



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

유해해양식물 *Spartina* sp.를 이용한
바이오연료 생산



2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 수 산 생 명 과 학 부

생 물 공 학 전 공

조 현 진

공 학 석 사 학 위 논 문

유해해양식물 *Spartina* sp.를 이용한
바이오연료 생산

지도교수 정 귀 택

이 논문을 공학 석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 수 산 생 명 과 학 부

생 물 공 학 전 공

조 현 진

조현진의 공학석사 학위논문을 인준함.

2023년 02월 17일



목차

List of Tables and Figures	iii
Abstract	vi
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1. 실험재료	4
2.2. 효소당화 및 열산가수분해	4
2.2.1. 효소당화	4
2.2.2. 열산가수분해	5
2.3. 바이오 에탄올 발효	6
2.4. CRISPR/Cas9 시스템을 통한 균주 개발	7
2.4.1. 균주 및 배양조건	7
2.4.2. CRISPR/Cas9 시스템을 통한 유전자 과발현 및 삭제	9
2.5. 2,3-Butanediol 발효	12
2.6. 분석 방법	13
3. 결과 및 고찰	14
3.1. 갯끈풀(<i>Spartina</i> sp.) 성분분석	14
3.2. 효소당화 및 열산가수분해 최적화	16
3.2.1. 효소당화 조건 최적화	16
3.2.2. 열산가수분해 조건 최적화	18

3.3. 바이오에탄올 발효	22
3.4. 2,3-Butanediol 발효	29
3.4.1. 균주 개량	29
3.4.2. 갯끈풀(<i>Spartina</i> sp.) 가수분해물을 이용한 2,3-Butanediol 발효	31
4. 결론	38
참고문헌	40



List of Tables and Figures

Table 1. Plasmid and strain used in this study	8
Table 2. gRNA and Donor DNA primers used in this study	10
Table 3. Colony PCR primers	11
Table 4. Composition analysis of <i>Spartina</i> sp.	15
Fig. 1. Effect of enzymatic saccharification using various enzymes and mixture(C : Cellic CTec2, H : Cellic HTec2). Cellic CTec2 and Cellic HTec2 were mixed in 1:1, 2:1, 3:1 and 4:1 ratio.	17
Fig. 2. Effect of acid catalyst and thermal acid hydrolysis time on saccharification (S.A : sulfuric acid, N.A : nitric acid, H.A : hydrochloric acid). 0 h and 72 h indicate after pretreatment and after enzymatic saccharification.	20
Fig. 3. Effects of various pretreatment conditions with <i>Spartina</i> sp. hydrolysates. (A) thermal hydrolysis temperature, (B) concentration of nitric acid, (C) biomass concentration and (D)	

thermal hydrolysis time. 0 h and 72 h indicate after pretreatment and after enzymatic saccharification. 21

Fig. 4. Ethanol production using engineered *S. cerevisiae* SR8 with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media. 24

Fig. 5. Ethanol production using *Candida tropicalis* with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media. .. 26

Fig. 6. Ethanol production using *Kluyveromyces marxianus* with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media. 28

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of colony PCR for edited gene verification. (A) *adh1* gene knock out with 1054bp deletion: Lane 1 control samples, others were experimental group samples. Colony PCR products of edited *adh1* gene were 331bp, and original were 1385bp. (B) Overexpression of the BDH1 with the CCW12 promoter: Lane 1 control sample, others were experimental group samples. The colony PCR products of BDH1 overexpressed with the CCW12 promoter was 834bp, and

the original was 381bp. (Lanes 2 was SR8_Δ*adh1*, Lanes 3 and 4 were SR8 *CCW12p-BDH1:Δadh1* and Lane 5 was SR8 *CCW12p-BDH1*). 30

Fig. 8. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δ*adh1*, (C) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1* and (D) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1:Δadh1* strains with glucose and xylose in YP medium. 33

Fig. 9. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δ*adh1*, (C) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1* and (D) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1:Δadh1* strains with *Spartina* sp. hydrolysis in YP medium. 35

Fig. 10. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δ*adh1*, (C) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1* and (D) *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1:Δadh1* strains with *Spartina* sp. hydrolysis. 37

Production of Biofuel using Hazardous Alien Species *Spartina* sp.

Hyun Jin Cho

School of Marine and Fisheries Life Science (Major in Biotechnology),
The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Growing public awareness of renewable energy, zero carbon and climate change is driving interest in the use of microbial fermentation technologies for biofuels and chemical production. This study was performed the production of ethanol and 2,3-butanediol from *Spartina* sp. as lignocellulosic waste. The invasive alien species *Spartina* sp. spread in Ganghwa-do, Han River estuary, Republic of Korea was used as a biomass resource. Waste *Spartina* sp. has high carbohydrate and fiber contents which can be obtained sugar.

To obtain a high reducing sugar yield from *Spartina* sp.. The enzymatic saccharification and thermal acid pretreatment conditions was optimized. Experiments were carried out with various acid catalyst type, acid concentration, enzyme type, enzyme mixing ratio, reaction time and temperature. Finally, after adding 300 mM nitric acid (HNO₃), 10% of biomass content heat treatment at 120°C for 60 minutes was selected as the optimal thermal acid hydrolysis condition. When enzymatic

saccharification was conducted for 72 hours with Cellic CTec2 single enzyme after thermal acid hydrolysis, a maximum yield of 90.66% of enzymatic saccharification was obtained.

Ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* SR8, *Candida tropicalis* and *Kluyveromyces marxianus* was performed on the *Spartina* sp. hydrolysis. Among them, *S. cerevisiae* SR8 produced 16g/L ethanol with $Y_{EtOH}=0.39$ at 72 h.

To increase the production of 2,3-butanediol (2,3-BDO), the ethanol production gene *adh1* and the 2,3-butanediol production gene *BDH1* involved in the 2,3-butanediol pathway of *S. cerevisiae* SR8 were engineered. Then, ethanol production and 2,3-BDO production were compared through fermentation in the *Spartina* sp. hydrolysis using the recombinant strain.

1. 서론

재생 에너지, 탄소제로 및 기후 변화에 대한 대중의 인식이 높아짐에 따라 바이오 연료 및 화학 물질 생산을 위한 미생물 발효 기술의 사용에 대한 관심이 높아지고 있다. 미생물로부터 바이오 에탄올과 2,3-butanediol (2,3-BDO)을 생산하는 것이 그 중 하나이다[5].

바이오 연료 중 하나인 바이오 에탄올은 신재생 에너지 중 하나로, 화석 연료와 혼합하거나 대체하여 사용할 수 있어 기존의 석유 에너지를 대체할 수 있다[1, 26]. 또한 화학 산업에서 에탄올은 ethylene, propylene부터 hydrogen, butanol을 포함하여 다양한 화학 물질을 합성하는데 이용할 수 있는 building block으로서 기대 받고 있다[2].

2,3-BDO는 이중알코올 물질로, 산업체에 주요 전구체로 널리 사용되고 있는 물질이다[21]. 예로 수화를 통하여 합성고무의 원료인 1,3-부탄디엔(1,3-butadiene)을 만들거나, 탈수소반응을 통하여 식품 산업에서 향기 성분으로 사용되는 아세토인(acetoin)과 다이아세틸(diacetyl)을 만드는데 2,3-BDO가 사용된다[6]. 또한 -60°C 의 낮은 빙점으로 부동액으로 활용할 수 있다[5].

2,3-BDO는 2,3-butene oxide의 가수분해를 통하여 화학적으로 합성할 수 있다[23]. 하지만 이러한 방법은 가혹한 조건($160\text{--}220^{\circ}\text{C}$, 50 bar)에서 진행되어 butadiene, methylethylketone(MEK), butene과 같은 부산물을 생성해 2,3-BDO를 정제하는데 추가 비용을 발생시킨다[18, 22]. 따라서 산업에서는 주로 미생물 발효를 이용한 생물학적 방법을 통하여 2,3-BDO를 생산하고 있으며 이는 플랫폼 화학물질 생산을 위한 석유 공급 의존도를 완화할 수 있다[5, 23].

산업체에서 2,3-BDO 생산하기 위해 사용하는 미생물에는 *Klebsiella*

pneumoniae, *K. oxytoca* 등이 있다. 이들은 고수율, 고생산성으로 2,3-BDO를 생산할 수 있으나 생물안전등급 2등급으로 분류되어 산업적 공정에 적용 시 많은 제약 및 규제를 받는다는 단점을 지니고 있다[7]. 이에 대한 대안으로 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 2,3-BDO 생산에 대한 연구가 진행되고 있으며, 효모는 GRAS(Generally Recognized As Safe) 균주로 안전하며 유전적 정보가 잘 알려져 있다. 하지만 효모는 2,3-BDO 생산량이 낮아 대사공학적으로 재설계가 필요하다[7,17].

본 연구는 *S. cerevisiae*에서 높은 2,3-BDO 생산량을 얻기 위한 방법 중 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems9) 기법을 이용한 유전자 재조합을 시도하였다.

Cas9 유전자 가위 기술은 처음 바이러스의 침입에 대항하기 위한 박테리아의 적응면역메커니즘으로 소개되었다[18]. CRISPR/Cas9 시스템은 DNA에 돌연변이를 도입하는 두 가지 주요 분자로 구성되는데 Cas9는 게놈의 특정 위치에서 DNA의 두 가닥을 절단하여 DNA 조각을 추가하거나 제거할 수 있는 한 쌍의 분자 가위 역할을 한다. Guide RNA(gRNA)는 더 긴 RNA scaffold 내에 위치한 미리 디자인된 RNA 서열의 작은 조각(20bp)으로 구성된다. Scaffold 부분은 DNA에 결합하고 미리 설계된 gRNA서열은 Cas9를 게놈의 올바른 부분으로 안내하여 Cas9 효소가 게놈의 올바른 지점에서 절단할 수 있게 한다[19].

유전자를 편집하기 위한 CRISPR/Cas9 시스템의 적용은 표적 돌연변이를 목적으로 *S. cerevisiae*에 도입되었으며[20], 이를 이용하여 xylose 섭취가 가능하게 개량된 *S. cerevisiae*의 2,3-butanediol 생산유전자인 BDH1의 promoter를 strong promoter로 알려진 CCW12 promoter로 교체하였다[15]. 그 후 2,3-BDO의 경쟁 대사산물인 에탄올생산 유전자 중 *adh1* 유전자를

삭제하여 2,3-BDO 생산을 늘리고자 하였다.

본 연구에서 바이오매스로 사용한 갯끈풀(*Spartina* sp.)은 강화도 갯벌에서 발견된 침입 외래종으로 갯벌을 사막화시켜 토종 염생 식물의 서식지를 파괴하는 등 전 세계적으로 환경문제를 일으키는 잡초이다[7, 8]. 이 때문에 해양수산부 및 해양환경공단에서는 「해양생태계의 보전 및 관리에 관한 법률」 제24조(유해해양생물관리)에 근거하여 갯끈풀 관리 및 제거 사업을 하고 있다.

악성외래종으로 분류되는 갯끈풀(*Spartina* sp.)에는 셀룰로스와 헤미셀룰로스가 풍부한 것으로 보고된 바 있어[9], 본 연구에서는 이를 리그노셀룰로오스 바이오매스로 이용하여 열산가수분해 및 효소당화를 수행하였다. 그 후 헤미셀룰로스의 주요 구성 단당인 xylose를 대사 할 수 있는 재조합 효모 *S. cerevisiae* SR8와 야생형(wild type) 효모 *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*를 이용하여 갯끈풀 가수분해물에서 에탄올 발효를 진행하였다.

2,3-BDO 생산량을 증가시키기 위해 CRISPR/CAS9 시스템으로 균주를 개발을 수행하였으며 이 후 갯끈풀 가수분해물을 대상으로 개발한 균주를 이용하여 2,3-BDO 발효를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서는 2,3-butanediol 발효를 위한 바이오매스로 해양환경공단 허가 하에 인천 강화군에서 수집한 갯끈풀(*Spartina* sp.)를 사용하였다. 수거한 갯끈풀은 갯벌을 포함한 오염물질 제거를 위해 3회 세척하였으며, 자연 건조 및 분쇄 후 입자 크기가 0.71 - 1.4 mm인 시료만을 분리하여 사용하였다. 갯끈풀의 구성성분은 충남대학교 농업과학연구소에 의뢰하여 분석하였다.

2.2. 효소당화 및 열산가수분해

2.2.1. 효소당화

황산(H_2SO_4) 200 mM에 시료 5%(w/v)를 30분간 침지 시킨 후 열처리 시간 60분, 열 반응온도 130°C에서 열산가수분해를 진행한 후 10 N NaOH를 이용하여 pH 5.0으로 중화하였다. 효소는 Cellic CTec2(Novozymes, Denmark), Cellic HTec2(Novozymes, Denmark)를 사용하였다. 단일효소와 두 효소를 각각 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 비율로 혼합하여 시료 무게의 20%를 첨가한 후 진탕배양기에서 50°C, 150 rpm으로 72시간 동안 반응시켰다. 효소당화 한 시료를 24시간 마다 채취하여 생성된 환원당의 양을 측정하였으며 효소당화 효율(E_S , %)은 식(1)에 나타내었다[2].

$$E_S(\%) = \Delta S_{RS}/TC \times 100 \quad \text{식(1)}$$

여기서 ΔS_{RS} 는 효소당화 시 생성되는 환원당의 농도(g/L)이며, TC 는 갯끈풀(*Spartina* sp.)의 총 탄수화물(total carbohydrate)의 함량(g/L)이다[5].

2.2.2. 열산가수분해

효소 종류 및 효소당화 시간을 최적화한 후 갯끈풀의 열산가수분해 조건을 산 종류, 반응온도, 산농도, 바이오매스 농도, 반응시간별로 최적화하였다. Working volume 40 mL 기준 갯끈풀 시료 5%(w/v)에 200 mM의 황산(H_2SO_4), 질산(HNO_3) 또는 염산(HCl)을 첨가한 다음 130℃에서 30 - 90분 동안 열처리하여 산 종류 및 열처리 시간에 따른 전처리효율을 비교하였다. 그 후 열처리 온도(100-150℃), 산농도(100-500 mM), 갯끈풀 시료 농도(2.5-12.5%(w/v)), 열처리 시간(0-120 min)을 변수로 하였으며, 모든 실험과정은 열산가수분해 후 최적화한 효소당화를 실행하였다.

2.3. 바이오 에탄올 발효

갯끈풀을 열산 가수분해 및 효소당화하여 얻은 가수분해 산물을 이용하여 에탄올 발효를 진행하였다. Xylose 소비가 가능하다고 알려진 *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*와 xylose 대사가 가능하게 재조합된 *S. cerevisiae* SR8을 접종용 효모로 사용하였다[24, 25]. 세 효모 모두 working volume 50 mL의 YPD broth(yeast extract 10.0 g/L, peptone 20.0 g/L, dextrose 20.0 g/L)에서 24시간 동안 배양되었다[2].

배양된 효모는 원심분리기를 이용하여 배지를 제거한 후 250 mL flask 안에 100 mL working volume의 발효배지에 최종 효모 농도가 O.D 600 nm에서 0.8이 되도록 접종하였다[2]. 발효배지로 갯끈풀 가수분해 산물을 비롯하여 가수분해물의 당 함량을 고려한 glucose, xylose, glucose와 xylose 혼합 배지가 사용되었다. 각각의 배지에 2.5 g/L NH_4Cl , 5.0 g/L K_2HPO_4 , 0.25 g/L MgSO_4 , and 5.0 g/L yeast extract가 추가로 공급되었으며 갯끈풀 가수분해물만을 이용한 발효도 함께 진행되었다. 접종 후 shaking incubator에서 30°C, 150 rpm으로 120시간 동안 배양하였으며 일정 시간마다 시료를 분석하였다[2].

시료는 17000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 분석하였으며 에탄올 수율 계수 (Ethanol Yield Coefficient, Y_{EtOH} , g/g)는 식(2)로 나타내었다[26].

$$Y_{\text{EtOH}} \text{ (g/g)} = [\text{EtOH}]_{\text{max}} / [\text{Sugar}]_{\text{ini}} \quad \text{식(2)}$$

여기서 $[\text{EtOH}]_{\text{max}}$ 는 에탄올 발효를 통해 생성되는 최대 에탄올 농도 (g/L)이며, $[\text{Sugar}]_{\text{ini}}$ 는 에탄올 발효 초기 단당 환원당 (g/L)이다[2].

2.4. CRISPR/Cas9 시스템을 통한 균주 개발

2.4.1. 균주 및 배양조건

균주를 개발하기 위해 경북대학교 Yeast Metabolic Engineering 연구실로부터 얻은 xylose 섭취가 가능하게 개량된 *S. cerevisiae* SR8을 사용하였다[11, 14]. 본 연구에서 사용 및 구축된 모든 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 균주의 배양은 YPD broth를 이용하여 수행되었다. 선택마커로 항생제(300 µg/mL hygromycin B 및 100 µg/mL nourseothricin)를 사용하였으며, 이를 함유한 고체배지에서 선별 및 배양되었다. Seed-culture는 호기성 조건하에 30°C에서 24시간 동안 150 rpm에서 교반을 통해 배양하였다.

Table 1. Plasmid and strain used in this study

Plasmid or Strain	Description	Resources
Plasmid		
pRS41N-Cas9	A single-copy plasmid containing Cas9 and a natMX marker	[12]
pRS42H	A multi-copy plasmid containing a Hygromycin B marker	[12]
Strain		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	FΦ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺)phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SR8	<i>S. cerevisiae</i> D452-2 expressing the xylose oxidoreductase pathway derived from <i>Pichia stipitis</i> (XYL1, XYL2, and XYL3), Δald6, adaptive laboratory evolution on xylose	[11]
SR8 <i>pRS41N-Cas9</i>	SR8 with Cas9 protein expressing plasmid	[13]
SR8 <i>CCW12p-BDH1</i>	SR8 strain with insertion of <i>CCW12</i> promoter insertion in front of <i>BDH1</i> gene	This study
SR8_Δ <i>adh1</i>	SR8 strain with deletion of <i>adh1</i> gene	This study
SR8 <i>CCW12p-BDH1:Δadh1</i>	SR8 <i>CCW12p-BDH1</i> strain with deletion of <i>adh1</i> gene	This study

2.4.2. CRISPR/Cas9 시스템을 통한 유전자 과발현 및 삭제

2,3-BDO 생산량을 증가시키기 위해 CRISPR/Cas9 기법으로 유전자 과발현 및 삭제하였다. 먼저 2,3-BDO 생산에 관여하는 BDH1 유전자의 promoter를 strong promoter로 알려진 CCW12 promoter로 교체하고 에탄올 생산에 관여하는 유전자인 adh1을 삭제하였다[15].

유전자 조작은 다음과 같이 수정된 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하였다. BDH1의 promoter와 adh1서열 중 20bp를 Guide RNA (gRNA)로 디자인하였다. 20bp sequence는 5'기준 NGG protospacer-associated motif(PAM) sequence 중 각 유전자와 결합할 수 있는 binding sequence에 위치한 것으로 구성하였다[1,3]. 제작된 gRNA는 PCR로 증폭하여 *E. coli* DH5α에 transformation하여 pRS41N-Cas9에 transfection 하였다[1].

Donor DNA는 각 유전자의 specific sequence 부분을 덮을 수 있도록 제작되었으며 gene binding sequence에 위치하며 약 50bp의 2중 DNA로 구성되어있다. Donor DNA 합성을 위해 디자인된 primer와 gRNA는 Table 2에 나타내었다[3].

Transfection된 균주는 nourseothricin 100 $\mu\text{g/mL}$ 및 hygromycin B 300 $\mu\text{g/mL}$ 가 포함된 YPD 고체 배지에서 선별되었다. Transformation 여부를 확인하기 위해 디자인된 primer와 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix(TaKaRa, Japan) 이용하여 colony PCR을 수행하였으며 사용된 primer는 Table 3에 나타내었다[3, 4].

Table 2. gRNA and Donor DNA primers used in this study

Name	Sequence (5' → 3')
pRS42H BDH1.1_F	ATTCTTTCCTCCTTACG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
pRS42H BDH1.1_R	CGTAAGGAGGAAAGAATAG GATCATTTATCTTTCACTGCG
pRS42H adh1.1_F	CTTGATGGCCGGTCACT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
pRS42H adh1.1_R	AGTGACCGGCCATCAAGTT GATCATTTATCTTTCACTGCG
Donor BDH1.1_F	CCTTTTCGTTTTCGACGGAGAGAAGAAACCG CCACCCATGAACCACACGGT
Donor BDH1.1_R	ACCCTTCTTGAAATATGCCAAAGCTCTCAT TATTGATATAGTGTTTAAGC
Donor adh1.1_F	CAATATTTCAAGCTATACCAAGCATACAAT CAACTATCTCGCGAATTTCT
Donor adh1.1_R	CTTATTTAATAATAAAAATCATAAATCATA AGAAATTCGCGAGATAGTTG

Table 3. Colony PCR primers used in this work

Name	Sequence (5' → 3')
colony_BDH1.1_F	GCCGGATTTGCTCACGCTAC
colony_BDH1.1_R	GTCGGTTTGGATTTCTGGCCT
colony_adh1.1_F	ACGGCCTTCCTTCCAGTTAC
colony_adh1.1_R	CCTGAGAAAGCAACCTGACCTA

2.5. 2,3-Butanediol 발효

갯끈풀을 열산 가수분해 및 효소당화하여 얻은 가수분해 산물을 이용하여 2,3-butanediol 발효를 진행하였다. Xylose 섭취가능하게 재조합된 균주 *S. cerevisiae* SR8과 추가로 CRISPR/Cas9 기법으로 개량한 균주들을 접종용 효모로 사용하였다. 균주 모두 working volume 50 mL의 YPD broth(yeast extract 10.0 g/L, peptone 20.0 g/L, dextrose 20.0 g/L)에서 24시간 동안 배양되었다.

배양된 효모는 원심분리기를 이용하여 배지를 제거한 후 200 mL flask 안에 50 mL working volume의 발효배지에 최종 효모 농도가 O.D 600nm 에서 0.8이 되도록 접종하였다. 발효배지로 갯끈풀 가수분해 산물을 포함하는 YP배지가 사용되었으며 대조군으로 glucose와 xylose 혼합된 YP배지가 사용되었으며 추가로 갯끈풀 가수분해물만을 이용한 발효도 함께 진행되었다. 접종 후 shaking incubator에서 30℃, 150 rpm으로 120시간 동안 배양하였으며 일정 시간마다 시료를 분석하였다[16].

2.6. 분석방법

갯끈풀 열산가수분해 및 효소당화로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 spectrophotometer (V-1100, EMCLAB Inc., Germany)를 이용하여 580 nm에서 측정하였으며, glucose (Sigma-Aldrich, USA)를 표준물질로 사용하였다. 세포 농도 또한 spectrophotometer를 사용하였으며 600 nm에서 측정하였다[1].

가수분해물 및 발효로 생성된 glucose, xylose, ethanol 및 2,3-BDO 농도는 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent. Inc., USA)와 RID (refractive index detector), Aminex HPX-87H column (Biorad, USA)를 이용하여 분석하였다[1].

당화 결과의 통계적처리는 SPSS software package(ver. 23.0; SPSS Inc., USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다[2].

3. 결과 및 고찰

3.1. 갯끈풀(*Spartina* sp.) 성분 분석

Lignocellulosic biomass인 갯끈풀(*Spartina* sp.)의 구성성분을 분석한 결과 섬유 33.16%, 단백질 7.52%, 지방 0.98%, ash 9.84%, 탄수화물 48.5%가 함유되어 있었다[Table 4]. 이 결과 갯끈풀에서 활용할 수 있는 총 탄수화물 함량은 81.66%로 바이오매스로 적합하다고 판단하였다.



Table 4. Composition analysis of *Spartina* sp.

Species	Composition (%)				
	Fiber	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate
<i>Spartina</i> sp.	33.16	7.52	0.98	9.84	48.5

3.2. 효소당화 및 열산가수분해 최적화

3.2.1. 효소당화 조건 최적화

Fig. 1에서는 효소당화 진행 중 24시간 마다 시료를 취해 분석한 환원당 농도에 대한 결과를 나타내고 있다. 효소의 종류 및 혼합비율과 상관없이 72시간 동안 효소당화를 진행하였을 때 가장 많은 환원당이 검출되었다.

효소당화 수율을 계산한 결과 Cellic CTec2와 Cellic HTec2를 3:1로 혼합한 효소를 사용하였을 때 환원당 34.4 g/L, 효소당화 수율 84.09%로 가장 높았으나 SPSS 분석 결과 Cellic CTec2 단일효소와 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 혼합 효소 별 수율에서 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 72시간에서 환원당 34.1 g/L, 수율 83.53%를 생성한 단일 효소인 Cellic CTec2를 최적효소로 선정하고 이후 실험에서 모든 열산가수분해 실험 후 Cellic CTec2로 72시간 동안 효소당화를 진행하였다.

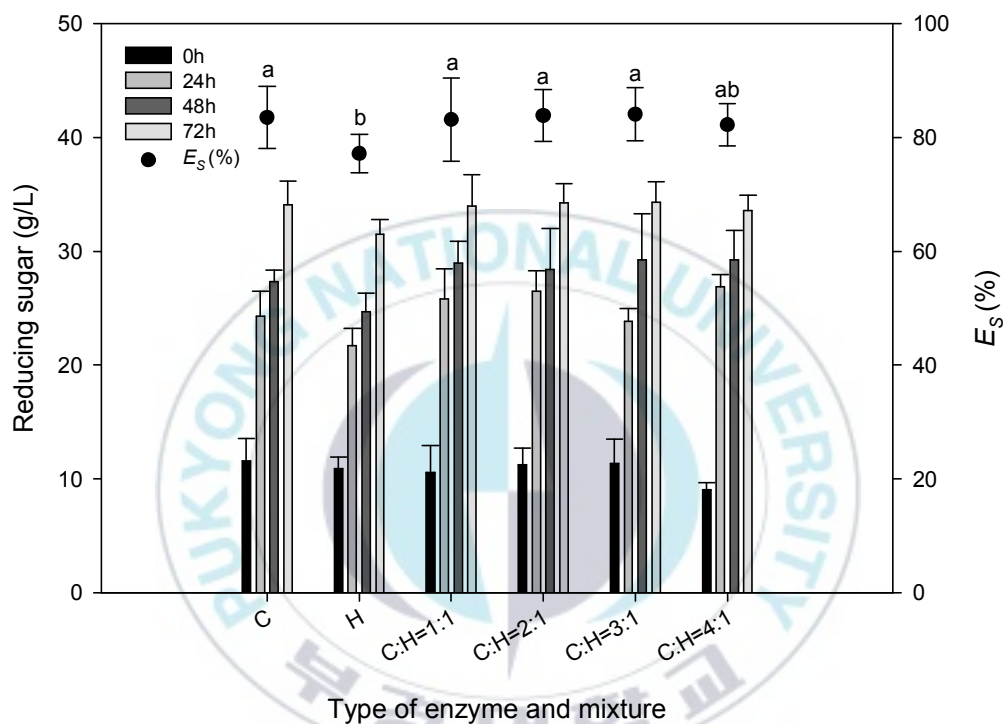


Fig. 1. Effect of enzymatic saccharification using various enzymes and mixture(C : Cellic CTec2, H : Cellic HTec2). Cellic CTec2 and Cellic HTec2 were mixed in 1:1, 2:1, 3:1 and 4:1 ratio.

3.2.2. 열산가수분해 조건 최적화

최적효소 및 효소당화를 선정한 후 열산가수분해 최적조건을 조사하였다. 먼저 5%(w/v)의 갯끈풀 시료에 200 mM 산 촉매 황산(H_2SO_4), 질산(HNO_3), 염산(HCl)을 각각 40 mL 첨가 후 130°C에서 열처리 시간을 30, 60, 120분으로 달리하여 가수분해 효율을 비교하였다(Fig. 2). 열산가수분해 후 최적화한 효소당화를 진행하여 최종 환원당 농도 및 효소당화 수율을 비교하였다. 열처리 후 효소당화를 진행하였을 때 황산은 120분, 질산과 염산은 60분에서 각각 30.65 g/L, 34.72 g/L, 33.06 g/L로 가장 높은 환원당 농도를 얻었으며 각각의 효소당화 수율은 75.06%, 85.05%, 80.96% 였다. 따라서 가장 많은 환원당을 생산한 질산(HNO_3)을 최적 산 촉매로 선정하였으며 60분 동안 열처리하는 조건을 최적 조건으로 선정하여 다음 실험을 진행하였다.

Fig. 3은 다음과 같은 실험조건을 달리하여 열산가수분해를 진행하였다. (A)는 반응 온도 100-150°C, (B)는 질산 농도 100-500 mM, (C)는 갯끈풀 (*Spartina* sp.) 시료 농도 2.5-12.5%, (D)는 열처리 시간 0-120분으로 세분화하였으며 각 실험은 단계적으로 최적조건을 선정 후 진행하였다.

반응온도를 달리하여 열산가수분해 후 효소당화를 진행하였을 때 온도가 140°C까지 증가할수록 열산가수분해를 통한 당이 증가하는 양상을 보였다. 하지만 72시간 동안 효소당화를 한 후에는 SPSS 검사 결과 120-150°C의 조건에서 유의미한 차이가 나타나지 않아 수율 83.65%, 34.15 g/L의 환원당을 생성한 120°C를 최적 반응 온도로 선정하였다(Fig. 3 (A)).

Working volume 40 mL 기준 갯끈풀 시료 5%를 100-500 mM로 질산(HNO_3)농도를 달리하여 열산가수분해 및 효소당화를 진행하였다. 산 농도가 높아지면서 열산가수분해를 통한 당, 효소당화 후 당 농도 모두 증가하

였으나 300 mM 이상의 농도에서는 당화 수율의 유의미한 차이가 없어 효소당화 수율 77.48%을 얻을 수 있고 상대적으로 낮은 농도인 300 mM을 최적 산 농도로 선정하였다 (Fig. 3 (B)).

2.5-12.5%의 갯끈풀 시료 농도별 열산가수분해 및 효소당화를 한 결과 시료의 함량이 높아질수록 가수분해를 통한 당, 효소당화를 통한 당 농도 모두 증가하는 경향을 보였다. 그러나 효소당화 수율로 비교하였을 때 시료 10% 조건에서 90.66%로 가장 높았으며 시료를 12.5%를 사용하였을 때 86.84%로 감소하였다. 그러므로 가장 높은 수율을 얻은 갯끈풀 시료 10% 조건을 최적조건으로 선정하였다 (Fig. 3 (C)).

마지막으로 갯끈풀 시료 10%에 300 mM 질산(HNO_3) 40 mL을 첨가한 후 120℃에서 열처리 시간을 0-120분으로 열처리 시간을 세분화하여 가수분해를 진행하였다. 열처리 시간을 늘릴수록 환원당 농도가 증가하여 60분에서 가장 높은 당 농도 74.03 g/L로 90.66%의 수율을 얻을 수 있었다. 60분 이상 열처리를 하였을 때 농도 및 수율이 감소하는 경향을 보였다. 최종적으로 갯끈풀 시료 10%에 300 mM 질산(HNO_3)을 첨가한 후 120℃에서 60분 동안 열처리하는 것을 최적 열산가수분해 조건으로 선정하였다.

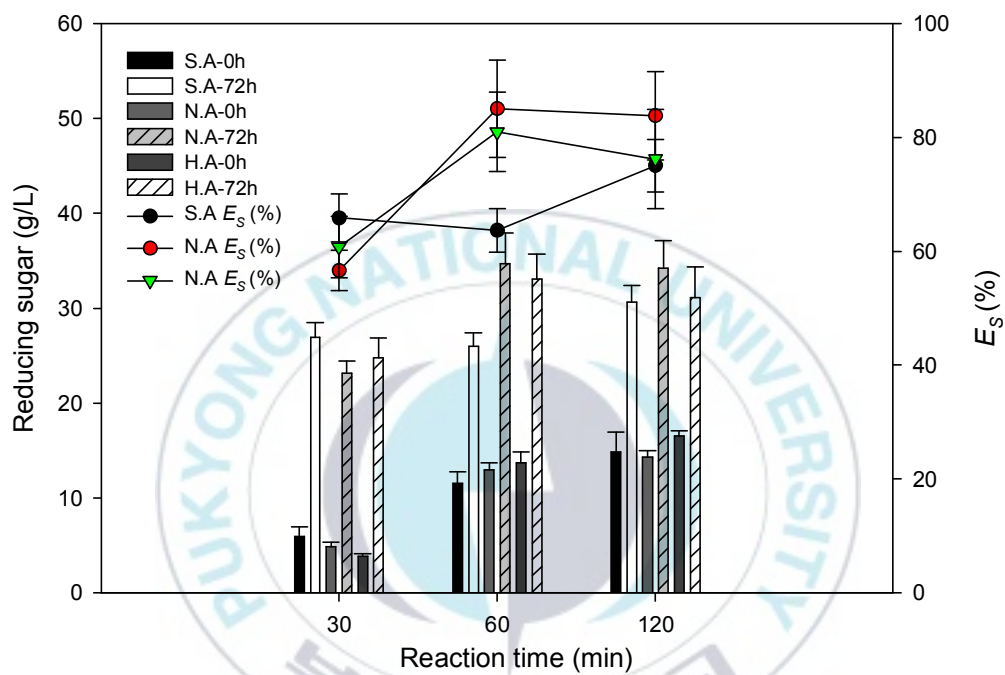


Fig. 2. Effect of acid catalyst and thermal acid hydrolysis time on saccharification (S.A : sulfuric acid, N.A : nitric acid, H.A : hydrochloric acid). 0 h and 72 h indicate after pretreatment and after enzymatic saccharification.

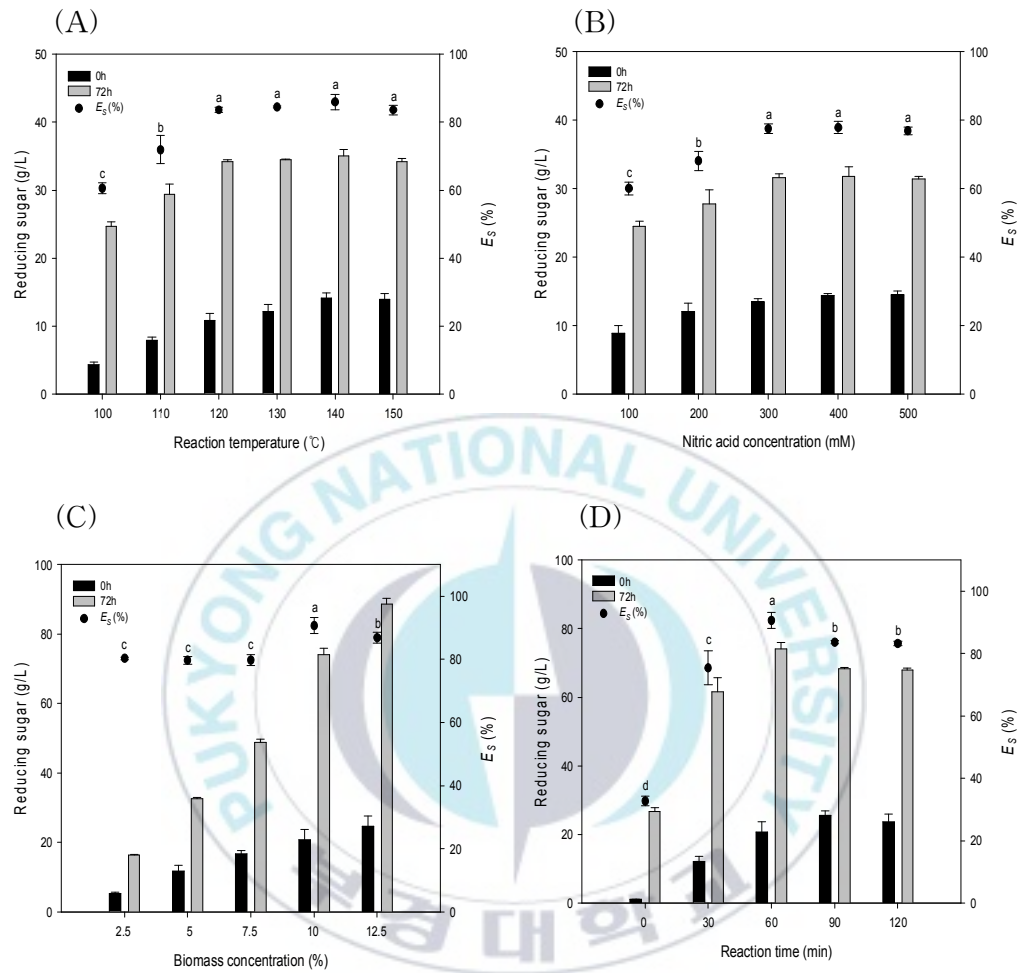


Fig. 3. Effects of various pretreatment conditions with *Spartina* sp. hydrolysates. (A) thermal hydrolysis temperature, (B) concentration of nitric acid, (C) biomass concentration and (D) thermal hydrolysis time. 0 h and 72 h indicate after pretreatment and after enzymatic saccharification.

3.3. 바이오에탄올 발효

에탄올 발효는 10%의 (w/v) 갯끈풀 (*Spartina* sp.) 가수분해 산물로부터 *S. cerevisiae* SR8, *C. tropicalis*, *K. marxianus*를 이용하여 진행되었으며 세포 농도, 당 소비와 에탄올 수율계수를 비교 분석하였다.

Fig. 4는 *S. cerevisiae* SR8 균주를 이용하여 추가 영양분이 포함된 (A) glucose 배지, (B) xylose 배지, (C) glucose와 xylose의 혼합배지, (D) 갯끈풀 가수분해물 배지, (E) 추가 영양분이 포함되지 않은 갯끈풀 가수분해물 배지에서 120시간 동안 에탄올 발효를 진행한 결과를 나타내었다.

갯끈풀 가수분해물의 glucose와 xylose의 총 당량은 44.5 g/L이며 이중 glucose가 25.9 g/L, xylose가 18.6 g/L이다. *S. cerevisiae* SR8은 glucose 배지(Fig. 4 (A))에서 48시간 만에 당을 모두 소비하였으며 48시간에서 최대 에탄올 19.9 g/L를 생산하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.48을 나타내었다. Xylose 배지(Fig. 4 (B))에서는 120시간 동안 당을 35.66 g/L 소비하였으며 96시간에서 최대 12.4 g/L의 에탄올을 생산하여 최종 에탄올 수율계수(Y_{EtOH})는 0.28을 나타내었다. 갯끈풀 가수분해물의 glucose와 xylose 함량을 기준으로 제조한 glucose 및 xylose 혼합배지(Fig. 4 (C))에서 glucose는 48시간 만에 전부 소모되었으나 xylose는 120시간 동안 14.24 g/L 소비되어 3.5 g/L의 xylose가 잔존하였다. 이때 72시간에서 최대 16 g/L의 에탄올을 생산하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.39를 나타내었다. 추가 영양분이 포함되어있는 갯끈풀 가수분해물 배지(Fig. 4 (D))에서 *S. cerevisiae* SR8은 24시간에 glucose를 전부 소비하였으나 xylose는 48시간 동안 4.8 g/L 정도 소비 후 더 이상 소비되지 않았다. 48시간에서 최대 15.0 g/L의 에탄올을 생산하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.36을 나타내었다. 추가 영양분이 포함되지 않은 갯끈풀 가

수분해물 배지(Fig. 4 (E))에서는 48시간에 가수분해물의 당을 모두 소진하였으나 xylose는 6.2 g/L 만을 소비하였다. 에탄올 생산량은 96시간에서 15.7 g/L를 생성하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.35를 나타내었다.



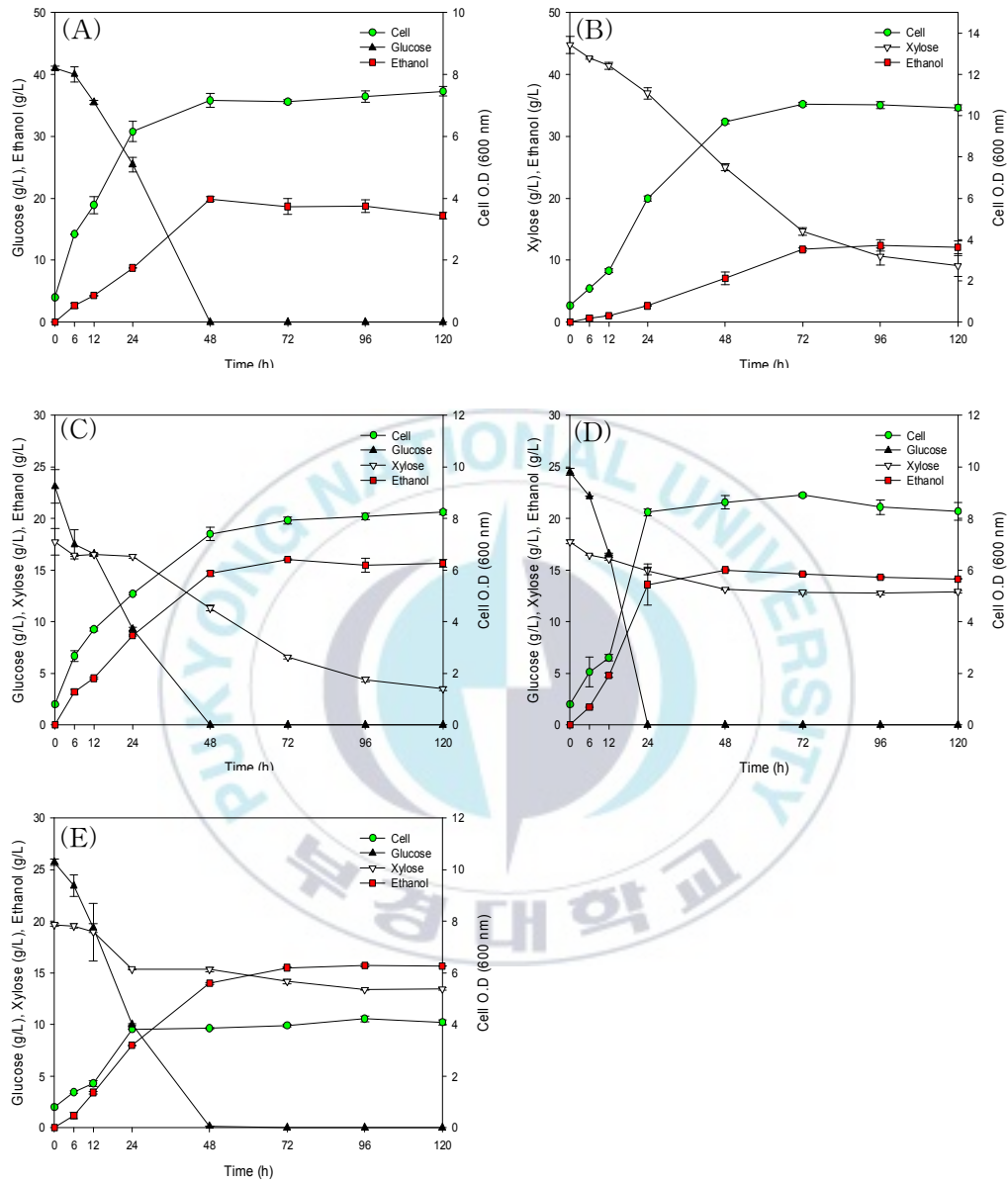


Fig. 4. Ethanol production using engineered *S. cerevisiae* SR8 with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media.

재조합 균주인 *S. cerevisiae* SR8과 xylose 섭취 및 에탄올 생산이 가능하다고 알려진 야생형 균주(wild type) *C. tropicalis*, *K. marxianus*를 이용하여 갯끈풀 가수분해물에서의 에탄올 생산량을 비교하였다[26, 27].

Fig. 5는 *C. tropicalis* 균주를 이용하여 영양분이 포함된 (A) glucose 배지, (B) xylose 배지, (C) glucose와 xylose 혼합배지, (D) 갯끈풀 가수분해물 배지, (E) 추가 영양분 없는 갯끈풀 가수분해물 배지에서 120시간 동안 에탄올 발효를 진행한 결과를 나타내었다.

*C. tropicalis*는 glucose 배지(Fig. 5 (A))에서 72시간에 모든 당을 소비하였으나 에탄올 생산량은 48시간에서 2.3 g/L를 생성하여 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.06을 나타내었다. Xylose 배지(Fig. 5 (B))에서는 14.7 g/L의 당을 소비하였으며 에탄올 생산을 거의하지 않은 것을 확인 할 수 있었다. Glucose와 xylose 혼합배지(Fig. 5 (C))에서 *C. tropicalis*는 48시간 동안 모든 glucose를 소비하였으나 xylose는 120시간 동안 4.86 g/L 소비하였다. 24시간에서 최대 1.7 g/L의 에탄올 생산량을 보였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.04를 나타내었다. 영양분이 포함되어있는 갯끈풀 가수분해물 배지(Fig. 5 (D))에서는 48시간에 모든 glucose를 소비하였으며 xylose는 120시간 동안 2.9 g/L로 거의 소비하지 않는 것을 볼 수 있었다. 영양분이 포함되어 있지 않은 갯끈풀 가수분해물 배지(Fig. 5 (E))에서 *C. tropicalis*는 glucose 및 xylose 섭취 모두 거의 하지 않아 세포 성장 및 에탄올 생산량이 없었다.

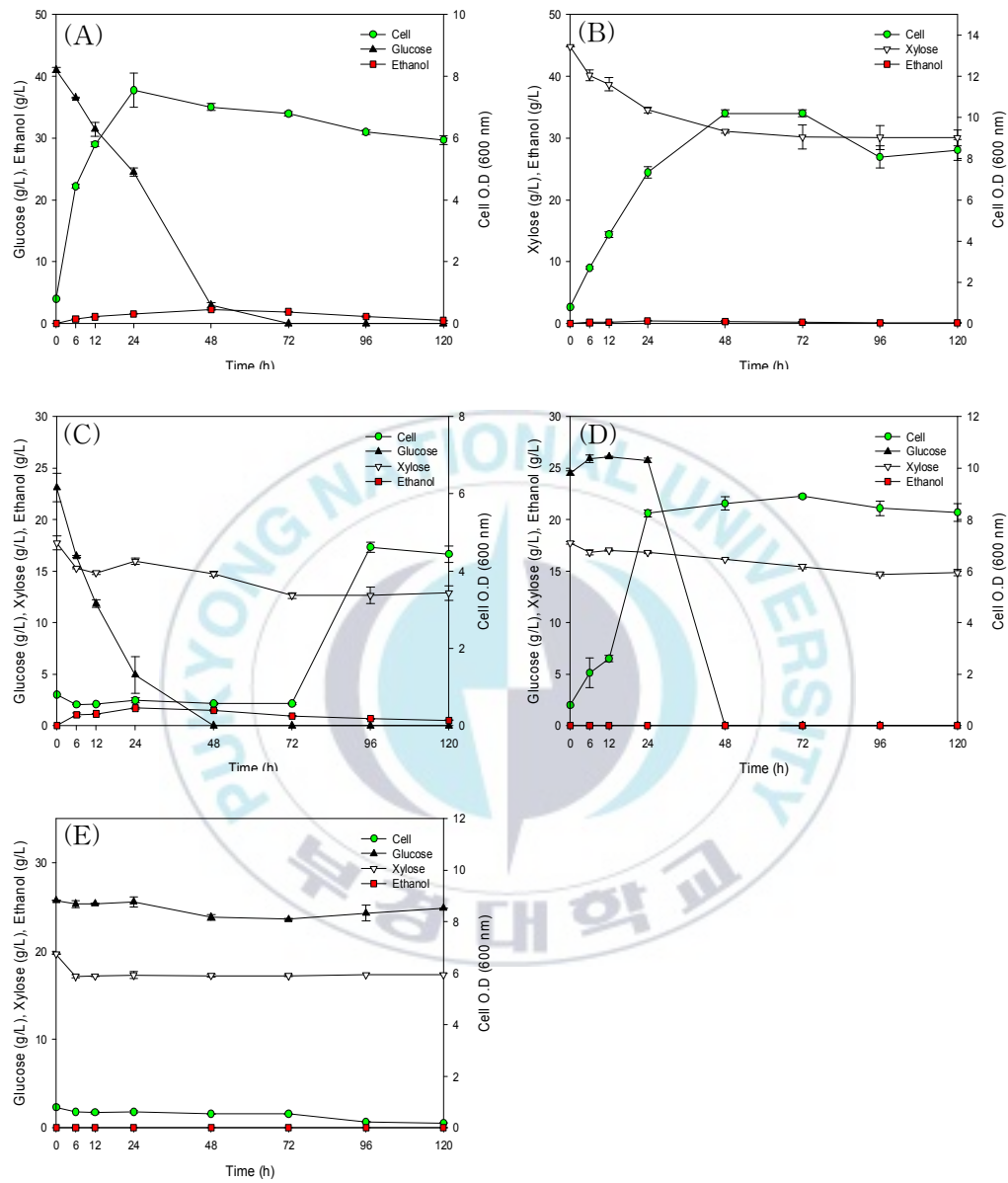


Fig. 5. Ethanol production using *Candida tropicalis* with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media.

Fig. 6는 *K. marxianus* 균주를 이용하여 영양분이 포함된 (A) glucose 배지, (B) xylose 배지, (C) glucose와 xylose 혼합배지, (D) 갯끈풀 가수분해물 배지, (E) 추가 영양분이 포함되지 않은 갯끈풀 가수분해물 배지에서 120시간 동안 에탄올 발효를 진행한 결과를 나타내었다.

Fig. 6 (A)에서 *K. marxianus*는 glucose 배지에서 24시간에 모든 당을 소비하였으며 에탄올 생산량은 24시간에서 최대 18.7 g/L를 생성하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.45를 나타내었다. Xylose 배지(Fig. 6 (B))에서는 31.1 g/L의 당을 소비하였으나 에탄올 생산은 거의하지 않는 것을 확인 할 수 있었다. Glucose와 xylose 혼합배지(Fig. 6 (C))에서 *K. marxianus*는 12시간 만에 모든 glucose를 소비하였으나 xylose는 120시간 동안 10 g/L 소비하였다. 12시간에서 최대 12.6 g/L의 에탄올 생산량을 보였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.3을 나타내었다. 영양분이 포함되어 있는 갯끈풀 가수분해물 배지(Fig. 6 (D))에서는 24시간에 모든 glucose를 소비하였으며 xylose는 3.5 g/L로 거의 소비하지 않는 것을 볼 수 있었다. 에탄올 생산량은 24시간에서 최대 13.6 g/L를 생성하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.31을 나타내었다. 영양분이 포함되어 있지 않은 갯끈풀 가수분해물 배지(Fig. 6 (E))에서 *K. marxianus*는 120시간에 glucose를 전부 소비하였으며 xylose는 3.4 g/L로 거의 소비하지 않는 경향을 보였다. 에탄올 생산량은 120시간에서 최대 10.1 g/L를 생성하였으며 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.2를 나타내었다.

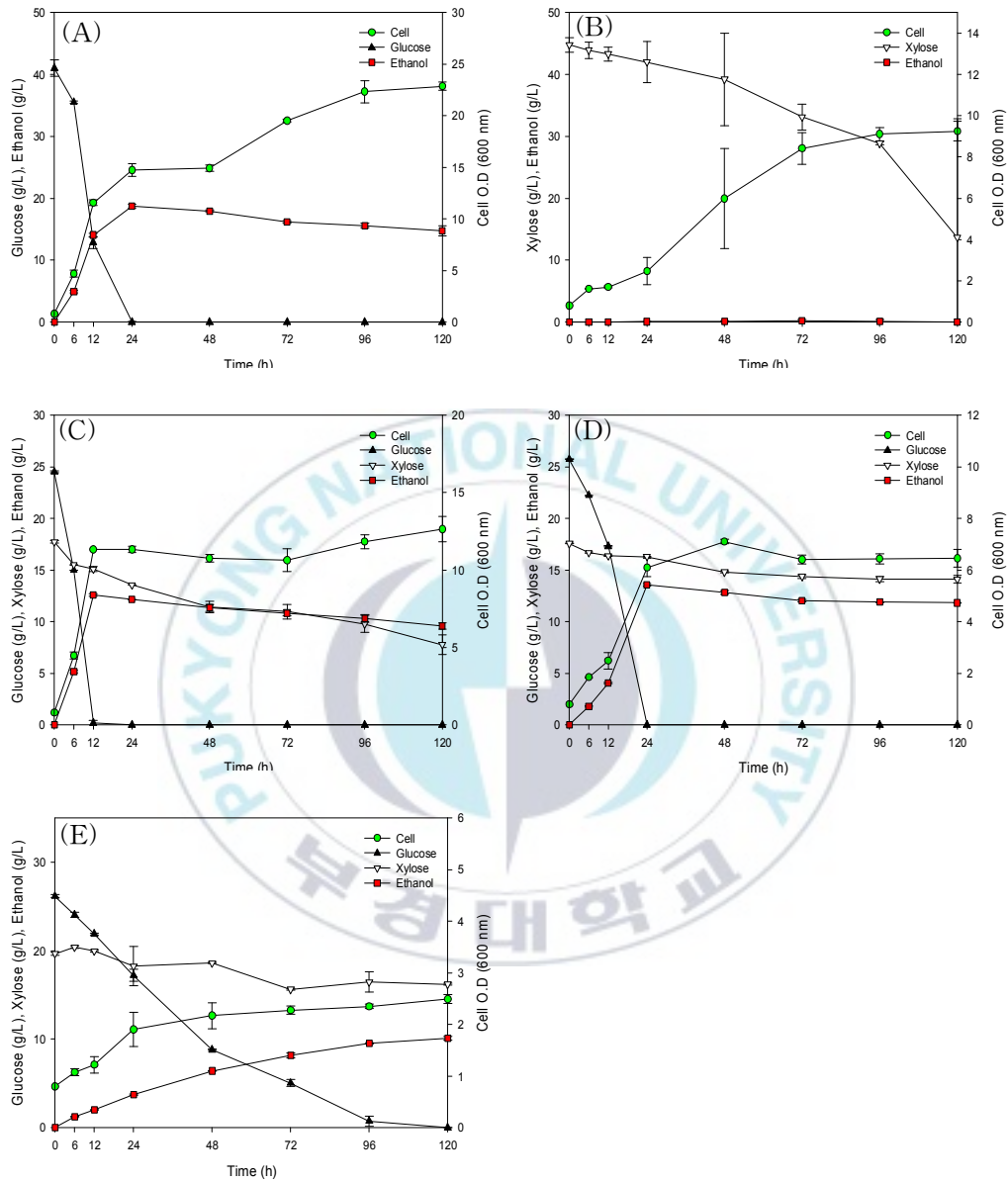


Fig. 6. Ethanol production using *Kluyveromyces marxianus* with (A) glucose, (B) xylose, (C) glucose and xylose mixed media, (D) *Spartina* sp. hydrolysis, and (E) only *Spartina* sp. hydrolysis media.

3.4. 2,3-Butanediol 발효

3.4.1. 균주 개량

Xylose 섭취 및 대사가능한 균주 *S. cerevisiae* SR8의 2,3-BDO 생산량을 증가시키기 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 재조합 균주를 만들었다. 에탄올 생산 유전자 중 하나인 *adh1* 삭제 및 2,3-BDO 생산 유전자의 promoter를 CCW12 promoter로 교체한 것을 확인하기 위해 Table 3에 나열된 primer를 사용하여 효모 colony PCR를 통해 확인하였다[3]. 실험군과 대조군의 colony 중 무작위로 선택하여 진행하였으며 colony PCR의 agarose gel 전기영동 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7 (A)는 *adh1* 유전자의 삭제를 확인한 것이며, 1번은 대조군인 *S. cerevisiae* SR8, 2번은 *adh1* 유전자만 삭제된 실험군 *S. cerevisiae* SR8_Δ*adh1*, 3번과 4번은 BDH1 promoter를 CCW12 promoter로 교체한 후 *adh1* 유전자를 삭제한 실험군 *S. cerevisiae* SR8 CCW12*p*-BDH1:Δ*adh1*이다. 2, 3, 4번 모두 *adh1* 유전자가 삭제되었을 때 나타나도록 설계된 331bp 위치에 밴드가 뜨는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 7 (B)는 BDH1 유전자의 promoter를 CCW12 promoter로 교체한 것을 확인한 것이며, 1번은 대조군, 5번은 BDH1 promoter를 CCW12 promoter로 과발현한 실험군 *S. cerevisiae* SR8 CCW12*p*-BDH1, 3번과 4번은 BDH1 promoter를 CCW12 promoter로 과발현한 후 *adh1* 유전자를 삭제한 실험군 *S. cerevisiae* SR8 CCW12*p*-BDH1:Δ*adh1*이다. 5, 3, 4번 모두 CCW12 promoter가 삽입되었을 때 나타나도록 설계된 834bp 위치에 밴드가 뜨는 것을 확인 할 수 있었다.

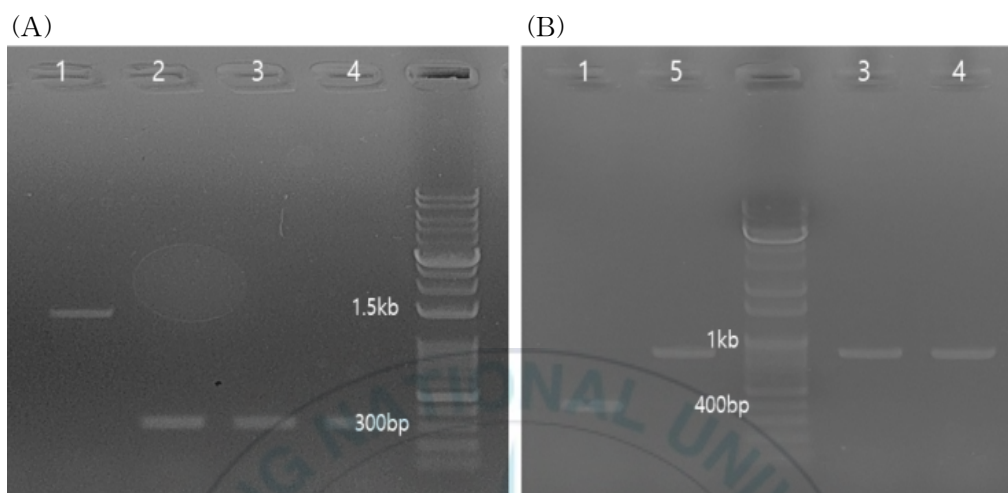


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of colony PCR for edited gene verification. (A) *adh1* gene knock out with 1054bp deletion: Lane 1 control samples, others were experimental group samples. Colony PCR products of edited *adh1* gene were 331bp, and original were 1385bp.

(B) Overexpression of the BDH1 with the CCW12 promoter: Lane 1 control samples, others were experimental group samples. The colony PCR products of BDH1 overexpressed with the CCW12 promoter was 834bp, and the original was 381bp. (Lanes 2 was SR8_Δ*adh1*, Lanes 3 and 4 were SR8 *CCW12p_BDH1*:Δ*adh1* and Lane 5 was SR8 *CCW12p_BDH1*).

3.4.2. 갯끈풀(*Spartina* sp.) 가수분해물을 이용한 2,3-Butanediol 발효

Xylose 섭취가능하게 재조합된 균주 *S. cerevisiae* SR8과 CRISPR/Cas9 기법으로 추가로 개량한 균주 *S. cerevisiae* SR8 $\Delta adh1$ (SR8-a), *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1* (SR8-B), *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1:Δadh1* (SR8-Ba)를 이용하여 갯끈풀 가수분해 산물에서 발효를 진행하였다. 발효 배지는 glucose 12.9 g/L, xylose 10.2 g/L를 포함하고 있다.

Fig. 8은 glucose와 xylose가 포함된 YP배지에 (A) SR8, (B) SR8-a, (C) SR8-B, (D) SR8-Ba 균주를 이용하여 72시간 동안 발효를 진행한 결과를 나타내었다. SR8 균주는 24시간에 거의 모든 당을 소비하였으며, 8.1 g/L의 에탄올을 생산하고 48시간에 0.1 g/L의 2,3-BDO를 생산하였다(Fig. 8 (A)). 에탄올 생산 유전자 중 하나인 *adh1*을 삭제한 균주 SR8-a는 24시간 동안 모든 glucose를 소비하였으며 48시간에 거의 모든 xylose를 소비하였다. 24시간에서 4.6 g/L의 에탄올을 생산하였으며 48시간에서 0.64 g/L의 2,3-BDO를 생산하여 모균주와 비교하여 약 1.8배 낮은 에탄올 생산량과 약 6배 증가한 2,3-BDO 생산량을 보였다(Fig. 8 (B)).

2,3-BDO의 생산 유전자인 *BDH1*의 promoter를 strong promoter인 *CCW12* promoter로 교체한 균주 SR8-B는 glucose와 xylose가 혼합된 YP 배지에서 24시간에 거의 모든 당을 소비하였으며 8.4 g/L의 에탄올을 생산하고 72시간에 최대 0.15 g/L의 2,3-BDO를 생산하여 SR8과 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 8 (C)).

Fig. 8 (D)는 SR8 균주에 *adh1* 유전자 삭제 및 *BDH1*의 promoter를 *CCW12* promoter로 교체된 균주 SR8-Ba를 발효한 결과이다. 24시간에서 모든 glucose를 소비하였으며, 48시간에서 거의 모든 xylose를 소비하였다.

24시간에서 최대 4.8 g/L의 에탄올 생산량과 48시간에서 0.65 g/L의 2,3-BDO 생산량을 보여 SR8에 비해 약 1.7배 낮은 에탄올 생산량과 약 6배 높은 2,3-BDO 생산량을 보였으나 adh1 유전자만 삭제한 SR8-a 균주와 비교하였을 때 유의미한 차이를 보이지 않았다.



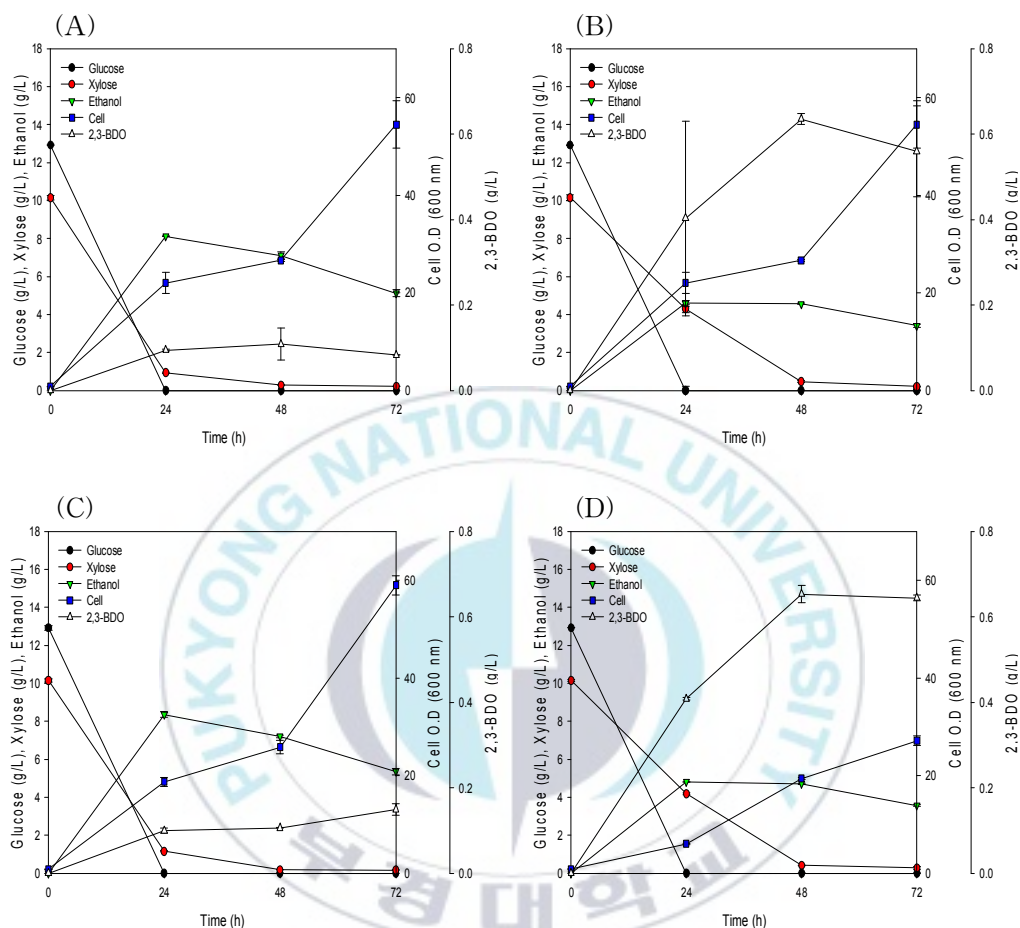


Fig. 8. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δadh1, (C) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1 and (D) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1:Δadh1 strains with glucose and xylose in YP medium.

Fig. 9는 갯끈풀 가수분해물을 포함한 YP배지, Fig. 10은 갯끈풀 가수분해물만을 배지로 사용하여 재조합 균주들을 72시간 동안 발효한 결과를 나타내었다.

YP배지가 포함된 가수분해물에서 SR8 균주는 48시간에 모든 glucose를 소비하였으나 xylose는 2.3 g/L 잔존하였고 72시간에서 최대 에탄올 9.5 g/L, 2,3-BDO 0.3 g/L를 생산하였다(Fig. 9 (A)). 반면 SR8-a 균주는 갯끈풀 가수분해물의 glucose 3.3 g/L, xylose 1.4 g/L만을 소비하였으며 세포성장 및 에탄올 생산을 거의 하지 못하였고 48시간에서 최대 0.6 g/L를 생산하였다(Fig. 9 (B)). SR8-B균주는 72시간에 모든 glucose를 소비하였으나 xylose는 4.5 g/L 정도 소비하지 못하였다. 72시간에서 최대 8.7 g/L의 에탄올 생산 및 0.17 g/L의 2,3-BDO를 생산하여 SR8과 비교하였을 때, 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 9 (C)). SR8-aB 균주는 갯끈풀 가수분해물의 glucose 4.3 g/L, xylose 1.5 g/L만을 소비하였으며 세포성장 및 에탄올은 거의 생산하지 못하였고 48시간에서 2,3-BDO를 0.5 g/L 생산하였다(Fig. 9 (D)).

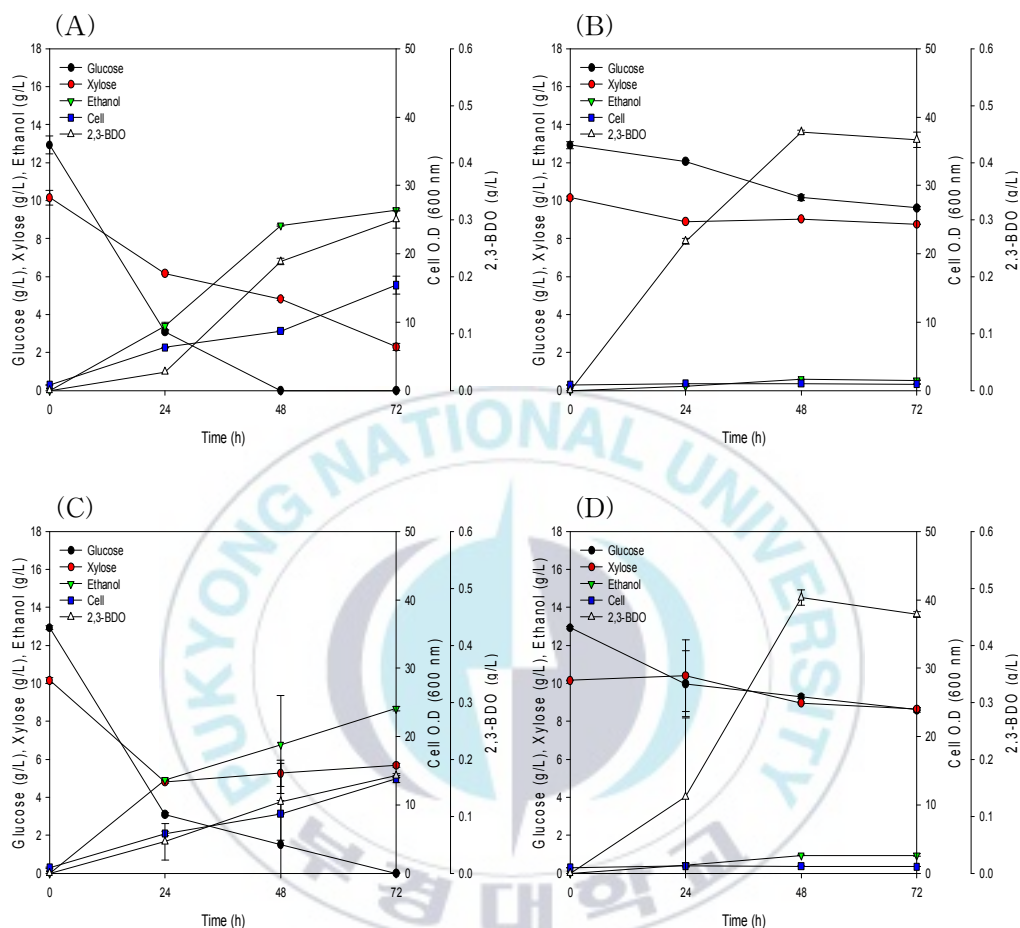


Fig. 9. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δadh1, (C) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1 and (D) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1:Δadh1 strains with *Spartina* sp. hydrolysis in YP medium.

가수분해 산물만을 배지로 사용하여 SR8 균주를 72시간 동안 발효하였을 때 24시간에 모든 glucose를 소비하였으며 72시간 동안 4.1 g/L를 제외한 xylose를 소비하였다(Fig. 10 (A)). 이때 에탄올은 72시간에서 최대 10 g/L를 생산하였으며, 2,3-BDO는 0.13 g/L 생산하였다(Fig. 10 (A)). SR8-a 균주는 glucose만 3.4 g/L 소비하고 xylose 소비 및 에탄올 생산은 거의 하지 못하였으나 48시간에서 2,3-BDO를 0.5 g/L 생산하였다(Fig. 10 (B)). SR8-B균주는 SR8 균주와 마찬가지로 24시간에 모든 glucose를 소비하였으며 5.2 g/L를 제외한 xylose를 소비하였다. 48시간에서 9.1 g/L의 에탄올을 생산하였으며 2,3-BDO는 0.12 g/L로 SR8 균주와 비교하였을 때 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 10 (C)). SR8-Ba 균주를 갯끈풀 가수분해 산물만을 배지로 사용하여 발효를 진행하였을 때 SR-a균주와 유사하게 glucose 및 xylose를 거의 소비하지 못하고 1.1 g/L로 에탄올 생산량이 적었으며 48시간에서 0.51 g/L 2,3-BDO를 생산하였다.

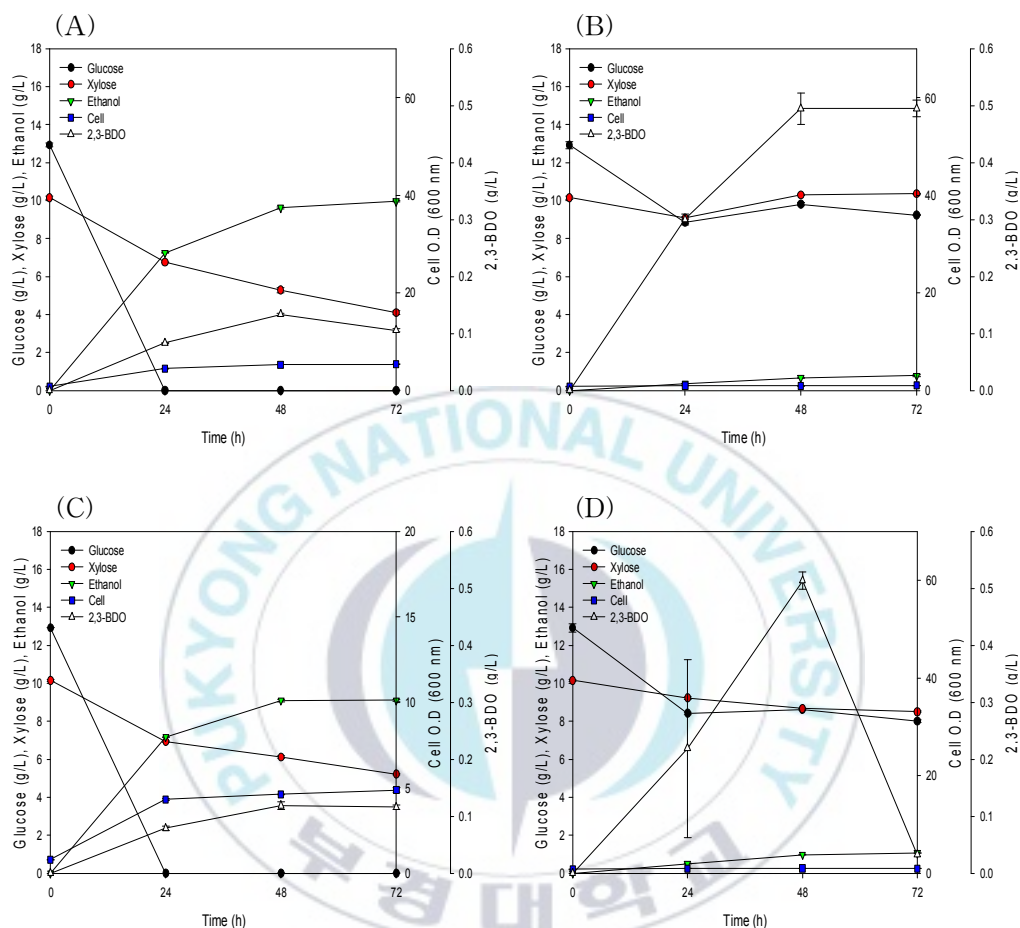


Fig. 10. Fermentation of (A) *S. cerevisiae* SR8, (B) *S. cerevisiae* SR8_Δadh1, (C) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1, and (D) *S. cerevisiae* SR8 CCW12p-BDH1:Δadh1 strains with *Spartina* sp. hydrolysis.

4. 결론

유해해양식물로 지정된 갯끈풀(*Spartina* sp.)로부터 개량된 효모를 이용한 발효를 위해 열산가수분해, 효소당화 최적화를 진행하였다. 갯끈풀 시료 10%(w/v), 300 mM의 질산(HNO_3)을 첨가하여 120℃에서 60분 동안 열산가수분해한 다음 Cellic CTec2 단일 효소를 넣어 72시간 동안 효소당화를 진행하였을 때 최대 90.66% 수율의 환원당을 얻을 수 있었다.

Xylose 섭취가 가능한 효모 3종(*S. cerevisiae* SR8, *C. tropicalis*, *K. marxianus*)을 이용하여 갯끈풀 가수분해물에서 에탄올 발효를 진행한 결과 재조합 균주는 야생형 균주에 비해 xylose 섭취를 및 에탄올 생산량이 높은 것을 확인 할 수 있었다. *S. cerevisiae* SR8의 경우 추가 영양분의 유무와 상관없이 갯끈풀 가수분해물 배지에서 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH}) 0.36, 0.35로 에탄올 수율이 가장 높았으며, 그 다음으로 *K. marxianus*를 이용하여 발효를 진행했을 때 추가 영양분이 들어있는 배지에서 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH}) 0.31, 영양분이 포함되지 않는 가수분해물배지에서 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH}) 0.22로 높았다. 하지만 *C. tropicalis*는 가수분해물을 이용한 에탄올 생산을 거의 하지 못하였다.

CRISPR/Cas9시스템을 이용하여 개량한 균주인 *S. cerevisiae* SR8_Δ*adh1*, *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1*, *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1;Δadh1*의 유전자 교체 및 삭제는 colony PCR을 통해 확인할 수 있었다. 이를 이용하여 glucose 와 xylose가 포함된 YP배지, 갯끈풀 가수분해물이 포함된 YP배지 및 가수분해 산물만을 배지로 발효를 진행하였을 때 *adh1* 결손 균주는 모균주인 SR8에 비해 낮은 세포성장률과 에탄올 생산량을 보였으나 상대적으로 높은 2,3-BDO 생산량을 보였다. *BDH1*의 promoter를 *CCW12* promoter로 교체한 균주의 경우 SR8과 세포

성장, 에탄올 생산량 및 2,3-BDO 생산량에서 유의한 차이를 보이지 않았다. *S. cerevisiae* SR8 *CCW12p-BDH1;Δadh1*의 경우 *S. cerevisiae* SR8 *adh1* 균주와 세포성장, 에탄올 생산량 및 2,3-BDO 생산량에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이로부터 경쟁 대사산물의 유전자 결손이 2,3-BDO 생산량을 증가시키는 데 직접적인 영향을 보이는 것으로 판단되나 2,3-BDO의 높은 생산량을 위해선 추가적인 실험이 필요하다.



참고문헌

- [1] 김진아, 정귀택. (2021). CRISPR/CAS9을 이용하여 lipid elongation gene의 과발현을 통한 효모의 에탄올 발효능 개선. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49(2), 210-216.
- [2] Ji Won Yang, Yu Rim Park, Gwi-taek Jeong, Sung-koo Kim. (2021). Bioethanol Production from *Gracilaria verrucosa* Using *Saccharomyces cerevisiae* with Adaptive Evolution. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49(1), 88-94.
- [3] 선우인영. (2019). Biofuel productions from macroalgae by co-fermentation and engineered yeasts. 부경대학교 박사학위논문.
- [4] Kim SR, Xu H, Lesmana A, Kuzmanovic U, Au M, Florencia C, et al. (2015). Deletion of PHO13, encoding haloacid dehalogenase type IIA phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbio.*, 81(5), 1601 - 1609.
- [5] Ra, C. H., Seo, J.-H., Jeong, G.-T., & Kim, S.-K. (2020). Evaluation of 2,3-Butanediol Production from Red Seaweed *Gelidium amansii* Hydrolysates Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- [6] Kim Soo-Jung. (2019). Recent Strategies for 2,3-Butanediol

- Production Using Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Trends Agric. Life Sci. 57, 25–32.
- [7] Jin-Seog Kim. (2016). A Research Review for Establishing Effective Management Practices of the Highly Invasive Cordgrass (*Spartina* spp.). Weed & Turfgrass Science, 5(3), 111–125.
- [8] Eun-Kyu Kim, Jihyon Kil, Young-Kyoo Joo, Young-Sang Jung. (2015). Distribution and Botanical Characteristics of Unrecorded Alien Weed *Spartina anglica* in Korea. Weed & Turfgrass Science, 4(1), 65–70.
- [9] Lingkan Ding, Jun Cheng, Liangchen Yue, Jianzhong Liu, Li Zhang, Junhu Zhou, Kefa Cen. (2016). Fermentative hydrogen and methane co-production from pretreated *Spartina anglica* biomass with optimal saccharification effect under acid/alkali-assisted steam/microwave heating and enzymolysis, Energy Conversion and Management, 127, 554–560.
- [10] Zhao, D., Yuan, S., Xiong, B. et al. (2016). Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. Microb. Cell. Fact., 15, 205, 1475–2859.
- [11] Kim SR, Skerker JM, Kang W, Lesmana A, Wei N, 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(2), e57048.

- [12] Zhang GC, Kong II, Kim H, Liu JJ, Cate JH, Jin YS. (2014). Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(24), 7694–701.
- [13] Xu, H., Kim, S., Sorek, H., Lee, Y., Jeong, D., Kim, J., Oh, E. J., Yun, E. J., Wemmer, D. E., Kim, K. H., Kim, S. R., & Jin, Y. S. (2016). PHO13 deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 34, 88–96.
- [14] Byeong-Kwan Jang, Deokyeol Jeong, Jeongman Seol, You-Kyung Lee, Soo Rin Kim. (2020). Xylose Facilitates Lactic Acid Yield of Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *KSBB Journal*, 35(2), 129–134.
- [15] Lin, Y., Chomvong, K., Acosta-Sampson, L. et al. (2014). Leveraging transcription factors to speed cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 126, 2731–3654.
- [16] Lee, YG., Seo, JH. (2019). Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 204, 2731–3654.
- [17] Kim, S., Kim, J., Lee, Y., Park, Y., & Seo, J. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6),

2241-2250.

- [18] 김수린. (2015). Cas9 유전자가위를 이용한 효모의 대사공학 기술 동향. BT NEWS, 22(1), 83-86.
- [19] Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, Feng Zhang, (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell, 157, 1262-1278.
- [20] Swarts, D.C., van der Oost, J., Jinek, M. (2017). Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. Molecular Cell, 66, 221-223.
- [21] Xiao-Jun Ji, He Huang, Ping-Kai Ouyang, (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review, Biotechnology Advances, 29, 351-364.
- [22] Kim, S. J., Kim, J. W., Lee, Y. G., Park, Y. C. and Seo, J. H. 2017. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2,3-butanediol production. Appl. Microbiol. Biotechnol, 101, 2241-2250.
- [23] Bialkowska, A. M., 2016. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. World J. Microbiol. Biotechnol, 32(12), 200.
- [24] Biao Zhang, Lili Ren, Zepeng Zhao, Siyang Zhang, Dayong Xu, Xin Zeng, Feng Li, 2021, High temperature xylitol production through simultaneous co-utilization of glucose and xylose by engineered

- Kluyveromyces marxianus*, Biochemical Engineering Journal, 165, 107820.
- [25] Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T., & Watanabe, N. (1992). Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. Biotechnology and bioengineering, 40(9), 1085-1091.
- [26] Yurim Park, In Yung Sunwoo, Jiwon Yang, Gwi-teak Jeong, Sung-koo Kim. (2020). Comparison of Ethanol Yield Coefficients Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitanae*, and *Kluyveromyces marxianus* Adapted to High Concentrations of Galactose with *Gracilaria verrucosa* as Substrate. Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(6), 930-936.
- [27] Jeffries, T.W. (1981), Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. Biotechnol Lett 3, 213-218.