

## Isolation of a Mutant with Thermotolerance and Ethanol Tolerance Using Proofreading-deficient DNA Polymerases in *Saccharomyces cerevisiae*

Yeon-Hee Kim \*

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

Received May 27, 2019 / Revised June 4, 2019 / Accepted June 19, 2019

In this study, we constructed a biological system that exhibited thermotolerance, ethanol tolerance, and increased ethanol productivity using a random mutagenesis method. We attempted to isolate a thermotolerant mutant using proofreading-deficient DNA polymerase  $\delta$  and  $\epsilon$  encoded by the *pol3* and *pol2* genes, respectively, in *Saccharomyces cerevisiae*. To obtain mutants that could grow at high temperatures (38°C and 40°C), random mutagenesis of AMY410 (*pol2-4*) and AMY126 (*pol3-01*) strains was induced. The parental strains (AMY410 and AMY126) grew poorly at temperatures higher than 38°C. By stepwise elevation of the incubation temperature, AMY410-Ht (heat tolerance) and AMY126-Ht strains that proliferated at 40°C were obtained. These strains were further incubated in medium containing 6% and 8% ethanol and then AMY410-HEt (heat and ethanol tolerance) and AMY126-HEt strain with ethanol tolerance at an 8% ethanol concentration was obtained. The AMY126-HEt strain grew even at an ethanol concentration of 10%. Furthermore, following the addition of high concentrations of glucose (5% and 10%), an AMY126-HEt3 strain with increased ethanol productivity was isolated. This strain produced 24.7 g/l of ethanol (95% theoretical conversion yield) from 50 g/l of glucose. The findings demonstrate that a new biological system (yeast strain) showing various phenotypes can be easily and efficiently bred by random mutagenesis of a proofreading-deficient mutant.

**Key words** : Ethanol tolerance, proofreading-deficient mutant, random mutagenesis, *Saccharomyces cerevisiae*, thermotolerance

### 서 론

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 오랜 기간 분자유전학적 연구에 주로 사용되는 대표적인 진핵생물의 모델로 여겨왔다. 하지만 산업이 다양해지고 특정 분야에 적용될 수 있는 유용한 특성(내열성, 내산성, 에탄올내성, 고효율 물질대사능 등)을 가진 균주의 개발이 요구됨에 따라, 돌연변이(selective and random mutation), 염색체가공(chromosome manipulation) 및 유전자 도입(foreign genes introduction) 등의 방법을 통해 효모균주의 기능을 향상시키고 있다[9, 13, 16, 20]. 특히 점점 심각해 지는 지구온난화 문제로 석탄연료의 대안이 되고 있는 바이오연료(biofuel)의 생산을 위해 바이오매스(cellulose, starch, xylan, agar)의 당화(saccharification)와 발효(fermentation)가 가능한 효모균주가 개량되고 있고, 이는 다양한 바이오매스 당화효소의 재조합을 통해 개발되고 있다[8, 10, 14, 21]. 이렇게 재조합 균주를 통해 생산되는 바이오연료 중 바이

오에탄올의 생산에 관한 연구 및 보급은 다른 대체에너지에 비해 빠르게 확산되고 있는 추세이다. 액체연료로서 에탄올은 많은 분야에 사용되고 있어 수많은 미생물들이 에탄올 생산에 사용되고 있지만, 미생물 생장의 저해제로 작용하여 배양 중 에탄올의 축적은 세포 성장과 목적 생산물의 생산성 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. 또한 대표적인 에탄올 생산 균주인 효모는 배양 온도 30°C에서 가장 활발히 잘 자라지만 38°C 이상의 온도에서는 성장이 저해되어 온도에도 민감하다. 하지만 바이오연료 생산과 같이 효모 균주를 산업적으로 이용하기 위해서는 생산공정에서 발생하는 높은 온도에서도 자랄 수 있는 균주가 유용하기 때문에 내열성 균주의 육종도 더불어 필요해질 수밖에 없다[18].

균주 개량을 위해서는 직접적으로 mutagen (돌연변이원)을 처리하여 돌연변이를 유발하는 전통적인 방법, 교배(hybridization) 및 원형질체 융합(protoplast fusion)을 통한 genome shuffling 방법 등을 사용할 수 있다[4, 5]. 돌연변이를 유도하기 위해 일반적으로 화학적 또는 물리적 mutagen을 사용하게 되는데, 화학적 mutagen으로는 EMS (Ethyl Methane Sulfonate), NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), 아질산(HNO<sub>2</sub>) 등을 사용하며, 물리적인 mutagen으로는 자외

#### \*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.

선, UV (Ultra Violet) 등을 사용하여 random mutagenesis를 유발시킨다. 또한 이러한 mutagen을 사용하는 방법 외에도 DNA polymerase의 catalytic large subunit를 암호화하는 유전자를 결실시킨 균주를 사용하여 무작위적으로 돌연변이를 유도하는 방법도 매우 효과적인 방법이라고 할 수 있다. 세포 분열을 위한 DNA 복제과정에서 3'→5'exonuclease 활성을 가지고 있는 DNA polymerase  $\delta$ 와 DNA polymerase  $\epsilon$ 의 large subunit는 잘못 연결된 nucleotide (mismatched nucleotide)를 제거하는 기능을 하고 있다[17]. "Proofreading (교정)"이라고 알려져 있는 이 기능은 DNA 복제의 높은 정확도(fidelity)를 유지하기 위해서 매우 중요한 기능이다. *S. cerevisiae* 균주에서는 *POL3*와 *POL2* 유전자가 각각 DNA polymerase  $\delta$ 와  $\epsilon$ 의 catalytic subunit을 코드하고 있다고 알려져 있다[6, 11, 19]. 이 proofreading domain은 진핵세포의 DNA polymerase에서 아주 높게 보존되어 있으며[11], 각각의 proofreading-deficient mutant 대립유전자(allele)인 *pol3-01*와 *pol2-4*는 복제의 정방향과 역방향 돌연변이(forward and reverse mutations)를 모두 유도하는 강력한 돌연변이원으로 알려져 있다[12]. 한편 또 다른 균주 개량법인 genome shuffling 방법은 두 개의 같은 속(genus) 또는 다른 속간의 균주 융합을 가능하게 하는 방법으로, 균주의 특성이 개량된 두 재조합 균주 간의 원형질체 융합(protoplast fusion)을 통해 혼성체(hybrid)의 육종을 가능하게 하였다[7, 15]. 하지만 이러한 방법은 이미 몇몇 특징(당 대사능, 에탄올내성, 내열성)이 개량된 균주 간의 융합 또는 서로 다른 단일 특성을 지닌 야생균주 간의 융합을 통한 개량이라는 면에서 야생형(wild type) 균주의 *in vivo* mutagenesis에 의한 근본적인 균주 개량과는 차이가 있다. 따라서 본 연구에서는 강력한 돌연변이원으로 알려진 DNA polymerase의 교정기능이 결실된 균주(proofreading-deficient mutant)의 사용에 의해 내열성 및 에탄올내성이 증가된 균주의 분리를 시도하고자 하였다. 또한 본 연구에서 분리된 개량 균주는 기존의 다양한 균주육종 방법(hybridization, genome shuffling)에 의해 더욱더 산업적으로 유용한 균주로 개량될 수 있을 것이고, 다양한 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하기 위한 공정에도 유용하게 사용될 수 있으리라 기대한다.

## 재료 및 방법

### 효모균주

Random mutagenesis를 유도하기 위해 사용된 효모 균주로는 *S. cerevisiae* AMY410 균주(*MATa ade5-1 leu2-3-112 trp1-289 ura3-52 his7-2 pol2-4 pol3-01* [pBL304 (*POL3 URA3*)]와 AMY126 균주(*MATa ade5-1 leu2-3-112 trp1-289 ura3-52 his7-2 pol3-01*)를 사용하였다. 이들 균주는 DNA 복제 시 proofreading 기능을 하는 *POL2* 유전자와 *POL3* 유전자가 결실된 균주로서 특정한 스트레스 환경에 노출되었을 경우, 돌연변이가 발생가능

성이 높은 균주이므로 random mutagenesis에 적합한 균주로 선정되었다. 본 연구에 사용된 효모균주는 일본 Osaka university의 Yeast Genetic Resource Center (YGRC) (<http://yeast.nig.ac.jp/yeast/top.jsf>)에서 제공받았다.

### 사용배지 및 배양조건

효모의 성장 및 돌연변이 유도배지로는 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)배지에 1% adenine (2.5 mg/ml)이 포함된 YPDA 배지를 사용하였으며, 에탄올 내성을 보기 위한 배지로는 YPDA 배지에 에탄올이 6%, 8%, 10% (v/v) 첨가된 YPDAE (ethanol) 배지를 사용하였다. 내열성 돌연변이를 유도하기 위해 먼저 각각의 균주를 YPDA 액체배지에  $10^4$  cells/ml 농도로 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양 후, YPDA 평판배지에 spreading 하고 38°C, 그리고 40°C에서 2일 정도 배양하여 내열성을 보이는 균주를 선별하였다. 내열성을 보이는 균주를 대상으로 에탄올내성 균주를 선별하기 위해 에탄올 농도를 6%와 8%로 맞춘 YPDAE 배지에서 균주를 4일간 배양하여 성장 속도가 좋은 균주를 선별하였다. 또한 에탄올 내성 정도를 확인하기 위해 선별된 균주를 YPDA 배지에서 24시간 정도 키운 다음 OD<sub>600</sub>=1이 되도록 희석하고, 희석액을 각각 10배씩 단계별로 희석하여 10% 에탄올이 함유된 YPDAE 배지에 3  $\mu$ l씩 spotting 하여 에탄올 내성을 판단하였다. 또한 에탄올 생산성을 보기 위해서 고농도 glucose 농도 (5%, 10%)에서 균주를 배양한 다음 성장속도가 좋은 균주를 선별하여 5% glucose가 포함된 YPD(5A) 배지에서 2일 동안 baffled flask 배양을 하였다. 배양 온도는 30°C로 사용하였으며, 액체 배양 시에 190 rpm의 속도로 진탕배양하였다. 균체 농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 잔존환원당 분석

액체 배양 후 배지 중에 남아 있는 환원당을 확인하기 위해서 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법을 실시하였다[3]. 배양액을 13,000 rpm으로 1분간 원심분리 후 상등액과 pellet을 분리하여 상등액을 가지고 배지 중에 남아 있는 잔존환원당을 측정하였다. 배양상등액에 DNS 용액(1.6% NaOH, 30% K·Na·Tartrate 4H<sub>2</sub>O, 0.5% DNS)을 첨가하여 3분 동안 boiling 후 5분 동안 cooling시킨 뒤 550 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존환원당을 확인하였다. 표준적정곡선의 작성을 위해 0.2% glucose를 사용하였다.

### 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 30 m/ 0.25 mm/ 0.25  $\mu$ l)을 사용하였다. 이동상은 N<sub>2</sub>를 0.6 ml/min 유속으로 사용하였으며, 주입구 온도 150°C, 검출기 온도 200°C, 승온 조건은 50°C(1.4 min)/(10°C/min)/60°C(1 min)/(25°C/min)/100°C(1 min)/(50°C/min)/150°C(1 min)이었다. 분리비는 70:1로 했으며 내부 표준물질로 1%(v/v)의 isopropanol을 이용하였다. 각각의 실험은 3번의 independent 실험을 수행하였으며 그 평균값을 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**Random mutagenesis를 통한 내열성 균주 분리**

Proofreading-deficient 균주인 AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주로부터 내열성이 증가된 변이주를 분리하기 위해 먼저 각각 균주를 YPDA 배지에 접종하여 30°C에서 3일간 변이(random mutagenesis)를 유도하였다. 배양이 끝난 배양액은 YPDA 평판배지에 spreading하여 30°C와 38°C에서 2일간 배양함으로써 single colony를 형성시켰다. 배양온도 30°C에서와는 달리 38°C에서의 single colony 수는 현저히 줄었음을 확인 할 수 있었으며, 30°C에서 자란 colony 수(colony-forming units)로부터 38°C에서 colony를 형성한 세포수(viable cell number)를 계산해보니 두 균주 모두  $5.9 \pm 0.73 \times 10^{-5}$  (AMY410)와  $7.5 \pm 0.48 \times 10^{-5}$  (AMY126)의 frequency를 보임을 알 수 있었다. AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주에 있어 mutation frequency의 현저한 차이는 보이지 않음을 확인 할 수 있었다. 38°C에서 colony의 크기가 상대적으로 큰 colony 3개를 선택하여 YPDA 평판배지에서 내열성을 조사해보았다. Fig. 1A에 나타난 것처럼, AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주는 30°C에 비해 38°C에서는 성장이 저

해되었음을 알 수 있었고, 돌연변이 유도 후 선별된 각각 3개의 mutant들은 38°C에서도 잘 자라고 있어 내열성이 증가되었음을 확인 할 수 있었다. 그 중, 성장속도가 상대적으로 좋은 no.3 mutant를 AMY410-3 균주로 명명하고, no.4 mutant를 AMY126-4 균주로 명명하여 내열성 증가를 위한 다음 실험을 진행하였다. 38°C에서 잘 자라는 AMY410-3 균주와 AMY126-4 균주를 이용하여 같은 방법으로 40°C에서 내열성 균주의 분리를 시도한 결과(Fig. 1B), 38°C에서보다는 성장속도가 다소 감소되었지만, 40°C에서도 AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주에 비해 내열성이 현저히 증가된 mutant를 분리할 수 있었고, 그 중 성장속도가 가장 좋은 no.3-1과 no.4-1 mutant를 선정하여 AMY410-Ht (heat tolerance)와 AMY126-Ht 균주로 각각 명명하였다.

다음으로 내열성을 보이는 각각의 균주에 대해서 실제 세포 성장속도를 측정, 비교해보기 위해, AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주, 그리고 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주를 YPDA 배지에 접종하여 각각 30°C, 38°C, 40°C에서 2일간 배양하였다(Fig. 2, Table 1). 그 결과, 30°C에서 모든 균주의 성장속도는 차이를 보이지 않았고, 38°C에서는 AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주의 성장속도가 약 95%정도 감소한 것에 비해 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주에서는 각각 65%와 56%정도 감소됨을 확인하였다. 이것은 38°C에서 AMY410-3 균주와 AMY126-4 균주보다 성장속도가 약 10% 이상 증가된 결과이며(data not shown), 40°C에서도 AMY126-Ht 균주는 35% 정도의 성장속도를 보임을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 배양온도의 증가에 따라 모든 균주의 성장속도는 감소하였지만, AMY410 (*pol2-4*)균주와 AMY126 (*pol3-01*)균주가 40°C에서 자라지 못하는 것과 비교하여 mutant에서의 내열성이 상당히 증가되었다고 보여진다. 효모균주에서 내열

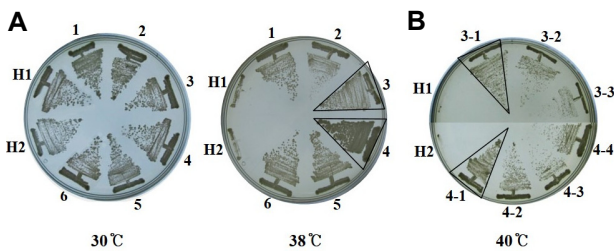


Fig. 1. Screening of thermotolerant mutants by random mutagenesis. Host strains (H1 and H2) and thermotolerant mutants were inoculated on YPDA and incubated at 30°C and 38°C (A) and 40°C (B) for 2 days. H1; AMY410 strain (*pol2* parental strain), H2; AMY126 strain (*pol3* parental strain), No.1~3, thermotolerant mutants derived from AMY410 strain, No.4~6, thermotolerant mutants derived from AMY126 strain, No. 3-1~3-3; thermotolerant mutants derived from AMY410-3 strain, No. 4-1~4-3; thermotolerant mutants derived from AMY126-4 strain

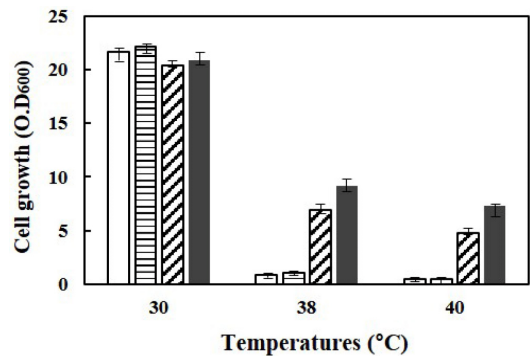


Fig. 2. Comparison of the cell growth of the thermotolerant mutants and its parental strain at different incubation temperatures. Each strain was cultivated on YPDA medium at 30°C for 2 days and the optical density (OD<sub>600</sub>) of each culture was measured. Triplicate cultures were run for each strain. Graph bar □, AMY410 strain (*pol2* parental strain); ▤, AMY126 strain (*pol3* parental strain); ▨, AMY410-Ht strain; ■, AMY126-Ht strain.

Table 1. Comparison of cell growth (OD<sub>600</sub>) according to incubation temperatures and concentration of ethanol in YPDA medium in each strain

Strains	Incubation temperature (°C)			Ethanol concentration (%)		
	30°C	38°C	40°C	YPDA	YPDAE (6%)	YPDAE (8%)
AMY410	21.7±0.5	0.9±0.2	0.5±0.1	20.5±0.2	7.1±0.1	1.7±0.2
AMY126	22.1±0.2	1.1±0.2	0.4±0.1	21.9±0.4	6.5±0.4	2.3±0.1
AMY410-Ht	20.4±0.1	7.3±0.5	4.8±0.3	-	-	-
AMY126-Ht	20.9±0.3	9.2±0.4	7.3±0.6	-	-	-
AMY410-HEt	21.1±0.6	7.9±0.2	4.2±0.4	21.5±0.3	16.5±0.2	5.1±0.6
AMY126-HEt	19.8±0.8	10.2±0.1	8.1±0.1	22.1±0.5	17.9±0.5	15.5±0.4

성을 가지게 하는 *hot1* mutation의 경우에도 38.5°C의 온도에서 자랄 수 있는 medial thermotolerance를 보이는데, 40°C에서 내열성을 가지는 것은 *pol3* 유전자 및 *pol2* 유전자의 결실에 의한 교정기능의 결핍에 따른 무작위적이고 다양한 돌연변이 (multiple mutation)의 결과라고 할 수 있을 것이다.

**Random mutagenesis를 통한 에탄올내성 균주 분리**

에탄올은 미생물의 생장 저해제로 작용하여 5% 이상의 에탄올 농도에서는 미생물 성장속도의 감소가 관찰되는데, 이는 세포의 성장에만 국한되지 않고 목적 생산물의 감소로 이어진다. 따라서 에탄올 내성의 증가는 에탄올을 생산하기 위해 사용하는 균주의 육종에는 필요한 과정이라 할 수 있다. 따라서 내열성이 증가된 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주에 대해서 에탄올내성 균주의 분리를 시도하였다. 먼저 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주를 에탄올농도 0%, 6%, 8%로 달리한 YPDAE 배지에서 4일간 배양하여 돌연변이를 유도하였고, 그 중 성장속도가 좋은 colony를 선별하여 AMY410 (*pol2-4*)균주 및 AMY126 (*pol3-01*)균주와 성장속도를 비교해보았다(Fig. 3A, Table 1). 6%의 에탄올 농도에서 AMY410 (*pol2-4*)균주 및 AMY126 (*pol3-01*)균주의 성장속도는 약 70%정도 감소하였고, 8% 에탄올 농도에서는 약 90% 감소로 에탄올에 의해 세포생장이 대부분 저해되었다. AMY410-Ht 균주의 에탄올내성 변

이주(AMY410-HEt)의 경우는 6% 에탄올 농도에서 23%정도의 성장속도 감소를 보였고, 8% 에탄올 농도에서는 76%의 성장속도 감소가 관찰되었다. 반면에 AMY126-Ht 균주의 에탄올내성 변이주(AMY126-HEt)의 경우는 6% 에탄올과 8% 에탄올 농도에서 각각 20%와 30%의 성장속도 감소만이 관찰되었다. 에탄올 내성에 있어 AMY410-HEt 균주보다 AMY126-HEt 균주에서 에탄올 내성이 더욱 증가되어 있음을 알 수 있었고, 이는 10% 에탄올 농도에서 균주 농도를 단계별로 희석한 결과를 비교했을 때 더 뚜렷이 확인 할 수 있었다(Fig. 3B). 10% 에탄올이 포함된 배지에서 AMY126-HEt 균주만이 저농도의 균체량으로도 내성을 가짐을 확인하였고, 이 결과는 에탄올 내성과 관련된 유전자들의 변이가 *POL2* 유전자의 결실(*pol2*)보다 *POL3* 유전자의 결실(*pol3*)에 의한 돌연변이에 의해 더욱 유도되었음을 시사한다. 또한 *pol* 유전자 결실에 따른 변이주의 형태학적 변화(크기, 출아형태 등)는 거의 관찰되지 않았다. 이전의 연구에서 에탄올 내성을 가진 균주의 육종을 위해 염색체가공기술(chromosome splitting technology)을 이용한 12개의 인공미니염색체(artificial mini-chromosome)를 구축하였고, 에탄올 내성을 보이는 균주가 12개 염색체 중 2개의 인공미니염색체의 결실에 의해 에탄올 내성 표현형을 가지게 됨을 보고하였다[16]. 결실된 2개의 인공미니염색체상의 유전자를 분석해 본 결과, 총 26개의 유전자 결실을 확인하였고,

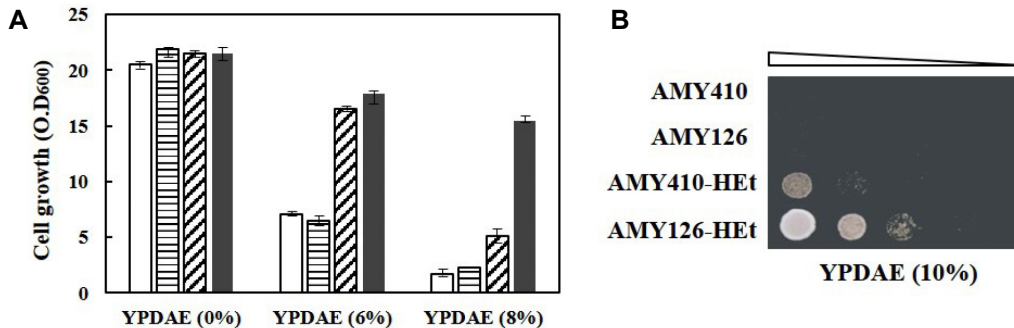


Fig. 3. Comparison of the cell growth of the ethanol-tolerant mutants and its parental strains at different ethanol concentrations. Each strain was cultivated on YPDA medium containing ethanol (0%, 6% and 8%) for 3 days (A) and aliquots (3 µl) of 10-fold serially diluted cell suspensions from each strain were spotted on to YPDA containing 10% ethanol (YPDAE), then incubated at 30°C for 3 days (B). Graph bar □, AMY410 strain (*pol2* parental strain); ▤, AMY126 strain (*pol3* parental strain); ▨, AMY410-HEt strain; ■, AMY126-HEt strain.

Table 2. Comparison of cell growth, reducing sugar, ethanol concentration and ethanol yield in each strain

Strains	Cell growth (OD <sub>600</sub> )		Reducing sugar (g/l)		Ethanol concentration (g/l)		Ethanol yield (g/g)
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	
AMY126-HEt	15.3	27.9	20.5	2.3	9.8	15.3	0.31
AMY126-HEt3	17.4	30.6	18.3	0.9	11.3	24.7	0.49

biosynthesis (*SRY1*, *URA1*), transcription (*FRE2*), transporter (*MCH2*, *JEN1*, *ARN1*, *ARN2*), cell cycle (*YHL050C*, *YHL050G*), morphogenesis (*COS8*)에 관련된 유전자 및 기능이 알려지지 않은 다수의 유전자(*YKL222C*, *YKL225W*, *YHL041W*, *YHL042W*, *YHL044W*, *YHL045W* 유전자 외 10종)를 포함하고 있음을 확인하였다. 에탄올 내성을 나타내는 메커니즘은 특정 유전자의 결함이나 발현 증가가 아닌 다양한 유전자의 복합적인 메커니즘에 의한 것이라는 것을 확인 할 수 있었고, 이는 내열성 증가와 더불어 *POL3* 유전자의 결실(*pol3*)에 의한 multiple mutation 유도에 의해 AMY126-HEt 균주에서 에탄올 내성이 증가되었음을 시사한다.

#### Random mutagenesis를 통한 고효율 에탄올 생산 균주 육종

산업적으로 바이오에탄올을 대량 생산하는 공정에서 흔히 발생하는 고농도의 당 및 부산물에 의한 세포성장의 저해는 또 다른 문제점으로 지적되고 있다[2]. 따라서 고농도의 당에 의해 성장이 저해되지 않고 에탄올 생산성을 최대로 할 수 있는 생물시스템을 구축하는 것도 매우 중요하다. 그러므로 내열성 및 에탄올내성이 증가된 AMY126-HEt 균주를 사용하여 에탄올 생산성 증가를 위한 random mutagenesis를 다시 한번 시도하였다. 먼저 AMY126-HEt 균주를 5%와 10% glucose 용액에서 18시간 동안 배양한 뒤 YPDA 고체배지에 spreading하여 2일 동안 배양하였다. 이후 growth가 좋은 colony를 각각 10개씩 선별한 뒤에 YPDA 액체 배지에서 2일간 배양하여 에탄올 생산성을 측정하였다. 그 중 5% glucose 용액에서 획득한 3번 균주가 20 g/l의 glucose로부터 9.6 g/l의 에탄올을 생산함을 알 수 있었고, 10% glucose에서 배양한 균주들의 경우는 에탄올 생산성이 3 g/l 이하로 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다(data not shown). 3번 균주의 경우 에탄올 수율이 0.48 g-ethanol/g-glucose임을 알 수 있었고 이론적 수율과 비교했을 때 glucose의 에탄올 전환 수율(conversion yield)은 94% 였다. 따라서 이 균주를 AMY126-HEt3 균주로 명명하고, 고농도의 glucose 조건에서 탄수화물에 의한 성장 저해를 받지 않고 어느 정도의 에탄올을 생산하는 것이 가능한지 조사해보았다. 먼저 5% glucose가 포함된 YPDA 50ml 액체배지에 AMY126-HEt 균주와 AMY126-HEt3 균주를 접종하고 2일간 배양한 후 에탄올 생산성을 측정해보았다. 그 결과 두 균주 모두 배양 48시간째에 배지 중에 포함되어 있던 대부분의 glucose를 거의 다 소모했음을 확인할 수 있었으며, 에탄

올 생산성 또한 48시간째를 기준으로 비교해 보면, AMY126-HEt 균주와 비교하여 AMY126-HEt3균주는 약 1.6배 증가된 24.7 g/l의 에탄올을 생산하였다. 이 결과는 AMY126-HEt3 균주의 경우, 고농도의 탄소원 첨가에도 불구하고 glucose를 매우 효율적으로 에탄올로 전환시킬 수 있다는 것을 의미하며, 이는 이론적 수율의 95% 수준임을 알 수 있다(Table 2). 따라서 *Δpol3* 균주를 사용한 random mutagenesis를 통해 내열성, 에탄올내성 및 에탄올 생산성이 증가된 새로운 생물시스템의 육종이 가능함을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해서 DNA 복제 시 교정기능이 결여된 균주(proofreading-deficient mutant)를 사용한 random mutagenesis법은 새로운 생물시스템을 효율적으로 개량하기에 유용한 방법이라는 것을 제시하였고, 다양한 산업적 조건 및 목적에 적합한 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*. *KSBB J.* **25**, 533-538.
3. Bara, M. T. F., Lima, A. L. and Ulhoa, C. J. 2003. Purification and characterization of an exo-β-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 81-85.
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. Kawasaki, Y. and Sugino, A. 2001. Yeast replicative DNA polymerases and their role at the replication fork. *Mol. Cells* **12**, 277-285.
7. Kim, Y. H. 2019. Construction of yeast strain suitable for bioethanol production by using fusion method. *J. Life Sci.* **29**, 376-381.
8. Ko, J. K., Bak, J. S., Jung, M. W., Lee, H. J., Choi, I. G. and Kim, T. H. 2009. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresour. Technol.* **100**, 4374-4380.

9. Kuyper, M., Toirkens, M. J., Diderich, J. A., Winkler, A. A., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T. 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **5**, 925-934.
10. Lee, J. S., Hong, S. K., Lee, C. R., Nam, S. W., Jeon, S. J and Kim, Y. H. 2019. Production of ethanol from agarose by unified enzymatic saccharification and fermentation in recombinant yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 625-632.
11. Morrison, A., Bell, J. B., Kunkel, T. A. and Sugino, A. 1991. Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3' exonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 9473-9477.
12. Morrison, A. and Sugino, A. 1994. The 3'→5' exonucleases of both DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 289-296.
13. Murakami, K., Tao, E., Ito, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., Sumiya, T., Nakamura, A. and Nishizawa, M. 2007. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 589-597.
14. Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. and Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew Sust. Energ. Rev.* **14**, 578-597.
15. 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.
16. Park, A. H., Sugiyama, M., Harashima, S. and Kim, Y. H. 2012. Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 184-189.
17. Shevelev, I. V. and Hubscher, U. 2002. The 3'-5' exonucleases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 364-376.
18. 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. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 139-147.
19. Simon, M., Giot, L. and Faye, G. 1991. The 3' to 5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *EMBO J.* **10**, 2165-2170.
20. Widiyanto, D., Yamamoto, E., Sugiyama, M., Mukai, Y., Kaneko, Y., Oshima, Y., Nishizawa, M. and Harashima, S. 2003. Creating a *Saccharomyces cerevisiae* haploid strain having 21 chromosomes. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 89-94.
21. 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.

## 초록 : 출아효모에서 proofreading-deficient DNA polymerase를 이용한 내열성 및 에탄올내성 변이주의 분리

김연희\*

(동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공)

본 연구는 내열성, 에탄올내성 및 에탄올생산성이 향상된 새로운 생물시스템을 육종하기 위해 DNA 복제 시 교정기능이 결여된 변이주(proofreading-deficient mutant)를 이용한 무작위적 돌연변이(random mutagenesis)를 유도하였다. DNA polymerase  $\delta$ 와  $\epsilon$ 의 catalytic subunit를 코드하고 있는 *POL3*와 *POL2* 유전자가 변이된 AMY410 균주(*pol2-4*)와 AMY126 균주(*pol3-01*)를 이용하여 30°C, 38°C, 40°C에서 내열성 변이를 유도하였다. AMY410 균주와 AMY126 균주는 38°C 이상의 온도에서는 거의 자랄 수가 없기 때문에, 배양 온도를 점차 높여가며 변이를 유도한 결과, 40°C에서도 잘 자라는 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주를 선별할 수 있었다. 또한 AMY410-Ht와 AMY126-Ht 균주의 에탄올내성을 추가로 획득하기 위해 6%와 8% 에탄올이 함유된 배지에서 변이를 유도하였고, 8% 에탄올 농도에서 내성을 가지는 AMY410-HEt 균주와 AMY126-HEt 균주를 분리하였다. 특히 AMY126-HEt 균주는 10% 에탄올 농도에서도 내성을 가짐을 확인할 수 있었다. AMY126-HEt 균주의 에탄올생산성의 증가를 위한 변이는 고농도 당(glucose)의 첨가에 의해 유도되었고, 50 g/l의 고농도 glucose를 함유한 배지에서 24.7 g/l의 에탄올(95% 이론적 전환수율)을 생산할 수 있는 고효율 에탄올 생산균주(AMY126-HEt3)를 최종 분리하였다. 따라서, 본 연구를 통해서 교정기능이 결여된 균주(proofreading-deficient mutant)를 사용한 돌연변이법으로 산업적으로 유용한 다양한 형질을 가진 생물시스템의 구축이 가능함을 확인하였다.