성을 분석하고 새로운 연구를 진행하는데 중요한 기초 자료가 될 것이다. 또한 다양한 조건의 형질전환 시도를 통해 도출된 결과들은 타 작물의 형질전환 방법을 확립하는데 응용될 수 있다.

### 2. 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화

셀룰라제를 발현하는 식물을 이용하면 섬유질계 기질의 당화공정이 용이하여 효소 사용 비용을 절감할 수 있는 장점이 있다. 또한 셀룰로즈 분해가 용이하므로 에탄올 발효 효율이 높아질 것으로 기대된다. 본 연구에서 개발된 에너지 작물용 벡터는 식물체내에서 산업용 효소 및 재조합 단백질을 생산하는 데 활용이 가능하다.

### 3. 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

효모를 이용하여 생산된 재조합 효소 각테일을 이용하여 다양한 섬유소 기질의 분해가 가능하였으며 지속적인 효소의 개발을 통해 곰팡이 효소를 대체 가능할 것으로 사료된다. 현재까지 재조합 효소로만 바이오매스를 충분히 당화하기에는 부족하였지만 상용화된 곰팡이 효소에 첨가하여 효소의 효율을 높이고 효소비용을 절감할 수 있는 방법을 제시하였다. 또한 재조합 균주를 이용한 생물통합공정 (consolidated bioprocessing) 가능성을 확인하였으며 이는 섬유소 바이오에탄올 생산 비용을 절대적으로 절감할 수 있는 방법이 될 것이다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Development of transgenic bioenergy crops improving saccharification and cost-effective production system of recombinant cellulase

### II. The purpose of the research and development

The purpose of this project is to develop the transgenic energy crop for easy saccharification and mass production of the recombinant enzyme, and thereby pretreatment and saccharification processes could be performed economically.

### III. Content and scope of the research and development

#### 1. Transformation system development for non-food and non-feed bioenergy crops

Domestic non-food bioenergy crops, *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* and *Phragmites communis*, were collected as for genetic resources, and their characteristics were analyzed. Efficient plant regeneration systems via callus induction from seed and were established. Optimal conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation were determined and reporter gene was introduced into the genomes and produced the transgenic plants in *M. sinensis* and *P. communis*. Finally the developments of transgenic plants with cellulase gene were conducted.

#### 2. Development and commercialization of model plants expressing cellulases

Rice plant was used as model plant expressing recombinant cellulase. Firstly, constitutive and drought stress inducible promoters were selected for driving the recombinant cellulase genes in plant cell. Also yeast or bacteria-derived cellulase genes were selected and introduced into rice genome and produced transgenic rice plants. Through physical analysis by electron microscopy, composition analysis after and before pretreatment of rice straw, chemical analysis of saccharification product, transgenic rice plants expressing recombinant cellulases were confirmed as useful biomass of bioethanol production.

#### 3. Cost-effective production technology of biomass saccharification enzymes

One of the major cost for the production of cellulosic bioethanol is the cost for enzymatic saccharification of cellulosic biomass. To reduce the cost of enzymes and produce them using domestic technology, recombinant expression of various cellulase genes from several cellulolytic fungus was tried using yeast recombinant expression technology. Optimization of fed-batch fermentation of selected recombinant yeast was carried out for the overproduction of each cellulase. Reconstruction of recombinant cellulase cocktail was



tried to optimize hydrolysis of various cellulosic substrate including cellulosic biomass. Consolidated bioprocessing using recombinant yeasts producing different cellulases was also tried to reduce the overall cost for the production of cellulosic bioethanol.

#### IV. Results of the research and development

##### 1. Transformation system development for non-food and non-feed bioenergy crops

Genetic resources of bioenergy crops, including *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. × giganteus* and *Phragmites communis*, were collected from native habitats except *M. giganteus* provided by Dongbu Farm Hannong Co. Ltd. and totally 20 genotypes of bioenergy crops were maintained in Sangmyung Univ.

Plant regeneration system were developed through the optimization of medium composition and plant growth regulator concentration using mature seeds of *M. sinensis* and *P. communis*. Also highly efficient plant regeneration system using immature inflorescences of *M. sinensis* and *P. communis* were established; 95.8% callus induction rate and 58.3 shoot induction rate in *M. sinensis* and 99.9% callus induction rate and 100% plant regeneration rate in *P. communis* were obtained.

Through *Agrobacterium*-mediated transformation, 9 transgenic lines in *M. sinensis* and 8 transgenic lines in *P. communis* were produced and the stable incorporation of transgene were identified with PCR and GFP expression analysis.

Then, 40 lines of transgenic plants containing *gfp* gene under the control of drought stress inducible *rab21* promoter were developed and the stable gene insertion and expression were confirmed using PCR and GFP fluorescence analysis.

Transgenic plant tissues containing four cellulose autolysis gene constructs with cellulase or beta-glucanase gene were obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation in *M. sinensis* and *P. communis*. The transgenic tissues were used for the production of transgenic plants. After transgenic plant production, the molecular and physiochemical analysis will be conducted.

##### 2. Development and commercialization of model plants expressing cellulases

Seven drought inducible promoters, 6 tissue-specific promoters and 3 drought inducible genes were isolated from rice. A total of 36 transgenic rice plants that expressed *cel2* (exo-glucanase), *cel4* (endo-glucanase),  $\beta$ -glu ( $\beta$ -glucosidase) originated from yeast and bacteria in a single or multiple and promoter::*gfp* were constructed. The expression of cellulases in rice was driven by either the maize Ubiquitine constitutive promoter or drought inducible promoters, 972 and 996, with the signal peptide for targeting the cellulase to the apoplasmic compartment for storage.

Some transgenic rice plants constitutively expressing cellulase exhibited growth retardation, however its phenotype was eliminated by use of inducible promoters. Transgenic plants showed an altered cell wall structure. A saccharification rate of transgenic rice straw was two fold higher than that of control plant. Solid state

fermentation of transgenic rice straw with fungus resulted in two fold higher in cellulase production compared with that of control plant. These results indicated that transgenic plants expressing cellulase could be useful for bioethanol production by reducing the costs of cellulase as well as pretreatment process.

### 3. Cost-effective production technology of biomass saccharification enzymes

For the production of recombinant cellulase using yeast *Saccharomyces cerevisiae*, numerous fungal cellulase genes were cloned from several novel and known fungal species. Cellulase genes were tried to improve for their activity and stability by using directed evolution and for different glycosylation patterns by using site directed mutagenesis, respectively. Improved cellulase genes were tried to overexpressed in yeast using translation fusion partner (TFP) technology for the hypersecretion of each cellulase. Finally, several yeast strains secreting different cellulases about 1~5 grams per liter were obtained. Fed batch fermentation of mixed yeasts producing different cellulases could provide recombinant cellulase cocktail showing hydrolyzing activity for various cellulosic substrate including alkali-pretreated rice straw. Demonstration of consolidated bioprocessing of cellulosic biomass to bioethanol using recombinant yeast mix developed in this research paves the way for low cost process for the production of cellulosic bioethanol.

## V. Research utilization plan and performance

### 1. Transformation system development for non-food and non-feed bioenergy crops

Plant tissue culture system of *M. sinensis* and *P. communis*, established in this study, could be utilized as basic data on the characterization of Gramineae crops and other plants, and the process of new researches. Furthermore the transformation system developed through the trials for the optimization of transformation in this study could be applied to the establishment of transformation method for other crops.

### 2. Development and commercialization of model plants expressing cellulases

Transgenic plants expressing cellulases provide us a low cost of saccharification process by reducing cellulase uses. And it will be anticipated that transgenic plants will show high yield of ethanol production because of easy degradation of cell wall. A various vectors we developed in this project will be utilized for molecular pharming to produce industrial enzymes and recombinant proteins in plant system.

### 3. Cost-effective production technology of biomass saccharification enzymes

Recombinant cellulase cocktail developed in this research can substitute the high cost commercial cellulase after additional fine tuning of each cellulase activity and searching for more active enzymes. Supplement of recombinant cellulase into the commercial fungal cellulase improved the function of biomass saccharification. Thus, this method could apply to make an optimal cellulase cocktail for the each biomass and reduce the dosage of cellulase

for the complete hydrolysis of equal amount of biomass. Recombinant yeast mixture producing different cellulases could perform the consolidated bioprocessing (CBP) of cellulosic biomass to bioethanol without or with much less amount of external cellulase than that required for usual simultaneous saccharification of fermentation (SSF). Eventually, CBP could reduce the production cost of cellulosic bioethanol down to 50%.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of research and development (R&D) projects -----	13
Section 1. Purpose and need for R&D projects -----	13
1. Purpose of R&D -----	13
2. Need for R&D -----	13
Section 2. Research Scope -----	15
Chapter 2. State of technology development in both domestic and abroad -----	19
Section 1. Biomass-based bioethanol production technology -----	19
1. Trends of global bioethanol production technologies -----	19
2. Cellulogenic biomass pretreatment technology -----	20
3. Enzyme saccharification and sugar platform technology -----	20
Section 2. Bioenergy crop transformation technology -----	21
1. Mass production of biomass crops <i>M. sinensis</i> and <i>P. communis</i> --	21
2. <i>M. sinensis</i> and <i>P. communis</i> cultivar development -----	22
3. transgenic technic of Non-food and non-feed bio-energy crops --	22
Section 3. Transcriptional regulation of cellulase gene expression in plants --	23
1. Production of cellulase expressing plants -----	23
Chapter 3. R&D contents and results -----	25
Section 1. Transformation system development for non-food and non-feed bioenergy crops -----	25
1. Investigating for cellulosic energy crops -----	25
2. Establishment of plant regeneration system -----	27
3. Development of a model system for <i>Agrobacterium</i> mediated transformation -----	50
4. Use of <i>Agrobacterium</i> mediated transformation for inducible promotor comparison -----	68
5. Use of <i>Agrobacterium</i> mediated transformation for cellulase gene introduction -----	75
Section 2. Development and commercialization of model plants expressing cellulases -----	78
1. Identification of optimum promotors to drive cellulase genes ----	78
2. Production of transgenic rice harboring drought-stress promotors -	82
3. Production of transgenic rice harboring tissue and development-specific promotors -----	86
4. Production of transgenic rice expressing cellulase genes -----	88

5. Structural characterization of transgenic rice expressing cellulase genes ---	96
6. Chemical characterization of rice, <i>M. sinensis</i> , and <i>P. communis</i> --	105
7. Pretreatment and saccharification of transgenic rice harboring either single and/or multiple forms of the cellulase gene -----	114
8. Establishment of biomass production field -----	126
Section 3. Cost-effective production technology of biomass saccharification enzymes -----	130
1. Development of cellulase gene identification and improvement technology -----	130
2. Purification and identification of cellulase microbes -----	134
3. Cellulase genes obtainment -----	135
4. Improvement of cellulase microbes -----	155
5. Mass production of cellulase using recombinant yeast -----	160
6. Cost-effective cellulase production via solid state fermentation --	174
7. Development of xylose utilizing yeast -----	180
8. Development of biomass optimum saccharification system ----	194
9. Comparison of cellulase production of transgenic rice -----	203
10. Development of both simultaneous and consolidated saccharification processes -----	207
Chapter 4. Achievements and contribution to related fields -----	214
Section 1. Transformation system development for non-food and non-feed bioenergy crop -----	214
Section 2. Development and commercialization of model plant expressing cellulase -----	215
Section 3. Cost-effective production technology of biomass saccharification enzymes -----	215
Chapter 5. Application of R&D accomplishments -----	221
Section 1 Research accomplishments -----	221
Section 2. Plans for application -----	222
Chapter 6. Global science and technology information -----	226
Chapter 7. Status of research facilities and equipment -----	229
Chapter 8. Reference -----	230

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	13
제 1 절	연구개발과제의 목적 및 필요성 -----	13
1.	연구개발 목적 -----	13
2.	연구개발의 필요성 -----	13
제 2 절	연구범위 -----	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	19
제 1 절	바이오매스기반 바이오에탄올 생산기술 -----	19
1.	세계 바이오에탄올 생산연구 동향 -----	19
2.	섬유질계 바이오매스 전처리 기술 -----	20
3.	효소당화 및 Sugar platform 구축기술 -----	20
제 2 절	바이오에너지 작물 형질전환 기술 -----	21
1.	바이오매스 작물 역사와 갈대의 대량 생산 -----	21
2.	역사와 갈대의 품종개발 -----	22
3.	비식용 및 비사료용 바이오에너지작물의 형질전환 기술 -----	22
제 3 절	식물체내 셀룰라제 유전자 발현 조절기술 -----	23
1.	셀룰라제 발현 식물체 생산 -----	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	25
제 1 절	바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발 -----	25
1.	섬유질계 에너지 작물 탐색 -----	25
2.	식물체 재생 시스템 확립 -----	27
3.	<i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환을 통한 모델 시스템 개발 -----	50
4.	유도성 프로모터 비교를 위한 <i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환 -----	68
5.	셀룰라제 유전자 도입 <i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환 -----	75
제 2 절	셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화 -----	78
1.	셀룰라제 유전자 발현을 위한 최적 프로모터 발굴 -----	78
2.	벼 유래 건조스트레스 프로모터가 도입된 형질전환 벼 제작 -----	82
3.	벼 유래 조직 및 발달 특이적 프로모터가 도입된 형질전환 벼 제작 ---	86
4.	셀룰라제 유전자가 도입된 모델작물 벼 제작 -----	88
5.	셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 구조적 특성 분석 -----	96
6.	벼, 역사, 갈대의 화학적 분석 -----	105
7.	단일/복합 셀룰라제 유전자 도입 형질전환 벼의 전처리와 효소 당화 -	114
8.	바이오매스 생산 단지 조성 -----	126
제 3 절	바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발 -----	130
1.	셀룰로즈 분해효소 유전자 확보 및 개량기술 개발 -----	130

2. 섬유소분해 신규 미생물 분리 및 동정 -----	134
3. 섬유소 분해효소 유전자 확보 -----	135
4. 고효율 cellulase 개량체 개발 -----	155
5. 재조합 효모 이용 섬유소 분해효소 대량생산 기술개발 -----	160
6. 고상발효에 의한 저가 셀룰라제 생산 -----	174
7. Xylose 고활용 효모 균주 개발 -----	180
8. 바이오매스 최적당화 효소 시스템 개발 -----	194
9. 셀룰라제 발현 형질전환체의 효소 생산능 비교 -----	203
10. 동시당화 및 생물통합 공정 개발 -----	207
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	214
제 1 절 바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발 -----	214
제 2 절 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화 -----	215
제 3 절 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발 -----	215
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	221
제 1 절 연구 성과 -----	221
제 2 절 성과활용 계획 -----	222
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	226
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	229
제 8 장 참고문헌 -----	230



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발과제의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 목적

당화가 용이한 섬유질계 비식용 및 비사료용 형질전환 에너지 작물개발과 재조합 효소의 대량생산 기술을 개발하여 에너지작물의 전처리 과정 중 Cellulose의 자가분해와 효소당화를 동시에 수행하는 경제적인 당화공정을 개발하고자 함이다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 경제적, 산업적 측면

최근 지구온난화에 의한 기후변화문제가 급속도로 부각되었고, 에너지문제는 환경문제와 연계되어 새로운 국면으로 접어들게 되었다. 이에 따른 이산화탄소 배출규제와 화석연료 고갈에 따른 에너지자원 확보 및 대체에너지 개발 기술선점을 위한 세계 각국의 경쟁이 날로 심화되고 있는 상황이며, 바이오에너지 기술개발은 에너지 문제뿐만 아니라 교토의정서에 의한 온실가스 감축 문제 등과도 연계되어 있는 중요 사안이 되었다.

온실가스를 배출 세계 9위인 우리나라는 연간 5억 9,000만톤 (2004년 기준), 1인당 배출량은 12.28 톤, 지난 15년간 약 69.5%의 증가율을 보이고 있어 앞으로 2012년까지 두 자릿수 이상 감축량 의무를 저야할 것이라는 분석이다. 이에 세계 각국은 기존 화석연료를 대체 가능하며 환경오염 배출 물질이 적은 바이오연료 생산 기술개발 및 보급을 위해 적극 지원하는 추세이며 국내에서도 이에 상응하는 대책마련이 필요하다.

특히 세계적으로 신재생에너지시장이 매년 30%의 성장세를 보이고 있다는 점에서 “한국형 바이오에너지 공급 시스템”의 조기 확립은 필수적이며, “발리 로드맵”이 채택됨에 따라 정부는 전체 에너지 사용량 중 신재생에너지 비중을 2006년 2.3%에서 2030년까지 9%로 확대하기로 결정하였다.

재생가능 에너지 중 바이오연료가 차지하는 비중이 높아 2005년 중 세계 바이오에탄올 및 바이오디젤 생산은 각각 1,707만 톤, 291만 톤으로 연평균 13-28% 증가율을 보였다. 국가별로는 미국과 브라질이 바이오에탄올을 중심으로 세계 생산의 80%를 점유하였으며 바이오디젤은 EU가 87%를 차지하고 있다. 그러나, 옥수수, 사탕수수 등으로부터의 당질계 에탄올 생산은 향후 곡물자원의 부족과 곡물가격의 상승 등으로 바이오연료 시장 확대의 제약요인으로 작용할 가능성이 높다. 최근 옥수수 가격은 2006년 하반기 중 66% 급등하였으며 소맥과 대두도 각각 35%, 15% 상승하였다.<sup>1)</sup> 따라서 바이오연료 산업을 확대하는 동시에 곡물가격의 안정화를 위해 섬유질계 혹은 목질계 바이오매스 등의 투입원료의 다양화가 제고되어야 한다.

2030년 기준 국내 활용 가능한 바이오매스의 기술적 잠재량은 연간 6,171천TOE 수준으로 매우 한정적이며, 전부를 에너지화 하더라도 '10년 1차에너지 소비량(262,609천TOE)의 3% 수준에 불과하다. 따라서 바이오에너지 보급목표인 2030년 기준 총 1차 에너지 중 4%(10,357천

1) 해외 경제정보 제 2007-11호

TOE)<sup>2)</sup>를 달성하기 위해서는 안정적인 바이오매스 확보 및 활용기술 개발이 필수적이라고 할 수 있다.

<표 1> 국내 바이오매스 에너지 잠재자원량

구 분	부존 잠재량 (2007년 기준)	가용 잠재량 (2010년 기준)	기술적 잠재량 (2030년 기준)
바이오에너지 자원량 (천TOE/년)	141,855	11,656	6,171
백분율(%)	100	8.2	4.4

출처: 에너지관리공단(2010), 2010 신재생에너지 백서

#### 나. 기술적 측면

섬유질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산기술의 가장 큰 제약요소는 Biomass recalcitrance에 따른 섬유질 기질의 전처리와 당화과정이다. 현재 바이오매스 당화효소는 주로 박테리아 혹은 곰팡이의 고상 및 액상 배양시스템에 의해 생산되나 바이오매스 전환을 위해 필요한 효소 대량생산 비용이 막대하여 리그노셀룰로즈 바이오매스를 사용한 바이오에탄올 생산비용 중 효소 생산비용은 30-50%를 차지하고 있다. 따라서 전처리 및 효소 생산 공정의 개선 없이는 에탄올 생산비용 절감이 거의 불가능하다. 또한 농업부산물의 당화효율을 극대화하기 위해서는 상용화된 효소를 포함하여, 셀룰라제 발현 신규 균주를 탐색하여 농업부산물에 최적화된 효소의 발굴과 개량이 필요하며, 또한 환경부담을 최소화하면서 효율성을 극대화할 수 있는 바이오매스 맞춤형 당화기술의 개발이 중요하다.

바이오매스의 효소적 당화에 관여하는 셀룰라제와 xylanase는 최소 5,000여종이 보고 (GenBank 검색기준)되어 있으며, 이들 중 *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* 유래의 효소가 Novozymes, Genencor 등의 회사에서 시판되고 있다. 미국 DOE가 제시한대로 2012년까지 바이오공정비용을 1/2로 낮추려면 보다 향상된 기능을 가지는 효소 (cellulase, xylanase)의 발굴 및 개량이 필요하며 이는 섬유질계 바이오매스의 효율적 이용에 근간이 되는 핵심적인 연구이다.

셀룰라제에 대한 오랜 연구를 통하여 곰팡이 (*Trichoderma reesei*) 유래효소가 가장 강력한 분해활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 이 효소활성은 약 22종의 단백질이 복합적으로 작용하는 것으로서, *T. reesei* 효소는 가용화 (exo-, endo-glycosidase) 활성화에 비하여, 단당화 ( $\beta$ -glycosidase) 활성이 상대적으로 약한 단점이 있다. 따라서 단당화 효율이 높은 새로운 효소들과 혼합각테일을 제조하거나, 부족한 효소활성을 개량하기 위한 개선 연구가 필요하며, 결정 구조 (crystal)를 완화하는 효과가 있는 단백질 (extensin)이나, 리그닌으로의 흡착을 방지하는 단백질 (lignin blocker)을 도입하는 등 다양한 유전자원을 확보하여 고효율 효소각테일을 개발하기 위한 연구가 필요하다.

최근 Biomass recalcitrance 문제를 해결하기 위해서 분자농업 기술을 활용하여 식물체에서 리그노셀룰로즈 분해 효소를 생산함으로써 바이오매스 당화효소 사용비용을 절감하고, 동시에 리그노셀룰로즈의 자가당화가 가능하게 하여 전처리 및 당화과정을 용이하게 하려는 연구가

2) 지식경제부(2008), 제3차 신·재생에너지 기술개발및 이용·보급 기본계획(2009~2030)

진행되고 있다.

바이오매스 작물로서의 억새. 갈대는 다년생이며 C4 식물로서 광합성효율과 수분이용효율이 높은 작물이다. 또한 수량성, 에너지생산 수율, 생태적응 능력 등의 측면에서 우수하여 해외 억새 연구 결과에 의하면 1년에 3-4 미터 성장하여 40 톤/ha 수확가능한 것으로 보고되고 있다. 또한 근경으로 무성 생식이 가능하여 대량증식이 용이하며 바이오매스 수량성이 뛰어나 바이오에탄올의 수율이 기타 셀룰로오스계 바이오매스보다 높은 것으로 나타나 국내외에서 그 활용에 관한 연구개발이 진행 중이다.

#### 다. 사회 문화적 측면

미국, 브라질 등 바이오에너지 선진국에서는 이미 옥수수대나 사탕수수와 같은 잉여 목질자원이 있음에도 불구하고 대규모 바이오에너지 수요를 대비하여 전략적으로 스위치그라스, 물억새, 포플러 등의 에너지작물을 개발하고 있다. 따라서 향후 50년 이내에 바이오에탄올은 곡물 자원과 경합이 없는 비식용, 비사료용 목질계 바이오매스가 주로 활용될 것으로 예상된다. 국내에서도 최근 수년 사이에 바이오 에너지 작물에 대한 관심이 점차 증대되고 있는 가운데, 국책 연구 사업을 통하여 바이오디젤 분야의 유채를 중심으로 한 연구, 그리고 바이오에탄올 분야의 고구마와 카사바를 중심으로 하는 당질계 (전분계) 에탄올 및 포플러 등을 중심으로 하는 목질계 에탄올 생산 연구 등이 시작되고 있다.

이와 같이 바이오에너지에 대한 국내 연구들은 주로 식용 또는 사료용 작물을 대상으로 이루어지고 있으나 식품이나 사료와의 경합으로 인한 가격 상승을 가져오는 등의 부작용이 예상되고 있어, 앞으로 비식용·비사료용 섬유질계 바이오에너지 작물을 개발하는 방향으로 연구가 진행되어야 할 것이다. 현재 국내에서 활용 가능한 에너지작물은 매우 한정적이며 대부분 당화가 어려운 목질계 자원이므로 향후 대규모 바이오에너지 생산을 통한 에너지 독립을 위해서 당화가 용이한 비식용 및 비사료용 에너지작물을 개발하고 경제성이 뛰어난 당화기술을 전략적으로 개발할 필요가 있다.

## 제 2 절 연구범위

### 1. 국내 활용 가능한 비식용 및 비사료용 섬유질계 에너지 작물 선별

비식용 작물 중 셀룰로오스 함량이 높은 작물을 일차적으로 선별하였다. 그 후 증식이 용이하고 척박한 환경에서도 자랄 수 있고 관리 비용이 적은 작물을 선택하였다. 선택된 작물의 생리적 성질, 생육환경 등을 조사하여 최종 3종 이상의 에너지 작물을 선별하였다.

### 2. 선별 에너지작물 효율적 재분화 기술 및 형질전환 기술 개발

선별된 다수의 작물의 여러 기관으로 부터 탈분화를 통해 형질전환이 용이한 캘러스 유기 및 재분화를 시도하여 소식물체 발생 효율을 분석하였다. 세포배양뿐만 아니라 항생제 test, *Agrobacterium*과의 공동배양 test 등을 통해 형질전환에 영향을 미치는 모든 조건을 검증하였다. 조직배양 조건이 확립된 후 *Agrobacterium* 침지 방법을 이용하여 핵 형질전환을 시도하였다. 세포에 유전자를 도입하는 방법은 현재까지 알려진 벼 핵형질전환 방법을 토대로 진행하

며, 세부 실험방법은 작물에 맞도록 개선하였다.

### 3. 식물 조직/발달 특이적 및 유도성 프로모터 개발과 형질전환 벡터 제작

벼과 작물로부터 다수의 스트레스, 조직, 발달 특이적으로 발현할 수 있는 유전자를 탐색 발굴하였다. 발굴된 프로모터는 gfp 마커유전자를 발현하도록 벡터 카세트를 제조하여 벼 핵계놈으로 도입하였다. 형질전환 벼 T0 세대를 검정한 후 972, 996 건조스트레스 유도성 프로모터를 최종 선발하였다. 벼과작물에 내성을 가지지 않은 Hygromycin으로 형질전환체를 선발하기 위해 Hygromycine 유전자를 포함하는 pCAMBIA1300 plasmid backbone을 활용하였다.

### 4. 고효성 셀룰로오스 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 식물체 제작과 우수라인 선발

셀룰로오스 분해능이 뛰어난 효모, 박테리아로부터 셀룰라제 신규 유전자를 분리하여 벼에 단일 혹은 복합으로 도입하였다. 이때 도입된 유전자의 단백질은 식물의 생장에 해가 가지 않도록 apoplast에 집적되도록 발현벡터를 제작하였다. gPCR, RT-PCR, 단백질 발현 분석 등을 실시하여 유전자가 안정적으로 도입된 형질전환체를 선발하였다.

### 5. 선발된 형질전환 에너지 작물의 포장적용 실험 및 대량생산

개발한 형질전환 벼는 실내의 성장실에서 순화과정을 거쳐 완벽한 식물체로의 생육이 가능하도록 관리한 후 T1 종자를 수확하거나 수확 중이다. 이렇게 확보된 다수 line의 T1 종자는 전처리, 고상발효, 당화효율 등의 후대 검증을 계속 시도할 예정이다.

### 6. 형질전환 에너지 작물의 셀룰로오스 자가분해 및 당화기술 개발

셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체 T0세대의 세포벽 구조를 비교하기 위한 전자현미경(SEM, TEM) 분석, glucan 함량 분석, 효소 활성 분석 등을 통해서 셀룰로오스 분해능을 조사하여 당화효율이 2배 증가함을 확인하였다. 또한 당화효율을 높일 수 있도록 벚짚과 억새의 최적 전처리 조건을 확립하였다. 셀룰라제 발현 식물을 이용하여 곰팡이 균주와 함께 고상발효를 실시하여 셀룰라제 생산효율이 대조구 대비 약 2배 증가됨을 확인하였다.

### 7. 셀룰로오스 분해효소 유전자 확보 및 개량 기술 개발

신규 셀룰라제 유전자 뿐 아니라 논문 분석과 data base 검색을 통하여 재조합 발현을 위한 후보 유전자를 선별하였으며 각각의 균주에서 만든 cDNA library로부터 직접 셀룰라제 유전자를 증폭하거나 합성하는 방법으로 exo type 분해 효소 유전자 12 종, endo type 분해 효소 유전자 11종, 헤미셀룰로오스 분해 효소 유전자 5종,  $\beta$ -glucosidase 유전자 5종, 기타효소 2종을 확보하였다. 또한 신규로 분리된 국내 자생 곰팡이 균주로부터 10여종의 셀룰라제 유전자를 확보하였고 exo type 분해 효소 유전자 3종에 대한 재조합 생산 및 효소의 생화학적 분석을 수행하였다.

### 8. 단백질공학기술을 이용한 셀룰라제 개량체 개발

셀룰라제 활성을 대량으로 비교분석할 수 있는 선별 조건을 구축하였으며 한 균주에 여러 가지 셀룰라제 유전자를 발현하는 균주를 제작하여 셀룰로오스를 함유한 배지에서 각 효소의 활성에 따라 선별적 성장을 확인할 수 있는 방법을 구축하였다. 구축된 방법을 이용하여 활성

이 약 40% 증가된  $\beta$ -glucosidase를 확보하였다. 이러한 방법으로 구축된 BGL 균주는 Cellobiose로부터 외부 효소의 도움 없이 바이오에탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다. 재조합 셀룰레이즈의 활성과 당쇄부가와의 관계를 규명하기 위하여 당쇄첨가 부위에 변이를 도입한 여러 가지 변이체를 제작하여 분석한 결과 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 hyperglycosylation은 셀룰레이즈 효소 활성화에는 큰 영향이 없음을 확인하였다. 재조합 셀룰레이즈의 분비생산성을 높이기 위하여 효모 TFP 기술을 이용하여 단백질 융합을 통한 고분비 생산 기술을 개발하였다.

#### 9. 셀룰로즈 분해효소 재조합 생산 및 셀룰로즈 고효율 분해기법 개발

에탄올 발효 진행 미생물인 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 확보된 다수의 셀룰라제 유전자를 도입하여 효소를 고분비하는 균주를 초고속으로 선별하는 기술을 개발하였다. 효모를 이용하여 셀룰라제 등의 외래단백질을 분비생산하고자 할 때 기존 제한적인 분비시그널만을 사용하고 있으나 본 연구에서는 단백질 맞춤형 분비생산기술을 활용하여 초고속으로 벡터 시스템을 구축하고 고분비 균주를 선별하여 섬유소 분해효소 단백질을 재조합 생산 시스템을 구축하였다.

#### 10. 효소 맞춤형 고효율 분비생산 (grams per liter) 기술 개발

대량의 셀룰라제 유전자를 다양한 효모 vector에 효율적으로 도입 및 적용할 수 있는 high throughput cloning 시스템을 개발하였고 셀룰라제 유전자를 *in vivo* recombination을 통해 세포내로 용이하게 도입하였다. 선별된 셀룰라제 유전자를 다수의 TFP vector에 각각 cloning하여 각 셀룰라제에 대한 고분비 생산균주 (1~5 g/L 수준)를 선별하였다.

#### 11. 섬유질 분해효소 생산 최적화 및 scale-up

선별된 생산균주를 5L 발효조를 이용하여 유가식 발효 배양을 통해 분비생산 발효 최적화 연구를 수행하여 배지 및 당 공급 속도 최적화 등을 통해 셀룰레이즈를 최적 생산할 수 있는 기술을 개발하고 최종적으로 활용될 효소의 생산은 50L 발효를 통해 충분한 효소를 확보하였다.

#### 12. 재조합 효소 cocktail을 이용한 분해 기술 개발

바이오매스 당화에 사용되는 상용화 효소는 곰팡이 유래의 수십가지 셀룰라제로 구성된 복합체이지만 효모에서 생산된 재조합 단백질을 이용하여 동일한 조건을 구현하기는 어렵기 때문에 셀룰라제를 구성하는 4가지 핵심효소인 exoglucanase (CBH1,2), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)를 이용하여 다수의 Kribb Cellulase Cocktail (KCC)을 제작하였다. 각 효소 콕테일을 다양한 기질 (Filter paper, Avicel, EFB, 볏짚)을 활용하여 효소 활성을 비교하여 바이오매스별 최적의 효소콕테일을 확인하였다. 재조합 효소만으로 바이오매스를 충분히 당화하기에는 부족하였지만 상용화된 효소에 첨가하여 효소의 효율을 높이고 효소비용을 절감할 수 있는 방법을 제시하였다.

#### 13. 전처리된 에너지작물을 활용한 동시당화 및 통합생물공정 가능성 검증

전처리된 볏짚, 억새를 사용하여 재조합 균주를 사용한 에탄올 발효에서 대조균주에 비해 40% 이상 에탄올 발효효율이 증가됨을 확인하였고 통합생물공정 가능성을 제시하였다. 이러한

방법은 효소의 사용량을 대폭 줄여 섬유소 바이오에탄올 생산 비용을 절대적으로 절감할 수 있는 방법이 될 것이다. 그러나 아직 재조합 효소의 활성과 최적당화온도 등의 차이로 인해 효율이 낮은 문제가 있어 추가적인 연구를 통하여 상용화 효소를 사용하지 않는 통합공정의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 바이오매스기반 바이오에탄올 생산기술

#### 1. 세계 바이오에탄올 생산 연구 동향

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 DOE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2006년 부시대통령은 석유에 대한 의존을 줄이기 위해 Advanced Energy Initiative 발표</li> <li>- 청정에너지 개발예산을 22% 증액 예정이며 대부분 바이오에탄올 보급을 위한 기술개발에 투입 (Bull, S. 2006)</li> <li>- 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산시 애로기술인 저가 셀룰라제 생산기술, 당화를 위한 전처리기술, 고효율 발효 미생물 개발에 집중</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 목질계 에탄올 생산공정 기술 개발 중</li> </ul>
미국 EPA-Integrated Genomics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미국 환경보호국은 당류 및 cellulose 등의 바이오매스로부터 부탄올 생산방법 개발을 위해 Integrated Genomics 지원</li> <li>- Cellulose 부탄올 공정을 통해 원유로부터 부탄올을 얻는 화학합성공정 대체 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기술개발 중</li> </ul>
미국 ADM, VeraSun Energy사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미국 Corn belt (Illinois, Iowa, Nebraska 등) 주변에서 옥수수를 이용하여 미국 전체 에탄올 생산량의 60% 이상을 생산</li> <li>- 섬유질계 corn stover 활용 에탄올 생산기술 개발 중</li> </ul>	
캐나다 Iogen사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 캐나다 Iogen Corp.는 세계 최초로 농산폐기물 유래의 cellulose로부터 효소당화를 통한 바이오에탄올 (EcoEthanol) 생산기술 개발</li> <li>- 섬유질계 바이오 연료의 세계 시장 규모가 2012년에는 100억 달러를 초과할 것으로 전망</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세계최초 섬유질계 에탄올 생산공정 상용화</li> </ul>
브라질	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1970년 오일쇼크 이후 '에너지독립'을 위한 바이오에탄올 개발 (ProAlcohol 프로그램) 착수</li> <li>- 전국주유소 바이오에탄올 판매의무화, 생산보조금 지급 등을 통한 보급확대</li> <li>- 2005년 165억 리터 생산, 수송용 연료의 약 40% 보급</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세계 최대의 바이오에탄올 생산</li> </ul>
일본	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2002년말 'Biomass Japan' 전략 채택</li> <li>- 2010년까지 수송용 바이오연료 500,000 kl/년 보급 목표</li> <li>- 폐목재 활용 바이오에탄올 생산기술 개발을 위해 해외기술 도입</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실증연구 중</li> </ul>
중국	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2005년 100만톤 연료용 바이오에탄올 생산 (세계 3위국)</li> <li>- E10 형태로 9개성 보급, 총 휘발유 공급량의 20%에 해당</li> <li>- 잉여농산물 활용, 섬유소계 바이오매스 활용 연구</li> <li>- 최대 3억 7천만톤 바이오에탄올 생산 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실증연구 중</li> </ul>

## 2. 섬유질계 바이오매스 전처리 기술

### 가. 국내 기술 현황

한국에너지기술연구원은 SEDAP (Steam Explosion after Dilute Acid Percolation) 반응기를 사용하여 볏짚의 SEDAP 운전 조건에 따른 헤미셀룰로즈, 셀룰로즈의 수율을 비교하여 볏짚의 SEDAP 전처리에 최적 조건을 도출하였다. 또한 ARP (Ammonia Recycled Percolation) 반응기를 사용하여 폐참나무의 ARP 운전 조건에 따른 헤미셀룰로즈, 셀룰로즈의 수율을 비교하여 폐참나무의 ARP 전처리에 최적 조건을 도출하는 연구를 수행하였다.

### 나. 국외 기술 현황

Arkenol 공정은 강산을 이용하여 150 kL/day의 에탄올을 생산하고 있으며, Iogen Co.는 약산 전처리 공정을 이용하여 효소 당화 공정을 거친 후 에탄올을 생산하는 공정으로 40 ton/day 규모의 섬유소계 바이오매스의 처리 능력을 보유하고 있다. 이러한 기술은 상용화 규모의 공정을 확보하여 상업화 단계에 들어선 공정으로 높이 평가받고 있다.

## 3. 효소당화 및 Sugar platform 구축기술

### 가. 국내 기술 현황

메타지놈 등 다양한 환경자원으로부터 유용 유전자를 탐색하고 발굴하는 체계적 스크리닝 연구가 바이오화학연구센터 및 프론티어사업단을 중심으로 수행되고 있다<sup>3)</sup>. 또한 초고속 서열해독을 기반으로 한 유전체 연구는 데이터 마이닝을 통해 공개 서열 자료로부터 선발한 섬유소 분해효소 (cellulase)의 정보를 집대성하는 CELDB (cellulase database) 구축 기초 연구를 진행 중에 있다. 기존 효소탐색은 사람이 직접 활성 중심으로 균주 및 효소를 탐색하는 노동집약적 방식이 이용되었으나, 최근 국내에서 미생물 세포의 전사조절유전자회로를 재구성하여 다양한 효소 (lyase, hydrolase, oxidase 등)의 활성을 합성생물학적으로 고속 탐색하는 방법을 개발하였다.

### 나. 국외 기술 현황

바이오매스의 효소적 당화에 관여하는 셀룰라제와 xylanase는 최소 5,000여종이 보고 (GenBank 검색기준)되어 있으며, 이들 중 *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* 유래의 효소가 Novozymes, Genencor 등의 회사에서 시판되고 있다. 미국 DOE (Department of Energy)에서는 2000년부터 5년간 'cellulosic bioethanol' 생산을 위해 목질계 바이오에탄올 생산단가의 대부분을 차지하는 효소 (cellulase) 비용절감 연구를 세계적인 효소 독점업체인 Novozyme사와 Genencor사를 중심으로 대대적으로 수행하였다. 개발 분야로는 셀룰라제 mixture 제조, 셀룰라제 기능분석, 단백질공학을 통한 효소개량, 목질분해 곰팡이인 *Trichoderma reesei*의 셀룰라제 2-D 분석연구 등이 포함되었으며, 이러한 연구를 통해서 효소비용을 에탄올 껌런 당 30-50 cent로 초기 대비 20-30배 수준으로 낮추었다.

목질분해 효율 향상을 위한 효소활성 개량 연구는 최근 단백질 공학기술의 발달에 따라 다양한 방법들이 이용되고 있다 (표). 미국 Mascoma사는 *S. cerevisiae*와 *Clostridium thermocellum* 두 개의 균주를 이용한 CBP 균주개발을 진행하여 thermophilic bacteria로부터

3) Appl. Env. Microbiol. 2006, 72:7406; Appl. Env. Microbiol. 2009: 257.



는 약 6% 에탄올 농도 결과를 얻었고, 또한, *S. cerevisiae*의 셀룰라제 발현을 3,000배 증가시켰다고 발표하였다. 미국 Qteros사 역시 *Clostridium phytofermentans*를 이용한 CBP 균주개발과 산업화 연구를 진행하고 있다. TMO Renewables사는 C5, C6 동시발효가 가능한 Thermophilic 미생물 개발에 주력하고 있으며 일차적으로 기존 1세대 바이오에탄올 공정에 DDGS 부산물을 에탄올로 전환하는 데에 활용할 예정이다. Agrol사는 내열성 박테리아 *Bacillus stearothermophilus*를 개발하고 있으며, Colusa Biomass Energy Corp. (미국)사와 제휴하여 플랜트를 건설할 예정이다. Royal Nedalco사는 *Piromyces* 유래의 오탄당 발효유전자를 효모에 도입하여 C5, C6 동시발효 균주를 개발하고 있다.

List of cellulases and relevant enzymes whose properties have been changed using directed evolution techniques

Enzyme	Altered property	DNA technique	Screening/Selection	Ref.
Endoglucanase	Thermal stability	Family shuffling	Facilitated screening-Congo red+CMC agar	Murashima et al., 2002b
Endoglucanase	Activity	DNA shuffling	Facilitated screening-Congo red+CMC agar	Kim et al., 2000
Endoglucanase	Alkali pH	epPCR	Facilitated screening-Congo red+CMC agar	Wang et al., 2005
Endoglucanase	-	Family shuffling	Facilitated screening-Congo red+CMC agar	Catcheside et al., 2003
$\beta$ -D-glucosidase	Cold adoption	DNA shuffling	Random Screening-chromogenic substrate	Lebbink et al., 2000
$\beta$ -D -glucosidase	Thermal stability	epPCR	Random Screening-chromogenic substrate	Gonzalez-Blasco et al., 2000
$\beta$ -D -glucosidase	Thermal stability	epPCR+Family shuffling	Random Screening-chromogenic substrate	Arrizubieta and Polaina, 2000
$\beta$ -D -glucosidase	Activity	epPCR	Random Screening-coupled to color reaction	McCarthy et al., 2004
$\beta$ -glycosidase	Activity	Family shuffling	Random Screening-chromogenic substrate	Kaper et al., 2002
Mutated $\beta$ -glucosidase (glycosynthase)	Activity	epPCR	Facilitated Screening-fluorogenic substrate	Kim et al., 2004
Mutated endoglucanase (glycosynthase)	Activity	cassette mutagenesis	Chemical complementation	Lin et al., 2004

## 제 2 절 바이오에너지 작물 형질전환 기술

### 1. 바이오매스 작물 역사와 갈대의 대량 생산

#### 가. 국내 기술 현황

최근 바이오매스용 작물의 필요성이 대두되고 있으며, 4대강 개발로 인해 조성될 유휴지에 대체 작물로 재배할 필요성이 있다. 역사와 갈대는 무비료·무농약 재배 및 척박한 환경에서 재배가 가능하고 환경 정화 능력이 탁월하다. 역사와 갈대는 주로 종자나 영양 번식체로 번식하는데, 영양번식체 생산 비용이 매우 높아 일부 조경용 역사에만 활용하고 있고 대량생산하는 기술개발이 필요하다 (표 2). 현재 대학 연구소를 중심으로 역사와 갈대의 조직배양 방법을 통한 식물체 재생 연구가 진행 중이다.

#### 나. 국외 기술 현황

주로 유럽과 미국을 중심으로 바이오에너지용 역사의 조직배양 방법을 통한 식물체 재생 연구가 진행 중이며, 대부분의 연구가 *Miscanthus sacchariflorus*와 *Miscanthus sinensis*의 자연교잡종인 *Miscanthus giganteus*에 집중되어 있다.

표 2. 억새와 갈대의 번식방법에 따른 효율 비교

번식방법	번식 재료	식물 1개체에서 얻을 수 있는 번식 재료의 수 (개)	번식 기간 (개월)	생산가능 식물체 (개체수)	장점	단점
종자	종자	1500-2,000	8	600-1600	시설 및 기술에 대한 요구 적음	종자 발아율 차이 많음 (40-80%) 모식물체와 유전적 차이
줄기삽목 <sup>1)</sup>	삽수	6	8	6	시설 및 기술에 대한 요구 적음 모식물체와 유전적으로 동일	줄기 상단부를 절단 과정 필요 번식효율이 낮음
근경 <sup>2)</sup>	근경	1-3.3	8	3.3-10	시설 및 기술에 대한 요구 적음 모식물체와 유전적으로 동일	근경 채취가 어려움 번식효율이 매우 낮음
조직배양	미성숙 화기	1	7	3-4만	탁월한 번식효율 모식물체와 유전적으로 동일	조직배양 시설 필요 고도의 기술 필요

<sup>1)</sup> 억새 대량 증식을 위한 줄기삽목 방법, 문운호 등, 한국작물학회, 2010.

<sup>2)</sup> 억새 (*Miscanthus sinensis*)의 생육 및 재생특성에 관한 연구, 이성규, 한국초지조사료학회지, 1985.

## 2. 억새와 갈대의 품종개발

### 가. 국내 기술 현황

국내 자생 억새와 갈대를 바이오에너지용 작물로 개발하기 위하여 바이오메스가 큰 유전형질을 탐색하는 연구가 진행 중으로, 농촌진흥청에서 4배체 거대억새 품종을 개발하였다.

### 나. 국외 기술 현황

현재 미국과 유럽 등에서 바이오에너지용으로 억새를 활용하고 있다. 특히 *Miscanthus giganteus*는 에탄올 수율이 매우 높은 품종으로 알려져 있어, 일리노이 주립대, 영국, 일본 등에서 초본성 셀룰로즈계 바이오메스 (억새) 대량 생산 연구가 진행 중이다.

## 3. 비식용 및 비사료용 바이오에너지작물의 형질전환 기술

### 가. 국내 기술 현황

바이오에너지작물인 유채의 지방산 조성 변화, 그리고 고구마와 포플러를 이용한 바이오에탄올 생산을 위한 전분 또는 리그닌 생합성 조절 등에 관한 초기 단계의 연구가 최근 시작되어 진행되고 있다. 그러나 현재까지 비식용 및 비사료용 바이오에너지작물의 형질전환에 대한 연구는 미진한 실정이며, 최근 갈대의 성숙 종자 유래 캘러스를 이용한 보고유전자의 도입 및 발현 보고가 유일하다.

### 나. 국외 기술 현황

섬유질계 바이오에너지 생산을 목적으로 bacteria 유래의 endo-와 exo-type 셀룰라제 유전자를 아그로박테리움 또는 유전자총을 이용하여 벼, 옥수수, 담배 등에 도입하는 연구가 진행 중이다. 그러나 상기 연구들의 대부분은 식용 및 사료용 작물을 대상으로 단백질을 발현하는 시스템이다. *Agrobacterium*을 이용하여 현재 비식용 및 비사료용 에너지작물로 주목받고 있는 *Miscanthus giganteus*의 형질전환 연구가 미국과 일본 등에서 진행되고 있으나 신뢰

할만한 방법은 확보되지 못하고 있으며, 현재까지 두 건의 특허 출원과 한 건의 논문이 보고되어 있다.

### 제 3 절 식물체내 셀룰라제 유전자 발현 조절기술

#### 1. 셀룰라제 발현 식물체 생산

##### 가. 국외 기술현황

Bacteria 유래의 endoglucanase와 exo-cellobiohydrolase 유전자를 CaMV 35S, Mac, Rubisco small sub-unit (RbcS-3C), globulin-1 promoter를 이용하여 벼, 옥수수, 담배, Lemna에서 발현하는 연구가 진행 중이다. 생성된 셀룰라제 단백질의 세포내 저장장소는 엽록체, 세포벽, 소포체, 액포 등으로 endo-1,4-β-D-glucanase 경우는 세포내 총 수용성 단백질 양 중 최저 0.002%부터 최고 26%에 이르는 수준이다. 단백질발현 프로모터로 항시발현 혹은 스트레스 유도성 프로모터를 사용하여 목적 효소를 발현시키는 연구가 지속적으로 진행 중이다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Arkansa State Univ. & Texas A&M Univ. (미국)	- <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 의 E1 셀룰라제 (endo-β-1,4- glucanase)와 <i>Trichoderma reesei</i> 의 exocellulase와 cellobiohydrolase I을 옥수수 globulin-1 promoter를 이용하여 발현시킨 후 단백질을 cell wall, ER, vacuole내에 집적시킴 (Plant Biotech. J. 2007. 5: 709-719)	연구개발 단계
Michigan State Univ. (미국)	- <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 의 E1 cellulase (endo-β-1,4- glucanase)를 CaMV35S promoter를 이용하여 벼와 옥수수에 도입함. 발현된 단백질을 apoplast내에 집적시킴 (Transgenic Res. 2007. 16: 739-749; Plant Science 2006. 171: 617-623)	연구개발 단계
CEA Systems, Inc. (미국)	- <i>Thermobifida fusca</i> 셀룰라제인 Cel6A와 Cel6E를 엽록체 형질전환 방법으로 담배의 엽록체 게놈으로 직접 도입함 (J. Biotechnol. 2007. 15: 362-369)	연구개발 단계
North Carolina State Univ. (미국)	- <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 의 E1 셀룰라제 (endo-β-1,4- glucanase)를 CaMV35S promoter를 이용하여 수생식물인 <i>Lemna minor</i> 8627에 도입함 (Bioresource Technology. 2007. 98: 2866-2872)	연구개발 단계
National Renewable Energy Lab. (미국)	- <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 의 E1 셀룰라제 (endo-β-1,4- glucanase)를 Mac 과 Rubisco small sub-unit (RbcS-3C) promoter를 이용하여 담배에 도입함 .발현된 단백질은 cytosol, ER, vacuole, apoplast, chloroplast에 집적함 (Transgenic Res. 2005. 14: 627-643)	연구개발 단계

#### 나. 국내 기술현황

Fungus 및 박테리아의 xylanase, 셀룰라제 유전자를 CaMV 35S promoter를 이용하여 애기장대에서 발현하는 연구가 진행 중이다. xylanase 경우 엽록체와 peroxisome의 세포내 소기관으로 동시에 집적시켜 세포내 총 수용성 단백질 양 중 xylanase의 생성량이 4.8%에 이르는 수준으로 도달하였다. 또한 *Trichoderma reesei* xylanase인 XYLII를 CaMV35S promoter를 이용하여 애기장대로 도입하여 엽록체와 peroxisome에 동시에 발현 집적하는 연구가 시도되었다 (J. Exp. Botany 2006. 57: 161-169).

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 바이오에너지용 비식용 및 비사료 작물 형질전환 시스템 개발

#### 1. 섬유질계 에너지 작물 수집 및 유지·관리

##### 가. 섬유질계 에너지 작물 탐색



그림 1. 국내 자생 섬유질계 에너지 작물 수집

당질계, 전분질계 바이오메스에 이어 차세대 바이오메스로 주목받고 있는 섬유질계 에너지작물은 cellulose와 hemicellulose의 함량이 많아 에너지 전환 효율이 높고 (Moon *et al.* 2010), CO<sub>2</sub> 저감효과가 있다는 장점으로 인해 친환경 미래 에너지로 주목받고 있다. 이에 본 연구팀은 섬유질계 에너지 작물 중 국내에서 활용 가능성이 높은 비식용 및 비사료용 작물로 억새와 갈대를 선정하였다.

억새와 갈대는 국내 전역에 걸쳐 자생하여 생태적 적응능력이 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 또한, 이들은 종자로 번식하는 것뿐만 아니라 근경을 통한 무성번식도 가능하고, 질소 시비 요구도가 매우 낮아 재배상의 이점이 있다 (Beale *et al.* 1996, Chris *et al.* 2010). 갈대의 경우 간척지의 토질을 정화시켜주는 효능 또한 주목받고 있어 국내에서 개발 가능한 섬유질계 에너지 작물로 매우 적합한 것으로 판단된다.

##### 나. 선별 작물의 수집 및 품종 확인

억새와 갈대는 전국에 걸쳐 다양한 종이 분포하고 있으나 체계적으로 명문화 되어있지 않은 상황이라 종 이하의 변종 구별이 매우 어려운 실정이다. 억새의 경우 국내에는 참억새 (*Miscanthus sinensis*), 물억새 (*Miscanthus sacchariflorus*), 장억새 (*Miscanthus changii*), 억새아재비 (*Miscanthus oligostachyus*) 4종과 금억새, 흰억새, 자주억새, 얼룩억새 등 9개의 변종이 확인되어있고, 갈대는 자생 지역으로 표시하여 구분하고 있다. 본 연구팀은 지역별로 참억새 3종, 갈대 3종의 종자를 각각 수집하여, 수집된 종자를 대상으로 까끄라기 유무, 제 1포영과 최하호영의 길이 비율을 조사하여 참억새와 갈대를 확인하였다.

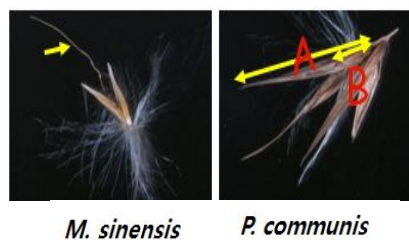


그림 2. 수집된 참억새 (*Miscanthus sinensis*)와 갈대 (*Phragmites communis*)의 종 확인

다. 억새류와 갈대의 수집

섬유질계 에너지 작물 중 국내에서 활용 가능성이 높은 비식용 및 비사료용 작물로 참억새 (*Miscanthus sinensis*), 물억새 (*M. sacchariflorus*), Giant Miscanthus (*M. × giganteus*)와 갈대 (*Phragmites communis*)의 유전자원을 수집하였다. 전국에 걸쳐 분포해 있는 참억새, 물억새와 갈대의 주요 자생지를 조사·선별하여, 지역별 자생지에서 미성숙 화기, 근경, 종자를 수집하였다. 미성숙 화기는 7~8월에 수집하여 캘러스 유도과 형질전환을 위한 재료로 사용하였고, 근경은 유전자원 유지를 위해 상명대 시험온실과 포장에 식재하여 재배하였으며, 종자는 9~10월에 수집하여 유전자원 보존 및 캘러스 유도를 위한 재료로 사용하였다 (표 3-1).

표 3-1. 바이오에너지 작물 수집 및 유지·관리 현황

식물종	시/도	지역	채취부위	보유현황
<i>Miscanthus sinensis</i> (참억새)	충청남도	오서산	근경, 화기	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체, 종자
	전라남도	천관산	근경, 화기	기외 식물체
	경상남도	화왕산	화기, 종자	기내 캘러스, 기외 식물체, 종자
		식산봉	화기, 종자	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체, 종자
		정석항공관	화기	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체
	제주도	Joy World	화기	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체
		녹차다원	화기	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체
<i>Miscanthus sacchariflorus</i> (물억새)		따라비오름	화기	기외 식물체, 종자
	전라남도	함평	근경, 화기	기외 식물체, 종자
		반구정	근경, 화기	기내 캘러스, 기외 식물체, 종자
		덕천강 금성교	종자	종자
		고천암호	근경	기외 식물체, 종자
	경상남도	주남저수지	화기	기내 캘러스, 기내 식물체
		우포늪	근경, 종자	기외 식물체, 종자
제주도	하도리	화기	기외 식물체	
<i>Miscanthus × giganteus</i>			근경, 식물체	구근, 식물체
<i>Phragmites communis</i> (갈대)	충청남도	신성리	근경, 화기, 종자	기내 캘러스, 기내 식물체, 기외 식물체, 종자
	경상남도	주남저수지	화기	기내 캘러스
	부산	을숙도	화기	기내 캘러스, 기내 식물체
	제주	하도리	화기	기외 식물체

전국의 주요 자생지역을 중심으로 참억새는 전국 총 8 곳, 물억새는 총 7 곳, 갈대는 총 4 곳에서 수집하였고, 기내에서 캘러스 또는 식물체, 그리고 기외의 종자 또는 식물체 상태로 유지·관리하고 있다. 또한, *M. giganteus*는 (주)동부한농으로부터 근경을 분양받아 기내 캘러스와 기외 식물체 상태로 유지·관리하고 있다.



그림 1-3. 수집된 억새류와 갈대의 식물체 재배 모습

## 2. 식물체 재생 시스템 확립

### 가. 성숙 종자를 이용한 식물체 재생

#### (1) 캘러스 유도

##### (가) 식물재료 및 종자소독

본 연구는 참억새 (*Miscanthus sinensis*)와 갈대 (*Phragmites communis*)의 성숙 종자를 재료로 하여 수행하였다. 참억새에 비해 갈대는 종자의 크기가 작고 (약 1.8 mm), 단단하여 실험 전 18시간 동안 Tween-20을 1방울/2 mL 첨가한 증류수에 침지하였다. 종자는 멸균을 위하여 70% 에탄올에 40초간 침지한 후 멸균수로 1회 세척하고, Tween-20을 1방울/20 mL 첨가한 40% NaOCl 용액 (유효염소농도 4%의 상업용 표백제)에 20분간 침지하였다. 이 후, 멸균수로 3회 이상 세척하였고, 멸균된 여과지로 종자 표면의 물기를 제거한 후 실험에 사용하였다.

##### (나) 기본배지 종류와 2,4-D 농도의 효과

억새의 종자로부터 캘러스 유도에 적합한 조건을 구명하기 위하여 기본배지의 종류와 2,4-D 농도에 대한 실험을 수행하였다. 기본배지의 종류로 MS배지 (Murashige & Skoog 1962)와 N6배지 (Chu et al. 1975)를 비교하였으며, 2,4-D 농도는 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L로 하여 기본배지와 2,4-D 농도의 조합처리를 실시하였다. 모든 배지는 pH를 5.8로 조정하였으며, agar 8 g/L를 첨가하여 121°C에서 17분간 고압 증기 멸균하였다. 멸균된 배지는 100×20 mm 투명 polystyrene petri-dish (SPL) 용기에 35 ml씩 분주하였고, 소독된 종자를 용기당 9개씩 치상하여 처리당 5반복하였다. 종자 치상 후 캘러스 유도는 25±2°C인 배양실에서 암조건으로 배양하였으며, 4주 후에 발아율, 캘러스 유도율, 캘러스 형성 부위를 조사하였다.

캘러스 유도배지에 치상한 억새 종자는 배양 3~7일 사이에 발아하기 시작하였고, 7~14일 경에 캘러스가 형성되기 시작하였다. 캘러스는 주로 종자의 배 부위에서 형성되기 시작하였으며, 종자에서 발달한 자엽초나 뿌리가 배지에 닿아있는 부분에서도 형성되었다.

기본배지로 MS배지와 N6배지를 사용하고 2,4-D를 농도별로 처리한 배지에서 종자를 배양하였을 때 종자 발아율은 일부 처리구를 제외하고는 전반적으로 90% 이상이었다. 특히, MS배지와 N6배지에 2,4-D 2.0 mg/L가 첨가된 처리구에서는 100% 발아율을 보여주었다. MS배지와 N6배지에서 모두 2,4-D 무첨가 처리구에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았고 2,4-D가 1.0

mg/L 첨가되었을 때 8.9%의 효율로 캘러스가 형성되었다. 그리고 N6배지에서는 2.0 mg/L 이상의 농도에서 22.2~28.9%의 캘러스가 형성되어 농도 증가에 따른 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, MS배지에서는 2,4-D 농도가 증가함에 따라 캘러스 유도율이 증가하다가 4.0 mg/L가 첨가된 처리구에서 42.2%로 최대를 나타낸 후 5.0 mg/L 처리구에서 다시 감소하는 경향을 보여주었다 (표 3-2).

본 실험에서 2,4-D 농도 차이에 따른 캘러스 유도율은 N6 배지에 비해 MS배지에서 2,4-D 농도에 매우 민감하게 반응한다는 것을 알 수 있었으며, 이는 Holme 등 (1997)이 proline을 첨가한 캘러스 유도배지에서 MS 배지는 배형성 캘러스를 증가시켰으나 N6 배지에서는 차이가 없었다고 보고한 것과 유사한 결과였다. 따라서, 종자로부터 2,4-D를 이용한 캘러스 유도시 MS배지에 2,4-D 4.0 mg/L를 첨가하는 것이 가장 효과적인 것으로 보인다. 또한 억새는 종자를 이용한 캘러스 유도시 다른 작물에 비해 2,4-D 요구도가 높은 것으로 판단되었다.

갈대는 참억새에 비해 발아율과 callus 유도율이 낮았으며, 오염 발생율이 높게 나타났다. 전체적인 callus 유도율은 참억새와 마찬가지로 MS 배지에 2,4-D 4 mg/L를 첨가한 처리구에서 가장 높게 나타났지만 (표 3-3), 자엽초 (coleoptile) 기부 끝 배반 (scutellum) 근처 callus 유도율은 N6 배지에 2,4-D 2 mg/L를 첨가한 처리구가 가장 효과적이었다. 참억새와 갈대는 종자로부터의 캘러스 유도에 적합한 2,4-D 농도에 차이를 보였는데 이는 두 종간의 내생 hormone 차이에 기인한 것이라고 생각된다.

표 3-2. 참억새 (*Miscanthus sinensis*) 성숙종자로부터 캘러스 유도에 미치는 2,4-D 농도의 효과

Medium	2,4-D concentration (mg/L)	Seed germination (%)	Callus formation (%)
MS	0	88.9	0.0
	1	93.3	8.9
	2	100.0	20.0
	3	94.4	16.7
	4	97.8	42.2
	5	100.0	27.8
N6	0	94.4	0.0
	1	93.3	8.9
	2	100.0	26.7
	3	86.7	22.2
	4	93.3	22.2
	5	97.8	28.9



표 3-3. 갈대 (*Phragmites communis*) 성숙종자로부터 켈러스 유도에 미치는 2,4-D 농도의 효과

Medium	2,4-D concentration (mg/L)	Seed germination (%)	Callus formation (%)
MS	0	41.7	0.0
	1	37.0	25.9
	2	33.3	16.7
	3	27.8	11.1
	4	38.9	27.8
	5	51.9	7.4
N6	0	22.2	0.0
	1	27.8	16.7
	2	33.3	22.2
	3	48.2	7.4
	4	33.3	0.0
	5	47.2	11.1

(다) proline 처리의 효과

참억새 종자로부터의 켈러스 유도에 적합한 조건을 구명하기 위하여 proline 농도에 대한 실험을 수행하였다. 기본배지는 MS 염류와 비타민 2,4-D 3 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 배지를 사용하였으며, proline은 각 0, 0.7, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 g/L 첨가하였다. proline은 배지를 고압 증기 멸균한 후 여과 살균하여 첨가해주었으며 배양 용기는 100×20 mm 투명 polystyrene petridish를 사용하였다. 소독된 종자를 용기당 9개씩 치상하였고, 처리당 4개 반복구를 두었다. 종자 치상 후 켈러스 유도는 25±2℃인 배양실에서 암처리 하였으며, 4주 후에 발아율, 켈러스 유도율, 켈러스 형성 부위를 조사하였다.

Proline은 켈러스 유도에 관한 생화학적 기작이 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 몇몇 단자엽 식물의 배형성 켈러스 유도에 효과가 있는 것으로 알려진 배지 첨가물 중 하나이다. 옥수수의 경우에는 켈러스 유도 배지에 proline을 첨가하는 것이 배형성 켈러스 유도율을 촉진하였고 (Armstrong & Green 1985, Suprasanna et al. 1994, Pareddy & Petolino 1990), 형성된 배형성 켈러스의 성장 또한 증가시키는 것으로 보고되었다 (Vasil & Vasil 1986, Fitch & Moore 1993).

참억새의 경우 모든 proline 처리구에서 종자 발아는 80% 이상을 나타내었으며, 97.2%였던 대조구에 비해 일부 처리에서는 오히려 감소하였으나 proline 12.0 g/L에서는 대조구와 같이 97.2%로 매우 양호하였다. 켈러스 유도율은 대조구에서 52.8%를 나타내었으며, 저농도 proline 처리인 0.7~3.0 g/L에서는 대조구에 비해 다소 낮은 41.7~50.0%를 보였으나 12.0 g/L 처리구에서는 58.3%로 대조구에 비해 높게 나타났다 (표 3-4). 이와 같이 proline은 참억새 종자의 발아 및 켈러스 유도율을 증가시키는 효과가 있지만, 저농도 처리 보다는 12.0 g/L 이상의 고농도 처리가 필요하다는 것을 확인하였다. Holme 등 (1997)은 억새의 미성숙 화기를 이용한 배형성

캘러스 유도 시 경우 proline을 약 1.4 g/L 첨가하는 것이 가장 효과적이라고 보고하였는데, 이로 보아 역새의 캘러스 유도에 proline 첨가가 효과적임을 알 수 있었으나, 동일 종이라도 식물 재료에 따라 proline의 요구량은 다른 것으로 생각되었다.

갈대는 proline 3.0 g/L 처리구에서 캘러스 유도율 22.2%로 proline 무처리구에 비해 약 7.7배 증가하여 매우 높은 증가율을 보였다. Proline 3.0 g/L 처리구를 제외하고는 농도 증가에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으며, 고농도 proline 처리인 12.0 g/L에서는 오히려 감소하였다 (표 3-5).

이것으로 보아 proline은 역새와 갈대의 성숙 종자 캘러스 유도에 효과적인 것으로 나타났으며, 2,4-D 요구도와 마찬가지로 참억새가 갈대에 비해 더 높은 농도의 proline 처리가 효과적이었으나 무처리구에 대한 처리의 효과는 갈대가 더 크게 나타났다.

표 3-4. 참억새 (*Miscanthus sinensis*) 성숙종자로부터 캘러스 유도에 미치는 proline농도의 효과

Medium	Proline concentration (g/L)	Seed germination (%)	Callus formation (%)
MS	0.0	97.2	52.8
	0.7	86.1	41.7
	1.5	91.7	44.4
	3.0	97.2	50.0
	6.0	83.3	52.8
	12.0	97.2	58.3

표 3-5. 갈대 (*Phragmites communis*) 성숙종자로부터 캘러스 유도에 미치는 proline 농도의 효과

Medium	Proline concentration (g/L)	Seed germination (%)	Callus formation (%)
MS	0.0	54.3	2.9
	0.7	33.3	11.1
	1.5	41.7	11.1
	3.0	38.9	22.2
	6.0	34.3	11.4
	12.0	33.3	9.1

(라) Gelling agent 종류와 농도의 효과

배지 고형제의 종류가 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보고, 적정 농도를 구명하기 위하여 실시하였다. 배지 고형제는 agar (Sigma)와 Phytigel (Sigma)을 사용하였으며, agar는 6, 7, 8, 9 g/L, Phytigel은 1.75, 2.0, 2.25, 2.5 g/L를 처리하였다. 참억새는 MS 염류와 비타민에

2,4-D 4 mg/L를 첨가한 기본배지를 사용하였으며, 갈대는 N6 염류와 비타민에 2,4-D 2 mg/L를 첨가한 배지를 기본으로 사용하였다. 모든 배지는 sucrose 30 g/L, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 750 mg/L를 첨가하였고 평균 전 pH 5.8로 조정해주었으며 배양 용기는 100×20 mm 투명 polystyrene petridish를 사용하였다. 소독된 종자는 용기당 9개씩 4반복 치상하였고 종자 치상 후 켈러스 유도는 25±2℃인 배양실에서 암상태로 실시하였으며, 4주 후에 발아율, 켈러스 유도율, 켈러스 형성 부위를 조사하였다.

배지고형제 agar와 Phytigel을 농도별로 처리하여 종자 발아율과 켈러스 유도율을 비교하였을 때, 종자 발아율은 agar가 Phytigel에 비해 전반적으로 높은 경향을 나타내었으나, 켈러스 유도율은 반대로 Phytigel이 agar에 비해 높았다.

참억새의 경우 켈러스 유도율은 모든 처리에서 66.7% 이상이었고, agar에서는 8.0 g/L 처리구에서 80.6%로 가장 높았으며, Phytigel에서는 2.25 g/L 처리구에서 86.1%로 가장 높게 나타났다. 따라서 참억새 종자로부터의 켈러스 유도를 위해서는 배지고형제로 Phytigel을 사용하고, 농도는 2.25 g/L로 하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

갈대도 참억새와 마찬가지로 켈러스 유도율은 모든 처리에서 agar에서는 8.0 g/L 처리구에서 22.2%로 가장 높았으며, Phytigel에서는 2.25 g/L 처리구에서 83.3%로 가장 높게 나타났다. 따라서 참억새 종자로부터의 켈러스 유도를 위해서는 배지고형제로 Phytigel을 사용하고, 농도는 2.25 g/L로 하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다. Wang과 Chai (2006)는 주요 잔디류 성숙종자로부터의 켈러스 유도에서 agar에 비해 Phytigel의 켈러스 유도율이 높았으며, 몇몇 종에서는 켈러스 유도에는 유의성이 나타나지 않았지만 배발생 켈러스 유도율은 Phytigel 처리구에서 더 높게 나타났다고 보고한 바 있다. 이로 보아, 참억새와 갈대를 포함한 단자엽 식물의 종자로부터 켈러스 유도에서는 배지고형제로 Phytigel을 사용하는 것이 바람직하다고 보여진다.

표 3-6. 참억새 (*Miscanthus sinensis*) 성숙종자로부터 켈러스 유도에 미치는 배지고형제 종류와 농도의 효과

Gelling agent	Concentration (g/L)	<i>Miscanthus sinensis</i>	
		Seed germination (%)	Callus formation (%)
Agar	6.0	88.9	75.0
	7.0	100.0	66.7
	8.0	100.0	80.6
	9.0	94.4	66.7
Phytigel	1.75	94.4	83.3
	2.0	61.1	75.0
	2.25	97.2	86.1
	2.5	94.4	72.2

표 3-7. 갈대 (*Phragmites communis*) 성숙종자로부터 캘러스 유도에 미치는 배지고형제 종류와 농도의 효과

Gelling agent	Concentration (g/L)	<i>Phragmites communis</i>	
		Seed germination (%)	Callus formation (%)
Agar	6.0	36.1	8.3
	7.0	48.1	14.8
	8.0	44.4	22.2
	9.0	47.2	16.7
Phytigel	1.75	41.7	22.2
	2.0	36.1	25.0
	2.25	55.6	33.3
	2.5	47.2	22.2

## (2) 캘러스 증식 및 식물체 재생

### (가) 캘러스 증식

본 연구는 종피를 제거한 참억새 성숙 종자를 공시재료로 하여 실시하였다. 억새의 종자로부터 유도된 캘러스는 매 4주마다 MS 염류와 비타민, 2,4-D 3.0 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 배지로 계대배양 하였으며, 종자로부터 캘러스 유도 3개월 후 식물체 재생을 위한 재료로 사용하였다.

형태형성 캘러스를 통한 식물체 재생을 위해서는 적합한 캘러스를 찾아내고, 선택적인 배양을 하는 것이 중요하기 때문에, 많은 곡류와 초본류에서 형태학과 조직학적 연구에 의한 캘러스 유형이 구분되고 있다 (Morrish et al. 1987, Armstrong 1994, Luo & Jia 1998, Toyama et al. 2003, Kim et al. 2010). 본 연구에서는 억새의 종자로부터 캘러스 유도 후 약 2개월부터 캘러스가 급속도로 증식하기 시작하였으며, 약 3개월 후 세 가지 형태의 캘러스로 분화하였다. 배지와 닿아있는 가장자리 부분에는 투명한 흰색의 물기가 많고 넓게 퍼지면서 증식하는 friable한 캘러스가 발달하였고, 가운데 부분에는 촉촉한 느낌의 진한 노란색을 띠는 둥근 돛 형태의 캘러스가 나타났으며, 가장 위 쪽에는 물기가 없이 불투명한 흰색의 캘러스가 발달하였다. 그 중 진한 노란색의 둥근 돛 형태를 갖는 캘러스의 경우 현미경으로 관찰하였을 때, 기관으로 분화하는 초기 모습을 나타내어 형태형성 캘러스인 것으로 판단되었다.

식물체 재생을 위하여 종자로부터 유도 및 증식된 캘러스를 직경 4 mm 크기로 분리하여 호르몬 무첨가 MS배지 또는 BA 1.0 mg/L 첨가 MS배지에 치상하였다. 치상 후 25±2°C인 배양실에서 암조건으로 신초의 재생을 유도하였고, 신초가 형성된 후 명조건으로 옮겨 배양하였다. 신초를 명조건에서 배양하여 지상부가 1 cm 이상 성장하였을 때, MS 배지에 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L가 첨가된 신장 및 발근배지로 옮겨 주었다. 뿌리가 정상적으로 발달하고 지상부가 약 5 cm 이상 신장한 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 뿌리에 붙어있는 배지를 제거한 후, 배양토 (뚝심이, 농우종묘)가 담겨진 육묘판에 이식하였다. 육묘판에서 활착된 식물체는 15 cm 이상 신장되었을 때 직경 12 cm의 화분에 옮겨 심어 온실에서 재배하였다.

억새의 캘러스로부터 식물체 재생은 캘러스 유도에 사용된 농도보다 낮은 농도의 옥신 첨가에

의해 이루어지며, 시토키닌의 첨가에 의해 증가하는 것으로 보고되었다 (Petersen 1997). 또한 억새의 종자 유래 캘러스로부터 식물체 재생은 2,4-D 1.0 mg/L와 BA 2.0 mg/L를 혼용처리 하였을 때 가장 높았으나 (Park et al. 2009), 다른 단자엽 식물에 비해 재생 효율은 높지 않았다.

본 연구에서는 억새의 종자 유래 캘러스로부터 식물체 재생을 유도하기 위해 2,4-D를 제거한 호르몬 무첨가 MS배지 또는 저농도의 BA를 첨가한 MS배지로 진한 노란색의 둥근 돔 형태를 갖는 캘러스를 선택하여 옮겨 배양하였고, 식물체 재생 배지에서 배양 3주 후부터 신초가 발달하기 시작하였다. 신초 발달 후 16:8시간 광주기의 명조건으로 옮겨 배양을 실시하였는데, 신초는 녹색으로 바뀌며 신장하였고 뿌리가 형성되었다. 그러나, 억새를 이용한 기존 연구결과와 마찬가지로 전반적인 식물체 재생 효율은 낮았으며, 캘러스로부터 식물체 재생 효율을 높이기 위한 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다. 발근된 소식물체는 약 5 cm 이상 신장한 후 토양으로 이식하였을 때 성공적으로 활착되었다. 활착 4주 후 식물체의 지상부가 20 cm 이상 신장한 후 관찰하였을 때 식물체는 외관상 정상적인 표현형을 보여주었다. 본 연구에서 확립한 억새 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재생은 돌연변이 유도 또는 유전적 형질전환 등의 생명공학 육종을 통한 신품종 육성 연구에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

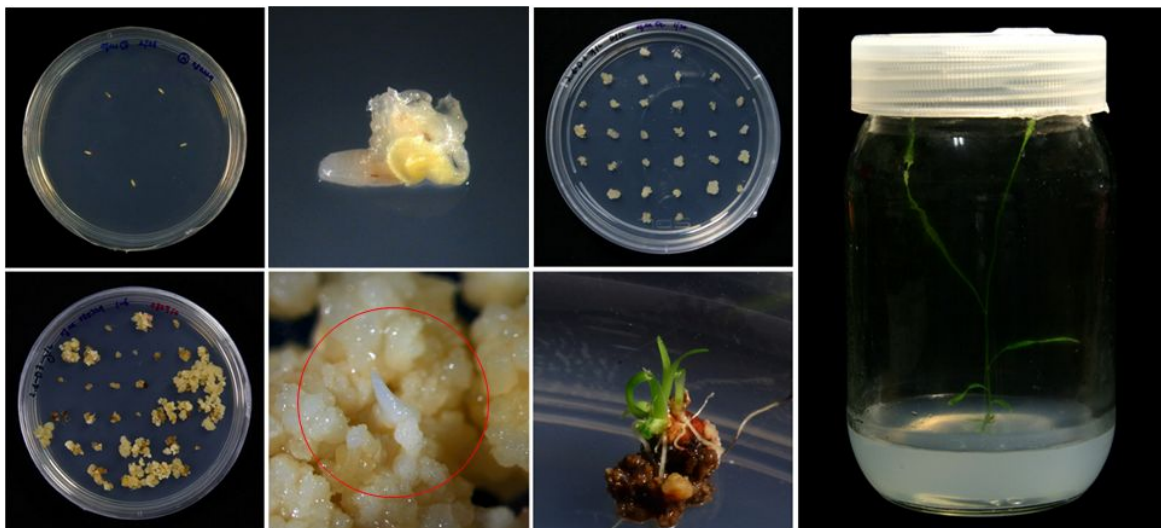


그림 1-5. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 성숙종자를 이용한 체세포배형성을 통한 식물체 재생

## 나. 미성숙 화기를 이용한 식물체 재생

### (1) 참억새

#### (가) 미성숙 화기로부터 캘러스 유도

##### ① 식물재료 및 소독

본 연구는 충청남도 오서산에서 채취한 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기를 재료로 하여 수행하였다. 미성숙 화기가 포함된 참억새 줄기를 70% 에탄올에 40초간 침지 후 멸균수로 1회 세척하였다. 이어서 Tween-20을 2~3방울/100 mL 첨가한 40% NaOCl 용액 (유효염소 농도 4%의 상업용 표백제)에 20분간 침지한 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 식물재료는 화기를 분리해낸 후 절단하여 실험에 사용하였다.

##### ② 미성숙 화기 길이와 부위에 따른 효과

미성숙 화기의 길이와 부위가 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 화기 길이는 0~5 cm, 5~10 cm, 10~15 cm, 15~20 cm, 20 cm 이상의 5개 처리를 하였으며, 화기 부위는 10~15 cm 길이의 화기를 3등분 하여 기부, 중간, 상단의 3개 처리를 하여 비교하였다. 기본 배지는 MS① 배지를 사용하였다. 모든 배지는 pH를 5.5로 조정하였으며, 121℃에서 15분간 고압 증기 멸균하여 100×20 mm 투명 polystyrene petri-dish 용기에 분주하였다. 소독된 미성숙 화기는 절단하여 치상하였다. 미성숙 화기 치상 후 캘러스 유도는 25±2℃인 배양실에서 암처리 하였으며, 4주 후에 캘러스 유도율과 형성된 캘러스 수를 조사하였다. 이 후 모든 실험에서 기본배지 및 제조방법, 치상방법과 반복수, 배양 및 조사방법을 상기와 동일하게 실시하였다.

미성숙 화기의 길이가 캘러스 유도에 미치는 영향을 비교해 보았을 때 0~5 cm와 5~10 cm 처리구에서는 캘러스 유도율이 약 50% 내외로 큰 차이를 나타나지 않다가 10~15 cm 처리구에서 캘러스의 유도율과 수에서 10~15 cm가 95.8%와 10.7개로 급격히 증가하였으며, 그 이상의 길이 처리구에서는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 미성숙 화기의 부위에 따른 캘러스 유도는 전반적으로 줄기에 가까운 기부 부분에서 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며, 형성된 캘러스 수도 가장 많았다.

오서산 억새의 미성숙 화기를 ‘상’, ‘중’, ‘하’ 부위로 구분하여 캘러스 유도율과 cluster당 캘러스 수를 비교한 결과, ‘하’ 부위가 40.3%의 유도율과 1.9개의 캘러스의 수로 가장 높게 나타났으며 ‘중’, ‘상’ 부위로 올라갈수록 유도율과 캘러스의 수는 감소하는 경향을 보여주었다.

Holme과 Petersen (1996)은 미성숙 화기의 길이 (0.05~65 mm)에 따라 유도된 캘러스의 수에 대해 실험하였고, 그 결과 길이가 길어질수록 캘러스의 수는 증가한다고 보고하였으나 배형성 캘러스는 짧은 미성숙 화기에서 많이 형성된다고 하였다. Petersen 등 (1999)도 짧은 미성숙 화기를 이용하여 80%이상의 배형성 캘러스를 유도하였다고 보고하였다. 화기의 길이에 있어서는 65 mm보다 긴 미성숙 화기에서의 캘러스 유도에 대한 보고가 없었으나, 본 실험에서 95.8%의 높은 캘러스 유도율로 캘러스가 형성되었다.

이와 같이 억새의 미성숙 화기의 부위와 길이에 따라 캘러스 유도율이 차이가 나는 것으로 나타났다. 따라서 억새 미성숙 화기로부터 캘러스를 유도 할 때에는 10~15 cm의 미성숙 화기의 ‘중’, ‘하’부분을 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

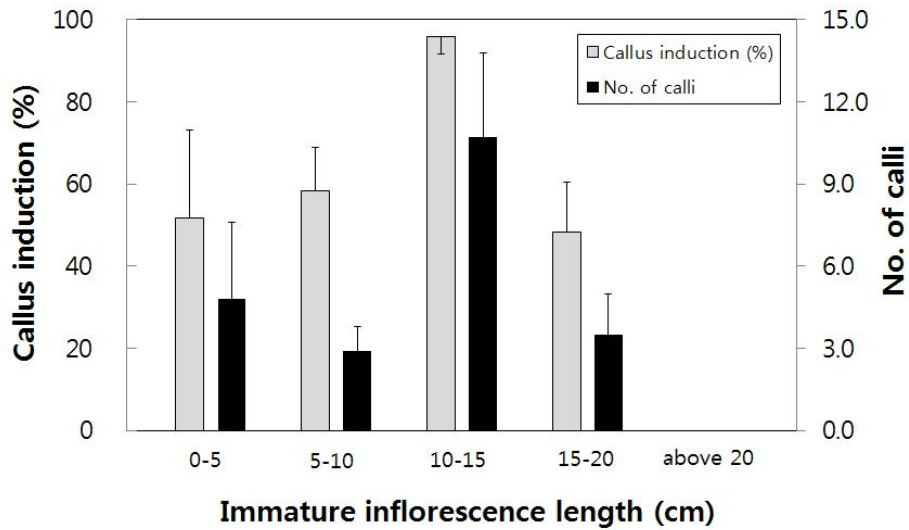


그림 1-6. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 켈러스 유도에 미치는 화기 길이의 영향

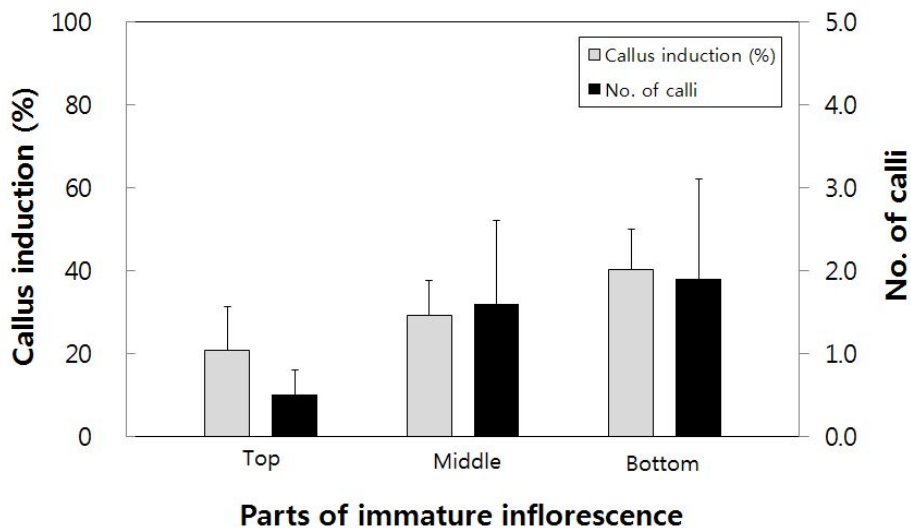


그림 1-7. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 켈러스 유도에 미치는 화기 부위의 영향

### ③ 기본 배지에 따른 효과

미성숙 화기로부터 켈러스 유도에 미치는 기본배지의 영향에 대해 알아보았다. 기본배지는 MS 염류와 비타민, N6 염류와 비타민의 두 가지를 사용하였으며, 기본배지의 종류를 제외한 나머지 조성은 MS① 배지와 동일하게 사용하였다.

MS배지를 첨가할 경우 83.3%의 켈러스 유도율과 8.7개의 켈러스 수를 나타내어 N6배지를 첨가한 것보다 좋은 결과를 나타내었다.

Holme 등 (1997)은 proline이 포함된 켈러스 유도배지의 MS배지는 배형성 켈러스를 증가시켰으나 N6배지에서는 별 영향을 미치지 못했다고 보고하였다. 본 실험에서도 MS배지가 N6배지와 비교하였을 때 억새 미성숙 화기로부터 켈러스를 유도하는데 효과적이었다.

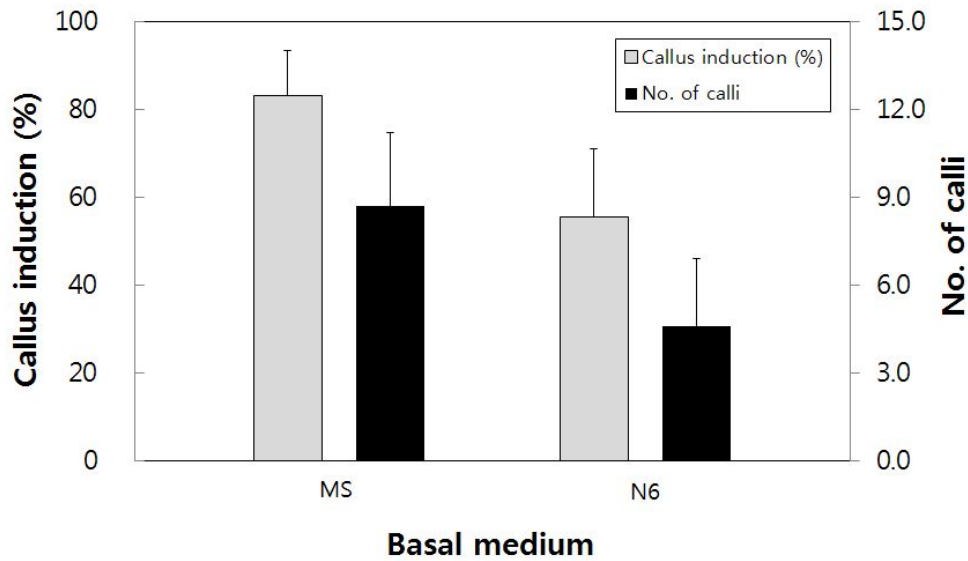


그림 1-8. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 켈러스 유도에 미치는 기본 배지의 영향

④ 식물생장조절제에 따른 효과

미성숙 화기로부터 켈러스 유도에 있어서 성장조절제의 농도에 따른 효율을 알아보았다. 기본배지는 MS① 배지를 사용하였으며, 식물생장조절제는 2,4-D 0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L와 BA 0, 0.1, 1.0 mg/L를 조합하여 처리하였다.

생장조절제 2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 86.7%로 가장 높은 켈러스 유도율과 5.5개의 켈러스 수를 나타내었고, 2,4-D 5 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서도 80%의 높은 유도율과 4.8개의 켈러스 수를 보여주었다. 2,4-D의 농도가 증가함에 따라 미성숙 화기에서 켈러스 유도율이 증가하는 경향을 보여주었으며, BA의 농도는 0.1 mg/L이었을 때 2,4-D의 농도에 관계없이 전반적으로 켈러스의 형성이 증가하였다.

Holme과 Petersen (1996)는 미성숙 화기의 켈러스 유도율은 2,4-D 농도의 영향을 거의 받지 않는다고 하였으며, Petersen (1997)은 잎 절편체에서 BA 농도의 증가에 따라 켈러스 유도가 감소하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 2,4-D에 BA 0.1 mg/L의 첨가가 켈러스 유도에 효과적임을 알 수 있었다.



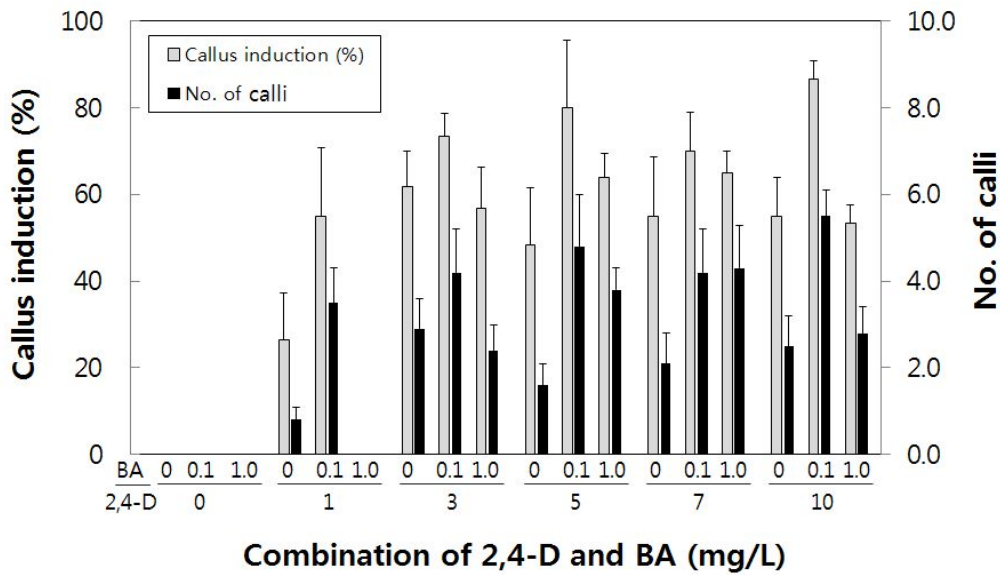


그림 1-9. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 식물생장조절제의 영향

⑤ 배지고형제에 따른 효과

배지고형제가 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agar 6, 8, 10 g/L와 Phytigel 2, 2.5, 3 g/L를 비교하였을 때, Phytigel 2 g/L에서 캘러스 유도율이 77.8%로 가장 높았다. agar보다는 Phytigel을 배지고형제로 사용하였을 때 캘러스 유도가 효과적이었다. Phytigel 농도는 낮아질수록 캘러스 유도가 효과적이었으나 차이는 크지 않았다.

Deberg 등 (1981)은 아티초크의 배양에서는 한천농도가 낮은 배지에서는 수분과 양분 흡수가 원활하다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 낮은 농도의 한천 배지에서 캘러스 유도가 높게 나타난 것과 유사한 결과라고 판단된다.

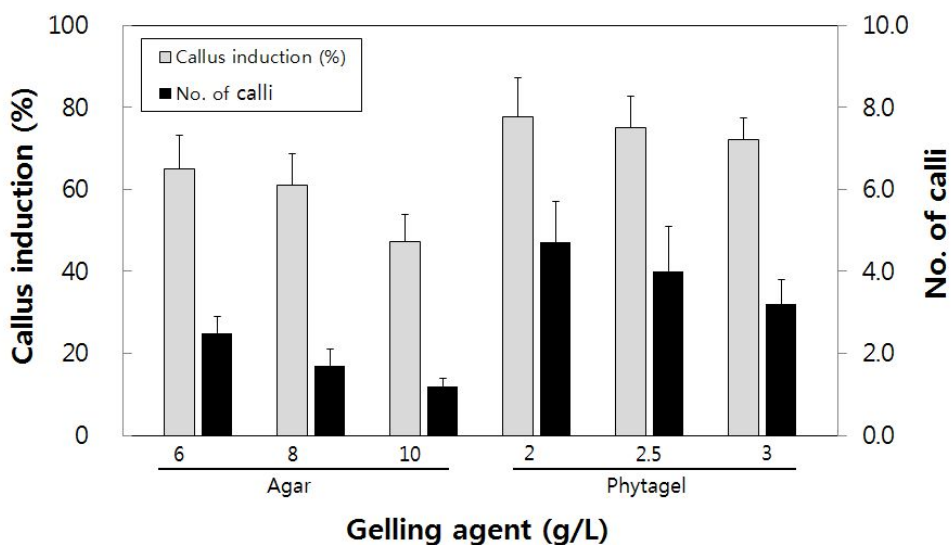


그림 1-10. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 배지고형제의 영향

⑥ 광조건에 따른 효과

캘러스 유도에 있어서 광도가 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 13, 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광도에서 배양하였을 때, 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 암상태에서 81.3%의 캘러스 유도율과 4.6개의 캘러스의 수를 나타내었다. 명상태로 갈수록 캘러스 유도율과 수는 급격하게 감소하였다. 역시 미성숙 화기로부터 캘러스 유도는 광도에 크게 영향을 받으며, 암상태가 캘러스 유도에 가장 적합한 것으로 보인다.

최근까지 보고된 바에 의하면 성숙종자 (Park et al. 2009)를 재료로 한 실험만 약광의 상태로 배양이 되었으며, 이를 제외한 모든 실험에서는 암상태에서 캘러스를 유도 하였다고 보고하였다. 이는 본 실험의 결과와 유사하며, 캘러스를 유도하는데 있어서 암상태로 배양하는 것이 효과적이라고 보인다.

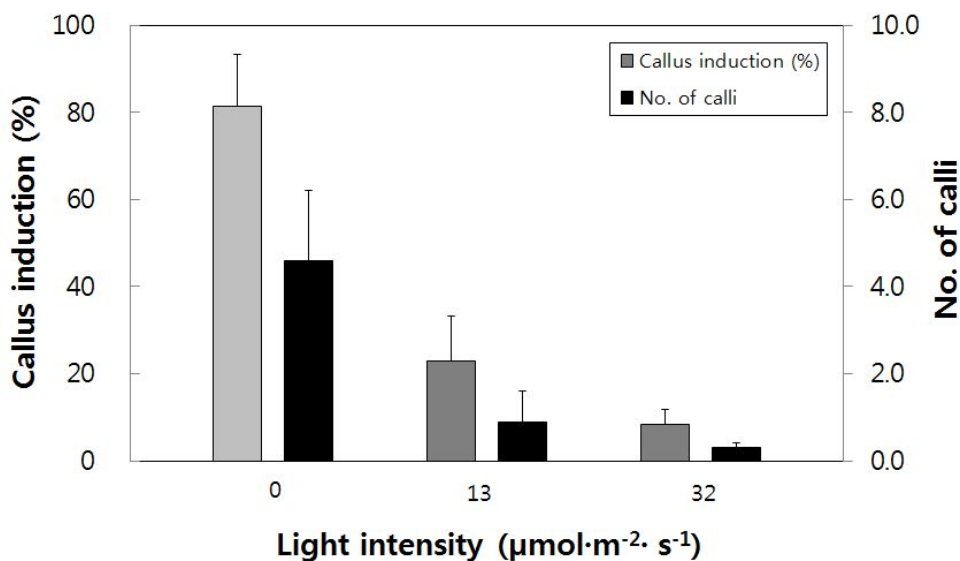


그림 1-11. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 광도의 영향

(나) 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 신초 재생

① 식물재료 및 기본배지

본 연구는 충청남도 오서산에서 채취한 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 하여 수행하였다. 미성숙 화기로부터 유도된 캘러스는 절편체에서 분리하여 증식을 위해 4주마다 계대배양 해주었고, 20주 동안 배양한 캘러스를 재료로 사용하였다. 기본 배지는 MS 배지를 사용하였으며, 배지는 pH를 5.5로 조정 후 121°C에서 15분간 고압 증기 멸균하여 100×40 mm 투명 polystyrene petri-dish에 분주하였다. 미성숙 화기 유래 캘러스는 용기당 4개씩 치상하였다. 치상 후 25±2°C인 배양실에서 3일 동안 암 배양한 후, 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 16:8시간 광주기 백색 형광등하에서 신초를 유도하였다. 배양 2, 4, 6주에 캘러스 생존 여부, 신초 재생율과 캘러스당 재생된 신초의 수를 조사하였다. 이 후 모든 실험에서 기본배지 및 제조방법, 치상방법과 반복수, 배양 및 조사방법을 상기와 동일하게 실시하였다.

② 캘러스 유도 배지에 따른 효과

억새 미성숙 화기로부터 2,4-D와 BA의 혼용처리에서 유도된 캘러스를 대상으로 신초재생을 비교하였다. 캘러스 유도에 사용한 식물생장조절제는 2,4-D 0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L와 BA 0, 0.1, 1.0 mg/L의 조합처리였다. 재생배지는 BA 1.0 mg/L와 NAA 0, 0.1, 1.0 mg/L를 조합처리하였다. 그 결과, 미성숙 화기로부터 2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 캘러스 유도배지에서 유도된 캘러스가 BA 1.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 재생배지에 치상 되었을 때 신초 재생률이 58.3%로 가장 높았으며 6.3개의 신초수를 보였다. 신초 재생에 있어 BA 0.1 mg/L가 첨가된 캘러스 유도배지에서 유도된 캘러스는 BA 무첨가 배지에서 유도된 캘러스에 비해 신초 재생이 효과적인 것으로 나타났다.

Park 등 (2009)은 MS 배지에 2,4-D 1 mg/L와 BA 2.0 mg/L가 첨가한 배지에서 식물체 재생률이 44.6%로 가장 높았다고 보고하였다. 본 실험에서는 Park 등 (2009)의 보고와 비교하였을 때 신초 재생률과 재생 신초수에서 보다 우수한 결과를 얻은 것이라고 생각된다.

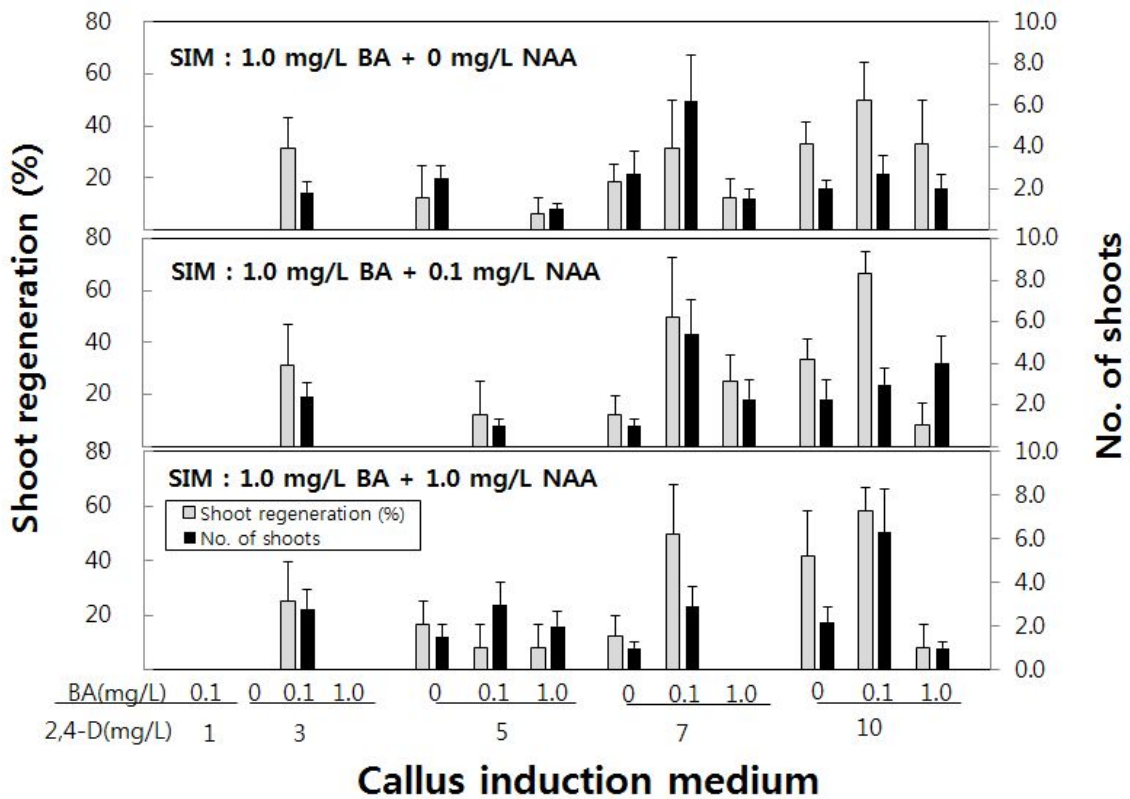


그림 1-12. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 신초 재생에 미치는 캘러스 유도배지의 영향

③ 식물생장조절제 농도에 따른 효과

억새 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 신초 재생에 있어서 성장조절제의 농도에 따른 효율을 알아보기 위하여 실시하였다. 캘러스 유도와 신초재생에 가장 효과적이었던 2,4-D 7 mg/L와 BA 0.1 mg/L, 2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L 조합처리구로부터 유도된 캘러스를 재료로 사용하였으며, 이들 캘러스를 BA 0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L와 NAA 0, 0.1, 1.0 mg/L를 조합처리한 배지에 치상하여 효과를 비교하였다.

2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 유도된 켈러스가 2,4-D 7 mg/L와 BA 0.1 mg/L 첨가 배지에서 유도된 켈러스보다 높은 재생 효율을 나타내었다. 또한, 2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 유도된 켈러스를 BA 1.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 신초 재생배지에 치상하였을 때, 재생율 40%로 가장 높게 나타났다. BA의 농도가 증가함에 따라 켈러스의 전체 혹은 일부가 갈변되어 죽는 경우가 발생하였다. 그러므로 역세의 신초 재생에 있어 시토키닌 농도는 낮게 유지하는 것이 바람직하다고 판단된다.

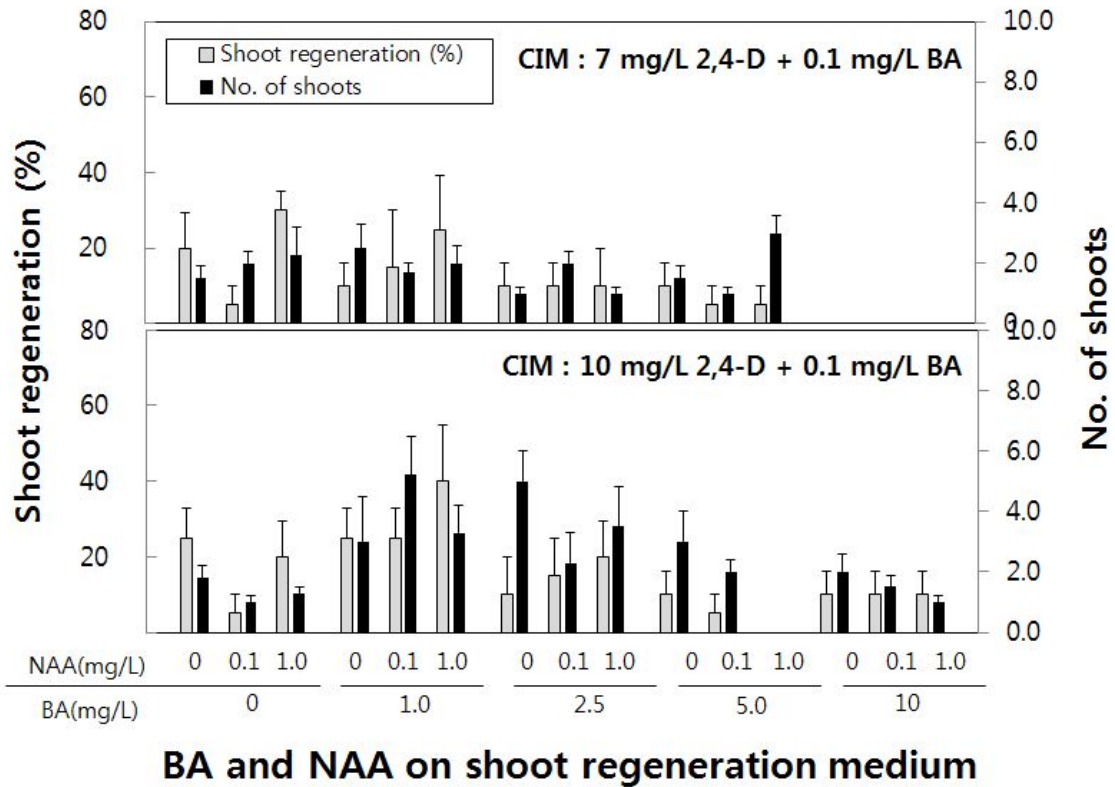


그림 1-13. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 켈러스로부터 신초 재생에 미치는 성장조절제 조합처리의 영향 (상 : 2,4-D 7 mg/L와 BA 0.1 mg/L에서 유도된 켈러스 / 하 : 2,4-D 10 mg/L와 BA 0.1 mg/L에서 유도된 켈러스)

#### ④ 배지고형제의 농도에 따른 효과

배지고형제인 Phytigel의 농도가 참억새 미성숙 화기 유래 켈러스로부터 신초 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. Phytigel은 2, 2.5, 3, 4 g/L를 처리하였으며, 나머지 첨가물은 기본배지와 동일하게 사용하였다.

식물체 재생은 켈러스 유도와는 달리 배지 강도가 3 g/L로 증가하면서 재생율 37.5%와 켈러스당 재생된 신초수 4개로 증가하였고, 그 이상의 강도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이 농도를 제외한 나머지 처리에서는 재생율이 약 18%, 켈러스당 재생 신초수 2개 이하로 처리간의 차이가 크지 않은 것으로 나타났다.

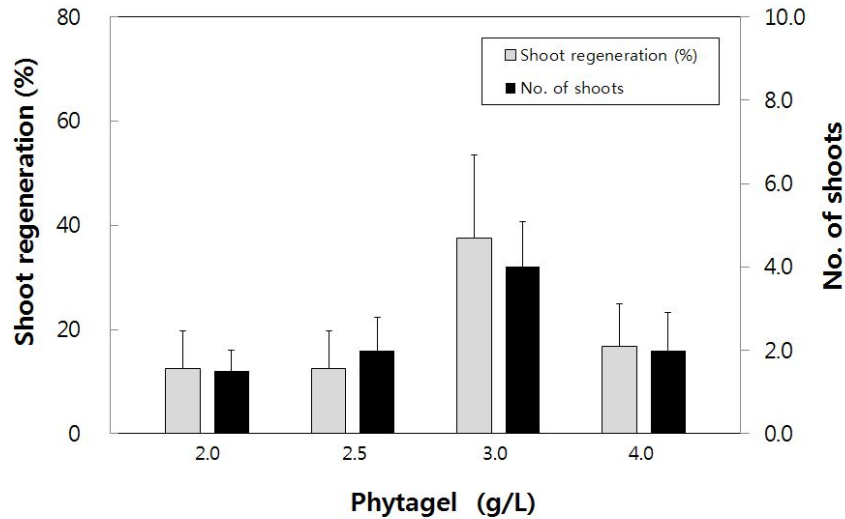


그림 1-14. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 신초 재생에 미치는 Phytigel 농도의 영향

이와 같이 본 연구를 통하여 참억새의 미성숙 화기로부터 캘러스 단계를 거쳐 식물체 재생에 이르는 시스템을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 식물체 재생 시스템은 미성숙 화기 1개로부터 배양 32주 만에 3만 여개의 식물체를 생산할 수 있는 잠재력을 갖추고 있다 (그림 1-15). 이는 앞으로 참억새의 우량 유전형 또는 품종을 대규모 재배 시 필요한 다수의 개체를 단기간 내에 생산하는 급속 대량증식에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.



그림 1-15. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기로부터 식물체 재생 (좌: 미성숙 화기 이용 식물체 재생 시스템, 우: 식물체 재생 시스템에 의한 식물체 생산)

(2) 갈대

(가) 미성숙 화기로부터 캘러스 유도

① 식물재료 및 소독

본 연구는 충청남도 신성리에서 채취한 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기를 재료로 하여 수행하였다. 미성숙 화기가 포함된 갈대 줄기를 70% 에탄올에 40초간 침지 후 멸균수로 1회 세척하였다. 이어서 Tween-20을 2~3방울/100 mL 첨가한 40% NaOCl 용액 (유효염소농도 4%의 상업용 표백제)에 20분간 침지한 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 식물재료는 화기를 분리해낸 후 절단하여 실험에 사용하였다.

② 기본 배지에 따른 효과

갈대의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 있어서 기본배지의 영향을 알아보았다. 기본배지는 MS② 배지를 사용하였는데, 배지는 pH를 5.8로 조정하였으며, 121℃에서 15분간 고압 증기 멸균하여 100×20 mm 투명 polystyrene petridish 용기에 분주하였다. 소독된 미성숙 화기는 절단하여 용기당 12개씩 치상하였다. 미성숙 화기 치상 후 캘러스 유도는 25±2℃인 배양실에서 암처리로 실시하였으며, 4주 후에 캘러스 유도율과 형성된 캘러스 수를 조사하였다. 이 후 모든 실험에서 MS 기본배지 및 제조방법, 치상방법과 반복수, 배양 및 조사방법을 상기와 동일하게 실시하였다.

배양 약 1주 이후부터 캘러스가 발달하기 시작하였고, 절편체 표면에 전체적으로 캘러스가 덮히는 형태로 발달하였다. 캘러스 유도율과 형성된 캘러스 수는 MS 배지가 88.9%의 유도율과 8.7개의 캘러스 수를 나타내어 N6 배지에 비해 월등히 높아 갈대의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에는 MS배지가 효과적인 것으로 나타났다.

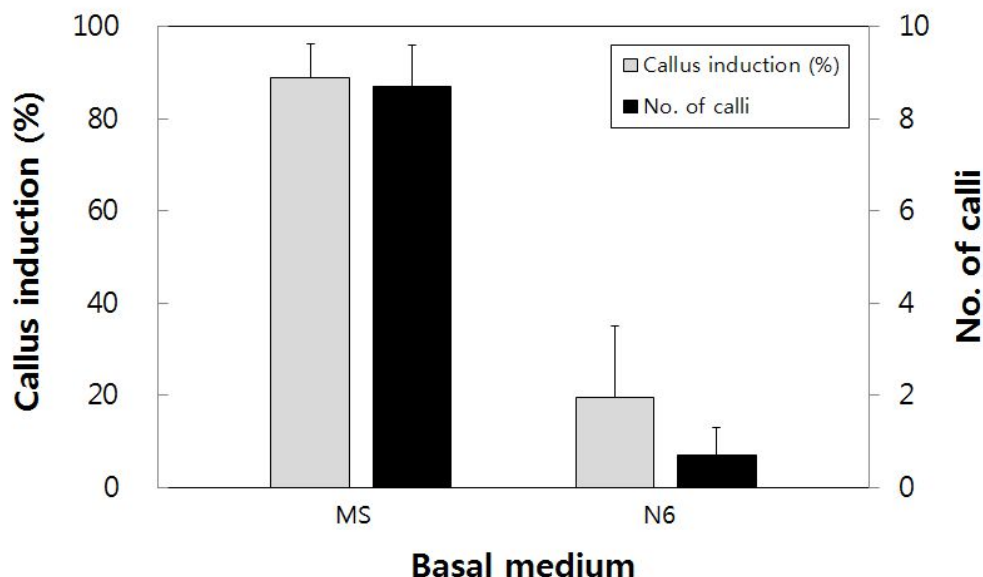


그림 1-16. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 기본 배지의 영향

③ 2,4-D 농도에 따른 효과

미성숙 화기로부터의 캘러스 유도에 미치는 식물생장조절제의 영향을 알아보기 위하여, 식물생장조절제 2,4-D 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L 처리를 실시하였다.

무처리구에 비해 2,4-D 1 mg/L를 첨가하였을 때 캘러스 유도율과 절편체당 캘러스의 수가 증가하였으며, 2,4-D의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서, 갈대 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에는 2,4-D 1 mg/L를 처리하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

현재까지 억새류의 성숙 종자와 줄기 절편, 미성숙 화기를 재료로 실행하였던 연구 보고에 따르면 2,4-D 1~2 mg/L 농도를 사용하는 것이 캘러스 유도에 효과적이라고 보고되었으며, 이는 본 실험 결과와 유사하였다. 그러나 기존의 보고와 비교하였을 때, 본 실험에서는 캘러스 유도율에는 큰 차이가 없었으나, 2,4-D 1 mg/L를 포함한 배지에서 다수의 캘러스를 얻을 수 있었다. 이러한 기존의 보고와 본 실험의 결과에 있어서의 차이는 실험에 사용된 유전형에 따른 차이라고 판단된다.

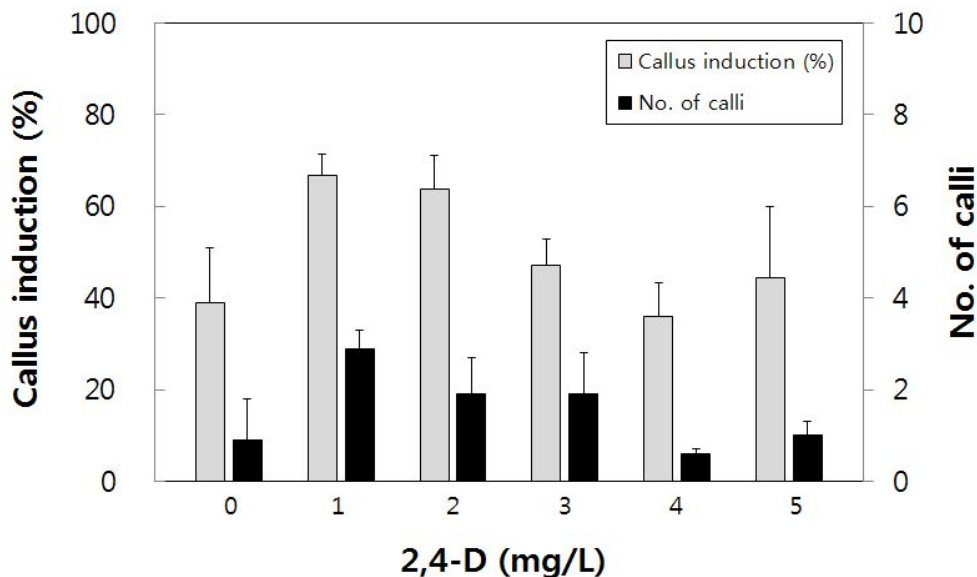


그림 1-17. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 식물생장조절제의 영향

④ 배지고형제에 따른 효과

배지고형제가 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agar 6, 8, 10 g/L와 Phytigel 2, 2.5, 3, 4 g/L를 비교하였을 때, Phytigel 4 g/L에서 91.7%의 높은 유도율을 나타냈고, 가장 낮은 농도인 agar 6 g/L에서는 61.6%로 가장 낮은 유도율을 보였다.

Deberg 등 (1981)은 아티초크의 배양에서는 한천농도가 낮은 배지에서는 수분과 양분 흡수가 원활하다고 보았다. 이는 본 실험에서의 결과와 다르게 나타났으므로 이후 본 실험에서는 갈대의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 있어 캘러스 유도배지에 Phytigel 4 g/L를 넣는 것이 효과적이라고 판단되었다.

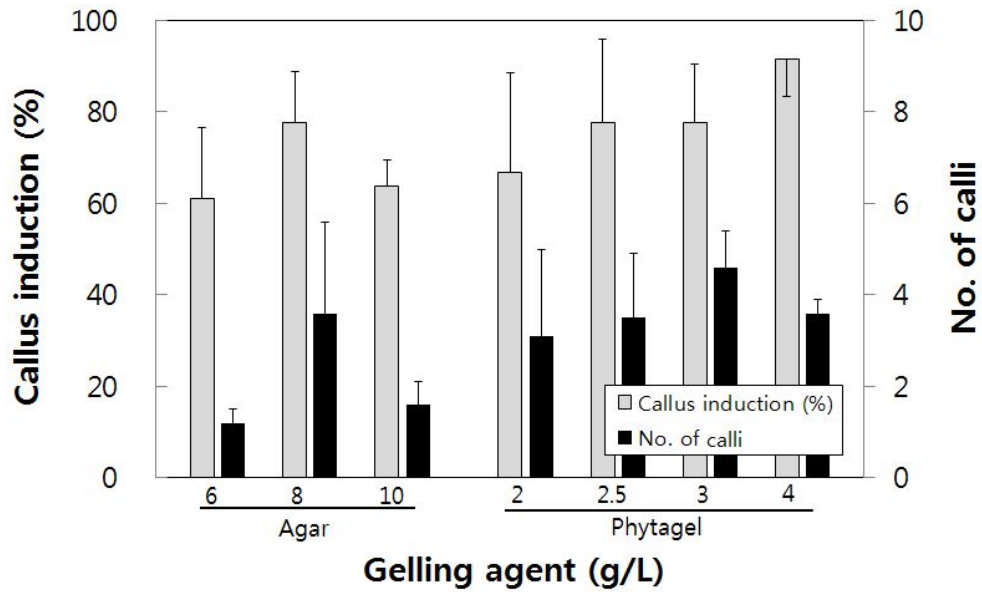


그림 1-18. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 배지고형제의 영향

⑤ BA 농도에 따른 효과

식물생장조절제 BA의 추가 농도처리가 미성숙 화기로부터의 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2,4-D가 1 mg/L 첨가된 기본배지에 BA 0, 0.01, 0.1, 1.0 mg/L를 처리하였다. 2,4-D 단독처리에 비해 저농도의 BA를 첨가하였을 때 캘러스 유도율과 형성된 캘러스 수가 증가하는 것으로 나타났으며, 1.0 mg/L를 첨가한 처리구에서는 캘러스가 전혀 발달하지 않아 2,4-D 1 mg/L와 BA 0.1 mg/L를 첨가하였을 때 58.3%로 가장 높은 유도율을 나타내었다.

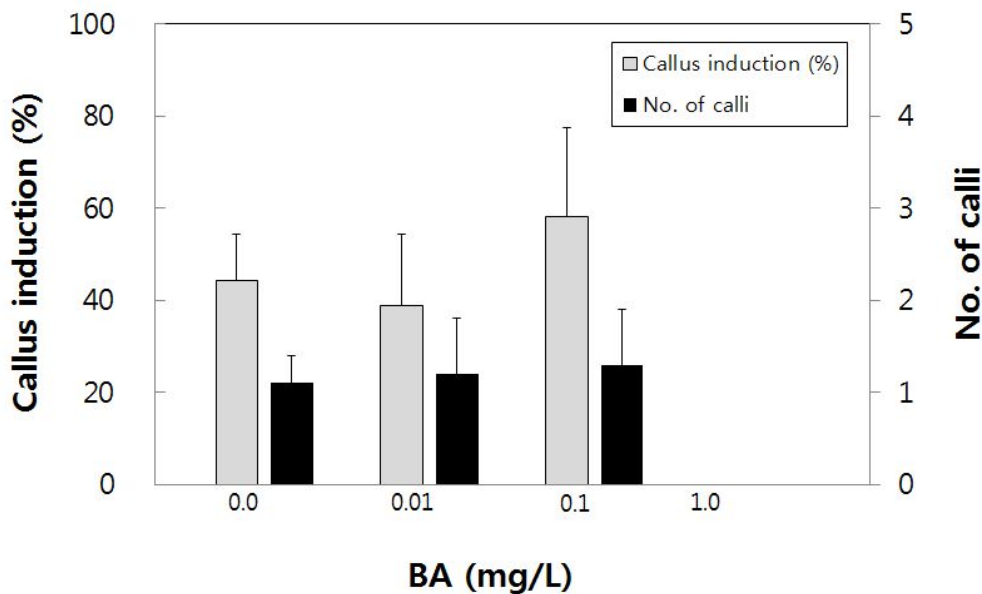


그림 1-19. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 BA 첨가의 효과



⑥ Myo-inositol 첨가에 따른 효과

갈대의 미성숙 화기로부터 캘러스를 유도하는데 myo-inositol의 농도의 효율을 알아보았다. 그 결과 모든 처리에서 평균 50%의 유도율을 나타내어, 갈대의 미성숙 화기로부터 캘러스를 유도하는데 myo-inositol은 처리 농도 간에 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났다.

Lauzer 등 (2000)은 미성숙 화기를 이용하여 MS 배지에 2,4-D 1 mg/L와 myo-insitol 100 mg/L를 첨가한 캘러스배지에서 배형성 캘러스 21.1%를 형성하였고 myo-inositol이 첨가된 배지에서 유도된 캘러스가 더 높은 재생 능력을 가지고 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 캘러스의 유도에 있어 myo-inositol의 영향은 없었으나 식물체 재생을 위하여 myo-inositol 100 mg/L 첨가는 효과적이라고 생각된다.

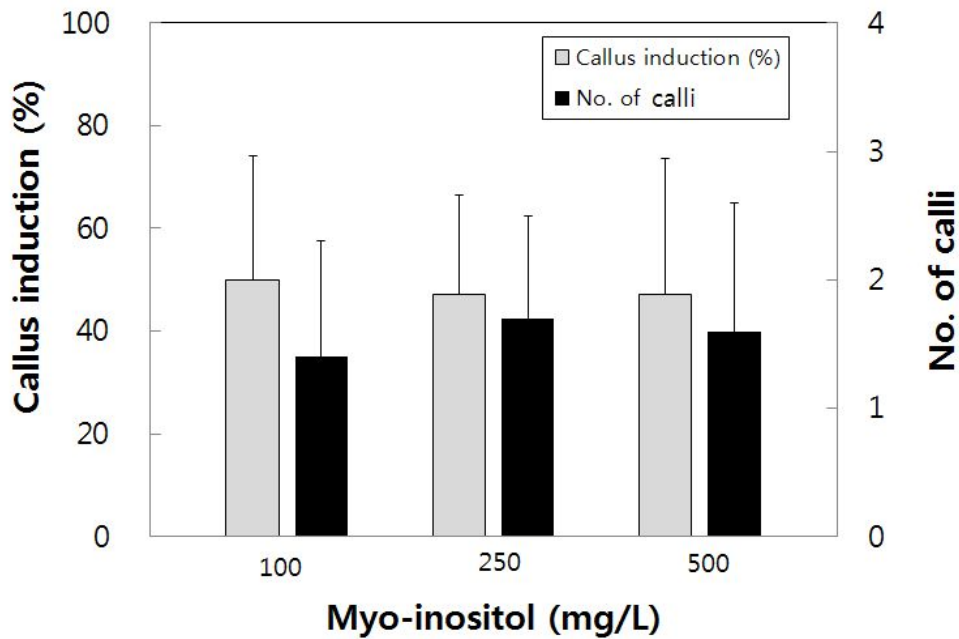


그림 1-20. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 myo-inositol의 효과

⑦ 광조건에 따른 효과

캘러스 유도에 있어서 광도가 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 13, 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 서로 다른 광도에서 실험하였다.

광도 처리에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나, 고풍도인 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 캘러스 유도율과 형성된 캘러스의 수가 가장 많았다. 83.3%로 가장 높은 유도율을 나타냈으나, 처리 간 차이가 크지 않았다.

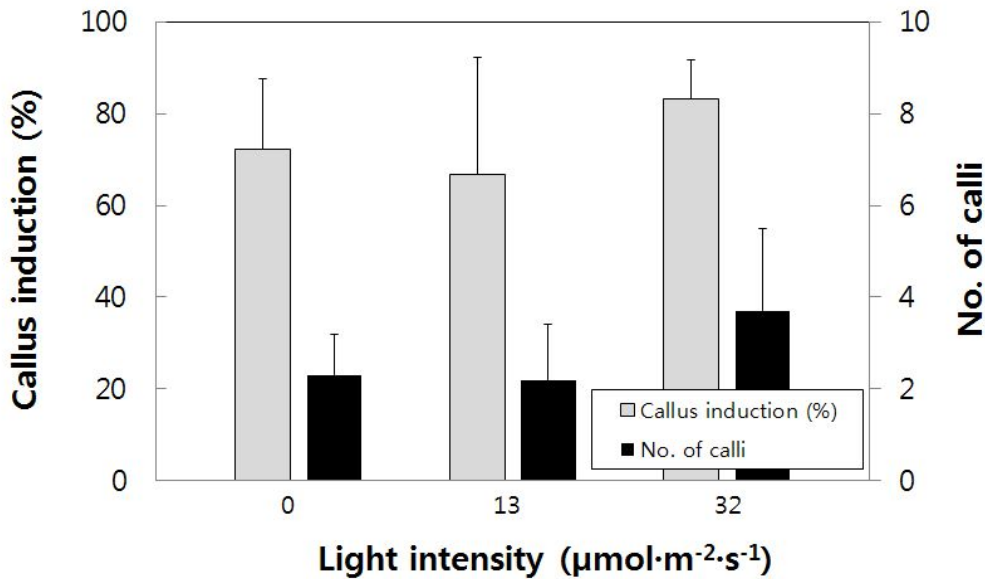


그림 1-21. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 광량의 효과

(나) 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생

① 식물재료 및 기본배지

본 연구는 충청남도 신성리에서 채취한 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 하여 수행하였다. 미성숙 화기로부터 유도된 캘러스는 절편체에서 분리하여 증식을 위해 4주마다 계대배양 해주었고, 절편체에서 캘러스를 분리한 후 20주 동안 배양한 재료를 공시재료로 사용하였으며, 기본배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 7 g/L가 첨가된 배지를 사용하였고, 배지의 pH를 5.8로 조정 후 121°C에서 17분간 고압 증기 멸균하여 100×40 mm 투명 polystyrene petri-dish 용기에 분주하였다. 준비된 미성숙 화기 유래 캘러스는 용기당 4개씩 치상하였다. 치상 후 식물체 유도는 25±2°C인 배양실에서 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 백색 형광등 하에서 16:8시간 광주기로 조명해 주었다. 배양 2, 4, 6주 후에 캘러스 생존율, 식물체 재생율과 캘러스당 재생된 식물체의 수를 조사하였다. 이 후 모든 실험에서 기본배지 및 제조방법, 치상방법과 반복수, 배양 및 조사방법을 상기와 동일하게 실시하였다.

② 식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 효과

갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 있어서 성장조절제의 농도에 따른 효율을 알아보기 위하여 BA와 IAA의 혼용처리와 BA와 NAA의 혼용처리 비교 실험을 하였다. 미성숙 화기로부터 캘러스 유도에 미치는 성장조절제의 영향에서 각 농도별로 유도된 캘러스를 재료로 하였으며, BA 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/L와 IAA 0, 0.01, 0.1 mg/L 조합 처리하였다.

갈대 미성숙화기 유래 캘러스를 배양하였을 때 배양 2주 후부터 캘러스에서 녹색 점들이 관찰되었으며 일부가 발달하여 작은 식물체를 형성하였다. 배양 4주 후에는 지상부의 신장과 함께 뿌리가 관찰되었고, 배양 6주 후 3~4 cm 크기의 소식물체로 발달하였다.

BA와 IAA의 혼용처리에 있어서는 BA 0.5 mg/L와 IAA 0.1 mg/L를 첨가한 재생배지에서 재생률 100%, 식물체 수 13.2개로 가장 높았고, 배지에 성장조절제를 첨가하지 않은 경우에는 재

생률 90%, 식물체 수 4.1개로 가장 낮았다. 그리고 BA와 NAA 혼용처리에서는 BA 0.25 mg/L와 NAA 0.1 mg/L를 첨가한 재생배지에서 재생률 100%, 식물체 수 17.4개로 가장 높았다. BA의 농도가 높아질수록 식물체가 많아졌으며, NAA의 농도가 높아질수록 재생률이 높아졌다.

혼용처리 된 모든 배지에서는 70~100%로 높은 재생률을 나타내었다. 그리고 BA에 IAA를 혼용처리하는 것보다 NAA를 혼용하여 배지에 첨가하는 것이 더 높은 재생률을 나타냈다.

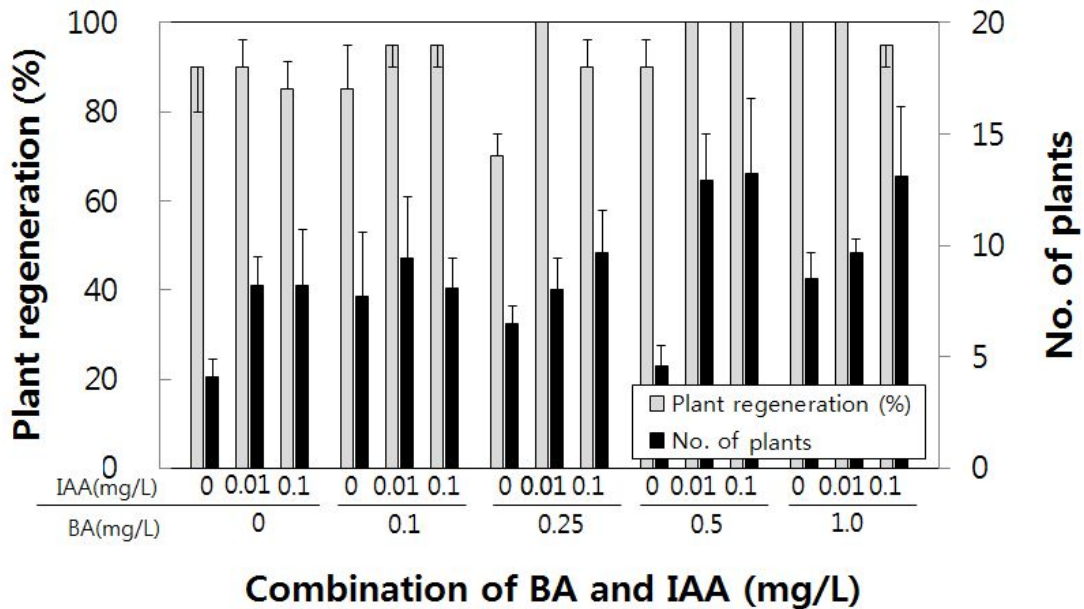


그림 1-22. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 미치는 BA와 IAA 조합처리의 영향

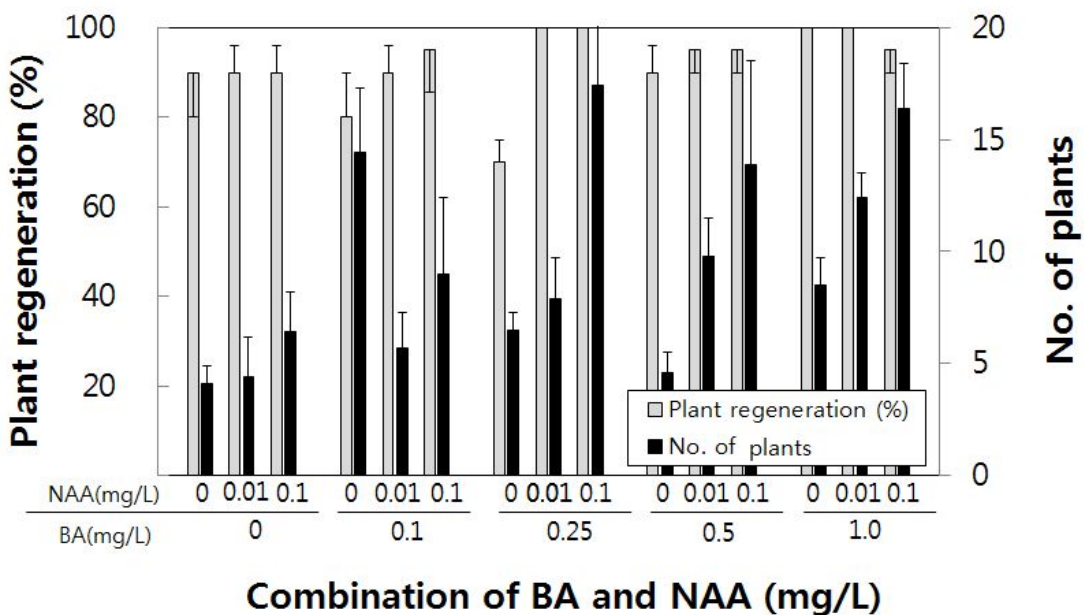


그림 1-23. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 미치는 BA와 NAA 조합처리의 영향

③ 기본배지의 종류에 따른 효과

갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 있어서 기본배지의 영향을 알아보았다. 기본배지는 MS 염류와 비타민, N6 염류와 비타민 두 가지를 사용하여 수행하였다. 두 처리구 모두 95~100%의 높은 재생율을 나타내어 처리구간 차이가 크지 않았다. 그러나 캘러스 당 재생된 식물체수는 N6 배지가 MS 배지에 비해 13.8개로 약 3배 정도 높았다.

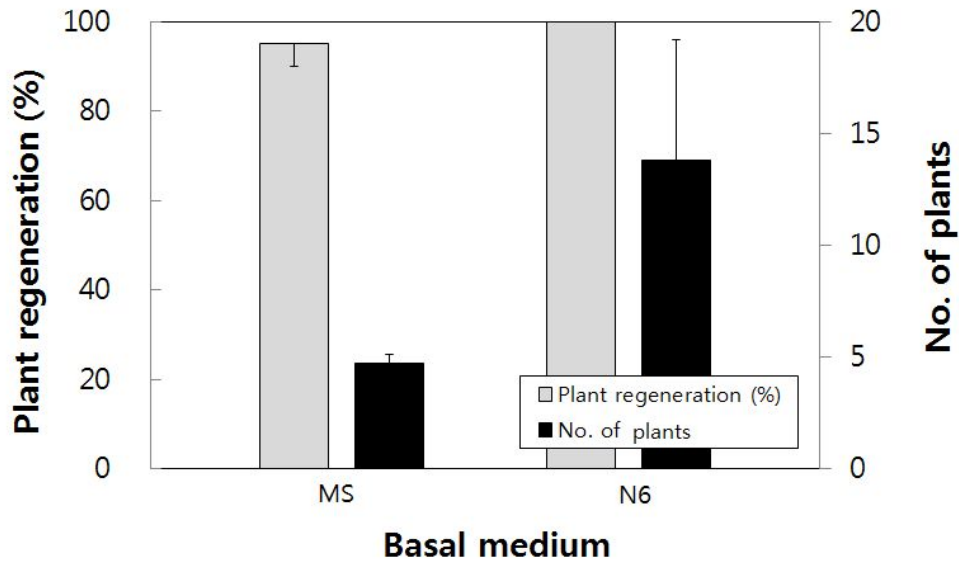


그림 1-24. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 미치는 기본배지의 영향

④ 배지고형제의 농도에 따른 효과

배지고형제인 agar의 농도가 참여세 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 미치는 영향을 알아보았다.

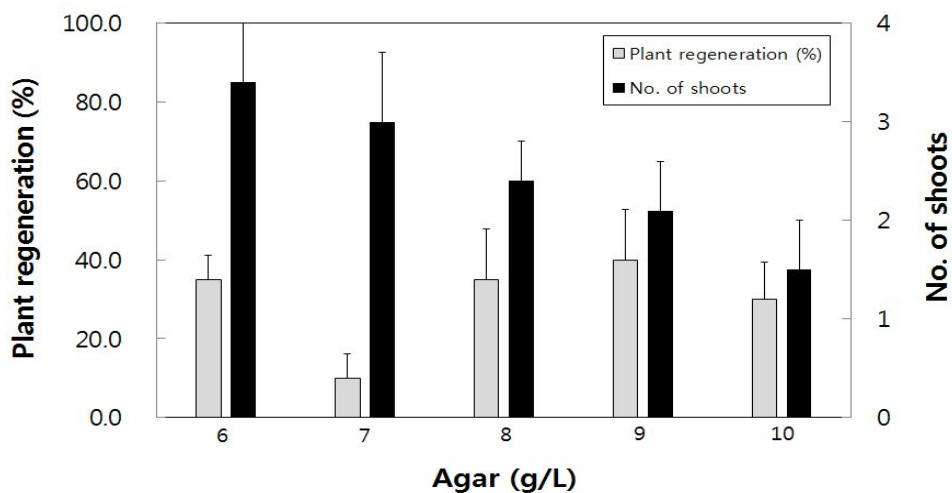


그림 1-25. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스로부터 식물체 재생에 미치는 배지고형제 농도의 효과

Agar 6, 7, 8, 9, 10 g/L를 처리하였으며, 나머지 첨가물은 기본배지와 동일하게 사용하였다. agar의 농도에 따른 식물체 재생율은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 재생된 식물체수는 agar 6 g/L 처리구에서 5.6개로 가장 높았다가 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주었다. 갈대의 캘러스로부터의 식물 재생에 있어서 배지고형제인 agar는 배지에서 배양되는 식물 조직의 양분 흡수 및 수분 공급에 효과적인 비교적 낮은 농도가 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 본 연구를 통하여 갈대의 미성숙 화기를 재료로 하여 배형성 캘러스를 유도하고 이로부터 식물체 재생을 유도하는 시스템을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 식물체 재생 시스템은 미성숙 화기 1개로부터 배양 32주 만에 4만 여개의 식물체를 생산할 수 있는 잠재력을 갖추고 있다 (그림 1-26). 이는 앞으로 갈대의 우량 유전형 또는 품종을 대규모 재배하고자 할 때 필요할 것으로 예상되는 다수의 개체를 단기간 내에 급속 대량 증식하여 생산하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.



그림 1-26. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기로부터 체세포배발생 캘러스 유도 및 식물체 재생 (좌: 미성숙 화기 이용 식물체 재생 시스템 확립, 우: 확립된 식물체 재생 시스템을 사용하였을 때 예측되는 미성숙 화기 1개로부터 획득할 수 있는 식물체 수 및 소요기간)

### 3. *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통한 모델 시스템 개발

#### 가. 형질전환 캘러스 선발을 위한 적정 항생제 농도 검정

##### (1) Hygromycin 선발 농도 검정

참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 위한 항생제 선발농도를 알아보았다. 식물재료는 참억새와 갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스를 사용하였으며, 기본배지는 참억새의 경우 MS①, 갈대의 경우 MS②배지를 사용하였다. 모든 배지는 121℃에서 15분간 고압 증기 멸균한 후, 항생제를 첨가하여 100×20 mm 투명 polystyrene petri-dish 용기에 분주하였다.

Hygromycin 농도는 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mg/L로 처리하였으며, 처리당 직경 4~5 mm 크기의 캘러스를 4개씩 치상하였다. 캘러스 치상 후 25±2℃인 배양실에서 암처리로 배양하였으며, 4주 후에 캘러스 생존율과 증식 정도를 조사하였다.

참억새와 갈대의 캘러스는 무처리구에서 왕성하게 증식하였으며, 두 식물 모두 hygromycin 25 mg/L 처리구에서부터 증식 정도가 감소하기 시작하였다. 갈대는 100 mg/L 처리구에서부터 완전히 증식이 억제되었으며 갈변 현상이 나타나기 시작하였다. 참억새는 갈대에 비해 hygromycin에 대한 내성이 다소 더 강해 일부 캘러스는 100 mg/L 처리에서도 약간의 증식이 이루어졌다. 따라서 참억새와 갈대의 형질전환 실험에서 hygromycin을 선발제로 사용할 경우 선발농도는 참억새의 경우 100~250 mg/L, 갈대의 경우 100 mg/L를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 비의 경우 hygromycin을 이용한 선발농도가 대부분 30~50 mg/L인 것에 비해 (Hiei *et al.* 1997) 참억새와 갈대는 hygromycin에 대한 매우 강한 내성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

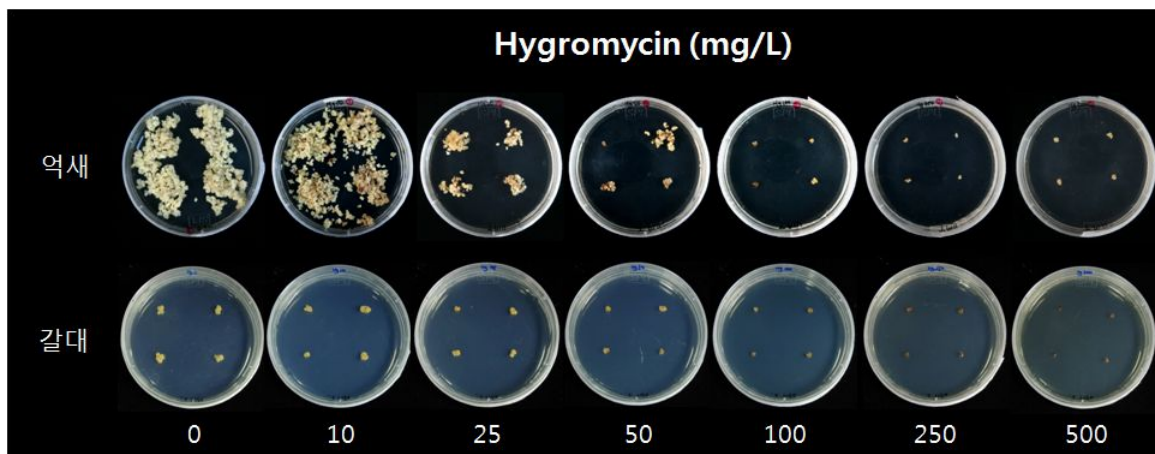


그림 1-27. 참억새와 갈대의 형질전환체 선발을 위한 hygromycin 농도 처리

##### (2) PPT 선발 농도 검정

참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 위한 PPT 선발농도를 알아보았다. 식물재료와 기본배지는 상기 hygromycin 선발 농도 검정 실험과 동일하게 사용하였으며, PPT 농도는 0, 0.1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 mg/L로 처리하였다. 처리 당 직경 4~5 mm 크기의 캘러스를 4개씩 치상한 후 25±2℃인 배양실에서 16:8시간 광주기로 배양하였으며, 4주 후에 캘러스 생존율과 증식 정도를 조사하였다.

참억새와 갈대의 캘러스는 PPT 농도 증가에 따라 캘러스의 생장이 감소하였다. 참억새와

갈대는 모두 2.5 mg/L 처리구에서부터 증식 정도가 감소하다가 25 mg/L 처리구에서부터 완전히 증식이 억제되었으며 갈변 현상이 심하게 나타났다. 따라서 참억새와 갈대의 형질전환 실험에서 PPT를 선발제로 사용할 경우 선발농도는 25 mg/L를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

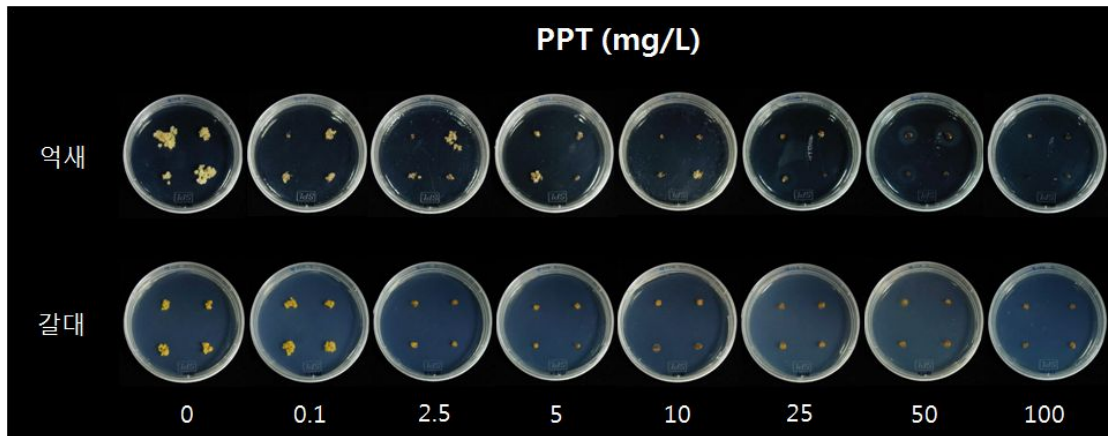


그림 1-28. 참억새와 갈대의 형질전환체 선발을 위한 PPT 농도 처리

#### 나. 미성숙 화기 이용 형질전환

##### (1) 식물재료 및 기본배지

본 연구는 제주도 Joy World, 식산봉, 정석항공관, 제주다원 지역에서 자생지에서 채취한 참억새의 미성숙 화기를 재료로 사용하여 보고유전자 도입 형질전환 식물체를 생산하기 위하여 수행하였다. 식물재료는 캘러스 유도를 위한 소독 및 절단방법과 동일한 방법으로 준비하였으며, 기본 배지는 MS④ 배지를 사용하였다.

##### (2) *Agrobacterium* 배양 및 형질전환 방법

참억새 미성숙 화기의 형질전환에는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105를 사용하였으며, vector는 pCAMBIA1301과 pCAMBIA1302 두 가지를 사용하였다. 두 vector는 모두 선발마커로 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자가 삽입되어 있으며, 보고유전자의 경우 pCAMBIA1301은 catalase intron을 가진 GUS 유전자를, pCAMBIA1302는 mGFP를 가지고 있다 (CAMBIA, Australia).

*A. tumefaciens*는 glycerol stock에 저장되어 있는 cell을 취하여 rifampicin 100 mg/L와 kanamycin 100 mg/L를 첨가한 고체 YEP 배지에 streaking 하여 28°C, 암 조건으로 2일 동안 배양하였다. 멸균된 나무막대로 왕성하게 성장하고 있는 하나의 colony를 긁어 100 ml 삼각 플라스크 용기에 담겨있는 액체 YM배지 50 mL에 풀어주어 28°C 암조건의 shaking incubator에서 24시간 동안 250 rpm으로 진탕배양을 하였다. YM배지에서 배양한 *Agrobacterium* 현탁액을 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후, acetosyringone 300 µM이 첨가된 액체 MS배지에 재현탁하여 OD<sub>600nm</sub> 1.0으로 조정된 다음 2시간 동안 28°C shaker incubator에서 암배양 하였다.

액체 MS 배지에서 2시간 배양한 세균현탁액에 4~5 mm 길이로 절단한 미성숙 화기를 침지하여 실온에서 20분간 접촉하였다. 접촉한 절편체를 공조배양배지에 치상한 후, 22°C±1, 암

조건에서 7일간 배양하였으며, 공조배양배지는 켈러스 증식배지에 acetosyringone 300 µM을 첨가한 배지를 사용하였다.

공조배양이 끝난 절편체를 멸균수로 3회 세척한 후 *Agrobacterium* 제거용 항생제가 포함된 resting 배지에 치상하였다. Resting 배지는 켈러스 증식 배지에 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 배지를 사용하였으며, 25±2°C, 암조건에서 7일 동안 배양하였다. Resting 7일 후, 켈러스 증식 배지에 hygromycin 50 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지 (TCIM1)로 옮겨준 다음 25±2°C, 암조건에서 4주 동안 배양하였다. 선발배지 배양 4주 후, 미성숙 화기로부터 재생된 켈러스를 분리하여 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지 (TCIM2)로 옮겨주었으며, 매 4주 마다 동일 배지로 계대배양 해주었다. 선발배지 치상 후 매 8주마다 형질전환 켈러스의 생존율과 증식률을 조사하였다. 그리고 선발배지에서 증식이 이루어진 켈러스는 형질전환 신초유도 배지 (TSIM)로 옮겨주어 25±2°C, 16:8시간 광주기 조건으로 배양하였다.

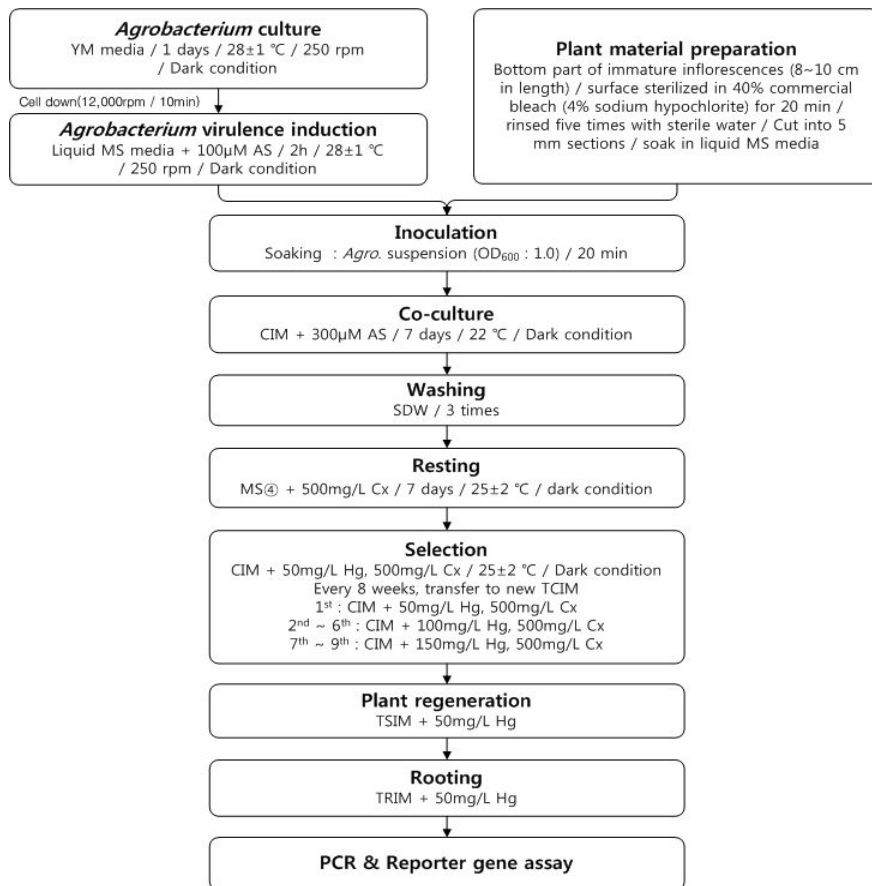


그림 1-29. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기본 방법

형질전환 신초 유도 배지는 신초 재생배지에 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지를 사용하였으며, 형질전환 신초유도 배지에서 8주간 배양한 후, 켈러스 생존율, 신초 재생율, 그리고 켈러스 당 재생된 신초 수를 조사하였다.

이와 같은 참억새 형질전환을 위한 *Agrobacterium* 준비, 형질전환 및 선발 과정은 이후의



모든 참여새 형질전환에 동일하게 적용하였다.

### (3) 형질전환 효율에 미치는 유전형과 공조배양 방법의 영향

참여새 미성숙 화기의 *Agrobacterium* 매개 형질전환에 있어서 유전형과 공조배양 방법이 형질전환 효율에 미치는 영향을 검정하였다. 제주도 정석항공관 지역의 참여새는 *Agrobacterium* 접종 후 4일 동안 공조배양을 실시하였으며, Joy World와 식산봉 지역 참여새는 공조배양 배지에  $\text{AgNO}_3$  5 mg/L를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 두 종류의 배지를 이용하여 공조배양 기간은 4일과 7일을 각각 처리하여 비교하였다. 또한 제주다원 지역의 참여새는 모두  $\text{AgNO}_3$  5 mg/L를 첨가한 공조배양 배지에서 7일 동안 배양하였다.

공조배양 후, resting 과정에서 절편체가 부풀기 시작하였으며, 일부 절편체는 갈변이 진행되었다. Hygromycin 50 mg/L가 첨가된 선발배지 배양 3주차부터 절편체의 절단면과 표면에서 켈러스가 유도되기 시작하였으며, 배양 8주차에 유도된 켈러스를 분리하여 hygromycin 100 mg/L가 첨가된 새로운 선발배지로 옮겨주었다. 2차와 3차 선발에서 유도된 켈러스의 상당수가 갈변되며 발달하지 못했고, 3차 선발에서 생존한 켈러스는 hygromycin 150 mg/L가 첨가된 선발배지에서 한 번 더 강하게 선발을 하였다. 선발 초기에는 켈러스 유도율이 43.7~49.4%로 유전형에 따른 큰 차이는 없었으며, 공조배양 7일 처리구에서는 다른 처리구에 비해 켈러스 유도율이 낮았다.

선발 후 선발배지에서의 켈러스 생존율을 기준으로 형질전환 효율을 비교해보았을 때, Joy World와 정석항공관 지역의 참여새가 *Agrobacterium* 매개 형질전환에 적합한 것으로 나타났으며, 공조배양 배지에  $\text{AgNO}_3$ 를 첨가하지 않은 처리구가  $\text{AgNO}_3$  5 mg/L를 첨가한 처리구에 비해 효과적인 것을 알 수 있었다. 또한, 공조배양 기간에 따른 형질전환 효율은  $\text{AgNO}_3$ 를 첨가하지 않은 배지에서 공조배양을 4일 동안 실시하였을 때 최종 켈러스 생존율이 0.4%로 가장 높았다 (그림 1-30).

형질전환 시킨 켈러스 가운데 6차의 선발배지에서의 배양을 거쳐 켈러스 3계통을 선발하였으며, 이들 켈러스를 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 신초 유도 배지에서 배양하면서 형질전환 신초를 유도하였다. pCAMBIA1301가 들어있는 EHA105 균주로 형질전환한 후, 4일간 공조배양했던 처리구에서 선발된 켈러스 2계통에서 신초가 재생되었다. 형질전환 신초 유도 배지에서 배양을 시작한 2주 후부터 녹색의 spot이 나타나기 시작하였고, 4주후에는 신초로 발달하였다 (그림 1-31). 이후, 신초의 길이가 0.5 cm 이상 신장하였을 때 신초를 분리하여 동일 배지에 계대배양 해 주었다. 형질전환 신초 유도배지에서 재생된 형질전환 신초는 신장과 발근 등의 발달 과정을 거친 후 유전자 도입 및 발현 검정을 실시할 예정이다.

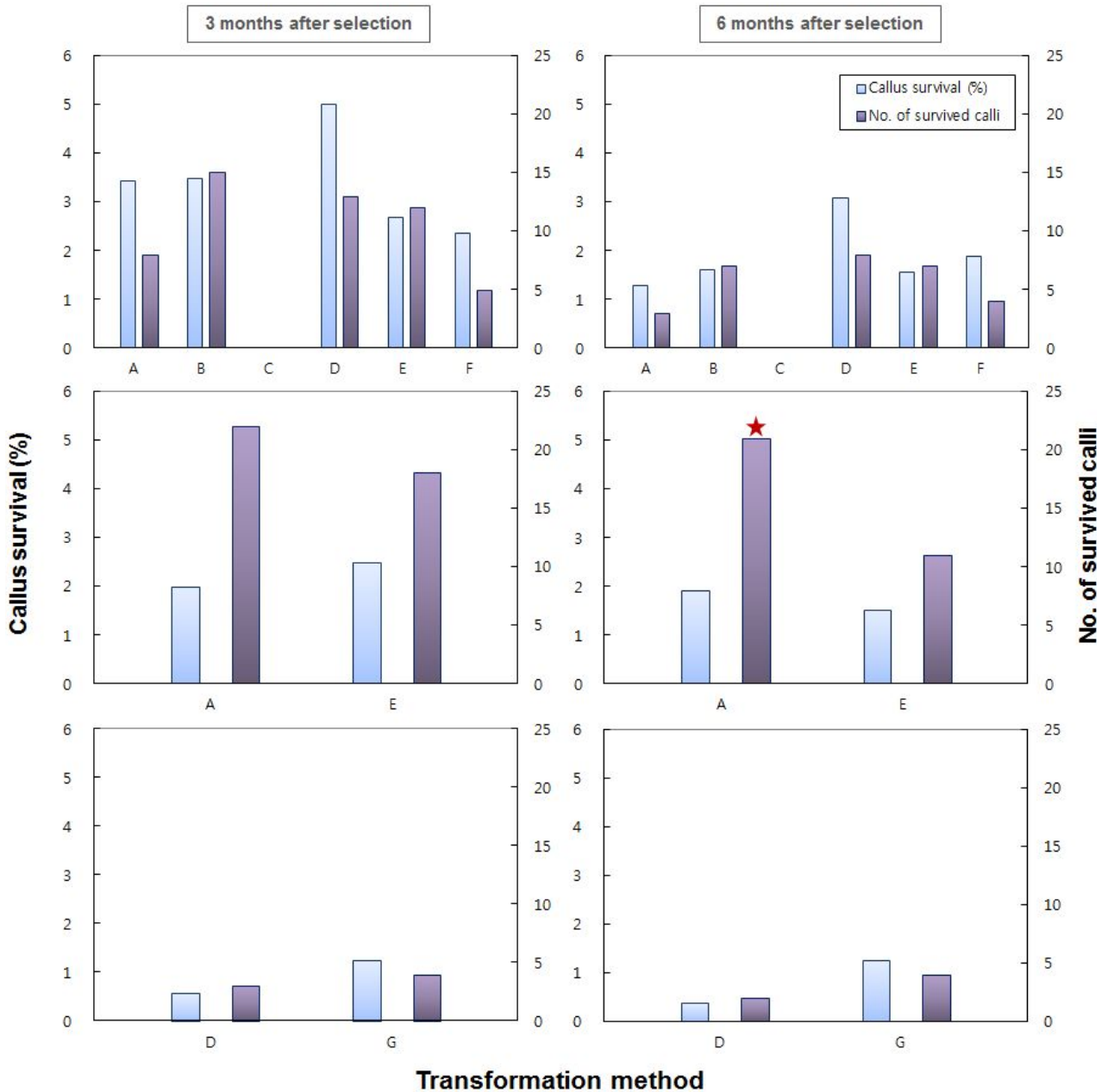


그림 1-30. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질 전환 효율에 미치는 유전형과 *Agrobacterium* strain & vector, 공조배양 기간 및 공조배양시  $\text{AgNO}_3$  첨가의 효과 (상: Joy World, 중: 정석항공관, 하: 제주다원, A: EHA105/pCAMBIA1301, 공조배양 4일, B: EHA105/pCAMBIA1301, 공조배양 4일+ $\text{AgNO}_3$  5 mg/L, C: EHA105/pCAMBIA1301, 공조배양 7일, D: EHA105/pCAMBIA1301, 공조배양 7일+ $\text{AgNO}_3$  5 mg/L, E: EHA105/pCAMBIA1302, 공조배양 4일, F: EHA105/pCAMBIA1302, 공조배양 7일, G: EHA105/pCAMBIA1302, 공조배양 7일+ $\text{AgNO}_3$  5 mg/L, ★: 형질전환 신초 재생 처리구)

참억새의 미성숙 화기를 이용하여 보고유전자 도입 형질전환을 실시한 결과 참억새의 미성숙 화기가 *Agrobacterium* 매개 형질전환의 재료로 적합하다는 가능성을 확인하였다. 형질전환 식물체 재생을 기준으로 정석항공관 지역의 참억새를 재료로 하여 *Agrobacterium* strain은 EHA105를 사용하고, AgNO<sub>3</sub>를 첨가하지 않는 배지에서 4일 동안 공조배양 하였을 때 형질전환 효율이 0.5%로 가장 높았다. 미성숙 화기로부터 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 선발배지에서 유도된 캘러스를 분리하여 hygromycin 100 mg/L가 첨가된 배지로 옮겨주었을 때, 정상적인 증식이 일어나는 캘러스와 그렇지 않은 캘러스가 확연히 구별되었다 (그림 1-31-D) 이러한 선발을 반복하여 생존한 캘러스를 신초 재생 배지로 옮겨주었을 때, 다수의 신초를 획득할 수 있었고, 유도된 신초는 유전자 도입 및 발현검정을 통해 계통당 우수 개체를 선발할 예정이다.

본 연구에서는 초기 선발 농도가 낮아 유전자가 도입된 캘러스의 선발에 1년 8개월의 기간이 소요되었으나 현재까지 신초 재생능을 유지하고 있으며, 초기의 선발 강도를 높이면 식물체 재생 기간 단축과 함께 더 많은 형질전환 계통을 획득할 수 있을 것으로 판단된다.

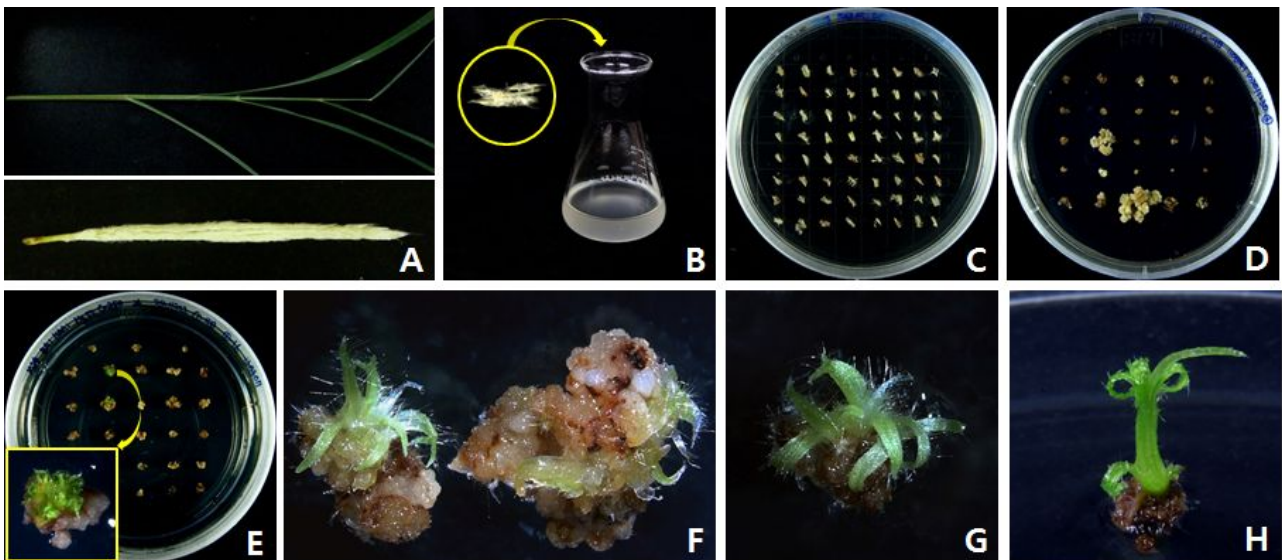


그림 1-31. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 이용 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통한 신초 재생 (A: 식물재료, B: 식물재료 절단 후 *Agrobacterium* 접종, C: acetosyringone 100  $\mu$ M 첨가 배지에서 공조배양 후 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 캘러스 유도배지에서 resting, D: hygromycin 50 mg/L가 첨가된 선발배지에서 형질전환 캘러스 유도, E: hygromycin 50 mg/L가 첨가된 재생배지에서 형질전환 신초 유도, F~H: 선발배지에서 재생된 형질전환 신초 계통.

#### 다. 미성숙 화기유래 캘러스 이용 형질전환

##### (1) 참억새 (*Miscanthus sinensis*)

##### (가) 식물재료 및 기본배지

제주도 식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 사용하여 형질전환 시스템을 확립하고자 하였다. 미성숙 화기로부터 유도한 캘러스는 4주 후 분리하여 동일한 배지로 옮겨주었으며, 이들 캘러스를 S0라 명명하였다. 이 후, 매 4주마다 MS④ 배지에 계대배양 하였으며,

계대배양 횟수에 따라 S1, S2 등으로 표시하였다. 캘러스는  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 암조건으로 배양하였으며, 배양 4주 캘러스를 3~4 mm로 분리하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환의 재료로 사용하였다.

(나) *Agrobacterium* 배양 및 형질전환 방법

참억새의 형질전환에는 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101을 사용하였으며, vector는 pCAMBIA1302의 mGFP 유전자에 달려있는 CaMV35S promoter를 옥수수 ubiquitin promoter로 대체시킨 pCAMBIA1302::mUbi::mGFP를 기본으로 사용하였다. 기본적인 형질전환 방법은 상기 미성숙 화기 이용 형질전환 방법과 동일하게 하였으며, desiccation 전처리를 추가하였고 resting 과정은 생략하였다 (그림 1-32).

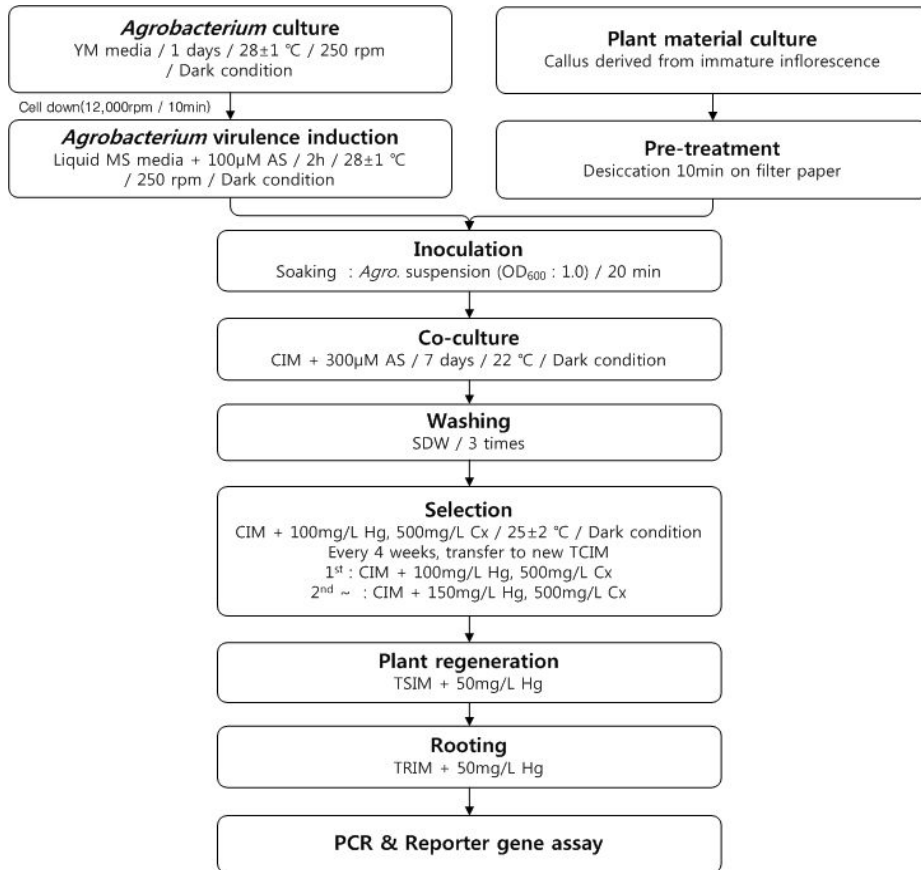


그림 1-32. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기본 방법

공조배양 후 선발은 캘러스 유도배지에 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지 (TCIM1)를 사용하였다. 선발 3~8주 사이에 절편체에서 새로 재생된 캘러스는 분리하여 동일 배지에 계대배양 해주었다. 캘러스의 크기가 7 mm 이상 발달하였을 때, hygromycin 150 mg/L가 첨가된 TCIM2 배지로 옮겨 선발하였다. 매 8주마다 캘러스의 생존율을 조사하였으며, 1차 선발 후 절편체당 새로 재생된 캘러스의 수를 기준으로 이후 캘러스의 생존율을 조사하였다. 이와 같은 조사와 결과 표시 방법은 모든 형질전환 실험에 동일하게 적

용하였으며, 선발 차수별 캘러스의 생존율을 기준으로 형질전환 효율을 비교하였다.

(다) 형질전환 효율에 미치는 유전형 (지역)의 효과

참억새 미성숙 화기로부터 캘러스를 유도한 후, 분리한 캘러스의 유전형 (지역)에 따른 형질전환 효율을 검정하였다. 유전형의 종류는 제주도 식산봉, Joy World, 정석항공관, 제주다원 지역에서 채취한 참억새 4종을 사용하였으며, GV3101과 EHA105의 두 가지 *Agrobacterium* strain을 조합하여 처리하였다.

4종의 유전형 중, GV3101과 EHA105의 두 가지 strain 모두 식산봉 지역 참억새가 캘러스 생존율 각각 1.2%와 1.6%로 가장 높았으며, GV3101보다는 EHA105가 참억새의 형질전환에 적합한 것으로 나타났다. 식산봉 지역 참억새는 선발 초기 캘러스 유도율은 낮았지만 절편체당 유도된 캘러스의 수가 많았다. 6차 선발 후에도 6~8개의 캘러스 계통이 생존하였으며, EHA105 strain을 이용한 식산봉 지역 참억새 캘러스 1계통에서 형질전환 신초가 재생되었다.

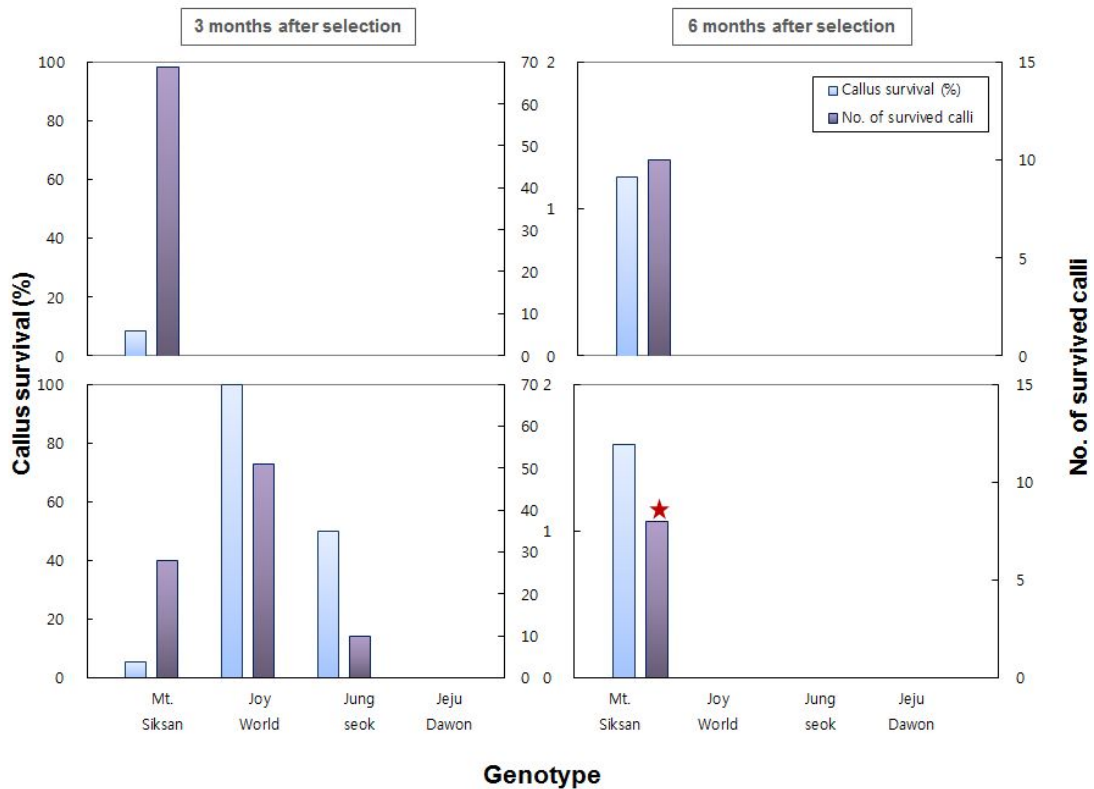


그림 1-33. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 유전형 (지역)의 효과 (상: GV3101/pCAMBIA1302::mUbi::mGFP, 하: EHA105/pCAMBIA1302::mUbi::mGFP, ★: 형질전환 신초 재생 처리)

재생된 신초는 현재 성장을 유도하고 있으며, 5 cm 이상 성장되었을 때, 유전자 도입 및 발현검정을 실시할 예정이다. 초기 선발에 있어서 캘러스 생존율을 비교해보면 Joy World 지역 참억새가 식산봉 지역 참억새에 비해 생존율이 높았지만, 6차 선발에서는 식산봉 지역 참억새

만 생존하였다. 이것으로 보아 Joy World 지역 참억새가 식산봉 지역 참억새에 비해 hygromycin에 대한 내성이 더 강하며, 이런 경우 선발의 효과가 천천히 나타날 수 있는 것으로 보인다. 선발배지에서의 생존율은 4차 선발 이후에 급격히 감소하여 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스는 항생제에 대한 반응이 서서히 나타나는 것을 알 수 있었는데, 형질전환 계통 선발에는 최소한 4번의 선발배지 계대배양이 필요하다고 판단된다.

(라) 형질전환 효율에 미치는 *Agrobacterium* strain과 vector의 효과

식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 형질전환 효율에 미치는 *Agrobacterium* strain과 vector의 효과를 알아보았다. *Agrobacterium* strain간 비교를 위하여 pCAMBIA1302::mUbi::mGFP vector가 도입되어 있는 LBA4404, EHA105와 GV3101을 사용하였으며, 동시에 vector 비교를 위하여 pCAMBIA1301과 pCAMBIA1302를 도입한 GV3101 균주를 사용하여 실험하였다.

*Agrobacterium* strain은 EHA105가 초기 새로 발생한 캘러스의 수는 적었지만, 6차 선발 이후의 생존율은 1.5%로 가장 좋았다. 이는 형질전환이 어려운 작물로 분류되던 벼의 성공적인 형질전환에는 감염성이 높은 EHA101과 pIG121Hm의 super binary vector의 사용에 기인했던 것과 유사한 결과이다 (Hiei 1994). 한편 vector간 비교에서는 pCAMBIA1302::mUbi::mGFP vector가 pCAMBIA1301과 pCAMBIA1302에 비해 다소 높은 생존율을 나타내었다. 현재, EHA105/pCAMBIA1302::mUbi::mGFP 처리구에서 4계통, GV3101/pCAMBIA1301 처리구에서 2계통과 GV3101/pCAMBIA1302 처리구에서 4계통의 캘러스를 선발하였으며, 형질전환 신초 재생 배지로 옮겨 형질전환 신초를 유도하고 있다.

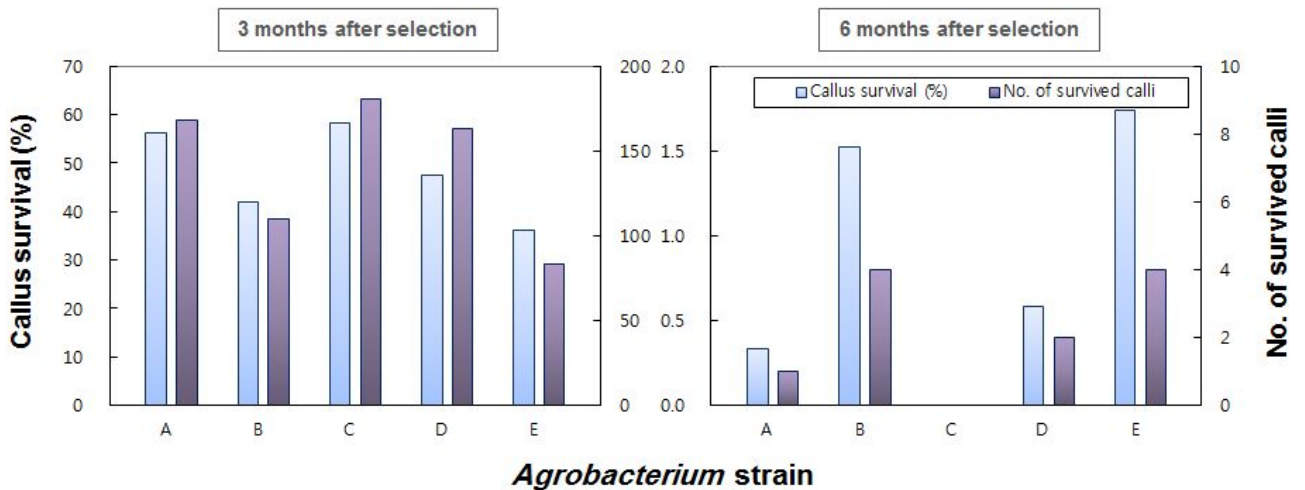


그림 1-34. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 *Agrobacterium* strain의 영향 (A: LBA4404, B: EHA105, C: GV3101, D: pCAMBIA1301, E: pCAMBIA1302)

(마) 형질전환 효율에 미치는 전처리, 접종 방법, 공조배양 방법의 효과

식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 *Agrobacterium* 접종 전 캘러스의 전처리와 접종 방법, 공조배양 방법이 형질전환 효율에 미치는 효과를 검증하였다. 전처리는 desiccation 10분, 고당 액체배지 침지 30분, heat (43°C, 30분) & centrifugation (2,000 g, 10분), 0.05 M MgCl<sub>2</sub> 용액 침지 15분의 4가지 처리를 사용하였다. 접종방법은 캘러스를 세균 현탁액에 침지하는 soaking, 캘러스를 *Agrobacterium* 현탁액에 침지한 후 멸균된 spatula로 부드럽게 눌러 으개주는 mashing, Tween 20을 첨가 (1방울/50 ml)한 세균 현탁액에 soaking 하는 3가지 처리를 사용하였다. 공조배양 방법은 기존의 고체 AS 배지에 치상하는 방법과 멸균 filter paper에 액체 공조배양 배지를 2.2 ml 분주한 후 치상하는 방법을 사용하였다.

4가지 전처리를 실시한 실험에서는 형질전환 캘러스를 획득하지 못하여 처리간 효과를 비교하지 못했다. 접종 방법의 경우 식물재료를 Tween 20을 첨가한 *Agrobacterium* 현탁액에 침지한 처리구에서 4계통의 캘러스가 선발되었다. 캘러스는 표면이 고르지 않아 접종시 *Agrobacterium* 현탁액에 뜨는 경우가 많은데, Tween 20이 캘러스의 표면장력을 감소시켜 세균 현탁액과의 접촉을 증가시킨 것으로 보인다. Cheng 등 (1997)은 밀의 미성숙 배를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시 접종 배지에 계면활성제를 첨가하면 T-DNA 전달은 증가하지만, 식물 조직의 회복에는 부정적인 효과가 있다고 보고하였다. 참억새의 캘러스는 증식이 매우 빠르게 진행되어 식물조직의 회복능력이 크므로, T-DNA 전달 효율이 증가한 상태에서 조직의 회복이 잘 이루어진 것으로 보인다. 접종 후 co-culture시 배양방법의 경우에는 고체 AS 배지에 그대로 치상한 처리구에서 1계통의 캘러스가 선발되었다. 따라서, 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 형질전환 시 접종을 위한 현탁액에는 Tween 20을 첨가하고, 접종 후 공조배양은 고체 AS 배지에서 실시하는 것이 효과적인 것으로 나타났다. 현재, 선발된 5계통의 캘러스는 형질전환 신초 재생 배지로 옮겨 형질전환 신초를 유도하고 있다.

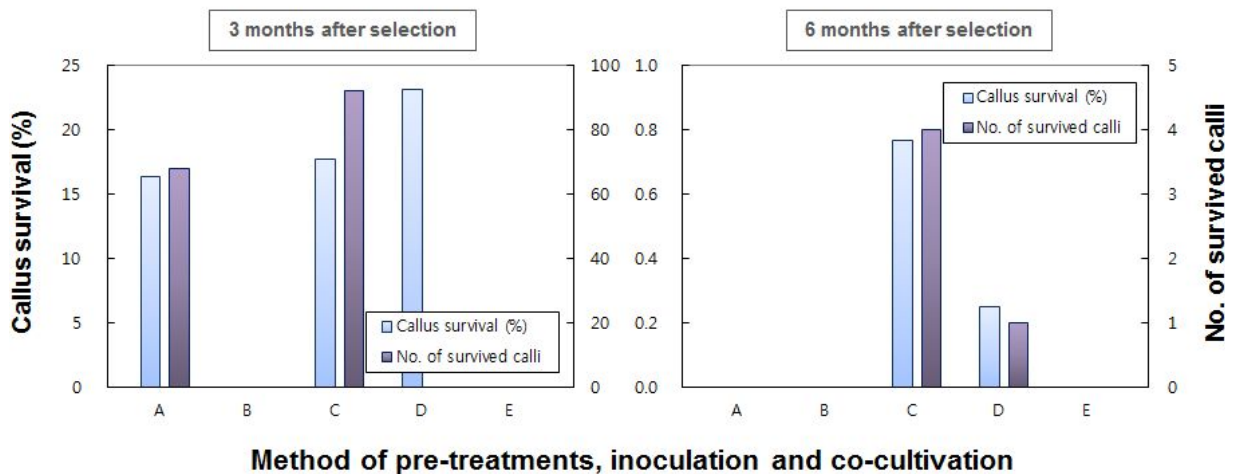


그림 1-35. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 전처리, 접종, co-culture 배양방법의 영향 (A: soaking, B: mashing in *Agrobacterium* suspension, C: soaking with Tween20, D: place on AS media, F: place on filter paper with 2.2 ml liquid media)

(바) 형질전환 효율에 미치는 공조배양 기간의 효과

식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 형질전환 효율에 미치는 공조배양 기간의 효과를 알아보기 위하여 공조배양 1, 2, 4, 7, 10일의 5가지 처리를 실시하였다. 공조배양 기간이 길어질수록 공조배양 배지에서의 *Agrobacterium* 생장이 증가하였으며, 7일과 10일 처리구에서는 절편체를 덮을 정도로 성장하였다. *Agrobacterium* 과생장이 증가할수록 캘러스의 갈변도 증가하였으며, 갈변이 진행된 캘러스는 새로운 캘러스가 유도되는데 소요되는 시간이 길어졌다.

선발 초기에는 공조배양 기간별 처리에 따른 캘러스 유도율과 생존율에 큰 차이가 나지 않았으나, 선발 6개월 후, 2일 동안 공조배양 한 처리구에서 캘러스 생존율 1.7%, 생존한 캘러스 10계통으로 가장 효과적인 것으로 나타났다. 캘러스를 이용한 형질전환의 경우 공조배양 기간이 길어짐에 따라 *Agrobacterium* 과생장에 의한 절편체의 손상이 많이 일어나는데, 이러한 현상이 형질전환 효율에 영향을 미치는 것으로 보인다.

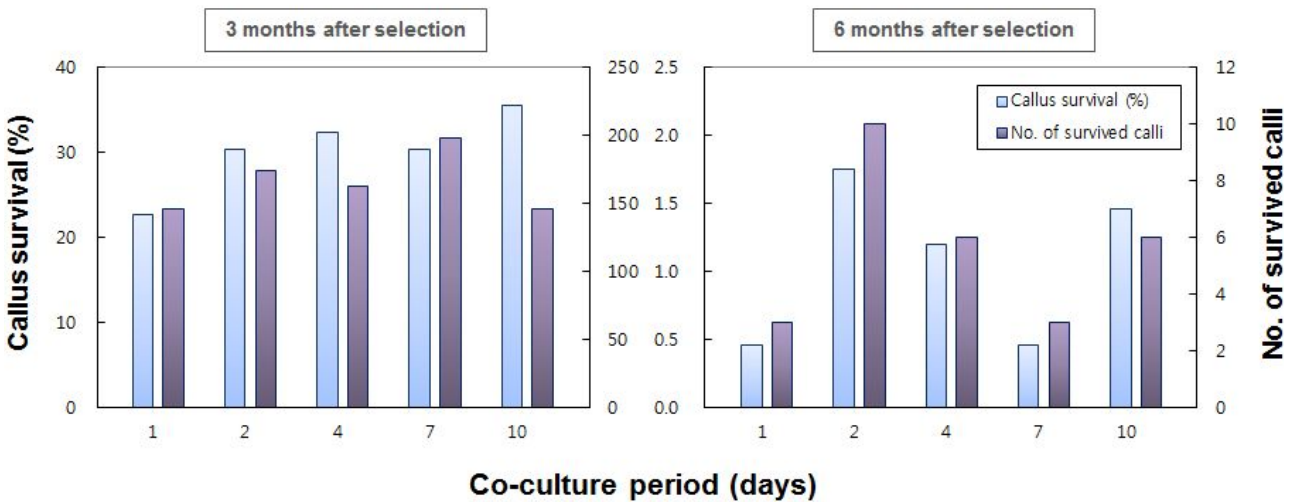


그림 1-36. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 co-culture 기간의 영향

(사) 형질전환 효율에 미치는 공조배양 시 acetosyringone (AS) 농도의 효과

식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 형질전환 효율에 미치는 공조배양 시 acetosyringone (AS) 농도의 효과를 알아보기 위하여 0, 100, 300, 500  $\mu\text{M}$ 의 4가지 처리를 실시하였다. Acetosyringone은 *Agrobacterium*의 vir 유전자의 전사를 조절하는 페놀 화합물 중 하나로 벼나 보리 등에서 형질전환 효율을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Klee *et al.* 1983; Hille *et al.* 1984)

300  $\mu\text{M}$  처리를 제외하고, 선발 초기와 후기 모두 처리 간 차이는 크게 나타나지 않고 있으며, 다른 실험 처리구에 비해 기간에 따른 선발배지에서의 생존율 감소가 천천히 이루어지고 있다. 선발된 캘러스 중 8 mm 이상 발달한 캘러스 12계통을 신초 재생배지로 옮겨 신초를 유도하였으며, 캘러스에서 3~5 mm 길이의 신초가 재생되었다.



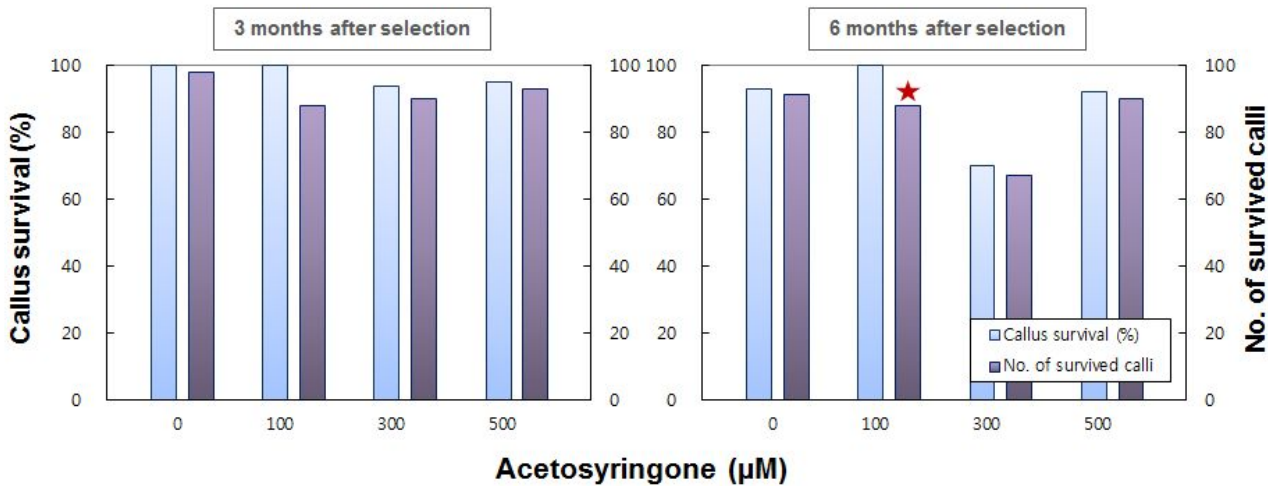


그림 1-37. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 acetosyringone 농도의 효과 (★ : 형질전환 실패 재생 처리)

(아) 형질전환 효율에 미치는 공조배양 배지의  $AgNO_3$  농도 효과

본 연구는 식산봉 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 형질전환 효율에 미치는 공조배양 배지의  $AgNO_3$  농도 효과를 알아보기 위하여 수행하였다. 공조배양 배지의  $AgNO_3$  농도는 0, 5, 10, 15 mg/L의 4가지 처리를 실시하였다.

공조배양 배지의  $AgNO_3$  농도가 증가할수록 *Agrobacterium* 과생장이 억제되어  $AgNO_3$ 가 갈변방지의 역할 뿐만 *Agrobacterium* 증식에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.  $AgNO_3$  15 mg/L 처리구를 제외하고, 선발 초기와 후기 모두 전반적으로 비슷한 정도의 캘러스 생존율을 나타냈으며,  $AgNO_3$  고농도 처리구에서는 *Agrobacterium* 증식이 억제되어 캘러스의 손상은 적어지지만, 유전자 도입 효과는 낮은 것으로 보인다.

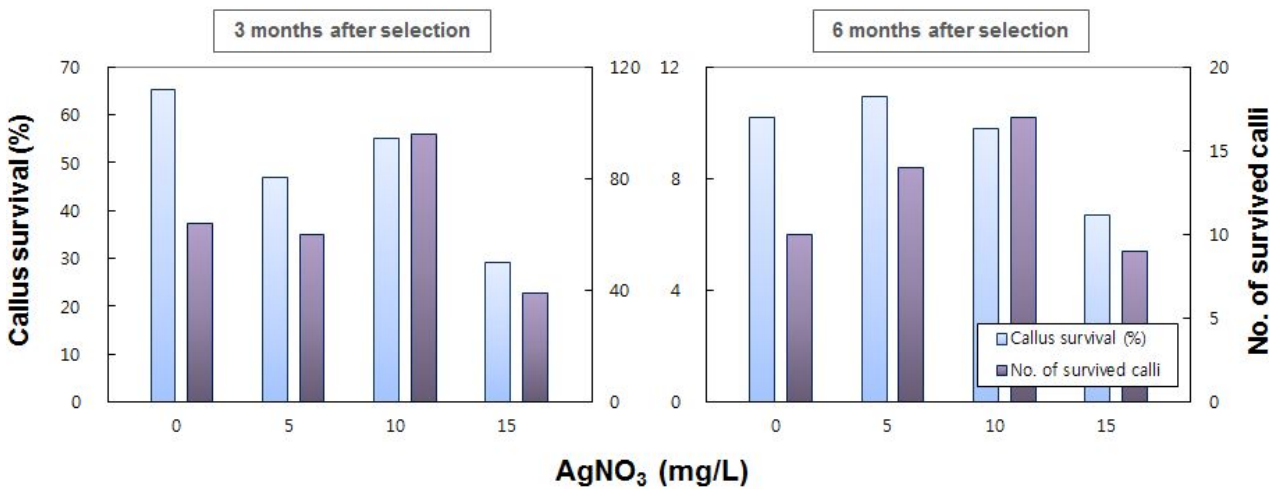


그림 1-38. 참억새(*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는  $AgNO_3$  농도의 효과

#### (자) 형질전환 켈러스의 유전자 도입 및 발현 검정

참억새 형질전환 켈러스의 유전자 도입 및 유전자 발현을 분석하기 위하여 PCR과 RT-PCR 검정, GUS 및 형광현미경을 통한 GFP 형광 발현 검정을 수행하였다.

##### ① PCR

선발배지 배양 8주차인 형질전환 켈러스 4계통을 무작위로 선발하여 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Macherey-Nagel사의 Nucleospin Plant II Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. Primer는 *hpt II* 유전자의 251 bp ends (5'-GAT GTT GGC GAC CTC GTA TT-3', 5'-ATT TCA TAT GCG CGA TTG CT-3')를 이용하였으며, Elpis Biotech사의 HiPi PCR PreMix Kit을 이용하여 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95°C에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95°C 30초 denaturation, 60°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension을 35 cycle 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

4계통의 형질전환 켈러스 모두에서 선발마커인 *hpt*에 해당하는 251 bp 크기의 band가 나타났다. 이로 보아 검정한 모든 계통에서 안정적인 유전자 도입이 이루어졌음을 알 수 있었다.

##### ② RT-PCR

PCR에 사용한 동일한 계통의 켈러스를 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Qiagen사의 RNeasy plant mini kit 을 이용하여 RNA를 추출한 후 Invitrogen 사의 Super Script First-Stand kit을 이용하여 cDNA 합성을 하였다. 식물체 내에서 항상 일정하게 발현되는 참억새의  $\beta$ -Actin 유전자 primer 1470 bp ends (5'-GGT GTC ATG GTA GGG ATG GG -3', 5'-CCA CAT CTG TTG GAA AGT GCT-3')를 이용하여 각 RNA의 상대적인 정량을 하였다. *hpt II* 유전자의 251 bp ends (5'-GAT GTT GGC GAC CTC GTA TT-3', 5'-ATT TCA TAT GCG CGA TTG CT-3')를 이용하였으며, HiPi PCR PreMix Kit (Elpis Biotech사)을 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95°C에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후 95°C 30초 denaturation, 56~60°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension을 30 cycle 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

RT-PCR 분석에서 4계통의 형질전환 켈러스에서 251 bp 크기의 band를 관찰 할 수 있었으며, 이를 통하여 형질전환 켈러스 모두에서 *hpt* 유전자가 transcription level에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

##### ③ GFP 형광

형질전환 효율 증진을 위한 조검 검색 결과 최적화된 형질전환 방법을 이용하여 보고유전자 *gfp* 도입 형질전환을 실시하였다. *Agrobacterium* strain은 EHA105이며, vector는 pCAMBIA1302, pBIN mGFP5-ER 두 가지를 비교하였다. 선발 8주 후, 켈러스 생존율과 증식 여부를 조사하였으며, 형질전환체 내로의 유전자 발현을 확인하기 위하여 green fluorescent protein (GFP) 형광을 현미경을 이용하여 조사하였다. GFP 형광 관찰을 위하여 470/40 nm의

exciter 필터, 495 nm LP dichromatic beam splitter, 525/50 nm barrier 필터를 장착한 실체형 광현미경 (Stemi SV11, Zeiss, Germany)을 사용하였다.

참억새의 경우 형질전환하지 않은 control의 캘러스에서도 GFP와 유사한 형광 발현이 관찰되었으나, 형질전환 캘러스에서는 control과 구별 가능한 강한 형광발현이 나타나 유전자 도입 여부를 확인할 수 있었으며, pCAMBIA1302 vector에 비해 pBIN mGFP5-ER vector가 넓은 부분에 걸쳐 밝은 형광을 보여주었다 (그림 1-39).

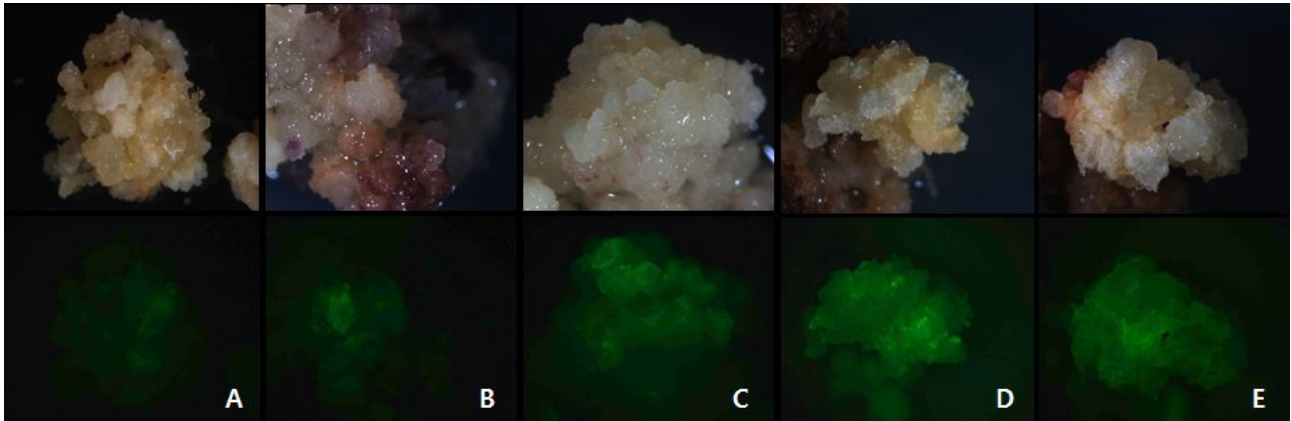


그림 1-39. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 *Agrobacterium* 매개 보고유전자 *gfp* 도입 형질전환 캘러스의 GFP 발현 검정 (A: control, B와 C: EHA105/pCAMBIA1302, D와 E: EHA105/pBIN mGFP5-ER)

#### ④ GUS staining

보고유전자 GUS의 발현 여부를 확인하기 위하여 GUS 조직화학적 분석을 실시하였다 (Jefferson et al., 1987). GUS 분석에는 선발 8주차 캘러스를 무작위로 선별하여 사용하였다.

X-Glue (5'-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid), 1.0 M NaPO<sub>4</sub> buffer, 0.25 M EDTA, 0.005 M KFerricyanide, 0.005 M KFerrocyanide, 0.02 M X-Glucuronide, 0.1% Triton X-100)에 침지시킨 후, 37°C incubator에서 24시간 동안 암조건에서 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 70% 에탄올로 탈색시킨 후 GUS 발현을 확인하였다.

선발 과정에서 새로이 유도된 캘러스의 일부에서 GUS 발현이 나타났으며, 절편체의 일부분에 유전자가 도입되었다는 것을 확인할 수 있었다.

이와 같이 PCR, RT-PCR 및 GFP 형광과 GUS staining 결과를 종합해보면 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 형질전환 후 선발과정에서 유도된 새로운 캘러스는 유전자의 도입과 발현이 안정적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 그러나 선발된 캘러스의 일부분에서 GFP 형광과 GUS staining이 나타난 것으로 보아 배양 초기의 선발제의 농도를 올리는 것이 필요하다고 판단된다.

이상의 결과를 보면, 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스 이용 *Agrobacterium* 매개 형질전환에는 식산봉, Joy World 지역 참억새의 미성숙 화기 (그림 1-40-A)로부터 유도한 캘러스를 재료로 사용하여 (그림 1-40-B), EHA105와 GV3101 strain을 이용하여 유전자를 도입하는 것이 효과적인 것으로 나타났다. 접종 시 *Agrobacterium* 현탁액에는 Tween 20을 첨가하고

acetosyringone 100  $\mu$ M과 AgNO<sub>3</sub>를 5~10 mg/L 첨가한 배지에서 공조배양한 후, hygromycin 100 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하였을 때 (그림 1-40-C, D), 배양 4주 이후부터 유전자가 도입된 캘러스에서만 새로운 캘러스가 유도되었고 (그림 1-40-E), 선발된 캘러스의 일부에서 보고유전자 *gus*의 발현이 확인되었다 (그림 1-40-F). 또한 일부 계통에서 PCR을 통한 유전자 도입과 RT-PCR을 통한 발현 검정 결과 예상하는 크기의 band가 나타나 안정적인 유전자 도입 및 발현을 확인할 수 있었다 (그림 1-40-G). 선발된 모든 캘러스는 식물체 재생을 유도하고 있으며, 현재 9계통의 신초가 선발배지에서 정상적인 발달을 하고 있다 (그림 1-40-H~K). 이와 같이 본 연구를 통하여 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템을 확립하였다.

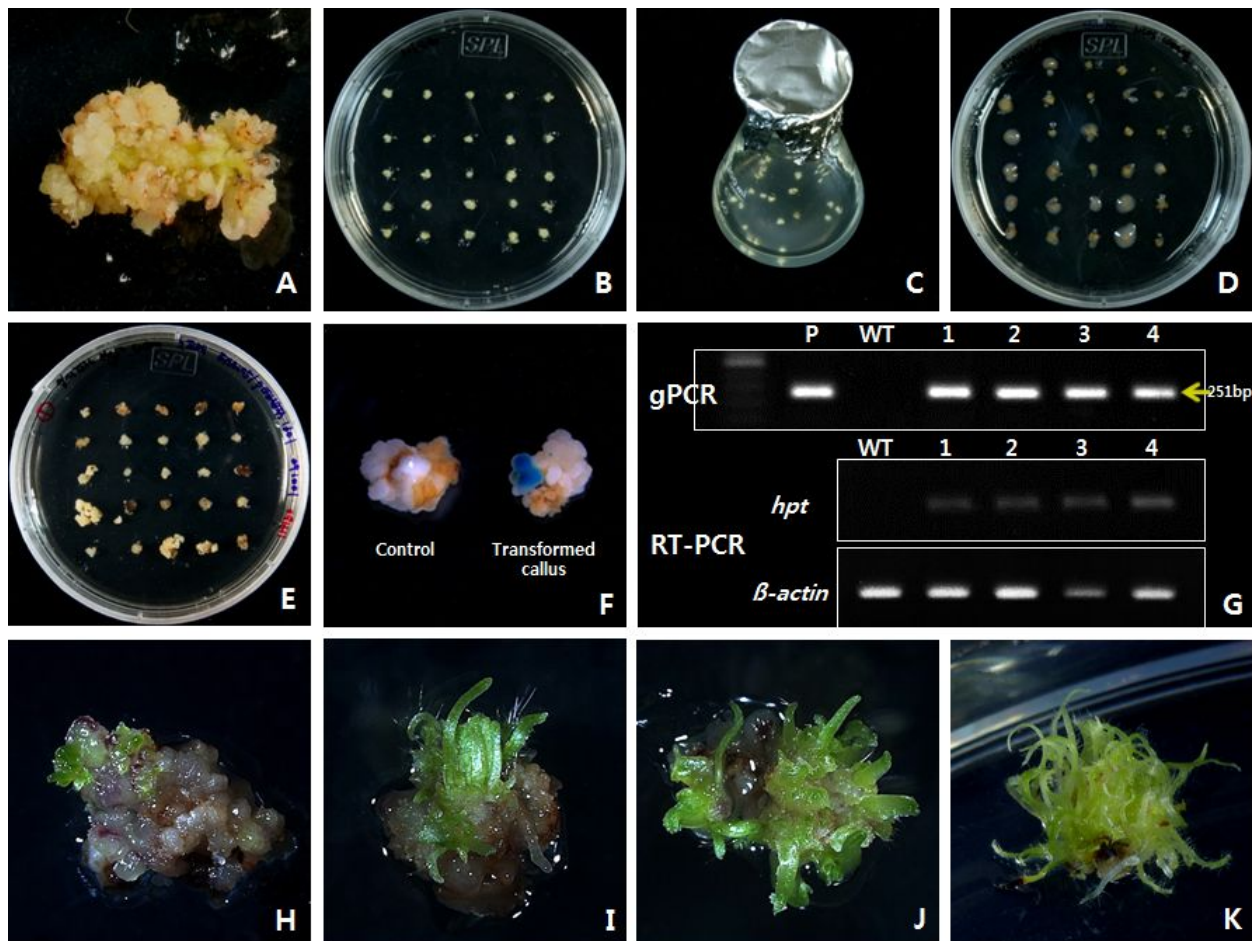


그림 1-40. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 과정 (A, B: 미성숙 화기 유래 캘러스를 분리한 식물재료, C: 접종, D: 공조배양, E: 선발, F: 보고유전자 *gus* 발현 검정, G: 유전자의 도입 (PCR) 및 발현 (RT-PCR) 검정, H~K: 선발된 캘러스로부터 재생된 형질전환 신초 계통)

## (2) 갈대 (*Phragmites communis*)

### (가) 식물재료 및 기본배지

본 실험은 부산광역시 을숙도 갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스를 사용하여 안정적인 형질 전환 시스템을 확립하고자 수행하였다.

미성숙 화기로부터 유도한 캘러스는 매 4주마다 캘러스 증식배지에 계대배양하여,  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 암조건으로 배양하였다. 배양 4주 된 캘러스를 6~8 mm 크기로 분리하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환의 재료로 사용하였다.

### (나) *Agrobacterium* 배양 및 형질전환 방법

갈대의 형질전환에는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105를 사용하였으며, vector는 pCAMBIA1301을 사용하였다. pCAMBIA1301은 선발 마커로 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자와 보고 유전자로 catalase intron을 가진 GUS 유전자가 삽입되어 있다 (CAMBIA, Australia).

*A. tumefaciens*는 glycerol stock에 저장되어 있는 cell을 취하여 rifampicin 100 mg/L와 kanamycin 100 mg/L를 첨가한 고체 YEP 배지에 streaking 하여  $28^\circ\text{C}$ , 암 조건으로 2일 동안 배양하였다. 멸균된 나무막대로 왕성하게 성장하고 있는 하나의 colony를 긁어 100 ml 삼각 플라스크 용기에 담겨있는 액체 YM배지 50 mL에 풀어주어  $28^\circ\text{C}$  암조건의 shaking incubator에서 24시간 동안 250 rpm으로 진탕배양을 하였다. YM배지에서 배양한 *Agrobacterium* 현탁액을 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후, acetosyringone 300  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 액체 MS배지에 재현탁하여  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  1.0으로 조정된 다음 2시간 동안  $28^\circ\text{C}$  shaker incubator에서 암배양 하였다.

액체 MS 배지에서 2시간 배양한 세균 현탁액에 갈대 화기 유래 캘러스를 침지하여 실온에서 20분간 접종하였다. 접종한 캘러스를 공조배양배지에 치상한 후,  $22^\circ\text{C}\pm 1$ , 암조건에서 7일간 배양하였으며, 공조배양배지는 캘러스 증식배지에 acetosyringone 300  $\mu\text{M}$ 을 첨가한 배지를 사용하였다.

공조배양이 끝난 캘러스를 멸균수로 3회 세척한 후 캘러스 증식 배지에 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지로 옮겨준 다음  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 암조건에서 4주 동안 배양하였다. 선발배지 배양 4주 후, 형질전환 캘러스를 매 4주 마다 동일 배지로 계대배양 해주었다. 선발배지 치상 후 매 8주마다 형질전환 캘러스의 생존율과 증식률을 조사하였다. 그리고 선발배지에서 증식이 이루어진 캘러스는 식물체 재생 배지 (hygromycin 50 mg/L가 첨가된 hormone free MS 배지)로 옮겨주어  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 16:8시간 광주기 조건으로 배양하였다.

### (다) 형질전환 효율에 미치는 전처리 방법의 효과

본 연구는 을숙도 지역 참억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 재료로 *Agrobacterium* 접종 전 캘러스의 전처리가 형질전환 효율에 미치는 효과를 검증하기 위하여 수행하였다.

전처리는 desiccation 10분, sonication 60초, heat ( $43^\circ\text{C}$ , 30분)와 centrifugation (2,000 g, 10분) 3가지 처리를 사용하였다. 선발배지는 캘러스 증식배지에 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지 (TCIM)를 사용하였으며, 선발 8주차에 형질전환 식물체 유도 배지 (TSIM)로 계대배양 하여

25±2°C, 16:8시간 광주기 조건으로 배양하였다. 형질전환 식물체 유도 배지는 식물체 재생배지에 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지를 사용하였으며, 배양 8주 후 선발배지에서의 캘러스 생존율을 조사하여 처리간 효과를 비교하였다.

3가지 전처리를 실시한 실험 결과, 접종 전 캘러스에 10분 동안 desiccation 처리하는 것이 캘러스 생존율 100%로 가장 좋았으며, 최종 선발 후 형질전환 식물체 재생 배지로 옮겨 형질전환 신초를 유도할 예정이다 (그림 1-41).

이 외에도 *Agrobacterium* strain, 공조배양 기간, 공조배양 배지의 acetosyringone 농도, AgNO<sub>3</sub>의 농도, 접종방법에 따른 처리를 각각 2차에 걸쳐 수행하였으며, 선발을 진행하고 있다.

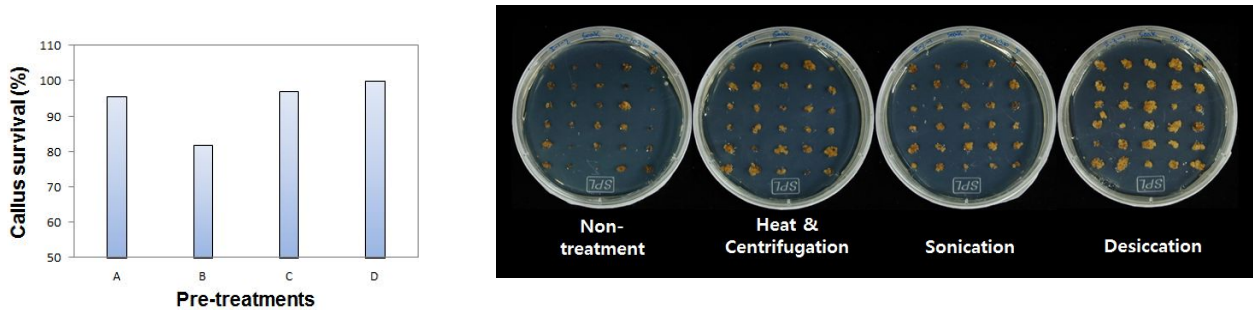


그림 1-41. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율에 미치는 전처리 방법의 효과 (상: 선발배지에서 캘러스 생존율, 하: 선발배지에서의 캘러스, A: 무처리, B: heat & centrifugation, C: sonication, D: desiccation)

#### (라) 보고유전자 도입 형질전환

선발배지에서 3 mm 이상 증식한 캘러스는 총 12계통이었으며, 캘러스의 GUS staining 분석 결과 약하게나마 캘러스 일부에서 보고유전자 발현이 확인되었다. 이 캘러스로부터 총 8계통의 식물체가 재생되었고, 재생된 식물체의 PCR을 실시한 결과 8계통 모두 선발마커인 *hpt*와 보고유전자인 *gus*에 해당하는 band가 나타나 모든 형질전환 식물체에서 안정적인 유전자 도입이 확인되었다.

보고유전자 도입 형질전환 식물체 유도 실험에서는 일부 캘러스에서 알비노 식물체가 재생되었는데 (그림 1-42-F의 오른쪽 식물체), 정상 식물체에 비해 속도는 느리지만 선발배지에서 신장과 발근이 이루어졌다. 알비노 식물체도 PCR을 통한 유전자 도입을 확인해본 결과 정상식물체와 동일하게 선발마커인 *hpt*에 해당하는 band는 나타났으나, 보고유전자인 *gus*에 해당하는 band는 나타나지 않았다 (그림 1-42-I의 A-1, A-2).

갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환의 재료로 사용하기 위해 미성숙 화기 (그림 1-42-A)로부터 캘러스를 유도한 후 증식하였다 (그림 1-42-B). 증식된 캘러스의 전처리는 desiccation 방법을 사용하였고, *Agrobacterium* 현탁액에 침지하여 mashing 방법으로 접종 후 (그림 1-42-C) 선발배지에서 형질전환 캘러스 선발 및 식물체 재생을 유도하였다 (그림 1-42-E, F). Hygromycin 100 mg/L가 첨가된 배지에서 선발된 캘러스의 GUS staining 결과, 캘러스의 일부에서 *gus* 유전자의 발현이 약하게 나타나는 것을 확인하였다 (그림 1-42-G). 재생된 형질전

환 식물체 8계통은 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 신장배지에서 정상적인 신장과 뿌리 발달이 이루어졌다 (그림 1-42-H). 신장이 이루어진 식물체는 순화과정을 거쳐 온실에서 재배하였으며, PCR을 통해 유전자 도입이 확인되었다 (그림 1-42-I).

이와 같이 갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템을 확립하였다. 갈대의 미성숙 화기에서 얻어진 캘러스를 식물 재료로 사용하여 pCAMBIA1301 vector가 도입되어 있는 *Agrobacterium* EHA105를 이용하여 형질전환을 시킨 후 캘러스 선발 및 식물체 증식 과정을 통하여 형질전환 식물체를 생산하고 이들로의 유전자 도입 여부를 확인할 수 있었다.

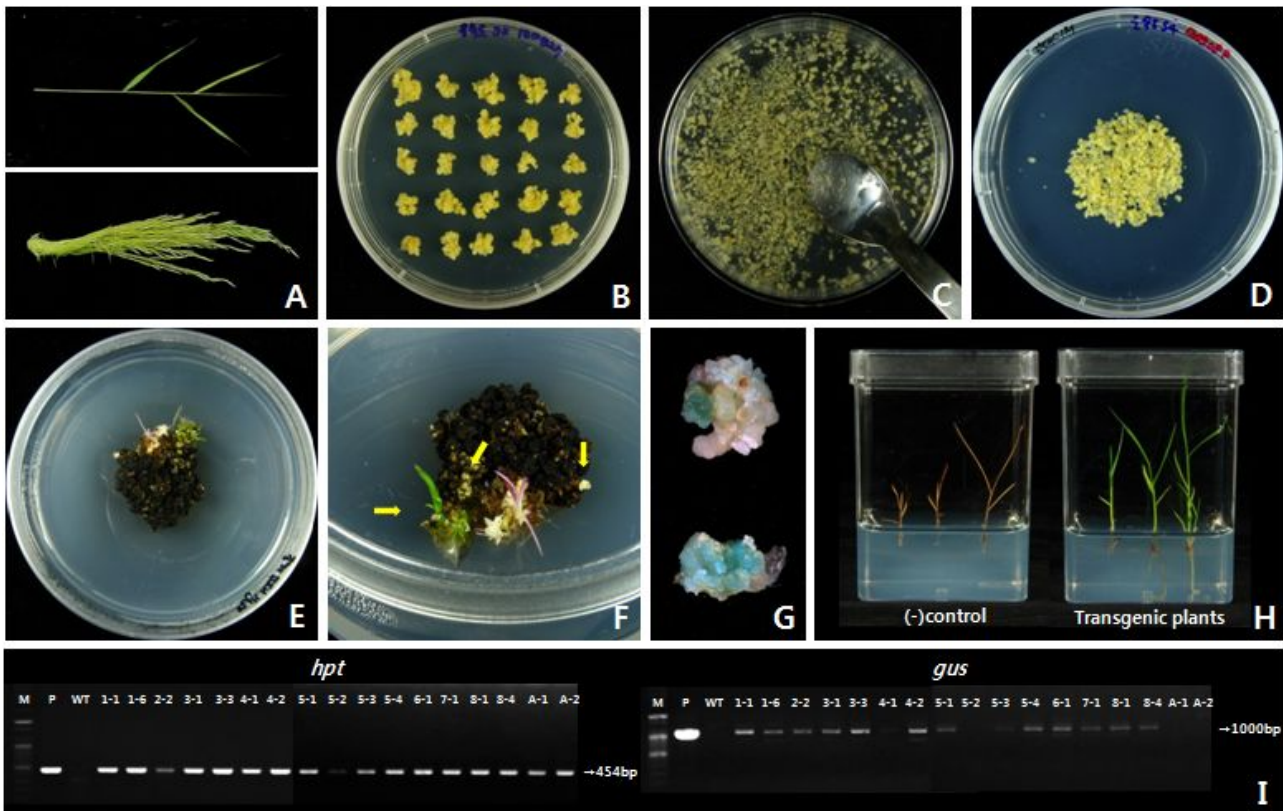


그림 1-42. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 과정 (A, B: 미성숙 화기 유래 캘러스를 분리하여 배양한 식물재료, C: *Agrobacterium* 현탁액에 침지 후 mashing 방법에 의한 접종, D: 공조배양, E, F: 선발 및 형질전환 식물체 재생, G: 보고유전자 *gus* 발현 검정, H: hygromycin 25 mg/L 첨가 배지에서의 형질전환 식물체 신장, I: genomic PCR을 통한 유전자의 도입 검정)

#### 4. 유도성 프로모터 비교를 위한 *Agrobacterium* 매개 형질전환

본 과제의 최종 목표인 cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환체를 개발하기 위해서는 작물의 영양생장기에는 발현되지 않아 정상적인 생장이 이루어진 후, 특정 자극 혹은 스트레스에 의해서만 유전자가 발현될 수 있도록 해주는 유도성 프로모터의 사용이 필수적이다. 이에, 주관기관이 벼에서 발굴하고 기능을 확인한 건조 스트레스 유도성 ‘rab21’과 ‘996’, ‘972’ 프로모터를 이용한 보고유전자의 참억제와 갈대 형질전환을 통해 프로모터 간의 차이를 검증하였다.

##### 가. 참억제

###### (1) 식물재료, 기본배지 및 형질전환 방법

제주도 노꼬메 오름 지역 참억제의 미성숙 화기 유래 캘러스를 공시재료로 사용하였으며, 식물재료, 기본배지 조성 및 형질전환 방법은 상기 형질전환 조건 확립 실험과 동일하게 수행하였다. *Agrobacterium*은 주관기관으로부터 분양받은 EHA105/pHC10::p996, EHA105/pHC10::p972와 EHA105/pHC10::prab21을 사용하였다. 기본 vector에는 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자와 mGFP 유전자가 삽입되어 있으며, MCS 부위에 996, 972, rab21 promoter가 각각 도입되어 있다 (그림 1-43).

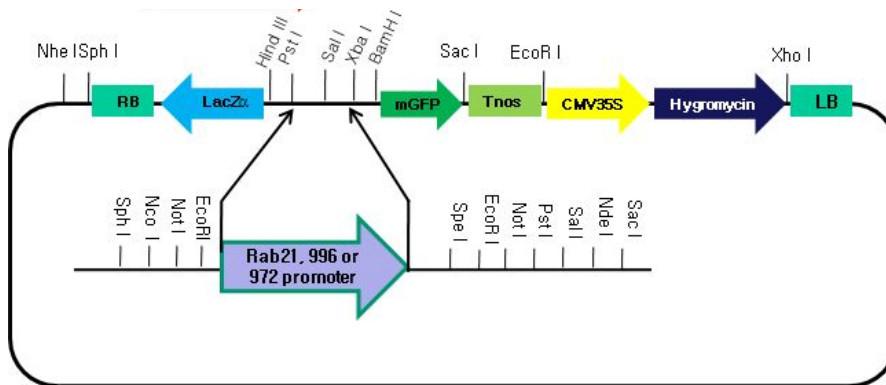


그림 1-43. 벼에서 유래된 건조스트레스 유도성 프로모터의 형질전환 운반용 벡터

###### (2) 유도성 프로모터의 기능 비교를 위한 보고유전자 도입 형질전환체 생산 및 검증

건조 스트레스 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 보고유전자 *gfp*가 도입된 형질전환 캘러스는 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하여, 유전자가 도입된 캘러스만을 선발하였다. 배양 3주차부터 캘러스가 느리게 성장하기 시작하였으며, 일부 캘러스는 미세한 갈변이 나타나면서 성장하지 못했다. 매 4주마다 정상적으로 증식되는 캘러스만을 분리하여 새로운 동일 배지로 옮겨 선발하였다. 현재, 6차 선발까지 진행하여 총 14계통의 캘러스를 선발하였으며, 선발된 캘러스는 직경 8 mm 이상 발달시킨 후 형질전환 신태를 유도할 예정이다 (그림 1-44).



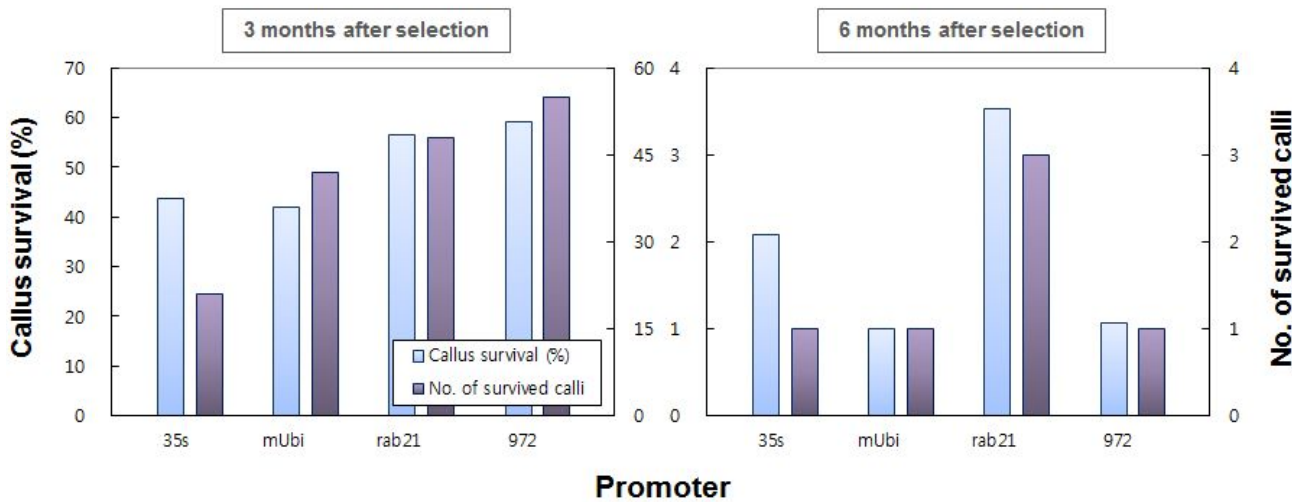


그림 1-44. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 건조 스트레스 유도성 프로모터 도입 *Agrobacterium* 매개 형질전환

선발배지 배양 8주 후 증식이 확인된 형질전환 캘러스의 7개 계통을 무작위로 선발하여 genomic PCR을 통한 캘러스 상태의 유전자 도입 여부를 확인하였다. Genomic PCR 검정 결과, 996 promoter와 rab21 promoter construct로 형질전환하여 선발한 형질전환 캘러스 계통 중 일부를 제외하고 전반적으로 보고유전자인 *gfp*의 경우 예상되었던 573 bp 크기의 band와 선발마커인 *hpt*의 경우 454 bp 크기의 band가 관찰되었다 (그림 1-45). 이로 보아 참억새 캘러스의 형질전환을 통하여 유전자 도입이 성공적으로 이루어졌음을 확인 할 수 있었다. 그러나 *gfp* PCR 에서 예상되었던 크기의 band 이외에 추가적인 band가 관찰되어 이에 대해 추후 분석을 실시할 예정이다.

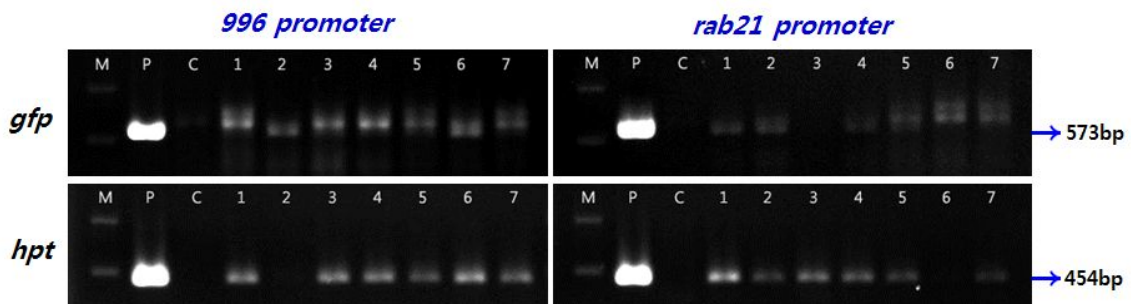


그림 1-45. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 도입 형질전환 캘러스의 PCR 분석을 통한 유전자 도입 확인 (M: 1 kb DNA marker, P: plasmid pHC10, C: non-transgenic control)

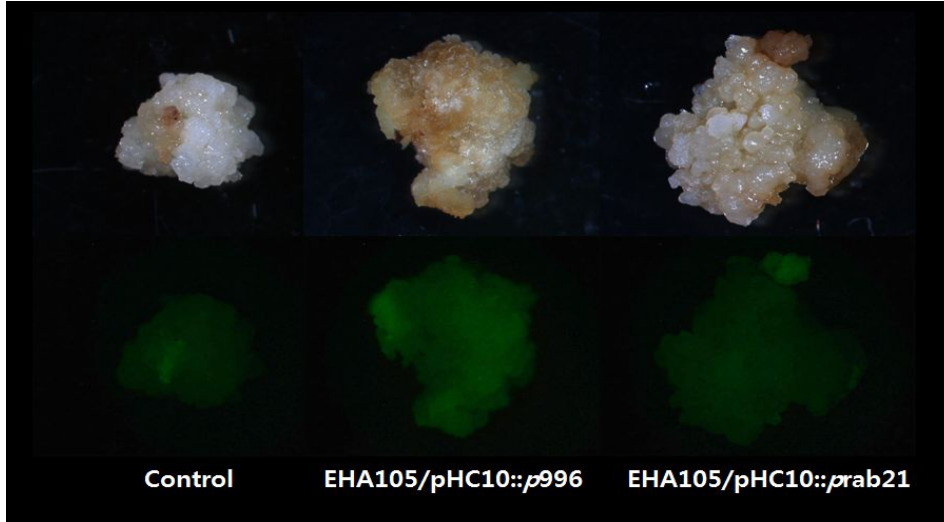


그림 1-46. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 도입 형질전환 캘러스의 4시간 건조 처리 후 형광발현을 통한 유전자 발현 확인.

그리고 형광현미경을 통한 GFP 발현을 검정하였을 때, 비형질전환 대조구 캘러스에서도 GFP 유사 발현이 약하게 나타났다. 선발배지에서 정상적으로 증식이 이루어진 캘러스 가운데 rab21 프로모터에서는 대조구와 유사한 발현이 관찰되었으나, 996 프로모터 도입 형질전환 캘러스에서는 대조구와 구별되는 강한 GFP 발현을 나타내어 유전자 도입 및 발현이 확인되었다 (그림 1-46). 이러한 결과로 미루어 볼 때 참억새에서는 cellulose 자가분해 유전자 도입시 996 프로모터를 사용하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

#### 나. 갈대

##### (1) 식물재료, 기본배지 및 형질전환 방법

본 실험은 부산광역시 을숙도 지역 갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스를 공시재료로 사용하였다. 식물재료, 기본배지 조성 및 형질전환 방법은 상기 형질전환 조건 확립 실험과 동일하게 수행하였으며, *Agrobacterium*은 주관기관으로부터 분양받은 EHA105/pHC10::p996과 EHA105/pHC10::prab21을 사용하였다. 기본 vector에는 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자와 mGFP 유전자가 삽입되어 있으며, MCS 부위에 996, rab21 promoter가 도입되어 있다. 형질전환 후, 유전자 도입 및 발현 검정은 상기 참억새와 동일하게 수행하였다.

##### (2) 유도성 프로모터의 기능 비교를 위한 보고유전자 도입 형질전환 캘러스 생산 및 검정

건조 스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환 캘러스는 hygromycin 50 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하여, 유전자가 도입된 캘러스만을 선발하였다. 배양 2주차부터 캘러스가 느리게 성장하기 시작하였으며, 일부 캘러스는 갈변이 나타나면서 성장하지 못했다. 배양 4주차에 정상적으로 증식되는 캘러스를 새로운 동일 배지로 옮겨주었으며, 무작위로 7계통을 선발하여 캘러스 상태에서의 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 genomic PCR과 형광현미경을 통한 GFP 발현을 검정하였다.

갈대 형질전환 캘러스의 PCR을 통한 유전자 도입 여부를 확인해보았을 때, 선발마커인 *hpt*

의 경우 86% 이상의 형질전환 캘러스에서 유전자 도입이 확인되었다 (그림 1-47). 갈대 형질전환 캘러스를 대상으로 4시간의 건조 처리 후 형광현미경을 통한 GFP 발현을 검정하였을 때, 비형질전환 대조구 캘러스에서도 GFP 유사 발현이 다소 나타났으나, 형질전환 캘러스에서는 그와 구별되는 밝은 부분이 나타나는 것으로 보아 정상적인 유전자 도입 및 발현이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1-48).

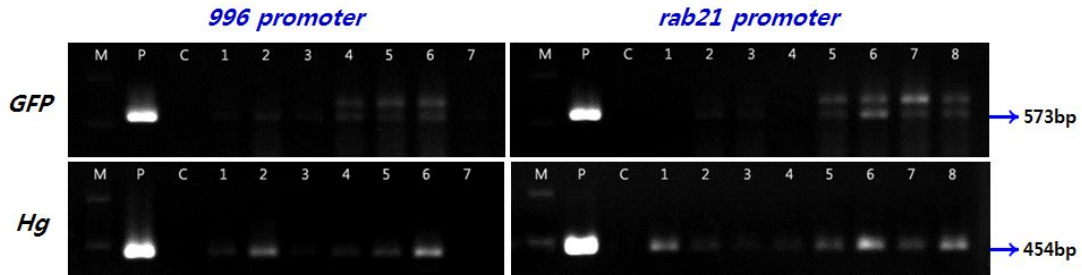


그림 1-47. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 도입 형질전환 캘러스의 PCR 분석을 통한 유전자 도입 확인 (M: 1 kb DNA marker, P: plasmid pHC10, C: non-transgenic control)

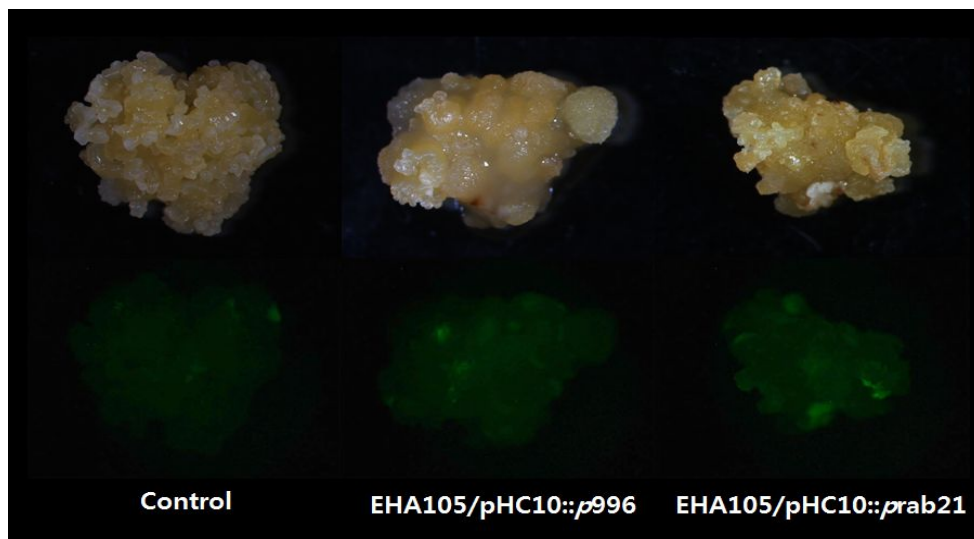


그림 1-48. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 도입 형질전환 캘러스의 4시간 건조 처리 후 형광발현을 통한 유전자 발현 확인

(3) 유도성 프로모터의 기능 비교를 위한 보고유전자 도입 형질전환 식물체 생산 및 검정  
선발배지 배양을 통해 선발된 형질전환 캘러스는 선발배지 배양 8주차에 hygromycin 25 mg/L가 첨가된 식물체 재생배지로 옮겨주어  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  백색 형광등의 16/8시간 광조건 하에서 형질전환 식물체 발달을 유도하였다.

재생배지에서 배양 2주 무렵부터 캘러스의 일부분에서 녹색 점이 나타나기 시작하였으며 (그림 1-49-D), 4주 이후부터는 식물체 재생이 이루어지고 지상부의 신장이 이루어지기 시작하였다 (그림 1-49-E). 형질전환 식물체의 길이가 3 cm 이상 신장하였을 때, 식물체를 하나씩

분리하여 hygromycin 25 mg/L가 첨가된 신장배지로 옮겨주어 신장을 유도하였다 (그림 1-49-F, G). 총 40계통의 형질전환 식물체가 정상적으로 신장되었으며 기외 순화과정을 거쳐 온실에서 재배하였다 (그림 1-49-H).

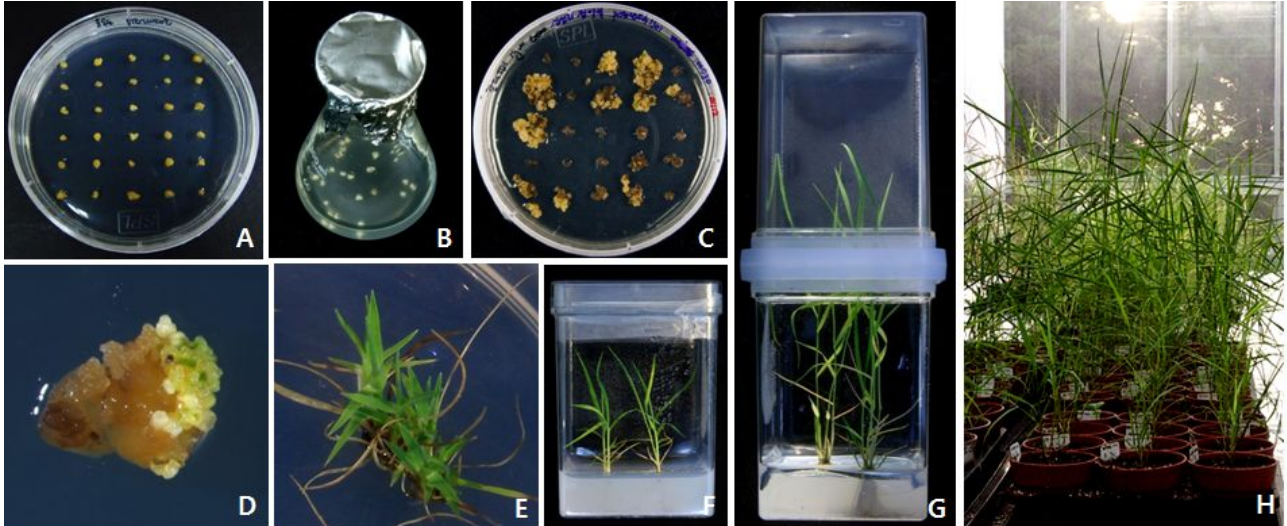


그림 1-49. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 도입 형질전환 과정 (A: 식물재료, B: 접종, C: 항생제 배지에서 형질전환 캘러스 선발, D, E: 형질전환 캘러스로부터 식물체 분화, F, G: 형질전환 식물체 신장 및 발근, H: 기외 활착을 통한 온실 재배)

형질전환 식물체가 20 cm 이상 정상적으로 신장되었을 때, 유전자 도입을 확인하기 위하여 genomic PCR 검정을 실시하였다.

갈대 형질전환 식물체를 대상으로 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 PCR 분석을 실시하였을 때, 총 40계통의 형질전환체에서 선발마커인 *hpt*와 보고유전자인 *gfp*에서 예상되었던 454 bp와 573 bp 크기의 band가 나타나, 모든 계통에서 안정적인 유전자 도입이 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (그림 1-50).

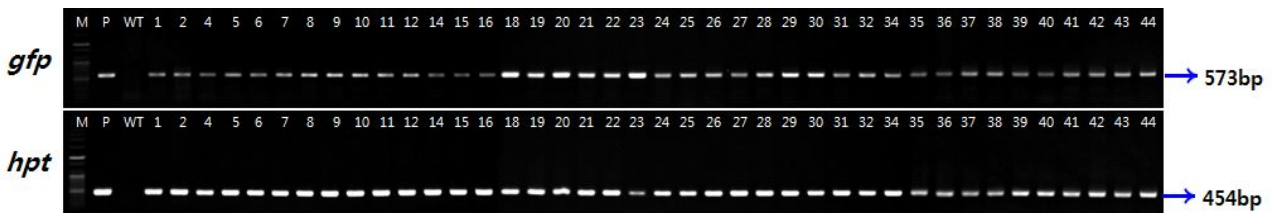


그림 1-50. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 *rab21* 프로모터 도입 형질전환 식물체의 PCR 분석을 통한 유전자 도입 확인 (M: 1 kb DNA marker, P: plasmid pHC10, C: non-transgenic control)

유전자 도입이 확인된 갈대 형질전환 식물체는 건조 스트레스에 따른 프로모터의 발현 정도를 알아보기 위하여 각 계통에서 완전히 전개된 상단부 잎을 1개 절단하여 12시간 동안 건

조 처리를 해주었으며, 12시간 후 형광현미경을 이용하여 형광발현 여부를 조사하였다. 건조처리 전과 후의 형광 발현 정도를 확인해본 결과, 대조구 식물체에 비해 형질전환 식물체에서 GFP 발현이 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, 계통마다 발현 정도에는 차이가 있었다.

이와 같이 갈대 형질전환 식물체 40계통은 모두 유전자가 안정적으로 도입되었으며, 도입된 유전자가 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

선발배지에서 정상적인 발근과 함께 초장이 약 3 cm 신장한 소식물체를 이용하여 건조 스트레스에 따른 프로모터의 발현 정도를 알아보기 위하여 소식물체를 건조 처리를 해주면서 2시간 간격으로 형광발현을 조사하였다. 초기에는 GFP 발현이 약하게 관찰되었으며, 건조처리 8시간까지 GFP 발현량이 서서히 증가하였다. 건조처리 72시간 후에는 비형질전환 대조구 식물체에 비해 형질전환 식물체에서 GFP 발현이 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이로 보아 건조 스트레스 유도 프로모터 *rab21*이 갈대에서 안정적으로 발현될 뿐만 아니라 건조스트레스에 의해 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

PCR과 형광단백질 발현으로 유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 식물체는 보다 정확한 발현을 검정하기 위하여 RT-PCR과 Western blot 검정을 진행하고 있다.

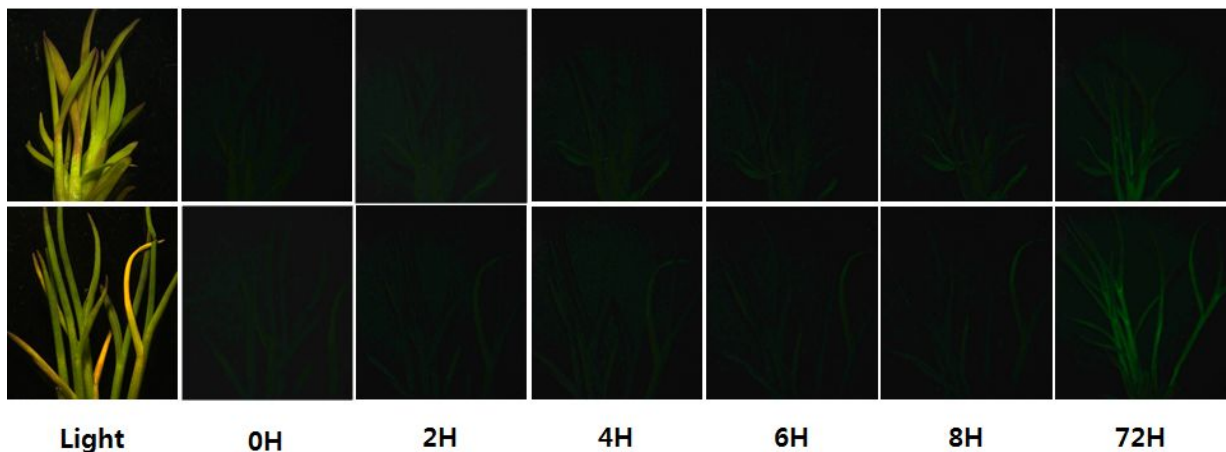


그림 1-51. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 *rab21* 도입 형질전환 식물체의 건조 처리 시간별 유전자 발현 확인.

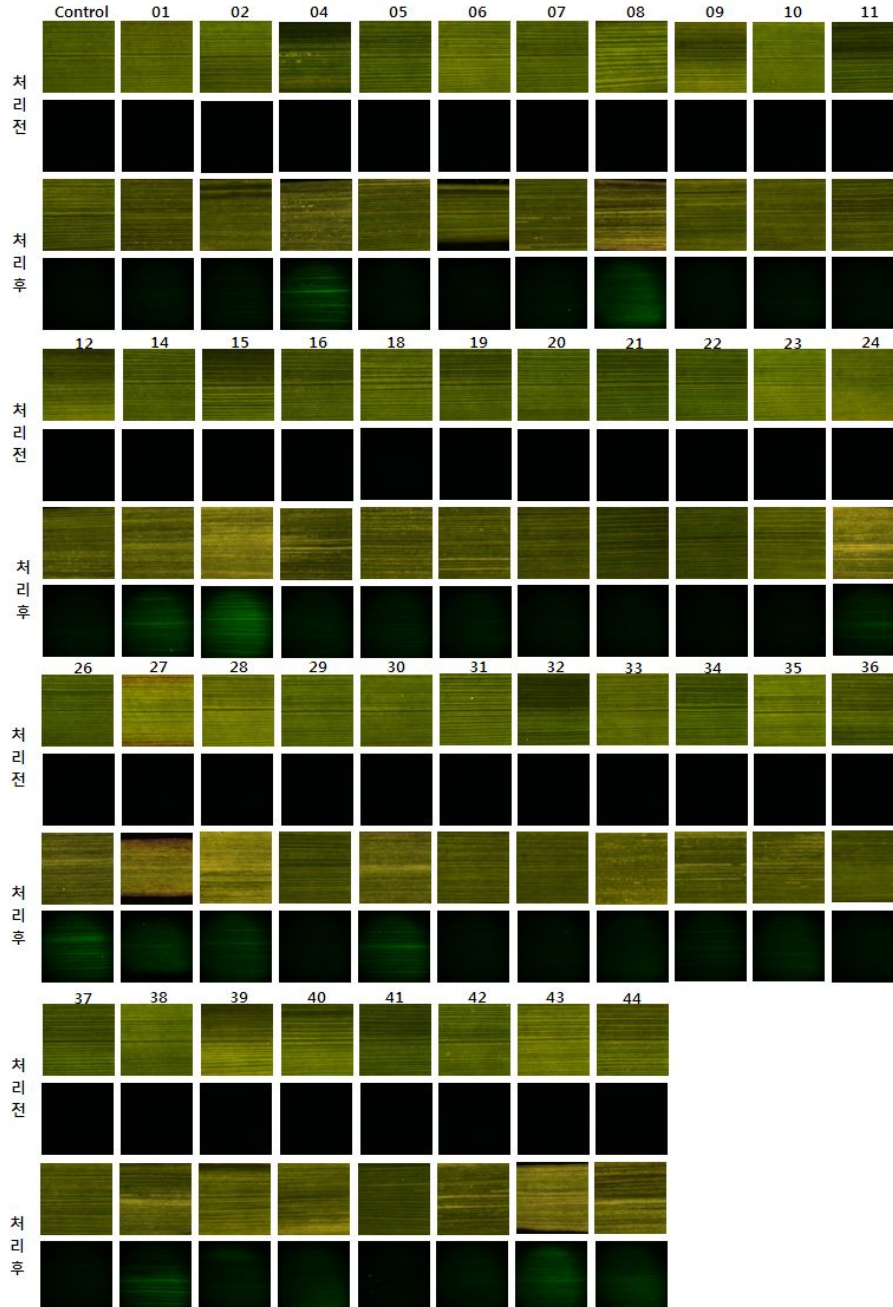
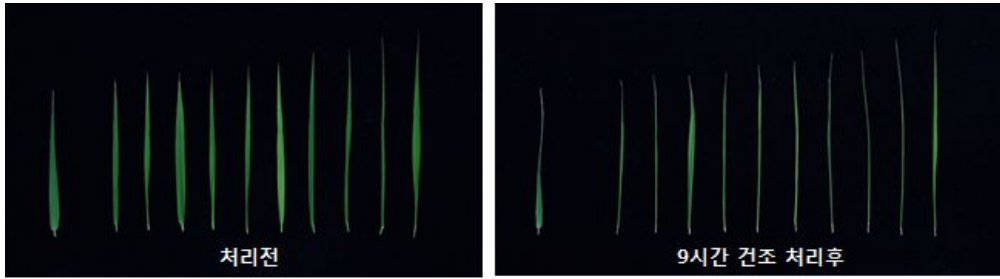


그림 1-52. 갈대 (*Phragmites communis*)의 건조스트레스 유도성 프로모터 rab21과 mGFP 유전자 도입 형질전환 식물체 40계통의 건조 처리전과 12시간 건조 처리 후 *gfp* 유전자 발현 확인

5. 셀룰라제 유전자 도입 *Agrobacterium* 매개 형질전환

가. 식물재료 및 기본배지

본 실험은 Joy World 지역 참억새와 을숙도 지역 갈대의 미성숙 화기 유래 캘러스를 공시 재료로 사용하였다. 식물재료, 기본배지 조성 및 형질전환 방법은 상기 형질전환 조건 확립 실험과 동일하게 수행하였으며, *Agrobacterium*은 주관기관으로부터 분양받은 cellulose 자가분해 유전자를 사용하였다. GV3101/pCAMBIA1302::p972에 셀룰로즈 자가분해 유전자인 cel4 opt AP, cel4 opt ER, β-glu AP, β-glu ER 유전자가 도입된 4개의 construct를 사용하였으며, 대조구로 GV3101/pCAMBIA1302::p972::mGFP를 사용하였다. Vector에는 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자와 mGFP 유전자가 삽입되어 있으며, MCS 부위에 셀룰로즈 자가분해 유전자가 도입되어 있다 (그림 1-53).

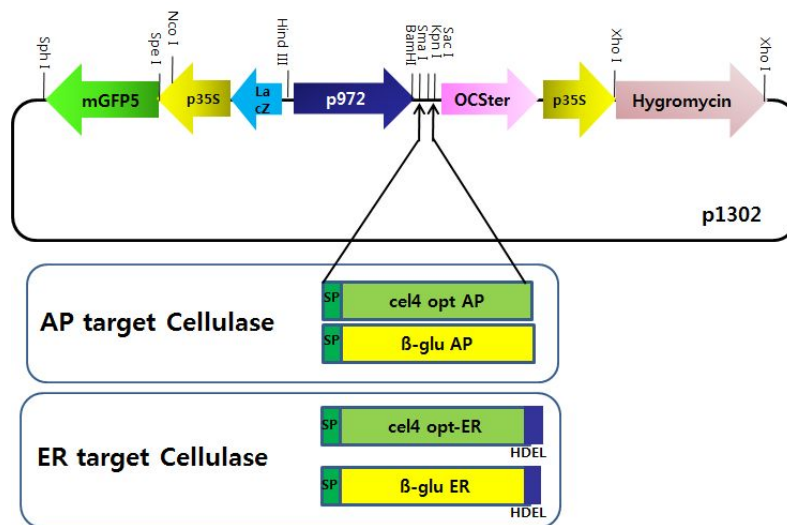


그림 1-53. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환용 벡터

나. 참억새의 cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환체 생산

셀룰로즈 자가분해 유전자가 도입된 형질전환 캘러스는 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하여, 유전자가 도입된 캘러스만을 선발하였다. 선발배지 치상 후, 절편체의 갈변이 점진적으로 진행되었고, 배양 3주 후부터 새로운 캘러스가 발달하기 시작하였다. 캘러스가 2 mm 이상 발달하였을 때, 분리하여 hygromycin 150 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 배지로 옮겨주었으며, 매 4주마다 정상적으로 증식되는 캘러스만을 분리하여 새로운 동일 배지로 옮겨 선발하였다. 현재, 6차 선발까지 진행하였으며 2계통의 캘러스가 선발배지에서 정상적인 증식을 나타냈다 (그림 1-54). 선발된 캘러스는 크기 8 mm 이상 발달하였을 때, 형질전환 신초를 유도하기 위한 재료로 사용할 예정이다.

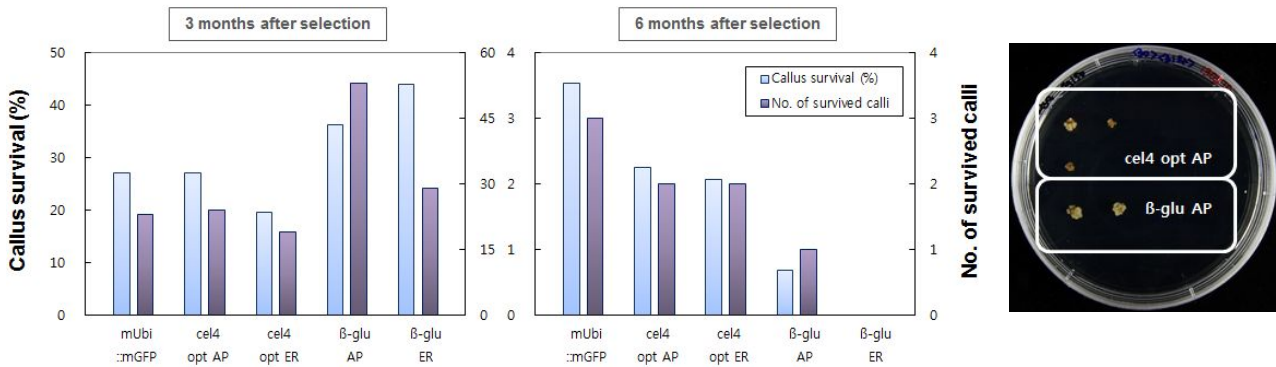


그림 1-54. 참억새 (*Miscanthus sinensis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 셀룰로즈 자가 분해 유전자 도입 *Agrobacterium* 매개 형질전환 및 선발 캘러스 계통

#### 다. 갈대의 셀룰로즈 자가분해 유전자 도입 형질전환체 생산

갈대의 경우에는 상기 보고유전자 도입 형질전환과 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 셀룰로즈 자가분해 유전자가 도입된 형질전환 캘러스는 hygromycin 100 mg/L와 cefotaxime 500 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하여, 유전자가 도입된 캘러스만을 선발하였다. Mashing 처리 후 배양 2주차부터 캘러스에 갈변이 나타나기 시작하였으며, 선발배지 배양 8주 후, 전반적으로 갈변이 되고 일부 캘러스가 성장하기 시작하였다. 2 mm 이상 성장한 캘러스는 분리하여 동일한 배지로 옮겨주었으며, *p972::mGFP* 17계통, *pmUbi::cel4 opt AP* 36계통, *p972::cel4 opt AP* 11계통, *p972::β-glu AP* 2계통을 선발하여, 형질전환 식물체 재생을 유도하고 있다.

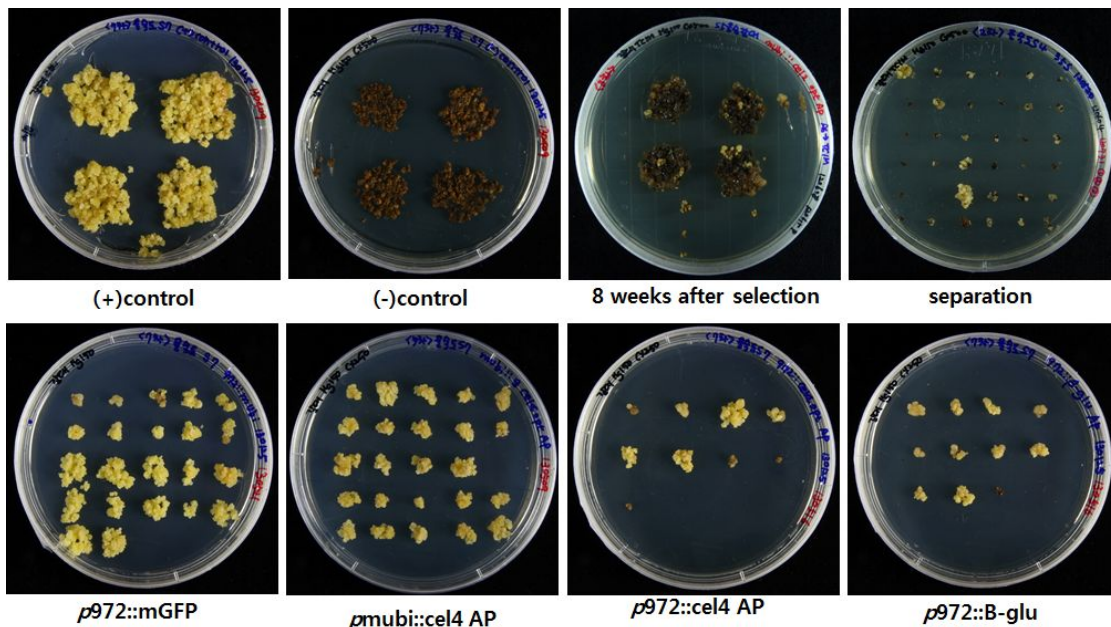


그림 1-55. 갈대 (*Phragmites communis*)의 미성숙 화기 유래 캘러스를 이용한 셀룰로즈 자가 분해 유전자 도입 *Agrobacterium* 매개 형질전환 캘러스의 선발



셀룰라제 유전자 도입 형질전환 결과 획득한 참억새 2계통과 갈대 49계통의 켈러스는 유전자의 도입 및 발현이 검정된 형질전환과 동일한 방법으로 수행하여, 선발배지에서 켈러스 발달 모습이 동일하다. 따라서, 본 실험에서 획득한 켈러스 계통 모두 유전자 도입 및 발현이 정상적으로 이루어질 것으로 기대되며, 현재 식물체 재생을 진행하고 있다.

## 제 2 절 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화

### 1. 셀룰라제 유전자 발현을 위한 최적 프로모터 발굴

#### 가. 유도성 프로모터 발굴

지금까지 식물체내에서의 재조합 셀룰라제 유전자 발현은 항시발현 프로모터 (constitutive promoter)를 주로 사용하였다. 따라서 작물이 성장하는 기간 동안 생성된 재조합 셀룰라제 효소에 의해 식물의 생장이 저해될 뿐만 아니라 세포내에 존재하는 protease에 의해 재조합 셀룰라제 효소의 생성량이 감소하였다. 따라서 식물체내의 재조합 셀룰라제 단백질의 생성량과 안정성을 높이기 위해 특정 자극 혹은 스트레스에 의해서만 유전자 발현을 유도될 수 있도록 유도성 프로모터를 이용할 필요성이 있다. 본 연구에서는 단자엽 모델작물인 벼에서 건조스트레스 유도성 유전자를 발굴하여 그 프로모터를 셀룰라제 유전자발현에 이용하고자 하였다.

RIKEN의 Yamaguchi-Shinozaki 박사의 DNA microarray 연구 (Rabhani et al., 2003) 결과에 의해 알려진 62개의 건조스트레스 유도성 유전자의 dbEST ID를 NCBI DB에서 조사하여 먼저 부분 염기서열을 확보하였다. 확보한 부분염기서열을 토대로 NCBI Basic Local Alignment Search Tool을 통해 *Oryza sativa* genome database로부터 17종의 건조유도성 유전자의 전신염기서열과 약 2kb길이의 프로모터 염기서열 정보를 확보하였다. 선별한 건조스트레스 유도성 유전자의 3'UTR 부위를 증폭하도록 gene-specific primer (GSP)를 디자인하였고, 3주 된 rice seedling에 0시간, 24시간 건조스트레스를 가한 후 total RNA는 분리하여 reverse transcriptase로 cDNA를 합성하고 GSP로 PCR증폭을 하여 발현 양상을 재검증하여 발현수준이 높은 유전자들을 1차 선별하였다 (그림 2-1).

3주 된 동진벼 (*Oryza sativa* L.)의 잎을 사용하여 건조처리 (0 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr) 후 TRI reagent를 사용하여 total RNA를 분리한 후, 1st cDNA를 합성하고 RT-PCR로 검증하여, 1차 선별된 유전자들을 2차 재검증하여 최종 7종의 건조스트레스 유도성 유전자를 발굴하였다 (그림 2-2, 3).

#### 나. 발달 및 조직특이적 프로모터 발굴:

단자엽작물의 발달특이적 및 종자를 포함한 조직특이적 유전자를 확보하기 위해 Gramene DB (www.gramene.org)에서 전신발현 유전자 3종, 배유특이적 발현 유전자 7종, Stem elongation stage 발현 유전자 11종, tillering stage 발현 유전자 3종을 선별하였다 (그림 2-4). 조직특이적 단백질 유전자 중 배유에서 발현되는 6종의 유전자와 전신에서 발현하는 3종의 유전자의 약 2kb의 프로모터 부위를 유전자 특이 프라이머 세트를 사용하여 genomic DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응 (PCR)에 의해 증폭하여 pGEM T-easy vector로 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 확인 분석 후 pHC10으로 서브클로닝하여 아그로박테리움-매개된 진공 침윤법에 따라 동진벼 (*Oryza sativa* L.)의 핵계놈으로 도입할 예정이다 (표 2-1).

No	Accession	locus	description	gene specific primer	GSP size	cycle	RT-PCR 결과
			18S small subunit ribosomal RNA	rice 18S-F: GAAAGTTGGGGGCTCGAAGA rice 18S-R: ACAAAAGGCAGGGACGTAGT	658 bp		
			18S small subunit ribosomal RNA	rice 18S-F163: CACTGATGTATCCAACGAG rice 18S-R: ACAAAAGGCAGGGACGTAGT	163bp	20 cycle	
1	BP432943	Os06g0698300	Protein phosphatase 2C family protein	943 GSP-F: CTGGTGGTTTTGTGATGTGGGC 943 GSP-R: TCTCTCTGGCAGGTGATTCTCC	338bp	23 cycle	
2	BP432947	Os12g0288400	Copine domain containing protein	947 GSP-F: TGGTTGGAGTTGGAGATGGTC 947 GSP-R: GAAGGCATACTGCGAAGCTA	325bp	not induced by drought (24h)	
3	BP432984	Os11g0454000	Dehydrin family protein	984 GSP-F: CCGGGTCGTCAACAAATATG 984 GSP-R: AACACAAGCACAAAGTCACAC (Os11g0454200, Os11g0454300, Os11g0453900과 570까지 일치하므로 stop다음에서 디자인함)	212bp	27 cycle	
4	BP432946	Os02g0181300	WRKY transcription factor (wrky36) gene	946 GSP-F: GCTCATTTCCTCCCGCTGCC 946 GSP-R: CGGAGAGGGCGGTGACGAGCG	360bp	not working	
5	C26345	Os01g0159300	Zn-finger, RING domain containing protein	C345 GSP-F: AGAAGCACAGACCCCCACAG C345 GSP-R: GTCGGTGTGGAAGTCGTGATTG	310bp	20 cycle	
6	BP432970	Os07g0687900	WS176 protein induced by water stress	970 GSP-F: TACAAGGAGGAGGAGGACAAC 970 GSP-R: CAGACTTTGGGTGTTCCCTCG	307bp	not working	
7	BP432971	Os05g0209600	Lipolytic enzyme, G-D-S-L family protein	971 GSP-F: GAGGACGTACCCACATGCCA 971 GSP-R: GGGTCACATCTCATCTCTG	350bp	25 cycle	
8	BP432975	Os04g0659300	DUF26-like protein	975 GSP-F: TCTACAACGAGTGCTACGCC 975 GSP-R: CTACTCAGCAGCACCA	440bp	not much induced by 24h DR	
9	BP432996	Os01g0769000	Conserved hypothetical protein	996 GSP-F: GGGCCCTCCTGTCTGTGTT 996 GSP-R: CGCACAGGCTAAAAGCCGA homologous to Os02g0517300 3' UTR에서 디자인함	309bp	23 cycle	
10	AU057557	Os01g0717000	GmCK1p (EC 2.7.1.32) (choline kinase)	557 GSP-F: CCAGTTGCGTATGACATCGCT 557 GSP-R: TCTTCTCTCTTTTCAAGGGAG	437bp	20 cycle	
11	BP433000	Os01g0348900	dark-induced leaf senescence-associated gene	3000 GSP-F: CACCCAAGAAGCTGTTAGGC 3000 GSP-R: GTCTTGCAATGGAATGCTGA	299bp	20 cycle	
12	D40139	Os02g0736400	Dihydroorotate dehydrogenase family protein	139 GSP-F: TATGTACGGCGTAATGATG 139 GSP-R: GTTCTGCTGTTTTGGGCTG	350bp	20 cycle	
13	BP432972	Os08g0205800	Conserved hypothetical protein	972 GSP-F: ACTCCTCCTCCTGCTGCCAC 972 GSP-R: GAAGCACATGTGAGGAGGC	262bp	20 cycle	

그림 2-1. 건조 스트레스 조건에서 선발 유전자의 발현양상 1차 RT-PCR 확인

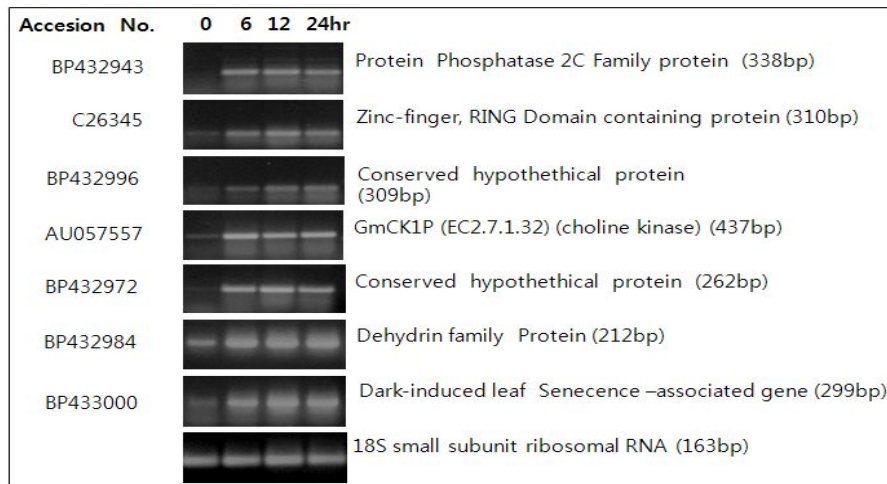


그림 2-2. 건조 스트레스 조건에서 선발 유전자의 발현양상 1차 RT-PCR 확인

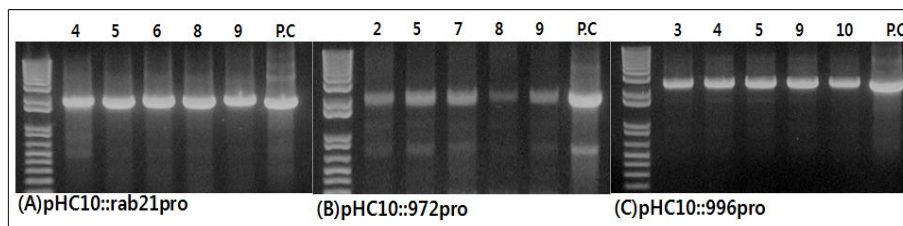


그림 2-3. 건조 스트레스 조건에서 선발 유전자의 발현양상 2차 RT-PCR 확인



그림 2-4. 선발된 벼 조직 및 발달특이적 유전자들

발달 및 조직특이적 프로모터 종류	발현 부위
C24 sterol methyltransferase	Endosperm_specific
26 kDa globulin (globulin	Endosperm_specific
AK121828 (Fasciclin1)	Endosperm_specific
AK108772 (Fasciclin2)	Endosperm_specific
AK061377 (Fasciclin3)	Endosperm_specific
OJ1015F07 (Fasciclin4)	Endosperm_specific
GF14b	All tissue expression
GF14C	All tissue expression
GF14G	All tissue expression

표 2-1. 프로모터부위가 확보된 조직특이적 신규 프로모터

프로모터를 클로닝하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. PCR 반응 혼합물은 DNA 200ng, 10X ExTaq 중합효소 완충액 (pH8.0), 200 mM dNTPs, 5XBandDoctor, 10 pmole의 각 프라이머 및 5U Extaq (Takara사) 중합효소를 포함하였다. 반응은 효소를 넣지 않은 채 시작되어, 다음 조건에 따라 증폭되었다: 후-변성으로 5분 동안 95°C의 1사이클; 1분 동안 95°C, 1분 동안 64°C, 2분 동안 72°C의 35사이클; Applied Biosystem GeneAmp PCR system9700 증폭기에서 후-연장 (extension)으로 10분 동안 72°C의 1사이클. PCR반응으로부터 증폭된 주요 생성물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 젤-정제되었고, 순차적으로 pGEM-T 이지 (easy) 벡터 (Promega, USA)로 클로닝하고 염기서열 확인 pHC10 벡터로 서브클로닝하여 벡 핵형질전환용 벡터로 사용하였다.

#### 다. 프로모터 분석 기본 벡터 카세트 제작

셀룰라제 유전자발현 조절용 최적프로모터 발굴을 위하여 13-mGFP4로부터 분리한 mGFP4와 Nos terminator를 Hygromycin 선발마커가 포함된 pCAMBIA1300 MCS로 서브클로닝하여 벡 핵형질전환 바이너리 (binary) 벡터 pHC10을 제조하였다 (그림 2-5).



그림 2-5. 셀룰라제 유전자발현 조절용 pHC10 벡터

## 2. 벼 유래 건조스트레스 프로모터가 도입된 형질전환 벼 제작

### 가. 건조스트레스 프로모터 도입 형질전환 벼 유전자 도입 검증

최종 선발한 7종의 건조유도성 유전자의 약 2kb의 프로모터 부위를 pHCl0 vector의 GFP 선발마커 상단부위에 서브클로닝하여 형질전환발현벡터를 제조한 후 프로모터 기능을 분석하기 위해 rab21pro (대조구 전신발현 건조스트레스 유도성 프로모터)를 포함하여 7종의 건조스트레스 프로모터를 아그로박테리움-매개된 진공 침윤법에 따라 중만생종인 동진벼 (*Oryza sativa* L.)로 도입하였다 (그림 2-6, 7). 확보한 형질전환체는 genomic PCR로 유전자 도입 여부를 검증하였다 (그림 2-8, 9).

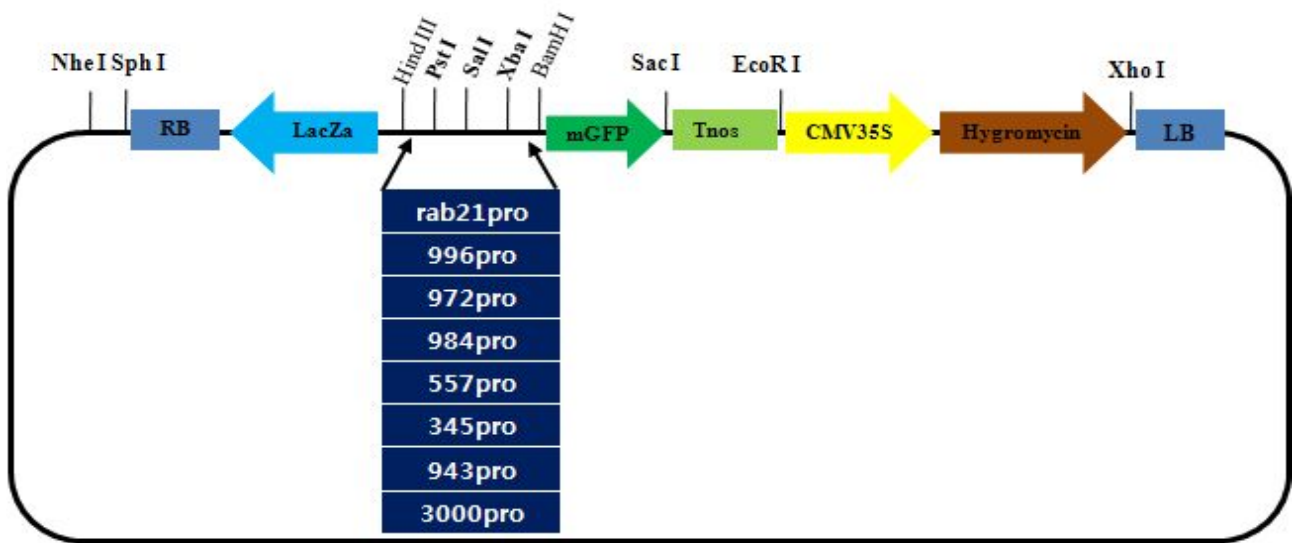


그림 2-6. 벼에서 유래된 건조스트레스 유도성 프로모터의 형질전환 운반용 벡터의 도식도

### 가. 형질전환 벼 생산 과정

형질전환체의 개발을 위해서 캘러스 유래의 벼 형질전환 방법을 이용하였다 (그림 2-7). 제작된 벡터가 형질전환된 아그로박테리움과 종자로부터 유기된 캘러스를 3일간 공동배양하였다. 그 후 4단계의 선발과정을 거쳐 형질전환된 캘러스를 선발하고 2단계의 재분화 선발과정을 거쳐 유식물체를 확보할 수 있다. 재분화를 통해 확보될 선발개체는 genomic PCR, 아그로박테리움 유무 확인, RT-PCR을 통해서 유전자 도입을 확인한 후 순화과정을 거쳐 완전한 형질전환체가 생산된다

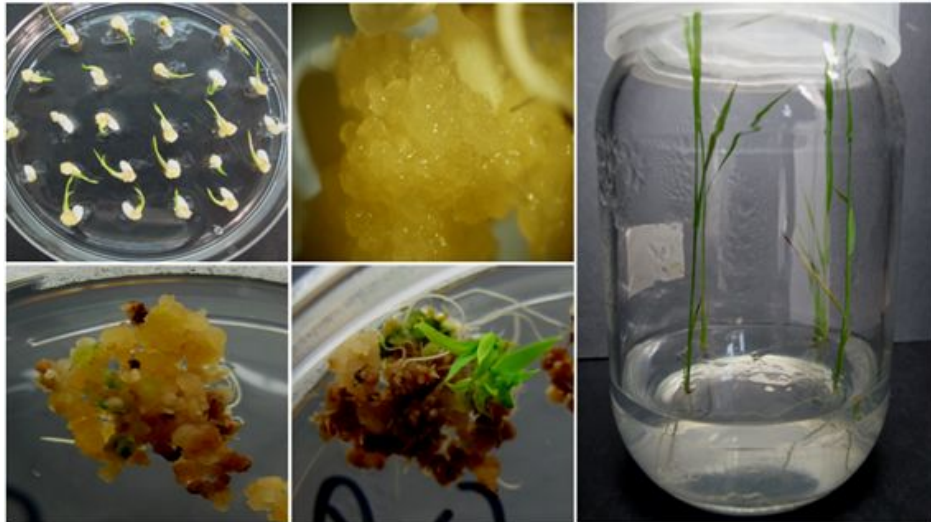


그림 2-7. 캘러스 유래의 벼 핵형질전환 과정

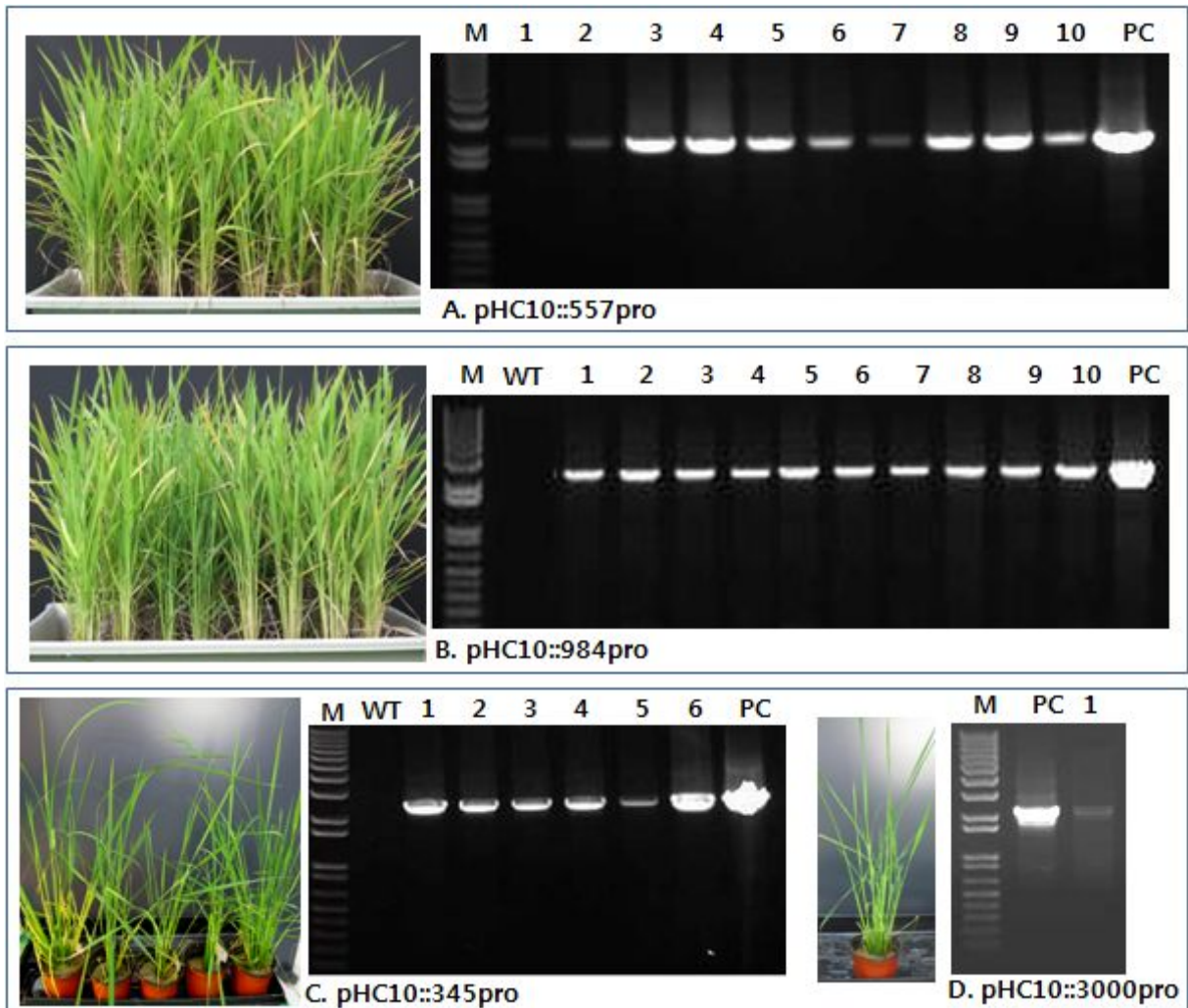


그림 2-8. 건조스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환체의 Genomic PCR 검증(1)

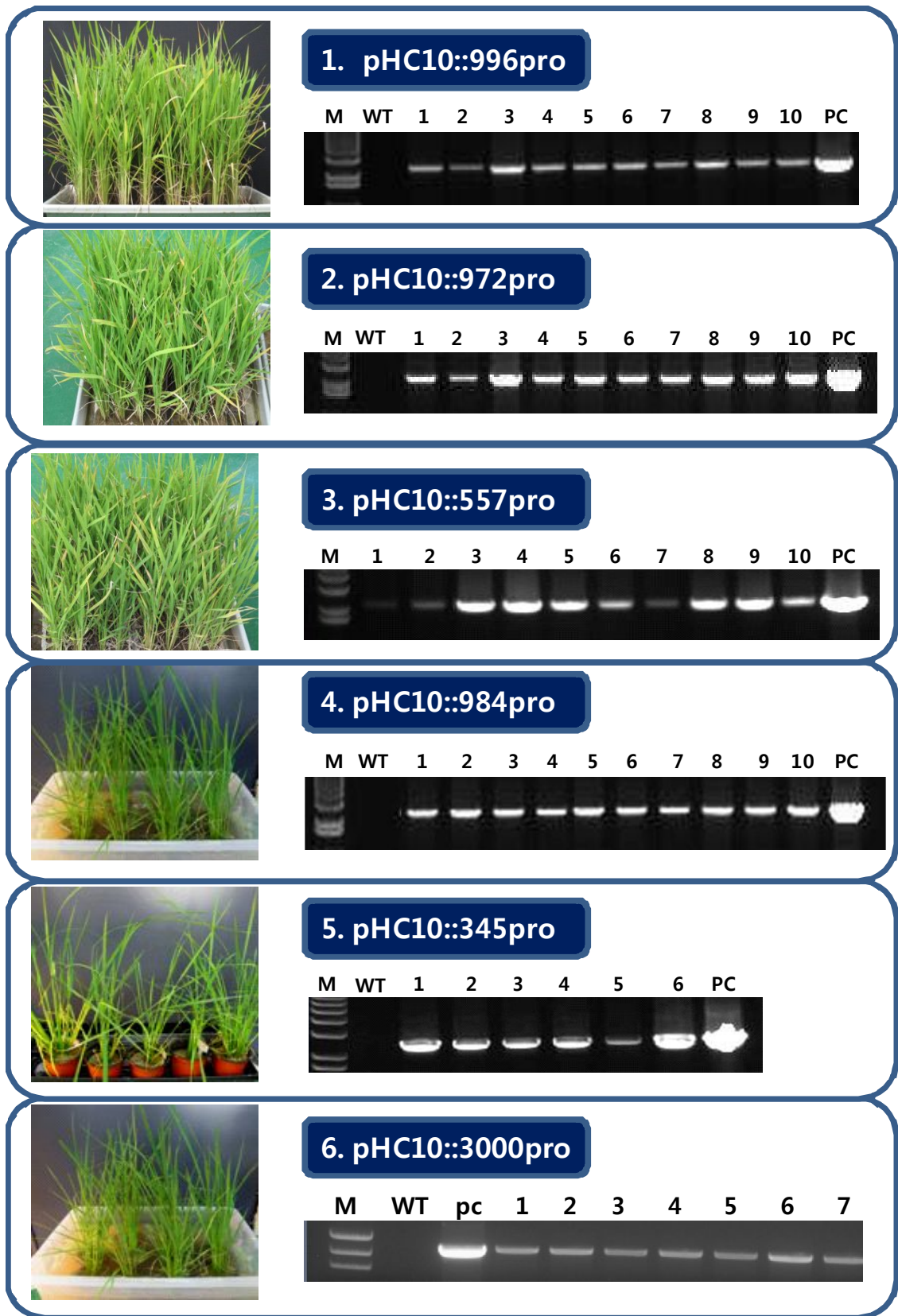


그림 2-9. 건조스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환체의 Genomic PCR 검증(2)



나. 형질전환 벼의 건조스트레스 프로모터 활성 조사

557, 984, 345, 3000 프로모터가 도입된 형질전환체를 최소 1 - 10라인의 독립개체를 확보하였으며, 확보한 유식물체의 GFP ELISA 분석을 수행함으로써 프로모터의 기능을 확인하였다. GFP ELISA 분석을 위해 형질전환체 잎을 0hr, 6hr 건조스트레스를 가한 후 GFP 발현 수준을 건조스트레스를 처리하지 않은 벼 형질전환체와 비교하였다. 6시간 건조스트레스 조건하에서 대조구인 rab21 전신발현 건조스트레스 유도성 프로모터에 비해 557, 996, 972, 984 건조스트레스 유도성 프로모터 모두 약 2배 이상의 활성을 보이는 것을 알 수 있었다 (그림 2-10). 따라서 본 연구를 통해 확보된 건조스트레스 프로모터를 타겟 셀룰라제 유전자가 도입된 모델작물과 바이오네너지 작물인 억새와 갈대를 생산하는데 활용하였다.

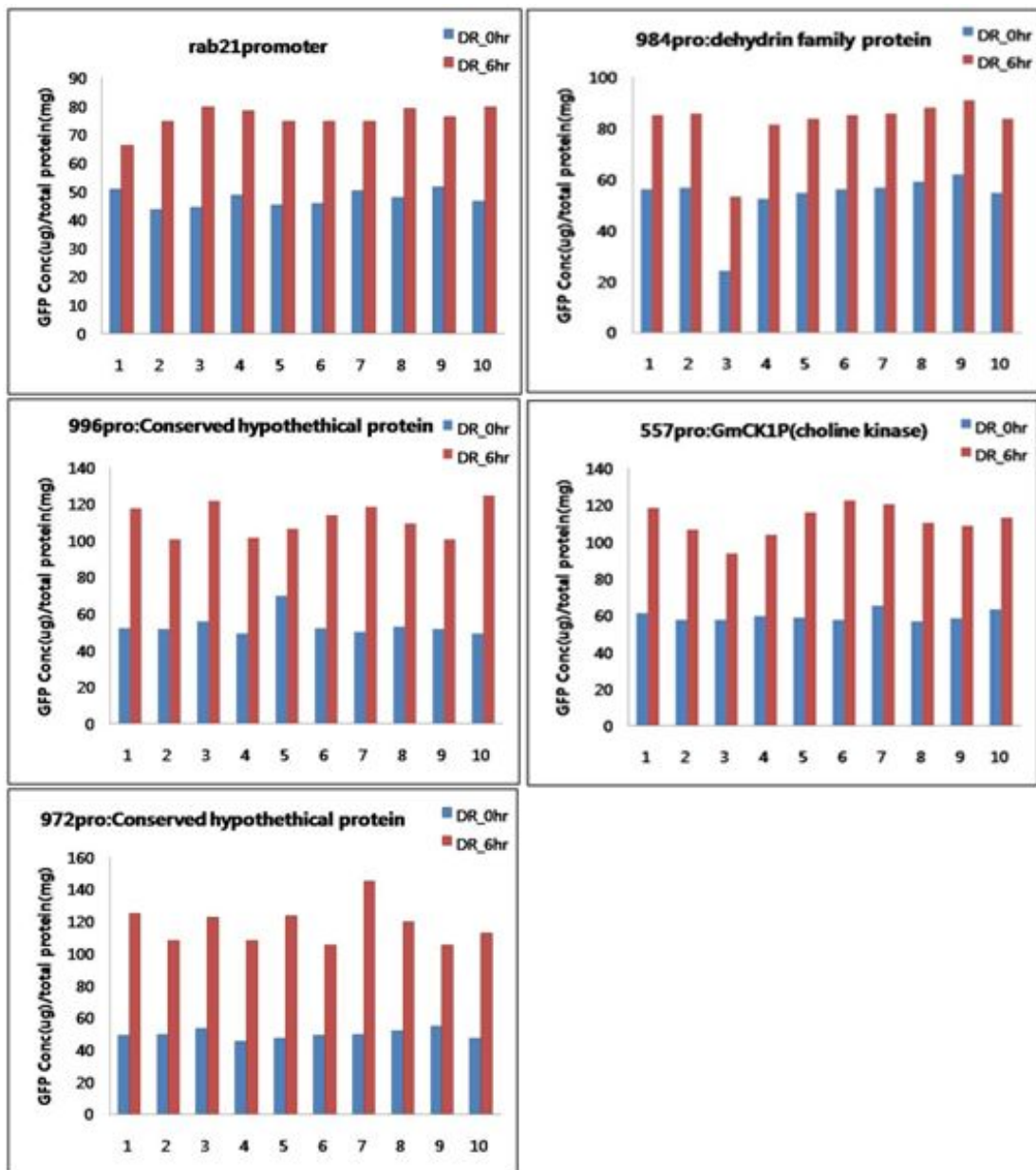


그림 2-10. 건조스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환체 GFP 활성

3. 벼 유래 조직 및 발달 특이적 프로모터가 도입된 형질전환 벼 제작

가. 조직특이적 및 전신발현 프로모터 도입 형질전환 벼 유전자 도입 검증

조직 특이적 프로모터로 C24 sterol methyltransferase, 26 kDa globulin, AK121828, AK108772, AK061377, OJ1015F07 6종을 선별하였으며, 전신발현 프로모터로는 GF14B, GF14C, GF14G를 선택하였다. 선별한 9종의 프로모터를 GFP발현 pHC10에 삽입하여 형질전환 벡터를 제작하였다 (그림 2-11). 각 프로모터가 도입된 형질전환 벡터를 *Agrobacterium*에 형질전환하여 벼 핵형질전환을 실시하였으며, 확보한 형질전환체의 Genomic PCR검증으로 GF14G, Fasciclin1, Fasciclin4 3종류의 신규프로모터에서 각각 10, 6, 14 라인을 유식물체를 확보하였다 (그림 2-12).

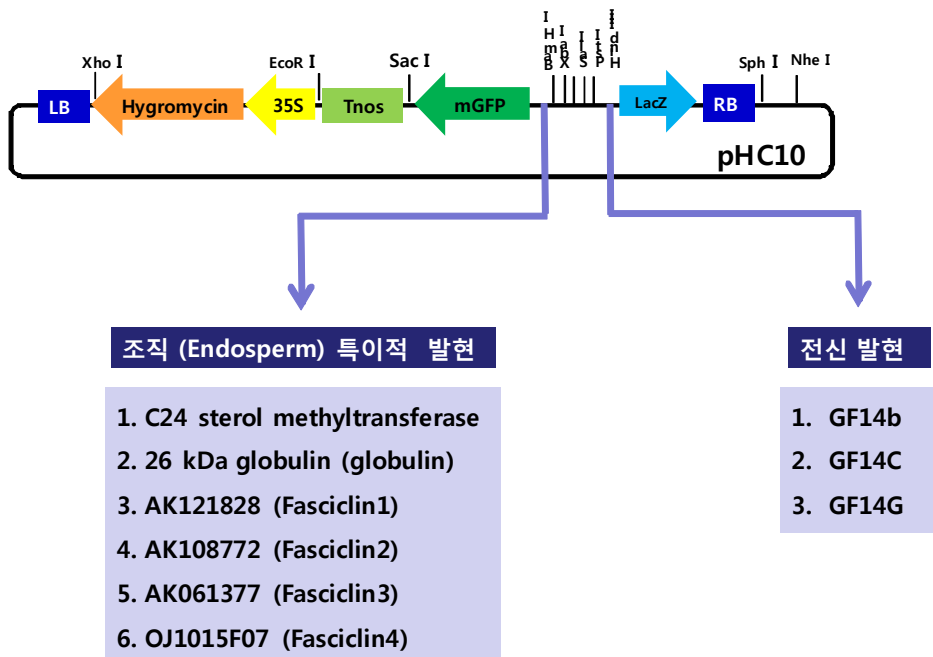


그림 2-11. 벼에서 유래된 전신 및 배유특이적 프로모터의 형질전환 운반용 벡터의 도식도

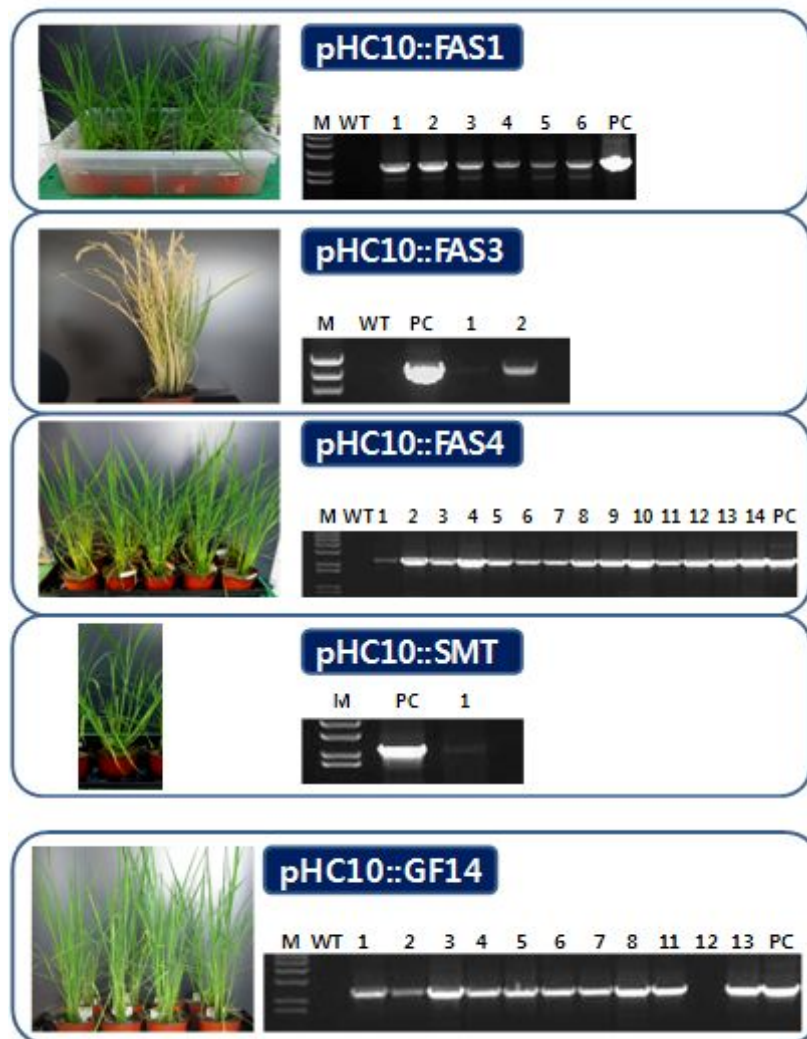


그림 2-12. 조직특이적 및 전신발현 프로모터가 도입된 형질전환체의 Genomic PCR 검증

#### 나. 형질전환 벼의 전신발현 및 배유특이적 프로모터 활성 조사

전신발현 프로모터인 GF14b, GF1c, GF14g를 형질전환하여 먼저 GF14g 형질전환체를 확보하였으며 genomic DNA PCR로 유전자 도입을 확인하였다. 최소 10라인의 유식물체가 확보된 GF14g 전신발현프로모터의 기능을 조사하기 위해 GFP 항체를 이용한 ELISA 분석을 수행하였다. Genomic PCR로 선발된 형질전환체 있을 대조구와 비교하였을 때 잎에서의 GFP 정상적 발현을 확인할 수 있었다 (그림 2-13). 또한 배유 특이적 발현 유전자인 FAS4 프로모터가 도입된 형질전환 벼 10라인을 확보하여 이들 프로모터가 실제로 조직 (배유) 특이적으로 발현하는지 여부를 확인하기 위해 Fasciclin (FAS) 4 형질전환벼 잎으로부터 단백질을 추출하여 ELISA 분석으로 GFP 발현을 분석한 결과 잎에서는 발현하지 않는다는 것을 확인하였다 (그림 2-13).

본 연구에서는 건조스트레스 프로모터를 우선 활용하기로 결정한 바 발달 및 조직특이적 프로모터는 추후 T1세대를 확보한 후 작물의 조직별 GFP 발현 양상과 발현수준을 조사할 예정이다.

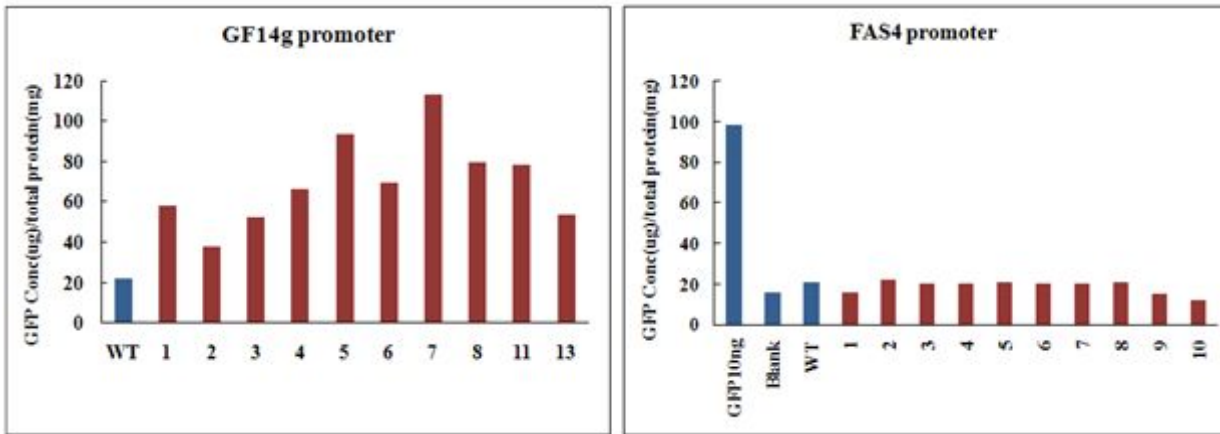


그림 2-13. FAS4 및 GF14g 형질전환벼 앞의 GFP 활성

#### 4. 셀룰라제 유전자가 도입된 모델작물 벼 제작

##### 가. 셀룰라제 유전자 도입벡터 제작

제1 협동기관으로부터 *Polyporus arcularius* 셀룰라제 4종 및 효모의  $\beta$ -glucosidase 유전자 (표 2-2)를 분양받아 벼 핵게놈내로 도입하여 자가당화가 용이한 형질전환체를 제조하고자 하였다. 먼저 벼에서 원핵생물 유래 셀룰라제 유전자의 발현을 최적화하기 위해서 벼의 translational machinery에 알맞도록 코돈을 최적화 필요가 있다. Graphical codon usage analyser program과 <http://www.kazusa.or.jp/codon>의 database를 활용하여 *Polyporus arcularius* 셀룰라제 유전자 중 *cel2*와 *cel4*의 코돈을 벼의 코돈에 맞게 바꾸었다 (벼 GC content: 55.26%, 1st letter GC 58.19%, 2nd letter GC 45.97%, 3rd letter GC 61.61%).

벼의 codon으로 최적화된 *cel2*와 *cel4* 유전자를 합성하기 위해 약 30 bp 길이로 프라이머를 작성하여 successive-PCR기법으로 전장 유전자를 합성하여 클로닝 벡터로 삽입하여 염기서열을 확인하였다 (그림 2-14).

벼의 코돈으로 최적화된 *cel2*와 *cel4* 유전자는 식물 세포내의 소포체와 apoplast에서 발현되도록 디자인하였으며 유전자 발현 프로모터로는 먼저 단자엽 식물에서 강한 활성을 가지고 있는 maize ubiquitin promoter를 사용하였다. 유전자 염기서열에 맞도록 약 30 bp 길이로 프라이머를 작성하여 successive-PCR기법으로 전장 유전자를 합성하였다. 염기서열을 확인한 후 maize ubiquitin promoter의 3' 부위에 도입하여 형질전환 벡터를 제작하고 아그로박테리움-매개 진공 침윤법에 따라 동진벼 (*Oryza sativa* L.)로 순차적으로 도입하였다 (그림 2-15).

Gene source	Cellulase type	Promoter	Cellulase gene	Targeting organelle
<i>Polyporus arcularius</i> (버섯류)	CellobiohydrolaseII (exoglucanase)	Maize ubiquitin	cel2	Apoplast
			cel2-codon opt	Apoplast
			cel2	Endoplasmic reticulum
			cel2-codon opt	Endoplasmic reticulum
	Endoglucanase	Maize ubiquitin	cel4	Apoplast
			cel4-codon opt	Apoplast
			cel4	Endoplasmic reticulum
			cel4-codon opt	Endoplasmic reticulum
Yeast	$\beta$ -glucosidase	Maize ubiquitin	$\beta$ glu	Apoplast
			$\beta$ glu	Endoplasmic reticulum

표 2-2. 도입한 *Polyporus arculariu* 및 Yeast 셀룰라제

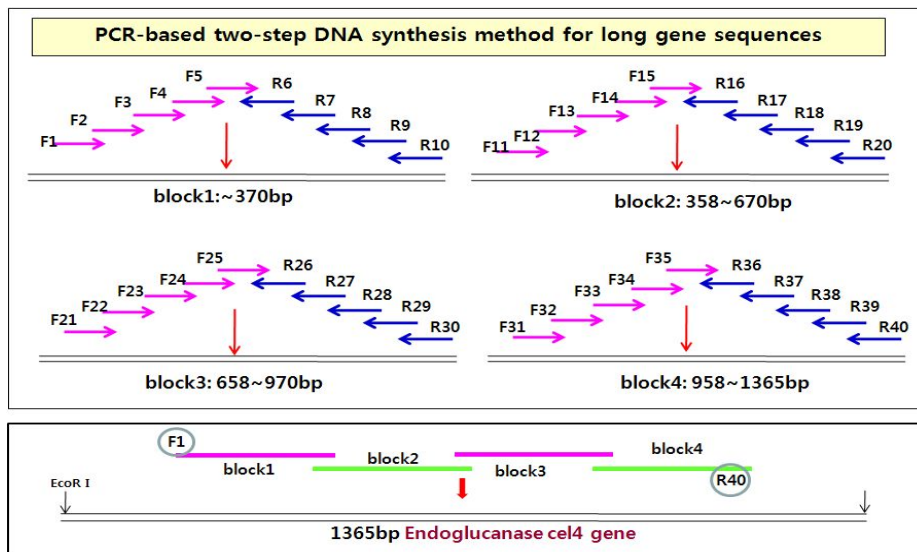


그림 2-14. Successive PCR method for gene synthesis

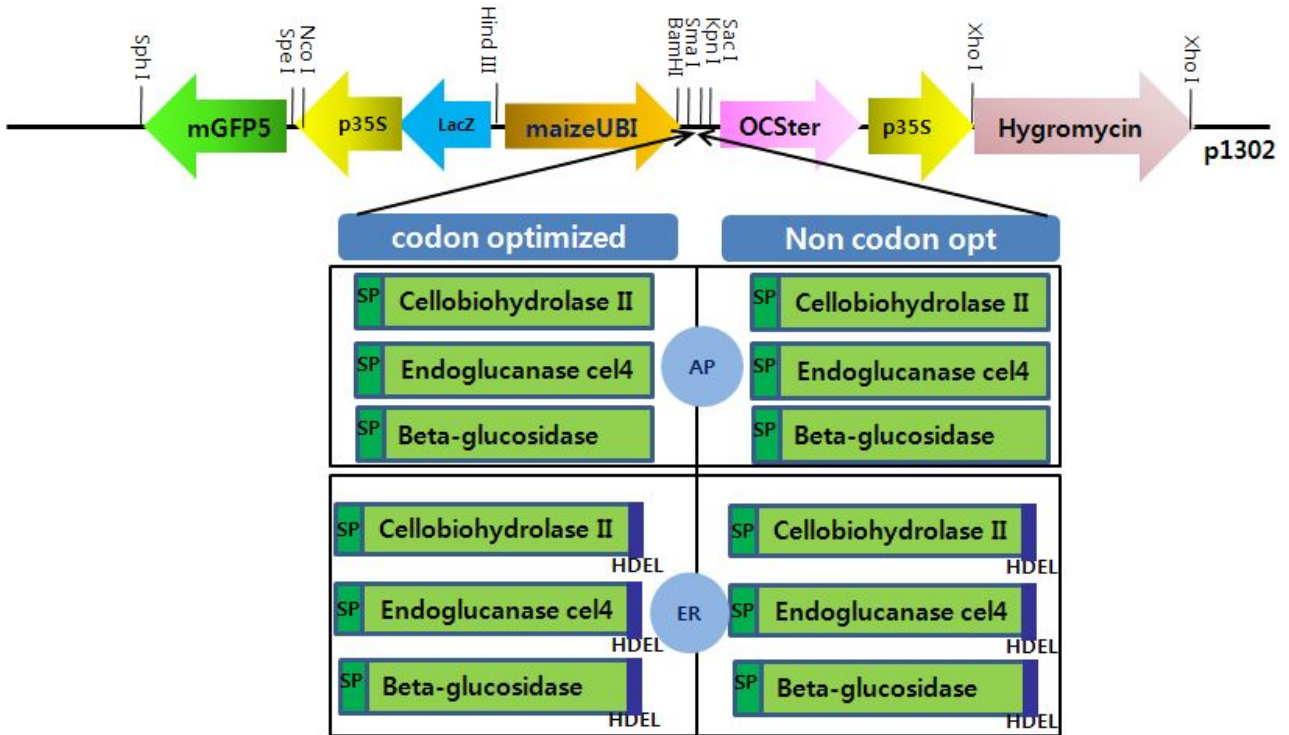


그림 2-15. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 발현용 벡터

#### 나. 유전자 도입 형질전환 벼의 생물학적 특성 분석

##### (1) 건조스트레스에서 과발현되는 유전자가 도입된 형질전환 벼 개발

건조스트레스 유전자 BP432943을 mUbi promoter하에 항시 발현시킨 형질전환 벼를 개발하였다. BP432943의 유식물체를 확보하고 도입 유전자의 유무를 genomic PCR로 확인하였으며 현재 유식물체를 계속해서 확보하고 있다 (그림 2-16). PCR 반응 혼합물은 DNA 200 ng, 10X premixTaq (Gendocs), 10 pmole의 각 프라이머를 포함하였다.. 다음 조건에 따라 증폭되었다: 후-변성으로 5분 동안 95°C의 1사이클; 30초 동안 95°C, 30초 동안 55°C, 1분 동안 72°C의 30사이클; 후-연장 (extension)으로 5분 동안 72°C의 1사이클 PCR을 수행하였다.



그림 2-16. 건조스트레스에 의해 유도되는 유전자가 도입된 형질전환체의 Genomic PCR 검증

(2) 단일 셀룰라제 항시발현 형질전환 벼 개발

셀룰라제 항시발현 형질전환벼를 생산하기 위해서 전년도에 제작한 벡터를 이용하여 벼 핵형질전환을 시도하였다. 벡터는 제1 협동기관으로부터 분양받은 4종의 *Polyporus arcularius* 셀룰라제 유전자 중 *cel2*와 *cel4*의 코돈을 벼의 코돈에 맞게 최적화하였으며, 발현 후 식물 세포내의 소포체 (ER)와 apoplast로 이동하도록 디자인하였다. 각 유전자는 maize ubiquitin 프로모터와 결합시켜 형질전환 벡터를 제작하고 아그로박테리움-매개 침윤법에 따라 동진벼 (*Oryza sativa* L.)로 순차적으로 도입하였다 (표 2-2). 코돈 최적화한 유전자의 경우 'opt', 최적화 하지 않은 유전자의 경우 'ori'로 표기하였으며, 기관 타겟은 소포체의 경우 'ER', Apoplast의 경우 'AP'로 표기하였다. 또한 maize ubiquitin 프로모터에 의해 조절되는  $\beta$ -glucosidase 유전자를 도입한 벡터를 이용하여 형질전환벼를 생산하였다.

단일 셀룰라제 항시발현 형질전환벼는 총 10종류이며, 생산된 선발개체는 genomic PCR, *Agrobacterium* 오염 확인을 통해서 유전자의 도입을 확인하였고, RT-PCR을 통해서 유전자의 발현을 확인하였다. PCR 조건은 다음과 같다. Total RNA는 plant total RNA mini kit (Gendocs)를 사용하여 추출하였으며, 추출한 RNA 1 ug을 cDNA synthesis kit (TaKaRa)로 합성한 후, 후-변성으로 5분 동안 95°C의 1사이클; 30초 동안 95°C, 30초 동안 60°C, 30초 동안 72°C의 30사이클; 후-연장 (extension)으로 5분 동안 72°C의 1사이클 동안 RT-PCR을 수행하였다 (그림 2-17, 18, 19).

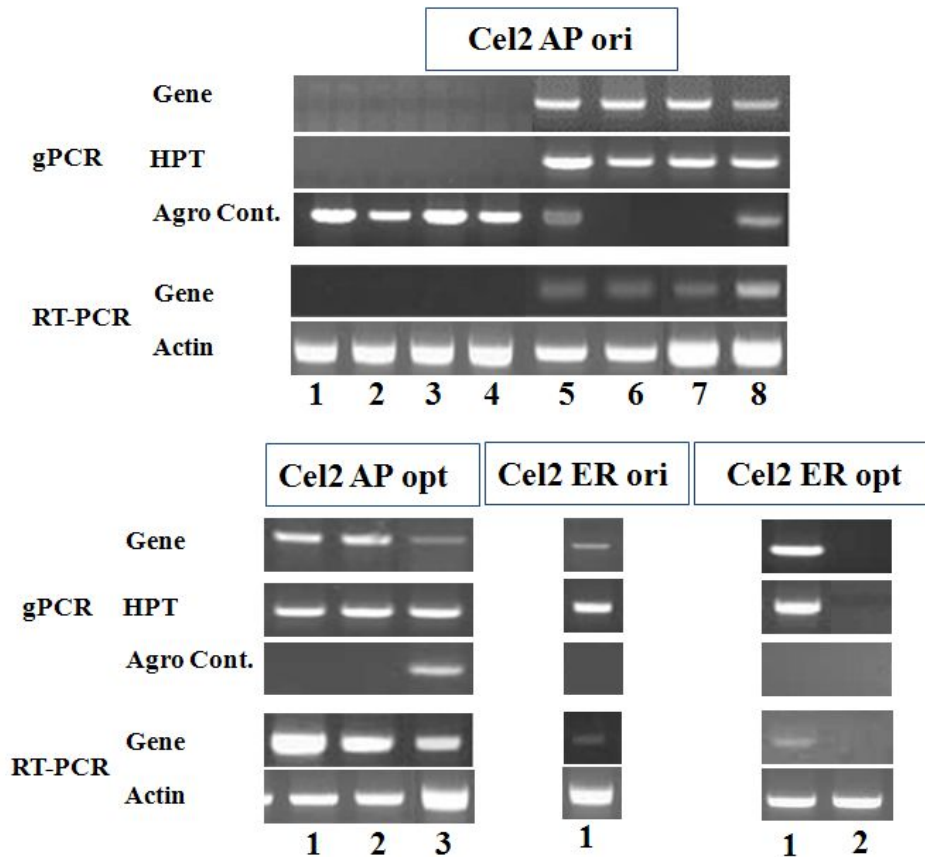


그림 2-17. Exo-glucanase (*cel2*) 유전자가 도입된 형질전환체 분석

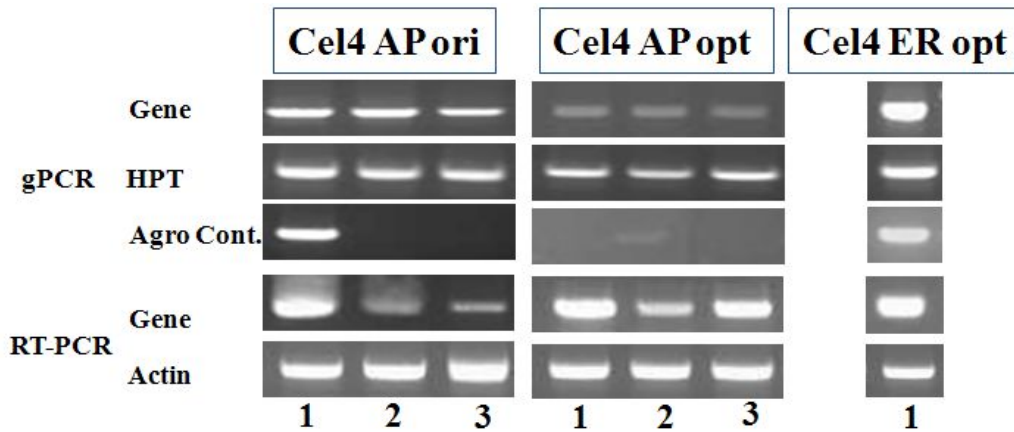


그림 2-18. Endo-glucanase (cel4) 유전자가 도입된 형질전환체 분석

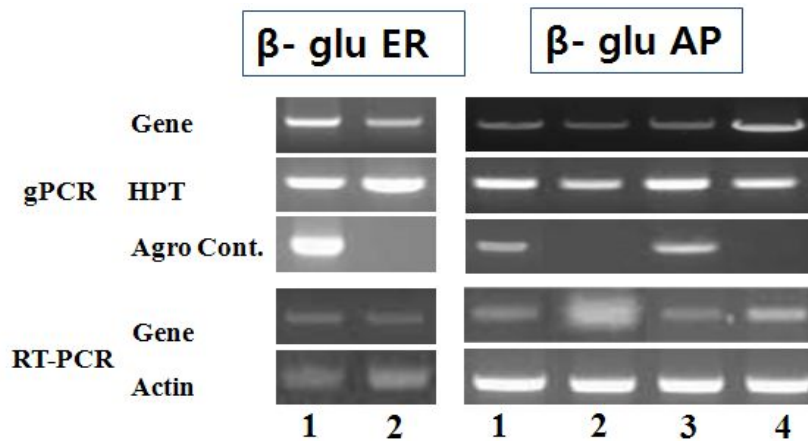


그림 2-19.  $\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 형질전환체 분석

### (3) 복합 셀룰라제 항시발현 형질전환 벼 개발

복합 셀룰라제 발현 형질전환 벼를 생산하기 위해 2개의 서로 다른 셀룰라제 유전자가 도입된 벡터를 제작하였다. cel2, cel4 두 종류의 유전자와  $\beta$ -glucosidase 유전자가 동시에 발현하도록 디자인하였다 (표 2-3, 그림 2-20). 프로모터로는 항시발현하는 CMV (cauliflower mosaic virus), mUbi (maize ubiquitin)을 사용하였고, 타겟기관은 Apoplast로 통일하였다. 아그로박테리움을 매개로 벼 핵형질전환을 시도하여 셀룰라제 유전자가 복합으로 도입된 형질전환체를 생산하였고, 분석을 통해서 유전자 도입을 확인하였다 (그림 2-21).

순화과정을 통해서 확보된 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체 중 cel4 (endo-glucanase) 유전자, 코돈 최적화한 유전자, Apoprast를 타겟 (cel2, cel4)으로 한 개체가 순화 및 생육과정에서 고사되는 경향을 보였다. 특히 cel4 유전자가 도입된 형질전환체의 경우 순화 초기 단계



에서부터 정상적으로 성장하지 못하였으며 줄기와 잎이 단단하지 못하여 생육과정에서 꺾이고, 개체가 도립하지 못하는 특징을 보였다 (그림 2-22, 23). 이러한 이유는 셀룰라제가 Apoplast에서 항시발현이 되므로 식물생장에 영향을 준 것으로 추정한다. 따라서 이러한 현상을 억제하기 위해 타겟 셀룰라제가 건조스트레스 조건 하에서만 발현이 되도록 본 연구에서 개발한 건조스트레스 프로모터를 사용하여 형질전환 벼를 제작하였다.

Promoter	Cellulase gene	Targeting organelle	Promoter	Cellulase gene	Targeting organelle
Maize ubiquitin	cel2	Apoplast	35S	$\beta$ glu	Apoplast
	cel2-codon opt	Apoplast	35S	$\beta$ glu	Apoplast
Maize ubiquitin	cel4	Apoplast	35S	$\beta$ glu	Apoplast
	Cel4-codon opt	Apoplast	35S	$\beta$ glu	Apoplast

표 2-3. 복합 셀룰라제 발현에 사용한 유전자들

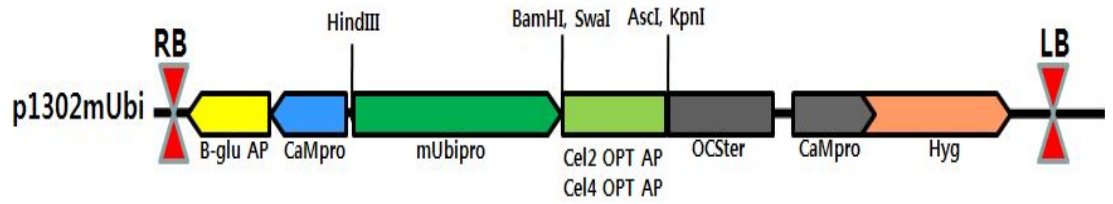


그림 2-20. 복합 셀룰라제 항시발현 벡터

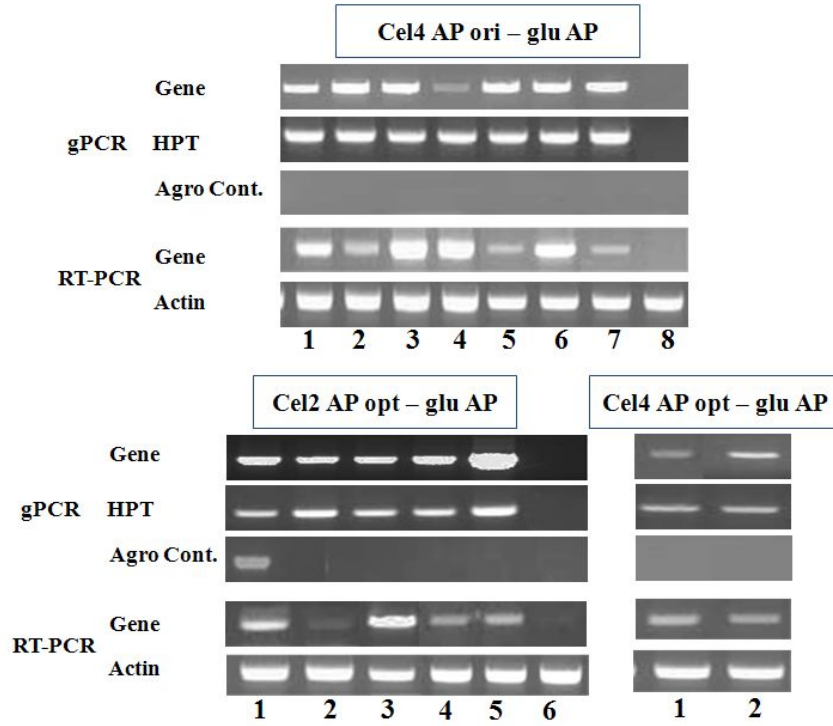


그림 2-21. 복합 셀룰라제 항시발현 형질전환체 분석



그림 2-22. 순화중인 셀룰라제 유전자 도입 형질전환체



그림 2-23. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 표현형

(4) 건조 유도성 프로모터에 의한 단일 및 복합 셀룰라제 발현 형질전환 벼 개발

(가) 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 단일/복합 셀룰라제 벡터제작

건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 단일/복합 셀룰라제 발현벡터를 제작하기 위해 건조 유도성 프로모터인 972 프로모터와 996 프로모터를 선택하였다. 먼저 항시발현 프로모터인 mubi 프로모터로 제작된 단일/복합 셀룰라제 발현벡터를 이용하여 mubi 프로모터 부분을 *Hind*III와 *Bam*HI 효소로 자른 후 972 프로모터를 삽입하여 건조유도성 단일 셀룰라제 발현 벡터를 완성하였고, 이렇게 완성된 단일 셀룰라제 발현 벡터들을 이용하여 CaM pro:: $\beta$ -glu AP 부분을 *Af*III로 자른 후 Klenow를 처리하여 blunt로 만들어 *Hind*III로 자르고, 삽입될 996pro:: $\beta$ -glu AP 도 *Sal*I으로 자른 후 Klenow를 처리하여 blunt로 만들고 *Hind*III를 처리하여 한쪽은 *Hind*III로 다른 한쪽은 blunt로 삽입하여 복합 셀룰라제 발현 벡터를 완성하였다 (표 2-4, 그림 2-24).

Promoter	Cellulase gene	Targeting organelle	Promoter	Cellulase gene	Targeting organelle
Rice 972	cel2-codon opt	Apoplast			
Rice 972	cel2-codon opt	Apoplast	Rice 996	$\beta$ glu	Apoplast
Rice 972	cel4-codon opt	Apoplast			
Rice 972	cel4-codon opt	Apoplast	Rice 996	$\beta$ glu	Apoplast
			Rice 972	$\beta$ glu	Apoplast

표 2-4. 건조유도성 프로모터로 조절되는 단일/복합 셀룰라제 유전자 도입 벡터

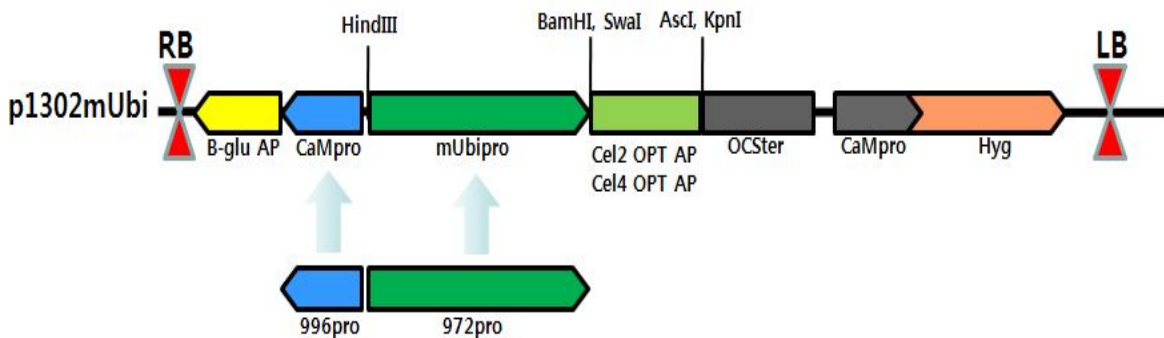


그림 2-24. 건조유도성 프로모터에 복합으로 연결된 셀룰라제 발현 벡터

(나) 건조유도성 프로모터에 의한 단일/복합 셀룰라제 발현 형질전환 벼 생산

건조유도성 프로모터와 셀룰라제 유전자가 도입된 벡터를 벼 형질전환 방법을 통해 식물체 내로 형질전환 하였다. 재분화된 형질전환체는 각 유전자의 프라이머를 이용하여 gnomiic PCR 을 실시한 결과 유전자가 안정적으로 도입 된 것이 확인 되었다 (그림 2-25, 26).

**건조유도성 프로모터 :: 단일 셀룰라제 도입**

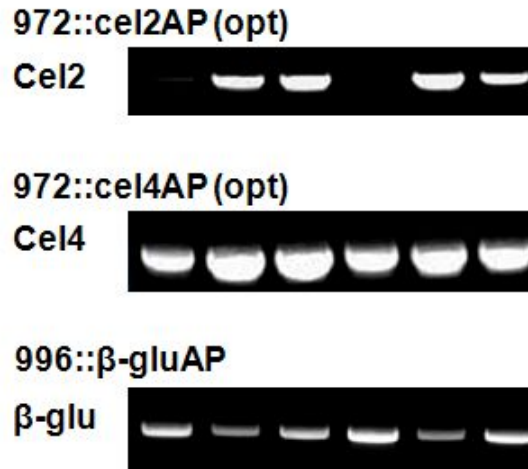


그림 2-25. 건조유도성 프로모터 단일 형질전환체 유전자 도입 분석

**건조유도성 프로모터 :: 복합 셀룰라제 도입**

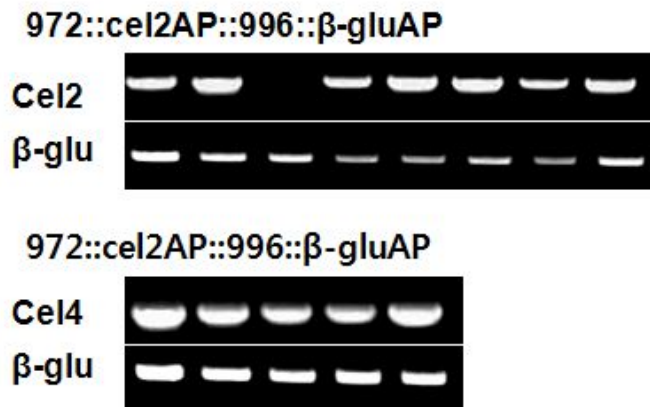


그림 2-26. 건조유도성 프로모터 복합 형질전환체 유전자 도입 분석

5. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 구조적 특성 분석

가. 셀룰라제 유전자가 도입 식물체 생육

핵형질전환을 통해 생산된 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체를 메탈램프에 의해 빛이 조절되는 성장실에서 생육시켰다 (그림 2-27). 생산된 형질전환체는 총 19종류이며 셀룰라제 종류 (cel 2, cel 4, β-glucosidase), 프로모터 종류 (항시발현, 건조스트레스 유도성)에 따라 분류할 수 있다 (표 2-5)

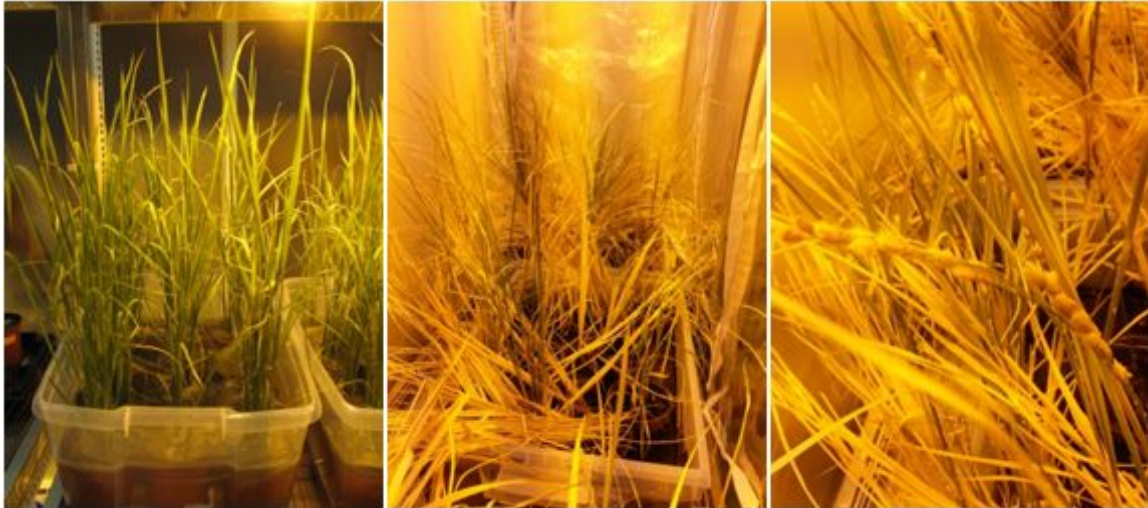


그림 2-27. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼 생육

프로모터 종류	삽입 유전자
mubi (항시발현)	GFP (control)
	cel2 AP ori
	cel2 ER ori
	cel2 AP opt
	cel2 ER opt
	cel4 AP ori
	cel4 ER ori
	cel4 AP opt
	cel4 ER opt
	beta-glu- ER
	beta-glu- AP
	cel2(AP) ori- glu(AP)
	cel2(AP) opt - glu(AP)
	cel4(AP) ori - glu(AP)
	cel4(AP) opt - glu(AP)
건조유도성프로모터	972::cel2(AP) opt
	972::cel4(AP) opt
	972::beta - glu(AP)
	972::cel2(AP) opt :: 996::glu(AP)
	972::cel4(AP) opt :: 996::glu(AP)

표 2-5. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼

나. 셀룰라제 유전자 도입 식물체의 구조적 특징 분석

생장실에서 생육한 셀룰라제 유전자 도입 형질전환벼의 특성을 분석하기 위해서 전자현미경하에서 관찰을 시도하였다. SEM 분석을 위해서는 확보된 시료를 건조 후 절단하여 준비하

였으며, TEM 분석을 위해서는 생육중 인 잎을 사방 1 mm 크기로 절단하여 고정액 (2.5% gluta aldehyde)에 침지 후 전처리하여 관찰하였다.

(1) SEM 분석

단일/복합 셀룰라제유전자가 도입된 형질전환 벼 잎 표면의 구조적 변화를 관찰하기 위해서 전자현미경 (SEM)하에서 관찰하였다.

(가) Exoglucanase (cel2) 도입 형질전환체 분석

항시발현 프로모터에 의해서 조절되는 exoglucanase 유전자가 도입된 벼 (T0)의 잎 표면을 관찰한 결과는 아래 그림 2-28과 같다. 셀룰라제 유전자를 벼에 맞게 gene optimization 한 경우 거치가 발달한 것을 확인할 수 있었다. 잎 표면의 세포 구조 및 배열을 wild type와 큰 차이를 나타내지는 않았다.

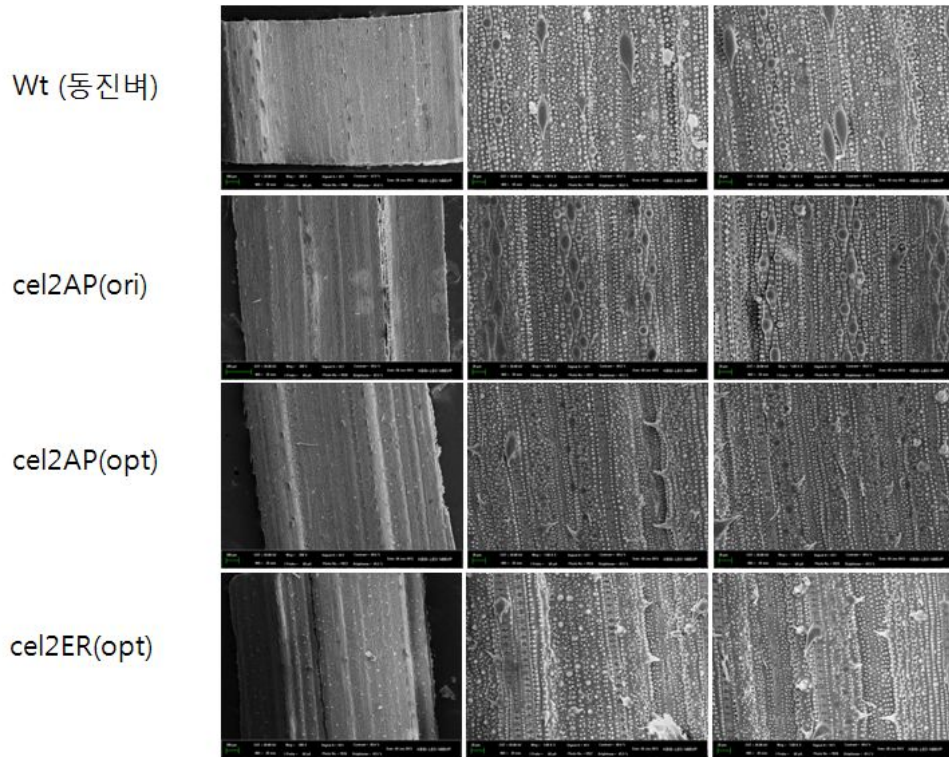


그림 2-28. Exoglucanase (cel2) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 SEM 분석

(나)  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -glu) 도입 형질전환체 분석

$\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 형질전환 벼의 잎 표면을 관찰한 결과 단백질이 소포체에 서 발현된 경우 ( $\beta$ -glu ER) 표면에 거치가 발생한 것을 확인하였다 (그림 2-29). 그 외 잎을 구성하는 세포의 크기나 배열의 이상은 관찰 할 수 없었다.

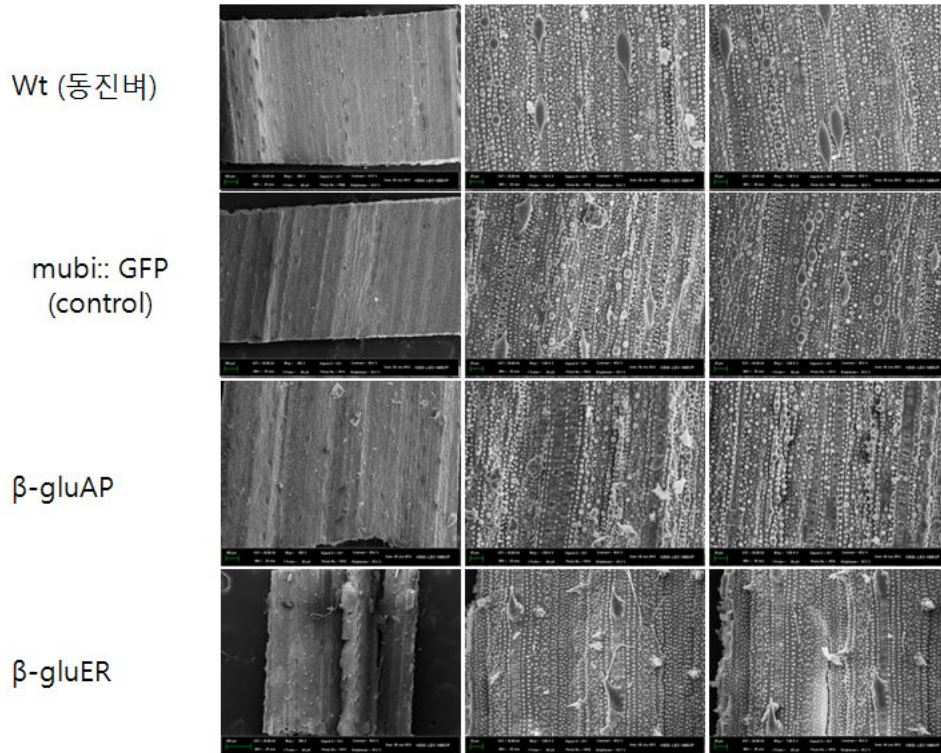


그림 2-29.  $\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 벼 형질전환체 SEM 분석

(다) Exoglucanase와 Endoglucanase 도입 형질전환체 비교 분석

단일 셀룰라제 도입 형질전환체 중 exoglucanase와 endoglucanase가 도입된 형질전환체의 구조적 차이를 비교하였다. 그결과 endoglucanase (cel4) 유전자가 소포체 (ER)에서 발현된 경우 표면이 매끄럽고 거치가 발생하지 않은 것을 확인할 수 있었다 (그림 2-30). 또한 endoglucanase가 발현된 식물체에서는 표면 돌기의 크기가 작았고 그것들의 간격이 좁은 것을 관찰하였다.

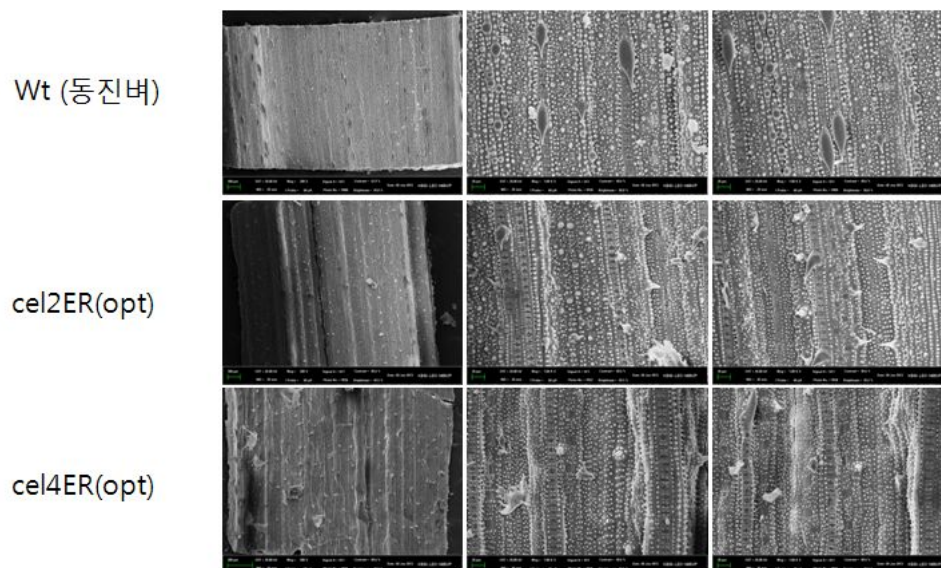


그림 2-30. Exo, Endo-glucanase (cel2, cel4) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 SEM 분석

(라) 건조스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환체 분석

건조 스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 유전자가 단일, 복합으로 도입된 형질전환체의 조직 표면을 관찰한 결과이다 (그림 2-31). Wild type에 비해서 돌기의 크기가 작았으며 돌기들 사이의 간격은 좁아져 있었다. endoglucanase를 도입한 형질전환체여서인지 거치는 발달하지 않았다.

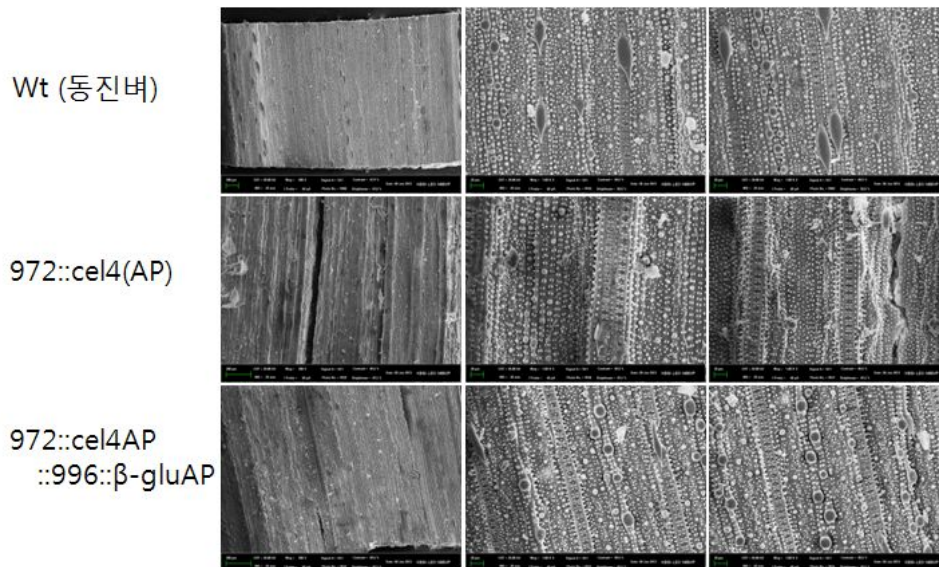


그림 2-31. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 Endoglucanase (cel4) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 SEM 분석

셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 잎 표면은 Wild type에 비해 돌기와 거치가 발생하지 않은 매끄러운 표면이고, 조직이 치밀하지 않게 이루어져 있을 것이라 예상하였으나 SEM 분석을 실시한 결과 예상했던 결과를 얻지는 못했다. 세포간극과 세포벽의 구조는 다음 TEM 관찰을 통해서 분석하였다.

(2) TEM 분석

셀룰라제 유전자가 도입된 식물체의 세포벽은 그림 2-32와 같다. 그림에서와 같이 셀룰라제 유전자가 도입된 식물체의 세포벽은 1차벽의 구조가 치밀하지 못하고 2차벽 또는 중엽과 결합된 상태일 것이라 예상되었다. 단일/복합 셀룰라제가 도입된 식물체 세포벽의 구조적 차이는 아래와 같다.



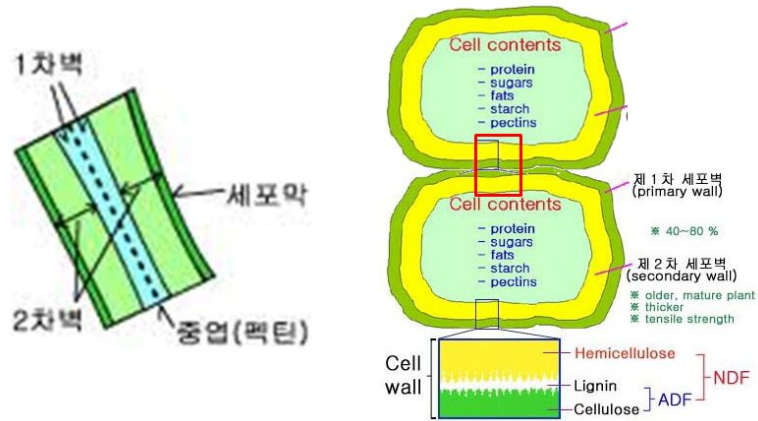


그림 2-32. 식물 세포벽 구조

(가) Exoglucanase (cel2) 도입 형질전환체 분석

셀룰로스의 외부에서부터 분해하는 exoglucanase (cel2) 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 구조적 차이는 그림 2-33과 같다. Wild thpe의 경우 세포벽의 구조가 단단하고 중엽을 관찰 할 수 있었던 반면 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 경우에는 중엽의 관찰이 어렵고 세포벽의 조직이 치밀하지 않음을 확인할 수 있었다. 벼에 맞게 codon optimization을 실시한 유전자를 삽입한 식물체인 cel2AP(OPT)의 경우 세포벽이 전체적으로 얇고 중엽이 발달하지 않은 것을 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 이와같은 현상은 단백질 발현 기관에 따른 차이는 크지 않았다.

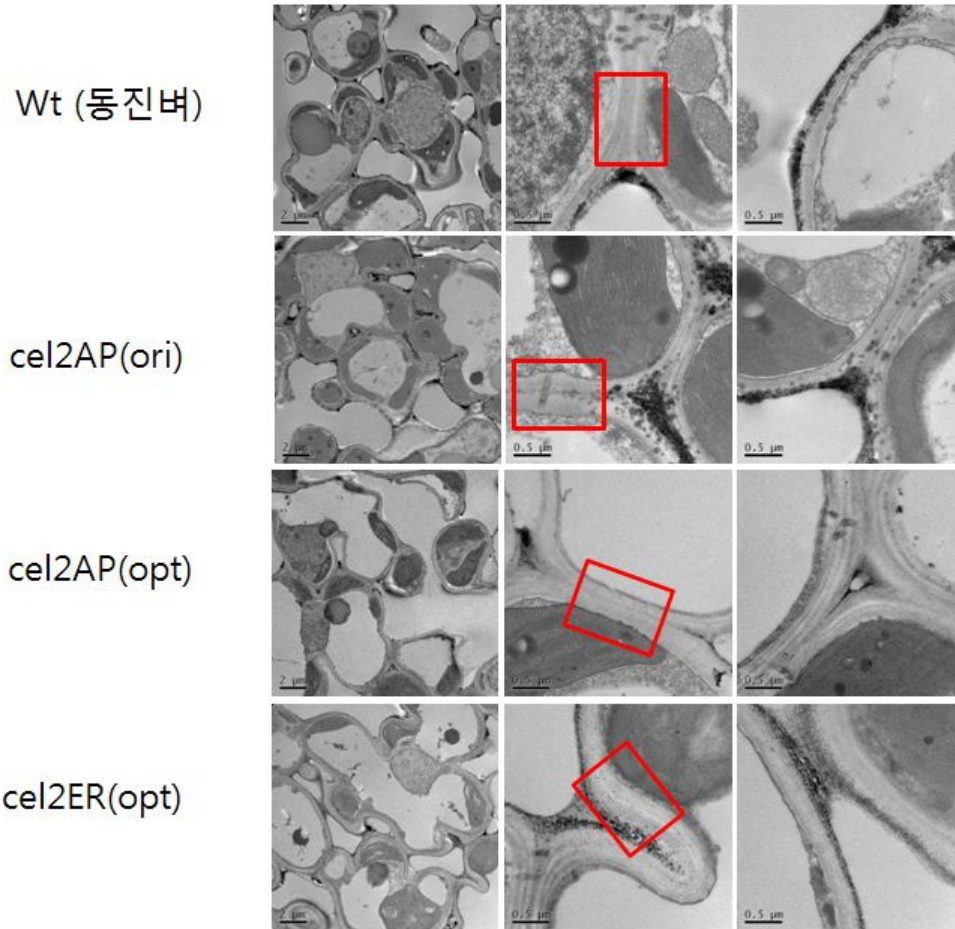


그림 2-33. Exoglucanase (cel2) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 TEM 분석

(나)  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -glu) 도입 형질전환체 분석

$\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 형질전환 벼의 세포벽의 구조를 관찰한 결과 Wild type 및 타형질전환체에 비해서 세포벽 구조가 많이 손상되어 있음을 확인할 수 있다 (그림 2-34). Wild type과 형질전환체와 비교하면 그 차이는 뚜렷하다. 특히 Apoplast 타겟 식물체일 경우에는 조직이 매우 느슨한 것이 관찰됨에 따라 셀룰라제 유전자가 정상적으로 발현하여 셀룰로즈 층의 결합이 치밀하지 않은 것으로 나타났다.

조직의 치밀함 정도를 비교한 결과  $\beta$ -glucosidase 유전자의 경우에는 ER (소포체) 보다는 Apoplast에 단백질을 발현한 경우 발현량이 높은 것으로 생각된다.

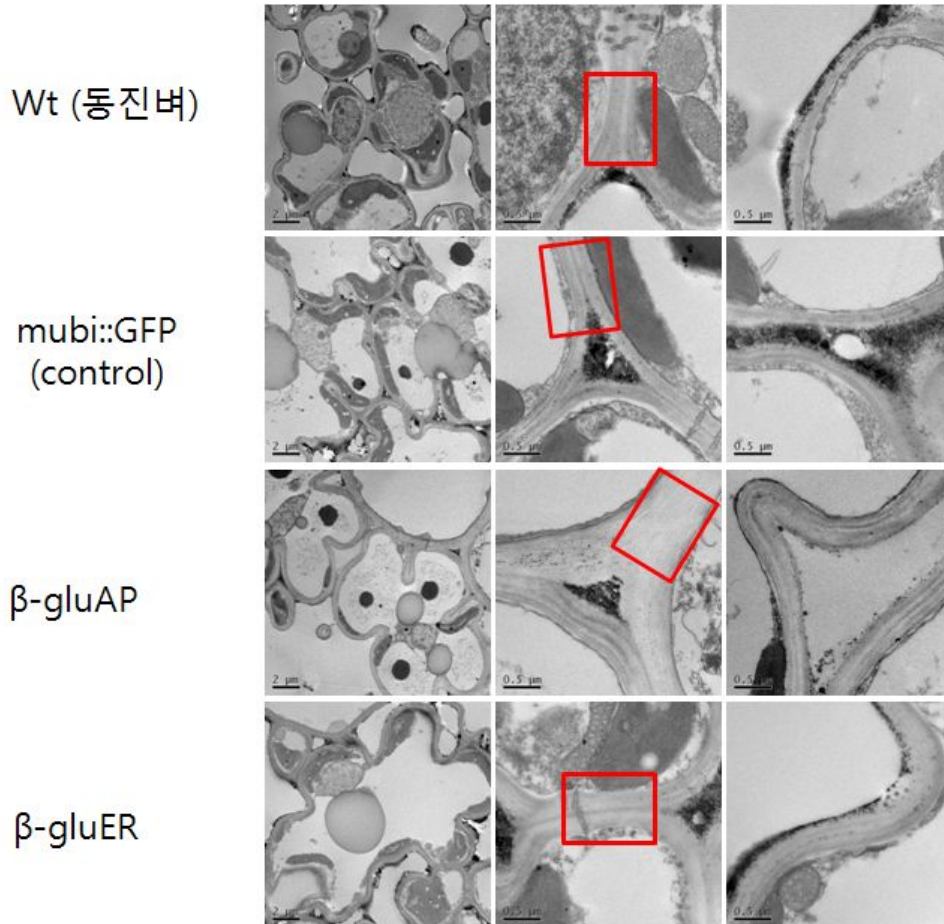


그림 2-34.  $\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 벼 형질전환체 TEM 분석

(다) Exoglucanase와 Endoglucanase 도입 형질전환체 비교 분석

cel2 유전자와 cel4 유전자가 도입된 형질전환체의 세포벽의 구조를 비교한 결과이다. cel2 유전자를 도입한 경우 1차벽의 경계가 흐려지고는 경향이 매우 높았다 (그림 2-35). cel4 유전자를 도입한 식물체의 세포벽이 치밀하지 못할 것으로 예상하였으나 각 유전자가 도입된 형질전환체 1개체씩을 관찰한 결과는 예상과 달랐다. 추후 계속된 연구를 통해서 여러 line 및 생육이 왕성한 형질전환체를 선발하여 관찰 하여 경향을 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.

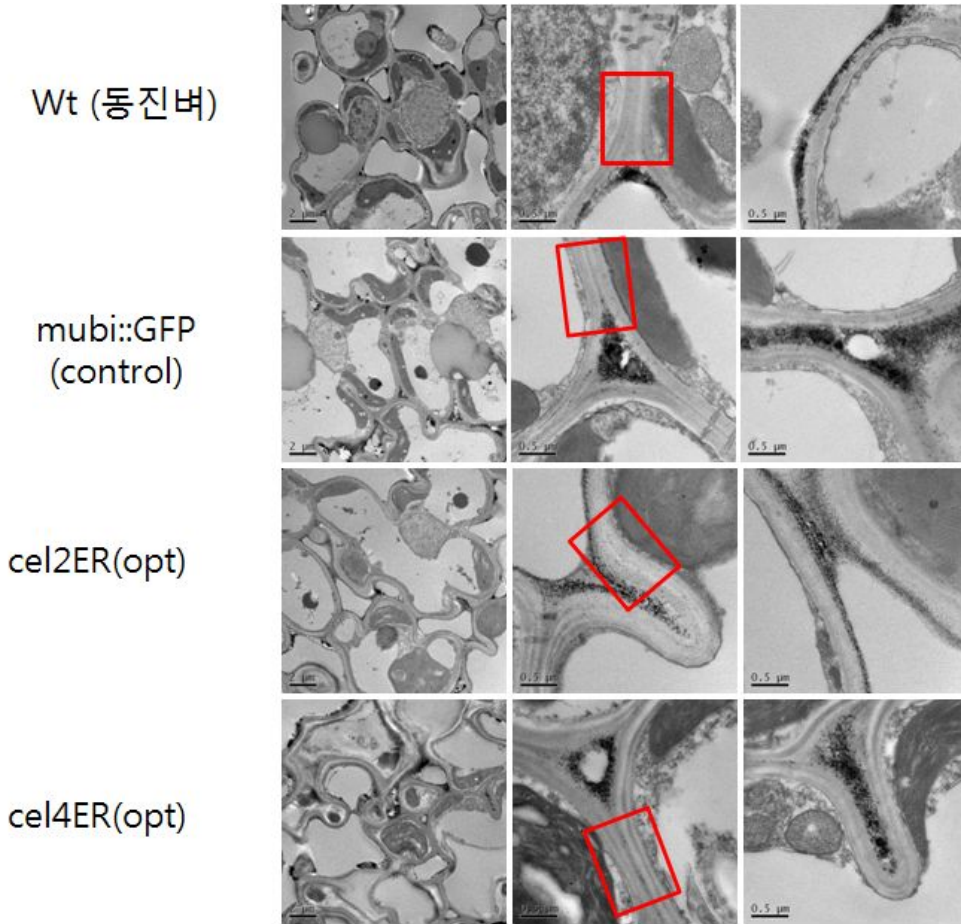


그림 2-35. Exo, Endo-glucanase (cel2, cel4) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 TEM 분석

(라) 건조스트레스 유도성 프로모터가 도입된 형질전환체 분석

셀룰라제 유전자가 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 형질전환체의 구조적 특성을 파악하였다 (그림 2-36). 두 개의 유전자가 복합으로 도입된 형질전환체의 경우 Wild type와 동일향 경향을 나타내었다. 이는 관찰한 시료가 건조시키지 않은 잎이기 때문에 유전자의 발현이 정상적으로 일어나지 않아서 인 것으로 생각되어진다. 추후 연구를 통해서 건조스트레스를 처리한 시료와 그렇지 않은 시료의 TEM 관찰을 통한 정확한 분석이 필요하다.

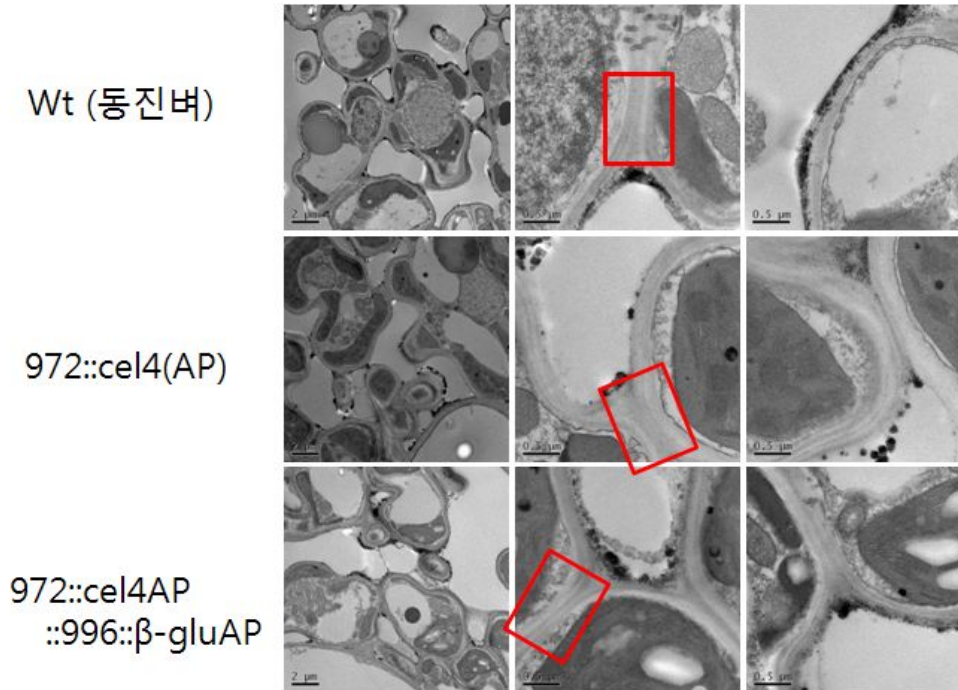


그림 2-36. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 Endoglucanase (cel4) 유전자가 도입된 벼 형질전환체 TEM 분석

## 6. 벼, 억새, 갈대의 화학적 분석

### 가. 벼, 억새, 갈대의 최적 전처리 조건 탐색

효소를 이용한 당화과정의 최적화를 위해 Alkali (NaOH)용매를 사용하여 바이오매스 (갈대, 억새)의 전처리연구를 수행하였다. 우선 과제에서 모델바이오매스로 선정된 갈대와 억새를 각각 대전지역 인근 산에 서식하는 억새와 하천과 강 주변에 분포한 갈대를 수집하여 연구에 사용하였다.

각각의 바이오매스는 상온상태로 건조 후 14 Mesh 이하로 분쇄 후 실험에 사용하였다. 전처리 실험을 위해 반응기는 고온고압 반응기 (용량 1 L)를 사용하였고, 고체시료 (갈대, 억새) 100 g 에 용매 (1% NaOH) 900 ml를 투입하여 반응온도 121°C 1시간 반응, 150 RPM 으로 전처리 실험을 진행하였다. 반응 후 반응액의 pH를 4.8로 조절한 뒤 고체와 액체를 여과를 통해 분리하고 반응 후 남은 고체샘플은 Dry oven에서 12시간 이상 건조하였다. 전처리 전후 샘플의 성분변화를 살펴 보기위해 전처리 전후 고체 샘플의 성분분석을 진행 하였다. 성분분석은 Carbohydrate 분석과 lignin 분석 Ash 분석을 진행하였다. Carbohydrate 분석은 먼저 Carbohydrate분석을 위해 준비된 전처리 전후 시료 0.3±0.01 g을 정확히 취하여 20 ml test tube에 넣고 72%황산 3 mL를 주입한 다음 15-20분 간격으로 저어주면서 2시간 동안 30°C의 shaking incubator 에서 반응시켰다. 2시간 후 84 ml의 증류수와 함께 용량 100 ml의 삼각플라스크에 가하여 산 농도를 4%로 낮춘 후 autoclave 에서 121°C, 60분간 반응시켰다.

Lignin 및 Ash분석은 샘플 2 g을 100 ml 유리시험관에 넣고 72% 황산 30 ml를 주입하여

2시간 동안 30℃ shaking incubator에서 반응시킨 후 1 L 플라스크에 560 ml 의 증류수를 첨가한 후 4시간 동안 환류 냉각하여 잔류 당을 추출한 다음, 105℃에서 12시간 건조 후 무게를 측정하여 리그닌 함량을 결정하였다. Ash함량은 Lignin성분 분석 후 잔류한 고체를 575 ℃의 전기로에서 4시간 이상 회화시킨 후 남은 양의 무게를 계산하여 측정하였다.

갈대와 억새의 전처리 전후 구성성분을 조사하기 위해, Alkali (NaOH)용매를 이용하여 전처리 실험을 진행한 결과 바이오매스 구성성분 중 Lignin성분과 Ash성분이 감소하였다. 억새전처리 결과 전처리 전 100 g바이오매스에서 전처리 후 약 35 g이 액상으로 용해되었다. Lignin성분 25%중 약 15%의 lignin이 감소하였고 Ash 경우 전체 1.7%중 1.57%의 Ash가 감소하였다. 갈대의 전처리 결과 전처리 전 100 g 바이오매스가 전처리 후 약 43 g이 액상으로 용해되었다. Lignin성분 32.6%중 약 20%의 Lignin이 감소하였고 Ash 경우 전체 7.4%중 약 5%의 Ash가 감소하였다 (표 2-6).

억새	Weight(g)	Soild(g)					Total weight(g)
		Glucan	Xylan	Lignin	Ash	Total	
Untreated	100	38.1	17.42	24.8	1.7	82.02	82.02
After treated	66.46	36.28	14.88	10.76	0.13	62.05	62.05
Treated(%)	100%	54.60%	22.39%	16.20%	0.20%	93.39%	

갈대	Weight(g)	Soild(g)					Total weight(g)
		Glucan	Xylan	Lignin	Ash	Total	
Untreated	100	31.82	14.3	32.6	7.4	86.12	86.12
After treated	57.16	27.49	10.31	12.57	2.36	52.73	52.73
Treated(%)	100%	48.10%	18.04%	22.00%	4.13%	92.27%	

표 2-6. 억새와 갈대의 전처리 전, 후의 구성성분 조사

전처리 전후의 샘플들의 효소당화 Test를 위해 Celluclast1.5L 과 β-glucosidase를 각각 Novozyme에서 구입 후 사용하였다. 전처리 전 후 각 기질의 양은 Glucan base 1 g 량으로 계산하여 주입하였고, Buffer는 Citric acid buffer 를 사용하여 pH4.8로 조절하여 고액비 1:100으로 당화실험을 진행하였다. 효소 당화 온도는 50℃로 조절하고 Shaking RPM은 150으로 설정하였다. 효소 당화 전 모든 바이오매스는 121℃, 1bar에서 1hr autoclave 시킨 후 실험을 진행하였다.

억새의 효소당화 실험결과 전처리 전 샘플은 당화율이 20%이하인 반면에 전처리 후 샘플은 95%이상의 효소당화율을 나타냈다. 또한 갈대의 경우 전처리 전 효소당화율이 22%이하 결과를 나타냈지만 전처리 후 갈대의 효소당화율은 80%이상으로 증가했음을 알 수 있었다.

실험은 72시간 동안 진행되었으며 각 샘플은 9번에 걸쳐 (0, 3, 15, 24, 36, 48, 72 시간) 샘플링을 진행하였다. 샘플링을 마친 샘플들은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 그림 2-37, 38과 같이 Alkali (NaOH) 전처리된 갈대, 억새 샘플은 72시간 까지 지속적으로 ED (Enzymatic Digestibility)값의 증가를 나타냈지만 전처리하지 않은 갈대, 억새 샘플의 경우 ED값이 현저히 낮았다. Alkali (NaOH) 전처리 공정으로 전 처리한 갈대, 억새 샘플이 전 처리 하지 않은 갈대, 억새 샘플보다 4배가량 높은 ED값을 나타냈다. 이러한 효소당화실험의 결과는 Alkali (NaOH) 전처리를 통한 갈대, 억새 샘플의 Lignin이 분리되고 이를 통해 바이오매스 내의 효소 흡착이 가능한 셀룰로오스 표면적이 증가하였음을 보여준다.

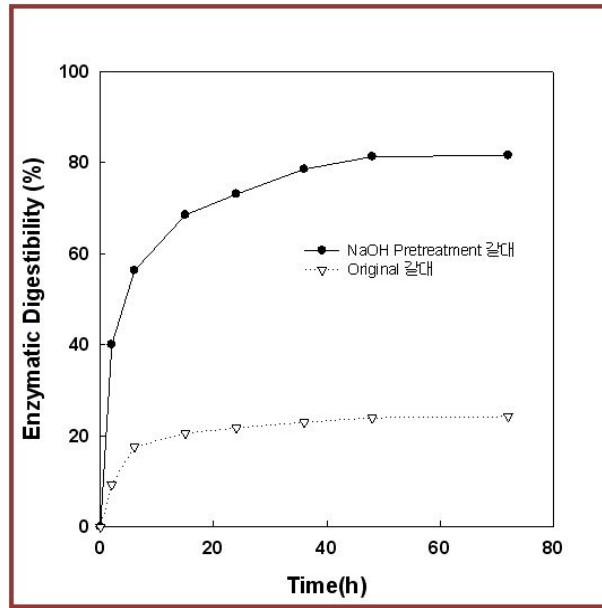


그림 2-37. 억새의 전처리 전, 후 효소당화 조사

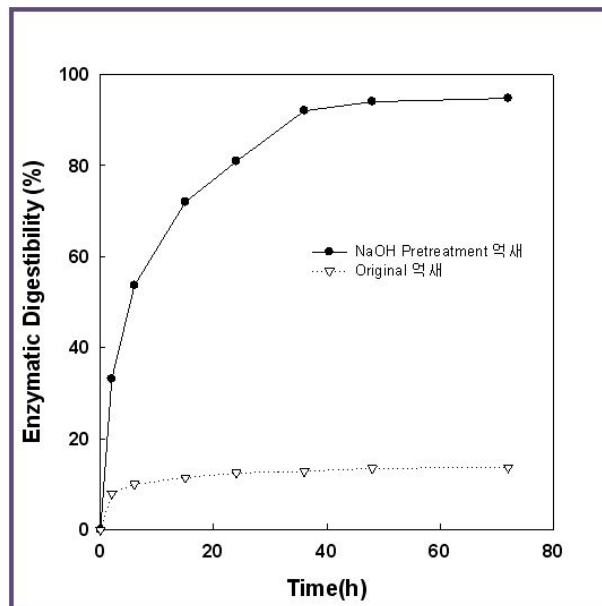


그림 2-38. 갈대의 전처리 전, 후 효소당화 조사

나. 벼, 억새, 갈대의 최적 전처리 조건 탐색

전처리 전후의 샘플들의 효소당화 Test를 위해 Celluclast 1.5 L 과  $\beta$ -glucosidase를 각각 Novozyme에서 구입 후 사용하였다. 전처리 전 후 각 기질의 양은 Glucan base 1 g 량으로 계산하여 주입하였고, Buffer는 Citric acid buffer 를 사용하여 pH4.8로 조절하여 고액비 1:100으로 당화실험을 진행하였다. 효소 당화 온도는 50°C로 조절하고 Shaking RPM은 150으로 설정하였다. 효소 당화 전 모든 바이오매스는 121°C, 1bar에서 1hr autoclave 시킨 후 실험을 진행하였다.

(1) 묽은 황산을 이용한 전처리

Acid계 용매는 물리화학적 전처리 방법을 통해 Lignicellulose계 바이오매스 구성성분중 약 30%를 차지하는 Hemicellulose 성분을 5탄당인 Xylose로 fractionation 시키는데 효과적인 촉매역할을 한다. 본 실험에는 Acid계 용매 중 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 최적의 물리화학적 묽은 황산 전처리 조건을 확립하기위한 벼, 갈대, 억새 바이오매스의 물리화학적 조건별 전처리 실험을 진행하였다.

묽은 황산을 이용한 갈대, 억새, 벼 시료의 전처리에서 반응기는 SUS316재질의 길이 18 cm 내경 1 cm의 bomb tube 반응기를 사용하고, 시료는 0.5±0.01 g을 충전하고 묽은 황산 용액 7.0±0.1 ml을 가하여 전체 고 액비 1:15의 상태로 전처리 반응을 진행하였다. 반응 후에 갈대, 억새, 벼 시료의 전처리 가수분해물로부터 분별되어 나온 액체를 회수해서 Xylose 농도를 분석 하여 묽은 황산을 이용한 갈대, 억새, 벼 시료의 묽은황산 전처리효과를 비교하였다. Xylose 분별 전의 갈대, 억새, 벼 Xylose 함량과 비교하여 Xylose수율을 결정 하였다. 전처리 반응조건은 온도 130°C, 150°C, 170°C 시간 5 min, 10 min, 20 min, 30 min 황산농도 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%으로 실험을 진행하였다.



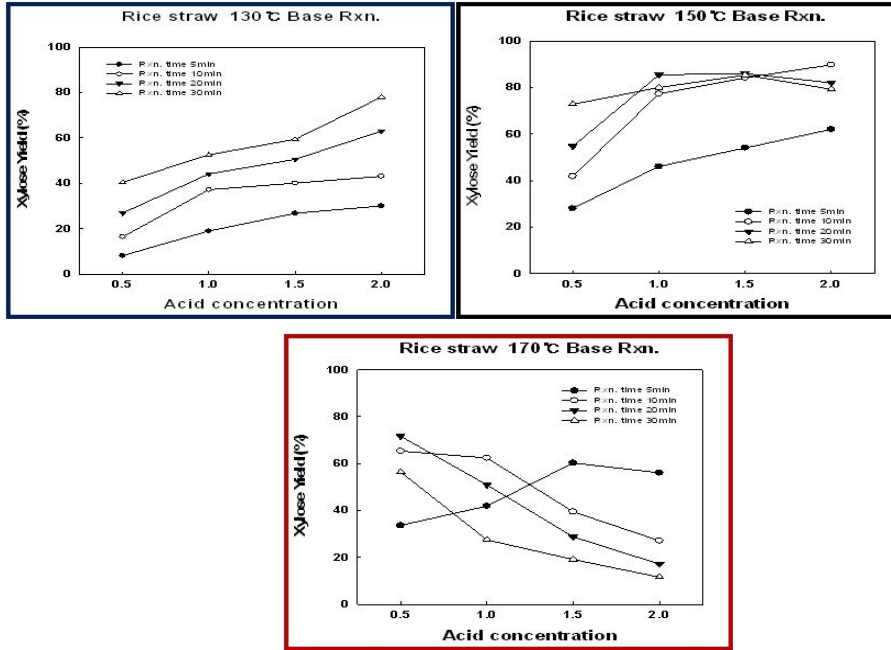


그림 2-39. 볏짚 조건별 황산 전처리 결과

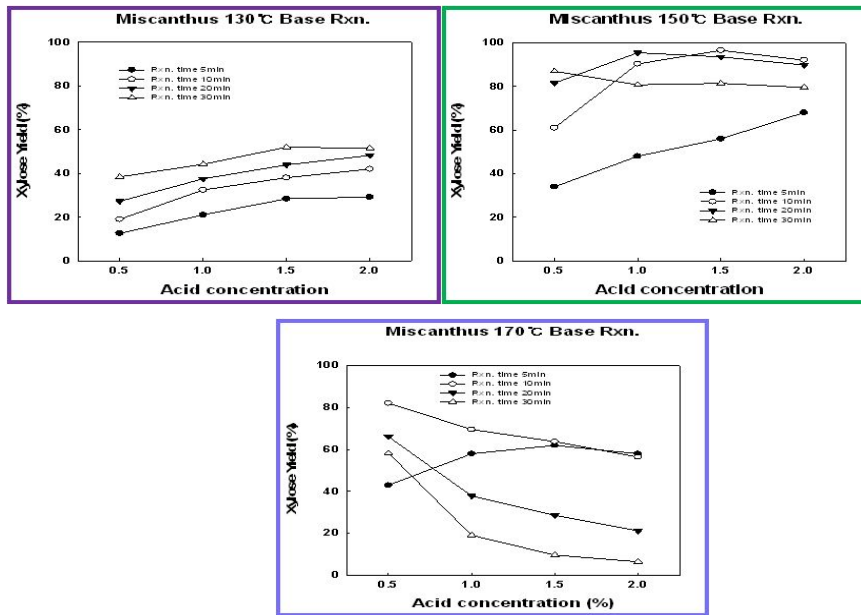


그림 2-40. 억새 조건별 황산 전처리 결과

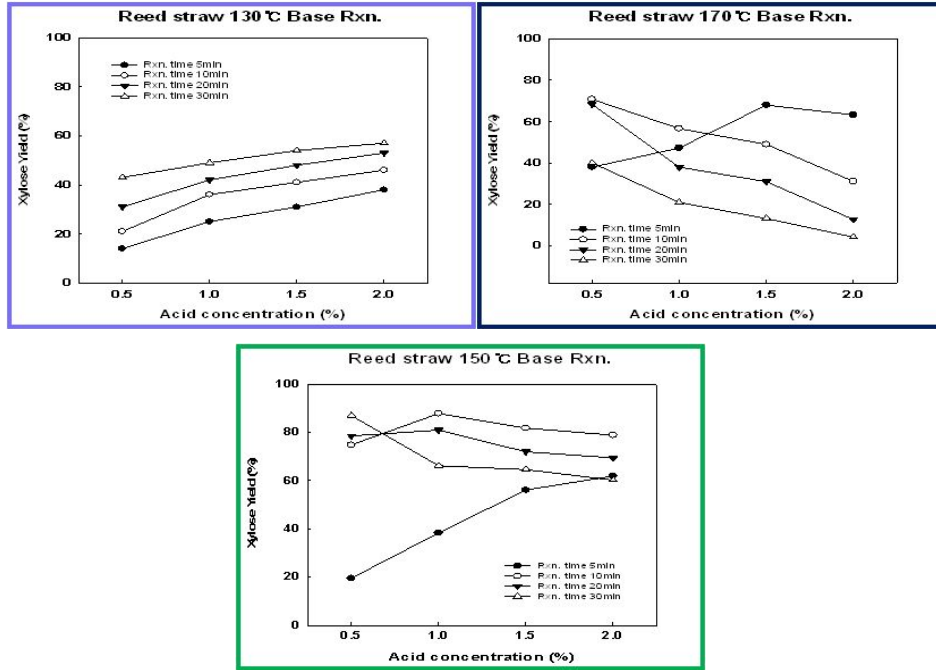


그림 2-41. 갈대 조건별 황산 전처리 결과

위 결과에서 보이듯이 반응 조건별로 Xylose의 수율이 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 전처리 실험상 바이오매스별 최적의 조건과 Xylose의 수율은 표 2-7에 나타내었다.

Biomass	Optimize Conditions			Xylose yield (%)
	Temp.(°C)	Time(min)	Conc.(%)	
벼짚	150	10	2	90
갈대	150	30	0.5	88
억새	150	10	1.5	96

표 2-7. 바이오매스별 최적의 조건 및 Xylose 수율

유사하게도 각각의 바이오매스의 최적전처리 조건에서 반응시간과 산농도는 다르게 나타났으나 온도조건은 150°C로 동일하게 나타났다. 이는 150°C에서 푼은 황산을 이용한 전처리를 진행시 가장 최적의 온도 조건임을 알 수 있게 한다. 170°C이상의 온도, 높은 시간, 높은 산농도에서 Xylose 수율이 낮게 나타나는 것은 Xylose 분별공정에서의 높은 온도와 산의 영향을 통해 Furfural, 5-HMF, 유기산 등의 과분해물로 전환된 것으로 사료된다 (그림 2-39, 40, 41).

(2) NaOH을 이용한 물리화학적전처리

Alkali계 용매는 물리화학적 전처리 방법을 통해 Lignocellulose계 바이오매스 구성성분중

약 30%를 차지하는 Lignin성분을 제거하는데 효과적인 촉매역할을 한다. 본 실험에는 Alkali성 용매 중 NaOH를 이용하여 최적의 물리화학적 NaOH전처리 조건을 확립하기위한 볏짚, 갈대, 억새 바이오매스의 물리화학적 조건별 전처리 실험을 진행하였다. NaOH를 이용한 갈대, 억새, 볏짚 시료의 전처리에서 반응기는 SUS316재질의 길이 18 cm 내경 1 cm의 bomb tube 반응기를 사용하고, 시료는  $0.5 \pm 0.01$  g을 충전하고 NaOH용액  $7.0 \pm 0.1$  ml을 가하여 전체 고액비 1:15의 상태로 전처리 반응을 진행하였다. 반응 후에 갈대, 억새, 볏짚 시료의 성분분석을 통해서 전처리 후 남아있는 Cellulose의 함량과 줄어든 Lignin의 함량을 비교하여 최적조건을 결정하였다. 전처리 반응조건은 온도 130°C, 150°C, 170°C 시간 5 min, 10 min, 20 min, 30 min NaOH농도 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%으로 실험을 진행하였다.

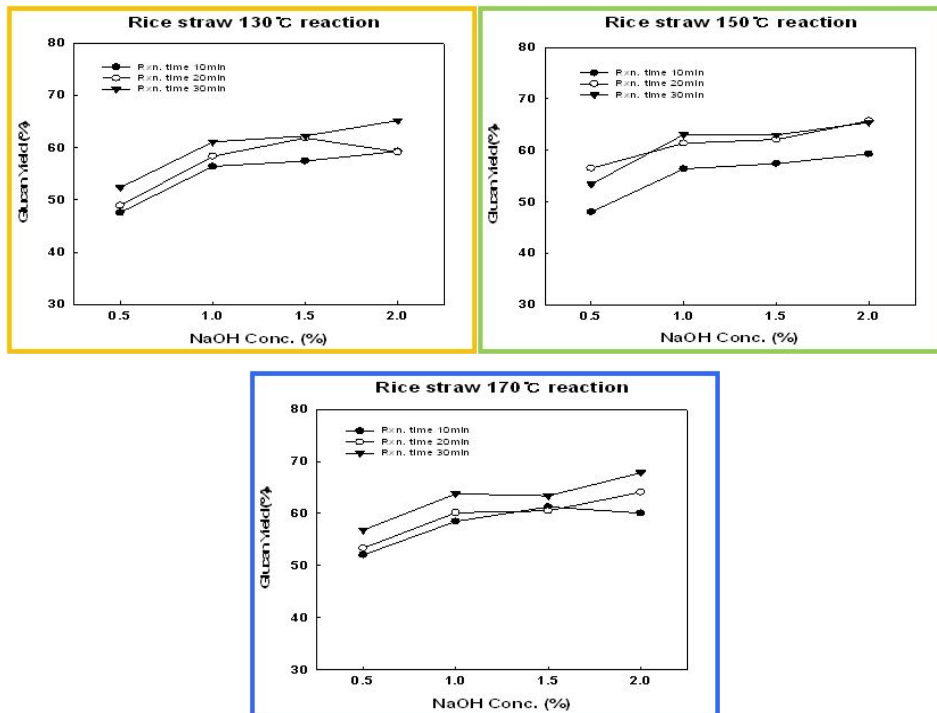


그림 2-42. 볏짚 조건별 NaOH 전처리 결과

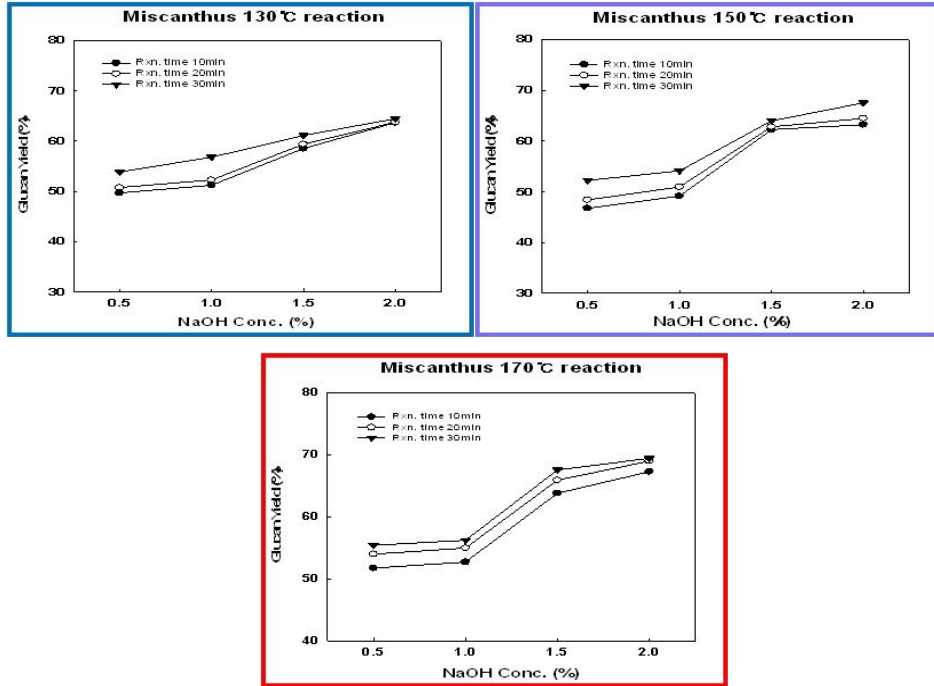


그림 2-43. 억새 조건별 NaOH 전처리 결과

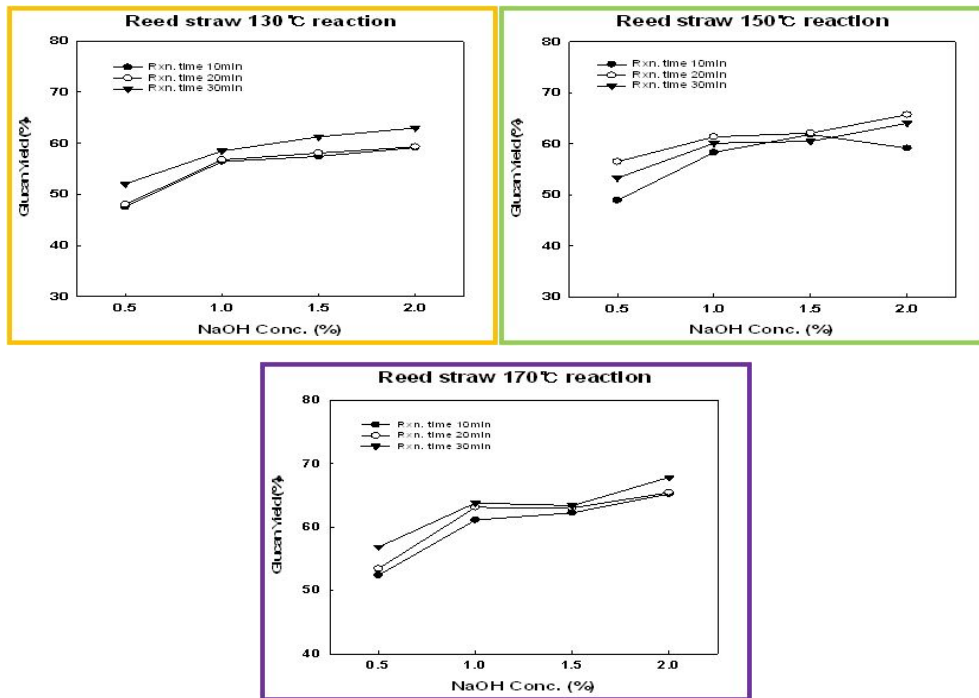


그림 2-44. 갈대 조건별 NaOH 전처리 결과

위 결과에서 보이듯이 반응 조건별로 Glucose의 수율이 차이가 나는 것을 알 수 있다. 전처리 실험상 바이오매스별 최적의 조건에서의 Glucose의 함량과 Lignin의 감소량은 표 2-8에 나타내었다 (그림 2-42, 43, 44).

Biomass	Optimize Conditions			Glucan yield		Lignin yield	
	Temp.(°C)	Time(min)	Conc.(%)	Before pretreated(%)	After pretreated(%)	Before pretreated(%)	After pretreated(%)
벗짚	170	30	2.0	36.8	68.74	38.6	2.1
갈대	170	30	2.0	31.8	66.78	32.6	2.8
억새	170	30	2.0	38.1	69.43	24.8	0.93

표 2-8. 바이오매스별 최적의 조건에서의 Glucose의 함량과 Lignin의 감소량

본 실험상에서 조건의 설정 Range가 작았던 이유인지 가장 높은 조건에서 가장 좋은 전처리 결과를 얻게 되었다. 벗짚은 온도 170°C, 시간 30min, NaOH농도 2.0%에서 전처리 후 바이오매스에서 Glucan yield가 약 69%를 나타냈으며 Lignin은 약 36%가 감소하였다. 갈대, 억새 바이오매스는 벗짚과 같은 조건에서 각각 Glucan yield는 약 67%, 70%를 차지하였고 Lignin은 각각 30%, 24%씩 감소했음을 알 수 있었다.

### (3) 효소 가수분해 Test

푹은 황산과 NaOH를 이용한 최적 전처리 조건에서의 전처리된 갈대와 억새 바이오매스를 이용하여 효소를 이용한 효소 가수분해 테스트를 진행하였다. 대조구로는 전처리하지 않은 야생형 갈대, 억새 샘플을 이용하여 효소 가수분해 테스트에 비교하였다. 전처리 과정을 마친 바이오매스 (갈대, 억새)를 DI water를 이용한 washing과정을 거친 후 pH를 5상태로 맞춘 후 Dry oven에서 45°C overnight 건조 후에 효소 가수분해에 사용하였다. 효소가수분해의 조건은 그림 2-45에 나타내었다.

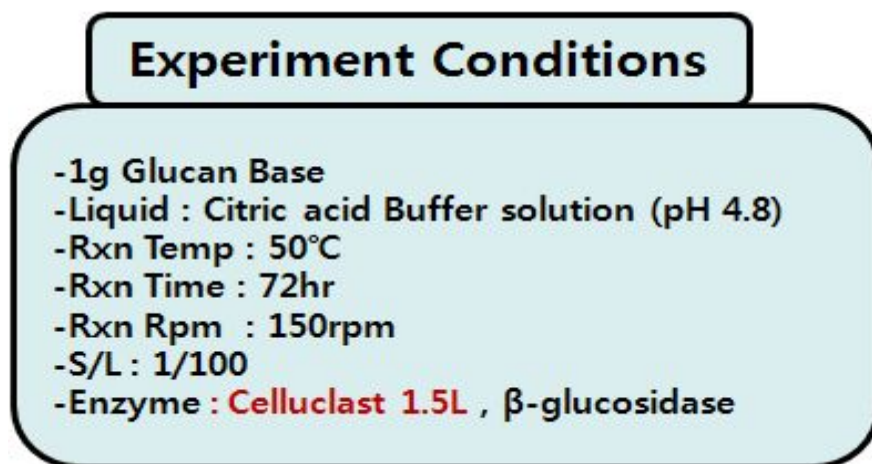


그림 2-45. 효소 가수분해 조건

사용한 효소는 Novozyme사에서 판매 중인 상용효소 Celluclast 1.5 L (셀룰라제) 과 A-188 ( $\beta$ -glucosidase)를 이용하여 효소 가수분해 실험을 진행하였다. 효소가수분해 중 시간별 샘플

링을 진행하여 HPLC (Simazu Co., Japan)를 사용하여 샘플 분석을 진행하였다. 분석 컬럼은 (Aminex HPX-87H, Bio-rad Co., USA)를 사용하였다.

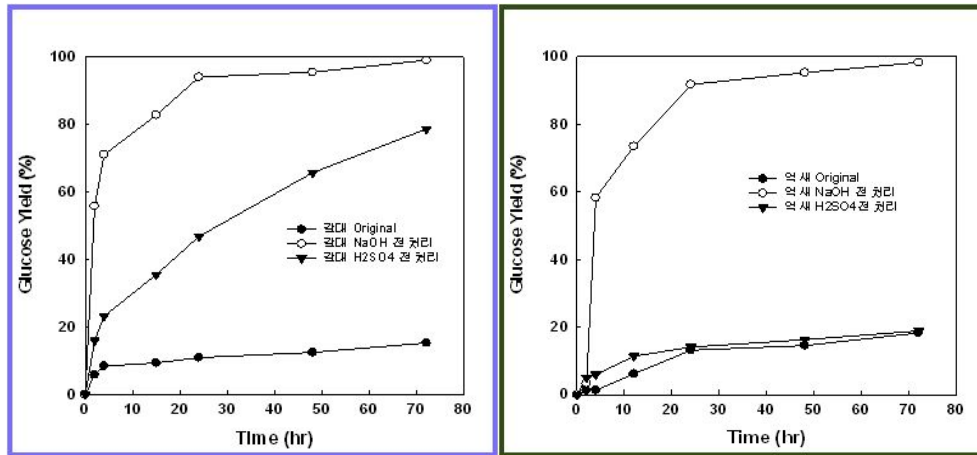


그림 2-46. 갈대, 역세 효소가수분해 결과

이 때 분석 용매는 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였고, 용매흐름 속도는 0.5 ml/min 으로 설정하였다. 분석 시 컬럼과 RI 검출기 (Refractive index detector, Simazu Co., Japan)의 온도는 각각 65°C, 50°C로 각각 조절하였다. 가수분해물 표준당으로 D-글루코즈, D-자일로즈, L-아라비노스 (Sigma-Aldrich Co., USA) 을 사용하였다. 효소가수분해 Time Curve를 통해 시간이 진행됨에 따라 바이오매스 내 Cellulose가 Glucose상태로 당화 되는 것을 볼 수 있었다. 갈대 바이오매스의 효소가수분해 결과 NaOH 전처리 바이오매스는 약 98%, 묽은 황산 전처리 바이오매스는 약 80% 당화율을 보였다. 갈대 야생형 샘플의 당화율보다 약 5~7배 높아진 결과이다.

역세 바이오매스의 효소가수분해 결과 NaOH 전처리 바이오매스는 갈대 바이오매스의 NaOH 전처리 샘플과 비슷하게 약 97%의 당화율을 보였지만, 역세의 묽은 황산 전처리 바이오매스는 약 20%의 당화율을 보였다. 갈대 바이오매스와 다르게 역세 바이오매스에서의 묽은 황산 전처리 샘플의 당화율은 야생형 바이오매스와 크게 차이가 없이 나타났다. NaOH와 묽은 황산을 이용한 물리화학적 전처리 샘플의 효소가수분해 테스트를 통해 전처리된 샘플들의 당화율이 높게 나타난 것으로 보아 최적 전처리 조건임을 확인할 수 있었지만 역세 바이오매스의 묽은 황산을 이용한 전처리 조건은 추가적인 확인 실험이 필요할 것으로 사료된다 (그림 2-46).

## 7. 단일/복합 셀룰라제 유전자 도입 형질전환 벼의 전처리와 효소 당화

### 가. NaOH을 이용한 물리화학적 전처리에 따른 구성성분 분석

형질전환된 벼에서 발현된 셀룰라제에 의해 벼의 세포벽에 변화가 있는지 알아보기 위해 전처리 전후로 세포벽의 성분을 분석해 보았다. 전처리는 알칼리인 NaOH를 사용하였으며 형질전환벼와 동일한 조건에서 재배한 wild type 벼를 control로 사용하였다. 벼는 일정 시간이상

말린 뒤 실험에 사용하였다. 회분식 열반응기를 이용해 전처리 하였다 (그림 2-47)



그림 2-47. 회분식 열반응기로 전처리

실험에는 wild type 벼, cel2 발현 형질전환 벼,  $\beta$ -glu 발현 형질전환 벼, cel2 + B-glucosidase 발현 형질전환 벼를 사용하였다. NaOH 전처리는 SUS316재질의 길이 18 cm, 내경 1 cm의 bomb tube 반응기에서 수행하였고, 시료는 0.5 g을 충전하고 NaOH용액 9.5 ml 을 가하여 전체 고액비 1:20의 상태로 반응을 진행하였다. 전처리는 150°C에서 15분간 수행한 후 고체로 남아있는 바이오매스를 증류수로 세척 하고 45°C에서 건조하였다. 전처리 후 남아있는 셀룰로즈 및 자일란의 함량을 전처리 전과 비교하기위해 성분분석을 수행하였다. 표 2-9에서 각 샘플의 셀룰로즈와 자일란 함량의 변화량을 보여주고 있다.

Sample	셀룰로즈(%)			자일란(%)		
	전처리 전	전처리 후	증감율 <sup>1)</sup>	전처리 전	전처리 후	증감율 <sup>1)</sup>
1 Wild Type Rice	29.58	64.95	119.57	19.28	17.00	-11.83
2 Cel2 AP Rice	15.93	40.00	151.10	13.73	14.20	3.42
3 B-glu AP Rice	26.27	67.71	157.75	17.88	17.25	-3.52
4 Cel2 AP + B-glu AP Rice	15.73	42.18	168.15	13.36	13.31	-0.37

1) 증감율= (전처리 후 양-전처리 전 양)/ 전처리 전 양

표 2-9. 셀룰라제 항시 발현 T0 형질전환 벼 NaOH 전처리 전후 성분 분석 결과.

전처리 전의 셀룰로즈 함량을 보면 Cel2 및 Cel2+ $\beta$ -glu 발현 형질전환체의 경우 wild type 과  $\beta$ -glu 형질전환체에 비해 상당히 적은 것을 볼 수 있었다. 즉 이는 Cel2의 발현이 세포벽의 주요 성분인 셀룰로즈에 변화를 주었다는 것을 시사하는 것이다. 또한 자일란의 함량 또한 감소한 것을 알 수 있다. 전처리 후에는 모든 샘플에서 셀룰로즈의 함량이 증가하는데 이는 전

처리로 인한 리그닌의 감소에 의한 것으로 추정할 수 있다. 자일란의 경우는 함량이 오히려 감소하거나 거의 변화가 없었는데 이는 전처리 동안 자일란의 일부가 손실된 결과라고 생각된다. 본 실험은 T0 상태의 형질전환체를 사용하여 T1 변을 이용하여 재현이 되는지 확인할 필요가 있다.

나. 효소 가수분해에 의한 당화율 분석

위의 성분 분석 결과는 Cel2가 발현된 변의 경우 세포벽에 변화가 생겼을 가능성을 시사한다. 이를 간접적으로 확인해 보기 위해 효소 가수분해 실험을 수행하였다. NaOH 전처리 과정을 거친 벚짚을 증류수로 세척한 뒤 오븐에서 45°C로 overnight 건조 후에 효소 가수분해에 사용하였다. 효소가수분해 조건은 표 2-10에 나타내었다.

구분	Buffer	반응온도	반응시간	회전속도	고/액 비율
내용	Citric acid Buffer solution (pH 4.8)	50°C	72hr	150rpm	1/100

표 2-10. 효소가수분해의 조건

사용한 효소는 Novozymes사에서 판매 중인 상용효소 Celluclast 1.5 L (셀룰라제) 과 A-188를 이용하여 효소 가수분해 실험을 진행하였다 (그림 2-48). 가수분해 후 당농도 측정은 HPLC (Simazu Co., Japan)로 수행하였고 컬럼은 Aminex HPX-87H, Bio-rad Co., USA (0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mL/min)를 사용하였다. 가수분해물 표준당으로 D-글루코즈, D-자일로즈, L-아라비노스 (Sigma-Aldrich Co., USA) 을 사용하였다.



그림 2-48. 효소가수분해 실험

그림 2-49는 시간에 따른 효소가수분해 정도를 보여주고 있다. 효소가수분해 결과 Glucose 당화율은 wild type 벚짚이 69.20%, Cel2 발현 벚짚이 79.70%, β-glu 발현 벚짚이 64.73%, Cel2 + B-glucosidase 발현 벚짚이 85.11%로 Cel2가 발현된 경우 당화율이 높은 것으로 나타났다. Xylose의 당화율도 wild type 벚짚이 92.91%, Cel2 발현 벚짚이 74.57%, β-glu 발현 벚짚이



93.85%, cel2 +  $\beta$ -glucosidase 발현 벚짚이 76.41%로 Cel2 발현 벚짚이 높은 당화율을 보여주었다 (그림 2-49). 이러한 결과는 Cel2가 발현될 경우 세포벽이 효소가 잘 작용할 수 있는 구조로 바뀐다는 것을 시사한다.

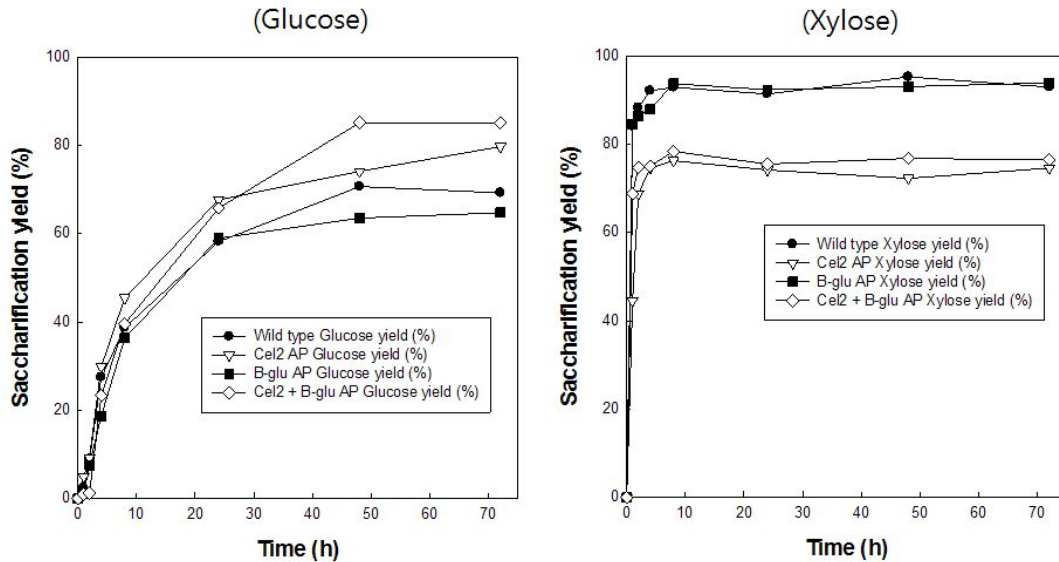


그림 2-49. 벚짚 샘플별 (4종) Glucose, Xylose 당화율 비교 그래프

#### 다. 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체 당화율 분석

벚짚 성분분석 방법은 다음과 같다. 단일/복합 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 성분분석을 위해 건조된 잎을 절단하여 준비하였다 (그림 2-50). 절단한 벚짚 시료 약 0.3 g과 72.0%  $H_2SO_4$  수용액 3 mL을 20 mL 시험관에 넣고, 30°C 항온 수조에서 1 시간 동안 반응시키는 1차 가수분해를 수행하였다. 1차 가수분해가 수행되는 1 시간 동안 15~20분 간격으로 유리막대를 이용하여 저어주면서 반응시키고, 반응이 끝난 후 84 mL의 증류수를 가하여 산 농도를 4.0%로 낮춘 후 고압멸균기 (8000-DSE, Nap Co., 대한민국)를 이용하여 121°C에서 1 시간 동안 반응시키는 2차 가수분해를 수행하였다. 반응 중 분해되는 당의 양을 보정하기 위해 D-글루코오스, D-갈락토오스 및 L-아라비노오스 (Sigma Aldrich Co., USA) 등의 표준물질도 동일한 조건에서 반응시켰다. 반응 후 상온까지 냉각시킨 시료를 탄산칼슘 ( $CaCO_3$ )으로 중화하고 원심분리기 (UNION 32R, Hanil Co., 대한민국)를 사용하여 8,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상등액을 10 mL 주사기 (syringe)로 취하여 0.45  $\mu m$  필터 (Whatman Co., British)로 여과한 후 분석하였다.



그림 2-50. 건조된 형질전환 벼 잎과 당화 시료

셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼는 전처리를 하지 않은 상태로 효소 당화를 실시하였다. 절단한 벼짚을 완전하게 건조시키기 위해 Dry oven 45°C에서 overnight한 후 약 10 mm 이하로 분쇄하여 효소당화 Test에 사용하였다. 250 ml 삼각플라스크에 총 부피 100 ml 기준으로 고/액비 1/10으로 건조 분쇄한 벼짚 10 g + 5 mM Sodium citrate buffer (pH4.8) 90 ml로 넣고 실링 후 50°C shaking incubator 150 rpm으로 반응 시켰다. 사용된 효소는 Novozyme 사의 C-tec2를 사용하였고, 효소접종량은 30 FPU/g glucan 비율로 넣어 실험을 진행하였다.

(1) 항시발현 프로모터에 의해 조절되는 단일 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체

(가) 기관 타겟 및 유전자 optimization에 따른 성분 및 당화율 분석

① Exoglucanase 유전자 도입 식물체 분석

Exoglucanase가 도입된 형질전환된 벼에서 발현된 셀룰라제에 의해 벼의 세포벽에 변화가 있는지 알아보기 위해 형질전환 벼의 성분 분석을 진행하여 표에 구성 성분비율을 나타내었다. 실험에는 wild type, Cel2 AP(ori), Cel2 ER(ori), Cel2 AP(opt), Cel2 ER(opt)발현 형질전환 벼를 사용하였다. 성분분석 결과 Glucan 함량을 보면 Cel2 AP 및 Cel2 ER 발현 형질전환체의 경우 Wild type에 비해 상당히 적은 것을 볼 수 있었다. 즉 이는 Cel2의 발현이 세포벽의 주요 성분인 셀룰로즈에 변화를 주었다는 것을 시사하는 것이다. Glucan성분은 Wild type이 29.58%로 가장 높았고, Cel2 ER(ori)가 20.38%으로 가장 낮게 나타났다 (표 2-11). 이와 반해 효소당화 결과는 그림 2-51에서 볼 수 있듯이 Cel2 ER(ori)에서 Glucose 40.77%, Xylose 26.28%, Wild type Glucose 17.23%, Xylose 5.76%로 Glucose 당화율은 약 2.4배, Xylose 당화율은 약 4.6배 높은 당화율을 나타냈다 (그림 2-51). 이는 Cel2 ER(ori)유전자를 발현을 통해 벼짚 내 세포벽들이 효소 분해가 쉬운 상태로 변형되었음을 시사한다.

Sample	Sugar Composition (%)		Saccharification Yield (%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
Cel2 AP(ori)	22.68	12.30	40.68	25.02
Cel2 ER(ori)	20.38	11.23	40.77	26.28
Cel2 AP(opt)	24.19	13.22	39.76	26.18
Cel2 ER(opt)	22.96	12.00	39.07	21.94

표 2-11. Cel2 유전자 도입 식물체의 당 분석

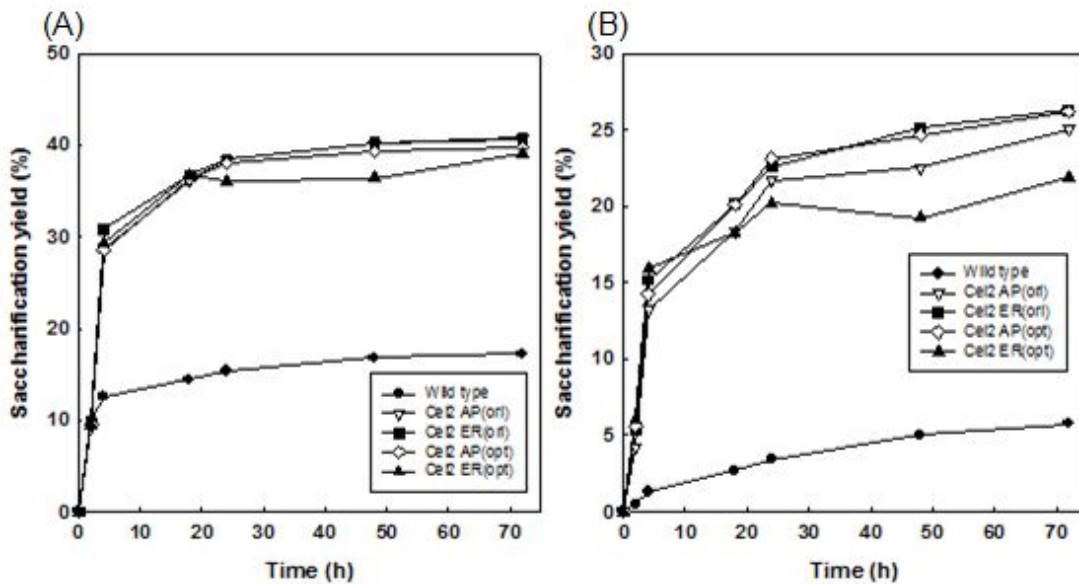


그림 2-51. Cel2 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

## ② Endoglucanase 유전자 도입 식물체 분석

Endoglucanase가 도입된 형질전환된 벼에서 발현된 셀룰라제에 의해 벼의 세포벽에 변화가 있는지 알아보기 위해 성분 분석을 진행하여 표에 구성 성분비율을 나타내었다. 실험에는 wild type, Cel4 AP(ori), Cel4 ER(ori), Cel4 AP(opt), Cel4 ER(opt) 발현 형질전환 벼를 사용하였다. 성분분석 결과 Glucan 함량을 보면 Cel4 AP(ori) 와 Cel4 ER(ori) 발현 형질전환체 보다 Cel4 AP(opt), Cel4 ER(opt) 발현 형질 전환 벼의 Glucan 함량이 더 높게 나타났다 (표 2-12). Glucan 성분은 Wild type이 29.58%로 가장 높았고, Cel4 AP(ori)가 17.15%으로 가장 낮게 나타났다. 효소당화 결과는 그림 2-52에서 볼 수 있듯이 Cel4 ER(ori)에서 Glucose 45.87%, Xylose 27.33%으로 가장 높게 나타났으며, Wild type 벼의 효소당화율 보다 Cel4 유전자 도입 형질전환 식물체의 Glucose당화율은 약 2.7배, Xylose당화율은 약 4.7배 높은 당화율을 나타냈다 (그림 2-52).

Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
Cel4 AP(ori)	17.15	8.77	45.44	26.39
Cel4 ER(ori)	19.90	10.51	45.87	27.33
Cel4 AP(opt)	21.46	11.29	44.56	27.09
Cel4 ER(opt)	22.14	11.93	38.70	25.81

표 2-12. Cel4 유전자 도입 식물체의 당 분석

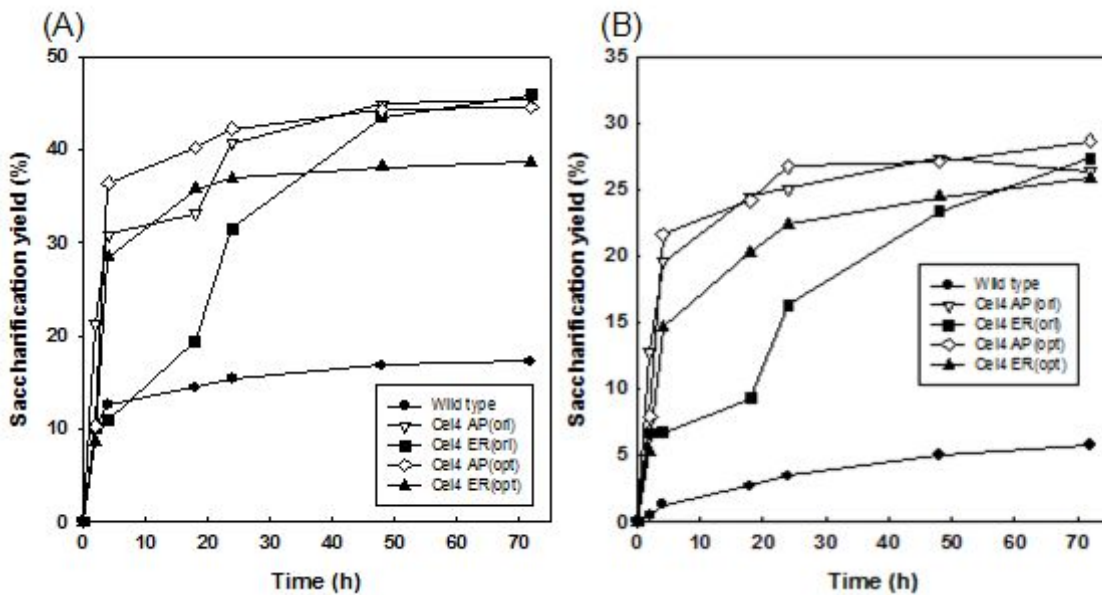


그림 2-52. Cel4 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

### ③ $\beta$ -glucosidase 유전자 도입 식물체 분석

$\beta$ -glucosidase 유전자를 형질전환 한 벚짚과 Wild type 벚짚의 성분분석 비교 결과에서 나타났듯이  $\beta$ -glu ER Glucan 함량이 24.55%로 23.38% 인  $\beta$ -glu AP Glucan 함량 보다 약 1.5% 높게 나타났다 (표 2-13). 하지만 효소당화 결과에서는  $\beta$ -glu AP의 Glucose 효소 당화율이 약 4% 더 높은 39.57%로 나타났다 (그림 2-53).  $\beta$ -glu AP 형질 전환시킨 벚짚이 wild type 벚짚과  $\beta$ -glu ER 형질전환 벚짚보다 상대적으로 Glucan함량이 낮은 이유는 형질전환에 따른 영향이 Cellulose 형성에 영향을 미쳐 나타나는 현상이며, 이 또한 효소당화 시 효소가 Cellulose를 분해하기 쉬운 구조로 형성 되었다고 사료된다.

Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
$\beta$ -glu ER	24.55	13.31	36.39	19.04
$\beta$ -glu AP	23.38	12.64	39.57	18.95

표 2-13.  $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당 분석

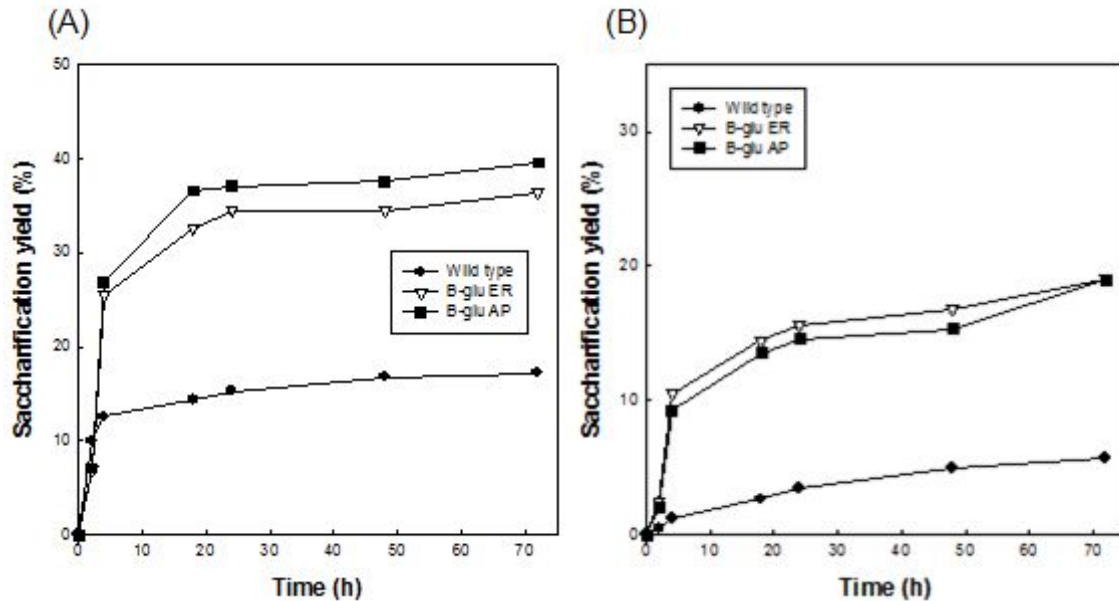


그림 2-53.  $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

(나) 항시발현 프로모터에 의해 조절되는 복합 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체

① Exoglucanase::  $\beta$ -glucosidase 유전자 도입 식물체 분석

Exoglucanase와  $\beta$ -glucosidase 두 개의 셀룰라제가 도입된 형질전환체의 Sugar composition 에서 볼 수 있듯이 본 Test결과에서 가장 높은 Glucan 함량을 나타낸 형질 전환 벚짚은 Cel2 AP(opt)의 24.19%로 가장 높은 함량을 나타냈다 (표 2-14). 하지만 그림 2-54에서 나타냈듯이 효소당화 결과상 Glucose 수율이 가장 높게 나타난 형질 전환 벚짚은 Cel2 AP(opt)- $\beta$ -glu AP 이 44.06%으로 wild type대비 약 2.6배 높은 수율을 나타내었다 (그림 2-54).

Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
Cel2 AP(ori)	22.68	12.30	40.68	25.02
Cel2 AP(opt)	24.19	13.22	39.76	26.18
Cel2 AP(ori)- $\beta$ -glu AP	23.63	12.71	38.45	19.34
Cel2 AP(opt)- $\beta$ -glu AP	22.16	11.20	44.06	22.48

표 2-14. Cel2:: $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당 분석

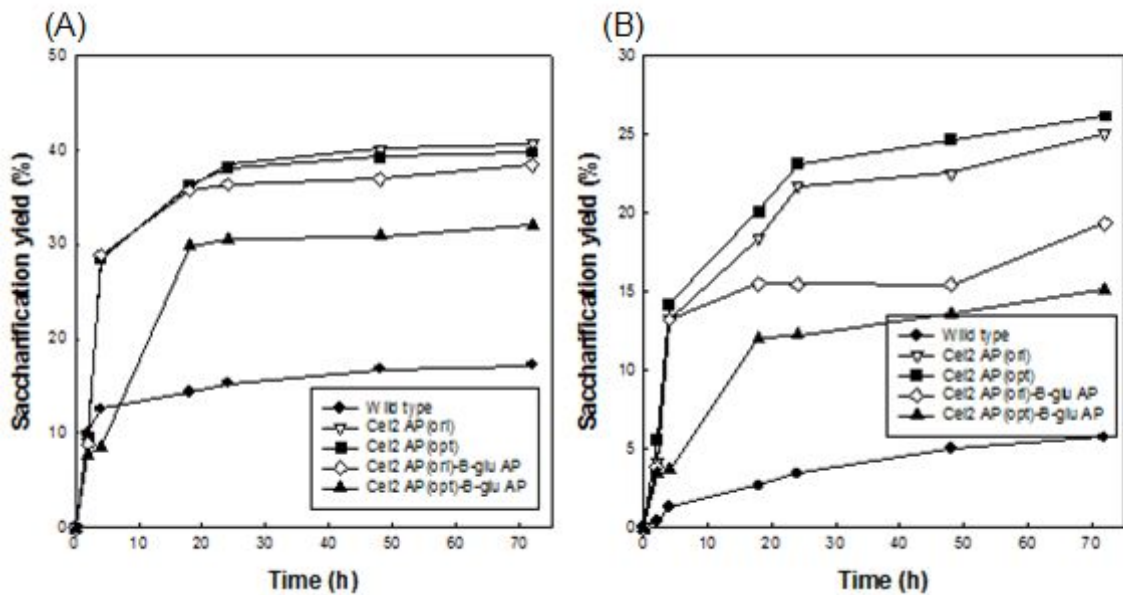


그림 2-54. Cel2:: $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

② Endoglucanase::  $\beta$ -glucosidase 유전자 도입 식물체 분석

Endoglucanase와  $\beta$ -glucosidase가 복수로 도입된 형질전환 벼의 Sugar composition Test 결과에서 가장 높은 Glucan 함량을 나타낸 형질 전환벼는 Cel4 AP(opt)- $\beta$ -glu AP의 25.15%로 가장 높은 Glucan 함량을 나타냈다 (표 2-15). 하지만 그림 2-55에서 볼 수 있듯이 효소당화 결과상 Glucose 수율이 가장 높게 나타난 형질 전환 벼는 Cel4 AP(ori)와 Cel4 AP(opt)가 각각 Glucose 당화율 45.55% 45.87%로 Cel4 AP(ori)- $\beta$ -glu AP, Cel4 AP(opt))- $\beta$ -glu AP 효소당화결과 보다 약 13% 높게 나타났다 (그림 2-55).

Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
Cel4 AP(ori)	17.15	8.77	45.44	26.39
Cel4 AP(opt)	19.90	10.51	45.87	27.33
Cel4 AP(ori)- $\beta$ -glu AP	21.02	11.11	32.03	15.13
Cel4 AP(opt)- $\beta$ -glu AP	25.15	13.38	33.76	16.45

표 2-15. Cel4:: $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당 분석

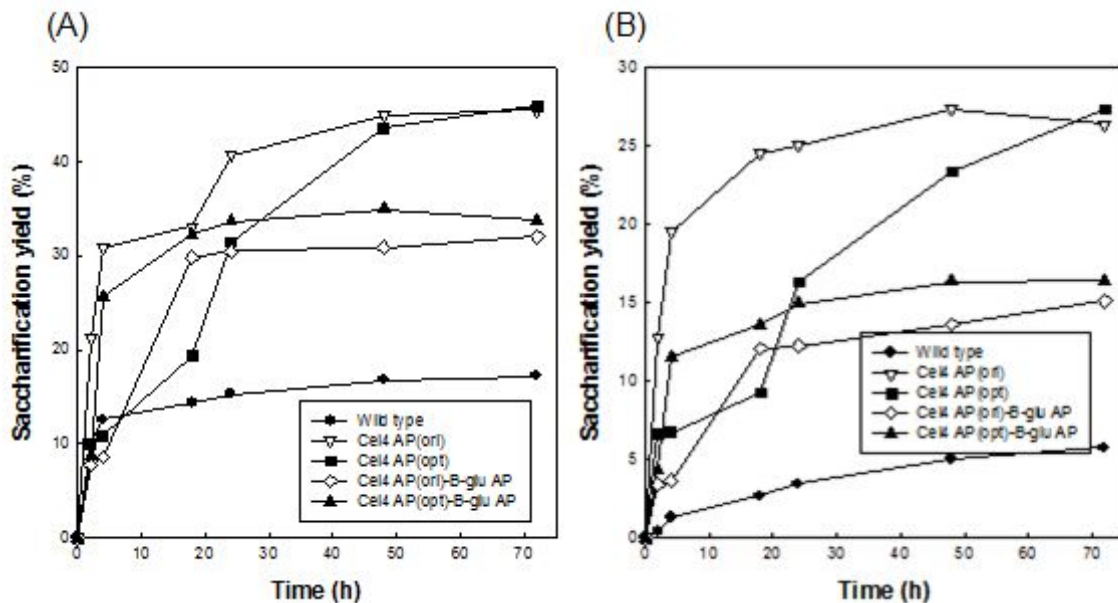


그림 55. Cel4:: $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

(2) 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 셀룰라제 유전자 도입 식물체 분석

(가) 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 단일 유전자 도입 식물체의 성분 및 당화율 분석

다음 Test는 건조 유도성 프로모터에 의해 조절되는 단일 유전자 발현을 통한 볏짚의 성분분석 및 효소당화결과이다. 앞에서 먼저 실험을 진행한 Cel2 AP(opt), Cel4 AP(opt),  $\beta$ -glu AP를 형질전환 시킨 볏짚과 972::프로모터를 추가 형질 전환시킨 972::cel2 AP (opt), 972::cel4 AP (opt), 972:: $\beta$ -glu AP를 비교실험 하였다. 성분분석 결과 (표 2-16).에서 보이는 바와 같이 972:: $\beta$ -glu AP를 형질전환 시킨 볏짚의 Glucan과 Xylan함량이 24.73%, 13.58%로 가장 높게 나타났으며 효소당화율 또한 972:: $\beta$ -glu AP이 Glucose 47.40%, Xylose가 20.39%로 가장 높은 효소당화율을 나타내었다 (그림 2-56). Wild type 볏짚의 효소당화율과 비교할 때 Glucose는 2 약 2.8배, Xylose는 약 3.5배로 높게 나타났다.

Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
cel2 AP (opt)	24.19	13.22	39.76	26.18
cel4 AP (opt)	21.46	11.29	44.56	27.09
$\beta$ -glu AP	23.38	12.64	39.57	18.95
972::cel2 AP (opt)	19.59	10.23	45.76	23.09
972::cel4 AP (opt)	20.88	11.60	35.79	17.29
972:: $\beta$ -glu AP	24.73	13.58	47.40	20.39

표 2-16. 972::Cel2, Cel4,  $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당 분석

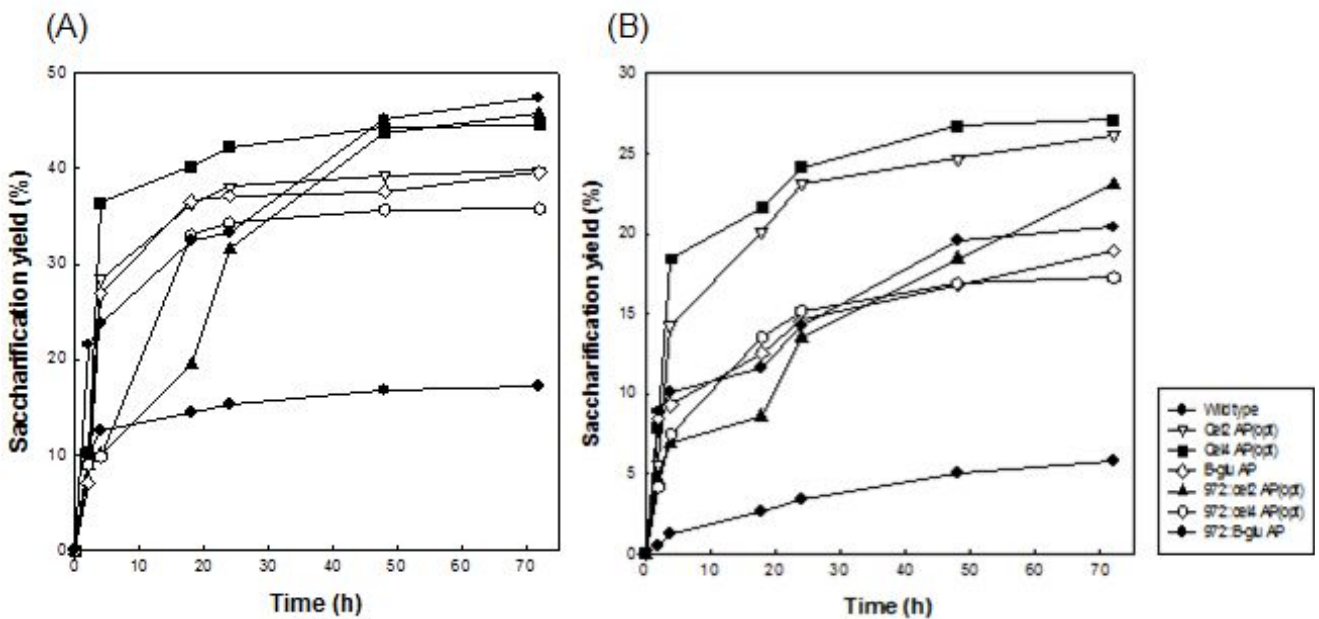


그림 2-56. 972::Cel2, Cel4,  $\beta$ -glu 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

(나) 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 복합 유전자 도입 식물체의 성분 및 당화율 분석

다음 Test는 건조 유도성 프로모터에 의해 조절되는 복합 유전자 발현을 통한 벚짚의 성분분석 및 효소당화결과이다. cel2 AP (opt) -  $\beta$ -glu AP, cel4 AP (opt) -  $\beta$ -glu AP, 972::cel2 AP (opt) - 996:: $\beta$ -glu AP, 972::cel4 AP (opt) - 996:: $\beta$ -glu AP 총 4개의 형질전환 벚짚의 성분분석 결과 (표 2-17).에서 보이는 바와 같이 cel4 AP (opt) -  $\beta$ -glu AP를 형질전환 시킨 벚짚의 Glucan 과 Xylan함량이 25.15%, 13.38%로 가장 높게 나타났으며. 효소당화율은 4개의 형질전환 벚짚 중972::cel4 AP (opt) - 996:: $\beta$ -glu AP이 Glucose 39.19%, Xylose가 17.30%로 가장 높은 효소당화율을 나타내었다 (그림 2-57). 하지만 효소당화율에서는 각기 다른 4개의 형질전환체 들의 당화율 차이는 크게 나타나지 않았다.



Sample	Sugar Composition(%)		Saccharification Yield(%)	
	Glucan	Xylan	Glucose	Xylose
Wild type	29.58	19.28	17.23	5.76
Cel2 AP(opt)- $\beta$ -glu AP	21.02	11.11	32.03	15.13
Cel4 AP(opt)- $\beta$ -glu AP	25.15	13.38	33.76	16.45
972::cel2 AP(opt)-996:: $\beta$ -glu AP	20.09	10.45	35.94	15.12
972::cel4 AP(opt)-996:: $\beta$ -glu AP	22.80	12.17	39.19	17.30

표 2-17. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 복합 유전자 도입 식물체의 전처리 전 후의 당 분석

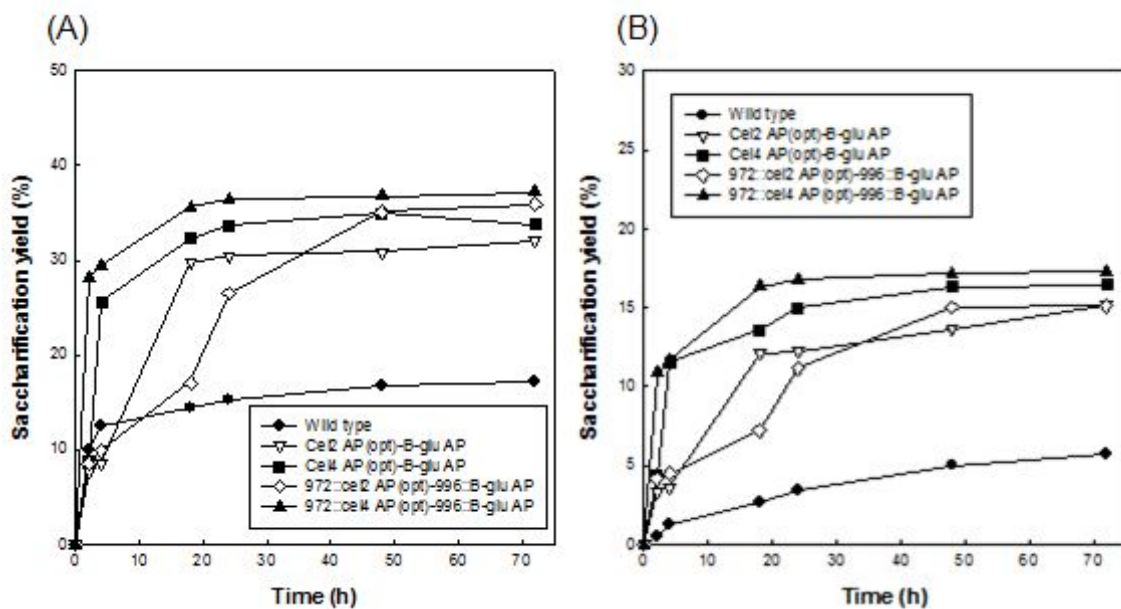


그림 2-57. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 복합 유전자 도입 식물체의 당화 후 glucose 함량 (A) 및 xylose 함량 (B)

Wild type 벼와 셀룰라제 유전자 발현 벼의 성분분석 결과 형질전환 벼의 glucan 함량은 0.8배 낮은 반면 당화율은 2.2배 높은 것으로 밝혀졌다. 형질전환 벼의 glucan 함량이 낮은 이유는 Wild type 벼에 비해 생육이 저조하였기 때문인 것으로 생각된다. 셀룰라제 유전자를 도입시킨 형질전환 벼의 경우 Wild type에 비해 식물체가 연약하였으며 잎과 줄기가 옆으로 처지는 현상을 보였다. 생육 상태가 좋지 못해 순화 및 성장 과정에서 고사하는 형질전환체가 다수 발생하기도 했다.

형질전환 벼의 glucan 함량이 낮은 반면 당화율이 2배 이상 높은 이유는 벼의 세포벽이 구조적으로 변화였다는 것을 시사한다. 셀룰라제의 발현으로 셀룰로스의 구조가 붕괴되었을 것이라 추측한다. 이는 세포벽의 구조적 특징을 관찰한 전자현미경 (TEM) 분석으로도 확인 할 수 있다.

셀룰라제 유전자 도입 식물로부터 바이오에탄올을 생산하기 위한 유전자 및 프로모터 선발을 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 바이오에탄올을 용이하게 생산 할 수 있는 벼 또는 식물체를 개발하기 위해서는 많은 수의 형질전환 line을 확보하고, 후대 검증을 통해서 유전적으로 안정한 형질전환 식물체를 확보하는 것이 우선시 되어야 한다.

추후 계속된 연구를 통해서 셀룰라제 유전자와 프로모터를 선발하여 최종적으로는 glucan 함량이 높고 당화효율이 높은 형질전환 벼와 비식용 작물을 개발하고자 한다.

## 8. 바이오매스 생산 단지 조성

### 가. 갈대, 억새, 물억새의 종자밭아

비식용바이오 매스 작물인 갈대, 억새, 물억새의 종자는 가을에 종자성숙 후 바람을 통해서 화기에서 탈락되어져 비산된다. 종자가 화포안에 존재하는 적절한 시기에 화기를 절단하여 보관하는 방법으로 종자를 확보한다. 종자를 밟아시키기 위해서는 화기와 종자를 분리한 후 흙에 파종하여 싹을 틔워 소식물체를 확보할 수 있다. 종자 밟아는 파종 밀도, 종자의 성숙도가 매우 중요하며 화기와의 분리가 반드시 필요하다.

종자를 직파한 경우에는 매우 종자밭아율이 매우 낮아 소식물체를 확보하기 위해서는 기내 밟아 후 흙에 파종하는 방법을 시도하였다 (그림 2-58).



그림 2-58. 물억새 종자밭아

다수의 소식물체를 확보하기 위해서 종자의 처리 방법을 달리하여 파종하였다. 소식물체 확보 시기, 효율을 조사하기 위해서 기내 배양 방법을 선택하였다. 밟아율 개선을 위한 실험 결과 밟아촉진을 위해서는 종피의 제거가 필요하며, 수작업에 의존하던 종피 제거방법을 도구를 이용하는 방법을 개발하였다. 흙에 파종 할 경우 종피를 제거하는 방법으로 도구 이용 시 밟아율이 가장 높았다 (그림 2-59, 표 18).

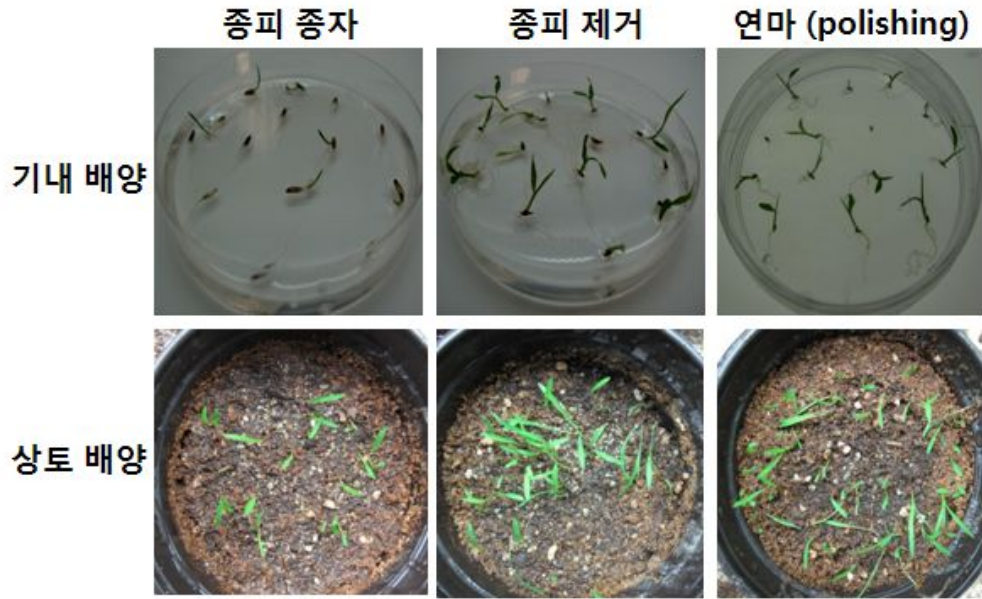


그림 2-59. 종자 상태에 따른 물억새 발아율

억새 종자	종피 미제거	종피제거	연마 (Polishing)
기내 발아율	60.2	88.8	87.5
상토 발아율	30	41	63

표 2-18. 물억새 종자의 발아율 비교

#### 나. 바이오매스 생산 단지 조성

비식용바이오매스를 이용해 바이오 에탄올 및 효소 생산을 위한 실험을 진행하기 위한 재료인 갈대, 억새, 물억새의 대량 확보를 위해 생산 단지를 조성하였다. 유묘는 도구를 이용해 종피를 제거한 종자를 육묘상자에 상토를 도포한 후 파종하였다. 3월 말 ~ 10월 말 까지 온실에서 생육한 후 4~5개체 (1분) 씩 분리 후 흙에 이식하였다 (그림 2-60, 61).

대전시의 협조를 얻어 유성구 용신교 좌안 교각 직상류 지점에 1,650 m<sup>2</sup> (약 500평) 규모의 단지를 조성하였다. 2년 동안 재료를 확보하여 실험을 진행 한 후 과제 종료 후에는 대전시에 귀속하기로 협약을 맺었다.

현재 억새와 갈대가 생육 중에 있으며 인경이 뻗어나가 완벽한 균락을 이루기까지 5년 정도의 기간이 필요할 것으로 생각되어진다 (그림 2-62). 매년 확보되는 바이오매스는 바이오에너지 생산 연구를 위한 시료로 제공되어 질 것이다.

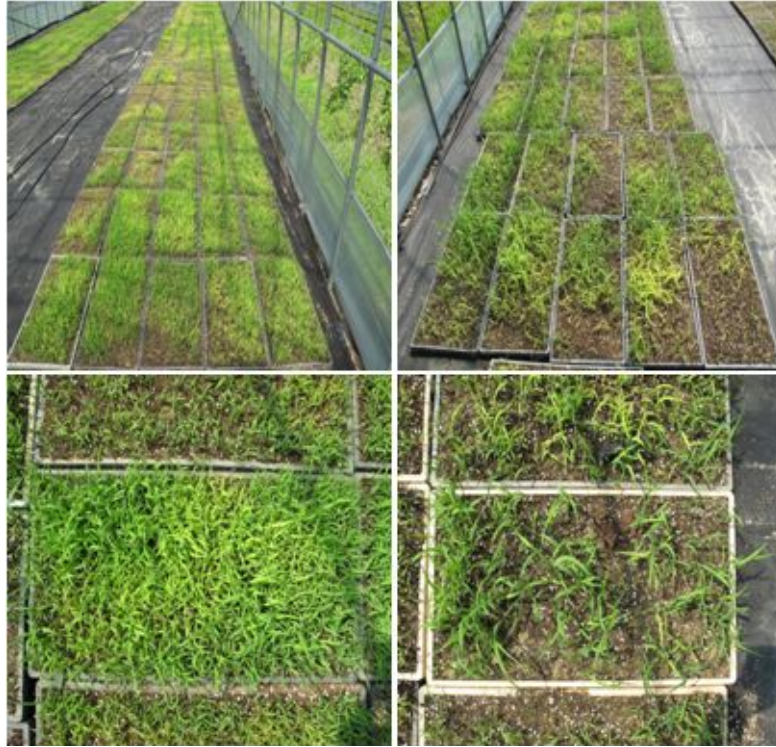


그림 2-60. 바이오매스 유묘 생산

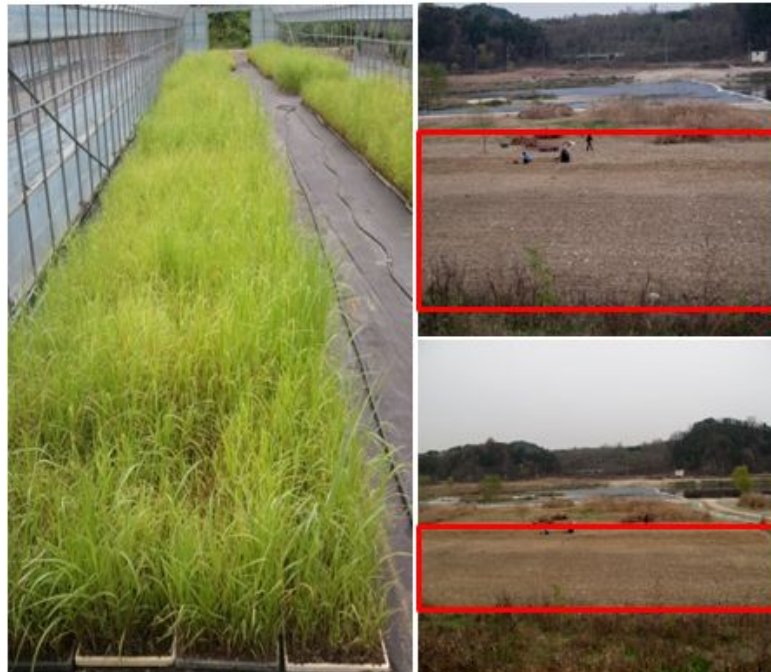


그림 2-61. 바이오매스 생산단지 조성



그림 2-62. 여름과 가을의 바이오매스 생산단지

### 제 3 절 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

#### 1. 셀룰로즈 분해효소 유전자 확보 및 개량기술 개발

##### 가. 효모기반 대규모 유전자 발굴기술 개발

바이오매스에 포함된 섬유소 (lignocellulose)를 효과적으로 분해하기 위해서는 exocellulase, endocellulase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase,  $\beta$ -xylosidase 등의 다양한 효소가 필요하며 이들이 복합적으로 작용하여 최종적으로 단당류인 glucose 및 xylose로 분해된다. 현재까지 천여 종의 섬유소 분해효소 유전자가 밝혀져 있으며 대부분 특허로서 보호되고 있으므로 본 연구에서는 대량의 신규 셀룰라제 유전자를 확보하고 섬유소 당화에 활용하고자 한다. 섬유소 분해 효소 유전자를 cloning하는 방법은 여러 가지가 있을 수 있으나 한 개의 유전자를 cloning하기 위해서 많은 노력과 시간을 요구하고 있으므로 대량의 섬유소 유전자를 cloning하기 위해서는 비교적 간단한 cloning 방법이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 대량의 섬유소 분해 유전자를 library로부터 용이하게 cloning하는 방법으로 섬유소 분해능이 없는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 활성 cloning 및 고효율 효소 스크리닝 방법을 개발하고자 하였다.

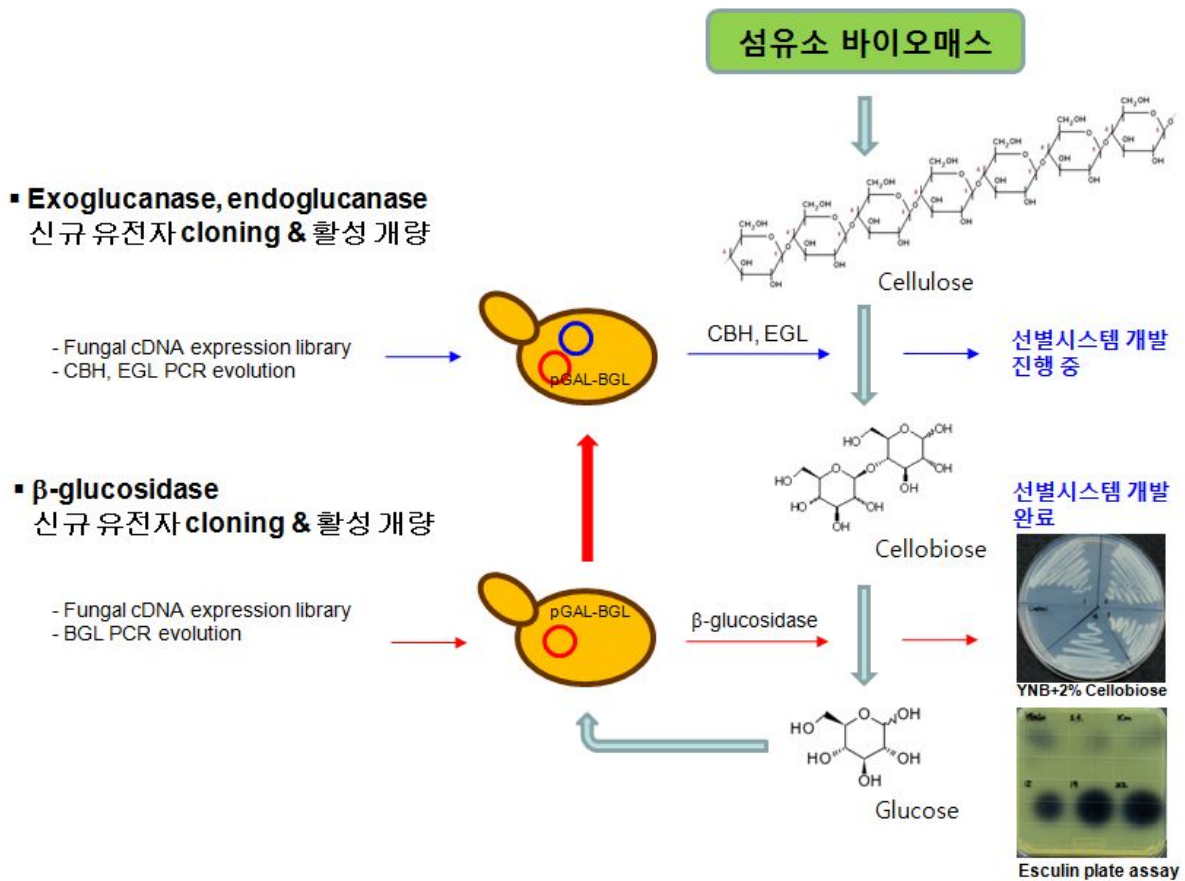


그림 3-1. 섬유소 분해효소 유전자 활성 클로닝 시스템

그림 3-1 에서 보는 바와 같이 효모 *S. cerevisiae*가 바이오매스 유래의 cellulose를 분해하

여 1차적으로 cellobiose를 얻고 이를 분해하여 glucose를 확보하여 세포가 성장하기 위해서는 최소한 3가지 효소, exoglucanase (CBH), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)가 필요하다. 이러한 섬유소분해 효소 시스템이 없는 효모는 섬유소를 단일탄소원으로 공급하는 배지에서 성장할 수 없으므로 외부 유전자 발현 library을 도입하여 섬유소 배지에서 성장하는 균체를 선별하여 섬유소 분해에 필요한 효소유전자를 쉽게 확보할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다. 이러한 시스템이 구축되면 다양한 유전자원으로부터 용이하게 섬유소분해 효소유전자를 대량으로 확보할 수 있다.

이를 위하여 일차적으로 섬유소 함유 배지에서 기존 효모 *S. cerevisiae*의 성장 정도를 확인하기 위하여 glucose, cellobiose 및 carboxymethyl cellulose (CMC)를 함유한 각각의 배지에 효모 2805 균주를 배양한 결과 glucose배지에서 성장한 정도는 아니지만 효모 자체가 이미 cellobiose 또는 CMC에서 어느 정도 성장하는 것이 확인되었다. 따라서 2805 균주를 그대로 형질전환 숙주세포로 사용하는 데는 문제가 있었다.

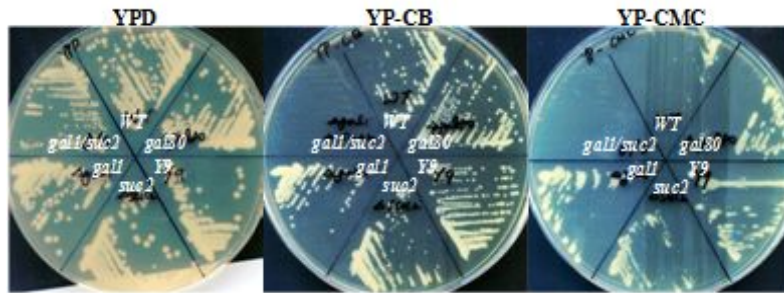


그림 3-2. 효모 2805 균주의 섬유소 배지에서 성장 비교

효모에도 어느 정도의 glucosidase의 활성이 있는 것으로 알려져 있으나 대부분 1,3- $\beta$ -glucosidase인데 이들의 활성으로 인한 미미한 성장일 것으로 판단되나 섬유소 배지에서 colony가 형성될 정도의 활성으로 나타났다. 따라서 숙주세포로 그대로 사용하기는 어려움이 있기 때문에 이들의 잔여활성을 제거하기 위해서 그림 3-3에서와 같이 염색체에 존재하는 2개의 1,3- $\beta$ -glucosidase 유전자인 EXG1, EXG2 유전자를 targeted gene disruption 방법으로 제거하였다. 먼저 promoter 및 terminator를 포함한 EXG1 및 EXG2 유전자를 효모 genomic DNA로부터 PCR을 이용하여 cloning하고 각 ORF를 제거한 후 대신 pop-out이 가능한 URA3 유전자를 삽입하여 효모로 형질전환 하였다. 형질전환체를 URA3 dropout배지에서 선별한 후 선별된 균주를 PCR을 사용하여 유전자의 disruption을 PCR 방법으로 확인하였다.

EXG1 disruption 균주를 다시 5-FOA배지에서 선별하여 URA3 유전자를 pop-out하고 다시 EXG2유전자를 동일한 방법으로 disruption하였다. 결과적으로 확보된 EXG1 및 EXG2 disruption균주를 다시 그림 3-2에서와 같은 방법으로 섬유소 배지에서 배양한 결과 wt 균주에 비해 성장속도가 느려졌지만 큰 차이를 보이지 않았다.

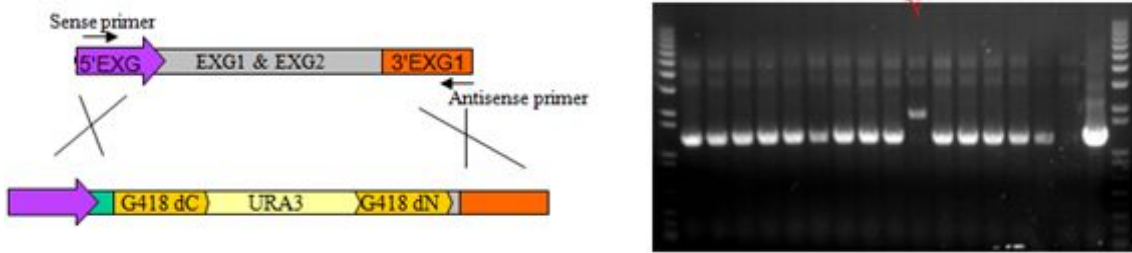


그림 3-3. 효모 2805 균주의 EXG1 및 EXG2 유전자의 disruption과정

효모 2805 ( $\Delta exg1$ ,  $\Delta exg2$ ) 균주가 여전히 섬유소 배지에서 성장하는 것은 자체 미토콘드리아 기능을 통해 복합배지로부터 gluconeogenesis가 일어날 가능성이 있으므로 미토콘드리아의 기능을 억제하는 항생제인 Antimycin A의 효과를 확인하였다. Antimycin A는 미토콘드리아 전자전달계에서 ubiquinol oxidation을 차단하여 ATP 형성을 막는 항생제이다. Antimycin 농도에 따라 세포의 성장을 비교한 결과 1 ug/ml에서 glucose배지에서는 영향이 없으나 섬유소 배지에서는 wt 균주의 성장이 억제되는 것을 확인하였다.

따라서 배지에 1 ug/ml의 Antimycin을 포함시킨 후 효모 *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의  $\beta$ -glucosidase 유전자를 cloning하였다. 그림 3-4에서 보는 바와 같이 Antimycin이 함유된 배지에서 2805 균주의 성장은 억제되고 있으나 BGL transformant는 빠른 게 성장함을 확인하였고 Antimycin이 없는 배지에서도 2805에 비해 빠른 성장을 함으로서 성장은 도입된  $\beta$ -glucosidase의 활성화에 의해 유지됨을 확인하였다. 또한 분비된 BGL의 활성을 확인하기 위하여 esculin plate 분석결과 형질전환체의 경우 강한 esculin 분해 활성을 나타냄을 확인하였다.

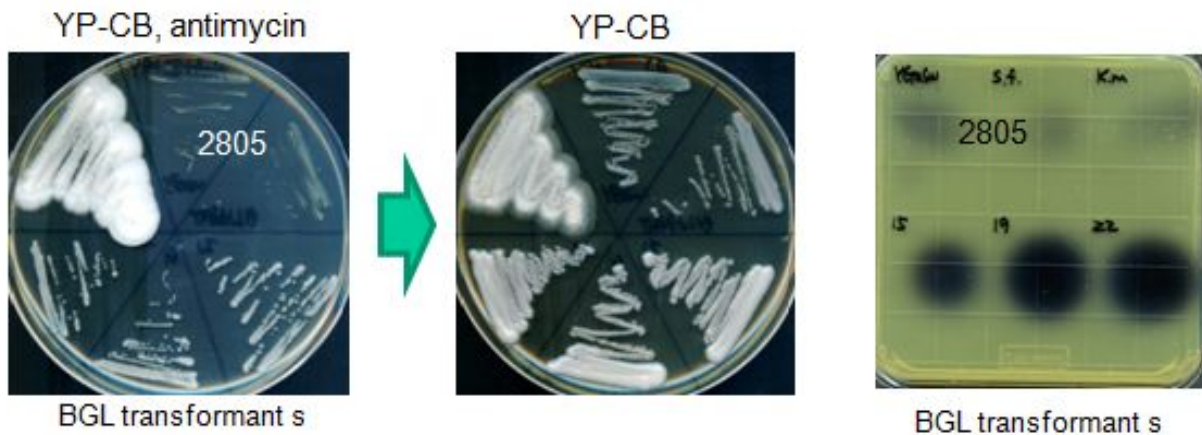


그림 3-4. 효모를 이용한  $\beta$ -glucosidase 유전자 활성 cloning 및  $\beta$ -glucosidase 활성

그림 3-4 에서 보는 바와 같이  $\beta$ -glucosidase 유전자가 도입되지 않은 대조균주는 cellobiose 배지에서 성장할 수 없는 반면  $\beta$ -glucosidase가 도입된 균주는 효과적으로 성장할 수 있음을 확인하였다. 이는 도입된  $\beta$ -glucosidase의 활성화에 의해 cellobiose 가 분해되고 이로부터 확보된 glucose를 이용하여 효모세포가 성장한 것으로 판단된다. 대조균주와  $\beta$ -glucosidase가 도입된 균주의  $\beta$ -glucosidase 활성 차이를 비교하기 위하여 esculin



(6-(beta-D-glucopyranosyloxy)-7-hydroxy-2H-1-Benzopyran-2-one,esculin monohydrate)을 사용하여 plate에서 활성 비교한 결과  $\beta$ -glucosidase 도입균주에서 훨씬 강한  $\beta$ -glucosidase 활성을 보여 효소유전자 개량 방법으로도 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

$\beta$ -glucosidase 유전자가 도입된 균주인 Y2805-BGL 균주를 이용하여 추가적인 섬유소 분해효소 유전자 선별을 위해서 다양한 exoglucanase (CBHI, II)와 endoglucanase (EGL)를 도입하여 carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxyethyl cellulose 등을 탄소원으로 공급한 배지에서 선별 연구를 지속적으로 진행하였으나 성장균주를 확보하는데 어려움이 있었다. 섬유소 분해능이 뛰어난 곰팡이 시스템에서 분비되는 효소의 분비 비율을 보면 exoglucanase : endoglucanase :  $\beta$ -glucosidase가 약 85 : 10 : 5의 비율로 exoglucanase의 비율이 타 효소보다 압도적으로 많은 것으로 알려져 있다. 이는 섬유소를 말단에서부터 cellobiose의 형태로 순차적인 분해가 효과적으로 일어나지 않으면 충분한 cellobiose를 확보하기 힘들고 또한  $\beta$ -glucosidase 에 의한 glucose의 확보도 어렵다는 것을 의미한다.

따라서 효모가 cellulose를 단일 탄소원으로 성장하기 위해서는 과량의 exocellulase의 분비가 필요한데 현재 이 부분이 불충분한 것으로 판단된다. 효모를 이용한 섬유소 분해효소 분비생산과 세포의 성장을 곰팡이 기준으로 분석한 보고 (Lynd et al., 2005)에 의하면 효모 전체 단백질의 10% 이상을 분비할 수 있어야 세포성장이 가능할 것으로 보고되었다 (그림 3-5). 또한 효모에서 분비생산된 섬유소분해 효소의 최적온도가 45-50°C인 반면 효모의 생육온도는 30°C 내외이므로 분비된 효소 또한 최적분해를 수행하지 못하는 문제도 있을 것으로 판단된다. 따라서 효모로부터 직접 셀룰라제 유전자 클로닝 기술을 개발하기 위해서는 단백질 과발현 기술과 최적 온도 차이를 극복할 수 있는 기술 개발이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

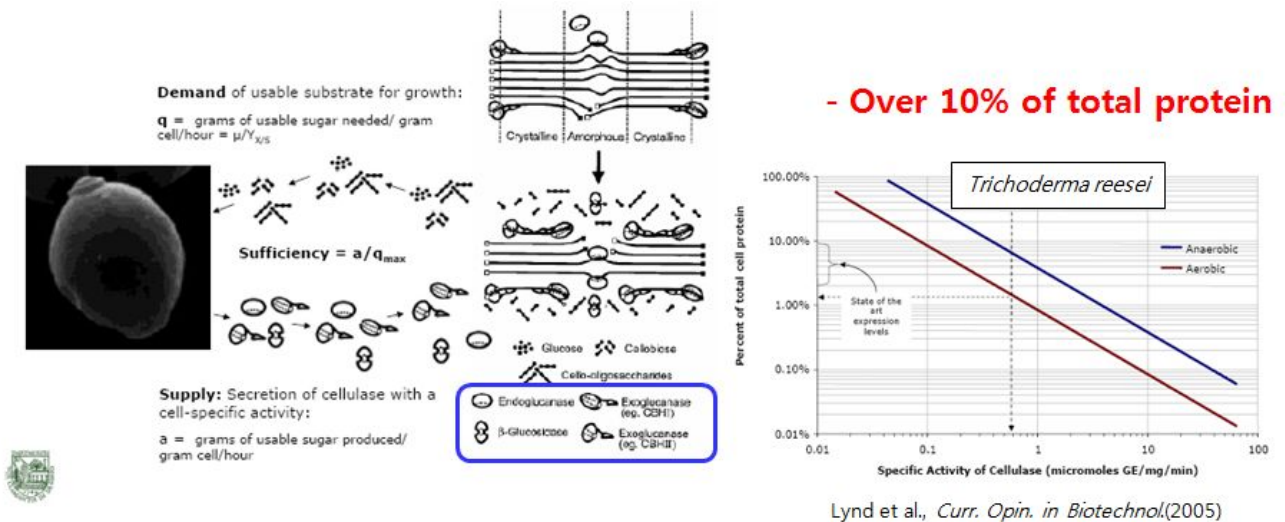


그림 3-5. 섬유소를 활용한 효모의 세포성장을 위한 최소 섬유소분해효소 분비량 예측

## 2. 섬유소분해 신규 미생물 분리 및 동정

신규 셀룰라제 유전자 확보를 위해서 셀룰라제 활성을 가지는 국내 자생의 신규 곰팡이 균주를 분리하였다. 이를 위해 다양한 산림 토양을 대전 근교에서 수집하여 균주 분리원으로 사용하였다. 곰팡이 균주 분리를 위한 기본 배지는 potato dextrose agar (PDA, Difco)를 사용하였으며, 곰팡이 분리 실험 시 fast-growing fungi의 생육을 억제하기 위해 Triton X-100과 L-sorbose를 각각 0.1%와 0.4% 농도로 첨가하였고, 세균 발생을 억제하기 위해 chloramphenicol을 0.01% 농도로 첨가하여 사용하였다. 셀룰라제 활성 검정에 적합한 배지조성을 결정하기 위하여 탄소원 및 질소원의 종류를 다양화한 배지로 (1) phyto-peptone, (2) bacto-peptone, (3) tryptone, (4) soytone, (5) yeast extract, (6) beef extract, (7) yeast N base, (8) malt extract, (9) proteose peptone, (10) casamino acids 각 1% 농도 + 0.5% CMC + 0.01% chloramphenicol 및 곰팡이 배양에 사용되는 기본적인 배지들 (11) CMA(BBL), (12) DRBC, (13) MA, (14) NA, (15) PAD, (16) PCA, (17) R2A, (18) TSA, (19) YM + 0.5% CMC + 0.01% chloramphenicol)을 활용하여 분리된 곰팡이 균주의 셀룰라제 활성 검정에 유용한 배지를 선별하였다.

셀룰라제 활성 검증은 CMC가 함유된 다양한 배지에서 테스트할 곰팡이 균주를 접종하여 25도에서 7일간 배양한 후, 곰팡이가 배양된 plate를 0.1% congo red 용액으로 염색하고 다시 1M NaCl 용액으로 탈색한 후 셀룰라제 활성을 나타내는 clear zone 생성 유무를 확인하고 크기를 비교하는 방법으로 실시하였다. 목질분해 활성을 보이는 미생물 30여종을 발굴하고 이들 중 활성이 강한 8종의 곰팡이를 선별 (그림 3-6, 표 3-1)하였다.

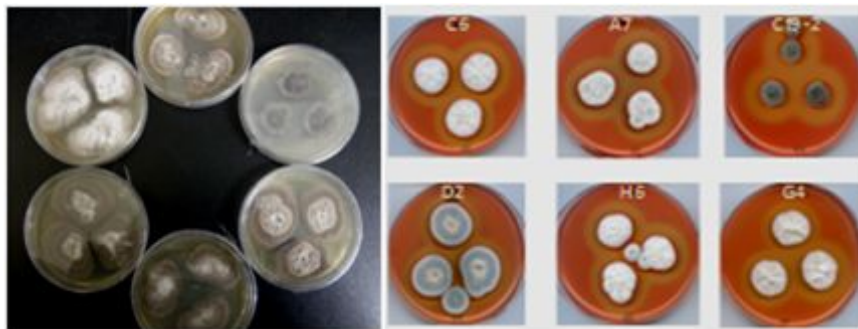


그림 3-6. 국내 자생의 목질분해 곰팡이 분리

각 균주의 ribosomal RNA의 ITS (Internal Transcribed Spacer) 분석 결과 주로 *Penicillium* 계열의 곰팡이였으며 *Cordyceps*, *Cladosporium*와 uncultured fungus도 발견되었다. 신종균주 여부를 결정하기 위해서는 좀 더 많은 유전자를 확보하여 비교할 필요가 있으나 이들 균주로부터 보고된 셀룰라제가 전혀 없으므로 신규한 셀룰라제를 확보할 수 있을 것으로 예상되었다.

분리된 각 곰팡이의 셀룰라제 활성 강도를 나타내는 clear zone의 크기는 CMC가 함유된 YMA 배지에서 생육한 곰팡이의 균사 말단에서 clear zone이 형성된 곳까지의 길이 (mm)로 나타내었으며 균사의 신장이 빨라 배양 후 7일이 경과하기 전에 배지 전체를 덮어버리는 균주

의 경우는 셀룰라제 활성 측정 실험을 배양 3일후에 실시하였다. 각 곰팡이 균주에서 조사된 clear zone의 크기를 비교 분석할 결과 clear zone의 크기는 곰팡이 균주에 따라 0 - 12 mm 까지 다양하게 나타났으며, 이들 중 0.5% CMC가 함유된 YMA 배지에서 25도, 7일간 배양 후 실시한 셀룰라제 활성 측정 실험에서 8 - 12 mm 크기의 clear zone을 형성하여 셀룰라제 활성이 높게 나타난 cf4 균주를 셀룰라제 유전자 확보를 위한 실험균주로 선별할 수 있었다. Cf4 균주의 ITS 영역 (Internal Transcribed Spacer region) 염기서열 분석을 통해 총 548 bp 길이의 ITS 영역 염기서열이 분석되었으며 Blast 검색결과 *Penicillium decaturense* NRRL 28152, *Penicillium waksmanii* strain NRRL 777, *Penicillium canescens* NRRL 2147, *Penicillium rivolii* NRRL 906, *Penicillium miczynskii* NRRL 1077과 *Penicillium manginii* NRRL 2134 균주들과 99% 수준의 유사도를 나타내었으며, *Penicillium* 속에 속하는 다양한 균주들과 ITS 영역의 염기서열이 92-99% 수준의 유사도를 나타내어 *Penicillium* sp. cf4 균주로 동정하였다.

표 3-1. 목질분해 활성 곰팡이

Sample	Strain	셀룰라제 활성
Cf2	<i>Penicillium</i> sp.	++++
Cf4	<i>Penicillium</i> sp.	+++++
Cf12	<i>Cordyceps</i> sp.	++++
Cf14	Uncultured fungus	+++++
A7	<i>Penicillium dipodomycolaisolate</i>	++++
Cf9-2	<i>Cladosporium cf. subtilissimum</i>	+++++
D2	<i>Penicillium</i> sp.	++++
G4	<i>Penicillium</i> sp.	++++

### 3. 섬유소 분해효소 유전자 확보

#### 가. Data base 분석을 통한 섬유소 분해효소 유전자 선별

현재 바이오에너지 생산용 효소는 전세계적으로 Novozymes사와 Danisco (Genencor)사가 주로 곰팡이시스템을 이용하여 대량생산한 효소를 독점공급하고 있으나 국내에서도 바이오에너지 기술독립을 위해서는 독자적인 효소생산 시스템의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 셀룰라제를 대량 생산하기 위한 연구를 진행중이다. 효모는 에탄올 발효능이 뛰어나지만 섬유질 분해능이 없는 단점이 있으므로 효소를 대량 생산하는 효모의 개발은 궁극적으로 바이오매스의 분해와 에탄올 발효를 동시에 수행할 수 있는 저비용 섬유소 바이오에탄올 생산 통합공정의 개발이 가능해 진다. 그러나 일반적으로 효모에서 섬유소 분해효소의 분비생산성이 낮아 통합균주 개발에 어려움이 있으나 본 연구에서는 효모로부터 재조합단백질을 고효율로 분비생산할 수 있는 특허기술 (TFP technology)을 적용하여 효소의 분비생산성을 획기적으로 증대시키고자 하였다.

섬유소 분해효소의 분비생산성 극대화를 위해서는 효모에서 발현율이 뛰어난 셀룰라제 유전자를 확보하는 것이 필수적이다. 따라서 기존 알려진 미생물 유래의 셀룰라제 유전자를 대량

확보하여 효모 발현시스템 개발에 활용하고 궁극적으로 신규 미생물 유래의 신규 셀룰라제 유전자를 대량 확보하고자 하였다. 먼저 박테리아 유래의 섬유소분해효소 유전자는 *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Clostridium thermocellum*, *Thermus caldophilus* 등의 미생물을 활용하였고 곰팡이 유래의 섬유소 분해효소 유전자는 *Trichoderma reesei*, *Aspergillus ficuum*, *Fomitopsis palustris*, *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의 유전자를 확보하였으며 또한 담자균류인 버섯 유래의 섬유소 분해효소 유전자를 확보하기 위하여 *Polyporus arcularius*, *Lentinula edodes* 등을 활용하였다. 유전자의 확보는 각 미생물의 염색체 또는 cDNA로부터 직접 PCR cloning하였으며 일부 유전자는 국내외 연구자로부터 유전자를 분양받아 사용하였다.

본 연구를 통해 확보된 섬유소 분해유전자는 표 3-2에서 보는 바와 같이 exoglucanase, endoglucanase 및  $\beta$ -glucosidase를 포함하는 셀룰라제 유전자 24종과 xylanase,  $\beta$ -xylosidase 등을 포함하는 hemicellulase 유전자를 7종을 확보하였다.

표 3-2. 확보된 셀룰라제 유전자 및 특성

Source Strains	Cellulase gene	cellulase type	MW(Kd)
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Cbh1</i>	exoglucanase	54.1
	<i>Cbh2</i>	exoglucanase	49.7
	<i>Egl1</i>	endoglucanase	48.2
	<i>Egl2</i>	endoglucanase	44.2
	<i>Egl6</i>	endoglucanase	44.4
	<i>Bgl1</i>	$\beta$ -glucosidase	78.4
	<i>Bgl2</i>	$\beta$ -glucosidase	52.2
	<i>Xyl</i>	$\beta$ -xylosidase	87.2
	<i>Abf</i>	arabinofuranosidase	51.1
	<i>Axe</i>	acetyl xylan esterase	30.8
<i>Polyporus arcularius</i>	<i>Cel1</i>	exoglucanase	48.9
	<i>Cel2</i>	exoglucanase	47.4
	<i>Cel3A</i>	endoglucanase	26.0
	<i>Cel4</i>	endoglucanase	44.0
<i>Bacillus substilus</i>	<i>CMcase</i>	endoglucanase	75.3
	<i>Xyl</i>	xylanase	23.4
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>CelA</i>	endoglucanase	52.5
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>CelA</i>	endoglucanase	44.0
	<i>XylN</i>	xylanase	23.0
<i>Thermus caldophilus</i>	<i>TcBgl</i>	$\beta$ -glucosidase	48.7
	<i>TcCel</i>	endoglucanase	46.0
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>PpExo1</i>	exoglucanase	76.7
	<i>PpExo2</i>	exoglucanase	108.5
	<i>PpExo3</i>	exoglucanase	25.8
	<i>PpEndo1</i>	endoglucanase	44.5
	<i>Cel5A</i>	endoglucanase	58.6
	<i>Cel5B</i>	endoglucanase	63.3
	<i>AI</i>	arabinose isomerase	53.2
<i>Aspergillus ficuum</i>	<i>Axe</i>	actyl xylan esterase	48.3
<i>Fomitopsis palustris</i>	<i>FpBgl</i>	$\beta$ -glucosidase	138.0
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	<i>SfBGL1</i>	$\beta$ -glucosidase	96.4

또한 기존의 알려진 곰팡이 유래의 exo-cellulase 유전자 중 효모에서 발현율이 뛰어난 것으로 알려진 exo-cellulase 5종을 효모에서 발현하였다. NCBI로부터 각각의 곰팡이 *Humicola grisea*, *Talaromyces emersonii*, *Neosartorya fischeri*, *Chaetomium thermophilum*, *Chrysosporium lucknowense* 유래의 *HgCBH1*, *TeCBH1*, *NfCBH1*, *CtCBH1*, *CiCBH2*의 서열정보를 확보하고, 효모의 translational machinery에 적합한 코돈 최적화 (codon optimization) 후 유전자 합성을 통해 각각의 유전자를 확보하였다.

표 3-3. 합성한 5종의 exo-cellulase 유전자 및 특성

Name	Species	GenBank Acc.Num.	Feature
HgCBH1	<i>Humicola grisea</i>	CAA35159	GH7 family, CBM1 (C-Term), 18 aa signal seq. 53.9 kDa, glycosylation site: 1, non-reducing end activity
TeCBH1	<i>Talaromyces emersonii</i>	AAL89553	No CBM, 18 aa signal seq. 47kDa, glycosylation site: 2 Hyper-glycosylation
NfCBH1	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001258178	GH7 family, CBM1 (C-Term), non-reducing end activity, 26 aa signal seq. 53.3 kDa, glycosylation site: 1, Hyper-glycosylation
CtCBH1	<i>Chaetomium thermophilum</i>	CAM98448.1	No CBM, 18 aa signal seq. 54.6 kDa, glycosylation site: 3, Hyper-glycosylation
CiCBH2	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	EMBL-Bank: HH793136.1	49.4 kDa, glycosylation site: 1, High level expression (~2 g/L)

#### 나. 목질분해 신규 효소 유전자 클로닝

선별된 곰팡이로부터 섬유소 분해유전자를 확보하기 위하여 glycosyl hydrolase 유전자 database로부터 섬유소 분해효소 유전자의 conserved domain을 확인하고 이를 이용하여 11종의 degenerate primer를 제작하였다. 각 균주의 염색체 또는 cDNA를 이용하여 PCR한 결과 예상밖의 다양한 PCR 밴드들이 증폭되었다 (그림 3-7). PCR 조건을 달리 하여 재시도한 경우에도 결과는 별 차이가 없었으며 일부 증폭된 유전자를 회수하여 유전자 서열 분석한 결과 non-specific 증폭에 의한 다른 유전자가 대부분이었으며 기대한 섬유소 분해효소 유전자를 확보하기 어려웠다. 따라서 이들로부터 섬유소 분해효소 유전자를 확보하기 위하여 기존의 알려진 섬유소 분해효소 유전자 복합체를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 통해 유전자를 2차 선별과정을 거쳤다. 그림 3-7에서 보는 바와 같이 서열상 동질성을 갖는 밴드들이 다수 확인되었으며 이들을 회수하여 T-vector에 cloning하고 염기서열 분석하였다. 결과적으로 *Penicillium oxalicum* 유래의 exo-cellobiohydrolase I (Genbank:ACE60553.1)와 84 % 유사성

을 보이는 셀룰라제 부분 유전자와 *Penicillium decumbens* exo-cellobiohydrolase (GenBank:ABN68954.1)와 82% 유사성을 보이는 셀룰라제 부분 유전자를 확인할 수 있었다.

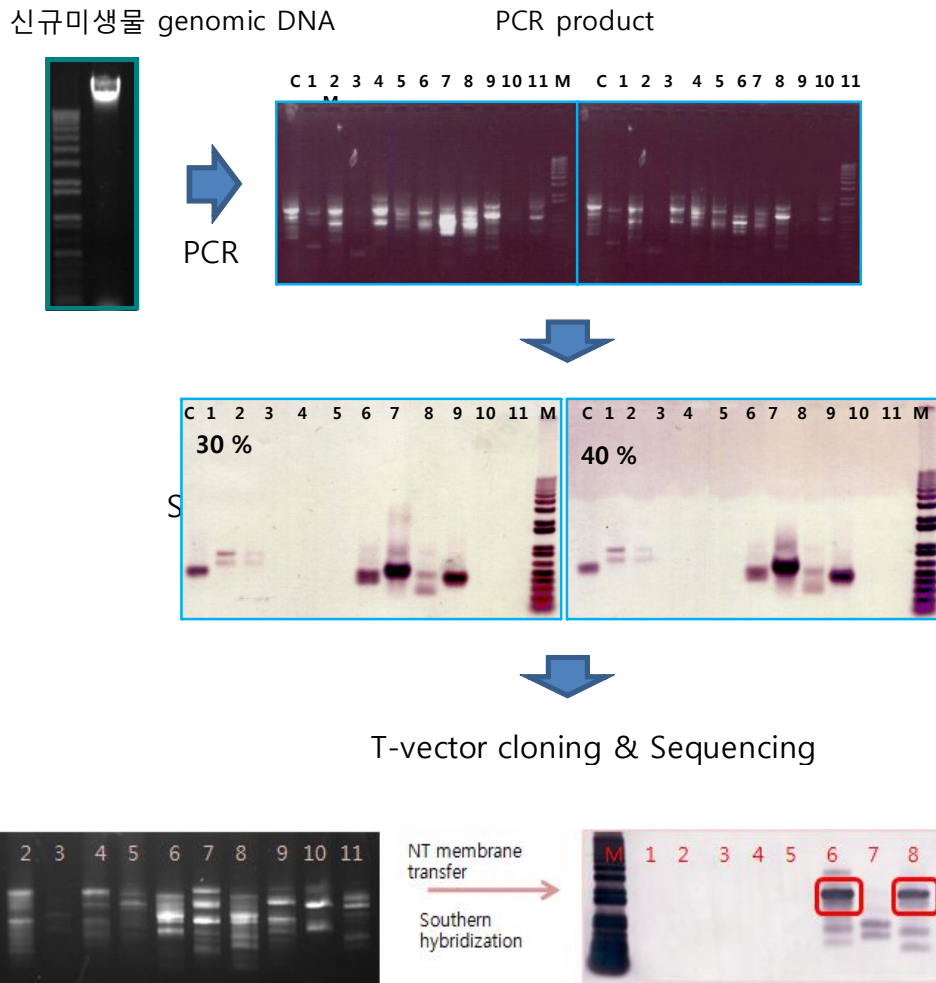


그림 3-7. Degenerate primer를 이용한 PCR 및 Southern hybridization

회수된 셀룰라제 절편을 이용하여 전체 유전자를 genomic DNA로부터 회수하기 위하여 기존 PCR 방법을 이용할 경우 무수한 non-specific DNA 증폭으로 인해 원하는 유전자의 확보가 매우 어려웠다. 따라서 본 연구를 통해 원하는 DNA만이 증폭되도록 genomic DNA를 특수 처리하여 단 한번의 PCR로 셀룰라제 유전자와 인접한 부위를 용이하게 cloning하는 방법인 template-blocking PCR 방법을 개발하였다 (그림 3-8) (특허출원, Biotechniques News에 신기술로 소개됨, [http://www.biotechniques.com/news/Template\\_blocking\\_PCR\\_for\\_genome\\_walking/biotechniques-217395.html](http://www.biotechniques.com/news/Template_blocking_PCR_for_genome_walking/biotechniques-217395.html)).

이러한 방법을 통하여 다수의 신규 셀룰라제 유전자를 용이하게 클로닝할 수 있었다. 그림 3-9, 10은 서열분석 완료된 *Penicillium* sp. Cf4 유래의 2가지 exo-cellobiohydrolase, PeCBH1 및 PeCBH2 와 상동성이 가장 높은 기존 셀룰라제와의 상동성 분석한 결과이다. Cf4 유래의 PeCBH1은 인트론이 없는 1,641 bp의 염기로 구성되어 있으며 유추된 아미노산 서열은 26개의 분비시그널과 셀룰로즈 결합 모듈 (cellulose binding module, CBM)을 포함하는 547개의 아미

노산으로 구성되었으며 *Penicillium oxalicum* 유래의 CBH1과 74.3% 아미노산 유사성을 보였다. 그림 3-11은 서열분석 완료된 *Penicillium* sp. Cf4 유래의 exo-cellobiohydrolase 와 기존의 알려진 셀룰라제 와 상동성 분석한 결과이다. Cf4 유래의 CBH1은 분비시그널과 c-term에 cellulose binding motif를 가진 전형적인 exo-cellulase였으나 CBM과 연결부위인 linker 부분에서 상당한 차이를 보여 linker 비교를 통한 신기능의 효소 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

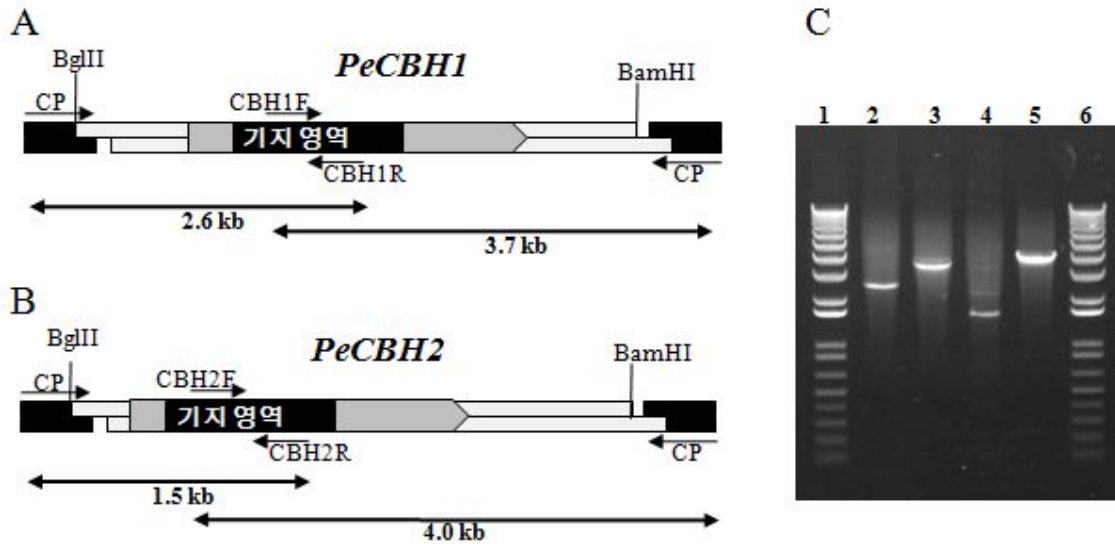


그림 3-8. 셀룰라제 유전자 one-step PCR cloning



```

        60          *          80          *          100
PeCBH1 : CTSTTGSVVVIDANWRVHSTSSSTNNCYTGNTWDATLCPDVTCASSCAVD : 99
P.oxalicum : CTPVSGSVVIDANWRVHDKNG-KNCYTGNTWDATLCPDKTCAANCAVD : 98

        *          120          *          140          *
PeCBH1 : GASYSSTYGVTTSGDELRLNFVTTASQKNIGSRLYLLEDDSTYEMFQLLN : 149
P.oxalicum : GASYASTYGVTTSGNSLRINFVTTCASQKNIGSRLYLLENDTTYQKFNLLN : 148

        160          *          180          *          200
PeCBH1 : QEFTFDVDVSNLPCGLNGALYFVSMDADGGTSRFPTNKAGAKYGTGYCDS : 199
P.oxalicum : QEFTFDVDVSNLPCGLNGALYFVDMDADGGMAKYPTNKAGAKYGTGYCDS : 198

        *          220          *          240          *
PeCBH1 : QCPRDLKFISGEANVEGWEPSDNIVNSGLGNHGSCCAEMDVWEANSISNA : 249
P.oxalicum : QCPRDLKFINGIANVEGWTPSSNDPNSGVGCHGTCCAEMDIWEANSISEA : 248

        260          *          280          *          300
PeCBH1 : VTPHPCDTPTQTECTTDACGGTYSSDRYAGTCDPDGCDFNPYRMGNTSFY : 299
P.oxalicum : LTPHPCDTPCQTMCEGNACGGTYSNDRYAGTCDPDGCDFNLYRQGVTNFY : 298

        *          320          *          340          *
PeCBH1 : GPCKTVDTSSPFTVVTQFITNDGTSSGTLSEIKRFYVQDGEVIGQSDSKV : 349
P.oxalicum : GPGMTVDTKSPFTVVTQFLTDDGTSTGTLSEIKRFYVQNGVIGQPCSTV : 348

        360          *          380          *          400
PeCBH1 : SVTGNSITTDFCTAQKKAFGDTSSFTEHGLAGMGAAEEGMVLVMSLW : 399
P.oxalicum : AGVSGNSITDSFCAQKAFGDTDDFTKHCALAGMGAAEEGMVLVMSLW : 398

        *          420          *          440          *
PeCBH1 : DDHNSNMLWLDSTYPTTASTTEGAARGSCDISSGDPTVETADANSYVI : 449
P.oxalicum : DDHNSNMLWLDSTYPTTASTTLGAKRGSCDISSGAPNDVESQNANSYVV : 448

        460          *          480          *          500
PeCBH1 : YSNIKVGPIGSTYNSGSSGSSSSTTTSKTSTTSKTSTTSKTSTTTKTS : 499
P.oxalicum : FSNIKAGPIGSTFNSCSTCGGNSGSTTTTKGSTTTKAETTTTTSKAI : 498

        *          520          *          540
PeCBH1 : STTSSTGSSTTGAAHYAQCGGISWTGATTCASPYTCTRQNDYYSQCL- : 546
P.oxalicum : TTTAASGGNGGGAAHWAQCGVGYTGPTTCASPYTCTRQNEYYSQCI- : 545

```

그림 3-9. 신규한 Cf4 셀룰라제의 아미노산 동질성 분석

```

                *           20           *           40           *
PeCBH2      : MCQRALLI SALVAVARAQQAGTCTSETKPSLTWQKCTASGCTDQSGSVGI : 50
P. decumben : MYQRALLI SALMAGVSAQQVGTQKEETHPEPLAWKECTSSGCTSKLGSVVI : 50

                60           *           80           *           100
PeCBH2      : DANWRVWVHSIDGTTNICYTGNEDADLCPDDETCATNCALDGADYSGTYGV : 100
P. decumben : DANWRVWVHSV DGYKNCYTGNEWLSLCPDDATCATNCAVDGADYAGTYGA : 100

                *           120           *           140           *
PeCBH2      : EADGDSLSTLTFKKTGSNVGSRIFLMEIDSTYQMFKLLNCEFTFDVDVSALEP : 150
P. decumben : TTEGDSLSTLNFVTGNSNIGSRFYLMELENKYQMFKLLNKEFTFDVDVSTLEP : 150

                160           *           180           *           200
PeCBH2      : CGLNGALYFVSMADGGLSKYENNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQG : 200
P. decumben : CGLNGALYFVSMADGGMSKYETNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGKG : 200

                *           220           *           240           *
PeCBH2      : NVTGWEPSIDNDANAGVCGHGSCCAEMDIWEANKISTAVTPHPCKEAGQTM : 250
P. decumben : NVEGWKPSANDKNAGVCPHGSCCAEMDIWEANSISTALTTPHPCDTNGQTI : 250

                260           *           280           *           300
PeCBH2      : CEGDSCGGTYSSTRYAGTCDPDGCDNFNPRMGNESFYGPGKIVDTSSKMT : 300
P. decumben : CEGDSCGGTYSTRYAGTCDPDGCDNFNPRMGNESFYGPGKMVDTKSKMT : 300

                *           320           *           340           *
PeCBH2      : VETQFITSINTATGTLSEIKRIYVQNGKVIANSASDVSGVSGNSITSDFC : 350
P. decumben : VVTQFITSIDGTDGSLKEIKRVYVQNGKVIANSASDVSGITGNSITSDFC : 350

                360           *           380           *           400
PeCBH2      : TAQKKEFGDEDVFAQYNGMSGMGEGLGEGMVLVMSLWDDHYANMLWLDSN : 400
P. decumben : TAQKKEFGDEDVFNKHGGLSGMCDALGEGMVLVMSLWDDHNSNMLWLDE : 400

                *           420           *           440           *
PeCBH2      : -YPTNATASDPGVARGTCGADSGKEADVESASADAKVVFSNIKVGAIGST : 449
P. decumben : KYPTDAAPASKAGVSRGTCSTDSGKESTVESESGSAKVVFSNIKVGSIGST : 450

PeCBH2      : YSS- : 452
P. decumben : FSA- : 453

```

그림 3-10. 신규한 Cf4 셀룰라제의 아미노산 동질성 분석

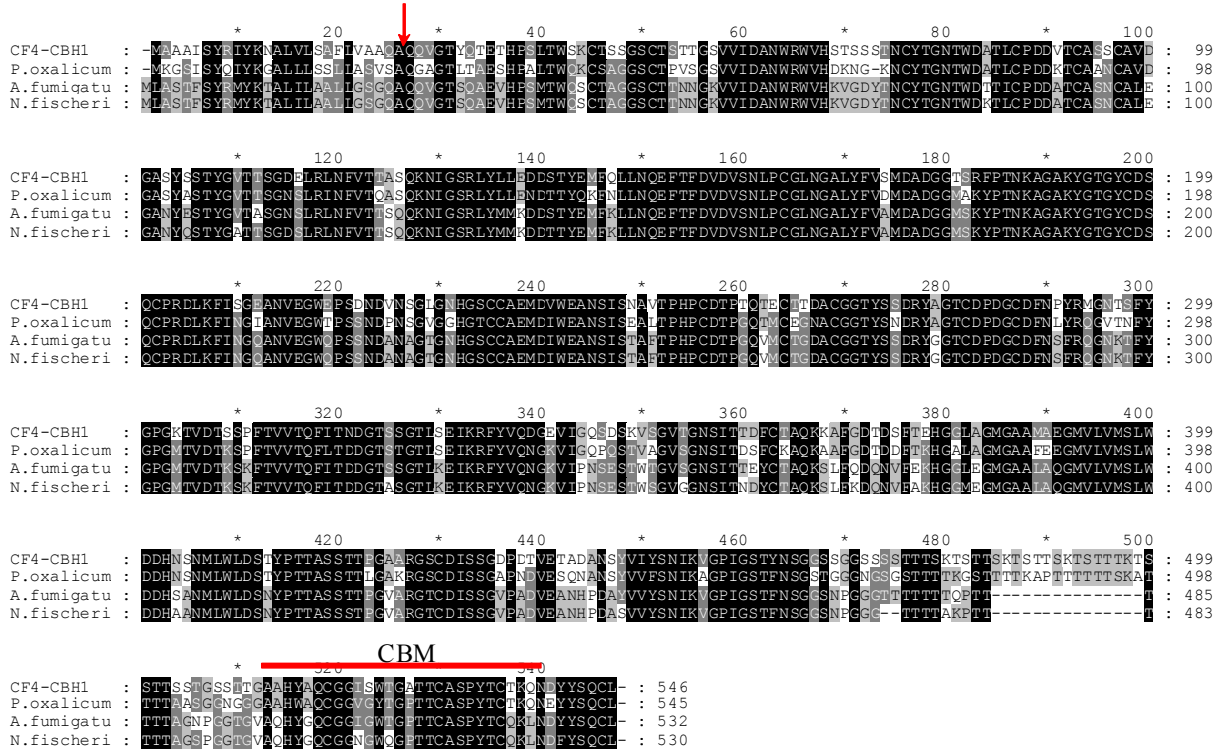


그림 3-11. 신규한 Cf4 셀룰라제의 아미노산 동질성 분석

*Penicillium* sp. CF4 유래의 두 번째 셀룰라제 유전자 (PeCBH2)는 인트론을 2개 포함하고 있는 1,359 bp의 염기로 구성되어 있으며 유추된 아미노산 서열은 17개의 분비시그널을 포함하는 452개의 아미노산으로 구성된 exoglucanase 였으며 *Penicillium decumbens* 유래의 CBH와 78.4% 아미노산 유사성을 나타내었다 (그림 3-10). PeCBH1와는 달리 PeCBH2 CBM을 함유하지 않고 있으나 두 단백질은 71.1%의 유사도를 나타내었다 (그림 3-12). 동일한 방법을 사용하여 클로닝된 *Penicillium dipodomycolaisolate* H7 유래의 exo-cellobiohydrolase, H6-CBH1은 인트론이 없는 1,614 bp의 염기로 구성되어 있으며 유추된 아미노산 서열은 25개의 분비시그널과 셀룰로즈 결합 모듈 (cellulose binding module, CBM)을 포함하는 538개의 아미노산으로 구성되었다. 이러한 방법을 통하여 다수의 신규 셀룰라제 유전자를 용이하게 클로닝할 수 있었다. 상기한 유전자 이외에도 신규 cellobihydrolase 및 endoglucanase 유전자를 다수 클로닝 (10종 이상 확보)하여 특성분석 및 효모를 이용하여 재조합 발현 연구를 진행하였다

```

PeCBH1 : MAAAI SYR IYK NALVLSA FLVAAC AQQVGT YQTETH PSLTWSKCTSSGSC : 50
PeCBH2 : -----MQQRALLLSALVAVARAQQAGTQTSETKPSLTWQKCTPASC-C : 41

PeCBH1 : TSTTGSVV IDANWRWVHSTSSSTNICYTGN TWDATLCPDDEVTCASSCAVDG : 100
PeCBH2 : TDCSGSVG IDANWRWVHSTDCGTTNICYTGN EWDADLCPDDETTCATNCALDG : 91

PeCBH1 : ASYSS TYGVTTSGDELRLNFVITASQKNIGSRLYLLEDDSTYEMFQLLNQ : 150
PeCBH2 : ADYSGTYGVEADGDSLSLITFKTGS---NVGSRLFLMEDDSTYQMFQLLNQ : 138

PeCBH1 : EFTFDVDVSNLPCGLNGALYFVSMADAGGTSRFP TNKAGAKYGTGYCDSQ : 200
PeCBH2 : EFTFDVDVSA LPCGLNGALYFVSMADAGG LSKYENNKAGAKYGTGYCDSQ : 188

PeCBH1 : CPRDLKFI SGEANVEGWEPDNDVNSGLGNHGSCCAEMDVWEANSISNAV : 250
PeCBH2 : CPRDLKFI NGQGNVDGWEPDNDVNA GVGGHGSCCAEMDIWEANKISTAV : 238

PeCBH1 : TPHPCDTPTQTECTTDACGGTYSSRYAGTCDPDGCDFN PYRMGNISFYG : 300
PeCBH2 : TPHPCKEAGQTMCEGDS CGGTYSSRYAGTCDPDGCDFN PYRMGNISFYG : 288

PeCBH1 : PGKTVDTSSPFTVVTQFITNDCTSSGTLSEIKRFYVQDGEVIGQSDSRVVS : 350
PeCBH2 : PGKTVDTSSKMTVATQFITSDNITFTGTLSEIKRIYVQNGKVIANSASDVS : 338

PeCBH1 : GVTGNSITTD FCTAQQKAFGDEI DSEFT EHGGLAGMGAAMAE GMLVMSLWD : 400
PeCBH2 : GVSGNSITSD FCTAQQKAFGDEI VFAQYNGMSGMGEGLEQQGMLVMSLWD : 388

PeCBH1 : DHNSNMLWLDSTYPTTASSTTPGARGSCDISSGDFDTVETALANSYVIY : 450
PeCBH2 : DHYANMLWLD SNYPTNATASDPGARGTCGADSGKPADVESASADAKVVE : 438

PeCBH1 : SNIKVGFI GSTYNSGGSSGGSSSSTTTSKTSTTSKTSTTSKTSTTTKTSS : 500
PeCBH2 : SNIKVGAIGSTYSS----- : 452

PeCBH1 : TTSSSTGSSTTGA AHYAQC GGISWTGATT CASPYTCTKQNDYYSQCL- : 546
PeCBH2 : ----- : -

```

그림 3-12. PeCBH1과 PeCBH2 간의 단백질 유사도 분석

#### 다. 신규 효소의 특성분석

효모 단백질 맞춤형 분비인자 스크리닝 기술인 TFP (translational fusion partner) 기술을 이용하여 선별된 PeCBH1 및 PeCBH2 유전자를 발현하여 각 효소를 고분비 생산하는 균주를

1차 선별하였다 (그림 3-13). 각 효소를 고분비하는 벡터로 STFP-22와 STFP13을 포함하는 벡터를 그림 3-14와 같이 선별하여 기존 알려진 다른 분비시그널과 차이가 있는지 확인하기 위하여 원래 PeCBH1 및 2 고유의 분비시그널과 효모에서 주로 많이 사용하는 분비시그널인 mating factor alpha (MFa)을 사용하여 분비능을 비교하였다 (그림 3-15). 각각의 발현벡터를 함유하는 효모균주를 배양하고 배양상등액을 SDS-PAGE 분석한 결과, TFP22-PeCBH1 균주에서 강한 밴드들이 관찰되었고 (그림 3-15-A), pNPC 기질을 이용하여 exoglucanase 활성을 분석한 결과 자체 시그널 보다 약 33%, MFa 보다 약 31% 더 높은 활성을 확인하였다 (표 3-4 (a)). PeCBH2의 경우에도 TFP13-PeCBH2 균주에서 강한 밴드가 관찰되었으며 (그림 3-15-B) 자체 분비시그널보다 약 21%, MFa 분비시그널 보다 약 24% 더 높은 활성을 확인하였다 (표 3-4 (b)). 따라서 고분비발현을 위한 최종균주로서 pTFP22-PeCBH1, pTFP13-PeCBH2를 함유한 균주를 선별하였다.

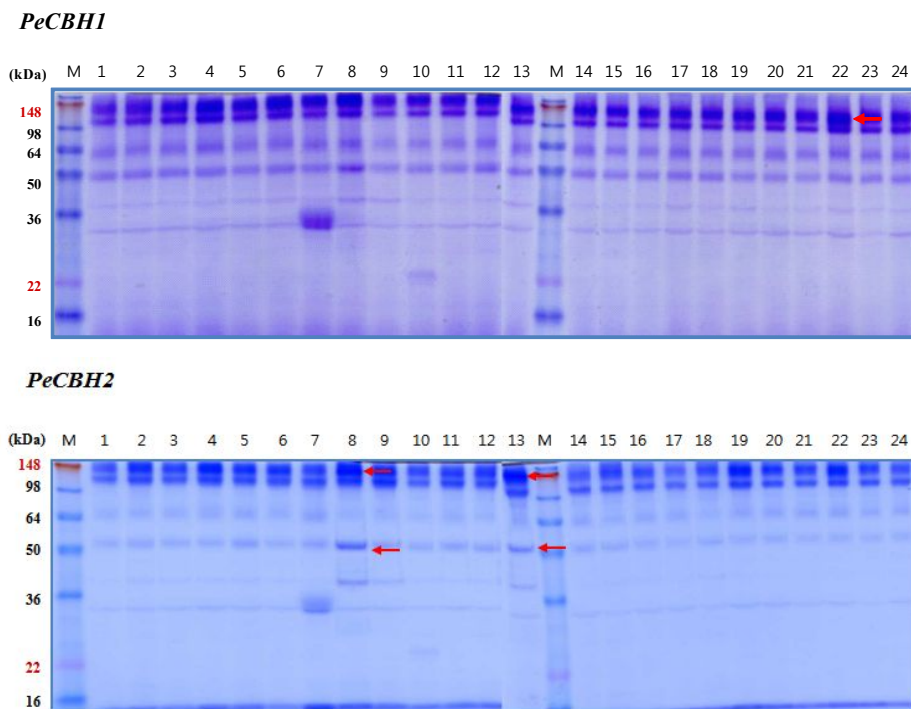


그림 3-13. PeCBH1과 PeCBH2의 고분비 생산 균주의 선별

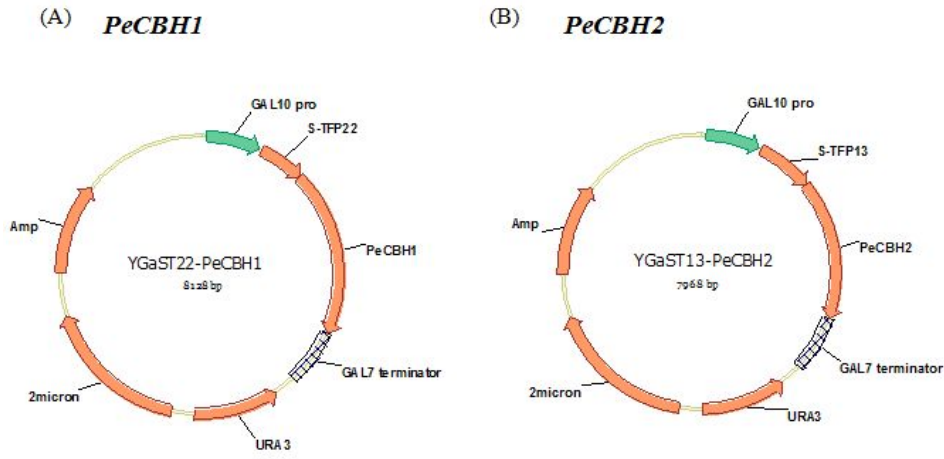


그림 3-14. *PeCBH1*과 *PeCBH2* 발현벡터

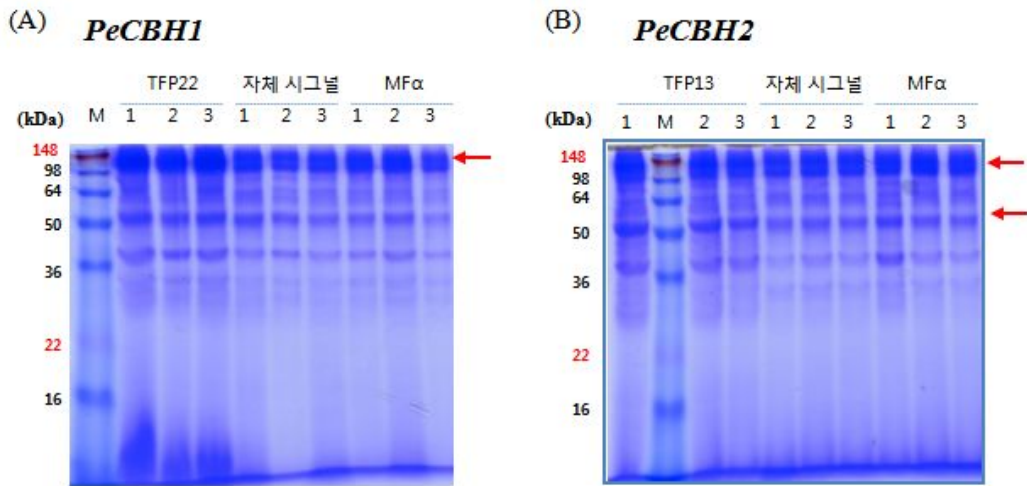


그림 3-15. *PeCBH1* 및 2의 분비를 위한 분비시그널의 비교

표 3-4. *PeCBH1*과 *PeCBH2* 에서 선별한 균주들의 엑소글루카나제 활성 분석

(a) *PeCBH1*

	exo-cellobiohydrolase activity (u/ml)
TFP22	0.974
자체 분비시그널	0.649
MFα 분비시그널	0.675

(b) *PeCBH2*

	exo-cellobiohydrolase activity (u/ml)
TFP13	0.623
자체 분비시그널	0.491
MFα 분비시그널	0.473

상기한 Y2805/ST22-PeCBH1, Y2805/ST13-PeCBH2 생산균주를 이용하여 셀룰라제를 대량 생산하기 위하여 5L 발효조에서 유가식 배양을 수행하였다. 본 배양에 들어가기 전에 50 ml YNB (0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노에시드, 2% 글루코스)배지에 초기 배양한 후 다시 200 ml의 YEPD 액체배지에서 배양하여 활성화하고 본 배양액에 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배지에 분비된 PeCBH1 를 확인하기 위하여 시간별 배양상등액을 SDS-PAGE 분석하였고 48시간동안 발효 배양 후 약 16 unit/ml의 활성을 확인하였다 (그림 3-16). PeCBH2 도 상기와 동일한 방법으로 발효 생산 후 배지에 분비된 효소를 확인하기 위하여 시간별 배양상등액을 SDS-PAGE 분석하였고 48시간 동안 발효 배양 후 약 13.6 unit/ml의 활성을 확인하였다 (그림 3-17).

**PeCBH1**

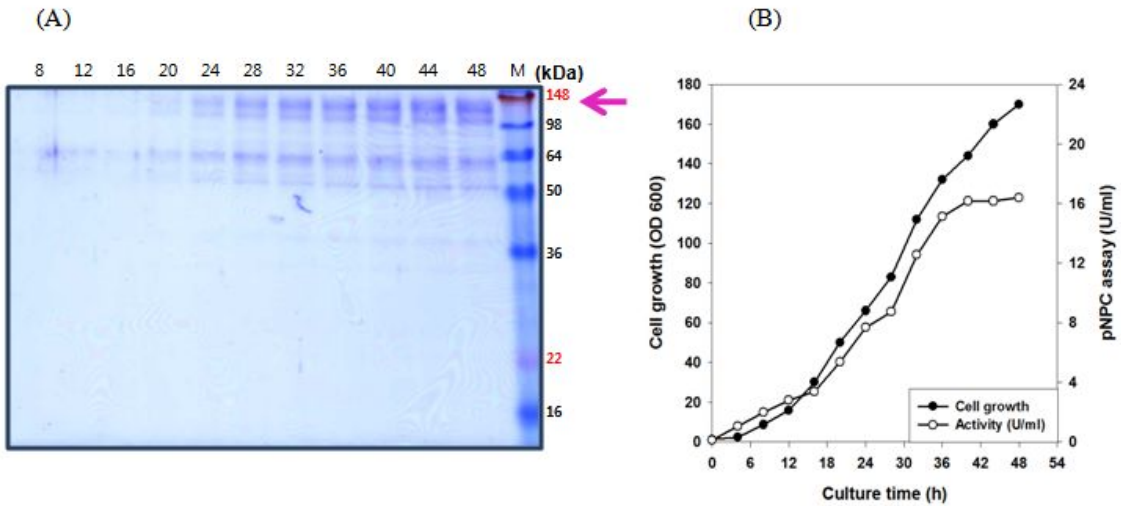


그림 3-16. PeCBH1 생산을 위한 발효생산을 위한 유가식 배양 프로파일

## PeCBH2

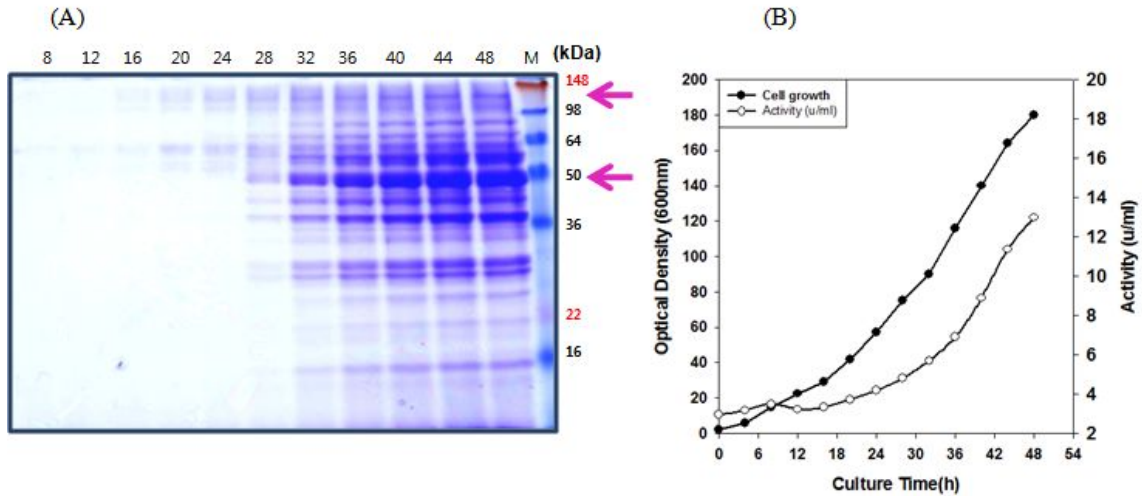


그림 3-17. PeCBH2 생산을 위한 발효생산을 위한 유가식 배양 프로파일

각 단백질의 특성분석을 위하여 각 단백질의 분리정제 연구를 수행하였다. 발효 생산된 PeCBH1 단백질은 50mM Tris 완충용액 (pH8.0)으로 한외여과 (분자량 30 kDa cut-off)를 이용하여 농축하였고, 이온 교환 크로마토그래피 방법으로 정제하기 위하여 50 mM Tris 완충용액 (pH8.0)으로 효소농축액을 HiTrap DEAE 컬럼에 흡착시킨 뒤 0에서 1 M까지의 NaCl (pH8.0) 상승 농도 기울기로 효소를 용출시켰다 (그림 3-18). 셀룰라제 활성을 가지는 분획을 모아 50 mM Tris 완충용액 (pH8.0)으로 투석한 후 2차 이온 교환 크로마토그래피 방법으로 HiTrap Qff 컬럼을 선택하여 같은 완충용액으로 효소 투석액을 흡착시키고 0에서 1 M까지의 NaCl (pH8.0) 상승 농도 기울기로 효소를 용출시켜 높은 exoglucanase 활성을 가지는 분획을 모았다. 발효 생산된 PeCBH2 단백질은 상기 PeCBH1과 동일하게 50 mM Tris 완충용액 (pH8.0)으로 한외여과 (분자량 30 kDa cut-off)를 이용하여 농축하였고, 이온 교환 크로마토그래피 방법으로 정제하기 위하여 50 mM Tris 완충용액 (pH8.0)으로 효소농축액을 HiTrap DEAE 컬럼에 흡착시킨 뒤 0에서 1 M까지의 NaCl (pH8.0) 상승 농도 기울기로 효소를 용출시켜 높은 exoglucanase 활성을 가지는 분획을 모았다 (그림 3-19). 효소 정량은 Bradford 방법을 사용하였고 bovine serum albumin을 표 3-준물질로 이용하였으며 정제 과정에 따른 결과는 표 3-5에 정리하였다.



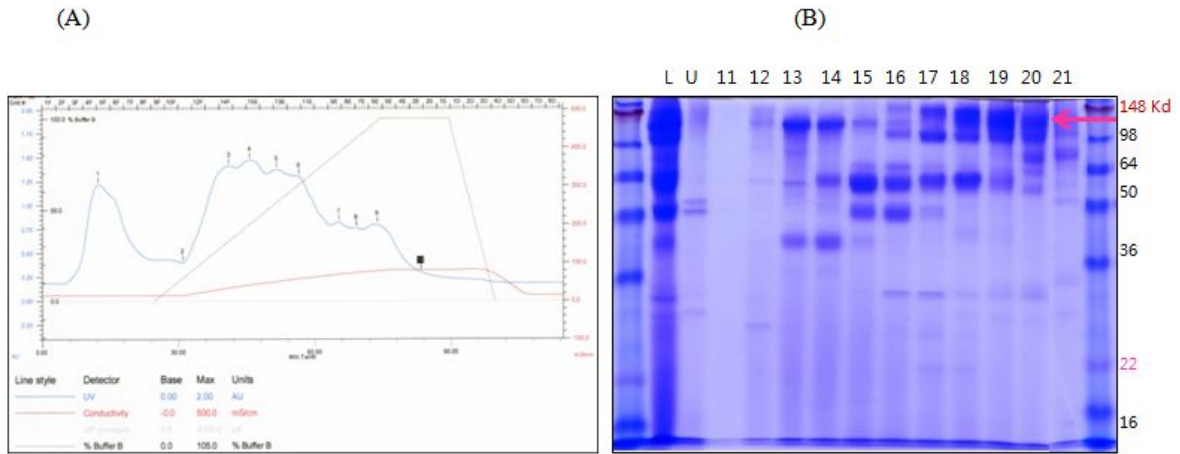


그림 3-18. PeCBH1 정제를 위한 ion-exchange 크로마토그래피

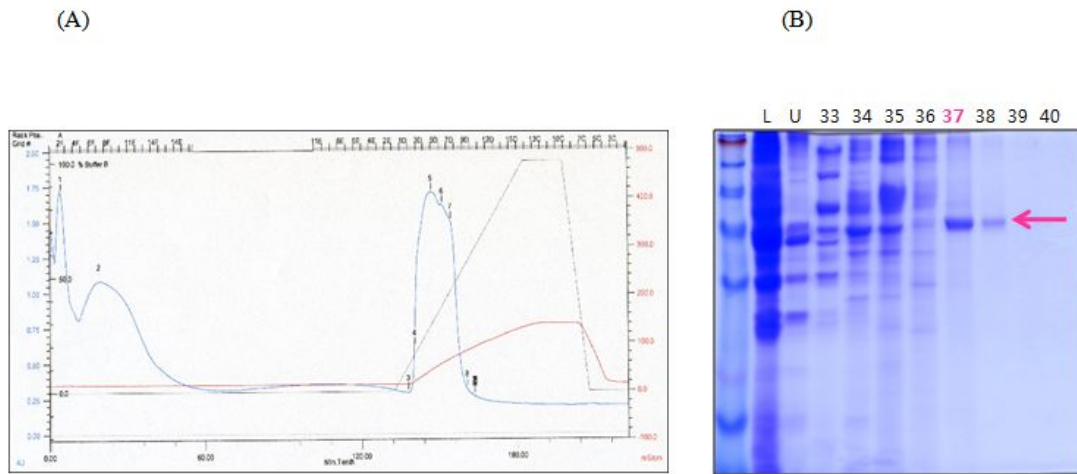


그림 3-19. PeCBH2 정제를 위한 ion-exchange 크로마토그래피

표 3-5. PeCBH1과 PeCBH2 의 정제결과

(a) *PeCBH1*

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield	Fold
Ultrafiltration	58.60	1434.10	24.47	1.00	1.00
DEAE ion exchange chromatography	13.52	527.12	38.99	0.63	1.59
Qff ion exchange chromatography	1.90	84.49	44.47	0.88	1.82

(b) *PeCBH2*

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield	Fold
Ultrafiltration	1232.55	1112.40	0.90	1.00	1.00
DEAE ion exchange chromatography	69.78	337.53	4.84	0.19	5.36

정제한 각 효소의 특성분석을 위하여 PeCBH1 및 2 를 대상으로 각각의 최적 pH와 최적 온도를 조사하였다. 효소의 최적 pH를 분석하기 위하여 sodium citrate (pH3.0 ~ 4.5), sodium acetate (pH 4.5 ~ 5.5), phosphate (pH5.5 ~ 8.0) 완충용액을 사용하였고, 최적 온도를 분석하기 위하여 30℃에서 70℃까지 사용하여 exoglucanase의 활성을 분석하였다. 이러한 결과로부터 PeCBH1은 pH 5 와 50 ℃ 에서 최대 활성을 나타내었고 (그림 3-20), PeCBH2는 pH 5 와 5 ℃ 에서 최대 활성을 나타내었다 (그림 3-21).

### PeCBH1

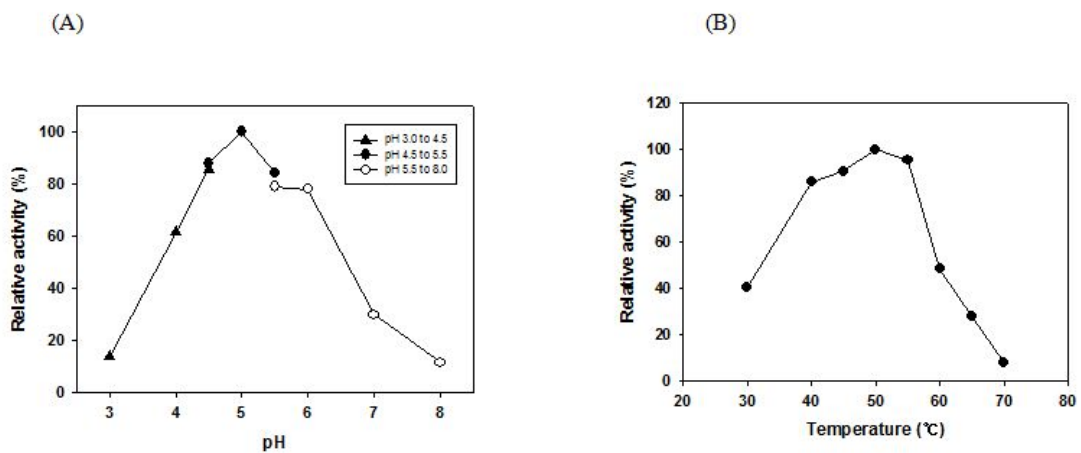


그림 3-20. PeCBH1의 최적 pH 및 최적온도

**PeCBH2**

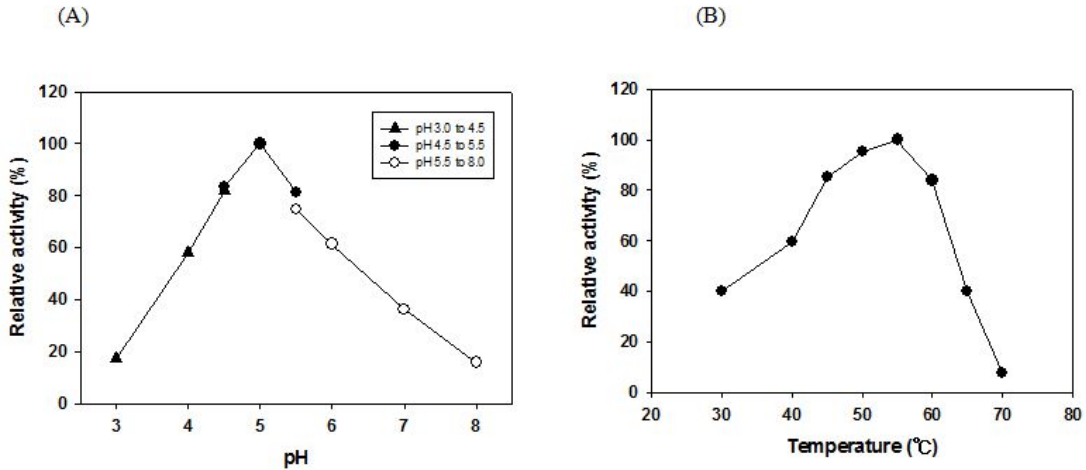


그림 3-21. PeCBH2의 최적 pH 및 최적온도

정제한 PeCBH1과 PeCBH2 효소가 선호하는 섬유소 기질 타입이 섬유소 chain중 reducing end 인지 non-reducing end 인지를 알아보기 위해 TLC 실험을 하였다. 0.1 ml의 정제한 효소 용액을 0.9 ml의 기질용액 (50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0), 1 mg/ml의 p-Nitrophenyl-beta-D-celotetraoside)과 50°C에서 0분에서 15분 동안 5분 간격으로 반응한 후 반응 용액과 동량의 2% 탄산나트륨을 첨가해 반응을 멈추고 각 시간별 가수분해 산물을 TLC 용 유리 실리카겔 위에 점을 찍어 건조하는데, 이 때 사용한 표 3-준물질은 글루코스 (G1), 셀로바이오스 (G2), 셀로트리오스 (G3), 셀로테트라오사이드 (G4)와 pNP-beta-D-glucofuranoside (pNPG1), pNP-beta-D-cellobioside (pNPG2), pNP-beta-D-celotrioside (pNPG3), pNP-beta-D-celotetraoside (pNPG4)의 여덟 종류로 시간별 각 효소의 분해산물을 보여주는 지표 3-로 사용하였다 (그림 3-22-A).

표 3-2. 확보된 셀룰라제 유전자 및 특성표 3-준물질과 시간별 효소 산물의 분리 목적으로 사용한 용리액은 acetonitrile과 증류수의 비율이 80:20 (v/v)이 되도록 하였고, 건조 후 당을 탐지하기 위하여 100 ml stock 용액 (100 ml acetone, 1 ml aniline, 1 g diphenylamine)에 10 ml phosphoric acid를 섞은 용액을 실리카겔에 뿌려서 건조하였다. 120°C에서 유리 실리카겔의 당이 발색될 때까지 반응하였고 이로부터 섬유소의 non-reducing 말단에 셀룰라제 활성을 갖는 것으로 알려져 있는 *T. reesei* CBH2는 pNP-beta-D-celotetraoside 기질을 시간이 지날수록 셀로바이오스와 pNP-beta-D-cellobioside로 자르는 반면, PeCBH1과 PeCBH2는 사용한 기질을 셀로트리오스와 pNP-beta-D-glucofuranoside로 자르는 reducing 말단 셀룰라제 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-22-B).

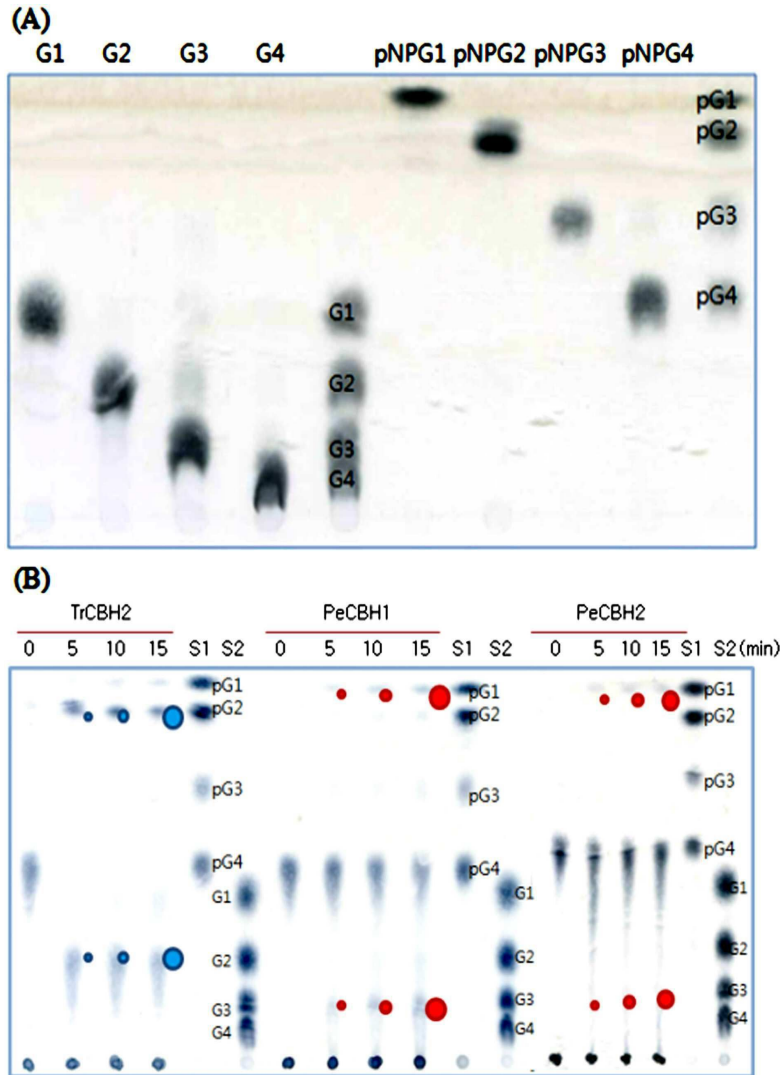


그림 3-22. PeCBH1 및 PeCBH2의 섬유소 기질 타입 결정을 위한 TLC 결과

신규곰팡이로부터 분리된 H6-CBH1 유전자에 대해서도 효모 *S. cerevisiae* 균주에서 재조합 발현하여 효소의 특성을 분석하였다. H6-CBH1 유전자를 발현하기 위하여 분비시그널을 제외한 H6-CBH1 유전자를 효모에서 단백질의 분비발현을 유도하는 24종의 단백질 분비융합인자 (TFP, Translational Fusion Partner)를 함유한 벡터와 함께 효모에 형질전환하고 *in vivo* recombination을 통해 발현벡터가 구축되도록 하였다. 형질전환된 균체 24 종류를 무차위적으로 선택하여 YPDG 배지에서 배양하고 농축액을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (그림 3-23). 배양 상등액의 활성분석을 통해 SDS-PAGE상에 나타난 밴드와 고활성을 보이는 균주를 각각 선별하였다. H6-CBH1을 가장 잘 분비 생산하는 TFP로는 13번을 선택하였고 단백질을 발현하는 벡터는 그림 3-24과 같다.

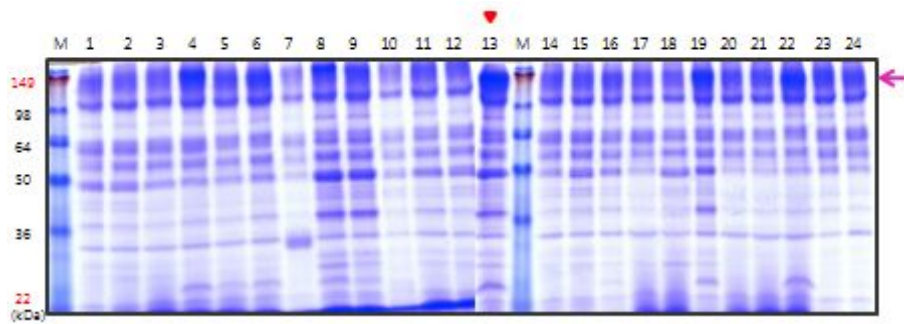


그림 3-23. H6-CBH1의 고분비 생산 균주 선별

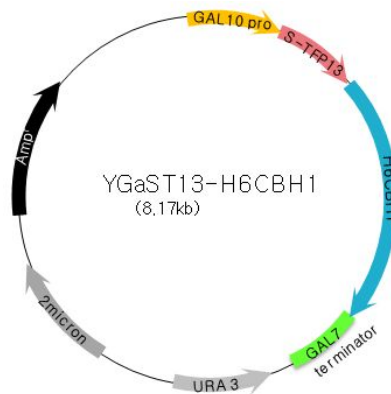


그림 3-24. H6-CBH1의 발현 벡터 구축

상기한 Y2805/ST13-H6-CBH1 생산 균주를 이용하여 셀룰라제를 대량생산하기 위하여 5L 발효조를 이용하여 유가식 배양하였다. 본 배양에 들어가기 전에 50 ml의 최소 액체 배지 (0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노에시드, 2% 포도당)에 1단계 초기배양을 한 후 다시 200 ml의 YEPD 액체배지 (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당)에서 배양하여 활성화 시킨 후 본 배양액 (6% 효모추출물, 3% 펩톤, 2% 포도당)에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 발효 중에 포도당에 의해서 셀룰라제가 충분히 발현 생산될 수 있도록 12시간 이후부터는 지속적으로 추가 배지 (5% 효모추출물, 30% 포도당)를 첨가해주었다. 배양 시간 별로 채취한 배지 10 ul를 SDS-PAGE 분석하여 각 셀룰라제의 분비량을 확인하였고 (그림 3-25), 48시간 동안 발효 배양 후 약 11 unit/ml의 활성을 보였다.

유가식 배양 후 농축된 exoglucanase 효소를 이용하여 정제를 수행하였다. DEAE-Sepharose 컬럼을 이용하여 이온교환 크로마토그래피를 수행하였고, 10 mM ammonium acetate buffer (pH 7.0)로 레진을 충분히 평형화시킨 후, 조효소액 5 ml를 로딩하여 0.2 ml/분의 유속으로 0에서 1M NaCl 농도구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 각 분획의 활성을 측정하여 활성이 나타나는 5, 6, 7번 분획만을 회수하여 amicon ultra-4 (Millipore, 30K NMWL 디바이스)를 이용하여 농축하였다 (그림 3-26).

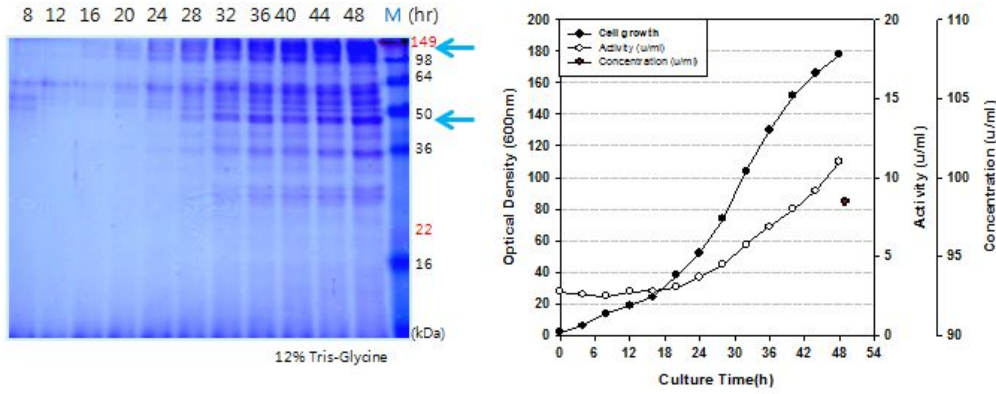


그림 3-25. H6-CBH1 생산을 위한 발효생산을 위한 유가식 배양 프로파일

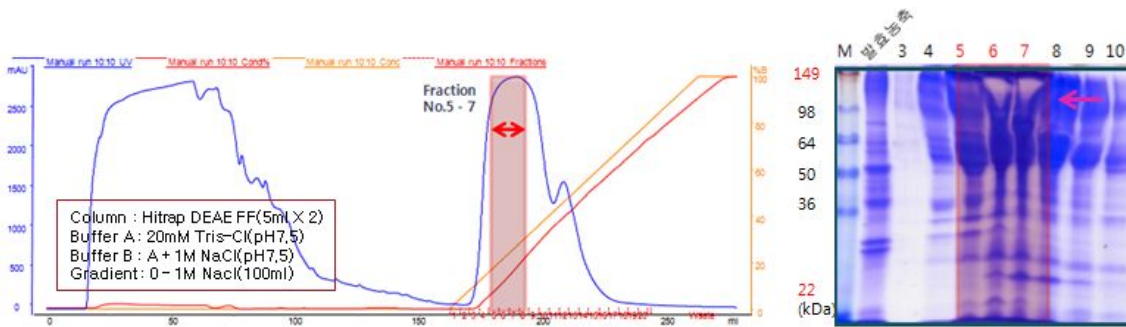


그림 3-26. Ion exchange chromatography를 통한 H6-CBH1 발현 단백질의 분리

정제된 exoglucanase의 특성을 조사하기 위해 정제된 조효소액을 사용하여 효소 활성에 미치는 pH와 온도의 영향을 조사하였다. 온도의 영향을 조사하기 위하여 30~70°C의 범위에서 반응시킨 후 각각의 활성을 측정하였고, 활성이 가장 높은 온도를 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 그 결과, 그림 3-27과 같이 최적 반응온도가 55°C임을 알 수 있었다. 또한, 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 sodium citrate (pH 3.0 ~ 4.5), sodium acetate (pH 4.5 ~ 5.5), phosphate (pH 5.5 ~ 8.0) 완충용액을 사용하여 50°C에서 반응시킨 후, 효소 활성을 측정하였다. 각 pH에서 상대적인 활성을 조사한 결과 pH 4.50에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 4.0 ~ 5.0의 산성 pH에서 비교적 안정한 것으로 확인되었다 (그림 3-27).

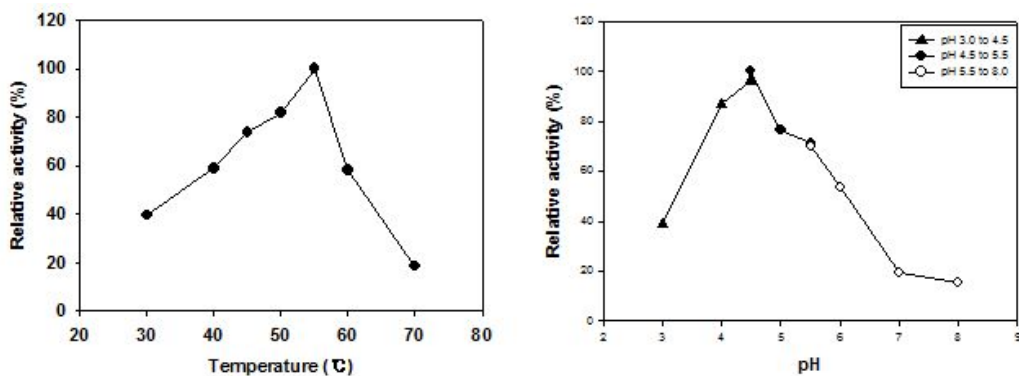


그림 3-27. 발현된 H6-CBH1의 최적 온도, pH

정제한 H6-CBH1 효소가 선호하는 섬유소 기질 타입이 섬유소 chain중 reducing end 인지 non-reducing end 인지를 알아보기 위해 TLC 실험을 하였다. 0.1ml의 정제한 효소 용액을 0.9ml의 기질용액 (50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0), 1 mg/ml의 p-Nitrophenyl-beta-D-cellotetraoside)과 50°C에서 0분에서 15분 동안 5분 간격으로 반응한 후 반응 용액과 동량의 2% 탄산나트륨을 첨가해 반응을 멈추고 각 시간별 가수분해 산물을 TLC 용 유리 실리카겔 위에 점을 찍어 건조하는데, 이 때 사용한 표 3-준물질은 글루코스 (G1), 셀로바이오스 (G2), 셀로트리오스 (G3), 셀로테트라오사이드 (G4)와 pNP-beta-D-glucopyranoside (pNPG1), pNP-beta-D-cellobioside (pNPG2), pNP-beta-D-cellotrioside (pNPG3), pNP-beta-D-cellotetraoside (pNPG4)의 여덟 종류로 시간별 각 효소의 분해산물을 보여주는 지표 3-로 사용하였다(그림 3-28). 표 3-준물질과 시간별 효소 산물의 분리 목적으로 사용한 용리액은 acetonitrile과 증류수의 비율이 80:20 (v/v)이 되도록 하였고, 건조 후 당을 탐지하기 위하여 100ml stock 용액 (100 ml acetone, 1 ml aniline, 1 g diphenylamine)에 10 ml phosphoric acid를 섞은 용액을 실리카겔에 뿌려서 건조하였다. 120°C에서 유리 실리카겔의 당이 발색될 때까지 반응하였고 이로부터 H6CBH1은 사용한 기질을 셀로트리오스와 pNP-beta-D-glucopyranoside로 자르는 reducing 말단 셀룰라제 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-28).

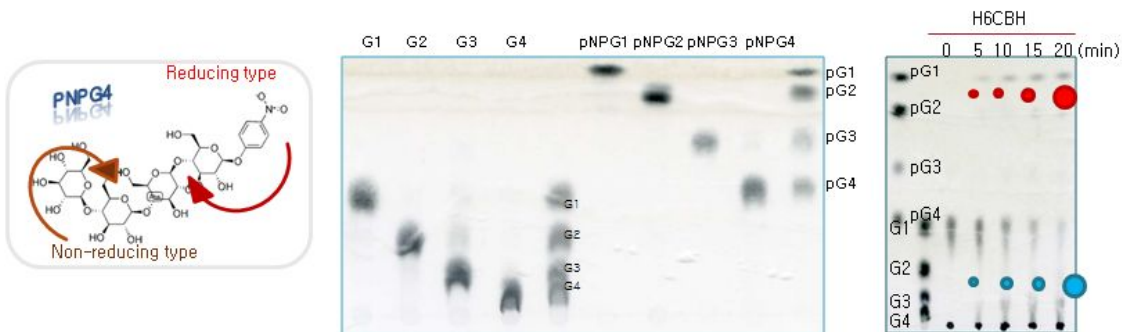


그림 3-28. 발현된 H6-CBH1의 cellulose 말단의 활성 type 결정

#### 4. 고효율 셀룰라제 개량체 개발

##### 가. Directed evolution기술 활용 $\beta$ -glucosidase 활성개량

단백질공학기술을 이용하여 기존 셀룰라제의 활성 개량을 위하여 현재 셀룰라제 생산을 위해 전세계적으로 사용되는 곰팡이인 *Trichoderma reesei* 균주에서 활성 bottleneck이 되고 있는 효소인  $\beta$ -glucosidase를 대상으로 선택하였다.  $\beta$ -glucosidase 유전자의 개량을 위해 형질전환을 통해 직접 고효율 균주를 선별할 수 있는 배지를 개발 (그림 3-29)하고 error-prone PCR을 통해 무작위 변이가 도입된 유전자 library를 효모에 형질전환 한 후 선별배지에서 성장하는 균주를 발굴하였다 (그림 3-30).

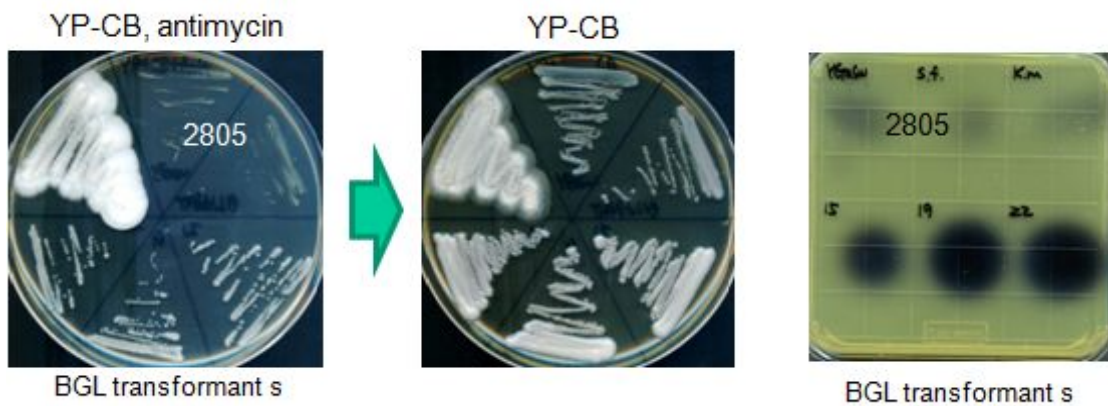
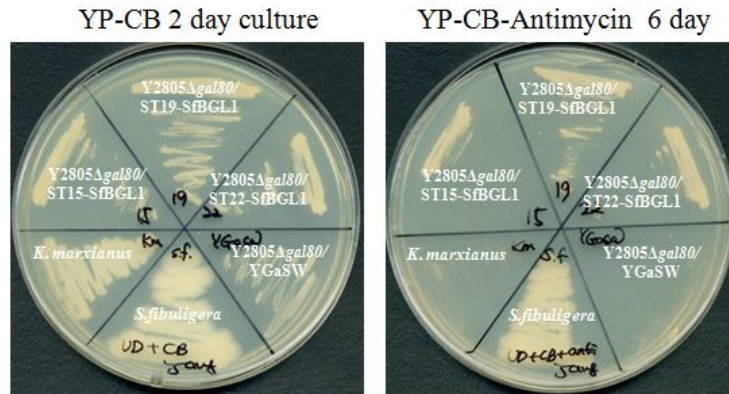


그림 3-29.  $\beta$ -glucosidase 활성증가 균주의 선별

발굴된 균주가 실제로 효소 활성이 증가되었는지 확인하기 위하여 각 균주를 액체배양하고 배양 상등액에서의  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정 한 결과 대조구에 비해 약 45% 정도의 활성이 증가된 변이유전자를 확보하였다 (표 3-6)

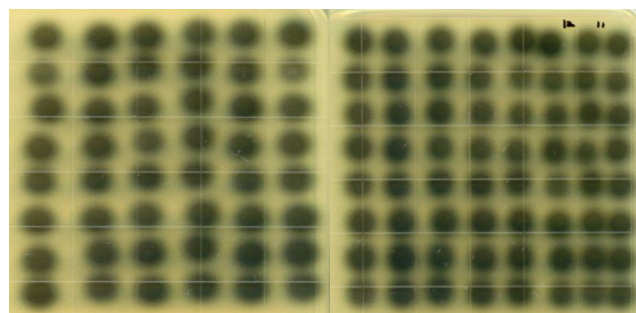


그림 3-30. Esculin을 이용한 변이 균주 선별



표 3-6.  $\beta$ -glucosidase 변이 균주의 효소 활성비교

Number	Cell growth (OD600)	Activity (Unit/ml)
Control (gal1/sfBGL1)	14.0	1378.6
1	15.1	1469.8
2	15.2	1458.4
3	14.5	1402.5
4	14.3	1413.5
5	14.6	1574.2
6	15.0	1545.6
7	15.3	1788.9
8	14.7	1678.2
9	14.0	1477.6
10	15.5	1793.8
11	14.6	1635.2
<b>12</b>	<b>16.3</b>	<b>1994.5</b>
13	15.0	1563.6
<b>14</b>	<b>15.7</b>	<b>1874.1</b>
15	14.4	1423.3
16	14.3	1310.3
17	14.5	1369.8

#### 나. Exoglucanase 활성개량

##### (1) TrCBH1의 당쇄제어

효모에서 생산한 *Trichoderma reesei* 유래의 TrCBH1이 성공적으로 분비 생산되었음에도 활성이 약한 단점이 있었다. 그 원인을 단백질 기능에 영향을 줄 수 있는 효모의 hyper N-glycosylation 때문일 것으로 판단하고 이를 개선하기 위해 NetNGlyc v1.0 프로그램을 이용하여 TrCBH1 내의 N-glycosylation을 예측하였고 그로부터 세 군데 (45, 270, 384aa)의 glycosylation 됨을 확인하였다. 단백질 구조에 영향을 최소화하고 glycosylation만을 선택적으로 제어하기 위하여 각 위치의 아스파라긴 아미노산을 가장 작은 아미노산인 알라닌과 아스파라긴과 가장 유사한 아미노산인 글루타민으로 치환하였다. 아미노산 변이체는 PCR primer를 이용하는 site directed mutagenesis 방법을 이용하여 제작하여 활성을 비교하였다 (그림 3-31).

Glycosylation site를 제거하여 hyperglycosylation이 되지 않도록 유도한 효모 TrCBH1 재조합 균주는 control로 비교한 효모 TrCBH1 재조합 균주와 비교하였을 경우 hyperglycosylation이 되지 않기 때문에 SDS-PAGE 상에서 단백질의 크기가 줄어드는 것을

확인할 수 있었으나 단백질 분비생산량이 확연히 줄어드는 것을 확인하였고 배지내 전체 활성에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 효모에서 발현된 재조합 *Trichoderma reesei* 유래의 TrCBH1의 활성은 효모의 hyper N-glycosylation에 의해 활성에 영향을 받지만 glycosylation을 제거함으로써 단백질분비량이 줄어드는 문제가 있어서 효과적인 방법이 아닌 것으로 판단되었다.

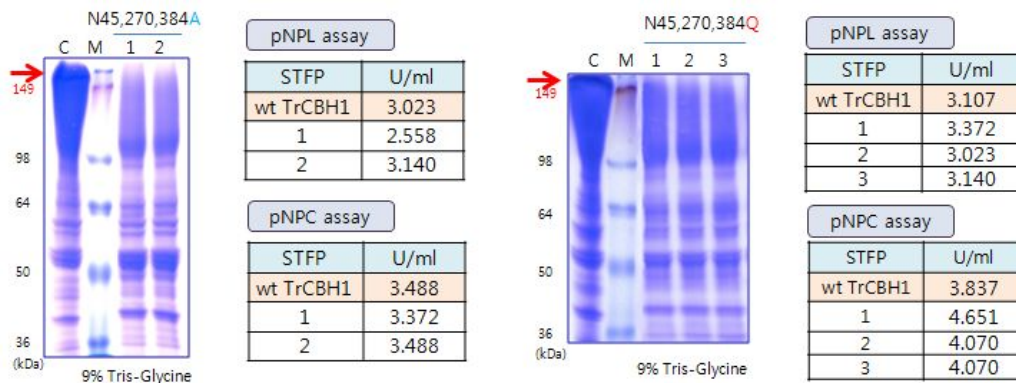


그림 3-31. deglycosylation을 유도한 재조합 효모 유래의 TrCBH1 효소의 활성 분석

곰팡이 셀룰라제 cocktail은 exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase,  $\beta$ -xylosidase 등 20여가지의 효소로 구성된 혼합 단백질이며 그중에서 exoglucanase는 전체 단백질의 70%이상을 차지하는 가장 핵심적인 효소이다. 1단계에서 개발한 효모 유래의 재조합 셀룰라제 cocktail 이 상용화된 셀룰라제 mix에 비하여 상대적으로 낮은 활성을 보이는 주된 이유는 KRIBB cellulase cocktail (KCC)에 포함된 exoglucanase의 낮은 활성이 가장 큰 이유이기 때문에 단백질 공학 기술을 이용하여 TrCBH1의 활성을 개량하는 실험을 진행하였다.

Directed evolution 기술 활용하여 효소의 활성을 개량하기 위해서는 개량체를 신속하고 손쉽게 확인할 수 있는 방법이 필요하다. 셀룰라제의 경우 pNPC를 기질로 이용하여 광학적으로 활성을 측정하는 방법과 Congo Red를 이용하여 고체배지에서 활성을 확인할 수 있는 방법이 개발되었으나 많은 수의 균체를 동시에 확인하는 방법으로는 사용할 수 없는 단점이 있다. 본 연구과제에서는 MUL (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-lactoside, MULac, Sigma)을 기질로 사용하여 고체배지에서 셀룰라제 활성 측정이 가능한지를 우선 확인하였다.

MUL은 endoglucanase와 beta-glucanase에 의해서도 분해되어 활성을 나타내지만 아직까지 exoglucanase에서만 활성을 보이는 기질이 존재하지 않기 때문에, exoglucanase의 상대적 활성 분석이 가능할 것이라 판단하고 이것을 기질로 이용하였다. 1mM MUL (MULac, Sigma)을 고체배지에 첨가하여 활성 측정 기질로 사용하였다. 참고로 그림 3-32는 1 mM MUL을 고체배지에 첨가하였을 때 endoglucanase와 exoglucanase 재조합 균주가 UV 상에서 형광을 나타낼 수 있음을 보여주고 있다. Endoglucanase (EGL2)를 발현하는 균주와 함께 exoglucanase PeCBH과 PeCBH2를 발현하는 균주는 셀룰라제를 발현하지 않는 균주 (Y2805)에 비하여 밝은 halo를 형성함을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 방법은 셀룰라제의 directed evolution에 적

용할 수 있을 것으로 판단되며 TrCBH1 유전자를 error-prone PCR을 이용하여 1kb 당 2-4개의 돌연변이를 유도하고 *in vivo* recombination을 이용하여 형질전환과 발현백터 제작을 동시에 진행하는 방법으로 효소 개량 연구를 진행하였으나 현재까지 활성이 크게 개량된 변이주를 확보하지 못하였다. 전세계적으로 exocellulase의 활성을 개량하기 위한 시도가 지속 진행 중이지만 고속 선별방법의 부재로 인하여 상당한 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.

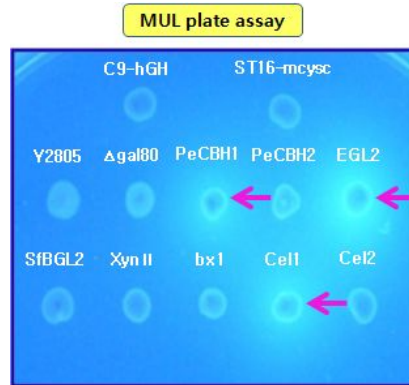


그림 3-32. MUL을 이용한 재조합 효모 유래 셀룰라제의 효소 활성 분석

(2) 단백질융합기술 활용 셀룰라제 분비능 개량 및 당쇄변이주 개발

곰팡이 유래의 섬유소분해 효소를 효모를 이용하여 재조합 대량생산하기 위해서는 효모에서 작동하는 효율적인 자체 분비시그널이 반드시 필요하고 분비효율 증진을 위해서 분비융합 파트너를 활용하는 것이 효율적인 경우가 있다. 따라서 효모 유래의 분비 유도 단백질 유전자를 확보하기 위하여 효모의 secretome을 분석하여 분비가 잘 되는 단백질 10여종을 확보하였다 (특허출원 PCTPCT/ KR2008/007231 )(그림 3-33).

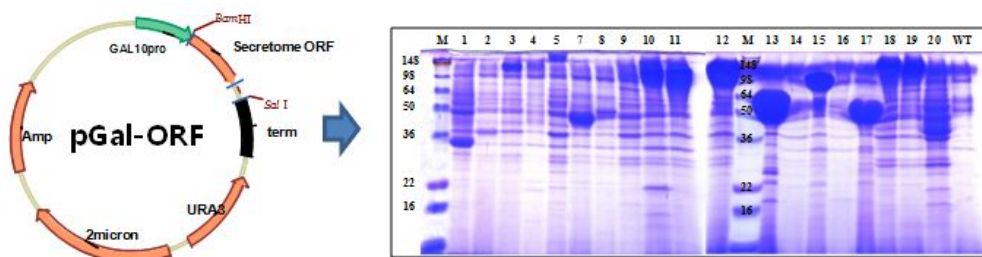


그림 3-33. 효모 secretome 분석을 통해 발굴된 고분비단백질

선별된 분비융합인자 (SFP, Secretion Fusion partner)중 분비활성이 낮은 곰팡이 endoglucanase, FpCel5의 분비를 촉진하는 SFP를 선별하고 효모에서 융합발현한 결과 그림 3-34에서 보는 바와 같이 FpCel5의 분비활성을 7배 이상 개선되었다. 그러나 SFP와 융합된 FpCel5는 효모 glycosylation에 의해 실제크기 (55 kD) 보다 상당히 큰 위치 (100 kD)에 나타

났는데 이로 인한 활성저하 문제가 있는지 확인하기 위하여 3개의 당질부가 부위 (189번째, 223번째, 297번째 N-X-S/T)의 Asp를 각각 Gln으로 변경한 Cel5 (N189Q), Cel5 (N223Q) 및 Cel5 (N297Q)를 제조하고 효모에서 분비 발현한 결과 (그림 3-34) glycosylation의 정도가 감소하였다. N297Q의 경우 효모에 의한 glycosylation이 완전히 제거되었으나 분비단백질의 양이 감소하여 전체 효소활성은 오히려 감소하였다. 따라서 FpCel5 효소에 효모 glycosylation이 부가된다 하더라도 단백질 분비량이 증가하여 가장 높은 활성을 유지하므로 그대로 사용하는 것이 유리함을 확인하였다.

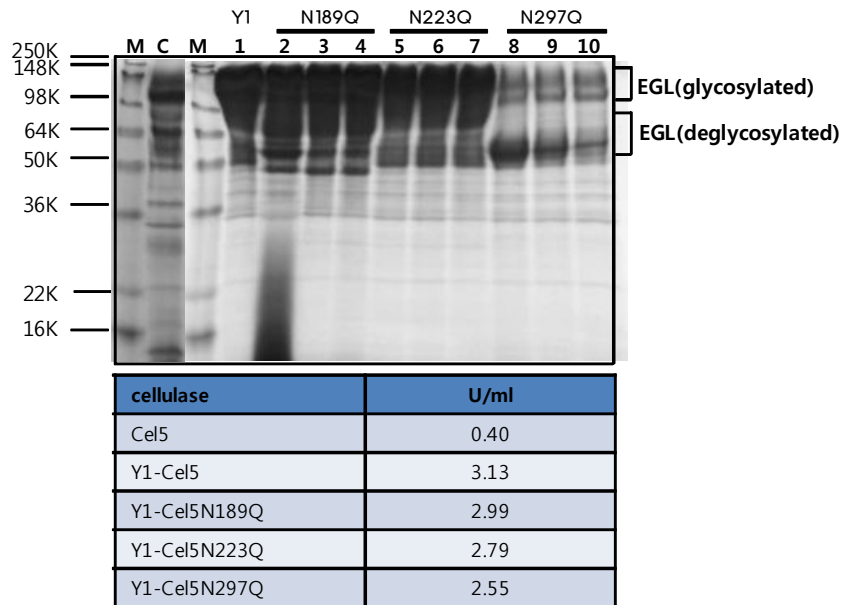


그림 3-34. 단백질융합기술을 이용한 섬유소분해효소 분비생산  
C: 대조구, Y1: 분비융합인자와 융합된 Cel5, N189Q: 189번째 N

## 5. 재조합 효모 이용 섬유소 분해효소 대량생산 기술개발

### 가. 효모 TFP 기술 활용 셀룰라제 고생산 균주개발

#### (1) 셀룰라제 고생산 균주 선별

효모를 이용하여 셀룰라제 등의 외래단백질을 분비생산하고자 할 때 기존 효모 발현시스템에서는 알려진 몇 종의 분비단백질 유래의 4-5종의 제한적인 분비시그널만을 사용하고 있다. 그러나 분비생산하고자 하는 단백질의 종류가 다양하고 또한 각 단백질의 고유한 성질이 다르기 때문에 단백질에 따라서 분비생산이 잘 되기도 하지만 많은 경우 생산성이 낮은 문제가 있다. 따라서 본 연구팀에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 단백질 맞춤형 분비생산기술인 TFP technology를 개발한 바 있다 (국제특허등록). 효모 TFP 기술은 효모유전체에 존재하는 600여종 이상의 분비단백질 유전자로부터 분비시그널 및 유전자 (fusion partner)의 길이가 다른 수천종의 TFP library를 구축한 바 있고 그들 중 다양한 단백질 분비생산에 활용가능한 24종의 대표 3-적인 TFP를 발굴하여 TFP vector로 구축하였다.

우선 대량의 셀룰라제 유전자를 다양한 효모 vector에 효율적으로 도입 및 적용할 수 있는 high throughput cloning 시스템이 필요하여 각 유전자를 벡터와 *in vivo* recombination이 가능하도록 양 말단에 벡터와 상보적인 서열을 PCR을 이용하여 도입하고 ligation independent cloning이 가능하도록 PCR을 이용하여 셀룰라제 유전자를 개량하였다. 이러한 기술을 통해 본 연구팀에서 보유하고 있는 24종의 단백질 분비융합인자 효모 벡터 (효모 TFP vector)에 각 셀룰라제 유전자를 *in vivo* recombination을 통해 용이하게 도입하였다 (그림 3-35).

선별된 셀룰라제 유전자를 언급된 24종의 TFP vector에 각각 cloning하여 각 셀룰라제에 대한 고분비 생산균주를 선별하였다. 섬유질계 기질은 종류에 따라 약 38-50%의 cellulose, 23-32%의 hemicellulose와 15-25%의 lignin으로 구성되어 있다. 이러한 기질을 효율적으로 효소분해 하기 위해서는 exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase,  $\beta$ -xylosidase 등 약 10여종이상의 분해효소를 필요로 한다. Cellulose의 분해에 필수적인 효소 4종 (exoglucanase I, exoglucanase II, endoglucanase 및  $\beta$ -glucosidase)과 hemicellulose분해를 위해 필수적인 xylanase와  $\beta$ -xylosidase를 고효율 분비생산하는 균주를 1차적으로 선별하였다. 각각의 셀룰라제 유전자를 24종의 효모 TFP vector에 삽입하여 효모 형질전환체를 무작위적으로 선별하고 test tube를 이용하여 현탁배양하였다. 각각의 배양상등액을 농축하여 SDS-PAGE 분석하고 셀룰라제의 분비량이 많은 균주를 1차 선별하고 활성 분석을 통해 최종 균주를 선별하였다 (그림 3-36-1).

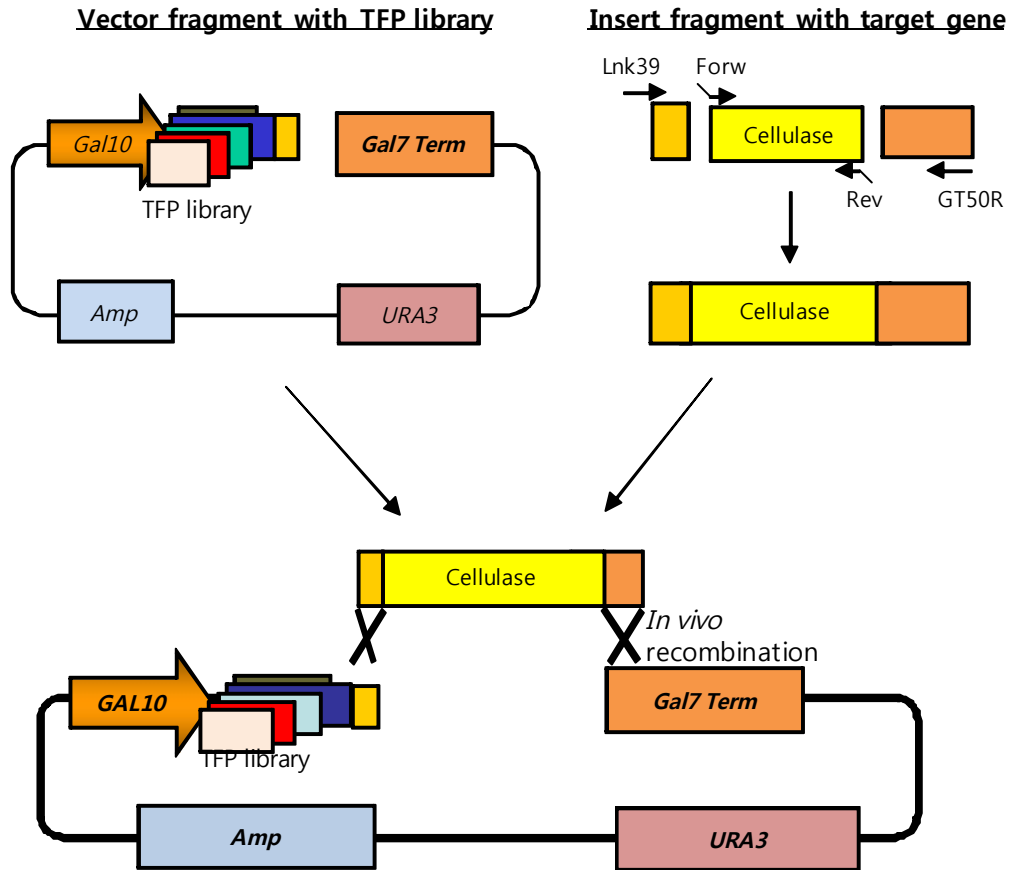


그림 3-35. 효모 *in vivo* recombination을 통한 초고속 클로닝

다양한 미생물 유래의 exoglucanase 유전자를 분석한 결과 그림 3-36에서 보는 바와 같이 *Trichoderma reesei* 유래의 TrCBH1가 효모에서 잘 분비생산되었으며 *Polyporus arcularius* 유래의 Cell1, Cel2도 효모에서 분비생산되는 것을 확인하였다. *Trichoderma reesei* 유래의 TrCBH1은 곰팡이 섬유소 분해효소 중 가장 연구가 많이 된 단백질이며 현재까지 곰팡이 이외의 방법으로 재조합 생산하기 힘든 단백질인데 본 연구에서 성공적으로 분비생산되었다. 또한 Cell1의 경우 효모 glycosylation에 의해 multi-band로 분비생산되었으며 CBM이 없는 단백질로 확인되어 활성이 낮은 문제가 있었다. Cel2의 경우 1차 SDS-PAGE결과에서 일정한 단백질 분비 패턴을 보이지 않아 몇 종의 균주를 선별하고 각각의 활성을 분석한 결과 TFP13번 균주에서 가장 강한 활성이 나타났다. 동일한 방법으로 endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, xylanase 및  $\beta$ -xylosidase에 대한 최적의 분비생산 TFP 발굴 및 최적생산 균주를 제조하였다.

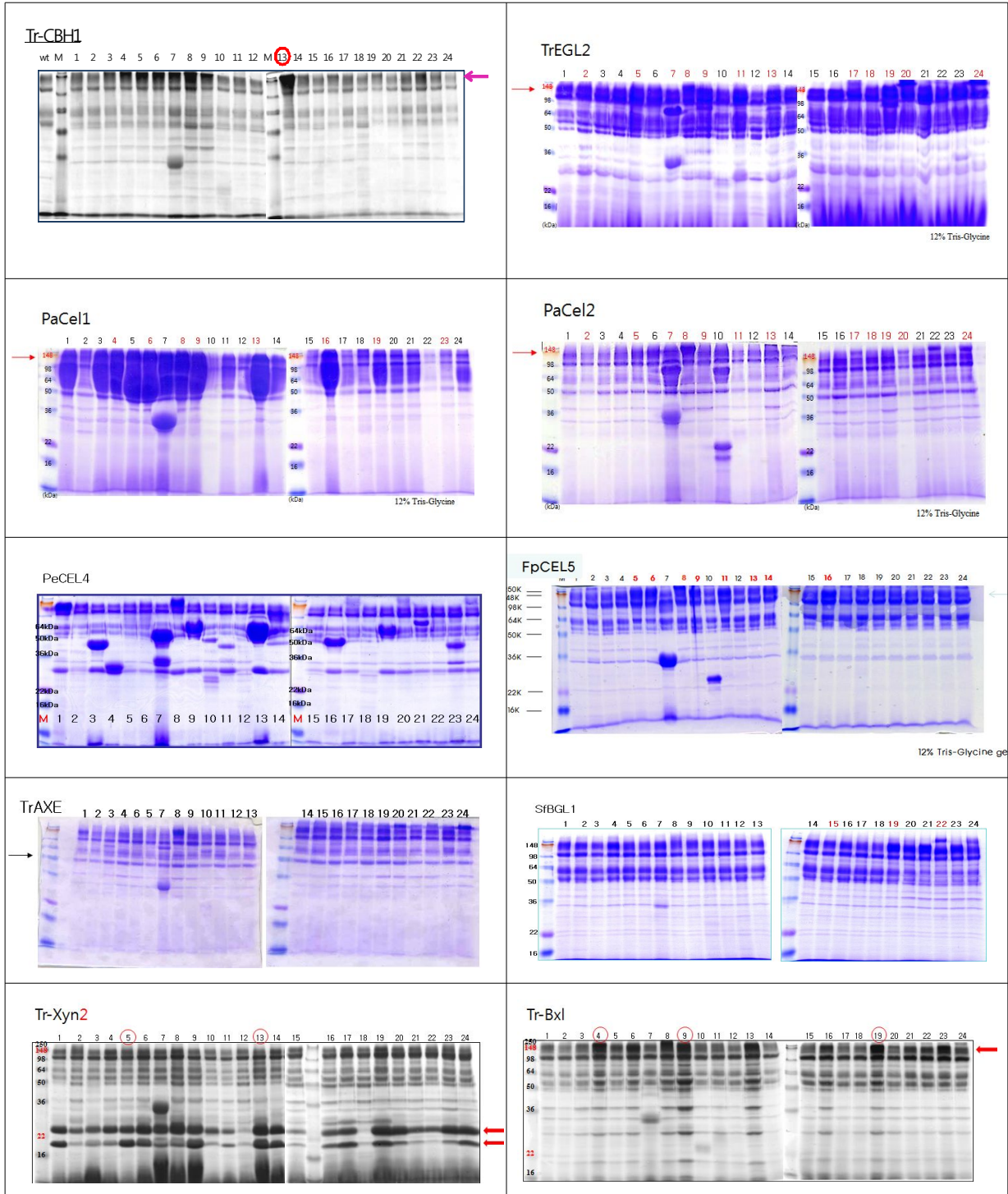


그림 3-36-1. 24종의 TFP 배터를 활용한 셀룰라제 고분비생산 균주의 선별

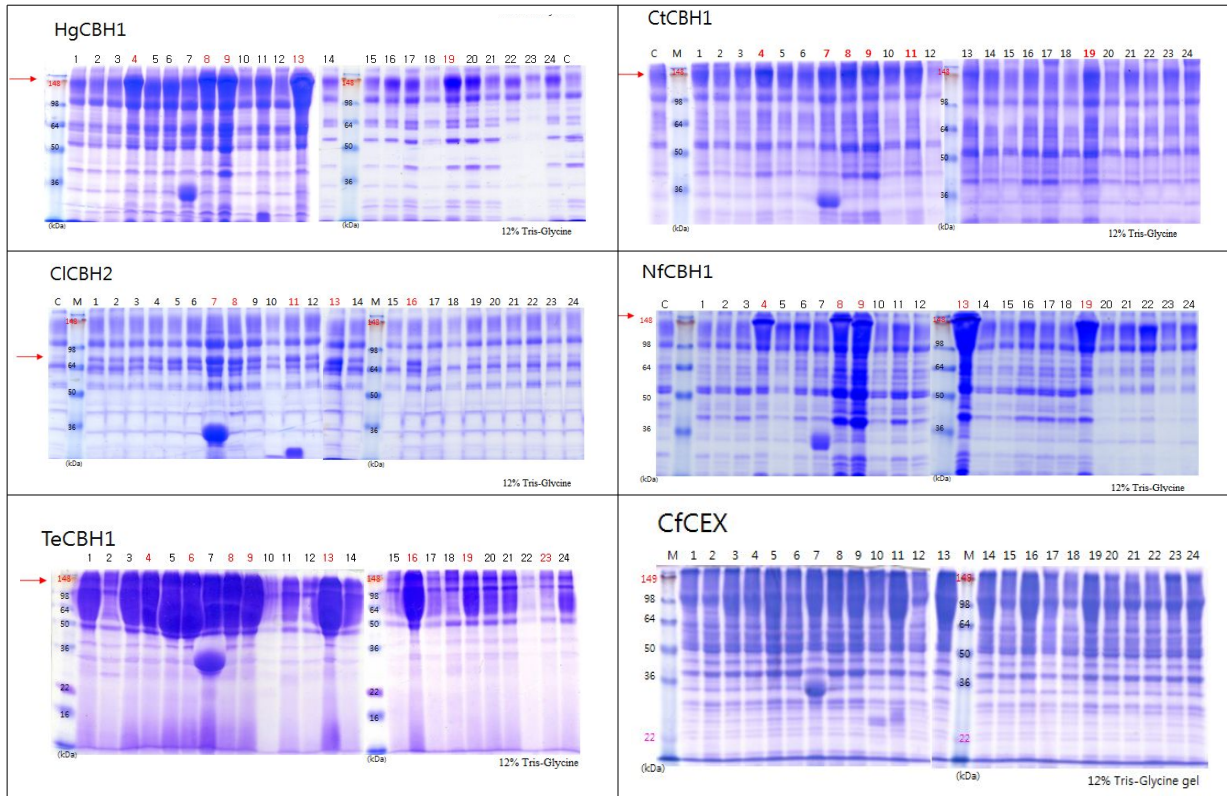


그림 3-36-2. 24종의 TFP 벡터를 활용한 셀룰라제 고분비생산 균주의 선별

3차년도에 기존 exoglucanase의 활성이 약한 문제를 해결하기 위하여 추가적인 곰팡이 exoglucanase 6종을 발굴하여 동일한 방법으로 최적 TFP를 선별하였다 (그림 3-36-2). 결과에서 보는 바와 같이 배양 상등액의 활성 분석을 통해 SDS-PAGE 상에 셀룰라제의 분비량이 많은 균주를 1차적으로 선별하였다. 그러나 SDS-PAGE 상에서 나타난 밴드는 실제 유전자들의 크기와 상당한 차이가 있었는데, 이는 단백질 서열상에 존재하는 N-glycosylation site의 당쇄부가 영향으로 추측되었다. 1차적으로 선별한 각각의 24개 형질전환체 중 단백질 발현 밴드가 높은 형질전환체를 선택하였고, 선택한 형질전환체의 N-glycosylation 영향을 제거하고자 각 단백질에 endoglycosidase (Endo-H) 효소를 처리한 후 다시 SDS-PAGE 분석을 하였다 (그림 3-37). 결과, Endo-H 처리 후 각 정상적인 크기의 단백질 분자량을 확인할 수 있었고, 각 발현된 단백질들이 N-glycosylation 되어 있음을 확인하였다.



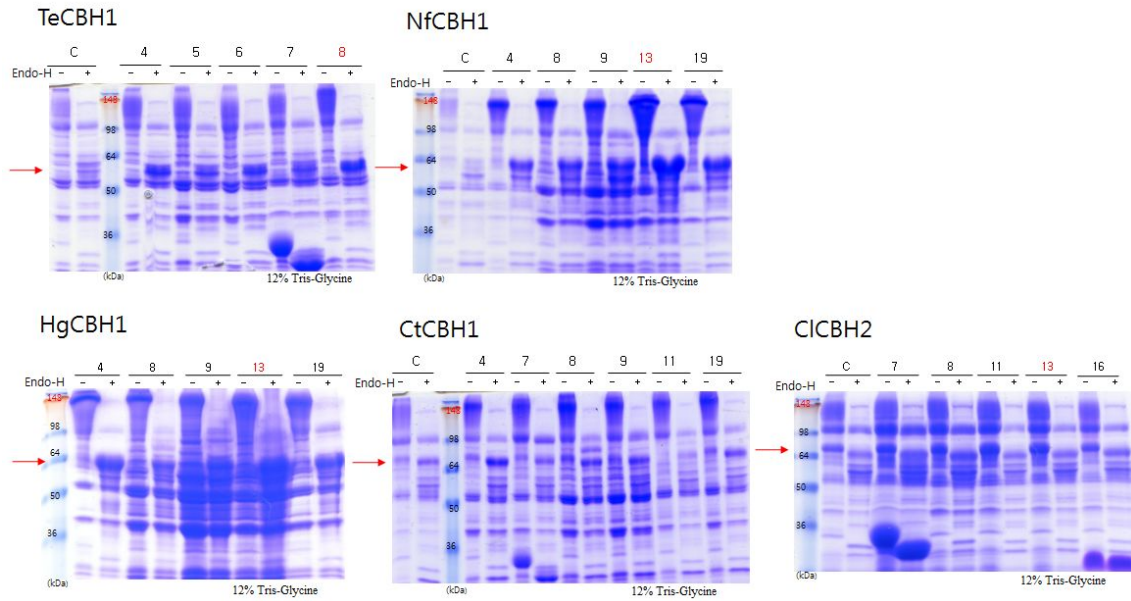


그림 3-37. Endo-H 처리 후 각 선별한 5종 exo-cellulase의 SDS-PAGE 분석

각각의 형질전환체로부터 분리된 단백질의 활성을 확인하기 위하여 수용성이면서 artificial substrate인 pNPC (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside), pNPL (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-lactobioside) 과 비수용성 기질인 Avicel을 이용하여 활성분석을 하였다. 0.1 ml의 효소 용액을 0.9 ml의 기질용액 (50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0), 1 mg/ml의 pNPC와 50°C에서 10분간 반응하였고, 반응 용액과 동량의 2% 탄산 나트륨을 첨가해 반응을 멈추고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또 다른 수용성 인공합성 기질인 pNPL도 상기 동일한 방법으로 활성 측정된 결과, STFP13-TeCBH1이 pNPC와 pNPL 각각 24 unit/ml, 42 unit/ml 으로 가장 높은 활성을 보였으나 나머지 exo-cellulase는 모두 미미한 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이때 효소 활성은 1분에 1  $\mu$ M의 니트로페놀을 생성할 수 있는 효소량을 1 유닛 (unit, U)으로 정하였다. 또한, 비수용성 기질인 Avicel을 이용하여 분리된 exo-cellulase의 활성을 분석하기 위하여 500  $\mu$ l의 효소 용액을 500  $\mu$ l의 기질용액 (2% Avicel pH-105 cellulose, 0.04% sodium azide, 0.3  $\mu$ l Novozyme-188, 50 mM Sodium acetate buffer (pH5.0))과 35°C, 1000 rpm에서 48시간동안 반응 후 분해된 당의 양을 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Avicel 활성분석 결과 (표 3-7), 48시간 이후 exo-cellulase 2 (CBH2) 타입인 ST13-CICBH2가 가장 높은 활성을 보였고, exo-cellulase 1 (CBH1) 타입 중에서는 ST13-HgCBH1이 높은 활성을 보였다.

표 3-7. 선별한 각 5종 *exo-cellulase* 유전자의 Avicel 기질 활성분석

TFP No.		<i>exo-cellulase</i> activity (unit/ml)
TeCBH1	4	2.17
	5	2.03
	6	2.47
	7	2.15
	8	2.15
NfCBH1	4	1.96
	8	1.28
	9	3.60
	13	4.36
	19	2.35
HgCBH1	4	18.75
	8	19.60
	9	13.50
	13	27.00
	19	21.90
CtCBH1	4	3.05
	7	4.87
	8	4.60
	9	4.43
	11	3.09
	19	4.73
CICBH2	7	44.55
	8	66.20
	11	60.50
	13	66.30
	16	61.95

5가지의 *exo-cellulase* 유전자는 각각의 자체 분비시그널, 또는 MFalpha 분비 시그널과 TFP 기술을 이용하여 선별한 셀룰라제 고발현 균주와의 단백질 분비량과 활성을 비교해 보았다. 자체 분비시그널을 이용하여 발현하기 위해 self signal forward와 reverse 프라이머로 PCR을 수행 후 *in vivo* recombination을 통하여 Y2805 균주에 도입하였다. 자체 분비시그널과 TFP가 융합된 각각의 균주들을 YPDG 배지에서 40시간 배양 후 원심분리하여 균체를 제거하고 남은 배양상등액 600  $\mu$ l를 400  $\mu$ l acetone으로 침전시켜 SDS-PAGE분석을 하였다 (그림 3-38). pNPC, pNPL, Avicel을 이용하여 활성 분석한 결과, CtCBH1은 TFP보다 자체 시그널을 이용할 경우 2.5배 높은 활성을 보였다. 나머지 4종의 *exo-cellulase*는 모두 TFP 기술을 이용할 경우 높은 분비 발현율을 확인하였다 (표 3-8).

이상의 결과로부터, 단백질 발현율과 활성이 가장 높은 각 5종의 유전자 발현 벡터를 선택

하였고, 각각의 최종균주는 셀룰라제 대량생산을 위해 활용하였다.

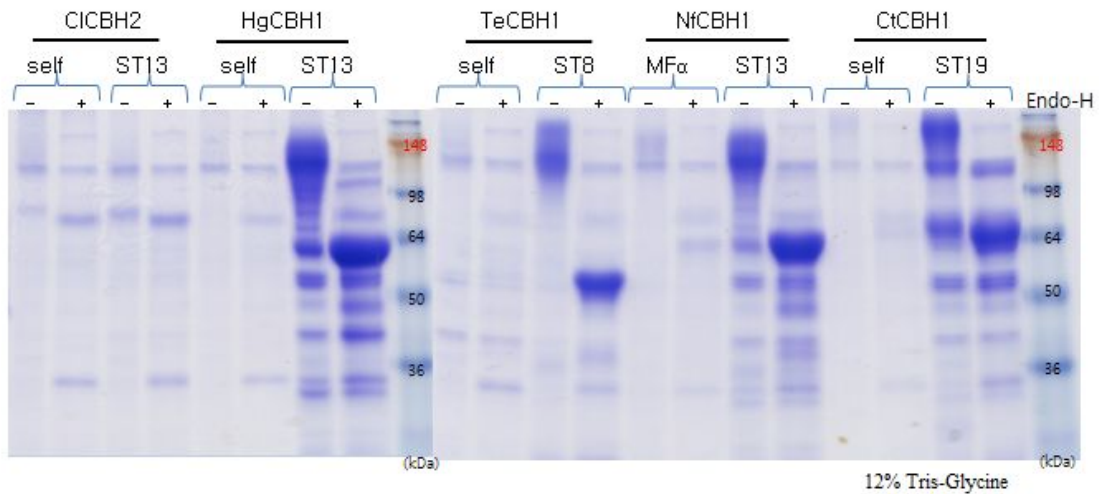


그림 3-38. 자체/MF $\alpha$  분비시그널과 TFP 융합 파트너를 이용한 Endo-H 처리 전 후 SDS-PAGE

표 3-8. 자체시그널/MF $\alpha$ 시그널 발현균주와 TFP 발현균주의 활성 비교

Gene name		pNPC activity (unit/ml)	pNPL activity (unit/ml)	Avicel activity (unit/ml)
empty vector		4.07	4.46	0.65
TeCBH1	self signal	10.27	18.33	2.97
	TFP no.8	24.38	41.28	3.04
NfCBH1	MFalpha	3.88	3.76	3.54
	TFP no.13	4.57	4.85	4.21
HgCBH1	self signal	4.19	3.92	1.67
	TFP no.13	4.61	5.78	4.67
CtCBH1	self signal	5.54	20.00	8.49
	TFP no.19	4.15	7.64	3.03
CICBH2	self signal	4.07	4.11	10.16
	TFP no.13	3.80	3.57	12.52

## (2) 유가식 배양을 통한 셀룰라제의 대량생산

재조합 생산균주가 함유하고 있는 발현벡터는 GAL 프로모터를 이용하고 있는데 단백질 발현을 위해서는 포도당보다 약 20배 상회하는 고가의 갈락토오스를 필요로 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 포도당만으로도 발현유도가 가능한 균주 Y2805 $\Delta$ gal80를 이용하였다. 최종 선별된 5종류의 셀룰라제 유전자를 Y2805 $\Delta$ gal80 (Mat a pep4::HIS3 gal80::Tc190, prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주에 in vivo recombination을 통하여 도입하였고, 대량생산균주로 이용하였다. 선별된 균주로부터 각각의 셀룰라제를 대량생산하기 위하여 5 L 발효조를 이용하여 유

가식 배양하였다. 초기 seed 배양은 최소배지를 함유한 플라스크에서 12시간 배양 후 발효배지 (yeast extract 3%, peptone 1.5%, glucose 2%, pH 5.5)를 포함한 발효조에 접종하고 12시간 배양 이후부터 feeding media (glucose 34%, yeast extract 5%)를 세포성장 속도에 맞추어 공급하였다. 각각의 발효결과는 그림 3-39에서 보는 바와 같고 배양시간별로 채취한 배지 10 ul 를 SDS-PAGE 분석하여 각 셀룰라제의 분비량을 확인하였다. 셀룰라제의 분비량은 효소의 종류에 따라서 차이가 있었으나 1-5 g/L 수준으로 분비생산됨을 확인하였다. 발효생산된 각각의 셀룰라제는 농축, 탈염과정을 거쳐 각각의 효소활성을 분석하고 냉동보관하여 다양한 셀룰라제 cocktail 제작에 활용하였다.

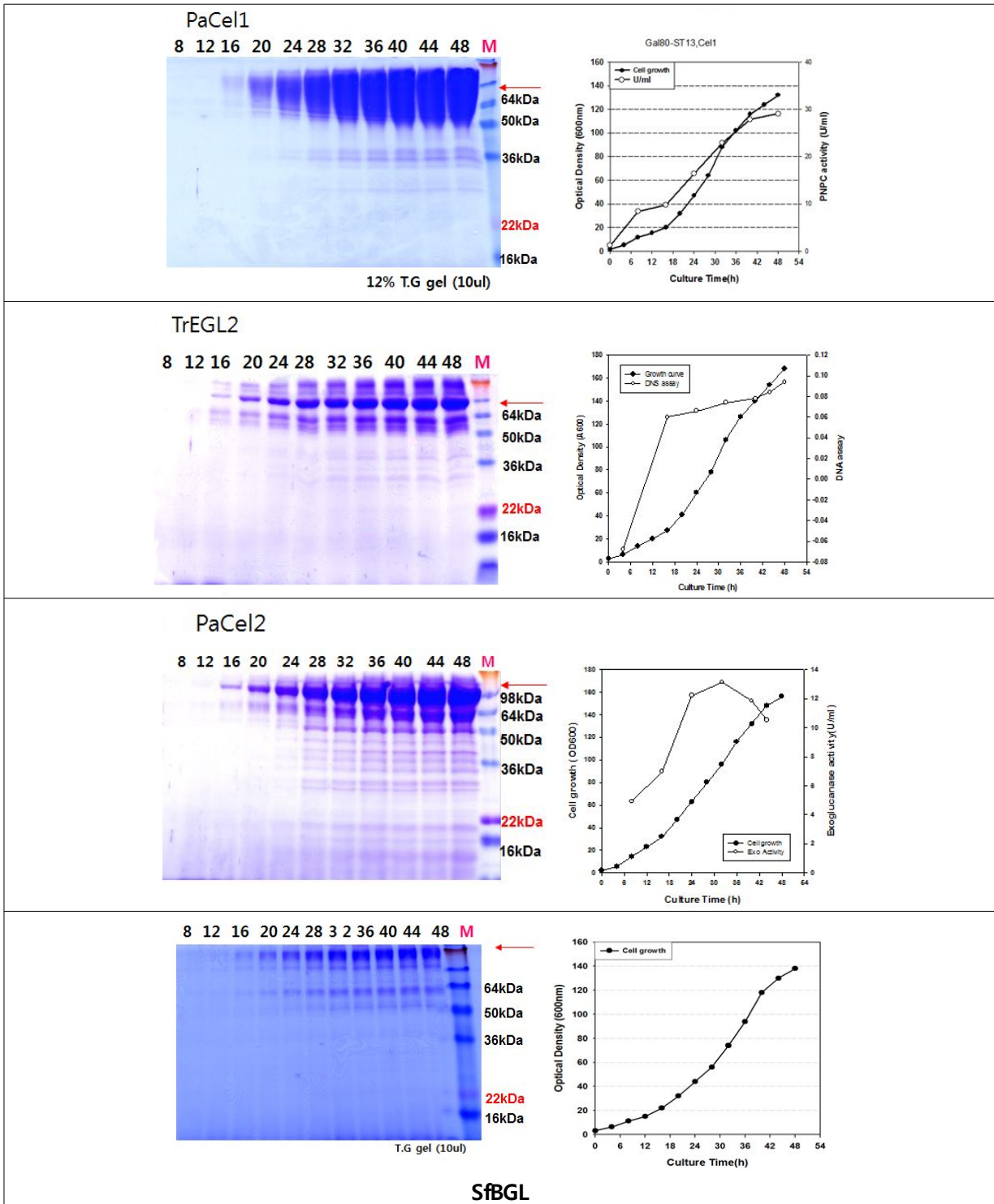


그림 3-39-1. 제조합 셀룰라제 생산 효모균주의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석

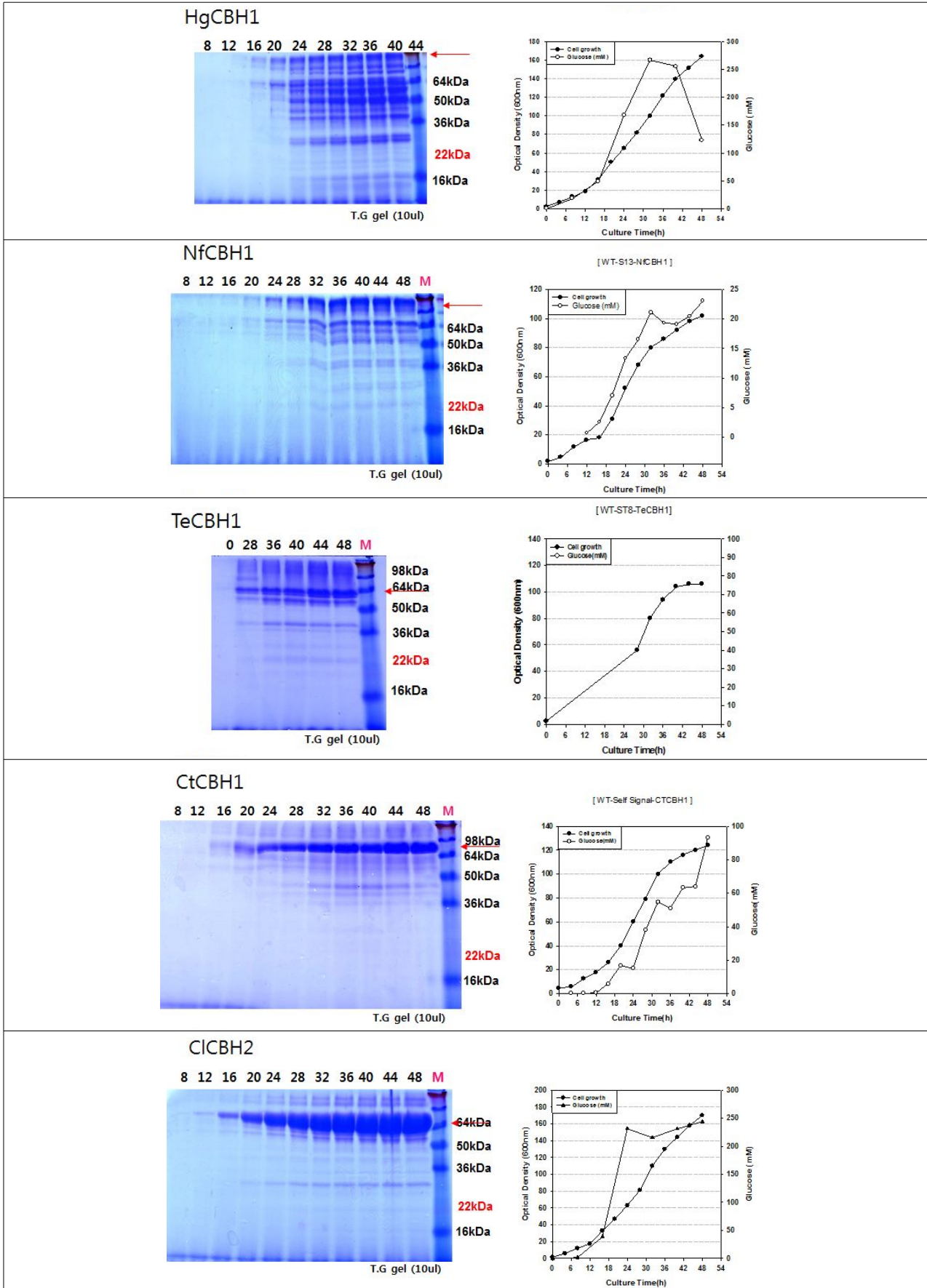


그림 3-39-2. 재조합 셀룰라제 생산 효모균주의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석

나. 효모 TFP 기술 활용 Xylan 분해효소 고생산 균주개발

(1) Hemicellulase 분해 효소 재조합 생산

Hemicellulose를 효과적으로 분해하기 위해서는 약 5개 이상의 복합 효소 (xylanase,  $\beta$ -xylosidase, arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase 외 다수의 debranching 효소)가 필요하다. 이러한 효소의 대량생산을 위해서 곰팡이 *T. reesei* 유래의 xylanaseI(XYN),  $\beta$ -xylosidase ( $\beta$ XL), arabinofuranosidase (ABF) 및 acetyl xylan esterase (AXE) 유전자를 활용하였다. 각각의 단백질을 분비생산할 수 있는 최적의 효모 TFP를 발굴하기 위하여 각각 24종의 발현벡터를 구축하였으며 이들로부터 24종의 형질전환체를 확보한 다음 배양 후 배지로 분비된 단백질을 분석하였다 (그림 3-40, 41). Hemicellulase의 분비량이 많은 균주를 1차 선별하고 각각의 효소활성을 측정하여 활성이 강한 균주를 최종 선별하였다. 선별한 균주는 5 L 발효조에서 유가식 배양하여 각 효소를 대량생산하였고 각각 2 g/L 수준으로 분비 생산되었다 (그림 3-42, 43).

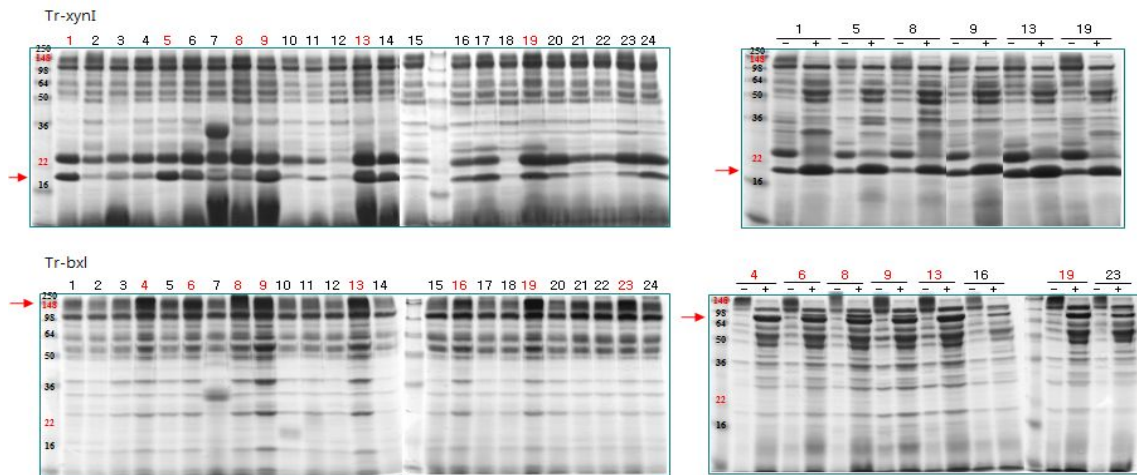


그림 3-40. Hemicellulase 고발현 균주의 선별을 위한 SDS-PAGE 분석

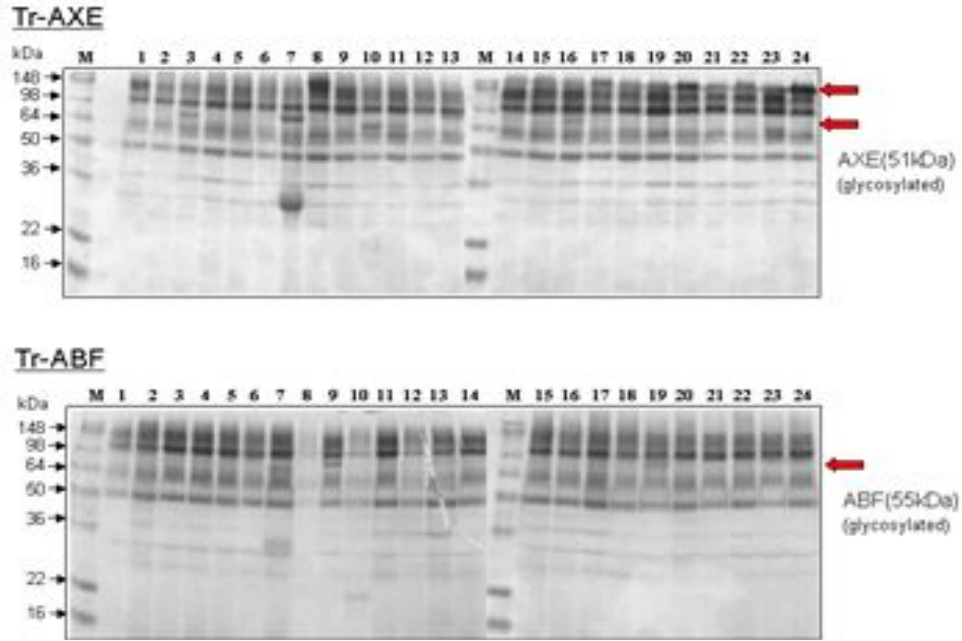


그림 3-41. Hemicellulase 고발현 균주의 선별을 위한 SDS-PAGE 분석

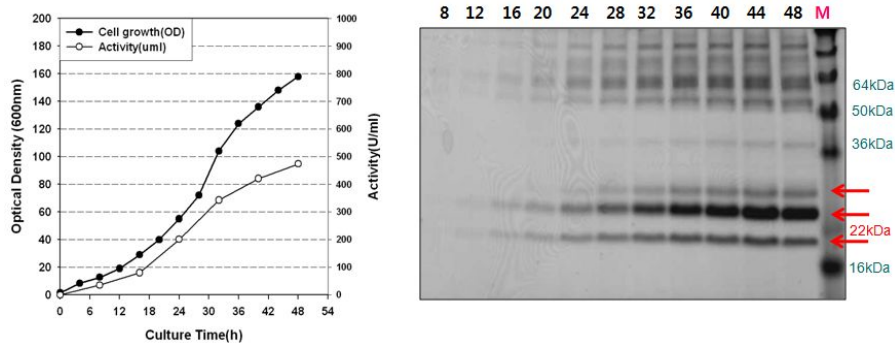


그림 3-42. Xylanase 생산 효모균주 Y2805-Tr-xynI의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석

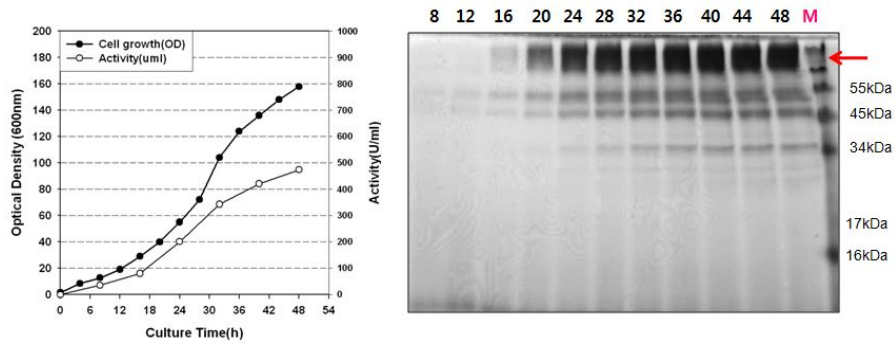


그림 3-43.  $\beta$ -xylosidase 생산 효모균주 Y2805-Tr-bx1의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석



(2) Hemicellulose 자가분해 효모 균주 개발

Endo-xylanase 와  $\beta$ -xylosidase를 각각 분비하는 *S. cerevisiae*를 xylan 배지 (4% yeast extract, 1% peptone, 4% glucose, 1% xylan)에서 복합 배양을 통해 xylan으로부터 가수분해되어 나온 xylotriose, xylobiose, xylose를 확인하였다. 복합배양은 10ml의 최소배지 (0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노에시드, 2% 포도당)에서 초기배양을 한 후 50 ml의 xylan 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하여 시간별로 균체량 및 효소활성을 측정하였다. Endo-xylanase 활성은 DNS 정량법을 사용하였고,  $\beta$ -xylosidase 활성은 pNPX (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside)를 사용하였다.

Endo-xylanase와  $\beta$ -xylosidase는 배양 48시간일 때 130 unit/ml과 100 unit/ml의 효소 활성을 보였으며 생성된 Endo-xylanase 의해 xylan으로부터 xylo-oligosaccharide를 생성하고 생성된 xylobiose는 더 이상 분해되지 않는다. 이때 분해되지 않는 xylobiose와 xylo-oligosaccharide는  $\beta$ -xylosidase에 의해 xylose로 전환된다. 그러므로 이 두가지 효소에 의해 xylan이 분해되어 총 7.5 g/L xylose와 1.8 g/L xylobiose, 0.4 g/L xylotriose등이 생성됨을 HPLC 분석을 통해 확인하였다 (그림 3-44). 그러나 사용한 효모 *S. cerevisiae*는 xylose를 탄소원으로 사용하지 못하는 균주이므로 생성된 xylose를 활용하지 못하고 배지에 축적되어 있으나 생물통합공정용 xylose 활용균주가 개발되어 동 균주에 Endo-xylanase 와  $\beta$ -xylosidase를 각각 분비하면 hemicellulose를 분해하여 xylose를 생산하고 생산된 Xylose를 활용할 수 있는 효모 균주를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

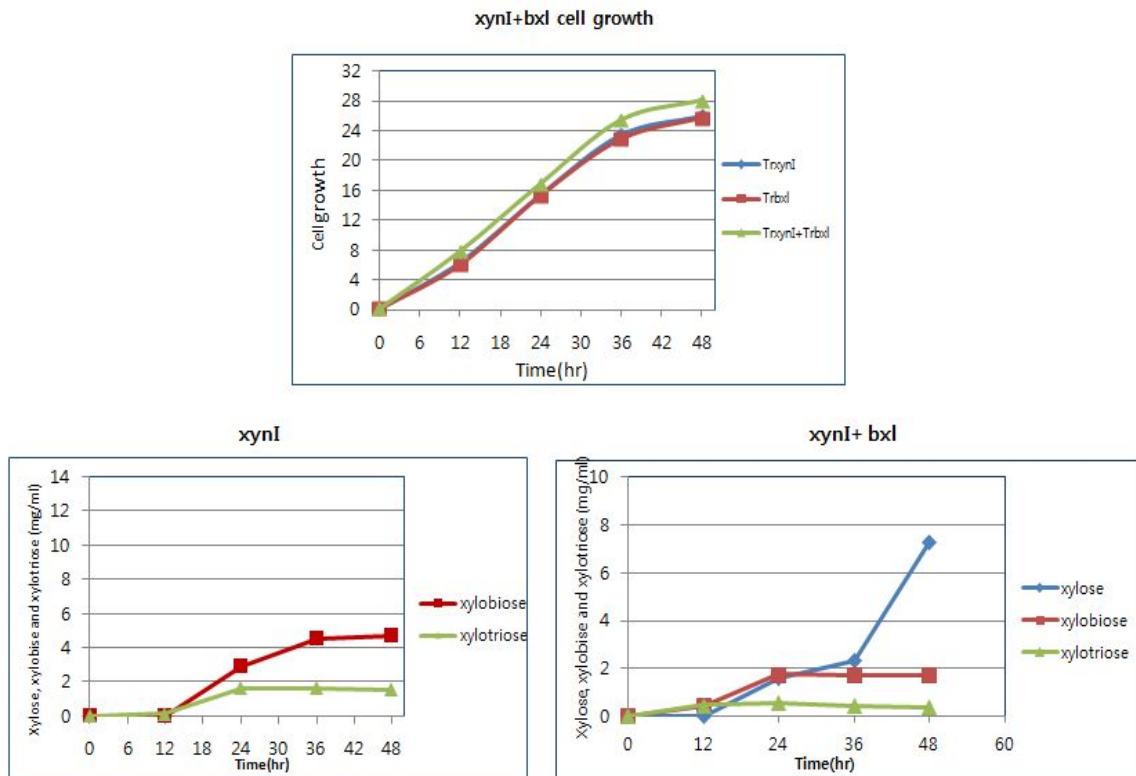


그림 3-44. Xylanase 및  $\beta$ -xylosidase 생산 균주의 단일배양 및 복합배양  
(A) 세포의 성장곡선, (B) xylanase 생산균주 배양배지 분석, (C) 복합배양 배양배지 분석

## 6. 고상발효에 의한 저가 셀룰라제 생산

셀룰라제 활성을 가지면서 전처리 및 당화까지 동시에 할 수 있는 가능성을 검토하기 위하여 다양한 곰팡이들을 적용해보았다. 셀룰라제 생산 균주로 알려진 *Trichoderma reesei*를 비롯해, 실제 셀룰로오스를 분해하는 활성을 보인 *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor* 같은 담자균류를 선정했다. 고상발효는 별도의 처리 없이도 바이오매스 자체를 고체 상태로 놓고, 균주를 접종하여 알맞은 온도, 습도 등을 유지해주면서 자연적으로 셀룰라제를 생산하고, 또한 바이오매스를 분해할 수 있다. 실제로 *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus*, *Coriolus versicolor* 는 CMC 및 CB 첨가 배지에서 분해능을 조사해본 결과 높은 셀룰라제 활성을 가지고 있었다. 직접적으로 유전자 수준에서 이들의 셀룰라제를 얻어낼 수도 있지만, 셀룰라제 자체가 여러 가지 타입으로 복합적으로 작용하여 분해하는 메카니즘을 가지고 있는만큼 이들 균주가 자체적으로 분해할 수 있도록 하는 것이 가장 이상적일 수도 있다.

바이오에탄올 생산과정에 필요한 여러 중간 스텝의 경우, 여러 문헌과 기초들이 구축되어 있지만, 고상발효는 그 방법이나 결과 및 실험 과정 등 기본적인 틀이 마련되어 있지 않다. 그렇지만, 최소비용으로 저가의 셀룰라제 생산 및 당화가 가능하다는 전제로 비용 및 실험 과정이 가장 최소한으로 요구될 수 있는 이점이 있다. 고상발효는 일정한 온도와 습도를 유지해주어 곰팡이의 균사가 고체 상태의 바이오매스를 균일하고 광범위하게 퍼지도록 하는 것이 관건이다. 균사가 바이오매스를 침투하며 각종 셀룰로오스 분해과정을 거치면서 셀룰라제를 직접 발현시키거나 또는 그 셀룰라제를 통해 당화되어 글루코오스 상태로 될 수 있는 가능성이 있다. 이를 직접 확인하기 위하여, 셀룰라제 활성을 알아보는 filter paper assay 및 DNS assay를 통해 셀룰라제 활성과 글루코오스 함량을 알아보았다. 고상발효의 최적조건을 알아보기 위해 균주별, 기간별, 바이오매스별로 각각 셀룰라제 활성과 당의 함량을 알아보았다. 균주별로는 *Trichoderma*와 *Lentinula edodes*에서 비교적 높은 셀룰라제 활성을 보였고, 시간대별로 당의 함량 차이를 볼 수 있었다. 그러나 예상했던 것과 달리 시간대별로 일정한 증가나 감소가 아닌 다소 불규칙적인 양상을 보였다. 그 원인으로 고체 상태에서의 샘플링과 곰팡이 균주의 균사침투 속도의 차이 및 얻어진 당의 사용 등을 들 수 있었다. 이러한 문제점에도 불구하고 셀룰라제 활성 및 당의 함량이 비교적 높아지는 추세로 보아 소요되는 비용과 여러 경제적인 측면을 고려하면 고상발효는 충분히 지속적으로 시도해볼만 하고 또한 좋은 결과도 얻을 것으로 기대된다. 셀룰라제 활성 측면에서 본다면 저가의 셀룰라제 생산도 가능하며, 셀룰로오스계의 바이오매스 분해에 전처리 및 별도의 효소 첨가 없이도 매우 경제적으로 당화까지 가능한 방법이 될 수 있다.

### 가. 고상발효 시스템 구축

벼와 같은 목질계 바이오매스는 물에 녹지 않기 때문에 액상발효를 통한 미생물의 배양이 쉽지 않다. 미생물이 목질계 바이오매스를 직접 이용하도록 하기 위해서는 고상발효 (Solid state fermentation) 시스템 도입이 필요하다. 고상발효는 에너지사용을 최소화하고, 폐배양액이

거의 없으며, 특히 곰팡이가 분비하는 효소의 양을 극대화시키는 장점이 있는 반면 컨트롤의 어려움과 오염에 취약한 단점이 있다. 따라서 이런 단점을 보완하여 실험실 수준의 고상발효를 진행했다.

고상발효에 중요한 것은 온도, 질소원, 초기함수율 등이다. 특히 함수율의 경우 지속적인 수분 유지가 매우 어렵기 때문에 초기함수율에 의해 곰팡이의 효소분비량이 결정된다. 따라서 초기함수율에 따른 고상발효와 질소원의 농도에 따른 고상발효를 진행했다 (그림 3-45).



그림 3-45. 온도와 습도조절이 가능한 고상발효 모델

실험은 크게 두 가지 장치로 가능하다. 온도와 습도를 일정하게 유지시켜주는 소형 고상발효기를 통해 곰팡이와 바이오매스를 섞어주는 방법과 일괄적으로 특정 공간에 방치시키는 방법이다. 사실 균주와 성장환경에 따라 여러 가지 다른 결과물을 얻을 수 있지만 공통적으로 셀룰라제 활성과 당화가 가능한 조건으로 맞춰준다. 샘플링은 3일 간격으로 하여 셀룰라제 활성과 당화를 통해 얻어진 글루코오스의 수치를 체크해준다. 셀룰라제 활성을 체크하는 방법은 filter paper를 통한 시간당 얻어진 단당류의 양을 계산한다. 물론 효소 안에도 당이 존재할 수 있기 때문에 대조군으로 filter paper를 제외하고 반응을 시켜준다. 또한 이 방법을 통해 자체적으로 존재하는 글루코오스의 양도 간접적으로 알아낼 수 있다.

Tricoderma의 경우 셀룰라제 활성이나 당함량이 시간이 지날수록 규칙적인 양상을 나타냈고 또한 증가하는 추세로 나타났다. 이는 결국 고체 바이오매스 상태를 이용하여 셀룰로오스를 분해하며 바이오매스를 이용해 당을 만드는 것으로 볼 수 있다 (그림 3-46). 그렇지만 셀룰로오스를 분해하여 만든 당이 곰팡이 균주의 성장에 이용될 수도 있기 때문에 고상발효 기간도 상당히 중요하게 작용할 수 있다.

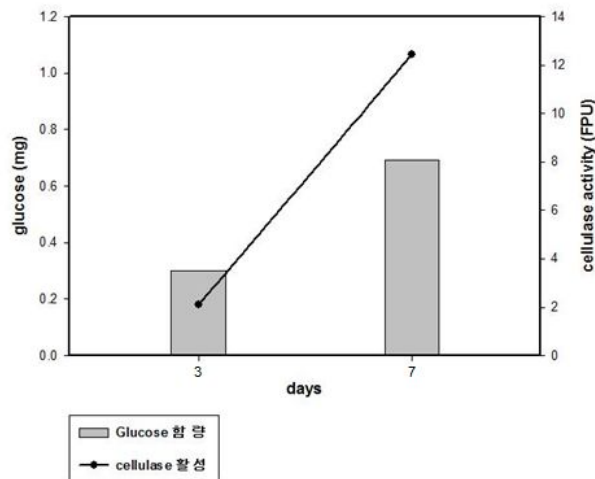


그림 3-46. *Tricoderma reesei*의 고상발효기간에 따른 셀룰라제 활성과 glucose 함량 조사

또한 셀룰라제 발현이나 당화의 정도를 보는 실험 이외에도 고상발효가 바이오에탄올 생산 과정에 있어서 전처리 과정을 대체할 수 있는지의 여부도 관심있게 알아볼 수 있다. 전처리 과정은 물리, 화학적인 처리로 당화에 어려운 리그닌 관련 물질을 제거해주는 것이다. 이 과정을 생물학적으로 보다 저렴하고 안정적으로 할 수 있는 이점을 가진 게 바로 고상발효가 될 수 있다. 고상발효 전의 바이오매스를 HPLC를 통해 고체성분 분석하고, 고상발효 후 적절한 시점에 바이오매스를 따로 분리하여 고체분석을 한다면 고상발효 전후의 성분적인 차이를 비교할 수 있다. 즉 고상발효를 통하여 저가의 셀룰라제 생산 이외에 바이오에탄올 생산과정의 두 단계인 전처리와 당화과정을 동시에 저렴하게 할 수 있다.

#### 나. 곰팡이 균주의 분리 및 동정

부패된 바이오매스 표면이나 주변 흙에는 수많은 미생물이 존재한다. 그 중에 곰팡이만을 분리하기 위해서는 먼저 박테리아를 제거해주어야 한다. 또한 곰팡이의 종류도 다양하기 때문에 단일균주로의 분리가 진행되어야 한다.

곰팡이를 분리하기 위해서 먼저 멸균된 DW에 흙이나 바이오매스를 넣고 vortexing 한다. 이것을 serial dilution하여 10<sup>-3</sup>까지 희석한다. 박테리아를 최대한으로 제거해주기 위해 다양한 기작으로 작용하는 항생제 (Kanamycin, streptomycin, gentamycin, ampicillin)가 포함된 PDA 배지를 제작했다. 여기에 희석한 현탁액을 100  $\mu$ l 정도 뿌리고 spreading해주었다. 30°C incubator에 약 일주일 정도 키우면 다양한 종류의 곰팡이들이 자란다. 균사상으로 자라는 곰팡이와 포자상으로 자라는 곰팡이가 섞여 있기 때문에 loop로 다시 긁어 수차례 계대배양 끝에 단일 균주로 분리할 수 있었다 (그림 3-47).

분리가 끝나고 셀룰라제 활성까지 확인했다면 새로운 균주의 보관이 필요하다. 일반적으로 계대배양을 통해 곰팡이주를 보관하지만 보다 안전한 보관을 위해 동결보관법을 사용했다. 다 자란 곰팡이를 plate로부터 agar block 상태로 자른 후 이것을 15% glycerol에 넣어 -70°C에 보관했다. 이 때, agar block의 개수는 6개가 적당하고 만일에 대비해 stock은 두 개씩 제작하여 각각 다른 곳에 보관했다. 동결보관법 이외에도 사면배지를 통해 계대를 하여 1년 동안 보

관하는 방법도 사용했다.

고상발효를 통한 셀룰라제 생산 여부는 셀룰라제 타입별 활성측정법에 따라 진행했고, 수치상으로 정량하여 고상발효 최적조건을 찾는 실험을 진행했다. 또한 citrate buffer를 이용하여 셀룰라제를 용출시키고 활성을 알아보기 위해 CMC 배지에 spotting하는 방법으로 상대적인 비교를 했다.

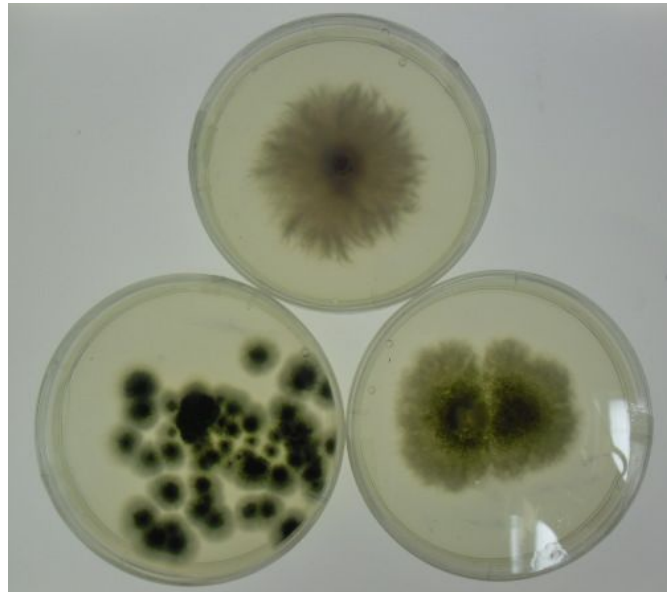


그림 3-47. 셀룰라제 분비능이 있는 다양한 곰팡이

#### 다. 고상발효를 이용한 셀룰라제 분비

다양한 곰팡이들 중 실제로 셀룰라제를 잘 분비하는 *Penicillium oxalicum*과 *Aspergillus fumigatus*를 선정하여 고상발효에 사용했다. 그러나 *A. fumigatus*는 human pathogen이기 때문에 최종적으로 *P. oxalicum*을 선정했다. 1차적으로 버를 직접 이용하기 위해 곰팡이가 이용할 수 있는 표면적을 넓히기 위해서 건조된 벚짚을 2~5mm로 분쇄하였다. 또한 곰팡이의 생장에 필수적인 영양원을 추가로 첨가해 주었다. 특히 셀룰라제와 같은 단백질은 질소원이 제공되면 분비량이 늘어나기 때문에 다양한 농도로 질소원을 첨가해주어 효소 분비량을 측정했다 (그림 3-48). 실험실에서 쉽게 쓸 수 있는 질소원으로 peptone, yeast extract, tryptone 등이 있다. 이 중 yeast extract를 사용하였을 때 효소 활성이 가장 높았고 yeast extract 5%의 농도에서 가장 높은 활성이 나타났다. 고상발효는 고체 상태의 바이오매스를 이용하도록 하는 것이지만 곰팡이의 생장에 수분이 필수적이기 때문에 소량의 물을 첨가해주었다. 그러나 많은 양의 물은 곰팡이 세포와 공기와의 접촉을 어렵게 만들기 때문에 초기함수율을 다양하게 하여 효소 분비량을 측정한 결과 50% 함수율에서 가장 높은 효소활성을 보였다 (그림 3-49).

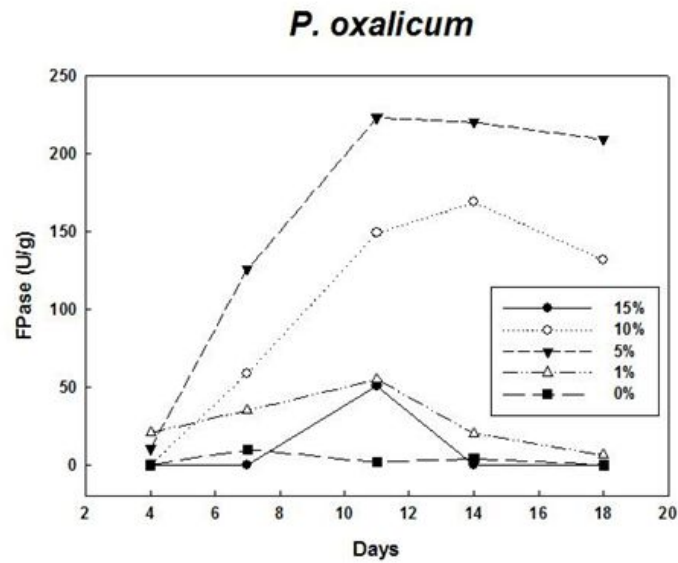


그림 3-48. Yeast extract 농도에 따른 셀룰라제 활성

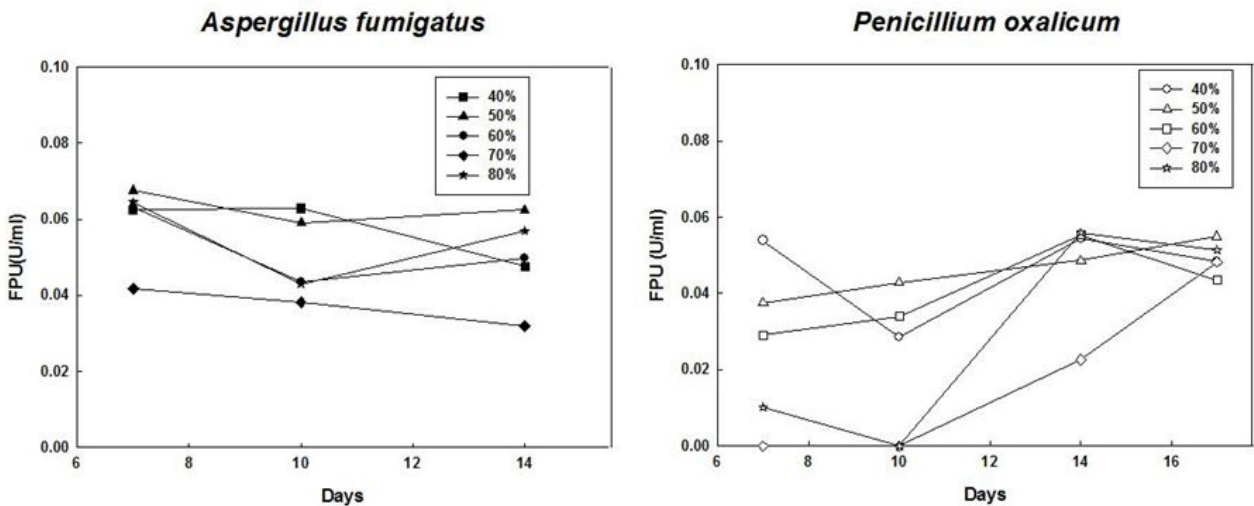


그림 3-49. 초기함수율에 따른 셀룰라제 활성

#### 라. 셀룰라제 활성 측정

셀룰라제는 타입별로 크게 3가지로 구분할 수 있다. 셀룰로오스 복합사슬의 말단부터 자르는 exo-glucanase, 중간에서 임의로 자르는 endo-glucanase, 그리고 마지막으로 이당체를 글루코오스로 자르는 beta-glucosidase이다. 이 세 가지 타입의 효소가 유기적으로 작용했을 때 목질계 바이오매스가 당화되는 것이다. Endo-glucanase는 CMC (carboxy methylcellulose)를 기질로 주어 측정하고, beta-glucosidase는 CB (cellobiose)를 이용하여 측정이 가능하다. 그러나 exo-glucanase는 이용한 기질 대비 product가 적기 때문에 측정이 쉽지 않아 셀룰로오스의 형태인 filter paper를 이용해 측정했다 (그림 3-50). 그 결과 고상발효 진행 12일만에 가장 높은 활성이 나타났고, 질소원으로는 yeast extract가 높은 활성을 가지도록 하는 것으로 나타났

다. 또한 beta-glucosidase 활성도 나타나므로 당화에 용이한 효소임을 알 수 있었다.

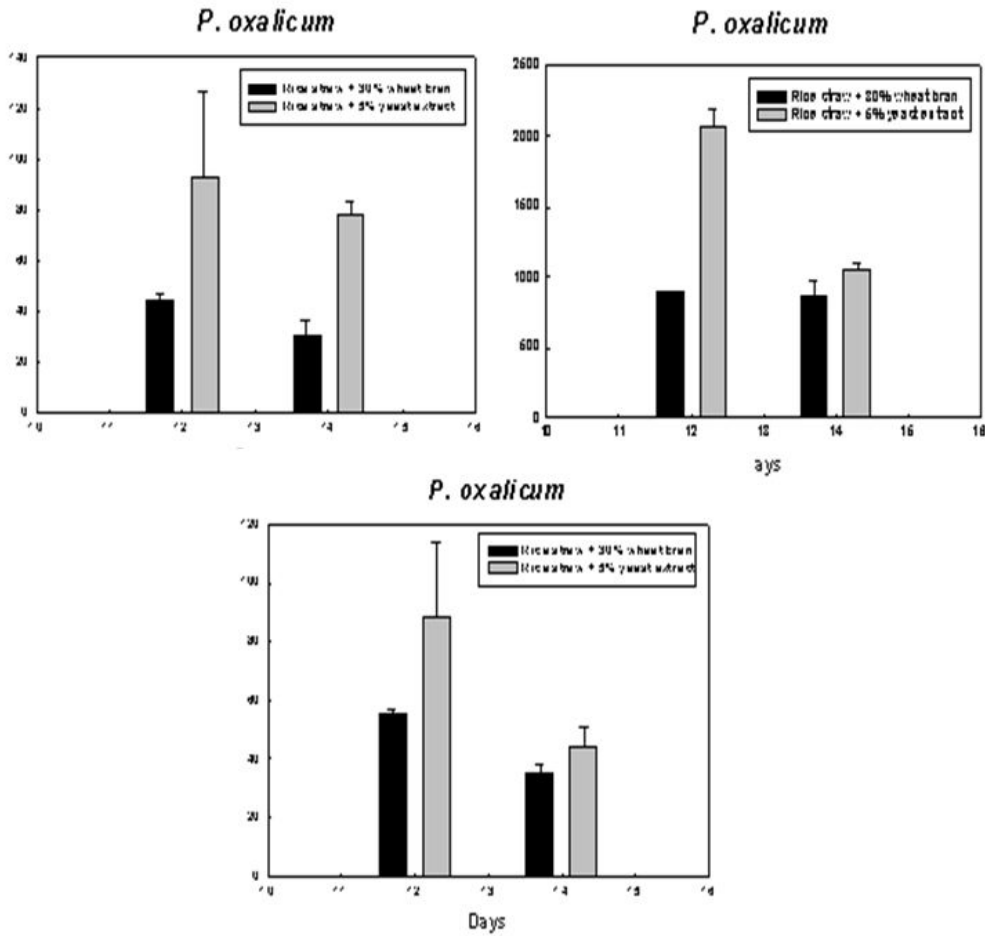


그림 3-50. *P. oxalicum*의 셀룰라제 활성

벼에는 셀룰로오스 외에도 헤미셀룰로오스가 존재하고 이것은 자일란의 중합체이기 때문에 5탄당을 분해하고 이용할 수 있는지의 여부도 확인하기 위해 endo-xylanase의 활성도 측정하여 셀룰라제의 활성과 비교해봤다 (그림 3-51). 셀룰라제 활성과 마찬가지로 헤미셀룰라제 활성도 가지는 것으로 확인되었고 그 활성은 셀룰라제 활성보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 그러나 당화된 바이오매스를 에탄올로 발효하기 위해서는 효모를 써야되고, 효모는 5탄당을 잘 이용을 하지 못하기 때문에 주로 셀룰라제 활성에 초점을 맞추었다.

본 실험으로 벼를 이용한 고상발효가 가능하고, *Penicillium oxalicum*이 벼를 이용하여 셀룰라제를 분비함을 확인했다. 특히 5% yeast extract의 농도와 50%의 초기함수율에서 가장 높은 셀룰라제 활성을 나타냈다. 앞으로 셀룰라제를 발현하는 형질전환 벼를 이용하여 고상발효를 시도하고자 한다.

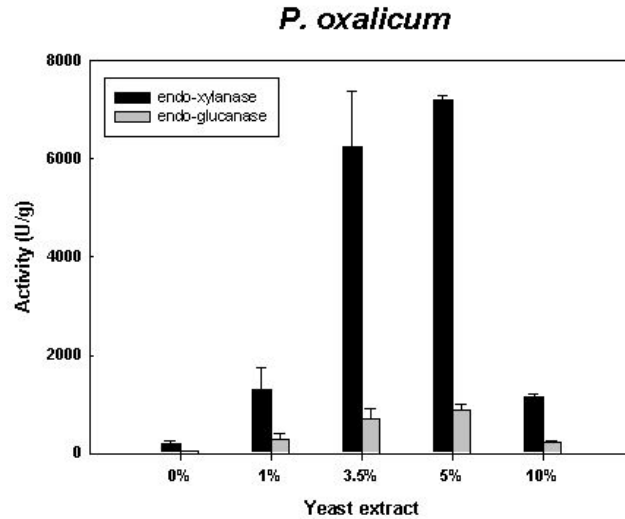


그림 3-51. 헤미셀룰로즈 분해능

#### 마. 고상발효를 통한 생물학적 전처리

고상발효에는 바이오매스 외에도 N-source가 사용이 된다. 주로 넣어준 N-source는 yeast extract와 밀기울이다. 그런데 이 둘은 모두 C-source로도 작용할 수 있다. 즉 고상발효 중에 곰팡이가 바이오매스를 사용하지 않고 단지 yeast extract나 밀기울만 사용하여 셀룰라제를 만들어낼 수도 있다는 것이다. 따라서 바이오매스를 사용한 것인지에 대한 확인이 필요하다. 이를 확인하기 위해 고상발효 전과 후의 바이오매스의 성분을 분석했다. 그 결과 고상발효 전보다 고상발효 후에 glucan이나 xylan 같은 셀룰로오스 성분이 감소했다. 즉, 곰팡이가 자라면서 셀룰로오스를 소모한 것이다. 이것은 셀룰라제 활성이 높을수록 셀룰로오스 사용량이 높은 것으로 일치했다. 또한 셀룰라제 활성이 낮은 균주의 고상발효의 경우에는 고상발효 전, 후의 셀룰로오스 비율이 거의 비슷했다.

다양한 바이오매스의 고상발효 중 흥미로운 결과를 얻었다. 갈대에서 *Coriolus vesicolor* 균주의 고상발효 전, 후의 성분 분석 결과 glucan과 xylan의 비율이 늘어났다. 이 결과는 물리화학적 전처리 후의 비율과 비슷한 결과이다. 일반적으로 목질계 바이오매스는 glucan, xylan, lignin의 세 가지 성분이 주를 이룬다. glucan, xylan의 비율이 늘어났다는 것은 반대로 lignin의 비율이 감소했다는 의미이다. 즉, 물리화학적인 전처리를 통해 lignin을 제거하는 것이 아니라 곰팡이가 자라면서 자연스럽게 리그닌이 분해된 것이다.

### 7. Xylose 고효율 효모 균주 개발

#### 가. CBP 복합 균주 개발 (C5 균주)

바이오에탄올 생산을 위해 활용 가능한 바이오매스 유래의 당 (sugar)은 주로 glucose (C6)와 xylose (C5)이며 바이오매스로부터 생산되는 바이오에탄올이 경제성을 가지기 위해서는 버려지는 당을 최소화해서 모든 당을 에탄올로 전환하는 기술개발이 필수적이다. 이러한 목적을 달성하기 위한 접근방법은 크게 두 가지 방법으로 구분할 수 있다. 현재까지 동정된 미생물중



에서 xylose발효를 통하여 에탄올을 생산하는 균주는 없기 때문에 xylose 활용능이 있는 균주를 조작하여 에탄올 발효능을 부여하거나 에탄올 발효능이 있는 균주를 조작하여 xylose 사용능을 부여하는 두가지 방법으로 접근하고 있다. 현재 본 연구팀에서 사용 중인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 glucose 활용능은 매우 뛰어나지만 xylose를 활용능이 매우 약하다. 특히 2가지 탄소원이 공존할 경우 xylose는 전혀 활용하지 못하는 문제가 있다. 이러한 문제해결을 위해서 효모의 xylose 대사조절을 위한 유전공학적 접근이 무수히 진행되어 어느 정도의 진전은 있으나 아직 상용화된 사례가 없다. 따라서 본 연구에서는 기존의 알려진 *S. cerevisiae*의 대사공학적 접근 방법과 신 효모균주를 발굴하여 발효 후 잔여 xylose를 추가 활용하는 방법을 모색하였다.

(1) *Pichia stipitis* 유래 XR, XDH, XK 유전자 발현 균주 제작

효모 *S. cerevisiae*가 hemicellulose로부터 생산된 xylose를 탄소원으로 사용하기 위하여 xylose를 세포내로 전달한 후 xylose reductase (XR)에 의하여 xylitol로 전환되고 다시 xylitol dehydrogenase (XDH)에 의하여 xylulose로 전환되고 xylulose kinase (XK)에 의하여 xylulose-5-phosphate로 전환된 후 pentose phosphate pathway경도로 도입된다 (그림 3-52)

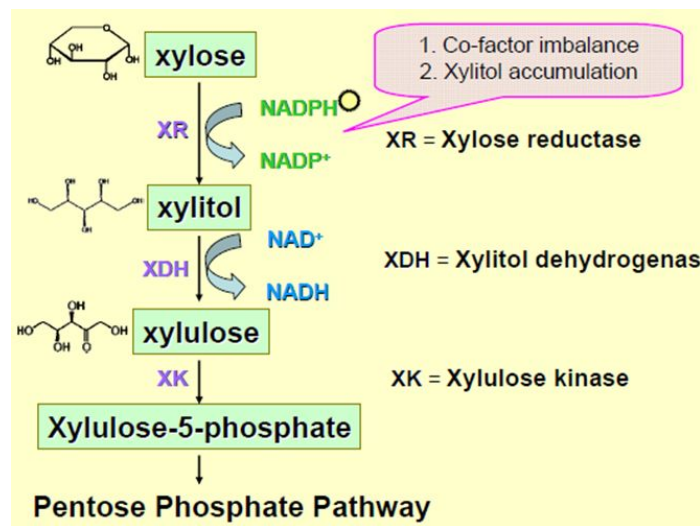


그림 3-52 . Xylose 대사 경로

효모 *Pichia stipitis* 는 5탄당 활용능력으로 인하여 많은 연구가 집중되어 xylose 대사관련 유전자가 밝혀져 있다. 본 연구에서는 xylose-fermenting *Pichia stipitis* 유래의 XR (xylose reductase), XDH (xylitol dehydrogenase) 및 XK (xylulokinase) 유전자를 클로닝하여 *S. cerevisiae* 염색체에 도입하는방법으로 xylose활용 균주를 제작하고자 하였다. URA3 유전자를 함유하는 YIp5XR-XDH와 neomycine selection marker를 가지고 있는  $\delta$ ISXK plasmid는 서울 대로부터 제공받았다 (그림 3-53).



그림 3-53. XR, XDH 및 XK 유전자 도입을 위한 효모 integration 벡터

2종의 효모 integration 벡터는 순차적으로 효모에 형질전환할 수 있도록 design 되었으며 먼저 YIp5-XR-XDH에 포함된 integration target 부분을 *Ava*I 제한효소로 처리하여 염색체내 URA3 locus로 도입하였다. 확보된 균주의 유전자 삽입여부는 PCR을 이용하여 확인하였다. 여기에 다시  $\Delta$ ISXK을 제한효소로 처리하여 염색체내 수십카피 이상 존재하는 delta 서열내로 도입하였다. 각 유전자가 도입된 균주2805/XR-XDH와 2805-XR-XDH-XK를 xylose를 함유한 배지에서 대조구와 함께 성장을 비교하였다 (그림 3-54).

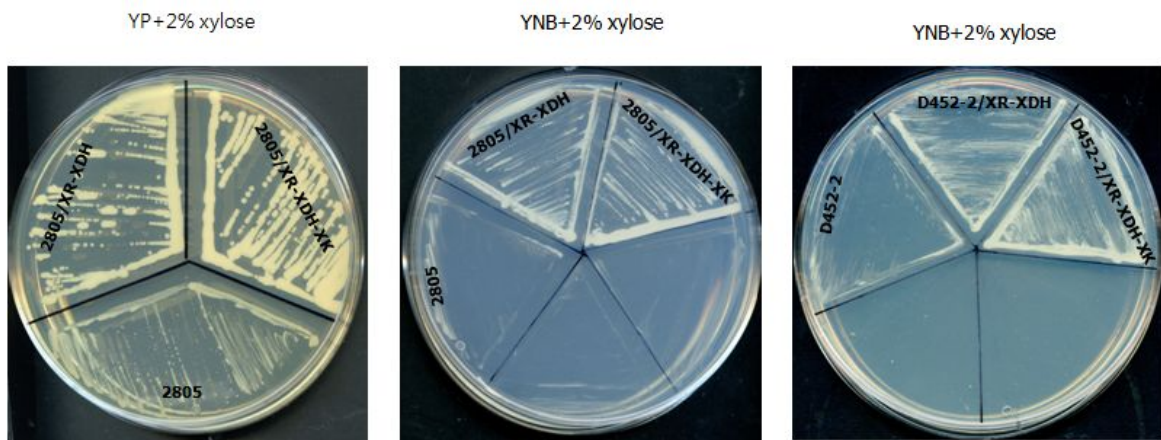


그림 3-54. 유전자 도입 후 세포의 성장 비교

XR과 XDH, XK 유전자 도입균주는 xylose를 탄소원으로 하여 잘 자랐으며 이에 비해 대조균주인 *S. cerevisiae* 2805와 D452-2는 잘 자라지 못하였다. 액상배양을 통하여 더 정확한 세포성장 비교를 위해 50 ml YP (1% Yeast extract, 2% Bacto-peptone) + 2% xylose broth 에서 72시간 배양하였다.

대조구인 Y2805와 D452-2 균주의 경우 xylose가 첨가된 배지에서 최종 cell growth가 3.0 이하로 거의 자라지 못했지만 2805균주에 XR과XDH,XK를 도입한 경우 OD=6.9 까지 성장했고, D452-2균주 또한 XR-XDH 도입에 의해 xylose 이용능이 증가된 것을 확인하였다 (그림 3-55).

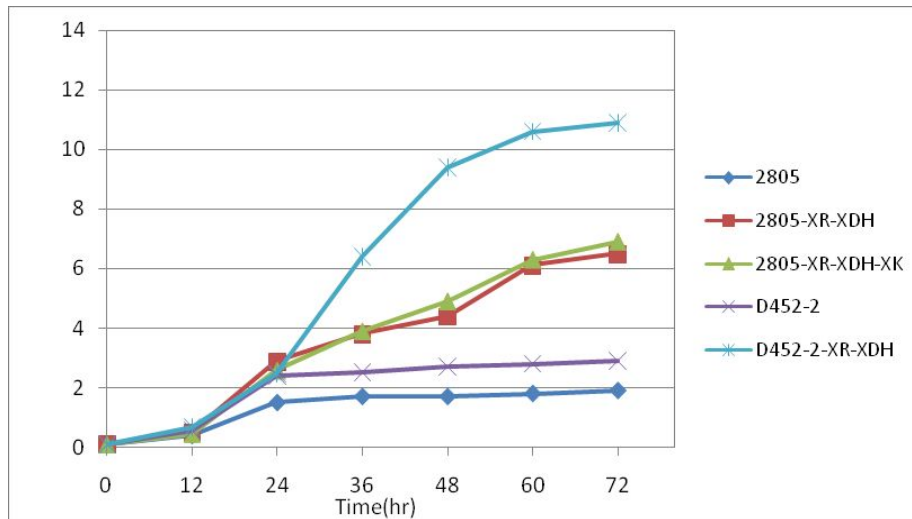


그림 3-55. XR, XDH, XK 도입 균주의 xylose 활용능 비교

그러나 xylose에 대한 성장정도가 균주에 따라 차이를 보이므로 균주에 따라 xylose 도입능의 차이나 유전자 발현차이가 있기 때문으로 판단되었다. 보고에 따르면 XK유전자를 multicopy로 도입할 경우 xylose 이용능이 향상되므로 XK를 효모 delta서열을 이용하여 다중 카피 도입을 시도하였다. Delta sequence는 Long Terminal Repeat (LTR)의 구성요소중의 하나로 Ty1과 Ty2 elements로 이루어져 있다. Yeast 염색체상에는 Ty elements들이 다수 존재하며 높은 homology를 가지고 있어 XK 유전자를 함유한  $\delta$ ISXK 벡터가 multicopy로 도입이 가능하다 (그림 3-56). Multicopy 도입 후 400 ug/ml의 G418 농도에서 형질전환체들을 선별하였다.

Multi copy integration

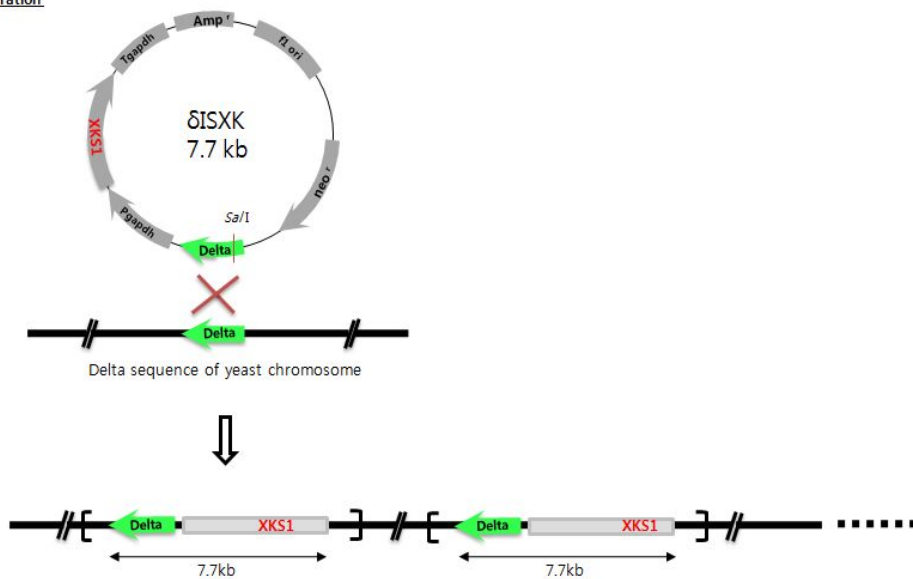


그림 3-46. XK 유전자 multicopy integration

얻어진 형질전환체들은 PCR로 XK 유전자 도입여부를 확인하였다. PCR을 통해 1차 선별된 균주들은 Southern hybridization을 통해 2차 선별과정을 거쳤다. 그 결과 3, 4, 5, 9, 13번 균주들에서 다양한 위치에 밴드들이 다수 확인되었으며, XK 유전자가 multicopy로 도입되어 있음을 확인 할 수 있었다 (그림 3-57).

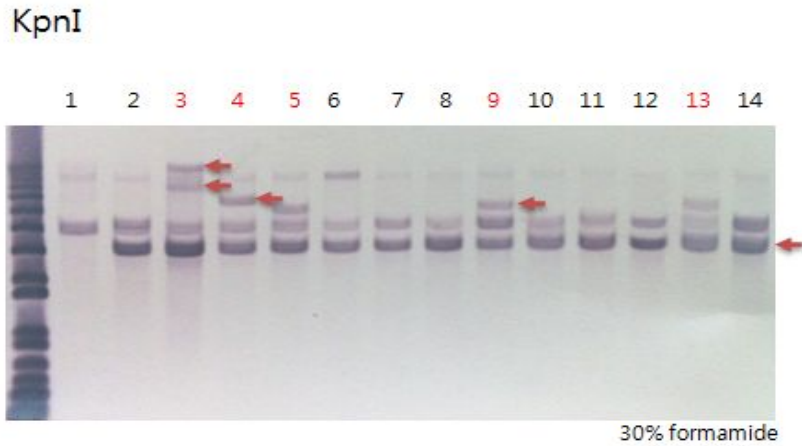
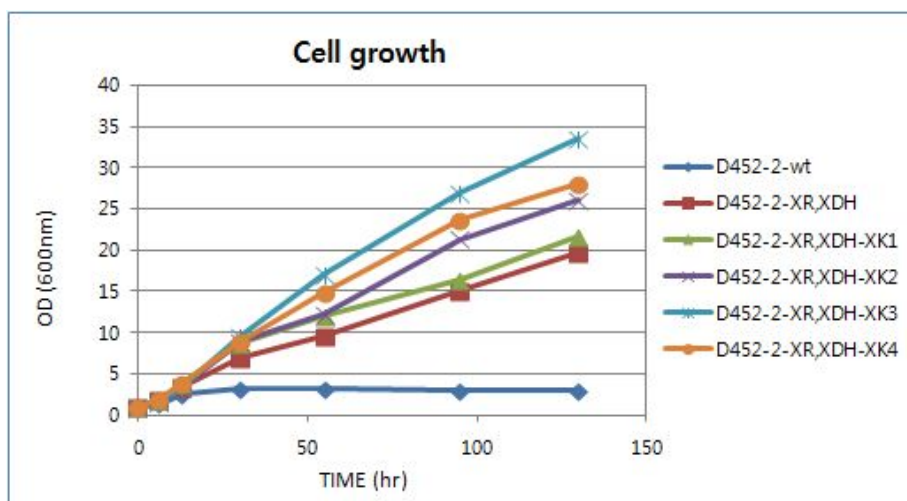


그림 3-57. Southern hybridization을 통한 XK 유전자 multicopy 도입 확인

D452-2/XR-XDH 균주에 XK 유전자가 multicopy로 도입된 균주 선별 후 세포성장 비교를 위해 50 ml YP (1% Yeast extract, 2% Bacto-peptone) + 2% xylose broth에서 130시간 배양하였다. XK 유전자가 multicopy로 도입된 균주 3번의 경우 xylose 배지에서 가장 높은 세포 성장을 보였으며 xylose 소모속도 또한 빠른 것을 확인하였다 (그림 3-58). 그러나 본 연구에서 개발된 xylose 활용 균주를 이용한 바이오에탄올 생산 발효연구에서는 xylose를 사용한 경우 미미한 에탄올 생산할 뿐 C6와 C5가 공존하는 조건에서는 xylose 소모가 거의 이루어지지 않는 문제가 여전히 해결되지 않았다.



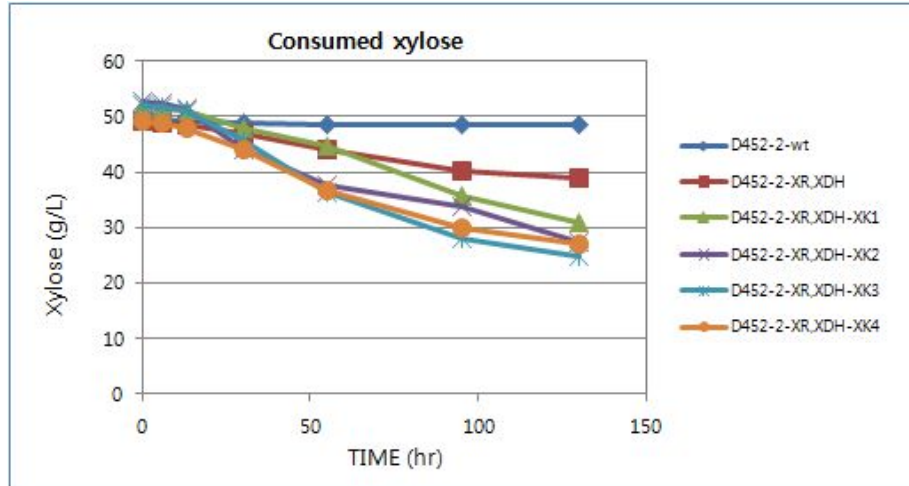


그림 3-58. XK multicopy 균주들의 오탄당 활용능 비교

(2) *Kluyveromyces marxianus* 균주를 이용한 xylose 활용 균주 개발

바이오에탄올 생산을 위해 활용가능한 섬유소 바이오매스 유래의 당 (sugar)은 주로 glucose (C6)와 xylose (C5)인데 현재 사용중인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 glucose 활용능은 매우 뛰어나지만 xylose를 활용하지 못한다. 특히 2가지 탄소원이 공존할 경우 xylose는 전혀 활용하지 못하는 문제가 있다. 이러한 문제해결을 위해서 효모의 xylose 대사조절을 위한 유전공학적 접근이 무수히 진행되어 어느정도의 진전은 있으나 아직 상용화된 사례가 없다. 따라서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*의 대사공학적 연구 뿐 아니라 자연계에 존재하는 효모 중 xylose 활용능이 있는 균주를 확보하고 추가 개량하는 방법을 시도하였다. 고온성 효모로서 *Kluyveromyces marxianus*는 45도까지 성장이 가능하며 xylose 활용능이 *S. cerevisiae*보다 우수한 것으로 알려져 있다.

고온성 효모 *K. marxianus* 균주 다수를 KCTC 및 일본 오사카대학에서 분양 받았으며 xylose의 활용능을 비교하였다 (그림 3-59). 대부분의 균주가 효모 *S. cerevisiae* 보다 오탄당인 xylose와 arabinose에서 성장이 뛰어남을 확인하였다. 또한 xylose로부터 에탄올 생산능을 비교하기 위하여 2% xylose에서 효모를 배양하고 생성된 에탄올의 양을 조사한 결과 이 균주의 경우에도 xylose로부터 에탄올의 생성량은 그다지 높지 않아 1 g/L 수준이었다 (그림 3-60).

YP + 2% xylose

YP + 2% arabinose

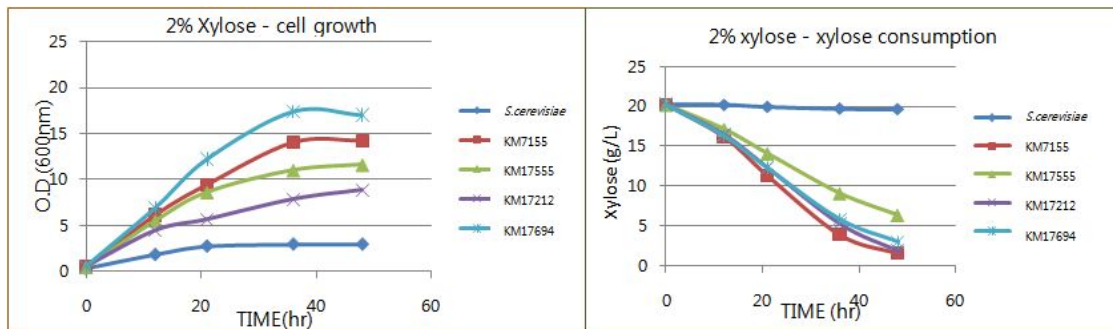
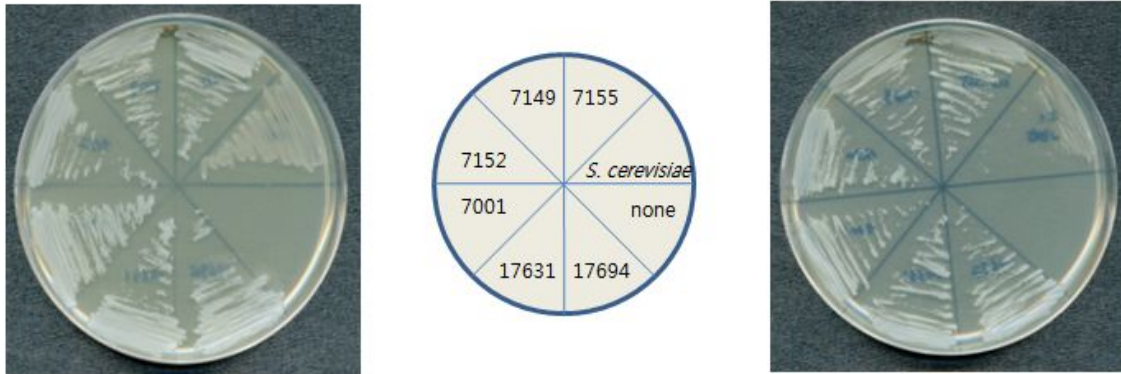


그림 3-59. 확보된 고온성 효모의 오탄당 활용능 비교

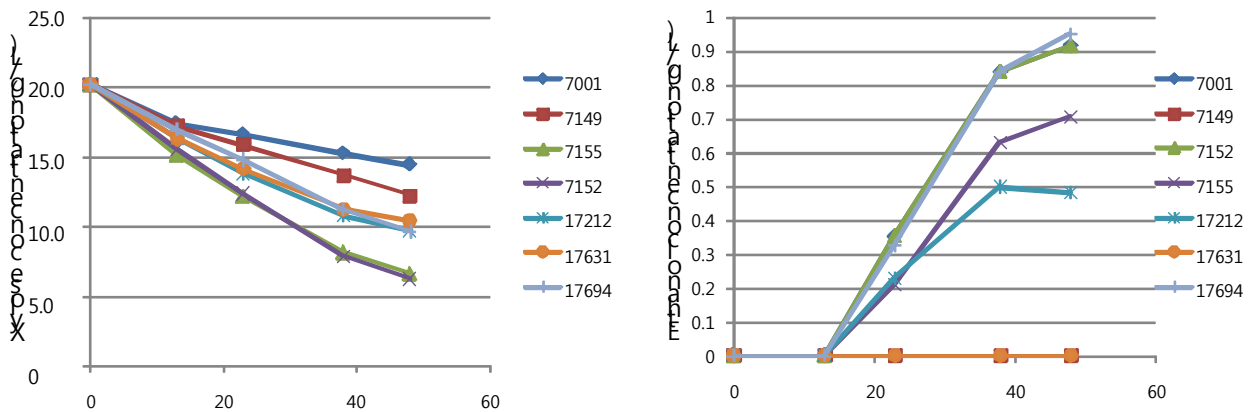


그림 3-60. Xylose를 이용한 에탄올 생성능 비교

(3) 오탄당 이용 신규 효모의 분리

오탄당 이용이 가능한 새로운 효모를 분리하기 위하여, 다양한 장소 (대전광역시 한국생명공학연구원 내의 토양과 포도 껍질, 그리고 팜부산물 2종류, 팜부산물 퇴비 등) 에서 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플 10 g을 40 ml의 멸균 증류수에 넣고, 한 시간 동안 vortex를 이용하여 섞어주었다. 이 후 상등액을 serial dilution 하여 이 시료를 bacteria를 저해하기 위한 효모

배지로 YMPS [1 L 당 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, + antibiotics (penicillin, streptomycin 50 mg)] agar 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 동안 배양 한 뒤, 곰팡이 포자 형태가 아닌 효모 형태의 콜로니를 생성하는 균주를 확보하여 단일균주를 분리하였다 (그림 3-61). 분리된 미생물 콜로니를 YMPS agar 배지에 다시 접종하여 순수 분리 및 배양을 하였으며, 그 결과, 토양에서 1종, 포도껍질에서 7종, 팜부산물 1에서 2종, 팜부산물2에서 4종, 팜부산물 퇴비에서 12종의 효모균주들이 분리되었다.

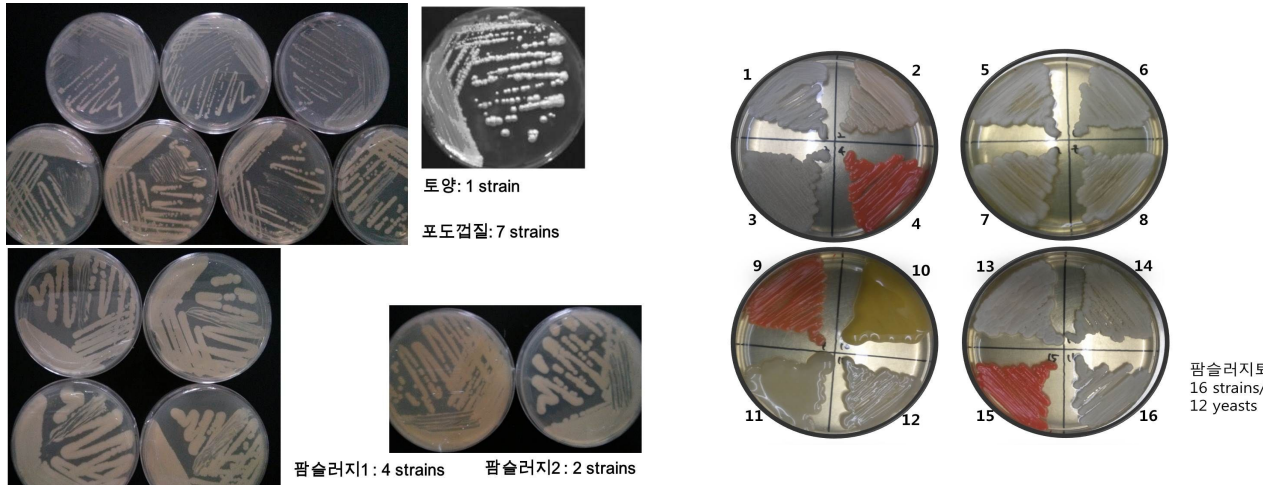


그림 3-61. 신 효모균주의 분리

(가) 신규 미생물의 동정을 위한 유전학적 분석

분리된 균주들의 종 분석을 위하여, 균주들을 3 ml YMPS 액체 배지에서 30°C, 180 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양 한 후에, 원심분리 하여 세포만을 회수한 후, i-genomic BYF DNA Extaction Mini Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA에서 진핵세포 미생물의 진화 계통연구에 가장 유용한 분자 마커로 이용되고 있는 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여 논문에서 밝혀진 프라이머인 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGA ACCTGCGG-3')과 LR3R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3')을 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)방법을 통하여 염기서열을 증폭하였다. 또한 박테리아의 여부를 알아보기 위하여 박테리아의 16S rRNA gene을 분석하기 위한 프라이머로 27F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3') 과 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다.

위의 염기서열을 증폭하기 위한 반응조성은 template DNA 1 µl, 10pmol ITS1 1.5 µl, 10pmol LR3R 1.5 µl, EX taq buffer (Takara) 5 µl, 2.5 mM dNTP 4 µl, 증류수 36.5 µl, EX taq DNA polymerase (Takara) 0.5 µl 이며, PCR 조건은 95°C 5분 반응 후, 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초로 30 사이클 반응하고, 72°C에서 10분간 추가 반응하는 반응조건을 사용하였다. 상기 PCR 반응 후 2 µl의 반응액을 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석한 결과, 토양과, 포도, 팜부산물에서 발견된 미생물의 경우 진핵세포 프라이머를 이용한 경우에만 1~1.2 kb 크기의

단편들이 증폭되었고 (그림 3-62), 이로써 분리된 모든 종이 eukaryotes임을 알 수 있었다. 그러나, 팜부산물 퇴비에서 분리된 미생물의 경우, 총 16종 중 12종만 진핵세포 프라이머를 이용하였을 경우 1~1.2 kb 크기의 단편들이 증폭되었고, 나머지 4종의 균주는 박테리아를 대상으로 한 프라이머에서 약 1.5 kb의 단편이 증폭되었다 (그림 3-63). 이로써 12종의 균주는 진핵세포이고, 4종의 균주는 박테리아임을 알 수 있었다. 이를 PCR purification kit 을 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. 이 후, PCR산물을 제노텍사에 의뢰를 통하여 염기서열을 분석하였다. 분석 한 염기서열은 균 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하였다. 그 결과, 다양한 호모 균주들이 분리되었다 (표 3-9). 많은 종들이 에탄올 발효를 하는 종임을 알 수 있었으며, G-1, G-2, G-3, 1-2, 2-2등은 와인공정이나 치즈 발효 등에서 많이 우점하는 호모임을 알 수 있었다. 이들의 ribosomal DNA 염기서열의 상동성은 매우 유사한 종부터 상당히 동떨어진 종까지 다양하게 분리된 것을 확인 할 수 있었다 (표 3-9). 상동성이 떨어지는 균주는 이미 밝혀지지 않은 신종일 확률이 높음을 의미한다.

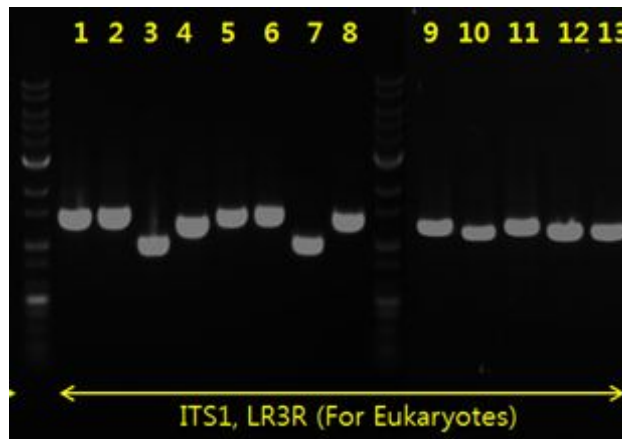


그림 3-62. 분리된 호모들의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA PCR 사진

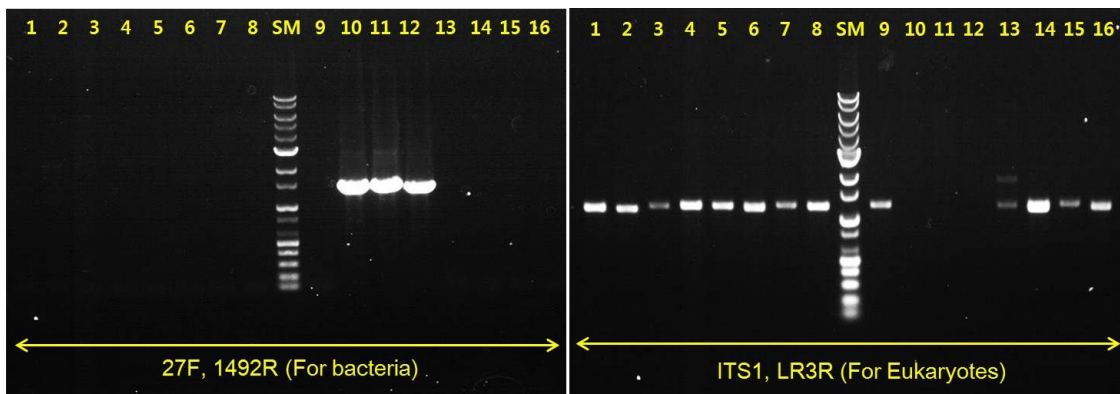


그림 3-63. 팜 부산물 퇴비에서 분리된 균주들의 ribosomal RNA gene PCR 사진



표 3-9. 분리된 미생물들의 ribosomal RNA 염기서열을 근간으로 한 동정

sample	Sequence file name	length	Closest relative	Accession No.	Similarity (%)
토양	Y-1	1072	<i>pichia guilliermondii</i>	KC119207	98.9
포도껍질	G-1	1134	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	AM160628	96.9
	G-2	1171	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	EU642637	98.9
	G-3	1215	<i>Candida stellata</i>	AY394855	98.0
	G-4	1299	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149	95.3
	G-5	1207	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	JQ425357	96.2
	G-6	1140	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	AM160628	96.0
	G-7	1259	<i>Candida stellata</i>	AY394855	99.8
팜슬러지1	1-1	1218	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	HQ396523	99.2
	1-2	1164	<i>Pichia norvegensis</i>	AB278165	92.1
팜슬러지 2	2-1	1230	<i>Pichia membranifaciens</i>	DQ104713	91.3
	2-2	1186	<i>Pichia kudriavzevii</i>	FR774540	99.8
	2-3	1197	<i>Pichia sp.</i>	AM905031	92.5
	2-4	1164	<i>Pichia membranifaciens</i>	DQ104713	91.5
팜슬러지 퇴비	1	1111	<i>Candida sp.</i>	JQ247717	94.0
	2	1124	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN428921	97.1
	3	1178	<i>Yamadazymamexicana</i>	AB365477	97.0
	4	1191	<i>Rhodotorulamucilaginoso</i>	HE660061	95.0
	5	1177	<i>Pichiocaribbica</i>	KC111450	94.4
	6	1145	<i>Candida sp.</i>	JQ247716	91.0
	7	1177	<i>Pichiocaribbica</i>	KC111450	95.3
	8	1158	<i>Pichiocaribbica</i>	KC111450	96.0
	9	1137	<i>Rhodotorulamucilaginoso</i>	KC205168	96.2
	10	1381	<i>Sphingobiumyanoikuyae</i>	JN700070	99.0
	11	1433	<i>Pantoeaagglomerans</i>	FJ593002	99.2
	12	1387	<i>Ochrobactrumintermedium</i>	AM490610	98.5
	13	1117	<i>Uncultured Verticillium</i>	GU055566	96.2
	14	1122	<i>Candida sp.</i>	JQ247716	94.1
	15	1130	<i>Rhodotorula sp.</i>	JX310560	96.7
	16	1131	<i>Candida sp.</i>	JQ247716	93.4

(나) 분리된 균주들의 당 이용능 확인

분리된 균주들의 당 이용능을 확인하기 위하여, 앞서 분리된 26종의 효모를 대상으로 하여 우선 바이오매스로부터 유래 할 수 있는 다양한 탄소원에 대한 이용능을 평가하고자 하였다. 바이오매스로부터 유래할수 있는 당으로는 육탄당인 glucose, galactose, mannose 등이 있고 오탄당으로는 arabionose, xylose, 이당으로는 cellobiose 등이 있다. 분리균주의 바이오매스로부터 유래하는 탄소원으로의 적용을 위하여 (오탄당과 육탄당을 모두 이용할수 있는지 여부), cellulosic biomass를 분해하여 나올 수 있는 단량체 형태의 탄소원에서의 성장을 확인하였다.

YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) broth 배지 3ml에 분리된 균주들을 접종하여 test tube에 24시간 동안 배양 한 뒤, O.D를 1이 되게 희석을 한 후, serial dilution 하여 희석배율대로 YNB (Yeast nitrogen base) agar plate에 탄소원만 달리하여 넣어준 배지에

(이때 넣어준 탄소원은 glucose, galactose, mannose, arabionose, xylose, cellobiose로써 cellulosic biomass를 분해했을 때 형성되는 주 단량체들의 성분이다) 각각 10  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 30 $^{\circ}$ C 에서 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, 그림 3-64에서 보는 바와 같이, 포도에서 분리된 G1~G7균주는 오탄당인 xylose와 arabinose를 잘 이용 못하였으며, 그 외의 균주들은 오탄당인 xylose와 arabinose, 육탄당인 glucose, galactose, mannose 모두 잘 이용하는 것으로 확인되었다.

그리고 이당인 cellobiose는 포도에서 분리된 G3, G7균주 이외의 모든 균주가 모두 잘 이용하여 성장하였다. 이로써, 대부분 균주들이 cellulosic biomass로부터 유래하는 모든 종류의 당 즉, 오탄당과 육탄당을 대체적으로 잘 이용하는 균주임을 알 수 있었다. 이는 여러 가지 cellulosic biomass로부터 유래한 당을 이용할 때 특히, 오탄당과 육탄당을 모두 이용할 수 있다는 점에서 이점으로 작용 할 수 있을 것으로 판단된다.

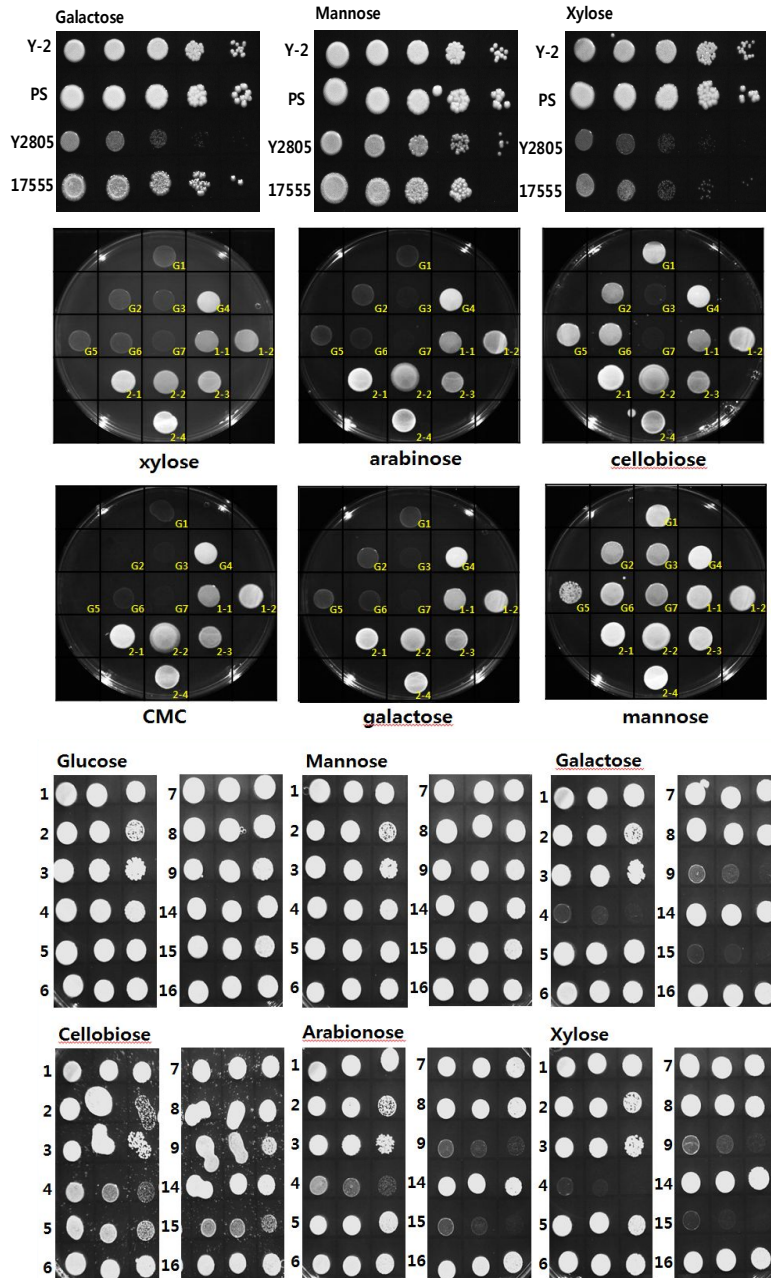


그림 3-64. 분리된 효모 균주들의 육탄당과 오탄당 이용능

(다) 분리된 균주들의 오탄당을 이용한 성장과 생산물 확인

분리된 균주들의 오탄당을 이용한 성장과 오탄당을 이용했을 때, 생산되어지는 생산물을 확인하기 위하여, xylose배지에서 배양하여 그 양상을 확인하였다. 일반적으로 xylose를 이용하여 고부가가치로 알려진 xylitol을 생산하거나, 에탄올을 생산하는 것으로 알려져 있다. 위에서 오탄당을 이용할수 있는 균주로 확인 되어진 균주 (Y-2, G4, 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16 총 20종 균주)들을 YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) broth 배지 3ml에 접종하여 test tube에 24시간 동안 배양 한 뒤, 이를 접종균으로 이용하여 YPX (yeast extract 1%, peptone 2%, xylose 2%) broth에서 30℃, 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, 대체적으로 성장률을 매우 좋았으나, 최종 생산물은 다르게 나타났다 (그

림 3-65).

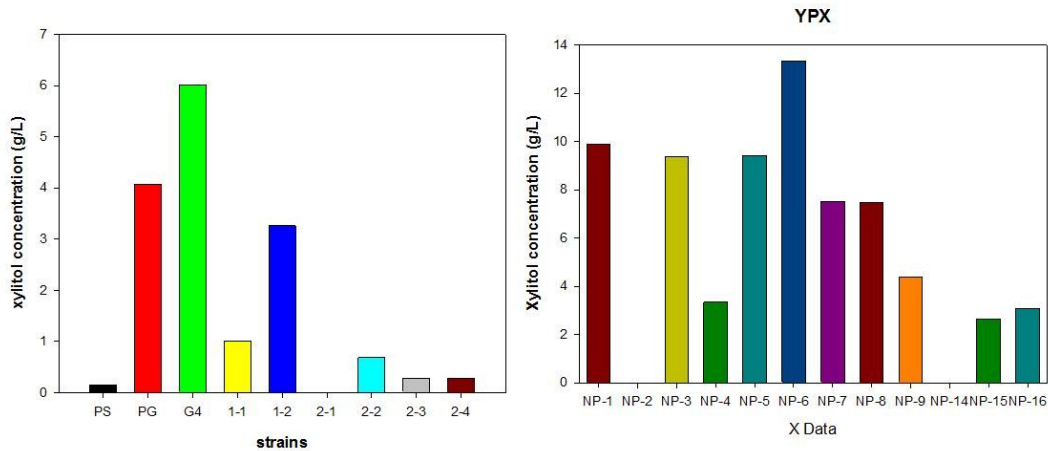


그림 3-65. 분리된 효모 균주들의 xylose를 이용한 xylitol의 합성

그림 3-65에서 보는 바와 같이 각각의 효모 균주들은 xylose를 이용하여 대부분이 xylitol을 생산하였다. 그러나 일부 균주의 경우 아주 적은 양으로 에탄올을 생산하는 경우도 있었으며 (1-1, 1-2 균주), 2-1, 2, 14 균주 같은 경우에는 xylose를 이용한 성장능은 좋았으나, 생산물로서 xylitol이나 에탄올을 만들지 못하는 것으로 확인되어 졌다. 분리되어진 균주중 PG (Y-2), G4, NP-6 는 특히 xylose를 이용하여, xylitol을 많이 축적하였다.

(라) 신규 효모 *Pichia guilliermondii* Y-2의 Xylose를 이용한 발효와 xylitol 생산

Y-2 균주는 위의 결과에서 확인했듯이, xylose를 잘 이용하는 효모이며, xylose를 이용하여 xylitol을 생산하기 때문에 xylose를 탄소원으로 이용한 발효를 진행하여 보았다. Y-2 균주를 YPD 5 ml에 접종하여 24시간 동안 종균배양을 한 뒤, 500 ml baffle flask에 100 ml의 xylose 발효용 배지 (xylose 2%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, ammonium sulfate 0.2%, magnesium sulfate 0.04%)를 취하여 종균배양액을 접종한 뒤 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하여, 약 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth, xylose의 잔량, 에탄올, 그리고 xylitol을 측정하였다. 그 결과, 그림 3-66에서 보는 바와 같이, 배양 58시간 후, 공급한 xylose를 거의 소진하여 이때의 xylose를 소모량은 약 30 g/L 이며, 약 13.5 g/L의 xylitol을 생산하였다. 이때의 xylose의 xylitol의 전환율은 약 65.2%이며, 이는 대표 3-적으로 xylose에서 xylitol로의 전환율이 높게 알려진 *P. guilliermondii*와 비교 해보았을 경우, 1995년 Roberto et al., 은 약 70%의 전환율, 1991년 Meyrial et al.,은 약 75% 전환율로 상기균주 역시도 xylitol의 합성율이 좋은 균주라고 말할 수 있다. 상기균주는 xylose를 이용하여 높은 xylitol 생산성을 지니는 것으로 보아서 xylitol 생산균주로서 그 활용 가능성이 있다고 판단되었다.

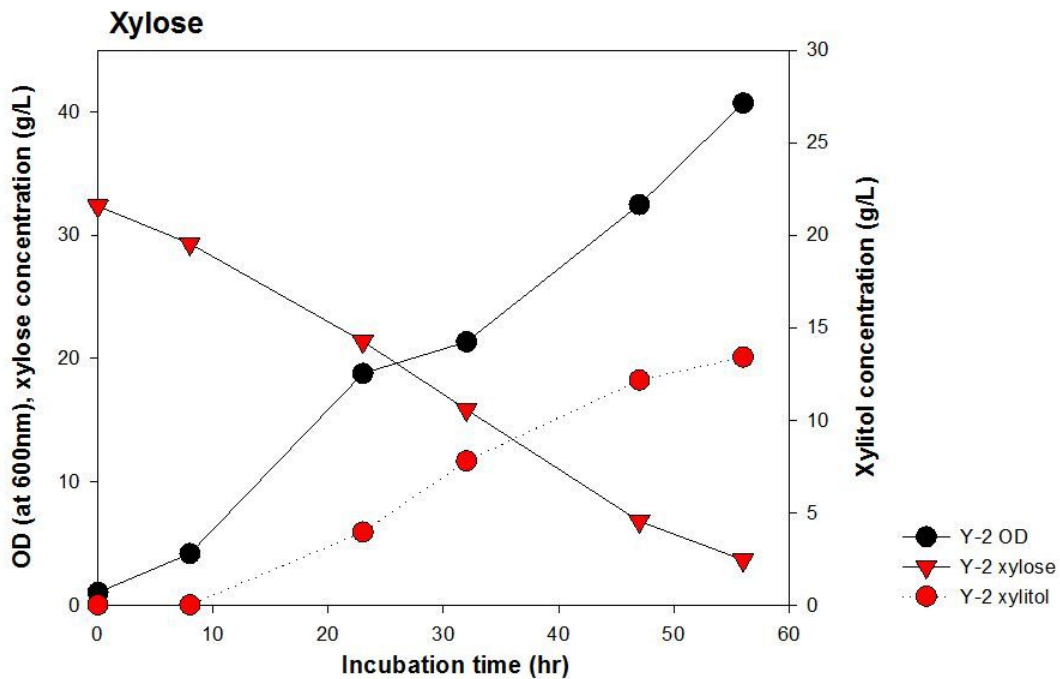


그림 3-66. Y-2균주의 xylose를 이용한 xylitol 생산.

(마) Glucose와 xylose mixture를 이용한 균주 Y-2의 발효

균주 Y-2는 오탄당과 육탄당의 탄소원이 각각 공급된 형태에서는, glucose를 이용하여 에탄올 발효를 하고, xylose를 이용하여 xylitol 생산을 하였다. 그러나 보통 lignocellosic biomass를 당화 했을 경우, glucose와 xylose가 혼재되어 있는 형태이므로, glucose와 xylose가 혼재되어 있을 때 각각의 기질을 잘 이용하여 에탄올과 xylitol을 함께 만드는지 glucose와 xylose mixture를 이용하여 발효를 진행하였다. Y-2 균주를 YPD 5 ml에 접종하여 24시간 동안 종균배양을 한 뒤, 500 ml baffie flask에 100 ml의 glucose 와 xylose가 함께 들어간 발효용 배지 (glucose 2.5%, xylose 2.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, ammonium sulfate 0.2%, magnesium sulfate 0.04%)를 취하여 종균배양액을 접종한 뒤 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양 하여, 약 8시간 내지 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth, glucose와 xylose의 잔량, 에탄올, 그리고 xylitol을 측정하였다.

그 결과, 그림 3-67에서 보는 바와 같이, 초반 동일하게 25 g/L의 glucose와 xylose를 공급 해주었을 때, 약 18시간 후에 glucose를 완벽히 소진하여 약 10 g/L의 에탄올을 생산 하였으며, xylose도 glucose와 함께 초반 18시간 까지 적은 양이지만 소모하다가, glucose가 완전히 소모된 18시간 후에는 급격히 소진하여 70시간 이후에는 모두 소모 하여 약 7.5 g/L의 xylitol을 생산하였다. 이로써 신균 균주 Y-2는 오탄당과 육탄당의 혼합기질 내에서도 두 기질을 모두 잘 이용하여 각각의 에탄올과 xylitol을 함께 생산할 수 있음을 확인하였다 (그림 3-67).

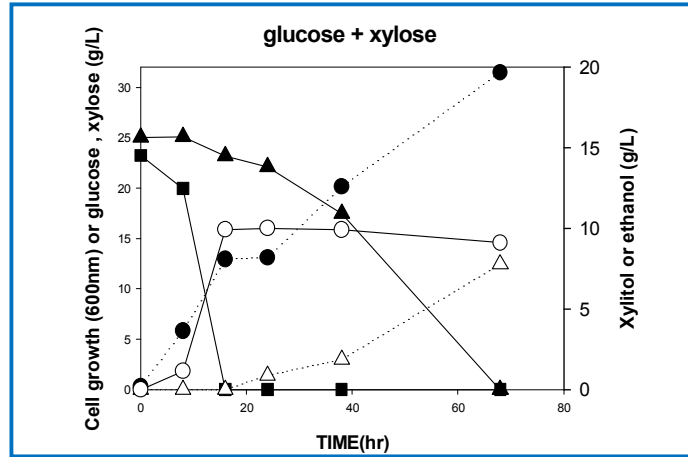


그림 3-67. 균주 Y-2의 glucose와 xylose혼합기질 내에서의 에탄올과 xylitol 생산

## 8 바이오매스 최적당화 효소 시스템 개발

### 가. 섬유소 가수분해 최적조건 발굴

셀룰라제에 의한 당화 효율을 높이기 위해서는 바이오매스를 산이나 알칼리에 의한 전처리는 필수로 거쳐야 하는 과정이다. 섬유소 바이오매스로서 돼지감자대 분쇄산물을 이용하여 산과 알칼리로 전처리한 후 전처리하지 않은 바이오매스와 전처리 후 바이오매스의 당화 비교를 통하여 당화율이 얼마나 차이 나는지에 대해서 비교하였다. 바이오매스의 알칼리 전처리는 고액비 1:10 (S/L), 2% NaOH용액, 120℃, 60 min으로 산 전처리 방법은 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120℃, 30min 의 고온 고압 반응 전처리하였다. 전처리 후 상등액은 제거하고 남아있는 기질을 세척, 중화, 건조하여 실험에 사용하였다. 셀룰라제에 의한 당화조건으로는 고액비 1:20 (S/L), 또는 1:10 (S/L)으로 50 mM sodium citrate buffer (pH4.8)을 사용하여 총 부피 50ml로 진행하였다. 이 반응용액에 상용화 효소인 Celluclast 1.5 L + novozyme A188 (celluclast 1.5 L 볼륨의 1/10)를 cellulose g당 20 FPU이 되도록 첨가하여 50℃, 300 rpm에서 72시간 동안 당화반응을 진행하였다. 당화반응 중 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC를 이용하여 생성된 glucose와 xylose를 정량하고 바이오매스가 가진 총 cellulose를 이용하여 생성된 단당류의 전환율을 그래프를 작성하여 결과를 정리하였다. 돼지감자대의 전처리는 비전처리에 비해 높은 수준의 당화율을 확보 할 수 있었던 것을 확인 할 수 있었고, 산전처리에 비해 알칼리 전처리의 수율이 더 좋았던 것을 확인 할 수 있었다 (그림 3-68).

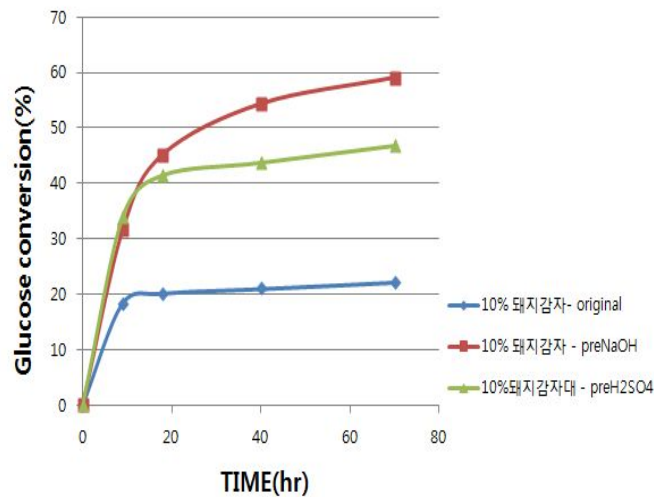


그림 3-68. 섬유소 바이오매스 돼지감자대의 산과 알칼리로 전처리 후 당화 (10% 고액비)

바이오매스를 전처리함으로써 당화율이 2~3배정도 증가하였으므로 이를 토대로 하여 본 연구에서 목표 3-로 하는 바이오매스인 볏짚, 억새, 갈대를 이용하여 전처리 후 당화에 대하여 비교하였다. 앞의 실험에서 산 전처리보다는 알칼리 전처리의 당화율이 높았기 때문에 이번 실험에서는 알칼리 전처리 후 바이오매스의 당화를 진행하였다. 바이오매스의 전처리는 고액비 1:10 (S/L), 2% NaOH용액, 120°C, 60 min의 고온고압 반응으로 진행하였고 전처리 후 상등액은 제거하고 남아있는 기질을 세척, 중화, 건조하여 실험에 사용하였다. 셀룰라제에 의한 당화 조건으로는 고액비 1:10 (S/L)으로 50 mM sodium citrate buffer (pH4.8)을 사용하여 총 볼륨 50ml로 진행하였다. 이 반응용액에 상용화 효소인 Celluclast 1.5 L + novozyme A188 (celluclast 1.5 L 볼륨의 1/10)를 cellulose g당 60FPU이 되도록 첨가하여 50°C, 300 rpm에서 72시간 동안 당화반응을 진행하였다. 당화반응 중 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC를 이용하여 생성된 glucose와 xylose의 그래프를 작성하여 결과를 정리하였다.

그 결과 실험에 사용된 모든 바이오매스는 전처리하지 않은 바이오매스에 비해 전처리 후 바이오 매스의 당화에서 높은 당화수율을 확인할 수 있었다 (그림 3-69, 70, 71).

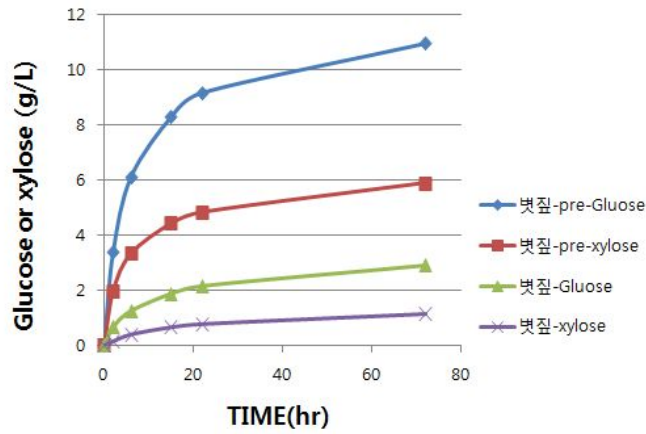


그림 3-69. 벚짚의 전처리 전후 당화

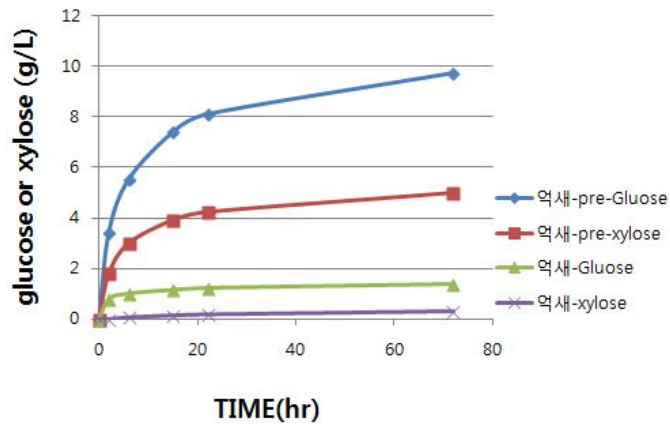


그림 3-70. 억새의 전처리 후 당화.

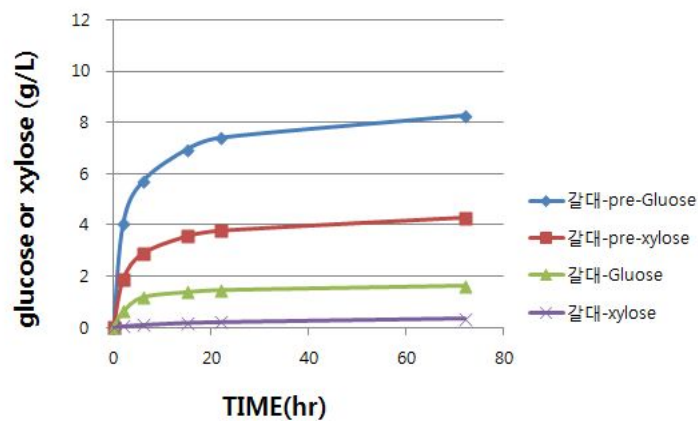


그림 3-71 갈대의 전처리 후 당화.

현재 상용화된 효소를 사용하여 전처리 후 바이매스를 당화할 때 당화 최고 수율은 60~80%수준으로 당화수율 향상이 필요하다. 이를 위해 detergent를 사용하여 효소와 기질의



반응에 있어서 기질에 대한 효소의 흡착을 변화시키면 당화율 상승을 기대할 수 있다. 이를 확인하기 위한 연구로서 기질로는 알칼리 전처리 돼지감자대를 사용하여 당화반응 (볼륨 100 ml, 1:10 (S/L ratio), 50 mM sodium citrate buffer (pH4.8), 50°C, 200 rpm)을 진행하였다. 여기에 detergent (tween 80)를 0~5%까지 첨가하여 실험군들로 분류하였다. 72시간의 당화시간동안 각 시간별로 샘플링하여 HPLC를 이용하여 glucose를 정량하고 바이오매스가 가진 전체 cellulose 대비 glucose로의 전환율을 계산하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 detergent가 들어간 실험군이 들어가지 않은 대조군에 비해 약 8% 정도의 당화율이 상승하는 것으로 나타났다 (그림 3-72).

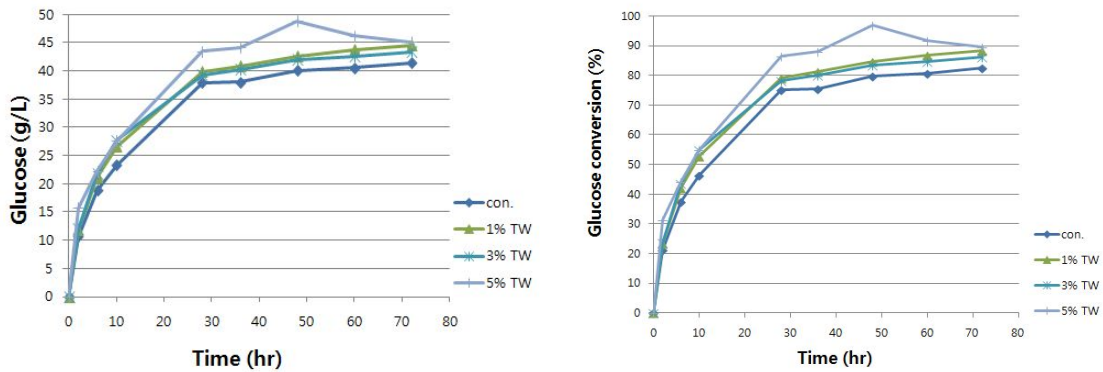


그림 3-72. Detergent 농도별 첨가에 따른 바이오매스 당화 (glucose g/L)

바이오매스 효소 당화시 당화반응기의 임펠러의 회전에 의하여 반응액이 회전하면서 효소와 기질의 반응 표 3-면적이 넓어질 수 있도록 유도하고 있다. 이 반응에서 물리적인 요소를 추가하여 반응 표 3-면적을 더 넓히고 효소와 기질의 반응의 흡착 및 활성표 3-면적이 보다 개선시키기 위하여 반응 시에 glass beads를 첨가함으로써 당화율 상승을 꾀하였다. 본 실험에 사용된 EFB는 1~5 mm로 분쇄된 EFB를 2% NaOH, 150°C, 1시간 반응하고 1 M 염산으로 중화 세척하여 사용하였다. 전처리 바이오매스를 임펠러 당화기에 10% (w/w)으로 넣고 50 mM Sodium citrate buffer (pH 4.8)를 사용하여 최종 볼륨 500 ml이 되도록 하였다. 효소는 5FPU/g cellulose의 Celluclast 1.5 L에 celluclast 볼륨의 1/10의 A188을 첨가하여 사용하였다. Glassbead는 1 mm, 5 mm 지름의 두 종류를 사용하였다. Glassbead 첨가량은 biomass 무게와 같은 무게를 첨가하였다. 50°C의 온도에서 250 rpm으로 실험을 진행하였고 각 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC를 이용하여 glucose와 xylose를 정량하였다.

결과적으로 glass bead를 첨가한 실험군이 glucose를 25 g/L를 생산하였고 넣지 않은 대조 실험군은 23 g/L를 생산함으로써 8% 정도의 당화율 상승을 보였다. 또, 1 mm의 glassbead를 사용한 실험군 보다 5 mm의 glassbead를 사용하였을 때 당화율이 약간 더 상승되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-73). 이는 glassbead의 지속적인 마찰력에 의하여 바이오매스가 파쇄됨으로써 효소와 기질의 반응 표 3-면적을 넓힌 것으로 사료된다.

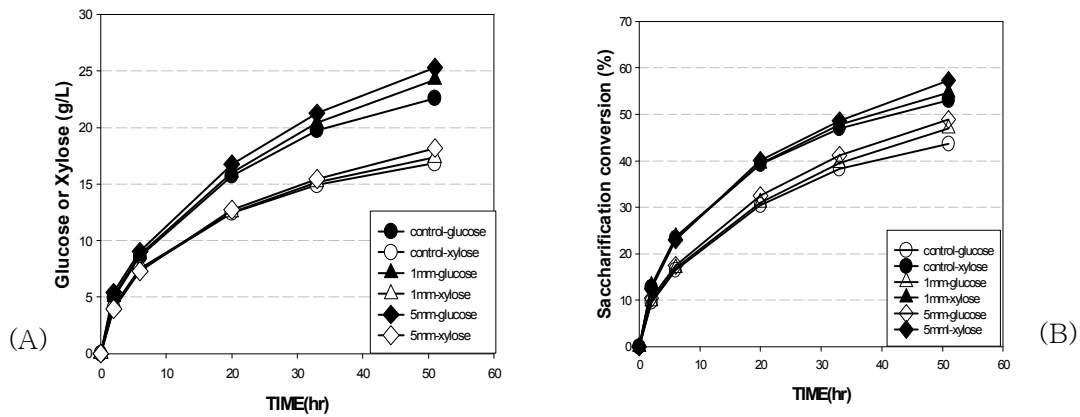


그림 3-73. Glassbead를 첨가한 바이오매스의 당화.

(A) 당화반응결과의 glucose, xylose g/L 그래프

(B) 당화반응결과의 glucose conversion, xylose conversion g/L 그래프

#### 나. Cellulose 가수분해용 최적효소 콕테일 제조

바이오매스 당화에 사용되는 상용화 효소는 곰팡이 유래의 수십가지 셀룰라제로 구성된 복합체이지만 효모에서 생산된 재조합 단백질을 이용하여 동일한 조건을 구현하기는 어렵기 때문에 셀룰라제를 구성하는 4가지 핵심효소인 exoglucanase (CBH1,2), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)를 이용하여 Kribb Cellulase Cocktail (KCC)을 제작하였다 (그림 3-74). *T. reesei* 유래의 endoglucanase2 (EGL2)와  $\beta$ -glucosidase는 *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의 BGL을 효모를 이용하여 재조합 생산하여 모든 KCC에 사용하였으며 KCC의 혼합비는 CBH1: CBH2: EGL: BGL=3.5:3.5:2:1로 혼합하였다.

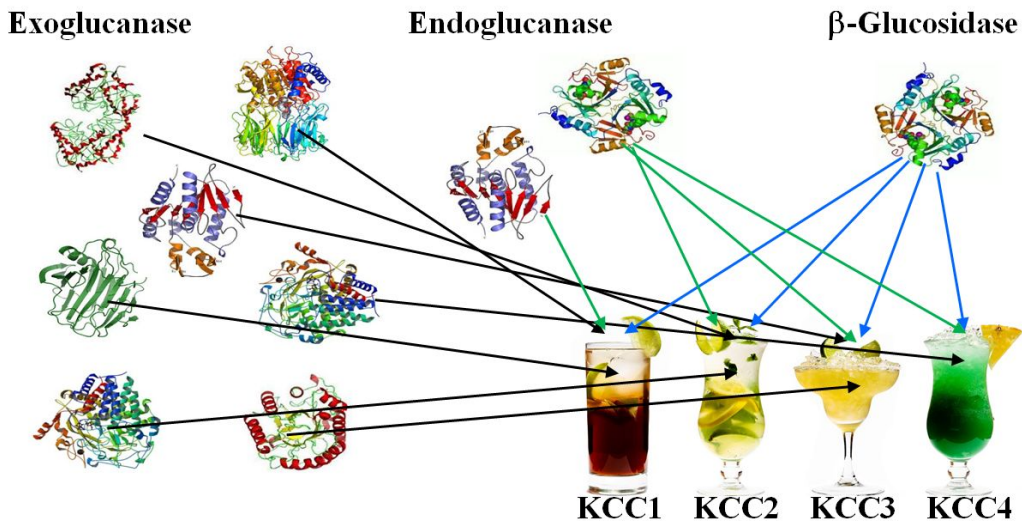


그림 3-74. 효소 콕테일 제조방법

4종의 효소가 포함된 KCC1는 상용화 효소에 비해 생산성이 낮고 단위볼륨당 활성은 낮으나 동일한 filter paper unit을 사용할 경우 섬유소 당화율은 비슷한 수준을 보였다. 또한, 상용화된 곰팡이 효소에 비해 높은  $\beta$ -glucosidase 활성을 보여 당화과정중 발생하는 중간산물인 cellobiose를 glucose로 쉽게 전환할 수 있는 장점을 가진 효소각테일이다. 이를 토대로 하여 고성능의 복합효소를 만들기 위하여 상용화 효소인 Celluclast 1.5 L을 각각 0~25 FPU/g cellulose의 수준으로 첨가하고 KCC1효소를 1.5 FPU의 상태로 첨가하여 주었을 때 당화율은 어떻게 변화하는지 확인하였다. 사용된 기질은 2% NaOH 전처리된 해조류 유래의 cellulose를 사용하였다. 당화조건으로는 볼륨 50 ml, 10% (w/w), 50 mM sodium citrate buffer (pH4.8), 50°C, 200 rpm의 조건으로 실험을 진행하였으며 총 48시간의 당화시간동안 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC로 glucose를 정량하였으며 이를 기질이 가진 총 cellulose를 토대로 glucose로의 전환율로 환산하였다.

실험결과 KCC1를 혼합한 실험군이 Celluclast 1.5 L을 단독적으로 사용한 실험군 (그림 3-68-B)에 비해서 당화율이 급격하게 상승하는 것을 확인 할수 있었다 (그림 3-75-A). 5 FPU/g cellulose의 실험군의 경우 KCC1를 넣지 않은 실험군의 당화율이 48시간에 37% 였고 KCC를 혼합하였을 때 80% 전환율을 보여 2배 이상의 전환율을 보였다. 이는 더 많은 효소를 첨가해주었을 때도 같은 효과를 보여 KCC1의 첨가에 의한 셀룰라제의 전체활성이 증가되었고 이를 통해 glucose의 생성이 많았던 것으로 사료된다. 고가인 상용화 효소의 사용량을 줄이고 본 연구를 통해 재조합 생산 가능한 KCC1를 낮은 농도로 넣어줌으로써 고효율의 효소당화시스템을 구축할 수 있었다.

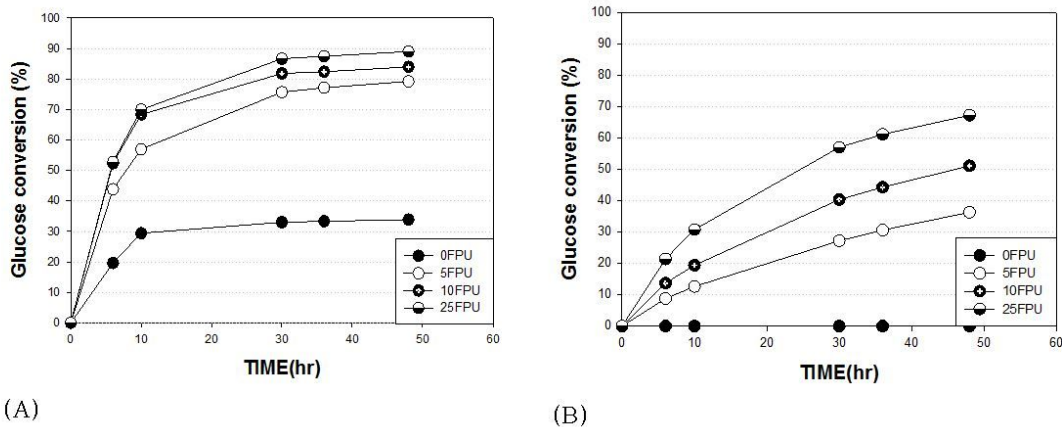


그림 3-75. Celluclast 1.5L과 KCC의 혼합 후 바이오매스의 당화

(A) Celluclast 1.5L 0~25 FPU/g cellulose + Kribb Cellulase Cocktail 1.5 FPU

(B) Celluclast 1.5L 0~25 FPU/g cellulose

재조합 단백질만으로 구성된 셀룰라제 각테일의 활성을 상용화된 셀룰라제의 활성과 비교하기 위하여 유가식 발효배양으로 대량생산한 셀룰라제를 발효농축 후 cocktail 제조를 위해 CBH1, CBH2, endo-cellulase,  $\beta$ -glucosidase의 비율을 3.5 : 3.5 : 2 : 1로 고정하여 섞어서 이

용하였고, 사용한 endo-cellulase는 *Tricoderma reesei* 유래의 EGL2를 TFP 기술로 분비활성 개량한 효소이며  $\beta$ -glucosidase는 *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의 BGL을 TFP 기술로 개량한 효소를 사용하였다. 제조한 셀룰라제 cocktail series는 cellulose 기질을 탄소원으로 사용하여 각 기질의 분해능을 비교하였다. 활성 개량에 사용한 모든 셀룰라제 cocktail은 또한 효소 정제에 따르는 비용을 최소화하기 위하여 활성에 사용한 효소들은 발효 배양을 통해 생산된 4종의 섬유소 분해효소를 발효배지로부터 회수하여 desalting 및 10배 농축한 후 각각의 효소를 정제 과정 없이 바로 cocktail 조성에 첨가하여 사용하였다.

Insoluble cellulose로 구성된 Avicel과 filter paper를 기질로 사용한 활성 측정 방법으로 각 cocktail의 활성을 비교하였는데, filter paper 활성측정 방법은 시간 당 기질 (filter paper)을 4% 당화하는 데 필요한 효소 활성을 FPU로 표 3-12에 나타내었다 (표 3-12). 아래의 표 3-13은 cellulose를 분해하는 4가지 주요 효소들로 cocktail을 제조하여 filter paper를 분해하는 활성을 단백질 g당 FPU로 나타낸 결과와 전처리한 EFB (empty fruit bunch)를 기질로 cocktail의 상대적인 활성을 비교한 것이다.

HgCBH1과 C1CBH2 (KCC2) 또는 CtCBH1과 C1CBH2 (KCC3)를 첨가했을 때 기존 버전의 KCC1 (*Polyporus arcularius* 유래의 CBH1과 CBH2)보다 활성이 개선되었음을 확인하였다. Filter paper 활성은 KCC1 대비 KCC3이 8.8배, KCC2 대비 KCC3이 2.65배 개선되었고, Novozyme사의 Celluclast에 0.5% Novozyme 188 (BGL) 첨가한 경우에 비해 여전히 활성이 낮았지만 KCC1과 비교하면 상당히 개선된 활성을 보였다. 그러나 특이하게 전처리한 바이오매스인 EFB에 대한 활성은 KCC3이 KCC1보다는 약 2.2배 개선되었고 KCC2 보다는 약 1.5배 개선되었지만 Celluclast에 대해서는 오히려 약 2.7배 활성이 높게 나와 바이오매스의 경우에는 종류에 따라 효소 활성이 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 따라서 바이오매스에 따른 최적 효소 콕테일의 제조를 통해 효소 비용을 절감할 수 있을 것으로 예상되었다.

표 3-12. 재조합 효소 cocktail을 이용한 filter paper 활성 비교

Total Cellulase	Protein (mg/ml)	U/ml	FPU/g
KCC1	22.72	0.30	13.06
KCC2 (HgCBH1+C1CBH2)	21.90	0.95	43.27
KCC3 (CtCBH1+C1CBH2)	23.01	2.64	114.83
Celluclast +Novozyme 188 (0/5%)	124.36	37.37	300.54

표 3-13. 재조합 효소 cocktail을 이용한 EFB 활성 비교

Total Cellulase	Protein (mg/ml)	Glucose (mM)
KCC1	24.6	318.9
KCC2 (HgCBH1+ ClCBH2)	24.3	467.9
KCC3 (CtCBH1+ ClCBH2)	22.9	708.7
Celluclast + Novozyme 188 (0/5%)	123.4	262.2

다. 볏짚 및 억새를 이용한 바이오에탄올 전처리/당화/발효/증류 생산

전처리된 볏짚과 억새를 이용하여 에탄올 발효 및 에탄올 증류 연구를 수행하였다. 볏짚과 억새의 전처리는 바이오매스 고액비 (1:10)으로 2% NaOH로 120℃에서 1시간 동안 처리 하였고 HCl로 중화적정 한 후 건조 및 분쇄하여 사용하였으며, 에탄올 발효조건은 10%의 바이오매스에 에탄올 배양배지 (Y.E 0.5%, pepton 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ammonia sulfate 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.04%, pH5.0)를 혼합하여 발효 배지를 만들었다. 효소 당화는 본 연구에서 생산된 효소와 Novozyme의 효소를 단독 또는 섞어서 사용하는 방법을 이용하였다. Novozyme C-tec과 H-tec의 비율을 7 : 3으로 혼합하여 30 FPU/g cellulose 가 되도록 넣어준 후 50℃, 200 rpm으로 6~12시간 동안 초기 당화를 진행하여 glucose를 생산한 후 10%의 바이오매스와 셀룰레이즈를 더 첨가하여 총 20%의 바이오매스를 24시간 동안 당화하였다. 여기에 YPD 배지에서 seed culture 된 균주를 비율에 맞게 혼합하여 본 배양에 접종하였다. 발효 균주로는 gal80/CYH균주를 사용하여 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC로 glucose, xylose, Ethanol의 생성과 소모를 확인하여 그래프로 나타내었다. 그 결과로 최종 에탄올 농도는 볏짚으로 발효한 경우 64 g/L가 생산되었고, 억새를 발효한 경우에는 56 g/L가 생산되었다 (그림 3-76). 발효 후 생산된 바이오에탄올은 그림 3-77에서 보는 바와 같은 증류기를 이용하여 증류하여 볏짚으로 생산된 94%의 에탄올 350 ml과 억새로부터 생산된 95%의 에탄올 250 ml을 얻을 수 있었다.

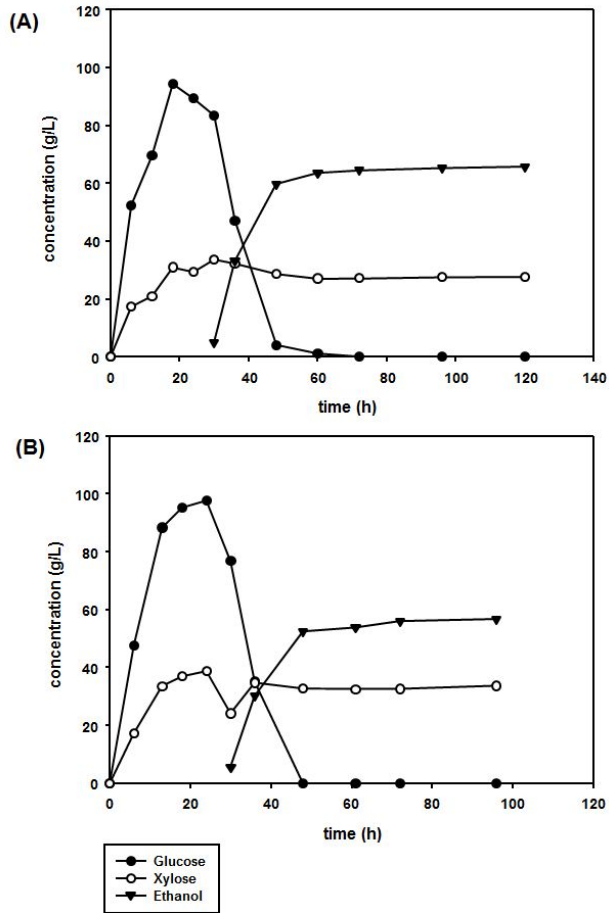


그림 3-76. 바이오매스를 이용한 에탄올 발효  
 (A) 볏짚을 이용한 에탄올 발효. (B) 억새를 이용한 에탄올 발효

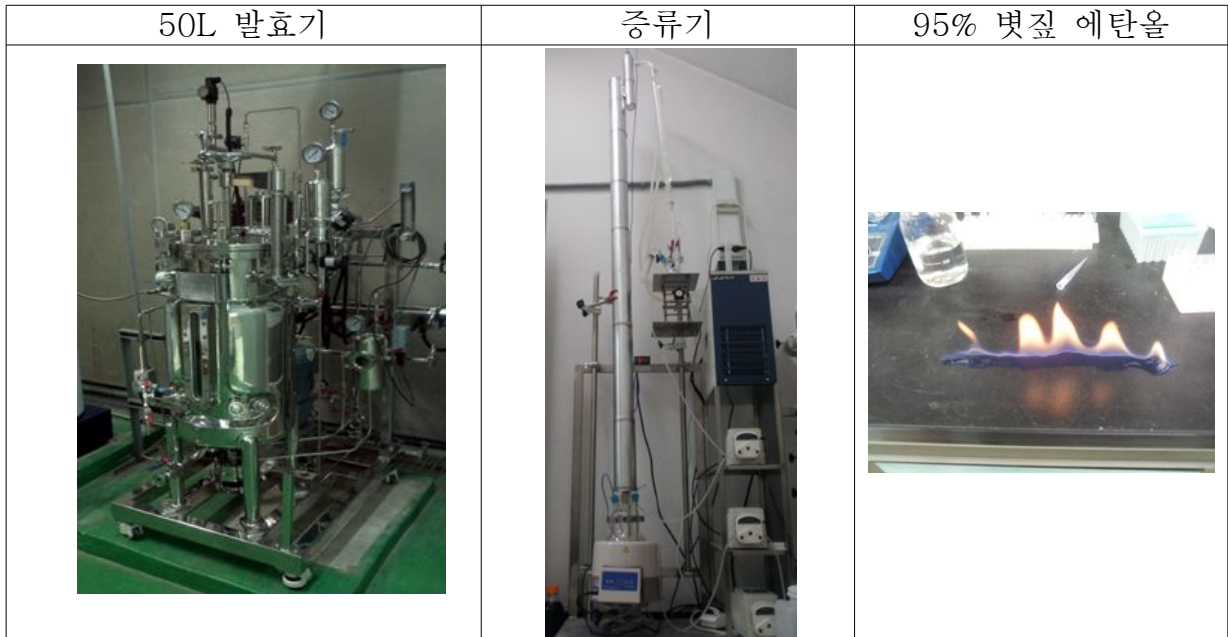


그림 3-77. 볏짚 바이오에탄올 생산 프로세스

## 9. 셀룰라제 발현 형질전환체의 효소 생산능 비교

셀룰라제 유전자가 도입된 벼 형질전환체 (T0)를 활용하여 고상발효에 의해 셀룰라제를 생산하는 것이 가능하다. 형질전환 벼의 볏짚을 이용하여 고상발효를 통해 셀룰라제 생산성을 조사하였다. 발효 균주로는 *A. oryzae* (AO)를 사용하였으며, 건조된 볏짚 0.5 g을 넣고 함수율은 50%가 되도록 맞추었다. 3일 동안 공동 배양 후 3종의 셀룰라제 활성을 측정하였다. Total 셀룰라제 활성을 측정하기 위해 filter paper assay를 실시하였고, 셀룰라제 타입 중 endoglucanase의 활성을 측정하는 방법인 CMCcase assay 실시, cellbiose를 기질로 사용하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정하였다.

### 가. 단일 셀룰라제 유전자 도입 형질전환 벼의 효소 활성

#### (1) FPase assay

FPase 활성 측정을 통해 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 효소생산 및 활성을 확인하였다. 총 8종의 형질전환체를 확인한 결과 Wild type에 비해 낮은 수준의 활성이 나타났다. 형질전환체들 중에는 cel2 ER (opt)와 cel4 ER (opt) 형질전환체가 비교적 높은 효소 활성을 나타내었다 (그림 3-78).

#### (2) $\beta$ -glucosidase assay

Wild type에 비해  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 형질전환체는 cel2AP (opt), cel4AP (opt), cel4 ER (opt)등으로 나타났다.  $\beta$ -glucosidase 유전자를 도입한 형질전환체에서 활성이 높게 나타날 것으로 예상하였으나 control에 비해서 낮은 효소 활성을 나타내었다 (그림 3-78).

#### (3) CMCcase assay

CMCase assay를 시도한 결과 cel2AP (opt), cel4 ER (opt),  $\beta$ -glu AP 유전자가 도입된 형질전환체에서 효소 활성이 높게 나타났다.  $\beta$ -glu AP의 경우 2배 이상의 효소활성이 나타났다 (그림 3-78).

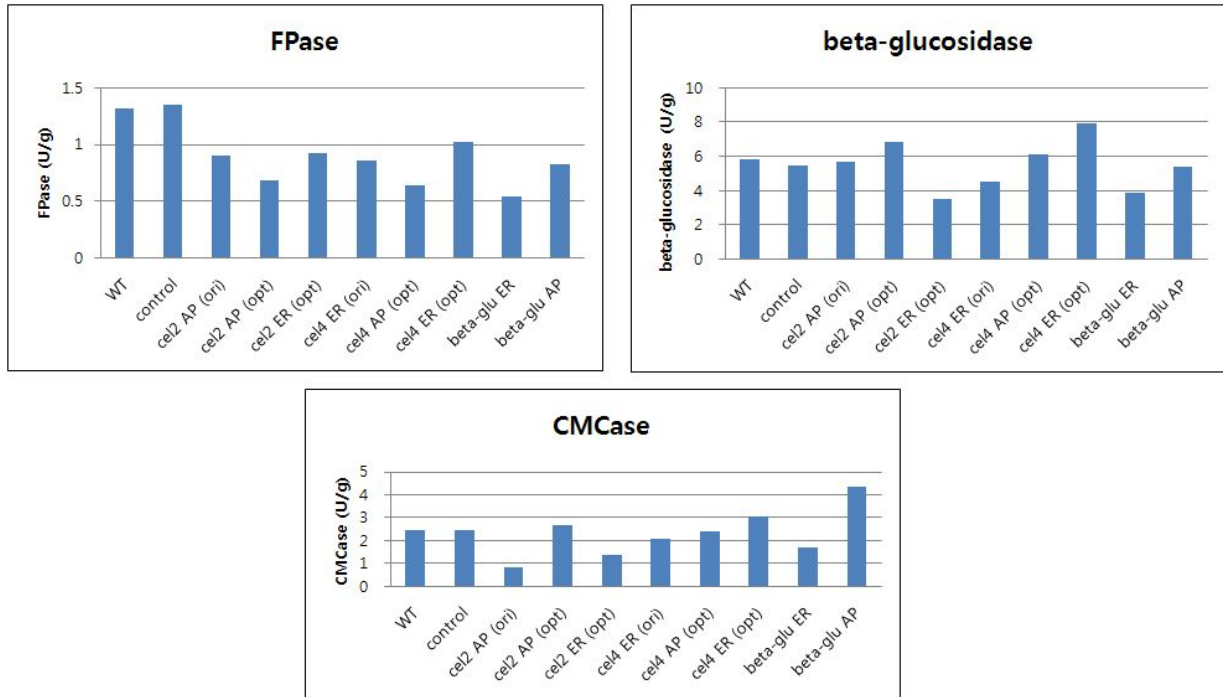


그림 3-78. 단일 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 효소활성

단일 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 효소 생산 및 활성을 조사한 결과 Wild type 나 형질전환 control에 비해 효소 활성에 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 생산된 효소는 실험 과정에서 고압멸균을 시도하여 모두 활성을 잃은 것 때문으로 생각되어진다. 생산된 효소의 영향을 확인 할 수는 없었으나 endoglucanase 함량이 높은 것으로 보아 세포벽이 구조적으로 느슨하게 변한 것은 추측할 수 있다.

단백질 발현 기관 및 셀룰라제 종류에 따른 효소 활성에 대한 비교는 지속적인 연구를 통해서 상관관계를 파악 할 예정이다.

#### 나. 복합 셀룰라제 유전자 도입 형질전환 벼의 효소 활성

##### (1) FPase assay

벵짚에 포함된 total 셀룰라제를 조사한 결과 control에 비해서 매우 낮은 경향을 나타냈다 (그림 3-79). 단일 셀룰라제 유전자 도입 식물과 복합 셀룰라제 유전자 도입 식물의 차이가 크지 않게 나타났다. 이러한 결과가 도출된 이유는 시료의 상태 때문인 것으로 생각되어진다. 식물이 정상적으로 단백질을 생산할 수 있을 정도로 왕성하게 생육을 하여야 하는데 복합 셀룰라제 도입 식물은 매우 느린 성장과 생육 중 고사되어 버리는 현상이 나타는 것을 들 수 있다.

##### (2) $\beta$ -glucosidase assay

$\beta$ -glucosidase의 활성은 control에 비해서 높은 경향을 나타냈다 (그림 3-79). 그러나 차이가 매우 근소하여 셀룰라제 유전자 발현 때문이라고 확신 할 수 없다.



### (3) CMCase assay

형질전환 벼의 total 셀룰라제 효소의 활성을 조사한 FPase에 비해서 CMCase는 매우 높은 활성을 나타내었다 (그림 3-79). endoglucanase 유전자가 도입된 식물체를 분석한 결과이기 때문으로 생각되어진다. 또한 복합 셀룰라제 유전자가 도입된 cel4AP (opt):: $\beta$ -gluAP 식물체의 경우에는 Wild type에 비해 2배 이상의 활성이 나타남을 확인하였다.

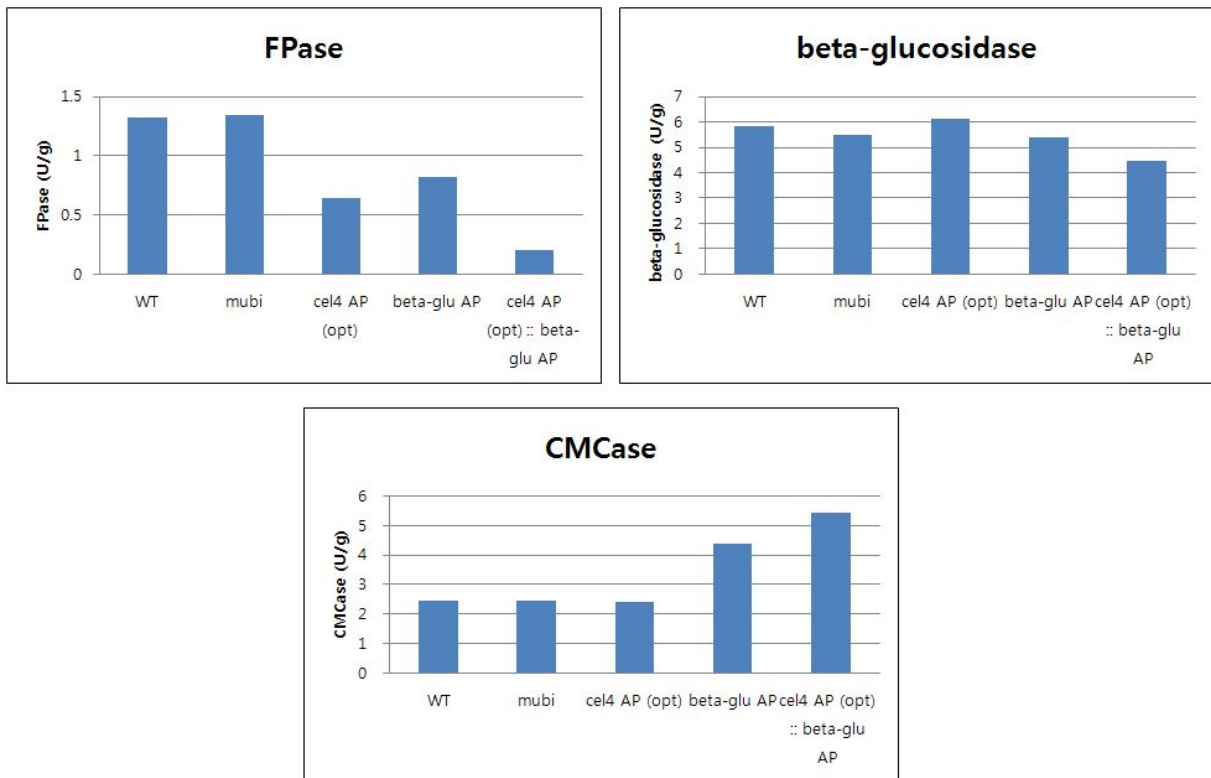


그림 3-79. 복합셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 효소활성

복합 셀룰라제가 도입된 형질전환체의 경우 Total 셀룰라제의 활성은 낮게 나타난 반면  $\beta$ -glucosidase, endoglucanase의 활성은 높게 나타남을 확인하였다. 효소 활성이 복합 셀룰라제 발현 형질전환체에서 높게 나타나는 것으로 보아  $\beta$ -glucosidase와 endoglucanase를 동시에 형질전환 한 경우 세포벽이 쉽게 분해될 수 있도록 변성되었을 것이라 추측된다. 추후 계속된 연구를 통해서 다수의 셀룰라제 도입 형질전환체의 효소 생산 및 활성을 확인할 수 있는 재실험을 해 볼 가치가 있다.

다. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 셀룰라제 유전자 도입 형질전환 벼의 효소 활성

#### (1) FPase assay

Total 셀룰라제 효소 활성은 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 유전자가 도입된 형질전환벼가 항시발현 프로모터가 도입된 벼 보다 높게 나타났다 (그림 3-80). 건조 스트레스 유

도성 프로모터에 의해 조절되는 복수의 유전자가 도입된 형질전환체의 경우 항시발현 프로모터 도입 식물체에 비해 최대 8배 이상 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 이와같은 결과는 식물 성장실의 조건이 바람이 많이 불어 잎을 건조시켜 건조 스트레스 유도성 프로모터가 발현했기 때문인 것으로 예상된다.

(2)  $\beta$ -glucosidase assay

$\beta$ -glucosidase 활성은 control에 비해 큰 차이를 나타내지 않았으며, 단일/복합 유전자 도입 및 항시발현/건조스트레스 유도성 프로모터 발현 등에 영향을 받지 않은 것으로 나타났다 (그림 3-80).

(3) CMCase assay

endoglucanase 활성을 측정한 결과 control에 비해서 매우 높은 활성이 나타났다 (그림 3-80). 복합 셀룰라제 유전자가 도입되거나 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 단일 셀룰라제 유전자 도입 식물체에서의 CMCase 활성이 control에 비해 2배 이상 높게 나타났다.

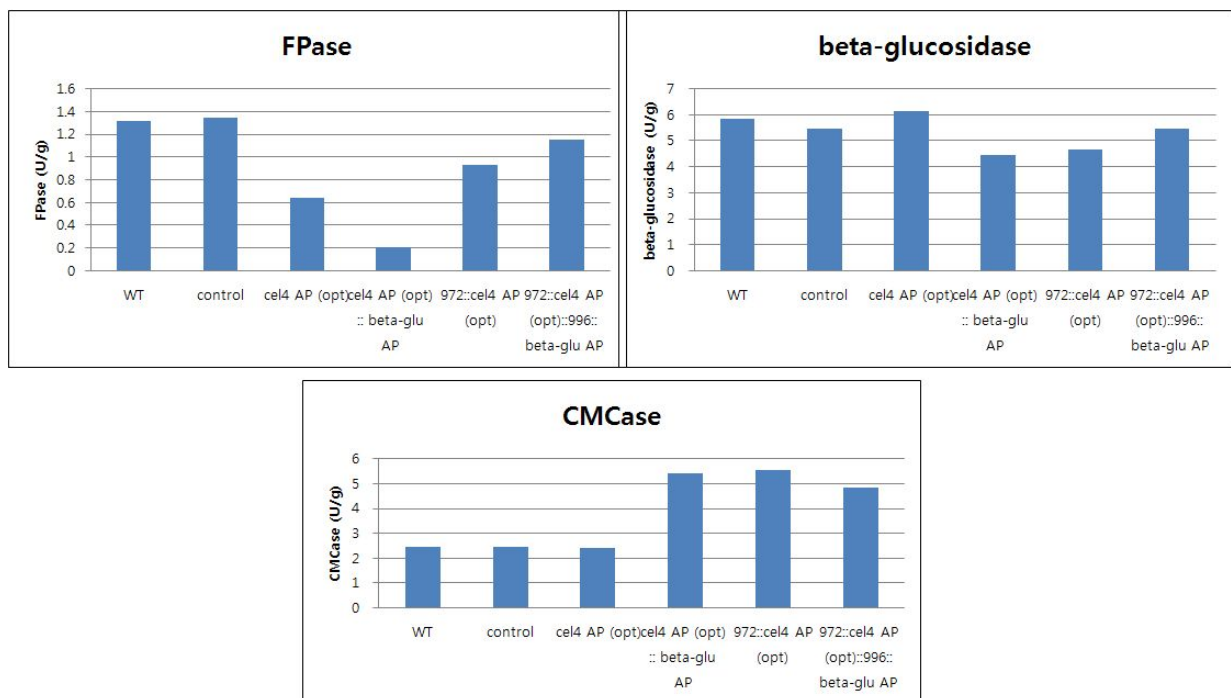


그림 3-80. 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 조절되는 셀룰라제 유전자 도입 형질전환체의 효소활성

형질전환체를 이용하여 고상발효를 수행한 결과 CMCase 활성이 Wild type에 비해 높게 나타남을 확인 할 수 있었다. 이와같은 결과는 endoglucanase 유전자가 도입된 형질전환체 잎

의 조직이 치밀하지 못하여 곰팡이에 잘 분해되었기 때문인 것으로 생각되어진다. 셀룰라제가 발현되어 효소 활성이 높아졌거나 또는 벚짚의 물리적, 구조적 성질이 변하여 효소의 활성이 높았던 것은 확실한 결과이다. 이러한 결과로 미루어 보아 셀룰라제 유전자가 도입된 식물체를 이용하여 바이오에탄올을 생산 할 경우 효소 첨가량을 줄일 수 있는 장점이 있다. 이번 연구는 형질전환 당대인 T0 식물체의 잎을 사용하여 시도한 결과로 정확한 결과를 얻기 위해서는 형질이 고정된 후세대의 식물체, 여러 line의 식물체를 비교 분석하는 연구가 필요하다.

#### 10. 동시당화 및 생물통합 공정 개발

농업폐기물은 고갈되어 가고 있는 석유에너지의 대체 원료로서 그 연구의 필요성이 급부상되고 있다. 이를 농업폐기물을 당화, 발효하여 바이오에탄올을 생산할 수 있어 차세대 수송용 연료로 사용이 가능하다. 하지만 현재의 바이오 에탄올 생산 단가는 많은 비용을 초래하고 있는 실정이며 생산 단가를 낮추기 위한 방안을 모색하고 있는 중이다. 생산 단가를 낮출 수 있는 방안으로는 농업부산물의 당화를 진행함에 있어 사용되어지는 셀룰라제의 사용량을 줄이는 방안도 하나의 대안이다. 이 연구에서는 효소의 사용량을 줄이기 위하여 셀룰라제를 발현하는 재조합 효모를 에탄올 발효에 사용함으로써 효소의 사용량을 줄이고 당화의 효율을 증가하고자 하는데 목적이 있다.

##### 가. 재조합 BGL 균주와 cellobiose를 이용한 바이오에탄올 발효

본 연구에서 개발된  $\beta$ -glucosidase를 분비생산하는 재조합 효모가 cellobiose를 기질로는 빠른 성장이 가능하므로 cellobiose를 이용한 에탄올 발효연구를 수행하였다. 에탄올 발효는 Y-SfBGL1 단일 균주를 사용하여 5 L jar fermentor에서 수행하였다. 그림 3-81에서 보는 바와 같이 glucose를 이용한 에탄올 발효에서는 20시간 동안 매우 빠른 속도로 에탄올을 이룬치 (51 g/100 g glucose)에 가까운 수준으로 에탄올을 생산하였으며 cellobiose에서는 glucose보다는 소모속도가 느렸지만 40시간이내에 동일한 수준으로 에탄올을 생산할 수 있었다. 본 결과는  $\beta$ -glucosidase 재조합 발현 효모 *S. cerevisiae*를 이용한 에탄올 발효에 관하여 현재까지 보고된 타 결과와 비교할 때 가장 고농도의 cellobiose (10%)를 사용하여 가장 빠른 속도로 에탄올 발효가 가능함을 확인할 수 있었다.

##### 나. 재조합 BGL 균주의 바이오매스별 동시당화발효 효과

2% NaOH에서 전처리된 벚짚을 사용하여 동시당화발효를 진행하였다. 동시당화발효의 조건으로는 5g의 바이오매스에 에탄올배양배지 (Y.E 0.5%, pepton 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Ammonia sulfate 0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.04%, pH5.0)를 45 ml을 혼합하여 10% (w/v)의 동시당화발효 배지를 만들었다. 여기 cellulcalst 1.5 L을 5 FPU/g cellulose가 되도록 넣어준 후 50°C, 200 rpm으로 10시간 동안 초기 당화를 진행하여 glucose를 생산하였다. 10시간 초기당화 후 미리 YPD 배지에서 seed culture된 Y2805 $\Delta$ gal80/ST19-sfBGL1-10 균주와 BGL1 유전자를 포함하지 않는 대조구 발효 균주인 Y2805 $\Delta$ gal80/YGaSW균주를 같은 cell양이 되도록 본 배양에 접종하였

다. 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC로 cellobiose, glucose, xylose, Ethanol의 생성과 소모를 확인하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 BGL발현 균주로 동시당화발효를 진행하였을 때 대조군에 비해서 cellobiose의 양이 더 급격하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며 그로 인해 생성된 glucose가 에탄올로 전환되어 에탄올의 생산량이 32% 증가한 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-82).

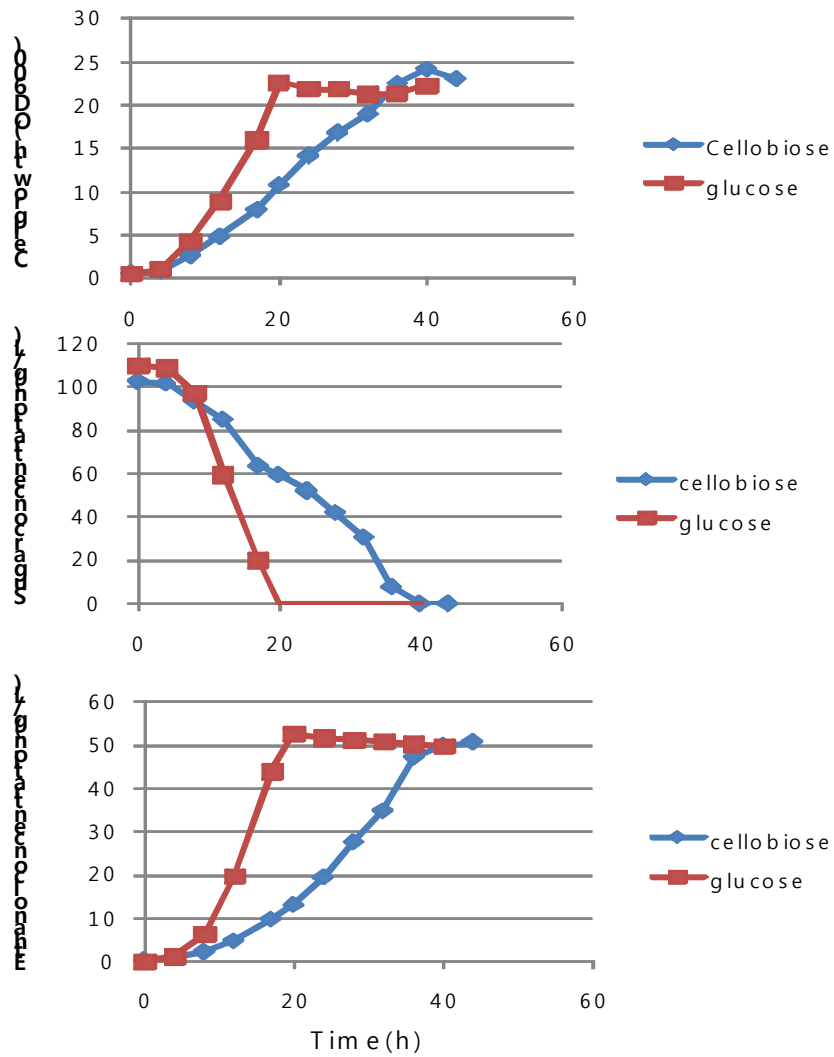


그림 3-81. BGL-yeast를 이용한 cellobiose CBP 에탄올 발효

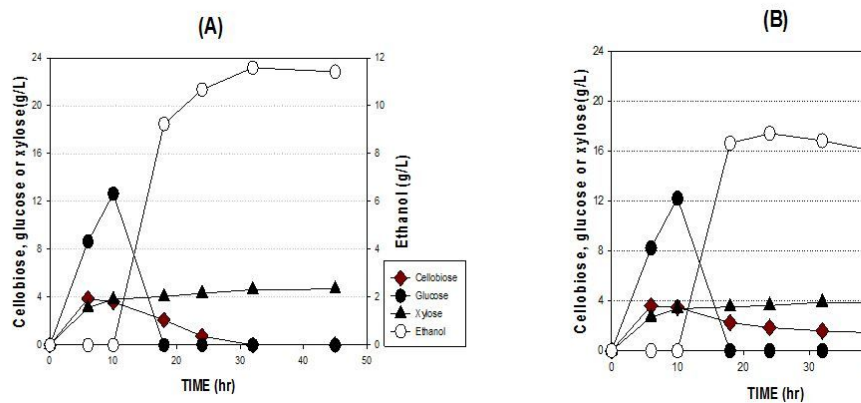


그림 3-82. 전처리 볏짚을 이용한 동시당화발효

(A) *Y2805Δgal80/ST19-sfBGL1-10*를 이용한 에탄올발효

(B) *Y2805Δgal80/YGaSW*를 이용한 에탄올발효

전처리된 억새 바이오매스를 이용하여 동일한 방법으로 동시당화발효를 수행하였으며 분석 결과를 그래프로 나타내었다. 이 경우에도 재조합 BGL균주에 의해 에탄올 생산성이 35% 증가하는 것을 확인하였다 (그림 3-83).

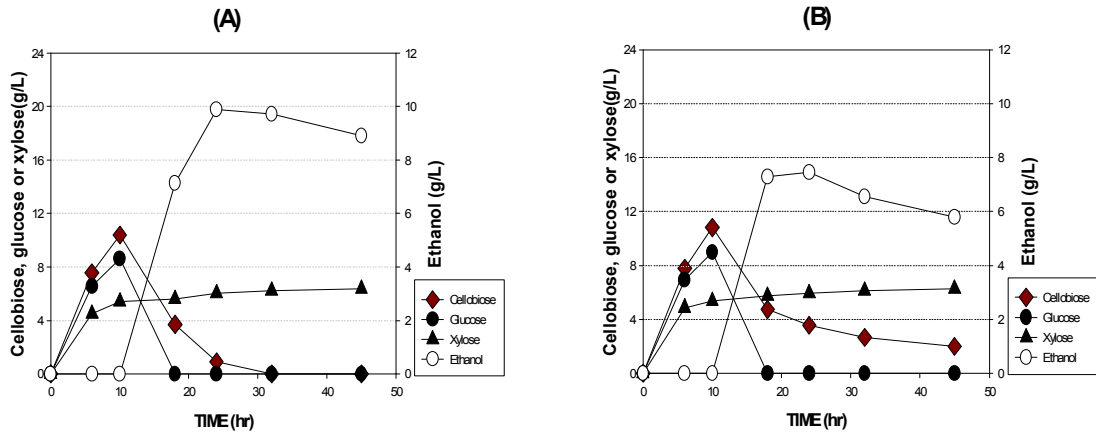


그림 3-83. 전처리 억새를 이용한 동시당화 발효  
 (A) *Y2805Δgal80/ST19-sfBGL1-10*를 이용한 에탄올발효  
 (B) *Y2805Δgal80/YGaSW*를 이용한 에탄올발효

전처리된 갈대 바이오매스를 이용하여 동일한 방법으로 동시당화발효를 수행하였으며 분석 결과를 그래프로 나타내었다. 이 경우에도 재조합 BGL균주에 의해 에탄올 생산성이 34% 증가하는 것을 확인하였다 (그림 3-84).

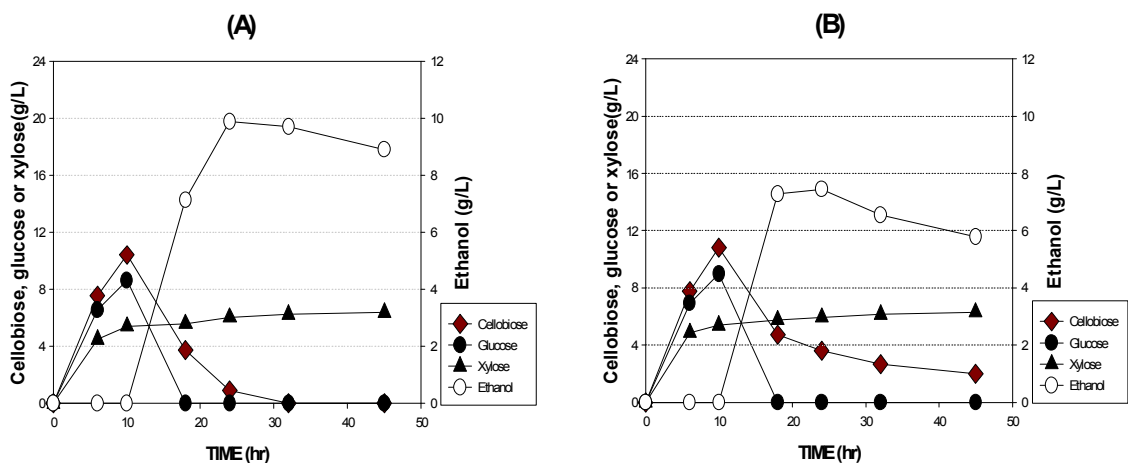


그림 3-84. 전처리 갈대를 이용한 동시당화발효  
 (A) *Y2805Δgal80/ST19-sfBGL1-10*를 이용한 에탄올발효  
 (B) *Y2805Δgal80/YGaSW*를 이용한 에탄올발효

각 바이오매스를 이용한 결과에서 확인된 바와 같이 동시당화 발효할 때 본 연구에서 제작된 균주인 BGL효모를 이용하면 자체적으로 발현된  $\beta$ -glucosidase에 의하여 cellobiose의 glucose로의 전환이 더 용이하게 일어나며 에탄올 수율이 30% 이상 향상되는 것을 확인하였다.

다. 복합균주를 이용한 동시당화 및 생물통합 공정

(1) 탄소원에 따른 재조합 복합 균주의 배양

재조합 셀룰라제 분비생산 효모 균주 복합체 (KRIBB Yeast Cocktail, KYC)는 효소 칵테일인 KCC를 구성하는 효소를 생산하는 균주 복합체를 의미하며 따라서 KCC와 KYC는 동일한 셀룰라제 효소조성을 포함한다. KYC-1과 KYC-2를 이용하여 바이오매스로부터 직접 바이오에탄올을 생산할 수 있는 복합균주 개발을 위하여 배지에 소량의 1% glucose와 1% Avicel 또는 CMC (carboxymethyl 셀룰로즈)를 공급하여 24시간 동안 배양하였다. 분비 생산된 셀룰라제가 Avicel과 CMC를 분해할 수 있도록 37°C에서 3시간 동안 효소 당화를 진행하였고 효소당화 후 재조합 셀룰라제를 새로 접종 하였으며 Y2805 $\Delta$ gal80/CYH 대조구 균주와 함께 96시간 까지 세포 성장을 비교하였다 (그림 3-85). Glucose를 단일 탄소원으로 공급한 경우에 두 균주의 성장은 차이가 없었으나 glucose의 농도를 낮추고 CMC와 Avicel을 탄소원으로 공급한 배지에서 KYC-1과 KYC-2가 미미하지만 대조구에 비해 성장이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구에서 개발된 KYC-1과 KYC-2의 cell growth 차이는 없었다.

배양 중 복합균주에서 분비되는 셀룰라제의 발현여부를 확인하기 위해 배양상등액을 acetone down 후 SDS-PAGE 분석한 결과 KYC-1과 KYC-2에서는 4종의 셀룰라제들이 배지중으로 충분히 분비생산되고 있음을 알 수 있었다 (그림 3-86). 그러나 37°C 당화만으로는 충분한 탄소원을 확보할 없었고 효소 당화 온도 조건을 적절히 조절함으로써 세포 성장의 차이를 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

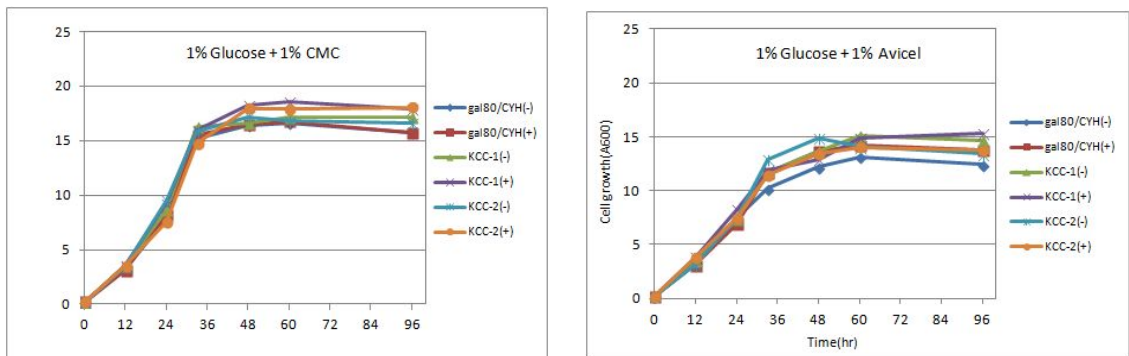


그림 3-85. 탄소원에 따른 재조합 복합균주의 성장여부 확인

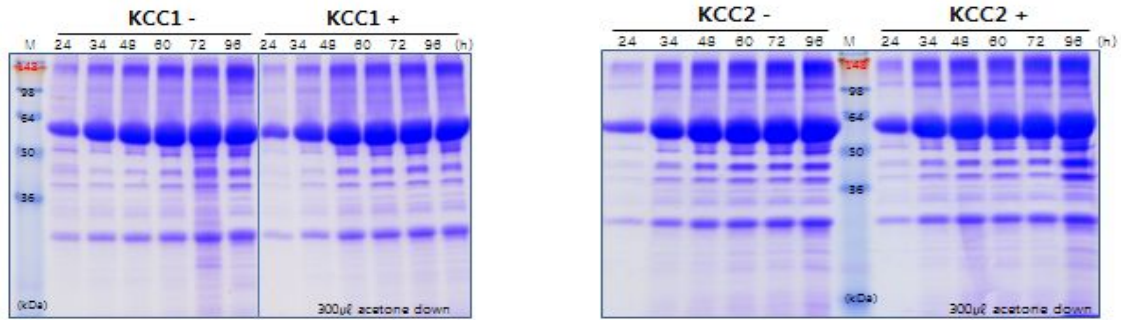


그림 3-86. 복합균주의 배양 후 분비 단백질 비교

### (2) 온도에 따른 복합균주의 cellulose 분해능 비교

4가지 효소를 분비생산하는 복합균주 KYC-1과 KYC-2를 온도에 따른 효소당화효율을 비교해 보고자 하였다. 4가지 복합 균주를 pre culture 후 avicel이 포함된 50ml flask에 각각의 균주를 Exo:Endo:SfBGL=7:2:1 비율로 접종하여 24시간 동안 배양을 통해 셀룰라제가 충분히 분비 생산되도록 하였다. 분비 생산된 복합 효소는 37°C, 50°C에서 144시간 반응하여 HPLC 분석을 통해 생성된 glucose를 확인하였다. 그 결과 37°C에서 효소반응을 한 경우 glucose가 전혀 생성되지 않았고 50°C에서도 당화 효율이 매우 낮았지만 KYC-2의 경우 144시간 당화를 통해 0.54 g/L의 glucose가 생성됨을 확인하였다. 결과적으로 셀룰라제 효소는 충분히 분비되지만 효소에 의한 cellulose가 원활히 분해되지 못하여 세포성장 지연등이 문제가 된 것으로 판단된다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 *Kluyveromyces marxianus*나 *Hansenula polymorpha*와 같은 고온성 효모의 이용이 요구되며 고온 발효를 통해 최적 효소반응 유도가 필요한 것으로 사료된다.

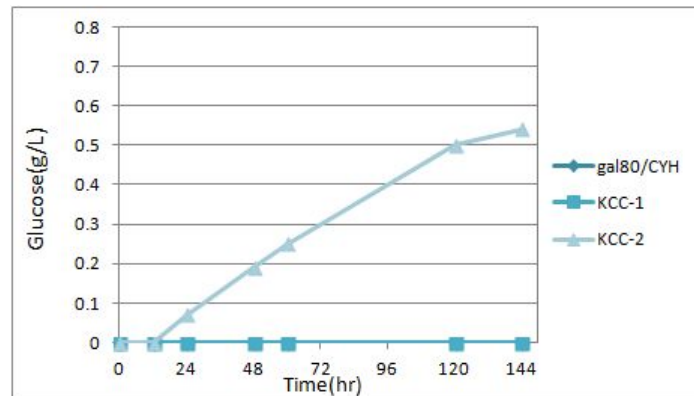


그림 3-87. 복합효소 온도에 따른 효소당화 비교

### (3) 재조합 균주의 동시당화 발효

본 연구에서 개발된 셀룰라제 분비생산 효모를 이용하여 기존에 사용하는 상용 셀룰라제 사용량을 줄이고 동일한 효율의 에탄올 생산을 기대하여 에탄올 발효 연구를 수행하였다. 에탄올 발효는 Y2805Δgal80에 ST19-BGL, ST19-EGL2, ST13-HgCBH1, ST13-CICBH2의 4가지



균주를 1:1:4:4 비율로 혼합해 사용하였다. 1:10 고액비의 바이오매스는 2% NaOH로 120℃에서 시간 전처리 된 볏짚을 사용하였다. 에탄올 발효 조건으로는 10 g의 바이오매스에 에탄올 배양배지 (yeast extract 0.5%, pepton 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ammonia sulfate 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.04%, pH5.0)를 60 ml을 혼합하여 발효 배지를 만들었다. 여기에 Novozyme사의 상용 셀룰라제 (C-Tec : H-Tec = 7 : 3)를 각각 2, 5, 10 FPU/g 글루칸이 되도록 넣어준 후 50℃, 150 rpm으로 6시간 동안 초기 당화를 진행하여 glucose를 생산하였다. 6시간 당화 후 YPD 배지에서 초기 배양된 균주를 비율에 맞게 혼합하여 본 배양에 접종하였다. 대조구 발효 균주로는 Y2805Δgal80/CYH균주를 사용하여 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC로 glucose, 에탄올의 생성과 소모를 확인하여 그래프로 나타내었다 (그림 3-88). 그 결과로 KYC-2 콕테일 균주로 발효를 진행하였을 때 대조군에 비해서 전반적으로 에탄올 생산이 향상되었지만 효소를 충분히 넣은 경우 (5~10 FPU/g cellulose)에는 큰 차이가 없고 셀룰라제를 최소량 (2 FPU/ g cellulose) 사용한 경우에는 KYC 균주가 대조구 보다 빠르게 볏짚의 동시당화 에탄올 발효가 가능하였다 (그림 3-88 (A)). 최소한의 외부 효소를 사용하여 바이오에탄올 발효가 가능하지만 효소활성 개선을 통한 발효속도 개선이 필요할 것으로 보인다.

결과적으로 본 연구에서 개발된 복합균주를 이용하여 에탄올을 생산할 경우 상용화 효소 사용량을 획기적으로 줄일 수 있으며 추가적인 연구를 통하여 상용화 효소를 사용하지 않는 통합공정의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

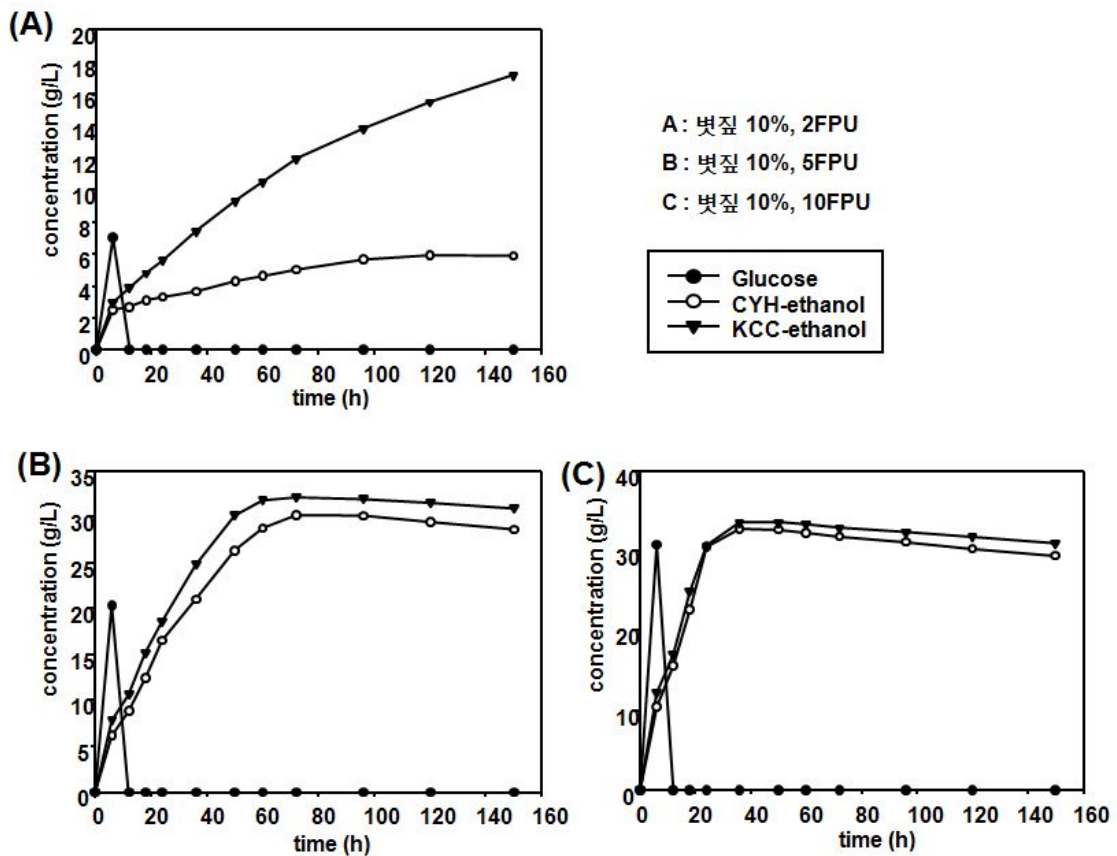


그림 3-88. 볏짚 (10%)을 이용한 바이오에탄올 생산 동시당화 발효

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 바이오에너지용 비식용 및 비사료작물 형질전환 시스템 개발

#### 1. 유전자원 수집 및 섬유질계 에너지 작물 선발

전국의 주요 자생지역을 중심으로 참억새는 8 곳, 물억새는 7 곳, 갈대는 4 곳에서 유전자원 수집을 완료하였고, 기내에서 캘러스 또는 식물체, 그리고 기외의 종자 또는 식물체 상태로 유지·관리하고 있다. 또한, *M. giganteus*는 (주)동부한농으로부터 식물체를 분양받아 기내 캘러스와 기외 식물체 상태로 유지·관리하고 있다. 이와 같이 수집한 우량 유전자원은 섬유질계 에너지 작물 개발을 위한 육종 및 실험 재료로 활용할 수 있다.

#### 2. 억새, 갈대 기내배양 확립 및 형질전환 기초 자료조사 완료

참억새, 물억새와 갈대의 미성숙 화기, 뿌리와 종자를 수집하여 소독 후 기내로 도입한 후, 지속적인 계대배양을 통한 유지 및 관리를 완료하였다. 참억새와 갈대의 미성숙 화기 이용 캘러스 유도과 식물체 재생을 위한 유전형, 기본배지조성, 2,4-D, BA등의 성장조절제의 영향, Myo-inositol 등의 기타 첨가물의 효과 및 광조건에 따른 적정조건 선정을 완료하였다.

참억새와 갈대의 형질전환 callus 선발을 위한 적정 항생제, hygromycin 및 PPT 선발 농도 검정을 완료하였다. 또한, 억새의 미성숙 화기 유래 캘러스를 대상으로 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통한 보고유전자 도입과 발현 확인을 완료하였다.

연구를 통해서 확보된 억새, 갈대의 재분화 방법과 형질전환 기초자료는 비식용 바이오매스 작물 조직배양 및 형질전환 연구에 기초 자료가 될 것이다.

#### 3. Cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환체 개발

Cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환체 개발에 사용할 유도성 프로모터의 효율을 비교하기 위하여 건조스트레스 유도성 rab21, 972, 996프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자를 도입한 형질전환 식물체 개발을 완료하였다. 갈대의 경우 rab21 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자 도입 식물체 40계통을 생산하였으며, PCR과 건조처리 후 GFP 발현 검정으로 유전자의 안정적인 도입과 발현을 확인하였다.

참억새와 갈대의 유도성 프로모터 효율을 비교하기 위하여 건조스트레스 유도성 rab21, 996, 972프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자를 도입한 형질전환과 갈대의 rab21 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자 도입 식물체 44계통의 GFP 발현 분석을 완료하였다. 참억새와 갈대의 형질전환을 통해 유전자 도입 캘러스를 획득한 후 식물체 재생을 진행하고 있으며, 갈대의 GFP 발현 검정을 통해 36계통에서 GFP 발현을 확인하였다.

본 연구를 통해서 개발된 형질전환체는 셀룰라제 유전자 도입 식물체를 생산하기 위한 기초 자료로 이용 될 수 있다.

## 제 2 절 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발 및 실용화

### 1. 벼 유래 프로모터 개발 및 벡터 카세트 개발

총 19종의 유전자 및 프로모터 발굴, 프로모터 및 셀룰라제 도입 벡터 카세트 제작 완료, 총 35개의 식물 형질전환 벡터 제작 완료

본 연구를 통해 개발된 건조스트레스 유도성 프로모터는 벼과 작물 및 타 식물의 형질전환에 적용하여 우수한 형질의 재조합 식물체를 생산할 수 있다. 개발한 프로모터 분석용 벡터 카세트는 유전자 및 프로모터의 특성 분석 시 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 개발된 벡터 카세트를 이용할 경우 유전자 도입에 드는 시간을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 리포터 유전자가 도입되어 있어서 형질전환 성공 여부를 간단하게 확인 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

### 2. 벼 형질전환 방법 확립

캘러스를 이용한 벼 형질전환 방법을 통해서 총 36종류의 형질전환체를 생산하였다. 이렇게 생산된 형질전환 벼는 유전자의 특성 및 프로모터의 발현 분석을 위한 중요한 재료가 될 것이다.

벼 핵형질전환을 통해 프로모터 발현 분석과 셀룰라제 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 생산하기 위해 3가지 방법을 시도하였다. 3가지 방법 모두에서 형질전환 벼를 생산이 가능하였으나 형질전환체 생산 효율이 높은 방법을 확립하였다. 시행착오를 거쳐 정립한 캘러스를 이용한 벼 형질전환 방법은 셀룰라제 이외의 유용한 유전자가 도입된 형질전환벼 개발 또는 캘러스를 이용한 타작물의 형질전환 효율을 높이거나 방법 개선에 응용할 수 있을 것이다.

### 3. 바이오매스 최적 전처리 조건 확립

볏짚, 억새, 갈대에 전처리를 시도하여 구조적으로 변화된 식물 조직을 확보하였다. 물리적 방법과 산, 알칼리를 처리하는 화학적 방법을 시도하여 구조적으로 변화되어 에탄올 생산에 용이한 형태로 변화시켰다. 전처리 전 후의 성분을 분석한 결과 전처리가 바이오에너지 생산에 가장 중요한 요소 중에 하나라는 것이 밝혀졌다. 전처리 후 리그닌의 함량에 따라 발효 효율이 변하게 되며 리그닌을 효율적으로 제거할 수 있는 방법이 계속적으로 연구되고 있다.

이렇게 얻어진 연구결과들은 리그노셀룰로스를 이용한 바이오에탄올 생산에 중요한 기초자료가 될 것이며 벼과 작물 이외의 바이오매스를 활용한 연구에 큰 도움이 될 것이라 생각된다.

## 제 3 절 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

### 1. 셀룰로즈 분해효소 유전자 확보 및 개량 기술 개발

가. 담자균 및 미생물로부터 섬유질 분해 효소 유전자 15종 이상 확보

(Exo type 분해 효소 유전자 5종, endo type 분해 효소 유전자 5종, 헤미셀룰로즈 분해 효

소 유전자 5종 이상 확보)

신규 셀룰레이즈 유전자 뿐 아니라 논문 분석과 data base 검색을 통하여 재조합 발현을 위한 후보 유전자를 선별하였으며 각각의 균주에서 만든 cDNA library로 부터 직접 셀룰레이즈 유전자를 증폭하거나 합성하는 방법으로 exo type 분해 효소 유전자 12 종, endo type 분해 효소 유전자 11종, 헤미셀룰로오스 분해 효소 유전자 5종,  $\beta$ -glucosidase 유전자 5종, 기타효소 2종을 확보하였다. 또한 신규로 분리된 국내 자생 곰팡이 균주로부터 10여종의 셀룰레이즈 유전자를 확보하였고 exo type 분해 효소 유전자 3종에 대한 재조합 생산 및 효소의 생화학적 분석을 수행하였다.

#### 나. 단백질공학기술을 이용한 셀룰라제 개량체 개발

셀룰레이즈 활성을 대량으로 비교분석할 수 있는 선별 조건을 구축하였으며 한 균주에 여러가지 셀룰라제 유전자를 발현하는 균주를 제작하여 셀룰로오스를 함유한 배지에서 각 효소의 활성에 따라 선별적 성장을 확인할 수 있는 방법을 구축하였다. 구축된 방법을 이용하여 활성이 약 40% 증가된  $\beta$ -glucosidase를 확보하였다. 이러한 방법으로 구축된 BGL 균주는 Cellobiose로부터 외부 효소의 도움 없이 바이오에탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다. 재조합 셀룰레이즈의 활성과 당쇄부가와의 관계를 규명하기 위하여 당쇄첨가 부위에 변이를 도입한 여러 가지 변이체를 제작하여 분석한 결과 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 hyperglycosylation은 셀룰레이즈 효소 활성에는 큰 영향이 없음을 확인하였다. 재조합 셀룰레이즈의 분비생산성을 높이기 위하여 효모 TFP 기술을 이용하여 단백질 융합을 통한 고분비생산 기술을 개발하였다.

## 2. 셀룰로오스 분해효소 재조합 생산 및 셀룰로오스 고효율 분해기법 개발

### 가. 에탄올 발효 미생물을 활용한 섬유질분해 효소 재조합 대량생산

에탄올 발효 진핵 미생물인 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 확보된 다수의 셀룰레이즈 유전자를 도입하여 효소를 고분비하는 균주를 초고속으로 선별하는 기술을 개발하였다. 효모를 이용하여 셀룰라제 등의 외래단백질을 분비생산하고자 할 때 기존 제한적인 분비시그널만을 사용하고 있으나 본 연구에서는 단백질 맞춤형 분비생산기술을 활용하여 초고속으로 벡터 시스템을 구축하고 고분비 균주를 선별하여 섬유소 분해효소 단백질을 재조합 생산 시스템을 구축하였다.

### 나. 효소 맞춤형 고효율 분비생산 (grams per liter) 기술 개발

대량의 셀룰라제 유전자를 다양한 효모 vector에 효율적으로 도입 및 적용할 수 있는 high throughput cloning 시스템을 개발하였고 셀룰라제 유전자를 *in vivo* recombination을 통해 세포내로 용이하게 도입하였다. 선별된 셀룰라제 유전자를 다수의 TFP vector에 각각 cloning하여 각 셀룰라제에 대한 고분비 생산균주 (1~5 g/L 수준)를 선별하였다.

### 다. 섬유질 분해효소 생산 최적화 및 scale-up

선별된 생산균주를 5 L 발효조를 이용하여 유가식 발효 배양을 통해 분비생산 발효 적화

연구를 수행하여 배지 및 당 공급 속도 최적화 등을 통해 셀룰레이즈를 최적 생산할 수 있는 기술을 개발하고 최종적으로 활용될 효소의 생산은 50 L 발효를 통해 충분한 효소를 확보하였다.

#### 라. 재조합 효소 cocktail을 이용한 분해 기술 개발

바이오매스 당화에 사용되는 상용화 효소는 곰팡이 유래의 수십가지 셀룰레이즈로 구성된 복합체이지만 효모에서 생산된 재조합 단백질을 이용하여 동일한 조건을 구현하기는 어렵기 때문에 셀룰레이즈를 구성하는 4가지 핵심효소인 exoglucanase (CBH1,2), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)를 이용하여 다수의 Kribb Cellulase Cocktail (KCC)을 제작하였다. 각 효소 콕테일을 다양한 기질 (Filter paper, Avicel, EFB, 볏짚)을 활용하여 효소 활성을 비교하여 바이오매스별 최적의 효소콕테일을 확인하였다. 재조합 효소만으로 바이오매스를 충분히 당화하기에는 부족하였지만 상용화된 효소에 첨가하여 효소의 효율을 높이고 효소비용을 절감할 수 있는 방법을 제시하였다.

#### 마. 전처리된 에너지작물을 활용한 동시당화 및 통합생물공정 가능성 검증

전처리된 볏짚, 억새를 사용하여 재조합 균주를 사용한 에탄올 발효에서 대조균주에 비해 40% 이상 에탄올 발효효율이 증가됨을 확인하였고 통합생물공정 가능성을 제시하였다. 이러한 방법은 효소의 사용량을 대폭 줄여 섬유소 바이오에탄올 생산 비용을 절대적으로 절감할 수 있는 방법이 될 것이다. 그러나 아직 재조합 효소의 활성과 최적당화온도 등의 차이로 인해 효율이 낮은 문제가 있어 추가적인 연구를 통하여 상용화 효소를 사용하지 않는 통합공정의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

### 3. 곰팡이를 이용한 효소 활성 검증

AO 균주를 이용한 고상발효를 시도하여 효소 활성을 조사한 연구를 진행하였다. 고상발효 시 효소 분비량이 높은 균주를 탐색하고 셀룰라제 유전자를 확보하였다. 또한 바이오매스를 용이하게 분해 할 수 있는 균주를 개발하기 위해 돌연변이 및 형질전환을 시도하고 있다. 계속된 연구를 통해서 확보된 효소 고생산 균주 및 효소는 바이오에너지 생산에 효율 및 경제적으로 크게 기여할 것이다.

### 4. 볏짚바이오매스 활용 바이오에탄올 생산공정 경제성 분석

본 연구과제에서 사용한 비식용작물 볏짚, 억새, 갈대 바이오매스 중 볏짚을 기준으로 바이오에탄올 생산공정 간 비용을 산출 분석하였다. 바이오매스 비용은 현재 축산농가에서 유통되고 있는 가격을 기준하였으며, distillation & solid recovery, 전처리 공정 상의 폐수 처리비용은 미국 NREL의 옥수수대 바이오매스 에탄올 산정비율을 적용하였다. 볏짚 12kg을 전처리, 당화발효공정을 거친 후 생산되는 에탄올 1 갤런 (3.78리터) 생산을 기준으로 할 경우 전체 공정 중 가장 비용이 높은 부분이 당화효소로서 전체 공정비용 중 35.4%를 차지하였다. 그 다음으로 높은 투입비용을 차지하는 공정이 전처리와 당화발효기를 운전할 때 사용되는 전기비용으로 각각 18.6%, 9.9%로 총 공정비용의 28.5%를 차지하였다 (그림 4-1).

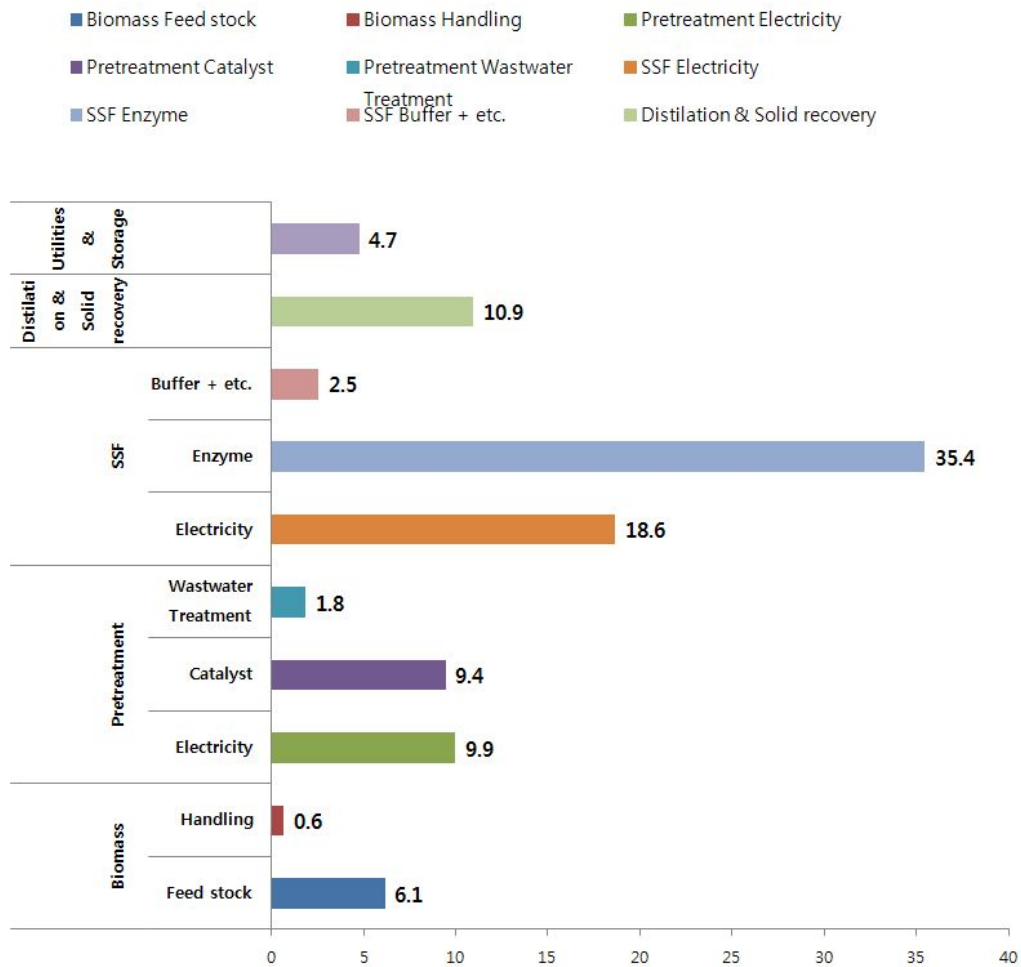


그림 4-1. 바이오에탄올 생산공정별 투입비용

본 연구과제에서는 경제적인 바이오매스 전처리와 당화공정을 개발하고자 하였기에 공정 간 투입비용을 셀룰라제를 자체 발현 생산하는 형질전환 벼를 바이오매스로 사용할 경우 전처리 및 당화공정에 초점을 두어 분석하였다 (표 4-1). 전처리 및 당화 공정별 비교 상세 비용은 아래 표 (표 4-2, 3)와 같다. 형질전환 벼의 당화효율이 대조구 대비 약 2배 이상 높은 것을 감안하여 공정 비용을 산출할 경우 전처리 공정에 소요비용은 전체 공정 비용 중 약 20%, 당화 발효공정은 57.5%를 차지하였다. 만일 대조구 바이오매스의 당화공정에 사용한다면 효소 비용을 2배 이상 증가할 것이다. 결론적으로, 현재 공정기술로 1 리터의 바이오에탄올 생산하는 비용은 약 5,200원으로 미국 NREL 기준의 경제성 가격인 1,200-1,000원/리터에 비해 4-5배 높다. 그러나 효소의 대량구매에 따른 비용절감 (50%), 자체 효소 개발에 의한 최소한 30% 구입효소 대체, 공정 간 사용 전기비용 (100%) 등을 자체 발전에 의한 절감, 공정 개선에 따른 전반적인 효율 증대 개선이 이루어진다면 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산이 전분질/당질계 바이오에탄올 가격 대비하여 충분히 경쟁력이 있을 것으로 판단된다.

표 4-1. 전체 공정별 상세 비용

	Biomass		Pretreatment			SSF (Simultaneous Saccharification & Fermentation)			Distillation & Solid recovery <sup>(9)</sup>	Utilities & Storage <sup>(10)</sup>	Total
	Feed stock <sup>(1)</sup>	Handling <sup>(2)</sup>	Electricity <sup>(3)</sup>	Catalyst <sup>(4)</sup>	Wastewater Treatment <sup>(5)</sup>	Electricity <sup>(6)</sup>	Enzyme <sup>(7)</sup>	Buffer + etc. <sup>(8)</sup>			
Cost (won)	1200	120	1954	1855	360	3683	7000	500	2160	924	19,756
Cost (%)	6.1	0.6	9.9	9.4	1.8	18.6	35.4	2.5	10.9	4.7	100
단계별 Cost (won)	1320		4169			11183			2160	924	19,756
단계별 Cost (%)	6.8		19.8			57.5			10.9	4.7	99.7
NREL (%)	36		26 <sup>(11)</sup>			21 <sup>(12)</sup>			12	5	100

\* Et-OH 6.5% 60L 생산시 공정 (100L Bench scale 공정, 100L 전처리 기기 2회 가동 + 100L 연속당화장치 1회 가동)  
 \* 볏짚 12kg 투입 무수 Ethanol(95%) 3.78L(1gallon) 생산 단가 : 19756원  
 (1) Feed stock = 현 국내 유통가격 500kg/50,000원 볏짚 1kg 당 10  
 (2) Handling = 분쇄비용(Feed stock 10%(인건비 + 기기감가상각비))  
 (3) Pretreatment Electricity ( Pretreatment sheet 참조)  
 (4) Pretreatment Catalyst ( Pretreatment sheet 참조)  
 (5) Wastewater treatment : NREL 자료 인용  
 (6) SSF Electricity (SSF sheet 참조)  
 (7) Enzyme : 본 사용량의 50%를 자체개발 효소로 대체 50% 비용 절감 효과 (14,000원 기준 50% 절감 7,000원) (SSF sheet참조)  
 (8) Buffer + etc : SSF 시 사용 Buffer 및 균주 Seed용 배지 비용  
 (9) Distillation & Solid recovery : NREL 자료 인용  
 (10) Utilities & Storage : NREL 자료 인용  
 (11) (Pretreatment 20% + Boiler/Turbogenerator 4% +Wastewater Treatment 2%)  
 (12) (Hybrid Hydrolysis & Fermentation 8% + Enzyme 9% + Boiler/ Turbogenerator 4%)

표 4-2. 전처리 공정 상세 비용

100L Pretreatment Equipment Electricity Cost						
	용량	단가(won)	사용시간(h)	사용량(kwh)	효율(%)	사용금액(won)
1) Agitator motor	0.75	52.5	2	1.5	100	78.8
2) Scrubber motor	0.2		0.5	0.1	100	5.3
3) Air compressor	6.5		0.5	3.25	100	170.6
4) Silicon heating boiler	20		2	40	80	1680.0
5) Expressive machine	0.75		0.5	0.375	100	19.7
6) Total						1954

Pretreatment Catalyst Cost						
	용량	단가(won)	단위	사용시간(h)	사용량(kwh)	사용금액(won)
1) NaOH		800,000	/ton	1	20	16.0
		800	/kq			
		0.8	/g			
2) Electricity	0.1	52.5	kwh	0.5	0.05	0.2
3) Water	1	1	L	1	1	1.0
4) Total				108L		1855

표 4-3. 당화 발효공정 상세비용

<b>100L SSF Equipment Eletrocity Cost</b>						
	용량	단가(won)	사용시간(h)	사용량(kwh)	효율(%)	사용금액(won)
1) Mix-paddle motor	1.5	52.5	48	72	30	1134.0
2) Homomixer motor	2.2		8	17.6	60	554.4
3) Electronic stim boiler	20		2	40	80	1680.0
4) Chiller	3		2	6	100	315.0
<b>Total :</b>						<b>3683</b>
<b>Enzyme Cost</b>						
	용량	단가(won)	단위	사용시간	사용량(ml)	사용금액(won)
1) C-tec2	L	400000	/20L	1	700	14000
		20000	/L			
		20	/ml			
자체 개발 효소 사용량 50%대체						-7000
<b>Total</b>						<b>7000</b>



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구 성과

#### 1. 논문게제

년도	SCI	비SCI	NSC <sup>주7</sup>	IEEE <sup>주8</sup>
'12년 (편)	2	1		
연구 기간 전체 (편)	4(1)	1		

#### 2. 지식재산권

년도	지식재산권(국내)						지식재산권(국외)					
	특허 출원	특허 등록	프로 그램	실용 신안	의 장	품 종	특허 출원	특허 등록	프로 그램	실용 신안	의 장	품 종
12~13년 (건)	4	5					5	4				
연구 기간 전체 (건)	14	8					16	4				

#### 3. 기술 확산, 사업화, 창업

년도	기술 확산				사업화		창업(건)
	기술이전		기술 지도 (건)	기술 평가 (건)	완료 여부	매출액 (백만원)	
	건수	계약금액 (백만원)					
12~13년							
연구 기간 전체	1	32			진행중		

#### 4. 인력양성

- 억새와 갈대 식물체 재생을 통한 대량생산 관련 석사 학위자 양성 : 1명 (백범선)
- 억새와 갈대 식물체 재생 및 형질전환 연구 관련 고용창출 : 1명 (박은지)

#### 5. 기타 관련 성과

- 국내 및 국제 학술회의 발표 : 총 15회
- 홍보실적 : 총 8회 (신문, 방송, 저널 등)
- 전시회 참여 : 총 4회 (국외 1회, 국내 3회)
- 심포지엄 개최 : 총 1회 (제1회 바이오매스에너지 미니심포지엄)
- 연수지원 : 총 2회 (국외 1건, 국내 1건)
- 수상경력 : 1건 (2013 국가연구개발 우수성과 100선 선정)

## 제 2 절 성과활용 계획

### 1. 실용화, 산업화 계획

#### 가. 참억새와 갈대의 식물체 재생 시스템

본 연구를 통해 확립한 참억새와 갈대의 미성숙 화기 이용 식물체 재생 시스템은 성숙 종자를 이용한 식물체 재생 시스템에 비해 효율이 매우 높아 형질전환을 통한 품종 개발의 기초자료로 활용할 수 있다. 또한 차세대 바이오매스로 주목받고 있는 섬유질계 에너지작물을 바이오에너지 작물로 활용하기 위해서는 해당 작물의 대량 생산이 필요하게 되는데, 이 때 본 연구의 식물체 재생 시스템이 활용될 수 있다.

#### 나. 참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템

참억새와 갈대를 차세대 바이오매스로 개발하기 위해서는 고효율·저비용의 당화공정이 필요하며, 이를 위해서는 당화가 용이한 품종을 개발하는 것이 필요하다. 본 연구를 통해 확립한 참억새와 갈대의 미성숙 화기와 미성숙 화기 유래 켈러스 이용 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템은 유도성 프로모터에 의해 조절되는 cellulose 자가분해 신품종 개발에 활용될 수 있다. 또한, 상업적으로 가치가 높은 단자엽 식물의 품종 개량에 참억새와 갈대의 미성숙 화기이용 형질전환 시스템을 적용할 수 있을 것으로 보인다.

#### 다. 건조유도성 프로모터 및 프로모터 분석 벡터 카세트 응용

벼과 유래의 건조스트레스 유도성 프로모터가 개발되어 총 6건 (국내 3건, 국외 3건)이 출

원되어 그 중 5건이 등록되었다. 본 과제를 통해 개발된 프로모터는 벼 이외에 벼과 작물, 타 작물에 도입하여 유용 유전자 발현에 응용할 수 있다. 뿐만아니라 건조 스트레스 유도성 프로모터는 건조 스트레스 이외에 염분, 고온 등 다양한 환경스트레스 저항성 작물 개발에 이용할 수 있다. 척박한 환경에서 성장 가능한 품종을 개발하는데 이용할 수 있을 뿐만아니라 형질이 우수한 품종, 유용물질 고생산 품종을 개발 하는데도 응용 할 수 있다.

연구 수행 중 개발된 프로모터 분석용 벡터카세트는 현재 고추유래의 프로모터 분석 연구에 실제 사용하고 있으며, 다양한 프로모터의 분석 시 이용될 수 있다. 개발된 벡터 카세트에는 GFP 유전자가 도입 도입되어 있어 육안으로 형질전환 유·무 및 발현량을 확인 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 벡터카세트의 프로모터와 유전자를 다른 형질전환 벡터에 쉽게 클로닝할 수 있도록 제작되어있어 다양한 종류의 벡터에 이용할 수 있다.

이러한 장점을 가진 프로모터와 벡터 카세트는 유용 단백질 생산, 유전자 발현 분석, 특정 형질 과발현 등 식물을 재료로 연구를 수행하는 연구자들이 매우 필요로 하는 기술이며 상업화 가능성이 높다.

#### 라. 재조합 셀룰라제 및 효소 생산

곰팡이 고상발효를 통해서 효소를 생산 가능성을 확인하였다. 목질계 바이오에탄올 생산용으로 활용하기 위해 효소 개량 및 저가 생산이 가능하여 생산비용을 절감할 수 있다. 곰팡이 종류 및 도입유전자에 따라 다양한 셀룰라제를 생산 할 수 있도록 방법을 개선한다면 좀 더 넓은 산업분야에 응용할 수 있을 것으로 예상된다.

현재까지는 고상발효를 이용한 효소생산 기술은 농업 및 식품관련 산업에서 주로 이용되어져 왔다. 이렇게 생산된 효소는 바이오에너지 생산 외에도 비료 및 사료사업 등 다양한 산업에 이용이 가능하다.

## 2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

### 가. 특허 출원, 등록

과제 수행 중 출원된 24건 (국내 14건, 국외 10건)의 특허에 대해서 등록을 진행 할 예정이며, 등록된 9건 (국내 5건, 국외 4건)에 대해서는 특허권을 유지할 계획이다. 뿐만 아니라 현재 연구 중인 프로모터, 유전자, 연구방법 등을 특허 출원 및 등록을 통해서 지식재산권 보호를 받고자 한다.

### 나. 품종 (식물보호) 등록

#### (1) 형질전환 식물체 식물특허 출원

셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 유전적 안정성, 환경적 안전성 검증 후 식물 특허 출원 및 등록을 하고자 한다. 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 T0~T4 세대 분석 후 셀룰라제 효소 생산이 높고 당화가 용이한 라인을 선발하고자 한다. 선발된 형질전환체는 삽입된 유전자의 위치, 식물체 생육, 후대 생산 등 검증을 완료한 후 선발된 라인의 셀룰라제 유전자 도입 품종을 식물특허를 출원하여 보호받고자 한다.

다. 논문 게재

(1) 건조유도성 프로모터 분석

연구 수행 중 개발된 프로모터의 발현 분석 실험을 계속적으로 실시할 계획이다. 건조유도성 프로모터에 의해 조절되는 유전자의 발현을 분석하여 외부 환경의 변화에 따른 발현 차이를 비교하고 가장 우수한 프로모터를 선발하고자 한다. 이를 위해서 제작된 형질전환 벼의 후대 검증이 반드시 필요하며 연구과제 종료 후에도 지속적으로 연구를 진행하여 건조스트레스 유도성 프로모터의 개발 및 연구를 완료하고자 한다.

(2) 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체 분석

본 연구를 통해 생산된 셀룰라제 유전자 도입 형질전환체의 물리적, 생리적 특성을 지속적으로 관찰하고 분석하는 연구를 수행하고자 한다. 안정적으로 셀룰라제 유전자가 도입된 식물체의 구조적 특성을 분석하여 Wild type과 비교, 기관 및 프로모터에 따른 차이 등을 비교 분석할 예정이다. 당대 형질전환체 이외에도 후대 검증을 통해서도 유전적 안정성 여부를 확인하고 세포벽의 구조적 변화 및 유전자에 따른 차이 등을 검증하여 논문으로 발표할 예정이다.

3. 추가연구, 타연구에 활용 계획

가. 바이오에너지 작물 개발에 적용

(1) 에너지 작물의 전처리 및 당화 기술 개발에 적용

벼, 억새, 갈대의 다양한 전처리 조건 탐색, 전처리 전·후의 glucan 함량 분석 및 당화 후 당화율 조사를 통해 셀룰로오스의 분해에 대한 기초연구를 실시하였다. 이러한 연구결과는 벼과작물 이외의 바이오에너지 작물의 특성 연구 및 전처리, 당화 기술 개발에 중요한 기초자료가 될 것으로 생각된다.

(2) 셀룰라제 고생산 곰팡이 균주 탐색

곰팡이를 이용하여 셀룰라제를 생산하는 연구를 수행하여 도출된 많은 결과들은 추후 연구 및 타 작물에서의 효소 생산 시 자료로 이용 될 수 있다. 수행된 연구 결과를 토대로 곰팡이와 기질의 고액비, 배양 방법 등을 타 균주에 적용하여 용이하게 효소 생산 및 활성 분석을 실시할 수 있을 것이다. 또한 벼짚 이외의 타 작물에 적용하여 셀룰라제를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

(3) 셀룰라제 유전자가 도입된 미생물 개발

목질계 바이오에탄올 생산 시 반드시 필요한 셀룰라제를 확보하기 위해서 곰팡이 이외의 미생물에 목질분해능을 도입하고자 할 때 본 연구를 통해 밝혀진 셀룰라제 유전자 (cel 2, cel4 등)를 적용할 수 있다.

4. 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 계획

가. 식물 형질전환 방법 교육 및 지도

벼의 형질전환 방법을 습득하고자하는 연구자들에게 다양한 방법을 교육하고 형질전환체 분석 방법에 대한 지식 전달이 가능하다. 벼 이외의 작물에도 도입할 수 있도록 실습 및 조연이 가능하다. 따라서 다양한 목질계 바이오매스의 형질전환 방법 개발 및 개선에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

나. 바이오에탄올 생산 과정 전반에 대한 조연

목질계 바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 전반적인 과정에 대한 연구자적 입장에서의 조연이 가능하다. 전처리, 당화, 발효 전과정을 실시하면서 획득한 연구 노하우는 벼, 억새, 갈대 이외의 작물로부터 바이오에탄올 생산 시 연구 방향을 제시 할 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 섬유질계 에너지 작물의 식물체 재생 시스템

미국과 유럽에서는 섬유질계 바이오에너지 생산을 목적으로 자국 환경에 적용 가능한 스위치그래스, *M. giganteus* (3배체 거대억새), 물억새 등을 에너지작물로 활용하기 위한 재생 시스템 개발 연구를 활발히 진행하고 있지만 식물체 재생 효율은 높지 않다.

### 2. 섬유질계 에너지 작물의 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템

세계적인 에너지 관련 회사를 중심으로 바이오에너지 작물 개발을 위한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템 개발 연구가 진행되고 있다. 억새의 *Agrobacterium* 매개 형질전환 관련 PCT 특허가 2건 출원 (PCT/US2009/066241, PCT/US2009/041424)되었으나, 논문은 보고된 바 없다.

“Miscanthus transformation methods” (PCT/US2009/066241) 특허는 *M. sinensis* 종자, *M. giganteus*와 *M. sacchariflorus* 'Robusta'의 미성숙 화기, 기내 식물체의 어린 싹 등 다양한 조직을 이용하여 체세포 배발생 캘러스를 유도한 후 EHA105 / NB4KAN:p326-EGFP로 형질전환 하였다. 액체 캘러스 유도배지 2.1 ml로 적신 멸균 filter paper에서 암상태로 5~7일 공조 배양한 후 세척하고 paromomycin 100 mg/L가 첨가된 선발배지에서 선발하여 접종 20일 후 GFP 발현으로 유전자 발현을 검정하였을 때 형질전환 효율이 5~15%였으며, 동일 방법에 캘러스 전처리로 heat shock 처리를 하였을 때 형질전환 효율은 20~30%로 증가하였다고 보고하였다.

“Transformation and engineered trait modification in Miscanthus species” (PCT/US2009/041424) 특허는 참억새의 성숙종자 유래 캘러스와 미성숙 화기를 재료로 형질전환하였으며 사용한 *Agrobacterium*은 GV3101/pBI121이었다. 5일 동안 공조배양 한 후 Geneticin 100 mg/L가 첨가된 캘러스 유도 배지에서 선발하였으며, GUS staining으로 도입 유전자의 발현을 검정하였다고 보고하였다.

Particle bombardment 방법을 이용한 형질전환도 한 건 보고되었는데(GCB Bioenergy 3: 322-332, 2011), 일본 지역에서 자생하는 참억새 18개 유전형의 성숙 종자 유래 캘러스를 식물 재료로 사용하였으며, hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지에서 3주, hygromycin 100 mg/L가 첨가된 배지에서 4주 동안 선발하여 RT-PCR로 유전자 발현을 검정하였다고 보고하였다.

갈대의 경우에는 형질전환에 관한 1편의 논문이 보고되었으며 특허 출원 및 등록이 보고된 바는 없다. 2013년 Kim 등이 갈대의 성숙 종자 유래 캘러스를 식물 재료로 사용하여 형질전환 식물체를 생산하였는데, *Agrobacterium* EHA105 균주를 이용한 접종과정에서 감압을 사용하고 200uM AS 처리를 통하여 3.5%의 형질전환 효율을 얻었다고 보고하였다 (GCB Bioenergy 5:73-80, 2013).

이와 같이 바이오에너지 작물로 주목받고 있는 억새와 갈대에 있어서 형질전환 시스템 개발에 대한 상당한 연구에도 불구하고, 현재까지 일부의 보고가 이루어진 상태로서 신뢰할만한 형질전환 시스템 확보가 전세계적으로 미진한 실정이다.

### 3. 셀룰라제 개량 연구 확대

#### 가. 개량 효소 개발

대학을 중심으로 셀룰라제 개량 연구가 확대되고 있다. 단백질 3차원 구조를 기반으로 하여 개량효소의 구조 및 기능을 예측하는 rational design과 무작위 돌연변이를 통해 원하는 방향으로 단백질을 개발하는 방향성 분자진화 기술이 셀룰라아제 개량에 적용되고 있다.

셀룰라아제의 개량 연구는 주로 열안정성 및 활성개량을 목적으로 수행되고 있으며 endo-type의 셀룰라제를 타겟으로 국한되어 있다. 셀룰라제 활성도메인에 다양한 형태의 섬유소결합도메인을 융합시켰을 때, 셀룰라제의 활성 및 열안정성이 향상되었으며, 특히 결정성섬유소에 대한 활성증가는 공통적으로 보고되고 있다. endo-type의 셀룰라제의 라이브러리 탐색은 CMCase 효율 조사를 통해 이루어지며, 효율적인 라이브러리 탐색기술이 개발되어 있지 않다.

곰팡이를 이용한 셀룰라제 생산 방법은 기술적 포화상태이기 때문에 균주대사공학을 통한 에탄올 생산으로 관심이 증가하는 상태이다.

#### 나. 당화 효소 개발

성능이 우수한 당화 효소의 개발이 활성화 되고 있다. Nonozyme 사에서는 2012년에 기존의 CTec2보다 활성이 약 30% 더 증가된 CTec3를 출시하였다. 타 연구기관에서는 효소 개발을 위해서 오믹스 기술을 이용하여 곰팡이가 셀룰라제를 어떻게 분비하는지에 대한 상세한 연구가 진행 중에 있다.

### 4. 바이오매스를 활용한 에너지 생산 연구

#### 가. 2세대 바이오매스를 이용한 에너지 개발

농업·임업 부산물을 이용한 폐자원을 활용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 전세계적으로 96기의 파일럿 플랜트가 운영 중에 있다. 미국의 경우 옥수수에서 2세대바이오매스로의 전환을 권장·유도하여 매년 2세대 바이오에탄올 플랜트가 건설되고 있다.

#### 나. 동시당화발효, 발효부산물을 활용한 통합시스템 개발 등 차세대 공정 개발

바이오에탄올 생산 플랜트가 단순히 에탄올을 생산하는 시설로만 구성되어있지 않고 바이오매스 및 발효부산물을 이용하여 바이오화학제품, 바이오가스, 유기질비료, 사료 등의 유용물질을 생산하고, 폐수처리도 동시에 행하여 경제성을 제고시키는 통합시스템으로 개발되고 있다.

### 5. 식물 형질전환 연구

#### 가. 형질전환 식물체 개발

최근 연구되는 식물 형질전환체의 개발 목적은 유용 물질 생산, 병·해충 저항성, 환경 저항성 등 기능이 증가된 식물체를 생산하는 것이다. 백신, 제약, 산업용 효소 생산을 위한 연구가 진행 중이며 전분, 지방, 왁스, 플라스틱 등 다양한 종류의 특수 물질을 포함하는 식물체를 개발하고 있다.

#### 나. 리그닌 함량 감소 식물체 개발

유전자 변형 기술은 기본적인 작물 이외에도 농업, 상업 전반에 적용되고 있다. 상업적 이용을 목적으로 포플러 형질전환이 시행되고 있다. 목재의 견고함을 유지시켜주는 구조물질인 리그닌 함량이 감소되어 제지공정에 용이한 식물체가 개발되고 있다. 리그닌 함량이 적은 포플러 형질전환체는 바이오에탄올 생산에도 용이할 것으로 예상되고 있다.

#### 다. 바이오 에너지 작물 개발

유채, 옥수수, 사탕수수, 벼 등 바이오에너지를 생산할 수 있는 다수의 작물에 형질전환을 시도하고 있다. 셀룰라제 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체가 개발되어 셀룰라제의 생산이 확인되었고, 바이오오일 고생산 형질전환 식물체들이 속속 보고되고 있다. 뿐만아니라 셀룰라제 유전자가 도입된 벼 형질전환체도 개발되었다는 보고가 있다.



## 제 7 장 연구시설·장비 현황

\* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

### 1. 연구시설, 장비 구입 및 관리 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)
(주)젠닥스	식물조직세 포배양시스 템	Low Temp, Light Incubator (KS-840L)	1	2008.08.01	25,000,000	고려과학 (055-759-7023)	(주)젠닥스 연구소
(주)젠닥스	식물생장실	자동제어 광독립 식물생장실 (개발장비)	2	2011.09.08	30,465,000	고려과학 (055-759-7023)	(주)젠닥스 연구소
생명연	FPLC	AKTA	1	2010. 3. 2	26,400,000	(주)비앤비 (042-488-0058)	생명연 연구동

## 제 8 장      참고문헌

- Armstrong CL (1994) Regeneration of plants from somatic cell cultures: applications for in vitro genetic manipulation. In: Freeling M and Walbot V (eds.), The Maize Handbook, Springer Verlag, New York. pp. 663-671
- Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214
- Beale CV, Bint DA, Long SP (1996) Leaf photosynthesis in the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England. *J. Exp. Bot.* 47: 267-273
- Biswas GCG, Ransom C, Sticklen M (2006) Expression of biologically active *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in transgenic maize plants. *Plant Science*, 171:617-623
- Chris S, Heather T, Taylor C, Sarah CD, Stephen PL (2010) Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science* 329: 790-792
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659-668
- Dai Z, Hooker BS, Quesenberry RD, Thomas SR (2005) Optimization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase (E1) production in transgenic tobacco plants by transcriptional, post-transcription and post-translational modification. *Transgenic Res.* 14: 627-643
- Debergh Y, Harbaoui Y, Lemeur R (1981) Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187
- Fitch MMM, Moore PH (1993) Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 335-343
- Hesham Oraby, Balan Venkatesh, Bruce Dale, Rashid Ahmad, Callista Ransom, James Oehmke, Mariam Sticklen (2007) Enhanced conversion of plant biomass into glucose using transgenic rice-produced endoglucanase for cellulosic ethanol. *Transgenic Res* 16: 739 - 749
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol.* 35: 205-18
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282
- Holme IB, Krogstrup P, Hansen J (1997) Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus × ogiformis* Honda

- 'Giganteus' as affected by proline. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 203–210
- Holme IB, Petersen KK (1996) Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda "Giganteus". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 43–52
- Hood EE, Love R, Lane J, Bray J, Clough R, Pappu K, Drees C, Hood KR, Yoon S, Ahmad A, Howard JA (2007) Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. *Plant Biotechnol J.* 5(6): 709–719
- Hyunjong B, Lee DS, Hwang I (2006) Dual targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. *J Exp Bot.* 57(1): 161–169
- Kim HS, Zhang G, Juvik JA, Widholm JM (2010) *Miscanthus × giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. *GCB Bioenergy* 2: 192–200
- Lauzer D, Dallaire S, Vincent G (2000) In vitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 60: 229–234
- Luo JP, Jia JF (1998) Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. *Plant Cell Rep.* 17: 567–570
- Moon YH, Koo BC, Chio YH, Ahn SH, Bark ST, Cha YL, An GH, Kim JK, Suh SJ (2010) Development of "iscanthus" the promising bioenergy crop. *Kor. J. Weed Sci.* 30: 330–339
- Morrish F, Vasil V, Vasil IK (1987) Developmental morphogenesis and genetic manipulation in tissue and cell cultures of the Gramineae. *Adv. Genet.* 24: 431–499
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Pareddy DR, Petolino JF (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci.* 67: 211–219
- Park CH, Kim YG, Kim KH, Alam I, Lee HJ, Sharmin SA, Lee KW, Lee BH (2009) Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration from mature seed culture of *Miscanthus sinensis*. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 29: 291–298
- Petersen KK (1997) Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus x ogiformis* Honda 'iganteus' as influenced by benzyladenine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49: 137–140
- Petersen KK, Hansen J, Krogstrup P (1999) Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda "Giganteus". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 189–197
- Sun Y, Cheng JJ, Himmel ME, Skory CD, Adney WS, Thomas SR, Tisserat B, Nishimura Y, Yamamoto YT (2007) Expression and characterization of *Acidothermus*

- cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. *Bioresour Technol.* 98(15): 2866-2872
- Suprasanna P, Rao KV, Reddy GM (1994) Embryogenic callus in maize: Genotypic and amino acid effects. *Cereal Res. Commun.* 22: 79-82
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Rui KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicidetolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Cell* 16: 19-27
- Vasil V, Vasil IK (1986) Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 124: 399-408
- Wang H, Chai M (2006) Effect of four brands of gelling agents on callus induction from mature seeds of several turfgrass species. *Acta Hort. Sin.* 33: 437-440
- Yu LX, Gray BN, Rutzke CJ, Walker LP, Wilson DB, Hanson MR.(2007) Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *J Biotechnol.* 131(3): 362-369

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 당화가 용이한 형질전환 바이오에너지 작물 및 재조합 셀룰라제 저가생산기술 개발				
	(영문) Development of transgenic bioenergy crops improving saccharification and cost-effective production system for recombinant cellulase				
주관연구기관	(주)젠닥스		주 관 연 구 책 입 자	(소속)(주)젠닥스	
참 여 기 업	(주)젠닥스			(성명) 정 화 지	
총연구개발비  (2,300,000천원)	계	2,300,000	총 연구 기간	2008. 6.~2013. 6.( 5년 )	
	정부출연 연구개발비	2,000,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	93명
	기업부담금	300,000		내부인원	93명
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>• 연구목표:                      당화가 용이한 섬유질계 비식용 및 비사료용 형질전환 에너지 작물개발과 재조합 효소의 대량생산 기술을 개발하여 에너지작물의 전처리 과정 중 Cellulose의 자가분해와 효소당화를 동시에 수행하는 경제적인 당화공정 개발</p> <p>• 연구내용:                      ① 비식용 및 비사료용 섬유질계 형질전환 에너지 작물 개발 (3종 이상)                      - 국내 활용 가능한 비식용 및 비사료용 섬유질계 에너지 작물 선별                      - 선별 에너지작물 효율적 재분화 기술 및 형질전환 기술 개발                      - 식물 조직/발달 특이적 및 유도성 프로모터 개발과 형질전환 벡터 제작                      - 고효성 셀룰로오스 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 식물체 제작과 우수라인 선발                      - 선발된 형질전환 에너지 작물의 포장적응 실험 및 대량생산                      - 형질전환 에너지 작물의 셀룰로오스 자가분해 및 당화기술 개발</p> ② 셀룰로오스 분해효소 유전자 확보 및 개량 기술 개발 - 담자균 및 미생물로부터 섬유질 분해 효소 유전자 15종 이상 확보 (Exo type 분해 효소 유전자 5종, endo type 분해 효소 유전자 5종, 헤미셀룰로오스 분해 효소 유전자 5종 이상 확보) - 단백질공학기술을 이용한 셀룰라제 개량체 개발                     ③ 셀룰로오스 분해효소 재조합 생산 및 셀룰로오스 고효율 분해기법 개발					

- 에탄올 발효 미생물을 활용한 섬유질분해 효소 재조합 대량생산
- 효소 맞춤형 고효율 분비생산(grams per liter) 기술 개발
- 섬유질 분해효소 생산 최적화 및 scale-up
- 재조합 효소 cocktail을 이용한 분해 기술 개발
- 전처리된 에너지작물을 활용한 동시당화 및 통합생물공정 가능성 검증

○ 연구결과

- 비식용 및 비사료용 섬유질계 형질전환 에너지 작물 개발
  - 국내에서 자생하는 비식용 및 비사료용 섬유질계 에너지 작물 선별 후, 참억새 8종, 물억새 7종, *Miscanthus giganteus*, 갈대 4종의 유전자원 수집 및 유지·관리
  - 참억새와 갈대의 미성숙 화기 이용 캘러스 유도과 식물체 재생을 위한 최적 시스템 개발
  - 참억새는 95.8%의 캘러스 유도율과 58.3%의 신초 재생 효율을, 갈대는 99.9%의 캘러스 유도율과 100%의 식물체 재생 효율 확보
  - 참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 참억새 9계통, 갈대 8계통의 *gfp* 도입 형질전환체를 생산 및 PCR과 GFP 발현 검정을 통한 안정적인 형질전환 확인
  - 건조스트레스 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *gfp* 유전자 도입 형질전환 식물체 개발
  - 갈대의 *rab21-gfp* construct 도입 형질전환 식물체 40계통 생산 및 PCR과 건조처리 후 GFP 발현 검정으로 36계통에서 유전자의 안정적인 도입과 발현을 확인
  - Cellulose 자가분해 유전자 도입 형질전환 및 선발 과정을 통하여 참억새와 갈대에서 형질전환 캘러스 확보 후, 형질전환 식물체 재생을 진행 중. 형질전환 식물체 확보 후, 특성 검정을 실시할 예정
- 셀룰로즈 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발
  - 벼로부터 건조유도성 프로모터 7종, 조직특이성 프로모터 6종, 항시발현 프로모터 3종 및 건조유도성 유전자 3종을 분리
  - 효모와 박테리아 유래의 셀룰라제 유전자 *cel2* (exo-glucanase), *cel4* (endo-glucanase),  $\beta$ -*glu* ( $\beta$ -glucosidase)를 단일 혹은 복합으로 벼 게놈에 도입한 형질전환체 및 프로모터::*gfp* 형질전환체 36종을 생산
  - 벼에서 셀룰라제 유전자를 발현하기 위한 프로모터로는 항시발현용 프로모터 옥수수 유래 maize Ubiquitin과 벼로부터 분리한 972, 996 건조스트레스 유도성 프로모터를 사용하였으며 발현된 셀룰라제를 Apoplast로 집적
  - 셀룰라제 유전자가 항시 발현되는 벼 중 일부는 성장 속도가 대조구에 비해 느렸으나, 유도성 프로모터로 발현시킨 경우는 정상적임. 형질전환 벼의 세포벽의 구조가 치밀하지 못하였으며, 당화율이 대조구 대비 두 배 이상 증가됨.
  - 형질전환 벼를 곰팡이와 함께 고상발효를 한 경우 셀룰라제 생산율이 대조구에 비해 2배 이상 효율을 보임을 확인. 따라서 셀룰라제 유전자를 벼에서 발현하므로써 당화에 사용되는 효소 사용량을 감소하고 동시에 전처리 공정이 용이한 바이오매스로서의 활용 가능성을 확인함
- 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발
  - 신규 셀룰레이즈 유전자 뿐 아니라 논문 분석과 data base 검색을 통하여 재조합 발현을 위한 후보 유전자를 선별
  - 각각의 균주에서 만든 cDNA library로 부터 직접 셀룰레이즈 유전자를 증폭하거나 합성하는 방법으로 exo type 분해 효소 유전자 12 종, endo type 분해 효소 유전자 11종, 헤미셀룰로즈 분해 효소 유전자 5종,  $\beta$ -glucosidase 유전자 5종, 기타효소 2종을 확보하여 directed

evolution 기술을 활용하여 효소의 개량, glycosylation 변이주 개발

- 효모를 이용한 효소의 재조합 대량생산을 위해 효모 TFP 기술을 이용하여 각 셀룰라제에 대한 고분비 생산균주(1~5 g/L 수준)를 선별함
- 선별된 생산균주를 5L 발효조를 이용하여 유가식 발효 배양을 셀룰레이즈를 최적 생산할 수 있는 기술을 개발하고 효모에서 생산된 4가지 핵심효소인 exoglucanase (CBH1,2), endoglucanase (EGL) 및  $\beta$ -glucosidase (BGL)를 이용하여 다수의 KRIBB Cellulase Cocktail(KCC)을 제작하여 다양한 기질(Filter paper, Avicel, EFB, 볏짚)을 활용하여 효소 활성을 비교하고 바이오매스별 최적의 효소카테일을 확인
- 전처리된 볏짚, 억새를 사용하여 재조합 균주를 사용한 생물통합에탄올 발효(consolidated bioprocessing)에서 외부 효소의 사용량을 50% 이상 절감하여 바이오에탄올의 생산 가능성이 확인

#### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

##### • 참억새와 갈대의 식물체 재생 시스템

본 연구를 통해 확립한 참억새와 갈대의 미성숙 화기 이용 식물체 재생 시스템은 성숙 종자를 이용한 식물체 재생 시스템에 비해 효율이 매우 높아 형질전환을 통한 품종 개발의 기초자료로 활용할 가치가 매우 큼. 또한 차세대 바이오매스로 주목받고 있는 섬유질계 에너지작물을 바이오에너지 작물로 활용하기 위해서는 해당 작물의 대량 생산이 필요하게 되는데, 이 때 본 연구의 식물체 재생 시스템이 활용될 수 있음.

##### • 참억새와 갈대의 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템

참억새와 갈대를 차세대 바이오매스로 개발하기 위해서는 고효율·저비용의 당화공정이 필요하며, 이를 위해서는 당화가 용이한 품종을 개발하는 것이 필요함. 본 연구를 통해 확립한 참억새와 갈대의 미성숙 화기와 미성숙 화기 유래 캘러스 이용 *Agrobacterium* 매개 형질전환 시스템은 유도성 프로모터에 의해 조절되는 cellulose 자가분해 신품종 개발에 활용될 수 있음. 또한, 상업적으로 가치가 높은 단자엽 식물의 품종 개량에 참억새와 갈대의 미성숙 화기이용 형질전환 시스템을 적용할 수 있을 것으로 보임.

##### • 셀룰라제 분해능이 도입된 바이오에너지 모델작물 개발

셀룰라제를 발현하는 식물을 이용하면 섬유질계 기질의 당화공정이 용이하여 효소 사용 비용을 절감할 수 있는 장점이 있음. 또한 셀룰로즈 분해가 용이하므로 에탄올 발효 효율이 높아질 것으로 기대됨. 본 연구에서 개발된 에너지 작물용 벡터는 식물체내에서 산업용 효소 및 재조합 단백질을 생산하는 데 활용이 가능함

##### • 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발

효모를 이용하여 생산된 재조합 효소 카테일을 이용하여 다양한 섬유소 기질의 분해가 가능하였으며 지속적인 효소의 개발을 통해 곰팡이 효소를 대체 가능할 것으로 사료됨. 현재까지 재조합 효소로만 바이오매스를 충분히 당화하기에는 부족하였지만 상용화된 곰팡이 효소에 첨가하여 효소의 효율을 높이고 효소비용을 절감할 수 있는 방법을 제시하였음. 또한 재조합 균주를 이용한 생물통합공정(consolidated bioprocessing) 가능성을 확인하였으며 이는 섬유소 바이오에탄올 생산 비용을 절대적으로 절감할 수 있는 방법이 될 것임.

[별첨 2]

## 자체평가 의견서

연구개발분야	융복합	과제구분	<input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 <input type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	308010-5
연구과제명	당화가 용이한 형질전환 바이오에너지 작물 및 재조합 셀룰라제 저가생산기술 개발				
주관연구기관	(주)젠닥스				
연구담당자	주관연구책임자	정 화 지			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	한국생명공학연구원 (바이오화학에너지센터)	성명	손정훈
		기관(부서)	상명대학교 (식물산업공학과)	성명	형남인
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
연구기간	총기간	2008.6.25.~2013.6.24. (5년)	당해년도기간	2012.6.25.~ 2013.6.24	
연구비(천원)	총규모	2,300,000	당해년도규모	460,000	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행       계획대로 진행       계획대로 진행되지 못함

계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음       어느 정도 얻음       얻지 못함



3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

기술료 등 수익                      수 익 :

기업 등에의 기술이전                      기업명 :

기술지도 등                      기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

국내출원/등록                      출원 14 건,                      등록 5 건

해외출원/등록                      출원 10 건,                      등록 4 건

5-3 논문게재·발표 등

국내 학술지 게재                      1 건

해외 학술지 게재                      2 건

국내 학·협회 발표                      5 건

국내 세미나 발표                      3 건

기 타                      건

5-4 인력양성효과

석 사                      1 명

박 사                      명

기 타                      명

5-5 수상 등

있 다                      상 명칭 및 일시 :

없 다

5-6 매스컴 등의 PR

있 다                      신문 7 건; 국외전시회 1회, 국내전시회 2회, 심포지엄 개최 1회

없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다                       약간 감소되었다                       크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다                       약간 조정필요                       전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

해당사항 없음

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 건조스트레스 유도성 프로모터의 국내 및 국외 특허 등록을 각각 3건, 2건 진행하였으며, 억제와 갈대 대량생산 기술의 국내 특허 등록 2건을 완료하였음)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분                     보통                     불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

충분                     고려 중                     중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대                     동일                     축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	(주)젠닥스	부사장/연구소장	정 화 지 (인)
참여기업대표	(주)젠닥스	대표이사	이 용 옥 (인)



	후, 특성 검정 실시 예정
<p>④ 식물 조직/발달 특이적 및 유도성 프로모터 개발과 형질전환 벡터 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다수의 스트레스, 조직, 발달 특이적으로 발현 할 수 있는 유전자를 벼과 작물로부터 발굴하고 선발유전자가 건조스트레스 처리에 의해 발현되는지를 확인한 후 건조유도성 프로모터를 선발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 벼로부터 건조유도성 프로모터 7종, 조직특이성 프로모터 6종, 항시발현 프로모터 3종 및 건조 유도성 유전자 3종을 분리</li> <li>- 선발된 프로모터::GFP 마커 유전자를 이용하여 벡터 카세트 제작 후 벼 형질전환</li> <li>- 우수 건조스트레스 유도성 프로모터 선발 (972, 996 프로모터)</li> </ul>
<p>⑤ 고효성 셀룰로오스 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 식물체 제작과 우수 라인 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 셀룰로오스 분해능이 뛰어난 균주로부터 셀룰라제 신규 유전자를 분리하여 식물 형질전환 벡터에 클로닝</li> <li>- 형질이 우수한 형질전환체 선발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효모와 박테리아 유래의 셀룰라제 유전자 cel2 (exo-glucanase), cel4 (endo-glucanase), <math>\beta</math>-glu (<math>\beta</math>-glucosidase)를 단일 혹은 복합으로 벼 게놈에 도입</li> <li>- 996, 972 프로모터를 사용하였으며 발현된 단백질이 apoplast에 집적되도록 벡터제작</li> <li>- 제작된 형질전환 식물체는 유전자 도입 및 발현 확인을 위해 gPCR, RT-PCR, 단백질 발현 분석 등을 실시하여 유전자가 안정적으로 도입된 형질전환체를 선발함</li> </ul>
<p>⑥ 선발된 형질전환 에너지 작물의 포장적용 실험 및 대량생산</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발한 형질전환 벼는 실내의 성장실에서 순화</li> <li>- 포장 적용 실험을 거친 후 생육 상태를 조사하고 후대 종자 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 현재 개발한 형질전환 벼 T0세대는 실내의 성장실에서 순화과정을 거쳐 완벽한 식물체로의 생육이 가능하도록 관리하여 T1 종자를 수확</li> <li>- 확보된 다수 line의 후대 종자는 파종 후 생화학적 분석을 할 예정</li> </ul>
<p>⑦ 형질전환 에너지 작물의 셀룰로오스 자가 분해 및 당화기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체의 물리적 생화학적 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 셀룰라제 유전자가 도입된 형질전환체 T0세대의 세포벽 구조를 비교하기 위한 전자현미경 (SEM, TEM) 분석 glucan 함량 분석, 효소 활성 분석 등을 통해서 셀룰로오스 분해능을 조사함</li> <li>- 셀룰라제 발현 식물을 이용하여 곰팡이 균주와 함께 고상발효를 실시하여 셀룰라제 생산효율이 증가됨을 확인함</li> <li>- 볏짚과 억새의 최적 전처리 조건을 확립함</li> </ul>
<p>⑧ 셀룰로오스 분해효소 유전자 확보 및 개량 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 담자균 및 미생물로부터 섬유질 분해 효소 유전자 15종 이상 확보(Exo type 분해 효소 유전자 5종, endo type 분해 효소 유전자 5종, 헤미셀룰로오스 분해효</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exo type 분해 효소 유전자 12종, endo type 분해 효소 유전자 11종, 헤미셀룰로오스 분해 효소 유전자 5종, <math>\beta</math>-glucosidase 유전자 5종, 기타효소 2종을 확보</li> <li>- 셀룰라제 활성을 비교분석 선발 조건 구축 분자진화 기술을 활용하여 활성이 40% 이상 개선된 <math>\beta</math>-glucosidase 확보</li> </ul>

소 유전자 5종 이상 확보) - 단백질공학기술을 이용한 cellulase 개량체 개발	- 재조합 셀룰레이즈 당쇄 변이체 개발 - 재조합 셀룰레이즈의 분비생산성 향상을 위한 단백질 융합체 개발(최대 7배 분비 향상)
⑨ 셀룰로즈 분해효소 재조합 생산 및 셀룰로즈 고효율 분해기법 개발 - 에탄올 발효 미생물을 활용한 섬유질분해 효소 재조합 대량생산 - 효소 맞춤형 고효율 분비생산(grams per liter) 기술 개발 - 섬유질 분해효소 생산 최적화 및 scale-up - 재조합 효소 cocktail을 이용한 분해 기술 개발 - 전처리된 에너지작물을 활용한 동시당화 및 통합생물공정 가능성 검증	- 에탄올 발효 효모 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )를 이용하여 확보된 다수의 셀룰레이즈 유전자를 도입, 고평비 균주 개발 - 단백질 맞춤형 분비생산기술을 활용하여 각 cellulase에 대한 고평비 생산균주(1~5 g/L 수준) 개발. - 선별균주의 유기식 발효 배양을 통해 분비생산 발효 최적화 연구 수행 - 효소의 생산은 50L 발효를 통해 확보 - 재조합 효소 cocktail 제조 및 활성 분석 - 상용화된 효소에 첨가하여 효소의 효율을 높이고 효소비용을 절감할 수 있는 방법 제시 - 전처리된 볏짚, 억새를 사용한 재조합 균주에탄올 발효에서 대조균주에 비해 40% 이상 에탄올 발효효율이 증가됨을 확인 - SSF 또는 CBP 에탄올 발효에서 당화효소 사용량 대폭 절감 확인 - 섬유소 바이오에탄올 생산 비용을 절대적으로 절감할 수 있는 방법 제시

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 핵심기술

구분	핵심 기술 명
①	억새와 갈대의 미성숙 화기를 이용한 작물의 대량생산 및 형질전환 시스템 개발
②	건조스트레스 유도성 프로모터 활용 목적단백질 대량생산 기술
③	재조합 당화효소 대량생산 기술 및 재조합 발효 균주 기술

### 4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허출원	산업체이전(상품화)	현장으로 해결	정책자료	기타
바이오에너지 작물의 대량생산 기술				V		V	V	V		
바이오에너지 작물의		V				V	V			

형질전환 시스템 개발										
건조스트레스 유도성 프로모터 활용 목적단백질 대량생산 기술					v	v				
재조합 당화효소 대량생산 기술 및 재조합 발효 균주 기술					v	v				

\* 각 해당란에 v 표시

### 5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
바이오에너지 작물의 대량생산 기술	- 억새와 갈대를 이용한 바이오에너지 작물 대량 생산에 활용하고자 함 - 억새와 갈대의 Agrobacterium 매개 형질전환 시스템 효율 증진에 활용하고자 함
바이오에너지 작물의 형질전환 시스템 개발	- 억새와 갈대를 차세대 바이오매스로 개발하기 위한 cellulose 자가분해 신제품 개발에 활용하고자 함
건조스트레스 유도성 프로모터 활용 목적단백질 대량생산 기술	- 벼, 옥수수 등의 단자엽 식물에서 산업용효소를 생산하기 위해 활용하고자 함 - 담배를 비롯한 비식용 작물에서도 적용 가능성을 연구하여 의약품 단백질을 생산하는 분자농업용 프로모터로 활용하고자 함
재조합 당화효소 대량생산 기술 및 재조합 발효 균주 기술	섬유소 당화효소 대량생산 및 활용 - 생산균주를 활용한 consolidated bioprocessing 최적화 연구에 활용 - 재조합 효소 및 재조합 균주의 기술이전을 통한 실용화

### 6. 연구결과에의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

