

Plant Biomass Degradation and Bioethanol Production Using Hyperthermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*

Han-Seung Lee^{1,2*}

¹Department of Food Biotechnology, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Research Center for Extremophile and Marine Microbiology, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received November 19, 2015 / Revised December 22, 2015 / Accepted December 28, 2015

To overcome the depletion of fossil fuels and environmental problems in future, the research and production of biofuels have attracted attention largely. Thermophilic microorganisms produce effective and robust enzymes which can hydrolyze plant biomass and survive under harsh bioprocessing conditions. *Caldicellulosiruptor bescii*, which can degrade unpretreated plants and grow on them, is the one of the best candidates for consolidated bioprocessing (CBP). *C. bescii* can hydrolyze pectin efficiently as well as the major plant cell wall components, cellulose and hemicelluloses. Many glycosyl hydrolases and carbohydrate lyases with multidomain structure play an important role in plant biomass decomposition. Recently genetic tools for metabolic engineering of *C. bescii* have developed and bioethanol production from unpretreated biomass is achieved in *C. bescii*. Here, we review the recent studies for biomass degradation by *C. bescii* and bioethanol production in *C. bescii* in order to provide information about metabolic engineering of thermophilic bacteria and biofuel development.

Key words : Bioethanol, *Caldicellulosiruptor bescii*, consolidated bioprocessing (CBP), pectin, plant biomass

서론

머지 않은 미래에 다했 화석 연료 고갈과 화석 연료 사용에 따른 온실 효과 등의 심각한 환경 문제를 경감하기 위하여 재생에너지로서의 바이오연료(biofuel)에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 일반적으로 바이오연료는 다양한 바이오매스를 이용하여 생물학적 처리 과정을 통해 얻는 연료를 뜻하는데 바이오에탄올(bioethanol)이나 바이오부탄올(biobutanol) 등의 알코올류, 바이오디젤(biodiesel), 바이오수소(biohydrogen), 메탄 가스 등을 포함한다[20]. 그 중에서 가장 활발한 연구가 진행되고 있으며 실제 산업적으로 사용하고 있는 바이오연료는 바이오에탄올인데, 인류는 오랜 옛날부터 효모를 이용하여 알코올 발효를 통해 술을 만들어 왔기에 옥수수나 사탕수수 등을 원료로 사용하여 손쉽게 바이오에탄올을 생산할 수 있었다.

하지만 바이오에탄올의 원료로 사용하는 옥수수나 사탕수수의 양이 지속적으로 증가함에 따라 세계적인 곡물 가격 상승의 문제가 발생하게 되었고 좀 더 값싼 비식량자원 바이오

매스로부터 바이오에탄올을 생산하는 기술이 요구되었다[29]. 셀룰로스(cellulose)와 헤미셀룰로스(hemicellulose)는 비식량자원 바이오매스의 대표로서 현재 활발한 연구가 진행 중에 있는데 우리나라와 일본 등 아시아권 연구진들은 헤미셀룰로스나 미세조류의 바이오매스를 이용한 바이오연료 개발에 더욱 역점을 두고 있는 반면[26], 미국을 중심으로한 연구진들은 비식용 식물성 바이오매스를 이용하려는 다각적인 시도를 하고 있다. 미국 에너지부(Department of Energy: DOE)는 바이오연료의 생산과 이에 필요한 기초 원천 기술 개발을 위해, 2007년 다양한 연구자들의 컨소시엄으로 3개의 연구센터, Bioenergy Science Center (BESC), Joint Bioenergy Institute (JBEI), Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC)를 개소한 바 있다[39]. 이들 연구센터들은 유전자 변형 및 품종 개량을 통한 분해하기 쉬운 작물의 개발, 고효율 효소의 개발, 대사공학을 통한 고효율 발효균주의 개발 등에 힘써 왔는데 최근 가장 활발한 연구 성과를 내고 큰 주목을 받는 것이 초고온성 극한미생물 *Caldicellulosiruptor bescii*을 이용한 식물성 바이오매스의 분해와 바이오연료의 생산이다.

옥수수와 같은 전분질이나 사탕수수의 설탕(sucrose) 등은 미생물이 분해하기 쉬우므로 발효가 간단하고 쉽지만 식물성 바이오매스는 구조가 복잡하고 단단하여 생물학적 처리방법에 대한 저항성(recalcitrance)을 갖고 있기 때문에[25] 화학적 전처리가 필요하며, 당화와 알코올 발효까지 세가지 단계를 거쳐야 한다. 그런데 최근 *C. bescii*의 유전공학적 기법들이 개발됨에 따라 이 세 단계를 통합할 수 있는 통합바이오공정

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-6308, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : hanslee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(consolidated bioprocessing; CBP)이 큰 주목을 받고 있다[12]. 따라서 본 총설에서는 초고온성 세균인 *C. bescii*를 이용한 식물성 바이오매스의 분해와 바이오에탄올의 생산에 대한 최신 연구결과를 소개하고 향후 전망에 대해 논해보고자 한다.

본 론

식물성 바이오매스와 고온성 극한미생물

나무나 풀을 구성하는 비식용 식물성 바이오매스는 1세대 바이오에탄올의 원료인 옥수수나 사탕수수와 달리 그 구조가 매우 견고하고 복잡하다. 식물성 바이오매스를 구성하는 3대 주요 성분은 셀룰로스, 헤미셀룰로스(hemicelluloses), 리그닌(lignin)인데 각각의 식물종에 따라 그 구성비가 상당히 다르다[32]. 일반적으로 식물성 바이오매스에서 가장 풍부한 성분이자 상대적으로 단순한 구조를 이루고 있는 물질은 포도당의 β -1,4-결합물질인 셀룰로스인데 단단한 결정을 이루고 있기 때문에 그 구조를 화학적 처리로 무너뜨리지 않고서는 cellulase에 의해 쉽게 분해되지 않는다. 헤미셀룰로스는 자일로스, 갈락토스, 아라비노스 등의 다양한 당으로 구성된 이형다당(heteropolysaccharides)이기 때문에 한두 개의 효소로 완전한 분해가 어렵고 다양한 효소들의 복합작용을 이용한 당화가 필요하다. 그리고 지용성 폐놀고분자인 리그닌은 일반적으로 에탄올 발효에 방해가 되기 때문에 화학적 전처리 과정을 통해 제거해야 하는데 생물학적 방법으로는 그 분해가 어렵고 비용을 증가시키는 원인이 되는 물질이다[10]. 이외에도 식물에서 구조적으로 중요한 역할을 하는 성분은 펙틴(pectin)인데 전체 바이오매스 성분 중의 함량은 10% 이내로 적지만 식물 세포벽과 세포벽 사이의 라멜라층에 주로 분포하면서 세포들을 연결시켜주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[34].

이렇듯 식물성 바이오매스는 다양한 성분이 견고한 구조를 이루어 생물학적 처리 방법에 저항성(recalcitrance)을 갖고 있기 때문에 당화와 알코올 발효 이전에 전처리(pretreatment) 과정이 부가적으로 필요하다. 일반적으로 전처리 과정은 열처리와 화학적 처리를 동시에 진행하는데 산, 알칼리, 유기용매 등이 사용되며[44] 바이오연료 생산 과정 중에서 가장 비용이 많이 들고 환경에 유해한 폐기물들이 생산되는 공정이다. 따라서 식물 유전자들은 리그닌 합성을 억제하거나 세포벽의 구조를 느슨하게 만드는 유전자변형(Genetically modified; GM) 작물을 개발하여 수율을 높이고자 다양한 방법으로 노력하고 있다[10, 32].

하지만 최근 고온성 극한미생물을 이용하여 전처리 없이 효과적으로 리그노셀룰로스로부터 바이오연료를 생산할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다[5]. 호열성 세균들은 강력하고 효과적인 다당류 분해효소를 생산하며 가혹한 바이오프로세스 과정 중에도 견디는 높은 안정성을 보인다. 또한 고온 조건은 오염의 가능성이 적고 탄수화물의 용해도가 높아지며

생산된 알코올 회수가 용이한 장점이 있기 때문에[5] 셀룰로스 분해능이 있는 호열성 세균에 대한 연구가 주목을 받아 왔다. 그 중에서 최근 가장 큰 주목을 받는 균주는 *Clostridium thermocellum*과 *Caldicellulosiruptor bescii*인데 *C. thermocellum*은 최적 생육 온도가 55에서 60°C 정도이고 cellulosome이라는 단백질 복합체를 통해 셀룰로스를 효과적으로 분해하지만[2] 자일로올리고당 transporter가 없다는 단점이 있다. 반면 *C. bescii*는 최적 생육 온도가 80에 가까운 초고온균으로서 다양한 multidomain 효소들을 분비하고 5탄당과 6탄당을 모두 영양원으로 사용하며 최근 genetic system이 개발되어 많은 대사 공학적 연구가 진행되고 있는 실정이다[14, 42].

*Caldicellulosiruptor bescii*를 이용한 바이오매스의 효과적인 분해

*Caldicellulosiruptor bescii*는 1990년 러시아 캄차카 반도의 게이저(Geyzers) 계곡에 있는 온천에서 처음 분리되었고 처음엔 *Anaerocellum thermophilum*이라고 명명되었으나 후에 *C. bescii*로 재분류된 그램 양성 호열성 세균이다[42]. *C. bescii*의 생육 가능한 온도 범위는 42-90°C까지이고 생육 최적 온도는 78-80°C로 초호열성의 경계에 있으며 glucose, fructose, galactose, arabinose, cellobiose, lactose, maltose, mannose, melibiose, rhamnose, cyclodextrin, xylan 등의 다양한 당류 뿐만 아니라 결정형 셀룰로스(Avicel and sigmacell-20), filter paper (Whatman), xylan (beechwood, birchwood, and oat spelts), pectin 등 다양한 식물성 바이오매스 성분까지 이용할 수 있는 능력을 가지고 있다. 하지만 바이오연료 생산에 있어서 *C. bescii*가 주목을 받는 가장 큰 이유는 전처리하지 않은 바이오매스를 분해하면서 생육이 가능하기 때문인데 Yang 등[41]은 전처리하지 않은 poplar (*Populus*)와 switchgrass (*Panicum virgatum*)에서 *C. bescii*가 바이오매스를 분해하며 생육하는 것을 확인하였다. 목본류(wood)인 poplar와 초본류(grass)인 switchgrass는 성장 속도가 빠르고 단위 경작 면적당 바이오매스 생산량이 뛰어나 현재 미국에서 바이오연료의 원료로 가장 주목을 받는 식물들이다[1].

*Caldicellulosiruptor bescii*가 효과적으로 전처리하지 않은 식물성 바이오매스를 분해할 수 있는 이유는 다양하고 독특한 분해효소들을 갖고 있기 때문인데 *C. bescii*의 genome sequencing 결과에 따르면 *C. bescii*에는 무려 92개의 carbohydrate-active enzyme (CAZy) 유전자를 갖고 있으며 이중 탄수화물 가수분해효소(glycosyl hydrolase)가 53종, 탄수화물 전이효소(transferase)가 29종, 탄수화물 에스테르화효소(esterase) 5종, 탄수화물 분해효소(lyase) 3종이며, binding module만 갖고 있는 유전자도 2종이 있다[28]. 다른 미생물 유래 효소와 달리 *C. bescii* 유래 세포의 효소들(S-layer or extracellular enzymes)의 매우 독특한 특징은 이 효소들의 multi-domain 구조이다(Table 1). 특히 결정형 셀룰로스에서 키웠

Table 1. Extracellular glycosyl hydrolases with multiple domains

Gene number	CAZy domains	Signal peptide*	Annotation (known activity**)
Cbes_0089	GH11,CBM36	Y	endo-1,4- β -xylanase
Cbes_0182	GH43,CBM22,GH43,CBM6	Y	arabinoxylan arabinofuranohydrolase (XynF [40])
Cbes_0183	GH10,CBM22,CBM22	Y	cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (XynE [40])
Cbes_0594	GH5,CBM28	Y	cellulase
Cbes_0609	GH13,CBM41,CBM48,CBM20	Y	type I pullulanase
Cbes_0618	GH10,CBM22,CBM22	Y	Endo-1,4- β -xylanase
Cbes_1857	GH10,CBM3,CBM3,GH48	Y/N	glycoside hydrolase family 48
Cbes_1859	GH5,CBM3,CBM3,GH44	Y	mannan endo-1,4- β -mannosidase (ManA[22])
Cbes_1860	GH74,CBM3,CBM3,GH48	Y	glycoside hydrolase family 48
Cbes_1865	GH9,CBM3,CBM3,CBM3,GH5	Y	mannan endo-1,4- β -mannosidase (CelC[40])
Cbes_1866	GH5,CBM3,CBM3,CBM3,GH5	Y	mannan endo-1,4- β -mannosidase., Cellulase (CelB[40])
Cbes_1867	GH9,CBM3,CBM3,CBM3,GH48	Y	glycoside hydrolase family 48, cellulase/cellulose (CelA[40])

*Signal peptide analysis is the result from SignalP program [35]. Y means yes (there is a signal peptide) and N means no (there is not signal peptide). Y/N means that it is not enough to decide whether signal peptide exist or not.

**Known activity means the confirmed enzyme activity of the enzyme or orthologs in other *Caldicellulosiruptor* strains.

을 때 가장 많이 분비되는 중요 cellulase인 CelA의 경우엔 다섯개의 도메인으로 구성되어 있는데 glycosyl hydrolase family 9 (GH9)와 48 (GH48)의 활성 도메인이 각각 N-말단과 C-말단에 존재하며 그 사이에 type III cellulose-binding modules (CBM3) 3개가 반복적으로 연결되어 있다[19]. 이러한 CelA의 구조는 결정형 셀룰로스의 분해에 매우 효과적이며 현재 상업적으로 바이오매스를 당화시키는데 이용되는 *Trichoderma reesei* 유래의 Cel7A exoglucanase와 *Acidothermus cellulolyticus* 유래의 Cel5A endoglucanase의 혼합물보다 Avicel에 대한 활성이 7배나 뛰어나다[7]. 이렇게 CelA가 효과적으로 결정형 셀룰로스를 분해할 수 있는 이유는 3개의 binding domain (CBM3)들을 이용하여 셀룰로스에 결합한 후 두 개의 활성 도메인(GH9과 GH48)가 셀룰로스에 구멍(cavity)을 내는 방식으로 셀룰로스를 분해하기 때문인 것으로 확인되었다[7]. *C. bescii*에 의한 식물성 바이오매스의 분해에는 CelA (Cbes_1867) 이외에도 다양한 효소들이 함께 작용하는 것으로 추정되는데 Dam 등[19]은 마이크로어레이와 프로테오믹스 기법을 이용하여 up-regulated 유전자들과 단백질을 분석하였다. 그 결과 Cbes_0182, Cbes_0183, Cbes_0618 등의 xylan 분해 효소들, xyloglucanase cluster의 효소들(Cbes_1857, Cbes_1859, Cbes_1860), 셀룰로스 분해효소인 Cbes_1865 (CelC)와 Cbes_1867 (CelA) 등이 복합적으로 작용할 것으로 추정하였고 이들의 역할에 대한 대사공학적 연구가 진행되고 있다.

식물성 바이오매스 분해에서 펙틴 분해의 중요성

Table 2에서 보듯이 *Caldicellulosiruptor bescii*의 genome에는 펙틴 분해효소 유전자가 5개 이상 있을 것으로 추정되며 그 중 3개는 하나의 cluster를 이루고 있었는데[6] tran-

scriptomics data로부터 얻은 가장 의외의 결과는 가장 높이 up-regulated된 유전자들이 펙틴을 분해 관련 cluster의 유전자들(Cbes_1853, Cbes_1854, Cbes_1855)이었다는 것이다[27]. 이들 유전자 서열로부터 유추한 단백질은 모두 pectate lyase (PL) domain과 carbohydrate binding module (CBM)을 하나씩 가지고 있었는데 특히 PecB (CMB66-PL3)는 탄소원으로 포도당을 주었을 때와 비교해서 switchgrass에서 생육시켰을 때 51-fold가, PecA (CBM66-PL9)는 27.9-fold가 up-regulation되었다. 이들 두 효소는 N-말단에 signal peptide를 갖는 것으로 추정되어 세포의 단백질로 추정되며 이들 효소에 의해 분해된 oligogalacturonate들을 세포내에서 대사할 것으로 추정되는 Rhamnogalacturonan lyase PecC (PL11-CBM3)도 포도당 배지에서보다 switchgrass에서 생육시켰을 때 9.6-fold나 up-regulation되었다.

식물 세포 사이의 접착제 역할을 하는 펙틴은 식물성 바이오매스에서 상대적으로 비중이 낮은 구성물이고 결정을 형성하지도 않는 유연한 구조물이기 때문에 과거 바이오매스 연구자들이 크게 주목하지 않았던 물질이었다. 하지만 펙틴의 분해가 식물성 바이오매스 분해에 중요한 역할을 한다는 것이 점차 밝혀지고 있으며[4] 유전자 조작을 통해 펙틴의 구성 성분인 homogalacturonan의 methyl기를 제거한 *Arabidopsis*는 바이오매스 당화에 더욱 효과적이라는 보고[30]가 있었다.

Caldicellulosiruptor 속의 균주들은 대부분 pectin 분해 관련 효소를 하나 이상 갖고 있지만 지금까지 complete genome sequencing이 끝난 *Caldicellulosiruptor* 8균주 중에 위의 펙틴 클러스터 속 3가지 pectin 분해 효소(PecABC) ortholog들을 모두 갖고 있는 균주는 하나도 없고 *C. kronotskyensis*, *C. kristjanssonii*, *C. lactoaceticus*는 2개의 ortholog만 갖고 있다 (Table 2). 펙틴은 rhamnogalacturonan I 과 II (RG-I와 RG-II), xylo-

Table 2. Genes possibly involved in pectin degradation

Gene number	CAZy domains	Original annotation (Function)	Signal peptide*	Gene number of orthologs**
Cbes_1569	GH28	Glycoside hydrolase family protein	N	Csac_0664, Calhy_1166, COB47_0984, Calkr_2305, Calla_0145, Calkro_0342
Cbes_1853	PL11,CBM3	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (PecC)	N*	Calkro_0864
Cbes_1854	PL3,CBM66	Pectate lyase (PecB)	Y	Calkro_0863, Calkr_1848, Calla_1249, COB47_1662,
Cbes_1855	PL9,CBM66	Pectate disaccharide-lyase (PecA)	Y	Calkr_1849, Calla_1250
Cbes_1856	No	AraC family transcriptional regulator	N	Calkro_0862 Calkr_1850 Calla_1251 COB47_1663
Cbes_2325	CE12	G-D-S-L family lipolytic protein	N	Calkro_0229, Calhy_0201, Calow_2054, COB47_2097, Calla_0095
Cbes_2380	GH28	Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase	N	Calkro_0152, Calhy_0137, Calkr_1976, Calla_0050, COB47_2144, Calow_2114, Csac_0361,

*Signal peptide analysis is the result from SignalP program [29]. Y means yes (there is a signal peptide) and N means no (there is not signal peptide).

**Gene number denotes *Caldicellulosiruptor* strains as below. Csac, *C. saccharolyticus*; Calhy, *C. hydrothermalis*; COB47, *C. obsidiansis*; Calkr, *C. kristjanssonii*; Calla, *C. lactoaceticus*; Calkro, *C. kronotskyensis*; Calow, *C. owensensis*.

galactouronan (XGA), homogalacturonan (HG) 등의 복잡한 구조를 갖는 이형다당류이므로[34] 펙틴의 효과적 분해를 위해서도 역시 다양한 기질 특이성을 갖는 효소들의 복합적 작용이 필요할 것으로 생각되는 바, *C. bescii*가 전처리 하지 않은 식물성 바이오매스를 효과적으로 분해하는 데에는 이러한 다양한 펙틴분해효소들의 작용이 더 효율적일 것으로 추정되며 genetic tool을 이용한 pectin 분해 효소의 역할 연구가 진행되고 있다.

*Caldicellulosiruptor bescii*의 genetic tool 개발과 metabolic engineering

고온성 극한미생물의 연구에 있어서 가장 어려운 점은 대사 공학을 위한 genetic tool이 거의 없다는 점이다. 일반적으로 genetic tool을 개발하기 위해서는 Restriction-Modification (RM) 시스템의 극복, replication origin을 포함한 셔틀 벡터의 구축, 형질전환 방법의 확립, selection marker의 선정의 과정을 거쳐야 하며 이를 통해 유전자의 deletion이나 insertion이 가능해야 한다. 지금까지 고온성 고균(archaea)의 경우는 natural competency가 있는 균주의 발견[31]과 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase 저해제인 simvastatin을 이용한 선별법이 개발[37]되어 대사공학적인 연구가 활발하게 진행되고 있으나 고온성 세균의 경우는 mevalonate pathway가 없는 관계로 simvastatin을 사용할 수 없고 마땅한 항생제 내성 유전자도 없다. 물론 몇몇 *Thermotoga* 등 고온성 세균에서 genetic tool이 개발되었다는 보고[23, 24]가 과거 있었으나 가능성의 수준에서 그쳤고 활발한 연구가 진행되지 않고 있는 실정이다. 하지만 최근 *C. bescii*의 genetic tool이 개발되면서 현재 가장 활발하게 *C. bescii*의 대사 공학적

연구가 진행되고 있다.

일반적으로 genetic tool을 개발하기 위해서는 selection marker의 선정이 선행되어야 하는데 특정 유전자 결실 균주 (auxotroph)를 이용하거나 항생제 내성 유전자를 이용하는 방법으로 나뉜다. 고온에서 안정하며 활성이 있다고 알려진 항생제 내성 유전자가 보고[33]된 적은 있지만 *C. bescii*의 생육 온도에서는 배양 시간에 따라 artifact colony가 많이 생겨 실제로 사용할 수 없었기 때문에 *C. bescii*의 경우엔 특정 대사 유전자를 결손시킨 후 complementation 시키는 nutritional selection 방법이 시도되었다. 현재까지 가장 많이 알려졌고 고온성 고균에서 검증된 nutritional selection 방법은 피리미딘 생합성 경로에 관여하는 orotidine 5-phosphate decarboxylase (*pyrF*) 결실 균주를 이용하여 uracyl auxotroph로서의 성질과 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 저항성을 동시에 이용하는 선별법이다[38]. 따라서 orotate phosphoribosyltransferase (*pyrE*) 또는 *pyrF*가 결실된 uracyl auxotroph를 만들기 위하여 casein과 yeast extract를 뺀 modified DSMZ 516 배지에 temperature shock을 주어 mutation stress를 준 후 uracyl이 포함된 minimal 배지에 5-fluoroorotic acid (5-FOA)를 농도별로 첨가하여 자라는 콜로니로부터 genomic DNA를 분리하여 *pyrE* 또는 *pyrF*가 결손된 균주를 탐색한 결과 *pyrB* (Cbes1375)의 N-말단부터 *pyrF* (Cbes1377)의 C-말단까지 결실된 *C. bescii* JWCB002 (Δ *pyrBCF*) 균주를 얻었다[13]. 이후 uracyl이 없는 최소배지(low osmolarity defined growth medium, LOD) 조성을 확립하였고[21] 좀 더 selection이 용이한 Δ *pyrFA* 균주인 *C. bescii* JWCB005를 확보하여[11] 형질전환 host로 사용하였다.

대장균과 *C. bescii*에서 복제 가능한 셔틀 벡터를 만들기 위

해 *C. bescii*가 갖고 있는 두 개의 플라스미드[18] 중 크기가 작고 replication origin을 갖고 있는 pBAS2에 uracil auxotroph complementation 용 *pyrF* 유전자를 삽입하였고 대장균의 low copy replication origin PSC101과 apramycin resistant gene cassette (AprR)를 연결하여 pDCW89를 구축하였다[11]. 유전자의 결실이나 도입을 위해 외래 DNA를 형질전환 시켰을 때 가장 큰 장애물 중 하나는 외래의 DNA가 들어 왔을 때 DNA의 methylation의 차이를 인식해서 균주 내부의 restriction system에 의해 도입된 DNA를 분해하는 restriction-modification (R-M) system인데 위에서 구축한 pDCW89 서틀 벡터를 전기충격법(electroporation)으로 형질전환 시키면 그 효율이 매우 낮은 단점이 있다. Chung 등[17]은 HaeIII와 유사한 활성을 보이는 새로운 고온성 제한효소 CbeI을 *C. bescii*에서 클로닝하고 특성을 밝힌 후, *cbeI* (Cbes_2438)과 이웃한 α -class N4-cytosine methyltransferase (M.CbeI, Cbes_2437)이 R-M system의 상대역이라는 것을 확인하였고[13] 대장균에서 클로닝한 M.CbeI을 형질전환용 서틀 벡터 DNA에 처리한 결과 효과적인 형질전환이 일어나는 것을 확인하였다. 이러한 과정을 통해 *cbeI* 유전자의 위치에 *pyrF* 유전자를 삽입시킨 후 1차 selection을 하고, 최소 배지에 5-FOA를 첨가하여 double-crossover mutant를 counter selection 하는 방식으로 *cbeI* 유전자를 deletion 시킨 *C. bescii* JWCB018 균주를 확보하는데 성공함으로써 향후 형질전환에 있어서 번거로운 methyltransferase 처리를 하지 않아도 되었다[14].

Caldicellulosiruptor bescii 대사공학을 이용한 바이오연료의 생산

하나의 균주로 식물성 바이오매스의 분해, 당화, 알코올 발효의 세가지 단계를 단번에 통합적으로 수행하는 통합바이오 공정(consolidated bioprocessing; CBP)은 바이오연료 생산의 궁극적인 목표이다. 다양한 *C. bescii*의 대사공학 연구가 CBP를 더 높은 효율로 이루기 위해 진행되고 있다. 먼저 가장 중요한 세포의 단백질인 CelA의 중요성을 확인하기 위하여 *celA*를 deletion 시킨 결과[43], Avicel에서 생육시켰을 경우, 균주의 생육이 80% 가까이 급격하게 감소하는 것을 확인하였고 환원당의 생산도 15-fold 감소하였다. 화학적으로 전처리하지 않은 poplar, switchgrass, *Arabidopsis*에서는 균주의 생육이 Avicel에 비해 상대적으로 크게 감소하지는 않았는데(30% 내외) 이는 cellulose 이외의 다른 다당류를 분해해서 이용했기 때문으로 생각된다.

또한 transcriptomics에서 가장 높은 up-regulation을 보였던 pectin의 영향을 검토하기 위하여 *pecABC* cluster를 모두 deletion 시켜 바이오매스의 분해 정도를 확인한 결과[15], 화학적 전처리를 하지 않은 poplar와 switchgrass에서는 각각 34%와 27%의 생육이 감소되었고 *Arabidopsis*에서는 61%나 생육이 감소되었다. 이는 식물성 바이오매스의 이용에 펙틴의

분해가 중요하다는 것을 다시 한 번 보여주는 결과이다.

이러한 바이오매스 분해 효소들은 주로 세포의 단백질이기 때문에 이 유전자들의 과발현에 관한 연구는 signal peptide의 절단과 glycosylation 같은 post-translational modification으로 인해 어려움이 있었다. 하지만 최근 Chung 등[16]은 *C. bescii*의 내부에서 스스로 복제 가능한 플라스미드 벡터를 개발하였고 CelA를 성공적으로 발현하는데 성공하였다. 이러한 발현 기술은 원하는 효소의 과발현뿐만 아니라 생리적 특성을 밝히는데 앞으로 더욱 큰 도움이 될 전망이다.

이렇게 대사공학을 통하여 얻은 *C. bescii* 변이체를 통합바이오 공정(consolidated bioprocessing; CBP)에 적용하려는 시도도 계속되고 있는데 그 첫번째 연구는 lactate dehydrogenase (*ldh*)의 deletion을 통하여 전자의 흐름을 젖산이 아닌 acetate 쪽으로 유도하여 알코올이나 수소 생산을 증대시키기 위한 것이었다(Fig. 1). Cha 등[9]은 *C. bescii*의 *ldh* 결실 변이주 (JWBC017)를 0.5% switchgrass가 첨가된 LOD 배지에서 120 시간 키웠을 때 40%의 acetate가 더 생성되고 수소 발생량도 70%나 증가함을 확인하였다.

이렇게 분해된 당류가 젖산 쪽으로 대사되는 것을 막은 후에 바이오에탄올을 생산하기 위하여 몇가지 알코올 대사 효소 유전자를 발현하여 CBP의 가능성을 탐색하였다. 첫번째 방법은 *Clostridium thermocellum*의 bifunctional acetaldehyde/alcohol dehydrogenase 유전자(*Cthe-adhE2*) [36]를 이용하여 acetyl-CoA로부터 직접 ethanol을 생산하는 방법인데(Fig. 1) Chung 등[12]은 *adhE* 발현을 통하여 2% switchgrass로부터 직접 에탄올을 생산하는데 성공하였다. *C. bescii* 야생주는 에탄올을 생산을 하지 못하지만 *C. bescii* JWCB032 ($\Delta pyrFA$ *ldh::ISCbe4* $\Delta cbe1::PS$ -layer *Cthe-adhE2*/(*ura*/5-FOAR))균주는 발효 생성물의 70% 정도가 ethanol이었고 농도는 12.8 mM이었다.

Acetyl-CoA로부터 ethanol을 생산하는 경로는 *adhE*를 통해 acetyl-CoA로부터 직접 생산하는 방법 이외에 acetaldehyde를 거쳐 에탄올을 생산하는 경로도 존재하는데 bacterial alcohol dehydrogenase (*AdhA*)는 acetaldehyde로부터 에탄올을 생산하는 효소이다[8]. 그런데 Basen 등[3]은 초고온성 아카이아인 *Pyrococcus furiosus*에 *Thermoanaerobacter* strain X514의 *adhA*를 삽입한 결과 놀랍게도 *adhE*를 단독으로 또는 함께 삽입했을 때보다 훨씬 더 많은 에탄올 생산이 이루어지는 것을 확인하였다. 이는 *P. furiosus*의 aldehyde ferredoxin oxidoreductase (AOR)이 acetate를 acetaldehyde로 전환시키기 때문인 것으로 밝혀졌는데 AOR은 여러 알데하이드에 활성을 보이므로 butyrate를 butanol로 전환시킬 수도 있어서 에탄올뿐만 아니라 고가의 다른 알코올 생산에도 활용이 가능할 것으로 생각된다. 현재 이 pathway는 *P. furiosus*에서만 확립이 되어 있으나 *C. bescii*에 이런 효소 유전자들을 도입하면 좀 더 효율적인 CBP에 한 발 더 나아갈 수 있을 것으로 기대를

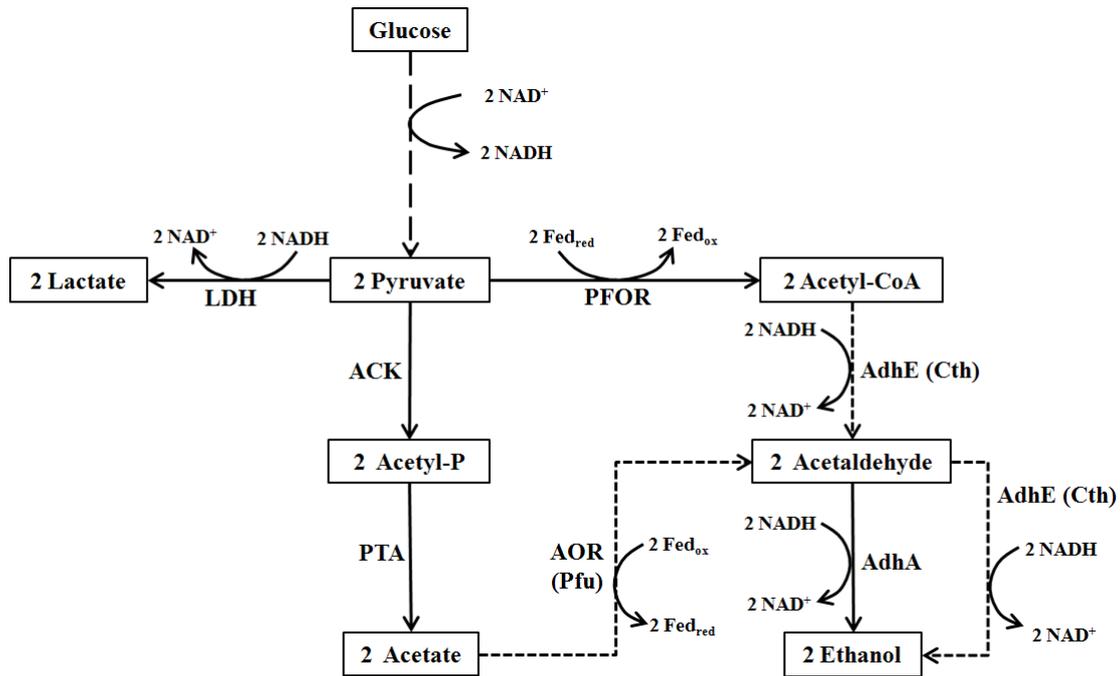


Fig. 1. Metabolic pathways for ethanol fermentation from glucose. Broken line is simplified modified glycolysis and dotted lines are missing pathways in *C. bescii*. Abbreviation of enzymes are as following: LDH, lactate dehydrogenase; ACK, acetate kinase; PTA, phosphotransacetylase; PFOR, pyruvate ferredoxin oxidoreductase; AOR, aldehyde ferredoxin oxidoreductase; AdhA, alcohol dehydrogenase A; AdhE, bifunctional acetaldehyde/alcohol dehydrogenase. Pfu and Cth designate *Pyrococcus furiosus* and *Clostridium thermocellum*, respectively.

모으고 있다.

향후 연구 전망

고온성 세균으로서는 매우 드물게 *Caldicellulosiruptor bescii*의 유전공학적 기법이 개발되었고 이를 통해 대사공학 연구 결과가 계속 발표되고 있지만 좀 더 정교한 genetic tool의 개발이 필요한 실정이다. 특히 고발현을 위한 프로모터의 개발과 heterologous expression을 위한 좀 더 고효율 replicating vector의 개발이 필요하다. 또한 uracil auxotroph를 이용한 nutritional selection 방법은 5-FOA를 이용한 counter selection이 필요하므로 좀 더 시간과 노력을 단축시킬 수 있는 새로운 항생제 선별기법도 필요할 것이다. 하지만 현재까지의 방법으로도 여러 유전자의 deletion과 insertion이 가능하므로 다양한 glycosyl hydrolase의 과발현 및 조절유전자의 조작을 통해 전처리하지 않은 바이오매스를 더 고효율적으로 분해하는 변이주를 개발하려는 시도가 계속될 것이다. 특히 경제성 있는 수준의 CBP를 위해서는 고농도(high load) 바이오매스의 분해가 가능해야 하는데 그러기 위해서는 바이오매스 분해로 발생하는 유독물질의 저감이 필요하며 *C. bescii*의 낮은 알코올 내성도 높여야 하는 문제가 남아 있다.

References

1. Ai, J. and Tschirner, U. 2010. Fiber length and pulping characteristics of switchgrass, alfalfa stems, hybrid poplar and willow biomasses. *Bioresour. Technol.* **101**, 215-221.
2. Akinoshio, H., Yee, K., Close, D. and Ragauskas, A. 2014. The emergence of clostridium thermocellum as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Front. Chem.* **2**, 66.
3. Basen, M., Schut, G. J., Nguyen, D. M., Lipscomb, G. L., Benn, R. A., Prybol, C. J., Vaccaro, B. J., Poole 2nd, F. L., Kelly, R. M. and Adams, M. W. 2014. Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 17618-17623.
4. Biswal, A. K., Soeno, K., Gandla, M. L., Immerzeel, P., Pattathil, S., Lucenius, J., Serimaa, R., Hahn, M. G., Moritz, T. and Jönsson, L. J. 2014. Aspen pectate lyase PtxtPL1-27 mobilizes matrix polysaccharides from woody tissues and improves saccharification yield. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 11.
5. Blumer-Schuette, S. E., Brown, S. D., Sander, K. B., Bayer, E. A., Kataeva, I., Zurawski, J. V., Conway, J. M., Adams, M. W. and Kelly, R. M. 2014. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 393-448.
6. Blumer-Schuette, S. E., Lewis, D. L. and Kelly, R. M. 2010. Phylogenetic, microbiological, and glycoside hydrolase diversities within the extremely thermophilic, plant biomass-degrading genus caldicellulosiruptor. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 76, 8084-8092.
7. Brunecky, R., Alahuhta, M., Xu, Q., Donohoe, B. S., Crowley, M. F., Kataeva, I. A., Yang, S. J., Resch, M. G., Adams, M. W., Lunin, V. V., Himmel, M. E. and Bomble, Y. J. 2013. Revealing nature's cellulase diversity: The digestion mechanism of caldicellulosiruptor bescii CelA. *Science* **342**, 1513-1516.
 8. Carere, C. R., Ryzak, T., Verbeke, T. J., Cicek, N., Levin, D. B. and Sparling, R. 2012. Linking genome content to biofuel production yields: A meta-analysis of major catabolic pathways among select H₂ and ethanol-producing bacteria. *BMC Microbiol.* **12**, 295-2180-12-295.
 9. Cha, M., Chung, D., Elkins, J. G., Guss, A. M. and Westpheling, J. 2013. Metabolic engineering of caldicellulosiruptor bescii yields increased hydrogen production from lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 85.
 10. Chen, F. and Dixon, R. A. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* **25**, 759-761.
 11. Chung, D., Cha, M., Farkas, J. and Westpheling, J. 2013. Construction of a stable replicating shuttle vector for caldicellulosiruptor species: Use for extending genetic methodologies to other members of this genus. *PLoS One* **8**, e62881.
 12. Chung, D., Cha, M., Guss, A. M. and Westpheling, J. 2014. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered caldicellulosiruptor bescii. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 8931-8936.
 13. Chung, D., Farkas, J., Huddleston, J. R., Olivar, E. and Westpheling, J. 2012. Methylation by a unique alpha-class N4-cytosine methyltransferase is required for DNA transformation of caldicellulosiruptor bescii DSM6725. *PLoS One* **7**, e43844.
 14. Chung, D., Farkas, J. and Westpheling, J. 2013. Overcoming restriction as a barrier to DNA transformation in caldicellulosiruptor species results in efficient marker replacement. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 82.
 15. Chung, D., Pattathil, S., Biswal, A. K., Hahn, M. G., Mohnen, D. and Westpheling, J. 2014. Deletion of a gene cluster encoding pectin degrading enzymes in caldicellulosiruptor bescii reveals an important role for pectin in plant biomass recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 147.
 16. Chung, D., Young, J., Bomble, Y. J., Vander Wall, T. A., Groom, J., Himmel, M. E. and Westpheling, J. 2015. Homologous expression of the caldicellulosiruptor bescii CelA reveals that the extracellular protein is glycosylated. *PLoS One* **10**, e0119508.
 17. Chung, D. H., Huddleston, J. R., Farkas, J. and Westpheling, J. 2011. Identification and characterization of CbeI, a novel thermostable restriction enzyme from caldicellulosiruptor bescii DSM 6725 and a member of a new subfamily of HaeIII-like enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1867-1877.
 18. Clausen, A., Mikkelsen, M. J., Schröder, I. and Ahring, B. K. 2004. Cloning, sequencing, and sequence analysis of two novel plasmids from the thermophilic anaerobic bacterium anaerocellum thermophilum. *Plasmid* **52**, 131-138.
 19. Dam, P., Kataeva, I., Yang, S. J., Zhou, F., Yin, Y., Chou, W., Poole 2nd, F. L., Westpheling, J., Hettich, R., Giannone, R., Lewis, D. L., Kelly, R., Gilbert, H. J., Henrissat, B., Xu, Y. and Adams, M. W. 2011. Insights into plant biomass conversion from the genome of the anaerobic thermophilic bacterium caldicellulosiruptor bescii DSM 6725. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3240-3254.
 20. Demirbas, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energ. Convers. Manage.* **49**, 2106-2116.
 21. Farkas, J., Chung, D., Cha, M., Copeland, J., Grayeski, P. and Westpheling, J. 2013. Improved growth media and culture techniques for genetic analysis and assessment of biomass utilization by caldicellulosiruptor bescii. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 41-49.
 22. Gibbs, M. D., Elinder, A. U., Reeves, R. A. and Bergquist, P. L. 1996. Sequencing, cloning and expression of a β -1,4-mannanase gene, manA, from the extremely thermophilic anaerobic bacterium, caldicellulosiruptor Rt8B. 4. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 37-43.
 23. Han, D., Norris, S. M. and Xu, Z. 2012. Construction and transformation of a thermotoga-E. coli shuttle vector. *BMC Biotechnol.* **12**, 2-6750-12-2.
 24. Han, D., Xu, H., Puranik, R. and Xu, Z. 2014. Natural transformation of thermotoga sp. strain RQ7. *BMC Biotechnol.* **14**, 39.
 25. Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. and Foust, T. D. 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **315**, 804-807.
 26. Jones, C. S. and Mayfield, S. P. 2012. Algae biofuels: Versatility for the future of bioenergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 346-351.
 27. Kataeva, I., Foston, M. B., Yang, S., Pattathil, S., Biswal, A. K., Poole II, F. L., Basen, M., Rhaesa, A. M., Thomas, T. P. and Azadi, P. 2013. Carbohydrate and lignin are simultaneously solubilized from unpretreated switchgrass by microbial action at high temperature. *Energy Environ. Sci.* **6**, 2186-2195.
 28. Kataeva, I. A., Yang, S. J., Dam, P., Poole 2nd, F. L., Yin, Y., Zhou, F., Chou, W. C., Xu, Y., Goodwin, L., Sims, D. R., Detter, J. C., Hauser, L. J., Westpheling, J. and Adams, M. W. 2009. Genome sequence of the anaerobic, thermophilic, and cellulolytic bacterium "anaerocellum thermophilum" DSM 6725. *J. Bacteriol.* **191**, 3760-3761.
 29. Kim, S. and Dale, B. E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* **26**, 361-375.
 30. Lionetti, V., Francocci, F., Ferrari, S., Volpi, C., Bellincampi, D., Galletti, R., D'Ovidio, R., De Lorenzo, G. and Cervone, F. 2010. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 616-621.
 31. Lipscomb, G. L., Stirrett, K., Schut, G. J., Yang, F., Jenney Jr, F. E., Scott, R. A., Adams, M. W. and Westpheling, J.

2011. Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: Construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2232-2238.
32. Loque, D., Scheller, H. V. and Pauly, M. 2015. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**, 151-161.
33. Mai, V., Lorenz, W. W. and Wiegel, J. 1997. Transformation of thermoanaerobacterium sp. strain JW/SL-YS485 with plasmid pIKM1 conferring kanamycin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**, 163-167.
34. Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 266-277.
35. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785-786.
36. Riederer, A., Takasuka, T. E., Makino, S., Stevenson, D. M., Bukhman, Y. V., Elsen, N. L. and Fox, B. G. 2011. Global gene expression patterns in clostridium thermocellum as determined by microarray analysis of chemostat cultures on cellulose or cellobiose. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1243-1253.
37. Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* **185**, 210-220.
38. Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3889-3899.
39. Uppugundla, N., da Costa Sousa, L., Chundawat, S. P., Yu, X., Simmons, B., Singh, S., Gao, X., Kumar, R., Wyman, C. E. and Dale, B. E. 2014. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 72.
40. VanFossen, A. L., Ozdemir, I., Zelin, S. L. and Kelly, R. M. 2011. Glycoside hydrolase inventory drives plant polysaccharide deconstruction by the extremely thermophilic bacterium *caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1559-1569.
41. Yang, S. J., Kataeva, I., Hamilton-Brehm, S. D., Engle, N. L., Tschaplinski, T. J., Doepcke, C., Davis, M., Westpheling, J. and Adams, M. W. 2009. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe "anaerocellum thermophilum" DSM 6725. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4762-4769.
42. Yang, S. J., Kataeva, I., Wiegel, J., Yin, Y., Dam, P., Xu, Y., Westpheling, J. and Adams, M. W. 2010. Classification of 'anaerocellum thermophilum' strain DSM 6725 as *caldicellulosiruptor bescii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2011-2015.
43. Young, J., Chung, D., Bomble, Y. J., Himmel, M. E. and Westpheling, J. 2014. Deletion of *caldicellulosiruptor bescii* CelA reveals its crucial role in the deconstruction of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 142.
44. Zhang, Y. H., Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R. and Lynd, L. R. 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 214-223.

초록 : 고온성 세균 *Caldicellulosiruptor bescii*를 이용한 식물성 바이오매스의 분해와 바이오에탄올의 생산

이한승^{1,2*}

(¹신라대학교 의생명과학대학 바이오산업학부 식품공학전공, ²신라대학교 해양극한미생물연구소)

화석 연료의 고갈과 환경 문제를 극복하기 위하여 식물성 바이오매스를 이용한 바이오연료의 생산이 큰 주목을 받고 있는 가운데 화학적 전처리를 하지 않은 바이오매스를 직접 분해할 수 있는 그램 양성 초호열성 세균 *Caldicellulosiruptor bescii*에 대한 관심이 높아지고 있다. *C. bescii*는 식물 세포벽을 구성하는 셀룰로스, 헤미셀룰로스 등의 분해 뿐만 아니라 세포벽을 연결시켜주는 pectin도 효율적으로 분해할 수 있는데 최근 *C. bescii*의 genetic tool이 개발되면서 바이오매스 분해에 관여하는 효소의 특성 규명과 아울러 대사공학적 방법으로 바이오에탄올을 생산하는 통합바이오공정(consolidated bioprocessing; CBP)의 개발이 가능케 되었다. 본 총설에서는 초고온성 세균인 *C. bescii*를 이용한 식물성 바이오매스의 분해와 바이오에탄올의 생산에 대한 최신 연구결과를 소개하고 향후 전망에 대해 논하고자 한다.