

유도적 돌연변이 유발 방법을 통한 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate에 대해 내성을 갖는 돌연변이 효모 선별

이유진, 권덕호, 박재범, 하석진*
강원대학교 생물공학과

Received: February 23, 2017 / Revised: March 21, 2017 / Accepted: March 21, 2017

Isolation of Mutant Yeast Strains having Resistance to 1-ethyl-3-methylimidazolium Acetate through a Directed Evolutionary Approach

Yoo-Jin Lee, Deok-Ho Kwon, Jae-Bum Park, and Suk-Jin Ha*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

Cellulosic biomass is a renewable source for biofuel production from non-edible biomass. An optimized pretreatment process is required for the efficient utilization of cellulosic biomass. Among various pretreatment processes, the use of ionic liquids has been reported recently. However, the residual ionic liquid after pretreatment acts as an inhibitor of microbial fermentation. Recently, we isolated mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains resistant to the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM][Ac]) by using a directed evolutionary approach. When 3% [EMIM][Ac] was added to a medium containing 80 g/l of glucose, mutants D452-B2 and D452-S3 produced 35.6 g/l and 36.3 g/l of ethanol, respectively, for 18 h while the parental strain (*S. cerevisiae* D452-2) produced 1.3 g/l of ethanol. Thus, these mutant *S. cerevisiae* strains might prove advantageous when ionic liquids are used for biofuel production from cellulosic biomass.

Keywords: Cellulosic biomass, ionic liquid, tolerance, yeast

서론

에너지 수요의 빠른 증가와 화석연료 사용으로 인한 지구 온난화로 친환경적이며, 재생 가능한 대체에너지를 필요로 한다. 차세대 청정에너지로 각광받고 있는 바이오 에너지 중에서 가장 널리 이용되는 바이오 에탄올의 생산은 미국과 브라질에서 90% 이상 생산하고 있다. 하지만 이러한 바이오 에탄올의 생산 원료는 옥수수 또는 사탕수수과 같은 식량자원이 이용되기 때문에 식량문제와 곡물가격 상승에 대한 새로운 문제를 야기하고 있다[1–4]. 이러한 문제를 해결하고자 식량자원이 아닌 폐목재, 나무 등 비식용 바이오 매스인 제 2세대 목질계 바이오 매스에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[2, 5]. 목질계 바이오 매스는 cellulose, hemicellulose,

lignin으로 구성되어 있으며[6, 7], 그 중 cellulose와 hemicellulose는 미생물 발효에 사용될 수 있는 당당류로 가수분해 될 수 있는 기질이기에 때문에 대체 에너지원으로서 주목을 받고 있다[7, 8]. 목질계 바이오 매스를 효과적으로 이용하기 위해서 cellulose를 둘러싸고 있는 lignin을 제거하는 전처리 과정이 필요하다[9]. 다양한 전처리 방법들 중 ionic liquid는 양이온과 음이온의 이온 결합으로 이루어진 이온성 염 화합물이며 비폭발성, 낮은 휘발성과 열적 안정성 외에도 효소의 우수한 반응성, 선택성, 안정성 등의 장점으로 인해 목질계 바이오 매스 전처리에 주로 사용된다[5, 10, 11].

Ionic liquid는 cellulose를 용해시킬 수 있다고 이전에 증명된 바 있으며[12], 산이나 암모니아를 사용하는 기존의 방법보다 ionic liquid를 이용한 전처리가 더 효과적이라고 알려져 있다[13]. 또한 ionic liquid 처리된 cellulose의 경우 미처리 된 것 보다 결정체가 적기 때문에 분해효소인 cellulase와 쉽게 반응할 수 있다[14, 15]. 특히 다른 전처리 과정에서 생성되는 발효저해물질(furfural 또는 hydroxymethylfurfural)

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6278, Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sjha@kangwon.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

이 생성되지 않는다는 점에서 크게 주목할 수 있다. 하지만 ionic liquid를 구성하는 양이온에서 치환된 알킬기 수뿐만 아니라 알킬체인 길이에 따라 다양한 독성 영향이 나타난다는 결과가 밝혀져 있다[16–19]. Ionic liquid의 목질계 바이오 매스 전처리 효과는 매우 뛰어나지만 전처리 이후에 100% 회수되지 않고, 잔존하는 ionic liquid (0.2–5% w/w)의 독성이 미생물 균주의 생육에 나쁜 영향을 미쳐 에탄올 발효의 수율 및 생산성을 저해한다[17, 20, 21].

따라서 본 연구의 목적은 다양한 ionic liquid 중에서 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM][Ac])에 대한 내성이 증가된 돌연변이 효모 균주를 개발하는데 있다. 유도적 돌연변이 유발 방법(directed evolutionary approach)을 통해 돌연변이를 유발하여 [EMIM][Ac]에 대한 내성이 증가된 돌연변이 균주를 선별하였으며 최종적으로 [EMIM][Ac]가 포함된 배지에서 효과적인 에탄올 생산 능력을 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

Yeast extract, bacto peptone, agar는 Becton, Dickinson and Company (USA)로부터 구매하였다. Glucose는 대정화금 (Korea)에서 구매하였다. 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM][Ac])는 C-TRI (Korea)에서 구매하였다.

실험에 사용된 균주 및 발효조건

본 배양을 위하여 사용된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* D452-2이며, 전 배양에 사용된 배지는 YPD₂₀ (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l)이다. Ionic liquid에 대한 내성을 확인하기 위해 250 ml flask에 [EMIM][Ac]를 5% 농도로 첨가한 50 ml의 YPD₈₀ (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 80 g/l) 배지에 접종하여 30°C 그리고 150 rpm 조건에서 발효를 진행하였다.

유도적 돌연변이 유발 방법(Directed evolutionary approach)

S. cerevisiae D452-2 균주를 이용하여 5% [EMIM][Ac]가 포함된 배지에서 유도적 돌연변이 유발 실험을 수행하였다. 유도적 돌연변이 유발에 사용된 배지는 5% [EMIM][Ac]와 80 g/l의 glucose가 포함된 YPD₈₀ 배지이며 초기 흡광도 (OD₆₀₀)가 1이 되도록 접종하여 30°C 그리고 150 rpm에서 배양하였다. 그 후 glucose가 모두 소비되어 잔여 농도가 0 g/l일 때 5% [EMIM][Ac]와 80 g/l의 glucose가 첨가된 새로운 YPD₈₀ 배지에 배양액의 1%를 접종하는 방법으로 유도적 돌연변이 유발을 진행하였으며 이 과정을 약 70여일간 8차례에 걸쳐 수행하였다.

[EMIM][Ac]에 대한 내성이 향상된 돌연변이 균주 선별

유도적 돌연변이 유발 방법을 통해 얻어진 제7차 배양액을 5%의 [EMIM][Ac]가 첨가된 YPD₂₀ 고체배지에 단계적으로 희석하여 도말한 후 30°C에서 약 10일간 배양하여 단일 colony를 확보하였다. 그 후 colony의 크기 별로 구분하여 5% [EMIM][Ac]와 80 g/l의 glucose가 포함된 YPD₈₀ 배지에 초기 OD가 1.0(A₆₀₀ nm)이 되도록 접종한 후 30°C 그리고 150 rpm 조건으로 배양을 진행하여 비교하였다. 최종적으로 glucose 소비속도와 ethanol 생산량이 높은 균주를 선별하였다.

분석방법

발효과정의 세포성장은 UV-visible spectrophotometer (Biomate 5, Thermo, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 다양한 대사산물(glucose, acetate, glycerol, ethanol)의 분석은 HPLC (HPLC 1200 Series, Agilent Technologies, USA)를 이용하였다. 분석용 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid H⁺ column (Phenomenex, USA)을 사용하였으며 refractive index detector (RID)를 이용하여 측정하였다. Column과 detector의 온도는 각각 50°C 이고, 이동상은 0.005 N 황산용액을 0.6 ml/min의 유속으로 사용하였다.

결과 및 고찰

S. cerevisiae D452-2 균주의 유도적 돌연변이 유발 실험

바이오매스로부터 에탄올을 생산하기 위해 주로 사용되는 효모인 *S. cerevisiae*를 이용하여 [EMIM][Ac]에 내성을 가진 돌연변이 효모 균주를 선별하기 위한 실험을 진행하였다. *S. cerevisiae* D452-2를 YPD₂₀ 배지에 전배양한 후 5% [EMIM][Ac]이 첨가된 YPD₈₀ 배지에 초기 OD (A₆₀₀ nm)가 1.0이 되도록 접종한 후 유도적 돌연변이 유발 방법을 수행하였다. 배양 중에 glucose 농도가 초기 80 g/l에서 0–1 g/l 정도로 낮아지면 5% [EMIM][Ac]가 포함된 새로운 YPD₈₀ 배지에 배양액의 1%를 다시 접종하였다. 유도적 돌연변이 유발 실험의 제 1차 배양과 2차 배양에서는 80 g/l의 glucose를 10일 동안 소비하였으며 균체의 성장이 매우 저조하여 최종 OD (A₆₀₀ nm)가 0.9 또는 0.96 정도였으나 3차 배양부터 균체의 성장이 증가하여 10일 동안 OD (A₆₀₀ nm)가 2.98까지 증가하였다(Fig. 1). 4차 배양부터는 glucose 소비 속도와 균체의 성장 속도가 함께 증가하기 시작하여 7차 배양 결과 4일 동안 80 g/l의 glucose를 모두 소비하였으며, OD (A₆₀₀ nm)는 6.07까지 증가하였고, 36.34 g/l의 에탄올이 생산되었다. 8차례에 걸쳐 5% [EMIM][Ac]가 첨가된 YPD₈₀ 배지에 유도

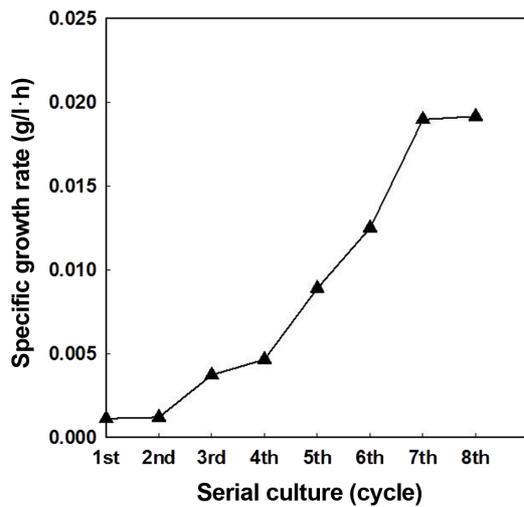


Fig. 1. The specific growth rates of *S. cerevisiae* D452-2 increased drastically through a directed evolutionary approach using YPD₈₀ medium containing 5% of [EMIM][Ac].

적 돌연변이 유발 방법을 수행한 결과 glucose 소비속도, 균체의 성장 속도, 에탄올 생산 속도 등이 각각 9.71배, 15.86배, 11.2배 증가되었음을 확인하였다.

[EMIM][Ac]에 대한 내성이 증가된 돌연변이 균주 선별

유도적 돌연변이 유발 실험 이후 [EMIM][Ac]에 대한 내성이 증가된 돌연변이 균주를 선별하기 위해 5% [EMIM][Ac]와 20 g/l의 glucose가 포함된 YPD₂₀ 고체배지에 도말하여 30°C에서 약 10일간 배양하였다. 고체배지에 배양한 결과 colony의 크기가 균일하지 않고 다양하게 분포되어 있는 것을 확인하였으며 각각의 크기별로 크기가 큰 colony와 작은 colony로 구분하여 선별하였다. 선별된 균주들의 [EMIM][Ac]에 대한 내성을 확인하기 위해 크기가 큰 colony 4 종류(B1,

B2, B3, and B4)와 크기가 작은 colony 4 종류(S1, S2, S3, and S4)를 5% [EMIM][Ac]가 포함된 YPD₈₀ 배지에 접종하여 각각의 균주들의 균체성장률과 ethanol의 생산 수율 그리고 생산성을 비교하였다(Table 1). 배양 결과 크기가 큰 colony 4 종류 모두 속도의 차이가 있기는 하지만 5% [EMIM][Ac]에 크게 저해를 받지 않고 균체 성장을 이루었으며, glucose를 효과적으로 ethanol로 전환시켰다. 그 중 B2 균주의 경우엔 배양 28시간 이내에 80 g/l의 glucose를 모두 소비하여 $2.6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 가장 높은 glucose 소비속도를 보였으며, 이때 32.5 g/l의 ethanol를 생산하였고 균체의 성장은 OD ($A_{600 \text{ nm}}$)가 7.1이었다. 크기가 작은 colony 4 종류 역시 속도의 차이가 있기는 하지만 배양 결과 모두 5% [EMIM][Ac]에 크게 저해를 받지 않았다. 배양 28시간 동안 S3 균주의 경우 glucose 소비 속도는 $2.6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 가장 높았으며, 31.7 g/l의 ethanol을 생산하였고, 균체의 성장은 OD ($A_{600 \text{ nm}}$)가 6.6이었다. 고체배지에서의 크기가 큰 colony와 작은 colony의 크기에 따른 glucose 소비 속도와 ethanol 생산량에는 모두 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다. 따라서 glucose 소비 속도가 가장 빠르고, ethanol 생산량이 가장 높은 B2 균주와 S3 균주를 각각 최종적으로 선별하고 각각 D452-B2와 D452-S3로 명명하였으며 이후 추가 실험을 진행하였다.

B2 균주와 S3 균주의 발효 결과 비교

선별된 돌연변이 균주의 [EMIM][Ac]에 대한 내성을 모균주(*S. cerevisiae* D452-2)와 비교하기 위하여 D452-B2와 D452-S3 그리고 모균주를 3% [EMIM][Ac]가 추가된 YPD₈₀ 배지와 [EMIM][Ac]가 추가되지 않은 YPD₈₀ 배지에 각각 접종하여 발효를 진행하여 비교하였다. 5%의 [EMIM][Ac] 조건에서는 모균주의 성장속도와 glucose 소비속도가 크게 낮아져 돌연변이 균주와 비교하기 어려워 [EMIM][Ac] 농도를

Table 1. Evaluation of the parental strain D452-2, mutant B1, B2, B3, B4, S1, S2, S3, and S4 strains using YPD₈₀ medium containing 5% of [EMIM][Ac].

Strains	Glucose consumption rate ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Final optical density ($A_{600 \text{ nm}}$)	Specific growth rate (h^{-1})	Ethanol production (g/l)	Ethanol productivity ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ethanol yield (g/g)
D452-2	0.28 ± 0.01	2.91 ± 0.13	0.03 ± 0.00	1.33 ± 0.15	0.05 ± 0.01	0.17 ± 0.02
B1	1.91 ± 0.02	7.54 ± 0.11	0.06 ± 0.00	21.07 ± 1.57	0.75 ± 0.06	0.39 ± 0.03
B2	2.63 ± 0.07	7.16 ± 0.21	0.08 ± 0.00	32.45 ± 1.47	1.16 ± 0.05	0.44 ± 0.01
B3	2.47 ± 0.05	7.38 ± 0.01	0.07 ± 0.00	30.46 ± 0.25	1.09 ± 0.01	0.44 ± 0.01
B4	1.62 ± 0.04	7.53 ± 0.31	0.06 ± 0.00	19.94 ± 0.03	0.71 ± 0.00	0.44 ± 0.01
S1	1.44 ± 0.05	6.92 ± 0.01	0.05 ± 0.00	17.58 ± 1.11	0.63 ± 0.04	0.44 ± 0.01
S2	1.56 ± 0.12	7.13 ± 0.51	0.05 ± 0.00	19.21 ± 1.27	0.69 ± 0.05	0.44 ± 0.00
S3	2.55 ± 0.06	6.91 ± 0.36	0.07 ± 0.00	31.74 ± 0.60	1.13 ± 0.02	0.44 ± 0.00
S4	2.40 ± 0.00	7.29 ± 0.22	0.07 ± 0.00	30.00 ± 0.06	1.07 ± 0.00	0.45 ± 0.00

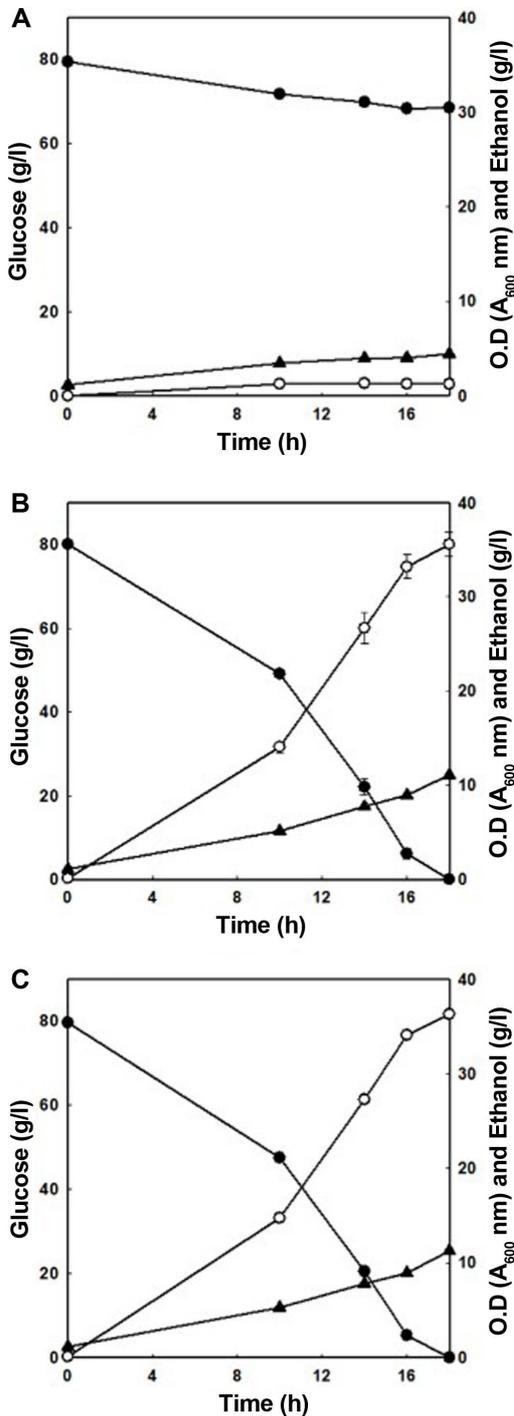


Fig. 2. Comparisons of the parental strain (*S. cerevisiae* D452-2) (A) with mutant strains D452-B2 (B) and D452-S3 (C) using YPD₈₀ medium containing 3% of [EMIM][Ac]. Symbols: glucose (●), OD₆₀₀ (▲) and ethanol (○).

3%로 조정하여 비교 실험을 수행하였다. [EMIM][Ac]가 포함된 YPD₈₀ 배지를 이용하여 30°C와 150 rpm 조건으로 발

효를 진행한 결과 발효 18시간 동안 모균주는 11.0 g/l의 glucose를 소비하고, 균체의 성장은 OD (A₆₀₀ nm)가 4.5이었으며 1.3 g/l의 낮은 ethanol 생산량을 보였다(Fig. 2A). 이때 에탄올의 수율과 생산성은 각각 0.1 g/g과 0.1 g·l⁻¹·h⁻¹이었다. 하지만 모균주와 달리 돌연변이 균주 D452-B2와 D452-S3는 같은 시간 동안에 각각 80.1 g/l와 79.7 g/l의 glucose를 소비하였고, 균체의 성장은 OD (A₆₀₀ nm)가 각각 11.1과 11.3이며, ethanol 생산량은 각각 35.6 g/l과 36.3 g/l이었다(Fig. 2B, C). 이때의 에탄올의 수율과 생산성은 각각 0.44 g/g과 0.46 g/g 그리고 1.9 g·l⁻¹·h⁻¹과 2.0 g·l⁻¹·h⁻¹이었다. 모균주는 3% [EMIM][Ac]에 대해 심하게 저해를 받아 균체의 성장이 크게 감소하였으며 에탄올의 생산도 매우 낮았으나 돌연변이 균주 D452-B2와 D452-S3는 효과적으로 glucose를 소비하여 에탄올을 생산하였다. D452-B2와 D452-S3 균주의 에탄올 수율은 모균주와 비교하여 각각 2.89배와 2.99배 증가하였으며 생산성은 27.41배와 27.98배로 매우 크게 증가하였다.

유도적 돌연변이 유발 실험 중에 발생하는 의도치 않은 다른 대사과정의 변화를 확인하기 위해 D452-B2와 D452-S3 그리고 모균주를 [EMIM][Ac]가 추가되지 않은 YPD₈₀ 배지를 이용하여 30°C와 150 rpm 조건에서 발효를 진행하여 그 결과를 비교하였다(Table 2). 모균주는 발효 12시간 만에 80 g/l의 glucose를 모두 소비하며 31.6 g/l의 ethanol을 생산하였다. 이때의 에탄올 수율과 생산성은 각각 0.4 g/g와 2.6 g·l⁻¹·h⁻¹이었다. 하지만 [EMIM][Ac]에 내성이 증가된 돌연변이 균주 D452-B2와 D452-S3 균주는 각각 12시간 동안에 54.1 g/l와 58.4 g/l의 glucose를 소비하였고, 25.7 g/l와 27.6 g/l의 ethanol 생산을 보였다. 돌연변이 균주 D452-B2와 D452-S3는 [EMIM][Ac]에 내성이 증가된 반면 [EMIM][Ac]이 첨가되지 않은 일반 YPD₈₀ 배지에서는 오히려 glucose의 소비속도가 모균주에 비해 각각 33% 그리고 28% 감소하였음을 확인하였다. 또한 균체의 성장과 에탄올의 생산량도 38-42%와 13-18% 감소하였다. 그로 인해 D452-B2와 D452-S3 균주의 경우 에탄올 생산성은 13-18% 가량 감소하였으나 반면에 낮은 균체의 성장으로 인해 수율은 약 22% 가량 증가하였다. 유도적 돌연변이 유발 실험에 의해 D452-B2와 D452-S3 균주의 [EMIM][Ac]에 대한 내성은 증가하였으나 일반 YPD₈₀ 배지에서의 오히려 glucose 소비속도가 현저히 낮아지는 결과를 확인하였다. 유도적 돌연변이 유발 실험 과정에서 예상하지 못하는 다양한 돌연변이가 발생했을 것으로 예상되며 그로 인해 이러한 결과가 나타났을 것으로 사료된다.

다양한 ionic liquid에 내성을 보인 효모들을 선별하기 위한 연구가 진행되었으며, 그 결과 *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Hyphopichia*, *Kazachstania*, *Meyerozyma*,

Table 2. Comparisons of the parental strain (*S. cerevisiae* D452-2) with mutant strains D452-B2 and D452-S3 using YPD₈₀ medium without [EMIM][Ac] addition.

Strains	Glucose consumption rate (g ⁻¹ ·h ⁻¹)	Final optical density (A ₆₀₀ nm)	Specific growth rate (h ⁻¹)	Ethanol production (g/l)	Ethanol productivity (g ⁻¹ ·h ⁻¹)	Ethanol yield (g/g)
D452-2	6.80 ± 0.01	17.70 ± 0.42	0.44 ± 0.01	31.57 ± 1.17	2.63 ± 0.10	0.39 ± 0.01
D452-B2	4.50 ± 0.21	11.84 ± 0.03	0.25 ± 0.02	25.67 ± 0.94	2.14 ± 0.08	0.48 ± 0.00
D452-S3	4.87 ± 0.07	12.40 ± 0.00	0.27 ± 0.00	27.46 ± 0.29	2.29 ± 0.02	0.47 ± 0.00

Naumovozyma, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia*, *Zygoascus* 속들은 [EMIM][Ac]의 농도 최대 5%까지 저해를 받지 않는다고 밝혀졌다[20, 21]. 특히 대표적인 효모인 *S. cerevisiae*는 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride([EMIM][Cl])는 최대 200 mM (2.93%), [EMIM][Ac]는 100 mM (1.7%)까지 내성을 보인 것으로 확인되었다[20, 22]. 최근에는 chemical genomics-guided biodesign이라는 방법을 통해 *PTK2* 유전자 가결여된 *S. cerevisiae* Y133-IIL 균주의 경우 1%의 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl]) 조건에서 효과적으로 glucose와 xylose를 에탄올로 전환시킨다고 보고되었다[23]. 본 연구를 통해 선별된 돌연변이 균주 *S. cerevisiae* D452-B2와 D452-S3는 이들 결과와 비교해도 크게 뒤쳐지지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

요약

목질계 바이오 매스 전처리에 사용되는 ionic liquid는 전처리 후 100% 회수되지 않아 잔존하는 ionic liquid의 독성이 직접적으로 미생물 균주의 생육에 나쁜 영향을 미쳐 에탄올 발효의 수율 및 생산성을 저해하는 문제를 가지고 있다. 본 연구에서는 ionic liquid에 저해를 받지 않으며 높은 ethanol 생산 효율을 가진 균주를 얻고자 유도적 돌연변이 유발 실험을 진행하였다. 선별된 돌연변이 균주 D452-B2와 D452-S3는 3% [EMIM][Ac]가 포함된 배지에서 glucose 소비속도는 4.5 g⁻¹·h⁻¹와 4.4 g⁻¹·h⁻¹로 모균주인 *S. cerevisiae* D452-2 균주에 비해 6배 가량 증가하였으며, ethanol 생산성은 각각 1.99 g⁻¹·h⁻¹와 2.0 g⁻¹·h⁻¹로 27배 가량 증가하였다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2014R1A1A4A01004700). This study is supported by 2015 Research Grant from Kangwon National University (520150059).

References

1. Tye YY, Lee KT, Abdullah WNW, Leh CP. 2016. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renew Sustain Energy Rev.* **60**: 155-172.
2. Ajanovic A, Haas R. 2014. On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU. *Appl. Energy* **135**: 730-737.
3. Ho S-H, Huang S-W, Chen C-Y, Hasunuma T, Kondo A, Chang J-S. 2013. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.* **135**: 191-198.
4. Sanchez OJ, Cardona CA. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **99**: 5270-5295.
5. Yamada R, Nakashima K, Asai-Nakashima N, Tokuhara W, Ishida N, Katahira S, et al. 2016. Direct ethanol production from ionic liquid-pretreated lignocellulosic biomass by cellulase-displaying yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* in press.
6. Shirkavand E, Baroutian S, Gapes DJ, Young BR. 2016. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—A review. *Renew Sustain Energy Rev.* **54**: 217-234.
7. Su C-H, Chung M-H, Hsieh H-J, Chang Y-K, Ding J-C, Wu H-M. 2012. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **43**: 573-577.
8. Chakraborty S, Gaikwad A. 2010. Mixing effects in cellulase-mediated hydrolysis of cellulose for bio-ethanol production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**: 10818-10825.
9. Labbé N, Kline LM, Moens L, Kim K, Kim PC, Hayes DG. 2012. Activation of lignocellulosic biomass by ionic liquid for biorefinery fractionation. *Bioresour. Technol.* **104**: 701-707.
10. Lee S-M, Chang W-J, Koo Y-M. 2005. Application of ionic liquids in biotechnology. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 183-191.
11. Ninomiya K, Omote S, Ogino C, Kuroda K, Noguchi M, Endo T, et al. 2015. Saccharification and ethanol fermentation from cholinium ionic liquid-pretreated bagasse with a different number of post-pretreatment washings. *Bioresour. Technol.* **189**: 203-209.
12. Zhu S, Wu Y, Chen Q, Yu Z, Wang C, Jin S, et al. 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review.

- Green Chem.* **8**: 325-327.
13. Li C, Knierim B, Manisseri C, Arora R, Scheller HV, Auer M, *et al.* 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* **101**: 4900-4906.
 14. Elgharbawy AA, Alam MZ, Moniruzzaman M, Goto M. 2016. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochem. Eng. J.* **109**: 252-267.
 15. Zhao H, Jones CL, Baker GA, Xia S, Olubajo O, Person VN. 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* **139**: 47-54.
 16. Kuroda K, Miyamura K, Satria H, Takada K, Ninomiya K, Takahashi K. 2016. Hydrolysis of cellulose using an acidic and hydrophobic ionic liquid and subsequent separation of glucose aqueous solution from the ionic liquid and 5-(Hydroxymethyl) furfural. *ACS Sustain Chem. Eng.* **4**: 3352-3356.
 17. Pham TPT, Cho C-W, Yun Y-S. 2010. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Res.* **44**: 352-372.
 18. Romero A, Santos A, Tojo J, Rodriguez A. 2008. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *J. Hazard. Mater.* **151**: 268-273.
 19. Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD. 2001. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.* **3**: 156-164.
 20. Nakashima K, Yamaguchi K, Taniguchi N, Arai S, Yamada R, Katahira S, *et al.* 2011. Direct bioethanol production from cellulose by the combination of cellulase-displaying yeast and ionic liquid pretreatment. *Green Chem.* **13**: 2948-2953.
 21. Sitepu IR, Shi S, Simmons BA, Singer SW, Boundy-Mills K, Simmons CW. 2014. Yeast tolerance to the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *FEMS Yeast Res.* **14**: 1286-1294.
 22. Yu C, Simmons BA, Singer SW, Thelen MP, VanderGheynst JS. 2016. Ionic liquid-tolerant microorganisms and microbial communities for lignocellulose conversion to bioproducts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 10237-10249.
 23. Dickinson Q, Bottoms S, Hinchman L, Mcllwain S, Li S, Myers CL, *et al.* 2016. Mechanism of imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational engineering of a tolerant, xylose-fermenting strain. *Microb. Cell Fact.* **15**: 17.