



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월09일
(11) 등록번호 10-2323926
(24) 등록일자 2021년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
C12P 7/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0141488
(22) 출원일자 2019년11월07일
심사청구일자 2019년11월07일
(65) 공개번호 10-2021-0055249
(43) 공개일자 2021년05월17일
(56) 선행기술조사문헌
APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 제73권, 15
호, 4881-4891면 (2007.08.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
김수린
대구광역시 북구 복현로 50, 205동 403호(복현동,
복현블루밍브라운스톤 명문세카아파트)
정덕열
서울특별시 노원구 마들로 31, 120동 504호(월계
동, 그랑빌아파트)
예수지
대구광역시 달서구 한들로 55, 109동 1502호(장기
동, 장기초록나라)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 2 항

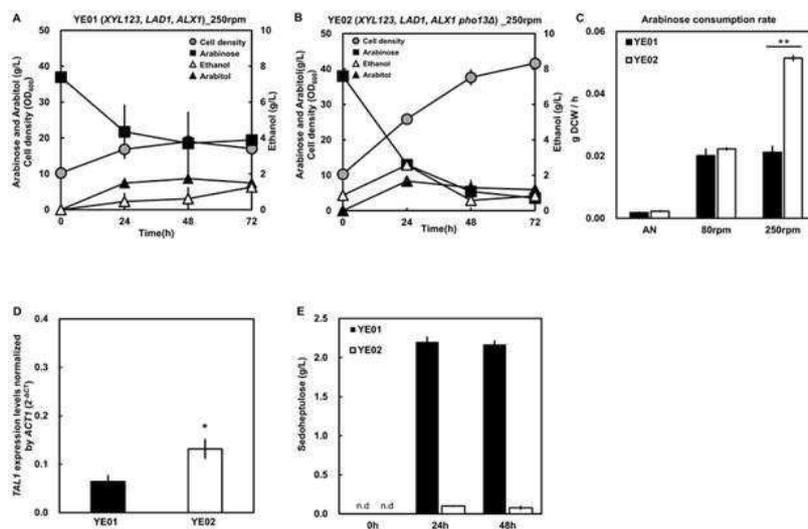
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 아라비노스를 발효하여 에탄올을 생산하는 신규 효모 균주

(57) 요약

본 발명은 아라비노스를 발효하여 에탄올을 생산하는 신규 효모 균주 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 및 이를 이용하여 에탄올의 생산을 증대시키는 최적의 배양 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 균주는 기존의 균주보다 아라비노스의 소비율 및 발효능이 향상된 것으로서, 바이오연료로서의 에탄올의 생산 능력이 크게 향상된 특징을 가진다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12R 2001/865 (2021.05)

(56) 선행기술조사문헌
JP2014512818 A
US20120064591 A1
KR1020100081096 A
US20150218592 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01279801
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업첨단핵심기술개발
연구과제명	과일 펙틴 발효를 통한 당알콜 생산 효모균주의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경북대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

LAD1 및 ALX1 유전자가 도입되고 PHO13 유전자가 제거되어 호기 조건에서 TAL1(transaldolase) 유전자의 발현이 향상 및 아라비노스 발효능이 향상된, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) YE02 균주(KACC 93328P).

청구항 2

삭제

청구항 3

1) 제 1항의 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) YE02 균주(KACC 93328P)를 배지에서 호기 조건하에 발효하는 단계; 및

2) 상기 발효에 따른 배지 또는 상기 균주로부터 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 에탄올의 생산 방법.

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아라비노스를 발효하여 에탄올을 생산하는 신규 효모 균주 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 및 이를 이용하여 에탄올의 생산을 증대시키는 최적의 배양 방법에 관한 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003] 리그노셀룰로오스와 같은 오탄당의 발효 기술은 농업부산물을 이용한 바이오매스를 바이오연료로 전환하여 사용하는 데 필요한 핵심 기술로서 잠재력이 있다. 특히 과일부산물로부터 나온 펙틴이 풍부한 바이오매스는 리그닌의 함량이 적고, 최근 과일 가공품이 늘어남에 따라 생성량이 증가하고 있기 때문에, 바이오연료의 원료로 사용될 가능성이 더욱 높아지고 있는 추세이다.

[0004] L-아라비노스(L-arabinose)는 펙틴에 있는 가장 많은 오탄당 중 하나로 xylose와 동일한 경로로 D-xylulose-5-phosphate로 전환된다. 이 경로에서 L-아라비노스는 각각 두번의 산화환원과정을 거쳐 D-xylulose로 전환되는데, 이때 NAD(P)H 특이적 aldose 환원효소 (AR or XR), NAD⁺ 특이적 L-arabitol-4-dehydrogenase (LAD), NAD(P)H 특이적 L-xylulose 환원효소 (LXR or ALX), NAD⁺ 특이적 xylitol dehydrogenase (XDH)가 관여한다. 생성된 D-xylulose는 xylulokinase (XK)에 의해 인산화되어 D-xylulose-5 phosphate로 변환된다 (Richard P, Putkonen M, Vaananen R, Londesborough J, Penttila M (2002) The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylulose reductase gene. Biochemistry 41:6432-6437). 몇몇 자연 유래 균주는 아라비노스를 대사할 수 있는 능력이 있다고 밝혀져 있으나, 이러한 균주들은 대부분 에탄올과 푸르푸랄(furfural)과 같은 방해물질에 대한 저항성이 낮아 산업적 활용에는 한계가 있다(Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl Microbiol Biotechnol 74:937-953).

[0005] 이에 본 발명자들은 아라비노스를 발효하여 바이오연료를 생산하는 신규 균주를 연구하던 중에 사카로마이세스 세레비지애의 일부 대사 경로를 조절하면 바이오연료로 활용 가능한 에탄올의 생산량이 크게 증가되는 점을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 아라비노스를 발효하여 에탄올의 생산능을 가지는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 에탄올을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아라비노스(L-asabinose)를 발효하여 에탄올을 생산하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에서 있어서, 상기 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 *richoderma reesei*의 *LAD1* 유전자와 *Ambrosiozyma monospora*의 *ALX1* 유전자를 도입하여 아라비노스(arabinose) 대사경로가 구축된 균주(YE01) 또는 상기 균주에서 PH013 유전자를 제거한 균주(YE02)를 포함할 수 있다. 특히 상기 PH013 유전자가 제거된 YE02 균주는 2019년 8월 28일자에 KACC 933328P 으로 수탁되었다.

[0012] 상기 유전자의 도입 및 제거는 공지된 방법에 따라 이루어질 수 있으며, 그 방법에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 LiAc/SS-DNA/PEG method 및 CRISPR/Cas9 기술을 일부 변경하여 사용하였으나, 이밖에 공지된 유전자 편집 기술 또는 형질전환 기술을 활용할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 용어, "아라비노스"는 오탄당의 하나로서, 알데하이드기를 포함하고 있으며, 백색의 결정성분말로서 화학식은 C₅H₁₀O₅이다. 자연계에는 D형, 또는 L형이 존재하며, L-아라비노스는 실제로 자연계에서 D-아라비노스보다 일반적인 형태로 헤미셀룰로스 및 펙틴과 같은 생체 고분자의 구성 성분으로 알려져 있다. L-아라비노스는 설탕을 대체할 수 있는 대체당으로서, 비만, 당뇨병, 고지혈증 등의 성인병 예방에도 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 배지에서 배양하여 아라비노스를 발효하는 단계; 및 발효에 따른 배지 또는 상기 균주로부터 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 에탄올의 생산 방법을 제공한다.

[0015] 상기 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 당원으로는 글루코즈, 사카로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[0017] 한편, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃일 수 있다. 발효는 원하는 아라비노스의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 상기 발효는 보통 10 내지 100 시간에서 달성될 수 있다. 에리스리톨은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용할 수 있는 에탄올의 회수 방법은 당업계에서 알려진 방법, 예컨대 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 GC/MS 분석 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 아라비노스의 발효능이 향상된 효모 균주인 형질 전환된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 및 이의 배양 방법에 대한 것으로서, 본 발명의 상기 균주 및 배양 방법에 따르면 기존의 균주에 비하여 현저하게 에탄올의 생산량이 증가되며, 상기 에탄올을 바이오연료 등 다양한 산업 분야에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 아라비노스 대사를 위한 Fungal 고유 경로를 나타낸 것이다. AR(XR), 알 도스 환원 효소; LAD, L-아라비톨-4-데하이드로게나제; ALX, L-자일룰로스 환원효소; XDH, D- 자일리톨 환원효소; XK, 자일로키나제.
- 도 2는 아라비노스 발효에 있어, PHO13 유전자 제거의 효과를 나타낸 것이다. A 및 B는 호기성 조건(250rpm)에서 YE01 및 YE02의 발효 프로파일을 나타낸 것이고, C는 다양한 산소 조건에서 아라비노스 소비 속도와 PHO13 제거와의 관계를 확인한 것이다. (오차 막대는 2개의 biological replicates 간의 표준 편차) D는 ACT1에 의해 확인된 TAL1의 상대적인 발현 수준이며, E는 아라비노스 대사과정에서 세포 외 sedoheptulose 농도로 TAL1의 상대적 발현 수준을 확인한 것이다. 모든 실험은 호기성 조건(250 rpm) 하에서 유일한 탄소 공급원으로 40g/L 아라비노스를 함유하는 YP 배지에서 모든 발효를 10의 초기 OD로 수행 하였다. 오차 막대는 3 개의 biological replicates간의 표준 편차를 나타낸다. n.d:감지되지 않음.
- 도 3은 배양 24시간 및 48시간의 호기 조건(250rpm)하에 40g/L L-아라비노스를 함유하는 YP 배지에서 성장 된 YE01 및 YE02에서 선택된 중간 대사 물질의 양을 확인한 결과로, 각 막대는 점선 플롯의 평균 및 표준 편차를 나타낸다. P-값은 두 균주 (YE01 및 YE02) 사이의 t- 검정을 통해 계산되었다 : * 및 **는 각각 p <0.05 및 p <0.01에서 유의미한 차이를 나타냄. 배양 48시간에서 트레할로스(B) 및 오르트산(E)의 p-값은 각각 0.2 및 0.15였다.
- 도 4는 아라비노스 발효 균주의 유전자 구성을 나타낸 것이다. YE02 (A) 및 YE01 균주 (B)는 각각 숙주로서 DY02 및 DY01로 형질 전환되었다.
- 도 5는 다양한 호기 조건 하에서 아라비노스 발효 프로파일에 대한 PHO13 유전자 결실(pho13Δ)의 효과로서; 혐기성(A 및 D), 미세 호기성(B 및 E) 및 호기성(C 및 F) 에서의 프로파일 결과이다. YE01 균주의 아라비노스 대사(A, B 및 C) 및 YE01 pho13Δ 돌연변이 체, YE02 균주(D, E 및 F)를 각각 탄소원으로 40 g/L 아라비노스를 함유하는 YP 배지에서 10의 초기 OD값으로 시험 하였다. 오차 막대는 2 개의 생물학적 복제물의 표준 편차를 나타낸다.
- 도 6은 배양 24 시간 및 48 시간에서 호기성 조건 하에서 40g/L L-아라비노스를 함유하는 YP 배지에서 배양된 YE01 및 YE02의 세포 내 대사 산물 프로파일의 계층적 클러스터링 및 히트 맵 투영 결과이다. 세포 내 대사 산물은 GC/MS에 의해 검출되었고 상대적 함량 비로 측정되었다. 계층적 군집 분석을 위해, 유클리드 거리가 거리 측정(BioVinci, BioTuring, San Diego, CA, USA)으로 사용되었다. 각 특성의 행 Z-점수는 빨강-파랑 색 눈금으로 표시된다. 여기서 타일의 빨강은 풍부도가 높고 파랑은 풍부도가 낮음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 아라비노스의 발효를 통해 에탄올 생산능을 가지는 형질전환된 효모 균주인 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에 대한 것으로, 상기 균주는 국립농업과학원에 2019년 08월 28일자로 수탁 번호 KACC 933328P로 수탁하였다.
- [0026] 또한, 상기 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주의 에탄올 생산 능력을 향상시키기 위하여, 상기 균주의 대사과정을 조절할 수 있도록 일부 유전자를 도입 또는 제거한 특징을 가진다. 본 발명의 상기 균주는 *trichoderma reesei*에서 유래된 *LAD1* 유전자와 *Ambrosiozyma monospora*에서 유래된 *ALX1* 유전자를 도입 하여 아라비노스(arabinose) 대사경로가 구축된 균주(YE01)로서, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 유전자 도입을 위한 카세트, *FBA1p-LAD1-FBA1t* 및 *PGK1p-ALX1-CYC1t* 카세트를 아라비노스 발효 효모인 사카로마이세스 세레비지에(*S.cerevisiae*)에 도입하는 방법을 사용하였다. 또한, 아라비노스 생산능을 보다 향상시키기 위하여, 상기 YE01 균주에서 추가로 PHO13 유전자를 제거한 균주(YE02)를 제작하였다.
- [0027] 본 발명의 상기 사카로마이세스 세레비지에의 대사 경로는 도 1과 같이 나타낼 수 있다. 자연 상태에서도 L-arabinose를 발효하여 D-xylulose를 생산할 수 있으나, 수율이 높지 않고 여러 가지 방해 물질로 인하여 산업적으로 활용되기는 어렵다. 따라서 본 발명의 일 실시예에서, 사카로마이세스 세레비지에 균주는 L-arabitol에서 L-xylulose 생성을 촉진하는 *LAD1* 유전자를 도입하고, L-xylulose로부터 xylitol 생성을 촉진하는 *ALX1* 유전자를 도입하여, L-arabinose로부터 xylitol의 생산을 촉진하였다(YE01).
- [0028] 또한, PHO13 유전자를 추가로 제거하여, TAL1 유전자를 활성화하고, 아라비노스 발효를 더욱 촉진시킬 수 있었

다. TAL1 유전자는 sedoheptulose-7-phosphate를 erythrose-4-phosphate로 전환하는 transaldolase를 발현하는 유전자로, PHO13이 제거된 균주는 sedoheptulose의 축적량이 현저히 줄어들게 된다. 본 발명의 일 실시예에서 확인한 바와 같이, PHO13을 제거하면 TAL1 유전자의 발현이 높아지게 되며(도 2D), sedoheptulose의 축적량은 감소하게 된다(도 2E).

[0029] 또한, PHO13 유전자를 제거한 경우, 자일로스(xylose)에서 배양한 사카로마이세스 세레비지에는 트레할로스 생합성량이 증가하게 되어, 오탄당 인산화경로가 강화되고, TCA 회로가 약화될 수 있다는 사실을 바탕으로, PHO13이 제거된 YE02 균주에서 sedoheptulose 축적량과 glucoheptonic acid의 생성량이 낮은 것을 확인하였으며, 이를 통하여 아라비노스 발효 경로에서도 마찬가지로, PHO13 유전자의 제거를 통하여 오탄당 인산화경로를 강화시킬 수 있다는 점을 확인하였다. (도 2 및 3)

[0030] 즉, 본 발명은 상기 PHO13 유전자를 제거함으로써 인하여, 사카로마이세스 세레비지애에서 아라비노스의 소비율을 증가시키고, 에탄올 생산량을 극대화할 수 있는 점을 확인하였다. 특히 본 발명의 일 실시예에서 호기 조건에서 사카로마이세스 세레비지애를 배양하였을 때, PHO13 유전자 제거에 의한 에탄올 생산량 증가 효과가 극대화되었음을 확인하였다.(표 2)

[0031]

[0032] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034] <실시예 1> 재료 및 방법

[0035] <1-1> 균주 제작

[0036] 효모의 형질전환은 이전 연구에서 활용된 LiAc/SS-DNA/PEG method(Gietz RD et al, (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature protocols 2:31) 및 CRISPR/Cas9 기술을 일부 변경하여 사용하였다(Kim SR et al, (2015) Environmental Microbiology 81:1601-1609). 간략히 서술하자면, *FBA1p-LAD1-FBA1t* DNA 카세트 및 *PGK1p-ALX1-CYC1t* DNA 카세트를 xylose 발효능을 가지는 효모(*S. cerevisiae*)인 DY01 및 DY02에 각각 도입하였으며, 상기 카세트에 포함된 *LAD1* 유전자는 *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC 56765)에서, *ALX1* 유전자는 *Ambrosiozyma monospora* (ATCC 18855)에서 유래하였다. 상기 DY01는 *ALD6* 유전자 위치에 *TDH3p-XYL1-TDH3t*, *PGK1p-XYL2-PGK1t* 카세트를 도입하고 *INT#1* 자리에 *TEF1p-XYL3-TEF1t* 카세트를 도입한 것이며, DY02는 *ALD6* 유전자 위치에 *TDH3p-XYL1-TDH3t*, *PGK1p-XYL2-PGK1t* 카세트를 도입하고, *PHO13* 유전자 위치에 *TEF1p-XYL3-TEF1t* 카세트를 도입한 것이다. 본 발명의 *S. cerevisiae*는 상기 DY01에 *LAD1* 및 *ALX1*이 도입된 것을 YE01, DY02에 *LAD1* 및 *ALX1*이 도입된 것을 YE02라고 각각 명명하였다. 상기 유전자 구성 및 도입 과정은 도 4에 구체적으로 기재되어 있으며, 해당연구에 사용된 플라스미드 및 균주 정보는 하기 표 1에 표기되어 있다.

표 1

[0037]

lasmid or Strain	Description	Reference
Plasmids		
pRR6-X123	pRS306 <i>TDH3_p-XYL1-TDH3_t-PGK1_p-XYL2-PGK1_t-TDH3_p-XYL3-TDH3_t</i>	Kim et al. (2012)
pRS41N-Cas9	A single-copy plasmid with a <i>natNT</i> marker and Cas9	Kim et al. (2015)
pRS42H-ALD6.1	pRS42H plasmid with a gRNA block containing 20-bp <i>ALD6</i> sequence (ALD6.1)	This study
pRS42K-PHO13.1	pRS42K plasmid with a gRNA block containing 20-bp <i>PHO13</i> sequence (PHO13.1)	This study
pRS42H-INT#1	pRS42H plasmid with a gRNA block containing 20-bp near <i>HIP1</i> sequence (INT#1)	This study
pRS403-PGK1p-CYC1t	pRS403 plasmid with a PGK1promoter and CYC1 terminator	This study

pRS42H-SOR1.1	pRS42H plasmid with a gRNA block containing 20-bp <i>SOR1</i> sequence (SOR1.1)	This study
Strains		
DY01 (X123)	<i>S. cerevisiae</i> D452-2 <i>ald6::XYL12, XYL3</i> ¹⁾	This study
DY02 (X123 <i>pho13</i> Δ)	<i>S. cerevisiae</i> D452-2 <i>ald6::XYL12, pho13::XYL3</i>	This study
YE01 (X123, LAD1, ALX1)	<i>S. cerevisiae</i> DY01 <i>sor1::FBA1p-LAD1-FBA1t-PGK1p-ALX1-CYC1t</i>	This study
X123, LAD1 <i>pho13</i> Δ	<i>S. cerevisiae</i> DY02 <i>int#1::FBA1p-LAD1-FBA1t</i> ¹⁾	This study
YE02 (X123, LAD1, ALX1 <i>pho13</i> Δ)	<i>S. cerevisiae</i> DY02 <i>int#1::FBA1p-LAD1-FBA1t, sor1::PGK1p-ALX1-CYC1t</i>	This study

[0039] <1-2> 발효 조건 및 플라스크 발효

[0040] 효모는 20 g/L glucose를 포함한 10 mL 의 YP (10 g/L yeast extract and 20 g/L Bacto™ Peptone) 배지에서 30° C, 24시간 동안 배양하였다. 세포 수를 증가시키기 위해, 20 g/L glucose를 포함한 50 mL 의 YP 배지에 초기 세포 농도를 OD₆₀₀=0.1로 맞추어 한번 더 접종한 후 30 ° C 에서 24시간 동안 발효하였다. 이후 초기 세포 농도를 OD₆₀₀=10으로 맞추어 100-mL Erlenmeyer flask를 이용하여 40 g/L arabinose 를 포함한 20 mL of YP 배지에 접종하였다. 세포막 대사체 분석에도 초기세포농도를 OD₆₀₀=10로 맞추어 사용하였고, 혐기발효는 100 mL-serum bottles을 이용하였다.

[0042] <1-3> HPLC 및 GC/MS를 통한 대사체분석

[0043] 본 발명의 L-arabinose, L-arabitol, ethanol의 농도는 HPLC 1260 series, Agilent Technologies, USA)를 사용하여 분석하였으며, 대사체 추출 및 GC/MS를 이용한 대사체 분석 방법은 이전에 공개된 문헌을 참고하여 시행하였다. 간략히 설명하자면, GC/MS 분석전에 진공건조된 샘플을 메톡시아민화 및 트리메틸실릴화를 통해 전처리하였다. 메톡시아민화의 경우 40 μL의 피리미딘에 메톡시아민 하이드로클로라이드를 샘플에 첨가하였고 30 °C에서 90 분 동안 배양 하였다. 트리메틸실릴화의 경우 N- 메틸 -N- (트리메틸 실릴) 트리플루오로아세트아미드 40 μL를 샘플에 처리하여 37 °C에서 30 분 동안 배양하였다. GC/MS 분석은 GC / MS 분석은 Agilent 5973 질량 선별 검출기가 장착 된 GC Agilent 6890을 사용하여 수행되었고, 1 μL 의 전처리된 샘플을 사용하였고 스플릿리스 모드로 RTX-5Si1 MS 컬럼에 의해 분리되었다. 초기오븐온도를 50 °C에서 1분 동안 유지해준 후 20 °C/min의 속도로 330°C까지 상승시켰고, 최종온도 도달시점부터 2분을 유지시켜주었다. 헬륨가스는 1.5 mL/min 의 일정한 유속으로 캐리어 가스로 사용되었고, 이온소스 및 전달라인의 온도는 각각 250 °C 및 280 °C로 설정하였다. 질량검출기는 스캔모드에서 50 - 800 m/z의 질량범위 내에서 검출되었다.

[0045] <1-4> RT-qPCR를 이용한 전사분석

[0046] *TAL1* 유전자의 RT-qPCR은 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다(Kim SR et al, (2015) Environmental Microbiology 81:1601-1609). 모든 세포는 40 g/L 아라비노스를 포함한 YP배지에서 배양되었고 cDNA solution 은 프라이머와 iQ™ SYBR Green Supermix(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)와 함께 qPCR에 사용되었다. 이는 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)를 이용하여 수행되었고 RT-qPCR의 cDNA 샘플은 생물학적, 기술적으로 3회 반복하여 이루어졌다.

[0048] <실시예 2> 실험 결과

[0049] <2-1> 아라비노스 발효 균주(YE01, YE02)의 발효 특성

[0050] 다양한 산소 조건에서 두 균주 (YE01과 YE02)의 발효특성을 표 1 및 도 2에 나타냈다. YE01의 아라비노스 소비율은 혐기조건, 미호기조건, 호기조건에서 각각 0.002, 0.020, and 0.021 g DCW/h 이었다. YE02 균주는 혐기조건과 미 호기 조건에서는 YE01과 큰 차이를 보이지 않았지만 호기적인 조건에서는 아라비노스 소비속도가 0.051 g DCW/h로 YE01과 비교했을 때 유의적인 차이를 보였다 (표 1 및 도 2).

[0051] 즉, 하기 표 1에서 보듯이, 호기적인 조건에서 YE02의 최대 에탄올 생산량과 specific ethanol productivity는 YE01에 비해 각각 2배, 3.5배 증가하였다. Arbitol 생산량은 호기적인 조건에서 가장 적었지만 두 균주 간의 유

의적인 차이는 없었다.

[0052] 이러한 결과는 기존에 보고된 fungal arabinose 대사경로를 도입한 균주에 비해서 YE02 균주의 arabinose 소비율과 specific ethanol productivity가 가장 높았다.

표 2

[0053]

Strain	Genetic Backgrounds	Heterologous gene	Aeration (rpm)	Time (h)	Initial arabinose concentration (g/L)	Consumed Arabinose (g/L)	$q_{arabinose}$	Ethanol (g/L)	Arabinol (g/L)	Glycerol (g/L)	$Y_{ethanol}$	$V_{ethanol}$	$P_{ethanol}$	Ref
Fungal arabinose pathway														
YE01	XYL123	<i>sor1::LAD1-ALX1</i>	AN	672	40	6.9	0.002	1.5	8.4	0.6	0.51	0.01	0.94	This study
			80	48	40	6.3	0.020	1.0	14.0	0.3	0.30	0.02	3.42	
			250	72	40	13.1	0.021	1.3	7.5	0.7	0.13	0.02	2.05	
YE02	XYL123, <i>pho13Δ</i>	<i>sor1::LAD1 int#1::ALX1</i>	AN	672	40	8.3	0.002	4.6	10.1	0.5	0.55	0.01	1.27	This study
			80	48	40	7.2	0.022	1.1	13.1	0.3	0.25	0.02	3.43	
			250	24	40	18.6	0.051	2.6	8.4	0.0	0.16	0.11	7.13	
H2561	XYL123	<i>LAD1, LXR1</i>	AN	70	50	-	-	0.1	-	-	-	-	0.35	Richard et al. (2003)
424A(LNH-ST)/pLXR _{NAD} -LAD	XYL123	<i>LAD1, ALX1</i>	OL	96	45	40.5	-	9.0	13.5	0.6	0.19	0.10	1.66	Bera et al. (2010)
Bacterial arabinose pathway														
JBY25-4M	CEN.PK2-1C	<i>araABD, GAL2</i>	OL	-	20	-	-	6.0	-	-	0.30	-	60	Becker et al. (2003)
BWY1-45	CEN.PK2-1C	<i>araABD, GAL2</i>	AN	150	30	23.1	0.11	9.0	2.5	1.4	0.39	-	36	Wiedemann et al. (2008)
IMS0002	<i>xy1A, XKS1</i>	<i>araABD</i>	AN	72	20	20.7	-	9.0	<0.02	1.4	0.45	-	-	Wisselink et al. (2007)
BSW3AP	CEN.PK10 2-3A	<i>araABD</i>	OL	120	20	18.6	0.7	6.9	0.13	-	0.43	-	-	Wang et al. (2013)
BSW3AG	CEN.PK10 2-3A	<i>araABD, GAL2</i>	AN	80	20	-	0.61	-	-	1.4	0.43	-	270	Wang et al. (2013)

[0054] 파라미터 : $q_{arabinose}$, 아라비노스 소비 속도(g DCW/h); $Y_{ethanol}$, 에탄올 수율(g 에탄올/g 아라비노스); $V_{ethanol}$, 에탄올 부피 생산량(g 에탄올/h); 및 $P_{ethanol}$, 특정 에탄올 생산성(mg 에탄올/g DCW/h).

[0055] <2-2> PHO13 유전자 제거에 의한 TAL1 유전자의 대사 변화

[0056] PHO13 유전자를 제거한 YE02 균주에서의 세포 내 대사체 분석을 통해 아라비노스 발효에 대한 PHO13 유전자의 효과를 확인하기 위하여, 호기적인 조건에서의 YE01균주와 YE02균주의 대사체 변화를 비교하였다. 배양 후 24시간, 48시간의 샘플에서 채취한 두 균주에서 95개의 대사체가 확인되었고, YE02균주와 비교하였을 때 YE01균주에서 central carbon 대사에 관련된 대사체가 많았다(도 3). 그러나, 질소 대사경로와 관련한 대사체는 PHO13이 제거된 균주인 YE02에서 더 많이 확인되었다.

[0057] 즉, *S. cerevisiae*를 자일로스를 포함한 배양액에서 키웠을때, PHO13 유전자제거로 인해 트레할로스 생합성이 증가해 오탄당인산화경로가 upregulation 되고 TCA cycle이 downregulation 되었다. 상기 실험을 통하여, YE01

균주에 비해 *TAL1* 유전자가 활성화된 YE02균주의 sedoheptulose 축적량과 glucoheptonic acid 축적량이 낮은 것을 확인하였으며, 이를 통하여 아라비노스 발효 과정에서도 자일로스 발효와 마찬가지로 *PHO13* 유전자가 제거됨으로서 오탄당인산화경로를 강화시키는 것을 확인하였다. (도 2 및 3)

[0058] 즉, 상기 결과를 통하여, *PHO13* 유전자가 제거된 YE02 균주는 특히 호기 조건에서 NADH 생산과 함께 transaldolase를 활성화시켜 에탄올 생산을 위한 대사 경로를 활성화 할 수 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0060]

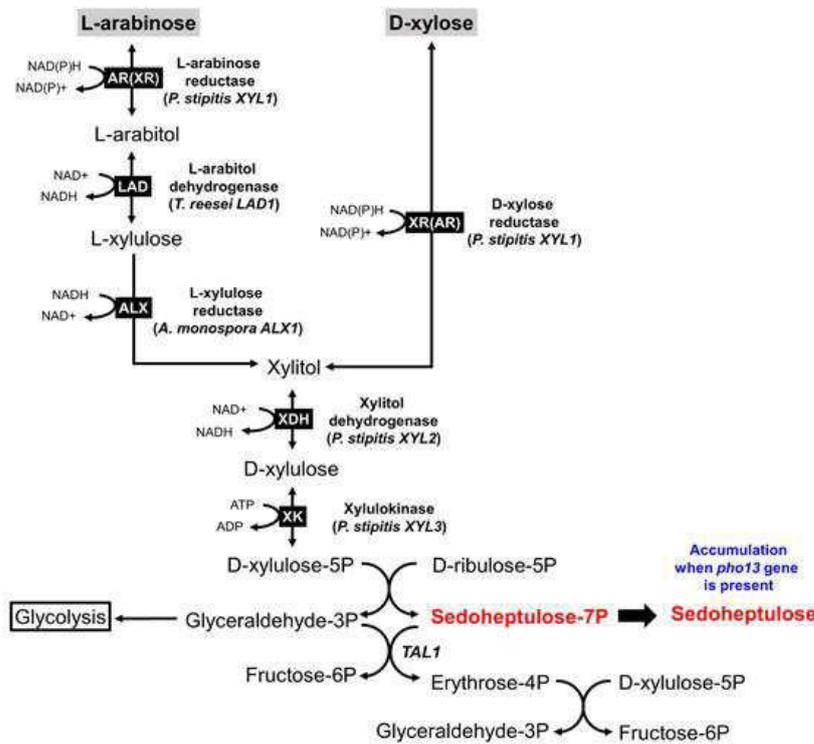
기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC93328P

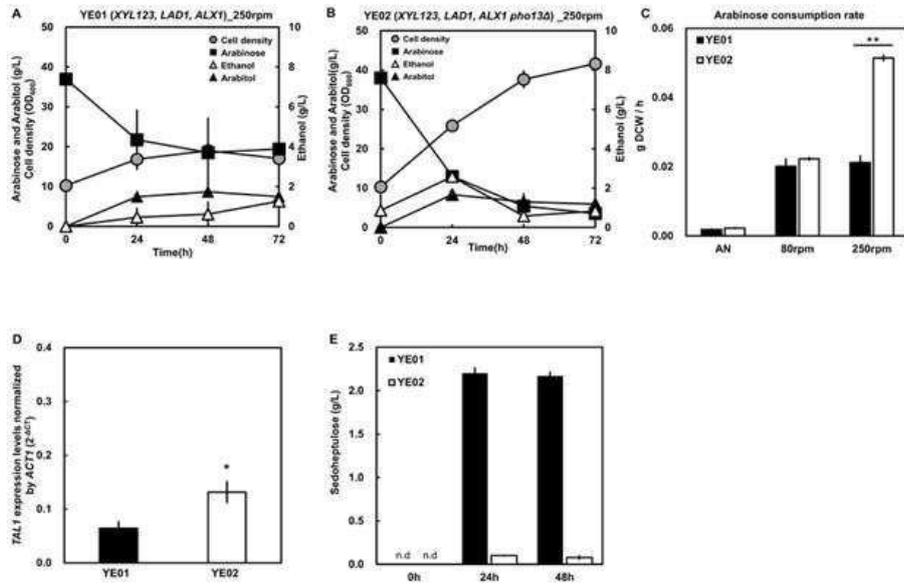
수탁일자 : 20190828

도면

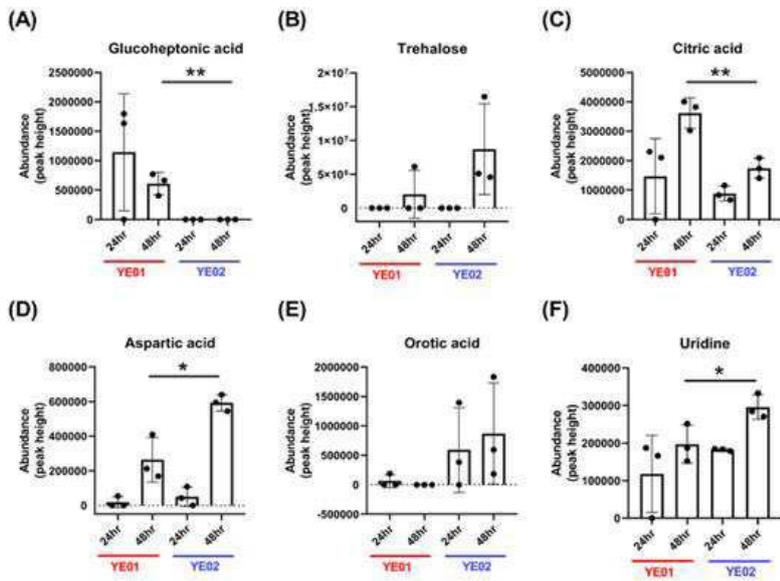
도면1



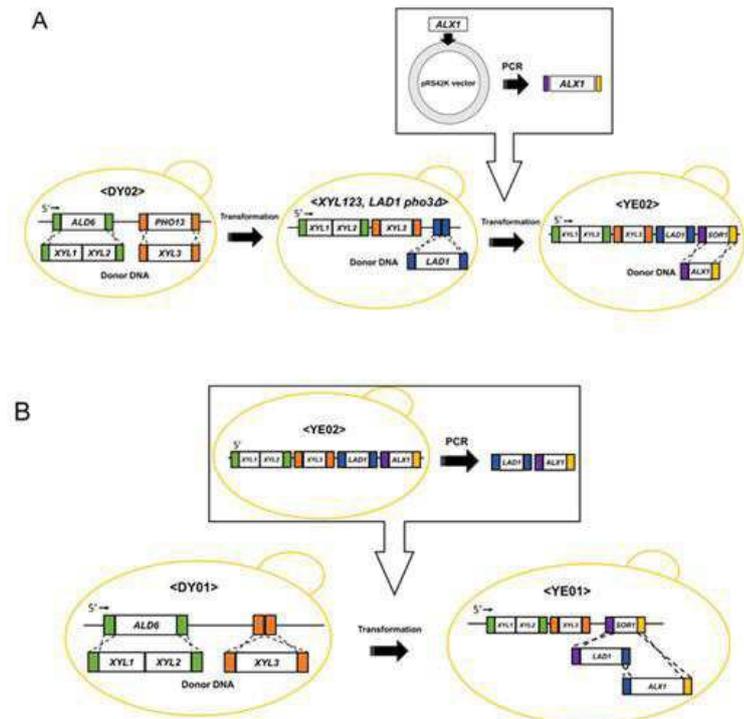
도면2



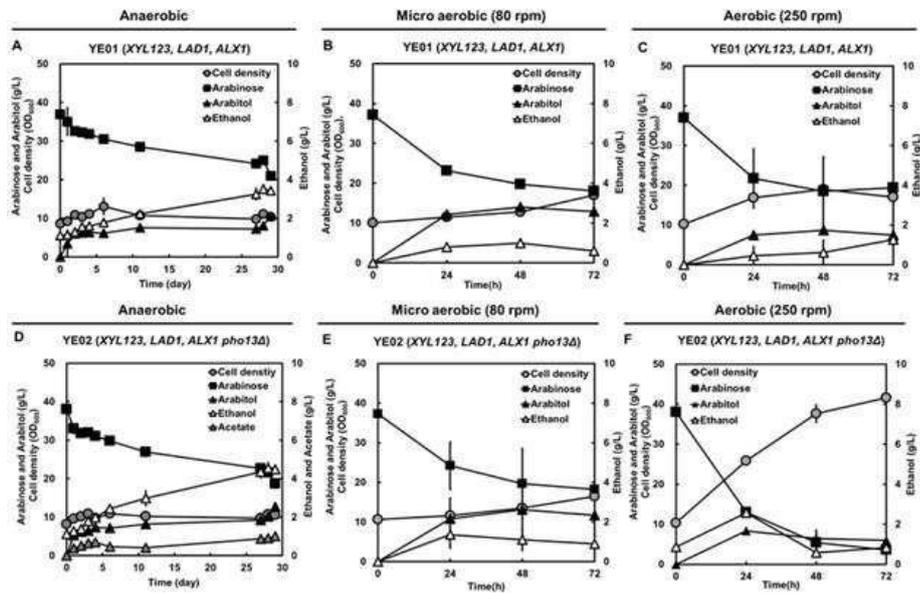
도면3



도면4



도면5



도면6

