

적응진화를 활용한 cellobiose와 xylose 동시발효 *Pichia stipitis*의 개발

김대환, 이원흥*
전남대학교 바이오에너지공학과

Received: September 10, 2019 / Revised: October 6, 2019 / Accepted: October 10, 2019

Development of *Pichia stipitis* Co-fermenting Cellobiose and Xylose Through Adaptive Evolution

Dae-Hwan Kim and Won-Heong Lee*

Department of Bioenergy Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

Production of biofuels and value-added materials from cellulosic biomass requires the development of a microbial strain capable of efficiently fermenting mixed sugars. In this study, the natural xylose fermenting yeast, *Pichia stipitis*, was evolved to simultaneously ferment cellobiose and xylose. Serial subcultures of wild-type *P. stipitis* in 20 g/l cellobiose were performed to increase the rate of cellobiose consumption. A total of ten rounds of the serial subculture led to the isolation of an evolved strain fermenting cellobiose significantly faster than the parental strain. The evolved strain displayed enhanced ethanol yield from 0 to 0.4 g ethanol/g cellobiose. The evolved *P. stipitis* simultaneously fermented cellobiose and xylose in batch fermentation. The genetic information of our evolved *P. stipitis* would be valuable in the development of a microbial host for the production of biofuels and biomaterials from cellulosic biomass.

Keywords: *Pichia stipitis*, cellobiose, xylose, co-fermentation, adaptive evolution

서 론

근래 식용작물 유래의 전분계 바이오매스를 대체하여 비 식용 작물 유래의 섬유소계 바이오매스로부터 바이오소재 및 바이오연료를 생산하는 연구가 활발히 진행되어 왔다[1–3]. 전분계 바이오매스와 달리 섬유소계 바이오매스는 전처리 및 효소당화를 거쳐 glucose와 xylose 등의 혼합당으로 전환되는데, 대부분의 미생물은 glucose의 다른 당에 대한 대사억제(glucose repression)에 의해 glucose를 모두 대사한 후 다른 당을 대사하는 순차적인 발효양상을 보이며, 이로 인해 혼합당이 모두 대사되기까지 발효시간이 늘어날 뿐만 아니라 glucose 대사에서 발생하는 발효산물에 의해 다른 당의 대사가 저해되어 목적물질의 생산수율이 낮아지는 단점을 보이게 된다[4, 5]. 따라서 섬유소계 바이오매스로부터 바이오연료 및 바이오소재를 효과적으로 생산하기 위해서는

다양한 형태의 혼합당을 효과적으로 발효할 수 있는 미생물의 개발이 필수적이라 할 수 있다.

전통적인 맥주발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 xylose를 대사할 수는 없으나 탁월한 glucose 대사성능 및 ethanol 생산성능으로 인해 섬유소계 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 연구에 널리 활용되어 왔다[6–8]. xylose를 대사할 수 있는 다양한 미생물로부터 xylose 대사 효소들(예, xylose reductase, xylitol dehydrogenase 및 xylulokinase 등)을 도입하고 발현수준을 조절하여 xylose로부터 효과적으로 ethanol을 생산하는 균주가 개발된 바 있으며[9–11], glucose repression을 피하고 혼합당 대사효율을 높이기 위해 cellulose를 분해할 수 있는 미생물로부터 cellobiose 대사 효소들(예, cellobiose transporter 및 intracellular β -glucosidase 또는 cellobiose phosphorylase 등)을 추가로 도입하여 xylose와 cellobiose를 동시에 대사할 수 있는 균주가 개발되기도 하였다[12–14]. 그러나 이러한 재조합 *S. cerevisiae*는 xylose의 대사 중 xylitol 및 acetate 등의 부산물이 발생하는 문제점이 보고되어 왔으며[9, 10], xylose와 cellobiose의 동시대사 중에는 세포 내 cellobiose 분

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-2046, Fax: +82-62-530-2047

E-mail: wonhlee@jnu.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

해효소들의 비특이적인 글리코실전이반응(transglycosylation)에 의해 세포가 대사하기 힘든 다양한 형태의 중합체들이 부산물로 발생하는 문제점이 보고되어 왔다[12, 15, 16].

이에 반해 자연적으로 xylose를 대사할 수 있는 효모인 *Pichia stipitis*는 유전자 재조합 기술을 이용한 외래 유전자들의 도입과 추가적인 대사회로의 조절 없이도 섬유소계 바이오매스로부터 유래하는 다양한 당류들을 대사할 수 있다는 장점이 있다[17-19]. 그러나 야생형의 *P. stipitis*의 경우 xylose의 대사는 원활한 반면 cellobiose의 대사는 현저히 느리기 때문에 세포의 cellobiose 대사의 향상 없이는 glucose repression을 회피하여 섬유소계 바이오매스 유래의 다양한 당류들을 효과적으로 대사하기는 어렵다[20].

최근 미생물의 대사공학적 개선을 위한 방법으로 실험실 수준의 적응진화(adaptive evolution) 방법이 널리 활용되고 있다. 적응진화란 세포 내 특정 유전자들의 발현의 조절 또는 발현수준의 변화 없이는 미생물의 생육이나 대사가 어려운 환경(예, 기질공급의 제한, 환경 스트레스 유발 및 생육 저해제 첨가 등)에 미생물을 지속적으로 노출시켜 세포가 스스로 유전적 변이를 일으켜 환경을 극복하고 진화하도록 유도한 후, 돌연변이 개체들이 보통의 개체보다 환경에 우선 적응하여 우점종이 되도록 하여 균주를 개선하는 방법이다[21-23].

따라서 본 연구는 자연적인 xylose 대사 효모인 *P. stipitis*에 적응진화를 유도하여 섬유소계 바이오매스 유래의 혼합당인 xylose와 cellobiose를 효과적으로 대사하는 균주를 개발하고자 하였다. 이를 위해 cellobiose 환경에서 지속적인 계대배양을 통해 *P. stipitis*의 cellobiose 대사효율이 향상되도록 유도하였으며, 이를 통해 cellobiose와 xylose를 동시에 대사할 수 있는 *P. stipitis*를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 적응진화 및 진화된 균주의 선별

본 연구에서 적응진화를 통한 cellobiose 대사의 향상을 위해 *P. stipitis* CBS6054 균주가 사용되었다.

적응진화 실험을 위해 *P. stipitis* 단일 콜로니를 5 ml의 YPD 배지(10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose)를 포함한 테스트 튜브에 접종하고 30°C에서 250 rpm의 교반 속도로 전배양하였다. 전배양 중 대수증식기 후반에 효모 세포를 회수한 후 25 ml의 YPC 배지(10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l cellobiose)를 포함하는 플라스크에 세포 흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하고 30°C에서 90 rpm의 교반 속도로 본배양을 진행하였다. 본배양 중 대부분의 cellobiose가 소모되어 잔여농도가 약 1 g/l 내외까지 이르렀을 때 효모를 회수하여 새로운 YPC 배지에 세포 흡

광도가 0.1이 되도록 접종하였으며 이 과정을 총 10회에 걸쳐 수행하였다.

계대배양을 통해 얻어진 10번째 배양액을 20 g/l glucose를 포함한 YPD 고체배지에 적절하게 희석하여 도말한 후 30°C에서 약 2일간 배양하여 단일 콜로니를 확보하였다. 이후 무작위로 40개의 콜로니를 선별하여 20 g/l의 cellobiose가 함유된 YPC 배지에 세포 흡광도가 0.1이 되도록 접종하고 30°C에서 90 rpm 조건으로 배양을 진행하여 cellobiose 소모속도와 ethanol 생산수율이 높은 균주를 1차 선별한 후, 40 g/l의 cellobiose가 함유된 YPC 배지에서 동일한 조건으로 배양을 진행하여 cellobiose 소모속도와 ethanol 생산속도가 높은 균주를 최종 선별하였다. 돌연변이 균주의 선별을 위한 회분식 발효는 한 번씩 수행하였다.

혼합당 발효

20 g/l의 glucose를 함유한 YPD 배지에서 전배양 한 효모 균주들을 회수한 후 cellobiose와 xylose를 각각 20 g/l, 30 g/l 및 40 g/l 씩 함유하는 YPCX 배지에 세포 흡광도가 0.1이 되도록 접종한 후 30°C에서 90 rpm 조건으로 혼합당 발효를 진행하였다. 혼합당 발효는 각각 2회에 걸쳐 반복 실험을 수행하였다.

진화된 효모 균주의 안정성 확인

적응진화를 통해 선별한 *P. stipitis* 진화 균주가 유전적으로 안정한지 확인하기 위해 20 g/l glucose를 포함한 YPD 배지에서 세포 흡광도 0.1이 되도록 접종하고 30°C에서 90 rpm의 교반 속도로 배양을 진행하였으며, 24시간 후 세포를 회수하여 새로운 YPD 배지에 10회에 걸쳐 계대배양을 진행하였다. 아울러 각 배양 단계의 종료시점에서 효모 세포를 회수한 후 20 g/l의 cellobiose를 포함한 YPC 배지에 세포 흡광도 0.1이 되도록 접종하고 30°C에서 90 rpm 조건으로 회분식 발효를 진행하여, 적응진화를 통해 선별한 균주의 cellobiose 대사가 glucose 조건에서의 계대배양에 의해 변화하는지 확인하였다. *P. stipitis* 진화 균주의 유전적 안정성을 확인하기 위한 회분식 발효는 한 번씩 수행하였다.

분석방법

발효 중 세포성장을 확인하기 위해 배양액을 적당히 희석한 후 UV-visible spectrophotometer (Biomate, Thermo, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 발효 중 대사산물의 분석을 위해 배양액을 원심분리하여 세포를 제외한 상등액을 회수한 후 refractive index detector (RID)가 장착된 액체크로마토그래프(HPLC US/e2695, Waters, USA)를 이용하여 농도를 분석하였다. 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 이

동상으로는 0.01 N 황산용액을 0.6 ml/min의 유속으로 흘려 주었다.

결 과

적응진화를 통한 *P. stipitis*의 cellobiose 대사의 향상

*P. stipitis*의 cellobiose 대사효율을 확인하기 위하여 야생형의 *P. stipitis*를 약 20 g/l의 cellobiose를 탄소원으로 하여 회분식 발효를 진행한 결과, cellobiose를 모두 대사하기까지 160시간 이상이 소요되며 ethanol은 전혀 생성되지 않고 온전히 세포의 성장만 이루어지는 것을 확인하였다(결과는 제시하지 않음). 이에 cellobiose 조건에서 지속적으로 계대배양하는 적응진화 방법을 통해 cellobiose의 대사효율이 증가된 *P. stipitis* 돌연변이 균주를 확보하고자 하였다.

Fig. 1에서 보이듯이, 야생형의 *P. stipitis*를 이용한 적응진화의 첫 번째 배양에서는 발효 후 144시간이 지나도 cellobiose가 모두 소모되지는 않았으며 ethanol의 생성은 관찰되지 않았다. 적응진화의 두 번째부터 네 번째 배양도 첫 번째 배양과 마찬가지로 배양 시작 후 144시간이 지나도록 cellobiose가 모두 소모되지 않았으며, 다섯 번째 배양에서는 cellobiose가 144시간 안에 모두 소모되었으나 여전히 ethanol은 생성되지 않음을 확인하였다. 그러나 여섯 번째 배양부터 *P. stipitis*의 cellobiose 대사속도가 확연히 증가하여 다섯 번째 배양과는 달리 48시간 안에 모든 cellobiose를 소모하고 약 4.6 g/l의 ethanol을 생산하는 것이 관찰되었으며(ethanol 생산속도 0.1 g/l h, ethanol 수율 0.29 g ethanol/g

cellobiose), 일곱 번째 배양에서는 cellobiose 소모속도가 더욱 증가하여 24시간 동안 거의 모든 cellobiose를 소모하고 약 6.2 g/l의 ethanol을 생산하는 것이 관찰되었다(ethanol 생산속도 0.26 g/l h, ethanol 수율 0.42 g ethanol/g cellobiose). 추가적으로 수행한 열 번째 배양까지는 큰 폭의 cellobiose 대사속도의 향상은 관찰되지 않았으나, 일곱 번째 배양과 비교하여 열 번째 배양에서는 cellobiose가 배양 후 18시간 안에 모두 소모되어 약 6.9 g/l의 ethanol이 생성됨을 관찰하였다(ethanol 생산속도 0.38 g/l h, ethanol 수율 0.43 g ethanol/g cellobiose). 따라서 총 10회의 cellobiose 조건에서의 계대배양을 통해 야생형의 균주보다 cellobiose의 대사속도 및 ethanol 생성이 현저하게 상승한 돌연변이 균주 집단을 확보할 수 있었다.

Cellobiose 대사가 향상된 *P. stipitis* 진화 균주의 선별

Cellobiose 조건에서 적응진화된 균주 집단으로부터 cellobiose 대사가 향상된 *P. stipitis* 돌연변이 단일 개체를 선별하기 위하여 열 번째 배양에서 회수한 효모 세포들을 20 g/l의 glucose를 포함하는 고체배지에 배양하여 대략 350 개 정도의 콜로니를 확보한 후 40개의 콜로니를 무작위로 선별하여 20 g/l의 cellobiose 조건에서 회분식 발효를 수행하였다. 20 g/l의 cellobiose 조건에서 40개의 균주들은 거의 비슷한 수준의 cellobiose 대사 및 ethanol 생산 양상을 나타내었으며(보충 Fig. 1 및 보충 Table 1), 그 중 ethanol 수율을 비교하여 3개의 균주들을 골라 40 g/l의 cellobiose 조건에서 회분식 발효를 수행하여 우수한 cellobiose 대사효율을 보이

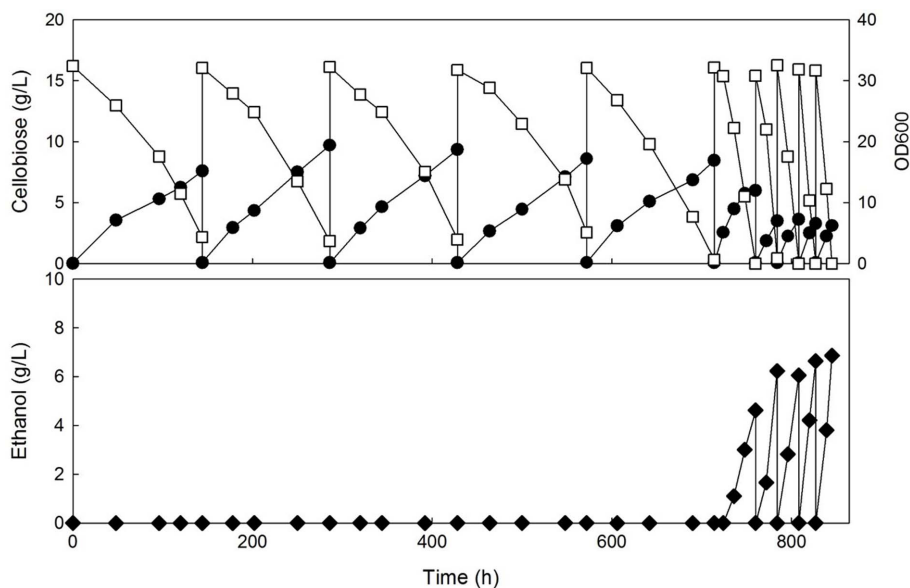


Fig. 1. Profiles of serial subcultures of wild-type *P. stipitis* on cellobiose condition. Symbols: cellobiose (□), OD₆₀₀ (●) and ethanol (◆).

Table 1. Summarized results from cellobiose fermentations with the parental *P. stipitis* strain and three isolated strains from the last culture of the serial subcultures. Fermentation parameters (OD₆₀₀, ethanol, sugar consumption rate, ethanol productivity and ethanol yield from sugar) were calculated from the values at 24 h after fermentations. All fermentation experiments for evaluation of the parental strain and the isolated strains were performed once.

Culture condition	Strains	OD ₆₀₀	Ethanol (g/l)	Sugar consumption rate (g/l-h)	Ethanol productivity (g/l-h)	Ethanol yield from sugar (g/g)
Cellobiose 20 g/l	CBS6054	4.1	0.0	0.10	0.00	0.00
	YN14	8.1	8.2	0.82	0.34	0.41
	YN16	8.7	8.0	0.83	0.33	0.40
	YN47	8.4	7.6	0.81	0.32	0.39
Cellobiose 40 g/l	CBS6054	5.1	0.0	0.17	0.00	0.00
	YN14	11.9	16.6	1.10	0.46	0.42
	YN16	12.3	15.8	1.08	0.44	0.40
	YN47	12.5	16.1	1.09	0.45	0.41

는 균주를 선별하고자 하였다.

Fig. 2는 *P. stipitis* 모균주 및 3가지 돌연변이 균주들 (YN14, YN16 및 YN47)의 20 g/l 및 40 g/l cellobiose 조건에서의 회분식 발효양상을 나타내고 있다. 20 g/l cellobiose 조건에서 모균주는 72시간 동안 약 6 g/l의 cellobiose를 소모하였으나 ethanol은 전혀 생성하지 못한 반면, 돌연변이 균주들은 거의 비슷한 발효양상을 나타내어 24시간 동안 cellobiose를 모두 소모하고 약 8 g/l의 ethanol을 생산하였다 (Fig. 2A-2C). 한편 40 g/l cellobiose 조건에서 모균주는 72시간 동안 약 10 g/l의 cellobiose를 소모하여 20 g/l cellobiose 조건에 비해 약간 증가한 cellobiose 소모속도를 나타내었으나 여전히 ethanol은 생성되지 않았다. 반면 돌연변이 균주들의 경우 20 g/l cellobiose 조건에서는 비슷한 발효양상을 나타내었으나, 40 g/l cellobiose 조건에서는 3가지 균주들이 약간 다른 발효양상을 나타내었다 (Fig. 2D-2F). 특히 YN14 균주는 발효 후 24시간 동안 다른 균주들에 비해 빠른 cellobiose 소모 및 ethanol 생산 양상을 보였기 때문에 YN14 균주를 최종적으로 선별하여 *P. stipitis* YN14로 명명하였으며 이후 추가적인 실험을 진행하였다. *P. stipitis* 모균주 및 3가지 돌연변이 균주들의 발효결과는 Table 1에 정리하였다.

진화된 *P. stipitis*의 cellobiose와 xylose 동시발효

Xylose를 원활하게 대사할 수 있는 재조합 *S. cerevisiae*에 곰팡이 유래의 cellobiose 대사 유전자들을 도입한 선행연구에서 재조합 *S. cerevisiae*는 cellobiose와 xylose를 동시에 대사하여 섬유소계 바이오매스로부터 ethanol과 같은 바이오연료를 효과적으로 생산할 수 있음이 보고된 바 있다 [12, 14]. 한편 야생형의 *P. stipitis*는 유전적인 조작 없이 xylose를 원활하게 대사할 수 있으며 본 연구에서 개발된 *P. stipitis*

YN14 균주는 cellobiose를 매우 빠르게 대사할 수 있기 때문에 *P. stipitis* 모균주와 YN14 균주가 혼합당을 효과적으로 대사할 수 있는지 확인하고자 cellobiose와 xylose 혼합당 조건에서 회분식 발효를 진행하였다.

Fig. 3은 cellobiose와 xylose가 각각 20 g/l, 30 g/l 또는 40 g/l가 포함된 혼합당 조건에서 *P. stipitis* 모균주 및 YN14 균주의 혼합당 발효양상을 나타내고 있다. Cellobiose와 xylose가 각각 20 g/l씩 포함된 혼합당 조건에서 모균주는 36시간 동안 xylose를 모두 소모한 반면 cellobiose는 7 g/l 정도 밖에 소모하지 못하였으며 약 8.3 g/l의 ethanol을 생산하였다 (Fig. 3A). 특히 발효 시작 후 24시간 동안 xylose의 대사는 원활하게 일어난 반면 cellobiose의 대사는 거의 일어나지 않은 것을 고려한다면, 모균주는 cellobiose 대사가 매우 느리기 때문에 xylose를 먼저 대사한 후에 cellobiose를 대사하는 순차적인 발효경향을 보인다고 판단할 수 있다. 또한 모균주는 cellobiose와 xylose가 각각 30 g/l 또는 40 g/l씩 포함된 혼합당 조건에서도 비슷한 발효양상을 나타내었다. 발효 중간 단계까지 xylose는 매우 원활하게 대사한 반면 cellobiose는 거의 대사하지 않았으며, xylose의 대사가 완료되는 단계에 이르러서야 cellobiose의 대사가 이루어지는 발효양상이 확인되었다 (Fig. 3B 및 3C). 그리고 모균주는 혼합당 발효 중 부산물(xylitol, glycerol 및 acetate 등)의 축적이 거의 일어나지 않는 것이 관찰되었다.

한편 YN14 균주의 경우 cellobiose와 xylose가 각각 20 g/l씩 포함된 혼합당 조건에서 cellobiose와 xylose를 각각 24시간 및 36시간 안에 모두 소모하였으며 그 결과로 약 15.3 g/l의 ethanol을 생산하였다 (Fig. 3D). 동일한 조건에서의 모균주 발효결과와 비교할 때 YN14 균주는 모균주와 거의 동일한 속도로 xylose를 대사하였으며, 이러한 결과는 cellobiose 조건에서의 적응진화는 YN14 균주의 xylose 대사에는 영향을

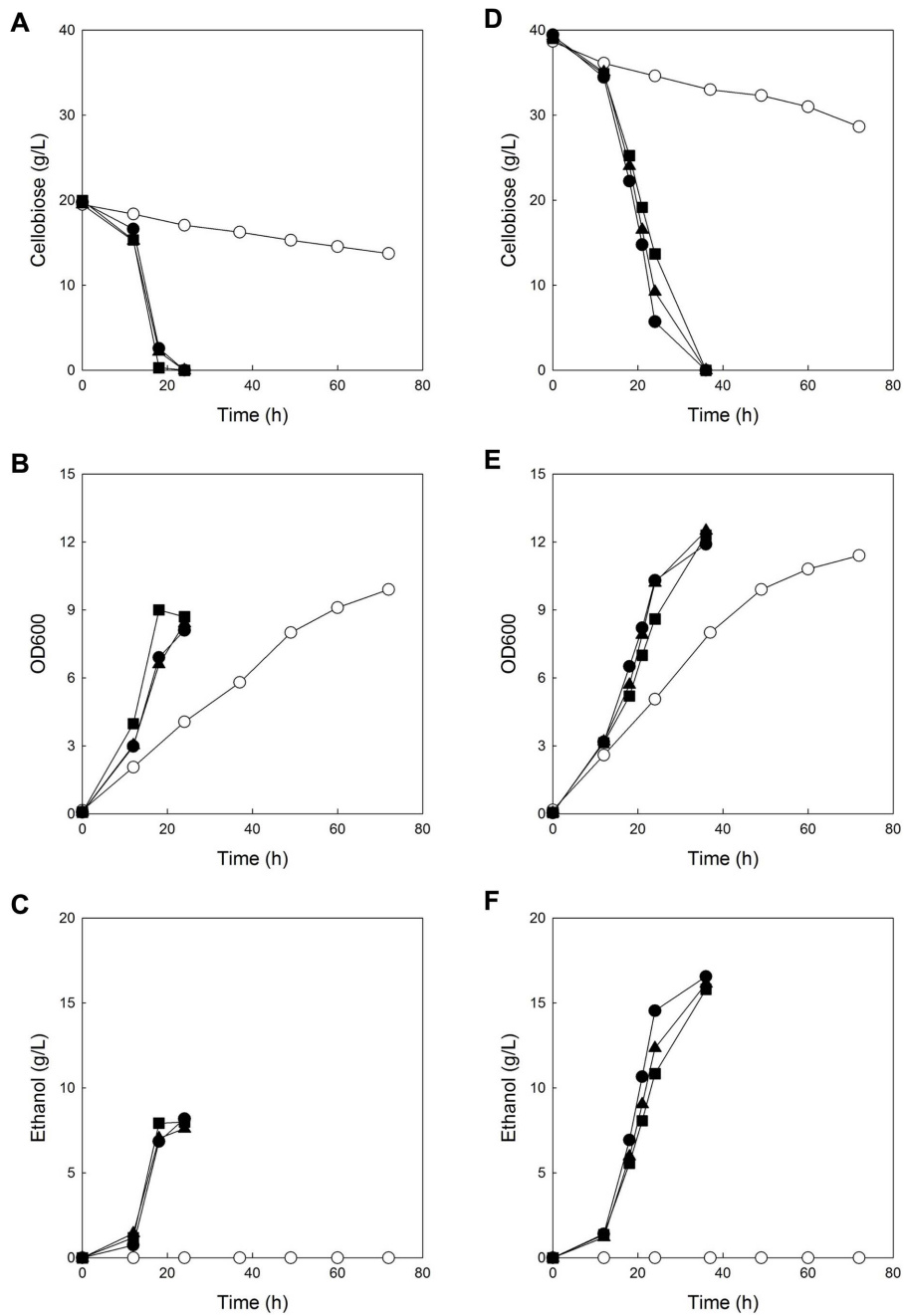


Fig. 2. Profiles of cellobiose fermentations by the parental *P. stipitis* strain and the three isolated strains from the last subculture. Cellobiose consumption (A), cell growth (B) and ethanol production (C) during the fermentation of 20 g/l cellobiose. Cellobiose consumption (D), cell growth (E) and ethanol production (F) during the fermentation of 40 g/l cellobiose. Symbols: parental strain (○), YN14 (●), YN16 (■) and YN47 (▲). All fermentation experiments for evaluation of the parental strain and the isolated strains were performed once.

미치지 않았다는 것을 의미한다. 아울러 YN14 균주는 cellobiose와 xylose가 각각 30 g/l씩 포함된 혼합당 조건에서 보다 선명한 혼합당 동시대사 양상을 보였다. Cellobiose가

xylose보다 약간 빠르게 대사되는 양상이 관찰되었으나, 두 가지 당은 발효 시작 후 36시간 동안 비슷한 속도로 모두 대사되었으며 그 결과로 약 23.4 g/l의 ethanol이 생성되었다

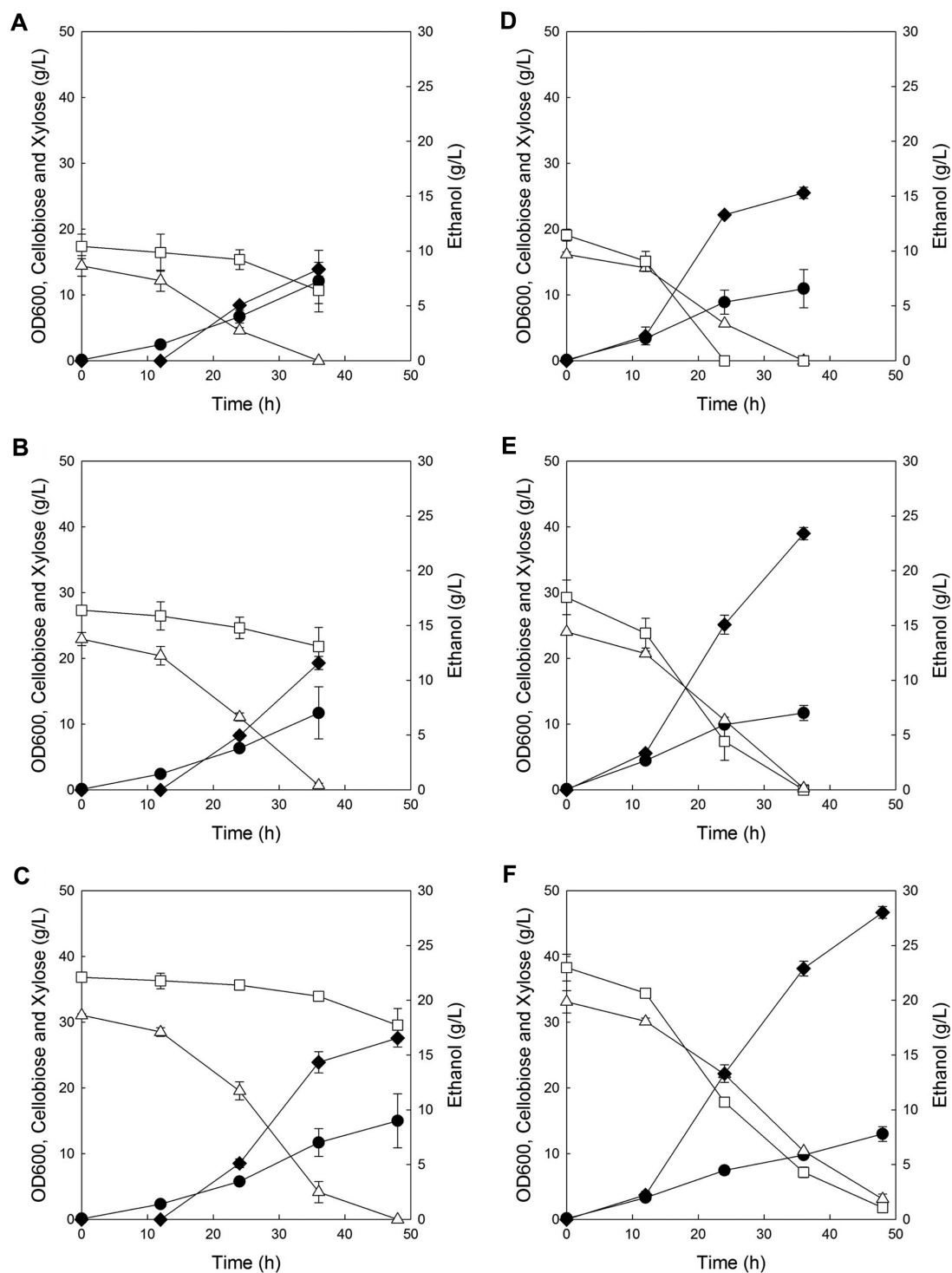


Fig. 3. Comparison of fermentation profiles of the parental *P. stipitis* strain and the mutant YN14 strain during the fermentation with the mixed sugars containing cellobiose and xylose. Parental strain with 20 g/l cellobiose and 20 g/l xylose (A), 30 g/l cellobiose and 30 g/l xylose (B), and 40 g/l cellobiose and 40 g/l xylose (C). Mutant YN14 strain with 20 g/l cellobiose and 20 g/l xylose (D), 30 g/l cellobiose and 30 g/l xylose (E), and 40 g/l cellobiose and 40 g/l xylose (F). Symbols: cellobiose (□), xylose (Δ) OD₆₀₀ (●) and ethanol (◆). All values represent averages of two independent fermentation experiments and the error bars denote standard deviations from the two fermentation experiments.

Table 2. Summarized results from the fermentations of cellobiose and xylose with the parental *P. stipitis* strain and the mutant YN14 strain. All values represent the average \pm standard deviation from the two independent fermentations.

Culture condition	Strains	OD ₆₀₀	Ethanol (g/l)	Total sugars consumption rate (g/l·h)	Ethanol productivity (g/l·h)	Ethanol yield from sugars (g/g)
Cellobiose 20 g/l + xylose 20 g/l	CBS6054	12.1 \pm 4.67	8.3 \pm 0.63	0.59 \pm 0.04	0.23 \pm 0.02	0.40 \pm 0.00
	YN14	11.0 \pm 2.90	15.3 \pm 0.50	0.98 \pm 0.01	0.43 \pm 0.01	0.43 \pm 0.02
Cellobiose 30 g/l + xylose 30 g/l	CBS6054	11.7 \pm 3.96	11.6 \pm 0.60	0.77 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02	0.42 \pm 0.04
	YN14	11.7 \pm 1.13	23.4 \pm 0.56	1.47 \pm 0.07	0.65 \pm 0.02	0.44 \pm 0.01
Cellobiose 40 g/l + xylose 40 g/l	CBS6054	15.0 \pm 4.10	16.5 \pm 0.80	0.80 \pm 0.05	0.34 \pm 0.02	0.43 \pm 0.01
	YN14	13.0 \pm 1.13	28.0 \pm 0.53	1.39 \pm 0.05	0.58 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02

(Fig. 3E). 아울러 동일한 조건에서의 모균주 발효결과와 비교할 때, YN14 균주는 모균주와 거의 동일한 속도로 xylose를 대사한다는 것도 확인되었다. Cellobiose와 xylose가 각각 40 g/l씩 포함된 혼합당 조건에서도 두 가지 당의 동시대사 양상은 동일하게 관찰되었다. YN14 균주는 발효 시작 후 48시간 동안 비슷한 속도로 cellobiose와 xylose를 소모하였으며 약 28.0 g/l의 ethanol을 생산하였다(Fig. 3F). 그리고 YN14 균주 역시 모균주와 비슷하게 혼합당 발효 중 부산물의 축적은 거의 일어나지 않았으나, 특이하게도 혼합당이 각각 30 g/l 또는 40 g/l씩 포함된 조건에서는 발효 후반부(36시간 이후)부터 xylitol이 소량(약 0.7–0.9 g/l) 축적되는 것이 관찰되었다. 각 혼합당 조건에서의 YN14 균주의 ethanol 생산수율과 ethanol 생산속도는 cellobiose와 xylose가 각각 30 g/l씩 포함된 조건에서 0.44 g ethanol/g sugars 및 0.65 g/l·h로 가장 높았으며, 이러한 결과로부터 각 당이 약 30 g/l씩 포함된 조건이 혼합당 동시발효에 가장 효과적인 조건임을 알 수 있었다. *P. stipitis* 모균주와 YN14 균주

의 혼합당 발효결과는 Table 2에 정리하였다.

진화된 *P. stipitis*의 유전적 변이의 안정성 확인

본 연구에서는 cellobiose의 대사가 현저히 느린 야생형 *P. stipitis*를 이용하여 cellobiose 조건에서 적응진화를 진행하여 cellobiose 대사효율이 상승한 YN14 균주를 확보할 수 있었으며, 이는 *P. stipitis* 모균주가 cellobiose 대사와 관련된 유전자들의 돌연변이 혹은 발현 수준의 변화 없이는 생육이 어려운 환경에서 스스로 유전적 변이를 일으켜 YN14 균주로 진화하였다는 것을 나타낸다. 아울러 이러한 결과는 YN14 균주를 cellobiose 대사에 관련된 스트레스를 유발하지 않는 환경에서 계대배양을 진행하는 경우 cellobiose 대사와 관련된 각종 인자들이 다시 변화하여 모균주와 비슷한 수준으로 회귀할 수도 있음을 시사한다. 따라서 YN14 균주가 유전적으로 안정한지 확인하기 위하여 glucose를 단일 탄소원으로 하는 조건에서 총 10회에 걸쳐 계대배양을 진행하였으며, 각 배양 단계의 종료시점에서 회수한 세포를 cellobiose를 단일

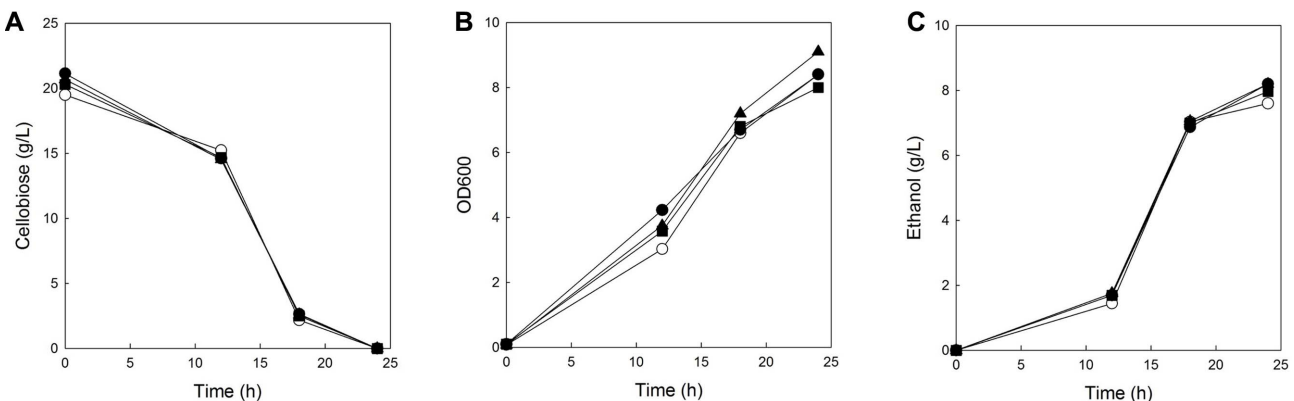


Fig. 4. Profiles of cellobiose fermentation by the YN14 cells harvested from the each culture of serial subcultures with glucose. Cellobiose consumption (A), cell growth (B) and ethanol production (C) during the fermentation of 20 g/l cellobiose. Symbols: yeast cells from 1st culture with glucose (○), yeast cells from 4th culture with glucose (●), yeast cells from 7th culture with glucose (■) and yeast cells from 10th culture with glucose (▲). All fermentation experiments with the yeast cells from the each culture of serial subculture were performed once.

탄소원으로 하는 조건에서 회분식 배양을 진행하여 YN14 균주의 cellobiose 대사양상을 비교하였다.

Fig. 4는 glucose 조건의 계대배양 단계에서 첫 번째 배양, 네 번째 배양, 일곱 번째 배양 및 열 번째 배양 후 회수한 YN14 균주들의 20 g/l cellobiose 조건에서의 회분식 발효양상을 나타내고 있다. Glucose 조건에서 1회 배양한 후 회수한 YN14 균주는 cellobiose 대사속도의 저하 없이 24시간 안에 모든 cellobiose를 소모하였으며 0.4 g ethanol/g cellobiose의 수율로 약 7.6 g/l의 ethanol을 생산하였다. Glucose 조건에서 4회, 7회 및 10회 계대배양한 후 회수한 YN14 균주들 역시 거의 변하지 않은 cellobiose 대사속도를 보였으며, glucose 조건에서 1회 배양한 YN14 균주와 거의 비슷한 ethanol 생산량 및 생산수율을 나타내었다(ethanol 생산 8.0–8.2 g/l, ethanol 생산수율 0.39–0.40 g ethanol/g cellobiose). 이러한 결과로부터 cellobiose 환경에서 적응진화한 YN14는 유전적으로 안정하기 때문에 스트레스를 유발하지 않는 환경에서 배양하더라도 진화에 필요했던 유전적 변이를 상실하지 않는다는 것을 확인하였다.

고 찰

*P. stipitis*는 섬유소계 바이오매스로부터 ethanol과 같은 바이오연료를 생산하는 미생물로 널리 활용되어 왔으며, xylose의 대사가 매우 원활할 뿐만 아니라 다양한 당류(예, glucose, mannose, galactose, cellobiose 등)를 대사할 수 있는 유용한 효모로 알려져 있다[17–19]. *P. stipitis*의 유전체 및 전사체를 분석한 선행연구 결과에 따르면, *P. stipitis*에는 약 11개의 sugar transporter(*SUT1–4*, *HXT2.1–2.6* 및 *HXT4*)와 약 7개의 intracellular β -glucosidase(*BGL1–7*)들이 cellobiose의 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다[18, 24]. 특히 *HXT2.4*와 *BGL5*, *HXT2.5*와 *BLG3* 및 *HXT2.6*과 *BGL1* 등은 유전체에서 각각 클러스터를 이루며 cellobiose 환경에서 상당히 높은 수준으로 발현되는 것이 확인되어 *P. stipitis*의 cellobiose 대사에 주요한 역할을 할 것으로 보고된 바 있다[18, 24]. 그러나 본 연구에서 야생형의 *P. stipitis*는 cellobiose 대사에 관련된 유전자를 다수 보유하고 있음에도 cellobiose의 대사속도가 매우 느린 것이 확인되었는데, 이는 세포 내의 cellobiose transporter들이나 intracellular β -glucosidase들의 활성이 매우 낮기 때문이거나 cellobiose를 빠르게 대사할 수 있을 정도로 충분히 발현되지 않는 때문인 것으로 사료된다. 선행연구에서 *P. stipitis* 유래의 *HXT2.4*와 *BGL5*를 도입한 재조합 *S. cerevisiae* 또는 *P. stipitis* 유래의 *HXT2.4*와 *Neurospora crassa* 유래의 *GH1-1* (intracellular β -glucosidase)을 도입한 재조합 *S. cerevisiae* 균주의 cellobiose 대사 효율이 좋지 않았음이 보고된 바 있

는데[25, 26], 이러한 선행연구 결과 역시 야생형 *P. stipitis*의 cellobiose 대사와 관련된 효소 및 단백질들의 활성은 그다지 높지 않음을 나타낸다.

한편 본 연구에서 개발된 YN14 균주는 매우 빠른 cellobiose 대사속도를 보였는데, 이는 적응진화를 통해 앞서 언급했던 sugar transporter들(예, *HXT2.4*, *HXT2.5* 및 *HXT2.6* 등)이나 intracellular β -glucosidase들(*BGL1*, *BGL3* 및 *BGL5* 등)이 유전적 변이를 일으켜 활성이 향상되었거나 발현 수준이 모균주에 비해 현격히 늘어났기 때문일 것으로 예상된다. 또한 YN14 균주는 적응진화에 의한 돌연변이에도 불구하고 xylose 대사가 거의 영향을 받지 않았으며 이를 통해 cellobiose와 xylose 혼합당을 동시에 대사하여 모균주에 비해 ethanol 생산 및 생산속도가 2배 가까이 빨라지는 발효결과를 나타내었는데, 이러한 결과를 cellobiose와 xylose를 동시에 대사하는 재조합 *S. cerevisiae*에 관한 선행연구결과와 종합해 본다면 효모에서 cellobiose 대사와 xylose 대사는 서로 간의 대사를 저해하지 않고 상승효과를 낼 수 있음을 알 수 있다[12, 14]. 그리고 YN14 균주는 혼합당의 농도가 높은 경우 약간의 xylitol이 축적되는 것이 관찰되었는데, 아마도 cellobiose와 xylose의 동시대사로 인해 YN14가 대사할 수 있는 한계치에 가깝게 혼합당이 유입되었기 때문인 것으로 추측된다. 흥미롭게도 YN14 균주는 cellobiose와 xylose를 동시에 대사하는 재조합 *S. cerevisiae*가 보였던 문제점 중 하나인 혼합당 발효 중 intracellular β -glucosidase의 글리코실전이반응에 의한 각종 당중합체의 형성이 거의 일어나지 않았다[12, 15, 16]. Cellobiose와 xylose 혼합당 발효에서 발효시간이 경과하더라도 cellobiose의 중합체 및 cellobiose와 xylose의 중합체가 배지 내에 축적되는 현상이 거의 발생하지 않았으며(보충 Fig. 2), 이는 YN14 균주의 cellobiose 대사에 관련된 효소들이 기존에 보고된 효소들보다 향상된 성능을 가지고 있음을 나타낸다. 따라서 YN14의 유전체 분석 및 전사체 분석과 같은 추가적인 연구를 통해 cellobiose 대사 향상의 원인 및 이와 관련된 주요 유전자들을 확보할 수 있을 것이며, 이를 섬유소계 바이오매스에서 유래하는 혼합당으로부터 효과적으로 바이오 연료 및 바이오 소재를 생산할 수 있는 미생물의 개발에 활용할 수 있을 것이다.

요 약

섬유소계 바이오매스로부터 바이오 연료 등과 같은 유용한 물질을 생산하기 위해서는 바이오매스로부터 유래하는 혼합당을 효과적으로 대사할 수 있는 균주의 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 xylose를 대사가 가능한 효모인 *P. stipitis*를 적응진화하여 cellobiose 대사효율이 향상되고

cellobiose와 xylose를 동시에 대사할 수 있는 균주를 개발하고자 하였다. 총 10회의 계대배양을 통해 얻어진 진화된 *P. stipitis* 돌연변이 균주는 모균주에 비해 6배 이상 증가된 cellobiose 대사속도를 나타내었으며 ethanol 생산수율을 0에서 0.4 (g ethanol/g cellobiose)로 향상시켰다. 아울러 본 실험에서 개발한 돌연변이 균주는 cellobiose와 xylose 혼합당 조건에서 모균주에 비해 2배 가까이 향상된 ethanol 생산 및 생산속도를 나타내었다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2019R1F1A1059516).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Amoah J, Kahar P, Ogino C, Kondo A. 2019. Bioenergy and Biorefinery: feedstock, biotechnological conversion and products. *Biotechnol. J.* **14**: e1800494.
2. Gray KA, Zhao L, Emptage M. 2006. Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**: 141-146.
3. Turner TL, Kim H, Kong II, Liu JJ, Zhang GC, Jin YS. 2018. Engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to produce biofuels and chemicals. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **162**: 175-215.
4. Gancedo JM. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.
5. Kayikci Ö, Nielsen J. 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **15**: fov068.
6. Jin YS, Cate JH. 2017. Metabolic engineering of yeast for lignocellulosic biofuel production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **41**: 99-106.
7. Park YC, Oh EJ, Jo JH, Jin YS, Seo JH. 2016. Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37**: 105-113.
8. Zhang GC, Liu JJ, Kong II, Kwak S, Jin YS. 2015. Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial bioconversion. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **29**: 49-57.
9. Kim SR, Park YC, Jin YS, Seo JH. 2013. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol. Adv.* **31**: 851-861.
10. Kim SR, Skerker JM, Kang W, Lesmana A, Wei N, Arkin AP, et al. 2013. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* **8**: e57048.
11. Tsai CS, Kong II, Lesmana A, Million G, Zhang GC, Kim SR, Jin YS. 2015. Rapid and marker-free refactoring of xylose-fermenting yeast strains with Cas9/CRISPR. *Biotechnol. Bioeng.* **112**: 2406-2411.
12. Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, Choi JH, Yang X, Seo JH, et al. 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 504-509.
13. Ha SJ, Galazka JM, Oh EJ, Kordić V, Kim H, Jin YS, et al. 2013. Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. *Metab. Eng.* **15**: 134-143.
14. Kim SR, Ha SJ, Wei N, Oh EJ, Jin YS. 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* **30**: 274-282.
15. Bae YH, Kang KH, Jin YS, Seo JH. 2014. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **169**: 34-41.
16. Chomvong K, Kordić V, Li X, Bauer S, Gillespie AE, Ha SJ, et al. 2014. Overcoming inefficient cellobiose fermentation by cellobiose phosphorylase in the presence of xylose. *Biotechnol. Biofuels.* **7**: 85.
17. Agbogbo FK, Coward-Kelly G. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1515-1524.
18. Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, et al. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* **25**: 319-326.
19. Perego P, Converti A, Palazzi E, Del Borghi M, Ferraiolo G. 1990. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microbiol.* **6**: 157-164.
20. Geiger M, Gibbons J, West T, Hughes SR, Gibbons W. 2012. Evaluation of UV-C mutagenized *Scheffersomyces stipitis* strains for ethanol production. *J. Lab. Autom.* **17**: 417-424.
21. Lang GI, Desai MM. 2014. The spectrum of adaptive mutations in experimental evolution. *Genomics* **104**: 412-416.
22. Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. 2019. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab. Eng.* **8**: 1-16.
23. Winkler JD, Kao KC. 2014. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics* **104**: 406-411.
24. Jeffries TW, Van Vleet JRH. 2009. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.* **9**: 793-807.
25. Ha SJ, Kim H, Lin Y, Jang M-U, Galazka JM, Kim TJ, et al. 2013. Single amino acid substitutions in HXT2. 4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 1500-1507.
26. Nelson SS, Van Vleet JH, Jeffries TW. 2010. Presented at the 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Clearwater Beach, FL.