ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2019 Vol. 29. No. 3. 376~381 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.3.376

- Note -

Construction of Yeast Strain Suitable for Bioethanol Production by Using Fusion Method

Yeon-Hee Kim *

Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Divison of Applied Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received February 19, 2019 / Revised March 13, 2019 / Accepted March 13, 2019

To construct useful yeast strain for bioethanol production, we improved yeast harboring various phenotypes by using yeast protoplast fusion method. In this study, *S. cerevisiae* BYK-F11 strain which have ethanol tolerance, thermotolerance and β-glucanase activity and *P. stipitisΔura* strain which has xylose metabolism pathway were fused by genome shuffling. *P. stipitisΔura* strain was constructed for protoplast fusion by *URA3* gene disruption, resulting in uracil auxotroph. By protoplast fusion, several fused cells were selected and BYKPS-F8 strain (fused cell) showing both karyotypes from two parent strains (*S. cerevisiae* BYK-F11 and *P. stipitisΔura* strain) among 22 fused cells was finally selected. Sequentially, various phenotypes such as β-glucanase activity, xylose utility, ethanol tolerance, thermotolerance and ethanol productivity were analyzed. The BYKPS-F8 strain obtained β-glucanase activity from BYK-F11 strain and 1.2 fold increased xylose utility from *P. stipitisΔura* strain. Also, the BYKPS-F8 strain showed thermotolerance at 40℃ and increased ethanol tolerance in medium containing 8% ethanol. In this fused cell, 7.5 g/l ethanol from 20 g/l xylose was produced and the multiple phenotypes were stably remained during long term cultivation (260 hr). It was proved that novel biological system (yeast strains) is easily and efficiently bred by protoplast fusion among yeasts having different genus.

Key words : Ethanol tolerance, karyotype, protoplast fusion, thermotolerance, xylose utility

서 론

전 세계적으로 환경문제에 따른 규제 강화로 친환경 특성을 가지는 에너지 신소재 및 천연소재 고갈에 따른 석유를 대체할 수 있는 바이오 연료(바이오에탄올(bioethanol)과 바이오디젤(biodiesel) 등)를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이런 대체에너지들 중 휘발유의 대체 연료인 바이오에탄올의 생산에 관한 연구 및 보급이 빠르게 확산되고 있는 추세이다. 바이오에탄올은 다양한 곡물계, 목질계 또는 해조류 유래 바이오매스(cellulose, xylan, agar, laminaran 등)로부터 생산될 수 있으며, 이러한 바이오매스로부터 발효당으로의 당화(saccharification) 및 발효(fermentation)공정이 요구된다[2, 9, 15]. 에탄올의 효율적인 생산을 위해 다양한 미생물들이 사용되고 있지만, 에탄올은 미생물 생장의 저해제로 작용하여 배양 중 에탄올의 축적은 세포 성장과 목적 제품의 생산율 감소로 이어지는 등 세포에 스트레스를 준다고 알려져 있다[1]. 따라서 이러한 산업적 균주의 에탄올 내성 및 생산성의 증가는 에탄올을 생산할 수 있는 균주의 육종을 위해서도 반드시 필요한 과정이다. 대표적인 에탄올 생산 균주인 효모는 배양 온도 30℃에서 가장 활발히 자라며 38℃이상의 온도에서는 성장이 저해되어 온도에도 민감하다. 하지만 바이오연료 생산과 같이 산업적으로 효모 균주를 이용하기 위해서는 생산공정에서 발생되는 높은 온도에서도 자랄 수 있는 균주가 유용함으로 내열성 균주의 육종도 필요해진다[13].

바이오에탄올을 생산하기 위한 효모 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae, Pichia sp., Kluyveromyces marxianus* 등이 있다. 이 중 *S. cerevisiae*는 대표적인 전통 알코올발효 미생물로서 그 이용가치가 높고 genome 서열이 다 밝혀져 있기 때문에 재조합균주의 제작 등 분자유전학적 균주 육종에 유용하다. 또한 *Pichia pastoris*는 메탄올 자화효모로서 고농도 세포 배양 시 발생되었던 단백질 발현률 저하를 막을 수 있다는 장점이 있으며[11], *P. stipitis*는 xylose 자화효모로서 *S. cerevisiae*가 이용하기 어려운 오탄당인 xylose를 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 공정이 존재한다는 장점이 있다[16]. 또한 *K. marxianus*는 내열성이 높아 이 균주를 사용함으로써 높은 온도를 억제하는 cooling 비용이 절감된다는 장점이 있다.

효모 균주의 특성을 개량하기 위해서 여러 가지 선택(selection) 돌연변이, 교배(hybridization), 원형질체융합(protoplast fusion), 형질전환(transformation) 등의 방법이 있다. 대부분의 일배체(haploid) 효모들은 에이(a)타입과 알파(α)타입의 mating factor를 가지고 있어 쉽게 서로 접합하여 이배체

***Corresponding author**
Tel : +82-51-890-2281, Fax : +82-504-033-6356
E-mail : yeonheekim@deu.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.

(diploid) 효모를 형성할 수 있다[5]. 따라서 서로 다른 mating factor를 가진 효모들은 간단히 섞기만 하면 쉽게 혼성화(hybrid)가 가능하다. 하지만 같은 mating factor를 가진 효모들은 위와 같은 방법으로 혼성화가 가능하지 않다. 그리고 속(genus)이 다른 균주 또한 서로 융합이 일어나기 힘들다. 따라서 이런 포자 형성 또는 혼성화가 어려운 효모들의 혼성체를 만들기 위해서 원형질체(protoplast)를 만든 후 융합하는 genome shuffling방법을 시도할 수 있다[4, 8, 14]. Genome shuffling은 새로운 생물시스템의 engineering을 위한 획기적인 전략으로써 유전적다양성은 protoplast fusion에 의해 이루어진다. Protoplast fusion은 효모 균주의 세포벽을 제거하여 원형질체를 만든 뒤 원형질체를 융합시켜 두 개체의 염색체를 하나의 세포로 도입 시킨 융합체(fusant)를 선별하는 방법이다[5]. 본 연구에서는 다양한 특성을 가진 균주의 육종을 위해 에탄올 내성, 내열성, β-glucanase활성을 가지는 *S. cerevisiae* 균주와 xylose를 탄소원으로 이용하는 특성을 가지는 *P. stipitis* 균주를 protoplast fusion의 genome shuffling방법을 이용하여 다른 속(genus)간의 융합을 통한 새로운 균주의 육종을 시도하였다. 본 연구에서 개량한 균주시스템을 이용하여 해조류나 목질계 유래의 biomass로 부터 바이오에탄올을 효율적으로 생산할 수 있을 것이라 생각되며, 또한 이 균주는 목적에 따라 더 개량되어 산업적으로 유용하게 사용될 것이라 기대된다.

재료 및 방법

효모 균주

원형질체 융합에 의한 균주 개량을 위해 *S. cerevisiae* BYK-F11 균주[8]와 *P. stipitisΔura* 균주를 사용하였다. BYK-F11 (*MATa leu2-3Δ0 ura3-Δ0 his3-Δ200, Δ1 lys2-Δ0, pAInu-exgA (URA3)*) 균주는 에탄올 내성과 내열성이 뛰어난 *S. cerevisiae* YKY020 균주와 *Aspergillus oryzae* 유래의 exo-β-1,3-glucanase 유전자(*EXGA*)가 도입되어 β-glucanase 활성을 가지는 *S. cerevisiae* BY4742*Δexg1*/pAInu-exgA 재조합균주의 genome shuffling에 의해 구축되었다. BYK-F11 균주는 8%의 에탄올 농도에서 내성을 보이며 40°C의 온도에서도 성장속도를 잘 유지하는 내열성 균주로 개량되었으며 diploid (이배체) 균주이다. Xylose metabolism pathway를 가진 *P. stipitisΔura* 균주는 wild type *P. stipitis* 균주의 *URA3* 유전자를 선별마커로 이용하기 위해 *KanMX* (geneticin 내성유전자) 유전자로 *URA3* 유전자를 결실시킨 균주로 uracil 영양요구주이다.

사용배지 및 배양조건

효모의 성장배지로는 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 배지를 사용하였으며, 원형질체 융합을 선별하기 위한 선별배지로는 SD (0.67% yeast nitrogen without base amino acids, 2% dextrose) 배지에 원형질체의 삼투압 유지를 위해 1.2 M sorbitol을 넣은 배지(SD-sorbitol)를 사용하였다. 융합체의 확인을 위해 SD배지에 2 mg/ml geneticin을 넣은 배지를 사용하여 스크리닝을 하였으며 β-glucanase의 발현을 위한 배지로는 YPD 배지를 사용하고, xylose 이용능과 에탄올 생산성을 조사하기 위해 2% xylose가 포함된 YPX 배지를 사용하였다. 융합체의 β-glucanase 활성을 보기 위해서 YPD 고체배지를 사용하여 plate assay를 수행하였다. 30℃에서 하루 동안 배양 후, 기질인 0.04% MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside) (Fluka Analytical, USA) 용액 1 ml를 스프레이하여 37℃에서 10분 동안 반응 후 UV상에서 형광을 확인하였다[7]. 에탄올 내성을 조사하기 위한 배지는 8%의 에탄올이 첨가된 YPDE배지를 사용하였다.

P. stipitis 균주의 uracil 영양요구주(*Δura3*) 구축

P. stipitisΔura 균주를 구축하기 위해서 *URA3* 유전자와 *KanMX* 유전자의 영역을 overlap PCR을 통해 증폭하였다. *URA3* 유전자의 앞부분(5′-300bp 영역)을 증폭하기 위해 p.ura3-F1 (5′-ATGGTCAACGTCCAAACCTA-3′)과 p.ura3-R3 (5′-TGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTTTTCC AATGTCTGCG-3′) primer를 사용하였으며, *KanMX* 유전자(1.69kb)를 증폭하기 위해서는 pBlue-F (5′-AAAGGGAACAAAAGCTGGAG-3′)와 pBlue-R (5′-GCCCGGGGGATCCACTAGTT-3′) primer를 사용하였다. 그리고 *URA3* 유전자의 뒷부분(3′-300bp 영역)을 증폭하기 위해 p.ura3-F2 (5′-TCTAGAACT AGTGGATCC CCCGGGCACTGTGGAAATCGCC-3′)와 p.ura3-R2 (5′-TTA CACTTGGCTTGTCTTCT-3′) primer를 사용하여 각각의 단편을 구축하였다. 구축된 3개의 PCR 단편을 template로 사용하고, p.ura3-F1과 p.ura3-R2 primer를 사용하여 5′-*ura3-KanMX-ura3*-3′ 단편을 증폭하였다. 이렇게 증폭한 단편을 *P. stipitis* 균주에 도입하여 상동재조합에 의해 *URA3* 유전자가 결실된 *P. sitipitisΔura* 균주를 구축하였다.

원형질체 형성 및 genome shuffling

S. cerevisiae BYK-F11과 *P. stipitisΔura* 균주를 각각 YPD 배지에 접종하여 30℃에서 하루 동안 배양하여 자란 균체(약 2×10^8 cells)를 원심분리하여 회수하였다. 균체는 1.2 M sorbitol과 0.01 M EDTA가 첨가된 0.1 M sodium citrate buffer (citrate-sorbitol-EDTA buffer)를 이용하여 다시 세척하고, 0.3 mg/ml zymolyase 20T가 첨가된 citrate-sorbitol-EDTA buffer에 현탁하여 30℃에서 120분간 반응하였다. 그 후 원심분리하여 회수된 균체는 10 mM calcium chloride를 함유한 1.2 M sorbitol 용액으로 세척 후 재현탁했다. 이렇게 만들어진 각각의 원형질체를 섞어 25℃에서 15분간 반응한 뒤, 10 mM calcium chloride와 20% PEG가 첨가된 1.2 M sorbitol 용액을 첨가 후 25℃에서 더 반응시켰다. 원형질 융합이 일어난 원형질체를 1.2 M sorbitol이 첨가된 YPD 액체배지에 재현탁하여

30℃에서 20분간 반응시킨 후, 선별배지에 현탁액(약 6×10^6 cells)을 분주하고 top agar를 부어준 후에 30℃에서 3일 정도 배양하였다[3].

Pulse field gel electrophoresis (PFGE)를 통한 핵형(karyotype) 분석

S. cerevisiae BYK-F11과 *P. stipitisΔura* 균주의 chromosomal DNA는 1% low melting agarose (Sigma)를 사용하여 DNA plug를 만들어 준비하였다[12]. Chromosomal DNA는 CHEF-DRIII system (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 0.5 xTBE buffer에 1% gold agarose (pulsed field certified agarose; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 녹인 겔에서 분리하였다. CHEF gel electrophoresis의 조건은 106°의 angle로 3.0 V/cm에서 48시간 동안 500초의 interval로 switching 하였고, 전기영동 후 0.5 μg/ml의 ethidium bromide (EtBr)로 염색 후 UV상에서 karyotype을 확인하였다.

Gas chromatography

효모균주들의 에탄올 생산성을 확인하기 위해 배양된 시료를 원심분리 후 상등액을 gas chromatograph (GC)를 이용하여 분석하였다. GC는 HP 5890 series II를 사용하였고, 컬럼은 HP-FFAP capillary column (Agilent technologies, Canada, Cross-Linked PEG-TPA)을 사용하였다. 각각의 실험은 3번의 independent 실험을 수행하였으며 그 평균값을 산출하였다.

결과 및 고찰

속(genus) 간 원형질체 융합을 위한 *P. stipitisΔura* 균주 구축

Genome shuffling을 위한 원형질체 융합을 위해서는 서로 다른 선택마커(영양요구 및 항생제내성 마커 등)를 가진 두 개의 균주가 필요하다. 본 연구에서는 같은 속 간의 원형질체 융합이 아닌 다른 속 간의 원형질의 융합을 시도하고자 한다. Xylose 대사능이 뛰어난 *P. stipitis* 균주는 wild type의 균주로서 fusion후의 선별마커가 따로 없기 때문에 genome shuffling에 바로 사용하기에 적합하지 않다. 따라서 *URA3* 유전자를 선별마커로 사용하기 위해, *KanMX* 유전자의 삽입으로 *URA3* 유전자의 기능이 결실된 *P. stipitisΔura* 균주를 제작하였다. 그 결과, 영양분이 풍부한 YPD배지에서는 *P. stipitis* 균주(WT)와 *P. stipitisΔura* 균주 모두 잘 자랐지만, uracil이 들어있지 않은 최소배지(SC-uracil)에서는 *P. stipitisΔura* 균주가 자라지 못하는 것으로 보아 *URA3* 유전자가 결실되었음을 확인하였다(Fig. 1A).

원형질체 융합을 통한 다른 속간의 효모균주 융합

다양한 phenotype을 가진 다른 속의 두 균주 융합을 통해

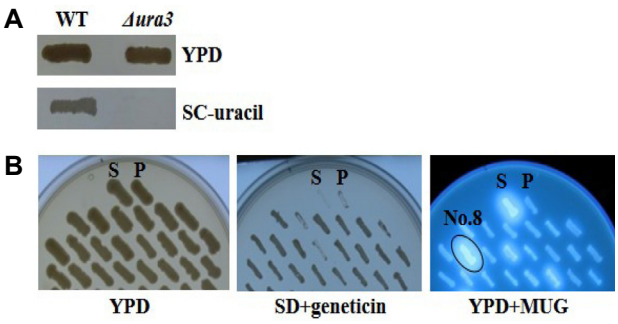

Fig. 1. Confirmation of uracil auxotroph in *P. stipitisΔura* strain (A) and screening of fusants by auxotrophic test and analysis of β-glucanase activity (B). Host strains and fusants were streaked on to YPD, SD containing geneticin and YPD containing MUG medium for 3 days. The β-glucanase activity was detected by MUG degradation on UV illumination. WT, *P. stipitis* wild type strain: *Δura3*, *P. stipitisΔura* strain: S, *S. cerevisiae* BYK-F11 strain: P, *P. stipitisΔura* strain; No.8, selected fusant (BYKPS-F8).

xylose 대사, β-glucanase 활성, 에탄올 내성 및 내열성을 모두 가진 새로운 생물시스템의 구축을 시도해 보았다. 먼저 BYK-F11 균주와 *P. stipitisΔura* 균주를 각각 zymolyase를 처리하여 원형질체화 시키고, 각각의 원형질체를 융합시켜 SD배지에서 자란 22개의 colony를 1차 선별하였다. 선별된 융합체들의 확실한 혼성화 유무를 알기 위해 2차 선별로 SD선별배지에 geneticin을 첨가한 배지에서 배양을 하였다. 선택된 22개의 융합체 중에서 2개의 융합체(No. 2, 10)는 모균주(S and P)와 같이 선별배지에서 자라지 못하는 것을 확인하였고, 3개의 융합체(No. 8, 10, 20)에서는 β-glucanase 활성이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 따라서 22개 융합체 중에서 2개의 융합체(No. 8, 20) 만이 각각 모균주의 표현형을 모두 가지고 있다고 판단하고, 그 중 β-glucanase 활성이 가장 높은 융합체 no.8을 최종 선정하여 BYKPS-F8 균주로 명명하였다.

BYKPS-F8 균주의 염색체 karyotype 분석

Saccharomyces 속(*S. cereisiae* 경우, 16개의 염색체, 12.1Mb)과 *Pichia* 속(*P. stipitis* 경우 8개의 염색체, 15.4Mb)은 염색체의 개수와 그 크기가 서로 다르다. 따라서 두 균주의 융합체인 BYKPS-F8 균주의 경우 두 균주의 genome이 융합된 형태로 존재할 가능성이 높으므로 BYKPS-F8 균주의 karyotype 분석을 PFGE를 통해 조사해보았다. *S. cerevisiae* BYK-F11 균주보다 상대적으로 염색체의 사이즈가 큰 *P. stipitisΔura* 균주의 염색체 분리조건으로 PFGE를 진행하였고, 그 결과, BYKPS-F8 균주의 경우, 모균주 *S. cerevisiae* BYK-F11와 *P. stipitisΔura* 균주의 genome을 모두 가지고 있는 형태의 karyotype을 보임을 확인 할 수 있었다(Fig. 2A, lane 3). 하지만, 융합체의 경우, 혼성화에 의해 단순히 두 균주가 섞여있을 가능성도 배제할 수 없다. 그러므로 BYKPS-F8 균주를 YPD배지에서 24시간 배

양한 후, SD배지에서 자란 single colony를 random하게 선택하여 PFGE를 재실시해 본 결과, 융합체와 같은 karyotype을 보임을 확인하였다. 이러한 결과는 genome shuffling에 의해 *Saccharomyces* 속과 *Pichia* 속간의 protoplast fusion이 성공적으로 이루어졌음을 시사한다. Protoplast fusion에 의한 genome shuffling의 효율은 같은 속의 효모균주에 적용하였을 경우 약 15% 정도의 융합률(fusion efficiency)을 보이는데 반해[8] 다른 속의 효모균주에 적용한 본 연구에서는 약 9%의 융합률을 보였다. 이 융합률은 protoplast fusion법의 효율이 20% 이하임을 감안하면 결코 낮은 수치가 아니며 인위적인 다른 속간의 균주 융합에 이 방법이 효율적임을 시사한다.

BYKPS-F8 균주의 xylose 이용능 조사

*P. stipitisΔura*는 다른 효모와는 달리 오탄당인 xylose를 효율적으로 이용할 수 있는 대사경로를 가지고 있는 균주이다. 그래서 *S. cerevisiae* BYK-F11와 *P. stipitisΔura* 그리고 BYKPS-F8 균주를 2%의 xylose가 포함된 YPX배지에서 배양하여 BYKPS-F8 균주에서도 *P. stipitisΔura* 균주에서처럼 xylose 이용능을 가지는지 조사하였다. 그 결과 *S. cerevisiae*인 BYK-F11 균주는 xylose를 직접적으로 이용하지 못해 배양 48시간까지 거의 자라지 못했음을 확인 할 수 있었고, 융합체인 BYKPS-F8 균주는 배양 48시간째에 모균주인 BYK-F11 균주보다 6배, *P. stipitisΔura* 균주보다는 1.2배 정도 더 잘 자랐음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이 결과는 BYKPS-F8 균주가 genome shuffling에 의해 *P. stipitisΔura* 균주가 가지는 xylose metabolism pathway를 가졌음을 시사한다. 또한 BYKPS-F8 균주의 경우 이배체인 모균주 *S. cerevisiae* BYK-F11균주와 일배체인 *P. stipitisΔura* 균주의 융합에 의해 구축된 삼배체(triploid)로 추정되며, 일배체보다 성장속도가 더 향상되었을 가능성이 높고, 탄소원인 xylose의 이용능도 모균주 보다 다소 향상되었을 것이라고 생각된다. 이는 자연계에 존재는 야생형의 다양한 효모균주들이 일배체보다 이배체 또는 다배체(polyploid)를 형성하여, 우수하고 다양한 특성을 나타내고 성장속도 및 물질대사효율이 높은 것과도 일치한다.

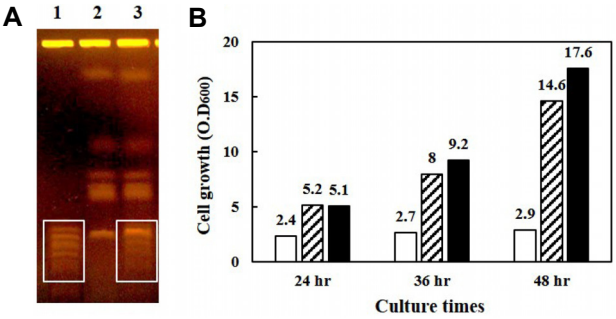

Fig. 2 Karyotype analysis of BYKPS-F8 strain and comparison of cell growth in each strain on YPX (2%) medium. (A) Karyotype of each strain was analyzed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Lane 1: *S. cerevisiae* BYK-F11 strain, lane 2: *P. stipitisΔura* strain, lane 3: BYKPS-F8 fusant. (B) Each strain was cultivated on YPX (2% xylose) at 30℃ for 48 hr. Graph bar □: *S. cerevisiae* BYK-F11 strain, ▨: *P. stipitisΔura* strain, ■: BYKPS-F8.

BYKPS-F8 균주의 내열성, 에탄올 내성 및 생산성 조사

융합균주의 내열성 및 에탄올 내성 증가 정도를 알아보기 위해 먼저 모균주와 융합균주 BYKPS-F8 균주를 대상으로 한 내열성 조사를 해보았다. 모균주 *S. cerevisiae* BYK-F11 균주는 40℃ 에서 내열성을 가지며 다른 모균주인 *P. stipitisΔura* 균주도 35°C 정도까지 내열성을 가지는 균주이다. 융합체 BYKPS-F8 균주의 단일 클론(#1 and #2 independent clone)의 내열성을 조사해 본 결과, 40°C에서 모균주 BYK-F11 균주 정도의 내열성을 나타내었고, 40℃를 초과한 온도에서는 모균주와 마찬가지로 성장속도가 저하됨을 관찰 할 수 있었다(data not shown). 다음으로 융합균주의 에탄올내성 정도를 알아보기 위해 8% 에탄올이 첨가된 YPD 고체배지에 각각의 균주를 동일한 농도로 spot 하여 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 그 결과 모균주인 BYK-F11 균주는 에탄올에 내성이 있기 때문에 YPDE (8%)배지에서 잘 자랐지만, *P. stipitisΔura* 균주는 YPDE 배지에서 잘 자라지 못하는 것을 확인하였다. 하지만 BYKPS-F8 균주는 모균주인 BYK-F11 균주보다 높은 에탄올 내성을 나타냄을 확인 할 수 있었고, 각각의 단일 클론에서의 차이는 보이지 않았다(Fig. 3). 또한 에탄올 내성이 높은 BYKPS-F8 균주를 20 g/l의 xylose 배지에서 약 72시간정도 배양한 후 에탄올 생산성을 조사해 본 결과, 약 7.5 g/l의 에탄올이 생산되었다. 이는 모균주인 BYK-F11 균주가 xylose를 거의 이용하지 못하는 것에 반해 BYKPS-F8 균주는 *P. stipitisΔura* 균주 정도의 에탄올을 생산할 수 있음을 알 수 있었다. 다형질(multiple phenotypes) 균주를 구축하기 위해 외래의 형질(유전자 및 염색체)을 도입하고자 할 때, 세포는 종종 도입된 형질을 거부하고 plasmid의 결실이나 다배체의 경우는 염색체상에서 결실시키려는 경향이 있다. 하지만 BYKPS-F8 균

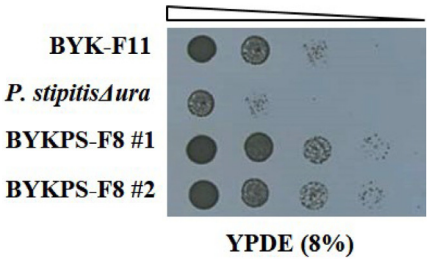

Fig. 3. Analysis for ethanol tolerance of BYKPS-F8 fusant. Aliquots (3 μl) of 10-fold serially diluted cell suspensions from *S. cerevisiae* BYK-F11, *P. stipitisΔura* strain and BYKPS-F8 fusant were spotted on to YPD containing 8% ethanol (YPDE), then incubated for 3 days at 30℃. #1 and #2 indicate independent clone from BYKPS-F8 fusant.

Table 1. Comparison of various phenotypes in *S. cerevisiae* BYK-F11, *P. stipitisΔura* strain and BYKPS-F8 fusant

Strains \ Phenotypes	β-glucanase activity	Xylose utility	Thermotolerance (°C)	Ethanol tolerance	Ethanol conc. (g/l)
BYK-F11	+	-	40	+	-
P. stipitisΔura	-	+	35	-	7.3
BYKPS-F8	+	++	40	++	7.5

주의 경우에는 약 260시간의 장기배양 후에도 도입한 형질을 모두 유지하고 있음을 확인하여 안정적으로 융합체를 형성하고 있음을 확인하였다(data not shown).

본 연구에서는 protoplast fusion법을 통한 genome shuffling으로 다양한 표현형을 가진 다른 속간의 균주 융합을 시도하였고, 성공적으로 두 모균주의 특성을 모두 가지는 융합균주를 구축할 수 있었다(Table 1). 비록 본 연구에서는 내열성, 에탄올 내성 및 xylose 이용능에 초점을 맞추어 균주개량을 유도하였지만, 이는 다양한 바이오매스(cellulose, glucan, xylan, agar 등)의 당화효소를 가진 균주[6, 10]의 이용으로 효율적인 바이오에탄올 생산이 가능한 생물시스템의 개량뿐만 아니라 산업적으로 유용한 균주의 개량에도 손쉽게 적용 가능할 것이라 기대한다.

References

1. Attfield, P. V. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker´s yeast. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1351-1357.
2. Bae, Y. W., Seong, P. J., Cho, D. H., Shin, S. J., Kim, S. W., Han, S. O., Kim, Y. H. and Park, C. H. 2010. Bioethanol Production Based on Lignocellulosic Biomass with *Pichia stipitis*. *KSBBJ* **25**, 533-538.
3. Harashima, S., Takagi, A. and Oshima, Y. 1984. Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. *Mol. Cell Biol.* **4**, 771-778.
4. Hou, L. 2010. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1084-1093.
5. Jeon, H. T., Park, U. M. and Kim, K. 2011. The use of aureobasidin A resistant gene as the dominant selectable marker for the selection of industrial yeast hybrid. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 111-118.
6. Jung H. M. and Kim, Y. H. 2018. Simultaneous Overexpression of Integrated Genes by Copy Number Amplification of a Mini-Yeast Artificial Chromosome. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 821-825.
7. Kim, M. J., Nam, S. W., Tamano, K., Machida, M., Kim, S. K. and Kim, Y. H. 2011. Optimazation for production of exo-β-1,3-glucanase (laminarase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. Soc. Biotech. Bioeng.* **26**, 427-432.
8. Park, A. H. and Kim, Y. H. 2013. Breeding of ethanol producing and tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using genome shuffling. *J. Life Sci.* **23**, 1192-1198.
9. Sakamoto, T., Hasunuma, T., Hori, Y., Yamada, R. and Kondo, A. 2012. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Biotechnol.* **158**, 203-210.
10. Seok, J. H., Kim, H. S., Hatada, Y., Nam, S. W. and Kim, Y. H. 2012. Construction of an expression system for the secretory production of recombinant α-agarase in yeast. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1041-1049.
11. Seok, J. H., Park, H. G., Lee, S. H., Nam, S. W., Jeon, S. J., Kim, J. H. and Kim, Y. H. 2010. High-level secretory expression of recombinant β-agarase from *Zobellia galactanivarans* in *Pichia pastoris*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 40-45.
12. Sheehan, C. and Weiss, A. S. 1990. Yeast artificial chromosome: rapid extraction for high resolution analysis. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2193.
13. Shi, D. J., Wang, C. L. and Wang, K. M. 2009. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mircobiol. Biotechnol.* **36**, 139-147.
14. Spencer, J. F. T. and Spencer, D. M. 1983. Genetic improvement of industrial yeast. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 121-142.
15. Yanagisawa, M., Kawai, S. and Murata, K. 2013. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered* **4**, 224-235.
16. Zhu, Y., Wu, L., Zhu, J., Xu, Y. and Yu, S. 2018. Quantitative proteomic analysis of xylose fermentation strain *Pichia stipitis* CBS 5776 to lignocellulosic inhibitors acetic acid, vanillin and 5-hydroxymethylfurfural. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, doi: 10.1093/femsle/fny245.

초록 : 융합법을 이용한 바이오에탄올 생산에 적합한 효모균주의 구축

김연희*
(동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공)

본 연구는 에탄올내성, 내열성, β-glucanase 활성 및 xylose 대사가 가능한 새로운 생물시스템을 육종하기 위해 원형질체융합(protoplast fusion)이라는 방법을 사용하여 *S. cerevisiae* BYK-F11 균주와 *P. stipitis*Δ*ura* 균주와의 genome shuffling을 시도하였다. *P. stipitis*Δ*ura* 균주는 *URA3* 유전자를 결실시켜 uracil 영양요구주로 구축되었다. Protoplast fusion을 통해 몇몇의 융합체가 선별되었고, 두 모균주인 BYK-F11 균주와 *P. stipitis*Δ*ura* 균주의 핵형(karyotype)를 모두 가지는 BYKPS-F8 균주가 22개의 융합체중에서 최종 선정되었다. 이어 β-glucanase 활성, xylose 이용능, 에탄올내성, 내열성 및 에탄올생산성에 대한 다양한 표현형이 조사되었다. BYKPS-F8 균주는 모균주인 BYK-F11 균주가 가지는 β-glucanase 활성을 가지게 되었고, *P. stipitis*Δ*ura* 균주가 가지는 xylose 이용능도 모균주보다 1.2배 증가되었음을 확인할 수 있었다. BYKPS-F8 균주는 40°C에서 내열성을 보였으며, 8% 에탄올이 첨가된 배지에서 모균주에 비해 에탄올 내성이 증가되었음을 확인 할 수 있었다. 20 g/l의 xylose가 함유된 배지에서 72시간 배양에 의해 약 7.5 g/l의 에탄올을 생산할 수 있었으며, 260시간의 장기간의 배양에도 BYKPS-F8균주에 도입한 다형질이 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서 사용된 균주 육종방법을 통해 다형질을 가진 다른 속간의 균주 융합 및 산업적으로 유용한 생물시스템의 육종이 가능함을 확인하였다.