

발간등록번호

11-1543000-000947-01

비목재 자원을 활용한 바이오 신소재 개발:
고온성 효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및 그린바이오
신소재 생산기술 개발

(Thermotolerant yeast(KM) platform for the production of
bioenergy and biomaterial from agricultural biomass)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비목재 자원을 활용한 바이오신소재 개발: 고온성 효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및 그린바이오 신소재 생산기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 손 정 훈

세부연구책임자 : 손 정 훈

연 구 원 : 김철호, 이승구, 전재홍,
배정훈, 성봉현, 서정우, 오백록, 김현순,
이대희, 염수진, 정해영, 이선희, 손민정,
김현진, 김미진, 박현주, 임광묵

협동연구기관명 : (주)삼성전자

협동연구책임자 : 박 진 환

위탁연구기관 : 성균관대학교

위탁과제책임자: 권 대 혁

요 약 문

I. 제 목

비목재 자원을 활용한 바이오신소재 개발: 고온성 효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및
그린바이오 신소재 생산기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	2						2		1	학회 발표
	달성	2	2					2			5
2차 년도	목표	5	1					2	3	2	
	달성	4	1					1	4	1	7
3차 년도	목표	6	2					2	5	2	
	달성	9	-					3	9	-	5
4차 년도	목표	6	3					2	5	-	
	달성	8	4					2	3	2	5
5차 년도	목표	6	3					2	5		
	달성	13	7					2	4		5
계	목표	25	9					10	18	5	
	달성	36	14					10	20	3	

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1		5	3	
	달성	1+2건	진행중		7	1	

III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 농업바이오매스 활용 바이오에너지 및 바이오신소재 생산기술 개발 필요성
- 바이오매스 경제시대 도래: 석유자원 고갈 및 국제환경규제로 인해 기존 석유화학산업을 대체할 수 있는 농업 바이오매스 기반의 저탄소 대체원료 개발기술이 미래 세계경제에 결정적 영향을 미칠 핵심기술로 부상(NIC' s Global Trends 2025)
- 화석연료 고갈 및 기후변화에 대한 국가적 대응전략: 농업 바이오매스 기반의 에너지 및 바이오화학 산업 육성을 통하여 신성장 동력 확보와 고효율 저탄소 사회 구축 필요
- 저탄소 녹색성장 견인: 농업 바이오매스 산업 육성을 통하여 “국가 농업 경쟁력 확보 및 미래 성장산업 기반확보 필요
- 돼지감자 활용 필요성
- 농가소득 증대용 한국형 바이오매스 작물 필요: 농촌인구의 고령화로 인한 농업구조 및 농업생산력 저하문제와 한미 FTA 등으로 인해 점진적으로 경쟁력을 상실하고 있는 국내 농업 현실을 고려하여 농촌경제 활성화가 가능한 한국형 바이오매스 작물개발이 필요함.
- 돼지감자(Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus* L.): 돼지감자는 비식량작물로서 서리 및 다양한 식물병에 강하고 건조지역 등 기후 적응력이 강하여 우리나라 기후에 잘 맞고 재배가 쉬어 재배 불리 지역 및, 저 노동력으로 생산 가능한 대체 작물로 적합함.
- 바이오에너지 및 석유대체 물질 생산용 플랫폼 효모 *Kluyveromyces marxianus*(KM)
- 고온성 효모 KM 균주의 특성
 - KM (*Kluyveromyces marxianus*)은 비전통 효모(non-sacharomyces)의 일종으로 hemiascomycetous yeast이며 lactose 발효능이 뛰어나 유가공 제품에 주로 존재하므로 인체에 매우 안정적이며 미국과 유럽에서 GRAS(Generally regarded as safe), QPS(Qualified Presumption of Safety)로 알려져 있음.
 - 최근 KM은 고온에서의 빠른 성장능력(doubling time, ~70 분)과 값싼 탄소원을 활용하여 바이오에탄올 및 대사물질 생산능력이 뛰어나 바이오매스 기반의 바이오에너지 및 플랫폼화합물 생산 균주로서 최근 이목이 집중되고 있음(Lane and Morrissey, Fungal Biology Reviews, 2010).
- 고온성 효모 KM 균주의 산업적 활용
 - 바이오에탄올 생산을 위해 일반적으로 사용되는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 많은 연구가 진행되어 있으나 생육온도가 35도를 넘지 못하고 오탄당을 포함한 탄소원의 활용능이 낮아 바이오에탄올 생산비용이 높은 단점이 있음. 반면 KM 균주는 52도까지 고온성장이 가능하고 lactose, inulin, cellobiose 등의 다양한 다당류의 활용이 가능하고 오탄당 활용능도 매우 우수함. 그러나 유전체 분석연구 등 기초연구는 주로 *Kluyveromyces lactis*에 집중되었고 산업효소 생산 등의 응용연구는 주로 KM을 활용됨.
 - 효모 *S. cerevisiae*나 *K. lactis*에 비해 기초연구가 부족하지만 다양한 genetic tool이 개발되어 있고 대사공학적인 균주개량이 가능함이 입증되어 있음(Bartkeviciute et al., 2000, Siekstele et al., 1999).
 - 특히 Cargill-Dow사(Naturework사)에서 옥수수로부터 생분해성 바이오폴리머의 원료인 lactic

acid를 생산하기 위한 생산균주로 활용. PLA는 aliphatic polyester로서 starch와 섞어 생분해성 플라스틱의 생산단가 절감을 위해 사용중임.

- 몇몇 사례에서 검증된 바와 같이 고온성 효모 KM은 바이오에너지/바이오화학 분야에서 세포 공장 플랫폼 균주로서 활용할 가치가 매우 높으며 전세계적으로 아직 본 균주에 대한 초기연구 단계에 있으므로 유전체 분석을 포함한 옴믹스 연구, 유전자재조합, 합성생물학 연구 등을 통해 효모 KM 세포공장 platform연구에 집중적인 연구개발이 진행하면 국내 바이오화학 산업을 활성화하고 본 균주의 세계적 기술허브로서 역할을 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 특히 효모 KM은 inulinase의 활성이 매우 뛰어나 본 연구에서 타겟으로 하는 바이오매스인 돼지감자 이눌린을 효율적으로 분해하고 다양한 바이오연료 및 석유대체 화합물 생산이 가능함.

□ 고온성 CBP 바이오에탄올 생산기술

○ 고온성 효모 KM 균주의 특성

- 현재 섬유소 바이오매스로부터 바이오에너지 생산공정은 전처리/효소생산/당화/발효 등 다단계 공정(그림 참조)으로 나뉘어 대규모의 장치비 및 운영비를 필요로 하고 있으나 이러한 기능을 통합 수행할 수 있는 consolidated bioprocess(CBP)의 경우 생산비용을 약 50% 이상 절감할 수 있음(Lynd et al., 2006).
- CBP 기술은 섬유소 분해효소의 생산, 섬유소 가수분해, C5/C6 동시발효 과정을 하나의 리액터에서 수행하는 공정으로서 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에탄올 및 화학원료 생산을 위한 가장 경제적인 공정으로 관심을 받고 있음.
- CBP 기술개발의 핵심은 섬유소 바이오매스 분해 및 활용능을 보유한 고성능의 효모 개발이 필수적인데 효모 *S. cerevisiae*를 이용한 CBP 균주 개발의 한계는 섬유소분해효소의 최적온도가 약 45-50°C이지만 *S. cerevisiae*의 생장이 35°C 이상에서는 불가능하기 때문에 바이오매스의 분해와 알콜발효가 동시에 이루어 질수 없는 문제가 있음.
- 이에 반해 고온성 효모 KM은 최고 52°C도까지 생장이 가능하므로 CBP 바이오에탄올 생산 균주로서 KM이 매우 적합함.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 비목재 농업 바이오매스(돼지감자) 개량, 증산 및 대량생산 기술개발
 - 돼지감자 기내배양시스템 개발
 - 돼지감자의 재분화 조건 구명 및 형질전환 원천기술 개발
 - 지하부 바이오매스(돼지감자) 증산을 위한 유용유전자 발굴 및 도입
2. 돼지감자 유래 바이오매스 전처리 기술개발
 - 돼지감자 지상부(섬유소) 및 지하부(이눌린) 활용을 위한 전처리 최적 조건 확립
 - 산 및 알칼리(암모니아) 처리 공정을 통한 리그닌 유래 독성물질 제거
 - 효소 당화 공정용 전처리 공정 최적 조건 도출 및 수율 극대화
3. 고온성 효모 KM 세포공장 platform 구축(KM 옴믹스, KM 재조합 기술, KM 합성생물학 기술)
 - 고온성 효모 KM 유전체 서열 해독 및 정보 해석

- KM 세포공장 시스템 구축을 위한 전사체 분석 및 대사회로 해석
 - KM 유전자 재조합 시스템(유전자 발현 toolbox, 유전자 도입 및 knock-out, 표면발현 시스템 구축)
 - KM 외래단백질 분비 극대화 시스템 개발
 - 합성생물학 기반 바이오매스 분해 유전자 합성, 효소 개량, 고속활성 분석 및 탐색
 - 대사효소(diol 경로 유전자, CoA 전이효소, 탈수소효소) 개량 및 생합성 모듈 개발
4. 돼지감자 섬유소 바이오매스 분해/활용 CBP 바이오에탄올 생산 KM 균주개발
- 섬유소 분해능 도입 KM CBP 균주 개발(셀룰레이즈 고분비, 미니-셀룰로좀 시스템)
 - 바이오매스 유래 C6/C5 동시활용을 위한 대사 모듈 개발 및 도입
5. 돼지감자 이눌린 활용 고부가 바이오신소재(1,4-BDO 및 lactic acid) 최적생산을 위한 KM 균주개발
- 1,4-BDO 및 lactic acid 생합성 경로 핵심유전자 확보 및 생합성 경로 디자인
 - 대사공학 및 시스템 생물학기법에 의한 균주 재설계
 - 오믹스 분석결과를 활용한 1,4-BDO 및 lactic acid 생합성 경로 재설계 및 생산 극대화
6. 농업 바이오매스 통합적 활용을 위한 CBP 바이오에탄올, 1,4-BDO 및 lactic acid 대량생산 발효공정 개발
- 섬유소 바이오매스 기반 바이오에탄올 CBP 발효공정 최적화 및 바이오에탄올 생산
 - 돼지감자 이눌린 기반 1,4-BDO 및 lactic acid 생산 배지 최적화 및 발효 조건 최적화
 - 발효공정과 연계된 바이오에탄올, 1,4-BDO 및 lactic acid 회수 및 분리 공정 개발
 - 300L 규모의 발효 공정 scale-up 및 기술 검증
 - 바이오에탄올, 1,4-BDO 및 PLA 사업화 타당성 분석

V. 연구개발결과

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
돼지감자 개량 및 대량생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 재분화 조건 구명 ▪ 돼지감자 형질전환 조건 및 체계 확립 ▪ 이눌린 함량증대 감자 생산 ▪ 돼지감자 형질전환 기술 확립 ▪ 돼지감자 대량재배 및 공급 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 기내배양 조건 및 재분화 조건 구명 ▪ 돼지감자 개량을 위한 유전자 발굴 ▪ 돼지감자 괴경형성, 당대사 관련 유전자 발굴 ▪ 이눌린 함량증대를 위한 SST, FFT 유전자 확보 및 감자 이눌린 발현 확인 ▪ 형질전환 체계 확립을 위한 재분화 조건, Agrobacterium strain 구명 ▪ GUS 유전자를 이용한 형질전환 확인 ▪ SST, FFT 유전자를 이용한 형질전환체 확보증 ▪ 돼지감자 재배법, 바이오매스 생산량 검증 ▪ 돼지감자 상시 재배 및 연구용 바이오매스 원료 상시 공급 체계 구축
돼지감자 바이오매스 전처리 기술	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 바이오매스의 성분 분석 ▪ 돼지감자 전처리 특성 파악 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NREL 기준 분석방법을 기준으로 바이오매스의 성분(당, 리그닌) 분석 완료 ▪ 전처리 방법에 따른 바이오매스 영양 분석을 통해 압

개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 바이오매스의 침출전처리 공정 적용 ▪ 산, 암모니아 전처리 조건의 특성 파악 ▪ 최적당화를 위한 전처리 공정의 최적화 ▪ 전처리 공정 scale-up 설계 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 모니아 침출공정 선택 ▪ 표면분석법을 통한 전처리 최적조건 확립 ▪ 전처리 조건에 따른 효소당화 효율 확인 ▪ 암모니아와 황산을 이용한 침출 공정 전처리 적용 ▪ RSM 분석법을 이용한 전처리 공정 변수의 최적화 탐색 ▪ 당화수율에 따른 최적 공정 조건 확립 ▪ Scale-up 공정 변수 확보
KM 오믹스(유전체) 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 유전체 분석 ▪ Genome annotation ▪ 유전체 정보화 시스템 구축 ▪ 웹기반 정보화 시스템 구축 ▪ 효모 유전체 비교분석 ▪ 배양조건에 따른 RNA-seq 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 유전체 해독 균주로 CBS6556 선정하고 Illumina platform으로 KM 유전체 서열 분석 ▪ 346개의 contig(>200 bp)를 확보하였으며 total contig length는 10,793,580 bp 확인 ▪ AutoFACT 및 ERGOTM을 이용한 genome annotation ▪ 웹 기반 유전체 정보화 시스템 구축, ERGO data와 자체 InterPro 검색 결과 활용 웹 기반 유전체 정보화 시스템 구축 ▪ NGS 기법을 이용한 KM 유전체 염기서열 추가 해독 및 주석화 ▪ Finishing 및 assembly validation- ▪ 통합 유전체 주석화 <ul style="list-style-type: none"> - Ab initio gene model과 evidenced gene model을 EvidenceModeler로 통합하여 최종 유전자 모델 산출 - rRNA gene 분석에 의해 대표적인 KM 균주 10종을 선별하여 Illumina HiSeq 2000과 Ion Torrent PGM으로 유전체 염기서열 결정 및 assembly 수행 ▪ 배양 조건에 따른 유전자 발현 분석, RNA-seq 실시 ▪ 전사체 분석 및 유전체 데이터에 대한 통합 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 조건(탄소원 및 온도)에 따른 RNA 분리 후 RNA-seq 및 genome tiling array로 유전자 발현 양상의 변화를 분석
KM 유전자 재조합 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 발현 toolbox 개발 ▪ 유전자 초고속 개량시스템 개발 ▪ 유전체 정보기반 표면발현 시스템 구축 ▪ 단백질 고분비 생산 모듈 개발 ▪ 재조합 셀룰레이즈 고분비 생산 기술 ▪ 섬유소분해효소 카테일 제조 및 당화 기술 개발 ▪ KM C6/C5 동시활용 균주 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 형질전환을 위한 선별표지, 영양요구성 변이주, 자기복제서열의 확보 및 특성분석 ▪ 유전자 발현 toolbox 개발을 위한 프로모터의 스크리닝, 분비시그널 발굴 및 개량 ▪ 유전자 integration 및 plasmid 형태로 외래단백질 발현 분비생산 확인(리파제, β-glucosidase) ▪ KM in vivo recombination 시스템 활용 효소 유전자 초고속 개량시스템 개발 ▪ KM proteome 및 secretome 분석 ▪ KM 단백질분비융합인자 발굴 및 제조 ▪ 재조합단백질 고분비생산 기술(CalB, 섬유소분해효소 β-glucosidase(SfBGL1), EPG 등 분비 발현) ▪ 재조합 리파제 생산 기술 기술이전

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 효소 표면발현 시스템 구축 ▪ 바이오매스 당화효소 활성 개량 및 효소 카테일 제조 ▪ 바이오매스 당화 최적화 기술 개발 ▪ Xylose 활용균주 개발 ▪ Xylose isomerase 분비 발현을 통한 C5/C6 동시활용 균주 개발(특허출원) ▪ 바이오에탄올 및 유용 바이오케미컬 생산용 CBP 균주 개발
KM 합성생물학 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오매스 분해/전환효소 초고속 활성 분석 확립 ▪ 구조기반 단백질공학 적용 연구 ▪ CBD 대사복합체 개발 ▪ 1,4-BDO 합성 대사복합체 구축 ▪ CBD등 대사복합체의 검증 및 in vitro 특성조사 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오매스 분해/전환효소 구조 비교분석을 통한 모델형 단백질설계 및 개량연구 수행 ▪ 유전자회로 이용 효소활성을 초고속 분석 합성생물학 기술 개발(GESS기술) ▪ 합성생물학적 Metabolosome 구축을 위한 Protein Body기술 개발 ▪ CBD 대사집적체 이용 효소안정성 및 특성규명 연구 ▪ CBD 대사집적체 이용 연속반응 생합성 수행 및 효율분석 ▪ 효모 세포 내 CBD복합체 형성 ▪ 1,4-BDO 합성효소 4종의 LZ융합단백질 유전자 합성 및 발현 ▪ CBD 대사집적체 이용 효소안정성 및 특성규명 연구 ▪ CBD 대사집적체 이용 연속반응 생합성 수행 및 효율 분석 ▪ 대사복합체를 이용하여 숙신산 및 바이오부탄올 생산 검증
1,4-BDO 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1,4-BDO 경로유전자 합성/재설계 ▪ 1,4-BDO 생합성 경로 디자인 ▪ 생합성경로 핵심 유전자 도입 및 발현 최적화 ▪ 대사공학 및 시스템 생물공학 기법에 의한 균주 재설계 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 균주에서 고부가 바이오신소재 (1,4-BDO) 생합성 경로 핵심 유전자 확보 및 유전자 도입 균주 개발 ▪ 1,4-BDO 생산을 위한 핵심 전환효소 4종 확보 ▪ 1,4-BDO 생합성 유전자 조합 KM 발현 최적화를 위한 연구 ▪ KM균주의 genome library 구축을 통한 1,4-BDO 내성 균주 선별 기술 개발 ▪ 1,4-BDO 내성 균주(E. coli) 이용 1,4-BDO 생산 균주 개발 ▪ <i>In silico</i> simulation 을 이용한 1,4-BDO 생합성 핵심 효소 개발 및 개량 ▪ TCA cycle 강화를 통한 1,4-BDO 기질 생성 강화 ▪ Anaplerotic 경로 강화 통한 TCA 중간체 생성 강화 ▪ 1,4-BDO 소모 경로 차단 통한 1,4-BDO 생산 강화 ▪ 1,4-BDO 발효 공정 최적화(1,4-BDO 50g/L 생산)
Lactic acid 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 이눌린 활용 KM lactic acid 생산균주 개발 ▪ 내산성 효모 발굴 및 LA 생산 균주 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이눌린 기반 L-lactic acid 및 D-lactic acid 생산 KM 균주 개발(생산농도 148 g/L) ▪ 비식용 섬유소 기반 lactic acid 생산 CBP 균주 개발 ▪ 대사공학적 개량을 통한 LA 생산성 개선

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내산성 효모 균주 발굴 ▪ Lactic acid 분리 정제 기술 개발 (순도 95% 이상)
바이오신소재 DFA 생산 효소 및 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 이눌린 활용 DFA III 생산 효소 및 균주 개발 ▪ 자당 및 레반을 이용한 DFA IV 생산 효소 및 균주 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이눌린으로부터 DFA III 생산용 재조합 효소(AsIFT) 생산 및 생산균주 개발(이눌린 기반 73.4% DFA III 전환) ▪ 자당 또는 레반으로부터 DFA IV 생산용 재조합 효소 및 생산 균주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 레반으로부터 효소반응 60% 전환, 발효 68.7% 전환 - 자당으로부터 단일스텝 발효를 통해 67.9 g/L DFA IV 생산
돼지감자를 활용한 바이오에탄올 및 바이오소재 생산 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 지상부 섬유소를 이용한 에탄올 발효공정 개발 ▪ 돼지감자 지하부 이눌린을 이용한 에탄올 발효공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 지상부 섬유소와 지하부를 동시에 이용한 발효 공정 개발 ▪ 돼지감자 지상부 섬유소 전처리 및 바이오에너지 전환 공정 스케일업 (500리터 규모, 에탄올 농도 60.5 g/L, 생산성 5.04 g/L/h 달성) ▪ 돼지감자 이눌린의 공급 방식 최적화를 통한 lactic acid 생산 최대화(50L 규모, LA 농도 130.4 g/L, 생산성 3.25 g/L/h 달성)

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 돼지감자 형질전환 기술 개발의 완료를 통해 내재해성 유용 유전자를 도입하고 농가재배 또는 조건 불리지역의 대량 재배를 통해서 섬유소 바이오매스 및 이눌린의 대량 공급이 가능할 것임. 국내 부족한 바이오매스 문제를 해결하고 국내 바이오에너지 및 바이오화학소재 대규모 수요시 농촌 재배를 통해 농가소득 증대 및 국내 농업의 경쟁력 강화가 가능할 것으로 예상됨.
- 효모 KM 균주를 비목재 자원을 활용한 바이오신소재 생산을 위한 플랫폼 균주로 개발하기 위해 효모 유전체 분석, 유전자 재조합 기술, 합성생물학 기술 등을 이용하여 균주의 활용가치를 대폭 향상시켜 본 연구에서 대상으로 했던 바이오에너지/바이오화학 소재 이외에도 다양한 활용이 가능할 것으로 예상됨.
- 본 연구에서 개발 목표로 한 비식용 섬유소 바이오매스 기반 바이오에탄올 생산 기술은 국내 연료의무첨가제(RFS) 시행을 대비하여 효율적인 공급 기반을 제공할 수 있을 것임.
- 효모 KM을 이용한 이눌린 활용 lactic acid 생산 기술 및 내산성 효모를 이용한 lactic acid 생산 기술은 생산성이 세계 최고 수준이며 국내 바이오플라스틱 생산을 준비하고 있는 기업에서 현재 기술검증이 진행중이므로 기술이전을 통한 활용이 예상됨.
- KM 균주가 특이하게 1,4-BDO에 대한 저항성이 낮아 초기 목표로 했던 1,4-BDO의 생산은

산업균주 대장균을 이용하여 초기 목표 수준을 초과 달성하였으며 참여기업인 삼성전자에서 사업화를 고려하고 있음. 또한 다양한 환경시료로부터 신규 효모를 다수 발굴하였고 이들 중 1,4-BDO에 대한 내성을 갖는 효모가 다수 발굴되었으므로 추가 연구를 통해서 1,4-BDO의 생산 연구를 진행할 예정이며 생산성을 더욱 향상 시킬수 있을 것으로 예상됨.

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표 -----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	25
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	419
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	423
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	424
제 7 장	참고문헌 -----	425

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

□ 농업바이오매스 활용 바이오에너지 및 바이오신소재 생산기술 개발 필요성

○ 바이오매스 경제시대 도래: 석유자원 고갈 및 국제환경규제로 인해 기존 석유화학산업을 대체할 수 있는 농업 바이오매스 기반의 저탄소 대체원료 개발기술이 미래 세계경제에 결정적 영향을 미칠 핵심기술로 부상(NIC' s Global Trends 2025)

○ 화석연료 고갈 및 기후변화에 대한 국가적 대응전략: 농업 바이오매스 기반의 에너지 및 바이오화학 산업 육성을 통하여 신성장 동력 확보와 고효율 저탄소 사회 구축 필요

- 다양한 농업 바이오매스로부터 석유화학 대체 물질을 생산하는 과정은 전체 CO2 생산을 증가시키지 않는 환경 친화적 기후 변화 대응책의 일환

- 정부의 '20대 전략, 100대 과제' ('08.10) 중 녹색성장 분야 및 과학기술기본계획(577 Initiative)' 에서 '글로벌 이슈 관련 연구개발 추진' 중 중점육성기술(신·재생에너지 기술)과 연계, 신재생에너지 보급 활성화를 통해 2030년 1차 에너지 중 비중을 11% 수준 확대 - 특히 바이오분야는 3.4%로서 현수준 대비 19배 증가 목표

- 제3차 신재생에너지 기술개발 및 이용, 보급 기본계획('08. 12): ' 12년 이후 신재생연료 의무보급제도(RFS) 도입계획 (바이오에탄올 사용비율 ' 15년 3.1%, ' 20년 4.9%, ' 30년 10%)

○ 저탄소 녹색성장 견인: 농업 바이오매스 산업 육성을 통하여 "국가 농업 경쟁력 확보 및 미래 성장산업 기반확보 필요

- 화석연료에 비해 고용창출효과가 최대 100배에 달하는 바이오에너지 및 바이오화학 산업의 육성을 통해 한미 FTA, 농산물 시장 개방확대로 위기에 처한 국내 농촌경제의 활성화

- 바이오에탄올 시장은 가솔린 시장의 약 6%까지 성장하고 있으며, 2020년에 1500억불이상까지 성장이 예측(Global Bioenergy Markets, 2008)되며 국내시장도 2015년 E10도입시 1조 시장이 예측

- 농업 바이오매스 기반 석유화학 대체 시장은 2015년 전체 화학소재 시장의 약 10 ~ 15%(165조원 ~ 330조원)를 점유할 것으로 기대되고 있으며(지식경제부, 2008). 지속가능 석유대체 바이오화학 제품의 발굴 및 생산기술 개발전략이 필요

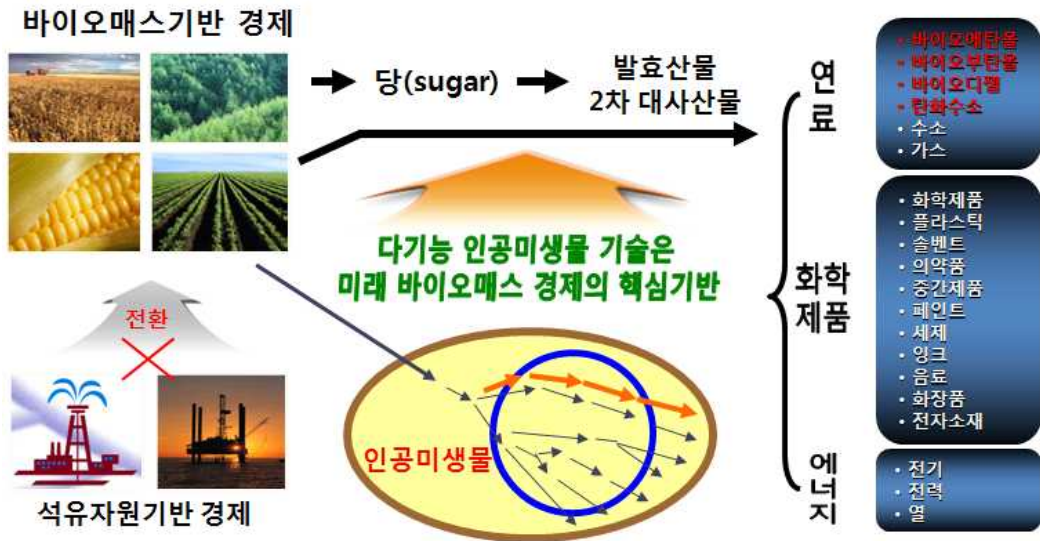
- 따라서 미활용 농업 바이오매스의 발굴과 바이오에너지 및 석유대체 바이오화학 제품 생산을 위한 미생물기술 개발은 지속가능한 바이오경제의 핵심적 기반이 될 것임.

□ 돼지감자 활용 필요성

○ 농가소득 증대용 한국형 바이오매스 작물 필요: 농촌인구의 고령화로 인한 농업구조 및 농업생산력 저하문제와 한미 FTA 등으로 인해 점진적으로 경쟁력을 상실하고 있는 국내 농업 현실을 고려하여 농촌경제 활성화가 가능한 한국형 바이오매스 작물개발이 필요함.

- 반복적인 석유 파동 및 곡물 파동에 대비한 식량 및 바이오매스 문제를 해결할 대체 작물이 시급히 필요

- 바이오매스 경제 시대를 대비한 적절한 바이오매스 작물을 선택하고 저탄소 녹색성장 기틀 마련과 농촌경제 활성화 필요



○ 돼지감자(Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus* L.): 돼지감자는 비식량작물로서 서리 및 다양한 식물병에 강하고 건조지역 등 기후 적응력이 강하여 우리나라 기후에 잘 맞고 재배가 쉬어 재배 불리 지역 및, 저 노동력으로 생산 가능한 대체 작물로 적합함.

돼지감자(Jerusalem artichoke)



지상부 섬유소 바이오매스



지하부 돼지감자(이눌린)

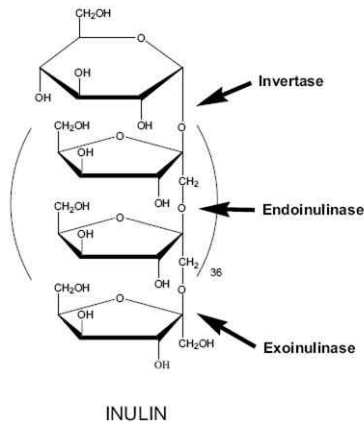


<돼지감자 재배 상태 및 수확 전후 모습>

- 평당 수확량이 감자, 고구마에 비해 3~4배 이상 월등히 우수한 비식용작물임(수확량 감자 2,813kg/10a, 고구마 1,670kg/10a, 돼지감자 9,000kg/10a, 자체시험재배 및 농림수산식품 통계연보, 2008)
- 80년대부터 90년대 초반까지 실제로 에너지 작물로서의 개발을 위해 많은 연구들이 수행된 바

있음.

- 돼지감자의 저장성분인 이눌린(inulin, fructose중합체)의 우수한 약효로 인하여 당뇨 등의 건강 식품, 차, 제과용 식품소재, 화장품 보습제, fructose syrup, ethanol 등의 다용도로 이용 가능하여 규모는 작지만 많은 재배농가들이 있음.
- 돼지감자는 2~3 m 생육 가능하여 지상부 바이오매스는 섬유소 자원으로 바이오에탄올 원료로 활용 가능하고 또한 축산 사료로도 이용 가능함. 돼지감자 괴경은 15-20% 정도의 수용성 이눌린(β -2,1-D-fructose polymer)을 함유하며 바이오에탄올 생산 공정이 전분당 이용시 보다 용이함.
- 돼지감자의 영양변식 기관인 괴경은 고온에서 저장이 불가능하고 실제이용 부위인 종서의 양이 많이 필요하고 다른 중요한 점은 매개병충 및 지속적인 재배에 의한 종서의 퇴화 관리가 절실함.
- 따라서 대규모 바이오매스 확보를 위한 원활한 재배를 위해 무병 우량종서 공급이 필수적이며 이미 씨감자에서 확인된 바와 같이 조직배양을 통해 우량종서의 공급이 가능함.



KMITL Sci. Tech. J. Vol. 7 No. S2 Nov. 2007

Table 1 Major components in Jerusalem artichoke tuber juices

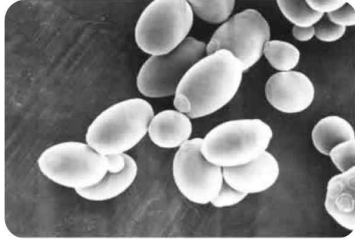
Composition	Amount	Composition	Amount
Moisture (%)	77.7	Minerals	
Total soluble solid (°Brix)	19.5	- nitrogen (mg/l)	2,431.3
Total sugar (g/l)	256.3	- phosphorus (mg/l)	2,491.8
Reducing sugar (g/l)	21.0	- magnesium (mg/l)	273.8
Inulin (g/l)	189.0	- sodium (mg/l)	182.7
Phenolic compound (g/l)	1.3	- zinc (mg/l)	1.9

<돼지감자 조성 및 이눌린의 구조>

□ 바이오에너지 및 석유대체 물질 생산용 플랫폼 효모 *Kluyveromyces marxianus*(KM)

○ 고온성 효모 KM 균주의 특성

- KM (*Kluyveromyces marxianus*)은 비전통 효모(non-sacharomyces)의 일종으로 hemiascomycetous yeast이며 lactose 발효능이 뛰어나 유가공 제품에 주로 존재하므로 인체에 매우 안정적이며 미국과 유럽에서 GRAS(Generally regarded as safe), QPS(Qualified Presumption of Safety)로 알려져 있음.
- 최근 KM은 고온에서의 빠른 성장능력(doubling time, ~70 분)과 값싼 탄소원을 활용하여 바이오에탄올 및 대사물질 생산능력이 뛰어나 바이오매스 기반의 바이오에너지 및 플랫폼화합물 생산 균주로서 최근 이목이 집중되고 있음(Lane and Morrissey, Fungal Biology Reviews, 2010).

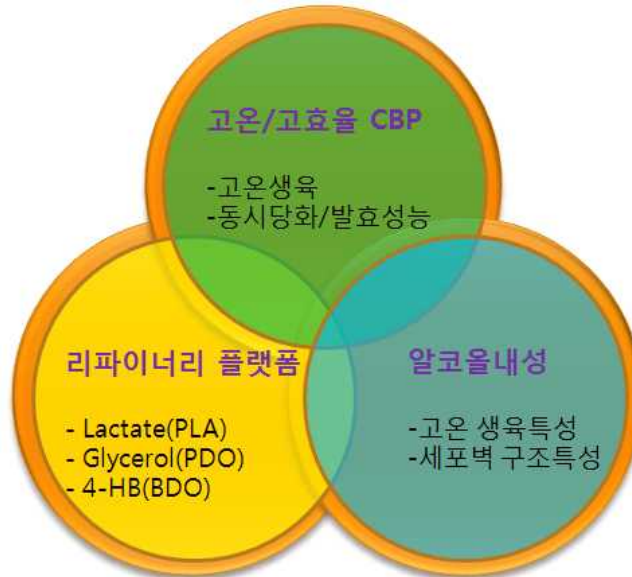


<KM 사진 및 다양한 효모균주의 특성비교>

○ 고온성 효모 KM 균주의 산업적 활용

- 바이오에탄올 생산을 위해 일반적으로 사용되는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 많은 연구가 진행되어 있으나 생육온도가 35도를 넘지 못하고 오탄당을 포함한 탄소원의 활용능이 낮아 바이오에탄올 생산비용이 높은 단점이 있음. 반면 KM 균주는 52도까지 고온성장이 가능하고 lactose, inulin, cellobiose 등의 다양한 다당류의 활용이 가능하고 오탄당 활용능도 매우 우수함. 그러나 유전체 분석연구 등 기초연구는 주로 *Kluyveromyces lactis*에 집중되었고 산업효소 생산 등의 응용연구는 주로 KM을 활용됨.

- 효모 *S. cerevisiae*나 *K. lactis*에 비해 기초연구가 부족하지만 다양한 genetic tool이 개발되어 있고 대사공학적인 균주개발이 가능성이 입증되어 있음(Bartkeviciute et al., 2000, Siekstele et al., 1999).
- 특히 Cargill-Dow사(Naturework사)에서 옥수수로부터 생분해성 바이오폴리머의 원료인 lactic acid를 생산하기 위한 생산균주로 활용. PLA는 aliphatic polyester로서 starch와 섞어 생분해성 플라스틱의 생산단가 절감을 위해 사용중임.
- 미국 생분해성 플라스틱에 대한 수요는 연평균 16% 성장률을 기록해 2012년에 7억2천만 파운드(약 9억달러)에 이를 전망. Natureworks사는 이 분야의 선도업체로서 향후 5년 이내 바이오플라스틱 시장은 약 500억 파운드에 이를 것이며 전세계 플라스틱 시장의 10% 비중을 차지할 것으로 전망함(Plastic News, 2009).
- 몇몇 사례에서 검증된 바와 같이 고온성 효모 KM은 바이오에너지/바이오화학 분야에서 세포공장 플랫폼 균주로서 활용할 가치가 매우 높으며 전세계적으로 아직 본 균주에 대한 초기연구단계에 있으므로 유전체 분석을 포함한 옴믹스 연구, 유전자재조합, 합성생물학 연구 등을 통해 효모 KM 세포공장 platform연구에 집중적인 연구개발이 진행하면 국내 바이오화학 산업을 활성화하고 본 균주의 세계적 기술허브로서 역할을 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 특히 효모 KM은 inulinase의 활성이 매우 뛰어나 본 연구에서 타겟으로 하는 바이오매스인 돼지감자 이눌린을 효율적으로 분해하고 다양한 바이오연료 및 석유대체 화합물 생산이 가능함.



<KM 리파이너리 플랫폼의 유용성>

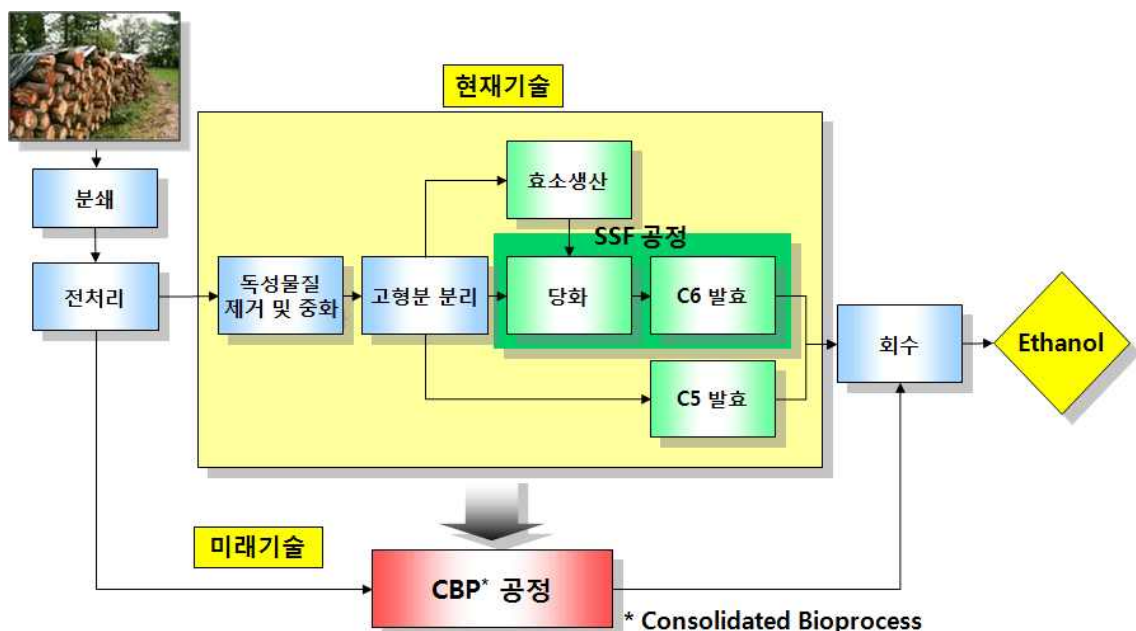
□ 고온성 CBP 바이오에탄올 생산기술

○ 고온성 효모 KM 균주의 특성

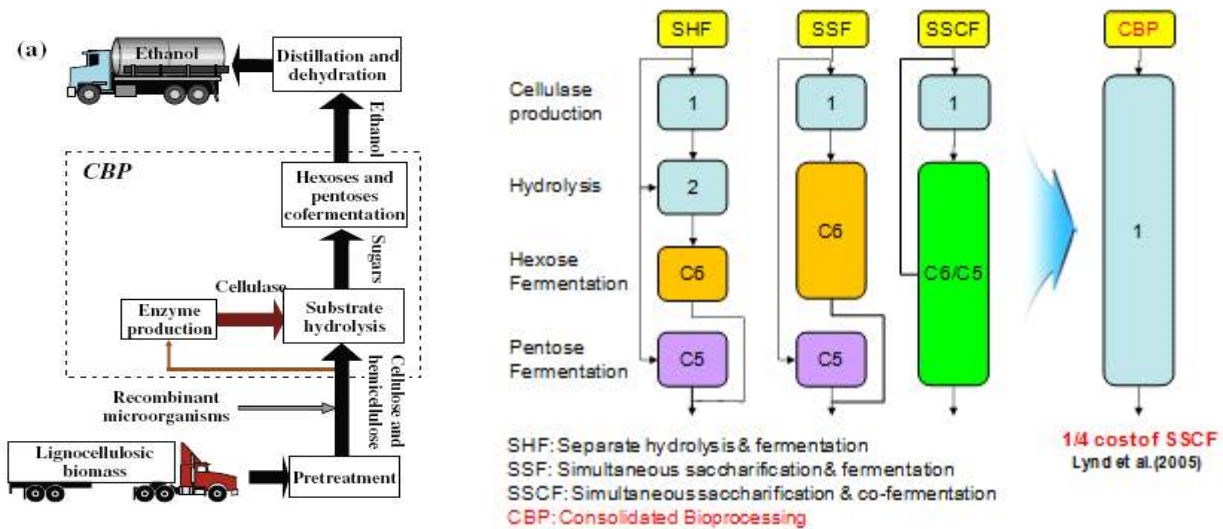
- 현재 섬유소 바이오매스로부터 바이오에너지 생산공정은 전처리/효소생산/당화/발효 등 다단계 공정(그림 참조)으로 나뉘어 대규모의 장치비 및 운영비를 필요로 하고 있으나 이러한 기능을

통합 수행할 수 있는 consolidated bioprocess(CBP)의 경우 생산비용을 약 50% 이상 절감할 수 있음(Lynd et al., 2006).

- CBP 기술은 섬유소 분해효소의 생산, 섬유소 가수분해, C5/C6 동시발효 과정을 하나의 리액터에서 수행하는 공정으로서 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에탄올 및 화학원료 생산을 위한 가장 경제적인 공정으로 관심을 받고 있음.
- 미국 Mascoma사는 *S. cerevisiae*와 *Clostridium thermocellum* 두 개의 균주를 이용한 CBP 균주 개발을 진행하여 thermophilic bacteria로부터는 약 6% 에탄올 농도 결과를 얻었고, 또한, *S. cerevisiae*의 cellulase 발현을 3,000배 증가시켰다고 발표함.
- 미국 Qteros사 역시 *Clostridium phytofermentans*를 이용한 CBP 균주개발을 진행하고 있음.
- 이러한 CBP 기술개발의 핵심은 섬유소 바이오매스 분해 및 활용능을 보유한 고성능의 효모 개발이 필수적인데 효모 *S. cerevisiae*를 이용한 CBP 균주 개발의 한계는 섬유소분해효소의 최적온도가 약 45-50°C 이지만 *S. cerevisiae*의 생장이 35°C 이상에서는 불가능하기 때문에 바이오매스의 분해와 알콜발효가 동시에 이루어 질수 없는 문제가 있음.
- 이에 반해 고온성 효모 KM은 최고 52°C 도까지 생장이 가능하므로 CBP 바이오에탄올 생산 균주로서 KM이 매우 적합함.



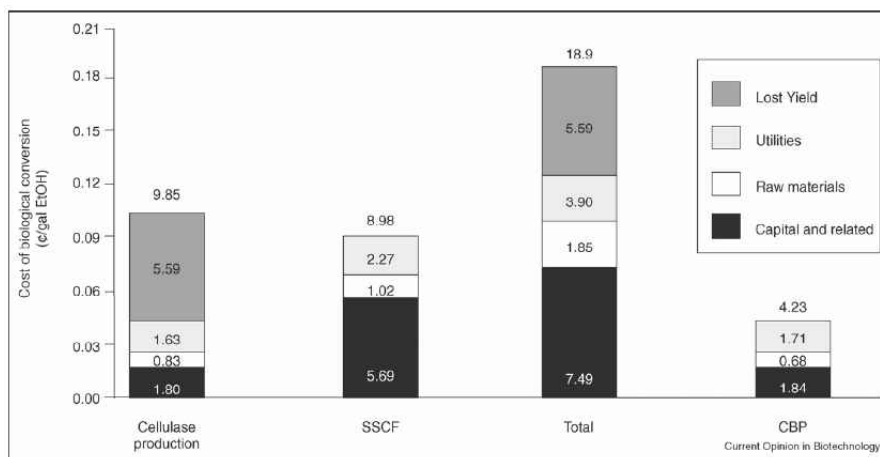
<기존 다단계 바이오에탄올 생산공정 및 CBP공정의 비교>



<바이오에탄올 생산 CBP 모식도>

Fu & Holtzapple, Bioresource Tech. 2010, 101:2825-2836

Lynd et al., Biotechnol. Prog. 1999, 15:777-793



The comparative cost of ethanol production by consolidated bioprocessing (CBP) and by simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) featuring dedicated cellulase production. Processes are simulated assuming aggressive performance parameters intended to be representative of mature technology. Cellulase production: yield, 400 FPU (filter paper unit)/g carbohydrate; productivity, 400 FPU/L/h. Hydrolysis and fermentation yields are set at 95% of the theoretical value for both CBP and SSCF. The SSCF reaction time is 7 days. Savings in the SSCF reactor accompanying reaction times less than 7 days are completely offset by the increased enzyme costs associated with higher cellulase loadings required to achieve shorter reaction times. The CBP reaction time is set at 1.5 days, consistent with the expectation of higher hydrolysis rates (see text). If the reaction time were increased to 3 days, the cost of CBP increases from 4.4 c/gallon to 5.5 c/gal. (Simulations were carried out using ASPEN-based models based on the modeling framework developed at the National Renewable Energy Laboratory [55,56], with modifications for mature technology as described elsewhere [2].)

<기존 공정과 CBP공정의 공정비용 비교>

Lynd et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2005, 16:577-583

□ 연구성과 목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	2					2		1	학회 발표
	달성	2	2				2			5
2차 년도	목표	5	1				2	3	2	
	달성	4	1				1	4	1	7
3차 년도	목표	6	2				2	5	2	
	달성	9	-				3	9	-	5
4차 년도	목표	6	3				2	5	-	
	달성	8	4				2	3	2	5
5차 년도	목표	6	3				2	5		
	달성	13	7				2	4		5
계	목표	25	9				10	18	5	
	달성	36	14				10	20	3	

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1		5	3
	달성	1+2건	진행중		7	1

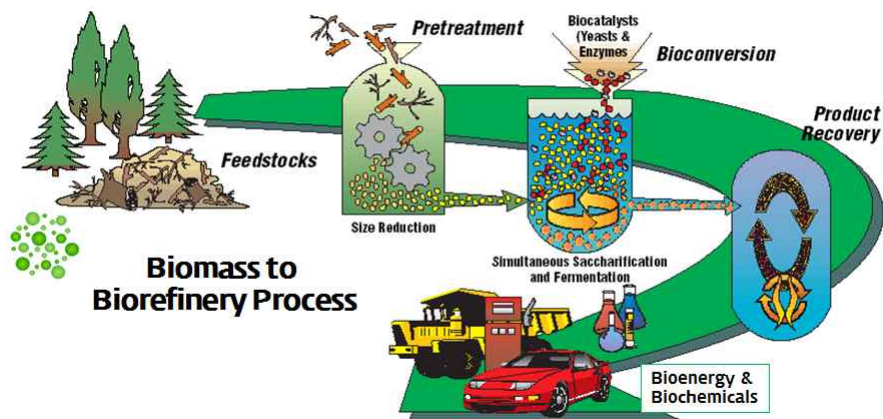
기술이전 내역

1. 생물축매 리파제를 이용한 바이오디젤 생산 기술, (주)대경에스코, 기술료 4억5천만원(선급 5천만원)(2014. 11. 19)
2. 내산성 효모를 이용한 D-lactic acid 생산 기술, 국내 L사(기술검증 진행중)
3. 고효율 변이 리파제 및 재조합 생산 기술, 국내 A사(기술이전 조건 협상중)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

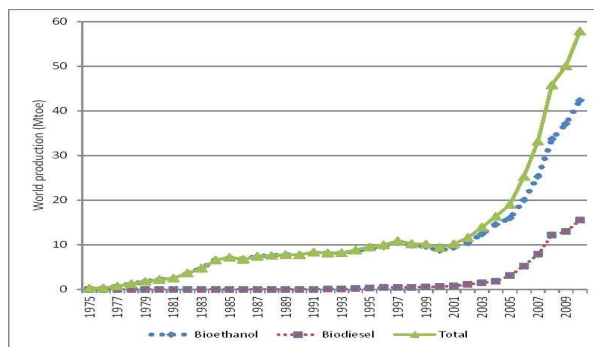
□ 바이오매스 기반 바이오에너지/화학 생산기술

- 20세기 산업혁명을 이끌었던 석유자원 기반의 경제시대가 원유고갈 및 기후변화 문제에 따라 바이오매스 기반의 경제로 전환되며 바이오매스 기반의 석유자원 대체기술이 미래 세계경제에 결정적 영향을 미칠 핵심기술로 부상함(NIC's Global Trends 2025).
- 특히, 전세계 에너지 및 화학원료 공급원의 80.1%에 해당하는 석탄, 석유, 천연가스와 같은 화석 연료 사용의 증가로 대기환경 오염과 온실가스 배출이 확대됨에 따라, 이를 쉽게 대체할 수 있는 지속성 바이오자원인 바이오매스(biomass)에 기반을 둔 바이오에너지/화학 생산이 전 세계적인 주목을 받음. 전체에너지 사용량의 27%, 온실가스 배출량의 30%를 차지하는 수송용 연료의 사용량은 계속 증가하고 있어 이를 대체할 수 있는 지속가능 바이오연료 개발이 필요하며 2018년 약 1,000 억불 이상의 시장을 형성할 것으로 예상됨(Global Bioenergy Markets, 2008).
- 비식용 바이오매스 기반 바이오에너지/화학 생산이 재조명되고 각광받고 있는 것은 불확실성이 강한 원유에 대한 의존도를 줄이고 에너지원 및 원료원의 다변화를 통해 에너지 안보를 강화하고 화석 연료에 비해 대기오염물질의 배출이 적고, 원료재배 과정에서 온실가스를 감축하여 환경오염의 문제를 해결하는데 주목적이 있음. 또한 원료작물을 생산하는 경우 농가소득을 증대하여 사회 균형 발전에 기여할 수 있기 때문임. 지속가능한 바이오매스 자원을 활용한 바이오에너지/화학 생산기술은 수송용 바이오연료 및 석유화학 대체 친환경 화학제품의 생산과 같은 실용화가 가능한 바이오 창조경제의 핵심기술임.



[바이오자원에서부터 바이오에너지/화학 제품 생산]

- 현재까지 전 세계적으로 이용, 개발되고 있는 대표적 바이오에너지는 각각 경유와 가솔린을 대체할 수 있는 바이오디젤과 바이오에탄올임. 선진 각국은 금세기에 닥칠 석유자원 고갈에 대비하여 바이오매스/에너지 기술을 국가 정책적 관점에서 집중개발하고 바이오연료 도입계획을 수립하고 있음. 미국은 2030년 까지 자국의 가솔린 사용량의 30%를 바이오에탄올로 대체하려는 계획을 발표함. 유럽연합은 강제 휴경지에 바이오 연료 작물의 재배를 허용하고 세제혜택 및 보조금 지원, 최소혼합비율 의무화 등의 적극적인 지원 정책을 실시하여 2020년 까지 바이오 연료 비중을 20%까지 확대하여 에너지 문제에 대응하고자 함. 중국 역시 국가 운송수단의 16%는 E10 (10% 에탄올 함유)으로 사용할 정책을 발표하였으며 브라질은 에탄올 연료 상용화의 선두국가로, 2008년 2%, 2013년 5% bioethanol 이용을 목표로 설정한 바 있음.



[전세계 바이오에너지 생산량 변화]

- 국내에서도 2차 에너지기본계획('14. 1)을 통해 신재생에너지보급확대를 위해 ' 35년 신재생 에너지 보급률 11% 달성목표를 두고 있으며 신재생에너지중 바이오가 차지하는 비중이 약 18%에 해당함. 또한 이미 바이오디젤을 경유에 2% 첨가해서 사용하고 있지만 연료혼합 의무화 제도(RFS, Renewable Fuel Standard) 계획에 따라 '15년 바이오디젤 2.5%, '17년 바이오디젤 3.0%가 확정되었으며 바이오에탄올의 의무사용은 도입 시기를 지속 모색중임. 국내 바이오에탄올 3% 도입이 시행될 경우 약 30만톤의 바이오에탄올 공급이 필요하며 이를 위해서는 건조중량 150만톤의 바이오매스가 필요함.

【 1차 에너지 기준 원별 보급 목표 (%) 】

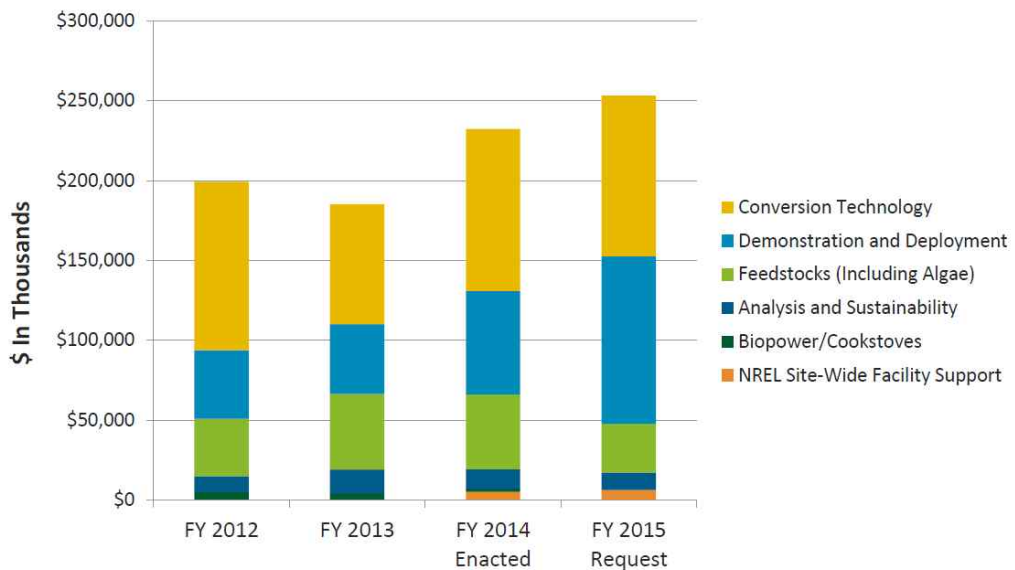
에너지원	태양광	태양열	풍 력	지 열	폐기물	바이오	수 력	해 양
2020년	11.1	1.4	11.3	2.5	47.3	17.6	6.3	2.4
2025년	13.3	3.9	12.5	4.6	40.2	19.6	4.3	1.6
2035년	14.1	7.9	18.2	8.5	29.2	17.9	2.9	1.3

○ 바이오에탄올은 사용 원료의 특성에 따라 다음 표와 같이 1세대와 2세대 바이오 에탄올로 분류되고 있음. 1세대 바이오 에탄올의 원료가 되는 사탕수수, 옥수수, 밀 등은 식량과의 경쟁체제에 놓여 있어 곡물가격의 상승을 가져오는 본질적인 문제를 안고 있음. 따라서 나무, 잡초, 농·임업 부산물 등과 같은 비식량 섬유소계 바이오매스 자원을 활용한 제2세대 바이오연료 생산 연구가 최선의 대안으로 받아들여지고 있음.

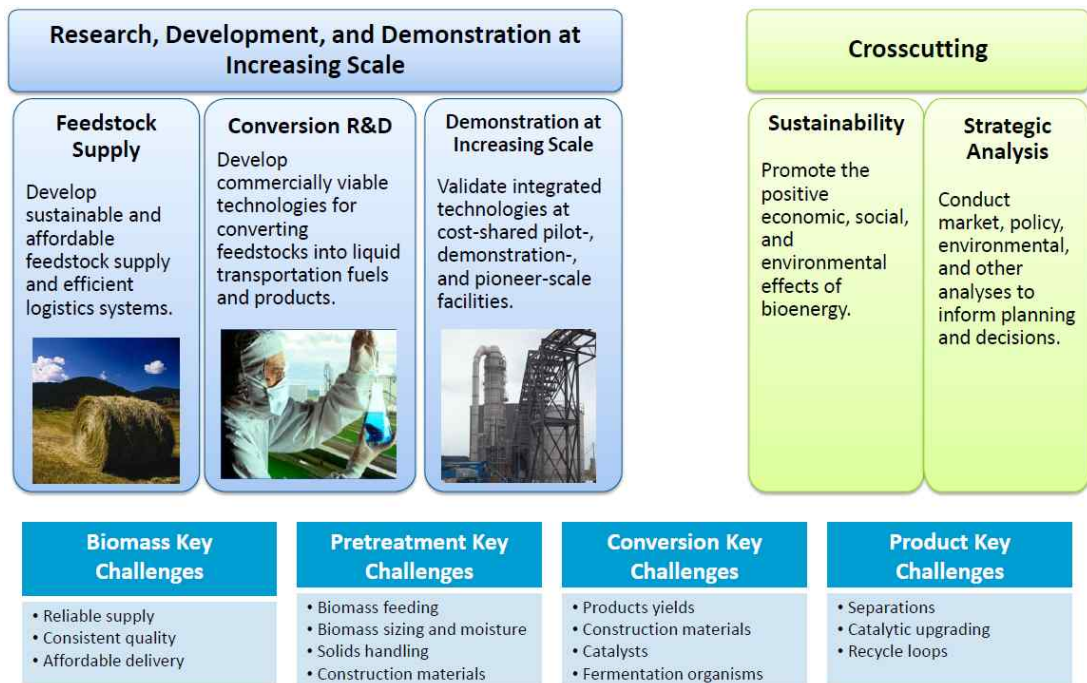
○ 비식용 바이오매스의 개발 및 활용 기술 필요

- 바이오에너지/화학 생산에 옥수수, 사탕수수 등의 당질계 바이오자원을 이용할 경우, 향후 곡물자원의 부족과 곡물가격 상승으로 인해 바이오에너지/화학 시장 확대의 제약요인으로 작용할 가능성이 높음. 따라서 바이오에너지 및 지속가능 화학산업을 확대하는 동시에 곡물가격의 안정화를 위해 곡물자원과 경합이 없는 비식용, 비사료용 섬유질계 및 미세조류와 같은 지속가능 바이오자원으로 원료를 다양화할 필요가 있음.

- 2세대 바이오매스 자원인 비식용 바이오매스 자원을 활용한 바이오에너지 생산 기술은 전세계적으로 아직 기술 성숙도가 낮아 원유가 대비 생산 비용이 아직 높음(\$2~3/gallon). 이러한 문제를 해결하기 위하여 미국 DOE 에서 2세대 바이오에너지원인 섬유소 바이오매스 자원과 미세조류를 이용한 바이오에너지 생산 기술에 2억5천만불 이상의 연구비를 투자하고 있음.



[그림. DOE fund for bioenergy]

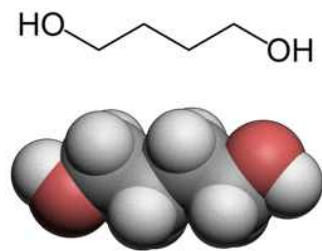


[미국 바이오에너지 연구사업 개괄, DOE]

□ 석유대체 플랫폼화합물 1,4-부탄디올(1,4-BDO) 생산기술

○ 1,4-부탄디올(1,4-BDO)

- BDO는 고기능성 폴리머, 용제, 고품질화합물 생산을 위한 플랫폼화합물이며 의류, 자동차, 전자기기 등의 다양한 산업제품에서 활용됨. BDO는 자동차 및 전자기기용 플라tm틱 폴리머인 polybutylene terephthalate (PBT)의 제조에 사용되며 또한 폴리머 유도체인 thermoplastic polyurethanes (TPU) 및 copolyester ether (COPE)의 원료로 사용됨.



<1,4-butandiol>

- BDO는 스판덱스의 원료인 tetrahydrofuran(THF) 및 polytetramethylene ether glycol (PTMEG)의 원료로 사용되며 gamma-butyrolactone (GBL)의 원료임. 이는 N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) 및 2-pyrrolidone 생산을 위한 중간체임. NMP는 전자산업에서 사용되는 고기능성 용제이며 2-pyrrolidone은 의약품제조를 위한 중간체임.

- 전세계 1,4-BDO생산량은 연간 약 100만 MT이며 2005년기준 톤당 단가는 약 US\$ 2000이며 이중 반이 스판덱스(spandex)생산을 위한 tetrahydrofuran용으로 사용되며 최대생산기업은 BASF 임.

- 2007년 수요량은 약 25억 파운드이며 연간 100~150 파운드씩 증가추세이며 현재 세계시장 규

모는 3조원에 달함. BDO의 생산은 전량 석유기반 화학공정을 통해 생산되고 있음.

- 미국의 Genomatica사는 재조합 대장균을 이용하여 당으로부터 1,4-BDO 생산기술을 개발하였으나 아직 생산성이 매우 낮음(32,000 BTU per pound of 1,4-butanediol (75 MJ/kg)), 그러나 2013년부터 상용화를 목표로 하고 있음.
- 석유화학공정으로 생산되는 BDO의 가격은 원유가에 의존하여 가격 변동폭이 ton 당 \$1,500에서 \$2,400 사이로 크므로 고온성 KM platform기술을 활용, 안정화된 바이오 공정기술을 확보하여 비식량 자원인 돼지감자로부터 생산하게 되면 가격경쟁력이 있는 1,4-BDO 대량생산 및 상업화가 가능함.

□ 바이오폴리머 PLA용 젖산 생산기술

○ Lactic acid

- 젖산은 1780년 우유에서 처음으로 분리된 이후 1881년 CE Avery에하여 처음으로 상업적으로 생산됨. 초기에는 네델란드의 CCA Biochem사와 미국의 Stering Chemicals사가 주요 생산업체로 CCA는 탄수화물을 원료로한 발효법으로, Stering사와 일본의 Musashino사는 화학공정법으로 생산함. 그 후 대부분 업체는 발효공정으로 전환하여 여러 가지 공정을 개발하고 있음
- PLA(Poly(lactic acid)) 소재는 2001년 미국의 Cargill사가 Dow Chemical과 공동으로 상업화에 성공한 바이오플라스틱으로 현재 가장 성공한 바이오플라스틱으로 인정받고 있는 소재임. PLA는 옥수수 전분을 당으로 이용한 발효를 통해 젖산을 생산하고, 화학공정을 통해 젖산을 락타이드로 전환한 후, 중합하여 제조한 소재로 100% 바이오매스로부터 제조된 바이오플라스틱임. PLA 소재의 특징은 강성이 우수하고, 투명성이 좋은 편이나 경직된 사슬구조로 낮은 충격강도를 보이고 낮은 결정화속도로 인해 내열성이 낮은 단점을 가지고 있음. 이와 같은 PLA의 단점을 극복하기 위해 L-form과 D-form을 동시에 사용하는 stereocomplex PLA 생산이 필요함.
- 현재 상용화된 PLA인 NatureWorks의 Ingeo PLA는 L-lactide로 제조한 L-PLA이며 D-lactide 및 D-PLA는 Purac에서 일부 생산하여 판매하고 있으나 생산량이 극히 적어 매우 고가에 판매되고 있음. 일반적인 PLA가 L-lactide를 이용하고 있는 이유는 식품 및 의료용으로 L-form의 lactic acid가 사용되고 있으므로 발효 효율도 D-form 보다는 L-form이 월등히 높아 젖산 생산기업들이 대부분 L-form의 lactic산생산하고 있기 때문임.

< Lactic acid 관련 해외연구 동향 >

미 국	<ul style="list-style-type: none"> -지속가능한 비식용 바이오매스 확보 및 활용 연구 (NREL) -식자재 폐기물 활용하는 젖산 발효 기술 (Arggone) -5탄당 발효 균주 개발 (Cargill) -5탄당 발효 균주 비식용 바이오매스 이용하는 Lactic acid 생산 플랜트 연구 (Cargill) -락타이드 증류 정제 공정 상업화 (Cargill) -고분자량 PLA 연속 생산 공정 개발 (Natureworks)
--------	---

유럽	-락타이드의 Melt-crystallization 정제 공정 상업화 (Sulzer-PURAC) -락타이드 플랜트 7만톤 규모 확장 (PURAC) -PLA 생산 플랜트 공동 추진 (Galactic-Total)
일본	-D형 젯산 생산 기술 개발, 중국에 합작 유한회사 설립 (MCI) -자체 PLA 플랜트 구축, 자동차 부속 적용 기술 개발 (Toyota) -Sc-PLA 제품 공동 개발 (MCI-Teijin) -PLA 내열성 개선, Sony 전자제품 적용 (Mitsubishi)
중국	-독자적인 PLA 중합 기술 개발 (장춘응용화학연구소)

- 국내에서도 최근 플라스틱 원료로서 젯산이 집중적으로 조명을 받음에 따라 젯산 생산의 경제성을 확보하기 위한 연구가 CJ, 삼성, 호남석유화학과 같은 식품회사와 석유화학회사를 중심으로 경쟁적으로 진행되고 있음
- 비식량자원인 바이오매스를 이용하여 젯산을 생산하는 기술은 아직 초보단계이나 최근 각 부처별 정책적인 지원으로 바이오매스 개발이나 활용연구가 활발히 진행되고 있음.
- 산업원천 (바이오매스기반 PLA, 바이오 2,3-BDO, 바이오 내열성 플라스틱), 바이오화학실용화센터 구축 등 일부 R&D 및 인프라 구축이 진행중이나 인프라 -R&D-인증-융합기술을 포괄하는 지원이 필요
- 비식량 농업자원으로부터 BDO와 같은 신소재 대량생산기술의 개발은 바이오매스 처리 및 1,4-BDO 생산 플랜트를 원료공급이 쉬운 농촌지역에 유치하여 농촌지역의 고용창출을 유도함.
- 기존에 작물 재배 기술이 확립되어 있는 폐지감자의 지상부와 지하부 모두를 이용하여 유용한 신소재의 원료로 이용함으로써 농업산물의 대량 판로를 개척하고 농가소득증대에 기여함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 바이오매스(돼지감자) 개량, 증산 및 대량생산 기술개발

1. 돼지감자의 기내 배양시스템 개발

가. 기내 배양 시스템 개발

시중에서 유통되는 돼지감자 2개 품종 (자주색, 흰색)과 중국에서 확보한 내염성 품종인 다팽품종의 기내 식물체를 유도하여 증식하였다. 기본 배지는 MS 배지를 사용하였고 16시간 광의 주기로 24도의 온도의 배양실에서 병배양에 의한 줄기 절단 증식방법으로 계대배양을 할 수 있었다 (그림 1-1A). 기내증식의 계대배양기간은 약 4주가 소요되었고 약 3배의 증식 효과를 낼 수 있었으며 대량 증식을 위하여 BAP 등의 호르몬 처리에 의한 node에서의 줄기 증식을 유도 가능할 것으로 사료되었다.

기내 소과경 실험을 시도하여 18도의 낮은 온도 조건과 9%의 sucrose 농도의 배양에 의하여 그림1-1B와 같은 기내소과경의 유도를 확인 할 수 있었다. 한 줄기에서 약 2내지 3개의 소과경이 유도되었으며 배양기간은 약 50일 이상이 소요되었다. 우량묘의 대량생산의 측면에서 고찰하여 볼 때 돼지감자의 노지 재배 시 씨감자 증식 배율이 워낙 높은 관계로 기내소과경의 생산과 저장, 그리고 파종에 의한 증식체계보다는 우량묘의 대량증식과 이의 순화과정을 거친 포트묘 생산(그림 1-1D), 그리고 이의 포장 증식에 의한 씨감자 증식체계가 현실적으로 적합한 증식 방법으로 판단되었다.

획득한 기내 돼지감자 라인들은 수년간의 관행의 재배에 의한 바이러스의 감염이 되어 있는 관계로 본 실험실에서 확립된 감자 조직배양시 바이러스의 제거방법을 사용하여 우선적으로 우량묘의 유도를 시도하였다. 30ppm 농도의 항바이러스제인 ribavirin 처리에 의하여 바이러스의 증식을 억제하며 3-5회의 연속 처리에 의하여 바이러스를 완전히 제거할 수 있는 방법을 사용하였다. 이때 그림 1-1C 에서와 같이 정상적인 조직의 생육도 현저히 저해됨을 볼 수 있다.

나. 돼지감자의 하우스, 노지 재배 및 시료 생산

돼지감자의 기내 생산기술 확립으로 우량형질의 돼지감자를 확보, 공급과 더불어 시험용 원료의 재배를 하우스에서 수행하였고 또한 한국형 에너지 작물로서 돼지감자에 대한 타당성 제고, 시범 생산 시스템 확립의 일환으로 노지 논에서의 재배를 수행하였다.

하우스 재배시 재식거리는 평당 13개의 파종간격이 되도록 파종하였고 약 4개월 후에 지상부 바이오 매스를 조사한 결과 포기당 생체중으로 약 6.2kg 의 바이오 매스를 (평당 80.6kg)

생산할 수 있었으며 이는 야콘보다 약 3.4배에 달하였고 타 작물에 비하여 월등히 우수하였다. 수확한 결과 한 포기당 평균 줄기 총무게 2.6kg, 줄기갯수 4.3개, 길이 4.5m 그리고 돼지감자 괴경 무게는 2.3kg에 달하였다. 이는 평당 돼지감자 29.9 kg, 총 지상부 줄기 33.8kg로 하우스 재배에서 평당 총 63.7kg의 바이오매스를 생산할 수 있었다(그림 1-2).

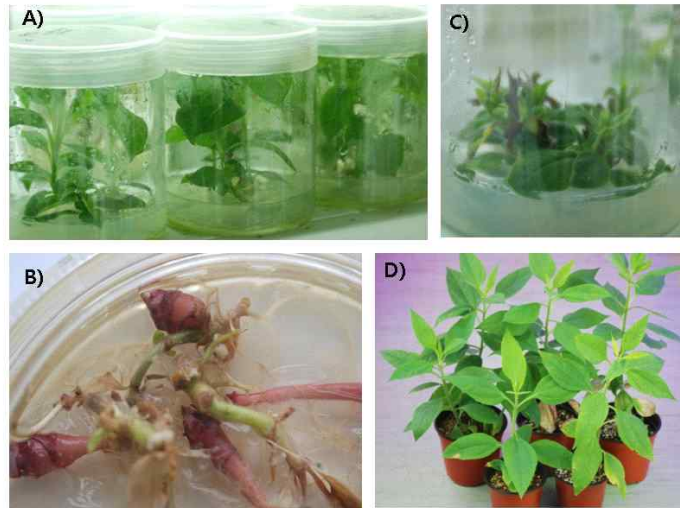


그림 1-1. 기내배양 중인 돼지감자 배양시스템과 포트묘의 모습

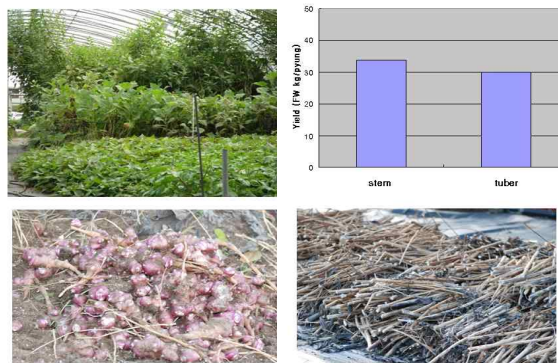


그림 1-2. 돼지감자의 하우스재배 및 수확 모습

에너지 작물로서 돼지감자에 대한 타당성 제고, 시범 생산 시스템 확립의 일환으로 논지 논에서의 약 500 평 규모의 재배를 수행하였고 휴경지 논에서 옥수수를 심었을 경우와 바이오매스의 비교 실험을 수행하였고 (그림 1-3A) 재배, 수확한 시료의 기계 수확 방법, 세척기를 사용한 세척 및 건조 방법 등의 시험을 수행하였다 (그림 1-3D).



그림 1-3. 노지재배 및 수확기계를 사용한 수확 그리고 건조기를 사용한 건조

돼지감자의 수확량은 전년도에 비해 50%의 수확량 밖에 미치지 못했는데 이는 2010년도 여름철과 가을에 비가 많이 와서 반이상의 돼지감자 줄기가 넘어져서 썩은 결과로 인하여 제대로 수확이 이루어지지 않은 결과로 해석된다. 구근류 수확기계를 사용하여 그림 3B에서와 같이 수확한 돼지감자는 세척, 절단 후 건조기에서 건조하여 분말로 하여 냉동보관하여 시료로 제공되었다. 똑같은 재배 조건으로 노지에서 재배한 결과 수확시 줄기의 생체중은 옥수수 평균 평당 20.7 kg 으로 돼지감자와 유사하였으나 옥수수 수확량은 4.1 kg이었고 돼지감자는 14.8 kg으로 3배 이상 많았고 건조 중량에서도 옥수수보다 2.5배 수확량이 많았다 (그림 1-4). 실험의 재식밀도는 옥수수는 평당 33주, 돼지감자는 13주의 밀도로 재배되었다.

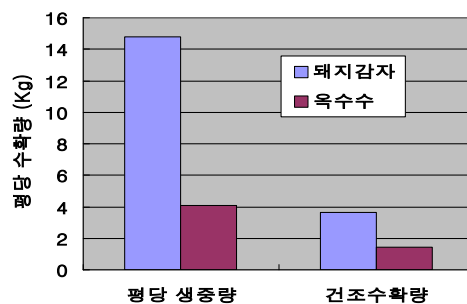


그림 1-4. 노지 재배에서 옥수수와와의 수확량 비교

2. 돼지감자의 재분화 조건 구명 및 형질전환 원천기술 개발

바이오매스 개량을 위해 필수적인 돼지감자의 형질전환 체계확립을 위한 재분화 조건을 구명하기 위하여 잎의 발달 단계별 혹은 잎의 부위별, internode 등의 캘러스 생성, shoot 분화 효율 등을 비교하였고 재분화 효율향상을 위한 적정 배지, 호르몬 등의 조성의 연구도 시도하였다.

가. 돼지감자의 재분화 체계 확립

현재 2, 3년차에 걸친 다양한 실험에 의하여 형질전환시 활용이 가능한 70%를 상회하는 충분한 효율의 재분화 조건을 확립하는데 성공하였다.

(1) 다양한 호르몬 조합 및 명/암 배양 실험

(가) 치상 재료

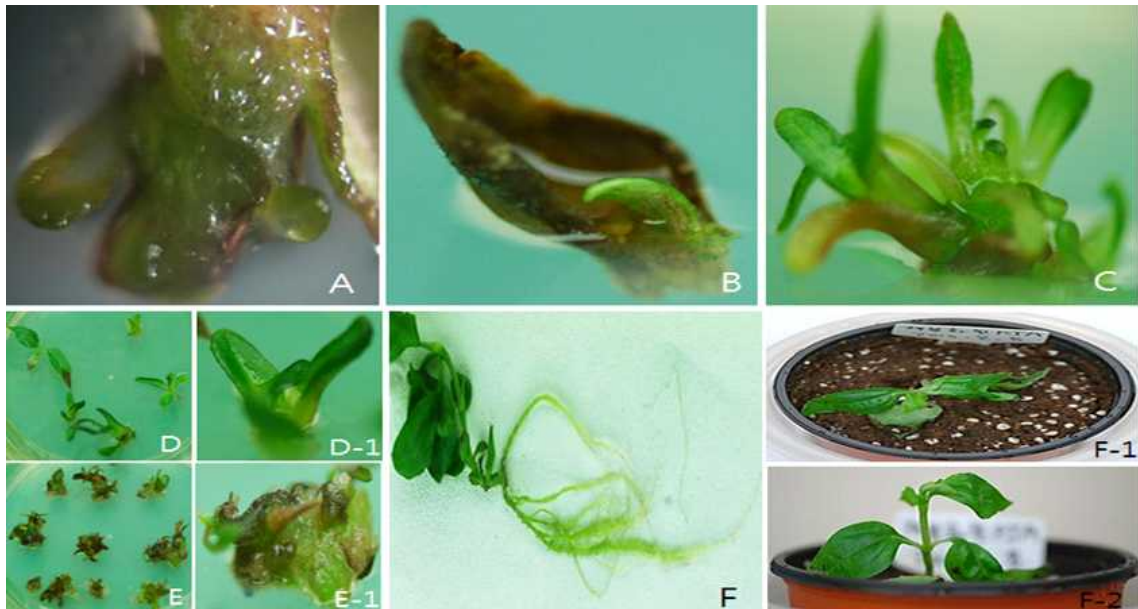


그림 1-5. 돼지감자의 재분화 사진. A) 암 배양 4주 후; B) 명 배양으로 옮긴 후 1주 후; C) 명 배양 4주 후; D),D-1) 유식물체;E),E-1) callus; F),F-1),F-2) rooting 후 pot로 이식

돼지감자 (PJA) 잎을 3S 배지에 치상하여 암 배양(light/dark,0/24)하였다. 배양 4 주후 유기된 callus에서 재분화 된 유식물체를 얻었다 (그림 1-5). 재분화 된 식물체들은 callus에서 떼어 내어 광주기가(light/dark,16/8) 인 성장상에서 각각 독립적으로 생육시켰다. 재분화 된 식물체들은 계대 배양을 통하여 line을 유지 하였으며, 잎은 실험 재료로사용 되었다.

2013. 7 월부터 3s유래 재분화 식물의 잎으로 치상 시 재분화율이 현저히 떨어졌다. 그 원인을 1. 식물 개체 간 재분화 능력의 차이로 인한 것이거나 2. 계대 배양 회수가 많아짐으로써 재분화 능력을 상실하는 것으로 생각하였다. 식물 개체 간 재분화 능력의 차이를 알아보기 위한 실험 실시하였는데 재분화 식물 35개체의 잎을 개체별로 1 dish 당 25 explants를 3s 배지에 치상한 후 4주간 암배양 하여 재분화 율을 조사하였다.

재분화 된 식물 35개체 중 재분화가 된 개체가 없었다. 이와 동시에 wild type에서 재분화 개체를 얻기 위한 실험을 아래의 표에서와 같이 실시하였다.

명배양, 잎 치상

배지 조성	치상개수	재분화유무
3s	12	X
2.4-D 1 mg/l	12	X
KI 0.2 mg/l	12	X
IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l	12	O

암배양, 잎 치상

배지 조성	치상개수	재분화유무
3s	600	O
2.4-D 1 mg/l	12	X
KI 0.2 mg/l	12	O
IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l	12	X

명 배양, 줄기 치상

배지 조성	치상개수	재분화유무
3s	12	X
KI 0.2 mg/l	12	X
IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l	12	X

암 배양, 줄기 치상

배지 조성	치상개수	재분화유무
3s	12	X
KI 0.2 mg/l	12	X
IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l	12	X

선행 연구에서 3s 배지에서 4주간 암배양 하여 재분화 개체를 얻었기 때문에 3s 배지에 wild type 식물의 잎을 사용하여 600 개의 explants를 치상하여 배양 하였다. Karadag et al(2013)의 문헌에서 돼지감자 줄기를 이용하여 KI 0.2 mg/l, IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 의 호르몬 배지에서 명배양 한 결과 재분화율이 가장 좋았다는 결과를 토대로 잎과 줄기를 치상하

여 명 배양과 암배양을 각각 처리 하였다. 또한, somatic embryogenesis 에 필요한 조건인 세포 내 옥신의 농도를 높여주기 위해 2,4-D가 첨가된 배지에 explants를 치상하여 암배양 하였다.

배양 4주 후 KI 0.2 mg/l 가 첨가된 배지에 잎을 치상하여 암배양한 조건에서만 somatic embryogenesis를 통한 재분화 개체가 유도되었다. 배양 6주가 지나면서 IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l가 첨가된 배지에 잎을 치상하여 명배양한 조건에서 callus성 재분화 개체가 유도되고, 3s 배지에 잎을 치상하여 암배양 한 조건에서도 재분화 개체가 유도되기 시작하였다. 하지만 재분화 비율은 1%가 되지 않았다. 재분화된 개체들은 호르몬이 없는 3s 배지에 옮겨 명배양 조건에서 정상 유식물체로 유도시켰다. 재분화 식물체의 잎은 다음의 실험 재료로 사용되었다.

각 호르몬 유래별 식물체의 재분화율을 조사하기 위하여 KI 0.2 mg/l, IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 그리고 3s 의 배지에서 유도된 재분화 식물체의 잎을 각각 zeatin 1.0 mg/l, AgNO₃ 100uM, Ba 0.5 mg/l, KI 0.2 mg/l, IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 가 첨가된 배지에 12 explants 씩 치상한 후 4주간 암배양 하였다(그림 1-6).

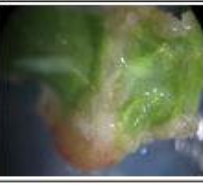



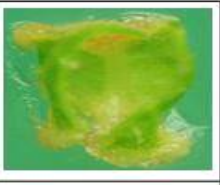
그림 1-6 에서와 같이 선행 연구에서 3s 유래의 재분화 식물체의 잎을 이용하여 zeatin 1.0 mg/l 와 AgNO₃ 100 uM 에서 재분화 비율이 좋은 것을 확인하였다. 하지만 이번 실험 결과 3s 유래의 재분화 식물체의 잎을 이용한 경우 모든 호르몬 조합의 배지에서 재분화가 유도되지 않았다. KI 0.2 mg/l 유래의 식물체 잎을 이용한 경우에는 모든 조합의 배지에서 재분화가 유도 되었다. IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 유래의 식물체를 이용한 경우에는 오직 zeatin 1.0 mg/l 가 첨가된 배지에서 재분화가 유도되었다. 선행 연구 결과와 함께 미루어 보아 3s 유래의 식물체임에도 불구하고 결과가 다르게 나온 것은 호르몬 유래에 따른 개체의 차이는 아닌 것으로 생각이 된다. 문헌에 따르면 (Mostafa et al (2008), Bianchi et al (1999)) 돼지감자의 재분화시 somatic embryogenesis를 통해 재분화가 된 개체에서는 반복된 재분화 실험 시 결과가 좋다고 한다. 하지만, organogenesis를 통해 유도된 개체들을 이용하여 재분화를 유도 할 경우 그 비율이 현저히 낮아진다고 한다.

이번 실험 결과 KI 0.2 mg/l에서 유래된 개체는 somatic embryogenesis를 통하여 재분화가 이루어 졌음을 확인하였다. IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 유래의 개체는 callus를 통한 재분화로서 somatic embryogenesis와는 다른 발생을 하였고, 3s의 경우는 재분화 기간이 10주 이상이 걸려 발생 과정을 관찰하지 못하였지만, 이 결과로 미루어보아 organogenetic한 발생으로 추측된다. 이것으로 미루어 보아 재분화 개체의 발생 경로에 따라 반복적인 재분화에 영향을 미치는 것 같다.

KI 0.2 mg/l 유래 재분화 식물의 잎

				
Zeatin 1.0 mg/l	AgNO3 100 uM	BA 0.5 mg/l	KI 0.2 mg/l	IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l

IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l 유래 재분화 식물의 잎

				
Zeatin 1.0 mg/l	AgNO3 100 uM	BA 0.5 mg/l	KI 0.2 mg/l	IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l

3S 유래 재분화 식물의 잎






				
Zeatin 1.0 mg/l	AgNO3 100 uM	BA 0.5 mg/l	KI 0.2 mg/l	IAA 0.2 mg/l + KI 0.5 mg/l

그림 1-6. 각 호르몬 유래별 식물체의 재분화 실험 사진

나. 돼지감자의 형질전환 조건 구명 및 체계 확립

1) 형질전환 조건 규명

Agrobacterium-mediated 형질전환을 위한 박테리아 및 vector 선정 실험을 수행하였다. vector 및 아그로박테리아의 종류로 EHA105 / pCambia 3301 , GV3101 / pCambia 3301 , LBA4404 / pCambia 1304을 사용하여 비교하고자 하였고 Agrobacterium-mediated 형질전환 방법으로 Agro균을 OD600 0.4 - 0.5 로 키운고 돼지감자 잎을 잘라 Agro 균과 15분간 CO-culture 실시하고 selection marker 가 첨가된 배지에서 암 배양(light/dark, 0/24) 하였다.

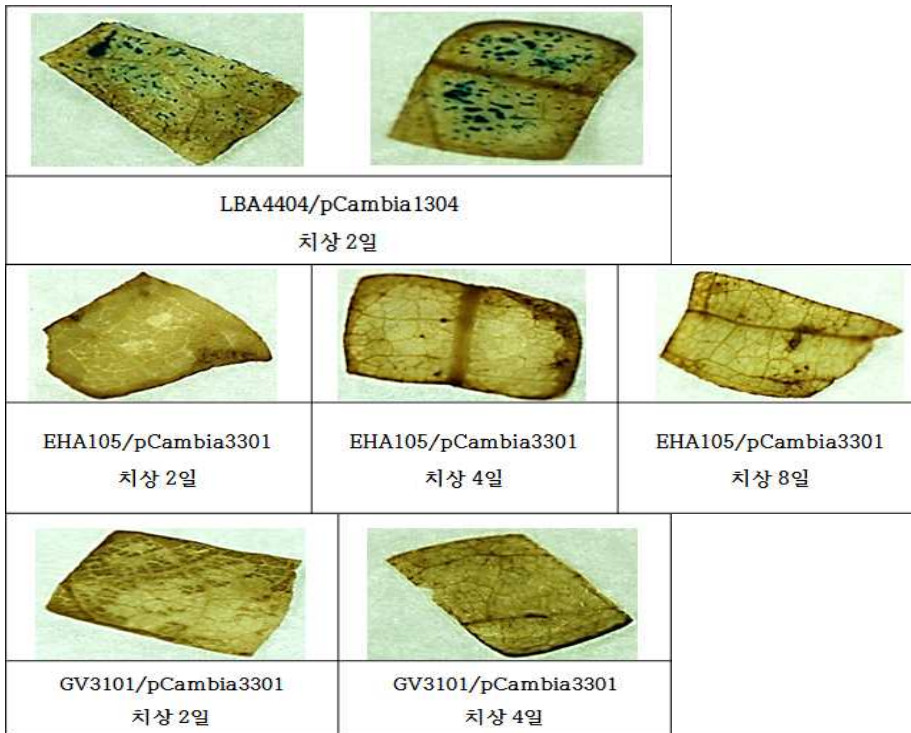


그림1-7. Agrobacterium-mediated 돼지감자 GUS 형질 전환시 agro strain 별 GUS 발현 양상

돼지감자에 형질전환기법을 이용하여 외부 유전자를 도입시켜 발현 유무를 확인하기 위해 reporter gene인 GUS gene을 이용하였다. T-DNA에 GUS gene이 포함된 vector를 Agrobacteria strain(EHA105, GV3101 and LBA4404)별로 transformation 시켜서 stable transformation에서 agrobacteria strain에 따른 GUS 발현율을 알아보았다. 캘러스 유도 배지에 치상된 상태에서 2일부터 GUS staining 실시 한 결과 strain GV3101과 EHA105 에서는 잎에 GUS 발현이 나타나지 않았지만 strain LBA4404에서는 GUS 발현양상이 나타났다. GV3101과 EHA105는 외부 유전자를 도입하여 형질전환이 안되는 것은 아니다. 다만 LBA4404가 다른 strain에 비해 좀 더 이른 시기에 발현이 되었고 돼지감자 형질전환에 있어서 더 나은 Agrobacteria strain이라는 것을 나타낸 결과이다 (그림 1-7).

재분화된 식물체의 잎을 LBA4404 strain을 이용하여 GUS 유전자가 포함되어 있는 pCambia 1304 vector를 돼지감자 식물체내에 삽입하였다. 돼지 감자 잎과 아그로 균을 15분간 공동 배양 한 후, 2일간 3s 배지에 배양 하였다. 그 후 zeatin 1.0 mg/l + cabenicillin 500 mg/l 이 첨가된 배지에 치상하여 암배양 하였다. 배양일 별로 그림 3에서와 같이 GUS 발현 양상을 관찰하였다. 배양 초기에는 잎 표면에 있는 균 때문에 vector 의 삽입 유무가 불확실하였다. 치상 6일이 지나면서 잎 상처 부위에 callus가 생성되기 시작하였다. 항생제의 영향으로 표면에 있는 균이 사라지면서 spot 형태로 callus와 잎이 발색이 된 것을 확인하였다 (그림 1-8).

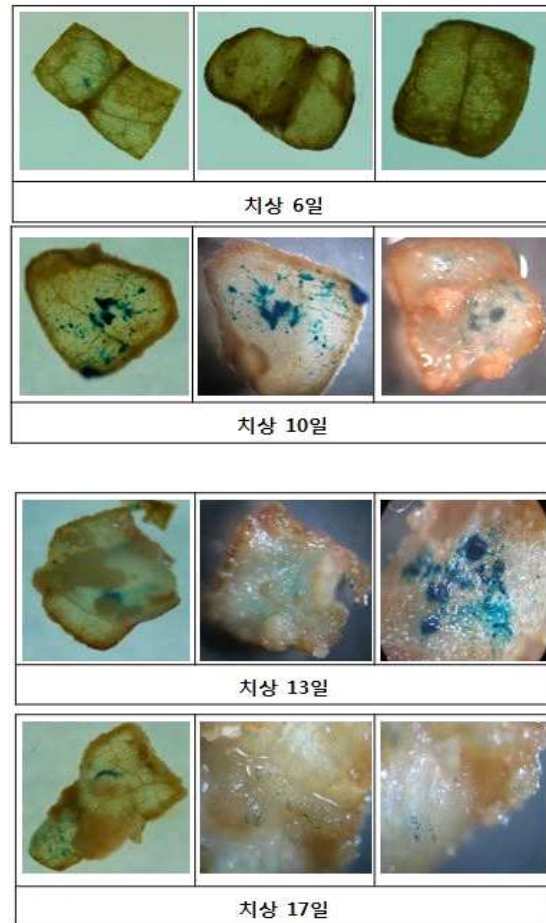


그림1-8. 배양일에 따른 GUS 유전자 발현 양상 비교

3. 지하부 바이오매스(돼지감자) 증산을 위한 유용유전자 발굴 및 도입

가. 돼지감자의 유전체 분석을 통한 당대사 관련 유전자 발굴

돼지감자의 형질전환 체계가 확립이 되면 연구의 최종의 목표인 돼지감자 괴경의 바이오매스 증산, 지상부 바이오매스 분해능력 향상된 형질전환 돼지감자를 제조할 예정이다. 그러므로 우선 돼지감자의 괴경형성 중에 고발현되는 유전자, 당분해 및 당대사에 관련된 유전자들을 발굴하여야 하는데 이를 위해 괴경형성 초기단계의 괴경과 생육단계의 줄기의 발현 유전자들을 서열비교 분석하여 수행하고자 하였다.

돼지감자 괴경형성과 관련된 당대사 관련 유전자를 발굴하기 위하여 먼저 괴경이 자색인 PJA 품종의 돼지감자의 왕성히 자라는 잎, 줄기 그리고 괴경형성 초기단계의 괴경으로부터 각각 2 mg의 total RNA를 분리하였다. 탄수화물 대사의 source 기관인 잎과 sink 기관인 괴경의 cDNA로부터 유전자들을 sequencing 하여 각각 leaf로부터 총 12,677개 그리고 tuber로부터 17,626 개의 contig들을 얻을 수 있었고 각 contig 들의 bp 크기별 분포는 그림 1-9, 그림 1-10과 같이 100-500 bp 크기의 contig 들이 가장 많았다.

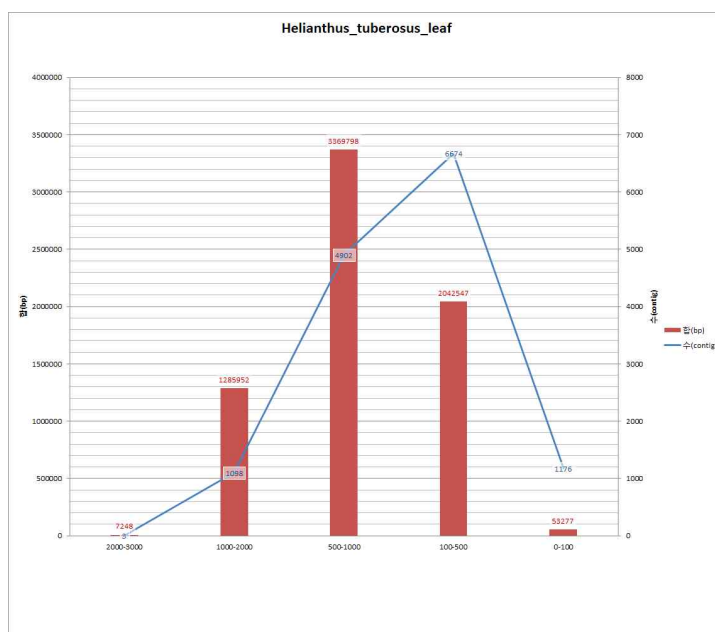


그림1-9. 돼지감자 잎으로부터 발굴된 contig들의 크기별 분포

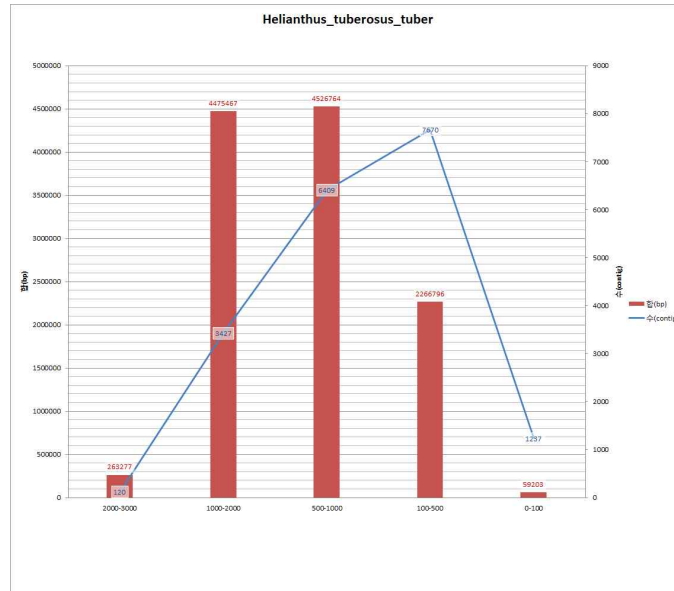


그림1-10. 돼지감자 tuber로부터 발굴된 contig들의 크기별 분포

blastx 분석에서 각각 leaf 및 tuber 부위에서 많이 나온 유전자들을 순서대로 표 1-1과 1-2에서 나열하였다. leaf 및 tuber 둘 다 해바라기의 hypothetical protein인 AAR23802.1 과 매치되는 contig 가 19, 16 개로 많이 나왔으며 leaf 의 경우 multicystatin, heat-shock protein, 그리고 광합성 관련 RuBisCO 유전자들이 많이 분포하였다. tuber 의 경우 putative ATP synthase, heat-shock protein, 그리고 resistance gene analog NBS7 등이 많이 분포하였다. Fructan 분해관련 tuber로부터 6개 leaf로부터 2개의 서로 다른 beta-fructofuranosidase들의 유전자들과 당분해 관련 12개의 invertase 유전자들을 찾을 수 있었다. 그리고 총 61개의 glucose 관련 유전자들을 찾을 수 있었다.

Fructose 관련 tuber로부터 표 1-3, 표 1-4에서 같이 6개, leaf로부터 11개의 유전자들을 발굴 할 수 있었다.

이상의 결과에서 돼지감자의 괴경형성 중에 고발현되는 유전자들, 당분해 및 당대사에 관련된 유전자 서열들을 발굴할 수 있었는데 이를 바탕으로 우선적으로 적절히 선별된 유전자의 full sequence를 얻어서 발현벡터와 RNAi silencing 벡터를 조제하고 이를 완성된 형질전환 기술을 사용하여 형질전환 돼지감자를 만들고 이를 분석하여 유전자 발현여부, 괴경의 바이오매스 증감여부, 분해능력 향상 여부를 조사하는 연구가 진행될 것이다.

표1-1. Blastx 분석 중 leaf에서 count 가 많은 유전자들의 순서별 분포

gene	leaf	tuber	Description
AAR23802.1	19	16	hypothetical protein [Helianthus annuus]
BAA95416.1	18	3	multicystatin [Helianthus annuus]
BAK03333.1	15	8	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
CAC84405.2	9	2	17.67 kDa heat-shock protein [Helianthus annuus]
P08705.1	9	1	RecName: Full=Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic; Short=RuBisCO small subunit; Flags: Precursor
BAA87069.2	8	4	elicitor-induced DNA-binding protein homolog [Matricaria chamomilla]
BAG16522.1	8	6	putative MATE family transporter [Capsicum chinense]
CAM82775.1	8	47	putative ATP synthase [Nidula niveotomentosa]
P46486.1	8	1	RecName: Full=Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic; AltName: Full=Light-harvesting complex I 17 kDa protein; AltName: Full=PSI-F; Flags: Precursor
XP_002517398.1	8	5	hypothetical protein RCOM_0852460 [Ricinus communis]
ABC59684.1	7	1	delta-12 fatty acid acetylenase [Helianthus annuus]
ACJ12926.1	7	6	WRKY transcription factor 1 [Artemisia annua]
ACJ70698.1	7	3	polyphenol oxidase [Cynara cardunculus var. scolymus]
ACJ84498.1	7	15	unknown [Medicago truncatula]
CAC84406.1	7	13	17.6 kDa heat-shock protein [Helianthus annuus]
P36688.1	7	1	RecName: Full=50S ribosomal protein L12, chloroplastic; AltName: Full=CL12; Flags: Precursor
P52837.1	7	5	RecName: Full=Flavonol 4'-sulfotransferase; Short=F4-ST
Q5MYA4.3	7	6	RecName: Full=Histone H3.2
XP_002524590.1	7	6	metal ion binding protein, putative [Ricinus communis]
AAK66565.1	6	9	quinone oxidoreductase-like protein [Helianthus annuus]
AAM27915.1	6	9	carbohydrate oxidase [Helianthus annuus]
ABX76302.1	6	5	heat shock protein 90 [Ageratina adenophora]
ACV71016.1	6	1	UPA16 [Capsicum annum]
ADI56655.1	6	2	WRKY transcription factor [Artemisia annua]
ADN33912.1	6	4	40S ribosomal protein s24 [Cucumis melo subsp. melo]
CAN81449.1	6	3	hypothetical protein VITISV_011174 [Vitis vinifera]
XP_002264609.1	6	3	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
XP_002271486.1	6	9	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
XP_002298613.1	6	3	predicted protein [Populus trichocarpa]

표1-2. Blastx 분석 중 tuber에서 count 가 많은 유전자들의 순서별 분포

gene	leaf	tuber	Description
CAM82775.1	8	47	putative ATP synthase [Nidula niveotomentosa]
AAR23802.1	19	16	hypothetical protein [Helianthus annuus]
ACJ84498.1	7	15	unknown [Medicago truncatula]
XP_002284344.1	1	15	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
CAC84406.1	7	13	17.6 kDa heat-shock protein [Helianthus annuus]
XP_002532192.1	4	12	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
AAL07542.1	4	10	resistance gene analog NBS7 [Helianthus annuus]
AAK66565.1	6	9	quinone oxidoreductase-like protein [Helianthus annuus]
AAM27915.1	6	9	carbohydrate oxidase [Helianthus annuus]
XP_002271486.1	6	9	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
P49198.2	4	9	RecName: Full=40S ribosomal protein S3a
BAC10911.1	2	9	pathogenesis-related protein [Zinnia elegans]
BAK03333.1	15	8	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
ACB38232.1	3	8	aquaporin [Gerbera hybrid cultivar]
XP_002519512.1	3	8	Protein kinase APK1A, chloroplast precursor, putative [Ricinus communis]
CBI27434.3	1	8	unnamed protein product [Vitis vinifera]
XP_002528938.1	6	7	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
AAO38032.1	4	7	delta12-fatty acid acetylenase [Helianthus annuus]
CAH10488.1	2	7	hypothetical protein [Homo sapiens]
XP_002274932.1	2	7	PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Vitis vinifera]
BAD27390.1	1	7	gamma-glutamylcysteine synthetase [Zinnia elegans]
XP_002285750.1	1	7	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
XP_002517383.1	1	7	transferase, transferring glycosyl groups, putative [Ricinus communis]
BAG16522.1	8	6	putative MATE family transporter [Capsicum chinense]
ACJ12926.1	7	6	WRKY transcription factor 1 [Artemisia annua]
Q5MYA4.3	7	6	RecName: Full=Histone H3.2
XP_002524590.1	7	6	metal ion binding protein, putative [Ricinus communis]
XP_002327915.1	5	6	predicted protein [Populus trichocarpa]
ABQ32300.1	4	6	putative 40S ribosomal protein S9 [Artemisia annua]

표1-3. tuber 에서 발견되는 fructose 관련 유전자들

gene	description	cnt
P21343.2	RecName: Full=Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta; Short=PFK; AltName: Full=6-phosphofructokinase, pyrophosphate dependent; AltName: Full=PPi-PFK; AltName: Full=Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructose-1-kinase	3
XP_002276269.1	PREDICTED: similar to Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha [Vitis vinifera]	2
NP_964141.1	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system EIIA, galactitol/fructose specific [Lactobacillus johnsonii NCC 533]	1
NP_178224.1	fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]	2
BAE48790.1	fructose-bisphosphate aldolase [Codonopsis lanceolata]	5
ABR21384.1	fructose-1,6-bisphosphatase [Flaveria linearis]	1

표1-4. leaf 에서 발견되는 fructose 관련 유전자들

gene	description
ABR21384.1	fructose-1,6-bisphosphatase [Flaveria linearis]
XP_002527886.1	fructose-1,6-bisphosphatase, putative [Ricinus communis]
BAE48790.1	fructose-bisphosphate aldolase [Codonopsis lanceolata]
ZP_07933310.1	diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase
ABW38331.1	chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase II [Fragaria x ananassa]
AAR86689.1	fructose-bisphosphate aldolase [Glycine max]
BAB55655.1	fructose-6-phosphate2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase[Bruguiera gymnorhiza]
XP_002530473.1	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]
NP_192313.3	pyrophosphate--fructose-6-phosphate1-phosphotransferase [Arabidopsis thaliana]
AAR88661.1	fructose-bisphosphate aldolase [Pandanus amaryllifolius]
ABW38332.1	cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase [Fragaria x ananassa]

나. 이눌린 함량증대 형질전환 돼지감자 및 대량 생산기술개발

(1) 이눌린함량 증대용 유전자 형질전환 감자 개발

돼지감자의 형질전환이 완성되기 이전에 이눌린 함량 증대용으로 발굴된 유전자의 작동 여부를 미리 확인하기 위한 대체 실험의 일환으로 이들 유전자들을 도입된 감자를 먼저 획득하여 이눌린의 함량증대여부를 확인하고자 하였다.

(가) Extraction of SST-1 gene from Jerusalem artichoke

돼지감자는 Fructan의 3types중 하나인 Inulin이 많이 포함되어있는 대표적인 국화과 작물이다. Inulin은 sucrose에서 SST-1 (sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase) 효소에 의해 1-kestose가 합성이 되고 FFT-1 (fructan: fructan 1-fructosyltransferase) 효소의 추가적인 작용에 의해 합성이 된다. Inulin을 합성하는 이 두 효소를 potato에 형질전환 시켜서 Inulin 합성 여부를 알아보기 위해 우선 SST-1 gene을 돼지감자로부터 추출 하였다 (그림 1-11). Jerusalem artichoke cv. P.J.A 와 cv. 다팽 Full-length cDNA에서 SST-1 gene을 추출하기 위해 PCR condition optimization을 하였다. Full-length cDNA에서 약 1900bp SST-1을 증폭시키기 위해 3가지 PCR kit buffer (Roche)를 사용하여 1900bp에 해당되는 band를 확인하고 TOPO cloning을 위해 PCR purification을 실시하였다 (그림 1-11A).

돼지감자 species간에 SST-1 발현율을 알아보기 위해 real-time PCR을 실시하였다. Reference gene은 Actin gene을 사용하여 cDNA normalization을 하였고 SST-1 gene의 발현율을 비교해 보았다. RNA level에서 SST-1 gene은 cv. 다팽 보다 cv. P.J.A에서 약 2.3배 더 많이 발현 되었다 (그림 1-11B). 이 결과로 인하여 species에 따라서 SST-1 gene의 발현율이 다르다는 것을 입증 하였다.

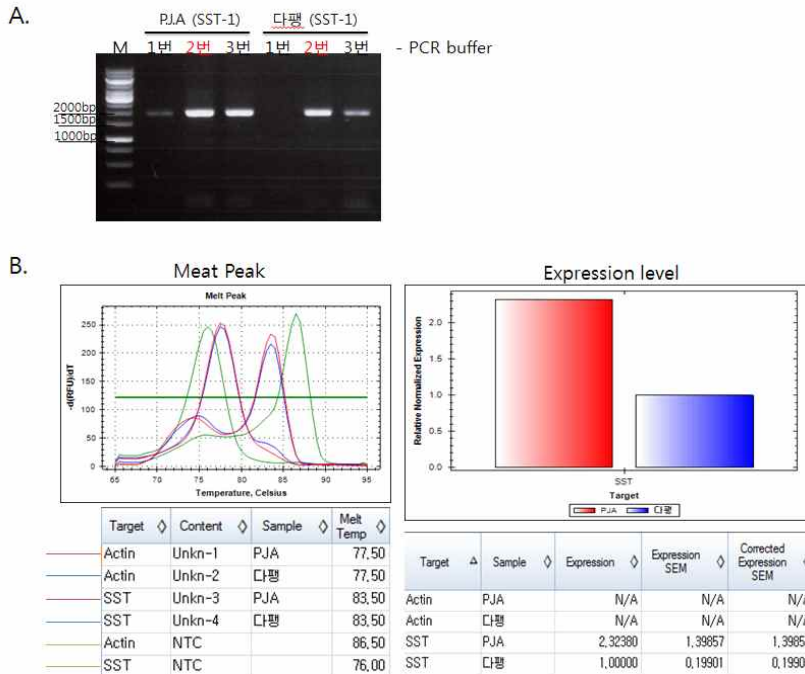


그림 1-11. 돼지감자 cDNA로부터 SST-1 gene 추출 실험. (A) Jerusalem artichoke cv. P.J.A 와 cv. 다팽 Full-length cDNA에서 SST-1 gene을 추출하기 위한 PCR condition optimization. PCR kit (Roche)의 buffer1, 2, 3번을 사용하여 PCR 수행 결과 2번 buffer를 적용함. primer: HssT F (5'-AAAACCTCCCTCAGGCCAC-3'), HssT R (5'-CCATCAAAGTTTCGAAAGTCC-3'). (B) Real-time PCR을 이용하여 RNA level에서 cv. P.J.A 와 cv. 다팽 SST-1 gene의 발현율을 측정 한 결과. Reference gene : Actin. Dye : SYBR Green I. cv. 다팽 보다 cv. P.J.A에서 SST-1 발현율이 약 2.3배 높음.

(나) Cloning of SST-1 gene with expression vector pEG103

추출된 SST-1 gene을 이용하여 sequence를 확인하고 expression vector인 PEG103 vector에 클로닝 하기 위해 Gateway region을 포함하고있는 PCR8/GW/TOPO vector (Invitorgen)에 클로닝 하였다. Gateway region은 gateway system에 의해 클로닝이 가능하다. pEG103 expression vector에는 Gateway region이 포함 되어 있는데 이 부분에 target gene이 insertion 되기 위해서 gateway region이 포함된 TOPO vector를 사용하여 gateway region이 서로 exchange 가 일어나는 LR cloning system에 의해서 클로닝이 되게 된다. SST-1 protein은 Glycosyl hydrolases family 32 region 안에 GH32_B_Fructosidase, substrate binding site, active site, GH32_C terminal region으로 구성되어 있다. TOPO cloning 후 sequencing을 한 결과 Helianthus tuberosus SST-1 gene 과 비교했을 때 4개의 nucleotide 가 달랐다. 54bp 부분에 A 염기가 G로 치환이 되었지만 protein 변화는 없었다. cv. *C. scolyumus* 와 cv. *L. sativa*의 SST-1 gene 과 비교했을 때 같은 부분에 G 염기로 동일하였다. GH_B_Fructosidase region인 713bp 부분은 C염

기가 T염기로 치환되었고 protein도 Serine에서 Leucine으로 치환되었다. 하지만 cv. *C.scolymus* 와 cv. *L.sativa* 에서는 T염기로 동일하였다. 1462bp 부분은 A염기가 G염기로 치환되었고 protein도 Serine에서 Glycine으로 치환되었지만 cv. *C.scolymus*, cv. *L.sativa* 와 비교하였을 때 G염기로 동일 하였다. 그리고 1848bp 부분은 protein 변화가 없었다. Sequencing 결과 4개의 다른 nucleotide 가 SST-1 gene 발현에 심각하게 영향을 주는 요인이 아니라고 판단하여 pEG103 expression vector에 cloning을 하였다 (그림 1-12). 확인된 cloned pEG103+SST-1 DNA 를 *E.coli* (DH5a)에 transformation하였고, EcoRI enzyme digestion 과 PCR을 이용하여 target gene이 integration 이 되었는지 확인하였다(그림12B, 2C). 그리고 potato에 형질전환 시키기 위해 *Agrobacteria* (GV3101)에 transformation 하고 PCR로 SST-1 gene을 확인하였다 (그림 1-12D).

(다) Stable transformation of SST-1 gene to *Solanum tuberosum* l. cv. Desiree

Potato에서 Inulin 합성을 유도하기 위해 *Agrobacteria* strain GV3101에 transformed pEG103+SST-1을 형질전환 시켰다. potato species는 cv. Desiree를 이용하였고 현재 kanamycin 이 포함된 plant regeneration media에 치상된 상태로 캘러스 유도 중에 있다.

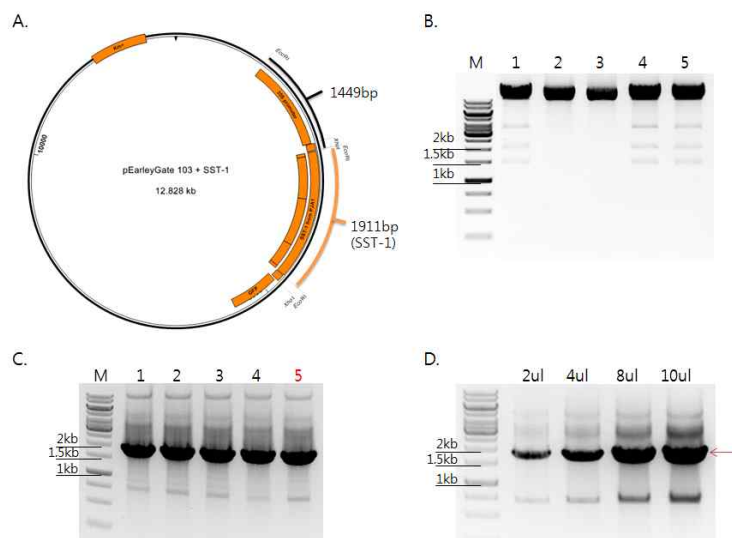
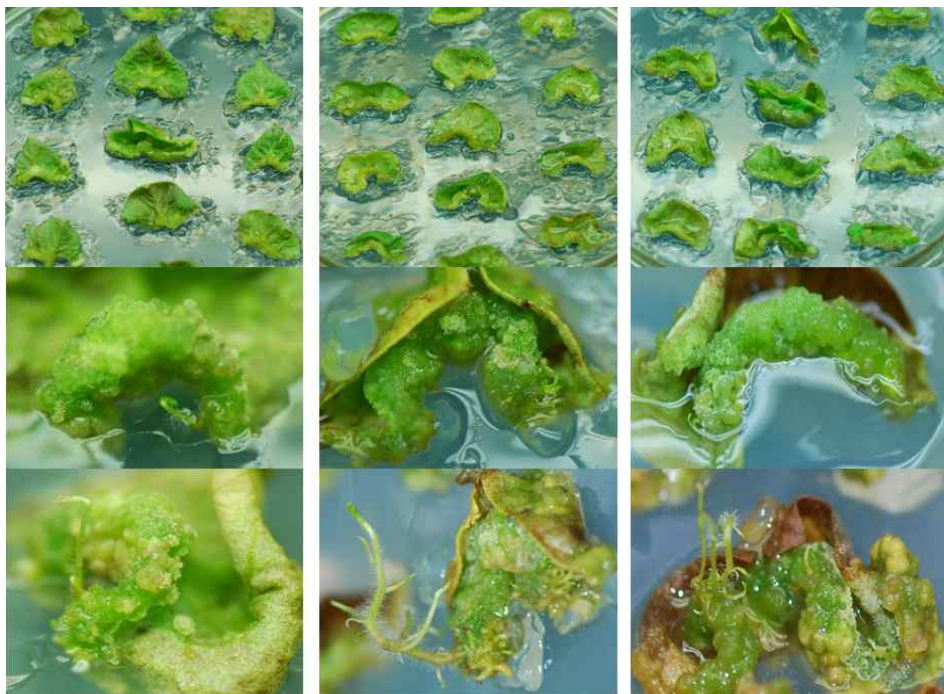


그림 1-12. 확인된 SST-1 gene을 식물 발현 벡터 pEarleyGate103 vector로 클로닝 결과. (A) pEG103+SST-1 vector map. EcoR I enzyme site를 기준으로 35S promotor가 포함된 1449bp 부분과 SST-1이 포함된 1911bp 부분으로 구분된다. 그리고 kanamycin 저항성을 가지고 있는 pEG103 vector는 reporter gene으로 Green Fluorescent Protein (GFP) 가 포함되어 있고 His-Tag이 tagging 되어 있다. (B) *E.coli* transformation 후 Enzyme digestion (EcoR I)을 이용하여 클로닝 유무를 확인한 결과. 35S pro 부분의 약 1500bp 부분 band 와 SST-1이 포함된 약 2000bp 부

분 band, 그리고 이 두 site를 합친 3500bp 부분 band, 나머지 vector size 이렇게 총 4개의 band를 확인 하였다. (C) *E.coli* transformation 후 PCR을 이용하여 SST-1 gene 확인 결과. 5개의 sample 모두 SST-1 size에 해당하는 band를 확인 하였다. (D) 확인된 cloned pEG103+SST-1을 *Agrobacterium* strain GV3101을 이용하여 *Agrobacterium* transformation 후 plasmid DNA를 PCR을 이용하여 SST-1 gene을 확인한 결과. SST-1 size에 해당하는 band를 확인하였다(red arrow).

(라) *Agrobacterium*-mediated transformation

Agrobacterium strain GV3101을 이용하여 *Agrobacterium* transformation 후 potato에서 Inulin 합성을 유도하기 위해 *Agrobacterium*-mediated transformation을 진행하였다. Potato species는 cv. Desiree를 이용하였고 OD600;0.6일 때 30분 incubation한 후 MS medium(MS 4.3 g/L, Sucrose 30 g/L, Myo-inocitol 0.1 g/L, Vitamin 2 ml/L, Agarose 8 g/L, pH 6.0) + 2 mg/L 2,4-D에서 2일 치상 후 MS medium + 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA3+2mg/LZeatin+1mg/LBasta+500mg/LCarbenicillin에서 shooting된 후(그림 1-13), MS medium + 1 mg/L Basta + 500 mg/L Carbenicillin에서 rooting 유도 되었다(그림 1-14). 각각의 유전자 별 shooting되는 비율은 SST-1이 제일 높았으며, SST-1 + FFT-1, FFT-1 순으로 shooting 되는 비율이 높았다.



GV3101/pEG103+SST-1

GV3101/pEG103+SST-1&FFT-1

GV3101/pEG103+FFT-1

그림 1-13. Inulin 합성을 유도하기 위해 cv. Desiree에 형질전환 시켜 shooting 유도. *Agrobacterium*-mediated transformation 후 MS medium + 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA3+2mg/LZeatin+1mg/LBasta+500mg/LCarbenicillin에서 2주에 간격으로 계대배양하여 shooting을 유도 모습

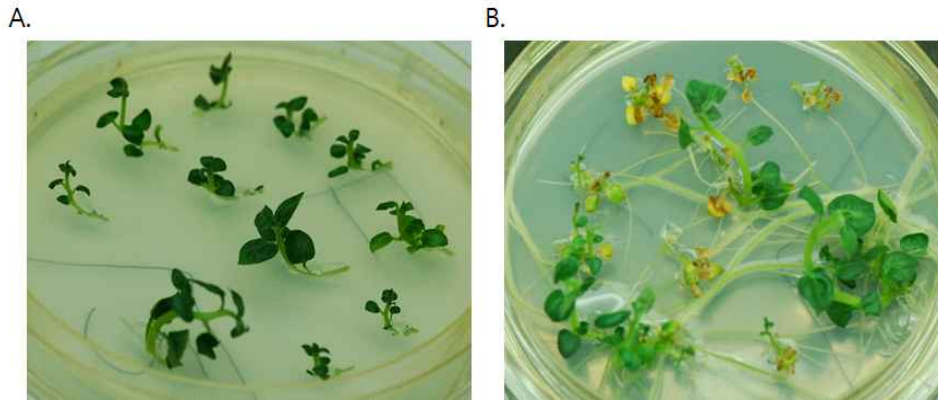


그림 1-14. Shooting된 개체들을 MS medium + 1 mg/L Basta + 500 mg/L Carbenicillin에서 rooting 유도 . A. Shooting된 개체를 shooting medium에 치상. B. 치상 2주 후 상태. Basta 저항성을 가진 개체만 rooting 유도

(마) Genomic DNA 검정

위의 실험에서 SST-1 형질전환체 와 FFT-1 형질전환체는 각각 10개체, 그리고 SST-1/FFT-1 형질전환 개체는 3개체씩 Rooting 유도배지에서 뿌리가 유도되었다. 이 유도된 개체들이 각각의 유전자가 삽입 되어있는지 분자수준에서 검정하기 위하여 genomic DNA를 추출하여 PCR을 하였다. Genomic DNA는 각각 2ul를 사용하였고 SST-1_F/R, FFT-1_F/R는 각각 10pmol 1ul씩 사용하여 56도에서 30cycle 증폭하였다. SST-1/FFT-1 형질전환체는 각각의 full size의 SST-1 primer와 FFT-1 primer로 PCR 검정을 하였다(그림 1-15.). Genomic DNA를 이용한 PCR 검정에서 SST-1 #4, #5, #10번 개체와 FFT-1 #4, #5, #6, #8 개체가 selection 되었다. SST-1/FFT-1 개체에서는 형질전환체가 유도되지 않았다.

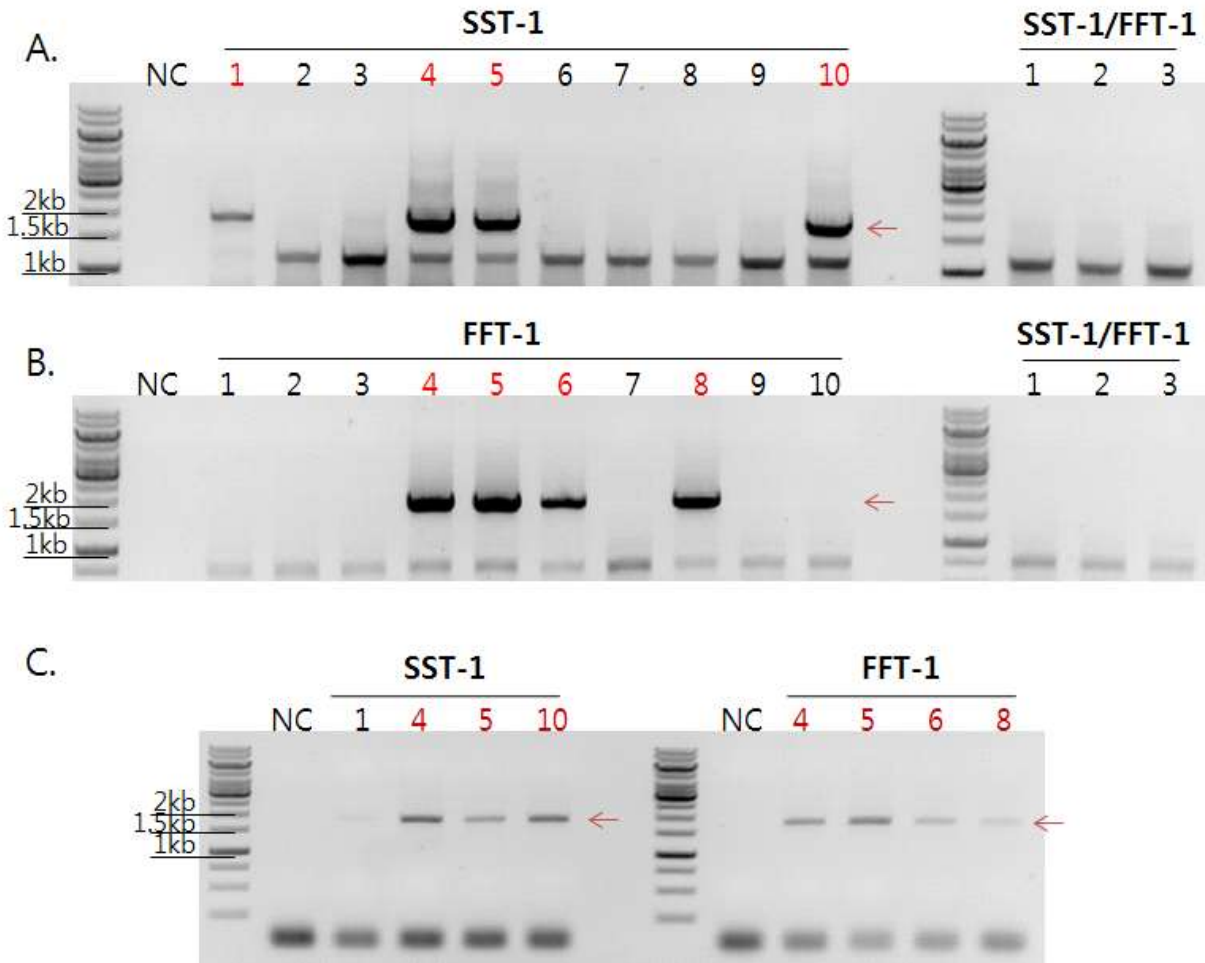


그림1-15. Rooting 유도된 개체에서 SST-1, FFT-1, SST-1/FFT-1 유전자가 들어가 있는 형질전환체를 selection 하기 위해 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR를 수행해 DNA수준에서 검정. A. SST-1 full primer를 이용하여 PCR 수행 한 결과 (annealing temp. 55도), rooting 유도된 SST-1 개체 10개에서 #1, #4, #5, #10번 개체에서 SST-1 size (1911bp)에 해당하는 band를 확인(red arrow). B. FFT-1 full primer를 이용하여 PCR을 수행해 1차 selection(annealing temp. 55도). Rooting 유도된 10개의 FFT-1 개체에서 #4, #5, #6, #8번 개체에서 FFT-1 size (1848bp)에 해당하는 band를 확인(red arrow). C. 더 확실한 결과를 얻기 위해 selection 된 SST-1와 FFT-1 개체를 56도 annealing 온도를 적용하여 PCR를 수행한 결과, 각각의 size에 해당하는 단일 band를 확인. SST-1 #1번 개체는 band양상이 약하게 나와서 selection 대상에서 제외 하였고, 3개의 SST-1/FFT-1 개체에서는 SST-1와 FFT-1 둘 다 band가 확인 되지 않음.

(바) RNA level에서 SST-1 유전자와 FFT-1 유전자의 발현 확인

DNA level에서 selection 된 SST-1 #4, #5, #10번 개체와 FFT-1 #4, #5, #6, #8 개체로 제대로 삽입 유전자가 전사가 일어나는지 RNA level에서 RT-PCR로 확인 하였다. 먼저 식물체로부터 total RNA를 추출하여 1ug의 total RNA 와 oligo dT20 primer를 이용하여 cDNA를 합성 하였다. 합성된 cDNA를 actin gene PCR을 이용하여 cDNA의 양을 확인 하였고, 각각의 SST-1 full primer와 FFT-1 full primer로 PCR을 하여 유전자를 확인 하였다(그림 1-16).

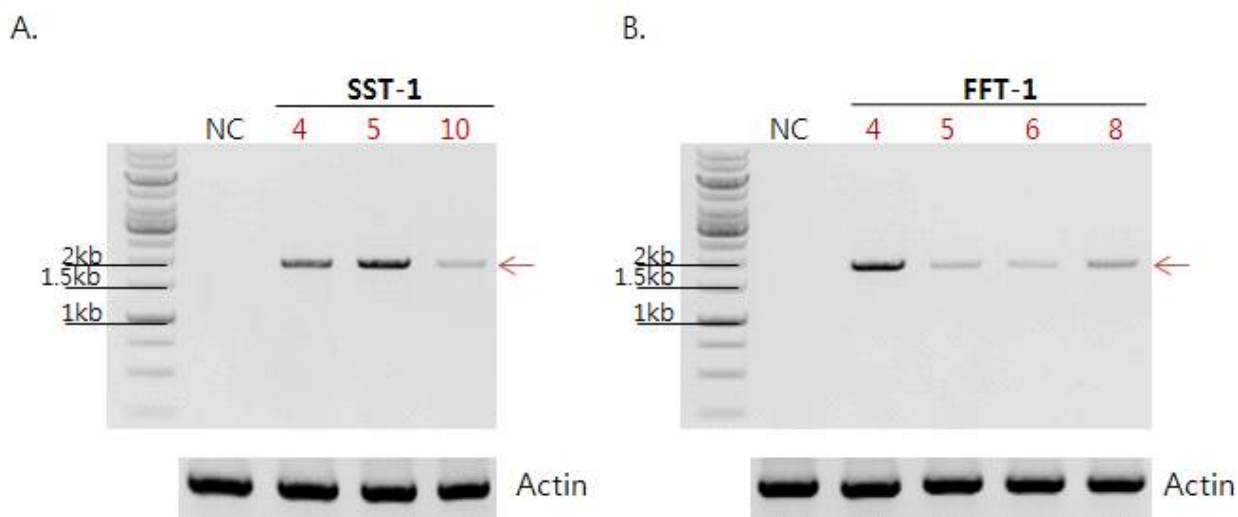


그림 1-16. RNA level 에서의 RT-PCR을 이용한 SST-1, FFT-1 발현 확인. A. cDNA 2ul와 SST-1 full primer를 이용하여 PCR을 한 후 발현을 확인. SST-1 #4, #5, #10번 개체에서 SST-1 유전자가 제대로 전사가 된 것을 확인(red arrow). B. cDNA 2ul와 FFT-1 full primer를 이용하여 PCR 한 결과, FFT-1 #4, #5, #6, #8번 모두 FFT-1 유전자가 RNA level에서도 발현 되는 것을 확인(red arrow).

선별된 라인들로부터 더 많은 SST-1 gene 과 FFT-1 gene이 RNA level에서 발현 되는 개체를 selection 하기 위해 그림 8에서와 같이 quantitative PCR (Real-time PCR)을 수행 하였다. cDNA의 양을 측정하기 위해 reference gene 으로 actin primer (Forward: 5' -GCTTCCCGATGGTCAAGTCA-3' , Reverse: 5' -GGATTCCAGCTGC TTCCATTC-3')를 이용하였다. A, D. 각각의 개체 cDNA로 actin PCR을 한 결과 no template control (NTC; gray)와 비교하여 actin이 증폭이 잘 된 것을 확인 할 수 있다. B, E. 각각의 개체를 SST-1와 FFT-1 primer로 qPCR 한 결과, negative control (NC; black)와 NTC (gray)는 증폭된 곡선과 melt peak 결과에 의해 각각 SST-1과 FFT-1이 증폭이 안된 것을 확인 할 수 있다. C, F. Actin reference gene result를 바탕으로 각각의 SST-1, FFT-1 발현율을 normalized 한 결과이다. SST-1 개체의 경우 #5번(green) 개체가 가장 발현율이 높았고 #4번(blue) 개체가 그 뒤를 따랐다. #10번(yellow) 개체는 발현율이 현저히 낮았다. FFT-1의 경우 #4번 개체가 가장 발현율이 높았고 그 다음으로는 #5(blue), #6번(yellow) 개체가 거의 비슷한 발현율을 보였다(그림 1-17).

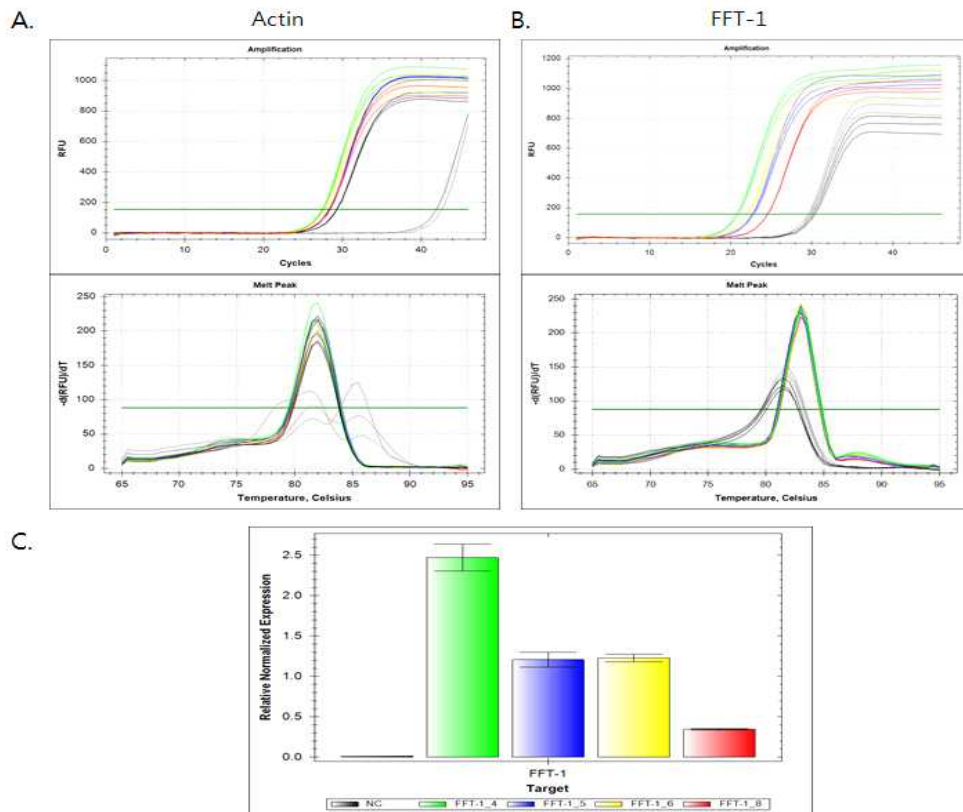


그림1-17. SST-1과 FFT-1의 발현율이 높은 개체를 selection 하기 위한 quantitative PCR (Real-time PCR)

SST-1, FFT-1 유전자가 도입된 괴경 확보 및 Fructan 분석. Jerusalem artichoke (돼지감자)의 fructan 생합성 과정에서 sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (SST-1)에 의해 sucrose로부터 1-kestose (1-K)를 합성한 후, fructan:fructan 1-fructosyltransferase (FFT-1) 유전자에 의해 낮은 중합도의 이눌린 타입 fructan (DP; 3-35 fructosyl residues)을 합성한다. 이 두 유전자 각각에 의한 괴경에서의 이눌린 타입 fructan 합성을 유도하기 위하여 선행연구에서 확보한 2개의 SST-1 형질전환체 (SST-1 #4, #5)와 3개의 FFT-1 형질전환체 (FFT-1 #4, #5, #6)의 분석을 시도하였다

Fructan을 분석하기 위해 20mM sodium phosphate (pH7.0)를 이용하여 soluble carbohydrate를 추출 후, HPLC (High performance liquid chromatography, KS-082칼럼)를 수행하였다. SST-1과 FFT-1 유전자가 각각 도입된 감자 괴경에서 적은 양의 이눌린이 검출되었고, 특히 SST-1 #4, #5 괴경에서는 1-kestose에 해당하는 peak도 나타난 것으로 보아 도입된 SST-1에 의해 fructan 생합성 과정이 유도되고 있는 것을 확인하였다 (그림 1-18).

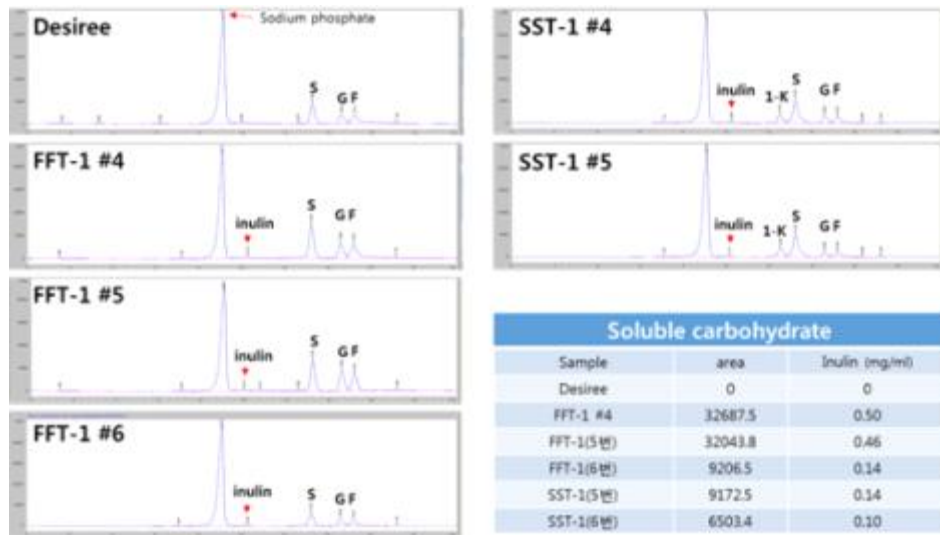


그림 1-18. HPLC 분석법에 의한 SST-1 및 FFT-1 형질전환체의 fructan 분석

SST-1+FFT-1유전자 공동 발현 형질전환체 개발. SST-1 유전자에 의한 1-kestose가 유도된 결과를 바탕으로 SST-1과 FFT-1를 공동으로 도입하여 이눌린 합성을 유도하기 위해 *Agrobacterium*-mediated transformation을 진행하였다. 감자식물체 (cv. Desiree)를 이용하였고 OD600=0.6일 때 30분 배양한 후 공동배양배지 (MS salts 4.3 g/L, Sucrose 30 g/L, Myo-inocitol 0.1 g/L, Vitamin 2 ml/L, Agarose 8 g/L, pH 6.0 + 2 mg/L 2,4-D)에서 2일 치상 후 재분화배지 (MS기본배지 + 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA3 + 2mg/L Zeatin + 1mg/L Basta + 500mg/L Carbenicillin)에서 shooting된 후, MS 기본배지 + 1 mg/L Basta + 500 mg/L Carbenicillin에서 rooting 유도되었다.



그림 1-19. SST-1+FFT-1의 공동발현을 위한 형질전환 감자 식물체 개발

위의 실험에서 SST-1 + FFT-1 발현 식물체가 일차적으로 선발되었다(그림 1-19). 이 형질 전환체에 각각의 유전자가 삽입 되어있는지 분자수준에서 검정하기 위하여 genomic DNA를 추

출하여 PCR을 하였다. 형질전환체는 유전자 각각의 전체 크기를 검출하기 위한 SST-1 primers 와 FFT-1 primers를 이용하였다. Negative control은 Desiree를 이용하였고 positive control은 SST-1, FFT-1 유전자가 각각 도입되어 이미 선발된 기존의 형질전환체를 이용하였다. PCR 검정 결과, 2번, 3번 개체는 SST-1과 FFT-1 유전자가 모두 삽입 되었으나, 1번, 4번 개체는 FFT-1 유전자만 삽입되었다. 따라서 SST-1 + FFT-1 #2, #3번 개체를 선발하였고, 이들은 각각 SST-1 + FFT-1 #1, #2번으로 재명명하였다.

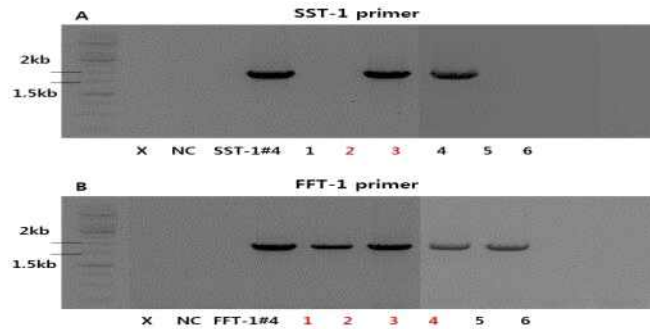


그림 1-20. SST-1+FFT-1발현 형질전환체의 genomicPCR 검출

DNA 발현이 확인된 SST-1 + FFT-1 #1, #2번 개체에서 삽입된 유전자의 전사가 제대로 일어나는지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 식물체로부터 total RNA를 추출하여 1ug의 total RNA 와 oligo dT20 primer를 이용하여 cDNA를 합성 하였다. 합성된 cDNA를 actin gene PCR을 이용하여 cDNA의 양을 확인하였고, 각각의 SST-1 primers와 FFT-1 primers로 PCR을 하여 유전자를 확인하였다. Negative control은 Desiree를 이용하였고 positive control은 SST-1, FFT-1 유전자가 각각 도입되어 이미 선발된 기존의 형질전환체를 이용하였다. RT-PCR 을 수행한 결과 SST-1 + FFT-1 #1, #2번 개체 모두 RNA level에서 SST-1, FFT-1 유전자가 같이 발현하는 것을 확인하였다 (그림 1-20, 1-21).

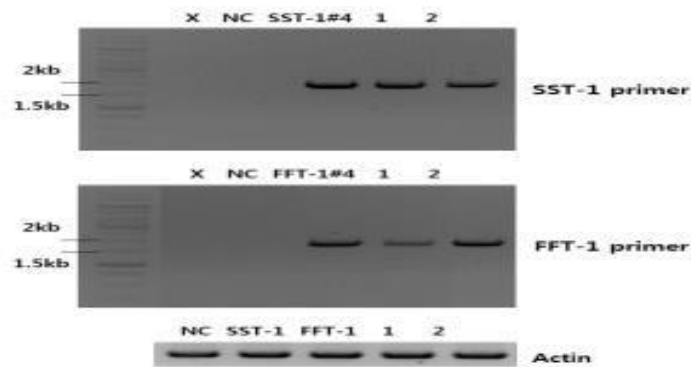


그림 1-21. RNA level 에서의 RT-PCR을 이용한 SST-1, FFT-1 발현 확인

SST-1 및 FFT-1 두 전사체 발현이 확인된 형질전환체 (SST-1 + FFT-1 #1, #2)의 괴경으로부터 fructan을 분석 하기 위하여, 식물체를 재배 중에 있으며 이들의 생육관찰 결과 대조구와의 차이는 없는 것을 확인하였다. 그러므로 SST-1 및 FFT-1 두 전사체 발현을 돼지감자에서 증대시킴으로 돼지감자내 이눌린 함량을 증대시킬수 있음을 확인하였다.

제 2 절 바이오매스 전처리 기술 개발

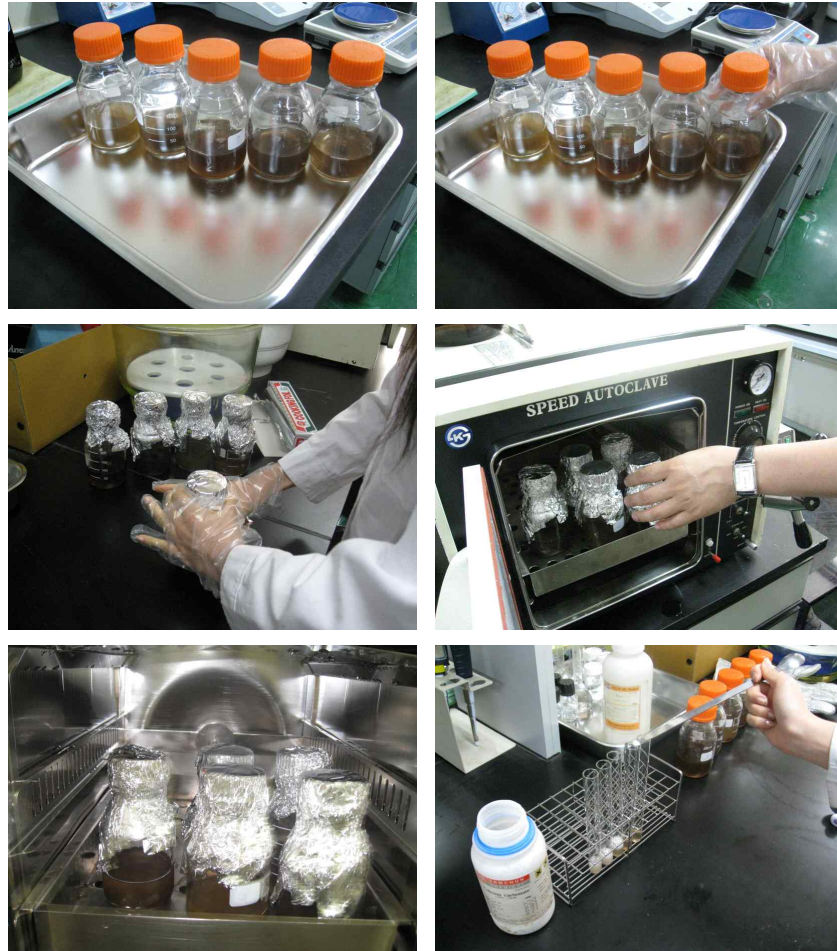
1. 돼지감자 바이오매스 전처리 기술

가. 바이오매스의 성분 분석 및 고체, 액체 분석법 확립

바이오매스의 구성 성분의 분석을 위하여 미국 NREL 기준 분석방법을 기준으로 글루코오스, 자일로오스(헤미 셀룰로오스), 리그닌, 회분 및 기타 추출물의 분석 방법을 확립하였다(그림 2-1). 기존의 바이오매스의 분석은 단순히 열분해를 통하여 전체 바이오매스의 구성 원소별 분석을 제시함으로써, 최종 전환 산물의 가능한 당화 범위 및 물질 수지 확립이 불가능하였다. 그러나, 이러한 분석법을 적용할 경우, 본 연구에서 확보하고자하는 당 성분 및 기타 성분의 체계적인 분석이 가능 하겠다. 본 연구에서 확립된 분석 방법은 최종 및 기술 단계별 수준 지표를 제시할 수 있으며, 각 공정 단계별로 물질 수지를 제공할 수 있는 중요한 핵심 기술이다. 이 분석 방법을 적용할 경우, 초기 바이오매스 및 전처리 후의 바이오매스의 구성 성분을 확인할 수 있을 뿐 아니라, 각 전처리 단계에서 파생되는 고/액상의 구성 성분을 확인할 수 있다(그림 2-2. 표 2-1).



<그림 2-1. 바이오매스 성분분석 과정>



<그림 2-2. 돼지감자 바이오매스 성분분석>

<표 2-1. 돼지감자 지상부 조성>

성분	함량(%)
Cellulose	42.4
Hemi-cellulose	23.9
Lignin	20.1
Ash	2.0
Others	11.6

나. 화학적 전처리에 의한 바이오매스의 영향 분석

기존 바이오매스의 전처리 방법 중에서 적용 가능성이 가장 높으며, 선행 연구를 통하여 입증된 산 및 알칼리, 암모니아 용액을 이용한 화학적 전처리 방법을 대상 바이오매스에 적용하여 각각의 전처리 영향을 분석하였다. 이러한 화학전 전처리 공정의 영향을 분석하고 파악하기 위해서는 공정 조건에 맞는 변수를 확립하고 이에 따른 고/액상의 분석 방법이 확립되어야 한다. 본 연구를 위하여 화학 용매를 적용 가능한 회분식 및 침출식 반응 시스템을 구축하였다(그림 2-3). 회분식 반응시스템은 화학 용매, 온도 및 반응 시간에 따른 전처리 영향을 분석하여 최적의 공정 조건을 제시할 수 있으며, 이렇게 제시된 공정 조건을 이용하여 과반응에 따른 당 및 리그닌에 의해 분해되는 파생 물질을 최소화 할 수 있는 침출(percolation) 공정을 구축 하였다.



<그림 2-3. 회분식 전처리 반응 시스템>

바이오매스를 반응처리분석법을 이용하여 5 ~ 15 %의 암모니아수를 이용하여 온도범위 140부터 190℃까지 회분식 반응을 이용하여 기초적인 반응시간과 온도를 파악한 후, 침출(percolation) 공정을 이용하여 그 효율을 파악하였다(표 2-2, 2-3). 회분식 반응을 적용할 경우, 당 성분은 초기에 쉽게 생성되나 어느 정도 시간이 흐를수록 과분해되어 당 생산이 감소되었다. 회분식 공정은 기존의 여러 연구 결과에서와 같이 공정은 수월하나 C5, C6 및 리그닌의 과 분해를 제어할 수 없어 당 회수율이 낮아지고, 독성 물질이 축적되는 문제점을 발생 하였다.

<표 2-2. The central composite design for the response surface method>

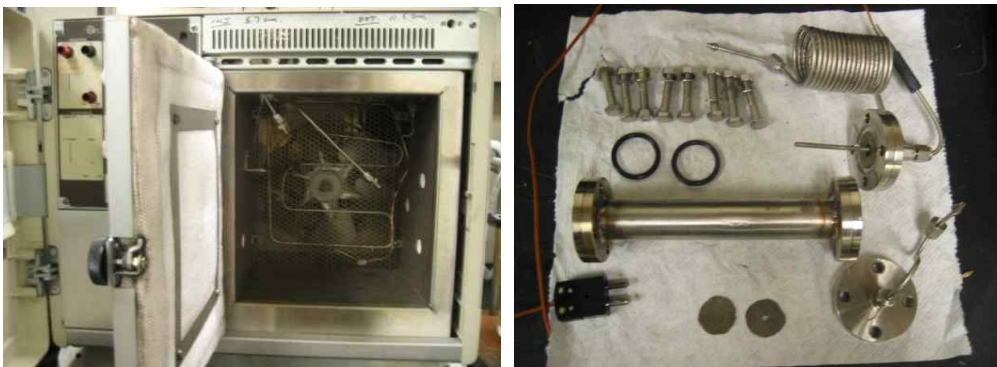
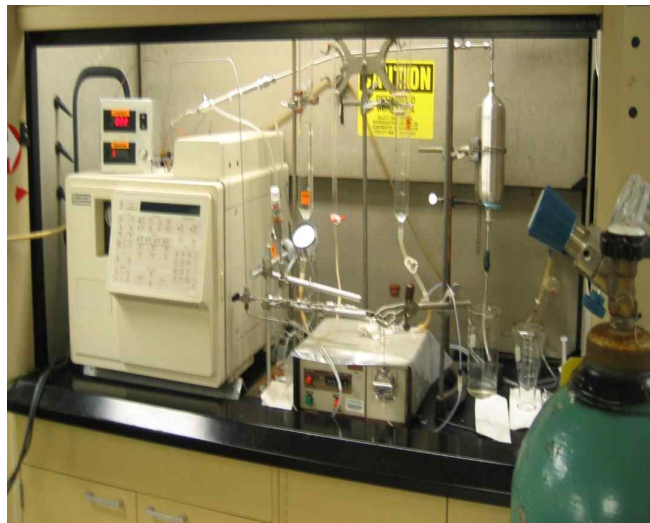
Level	Ammonia concentration (%)	Reaction temperature (°C)	Reaction time (min)
-1.414	5	140	10
-1	7	150	20
0	10	165	35
1	13	180	50
1.414	15	190	60

Run	X(1) ^a	X(2) ^b	X(3) ^c
1	1	-1	-1
2	0	0	0
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	1	-1
6	-1	-1	1
7	0	0	-1.414
8	-1.414	0	0
9	0	0	0
10	0	-1.414	0
11	1	1	1
12	0	1.414	0
13	0	0	1.414
14	-1	-1	-1
15	1.414	0	0
16	1	-1	1
17	0	0	0

<표 2-3. The result of batch reaction under various conditions.>

Run	Result	
	Glucose content (%)	Lignin content (%)
1	37.65	8.28
2	36.45	7.56
3	38.26	9.21
4	37.93	6.93
5	35.97	6.85
6	37.26	8.80
7	38.54	9.40
8	38.35	9.24
9	36.26	7.37
10	39.12	10.61
11	33.85	5.55
12	35.22	7.78
13	33.37	6.06
14	39.25	10.23
15	34.25	6.12
16	34.45	6.49
17	36.46	7.56

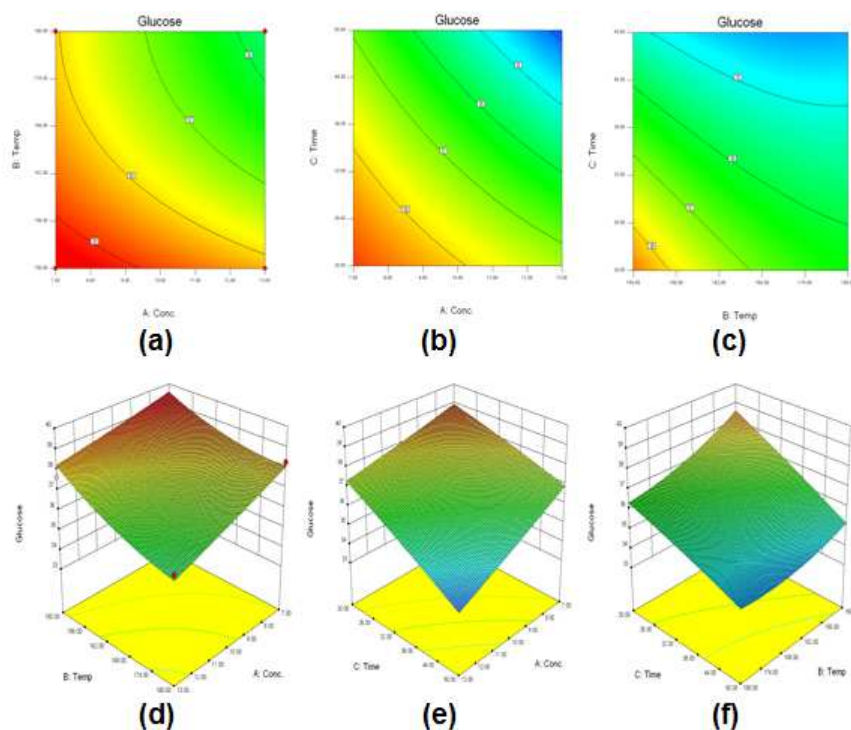
이러한 문제점을 해결하고 기질 바이오매스의 연속적인 투입 공정의 가능성을 파악하기 위하여 구축된 연속식 침출 공정을 적용하였다. 침출 공정은 아래 그림에서와 같이 반응기내에 적용 바이오매스를 투입(packed)하고 원하는 온도 조건에서 화학 용매를 일정한 유속으로 반응기에 흘려보내, 고/액 반응을 유도하면서 생성 물질을 회수하는 공정이다. 이러한 침출 공정은 반응기내에 생성된 당 성분 및 분해 산물을 효율적으로 고온, 고압의 반응기 밖으로 분리/분별 가능하여 회분식 공정의 문제점을 극복할 수 있다. 주요 공정은 반응 온도를 유지할 수 있는 주 반응 시스템과 반응기 내에 고/액 반응을 유지할 수 있도록 압력(back pressure)공급 장치 및 용매를 일정하게 공급할 수 있는 펌프시스템과 침출물 회수를 위한 저장조(reservoir)로 구성되어 있다(그림 2-4).



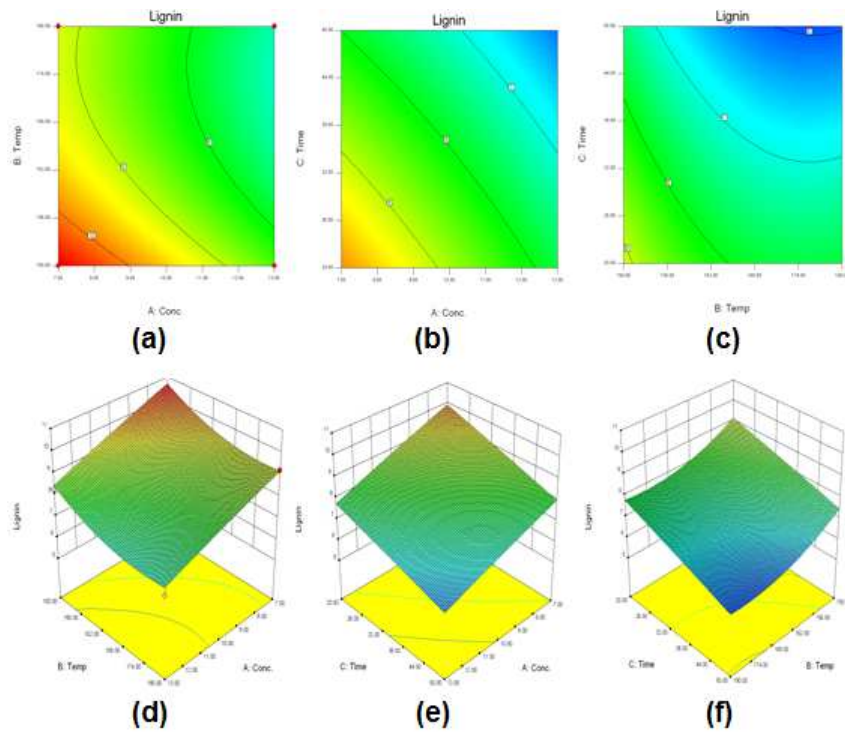
<그림 2-4. 침출 전처리 공정>

회분식 전처리 공정의 조건과 같은 조건으로 침출실험을 진행하였다. 실험에 의한 반응표면분석법의 결과로 침출공정에서는 157.7℃의 온도에서 11.27%의 농도로 20분간 반응하였을 때 최적 조건임을 예측하였다(그림 2-5 및 2-6). 침출공정에서 예측된 조건으로 전처리를 수행한 결과로 표 2-4와 같이 글루코스와 리그닌의 함량이 나타났다. 또한 72시간동안 효소당화

를 수행하였을 때 침출공정으로 전처리한 경우에 전처리를 하지 않았을 때보다 4배 이상 효소 소화율이 향상 된 것을 확인하였다(그림 2-7).



<그림 2-5. Effects of ARP treatment conditions for glucose
 (a) Ammonia concentration vs. temperature at the time of 20min
 (b) Ammonia concentration vs. time at the temperature of 157.7°C
 (c) Temperature vs. time at the ammonia concentration of 11.27%
 (d), (e), (f) 3D Surface>

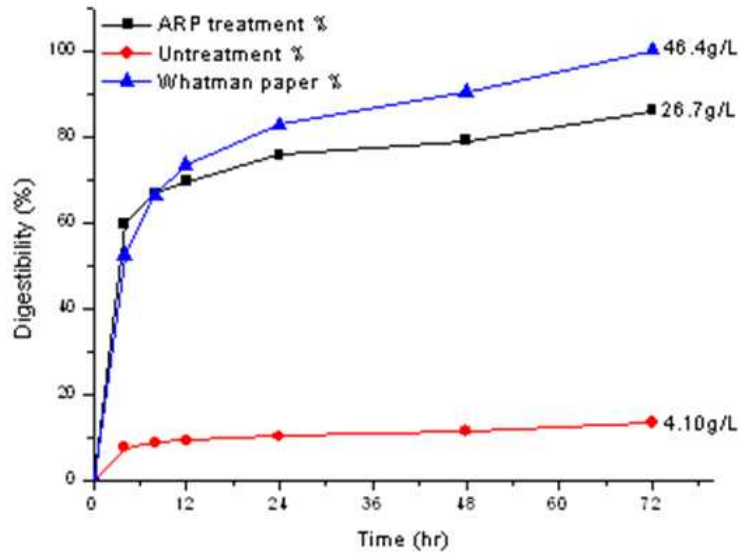


<그림 2-6. Effects of ARP treatment conditions for lignin
 (a) Ammonia concentration vs. temperature at the time of 20min
 (b) Ammonia concentration vs. time at the temperature of 157.7°C
 (c) Temperature vs. time at the ammonia concentration of 11.27%
 (d), (e), (f) 3D Surface>

<표 2-4. The effect of ARP treatment on the composition and enzymatic digestibility of biomass with the optimized condition>

	Glucose content (%)	Lignin content (%)	Enzymatic digestibi
Untreatment Biomass	42.41	20.14	18.68
ARP treated Biomass	39.98	8.01	85.89

**ARP condition ; Ammonia concentration : 11 %
 Reaction Temperature : 157 ℃
 Reaction Time : 10min**



<그림 2-7. Enzymatic hydrolysis of pretreated biomass with the optimized condition>

다. 호름식 침출공정을 이용한 돼지감자 바이오매스 전처리 기술 개발

(1) 전처리 방법

바이오매스의 주요 구성 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌을 효율적으로 분별하기 위해서는 기존의 주요 전처리 방법인 적용하기에는 한계점이 있다. 기존의 전처리 공정은 기본적으로 회분식 공정이며, 이러한 회분식 공정은 전처리 후 얻어지는 고체 혹은 액체 상에 주요 구성 성분의 분해산물인 HMF와 furfural을 계속 함유하는 문제점이 있다. 본 연구에서는 1차년도에서 제시한 호름식 침출 공정(percolation reactor)을 이용하고 적용 용매를 산과 암모니아수를 이용하여 전처리를 수행하였다. 호름형 침출 반응기에 암모니아수와 약황산으로 반응을 유도하여 각 주요 구성 성분을 분별 시키고자 하였다. 전처리 공정은 침출 반응기내에 암모니아수를 흘려 바이오매스로부터 리그닌을 제거하는 공정과 약황산을 흘려 헤미셀룰로오스 성분을 액상으로 분별하는 공정으로 잔류되는 고체상으로 셀룰로오스 성분을 회수하는 방법으로 수행되었다. 생산되는 잔류고체의 경우 각각 리그닌과 헤미셀룰로오스가 제거된 형태로 각 저해요소를 제거하여 효소당화를 하는 것으로 당화 효과를 비교하여 볼 수 있다.

1차년도에 언급되었던 호름형 침출 반응기를 이용하여 바이오매스를 반응기내에 투입하고 원하는 반응온도까지 온도를 조절하는 동시에 질소 가스를 이용하여 용매투입용 펌프 이후부터 전 공정에 일정한 back pressure를 유도하여 고온 반응기내에는 용매와 바이오매스 사이에 항상 고-액 반응을 유지할 수 있도록 하였다(그림 2-8). 침출 전처리에 사용된 조건은 표 2-5

에 기술한 바와 같으며 암모니아수에 의한 전처리는 용매 펌프를 이용하여 암모니아수를 일정 시간 동안 공급하여 반응기내에 투입된 바이오매스로부터 리그닌을 침출시켜 반응기 밖의 저장조로 제거시킨다. 그리고 약황산에 의한 전처리는 황산 용액을 반응기내로 공급시키면, 헤미셀룰로오스 성분이 바이오매스로부터 침출되어 저장조로 회수한다. 일정시간 반응 시키면 반응기내에 잔류되는 고체상을 회수하여 셀룰로오스 성분을 분별한다.

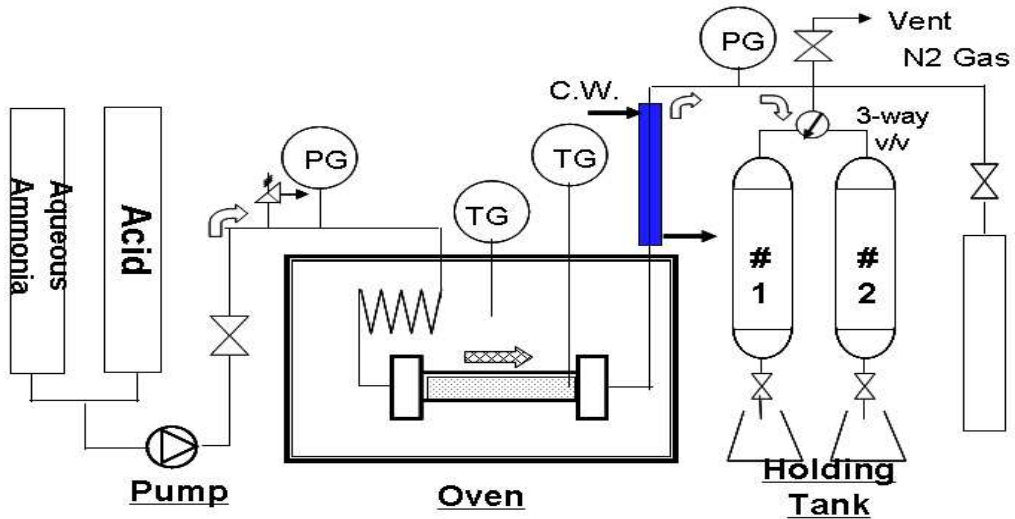


그림 2-8. 침출 전처리 장치의 모식도

표 2-5 침출 전처리 및 당화조건

조건		알칼리처리	산처리
전처리	용매	Aq. ammonia (10~20 %)	Sulfuric acid (0.5 ~ 2.0 %)
	반응온도	150 ~ 190 °C	150 ~ 190 °C
	반응시간	40 min	40 min
	침출유속	4.0 mL/min	4.0 mL/min
당화	효소량	60 FPU/g dry biomass	
	반응온도	50°C	
	반응시간	72 hr	

(2) 전처리 후 성분 분석 결과

첫째로 40분 동안 암모니아수를 반응기내로 침출시켜 리그닌을 제거시켜 탈 리그닌 효과를 나타내었으며, 다음으로 황산 용액을 이용하여 자일로스 성분을 용액상으로 회수시켰으며 최종적으로 고체상으로 얻어진 바이오매스의 생존율(Survival ratio)를 확인하였다(표 2-6).

표 2-6 전처리 후 바이오매스의 생존율

	농도	온도 (°C)	생존율 (%)
Aqueous Ammonia	10%	150	68.0
		170	62.4
		190	59.6
	15%	150	67.8
		170	61.1
		190	60.4
	20%	150	64.5
		170	57.5
		190	54.7
Sulfuric acid	0.5%	150	58.4
		170	50.9
		190	36.9
	1.0%	150	59.9
		170	51.6
		190	34.8
	2.0%	150	55.8
		170	44.0
		190	31.6
Hot water	-	150	82.7
		170	64.7
		190	57.2

암모니아수에 의한 전처리는 55~68%의 생존율을 나타내며 황산에 의한 전처리는 32~60%의 생존율을 나타냈다. 황산의 전처리는 암모니아수의 전처리에 비해 온도의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다.

표 2-7. 각 전처리 조건별 바이오매스의 성분 분석

Pretreatment conditions			Components (%)				
Solutions	conc.	Temp. (°C)	Cellulose	Hemi-Cellulose	Lignin	Others	Total
Aqueous Ammonia	10%	150	36.8	12.4	13.5	5.4	68.0
		170	37.3	9.1	12.0	3.9	62.4
		190	38.9	9.7	10.9	0.1	59.6
	15%	150	38.3	12.1	12.6	4.8	67.8
		170	36.3	9.2	9.6	6.0	61.1
		190	37.0	8.5	9.0	5.9	60.4
	20%	150	35.8	11.1	11.2	6.2	64.5
		170	35.4	9.2	8.1	4.7	57.5
		190	33.5	8.0	7.1	6.0	54.7
Sulfuric acid	0.5%	150	34.8	0.0	17.1	6.6	58.4
		170	30.0	0.0	16.2	4.7	50.9
		190	16.7	0.0	17.6	2.5	36.9
	1.0%	150	32.5	0.0	17.2	10.2	59.9
		170	26.7	0.0	17.7	7.3	51.6
		190	8.0	0.0	17.4	9.4	34.8
	2.0%	150	29.6	0.0	16.8	9.4	55.8
		170	24.1	0.0	15.6	4.3	44.0
		190	2.5	0.0	16.2	12.9	31.6
Hot water	-	150	37.1	15.1	18.5	12.0	82.7
		170	36.8	6.6	16.6	4.7	64.7
		190	34.1	2.7	16.7	3.7	57.2
Untreatment			41.7	19.2	20.9	18.3	100.0

표 2-7에서는 각 전처리 조건에 따른 바이오매스의 구성성분을 나타내었다. 또한 그림 2-9와 표 2-8에서는 150 °C에서 전처리를 할 때 침출공정에서는 10, 15 그리고 20% 농도의 암모니아 전처리를 하였을 때 셀룰로오스 잔존율은 약 90%이고 헤미셀룰로오스 잔존율은 10, 15% 암모니아수 전처리는 약 64%, 20% 암모니아수 전처리는 58%로 나타났다. 그리고 리그닌 제거율은 35~46%로 온도가 높을수록 크게 나타났다. 또한 황산 전처리에서는 헤미셀룰로오스가 대부분 제거가 되었고 리그닌은 약 18%의 제거율을 보였다. 150°C에서는 암모니아수와 황산의 두 경우에 농도 차이에 의한 전처리 결과가 크게 다르지 않다는 것을 보인다. 그러나 그림 2-10과 표 2-9에서 보는 바와 같이 170°C 이상의 온도가 되었을 때는 농도가 높아질수록 리그닌 제거율도 눈에 띄게 증가함을 알 수 있다. 또한 황산 전처리를 하였을 때 농도가 높아짐에 따라 셀룰로오스의 잔존율이 크게 감소하는 단점이 발생하였다. 특히 그림 2-11과 표

2-10에서와 같이 190℃에서는 셀룰로오스 성분이 6%밖에 남지 않는 상황이 발생하였다. 열수에 의한 전처리에서는 온도가 높아지면서 헤미셀룰로오스 성분의 제거율이 높아짐을 알 수 있었다.

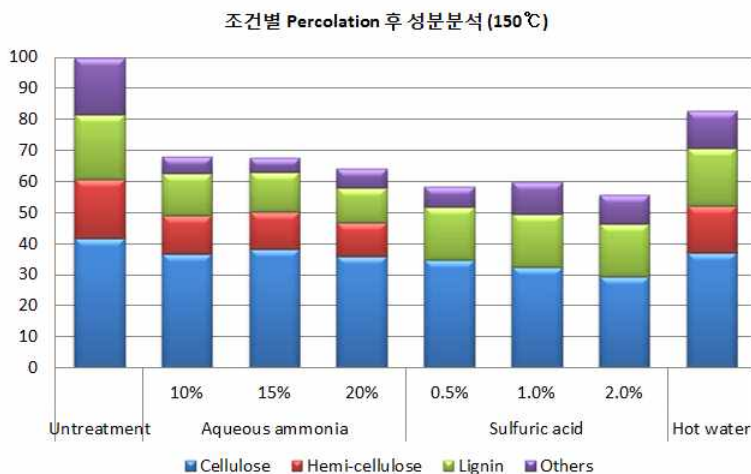


그림 2-9. 150℃에서의 전처리 조건별 침출공정 후 성분분석

표 2-8. 150℃에서의 전처리 조건별 침출공정 후 당 잔존율과 리그닌 제거율

Pretreatment conditions		Cellulose 잔존율 (%)	Hemi-cellulose 잔존율 (%)	Lignin 제거율 (%)
Aqueous ammonia	10%	88.3	64.4	35.4
	15%	91.9	63.1	39.6
	20%	86.0	58.1	46.1
Sulfuric acid	0.5%	83.4	0.0	18.1
	1.0%	78.0	0.0	17.6
	2.0%	71.0	0.0	19.4
Hot water		89.0	78.8	11.4

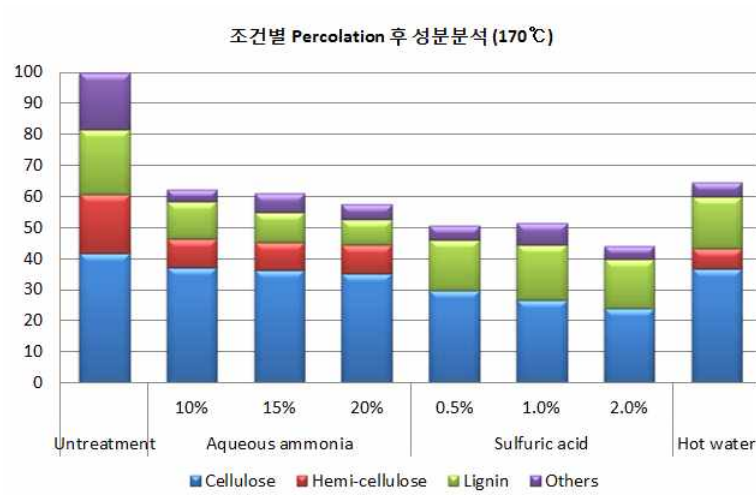


그림 2-10. 170°C에서의 전처리 조건별 침출공정 후 성분분석

표 2-9. 170°C에서의 전처리 조건별 침출공정 후 당 잔존율과 리그닌 제거율

Pretreatment conditions		Cellulose 잔존율 (%)	Hemi-cellulose 잔존율 (%)	Lignin 제거율 (%)
Aqueous ammonia	10%	89.5	47.4	42.3
	15%	87.0	47.8	53.8
	20%	85.0	48.2	61.0
Sulfuric acid	0.5%	71.9	0.0	22.2
	1.0%	64.1	0.0	15.2
	2.0%	57.8	0.0	25.1
Hot water		88.2	34.5	20.4

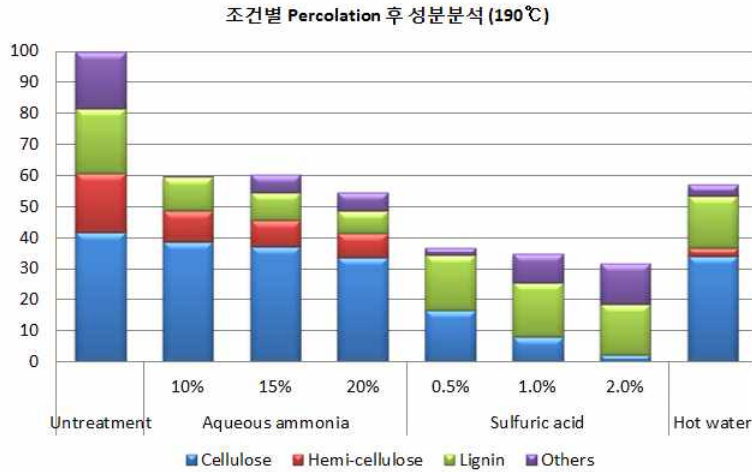


그림 2-11. 190℃에서의 전처리 조건별 침출공정 후 성분분석

표 2-10. 190℃에서의 전처리 조건별 침출공정 후 당 잔존율과 리그닌 제거율

Pretreatment conditions		Cellulose 잔존율 (%)	Hemi-cellulose 잔존율 (%)	Lignin 제거율 (%)
Aqueous ammonia	10%	93.3	50.8	47.6
	15%	88.8	44.6	57.0
	20%	80.5	41.9	65.8
Sulfuric acid	0.5%	40.1	0.0	15.6
	1.0%	19.3	0.0	16.5
	2.0%	6.0	0.0	22.1
Hot water		81.7	14.3	19.8

(3) 전처리 조건별 효소 당화효율 비교

전처리를 거친 바이오매스를 이용하여 효소당화를 실시하여 전처리에 따른 당 전환율을 확인하였다. 실험에 사용된 효소는 cellulase로는 celluclast 1.5L, β -glucosidase로는 Novozyme 188을 사용하였으며, 효소는 각각 60 FPU/g Cellulose, 120 CBU/g Cellobiose를 첨가하였으며 기질농도는 4 wt.%로 동일 한 농도를 맞추어 shaking incubator 안에서 flask를 이용해 180 rpm, 50 ℃로 72 시간동안 실시하였다.

그림 2-11~16은 각 조건별로 전처리된 돼지감자줄기를 효소당화를 하였을 때 글루코스 농도와 전환율을 나타내어 전처리전의 돼지감자줄기와 Whatman No.1에 대한 농도와 전환율

을 비교한 그래프이다. 그림에서 보듯 전처리를 하지 않은 돼지감자줄기의 효소당화의 경우에는 글루코스 생산농도와 전환율이 각각 2.4 g/L와 14.2%로 효소당화 효과가 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 암모니아수로 전처리를 수행한 돼지감자줄기의 효소당화는 그림 2-16에 따르면 최소 60%의 글루코스 전환율을 나타내었다. 이때의 글루코스 생산농도는 15.6 g/L로 전처리를 하지 않았을 때보다 약 6배 이상의 생산농도 증가를 보였다(그림 2-15). 저해요소로 작용하는 리그닌을 제거하는 것이 글루코스 생산에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 전처리 조건의 최적화를 통해 글루코스 전환율을 높인다면 더 높은 농도의 글루코스를 생산이 가능할 것으로 보인다. 또한 반응온도 190℃의 고온에서는 20% 암모니아수로 전처리를 수행한 바이오매스의 경우에 21.2 g/L의 글루코스 농도와 86.3%의 글루코스 전환율이 나타나는 것을 알 수 있다. 반면에 황산에 의한 전처리의 경우에 150와 170℃의 온도에서 전처리된 돼지감자줄기는 평균 14 g/L 농도의 글루코스가 생산이 되었지만 평균 전환율은 약 64%로 나타났다(그림 2-11~14). 헤미셀룰로오스의 제거 역시 글루코스 전환율을 높이는데 영향이 있다는 것을 보였다. 암모니아수의 경우와 마찬가지로 최적화를 통한다면 글루코스의 생산량을 높일 수 있을 것으로 보인다. 그러나 그림 2-15에서 보는 바와 같이 190℃의 고온에서는 전환율이 90%이상으로 나타나지만 과다 손실된 셀룰로오스의 영향으로 생산된 글루코스의 양이 다른 전처리 조건의 바이오매스에 비해 현저히 적다는 것을 알 수 있었다. 또한 열수에 의한 전처리에서는 190℃의 고온에서 18.4 g/L의 글루코스 농도와 77.2%의 글루코스 전환율을 보여 비교적 높은 효과를 기대할 수 있었다.

2차년도에는 암모니아수와 황산에 의한 침출 전처리를 수행하였다. 각각의 전처리에서 돼지감자줄기에 대한 침출공정의 가능성을 확인하였다. 각 공정에 대해 최적화를 수행하면 높은 수율의 글루코스의 생산이 가능할 것으로 보인다. 최적화공정으로 암모니아와 산 또는 암모니아와 열수의 조합으로 2단 전처리를 고려해 볼 필요가 있다. 상기 공정은 효소당화를 할 때 저해요소로 작용하는 리그닌을 제거하는 암모니아 침출공정의 장점과 헤미셀룰로오스를 제거하는 황산 침출공정의 장점을 조합한 공정이다. 3차년도에는 이러한 공정을 통해 글루코스 전환율과 생산량을 높이는 방향으로 연구가 수행되어야 할 것이다.

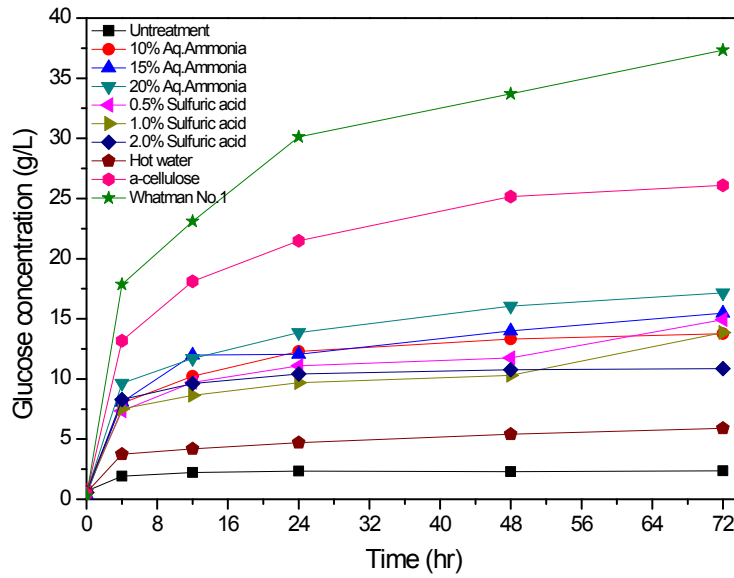


그림 2-11. 150°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 농도.

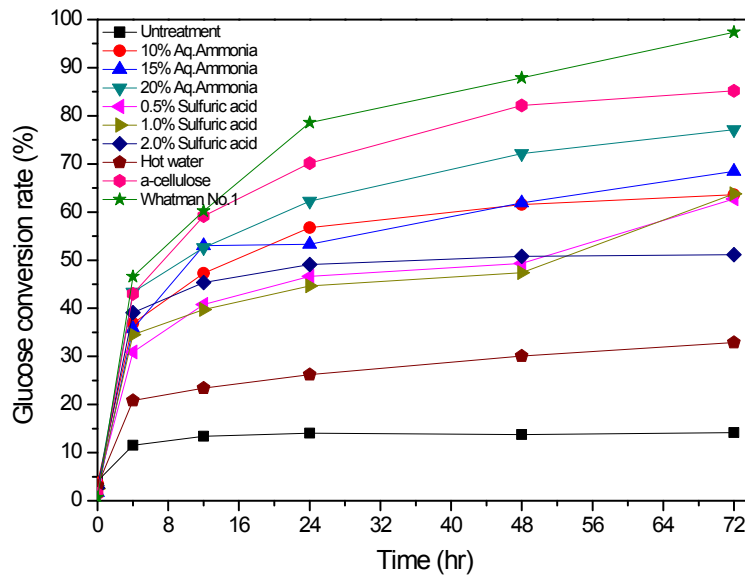


그림 2-12. 150°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 전환율.

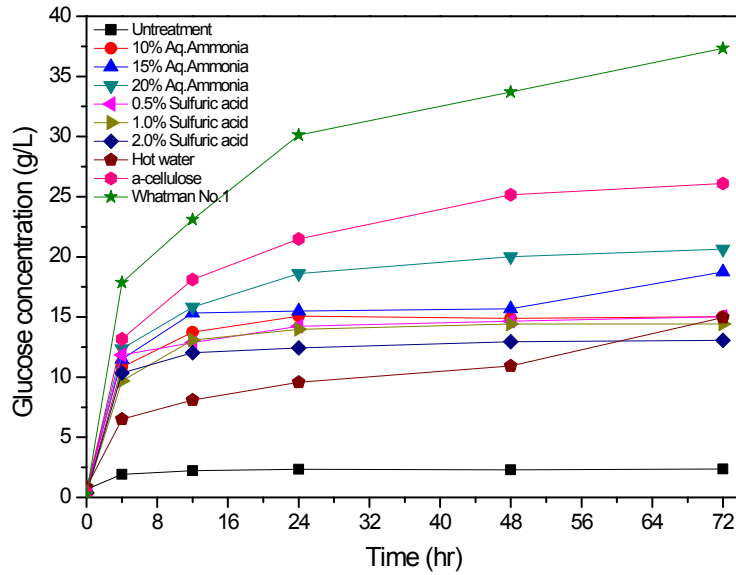


그림 2-13. 170°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 농도.

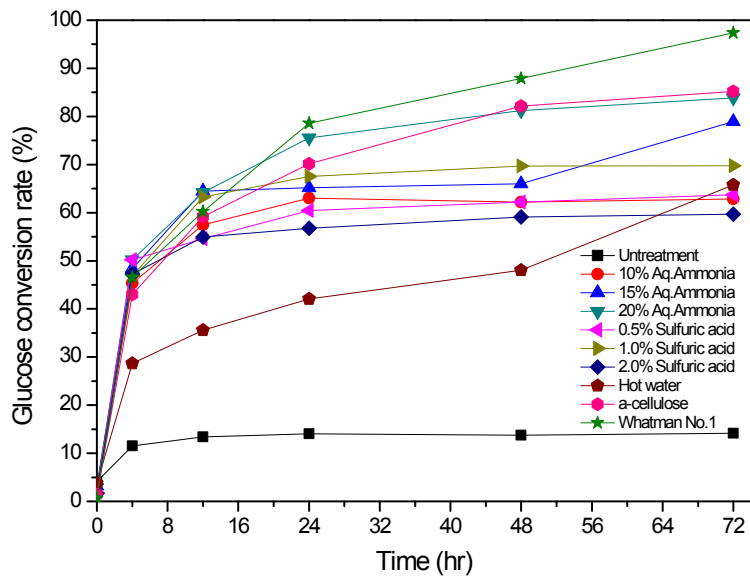


그림 2-14. 170°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 전환율.

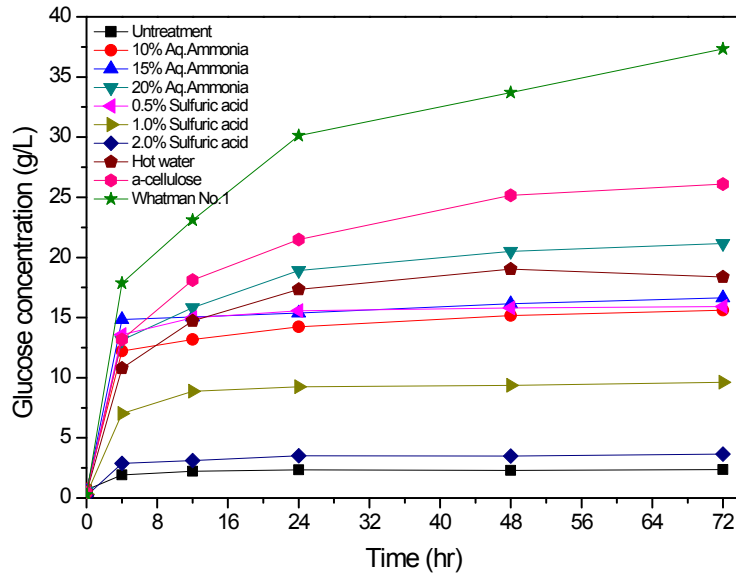


그림 2-15. 190°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 농도.

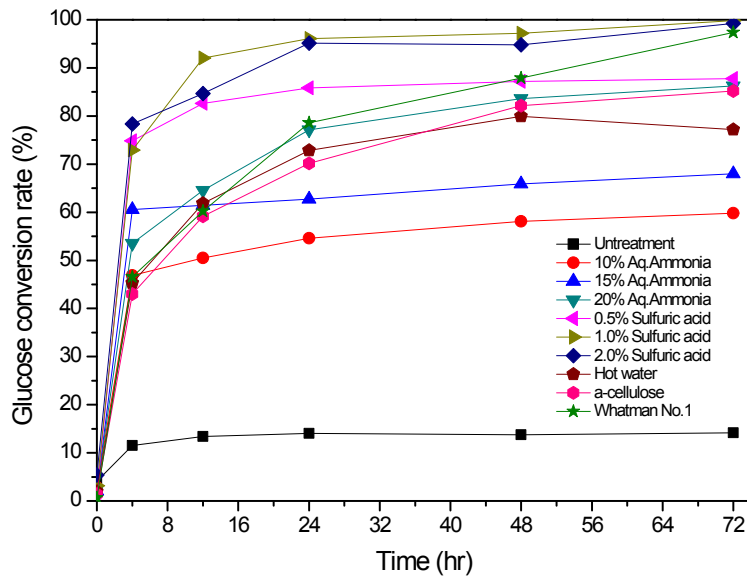


그림 2-16. 190°C에서의 전처리 조건별 침출 공정 후 효소당화 글루코스 전환율.

라. 반응표면분석법을 이용한 돼지감자 바이오매스 전처리 기술 개발

(1) 바이오매스 전처리 조건 최적화

2차 년도에 확인해보았던 바이오매스의 침출 전처리 조건에 대한 최적 조건을 예측해보기 위해 바이오매스 생산량, 성분분석 및 당화결과를 통합적으로 분석하기 위한 최적조건을 탐색하는 방법으로 통계학적 최적화 도구인 반응표면 분석법(RSM : Response Surface Method)을 사용하여 실험을 진행하였다.

공정 변수에 따라 글루코오스 잔존율과 리그닌 제거율에 미치는 영향에 대해 알아보았으며 최적조건을 예측하여 당 전환율을 구하였다. 최적 조건을 예측하기 위한 전처리는 암모니아수와 황산용액에 대하여 수행되었다. 전처리가 수행된 바이오매스는 모두 성분분석을 하였고 효소당화를 진행하였다. 효소당화는 pH4.8의 citrate buffer solution으로 5 wt%의 기질 농도로 50 °C에서 72시간동안 진행되었다. 효소당화에 사용된 효소는 C-tec이었다.

(가) 암모니아수에 의한 침출 전처리

암모니아수에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 표 2-11과 같은 조건을 설정해서 수행하였다.

표 2-11 암모니아수에 의한 침출전처리의 최적화를 위한 공정변수

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Aqueous Ammonia concentration (wt%)	X1	10	15	20
Temperature (°C)	X2	130	170	210
Reaction time (min)	X3	20	30	40

각 실험의 조건은 10 ~ 20 wt%의 농도의 암모니아수로 130 ~ 210 °C의 반응온도에서 20 ~ 40분의 반응시간으로 수행하였다. 실험의 결과로는 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소소화율을 구하였고 그 결과는 그림 2-17~20 및 표 2-12에 나타내었다.

표 2-12. 암모니아수에 의한 침출전처리의 최적화 실험 결과

No.	X1	X2	X3	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	0	1	1	56.0	80.3	31.9	90.1
2	1	1	0	56.4	86.3	37.4	99.9
3	0	0	0	64.4	94.9	38.6	75.1
4	1	0	1	61.6	95.1	49.4	82.8
5	-1	0	-1	67.2	91.2	31.3	63.5
6	-1	-1	0	76.8	88.6	18.8	53.5
7	0	0	0	65.7	90.1	37.0	75.6
8	-1	1	0	55.4	81.5	17.5	97.7
9	1	0	-1	63.3	84.9	30.9	77.0
10	0	0	0	65.0	86.2	40.4	78.7
11	0	-1	1	75.2	94.1	20.9	56.6
12	0	1	-1	56.6	88.1	33.0	99.6
13	0	-1	-1	77.2	92.9	15.5	45.5
14	0	0	0	64.1	88.4	39.1	77.4
15	1	-1	0	74.8	85.2	24.0	62.0
16	-1	0	1	65.7	95.2	40.0	75.0
17	0	0	0	64.8	92.3	38.2	72.6

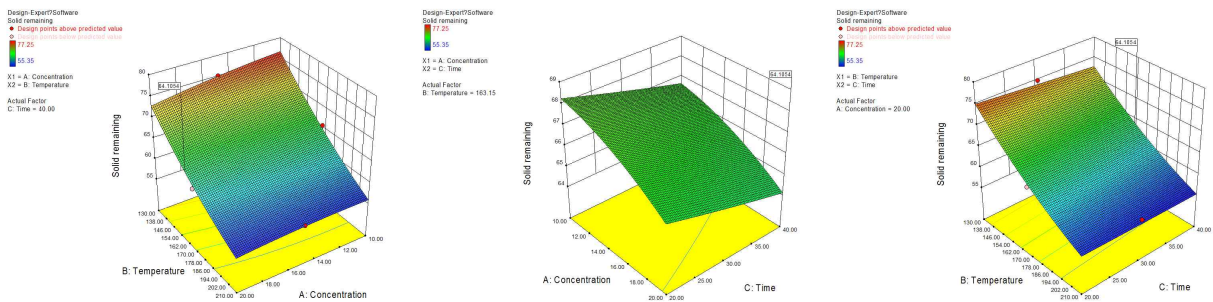


그림 2-17. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on solid remaining of pretreated Jerusalem artichoke residue by aqueous ammonia

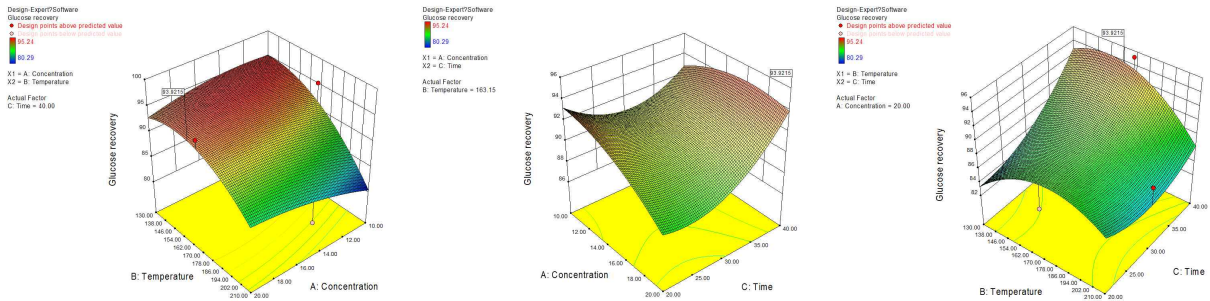


그림 2-18. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on glucose recovery yield of pretreated Jerusalem artichoke residue by aqueous ammonia

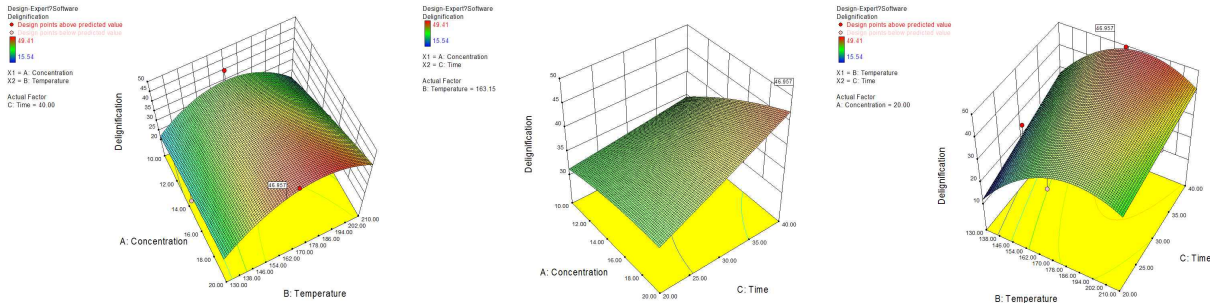


그림 2-19. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on delignification yield of pretreated Jerusalem artichoke residue by aqueous ammonia

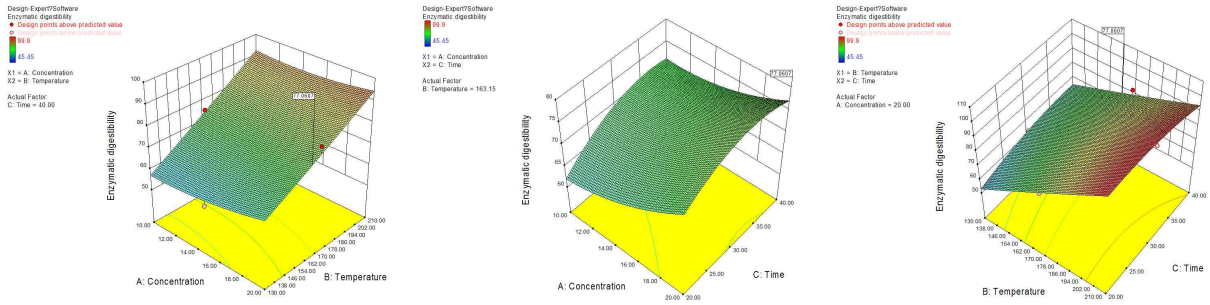


그림 2-20. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated Jerusalem artichoke residue by aqueous ammonia

표 2-13. The optimum condition of Ammonia percolation process

Conditions	Value
Concentration (wt%)	20
Temperature (°C)	163.2
Reaction time (min)	40

위 실험 결과를 바탕으로 침출 반응기에서 얻은 최적 조건을 예측한 결과는 표 2-13에 나타내었다. 돼지감자줄기에 대한 침출 전처리 공정은 20 wt%의 농도의 암모니아수로 163.2 °C의 반응온도에서 40분의 반응시간에서 최적 조건임을 예측하였다. 반응 표면 분석 실험에서 예측된 최적조건으로 침출 전처리 공정에 적용하여 바이오매스의 전처리 실험을 수행하였다. 암모니아수에 대한 비교군으로 열수를 용매로 하여 같은 온도와 반응시간 조건으로 전처리를 수행하였다.

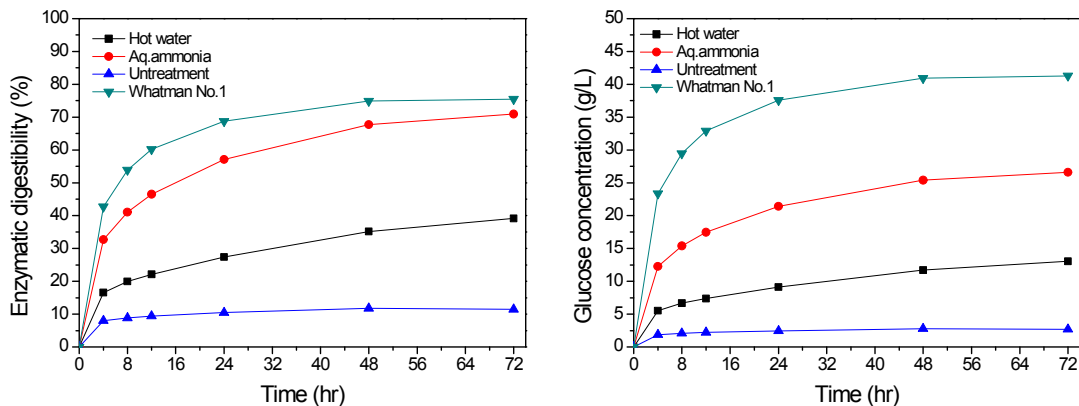


그림 2-21. 암모니아수에 의한 침출 전처리의 최적 조건으로 전처리된 바이오매스의 효소당화

예측된 최적 조건을 통한 침출 전처리 공정에서 고형물 잔존율은 64.1%로 나타났고 95.6%의 글루코오스 회수율과 63.0%의 리그닌 제거율을 보였다. 그때의 효소소화율은 70.9%인 것으로 확인하였다(그림 2-21).

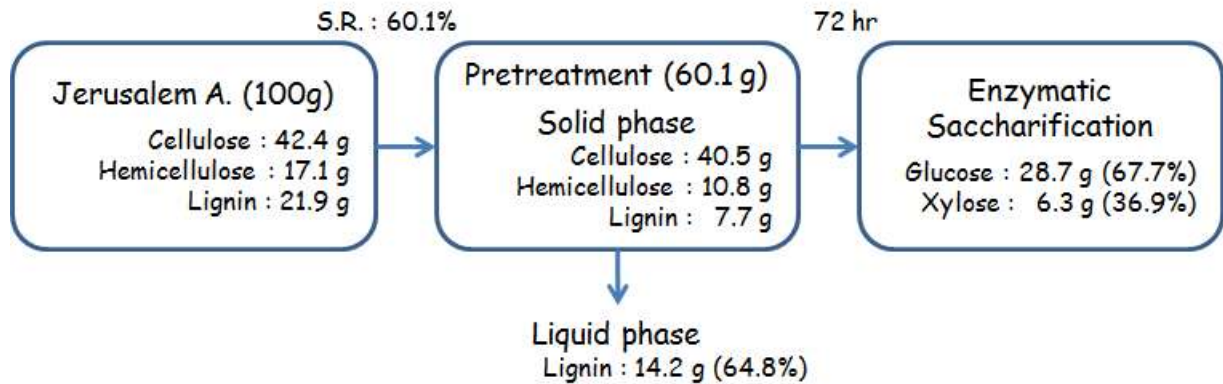


그림 2-22. Mass balance of pretreatment by 20 wt% Aqueous ammonia at 163.2°C for 40 min

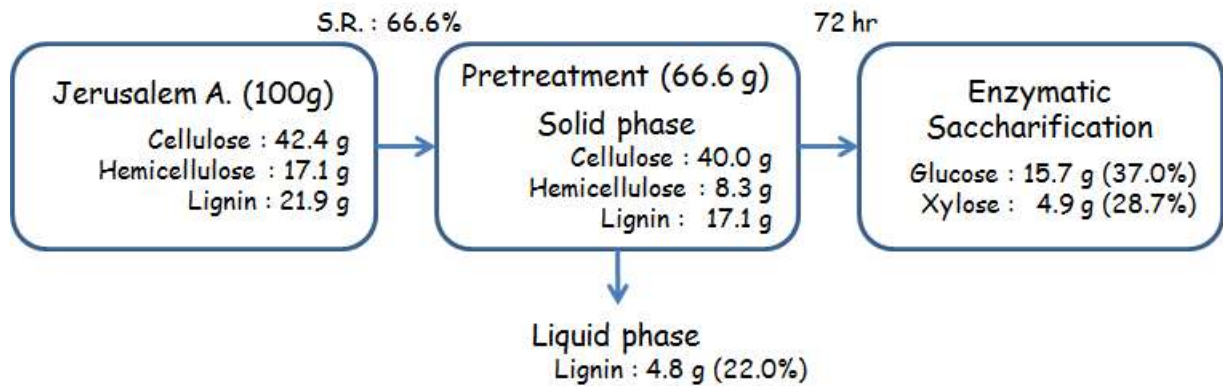


그림 2-23. Mass balance of pretreatment by Hot-water at 163.2°C for 40 min

전체적인 바이오매스의 전처리 효율, 당화율 및 에탄올 생산 수율을 얻기 위해서는 공정에 대한 mass balance를 구하는 것이 중요하다. 바이오매스로부터 얻을 수 있는 당화율은 전처리 혹은 당화, 발효과정에서 손실되는 당 및 기타 성분을 파악해야만 정확한 당 생산량을 얻을 수 있다. 163.2 °C에서 40분 동안 20 wt% 암모니아수와 열수에 의한 전처리 공정에 대한 mass balance를 보면 암모니아수에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 28.7 g으로 전체 바이오매스의 67.7%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 15.7 g으로 37.0 %의 수율을 나타냈다(그림 2-22, 2-23). 효소당화의 저해물질로 작용하는 리그닌은 암모니아수의 전처리공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. 바이오매스에 대해 암모니아수와 열수 공정으로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 글루코오스 전환율이 각각 70.9%와 39.2%로 두 공정을 비교하면 약 2배가량의 차이를 보였다. 전처리 전의 바이오매스의 글루코오스 전환율이 11.5%로 나타난 것으로 보아 열수 전처리도 효과는 있지만 암모니아수를 사용하여 수행하였을 때 훨씬 좋은 전처리 효과를 본다고 할 수 있다.

(나) 묽은 황산 용액에 의한 침출 전처리

묽은 황산 용액에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 표 2-14과 같은 조건을 설정해서 수행하였다.

표 2-14. 황산 용액에 의한 침출전처리의 최적화를 위한 공정변수

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Sulfuric acid solution concentration (wt%)	X1	0.5	1.0	1.5
Temperature (°C)	X2	130	170	210
Reaction time (min)	X3	20	30	40

각 실험의 조건은 0.5 ~ 1.5 wt%의 농도의 황산 용액으로 130 ~ 210 °C의 반응온도에서 20 ~ 40분의 반응시간으로 수행하였다. 실험의 결과로는 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소소화율을 구하였고 그 결과는 표 2-15에 나타내었다.

표 2-15. 황산 용액에 의한 침출전처리의 최적화 실험 결과

No.	X1	X2	X3	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	-1	0	1	52.0	80.4	27.3	65.3
2	1	1	0	26.8	0.9	1.3	63.9
3	0	1	-1	26.4	3.8	1.0	93.4
4	-1	1	0	26.9	12.2	4.8	98.1
5	0	-1	1	66.5	80.8	18.7	26.1
6	0	0	0	53.8	82.5	22.5	61.0
7	1	-1	0	66.0	84.2	1.1	31.7
8	1	0	-1	49.6	72.5	24.1	69.6
9	-1	-1	0	74.7	79.5	16.6	24.0
10	-1	0	-1	53.1	85.5	37.8	60.0
11	0	0	0	52.4	77.0	15.7	65.5
12	1	0	1	48.1	72.8	24.8	71.6
13	0	0	0	51.1	75.0	21.0	67.1
14	0	1	1	27.9	1.4	3.2	72.2
15	0	-1	-1	71.2	90.2	14.0	24.9
16	0	0	0	50.5	72.1	15.9	71.4
17	0	0	0	51.4	75.2	16.1	65.8

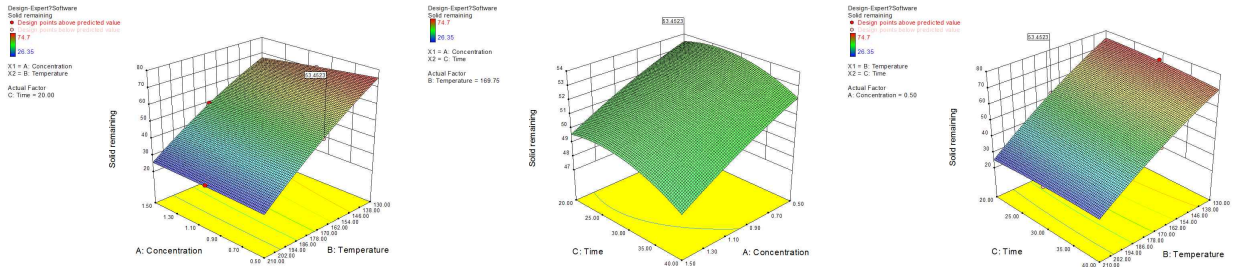


그림 2-24. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on solid remaining of pretreated Jerusalem artichoke residue by sulfuric acid solution

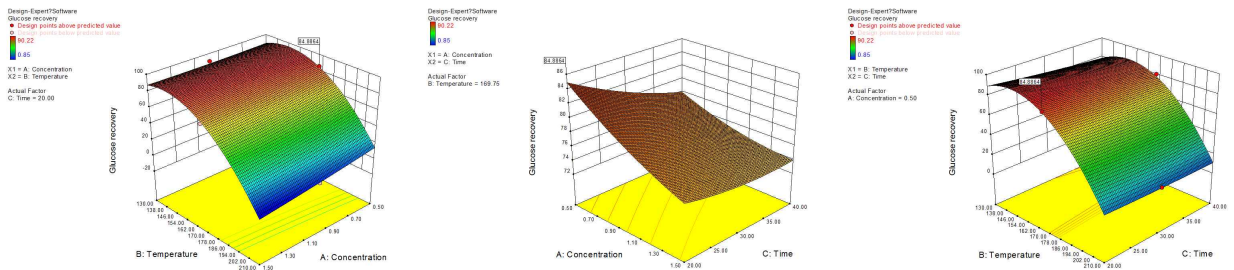


그림 2-25. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on glucose recovery yield of pretreated Jerusalem artichoke residue by sulfuric acid solution

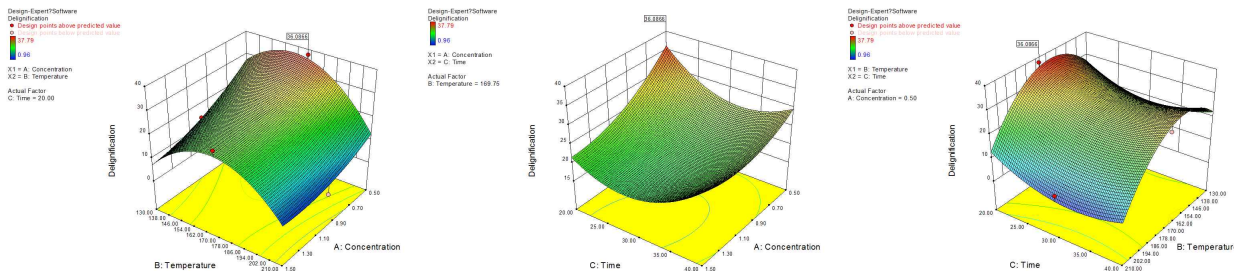


그림 2-26. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on delignification yield of pretreated Jerusalem artichoke residue by sulfuric acid solution

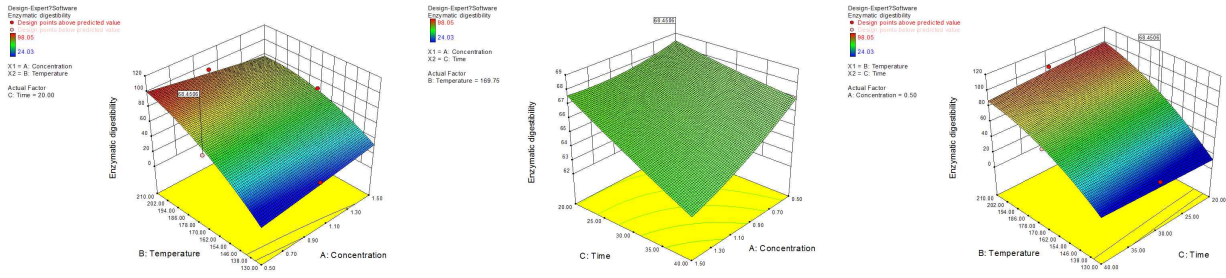


그림 2-27. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated Jerusalem artichoke residue by sulfuric acid solution

표 2-16. The optimum condition of Acid percolation process

Conditions	Value
Concentration (wt%)	0.5
Temperature (°C)	169.7
Reaction time (min)	20

위 실험 결과(그림 2-24~27)를 바탕으로 침출 반응기에서 얻은 최적 조건을 예측한 결과는 표 2-16에 나타내었다. 돼지감자줄기에 대한 침출 전처리 공정은 0.5 wt%의 농도의 황산 용액으로 169.7 °C의 반응온도에서 20분의 반응시간에서 최적 조건임을 예측하였다. 반응 표면 분석 실험에서 예측된 최적조건으로 침출 전처리 공정에 적용하여 바이오매스의 전처리 실험을 수행하였다. 황산 용액에 대한 비교군으로 열수를 용매로 하여 같은 온도와 반응시간 조건으로 전처리를 수행하였다.

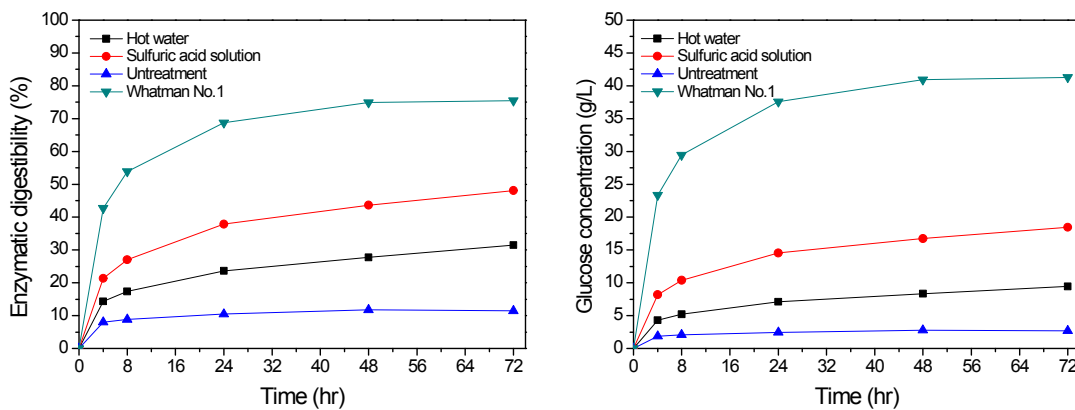


그림 2-28. 황산 용액에 의한 침출 전처리의 최적 조건으로 전처리된 바이오매스의 효소당화

예측된 최적 조건을 통한 침출 전처리 공정에서 고형물 잔존율은 54.9%로 나타났고 89.2%의 글루코오스 회수율과 36.9%의 리그닌 제거율을 보였다. 그때의 효소소화율은 48.1%인 것으로 확인하였다(그림 2-28).

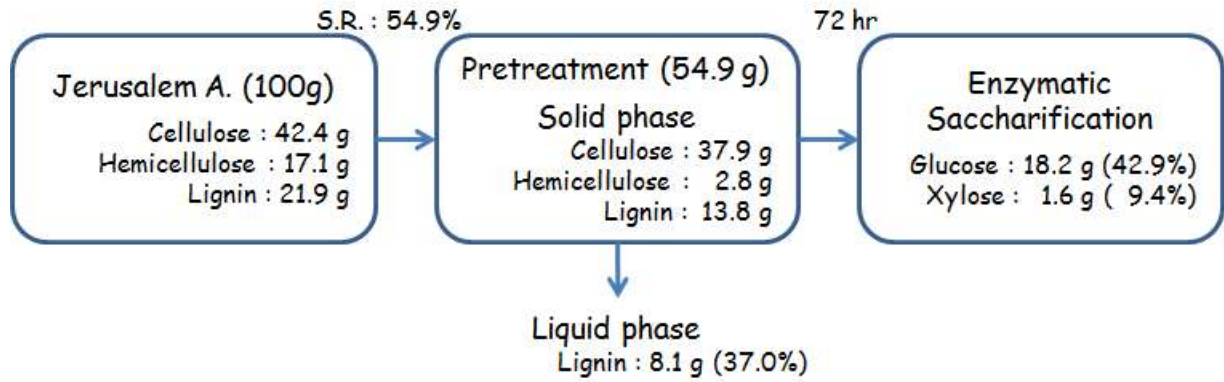


그림 2-29. Mass balance of pretreatment by 0.5 wt% Sulfuric acid solution at 169.7°C or 20 min

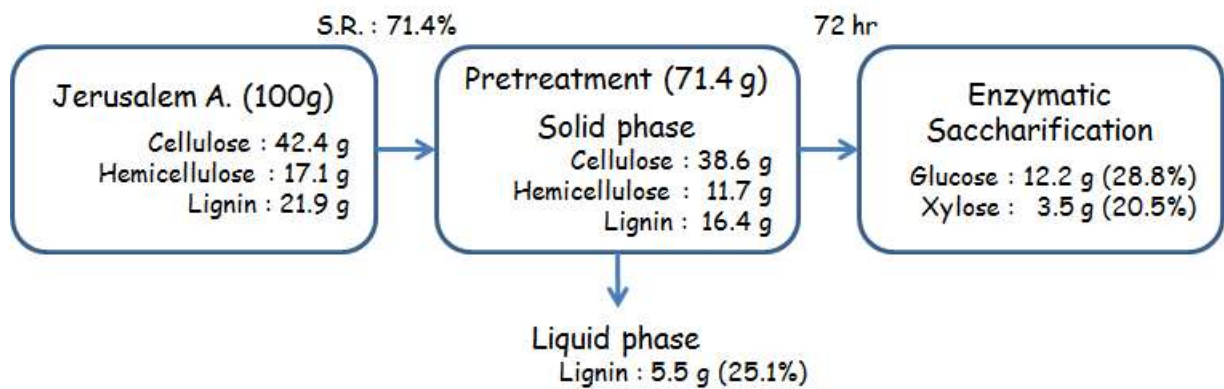


그림 2-30. Mass balance of pretreatment by Hot-water at 169.7°C or 20 min

앞서 암모니아수와 마찬가지로 황산용액에 의한 전처리 공정에 대한 mass balance를 구하였다. 169.7 °C에서 20분 동안 0.5 wt% 황산 용액과 열수에 의한 전처리 공정에 대한 mass balance를 보면 황산 용액암모니아수에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 18.2 g으로 전체 바이오매스의 42.9%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 12.2 g으로 28.8%의 수율을 나타냈다(그림 2-29, 2-30). 효소당화의 저해물질로 작용하는 리그닌은 황산 용액의 전처리공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. 바이오매스에 대해 황산 용액과 열수 공정으로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 글루코오스

전환율이 각각 48.1%와 31.5%로 두 공정을 비교하면 약 1.5배 정도의 차이를 보였다. 그리고 11.5%의 글루코오스 전환율을 보인 전처리 전의 바이오매스와 비교하면 3배에서 5배 정도 글루코오스 전환율의 상승 효과는 있지만 암모니아수에 의한 전처리의 경우보다 전처리 시간은 짧지만 고형물 잔존율도 떨어지고 글루코스 전환율도 크게 떨어지는 결과를 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 열수에 의한 전처리에서는 상대적으로 높은 온도에서 긴 시간을 처리한 것과 낮은 온도에서 짧은 시간을 처리한 것을 비교하였다. 이 때 후자의 경우에 글루코오스 전환율이 높게 나타났다. 따라서 열수에 의한 전처리에서는 시간 조건보다 온도 조건이 더 민감하게 적용된다고 볼 수 있었다.

(다) 2단 전처리 공정에 의한 침출 전처리

앞서 암모니아수와 황산 용액에 의한 전처리의 최적 조건을 찾았다. 찾은 조건을 바탕으로 2단 전처리 공정을 표 2-17과 같은 조건으로 수행하였다. 2단 전처리는 조건별로 암모니아수와 열수, 열수와 암모니아수, 황산 용액과 열수, 열수와 황산 용액, 암모니아수와 황산 용액 그리고 황산 용액과 암모니아수의 순서로 전처리를 수행하여 비교하였다. 전처리된 바이오매스는 각각 효소당화를 진행하여 글루코오스 전환율을 구하였다.

표 2-17. 2단 전처리 공정을 위한 실험 조건

Solution	Condition 1		Condition 2		Condition 3	
	Aqueous ammonia	Hot water	Sulfuric acid	Hot water	Aqueous ammonia	Sulfuric acid
Concentration (wt%)	20	-	0.5	-	20	0.5
Temperature (°C)	163.2	163.2	169.7	169.7	163.2	169.7
Reaction time (min)	40	40	20	20	40	20

2단 전처리 공정을 거친 바이오매스의 효소당화 결과를 그림 2-31에 나타내었다. 72시간의 효소당화를 수행한 결과를 비교해보면 1단으로 암모니아수를 처리한 후 2단에 황산용액 또는 열수로 처리한 바이오매스가 글루코오스 전환율이 약 77% 정도로 다른 전처리 바이오매스보다 상대적으로 높게 나타났다. 그때의 글루코오스 농도는 약 28 g/L이었다.

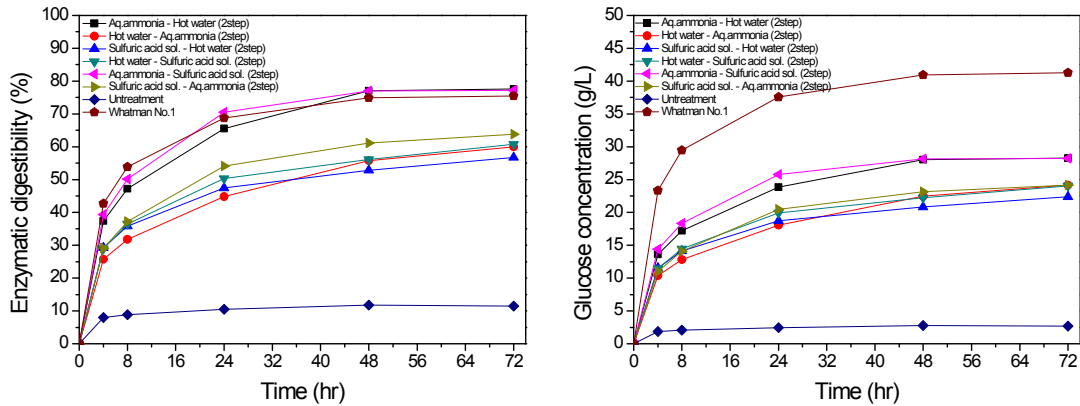


그림 2-31. 2단 전처리 공정에 의해 전처리된 바이오매스의 효소당화

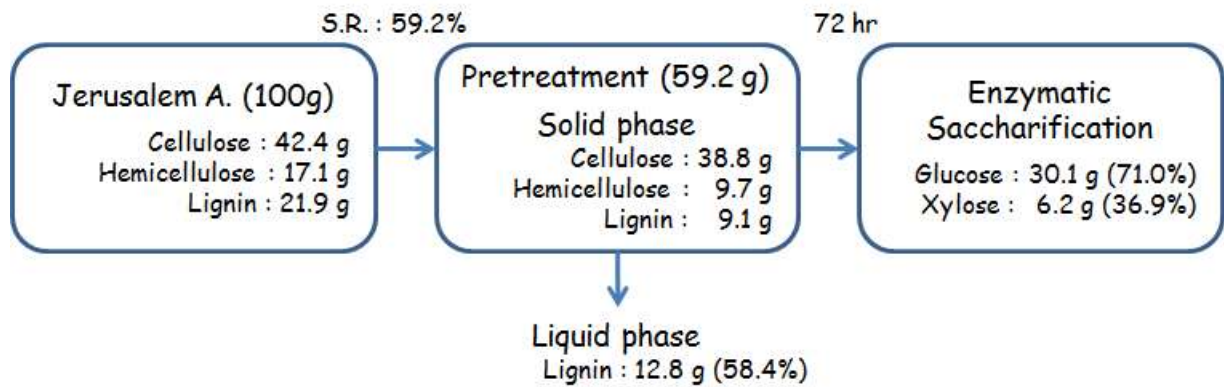


그림 2-32. Mass balance of pretreatment by 20 wt% Aqueous ammonia for 40 min and Hot-water for 40 min at 163.2°C

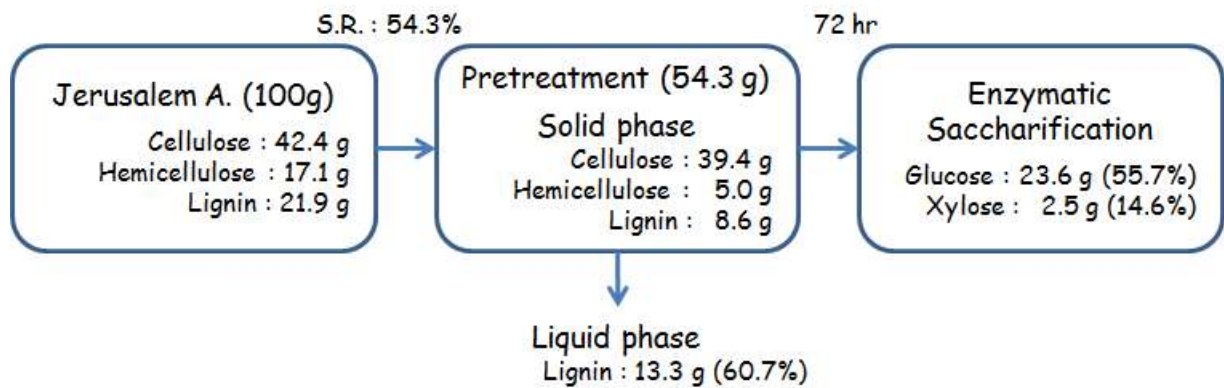


그림 2-33. Mass balance of pretreatment by Hot-water for 40 min and 20 wt% Aqueous ammonia for 40 min at 163.2°C

앞서 암모니아수와 황산 용액의 전처리와 마찬가지로 2단 전처리에 의한 공정에 대한 mass balance를 구하였다. 먼저 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간동안 열수로 전처리를 하여 그림 2-32와 같이 mass balance를 나타내었다. 이때 글루코오스 생산량은 30.1 g으로 전체 바이오매스의 71.0%의 수율을 나타냈다. 암모니아수로만 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 글루코오스 전환율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 같은 온도와 시간동안 열수를 먼저 전처리를 한 후에 암모니아수로 전처리를 하고 그림 2-33처럼 mass balance를 구하였다. 이때 글루코오스 생산량은 23.6 g으로 전체 바이오매스의 55.7%의 수율을 보였다. 열수로만 전처리를 하였을 때보다 암모니아수를 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 50%의 글루코오스 생산량 향상을 나타냈다. 그러나 암모니아수를 먼저 처리한 공정 보다는 글루코오스 생산량이 낮은 경향을 보였다.

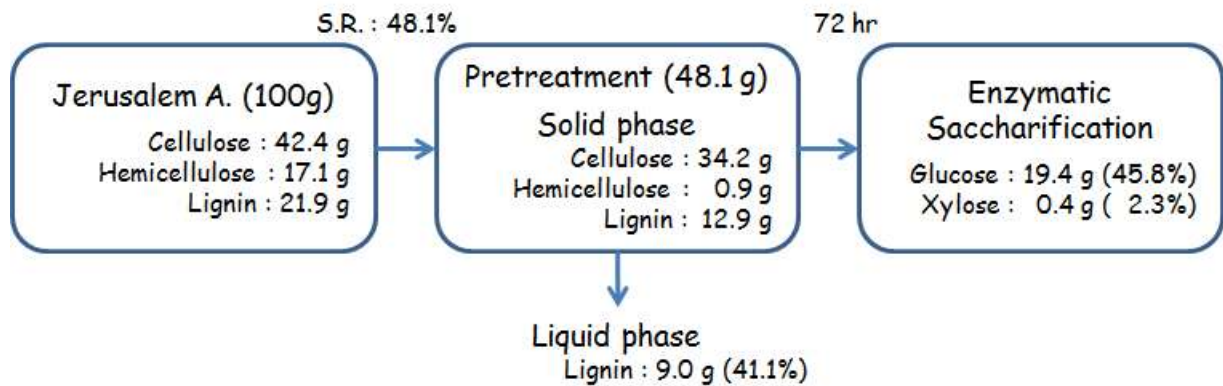


그림 2-34. Mass balance of pretreatment by 0.5 wt% Sulfuric acid solution for 20 min and Hot-water for 20 min at 169.7°C

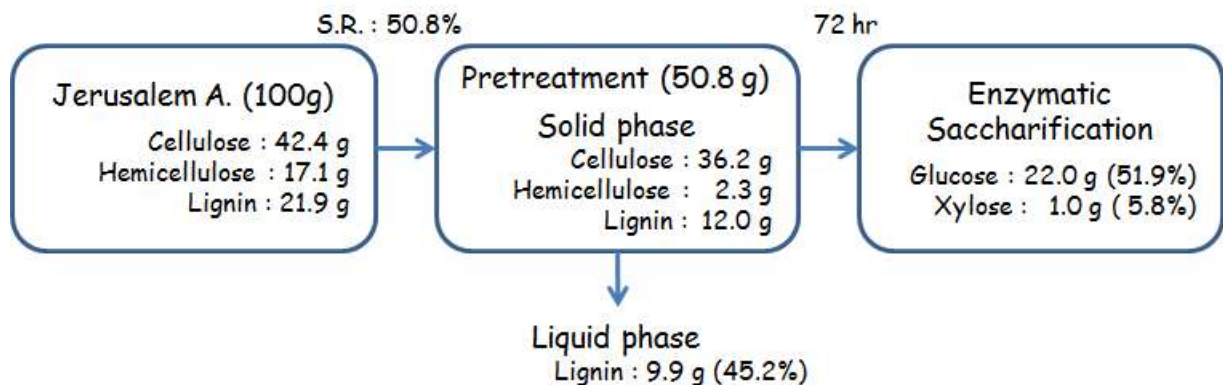


그림 2-35. Mass balance of pretreatment by Hot-water for 20 min and 0.5 wt% Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7°C

두번째로 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간

동안 열수로 전처리를 하여 그림 2-34와 같이 mass balance를 나타내었다. 이때 글루코오스 생산량은 19.4 g으로 전체 바이오매스의 45.8%의 수율을 나타내었다. 황산 용액으로만 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 글루코오스 전환율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 같은 온도와 시간동안 열수를 먼저 전처리를 한 후에 황산 용액으로 전처리를 하고 그림 2-35처럼 mass balance를 구하였다. 이때 글루코오스 생산량은 22.0 g으로 전체 바이오매스의 51.9%의 수율을 보였다. 열수로만 전처리를 하였을 때보다 황산 용액을 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 80%의 높은 글루코오스 생산량 향상을 나타냈다. 또한 암모니아수와는 다르게 열수를 먼저 처리한 후 황산 용액을 처리한 바이오매스가 상대적으로 글루코오스 생산량이 높게 생산된 경향을 보였다.

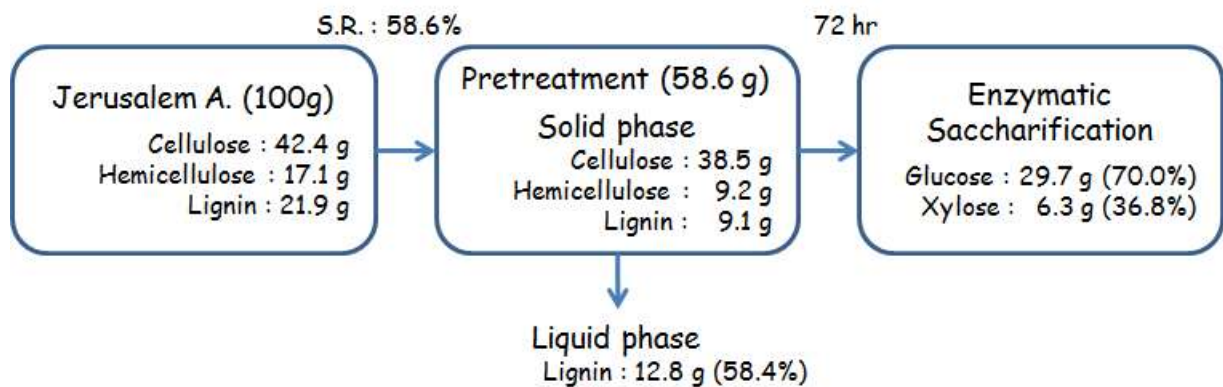


그림 2-36. Mass balance of pretreatment by 20 wt% Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C and 0.5 wt% Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7°C

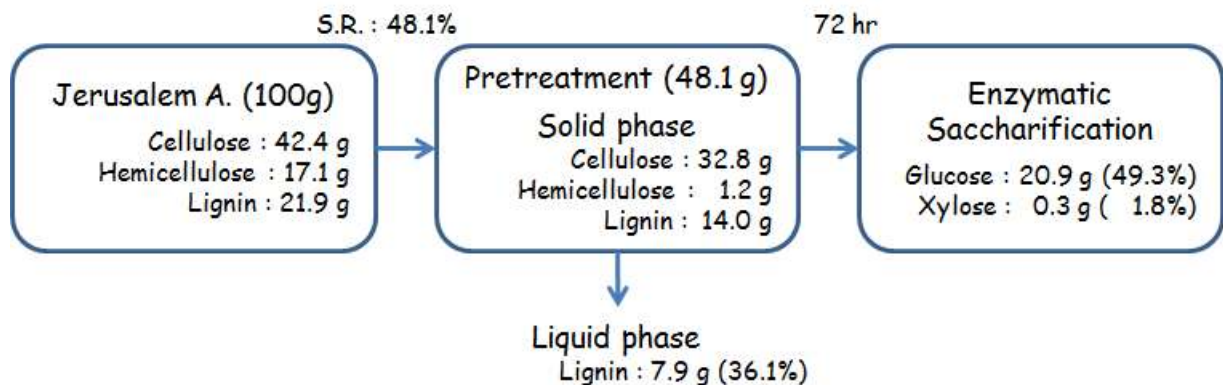


그림 2-37. Mass balance of pretreatment by 0.5 wt% Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7°C and 20 wt% Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C

세 번째로 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 하여 그림 2-36과 같이 mass balance를 구하였다. 이때 글루코오스

생산량은 29.7 g으로 70.0%의 수율이 나타났다. 이 공정은 암모니아수로 처리 후에 열수로 처리한 2단 전처리 공정과 유사한 글루코오스 생산량과 수율을 보이며 그 외의 다른 공정보다는 상대적으로 높은 결과를 나타내주었다. 반대로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 글루코오스 생산량이 20.9 g으로 49.3%의 수율로 그림 2-37과 같이 나타났다.

황산 용액을 먼저 처리한 2단 전처리 공정은 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리공정에 비해 글루코오스가 약 30% 낮게 생산되었다. 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리는 효소당화의 수율을 높이는 작용을 하지만 황산 용액이 먼저 처리된 2단 전처리 바이오매스는 수율의 향상과는 크게 영향이 없는 경향을 보였다.

(2) 전처리 공정의 Scale-up 설계

회분식 및 침출식 공정을 통하여 얻어진 최적의 전처리 공정 (aqueous ammonia-hot water)을 상용화 규모로의 적용을 위해서는 scale-up 설계가 필요하다. 이러한 scale-up 설계의 필수적인 조건은 바이오매스의 연속 전처리가 가능한 공정의 적용 및 확보가 요구된다. 현재 국내의 관련 연속 전처리 공정의 기술적 수준은 기초 단계에 있으며, 대부분 screw-driven type의 압출 반응을 적용하고 있다. 압출 반응은 고체상의 바이오매스에 적용 용매를 반응시키는 고/액 반응을 유도할 수 있으며, 연속적으로 바이오매스를 처리 가능한 공정이다(그림 2-38). 본 연구에서 도출된 전처리 공정의 최적조건(lab-scale)을 twin-screw extrusion 반응기에 적용하기 위하여 고/액 비율, 반응온도, 반응시간을 통계적 분석법을 이용하여 운전조건을 확보하였다.

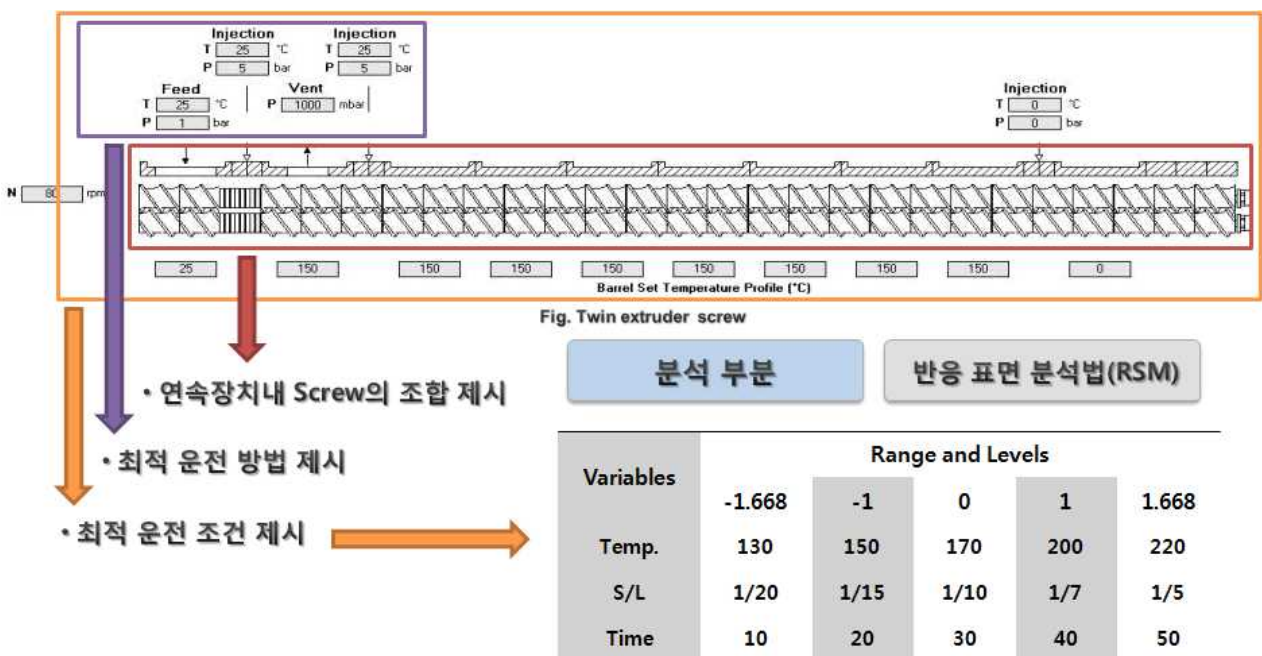


그림 2-38. Schematic design for twin screw extrusion process.

제 3 절 고온성 효모 *KM(Kluyveromyces marxianus)*의 유전체 해독

1. 유전체 해독 전략의 수립

Sanger dideoxy chain termination chemistry를 이용한 전통적인 whole-genome shotgun 유전체 해독 프로젝트에서는 타겟 유전체를 수 kb의 중복되는 절편으로 파쇄하여 플라스미드 벡터에 도입, 대장균에 형질전환을 한 뒤 재조합 plasmid를 대량으로 분리하여 클론 인서트의 양 말단에서 서열 단편쌍(mate)을 얻어 overlap-layout-consensus 방식으로 유전체 서열을 재구성하는 방법을 이용해 왔다. 그러나 2004년 말 무렵부터 등장한 차세대 염기서열 결정기술(next-generation sequencing technology, NGS)(Shendure & Ji, 2008)이 점차로 대중화하면서 초기의 주요 용도였던 resequencing, 즉 참조 유전체 서열(reference genome sequence)이 존재하는 상황에서 이와 유사한 시료의 유전체 정보를 결정하는 일 뿐만 아니라 상당한 수준의 de novo genome assembly까지도 가능한 상황이 되었다.

NGS는 서열 단편을 증폭하기 위해 대장균과 같은 생체 시스템을 사용하지 않는 대신 오직 PCR에 의해서 라이브러리 분자를 생성한다. Sanger chemistry와는 달리 read length가 매우 짧고 error가 비교적 높으며 전문학적인 숫자의 read가 대량으로 생산되므로 초기에는 오직 reference genome위에 이를 정렬하여 그 차이를 검출하는 용도(resequencing)로만 쓰일 수 있을 것으로 기대되었다. 그러나 read length와 정확도가 계속 개선되고 de Bruijn graph 기법과 같이 de novo assembly를 위한 알고리즘이 실용화되면서 이제는 gigabase 수준의 고등 생명체의 유전체를 완전히 재구성하는 용도로도 충분히 쓰일 수 있게 된 것이다.

본래 이 과제를 계획하던 2010년 초반에는 NGS 기법 중 당시에 가장 널리 쓰이던 플랫폼인 Roche/454 GS FLX Titanium을 이용하여 20x coverage의 고품질 유전체 초안을 만들 예정이었다. 그러나 과제를 착수하게 되면서 저렴한 비용으로 훨씬 대량의 데이터를 생산하는 것이 가능한 Illumina GA IIx를 사용하는 것으로 계획을 변경하였다. GS FLX Titanium에 비하여 당시의 일루미나 기법은 read length가 짧다는 불리한 점이 있지만 1) 해독 비용이 훨씬 저렴하고 2) homopolymeric region의 염기 수를 정확히 인지하므로 frameshift를 유발하지 않으며 3) read length가 점차 향상되고 있고 4) 일루미나 데이터를 이용한 de novo assembly 및 매핑에 최적화된 소프트웨어가 늘어나고 있다는 장점을 갖고 있다. 최종 보고서가 작성되고 있는 2015년도 5월 현재 일루미나 GA의 뒤를 잇는 HiSeq는 유전체 연구를 위한 가장 보편적인 장비로서 사실상의 표준 플랫폼으로 인식되고 있다.

시퀀싱 라이브러리로는 600 bp의 인서트를 지닌 표준 shotgun 라이브러리(short insert)와 5 kb의 유전체 단편을 원형화하여 얻은 mate-pair(“jumping”) library 2 종을 제작하여 일루미나와 같은 short read의 조립에 널리 쓰이는 de Bruijn assembler를 이용, 스캐폴드를 제작하기로 하였다. 그림 3-1에서는 표준 shotgun 라이브러리와 mate-pair library를 이용하여 스캐폴드를 작성하는 개념을 설명하고 있다. 5 kb의 mate-pair library로도 이론적으로는 충분한 스캐폴드가 얻어져야 하지만, 라이브러리의 제작 효율이 높지 않아서 실제로는 5 kb의 거리를

둔 단편 양 끝이 제대로 jumping을 하여 성공적인 long range mate-pair로 얻어지는 비율이 다소 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 피니싱 단계에서는 ~40 kb의 포스미드 라이브러리를 제작하여 신뢰성 있는 스캐폴드를 작성하고, 이를 이용한 gap filling을 진행하였다.

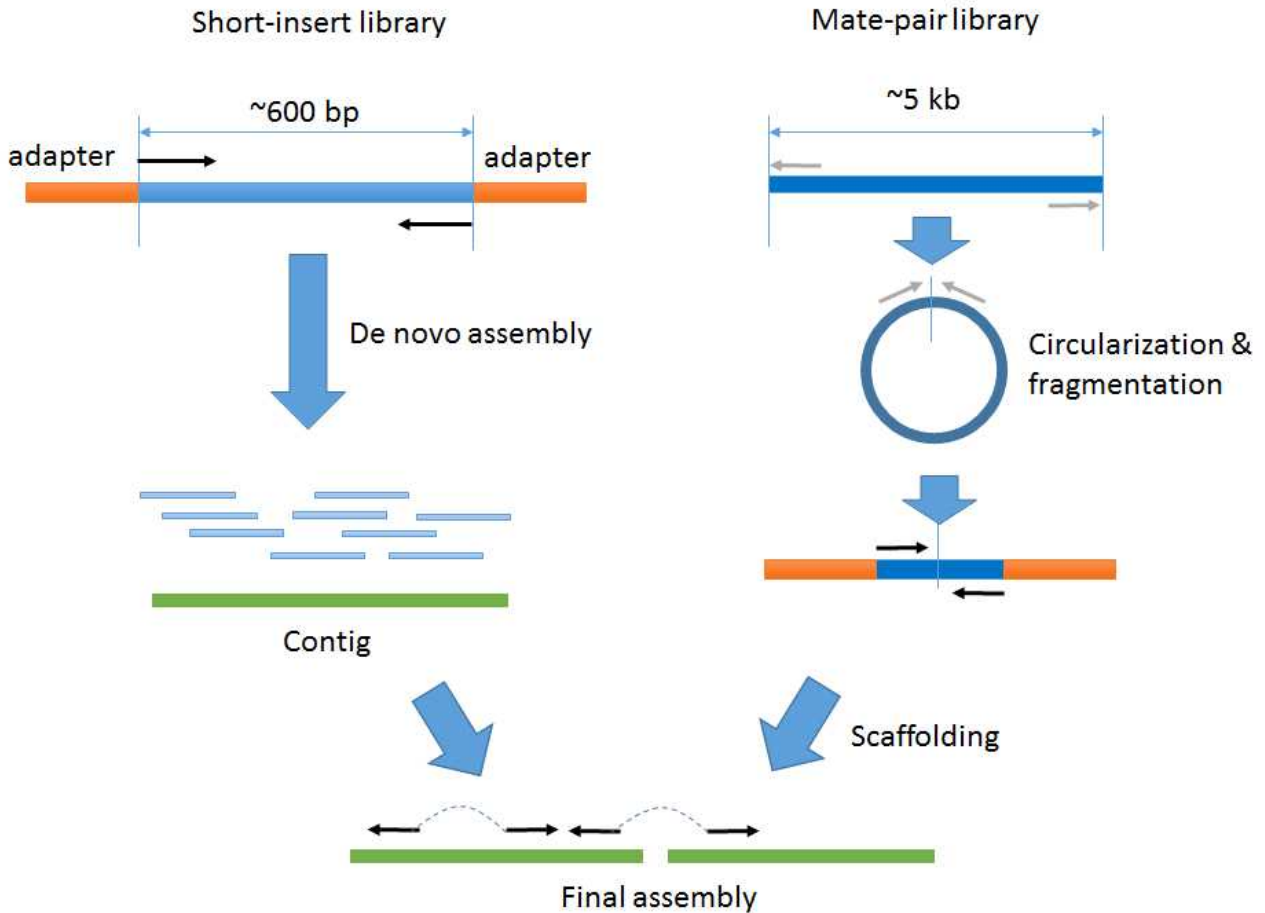


그림 3-1. 일루미나 플랫폼을 이용한 일반적인 de novo assembly 방법.

2. 유전체 해독 대상의 선정

참여 연구자들의 심의를 통하여 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555(=ATCC 26548, =CBS 6556, =NCYC 2597, =NRRL Y-7571)를 유전체 해독 균주로 최종 확정하였다.

3. 차세대 염기서열 분석 방법을 이용한 KM 유전체의 염기서열 시퀀싱 및 조립

가. Illumina sequencing 및 QC

본 과제에서는 서울대학교 농생명과학공동기기원(National Instrumentation Center for Management, NICEM)을 통하여 라이브러리 제작(그림 3-2)과 HiSeq GA IIx 시퀀싱을 진행하였다. Short insert library의 경우 151 cycle, 5 kb mate-pair library는 121 cycle로 pair end sequencing을 수행하였으며 FastQC에 의한 품질 점검 결과는 표 3-1와 그림 3-3에 나타내었다.

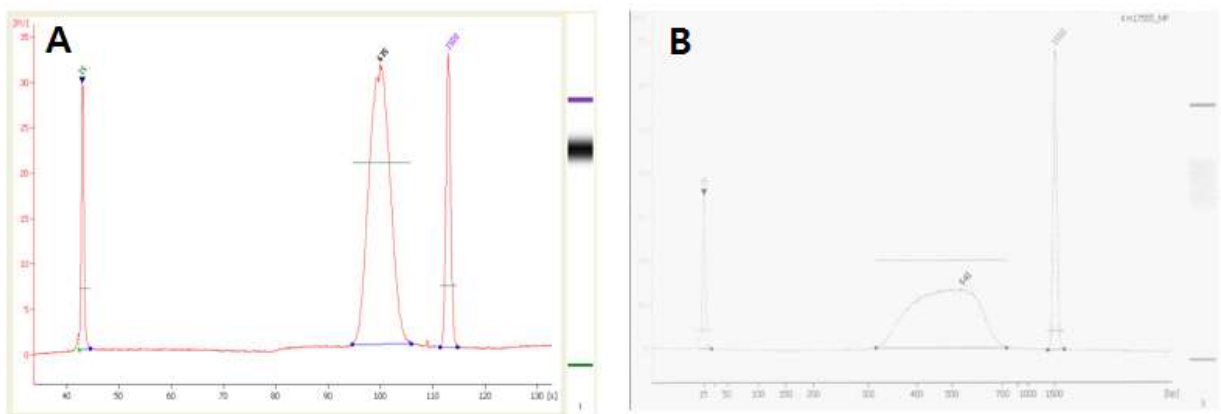


그림 3-2. 라이브러리 제작을 위한 두 종류의 insert DNA의 크기 분포. A, short insert library. B, long insert mate-pair library.

	Short insert library		Mate-pair library	
결과 수령일	2010년 10월 26일		2011년 1월 27일	
Encoding	Sanger / Illumina 1.9		Illumina 1.5	
	File 1	File 2	File 1	File 2
Total sequences	30610390	30610390	40339119	40339119
%GC	41	41	41	41
Total basepairs	4622168890	4622168890	4881033399	4881033399
Total basepairs (sum)	9244337780 (9.2 Gb)		9762066798 (9.8 Gb)	

표 3-1. FastQC report.

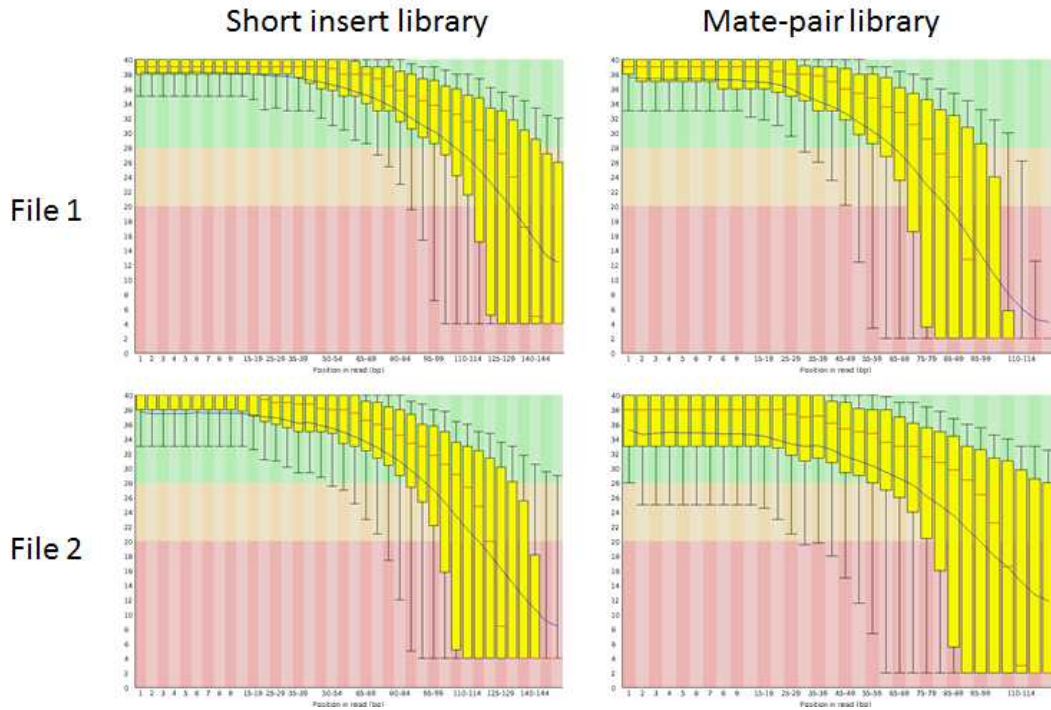


그림 3-3. Per base quality.

나. 초기 de novo assembly

두 종류의 라이브러리에 대한 시퀀싱 결과물이 약 3개월의 시간 차이를 두고 생성되었으므로, 시기적으로 먼저 제공된 short insert library 시퀀싱 데이터를 이용한 de novo assembly를 실시하였다. 서열의 전처리(quality trimming과 필터링) 및 조립에는 CLC Genomics Workbench 4.0.2를 사용하였다. 다양한 전처리 조건을 적용하면서 여러 차례의 조립을 거쳐 총 346개의 contig로 구성된 조립물을 얻었고, 이를 KM01 버전으로 명명하였다(그림 3-4). 전처리 과정을 통과한 read는 총 27,789,153개(45.4%)로서 2,920,946,043 bp에 해당하였다.

<전처리 조건>

Quality trimming: 0.01

No. of ambiguous bases allowed per read: 0

Minimal read length: 75

27,789,153 reads passed (45.4%)

<KM01 assembly metrics>

No. of contigs: 346 (>200 bp)

Total contig length: 10,793,580 bp

Max contig length: 345,545 bp

N50 contig: 99,812 bp

Average contig length: 31,195 bp

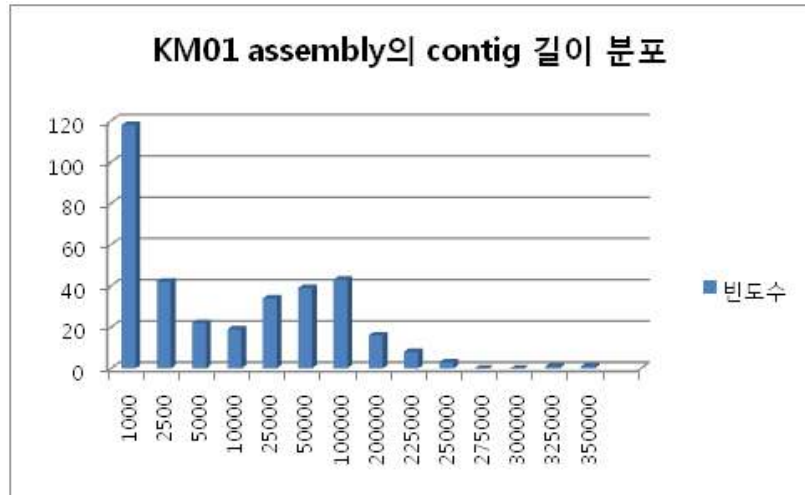


그림 3-4. CLC Genomics Workbench ver. 4.0.3로 획득한 *de novo* assembly의 contig 길이 분포.

다. Mate-pair library 시퀀싱 결과물의 점검

전술하였듯이 mate-pair library에서는 짧은 길이의 contiguous fragment가 제외되지 않아서 애초에 의도한 long range mate pair로서 작동하지 않는 데이터의 비율이 매우 높은 것으로 알려지고 있다. 또한 read 내에서 따라서 jumping 접합 부분이 출현하여 부정확한 매핑을 초래할 수도 있다. 후자를 방지하기 위하여 시퀀싱 결과물의 앞부분 약 40 bp만을 절단한 다음 아래의 조건으로 전처리를 실시하였다.

Quality trimming: 0.01

No. of ambiguous bases allowed per read: 0

Minimal read length: 25

73,890,510 reads passed (91.6%)

당시에 사용하던 컴퓨터 환경과 CLC Genomics Workbench로는 두 종류의 라이브러리에서 생산된 모든 데이터를 한번에 섞어서 scaffolding이 가능한 *de novo* assembly를 할 수 없었다. 따라서 전처리를 통과한 mate-pair library read를 KM01 assembly 위에 CLC Genomics Workbench 환경으로 단지 매핑만을 하여 paired distance가 평균 5 kb를 만족하는지를 평가한 다음 스캐폴드 생성 전략을 수립하기로 하였다. Mate 간격 2.5 - 7.5 kb의 조건으로 매핑한 결과물을 ACE file로 export한 뒤 read tag을 분석하여 동일 contig 내에 매핑된 read pair로부터 그림 3-5와 같은 분포 결과를 얻었다. 총 42,981,324 read가 쌍을 이루고 있는 것으로 보아 FastQC를 이용한 시퀀싱 성적은 다소 미흡하지만 read의 시작 부위 40 bp를 이용하여 매핑 및 스캐폴드 작성을 하는 데에는 문제가 없을 것으로 판단하였다.

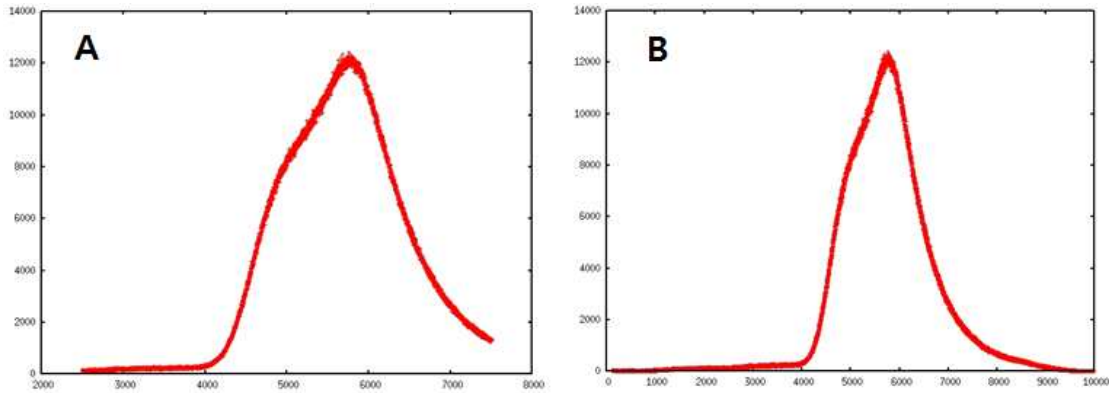


그림 3-5. KM01 draft sequence에 mapping한 5 kb mate-library read(paired end sequencing)의 실제 mate간 거리. A, 2,500~7,500 bp 조건으로 mapping한 결과. B, 100~10,000 bp 조건으로 mapping한 결과.

라. SOAPdenovo를 이용한 de novo assembly 테스트

본 연구팀에서는 원핵생물(prokaryote)의 유전체 de novo assembly 용으로 CLC Genomics Workbench를 지속적으로 활용하여 왔다. 그러나 본 연구과제의 착수 당시 이 프로그램은 long range mate-pair library를 이용한 scaffold 작성 기능이 충분하지 않은 한계점이 있었다. 따라서 동물과 작물 등 거대 유전체의 de novo assembly에 경험이 많은 국가생명연구자원정보센터(KOBIC) 김남신·정원형 박사의 도움을 얻어 SOAPdenovo(v1.0.4)을 이용한 유전체 조립 테스트를 실시하였다. 시퀀싱 결과물에 대한 quality trimming과 필터링 조건은 표 3-2와 같다.

		Short insert	5 kb mate-pair	
			조건 1	조건 2
조건		min length 80 bp min qual Q20	trim 40 bp min qual Q10 avg qual Q30	min length 80 bp min qual Q10 avg qual Q30
No. of passed reads	Paired	15,596,351 (51%)	39,445,109 (97.8%)	16,763,215 (41.6%)
	Single	8,330,095	793,582	13,713,763

표 3-2. SOAPdenovo를 위한 데이터 전처리 조건.

Short insert library read는 contig와 scaffold 작성에 전부 사용하였고, mate-pair library read는 scaffold의 작성에만 사용하였다. Mate-pair library의 전처리 조건을 달리하여 다양한 K-mer 조건에 따른 de novo assembly를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) Mate-pair library read에 대한 전처리 조건 1 적용(Kmer: 25~61)

Contig의 수는 Kmer의 증가에 따라 점차 줄어들지만 scaffold는 Kmer = 49의 조건에서 가장 양호한 결과를 보이다가 다시 증가함을 알 수 있었다(그림 3-6).

	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	>=200	>=200(-gap)
soap25	4078	230	7	200	263	46063	728356	982971	11115245	10595117
soap31	4103	220	6	200	264	48303	763626	1175851	11099912	10627708
soap37	2519	200	5	200	310	53232	896660	1632115	11040106	10646661
soap43	414	158	6	200	493	67479	843040	1300242	10961885	10662328
soap49	395	153	6	201	477	69791	848978	1179676	10984203	10678115
soap55	2461	147	5	200	439	72706	912705	1414655	10906950	10687784
soap61	4396	145	4	202	331	73785	1181318	1681050	10915580	10698913

그림 3-6. SOAPdenovo를 이용한 조립 결과. 컬럼에 대한 설명: (n) total number of contigs(or scaffolds); (n:200) number of contigs larger than 200; (n:N50) # of contigs larger than N50 contig; (min) minimum contig length; (median) contig length at the center mean; (average) contig length; (N50) length of N50 contig; (max) maximum contig length; (>=200) sum of all contig lengths larger than 200; (>=200(-gap)) sum of all contig lengths excluding 'N' character.

(2) Mate-pair library read에 대한 전처리 조건 2 적용(Kmer: 25~55)

이 경우에는 Kmer > 40인 경우 scaffolding이 제대로 이루어지지 않았다. 이상과 같이 Kmer 63 버전의 SOAPdenovo를 사용하였을 때 Kmer = 61의 조건에서 가장 양호한 조립 결과물을 얻었다. 조립 과정에서 측정된 paired end distance(insert size)는 short insert library가 485 bp, 5 kb mate-pair library가 5600 bp로 나타났다.

	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	>=200	>=200(-gap)
soap25	4090	230	6	200	264	46049	749806	1627587	11499346	10591945
soap31	4112	210	5	200	264	50563	893165	1629712	11350955	10618837
soap37	2535	206	6	200	336	51641	814328	1175889	11250688	10638211
soap43	4594	3903	639	200	1682	2762	5089	30532	10798689	10781723
soap49	4074	3430	553	200	1910	3149	5866	36970	10818440	10802660
soap55	5988	3106	481	200	2070	3487	6559	40413	10846457	10833142

(3) Mate-pair library 포함 여부에 따른 조립 결과물의 비교

Mate-pair library를 scaffolding에 사용하였을 경우 short insert library만을 이용한 조립물보다 결과가 더 양호하게 나타났다. 단, mate-pair library를 contig 작성 단계에도 사용하면

결과는 다음과 같이 악화되었다.

K=49	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	>=200
paired only	456	195	10	201	610	55156	399807	821710	10800474
paired+mate	395	153	6	201	477	69791	848978	1179676	10984203

K=61	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	>=200
paired only	5005	208	10	202	625	51820	371609	815271	10809868
paired+mate	4396	145	4	202	331	73785	1181318	1681050	10915580

	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	sum
paired only	399	151	5	201	386	70637	908486	1533597	1.07E+07
paired+mate	61083	5500	1804	200	247	310	286	8512	1707232

(4) Mate-pair library의 paired distance 점검

Short insert library로 만들어진 scaffold에 5 kb mate-pair library read를 매핑하여 그 분포를 조사하였다.

동일 스캐폴드에 매핑: 41.6% pairs

Pair의 한쪽만 매핑: 47% pairs

매핑 불가: 9.6% pairs

서로 다른 스캐폴드에 매핑: 1.8% pairs

Paired distance < 1000 bp인 것을 invalid mate-pair로 간주할 경우 약 4.4%가 이에 해당하였다. Invalid paired의 제거 여부는 전체적인 조립 결과 성적에 거의 영향을 주지 않았다(data not shown)

(5) Kmer 증가에 따른 결과물의 향상

이상의 테스트에서 사용한 SOAPdenovo는 version 1.0.4로서 허용하는 최대 Kmer는 63이었다. 일반적으로 Kmer가 커지면 assembly의 성적이 좋아진다. 그러나 이것이 정확도와 증가와 곧바로 연결되지는 않으며, Kmer보다 짧은 read에 대해서는 overlap을 검출하지 못한다는 문제가 발생한다. 2011년 상반기에 비로소 127 bp의 Kmer를 허용하는 SOAP version 1.0.4가 개발되어 이를 이용한 조립을 수행하여 이전의 결과와 비교하였다. Kmer = 91에서 가장 양호한 결과를 얻을 수 있었다. Kmer = 61과 비교 시 결과는 조금 더 개선되었으나 현저한 차이는 없었다(그림 3-6).

5K library insert distance

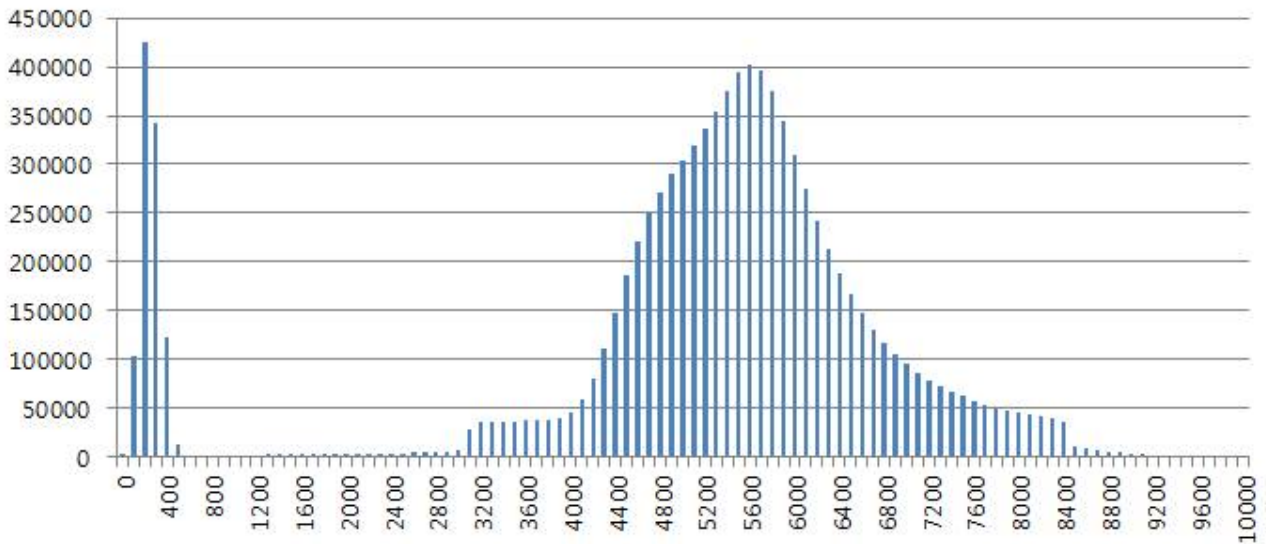


그림 3-6. Short insert library read로만 구성된 SOAPdenovo 스캐폴드에 5 kb mate-pair library read를 매핑하였을 때 나타난 paired end distance 분포.

SOAPdenovo version	version 1.0.4	version 1.0.5
Max Kmer	63	127
Best Kmer	61	91
No. of scaffold	145	132
Total length (bp)	10,915,580	10,870,900
N50	1,181,318	1,196,683

마. SSPACE를 사용한 scaffold 작성

이미 존재하는 contig 서열을 바탕으로 하여 paired end read를 매핑하여 스캐폴드를 만들 수 있는 프로그램인 SSPACE(Boetzer et al., 2011)를 사용하여 후속 작업에 사용할 수 있는 고수준의 조립체를 얻었다. Mate-pair library의 크기는 CLC Genomics Workbench에서 산출한 paired end distance를 기반으로 하여 6,000 bp \pm 50%로 설정하였다. 기타 옵션은 -x 1(extension allowed) -k 5 -a 0.7 -n 15 -p 1 -o 20 -t 0 -m 32로 하였다. 총 346개의 contig는 SSPACE에 의한 스캐폴딩으로 128개로 줄어들었다(표 3-3).

	Scaffolding 전(KM01)	Scaffolding 후
Total number of sequences	346	128
Total length	10793580	10998910
Max size	345545	1446315
Min size	145	145
Average size	31195	85928
N50	99821	1150642

표 3-3. SSPACE 실행 전후의 assembly 비교.

4. Finishing

가. 피니싱 전략의 수립

유전체 프로젝트에서 finishing이란 모든 gap을 채우고, 정확도가 낮은 영역을 개선하며, assembly 오류를 바로잡는 것을 의미한다. 궁극적으로는 대상 생명체의 염색체 구조를 그대로 반영한 서열을 만들어내는 것이지만, 비용과 기술적인 한계로 인하여 실용적인 수준으로 목표를 정하는 것이 일반적이다. Finishing에서 가장 시급한 목표는 서열 내의 sequencing gap(혹은 mapped gap)을 제거하는 것이다. 스캐폴드 서열 내에서 gap은 NNN..N으로 표시되며, N의 수효가 보통 gap의 크기를 반영한다. 이를 채우기 위해서는 gap을 포함하는 영역을 PCR로 증폭하거나 혹은 이를 포함하는 large insert clone을 찾아내어 primer walking을 실시하는 것이다. 본 프로젝트에서는 당초 NGS만을 이용하여 genomic library를 제작, 시퀀싱을 실시하였으므로 primer walking이 가능한 large insert clone이 존재하지 않는다. 따라서 fosmid library와 같이 추가적인 라이브러리를 제작하지 않는 이상 PCR에 의한 gap closing만이 가능하다.

Finishing 과정을 위한 gap closing read는 Sanger chemistry를 통해서 생산되므로, 이를 기존의 contig에 정렬해 넣은 뒤 서열을 확장하고 서로 연결하기 위한 작업 환경이 필요하다. 본 과제에서는 Sanger sequencing에 기반한 유전체 프로젝트에서 오랜 기간 동안 쓰이면서 성능이 입증된 consed(Gorden & Green, 2013)를 사용하였다. NGS 기반의 assembly는 수많은 short read로 구성되어 있으므로 원래의 read 정보를 그대로 전환하는 것은 사실상 불가능하다. 따라서 각 contig는 길이 600 bp의 가상적 Sanger read에 의한 overlapping 구조(pseudoassembly)로 전환하여 consed 프로그램에서 읽을 수 있는 ACE file 형태로 전환하였다. Contig의 길이 전체에 해당하는 하나의 긴 가상 read로 조립물을 재구성하는 것도 가능하지만, 이러한 경우 contig 내부에서는 절단이나 연결과 같은 교정 작업이 불가능하다.

나. KM01 assembly를 overlapping pseudoread로 전환하여 gap filling 실행

SSPACE에 의해서 KM01의 contig를 scaffold로 전환하는 과정에서 각 contig들의 scaffold 내에서 위치하는 방향이 결정되었다. 이를 근거로 contig의 방향을 수정한 다음

(reverse complementary로 전환한 contig의 이름은 Contig91 -> Contig91r과 같이 수정) 자체 제작한 펄 스크립트를 사용하여 서로 50 bp씩 중첩되는 총 17,966개의 가상 read와 이것으로 구성된 조립체(ACE file)를 만들었다(그림 3-7). 가상 크로마토그램은 consed 패키지에 포함된 mk_trace를 이용하였다. 길이가 1500 bp를 넘지 않는 contig는 pseudoassembly 작성 대상에서 제외하였다. 만들어진 ACE file은 consed에서 열어서 contig 사이의 gap 부분을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 설계하여 PCR후 Sanger sequencing으로 읽어서 지속적으로 gap을 메워나갔다.

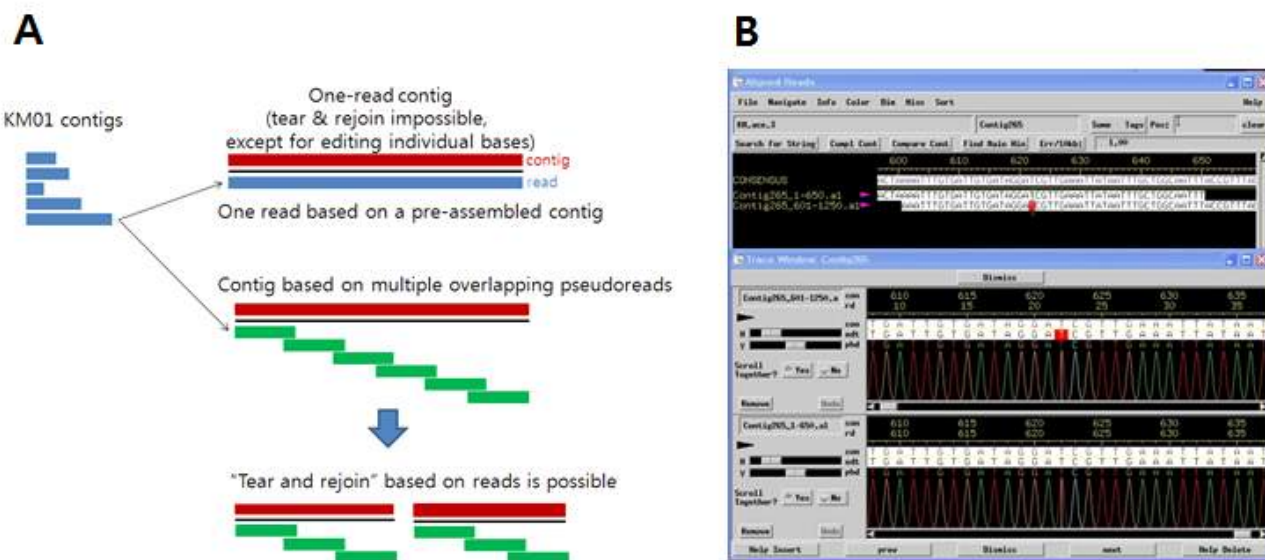


그림 3-7. Overlapping pseudoread를 이용한 가상적인 assembly 구조의 작성. A,개념도. B, ace 파일로 전환한 pseudoassembly를 consed에서 연 모습.

다. Optical mapping

2011년 6월 말까지 진행된 assembly 및 gap closing 결과물의 정확도를 점검하기 위하여 OpGen의 optical mapping 분석을 실시하였다. 실제 분석 서비스는 DisGene에서 진행하였다. Optical mapping이란 제한효소 NheI으로 절단한 유전체 DNA의 고해상도 형광 이미지를 얻어서 고수준의 유전체 지도를 작성하거나 혹은 contig 서열의 in silico cutting 결과와 비교하여 contig 서열의 정확도를 추정하는 분석 기법이다. 분석 결과 정확한 서열을 알기 어려운 염색체 말단의 telomeric region과 반복 서열로 예상되는 영역을 제외한 부분은 그림 3-6과 같이 optical map과 contig sequence 사이에 비교적 잘 일치가 됨을 알 수 있었고, 연결 정보가 없거나 빈약한 스케폴드 구조를 뒷받침하기도 하였다.

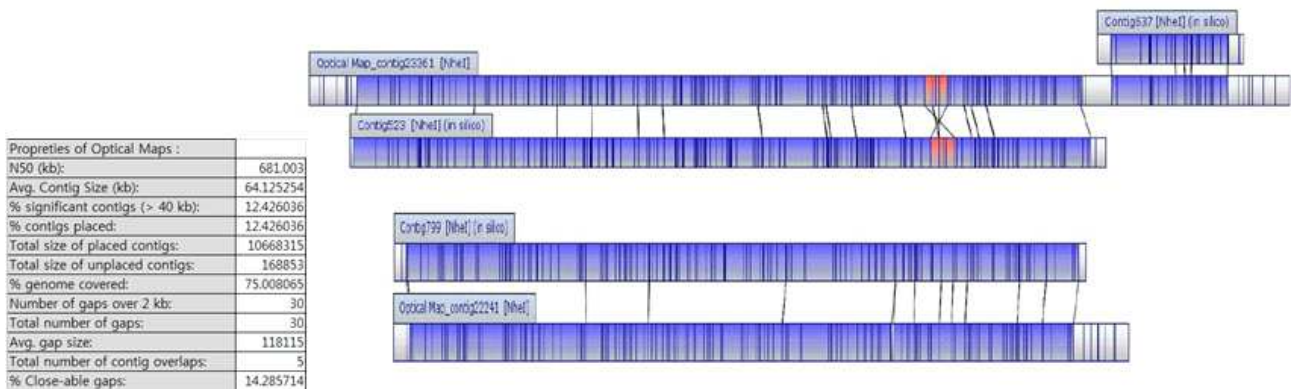


그림 3-6. Optical mapping 결과.

라. Fosmid library를 이용한 scaffold 구조의 개선 및 gap filling 지속

문헌정보에 의하면 *Kluyveromyces* 종의 염색체는 총 6-8개 수준이 될 것으로 추정되지만 5 kb mate-pair library를 이용하여 얻어진 scaffold는 총 120여개로서 여기에 존재하는 gap을 다 채운다 하더라도 실제의 염색체 수에 근접하는 assembly를 얻는 것은 사실상 불가능하다. 실제 염색체 수에 이를 수 있는 수준의 scaffold를 얻기 위해서는 좀 더 큰 수준의 insert를 지닌 라이브러리를 작성하여 end sequencing을 하여 기존의 assembly 위에 매핑하는 것이 바람직하다는 결론을 내렸고, 이에 따라서 약 40 kb 가까운 insert를 수용 가능한 fosmid library를 제작하기에 이르렀다. 라이브러리의 제작과 Sanger chemistry에 의한 end sequencing은 (주)제노텍을 통하여 실시하였다. 평균적인 insert DNA의 크기를 38 kb로 가정하여 약 5.19x의 clone coverage에 달하는 fosmid library clone(Epicentre pCC1FOS 벡터) 1,488개를 확보하여 end sequencing을 실시하였다. Genomic DNA fragment는 벡터 multiple cloning site의 Eco72 I site에 삽입하였다. Forward와 reverse 시퀀싱 프라이머로는 T7 프라이머보다 약간 상단에 위치한 커스텀 프라이머(5'-cgacggccagtgaattg-3') 및 RP pCC1 reverse primer(5'-tacgccaagctatttagtgaga-3')를 사용하였다. End read를 점검하는 과정에서 213개의 read(7.2%)가 forward primer 쪽에서 EcoR72 I site 직후에 약 300 bp의 동일한 서열 단편을 갖고 있음을 발견하였다. BLAST 검색에 의하면 이는 Mob 단백질의 유전자 일부에 해당하는 벡터 서열이었음이 밝혀졌는데, 벡터 제작 과정에서의 오류인 것으로 판단되었다. 시퀀싱 결과물은 2차년도인 2011년 12월에 전부 수령하였다. Consed의 add new reads 기능으로 fosmid end read를 gap closing이 진행 중인 기존의 assembly 위에 정렬하여 훨씬 더 높은 수준의 scaffold를 구성할 수 있었고, 이로부터 새롭게 확인된 mapped gap을 대상으로 지속적으로 gap filling을 실시하였다. Mapping을 통해 추정된 fosmid library의 insert 크기는 34,469 bp, 표준편차는 3,873 bp였다. 특히 forward sequencing primer와 클로닝 사이트의 간격이 비교적 짧아서 벡터 서열이 제대로 마스킹되지 않거나, 반대로 너무 과하게 마스킹되어 assembly에 오류가 있었던 부분을 복구하였다. Physical end, 즉 염색체의 말단에 해당될 것으로 여겨지지만 기존의 contig와는 match하지 않는 fosmid end read는 직접 클로닝 사이트를 확인하여 벡터 서열을 수작업으로 마스킹하였다.

(그림 3-7). 이상과 같이 PCR 및 Sanger sequencing에 의한 gap filling 작업은 2011년 4월(1차년도 말)부터 약 1년간 진행되었다.

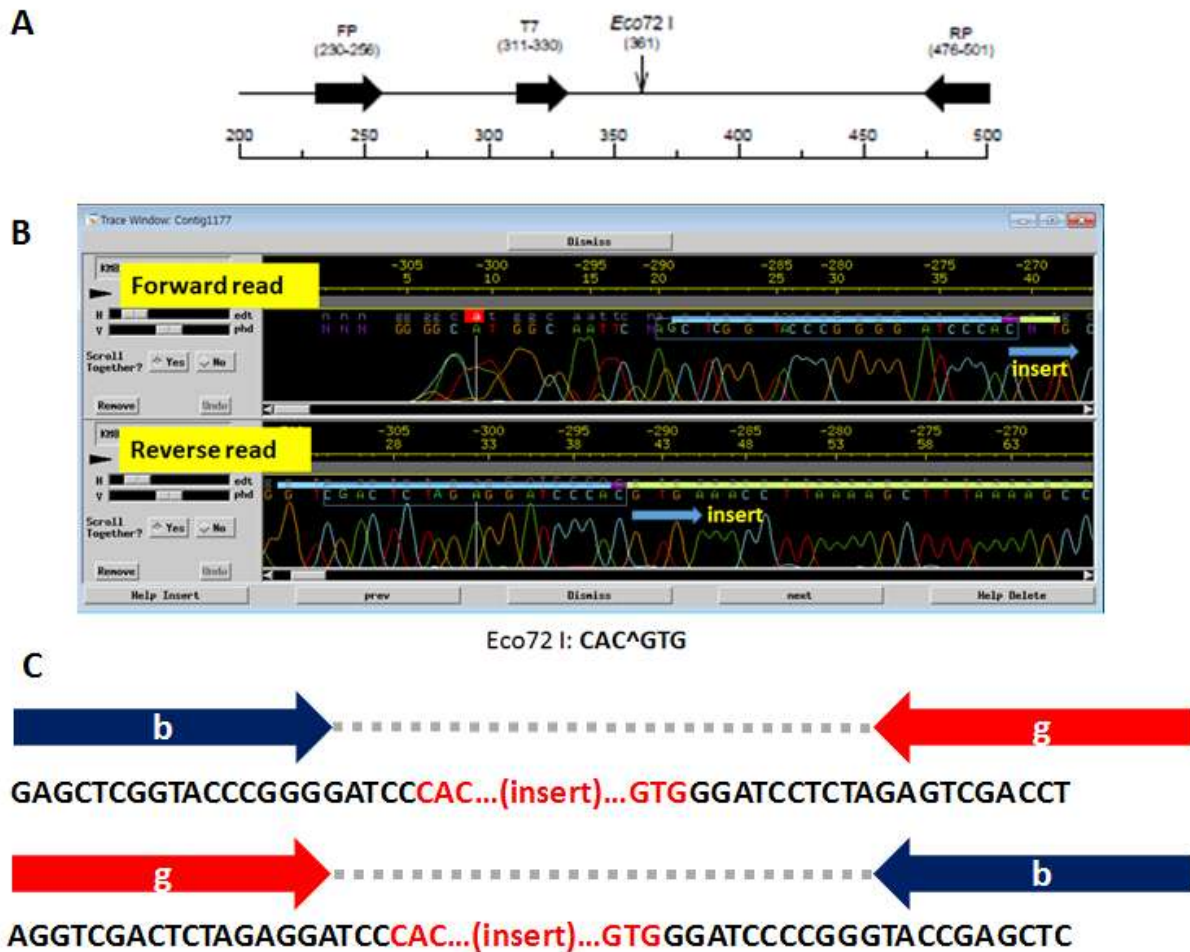


그림 3-7. Fosmid end read의 수동 편집. A, 클로닝 사이트 부근의 벡터 지도. B, 수작업으로 마스킹한 벡터 서열을 푸른색 영역으로 표시하였음. C, 클로닝 사이트 부근의 상세 서열. b는 forward read, g는 reverse read의 판독 방향(시퀀싱 프라이머의 5'→3' 방향)을 나타낸 것임.

마. 염색체 말단 부위(telomeric sequence)의 발굴

Telomere는 염색체 말단의 특수한 구조물로서 linear chromosome의 끝부분에 존재하는 특징적인 반복 서열과 단백질의 복합체이다. Telomere의 기능은 염색체의 융합과 nucleolytic attack에 의한 변형으로부터 스스로를 보호하기 위한 것으로 알려져 있다. Fosmid end sequence를 추가함으로써 일루미나 시퀀싱 및 assembly로는 파악이 되지 않던 염색체 말단의 telomeric repeat-containing region을 발견하게 되었다. 여기에는 AC의 함량이 높은 25-bp 염기의 반복 단위가 약 20회 반복되어 있었고, NGS로 형성된 다른 contig와는 정렬하지 않는 반면(그림 3-8) 반대편 mate는 기존의 contig와 잘 일치하였다. 전체 assembly를 면밀히 조사한 결

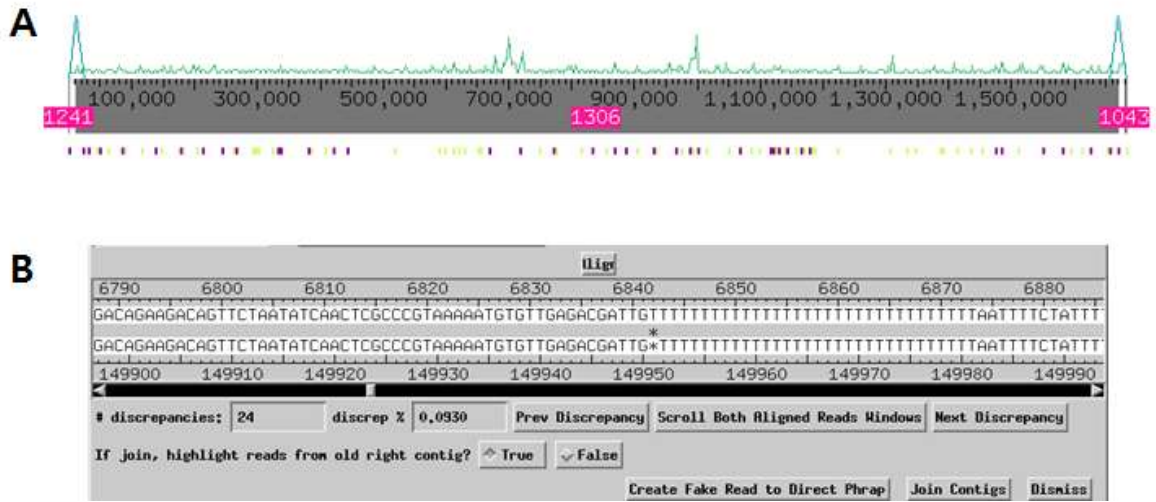


그림 3-9. A, telomeric tandem repeat을 포함하는 fosmid end read pair가 상당한 크기의 sequence gap을 사이에 두고 contig 말단에 매핑된 모습. B, fosmid clone을 임의로 선정하여 full length shotgun sequencing을 실시한 결과 NGS로 구성된 기존의 assembly가 대단히 정확함을 입증하였음(26-kb 구간에 대해 단 하나의 오류).

이 fosmid clone의 전장 서열 해독을 통해 채워진 gap은 약 5.3 kb에 해당하였다. 기존의 contig에 대해서 overlap 여부를 검색해 보니 scaffold 구조에 편입되지 못한 20개의 짧은 overcollapsed contig가 match하고 있었다. 따라서 KM의 염색체 말단은 telomeric tandem repeat과 그보다 좀 더 긴 5-6 kb의 repeat이 존재하는 것으로 파악되었다. 후자의 repeat는 동일 염색체 말단 내에서의 연속적인 반복이 아니라 모든 염색체 말단에 공통적으로 존재하는 반복 서열인 것으로 파악된다.

사. rRNA gene의 탐색

공개된 K. marxianus의 rRNA gene 서열을 이용하여 검색한 결과 contig1321(5번 scaffold) 내에 rRNA gene이 확인되었다(그림 3-10). Contig1321에 대한 short insert library read의 평균 coverage(24,122x)로 판단할 때 copy 수는 약 40회 정도일 것으로 예상된다.

아. Assembly validation의 사례

다른 de novo assembly algorithm으로 조립한 결과물과 대조해 보거나, fosmid end read의 매핑 정확도(pair distance 및 방향), 그리고 optical mapping의 결과물을 이용하여 피니싱이 진행 중인 working version의 validation을 할 수 있다. CLC Genomics Workbench로 작성되어 finishing을 진행해 온 WGS 최초 등록본(KM02)를 SOAPdenovo v1.0.5(Kmer = 91) assembly 결과물과 MUMmer로 비교해 보니 다른 부분은 거의 그대로 정렬하지만 KM02의 scaffold 3번 내부의 서열에 불일치가 있는 것처럼 관찰되었다(그림 3-11). 그러나 fosmid end read의 mapping에 의하면 clone들이 scaffold 전체에 비교적 고르게 분포하고 있고 optical mapping으로도 이 구조를 지지하고 있어서 KM02 working version이 올바른 것으로 판단하였다.

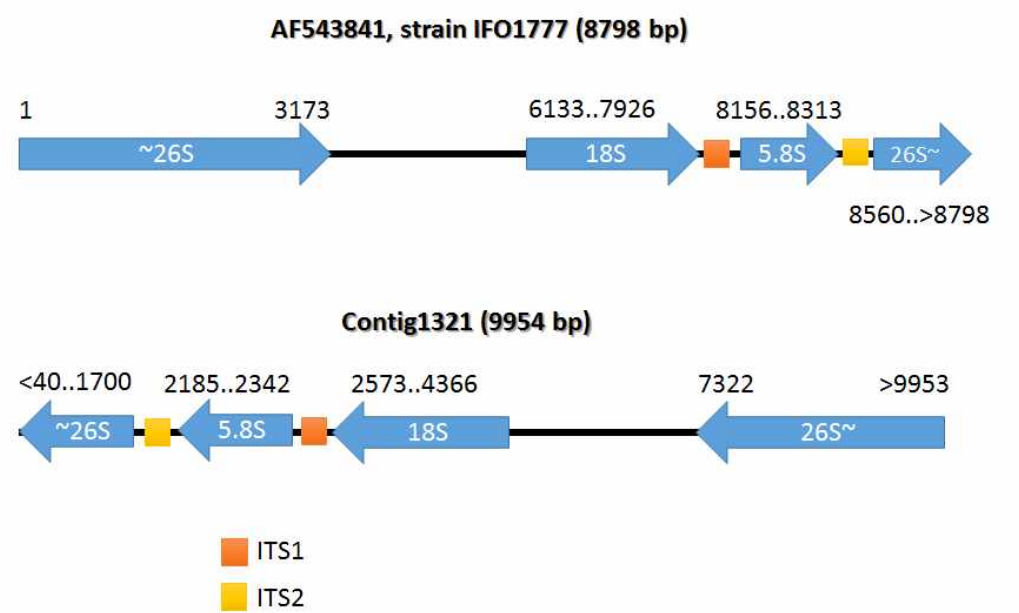


그림 3-10. Ribosomal RNA gene의 구조.

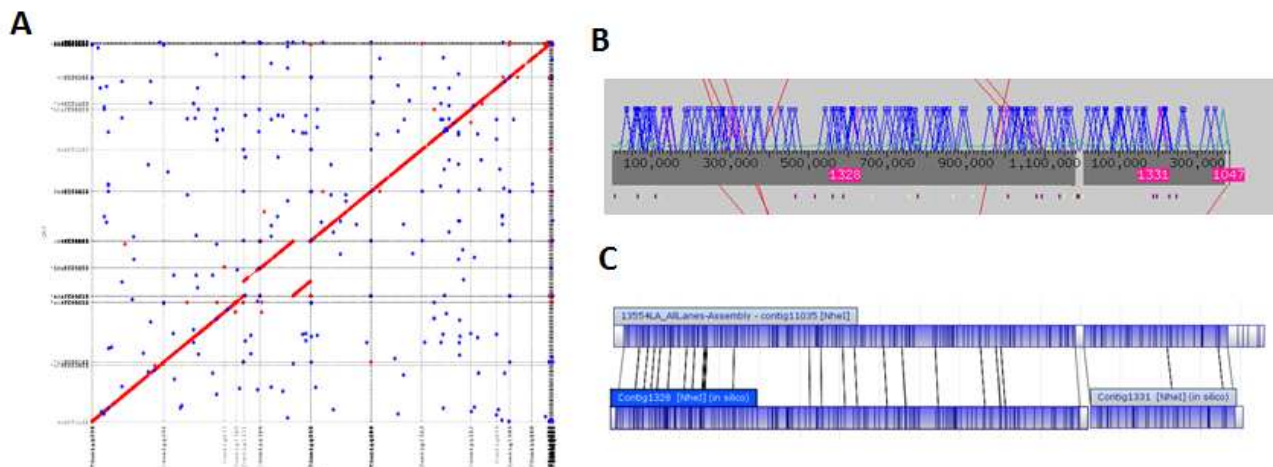


그림 3-11. Assembly validation. A, KM02 assembly(가로축)과 SOAPdenovo assembly의 비교. B, 불일치가 관찰되는 3번 scaffold의 fosmid end read mapping 현황, C, optical mapping 결과.

자. 유전체 서열의 NCBI 등록

(1) WGS 최초 등록(KM02)

2012년 4월 말까지 finishing이 진행된 KM 유전체 어셈블리(allContigs_120412.fasta, 145 contigs)를 기초로 하여 NCBI의 WGS(whole genome shotgun)에 등록할 서열을 준비하였다. 주석화 정보는 부가하지 않았다. 길이 200 bp 미만의 contig는 제외하였고, 서열 말단에 연속하여 나타나는 X나 N를 제거하여 총 122개의 contig(8 scaffolds)로 구성된 KM02 버전을 작성하였다.

최초 WGS 추출물에 대한 NCBI의 검토 의견에 따라 대장균/벡터/어댑터 서열 또는 미토콘드리아 게놈 서열에 해당하는 contig에 대한 제거(전체 삭제 또는 말단 트리밍)를 실시하였다. 최종 수정이 완료된 119개 서열의 버전은 내부적으로는 KM02r(“r” for revision)로 불렀지만 NCBI에 등록·공개된 assembly version명은 KM02를 그대로 유지하였다. 최초 등록본과 수정본에 대한 정보를 (표 3-4)에 나타내었다.

	Accession	비고
BioProject	PRJNA89605	Locus tag prefix: UUQ
BioSamples	SAMN02981417	
Assembly	AFKM01: replaced (GCA_000299195.1)	2012년 9월 25일 등록; KM02 - Total sequence length: 10,926,807 - No. contigs: 119 - Scaffold N50: 1,410,702 - Contig N50: 1,189,284
	AKFM02: latest (GCA_000299195.2)	2015년 4월 9일 등록; KM02r2 - Total sequence length: 10,920,632 - No. contigs: 111 - Scaffold N50: 1,410,702 - Contig N50: 1,189,284 - Scaffold에 포함되지 못한 contig의 총 길이: 111,621

표 3-4. KM 유전체 정보의 등록

(2) 업데이트본의 등록(KM02r2)

Fosmid 2개 클론의 전장 시퀀싱 결과를 추가하여 수정한 assembly를 업데이트본으로 등록하였다. 여기에는 subtelomeric repeat을 지닌 KM81010C02 클론과 PCR/Sanger sequencing이 잘 되지 않는 어려운 gap을 포함하고 있는 KM81007D08 클론이 선정되었다. 포스미드 클론의 insert 크기는 33 kb였으며, 각 8 kb 및 1 kb의 gap을 채울 수 있었다. KM02r2 assembly 버전의 전체 구조는 그림 3-12에 나타내었다. KM02r2는 총 111개의 contig로 구성되어 있으며, 이 중에서 24개의 contig가 8개의 scaffold를 형성하고 있다(표 3-5).

	Contig 순서	크기(gap 포함)
Scaffold 1	Contig1243(31)-1290-637-1059(16)	1,738,350 bp
Scaffold 2	Contig1352(20)-1043(15)	1,700,481 bp
Scaffold 3	Contig1328-1331-1047(15)	1,577,254 bp
Scaffold 4	Contig1338(48)-1072(19)	1,410,702 bp
Scaffold 5	Contig291(18)-1320(16)-1321-1340(23)	1,336,893 bp
Scaffold 6	Contig1056(15)-1319-1323(22)	1,198,968 bp
Scaffold 7	Contig1071(21)-1312-859-1335(21)	937,562 bp
Scaffold 8	Contig1276(22)-1347	908,801 bp

표 3-5. KM의 scaffold 구조. 괄호 안의 숫자는 telomeric tandem repeat(5'-GGTGTACGGATTTGATTAGTTATGT-3')의 반복 횟수이다. Scaffold에 포함되지 않고 별도로 존재하는 5개의 contig(1154, 216, 219, 339 및 676)에도 1-4개의 repeat이 관찰되었다.

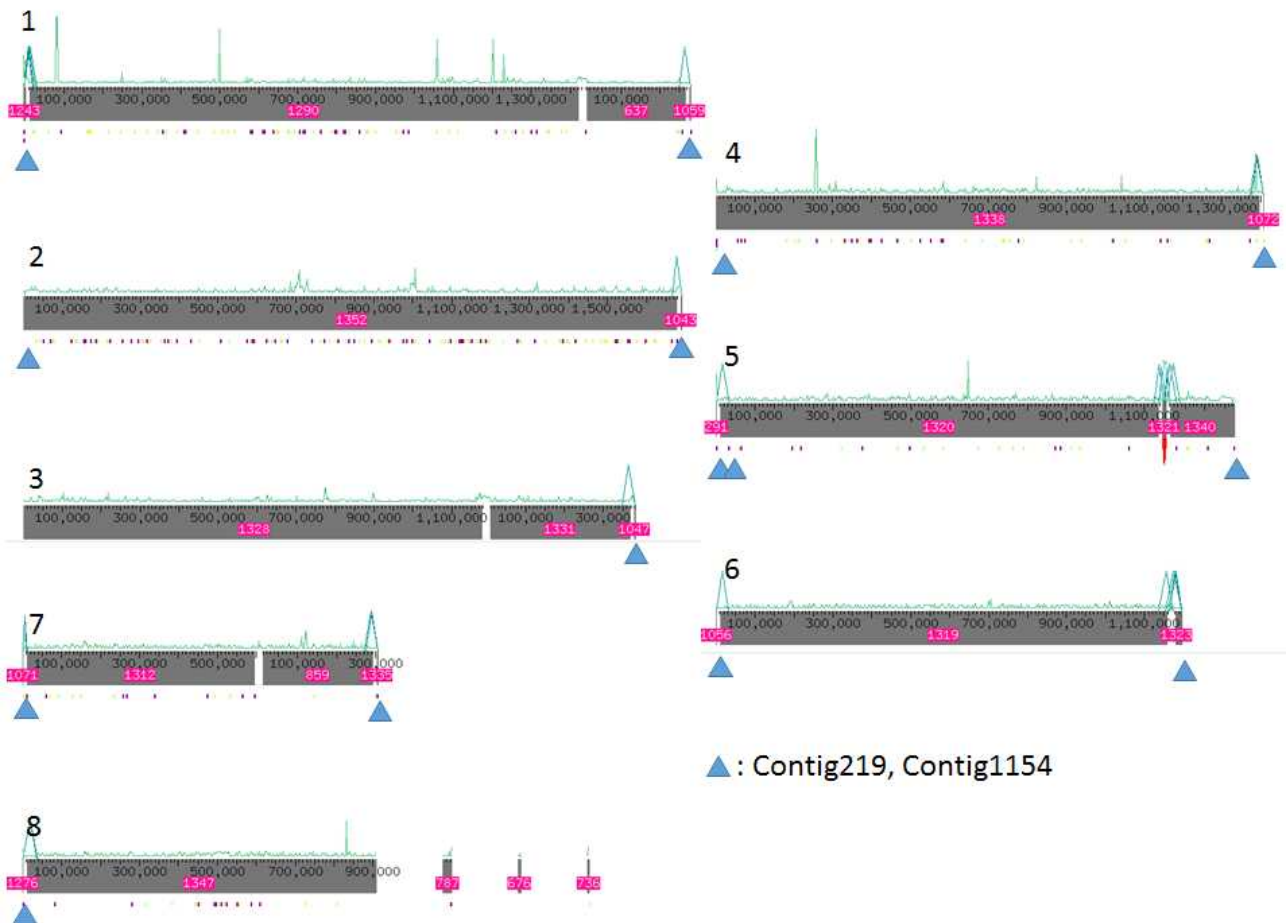


그림 3-12. 최종 assembly인 KM02r2. 파랑색 삼각형은 telomeric repeat이 있는 곳.

5. 유전체 주석화(genome annotation)

연구 기간 동안 주요 버전의 유전체 assembly가 마련되는 시점에 맞추어 유전체 주석화를 실시하여 참여 연구자들에게 제공하는 것을 목표로 하였다. 유전체 주석화는 간단하게는 유전자의 구조 예측(gene prediction or structural annotation)을 실시한 뒤 이를 공개된 단백질 정보 DB에 대하여 상동성 검색을 실시하여 그 기능을 예측하는 것(functional annotation)으로 볼 수 있다. 그러나 사용자 편의를 위해서는 그래픽 인터페이스를 갖춘 유전체 브라우저와 검색 기능, 그리고 더욱 바람직하게는 gene curation이나 편집 기능까지 수반하는 종합 솔루션이 필요한 경우도 있다. 본 과제에서는 초기 버전의 assembly에 대해서는 자체적인 수준에서 유전체 주석화 결과물을 제공하고, assembly의 개선 정도에 따라서 전문 유전체 분석 및 개발 업체에 의뢰하여 통합 유전체 정보화 사이트를 개발·제공하는 순서를 따랐다.

가. KM01 version에 대한 최초의 유전체 주석화

최초 assembly 버전인 KM01은 ab initio gene prediction tool인 Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>)와 기능 예측 도구인 AutoFACT(Koski et al., 2005)를 사

용하여 유전체 주석화를 실시하였다(그림 3-13). 우선 *cross_match*로 서열 자체를 검색하여 반복 서열을 스크린한 뒤, *RepeatMasker*로 반복 서열 DB에 대한 검색 및 마스킹을 수행하였다. 이 과정을 통하여 총 415,090 bp(3.8%)가 제거되었고, 이를 *Augustus*(*Kluyvermyces latcis* 파라미터 사용)에 입력하여 총 4,692개의 단백질 암호화 유전자를 확보하였다. 이 중에서 96%가 단일 엑손 유전자였다. 대부분의 유전자가 인트론을 갖고 있지 않음에 감안하여 반복 서열에 대한 전처리를 하지 않은 *assembly*에 대하여 *Glimmer v3.02*(Delcher et al., 1999)를 적용한 결과 5,154개의 유전자(최수 유전자 길이 150 bp로 설정)를 얻을 수 있었다.

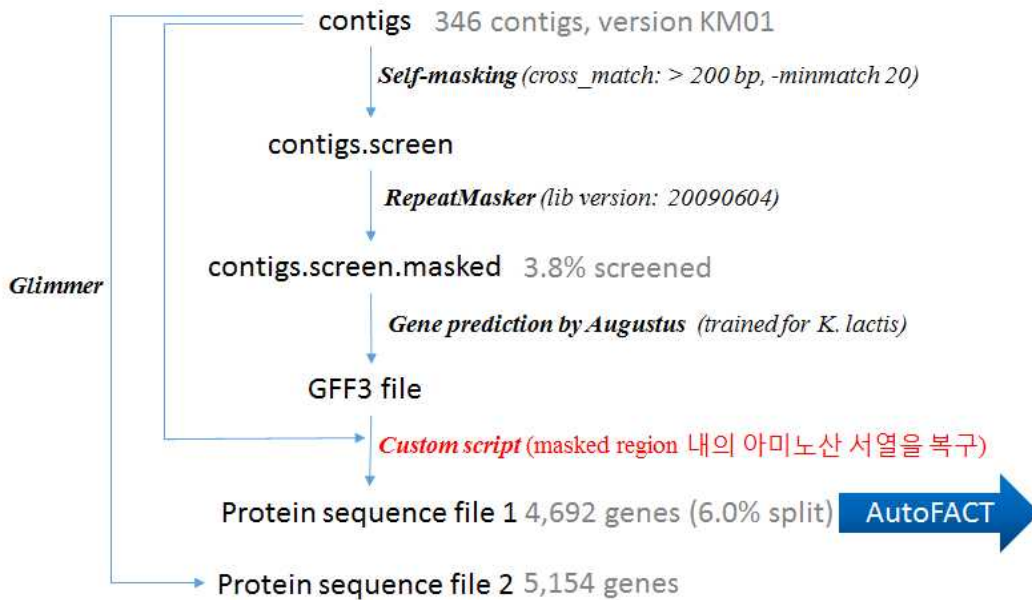


그림 3-13. KM01 버전에 대한 유전체 주석화 과정.

각 유전자 서열은 단백질 서열로 번역 후 UniRef90, KEGG Genes 및 NCBI NR database에 대하여 BLASTP 검색을 실시한 다음 AutoFACT로 처리하여 각 유전자에 대한 기능 정보를 추출하였다. 결과물은 전체 유전자의 주석 정보가 수록된 html과 개별 유전자의 상세 정보가 포함된 html 파일로 구성된다(그림 3-14). AutoFACT에서는 텍스트 이외의 시각화 자료는 제공하지 않으므로, BLAST 검색 및 GBrowse 환경(Stein et al., 2002)의 유전체 정보화 시스템을 임시로 구축하여 주관 연구기관 내의 전산망에서 한시적으로 서비스하였다(그림 3-15).

KM01_g3.faa.html

Contig254_orf00052	RIM20	pH-response regulator protein palA/RIM20 Kluyveromyces lactis	2107	0.0	59% (386/645)			
Contig254_orf00053	KLTH	adenylypyrophosphate Kluyveromyces lactis	1702	0.0	70% (299/424)	2.5.1.75	Translation structure :	
Contig254_orf00054	DML1	Protein DML1 n=1 Tax=Kluyveromyces lactis RepID=DML1_KLULA	1939	0.0	75% (349/461)			
Contig254_orf00055		unclassified						
Contig254_orf00056		TPO4: Polyamine transport protein, recognizes spermine, putrescine, and						

Information이 없으면
클릭할 수 없음

Click!

Detailed annotation info for Contig254_orf00054

Annotation Name Protein DML1 n=1 Tax=Kluyveromyces lactis RepID=DML1_KLULA

Score 1939 emsp

E-value 0.0

% Sequence Identity 75% (349/461)

Locus DML1

EC Number

COG Function

KEGG Pathway

Source (Query=Contig254_orf00054)	Accession	Description	Score	E-value	% Sequence Identity	Locus	EC Number	Informative Hit	Function/
AutoFACT	Contig254_orf00054	Protein DML1 n=1 Tax=Kluyveromyces lactis RepID=DML1_KLULA	1939	0.0	75% (349/461)	DML1		1	
uniref90	UniRef90_Q6CU61	Protein DML1 n=1 Tax=Kluyveromyces lactis RepID=DML1_KLULA	1939	0.0	75% (349/461)			1	
nr	EDN54147	mizato-like protein [Saccharomyces cerevisiae YJM789]	999	1e- 106	44% (217/487)			6	

그림 3-14. AutoFACT가 제공하는 html 결과 파일.

Kluyveromyces marxianus sample database

이 31 kbp 정보는 Contig254 의 80,000 - 111,000 사이의 정보입니다

설명
 찾기
 표지 혹은 영역:
 찾기
 데이터 송신부
 스크롤: <<< >>> 보기 31 kbp >>> 뒤집기

개요(overview)

Contig254
0k 10k 20k 30k 40k 50k 60k 70k 80k 90k 100k 110k 120k 130k 140k 150k 160k 170k 180k 190k 200k 210k

영역

Contig254
80k 90k 100k 110k

세부(details)

Genes
 Augustus prediction
 Glimmer3 prediction

Contig254_orf00054 Contig254_orf00059 Contig254_orf00061 Contig254_orf00067 Contig254_orf00071 Contig254_orf00073 Contig254_orf00075
 Contig254_orf00055 Contig254_orf00060 Contig254_orf00064 Contig254_orf00068 Contig254_orf00072 Contig254_orf00074 Contig254_orf00076
 Contig254_orf00058 Contig254_orf00063 Contig254_orf00069 Contig254_orf00070

강조 표시를 제거하십시오 갱신하십시오

그림 3-15. 임시로 구축한 GBrowse 기반의 *K. marxianus* 유전체 브라우저.

나. ERGOTM annotation 시스템을 이용한 유전체 주석화(KM01 version)

위에서 살펴본 GBrowse 시스템은 보안 문제로 인하여 주관연구기관 내에서만 접속할 수 있는 상태였고, 파일 형태로 배포한 AutoFACT 기반의 주석 자료는 유전자 탐색과 분석 등을 용이하게 수행하기에 불편하므로, IG Assets(구 Integrated Genomics)의 fungal genome annotation service를 이용하여 보안 접속을 통해 참여 연구자 전체가 접근 가능한 웹 기반의 유전체 정보화 시스템을 구축하여 2011년 4월 공개하여 1년간 유지하였다. 유전자 예측은 IG Assets에서 *K. lactis*를 기반으로 작성한 파라미터를 활용, Fgenesh(<http://www.softberry.com/>)로 실시하며, 자동화된 ERGO annotation system을 이용하여 ortholog와 protein family에 기반한 기능 예측 및 대사 경로 예측을 실시하였다(표 3-6). KM01 assembly 버전으로부터 총 4,998개의 단백질 암호화 유전자(coding density 68.7%)와 189개의 tRNA가 예측되었다. 단백질 암호화 유전자 중에서 374개(7.5%)가 intron을 포함한 것으로 예측되었고, SignalP(Petersen et al., 2011) 실행에 의해 세포 외로 분비될 것으로 예측된 유전자는 382개(6.9%)였다. 모든 정보는 70종의 basic diversity set과 계약 당시 지정한 150종의 유전체 정보와 함께 ERGO 환경을 통해 웹 브라우저로 탐색할 수 있다(그림 3-16). GenBank 파일과 유전자 서열 파일 등 모든 결과 파일은 별도로 다운로드하여 1년간의 유전체 정보화 사이트 서비스 기간이 종료한 뒤에도 활용할 수 있도록 하였다.

RNAs, total	189
RNAs, transfer	186
RNAs, ribosomal	3
ORF, total	4998
with introns	374
with assigned function	3547
and no similarity	0
without assigned function	1451
with similarities	1366
in protein clusters	0
not in asserted pathways	3320
and with assigned function	1872
in protein clusters	0
in paralog clusters	810
in COGs	2134
in Pfam	3377
in preserved operons	0
in possible fusion events	2470
as composite	1245
as component	2188

표 3-6. ERGO annotation에 의한 feature summary.

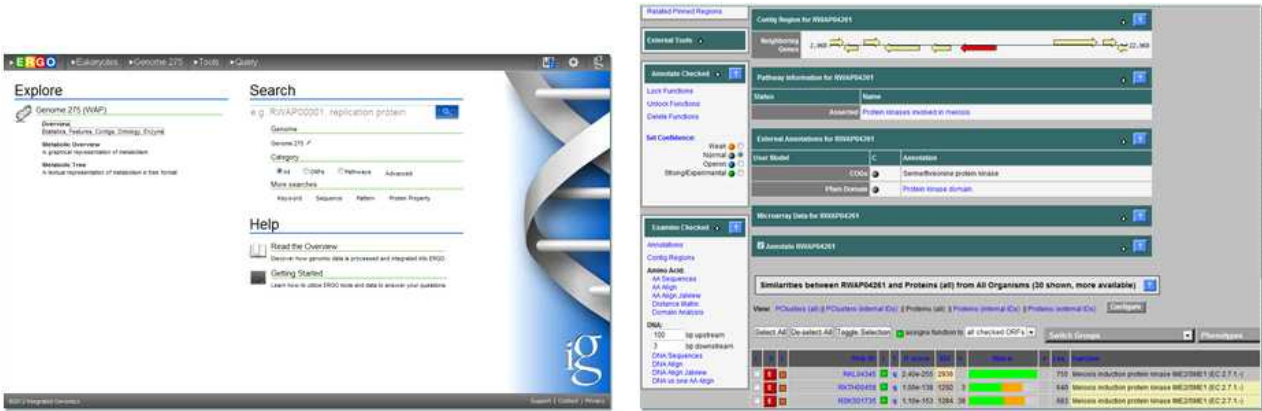


그림 3-16. ERGO web site의 스크린샷.

다. 어셈블리 개선에 따른 유전체 주석화 전과 방안 검토

(1) Rapid Annotation Transfer Tool(RATT)의 활용

진행 생물의 유전체 주석화에는 일반적으로 많은 시간이 소요되므로, 유전체 해독이 진행되면서 업데이트되는 서열에 대해 계속적으로 유전체 주석화를 새롭게 실시하는 것이 현실적으로 어려운 경우가 많다. 따라서 개선된 서열과 기존의 서열을 비교하여 기존 서열에 추가된 주석화 정보를 전파하는 방안을 모색해 보았다. Sanger Institute에서 개발한 RATT(Otto et al., 2011)은 바로 이러한 목적으로 만들어진 도구이다. RATT는 nucmer를 이용하여 기존 서열과 개선된 서열을 비교하여 주석 정보를 전파하고 이에 따르는 수정 작업을 진행한다. IG Assets에서 ERGO annotation service를 통해 만들어진 EMBL 파일을 각 서열별로 분할하여 별도의 파일로 저장한 뒤, KM02r2 서열에 전파하여 보았다. 전파 유형(transfer type)은 “Assembly”로 하였으며, 설정 파일에서 eukaryotic 타입을 지정하였을 때 성공적인 전파가 이루어졌다(그림 3-17).

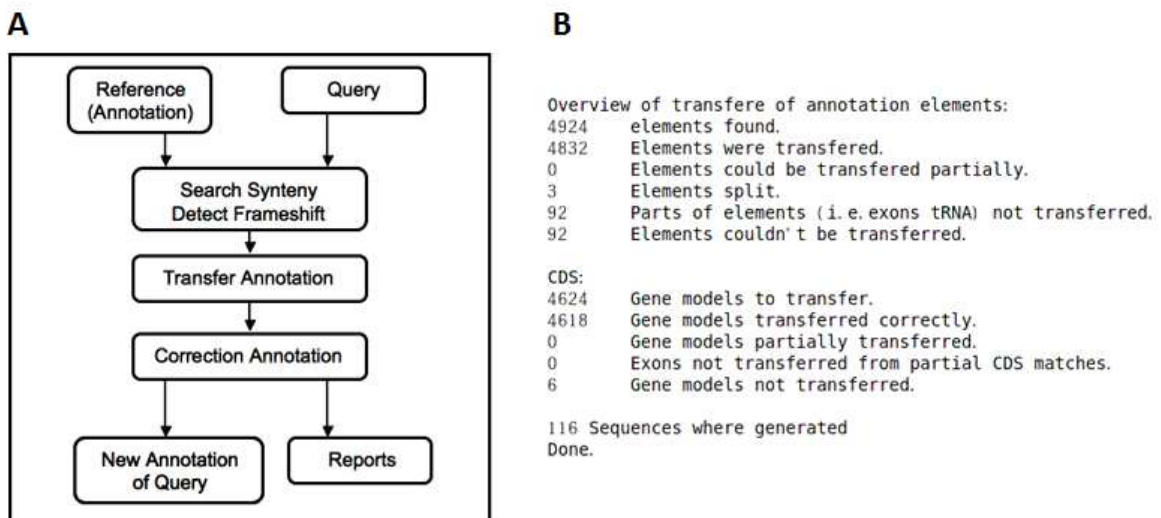


그림 3-17. A, RATT의 실행 순서(출처: <http://ratt.sourceforge.net/>). B. 실제 KM 유전체 서열에 대한 RATT 실행 로그.

(2) 단백질 서열을 이용한 spliced alignment 테스트

단백질 서열이 외부 정보로 주어졌을 때 이를 유전체 서열 위에 spliced alignment를 수행하여 유전자 예측의 정보로 사용할 수 있다. 입력물은 근연종에서 유래한 단백질 서열일 수도 있고, 이전 버전 어셈블리를 이용하여 작성한 유전체 주석화물에서 추출한 단백질 서열일 수도 있다. 혹은 단백질 도메인/패밀리 DB에서 작성된 HMM library일 수도 있다. Genewise 프로그램(Birney et al., 2004)을 이용하여 시험적으로 다음의 방법을 시행하였다. RepeatMasker 처리를 한 유전체 서열을 10 kb씩 중첩되게 110 kb 단위로 절단한 뒤 Pfam-A.seed에 수록된 단백질 서열로 BLASTX를 수행한다. Hit하는 nonredundant HMM을 추려내어 HMM library를 만든 다음 genewisedb를 실행하고, 각 query 서열에 대해 예측된 유전자 구조를 병합하여 전체 결과를 구성하였다.

효모 유전체의 분석을 위한 참조 단백질 정보는 Yeast Gene Order Browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>; Byrne & Wolfe, 2005)에서 입수할 수 있다. YGOB는 주요 효모의 synteny 정보를 시각화하는 온라인 분석 도구이다(그림 3-18).

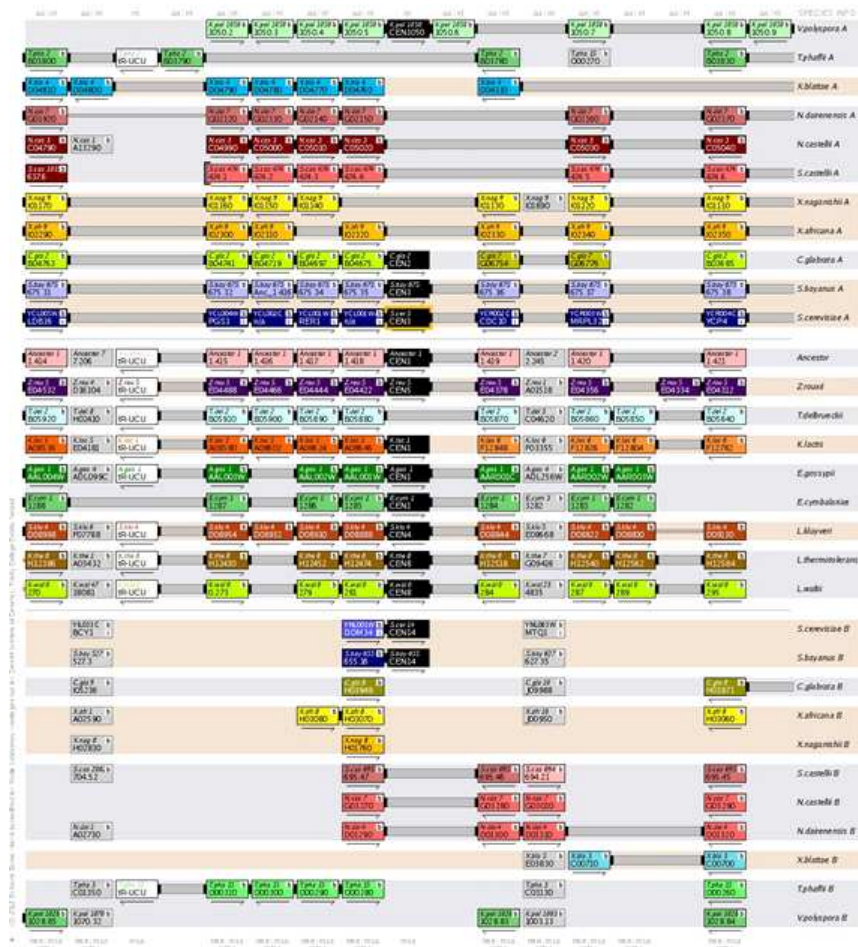


그림 3-18. YGOB에서 출력한 효모 염색체 CEN 주변의 유전자 분포.

라. 통합 유전자 모델 작성 방법에 대한 검토

일반적으로 진핵 생물은 coding density가 낮고 엑손-인트론으로 나뉜 불연속적인 유전자 구조를 하고 있으므로 유전체 서열만을 사용한 ab initio 유전자 예측이 매우 어렵다. 따라서 가까운 단백질 서열의 spliced alignment 정보가 유전자 구조 예측에 중요한 정보로 쓰이게 된다. 최근 들어서는 RNA-seq 결과물이 발견되는 유전자에 대한 유용한 evidence로서 점차 널리 활용되고 있다. RNA-seq read를 정렬할 유전체 서열 정보조차 없는 경우에는 Inchworm (현재 Chrysalis, Butterfly와 함께 Trinity 패키지로 구성됨)이나 Oases와 같은 de novo transcriptome assembler를 쓰게 된다.

유전체 서열이 가용한 경우 RNA-seq read를 조립하여 전사체(transcript)를 재구성하는 방법에는 alignment assembly와 genome-guided assembly(Inchworm)의 두 가지 방법이 있다. 후자의 경우에는 최초의 read mapping을 통해 유전체 서열 위에 분포하는 RNA-seq read를 구간별로 모아서 de novo assembly로 조립을 수행하므로, 인트론 구조를 추정하여 만들어내는 alignment의 정확성에 크게 좌우되지 않는다(그림 3-18(A)). 서열 단편의 정렬에는 TopHat(long-intron containing genome)이나 BLAT(short-intron containing genome; read length는 최소 67 bp), 또는 GSNAP과 같은 alignment tool을 쓸 수 있다. 어느 경우이든 genome coordinate로 정렬한 SAM 파일이 있어야 Inchworm을 사용한 reference-guided transcript assembly가 가능하다.

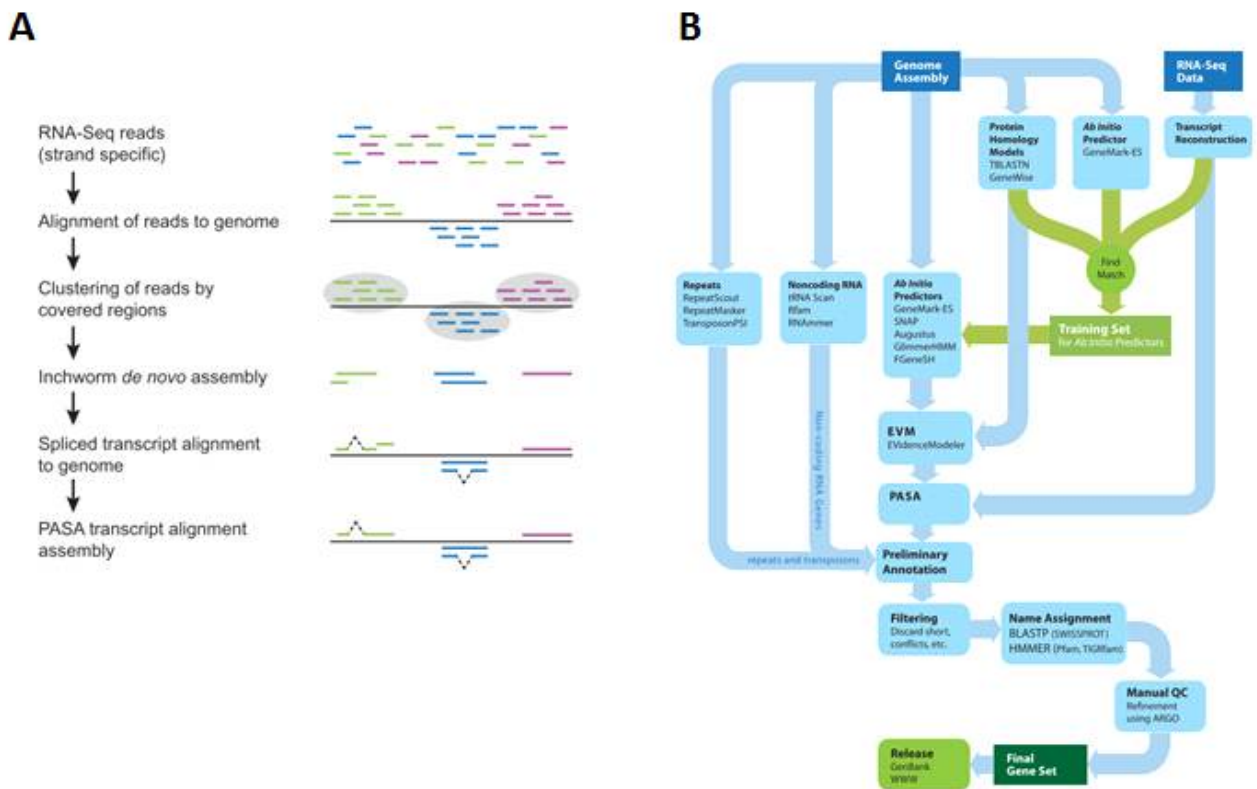


그림 3-18. A, RNA-seq alignment와 de novo assembly를 이용한 전사체 조립. B, Broad Institute의 유전체 주석화 과정. 자료 출처: Haas et al., 2011)

본 과제에서는 3종류의 배양 조건을 통해 얻은 일루미나 RNA-seq read를 BLAT으로 KM02 유전체 서열에 정렬하여 SAM 파일을 얻었고, 이를 Inchworm에 투입하여 시험적으로 49,577개의 transcript를 확보할 수 있었다.

다음 단계로는 전사체 서열의 spliced alignment를 통해 유전자 모델 구조를 예측하는 과정이 필요하다. PASA(Program to Assemble Spliced Alignments, Haas et al., 2003)이 바로 이러한 용도의 프로그램으로서, Broad Institute에서는 완전한 진핵 생물 유전체의 주석화 파이프라인으로 쓰이고 있다. 전체 과정은 다음과 같다(그림 3-18(B)).

- 1) Ab initio gene finding(GeneMarkHMM, FGENESH, Augustus, SNAP, GlimmerHMM 중에서 선택)
- 2) Genewise로 UniRef90 단백질 데이터베이스를 검색하여 상동성을 검색하고 인트론 구조를 예측
- 3) EST, 전장 cDNA, 혹은 RNA-seq assembly(Trinity)를 유전체 서열 위에 정렬
- 4) 전단계에서 얻은 전사체의 중복 구조에 기반하여 PASA alignment
- 5) EvidenceModeler(EVM)을 사용하여 가중치에 기반한 consensus gene model을 확보
- 6) EVM consensus prediction을 업데이트하기 위해 PASA를 실행하고 UTR annotation과 transcript isoform annotation을 수행
- 7) Argo 또는 Apollo을 이용하여 주석화 결과물의 최종 교정

마. 통합 유전자 모델의 구축 및 유전체 브라우저의 개발

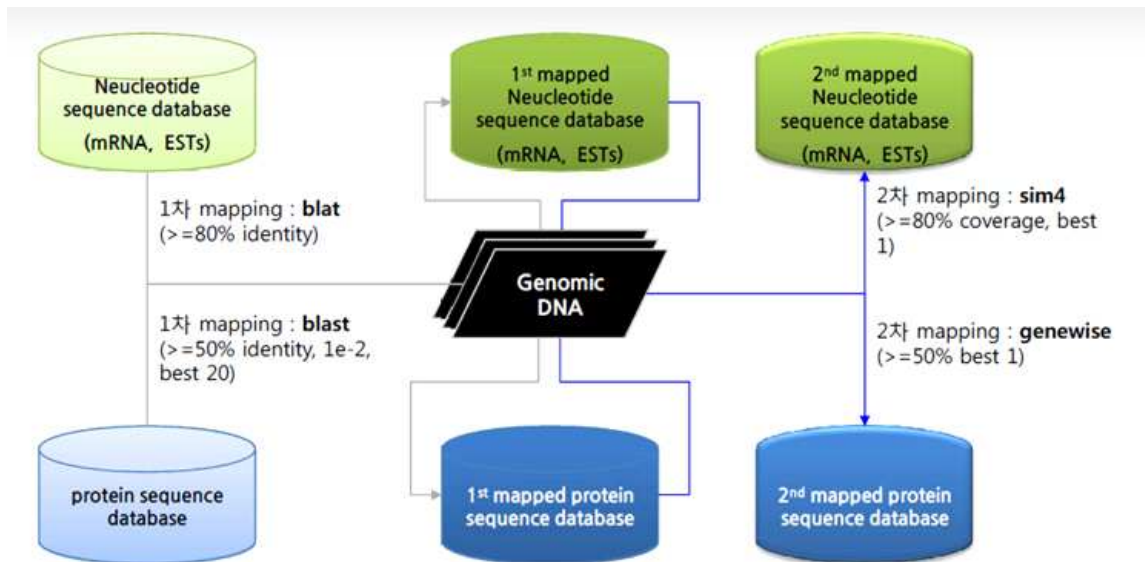
이상의 과정에서 검토한 지식을 바탕으로 하여 KM의 업데이트된 유전체 서열 정보에 맞춘 최종 유전체 주석화를 실시하였다. 분석 작업에 투입된 입력물은 다음과 같다. 실제 주석화 및 유전체 브라우저 구축 작업은 (주)인실리코젠에서 수행하였다(완료일: 2013년 3월 28일). 유전자 통합 모델의 구축에는 EVM을 사용하되 각 모델에 대해 동일한 가중치(=5)를 부여하였다.

- Yeast gene order browser 사이트에서 다운로드한 21개 species의 유전자·전사체·단백질 서열
- 1차년도에 IG Assets에서 제공한 Fgenesh 기반 유전자 모델(ab initio prediction)
- 자체적으로 작성한 Glimmer3 결과물(ab initio prediction)
- 2차년도에 실시한 RNA-seq read를 TopHat(ver 1.3.2, alignment engine으로는 bowtie ver. 0.12.7 사용)으로 정렬 후 Cufflinks ver. 1.3.0으로 조립하여 얻은 transcript(4,823 서열)

EVM 실행 결과 총 4,860개의 유전자를 얻을 수 있었다. 유전자 당 평균 exon의 수는 1.04 개였고, 인트론을 포함하여 계산하면 전체 유전자의 길이는 7,343,317 bp(평균 길이 1,510.97 bp; 유전체 길이의 90.7%)였다. 유전자 사이의 평균 간격은 2,224 bp였으며, 유전체 Mb 당 평균적으로 450개의 유전자가 분포하는 것으로 나타났다. 결과물은 CLC Sequence Viewer 및 CLC Genomics Workbench에서 열람할 수 있는 형태의 파일로 제공되었다.

이와는 별도로 추후 통합 유전자 모델의 최종 큐레이션 작업 시 편의성을 도모하기 위해

유전자 브라우저의 일종인 JBrowse 환경(Skinner et al., 2009)을 구축하였다(그림 3-19~21). JBrowse는 궁극적으로 GBrowse를 대체하기 위하여 개발된 유전체 브라우저로서 속도가 매우 빠르고 대용량의 데이터베이스에 맞추어 확장이 용이한 자바스크립트 기반의 도구이다.



- Nucleotide mapping** : 1차 mapping 이후 genomic DNA의 mapping region에서 양쪽 말단으로 1kb씩 확장한 genomic DNA segment를 추출한 후 2차 mapping에 이용
- Protein mapping** : 1차 mapping 이후 genomic DNA의 mapping region에서 양쪽 말단으로 2kb씩 확장한 genomic DNA segment를 추출한 후 2차 mapping에 이용

그림 3-19. Evidence gene model의 구축

		YGOB			IG	RNAseq	
		AA_03_protein	NT_03_mRNA	Ygob_CDS	WAP_CDS(Fgenesh)	Kmar_rnaseq20	Glimmer3
Input							
sequence #		114,457	113,936	113,644	4,997	4,823	
length, bp		53,590,093	160,717,678	160,564,145	7,392,297	4,223,301	
count							
(#)	gene (%)	57,131 (49.9)	1,444 (1.3)	1,466 (1.3)	4,961 (99.3)	4,746 (99.6)	7,048
	exon (CDS)	64,199	1,995	2,017	5,385	4,896	7,048
	CDS/gene (avr.0)	1.1	1.4	1.4	1.1	1	1
length							
(bp)	gene	1331.8	822.5	810.5	1498	886.2	1,092
	exon (CDS)	1165.3	519.7	514.2	1368	841.3	1,092
	max gene	14,739	117	93	78		24,096
	min gene	48	1,444	1,466	4,961		105

그림 3-20. Gene model의 집계

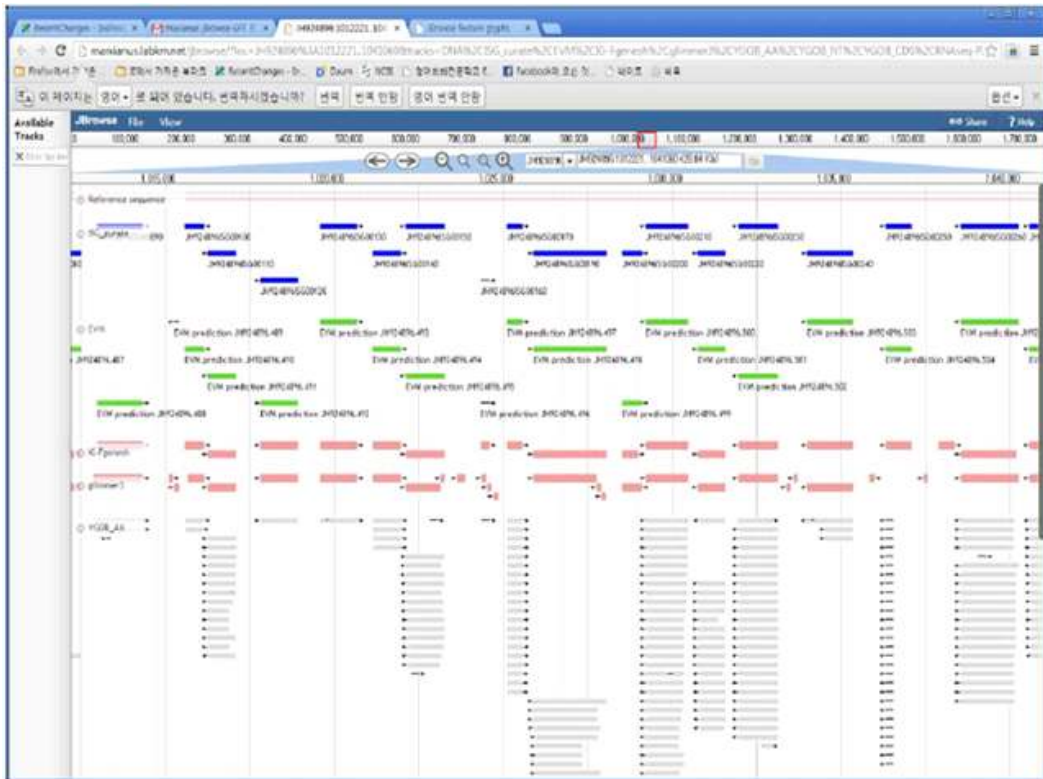


그림 3-21. JBrowse 스크린샷.

바. Yeast Genome Annotation Pipeline(YGAP)을 사용한 자동 유전체 주석화

Yeast Gene Order Browser(YGOB)를 개발하였던 연구팀에서 효모의 유전체 서열과 synteny 보존에 기반한 유전체 주석화 파이프라인을 2012년도에 발표하였다(Proux-Wéra et al., 2012). 효모는 진핵 생물 중에서 유전체 크기가 가장 작고 gene density가 높은 동시에 높은 수준의 주석화 정보가 존재하므로, cDNA 정보와 같이 발현되는 유전자에 대한 직접적인 정보를 갖고 있지 않다 하더라도 자동화된 유전체 주석화 파이프라인을 적용하기에 매우 적당한 대상인 것으로 판단된다. YGAP는 시퀀싱 오류에서 기인하는 frameshift를 검출할 수 있으며, 효모의 유전체 특성에 최적화된 인트론 검출이 가능하다. KM02r2 version을 YGAP 서버 (<http://wolfe.ucd.ie/annotation/>)에 업로드하여 얻은 주석화 결과는 다음과 같다.

- 5137개의 protein-coding gene
 - intron-containing gene: 76
 - *Saccharomyces cerevisiae*에 대한 homolog가 존재하는 것: 4426
 - Ancestral gene이 확인되는 것: 4470
 - 단백질에 대한 상동성 없이 단지 long ORF로서 검출된 것: 107
- 181개의 tRNA gene

YGAP에서는 다운로드 파일 뿐만 아니라 mini-YGOB browser의 형태로 유전체 브라우저를 제공하지만 한시적으로만 유지되므로 초기 주석화 결과물의 검토용으로 활용하는 것이 바람직하다. 이상에서 살펴보았듯이 진핵 생물의 유전체 주석화는 유전자 파라미터가 존재하는 상황 하에서의 ab initio prediction(Augustus), 단백질이나 cDNA/RNA-seq 정보를 이용한 방법 및 synteny와 comparative genomics에 기반한 방법(YGAP) 등 다양한 선택의 폭이 존재하며, 주석화 결과물의 최종 검토와 활용을 위하여 시각화 기능을 수반하는 유전체 브라우저의 제공이 필수적인 요소로 판단된다.

6. 비교 유전체 분석

가. KM01 버전의 비교 유전체 분석

일루미나 데이터만으로 de novo assembly를 수행하여 얻은 KM01 버전을 확보할 당시에는 *Kluyveromyces* genus에서 유전체 정보가 공개된 것이 *K. lactis*와 *K. thermotolerans*(현재는 *Lachancea thermotolerans*로 재분류)에 불과하였다(표 3-7). MUMmer로 whole-genome alignment를 실시한 결과 *K. lactis*에 대해서만 매우 제한적인 synteny를 보였다(그림 3-22). 최종 보고서 작성 시점인 2015년 5월 말 현재 NCBI에 공개된 *Kluyveromyces* genus의 유전체 정보는 본 과제의 성과를 포함하여 8개로 늘어난 상태이다(구 *K. lactis*는 제외하였음).

Strain (assembly version)	Assembly level	Statistics (미토콘드리아 서열 제외)
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1440 (ASM251v1)	complete genome	6 chromosomes 10,729,447 bp
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> ATCC 18862 (ASM17935v1)	contig	336 contigs 9,910,115 bp contig N50: 60,282 bp
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> UCD 54-210 (ASM17941v1)	contig	510 contigs 9,807,744 bp contig N50: 36,691
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMB1 (ASM74778v1)	contig	36 contigs 11,165,408 bp contig N50: 1,416,405
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> CBS 2104 (KLDO-01)	contig	86 contigs 10,741,898 bp contig N50: 493,016
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042 (Kmar_1.0)	complete genome	8 contigs 10,920,159 bp
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC1777	complete genome	AP014599-AP014607 (not available from NCIB)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> KCTC 17555 (KM02r2)	scaffold	111 contigs 10,920,632 bp scaffold N50: 1,410,702 bp contig N50: 1,410,702 bp

표 3-7. *Kluyveromyces* genus의 공개된 유전체 정보.

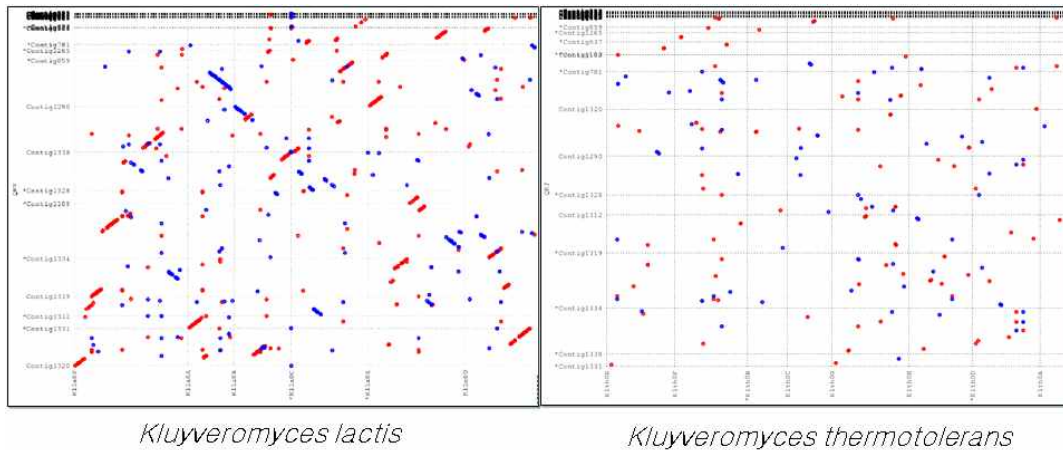


그림 3-22. KM01 version의 whole-genome alignment plot(MUMmer).

나. *K. marxianus* DMKU 3-1042의 유전체 서열을 이용한 비교 분석

K. marxianus DMKU 3-1042는 *Kluyveromyces* genus 중에서 가장 최근에 유전체 정보가 공개된 균주 중 하나이다(AP012213-AP012220; AP012221은 미토콘드리아 게놈, Lertwattanasakul et al., 2015). Sanger sequencing(plasmid 및 fosmid library)과 optical mapping이 사용된 조립물 이므로 상당히 높은 수준의 정확도를 기대할 수 있다. MUMmer alignment를 통하여 DMKU 3-1042의 염색체 서열 위에 KM02r2의 scaffold 8(24개의 contig)개를 다음과 같이 할당할 수 있었다.

- 염색체 1번: scaffold 1 (reverse complementary)
- 염색체 2번: scaffold 2
- 염색체 3번: scaffold 3
- 염색체 4번: scaffold 4
- 염색체 5번: scaffold 5
- 염색체 6번: scaffold 6 (reverse complementary)
- 염색체 7번: scaffold 8
- 염색체 8번: scaffold 7

그림 3-23에 보였듯이 KM scaffold는 DMKU 3-1042의 염색체 서열 위에 매우 정확하게 정렬하였다.

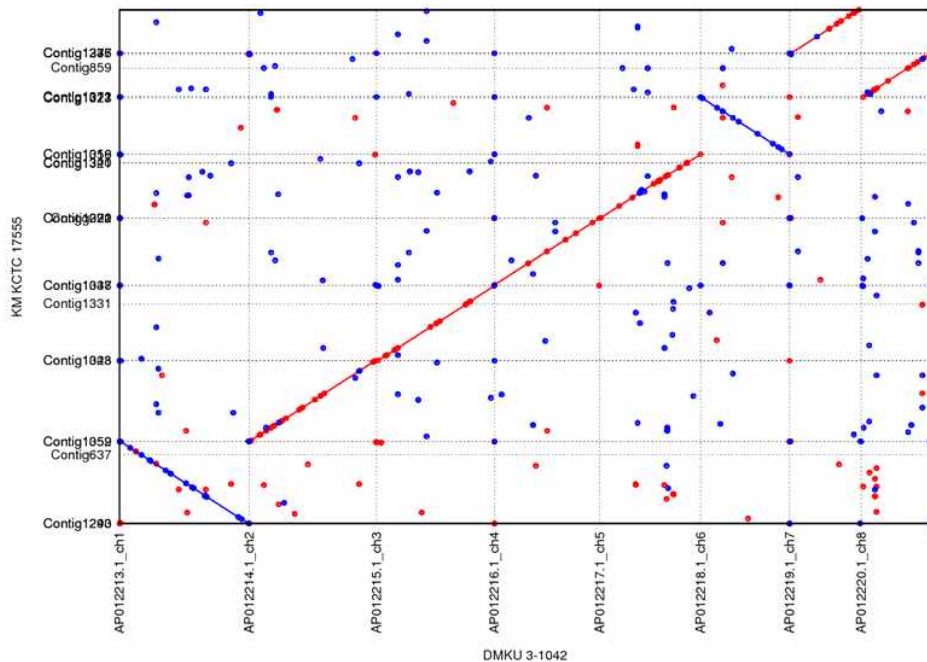


그림 3-23. DMKU 3-1042와 KM(scaffolds only)의 MUMmer alignment.

다. KM 미토콘드리아 유전체 서열의 재구성 시도

통상적으로 유전체 프로젝트 과정에서 미토콘드리아 게놈 서열은 complete circle 형태로 얻어지는 경우가 많으나, KM KCTC 17555의 경우에는 미토콘드리아와 연관된 단편적인 contig만을 얻을 수 있었다. 공개된 *Kluyveromyces* species의 완성된 미토콘드리아 게놈 서열 2종 (DMKU 3-1042 및 NBRC 1777, 길이는 각각 46,308 bp와 46,256 bp)을 참조로 하여 KM의 일루미나 short insert library read를 매핑해 보았다. 실행 환경은 CLC Genomics Workbench ver. 8.0이었다. DMKU 3-1042 및 NBRC 1777의 미토콘드리아 서열은 99.69% 동일하다. 기대했던 바와 달리 KM의 read 중 매핑이 된 것은 겨우 1.72%에 불과하였다(표 3-8). 실제 read coverage를 도시해 보면 COX 및 COB 등과 같이 잘 보존된 것으로 알려진 유전자에 대해서만 집중적

으로 매핑이 된 것을 알 수 있다(그림 3-24). 따라서 현재의 NGS data 수준으로는 de novo assembly나 근연종 서열에 대한 reference mapping으로는 KM 균주의 미토콘드리아 게놈의 전체 염기 서열을 재구성하는 것이 불가능하다고 판단하였다.

Reference	DMKU 3-1042	NBRC 1777
Total reads used	1,001,771 (1.72%)	1,001,649 (1.72%)
No. of mapped reads	58,328,057	58,328,057

표 3-8. 알려진 *K. marxianus* 미토콘드리아 게놈 서열에 대한 KM read의 매핑 결과 요약.

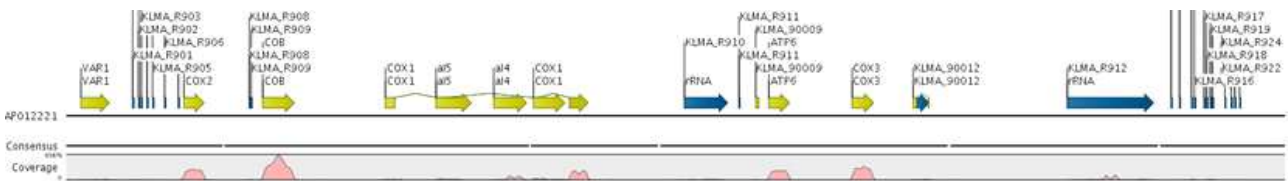


그림 3-24. *K. marxianus* DMKU 3-1042의 미토콘드리아 게놈 서열(AP012221)에 대한 reference mapping 결과. CLC Genomics Workbench ver. 8.0의 스크린 샷.

7. 고온성 효모 KM의 전사체 분석

가. 전사체 분석을 위한 기술적 플랫폼의 검토

지난 20여 년 간 전사체 분석의 표준 플랫폼으로 사용되었던 microarray technology의 뒤를 이어서 RNA-seq을 이용한 유전체 발현 분석이 최근 각광을 받게 되었다. Microarray는 비교적 실험 비용이 저렴하고 데이터의 처리 및 분석을 위한 고도화 기법이 이미 널리 보급되어 있으나, noise가 심하고 dynamic range가 좁으며 알려진 유전자 정보에 의존해야 한다는 근본적인 한계점이 있다. 이에 비해서 RNA-seq은 dynamic range가 넓고 기존의 유전자 정보에 대한 제한을 받지 않으며, novel transcript 및 ncRNA의 발견이 가능하다는 장점이 있다. 하지만 본 과제를 수행하기 시작한 2010년도 무렵에는 아직 실험 비용이 높은 편이기 때문에 반복 실험에 의해 정확도를 높이는 데에는 한계가 있었다. 2차년도에 gene prediction 결과에 활용하기 위하여 시험적으로 Illumina platform에 의한 RNA-seq을 실시하였으나 이를 실시한 서비스 업체의 기술 수준이 안정화되기 전이라 실험 방법이나 데이터의 신뢰도를 충분히 보장하기 어려운 문제점이 있었다. 이에 따라서 3차년도에는 Agilent사의 genome tiling array를 사용한 전사체 분석을 병행하였다. 전사체 분석을 위한 비교 조건은 탄소원(포도당 vs. 자일로스)과 배양 온도(30°C vs. 42°C)였다.

나. RNA-seq analysis

(1) 시퀀싱 결과물의 QC

효율적인 유전자 예측을 위한 evidence 제공 및 배양 조건에 따른 유전자 발현 양상의 비교 분석을 위하여 일루미나 GA IIx를 이용한 RNA-seq 실험 및 분석을 실시하였다. 라이브러리 제작과 single-end 시퀀싱은 디스진에서 실시하였으며, 데이터 수령일은 2011년 8월 31일이었다. 서열 전처리는 CLC Genomics Workbench에서 실시하였다. 반복 실험을 하지 않았으므로 발현 수준의 차이에 대한 통계적 유의성 검정은 할 수 없는 조건이었다(표 3-9, 그림 3-25).

라이브러리명	YPD_30C	YPD_42C	YPX_30C
배양 조건	포도당 2%/30℃	포도당 2%/42℃	자일로스2%/30℃
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9
Total sequences	9,789,451	6,167,972	8,275,544
Sequence length	69	69	69
%GC	44	42	43
Total basepairs	675,472,119	425,590,068	571,012,536
Trim 조건	- Trim using quality score: limit 0.01 - Max number of ambiguities: 0 - Discard reads below 40 nt		
No. of reads after trimming	8,276,194 (84.54%)	4,901,288 (79.46%)	7,006,594 (84.67%)
No. of bases /average reads length	559.47 Mb/67.6	330.84 Mb/67.5	475.05 Mb/67.8

표 3-9. RNA-seq 결과의 FastQC report.

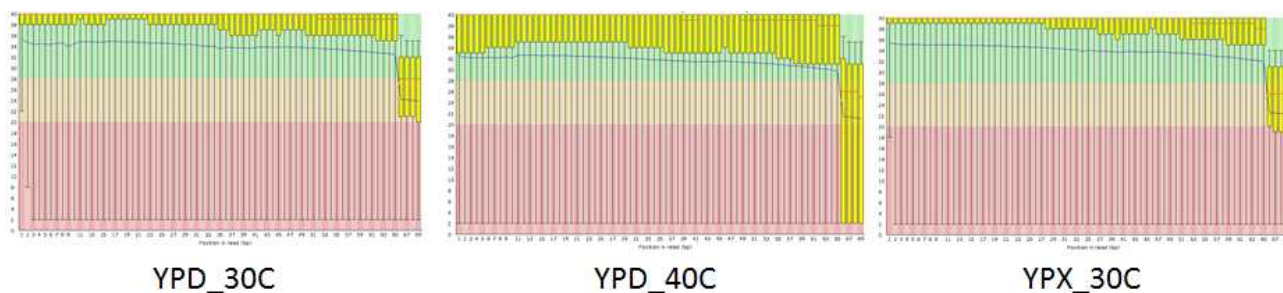


그림 3-25. RNA-seq 결과의 per base quality.

다. CLC Genomics Workbench를 이용한 RNA-seq 분석

CLC Genomics Workbench에서 RNA-seq read의 매핑과 expression value 전환을 하려면 유전체 서열과 더불어 유전자 정보를 수록한 GenBank 또는 GFF 파일을 필요로 한다. IG Assets의 ERGO service에서 제공한 EMBL 파일은 gene과 CDS feature만 갖고 있을 뿐 아니라 locus tag도 생략이 된 매우 간략한 구조임은 물론 CLC 환경에서는 주석화 정보를 포함하지 않은 것으로 간주하는 문제가 있다. 따라서 자체적으로 작성한 펄 스크립트를 이용하여 full annotation을 갖춘 GenBank 파일로 전환하여 sequence with annotation 기능으로 읽어들이고 후

RNA-seq read의 매핑 및 expression value(RPKM, reads per kb per million reads)로 전환하였다. 최종 산물과 배양 조건별 발현 수치는 각 유전자별로 정리하여 표 형태로 제공하였다(표 3-10, 그림 3-26).

Sample	YPD_30C	YPD_42C	YPX_30C
No. of input read	8,276,194	4,901,288	7,006,594
Uniquely mapped	6,385,414	4,056,135	5,708,690
Non-specifically mapped	6,503	2,489	6,092

표 3-10. Detailed fragment counting report.

Locus tag	Product	Expression values (YPD_30C)	Expression values (YPD_42C)	Expression values (YPX_30C)
RWAP00001	Dethiobiotin synthetase	10.65657486	6.070451749	5.579225589
RWAP00002	KAPA/DAPA permease	15.19454995	13.58979676	11.01523038
RWAP00003	hypothetical protein	0	0	2.243394905
RWAP00004	hypothetical protein	3.248046818	5.967897811	0.605483746
RWAP00005	hypothetical protein	25.54960616	45.75006865	24.66228761
RWAP00006	hypothetical protein	42.98785087	52.99581585	58.32826752
RWAP00007	NADPH-dependent methylglyoxal reductase	49.5119611	6.029092755	192.3976459
RWAP00008	FERRIOXAMINE B PERMEASE	20.14095556	26.455221	7.104083865
RWAP00009	hypothetical protein	118.5039081	40.0345205	13.27543006
RWAP00010	hypothetical protein	7.70385852	6.53303965	2.651284887
RWAP00011	Thiazole biosynthetic enzyme	17.38306538	20.09287861	12.12942566
RWAP00012	Zn-dependent alcohol dehydrogenases and	225.5318328	95.46512431	5516.681529
RWAP00013	hypothetical protein	65.05867852	71.05824358	149.9665506
RWAP00014	hypothetical protein	81.71264888	108.4458292	36.55785781
RWAP00015	hypothetical protein	9.66668026	4.80758876	1.99169694
RWAP00016	Ubiquinone biosynthesis accessory protein (39.91202015	46.10526796	24.32099241
RWAP00017	RNA helicase	57.49956821	98.66223144	12.34741248

그림 3-26. 각 배양 조건에 따른 유전자의 발현 수치 비교.

라. Genome tiling array analysis

2차년도 RNA-seq 실험은 배양 조건에 따른 차등 발현 유전자의 발굴보다는 통합 유전자 모델을 수립하기 위한 evidence를 제공하기 위한 것이 주된 목적이었다. 서비스 비용이 아직은 높은 수준이라서 통계적 의미를 부여할 수 있는 정도의 생물학적 반복(3회 권장)을 하지 못하였고, 서비스 업체의 기술 수준도 안정화 단계에 진입하기 전의 상황이었다. 이에 따라서 3차년도에는 전사체 분석의 정밀도를 높이기 위하여 Agilent사의 genome tiling array를 이용하게 되었다. 이 기법은 실험 비용이 비교적 저렴하여 다수의 생물학적 반복에 대한 결과물을 얻을 수 있고, 데이터의 통계적 분석 방법이 잘 확립되어 있으며, 전사체 분석의 표준 기술이었던 microarray technology와 같이 유전자 서열에 대한 사전 정보에 의존하지 않으면서도 transcript architecture를 정밀하게 관찰할 수 있는 특징이 있다.

본 연구에서는 Agilent사의 GE 200K custom chip(244K format, no replication)을 사용하였다. 칩의 설계와 실험 및 결과 분석은 이바리오젠을 통하여 수행하였다. 프로브 설계에 사용된 유전자 정보는 NCBI의 최초등록본인 KM02보다 조금 더 수정이 진행된 120531R2-allContigs.fasta였다. 이 버전에는 약간의 편집상 오류를 지니고 있어서 해석에 주의를 요한다(그림 3-27). 유전체 크기(약 11 Mb)를 감안하여 프로브의 길이는 60-mer로 확정하였고 시작 부위를 기준으로하여 45-mer 간격으로 배치된 프로브 241,127개가 하나의 칩에 올려진 상태이다. 칩 제작 매수는 총 3장으로서 반복 실험은 포함되지 아니하였다.

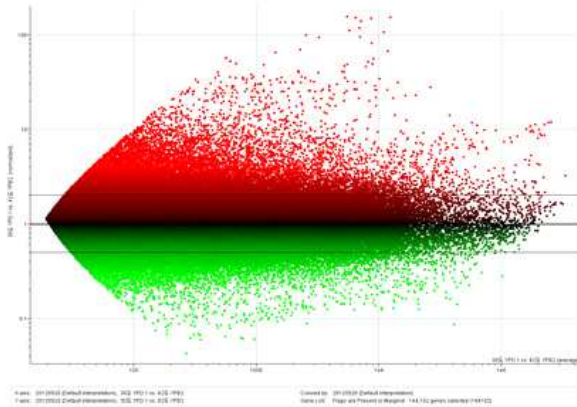


그림 3-27. Agilent genome tiling array 설계에 사용한 어셈블리의 오류. KM81010C02의 전장 서열이 추가되었으므로 Contig283-1324-1334가 하나의 contig로 병합되었어야 하나, contig1324는 제외한 나머지 contig만이 병합되어 Contig1334가 되었다. 제외된 Contig1324(974 bp)는 Contig1334 내부에 100% identity로 포함될 수 있다. Contig283은 병합 과정에서 최종 contig의 시작 부위(빨간색 화살표)에 맞추어 위치시켰어야 하는데, telomeric region의 반복 서열로 인하여 정렬 위치를 잘못 잡게 되어 몇 bp 수준의 mismatch가 유발되었다.

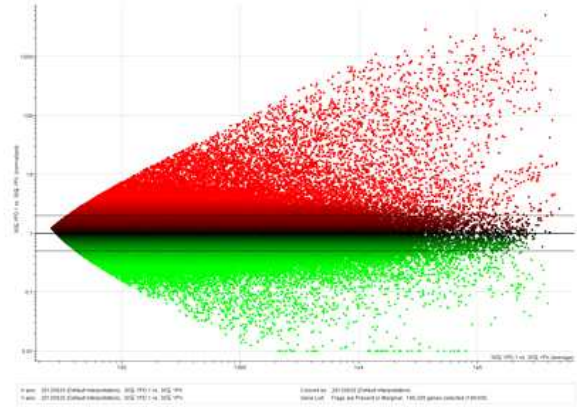
Total RNA의 추출을 위한 배양 조건은 RNA-seq 실험과 동일하였다. Microarray의 스캐닝과 데이터 분석은 Agilent사의 microarray scanner 및 GeneSpring software를 통하여 수행되었다. Normalization은 intensity dependent (Lowess) 방법에 의하여 실시되었고, normalized ratio가 2배 이상 차이를 보이는 프로브만이 선별되었다(그림 3-28, 29).

실험 균주	Hybridization 조건(시료명)
KM 17555(표준균주)	Chip 1: 포도당 - Cy3: 포도당/30°C(YPD 1) - Cy5: 자일로스/30°C(YPX)
	Chip 2: 온도 - Cy3: 포도당/30°C(YPD 1) - Cy5: 포도당/42°C(YPD 2)

MA plot



YPD 30°C (Cy3), YPD 42°C (Cy5)
17575 up, 12182 down(>2-fold)



YPD 30°C (Cy3), YPX 30°C (Cy5)
25482 up, 21402 down (>2-fold)

그림 3-28. KM 표준균주(KCTC 17555)에 대한 MA plot.

Normalized Data greater than 2 : 25,482 genes selected								
20120920								
sample ()*S	30도 YPD 1 vs. 30도 YPX							
Systematic	Normalized	Flags	Raw	Control	Sequence	BPStart	EndDistan	TargetID
PI428040543-78861	5036.5854	P	750432	148.99612	ATCTCGA	1579893	109670	Contig1345
PI428040543-1935	2869.7615	P	415291.6	144.71294	TTATTATG	87031	293546	Contig1331
PI428040541-27422	2863.2935	P	73062.94	25.517105	AATATGT/	64486	1082644	Contig1320
PI428040543-78862	2861.9612	P	279506.2	97.66249	TAACGAA	1579938	109625	Contig1345
PI428040543-78853	2695.0059	P	474027.5	175.89113	ATGTTGG	1579533	110030	Contig1345
PI428040543-78854	2668.0469	P	558727.3	209.41437	AGCAAGC	1579578	109985	Contig1345
PI428040543-78856	2552.179	P	526694.8	206.37065	TTTTGGCT	1579668	109895	Contig1345

그림 3-29. 산출된 significant probe의 사례(일부).

8. NGS에 의한 KM 관련 균주의 유전체 해독 및 분석

가. 개요 및 균주의 선정

산업적으로 유용한 고온성 GRAS 효모인 *Kluyveromyces marxianus* 종을 구성하는 다양한 strain의 특성을 파악하여 활용성을 증대하기 위한 목적으로 주관연구기관이 보유한 KM 균주들의 상관관계를 조사하여 그룹화하고, 그 중에서 선별된 균주에 대한 NGS 기법의 유전체 해

독을 진행하였다. 분석 대상 균주는 다음의 표에 수록했듯이 총 19개 스트레인이었다(outgroup 제외). BY 균주의 유래와 genotype은 참고문헌(Babiker et al., 2010)에 RAK 균주번호로 소개되어 있다.

- KRIBB 미생물자원센터(KCTC) 보유 균주: 7001, 7118, 7149, 7150, 7155, 7524, 17212(T), 17544, 17555(1-3차년도 유전체 해독 균주), 17694, 17631, 17724, 17725, 17759
- 일본 Yeast Genetic Resource Center 균주:
 - BY25569(RAK3605, *ura3*, derived from *K. marxianus* DMKU3-1042)
 - BY25571(RAK4174, *ura3 leu2*, derived from *K. marxianus* DMKU3-1042)
 - BY25573(RAK4071, *ura3*, derived from NCYC587)
 - BY25574(RAK4076, *ura3*, derived from IFO0273)
 - BY25575(RAK4077, *ura3*, derived from IFO0277)
- Outgroup: *Candida magnoliae* JH110

KM 균주의 종내 다양성 파악을 위하여 nuclear rRNA 유전자 일부와 ITS(internal transcribed spacer)를 PCR로 증폭하여 Sanger sequencing을 실시한 다음 다중 정렬 후 다양한 분석 방법을 동원하여 계통수를 작성하였다. AFLP에 의한 fingerprinting을 이용하여 균주를 비교하는 방법(AFLP Analysis System for Microorganisms, Invitrogen)도 있으나 좀 더 편리하게 적용할 수 있는 rRNA gene 서열 분석 방법을 선택하였다. Fungus 전체를 아우르는 계통수 분석에는 6-10개 정도의 housekeeping gene을 이용한 MLST를 사용하는 것이 일반적이다.

나. Ribosomal RNA gene에 의한 phylogeny

(1) PCR 및 Sanger sequencing

그림 3-30에 진균류의 일반적인 nuclear ribosomal RNA gene의 구조와 전사 방법을 나타내었다. 원핵생물은 large subunit(5S + 23S)와 small subunit(16S)로 구성된 반면 진핵생물은 5S + 5.8S + 28S(효모는 25S), 그리고 18S rRNA로 구성되어 있다. 18S rRNA 서열은 매우 유사하므로, IGS(intergenic spacer region)이나 ITS를 사용하거나, large subunit 내의 divergent domain(D1-D7)을 사용하기도 한다. 가장 차이가 심한 영역은 600-900 bp 길이의 D1-D3으로 알려져 있다. 따라서 5.8S를 둘러싸고 있는 ITS1과 ITS2를 증폭하여 시퀀싱하거나, 또는 25S 앞부분의 D1-D2 영역을 증폭하여 시퀀싱을 한 뒤 계통수 작성에 사용하면 된다. 본 과제에서는 ITS1 - LR7 프라이머 조합을 사용하여 2,081 bp의 PCR 증폭산물을 얻었다(그림 3-31).

ITS1 primer: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

LR7 primer: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3'

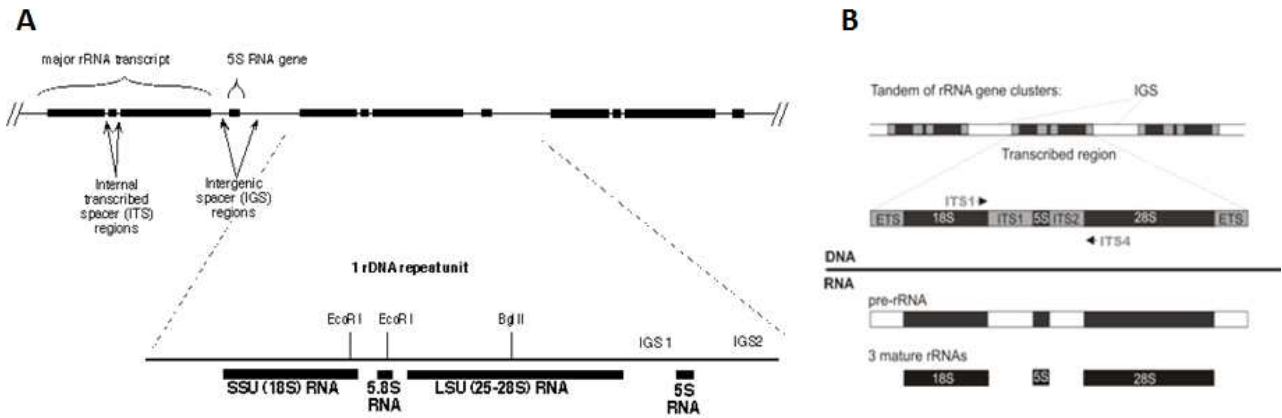


그림 3-30. A, Nuclear rRNA gene의 반복 구조. 출처: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>. B, 전사 직후 및 processing이 끝난 rRNA의 모습. 출처: <http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages783-787.pdf>.

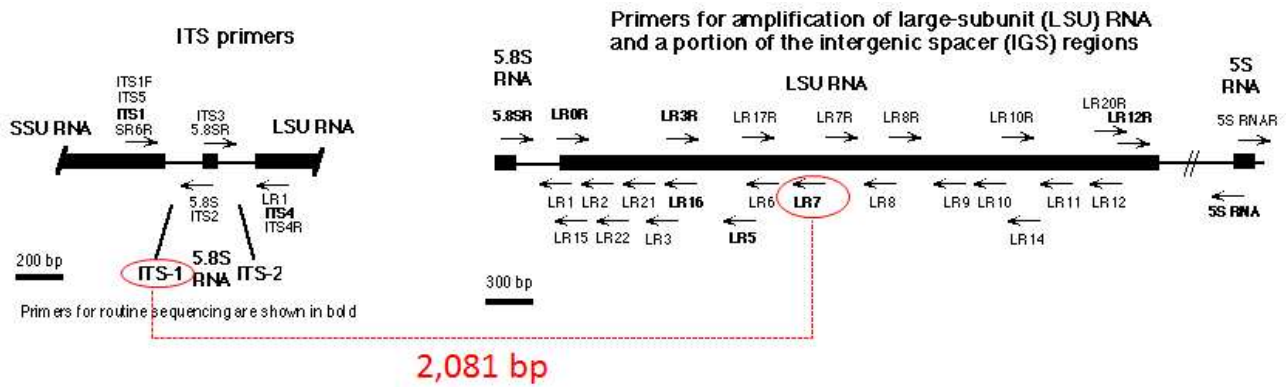


그림 3-31. PCR 증폭에 사용한 프라이머의 위치와 방향 정보. 출처: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.

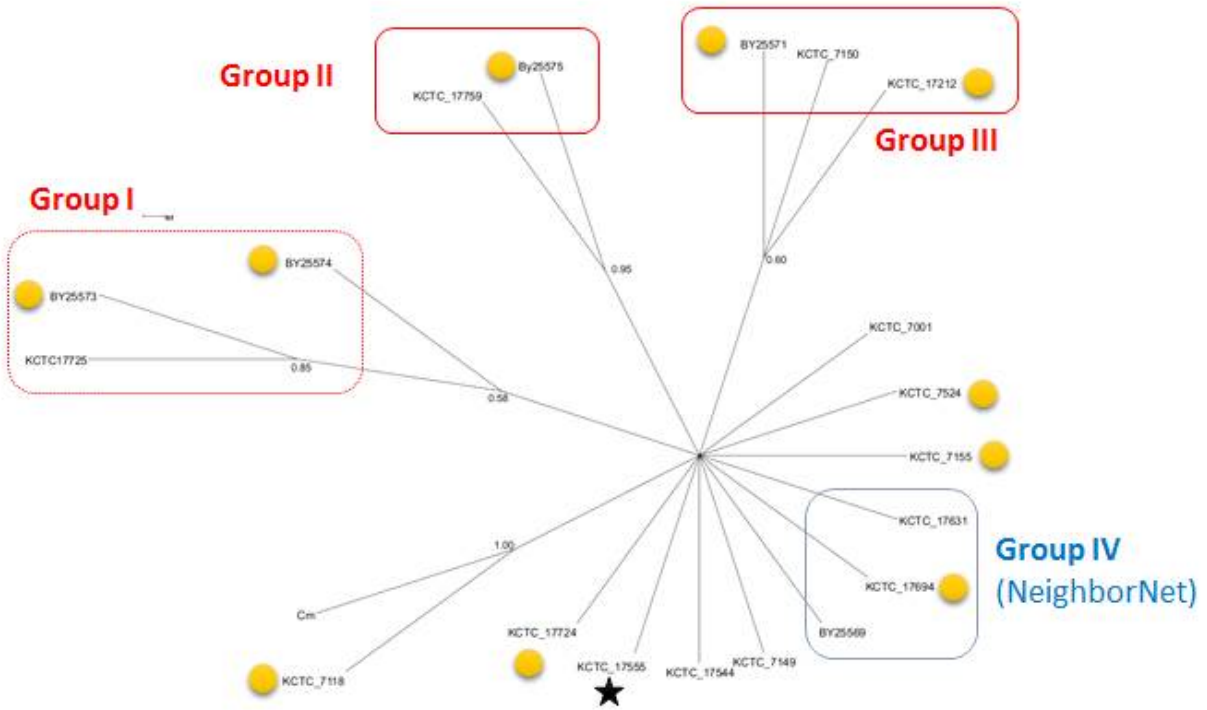
PCR 산물은 증폭용 프라이머와 내부 프라이머를 이용하여 Sanger sequencing을 실시하였다. 특히 증폭용 프라이머가 결합한 부위의 서열이 명확히 드러나게 하기 위하여 증폭용 프라이머의 약간 안쪽에서 바깥쪽으로 결합하는 내부 프라이머를 별도로 작성하여 시퀀싱한 뒤 전체 read를 조립하여 각 균주에 대해서 2 kb의 완벽한 서열 단편을 확보하였고, 각 rRNA의 위치를 정리하였다(표 3-11). NCBI에서 *K. marxianus* strain DMic 113892의 ITS1 - 5.8S - ITS2 서열(JN008149)를 입수하여 5.8S rRNA 부분만을 끊어내어 assembled sequence와 대조해 보니 *Candida magnoliae*와 KCTC 7118을 제외한 나머지는 100% 동일하였다(L = 156 bp). KM7118은 같은 *K. marxianus* 종에 속함에도 불구하고 나머지 샘플과 전반적으로 차이가 크다는 것은 매우 이례적이었다.

Strain	길이	18S	ITS1	5.8S	5.8S 길이	ITS2	25S
BY25569	2080	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
BY25571	2080	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
BY25573	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
BY25574	2080	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
BY25575	2079	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
Cm	1663	...30	31...130	131...273	142	274...374	375...
KCTC 17212 ^T	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17544	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17555	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17631	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17694	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17724	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17725	2078	...30	31...259	260...417	157	418...663	664..
KCTC 17759	2083	...30	31...262	263...420	157	421...666	667...
KCTC 7001	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
KCTC 7118	2230	...30	31...391	392...549	157	550...783	784...
KCTC 7149	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
KCTC 7150	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
KCTC 7155	2081	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...
KCTC 7524	2080	...30	31...259	260...417	157	418...663	664...

표 3-11. 20종 균주의 시퀀싱 결과. Cm은 *Candida magnoliae* JH110.

20종의 염기서열은 multiple sequence alignment를 거친 뒤 maximum likelihood(ML), maximum parsimony(MP) 및 neighborNet(splittree)의 3가지 방법으로 계통수를 작성하였다. 분석 방법은 각기 다르지만 얻어진 계통수는 매우 유사하였으며, 특히 ML과 MP 방법의 결과 차이는 BY25574가 MP tree에서는 어느 그룹에도 속하지 않는다는 것을 제외하고는 동일하였다(그림 3-32, 3-33). 작성된 계통수를 기반으로 하여 20개의 균주(KM은 19종)는 대략적으로 4개의 그룹(I-IV)과 기타 멤버로 나눌 수 있었다. Group IV는 ML과 MP tree에서는 뚜렷하게 묶이지 않지만 neighborNet tree에서는 그룹을 짓는 경향이 있었다. 이상의 결과를 기반으로 하여 각 그룹을 대표할 수 있는 균주 총 10종을 선별하여 유전체 해독 대상으로 결정하였다. 다음의 목록에서 밑줄을 친 것은 유전체 해독 대상 균주이다. BY25574는 Group I의 대표격은 아니지만 계통수 작성 방법에 따라 다른 topology로 나타났으므로 유전체 서열 수준에서의 정확한 연관관계 규명을 위해 포함시켰으며, haploid genome을 갖고 있는 BY25571은 최초에는 선정되지 않았으나 3차년도부터 주력 연구 균주로 쓰이게 되어 유전체 해독 대상이 되었다. 이와 같이 nuclear rRNA gene 서열의 phylogenetic analysis에 의해 선정된 BY 계열의 균주는 전부 유전적 배경이 다름을 잘 반영하고 있다.

A



B

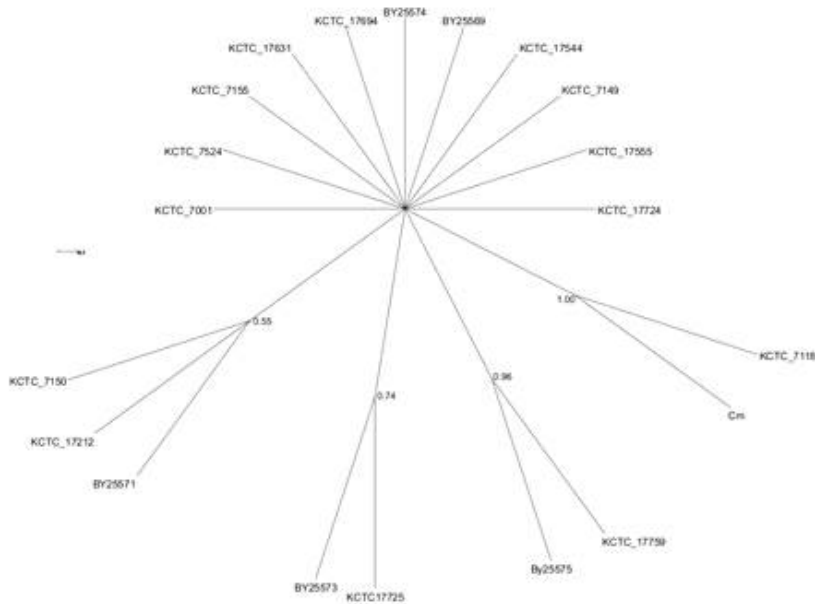


그림 3-32. rRNA gene 영역을 이용하여 작성한 계통수. A, maximum likelihood. B, maximum parsimomy. 노랑색 원은 유전체 해독 대상 균주이고 별표는 1-3차년도에 집중적으로 유전체를 해독하여 완성 수준까지 진행한 KCTC 17555.

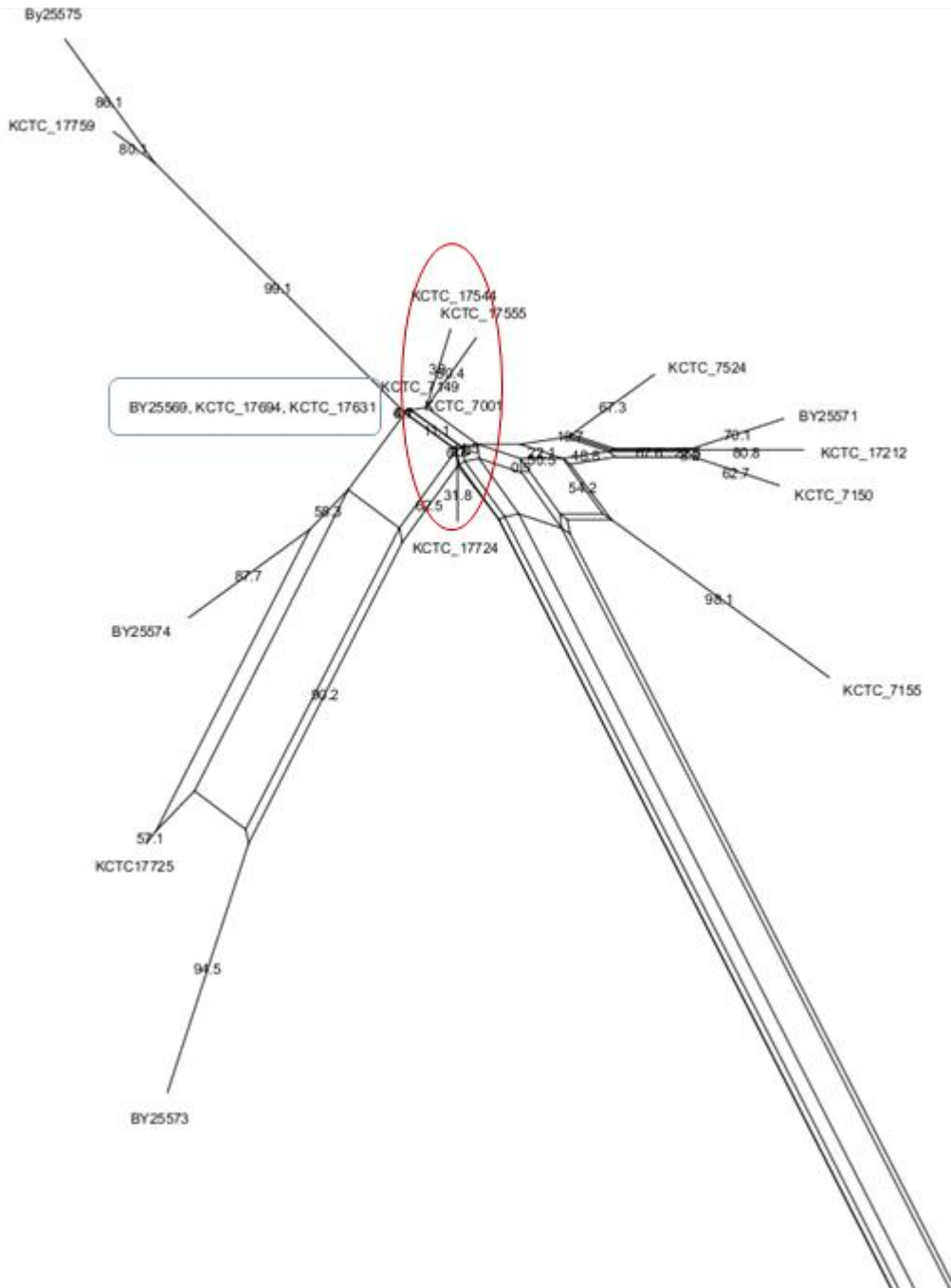


그림 3-33. rRNA gene 영역을 이용하여 작성한 neighborNet 계통수.

- Group I: KCTC 17725, BY25573, BY25574
- Group II: KCTC 17759, BY25575
- Group III: BY25571, KCTC 7150, KCTC 17212(T)
- Group IV: BY25569, KCTC 17694, JCTC 17631
- 기타: KCTC 7001, KCTC 7118, KCTC 7149, KCTC 7155, KCTC 7524, KCTC 17544, KCTC 17555, KCTC 17724

다. NGS를 이용한 유전체 해독

(1) Ion Torrent PGM을 이용한 BY25571 균주의 유전체 해독

3차년도부터 주력 연구 대상으로 쓰이게 된 BY25571의 경우 유전체 정보를 신속하게 해독하여 제공할 필요성이 제기되어 일루미나 기법에 비하여 빠른 결과를 산출하는 Ion Proton PGM으로 시퀀싱을 실시하였다. (주제노텍의 시퀀싱 서비스를 이용하여 단일 318 chip(약 600 Mb 생산 가능)으로 결과를 얻었다. 결과물은 일루미나와 같은 fastq format으로 제공되었다. Read length는 8-489 bp로 큰 범위에 걸쳐 존재하는데, 전반적인 시퀀싱 quality는 일루미나의 그것에 미치지 못하였다(그림 3-34). 서열의 전처리와 de novo assembly는 CLC Genomics Workbench ver 6.5.1을 사용하였다. Sequencing coverage는 약 67x 수준이라서 일루미나 플랫폼으로 얻어지는 일반적인 결과에 비하면 낮은 수준이다. De novo assembly로 얻어진 contig의 수는 3천에 가까워서 일루미나 시퀀싱으로 얻어지는 일반적인 경우에 비해 매우 미흡한 상태였다(표 3-12). 이 중에서 average coverage < 10인 contig는 1,090개나 되어서 전체 contig 수의 36.8%라는 높은 비중을 차지하지만, 길이의 합은 304,071 bp(2.7%)에 불과하였다. Ion Torrent PGM의 read quality가 좋지 않다는 근본적인 한계로 인하여 de novo assembly의 성적 역시 미흡한 것으로 판단되었다.

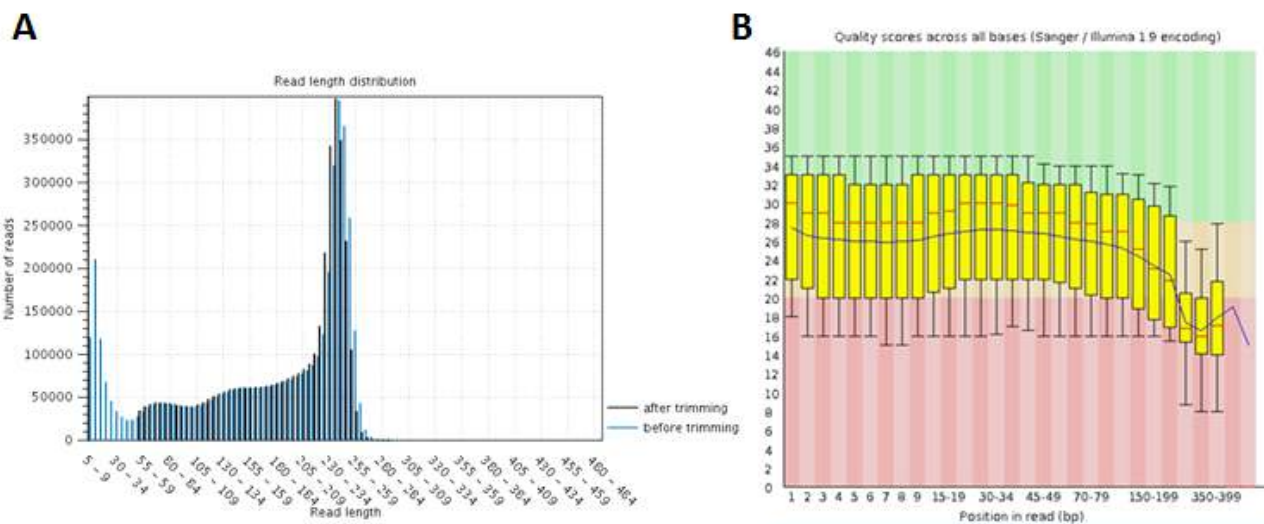


그림 3-34. Ion Torrent PGM 시퀀싱 결과의 QC(CLC Genomics Workbench). A, read의 길이 분포. B, per base quality (FastQC).

BY25571 raw data		De novo assembly result
결과 수령일	2012.12.7	<ul style="list-style-type: none"> • Number of contigs: 2,964 • Total length: 11,302,739 • Max contig length: 64,420 • Contig N50: 14,291 • Average contig length: 3,813
Encoding	Sanger/Illumina 1.9	
Total sequences	4,478,582	
%GC	40	
Total basepairs	758.16 Mb	
Mean length	169 bp (4-489 bp)	
Trim 조건	<ul style="list-style-type: none"> - No quality trim - Ambiguous base allowed per read: 1 - Minimum read length: 50 	

표 3-12. FastQC report.

(2) 일루미나 HiSeq 2000을 이용한 다양한 KM 균주의 유전체 해독

라이브러리 제작과 HiSeq 2500을 이용한 염기서열 해독은 주관연구기관인 한국생명공학연구원 인체유래자원센터를 통하여 실시하였다. 라이브러리의 평균적인 insert 크기는 250 bp 내외였고, 101 cycle로 paired end sequencing을 실시하였다. 서열 전처리와 de novo assembly는 CLC Genomics Workbench ver. 8.0을 사용하였다.

(가) 1차 시퀀싱 및 de novo assembly

Strain	BY25571	BY25573	BY25574	BY25575	KCTC 7118
Total sequences	25,740,462	43,611,068	14,271,170	31,163,498	50,272,056
%GC	39	39	37	40	38
Total basepairs	2,599,786,662	4,404,717,868	1,441,388,170	3,147,513,298	5,077,477,656
Strain	KCTC 7155	KCTC 7524	KCTC 17212	KCTC 17694	KCTC 17724
Total sequences	60,743,918	42,452,720	55,232,816	43,506,540	36,904,556
%GC	40	39	40	39	40
Total basepairs	6,135,135,718	4,287,724,720	5,578,514,416	4,394,160,540	3,727,360,156

표 3-13. FastQC report. Quality encoding은 Sanger/Illumina 1.9, 데이터 수령일은 2013년 2월.

<전처리 조건>

- Quality trimming: 0.01
- No. of ambiguous bases allowed per read: 1
- Minimal read length: 70

예상과 달리 de novo assembly는 10개의 균주 중에서 총 4개(BY25571, BY25573, BY25575 및 KCTC 7118)에서만 양호한 결과를 얻을 수 있었다(표 3-14). 특히 BY25571, BY25573 및 BY25575의 3종은 1 kb 이상의 contig가 100개 미만이었다. 나머지 6종은 contig의 수효가 비정상적으로 많았고 전체 길이도 예상치보다 2~5 Mb 정도 큰 결과를 보였다. 흥미로운 사실은 조립 성적이 전반적으로 불량함에도 불구하고 미토콘드리아 게놈 서열은 하나의 high-depth contig로 만들어졌다(KCTC 17724 제외).

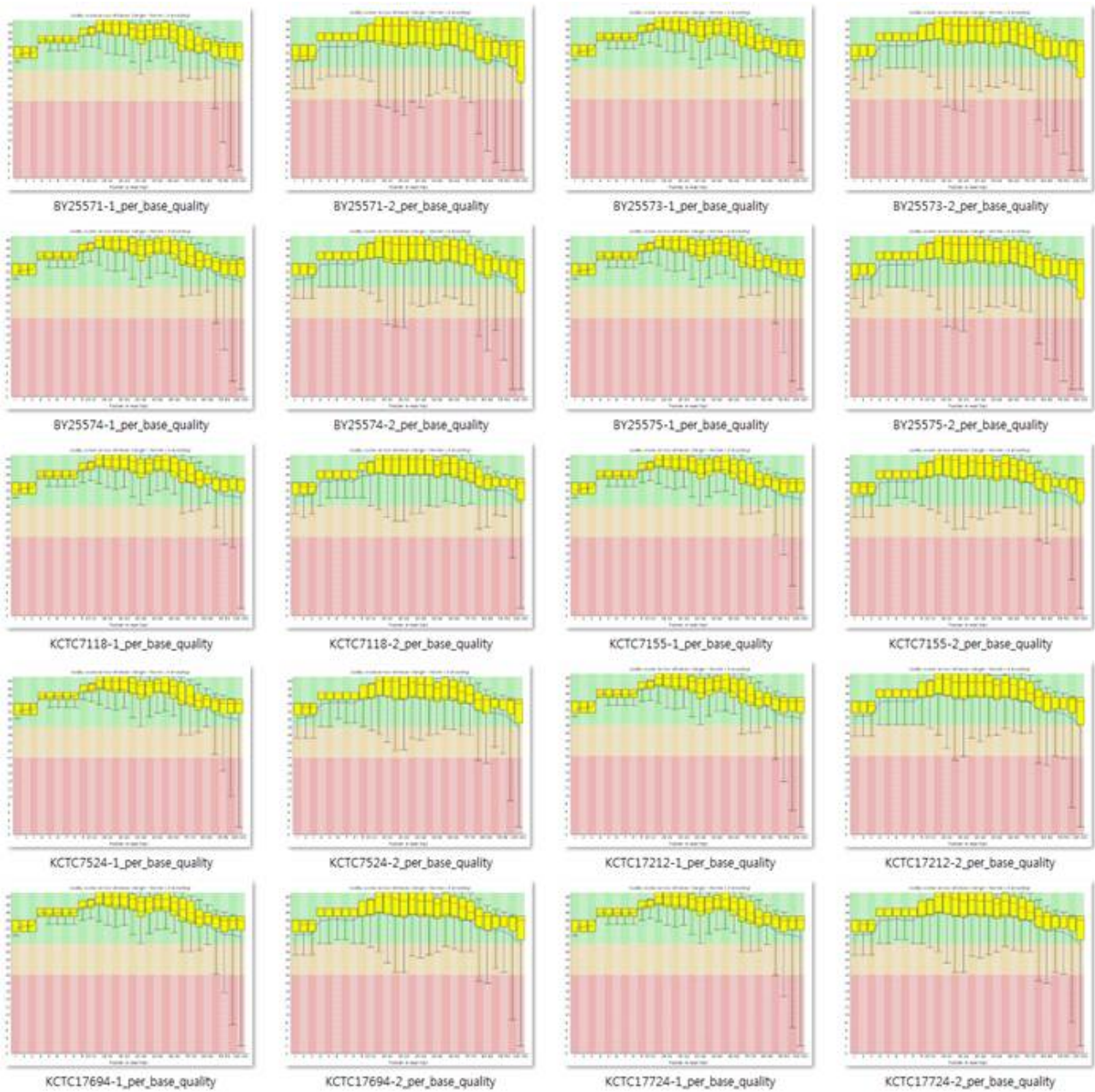


그림 3-35. 1차 시퀀싱 결과의 per base quality.

짧은 contig가 지나치게 많이 생성되어 조립 결과에 영향을 미쳤는지의 여부를 확인하기 위하여 contig들을 길이 구간으로 나눈 뒤 전체에 대한 길이 합과 숫자의 비율을 도시하여 보았다(그림 3-36). Assembly 결과가 불량한 것은 짧은 contig가 지나치게 많이 발생한 것에서 기인하는 것으로 나타났다. 그러나 per base quality와 같은 사전 점검(QC)에서 특별히 성적이 저조한 것이 assembly 성적도 불량한 것이 아니며, 데이터의 분량과도 큰 상관관계가 없었다. 간혹 다른 종류의 미생물 유전체가 오염되어 별도의 조립체를 구성하면서 contig 수와 total length를 크게 늘이는 경우가 있다. 만약 오염된 미생물의 유전체가 효모의 유전체와 %GC에서 큰 차이를 보인다면 사전 점검 과정에서 이를 인지할 수 있다. Total length가 16 Mb를 초과하는

KCTC 17694의 경우 이러한 오염을 의심할 수 있지만 QC 결과로는 특이점이 관찰되지 않았다. Quality trim 조건을 더욱 강화하거나, input data의 분량을 줄여서 재 assembly를 해 보았으나 결과는 전혀 개선되지 않았다. 이에 따라서 조립 성적이 불량한 6개 균주에 대해서는 재시퀀싱을 진행하는 것으로 결론을 내렸다.

Strain	BY25571	BY25573	BY25574	BY25575	KCTC 7118
No. of contigs	168	155	7,166	190	919
Total length	10,819,474	10,819,567	13,301,039	10,809,966	11,771,045
Max contig length	733,480	731,095	511,166	772,608	236,908
N50 length	298,150	286,839	30,645	264,953	83,142
Avg. contig length	64401	69,803	1,856	56,894	12,808
Mitochondrial sequence	Contig20 (46 kb, 1038x)	Contig6 (45.9 kb, 3057x)	Contig15 (45 kb, 2366x)	Contig4 (46.3 kb, 1863x)	Contig2 (85.8 kb, 2501x)
Strain	KCTC 7155	KCTC 7524	KCTC 17212	KCTC 17694	KCTC 17724
No. of contigs	15,096	4,713	9,201	16,898	9,697
Total length	15,528,771	11,387,076	13,954,961	16,115,600	13,981,278
Max contig length	506,518	227,844	509,602	436,291	693,096
N50 length	1,430	12,275	3,304	1,298	2,912
Avg. contig length	1,028	2,416	1,516	953	1,441
Mitochondrial sequence	Contig5 (40.8 kb, 2398x)	Contig46 (40.8 kb, 3704x)	Contig50 (44.7 kb, 1291x)	Contig40 (40.8 kb, 3634x)	Not identified as a single contig

표 3-14. De novo assembly 결과. 굵은 글씨로 나타낸 것은 양호한 조립 결과.

(나) 2차 시퀀싱 및 de novo assembly

1차 시퀀싱 및 de novo assembly에서 결과가 불량하였던 6개 균주(BY25574, KCTC7155, KCTC7524, KCTC17694, KCTC17212 및 KCTC17724)에 대하여 같은 조건으로 재시퀀싱을 실시하였다. FastQC로 시퀀싱 품질을 사전 점검한 결과 per base quality는 1차 분석 때보다 훨씬 양호하게 나타났다(그림 3-36). 서열 전처리와 de novo assembly는 1차 분석과 동일한 조건에서 실시하였다. 그러나 contig 수와 total length 등 assembly metric은 거의 개선되지 아니하였다(data not shown). 단, 1차 시퀀싱 및 조립 때와는 달리 KCTC 17724에서는 미토콘드리아 게놈 서열이 단일 contig(Contig13, 40.8 kb, 4197x)로 형성되었으나 오히려 KCTC 17694에서는 발견되지 않았다.

Strain	BY25574	KCTC 7155	KCTC 7524	KCTC 17212	KCTC 17694	KCTC 17724
Total sequences	35,619,482	29,530,746	27,981,582	38,173,242	24,426,766	29,917,148
%GC	37	37	37	37	37	38
Total basepairs	3,597,567,682	2,982,605,346	2,826,139,782	3,855,497,442	2,467,103,366	3,021,631,948

표 3-15. FastQC report. Quality encoding은 Sanger/Illumina 1.9, 데이터 수령일은 2013년 6월.

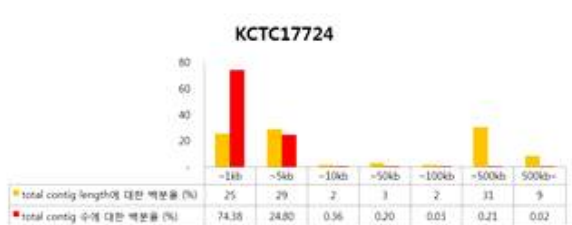
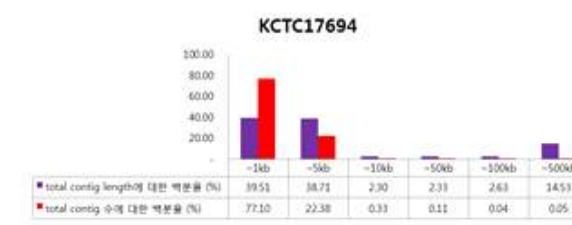
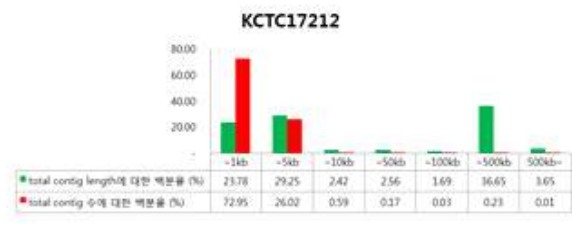
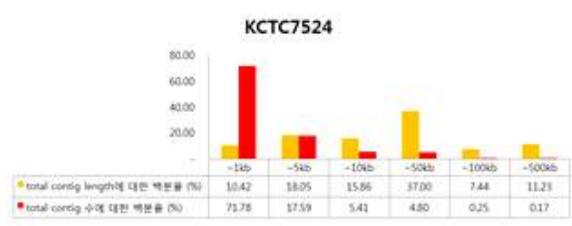
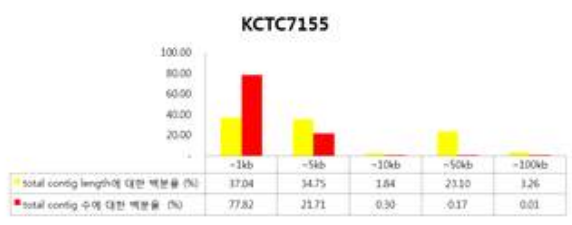
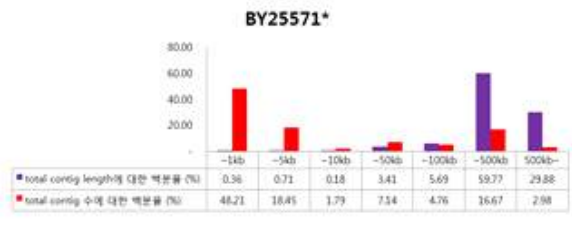


그림 3-36. Contig의 길이 구간에 대한 수-합계 분포.

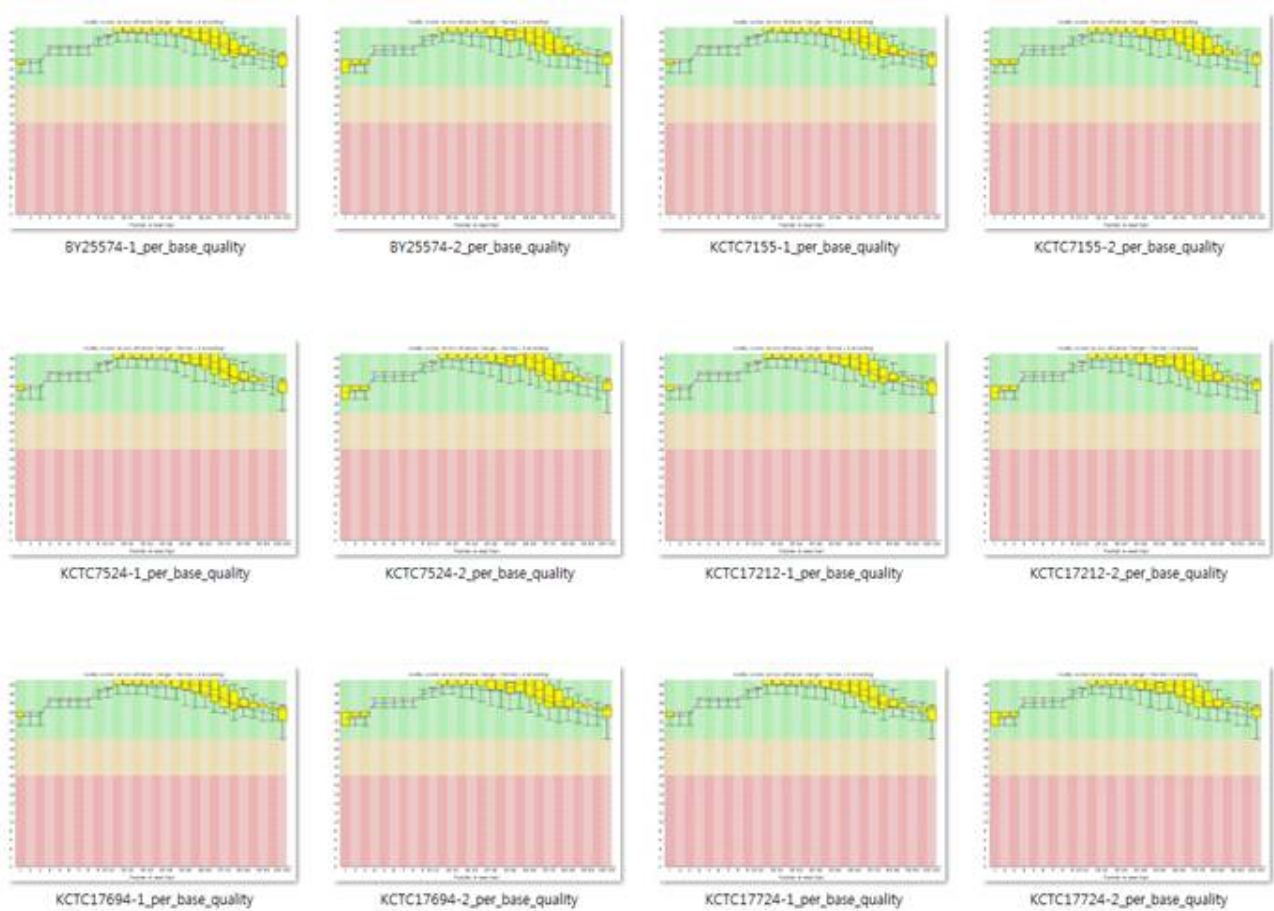


그림 3-36. 2차 시퀀싱 결과의 per base quality.

(3) BY25571 균주의 draft assembly 개선

Ion Torrent PGM 시퀀싱은 read length는 상당히 긴 편이지만 sequencing quality 자체의 한계로 인하여 일루미나 HiSeq 결과만을 이용한 de novo assembly에 비해서는 매우 미흡한 결과를 보였다. 따라서 두 가지 platform의 결과를 합쳐서 동시에 조립을 수행하면 Ion Torrent PGM의 long read에 의해서 향상된 결과가 나올 수도 있다는 가정 하에 전체 데이터에 대한 혼합 조립을 실시하였다(표 3-16). 실행 환경은 CLC Genomics Workbench ver. 6.5.1을 이용하였으며 word size는 64, bubble size는 자동으로 하였다. Ion Torrent data에 대해서는 전처리를 실시하지 않았는데, 이는 Illumina 데이터를 기준으로 하여 quality trimming과 length filtration을 하면 이를 통과하는 read가 너무나 적기 때문이었다.

Sample	Illumina	PGM	Illumina + PGM
Total reads	25,740,462	4,478,582	N.A.
Total bases	2,599,786,662	758,164,525	N.A.
%GC	39.0	40.0	N.A.
Total reads (trimmed)	22,269,192	4,478,582	26,747,774
Total bases (trimmed)	2,134,198,455	758,164,525	2,892,362,980
No. of contigs	171	2,993	1,722
Total contig length	10,818,401	11,308,355	11,259,022
Max	733,504	80,670	760,898
N50	298,172	16,294	251,351
Average	63,266	3,778	6,538
Paired end distance	283.92	N.A.	N.A.

표 3-16. Illumina와 Ion Torrnnet PGM의 단독 및 혼합 de novo assembly 결과.

Total contig length는 일루미나 데이터 대비 +440,621 bp, Ion Torrent 데이터 대비 -49,333 bp의 근소한 증감을 보였다. Contig 수 측면에서는 일루미나 단독 결과보다는 증가하고 Ion Torrent 단독 결과에 비해서는 감소하였다(그림 3-37). 조립 결과물에 대한 contig 길이 구간별 분석을 실시한 결과 긴 contig의 길이가 차지하는 비중이 전반적으로 높아지는 약간의 개선 효과를 볼 수 있었다.

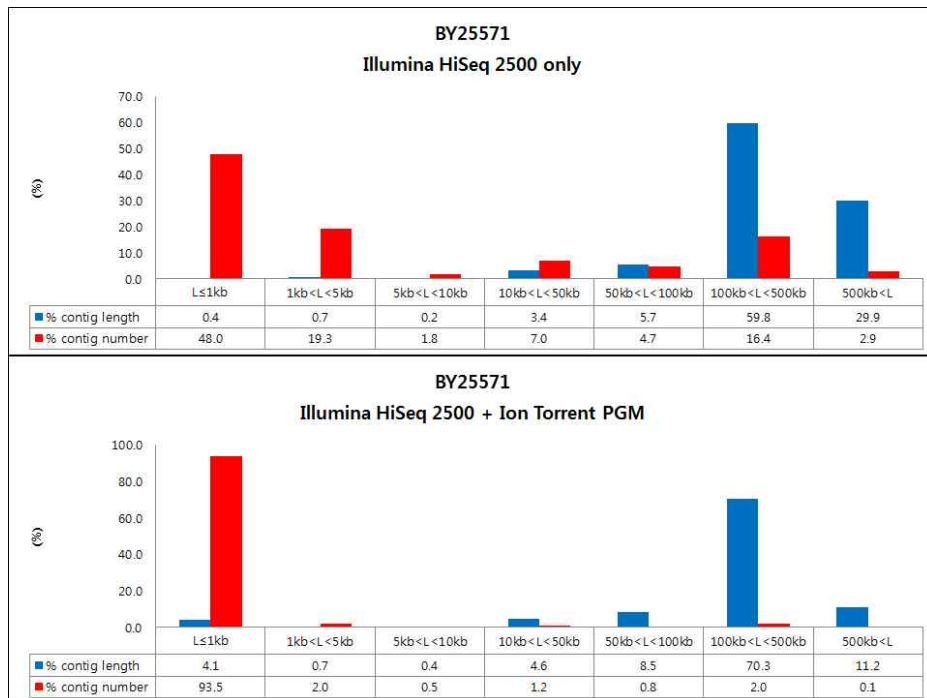


그림 3-37. BY25571을 일루미나 시퀀싱 데이터만으로 de novo assembly 한 결과(위)와 Ion Torrent PGM 데이터를 혼합하여 처리한 결과(아래)의 비교.

다음으로는 일루미나 데이터의 단독 조립으로 이미 만들어진 scaffold에 PB-Jelly를 이용하여 Ion Torrent PGM 유래 데이터를 추가하여 gap closing이 가능한지의 여부를 조사하였다. Ion Torrent PGM 데이터는 최소길이 50/100/150/200 bp로 컷오프하여 투입하였으나 실제 gap closing이 이루어진 것은 전혀 없었다. 이러한 결과가 얻어지는 가장 큰 원인은 근본적으로 두 플랫폼에서 얻어지는 read의 quality 분포에 큰 차이가 나고, 특히 Ion Torrent data의 품질에 일루미나의 그것에 비해 크게 미흡한데서 기인하는 것으로 판단된다(그림 3-38). 이에 따라서 후속 분석을 위한 유전체 assembly는 일루미나 데이터 단독으로 조립한 것을 사용하는 것으로 최종 결정하였다.

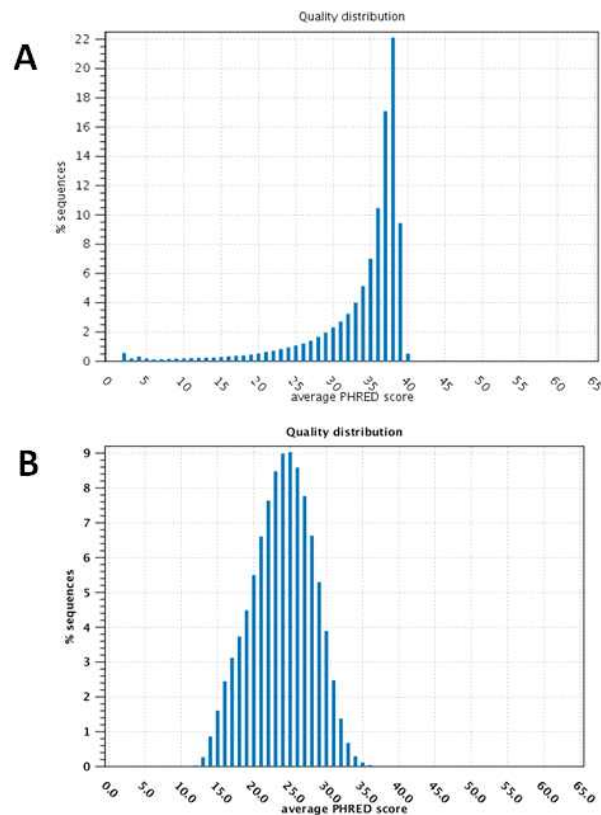


그림 3-38. Illumina HiSeq 2000(A)과 Ion Torrent PGM(B)의 quality distribution 비교.

라. Comparative genomic analysis

(1) Whole-genome sequence를 이용한 유사도 비교

KM 관련 균주 중 de novo assembly가 양호하게 나온 것 4종을 유전체 정보가 공개된 *Kluveromyces* genus 중 선별된 것과 비교하여 염기서열 수준에서의 유사도를 비교하여 보았다. JSpecies 프로그램을 실행하여 각 유전체 및 어셈블리의 average nucleotide identity(ANI)를 계산하였고, 이를 R에서 distance matrix로 전환하여 hierarchical clustering을 수행하였다(그림

3-39). KCTC 7118을 제외하면 ANI 값은 전부 98.9% 이상으로 대단히 유사하였다. Ribosomal RNA gene을 이용한 phylogenetic tree에서 개별적인 그룹으로 나뉘던 멤버들을 좀 더 큰 수준으로 묶는 효과가 있었다.

A

	BY25573	BY25575	KCTC 17555	KCTC 7118	DMKU 3-1042	BY25571	<i>K. lactis</i>
BY25573	---	98.92	99.08	88.14	98.87	98.92	86.38
BY25575	98.93	---	98.9	88.48	99.81	99.85	86.27
KCTC 17555	99.1	98.91	---	87.79	98.9	98.91	86.36
KCTC 7118	88.1	88.57	87.83	---	88.5	88.41	86.55
DMKU 3-1042	98.98	99.88	98.96	87.87	---	99.88	86.11
BY25571	98.93	99.85	98.9	88.43	99.81	---	86.26
<i>K. lactis</i>	86.34	86.24	86.34	86.68	86.23	86.24	---

B

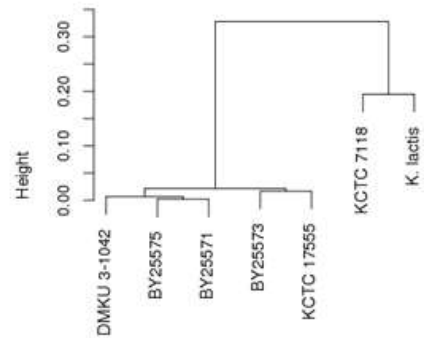


그림 3-39. De novo assembly 결과가 양호한 KM 관련 균주 4종을 1-3차년도 주력 해독 균주인 KCTC 17555 및 2종의 완성된 참조 서열(DMKU 3-1042 및 *K. lactis*) 비교하였음. A, average nucleotide identity matrix (alignment tool은 MUMmer 사용). B, complete linkage 방법으로 작성한 cluster dendrogram.

(2) 미토콘드리아 게놈 서열의 비교

KCTC 17555를 제외한 모든 KM 연관 균주에서는 비록 유효한 유전체 assembly를 모두 확보하는데에는 실패했으나, 미토콘드리아 게놈은 1-3차년도의 유전체 해독 목표였던 KCTC 17555를 제외하면 high read coverage의 단일 contig 서열로 얻어졌다. 특이하게도 KCTC 7118의 경우 나머지 것들에 비하여 2배 이상의 크기(85.8 kb)를 갖고 있었다. KCTC 17555는 최초의 일루미나 assembly(KM01)를 대상으로 DNKU 3-1042의 미토콘드리아 게놈 서열과 유사한 것이 있는지를 탐색해 보았으나 300 bp 미만의 단편적인 contig가 확인되는 것에 그쳤다.

KCTC 7118의 미토콘드리아 서열이 다른 KM 균주와 매우 다르다는 것은 유전체 서열에 의한 비교 분석 결과와도 일치하고 있다. 따라서 KCTC 25573과 유전체 서열 수준에서 매우 가까운 KCTC 17555가 유독 미토콘드리아 게놈에서만 높은 많은 변이를 거쳤다는 것은 받아들이기 힘들다. 어떠한 확인 불가능한 이유로 시퀀싱 라이브러리 제작 과정에서 미토콘드리아 게놈이 대부분 제거되었다고 보는 것이 타당할 것이다.

DNKU 3-1042의 미토콘드리아 게놈 서열(AP012221)을 참조 서열로 하여 나머지 것들을 MUMmer로 정렬하여 synteny 정도를 측정하였으며, average nucleotide identity를 측정하여 distance matrix에 의한 cluster dendrogram을 작성하였다(그림 3-40). Synteny가 높을수록 dendrogram 상에서도 같은 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 이상이 분석 결과는 KM의 진화과정에서 미토콘드리아 게놈의 다양성이 기여하는 정도를 파악하는데 중요한 단서를 쓰이게 될 것이다.

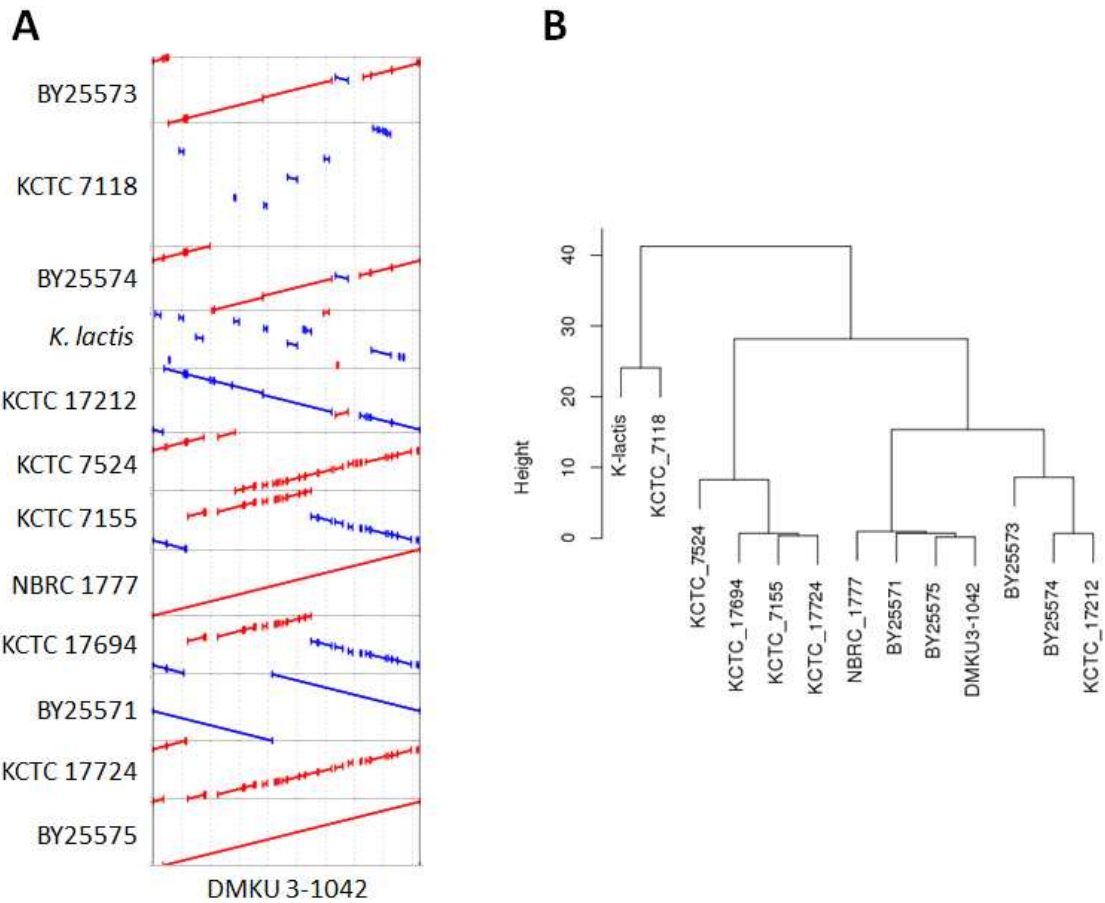


그림 3-40. KM 미토콘드리아 게놈 서열의 비교. A, DMKU 3-1042를 기준으로 한 MUMmer plot. B, complete linkage 방법으로 작성한 average nucleotide identity 기반의 cluster dendrogram.

제 4 절 *Kluyveromyces marxianus*(KM) 유전자 재조합 기술

1. KM 유전자 재조합 시스템

가. KM 균주 특성 조사

돼지감자 바이오매스로부터 바이오에너지 및 바이오화학소재 생산을 위한 플랫폼 효모 균주 *K. marxianus* 개발을 위해 먼저 다양한 stock 균주로부터 본 과제 목적에 맞는 최적의 균주를 선별하였다. 대전 한국생명공학연구원 소재 유전자은행에서 15종의 *K. marxianus* 균주를 분양 받았고, Yeast Genetic Resource center (Japan)로부터 3종의 *K. marxianus* 균주를 분양

받아 섬유소 기질 분해 능력, 고온내성 등을 조사하였다.

(1) 섬유소기질 분해 능력 비교

KM 균주는 원래 섬유소 분해기능이 없지만 일부 균주에서 약한 섬유소 분해능을 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 섬유소 분해 효능이 강한 균주를 선별하기 위해 18종의 *K. marxianus* 균주를 2% Carboxymethyl cellulose(CMC)와 cellobiose가 포함된 YP(1% Yeast extract, 2% Peptone) 배지에서 30℃에서 48시간 동안 배양하여 cellulase 활성을 분석하였다. 대부분 균주에서 cellulase 활성이 약하게 있음을 확인하였고 특히 KCTC 7155 균주와 BY25569, BY25571, BY25573균주에서 cellulase 활성이 비교적 높은 것을 확인하였다 (표 4-1).

표 4-1. *K. marxianus* 균주들의 섬유소 기질 활용 세포성장능 비교

strain	세포의 성장정도	
	YP+CB	YP+CMC
KCTC 7001	++	+
KCTC 7118	-	-
KCTC 7149	++	+
KCTC 7150	++	+
KCTC 7155	+++	+++
KCTC 7524	++	+
KCTC 17212	++	+
KCTC 17544	++	+
KCTC 17555	++	++
KCTC 17631	+++	++
KCTC 17694	++	+
KCTC 17724	++	++
KCTC 17725	++	+
KCTC 17759	++	+
BY25569	+++	+++
BY25571	+++	+++
BY25573	+++	+++

(2) 고온내성 비교

바이오에탄올 발효균주로서 섬유소 기질을 사용할 때 섬유소 분해효소의 최적온도가 40-50도이므로 이러한 온도에서 내성을 갖는 효모의 개발이 필요하다. 섬유소 기질에서 성장성이 좋은 6종의 균주를 선별하여 고온에 대한 내성을 비교하였다. 세포 배양액을 YPD(1%

Yeast extract, 2% Peptone 및 2% glucose) 배지에 dotting 한 후 42°C, 45°C, 50°C 에서 24시간 동안 배양한 결과 17724 균주는 열에 대한 내성이 낮았고 7155, 25569, 25571, 25573 균주는 열에 대한 내성이 높은 것을 확인하였다(그림 4-1).

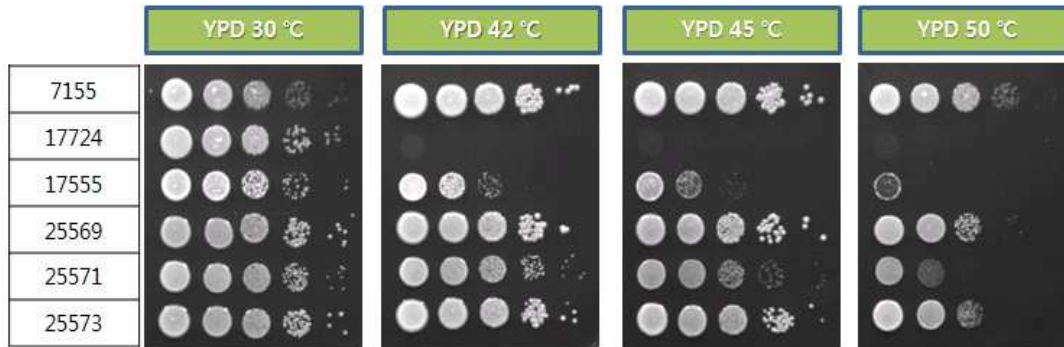


그림 4-1. 각 균주들의 고온내성 확인

나. KM 형질전환 기술 및 유전자 재조합 시스템 개발

선별된 고온성 효모 KM 균주의 유전자 조작시스템 개발을 위하여 기본적으로 형질전환시스템의 개발이 요구된다. 이를 위해 선별표지, 영양요구성 변이주, 형질전환 벡터, 유전자 발현시스템 등을 개발하고자 하였다.

(1) 형질전환 선별 마커 개발

(가) Uracil 영양요구성 KM 균주 개발

KM은 균주에 따라서 haploid와 diploid 형태로 존재하므로 diploid의 경우 같은 유전자가 2 copy가 존재한다. Uracil 영양요구성 변이주 제작을 위하여 diploid인 *K. marxianus* 7155의 2 copy의 URA3 (orotidine 5-phosphate decarboxylase) 유전자를 disruption 하였다. 첫 번째 URA3 유전자는 항생제 표지인 zeocin 저항성 유전자를 선별표지로 사용하였고 2번째 URA3 유전자는 G418저항성 유전자를 이용하였다. 먼저 *K. marxianus* 7155의 genomic DNA를 template로 하여 URA3 ORF의 upstream과 downstream의 300 bp의 DNA 절편을 primer CU1/CU2-1과 CU5-1/CU6을 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. upstream DNA 절편과 downstream DNA 절편을 항생제인 zeocin에 대한 저항성 유전자와 연결하기 위해 primer CU3-1/CU4-1를 이용하여 zeocin 저항성 유전자를 증폭하였고, primer CU1/CU6을 이용하여 overlap extension PCR을 통해 3개의 DNA 조각을 연결하였다(그림 4-2). PCR product를 *K. marxianus*에 형질전환하기 위해 electroporation 법을 이용하였다. 형질전환된 세포는 100µg/ml zeocin이 함유된 YPD 배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다.

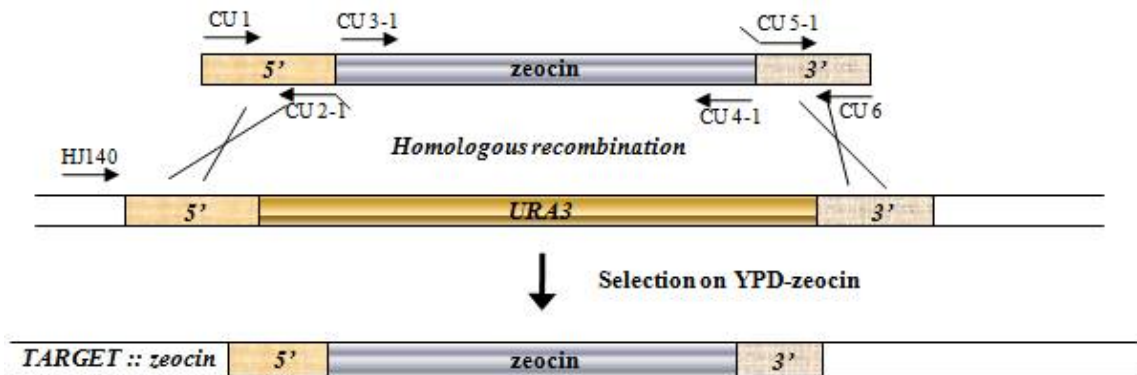


그림 4-2. Zeocin cassette를 이용한 URA3 gene disruption 과정

선별된 세포는 zeocin에 대한 저항성은 있지만 아직 uraci이 없어도 성장하였다. 형질전환 여부를 primer HJ140/CU4-1을 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 zeocin cassette는 URA3 locus에 형질전환 되었으나, 1개의 URA3 gene이 더 남아있는 것을 확인하였다. 따라서 남아있는 URA3 유전자를 disruption 하기 위해 zeocin cassette에서와 동일한 과정으로 G418 cassette를 제작 하였다. 먼저 *K. marxianus* 7155의 genomic DNA를 template로 하여 CU1/CU2와 CU5/CU6 primer를 이용하여 PCR을 통해 URA3 ORF의 upstream과 downstream의 300 bp의 DNA 절편을 증폭하였다. upstream DNA 절편과 downstream DNA 절편을 G418 유전자와 연결하기 위해 primer CU3/CU4를 이용하여 G418 유전자를 증폭하였고, primer CU1/CU6을 이용하여 overlap extention PCR을 통해 3개의 DNA 절편을 연결하였다(그림 4-3). 얻어진 PCR product를 zeocin cassette가 삽입되어 있는 *K. marxianus* 7155 균주에 electroporation 법을 이용하여 100 µg/ml G418이 함유된 YPD 배지에 형질전환 하였다. 형질전환 여부를 HJ140/CU4 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하여 G418 cassette가 URA3 locus에 삽입되었음을 확인하였다.

Zeocin cassette와 G418 cassette가 삽입된 형질전환체를 uracil이 없는 최소 배지(0.67% Yeast nitrogen base without amino acid, 0.77% Ura-DO supplement, 2% glucose 및 2% agar)에 도말 후 배양한 결과 전혀 성장하지 못하는 것을 확인하였다. URA3 유전자가 disruption 되면 uracil을 합성할 수 없어 최소배지에서 성장하지 못하므로 선별된 형질전환체는 URA3 gene이 모두 disruption 되었음을 확인하였고 Km7155u라 명명하였다.

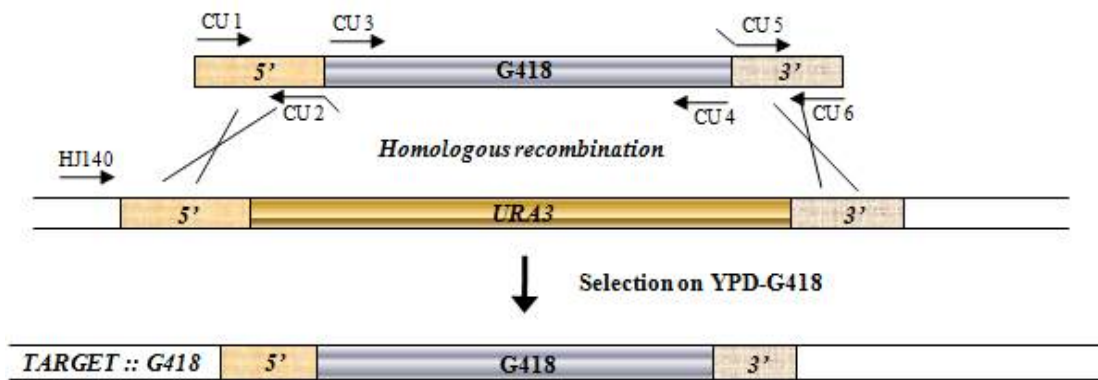


그림 4-3. G418 cassette를 이용한 URA3 gene disruption 과정

(나) 류이신 영양요구성 KM 균주 개발

KM 균주에 여러 가지 유전자를 동시에 형질전환하기 위해서는 하나 이상의 선별표지를 필요로 한다. 따라서 uracil 영양요구성 균주와 더불어 류이신 영양요구성 균주를 제작하였다. Leu2 (3-isopropylmalate dehydrogenase) 유전자를 선별표지로 사용하기 위해 동일한 방법으로 diploid인 *K. marxianus* 17555에 존재하는 Leu2 유전자를 disruption 하였다. Leu2 ORF의 upstream과 downstream의 300bp의 DNA 절편과 zeocin 유전자를 PCR을 통해 증폭 후 overlap extension PCR을 통해 zeocin cassette를 제작하였다. 제작된 zeocin cassette를 *K. marxianus* 17555에 형질전환하여 PCR을 통해 형질전환 여부를 확인한 결과 zeocin cassette는 Leu2 locus에 형질전환 되었으나 1개의 Leu2 gene이 더 남아있었다. 남아있는 Leu2 gene을 disruption 하기 위해 동일한 방법으로 G418 cassette를 제작하여 형질전환 하였다. 형질전환 여부를 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하여 G418 cassette가 Leu2 locus에 삽입되었음을 확인하였다. 형질전환체를 leucine이 없는 최소 배지(0.67% Yeast nitrogen base without amino acid, 0.69% Leu - DO supplement, 2% glucose 및 2% agar)에 도말 후 배양한 결과 전혀 성장하지 못하는 것을 확인하였다. 따라서 선별된 형질전환체는 Leu2 gene이 모두 disruption 되었음을 확인하였고 Km17555 I 로 명명하였다.

(2) *K. marxianus* 유래의 신규 자기복제서열 (ARS) 확보

*K. marxianus*에서 외래유전자를 안정하게 유지시키기 위해서는 주로 염색체로의 integration을 통한 유전자 도입 방법이 주로 이용되고 있으나 integration 시스템은 형질전환 효율이 낮고 유전자 copy 수가 적으며 유전자 library 구축시 유전자의 회수가 어렵다는 단점이 있다. 따라서 높은 형질전환 효율을 가지며 세포내에서 독자적으로 유지되고 또 쉽게 유전자 회수가 가능한 episomal plasmid vector 시스템이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 이러한 효율적인 episomal plasmid vector 개발을 위해서 *K. marxianus* 염색체 유래의 ARS를 다수 선별하여 형질전환 효율 및 세포내 안정성이 뛰어난 ARS를 확보하였으며 개발된 episomal plasmid vector를 활용하여 변이가 도입된 효소 유전자 library를 구축하고 이로부터 고온성 효모 *K. marxianus*에서 활성이 우수한 유전자를 초고속으로 직접 선별할 수 있는 시스템을 개발하였다.

(가) *K. marxianus*의 genomic 자기복제서열 선별

K. marxianus genomic DNA를 분리한 후 제한효소 *Sau3A I* 으로 부분 절단하여 DNA 절편을 얻었다. 이 DNA 절편에 Klenow DNA polymerase로 G와 A의 2개의 뉴클레오티드를 fill-in한 후 전기 영동하여 500-1,000bp 크기의 DNA 절편들을 분리하였다. plasmid pBlue-KmURA3는 제한효소 *Xho I* 로 절단한 후, Klenow DNA polymerase로 C와 T의 2개의 뉴클레오티드를 fill-in하였다. 분리된 DNA 절편을 절단된 pBlue-KmURA3에 삽입하여 대장균에 형질전환하여 대장균 pool로부터 DNA를 회수하여 *K. marxianus* genomic DNA library를 제조하였다(그림 4-4).

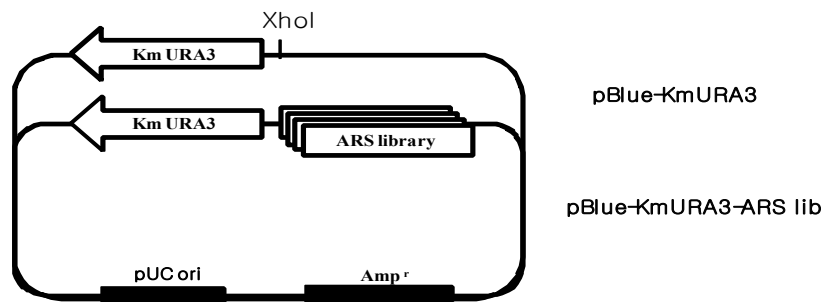


그림 4-4. pBlue-KmURA3 및 pBlue-KmURA3-library vector

K. marxianus 유래의 library DNA를 Km7155u에 형질전환시킨 후, 이를 최소 배지에 도달하여 42개의 형질전환체를 얻었다. Plasmid가 *K. marxianus*로 도입되었는지 확인하기 위하여, 무작위 선별된 10개의 형질전환체로부터 전체 DNA를 추출한 후 대장균 DH5 α 에 재형질전환시켰다. 대장균 형질전환체로부터 plasmid를 분리 후 제한효소 분석 결과 형질전환된 대장균의 plasmid에는 약 500-1,000 bp 크기의 DNA 절편이 포함되어 있는 것을 확인하였다. KM 유래의 DNA 절편의 자기복제 활성을 확인하기 위하여, plasmid 안정성 및 형질전환 효율을 확인하였다.

(나) Plasmid 안정성 확인

각각의 형질전환체를 YPD 복합 배지(1% Yeast extract, 2% Peptone 및 2% glucose)에서 약 20세대 동안 배양한 후 동일한 세포수를 YPD 고체 배지(1% Yeast extract, 2% Peptone 및 2% glucose 및 2% 박토아가)와 최소 배지(0.67% Yeast nitrogen base without amino acid, 0.77% Ura - DO supplement, 2% glucose 및 2% agar)에 각각 도달하고, 30°C에서 48시간 동안 배양하여 나타난 집락의 수를 비교하여 세대당 선택 표지의 안정성을 결정하였다(표 4-2). 또한 비교군으로서 자기복제활성을 보이는 *K. marxianus* 유래의 ARS를 함유하는 plasmid pBlue-FR A, pBlue-FR B를 사용하였다(그림 4-5). 그 결과 plasmid 안정성이 1~70%까지 다양하게 나타났으며, 특히 33번 형질전환체의 경우 비교군 plasmid와 유사한 70%의 안정성을 나타내었다. plasmid 안정성이 35% 이상 되는 형질전환체 6개를 선별하여 추가적인 연구를 수행하였다.

표 4-2. 각 형질전환체들의 plasmid 안정성

형질전환체	plasmid 안정성 (%)	형질전환체	plasmid 안정성 (%)
1	32.3	23	25.8
2	15.7	24	25.2
3	32.9	25	33.7
4	42.6	26	27.5
5	33.2	27	32.3
6	27.2	28	19.4
7	31.5	29	21.9
8	26.4	30	17.4
9	16.1	31	31.7
10	16.8	32	37.6
11	11.3	33	70.0
12	15.2	34	67.8
13	38.1	35	9.4
14	28.4	36	19.1
15	19.4	37	19.7
16	9.4	38	24.7
17	24.1	39	51.2
18	11.5	40	1.1
19	30.4	41	27.7
20	12.6	42	17.3
21	23.5	FR A	65.9
22	31.6	FR B	70.9

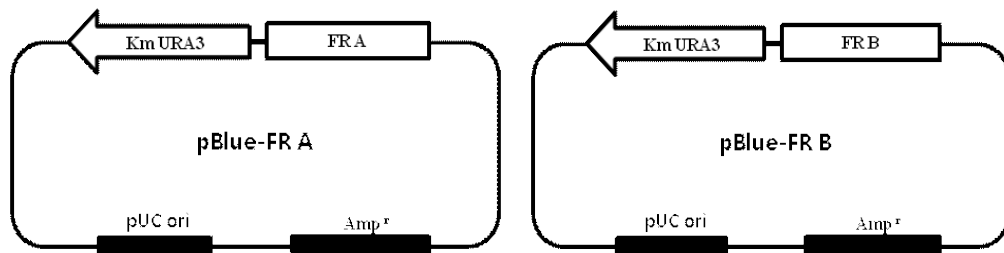


그림 4-5. pBlue-FR A, pBlue-FR B vector

(다) 형질 전환 효율 조사

선별된 6개의 형질전환체로부터 plasmid를 분리하여 다시 Km7155u와 25571에 각각 형질 전환한 후 plasmid μg 당 형질전환체 수를 결정하였다. plasmid 농도는 분광광도계를 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 또한, 대조군으로서 ARS를 함유하지 않는 pBlue-KmURA3와 ARS를 함유한 pBlue-FR A를 사용하였다. 그 결과 본 연구에서 확보된 6개의 ARS를 포함하는 모든 plasmid는 ARS 포함하지 않는 대조군 plasmid pBlue-KmURA3 보다 월등히 높은 형질전환 효율을 보였다(표 4-3). 특히 KmARS32를 포함하는 plasmid의 경우 7155u 에서 가장 높은 형질전환 효율을 보였다. 25571균주에서도 비교군 plasmid인 pBlue-FR

A와 유사한 형질전환 효율이 나타나는 것을 확인하여 본 발명에서 얻은 ARS 유전자는 *K. marxianus*에서 공통적으로 활용가능한 판단된다. 또 계대배양 후 세포로부터 plasmid를 회수할 수 있으므로 세포내에서 에피솜 상태로 자기복제되고 있음을 확인하여 확보된 6가지 DNA 절편이 *K. marxianus*의 ARS임을 확인하였다.

표 4-3. KM ARS를 함유하는 각 plasmid의 형질전환 효율

7155u		25571	
재조합 plasmid	형질전환체 수/ μg DNA	재조합 plasmid	형질전환체 수/ μg DNA
pBlue-KmURA3	0	pBlue-KmURA3	0
KmARS 4	1.2×10^5	KmARS 4	7.5×10^4
KmARS 13	1.3×10^5	KmARS 13	7.6×10^4
KmARS 32	1.4×10^5	KmARS 32	7.5×10^4
KmARS 33	1.1×10^5	KmARS 33	7.5×10^4
KmARS 34	1.1×10^5	KmARS 34	7.5×10^4
KmARS 39	1.2×10^5	KmARS 39	7.4×10^4
FR A	1.3×10^5	FR A	7.7×10^4

(라) 확보된 ARS의 염기서열 분석

자기복제능력을 가지는 6개 plasmid의 염기서열을 분석한 결과 633 ~ 1275 bp 크기의 DNA 절편이 포함되어 있는 것을 확인하였다. KmARS 4는 633 bp로서 일반적으로 진핵세포 ARS에서 관찰되는 AT-rich 서열로 구성되어 있었으며, 먼저 이들 서열 중 단백질을 코딩하는 서열이 있는지 확인하기 위하여 NCBI BLASTX 검색을 통해 단백질 database를 검색한 결과 124~240 bp에서 *Erwinia pyrifoliae* Ep1/96 유래의 hypothetical protein과 부분적으로 상동성을 나타내었다. 따라서 ORF와 상동성을 나타내는 영역을 제외한 1~123 bp, 241~633 bp에 *K. marxianus* 유래의 ARS가 존재하는 것으로 판단되며 진핵세포 ARS에서 관찰되는 ARS core consensus 서열(5' -(A/T)TTTA(C/T)(A/G)TTT(A/T)-3')도 발견되었다.

KmARS 13은 763 bp의 AT-rich 서열로서, 단백질 database에서 상동성을 나타내는 서열은 존재하지 않았으며 전체서열에 ARS를 포함하고 있는 것으로 판단된다. KmARS 32는 1275 bp의 AT-rich 서열이며 3~452 bp, 1085~1270 bp에서 *K. lactis* NRRL Y-1140 유래의 hypothetical protein과 상동성을 나타냈으며, ARS는 453~1084 bp에 존재할 것으로 판단되었다. KmARS 33과 34는 동일서열으로서 719 bp이며, 1~384 bp에서 *K. lactis* NRRL Y-1140 유래의 hypothetical protein과 상동성을 나타내었으며 ORF를 제외한 385~719 bp에 ARS가 존재하는 것으로 판단되었다. KmARS 39는 680 bp이고, 599~679 bp에서 *K. lactis* NRRL Y-1140 유래의 hypothetical protein과 상동성을 나타내며 ARS는 1~598 bp에 존재하는 것으로 확인되었다(그림 4-6).

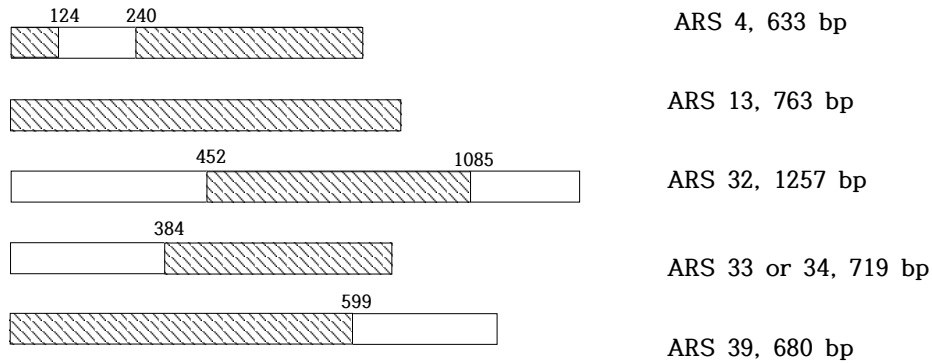


그림 4-6. 5종의 ARS 염기서열 분석

(마) ARS를 포함한 vector를 이용하여 외래단백질 발현

*K. marxianus*의 ARS를 이용하여 리파제 CalB14를 발현하기 위하여 CalB14 유전자를 포함하는 plasmid에 ARS를 도입하였다. 각각의 ARS 유전자를 PCR을 수행하여 증폭하였고, 제한효소 *Sal I* 으로 절단하여 제한효소 *Xho I* 으로 절단한 pBGAP-ST3-CalB14 vector에 결합하여 대장균 DH5 α 에 형질전환하였으며, 형질전환체로부터 KmARS 유전자가 삽입된 plasmid를 얻었다(그림 4-7). 이러한 재조합 plasmid를 7155u와 25571에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일 colony를 선별하였다.

각각의 형질전환체가 리파제를 분비 생산하는지 확인하기 위하여 배양 배지내 리파제 활성을 분석하였다. 활성분석은 각 세포를 YPD에 접종하여 30°C에서 배양 후 배양상등액을 pNPP 측정법으로 각각의 리파제 활성을 비교하였다. 50 mM pNPP 100 μ l, ethanol 950 μ l, 50 mM pH 7.5 의 Tris-HCl buffer가 조합된 반응액 1ml에 20 μ l의 효소용액을 넣고 5분간 반응 후 410 nm에서 흡광도를 측정한 결과 5개 균주에서 CalB 활성을 보였다 (표 4-4 A, B). 즉 *K. marxianus*의 ARS를 함유한 vector가 세포내에서 유지되고 있음을 확인하였고 확보된 5개의 KmARS 중 7155u에서는 FR-A 및 KmARS 4가 25571에서는 ARS 4 및 13이 리파제의 발현이 높음을 알 수 있어 각 균주별로 ARS 효율이 다를 수 있었다.

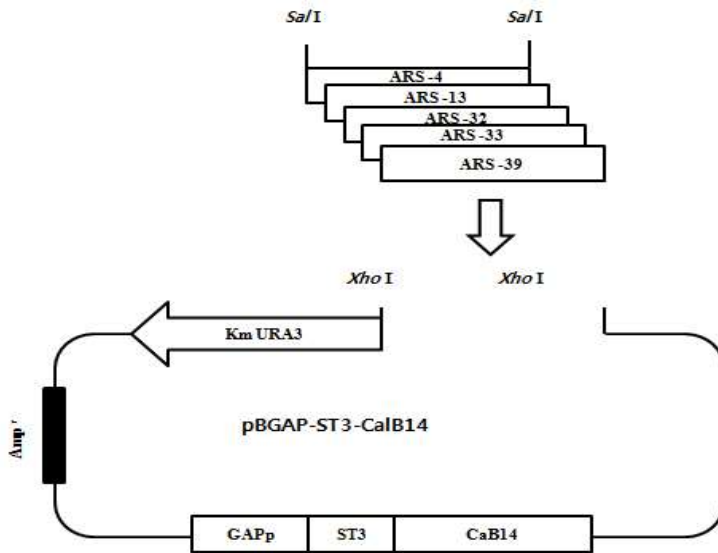


그림 4-7. *K. marxianus* ARS를 포함한 CalB14 발현 vector의 제조 과정

표 4-4 A. Km7155u 형질전환체들의 리파제 활성 분석

ARS number	Lipase activity (U/L)	ARS number	Lipase activity (U/L)
ARS4-1	42	ARS33-1	19
ARS4-2	41	ARS33-2	20
ARS4-3	42	ARS33-3	20
ARS13-1	27	ARS39-1	20
ARS13-2	27	ARS39-2	21
ARS13-3	26	ARS39-3	19
ARS32-1	20	FR A-1	62
ARS32-2	20	FR A-2	63
ARS32-3	20	FR A-3	63

표 4-4 B. Km25571 형질전환체들의 리파제 활성 분석

ARS number	Lipase activity (U/L)	ARS number	Lipase activity (U/L)
ARS4-1	40	ARS33-1	19
ARS4-2	40	ARS33-2	20
ARS4-3	41	ARS33-3	20
ARS13-1	68	ARS39-1	19
ARS13-2	66	ARS39-2	19
ARS13-3	67	ARS39-3	19
ARS32-1	20	FR A-1	21
ARS32-2	20	FR A-2	22
ARS32-3	19	FR A-3	21

(바) Episomal plasmid를 이용한 lipase 유전자 초고속 개량

KM 균주는 외래유전자 도입방법이 주로 염색체 integration system이라 형질전환 효율이 높지 않기 때문에 변이주 library의 제조가 쉽지 않다. 따라서 KM 균주내에서 단백질 초고속 개량 시스템 개발을 위해 본 연구에서 개발된 ARS를 활용하여 리파제 개량을 시도하였다. 특히 세포내 재조합 (in vivo recombination) 시스템을 활용하여 분자진화 유전자와 벡터를 동시에 세포에 형질전환하여 세포내에서 다시 벡터가 구축되도록 하였다. 변이 lipase library를 얻기 위해 pBTEF-ST3-wt-CalB를 주형으로 하여 error-prone PCR (PCR random mutagenesis kit, Clontech)을 수행하였다. 벡터 pBTEF-FR A를 선형상태로 제조하여 KM25571에 형질전환 결과 변이 유전자가 도입된 경우 대부분의 균주 주변에 활성환이 나타나는 것을 확인하였다(그림 4-8). 상대적으로 활성환이 큰 10개의 균주를 선별하여 lipase 활성을 측정 한 결과 2개의 균주가 wt보다 활성이 증가한 것으로 확인하였다(그림 4-9). 2개 균주의 염기서열을 분석한 결과 2번 균주는 TEF promoter, ST3, CalB에 염기서열 변화가 있었고, 7번 균주는 CalB의 278번째 Leucine 아미노산이 Arginine으로 변경되었으며 변이가 일어난 위치는 *S. cerevisiae*에서 실험하였을 경우에서 lipase활성 개선에 영향을 주는 아미노산으로 알려진 위치이다(표 4-5). 이 결과를 통하여 에피솜 플라스미드를 이용하여 KM 균주내에서 단백질 초고속 개량이 가능한 것을 확인하였다.

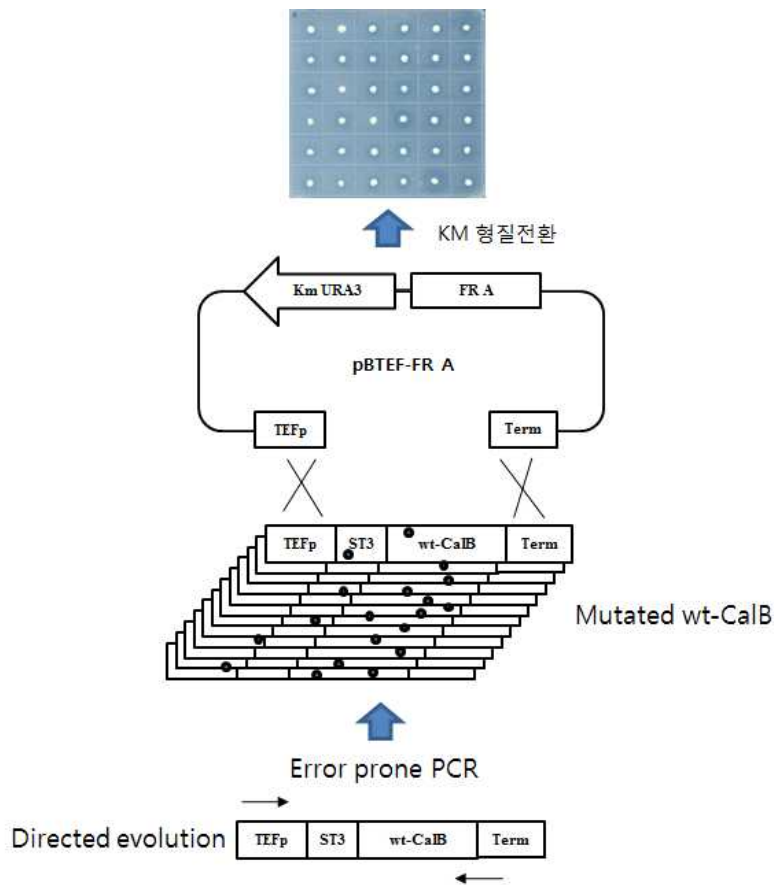


그림 4-8. Lipase 유전자 초고속 개량을 위한 발현 vector의 제조 과정과 고효성 lipase의 선별과정

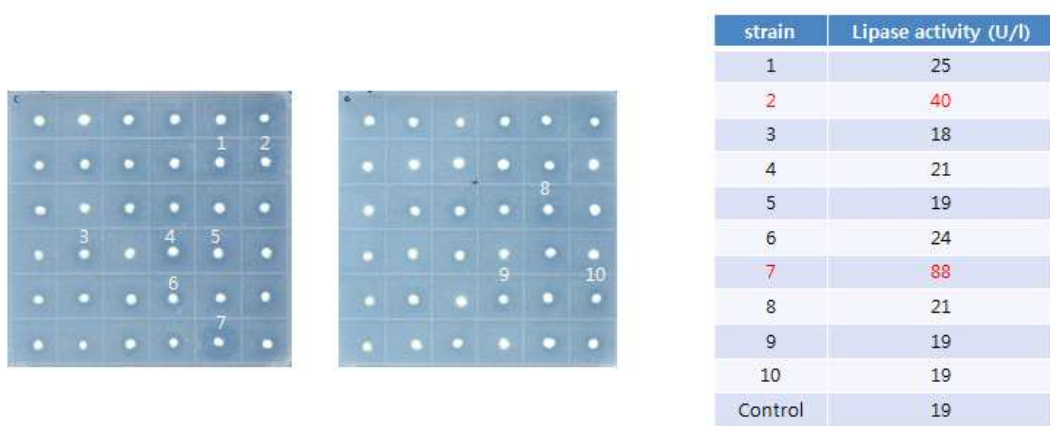


그림 4-9. 각 변이주들의 lipase 활성 분석

표 4-5. 각 변이주들의 염기서열 분석

strains	TEF promoter	ST3	wt-CalB
2	염기 2개 deletion, 염기 1개 change (A-> T)	Q2L	G41V
7	-	-	L278R

(3) *K. marxianus* 유래의 promoter screening

(가) Promoter screening 선별 vector 제조

K. marxianus 유래의 강력한 promoter를 screening을 위해 항생제 G418에 대한 내성을 선택표지로 하고 세가지 reading frame을 갖는 library vector를 제조하였다. 즉 pYGaG418을 주형으로 세 개의 reading frame과 BamHI 인식서열을 갖는 primer를 이용하여 PCR을 수행하였고, 제한효소 BamHI과 PstI으로 처리하여 같은 제한효소로 처리된 pYGa-G418에 결합하여 pYG418-F1, F2 및 F3을 제조하였다(그림 4-10).

(나) *K. marxianus*의 genomic DNA library 제조

K. marxianus 유전체로부터 promoter library 제조를 위해 *K. marxianus* 7155로부터 genomic DNA를 추출하였다. 각각의 염색체를 제한효소 Sau3AI으로 부분절단 후 아가로스 젤

에서 0.5 내지 1.0 kb 크기의 DNA를 회수한 다음 BamHI 으로 절단하고 calf intestine phosphatase로 처리한 pG418-F1, F2 및 F3 혼합 vector에 연결하였다(그림 4-10). 연결된 DNA를 대장균 DH5 α 에 형질전환하여 1×10^4 형질전환체 library를 확보할 수 있었다.

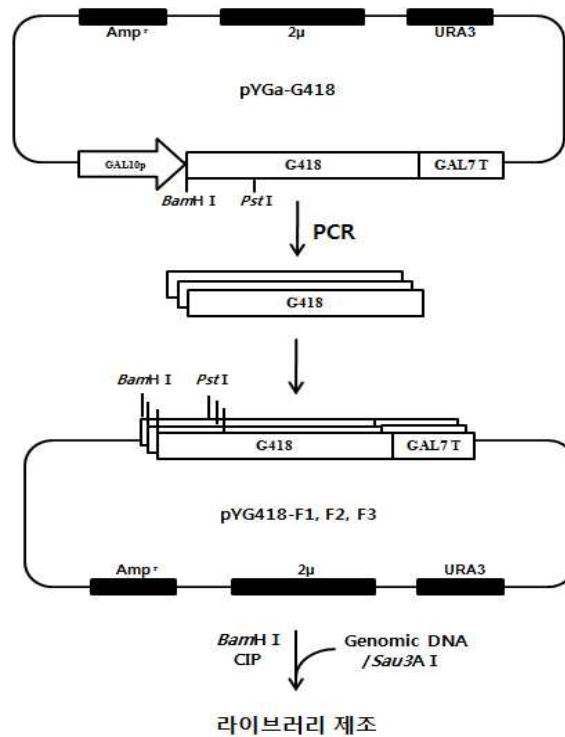


그림 4-10. pYG418-F1, F2 및 F3 및 *K. marxianus* 유전자 library 제조과정

(다) 효모 형질전환 및 promoter 선별

일단 제조된 library DNA를 효모 *S. cerevisiae* Y2805 (*Mat a pep4::HIS3 prb1 can1 his3-200 ura3-52*)에 형질전환한 다음 100μg/ml G418이 함유된 YPD 배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양 후 각 배지에서 형성된 균체의 수는 표 4-6에 표시한 바와 같다. 대조군으로서 library 제작을 위해 사용한 vector (pYG418-F1, F2 및 F3)만을 형질전환한 경우에는 최소 배지에서는 약 1×10^4 정도의 균체가 형성되었으나 G418이 함유된 YPD 배지에서는 전혀 성장하지 못하였다. 그러나 효모 유전체 library를 삽입한 경우에는 G418이 함유된 YPD 배지에서 약 124개의 형질전환체를 얻었다. 형질전환체들은 유전체 library가 promoter 활성을 가짐으로서 G418 저항성 유전자가 발현되어 약제내성을 나타낸 것으로 판단되었다.

표 4-6. 형질전환체 수

형질전환 균주	형질전환체 수	
	UD 최소배지	YPD+ 100 μ g/ml G418
Y2805(숙주세포)	0	0
pYG418 vector	$\sim 1 \times 10^4$	0
pYG418+genomic library	$\sim 1 \times 10^4$	124

(라) Promoter 서열 분석

각 균체를 YPD배지에서 24시간 배양하여 plasmid를 분리 후 대장균에 재형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 plasmid를 분리한 후 제한효소 처리하여 삽입된 유전자를 확인하였고, 염기서열 분석을 통해 8 종류의 promoter를 함유하는 서로 다른 유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다. 표 4-7에 표시한 바와 같이 삽입된 유전자의 길이는 106 bp에서 608bp로서 일반적으로 promoter 서열이 가지는 길이의 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 확보한 염기서열 정보를 NCBI BLASTX 검색을 통해 단백질 database를 검색한 결과 pYG418-pro1과 pYG418-pro8에서는 효모에서 강력한 promoter의 한종류인 ADH1과 TEF1 promoter와 높은 상동성을 나타내었다. 그 외의 library 서열에서는 *K. lactis*의 unnamed protein과 상동성을 나타내었다.

표 4-7. 각 plasmid의 염기서열 분석

plasmid	유전자	promoter 예상 길이
pYG418-pro1	ADH1 (<i>K. marxianus</i>)	442
pYG418-pro2	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	412
pYG418-pro3	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	608
pYG418-pro4	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	297
pYG418-pro5	TF II D (<i>K. lactis</i>)	475
pYG418-pro6	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	106
pYG418-pro7	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	626
pYG418-pro8	TEF1 (<i>K. lactis</i>)	500

(마) 신규 promoter를 이용한 리파제의 분비 생산

확보된 8종의 promoter 활성을 확인하기 위하여 CalB 유전자를 Km7155u에 도입하여 발현을 확인하였다. PCR을 수행하여 promoter 영역만을 확보 하였고, EcoRI/Bgl II 으로 처리 후 같은 효소로 처리된 vector에 삽입하여 pST3-CalB1411-pro1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8을 제조하고 대장균 DH5 α 에 형질전환하여 promoter가 삽입된 plasmid를 얻었다. 비교균으로서 강력한 구성적 promoter인 *K. marxianus* 유래의 GAPDH를 함유하는 plasmid pGAP-ST3-CalB14를 사용

하였다. 제조된 vector를 Km7155u에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일 colony를 선별하여 pNPP 측정법으로 분석한 결과 pro1 (ADH), pro2 (unnamed protein), pro8 (TEF)에서만 lipase 활성을 강하게 나타내었다. 특히 TEF와 unnamed protein promoter는 GAP promoter보다 lipase 활성이 더 높아 promoter 활성이 강력한 것을 확인하였다(표 4-8).

표 4-8. 형질전환체들의 lipase 활성 분석

형질전환체	promoter	lipase activity (U/l)
pGAP-ST13-CalB14	GAP (<i>K. marxianus</i>)	318
pST3-CalB1411-pro1	ADH1 (<i>K. marxianus</i>)	248
pST3-CalB1411-pro2	unnamed protein (<i>K. lactis</i>)	340
pST3-CalB1411-pro8	TEF1 (<i>K. lactis</i>)	350

(4) Targeted gene knock-out 시스템

(가) KU70 gene knock-out

K. marxianus 25571균주의 alcohol dehydrogenase (ADH) gene을 disruption 하기 위해 genomic DNA를 template로 하여 ADH ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 PCR을 통해 증폭 후 primer Tc-f와 U200r, U200f와 Tc-r을 이용하여 증폭된 URA3 DNA절편과 overlap extension PCR을 수행하였다. 2개의 PCR fragment는 25571균주에 형질전환하여 ADH locus에 도입된 균주를 uracil이 없는 선택배지 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.077% Ura-DO supplement, 2% glucose, 2% agar)에서 선별하였다. 형질전환 여부를 primer U200f/HJ372를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하여 URA3 cassette에 의해 ADH 유전자가 knock-out되었음을 확인하였다(그림 4-11).

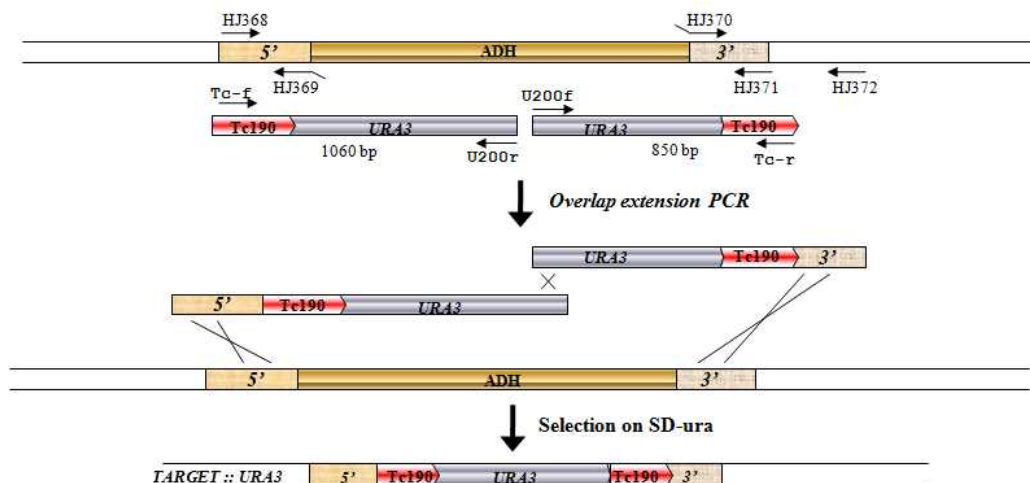


그림 4-11. URA3 cassette를 이용한 ADH gene disruption 과정

(나) Multicopy 도입 시스템 구축

KM 균주에서 URA3 pop-out cassette를 이용하여 반복적으로 형질전환하여 발현하고자하는 유전자를 여러 카피 도입하는 방법은 개발되어 있으나 이 방법은 형질전환과 URA3 유전자 pop-out을 매번 반복해야하는 단점이 있다. 이러한 단점을 개선한 multicopy integration system구축하기 위하여 CalB14를 reporter gene으로 이용하였다. Ribosomal DNA 영역은 KM genome내 다수 존재하기 때문에 rDNA를 클로닝하여 발현백터에 포함시키고 염색체상의 rDNA로 integration을 유도하면 여러 copy 유전자 integration이 가능하다. 18s ribosomal DNA 영역은 PCR을 통해 확보하였고 pNKY51 vector내 EcoRI site로 도입하였다. 18s rDNA 영역이 도입된 vector에 GAP-ST3-CalB14 유전자를 다시 도입하였고, electroporation을 통해 KM 7155 와 KM 25571 균주에 도입하였다(그림 4-12).

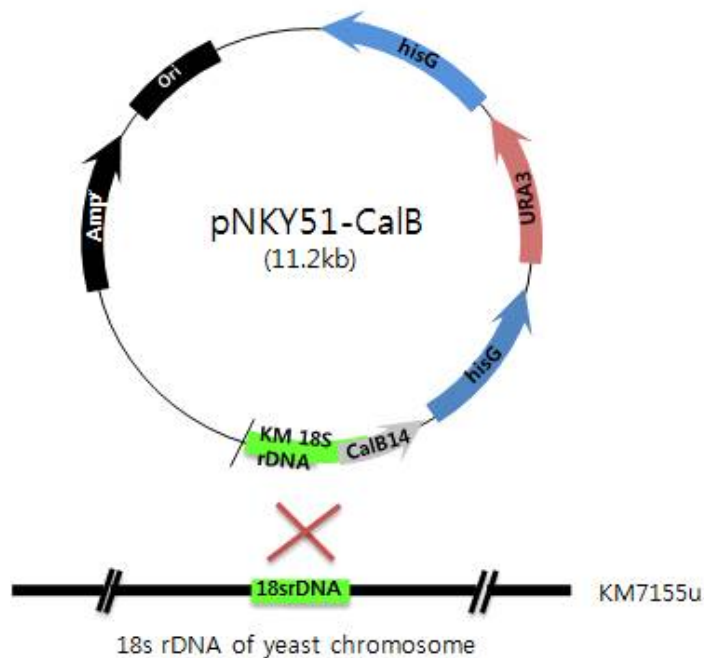


그림 4-12. ST3-CalB14 유전자 도입을 위한 효모 integration 벡터

각각의 균주에서 획득한 형질전환 균주를 무작위로 선별하여 tributyrin 평판 배지에서 활성을 측정하였다. 총 17개의 균주의 활성을 측정한 결과 8개의 균주에서 활성환을 형성하였으며, 이 균주를 액체배양한 후 pNPP assay를 통해 효소 활성을 확인하였다(그림 4-13). KM 25571 균주보다 KM7155 균주에 도입되었을 때 10~20 U/L 이상의 높은 활성을 보였다. 이와 같은 시스템을 통해 목적유전자가 대부분 1 copy로 chromosome내 도입 되는 것을 확인하였다.

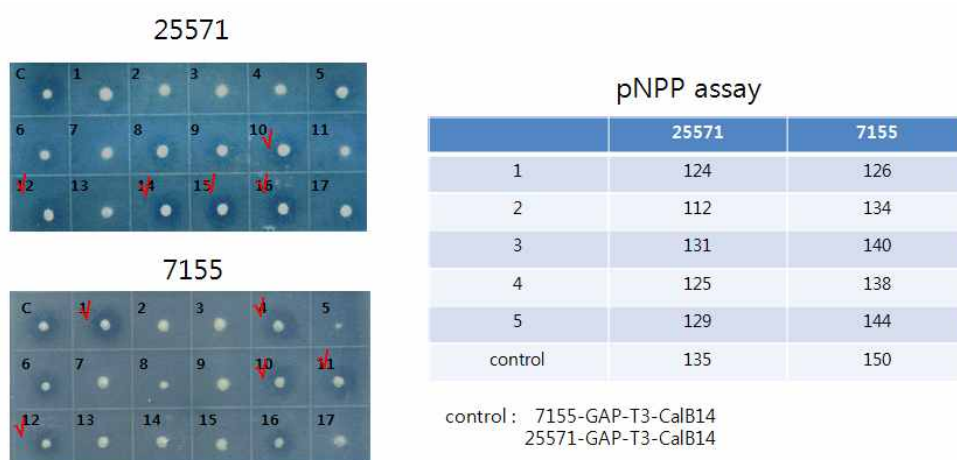
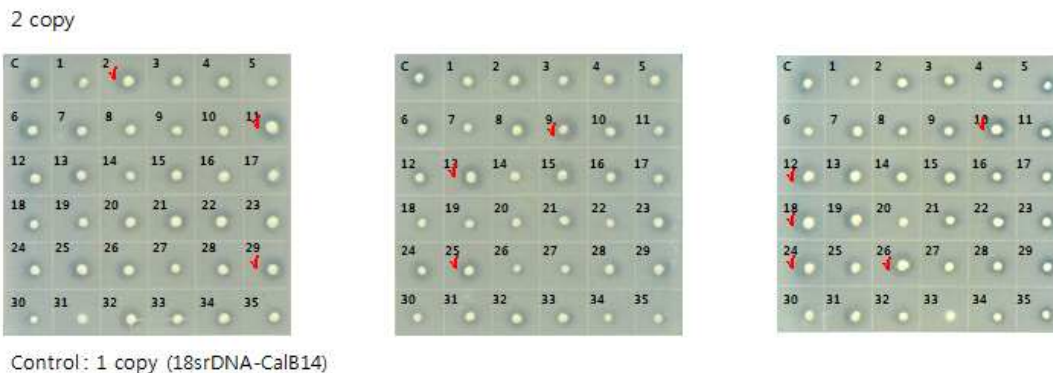


그림 4-13. 18s rDNA에 도입된 리파제 활성 비교

남아있는 URA3 gene은 pop-out을 유도한 뒤 5-FOA 배지에서 선별하였다. URA3 gene이 제거된 7155u/ST3-CalB14 균주에 CalB14 유전자를 다시 도입하여 copy 수 증가에 따른 효소 활성을 확인하고자 하였다. 위의 과정과 동일한 방법을 통해 ST3-CalB14 유전자를 2 copy로 도입 하여 tributyrin 평판배지에서 활성환을 확인하였다. Control에 비해 halo가 큰 11개 균주를 선별하여 pNPP assay를 통해 활성을 확인하였다. 그 결과 single copy 균주보다 활성이 증가된 균주는 없었다. 따라서 2 copy 도입만으로는 효소 활성에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 확인되어 더 많은 유전자를 도입하여 활성을 비교하였다(그림 4-14).



No.	Activity(U/L)	No.	Activity(U/L)
1	175	7	148
2	186	8	158
3	154	9	175
4	168	10	167
5	185	11	186
6	167	C	194

그림 4-14. 2 copy로 도입된 균주의 lipase 활성 비교

Pop-out과 integration과정을 반복하여 CalB14 유전자를 4 copy로 도입하였고 1~4 copy 균주들의 활성을 비교 해 본 결과 3 copy로 도입된 균주의 경우 2 copy 도입된 균주에 비해 70 U/L의 활성 증가를 보여 multicopy 도입에 의한 lipase 활성 증가를 확인하였다(그림 4-15).

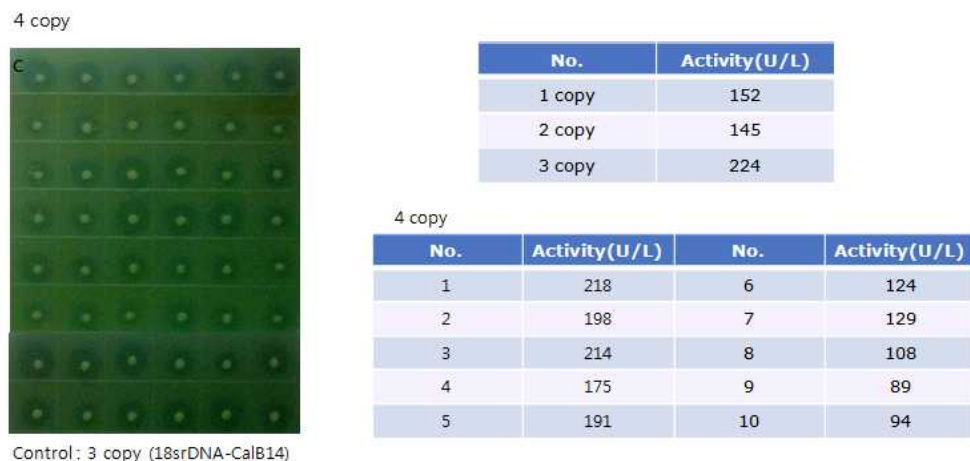


그림 4-15. 4 copy로 도입된 균주 리파제 활성 비교

4 copy까지 도입된 균주들이 실제로 18s rDNA 영역내로 multicopy로 도입되었는지 Southern blot을 통해 확인하였다. CalB14 gene을 probe로 사용하였고 각각의 genomic DNA를 추출하여 SacI, XhoI, KpnI, SmaI으로 제한효소를 처리하였다. pNPP assay에서 가장 높은 활성을 보였던 3 copy로 도입된 균주에서만 다른 위치에 signal이 나타나는 것을 관찰하였고, 이결과를 통해 정확한 copy 수는 확인할 수 없지만 chromosome상에 2 copy 이상 도입되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 4-16). 그러나 KM 7155 균주내 35%와 33%의 homology를 보이는 lipase 유전자가 존재하며 이 유전자로 인해 Southern hybridization에서 약하게 signal이 보이는 것을 확인하였다(그림 4-17). 따라서 reporter gene으로 CalB14 유전자를 사용하는 것은 적절하지 못하는 것으로 보이나, 이 시스템을 통해 multicopy integration 가능성을 확인하였다. 유전자 copy number가 발현율에 미치는 영향이 크지 않았으며 외래단백질 고발현을 위한 다른 factor가 있을 것으로 사료되었다.

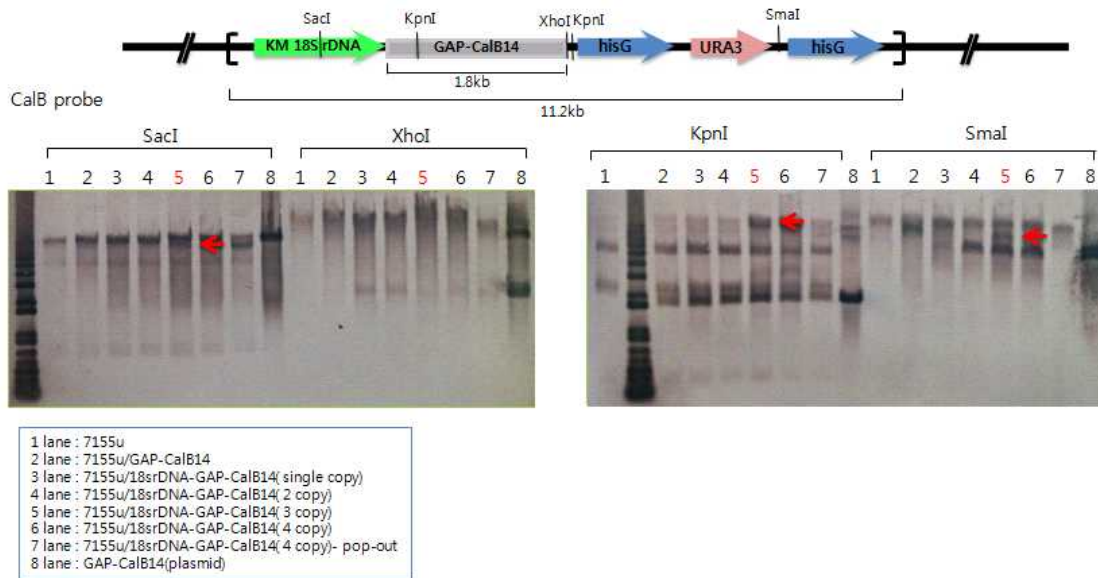


그림 4-16. 선별된 multicopy 균주들의 southern hybridization 분석

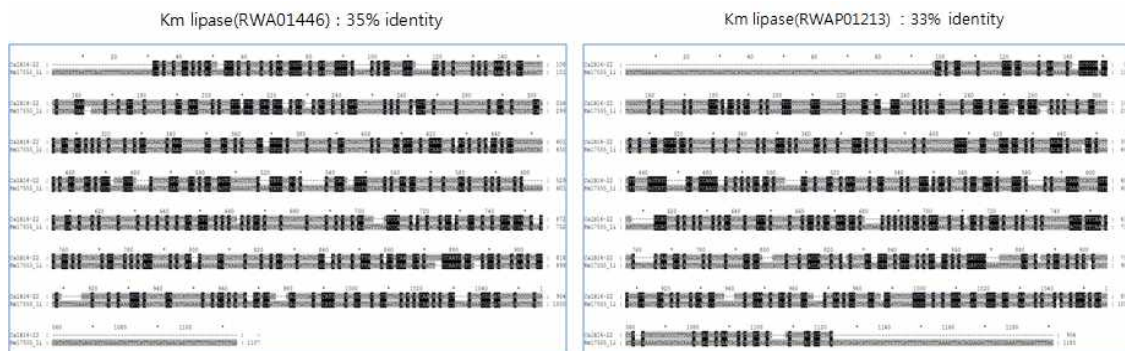


그림 4-17. KM 유래 lipase homology 비교

2. KM 단백질 고발현 시스템 개발

가. KM proteome 분석 및 고분비 융합인자 발굴

KM 균주의 적온 및 고온에서의 유전자 발현 양상과 외래 단백질 발현 및 고분비 시스템 구축을 위하여 KM 균주의 proteome 분석 및 KM 고유의 고분비 단백질 (secretome)들 검색연구를 수행하였다. KM 균주 배양과정에서 세포내 발현 단백질 및 배지로 분비되는 단백질을 분석하였다. *K. marxianus* 17555의 proteome 분석을 위하여 500ml flask 배양을 진행하였다. YPD 액체 배지 500ml에 전배양한 균주를 1% 접종한 후에 30°C와 42°C에서 각각 배양하였고, intra-cellular 단백질을 얻기 위해서 OD600 = 9에서 시료를 원심분리하여 균주만 회수하

였다. 그리고 extra-cellular 단백질은 48시간 배양후 원심분리하고 상등액을 회수하여 한외 여과 (ultra-filtration)를 통해 10배 농축하였다. 그림 4-18은 KM 17555의 성장곡선으로서 시료가 회수된 시점이 표시되어있다. 이렇게 얻어진 시료들은 SDS-PAGE를 진행하였다. (그림 4-19)

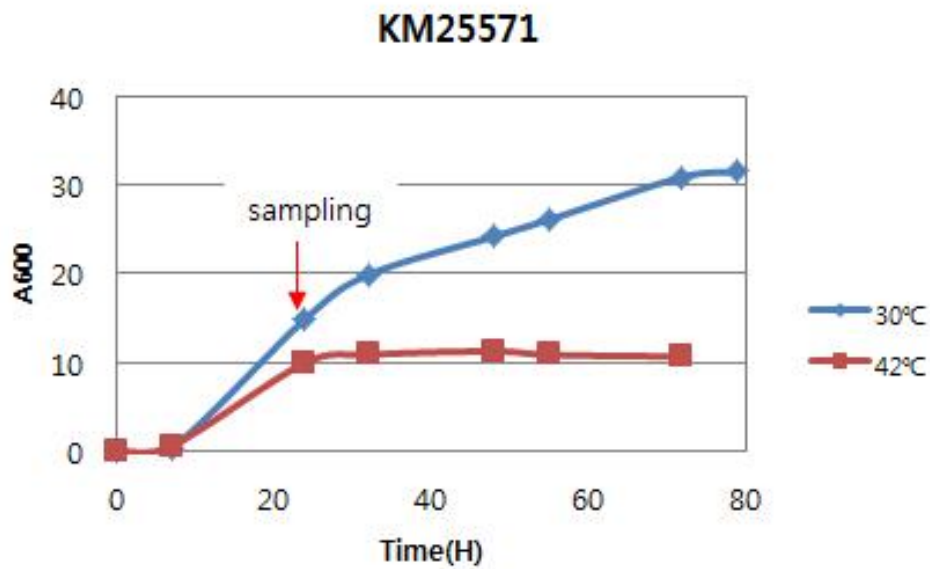


그림 4-18. *K. maxianus* 25571의 YPD 액체 배지에서의 성장곡선

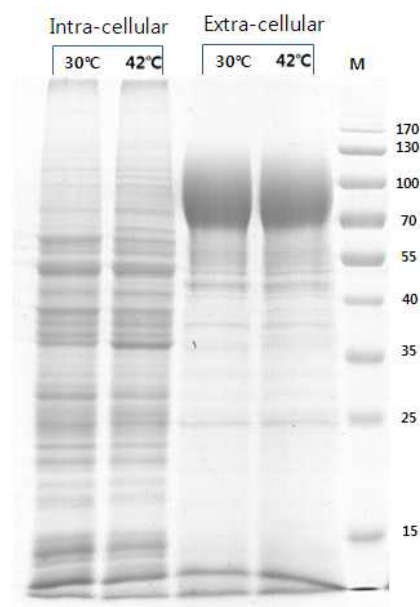


그림 4-19. KM 17555의 intra & extra cellular protein에 대한 SDS-PAGE

SDS-PAGE가 끝난 gel을 각각의 분자량에 따라 6개의 fraction으로 나눈 후 각각의 gel을 1 mm 정도의 크기로 절단시켰다. 절단된 gel 조각을 1.5 mL tube로 옮겨 담은 후 30% methanol을 적당량 첨가하여 gel을 washing하였다. 10 mM ABC (Ammonium bicarbonate) / 50% ACN (acetonitrile)을 gel volume의 2 배 정도를 이용하여, gel의 dye가 완전히 제거되도록 2~3회 정도 탈색시켰다. 완전히 탈색된 gel 조각에 100% ACN을 첨가시켜 gel이 하얗게 변할 때 까지 반응시킨 후 ACN을 제거 하고, vacuum dryer (Savant, USA)를 이용하여 완전히 건조시켰다. 건조된 gel 조각에 gel이 잠길 정도의 100 mM ABC / 10 mM DTT용액을 첨가하여 56°C에서 1 시간동안 반응시켰다. DDT를 제거한 후에 55 mM IAA (iodoacetamide) / 100 mM ACN 용액을 DDT 용액과 동일한 volume를 첨가하여 암상태에서 40 분 동안 처리하였다. IAA 용액을 제거한 후 2 배 volume의 3차 증류수를 2~3 회 처리하여 gel을 washing시켰다. 100% ACN을 이용하여 gel의 수분을 제거하고, vacuum dryer를 이용하여 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 gel에 trypsin (Promega, USA)을 12 uL (0.1 ug/uL)가 첨가된 50 mM ABC 용액을 gel이 완전히 잠길 정도의 volume으로 넣어 준 후 37°C에서 16 시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 gel을 centrifuge를 이용하여 spin down시킨 후 상등액을 새로운 1.5 mL tube에 옮겨 남아있는 gel에 gel volume과 동일한 volume의 0.5% TFA (trifluoroacetic acid) / 50% ACN을 첨가하여 gel 에 남아있는 tryptic peptides를 용출시킨 후 상등액을 동일한 tube에 옮겼다. 남은 gel에 100% ACN을 첨가시켜 gel에 남아있는 tryptic peptide를 완전히 용출시켜 다시 상등액을 동일한 tube로 옮겼다. 모아진 tryptic peptides solution을 vacuum dryer를 이용하여 완전히 건조시킨 후 MS/MS분석에 이용하기 전까지 -20°C 에 보관하였다.

나. LCQ MS/MS 분석

각각의 건조된 tryptic peptides에 10 uL 의 0.1% TFA와 0.02% formic acid가 첨가된 3차 증류수를 이용하여 용해시켰다. 용해시킨 peptide용액을 1분간 centrifuge를 이용하여 spin down시킨 후 상등액을 loading tube에 옮겼다. Loading tube의 peptides를 auto sampler (ThermoFinnigan, San Jose, CA)를 이용하여 MGU30-C18 trap column (LC packings, USA) 에 binding 시켰다. Trap column에서 desalting 되고 농축되어진 peptides는 trap column에 직접적으로 연결된 reverse-phase (RP) column (PROXEON, Denmark)에 binding시켰다. Binding된 peptides를 0.1% TFA, 0.02% formic acid가 첨가된 80% ACN buffer를 이용하여 120 nl/min의 유속으로 0~80% 의 gradient를 이용하여 80분 동안 elution시켰다. Elution된 peptide는 ESI 방식을 이용하여 MS/MS분석을 실시하였다. MS/MS 분석은 LCQ DECA XP plus (Thermo Finnigan, CA)를 사용하였으며, 각각의 full MS (m/z 400~2,000) 에서 가장 감도가 높은 3개의 MS에 대해 MS/MS를 수행하여 spectrum Raw data을 얻었다

다. LC-MS/MS spectrum 분석을 통한 protein 동정

MS Spectrum 결과를 이용하여 단백질체를 분석하기 위해 Mascot ver. 2.2 (Matrixscience, USA)을 사용하였다. MIS mode (MS / MS Ion Search)로 분석하였으며 이 때 database는 NCBI Staphylococcus aureus TW20 complete genome set을 사용하였고 Enzyme type은 Trypsin, Variable Modification은 Cysteine 에 Carbamidomethylation, Methionine 에 Oxidation을 지정하였다. 그리고 peptide mass tolerance는 1.5 Da 이며, fragment mass tolerance는 1.5 Da 으로 설정하였고 Ion type은 +2, +3 이며 Peptide의 validation을 위해 Decoy database search mode

로 실행하였다. 분석되어진 최종 결과에서 Decoy database에서 유추한 false value을 감안하여 FDR (False positive ratio)을 최대 5 % 까지 허용하여 validation 하였다.

표 4-9에서 보여진 30°C 와 42°C 에서의 intra-cellular 단백질에 대한 proteome 분석 결과는 30 °C 와 42 °C 에서 각각 293, 290개의 동정된 단백질 확인 (전체 374개), 이 후 4번의 반복 결과 중 2회 이상 검출된 데이터를 유의미한 데이터로 간주하여 각각 210, 204개의 단백질 선별 (전체 249개) 하였다. 그리고 최종적으로 p-value 0.05 이하, 최소 ratio 차이가 1.5배 이상이었으며 검출 빈도가 4회 중 2회 이상으로 차이나는 단백질 선별 결과 90개를 찾았고, 이 중 42°C 에서 증가한 것으로 보이는 단백질이 49개, 30°C 에서 증가한 것으로 보이는 단백질은 41 개를 찾을 수 있었다.

<표 4-9. 30°C 와 42°C 에서 배양한 intra-cellular 단백질에 대한 proteome분석>

no	Accessions	Protein Description	Predicted EC id	Mw / pi	Topology TM(S P) ¹⁾	Average±SDofmol% ²⁾		comparisonbetween 42°Cvs.30°C ³⁾	
						30°C	42°C	Log ₂ (ratio)	Student's t-test ⁴⁾ (p-value)
1	RWAP01939	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1.15.1.1	16047/6.14	0 (N)	-	0.85±0.64	42°C	42°C
2	RWAP00510	Small heat shock protein	-	22043/5.34	0 (N)	-	0.58±0.18	42°C	42°C
3	RWAP04639	Profilin	-	13798/5.85	0 (N)	-	0.37±0.2	42°C	42°C
4	RWAP01389	Adenosine 5'-monophosphoramidase	-	16617/6.75	0 (N)	-	0.36±0.23	42°C	42°C
5	RWAP01257	Phosphatidylethanolamine-binding protein	-	21765/5.47	0 (N)	-	0.33±0.12	42°C	42°C
6	RWAP03915	10 kDa chaperonin GROES	-	11350/8.96	0 (N)	-	0.29±0.06	42°C	42°C
7	RWAP04638	Hypothetical YCII-related domain containingprotein	-	11519/6.07	0 (N)	-	0.28±0.06	42°C	42°C
8	RWAP04756	Cytochrome c oxidase polypeptide IV	1.9.3.1	16900/5.93	0 (N)	-	0.25±0.14	42°C	42°C
9	RWAP02431	GTP-binding nuclear protein RAN	-	24451/6.11	0 (N)	-	0.23±0.11	42°C	42°C
10	RWAP01076	Ras-related protein SEC4	-	22557/5.58	0 (N)	-	0.23±0.16	42°C	42°C
11	RWAP02769	Ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1.10.2.2	14444/4.03	0 (N)	-	0.22±0.05	42°C	42°C
12	RWAP02870	Acetyl-CoA hydrolase	3.1.2.1	58206/5.89	0 (N)	-	0.21±0.08	42°C	42°C
13	RWAP02564	ARP2/3 complex 21 kDa subunit	-	20324/7.71	0 (N)	-	0.21±0.11	42°C	42°C
14	RWAP02551	Cytochrome c peroxidase	1.11.1.5	38867/6.73	0 (Y)	-	0.15±0.13	42°C	42°C
15	RWAP01420	hypothetical protein	-	38579/5.73	0 (N)	-	0.15±0.09	42°C	42°C
16	RWAP03849	ThiJ/PfpI family protein	-	25710/5.06	0 (N)	-	0.14±0.05	42°C	42°C
17	RWAP00652	Hsp90 co-chaperone	-	20923/4.44	0 (N)	-	0.12±0	42°C	42°C
18	RWAP01265	Nitroreductase family protein	-	20885/5.92	0 (N)	-	0.12±0	42°C	42°C
19	RWAP03571	D-arabinitol 2-dehydrogenase [ribulose forming]	1.1.1.25 0	33936/6.5	0 (N)	-	0.11±0.05	42°C	42°C
20	RWAP02000	SCS2 protein	-	26909/5.43	1 (N)	-	0.11±0.02	42°C	42°C
21	RWAP02902	Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase[UDP-forming]	3.1.3.12	126422/5.74	0 (Y)	-	0.11±0.04	42°C	42°C
22	RWAP03752	Aldehyde dehydrogenase	1.2.1.3	55089/5.41	0 (N)	-	0.09±0.07	42°C	42°C
23	RWAP03530	Polygalacturonase	3.2.1.15	37683/5.35	0 (Y)	-	0.08±0.02	42°C	42°C
24	RWAP03238	Glucan 1,3-beta-glucosidase	3.2.1.58	49571/4.59	0 (Y)	-	0.08±0.03	42°C	42°C
25	RWAP04863	Succinate dehydrogenase [ubiquinone]flavoprotein subunit	1.3.5.1	71172/6.28	0 (N)	-	0.07±0.04	42°C	42°C
26	RWAP03152	UDP-glucose 4-epimerase	5.1.3.3	76727/5.11	0 (N)	-	0.07±0.01	42°C	42°C
27	RWAP01336	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1.2.4.2	115247/6.39	0 (N)	-	0.06±0.02	42°C	42°C
28	RWAP01100	Phosphoglucomutase	5.4.2.8	62404/5.88	0 (N)	-	0.05±0.01	42°C	42°C
29	RWAP04191	Heat shock protein SSA4	-	70147/5.03	0 (N)	0.11±0.05	1.2±0.27	3.390	0.003
30	RWAP04166	NADP-dependent alcohol dehydrogenase, cinnamylfamily	1.1.1.-	40122/5.97	0 (N)	0.18±0.1	0.73±0.14	1.976	0.002
31	RWAP03189	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.1.1.8	42612/6.04	0 (N)	-	0.22±0.04	1.934	42°C

		[NAD+]								
32	RWAP01699	Malate dehydrogenase	1.1.1.37	36178/7.08	0 (N)	0.55±0.14	2±0.23	1.858	0.000	
33	RWAP04695	Superoxide dismutase	1.15.1.1	25499/7.82	0 (N)	0.11±0.02	0.35±0.04	1.735	0.000	
34	RWAP04633	hypothetical protein	-	34608/6.25	0 (N)	-	0.3±0.13	1.695	42°C	
35	RWAP02636	Heat shock protein 82	-	81598/4.78	0 (N)	0.15±0.03	0.45±0.05	1.614	0.000	
36	RWAP03104	60 kDa chaperonin GROEL	-	61070/5.61	0 (N)	0.14±0.04	0.42±0.12	1.601	0.015	
37	RWAP00537	Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	37197/5.47	0 (N)	0.19±0.03	0.56±0.21	1.562	0.039	
38	RWAP02788	Dihydropolipoamide succinyltransferase component(E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	2.3.1.61	48069/9.18	0 (N)	0.08±0.04	0.23±0.08	1.510	0.028	
39	RWAP03723	DnaK	-	69506/5.54	0 (N)	0.1±0.01	0.28±0.08	1.486	0.023	
40	RWAP00419	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.2.1.12	35314/6.67	0 (N)	3.01±0.47	7.72±0.75	1.359	0.000	
41	RWAP03994	Outer mitochondrial membrane protein porin	-	29355/8.6	0 (N)	0.46±0.2	1.16±0.31	1.335	0.012	
42	RWAP01369	ADP-ribosylation factor	-	20623/6.32	0 (N)	0.25±0.14	0.63±0.24	1.309	0.045	
43	RWAP00065	Thioredoxin peroxidase	1.11.1.1	21700/4.95	1 (N)	0.66±0.15	1.46±0.37	1.138	0.017	
44	RWAP00809	Membrane alanine aminopeptidase	3.4.11.2	97836/5.18	0 (N)	-	0.13±0.08	1.106	42°C	
45	RWAP03655	LSU ribosomal protein MRPL12P	-	18747/7.82	0 (N)	-	0.28±0.2	1.042	42°C	
46	RWAP04560	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	-	74427/4.81	1 (N)	0.1±0.05	0.2±0.06	1.042	0.068	
47	RWAP00927	Cytochrome c	-	12367/9.47	0 (N)	1.98±0.24	3.61±0.62	0.869	0.009	
48	RWAP03337	6-phosphofruktokinase catalytic subunit	2.7.1.11	107807/5.53	0 (N)	0.06±0.02	0.1±0.01	0.867	0.019	
49	RWAP03475	NADPH dehydrogenase	1.6.99.1	45973/6.51	0 (N)	0.18±0.03	0.3±0.04	0.719	0.006	
50	RWAP02028	Hypothetical protein	-	18979/5.89	0 (N)	-	0.2±0.07	0.639	42°C	
51	RWAP02536	LSU ribosomal protein L1E (= L4P)	-	39339/10.71	0 (N)	0.91±0.16	0.6±0.16	-0.60	0.035	2
52	RWAP02934	Trp repressor binding protein	-	26050/6.45	0 (N)	0.15±0.06	-	-0.63	30°C	1
53	RWAP03091	SSU ribosomal protein S5P	-	27490/10.46	0 (N)	0.7±0.12	0.45±0.14	-0.63	0.041	4
54	RWAP00563	LSU ribosomal protein L15E	-	24462/11.46	0 (N)	0.31±0.05	0.18±0.06	-0.74	0.014	4
55	RWAP01790	Pyruvate decarboxylase	4.1.1.1	61973/5.81	0 (N)	1.62±0.31	0.96±0.1	-0.75	0.019	6
56	RWAP04804	Heat shock protein SSB1	-	66186/5.36	0 (N)	0.72±0.03	0.42±0.08	-0.77	0.002	5
57	RWAP01345	LSU ribosomal protein L13P	-	23919/10.54	0 (Y)	0.73±0.14	0.4±0.17	-0.87	0.026	2
58	RWAP03535	SSU ribosomal protein S17P	-	17931/10.76	0 (N)	0.4±0.09	0.21±0.11	-0.88	0.046	6
59	RWAP00946	hypothetical protein	-	43787/10.29	0 (N)	0.26±0.07	0.13±0.04	-0.95	0.028	6
60	RWAP01347	Dihydropolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	2.3.1.12	49282/6.21	0 (Y)	0.12±0.05	-	-1.12	30°C	1
61	RWAP01255	S-adenosylmethionine synthetase	2.5.1.6	42401/5.16	0 (N)	0.13±0.09	-	-1.12	30°C	4
62	RWAP04454	LSU ribosomal protein L18P	-	34008/6.22	0 (N)	0.37±0.08	0.17±0.07	-1.14	0.019	0
63	RWAP01653	Pyruvate kinase	2.7.1.40	54853/6.17	0 (N)	1.25±0.37	0.49±0.17	-1.35	0.018	3
64	RWAP04235	LSU ribosomal protein L7AE	-	28180/10.06	0 (N)	0.79±0.25	0.3±0.02	-1.39	0.030	5
65	RWAP04117	Inorganic phosphate transporter PHO88	-	21264/9.14	1 (N)	0.33±0.19	-	-1.45	30°C	8
66	RWAP01185	Glycerol dehydrogenase (NADP+)	1.1.1.72	34423/6.02	0 (N)	0.22±0.18	-	-1.57	30°C	6
67	RWAP04965	Cystathionine gamma-lyase	4.4.1.1	41901/5.95	0 (N)	0.19±0.07	-	-1.61	30°C	3
68	RWAP03883	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5.2.1.8	12284/5.7	0 (N)	0.67±0.28	-	-1.65	30°C	

69	RWAP03721	Endoplasmic reticulum calcium-transportingATPase	3.6.3.8	134629/5.81	10 (N)	0.03±0.02	-	30°C	30°C
70	RWAP00639	hypothetical protein	-	52638/4.67	1 (Y)	0.05±0.01	-	30°C	30°C
71	RWAP02657	hypothetical protein	-	63813/8.45	12 (N)	0.06±0.02	-	30°C	30°C
72	RWAP00668	RNA polymerase II transcription factor B 73 kDasubunit	-	70430/6.42	0 (N)	0.06±0.04	-	30°C	30°C
73	RWAP03080	hypothetical protein	-	103488/5.61	0 (N)	0.06±0.02	-	30°C	30°C
74	RWAP00299	ATP phosphoribosyltransferase	2.4.2.17	32428/6.04	0 (N)	0.08±0.01	-	30°C	30°C
75	RWAP04320	Ketol-acid reductoisomerase	1.1.1.16	44798/8.73	0 (N)	0.08±0.04	-	30°C	30°C
76	RWAP03110	Cystathionine beta-synthase	4.2.1.22	54268/5.61	0 (N)	0.09±0.07	-	30°C	30°C
77	RWAP04357	Sterol 24-C-methyltransferase	2.1.1.41	42226/5.48	0 (N)	0.11±0.06	-	30°C	30°C
78	RWAP02153	Copper transport protein CTR1	-	38091/5.72	3 (Y)	0.12±0.08	-	30°C	30°C
79	RWAP03669	GTP-binding protein	-	44267/6.09	0 (N)	0.13±0.01	-	30°C	30°C
80	RWAP01020	ATP synthase delta chain	3.6.3.14	16507/5.37	0 (N)	0.15±0	-	30°C	30°C
81	RWAP00867	Aquaporin	-	34032/6.71	6 (N)	0.16±0.14	-	30°C	30°C
82	RWAP02292	Stress protein YPL004C	-	35755/4.85	0 (N)	0.16±0.06	-	30°C	30°C
83	RWAP02145	SSU ribosomal protein S12P	-	16113/10.73	0 (N)	0.17±0.02	-	30°C	30°C
84	RWAP01370	hypothetical protein	-	14149/10.77	0 (N)	0.18±0.01	-	30°C	30°C
85	RWAP02050	Mitochondrial import receptor subunit TOM20	-	20257/5.6	1 (N)	0.19±0.11	-	30°C	30°C
86	RWAP04752	LSU ribosomal protein L22E	-	13789/6.13	0 (N)	0.21±0.04	-	30°C	30°C
87	RWAP03829	hypothetical protein	-	33002/4.73	0 (Y)	0.22±0.07	-	30°C	30°C
88	RWAP02033	(DL)-glycerol-3-phosphatase	3.1.3.21	27612/5.42	0 (N)	0.27±0.09	-	30°C	30°C
89	RWAP01383	LSU ribosomal protein L12AE	-	10480/3.84	0 (N)	0.28±0.05	-	30°C	30°C
90	RWAP01399	Hypoxia induced protein family	-	25079/9.45	3 (N)	0.33±0.16	-	30°C	30°C
91	RWAP00068	Guanylate kinase	2.7.4.8	20844/5.99	0 (N)	0.37±0.37	-	30°C	30°C

1) prediction of topology. TM : the number of transmembrane domain ; SP : the existence of signal peptide

2) Average ± SD of mol% calculated from emPAI that is simple non labeling quantification method in the MS based proteomics. These results was calculated by quadruple repeat experiment.

3) Comparison between 45°C vs 35°C. The ratios was calculated by dividision 45°C by 35°C of mol%. The values that is 45°C or 35°C means exclusively identification 4) Statistical significance using the Student's t-testover the minimum twice.

표 4-10의 secretome 분석 결과의 경우 전체 109개 동정하였으나 2회 반복 이상 검출 61개만을 선별하였고, 이 중 7개의 major protein 이 상위 50% 이상의 양을 차지하고 있는 것으로 보여진다. 그 단백질은 triosephosphate isomerase, translation initiation inhibitor, invertase, carboxymethylenebutenolidase, cytosine deaminase, glucan 1,3-beta-glucosidase로 확인되었다. 그리고 그림 4-20에서는 상위 20개 단백질에 대해서 양과 비중에 대해서 보여주고 있다.

표 4-10. Secretome 분석

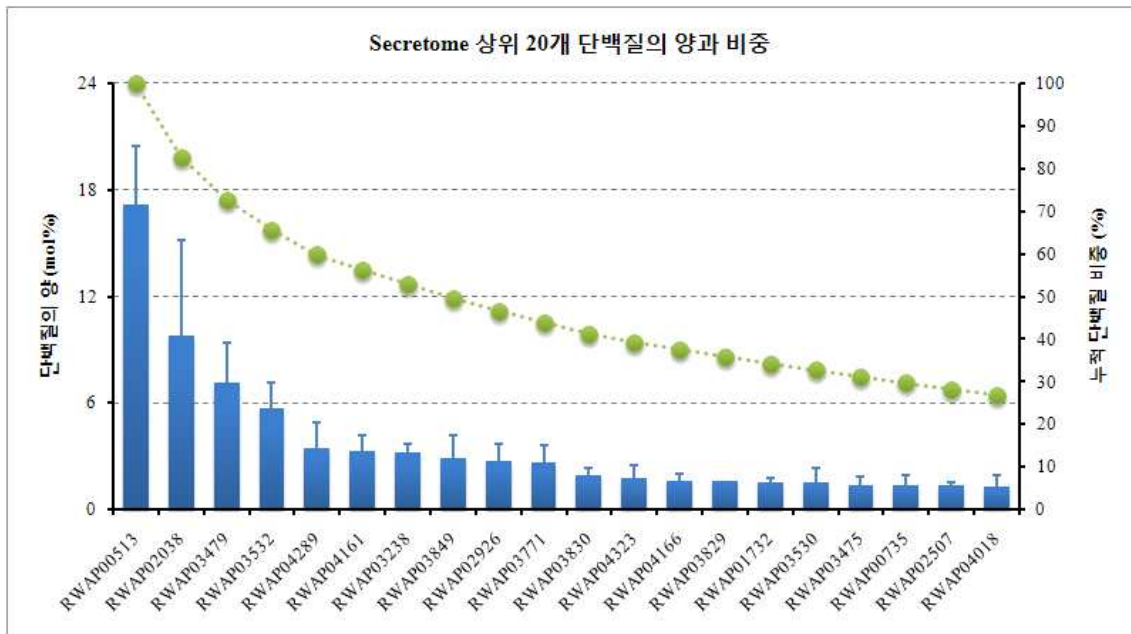
no	Accessions	Protein Description	Predicted ECid	Topology TM(SP) ¹⁾	Mw/pI	The no. of identification	Avr.±SD ²⁾
1	RWAP00513	Triosephosphate isomerase	5.3.1.1	0 (N)	27077/6	4	17.21±3.22

2	RWAP02038	Translation initiation inhibitor	-	0 (N)	14224/5.38	4	9.77±5.4
3	RWAP03479	hypothetical protein	-	0 (N)	46884/5.74	4	7.13±2.26
4	RWAP03532	Invertase	3.2.1.26	0 (Y)	62367/4.88	4	5.7±1.49
5	RWAP04289	Carboxymethylenebutenolidase	3.1.1.45	0 (N)	27715/5.05	4	3.49±1.44
6	RWAP04161	Cytosine deaminase	3.5.4.1	0 (N)	16947/4.91	3	3.28±0.94
7	RWAP03238	Glucan 1,3-beta-glucosidase	3.2.1.58	0 (Y)	49571/4.59	4	3.26±0.42
8	RWAP03849	ThiJ/PfpI family protein	-	0 (N)	25710/5.06	4	2.87±1.34
9	RWAP02926	hypothetical protein	-	0 (N)	27591/6.32	4	2.76±0.93
10	RWAP03771	Glucose-6-phosphate isomerase	5.1.3.15	0 (N)	61664/5.83	4	2.64±0.96
11	RWAP03830	NAD(P)H dehydrogenase [quinone]	1.6.5.2	0 (N)	25292/5.51	4	1.92±0.4
12	RWAP04323	Transaldolase	2.2.1.2	0 (N)	36563/5.2	4	1.78±0.7
13	RWAP04166	NADP-dependent alcohol dehydrogenase, cinnamylfamily	1.1.1.-	0 (N)	40122/5.97	4	1.61±0.41
14	RWAP03829	hypothetical protein	-	0 (Y)	33002/4.73	4	1.6±0.04
15	RWAP01732	Inorganic pyrophosphatase	3.6.1.1	0 (N)	32343/5.28	4	1.53±0.27
16	RWAP03530	Polygalacturonase	3.2.1.15	0 (Y)	37683/5.35	4	1.52±0.8
17	RWAP03475	NADPH dehydrogenase	1.6.99.1	0 (N)	45973/6.51	4	1.41±0.46
18	RWAP00735	Glyoxalase family protein	-	0 (N)	13926/5.46	3	1.4±0.58
19	RWAP02507	Cell wall protein CWP1 precursor	-	0 (Y)	25811/5.04	4	1.38±0.19
20	RWAP04018	Glucan 1,3-beta-glucosidase	3.2.1.58	0 (Y)	34131/4.29	4	1.31±0.63
21	RWAP00065	Thioredoxin peroxidase	1.11.1.15	1 (N)	21700/4.95	4	1.3±0.48
22	RWAP04298	Glucanase	3.2.1.-	0 (Y)	38630/4.58	4	1.3±0.45
23	RWAP00523	Coproporphyrinogen III oxidase	1.3.3.3	0 (N)	37222/5.76	4	1.29±0.19
24	RWAP03673	hypothetical protein	-	0 (N)	17069/7.79	4	1.26±0.26
25	RWAP02667	Nuclear transport factor 2	-	0 (N)	14493/4.45	4	1.09±0.51
26	RWAP03890	NADPH-dependent methylglyoxal reductase	1.1.1.283	0 (N)	38901/5.52	4	1.04±0.23
27	RWAP01699	Malate dehydrogenase	1.1.1.37	0 (N)	36178/7.08	3	0.91±0.84
28	RWAP04638	Hypothetical YCII-related domain containing protein	-	0 (N)	11519/6.07	2	0.89±0.21
29	RWAP04031	Glucanase	3.2.1.-	0 (Y)	39185/4.78	4	0.86±0.29
30	RWAP00461	Peroxiredoxin	1.11.1.15	0 (N)	18414/5.48	4	0.84±0.41
31	RWAP03723	DnaK	-	0 (N)	69506/5.54	4	0.84±0.12
32	RWAP01257	Phosphatidylethanolamine-binding protein	-	0 (N)	21765/5.47	4	0.82±0.26
33	RWAP04436	Ribonuclease T2	3.1.27.1	0 (Y)	45388/4.26	4	0.82±0.26
34	RWAP03752	Aldehyde dehydrogenase	1.2.1.3	0 (N)	55089/5.41	4	0.81±0.32
35	RWAP04088	Fortilin	-	0 (N)	18865/4.37	4	0.81±0.41

36	RWAP01640	Cytochrome B5	-	1 (N)	13404/4.24	3	0.79±0.13
37	RWAP04388	Peptidase family M20A protein	-	0 (N)	53910/5.03	4	0.72±0.4
38	RWAP04331	hypothetical protein	-	0 (N)	32173/6.11	2	0.72±0.5
39	RWAP00537	Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	0 (N)	37197/5.47	2	0.67±0.51
40	RWAP03693	Xylose reductase	1.1.1.307	0 (N)	37532/5.59	4	0.63±0.25
41	RWAP00418	Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	0 (N)	37756/6.01	3	0.56±0.35
42	RWAP04125	Spermidine synthase	2.5.1.16	0 (N)	33371/5.16	4	0.55±0.42
43	RWAP01449	NADPH-dependent methylglyoxal reductase	1.1.1.283	0 (Y)	40106/6.43	3	0.44±0.36
44	RWAP03826	hypothetical protein	-	0 (Y)	23076/6.13	2	0.43±0.09
45	RWAP00419	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.2.1.12	0 (N)	35314/6.67	2	0.4±0.11
46	RWAP02760	Aspartic proteinase	3.4.23.41	0 (Y)	54837/4.98	2	0.4±0.34
47	RWAP03190	Argininosuccinate synthase	6.3.4.5	0 (N)	46764/5.11	4	0.36±0.1
48	RWAP01464	Hexokinase	2.7.1.1	0 (N)	53845/5.4	4	0.36±0.07
49	RWAP01334	SIM1 protein	-	0 (Y)	41882/4.68	4	0.36±0.17
50	RWAP03126	Serine-pyruvate aminotransferase	2.6.1.44	0 (N)	39829/6.18	3	0.31±0.07
51	RWAP03606	NADPH dehydrogenase	1.6.99.1	0 (N)	44570/5.63	2	0.3±0.1
52	RWAP00855	Hypothetical protein	-	0 (Y)	47801/4.64	3	0.29±0.15
53	RWAP02545	Covalently-linked cell wall protein	-	0 (Y)	39505/8.99	3	0.29±0.1
54	RWAP01255	S-adenosylmethionine synthetase	2.5.1.6	0 (N)	42401/5.16	4	0.28±0.08
55	RWAP03833	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	3.2.2.1	0 (Y)	40484/4.51	2	0.27±0.01
56	RWAP04870	hypothetical protein	-	0 (N)	69746/4.92	2	0.26±0.16
57	RWAP04379	Adenosylhomocysteinase	3.3.1.1	0 (N)	49273/5.62	3	0.25±0.09
58	RWAP03513	Carboxypeptidase Y	3.4.16.5	0 (Y)	60924/4.78	2	0.22±0.05
59	RWAP04082	Hypothetical cytosolic protein	-	0 (N)	51535/5.01	2	0.21±0.01
60	RWAP02712	Catalase	1.11.1.6	0 (N)	62592/6.04	2	0.19±0.09
61	RWAP04712	Aspartic proteinase	3.4.23.41	1 (Y)	62979/4.74	2	0.18±0.01

1) prediction of topology. TM : the number of transmembrane domain ; SP : the existence of signal peptide

2) Average ± SD of mol% calculated from emPAI that is simple non labeling quantification method in the MS based proteomics. These results was calculated by quadruple repeat experiment.



그

그림 4-20. 분비단백질에 대한 상위 20개 단백질의 양(mol%)과 누적 단백질 비중(%)

KM secretome 분석 결과에 의하면 표 4-10의 상위 61가지 단백질 중 분비시그널을 포함하고 있는 단백질은 18종에 불과하였다. 분비시그널을 포함하지 않는 많은 단백질들이 secretome 분석결과 나타난 이유는 KM 균주배양과정에서 일부 균주의 세포막이 파쇄되어 세포내 단백질이 세포 밖으로 노출된 것으로 판단되며 *S. cerevisiae*와는 달리 KM 균주는 상대적으로 적은 수의 단백질이 세포밖으로 분비되고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 secretome 분석 결과는 유전체 분석을 통해서 분비단백질 유전자를 선별할 때 중요한 판단 자료로 사용되었다.

라. KM 단백질 분비 융합인자 기술 개발

(1) 유전체 정보기반 KM 단백질 분비융합인자 기술 개발

KM 유전체 정보를 기반으로 분비시그널을 포함하고 있는 382개의 유전자 서열을 확보하였으며 secretome 분석결과와 각각의 유전자에 대한 알려진 정보를 바탕으로 세포밖으로 분비되는 단백질과 세포벽 단백질 위주로 33개의 분비단백질 유전자를 선별하였다(표 4-11). *K. marxianus* 17555의 genomic DNA를 template로 하여 33개 유전자의 시작코돈부터 1 kb 위치까지 동일한 크기가 되도록 PCR을 통해 각각 증폭하였다. 각각의 유전자를 증폭하는 정방향 프라이머는 unidirectional PCR에 사용하는 GalSfi I 프라이머 서열을 포함하여 제작하였다. 33개의 PCR 산물은 100 ng이 되도록 정량하여 혼합 후 GalSfi I primer를 이용하여 unidirectional PCR을 수행하였다. Unidirectional PCR은 일반적인 PCR과는 달리 증폭되는 PCR 산물을 주형으로 다시 사용할 수 없고 처음에 첨가한 유전자만을 주형으로 사용하기 때문에 기하급수적으로 증폭되지 않고 산술급수적으로만 증폭된다. 따라서 원하는 양의 ssDNA를 확

보하기 위해서는 일반적인 PCR 조건과는 달리 50 cycle이상의 PCR 반응을 필요로 한다. Single strand DNA purification kit를 이용해 정제된 PCR 산물은 E.coli DNA polymerase Klenow fragment와 random hexamer를 포함하는 프라이머를 사용하여 dsDNA를 제작하였다. PCR Purification kit를 이용해 정제된 산물은 GalSfi I, SfiB3' primer를 이용하여 다시 증폭하였고, 0.2kb~0.4 kb fragment를 agarose gel 전기영동을 통해 회수하였다. 얻어진 PCR산물은 SfiI으로 절단하여 얻어진 YGalNV 벡터와 함께 세포내 재조합을 통하여 *Saccharomyces cerevisiae* invertase 변이 균주에 도입되거나 YGalNV 벡터에 cloning 후 *Saccharomyces cerevisiae* Y2805에 도입된다(그림 4-21). 이러한 과정을 통하여 *Saccharomyces cerevisiae*에서 invertase를 분비시킬 수 있는 KM 유래의 단백질 분비 융합인자를 200여종 확보하였다.

표 4-11. 선별된 33개의 분비단백질 list

No.	Protein
1	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase (EC 3.2.1.113)
2	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase (EC 3.2.1.113)
3	Endo-1,6-alpha-mannanase (EC 3.2.1.101)
4	Glycosyl hydrolases family 16::PF00722
5	O-Glycosyl hydrolase (EC 3.2.1.-)
6	Guanosine-diphosphatase (EC 3.6.1.42)
7	Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2)
8	Homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)
9	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)
10	Lipase (EC 3.1.1.3)
11	Protein disulfide isomerase (EC 5.3.4.1)
12	SIM1 protein
13	Mating pheromone alpha-factor
14	Carboxypeptidase Y (EC 3.4.16.5)
15	SIM1 protein
16	Cell wall protein CWP1 precursor
17	Covalently-linked cell wall protein
18	Covalently-linked cell wall protein
19	Covalently-linked cell wall protein
20	Protein disulfide isomerase (EC 5.3.4.1)
21	Carboxypeptidase KEX1 precursor (EC 3.4.16.6)
22	Carboxypeptidase Y (EC 3.4.16.5)
23	Invertase (EC 3.2.1.26)
24	Protein disulfide isomerase (EC 5.3.4.1)
25	Glucan 1,3-beta-glucosidase (EC 3.2.1.58)
26	Glycolipid anchored surface protein
27	Glycolipid anchored surface protein
28	Glucanase (EC 3.2.1.-)
29	Protein disulfide isomerase (EC 5.3.4.1)
30	Glucanase (EC 3.2.1.-)
31	Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)
32	Cell wall protein SED1
33	SLS1 protein precursor

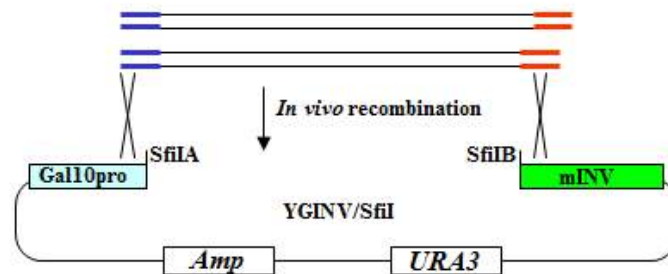
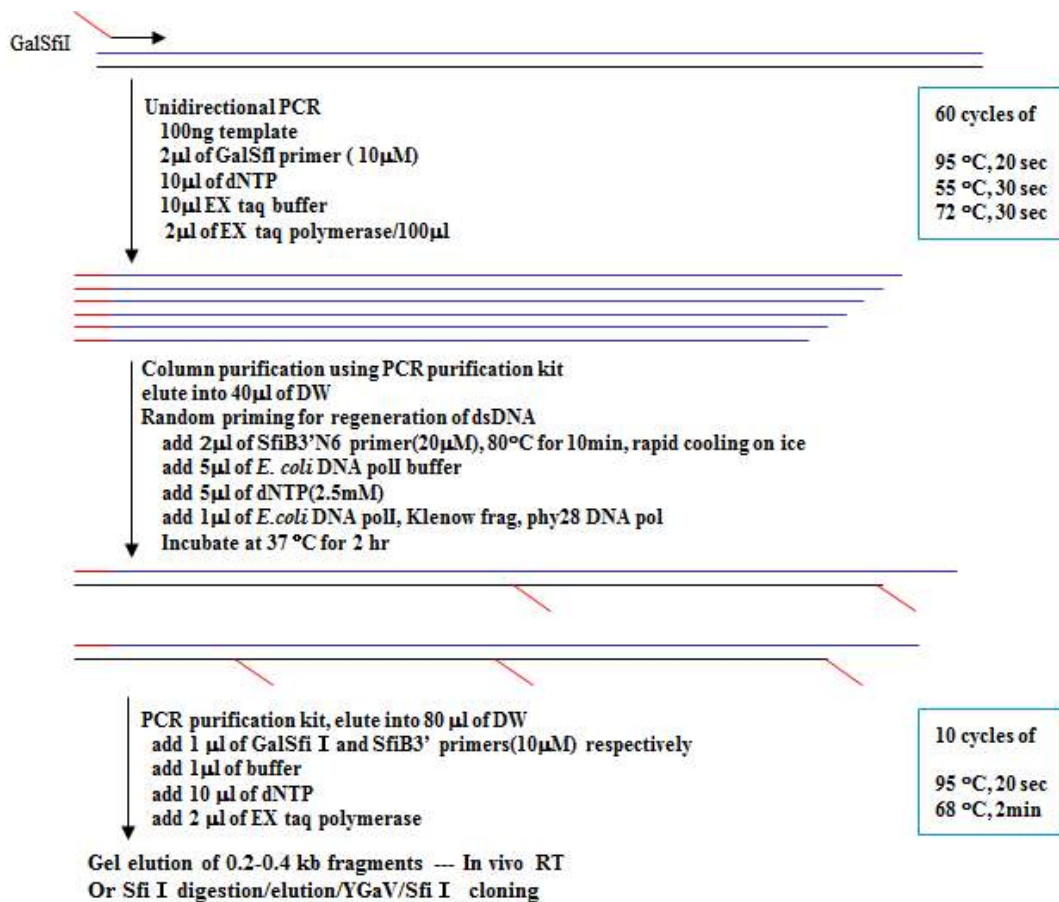
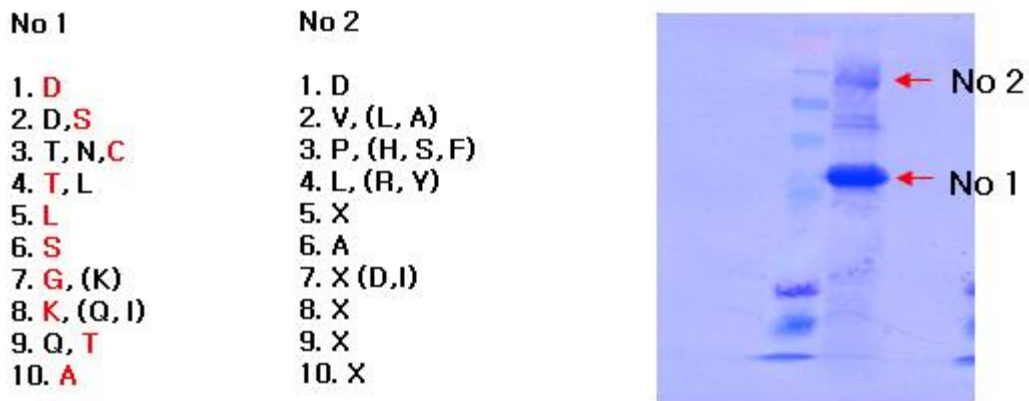


그림 4-21. KM 유전자 library 제조과정

(2) KM 단백질 서열 분석을 통한 분비융합인자 개발

KM 균주를 이용하여 단백질 발현 연구를 진행하는 과정에서 KM 균주는 제한된 수의 단백질이 세포밖으로 분비되고 있음을 확인할 수 있었다. Secretome 분석과 더불어 KM 배양 중 분비된 단백질 중 SDS-PAGE 상에서 뚜렷한 밴드를 보여주는 단백질을 규명하여 분비 융합인자로 활용하고자 하였다. 그림 4-22에서 나타난 바와 같이 SDS-PAGE 상에서 구분되는 밴드를 2가지 분리하고 각각의 단백질의 아미노말단의 아미노산 서열을 분석하였다. 분석 결과 한 가지는 단백질 서열을 확인하지 못하였고 가장 분비량이 많은 단백질은 endopolygalacturonase (EPG1)임을 확인하였다. EPG1 단백질은 19개의 분비시그널과 Kex2 단

백질분해효소에 의해서 분해되는 6개 아미노산으로 구성된 propeptide를 포함하는 prepro-peptide형태로 발현된 후 processing 과정을 거쳐서 성숙한 단백질로 만들어진다



MLFSNTLLIAAASALLAEASPLEKRD**SC**TL**SG**KTAGGGLSNCATVTVNNVEVPAGKTLDTLGLQDGATVNFVVGQVTFDYDEWVGPLVSI SGKNIKVVVGKSGHLLDGDGARWWDGKGDSGKKVKPKFMSLKLGTGNSDVGGLQIKNTPIQAISVNSCSDTVIHDVTIDNSDGDKDSLGHNTDGFVDVGNVNNVTIENCHVYNQDDCIAVNSGTGVYFKNNYCSGGHGASIGSVGLRSNNVVDTVYFENNQIVNSDNGLRIKTIQKATGSVNNVHFLSNTISGIRKFGIVVETDYSSGSTTGTPGSKVPITNFEVDGLTGSVDSSAYRVKILVAGASKWTWKDVIDITGGSSFGSCTGI
PSGSGA FC

그림 4-22. 분비단백질 아미노말단 서열분석 결과

EGP1 자체 promoter와 signal sequence를 이용하여 왜래단백질을 분비발현해 보기 위해 리파제 CalB14를 이용하였다. 먼저 KM 17555 genomic DNA로부터 PCR을 통해 증폭하였으며, EGP1 유전자를 확보하고 pBlue-CalB14에 도입하여 pEPG1-CalB14 vector를 구축하였다 (그림 4-23). 구축된 vector를 제한효소 Nhe I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들어 URA3 auxotroph 균주인 KM 25571 균주에 형질전환하였다. 형질전환체들의 lipase 활성을 측정하기 위하여 100µl 50mM pNPP(*p*-nitrophenyl palmitate), 1.9ml ethanol, 38ml 50mM pH 7.5의 Tris-HCl buffer가 조합된 반응액 1ml에 20µl의 배양 상등액을 첨가한 후 410nm에서의 흡광도를 측정하였다. Lipase의 활성 1 unit는 1분당 1µM의 pNP기를 유리시키는 효소의 활성으로 정의하였다. 그 결과 KmTEF promoter 및 *S. cerevisiae* 유래의 분비시그널을 사용하여 발현한 것보다는 적었지만 외래단백질인 lipase를 발현 및 분비생산 할 수 있음을 확인하였다 (표 4-12).

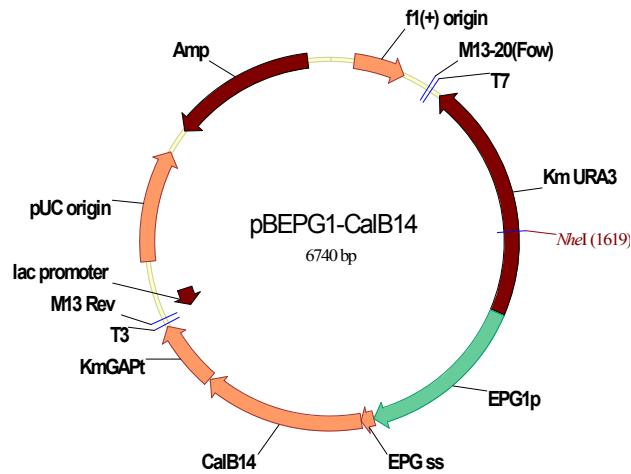


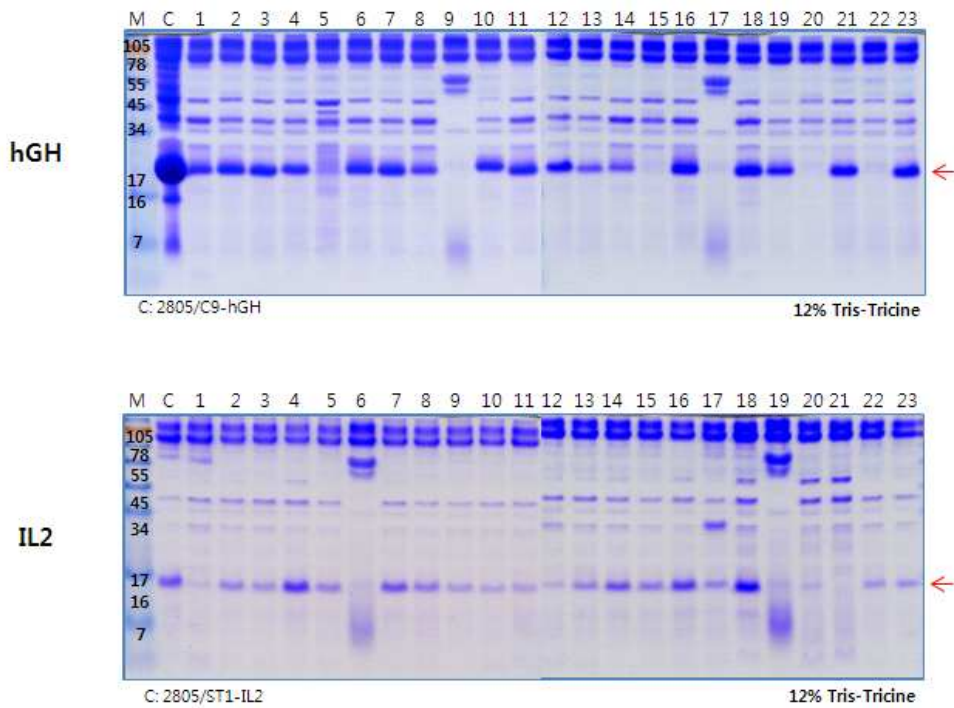
그림 4-23. CalB14 발현을 위한 *K. marxianus* vector

표 4-12. 형질전환체들의 lipase 활성 분석

형질전환체	lipase activity (U/L)
25571/pBGAP-ST3-CalB14	102
25571/pBTEF-ST3-CalB14	654
25571/pEGP1-CalB14	108

(3) KM 유래의 단백질 분비 융합인자 선별

확보된 200여개의 분비융합자 중에서 단백질 발현에 효과적인 유전자를 선별하기 위하여 인체 성장인자 (hGH)과 인체 인터류킨-2 (hIL2)를 모델유전자로 각각의 단백질은 효율적으로 분비시키는 분비 융합인자를 선별하고자 하였다. 200여개의 형질전환체로부터 추출된 total DNA를 template로 하여 PCR을 통해 유전자를 확보하였다. hGH 또는 hIL2 유전자와 overlap extension PCR을 통해 얻어진 PCR 산물은 효모발현 벡터와 함께 세포내 재조합을 통하여 *Saccharomyces cerevisiae* 균주에 도입되었다. 형질전환체를 YPDG (1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose) 배지에서 40시간 배양하고 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석한 결과 각 유전자 크기로부터 유추되는 단백질 크기의 발현밴드를 확인할 수 있었다 (그림 4-24). 발현량이 많은 균주를 선별하여 back-transformation하여 plasmid를 얻었고, 이들의 염기서열을 분석해 본 결과 다양한 길이의 7종의 분비단백질 서열을 얻었다 (표 4-13).



<그림 4-24. hGH과 IL2의 분비 발현 확인>

표 4-13. 선별된 7종의 분비 융합인자

TFP No.	Protein	Gene ID	Length (bp)
1	Protein disulfide isomerase (EC 5.3.4.1)	RWAP03627	237
2	Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2)	RWAP01726	90
3	Covalently-linked cell wall protein	RWAP02544	315
4	Glycolipid anchored surface protein	RWAP04029	201
5	Glucanase (EC 3.2.1.-)	RWAP04031	177
6	Covalently-linked cell wall protein	RWAP02544	180
7	Covalently-linked cell wall protein	RWAP02545	180

(4) *K. marxianus* 에서 분비 융합인자를 이용한 이중 단백질 분비 발현

(가) hGH과 hIL2 분비 발현

선별된 7종의 분비 융합인자에 hGH과 hIL2를 *K. marxianus*에서 발현하기 위해 각각 유전자를 PCR을 통하여 증폭하여 KM 발현 vector인 pTEF1 vector에 구축하였다 (그림 4-25). 구축된 vector를 제한효소 Nhe I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들어 URA3 영양요구성 균주인 KM 25571 균주에 형질전환하였다. 형질전환체를 YPD(1% yeast extract, 2% peptone,

2% glucose) 배지에서 40시간 배양하고 상등액을 아세트산으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석한 결과 *S. cerevisiae*에서는 많은 단백질이 분비발현되는데 비하여 *K. marxianus*에서는 분비된 단백질의 양이 미약하였다 (그림 4-26). 이러한 결과는 *K. marxianus* secretome 분석 결과에서도 확인한 바와 같이 *K. marxianus* 균주는 *S.cerevisiae* 균주에 비하여 적은 수와 적은 량의 단백질이 분비되고 있으며 단백질 분비능이 약한 것으로 보이며 특히 이종단백질일 경우 발현량은 더욱 약한 것으로 판단됨.

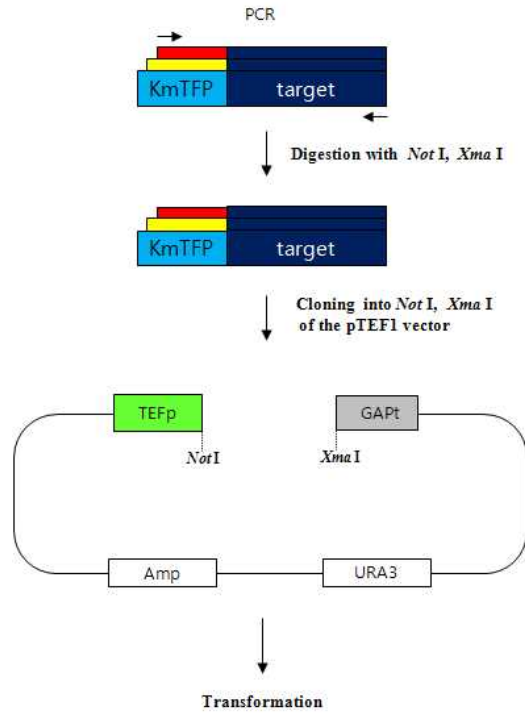


그림 4-25. hGH 또는 hIL2 발현을 위한 *K. marxianus* vector

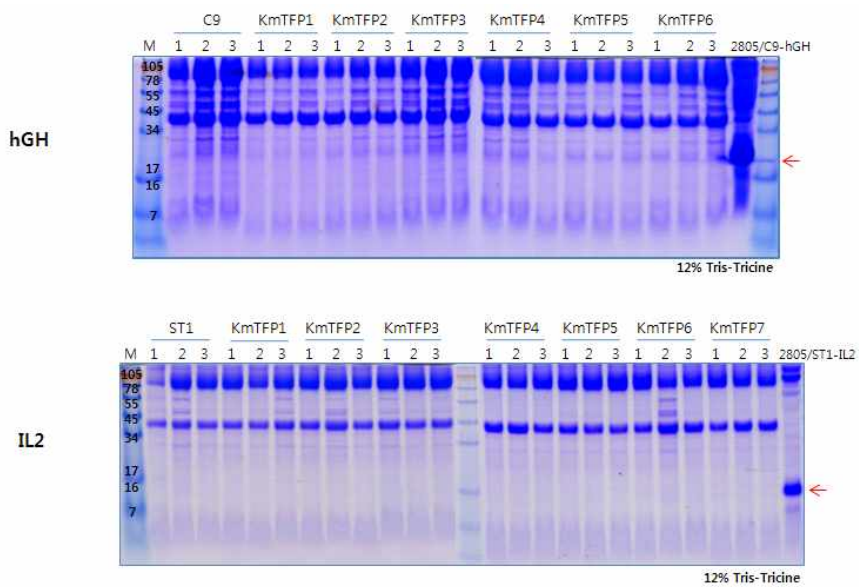


그림 4-26. 형질전환체들의 SDS-PAGE 분석

(나) Endopolygalacturonase (EPG1)의 분비 발현

이중 단백질인 hGH와 hIL2를 이용해서는 *K. marxianus*의 분비능을 확인하기 어렵기 때문에 7종의 분비 융합인자를 이용하여 *K. marxianus* 자체단백질인 endopolygalacturonase (EPG1)를 이용하여 선별된 분비모듈의 성능을 비교분석하였다. EPG1을 발현하기 위해 각각 유전자를 PCR을 통하여 증폭하여 pTEF1 vector에 구축하였다. 구축된 vector를 제한효소 Nhe I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들어 epg mutant 균주에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일균주를 선별하였다. 형질전환체를 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) 배지에서 40시간 배양하고 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석한 결과 각 유전자 크기로부터 유추되는 단백질 크기의 발현밴드를 확인할 수 있었다 (그림 4-27).

형질전환체들의 endopolygalacturonase 활성을 측정하기 위하여 기질 (0.5% polygalacturonic acid) 380 μ l에 효소액 20 μ l를 가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 cooper 용액 0.4 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이것을 15분간 중탕하여 arsenomolybdate 용액 0.4 ml를 가한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. endopolygalacturonase의 효소활성은 50°C에서 1분당 1 μ M의 galacturonic acid를 생성하는 것을 1 unit로 하였다. 그 결과 KM 유래의 TFP2, TFP3, TFP4, TFP6, TFP7의 경우 자체 signal sequence를 가지고 있는 25571 균주보다 활성이 좋은 것으로 확인하여 분비융합 인자로서 가능성을 확인하였다.

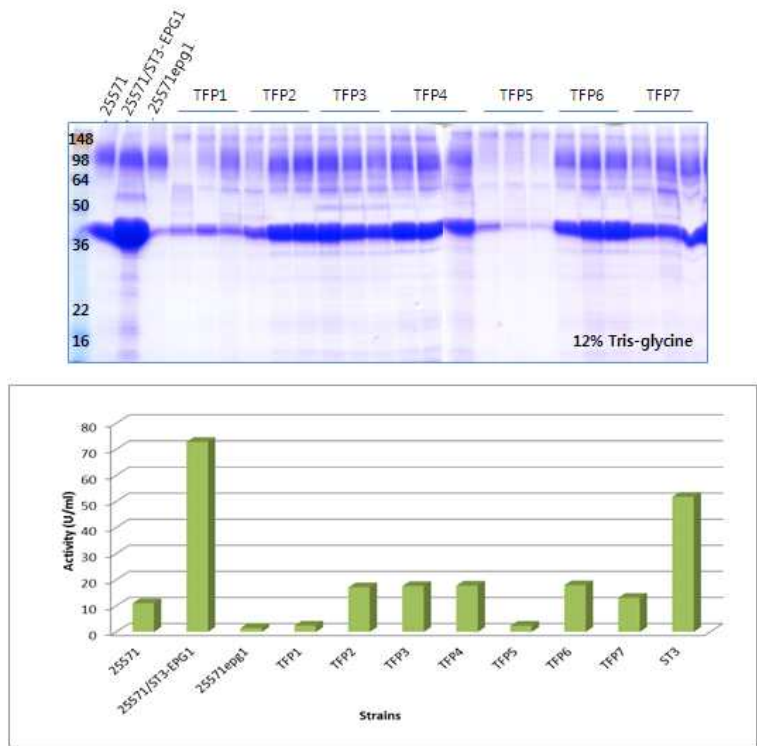


그림 4-27. Endopolygalacturonase의 분비 발현 및 활성분석

(5) 재조합 Endopolygalacturonase(EPG1)의 분비 생산

(가) *S. cerevisiae*에서 EPG1의 분비 발현

펙틴은 갈락투론산이 α -1,4결합한 폴리갈락투론산 (펙틴산이라고도 함)이 기본골격이고, 그 카르복실기의 60~80%가 메틸에스테르로 되어 있다. 펙틴가수분해효소는 폴리갈락투론산을 가수분해하는 폴리갈락투로나아제와 말단의 α -1,4결합을 절단하는 말단폴리갈락투로나아제와 내부의 α -1,4결합을 절단하는 내부 폴리갈락투로나아제가 있다. 펙틴분해효소는 주로 식품산업에서 과즙의 청징에 사용하며 착즙시 사용하면 과즙의 수량이 좋아진다.

현재 상용화되어 사용되는 펙틴 분해효소는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Coniothyrium* 등에서 생산하여 사용한다. 폴리갈락투로나아제를 발현하는 EPG1 유전자를 *S. cerevisiae*에서 발현하기 위하여 *K. marxianus* genomic DNA를 주형으로 1차 PCR하여 유전자를 확보하였다. 효모 벡터 말단과 상보적인 서열을 도입하기 위하여 2차 PCR하여 벡터와 세포내 재조합 (in vivo recombination)이 가능한 유전자를 제작하였다. 증폭된 유전자는 단백질 분비발현을 도와주는 24종의 단백질 분비융합인자를 함유한 선형의 벡터와 함께 효모 균주 Y2805(*Mat a pep4::HIS3 prb1 can1 his3-200 ura3-52*)에 도입하여 in vivo recombination을 통하여 형질전환체가 형성되도록 하였다 (그림 4-28).

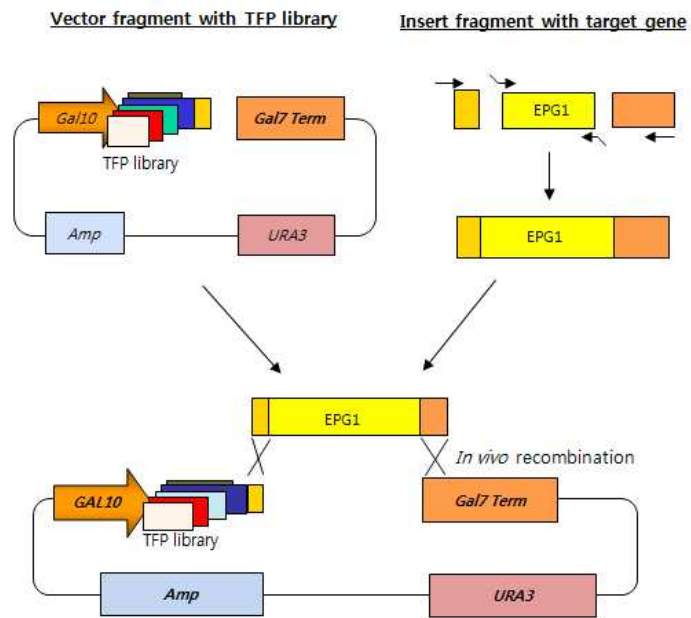


그림 4-28. EPG1 유전자의 효모 TFP 벡터 도입을 위한 과정

세포내 재조합을 통해 형성된 형질전환체는 uracil이 없는 선택배지에서 형질전환체를 선별하였다. YPDG (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토오스) 배지에서 40시간 배양 후 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석결과 EPG1은 37kd 위치에서 거의 모든 TFP에 의해 분비생산되고 있음을 알 수 있었다 (그림 4-29). 형질전환체들의 활성 분석 결

과 모든 균주에서 활성이 있음을 확인하였고, 그 중 2805/STFP4-EPG1는 wt에 비하여 활성이 10배 증가 되었다 (표 4-14).

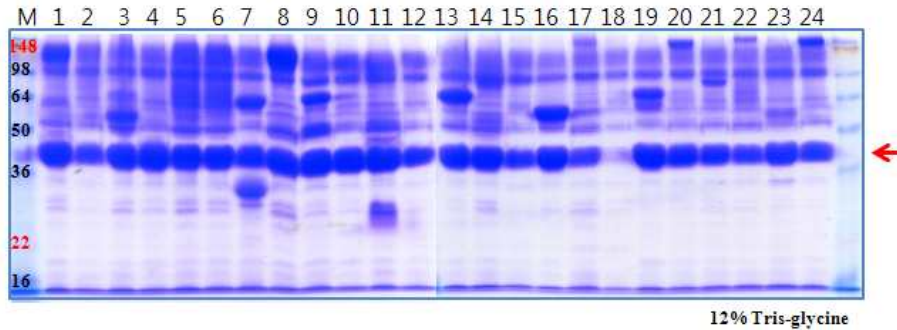


그림 4-29. EPG1의 분비 발현 확인

<표 4-14. 형질전환체들의 활성분석>

STFP No.	Activity (U/ml)	STFP No.	Activity (U/ml)
1	43	13	31
2	21	14	47
3	44	15	22
4	51	16	39
5	42	17	28
6	44	18	20
7	20	19	46
8	38	20	37
9	42	21	29
10	40	22	23
11	33	23	45
12	26	24	33
		2805	3

(나) *K. marxianus*에서 EPG1의 분비 발현

EPG1 유전자를 *K. marxianus*에서 발현하기 위하여 효모에서 분비능이 확인된 STFP3 단백질 분비융합인자를 이용하였다. STFP3 유전자와 EPG1 유전자를 PCR을 통해 증폭 후 각 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 PCR을 통하여 두 절편을 연결하였다. PCR 산물은 제한효소 Not I, Xma I 으로 절단하여 같은 제한효소로 절단한 pTEF1 vector에 구축되었다 (그림 4-30). 이러한 재조합 플라스미드를 Km25571 균주에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일콜로니를 선별하였다. 배양 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석한 결과 EPG1이 분비생산 되었음을 확인하였다. 형질전환체들의 활성 분석 결과 모든 균주에서 활성이 있음을 확인하였고, 25571/ST3-EPG1-1는 효소 활성이 5배 증가되었음을 확인하였다(그림 4-31).

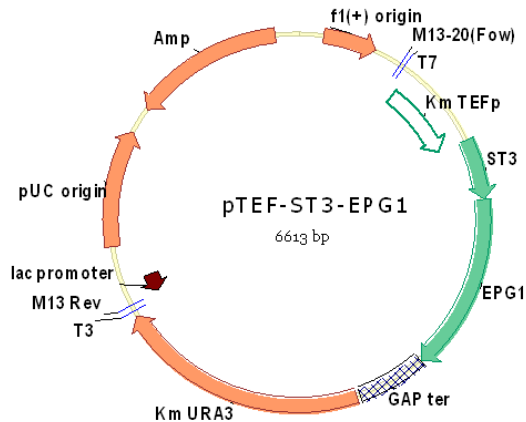


그림 4-30. EPG1 발현을 위한 *K. marxianus* vector

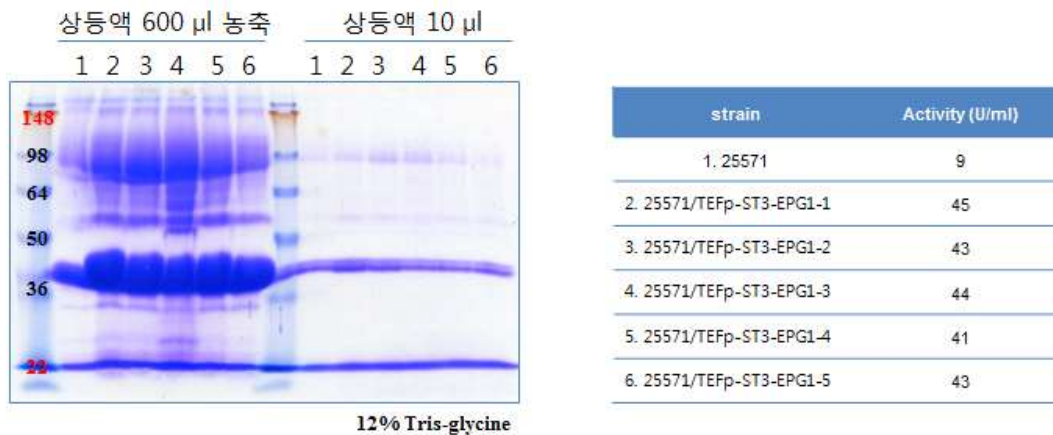


그림 4-31. EPG1의 분비 발현 & 활성분석

(다) Endopolygalacturonase 대량생산

위에서 선별된 2805/STFP4-EPG1 및 25571/ST3-EPG1-1 균주로부터 효소를 대량생산하기 위하여 5L 발효조에서 유가식 배양을 수행하였다. 본배양에 들어가기 전에 50m l의 최소액체배지에 1단계 초기배양한 후 다시 200m l의 YPD 액체배지에서 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배지로 분비된 EPG1을 확인하기 위하여 시간별 배양상등액을 취하여 SDS-PAGE 분석하였다. 48시간의 발효 배양 후 약 1-2g/l의 endopolygalacturonase가 배지로 분비 생산되었음을 확인하였다. 발효 시간별 활성분석 결과 48시간의 발효 배양 후 *S.cerevisiae* 2805/STFP4-EPG1 균주는 약 480 unit (그림 4-32), *K. marxianus* 25571/ST3-EPG1 균주는 약 250 unit(그림 4-33)의 활성을 확인하였다.

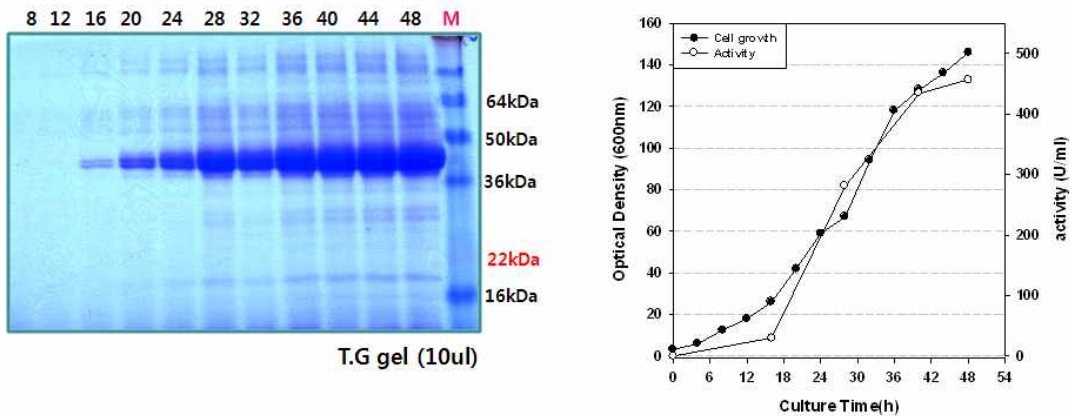


그림 4-32. *S. cerevisiae*에서 EPG1의 분비 발현 및 활성분석

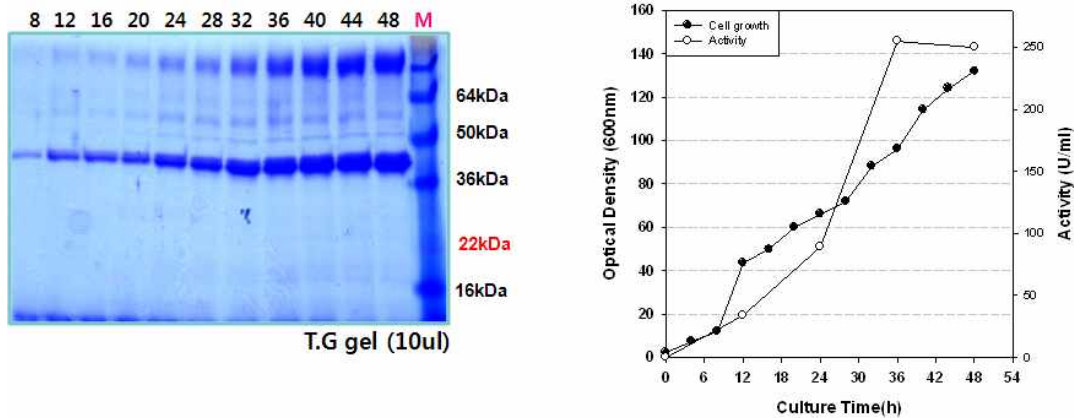


그림 4-33. *K. marxianus*에서 EPG1의 분비 발현 및 활성분석

(라) 재조합 EPG 생화학적 특성 확인

pH가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50mM citrate buffer (pH3-4), sodium acetate buffer (pH5-7)용액 각 0.4 ml에 20 μ l의 효소용액을 가하고 기질과 함께 50 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응 온도를 20-60 $^{\circ}$ C까지 변화시키면서 반응시켜 활성을 측정하였다. 결과에서 보는바와 같이 두 효소의 최적 pH는 5이며, 최적 반응 온도는 50 $^{\circ}$ C로 확인하였다(그림 4-34).

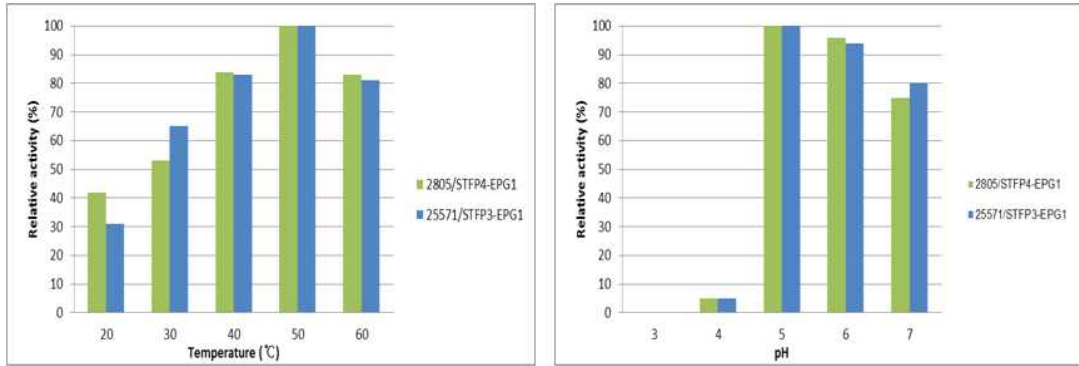


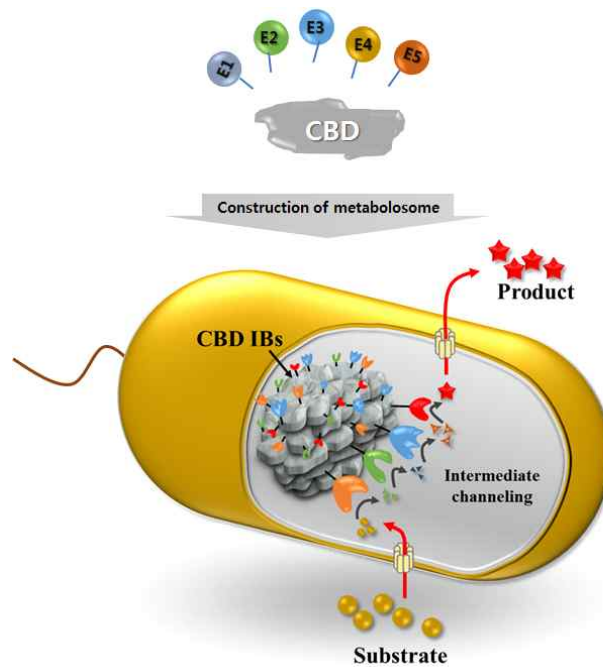
그림 4-34. pH와 온도에 따른 효소 활성 확인

제 5 절 KM 합성생물학 기술 개발

1. 산업유용물질 생합성을 위한 인공 대사집적체 구축 및 특성조사 연구

가. 대사경로 유전자 합성/재설계 전략

자연 상태의 세포들은 특정 대사활성이 집약된 다양한 소기관을 내포하고 있다. 고기능 현미경 및 상호작용 분석기술의 발달에 따라 원핵세포일지라도 단백질 및 효소복합체로 구성되는 다양한 구조물을 형성하고 세포내에 함유하고 있음이 알려지고 있다. 대사경로를 구성하는 다양한 효소들이 소기관을 형성하면 특정 대사과정이 공간적으로 구분되어 선택적 활성화가 가능하다. 본 연구팀은 전년도 연구에서 섬유소결합도메인 (CBD, cellulose binding domain)과 활성 효소를 융합하여 세포 내에 발현하면 자발적 단백질응집이 나타나며, 이렇게 형성된 세포 내 구조물이 높은 효소활성을 나타낼 수 있음을 입증하였다 (Biotechnol. Bioprocess Eng. 16: 1173-9). 예를 들면 β -glucuronidase 와 β -glycosidase를 CBD와 융합시킨 경우 정상적인 단백질 접힘 상태를 유지할 수 있으며 대부분의 활성(약 93%)이 단백질입자에서 관찰되었다. 본 연구에서는 대사경로 상 순차적 반응특성을 나타내는 효소들을 세포내 대사집적체(metabolon) 형성을 유도함으로써 특정 대사산물을 효율적으로 획득하는 연구를 진행하고자 하였다.



<그림 5-1. CBD 융합단백질 기반의 인공 대사집적체 모식도>

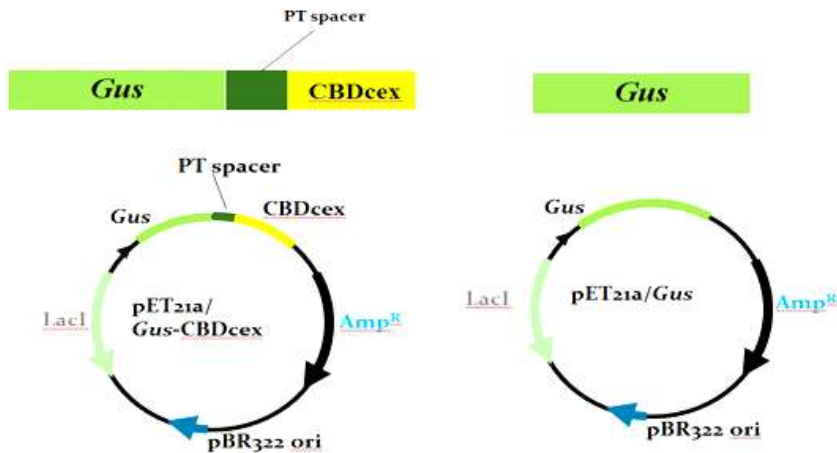
예상되는 효과는 다음과 같다. 먼저, CBD 융합단백질을 이용한 인공 대사집적체는 세포내 일반효소들로부터 물리적으로 분리된 상태에서 대사흐름을 유도하므로, 대사 중간물질이 세포에 유독할 지라도 숙주에 대한 해미지를 최소화 할 수 있다. 또한 하나의 효소 주변에 순차적으로 관여하는 효소들이 집적되므로 중간 생성물의 누수가 적고, 고정화효과에 의하여 효소안정성을 높이는 등 대사활성과 관련한 여러 난점들을 해결해 줄 것으로 기대되고 있다 (그림 5-1). 본 연구결과는 고온성 효모(KM) 세포공장 구축을 위한 플랫폼기술로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 인공 대사집적체에 미생물/식물에서 C3화합물에 이산화탄소를 전이하여 유용 C4 화합물로 전환하는 효소를 도입하고자 하였다. 이 과정은 복잡하게 얽혀있는 세포에너지 대사의 중심인 tricarboxylic acid cycle (TCA)을 경유하는 효소반응을 물리적 구획을 통하여 촉진하고자 한다는 점에서 새로운 전략을 제시하는 것이다. 사용 대사효소들은 원 숙주인 대장균 유래의 것을 그대로 사용하고자 하였다. 일반적으로 원 숙주유래의 효소를 대사증폭에 활용하는 경우 세포 내 조절단백질이나 상호작용에 의하여 효과가 상쇄되는 경우가 있어서, 이런 조절기전을 피할 수 있는 이종 숙주 유래 효소가 사용된다. 그러나 순차적 대사효소가 단백질입자를 형성하는 경우 집적된 효소가 상호작용에 의한 대사조절로부터 비교적 자유롭기 때문에 원 숙주 유래의 효소라도 다양하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

나. 정제된 CBD 융합단백질의 시험관내 특성 조사 및 인공 대사집적체 효과

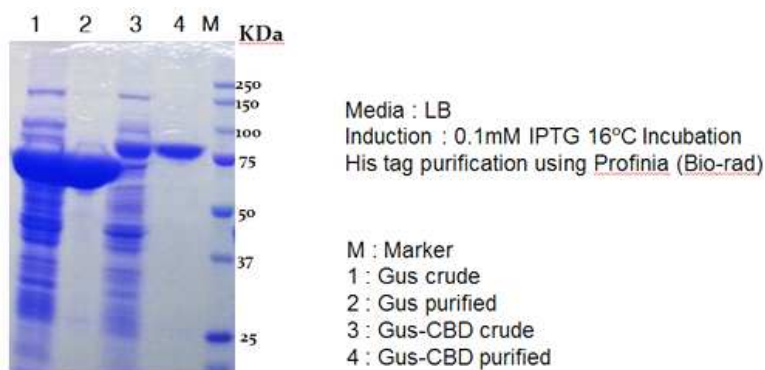
(1) β -glucuronidase 효소와 β -glucuronidase-CBD 융합 단백질의 클로닝 및 정제

인공 대사집적체의 기본적인 개념과 이해를 위하여 β -glucuronidase 와 CBD 의 융합 단백질을 이용하여, β -glucuronidase 효소와 β -glucuronidase-CBD 융합 단백질의 특성조사 실험을 수행하기 위하여 각각 효소의 클로닝 및 정제를 수행하였다.



<그림 5-2. β -glucuronidase-CBD 융합단백질과 β -glucuronidase 의 벡터 모식도>

β -glucuronidase-CBD 융합 단백질의 클로닝을 위하여 CBDcex 사이에 구조적/기능적 구획을 제공을 위해 24 base pair의 짧은 proline threonine (PT) 서열을 삽입하였고, 각각 β -glucuronidase-CBD와 β -glucuronidase 유전자는 pET21(a) 벡터에 클로닝을 수행하였다 (그림 5-2). β -glucuronidase-CBD와 β -glucuronidase가 각각 형질 전환된 대장균 BL21 (DE3)를 항생제 (앰피실린 50 ug/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37°C에서 진탕배양을 진행하다가 흡광값(OD600)이 0.4일 때 0.1 mM IPTG를 첨가한 후 16°C에서 12시간 배양하고 원심분리 (5,000 rpm, 5분)를 하여 균주를 수집하였다. 수집된 균주는 sonicator를 이용하여 파쇄하였고, His-tag affinity 컬럼을 이용하여 정제를 수행하였다 (그림 5-3). 정제 후 β -glucuronidase-CBD와 β -glucuronidase의 p-nitrophenyl glucronide에 대한 specific activity는 각각 19 U/mg 과 102 U/mg 이었다 (표 5-1).



<그림 5-3. β -glucuronidase-CBD 융합단백질과 β -glucuronidase 의 정제후 SDS-page 사진>

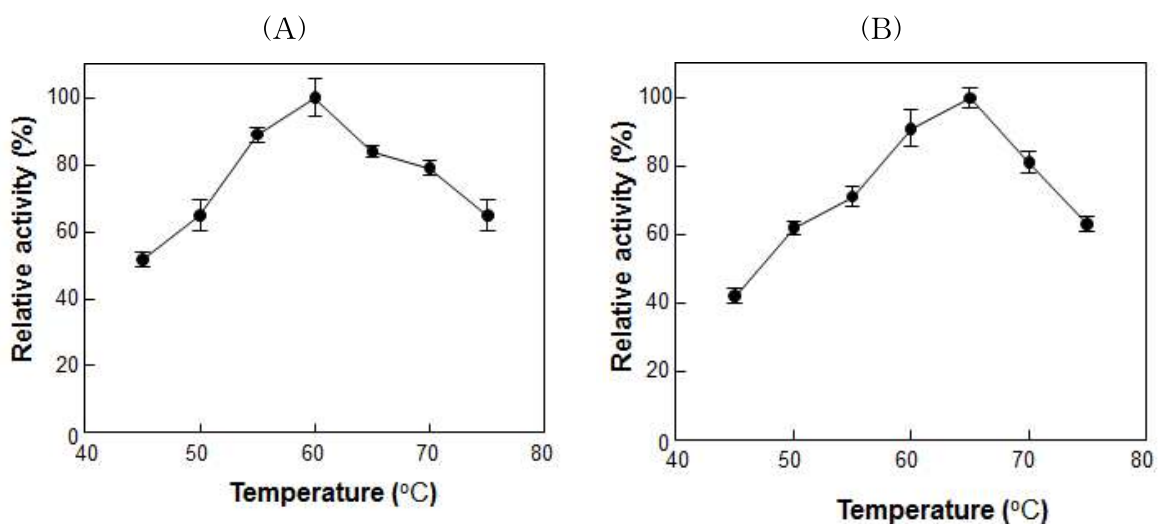
표 5-1 β -glucuronidase-CBD 융합단백질과 β -glucuronidase 의 *p*-nitrophenyl glucuronide에 대한 활성 조사

	Specific activity (μ mole/min/mg)
Gus	102 \pm 4.3
Gus-CBD	19 \pm 0.6

(2) β -glucuronidase 효소와 β -glucuronidase -CBD 융합 단백질의 온도와 pH에 대한 효과 및 안정성 조사

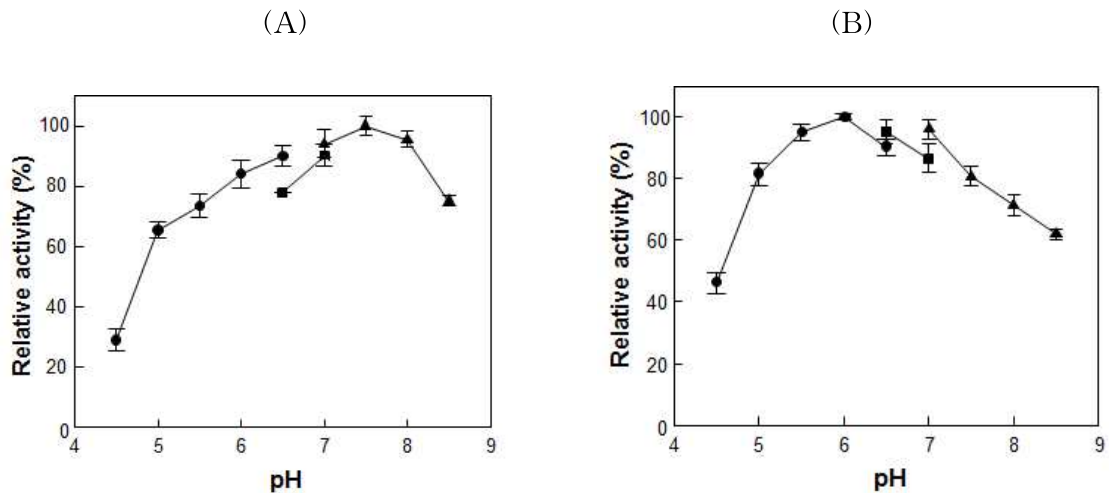
β -glucuronidase 효소와 β -glucuronidase-CBD 융합 단백질에 대한 온도 효과를 조사하기 위하여, 효소 반응은 온도 45°C에서 75°C 범위까지 0.5 mM *p*-nitrophenyl glucuronide가 포함된 50 mM pH 7.5 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer을 사용하여 각각 5분 동안 반응을 실시하였다. 그 다음 최종 농도 500 mM NaCO₃을 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 또한 β -glucuronidase 효소와 β -glucuronidase -CBD 융합 단백질에 대한 pH 효과를 조사하기 위하여, 기질로서 0.5 mM *p*-nitrophenyl glucuronide가 포함된 50 mM sodium acetate buffer을 사용하여 pH 4.0에서부터 6.5까지 실시하고, 50mM potassium phosphate buffer를 이용하여 pH 6.5에서 7.0, 50 mM (HEPES) buffer를 사용하여 pH 7.0에서부터 8.5 범위까지 효소 반응을 실시하였다. 구체적으로, 효소반응은 60°C에서 5분 동안 수행하고 다시 최종 농도 500 mM NaCO₃를 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다.

그 결과 그림 5-4에 나타난 바와 같이, β -glucuronidase (A)와 β -glucuronidase-CBD 융합 단백질 (B) 최적 온도는 각각 60°C, 65°C임을 확인하였다.



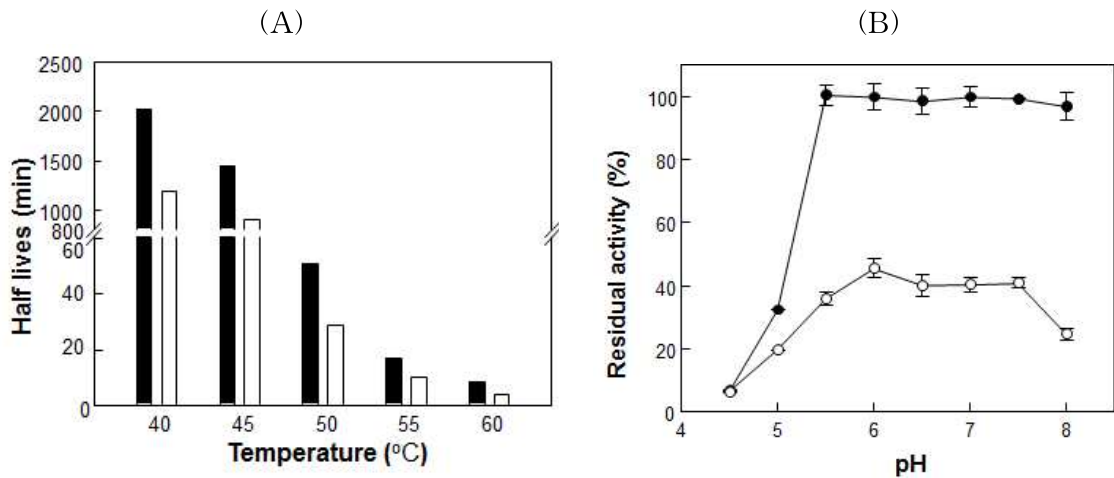
<그림 5-4. β -glucuronidase (A)와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질 (B)의 온도에 대한 활성 조사>

또한 그림 5-5에 나타난 바와 같이, β -glucuronidase (A)와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질 (B) 최적 pH는 각각 7.5, 6.0임을 확인하였다. 흥미롭게도 CBD 융합 단백질인 β -glucuronidase-CBD의 최적 pH가 산성으로 바뀌는 것을 확인하였다.



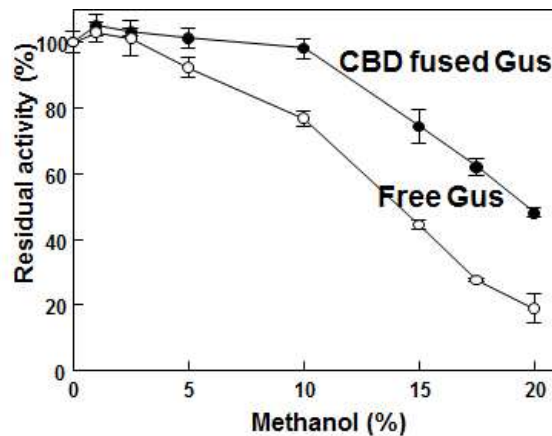
<그림 5-5. β -glucuronidase (A)와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질 (B)의 pH에 대한 활성 조사>

위의 실험을 바탕으로 β -glucuronidase와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질의 온도, pH에 대한 안정성 실험을 수행하였다. 먼저 열안정성 실험에 대하여 β -glucuronidase에 대하여 연구한 결과 각각 40, 45, 50, 55, 60 °C에서 열안정성이 반으로 줄어드는 시간이 각각 1188, 901, 26, 10, 3.6 분임을 확인 할 수 있었고, β -glucuronidase-CBD 융합단백질에 대하여 연구한 결과 각각 40, 45, 50, 55, 60 °C에서 열안정성이 반으로 줄어드는 시간이 각각 2020, 1442, 50.5, 16.7, 8.4 분임을 확인 할 수 있었다 (그림 5-6A). 또한 β -glucuronidase와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질을 pH 4.5-8.0의 buffer에서 12시간 방치후 활성 측정 결과 흥미롭게도 β -glucuronidase-CBD 융합단백질의 활성은 pH 5.5 이상에서 그대로 남아있었지만 β -glucuronidase는 40% 이하의 활성을 나타내었다 (그림 5-6 B).



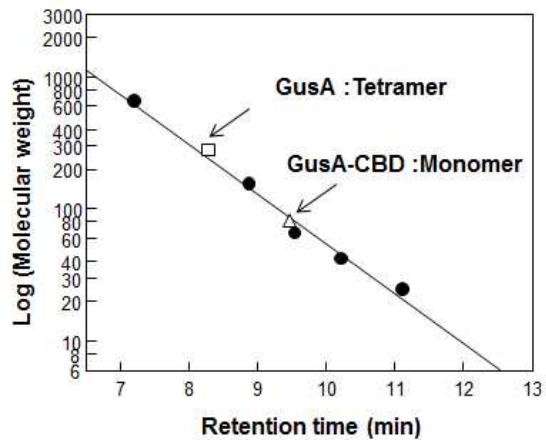
<그림 5-6. β-glucuronidase (A)와 β-glucuronidase-CBD 융합단백질 (B) 의 온도 안정성에 대한 활성 조사>

β-glucuronidase 와 β-glucuronidase-CBD 융합단백질에 대한 유기용매 내성을 알아보기 위해 다양한 농도의 메탄올이 함유된 buffer 에서 활성 측정 결과 β-glucuronidase-CBD 융합단백질의 활성이 전체 적으로 메탄올에 대한내성이 높은 것으로 확인이 되었다 (그림 5-7).



<그림 5-7. β-glucuronidase 와 β-glucuronidase-CBD 융합단백질의 methanol 에 대한 내성도 활성 조사>

결론적으로 β-glucuronidase 과 β-glucuronidase-CBD 융합단백질 의 특성조사 결과, β-glucuronidase-CBD 융합단백질이 온도, pH, 유기용매에 대한 안정성이 뛰어난다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상을 규명하기 위하여 본 연구진은 β-glucuronidase 과 β-glucuronidase-CBD 융합단백질의 단백질 사이즈를 확인하기 위하여 젤 크로마토그래피를 이용하여 단백질 사이즈를 분리하였다.



<그림 5-8. β -glucuronidase 와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질의 젤크로마토그래피에 의한 사이즈 확인>

그 결과 β -glucuronidase는 사량체로 확인이 되었지만, 흥미롭게도 β -glucuronidase-CBD 융합단백질은 단량체로 확인이 되었다. 이는 CBD 가 융합됨으로 인해 단백질 조합에 영향을 끼쳐 사량체로 조합되는 것을 막고 단량체로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 5-8).

이후 기질과 각각 β -glucuronidase 와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질 효소들을 반응시킨 반응 물을 다시 젤 크로마토그래피에 분석을 수행하였다. 그결과, β -glucuronidase 는 정체 시간이 기질 존재 여부에 따라 차이가 없었지만, β -glucuronidase-CBD 융합단백질은 기질이 존재할 때 정체 시간이 1.98 분으로 단축되었음을 확인하였다. 이는 단량체로 존재했던 β -glucuronidase-CBD 융합단백질이 기질에 의하여, 다량체 (multimer)이 형성되었음을 확인 할 수 있었다 (표 5-2).

<표 5-2. β -glucuronidase 와 β -glucuronidase-CBD 융합단백질의 기질여부에 따른 젤 크로마토 그래피에서 정체 시간 >

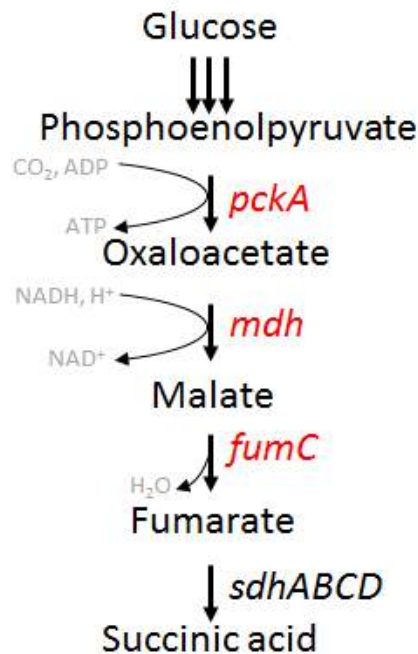
	Retention time (min)
Gus	8.25
Gus + Substrate	8.26
Gus-CBD	9.45
Gus-CBD + Substrate	1.98

결론적으로 CBD 융합을 하게 되는 β -glucuronidase는 기질이 존재하지 않을때에는 단량체로 존재하다가 기질이 존재할 때 다량체로 존재하면서 그에 따른 온도, pH, 유기용매에 대한 안정성을 높이는 것을 확인 할 수 있었다.

다. 대사과정상의 순차적 효소를 이용한 인공 대사집적체 형성 전략 수립

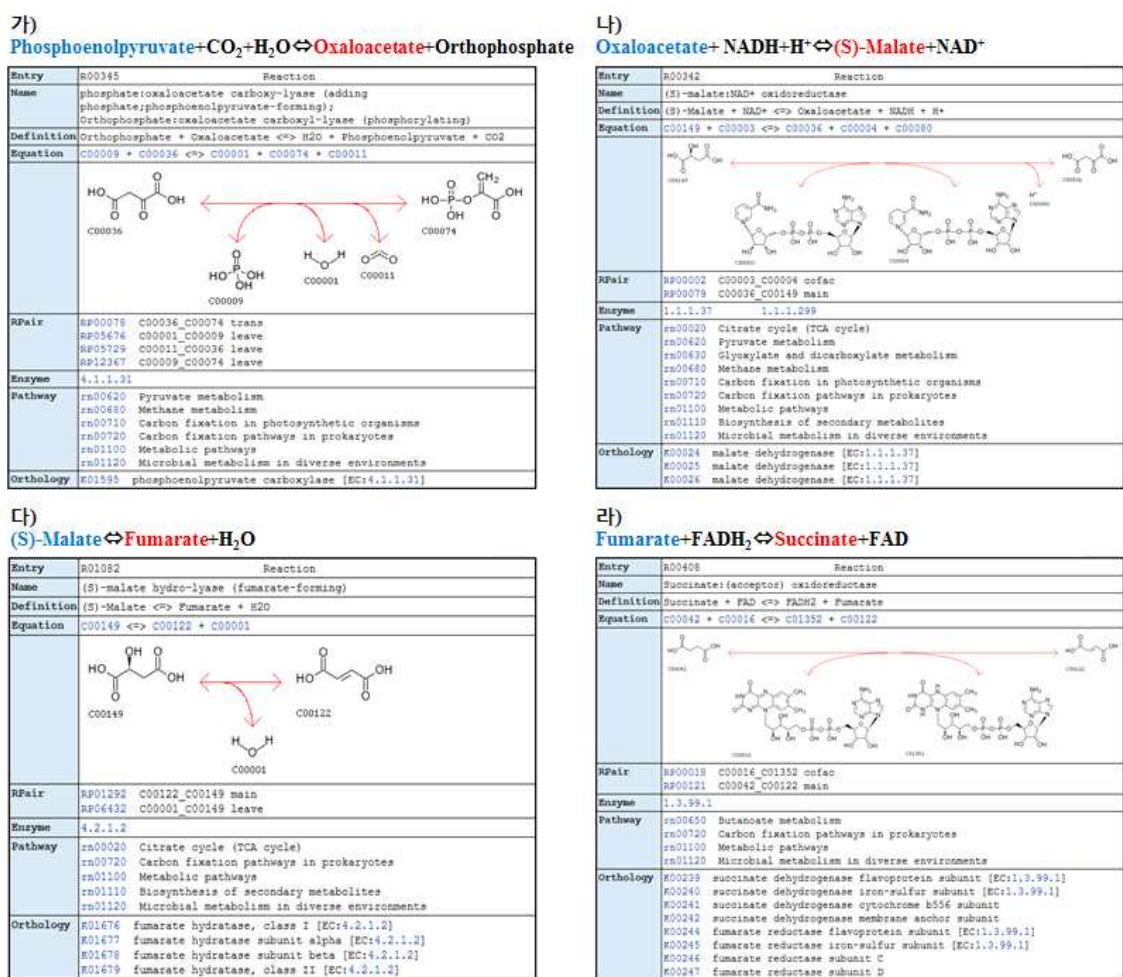
대사집적체를 구성하는 구조단백질로는 1차년도 연구에서 제시한 CBDcex를 사용하였으며, 대사효소로는 대장균 MG1655 유래의 pckA (phosphoenolpyruvate carboxykinase, EC4.1.1.49), mdh (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37), 그리고 fumC (fumarate hydratase class II, EC 4.2.1.2)를 사용하였다. 이 효소들은 C4식물의 광합성 및 탄소고정화에 중요한 매개물질일 뿐만 아니라 식품, 화장품에 널리 이용되는 malate, fumarate를 직접 합성하는 효소이며, 고분자 합성원료인 1,4-butanediol 등 유망 Diol 합성의 중간단계를 구성하는 효소들이다. 특히 mdh는 탈수소효소로서 NADH를 소모하여 C4화합물을 전환시키는 다양한 환원반응에 활성형 단백질입자를 사용할 수 있는 지를 보여주는 좋은 모델시스템이다. 또 다른 C4전환효소인 sdhABCD (succinate ubiquinone oxidoreductase, EC 1.3.99.1)에 대하여도 검토하였으나 이 효소가 복잡한 대사기능의 막결합 단백질로 알려져 있어서 현 단계의 인공 대사집적체 구성에는 적합하지 않은 것으로 판단하였다 (그림 5-9).

위 C4 전환반응에 후속 전환효소들을 순차적 도입하면 succinate, 4-HB (4-hydroxybutyrate)를 경유하여 1,4-BDO 합성에 이르게 된다. 참고로 본 사업의 참여기업인 삼성전자에서는 다양한 C4전환효소를 도입하여 1,4-BDO를 합성하는 연구를 진행 중에 있다. 본 연구팀에서는 C4화합물 합성과정의 상위 생합성 효소들인 pckA, mdh, fumC를 중점타깃으로 하여 세포 내 인공 대사집적체를 구성하는 합성생물학 기술에 먼저 주력하고자 하였다.



<그림 5-9. succinate 생합성 대사경로. 혐기 배양시 형성되는 유기산 생성 경로 중 succinate 생합성 경로의 효소 선별>

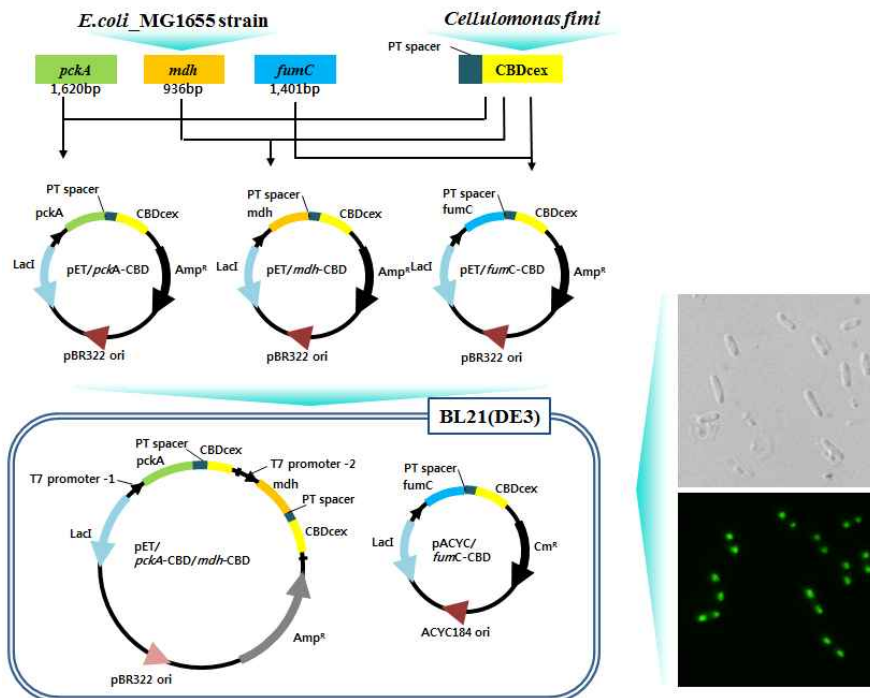
Malate, fumarate는 식품의 산미조절, 화장품원료 등으로 널리 이용되며, succinate는 화학물 전구체 및 식품첨가물, 이온 킬레이트화제, 그리고 약품 등으로 활용된다. 일반적으로 succinate는 화학적 과정을 통해 maleic anhydride로부터 얻어지지만 근래에는 미생물을 이용한 생합성연구가 활발하다. 미생물세포를 무 산소 배양하는 경우 산화적 인산화반응을 통한 TCA사이클 구성 C4화합물의 축적이 기대되나, 실제 세포에서는 TCA효소들 (그림 5-10) 외에도 다양한 C4전환효소들이 복잡하게 각축하고 있어서 malate, fumarate, succinate의 축적을 방해하게 된다. 예를 들어 oxaloacetate의 경우 mdh에 의하여 malate로 전환되어야 하지만 aminotransferase에 의하여 동시에 aspartate를 생성하게 되고, malate로부터 fumarate를 생합성하는 반응도 탈수소반응의 역반응으로 진행하기 어려운 것으로 판단되고 있다. 따라서 본 연구의 인공 대사집적체에 위 생합성 관련 효소들을 함께 집적시켜주면 TCA사이클을 역으로 진행하여 phosphoenolpyruvate로부터 oxaloacetate, malate, fumarate의 합성이 가능할 것이다.



<그림 5-10. 대장균 내 C4 생합성 관련 효소들의 반응기전 >

(1) 세포내 immobilization을 위한 CBD 융합단백질의 구축

위 pckA, mdh, fumC 유전자는 대장균 MG1655로부터 확보하였다. 먼저, Wizard Genomic DNA purification kit (promega)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 NCBI 서열정보를 바탕으로 제작된 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 증폭된 각 유전자 (pckA, mdh, fumC)는 발현벡터 pET21a (Novagen)에 클로닝하여 heat shock 방법을 사용하여 대장균 DH5 α 에 형질 전환 하였다. 형질전환된 세포는 50 μ g/ml 엠포실린이 포함된 LB 배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다. 세 가지 전환효소를 한 세포 내에서 효과적으로 발현시키기 위하여 origin 과 항생제 마커가 서로 다른 두 가지 벡터를 사용하였다. 앞서 제작된 벡터들을 주형으로 하여 PCR을 통해 pckA-CBD, mdh-CBD 그리고 fumC-CBD를 증폭하였다. 이들 유전자들은 pETDuet-1 (Novagen)와 pACYCDuet-1 (Novagen) 발현벡터에 클로닝 하여 pET/pckA-CBD/mdh-CBD와 pACYC/fumC-CBD를 제작하였다. 각 C4전환효소 (pckA, mdh, fumC)와 CBDcex 사이에는 구조적/기능적 구획을 제공을 위해 24 base pair의 짧은 proline threonine (PT) 서열을 삽입하였다. 유전자 증폭에는 pfu DNA polymerase를 사용하였으며, 제작된 벡터들은 이 후 진행될 효소 활성 검증 실험을 위하여 대장균 BL21(DE3)에 다시 형질전환 하였다 (그림 5-11).

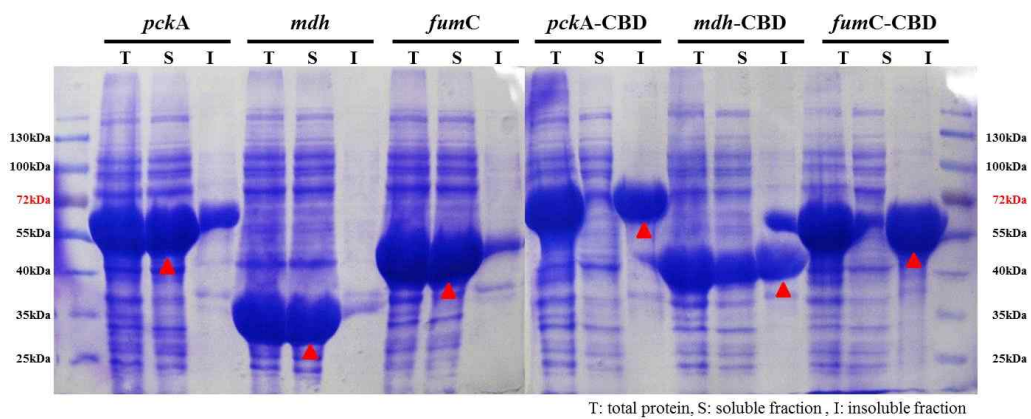


<그림 5-11. succinate 인공 대사집적체 형성을 위한 유전자 발현 벡터 제조과정>

(2) CBD 융합단백질의 효소 활성 분석

먼저, 각각의 효소들(pckA, mdh, fumC)을 CBD에 융합시켰을 때에 집적체의 형성여부 및 효소 활성을 확인하였다. 실험방법은 다음과 같다. pET/pckA-CBD, pET/mdh-CBD 그리고 pET/fumC-CBD 가 각각 형질전환된 대장균 BL21(DE3)를 항생제(엠포실린 50 ug/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 에서 진탕배양을 진행하다가 흡광값(OD600)이 0.4일 때 0.5 mM IPTG

를 첨가한 후 3시간 배양하고 원심분리(5,000 rpm, 5 분동안)를 하여 균주를 수집하였다. 각 재조합 미생물들을 현미경으로 관찰한 결과 모든 미생물에서 refractive particles을 관찰할 수 있었다. 각 미생물에 초음파를 처리(pulse 1초: 3초, 3분)하여 균체를 파쇄한 후 원심분리(13,000 rpm, 30 분동안)하여 상등액과 침전물을 분리한 다음 침전물 속 단백질입자의 활성을 측정하였다. CBD 융합단백질은 세포 내에서 단백질입자 형태로 발현되므로 그림 5-12와 같이 불용성 분획으로 얻어진다. 불용성 단백질 내 잔존하는 세포불순물을 제거하기 위해 0.5 % Triton X-100을 3회 세척 한 후 포스페이트버퍼(pH 7.4)에 부유화 시켜 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량 및 SDS-PAGE 분석은 일부 세척된 침전물을 8M Urea 에 부유화 하여 CBD 융합단백질의 집적된 구조를 충분히 풀어준 후 사용하였다 (그림 5-12).



<그림 5-12. succinate 대사 효소의 CBD 융합 발현 확인. (*pckA*(64kDa), *mdh*(32kDa), *fumC*(50kDa), *pckA*-CBD(72kDa), *mdh*-CBD(47kDa), *fumC*-CBD(64kDa)>

pckA-CBD 활성 확인은 반응 생성물인 oxaloacetate (OAA) 가 불안정한 물질임에 따라 직접적인 측정이 어려우므로 부수적으로 *mdh* (malate dehydrogenase, Roche)를 사용하여 반응 경로상에 소모되는 β -NADH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate, sigma, USA) 를 측정하는 방법으로 진행하였다. *pckA*-CBD 활성 분석액에는 50 mM HEPES (pH 7.5) 을 완충용액으로 하여 10 mM Phosphoenolpyruvate(PEP), 10 mM NaHCO₃, 10 mM ADP, 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 그리고 0.2 mM β -NADH를 포함한다. 대조군으로 진행된 실험에서 *pckA*가 존재 하지 않는 반응액에서는 OAA가 생성되지 않아 *mdh*가 활성을 갖지 못하여 β -NADH양이 감소되지 않는 것으로 확인 하였다. *mdh*-CBD 활성 또한 동일한 방식으로 50 mM HEPES (pH 7.5) 완충용액에 10 mM OAA를 기질로 하여 0.2 mM β -NADH가 감소되는 정도를 측정하였다. 위의 실험은 모두 25°C 조건에서 5분 동안 진행하였으며 spectrophotometer를 사용하여 340 nm 에서의 흡광값을 미리 준비한 표준검량선에 대입하여 소모된 β -NADH의 총량을 측정하였다. 1 unit은 25°C 에서 1분 동안 1 μ mol OAA와 β -NADH 를 L-malate와 β -NAD⁺로 전환시키는 효소량으로 정의하였다.

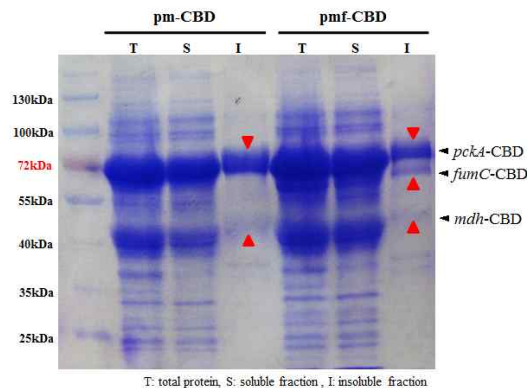
fumC-CBD 활성 확인은 25°C 조건에서 50 mM HEPES (pH 7.5) 완충용액에 10 mM malate를 기질로 첨가하여 총 10분동안 생성되는 fumarate를 spectrophotometer를 사용하여 240 nm에서 흡광값을 측정하는 방식으로 진행하였다. 1 unit은 25°C 에서 1분 동안 1 μ mol

L-malate를 fumarate 로 전환시키는 효소량으로 정의하였다. 각 CBD 융합단백질의 대조군으로서 CBD를 융합시키지 않은 자연형태의 *pckA*, *mdh*, 그리고 *fumC*를 분리정제 하여 위와 동일 조건으로 효소 활성을 함께 확인하였다.

<표 5-3. 효소단백질을 CBD와 결합시켰을 때의 효소활성 확인>

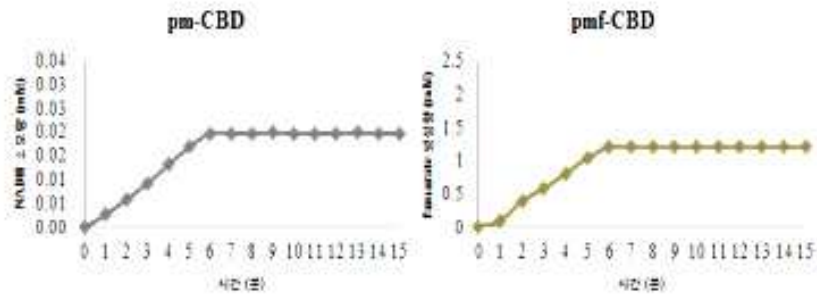
Enzymes	Specific activity	Enzymes	Specific activity	Enzymes	Specific activity
<i>pckA</i>	2.91±0.16 U/mg	<i>mdh</i>	4.05±1.72 U/mg	<i>fumC</i>	1.04±0.35 U/mg
<i>pckA</i> -C BD	0.62±0.01 U/mg	<i>mdh</i> -CB D	2.20±0.02 U/mg	<i>fumC</i> -C BD	0.21±0.07 U/mg

표 5-3은 불용성 형태로 집적된 효소들이 그 활성을 유지하고 있음을 나타낸 결과이다. 즉, 각 융합단백질들은 서로의 특성을 유지한 형태로 발현되며, CBD에 의한 효소 집적 후에도 활성이 유지되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 여러 효소들을 CBD 융합단백질 형태로 한 세포내에서 발현시켜 세포내 tricarboxylic acid cycle (TCA)을 역으로 가로질러서 유용 C4화합물을 합성하는 인공 대사집적체 (metabolon) 형성을 유도하였을 때에도 고유의 효소 활성이 잘 유지 되는지 알아보기 위해 아래의 실험들을 수행하였다. 먼저 순차적 대사과정에 위치한 두 가지, 세 가지 효소를 한 세포내에서 발현시켜 인공 대사집적체 형성을 유도하였다 (그림 5-13). pm-CBD (*pckA*-CBD와 *mdh*-CBD를 포함하는 단백질입자)와 pmf-CBD (*pckA*-CBD, *mdh*-CBD 그리고 *fumC*-CBD를 포함하는 단백질입자)를 10 mM PEP를 기질로 하는 100 mM Tris-HCl(pH 7.8), 10 mM NaHCO₃, 10 mM ADP, 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 그리고 0.2 mM β-NADH을 포함하는 반응액에서 효소활성을 확인하였다. 중간 기질인 OAA나 Malate가 별도로 첨가되지 않았기 때문에 *pckA*-CBD와 *mdh*-CBD, 그리고 *fumC*-CBD 가 세포내에서 잘 집적되어 유기적으로 융합되었을 경우 pm-CBD 반응액에서는 β-NADH 소모량을 그리고 pmf-CBD 반응액에서는 fumarate 생성량을 관찰 하였다. 측정방법 및 효소 활성 표기 방법은 전술한 실험과 동일하게 진행하였다. 실험결과, pm-CBD는 0.20±0.02 U/mg, pmf-CBD는 0.23±0.01 U/mg의 효소 활성을 확인 하였다.



<그림 13. 순차적 대사 효소의 CBD 융합 발현 확인>

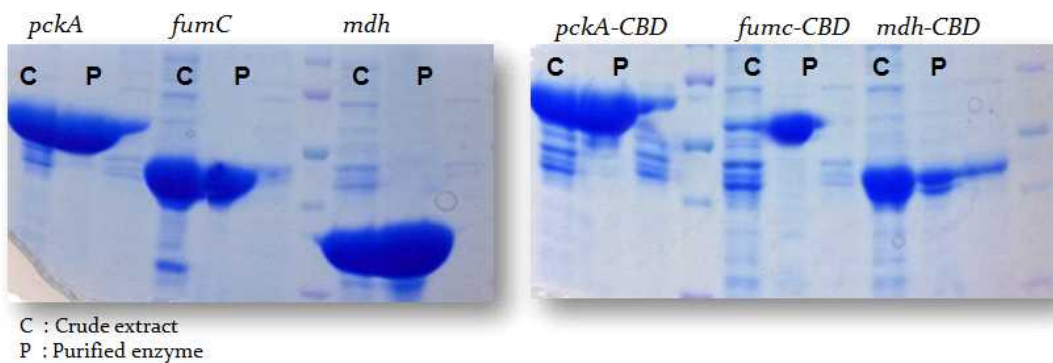
상위 실험과 함께 종합하여 보면, 순차적 대사효소를 포함하는 CBD 융합단백질이 인공 대사집적체로 집적될 때 개별 효소활성의 대부분이 집적체 내부로 봉입되는 in vivo immobilization이 가능하였으며, 활성분석 결과로 인공 대사집적체의 집적에 의해 순차적 대사 과정이 세포에서 분리한 단백질입자에서 잘 진행되며 단백질입자의 활성 값은 단위 효소량 당 약 30%까지 감소되었으나, 실제 전환반응을 잘 수행하는 것을 알 수 있었다 (그림 5-14).



<그림 5-14. 시간별 효소 활성 그래프>

(3) 살아있는 세포 내의 인공 대사집적체 구현을 위한 시험관 내 연구

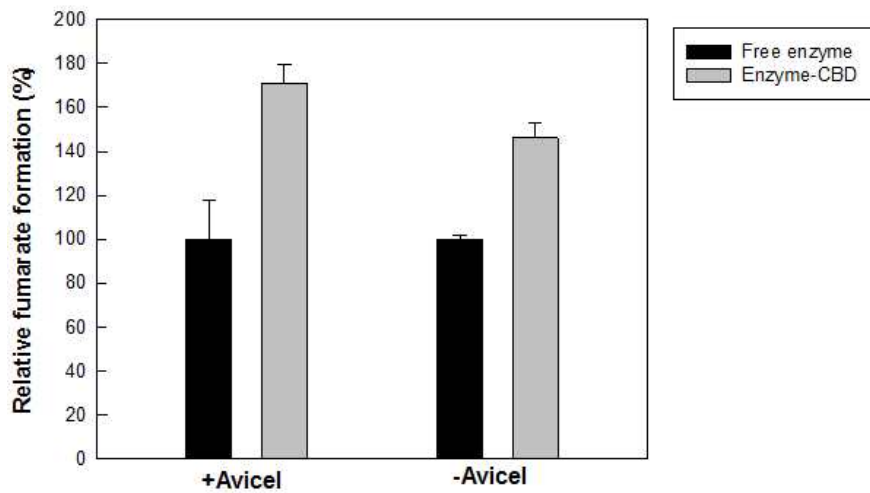
pET/pckA, pET/mdh, pET/fumC, pET/pckA-CBD, pET/mdh-CBD 그리고 pET/fumC-CBD 가 각각 형질전환된 대장균 BL21(DE3)를 항생제 (엠페실린 50 ug/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37°C에서 진탕배양을 진행하다가 흡광값(OD600)이 0.4일 때 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 3시간 배양하고 원심분리(5,000 rpm, 5 분동안)를 하여 균주를 수집하여 균주를 파쇄한 후, Histag affinity 컬럼을 이용하여 정제를 하였다 (그림 5-15)



<그림 5-15> pckA, mdh, fumC, pckA-CBD, mdh-CBD 그리고 fumC-CBD의 His-tag 정제후 SDS-PAGE gel 그림

인공적인 대사집적체를 시험관 내에서 구현하기 위하여, 세가지 효소의 CBD융합 단백질들을 인공적으로 대사집적체 형성을 유도하기 위하여, CBD의 결합을 유도하는 기본적인 물질로서 Avicel 을 이용하여, fumaric acid 형성을 측정을 하였다. 이때 control로서 야생형 효소들을 사용을 하였다. 그 결과, 야생형 효소보다 CBD 융합단백질이 1.5배의 높은 활성을 보였으며, Avicel을 사용했을때 1.8 배 증가되는 결과를 나타내었다 (그림 5-16).

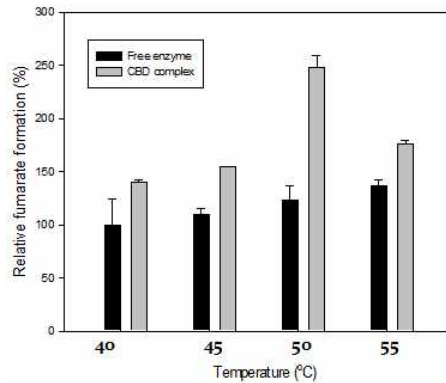
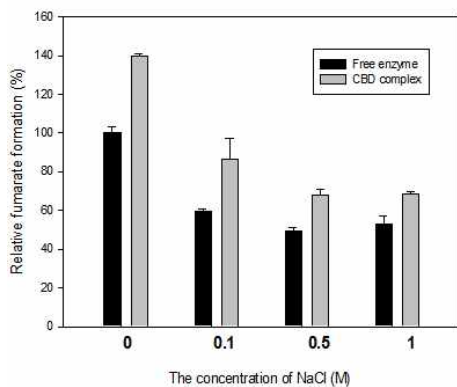
또한 염, 온도에 대한 인공적인 대사집적체의 효과를 시험관 내에서 구현하기 위하여, 세 가지 효소의 CBD융합 단백질들을 다양한 농도의 염과 온도에 따라 인공적으로 대사집적체 형성을 유도하여 fumaric acid 형성을 측정을 하였다. 이때 control로서 CBD가 융합되지 않은 야생형 효소들을 사용하였다. 그 결과, 다양한 농도의 염을 처리하였을때 야생형 효소보다 CBD 융합단백질이 전체적으로 1.3배 이상의 높은 활성을 보였다. 하지만 염의 농도에 따른 특별한 효과는 보지 못하였다 (그림 5-17A). 또한 다양한 온도에 따른 인공 대사집적체 효과를 실험한 결과 CBD 융합단백질이 야생형 효소보다 50 °C에서 2배 이상의 활성을 보이는 것을 확인하였다 (그림 5-17B).



<그림 5-16 *pckA*-CBD, *mdh*-CBD, *fumC*-CBD 의 인공 대사집착체 형성에서 Avicel의 효과>

(A)

(B)



<그림 5-17 *pckA*-CBD, *mdh*-CBD, *fumC*-CBD 의 인공 대사집착체 형성에서 NaCl과 온도에 따른 활성 측정>

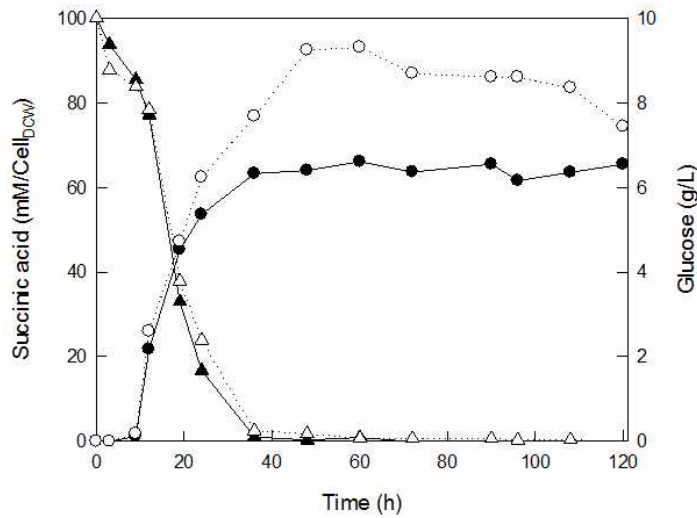
이는 시험관 내에서 정제된 효소를 가지고 인공적인 대사집적체 형성이 일어나는 것이 가능하며, 또한 높은 온도 에 따라 인공적으로 대사집적체 형성을 유도가 가능하다는 것을 확인하였다. 그래서 본 연구의 최종 목표인 1,4-BDO 생산에 이러한 인공적인 대사집적체 를 적용하여 높은 수율의 1,4-BDO 생산을 위한 연구를 추진할 계획이다.

(4) 살아있는 세포 내 인공 대사집적체 도입

대사공학 연구에서는 knock-out 균체를 사용하거나 외래 효소를 대량 발현하는 방법을 통해 유용 C4화합물의 수율을 높이려고 하나 세포 내 물질 확산 및 복잡한 생리적 조절을 받게 되어 기대한 효과를 보지 못하는 경우가 많다. 본 연구에서는 순차반응 대사효소를 단백질 입자에 집적하여 그 효과를 확인하고자 하였다. 인공 대사집적체는 순차반응 효소와 확산 가능한 co-factor, 기질을 포함하게 되며 세포 내 특정위치에 높은 활성의 대사구역을 형성할 수 있다. 이러한 인공 대사집적체는 대사과정의 중간생성물의 유실을 최소화함과 동시에 세포 내 불안정하게 형성되는 효소를 안정적으로 유지 시켜 대사흐름을 가속화할 수 있을 것이다.

실험방법은 다음과 같다. pET/pckA-CBD/mdh-CBD 와 pACYC/fumC-CBD 가 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 를 항생제(엠포실린 50 ug/ml 클로람페니콜 17ug/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37°C 에서 밤새 전배양한 후, 본배양 배지에 5%(v/v) 농도로 접종하였다. 본 배양은 100ml serum bottle 을 사용하여 균주 접종 후 입구를 마개로 막아 공기 유출입을 차단하였다. 상층부에 잔존하는 공기는 고압의 이산화탄소를 주입하여 제거하였다. 배지조성은 1리터 당 9 g glucose(50 mM), 5 g Yeast extract, 10 g NaHCO₃, 8.5 g NaH₂PO₄ · H₂O, 15.5 g K₂HPO₄ 으로 준비하였으며 배지에 용해된 산소를 제거하기 위해 1 mM Na₂S · 9H₂O를 첨가하였다. 효소 발현 유도를 위하여 0.1 mM IPTG를 함께 첨가하였다. 배양 조건은 37°C 에서 정체배양을 실시하였으며 주사기를 이용하여 시간별로 5ml 씩 배양액을 채취하여 분석에 사용하였다. 채취한 배양액은 원심분리(5,000rpm 5min)하여 균체를 침전 시켰고 0.2 µm pore size syringe filter를 사용하여 배양액 내 불순물을 제거한 후 HPLC (High performance liquid chromatography, shimadzu, Japan)를 수행하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동상으로 0.01 N 황산을 0.5 ml/min 으로 흘려주었으며 47°C 조건에서 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-rad, USA)을 이용하여 배양액 내 포도당 및 숙신산을 분석하였다. 분석기는 RI(refractive index) detector(Shimadzu, Japan)를 사용하였다.

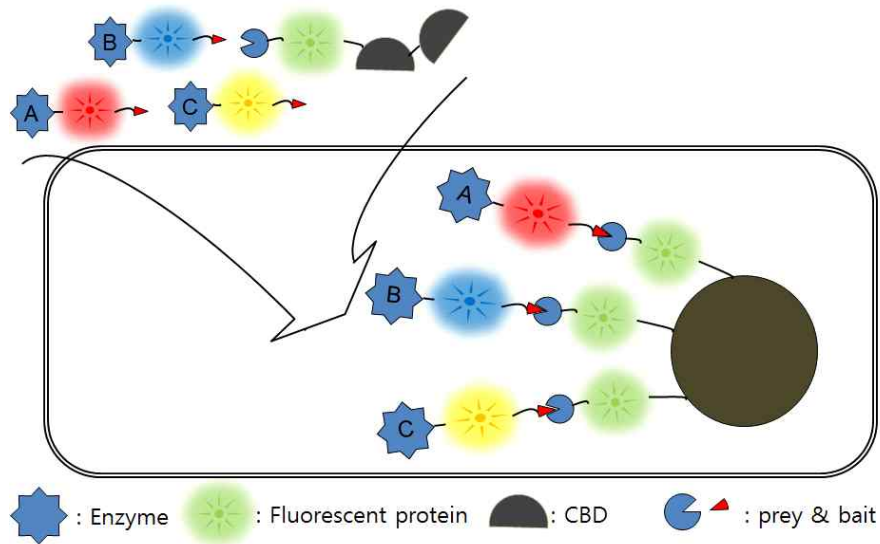
HPLC 분석 결과, 대사집적체형성균(SA-CBD: pckA-CBD, mdh-CBD, fumC-CBD)과 단순 과발현균(SA; pckA, mdh, fumC)에서 생성되는 숙신산의 양을 비교하였을 때, 대사집적체형성균의 숙신산 생성량이 단순 과발현균에 비하여 세포당 높은 숙신산 생성을 확인하였다(그림 5-18). 이에 따라 본연구의 대사집적체 형성을 통하여 단일 세포내에서 타겟 물질의 높은 생산량을 기대할 수 있게 되었다.



<그림 5-18 대장균내에서 CBD 를 이용하여 숙신산 생산. Closed triangle: pckA, fumC, mdh 가 들어있는 대장균에서 글루코스 농도, Open triangle: pckA-CBD, fumC-CBD, mdh-CBD 가 들어 있는 대장균에서 글루코스 농도, Closed circle: pckA, fumC, mdh 가 들어있는 대장균에서 숙신산농도, Open circle: pckA-CBD, fumC-CBD, mdh-CBD 가 들어 있는 대장균에서 숙신산 농도 >

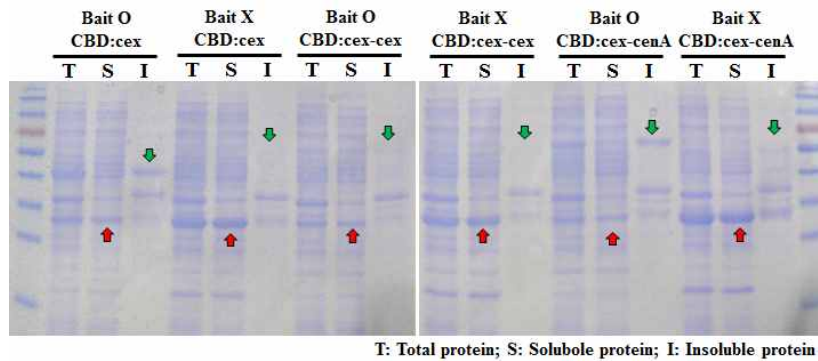
라. 구조기반 인공 대사집적체의 최적화 연구

CBD 융합단백질 형태로 효소를 발현 시켰을 때 세포 말단으로 효소가 집적되는 효과를 확인하였지만, 일부 효소 단백질은 CBD와 함께 집적체 내부에 함께 집적됨으로서 효소 양 대비 활성이 줄어드는 것으로 판단하였다. 또한, 효소가 다량체를 이룰 경우, 전사/발현 시 융합된 CBD에 의해 단백질 4차 구조 형성이 어려울 것으로 예상된다. 그러므로 타깃 바이오화학물질의 생합성에 필요한 효소들의 효과적인 발현을 위하여 CBD를 이용한 구조단백질부분과 효소 활성 단백질부분을 독립적으로 발현 시킨 후 세포 내에서 자연적인 결합을 일어나도록 류이신-지퍼 펩타이드를 이용하는 prey-bait 시스템을 인공 대사집적체에 적용하였다. 또한, 두 종류의 CBD를 직렬 융합시켜 구조단백질 부분의 집적효과를 높이는 연구를 수행하였다 (그림 5-19). 직렬 융합 CBD를 위하여 *C. fimi* 유래의 CBDcex와 CBDcenA를 사용하였다. CBDcenA는 명확한 구조적 정보가 현재까지 밝혀지지 않았지만 CBDcex와 서열 유사도가 50%를 이루고 외부로 노출되는 소수성 잔기 트립토판 17, 트립토판 54, 트립토판 72가 상보적으로 잘 보존되어 있어 CBDcex와 유사한 형태로 3차구조를 형성할 것으로 예상되므로 인공 대사집적체 형성에 적합할 것으로 판단하였다 (그림 5-19).



<그림 5-19. prey-bait 및 직렬 융합 CBD 인공 대사집적체 모식도>

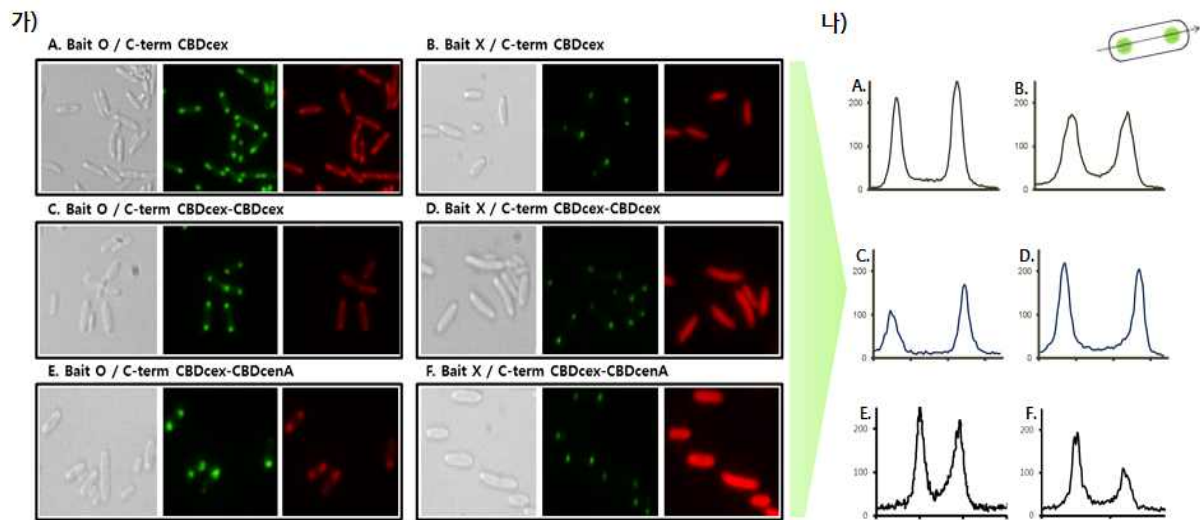
prey-bait 및 직렬 융합 CBD에 의한 효과를 확인하기 위하여 가상의 활성 효소 단백질 부분으로서 적색 형광단백질(RFP)에 prey 펩타이드를 클로닝하였고 구조 단백질 부분인 CBD에 bait 펩타이드와 녹색형광단백질(GFP)을 클로닝 하였다. 대조군으로 bait가 없는 CBD 구조체를 발현하는 균주를 제작하여 prey-bait에 의한 효소의 집적효과를 대비적으로 확인 하였다. 직렬 융합 CBD의 조합으로는 CBDcex-CBDcex 와 CBDcex-CBDcenA를 제작하였고 단독 CBDcex 와 비교 하였다. 단백질 발현을 위한 배양 조건은 각 벡터가 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 를 항생제(엠포실린 50 ug/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37°C에서 밤새 전배양한 후, 본배양 배지에 1%(v/v) 농도로 접종하였다. 30°C에서 본 배양을 진행하다가 흡광값(OD600)이 0.4일 때 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 5시간 배양하고 원심분리(5,000 rpm, 5 분동안)를 하여 균주를 수집하였다. SDS-PAGE를 통하여 단백질 발현정도를 비교하였다. 본 연구 전략의 주안점은 bait 를 갖는 CBD 구조체가 prey를 갖는 활성 효소 단백질을 수용할 만큼 발현되어야 한다. 그림 5-13에서 확인 할 수 있듯이 단독 CBDcex, CBDcex-CBDcex, 그리고 CBDcex-CBDcenA 모두 bait가 없는 상태에서 발현 시켰을 때 단백질 발현율이 상당히 감소하는 것을 관찰 할 수 있다. 이는 류이신-지퍼 펩타이드를 사용한 bait 서열이 대장균 내 발현기작에 잘 적용되는 것으로 판단되어 앞으로 연구 진행에 참고하였다. 반면, bait 서열이 존재하는 단독 CBDcex와 CBDcex-CBDcenA 발현 단백질에서는 정상적으로 CBD 구조체가 발현됨을 확인 하였다. CBDcex-CBDcex 의 경우 CBD 구조체를 가장 잘 형성하였지만 발현수준이 극히 낮아지는 단점이 확인되었다 (그림 5-20).



T: Total protein; S: Soluble protein; I: Insoluble protein

<그림 5-20. prey-bait 및 직렬 연결 CBD 발현 단백질 SDS-PAGE>

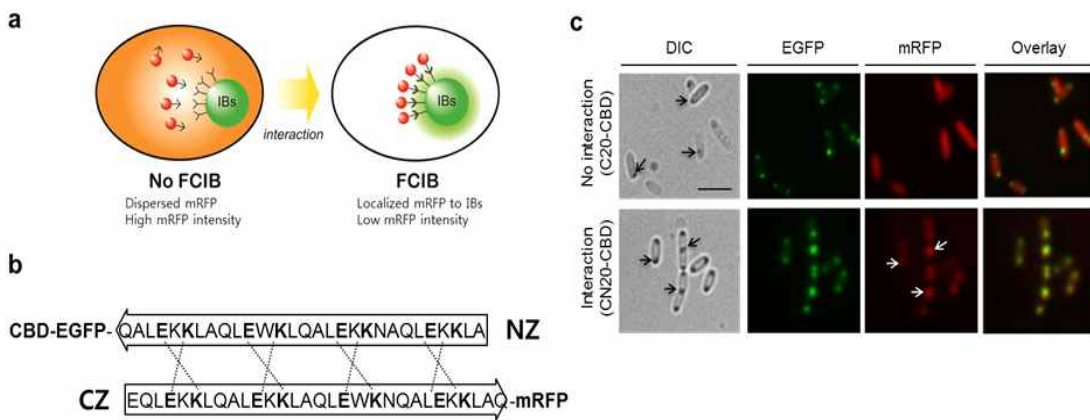
다음으로, 각 실험군들의 세포 내 형광단백질을 현미경으로 관찰하여 prey-bait에 의한 CBD 구조단백질과 활성 효소 단백질간의 결합 정도를 확인 하였다. 먼저, 그림 5-21 (가) 의 좌측 그림을 통해 bait가 없는 CBD 봉입체에는 적색 형광단백질에 달린 prey가 결합되지 않음을 확인 하였다. 이는 인공 대사집적체의 CBD 구조 단백질과 활성 효소 단백질이 서로 독립적으로 발현될 수 있음을 보여줌과 더불어 CBD 구조 단백질이 집적체를 형성할 때 활성 효소 단백질에 영향을 안 준다는 것을 보여준다. 즉, 순수 CBD만으로 집적체가 형성되므로 집적도가 증가될 것으로 예상되며, bait에 의한 활성 효소 단백질의 접근성 또한 향상될 것으로 판단된다.



<그림 5-21. 세포 내 형광단백질 및 형광 강도 관찰 가) 가시광선과 형광조건에서 세포내 형광단백질 분포 나) CBD 봉입체의 형광 강도 비교>

이어서 bait가 있는 CBD 봉입체의 나타내는 녹색 형광단백질 위치와 동일하게 적색 형광단백질이 관찰되는 것으로 보아 CBD 구조 단백질에 활성 효소 단백질의 접근이 잘 이루어지는 것으로 판단된다. 특히, CBDcex-CBDcenA를 이용한 CBD 구조 단백질이 그림에서 적색

형광단백질의 집적도가 더 높은 것으로 확인 되었다. 이를 보충하는 자료인 그림 5-21 (나) 는 CBD 구조 단백질이 보여주는 녹색 형광단백질의 강도를 보여주는 그림으로서 CBDcex-CBDcenA의 형광 강도가 타 구조 단백질 보다 높은 형광 강도를 보임을 알 수 있다. 본 연구의 전략에서 중요한 부분은 CBD 구조 단백질이 활성 효소단백질을 모두 수용 할 만큼 존재하여야 한다는 것이다. 그러므로 CBD 구조 단백질과 활성 효소단백질의 균형적인 발현을 유도하기 위하여 프로모터와 origin 등의 발현 시스템에 대한 연구를 수행하고 있으며 더불어 prey-bait 시스템의 활용도를 높이기 위하여 선택적 결합력을 갖는 펩타이드를 도입하여 표준화 및 디자인 가능한 인공 대사집적체를 구축하기 위해 연구를 진행하였다. 그 결과 인공 대사 집적체를 보다 안정적으로 할 수 있으며, 그들의 결합력을 조절할 수 있는 링커로서 다양한 지퍼들을 확보하였고, 이는 CBD를 통해 안정적인 inclusion body를 형성하게 하고, 그 주위에 지퍼의 결합을 통하여, 안정되고 결합력 있는 인공 대사집적체를 만들 수 있었다 (그림 5-22).



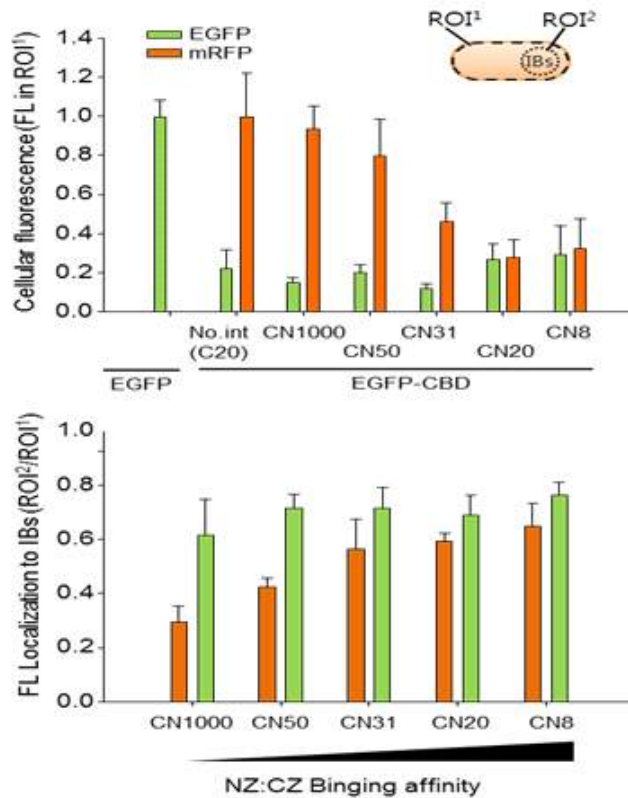
<그림 5-22. 세포 내 형광단백질의 CBD융합에 의한 집적체 형성 및 형광 강도 관찰>

인공 대사집적체를 적용하여 생합성 경로의 다양한 효소를 이용하기 위해서는 결국은 효소의 양을 조절하는 것이 큰 문제점이다. 이러한 효소의 양을 지퍼들의 결합력을 조절하는 것으로 해결책을 세웠고, 그에 따라 다양한 결합력을 가진 지퍼들을 확보하였다 (표 5-4).

<표 5-4. 다양한 지퍼 단백질에 대한 결합력 조사>

No.	Mutations	KD (μM)
CN8-CBD	4/27	8
CN20-CBD	None	20
CN31-CBD	25	31
CN50-CBD	11	50
CN1000-CBD	13/25/27	1000

그에 따라 다양한 결합력을 가진 지퍼들을 통해 그에따른 대사 집적체 형성의 비율을 확인 하였다 (그림 5-23). 지퍼 결합력에 따라 RFP 형광이 점점 CBD 봉입체로 모여들어 세포내에서 RFP 형광이 감소하는 것을 확인 하였다. 이를 통하여, 인공 대사 집적체 방법을 좀더 정교하게 구현할 수 있는 방법을 확보하였고 이러한 방법을 바이오부탄올 생산에 적용을 하였다.



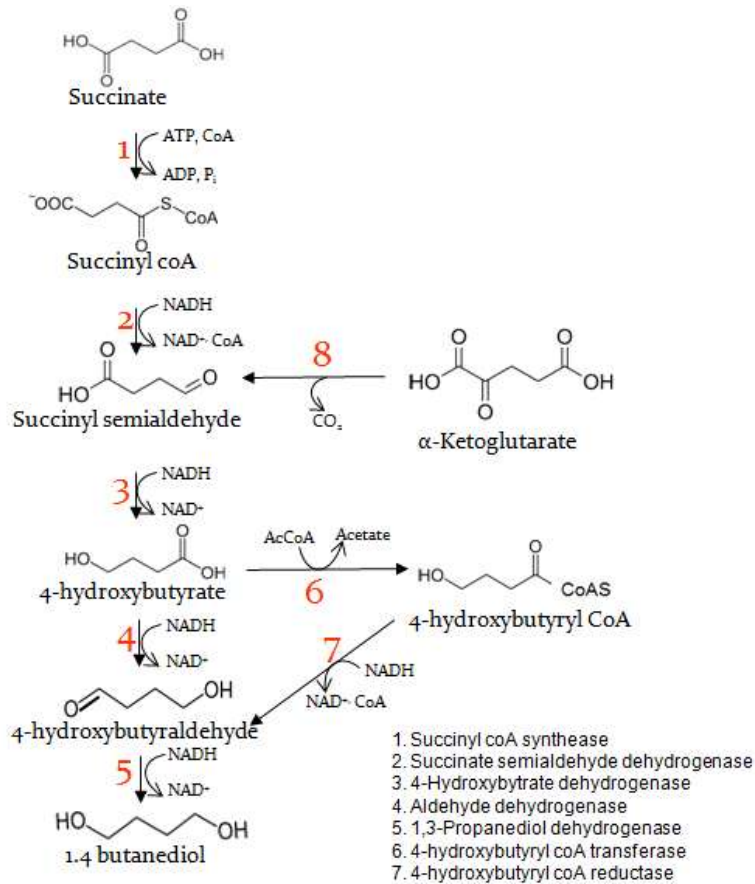
<그림 5-23. 세포 내 형광단백질의 CBD융합의 지퍼 결합력에 따른 집적체 형성 및 형광 강도 관찰>

마. 구조기반 인공 대사집적체의 세포내 응용 연구

(1) 1,4-butanediol 생산을 위한 대장균내에서 인공 대사집적체 형성 응용

1,4-BDO는 유기용매, 플라스틱, 엘라스틱 섬유, 스판덱스의 원료로써 산업계에서 각광받고 있고 그에 따른 잠재성이 대단히 큰 차세대 원료물질이다. 앞서 연구한 연구내용을 바탕으로 본 연구진은 과제의 최종 목표인 1,4-BDO 생산성을 최대로 이끌기 위해 인공 대사집적체 방법을 적용하고자 하였다. 그래서 CBD 기반의 인공 대사집적체 형성을 시험관내, 또는 대장균내에서 효과를 확인하였고, 이러한 시스템을 1,4-BDO 생합성 경로의 효소들에게 적용 할 예

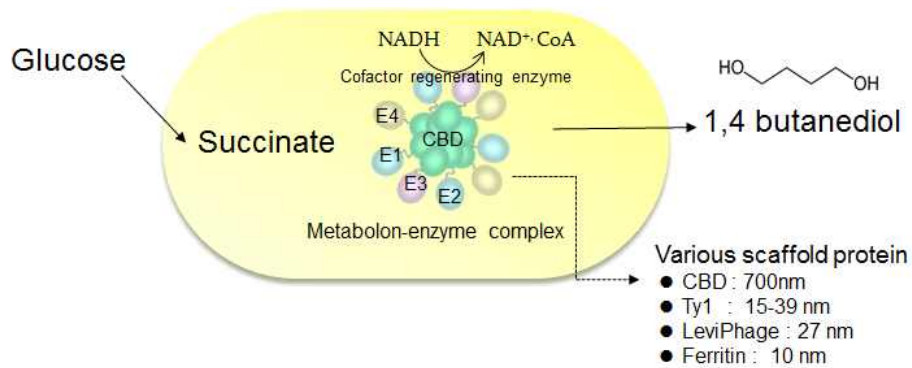
정이다. 1,4-BDO 는 대장균내에서 숙신산으로부터 5개의 효소를 통하여 합성되는 것으로 알려져 있다 (그림 5-24).



<그림 5-24 대장균 내에서 숙신산으로부터 1,4 BDO의 생합성 대사경로>

본 연구진에서는 succinyl coA synthase, succinate semialdehyde dehydrogenase, 4-hydroxybutyrate dehydrogenase, 4-hydroxybutyryl coA transferase, 그리고 4-hydroxybutyryl coA reductase 의 유전자 코돈 최적화 및 합성을 완료하였다.

하지만 이러한 생합성 경로에서 중간 물질인 4-hydroxyaldehyde 의 세포내 독성과, 가장 중요한 물질로서 조효소인 NADH와 CoA의 공급이 최대생산의 제한점으로 문제가 야기되고 있다. 그래서 본 연구팀은 인공 대사집적체 방법을 이용하여, 중간 대사산물의 독성을 최소화하여 줄이고, 인공 대사집적체에 조효소를 꾸준히 공급할 수있는 시스템을 도입하여 1,4-BDO 의 최대생산을 기대하고자 한다 (그림 5-25). 더욱더 구체적으로는 NADH, coA 연속 공급을 위하여 각각 formate dehydrogenase, pantothenate kinase 효소를 인공 대사집적체에 적용하여 1,4 BDO 의 최대생산을 기대하고자 한다.

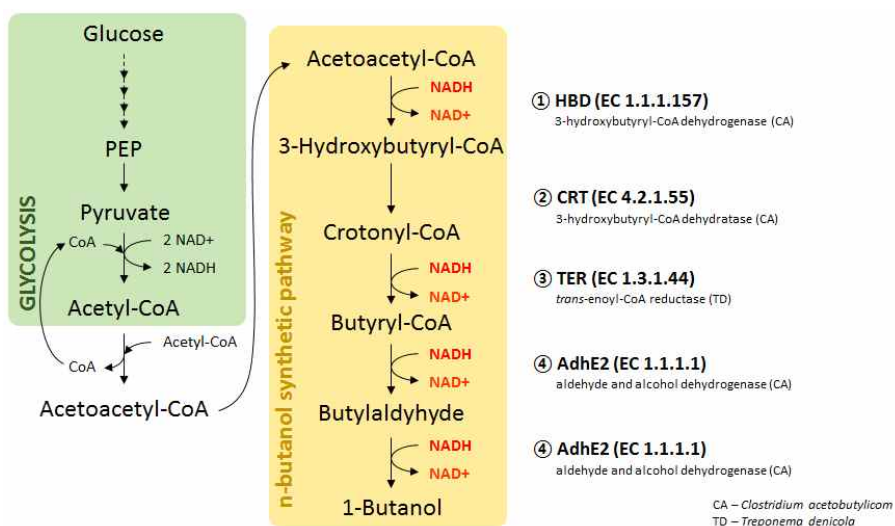


<그림 5-25. 대장균 내에서 인공대사집적체를 이용하여 숙산산으로부터 1,4 BDO의 생산>

(2) 부탄올 생산을 위한 대장균내에서 인공 대사집적체 형성 응용

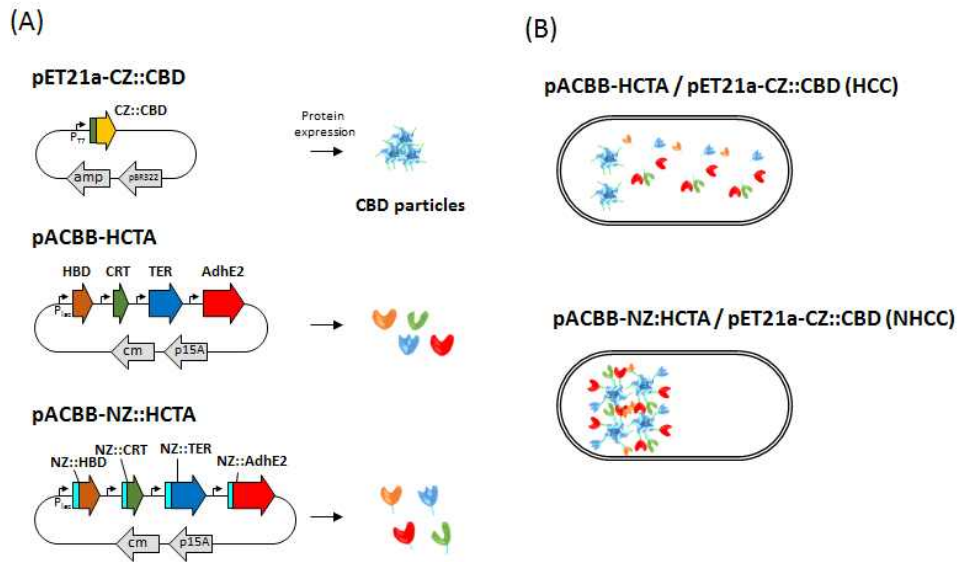
부탄올(n-butanol)은 현재 사용되고 있는 석유계 연료 및 실용화 단계에 있는 바이오 에탄올의 대체 바이오 연료일 뿐만 아니라, 화장품 향수, 호르몬, 위생제, 산업용 코팅제, 페인트 첨가제, 섬유, 플라스틱 모노머, 의료용품, 비타민, 향생제, 농약 등 활용 범위가 매우 넓은 중간체 화합물이다.

대사집적체를 구성하는 구조단백질로는 앞서 연구한 *Cellulomonas fimi* 유래의 CBD를 사용하였으며, 부탄올 합성을 위한 대사경로는 그림 5-26과 같다. 사용된 효소로서 *Treponema denicola* 유래의 TER(trans-enoyl-CoA reductase, EC 1.3.1.44), *Clostridium acetobutylicom* 유래의 HBD(3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, EC 1.1.1.157), CRT(3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase, EC 4.2.1.55) 그리고 ADhE2(alcohol aldehyde dehydrogenase, EC 1.1.1.1)를 사용하였다 (그림 5-26).



<그림 5-26. 부탄올 합성 대사경로>

세포 내 대사집적체의 형성을 위하여 구조단백질과 대사효소의 각 N-말단에 앞서 연구된 류신(Leucine) 지퍼 펩타이드를 가지는 융합단백질을 제조하여, 각 융합단백질이 세포 내에서 발현 시 류신지퍼의 상호결합에 의해서 구조단백질에 대사효소가 부착되도록 구성하였다(그림 5-27).



<그림 5-27. 구조 단백질 발현 및 부탄올 생합성 단백질 발현용 plasmid 및 대사집적체 개념도>

구조집적체가 부탄올 생합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 류신지퍼의 CZ가 융합된 구조단백질(CZ::CBD)과 류신지퍼의 NZ가 융합된 부탄올 생합성 효소 (NZ::HCTA)를 구축하고 류신지퍼 펩타이드로써 한쌍인 CZ와 NZ의 상호결합이 존재하는 실험군과 상호결합이 존재하지 않는(empty-NZ) 대조군으로 구분하여 부탄올 생합성 유전자 회로를 제작한 후 대사회로가 조절된 숙주세포 *E. coli* MG1655 Δ fed Δ ldhA Δ adhE Δ pta (*E. coli* MG1655 mod)에 형질 전환 하였다.

E. coli MG1655 mod-pET21a-CZ::CBD/pACBB-NZ::HCTA(실험군) 및 *E. coli* MG1655 mod-pET21a-CZ::CBD/pACBB-HCTA(대조군)를 각각 항생제 (엠포실린 50 mg/ml, 클로람페니콜 34 mg/ml)가 첨가된 LB배지에 접종하여 37°C에서 16시간동안 전배양한 후, 본 배양 배지에 1%(v/v) 농도로 접종하였다. 37°C에서 흡광값(OD600)이 0.4일 때 0.1 mM IPTG를 첨가한 후 24시간 배양한 후 원심분리(5,000 rpm, 5분동안)를 하여 실험군과 대조군의 균주를 수집하였다.

사용된 부탄올 합성효소들은 기질전환 과정에서 보조인자로 NADH를 필요로 하는 반응 특성을 가지고 있다. 대사집적체에 결합된 대사효소들의 NADH 소모량을 측정함으로써 각 대사효소의 활성 및 대사집적체의 대사채널링 효과를 확인 할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 실험군과 대조군에서 부탄올 합성에 사용된 각 효소들의 활성 측정을 위하여 PBS 버퍼에 재 현탁한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리기를 이용하여 용해성 및 불용성 단백질을 분획하여 각각 대사효소의 활성을 측정하였다.

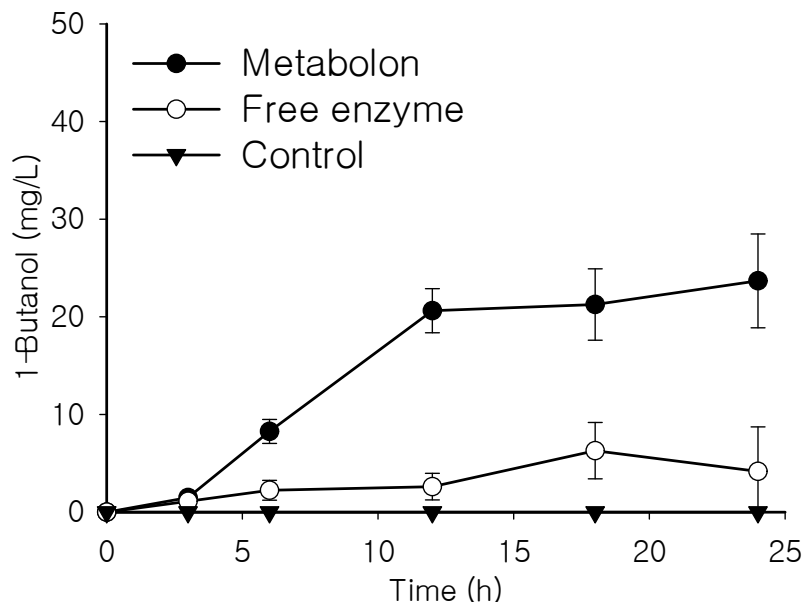
효소 활성 반응액 (5mM NADH, 20mM MOPS, pH 7.1)에 각 효소의 기질인 acetoacetyl-CoA, 3-hydroxybutyryl-CoA, Crotonyl-CoA, Butyryl-CoA 4mM이 포함되도록 하여

사용하였다. 효소 반응액에 25mg/mL 용해성 단백질 및 불용성 단백질을 첨가한 후 NADH의 감소량을 측정하였다. NADH의 측정은 분광광도계를 이용하여 340nm에서 흡광스펙트럼을 측정하여 NADH의 양을 정량하였다.

대사집적체를 형성하지 않는 대조군의 경우에서 HBD, CRT, TER, AdhE2의 상대 효소 활성(용해성:불용성)은 각각 76.4:23.6, 68.9:31.1, 47.5:52.5, 74.8:25.2로 측정되었고, 대사집적체를 형성하는 실험군의 HBD, CRT, TER, AdhE2의 상대 효소 활성(용해성:불용성)은 각각 22.2:77.8, 17.9:82.1, 15.1:84.9, 67.7:32.3의 활성을 나타내었다. 즉 대사집적체를 형성하지 않는 대조군의 경우 부탄올 생합효소의 활성이 용해성 분획에서 높게 측정된 반면, 대사집적체를 형성하는 실험군에서는 대부분의 효소 활성이 불용성 분획에서 측정되었다. 대사집적체를 유도한 실험군의 불용성 단백질에서 효소 활성이 높게 측정된 결과는 세포 내에서 구조단백질과 대사효소가 류신 지퍼에 의해 상호결합을 이루는 것을 시사한다.

대조군과 실험군의 부탄올 생산성을 비교하기 위해 4mM acetoacetyl-CoA, 5mM NADH, 20mM MOPS (pH 7.1)의 반응액에 대조군의 용해성 분획, 실험군의 불용성 분획을 각각 25mg/mL 씩 첨가한 후 37°C에서 전환 반응을 유도하여 부탄올 생산량을 측정하였다. 부탄올의 분석은 가스크로마토그래피(Gas Chromatography, agilent 7890B)를 이용하였으며, DB-WAX 컬럼(agilent, 30m, 0.32mm, 0.50mm film thickness)을 이용하였음. 분석조건은 오븐 온도는 초기 60°C(4분), 120°C(분당 15°C 승온), 230°C (분당 50°C 승온), 230°C (2분)으로 하였으며, 인젝터(inject) 250°C로 하여 FID분석기(300°C)로 분석하였다.

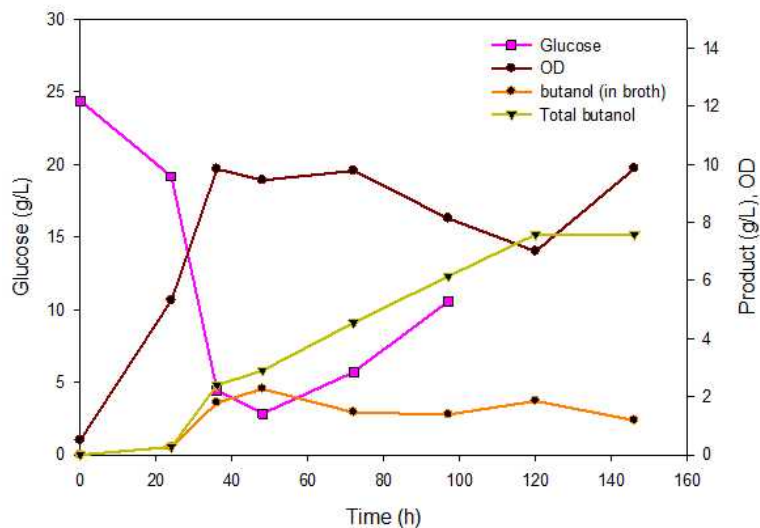
반응 12시간 이후 부탄올의 생산량을 측정한 결과 실험군에서는 20.63±2.25 mg/L, 대조군에서는 2.60±1.37 mg/L의 부탄올이 생산되었으며, 실험군의 반응속도가 대조군에 보다 약 9배 높게 나타났다. 또한 24시간 후 23.68±4.80 mg/L의 부탄올이 생산되었으며, 대조군에서는 4.80±4.14 mg/L의 부탄올이 생산되어 12시간 이후 부탄올의 생산량이 크게 증가하지 않았다(그림 5-28).



<그림 5-28. 시험관 내 부탄올 전환 시험 결과>

효소활성 및 부탄올 시험관 생산 실험결과를 종합한 결과 실험군에서 부탄올 생합성 대사 집적체가 형성됨으로서 부탄올의 생산성이 증가되었음을 확인하였다. 본연구를 통해서, CBD 융합 단백질을 이용하여, 다단계 효소 활성 반응에서 생산량이 증가하였음을 재확인 할 수 있었다.

마지막으로 대사 집적체를 형성하는 부탄올 생합성 세포를 이용하여 부탄올 생성량을 확인하기 위하여 4L 발효조를 이용하여, 부탄올 생산성을 비교하기로 하였다. 그 결과 생성된 부탄올 최대량 2g/L 이고, 부탄올 생산성은 0.05 g/L/h였다 (그림 5-29).



<그림 5-29. 대사집적체가 형성된 부탄올 생산 세포를 이용한 부탄올 생산>

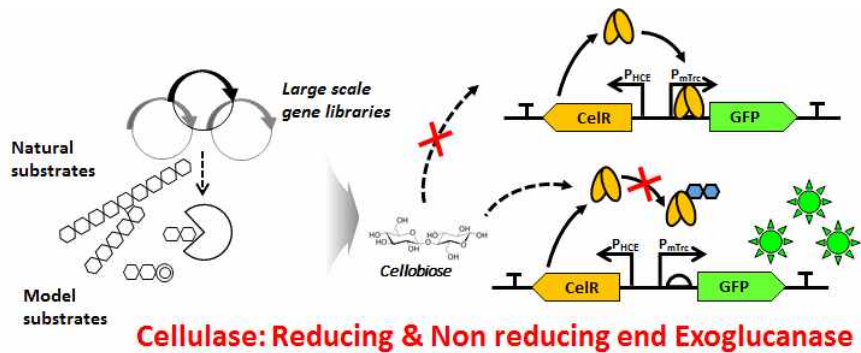
바. 바이오매스 분해 효소의 개량을 위한 분자진화 연구

(1) 섬유소 분해효소 맞춤형 유전자회로 개발 및 최적화

섬유소 분해효소의 활성도메인을 탐색 및 개량하기 위해선 효소활성을 정량적, 고감도, 고속으로 측정해야 한다. 일반적으로 섬유소분해효소의 활성을 측정하는 방법에는 필터페이퍼 (filter paper, Whatman no. 1)를 이용하여 전체 섬유소분해효소활성을 나타내는 방법, CMC (Carboxymethyl cellulose)를 이용하여 endo형 섬유소분해효소의 활성을 측정하는 방법, avicel 을 이용하여 exo형 섬유소분해효소의 활성을 측정하는 방법 등이 있다. 전체 섬유소분해효소 활성을 측정하는 FPA (FPase activity) 방법은 1 × 6 cm 필터페이퍼 조각을 섬유소분해효소와 반응시켜, 1분 동안 글루코오스 1 마이크로몰 (micromole)을 생산하는 효소유닛을 DNS (3,5- dinitrosalicylic acid)를 등의 환원당 측정법이나 글루코오스 측정법을 통해 측정하는 방법이다 (Biotechnol Bioeng, 2003, 82: 745-749). 이 방법은 값싸고 쉽게 구할 수 있는 기질을 사용하는 장점이 있어 널리 사용되고 있으나, 재연성이 떨어지고 많은 노동력과 시약들이 필요한 단점이 있다. 또한 대량의 라이브러리 등 많은 수의 효소활성을 측정하는데 사용될 수 없다.

수용성 CMC를 이용하여 endo형 섬유소분해효소를 측정하는 방법은 1분 동안 1 마이크로몰의 글루코오스를 생산할 수 있는 효소유닛을 측정하는 방법임 (Biotechnol Bioeng Symp, 1976, 21-33). 이 방법은 전통적인 endo형 섬유소분해효소를 측정하는 방법이지만, CMC의 DS (degree of substitution)이나 DP (degree of polymerization)에 의해 결과가 차이가 나며, 노동력을 요하는 방법이므로 대량의 라이브러리의 효소활성을 측정하는데 사용되기 어려운 단점이 있다. exo형 섬유소분해효소의 활성은 일반적으로 avicel을 이용하여 측정하는데, avicel은 낮은 DP를 나타내어 endo형 섬유소분해효소의 방해를 받지 않고 순수 exo형 섬유소분해효소의 활성만 측정할 수 있다 (crit rev biotechnol, 2010, 1-8). 그러나 이 방법 역시 재연성이 떨어지며 노동력을 요해 대량의 라이브러리 탐색에 사용되기 어렵고, 이렇듯 대부분의 섬유소분해효소 기능 탐색은 많은 시간과 노력을 요하는 개별적 활성분석기술에 의존하고 있는 형편이다. 게다가 최근 미생물 유전체 혹은 메타게놈 (metagenome)으로부터 새로운 유전자원을 확보하거나, 기존 유전자의 활성을 개량하여 유용성이 높은 바이오촉매로 발전시키기 위하여 방향성 분자진화기술 (directed evolution)을 적용하는 연구가 바이오산업기술의 중요한 전략으로 부각되고 있으며, 이에 따라 극미량의 효소활성을 감지하는 새로운 고속화기술의 등장을 요구하고 있어서 본 연구에서는 섬유소분해효소 고속 발굴 및 개량을 위한 유전자회로(GESS; Genetic Enzyme Screening System)를 개발하였다.

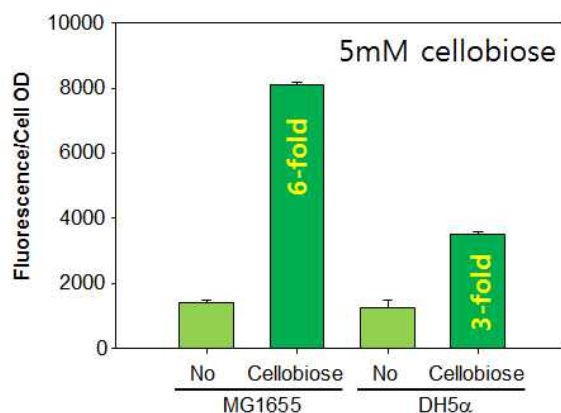
유전자회로는 섬유소 분해효소의 활성을 특이적으로 감지할 수 있는 CB-GESS를 개발하였고, CB-GESS는 천연 기질 및 모델 기질을 사용하여 섬유소 분해효소의 활성을 측정, 유리되는 셀로비오스를 유전자회로가 감지하여 리포터 단백질을 발현하는 시스템을 구축하였다 (그림 5-30).



<그림 5-30 exo형 섬유소 분해효소 활성 감지를 위한 재설계 유전자회로 (CBGESS: CelloBiose induced Genetic Enzyme Screening System) 모식도>

(2) 섬유소 분해효소 맞춤형 유전자회로의 셀로비오스 감지능 확인

CBGESS 함유 재설계 대장균의 셀로비오스 감지기능을 확인하기 위하여, MG1655와 DH5 α 균주에 열 충격을 통한 CBGESS의 형질전환을 시도하였다. MG1655는 대장균 K타입 균주의 오리지널 버전으로 일반적인 대장균의 특성을 가지고 있고, DH5 α 의 경우 염색체조작을 통해 유전자의 보존 및 변성을 최소화한 K타입 대장균이다. MG1655와 DH5 α 단일 콜로니를 100 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 각 2 ml의 LB (1% (w/v) 트립톤, 0.5% (w/v) 효모추출물, 1% (w/v) 염화나트륨) 액체 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 진탕 배양하였다. 위 배양액을 동일배지 10 ml에 1% 접종한 후 세포농도(OD)가 약 0.8정도 도달하였을 때, 각 5 ml로 나눈 뒤, 한 쪽에는 5 mM 셀로비오스를 첨가하고 다른 한쪽은 첨가하지 않았다. 이후, 18 시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양을 더 진행하여 형광발현을 유도하고 분석하였다. 세포농도 측정은 UV/VIS 형광분광기를 사용하였으며, 형광측정은 형광 플레이트 리더기 (Victor5, ParkinElmer, 미국)를 사용하였다.



<그림 5-31 DH5 α 와 MG1655에서 셀로비오스에 의한 재설계 유전자회로 형광 반응 결과>

실험결과, 셀로비오스를 첨가하지 않았을 때에 비하여 MG1655는 약 6배 형광이 증가하였으며, DH5 α 는 약 3배정도 형광이 증가하였다 (그림 5-31). 이 결과는 재설계 유전자회로가 셀로비오스를 감지하여 리포터 단백질인 eGFP를 발현, 형광이 감지됨을 나타낸 것이다. 이 결과를 통해 구축된 재설계 유전자회로가 셀로비오스 유무에 따라 형광 강도가 확실하게 차이가 남이 입증되어, 섬유소분해효소 활성을 측정하는 목적에 이용될 수 있음을 나타낸다.

(3) 재조합 섬유소 분해효소 활성도메인 개발

본 사업은 기존 미생물시스템의 한계를 개선할 수 있는 고온성 효모 *Kluyveromyces marxianus* (KM) 세포공장 platform을 구축하고 섬유소계 바이오에너지 및 고부가 바이오신소재의 효율적 생산 기술을 개발하고자 하는 것이다. 이러한 관점에서 발현, 활성 및 안정성이 우수한 바이오매스 분해/전환 효소의 개발은 필수적인 과정이라 할 수 있다. 따라서 메타게놈 유래 β -glycosidase, cellulase 활성과 *Cellulomonas fimi* 유래 cellulase를 재조합 대장균에서 발현하고 활성을 개선하기 위한 기술개발을 수행하였다. *C. fimi*는 그람 양성 세균으로서 7종

의 엑소 및 엔도 타입의 섬유소 분해효소가 존재하고 있으며, 이 중 cex는 엑소-글루카나아제 이면서 동시에 자일라나제의 활성을 가진 것으로도 알려져 있다. *C. fimi* 유래 섬유소 분해효소 7종의 섬유소 분해활성도메인(catalytic domain)을 pET21a 발현벡터에 클로닝하고 대장균에서 섬유소 분해활성도메인의 발현과 활성을 조사하였다. 발현숙주로는 대장균 BL21(DE3)와 Rosetta-gamiB(DE3)를 사용하였고, 발현여부를 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과 *C. fimi* 유래 7가지 재조합 섬유소 분해효소 중에서 cbhA, cenB, cenD, 및 cex의 4가지만이 대장균 내에서 발현되는 것으로 확인되었다 (그림 5-32).

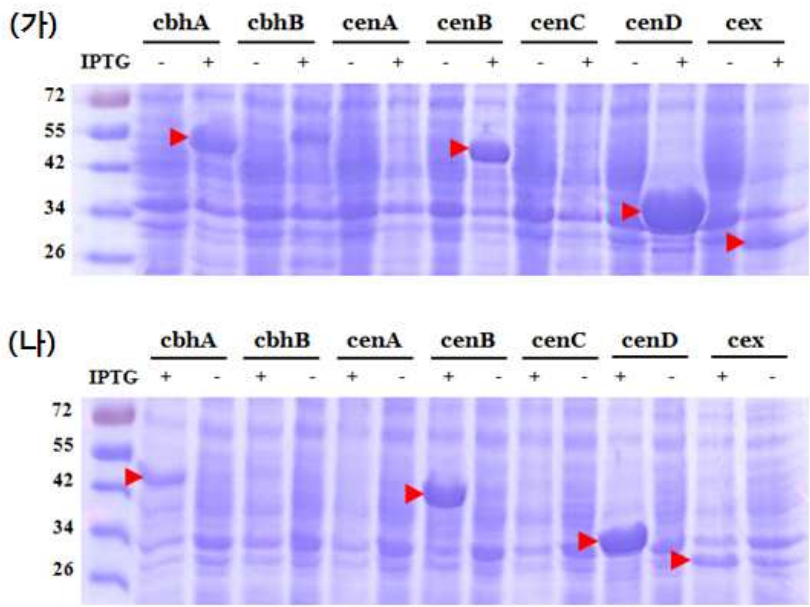
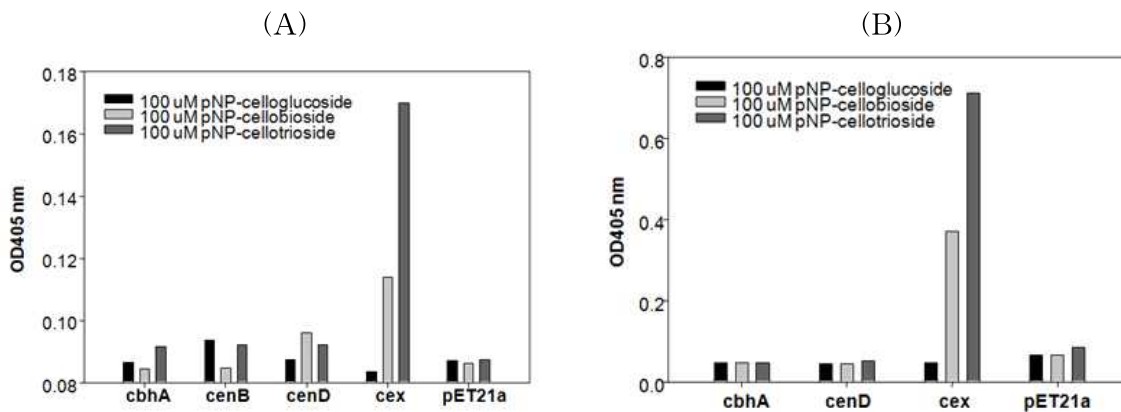


그림 5-32 *C. fimi* 유래 재조합 섬유소 분해효소의 대장균내 발현을 확인. (가) 대장균 BL21(DE3)에서 발현을 조사한 결과, (나) 대장균 Rosetta-gamiB(DE3)에서 발현을 조사한 결과임. (cbhA(47 kD), cbhB(70 kD), cenA(30 kD), cenB(50 kD), cenC(58 kD), cenD(38 kD), cex(34 kD)).

발현이 확인된 네 효소의 활성을 측정하기 위하여 각 유전자가 삽입된 대장균 BL21(DE3)을 LB 액체 배지에 접종하여 배양한 다음 회수하여 초음파분쇄기(pulse 1초: 3초, 3분)를 사용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 원심분리(1,500 rpm, 15분, 4°C)하여 분리된 상층액을 p-니트로페놀-cellodextrin을 통해 재조합 섬유소 분해효소의 활성을 확인하였다. 기질은 100 μM의 p-니트로페놀-celloglucoside, p-니트로페놀-cellobioside, p-니트로페놀-celotrioside를 사용하였으며, 반응버퍼는 0.1 M citrate버퍼(pH 4.8), 반응온도는 50 °C, 반응시간은 1시간으로 실험을 진행하였다. 발색측정은 멀티라벨리더기를 이용하여 405 nm에서 p-니트로페놀농도를 측정하였다. 또한 Rosetta-gamiB(DE3)에서 발현된 효소는 위와 동일한 방법으로 분리한 뒤, Ni-NTA kit(Qiagen)와 PD-10 desalting column(GE Healthcare)를 사용하여 정제한 뒤 활성을 측정하였다. 그 결과, 4개의 효소 중 Cex만이 p-니트로페놀-cellobioside와 p-니트로페놀-celotrioside에서 활성을 가지는 것으로 나타났다(그림 5-33). 이는 *C. fimi* 유래 cbhA, cenB, cenD는 대장균에서 발현되었지만 활성이 없는 것으로 보아 접힘(folding)이 정상적으로 이루어

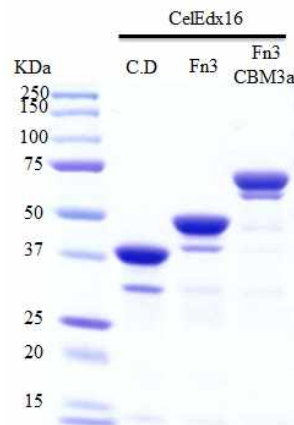
지지 않아 비활성 형태의 insoluble form으로 발현된 것으로 예측된다. 한편 메타게놈 유래 CelEdx16 cellulase는 KRIBB 전북분원의 송재준 박사연구팀에서 분리한 family 5 cellulase로서 대장균에서의 발현 및 활성이 이미 확인된 효소이다. 이에 본 연구에서는 *C. fimi* 유래 cex, 메타게놈 유래 CelEdx16의 활성도메인을 이용한 insoluble cellulose 분해연구를 진행하였다.



<그림 5-33. *C. fimi* 유래 재조합 섬유소 분해효소의 대장균 내 효소활성 확인. (가) 대장균 BL21(DE3)에서 효소활성을 조사한 결과, (나) 대장균 Rosetta-gamiB(DE3)에서 효소활성을 조사한 결과>

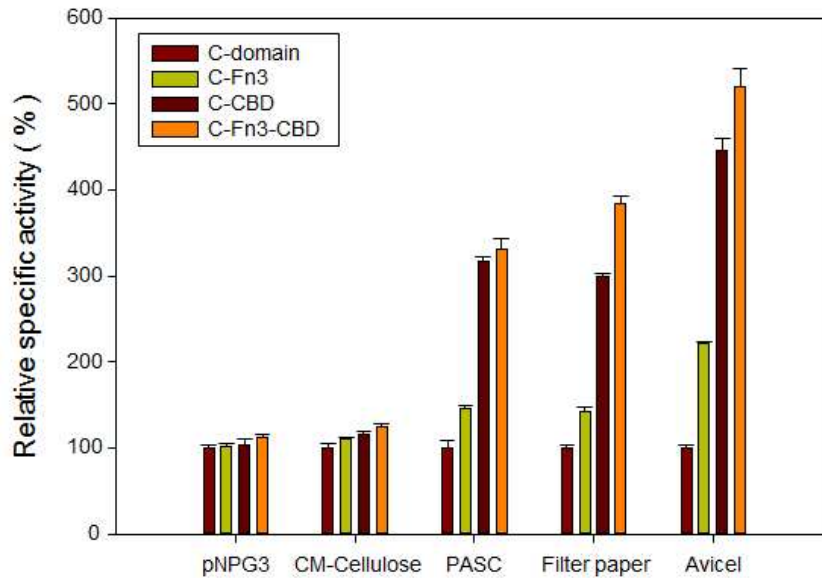
(4) 재조합 섬유소 분해효소 개발

먼저 메타게놈 유래 섬유소 분해 활성도메인인 CelEdx16를 pET21(a) 벡터에 클로닝 하고, 링커로 PT 링커를 삽입하고, 기질 바인딩 모듈로써 Fibronectin III domain, CBM3a (CBD) 를 융합한 유전자를 구축하여 insoluble cellulose에 결합하는 재조합 cellulase를 발현하였다. 위 유전자를 대장균에서 발현하고 아래와 같이 Histag affinity 컬럼으로 정제하였다 (그림 5-34).



<그림 5-34 CelEdx16, CelEdx16-Fn3, CelEdx16-Fn3-CBM3a 의 정제후 SDS-PAGE gel 사진>

정제된 효소를 가지고, 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 40°C 에서 0.2 mM p-nitrophenyl cellobiose, p-nitrophenyl cellotriose 를 가지고 활성을 측정하였다. 또한 insoluble 기질인 2% CMC, 0.5% PASC, 그리고 0.2% Avicel 을 가지고 활성을 측정하였다(그림 5-35).



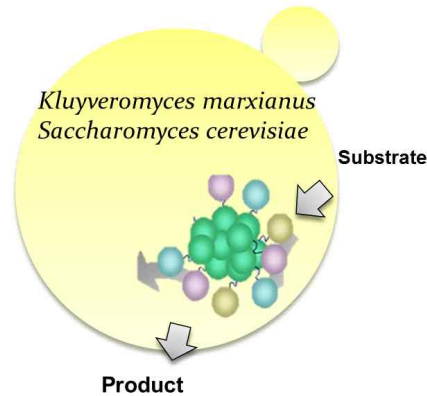
<그림 5-35 CelEdx16, CelEdx16-Fn3, CelEdx16-Fn3-CBM3a 의 p-nitrophenyl cellobiose, p-nitrophenyl cellotriose, CMC, PASC, 그리고 Avicel에 대한 활성 조사>

그 결과, p-nitrophenyl cellobiose, p-nitrophenyl cellotriose 에 대하여, 세가지 효소중 CelEdx16-Fn3-CBM3a에서 40% 정도의 활성의 감소가 보였지만, 활성 차이에서 뚜렷하게 변하지 않는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 5-35). 반면에 흥미롭게도 insoluble 기질인 2% CMC, 0.5% PASC, 그리고 0.2% Avicel 중에서 PASC 기질에서 야생형 효소인 CelEdx16과 비교하여 무려 CelEdx16-Fn3-CBM3a 융합 단백질이 3.5배 높은 활성을 나타내었다 (그림 5-35). 이는 야생형 효소인 CelEdx16에 바인딩 모듈로써 Fn3-CBM3a을 융합함으로써 인해 기질 친화도가 다른 효소를 확보하였음을 보여주는 결과이다. 자연계에 Insoluble cellulose 기질을 분해하는 효소가 많이 없음을 감안할 때, 본 연구에서 개발된 CelEdx16-Fn3-CBM3a 융합 단백질은 그 의미적으로 매우 가치가 높다.

2. *Kluyveromyces marxianus*에서 인공 대사집적체 형성 응용

본 사업은 기존 미생물시스템의 한계를 개선할 수 있는 고온성 효모 *Kluyveromyces marxianus* (KM) 세포공장 platform을 구축하고 섬유소계 바이오에너지 및 고부가 바이오신소재의 효율적 생산 기술을 개발하고자 하는 것이다. 결론적으로, 인공 대사집적체를 이용하여 산업유용물질 생합성을 하기 위해서, 고온성 효모인 *Kluyveromyces marxianus*에 응용하는 연

구에 본 연구는 응용될 수 있다. 먼저, CBD 융합단백질을 이용한 인공 대사집적체는 세포내 일반효소들로부터 물리적으로 분리된 상태에서 대사흐름을 유도하므로, 대사 중간물질이 세포에 유독할 지라도 숙주에 대한 해미지를 최소화 할 수 있다. 또한 하나의 효소 주변에 순차적으로 관여하는 효소들이 집적되므로 중간 생성물의 누수가 적고, 고정화효과에 의하여 효소안정성을 높이는 등 대사활성과 관련한 여러 난점들을 해결해 줄 것으로 기대되고 있다 (그림 5-36). 결론 적으로 본 연구결과는 고온성 효모(KM) 세포공장 구축을 위한 플랫폼기술로 이용될 수 있다.



<그림 5-36 효모 (*Kluyveromyces marxianus*) 에서 인공 대사집적체의 응용>

제 6 절 섬유소 바이오매스 분해/활용 시스템 개발

1. 재조합 셀룰레이즈 고분비생산 기술

가. Cellulase 유전자 대량 확보

섬유소 분해효소의 분비생산성 극대화를 위해서는 효모에서 발현율이 뛰어난 cellulase 유전자를 확보하는 것이 필수적이다. 따라서 기존에 알려진 곰팡이 유래의 cellulase 유전자를 대량 확보하여 효모발현시스템 개발에 활용하고자 하였다. Cellulose의 효율적 효소분해를 위해서 가장 많이 필요한 효소 (전체효소의 80-90% 정도)로서 본 연구에서는 5종의 exo-cellulase 유전자를 선별하여 효모에서 재조합 발현을 시도하였다. exo-cellulase는 cellulose의 양말단부터 cellobiose 형태로 절단하는 효소로서 reducing end와 non-reducing end로부터 hydrolysis하는 2가지 type의 효소를 필요로 한다. 이를 위해 곰팡이 *Humicola grisea*, *Talaromyces emersonii*, *Neosartorya fischeri*, *Chaetomium thermophilum* 유래의 CBH1과 *Chrysosporium lucknowense* 유래 CBH2 유전자를 활용하였다. 유전자 확보는 NCBI 염기서열 정보를 바탕으로 yeast의 translational machinery에 알맞도록 코돈 codon optimization 하여 인공적으로 합성하였다.

표 6-1. 확보된 5종의 exo-cellulase 유전자 및 특성

Cellulase	Source	GenBank Acc. Num.	Comments
HgCBH1	<i>Humicola grisea</i>	CAA35159	18 aa signal seq., With CBD, Low pNPC activity, High level secretion
TeCBH1	<i>Talaromyces emersonii</i>	AAL89553	18 aa signal seq., Hyper-glycosylation, No CBD domain, Low Avicel activity
NfCBH1	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001258278	26 aa signal seq, 60 kd, Hyper-glycosylation
CtCBH1	<i>Chaetomium thermophilum</i>	CAM98448.1	18 aa signal seq, 56 kd, Hyper-glycosylation, Higher Avicel activity
CICBH2	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	EMBL-Bank: HH793136.1	High level expression, High Avicel activity

곰팡이로부터 분리된 5종의 exo-cellulase 유전자를 효모 *S. cerevisiae* 균주에서 재조합 발현하여 각 효소의 특성을 분석하였다. 먼저 각각의 cellulase 유전자를 발현하기 위하여 자체의 분비시그널을 제외한 mature form 형태의 유전자를 각 유전자에 해당하는 forward와 reverse primer를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 cellulase 유전자를 다시 LNK39와 GT50R primer로 overlap extension PCR을 통하여 연결하였다. 이때 사용된 각각의 primer 서열은 표 6-2에 나타내었다.

표 6-2. 세포내 재조합 반응에 사용한 primer

Primer	sequence
TeCBH1_TFP_forward	ctcgccttagataaaaagaCAACAAGCAGGCACTGCAACG
TeCBH1_self sig_forward	<u>GAATTTTGGAAAATTCAAGAATTCATGCTTAGAAGAGCTCTTTTGC</u>
TeCBH1_TFP_reverse	cactccggttcaagtgcacTTACGAAGCGGTAAAGGTCG
NfCBH1_TFP_forward	ctcgccttagataaaaagaCAACAGGTCGGTACTTCC
NfCBH1_self sig_forward	<u>GAATTTTGGAAAATTCAAGAATTCATGCTGGCTTCCACCTTTTCC</u>
NfCBH1_TFP_reverse	cactccggttcaagtgcacTTACAGGCATTGAGAGTAAAAG
HgCBH1_TFP_forward	ctcgccttagataaaaagaCAGCAAGCGTGTAGTCTCACC
HgCBH1_self sig_forward	<u>GAATTTTGGAAAATTCAAGAATTCATGCGTACCGCCAAGTTTGC</u>
HgCBH1_TFP_reverse	cactccggttcaagtgcacTTACAAACATTGAGAGTACC
CtCBH1_TFP_forward	ctcgccttagataaaaagaCAACAAGCGTGTTCCTC
CtCBH1_self sig_forward	<u>GAATTTTGGAAAATTCAAGAATTCATGATGTATAAGAAGTTTGC</u>
CtCBH1_TFP_reverse	cactccggttcaagtgcacTTACAGACACTGAGAATACC
CICBH2_TFP_forward	ctcgccttagataaaaagaGCACCAGTAATAGAAGAAAGAC
CICBH2_self sig_forward	<u>GAATTTTGGAAAATTCAAGAATTCATGGCCAAAAAGTTGTTTATTACC</u>
CICBH2_TFP_reverse	cactccggttcaagtgcacTTAGAATGGTGGATTGCG

대량의 cellulase 유전자를 용이하게 효모세포로 도입하고 형질전환체를 확보하기 위해서 일반적 cloning 방법과 달리 ligation-free 형질전환시스템을 구축하였다. 유전자 말단이 서로 상보적인 선형벡터와 선형유전자를 효모세포에 도입하고 세포내에서 상동성을 가지는 부분에 의해서 원형의 plasmid가 제조되도록 하였다. 이를 위해 cellulase 유전자 말단에 삽입한 서열과 동일한 서열을 함유하는 벡터 YGa-TFPs를 제작하였다. 이는 제한효소 SmaI으로 처리하면 상보적인 말단이 노출될 수 있도록 고안되었다. PCR을 통해서 제조된 각 cellulase 유전자와 SmaI으로 처리된 선형벡터를 효모 균주에 형질전환하고 세포내 재조합을 통해서 24개의 TFP를 함유한 벡터에 cellulase 유전자를 용이하게 도입할 수 있었다. 효모 형질전환체를 무작위적으로 선별한 후 test tube에서 현탁배양하였다. 각각의 배양상등액을 농축하여 SDS-PAGE 분석하고 cellulase의 분비량이 많은 균주를 1차 선별하였다(그림 6-1).

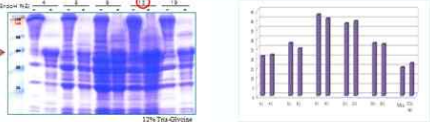
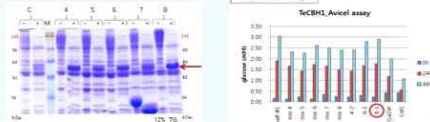
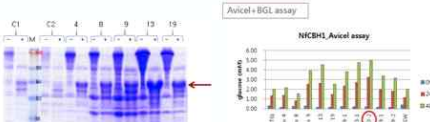

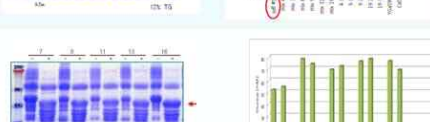
Cellulase	Yeast expression	Comments
HgCBH1		<ul style="list-style-type: none"> • 18 aa signal seq. • With CBD • Low pNPC activity • High level secretion
TeCBH1		<ul style="list-style-type: none"> • 18 aa signal seq. • Hyper-glycosylation • No CBD domain • Low Avicel activity
NfCBH1		<ul style="list-style-type: none"> • 26 aa signal seq, 60 kd • Hyper-glycosylation
CtCBH1		<ul style="list-style-type: none"> • 18 aa signal seq, 56 kd • Hyper-glycosylation • Higher Avicel activity
CICBH2		<ul style="list-style-type: none"> • High level expression(~2g/L) • High Avicel activity • 5 fold improvement of secretion with TFP

그림 6-1. 5종의 exo-cellulase 고발현 균주의 선별을 위한 SDS-PAGE 분석

결과에서 보는 바와 같이 대부분의 exo-cellulase 유전자는 효모에서 분비생산되면서 glycosylation되어 실제크기보다 큰 위치에 나타났으며 이들은 endoglycosidase (Endo-H)에 의해 제거될 경우 실제 크기의 단백질로 확인되었으나 TFP 종류에 따라 cellulase의 분비된 정도는 상당한 차이를 보였다.

5가지의 exo-cellulase 유전자 중에서 HgCBH1과 NfCBH1이 강한 밴드들이 관찰되었지만 발현량이 증가한다고 해서 cellulose를 잘 분해하는 것은 아니다. 즉, cellulase 활성을 제대로 가지면서 발현이 높아지는 균주 확보가 중요하다. 이를 확인하기 위해 avicel assay를 이용하여 활성을 조사하였다.

효모에서 분비 발현된 cellulase 단백질의 활성을 확인하기 위하여 100 μ l의 효소 용액을 0.9ml의 기질용액 (2% Avicel pH-105 cellulose, 0.04% sodium azide, 0.3 μ l Novozyme-188, 50 mM sodium acetate buffer (pH5.0)과 35 $^{\circ}$ C, 1000rpm에서 48시간동안 반응하였다. 48시간동안 분해된 sugar의 양을 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)를 이용하여 측정하였다. Avicel 활성분석 결과 ClCBH2가 가장 높은 활성을 보였고 CBH1 type 중에서는 HgCBH1이 가장 높은 활성을 보였다. 따라서 고분비 발현을 위한 최종 균주로서 효소 활성이 가장 좋은 ST13-HgCBH1과 ST13-ClCBH2를 선택하였다.

나. 섬유소 분해효소 β -glucosidase (SfBGL1)의 분비 발현

*K. marxianus*에서 *Saccharomycopsis fiburigera*유래의 β -glucosidase (SfBGL1)를 분비 발현하기 위해 plasmid pYGa-ST19-SfBGL1으로부터 STFP19-SfBGL1을 PCR로 증폭 후 KmGAPDH promoter에 도입하여 발현벡터를 구축하였다 (그림 6-3). 구축된 vector를 제한효소 Nhe I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들고 URA3 auxotroph균주인 7155u와 25571 균주에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일 균주를 선별하였다. 형질전환체들의 β -glucosidase 활성을 분석하기 위해 esculin이 포함된 EGDA 평판배지 (Esculin Gel Diffusion Assay : 0.2 M sodium citrate buffer (pH6.0), 0.2% esculin)에 배양 상등액 5 μ l를 dotting한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응한 결과 negative control인 7155u와 25571에서는 활성환이 보이지 않았고, 28종의 형질전환체에서 활성환을 확인하였다(그림 6-4). 또한 pNPG 분석법을 통해 28종의 형질전환체들의 β -glucosidase 활성을 비교하였다. 0.1ml의 효소 용액을 0.9ml의 기질용액(100mM citrate-phosphate buffer(pH5.0), 1mM의 p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)와 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 반응용액과 동량의 30% Na₂CO₃를 첨가해 반응을 멈추고, 410nm에서 흡광도를 측정한 결과 선별된 모든 형질전환체에서 β -glucosidase 활성을 확인하여 SfBGL1을 분비 생산하는 것으로 확인하였다(표 6-3). 그러나 양성대조균으로 사용한 SfBGL을 생산하는 효모 *S. cerevisiae*에 비해 활성이 약한 것으로 확인되었는데 이는 multicopy plasmid를 사용한 SC에 비해 KM 균주는 단일유전자만을 사용한 차이로 판단된다.

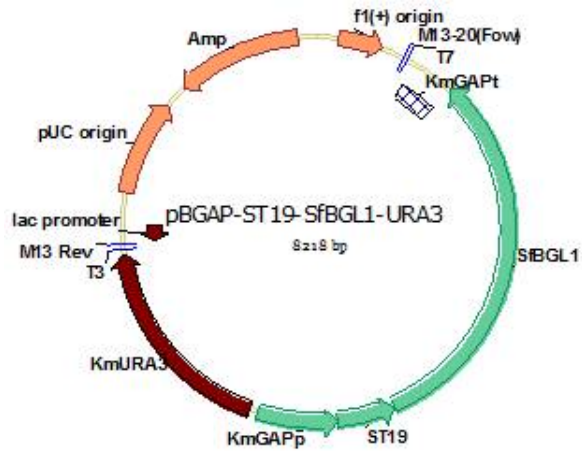


그림 6-3. SfBGL1 발현을 위한 *K. marxianus* vector

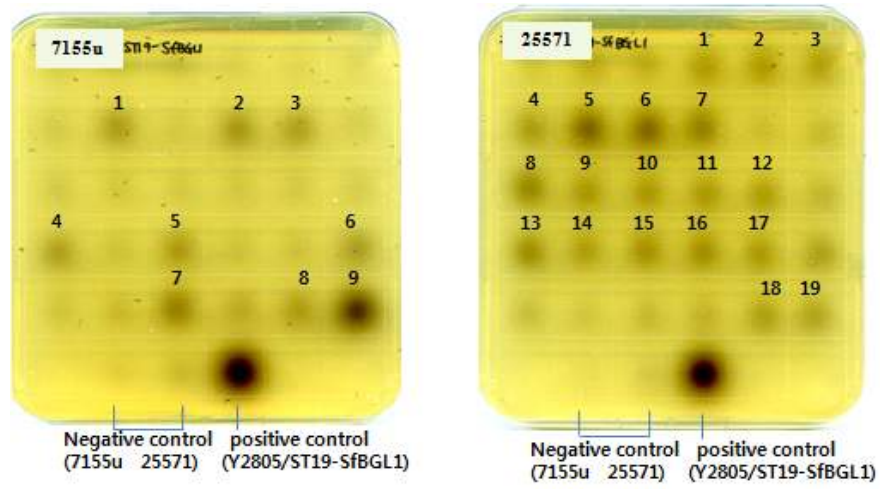


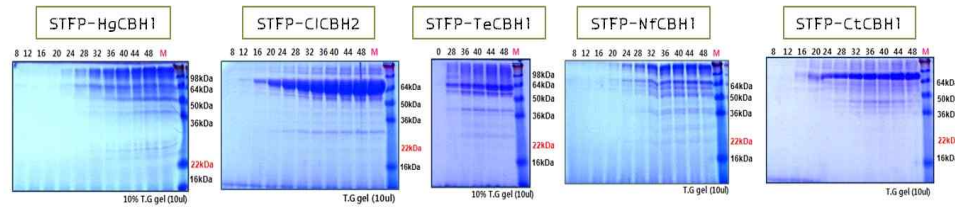
그림 6-4. Esculin이 포함된 EGDA 평판배지에서 β -glucosidase 활성 분석

표 6-3. 형질전환체들의 β -glucosidase 활성 분석

transformant	Activity (u/ml)
Negative control	0.1
Positive control	46
1	15
2	14
3	16
4	14
5	14
6	15
7	15
8	16
9	14
10	15

다. 유가식 배양을 통한 cellulase의 대량생산

선별된 균주로부터 각각의 cellulase를 대량생산하기 위하여 5L 발효조를 이용하여 유가식 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. 사용한 균주로는 Y2805-HgCBH1, Y2805-TeCBH1, Y2805-NfCBH1, Y2805-CtCBH1 및 Y2805-CiCBH2 이며 각각의 발효결과는 그림 6-5에서 보는 바와 같고 배양 시간별로 채취한 배지 10ul를 SDS-PAGE 분석하여 각 cellulase의 분비량을 확인하였다. Cellulase의 분비량은 효소의 종류에 따라서 차이가 있었으나 1-2 g/L 수준으로 분비생산됨을 확인하였다. 발효생산된 각각의 cellulase는 농축, 탈염과정을 거쳐 각각의 효소활성을 분석하고 냉동보관하여 다양한 cellulase cocktail 제작에 활용하였다.



Insoluble substrate : Avicel

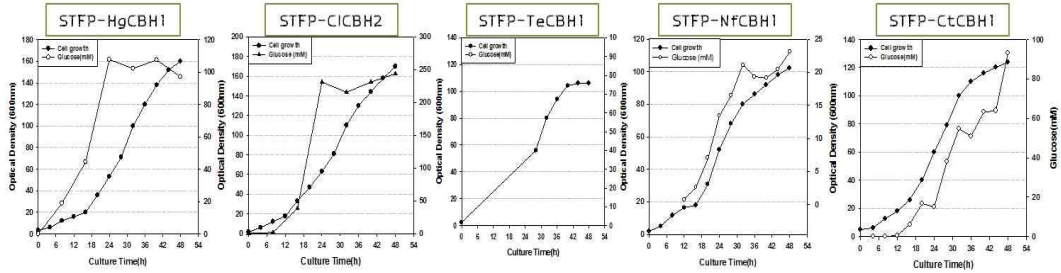


그림 6-5. Exo-cellulase 생산 효모균주의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석

라. 재조합 cellulase cocktail의 제조 및 활성개량

현재까지의 연구를 통하여 효모에서 분비 발현율이 뛰어난 셀룰라제 유전자를 대량 확보하였으며 맞춤형 분비발현 기술 (TFP technology)을 이용하여 각각의 효소를 대량 분비하는 효모 균주를 제작하였고 유가식 배양을 통하여 각각의 효소를 대량 확보하였고 발현된 효소의 조합을 통하여 다양한 셀룰라제 콕테일을 제조하였다. 엑소글루카네이즈인 CBH1과 CBH2는 다양한 곰팡이 유래의 효소를 사용하였으며 endo-cellulase는 *Trichoderma reesei* 유래의 EGL2를 TFP 기술로 분비활성 개량한 효소이며 β -glucosidase는 *Saccharomycopsis fibuligera* 유래로 TFP 기술로 개량한 효소를 사용하였다. 재조합 cellulase cocktail은 CBH1, CBH2, endo-cellulase, β -glucosidase의 비율을 1차적으로 곰팡이 유래 cellulase 구성 기준으로 3.5 : 3.5 : 2 : 1로 고정하여 분석에 이용하였다. 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 콕테일 제조에 사용하였다. 아래 표 6-4는 제조된 콕테일의 filter paper 활성을 단백질 g당 FPU로 나타낸 결과이며 표 6-5는 Avicel 분해를 통해 생성된 glucose의 양을 비교한 결과이다.

신규 exo-cellulase인 HgCBH1과 CiCBH2 (KCC2) 또는 CtCBH1과 CiCBH2 (KCC3)를 첨가했을 때 기존 버전의 KCC-1 (*Polyporus arcularius* 유래의 CBH1과 CBH2)보다 활성이 대폭 개선되었음을 확인하였다. Filter paper 활성은 Novozyme사의 cellulclast에 0.5% Novozyme 188 (BGL) 첨가한 경우 대비 여전히 활성이 약했지만 KCC1 대비 KCC3이 8.8배, KCC2 대비 KCC3이 2.65배 개선되었다. 각 효소 콕테일의 활성을 crystalline cellulose인 Avicel을 이용하여 확인한 바 KCC3이 KCC1보다는 약 10배 개선되었고 KCC2 보다는 약 2배 개선되었음을 확인되어 filter paper 활성과 유사하게 활성 증가되었음을 확인하였다.

표 6-4. 재조합 효소 cocktail을 이용한 filter paper 활성 비교

Cellulase cocktail	Protein (mg/ml)	U/ml	FPU/g
KCC1 (PaCel1+PaCel2)	22.72	0.30	13.06
KCC2 (HgCBH1+CICBH2)	21.90	0.95	43.27
KCC3 (CtCBH1+CICBH2)	23.01	2.64	114.83
Celluclast +Novozyme 188 (0/5%)	124.36	37.37	300.54

표 6-5. 재조합 효소 cocktail을 이용한 Avicel 분해활성 비교

Cellulase cocktail	Protein (mg/ml)	mM(glucose)
KCC-1	24.6	168.8
KCC-2	24.3	811.4
KCC-3	22.9	1658.6

그러나 특이하게 전처리한 바이오매스에 대한 특이활성 (Specific activity)은 Celluclast보다 재조합 효소 콕테일이 대부분 높게 나왔으며 KCC3이 KCC1보다는 약 2.2배 개선되었고 KCC2 보다는 약 1.5배 개선되었다. KCC3의 경우 Celluclast 보다 약 2.7배 활성이 높았다. 이러한 결과는 섬유소 기질에 따라 활성 차이가 크다는 것을 의미하며 바이오매스에 따른 최적 효소 콕테일의 제조 및 적용이 필요하며 이를 통해 효소 비용을 절감할 것으로 예상되었다.

표 4-6. 재조합 효소 cocktail을 이용한 전처리 바이오매스 활성 비교

Cellulase cocktail	Protein (mg/ml)	Glucose (mM)
KCC1	24.6	318.9
KCC2 (HgCBH1+CICBH2)	24.3	467.9
KCC3 (CtCBH1+CICBH2)	22.9	708.7
Celluclast +Novozyme 188 (0/5%)	123.4	262.2

2. 재조합 섬유소 분해효소 콕테일 개선

가. 신규 엑소셀룰레이즈의 도입을 통한 콕테일 개선

현재까지 70여종의 곰팡이 셀룰레이즈 유전자를 효모에서 재조합 발현하여 그 중 발현율이 우수한 당화효소를 다수 발굴하였다. 이러한 과정을 통해 재조합 생산된 효소를 이용하여 제조된 당화효소 콕테일인 KCC의 활성을 결정하는 가장 중요한 요소가 *exo-cellulase*이며 원활한 바이오매스의 분해를 위해서는 상당량의 강력한 *exo-cellulase*가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 재조합 당화효소 콕테일 개발을 위해서는 지속적인 고성능의 엑소셀룰레이즈의 발굴을 통해 KCC의 개선이 요구된다. 추가적인 엑소셀룰레이즈의 발굴 및 기능 개선을 위해 복합 기능 효소를 도입 및 활용하였다. *Cellulomonas fimi* 유래의 Cex (CfCEX)는 *exo-cellulase* (CBH) 활성 뿐 만 아니라 *endo-xylanase*의 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이를 효모에 도입하여 TFP 기술을 이용하여 분비발현 하였다.

그림 6-6에서 보는 바와 같이 다수의 균주에서 CfCEX로 판단되는 단백질의 분비가 확인되었으나 glycosylation 된 상태로 발현되었다. 이들 중 몇 종의 균주를 선택하여 Endo-H를 이용하여 당질을 제거한 결과 그림 6-7에서 보는 바와 같이 약 50kd의 CfCEX단백질이 과분비 발현되었음을 알 수 있었고 각각의 활성을 분석한 결과 Y2805(YGa-TFP13-CfCEX)가 가장 높은 활성을 보였다.

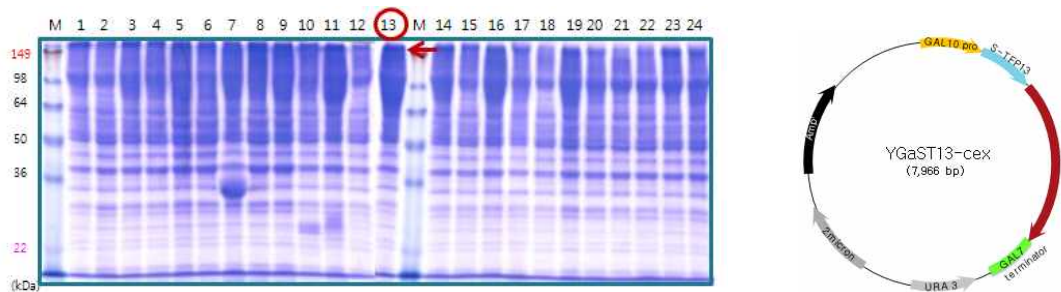
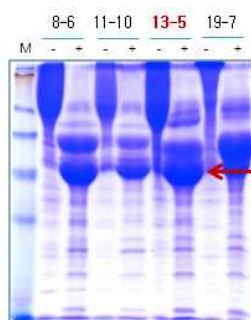


그림 6-6 CfCex 고발현 균주의 선별을 위한 SDS-PAGE 분석 및 선별 벡터



Strain	pNPL activity (U/ml)	pNPC activity (U/ml)
8-6	150.9	1569.8
11-10	86.3	1183.7
13-5	210.0	2076.7
19-7	107.6	1129.1

그림 6-7. Deglycosylation을 통한 목적 단백질의 발현 확인

선별된 Y2805(YGa-TFP13-CfCex) 균주를 이용하여 CfCex를 대량생산하기 위하여 5L 발효조를 이용하여 유가식 배양하여 효소를 대량 확보하였다(그림 6-8).

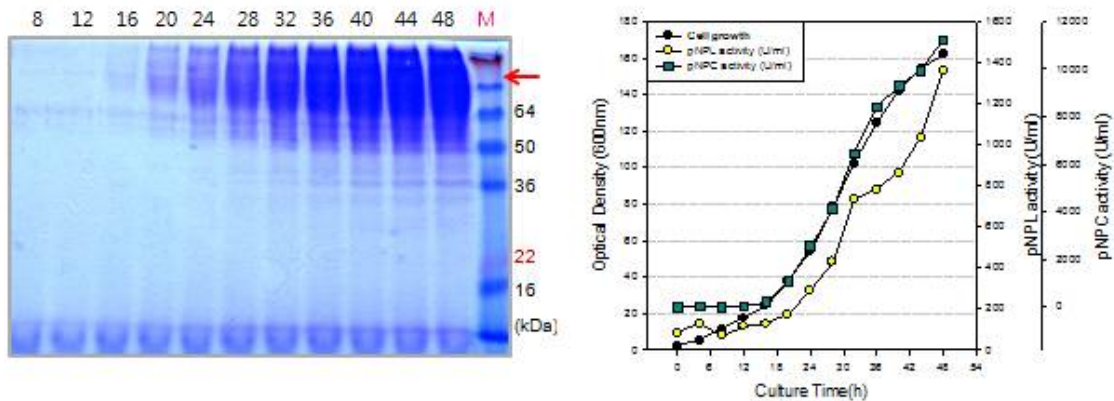


그림 6-8. Exoglucanase 생산 효모균주 Y2805-ST13-CfCex의 유가식 발효배양 및 분비단백질 분석

발효 배지를 농축 정제한 후 표 6-7에서 보는 바와 같이 제조된 cellulase cocktail을 이용하여 전처리한 바이오매스 EFB를 대상으로 활성 분석한 결과 KCC4 (CfCex)가 KCC3 (CtCBH1)보다 130% 활성 개선되었음을 확인하였다. 이러한 효과는 KCC4에 추가로 첨가된 효소 CfCex는 앞서 언급한 바와 같이 exo-cellulase 활성 분 아니라 hemicellulose 분해효소인 endo-xylanase 활성을 갖는 것으로 알려져 있으므로 전처리 바이오매스에서 KCC3보다 높은 활성을 갖는 이유가 xylanase 활성과 연관이 있을 것으로 예상되었다.

표 6-7. 효소 각테일별 바이오매스 당화 활성

Cellulase cocktail	Protein (mg/ml)	Glucose (mM)
KCC1 (PeCel1, PeCEL2, TrEGL2, SfBGL1)	9.9	1.6
KCC2 (HgCBH1, ClCBH2, TrEGL2, SfBGL1)	8.8	4.8
KCC3 (CtCBH1, ClCBH2, TrEGL2, SfBGL1)	8.9	12.9
KCC4 (CfCex, ClCBH2, TrEGL2, SfBGL1)	8.7	16.8

이러한 효과를 확인하기 위하여 효모를 이용하여 재조합 대량생산된 곰팡이 *T. reesei* 유래의 β -xylosidase (BXL)과 endo-xylanase (XYNII)를 각 효소각테일에 첨가하여 NaOH로 전처리된 벚짚을 대상으로 활성을 비교한 결과, KCC3에 β -xylosidase (BXL)를 첨가한 경우보다 endoxylanase (XYNII)를 첨가했을 때 약 600%의 활성이 개량되었다(표 6-8). 그러나 이미 xylanase의 활성을 함유하고 있는 KCC4에서는 xylanase를 추가한 경우 약 130% 활성 개선에

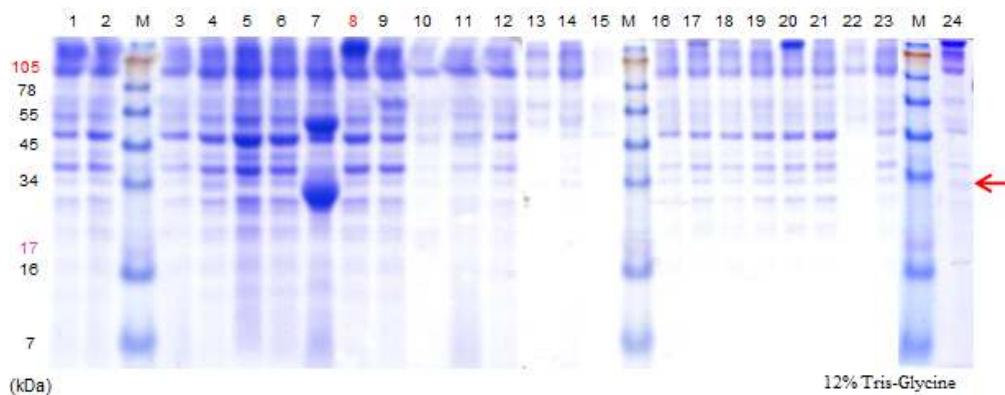
그쳤다. 따라서 전처리 바이오매스에서는 cellulase의 활성이 분해되지 못하는 hemicellulose에 의해 활성이 방해 받고 있기 때문으로 추정되었으며 효과적인 cellulase cocktail 개발을 위해서는 cellulase 뿐만 아니라 hemicellulase가 동시에 포함된 형태로 개발하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

표 6-8. 효소 각테일별 전처리 바이오매스 당화활성

Cellulase cocktail	Reducing sugar (mM)
KCC-3+buffer	0.66
KCC-3+Trbxl	0.74
KCC-3+Trxyn	4.55
KCC-4+buffer	1.60
KCC-4+Trbxl	2.19
KCC-4+Trxyn	2.21

다. 당화보조 효소의 분비 생산

선행연구 결과에서 KCC3 각테일은 섬유소 바이오매스 당화를 최소한의 구성임을 확인하였으나 곰팡이 셀룰레이즈에 비해 활성이 약한 이유를 개선하기 위하여 4가지 효소 CBH1, CBH2, BGL, EGL 이외에 보조인자를 발굴하고자 하였다. 곰팡이 유래의 효소중 당화보조 기능을 갖는 것으로 알려진 GH61E, CBM33, HiCDH 같은 효소를 보조효소로 활용하고자 효모에 과발현하였다.



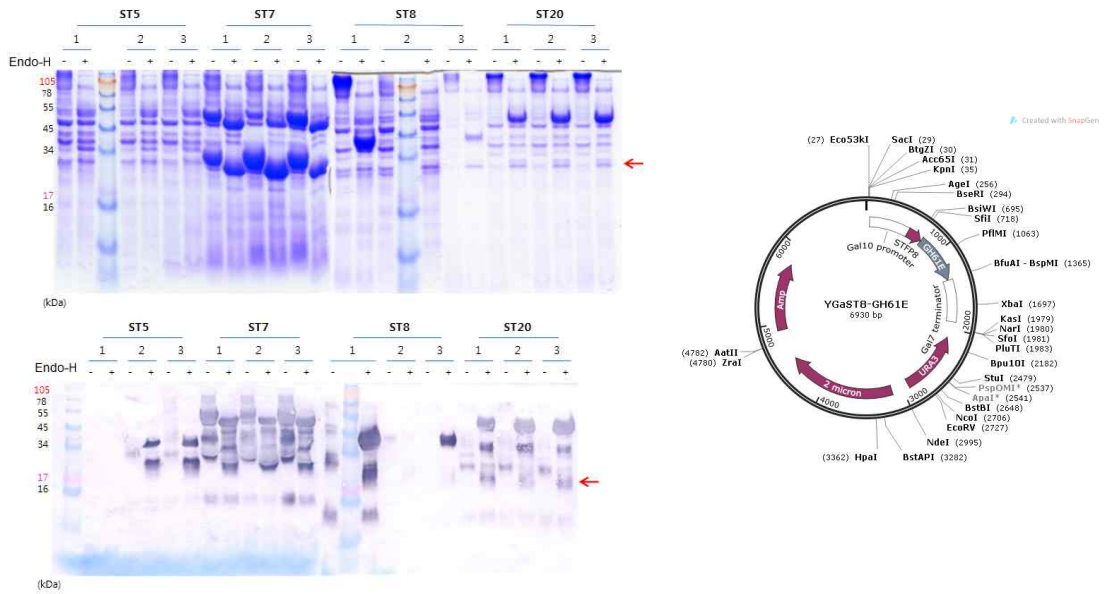


그림 6-9. 효모 TFP기술을 이용한 GH61E의 과발현 확인 및 최종 균주 선별

그림 6-9에서 보는 바와 같이 합성된 GH61E 유전자를 효모의 코돈에 최적화하여 합성하고, *S. cerevisiae* 균주에서 발현하기 위하여 분비시그널을 제외한 mature form GH61E 유전자를 24 종류의 단백질 분비융합인자(TFP, Translational Fusion Partner)를 함유한 벡터와 함께 효모에 형질전환 후 과발현을 유도하였다. His tagging을 통하여 GH61E의 발현을 확인하였고 ST8-GH61E를 최종 균주로 선별한 뒤 5L 발효조에서 유가식 발효로 대량 생산하였다. 그림 6-10은 ST8-GH61E 균주의 발효 시간별 SDS-PAGE 분석 결과와 각 시간별 세포 OD를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

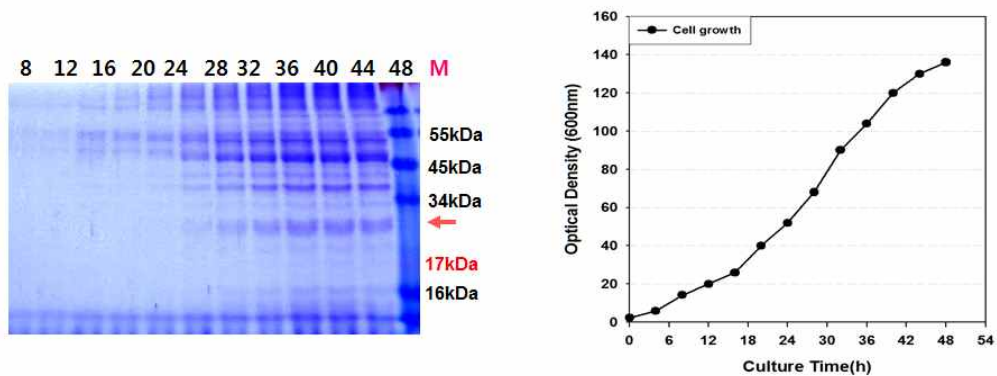


그림 6-10. 효모균주 Y2805-ST8-GH61E의 유가식 발효배양 및 세포 성장

아래 그림 6-11은 원핵 생물 유래의 CBM33 유전자를 효모의 코돈에 맞추어 합성한 뒤 24 종류 TFP와 함께 Y2805Δgal80 균주에 과발현한 결과이다. 최종적으로 발현량이 가장 많은

ST19-CBM33을 선별하였다. 또한, 최종 선별한 Y2805Δgal80-ST19-CBM33 균주를 이용하여 5L 유가식 발효를 진행하였고 이로부터 효모에서 대량생산한 CBM33 분비 단백질을 확보하였다 (그림 6-12).

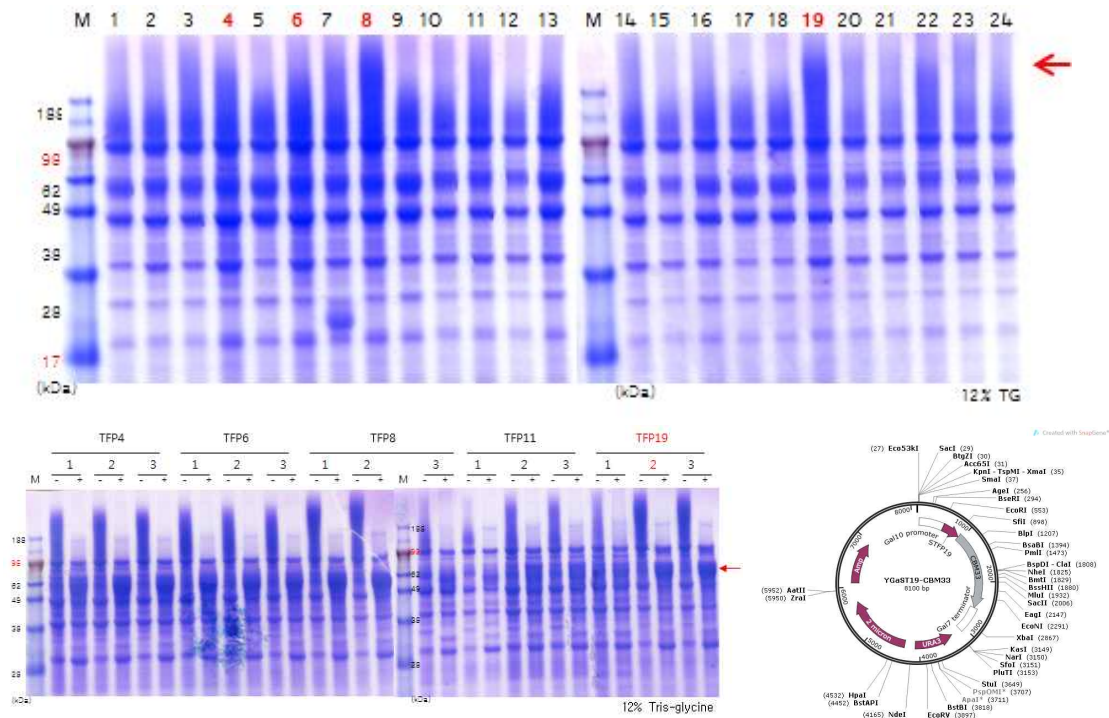


그림 6-11. 24 종류 TFP를 이용한 CBM33 과발현 확인 및 최종 균주 선별

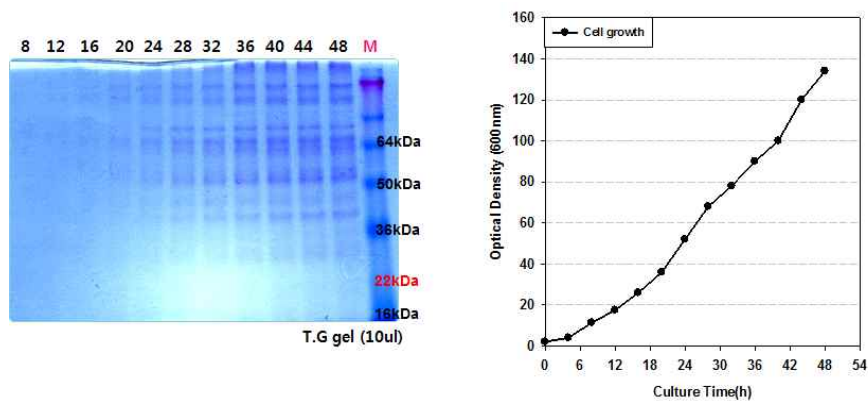


그림 6-12. 효모균주 Y2805Δgal80-ST19-CBM33의 유가식 발효배양 및 세포 성장

곰팡이 유래의 HiCDH (cellobiose dehydrogenase)는 올리고- 또는 모노- 형태의 당류를 기질로 과산화수소(H₂O₂)를 생성할 수 있기 때문에 산화환원 반응 중재자(redox mediator) 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그림 6-13은 합성된 HiCDH 유전자를 Y2805 균주에서 발현하기 위하여 분비시그널을 제외한 mature form CDH 유전자를 24 종류의 TFP 벡터와 함께 효모에 형질전환 후 과발현 확인한 것으로, 그 중 과발현이 확인된 TFP 3, 7, 8, 19번의 단일 균주들로부터 표 6-9에 HiCDH 효소 활성을 분석하였고 그로부터 Y2805-ST8-HiCDH 균주를 최종 선별하였다.

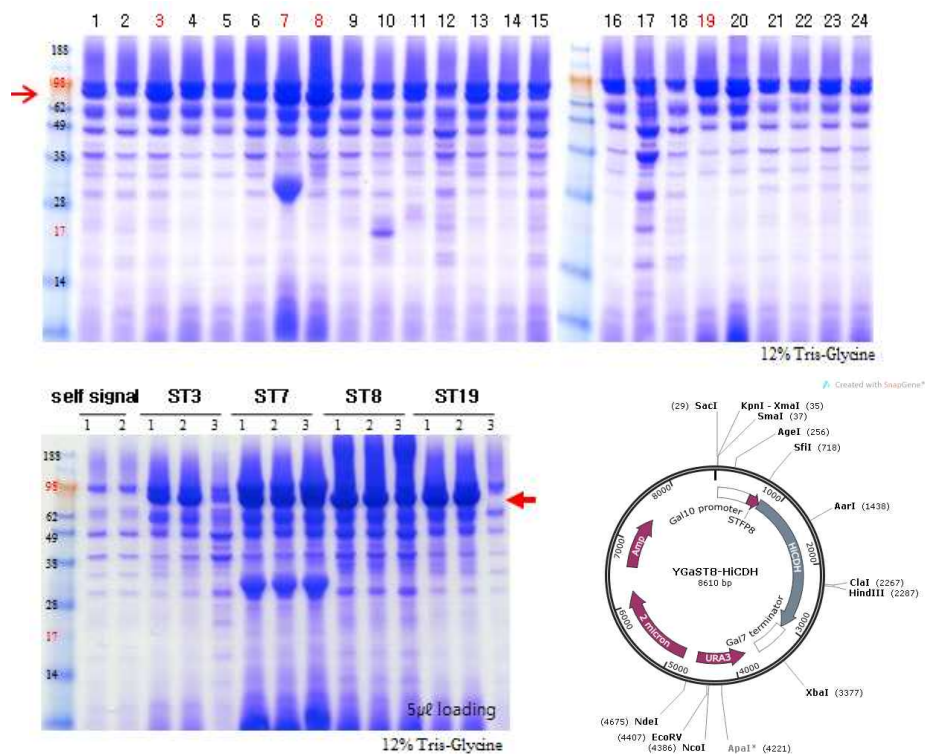


그림 6-13. 24 종류 TFP를 이용한 HiCDH 과발현 및 단일 균주 선별

HiCDH 효소 활성은 30mM Cellobiose가 포함된 McIlvaine 버퍼에 용해되어 있는 2,6-dichloroindophenol (DCIP)가 30분 동안 감소되는 정도를 520nm에서 측정하여 분석하는 것으로, 반응 시간 동안 변화량이 클수록 CDH 활성이 강한 것으로 볼 수 있다. 최종 선별된 Y2805-ST8-HiCDH 균주는 대량 생산을 위하여 5L 발효조에서 유가식 발효를 진행하였다 (그림 6-14).

표 6-9. 30분 동안의 OD 변화량을 분석하여 HiCDH의 Cellobiose 분해활성 비교

TFP No.	ΔOD(30min)	TFP No.	ΔOD(30min)
Self signal #1	0.16	8-1	0.78
Self signal #2	0.17	8-2	0.74
3-1	0.75	8-3	0.75
3-2	0.77	19-1	0.67
3-3	0.39	19-2	0.73
7-1	0.71	19-3	0.30
7-2	0.66	negative control (IftA)	0.10
7-3	0.55	blank	0.11

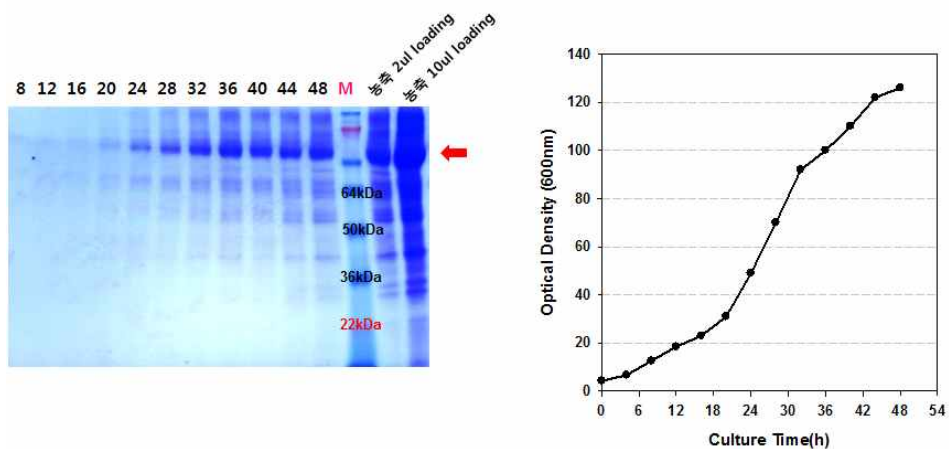


그림 6-14. 효모균주 Y2805-ST8-HiCDH의 유가식 발효배양 및 세포 성장

마. 셀룰레이즈 카테일에 보조인자 GH61E, HiCDH, CBM33 등을 첨가한 활성 개선

상기의 세 보조 효소 GH61E, HiCDH, CBM33는 효모에서 유가식 발효를 통하여 대량 확보 할 수 있었고, KCC3 카테일 효소에 첨가하여 그 효능을 검증하고자 하였다. 이를 확인하기 위해 총 100ml의 50mM sodium acetate, pH5.0 버퍼에 3% Avicel, 0.04% sodium azide, 2FPU/g 셀룰로스 상용화 효소 (C-Tec + H-Tec (7:3))가 첨가된 용액에 CBH1:CBH2:EGL:BGL이 각각 4:4:1:1 비율로 섞인 KCC3 효소 19.2mg을 섞고 GH61E, HiCDH, CBM33을 1mg씩 사용하여 몇 가지 조합을 구성한 뒤 당화 실험하였다. 그림 6-15는 반복 실험한 결과들의 평균치를 나타내는데, KCC3 단독으로 당화 실험한 경우보다 보조효소를 함께 반응하였을 때 약 9 ~ 17% 당화

능이 향상되었음을 확인할 수 있었다.

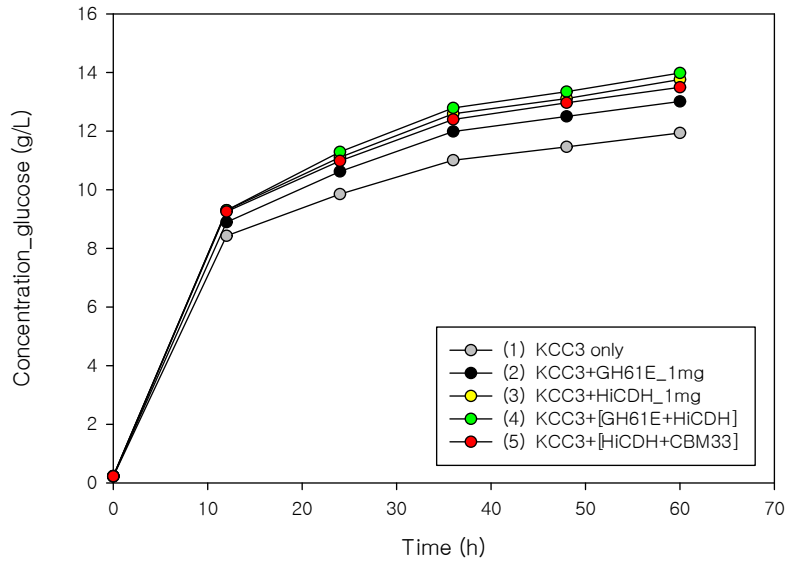


그림 6-15. Avicel을 이용한 KCC3 효소 각테일과 보조 효소 GH61E, HiCDH, CBM과의 당화 시너지 효과

아래 그림 6-16은 상용화 효소 사용 없이 상기와 동일한 조건으로 KCC3에 각 보조 효소를 범례와 같이 첨가하고, Avicel 대신 바이오매스로서 2% NaOH로 160°C, 1시간 처리 후 중화하여 건조분쇄한 3% 볏짚을 기질로 24시간 동안 당화하여 HPLC로 분석한 결과이다. 각 보조 효소들은 1mg씩 사용되었고 CBM33의 구조 안정에 영향이 있는 것으로 알려진 구리2가 금속이온은 0.1mg씩 사용되었다. 그 결과 상용화 효소를 사용하지 않았기 때문에 전반적인 활성이 약했지만 KCC3 단독으로 당화한 경우보다 보조효소 사용 시 약 20 ~ 30% 정도 당화능이 향상됨을 확인하였다. 따라서 당화보조효소로서 상기한 3가지 효소의 활성이 유효함을 확인하였고 향후 재조합 당화효소 각테일의 요소 효소로서 활용할 수 있음을 확인하였다.

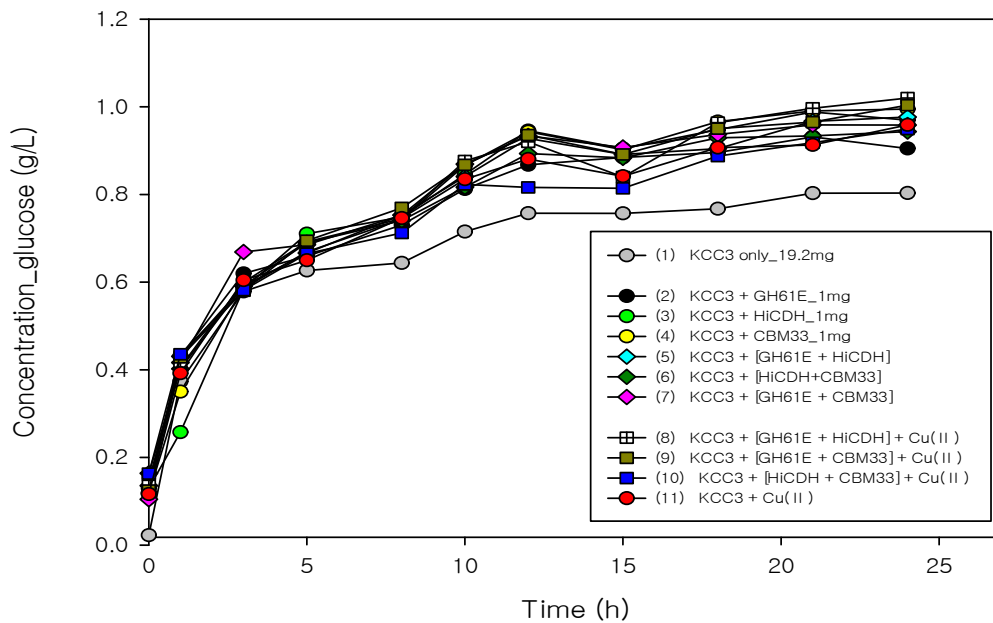


그림 6-16. 전처리 벧짚을 이용한 KCC3 효소 콕테일과 보조 효소 GH61E, HiCDH, CBM33, Cu(II)과의 당화 시너지 효과

바. 셀룰레이즈 콕테일 활용 곰팡이 당화효소 대체 효과

바이오매스 당화에 사용되는 상용화 효소는 가격이 고가이므로 바이오에너지 생산단가 부담이 매우 큰 요소이다. 본 연구에서 개발된 재조합 효소 [kribb cellulase cocktail(KCC)]는 곰팡이 효소에 비해 생산성이 낮아 곰팡이 효소를 전량 대체하기는 어려울 수 있으나 바이오매스에 따라 곰팡이 효소에 부가하여 효소 사용량을 절감하는 효과는 기대할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 상용화 효소인 Cellulclast 1.5L을 각각 0~25FPU/g cellulose의 수준으로 첨가하고 KCC효소를 1.5FPU의 상태로 첨가하여 주었을 때 당화율은 어떻게 변화하는지 확인하였다. 사용된 기질은 2% NaOH 전처리된 해조류 유래의 cellulose를 사용하였다. 당화조건으로는 볼륨 50ml, 10%(w/w), 50mM sodium citrate buffer(pH4.8), 50°C, 200rpm의 조건으로 실험을 진행하였으며 총 48시간의 당화시간동안 시간별로 샘플링을 진행하여 HPLC로 glucose를 정량하였으며 이를 기질이 가진 총 cellulose를 토대로 glucose로의 전환율로 환산하였다.

실험결과 KCC를 혼합한 실험군이 Cellulclast 1.5L을 단독적으로 사용한 실험군 (그림 6-17 B)에 비해서 당화율이 급격하게 상승하는 것을 확인 할수 있었다(그림 6-17A). 5 FPU/g cellulose 의 실험군의 경우 KCC를 넣지 않은 실험군의 당화율이 48시간에 37% 였고 KCC를 혼합하였을 때 80% 이상의 전환율을 보여 2배 이상의 전환율을 보였다. 이는 더 많은 효소를 첨가해주었을 때도 같은 효과를 보여 KCC의 첨가에 의한 cellulase의 전체 활성이 증가되었고 이를 통해 glucose의 생성이 많았던 것으로 사료된다. 고가인 상용화 효소의 사용량을 줄이고 본 연구를 통해 재조합 생산 가능한 KCC를 낮은 농도로 넣어줌으로써 고효율의 효소당화시스템을 구축할 수 있었다. 따라서 KCC 효소의 점진적 개량을 통해서 바이오매스 당화 비용을

절감할 수 있을 것으로 판단된다.

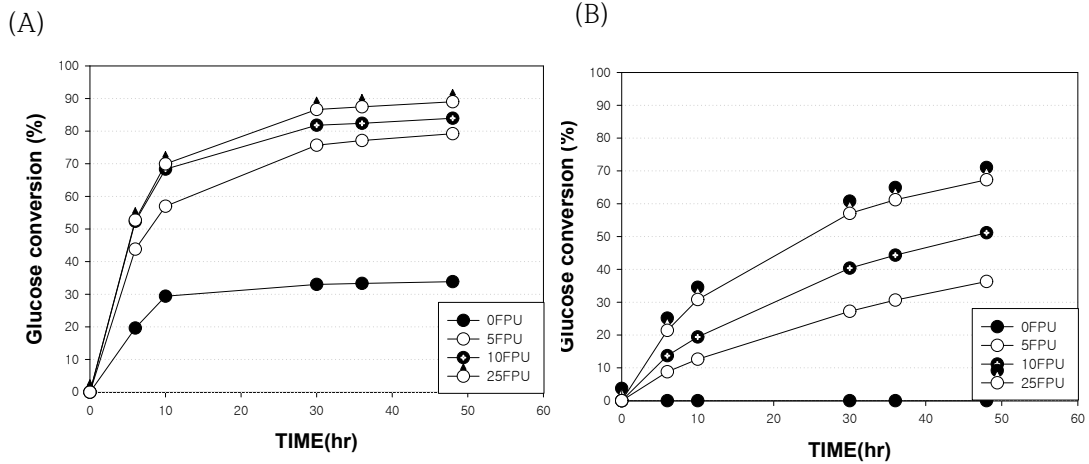


그림 6-17. Celluclast 1.5L과 KCC의 혼합 후 바이오매스의 당화
 (A) Celluclast 1.5L 0~25FPU/g cellulose + Kribb Cellulase Cocktail 1.5FPU
 (B) Celluclast 1.5L 0~25FPU/g cellulose

사. 돼지감자 전처리 및 섬유소 당화조건 최적화

Cellulase에 의한 당화 효율을 높이기 위해서는 바이오매스를 산이나 알칼리에 의한 전처리는 필수로 거쳐야 하는 과정이다. 섬유소 바이오매스로서 돼지감자대 분쇄산물을 이용하여 산과 알칼리로 전처리한 후 효소 당화율을 비교하였다. 바이오매스의 알칼리 전처리는 고액비 1:10 (S/L), 2% NaOH용액, 120°C, 60min으로 산 전처리 방법은 1% H2SO4, 120°C, 30min의 고온 고압 반응 전처리하였다. 전처리 후 상등액은 제거하고 남아있는 기질을 세척, 중화, 건조하여 실험에 사용하였다. Cellulase에 의한 당화조건으로는 고액비 1:20 (S/L), 또는 1:10 (S/L)으로 50mM sodium citrate buffer (pH4.8)을 사용하여 총 부피 50ml로 진행하였다. 이 반응용액에 상용화 효소인 Celluclast 1.5L + novozyme A188 (celluclast 1.5L 볼륨의 1/10)를 cellulose g당 20 FPU이 되도록 첨가하여 50°C, 300rpm에서 72시간동안 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 비 전처리에 비해 높은 수준의 당화율을 보였으며 산 전처리에 비해 알칼리 전처리의 수율이 높음을 확인 할 수 있었다(그림 6-18).

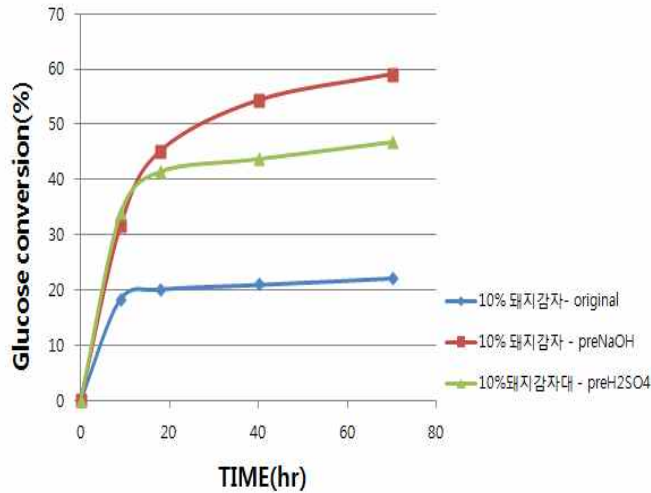


그림 6-18. 섬유소 바이오매스 돼지감자대의 산과 알칼리로 전처리 후 당화 (10% 고액비)

3. 유전체 정보기반 표면발현 시스템 구축

가. 효모 표면발현 시스템구축

효모 표면발현시스템은 대표적 효모인 *S. cerevisiae*에서 1차적으로 구축 후 개발된 시스템을 추후 KM 균주에 적용하고자 하였다. 표면 발현 부착 매개로 기존에 보고된 GPI-anchor 단백질인 α -agglutinin 유전자 (AGA1)를 이용하여 표면 발현 시스템을 구축하였다. 표면발현 모체로 agglutinin을 사용할 경우 단백질의 표면밀도가 효모세포 1개당 10^4 - 10^5 개로서 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다는 장점을 가지고 있다. α -Agglutinin 단백질은 AGA1과 AGA2의 소단위체로 구성되어 있으며 AGA1은 725개 아미노산으로 구성되어 효모 세포벽 β -glucan에 공유결합으로 고정되고, 87개의 아미노산으로 이루어진 AGA2가 disulfide 결합으로 AGA1과 연결되어 있다. 목적 단백질의 N-말단은 AGA2의 C-말단과 연결되며, 목적 단백질은 분비되고 난 후 효모 세포벽 바깥으로 display된다. AGA1과 AGA2 유전자는 *S. cerevisiae* Y2805 chromosome으로부터 PCR을 통하여 획득하였고, AGA2 유전자의 C-말단에 lipase 유전자를 삽입하여 발현하였다(그림 6-19).

표면 발현을 위한 발현 벡터로 YGa, YGSL, pUDE1을 이용하였으며, 적절한 표면 발현 조건을 선별하기 위하여 세 가지 조건으로 발현벡터를 구성하였다. AGA1 유전자 없이 AGA2와 lipase 유전자만 발현(without AGA1), 하나의 발현 벡터에 AGA1과 lipase fused AGA2의 동시 발현 (one vector), AGA1과 lipase fused AGA2를 서로 다른 벡터에서 발현(two vector)하였다. 이 때 signal sequence는 AGA2의 자체 signal sequence와 STFP3 signal sequence를 삽입하여 비교하였다. YGa 벡터에는 lipase fused AGA2를 발현하였고, pUDE1 벡터에는 AGA1과 lipase fused AGA2를 동시에 발현하였다. 그리고 YGSL 벡터에는 AGA1 유전자를 발현하였다 (그림 6-20).

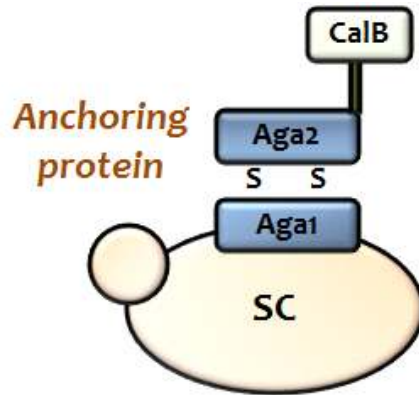


그림 4-21. lipase 표면발현 시스템

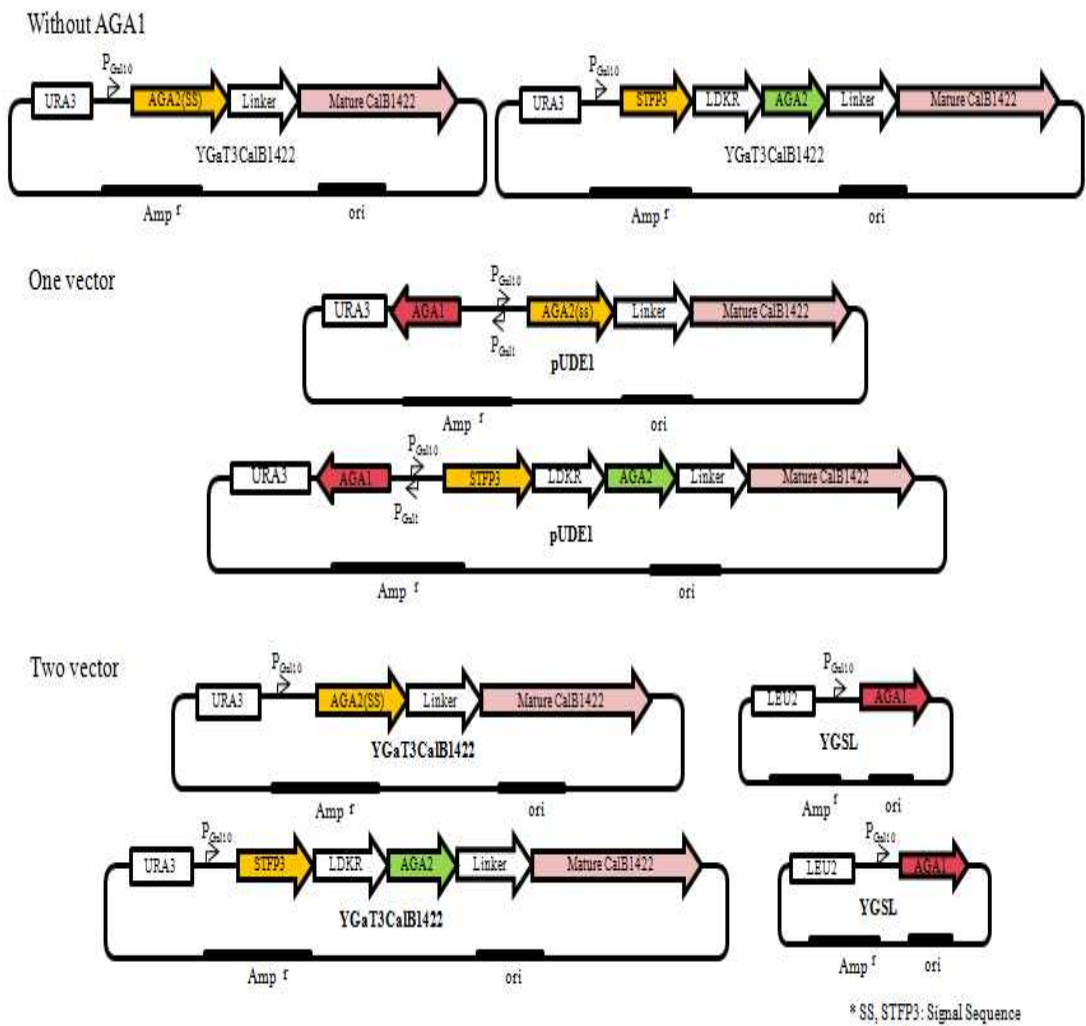


그림 6-20. 효모 세포 표면의 CalB 발현을 위한 발현 벡터 구축도

각 유전자가 재조합 된 벡터는 *S. cerevisiae* Y2805 균주에 형질 전환하고, 형질전환체를 YPDG 배지에서 48시간 배양한 후 lipase assay method (p-nitrophenyl palmitate(pNPP))를 사용하여 세포표면에 존재하는 lipase의 활성 및 배지로 분비된 lipase의 활성을 측정하였다. *S. cerevisiae*에서 분비 발현되는 CalB1422의 활성 (1080 U/L)보다 효모 표면발현의 활성이 낮게 나타났는데 이는 효모세포 표면에 발현되는 α -Agglutinin의 수가 약 10^4 - 10^5 개로 한정되어 있기 때문에 발현시킬 수 있는 효소의 양이 일정하고, 따라서 상대적으로 효소활성이 낮은 것으로 추정된다. 표면발현 된 lipase의 활성을 비교해 보면, two vector로 구축된 경우에서 whole cell activity가 16.74 U/L로 높게 나타났으며, signal sequence의 차이로 인한 활성의 차이는 거의 없었다 (표 6-10).

표 6-10. 효모 세포 표면에 발현된 CalB 단백질의 활성 분석

		Supernatant Activity(unit/L)	Whole cell Activity(unit/L)	% of retention
Control	Y2805	N.D	N.D	N.D
	Y2805-ST3-CalB	1080	N.D	N.D
Without AGA1	Y2805-AGA2(SS)-CalB	24.30	5.40	18.2
	Y2805-ST3-AGA2-CalB	22.14	5.40	19.6
One vector	Y2805-AGA1-AGA2(SS)-CalB	16.74	5.40	24.4
	Y2805-AGA1-ST3-AGA2-CalB	36.18	19.98	35.6
Two vector	Y2805-AGA1-AGA2(SS)-CalB	43.2	16.74	27.9
	Y2805-AGA1-ST3-AGA2-CalB	13.50	11.34	45.7

Lipase의 표면발현을 확인하기 위하여 immunofluorescence microscopy와 flow cytometer 분석을 하였다. Immunofluorescence microscopy를 보기 위하여 효모세포를 YPDG 배지에서 48시간 배양하였고, 균체를 원심분리하여 균체 침전물을 얻고, 이를 Tris-HCl (pH 7.5)에서 세척한 후 PBS에 OD600=20로 희석하였다. 면역항체염색은 CalB antibody를 1차 항체(1:1,000)로 4°C, 1.5시간 반응 후 세척하고 fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G를 2차 항체(1:300)로 4°C, 1시간 반응 후 세척하였다. 면역항체 염색한 균체의 형광 분석은 confocal laser scanning microscope를 이용하였다. 현미경 관찰 결과, one vector와 two vector로 구축된 경우의 세포들 표면에서 형광이 나타나는 것을 관찰하였고, 표면발현 됨을 확인하였다 (그림 6-21).

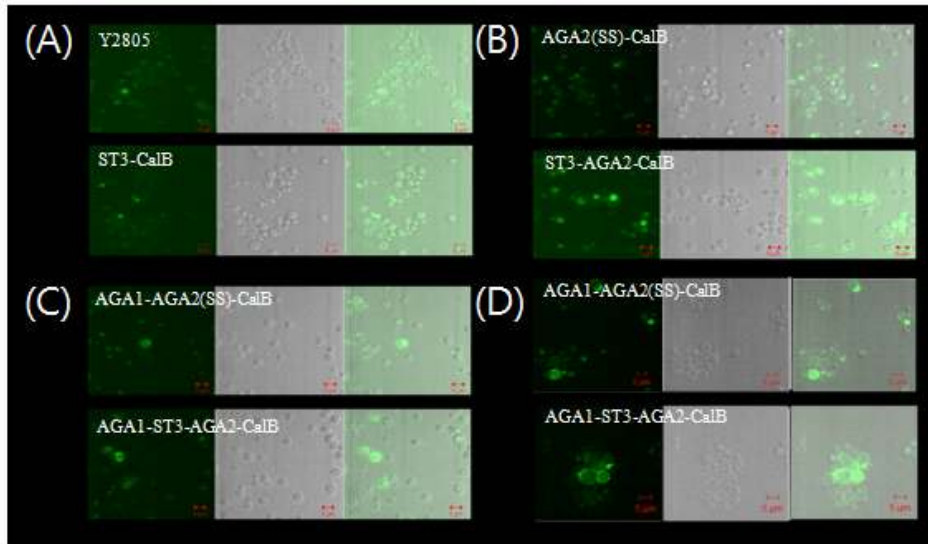


그림 6-21. 효모 세포 표면에 발현 된 CalB lipase-FITC의 immunofluorescence microscopy 분석

(A) Control (B) without AGA1 (C) one vector system (D) two vector system

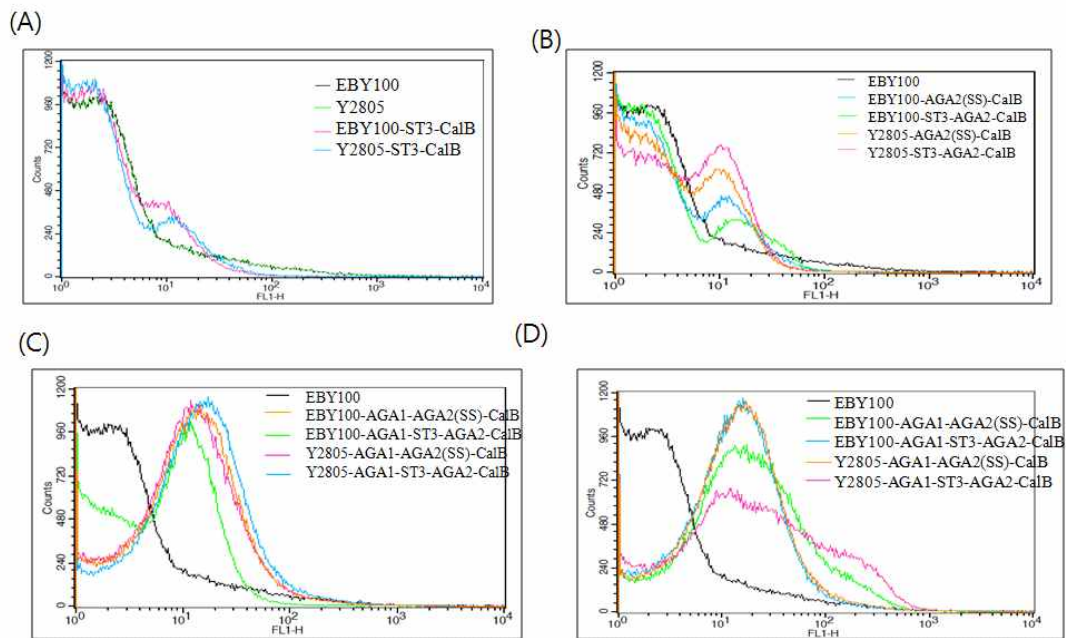


그림 6-22. 효모 세포 표면에 발현 된 CalB lipase-FITC의 flow cytometer 분석

(A) Control (B) without AGA1 (C) one vector system (D) two vector system

다음으로 위와 동일하게 세포를 면역항체로 염색하여 flow cytometer 분석을 하였다. 분비 단백질을 control로 하여 형광을 세기를 비교하였을 때 one vector와 two vector로 구축된 경

우에서 control보다 강한 세기를 가지는 세포의 수가 많이 나타났으며, 그 중에서도 two vector로 구축된 경우 좀 더 강한 형광을 가진 세포가 많이 존재하였다 (그림 6-22). Host 균주로서 표면발현에 많이 사용되고 있는 EBY100으로 비교 실험을 하였으며, EBY100의 경우에도 Y2805에서와 동일한 결과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 *S. cerevisiae* Y2805에서의 표면 발현을 위해서는 AGA1의 발현이 필요하며, AGA1과 lipase fused AGA2가 서로 다른 벡터에서 발현한 경우 가장 활성 형태를 가지는 것으로 확인하였다.

나. 효모 minicellulosome 구성을 위한 벡터시스템 개발

섬유소 분해능 CBP 효모 개발의 일환으로 효모 표면에 cellulase mixture를 cellulosome 형태로 구성하기 위하여 효모 minicellulosome 연구를 수행하였다. 1차적으로 α-Agglutinin 단백질 유전자의 표면 발현 및 dockerin 및 cohesin의 결합여부를 확인하고 궁극적으로 minicellulosome의 표면 발현 시스템을 구축하고자 하였다. Minicellulosome의 구성요소인 CipA와 dockerin 유전자를 *C. thermocellum* JW20 유래의 균주로부터 PCR을 통해 획득하였다. 발현벡터로 pCTCON과 YGa 벡터를 사용하였으며, pCTCON 벡터에는 AGA2와 CipA 유전자를 발현하였고, YGa 벡터에는 결합리포터로서 CalB lipase 유전자와 dockerin 유전자를 발현하였다 (그림 6-23).

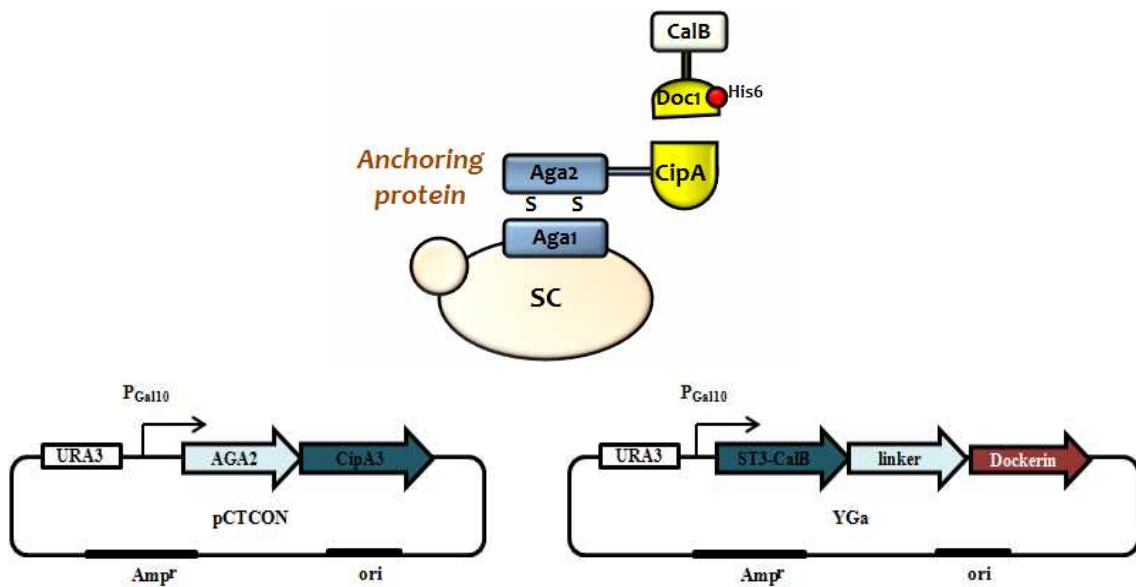


그림 6-23. 효모 세포 표면의 minicellulosome 발현을 위한 발현 벡터 구축도

각 유전자가 재조합 된 벡터를 효모균주에 형질 전환하고 형질전환체 중에서 dockerin fused lipase 균주를 1% tributyrin을 포함한 YPD 평판 배지에 옮겨 활성을 확인하였다. 그 결과, 균주 주변에 활성 환이 나타나는 것을 확인하였다 (그림 6-24).

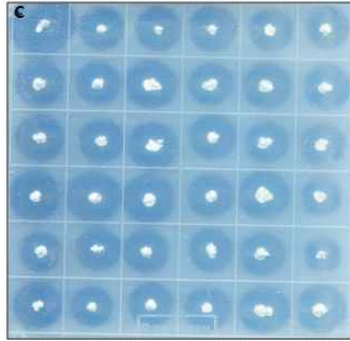


그림 6-24. Dockerin fused lipase의 평판 활성 확인
(C (control): Y2805-ST3-CalB)

또한, YPDG 배지에서 48시간 배양한 후 lipase assay method (p-nitrophenyl palmitate(pNPP))를 사용하여 lipase의 활성을 측정하였다. Lipase에 dockerin을 fusion 하였을 때 2781 U/L로서 lipase 단독으로 발현하였을 때 6966 U/L의 활성보다 낮은 활성을 보인다. 문헌상에서 *Rhizopus oryzae* lipase를 효모 세포 표면에 발현시킬 때 a-agglutinin과 lipase 사이의 linker peptide 수가 늘어감에 따라 기질 친화성이 증가한 결과가 보고되어 있는데, 이를 볼 때 dockerin이 fusion된 lipase 효소가 기질과 반응하기 위해 필요한 공간 확보가 어려워 기질과의 친화력이 감소하는 것으로 보이며, 따라서 효소활성이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다. Minicellulosome의 assembly 즉, CipA와 dockerin이 interaction 하는지 확인하기 위하여 CipA fused AGA2의 whole cell에 분비 발현된 dockerin fused lipase의 상등액을 반응 버퍼 (50mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 10mM CaCl₂)에서 1시간 동안 4, 15, 30°C 에서 반응하였다. 반응이 끝난 뒤 반응액을 원심분리하여 상등액과 whole cell에서의 활성을 확인하였다. 그 결과 세 조건의 온도 모두 동일하게 whole cell에서 lipase의 활성이 나타났고, 약 100~110 U/L 정도의 비슷한 활성을 보였다 (표 6-11). 이는 CipA와 dockerin이 interaction 하는 것을 의미하며 효모 균주 표면에 cohesin과 dockerin의 결합에 따른 것으로 예상되었다. 그러나 대부분의 lipase 활성이 soluble fraction에서 나타나는 것으로 판단하여 이 방법도 세포벽과의 결합효율이 높지 않음을 알 수 있었다.

표 6-11. 각 온도별 lipase의 활성

Temperature(°C)	Soluble fraction	Whole cell fraction
4	2160	109
15	1944	112
30	2214	98

다. 유전체 정보기반 세포벽 단백질 발굴

KM 균주에서 표면발현 시스템을 구축하기 위해서는 anchor로 작용할 수 있는 단백질의 확보가 필수적이다(그림 6-25). 현재까지 표면발현의 anchor로 사용되는 단백질은 세포벽에 노출되어있는 단백질중에서 세포막과 결합형태로 존재하는 단백질의 일부분이나 전체 부위를 활용하고 있다. 본 연구과제에서는 KM 유전체 분석 결과를 바탕으로 분비단백질을 확인할 수 있었으며 이들 단백질 중 GPI anchor를 포함하거나 세포벽에 존재하는 단백질로 분류된 단백질 6종을 선별하였다(표 6-12). 선별된 각각의 유전자를 클로닝한 후 CalB 유전자를 reporter로 사용하여 표면발현 시스템을 구축하여 활성을 확인하였으나 SC에서와 유사하게 표면 활성이 상당히 낮아 실제 응용에는 상당한 문제점이 있을 것으로 판단되었다.

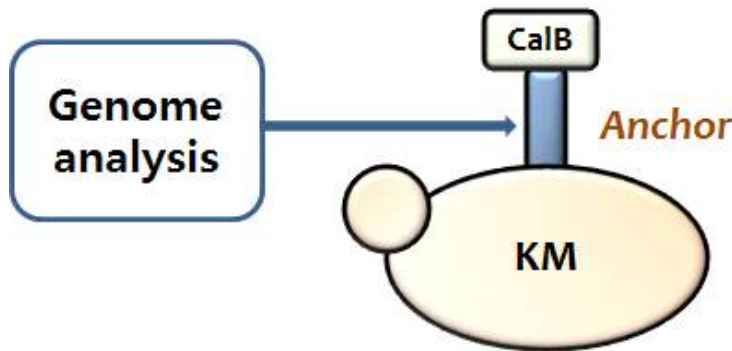


그림 6-25. 유전체 정보 기반 표면발현 anchor 발굴

표 6-12. KM 표면발현을 위한 anchor 유전자

ORF ID	Master Function	aa	MW	pI	cleavage site position
RWAP00660	GPI-anchored protein	421	42,756	4.279	20
RWAP02507	Cell wall protein CWP1 precursor	261	25,715	4.842	21
RWAP02544	Covalently-linked cell wall protein	322	32,288	6.764	19
RWAP02545	Covalently-linked cell wall protein	392	39,417	9.286	19
RWAP02546	Covalently-linked cell wall protein	343	34,578	7.917	19
RWAP04897	Cell wall protein SED1	230	23,532	4.174	17

4. 바이오매스 유래 C5/C6 활용균주 개발

가. 토양 유래 신규 효모의 분리

Xylose를 활용할 수 있는 신규 효모 탐색을 위하여, 연구원 내의 토양에서 샘플을 채취한 후 토양 10g을 40ml의 멸균 증류수에 넣고, 한 시간 동안 vortex를 이용하여 섞어주었다.

이 후 상등액을 20ml 취하여 이 시료를 bacteria를 저해하기 위한 효모배지로 YMPS [1L 당 yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g, + antibiotics (penicillin, streptomycin 50mg)]배지 2L에 접종하여 5L jar fermentor로 40℃에서 36시간동안 배양 한 뒤, 1.8L의 배양액을 빼고, 새로운 배지를 1.8L 넣어주고 다시 배양하는 농화배양 과정을 3번 반복 하였다. 그 후, 농화 배양된 샘플을 YMPS agar 배지에 도말하여, 40℃에서 48시간동안 배양하여, 곰팡이 포자 형태가 아닌 효모 형태의 콜로니를 생성하는 균주를 확보하였다. 분리된 효모를 xylose배지에서 빠른 성장을 보이는 균주를 다수 확보하였고 그중 Y-2를 선별하였다. (그림 6-26).

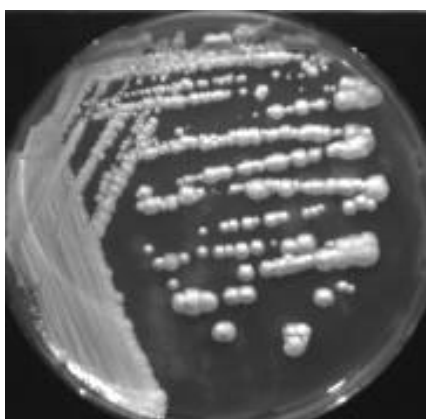


그림 6-26. 분리된 효모 Y-2의 YPD배지 내에서의 콜로니 모양 사진

나. 신규 미생물의 동정을 위한 유전학적 및 생리학적 분석

Y-2 균주의 종 분석을 위하여, 균주 Y-2를 3ml YMPS 액체 배지에서 40℃, 180rpm으로 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 분자마커로 이용되고 있는 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여 논문에서 밝혀진 프라이머인 ITS1(5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 LR3R (5' -GGTCCGT GTTTCAAGAC-3')을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)방법을 통하여 염기서열을 증폭하였다 (Iraz et al., 2011).

위의 염기서열을 증폭하기 위한 반응조성은 template DNA 1 μ l, 10pmol ITS1 1.5 μ l, 10pmol LR3R 1.5 μ l, EX taq buffer (Takara) 5 μ l, 2.5 mM dNTP 4 μ l, 증류수 36.5 μ l, EX taq DNA polymerase (Takara) 0.5 μ l 이며, PCR 조건은 95℃ 5분 반응 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분 30초으로 30 사이클 반응하고, 72℃에서 10분간 추가 반응하는 반응조건을 사용하였다. 상기 PCR 반응 후 2 μ l의 반응액을 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석한 결과, 1.2 kb 크기의 단편이 증폭되었고, 이를 solgent PCR purification kit 을 사용하여 PCR산물을 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, *Pichia guilliermondii* 와 99.2%의 상동성을 보였다. 또한, mega 5.0 프로그램을 이용하여 각각 *Pichia* spp. type strain들과 phylogenetic tree를 그려 보았을때, *Pichia guilliermondii*와 완벽하게 묶임으로써 *Pichia guilliermondii*임을 알 수 있었다 (그림 6-27). 이로써 *Pichia guilliermondii* Y-2로 명명하였고, Y-2 균주의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열은 NCBI의 GeneBank에 등록하였으며, 그 등록번호는 JX069771이다.

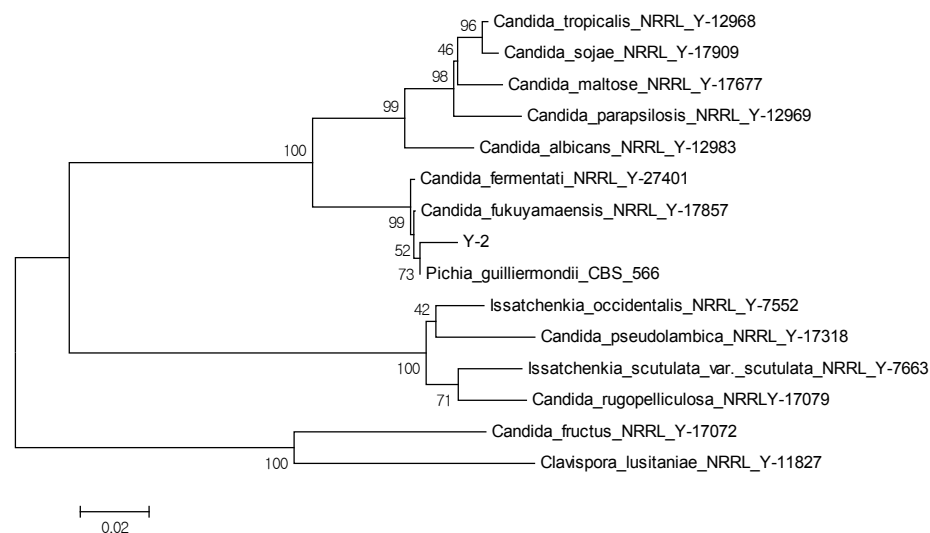


그림 6-27. *Pichia guilliermondii* Y-2의 Phylogenetic tree

또한, Y-2 균주의 carbon assimilation을 통한 균주 동정을 하기 위하여, 한국미생물 보존 센터 (KCCM)에 의뢰하여 API kit (20C AUX)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 표 6-13에서 보는 바와 같이 glucose, glycerol, 2-keto-D-gluconate, arabinose, xylose, adonitol, galactose, sorbitol, a-methyl-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine, cellobiose, maltose, saccharose, trehalose, melezitose, raffinose를 이용하는데 반하여, xylitol, inositol, lactose는 이용하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 이를 통하여, 동정결과는 매칭률을 100%로 보았을 때, *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) 와 60.3%, *Candida famata*와 39.6% 매칭률로 *Pichia guilliermondii* 로 동정되었다.

표 6-13. API kit (20C AUX)를 이용한 Y-2 균주의 carbon assimilation

No	분석항목	API	20C AUX
1	Control		-
2	Glucose assimilation		+
3	Glycerol assimilation		+
4	2-keto-D-gluconate assimilation		+
5	Arabinose assimilation		+
6	Xylose assimilation		+
7	Adonitol assimilation		+
8	Xylitol assimilation		-
9	Galactose assimilation		+
10	Inositol assimilation		-
11	Sorbitol assimilation		+
12	α -methyl-D-glucoside assimilation		+
13	N-acetyl-D-glucosamine assimilation		+
14	Cellobiose assimilation		+
15	Lactose assimilation		-
16	Maltose assimilation		+
17	Saccharose assimilation		+
18	Trehalose assimilation		+
19	Melezitose assimilation		+
20	Raffinose assimilation		+
21	Hyphae		-

다. Y-2 균주의 바이오매스로부터 유래하는 다양한 탄소원의 이용성

Y-2 균주가 cellulosic biomass의 분해를 통해 발생하는 다양한 탄소원에서의 성장을 확인하였다. YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) broth 배지 3ml에 상기균주를 접종하여 test tube에 24시간동안 배양 한 뒤, O.D를 1이 되게 희석을 한 후 YP agar plate에 다양한 탄소원(glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose, cellobiose)을 함유한 배지에 다양한 농도로 dotting하여 30°C 에서 48시간동안 배양하였다. 이때, 대조 균주로서 고온 효모 *Kluyveromyces fragilis* 와 오탄당과 육탄당을 효율적으로 이용하여 에탄올 발효를 할 수 있는 균주로 알려진 *Pichia stipitis*, 대표적인 에탄올 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 같이 배양하였다.

그 결과, 그림 6-28에서 보는 것과 같이, Y-2 균주는 *Pichia stipitis*와 유사하게 오탄당인 xylose와 arabinose, 육탄당인 glucose, galactose, mannose 그리고 이당인 cellobiose를 모두 잘 이용하여 성장하였다.

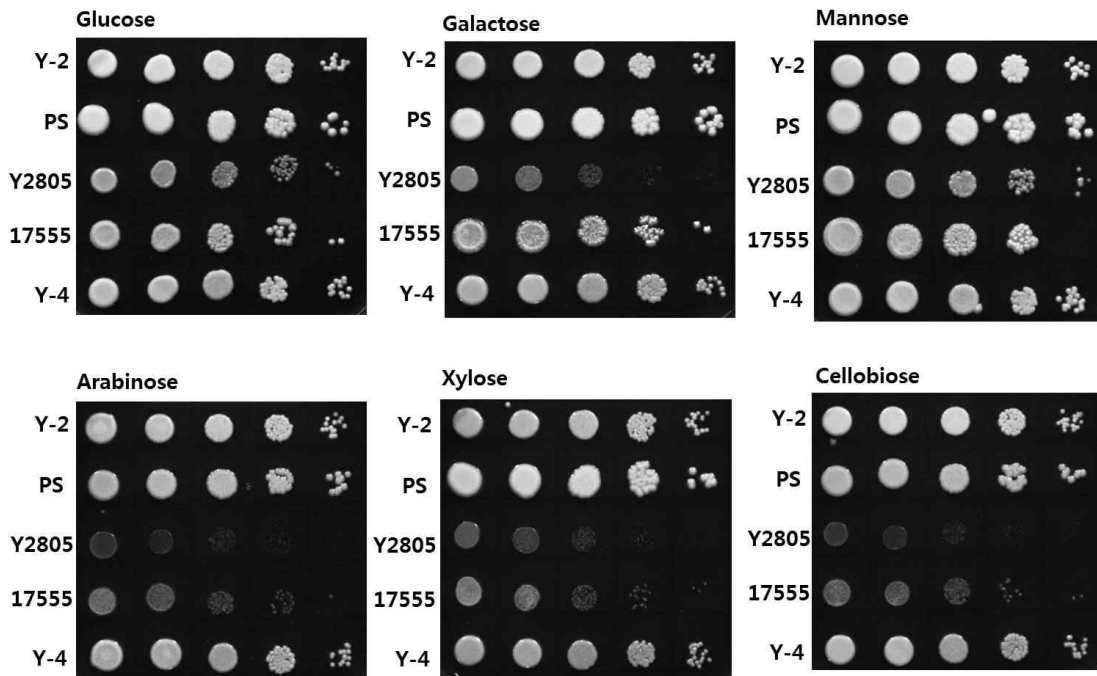


그림 6-28. 분리균주 Y-2의 cellulosic biomass로부터 유래하는 당들의 이용

라. Y-2 균주의 glucose를 이용한 에탄올 발효

Y-2 균주의 에탄올 발효능을 알아보기 위하여, 24시간동안 YPD 5ml에 상기 균주를 접종하여 종균배양을 한 뒤, 500ml baffle flask에 100ml의 에탄올 발효용 배지 (glucose 4.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, ammonium sulfate 0.2%, magnesium sulfate 0.04%)에 종균 배양액을 접종한 뒤 30°C에서 150rpm으로 진탕배양 하여, 약 8시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth와 탄소원 잔량 그리고 에탄올 생산량을 측정하였다. 이때의 cell growth는 O.D를 측정하였고, 탄소원 잔량과 에탄올 생산량은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)을 이용하여 정량하였다. 또한 발효능을 비교하기 위하여 상기 균주 뿐 아니라, 기존에 에탄올 발효능이 좋은 균주로 잘 알려진 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*도 같이 발효를 진행하였다. 샘플채취 시간은 균주가 정체기에 들어간 시간 대략 40시간까지 이루어졌다.

그 결과, 그림 6-29에서 보는 바와 같이, 상기균주는 다른 균주와 비교하여 약 24시간일 때 O.D.값이 최고치에 이르렀으며, 40시간 후에 45g/L의 glucose를 모두 소비하여 약 20g/L의 에탄올을 생산하였다. 이는 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*와 비교하였을 때, Y-2 균주는 탄소원으로부터 에탄올로의 전환율이 약 44% 로써, *S. cerevisiae*는 48%, *P. stipitis*는 46%로 비슷한 수준의 에탄올 전환율을 보였다. 이로써 Y-2 균주는 에탄올 발효능도 우수한 균주임을 알 수 있었다.

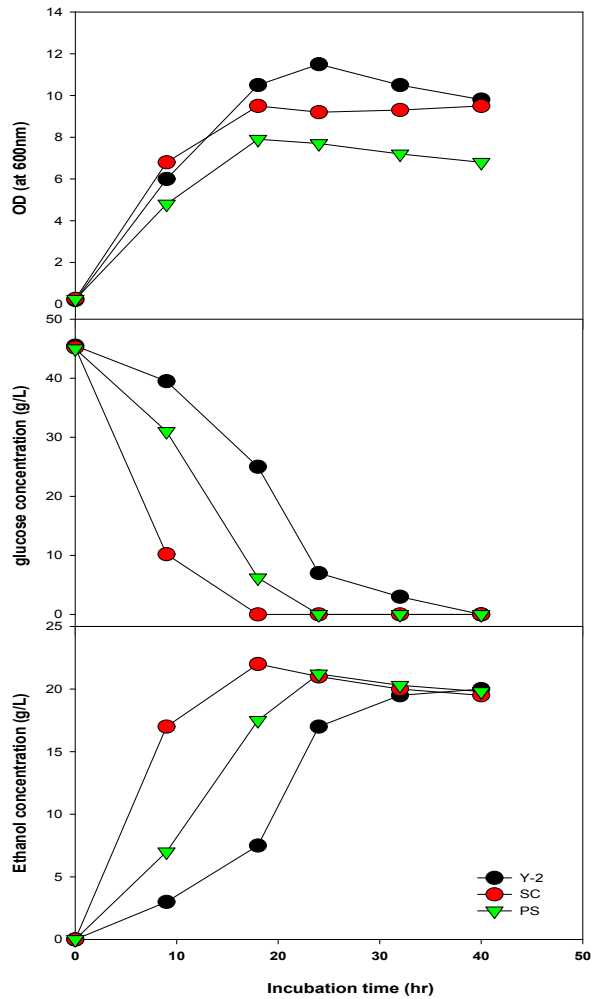


그림 6-29. 분리균주의 glucose를 이용한 에탄올 발효

마. 신규 효모 Y-2의 5탄당의 이용성

Y-2 균주는 5탄당 활용 가능성 확인을 위해 xylose와 arabinose plate상에서 확인하였으므로, 기존의 알려진 다른 효모 균주와 xylose 활용능력을 비교하여 보았다. 대표적으로 xylose를 잘 이용하여 에탄올 발효를 하는 균주로 알려진 *Pichia stipitis*와 에탄올 발효에 주로 사용되는 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 그리고 고온 에탄올 발효 균주로 알려진 *Kluyveromyces marxianus*를 대상으로 하여 xylose 이용 가능성을 평가 하였다. 각각의 균주들을 YPD 5ml에 접종하여 24시간 동안 종균배양을 한 뒤, 500ml baffie flask에 100ml의 xylose 발효용 배지 (xylose 4.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, ammonium sulfate 0.2%, magnesium sulfate 0.04%)를 취하여 종균배양액을 접종한 뒤 30℃에서 150rpm으로 진탕배양하여, 약 8시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth와 xylose의 잔량을 측정하였다. 이때의 cell growth는 O.D를 측정하였고, xylose 잔량과 xylitol, 에탄올 생산량은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)을 이용하여 정량하였다.

그 결과, 그림 6-30에서 보는 바와 같이, 예상대로 *Pichia stipitis* 는 xylose uptake율이 가장 높고 세포성장률도 가장 빨라서 36시간 이후에는 정체기에 들어가는 것으로 보였다. 이에 반하여 Y-2 균주는 xylose 소모율 측면에서 *Pichia stipitis* 보다는 느렸지만 *Saccharomyces cerevisiae* 와 *Kluyveromyces marxianus*에 비해서는 매우 빠름을 알 수 있었다. 따라서 본 균주는 신종 균주로서 xylose를 이용하여 세포 성장률이 월등히 좋기 때문에, 바이오매스를 당화하여 나오는 오탄당의 발효를 통해 다양한 물질 생산이 가능할 것으로 판단되었다.

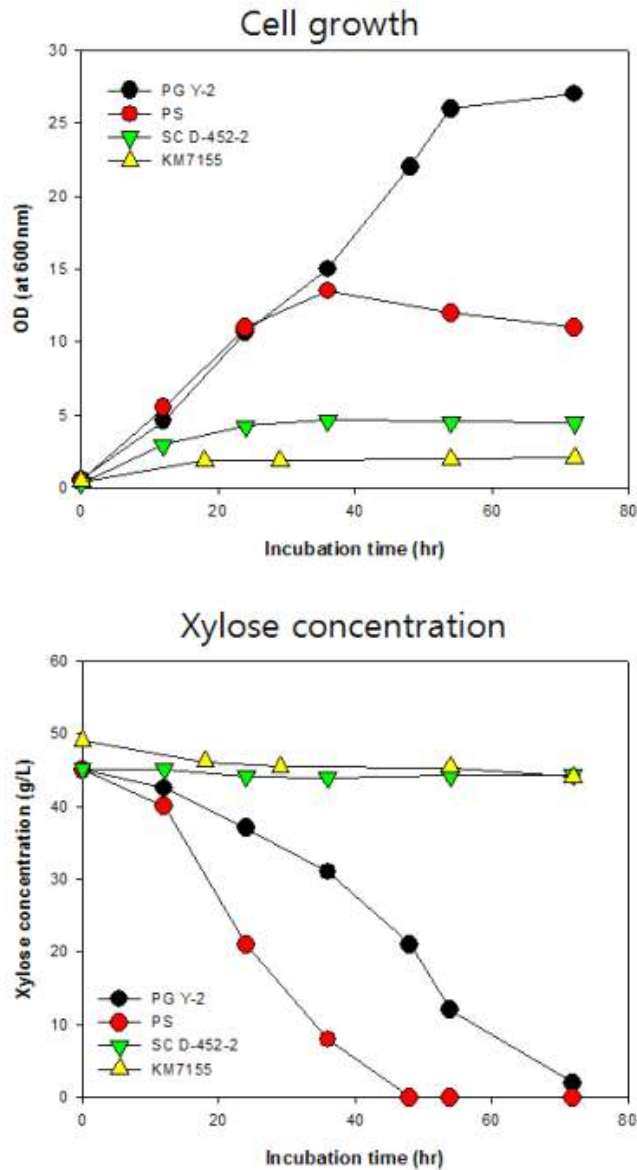


그림 6-30. Y-2 균주의 xylose를 이용한 세포생장과 xylose소모율

바. 신규 효모 Y-2의 xylose를 이용한 발효와 xylitol 생산

Y-2 균주는 xylose를 효율적으로 이용할 수 있으나 *Pichia stipitis*와 달리 에탄올 보다는 xylitol을 생산하는 균주로 확인되었다. 실제 생산 효율을 확인하기 위하여 Y-2 균주를 YPD

5ml에 접종하여 24시간 동안 종균배양을 한 뒤, 500ml baffle flask에 100ml의 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°C에서 150rpm으로 진탕배양 하여, 약 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth, xylose의 잔량, 에탄올, 그리고 xylitol을 측정하였다.

그 결과, 그림 6-31에서 보는 바와 같이, 배양 72시간 후, OD 값이 일정해지는 것으로 정체기에 들어갔음을 알 수 있었고, 이때의 xylose를 소모량은 약 12g/L이며, 에탄올은 생산하지 않았지만 약 7.5g/L의 xylitol을 생산하였다. 이때의 xylose의 xylitol의 전환율은 약 62.5%이며, 이는 대표적으로 xylose에서 xylitol로의 전환율이 약 70%인 *P. guilliermondii*와 하여 유사한 수준으로 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

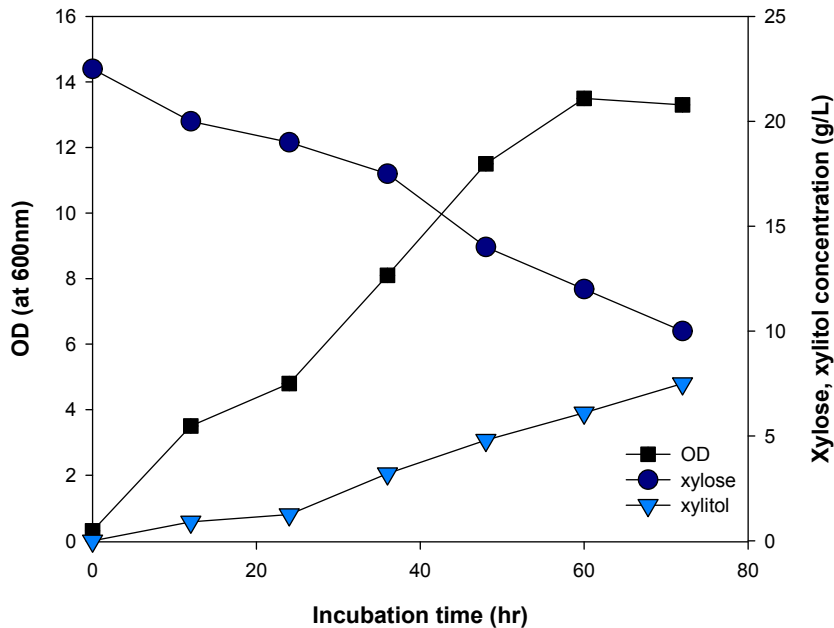


그림 6-31. Y-2균주의 xylose를 이용한 xylitol 생산

사. C5/C6 동시 이용 발효

앞서서 균주 Y-2는 오탄당과 육탄당의 탄소원이 각각 공급시, glucose를 이용하여 에탄올 발효를 하고, xylose를 이용하여 xylitol 생산을 하였다. 그러나, 보통 lignocelulosic biomass를 당화할 경우, glucose와 xylose가 혼재되어 있는 형태이므로, glucose와 xylose가 혼재되어 있을 때 각각의 기질을 잘 이용하여 에탄올과 xylitol을 함께 만드는지 확인하기 위해 glucose와 xylose mixture를 이용하여 발효를 진행하였다. Y-2 균주를 YPD 5ml에 접종하여 24시간 동안 종균배양을 한 뒤, 500ml baffle flask에 100ml의 glucose와 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 150rpm으로 진탕배양 하여, 약 8시간 내지 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 cell growth, glucose와 xylose의 잔량, 에탄올, 그리고 xylitol을 측정하였다.

그 결과, 그림 6-32에서 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. 따라서 신균주 Y-2는 오타당과 육탄당의 혼합기질 내에서도 두 기질을 모두 잘 이용하여 각각의 에탄올과 xylitol을 함께 생산할 수 있음을 확인하였다.

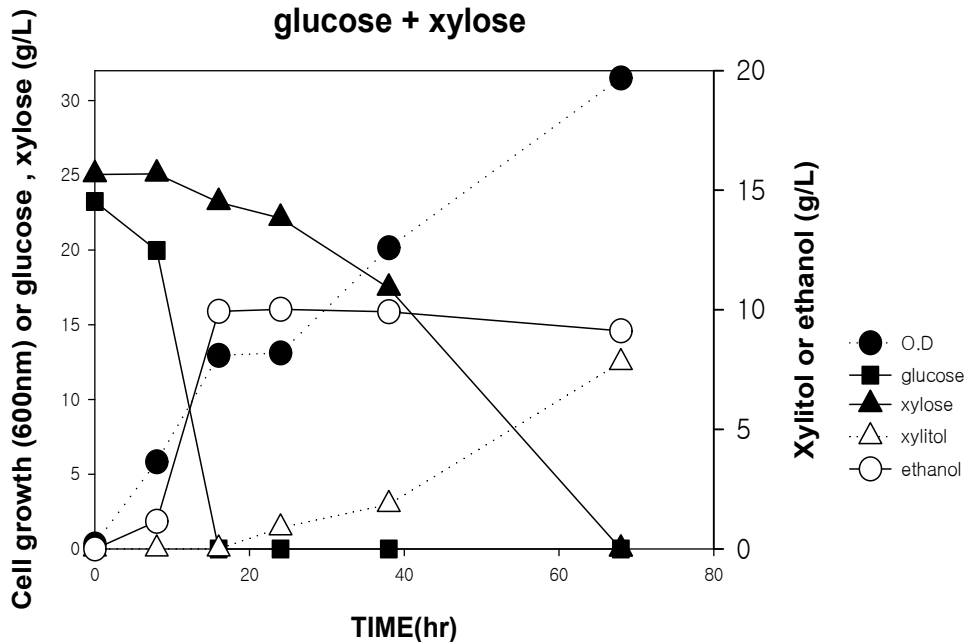


그림 6-32. 균주 Y-2 의 C5/C6 동시 발효를 통한 에탄올과 xylitol 생산

아. 신규 효모 Y-2의 발효폐액내의 xylose를 이용한 발효와 xylitol 생산

Y-2균주는 xylose를 이용하여 xylitol을 생산 가능한 균주임을 확인함에 따라 기존 효모를 이용하여 에탄올 발효를 진행하고 발생한 발효 폐액 (주성분 xylose)을 이용하여 본 균주의 성장 및 xylitol 생산 여부를 확인하였다. 이에 따라 발효 폐액은 돼지감자 지상부 섬유소를 이용하여 이미 에탄올 발효를 진행한 뒤 에탄올 증류가 끝난 발효 폐액을 이용하였다. 이 발효 폐액의 성상은 다음 표 6-14과 같다. Y-2 균주를 YPD 200ml에 접종하여 24시간 동안 중균배양을 한 뒤, 5L jar fermentor에 900ml의 발효폐액과 400ml의 증류수를 멸균한 뒤, 200ml의 중균배양액을 접종하여 30°C, 180rpm, 1vvm, pH 6 으로 유지하여 배양하였다. 8시간 간격으로 샘플을 채취하여 xylose의 잔량과 xylitol을 측정 하였다. 그 결과, 그림 6-33과 같이 24시간 이내에 12 g/L의 xylose를 모두 소모하여 약 6.5 g/L의 xylitol을 생성하였다 (약 53.4%의 축적률). 이러한 결과는 버려지는 발효 폐액 내의 오타당을 재이용하여 고부가가치의 xylitol을 생산할 수 있음을 보여준다.

표 6-14. 발효 폐액의 성분

pH	5.7
Total nitrogen	2.56 g/L
Xylose	19.4 g/L
Ethanol	56.4 g/L (증류전)

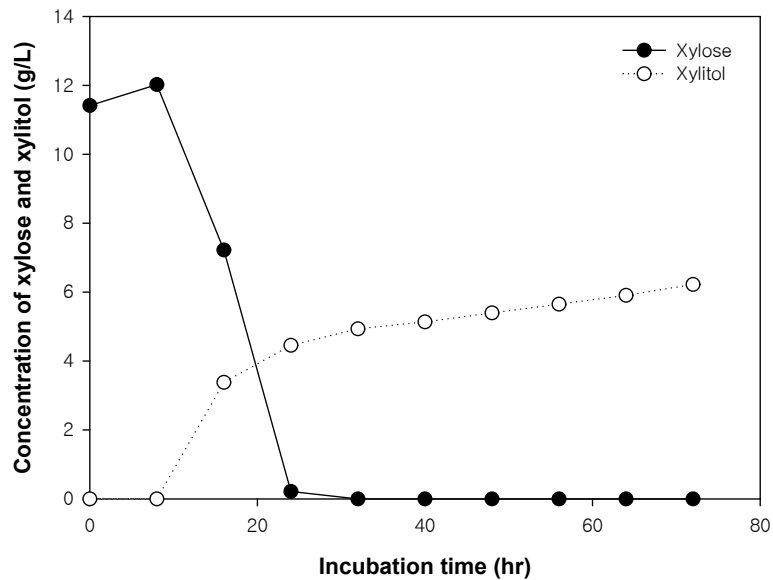


그림 6-33. 균주 Y-2의 발효 폐액을 이용한 xylitol의 생산

자. Xylose isomerase 분비발현을 통한 xylose 활용균주 개발

*Saccharomyces cerevisiae*는 자일로스는 효율적으로 발효하지 못하지만, 그 이성체인 xylulose는 효율적으로 발효하여 에탄올을 생산할 수 있다. 자연계에 존재하는 대표적인 자일로스 발효 효모인 *Pichia stipitis*로부터 xylose를 xylulose로 전환시키는 효모 경로의 xylose reductase 및 xylitol dehydrogenase의 유전자들을 *S. cerevisiae*에 도입함으로써 자일로스를 발효하는 재조합 *S. cerevisiae*를 구축하려는 연구(그림 6-34)가 수행되었으나 NADH 조효소의 불균형이 발생하여 에탄올 생산에 한계가 있음을 확인하였다.

이러한 문제를 회피하기 위한 방법으로 NADH 조효소를 사용하지 않고 xylose를 xylulose로 직접 전환시키는 효소인 xylose isomerase를 혐기성 곰팡이인 *Piromyces* sp.로부터 분리하여 *S. cerevisiae*에 도입하여 xylose를 발효하려는 많은 연구가 이루어 졌지만 xylose isomerase의 발현효율이 낮고 xylose와 glucose가 동일한 트랜스포터에 의해서 세포내로 운반되기 때문에 glucose에 의해서 xylose의 이용이 저해를 받아 이러한 방법으로 개발된 재조합 균주 또한 자일로스 발효능에 한계를 보여 주고 있다.

따라서 효모 *S. cerevisiae* 균주에 고효율로 xylose isomerase를 분비발현 함으로써 xylose

를 발효 가능한 xylulose로 전환하여 glucose 존재 하에서도 xylose를 탄소원으로 이용하여 에탄올을 발효하는 효모 균주를 개발하고자 하였다.

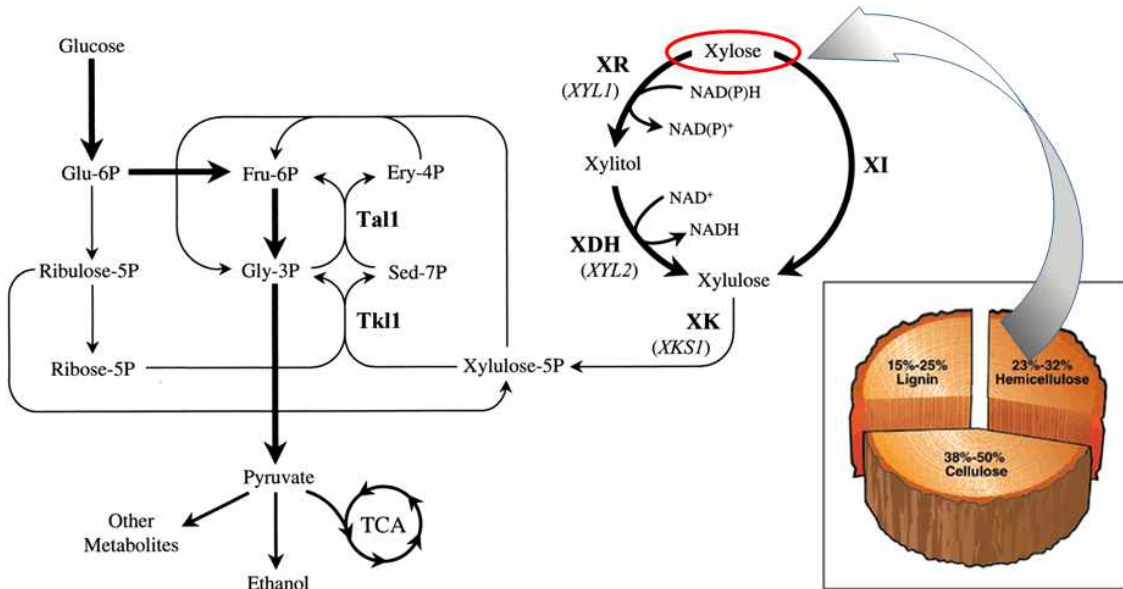


그림 6-34. Xylose 이용을 위한 metabolic pathway

(1) 단백질 융합인자(TFP)를 이용한 Xylose isomerase(XI) 고분비 효모 균주 개발

Piromyces sp. 유래의 xylose isomerase를 코딩하는 유전자 (XI)는 Codon Usage Database를 근거로 하여 *Piromyces* sp.의 유전자 코돈을 *S. cerevisiae* 균주가 선호하는 코돈으로 교체 후 (쥬)바이오니아에 의뢰하여 유전자를 합성하였다. 합성된 xylose isomerase 유전자 크기는 1314bp로서, 438개의 아미노산으로 구성되어 있으며 xylose isomerase는 세포내 발현효소로서 XI 유전자에는 효모에서 인식되는 자체 분비 시그널은 포함하고 있지 않다. 따라서 XI의 분비 발현 벡터를 제작하기 위하여 효모 24종의 단백질 분비융합인자를 이용하여 효모 세포 내 재조합을 통하여 형질전환체가 형성되도록 하였다(그림 6-35).

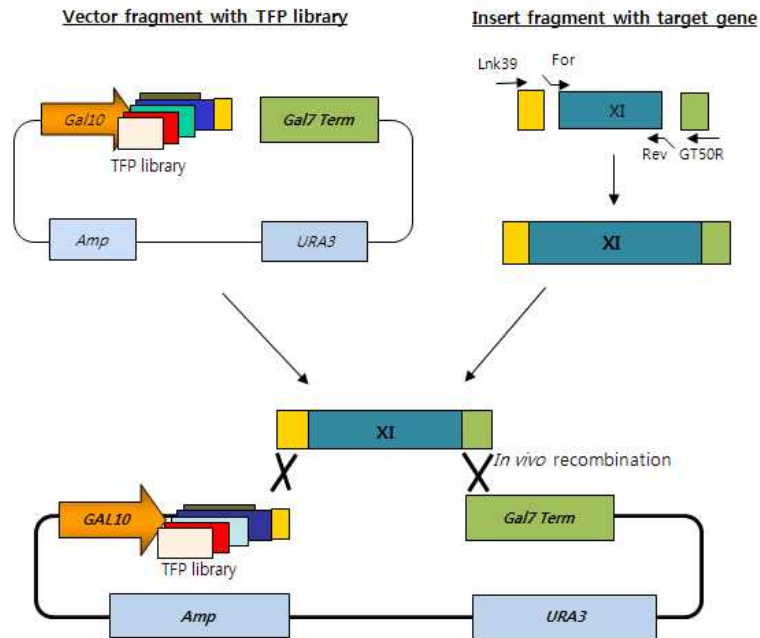


그림 6-35. Xylose isomerase 유전자의 효모 TFP 벡터 도입을 위한 과정

세포내 재조합을 통해 형성된 형질전환체는 uracil이 없는 선택배지에서 형질전환체를 선별하였다. YPDG(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토오스) 배지에서 40시간 배양 후 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 각각 YPDG 배지(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토스)에서 40시간 배양한 후 분비단백질을 SDS-PAGE 분석하였다. 그 결과, 그림 6-36에서 보는 바와 같이 49kDa 부근에서 xylose isomerase 단백질로 추정되는 밴드를 확인하였고 항(anti)-HIS 항체를 이용하여 western blotting 하여 xylose isomerase의 분비발현 균주를 확인하였다.

분비된 xylose isomerase는 거의 모든 TFP에 의해 분비생산되고 있음을 알 수 있었다. 그 중에서도 단백질 분비용합인자 3, 8, 13, 14, 19 및 20번이 높은 분비율을 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 xylose isomerase 분비율이 높은 단백질 용합인자 3,8,13,14,19 및 20을 포함하는 균주를 1차 선별하였다.

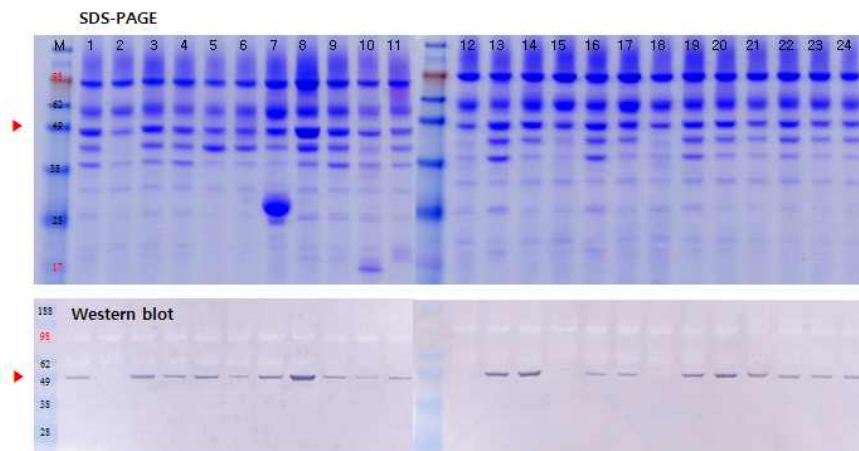


그림 6-36. Xylose isomerase의 분비 발현 확인

(2) Xylose isomerase가 도입된 균주의 xylose 이용능 확인

위 결과에서는 단일 형질전환체를 분석한 결과가 아니고 다수의 형질전환체를 동시에 분석한 결과이기 때문에 정확한 분석을 위해서 단일 콜로니로부터 균주를 배양하여 단백질 합성과 자일로스 이용능을 분석하였다.

선별된 각 TFP 별로(TFP 3,8,13,14,19 및 20) 단일 콜로니를 3개씩 골라서 1% galactose와 1% xylose를 탄소원으로 포함하는 배지(YPGX)에서 40시간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 xylose isomerase의 발현량을 SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였고 xylose 소모량은 HPLC [Aminex HPX-87H column, HPLC pump, Refractive index detector(Agilent technologies)]를 이용하여 정량하였다(그림 6-37).

그 결과 선별된 균주에 따라 xylose isomerase의 분비효율이 다양하였으며 대조구로 사용한 Y2805 균주(wt)의 경우 xylose를 거의 이용하지 못했으나 배지 내 분비 발현된 xylose isomerase의 발현량이 많은 균주일수록 xylose 소모량이 많은 것을 확인하였다. 특히 TFP 3번과 TFP 14번 단백질 분비용합인자에 의하여 발현된 xylose isomerase의 발현율이 높았고 10 g/L xylose 중 4.8~5.8 g/L xylose 를 소모하는 것을 확인하였다.

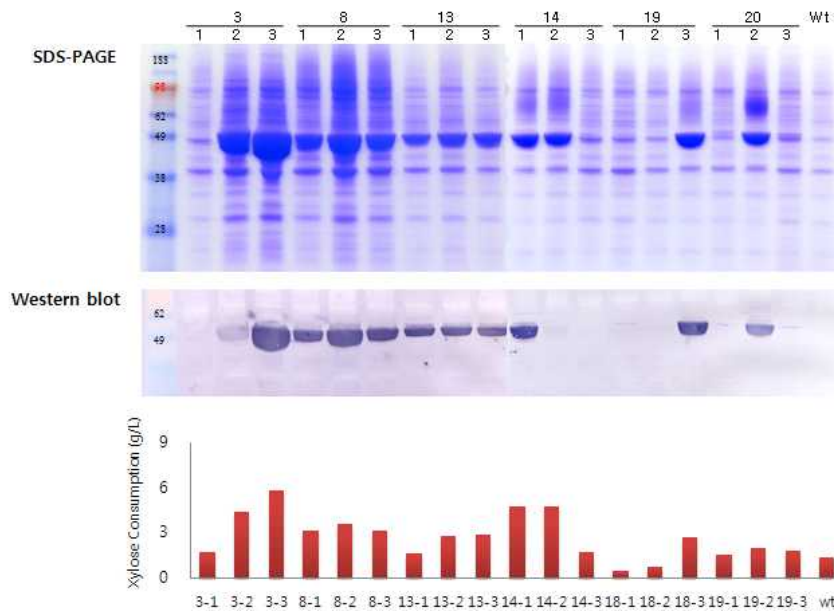


그림 6-37. Single로 분리된 XI 분비발현 균주의 SDS-PAGE 분석과 xylose 소모 확인

(3) Y2805Δgal80 균주를 이용한 xylose isomerase 분비 생산

야생형 효모 균주(Y2805)에서 GAL10 프로모터를 발현하기 위해서는 고가의 인듀서(inducer)인 galactose를 필요로 하기 때문에 glucose만으로도 발현유도가 가능한 gal80 변이균주, Y2805Δgal80를 이용하였다. 이에, xylose isomerase 유전자를 Y2805Δgal80 (Mat a pep4::HIS3 gal80:: Tc190, prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주에서 발현하기 위해 이전 결과에서 확보된 균주로부터 분리된 플라스미드, YGaT3-XI,6H 벡터와 YGaT14-XI,6H 벡터를 Y2805Δgal80에 형질전환하였다. 수득한 형질전환체는 탄소원으로 glucose가 포함된 YPD(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당)와 xylose와 glucose가 포함된 YPDx (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 1%

포도당, 1% xylose), xylose만 포함된 YPX(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 1% 자일로스) 배지에서 40시간 배양하고 상등액을 아세트산으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석 및 소모된 xylose를 HPLC를 이용하여 정량하였다.

Y2805Δgal80 균주에 도입된 형질전환체에서 발현된 xylose isomerase를 SDS-PAGE로 분석한 결과 Y2805 균주에서 발현된 결과와 유사하게 glucose만을 탄소원으로 사용한 배지에서도 xylose isomerase가 분비 생산되었으며 glucose와 xylose가 함께 첨가된 배지에서 xylose isomerase 분비 발현량이 가장 많은 것을 확인하였다(그림 6-38). 또한 TFP3번을 이용하여 xylose isomerase를 발현한 경우 TFP14번을 이용한 경우보다 xylose 이용능 또한 우수한 것을 확인하였다. 탄소원으로 xylose만 포함된 YPX 배지에서 약 4~4.2 g/L의 xylose를 소모했으며 xylose를 단일 탄소원으로 이용했을 때 xylulose 생성을 확인했고, 이는 소모된 xylose의 약 40~50%에 해당하는 것으로 확인되었다. 최종적으로 piromyces sp. 유래의 xylose isomerase를 고분비 발현하는 벡터로 YGa-T3-XI·6H를 선정하였다.

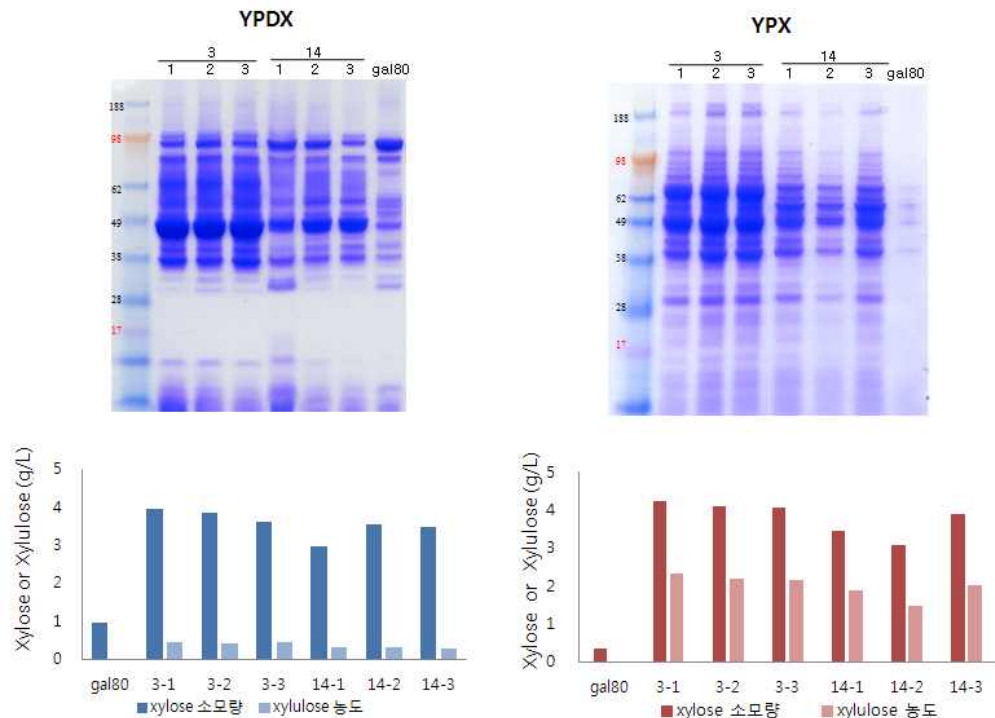


그림 6-38. Y2805Δgal80 균주에 도입된 XI 분비발현 균주의 SDS-PAGE 분석 및 xylose 소모량 확인

(4) 유가 배양식 발효를 통한 xylose isomerase의 대량 생산

Xylose isomerase 발현벡터 YGaT3-XI·6H가 Y2805Δgal80 균주에 도입되어 제작된 xylose isomerase 생산용 형질전환체(Y2805Δgal80/T3-XylA)를 이용하여 xylose isomerase를 대량 생산하고자 5L 발효조에서 유가식 배양을 수행하였다. 본 배양에 들어가기 전에 50 ml의 최소 액체배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모 질소원 기질, 0.5% 카사미노산, 2% 포도당)에 1

단계 초기 배양한 후, 다시 200 ml의 YPD 액체배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당)에 서 배양하여 활성화시킨 후, 본 배양액에 접종하여 30°C 에서 48시간 동안 배양하였다. 세포 성장 속도에 따라 유가 배양식 배지(15% 효모 추출물, 30% 포도당)를 추가 공급하였다.

그 결과 그림 6-39에 나타낸 것처럼 48시간 배양동안 세포는 약 140 OD까지 성장하였고, 배양 시간별로 농축하지 않은 발효 배양 배지 샘플을 10 μ l를 채취하여 SDS-PAGE 분석한 결과 xylose isomerase 단백질이 배지로 분비되는 것을 확인하였다. 발효를 통해 생산된 단백질은 50 mM 트리스 완충용액(pH7.5)으로 한외여과 (분자량 cut off 30,000)를 이용하여 농축하였다.

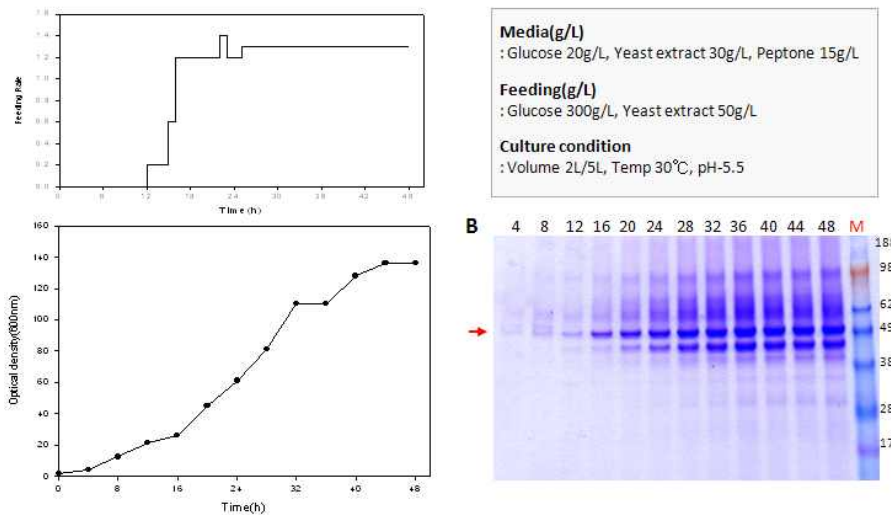


그림 6-39. 유가식 발효를 통한 xylose isomerase의 대량 생산

(5) Ni-NTA 컬럼을 이용한 xylose isomerase의 정제

순수한 Xylose isomerase를 얻기 위해 발효 농축액을 His-tag 컬럼을 이용하여 정제를 수행하였다. 구체적으로, 20 mM 트리스 완충용액에 0.5M NaCl 완충용액 (pH7.5)으로 Ni-NTA 레진에 충분히 안정화시킨 후 발효농축액 250ml을 로딩하여 0.2 ml/분의 유속으로 0.5M 이미다졸(imidazole)이 포함된 완충용액으로 농도구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 얻어진 분획을 SDS-PAGE 분석한 결과 단일밴드의 순수한 xylose isomerase 효소가 정제되었음을 확인하였다(그림 6-40).

- Buffer A: 20 mM Tris, 0.5 M NaCl pH 7.5
 - Buffer B: 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.5
 - Unbound: 100% Buffer A
 - Washing: 4% Buffer B (20 mM Imidazole)
 - Elution: 50% Buffer B (250 mM Imidazole)

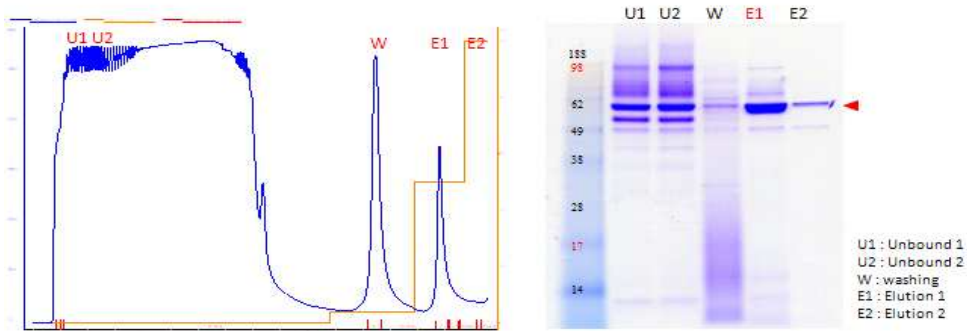


그림 6-40. 발효 생산된 xylose isomerase 단백질을 Ni-NTA 칼럼을 이용한 정제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE 분석

(6) 재조합 분비 생산된 xylose isomerase의 최적 온도, pH 및 금속이온에 대한 활성 측정

Xylose isomerase가 기질을 가수분해하는데 있어서 반응 온도가 미치는 영향을 조사하였다. 효소 활성을 측정하기 위해, 10 mM MgCl₂가 첨가된 150 mM 트리스 완충용액(pH7.5)에 1% xylose 용액을 기질로 사용하여 20~80°C의 범위에서 10°C 구간별로 반응시킨 후 생성된 xylulose를 HPLC를 이용하여 정량하였고 활성이 가장 높은 온도를 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 그 결과 최적 반응온도가 60°C인 것을 확인했고, 70°C에서도 최고 활성의 70% 정도에 해당하는 활성을 나타내었다. 또한 30°C~70°C 비교적 넓은 범위에서 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

한편, 효소활성의 최적 pH는 50 mM 시트레이트(citrate) 완충액(pH3.0~5.0), 말레이트(maleate) 완충액(pH6.0~7.0), 트리스(Tris) 완충액(pH8.0~9.0), 글리신-수산화나트륨(Glycine-NaOH, pH10)를 사용하여 각 pH 완충액에서 상대적인 활성을 조사하였다. 그 결과 그림 6-41에서 보는 바와 같이 pH7.0에서 최대 활성을 나타내었으며 pH6.0~9.0에서 90% 이상의 잔존 활성을 유지하였으나 pH5.0 이하에서는 활성이 급격히 저하되었다. 이러한 결과를 통해 xylose isomerase는 중성 및 약 알칼리에서 안정성이 우수한 것을 확인하였다.

효모에서 분비생산된 xylose isomerase의 금속이온에 대한 특성을 조사하기 위하여 앞서 정제된 효소에 다양한 금속이온을 첨가하여 활성을 측정하였다. 기질로 1% xylose 용액이 포함된 반응액에 각 금속 이온들을 10 mM 첨가하여 60°C에서 반응한 후 생성된 xylulose를 HPLC를 이용하여 정량하였다. 그 결과 다양한 금속 이온 중 Mg²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺와 같은 2가의 양이온을 첨가할 경우 효소활성이 130~160%까지 증가하였다. 그러나 Cu²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, EDTA를 첨가할 경우 효소 활성이 감소되는 것을 확인하였다(그림 6-41).

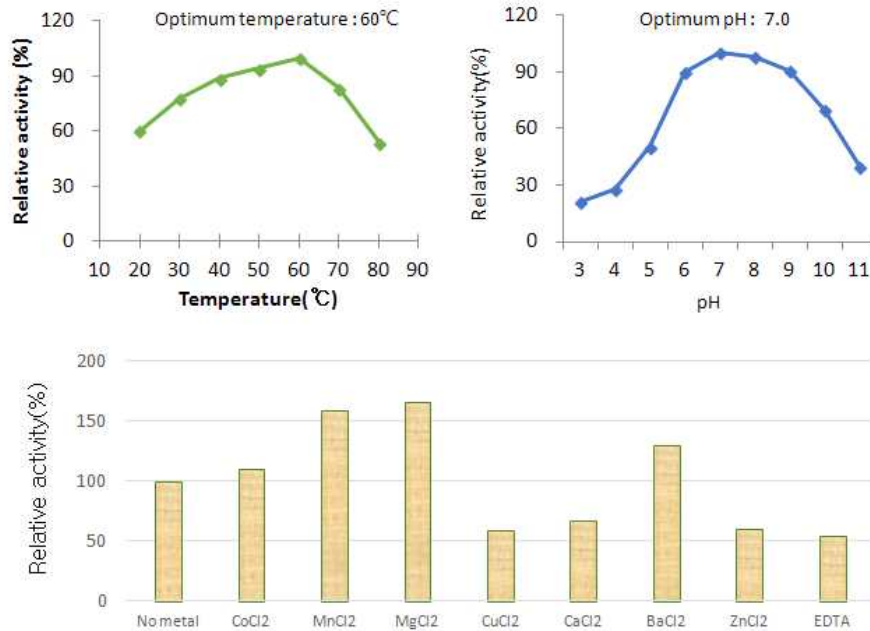


그림 6-41. 온도, pH 및 금속이온 종류에 따른 xylose isomerase의 상대적 효소 활성

(7) 마그네슘과 망간 농도에 따른 xylose 이용능 확인

Xylose isomerase의 활성을 유지하기 위해서는 금속이온을 필요로 하기 때문에 세포 외로 분비되는 xylose isomerase 발현시 배양 배지에 마그네슘을 농도별로 첨가하여 xylose 이용능에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로, xylose isomerase 생산 균주(Y2805Δ gal80/T3-XylA)를 3ml YPD에 접종하여 24시간 동안 종균 배양한 뒤 glucose 10g/L와 xylose 10g/L를 탄소원으로 포함하고 5, 10, 20 mM 농도의 염화마그네슘이 포함된 배지에 종균 배양액을 접종하고, 30°C에서 180 rpm으로 배양하면서 12시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장 및 xylose 잔량을 측정하였다.

그 결과, 그림 6-42에 나타난 바와 같이 배양 36시간까지 세포 성장에 큰 차이를 보이지 않았으나 배양 36시간 이후 마그네슘을 첨가해준 3가지 농도에서 금속이온을 첨가하지 않은 대조구보다 높은 세포 성장을 보였으며 20 mM 농도에서 최고의 효과를 확인하였다. 또한 금속 이온을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 48시간 이후부터 xylose를 거의 소모하지 못했으나 금속이온을 첨가해준 경우 배양 72시간까지 지속적으로 xylose를 소모하였으며 20 mM 농도에서 최대 5.2 g/L xylose를 소모하여 금속 이온 첨가로 인해 xylose 이용능이 증가됨을 확인하였다.

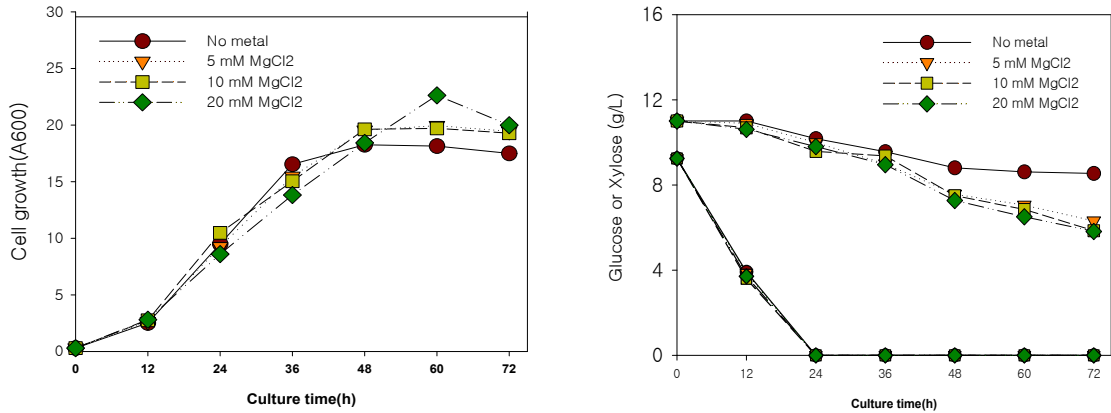


그림 6-42. XI를 발현하는 재조합 효모균주(Y2805 Δ gal80/T3-XI·H6)의 마그네슘 함유 배지에서의 세포성장 및 xylose 소모량 분석

Xylose isomerase 발현시 배양 배지에 망간을 농도별로 첨가하여 망간 이온 농도가 xylose 이용능에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 그림 6-43에 나타난 바와 같이 배양 24 시간까지 세포 성장에 큰 차이를 보이지 않았으나 배양 24시간 이후 망간을 첨가해준 3가지 농도에서 금속이온을 첨가하지 않은 대조구보다 높은 세포 성장을 보였으며 1 mM 농도에서 최고 효과를 확인하였다. 또한 배지에 포함된 glucose가 모두 사용된 후 xylose가 빠르게 사용되기 시작하였다. 금속이온을 첨가하지 않은 대조구의 경우 glucose가 소모된 이후에도 xylose를 거의 소모하지 못했으나 망간을 1 mM 첨가해준 경우 72시간 배양하면 xylose를 모두 다 소진하는 것을 확인하였다. 망간 이온이 1 mM 농도로 포함된 경우, 망간 이온이 존재하지 않는 경우보다 xylose 이용능이 증대된 것을 확인하였다.

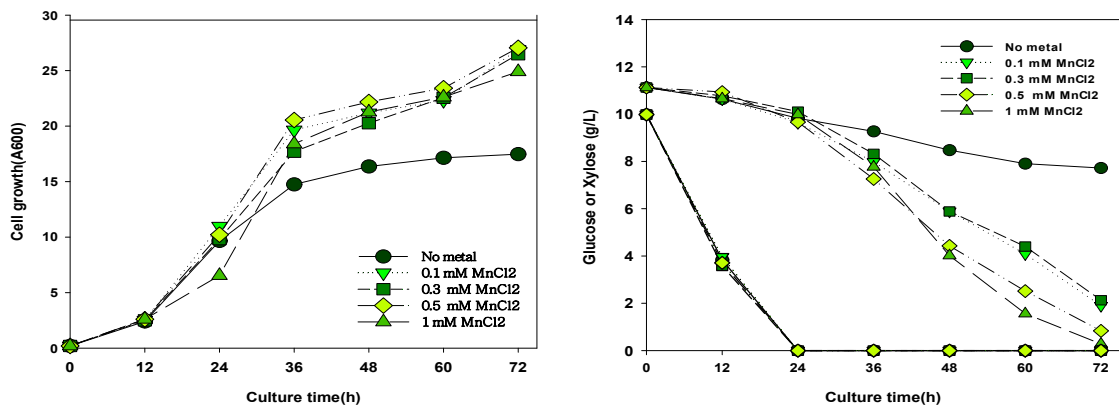


그림 6-43. XI를 발현하는 재조합 효모균주(Y2805 Δ gal80/T3-XI·H6)의 망간 함유 배지에서의 세포성장 및 xylose 소모량 분석

(8) 마그네슘과 망간 혼합 농도에 따른 xylose 이용능 확인

Xylose isomerase 발현시 20 mM 마그네슘보다 1mM 망간이 xylose를 이용하는데 있어

더 효과적인 것을 확인하였다. xylose 이용능에 가장 큰 효과를 보인 망간과 마그네슘을 함께 첨가하여 배양하면 xylose 이용능이 더 향상될 것으로 보여 0.5mM과 1mM 망간에 10mM, 20mM 마그네슘을 혼합하여 배양 후 세포성장 및 xylose 잔량을 측정하였다(그림 6-44). 그 결과 망간을 단독으로 첨가한 대조구에 비해 두 가지 금속이온을 혼합하여 첨가했을 때 더 높은 세포성장을 보였다. 또한 망간만 첨가한 경우 배양 72시간 동안 9.2~10.4g/L xylose를 소모했으나 망간과 마그네슘을 함께 첨가해준 경우 13.3~14.9g/L xylose를 소모하여 xylose 이용능이 모두 증가한 것을 확인하였고 0.5mM 망간+20mM 마그네슘 농도에서 가장 많은 xylose를 소모(14.9g/L)하여 xylose isomerase 활성을 위한 최적 농도임을 확인하였다.

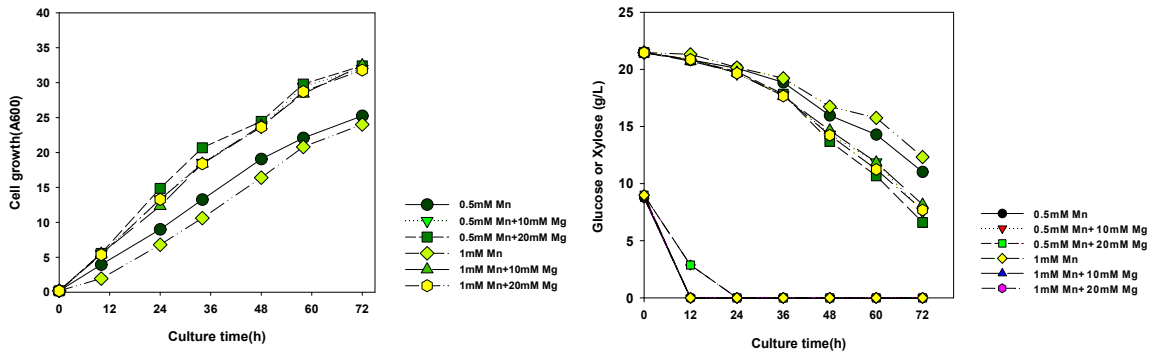


그림 6-44. XI를 발현하는 재조합 효모균주(Y2805Δ gal80/T3-XI·H6)의 망간과 마그네슘 함유 배지에서의 세포성장 및 xylose 소모량 분석

(9) Xylose isomerase의 intracellular와 extracellular 발현균주의 xylose 이용능 확인

Xylose isomerase를 세포 밖으로 분비발현 했을 때 glucose 존재 하에서도 xylose를 더 효율적으로 사용가능하다는 장점이 있기 때문에 실제로 xylose isomerase를 세포내 발현과 세포외로 분비 발현 시켰을 때 xylose 대사효율을 비교해 보았다. 탄소원으로 2% glucose와 xylose를 함유하는 YP(1% Yeast extract, 2% peptone)+1mM MnCl₂ 배지에서 84시간동안 배양한 후 배지에 존재하는 xylose와 에탄올을 HPLC 분석을 통해 확인하였다(그림 6-45). 두 균주 모두 84시간동안 xylose를 다 이용하지 못했으나 예상과는 달리 xylose isomerase를 세포내로 발현 했을 때 xylose를 더 빠르게 소모했으며 84시간 동안 16.5g/L 소모했다. 분비 발현 균주의 경우 8g/L 소모한 결과와 비교했을 때 세포내 발현균주가 xylose 대사 효율이 훨씬 좋은 것으로 확인되었다. 또한 세포내 발현 균주의 경우 배양 60시간에 약 3 g/L xylulose가 생성되었는데 이는 세포내 생성된 xylulose의 소모속도가 낮기 때문에 세포내에서 Xylulose 농도가 높아져서 세포외로 diffusion된 것으로 보인다. 두 균주 모두 glucose를 소모하여 에탄올이 생산되었으나 xylose를 소모하는 동안 에탄올 생산량이 크게 증가되지 않아 xylose를 이용하여 에탄올 발효를 하지 못하는 것을 확인했다. 따라서 xylose isomerase를 세포내/외 동시 발현을 하게 되면 xylose 대사 능력이 더 향상되고 xylulose 생성도 증가시켜 에탄올 발효가 가능할 것으로 기대하여 xylose isomerase의 세포내/외 동시발현 균주를 구축하였다.

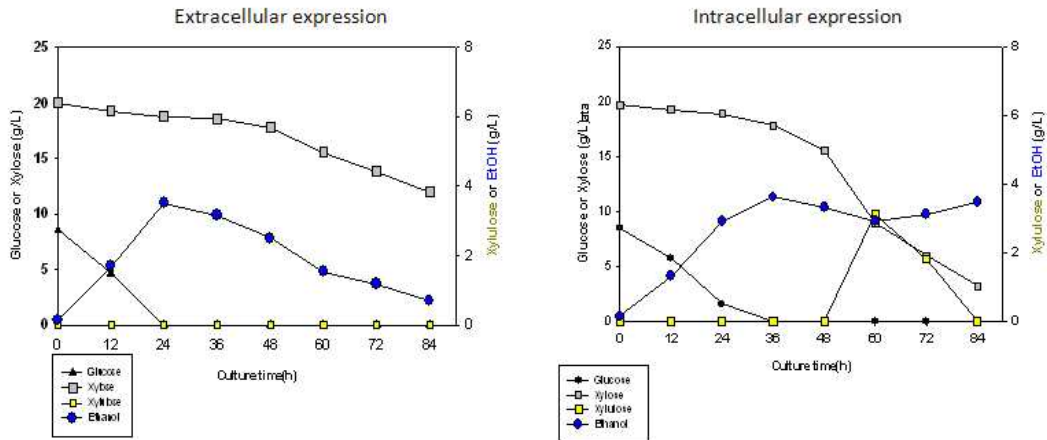


그림 6-45. Xylose isomerase의 intracellular, extracellular 발현균주의 xylose 소모 및 에탄올 생산 확인

(10) Xylose isomerase 세포내/외 동시발현 균주의 에탄올 발효

URA(YGa-T3-XI·H6)와 LEU(YGa-XI·H6) 선별 마커를 포함하고 있는 xylose isomerase 발현 벡터를 Y2805 1 균주에 형질전환 하였다. 두 발현벡터 도입여부는 PCR을 통해 확인하였고 xylose isomerase 분비 발현을 확인하기 위해 xylose가 포함된 배지에서 배양하여 단백질 발현여부와 xylose 이용능을 분석하였다. 그 결과 그림 6-46에서 보는바와 같이 xylose isomerase가 도입된 균주들은 모두 발현이 되는 것을 확인하였고 10g/L xylose중 3g/L xylose를 소모하였다. 따라서 xylose isomerase 동시 발현 균주로부터 에탄올 생산이 가능한지 에탄올 발효를 통해 확인하였다.

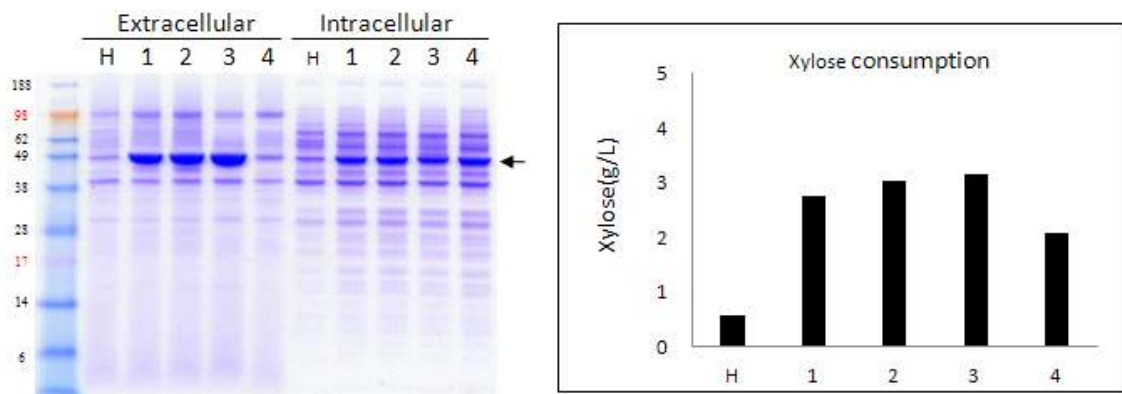


그림 6-46. Xylose isomerase의 세포내/외 동시발현 균주의 단백질 발현과 xylose 소모 확인

에탄올 배양배지(0.5% yeast extract, 0.5% pepton, KH₂PO₄, 0.2% Ammonia sulfate, 0.04% MgSO₄H₂O, pH5.0)에 2% xylose와 0.5mM MnCl₂, 20mM MnCl₂를 첨가하였고 30°C, 100rpm에서 72시간 동안 배양하였다. 대조군으로 xylose isomerase의 세포내 발현 균주와 분비 발현 균주의 xylose 소모량과 에탄올 생산량을 같이 비교하였다. 그 결과 그림 6-47에서 보는 바와 같이 xylose isomerase를 세포내와 세포외로 각각 발현한 균주보다 동시발현 균주의 세포성장이 더 빠른 것을 확인하였다. xylose 소모량은 세포내 발현 균주가 7.3g/L, 세포외 분비 발현 균주는 10.7g/L, 동시 발현균주가 14g/L xylose를 소모하여 세포내/외로 동시 발현했을 때 xylose 이용능이 향상된 것을 확인하였으나 현재 상태로는 에탄올 생산은 확인되지 않았다. 따라서 이 균주에 xylose의 활용능력을 개선하기 위해서 외부로부터 xylose 대사 과정에 작용하는 유전자를 추가 도입하여 5탄당의 활용능력을 증진시키기 위한 연구를 진행하였다.

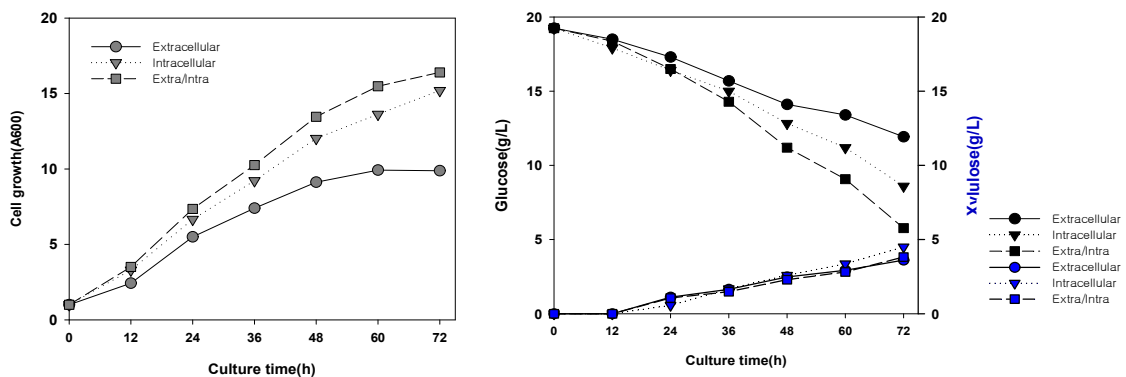


그림 6-47. Xylose isomerase의 세포내/외 동시발현 균주의 xylose 소모 및 에탄올 생산 확인

(11) *Pichia stipitis* 유래 XR, XDH, XK 유전자 도입

효모 *S. cerevisiae*의 5탄당 활용능력을 향상시키기 위하여 xylose isomerase 뿐만 아니라 *Pichia stipitis* 유래의 XR (xylose reductase), XDH (xylitol dehydrogenase) 및 XK (xylulokinase)를 염색체에 추가 도입 하였다. URA3 유전자를 함유하는 Yip5XR-XDH와 neomycine selection marker를 가지고 있는 δ ISXK plasmid는 서울대로부터 제공받았다.(그림 6-48.) 2종의 효모 integration 벡터는 순차적으로 효모에 형질전환할 수 있도록 design 되었으며 δ ISXK에 포함된 delta sequence 부분을 제한효소로 처리하여 염색체내로 도입하였다. 확보된 균주의 유전자 삽입여부는 PCR을 이용하여 확인하였다. 여기에 다시 Yip5-XR-XDH를 제한효소로 처리하여 염색체내 delta 서열내로 도입하여 최종적으로 XK, T3-XI, XI, XR-XDH 유전자가 순차적으로 모두 도입된 8가지 균주를 확보(표 6-15)하였고 에탄올 발효를 통해 에탄올 생산 여부를 확인해보았다.

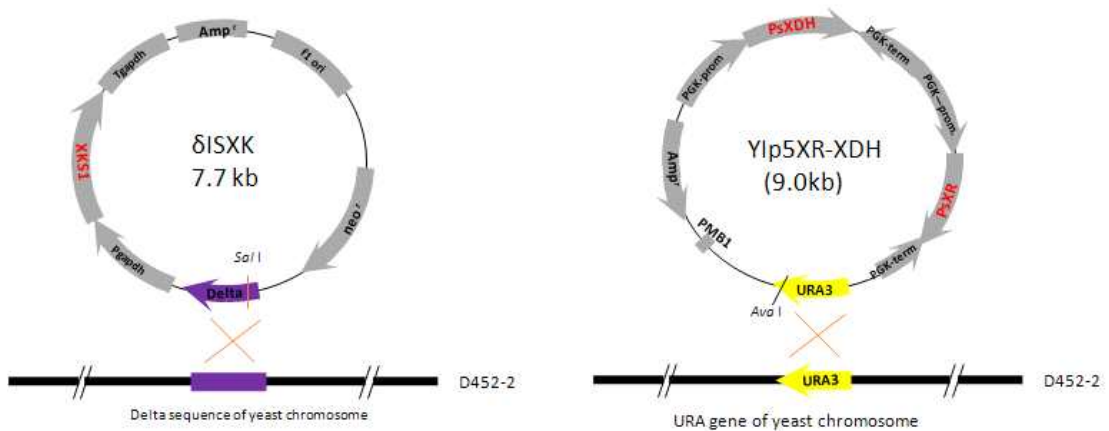


그림 6-48. XR, XDH 및 XK 유전자 도입을 위한 효모 integration 벡터

표 6-15. Xylose 이용능력을 가진 균주 list

	Xylose 이용 균주
1	D452-2/ XK(Int)
2	D452-2/ XK(Int), ST3-XI(Pla)
3	D452-2/ XK(Int), XI(Pla)
4	D452-2/ XK(Int), XI, ST3-XI(Pla)
5	D452-2/ XK(Int), XR, XDH(Int)
6	D452-2/ XK(Int), XR, XDH(Int), XI(Pla)
7	D452-2/ XK(Int), XR, XDH(Int), ST3-XI(Pla)
8	D452-2/ XK(Int), XR, XDH, XI(Pla), ST3-XI(Pla)

(12) Glucose와 xylose 혼합 기질을 이용한 에탄올 발효

섬유질계 바이오매스를 당화시키는 경우, 생산물로서 육탄당인 glucose와 오탄당인 xylose가 공존하므로 glucose와 xylose를 동시에 효율적으로 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는지 확인하고자 발효를 수행하였다.

본 연구에서 확보된 xylose 이용능이 있는 균주들의 에탄올 생산을 확인하기 위해 5ml YPD에 접종하여 24시간 종균배양한 뒤 5ml glucose와 xylose를 포함하는 발효 배지(1% glucose, 2% xylose와 1% galactose, 1% Yeast extract, 2% Bacto-peptone, 0.5mM MnCl₂, 20mM MnCl₂) 50ml에 종균 배양액을 접종하고 30°C에서 12시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률, glucose 및 xylose 잔여량, 에탄올 생산량을 측정하였다.

그 결과 그림 6-49 및 표 6-16에 나타난 바와 같이 24시간 경과 후 glucose와 galactose를 이용하여 에탄올을 생산하였다. 이 때 XK만 발현한 균주의 경우 glucose와 galactose를 모두 소모한 24시간 이후에도 xylose를 거의 이용하지 못했고 배양 72시간까지 에탄올 생산량이 증

가하지 않아 최종적으로 5.0g/L 에탄올이 생산되었다. 그러나 xylose 이용 균주들의 경우 glucose와 galactose를 소모한 24시간 이후부터 xylose를 소모하기 시작했으며 XI를 intracellular와 extracellular로 각각 발현한 균주보다 동시발현 균주가 xylose 이용능이 향상되었지만 이 균주에 XR-XDH가 추가 도입된 균주에서 xylose 이용능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

D452-2/XK,XI(Intra/Extra),XR-XDH 균주의 경우 glucose가 완전히 소모된 12시간 이후부터 xylose 소모량이 증가하면서 에탄올 생산을 증가시켰다. 최종적으로 발효 시작 후 72시간동안 xylose를 거의 다 소모했으며, 이때 생성된 에탄올은 14.7 g/L였다. 따라서 xylose 이용능이 향상된 재조합 균주의 경우 오탄당과 육탄당을 모두 이용하여 에탄올 발효가 가능하므로 섬유질계 바이오매스로부터의 바이오에탄올 제조 등의 산업공정에 널리 활용 될 수 있을 것으로 사료된다. 오탄당 활용과 관련하여 xylose isomerase를 분비발현하여 배지상에서 xylose를 xylulose로 변환하고 바이오에탄올 생산공정에 적용하는 기술은 세계 최초의 시도이며 특허출원하였다.

표 6-16. Xylose 이용 균주별 xylose소모량 및 에탄올 생산량 비교

Intracellular or Extracellular Expression	XK	XK, T3-XI	XK, XI	XK, T3-XI, XI	XK, XR-XDH	XK, XR-XDH, T3-XI	XK, XR-XDH, XI	XK, XR-XDH, T3-XI, XI
Xylose consumption (g/L)	2.66	8.30	7.54	10.5	7.06	9.67	7.73	17.10
Ethanol(g/L)	5.05	9.47	8.52	9.26	8.79	10.37	9.46	14.72

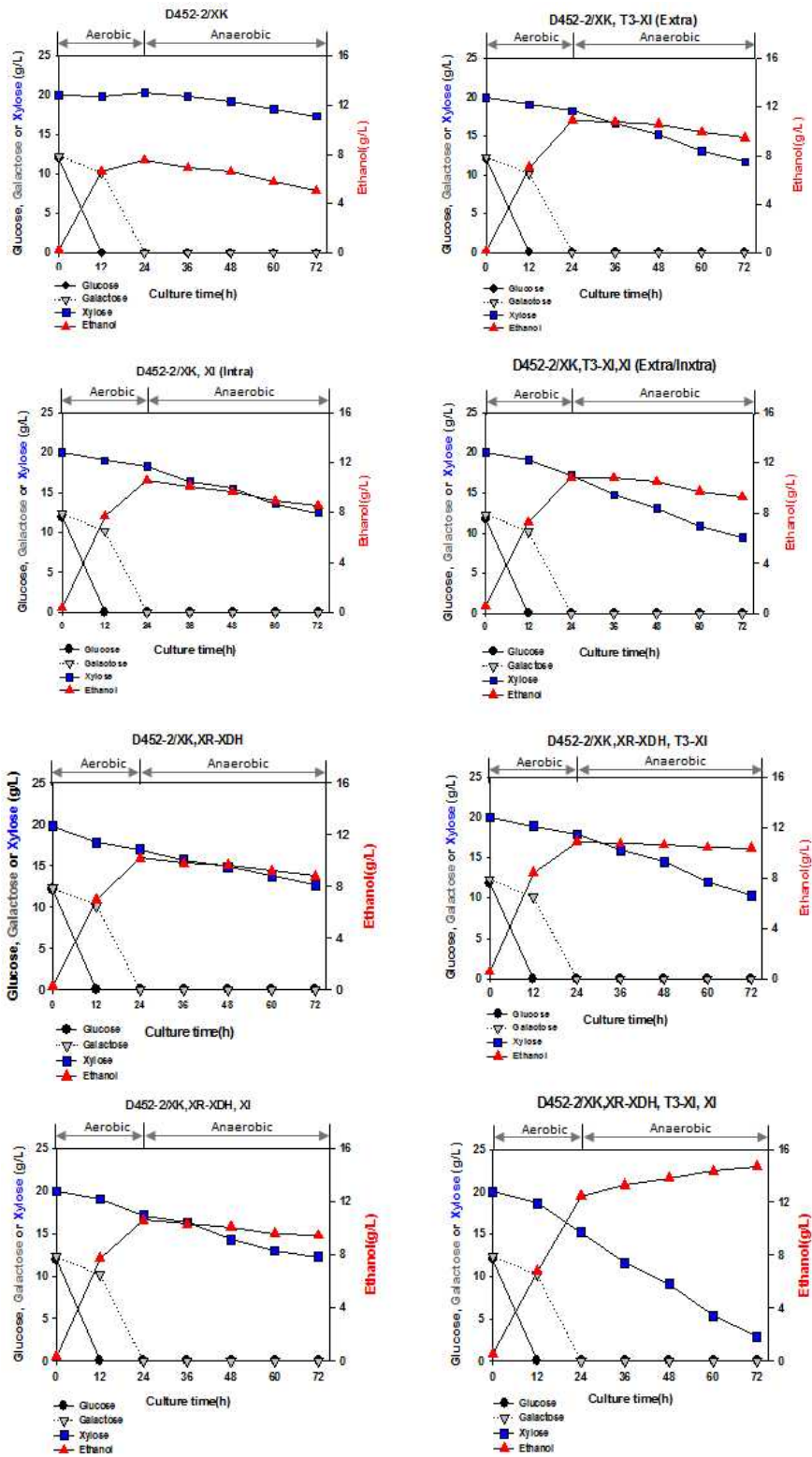


그림 6-49. 재조합 균주별 Glucose와 xylose 혼합 기질에서의 에탄올 생산 비교

제 7 절 돼지감자 이눌린 활용 바이오신소재 생산

1. 바이오플라스틱용 lactic acid 생산

가. KM 균주 활용 바이오플라스틱용 lactic acid 생산

젖산은 식품, 의약, 화장품 산업 등에서 폭넓게 사용되어온 화합물이지만 최근 폴리젖산(polylactic acid, PLA)의 원료로서 사용됨에 따라 화학산업에서 폭발적으로 사용이 확대되고 있는 재료이다. 종래의 폴리젖산은 석유로부터 생산되는 refinery 제품이지만 최근 바이오매스로부터 젖산의 생산이 가능해짐에 따라 전 세계적으로 생물학적 젖산 생산시스템 구축에 관한 연구가 진행되고 있다. KM 균주는 빠른 성장능과 다양한 기질을 활용할 수 있는 능력 등이 젖산 생산에 유리한 여러 가지 장점을 가지고 있기 때문에 KM 균주는 젖산 생산용 CBP 균주로서의 활용가치가 높다. 특히 돼지감자 이눌린을 이용하여 젖산을 생산한다면 경제성을 확보한 젖산 생산 시스템 구축이 가능할 것으로 사료되어 KM 균주를 이용하여 유용케미컬의 가장 큰 시장을 형성하고 있는 젖산생산용 균주를 개발하였다.

(1) *Lactobacillus*속 유래의 lactate dehydrogenase(LDH) 유전자 발현

본 연구를 통하여 pdc1(pyruvate decarboxylase) 유전자를 불활성화 시킨 *K. marxianus* 균주에서는 pyruvate가 에탄올로 발효되지 못함을 확인하였기 때문에 상기 균주에 lactate dehydrogenase 유전자를 발현함으로써 pyruvate로부터 젖산을 직접 생산하는 균주를 제작하고자 하였다. 젖산 생산성을 결정하는 요인으로서 모 균주의 특성과 lactate dehydrogenase 활성이 가장 중요하기 때문에 *K. marxianus*에서 활성이 우수한 lactate dehydrogenase 유전자를 선별하고자 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*로부터 lactate dehydrogenase 유전자를 클로닝하여 *K. marxianus*에 발현한 후 젖산 생산능을 비교하고자 하였다.

먼저 각각의 균주로부터 추출된 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 통해 유전자를 확보하였으며 각각의 유전자를 pTEF1 vector에 삽입하여 8개의 vector를 구축하였다(그림 7-1). 구축된 vector를 제한효소 Nhe I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들고 pdc1 mutant 균주인 KM 25571 Δ pdc1에 형질전환하여 형질전환체로부터 단일균주를 선별하였다. 형질전환체는 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) 배지에서 40시간 배양하고 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석하였다(그림 7-2). L-LDH와 D-LDH 유전자 크기로부터 유추되는 단백질 크기는 35 kD 단백질로 생산되는데 세포내 타 단백질과 혼재된 상태라 정확한 발현 밴드 확인은 어려웠다. 그러나 세포추출액내의 LDH 활성 분석결과 대부분 형질전환하지 않은 대조구에 비해 활성이 월등히 높음을 확인하였다 (data not shown).

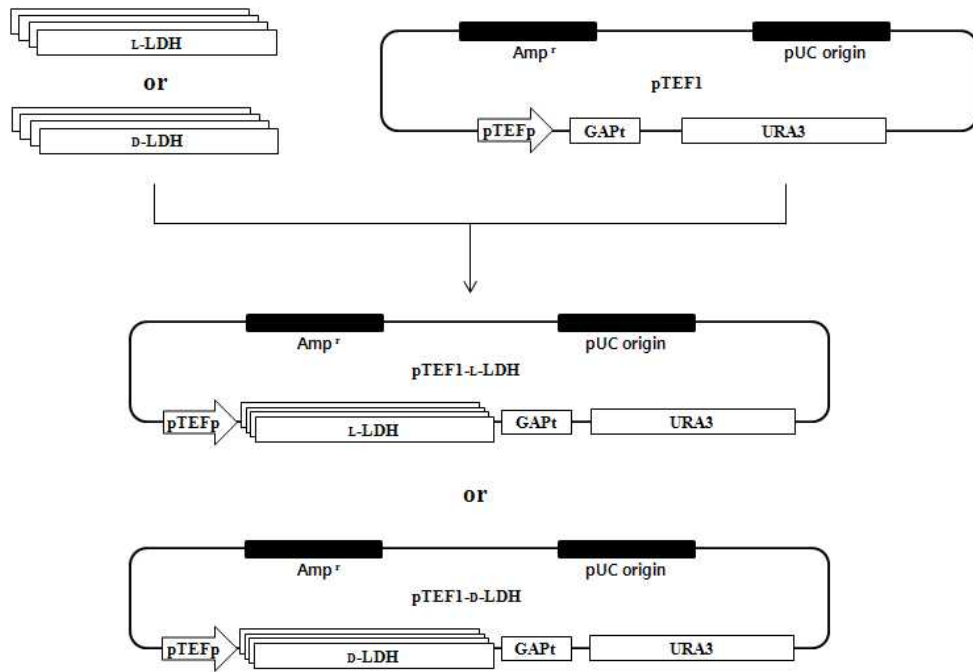


그림 7-1. L-LDH 또는 D-LDH 발현을 위한 *K. marxianus* vector

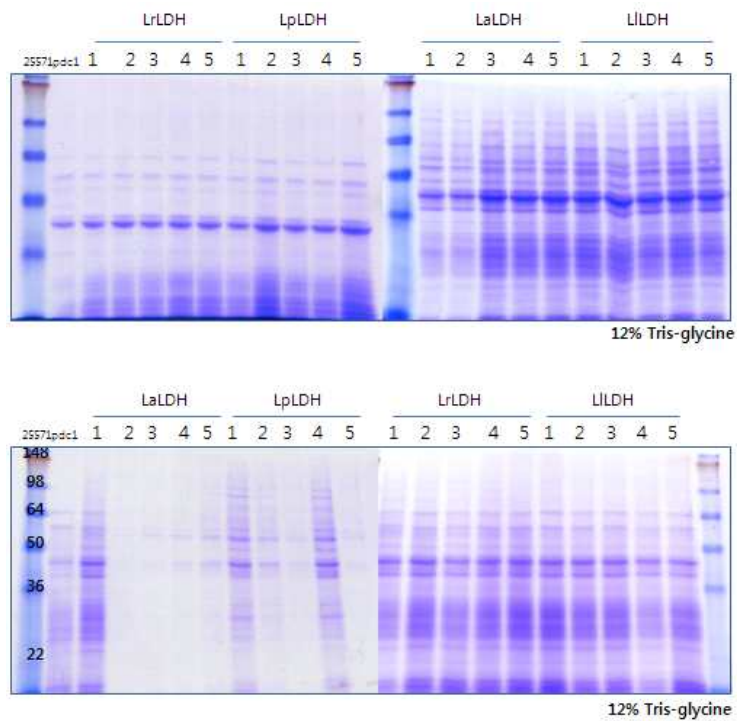


그림 7-2. 형질전환체들의 SDS-PAGE 분석

(2) 반응온도에 따른 lactic acid 생산

LDH 활성이 확인된 균주를 이용하여 lactic acid 생산을 위한 최적 반응온도를 확인하기 위해 30°C, 35°C 에서 flask 배양하였다. 각 균주들을 YPD 배지에서 진탕 배양하여 세포를 회수한 후 DW로 2회 세척한 다음 calcium carbonate를 함유하는 YPD10 (1% yeast extract, 2% peptone, 10% glucose) 배지에 접종하여 72시간 동안 배양하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 30°C 보다는 35°C 에서 lactic acid 생산량과 수율이 높은 것을 확인하였다(표 7-1). 30°C 에서는 25571pdc1/L-LpLDH, 25571pdc1/D-LrLDH 균주에서 lactic acid 생산량이 가장 높았고, 35°C 에서는 25571pdc1/L-LpLDH, 25571pdc1/D-LpLDH 균주에서 lactic acid 생산량이 높은 것으로 보아 온도에 따라서 유전자별 생산량이 다른 것을 확인하였다.

표 7-1. 반응온도에 따른 lactic acid 생산량 분석

(30 °C 배양)

Strains	lactic acid production (g/l)	Yield (%)	Optical purity (%)
L-Lactic acid			
25571pdc1/L-LaLDH	25	82	99.9
25571pdc1/L-LpLDH	31	79	99.9
25571pdc1/L-LrLDH	25	73	99.9
25571pdc1/L-LILDH	18	53	99.9
D-lactic acid			
25571pdc1/D-LaLDH	0.5	2	99.9
25571pdc1/D-LpLDH	39	63	99.9
25571pdc1/D-LrLDH	49	76	99.9
25571pdc1/D-LILDH	30	45	99.9

(35 °C 배양)

Strains	lactic acid production (g/l)	Yield (%)	Optical purity (%)
L-Lactic acid			
25571pdc1/L-LaLDH	42.5	73	99.9
25571pdc1/L-LpLDH	46.3	79	99.9
25571pdc1/L-LrLDH	46.0	78	99.9
25571pdc1/L-LILDH	22.6	61	99.9
D-lactic acid			
25571pdc1/D-LaLDH	10.4	58	99.9
25571pdc1/D-LpLDH	40.0	78	99.9
25571pdc1/D-LrLDH	31.0	70	99.9
25571pdc1/D-LILDH	30.0	45	99.9

(3) Glucose로부터 고농도의 lactic acid 생산

Lactic acid를 고농도로 생산하기 위해 KM 25571pdc1/L-LpLDH 균주로 유가식 배양을 수행하였다. 본 배양에 들어가기 전에 100ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 고농도 발효액에 40%의 glucose(final 10%)를 feeding하여 30°C 와 35°C 에서 lactic acid 전환 반응을 수행하였다(그림 7-3). HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 30°C 에서는 97.3 g/l의 lactic acid가 생성되어 79.2%의

전환율을 보였고, 35°C에서는 105.5 g/l의 lactic acid가 생성되어 88.1%의 전환율을 보였다.

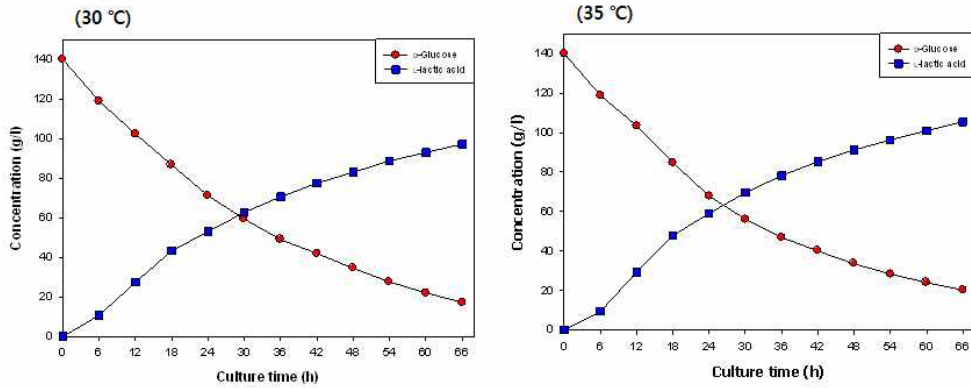
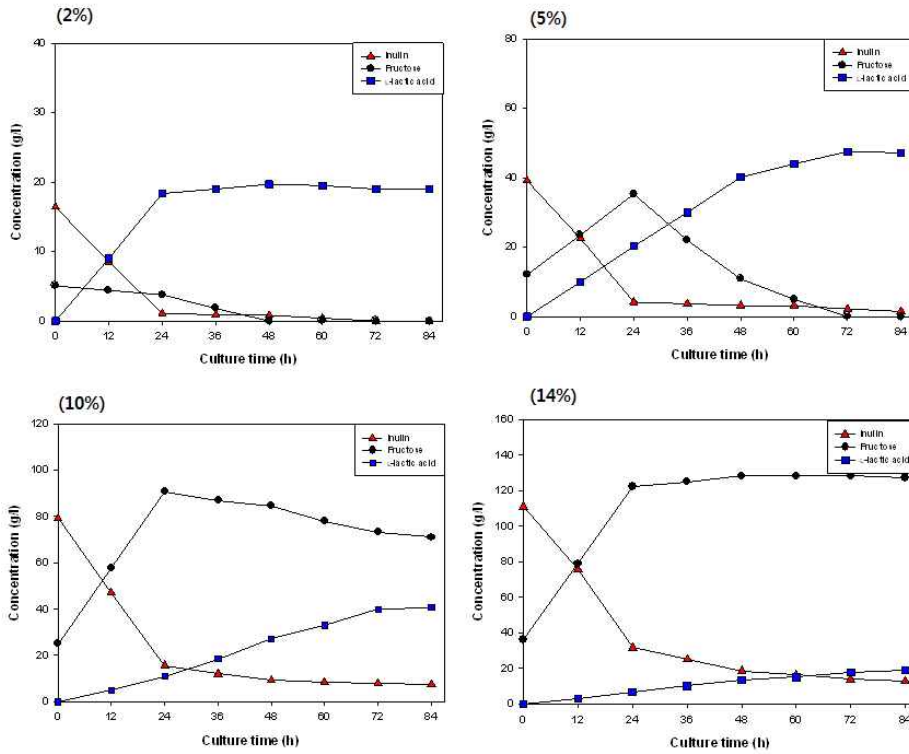


그림 7-3. Glucose로부터 고농도의 lactic acid 생산

(4) 플라스크 배양을 통한 돼지감자 전분으로부터 lactic acid 생산

돼지감자 이눌린을 autoclave (121°C에서 20분)하여 얻은 상등액을 HPLC로 성분 분석 결과 60%의 inulin이 함유되어 있는 것을 확인하였다. inulin 농도에 따른 lactic acid 생산량을 비교하기 위해 돼지감자 전분을 농도별로 첨가하여 flask 배양하였다. 각 균주들을 YPD 배지에서 진탕배양하여 세포를 회수한 후 DW로 2회 세척한 다음 3% calcium carbonate가 첨가된 돼지감자 전분에 접종하여 84시간 동안 배양하면서 시간별로 lactic acid 전환율을 비교하였다(그림 7-4). 모든 농도에서 첨가한 모든 Inulin은 fructose로 전환되었으나 Inulin 농도가 10% 이상일 경우 젖산 생산성은 오히려 감소하였으며 5% 일 때 lactic acid 생산량이 가장 높았고, inulin 농도가 낮을수록 lactic acid 전환율이 좋은 것으로 확인하였다.



Inulin 함량 (%)	당소모량 (g/l)	lactic acid 생산량 (g/l)	Yield (%)	Culture time (h)	Optical purity of lactic acid (%)
2	20.0	19.7	98.5	48	99
5	50.0	47.5	95.0	72	99
10	50.1	42.2	86.2	120	99
12	45.2	32.0	71.1	120	99
14	44.3	23.0	51.9	120	99

그림 7-4. Inulin 농도에 따른 lactic acid 생산량 분석>

(5) Nitrogen source에 따른 lactic acid 생산량 분석

돼지감자 전분에 yeast extract를 농도별로 첨가하여 lactic acid 생산량을 분석하였다. 각 균주들을 YPD 배지에서 진탕배양하여 세포를 회수한 후 DW로 2회 세척한 다음 3% calcium carbonate가 첨가된 돼지감자 전분에 접종하여 72시간 동안 배양하여 lactic acid 전환율을 비교하였다(표 7-2). Yeast extract 첨가량이 증가할수록 세포의 성장이 늘어났으며 lactic acid 생산량을 극대화하기 위해서 추가적인 nitrogen source는 불필요한 것으로 확인되었다.

표 7-2. Yeast extract 첨가량에 따른 lactic acid 생산량 분석

Yeast extract 첨가량 (%)	당 소모량 (g/l)	lactic acid 생산량 (g/l)	Yield (%)	Optical purity of lactic acid (%)
0	56.8	53.3	93.8	99
0.1	58.3	50.4	86.3	99
0.2	59.0	50.3	85.3	99
0.3	59.0	50.3	85.2	99
0.4	58.1	49.2	84.7	99
0.5	59.4	48.9	82.3	99
1	57.6	48.2	83.7	99

(6) 회분식 발효기를 이용한 돼지감자 전분으로부터 고농도의 lactic acid 생산

KM 25571pdc1/L-LpLDH 균주를 이용하여 돼지감자로부터 고농도의 lactic acid를 생산하기 위해 회분식 배양을 수행하였다. 100ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C 에서 24시간 동안 배양하여 세포를 회수한 후 DW로 2회 세척한 다음 돼지감자 전분에 접종하여 66시간 동안 배양하면서 시간별로 lactic acid 전환율을 비교하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 130.1 g/l의 L-lactic acid가 생산되어 98.9%의 전환율을 보였다(그림 7-5).

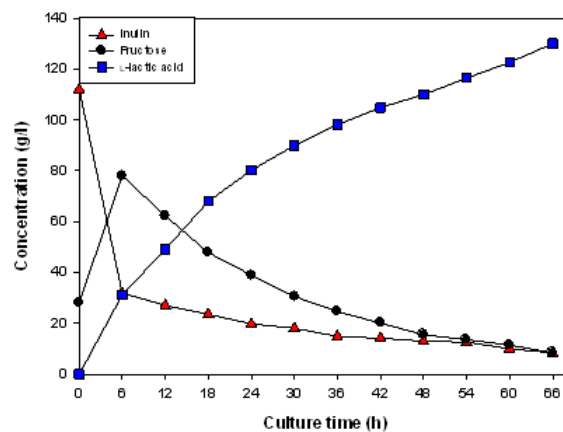


그림 7-5. 돼지감자 전분으로부터 고농도의 lactic acid 생산

(7) 유가 배양식 발효를 통한 D-lactic acid 생산

유가 배양식 발효를 통한 고농도 lactic acid를 생산하기 위해 먼저 100g/L 돼지감자를 121°C에서 20분간 고압 멸균 후 원심분리하여 얻은 상층액에 다시 100g/L 돼지감자를 녹여 (120g/L inulin) lactic acid 생산을 위한 기질로 사용하였다. 본 배양에 들어가기전 200ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C에서 OD600nm 값이 60에 도달할 때 세포를 회수한 후 돼지감자 이눌린에 접종하여 혐기성 조건에서 72시간 동안 배양하였다. 이때 배지에 남아있는 fructose 농도에 따라 100g/L inulin을 추가 공급하였다. 그 결과 배양 32시간까지는 fructose 소모에 따라 lactic acid 생산량도 증가하였으나, inulin을 추가 공급해준 32시간 이후부터 lactic acid 생산량이 증가하지 않아 최종적으로 배양 72시간동안 115g/L lactic acid가 생산되었다. 또한 배지에 남아있는 높은 농도의 fructose에 의해 inulinase 생산이 저해 받아 inulin을 분해하지 못한 것으로 보인다. 따라서 배지내 fructose 농도를 20~30g/L로 유지하고 기질인 inulin과 균체 농도를 높여 한번 더 유가식 발효를 진행하였다.

유가식 발효를 위한 배양조건은 위 서술된 방법과 동일하게 수행되었으며 170g/L inulin이 기질로 사용되었다. 세포배양은 OD600nm 값이 80에 도달 했을 때 회수하여 사용했으며 혐기성 조건에서 76시간 동안 배양하면서 lactic acid 전환율을 확인하였다. 이때 배지에 남아있는 fructose 농도에 따라 100g/L inulin을 추가 공급하였다. 그 결과 첫 번째 유가식 발효와 비슷하게 inulin을 추가 공급해준 44시간 이후부터 lactic acid 생산이 증가하지 않았지만 고농도 세포 배양액 때문에 lactic acid 생산량은 증가한 것으로 보였다. 최종적으로 배양 76시간 동안 156.7g/L fructose를 소모하여 136.9g/L lactic acid를 생산했고 87%의 전환율을 보였다(그림 7-6).

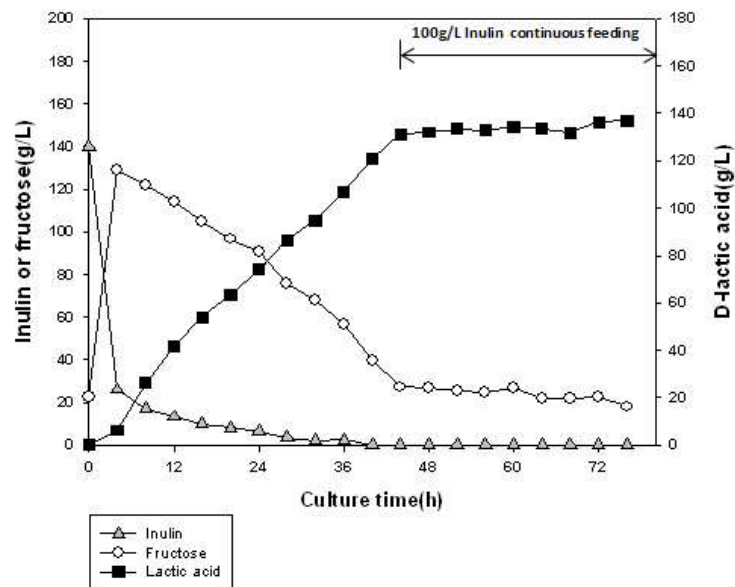


그림 7-6. 유가식 발효를 통한 고농도의 lactic acid 생산

(8) pH 내성 확인

발효를 통해 생산된 lactic acid는 pH3.8 이상에서는 dissociated form으로 존재하게 되는데 실제 PLA 생산을 위해서는 undissociated form의 젖산이 필요하다. 따라서 발효 후 황산을 사용하여 acidulation 과정이 필요하다. 이는 대규모 발효시 lactic acid 회수과정에서 고농도의 황산을 대량으로 사용해야 하고 결과적으로 발생하는 대량의 gypsum 처리문제가 있다. 따라서 가급적 낮은 pH에서의 발효를 통해 황산사용을 줄일 필요가 있다. 그러나 발효균주가 pH에 대한 저항성이 낮을 경우 pH 조절을 해 주지 않으면 세포의 성장이나 발효에 문제가 발생한다. 본 연구에서 개발된 KM 균주가 pH에 대한 내성정도를 확인하기 위하여 배지에 lactic acid를 농도별로 첨가하여 flask 배양 하였다. pH 5이상에서는 세포 성장에 영향을 미치지 않았지만 pH 3 ~ pH 4에서는 세포 성장에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 그리고 pH 3 이하에서는 세포가 전혀 성장하지 못하였다(그림 7-7). 따라서 KM 균주를 활용하여 lactic acid를 고효율로 생산하기 위해서는 acidic pH에 대한 내성문제 해결이 요구된다.

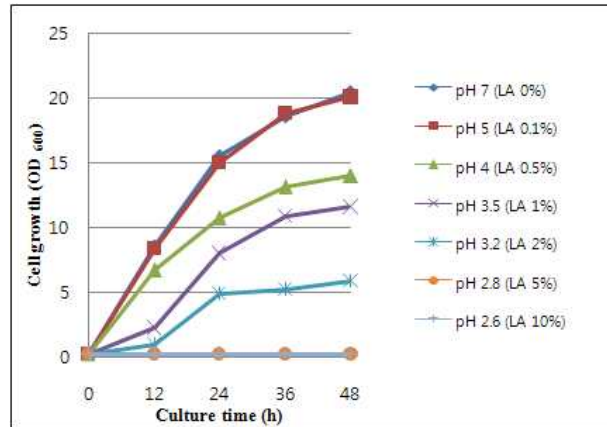
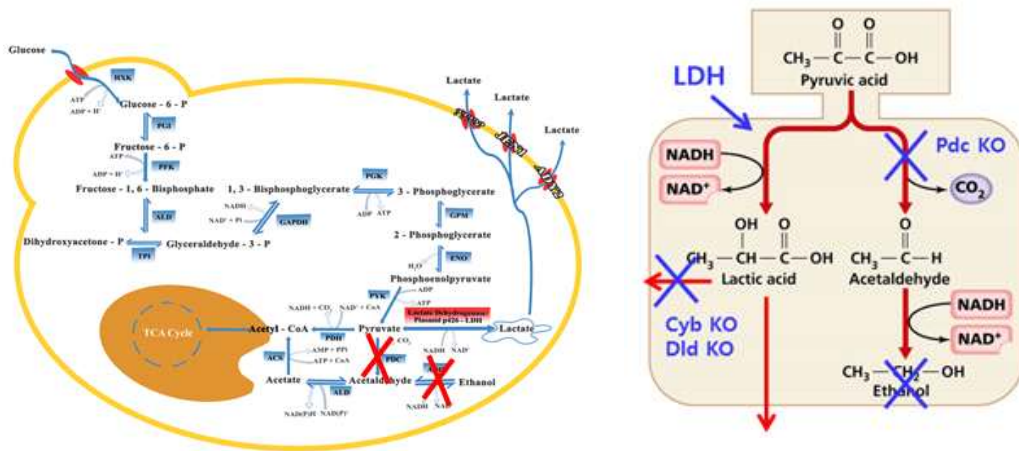


그림 7-7. pH에 따른 세포 성장 확인

나. *K. marxianus* 대사공학

효모 KM 균주를 이용하여 lactic acid를 대량생산하기 위하여 그림 7-8에서 보는 바와 같이 pyruvate decarboxylase와 alcohol dehydrogenase를 차단하여 에탄올 생산경로를 봉쇄하고 pyruvate로부터 lactic acid가 생산될 수 있도록 lactate dehydrogenase를 도입하여 돼지감자 이눌린으로부터 L-form과 D-form의 lactic acid를 생산한 바 있다. 추가적인 균주 개량을 통해 생산성 증가연구를 수행하였다.



lactic acid
 그림 7-8. 효모 이용 lactic acid 생산을 위한 대사경로 및 대사공학

(1) Lactic acid 생산성 증가를 위한 균주 개량

효모는 자체적으로 lactic acid를 탄소원으로 사용하기 위하여 lactic acid 분해활성을 가지고 있다. 배지에 lactic acid가 고농도로 축적될 경우 내재된 lactate dehydrogenase에 의하여 lactic acid를 pyruvate로 전환하는 산화반응이 일어나며 이러한 반응은 lactic acid의 생산성을 저하시키는 원인이 된다. 효모 *S. cerevisiae*의 경우 이러한 반응을 담당하는 효소의 유전자인 CYB2 (cytochrome-c-oxidoreductase) 와 DLD1 (D-lactate dehydrogenase) 유전자가 알려져 있다. 이러한 유전자 서열을 이용하여 KM 균주의 유전체 정보로부터 각각의 유사 유전자를 확인하였고 이를 차단함으로써 lactic acid 생산성을 개선하기 위하여 3차년도에 제작한 KM Δ pdc1 균주에 KmCYB2 (L-lactate cytochrome-c oxidoreductase) 유전자 또는 KmDLD1 (D-lactate dehydrogenase) 유전자를 결실시키고 L-LpLDH 또는 D-LpLDH 유전자를 도입하였다(그림 7-9).

먼저, KmCYB2 유전자를 불활성하기 위하여 BY25571 genomic DNA를 template로 하여 KmCYB2 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ628과 HJ629, HJ630과 HJ631 프라이머를 이용하여 증폭 후 프라이머 Tc-f와 U200r, U200f와 Tc-r을 이용하여 증폭된 *S. cerevisiae* URA3 DNA 절편과 overlap extension PCR을 수행하였다. 각 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 두 절편을 연결하였고, overlap extension PCR 산물은 BY25571 Δ pdc1 균주 (KCTC12225BP)에 형질전환하였다.

KmCYB2 locus에 PCR 단편이 도입된 균주를 우라실(uracil)이 없는 선택배지에서 선별하였다. 형질전환 여부를 프라이머 HJ628과 HJ632, U200f와 HJ632를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR 밴드를 확인하였다. KmCYB2 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ633와 HJ631 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 KmCYB2 유전자가 결실되었음을 확인하였다 (그림 7-10).

KmDLD1 유전자를 불활성하기 위하여 KmCYB2 유전자 결실방법과 동일한 방법을 사용하였다. BY25571 genomic DNA를 template로 하여 KmDLD1 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ673과 HJ674, HJ675와 HJ676 프라이머를 이용하

여 증폭 후 프라이머 Tc-f와 U200r, U200f와 Tc-r을 이용하여 증폭된 URA3 DNA 절편과 overlap extension PCR을 수행하였다. 각 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 두 절편을 연결하였고, overlap extension PCR 산물은 BY25571Δ pdc1 균주(KCTC12225BP)에 형질전환하였다. 형질전환 여부를 프라이머 HJ673과 HJ677, U200f와 HJ677를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR 밴드를 확인하였다.

KmDLD1 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ678와 HJ676 프라이머를 이용하여 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 KmDLD1 유전자가 결실되었음을 확인하였다 (그림 7-11). URA3 cassette에 존재하는 URA3 유전자를 제거하기 위해 YPD 배지에서 4~6시간 배양 후 5-FOA 배지에서 선별하였다. PCR을 통해 URA3 유전자 pop-out 여부를 확인한 결과 URA3 유전자가 제거된 균주 BY25571Δ pdc1Δ cyb2와 BY25571Δ pdc1Δ dld를 얻을 수 있었다. 이후, L-LpLDH 또는 D-LpLDH 유전자를 도입하기 위해 pTEF1-L-LpLDH vector 또는 pTEF1-D-LpLDH vector (그림 5-12)를 Nhe I 으로 처리한 후 형질전환하여 단일 균주를 선별하였다.

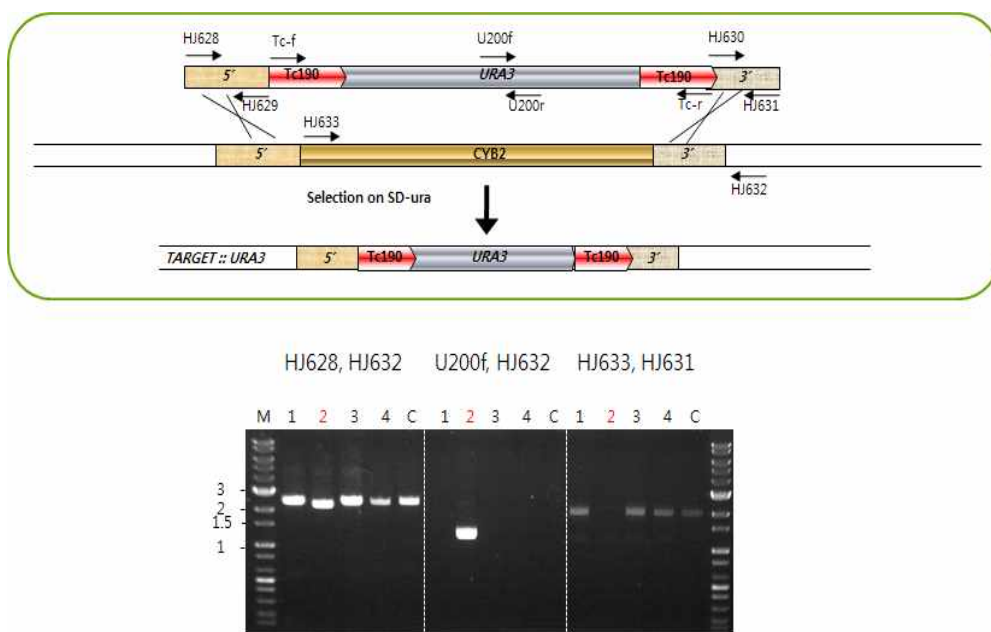


그림 7-9. URA3 cassette를 이용한 *KmCYB2* gene disruption 과정

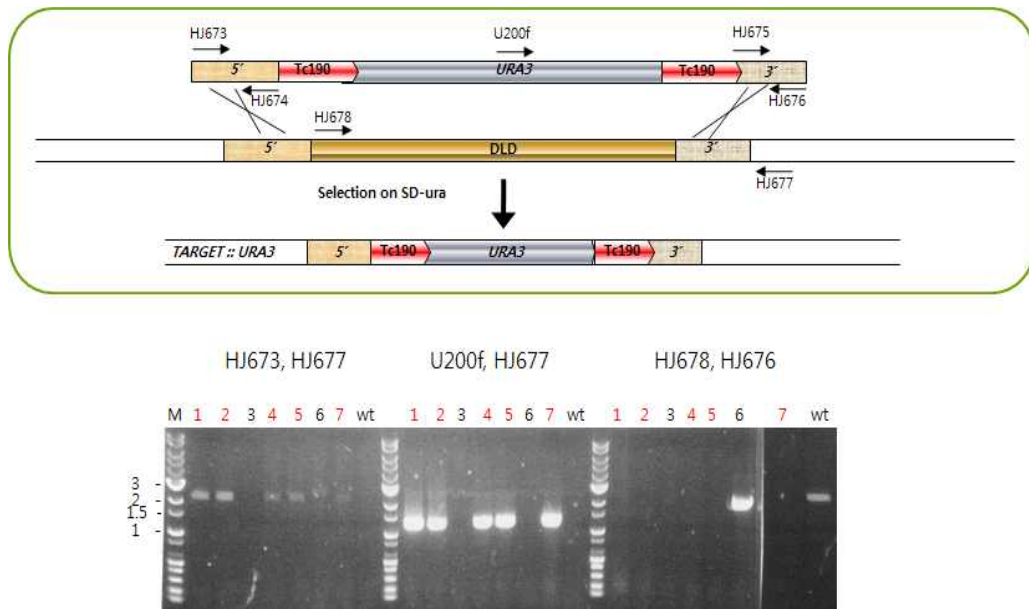


그림 7-10. *URA3* cassette를 이용한 *KmDLD1* gene disruption 과정

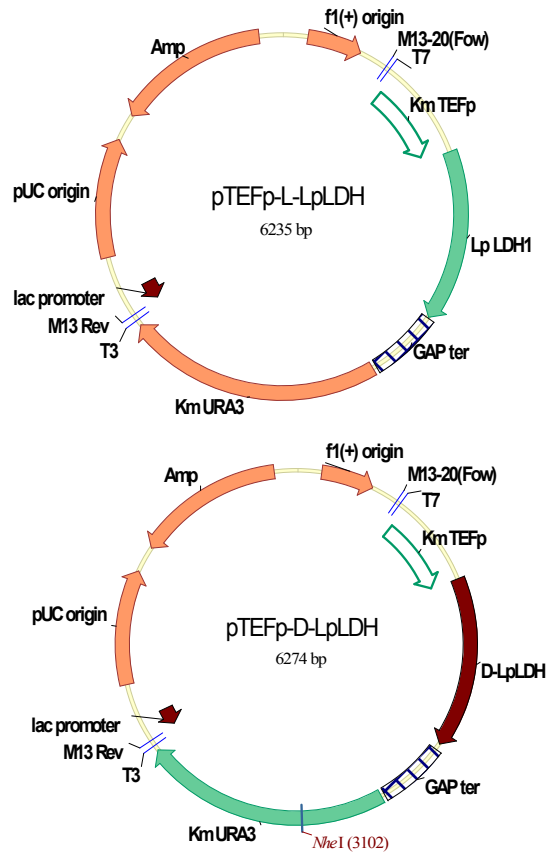


그림 7-11. L-LDH 또는 D-LDH 발현을 위한 *K. marxianus* vector

(2) Lactic acid 생산능 확인

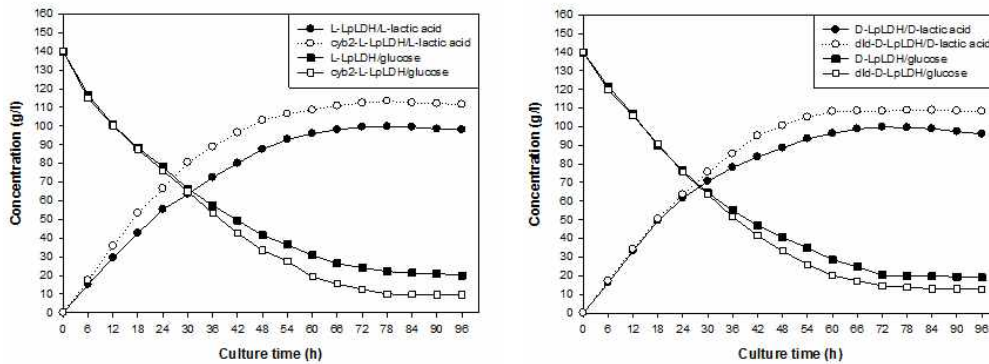
형질전환체의 lactic acid 생산능을 확인하기 위하여, YPD 배지에서 진탕배양하여 세포를 회수한 후 증류수로 2회 세척한 다음 YPD10 액체배지 또는 칼슘 카보네이트를 함유하는 YPD10 액체배지에 접종하여 72시간 동안 배양하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 두 균주 모두 pH를 조절하지 않는 조건에서는 lactic acid 생산량이 12% 이상 증가하였고, pH를 조절하는 조건에서는 26% 이상 증가한 것을 확인하였다(표 7-3). 이와 같은 결과는 KmCYB2 또는 KmDLD1 유전자를 불활성화시킴으로써 생산된 lactic acid가 다시 pyruvate로 산화되는 과정을 억제했기 때문이며 특히 KmDLD1 유전자의 기능과 lactic acid 생산성과의 관련성은 본 연구를 통하여 처음으로 규명되어 특허 출원하였다.

표 7-3. lactic acid 생산량 분석

	strains	당 소모량 (g/l)	lactic acid 생산량 (g/l)	Yield (%)	Culture time (h)	Optical purity of lactic acid (%)	
- CaCO ₃	L-LDH	L-LpLDH	12.8	10.1	78.9	72	99
		$\Delta cyb2/L-LpLDH$	13.9	11.4	82.0	72	99
	D-LDH	D-LpLDH	12.0	8.6	71.6	72	99
		$\Delta dld/D-LpLDH$	15.3	11.2	73.2	72	99
+ CaCO ₃	L-LDH	L-LpLDH	40.7	34.9	85.7	72	99
		$\Delta cyb2/L-LpLDH$	46.6	39.3	84.3	72	99
	D-LDH	D-LpLDH	37.2	31.8	85.4	72	99
		$\Delta dld/D-LpLDH$	48.2	40.3	83.6	72	99

(3) Glucose로부터 고농도 lactic acid 생산

KM25571 $\Delta pdc1 \Delta cyb2/L-LpLDH$ 와 KM25571 $\Delta pdc1 \Delta dld/D-LpLDH$ 를 이용하여 glucose로부터 고농도의 lactic acid를 생산하기 위해 회분식 배양을 수행하였다. 본배양에 들어가기 전에 100ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이 후 고농도 발효액에 56%의 glucose (final 15%)를 feeding하여 35°C에서 lactic acid 전환 반응을 수행하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 KM25571 $\Delta pdc1 \Delta cyb2/L-LpLDH$ 균주는 113.4 g/l의 lactic acid가 생성되어 87.1%의 전환율을 보였고, KM25571 $\Delta pdc1 \Delta dld/D-LpLDH$ 균주는 108.8 g/l의 D-lactic acid가 생산되어 86.1%의 전환율을 보였다 (그림 7-12)



strain	당 소모량 (g/l)	lactic acid 생산량 (g/l)	Yield (%)	Culture time (h)	Optical purity of lactic acid (%)
25571Δpdc1/L-LpLDH	117.9	99.6	84.5	78	99
25571Δpdc1Δcyb2/L-LpLDH	130.0	113.4	87.1	78	99
25571Δpdc1/D-LpLDH	119.8	99.8	83.3	72	99
25571Δpdc1Δdld/D-LpLDH	126.3	108.8	86.1	78	99

그림 7-12. Glucose로부터 고농도의 lactic acid 생산

(4) 돼지감자 전분으로부터 고농도의 lactic acid 생산

KM25571Δ pdc1Δ cyb2/L-LpLDH와 KM25571Δ pdc1Δ dld/D-LpLDH를 이용하여 돼지감자로부터 고농도의 lactic acid를 생산하기 위해 회분식 배양을 수행하였다. 100ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 세포를 회수한 후 DW로 2회 세척한 다음 돼지감자 전분에 접종하여 66시간 동안 배양하면서 시간별로 lactic acid 전환율을 비교하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 KM25571Δ pdc1Δ cyb2/L-LpLDH 균주는 130 g/l의 lactic acid가 생성되어 98.9%의 전환율을 보였고, KM25571Δ pdc1Δ dld/D-LpLDH 균주는 122 g/l의 D-lactic acid가 생산되어 95%의 전환율을 보였다(그림 7-13).

돼지감자 전분을 이용하여 lactic acid를 생산할 경우 본 연구에서 제작된 KM 균주는 돼지감자 분말을 전처리 할 필요가 없으며 돼지감자이외에 다른 탄소원이나 질소원을 필요로 하지 않기 때문에 매우 저렴한 비용으로 젖산 생산이 가능하며 본 연구에 사용한 돼지감자는 이눌린 함량이 60% 정도로 비교적 낮은 상태이기 때문에 이눌린 함량이 증가된 돼지감자가 개발된다면 lactic acid 발효시 이눌린을 고농도로 공급이 가능할 것이며 결과적으로 lactic acid의 생산성 또한 개선될 것으로 기대된다. 또한 이눌린 공급 방식의 개선 및 발효 최적화 연구를 통해 생산성은 더욱 증가될 것으로 기대된다.

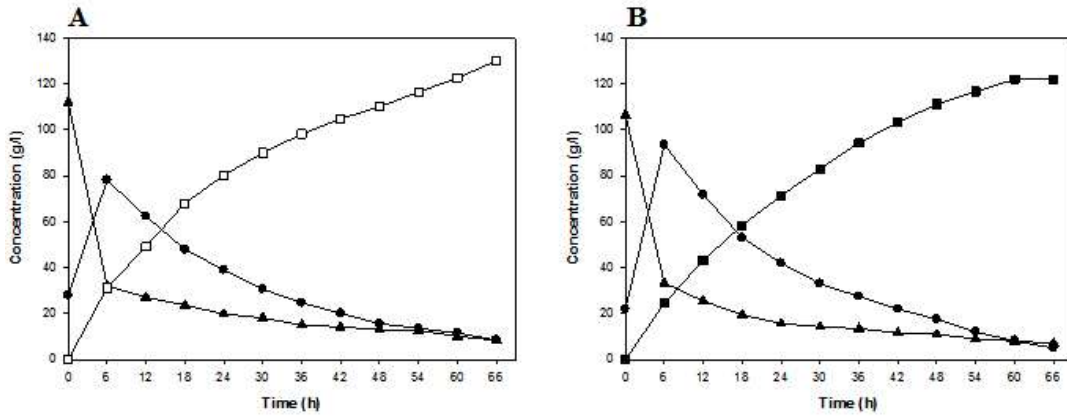


그림 7-13. 돼지감자 전분으로부터 고농도의 lactic acid 생산. A: L-LA, B :D-LA

다. 내산성 효모 PKM을 이용한 lactic acid 생산

효모는 일반적으로 박테리아에 비해 내산성이 뛰어나지만 lactic acid와 같은 유기산을 고농도로 생산하기 위해서는 효모 중에서도 내산성이 뛰어난 균주를 선별하여 활용할 필요가 있다. 또한 생산된 lactate를 황산처리를 통해 lactic acid로 변환하는 과정에서 발생하는 폐기물인 gypsum의 생산을 최소화하기 위해서는 가능한 한 산성조건에서 발효가 가능한 균주의 선별이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 KM 균주중에서도 내산성이 뛰어난 균주를 선별하여 lactic acid 생산 연구에 적용하였다.

(1) 내산성 효모 균주의 lactate 저항성 확인

본 연구를 통하여 팜슬러지로부터 분리된 새로운 KM 균주(PKM)는 기존의 KM 균주에 비하여 내산성이 우수하였기 때문에 이 균주를 lactic acid 생산 균주로 제작하기 위하여 우선 lactic acid에 대한 저항성을 확인하였다. 1~5%의 lactate가 포함된 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% glucose) 배지에 분리균주 PKM을 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다(그림 7-14). 대조구로 기존에 보유하고 있던 KM25571균주도 같이 배양하여 세포성장을 비교하였다. 그 결과 KM25571 균주의 경우 3% 이상의 lactate 농도에서는 잘 성장하지 못하였으나 PKM 균주의 경우 모든 농도에서 KM25571 보다 높은 세포성장을 보였으며 특히 4% 농도까지 성장하여 lactate에 대한 저항성이 높은 것을 확인하였다.

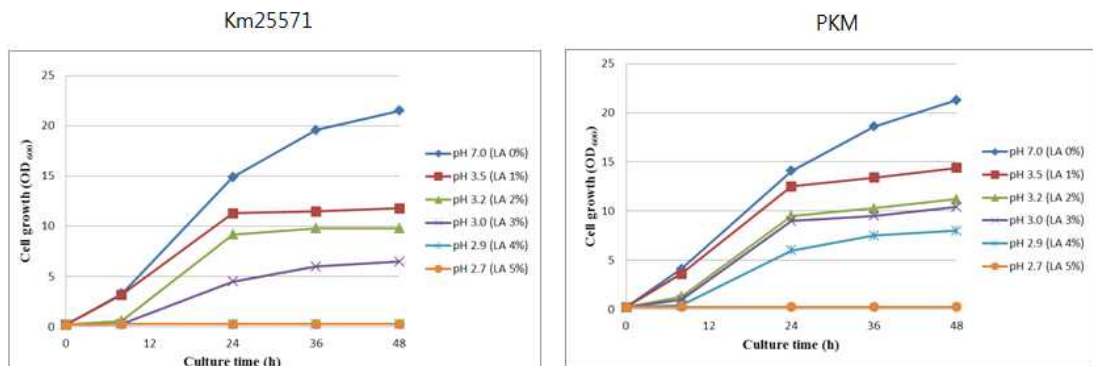


그림 7-14. PKM 균주의 lactate에 대한 저항성 확인

(2) 신규 내산성 효모의 대사공학 시스템 구축

PKM 균주를 lactic acid 생산 균주로 제작하고자 하였다. 우선 유전자의 도입과 결실에 모두 활용이 가능한 URA3 gene을 선별마커로 사용하기 위해서 uracil 영양요구성 PKM 균주를 제작하였다. PKM은 diploid 형태로 존재하므로 2 copy의 URA3 (orotidine 5-phosphate decarboxylase) 유전자를 disruption 하였다. 첫 번째 URA3 유전자는 항생제 표지인 zeocin 저항성 유전자를 선별표지로 사용하였고 2번째 URA3 유전자는 항생 펩티드 Nourseothricin에 대한 저항성 유전자(NTC)를 이용하였다.

먼저 PKM의 genomic DNA를 template로 하여 URA3 ORF의 upstream 300 bp의 DNA 절편을 HJ503/HJ504 primer로, downstream의 300 bp의 DNA 절편은 HJ505/HJ506을 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. upstream DNA 절편과 downstream DNA 절편을 항생제인 zeocin에 대한 저항성 유전자와 연결하기 위해 primer HJ324/HJ325를 이용하여 zeocin 저항성 유전자를 증폭하였고, primer HJ503/HJ506을 이용하여 overlap extension PCR을 통해 3개의 DNA 조각을 연결하였다(그림 7-15). PCR product를 PKM에 형질전환하기 위해 electroporation 법을 이용하였다. 형질전환된 세포는 100µg/ml zeocin이 함유된 YPD 배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다.

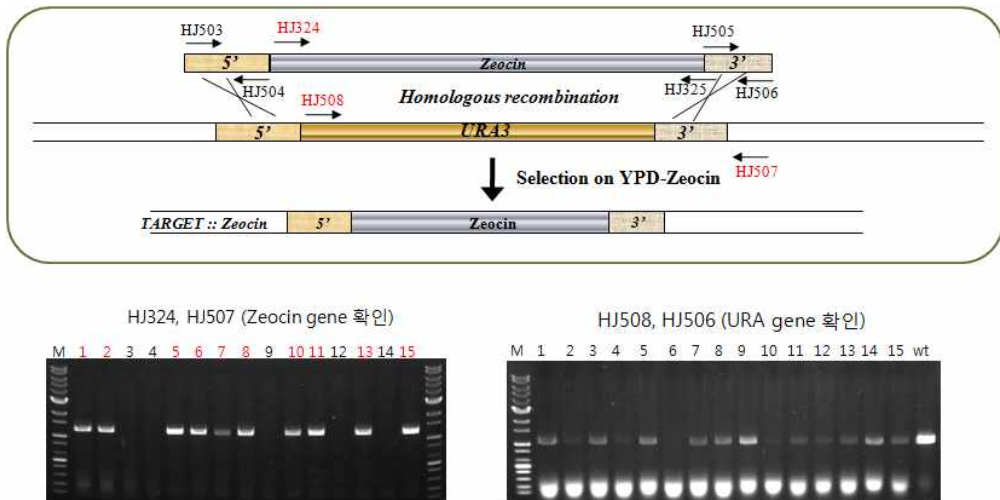


그림 7-15. Zeocin cassette를 이용한 URA3 gene disruption 과정

형질전환 여부를 primer HJ324/HJ507을 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 zeocin cassette는 URA3 locus에 형질전환 되었으나, 1개의 URA3 gene이 더 남아있는 것을 확인하였다. 따라서 남아있는 URA3 유전자를 disruption 하기 위해 zeocin cassette에서와 동일한 과정으로 NTC cassette를 제작 하였다. 먼저 PKM genomic DNA를 template로 하여 MJ376/MJ377와 MJ380/MJ381 primer를 이용하여 PCR을 통해 URA3 ORF의 upstream과 downstream의 300 bp의 DNA 절편을 증폭하였다. upstream DNA 절편과 downstream DNA 절편을 NTC 유전자와 연결하기 위해 primer MJ378/MJ379를 이용하여 NTC 유전자를 증폭하였고, primer MJ376/MJ381을 이용하여 overlap extension PCR을 통해 3개의 DNA 절편을 연결하였다(그림 7-16). 얻어진 PCR product를 zeocin cassette가 삽입되어 있는 PKM 균주에 electroporation 법을 이용하여 100µg/ml NTC가 함유된 YPD 배지에 형질전환 하였다. 형질전환 여부를

HJ386/MJ507 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하여 NTC cassette가 URA3 locus에 삽입되었음을 확인하였다.

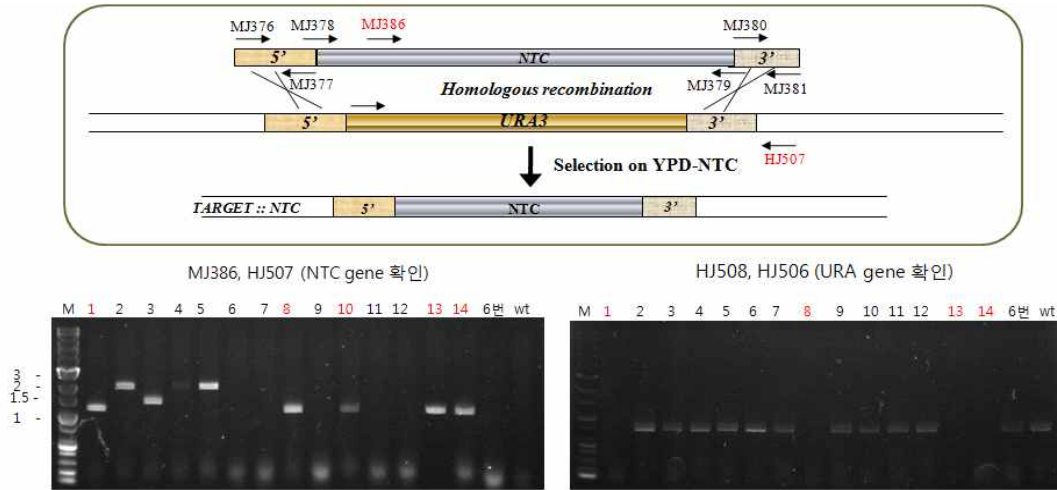


그림 7-16. NTC cassette를 이용한 URA3 gene disruption 과정

Zeocin cassette와 NTC cassette가 삽입된 형질전환체를 uracil이 없는 최소 배지(0.67% Yeast nitrogen base without amino acid, 0.77% Ura-DO supplement, 2% glucose 및 2% agar)에 도말 후 배양한 결과 전혀 성장하지 못하는 것을 확인하였다. URA3 유전자가 disruption 되면 uracil을 합성할 수 없어 최소배지에서 성장하지 못하므로 선별된 형질전환체는 URA3 gene이 모두 disruption된 것을 확인하였다(그림 7-17).

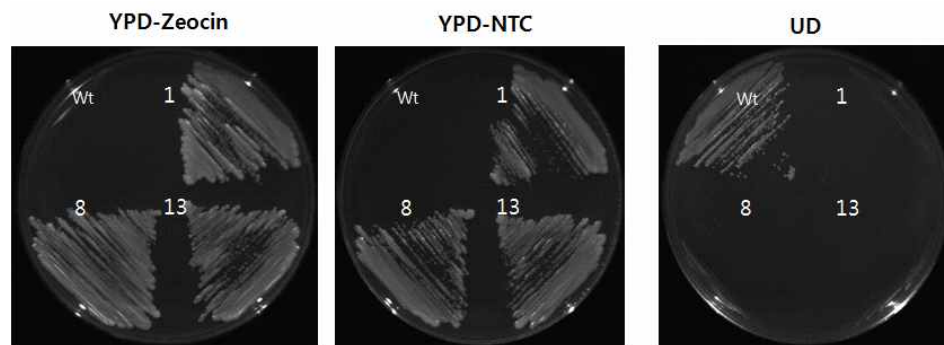


그림 7-17. Zeocin, NTC, Uracil 배지에서 성장여부 확인

(3) 항생제 선별표지에 따른 haploid 균주 분리

분리 균주들은 대부분 diploid 형태로 존재하며 유전자 조작시 여러 가지 어려움이 따른다. 따라서 random spore plating을 통하여 haploid 균주를 얻고자 하였다. PKM의 uracil 영양요구성 균주 제작시 zeocin과 NTC 유전자를 선별표지로 사용하였기 때문에 항생제 선별표지에 따른 균주를 선별함으로써 haploid 균주 선별이 가능하다. 먼저 PKMu::ZEO,NTC 균주를

포자형성배지(1% potassium acetate, 0.025% glucose, 1.5 agar)에서 3~4일간 배양하여 현미경을 통해 포자형성 세포가 관찰 후 멸균수에 현탁하여 포자형성 세포를 수집하였다. 이를 lyticase 처리로 세포벽을 제거 후 포자를 분리시킨 다음 100 μ g/ml zeocin이 함유된 YPD 배지에 도말하여 단일 균주를 선별하였다.

선별된 균주를 다시 100 μ g/ml zeocin, NTC 배지에 각각 옮겨 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양했을 때 NTC에 대한 내성은 갖지 않으면서 zeocin에 대한 내성을 가진 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 propidium iodide staining 후 flow cytometry를 이용하여 ploidy를 확인한 결과 haploid임을 확인하였다(그림 7-18). 본 PKM haploid 균주는 유전자 조작이 매우 용이하여 다양한 시스템에 적용이 가능할 것으로 판단된다.

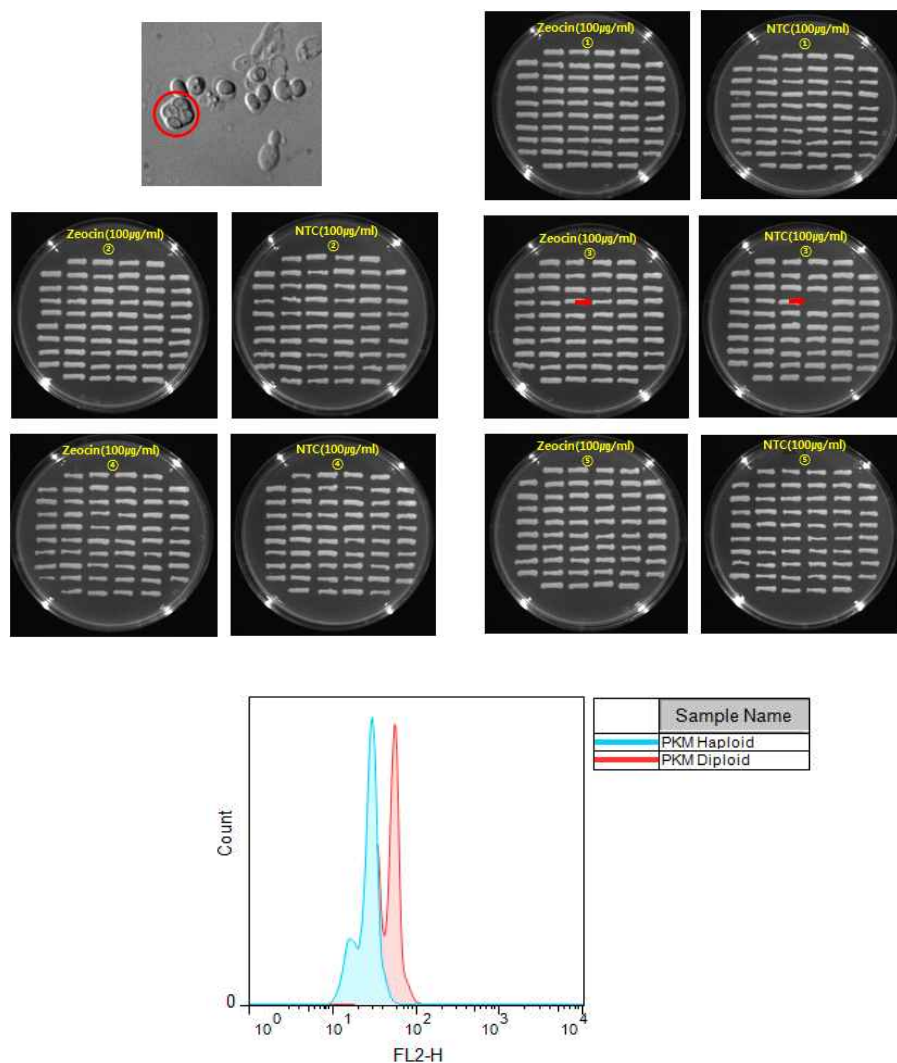


그림 7-18. Haploid 균주 선별 및 ploidy 확인

(4) PDC1 유전자 결실 균주 제작

에탄올 발효 경로가 봉쇄된 PKM 균주를 제작하기 위하여 PKM 균주에 존재하는 pyruvate decarboxylase (PDC1) 효소를 불활성화 시키고자 하였다. *S. cerevisiae*와는 달리 KM

균주는 한가지 PDC 유전자를 가지고 있지만 diploid 형태로 존재하므로 2 copy의 PDC1 유전자를 disruption 하였다.

PKM 균주의 PDC1 유전자를 disruption 하기 위해 genomic DNA를 template로 하여 PDC1 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 PCR을 통해 증폭 후 primer Tc-f와 U200r, U200f와 Tc-r을 이용하여 증폭된 *S. cerevisiae* URA3 DNA절편과 overlap extension PCR을 수행하였다. 2개의 PCR fragment는 PKM균주에 형질전환하여 PDC1 locus에 도입된 균주를 uracil이 없는 선택배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.077% Ura-DO supplement, 2% glucose, 2% agar)에서 선별하였다. 형질전환 여부를 primer MJ464/MJ468을 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하였다. PDC1 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ469, HJ468 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 PDC1 유전자가 disruption 되었음을 확인하였다(그림 7-19).

(5) PDC1 결실 균주의 에탄올 발효

에탄올 발효를 통하여 PDC1 결실 변이 균주의 에탄올 생산 여부를 확인하였다. 각 균주들을 최소 영양배지에서 24시간 seed culture 후 50g/L glucose가 첨가된 에탄올 발효배지 (Y.E 0.5%, pepton 0.5%, KH₂PO₄, Ammonia sulfate 0.2%, MgSO₄·H₂O 0.04%)에서 30°C, 110 rpm으로 배양하였으며 세포성장과 생성된 에탄올을 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 1copy만 결실된 pdc1균주의 경우 pyruvate가 에탄올로 전환되는 과정을 완벽하게 봉쇄할 수 없어 야생형 균주와 큰 차이없이 에탄올이 생성되었으며 2 copy가 모두 결실된 균주의 경우 야생형 균주에 비해 세포성장이 50% 정도 감소했지만 에탄올을 전혀 생산하지 않는 것을 확인하였다 (그림 7-20).

균주성장의 감소는 NAD⁺/NADH의 불균형에 의한 것으로 LDH 유전자를 발현하면 젖산 발효가 에탄올 발효를 대신하여 NAD⁺/NADH 불균형을 해소할 수 있기 때문에 pdc1 결실 균주에서 발생한 성장저하문제는 해결할 수 있다.

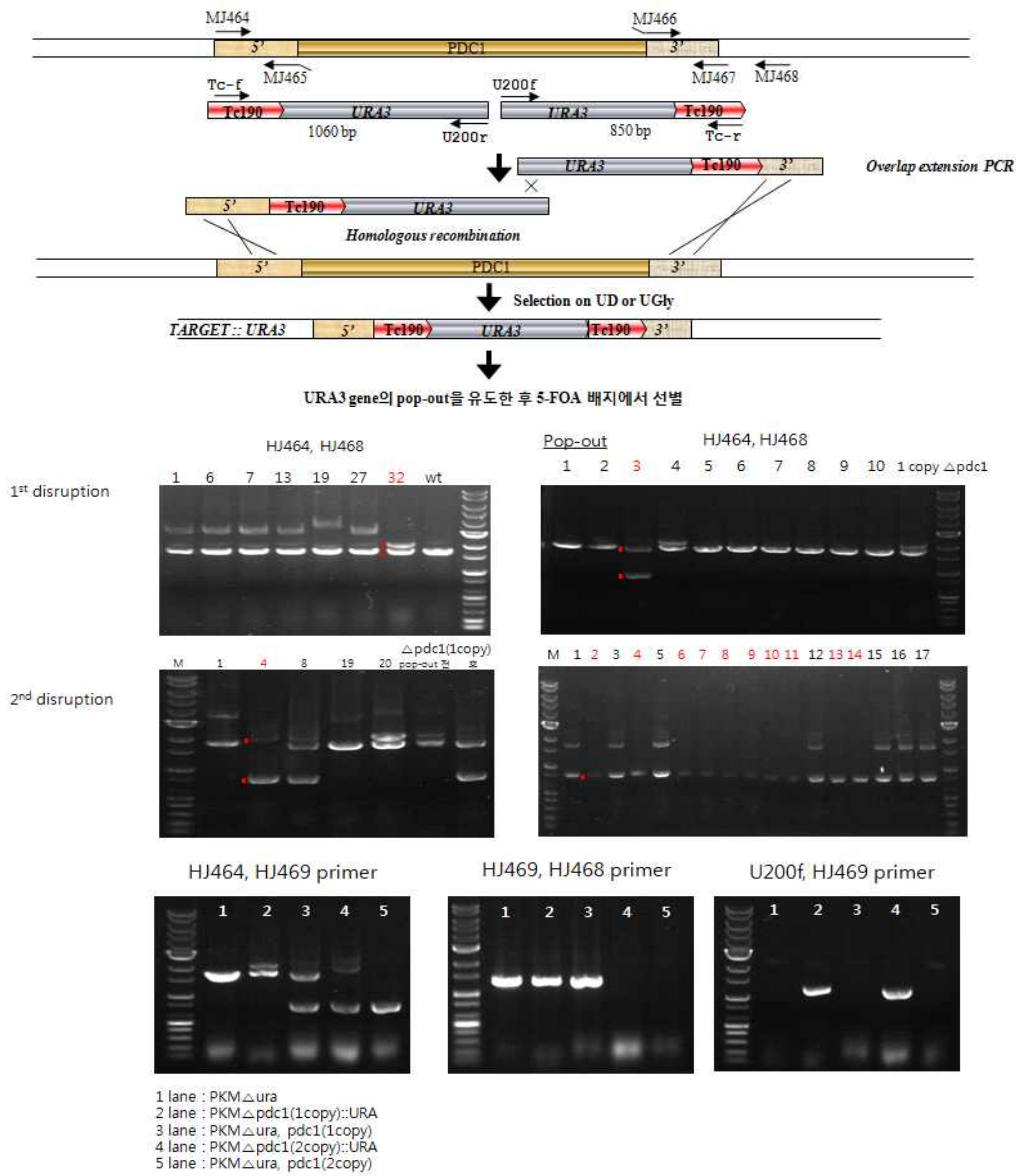


그림 7-19. URA3 cassette를 이용한 PDC1 유전자 disruption 과정

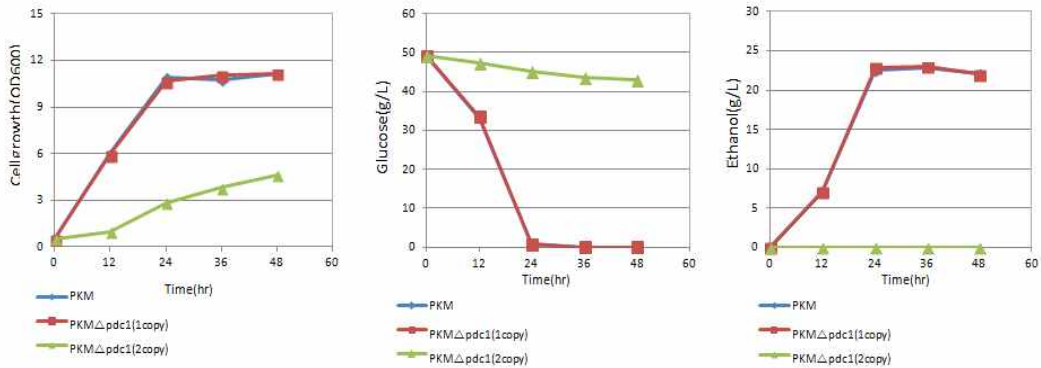


그림 7-20. PDC1 결실 균주의 세포상장에 따른 에탄올 발효

(6) *Lactobacillus plantarum* 유래 LDH 유전자 발현

PKM에서 D-LDH 유전자를 발현하기 위해 *Lactobacillus plantarum* 유래 LDH 유전자가 도입된 발현 vector를 제작하였다. pTEF-D-LDH 벡터는 LDH 유전자가 KM 유래의 translation elongation factor (TEF) promoter에 의하여 발현되는 벡터이며 선별 표시 유전자로는 KM 유래의 URA3 유전자를 포함하고 있는 integration vector이다. 이 벡터를 제한효소 Nhe I 으로 처리한 후 형질전환에 이용하면 Nhe I 은 KmURA3 gene에 위치하는 제한 효소이기 때문에 염색체상에 존재하는 KmURA3 유전자 위치로 integration된다. 형질전환체를 SD-Ura 배지에서 일차 선별한 후 선별된 단일 균주의 genomic DNA를 분리하여 PCR을 통하여 도입된 벡터가 염색체로 integration 되었음을 확인하였다 (그림 7-21).

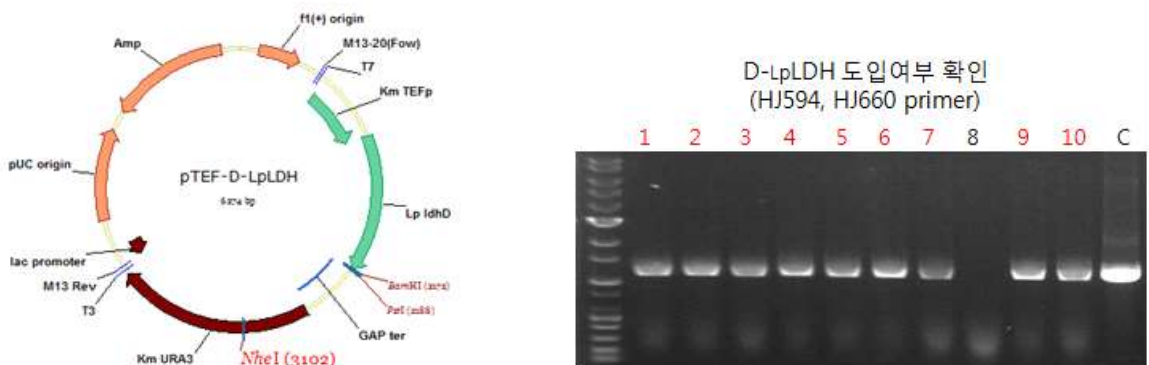
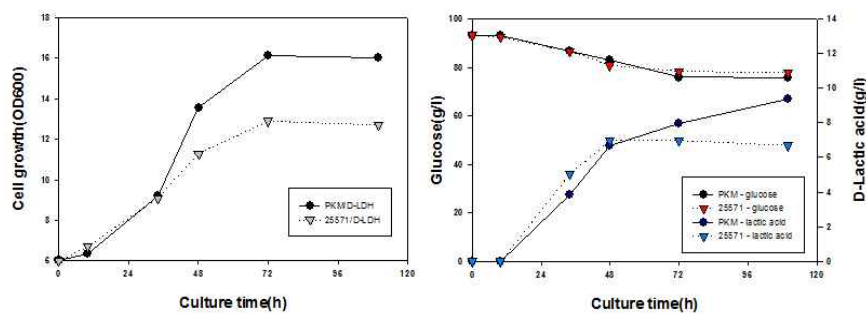


그림 7-21. D-LDH 유전자 발현 벡터 도입여부 확인

(7) 세포 배양과 lactic acid 전환 2단계 발효조건

pdc1 결실 균주의 D-form의 lactic acid 생산성을 확인하기 하기 flask 배양하였다. 기존 젖산 생산 균주인 25571Δpdc1/LDH를 대조군으로 같이 비교하였다. 각 균주들을 YPD 배지에서

진탕배양하여 세포성장 단계를 거친 후 YPD10(1% yeast extract, 2% peptone, 10% glucose)에 OD=6이 되도록 접종하여 35°C 에서 160 rpm으로 교반 시키면서 110시간 동안 lactic acid 생산 반응을 수행하였다. 이때 pH는 조절하지 않는 조건에서 배양을 수행하였다. HPLC를 통하여 소모된 glucose와 젖산 생산량을 확인한 결과 25571 Δ pdcl/LDH 균주의 경우 100g/l의 glucose로부터 18.2 g의 glucose를 소모하여 6.7g/L의 젖산이 생성되어 43.2%의 전환율을 보였으나 내산성 균주인 PKM Δ pdcl/LDH 균주의 경우 15.5 g의 glucose로부터 9.4g/L의 젖산이 생성되어 51.6%의 전환율을 보여 PKM 균주가 25571균주보다 낮은 pH에서 lactic acid의 생산효율이 우수한 것으로 확인되었다(그림 7-22).



	Glucose 소모량 (g/l)	lactic acid 생산량 (g/l)	Yield
PKM Δ pdcl/ D-LplDH	18.2	9.4	51.6
25571 Δ pdcl/ D-LplDH	15.5	6.7	43.2

그림 7-22. PKM 균주의 젖산 생산 확인

(8) 세포배양과 lactic acid 단일 단계 생산

세포의 성장단계와 lactic acid 생산 단계를 구분하지 않고 균주를 배양하면서 동시에 젖산을 생산할 경우 각 균주의 차이를 확인하기 위하여 PKM Δ pdcl/LDH와 25571 Δ pdcl/LDH 균주를 YPD 배지에서 전배양 후 YP5(1% yeast extract, 2% peptone, 5% glucose) 배지에 초기 접종량이 OD=1이 되도록 하고 30°C, 35°C 및 40°C 에서 160 rpm으로 120시간 동안 배양하였다. 그 결과 25571 Δ pdcl/LDH 균주의 경우 30°C 에서 최대 3.8g/l의 lactic acid가 생산되었지만 온도가 올라갈수록 생산성이 저하되었다. 그러나 상대적으로 온도내성 및 내산성이 우수한 PKM Δ pdcl/LDH균주의 경우 전반적으로 25571균주보다 lactic acid의 생산성이 우수하였고 35°C 에서 최대 7.7 g/l의 lactic acid가 생산되었다. 특히 PKM의 경우 고온에서 특이하게 2단계 stepwise lactic acid 농도 증가가 관찰되고 있으며 이러한 현상과 균주의 내산성과의 연관성을 분석중이다. 또한 배양 조건의 최적화를 통해 gypsum-free 고농도 젖산 생산이 가능할 것으로 기대된다 (그림 7-23).

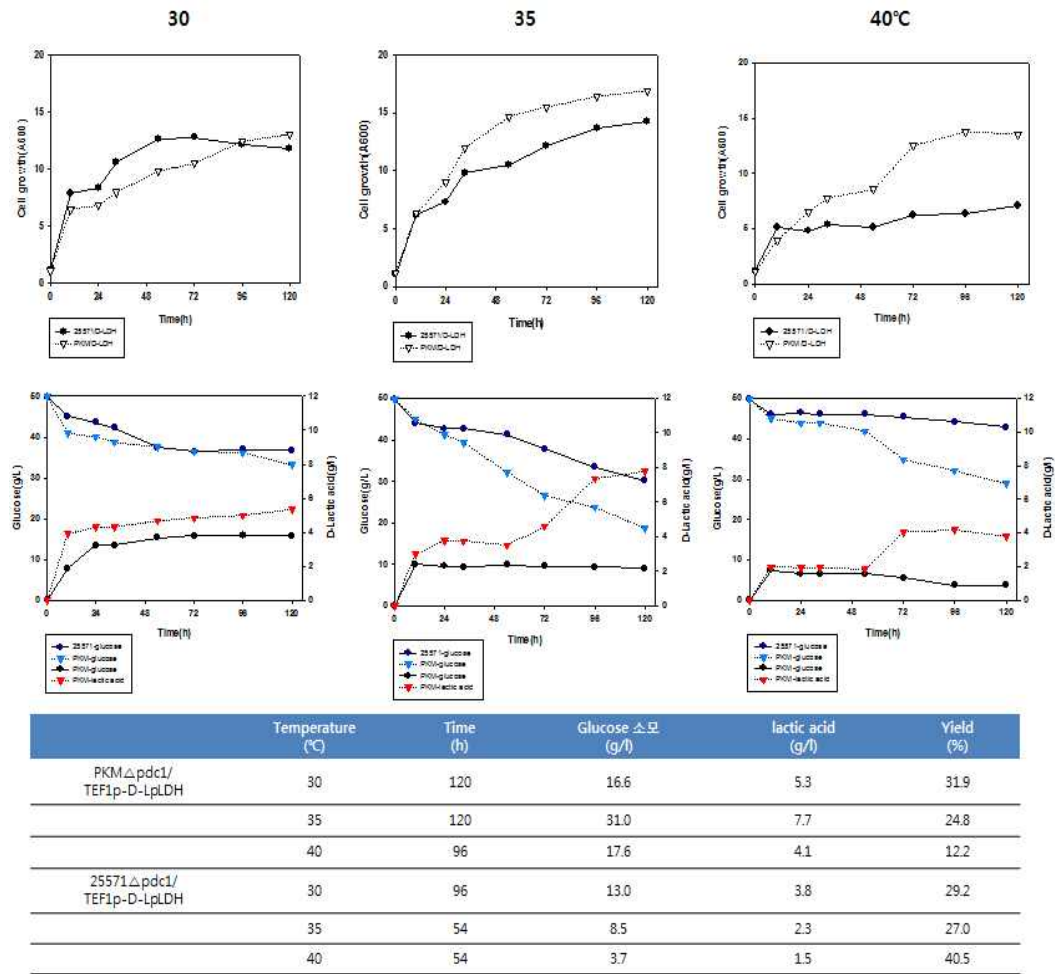
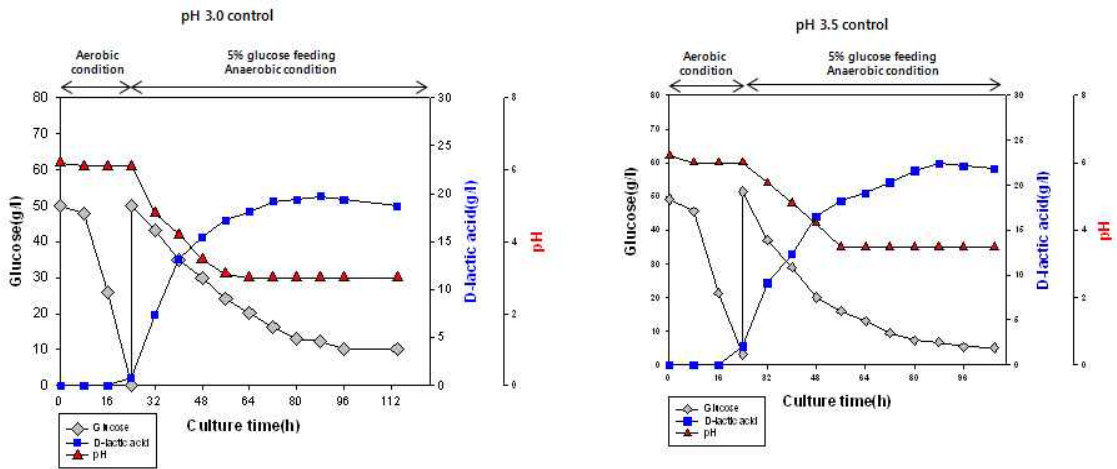


그림 7-23. 균주 성장에 따른 젖산 생산

(9) 2단계 배양을 통한 lactic acid 발효

PKM Δ pdc1/D-LpLDH 균주는 플라스크 배양을 통하여 내산성이 강한 균주로 pH를 조절 하지 않는 조건에서도 lactic acid 생산효율이 우수한 것으로 확인되었다. 따라서 유가식 배양으로 pH를 3.0과 3.5로 유지했을 때 lactic acid 생산성을 확인해 보고자 하였다. PKM Δ pdc1/D-LpLDH 균주를 YPD5 (3% yeast extract, 1.5% peptone, 5% glucose)에 접종하여 35°C, 800rpm, pH6.0으로 조절하여 세포성장 단계를 거친 후 glucose가 모두 소모된 24시간 후 40%의 glucose (final 5%)를 feeding 하여 lactic acid 전환하는 2단계 배양으로 발효를 진행하였다. 그 결과 배양 88시간까지 lactic acid 생산농도가 증가하여 pH3.0과 3.5로 조절한 조건 모두 배양 88 시간에서 최대 생산량을 보였으며 이후 lactic acid 생산이 감소하는 것을 확인하였다. 그림 7-24에서 보는바와 같이 pH를 3.5로 조절한 조건에서 44.7g/L glucose를 소모하여 22.4g/L lactic acid를 생산했으며 약 50%의 전환율을 얻었고 pH를 3.0으로 조절한 조건에서는 pH가 3.0으로 유지되기 시작하는 배양 54시간 이후부터 lactic acid 생산 증가량이 많지 않아 pH 3.5로 조절한 조건보다 낮은 18.7g/L lactic acid를 생산하였다.



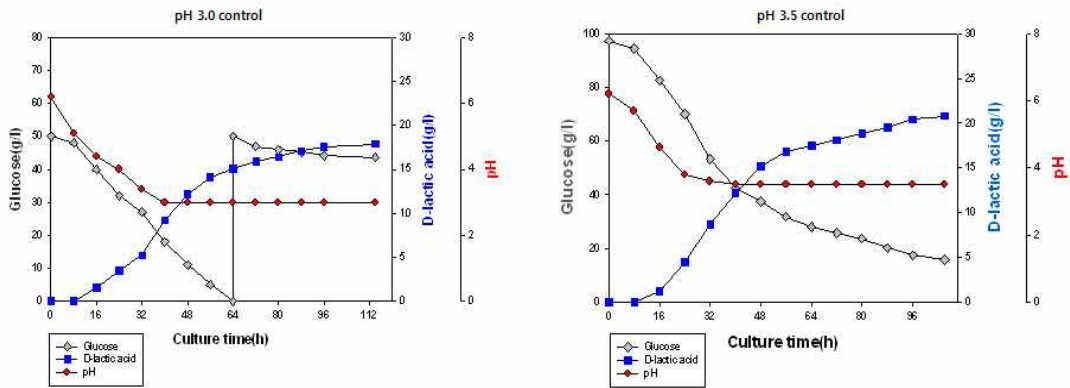
pH	Culture time(h)	Glucose consumption(g/L)	D-lactic acid production (g/L)	yield (%)
3.0	88	39.3	18.7	47.5
3.5	88	44.7	22.4	50.1

그림 7-24. 2단계 배양을 통한 lactic acid 발효

(10) 1단계 배양을 통한 lactic acid 발효

PKM Δ pdcl/D-LpLDH는 균주 성장 단계와 lactic acid 전환 단계를 통합한 1단계 배양을 통해서도 lactic acid 생산이 가능하기 때문에 유가식 발효를 통해 lactic acid 생산을 확인해 보고자 하였다. PKM Δ pdcl/D-LpLDH 균주를 YPD10(3% yeast extract, 1.5% peptone, 10% glucose)에 접종하여 35 $^{\circ}$ C, 400rpm, 2vvm 조건으로 114시간동안 발효를 진행했으며 1단계 배양과 동일하게 pH는 3.0과 3.5로 각각 조절하였다. pH를 3.0으로 조절한 발효에서는 배양 64시간동안 50g/L glucose를 모두 소모하여 glucose를 한번 더 feeding 해주었다. pH를 3.0으로 조절해 준 경우 114시간동안 56.3g/L glucose를 소모하여 17.9g/L의 lactic acid를 생산했고 31.7%의 전환율을 보였다. lactic acid 최적 생산을 위해서 5g/L glucose가 배지내 유지되어야 하지만 배양 64시간일 때 glucose가 모두 소모되어 lactic acid 생산농도가 많이 증가하지 않는 결과를 얻었다. 따라서 pH를 3.5로 조절한 발효에서는 초기 glucose를 100g/L로 첨가하여 발효를 진행하였다.

그 결과 배양 114시간동안 20.8g/L lactic acid를 생산하여 pH를 3.0으로 조절한 조건보다 생산농도는 증가했으나 공급해준 glucose가 바이오매스로 많이 축적되어 25.5%의 낮은 전환율을 보였다(그림 7-25). 하지만 pH가 3.5로 유지되는 이후에도 lactic acid 생산량이 증가하고 있기 때문에 바이오매스로 전환되는 glucose를 lactic acid 생산으로 전환하는 조건 최적화가 확립되면 고농도 lactic acid를 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

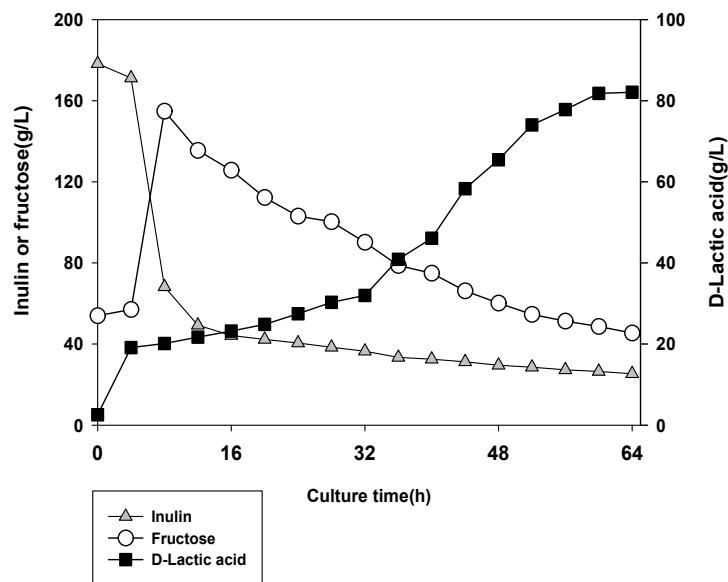


pH	Culture time(h)	Glucose consumption(g/L)	D-lactic acid production (g/L)	yield (%)
3.0	114	56.3	17.9	31.7
3.5	114	81.5	20.8	25.5

그림 7-25. 2단계 배양을 통한 lactic acid 발효

(11) 돼지감자 이눌린으로부터 D-lactic acid 생산

고농도 돼지감자 이눌린을 얻기 위해 200g/L 돼지감자를 121°C에서 20분간 고압 멸균 후 원심분리하여 얻은 상층액에 200g/L 돼지감자를 다시 녹여 (240g/L inulin) lactic acid 생산을 위한 기질로 사용하였다. 본배양에 들어가기전 PKM Δ pdcl/D-LpLDH 균주를 100ml의 YPD 액체배지에 배양하여 활성화시킨 후 본 배양액에 접종하여 30°C에서 OD600nm 값이 60에 도달할 때 세포를 회수한 후 돼지감자 이눌린에 접종하여 혐기성 조건 (200rpm, 0.5vvm, 35°C, pH6.0)에서 64시간 동안 배양하면서 시간별로 lactic acid 전환율을 확인하였다. 그 결과 배양 64시간동안 110g/L fructose를 소모하여 82g/L lactic acid를 생산했고 74.5%의 전환율을 보였다 (그림 7-26). 배지내 fructose 농도에 따라 inulin을 추가 공급해주는 유가식 발효를 수행하면 고농도의 lactic acid가 생산 가능할 것으로 사료된다.



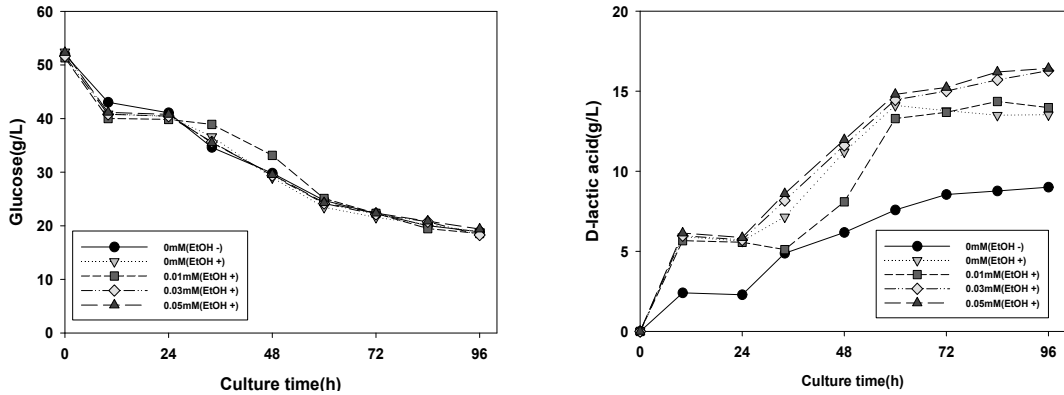
pH	Culture time(h)	당 소모량 (g/L)	D-lactic acid 생산량 (g/l)	yield (%)
6.0	64	110	82	74.5

그림 7-26. 돼지감자 이눌린으로부터 고농도의 D-lactic acid 생산

(12) Ergosterol을 첨가하여 lactic acid 생산 확인

Ergosterol은 효모 세포막을 구성하는 sterol의 주성분으로서 효모균주의 stress 내성과의 관련성이 알려져 있기 때문에 lactic acid 생산을 위한 배지에 소량의 ergosterol을 첨가하여 lactic acid 생산에도 영향을 주는지 확인해 보았다. PKM Δ pdc1/LDH 균주를 YPD 배지에서 진탕배양하여 세포성장 단계를 거친 후 YPD5(1% yeast extract, 2% peptone, 5% glucose)에 ergosterol 최종 농도가 0.01~0.05mM이 되도록 각각 첨가하였고 35°C, 160rpm, pH를 조절하지 않는 조건에서 배양을 수행하였다. 그 결과 ergosterol 농도에 관계없이 모두 비슷한 세포성장을 보였고 glucose 소모량도 차이 없었으나 0.05mM ergosterol을 첨가 했을때 lactic acid 생산량이 16.4g/L로 가장 많았다(그림 7-27). 이러한 결과는 ergosterol을 첨가하지 않은 대조구보다 약 2.9g/L 증가한 농도이다. 또한 ergosterol을 첨가한 경우 적은 농도이지만 lactic acid 생산량이 모두 증가된 것을 확인하여 ergosterol에 의해 내산성이 증가되어 lactic acid 생산에도 영향을 준 것으로 보인다.

아직까지 lactic acid 생산을 ergosterol과 연계하여 연구된 사례가 없기 때문에 본 연구에서 확인한 결과는 lactic acid 생산 균주개발을 위한 새로운 접근방법을 제시해줄 것으로 기대하고 있으며 현재는 유전자를 조작하여 ergosterol 함량이 증가된 균주를 개발하는 연구를 수행하고 있다.



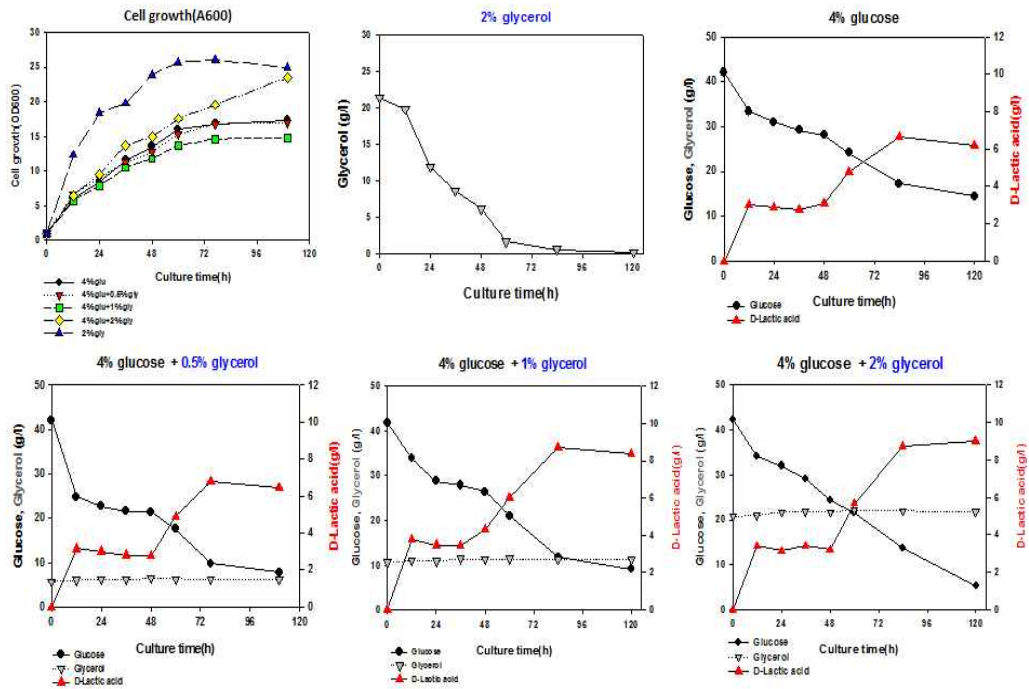
Ergosterol (mM)	0 (EtOH+)	0.01mM (EtOH+)	0.03mM (EtOH+)	0.05mM (EtOH+)
Time(h)	96	96	96	96
Glucose consumption (g/L)	33.6	32.8	33.4	32.9
D-lactic acid production(g/L)	13.5	14.0	16.3	16.4
Yield(%)	40.2	42.6	48.8	49.8

그림 7-27. Ergosterol 농도에 따른 lactic acid 생산량 분석

(13) 글리세롤 배지를 이용한 PKM Δ pdc1/D-LpLDH 균주의 젖산 생산 확인

글리세롤이 젖산 생산에 미치는 영향을 확인해 보기 위해 PKM Δ pdc1/D-LpLDH 균주를 다양한 농도의 글리세롤을 포함하는 배지에서 1단계 배양으로 젖산 생산을 비교하였다. 4% 포도당을 함유하고 YPD(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 4% 포도당)와 0~2% 글리세롤을 포함한 액체 배지에 OD=1이 되도록 균체를 접종한 후 35°C, 160rpm으로 120 시간동안 pH를 조절하지 않는 조건에서 배양하였다.

그 결과 글리세롤만 첨가하여 배양한 경우 가장 높은 세포성장을 보였으며 첨가해준 글리세롤을 배양 60 시간동안 모두 소모하여 글리세롤을 탄소원으로 잘 이용하는 것을 확인하였으나 젖산은 생산되지 않았다. 그러나 포도당과 함께 글리세롤을 첨가했을 경우 글리세롤이 탄소원으로 사용되지 않았지만 첨가해준 글리세롤 농도가 높을수록 젖산 생산량이 증가하였으며 포도당만 탄소원으로 하여 배양한 대조구보다 40% 이상 (2.2~2.8g/L) 젖산 생산량이 증가하였다(그림 7-28). 포도당과 함께 존재할 경우 글리세롤을 탄소원으로 사용하지 못하는 이유는 포도당에 의한 catabolite repression 때문이며 글리세롤의 젖산 생산 증진 효과는 글리세롤이 삼투압 조절제로 작용하여 산성 조건에서 균주의 안정성에 도움을 주기 때문으로 사료된다.



	당 소모량(g/L)	젖산 생산량(g/L)	수율(%)
포도당 4%	27.6	6.2	22.5
포도당 4% + 0.5% 글리세롤	34.3	6.4	18.7
포도당 4% + 1% 글리세롤	32.8	8.4	25.6
포도당 4% + 2% 글리세롤	37.0	9.0	24.3
2% 글리세롤	21.1	0	0

그림 7-28. 글리세롤 농도에 따른 lactic acid 생산량 분석

라. *S. cerevisiae* 대사공학을 이용한 바이오플라스틱용 lactic acid 생산

(1) PDC1 유전자 결실 및 LDH 유전자 도입

KM 균주는 여러 가지 바이오소재 생산에 있어서 우수한 특성을 보유한 반면에 기존의 *S. cerevisiae* 균주에 비하여 재조합단백질의 분비 발현능이 떨어지는 단점이 있다. *S. cerevisiae* 균주에서는 여러 가지 cellulase 유전자를 분비발현 하여 섬유소로부터 저렴한 비용으로 에탄올을 생산하는 CBP 균주가 구축되었기 때문에 이러한 균주를 lactic acid 생산에 적용할 경우 섬유소로부터 lactic acid 생산이 가능할 것으로 기대된다. 따라서 *S. cerevisiae* 균주를 이용하여 lactic acid 생산 균주를 제작하고자 하였다.

S. cerevisiae 균주가 에탄올 발효 대신 젖산 발효를 하기 위해서는 우선적으로 pyruvate를 acetaldehyde로 전환시키는 pyruvate decarboxylase 효소를 불활성화 시켜야하는데

S. cerevisiae 균주는 5개의 PDC 유전자를 가지고 있으며 특히 PDC1과 PDC5 유전자가 핵심적인 역할을 하기 때문에 pyruvate decarboxylase 효소 활성을 완전히 불활성화 시키기 위해서는 PDC1과 PDC5 유전자를 모두 결실시켜야한다.

S. cerevisiae 경우 PDC1, 5 유전자가 모두 결실된 균주는 NADH의 불균형으로 인하여 균주의 성장이 매우 지체되는 것으로 보고되었으며 이런 특성은 LDH 유전자를 발현함으로써 다소 개선되는 것으로 알려졌다. 따라서 PDC 유전자를 결실 시키는 것과 동시에 L-LpLDH 또는 D-LpLDH 유전자를 도입하기 위하여 *S. cerevisiae* genomic DNA를 template로 하여 PDC1 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ695와 HJ696, HJ697과 HJ698 primer를 이용하여 증폭 하였다. 각 유전자 절편과 L-LpLDH-URA3 DNA 절편 또는 D-LpLDH-URA3 DNA 절편을 혼합한 후 overlap extension PCR을 수행하여 disruption cassette를 제작하였다. PCR fragment는 *S. cerevisiae* 2805 균주에 형질전환하여 PDC1 locus에 도입된 균주를 uracil이 없는 선택배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.077% Ura-DO supplement, 2% 글루코오스, 2% agar)에서 선별하였다. 형질전환 여부를 primer HJ695와 HJ699, U200f와 HJ699를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하였다. PDC1 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ700와 HJ698 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 PDC1 유전자가 결실되었음을 확인하였다(그림 7-29).

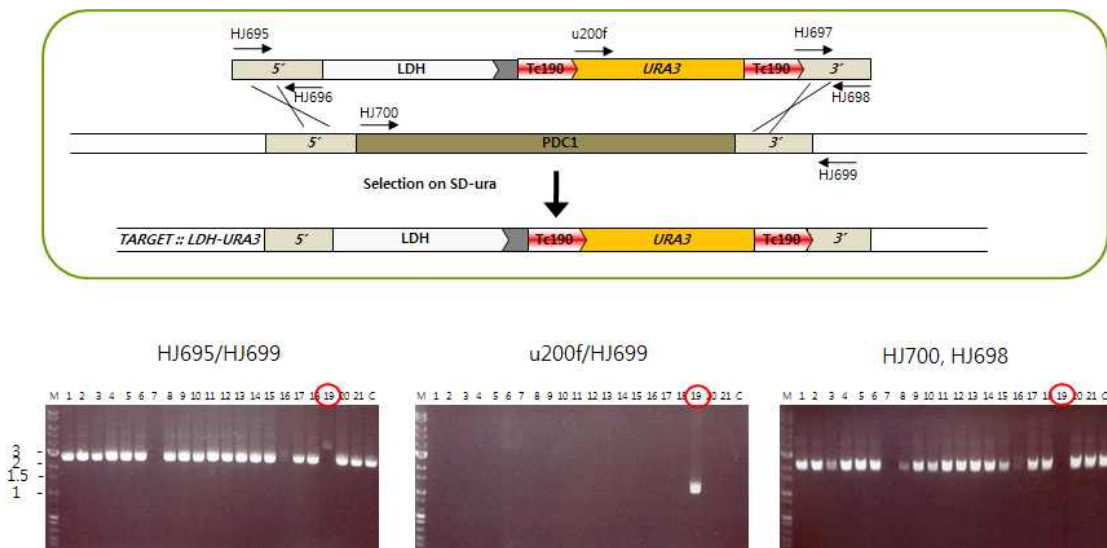


그림 7-29. URA3 cassette를 이용한 PDC1 gene disruption 과정

(2) PDC1 유전자 결실 균주의 에탄올 발효

에탄올 발효를 통하여 pdc1 mutant 균주의 에탄올 생산량을 비교하였다. 각 균주들을 최소영양배지에서 24시간 seed culture 후 50g/L의 글루코오스가 첨가된 에탄올발효배지(Y.E 0.5%, pepton 0.5%, KH2PO4 0.5%, Ammoniasulfate 0.2%, MgSO4 · H2O 0.04%)에서 30℃,

100rpm으로 배양하였으며 세포 성장과 생산된 에탄올을 측정하였다. 그 결과 wild type 균주 보다는 적지만 여전히 많은 양의 에탄올이 생성되었고, 세포의 성장은 wild type 균주와 비교하였을 때 큰 차이 없이 성장하였다(그림 7-30). *S. cerevisiae* 균주에서는 PDC1, PDC5, PDC6 유전자가 결실되어야지 에탄올 생산 경로가 완벽하게 봉쇄되는 것으로 알려져 있다. 따라서 PDC5,6 유전자로 인하여 에탄올이 생성되는 것이라 생각된다.

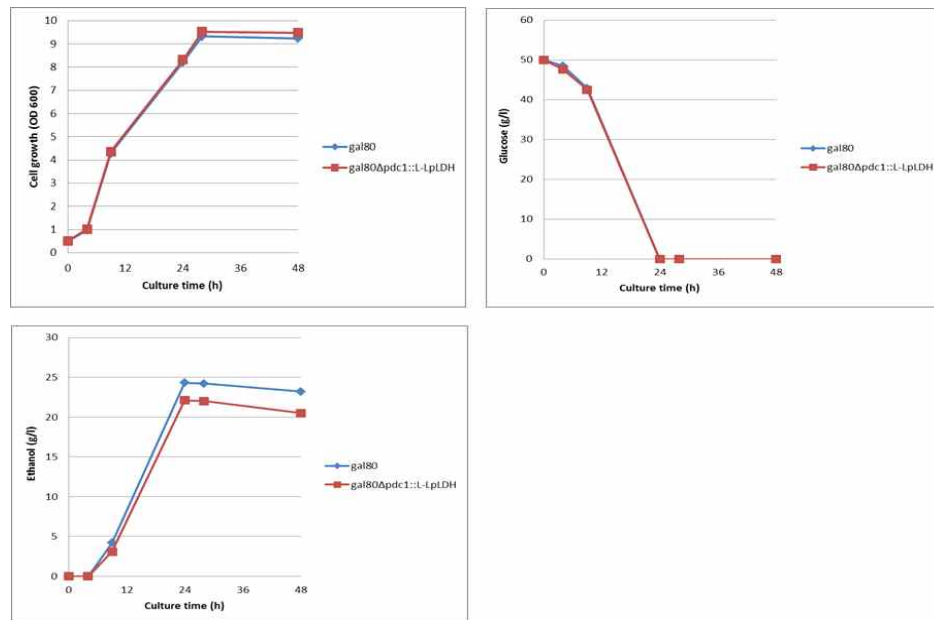


그림 7-30. 세포 성장에 따른 에탄올 생산량

(3) *S. cerevisiae* 2805 균주에서 Lactic acid 생산

S. cerevisiae 균주에서는 pdc 유전자 결실이 균주의 성장에 미치는 영향이 크므로 wt 균주에서 lactate dehydrogenase를 과발현 하였을 경우 젖산생산과 에탄올 생산성을 비교하기 위하여 Y2805Δgal80 균주에 D-LDH 유전자를 multicopy plasmid를 이용하여 발현하였다. GAL80 유전자가 결실된 효모에서 GAL10 promoter를 발현할 경우 GAL10 promoter는 galactose 없이도 glucose 배지에서 구성적으로 발현된다. 구축된 vector를 Y2805gal80 균주에 형질전환하여 단일 균주를 선별하였다. LDH 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 형질전환체는 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) 배지에서 40시간 배양하였고, 배양된 균체를 파쇄하여 원심분리를 통해 세포추출액을 얻었다.

발현된 단백질을 SDS-PAGE 및 western blot으로 분석 한 결과 40kDa 부근에서 발현 단백질을 확인할 수 있었다(그림 7-31). 발현된 LDH 단백질의 활성을 확인하기 위하여 0.1ml의 효소 용액을 2.7ml의 기질용액(sodium pyruvate)과 0.1ml의 NADH와 반응하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 1개 균주를 제외하고는 모든 균주에서 활성이 있는 것으로 확인하였고, 활성이 가장 좋은 10번 균주로 lactic acid 생산능을 확인하였다(표 7-4).

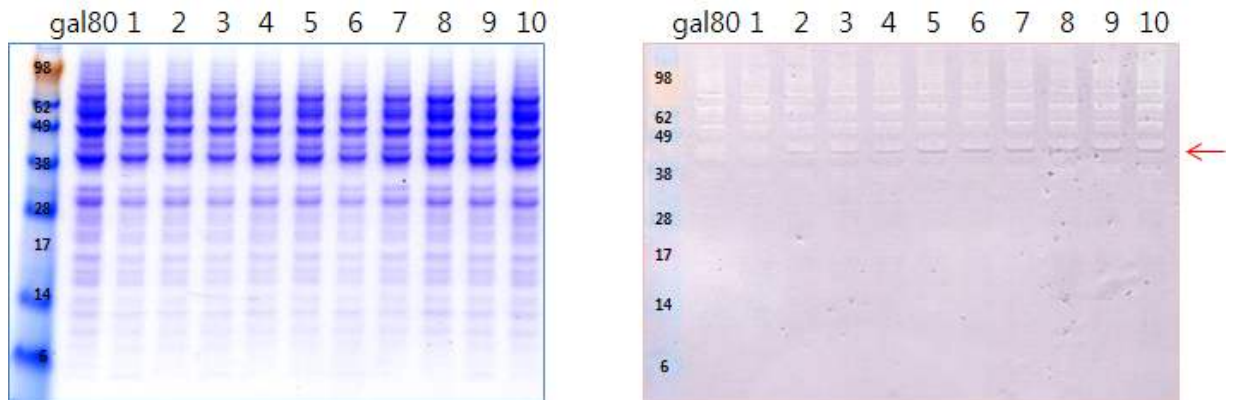


그림 7-31. 형질전환체들의 SDS-PAGE 및 western blot 분석

<표 7-4. LDH 단백질의 활성분석>

	LDH activity
	$\Delta A_{340nm}/5min$
2805	0.021
gal80	0.024
gal80/D-LpLDH-1	0.021
gal80/D-LpLDH-2	0.144
gal80/D-LpLDH-3	0.197
gal80/D-LpLDH-4	0.162
gal80/D-LpLDH-5	0.162
gal80/D-LpLDH-6	0.326
gal80/D-LpLDH-7	0.497
gal80/D-LpLDH-8	0.499
gal80/D-LpLDH-9	0.422
gal80/D-LpLDH-10	0.507

형질전환체의 lactic acid 생산능을 확인하기 위하여, YPD 배지에서 진탕배양하여 세포를 회수한 후 증류수로 2회 세척한 다음 칼슘 카보네이트를 함유하는 YPD10(10% glucose) 액체 배지에 접종하여 72시간 동안 배양하였다. HPLC를 통하여 lactic acid 생산량을 확인한 결과 5.2 g/l의 lactic acid가 생산되었고, 43.8 g/l의 에탄올도 생산 되는 것을 확인하였다(그림 7-32). PDC1 유전자가 결실되지 않은 경우에도 lactic acid의 생산이 가능하였지만 에탄올 발효 경로가 NADH 재생을 위한 주된 경로로 이용됨을 확인하였다.

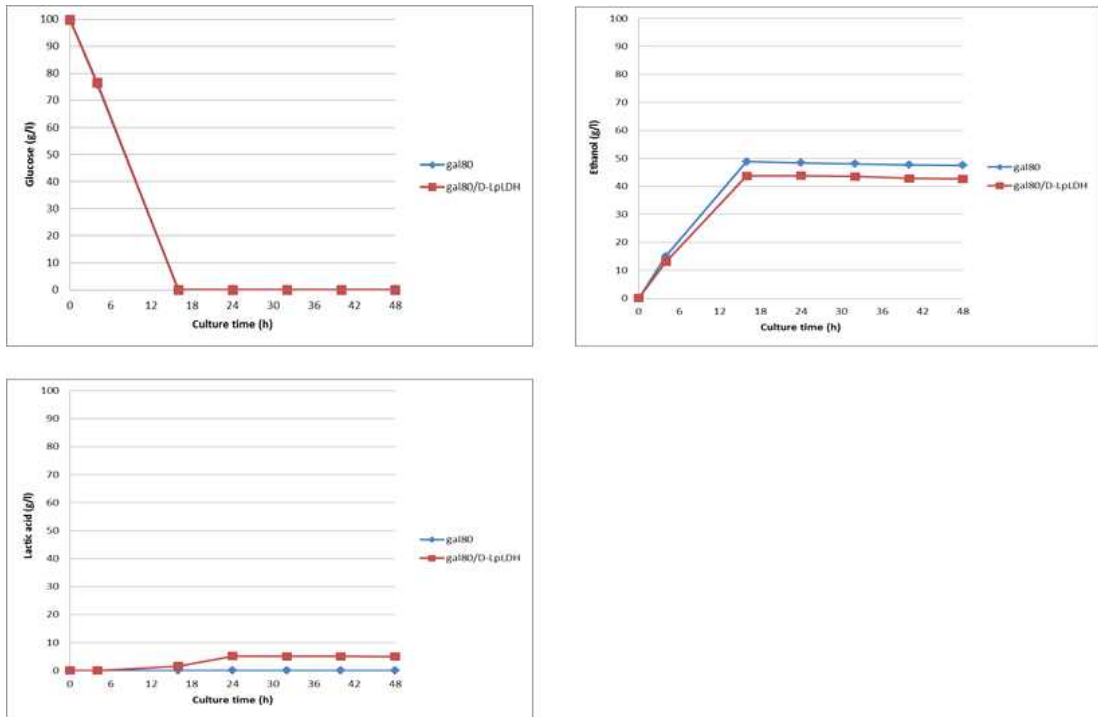


그림 7-32. lactic acid 생산량 분석

(4) Lactate 저항성을 지닌 효모 균주의 확인

본 연구팀에서 단백질 발현시스템으로 이용하고 있는 Y2805 균주에서 앞서와 같이 lactic acid의 생산량을 분석해 보았을 때 LDH 효소의 활성을 가지고 있음에도 불구하고 더 많은 양의 에탄올을 생성함을 알 수 있었다. 이는 본 효모에서는 lactic acid에 의한 독성 스트레스에 취약하기 때문이라고 여겨진다. 따라서 문헌조사를 통하여 다양한 스트레스에 대한 저항성이 높은 것으로 알려진 *S. cerevisiae* CEN.PK2 균주를 대상으로 lactate에 대한 저항성을 확인하였다. 2, 3, 4% lactate가 포함된 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% glucose) 고체배지에 세포배양액을 dotting하여 30°C에서 24시간 배양하였다(그림 7-33). 그 결과 Y2805 균주와 Y2805gal80 균주의 경우 3% 이상의 lactate 농도에서는 성장하지 못하였으나, CEN.PK2 균주와 CEN.PK2-1D 균주의 경우 모든 농도에서 세포성장을 보였으며, 특히 4% 농도까지 성장하여 lactate에 대한 저항성이 높은 것을 확인하여 이를 lactic acid 생산 균주로 선택하였다.

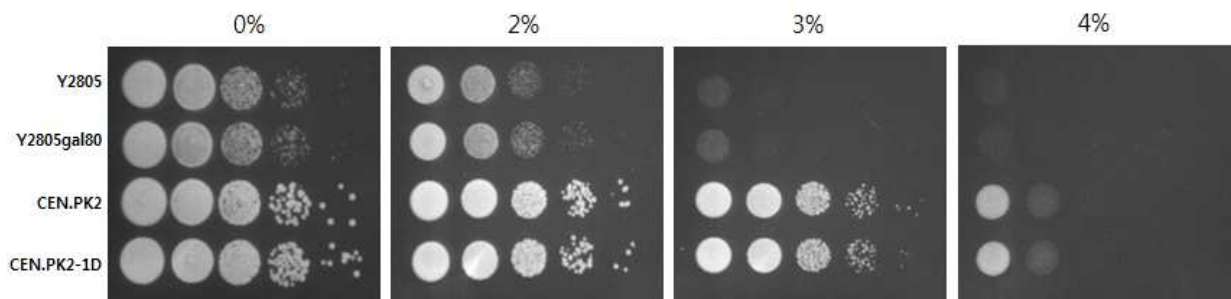


그림 7-33. 효모 균주들의 lactate 저항성 확인

(5) Lactate 고저항성 효모에서 D-lactic acid 생산성 확인

고농도 lactate에 저항성을 지닌 야생형의 CEN.PK 효모 균주에 직접 D-LDH 유전자를 발현하여 젖산생산과 에탄올 생산성을 비교해 보았다. 먼저 D-LDH 유전자 발현을 위하여 GAL10 promoter에 D-LpLDH 유전자를 도입하여 YGa-D-LpLDH vector(그림 7-34)를 구축하였고, 구축된 vector를 CEN.PK2와 CEN.PK2-1D 균주에 형질전환하여 단일 균주를 선별하였다. D-LDH 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 형질전환체를 YPDG (1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose) 배지에서 40시간 배양하였고, 배양된 균체를 과쇄하여 원심분리를 통해 세포추출액을 얻었다.

발현된 단백질을 SDS-PAGE 및 western blot으로 분석 한 결과 40kDa 부근에서 발현 단백질을 확인할 수 있었다(그림 7-35). 발현된 D-LDH 단백질의 활성을 확인하기 위하여 0.1ml의 효소 용액을 2.7ml의 기질용액(sodium pyruvate)과 0.1ml의 NADH와 반응하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 D-LDH 유전자가 도입된 균주는 모두 활성이 있는 것으로 확인하였다(표 7-5).

D-lactic acid 생산능을 확인하기 위하여 각 형질전환체 5개씩 YPD 배지에 접종하여 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 모두 회수하여 증류수로 2회 세척 후 YP-glucose (10%) 액체배지에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. HPLC를 통하여 D-lactic acid 생산량을 확인한 결과 D-LDH 유전자가 도입된 Y2805gal80 균주는 배양 12시간 쯤 0.8 g/l의 lactic acid가 생산되었지만 D-LDH 유전자가 도입된 CEN.PK2-1D 균주는 8.1 g/l의 D-lactic acid가 생산되어 D-lactic acid 생산량이 약 10배 더 많은 것을 확인하였다(표 7-6).

일반적으로 대부분의 *S. cerevisiae* 균주에서는 PDC1, PDC5 유전자를 모두 다 결실시킨 균주에 LDH 유전자를 발현할 경우에만 lactic acid가 생산되고 PDC 효소가 남아 있는 경우에는 대부분의 pyruvate는 에탄올로 전환되는 것으로 알려져 있지만 CEN.PK2-1D 균주의 경우 PDC 효소가 있음에도 불구하고 상당량의 lactic acid가 합성되었다. 이러한 결과는 lactic acid 생산용 균주로서 CEN-PK 균주의 높은 가능성을 입증하는 결과이다.

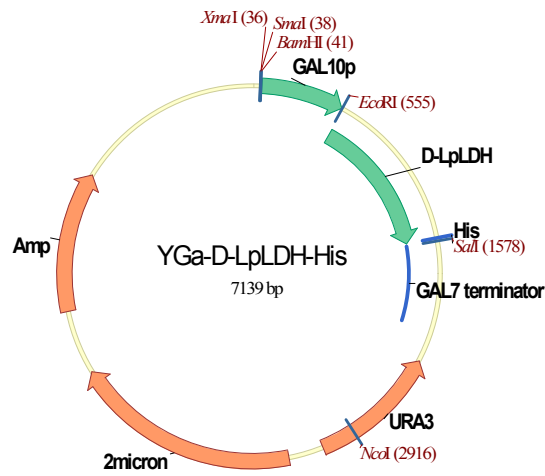


그림 7-34. *D-LDH* 발현을 위한 *S. cerevisiae* vector

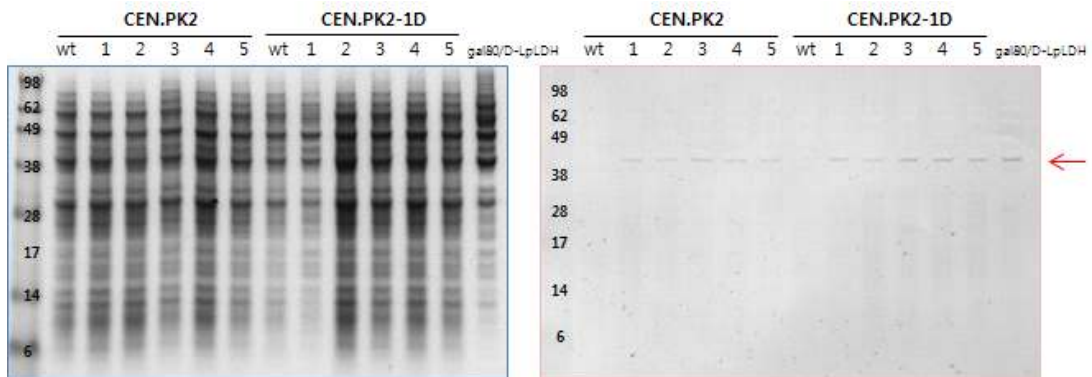


그림 7-35. 형질전환체들의 SDS-PAGE(좌) 및 western blot 분석(우)

표 7-5. D-LDH 단백질의 활성분석

		LDH activity ($\Delta A_{340nm}/5min$)
CEN.PK2	wt	0.012
	1	0.305
	2	0.297
	3	0.292
	4	0.306
	5	0.294
CEN.PK2-1D	wt	0.010
	1	0.180
	2	0.317
	3	0.325
	4	0.343
	5	0.336
gal80/L-LpLDH		0.281

표 7-6. 각 형질전환체들의 D-lactic acid 생산성 분석

strain		Lactic acid production (g/l)	Ethanol production (g/l)
CEN.PK2	wt	0	43.3
	1	7.8	39.9
	2	6.5	41.6
	3	6.4	41.2
	4	7.9	40.9
	5	6.4	41.0
CEN.PK2-1D	wt	0	44.7
	1	0.5	43.0
	2	7.9	40.3
	3	7.7	40.4
	4	8.1	40.0
	5	7.8	40.4
Gal80	wt	0	44.4
	D-LDH	0.8	43.5

(6) LDH 유전자 발현 promoter 비교 및 D-lactic acid 생산성 확인

LDH 유전자 발현을 유도하는 promoter에 따른 D-lactic acid 생산성을 비교하기 위해 일반적으로 LDH 발현에 주로 이용되는 PDC1 promoter와 galactose에 의하여 발현이 유도되는 GAL10 promoter를 이용하여 D-LDH 유전자를 발현하였다. 먼저 GAL10 promoter에 D-LpLDH 유전자가 도입된 vector (GAL10p-D-LpLDH)와 PDC1 promoter에 D-LpLDH 유전자가 도입된 vector (PDC1p-D-LpLDH)를 구축하였다. 구축된 vector를 CEN.PK2와 CEN.PK2-1D 균주에 형질전환하여 단일 균주를 선별하였다.

세포 성장에 따른 D-LDH 활성분석을 위해 YPDG 또는 YPD 배지에서 57시간 배양하여 배양균체를 파쇄하여 원심분리를 통해 세포추출액을 얻었다. 그 결과 PDC1 promoter 보다 GAL10 promoter를 이용할 때 더 높은 세포성장을 보였으며, 활성 또한 좋은 것으로 확인하였다(그림 7-36). pH를 조절하지 않는 조건에서 flask 배양을 통하여 D-lactic acid 생산성을 비교해 본 결과 PDC1 promoter를 이용하여 D-LDH를 발현한 CEN.PK2-1D 균주의 경우 4.8 g/l의 D-lactic acid가 생산된 반면 GAL10 promoter를 이용한 경우 9.5 g/l의 D-lactic acid가 생산되어 D-lactic acid 생산량이 더 많은 것을 확인하였다(그림 7-37). 그러나 여전히 높은 에탄올의 생산으로 인해 lactic acid의 생산이 제한적이며 고농도의 lactic acid의 생산을 위해서는 에탄올 생산 경로의 차단이 필수적임을 알 수 있었다.

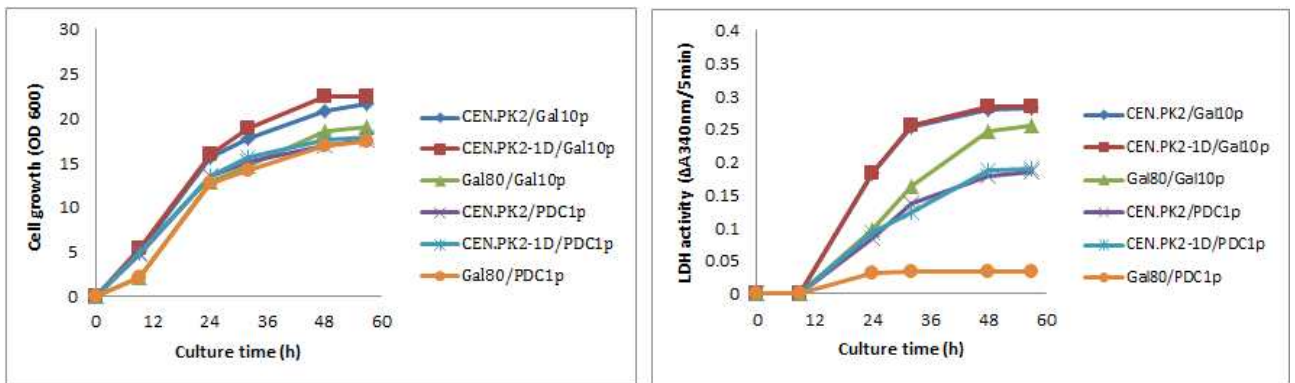
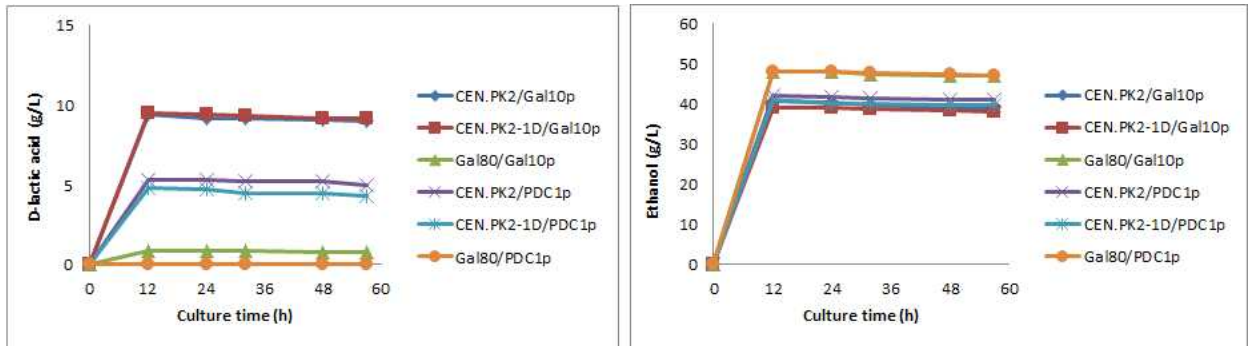


그림 7-36. 세포 성장에 따른 D-LDH 활성비교



strain		Lactic acid production (g/l)	Ethanol production (g/l)
CEN.PK2	wt	0	49.8
	GAL10	9.4	40.8
	PDC1	5.3	42.0
CEN.PK2-1D	wt	0	48.2
	GAL10	9.5	39.1
	PDC1	4.8	41.1
Y2805gal80	wt	0	48.5
	GAL10	0.9	48.2
	PDC1	0	48.2

그림 7-37. 배양시간에 따른 D-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

(7) CEN.PK 2-1D균주에서의 PDC1 유전자의 결실 및 LDH 유전자의 도입

PDC1 유전자를 결실 시키는 것과 동시에 D-LDH 또는 L-LDH 유전자를 도입하기 위하여 PDC1 유전자를 LDH 유전자로 교체하는 방법을 실시하였다. *S. cerevisiae* genomic DNA를 template로 하여 PDC1 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ695와 HJ721, HJ697과 HJ698 primer를 이용하여 증폭 하였다. 각 유전자 절편과 D-LpLDH-URA3 DNA 절편을 혼합한 후 overlap extension PCR을 수행하여 cassette를 제작하였다. PCR fragment는 CEN.PK2-1D 균주에 형질전환하여 PDC1 locus에 도입된 균주를 uracil이 없는 선택배지에서 선별하였다. 형질전환 여부를 primer HJ695와 HJ699, U200f와 HJ699를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR band를 확인하였다. PDC1 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ700와 HJ698 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 D-LpLDH 발현 cassette에 의해 PDC1 유전자가 결실되었음을 확인하였다(그림 7-38).

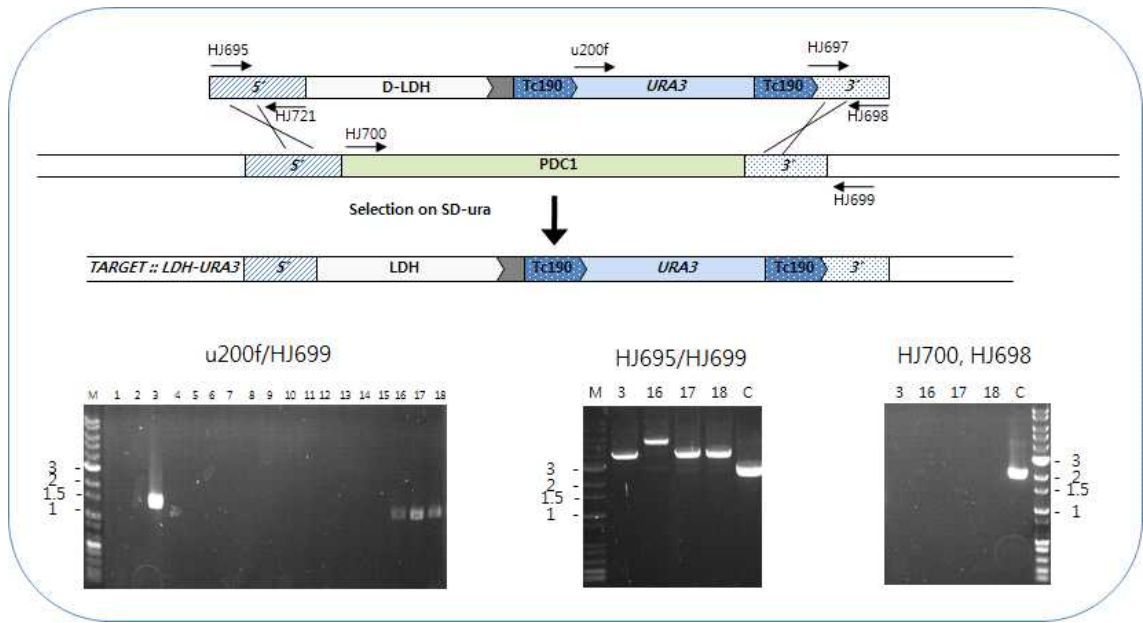
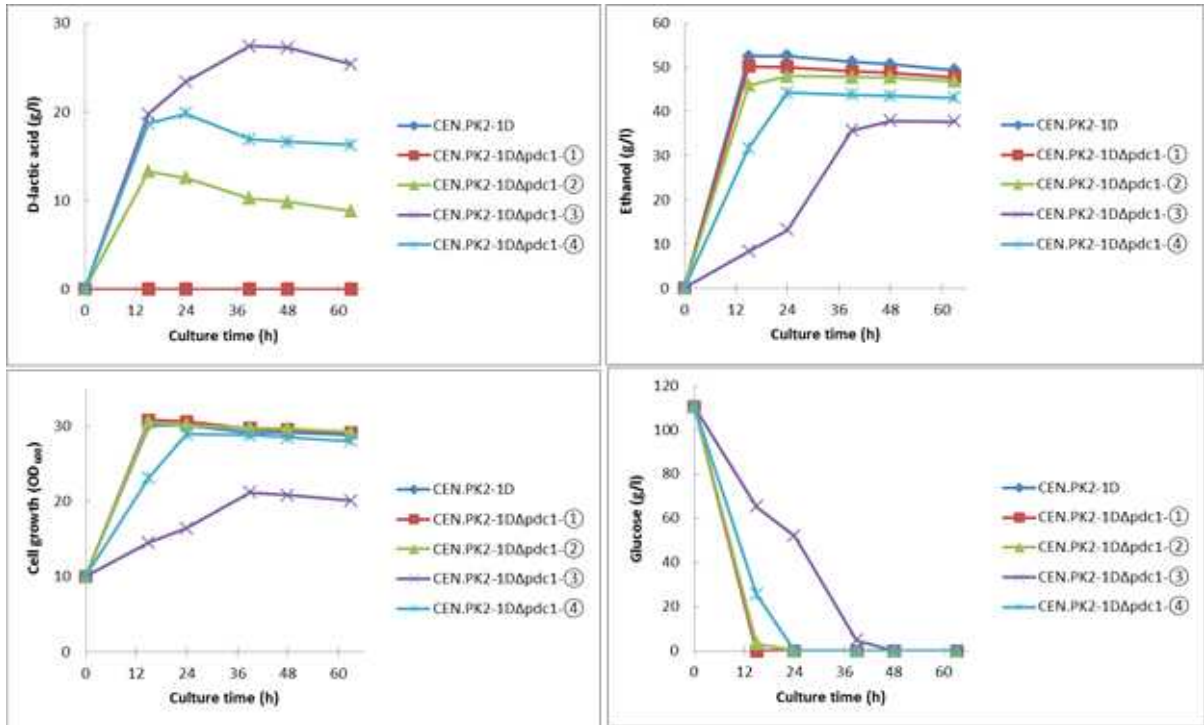


그림 7-38. *URA3* cassette를 이용한 *PDC1* 유전자 결실 과정

(8) *PDC1* 유전자 결실 균주의 D-lactic acid와 ethanol 생산량 분석

PDC1 유전자가 D-LpLDH 유전자로 교체된 4개의 균주를 pH를 조절하지 않는 조건에서 flask 배양을 통하여 D-lactic acid와 에탄올 생산량을 비교하였다. 그 결과 17번 균주의 경우 다른 균주보다 세포성장이 느렸지만 가장 많은 양의 D-lactic acid가 생산되었고, 가장 적은 양의 에탄올이 생성되었다(그림 7-39). 선행연구를 통하여 *S. cerevisiae* Y2805 균주에서 *PDC1* mutant를 제작한 경우 wt 균주에 비하여 매우 성장이 지체되며 glucose 소모능 또한 매우 약해지는 것을 확인하였으나 CEN-PK 균주에서는 다소 성장이 지체되는 현상이 나타났으나 *S. cerevisiae* 2805 균주와는 다른 결과를 나타내었다.



strain	Lactic acid production (g/l)	Ethanol production (g/l)
CEN.PK2-1D	0	52.5
CEN.PK2-1Dpdc1::D-LpLDH-①	0	50.3
CEN.PK2-1Dpdc1::D-LpLDH-②	13.3	48.0
CEN.PK2-1Dpdc1::D-LpLDH-③	27.4	37.9
CEN.PK2-1Dpdc1::D-LpLDH-④	19.8	44.2

그림 7-39. 세포성장에 따른 D-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

(9) PDC5 유전자 결실 및 L-LDH 또는 D-LDH 유전자 도입

PDC1 mutant의 에탄올 발효능이 감소한 것을 확인하였지만 아직도 lactic acid보다 많은 양의 에탄올이 생성되고 있기 때문에 남아있는 PDC5 유전자가 추가적으로 결실된 균주를 제작하고자 하였다. PDC1 유전자 결실에 사용한 방법과 동일한 방법을 사용하여 PDC5 유전자 결실을 진행하였다. PDC5 유전자를 결실 시키는 것과 동시에 L-LDH 유전자를 도입하기 위하여 *S. cerevisiae* genomic DNA를 template로 하여 PDC5 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ701와 HJ702, HJ703과 HJ704 primer를 이용하여 증폭 하였다. 각 유전자 절편과 L-LpLDH-URA3 DNA 절편을 혼합한 후 overlap extension PCR을 수행하여 cassette를 제작하였다. PCR fragment는 CEN.PK2-1DΔpdc1 균주에 형질전환하여 PDC5 locus에 도입된 균주를 1% 에탄올이 포함된 선택배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.077% Ura-DO supplement, 2% 글루코오스, 2% agar)에서 선별하였다. 형질전환 여부를 primer HJ701와 HJ705, U200f와 HJ705를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에

서 PCR band를 확인하였다.

PDC5 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ706와 HJ704 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 PDC5 유전자가 결실되었으며 URA3 유전자가 pop-out된 이후에도 PDC5 유전자는 결실된 상태를 유지하고 있음을 확인하였다. D-lactic acid 생산 균주를 제작하기 위하여 L-LDH 유전자 대신 D-LDH 유전자가 도입된 균주를 L-LDH 유전자를 도입하는 과정과 동일하게 진행하였고, PCR을 통해 PDC5 유전자가 결실되었음을 확인하였다(그림 7-40).

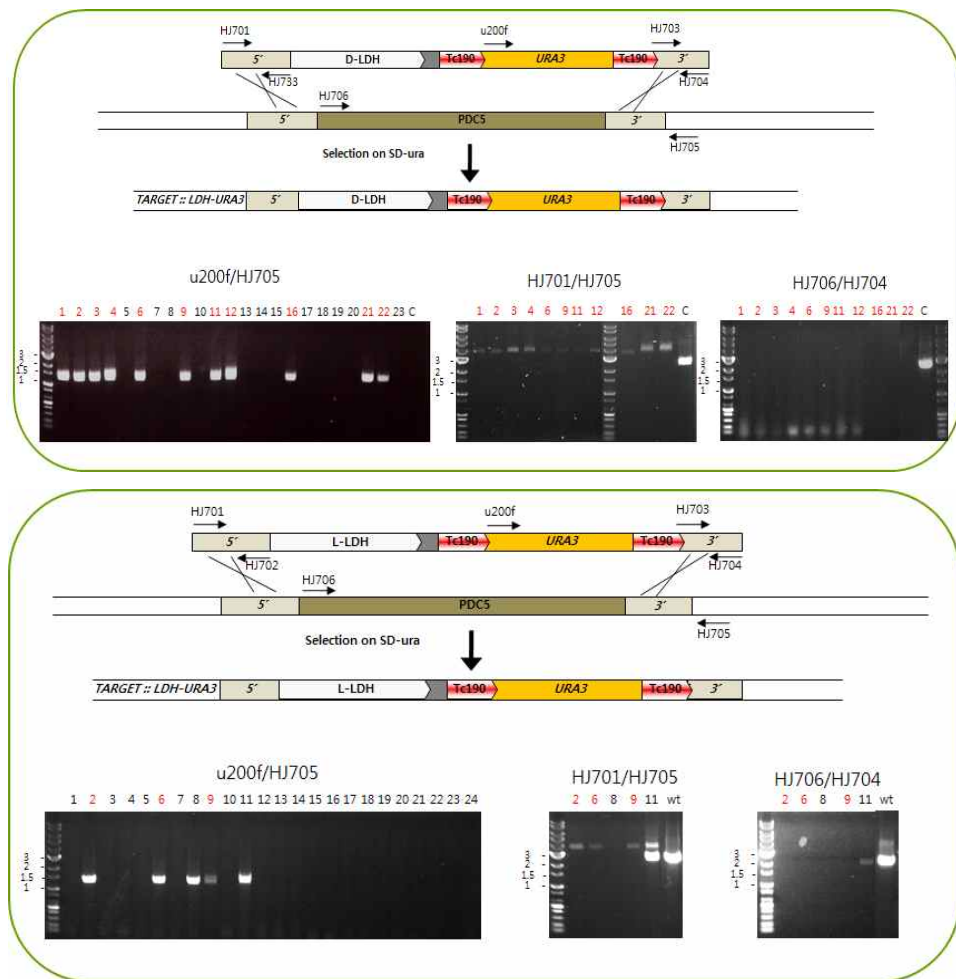


그림 7-40. URA3 cassette를 이용한 PDC5 유전자 결실 과정

PDC1, PDC5 유전자가 모두 결실된 균주는 acetaldehyde를 생산하지 못하기 때문에 C2 compound를 필요로 하고 glucose 존재시 성장이 매우 지체되는 것으로 보고되어 있으며, 이런 특성을 개선하기 위해 glucose 대신 ethanol을 첨가하여 flask 배양하였다. 그 결과 glucose가 첨가되면 세포가 잘 자라지 못하나, 에탄올을 첨가해주면 glucose만 있을 때 보다는

growth가 좋은 것을 확인하였다. 특히 1% 에탄올이 첨가된 배지에서 growth가 가장 좋은 것을 확인하였다(그림 7-41).

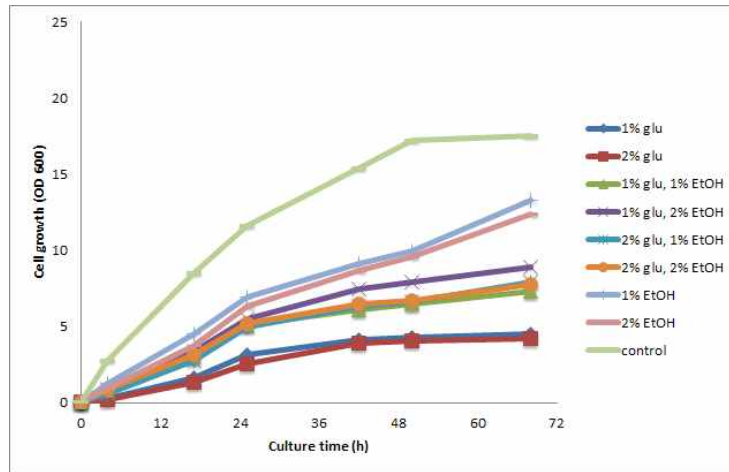
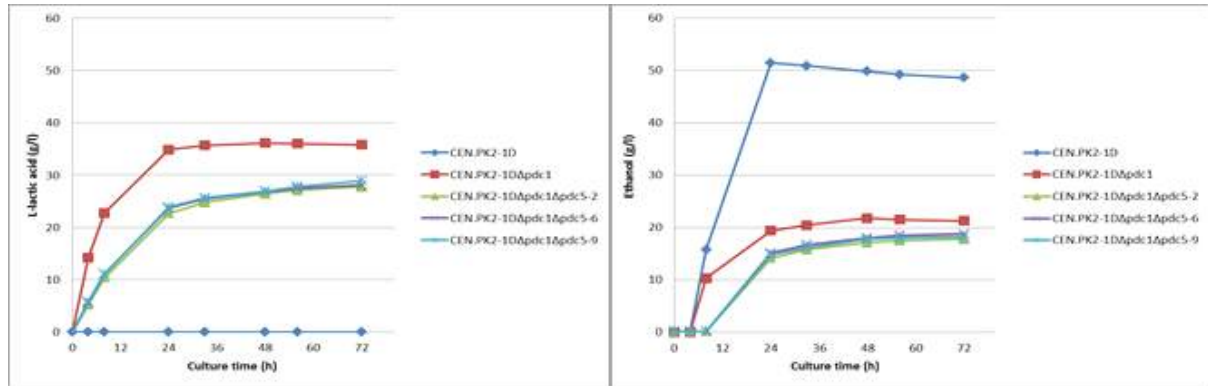


그림 7-41. PDC1, PDC5 유전자 결실 균주의 glucose와 ethanol 농도에 따른 cell growth 확인

(10) PDC1, PDC5 유전자 결실 및 L-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

PDC1, PDC5 유전자가 모두 결실된 균주와 PDC1 유전자만 결실된 균주를 pH를 조절하지 않는 조건에서 flask 배양을 통하여 L-lactic acid와 에탄올 생산량을 비교하였다. *S. cerevisiae* 균주에서는 PDC1, PDC5 유전자가 결실되었을 경우 에탄올 생성량은 감소하였지만 여전히 일정량의 glucose가 에탄올로 전환되는 것을 확인하였으며 따라서 PDC1, PDC5 유전자가 결실만으로 에탄올 생산 경로가 완벽하게 봉쇄되지 않는 것을 알 수 있었다. PDC1, PDC5 유전자가 결실된 균주는 PDC1 유전자 결실 균주에 비하여 에탄올 생산이 감소하였지만 성장 속도도 감소하였기 때문에 lactic acid 생산량도 감소한 것을 확인하였다(그림 7-42). 이러한 결과는 PDC1, PDC5 유전자가 결실된 균주의 성장저해에 기인하기 때문으로 생각된다.



Strain	Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
CEN.PK2-1D	0	51.4
Δpdc1	36.1	21.8
Δpdc1Δpdc5-2	27.7	17.8
Δpdc1Δpdc5-6	28.1	18.8
Δpdc1Δpdc5-9	29.9	18.2

그림 7-42. 세포 성장에 따른 L-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

(11) 내산성 효모의 배양 pH 에 따른 전사체 결과의 분석

본 연구에서 신규 내산성 효모로 선별된 NG7 균주의 pH2.0와 pH6.0에서의 전사체를 분석한 결과로부터 pH2.0에서 2배 이상의 발현 차이를 보이는 유전자 중 EC 번호가 부여된 유전자만을 KEGG 데이터베이스를 활용하여 세포 전체 대사회로에 mapping을 수행하여 분석해 보았다. 그 결과, purine/pyrimidine 대사와 aromatic 아미노산 대사 및 serine, cysteine 아미노산 대사 관련된 유전자들이 산성조건에서 mRNA의 발현이 증가한 것으로 분석되었다. 한편 5탄당 대사 및 전자전달계관련 유전자들이 산성조건에서 발현이 감소함을 보였다. 반면 sterol 합성에 관련된 많은 유전자들이 발현이 증가함을 보여, 이들이 내산성과의 연관이 있음을 예상할 수 있었다(그림 7-43).

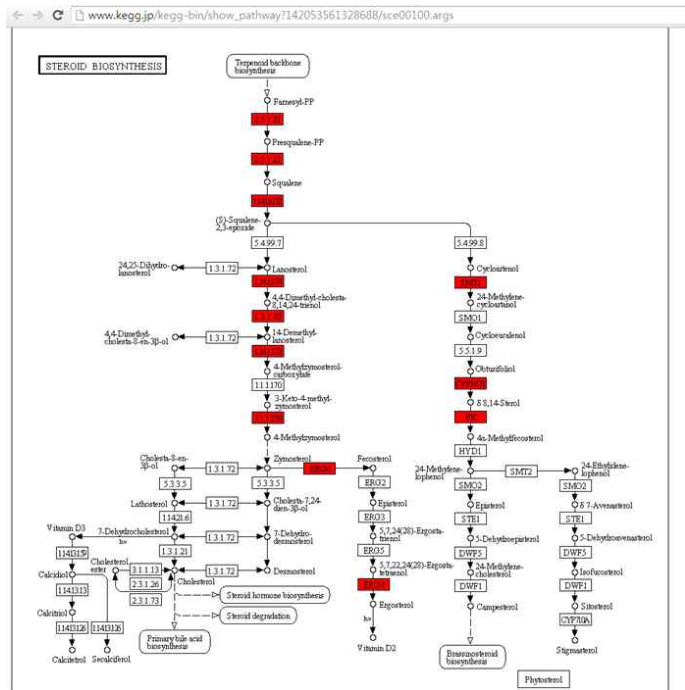


그림 7-43. KEGG 데이터베이스를 활용한 전사체 결과의 대사회로 맵핑분석-steroid 대사회로

(12) 전사체 분석 기반 내산성 연관 유전자의 선별 및 발현

효모의 lactic acid의 생산과정에서 있어 세포밖에 축적된 고농도의 lactic acid에 의하여 효모세포의 성장이 저해됨을 물론 lactic acid의 생산능의 감소를 초래하는 결과를 얻는다고 알려져 있다. 따라서 CEN.PK2-1D 효모의 내산성 증가를 위하여 전사체 분석결과를 기반으로 하여 내산성 연관 유전자를 추출하고 이를 CEN.PK2-1D 효모에 적용해보고자 하였다. 그림 7-43에서 보듯이 steroid 합성관련 유전자들이 증가하였고, 더불어 이들의 전사조절자로 추정되는 SREBP family에 속하는 유전자의 발현도 증가한 결과를 보였다. 따라서 *S. cerevisiae*에서 이와 대응하는 기능을 지닌 유전자를 탐색하였고, Yeast genome database를 통하여 UPC2 유전자를 타깃으로 정하였다. UPC2 유전자는 sterol농도에 반응하는 전사인자를 발현하는 유전자이다. 세포질에 존재하는 ergosterol의 농도가 감소하면 UPC2 protein은 핵 안으로 이동하여 ergosterol 생합성 관련 유전자의 발현을 증가시키는 역할을 수행한다. 따라서 이 유전자를 GAL10 promoter와 연결시켜 효모발현벡터에 클로닝하여 YGa-ScUPC2 벡터를 구축하였고, 이를 lactic acid 생산균주인 CEN.PK2-1D Δ pdc1::L-LDH에 형질전환하였다(그림 7-44).

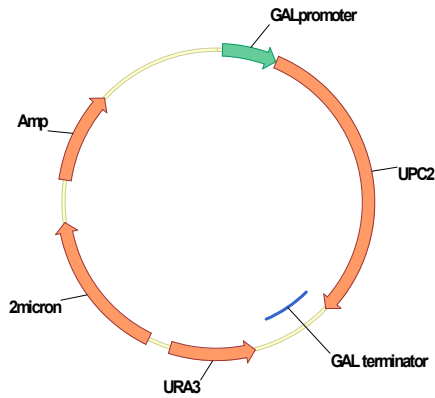


그림 7-44. *UPC2* 발현을 위한 *S. cerevisiae* vector

Galactose를 탄소원으로 공급하였을 때, *UPC2* 유전자의 발현이 증가되는지 확인하기 위하여 YPD와 YPG에서 각각 키운 후 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 이용해 qPCR을 수행하였다. 그 결과 YPD를 기준으로 YPG 배지에서 자란 세포는 30배 많은 *UPC2*의 transcript가 존재함을 알 수 있었다. 이에 따라 *UPC2* 단백질이 세포 내 다량 존재함을 가정할 수 있고, 기능을 하는 활성형의 *UPC2* 단백질이 작용하고 있는지 검증하기 위하여 문헌상에서 *UPC2* 단백질에 의해 유전자 발현이 조절된다고 알려진 ergosterol 생합성 경로의 여러 유전자들의 transcript양을 qPCR을 통해 비교 분석하였다. 그 결과 ergosterol 생합성 경로의 많은 유전자들의 mRNA 발현이 증가함을 알 수 있었다(그림 7-45).

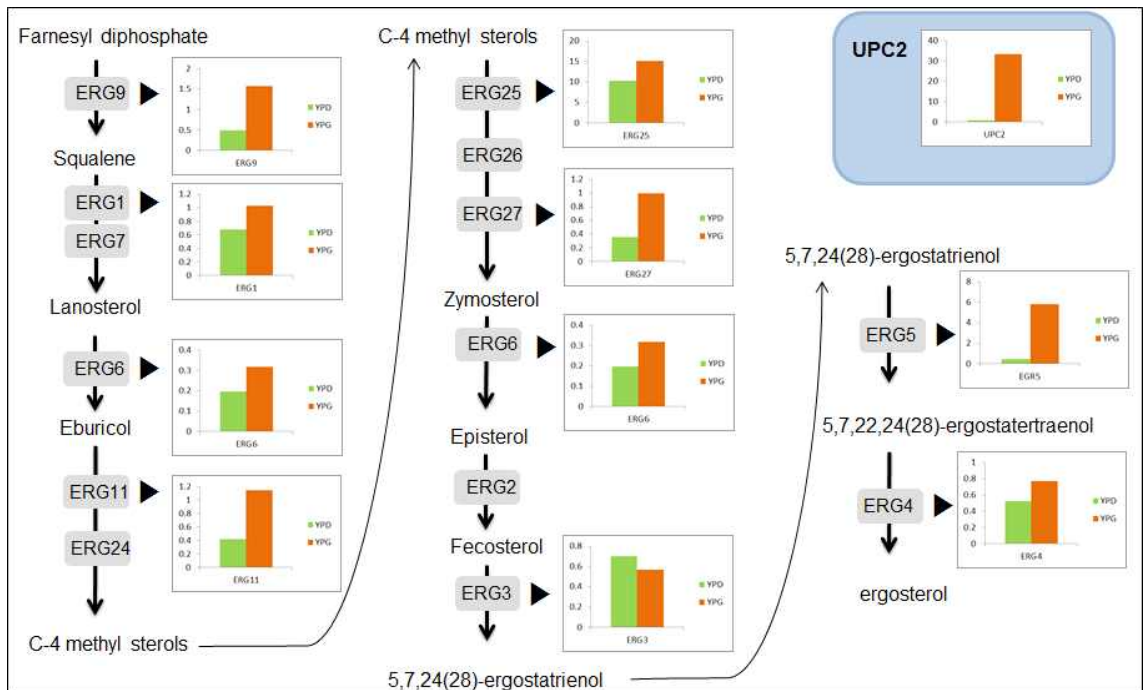


그림 7-45. *UPC2* 과발현에 의한 ergosterol 생합성 관련 유전자의 transcript 변화

이에 lactic acid에 대한 내성이 증가하는지 조사하기 위하여 1-4% lactic acid 고체배지 조건에서 콜로니 형성을 관찰하고자 하였고, 같은 조건의 액체배지에서의 세포성장을 비교해 보았다. 그 결과, 형질전환체가 3-4%의 lactic acid조건에서 모균주보다 더 많은 콜로니로 성장할 수 있음을 알 수 있었다 (그림 7-46). 이와 마찬가지로 액체배지에서도 UPC2 과발현 효모에서 모균주보다 고농도 lactic acid 배지에서 성장속도가 빠름을 관찰하였다(그림 7-47).

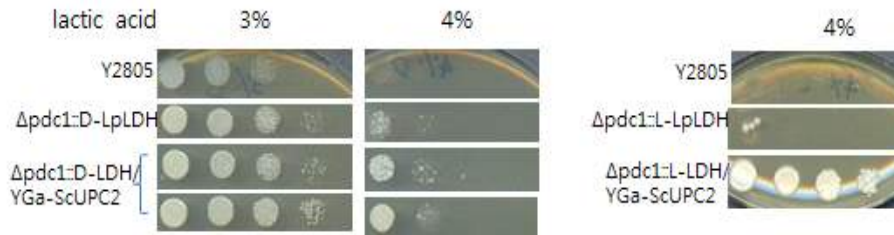


그림 7-46. *UPC2* 유전자 과발현에 따른 lactic acid 내성 테스트

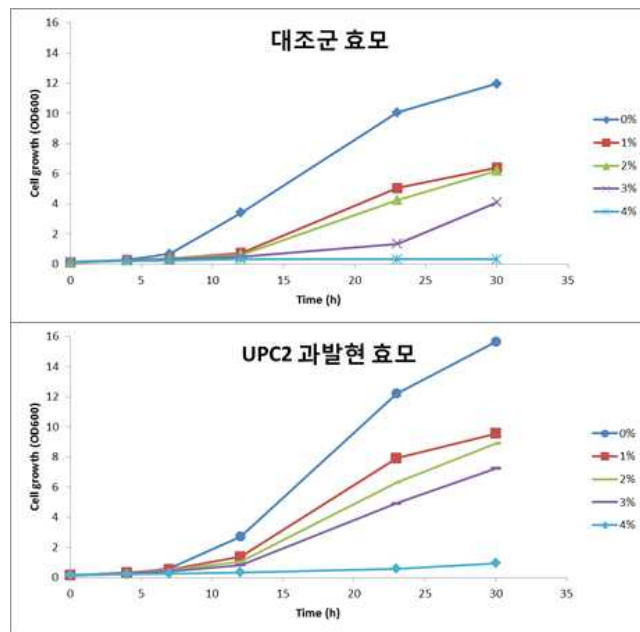
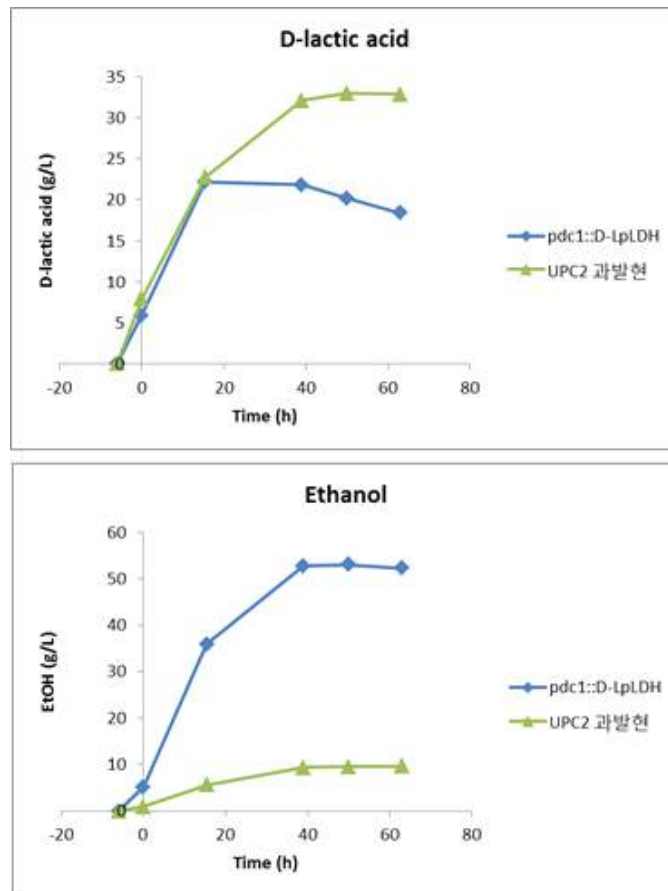


그림 7-47. *UPC2* 유전자 과발현 효모와 모균주의 lactic acid 액체배지에서 세포성장 비교

(13) *UPC2* 유전자 과발현 효모의 D- 또는 L-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

UPC2 유전자 과발현 효모에서 lactic acid에 대한 내성이 증가됨을 관찰하였다. 이러한 내성의 증가가 lactic acid의 생산량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 flask 배양을

수행하였다. pH를 조절하지 않는 조건에서 flask 배양을 통하여 D-lactic acid 생산성을 비교해 본 결과 UPC2 과발현 효모균주의 경우 최대 32 g/L의 L-lactic acid가 생산된 반면 모균주의 경우 최대 22 g/L의 L-lactic acid가 생산되어 UPC2 유전자 과발현 효모가 L-lactic acid 생산량이 더 많은 것을 확인하였다(그림 7-48). 반면 에탄올의 생산량은 UPC2 과발현 효모 균주에서 모균주보다 낮은 에탄올의 생산량을 보였다.

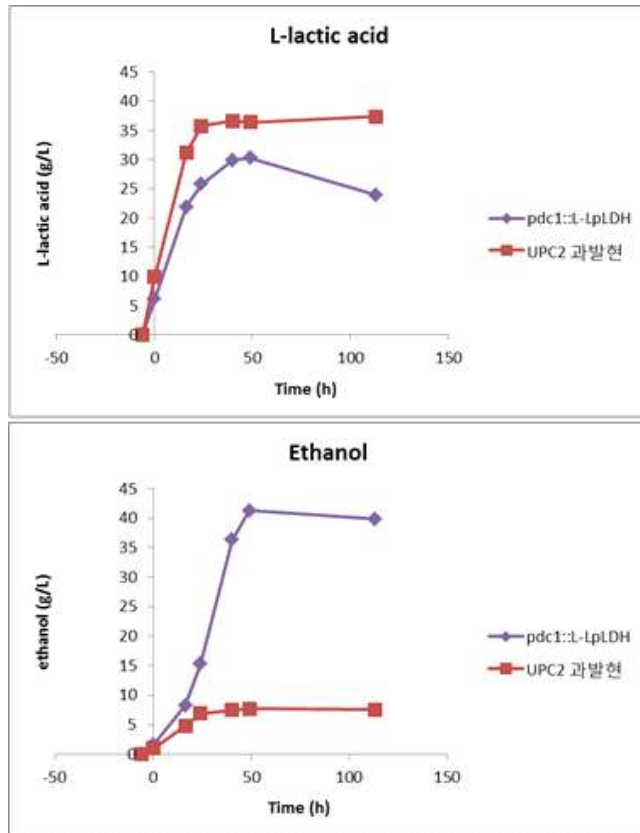


	D-Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
$\Delta pdc1::L-LDH$	22.1	52.7
$\Delta pdc1::L-LDH/YGa-ScUPC2$	32.9	9.6

그림 7-48. UPC2 과발현 균주의 D-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

동일한 배양조건 하에서 L-lactic acid 생산 균주에서도 UPC2 유전자를 과발현 시켰을 때 L-lactic acid의 생산량이 변화하는지 살펴보았다. Flask 배양을 통하여 L-lactic acid 생산성을 비교하였을 때 UPC2 과발현 효모균주의 경우 최대 37 g/L의 L-lactic acid가 생산된 반면 모균주의 경우 최대 30 g/L의 L-lactic acid가 생산되어 D-lactic acid와 마찬가지로 L-lactic acid 생산에 있어서도 UPC2 유전자의 발현이 이득이 됨을 확인할 수 있었다(그림 7-49). 에탄올의 생산량도 역시 UPC2 유전자 과발현 효모 균주에서 낮은 에탄올의 생산량을 보였다. 이

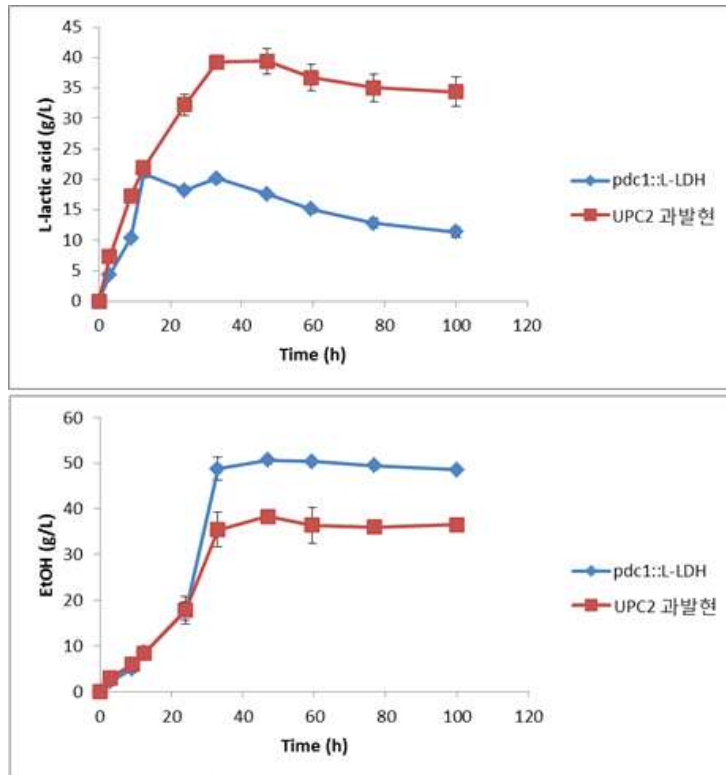
러한 결과를 종합해 볼 때 전사체를 기반으로 한 타깃 선별을 통해 내산성 증가 및 lactic acid 생산량을 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.



	L-Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
$\Delta pdc1::L-LDH$	30.2	41.3
$\Delta pdc1::L-LDH/YGa-ScUPC2$	37.3	7.7

그림 7-49. UPC2 과발현 균주의 L-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

UPC2 유전자 과발현을 극대화하여 lactic acid 생산을 증가시킬 수 있도록 전배양 시에 배지조성을 상기와 다르게 제조하여 lactic acid 생산량을 비교하였다. UPC2 유전자의 발현이 유도되도록 galactose를 첨가하면서 동시에 세포의 성장이 원활히 이뤄지도록 raffinose를 공급하여 전배양을 수행하였다. 이로부터 적정량의 세포를 수득한 후 고농도의 glucose 배지에서 본배양을 하면서 생산되는 L-lactic acid와 에탄올의 생산량을 분석한 결과, UPC2 과발현 효모의 경우 최대 39 g/L의 L-lactic acid가 생산된 반면 모균주의 경우 최대 21 g/L의 L-lactic acid가 생산되어 대략 54% L-lactic acid 생산량이 증가함을 알 수 있었다(그림 7-50). 반면 에탄올의 생산량은 UPC2 과발현 효모에서 모균주 보다 대략 20%가 감소된 결과를 얻었다. 따라서 본 연구에서 개발한 균주가 배양조건의 최적화를 통하여 최소의 에탄올을 생산하면서 lactic acid의 최대 생산을 얻을 수 있는 재조합 균주임을 시사하고 있다.



	L-Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
$\Delta pdc1::L-LDH$	21.0	50.6
$\Delta pdc1::L-LDH/YGa-ScUPC2$	39.4	38.2

그림 7-50. 배지조성 변화를 통한 UPC2 과발현 균주의 L-lactic acid 및 에탄올 생산량 분석

(14) 아미노산 치환을 통한 LDH 단백질의 활성 개량

효모의 lactic acid의 생산량을 증가시키기 위하여 LDH 단백질의 활성을 증가시킬 수 있는 방법을 모색하였다. 그 중 L-LDH 단백질의 아미노산 서열 84번째의 aspartic acid를 glycine으로 치환하였을 때, 본 효소의 활성이 증가한다는 논문을 참조하여 같은 위치의 아미노산이 치환된 돌연변이를 유도하여 LDH의 활성이 증가되는지 알아보려고 하였다. PCR 방법을 통하여 아미노산이 치환된 클론을 확보하고 이를 효모용 발현벡터에 클로닝한 후 형질전환하였다. 이로부터 얻어진 콜로니를 YPDG 배지에서 40시간 배양한 후 얻은 균체를 glass bead를 이용하여 세포 내 단백질을 추출해내었다. LDH의 활성측정을 위하여 단백질 추출물 0.1ml의 용액을 2.7ml의 기질용액 (sodium pyruvate)과 0.1ml의 NADH와 반응하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과 야생형의 LDH 단백질보다 아미노산이 치환된 LDH(D84G) 단백질의 활성이 적어도 10배 이상 증가했음을 확인할 수 있었다(표 7-7). 이들 균주를 대상으로 L-lactic acid의 생산능을 확인하기 위한 실험을 수행중이다.

표 7-7. L-LDH 단백질의 활성분석

Strain	LDH activity ($\Delta A_{340nm}/mg$ total protein)
CEN.PK2-1D	Not detected
$\Delta pdc1::L$ -LDH	0.004
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 1	0.145
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 2	0.175
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 3	0.192
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 4	0.178
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 5	0.194
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 6	0.177
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(WT) 7	0.171
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 1	2.28
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 2	2.11
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 3	2.02
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 4	1.95
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 5	1.98
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 6	1.89
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 7	1.89
$\Delta pdc1::L$ -LDH/YGC510-LDH(84G) 8	1.91

마. 바이오매스 분해능이 도입된 효모를 이용한 CBP-lactic acid 생산

상기한 바와 같이 섬유소 분해능이 도입된 재조합 효모 *S. cerevisiae* 복합균주를 이용하여 섬유소 바이오매스로부터 직접 바이오에탄올의 생산이 가능함을 확인하였다. 이러한 균주를 이용하여 lactic acid와 같은 유용 바이오케미컬도 섬유소 바이오매스 기질로부터 생산하기 위하여 본 연구에서 개발된 내산성 효모 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D 균주에 당화효소 고발현 시스템을 구축하고자 하였다.

(1) CEN.PK2-1D $\Delta pdc1::D$ -LDH 효모에서 SfBGL1 유전자의 발현

본 연구에서 개발된 D-lactic acid 생산 균주에서 직접 SfBGL1 단백질의 분비발현을 유도하고 섬유소 기질(cellobiose)로부터 lactic acid 생산이 가능한지 확인하였다. SfBGL1 유전자를 세포성장 정제기에 발현이 유도되는 CYC7 유전자의 프로모터와 연결하고 자가복제서열 2 micron을 가지는 벡터를 구축하였다. 제조된 벡터를 형질전환 하여 얻은 균주를 YPD 배지에서 40시간 배양하여 배양 상등액에 있는 단백질 발현 및 분비정도를 확인하였다. N-글리코실화에 의한 수식을 제거하기 위하여 엔도에이치(Endo-H) 효소를 처리한 후 SDS-PAGE 분석한 결과 타깃 단백질이 발현되고 분비되었음을 알 수 있다. 분비된 단백질의 활성을 앞서 설명한 바와 같이 pNPG 방법으로 측정된 결과, 모든 형질전환체에서 활성이 있음을 확인하였다(그림 7-51).

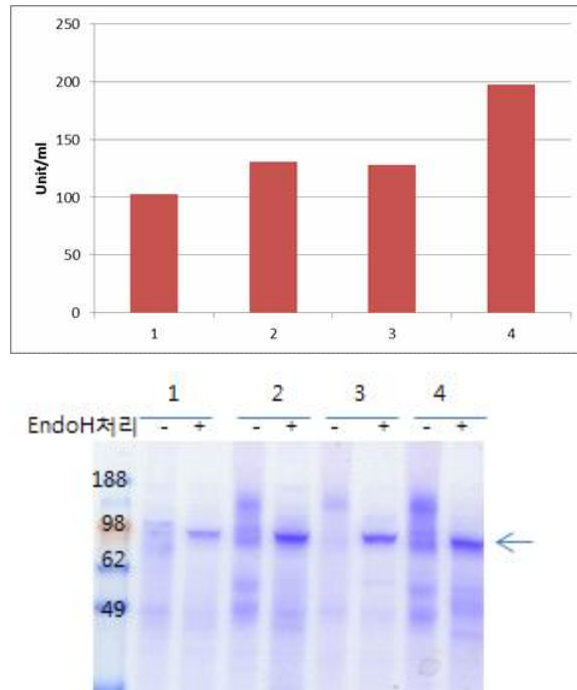


그림 7-51. 분비발현된 β -glucosidase의 활성 비교 및 SDS-PAGE 분석

(2) 분비 발현된 SfBGL1에 의한 섬유소 기질로부터 lactic acid 생산

상기한 β -glucosidase 분비균주를 대상으로 바이오케미컬 생산용 CBP 시스템으로 활용할 수 있는지 조사해보기 위하여 섬유소 분해시 생성되는 이당류인 셀로바이오스 (cellobiose)를 탄소원 및 에너지원으로 공급하면서 D-lactic acid를 생산할 수 있는지 확인하고자 하였다. pH를 조절하지 않은 조건에서 10%의 cellobiose와 최소한의 glucose를 공급하면서 flask 배양을 통하여 D-lactic acid 생산량을 측정한 결과, 10%의 셀로바이오스로부터 약 10g/L의 D-lactic acid가 생산됨을 알 수 있었고, 이는 소모된 셀룰로오스 대비 26%의 전환율을 보였다(그림 7-52 및 표 7-8). 원활한 SfBGL1의 분비발현을 위하여 최소한의 glucose를 공급한 것과 cellobiose를 단독으로 공급한 조건을 비교하였을 때, lactic acid의 생산량은 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 개발한 재조합 효모는 섬유소 기질만을 이용하여 lactic acid를 생산할 수 있음을 알 수 있었다. 한편 에탄올은 4 g/L가 생산되었는데, 이는 PDC5 유전자가 남아있기 때문인 것으로 판단된다. 이는 글루코오스를 탄소원으로 공급하였을 때와 비교해보면 절반 정도의 전환율이나, 난분해성 기질인 섬유소 분해산물을 통해 D-lactic acid를 얻었으므로 CBP 효모 시스템으로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

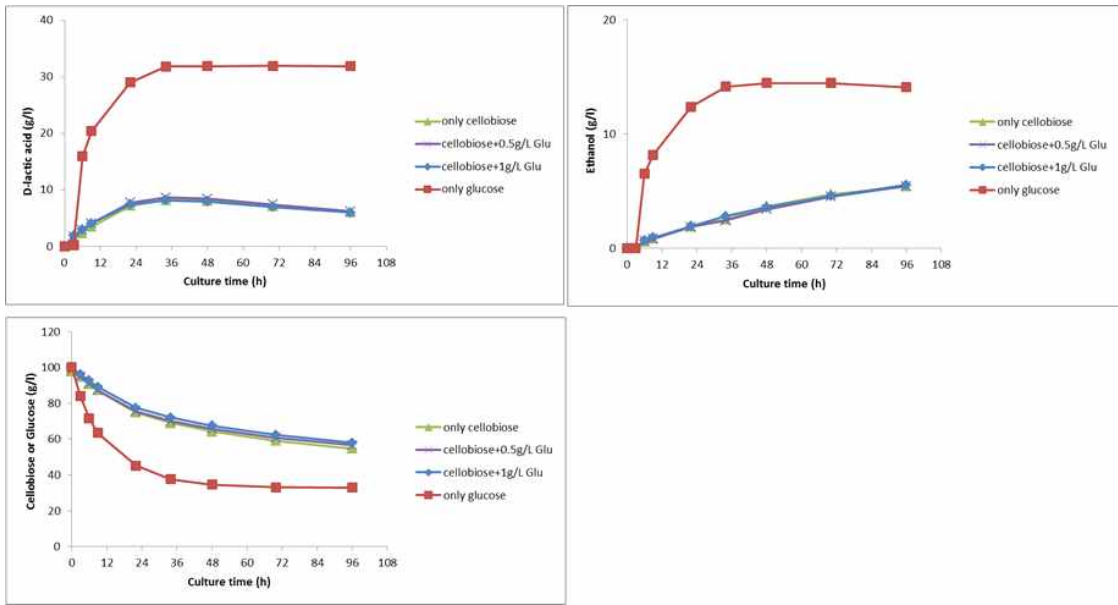


그림 7-52. 세포성장에 따른 탄소원 소비량 및 D-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

표 7-8. 탄소원에 따른 D-lactic acid와 에탄올 생산량 및 전환

Carbon source	Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
cellobiose	8.2	4.7
cellobiose, glucose (0.5%)	8.6	4.5
cellobiose, glucose (1%)	8.1	4.5
glucose	31.8	14.4

(3) CEN.PK2-1D Δ pdc1::D-LDH 효모에서 cellulase cocktail 발현

상기 결과에서 보듯이 내산성 *S. cerevisiae* 균주인 CEN.PK2-1D균주를 대상으로 섬유소 분해를 통한 lactic acid 생산 가능성을 확인하였으므로, 섬유소를 분해하는데 필요한 효소 4종을 발현할 수 있는 재조합 균주를 구축하고자 하였다. 결정화 구조의 섬유소를 분해하는데 있어 가장 중요한 요소로 작용하는 exo-cellulase(CBH) 단백질 2종 (CBH1, CBH2로 명명함)과 endo-glucanase (EGL) 1종 및 섬유소 분해산물인 이당류를 글루코오스로 분해하는 β -glucosidase (BGL) 1종을 분비 발현할 수 있도록 벡터를 제조하였다.

효모에서 발현할 수 있도록 galactose inducible promoter에 연결하였고 1개의 벡터에서 2종의 단백질을 분비발현 할 수 있도록 dual벡터 시스템을 활용하였다. 이를 효모에 형질전환하여 얻은 형질전환체의 배양액으로부터 cellulase 단백질의 분비발현을 확인하고자 하였다. 이러한 4종의 단백질은 N-글리코실화에 의해 당단백질 형태로 발현된다고 알려져 있으므로 이

를 제거하기 위해 각 단백질에 엔도에이치(Endo-H) 효소를 처리한 후 SDS-PAGE 분석하였다.

그 결과 각각의 세포에서 4종의 단백질이 동시에 효율적으로 발현되고 분비되었음을 알 수 있다(그림 7-53). 분비발현이 확인된 형질전환체로부터 4종의 단백질의 활성을 측정하기 위하여 아래와 같이 실험을 수행하였다. CBH1 또는 CBH2 활성측정 방법으로 섬유소(avicel, 1%)를 기질로 공급하고, sodium acetate 버퍼용액에서 50°C으로 반응시키면서 섬유소의 분해산물인 셀로바이오스의 농도를 측정하였다(그림 7-54).

그 결과, 다수의 형질전환체에서 셀로바이오스가 생성됨을 알 수 있었다. 그리고 EGL 단백질의 활성 측정 방법으로 carboxymethyl cellulose(CMC)를 기질로서 사용하고, 배양 상등액 10ul을 고체 배지에 흡수시킨 후 50°C에서 12시간동안 반응시켰다. 이를 시약 congo red으로 염색시켜 EGL의 활성을 관찰한 결과, 모든 형질전환체에서 halo를 형성하였으므로 활성형의 EGL이 분비발현 되었음을 알 수 있었다(그림 7-54). BGL의 활성은 앞서 언급한 바와 같이 pNPG 활성측정법으로 측정하였다. 그림 5-51에서 나타내었듯이 단독으로 BGL을 발현한 결과와 비교하였을 경우에 dual 벡터시스템으로 발현한 BGL의 활성이 절반 이하의 활성을 보여, 추후 lactic acid 생산을 위한 배양에서는 BGL 단백질을 보조적으로 공급해야 함을 알 수 있었다(표 7-9).

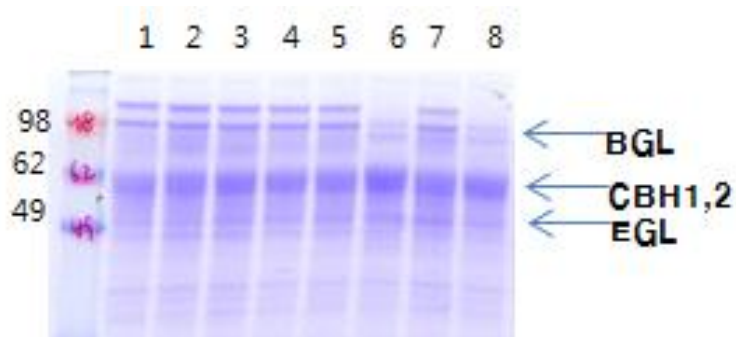


그림 7-53. 형질전환체들의 SDS-PAGE 분석

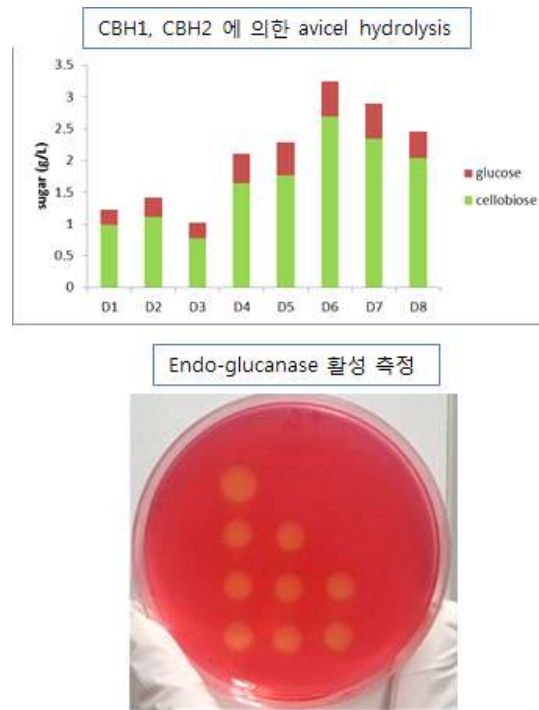


그림 7-54. 배양상등액의 cellulase 단백질 CBH1과 CBH2의 섬유소 분해산물 농도분석 및 EGL에 의한 CMC 분해에 따른 halo형성분석

표 7-9. 분비발현된 β -glucosidase 활성분석

Strain	Unit/ml
Transformant-1	40.5
Transformant-2	41.6
Transformant-3	22.0
Transformant-4	60.3
Transformant-5	63.2
Transformant-6	57.0
Transformant-7	62.5
Transformant-8	42.0
Transformant-9	56.1

(4) Cellulase 단백질의 분비에 따른 섬유소 분해 및 lactic acid와 에탄올 생산

4종의 섬유소 분해효소가 분비발현되는 균주를 대상으로 pH를 조절하지 않는 조건에서 flask 배양을 통하여 D-lactic acid와 에탄올 생산량을 비교하였다. 이 때 2종류의 균주를 사용하였는데, 4종의 cellulases 단백질을 dual 벡터시스템에 의해 발현하는 균주와 BGL을 단독으로 발현하는 균주를 각각 또는 혼합배양 함으로써 lactic acid의 생산량을 비교분석하고자 하였다. 섬유소 1%(Avicel)를 유일한 탄소원으로 공급하였고, pH를 조절하지 않은 조건에서 flask 배양을 수행하였다. 그 결과 4종의 단백질을 분비하는 균주만을 배양한 경우보다 BGL 단백질을 보조적으로 더 공급해 줄 수 있는 균주와 섞어 2종을 혼합 배양하였을 때, 3.32 g/L의 D-lactic acid가 생산됨을 알 수 있었고, 에탄올의 경우에도 2종 균주를 배양하였을 때 다

소 적은 양이 생산됨을 알 수 있었다(그림 7-55). 이는 섬유소가 분해되는 개시시점에서 주요한 역할을 하는 CBH1과 CBH2 뿐 아니라 이로 인해 생성되는 이당류가 효율적으로 단당류로 변환되는 것이 효모 CBP 시스템구축에 중요한 요소임을 시사해 준다. 또한 결정형 형태의 섬유소를 기질로 상용화 cellulase의 첨가가 없는 상태로 효모 CBP시스템을 통해 D-lactic acid를 생산한 고무적 결과로 판단된다.

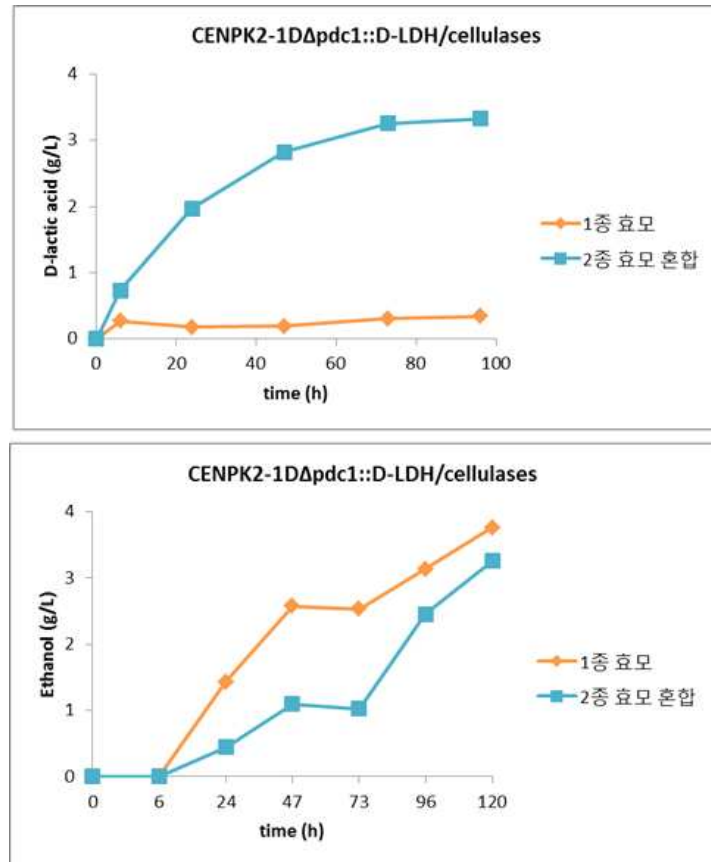


그림 7-55. 배양시간에 따른 D-lactic acid와 에탄올 생산량 분석

(5) CEN.PK2-1D Δ pdc1::D-LDH 효모에서 hemicellulose 분해 단백질 발현

바이오매스의 구성물로서 섬유소와 함께 얻어지는 원료 중 하나인 반섬유소 (hemicellulose)를 활용할 수 있는 CBP 효모 균주를 개발하고자 하였다. Hemicellulose를 분해할 수 있도록 endo-xylanase (XYN)와 β -xylosidase (bXYL)의 분비발현 벡터를 구축하고, 이들 단백질의 가수분해를 통하여 얻어진 xylose를 xylulose로 변환할 수 있도록 xylose isomerase (XylA)의 분비발현 벡터를 구축하였다. 각각의 벡터를 효모에 형질전환하여 얻어진 콜로니의 배양상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 모든 형질전환체에서 타겟 단백질의 분비발현이 원활하게 이뤄지고 있음을 확인할 수 있었다(그림 7-56~58).

분비발현된 XYN 단백질의 활성을 측정하기 위한 방법으로 인산버퍼용액에 1% birchwood

xylan을 기질로 공급하고, 배양상등액 50ul를 첨가한 후 50°C에서 10분동안 반응시켰다. 여기에 DNS용액을 넣고 끓인 후 540nm에서 흡광도를 측정함으로써 단백질 활성 unit을 계산하였다(그림 7-56). 1분동안 1 μ mole의 환원당을 방출시키는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였을 때, 모든 형질전환체에서 30 ~ 60 unit의 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 XylA 단백질의 활성은 배지에 공급한 xylose가 얼마나 소모되는지를 HPLC를 통하여 분석하였다. 그림 7-57에서 보듯이 형질전환체에서 고르게 Xylose가 줄어든 것을 관찰할 수 있었다.

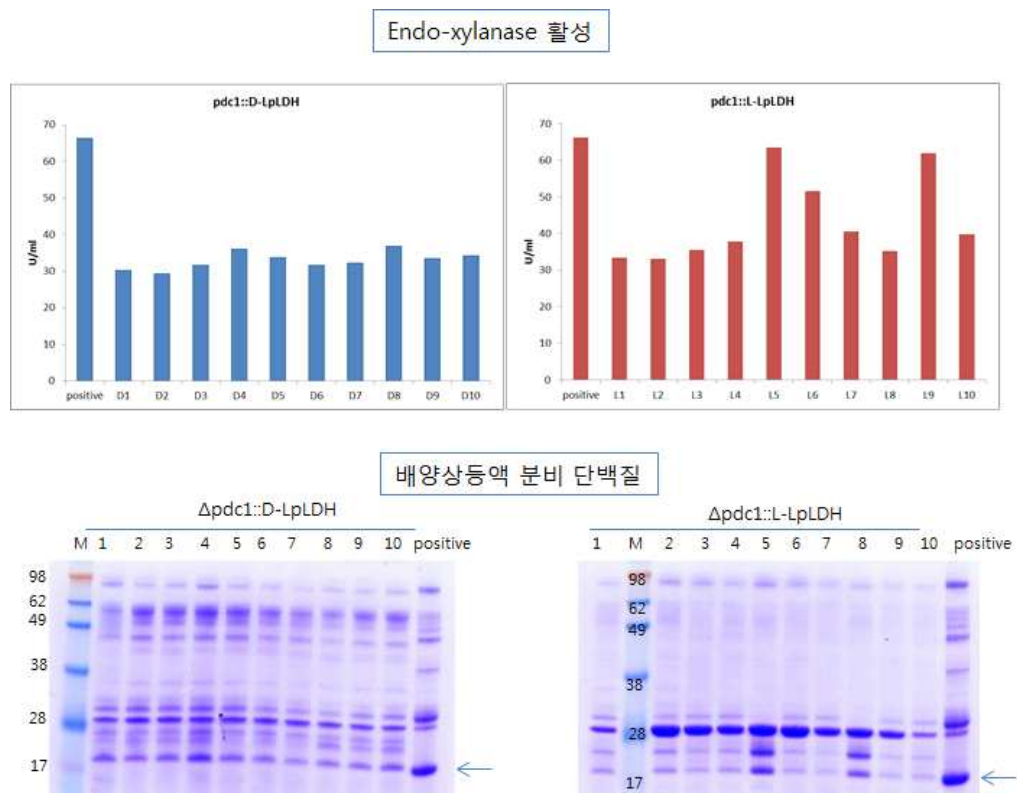
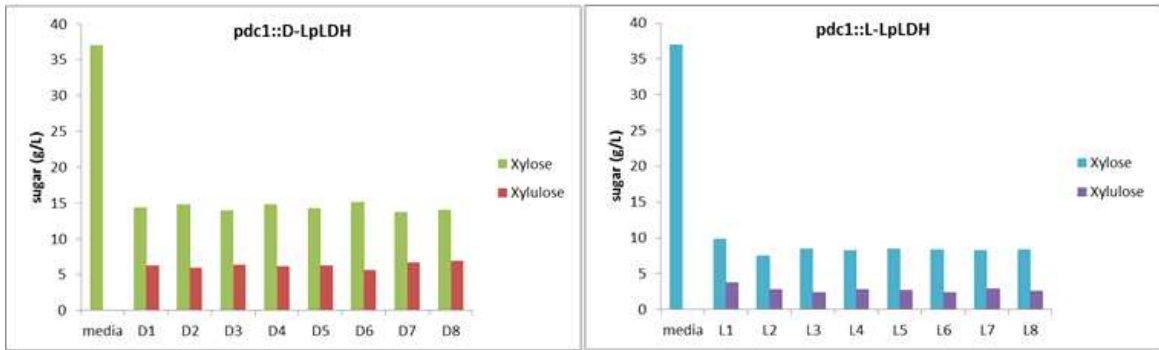


그림 7-56. XYN의 단백질 활성 분석 및 SDS-PAGE 분석

β -xylosidase (bXYL)의 활성측정은 pNPX(p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside)를 기질로 공급하였을 때 sodium phosphate버퍼용액에 배양상등액을 혼합하고 50°C에서 10분동안 반응시킨 후 405 nm에서의 흡광도를 관찰하였다. 그 결과 1분동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 방출시키는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였을 때, 그림 7-58에서와 같이 모든 형질전환체에서 30 ~ 60 unit의 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 본 균주 3종을 혼합 배양하여 xylan을 유일한 탄소원으로 공급하였을 때, lactic acid 생산량을 비교분석하고자 하였다.

Xylose isomerase에 의한 xylose 소모량



배양상등액 분비 단백질

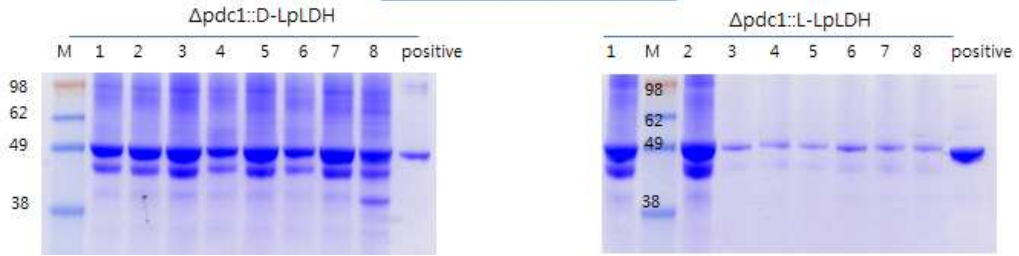
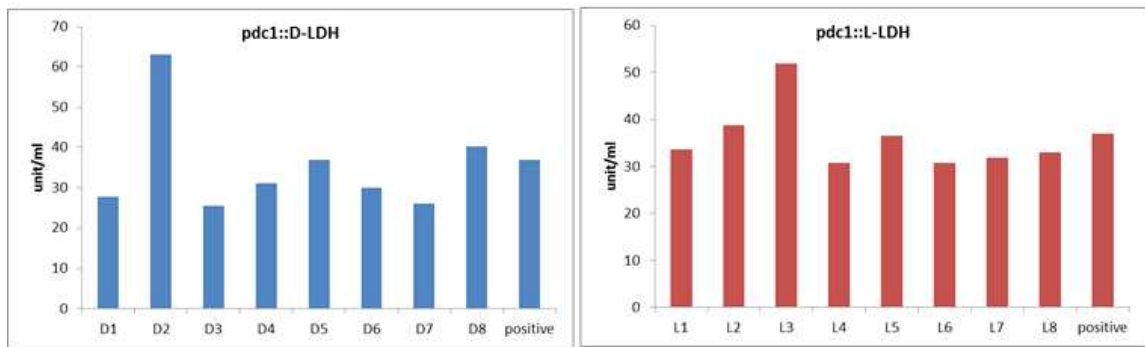


그림 7-57. 분비발현된 XylA 단백질에 의한 xylose 소모량 비교 및 SDS-PAGE

Xylosidase 의 활성 측정



배양상등액 분비 단백질

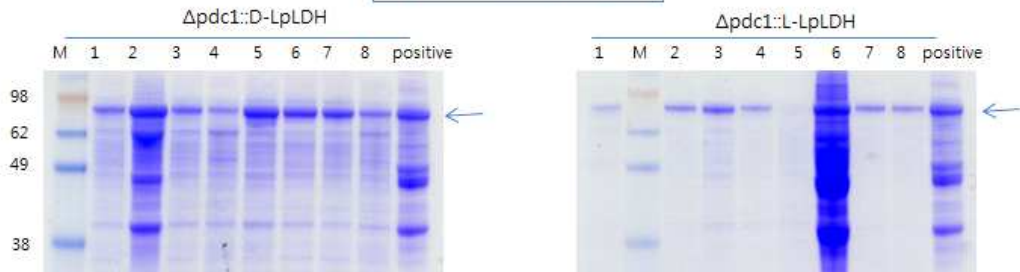


그림 7-58. 분비발현된 bXYL 단백질의 활성비교 및 SDS-PAGE 결과

(6) Hemicellulose 분해 단백질 발현 효모의 배양을 통한 lactic acid 생산량 분석

상기 선별한 xylan 분해효소의 분비균주를 대상으로 1% xylan을 유일한 탄소원으로 공급하면서, 세포 배양에 따른 D-lactic acid 또는 L-lactic acid 생산량을 비교하였다. 그 결과, xylan으로부터 생성된 배지중 xylose의 잔여량이 D-lactic acid 생산효모는 2 g/L이었고 L-lactic acid 생산효모는 2.5 g/L로 확인되었으며 생성된 lactic acid는 L-form의 경우 약 2.5 g/L, D-form은 약 0.5 g/L가 생성되었다. 이러한 결과로부터 hemicellulose로부터 직접 CBP lactic acid의 생산이 가능함을 확인하였다(그림 7-59).

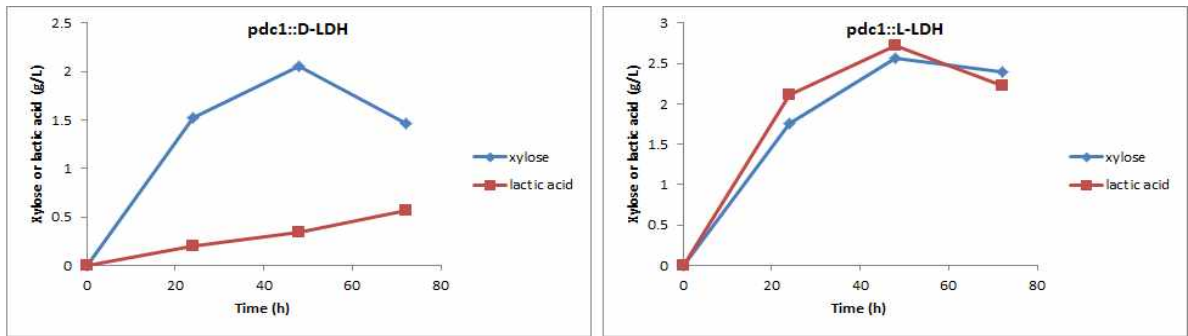


그림 7-59. Xylan 분해에 따른 xylose 및 lactic acid 생산량 비교 분석

(7) CEN.PK2-1D 균주의 GAL80 유전자의 결실

상기의 섬유소 및 반섬유소 분해 유전자의 발현은 GAL10 promoter에 의해 조절하는 시스템으로 구축되어 있다. GAL10 promoter는 매우 강력한 inducible promoter이지만 induction을 위해서 고가의 galactose를 필요로 한다. Galactose 없이 glucose 만으로도 GAL10 promoter가 induction 되도록 하기 위해서 glucose 존재 하에서 galactose의 유도 발현을 억제하는 저해 인자인 GAL80 유전자를 결실이 필요하다.

CEN.PK2-1D 균주의 GAL80 유전자 결실을 위해서 GAL80 ORF 염기 서열을 SGD (Saccharomyces Genome Database)에서 얻어 PCR을 이용하여 유전자를 확보하였다. 먼저 Gal80 ORF의 upstream과 downstream에서 각 300 bp의 DNA 절편을 HJ175과 HJ176, HJ177과 HJ178 primer를 이용하여 증폭 후 primer Tc-f와 U200r, U200f와 Tc-r을 이용하여 증폭된 URA3 DNA 절편과 overlap extension PCR을 수행하였다. 각 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 두 절편을 연결하였고, overlap extension PCR 산물은 CEN.PK2-1D 균주에 형질전환하였다. 형질전환 여부를 HJ175와 HJ176, U200f와 HJ178 primer를 이용하여 PCR을 통해 확인한 결과 예상되는 위치에서 PCR 밴드를 확인하였다.

GAL80 유전자가 남아있는지 확인하기 위해 HJ175와 HJ178 primer를 이용하여 확인한 결과 URA3 cassette에 의해 GAL80 유전자가 결실되었음을 확인하였다. 확인된 형질전환체를 selection pressure가 없는 액체 배지에서 4시간가량 배양한 후 5-FOA (5-fluoroorotic acid) 배지에서 URA3가 pop-out된 균주를 회수하고 PCR을 통해 pop-out을 확인하여 CEN.PK2-1D Δ gal80 균주를 제작하였다(그림 7-60).

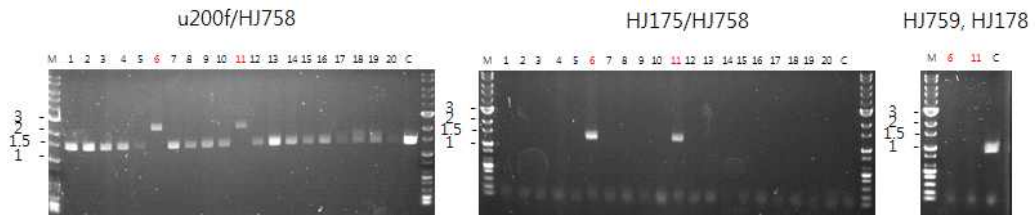
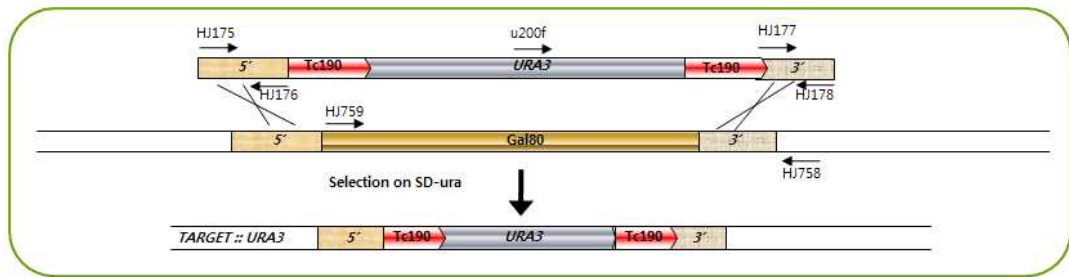


그림 7-60. *URA3* cassette를 이용한 *GAL80* 유전자 결실 과정

(8) CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 균주에서의 단백질 발현 시스템 검증

CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 균주에서의 GAL10 promoter의 발현을 및 발현 pattern을 확인하기 위하여 wild-type균주와 CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 균주에 2종의 외래단백질 (lipase인 CalB1422와 IL2) 발현 벡터를 도입하고 CEN.PK2-1D 균주는 galatose배지에서 배양하여 GAL10 promoter를 induction하고 CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 균주는 galactose를 포함하지 않은 glucose배지에서 배양하여 두 균주간의 단백질 발현 및 분비정도를 비교하였다(그림 7-61). 결과에서 보는 바와 같이 CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 에서 galactose를 inducer로 사용하지 않은 배지에서도 외래단백질이 효율적으로 발현되고 분비되었음을 알 수 있다. CEN.PK2-1D wild-type 균주의 경우 기존 사용하던 2805 wild-type에 비해 발현율이 감소된 것으로 확인되었으나 본 연구에서 필요한 CEN.PK2-1D $\Delta gal80$ 균주에서는 큰 차이가 없음을 확인하였다.

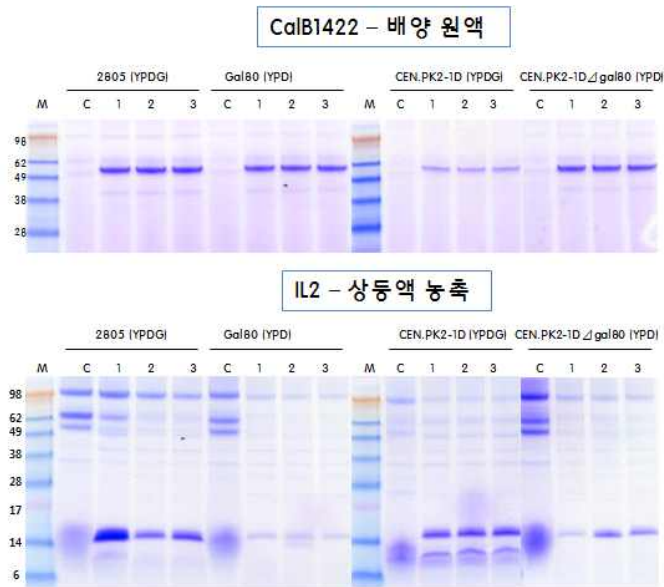


그림 7-61. CalB1422와 IL2 단백질 발현을 분석

(9) CEN.PK2-1D Δ gal80 균주에서의 셀룰레이즈 발현

CEN.PK2-1D Δ gal80 균주를 섬유소 바이오매스의 당화가 가능하도록 하기 위하여 우선 SfbGL1 발현균주를 제작하였다. SfbGL1 유전자는 gal80 균주에 발현 벡터를 integration하는 방법을 통해 도입하였다. 형질전환하여 얻은 균주를 YPD 배지에서 배양하여 단백질 발현 및 분비정도를 확인하였다. 결과에서 보는 바와 같이 SfbGL1 유전자 크기로부터 유추되는 단백질 크기와 차이가 있는데, 이는 SfbGL1 단백질 서열상에는 14개의 N-글리코실화 유발서열을 함유하고 있어 당쇄부가로 인한 차이일 것으로 추정된다.

N-글리코실화에 의해 단백질에 부가된 당을 제거하기 위해서 각 단백질에 엔도에이치 (Endo-H) 효소를 처리한 후 SDS-PAGE 분석한 결과 외래단백질이 효율적으로 발현되고 분비되었음을 알 수 있다(그림 7-62). 분비된 단백질의 활성을 확인하기 위하여 pNPG 측정방법을 사용하였으며 그 방법은 다음과 같다. 0.1ml의 효소 용액을 0.9ml의 기질용액(100mM 구연산-인산완충용액(pH5.0), 1mM의 p-나이트로페닐 글루코피라노사이드(p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside; pNPG)과 50°C에서 10분간 반응하였다. 반응용액과 동량의 30% 탄산 나트륨을 첨가해 반응을 멈추고, 410nm에서 흡광도를 측정된 결과 모든 형질전환체에서 활성이 있음을 확인하였다(표 7-10). 따라서 앞서 야생형 균주에서 수행한 cellulase cocktail 단백질 발현을 gal80 균주에도 동일하게 적용함으로써 CBP를 통한 lactic acid 생산시스템을 구축할 수 있을 것이다.

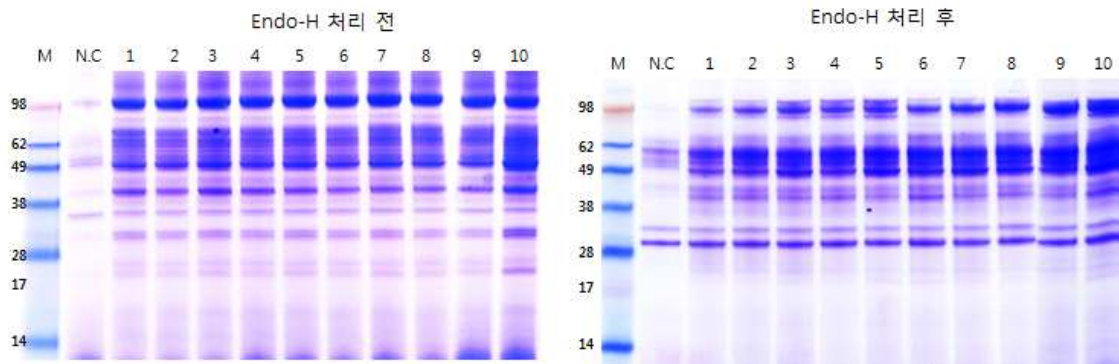


그림 7-62. 형질전환체들의 SDS-PAGE 분석

표 7-10. β -glucosidase 활성분석

Strain	Unit/ml
CEN.PK2-1D Δ gal80	20
형질전환 콜로니-1	246.2
형질전환 콜로니-2	249.2
형질전환 콜로니-3	285.9
형질전환 콜로니-4	298.9
형질전환 콜로니-5	324.6
형질전환 콜로니-6	229.7
형질전환 콜로니-7	240.8
형질전환 콜로니-8	243.5
형질전환 콜로니-9	243.5
형질전환 콜로니-10	340.0

2. 신규 내산성 효모 분리

가. Lactic acid 내성 균주 분리

(1) 신규 효모의 분리

산성조건에서 lactic acid를 고효율로 생산하기 위해 생산균주의 내산성이 매우 중요하기 때문에 내산성이 강한 신규 효모 탐색을 진행하였다. 다양한 조건의 샘플 (팜부산물, 팜슬러지, 포도껍질)을 채취한 후 샘플 10g을 40ml의 멸균 증류수에 넣고, 한 시간 동안 vortex를 이용하여 섞어주었다. 이 후 상등액을 serial dilution 하여 이 시료를 bacteria를 저해하기 위한 효모배지로 YMPS [1L 당 yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g, + antibiotics (penicillin, streptomycin 50mg)] agar 배지에 도말하여 30°C에서 48시간동안 배양 한 뒤, 곰팡이 포자 형태가 아닌 효모 형태의 콜로니를 생성하는 균주를 확보하였다. 분리된 미

생물 콜로니를 YMPS agar 배지에 다시 접종하여 순수분리 및 배양을 하였으며, 그 결과, 포도 껍질에서 7종, 팜부산물 1에서 2종, 팜부산물2에서 4종의 효모균주들이 분리되었다 (그림 7-63).

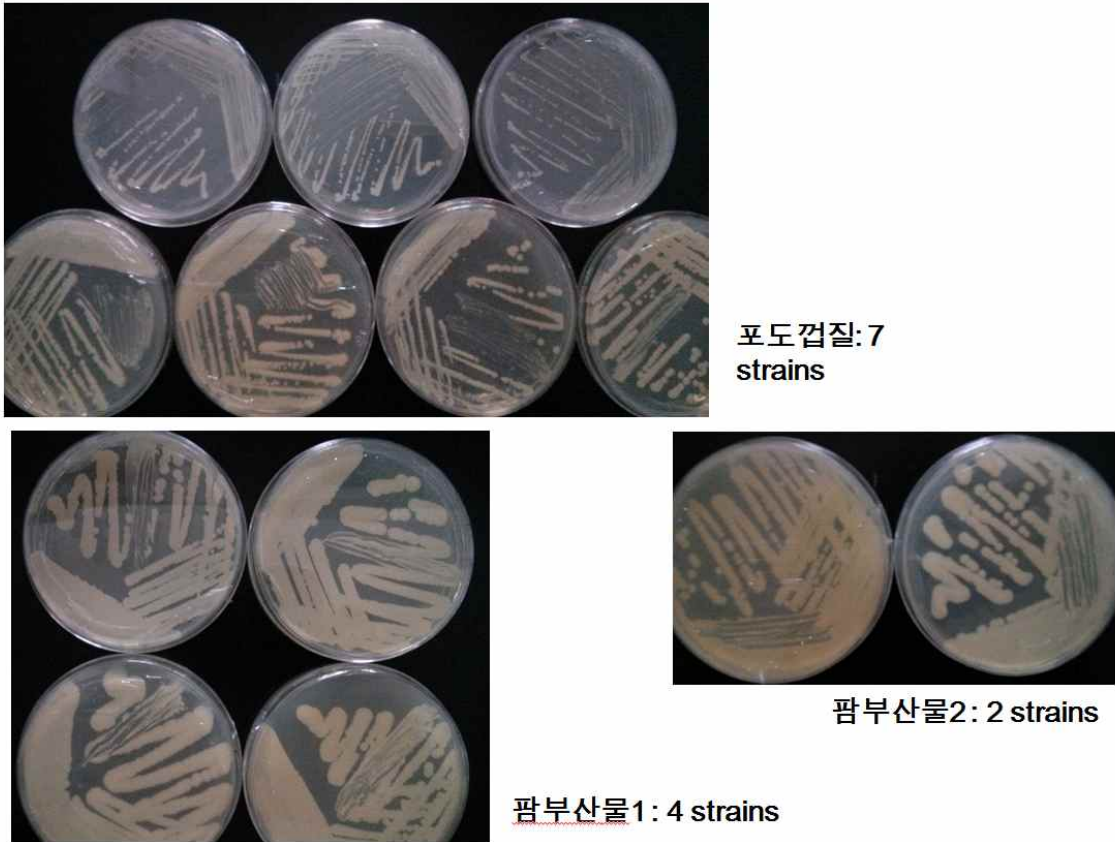


그림 7-63. 여러 샘플에서 분리된 효모들

(2) 신규 미생물의 동정을 위한 유전학적 분석

분리된 균주들의 종 분석을 위하여, 균주들을 3ml YMPS 액체 배지에서 30℃, 180rpm으로 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 분자마커로 이용되고 있는 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여 논문에서 밝혀진 프라이머인 ITS1(5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 LR3R (5' -GGTCCGTGTTTCAAGAC-3')을 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)방법을 통하여 염기서열을 증폭하였다. 위의 염기서열을 증폭하기 위한 반응조성은 template DNA 1µl, 10pmol ITS1 1.5µl, 10pmol LR3R 1.5µl, EX taq buffer (Takara) 5µl, 2.5 mM dNTP 4µl, 증류수 36.5µl, EX taq DNA polymerase (Takara) 0.5µl 이며, PCR 조건은 95℃ 5분 반응 후, 95℃ 30초, 60℃

30초, 72 °C 1분 30초으로 30 사이클 반응하고, 72°C 에서 10분간 추가 반응하는 반응조건을 사용하였다. 상기 PCR 반응 후 2µl의 반응액을 아가로스 겔에서 전기영동하여 분석한 결과, 1~1.2 kb 크기의 단편들이 증폭되었고 (그림 7-64), 이로써 분리된 모든 종이 eukaryotes임을 알 수 있었다. 이를 PCR purification kit (솔젠트)를 사용하여 PCR산물을 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, 모든 종이 효모에 해당되는 종임을 알 수 있었으며, 다양한 종들이 분리되었다 (표 7-11). 많은 종이 에탄올 발효를 하는 종임을 알 수 있었으며, G-1, G-2, G-3, 1-2, 2-2등은 와인공정이나 치즈 발효 등에서 많이 우점하는 효모임을 알 수 있었다. 이들의 ribosomal DNA 염기서열의 상동성은 매우 유사한 종부터 상당히 동떨어진 종까지 다양하게 분리된 것을 확인 할 수 있었다 (표 7-11). 상동성이 떨어지는 균주는 이미 밝혀지지 않은 신종일 확률이 높음을 의미한다.

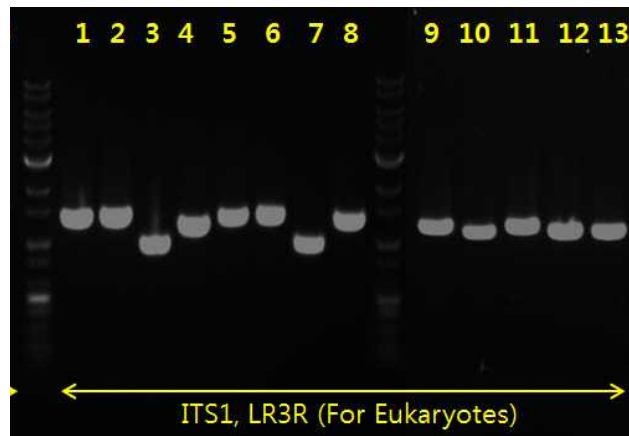


그림 7-64. 분리된 효모들의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA PCR 사진

표 7-11. 분리된 효모들의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 을 근간으로 한 동정

sample	Sequence file name	length	Closest relative	Accession No.	Similarity(%)
포도껍질 1	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
포도껍질 2	NG-1	938	<i>Issatchenkia scutulata</i>	HE660072	92.7
	NG-2	535	<i>Candida diversa</i>	HQ149317	99.4
	NG-3	910	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KC111446	96.0
	NG-4	525	<i>Candida diversa</i>	HQ149317	99.6
	NG-5	835	<i>Kodamaea ohmeri</i>	KC111449	98.9
	NG-6	526	<i>Candida diversa</i>	HQ149317	99.4
	NG-7	725	<i>Pichia kudriavzevii</i>	JQ808005	98.7
복숭아껍질	NP-1	867	<i>Pichia fermentans</i>	GQ458040	92.3
	NP-2	613	<i>Starmerella bacillaris</i>	AY394855	99.8
	NP-3	827	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	AM160628	98.2
	NP-4	674	<i>Pichia kluyveri</i>	FN667994	99.7
	NP-5	538	<i>Candida sp.</i>	EF460593	99.1
	NP-6	536	<i>Candida diversa</i>	HQ149317	99.1
	NP-7	924	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	AM160628	98.5
	NP-8	1021	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KC111446	98.9
	NP-9	1061	<i>Candida quercitrusa</i>	AM160627	95.9
팜슬러지 1	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

(3) 분리된 균주들의 특성분석

먼저 pH 별 생존능력을 확인하기 위하여 pH 2.0, 3.0, 6.0으로 각각 맞춰준 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose) 액체배지에 30°C에서 48시간 배양하여 성장곡선을 분석하였다(그림 7-65, 7-66). 그 결과 모든 균주에서 pH 3.0과 pH 6.0에서의 성장은 비슷하였고, 일부 G-1, G-2, 팜1-2, 팜2-2 균주는 pH 2.0 조건에서도 성장을 하는 것을 확인하였다. 그 중에서도 팜2-2, NG, NP 균주들이 다른 균주들에 비해 pH2.0에서 성장이 우수하여 높은 내산성을 보였다.

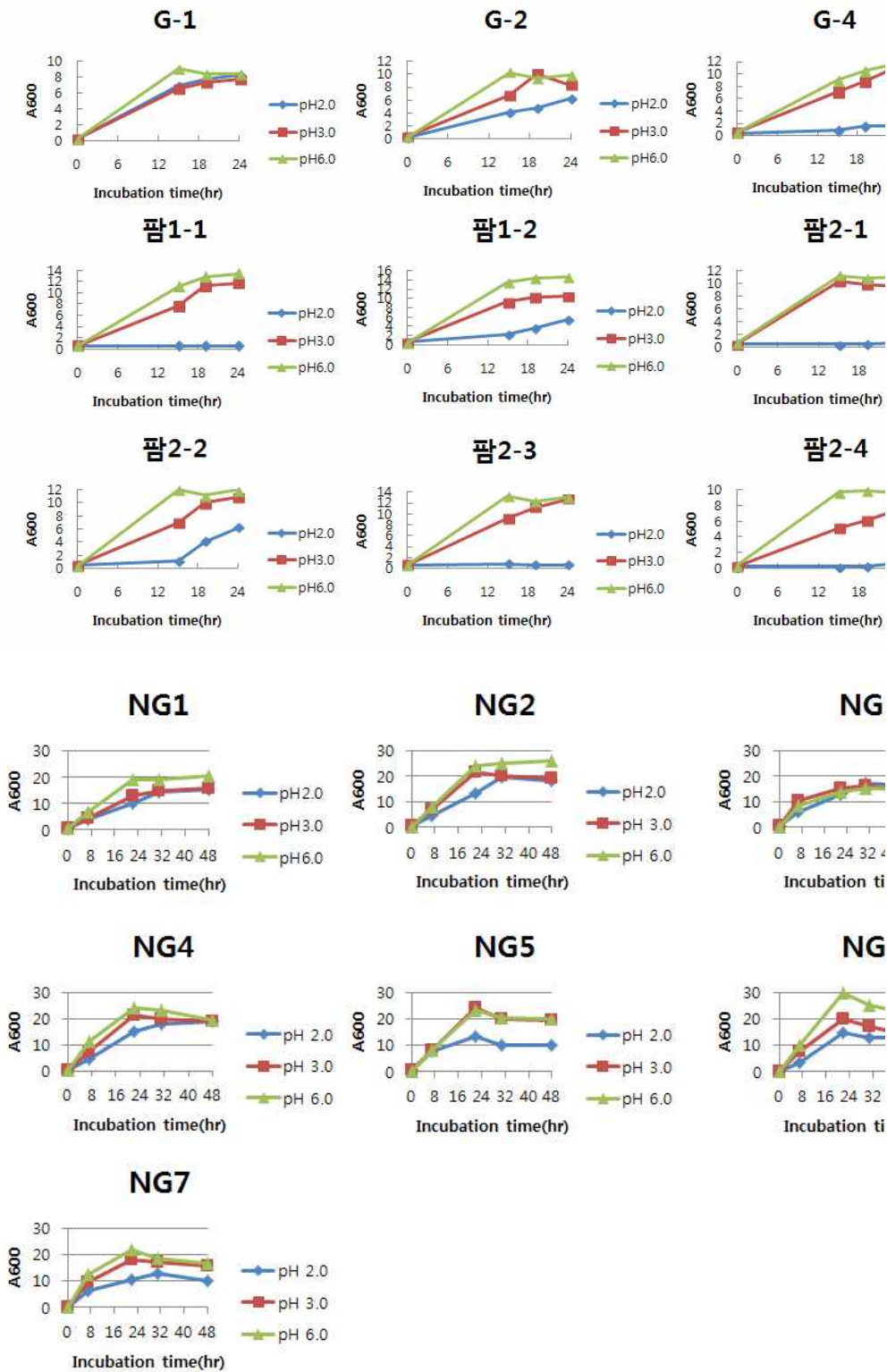


그림 7-65. 분리균주의 pH에 따른 성장곡선

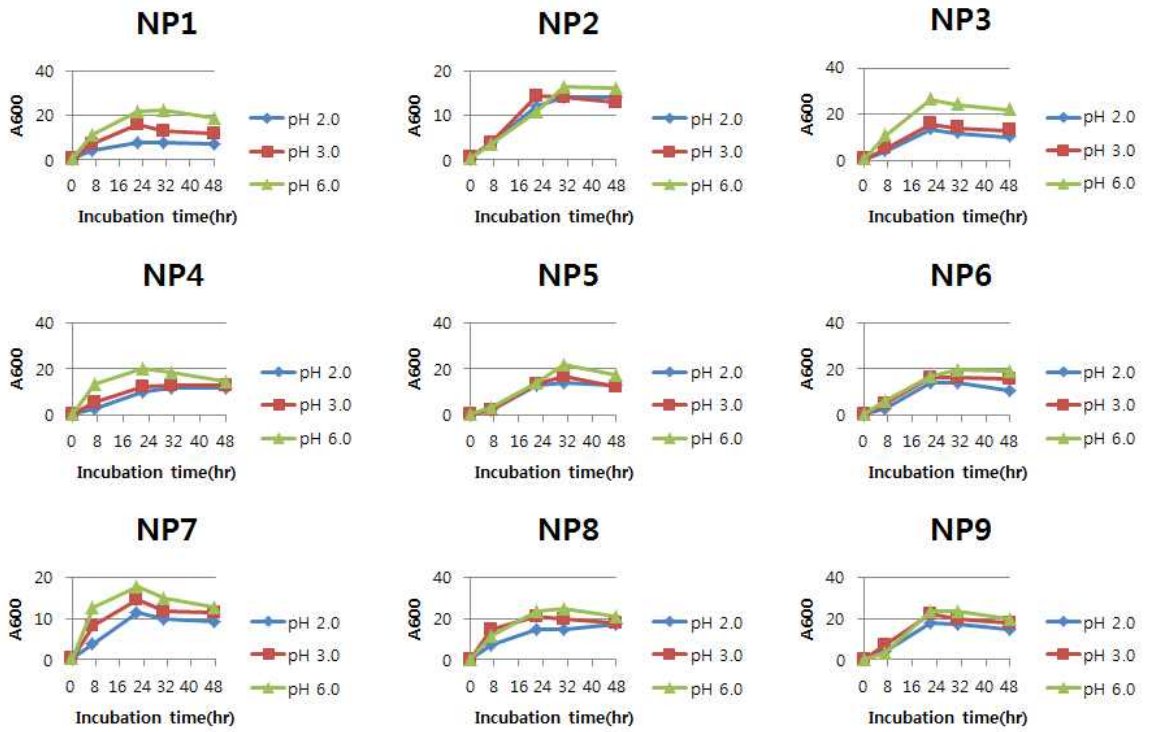


그림 7-65. 분리균주의 pH에 따른 성장곡선(계속)

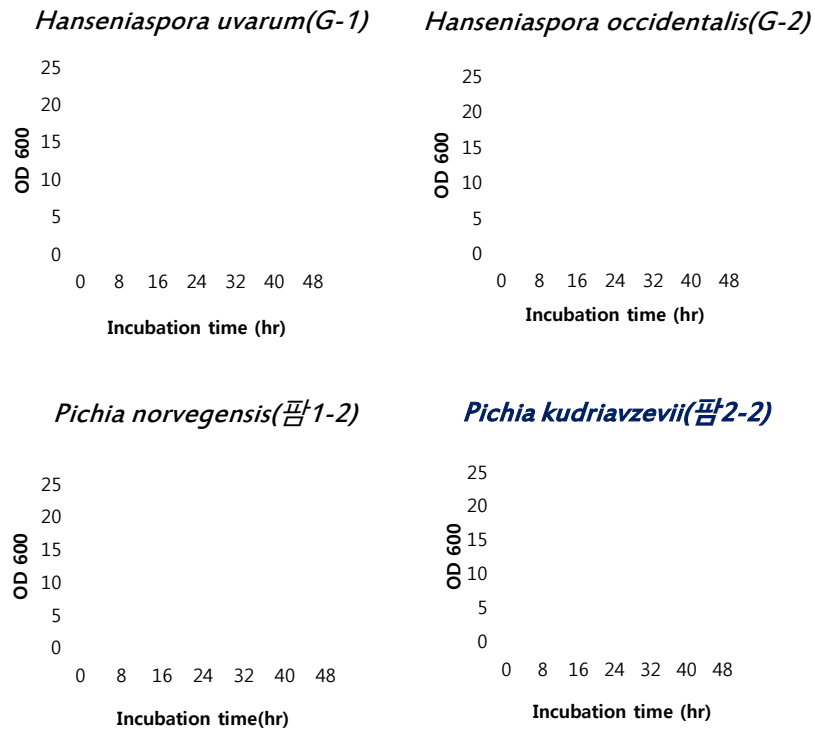


그림 7-66. 선별균주의 2차 배양

산성 pH에 대한 내성을 보이는 효모 균주의 lactate에 대한 저항성을 확인하였다. Lactate 0, 4, 5, 6%를 반응에 사용하였고 lactate가 포함된 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% glucose) 배지에 내성 효모 균주를 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다(그림 7-67). 그 결과 모든 균주가 6%의 lactate가 첨가된 배지에서도 성장을 하였고, 그 중에서도 2-2, NG1, NG7 균주가 다른 균주보다 lactate에 대한 저항성이 높은 것을 확인하였다.

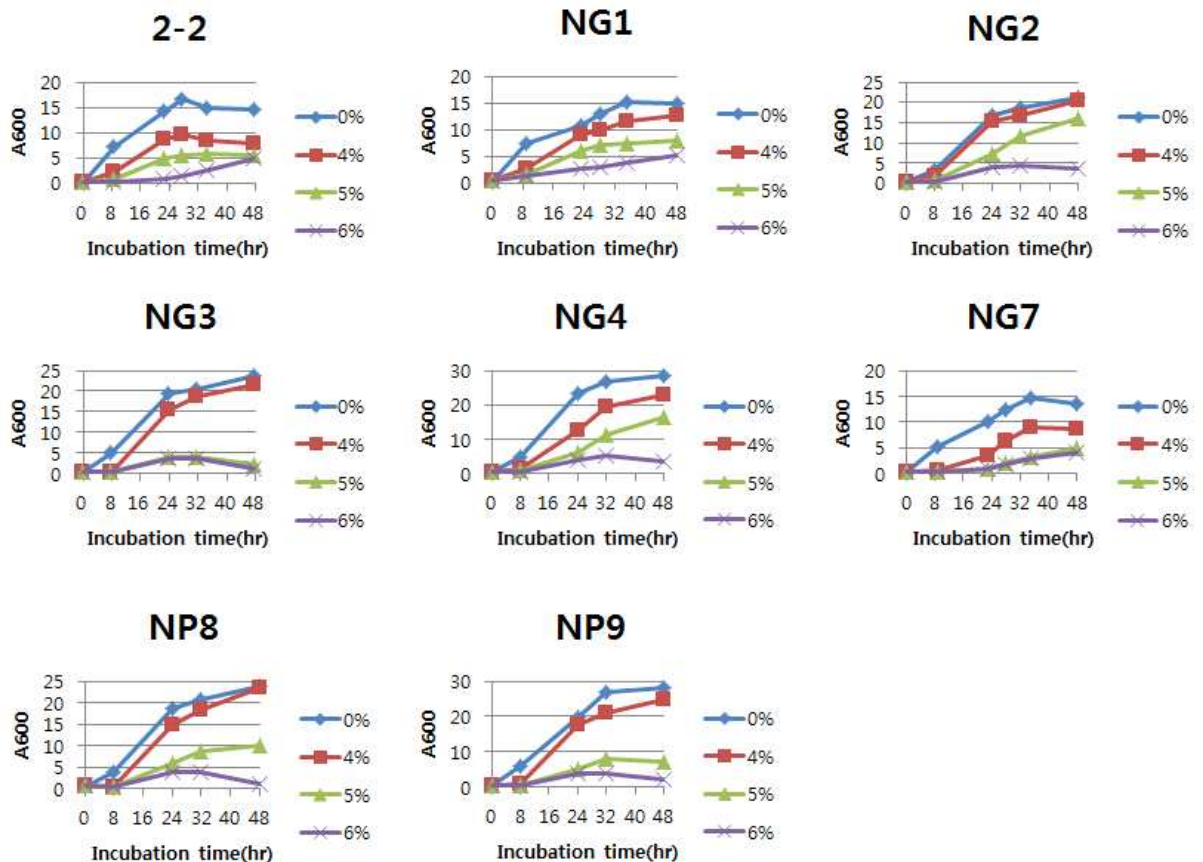


그림 7-67. Lactate에 대한 저항성 확인

분리된 효모 균주를 다양한 용도로 활용하기 위해서는 형질전환 기술의 개발이 필연적이다. 따라서 분리균주를 대상으로 형질전환 선별마커로 사용가능한 여러 항생제에 대한 저항성을 확인하였다. 항생제로 Zeocin (100ug/ml), G418 (100ug/ml), Cycloheximide (1ug/ml), Aureobasidin A (0.1ug/ml), Nourseothricin (100ug/ml) 및 Hygromycin (100ug/ml)을 사용하였고, 각 항생제가 포함된 YPD (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% glucose, 2% agar) 고체배지에 분리균주의 세포 배양액을 dotting 한 후 30°C에서 배양하였다 (표 7-12). 그 결과 균주에 따라서 저항성의 차이가 있었으며 모든 균주에서 Cycloheximide에 대한 저항성을 보였고, Nourseothricin과 Hygromycin에 대한 저항성이 없는 것을 확인하였다.

표 7-12. 분리균주의 항생제 내성 확인

균주	Zeocin	G418	Cycloheximi de	Aureobasidi n A	Nourseothri cin	Hygromy cin
G1	+		+			
G2			+			
G4	+	+	+			
G5			+			
G6	+		+			
NG1	+	+	+			
NG2	+		+			
NG3	+		+	+		
NG4	+		+			
NG5	+	+	+			
NG6	+		+			
NG7	+	+	+			
NP1	+	+	+			
NP2	+	+	+	+		
NP3	+		+	+		
NP4	+	+	+			
NP5	+		+			
NP6	+		+			
NP7	+		+			
NP8	+		+	+		
NP9	+	+	+	+		
1-1			+			
1-2			+			
2-1			+			
2-2	+	+	+			
2-3			+			
2-4			+			

분리균주 중 lactic acid 저항성이 높은 2-2, NG1, NG7 균주를 선별하여 온도별 생존 능력을 확인하였다. YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose) 액체배지에 30, 37, 42, 50°C 에서 48시간 진탕 배양하여 성장곡선을 분석하였다 (그림 7-68). 대조균으로서 *Saccharomyces cerevisiae* 균주와 고온성 균주인 *Kluyveromyces marxianus* 균주를 사용하였다. 그 결과 상기 세 분리균주가 30°C 에서 최적 성장을 보였으며, 42°C 에서 2-2 균주는 *K. marxianus* 균주와 비슷한 성장을 보였고, NG7 균주는 2-2와 *K. marxianus* 균주보다 온도에 대한 저항성이 좀 더 강한 것을 확인하였다. Ribosomal RNA 서열 분석 결과에 의하면 NG7 균주와 2-2균주는 동일한 *Pichia kudriavzevii* 균주로 동정되었으나 NG7균주는 기존의 알려진 *Pichia kudriavzevii* 균주와 유사성이 다소 낮았으며 열에 대한 안정성 면에서도 2-2 균주와 다른 특성을 나타내는 것으로 보아 신규한 균주일 가능성이 높은 균주로 사료된다.

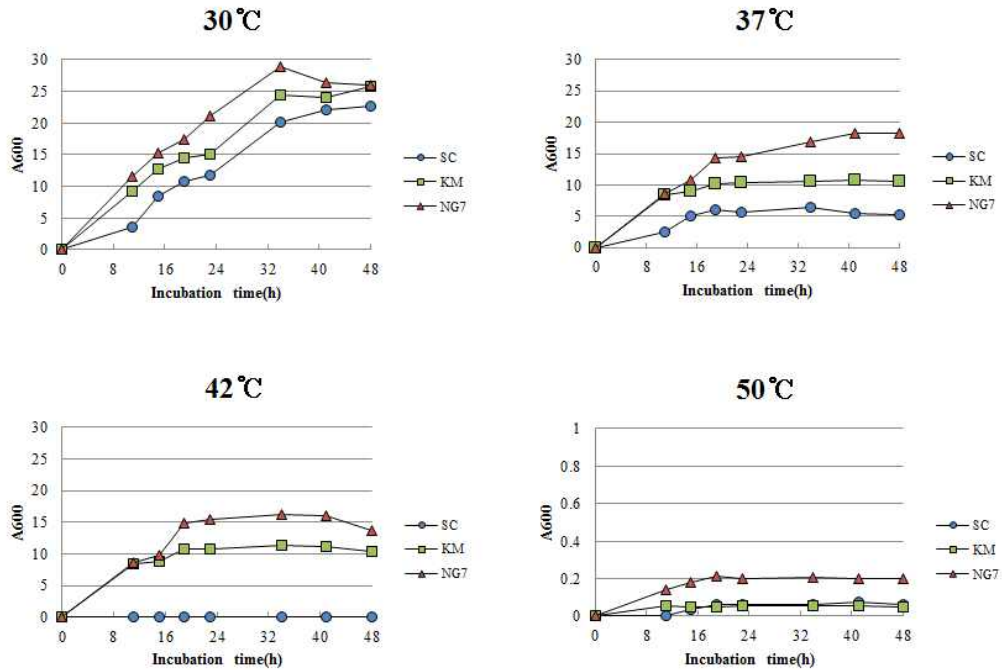


그림 7-68. 분리균주의 고온내성 확인

(4) 분리된 균주들의 에탄올 생성

2-2, NG1, NG7 균주의 에탄올 생성능을 확인하였다. 에탄올 발효배지 (5% Glucose, 5g/L Peptone, 5g/L Yeast extract, 5g/L Potassium phosphate, 2g/L Ammonium sulfate, 0.4g/L Magnesium sulfate)에 배양된 분리균주를 5% 접종하여 pH 2.0과 pH 6.0, 37°C와 42°C 네 가지 조건에서 100rpm으로 48시간 진탕 배양하였다. 대조균으로 *S. cerevisiae* 균주와 고온성 균주인 *K. marxianus* 균주를 사용하였다. 그 결과 pH 2.0에서는 2-2, NG1, NG7 균주만 성장하였고, 약 25g/L의 에탄올이 생성되었다. 이 때 발효 속도는 NG7 균주가 가장 빠름을 확인하였다. pH 6.0에서는 NG7의 경우 9시간대에 약 25g/L의 에탄올을 생성하였으며, 2-2, NG1, *S. cerevisiae* 균주는 12시간대, *K. marxianus* 균주는 36시간만에 약 25g/L의 에탄올을 생성하였다 (그림 7-69). 37°C에서는 2-2와 NG7 균주가 가장 잘 성장하였으며, 에탄올도 8시간 만에 약 25g/L 생성하였다. 42°C에서는 *K. marxianus* 균주보다 2-2와 NG7 균주가 잘 성장하였으며, 8시간 만에 약 25g/L의 에탄올이 생성되었다. *K. marxianus* 균주는 15시간에 약 22g/L의 에탄올을 생성하였으며, *S. cerevisiae*와 NG1은 10g/L 미만의 에탄올이 생성됨을 확인하였다 (그림 7-70). 따라서 본 연구에서 선별된 고온 내산성 균주는 다양한 스트레스에 대해 저항성이 뛰어나며 에탄올 생산성도 높아 향후 바이오에너지 및 바이오화학 생산용 플랫폼 균주로서 활용 가능성이 매우 높을 것으로 판단된다.

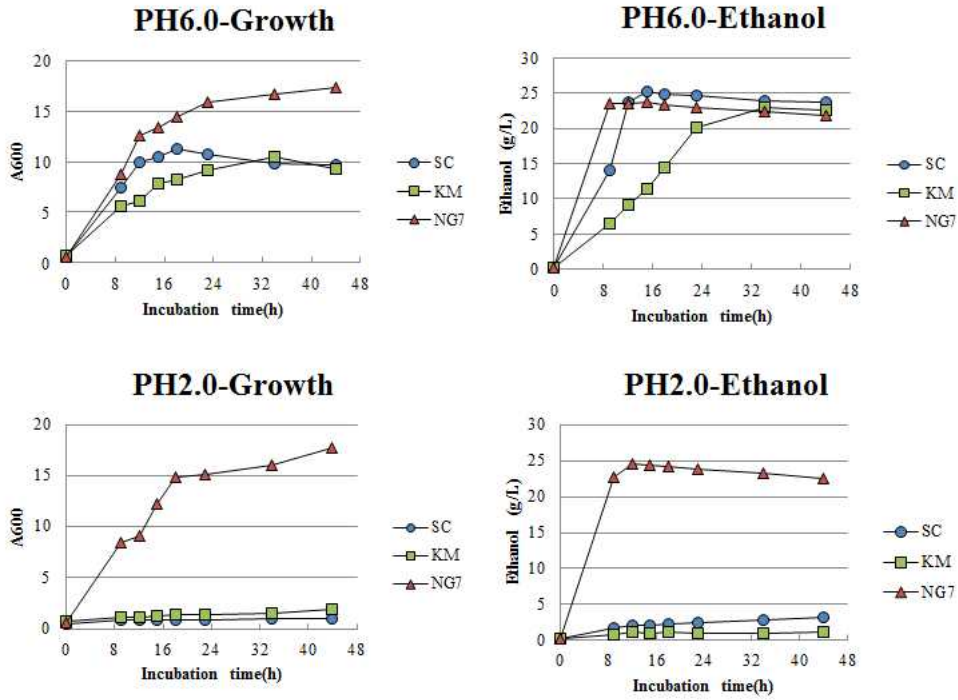


그림 7-69. 분리 균주들의 pH에 따른 에탄올 생성능

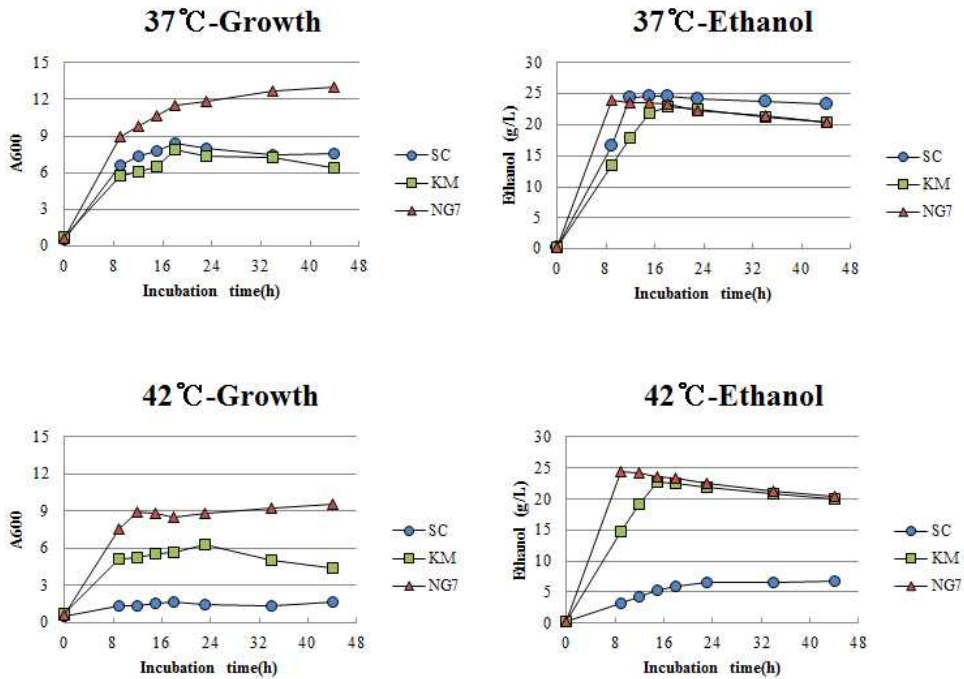


그림 7-70. 분리 균주들의 온도에 따른 에탄올 생성능

(5) Lactic acid 분리, 정제 기술 개발

효모 젖산발효 배지로부터 lactic acid 정제를 위해 그림 7-82와 같은 과정을 개발하여 발효배지 100ml을 황산을 이용하여 pH2에 맞춘 후 완전건조시켰다. 건조된 시료를 다양한 용매로 용해 시킨 결과 isopropyl alcohol(IPA)에 효율적으로 용해되었으며 이로부터 약 8.6g의 젖산을 회수하였다. IPA를 그림 7-83에서 보는 보와 같은 과정으로 온도별 감압증류를 통해 LA 시료를 확보하였다.

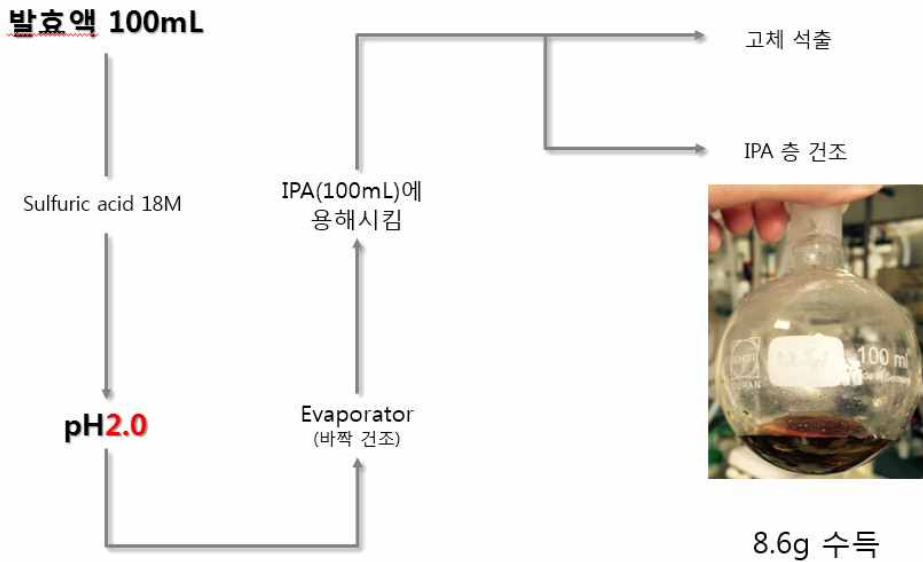


그림 7-71. 효모 발효 배지로부터 lactic acid 의 분리 정제 과정



pH2 로 맞춘 후, 바짝 날린 뒤
IPA로 추출하여 얻은 Product 5g을 가지고
vacuum distillation
(조건 : oil bath 25~110°C, condenser -10°C, 400mtorr)

	Bath 온도	수득 량 / (torr)	b.p (°C)
1	95°C~100°C	0.2mL (480mtorr-400mtorr)	48~62
2	101°C~103°C	0.3mL (400mtorr-420mtorr)	60~54
3	103°C	0.2mL (431mtorr-444mtorr)	50~41
4	103°C~110°C	0.1mL (447mtorr-)	31
	110°C~	수득 없음	

그림 7-72. 온도별 감압증류를 통한 lactic acid의 회수

감압증류시 사용한 온도별로 회수된 lactic acid를 분석한 결과 95~103도에서 얻은 lactic acid를 NMR 분석한 결과 순도가 약 93~95% 수준이었으며 그림 7-84에서 보는 바와 같이 5~7% 정도의 불순물이 확인되었으나 이는 발효 배지의 dehydration 과정중에 형성될 수 있는 lactide이거나 lactide 로 전이되는 과정중의 물질로 추정되었다. 따라서 발효배지로부터 lactic acid의 회수는 용이하게 진행될 수 있을 것으로 판단되었다.

[발효액 pH2 맞춘 뒤 건조 후 IPA로 용해시켜 얻은 용액을 증을 날린 뒤 vacuum distillation 실험을 통한 purification] 순도 : 93%

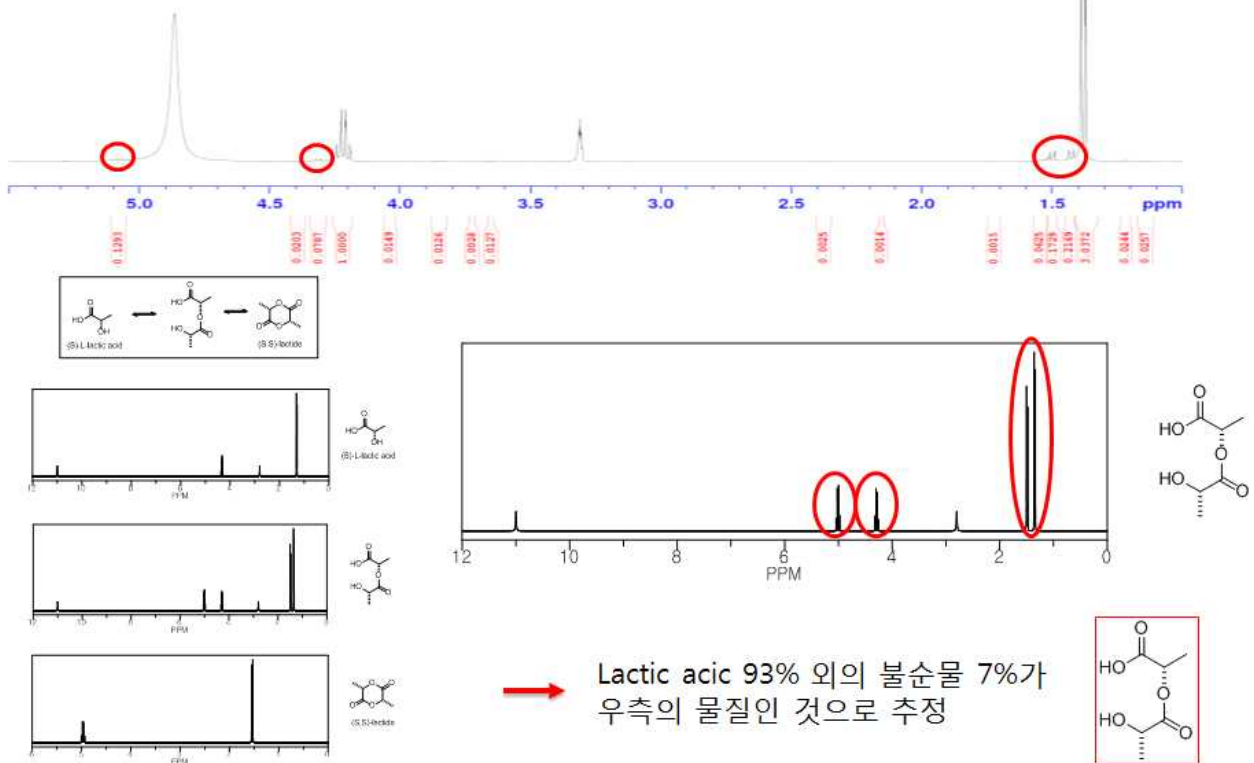


그림 7-73. IPA로 추출된 lactic acid의 NMR 분석

3. 프리탄 기반 바이오신소재 DFA 생산

다이프럭토스 안하이드라이드 (Difructose anhydride, DFA)는 두 개의 과당 분자로 구성되는 환상 이당체이다. 이 구조적 특징으로 DFA는 칼슘이나 철분과 같은 미네랄의 흡수를 촉진하는 기능을 나타내고, 따라서 골다공증이나 빈혈의 개선 및 예방 효능을 가지고 있는 천연 기능소재이다. 현재까지 결합구조에 따라 DFA-I, III, IV, V의 네 가지 형태가 보고되었으며, 이 중 대량생산공정이 가능한 것은 이눌린으로부터 이눌린과당전이효소에 의해 생성되는 DFA-III와 레반으로부터 레반과당전이효소에 의해 생성되는 DFA-IV이다.

본 연구에서는 효모 TFP 기술을 이용하여, 이눌린과당전이효소와 레반과당전이효소를 분비-발현 할 수 있는 효모 균주를 제작하고, 이를 이용하여 DFA의 대량 생산을 검증하였다.

가. 돼지감자 이눌린 활용 DFA-III 생산 시스템 개발

이눌린과당전이효소를 분비-발현 할 수 있는 재조합 균주를 제작하기 위해 KCTC 미생물 자원센터로부터 *Arthrobacter aureescens* (KCTC 3378) 균주를 분양받아 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 게놈 DNA를 주형으로 자체 분비 시그널서열을 제외한 활성형의 이눌린과당전이효소 (ift)를 증폭시키기 위해 NCBI data base GenBank:HM138085.1의 서열정보를 바탕으로 프라이머 pair를 제작하여 Aaft 유전자를 1차적으로 증폭하였다. 증폭된 유전자는 24 종의 효모 단백질 분비융합인자 발현시스템 (TFP)을 이용하여 효모 *Saccharomyces cerevisiae* Y2805GS ($\Delta gal80 \Delta suc2$) 균주 내로 도입되었다 (그림 7-74).

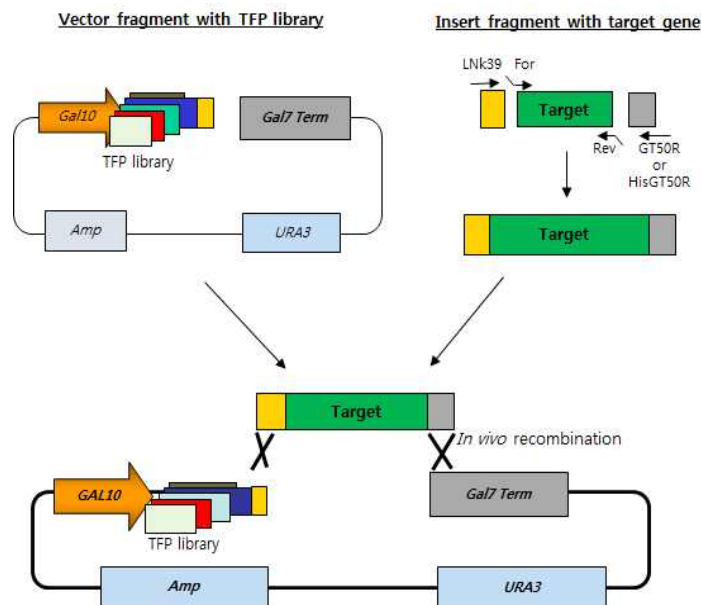


그림 7-74. 목적 유전자의 효모 TFP 벡터도입 모식도

재조합 벡터가 도입된 형질전환체를 선별하기 위해 uracil이 결여된 배지상에서 배양한 후, 최적 분비융합인자를 선정하기 위해 YPD (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당) 배지에서 40시간 이상 배양 후 상등액 내 분비단백질 (예상 사이즈 44 kDa)을 SDS-PAGE와 Western

blotting으로 확인하였다. 또한 배양상등액을 4%의 이눌린용액과 반응시켜 분비단백질에 의한 DFA III 형성을 HPLC 정량분석으로 확인하여 1차적으로 단백질 분비융합인자를 선별하였다. 선별된 분비융합인자로는 TFP No.3, 8, 16, 19, 22로 확인되었다 (그림 7-75).

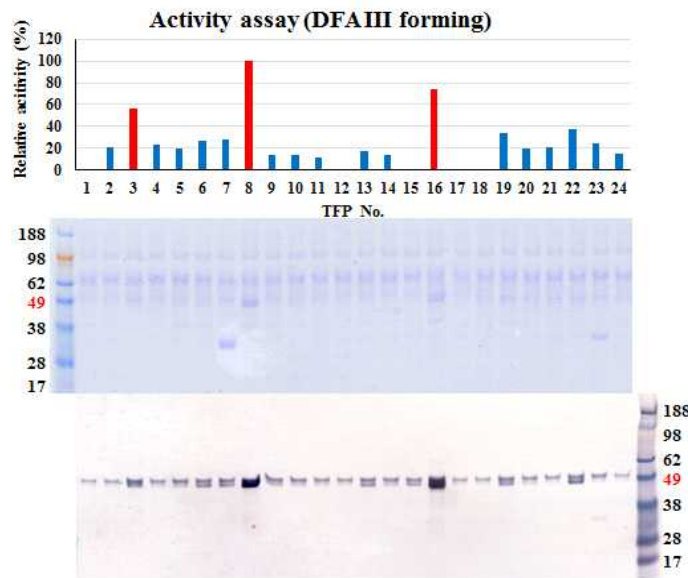


그림 7-75. TFP 형질전환 효모로 생산된 Aalft의 분비 및 활성 선별

선별된 분비융합인자의 단일 콜로니 분석을 위해, 선별된 TFP No.에서 세 개씩의 단일 콜로니를 선별하여 YPD 배지에 40 시간이상 배양 후, 동일한 방법을 이용하여 재조합 단백질의 분비능 및 활성을 비교, 최적의 분비융합인자를 선별하였다 (그림 7-76).

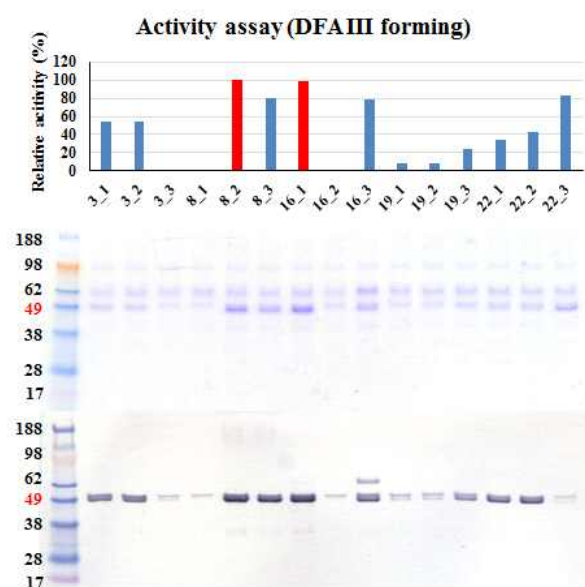


그림 7-76 단일콜로니 별 재조합단백질 분비 및 활성 선별

서열분석을 통해 확인한 최종 선별균주는 분비용합인자 SRL1 (ST8)로 융합된 YGaST8-Aa1ft-6H/Y2805GS를 선별하였다. 최종 선정된 균주를 이용하여 이눌린이 다량함유된 돼지감자 분말을 이용하여 세포배양을 통한 DFA III의 생산을 확인하기 위해 YPDA (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 0, 2% 포도당, 6.7% 멸균돼지감자분말)에 균주를 배양하여 HPLC 정량분석으로 DFA III의 생산을 확인하였다. 세포배양 결과 선별한 형질전환 균주는 멸균한 돼지감자 분말에 함유된 17.3 g/L의 이눌린을 활용하여 12.7 g/L의 DFA III를 생산함이 확인되었다 (표 7-13).

표 7-13. 형질전환 균주를 이용한 DFA III 생산 세포배양 결과

종류	초기 이눌린농도 (g/L)	생성된 DFA III (g/L)	시간 (h)	수율 (%)
효소반응	17.3 ± 0.40	12.7 ± 0.65	48	73.4

나. 플럭탄(레반)을 이용한 DFA IV 생산 시스템 개발

DFA IV는 레반으로부터 전환되는 두개의 과당으로 이루어진 환형 구조로, DFA III와 마찬가지로 칼슘, 철분과 같은 미네랄 흡수를 촉진하는 기능성 천연물질이다. DFA IV 생성에 관여하는 효소로는 자당으로부터 레반을 합성하는 레반슈크라제와 레반으로부터 DFA IV를 생성하는 레반-과당전이효소가 있다. 따라서 본 연구진은 이 두 가지 효소를 분비 발현하는 형질전환 효모를 제작하고, 이를 이용하여 레반-DFA IV를 생성하는 효소 및 발효 반응시스템을 구축하였다.

(1) 레반슈크라제를 분비-발현하는 형질전환 효모 균주 개발

자당을 이용하여 레반을 합성하는 레반슈크라제를 분비 발현하는 형질전환 효모를 제작하기 위해 여섯 종의 세균 (*Zymomonas mibilis*, *Pseudomonas syringae*, *Rahnella aquatilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*)유래의 레반슈크라제 유전자를 증폭한 후, TFP 기술을 응용하여 효모 *Saccharomyces cerevisiae* Y2805GS ($\Delta gal80 \Delta suc2$) 균주 내로 도입하였다. 형질전환 균주의 선별을 위해서 YPD (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당) 배지에서 40시간 이상 배양 후 상등액 내 단백질의 분비정도와 자당분해 활성을 SDS-PAGE와 DNS 법으로 검증하였다. 1차 분비용합인자 선별과 2차 단일 콜로니 분석으로 최종 선별된 균주는 표 7-14과 같다.

표 7-14. 분비융합인자 기술을 이용하여 최종 선별된 형질전환 효모 균주

유래	유전자	분비융합인자 (TFP)	최종선별균주
<i>Zymomonas mibilis</i>	levU	SRL1 (ST8)	YGaST8-levU-6H/Y2805GS
<i>Pseudomonas syringae</i>	lscA	UTH (ST16)	YGaST16-lscA-6H/Y2805GS
<i>Rahnella aquatilis</i>	lsrA	UTH (ST16)	YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS
<i>Bacillus subtilis</i>	BsSacB	SRL1 (ST8)	YGaST8-BsSacB-6H/Y2805GS
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BaSacB	SRL1 (ST8)	YGaST8-BaSacB-6H/Y2805GS
<i>Bacillus megaterium</i>	BmSacB	T1a (ST5)	YGaST5-BmSacB-6H/Y2805GS

선별된 여섯 종의 균주 중 최적의 레반 합성활성을 갖는 균주를 선정하기 위해 40 시간 이상 YPD 배지 배양의 상등액과 4% 자당을 반응시켜 재조합 단백질의 자당분해능 및 레반생성능을 비교분석한 결과, YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS에서 가장 좋은 레반합성능을 보였기 때문에 이 균주를 레반 및 DFA IV 생산공정에 사용할 최적 균주로 선별하였다.

(2) 레반-과당전이효소를 분비-발현하는 형질전환 효모 균주 개발

레반으로부터 DFA IV를 생성하는 유전자인 레반-과당전이효소를 분비 발현하는 형질전환 효모를 제작하기 위해 *Arthrobacter ureafaciens* 유래의 pUDFA81 벡터를 주형으로 자체 시그널 펩타이드를 제외한 활성형의 lftA 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자는 24 종의 효모 단백질 분비융합인자 발현시스템 (TFP)을 이용하여 효모 *S. cerevisiae* Y2805GS ($\Delta gal80 \Delta suc2$) 균주 내로 도입되었다. 형질전환 균주의 선별을 위해서 YPD (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당) 배지에서 40시간 이상 배양 후 상등액 내 단백질의 분비정도와 DFA IV 전환활성을 SDS-PAGE와 HPLC 정량분석법으로 검증하였다. 1차 분비융합인자 선별과 2차 단일 콜로니 분석으로 최종 선별된 균주는 분비융합인자 Ynl190w와 융합된 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS로 확인하였다.

(3) 재조합 레반과당전이효소 이용 DFA IV 생산반응공정

(가) 효소반응 생산

재조합 레반과당전이효소를 이용하여 DFA IV를 생산하기 위해 2% 레반 용액에 정제된 재조합 lftA를 10 ug/mL 추가한 후 37 ° C 에서 48시간 까지 반응 시켜 생성된 DFA IV의 양을 YMC-PACK ODS AQ 컬럼을 사용하여 컬럼 온도 50 ° C, 0.5 mL/min의 유속으로 정량분석하였다. 분석 결과 생성된 DFA IV의 양은 48 시간 기준 12.00 ± 0.03 g/L의 생산량을 보였다 (표 7-15).

(나) 세포배양 생산

레반과당전이효소를 분비 발현하는 형질전환 균주를 레반배지에 접종하여 DFA IV를 생산하면 재조합 레반과당전이효소의 발효 및 정제과정에 소모되는 비용과 시간을 효과적으로 줄일 수 있다는 장점을 갖는다. 따라서 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS 균주를 YPL 배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 4% 레반)을 이용하여 30 ° C, 180 rpm으로 배양시킨 후, 배양 상등액을 정량분석 한 결과 생성된 DFA IV의 양은 48 시간 기준 27.49 ± 2.86 g/L의 생산량을 보였다 (표 7-15).

표 7-15. 재조합 레반과당전이효소의 효소반응 및 세포배양을 통한 DFA IV 생산

종류	초기 레반농도 (g/L)	생성된 DFA IV (g/L)	시간 (h)	수율 (%)
효소반응	20	12.00 ± 0.03	48	60.00
세포배양	40	27.49 ± 2.86	48	68.73

(4) 단일반응계구축

DFA IV 생성에 관여하는 자당으로부터 레반을 형성하는 과정과, 레반으로부터 DFA IV를 생성하는 두 가지 반응을 동시에 세포배양을 통해 수행한다면 각 효소의 생산 및 정제에 드는 비용과 시간의 절감 뿐 만 아니라, 레반의 물리적 특성에 따른 수율 한계 (최대 약 4%)를 극복할 수 있기 때문에 고농도의 DFA IV의 효율적인 생산이 가능하다. 따라서 레반 생성에 관여하는 두 가지 효소를 각각 분비하는 두 가지 균주인 YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS와 YGaST8-BsSacB-6H/Y2805GS, 그리고 DFA IV를 생성하는 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS를 동시에 배양하는 단일반응계를 구축하였다.

먼저 사전실험에서 레반 합성능이 가장 좋게 확인된 YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS와 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS 균주를 이용하여 최적의 DFA IV 생산이 가능한 발효조건을 확인하기 위해 초기 기질농도, 발효유형, 배양온도에 변화를 주어 발효의 최적화를 수행하였다. 본 배양에 앞서 각 균주를 활성화하기 위해 50 mL의 SD-Ura 배지 (0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% uracil이 결핍된 영양보충물, 2% 포도당)에 24 시간 배양 후, 이를 200 mL의 YPD에 옮겨주어 24시간 동안 활성화하였다. 활성화된 배양액을 본 배지 (3% 효모추출물, 1.5% 펩톤)에 접종하여 발효를 수행하였다. 모든 배양은 30 ° C에서 수행되었다.

기질농도는 100-200 g/L의 자당을 기질로 사용하였을 때, 초기 기질농도가 높을수록 DFA IV의 생산수율이 증가하는 것이 관찰되었다 (17.2 g/L). 회분식, 준-회분식, 유가식, 연속식의 발효유형을 검증한 결과, 초기 세포성장을 유도한 후에 기질을 첨가하여 DFA IV를 생산하는 준-회분식 발효에서 세포성장 및 생산수율이 가장 우수한 것을 확인하였다 (18.4 g/L). 또한 반-회분식 발효에서 DFA IV 생산단계의 온도를 15 ° C로 낮춰 발효를 진행하는 것이 생산수율을 증가시키는 것이 확인되었다 (20.1 g/L). 이 외에 발효 중 생산되는 에탄올의 저해 및 기타 부산물을 억제시키기 위한 Km25571 균주 (*Kluyveromyces marxianus*, KCTC 25571)를 첨가하는 반응을 수행해 보았으나, 오히려 생산수율이 감소하는 결과가 관찰되었다 (그림 7-77).

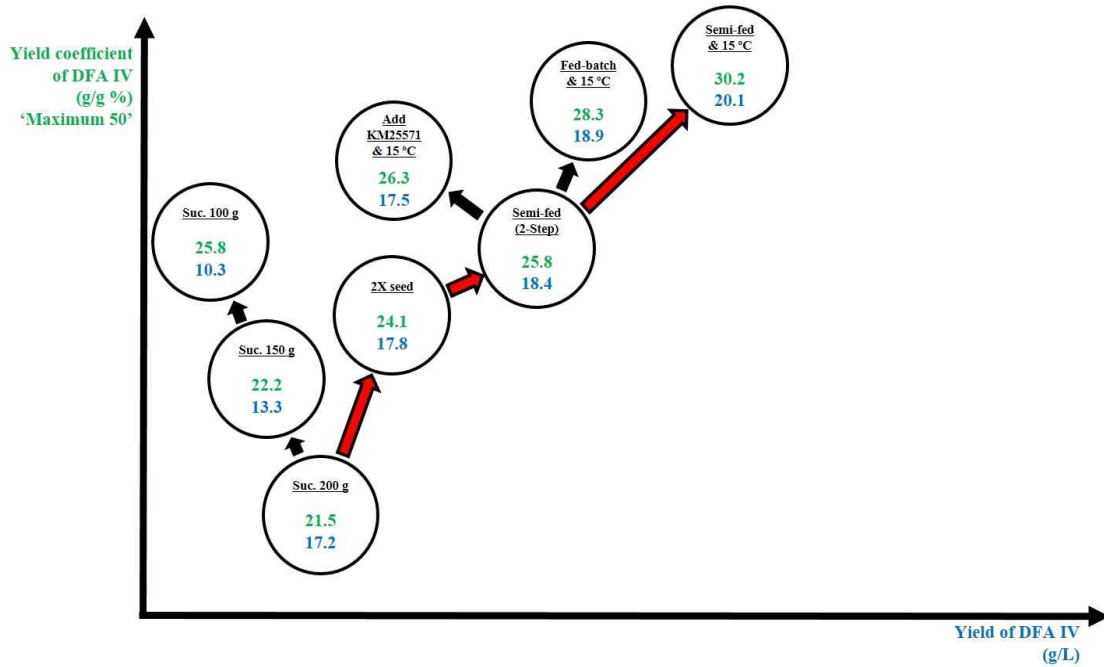


그림 7-77. YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS와 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS 균주를 이용한 DFA IV 직접생산 단일반응계 최적화

YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS 균주를 이용한 발효는 효소반응과 마찬가지로 초기 반응 속도가 매우 좋으나, 산업공정에 적용할 수 있는 수준의 생산수율이 나오지 않는 한계가 관찰되어 재조합 레반슈크라제를 분비 발현하는 균주를 플라스크 배양으로 다시 선별한 결과 총 여섯 균주 중, YGaST8-BsSacB-6H/Y2805GS 균주가 초기 반응속도는 느리지만 자당으로부터 레반이 생성되는 수율이 가장 좋은 것으로 확인되었다. 따라서 이 균주를 동시발효에 적용하여 발효를 수행하였다.

해당 균주를 회분식 유형을 사용한 동시발효에 적용한 결과 DFA IV의 생산수율이 기존 사용하던 YGaST16-lsrA-6H/Y2805GS 균주에 비해 약 13 g/L 가 증가된 32.8 g/L로 확인되었다. 또한 기존 사용하던 균주는 DFA IV 생산단계의 온도를 15 ° C로 낮추어 주어야 하는데 YGaST8-BsSacB-6H/Y2805GS 균주는 세포성장 단계인 30 ° C의 온도를 계속 사용함에도 DFA IV가 지속적으로 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 산업공정에 매우 유리한 특성이다. 이 공정을 최적화하기 위해 350 g/L까지 초기 기질농도를 변화시키는 발효와, 반-회분식 발효를 적용시켰다. 그 결과 초기 기질농도를 250 g/L으로 회분식 발효를 진행하였을 때, 생산된 DFA IV의 양이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (48.6 g/L), 또한 배양시간과 이에 따른 생산성 문제를 고려하여 반-회분식 발효를 위한 초기 균주 접종량을 두 배로 증가시켰을 때 생산량이 산업공정에 적용할 수 있는 67.9 g/L 수준까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7-78).

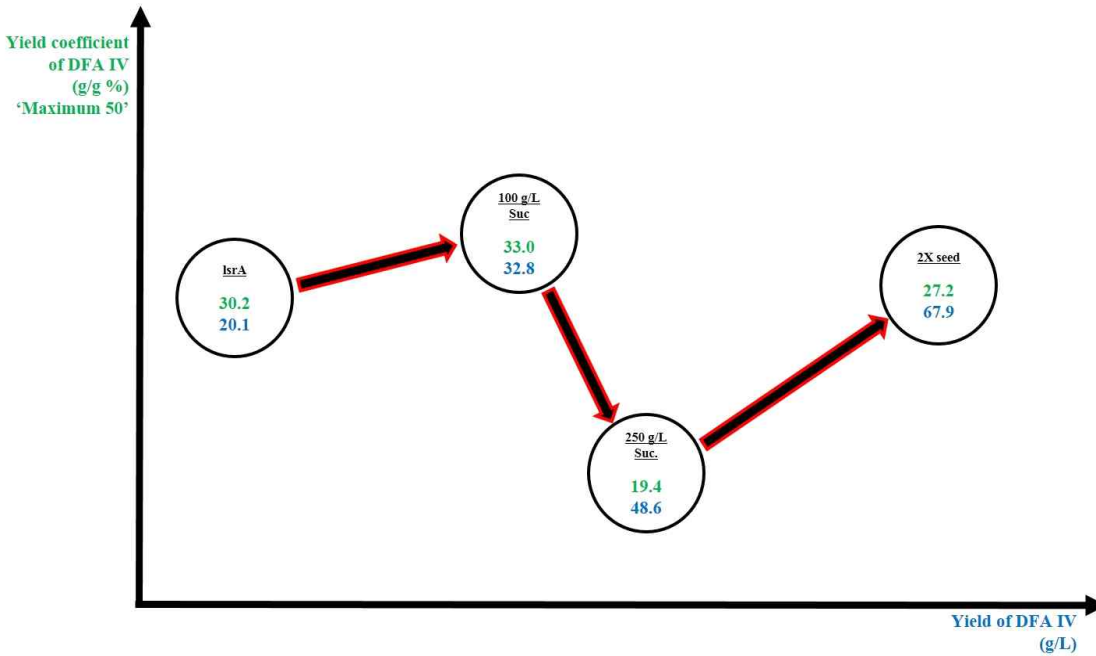


그림 7-78. YGaST8-BsSacB-6H/Y2805GS와 YGaST13-lftA-6H/Y2805GS 균주를 이용한 DFA IV 직접생산 단일반응계 최적화

제 8 절 돼지감자를 활용한 바이오에탄올 및 바이오소재 생산공정 개발

1. 돼지감자 섬유소를 활용한 바이오에탄올 생산 공정 개발

가. 돼지감자 지상부 섬유소 전처리

(1) 산, 알칼리 처리를 통한 지상부 전처리

(가) 돼지감자 지상부의 산 (H_2SO_4) 전처리

0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 4% 그리고 8% (v/v) H_2SO_4 에 5% (w/v)의 돼지감자 지상부를 soaking 한 후, 감압멸균기 (Auto-clave)를 이용하여 $121^\circ C$ 에서 1 h 동안 전처리를 하였다. 전처리된 돼지감자 지상부의 고형분을 $90^\circ C$ 에서 24 h 건조한 후 전처리된 지상부의 성분을 미국 신재생 에너지 연구소(National Renewable Energy Laboratory)에서 확립한 “Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures” 중 LAP-002와 LAP-003에 따라 당 및 리그닌 성분을 분석하였다. 72% (w/v) H_2SO_4 3 mL을 각각의 샘플 0.3 g에 취한 다음 $30^\circ C$ 에서 2 시간 반응시킨 후, 반응액의 H_2SO_4 의 최종 농도를 4%로 희석한 다음 $121^\circ C$ 에서 1 시간 다시 반응시켰다. 반응 후 샘플을 filtering을 하여 여과액과 filter에 걸러진 고형물을 회수 하였다. 고형

물은 105°C에서 건조 한 후 무게를 측정한 후, 다시 540°C에서 회화를 시켜 ash의 무게를 측정하였다. Filtering을 거친 샘플의 여과액은 1 mL를 취하여 204 nm에서 흡광도를 측정하여 산에 녹는 리그닌을 계산하였다. 여과액에 적정량의 CaCO₃ 분말을 첨가하여 중화시킨 후, 원심 분리 후, 상등액을 취하여 HPLC 분석을 통해 cellulose와 hemicellulose를 측정하였다.

농도별로 희석된 황산으로 전처리 한 지상부의 성분 분석 결과, 지상부의 황산 전처리는 농도가 증가됨에 따라 cellulose의 주성분인 glucan과 xylan은 황산용액에 용해되어 용출되는 것으로 관찰되었으며, 특히 xylan을 이루는 xylose 성분의 감소는 2% 황산 처리시 거의 99% 이상 황산 용액에 용해되는 것으로 측정되었다. 이때 대조구로 분석한 열수 및 산 처리를 하지 않은 지상부의 성분 분석 결과는 glucan, xylan 그리고 lignin의 함량은 각각 38.2%, 9.6% 그리고 22.4%로 나타났다. 전반적으로 황산의 농도를 높을수록 수용액으로 glucan 성분이 빠져 나가 결과적으로는 지상부 고형물의 glucan 함량이 낮아지는 것이 관찰되었다. 또한 xylan은 황산의 농도가 높아질수록 산-가수 분해되어 수용액으로 빠져나가는 것을 알 수 있었다. lignin은 황산의 농도가 높아질수록 함량이 낮아지는 것을 알 수 있었다. 리그린 제거 효율은 0.5% 황산 처리 시 지상부의 함량 중 25%의 리그린이 제거되는 것으로 확인되었으며, 황산의 양을 8%까지 증가시켰음에도 불구하고 리그린 제거 효율은 5% 내외로 증가 되어 전처리 시 황산 농도의 증가가 탈-리그린에는 도움이 되지 않는 것으로 생각되어진다. 하지만 에탄올 생산시 문제가 되는 hemicellulose에서 유래되는 xylan의 monosaccharide 형태인 xylose의 함량은 99%까지 제거할 수 있어 적절한 양의 산 처리를 통해 xylan 성분을 제거하는 것이 향후 에탄올 생산에 도움이 될 것으로 생각된다.

표 1. 돼지감자 지상부의 H₂SO₄ 처리를 통한 성분 변화

H ₂ SO ₄ 처리	Solubility		Lignin		Carbohydrates			Content	
	Soluble (%)	Insoluble (%)	Lignin (%)	Delignification (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	Xylan (%)	Glucan (%)	Xylan (%)
0%	6.9±0.3	93.1	21.3±1.2	4.7	35.4±1.5	8.3±1.5	8.3	38.0	8.9
0.1%	16.0±0.5	84.0	17.2±1.1	10.2	34.6±1.9	8.1±1.2	8.1	41.2	9.6
0.5%	17.5±0.9	82.6	16.8±2.2	24.8	32.9±0.5	3.6±1.1	3.6	39.8	4.3
1.0%	26.5±0.4	73.5	16.6±1.1	26.1	28.3±1.2	1.9±1.9	1.9	38.5	2.6
2.0%	31.1±0.3	68.9	16.1±2.5	28.0	22.2±1.1	0.5±1.1	0.5	32.1	0.7
4.0%	34.4±0.8	65.6	16.1±1.2	28.1	15.8±0.2	0.1±0.2	0.1	24.1	0.1
8.0%	37.8±0.6	62.2	15.5±1.1	30.8	8.6±2.0	0.0	0.0	13.8	0.0
Non-treated stalks	-	100.0	22.4±1.5	0.0	35.6±1.6	8.9±1.1	8.9	38.2	9.6

(나) 돼지감자 지상부의 알칼리 (NaOH) 전처리

0.1 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 4 M 그리고 6 M NaOH에 5% (w/v)의 돼지감자 지상부를 soaking한 후, 감압멸균기 (Auto-clave)를 이용하여 121°C에서 1 h 동안 전처리를 하였다. 전처리된 돼지감자 지상부의 고형물을 위에서 언급한 방법으로 고형물의 성분분석을 수행하였다.

NaOH 농도별로 전처리 한 지상부의 성분 분석 결과, 지상부의 NaOH 알칼리-전처리는 농도가 증가됨에 따라 cellulose의 주성분인 glucan의 함량이 일정량 보존 되면서 리그린의 제거 효율이 60%까지 되는 것으로 관찰되었으며, 특히 xylan을 이루는 xylose 성분의 감소는 최대 60% 제거 되는 것으로 확인되었다. 리그린 제거 효율은 NaOH의 농도가 1.0 M 이상에서는 거의 비슷한 수준으로 유지되었으며, glucan 및 xylan의 함량 또한 1 M NaOH를 정점으로 약 3% 및 2% 감소되는 것이 관찰되어, 돼지감자 지상부의 전처리를 위한 최적 NaOH 농도는 1 M로 확인되었다. 이때 대조구로 분석한 열수 및 산 처리를 하지 않은 지상부의 성분 분석 결과는 glucan, xylan 그리고 lignin의 함량은 각각 glucan, xylan 그리고 lignin의 함량은 각각 35.7%, 10.5% 그리고 22.7%으로 나타났다. NaOH로 처리를 하였을 경우 황산에 비해 glucan과 xylan의 함량이 높았으며, lignin 제거 효율 또한 황산에 비해 2배 이상 뛰어난 효과를 보여 주었다. 황산으로 지상부를 전처리 하였을 때보다 NaOH로 지상부를 전처리하였을 경우 glucan 및 xylan의 함량은 높이고 lignin의 함량을 낮추어, 이후의 효소 당화 및 발효 실험에 효율적일 것이라 예상된다.

표 2. 돼지감자 지상부의 NaOH 처리를 통한 성분 변화

NaOH 처리	Solubility		Lignin		Carbohydrates			Content	
	Soluble (%)	Insoluble (%)	Lignin (%)	Delignification (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	Xylan (%)	Glucan (%)	Xylan (%)
0 M	6.5±0.5	93.5	22.0±1.2	3.2	35.6±1.5	10.2±1.1	10.2	38.0	10.9
0.1 M	21.8±0.4	84.0	12.2±1.1	46.2	32.6±1.2	8.3±0.2	8.3	41.7	10.6
0.5 M	36.7±0.4	78.2	10.2±2.0	55.3	31.1±1.1	5.3±0.5	5.3	49.1	8.3
1.0 M	41.3±0.5	63.6	9.2±1.1	59.4	30.6±1.2	3.8±1.1	3.8	52.1	6.5
2.0 M	41.6±0.2	58.4	9.2±1.2	59.5	27.4±1.1	3.2±1.5	3.2	47.0	5.4
4.0 M	42.0±0.4	58.0	9.2±1.1	59.5	27.7±0.2	2.4±1.2	2.4	47.8	4.2
8.0 M	43.0±0.4	57.0	15.5±1.1	59.4	27.2±0.5	2.4±1.1	3.4	47.7	4.2
Non-treated stalks	-	100.0	22.7±1.5	0.0	35.6±1.1	10.5±1.1	10.5	35.7	10.5

(다) 돼지감자 지상부의 산-알칼리 연속 전처리

실험은 1차 전처리인 H₂SO₄ 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 그리고 8.0 (v/v)로 설정하여 121℃에서 1 시간 반응을 시킨 후 고형물을 회수하여 2차 전처리인 1M NaOH로 다시 121℃에서 1 시간 반응 하였다. 1, 2차로 전처리된 돼지감자 지하부의 고형물 함량분석을 위하여 미국 신재생 에너지 연구소(National Renewable Energy Laboratory)에서 확립한 “Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures” 중 LAP-002와 LAP-003에 따라 당 및 리그닌 성분을 분석하였다: 72% (w/w) H₂SO₄ 3mL을 각각의 샘플 0.3 g에 취한 다음 30℃에서 2 시간 반응시킨 후, 반응액의 H₂SO₄의 최종 농도를 4%로 희석한 다음 121℃에서 1 시간 다시 반응 시켰다. 반응 후 샘플을 filtering을 하여 여과액과 filter에 걸러진 고형물을 회수 하였다. 고형물은 105℃에서 건조 한 후 무게를 측정 한 후, 다시 540℃에서 회화를 시켜 ash의 무게를 측정하였다. Filtering을 거친 샘플의 여과액은 1 mL를 취하여 204nm에서 흡광도를 측정하여 산에 녹는 리그닌을 계산하였다. 여과액에 적정량의 CaCO₃ 분말을 첨가하여 중화시킨 후, 원심분리 후 상등액을 취하여 HPLC 분석을 통해 cellulose와 hemicellulose를 측정하였다.

표 3. 돼지감자 지상부의 산-알칼리 연속 처리를 통한 성분 변화

H ₂ SO ₄ 처리후 NaOH 처리	Solubility		Lignin		Carbohydrates		Content	
	Soluble (%)	Insoluble (%)	Lignin (%)	Delignification (%)	Glucose (%)	Xylose (%)	Glucan (%)	Xylan (%)
H ₂ O	30.2±0.6	69.8	10.8±1.1	49.6	33.6±1.6	6.9±0.6	48.1	9.9
1M NaOH 0.1% H ₂ SO ₄	35.8±0.4	64.2	8.6±1.5	59.7	32.8±1.2	5.8±1.0	51.0	9.0
1M NaOH 0.5 % H ₂ SO ₄	44.9±0.4	55.1	8.3±2.0	61.1	32.3±0.4	4.7±0.3	58.6	8.5
1M NaOH 1% H ₂ SO ₄	48.0±0.2	52.01	8.28±1.3	61.7	26.9±0.5	1.5±0.5	51.6	2.9
1M NaOH 2% H ₂ SO ₄	50.0±0.6	50.01	8.0±1.8	62.4	25.0±0.5	0.8±0.7	49.9	1.7
1M NaOH 4% H ₂ SO ₄	55.6±0.7	44.41	8.0±1.1	62.4	21.4±1.5	0.6±0.1	48.1	1.5
1M NaOH 8% H ₂ SO ₄	57.5±0.4	42.51	7.7±0.8	64.0	18.7±1.7	0.6±0.7	44.1	1.2
1M NaOH Raw(Stalk)		100	22.4±1.5	0.00	35.6±1.5	8.9±1.0	38.2	9.6

H₂SO₄ 처리 후 NaOH 처리를 한 후 지상부의 성분 분석 결과 기존의 단일방법인 H₂SO₄ 처리 및 NaOH 처리를 하였을 때 보다 glucan의 함량이 58.6%까지 증가되는 것을 볼 수 있고, lignin 제거효율 또한 60%이상 줄일 수 있었다. 단일 전처리보다 경제성 부분에서 병합 전처리가 부적합할 수 있지만 glucan의 함량을 높이고 lignin 함량을 낮추어 에탄올 발효시 병합 전처리가 더욱 효율적이라고 판단된다. glucan의 함량이 58.6%로 가장 높고, lignin의 함량 또한 8.3% 정도로 적절하여 이후 에탄올 발효 실험시 위의 조건이 가장 효율적일 거라 예상되어

0.5% H₂SO₄ 처리 후 1 M NaOH 처리를 한 돼지감자 지상부를 에탄올 발효 실험에 사용하였다.

(라) 산 (H₂SO₄) 처리를 통한 지상부-지하부 혼합물의 환원당 생산량 분석

CBP 통합 공정을 위한 지상부-지하부 산 처리를 통한 산-가수분해를 유도하여 지상부의 cellulose 성분의 용출과 지하부의 polysaccharide 형태의 inulin 성분을 fructose의 monosaccharide 형태로 전환시켜 초기 배양 배지 내에 가용 환원당의 농도를 높게 하여, 빠른 효모 배양을 통해 에탄올 생산량을 증가시키기 위하여, 본 실험을 수행하였다.

- 60°C에서의 돼지감자 지하부-지상부의 4% 황산 용액을 이용한 산-가수 분해
4% (v/v) 황산 용액에 지하부와 지상부를 각각 5% loading 한 후 60°C에서 120 rpm으로 진탕하여 0, 5, 12 그리고 24 시간 간격으로 산-가수분해 된 돼지감자 지상부와 지하부의 혼합 용액의 환원당 양을 측정하였다.

표 4. 60°C에서의 돼지감자의 산-가수 분해를 통한 시간에 따른 환원당의 생산량

Substrate	Total reducing sugar (g/L)			
	0 h	6 h	18 h	24 h
지하부	26.1 ± 1.3	68.0 ± 1.6	68.4 ± 1.0	68.6 ± 1.1
지상부	3.6 ± 0.3	4.4 ± 1.3	5.0 ± 0.2	5.5 ± 0.6

지하부와 지상부를 4% 황산용액에 loading하여 시간대 별로 샘플링을 하였을 때 지하부는 6 시간 이후 부터는 더 이상의 반응이 일어나 질 않는 것으로 보아 지하부는 황산에 의해 쉽게 분해가 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 또한 지상부는 시간이 지날수록 환원당이 높아지는 것으로 보아 높은 환원당을 얻기 위해서는 온도를 높여주면 빠른 산-가수분해를 유도하여 과량의 환원당을 생산할 것으로 생각된다.

- 80°C에서의 돼지감자 지상부의 8% 황산 용액을 이용한 산-가수 분해
1%, 2%, 4% 그리고 8% (v/v)로 희석된 황산에 각각 지상부 5% 만을 loading 하였고 온도는 80°C, 120 rpm으로 진탕시켜 주었다.

표 5. 80°C에서의 돼지감자 지상부의 산-가수 분해를 통한 시간에 따른 환원당의 생산량>

H ₂ SO ₄ (v/v)	Total reducing sugar (g/L)			
	0 h	6 h	18 h	24 h
1 %	1.8 ± 0.1	3.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	6.5 ± 0.3
2 %	2.2 ± 0.2	5.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2	8.5 ± 0.1
4 %	2.3 ± 0.1	7.6 ± 0.4	9.2 ± 0.1	10.3 ± 0.2
8 %	3.0 ± 0.5	9.9 ± 0.1	11.4 ± 0.1	12.1 ± 0.2

온도를 높여 80℃에서 반응을 시켰을 경우 위에서 언급한 60℃에서의 산-가수 분해 반응에 비해 황산의 농도가 높아질수록 또한 반응시간이 길어질수록 환원당의 농도가 상승하는 것을 알 수 있다.

▪ 121℃에서 돼지감자 지상부에 다양한 황산 용액을 이용한 산-가수 분해 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 그리고 5% (v/v)에 지상부를 5% loading 하여 121℃, 30분 반응시켜 환원당을 측정하였다. 121℃에서 30분간 반응시켰을 경우 기존의 60과 80℃에서의 환원당농도 보다 높게 나오는 것을 알 수 있다. 이로써 높은 온도에서는 짧은 반응시간만으로도 높은 환원당의 효율을 높일 수 있을 것으로 예상된다.

표 6. 121℃에서의 돼지감자 지상부의 황산 농도에 따른 환원당의 생산량

H ₂ SO ₄ (v/v)	Reducing sugar (g/L)
0.5%	5.9 ± 0.2
1.0%	11.0 ± 0.3
2.0%	12.7 ± 0.2
3.0%	13.3 ± 0.3
4.0%	13.9 ± 0.3
5.0%	14.0 ± 0.6

(2) 상용 cellulase 효소를 이용한 전처리된 돼지감자 지상부 섬유소 당화

(가) Celluclast 1.5L를 이용한 당화

효소에 의한 당화액 분석은 지상부의 산처리, 알칼리처리 그리고 산처리 후 알칼리 처리에 대해 각각 실험을 수행하였다. Novozyme 사의 복합 cellulase 효소인 Celluclast 1.5L를 0, 20, 40, 60, 80, 100 그리고 120 FPU별로 첨가하였다. Celluclast 1.5L은 각각 총 볼륨을 10 mL로 하였고 citric buffer (pH 4.8)로 pH를 조정된 실험을 수행하였다. 효소 당화 반응 운전조건은 42℃, 200 rpm으로 설정하였고 48 h 효소 반응 후 효소 당화액을 분석 하였다. Celluclast 1.5L를 0, 20, 40, 60, 80, 100 그리고 120 FPU별로 첨가 하여 얻은 결과 FPU가 증가할수록 환원당, glucose 그리고 xylose의 농도가 증가하는 것을 알 수 있었으며, 산처리 후 알칼리 처리가 환원당 및 glucose와 xylose의 함량 및 농도가 가장 높게 나타내는 것을 알 수 있었다.

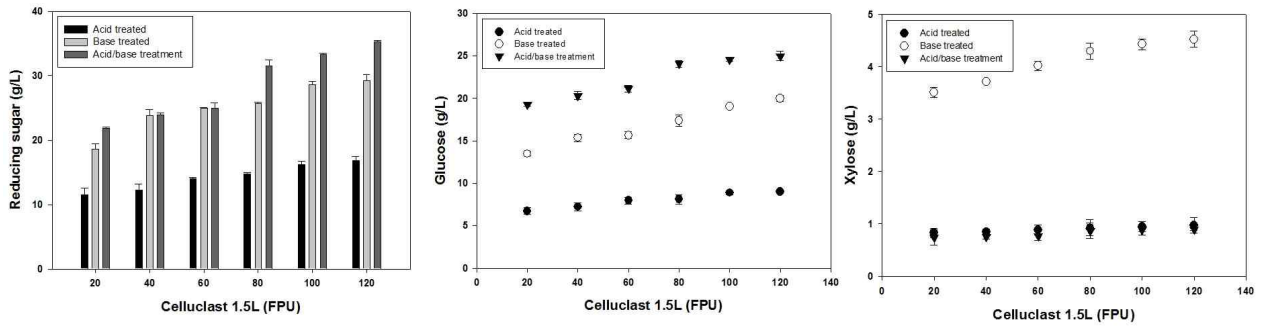


그림 1. Celluclast 1.5L 효소 농도에 따른 산, 알칼리, 산-알칼리 처리한 돼지감자 지상부에 대한 당화 효율 비교. 전체 환원당의 양 (좌측), 당화반응 후 생성되는 glucose의 양 (중간), 당화반응 후 생성되는 xylose의 양 (우측)

(나) Celluclast 1.5L와 Novozyme 188의 비율에 따른 당화

상용 cellulase 복합효소인 Celluclast 1.5L와 β -glucosidase인 Novozyme 188의 비율에 따른 돼지감자 지상부의 당화효율 비교 실험은 지상부의 산처리, 알칼리처리 그리고 산처리 후 알칼리 처리한 샘플을 대상으로 당화 반응을 수행 하였다 수행하였다. Novozyme 188과 Celluclast 1.5L를 0.2, 0.25, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6의 비율 설정하였다. Novozyme 188과 celluclast 1.5L은 각각 40 CBU/g dry biomass, 60 FPU/g dry biomass를 기준으로 비율을 설정하였다. 총 볼륨을 10 mL로 하였고 citric buffer (pH 4.8)로 pH를 조정 한 실험을 수행하였다. 운전조건은 42°C, 200 rpm으로 설정하였고 당화액 분석은 48 h 후 샘플을 채취하였다.

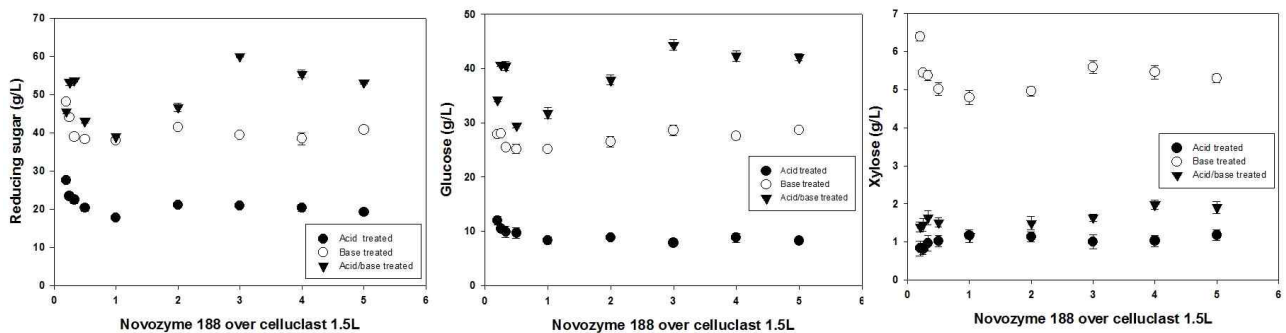


그림 2. Novozyme 188과 Celluclast 1.5L 효소 농도 비율에 따른 산, 알칼리, 산-알칼리 처리한 돼지감자 지상부에 대한 당화 효율 비교. 전체 환원당의 양 (좌측), 당화반응 후 생성되는 glucose의 양 (중간), 당화반응 후 생성되는 xylose의 양 (우측)

Novozyme 188과 Celluclast 1.5L 비율에 따른 당화실험은 지상부의 산처리, 알칼리처리 그리고 산처리 후 알칼리 처리에 대해 각각 실험을 수행하였다. 실험결과로써 총 환원당은 산처리 후 알칼리 처리, 알칼리처리 그리고 산처리의 순서대로 농도가 높았으며 glucose와 xylose의

함량은 알칼리 처리, 산처리 후 알칼리 처리 그리고 산처리 순서대로 농도가 높다는 알 수 있었다.

(다) Celluclast 1.5L와 CTec2를 이용한 당화

기존에 사용하던 Celluclast 1.5L와 새로운 효소인 CTec2를 비교하여 당화실험을 진행하였다. Novozyme 사의 복합 cellulase 효소인 Celluclast 1.5L과 CTec2를 각각 5, 10, 15, 20, 40, 60 그리고 80 FPU로 별로 첨가하였다. 총 볼륨은 10 mL로 하였고 citric buffer (pH 4.8)로 pH를 조정한 후 실험을 수행하였다. 당화반응 온도 조건은 37°C, 200 rpm으로 설정하였고 48h 효소 반응 후 당화액을 분석 하였다. Celluclast 1.5L과 CTec2의 당화비교 실험 결과 FPU를 증가 시킬수록 glucose와 xylose의 양이 증가되는 것을 볼 수 있었고 CTec2로 돼지감자 지상부를 당화 하였을 때 Celluclast 1.5보다 각각 glucose 농도와 xylose 농도를 각각 2.4, 1.7배 증가 하였다 (그림3).

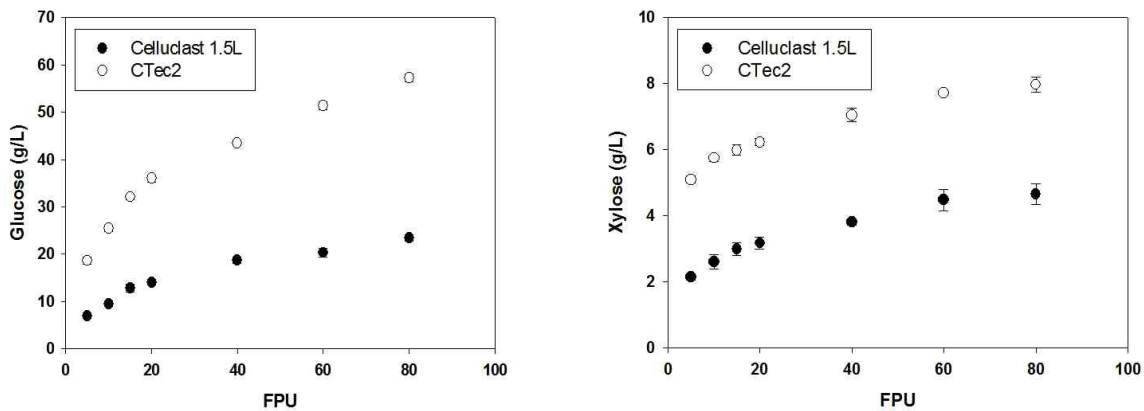


그림 3. 산처리후 알칼리처리된 돼지감자 지상부에 대한 Celluclast 1.5L과 CTec2의 당화비교. Glucose의 양 (좌측), xylose의 양 (우측)

(라) Cellulase CTec2와 HTec2의 비율에 따른 당화

상용 cellulase 복합효소인 CTec2와 β -glucosidase인 HTec2의 비율에 따른 돼지감자 지상부의 당화효율 비교 실험은 산처리후 알칼리 처리된 돼지감자 지상부 샘플을 대상으로 당화 반응을 수행하였다. 실험방법은 CTec2를 20 FPU로 고정하고 HTec2를 2.5, 5, 10, 20 FPU로 증가시켜서 반응 하였다. 총 볼륨은 10 mL로 하였고 citric buffer (pH 4.8)로 pH를 조정한 후 실험을 수행하였다. 운전조건은 37°C, 200 rpm으로 설정하였고 당화액 분석은 48 시간후 측정 하였다. CTec2를 20 FPU로 고정한 후 HTec2를 CBU별로 주입한 결과 HTec2가 투입됨으로써 glucose와 xylose의 함량이 높아지는 것을 알 수 있다 (그림 4). 하지만 경제성 부분에서 보았을 때 HTec2가 CTec2에 비해 단가가 10배 고가이기 때문에, HTec2를 따로 주입하지 않고 CTec2의 양을 늘리는 방법이 에탄올 생산을 위한 단가 저감에 기여할 것으로 판단된다.

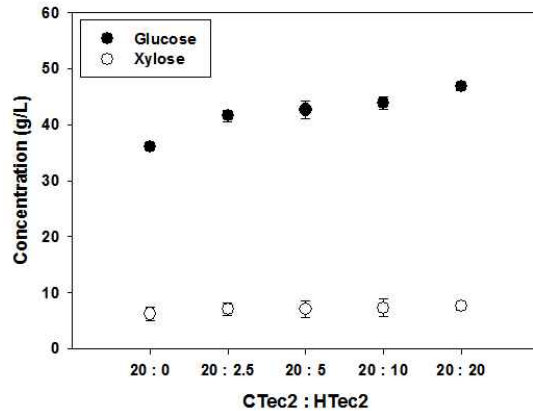


그림 4. CTec2에 대한 HTEc2의 CBU에 따른 산 처리후 알칼리 처리된 돼지감자 지상부의 glucose, xylose 농도 비교

나. 고온성 효모 바이오에탄올 생산 공정

(1) Cellobiose, PASC 등 합성배지 조성 및 농도 영향 분석

고온성 효모 *Kluyveromyces marxianus*을 이용한 CBP 바이오에탄올 공정 개발을 위해 돼지감자의 지상부(Stalk)와 지하부(Tuber)의 주성분인 inulin을 모델 물질로 *K. marxianus*의 에탄올 생산성을 조사하였다. 돼지감자의 지상부의 건조 중량에 대한 구성 성분은 17.2% cellulose, 6.5% hemicellulose, 14.6% Klason lignin, 58% extractive (inulin을 포함하는 액상부), 3.7% total ash로 알려져 있으며, 지하부는 대다수가 inulin으로 구성된 섬유소부로 알려져 있다 (그림 53). 따라서, 본 연구에서는 돼지 감자의 모델 물질로 polysaccharide 형태의 inulin과 inulin의 monosaccharide인 fructose를 독립 탄소원으로 하여 semi-defined medium에서의 *K. marxianus*의 에탄올 생산성을 조사하였다.

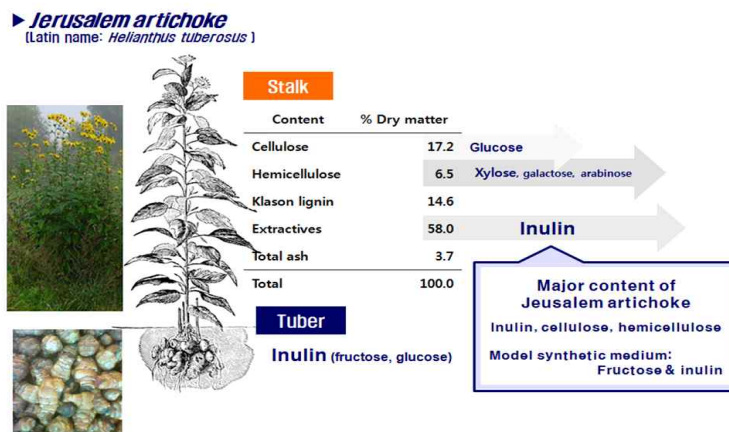


그림 5. 돼지감자 지상부와 지하부의 주요 구성성분

Semi-defined medium의 조성은 다음과 같다: 50 g/L inulin (or 100 g/L fructose), 65 g/L yeast extract, 26 g/L (NH₄)₂SO₄, 27.2 g/L KH₂PO₄, 15 g/L Citric acid, 6 g/L Sodium citrate, 5 g/L MgSO₄, 5 g/L CaCl₂, 4.2 mg/L ZnCl₂. 에탄올 생산에 사용한 균주는 KCTC에서 분양받은 *K. marxianus* KCTC7001을 사용하였으며 30°C에서 200 mL flask culture에 균체를 접종하여, 시간에 따른 세포의 성장과 inulin 또는 fructose의 감소량, 에탄올의 생산량을 모니터링 하였다. 효모 발효를 통해 생성되는 단당류, 다당류, 유기산, 에탄올의 분석은 HPLC 및 GC 이용하여 분석하였다. 상세한 분석 조건은 다음과 같다: 에탄올 분석은 flame-ionized detector (FID)가 장착된 Gas chromatograph (GC)를 사용하여 분석하였으며, 이 때 컬럼은 HP-5 (30 m 0.25 mm, 0.25 m, Agilent Technologies, USA)을 사용하여, 컬럼 온도를 60°C에서 3 min, 80°C에서 3 분, 110°C에서 5분으로 점차 온도를 증가시켰으며 온도의 증가는 5°C/min 이었다. 단당류인 glucose, xylose, galactose, arabinose, mannose의 분석은 Refractive Index Detector (RID)와 REZEX RPM-monosaccharide pb⁺⁺column (Phenomenex, USA)가 장착되어 있는 High performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 분석하였다. 이 때 이동상으로 HPLC grade water를 사용하였으며 유속은 0.6 ml/min, 컬럼 온도는 75°C, detector의 온도는 35°C로 하였다.

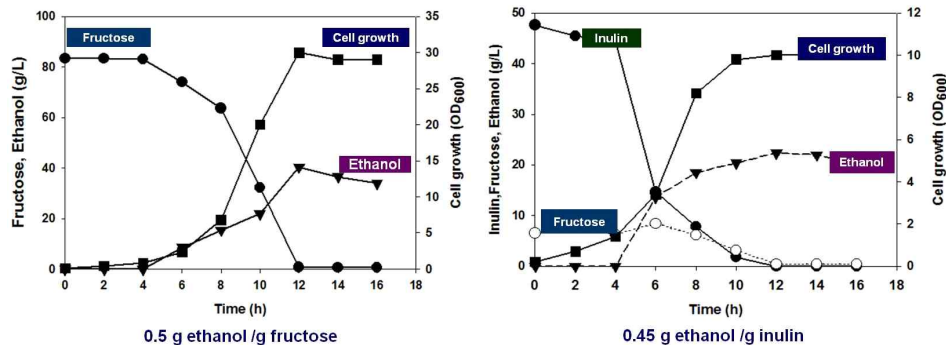


그림 6. Fructose (좌측)와 inulin (우측)을 독립 탄소영양원으로 공급하였을 때 flask culture에서의 세포 성장에 따른 에탄올 생산량

합성배지에서 모델 배지에서 배양결과, *K. marxianus* KCTC7001은 82 g/L fructose를 12시간 동안 소비하면서 40.3 g/L 에탄올을 생성하였다 (그림 54 좌측). 이때의 생산 수율은 g fructose 당 0.5g ethanol이 생산되었으며 생산수율은 3.36 g/L/h의 에탄올이 생산되었다. Fructose를 독립탄소원으로 하였을때 세포의 성장은 4시간 정도의 lag time이 관찰되었으며, 그 후 빠른 세포 성장속도를 보이며 접종 후 12 시간까지 빠른 성장을 하다가 fructose가 완전히 배양배지 내에서 고갈되는 시점인 12 시간부터는 세포의 성장이 지체되면서 에탄올의 성장 또한 감소되는 양상을 보여주었다.

Inulin을 독립 탄소원으로 공급한 경우, *K. marxianus* KCTC7001은 48 g/L inulin을 12시간 동안 소비하면서 22.4 g/L 에탄올을 생성하였다 (그림 6 우측). 이때의 생산 수율은 g inulin

당 0.45g ethanol이 생산되었으며 생산수율은 1.87 g/L/h의 에탄올이 생산되었다. Inulin에서도 마찬가지로 fructose 경우에서 보였던 4시간 정도의 세포성장이 지체되는 lag time이 관찰되었으며, 그 후 빠른 세포 성장속도를 보이며 접종 후 10 시간까지 빠른 성장을 하다가 배양배지 내에 fructose와 inulin이 완전히 고갈되는 시점인 12 시간부터는 세포의 성장이 지체되면서 에탄올의 성장 또한 감소되는 양상을 보여주었다.

(2) 돼지감자의 지상부와 지하부 비율과 YP성분의 유무에 따른 에탄올 생산량 비교

돼지감자를 수확하면 돼지감자의 줄기인 지상부와 뿌리인 지하부로 구분되어 진다. 지상부와 지하부의 비율로 따른 에탄올 생산량을 비교해 whole biomass 사용을 위한 최적 비율을 찾기 위하여 진행하였다. 실험방법은 250 mL flask에 50 mL을 working volume으로 설정하였고 배양온도는 37°C, 교반속도는 200 rpm 초기 pH는 6.0으로 설정하였다. Cellulase (CTec2)는 20 FPU/g biomass로 투입하였다. 당분석과 에탄올 분석은 High-performance liquid chromatography (HPLC) column은 phenomenex사의 ROA Organic acid를 사용하였고, column 온도는 65°C, flow rate 0.6 mL/min, 이동상은 2.5mM H₂SO₄을 사용하였다. 또한 기존에 실험은 YP성분 즉 yeast extract와 peptone을 주입하여 효모의 빠른 성장으로 인한 에탄올 생산 증대를 고려하였지만, YP성분 없이도 수율은 낮지만 에탄올을 생산할 수 있기 때문에 YP성분을 고려하지 않고 실험을 진행하였다. 초기 long time lag-phase를 줄이기 위하여 산처리 후 알칼리처리된 지상부와 건조하여 분쇄시킨 지하부로 이루어진 전배양 배지에 *K. marxianus* 균주를 접종한 후 24시간 전배양을 수행하였다. 또한 당화실험을 진행할 시 citric acid buffer (pH 4.8) 을 주입하였지만, citric buffer가 동시당화 발효시에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 citric acid buffer 주입유무에 대해서도 실험을 진행하였다.

표7. 돼지감자 지상부와 지하부의 비율에 따른 KM의 에탄올 생산량 비교

배양 배지조건	Sample	Stalk (g)	Tuber (g)	Cell number (x10 ⁷ CFU/mL)	Ethanol (g/L)	Ethanol yield (of theoretical, %)
YP/Citric acid buffer 첨가	1	0.5	4.5	9.0±0.4	31.4	60.6
	2	1.0	4.0	8.0±0.1	27.2	58.2
	3	2.0	3.0	7.5±0.1	23.8	56.1
	4	2.5	2.5	7.3±0.5	21.9	54.3
	5	3.0	2.0	5.7±0.4	20.4	53.5
	6	4.0	1.0	4.7±0.3	18.0	53.1
	7	4.5	0.5	3.7±0.3	17.9	56.5
	8	5.0	0.0	3.5±0.3	15.9	53.8
YP첨가/Citric acid buffer	9	1.0	4.0	8.2±0.1	29.5	63.2

비첨가	10	2.5	2.5	7.5±0.3	23.8	59.1
	11	4.0	1.0	6.7±0.4	19.6	57.8
YP 비첨가/Citric acid buffer 첨가	12	1.0	4.0	4.7±0.4	25.9	55.5
	13	2.5	2.5	3.7±0.1	20.4	50.6
	14	4.0	1.0	3.0±0.3	16.5	48.7
	15	5.0	0.0	2.8±0.3	13.9	47.0

돼지감자의 지상부와 지하부의 비율에 따른 에탄올 생성량을 비교 한 결과 지하부의 비율이 높아질수록 에탄올 생산량을 증대되는 것을 알 수 있다. YP (yeast extract, peptone)이 첨가 되면 에탄올 생산량이 높아지지만 YP성분이 없음에도 에탄올 생산이 가능하다는 것을 알 수 있다. 에탄올 수율은 다소 낮지만 yeast extract와 peptone의 높은 가격을 고려하여 본다면 경제적인 측면에서는 YP성분을 투입하지 않고 동시당화발효를 진행하는 것이 바람직하다고 본다. 또한 citric acid buffer (pH 4.8)의 첨가가 에탄올 생성량에 영향을 미치는 것으로 보인다. 에탄올 생성시 유기산 또한 같이 생성이 되는데 이 유기산들이 효모의 에탄올 생산에 저해를 가져온다. Citric acid는 동시당화발효시 당화에는 효율적일 수 있으나 결과적으로 에탄올 생산이 감소되는 것으로 알 수 있다.

(3) 반응표면분석법을 이용한 돼지감자 동시당화발효 공정 최적화

섬유질 탄소원의 에탄올 동시당화발효 효율에 가장 큰 영향을 미치는 공정변수는 공정에 가장 큰 영향을 미치는 공정변수는 당화효소의 투입량 (cellulase, FPU), 효모균주의 접종량 (*Kluyveromyces marxianus* inoculum, g DW) 그리고 당화발효 운전온도 (temperature)이다. 반응표면분석법중 중심합성계획법 (central composite design)을 이용하여 알칼리 전처리 돼지감자 지상부의 에탄올 동시당화발효 과정에서 상기 공정변수들의 영향을 조사하였다. 에탄올 생산량에 영향을 미칠 수 있는 변수 즉, 독립변수 (X_n)는 cellulase (X_1), inoculum (X_2), temperature (X_3)이었으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고 실험값은 아래 도표에 나타내었다. 도표에 나타낸 독립변수는 중심합성계획법에 20구로 설정하였다. 중심합성계획법은 중심점 (center point)와 축점 (axial point)을 2^k 요인실험에 추가시킨 실험계획으로 중심합성계획법의 실험에서는 6개의 중심선과 8개의 축점 및 6개의 외축점으로 구성하였다. 각각의 실험인자의 변화에 따른 생체량은 2차 다항식에 적용 하였다.

표 8. 알칼리 전처리 돼지감자 지상부 에탄올 동시당화발효 독립변수

Variable	Symbol code	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Cellulase (FPU)	X ₁	10	20	30	40	50
Inoculum (g)	X ₂	1	2	3	4	5
Temperature (°C)	X ₃	30	35	40	45	50

표 9. 중심합성계획법에 의한 실험조건

Number	Initial pH	Ammonium	Phosphate	
	X ₁	X ₂	X ₃	
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00
	2	+1.00	-1.00	-1.00
	3	-1.00	+1.00	-1.00
	4	+1.00	+1.00	-1.00
	5	-1.00	-1.00	+1.00
	6	+1.00	-1.00	+1.00
	7	-1.00	+1.00	+1.00
	8	+1.00	+1.00	+1.00
Star points	9	-2.00	0.00	0.00
	10	+2.00	0.00	0.00
	11	0.00	-2.00	0.00
	12	0.00	+2.00	0.00
	13	0.00	0.00	-2.00
	14	0.00	0.00	+2.00
Central points	15	0.00	0.00	0.00
	16	0.00	0.00	0.00
	17	0.00	0.00	0.00
	18	0.00	0.00	0.00
	19	0.00	0.00	0.00
	20	0.00	0.00	0.00

$$f = y_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{123}X_1^2X_2^2X_3^2$$

여기서 f 는 에탄올 생산량 (g/L)을 나타내며 y_0 는 절편, a_n 은 회귀계수이다. 중심합성 계획에 의해 수행한 20개의 조건에서 생산된 에탄올 생산량의 결과를 design-Expert 7.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하고, 각각 인자간의 상호영향을 조사함으로써 생체량 생산을 위한 최적의 조건을 조성하였다. 또한 이 때 전체 모델에 대한 유의성은 design expert program의 통계적 분석 시 P값에 의해 결정되며 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 인정된다. 최적의 인자 농도의 결정은 2차 다항식의 f값이 최대가 되는 지점을 3차원 반응 표면도와 contour plot을 이용하여 관찰하였다. 각각의 실험조건들은 돼지감자 지상부와 지하부를 9:1의 비율로 10% (w/w) 주입 하였으며 교반속도는 200 rpm으로 설정하였다. 이 RSM 실험은 500 ml 플라스크에서 working volume 50 ml로 실험을 진행하였다.

효모에 의한 에탄올 생산 최적화를 위해 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 cellulase (FPU), inoculum (g), temperature ($^{\circ}$ C) 각각 설정한 후 요인변수들은 -2, -1, 0, 1, 2의 5개로 부호화하여 각 레벨에 따른 에탄올 생산량을 측정하였으며, 표 4에 결과를 나타내었다. 에탄올 생산에 영향을 주는 3개의 변수 중에서 유의확률 (Probability value, P value)값이 일반적으로 0.05보다 작으면 처리한 효과차이가 “통계적으로 유의하다 (significant)”라고 하며, 이 값이 0.01보다 작으면 “통계적으로 매우 유의하다 (highly significant)”라고 말한다. 여기서 유의하다란 용어는 가정한 모형이 데이터해석에 의미가 있다는 뜻이다. 분산분석표 결과에 의하면 모델식은 P-value가 < 0.0001 으로 통계적으로 매우 유의한 범위에 있음을 알 수 있으며, 이차회귀식에 의하여 형성된 반응표면결과 R^2 는 0.9554로 높게 나타났다. 반응변수에 미치는 독립변수의 영향은 도표에서 나타낸 바와 같다. 그림 1-1은 각각의 독립변수의 상호작용을 나타내었다. 이로 산출된 에탄올 생산의 최적조건은 cellulase 40 FPU, inoculum 4g/l, temperature 42 $^{\circ}$ C이었으며, 이 조건하에서 에탄올 생산량 예상치는 27.3 g/L 이었다.

표 10. 각각의 변수들에 대한 에탄올 생산

	Number	Cellulase X ₁	Inoculum X ₂	Temperature X ₃	Ethanol (g/L) at 12h
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00	22.7
	2	+1.00	-1.00	-1.00	21.4
	3	-1.00	+1.00	-1.00	25.5
	4	+1.00	+1.00	-1.00	27.3
	5	-1.00	-1.00	+1.00	24.6
	6	+1.00	-1.00	+1.00	24.1
	7	-1.00	+1.00	+1.00	20.5
	8	+1.00	+1.00	+1.00	27.3
Star points	9	-2.00	0.00	0.00	23.1
	10	+2.00	0.00	0.00	25.0
	11	0.00	-2.00	0.00	25.6
	12	0.00	+2.00	0.00	25.3
	13	0.00	0.00	-2.00	23.1
	14	0.00	0.00	+2.00	24.8
Central points	15	0.00	0.00	0.00	25.1
	16	0.00	0.00	0.00	25.5
	17	0.00	0.00	0.00	26.5
	18	0.00	0.00	0.00	24.9
	19	0.00	0.00	0.00	22.5
	20	0.00	0.00	0.00	22.7

표 11. 반응표면 분석 결과 도출

Source	SS	DF	MS	F-value	Prob > F
Model	62.61	10	6.26	19.26	<0.0001
Residual (error)	2.93	9	2.68		
Lack of Fit	2.13	4	0.53	3.36	0.1081
Pure Error	0.79	5	0.16		
Total	65.54	19			

R² = 0.9554; CV = 2.35 %, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. R² = 0.9058

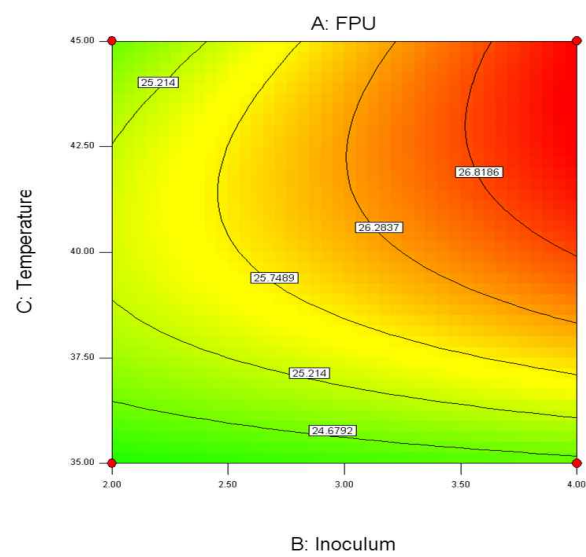
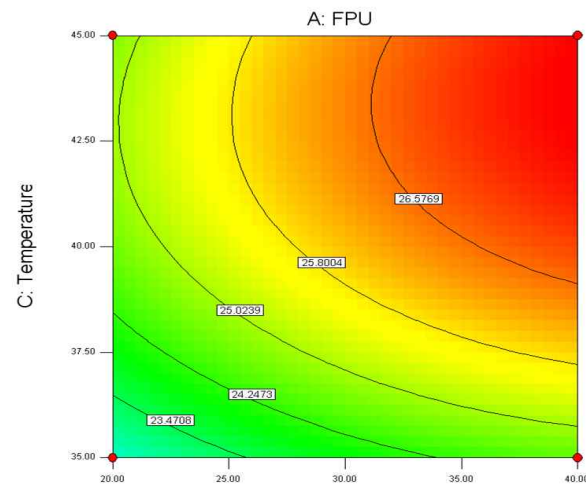
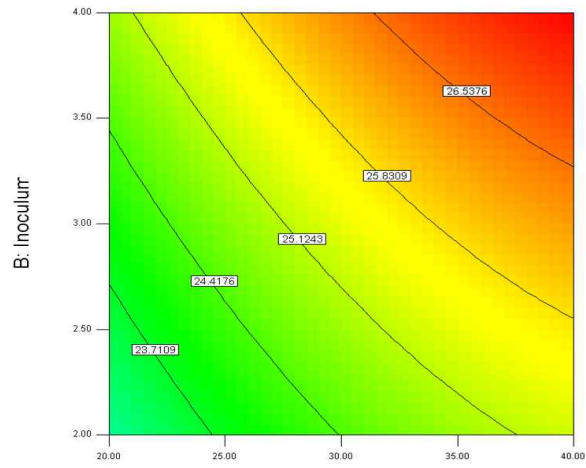


그림 7. 각 독립변수의 효과와 에탄올 생산에 미치는 상호 영향

반응표면분석법을 통해 cellulase, inoculum, temperature의 상호작용을 통한 최적의 조건을 실험한 결과 cellulase 40 FPU (/g solid), inoculum 4g/l 그리고 temperature 42°C였다. 반응표면분석법을 통해 얻어진 조건하에서 실제배양한 결과 에탄올 생산량이 27.1 g/L에서 30.6 g/L로 약 11% 증가 하였다. 반응표면분석법을 이용함으로써 단일 조건에서의 에탄올 생산 보다 각각의 인자들의 상호작용을 통한 에탄올의 생산이 효율적인 것을 알 수 있었다.

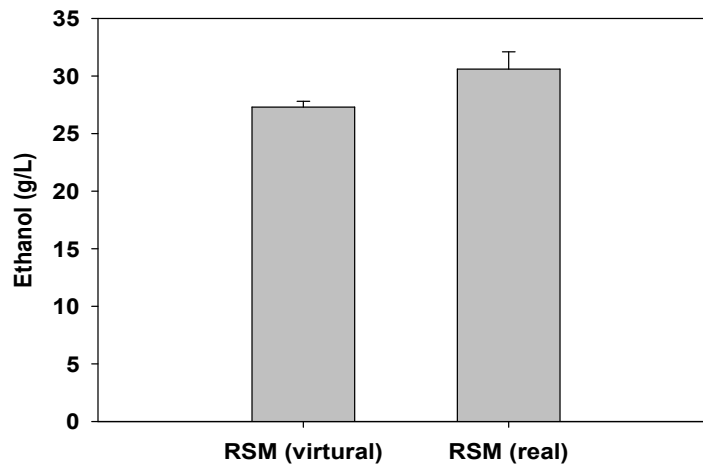


그림8. RSM을 통해 얻어진 가상의 값과 실제 발효를 이용한 에탄올 생산량 비교

(4) 돼지감자 유가식 동시당화발효

반응표면분석법을 통해 확립된 최적 조건에서 알칼리 전처리 돼지감자 지상부의 유가식 동시당화발효를 수행하였다. 총 250 g (25%)의 alkali 전처리 돼지감자 지상부 (질소원으로 지하부 이눌린 25 g)를 사용한 fed-batch SSF에서 배양 46시간째에 최대 56 g/L의 에탄올이 생산되었으며 (1.2 g/L/h), 이때 5탄당인 xylose의 생산량은 17 g/L으로 확인되었다 (그림9). Xylose의 생산량을 토대로 알칼리 전처리 돼지감자 지상의 당화율은 거의 100%인 것으로 추산되었으며, 생산된 당의 에탄올 발효수율은 약 0.43 (g/g sugar)으로 확인되었다. 이 결과는 전년도의 산/알칼리 연속 전처리 돼지감자 지상부의 fed-batch SSF (80 FPU/g WIS) 결과와 비교하여 절반의 당화효소량 (40 FPU/g WIS)을 사용하고도 양호한 에탄올 생산수율을 보이는 것으로 나타났다 (0.36 g/ g sugar). 뿐만 아니라, 산 전처리 공정을 배제함으로써 비용적인 면은 물론 환경적인 면에서도 개선된 것으로 확인되었다.

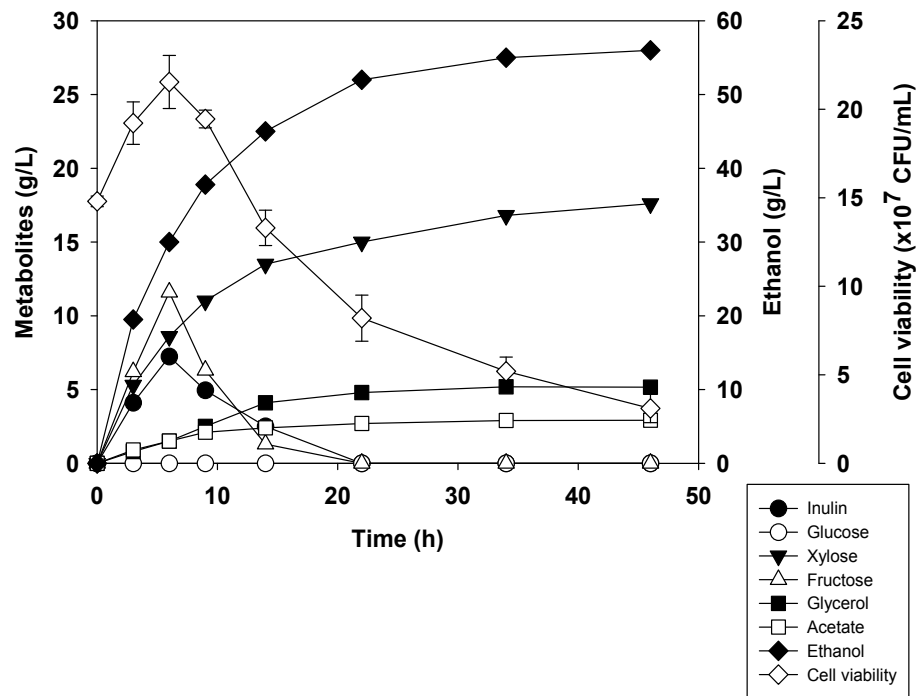


그림9. *K. marxianus*에 의한 알칼리 전처리 돼지감자 지상부의 에탄올 유가식 동시당화발효

다. 고온성 효모 바이오에탄올 공정 스케일업

(1) 바이오에탄올 공정 스케일업을 위한 전처리 및 배지조성

목질계 바이오매스는 광합성을 통하여 생합성되는 식물류와 폐목재류, 볏짚류 등을 포함하는 개념으로써 해부학적 구성상 셀룰로즈(cellulose) 40~60%, 헤미셀룰로즈 (hemicellulose) 20~40%, 리그닌(lignin) 10~25%으로 이루어진 복합고분자인 리그노셀룰로즈가(lignocellulose)가 그 주성분이다. 셀룰로즈는 다당류 중에서 분자량이 가장 큰 물질로 β -1,4 glucoside결합으로 연결된 두 포도당 잔기인 셀로바이오즈(cellobiose)가 주 구성체인 다당류를 일컫는다. 포도당 잔기의 탄소들 사이의 수소결합으로 인해 구조의 안정된 사슬을 이루고, 이 사슬들이 모여 미세섬유를 형성하는데 이들이 밀접하게 배열되고 서로 결합하여 결정성영역과 다공성영역을 이루는데, 이러한 복합구조는 물리적, 화학적으로 안정하여 가수분해에 제약을 준다.

리그노셀룰로즈를 발효성 당으로 전환하기 위한 가수분해는 주로 곰팡이나 세균 유래의 셀룰레이즈(cellulase)에 의한 효소당화법과 산, 알칼리 등의 촉매에 의한 화학적 당화법이 존재한다. 화학적 당화는 효소반응에 비해 속도가 느리고, 비특이적인 분해반응으로 인한 부산물 생성이 많기 때문에 효소적 당화가 더 적합하다. 하지만 일반적으로 효소에 의한 셀룰로즈의 가수분해는 적절한 전처리과정이 선행되지 않을 경우 리그노셀룰로즈의 셀룰로즈 대비 이론적 당화수율의 20% 정도만 얻을 수 있다. 전처리를 거친 리그노셀룰로즈를 다양한 효소로 처리시 이론적 당화수율의 90% 이상까지 얻을 수 있게 되는 것이다. 하지만, 전처리는 리그노셀룰로즈의 발효성 당으로의 전환 공정에서 가장 비싼 공정 단계 중의 하나로 간주되기 때문에, 전처리 기술의 선택은 적용 바이오매스, 효소, 미생물에 이르는 전반적인 공정과 어우러질 수 있는 기술을 선택하여야 한다.

표 12. 돼지감자 지상부 알칼리 전처리 전후 비교

Composition (%)	Before pretreatment	After pretreatment*
Cellulose	35.7±0.7	52.1±1.2
Hemicellulose	10.5±0.5	6.50±1.1
Lignin	22.7±1.1	9.20±0.9
Extractive	15.3±1.2	19.0±1.5
Ash	15.8±0.3	13.2±0.6

*1M NaOH용액을 사용하여 121℃, 60min 반응

실험에 사용된 돼지감자 지상부는 1M NaOH에 121℃, 60분 반응시킨 후 고형물 함량 분석을 위하여 미국 신재생 에너지 연구소(National Renewable Energy Laboratory)에서 확립한 “Chemical Analysis and Testing Labotatory Analytical Procedures”중 LAP-002와 LAP003에 따라 당 및 리그닌 성분을 분석하였다. 72% (w/w) H₂SO₄ 3mL을 각각의 샘플 0.3 g에 취한 다음 30℃에서 2시간 반응시킨 후, 반응액의 H₂SO₄의 최종 농도를 4%로 희석한 다음 121℃에

서 1 시간 다시 반응 시켰다. 반응 후 샘플을 filtering을 하여 여과액과 filter에 걸러진 고형물을 회수 하였다. 고형물은 105°C에서 건조 한 후 무게를 측정 한 후, 다시 540°C에서 회화를 시켜 ash의 무게를 측정하였다. Filtering을 거친 샘플의 여과액은 1 mL를 취하여 204nm에서 흡광도를 측정하여 산에 녹는 리그닌을 계산하였다. 여과액에 적정량의 CaCO₃ 분말을 첨가하여 중화시킨 후, 원심분리 후 상등액을 취하여 HPLC 분석을 통해 cellulose와 hemicellulose를 측정하였다.

돼지감자 지상부의 전처리 결과를 표 1에 나타내었다. 셀룰로즈 함량은 35.7%에서 16.4%가 증가되어 52.1%를 나타냈으며, 헤미셀룰로즈는 10.5%에서 6.5%로 4% 감소되었다. 또한, 리그닌은 22.7%에서 13.55%가 감소되어 9.2%의 함량을 보였다. 그 밖의 extractive와 ash는 각각 3.7% 증가, 2.6% 감소하였다. 본 과제에서 이용되는 *Kluyveromyces marxianus* KCTC7001균주는 셀룰로즈에서 유리되어 나오는 글루코즈만을 섭취한다. 전처리 과정 중에서 헤미셀룰로즈와 그 밖의 다른 구성성분을 최소화하고 글루코즈의 함량을 증대시켜 보다 높은 에탄올을 생산할 수 있을 거라 판단된다.

기존에 실험은 YP성분 즉 yeast extract와 peptone과 같은 질소원을 주입하여 효모의 빠른 성장으로 인한 에탄올 생산 증대를 고려하였다. 하지만 YP는 대용량 발효로 진행되었을 때 경제적인 면에서 효율이 다소 떨어진다고 판단되며, 이러한 질소원을 돼지감자 지하부로 대체하여 활용하는 방안을 모색하였다. 지하부는 질소원을 포함하는 동시에 아미노산, 칼륨 등을 함유하고 있다고 보고되었다 (Sretne Terzic, 2009). YP대신 돼지감자 지하부로 대체하였을 경우 수율은 낮지만 에탄올을 생산할 수 있기 때문에 YP의 첨가 유무의 비교 실험을 진행하였다. YPD(Yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) 전배양 배지에 *K. marxianus* 균주를 접종한 후 12시간 배양을 수행한 후 본배지에 접종하였다. 본배양 배지는 전처리된 돼지감자 지상부와 건조시킨 지하부 분말을 각각 다른 비율로 첨가하여 실험을 진행하였다.

실험방법은 250 mL flask에 25 mL을 working volume으로 설정하였고 배양온도 37°C, 교반 속도 200 rpm 초기 pH 6.0으로 설정하였다. Cellulase (CTec2)는 40 FPU/g biomass로 투입하였다. 당분석과 에탄올 분석은 High-performance liquid chromatography (HPLC) column은 phenomenex사의 ROA Organic acid을 사용하였고, column 온도는 65°C, flow rate 0.6 mL/min, 이동상은 2.5mM H₂SO₄을 사용하였다.

돼지감자의 지상부와 지하부의 비율에 따른 에탄올 생성량을 비교 한 결과 지하부의 비율이 높아질수록 에탄올 생산량을 증대되는 것을 알 수 있다. YP (yeast extract, peptone)가 첨가되면 에탄올 생산량이 높아지지만 YP성분이 없음에도 에탄올 생산이 가능하다는 것을 알 수 있다. 에탄올 수율은 다소 낮지만 yeast extract와 peptone의 높은 가격을 고려하여 본다면 경제적인 측면에서는 YP성분을 투입하지 않고 동시당화발효를 진행하는 것이 바람직하다

표 13. 돼지감자 지하부(질소원 대체) 첨가에 따른 에탄올 생산량 비교

Sample	Stalk (g)	Tuber (g)	EtOH (g/L)	Cell number ($\times 10^7$ cells/ml)
1	0.0	5.0	49.7	9.1 \pm 0.6
2	0.5	4.5	48.4	9.0 \pm 0.4
3	1.0	4.0	44.9	8.0 \pm 0.1
4	2.0	3.0	36.4	7.5 \pm 0.1
YP* (+) 5	2.5	2.5	33.8	7.3 \pm 0.5
6	3.0	2.0	33.1	5.7 \pm 0.4
7	4.0	1.0	29.0	4.7 \pm 0.3
8	4.5	0.5	27.6	3.7 \pm 0.3
9	5.0	0	24.6	3.5 \pm 0.3
10	0.0	5.0	44.5	5.1 \pm 0.6
11	0.5	4.5	43.5	5.0 \pm 0.3
12	1.0	4.0	39.9	4.7 \pm 0.4
13	2.0	3.0	33.8	3.9 \pm 0.5
YP* (-) 14	2.5	2.5	31.5	3.7 \pm 0.1
15	3.0	2.0	30.3	3.5 \pm 0.4
16	4.0	1.0	27.4	3.0 \pm 0.3
17	4.5	0.5	25.8	2.9 \pm 0.4
18	5.0	0.0	21.4	2.8 \pm 0.3

*YP : yeast extract, peptone

(2) 50L 발효조를 이용한 돼지감자 지상부의 에탄올 발효

5리터 배양기를 이용한 실험에서 최적화된 배양조건으로 돼지감자 지상부의 에탄올 생산 50L 발효 실험을 진행하였다. 30L working volume에서 전처리된 지상부는 25% (7.5kg), 지하부는 2.5% (750g)가 투입되었으며, 원활한 에탄올 발효를 위해 동시당화발효를 실시하지 않고, 1단계로 전당화를 실시한 후 2단계로 효모를 투입하는 전략을 세워 실험을 진행하였다. 전당화를 실시하기 위해 초기 지상부는 15%만을 주입하였고 4시간 단위로 5%씩 주입하였다. 이때 쓰인 효소는 40 FPU /g biomass가 투입되었으며, 300rpm에서 50℃로 반응을 하였다.

이후 1단계 전당화 12시간 후 발효조 온도를 42℃로 낮추어 전배양된 효모를 투입하여 에탄올 발효를 실시하였다. Cell viability는 샘플링시간마다 샘플을 취하여 $10^5 \sim 10^6$ 으로 희석하여 YPD (yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, glucose 20g/L) plate에 도말하여 24시간 경과 후 콜로니를 카운팅 하였다. 배양 66시간째에서 최대생산량인 60.3 g/L의 에탄올이 생산되었으며 (0.91 g/L/h), 이때 5탄당인 xylose의 생산량은 55 g/L으로 확인되었다. Xylose의 생산량을 토대로 알칼리 전처리 돼지감자로부터 생산된 에탄올 수율은 87%, 약 0.41 (g/g sugar)로 확인되

었다.

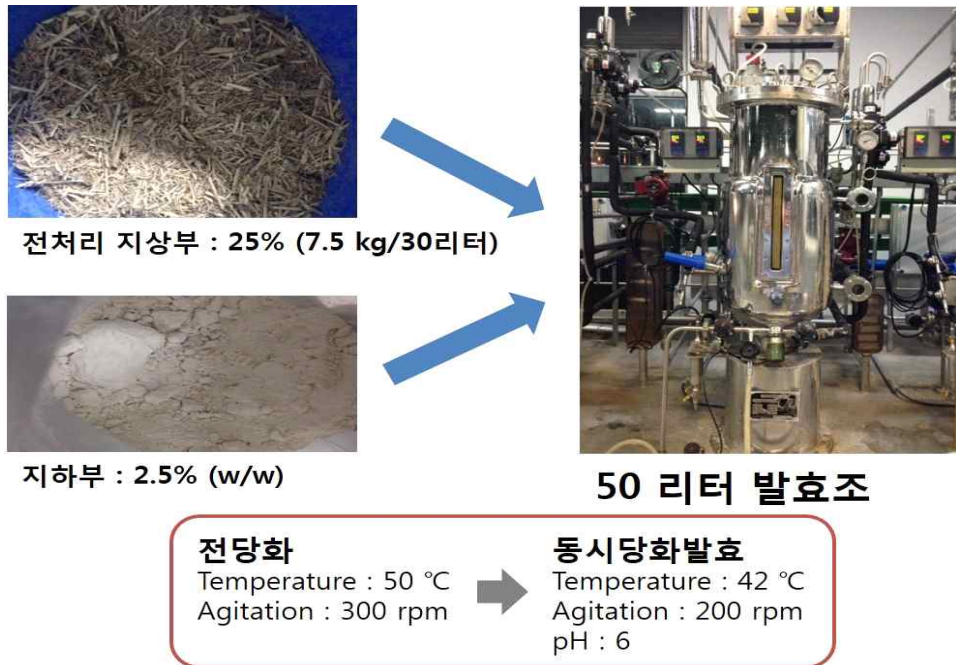


그림 10. 에탄올 생산을 위한 돼지감자 준비 및 50L 발효조의 운전조건

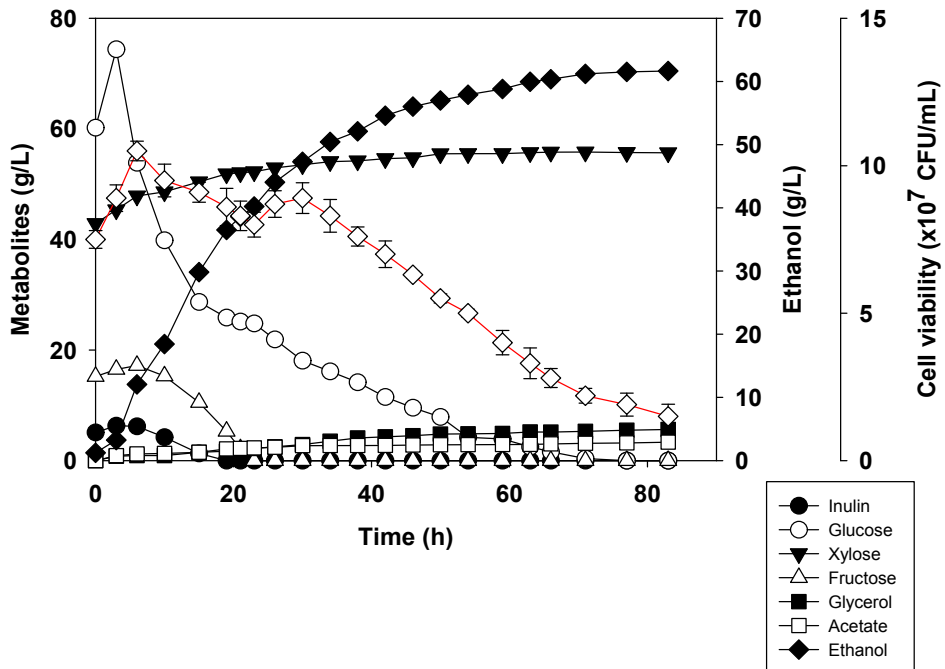


그림 11. 돼지감자 지상부의 에탄올 발효 (50리터)

결론적으로 알칼리 전처리된 돼지감자 지상부를 이용하여 5L, 50L 발효조에서 유가식 동시당화발효를 수행하였다. 앞선 실험에서 yeast extract, peptone과 같은 질소원 대신에 돼지감자 지하부를 활용하여 에탄올을 생산할 수 있다 판단하여 지상부와 지하부를 9:1 비율로 첨가하여 실험을 진행하였다. 5L 에탄올 발효 실험은 1L working volume 기준으로 지상부 225g, 지하부 25g 총 250 g (25%)의 alkali 전처리 돼지감자 지상부와 지하부를 사용하였으며, 효모는 건조중량 기준으로 4g으로 접종하였다. 효소는 40 FPU/g biomass로 투입하였으며, 200 rpm, 42℃의 운전조건으로 실험을 수행하였다. 배양 46시간째에서 56 g/L의 에탄올이 최대 생산되었으며(1.2 g/L/h), 이때 5탄당인 xylose의 생산량은 17 g/L으로 확인되었다. Xylose의 생산량을 토대로 알칼리 전처리 돼지감자 지상의 당화율은 거의 100%인 것으로 추산되었으며, 생산된 당의 에탄올 발효수율은 약 0.43 (g/g sugar)으로 확인되었다.

50L 에탄올 발효 실험은 총 지상부는 25% (7.5kg), 지하부는 2.5% (750g)가 투입되었으며, 전당화를 실시한 후 효모를 투입하는 2단계 부분전당화-동시당화발효 전략을 세워 실험을 진행하였다. 배양 후 최대생산량인 60.3 g/L의 에탄올이 생산되었고 생산성은 0.91 g/L/h이었다. 생산된 에탄올은 0.41 (g/g sugar), 87%의 수율을 타나내었다. 에탄올 증류 후 폐액에는 *K. marxianus*가 소비하지 못한 자일로즈가 남아있으며, 자일로즈 부터 자일리톨을 생산하여 고부가가치 물질로 전환할 수 있다.

이 결과는 산/알칼리 연속 전처리 돼지감자 지상부의 fed-batch SSF (80 FPU/g biomass) 결과와 비교하여 절반의 당화효소량 (40 FPU/g biomass)을 사용하고도 양호한 에탄올 생산수율을 보이는 것으로 나타났다 (5L : 0.43 g/g sugar, 50L 0.41 g/g sugar). 뿐만 아니라, 산 전처리 공정을 배제함으로써 비용적인 면은 물론 환경적인 면에서도 개선된 것으로 확인되었다.

(3) 500L 발효조를 이용한 돼지감자 지상부의 에탄올 발효

원활한 에탄올 발효를 위해서 500 L 발효조를 이용해 돼지감자 지상부 효소 당화를 먼저 진행하였다. Working volume 300 L에서 전처리한 돼지감자 지상부 25 %(75 kg), 지하부 2.5 %(7.5 kg)를 첨가하고 효소는 40 FPU/g biomass로 첨가하였다. 지상부는 5 %씩 나누어 4시간 단위로 첨가하였고 지하부는 당화 시작 20시간 후에 첨가하여 24시간 동안 300 rpm에서 50℃로 효소 당화를 진행하였다.

돼지감자 지상부의 당화효율(S, %)은 식 (1)으로 나타낼 수 있다.

$$S(\%) = \frac{\Delta X}{X} \times 100 \dots\dots\dots \text{식(1)}$$

여기서 ΔX는 생산된 xylose의 농도(g/L), X는 xylose의 함량(g/L)이다. Xylose 생산량은 15.88 g/L로 확인되었으며 xylose 생산량을 토대로 돼지감자 지상부의 당화율은 97.84 %이다.

효소 당화 24시간 후 전배양된 효모를 투입하여 에탄올 발효를 진행하였다. 전배양은 500 L bioreactor에서 working volume 350 L로 YPD(yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, glucose

60g/L)배지에서 배양하였다. 배양조건은 70 rpm, 30 °C, 0.4 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. 5시간동안 전배양을 하였고 cell growth(OD₆₀₀)는 18.20이다.

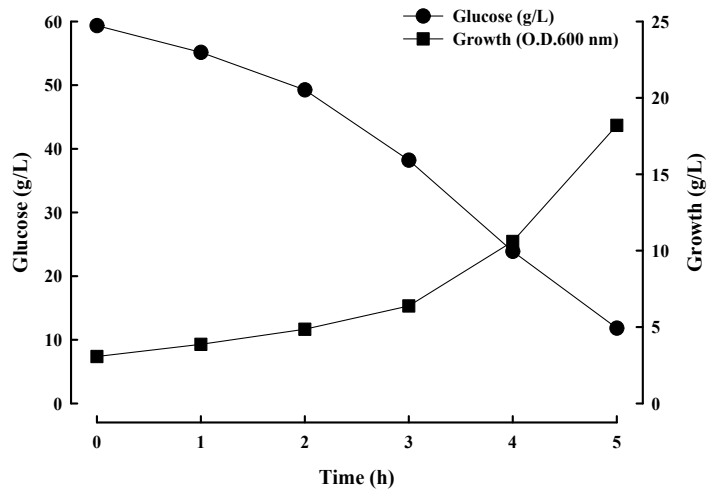


그림 12. *Kluyveromyces marxianus* KCTC7001균주 전배양



그림 13. 돼지감자 지상부 에탄올 발효에 사용된 500L 발효조

에탄올 발효는 전배양한 효모를 모두 harvest하여 500 L bioreactor에서 Working volume 300 L로 돼지감자 배지에 접종하였다. 배양조건은 100 rpm, 42 °C로 배양하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. 배양 14시간에 xylose를 제외한 모든 당을 소모하였고 배양 12

시간에 최대생산량인 60.50 g/L의 에탄올이 생산되었다. Xylose 생산량은 15.88 g/L로 xylose 생산량을 토대로 glucose 생산량은 127.20 g/L이고 inulin 생산량은 17.50 g/L이다. 돼지감자 지상부의 에탄올 수율(EY, %)은 식 (2), 에탄올 전환율(EC, g/g)은 식 (3), 에탄올 생산성(EP, g/L/h)은 식 (4)으로 나타낼 수 있다.

$$EY(\%) = \frac{\Delta E}{E} \times 100 \dots\dots\dots \text{식(2)}$$

$$EC(\text{g/g}) = \frac{\Delta E}{SC} \dots\dots\dots \text{식(3)}$$

$$EP(\text{g/L/h}) = \frac{\Delta E}{CT} \dots\dots\dots \text{식(4)}$$

여기서 ΔE 는 생산된 에탄올의 농도(g/L), E는 이론 에탄올 생산량(g/L), SC는 당소모량(g/L), CT는 culture time(h)이다. 이론 생산량은 73.80 g/L이지만 실제 생산된 에탄올은 60.50 g/L이므로 에탄올 수율은 81.98 %이다. 에탄올이 최대로 생산된 12시간을 기준으로 144.70 g/L의 당을 소모하고 60.50 g/L의 에탄올을 생산하여 에탄올 전환율은 0.42 g/g이고 생산성은 5.04 g/L/h이다.

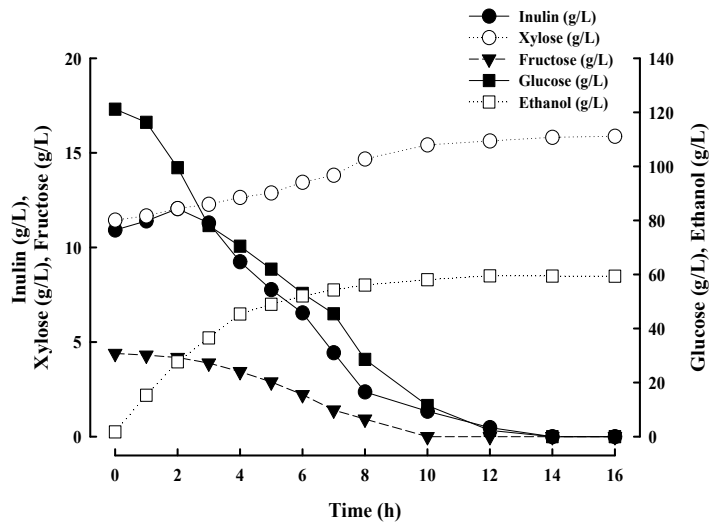


그림 14. 돼지감자 지상부의 에탄올 발효 (500리터)

2, 돼지감자 지하부 이눌린을 이용한 바이오소재 생산 공정 개발

가. 돼지감자 지하부를 이눌린을 이용한 lactic acid 생산 공정 개발

(1) 돼지감자 지하부 inulin 추출

돼지감자 추출물은 DW 3 L에 돼지감자 450 g을 넣고 autoclave를 이용하여 121 °C 에서 1 시간 동안 열처리를 하였다. 6000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상등액만 분리한 후 그 상등액에 돼지감자 450 g을 넣고 1시간 동안 열처리를 하였다. 열처리 후 원심분리를 하여 불용성 물질을 제거하고 사용하였다. 돼지감자 지하부 추출 결과 DW 3 L에 900 g의 돼지감자에서 inulin 190 g/L가 추출되었다.

(2) 돼지감자 지하부 이눌린 lactic acid 생산 최적화

Lactic acid발효는 2단계로 나누어서 진행하였다. 1단계는 세포 배양 단계로 *Kluyveromyces marxianus* M25571 Δ pdc1 Δ cyb2/L-LpLDH균주를 5L bioreactor에서 working volume 3 L로 YPD (yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, glucose 20g/L)배지에서 배양하였다. 배양조건은 500 rpm, 30 °C, 1.5 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. 2단계는 젖산 생산 단계로 1단계에서 배양한 *Kluyveromyces marxianus* M25571 Δ pdc1 Δ cyb2/L-LpLDH 균주를 모두 harvest하여 5L bioreactor에 working volume 2 L로 돼지감자(inulin 170 g/L)배지에 접종하여 젖산 발효를 진행하였다.

Lactic acid발효에서 교반속도의 영향을 확인하기 위해 교반속도를 200, 400, 600, 800 rpm으로 각각 배양하였다. 배양조건은 초기 균체접종은 OD=60, 35 °C, 1.5 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. 교반속도에 따른 젖산 발효의 결과는 그림 15에 나타내었다. 200, 400 rpm에서 젖산 생산량은 각각 103.49 g/L, 120.81 g/L 생산되어 400 rpm에서 젖산 생산량이 16.74 % 더 높게 나타났고, 배양시간도 6시간 정도 빠른 것으로 나타났다. 그러나, 600, 800 rpm에서는 젖산 생산량이 감소하였다. 배양 초기에 cell growth(OD₆₀₀)가 60에서 80으로 증가하면서 400 rpm 보다 젖산 생산량이 감소하였기 때문인 것으로 보인다. 따라서 초기 cell growth(OD₆₀₀)를 80이상으로 배양하여 rpm에 따른 젖산 발효 실험을 진행 할 필요가 있어 보인다.

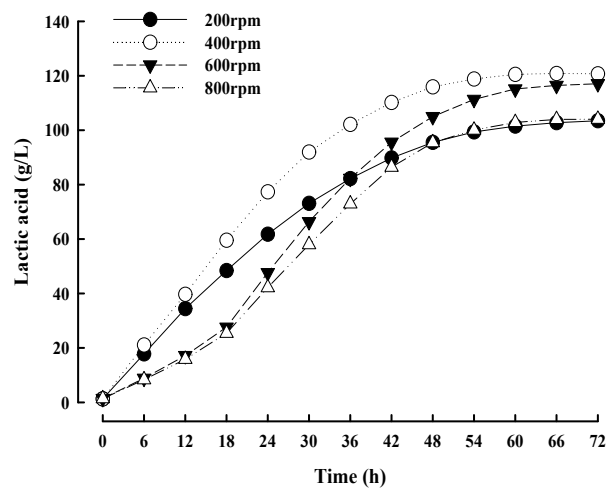
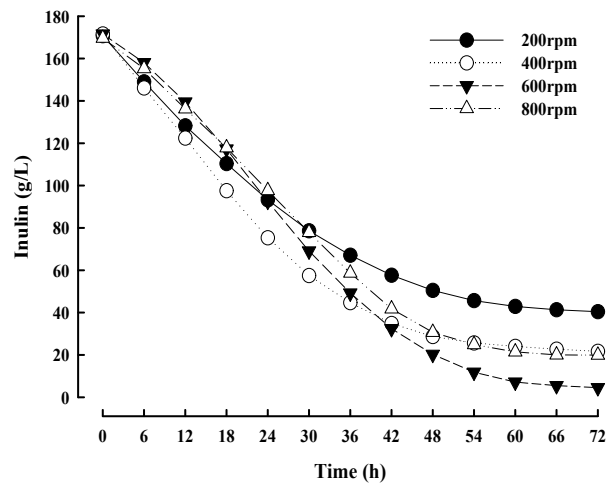
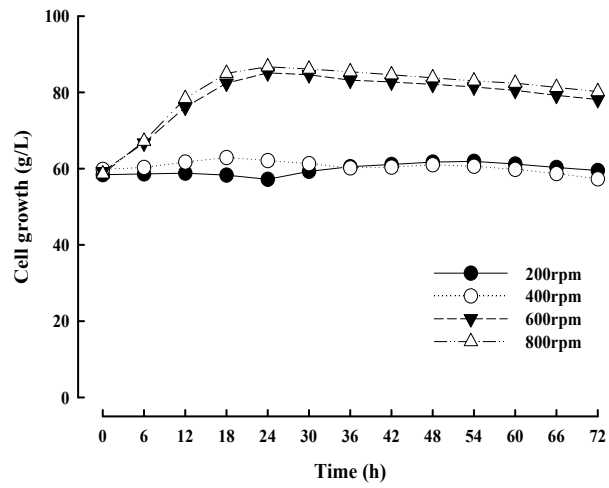
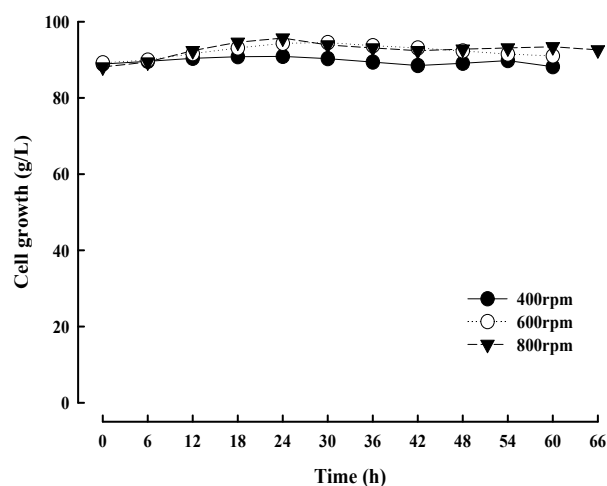
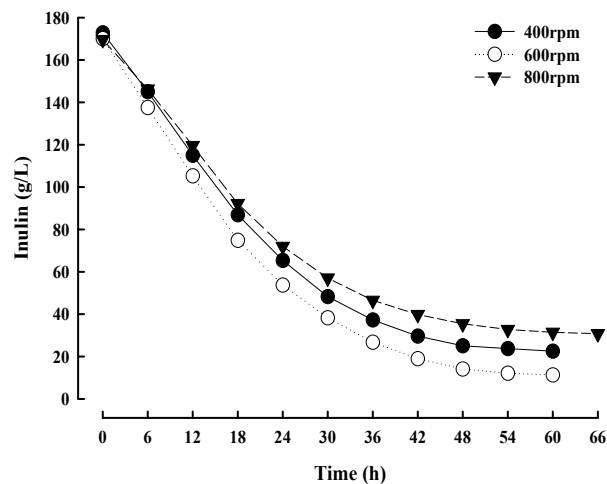


그림 15. Lactic acid 발효 교반속도의 영향

Lactic acid 발효에서 고농도 효모 접종 후 교반속도의 영향을 확인하기 초기 접종량을 OD=80 이상으로 접종한 후 400, 600, 800 rpm으로 배양하였다. 배양조건은 35 °C, 1.5 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. 초기 접종량을 OD=80이상으로 접종한 후 교반속도에 따른 lactic acid 발효의 결과는 그림 16에 나타내었다. 600, 800 rpm에서 배양 초기에 세포성장이 없었고 젖산 생산량이 증가하였다. 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm에서 젖산 생산량은 각각 121.06 g/L, 129.58 g/L, 112.18 g/L 생산되었다. 400 rpm보다 600 rpm에서 젖산 생산량이 7.04 % 더 높게 나왔지만 800 rpm은 7.33 % 감소하였다. 따라서 가장 적합한 배양조건은 초기 접종량을 OD=80이상으로 접종 후 600 rpm으로 배양하는 것으로 나타났다.



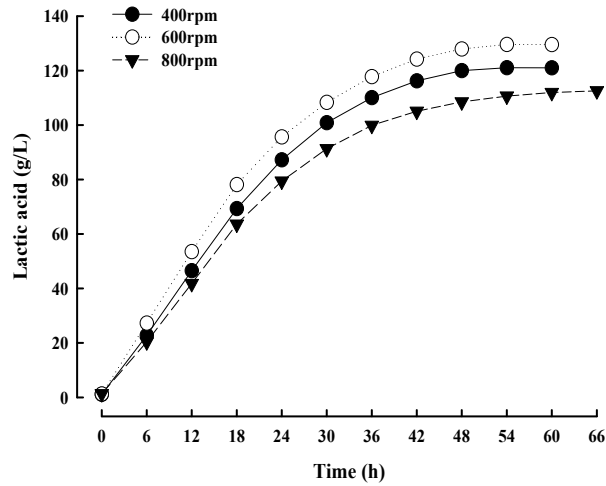


그림 16. 고농도 효모 접종 후 Lactic acid 발효 교반속도의 영향.

나. Lactic acid 생산 공정 스케일업

(1) 50L 발효조를 이용한 돼지감자 지하부 이눌린 lactic acid 생산

5L bioreactor를 이용한 실험에서 최적화된 배양조건으로 돼지감자 지하부의 50 L 젖산 발효를 진행하였다. 세포배양 단계 배양조건은 50L 발효조에서 working volume 35 L로 300 rpm, 30 °C, 1.5 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다. Lactic acid 생산 단계에서는 working volume 25 L에서 초기 접종량 OD=80, 300 rpm, 35 °C, 1.5 vvm으로 하였고 pH는 NH₄OH를 이용하여 6.0으로 조절하였다.

50L 발효조 배양 결과는 그림 17에 나타내었다. 초기 inulin 170 g/L를 하여 배양 44시간에 모든 inulin을 하였으며, 배양 40시간째에 130.40 g/L의 lactic acid를 생산하였다. 5L 발효조 결과와 비교했을 때 비슷한 lactic acid 생산량을 나타냈으나, 배양시간은 14시간 정도 빠른 것으로 나타났다. 40시간동안 130.40 g/L의 젖산을 생산하여 lactic acid 생산성은 3.26 g/L/h이다.

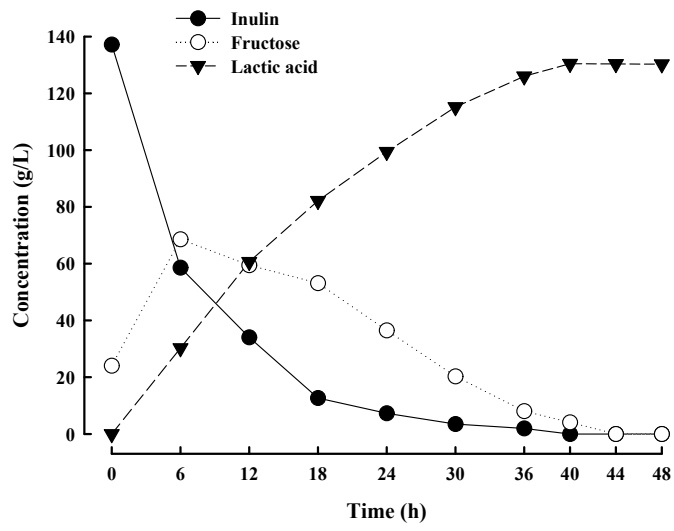


그림 17. 돼지감자 지하부 lactic acid 발효 (50리터)

협동과제 보고서
(삼성전자/성균관대학교)

제 1 장 연구개발과제의 개요

연구 개요	연구 성과 목표 (이론적·실험적 접근방법)
고온 내산성 효모 (KM) 오믹스 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전체 서열 해독 및 정보해석 ○ KM 의 전사체 분석 ○ KM 균주의 대사회로 해석
내산성 효모 대사공학 기반 재조합 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ KM multiple auxotroph 구축 (leucine, tryptophan, uracil) ○ CRISPR-CAS9 system 기반 유전공학기술 구축 ○ Lactic acid 생산을 위한 내산성 KM의 제조
LDH 유전자 개량 및 Multiple integration에 의한 synergy effect	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lactic acid 생산을 위한 내산성 KM의 제조 ○ Low pH 발효 공정 내 lactic acid activity 개선 ○ Substrate inhibition 감소 위한 LDH 개량 ○ LDH 유전자 다중도입으로 인한 synergy effect
Crab Negative 고온 내산성 효모 이용 LA 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 및 주요 기능 부위 해석 ○ low pH LA 발효 공정 최적화 (발효 농도 50g/L, pH 3.5 이하)
KM 균주 기반 1,4-BDO 생합성 경로 핵심 유전자 도입 및 발현 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1,4-BDO 생합성 경로 및 균주 디자인 ○ 1,4-BDO 생합성 경로 디자인 및 생합성 경로 핵심 유전자 확보
산업용 균주(E. coli) 이용 1,4-BDO 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균주 in silico 분석을 통한 핵심 유전자 확보 ○ 시스템생물학 기법을 이용한 균주개량 ○ 1,4-BDO 발효 공정 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 2002 년 세계 최초로 PLA 사업화에 성공한 NatureWorks (Cargil) 사의 경우 *Lactobacillus* 균주를 사용하고 있으며, 현재 생산하는 기술 수준은 200 g/L, 발효수율 95 %, 발효생산성 5 g/L/h 수준으로 파악되고 있다.
- 네덜란드 Purac 사는 광학적으로 순수한 젖산 생산기술을 확보한 것으로 알려져 있다.
- 국내 Lactic acid에 관한 연구개발은 주로 유산균을 이용한 젖산 생산균주 개발 및 이를 활용한 다양한 탄소 원으로부터의 L형 젖산 생산에 관한 것이 주류를 이루고 있다.
- 최근 제일 제당에서는 자체 개발한 유산균 균주를 이용하여 젖산을 파일럿 규모에서 185 g/L 수준까지 생산하는 기술을 개발한 상태이다.
- 균주개발의 경우 L-형 젖산 생산 균주인 *Lactobacillus spp.*에 대한 대사공학 및 genome shuffling 등의 최신 기술을 이용한 지속적인 발효 성능 향상과 더불어 내산성을 높이기 위한 효모 균주개발 등이 진행 중에 있으며, 발효공정 측면에서는 다양한 세포고정화 공법이나 연속식 발효공정 등을 통한 생산성 향상 연구가 진행 중에 있다.
- Lactic acid 생산의 발효 경쟁력은 우수한 미생물 균주의 개발과 저가 바이오매스를 활용할 수 있는 능력에 의해 좌우될 가능성이 크므로, 이러한 상황에서 미생물 균주개발의 경우 선진국과의 기술 격차가 크지 않아 선진국과 대등한 수준의 생산 균주 개발이 가능한 상황이다.
- 1,4-BDO의 국제 시장은 2020년까지 694,710만 달러(약 8조원)로 성장할 전망이다 (Grand View Research사, 2014). 변동이 심한 원자재 가격과 환경 규제로 인해 1,4-BDO 생산 기술은 바이오 기반 1,4-BDO 개발로 전환되는 추세이다.
- 바이오 기반 1,4-BDO 생산의 선두 기업은 Genomatica 사로, 2008년 처음으로 1,4-BDO 생산미생물 개발을 보인 후로 5 년 내에 미생물 발효 통한 1,4-BDO의 상업적 수준 생산에 도달하였다. 2012년 후반 Genomatica 사의 GENO BDOTM공정을 통해 수 천톤의 1,4-BDO 생산이 가능하였고, 이는 거대 화학기업 BASF와 Novamont 사에 의해 라이선스 계약되었다. 또한, Lanxess, DSM, Toray 등 다수의 화학기업은 Genomatica 공정에 의해 생산된 1,4-BDO를 사용하여 PBT(Polybutylene terephthalate), ThermoPlastic Copolyester 등 Downstream product 생산을 보였다.
- Genomatica 사는 2011년 Nature Chemical Biology 지에 대장균의 대사공학을 통해 포도당으로부터 약 20g/L의 1,4-BDO 생산을 보고하였다. 그 후, 13C-Fluxanalysis, Proteomics 등 시스템 생물학 기법을 활용한 균주 및 효소 개량과 발효 공정 최적화를 통해 100g/L 수준의 1,4-BDO를 생산하였다.
- BioAmber 사는 자사의 바이오 숙신산(Succinic acid) 기술을 Dupont 사의 촉매 기술

(Hydrogenation)과 통합하여 바이오 BDO를 생산한다. BioAmber 사는 자사의 바이오 BDO가 Polyester, Biodegradable plastics 등 다양한 제품의 화학 구성요소로 사용되는 데 있어 석유 유래 BDO 대비 가격 경쟁력이 있다고 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고온성 효모 KM 오믹스 기술 개발

1. 고온성 효모 KM 오믹스 기술 개발

가. 유전체 서열 해독 및 정보해석

○ 유전체 해독 균주의 선정

- *Hasenula pozolis*의 type strain이기도 한 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555(=ATCC 26548, =CBS 6556, =NCYC 2597, =NRRL Y-7571)를 유전체 해독 균주로 최종 확정하였으며, 주관연구기관을 통하여 분리 정제된 genomic DNA를 입수하였음

○ 유전체 해독 전략의 수립

- Illumina platform 사용 1) 해독 비용이 매우 저렴하고 2) homopolymeric region(HR)의 염기 수를 정확히 calling하지 못하여 발생하는 frameshift 유발 현상이 없으며, 3) read length가 점차 개선되고 있고 4) Illumina data에 최적화된 소프트웨어들이 계속 개발되고 있는 장점이 있음

○ ERGO™을 이용한 genome annotation

- 유전자 예측은 IG Assets에서 *K. lactis*를 이용하여 사전에 구축한 매트릭스를 활용, Fgenesh로 실시하며, 자동화된 ERGO annotation 시스템을 이용하여 ortholog와 protein family cluster에 기반한 기능 예측 및 대사 경로 예측을 실시함. 모든 정보는 사용자가 70종 유전체 (basic diversity set)과 사용자가 지정한 150종의 유전체 정보화 함께 ERGO 환경을 통해 웹 브라우저로 탐색

○ KM01 ver. assembly의 ERGO genome annotation

- Illumina 600 bp library의 paired end sequence를 CLC Genome Assembler로 합체하여 얻은 KM01 version의 contig 서열을 de novo assembly한 뒤 5 kb mate-pair library paired end read를 넣어 작성한 scaffold(346 contigs, 128 scaffolds, total contig length 10,793,580 bp, Max/N50/average contig = 344,545/99,821/31,195 bp)를 IG Assets(구 Integrated Genomics)의 fungal genome annotation service에 제출하여 유전체 주석화를 실시

- 유전자 예측은 *Kluyveromyces lactis*를 대상으로 사전에 구축된 매트릭스를 이용하여 fgenesh로 실시하였고, 자동화된 ERGO annotation system을 이용하여 product(protein) name, ortholog, protein family cluster, secreted protein(predicted), metabolic pathway에 대한 정보를 산출하였음

- ERGO를 이용한 유전체 주석화 결과 총 4,998개의 단백질 코딩 유전자와 189개의 rRNA가 예측되었으며, 이 중에서 374개(7.5%)가 intron을 함유한 것으로 예측되었음. SignalP 실행 결과 세포 외로 분비될 것으로 예측된 유전자는 382개(6.9%)였고 coding density는 68.7%였음

○ **Finishing**

- SOAPdenovo를 이용한 서열 합체 결과의 비교: 2 종류 라이브러리에서 유래한 data의 활용 방안과 k-mer 조건을 다양하게 바꾸어 가면서 테스트한 결과 k-mer 61일 때 short insert library read는 contig 형성과 scaffolding에 전부 사용하지만 5 kb mate-library read는 scaffolding 용도로만 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 나타냄

K-mer	n	n:200	n:N50	min	median	mean	N50	max	>=200	>=200(-gap)
25	4078	230	7	200	263	46063	728356	982971	11115245	10595117
31	4103	220	6	200	264	48303	763626	1175851	11099912	10627708
37	2519	200	5	200	310	53232	896660	1632115	11040106	10646661
43	414	158	6	200	493	67479	843040	1300242	10961885	10662328
49	395	153	6	201	477	69791	848978	1179676	10984203	10678115
55	2461	147	5	200	439	72706	912705	1414655	10906950	10687784
61	4396	145	4	202	331	73785	1181318	1681050	10915580	10698913

그림. SOAPdenovo를 이용한 de novo assembly 결과의 비교.

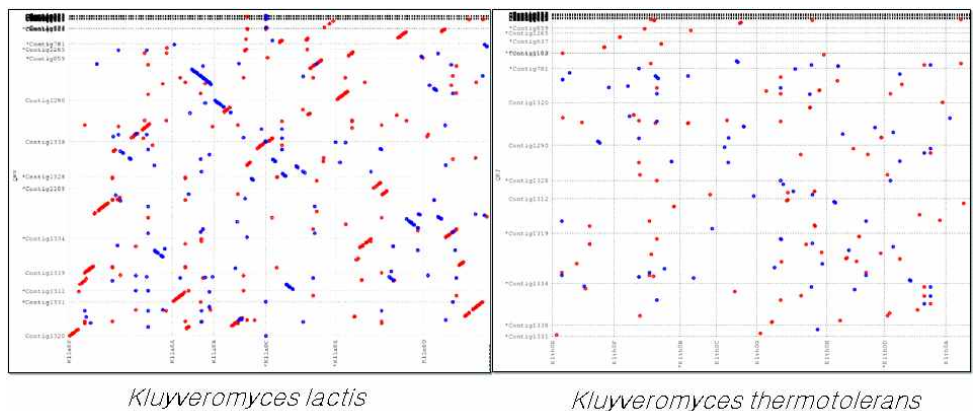
- 기본 전략: KM01 version assembly 위에 5 kb mate-pair library sequencing read를 SSPACE 프로그램으로 정렬하여 scaffold를 작성하였고, 각 contig는 600 bp 길이의 가상 trace file(pseudoread)의 assembly 형태로 전환한 ace file을 생성한 뒤 이를 consed program으로 열어서 PCR용 프라이머 설계, finishing read의 삽입 및 contig/read 단위의 수정이 이루어 지도록 하였음.
- 염색체 말단 부위의 발굴: fosmid end sequence를 추가함으로써 Illumina sequencing으로는 파악이 되지 않던 염색체 말단의 telomeric repeat-containing region을 발견할 수 있었음. 이곳에는 AC 함량이 높은 약 26 bp의 서열이 20회 이상 반복되어 있었는데, scaffold 구조를 정밀하게 validation한 결과 총 14개의 말단 부위가 확인되었으며, 염색체의 총 수는 8개인 것으로 추정
- Fosmid full clone sequencing: 염색체의 말단 부위에 매핑된 fosmid end read와 인접한 contig 사이의 sequence gap은 전부 5~20 kb 정도의 gap을 사이에 두고 있는 것으로 판명되었음. NGS의 coverage가 매우 높음을 감안하면 5 kb 이상의 영역이 시퀀싱되지 않고 순전한 gap으로 남아있다는 것은 납득하기 어려우므로, 이 부분에 존재하는 서열을 확인하고자 fosmid clone 하나를 선정하여(KM81002G02) shotgun library를 만든 뒤 fragment assembly와 finishing을 실시하여 32,203 bp의 전체 서열을 획득하였음. 이를 기존의 assembly 위에 정렬해 본 결과 약 26 kb에 걸쳐 homopolymeric T repeat 내의 단 1 bp를 제외하고는 완전히 일치하였음. 이는 NGS data를 통해 얻은 main assembly의 염기 서열이 대단히 정확함을 증명하는 것임. fosmid full clone sequencing을 통해 메워진 gap은 약 5.3 kb에 해당하는데,

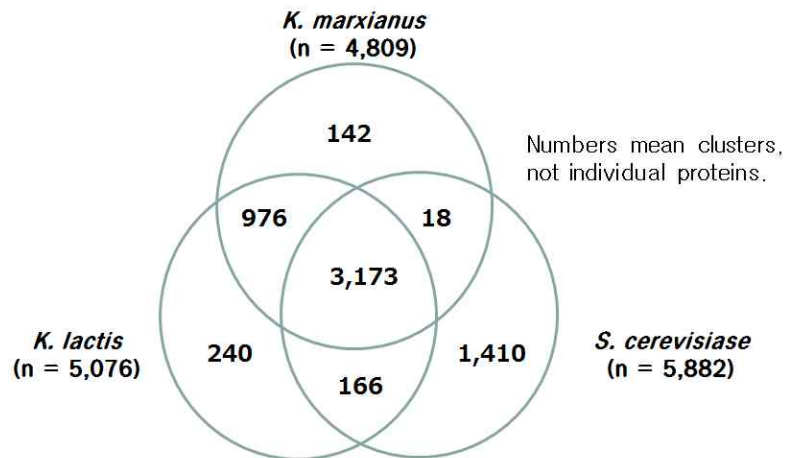
기존의 contig 서열에 대해 검색을 해 본 결과 scaffold 구조에 편입되지 못한 20개의 short contig가 match하는 것으로 확인되었음. 따라서 KM의 염색체 말단은 short teleomeric tandem repeat가 존재하고 그 안쪽으로는 약 5-6 kb에 걸쳐서 수백 bp 단위의 서열이 여러 염색체 말단에 걸쳐 반복적으로 분포 추정

- assembly는 200 bp 이상의 것을 대상으로 하였을 때 총 122개의 contig가 존재하며, 27개의 contig가 8개의 scaffold를 이루고 있음. Gap을 제외한 scaffold의 total length는 10,728,758 bp이며, singlet contig의 total length는 118,039 bp임

○ **Comparative genome analysis**

- Genome-level comparison: 유전체 서열 정보가 공개된 *K. lactis* 및 *K. thermotolerans*에 대하여 MUMmer로 whole-genome 수준의 alignment를 실시한 결과 *K. lactis*에 대해서만 매우 제한적인 synteny를 관찰할 수 있었음. 이는 동일 genus 내에서도 상당한 수준의 divergence가 있음을 시사함
- Gene (amino acid sequence) level comparison: augustus로 예측한 유전자를 아미노산 서열로 번역한 다음 *K. lactis* 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 translated CDS와 blastclust로 클러스터링 한 뒤 결과를 분석하여 총 3,173개의 단백질이 세 종 간에 보존되어 있음을 확인하였음





- Data source: Genolevures (*K. lactis*) and NCBI (*S. cerevisiae*)
- Protein sequence translated from augustus prediction using KM02 assembly.
- Clustered by blastclust with "-L .5 -b T-S 35" options.

그림. 3종 효모 간의 단백질 수준의 비교.

○ KM 표준 균주의 유전체 통합 유전자 모델 작성

- 유전체 염기서열 해독에 주력했던 KM 표준균주 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555에 대한 가장 정확한 유전자 정보를 확립하기 위하여, *ab initio* gene model과 evidence-based gene model을 통합한 최적화 유전자 모델을 구축하였음 (표준 유전체 서열 AFKM0100000)

	YGOB			IG	RNAseq	
	AA_03_protein	NT_03_mRNA	Ygob_CDS	WAP_CDS(Fgenesh)	Kmar_rnaseq20	Glimmer3
Input						
sequence #	114,457	113,936	113,644	4,997	4,823	
length, bp	53,590,093	160,717,678	160,564,145	7,392,297	4,223,301	
count						
(#) gene (%)	57,131 (49.9)	1,444 (1.3)	1,466 (1.3)	4,961 (99.3)	4,746 (99.6)	7,048
exon (CDS)	64,199	1,995	2,017	5,385	4,896	7,048
CDS/gene (avr.0)	1.1	1.4	1.4	1.1	1	1
length						
(bp) gene	1331.8	822.5	810.5	1498	886.2	1,092
exon (CDS)	1165.3	519.7	514.2	1368	841.3	1,092
max gene	14,739	117	93	78		24,096
min gene	48	1,444	1,466	4,961		105

표. Statistics of gene models

- 모델 통합 결과 총 4,860개의 유전자를 얻을 수 있었음. 유전자 당 평균 exon의 수는 1.04 개였고, intron을 포함하여 계산할 경우 전체 유전자의 길이는 7,343,317 bp(평균 1,510.97 bp/gene)로서 유전체 서열의 90.7%에 해당하였음(평균 450 genes/Mb genome, 평균 간격 2,224 bp)

○ **KM 균주의 comparative genome sequencing**

- 산업적으로 유용한 고온성 GRAS 효모인 *Kluyveromyces marxianus* 종을 구성하는 다양한 strain의 특성을 파악하고 그 활용성을 증대하기 위하여 KRIBB이 보유한 KM 균주들의 연관성을 파악하고 선별된 균주에 대한 NGS 기반 유전체 해독을 진행하였음
- KM의 종 내 phylogenetic tree 작성에는 nuclear rRNA 유전자 영역의 SSU(18S) rRNA 끝부분과 LSU(25-28S) rRNA 앞부분에 이르는 2,081 bp 부위를 ITS1 및 LR7 프라이머로 증폭한 뒤 Sanger sequencing으로 염기서열을 결정하여 사용하였음. 서열들은 다중정렬 후 maximum parsimony, maximum likelihood 및 neighborNet을 이용하여 tree를 작성하였음
- Phylogenetic tree 작성 결과 다음과 같이 대체적으로 4개의 그룹을 형성하였으며, 밑줄 친 10개 균주를 골라서 genome sequencing에 사용하였음
 - Group I: KCTC 17725, BY25573, BY25574
 - Group II: KCTC 17759, BY25575
 - Group III: BY25571, KCTC 7150, KCTC 17212^T
 - Group IV: BY25569, KCTC 17694, KCTC 17631
 - 기타: KCTC 7001/7118/7149/7155/7524/17544/17555/17724

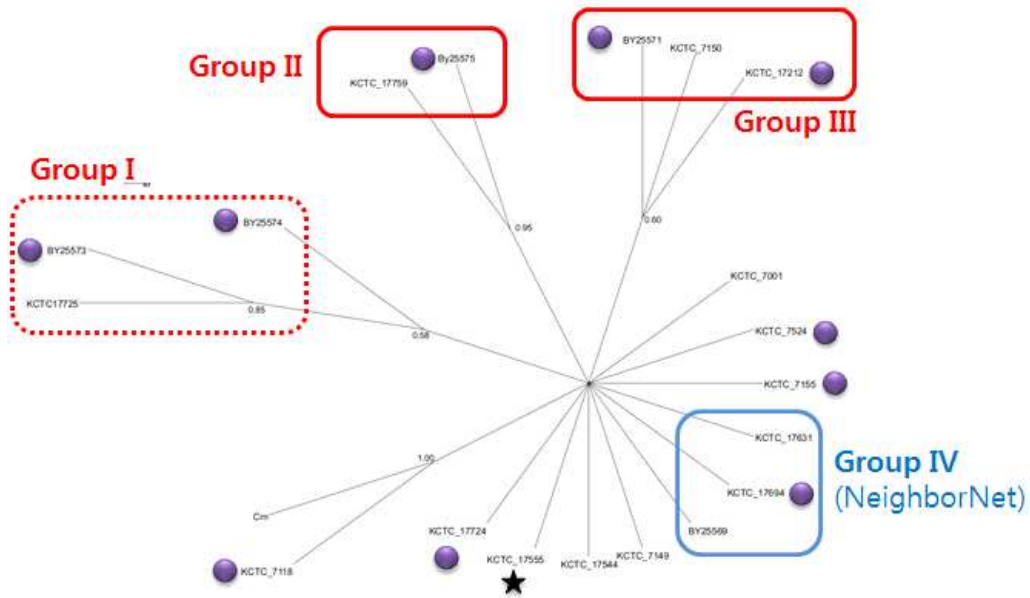


그림. KM 균주의 rRNA gene sequence-based phylogenetic tree. 유전체 해독 대상은 보라색 공으로 표시하였음. 별표는 KM 표준 균주(KCTC 17555), Cm은 outgroup으로서 포함시킨 *Candida magnoliae*

- Contig 길이의 구간 별 contig 수 및 length의 분포를 조사한 결과 KCTC 7118은 총 contig의 수가 많은 편이기는 하나 1 kb 미만의 contig를 적절히 cutoff하여 조절함으로써 활용 가능한 것으로 판단되었음

나. KM 의 전사체 분석

○ RNA-seq analysis

- 유전체 예측을 위한 evidence 및 배양 조건에 따른 유전자 발현 양상의 비교 분석을 위해 NGS(Illumina GA IIx)를 이용한 RNA-seq를 실시하였음. 배양 조건은 탄소원과 온도의 조합으로서 포도당-30℃, 포도당-42℃, 자일로스-30℃로 하였으며, quality trim으로 40 bp 미만의 것은 제거하였음. 데이터의 분량은 각각 559 Mb, 331 Mb 및 475 Mb의 수준이었음
- Read의 전처리 및 annotated genome(KM01 ERGO version) 상의 매핑 및 RPKM 수치 환산은 CLC genomics workbench 환경에서 수행하였음. RPKM의 비율을 이용하여 탄소원 또는 온도 차이에 따라 발현 정도가 달라지는 DEG candidate를 예측하였음

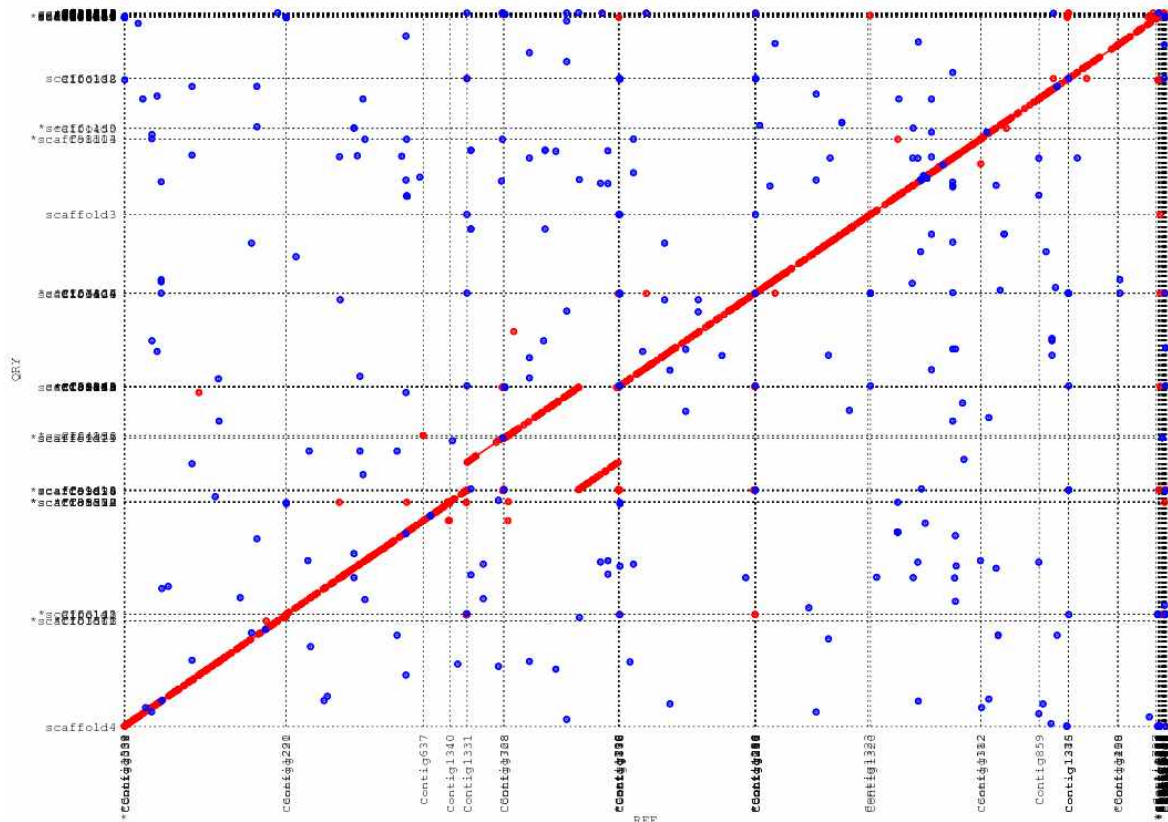


그림. 최신 assembly 결과(contig, X-축) 위에 SOAPdenovo ver. 1.0.5(k-mer 91)로 합체한 scaffold 서열을 MUMmer로 정렬하여 비교한 결과. Contig1328-1331(1047) scaffold 내부에서 나타나는 불연속은 점검이 필요함을 알 수 있음. 실제 optical map과 비교한 결과 최신 assembly가 정확한 것으로 판명되었음.

○ 배양 조건에 따른 전사체 분석

- KM 표준 균주에 대하여 온도와 탄소원의 조합에 따른 세 가지 배양 조건(포도당-30℃, 포도당-42℃, 자일로스-30℃; 배지는 탄소원에 따라 YPD 혹은 YPX)에서 total RNA를 추출한 뒤 Illumina GA IIx로 기초적인 RNA-seq analysis를 수행한 바 있음
- 당시에는 KM의 최종 유전자 모델을 확보하기 이전 단계였으므로, 유전체 서열만으로 유전자 예측을 할 수 있는 유일한 프로그램 중 하나인 Augustus(*Kluyveromyce lactis* 파라미터 사용)로 예측한 유전자를 대상으로 CLC Genomics Workbench 환경에서 DEG를 시험적으로 추출한 바 있음
- RNA-seq 실험은 통합 유전자 모델을 구축하기 위한 evidence 제공에 더 큰 목적을 두고 있었음. 배양 조건에 따른 전사체 분석의 다각화를 위하여 Agilent사의 genome tiling array를 활용하여 기본적인 전사체 분석을 실행하였음
- Genome tiling array는 실험 비용이 비교적 저렴하여 다수의 biological replicate에 대한

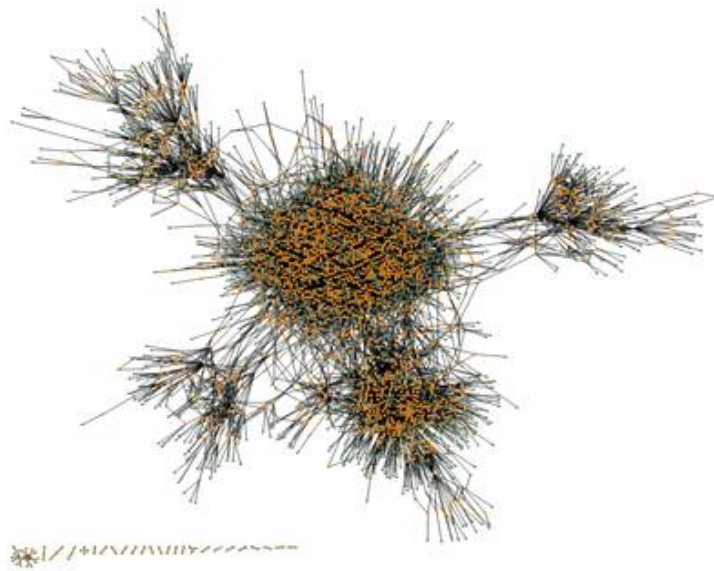
결과를 얻을 수 있고, 데이터의 통계적 분석 방법이 잘 확립되어 있으며, 재래식 microarray와 같이 유전자 서열에 대한 사전 정보에 의존하지 않으므로 transcript architecture를 정밀하게 탐색할 수 있는 특징이 있음

- 본 연구에서는 Agilent사의 GE 200K custom chip(244K format, no replication)을 제작하여 사용하였음. 프로브의 길이는 60mer로서 45mer spacing으로 배열되어 있으며, 한 장의 칩에 총 241,127개가 배열되어 있음. Total RNA 추출을 위한 배양 조건은 RNA-seq 실험과 동일함
- Microarray의 스캐닝과 데이터 분석은 Agilent사의 microarray scanner 및 GeneSpring software를 통하여 진행되었음
- Microarray 실험 데이터는 최종적으로 확립된 KM 유전자 모델 정보와 RNA-seq 결과물과 같이 통합하며 배양 조건에 따른 전사체의 변화 및 군주별 차이를 해석하는 데 활용

실험 군주	Hybridization 조건
KM 17555(표준군주)	Chip 1: 포도당 - Cy3: 포도당/30°C - Cy5: 자일로스/30°C
	Chip 2: 온도 - Cy3: 포도당/30°C - Cy5: 포도당/42°C
BY25571	Chip 3: 온도 - Cy3: 포도당/30°C - Cy5: 포도당/42°C

다. KM 군주의 대사회로 해석

- KM 군주의 de novo sequencing 및 annotation 을 통한 Genome-scale 대사 모델 구축



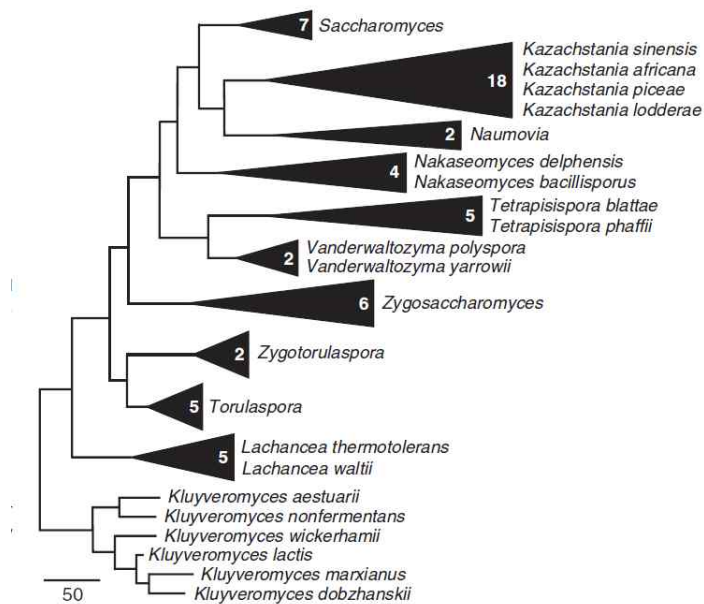
<그림. KM 대사 네트워크 (1845 reaction)>

- 산업용 균주의 게놈(genome) 정보를 이용한 대사 네트워크 모델 (genome-scale metabolic network model)의 구축과 시뮬레이션으로서 이 모델링 • 시뮬레이션 기법을 사용하여 KM 균주의 Genome 정보를 활용, 아래와 같이 KM 대사 모델을 구축함

표. KM Genome 정보기반 대사모델

<i>K. marxianus</i> metabolic model Characteristics	
Genome size (Mbps)	10.9
Number of genes annotated	4998
Number of genes represented in the metabolic model	675
Percentage of total genes	13.5%
Reaction number	1845
Metabolite number	1391

- *Kluyveromyces marxianus*의 유전적 분류



<그림. KM 의 Phylogeny Tree>

- 초기에는 사카로미세스속으로 분류되었으나, 이후에 다음과 같은 이유로 인하여 클루이베르마이세스속으로 변경됨 (포자와 자낭의 형태 차이/발효 및 산화할 수 있는 당에 대한 능력)
- KM genome sequence 및 Biomass composition 을 이용하여 pH 에 따른 대사모델 구축

- SAIT 자체 확보된 *K. marxianus*의 유전체 서열을 바탕으로 in silico Model 구축 함.
- 자체 Sequencing 한 Genome 정보를 활용하여 *K. lactis*에 대한 가상세포 모델의 초기버전 구축 (*Kluyveromyces lactis*와 유전적으로 매우 유사)
 - KM 의 생체량 적용
 - *S. cerevisiae*에 근거한 세포 내 구획 지정
 - ERGO site 를 이용하여 기존의 annotation data 와 상호 체크
 - 획득한 유전자 정보에 기반하여 비교유전체 기법을 적용, *K. lactis*와 대사 경로 비교
 - 열역학적인 제한 조건 부여, 세포 구획 지정

K. marxianus metabolism at different pH

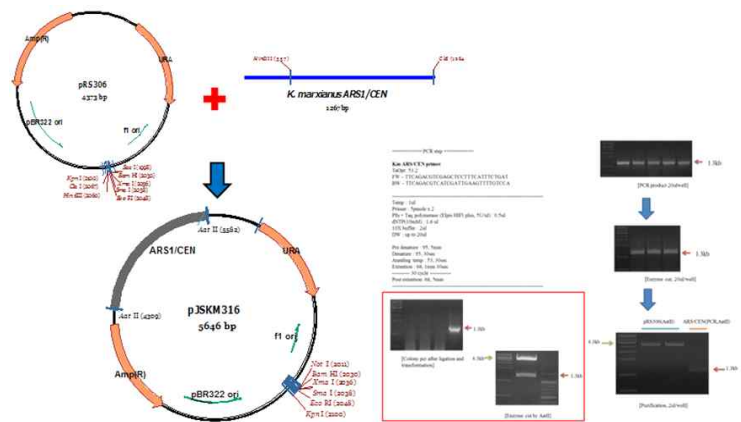


<그림. pH3, 5, 7 에서의 효소반응의 charge balance를 고려하여 pH 별 모델 구축>

2. 고온 내산성 효모(KM) 기반 대사공학 기반 재조합 기술 개발

가. KM 균주에서 발현 가능한 expression vector 개발

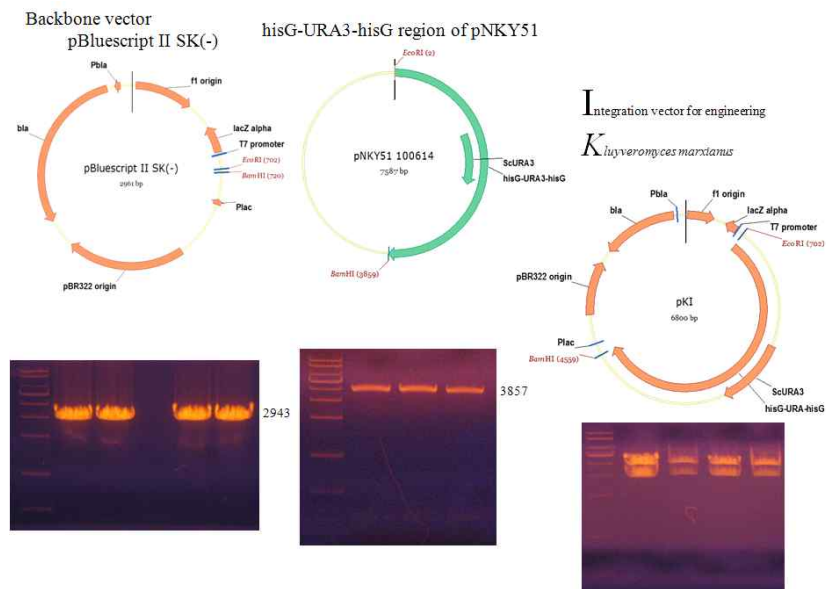
- KM 유전자 발현용 expression vector 제작을 위하여 yeast 와 *E. coli* cloning vector인 pRS306 vector에 KM genomic DNA로부터 분리되어진 ARS1/CEN을 cloning 하였다. 이는 replication origin 인 ARS (autonomously replicating sequence)가 포함된 vector로 KM 균주 내에서 독립적으로 복제가 가능하고 또한, centromere region인 CEN이 포함된 vector이다. 제작된 vector는 low copy number를 가지며 cell당 하나씩 나뉘어진다. 그리고 pJSKM316 plasmid vector는 shuttle vector로써 기능을 할 수 있다 (그림).



<그림. *Kluyveromyces marxianus* 의 expression vector 구축>

나. KM 균주에서 발현 가능한 integration system 개발

- pNKY51 플라스미드는 *E. coli* 플라스미드 벡터에 반복적으로 *Salmonella histidine operon* 사이에 효모의 *URA3* 유전자를 가지고 있다. 이 부분을 *EcoRI* 과 *BamHI* 으로 분리하여 3.8kb정도 크기로 pBluescript II SK(-) vector에 클로닝 하였다(그림 2). 이와 같이 KM에서 여러 유전자의 발현을 하기 위한 integration system을 구축하였다. 이는 안정성은 양호하나 발현율이 낮은 단점이 있다.

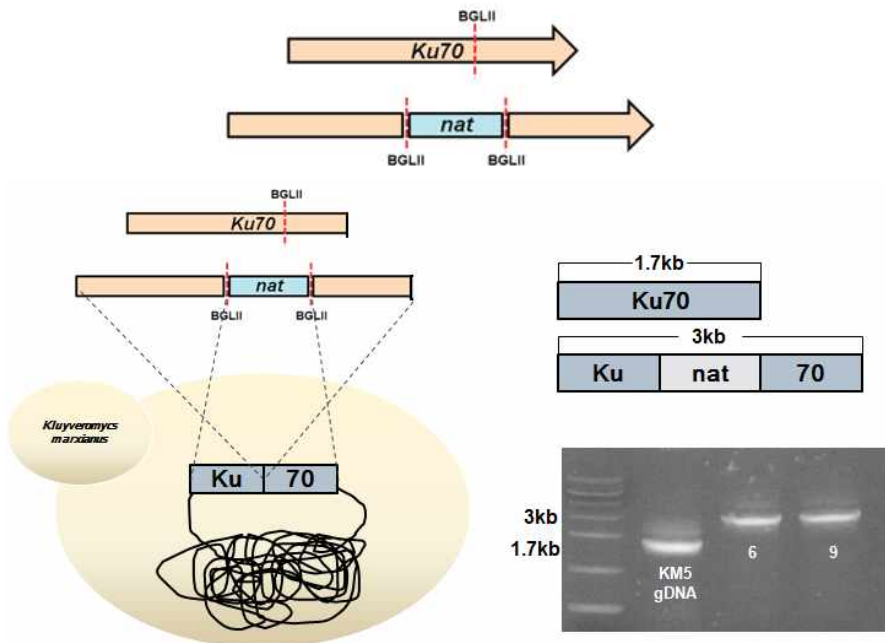
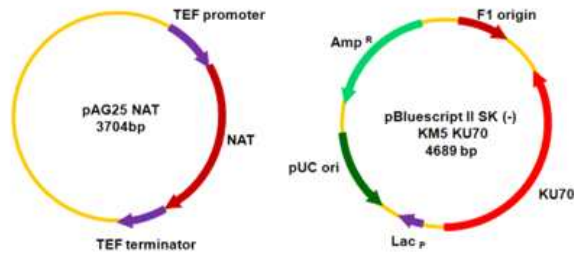
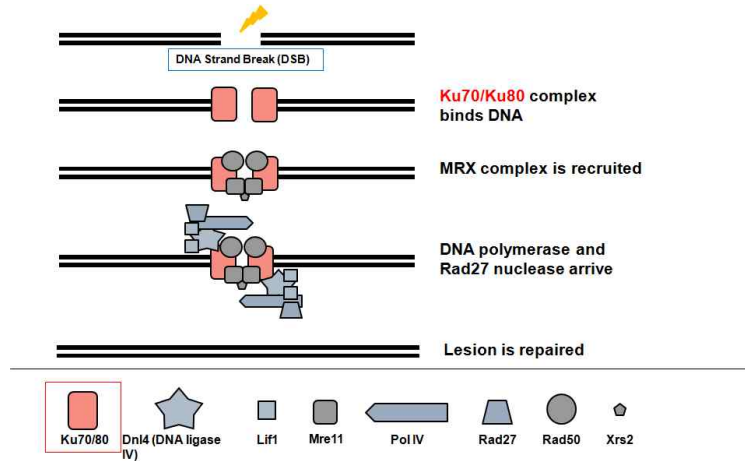


<그림. Non-homologous end joining mechanism과 KM균주에서의 Ku70 deletion>

다. KM 균주 Non-homologous end joining (NHEJ)/ Homologous recombination (HR) 조절

- KCTC 17555 균주는 *saccharomyces cerevisiae*와 다르게 NHEJ 발생빈도가 높음
- KM의 유전적 기반기술이 잘 갖추어 지지 않은 상황에서 본 균주의 높은 NHEJ 발생빈도로

- 인한 homologous recombination 저해는 KM의 유전공학적 활용에 장애가 됨
- NHEJ 기작의 핵심 유전자인 ku70을 deletion 함으로써 HR의 빈도를 높임



<그림. *Kluyveromyces marxianus* 의 integration system 구축>

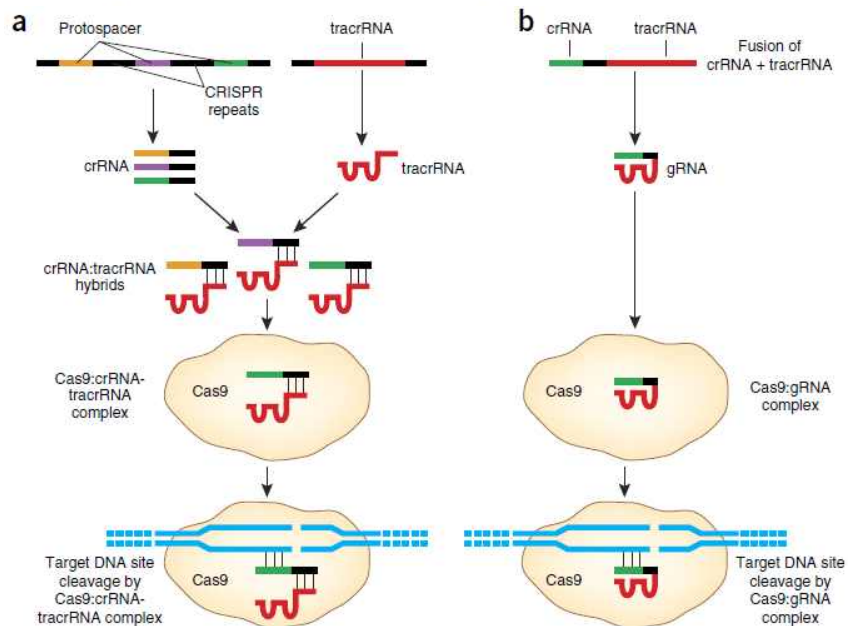
- ku70 mutation 작업은 pBluescript 에 XhoI과 BamHI site를 이용해 ku70유전자를 삽입한 후 ku70내의 BglIII site 사이에 nat(nourseothricin 저항성 유전자)를 삽입하였음

- ku70::nat DNA 단편을 KM균주의 크로모솜상에 형질도입하여 nourseothricin로 선별가능한 ku70 mutant 균주를 완성 (그림)
- KM 균주는 NHEJ 발생빈도가 높아 유전자를 크로모솜상에 한번의 형질도입으로 여러개의 유전자 단편을 도입하는 장점을 가지고 있으며, 이러한 장점과 NHEJ 때문에 일어나는 단점도 보완하기 위해 pJSKM316 발현벡터에 inducible한 promoter를 이용하여 NHEJ/HR의 상황을 switching 할 수 있게 함

라. CRISPR-CAS9 system 기반 유전공학기술 구축

- CRISPR-CAS9 system (아래 그림)

Jeffrey D Sander & J Keith Joung. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.*

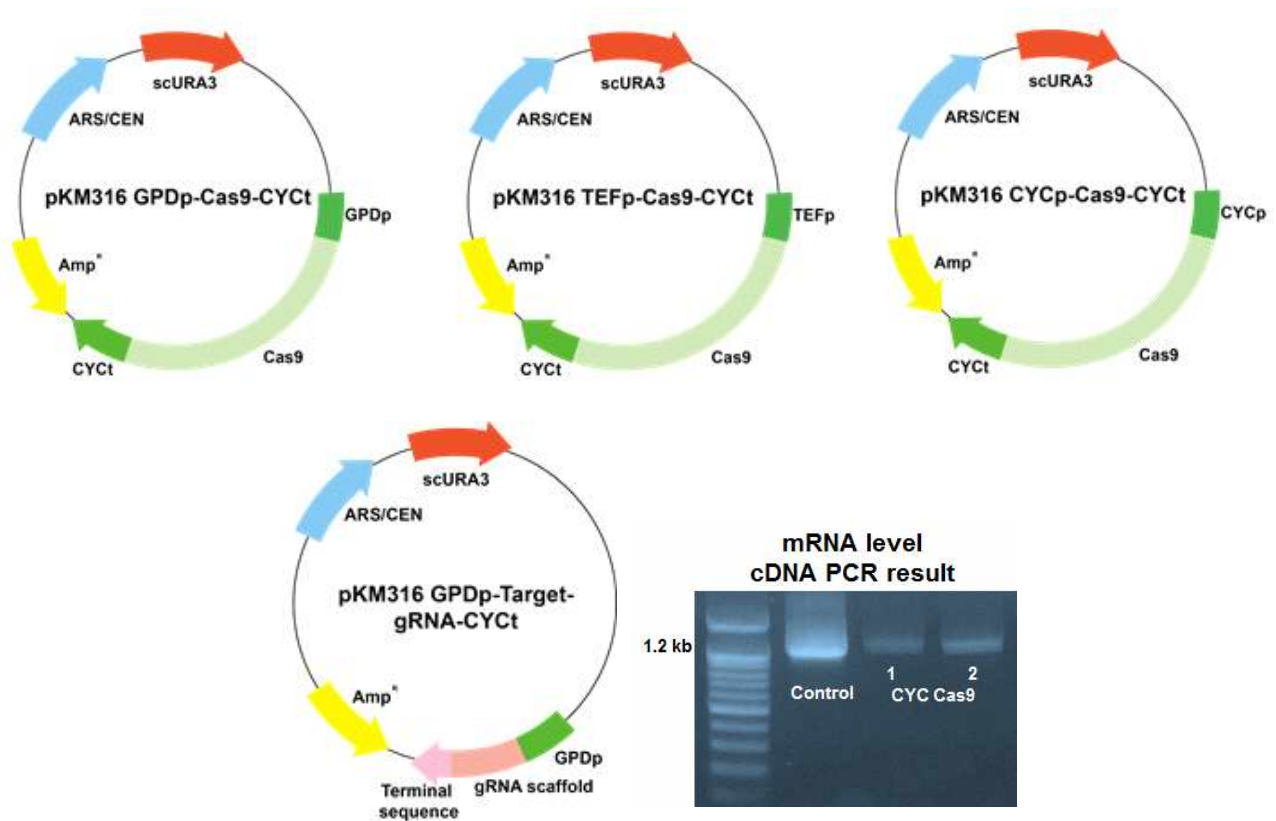


<그림. CRISPR-CAS9 system>

- clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein (CAS) systems.
- Bacteria의 Adaptive immune system인 본 기법을 응용하여 유전자를 knock-out 방법을 KM에 도입하고자 하였다.
- 본 기법은 knock-out 하고자하는 유전자의 염기서열을 포함한 RNA 구조체와 CAS9 단백질을 발현하는 벡터, knock-out 하고자 하는 부위의 homology한 100bp 내외의 sequence만 있으면 쉽게 유전자 조작이 가능하다는 이점을 가지고 있다.
- 자연적인 상태의 CRISPR-CAS9 system은 crRNA와 TracrRNA가 합해져 CAS9 protein에 binding 한 후, target sequence에 반응하여 이를 knock-out 시키는 mechanism을 갖는다.

(1) KM에 도입 가능한 CAS9 vector 구축

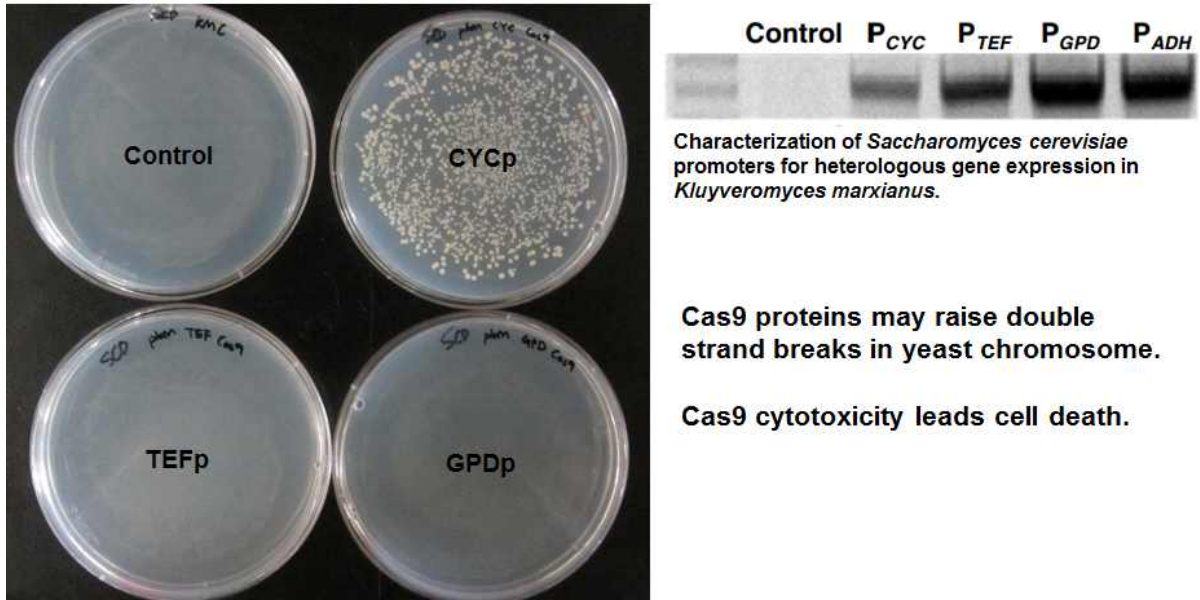
- Non-conventional한 yeast인 KM에서의 유전자 조작 기술은 본 균주의 DNA repair기작이 Non-Homologous End Joining (NHEJ) pathway에 치우쳐있어 매우 어려웠다.
- 이러한 KM 균주에 CRISPR-CAS9 system을 도입한다면 유전자 조작이 어려워 연구가 더뎠던 KM 연구에 많은 도움이 될 것이다.
- 기존의 KM에서 사용하기 위한 발현벡터를 개발한 바 있다. (pJSKM316 vector series)
- 위 벡터에 CAS9 유전자를 cloning함과 동시에 target 유전자에 대한 RNA를 전사할 수 있는 벡터를 개발하였다.(아래 그림)



<그림. KM에서 CAS9 protein을 발현(위),gRNA를 전사하는 벡터(아래)의 개발과 mRNA test>

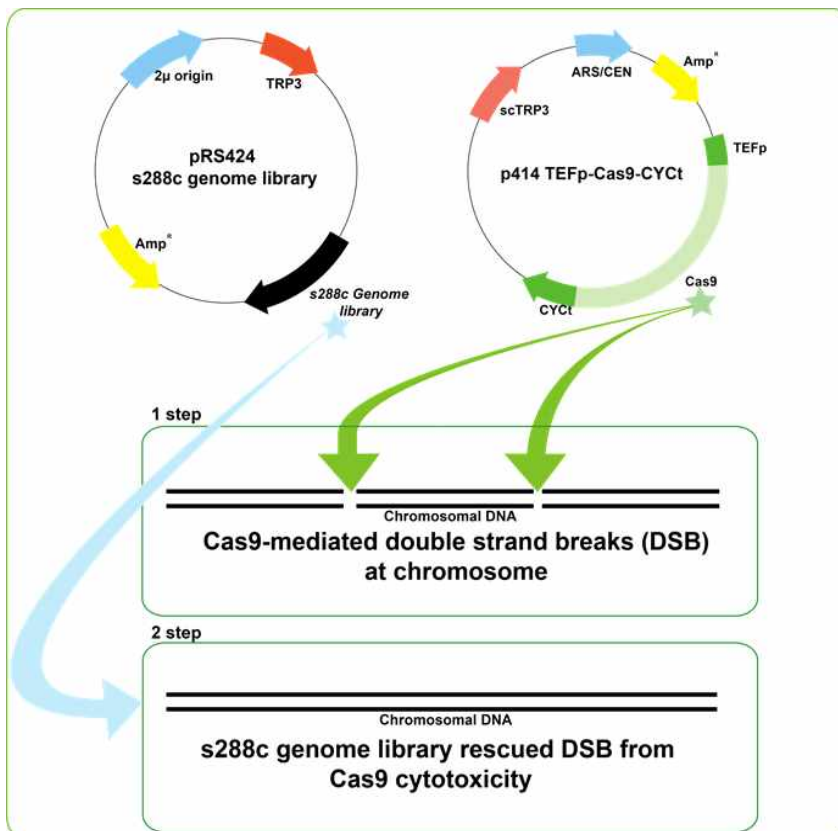
(2) CAS9의 toxicity를 완화시킬 수 있는 균주 개발

- CAS9 protein은 nuclease로써, 발현될 경우 cell의 growth가 줄어든다는 사실이 알려져 있다.
- KM에 CAS9을 발현하는 벡터를 도입할 경우 cell death가 일어나는 현상을 관찰하였다.(아래 그림)



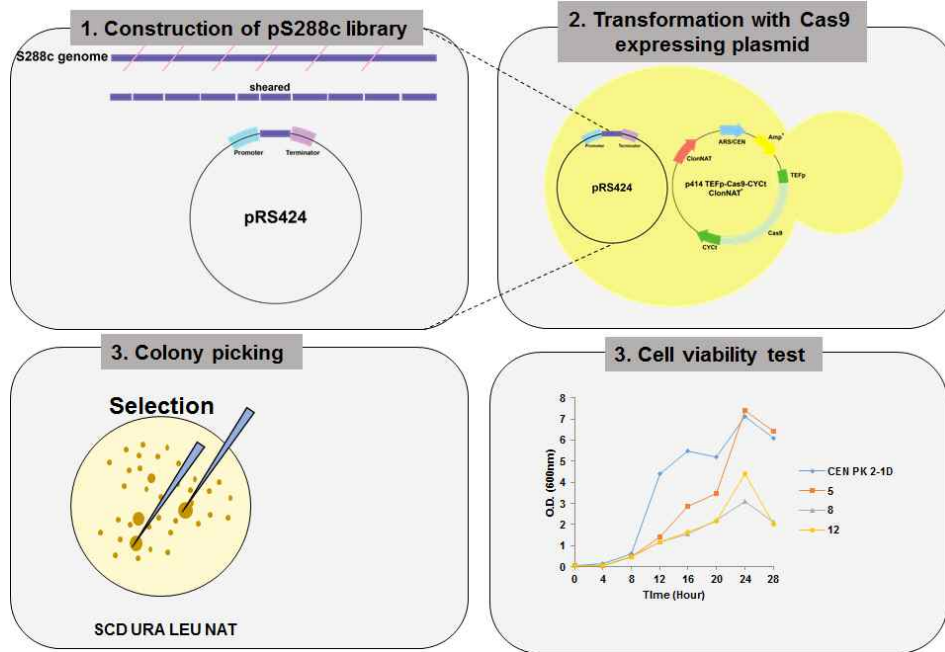
<그림. CAS9 protein발현 세기 조절에 의한 cell death>

- CAS9의 toxicity가 chromosome 상의 DNA들을 random하게 자르기 때문이라는 가설을 세우고 이를 완화시킬 수 있는 유전자를 탐색하였으며, 실험 방법은 다음과 같다. (아래 그림)



<그림. s288c library를 이용한 CAS9 cytotoxicity를 완화할 수 있는 균주 선별>

- *Saccharomyces cerevisiae* 균주인 s288c의 chromosome을 sonicator를 이용하여 잘게 자른 후 pRS424 벡터에 cloning 하였고, SC 균주인 CEN PK 2-1D에 형질도입 하였다.
- 이들 중 CAS9의 cytotoxicity를 완화시켜 크게 자라는 colony를 수집하였다. (아래 그림)



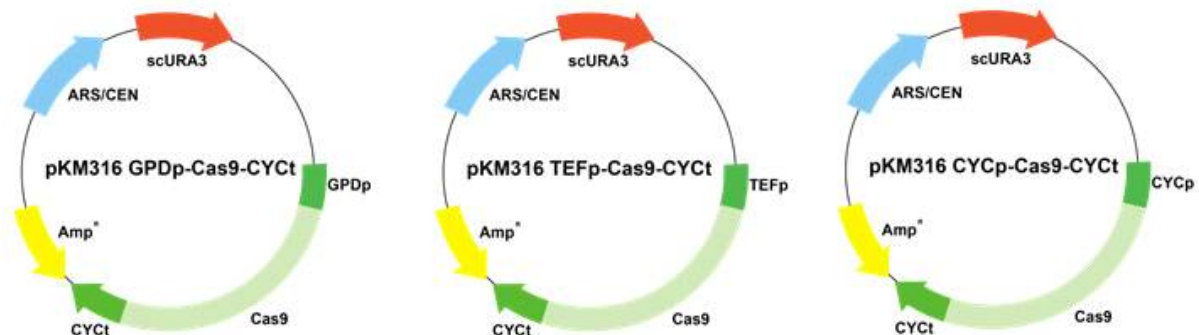
<그림. s288c library를 이용한 CAS9 cytotoxicity를 완화할 수 있는 균주 선별>

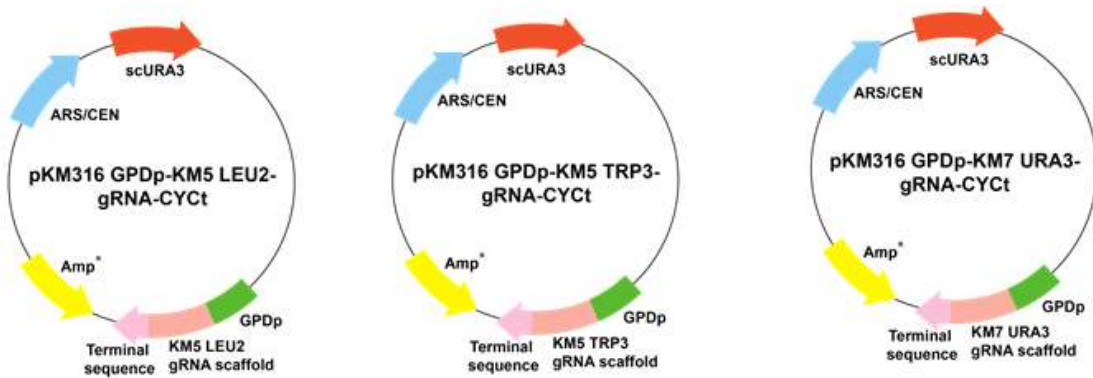
- 추후 선별된 균주에서 pRS424 plasmid를 수집하여, 이를 sequencing 함으로써 s288c의 특정 유전자가 CAS9 cytotoxicity에 미치는 영향을 조사할 계획이다.

(3) KM multiple auxotroph 구축 (leucine, tryptophan, uracil)

(가) CRISPR-CAS9 system을 이용한 multiple knock-out system 구축

- 벡터들을 KM의 URA3, LEU2, TRP3 유전자를 target으로 작동할 수 있도록 cloning하였다. (아래 그림)



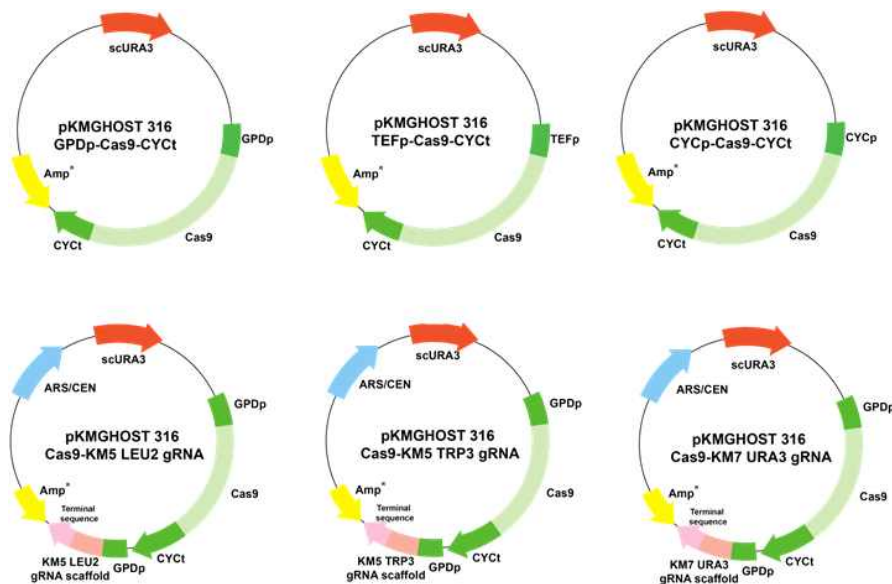


<그림. KM에서 CAS9을 발현하는 벡터(위)와 target 유전자에 대한 gRNA를 전사하는 벡터(아래)>

- 위 벡터를 KM에 형질도입하여 leucine, tryptophan, uracil 합성 유전자가 모두 knock-out 된 균주를 제작한다.

(4) KM 유전자 조작용 GHOST plasmid 제조

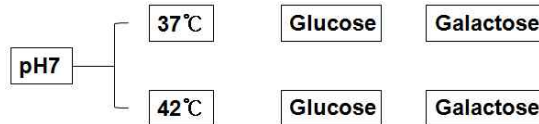
- 상기 KM에서 발현하는 CAS9 벡터를 제작한 후 plasmid replication에 관여하는 ARS/CEN 을 제거하여 줌으로써 선택한 유전자를 knock-out 한뒤 plasmid가 사라지는 system을 개발하고자 한다.
- 본 벡터는 유전자 조작이후 사용된 components들이 모두 사라지므로 추후 다른 유전자를 knock-out 작업하거나 형질도입 할 경우에 제약이 사라질 수 있으며, CAS9 protein의 지속적인 발현에 의해 cell death가 일어나는 것을 막을 수 있기에 유용한 기술이 될 것이라고 예상된다. (아래 그림)



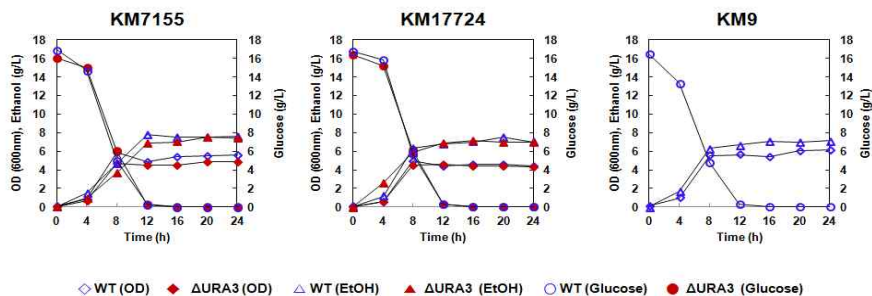
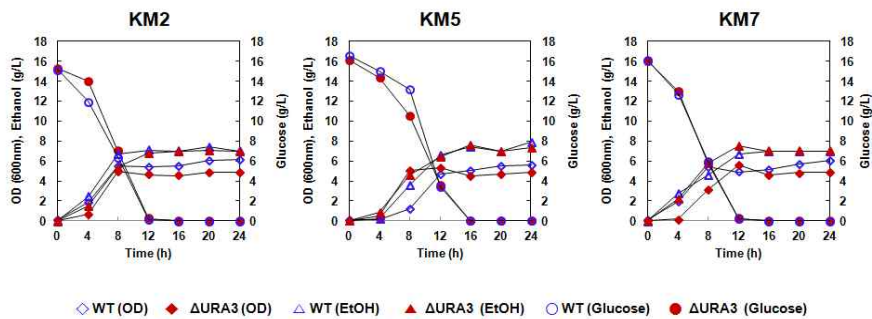
<그림. CAS9을 발현하고 사라지는 벡터(위)와 선택된 유전자에 대한 gRNA를 전사하는 벡터(아래)>

마. KM 균주 6종 wild type과 ura 요구성 균주에 대한 발효 profile 작성

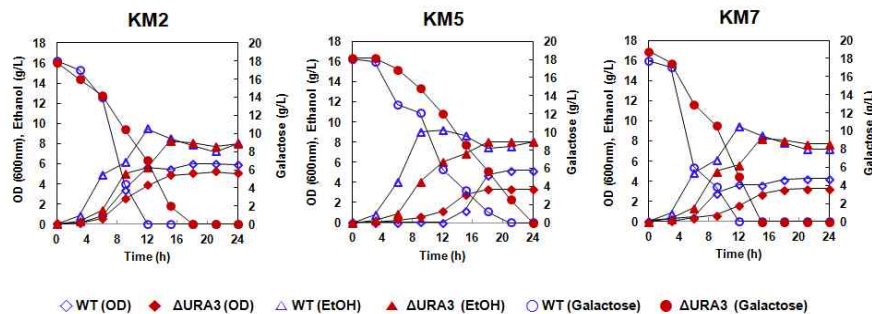
- KM 균주 6종 wild type과 ura 요구성 균주의 발효 profiling을 함으로써 각 균주의 pH 내성, 성장 속도, 생육 적정 온도 등을 토대로 KM관련 연구의 표본 확립
- KM균주 6종에 대해 각 조건에서 발효를 실시함 (그림)

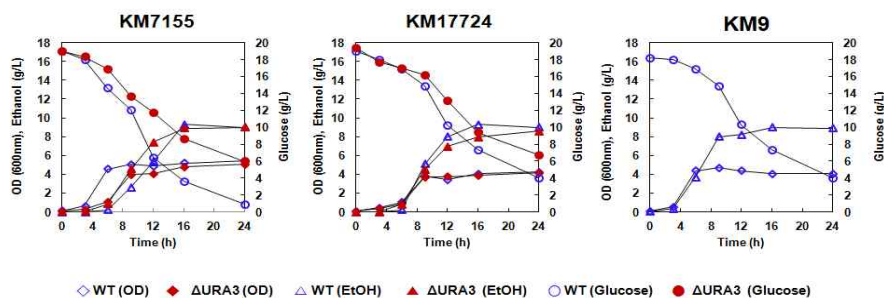
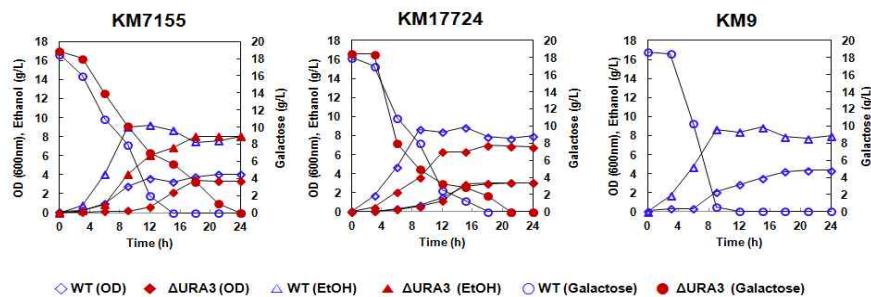


- Strain: *Klyuveromyces marxianus*_2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
 - Complex media (YP), Glucose (20g/L), 37°C, 100rpm
 - Aerobic condition, pH 7.0

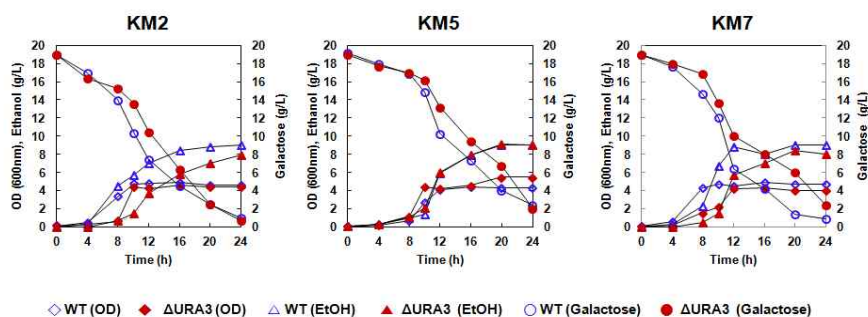


- Strain: *Klyuveromyces marxianus*_2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
 - Complex media (YP), Galactose (20g/L), 37°C, 100rpm
 - Aerobic condition, pH 7.0

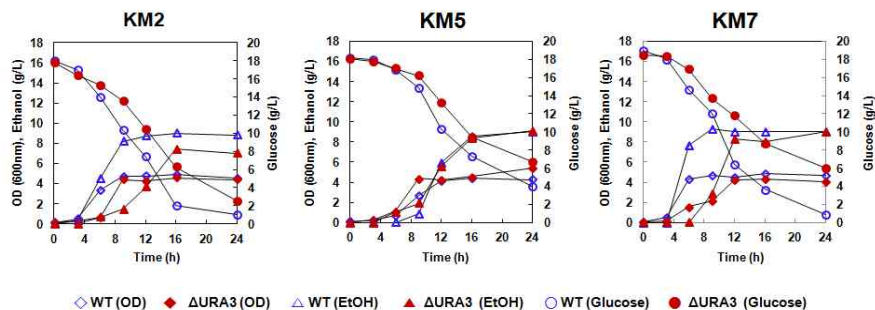


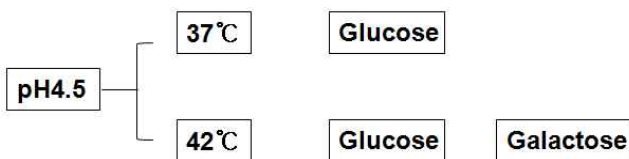
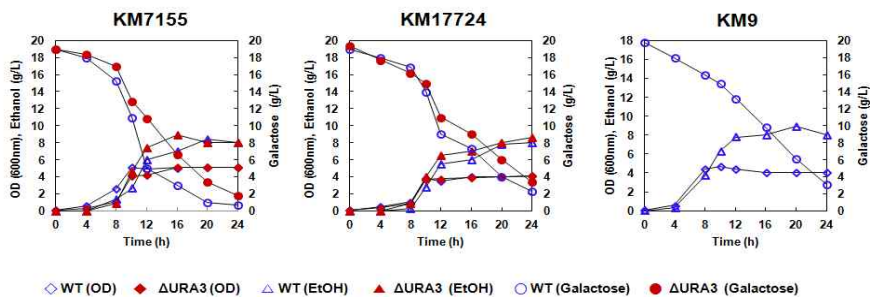


- Strain: *Klyuveromyces marxianus* _ 2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
 - Complex media (YP), Galactose (20g/L), 42°C, 100rpm
 - Aerobic condition, pH 7.0

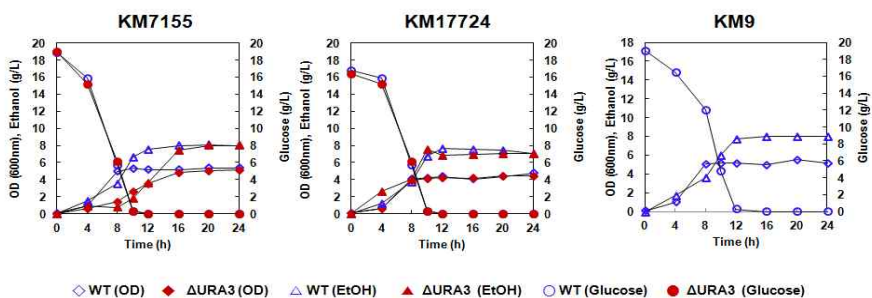
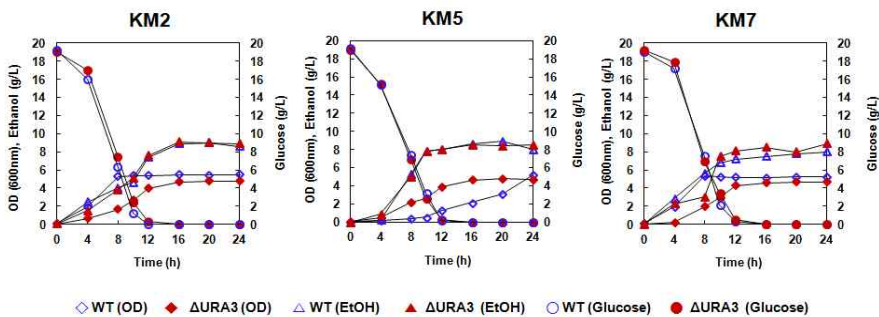


- Strain: *Klyuveromyces marxianus* _ 2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
 - Complex media (YP), Glucose (20g/L), 42°C, 100rpm
 - Aerobic condition, pH 7.0

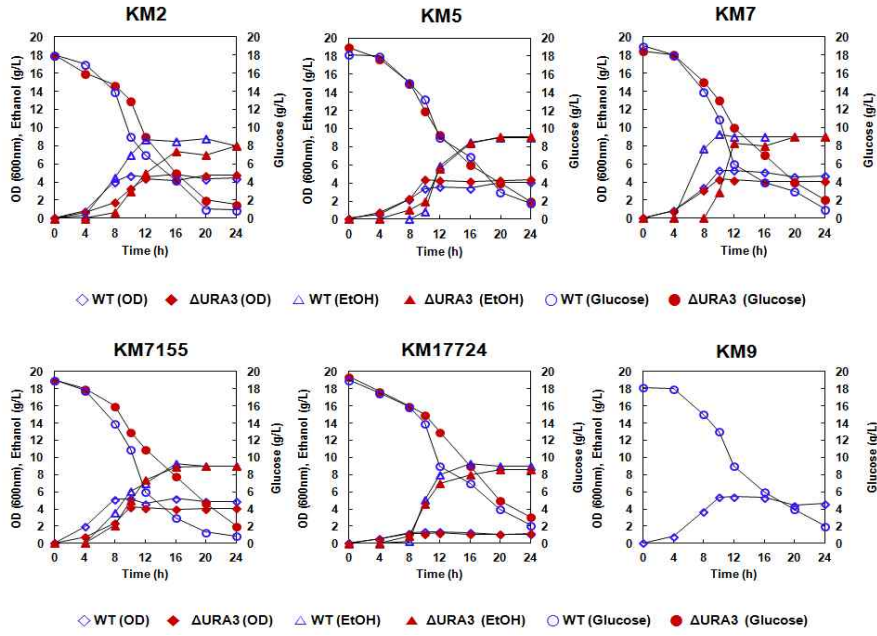




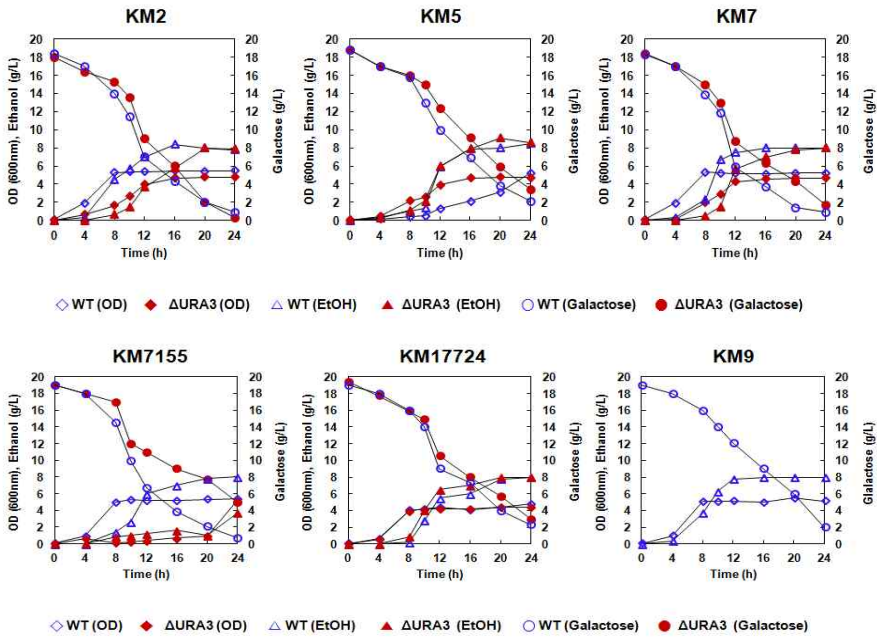
- Strain: *Kluyveromyces marxianus* _ 2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
- Complex media (YP), Glucose (20g/L), 37°C, 100rpm
- Aerobic condition, pH 4.5



- Strain: *Kluyveromyces marxianus* _ 2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
- Complex media (YP), Glucose (20g/L), 42°C, 100rpm
- Aerobic condition, pH 4.5



- Strain: *Kluyveromyces marxianus* _ 2, 5, 7, 7155, 17724, 7149
- Complex media (YP), Galactose (20g/L), 42°C, 100rpm
- Aerobic condition, pH 4.5

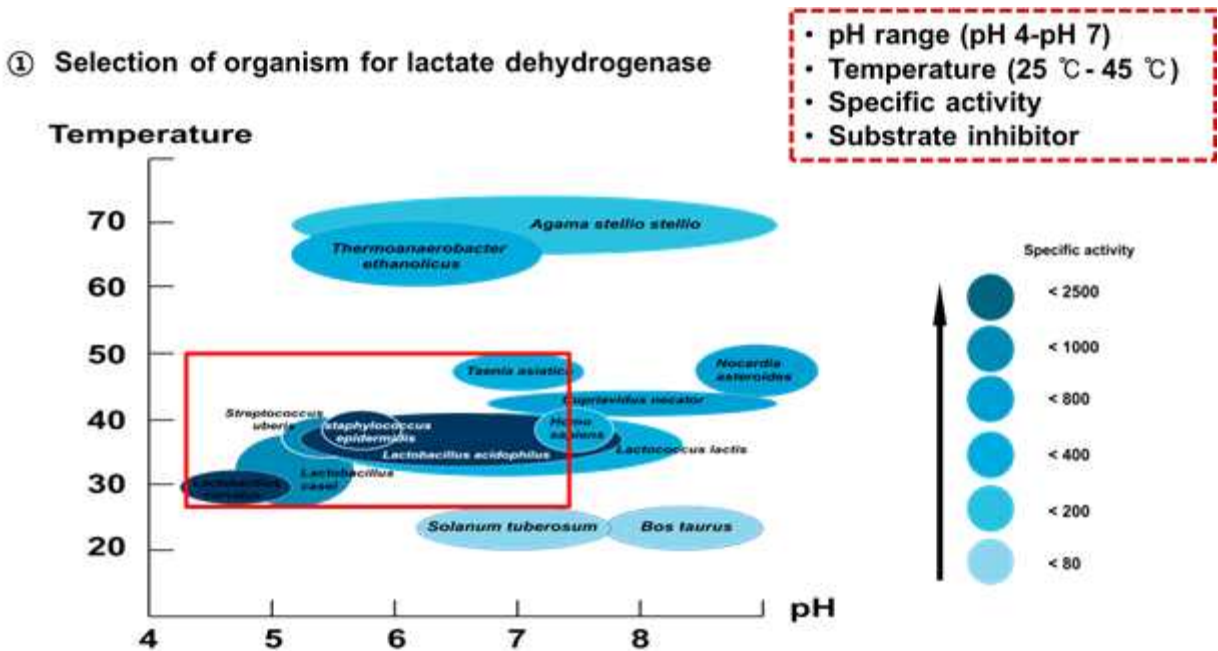


<그림. KM 균주별 발효 profile>

- KM5 균주는 다른 균주와 다르게 Δ URA 균주가 wild type보다 growth rate가 높았음
- KM5 균주를 제외한 나머지 균주는 URA 유전자를 deletion 하였을 경우 wild type 보다 growth rate가 떨어지는 특징을 보임

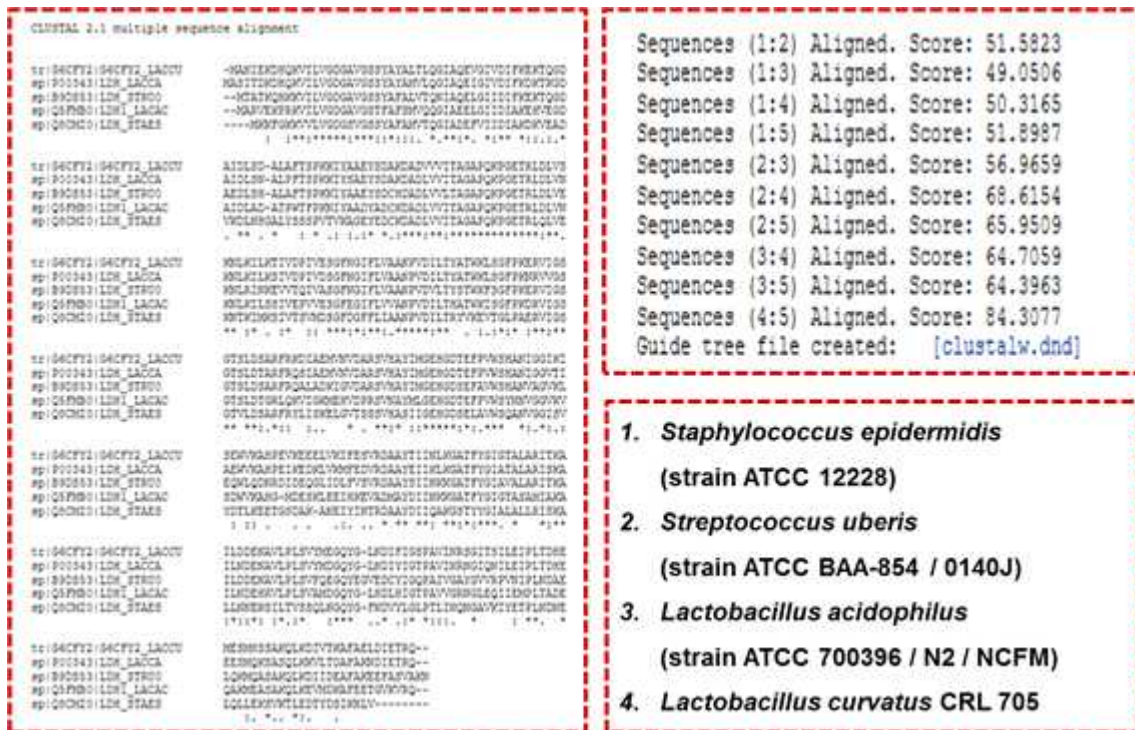
바. 내산성 Lactate dehydrogenases 유전자 탐색 및 선별

- 6 종의 KM 균주를 이용하여 내산성을 확인하였고, 이 후 내산성 Lactate dehydrogenases 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에 도입하기 위하여 다양한 생물체로부터 LDH 유전자를 탐색하였다.
- Lactate dehydrogenases 유전자 탐색의 기준은 pH 범위, 온도, specific activity, substrate inhibitor 등 4가지 항목으로 나누어 조사하였다. (아래 그림)



<그림. Lactate dehydrogenase 유전자 탐색>

- 4 종의 항목에 부합되는 균주들을 조사 하여 그림으로 작성한 결과 총 4-5 종의 균주를 선별하였다. 각 후보 균주는 *Staphylococcus Epidermidis* (Strain ATCC 12228), *Streptococcus Uberis* (ATCC BAA-854/014J), *Lactobacillus Acidophilus* (ATCC700396/N2/NCFM), *Lactobacillus Curvatus* CRL 705로 이들 균주가 가진 L형의 Lactate dehydrogenase 유전자를 추출하여 *Saccharomyces cerevisiae*에 도입하기 위하여 다음 실험을 진행하였다.(아래 그림)
- 각 4 종의 균주의 lactate dehydrogenases들은 1Kb 미만의 사이즈로 비슷하게 분포되어 있으며, 효모에서 보다 용이하게 유전자가 발현될 수 있도록 유전자 합성과정에서 codon optimization을 추가로 진행하였다. 유전자 합성을 진행하기 전 각 유전자들 서열의 alignment를 진행하였다.



<그림. 4 종의 유전자를 이용한 alignment>

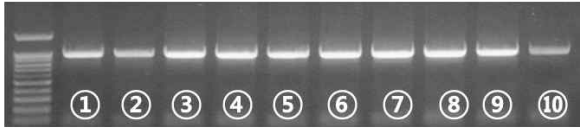
- 4 종의 유전자에 대한 alignment를 진행한 결과 49 %에서 64 %까지 유사한 것을 확인하였다. 각 각의 유전정보는 NCBI와 CLUSTRAW를 이용하여 검색하였으며, L형의 LDH와 D형의 LDH 중 L형의 LDH만을 검색하였다.

사. Lactate dehydrogenases 유전자 발현

- 유전자 합성을 위하여 각 유전자 서열에 제한효소를 첨가하였으며 5'말단에는 BamHI (GGATCC)를 3' 말단에는 SalI (GTCGAC)을 첨가해주었다. 각 유전자들은 pBluescript-SK(II) vector에 도입되었으며, DH5a에 유전자를 형질전환 후 이용하였다. 유전자들은 BamHI과 SalI 제한 효소를 이용하여 처리하였으며 agarose gel 정제를 통해 vector와 Insert를 각 각 제작하였다.
- KM7에 도입 이전에 각 유전자들은 *Saccharomyces cerevisiae*에 도입하여 발현을 확인하는 실험을 진행하였다. KM용 vector pJSLKM316GPD의 프로모터와 터미네이터가 pRS426GPD와 동일하므로 대조군으로 *Saccharomyces cerevisiae*에 먼저 유전자를 도입하여 확인실험을 진행하였다.
- *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환 후 각 유전자에 대한 특정 올리고머를 이용하여 PCR을 진행한 결과 유전자가 모두 존재하는 것을 확인하였다. 또한 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 진행한 결과 유전자가 정상적으로 발현되는 것을 확인하였다. (아래 그림)

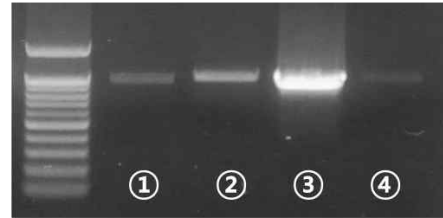
② Expression of Lactate dehydrogenase

Confirmation of transformants



- ①, ②: *Staphylococcus epidermidis* LDH
- ③~⑤: *Lactobacillus Curvurtus* LDH
- ⑥~⑧: *Lactobacillus Acidophilus* LDH
- ⑨, ⑩: *Streptococcus Uberis* LDH

Confirmation of mRNA level



- ① *Staphylococcus epidermidis* LDH
- ② *Lactobacillus Curvurtus* LDH
- ③ *Lactobacillus Acidophilus* LDH
- ④ *Streptococcus Uberis* LDH

<그림. Lactate dehydrogenase 유전자>

아. Lactate dehydrogenases engineering을 통한 LDH 유전자 개량

- LDH 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에 도입하여 Lactic acid 생산을 하는 것 외에 LDH 유전자 개량을 통하여 보다 많은 양의 기질을 이용하여 효율을 높일 수 있는 방법을 찾아보고자 하였다. LDH 유전자는 피르부산을 기질로 하여 NADH와 반응 후 lactate를 생산하는 것이 일반적이다. 그러나 고농도의 피르부산에 노출된 경우 반응이 진행되지 않는 문제점이 남아있다. 따라서 이러한 문제점을 해결한다면 고농도의 기질을 넣어주어도 지속적으로 lactate를 생산할 수 있다. 본 연구진은 이러한 점에 착안하여 KM에 균주에 적용한다면 SC 균주의 내산성을 높이는 것뿐만 아니라 LDH의 기질 저해 문제를 해결하여 결과적으로 더 많은 양의 lactic acid를 생산할 수 있을 것이라 예상한다.
- 기질 저해를 해결하는 대표적인 방법은 아미노산 치환을 통하여 성질을 변화시키는 것으로 Site-direct mutagenesis 방법이 가장 많이 이용되고 있다. 본 연구진은 이 방법을 적용하기 위하여 각 LDH 유전자에 영향을 줄 수 있는 아미노산을 탐색하였다. (아래 그림)

③ Regulation of substrate inhibition

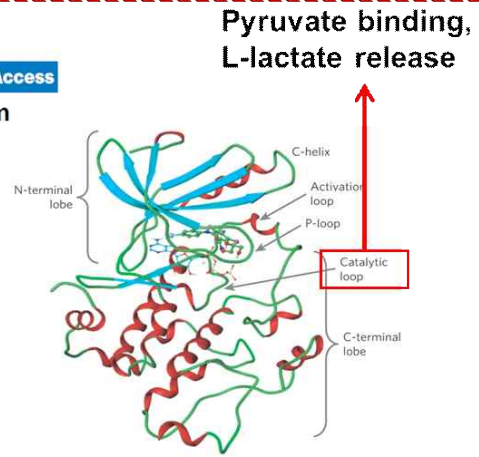
Research

Open Access

Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export

Paola Branduardi¹, Michael Sauer^{2,3}, Luca De Gioia¹, Giuseppe Zampella¹, Minoska Valli^{2,3}, Diethard Mattanovich^{2,3} and Danilo Porro^{*1}

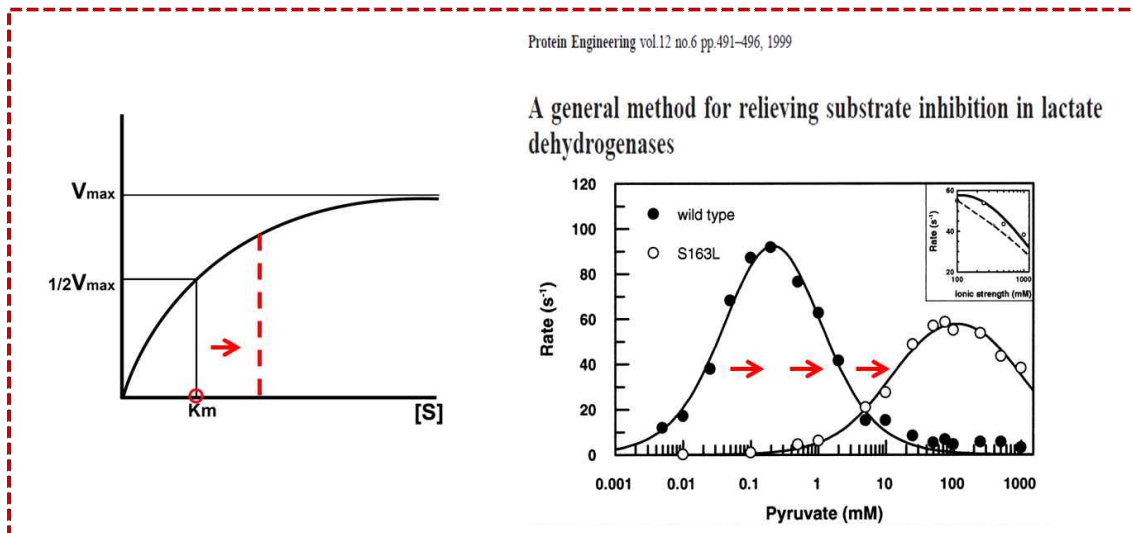
Strains	plasmid	LDH (source)	Lactate (mg l ⁻¹)	EtOH (mg l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹)	LDH activity (U mg ⁻¹)	LDH Km (mM)
W303-1A	pB1	<i>B. taurus</i>	20	6430	0.0010	0.4	1.00 [19]
CEN.PK	pB1	<i>B. taurus</i>	140	6340	0.0070	0.5	1.00
GRF18U	pB1	<i>B. taurus</i>	801	5750	0.0401	0.6	1.00
MB11	pLCS	<i>L. casei</i>	200	6110	0.0100	Nd	10.00 [19]
GRF18U	pB1; pB2	<i>B. taurus</i>	950	5730	0.0475	0.7	1.00
GRF18U	pB1; pB2; pB3	<i>B. taurus</i>	1100	5648	0.0550	0.8	1.00
GRF18U	pBST2	<i>B. stearotherm.</i>	128	6310	0.0064	0.6	0.03 [19]
GRF18U	pBME2	<i>B. megaterium</i>	1371	5672	0.0686	0.7	Nd
GRF18U	pLCS	<i>L. casei</i>	4160	4270	0.2080	5.5	10.00
GRF18U	p022TLP	<i>L. plantarum</i>	6150	3730	0.3075	3.2	1.50 (this study)



- Determination of amino acid residue for amino acid substitution.

✓ **Asn 108** → Asp, Gly, Lys, His, Ala

③ Regulation of substrate inhibition



- Determination of amino acid residue for amino acid substitution.

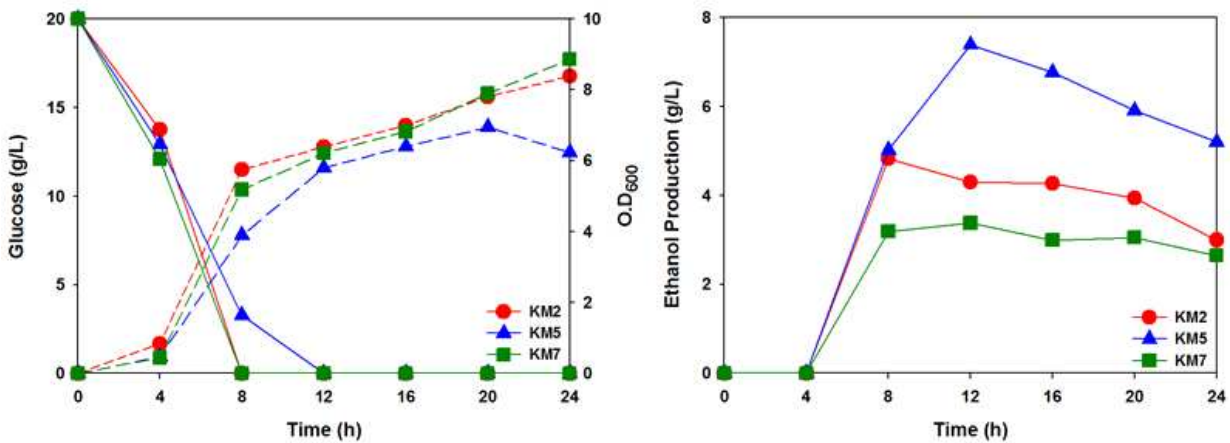
✓ **Ser 163** → Leu

<그림. Substrate inhibition>

3. Lactic acid 생산을 위한 내산성 KM 선별

가. 내산성 *Huyveromyces marxianus* (KM) 제조를 위한 균주 선별

- KM wild type 균주들 중 내산성 균주 제조에 적합성을 가진다고 판단 된 KM2, KM5, KM7 3종의 균주에 대해 발효 profile을 작성하였다. 발효는 250mL 플라스크에서 50mL scale로 진행하였고, YP broth에 glucose 20g/L, 동일한 initial OD로 진행하였다 (아래 그림).

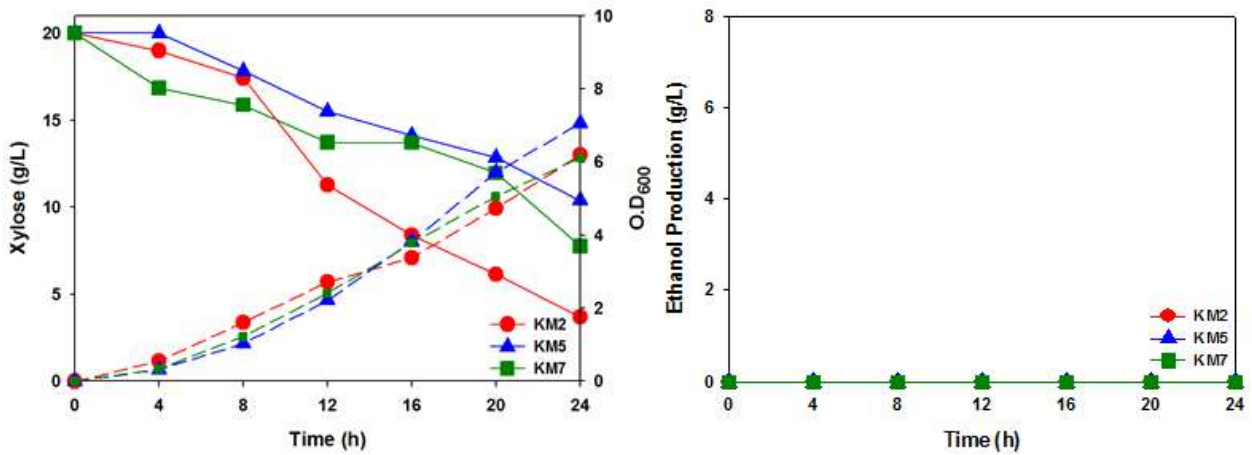


<그림. KM2, KM5, KM7 발효 profile>

- KM2, KM5, KM7균주는 8~12 시간 안에 넣어준 glucose를 모두 섭취하였으며, KM2, KM7 균주가 KM5 보다 비교적 당을 빠르게 소모하고 growth가 높게 나타났다. 또한, 에탄올 생산량도 마찬가지로 KM2, KM7 균주가 KM5 보다 약 2g/L정도 적게 측정되었다.
- 효모의 대표적인 특징인 에탄올 생산능은 lactic acid 생산을 저해 할 수 있기 때문에, ethanol 생산능이 비교적 낮은 KM2, KM7 균주가 lactic acid 생산에 적합하다고 판단하였다.

나. 내산성 KM 제조를 위한 균주 선별과 xylose 소모

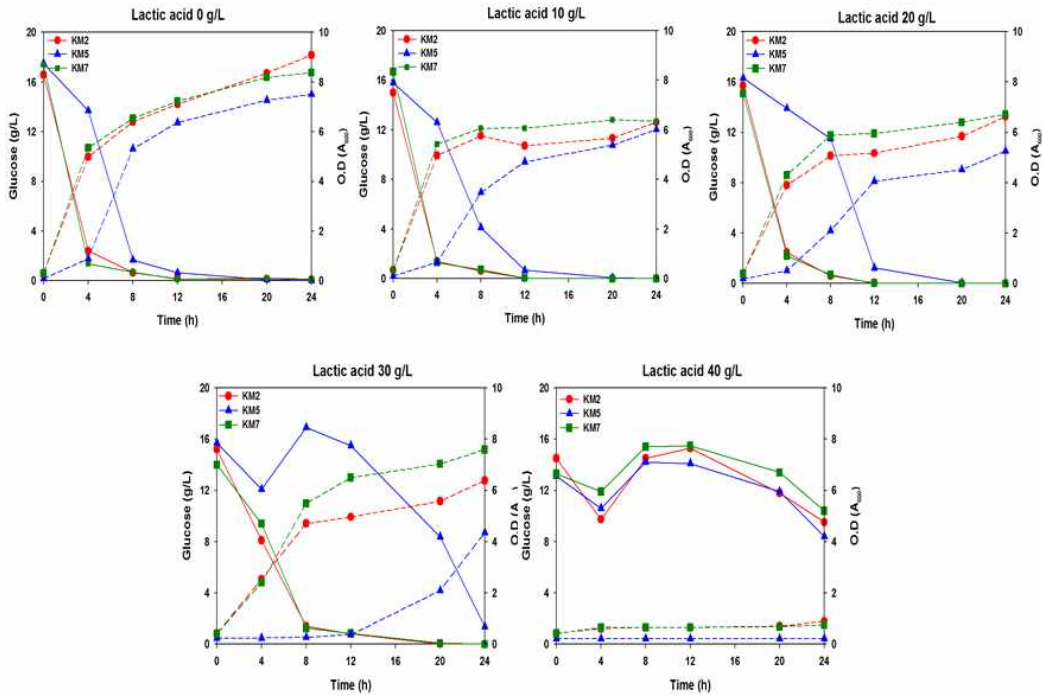
- KM 균주의 경우 일반적으로 사용하는 SC 균주가 활용하지 못하는 xylose를 carbon source로 사용할 수 있다. 또한 xylose를 사용하여 성장할 경우 glucose 보다는 생장이 느리지만 ethanol 생산량이 현저하게 감소하였다. 발효는 250mL 플라스크에서 50mL scale로 진행하였고, YP broth에 xylose 20 g/L, 동일한 initial OD로 진행하였다.
- Xylose 발효의 경우 3종의 균주가 xylose를 활용하긴 하지만 glucose에 비해 소모가 늦고 장시간 발효를 하여도 xylose를 다 소비하지 못하며, growth가 미량 감소한다는 결과를 얻었다. 그러나 3종류 균주 모두 ethanol 생산이 검출되지 않았다(아래 그림).



<그림. KM2, KM5, KM7 xylose 발효 profile>

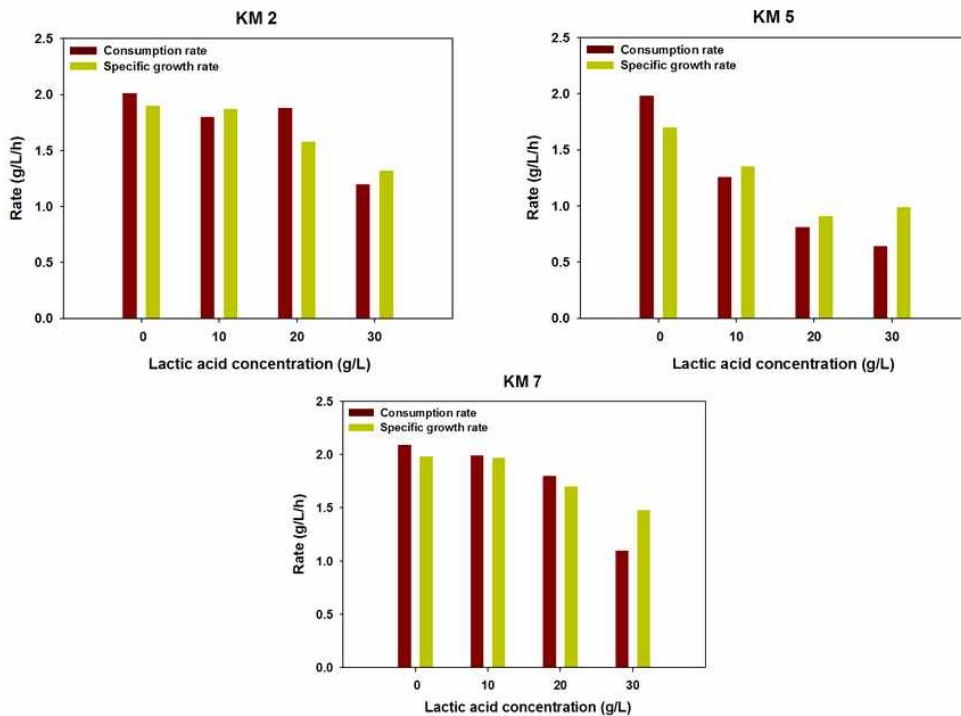
다. KM 균주의 pH tolerance

- 효모를 이용한 lactic acid 발효 과정에서 pH 감소로 인한 생장률 저하를 확인하였다. Lactic acid 본연의 pH가 매우 낮기 때문에, lactic acid를 지속적으로 생산하려면 pH에 대한 내성이 매우 중요한 변수이다. 따라서 각각의 배지에 lactic acid 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L를 첨가하여 실험을 수행하였다. Lactic acid를 첨가하지 않은 대조군은 배지의 pH가 6.95로 측정되었고, 10g/L의 lactic acid를 처리하였을 경우 3.52, 20g/L의 경우 3.11, 30g/L의 경우 2.92, 40g/L의 경우 2.78의 측정값을 얻었다. 10 g/L 이상의 lactic acid를 처리하였을 경우 순차적으로 carbon source의 흡수율이 일정량씩 감소하는 것을 보였고, 40g/L의 lactic acid를 처리하였을 경우에는 carbon source를 섭취하지 못하여 자라지 못하는 현상을 관찰하였다(아래 그림).



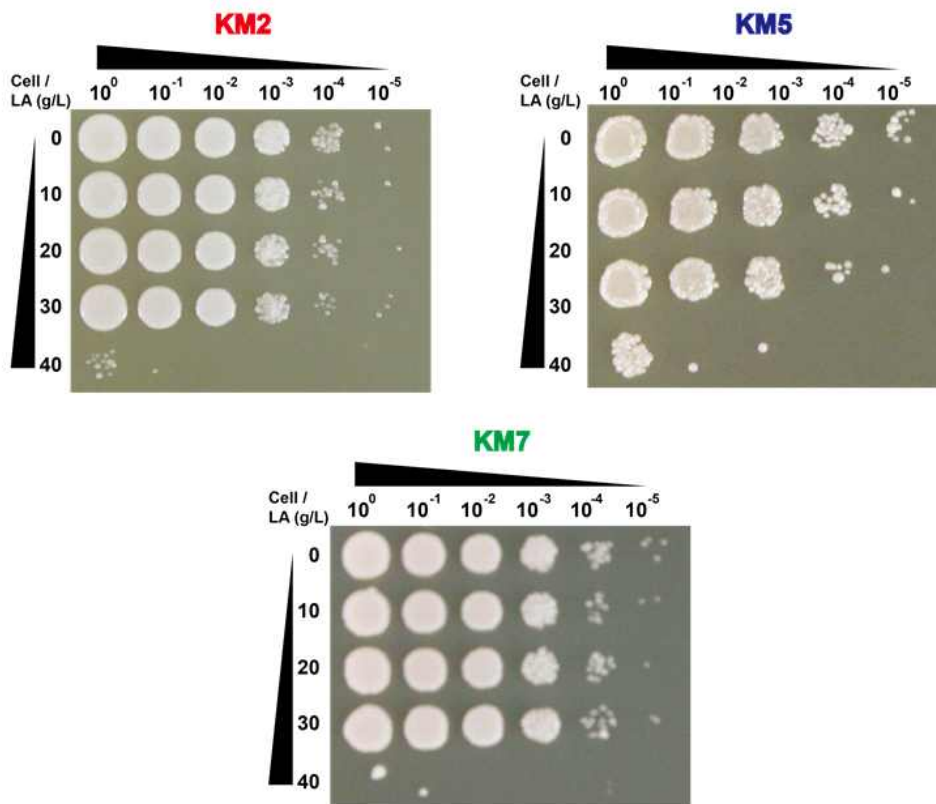
<그림. KM2, KM5, KM7의 pH tolerance>

○ KM2, KM5, KM7 각 균주별 pH tolerance 역시 차이가 나타났다. Lactic acid 투여량 별 glucose에 대한 consumption rate(g/L · h)와 growth rate(g/L · h)를 산출하였다(아래 그림).



<그림. KM2, KM5, KM7의 pH tolerance>

- 30g/L 의 Lactic acid가 존재할 경우 (pH 2.92), KM2, KM5, KM7의 glucose consumption rate는 순서대로 1.20g/L · h, 0.64g/L · h, 1.10g/L · h 로 측정되었다. 또한 30g/L 의 Lactic acid가 존재할 경우 (pH 2.92), KM2, KM5, KM7의 specific growth rate는 순서대로 1.32g/L · h, 0.99g/L · h, 1.48g/L · h 로 측정되었다. 실험 결과 KM2 > KM7 > KM5의 순으로 낮은 pH에서도 tolerance를 가지고 있다고 판단하였다.
- 위의 실험을 replica를 이용하여 재차 확인하였다(아래 그림).



<그림. KM2, KM5, KM7의 pH tolerance>

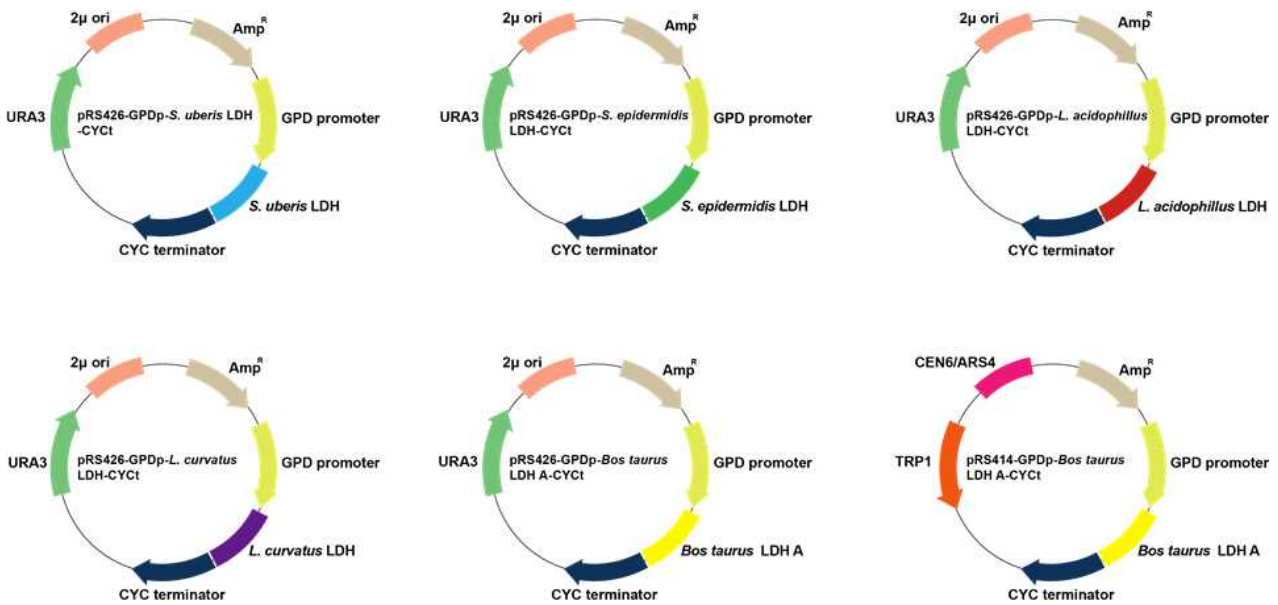
4. KM 균주를 이용한 lactic acid 생산

가. KM5 ΔURA 균주에 형질도입하기 위한 LDH 유전자의 codon optimization

- 본문 1절에 명시된 *staphylococcus epidermidis* (Strain ATCC 12228), *streptococcus uberis* (ATCC BAA-854/014), *lactobacillus acidphilus* (ATCC700396/N2/NCFM), *lactobacillus curvatus* CRL 705 유래의 LDH 유전자를 KM에 도입하기 위해 codon optimization 하였다. 추가로, SC 균주에서 lactic acid에 탁월한 성능을 보인다고 보고된 바 있는 *bos taurus* 유래의 LDH 유전자 (Nobuhiro Ishida et al., 2005) 도 codon optimization 하였다.

나. LDH 유전자 5종의 pRS426 vector 도입

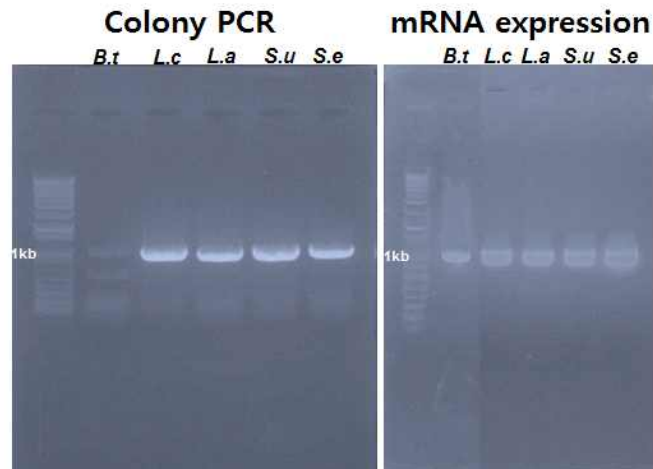
- 합성한 유전자의 cloning을 위하여 각 유전자 서열에 제한효소를 첨가한 primer를 작성하였다. 5'말단에는 BamHI (GGATCC)를 3' 말단에는 SalI (GTCGAC)을 첨가해주었다. 각 유전자들은 pBluescript-SK(II) vector에 도입되었으며, DH5α에 유전자를 형질전환 후 이용하였다. 유전자들은 BamHI과 SalI 제한 효소를 이용하여 처리하였으며 agarose gel 정제를 통해 vector와 Insert를 각각 제작하였다. 제작한 insert는 다시 pRS426 GPD 벡터로 옮겨 효모에서 사용가능하도록 하였다.



<그림. pRS426 GPD LDH vectors >

다. LDH 유전자가 도입된 KM5 ΔURA 균주 제조

- 나. 절에서 구축된 pRS426 GPD LDH 벡터의 GPD 프로모터-LDH 유전자-CYC 터미네이터-scURA3 부분을 PCR을 통해 증폭한 뒤 KM5 ΔURA 균주의 chromosome 상에 integration 하였다. 형질도입은 lithium acetate 방법으로 competent cell을 만든 후 DNA fragment를 전기천공법으로 삽입하였다(아래 그림).

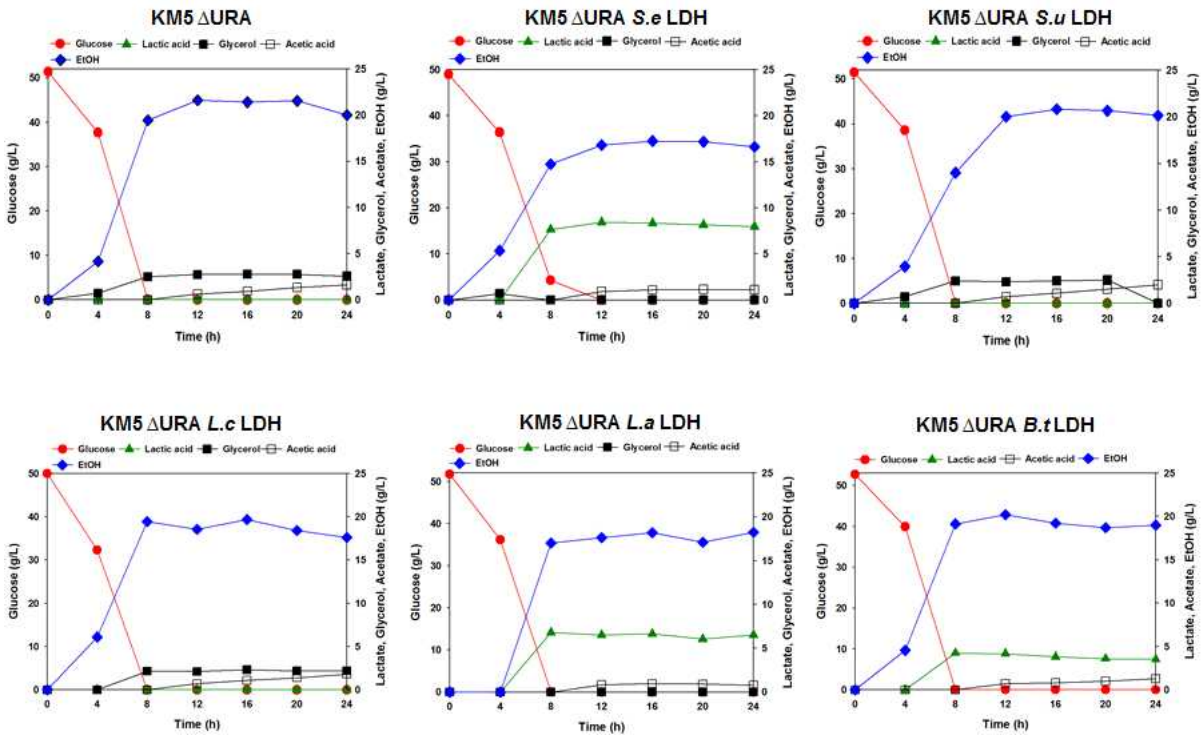


<그림. LDH 유전자 도입과 전사>

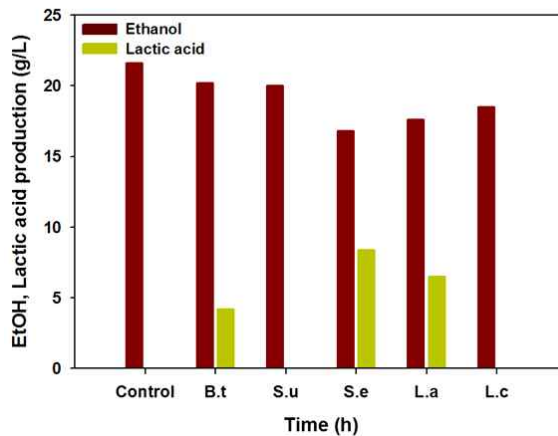
- 전기천공법으로 KM5 Δ URA 균주 chromosome 상에 삽입된 5종의 유전자를 해당 LDH sequence에 맞는 confirm primer를 이용해 확인하였다. 이 후, mRNA 전사가 이루어지는 지도 확인하였다.

라. LDH유전자가 도입된 KM5 Δ URA 균주 발효

- 5종의 LDH 유전자가 도입된 KM5 Δ URA 균주 5종을 250mL 플라스크에서 50mL의 YP broth에 50g/L의 glucose를 첨가하여 발효를 수행하였다. Initial OD는 1로 맞추었다.
- Glucose, lactic acid, glycerol, acetic acid, ethanol 모두 HPLC 기기를 통해 검량하였다. Column은 유기산 컬럼 (HPX-87H)을 이용하였고, 0.01N H₂SO₄ 이동상을 50℃에서 0.5mL/min의 유속으로 흘려주었다. Reflective Index detector를 이용하여 정량하였다.
- LDH 유전자가 삽입된 5종의 균주 중 3균주에서 lactic acid가 생산되었다. KM5 Δ URA S.e LDH 균주가 8.4g/L로 가장 많은 생산량을 보였고 KM5 Δ URA L.a LDH가 6.5g/L, KM5 Δ URA B.t LDH가 4.2g/L의 lactic acid를 생산하였다. 이외에 KM5 Δ URA S.u LDH, KM5 Δ URA L.c LDH균주에서는 lactic acid가 검량되지 않았다(아래 그림).
- 1-나 절의 pH tolerance 결과에서 lactic acid가 존재하는 상황에서 KM5균주는 glucose consumption과 specific growth rate가 감소하는 것을 보았다. KM5 Δ URA 균주에 LDH 유전자가 삽입되어 lactic acid를 생산한 균주들 역시 같은 경향성을 보였다. KM5 Δ URA S.e LDH, KM5 Δ URA L.a LDH, KM5 Δ URA B.t LDH 균주들 모두 growth가 감소한 것을 확인하였고, 이중 KM5 Δ URA S.e LDH 균주는 glucose consumption이 감소하는 것을 관찰하였다.



<그림. LDH 유전자가 도입된 KM5 ΔURA 균주의 발효 profile>



<그림. Lactic acid, ethanol>

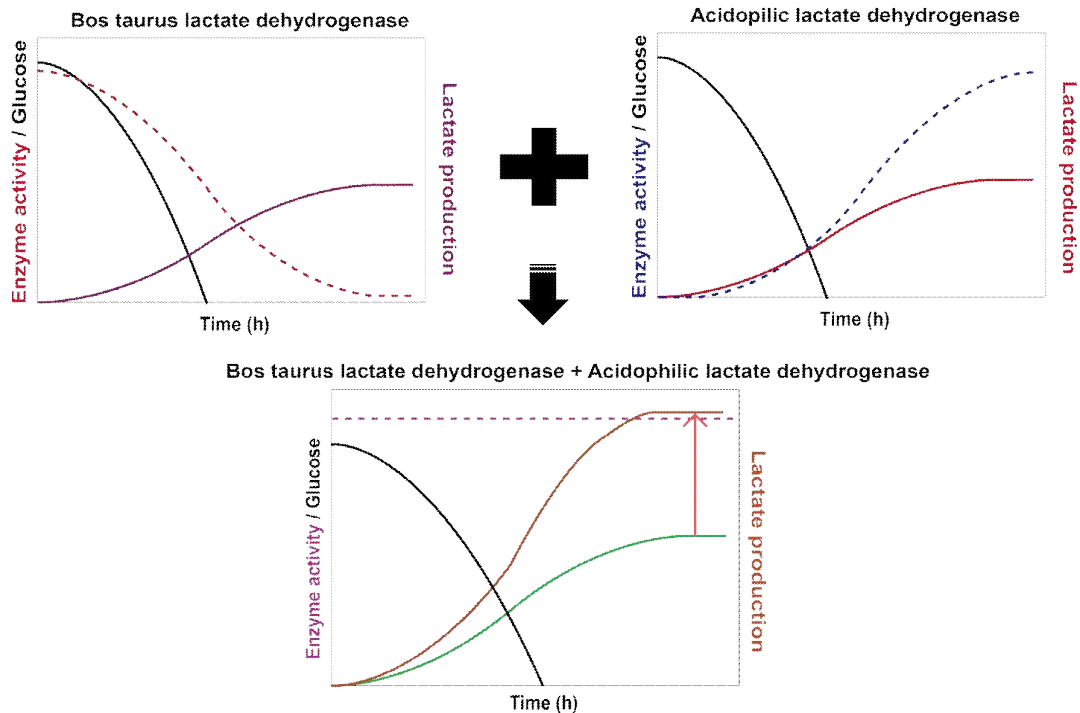
5. LDH 유전자 Multiple integration에 의한 synergy effect

가. LDH 유전자의 다중 도입으로 인한 Lactic acid 생산 향상 효과

- 아래 그림과 같이 최적 pH와 온도가 각기 다른 종 유래의 LDH 유전자들을 co-transformation 한다면, lactic acid 생산에 있어 상호보완적인 synergy effect를 얻을 수

있을 것이다.

lactate production ↑



<그림. LDH 유전자가 다중도입된 균주의 lactic acid 생산 예상도>

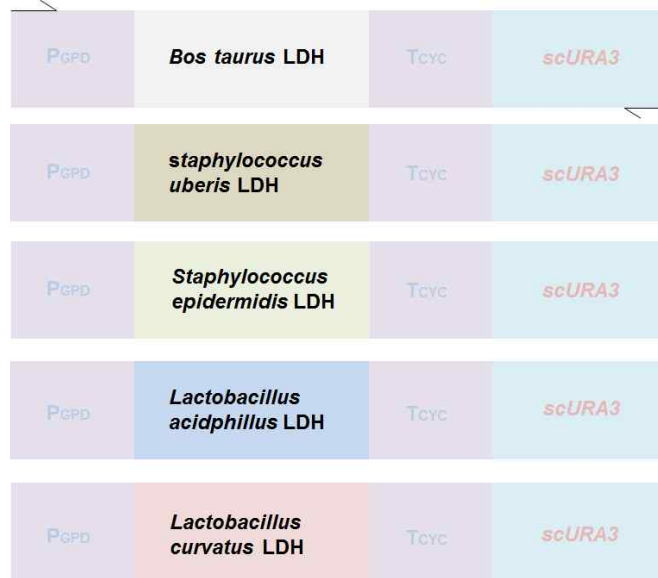
- 일반적으로 Bos taurus 유래의 LDH 유전자를 효모에 도입하여 Lactic acid를 생산하는 선행 연구 결과들이 보고되어 왔다. 그러나, Bos taurus 유래의 단일 LDH 유전자 (최적 pH 7-8) 만을 도입할 경우 발효 과정 중에 Lactic acid의 생산에 따른 발효 배지의 pH가 감소함에 따라 LDH의 활성이 떨어지는 문제점이 발생하게 된다. 따라서, 최적 pH와 온도 조건이 다른 LDH (내산성 균주 유래의 LDH, 최적 pH 4-6)을 다중 도입한 균주의 제작을 목표로 하였다. LDH 유전자를 다중 도입한 균주의 기대효과는 발효 과정 중 배지의 pH가 감소함에 따라 LDH의 활성이 감소하는 문제점이 최적 pH가 서로 다른 LDH의 시너지 효과로 인하여 개선될 것으로 예상된다. 따라서, 지속적으로 LDH 유전자의 활성이 유지되어 전체적인 Lactic acid 생산량이 향상 될 것으로 생각 된다 (그림).

나. LDH 유전자가 다중 도입된 균주 제작

- KM균주는 DNA repair 기작 중 homologous recombination 작용보다 non-homologous end joining 작용이 월등하게 높은 비율로 일어난다. 이런 특징 때문에, 여러 가지의 DNA 조각을 chromosome 상에 삽입할 수 있다 (Heo P et al., 2013).
- 1-가 절에 그림 1과 같이 optimal pH와 온도가 각기 다른 5가지 종 유래의 LDH 유전자들

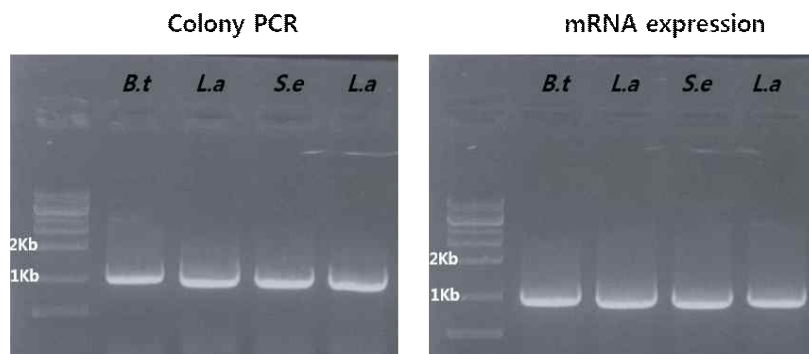
을 co-transformation 한다면, lactic acid 생산에 있어 상호보완적인 synergy effect를 얻을 수 있을 것이다.

- 앞서 구축한 pRS426 GPD LDH 벡터 시스템에서, GPD promoter부터 scURA3 부분까지의 DNA 조각을 PCR 기법을 사용해 제작하였다 (그림 23).



<그림 23. 다중 도입을 위한 유전자 조각>

- 단일 LDH 유전자 중, lactic acid의 생산이 확인되었던 B.t LDH, S.e LDH, L.a LDH 3종의 유전자 조각을 co-transformation 진행하였다. 그 결과, B.t + L.a LDH 조합, S.e + L.a LDH 조합이 integration 된 KM5 ΔURA 균주를 선별했다 (그림 24).

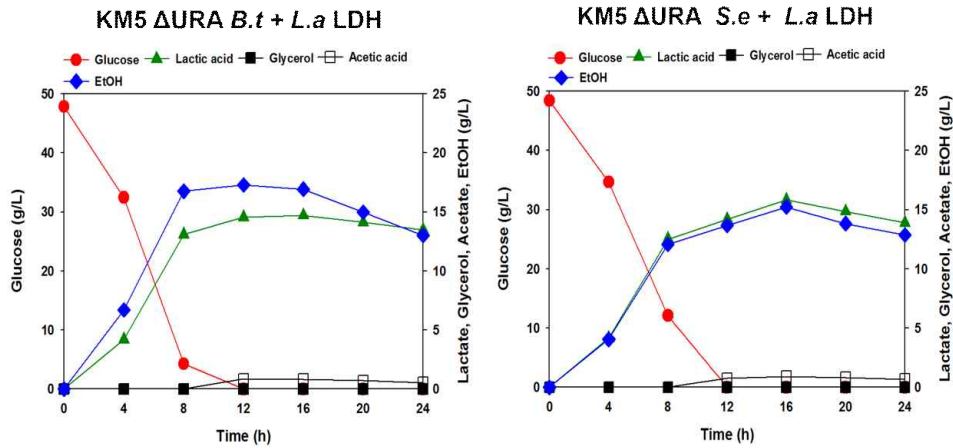


<그림 24. LDH 유전자가 다중 도입된 KM5 ΔURA 균주 선별>

다. LDH 유전자가 다중 도입된 균주 발효

- B.t + L.a LDH 조합과 S.e + L.a LDH 조합이 integration 된 KM5 ΔURA 균주 2종을 단일 LDH 유전자가 도입된 균주와 동일한 조건으로 발효를 수행하였다. 그 결과, 50 g/L

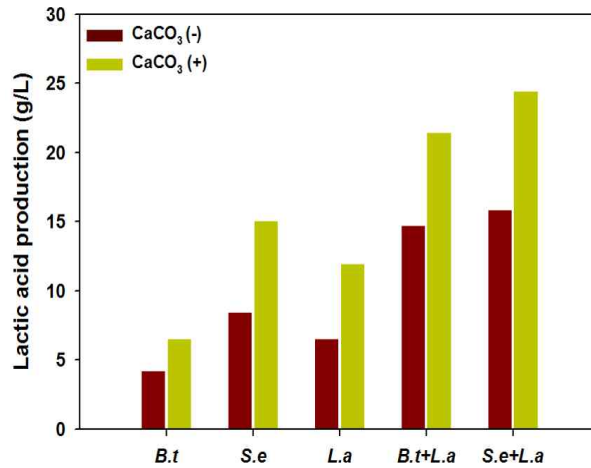
glucose 조건 하에서 B.t + L.a LDH 의 경우 14.7 g/L, S.e + L.a LDH 의 경우 15.8 g/L Lactic acid가 생산되었다. 상기의 결과는 단일 LDH 유전자가 도입된 KM5 ΔURA S.e LDH 균주 대비 1.8, 1.9 배, KM5 ΔURA L.a LDH 균주 대비 2.2, 2.3 배, KM5 ΔURA B.t LDH 균주 대비 3.4, 3.7 배 향상된 결과이다 (그림 25).



<그림 25. LDH 유전자의 다중 도입 KM5 ΔURA 균주의 발효 profile>

라. 중화제 첨가 (35g/L CaCO₃) 조건에서 LDH 유전자의 다중 도입 균주 발효 (Low cell)

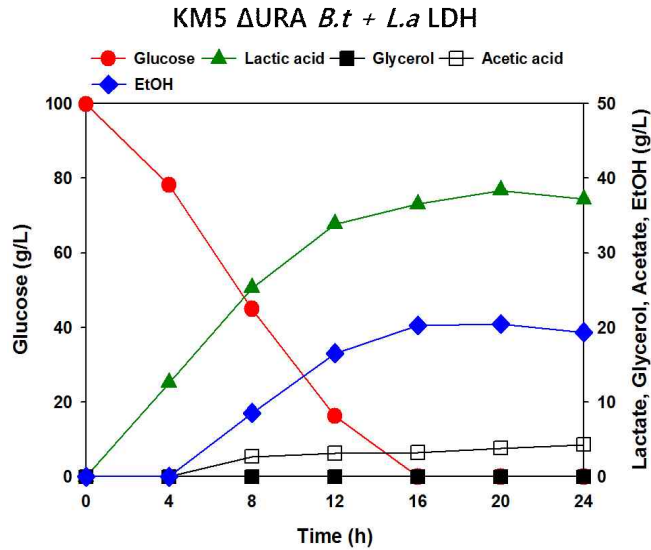
- 그림과 같이 최적 pH 조건이 다른 LDH 유전자의 다중 도입 균주가 단일 LDH 유전자의 도입 균주에 비해 Lactic acid 생산이 향상 되는 것을 확인하였다. 그렇다면, 최적 pH 조건이 다른 LDH 유전자의 다중 도입이 Lactic acid 생산 과정에서 중화제 첨가의 필요성을 상쇄 시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해 50 g/L glucose 배지 조건에 35g/L CaCO₃ 를 첨가하여 실험을 진행하였다. 접종해준 균주의 Initial O.D는 기존의 발효 실험과 동일하게 1로 맞추어서 진행하였다 (low cell).
- LDH 유전자가 다중 도입된 KM5 ΔURA 균주와 중화제 첨가 조건에서 LDH 유전자가 단일 도입된 KM5 ΔURA 균주의 Lactic acid 생산량을 비교하는 실험을 진행하였다. KM5 ΔURA B.t + L.a LDH, KM5 ΔURA S.e + L.a LDH 균주 2종 (14.7, 15.8 g/L) 모두 중화제가 첨가된 조건에서 발효를 진행한 단일 LDH 유전자 도입 균주 (B.t-6.5 g/L, S.e-15.0 g/L, L.a-11.9 g/L) 대비 상응하거나 보다 향상된 Lactic acid의 생산량을 나타내었다 (그림 26). 상기의 결과를 통해 최적 pH 조건이 다른 LDH 도입으로 Lactic acid 생산 과정에서 중화제 처리의 필요성을 상쇄하는 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.



<그림 26. 중화제 처리 전·후 LDH 도입 균주의 Lactic acid 생산 비교>

마. 중화제가 첨가된 고농도 Glucose (100 g/L) 조건에서 LDH 유전자의 다중 도입 균주 발효 (High cell)

- 50 g/L glucose 배지 조건에 35 g/L CaCO₃ 를 첨가하여 균주의 Initial O.D를 1로 맞추어서 실험을 진행하였다 (low cell). LDH 유전자의 다중 도입 균주 (KM5 ΔURA B.t + L.a LDH)의 산업적 가치를 평가하기 위해 고농도의 glucose 조건 (100 g/L)에 중화제를 첨가하여 250mL 플라스크에서 24h 발효 후 Lactic acid 생산을 확인하였다. 이때, Initial O.D는 기존의 Initial Cell 농도 보다 10배 농축된 10으로 맞추어서 실험을 진행하였다 (High cell).
- 다중 도입 균주의 경우 고농도의 Glucose를 16h 에 모두 이용하였으며, 38.4 g/L Lactic acid가 생산되었다. 이때, Ethanol의 생산량은 20.4 g/L 였다. 중화제가 첨가된 50 g/L glucose 배지조건에서 발효하여 생산된 Lactic acid (B.t+L.a - 21.4 g/L, S.e+L.a-24.4 g/L) 보다 고농도의 glucose (100 g/L)를 이용한 결과가 더 향상된 Lactic acid 생산량 (B.t+L.a - 38.4 g/L) 을 보였다 (그림 27). 상기의 결과를 통해 형질전환으로 제작된 다중 도입 균주가 초기 High cell 조건에서 고농도의 Glucose를 16h 안에 모두 소모하여 약 40 % 전환율로 Lactic acid를 생산하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나, 중화제가 첨가 된 (35 g/L CaCO₃) 50 g/L glucose 배지 조건의 결과 (약 50% 전환율)보다는 낮은 효율을 보였다. 예상되는 원인은 생산되는 Lactic acid의 양이 50 g/L glucose 조건에 비해 크게 증가함에 따라 동일한 양의 중화제가 첨가된 조건에서 배지의 pH가 상대적으로 크게 낮아지는 것을 확인하였다 (50 g/L glucose- Final pH: 6.2, 100 g/L glucose- Final pH: 4.7). 따라서, 낮아진 배지의 pH로 인해서 균주의 성장이 저해를 받음에 따라 상대적으로 낮은 Lactic acid 생산 효율을 보인 것으로 판단한다.



<그림. 고농도 Glucose 조건에서 LDH 유전자 다중 도입 균주 발효 Profile>

6. Crabtree Negative 효모 기반 LA 생산 균주 개발

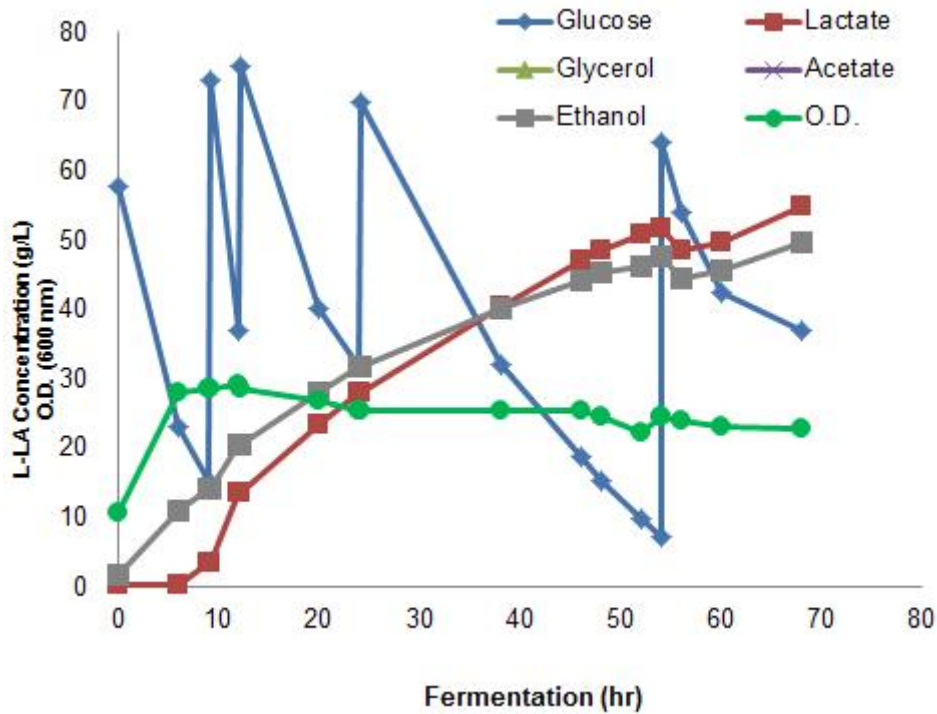
가. Genome 정보 및 시스템생물학 기법을 이용한 내산성 균주 특성 유전자 발굴

(1) KM 균주의 바이오인포매틱스 기반 추가 LDH 도입

- 제작된 내산성 KM 균주에 추가적으로 바이오 인포매틱스 기술을 이용하여 공개된 Genome 데이터로부터 Low pH 에 가장 활성이 좋은 것으로 예측되는 *Rattus norvegicus*; 집쥐, *Tursiops truncatus*; 병코 돌고래 기반 LDH를 KM에 도입하여 SAIT_LA01 (LDH(*Rattus norvegicus*) 도입), SAIT_LA02 (LDH(*Tursiops truncatus*) 도입) 균주를 제작하였다.

(2) KM 균주의 Low pH LA 발효 공정 개발 (pH 3.5 이하)

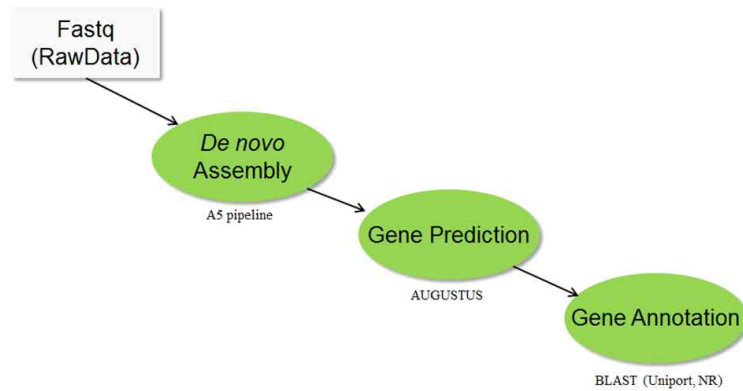
- 제작된 SAIT_LA01 의 Low pH 에서의 생산성을 확인하기 위해 발효 공정 개발을 통한 최적화를 수행하였다.
- 그 결과, pH 3.5에서 발효 공정 최적화를 통해 최종 LA 51.7 g/L, 수율 32.5%를 얻었다. (L-lactic acid 농도 51.7 g/L, 생산성 0.96 g/L/h, 수율 32.5% at 54 h (batch, *Rattus norvegicus*; 집쥐 LDH))



<그림. Rattus norvegicus; 집쥐 LDH 를 도입한 KM의 유가식 발효 결과>

(3) 추가 Crabtree Negative 효모 스크리닝을 통한 내산성 LA 균주 제작

- 내산성 효모균주 screening : LA 생산을 위한 내산성 효모를 선별하기 위해, 기존에 내산성이 보고된 효모 21종류에 대해 pH 2.8에서 2일동안 배양한 후 성장을 측정하였다. 그 결과 가장 높은 성장을 보인 균주를 SAIT-7 균주로 명명하였고 이를 LA 생산 균주로 engineering 하였다.
- 효모 중 내산성 후보 SAIT-7 의 genome 분석 진행 : SAIT-7 균주에 대하여 genome 정보로부터 내산성 균주 특성 유전자를 발굴하기 위해 genome sequencing 및 annotation 작업을 수행하였다. Sequencing 및 2 번의 annotation 과정을 통해 아래와 같은 data refinement를 시행하였다



- 2차 Annotation 결과 annotation 퀄리티를 나타내는 N50 수치 3.88 배 상승하여 분석 정확도를 확보하였다.

- SAIT-7

Resource	Assembler	Contigs	Total Length	Mean Length	Max Length	Min Length	N50	N90
SAIT-7	A5 pipeline	935	10,752,899	11,500	131,822	500	26,438	6,997
SAIT-7 (previous result)	Unknown	3,659	10,531,593	2,878	118,361	330	6,801	1,084

Total Length	Total GC Count	GC Contents
10,752,899	4,113,401	38.25%

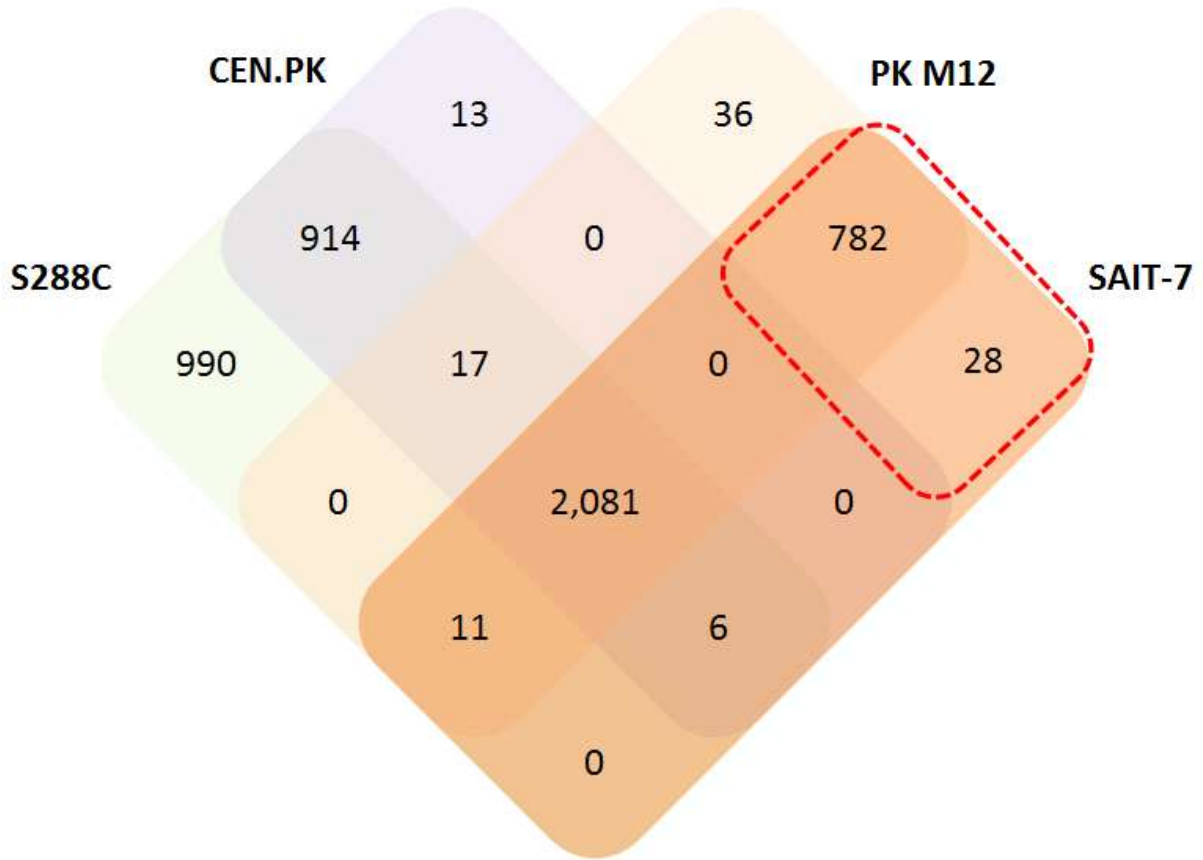
N50 값 **3.88배** 상승

- SAIT-7 (Used AUGUSTUS)

Genes	Transcripts	Completed	Partial	Completed(%)
4,815	4,815	4,625	190	96.05%

Transcripts	Total size	5'UTR	Genome in %	CDS	Genome in %	Intron	Genome in %	3'UTR	Genome in %
4815	7,652,160	6,355	0.06%	7,582,821	70.52%	58,574	0.54%	4,410	0.04%

- 기존 기 발표된 내산성 효모인 *Pichia kudriavzevii* M12 및 *Sacceromyces* S288C, CEN.PK Comparative genome 분석 진행



- 2081 개의 유전자는 모든 효모 계열에 존재
- 기존 IO 계열로 알려진 PKM 12 와 782 개의 유전자를 공유
- SAIT-7 에만 존재하는 유전자는 6 개

○ 내산성 및 비내산성 효모간 Comparative genome 분석을 통한 내산성 유전자 후보군 발굴
 - SAIT-7 단독 존재 유전자

SAIT-7	Function
GENE00131.1	Cell wall protein RHD3 OS=Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=RHD3 PE=1 SV=1 *Component of the cell wall involved in virulence.
GENE04487.1	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase OS=Escherichia coli GN=aphA1 PE=3 SV=2
GENE04488.1	Beta-lactamase TEM OS=Salmonella typhi GN=bla PE=3 SV=1
GENE04501.1	Capsid protein F OS=Enterobacteria phage phiX174 (Isolate Sanger) GN=F PE=1 SV=2
GENE04500.1	Major spike protein G OS=Enterobacteria phage phiX174 (Isolate Sanger) GN=G PE=1 SV=1
GENE04503.1	Minor spike protein H OS=Enterobacteria phage phiX174 (Isolate Sanger) GN=H PE=1 SV=1
GENE04498.1	Replication-associated protein A OS=Enterobacteria phage phiX174 (Isolate Sanger) GN=A PE=1 SV=1
GENE04502.1	Replication-associated protein A OS=Enterobacteria phage phiX174 (Isolate Sanger) GN=A PE=1 SV=1
GENE04499.1	Scaffolding protein D OS=Enterobacteria phage S13 GN=D PE=3 SV=2

- 28 genes, Unknown 제외 (9 genes), virulence component 등으로 구성

- PK-M12 & SAIT-7 (related on NADH) 존재 유전자

PKM12	SAIT-7	Function
GENE02700.1	GENE02328.1	Alternative oxidase, mitochondrial OS=Scheffersomyces stipitis (strain ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) GN=STO1 PE=3 SV=2
GENE02881.1	GENE00191.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6 OS=Mus musculus GN=Ndufaf6 PE=3 SV=1
GENE00591.1	GENE03473.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 5 OS=Danio rerio GN=ndufaf5 PE=2 SV=1
GENE03382.1	GENE01198.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 OS=Pongo pygmaeus GN=NDUFA12 PE=2 SV=1
GENE02784.1	GENE04793.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS=Homo sapiens GN=NDUFA13 PE=1 SV=3
GENE01966.1	GENE04505.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 OS=Pongo abelii GN=NDUFA5 PE=3 SV=1
GENE02288.1	GENE00809.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 OS=Pongo abelii GN=NDUF9 PE=2 SV=3
GENE01403.1	GENE01333.1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7 OS=Bos taurus GN=NDUFA7 PE=2 SV=2
GENE02041.1	GENE01887.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 14.8 kDa subunit OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo14.8 PE=1 SV=3
GENE02778.1	GENE00896.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19.3 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=G17A4.170 PE=2 SV=1
GENE01816.1	GENE01004.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.8 kDa subunit OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=B1O14.280 PE=1 SV=2
GENE02640.1	GENE02095.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.9 kDa subunit OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo20.9 PE=1 SV=1

PKM12	SAIT-7	Function
GENE02707.1	GENE04245.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo-21 PE=1 SV=2
GENE02749.1	GENE01997.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21.3 kDa subunit OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=20H10.080 PE=2 SV=2
GENE02725.1	GENE03842.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo21.3c PE=2 SV=1
GENE03357.1	GENE04535.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo-24 PE=2 SV=1
GENE01016.1	GENE02456.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo-49 PE=1 SV=2
GENE02094.1	GENE04361.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo-51 PE=2 SV=2
GENE03213.1	GENE01936.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit, mitochondrial OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=nuo78 PE=1 SV=2
GENE03821.1	GENE04702.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 OS=Debaryomyces hansenii (strain ATCC 36239 / CBS 767 / JCM 1990 / NBRC 0083 / IGC 2968) GN=ND3 PE=3 SV=1
GENE02631.1	GENE04283.1	Probable NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit, mitochondrial OS=Candida maltosa GN=ALI1 PE=3 SV=1

- SC (S288C/CEN.PK) 에 비해 상대적으로 많은 NADH dehydrogenase /oxidase 존재 → 일반적인 Crab tree negative 균주들의 특성으로서, 내산성을 위한 타겟 유전자

- PKM12 & SAIT-7 존재 유전자 (related on a membrane)

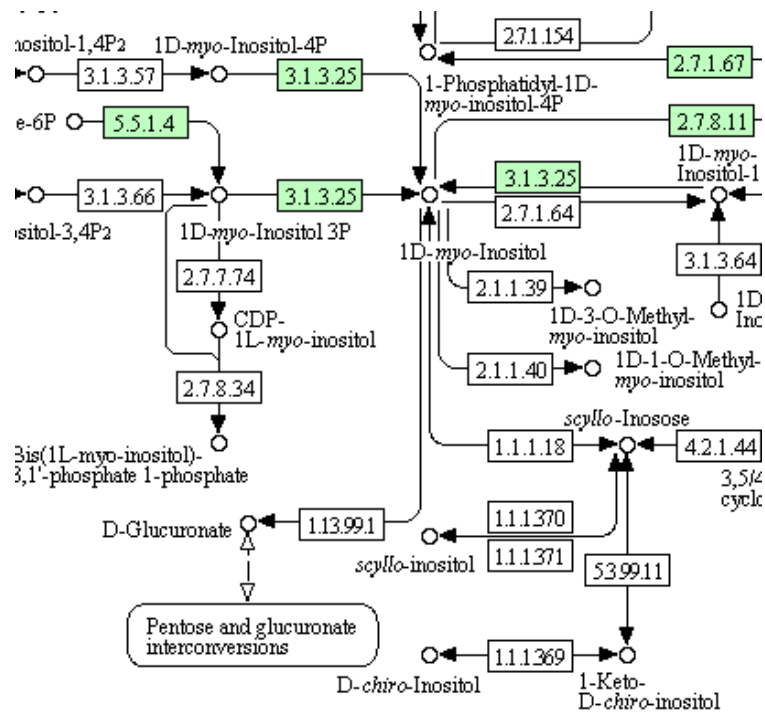
PKM12	SAIT-7	Function
GENE00055.1	GENE00417.1	Beta-mannosyltransferase 1 OS=Komagataella pastoris (strain GS115 / ATCC 20864) GN=BMT1 PE=3 SV=1
GENE01840.1	GENE03124.1	Acyl-coenzyme A thioesterase 10, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acot10 PE=2 SV=1
GENE04680.1	GENE03901.1	Acyltransferase LovD OS=Aspergillus terreus GN=lovD PE=1 SV=1
GENE01788.1	GENE02837.1	Delta(12) fatty acid desaturase OS=Mortierella alpina PE=1 SV=2
GENE04022.1	GENE01678.1	Delta(8)-fatty-acid desaturase OS=Lachancea kluyveri (strain ATCC 58438 / CBS 3082 / CCRC 21498 / NBRC 1685 / JCM 7257 / NCYC 543 / NRRL Y-12651) GN=SLD PE=1 SV=1
GENE00262.1	GENE03292.1	Dihydroceramide delta(4)-desaturase OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=dsd1 PE=3 SV=1, *Required for sphingosine biosynthesis
GENE04418.1	GENE04582.1	Palmitoyl-protein thioesterase 1 OS=Caenorhabditis elegans GN=ppt-1 PE=2 SV=2
GENE03266.1	GENE03047.1	UPF0592 membrane protein C7D4.03c OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPAC7D4.03c PE=3 SV=1
GENE02274.1	GENE00810.1	Yeast-form wall Protein 1 OS=Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=YWP1 PE=1 SV=1
GENE02431.1	GENE01273.1	Cell surface superoxide dismutase [Cu-Zn] 6 OS=Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=SOD6 PE=1 SV=1

PKM12	SAIT-7	Function
GENE02540.1	GENE02515.1	Magnesium transport protein CorA OS=Thermotoga maritima (strain ATCC 43589 / MSB8 / DSM 3109 / JCM 10099) GN=corA PE=1 SV=1
GENE03057.1	GENE01541.1	Metal tolerance protein 3 OS>Oryza sativa subsp. japonica GN=MTP3 PE=2 SV=1
GENE02433.1	GENE01268.1	Probable magnesium transporter NIPA4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g71900 PE=2 SV=1

- Sphingo lipid 관련 유전자 및 Magnesium transport 단독 존재

PKM12	SAIT-7	Function
GENE02104.1	GENE03426.1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Yarrowia lipolytica (strain CLIB 122 / E 150) GN=YALIOB21846g PE=3 SV=1, Amino-acid degradation; L-phenylalanine degradation; acetoacetate and fumarate from L-phenylalanine: step 3/6.
GENE00248.1	GENE03289.1	Inositol oxygenase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=MIOX1 PE=2 SV=1, Involved in the biosynthesis of UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA), providing nucleotide sugars for cell-wall polymers.
GENE02418.1	GENE01305.1	Universal stress protein A family protein C25B2.10 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC25B2.10 PE=1 SV=1

- Stress 관련 유전자 및 대사경로 유전자 (Inositol oxygenase 등) 존재



나. 발굴된 균주의 LA 생산 균주 제작 및 공정 최적화

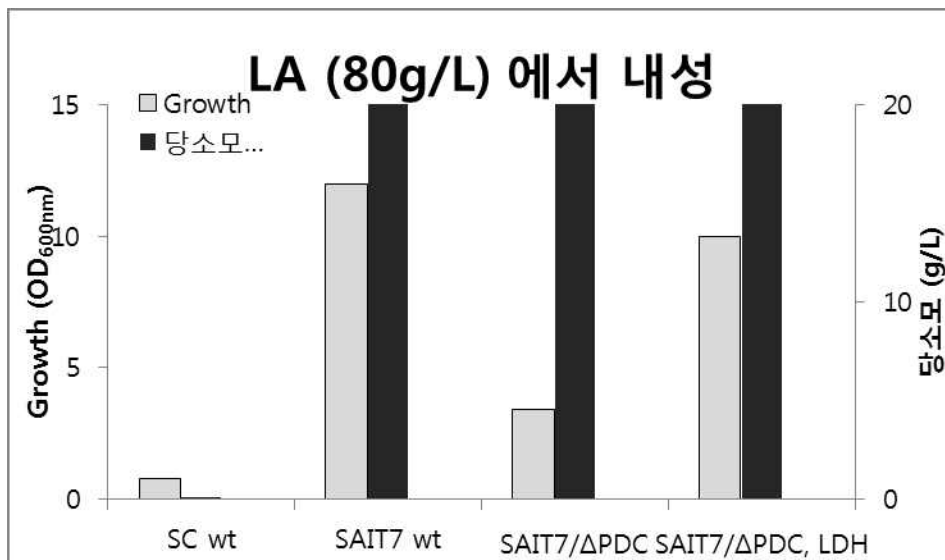
○ LA생산균주 제작

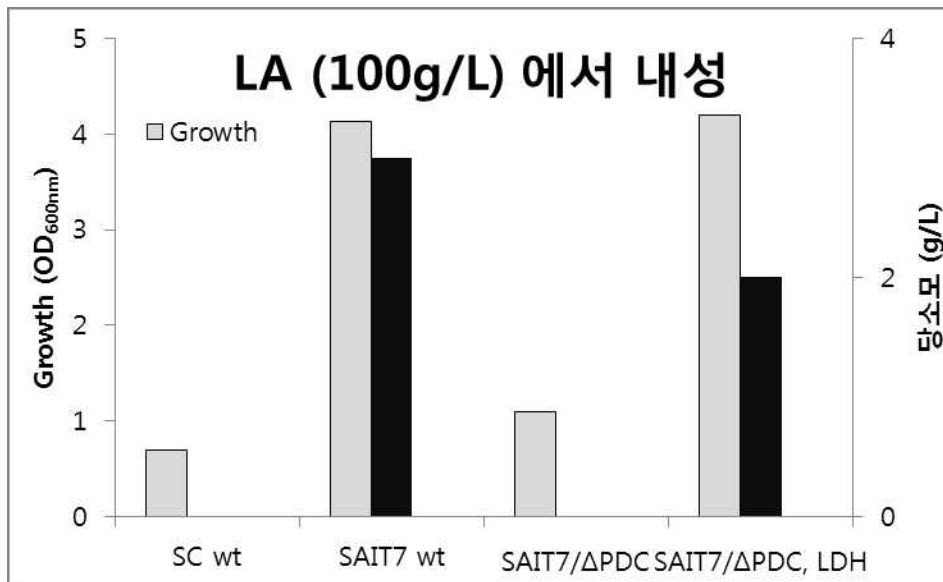
균주조작을 용이하기 위해 URA marker를 사용하기 위해 SAIT-7균주의 URA 유전자를 결실하고자 URA결실용 cassette를 제작하였다. PGK1 promoter와 terminator를 이용하여 SC균주의 mel5유전자를 발현 할 수 있게 제작 하였으며 SAIT-7균주의 diploid인 URA ORF의 upstream와 down stream 영역에 recombination시켜 URA auxotroph를 제작하였다. EtOH로 가는 탄소의 흐름을 차단하기 위해 PDC deletion cassette를 제작하였다. SAIT-7의 URA 유전자의 promoter-ORF terminator영역을 한번에 PCR증폭하였고, pop-out을 위한 repeat 서열을 위해 SC(*S. cerevisiae*)의 hisG 유전자의 1kb영역을 사용하여 deletion cassette를 제작하였으며 앞에서와 같은 방법으로 PDC ORF를 deletion하였고 SAIT-7/ Δ URA, Δ PDC균주를 확보하였다. LA생산을 위해 LDH cassette를 제작하였다. 아래 그림과 같이 Eno promoter-BT_LDH-eno terminator cassette를 제작하였고. Cyb2b유전자를 제거하며 삽입하기 위해 cyb2b upstream-Eno 프로모터-BT_LDH-Eno 터미네이터-HisG-URA cassette-HisG-Cyb2b downstream 순으로 연결되는 cassette를 제작하여 이전과 같은 방법으로 Cyb2b haploid를 제거하며 LDH cassette를 삽입하였으며 URA cassette는 pop-out함으로서, SAIT-7/ Δ URA, Δ PDC, Δ cyb2b haploid, Peno-BT_LDH균주를 제작하였다.



내산성 test

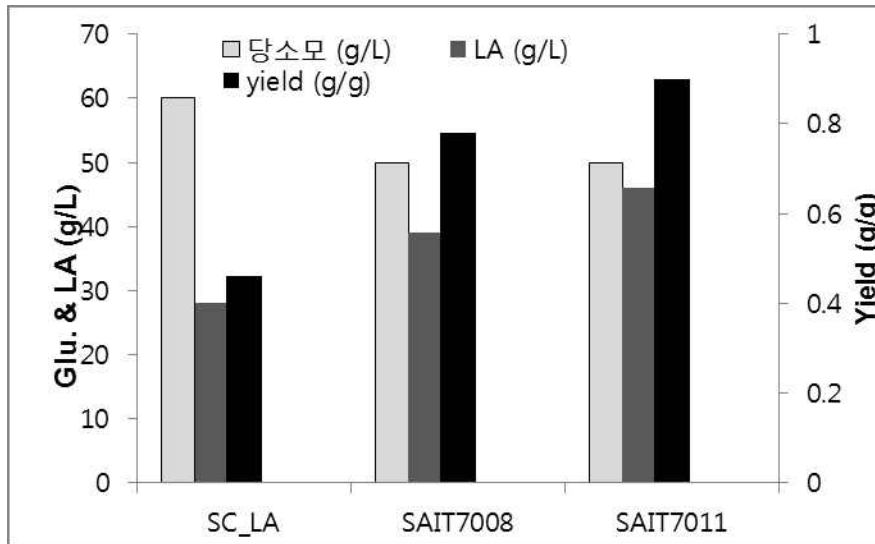
지금까지 제작된 SAIT-7균주의 내성을 test하여 SC균주의 내성과 비교하였다. SC WT, SAIT-7 WT, SAIT-7/ Δ PDC, SAIT-7/ Δ PDC,BT_LDH균주의 LA에 대한 내성을 평가하기 위해 YPD (glucose:20 g/L)배지에서 배양 후 LA농도를 각각 (10,20,40,80,100,120,160 g/L) 첨가한 배지에 OD 1이 되게 접종하여 호기 조건에서 배양 후 세포의 성장과 당소모를 측정하였다. 결과 LA 농도 40 g/L이하의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다. LA농도 80 g/L로 첨가된 배지에서 SC균주는 전혀 성장하지 못하였으나 SAIT-7 WT균주는 OD600nm에서 12까지 성장하였으며, PDC가 결실된 SAIT-7균주는 같은 배지에서 OD3.4 까지 성장하였으며, SAIT-7/ Δ PDC, LDH균주는 같은 조건에서 OD가 10까지 성장하였다. 당소모는 모든 SAIT-7 균주가 초기 첨가해준 glucose (20 g/L)를 모두 소모하였다. LA농도 100 g/L로 첨가된 배지는 SAIT-7여전히 성장하였다. SAIT-7 wt은 4.13 (OD600nm),SAIT-7/ Δ PDC 균주는 1.1 (OD600nm)SAIT-7/ Δ PDC, LDH 균주는 4.2 까지 성장하였으며 당소모는 0~3 g/L수준으로 급격히 감소하였다. LA농도가 120 g/L이상으로 첨가 된 배지에서는 모든 균주가 성장하지 못하였다. 이 결과는 PDC결실로 인한 redox 불균형으로 인해 SAIT-7의 LA내성이 약화 되었으나 LDH도입으로 그부분이 해결되고 있음을 시사하는 바이며 SAIT-7균주는 LA 농도 100 g/L까지 견디며 성장할 수 있음을 보여준다





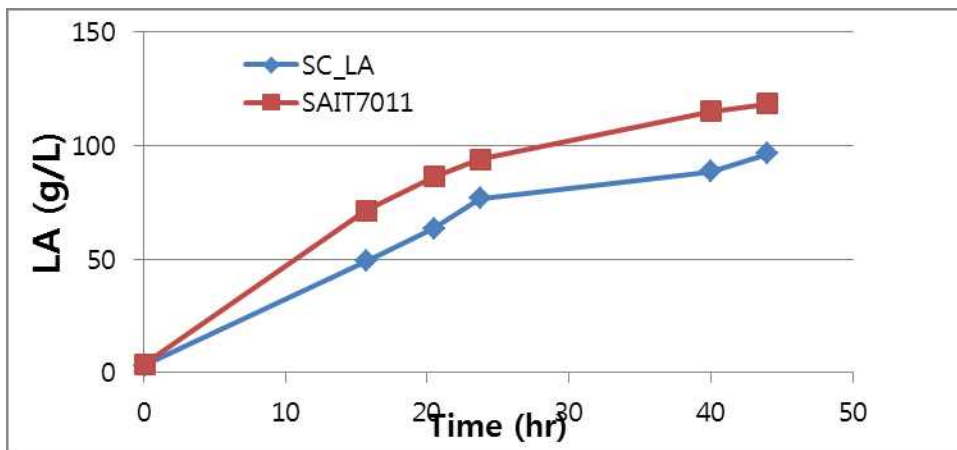
○ SAIT-7 LA생산 균주 제작 및 flask test

이전에 수행된 LA내성 실험을 통하여 SAIT-7균주의 LA에 대한 SC보다 우월한 내성과 PDC결실에 의한 redox 불균형이 LDH유전자 삽입에 의해 해소될 수 있음을 확인하였으며 추가적인 균주 조작을 통해 LA생산균주를 제작하고자 하였다. 지금까지와 같은 과정을 통해 SAIT-7의 GPD 유전자를 완전 결실 하였으며 diploid cyb2a유전자를 haploid를 결실하며 TDH3프로모터-BT_LDH cassette를 삽입하여 LDH 발현 cassette가 2 copy 삽입된 균주를 제작하여 SAIT-7008로 명명하였고, 나머지 cyb2a haploid를 결실하며 TDH3 프로모터-C2_LDH를 삽입하였고 최종적으로 SAIT-7 wt균주의 PDC, GPD, cyb2a가 결실되었고, 3 copy의 LDH (BT_LDH 2copy, C2 LDH 1 copy)유전자 발현 cassette가 삽입된 SAIT-7기반의 LA생산 균주를 제작하였으며 SAIT-7011균주로 명명하였다. 제작된 SAIT-7011균주의 LA생산 능력을 평가하기 위해 또한 기존에 제작된 SC기반의 LA생산 균주와 비교하기 위해 flask test를 진행하였다. YPD배지에 glucose 60 g/L를 첨가하였으며 미호기 조건에서 48시간을 배양한 후 당소모와 LA생산을 측정하였다. SAIT-7011 균주는 SC 기반 LA 생산 균주인 SP1191균주 (28 g/L) 대비 LA 생산이 1.6배 증가 (46 g/L) 하였으며 수율은 2배 정도 증가하였다 (0.46->0.9 g/g). SP1191균주는 4 copy의 LDH발현 cassette가 삽입된 균주로 LA생산 능력 자체는 우수하나 SAIT-7균주보다 더 적은 LA생산 능력을 보인 이유는 LA내성의 차이에 인한 것으로 생각된다.



○ 내산 발효 및 최적화

SAIT-7011균주의 LA생산능력과 LA 내성의 향상을 평가하기 위해 발효를 수행하였다. 내산성 확인해야 했기 때문에 중화제를 평소의 1/3로 줄여 최종 pH를 3.1로 유지하였고, 나머지 조건은 SAIT-SOP에 준하였다. SP1191균주는 LA를 최종적으로 96 g/L생산하였으나 SAIT-7011균주는 LA를 118 g/L 생산하였다. Yield는 두 균주 85% 정도 수준으로 비슷하게 나왔다. SP1191균주는 부산물로 에탄올과 글리세롤이 나왔지만 SAIT-7011균주는 부산물이 나오지 않았다. pH 3.1을 유지한 내산 조건의 발효에서도 SAIT-7균주는 SC균주보다 우수한 생산능력과 LA내성을 보여주었다.

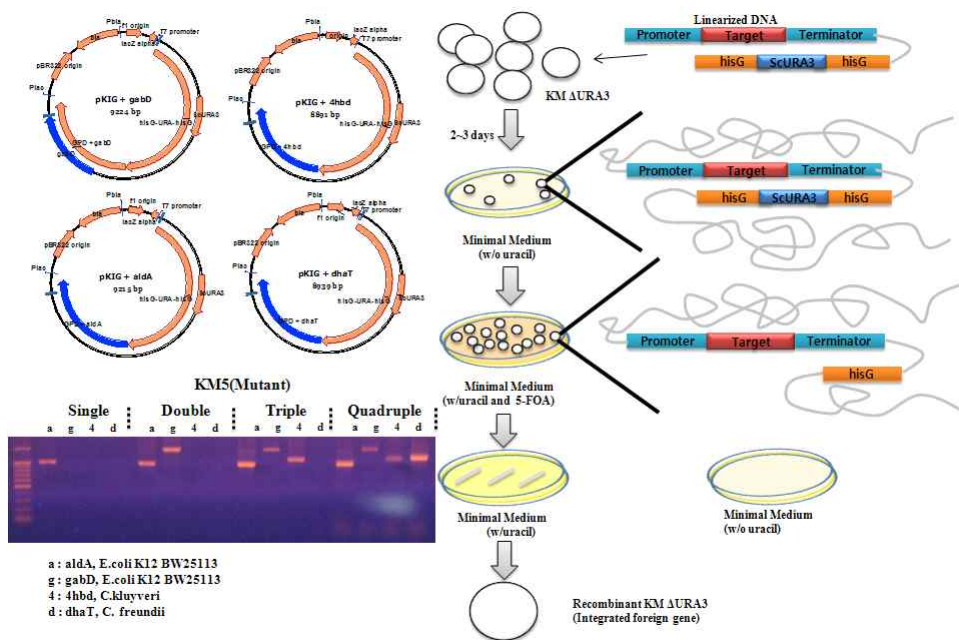


	Glucose (g/L)	LA (g/L)	Yield (%)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)
SC_LA	111.0	96.4	86.3	2.5	0.3
SAIT-7011	140.0	118.6	84.3	0.0	0.0

제 2 절 1,4-BDO 생산 균주 개발

1. KM 균주에서 고부가 바이오신소재 (1,4-BDO) 생합성 유전자 확보

- KM에서 1,4-BDO 생합성 경로의 유전자들을 발현하기 위해 URA-blaster system을 이용하여 생합성 하고자 하는 유전자들을 발현 하였다. 생합성하고자 하는 유전자를 KM에 발현 하고 +URA3 있는 곳에서 5-FOA를 이용하여 -URA3만을 제거 할 수 있는 방법으로 생합성 경로의 유전자들을 선별 하였다 (그림).



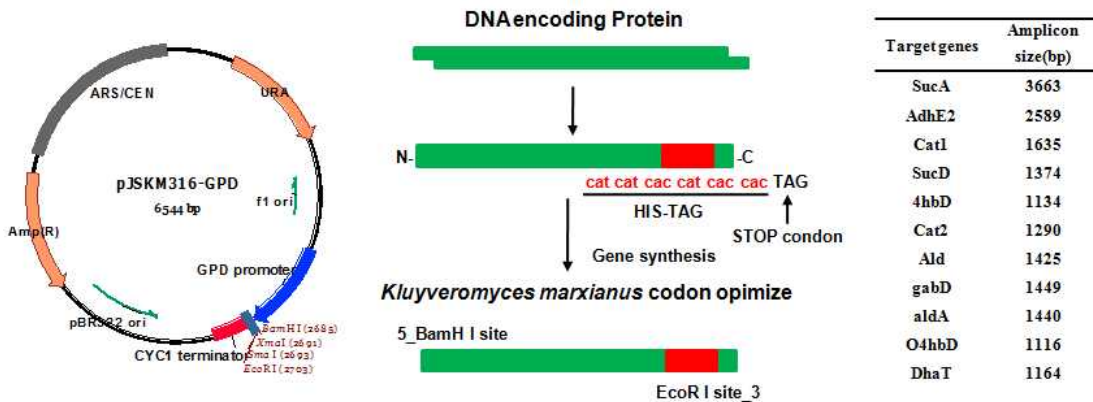
<그림. 구축된 integration system에 1,4-BDO 생합성 유전자 확보>

2. KM 균주 기반 1,4-BDO 생합성 경로 핵심 유전자 도입 및 발현 최적화

가. 1,4-BDO 생산 유전자 합성 및 발현

- KM에 1,4-BDO 생합성 유전자를 발현하기 위한 expression vector를 제작하여 합성된 유전자들의 construction들을 구축 하였다. 그림 4에서 보듯이 도입하고자 하는 1,4-BDO 생합성 유전자들은 기존 유사 특허를 통해서 알려진 1,4-BDO생산에 높은 활성도를 가지는 유전자들로서 각각의 유전자들은 KM균주에 condon optimized를 하였고 KM 발현 벡터에 도입을 위하여 필요한 제한효소 (*Bam*HI 과 *Eco*R I)를 붙여 주었고, KM에 형질 전환된 후 단백질 발현 정도를 확인하기 위하여 his-tag을 붙여 주었다. 좀 더 자세하게 1,4-BDO의 생합성 경로 및 관련 유전자의 구성을 설명하면 *sucA* (*M. bovis*)에 의해 암호화되는 2-oxoglutarate

decarboxylase는 α -ketoglutarate에서 succinate semialdehyde로 전환되고, *gabD* (*E. coli*)에 의해 암호화되는 succinate semialdehyde dehydrogenase는 succinate에서 succinate semialdehyde로 전환되고, *cat1* (*C. kluyveri*)에 의해 암호화되는 succinyl-coA synthetase는 succinate에서 succinyl-coA로 전환되고, *sucD* (*P. gingivalis*)에 의해 암호화되는 CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase는 succinyl-coA에서 succinate semialdehyde로 전환되고, *4hbD* (*P. gingivalis*)에 의해 암호화되는 4-hydroxybutyrate dehydrogenase는 succinate semialdehyde에서 4-hydroxybutyrate로 전환되고, *cat2* (*P. gingivalis*)에 의해 암호화되는 4-hydroxybutyryl-coA transferase는 4-hydroxybutyrate에서 4-hydroxybutyryl-coA로 전환되고, *adhE2* (*C. acetobutylicum*)에 의해 암호화되는 4-hydroxybutyryl-coA reductases는 4-hydroxybutyryl-coA에서 4-hydroxybutyraldehyde로 전환되고, *aldA* (*E. coli*)에 의해 암호화되는 aldehyde dehydrogenase는 4-hydroxybutyrate에서 4-hydroxybutyraldehyde로 전환되고, *ald* (*C. beijerinckii*)에 의해 암호화하는 alcohol dehydrogenase와 *dhaT* (*Citrobacter freundii*)에 의해 암호화하는 1,3-propanediol dehydrogenase에 의하여 최종적으로 4-hydroxybutyraldehyde에서 1,4-butanediol을 생합성한다.

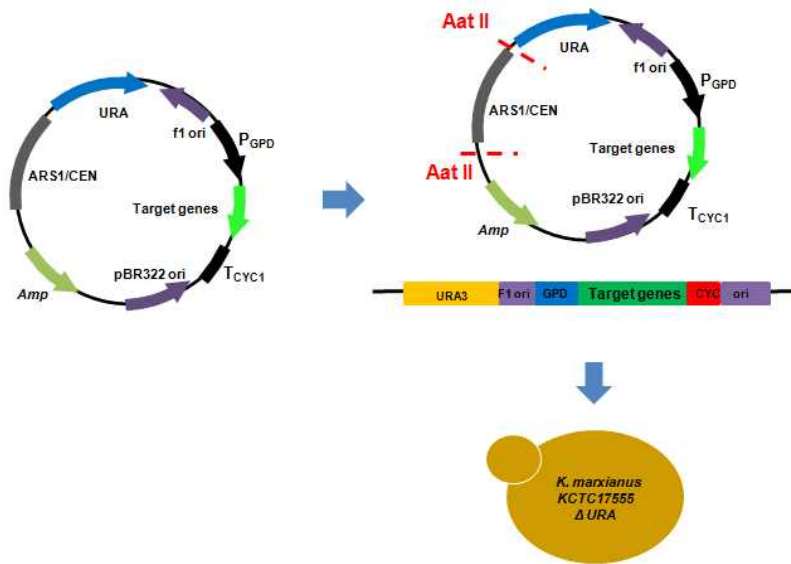


<그림. KM에서의 1,4-BDO생합을 위한 유전자들 합성 및 발현 벡터 구축>

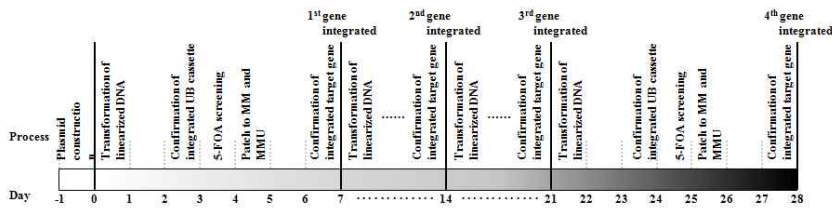
나. KM 균주에서 발현 가능한 integration system

- 현재 KM에서의 1,4-BDO 생합성을 위한 여러 유전자 도입을 위하여 시스템을 구축 하였다. 기존의 효모에서의 여러 유전자 도입을 위하여 유전자들이 발현 벡터에 삽입되어 selection makers를 이용하거나, 선형화된 integrating vector를 이용하여 숙주 효모 염색체에 삽입하는 방법 등이 있다. 본 연구에서는 random integration 시스템을 이용하여 숙주 KM 염색체에 1,4-BDO 생합성 유전자들을 삽입하여 장기간 세대를 거듭하여도 유전자가 유실되지

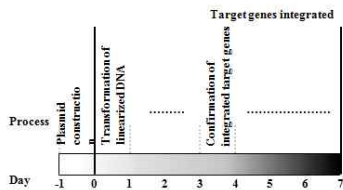
않고 안정성을 유지한다는 결과를 얻었다. 이 vector 시스템을 이용하면 우리가 고안한 고효율 promoter (GPD)의 조절을 받는 1,4-BDO 생합성 유전자들의 발현이 모두 안정되게 유지되는 야생형 발효균주를 선별 할 수 있었다. 또한, 한꺼번에 하나 이상의 유전자들을 선별함에 따른 시간의 절약도 가능 하였다 (그림).



Target genes integration using the Ura-blaster



Target genes using random integration



<그림. 여러개의 1,4-BDO생합성 유전자들을 발현 하기 위한 random integration system 구축>

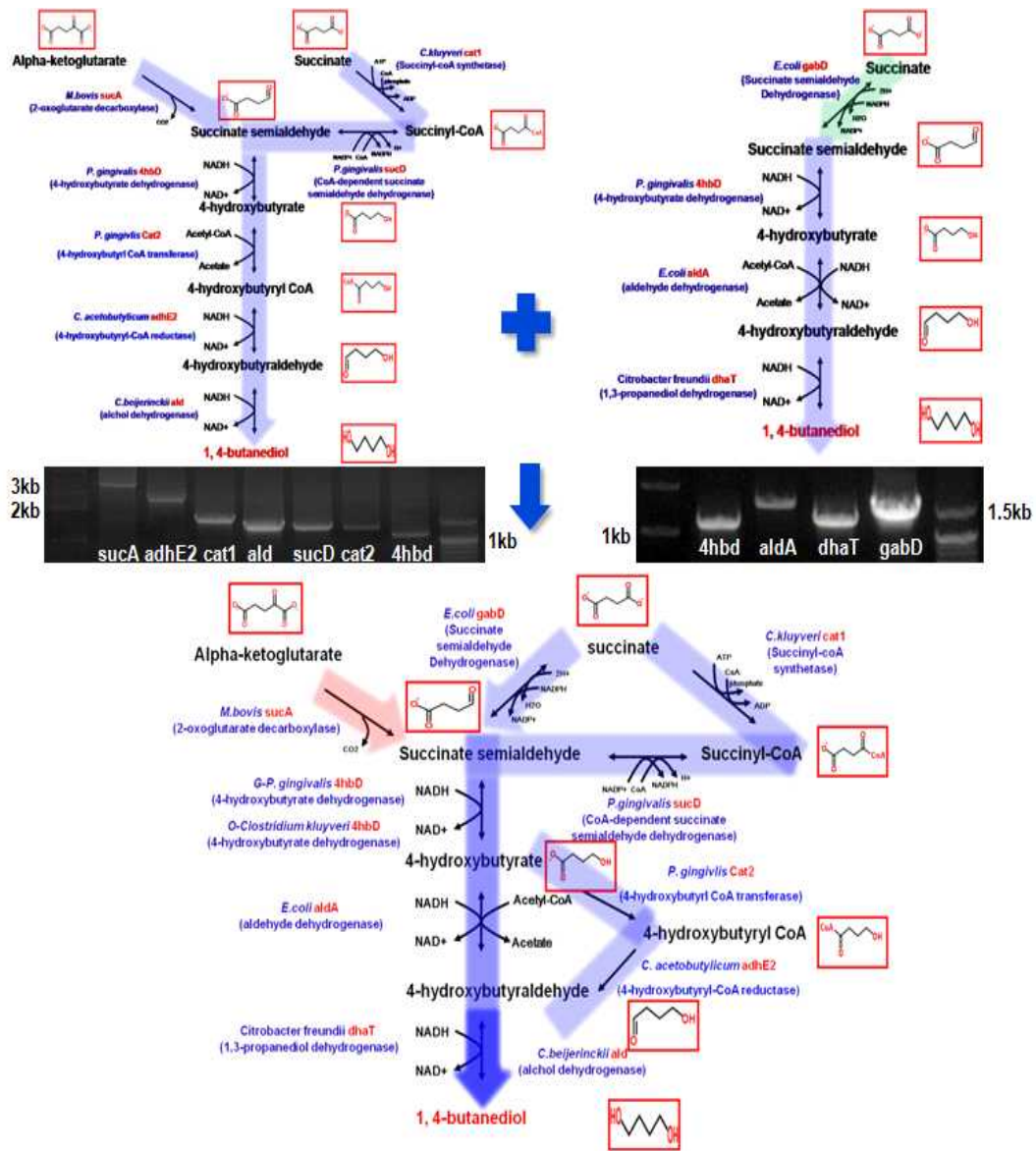
다. 1,4-BDO 생합성 경로 유전자들 KM 균주에 codon optimization

○ 미생물을 이용한 1,4-BDO 생산은 최근에 재조합 *E. coli*를 이용한 기술이 개발 되었다. 그림에서와 같이 OPX사의 유전자와 GENOMATICA사의 1,4-BDO생합성 유전자들을 KM균주에 codon optimized하기 위하여 합성하였다.

라. 1,4-BDO 생합성 경로 유전자들 KM 균주에 도입

- 미생물을 이용한 1,4-BDO 생산은 최근에 재조합 *E. coli*를 이용한 기술이 개발 되었다. Succinic acid의 경로를 이용하여 유전자들을 도입한 OPX 그룹과 α -ketoglutarate 와 succinate의 경로를 이용하여 유전자들을 도입한 GENOMATICA 그룹에서 0.23g/L(수율 0.87%)정도로 1,4-BDO를 생산하고 있다. 본 연구에서는 그림에서와 같이 OPX사의 유전자 와 GENOMATICA사의 1,4-BDO생합성 유전자들을 KM균주에 codon optimized를 통하여 삽입하여 1,4-BDO생합성 유무를 확인 하고자 하였다(그림).

<그림. 기존 유사 특허의 1,4-BDO생합성 경로 유전자 도입>



3. 산업용 균주(E. coli) 이용 1,4-BDO 생산 균주 개발

효모 KM 균주를 대상으로 1,4-BDO 내성을 분석한 결과 내성이 매우 약하였으나 대장균의 경우에는 1,4-BDO 100g/L까지 내성을 보여 본 연구에서 대상 균주를 대장균으로 선택하여 연구 수행함.

가. In silico simulation 을 이용한 1,4-BDO 생합성 핵심 효소 개발

○ 균주 in silico 분석을 통한 핵심 유전자 확인

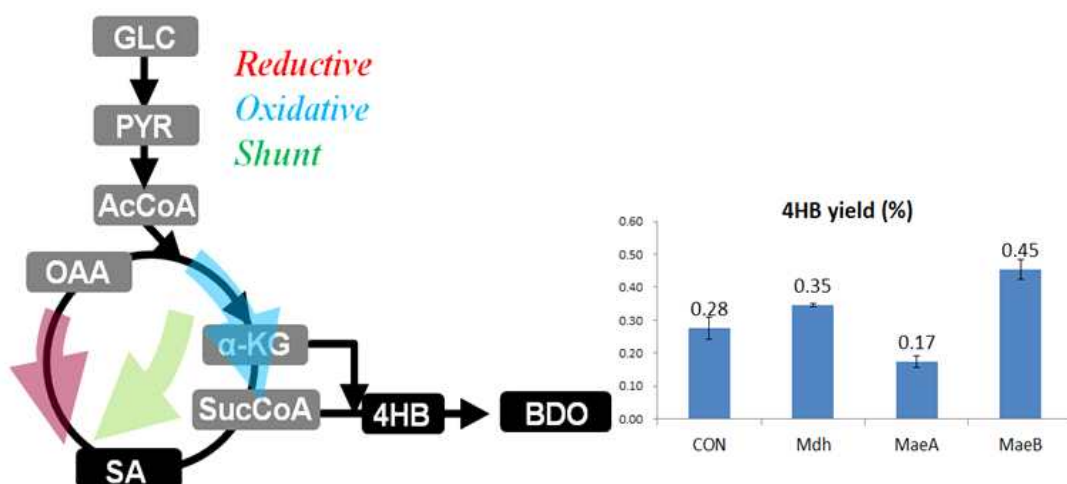
- 1,4-BDO 의 Upstream pathway (4HB) 강화를 위한 glyoxylate shunt 사용 (aceBA) 및 carbon imbalancing 을 해결하기 위한 malic enzyme 증폭 사용 제안 및 효과 확인

표2. 1,4-BDO, 4HB 및 Succinic acid 의 TCA 의 reductive arm 의 사용율에 따른 Maximum yield

	Max yield					
	mole/mole			g/g		
	C base	Redox balanced (only reductive)	Redox balanced (Full)	C base	Redox balanced (only reductive)	Redox balanced (Full)
14BDO	1.00	0.65	0.95	0.50	0.33	0.48
4HB	2.00	1.24	1.33	1.16	0.72	0.77
SA	2.00	1.70	1.70	1.31	1.11	1.11

- Shunt pathway 사용 확인: Labeling pattern 을 통한 shunt 사용 확인

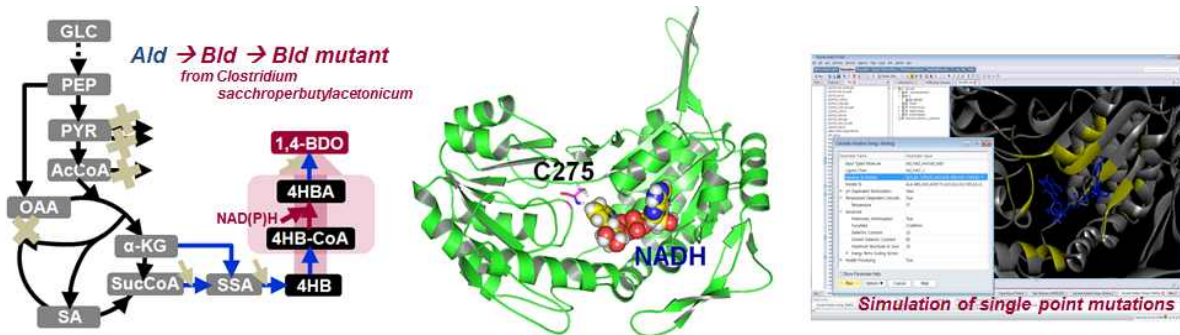
- Malic enzyme 사용 제안: Reductive TCA 사용하여 30% carbon flux 재사용 가능 제안 및 검증



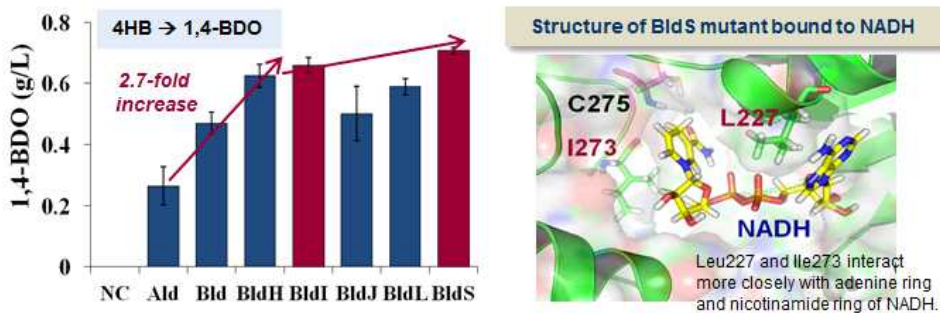
<그림. Malic enzyme 사용에 따른 4HB 수율의 증가 확인>

○ In silico 시뮬레이션을 통한 핵심 효소 개량

- Bld 효소의 활성 증가를 통한 4HB의 1,4-BDO로의 전환 강화 : 4HB-CoA를 4-hydroxybutyraldehyde(4HBA)로 전환시키는 반응은 1,4-BDO 생합성 경로에서 Downstream 경로에 해당하는 경로로 1,4-BDO 생성에 직접적인 영향을 미침. 이 경로를 강화하여 4HB의 1,4-BDO로의 전환을 증가시키고자 기존 *Clostridium beijerinckii* 유래 Aldehyde dehydrogenase (Ald) 보다 우수한 활성을 가지는 효소를 개발하고자 하였음. 우선, C4에 대해 보다 특이적인 Butyraldehyde dehydrogenase (Bld)를 *Clostridium sacchroperbutylaceticum* 균주로부터 확보하였음. 그 후 in silico simulation 기술을 활용하여 Cofactor인 NADH binding affinity를 높이는 방향으로 개량하였음. 먼저 Bld 효소의 구조를 모델링하여 NADH binding 영역을 제작하고 그 근방의 Amino acid들을 Mutagenesis시켜 binding energy를 계산하여 안정적으로 변한 Mutants를 도출해내었음. Mutant 5종을 실제 wet 실험으로 제작하여 in vivo activity를 확인한 결과, 5종 모두 Bld wild type 보다 활성이 증가하였고, 그 중 BldS(Bld M227L L273I) mutant의 경우 기존 Ald 효소보다 4HB의 1,4-BDO로의 전환 활성이 2.7배 증가하였음. 이 후 BldS mutant를 대장균 균주에 도입하여 1,4-BDO 생산을 증가시킬 수 있었음.



<그림. Bld 해당 경로 및 Bld 효소 구조 모델링>



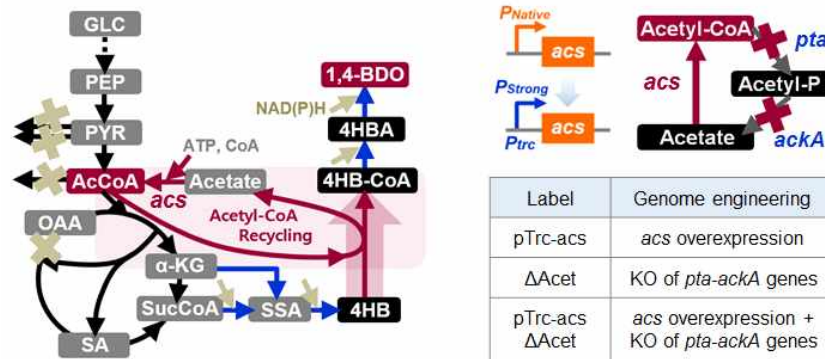
<그림. Bld mutant의 활성 비교 및 BldS 효소의 구조 분석>

나. TCA cycle 강화를 통한 1,4-BDO 기질 생성 강화

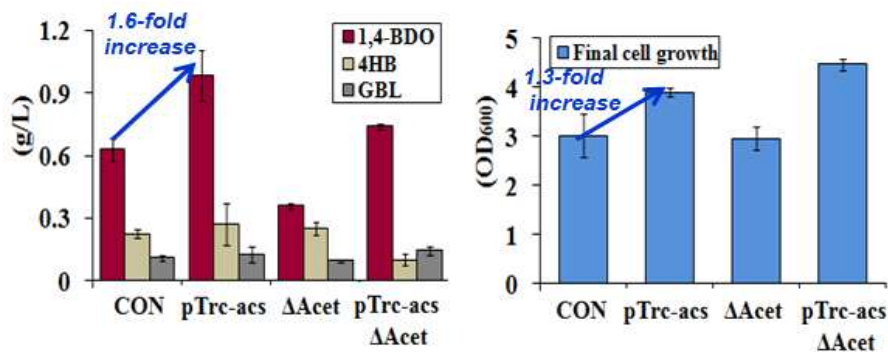
○ Acetate recycling 통한 Acetyl-CoA pool 강화

- TCA 도입부 대사물질이자, 세포 성장 및 1,4-BDO의 주요 전구체인 Acetyl-CoA pool을 증가시키기 위해 Acetate 관련 경로를 조작하였음. 그 중 Acetate를 Acetyl-CoA로 전환시키는

acs 유전자를 genome 상의 promoter 교체로 과발현한 경우, 1,4-BDO 생성이 1.6배 증가하면서 세포 성장도 1.3배 증가하였음. 이것은 Downstream 경로 중 4HB를 4HB-CoA로 전환시키는 반응(Cat2)과도 연결되어, 1,4-BDO 생합성 반응에 지속적으로 소모되는 Acetyl-CoA pool을 Acetate 재활용을 통해 강화한 결과라고 볼 수 있음.



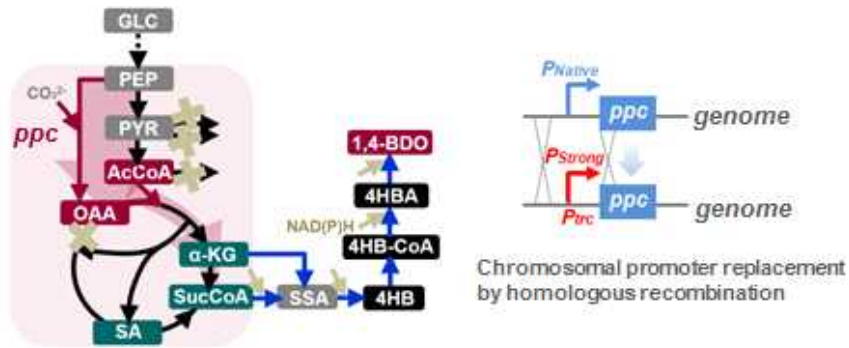
<그림. Acs 해당 경로 및 Acetate 관련 Genome 조작>



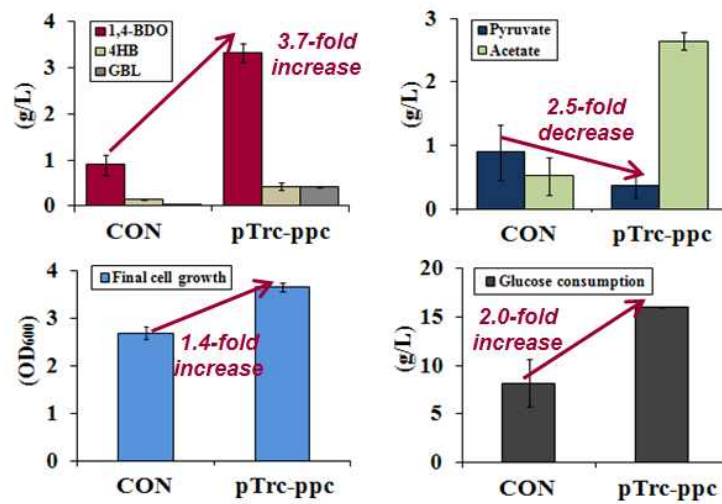
<그림. Acetate 관련 대사경로 조작에 의한 1,4-BDO 생성 및 세포 성장 비교>

○ Anaplerotic 경로 강화 통한 TCA 중간체 생성 강화

- 1,4-BDO는 TCA cycle 상의 a-Ketoglutarate(a-KG)와 Succinate(SA)로부터 생합성되므로, TCA cycle로의 대사흐름을 강화시킬 필요가 있음. 1,4-BDO 발효시 Pyruvate이 배양액에 과량 축적되는 현상이 관찰되었고, 이는 TCA로의 대사흐름이 원활하지 못하다는 것을 의미함. TCA 도입부 대사물질인 Acetyl-CoA(AcCoA)와 Oxaloacetate(OAA) pool의 balancing을 통해 이 부분을 개선하고자, Anaplerotic 경로인 ppc 유전자를 genome 상의 promoter 교체를 통해 과발현하였음. 그 결과, Glucose 소모가 2배 증가하고 Pyruvate 축적이 2.5배 감소하면서 1,4-BDO 생성이 3.7배 증가하였음.



<그림. Ppc 해당 경로 및 Chromosomal promoter 교체 통한 ppc 유전자 과발현>



<그림. Ppc 과발현에 따른 당 소모 및 1,4-BDO 생성 증가>

다. 유가식 배양을 통한 1,4-BDO 대량 생산

○ 발효 균주의 제작

- 3차년도에 제작된 기본균주 SAIT W025/ald 에서 SAIT W026/bldS 균주를 제작하였음. 1,4-BDO 생합성 경로 유전자들은 Upstream 경로와 Downstream 경로로 나누어 두 개의 plasmid로 도입 및 발현됨.

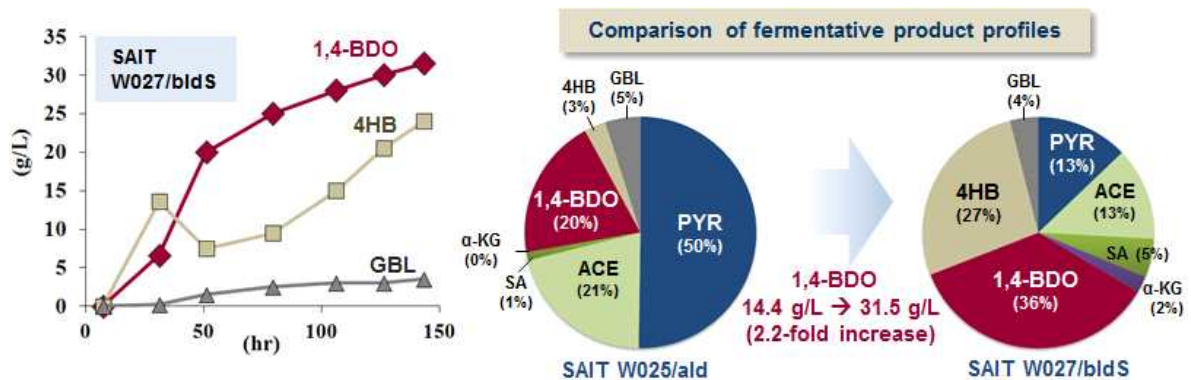
표3. 균주별 Genotype

Genotype & Plasmids	
SAIT W025/ald	<i>E. coli</i> W Δ ldhA Δ pfkB Δ adhE Δ lpdA::K. <i>lpd</i> (E354K) Δ mdh Δ arcA <i>gltA</i> (R164L) Δ gabD Δ sad / pTac15k <i>sucCD-sucD-4hbd-sucA</i> + pTrc99a <i>ald-cat2</i>
SAIT W027/bldS	<i>E. coli</i> W Δ ldhA Δ pfkB Δ adhE Δ lpdA::K. <i>lpd</i> (E354K) Δ mdh Δ arcA <i>gltA</i> (R164L) Δ gabD Δ sad <i>Pacs</i> :: <i>Ptrc</i> <i>Pppc</i> :: <i>Ptrc</i> / pTac15k <i>sucCD-sucD-4hbd-sucA</i> + pTrc99a <i>bldS</i> (<i>bld</i> M227L L273I)- <i>cat2</i>

○ 유가식 배양 공정을 통한 1,4-BDO 대량 생산

SAIT W027/bldS 균주의 유가식(Fed-batch) 배양을 통해 1,4-BDO 생산을 증가시켰음. 발효 배지는 MR 배지에 탄소원으로 Glucose 20g/L와 Yeast extract 2g/L가 첨가되었음. 배양은 2-phase로 나누어 진행되었음. Aerobic 조건으로 OD600에 이를 때까지 배양한 후 1,4-BDO 생합성 유전자의 발현을 위해 0.2mM IPTG를 첨가하고 2시간 배양한 다음, Aeration을 낮추어 (1VVM→0.25VVM) Microaerobic 조건에서 1,4-BDO를 생산하였음. 배양 동안 배지 내 Glucose 농도가 5~10g/L 되도록 농축된 Glucose 용액을 지속적으로 공급하였음.

SAITW027/bldS균주의 발효 결과, SAIT W025/ald 균주 대비 Pyruvate을 비롯한 부산물 축적은 감소하고 1,4-BDO와 전구체인 4HB 생성이 2배 이상 크게 증가하여, 최종 31.5g/L의 1,4-BDO를 생산할 수 있었음. 이는 핵심 효소 및 대사 수준의 균주 개량과 발효 공정 개발의 통합을 통해 가능하였고, 전구체 4HB의 높은 생산 수준을 볼 때 향후 1,4-BDO 생산의 추가 개선이 가능할 것으로 기대됨.

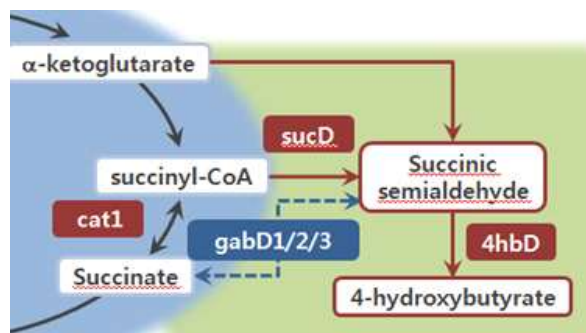


<그림. SAIT W027/bldS 균주의 1,4-BDO 발효 프로파일 및 전 단계 균주와의 비교>

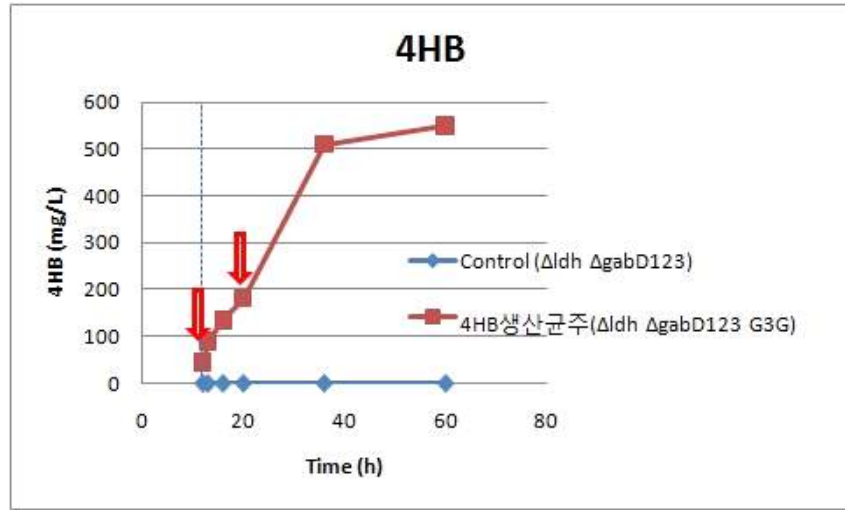
라. 시스템생물학 기법을 이용한 균주개량

○ 1,4-BDO 생산성 강화를 위한 Proteome 및 Genome 기반 효과 유전자 발굴

- 1,4-BDO의 생산성을 높이기 위한 전략으로 upstream pathway (4HB) 생산을 증가시킬 수 있는 유전자를 발굴함에 있어 omics 중 특히 proteomics 데이터를 기반으로 실시함
- 4HB를 생산하지 않는 균주 (control)와 4HB를 생산하는 균주를 선정하였으며 두 균주 배양 후 20h 샘플링하여 two dimensional electrophoresis를 수행

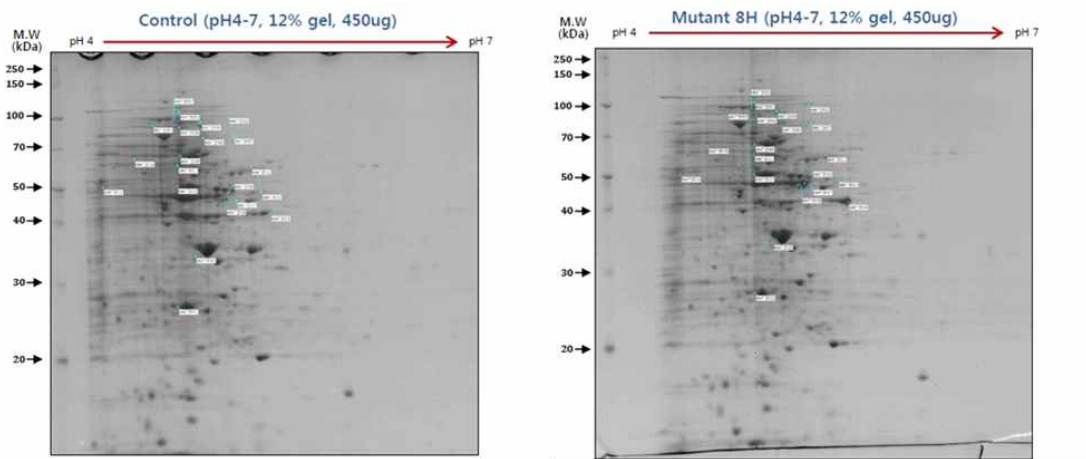


<그림. control (Δ ldh Δ gabD123)과 4HB 생산 균주 (Δ ldh Δ gabD123 G3G)>



<그림. control (Δ ldh Δ gabD123)과 4HB 생산 균주 (Δ ldh Δ gabD123 G3G) 4HB 생산>

- 평균 1200spot/gel proteome data 를 얻었으며 control 대비 4HB생산균주에서 발견되는 spot 을 찾고자 하였음. 그 결과 intensity가 증가한 spot은 총 44개가 있었으며 LC/MSMS를 이용한 동정 결과 membrane protein에 해당하는 9개 단백질을 찾을 수 있었음.
- 이는 iron-regulated ABC transporter에 해당하는 surD (ncgl1502)와 surfB(ncgl1503)외에도 ABC-type cobalamin/Fe³⁺-siderophore transport system (ngcl0776)로 파악됨



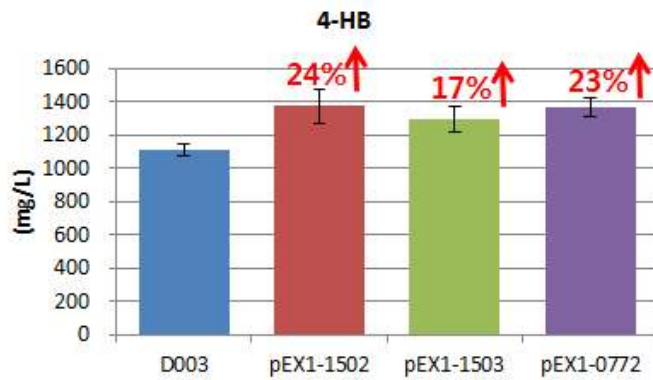
<그림. control균주와 4HB 생산균주의 2 Dimensional Electrophoresis image >

표. control대비 4HB생산균주에서 증가한 spot에 대한 동정 결과

Gene Symbol	Protein name	M/Z
<u>Ncgl 1502</u>	iron-regulated ABC transporter <u>sufD</u>	42254
<u>Ncgl 1503</u>	iron-regulated ABC transporter <u>sufB</u>	53459
<u>Ncgl 0776</u>	ABC-type <u>cobalamin/Fe3+-siderophore</u> transport system	35668

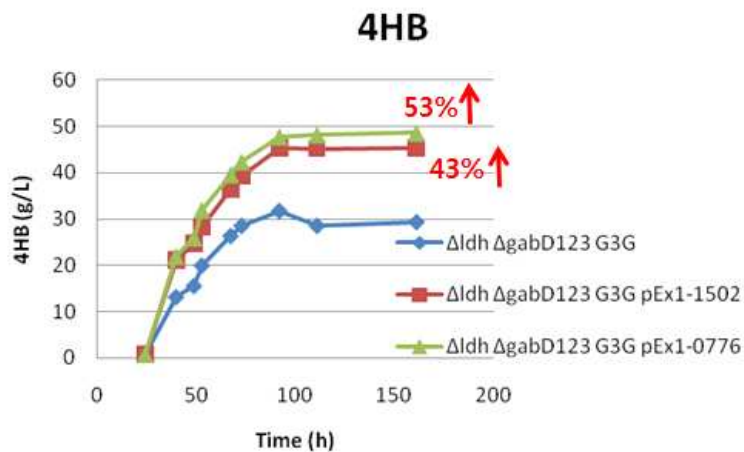
○ 동정한 유전자 과발현에 의한 4HB 생산성 비교

- 125ml flask scale에서 control 대비 ncgl1502는 24% 4HB 생산이 증가하였으며 ncgl1503은 17%, ncgl0776은 23% 4HB생산이 향상된 결과를 얻음



<그림. 동정한 유전자 과발현 4HB 생산성 비교 (125ml flask)>

- 동일한 균주를 1L 발효기에서는 ncgl 1502가 53% 4HB 생산 증가, ncgl0776은 43% 생산 증가 결과를 얻음



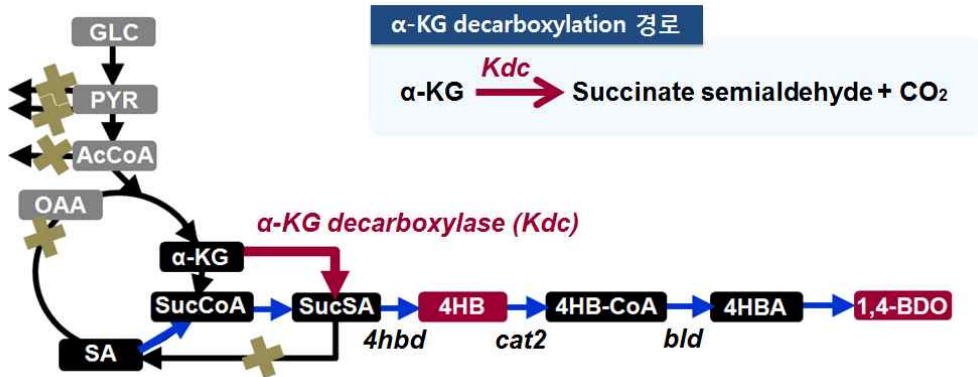
< 그림. 동정한 유전자 과발현 4HB 생산성 비교 (1L fermentor)>

- surf 유전자는 Fe-S cluster 합성에 관련되었고 Fe-S cluster는 ferredoxins, NADH dehydrogenase, hydrogenases, succinate-coenzyme Q reductase 등의 redox반응의 apoenzyme에 관여하는 것으로 알려졌으므로 redox관련 enzyme의 limiting으로 작용하던 Fe-S cluster에 영향을 준 것으로 판단됨.

4. 산업용 균주 이용 1,4-BDO 생산 균주 추가 개량

가. 우수 KDC 효소 발굴 및 도입

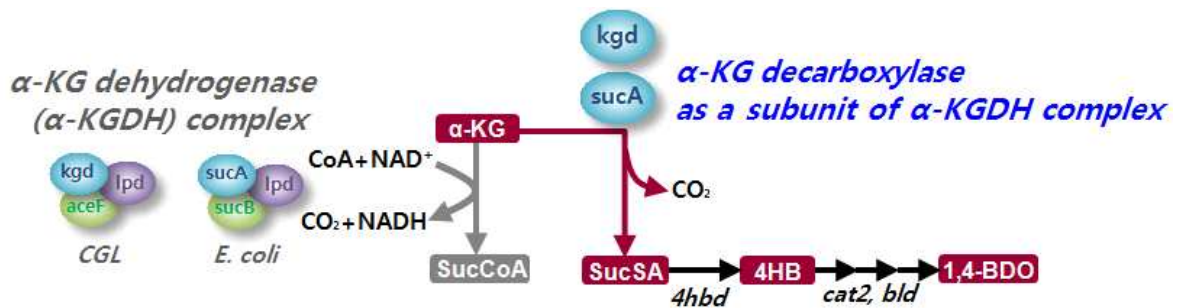
α -Ketoglutarate decarboxylation 경로는 1,4-BDO 생합성 과정에서 Upstream (Glucose \rightarrow 4HB)에 속하는 주요 단계임 (그림 1). α -Ketoglutarate (α -KG)를 Succinate semialdehyde (SucSA)로 비가역 전환시키는 α -Ketoglutarate decarboxylase (KDC) 효소의 반응으로 KDC 경로 강화는 1,4-BDO 생성 증가에 직접적 영향을 미칠 수 있음.



<그림. KDC 효소 해당 경로>

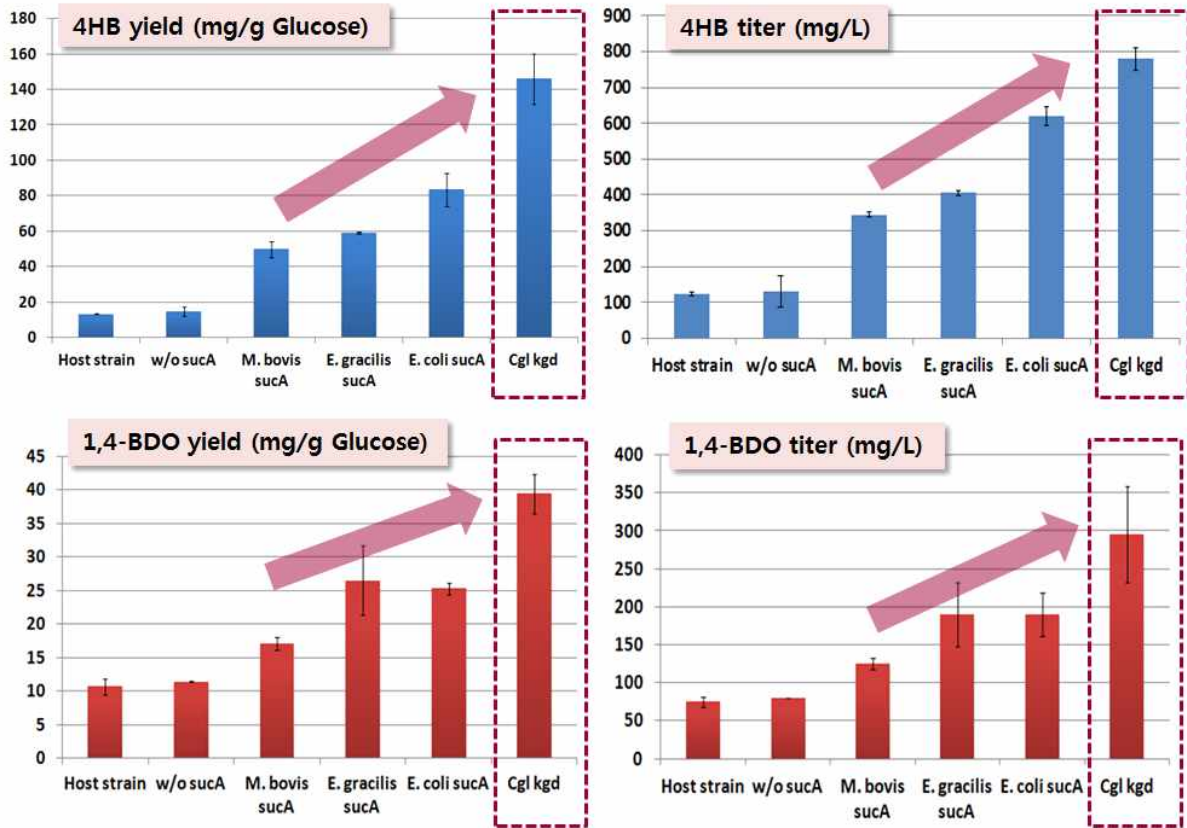
KDC 경로의 강화를 위하여 기존의 *Mycobacterium bovis* 유래 SucA 보다 우수한 KDC 효소를 발굴 및 대체하고자 하였음. 그 후보로 기존 SucA와 같은 효소군 (EC 4.1.1.71)에 속하는 *Euglena gracilis* 유래 SucA와 α -KG dehydrogenase (α -KGDH) 효소군 (EC 1.2.4.2)에 속하는 *E. coli* 유래 SucA, *Corynebacterium glutamicum* 유래 Kgd (OdhA)를 선정하였음 (그림 2). *E. coli* SucA와 *C. glutamicum* Kgd는 α -KGDH complex의 3가지 subunit 중 하나에 속하는데, 단독 과발현시 4HB 및 1,4-BDO 생성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였음.

#	Label	Kdc gene & Microbial source	Gene size (bp)	Characteristic	EC number
1	M. bovis sucA	sucA from Mycobacterium bovis	3645	Control	α-KG decarboxylase (EC 4.1.1.71) : α-KG → SSA+CO ₂
2	E. gracilis sucA	sucA from Euglena gracilis	1902	Eukaryotic	
3	E. coli sucA	sucA from E. coli MG1655	2802	A part of α-KG dehydrogenase (α-KGDH) complex	α-KG decarboxylase as a subunit of α-KGDH complex (EC 1.2.4.2) : α-KG + CoA + NAD ⁺ → Succinyl-CoA + CO ₂ + NADH
4	Cgl kgd	kgd (odhA) from Corynebacterium glutamicum ATCC13032	3666		



<그림. KDC 유전자의 선정 및 특징>

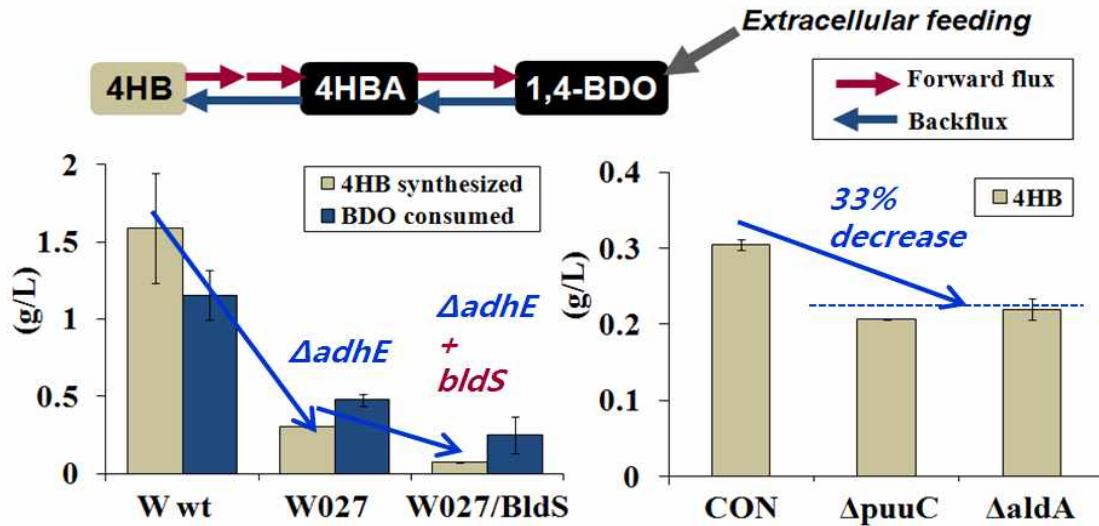
Succinyl-CoA에서부터 생성되는 Succinate semialdehyde의 영향을 배제하고자 SucD 경로는 도입되지 않은, KDC 및 4HBd 유전자 도입 균주 (4HB 균주)와 KDC 및 4HBd, Cat2, Bld 유전자 도입 균주 (1,4-BDO 균주)를 제작하여 4HB 및 1,4-BDO 생성 비교로 KDC 유전자 효과를 평가하였음 (in vivo assay). E. gracilis SucA, E. coli SucA, C. glutamicum Kgd 모두 Control인 M. bovis SucA 보다 4HB 및 1,4-BDO 생성이 증가하였음 (아래 그림). 특히 C. glutamicum Kgd 도입 균주의 경우, 4HB 생성 양 및 수율이 2.26~2.93배 증가하였고, 1,4-BDO 생성 양 및 수율이 1.55~2.30배 증가하였음. 따라서 대장균 1,4-BDO 생산균주에서 기존 M. bovis sucA를 C. glutamicum kgd 유전자로 대체하였음.



<그림. 기존 및 신규 KDC 효소의 4HB, 1,4-BDO 생성 비교>

나. 1,4-BDO 소모 경로 차단 통한 1,4-BDO 생산 강화

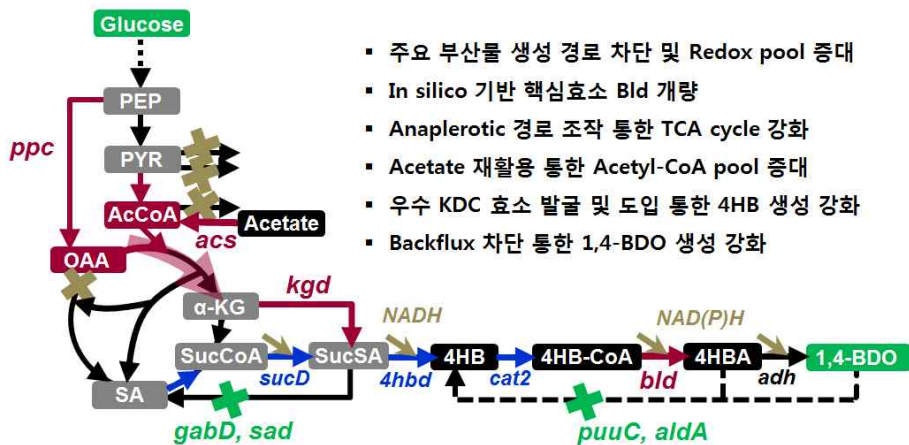
E. coli는 Alcohol을 Aldehyde 및 Carboxylic acid로 전환시키는 수 십개의 Alcohol dehydrogenase, Aldehyde dehydrogenase 효소를 보유함. 이러한 Alcohol/Aldehyde dehydrogenase가 생성된 1,4-BDO를 4HB로 역전환시킬 수 있으므로 관련 경로 (Backflux)를 차단하여 1,4-BDO 생산을 강화하고자 하였음. 우선, Host strain인 E. coli W wild-type 균주와 4차년도에 제작한 SAIT W027 및 W027/BldS 균주의 Backflux 영향을 평가하였음 (그림 4). 탄소원으로 1,4-BDO 10 g/L를 포함하는 LB 배지에서 1,4-BDO 소모를 통한 4HB 생성 양을 측정한 결과, wild-type 균주의 경우 1,4-BDO 소모 및 4HB 생성 양이 가장 많았고, adhE 유전자가 제거된 W027 균주의 경우 그 양이 크게 감소하였음. 이는 E. coli의 주요 Alcohol dehydrogenase인 AdhE에 의한 1,4-BDO backflux 영향이 크게 존재함을 의미함. W027에 4차년도 주요 개발 효소인 BldS를 도입한 균주 (W027/BldS)의 경우, W027 대비 1,4-BDO 소모 및 4HB 생성 양이 50% 이상 감소하였음. 이는 Aldehyde dehydrogenase의 일종인 Bld 효소 및 그 mutant BldS가 1,4-BDO로의 정방향 활성이 더 강하다는 것을 의미함.



<그림. Adh 및 Ald 경로 차단 통한 1,4-BDO 소모 감소>

W027를 기준으로 1,4-BDO Backflux를 더 감소시키기 위해 Aldehyde dehydrogenase 유전자를 탐색하였음. 후보 유전자로 3-Hydroxypropionaldehyde dehydrogenase 효소 해당 *puuC* (*aldH*)와 Aldehyde dehydrogenase A 효소 해당 *aldA*를 선정하여 제거 효과를 평가하였음. 제거 균주 모두 1,4-BDO 소모를 통한 4HB 생성 양이 약 33% 감소하였음. 따라서 W027에 *puuC*와 *aldA* 유전자를 모두 제거하였음. 최종적으로 5차년도에는 4차년도 개발 균주 SAIT W027/*bldS*를 기반으로 우수 KDC 효소인 *C. glutamicum* 유래 *Kgd*를 도입하고 1,4-BDO Backflux로 *PuuC*와 *AldA* 경로를 차단한 SAIT W030/*bldS* 균주를 제작하였음 (그림).

Genotype & Plasmids	
SAIT W025/ <i>ald</i>	<i>E. coli</i> W Δ <i>ldhA</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>lpdA::K</i> . <i>lpd(E354K)</i> Δ <i>mdh</i> Δ <i>arcA</i> <i>gltA(R164L)</i> Δ <i>gabD</i> Δ <i>sad</i> / pTac15k <i>sucCD-sucD-4hbd-sucA</i> + pTrc99a <i>ald-cat2</i>
SAIT W027/ <i>bldS</i>	<i>E. coli</i> W Δ <i>ldhA</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>lpdA::K</i> . <i>lpd(E354K)</i> Δ <i>mdh</i> Δ <i>arcA</i> <i>gltA(R164L)</i> Δ <i>gabD</i> Δ <i>sad</i> <i>Pacs::Ptrc Pppc::Ptrc</i> / pTac15k <i>sucCD-sucD-4hbd-sucA</i> + pTrc99a <i>bldS(bld M227L L273I)-cat2</i>
SAIT W030/ <i>bldS</i>	<i>E. coli</i> W Δ <i>ldhA</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>lpdA::K</i> . <i>lpd(E354K)</i> Δ <i>mdh</i> Δ <i>arcA</i> <i>gltA(R164L)</i> Δ <i>gabD</i> Δ <i>sad</i> <i>Pacs::Ptrc Pppc::Ptrc</i> Δ <i>puuC</i> Δ <i>aldA</i> / pTac15k <i>sucCD-sucD-4hbd-kgd</i> + pTrc99a <i>bldS(bld M227L L273I)-cat2</i>

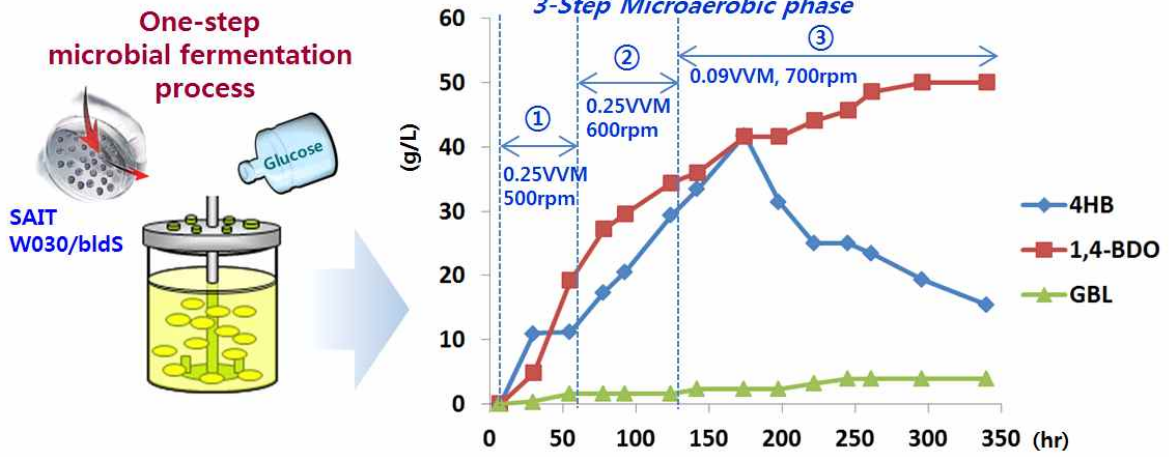


- 주요 부산물 생성 경로 차단 및 Redox pool 증대
- In silico 기반 핵심효소 Bld 개량
- Anaplerotic 경로 조작 통한 TCA cycle 강화
- Acetate 재활용 통한 Acetyl-CoA pool 증대
- 우수 KDC 효소 발굴 및 도입 통한 4HB 생성 강화
- Backflux 차단 통한 1,4-BDO 생성 강화

<그림. 대장균 1,4-BDO 최종 균주의 제작 및 대사 경로>

다. 1,4-BDO 발효 공정 최적화

최종 균주 SAIT W030/bldS의 유가식 (Fed-batch) 배양 및 이의 최적화를 통해 1,4-BDO 생산을 증가시켰음. 배양은 크게 Biomass 확보를 위한 Aerobic 구간과 1,4-BDO 생산을 위한 Microaerobic 구간으로 나뉘어지는데, 5차년도에는 Aeration 조절 및 배지 강화를 통해 1,4-BDO 생산 구간을 최적화하였음. 0.25VVM, 500rpm의 단일 조건에서 단계적 Aeration 조절을 통해 1,4-BDO 생산 최적 조건을 확립하였음 (0.25VVM, 500rpm -> 0.25VVM, 600rpm -> 0.09VVM, 700rpm). 또한, 세포 활성 유지를 통한 1,4-BDO의 지속적 생산을 위해 기존 배지 성분의 양을 2배 증가시켰음. 기본 MR 배지는 증류수 1L당 6.67g KH₂PO₄, 4g (NH₄)₂HPO₄, 0.8 g citric acid, 0.8 g MgSO₄ · 7H₂O, 5 mL trace metal solution의 성분을 포함함. 이와 같은 발효 공정 최적화를 통해 부산물 축적 감소와 함께 최종 50g/L의 1,4-BDO를 생산할 수 있었음 (아래 그림). SAIT W030/bldS 균주 개발을 통해 발효 초중반까지 중간체인 4HB와 1,4-BDO의 생산을 최대화하고 Aeration 등 발효 공정 최적화를 통해 1,4-BDO 생산을 지속적으로 증가 및 유지시킨, 균주와 발효 공정의 통합 개발 결과라고 볼 수 있음.



<그림. SAIT W030/bldS 균주의 발효 공정 최적화 통한 1,4-BDO 생산 향상>

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	달성도	구체적인 내용
돼지감자 개량 및 대량생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> 돼지감자 재분화 조건 구명 돼지감자 형질전환 조건 및 체계 확립 이눌린 함량증대 감자 생산 돼지감자 형질전환 기술 확립 돼지감자 대량재배 및 공급 	100	<ul style="list-style-type: none"> 돼지감자 기내배양 조건 및 재분화 조건 구명 돼지감자 개량을 위한 유전자 발굴 돼지감자 괴경형성, 당대사 관련 유전자 발굴 이눌린 함량증대를 위한 SST, FFT 유전자 확보 및 감자 이눌린 발현 확인 형질전환 체계 확립을 위한 재분화 조건, Agrobacterium strain 구명 GUS 유전자를 이용한 형질전환 확인 SST, FFT 유전자를 이용한 형질전환체 확보중 돼지감자 재배법, 바이오매스 생산량 검증 돼지감자 상시 재배 및 연구용 바이오매스 원료 상시공급 체계 구축
돼지감자 바이오매스 전처리 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> 돼지감자 바이오매스의 성분분석 돼지감자 전처리 특성 파악 돼지감자 바이오매스의 침출전처리 공정 적용 산, 암모니아 전처리 조건의 특성 파악 최적당화를 위한 전처리 공정의 최적화 전처리 공정 scale-up 설계 	100	<ul style="list-style-type: none"> NREL 기준 분석방법을 기준으로 바이오매스의 성분(당, 리그닌) 분석 완료 전처리 방법에 따른 바이오매스 영향 분석을 통해 암모니아 침출공정 선택 표면분석법을 통한 전처리 최적조건 확립 전처리 조건에 따른 효소당화 효율 확인 암모니아와 황산을 이용한 침출 공정 전처리 적용 RSM 분석법을 이용한 전처리 공정 변수의 최적화 탐색 당화수율에 다른 최적 공정 조건 확립 Scale-up 공정 변수 확보
KM 오믹스(유전체) 분석	<ul style="list-style-type: none"> KM 유전체 분석 Genome annotation 유전체 정보화 시스템 구축 기능 및 대사 경로 예측 웹기반 정보화 시스템 구축 효모 유전체 비교분석 배양조건에 따른 RNA-seq 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> KM 유전체 해독 균주로 CBS6556 선정하고 Illumina platform으로 KM 유전체 서열 분석 346개의 contig(>200 bp)를 확보하였으며 total contig length는 10,793,580 bp 확인 AutoFACT 및 ERGOTM을 이용한 genome annotation 웹 기반 유전체 정보화 시스템 구축, ERGO data 와 자체 InterPro 검색 결과 활용 웹 기반 유전체 정보화 시스템 구축 NGS 기법을 이용한 KM 유전체 염기서열 추가 해독 및 주석화 Finishing 및 assembly validation- 통합 유전체 주석화 - Ab inito gene model과 evidenced gene model

			<p>을 EvidenceModeler로 통합하여 최종 유전자 모델 산출</p> <ul style="list-style-type: none"> - rRNA gene 분석에 의해 대표적인 KM 균주 10종을 선별하여 Illumina HiSeq 2000과 Ion Torrent PGM으로 유전체 염기서열 결정 및 assembly 수행 ▪ 배양 조건에 따른 유전자 발현 분석, RNA-seq 실시 ▪ 전사체 분석 및 유전체 데이터에 대한 통합 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 조건(탄소원 및 온도)에 따른 RNA 분리 후 RNA-seq 및 genome tiling array로 유전자 발현 양상의 변화를 분석
KM 유전자 재조합 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 발현 toolbox 개발 ▪ 유전자 초고속 개량시스템 개발 ▪ 유전체 정보기반 표면발현 시스템 구축 ▪ 단백질 고분비 생산 모듈 개발 ▪ 재조합 셀룰레이즈 고분비생산 기술 ▪ 섬유소분해효소 카테일 제조 및 당화 기술 개발 ▪ KM C6/C5 동시활용 균주 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 형질전환을 위한 선별표지, 영양요구성 변이주, 자기복제서열의 확보 및 특성분석 ▪ 유전자 발현 toolbox 개발을 위한 프로모터의 스크리닝, 분비시그널 발굴 및 개량 ▪ 유전자 integration 및 plasmid 형태로 외래단백질 발현 분비생산 확인(리포제, β-glucosidase) ▪ KM in vivo recombination 시스템 활용 효소 유전자 초고속 개량시스템 개발 ▪ KM proteome 및 secretome 분석 ▪ KM 단백질분비융합인자 발굴 및 제조 ▪ 재조합단백질 고분비생산 기술(CalB, 섬유소분해효소 β-glucosidase(SfBGL1), EPG 등 분비 발현) ▪ 재조합 리포제 생산 기술 기술이전 ▪ 효소 표면발현 시스템 구축 ▪ 바이오매스 당화효소 활성 개량 및 효소 카테일 제조 ▪ 바이오매스 당화 최적화 기술 개발 ▪ Xylose 활용균주 개발 ▪ Xylose isomerase 분비 발현을 통한 C5/C6 동시 활용 균주 개발(특허출원) ▪ 바이오에탄올 및 유용 바이오케미컬 생산용 CBP 균주 개발
KM 합성생물학 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오매스 분해/전환효소 초고속 활성 분석 확립 ▪ 구조기반 단백질공학 적용연구 ▪ CBD 대사복합체 개발 ▪ 1,4-BDO 합성 대사복합체 구축 ▪ CBD등 대사복합체의 검증 및 in vitro 특성조사 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오매스 분해/전환효소 구조 비교분석을 통한 모듈형 단백질설계 및 개량연구 수행 ▪ 유전자회로 이용 효소활성을 초고속 분석 합성생물학기술 개발(GESS기술) ▪ 합성생물학적 Metabolosome 구축을 위한 Protein Body기술 개발 ▪ CBD 대사집적체 이용 효소안정성 및 특성규명 연구 ▪ CBD 대사집적체 이용 연속반응 생합성 수행 및 효율분석

			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 효모 세포 내 CBD복합체 형성 ▪ 1,4-BDO 합성효소 4종의 LZ융합단백질 유전자 합성 및 발현 ▪ CBD 대사집적체 이용 효소안정성 및 특성규명 연구 ▪ CBD 대사집적체 이용 연속반응 생합성 수행 및 효율분석 ▪ 대사복합체를 이용하여 숙신산 및 바이오부탄올 생산 검증
1,4-BDO 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1,4-BDO 경로유전자 합성/재설계 ▪ 1,4-BDO 생합성 경로 디자인 ▪ 생합성경로 핵심 유전자 도입 및 발현 최적화 ▪ 대사공학 및 시스템 생물공학 기법에 의한 균주 재설계 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KM 균주에서 고부가 바이오신소재 (1,4-BDO) 생합성 경로 핵심 유전자 확보 및 유전자 도입 균주 개발 ▪ 1,4-BDO 생산을 위한 핵심 전환효소 4종 확보 ▪ 1,4-BDO 생합성 유전자 조합 KM 발현 최적화를 위한 연구 ▪ KM균주의 genome library 구축을 통한 1,4-BDO 내성 균주 선별 기술 개발 ▪ 1,4-BDO 내성 균주(E. coli) 이용 1,4-BDO 생산 균주 개발 ▪ <i>In silico</i> simulation 을 이용한 1,4-BDO 생합성 핵심 효소 개발 및 개량 ▪ TCA cycle 강화를 통한 1,4-BDO 기질 생성 강화 ▪ Anaplerotic 경로 강화 통한 TCA 중간체 생성 강화 ▪ 1,4-BDO 소모 경로 차단 통한 1,4-BDO 생산 강화 ▪ 1,4-BDO 발효 공정 최적화(1,4-BDO 50g/L 생산)
Lactic acid 생산 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 이눌린 활용 KM lactic acid 생산균주 개발 ▪ 내산성 효모 발굴 및 LA 생산 균주 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이눌린 기반 L-lactic acid 및 D-lactic acid 생산 KM균주 개발(생산농도 148 g/L) ▪ 비식용 섬유소 기반 lactic acid 생산 CBP 균주 개발 ▪ 대사공학적 개량을 통한 LA 생산성 개선 ▪ Lactic acid 분리 정제 기술 개발 (순도 95% 이상)
바이오신소재 DFA 생산 효소 및 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 이눌린 활용 DFA III 생산 효소 및 균주 개발 ▪ 자당 및 레반을 이용한 DFA IV 생산 효소 및 균주 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이눌린으로부터 DFA III 생산용 재조합 효소 (AsIFT) 생산 및 생산균주 개발(이눌린 기반 73.4% DFA III 전환) ▪ 자당 또는 레반으로부터 DFA IV 생산용 재조합 효소 및 생산 균주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 레반으로부터 효소반응 60% 전환, 발효 68.7% 전환 - 자당으로부터 단일스텝 발효를 통해 67.9 g/L DFA IV 생산
돼지감자를 활용한 바이오에탄올	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 지상부 섬유소를 이용한 에탄올 발효 공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지감자 지상부 섬유소와 지하부를 동시에 이용한 발효 공정 개발 ▪ 돼지감자 지상부 섬유소 전처리 및 바이오에너지

<p>및 바이오소재 생산 공정 개발</p>	<p>▪ 돼지감자 지하부 이눌린 을 이용한 에탄올 발효 공정 개발</p>	<p>전환 공정 스케일업 (500리터 규모, 에탄올 농도 60.5 g/L, 생산성 5.04 g/L/h 달성) ▪ 돼지감자 이눌린의 공급 방식 최적화를 통한 lactic acid 생산 최대화(50L 규모, LA 농도 130.4 g/L, 생산성 3.25 g/L/h 달성)</p>
---------------------------------	--	---

- 돼지감자 형질전환 기술 개발의 완료를 통해 내재해성 유용 유전자를 도입하고 농가재배 또는 조건 불리지역의 대량 재배를 통해서 섬유소 바이오매스 및 이눌린의 대량 공급이 가능할 것임. 국내 부족한 바이오매스 문제를 해결하고 국내 바이오에너지 및 바이오화학소재 대규모 수요시 농촌 재배를 통해 농가소득 증대 및 국내 농업의 경쟁력 강화가 가능할 것으로 예상됨.

- 본 연구를 통해 확보된 돼지감자는 현재 국내에서 개발되고 있는 바이오매스로서 거대역새와 더불어 바이오매스 작물로서 활용 가능하며 바이오매스 대규모 수요시 간척지나 미활용 토지를 대상으로 대량재배 가능할 것임.

- 효모 KM 균주를 비목재 자원을 활용한 바이오신소재 생산을 위한 플랫폼 균주로 개발하기 위해 효모 유전체 분석, 유전자 재조합 기술, 합성생물학 기술 등을 이용하여 균주의 활용가치를 대폭 향상시켜 본 연구에서 대상으로 했던 바이오에너지/바이오화학 소재 이외에도 다양한 활용이 가능할 것으로 예상됨.

- 본 연구에서 개발 목표로 한 비식용 섬유소 바이오매스 기반 바이오에탄올 생산 기술은 국내 연료의무첨가제(RFS) 시행을 대비하여 효율적인 공급 기반을 제공할 수 있을 것임.

- 효모 KM을 이용한 이눌린 활용 lactic acid 생산 기술 및 내산성 효모를 이용한 lactic acid 생산 기술은 생산성이 세계 최고 수준이며 국내 바이오플라스틱 생산을 준비하고 있는 기업에서 현재 기술검증이 진행중이므로 기술이전을 통한 활용이 예상됨.

- KM 균주가 특이하게 1,4-BDO에 대한 저항성이 낮아 초기 목표로 했던 1,4-BDO의 생산은 산업균주 대장균을 이용하여 초기 목표 수준을 초과 달성하였으며 참여기업인 삼성전자에서 사업화를 고려하고 있음. 또한 다양한 환경시료로부터 신규 효모를 다수 발굴하였고 이들 중 1,4-BDO에 대한 내성을 갖는 효모가 다수 발굴되었으므로 추가 연구를 통해서 1,4-BDO의 생산 연구를 진행할 예정이며 생산성을 더욱 향상 시킬수 있을 것으로 예상됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

(1) 연구개발 성과

(단위 : 건수)

구분	(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	2					2		1	학회 발표
	달성	2	2				2			5
2차 년도	목표	5	1				2	3	2	
	달성	4	1				1	4	1	7
3차 년도	목표	6	2				2	5	2	
	달성	9	-				3	9	-	5
4차 년도	목표	6	3				2	5	-	
	달성	8	4				2	3	2	5
5차 년도	목표	6	3				2	5		
	달성	13	7				2	4		5
계	목표	25	9				10	18	5	
	달성	36	14				10	20	3	

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1		5	3
	달성	1+2건 진행중			7	1

기술이전 내역

1. 생물촉매 리파제를 이용한 바이오디젤 생산 기술, (주)대경에스코, 기술료 4억5천만원(선급 5천만원)(2014. 11. 19)
2. 내산성 효모를 이용한 D-lactic acid 생산 기술, 국내 L사(기술검증 진행중)
3. 고효율 변이 리파제 및 재조합 생산 기술, 국내 A사(기술이전 조건 협상중)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- DOE 바이오에너지 보고서

<http://genomicscience.energy.gov/centers/BRCs2014HR.pdf>

- EERE 바이오에너지 multi year Program

http://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/mypp_may_2013.pdf

- IEA 바이오에너지 Annual Report 2013

<http://www.ieabioenergytask43.org/wp-content/uploads/2014/03/IEA-Bioenergy-Annual-Report-2013.pdf>

- IRENA Global Bioenergy Supply and Demand Projections

http://www.irena.org/remap/IRENA_REmap_2030_Biomass_paper_2014.pdf

- Monthly Biodiesel Report

<http://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/biodiesel.pdf>

- 바이오화학 report 캐나다

[http://www.albertacanada.com/files/albertacanada/BioBased-Chemical-Import-Replacement-Report_Full-Report\(237_pages\).pdf](http://www.albertacanada.com/files/albertacanada/BioBased-Chemical-Import-Replacement-Report_Full-Report(237_pages).pdf)

제 7 장 참고문헌

Gao, C., Ma, C. and Xu, P. (2011) Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology advances*, 29, 930-939.

Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Kondo, A. (2010) Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 413-423.

Lee, J.W., Kim, H.U., Choi, S., Yi, J. and Lee, S.Y. (2011) Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current opinion in biotechnology*, 22, 758-767.

Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). *Enzyme and microbial technology*, 26, 87-107.

Okano, K., Yoshida, S., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Kondo, A. (2009) Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-Lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*, 75, 7858-7861.

Osawa, F., Fujii, T., Nishida, T., Tada, N., Ohnishi, T., Kobayashi, O., Komeda, T. and Yoshida, S. (2009) Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, 26, 485-496.

Ge, X.Y., Qian, H. and Zhang, W.G. (2010) Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20, 101-109.

Ge, X.Y., Qian, H. and Zhang, W.G. (2009) Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp. *Bioresource technology*, 100, 1872-1874.

Bruggink, C., Maurer, R., Herrmann, H., Cavalli, S. and Hoefler, F. (2005) Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1085, 104-109.

Kim, K. and Hamdy, M.K. (1986) Acid hydrolysis of Jerusalem artichoke for ethanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 28, 138-141.

Fleming, S.E. and GrootWassink, J.W. (1979) Preparation of high-fructose syrup from the

tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. CRC critical reviews in food science and nutrition, 12, 1-28.

Chi, Z., Zhang, T., Liu, G. and Yue, L. (2009) Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied microbiology and biotechnology*, 82, 211-220.

Porro, D., Brambilla, L., Ranzi, B.M., Martegani, E. and Alberghina, L. (1995) Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. *Biotechnology progress*, 11, 294-298.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. and Branduardi, P. (2010) 16 years research on lactic acid production with yeast - ready for the market? *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 27, 229-256.

Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. and Gombert, A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79, 339-354.

Pecota, D.C., Rajgarhia, V. and Da Silva, N.A. (2007) Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of biotechnology*, 127, 408-416.

Hause, B., Rajgarhia, V. and Suominen, P. (2009).

Jeong H, Lee D.H., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, K., Song, J.Y., Kim, B.K., Sung, B.H., Park, J.C., Sohn, J.H., Koo, H.M., Kim, J.F., (2012) Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. *Eukaryotic cell*, 11, 1584-1585.

Abdel-Banat, B.M., Nonklang, S., Hoshida, H. and Akada, R. (2010) Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 27, 29-39.

Bae, J.H., Sohn, J.H., Park, C.S., Rhee, J.S. and Choi, E.S. (2004) Cloning and functional characterization of the SUR2/SYR2 gene encoding sphinganine hydroxylase in *Pichia ciferrii*. *Yeast*, 21, 437-443.

Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods in enzymology*, 101, 202-211.

Kondo, K., Saito, T., Kajiwara, S., Takagi, M. and Misawa, N. (1995) A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *Journal of bacteriology*, 177, 7171-7177.

Branduardi, P., Sauer, M., De Gioia, L., Zampella, G., Valli, M., Mattanovich, D. and Porro, D. (2006) Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. *Microbial cell factories*, 5, 4.

Ishida, N., Saitoh, S., Tokuhira, K., Nagamori, E., Matsuyama, T., Kitamoto, K. and Takahashi, H. (2005) Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Applied and environmental microbiology*, 71, 1964-1970.

Wang, L., Xue, Z., Zhao, B., Yu, B., Xu, P. and Ma, Y. (2013) Jerusalem artichoke powder: a useful material in producing high-optical-purity l-lactate using an efficient sugar-utilizing thermophilic *Bacillus coagulans* strain. *Bioresource technology*, 130, 174-180.

Choi, H.Y., Ryu, H.K., Park, K.M., Lee, E.G., Lee, H., Kim, S.W. and Choi, E.S. (2012) Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis. *Bioresource technology*, 114, 745-747.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1135-45. doi: 10.1038/nbt1486. PubMed PMID: 18846087.

Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*. 2011 Feb 15;27(4):578-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btq683. Epub 2010 Dec 12. PubMed PMID: 21149342.

Gordon D, Green P. Consed: a graphical editor for next-generation sequencing. *Bioinformatics*. 2013 Nov 15;29(22):2936-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btt515. Epub 2013 Aug 31. PubMed PMID: 23995391; PubMed Central PMCID: PMC3810858.

Koski LB, Gray MW, Lang BF, Burger G. AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool. *BMC Bioinformatics*. 2005 Jun 16;6:151. PubMed PMID: 15960857; PubMed Central PMCID: PMC1182349

Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res*. 1999 Dec 1;27(23):4636-41. PubMed PMID: 10556321; PubMed Central PMCID: PMC148753.

Stein LD, Mungall C, Shu S, Caudy M, Mangone M, Day A, Nickerson E, Stajich JE, Harris TW, Arva A, Lewis S. The generic genome browser: a building block for a model organism

system database. *Genome Res.* 2002 Oct;12(10):1599-610. PubMed PMID: 12368253; PubMed Central PMCID: PMC187535.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011 Sep 29;8(10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701. PubMed PMID: 21959131.

Otto TD, Dillon GP, Degraeve WS, Berriman M. RATT: Rapid Annotation Transfer Tool. *Nucleic Acids Res.* 2011 May;39(9):e57. doi: 10.1093/nar/gkq1268. Epub 2011 Feb 8. PubMed PMID: 21306991; PubMed Central PMCID: PMC3089447.

Birney E, Clamp M, Durbin R. GeneWise and Genomewise. *Genome Res.* 2004 May;14(5):988-95. PubMed PMID: 15123596; PubMed Central PMCID: PMC479130.

Byrne KP, Wolfe KH. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* 2005 Oct;15(10):1456-61. Epub 2005 Sep 16. PubMed PMID: 16169922; PubMed Central PMCID: PMC1240090.

Haas BJ, Zeng Q, Pearson MD, Cuomo CA, Wortman JR. Approaches to Fungal Genome Annotation. *Mycology.* 2011 Oct 3;2(3):118-141. PubMed PMID: 22059117; PubMed Central PMCID: PMC3207268.

Haas BJ, Delcher AL, Mount SM, Wortman JR, Smith RK Jr, Hannick LI, Maiti R, Ronning CM, Rusch DB, Town CD, Salzberg SL, White O. Improving the Arabidopsis genome annotation using maximal transcript alignment assemblies. *Nucleic Acids Res.* 2003 Oct 1;31(19):5654-66. PubMed PMID: 14500829; PubMed Central PMCID: PMC206470.

Skinner ME, Uzilov AV, Stein LD, Mungall CJ, Holmes IH. JBrowse: a next-generation genome browser. *Genome Res.* 2009 Sep;19(9):1630-8. doi: 10.1101/gr.094607.109. Epub 2009 Jul 1. PubMed PMID: 19570905; PubMed Central PMCID: PMC2752129.

Proux-Wéra E, Armisén D, Byrne KP, Wolfe KH. A pipeline for automated annotation of yeast genome sequences by a conserved-synteny approach. *BMC Bioinformatics.* 2012 Sep 17;13:237. doi: 10.1186/1471-2105-13-237. PubMed PMID: 22984983; PubMed Central PMCID: PMC3507789.

Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrussamee N, Matsutani M, Murata M, Fujimoto N, Suprayogi, Tsuchikane K, Limtong S, Fujita N, Yamada M. Genetic basis of the

highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels*. 2015 Mar 18;8:47. doi: 10.1186/s13068-015-0227-x. eCollection 2015. PubMed PMID: 25834639; PubMed Central PMCID: PMC4381506.

Chan GF, Gan HM, Ling HL, Rashid NA. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot Cell*. 2012 Oct;11(10):1300-1. doi: 10.1128/EC.00229-12. PubMed PMID: 23027839; PubMed Central PMCID: PMC3485917.

Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H, Akada R. Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. 2010 Jan;27(1):29-39. doi: 10.1002/yea.1729. PubMed PMID: 19894210.

Conesa A, Götz S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics*. 2008;2008:619832. doi: 10.1155/2008/619832. PubMed PMID: 18483572; PubMed Central PMCID: PMC2375974.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011 Jan;29(1):24-6. doi: 10.1038/nbt.1754. PubMed PMID: 21221095; PubMed Central PMCID: PMC3346182.

Remm M, Storm CE, Sonnhammer EL. Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol*. 2001 Dec 14;314(5):1041-52. PubMed PMID: 11743721.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.