

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2011/132890 A2

PCT

(43) 국제공개일
2011년 10월 27일 (27.10.2011)

(51) 국제특허분류:

C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) C12R 1/865 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002712

(22) 국제출원일: 2011년 4월 15일 (15.04.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0035853 2010년 4월 19일 (19.04.2010) KR
10-2011-0003479 2011년 1월 13일 (13.01.2011) KR
10-2011-0003476 2011년 1월 13일 (13.01.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]**; 서울 성북구 안암동 5가 1 고려대학교, 136-701 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **한성욱 (HAN, Sung Ok) [KR/KR]**; 서울 성북구 길음 1동 대우푸르지오아파트 210동 201호, 136-785 Seoul (KR). **유경옥 (YU, Kyung Ok) [KR/KR]**; 서울 강서구 가양동 58-2, 157-801 Seoul (KR). **김승욱 (KIM, Seung Wook) [KR/**

KR]; 서울 노원구 공릉동 737 삼익아파트 104-905, 139-240 Seoul (KR).

(74) 대리인: **구현서 (KOO, Hyun Seo)**; 서울 송파구 방이동 22 대우유토피아빌딩 1910호 수특허법률사무소, 138-050 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

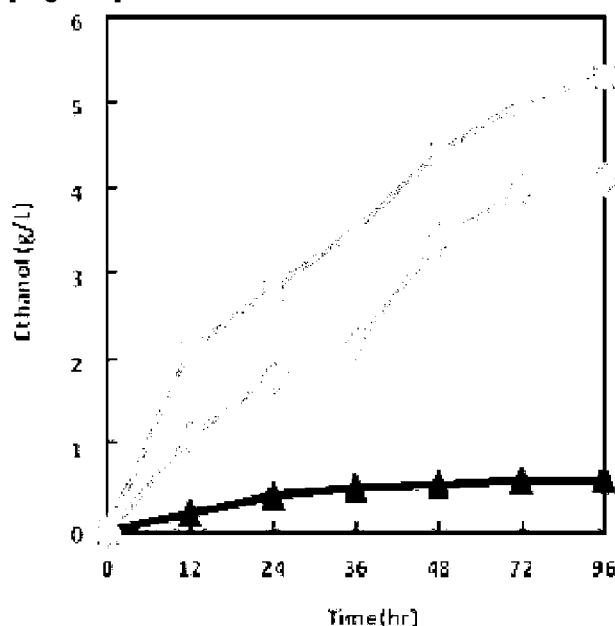
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: TRANSFORMANT FOR ENHANCING BIOETHANOL PRODUCTION, AND METHOD FOR PRODUCING ETHANOL BY USING SAID STRAIN

(54) 발명의 명칭 : 바이오 에탄올 생산 향상용 형질전환체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법

[Fig. 12]



(57) Abstract: The present invention relates to a transformant for inhibiting glycerol production through deletion of glycerol producing genes of *Saccharomyces cerevisiae* modified so as to use glycerol as a fermentation source, or enhancing bioethanol production through overexpression of TATA-binding proteins, SPT3 and SPT15, and a method for producing ethanol by using the transformant.

(57) 요약서: 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 생산 유전자의 결손을 통하여 글리세롤 생산을 저해시키거나, TATA 결합단백질 SPT3 와 15 의 과발현을 통하여 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것이다.

WO 2011/132890 A2



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 바이오 에탄올 생산 향상용 형질전환체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법

기술분야

- [1] 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 생산 유전자의 결손을 통하여 글리세롤 생산을 저해시키거나, TATA 결합단백질 SPT3와 15의 과발현을 통하여 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 에탄올은 현재 산업 용매로써 거대한 시장을 형성하고 있으며, 앞으로 자동차 등의 수송연료로 사용 가능성이 현실화되고 있어 지속적인 수요 증가가 예상되고 있다.
- [3] 글리세롤은 $C_3H_8O_3$ 로 $C_6H_{12}O_6$ 인 글루코오스 (glucose)에 비하여 1단계 환원된 물질로서 미생물의 대사 과정에서 보다 향상된 환원력을 제공할 수 있다. 발효를 통하여 생산되는 많은 물질이 그 대사과정에서 환원력을 요구하는 경우가 많기 때문에 글리세롤을 기질로 효과적으로 이용할 수 있다면, 원하는 발효산물의 수율 및 생산성의 향상을 가져 올 수 있다. 현재 바이오 디젤의 생산량이 늘어남에 따라 글리세롤의 생산량 늘어났기 때문에 가격이 급격히 하락하고 있는 실정이다. 상기한 바와 같이 바이오디젤의 생산량이 급증함에 따라, 부산물인 글리세롤의 생산도 늘어나 글리세롤을 포함하고 있는 부산물을 효과적으로 처리하는 문제가 발생할 것이다. 따라서 글리세롤을 이용하여 효과적으로 발효에 의해 유용한 발효산물을 생산할 수 있다면 많은 부속 효과를 가져 올 수 있다.
- [4] 본 발명자들에 의하여 사카로마이세스 세레비제에서의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산능이 증대된 형질전환체가 보고되었다 (Yu et al. Bioresour Technol. 101(11):4157-61(2010)). 상기 연구는 기존의 글리세롤을 효율적으로 이용하도록 개발되어진 균주의 개량을 통한 에탄올 생산능의 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비제에서의 에탄올 생산 시 약 10%정도의 부산물로 생산이 되어지는 글리세롤의 경로를 차단함으로써 에탄올 생산능의 증대를 이루었다.
- [5] 미생물에 의한 글리세롤의 생산에는 *S. cerevisiae*, *C. magnoliae*, *P. farinose*, *C. glycerinogens*와 같은 효모 균주, *B. subtilis* 와 같은 박테리아 및 *D. tertiolecta*와 같은 조류가 생산 균주로 알려져 있다. 글리세롤 생산 균주로 종래에 알려진 미생물에서 발견된 글리세롤 생합성 경로를 조작하여 제조되는 미생물을 사용할 수 있음이 알려져 있다. 일반적으로, 포도당과 같은 탄소 기질은 ATP의 존재하의 헥소키나제에 의하여 글루코즈-6-포스페이트로 전환된다.

글루코즈-6-포스페이트는 글루코즈-포스페이트 이소머라제에 의하여 프럭토즈-6-포스페이트로 전환되고, 다시 6-포스포프럭토키나제의 작용에 의하여 프럭토즈-1,6-디포스페이트로 전환된다. 상기 디포스페이트는 알돌레이즈에 의하여 디히드록시아세톤 포스페이트(DHAP)로 된다. 최종적으로 NADH-의존성글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제가 DHAP를 글리세롤-3-포스페이트(G3P)로 전환시키고, G3P는 다시 글리세롤-3-포스페이트 포스파타제에 의하여 탈인산화되어 글리세롤로 된다 (Hou J et al. Appl Microbiol Biotechnol. 85(4):1123-30.(2010)).

- [6] 종래 디히드로게나제가 DHAP를의 글리세롤 생합성 경로에 관여하는 유전자로서 DHAP를 글리세롤-3-포스페이트로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제를 코딩하는 유전자로서 GPD1이 알려져 있었다. 또한, 글리세롤-3-포스페이트를 글리세롤로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 포스파타제를 코딩하는 유전자로서 사카로마이세스 세레비지애의 GPP2가 알려져 있다.
- [7] 사카로마이세스 세레비제에서의 글리세롤 생산 경로는 디히드록시아세톤포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 에서 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, gpd)에 의하여 글리세롤-3-포스페이트로 전환된 후, 글리세롤-3-포스페이트에서의 글리세롤-3-포스페이트 포스파타제 (glycerol-3-phosphate phosphatase) 에 의하여 글리세롤로 전환되어지며 글리세롤 외분비 통로인 Fps1을 통하여 세포외부로 분비되어진다 (Oliveira et al. Biochim Biophys Acta. 27;1613(1-2):57-71(2003)).
- [8] 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지애에서의 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산 증대를 위하여 글리세롤 생산 유전자, 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 와 효모 글리세롤 채널 Fps1을 결손시켰으며 또한 글리세롤 업테이크 프로테인 (Gup1)이 삼투압에 대한 회복을 돕는다는 것을 확인하였으며 에탄올 생산량 증대를 이루었다.
- [9] 또한 본 발명자들은 TATA 접합 단백질을 과발현 함으로써 여러 동시 유전자 발현 변화를 유사하게 도입하여 전세포 조작을 용이하게 하기 위한 시그마 인자의 광역 조절 기능을 개발하였다.
- [10] 특히 에탄올 생성과 관계된 경우 진균, 및 그러한 진핵 세포에 관련된 RNA 폴리머라제 II 인자에 대해 광범위하게 적용될 수 있다. 표현형 특성, 특히 배양 배지에서 글리세롤(및 다른 당) 및/또는 에탄올의 내성, 및/또는 당업계에 공지된 다양한 공급원료로부터 세포에 의한 에탄올 생성의 개선을 위한, 다른 진핵 세포 및 이러한 세포의 상응하는 광역 전사 기구의 용도를 포함할 수 있다.
- [11] 따라서 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지애에서의 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산 증대를 위하여 TATA 결합 단백질(SPT3,15)를 과 발현 하여 에탄올 생산량 증대를

이루었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 글리세롤을 발효원으로 이용시 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모에서의 글리세롤 생산 경로를 차단하여 바이오에탄올 생산량이 증대될 수 있도록 개량되어진 균주를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 글리세롤을 발효원으로 이용시 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모에서 바이오에탄올 생산량이 증대될 수 있도록 개량되어진 균주를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [17] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel)의 유전자가 결손된 형질전환체를 제공한다.
- [18] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 1에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제에 포함된다.
- [19] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 유전자에 포함된다.
- [20] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 효모 글리세롤 채널 Fps1을 인코딩하는 FPS1은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 3에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 글리세롤 파실리테이터 채널 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 효모 글리세롤 채널에 포함된다.

- [21] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 효모 글리세롤 채널 Fps1을 인코딩하는 FPS1 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 4에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 효모 글리세롤 채널 유전자에 포함된다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유전자 결손된 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1은 바람직하게는 효모, 더욱 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [23] 본 발명의 형질전환체는 효모, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [24] 또한 본 발명은 a) 효모 글리세롤 채널 FPS1의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 효모 글리세롤 채널 FPS1의 1971에서 스탱 코돈까지의 서열이 포함된 리버스 프라이머로 도 8의 개열지도를 가지는 pPICZ 벡터 디엔에이를 주형으로 하여 PCR반응을 수행하여 Fps1 유전자의 시작 코돈과 스탱 코돈이 포함된 PCR 산물을 얻는 단계;b) 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 1324에서 스탱 코돈까지의 서열이 포함된 리버스 프라이머로 도 9의 개열지도를 가지는 pET28a 벡터 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 PCR 산물을 얻는 단계; 및 c) 상기 각각의 PCR 산물을 효모에 상동 재조합(homologous recombination) 하는 단계를 포함하는 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel) 유전자가 결손된 형질전환체 제조방법을 제공한다.
- [25] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 효모 글리세롤 채널 FPS1의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 효모 글리세롤 채널 FPS1의 1971에서 스탱 코돈까지의 서열이 포함된 리버스 프라이머는 각각 서열번호 5와 서열번호 6에 기재된 프라이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 1324에서부터 스탱 코돈이 포함된 리버스 프라이머는 각각 서열번호 7 및 서열번호 8에 기재된 프라이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [26] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 형질전환체에 글리세롤 디히드로게나제, 디히드로시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 추가로 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [27] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM11071P인 효모 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDak, pGup1Cas)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [28] 또한 본 발명은 사카로마이시스 세레비지에 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)를 코딩하는 유전자와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자를 함유하는 발현벡터 pGcyuDakAdhPdc를 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 피루브산 탈카르복실산 효소 (pyruvate decarboxylase)는 서열번호 17 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 17 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 피루브산 탈카르복실산 효소에 포함된다.
- [30] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 피루브산 탈카르복실산 효소 (pyruvate decarboxylase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 18에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 18에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 피루브산 탈카르복실산 효소 유전자에 포함된다.
- [31] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 알코올 탈수소화(alcohol dehydrogenase) 효소는 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 19에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 알코올 탈수소화 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 효소에 포함된다.
- [32] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 알코올 탈수소화(alcohol dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 20에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 20에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 알코올 탈수소화(alcohol dehydrogenase) 효소를 인코딩하는 유전자에 포함된다.
- [33] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 발현벡터는 도 11에 기재된 개열지도를 가지는 발현벡터 pGcyuDakAdhPdc인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [34] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 형질전환체에 사카로마이시스 세레비지에 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)를 코딩하는 유전자와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자 또는

사카로마이시스 세레비지에 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)를 코딩하는 유전자와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자를 함유하는 발현벡터 pGcyuDakAdhPdc를 더욱 포함하는 형질전환체를 제공한다.

- [35] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 형질전환체는 효모, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [36] 또한 본 발명의 상기 본 발명의 형질전환체의 제조방법에 의해 형성된 형질전환체에 c)단계 후에 추가적으로 재조합된 벡터 pGcyuDak, 및 pGupCas를 형질전환시키는 단계를 포함하는 글리세롤을 이용한 에탄올 생산용 형질전환체의 제조방법을 제공한다.
- [37] 상기 본 발명의 형질전환체 제조방법의 일 구체예에 있어서, 상기 재조합된 벡터 pGcyuDak, 및 pGupCas는 도 4 및 5에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [38] 또한 본 발명은 사카로마이시스 세레비지에 SPT(Suppressor of Ty)3와 SPT(Suppressor of Ty) 15(이하 각각 'SPT 3', 'SPT15'라 함) 유전자를 함유하는 발현벡터 pGupSpt3.15를 제공한다.
- [39] 본 발명의 일 구체예에 있어서, TATA 결합단백질 SPT3는 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 25에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 SPT3 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 SPT3에 포함된다.
- [40] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT3는 서열번호 26에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 26에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 SPT3 유전자에 포함된다.
- [41] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT15는 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 27에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 TATA 결합단백질 SPT15 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 TATA 결합단백질 SPT15에 포함된다.
- [42] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT15는 서열번호 28에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 28에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 TATA 결합단백질 SPT15 유전자에 포함된다.
- [43] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 본 발명의 발현벡터는 도 14에 기재된

개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [44] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 pGupSpt3.15 발현벡터를 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 형질전환체에 도입하여 제조된 형질전환체를 제공하고, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11153P인 형질 전환체 효모 사카로마이시스 세레비지에 YPH499(pGcyaDak, pGupSpt3.15Cas)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [45] 또한 본 발명은 글리세롤을 기질로 하여 본 발명의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산 방법을 제공한다.
- [46] 본 발명의 바람직한 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤은 바이오디젤의 부산물로 생성된 글리세롤인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [47] 또한 본 발명은 본 발명의 형질전환체를 포함하는 에탄올 생산용 조성물을 제공한다. 본 발명의 에탄올 생성물 조성물은 예를 들어 상기 형질전환체를 배양하여 글리세롤을 기질로 하여 에탄올을 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물, 정제 또는 정제되지 않은 효소 추출물 또는 폴리펩타이드 등을 포함한다.
- [48] 본 발명에서 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등이 이용가능하다. 프로모터로서는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다. 효모에의 재조합체 DNA의 도입방법으로서, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스펜도플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.
- [49] 또, 재조합벡터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 또 가진 것도 가능하다.
- [50] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다.
- [51] 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균 등의 세균을 숙주로 해서 얻게 된 형질전환체를 배양하는 배지로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 상기 언급한 적온의 범위에서 배양함으로써 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)와 디히드록시아세톤 키나아제 (dihydroxyacetone kinase) 또는 글리세롤 업테이크 프로테인 (glycerol uptake protein)을 균체 내에 축적시키고, 회수한다.
- [52] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 슈크로스,

말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다.

- [53] 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄 등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다.
- [54] 또, 프로모터가 유도성의 발현벡터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.
- [55] 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)와 디히드록시아세톤 키나아제 (dihydroxyacetone kinase) 또는 글리세롤 업테이크 단백질 (glycerol uptake protein)의 취득은, 얻게 되는 배양물 중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.
- [56] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 웨스턴블로팅 등에 의해 행할 수 있다.
- [57] 이하, 본 발명을 설명한다.
- [58] 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 생산 유전자의 결손을 통하여 부산물인 글리세롤 생산을 저해시킴으로써 주산물인 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)가 생산하는 글리세롤의 합성 경로인 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 2(glycerol dehydrogenase)와 효모 글리세롤 채널 Fps1p 를 인코딩하는 FPS1의 유전자를 결손 시켜 글리세롤의 생산량이 줄어들며 상대적으로 에탄올 생산능이 향상되어진 효모 형질 전환체 및 이들을 이용한 에탄올 생산 증대 방법에 대한 것이다.
- [59] 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 유래한 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 2(glycerol dehydrogenase)와 효모 글리세롤 채널 Fps1p 를 인코딩하는 FPS1의 유전자의 결손을 통한 글리세롤 생산능을 저해함으로써 에탄올 생산능이 증가된 이 균주에 글리세롤을

효율적으로 이용하는 유전자를 형질 전환시켜 기존의 형질전환체와 비교시 에탄올 생산능이 증가됨을 확인하였다. 또 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 유래한 글리세롤 업테이크 프로테인은 글리세롤에 대해 투과성과 삼투압에 대한 내성을 가지도록 도움을 주는 효소로써 글리세롤 생산능이 저해된 균주에서 글리세롤을 발효원으로 이용할 때 삼투압에 대한 내성을 가지도록 도움을 줄 수 있다.

[60] 또한, 본 발명에 따라 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 생산되어지는 글리세롤의 생산을 저해한 효모 형질 전환체는 공정에 유용하게 사용될 수 있다. 글리세롤을 기질로 한 발효결과 상기 유전자가 결손 되어진 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하였다.

[61] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[62] 사카로마이세스 세레비제에서의 글리세롤 생산 경로는 디히드록시아세톤포스페이트 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 에서 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *gpd*)에 의하여 글리세롤-3-포스페이트로 전환된 후, 글리세롤-3-포스페이트에서의 글리세롤-3-포스페이트 포스파타제 (glycerol-3-phosphate phosphatase) 에 의하여 글리세롤로 전환되어지며 글리세롤 외분비 통로인 *Fps1*을 통하여 세포외부로 분비되어진다. 본 발명에서는 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 조작되어진 균주에서의 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제와 효모글리세롤채널 *Fps1*유전자를 결손시킴으로써 에탄올 생산이 증대되었다.

[63] 본 발명의 실시예에서는 forward에 *Fps1*의 start codon에서부터 40mer까지의 유전자가 포함되어진 프라이머와 reverse에 *Fps1*의 stop codon이 포함되어진 프라이머를 이용하여 pPICZ 벡터 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 1.5kb의 PCR product를 얻었고, 얻어진 Zeocin내성을 가지도록 하는 유전자 PCR product를 효모에 homologous recombination 함으로써 *Fps1*유전자 결손 균주를 제작하였다. 또한 forward에 *Gpd2*의 start codon에서부터 40mer까지의 유전자가 포함되어진 프라이머와 reverse에 *Gpd2*의 stop codon이 포함되어진 프라이머를 이용하여 pET28a 벡터 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 1.5kb PCR product를 얻었고, 얻어진 Kanamycin내성을 가지도록 하는 유전자 PCR product를 효모에 homologous recombination 함으로써 *Fps1*, *Gpd2* 유전자 결손 균주를 제작하였다. 이후, 상기 *Gcy*와 *Dak*을 양방향 삽입한 재조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, *Gup1*의 유전자 삽입을 위하여 효모-유전자 삽입벡터 (yeast-integration vector)에 구축하였으며 이를 사카로마이세스 세레비지에에 유전자 삽입하였다. 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산을 조사하였다.

[64] 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환 된 YPH499*fps1*Δ*gpd2*Δ

- (pGcyaDak, pGup1Cas)에 의하여 에탄올 생산이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [65] 따라서 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산량의 증대를 위하여 본 발명자는 사카로마이시스 세레비지으로부터 유래한 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *gpd2*)와 글리세롤 외분비 통로인 효모 글리세롤 채널 Fps1의 유전자 결손, 그 균주에 글리세롤을 이용하도록 유전자 도입된 재조합 벡터의 형질 전환 및 글리세롤 업테이크 단백질 (Gup1)의 도입을 통하여 효모 형질 전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2010년 3월 10일 기탁번호 KCCM11071P로 기탁하였다. 뿐만 아니라 상기 효모 형질 전환체가 탄소원으로 글리세롤을 효율적으로 이용하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [66] 또한 사카로마이세스 세레비제에서의 글리세롤 생산 경로에 관여하는 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *gpd*)와 글리세롤 외분비 통로인 Fps1의 유전자를 결손 시킴으로 에탄올 생산 증대된 균주에서 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)의 과발현을 통하여 보다 더 증대된 에탄올 생산량이 증대되었다.
- [67] 본 발명의 실시예에서는 사카로마이세스 세레비지를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 PDC1와 ADH1 각각 1.6kb, 1.0kb의 PCR product를 얻었고, 얻어진 PCR product를 pGcyaDak 유전자에 클로닝하여 효모에 형질전환 함으로써 글리세롤 생산경로를 차단한 균주에의 삽입을 통하여 보다 에탄올 생산능이 증대된 균주를 제작하였으며 이후, Gup1의 유전자 삽입을 위하여 효모-유전자 삽입벡터(yeast-integration vector)에 구축하였으며 이를 사카로마이세스 세레비지에에 유전자 삽입하였다. 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산을 조사하였다.
- [68] 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환된 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyaDak, pGupCas)에 의하여 에탄올 생산이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [69] 따라서 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산량의 증대를 위하여 본 발명자는 사카로마이시스 세레비지으로부터 유래한 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 과발현하였고, 글리세롤 생산 경로가 차단되어진 균주에의 형질전환을 통하여 효모 형질 전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2010년 12월 17일 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyaDakAdhPdc,p

GupCas) 기탁번호 KCCM11152P로 기탁하였다.뿐만 아니라 상기 효모 형질 전환체가 탄소원으로 글리세롤을 효율적으로 이용하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[70] 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지에에서의 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산 증대를 위하여 글리세롤 생산 유전자, 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2와 효모 글리세롤 채널 *Fps1*을 결손시킨 형질전환체에서의 보다 높은 에탄올 생산능을 위하여 피루브산 탈카르복실산 효소와 알코올 탈수소화 효소 코딩하는 유전자를 도입한 형질전환체를 이용하였으며 에탄올 생산량 증대를 이루었다.

[71] 또한 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT3의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체 및 이들을 이용한 에탄올 생산 증대 방법에 대한 것이다.

[72] 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 유래한 TATA 결합단백질 SPT3와 SPT15를 인코딩하는 유전자의 과발현을 통한 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성을 증대시킴으로써 에탄올 생산능이 증가된 이 균주에 글리세롤을 효율적으로 이용하는 유전자를 형질 전환시켜 기존의 형질전환체와 비교시 에탄올 생산능이 증가됨을 확인하였다. 또한, 본 발명에 따라 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 생산되어지는 글리세롤의 생산을 저해한 효모 형질 전환체는 공정에 유용하게 사용될 수 있다. 글리세롤을 기질로 한 발효결과 상기 유전자 삽입된 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하였다.

[73] 본 발명의 실시예에서는 사카로마이세스 세레비지에를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 SPT3와 SPT15 각각 1.0kb, 0.7kb의 PCR product를 얻었고, 얻어진 PCR product를 효모에 형질전환 함으로써 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 과발현 균주를 제작하였다. 이후, 상기 *Gcy*와 *Dak*을 양방향 삽입한 재조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, *Gup1*의 유전자 삽입을 위하여 효모-유전자 삽입벡터(yeast-integration vector)에 구축하였으며 이를 사카로마이세스 세레비지에에 유전자 삽입하였다. 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산을 조사하였다.

[74] 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환 된 YPH499(pGcyDak,

- pGupSpt3.15Cas)에 의하여 에탄올 생산이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [75] 또한 이 효모 형질 전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2010년 12월 17일 기탁번호 KCCM11153P로 기탁하였다.

발명의 효과

- [76] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래의 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *gpd2*)와 글리세롤 외분비 통로인 효모 글리세롤 채널 *Fps1*의 유전자 결손을 통하여 글리세롤 생산을 억제하였으며 또한 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)와 디히드록시아세톤 키나아제 (dihydroxyacetone kinase) 유전자가 도입된 형질전환체에 글리세롤 업테이크 단백질 (glycerol uptake protein)을 유전자 삽입한 재조합 벡터를 효모 균주에 도입하였다. 이후, 상기 효모균주에 비하여 에탄올 생산수율이 높아진 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 조작되어진 균주에의 글리세롤 생산 유전자를 차단함으로써 제작되어진 효모 형질 전환체는 바이오디젤의 부산물로 생성이 되는 글리세롤을 이용하여 많은 양의 에탄올을 생산할 수 있어 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.
- [77] 또한 피루브산 탈카르복실산 효소와 알코올 탈수소화 효소를 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 증대되었으며, 이들 유전자를 상기 *gpd2*와 *Fps1*의 유전자 결손을 통하여 글리세롤 생산을 억제하고, 또한 글리세롤 디히드로게나제와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자가 도입된 형질전환체에 글리세롤 업테이크 단백질을 유전자 삽입한 효모 균주에 도입한 결과, 피루브산 탈카르복실산 효소와 알코올 탈수소화 효소를 포함한 형질전환체가 포함하지 않은 효모균주에 비하여 에탄올 생산수율이 더 높아진 것을 확인하였다.
- [78] 또한 TATA 결합단백질인 *SPT3*와 *SPT15*의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체의 경우에 이러한 결합단백질의 과발현을 유도하지 아니한 효모 균주에 비하여 에탄올 생산수율이 높아진 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [79] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 *FPS1*의 유전자 결손을 위한 homology arm의 확인을 위한 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, *Fps1*의 유전자 결손을 위하여 Zeocin 내성 유전자의 5'와 3'에 *Fps1* homology arm이 형성된 것 이며, Lane 3, *Gpd2*의 유전자 결손을 위하여 Kanamycin 내성 유전자의 5'와 3'에 *Gpd2* homology arm이 형성된 것을 확인한 그림을 나타낸다.
- [80] 도 2는 본 발명에서 제시된 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2

(glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 FPS1의 유전자 결손 방법을 나타낸 모식도이다.

- [81] 도 3(A)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 글리세롤 디히드로게나제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Gcy PCR 산물이며, 도 3(B)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 디히드록시아세톤 키나아제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Dak PCR 산물이며, 도 3(C)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Gup PCR 산물을 나타낸다.
- [82] 도 4는 본 발명에서 제시된 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pGcyuDak의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,
- [83] 도 5는 본 발명에서 제시된 글리세롤 업테이크 프로테인의 유전자 삽입을 위하여 구축한 재조합 벡터 pGup의 재조합 과정을 나타낸 모식도이다.
- [84] 도 6은 본 발명에서 제시된 유전자 결손 균주 YPH499fps1Δgpd2Δ의 삼투압에 대한 영향을 나타낸 그림으로 삽입된 pGup1cas에 의하여 삼투압에 의한 회복능력을 확인한 그림이다. 도 6에서 사용되어진 배지는 (A) glycerol을 carbon source로 한 배지 (B) YPD 배지에 1 M NaCl, 10 mM glycerol이 첨가된 배지. Lane1, YPH499 (pESC-TRP), lane2, YPH499fps1Δgpd2 (pESC-TRP), lane3, YPH499fps1Δgpd2 (pGcyuDak), lane4, YPH499fps1Δgpd2Δ(pGcyuDak,pGupCas)을 나타낸다.
- [85] 도 7은 본 발명에서 제시된 유전자 결손된 균주에 재조합 벡터 pGcyuDak, pGup를 형질전환하여 glycerol을 기질로 하여 에탄올 생산량이 증대됨을 생산함을 확인한 그래프이다. 도 7에서 심벌은 squares, YPH499 (pGcyuDak,pGupCas)
- [86] ;diamonds, YPH499fps1Δgpd2Δ(pGcyuDak,pGupCas)을 나타낸다.
- [87] 도 8은 pPICZ 벡터의 개열지도를 나타내고,
- [88] 도 9는 pET28a 벡터의 개열지도를 나타낸다.
- [89] 도 10은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 인코딩하는 유전자를 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, PDC1, Lane 3, ADH1 유전자를 확인한 그림을 나타낸다.
- [90] 도 11은 본 발명에서 제시된 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pGcyuDak에 유전자 삽입하는 재조합 과정을 나타낸 모식도를 나타낸다.

- [91] 도 12는 본 발명에서 제시된 유전자 결손된 균주에 재조합 벡터 pGcyuDakAdhPdc, pGup를 형질전환하여 glycerol을 기질로 하여 에탄올 생산량이 증대됨을 생산함을 확인한 그래프이다. 도 5에서 심벌은 검은색 ▲, YPH499 (pESC-TRP); 푸른색 ◆, 사카로마이시스 세레비지에 YPH499 *fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDak, pGupCas); 붉은색 ■, 사카로마이시스 세레비지에 YPH499 *fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDakAdhPdc, pGupCas)을 나타낸다.
- [92] 도 13은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 TATA 결합 단백질 SPT3와 SPT15의 유전자 확인을 위한 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, SPT3 이며, Lane 3, SPT15을 확인한 그림을 나타낸다.
- [93] 도 14는 본 발명에서 제시된 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15가 글리세롤 업테이크 단백질 유전자가 구축 재조합 벡터 pGup에 삽입된 재조합 벡터 pGupSpt3.15Cas의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,
- [94] 도 15는 본 발명에서 제시된 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드로시아세톤 키나아제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pGcyuDak의 재조합 과정을 나타낸 모식도이며,
- [95] 도 16은 본 발명에서 제시된 TATA 결합단백질 SPT3, SPT15의 과발현 벡터에 pGcyuDak를 형질전환하여 glycerol을 기질로 하여 에탄올 생산량이 증대됨을 생산함을 확인한 그래프이다. 도 16에서 심벌은 ◆, YPH499 (pESC-TRP); ■, YPH499 (pGcyuDak, pGupCas); ▲, YPH499 (pGcyuDak, pGupSpt3Cas); X, YPH499 (pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [96] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [97] 실시예 1: 효모의 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, gpd2), 효모 글리세롤 채널 Fps1 유전자의 결손
- [98] 글리세롤의 생산 경로의 차단을 위하여 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, gpd2), 효모 글리세롤 채널 Fps1 유전자의 결손을 위하여 forward (5'-atgagtaatcctcaaaaagctctaaacgactgagccatattcaacgg
- [99] gaaacgtcttgctcagtttcatttgatgctcgatgagttttccattatggtaatgctaagaaggtacatga-3; 서열번호 5)에 Fps1의 start codon에서부터 40mer까지의 유전자를 포함시켰으며 reverse(5'-gtcaaaagtaaaactacgagctactcaaaaaggtaataccattactattcttccattgtacttcatgttaccttcttaccattacataatggaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactg-3'; 서열번호 6)에 Fps1의 stop codon이 포함시켰으며 pPICZ 벡터 (Invitrogen, USA ; 도7a) 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 1.5kb의 양 옆에 각각 Fps1 유전자의 start codon과 stop codon이 포함되어졌으며 Zeocin 내성을 가지는 PCR product를 얻었고,

- [100] 또한 같은 방법으로 Gpd2의 유전자 결손을 위하여 forward
(5'-atgcttgctgtcagaagattaacaagatacacattccttagtggtgacaa
- [101] ttaatcatcggcatagtatagggadgctcgaaggctttaatttgcaagct-3;서열번호 7),reverse
(5'-attgaagagctagacatcgatgacgaatagccctgcgagctccgaaattaaacgttcgataacttcgtagct
actgcttattattcgtcatcgatgtctagctcttcaatagcttgcaaattaaagccttcgagcgtcccc;서열번호 8)
프라이머를 이용하여 pET28a 벡터(Invitrogen, USA ; 도7b) 디엔에이를 주형으로
한 PCR반응을 통하여 1.5kb PCR product를 얻었고,
- [102] 얻어진 Kanamycin내성을 가지도록 하는 유전자와 5'와 3'에 Gpd2에 유사성을
가지는 부위를 첨가함으로써 각각의 PCR product를 효모 YPH499 (*MATa*
ura3-52lys2-801_amberade2-101_ochretrp1-Δ63his3-Δ200leu2-Δ1) (Clontech
Laboratories, Inc.) homologous recombination 함으로써 Fps1, Gpd2 유전자 결손
균주를 제작하였다. 이후, Zeocin, Kanamycin이 포함된 YPD배지 (1% yeast
extract, 2% Bacto peptone, and 2% glucose, 2% agar)를 이용하여 유전자 결손된
균주를 선별하였으며 유전자 결손을 위한 PCR 밴드 및 유전자 결손 방법을
도식화하여 도면 1, 2에 각각 도시하였다. 이를 사카로마이시스 세레비지에
YPH499*fps1Δgpd2Δ* 라 명명하였다.
- [103]
- [104] <실시예 2> 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤
업테이크 프로테인 유전자의 형질전환
- [105] <실시예 2-1> 효모의 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제,
글리세롤 업테이크 프로테인 유전자의 증폭
- [106] 글리세롤을 해당과정의 중간물질인 DHAP로 효율적으로 전환하기 위하여
글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제 유전자를 클로닝하기
위하여 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이 (BY4741)로부터
펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 Gcy의 클로닝을 위하여 *BamH* (5-
ggatccatgcctgctactttacatga
- [107] ttct-3;서열번호 9), *SalI* (5-gtcgacatacttgaatacttcgaaaggag-3;서열번호 10), *Dak*는
Spe (5-actagtatgtccgctaaatcgtttgaagtc-3;서열번호 11), *Cla*(5-
atcgatatacaaggcgcttgaacccccctt-3;서열번호 12) 그리고 Gup1에는 *EcoR*(5-
gaattcatgtcgtgatcagcatcctg-3;서열번호 13), *Spe*(5-actagtccagca
- [108] ttttaggtaaattccgtg-3;서열번호 14)으로 각각의 인식서열이 삽입되도록
프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여
PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 936bp, 1755bp 그리고 1683bp의 PCR 밴드를
확인할 수 있었고 도면 3에 각각 도시하였다.
- [109]
- [110] <실시예 2-2> 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제,
글리세롤 업테이크 프로테인 유전자의 클로닝
- [111] 상기 실시예 1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고

아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.

- [112] 그 후, Gcy는 *BamH*, *Sal*, Dak는 *Spe*, *Cla* 그리고 Gup1은 *EcoR*, *Spe*으로 절단한 후 효모-대장균 셔틀 벡터 (yeast-*E. coli* shuttle vector) 인 pESC-trp (Clontech) 에 라이게이션 (ligation) 시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) DH5a에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각 pESC-Gcy, pESC-Dak, pESC-Gup이라 명명하였다. 그 후 pESC-Gcy를 벡터로 하여 Dak를 클로닝하여 에스세리시아 콜라이 DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pGcyDak이라 명명하였고 도면 4에 도시하였다. 또한 pESC-Gup1을 유전자 삽입하기 위하여 *BamH*1 인식서열을 포함하도록 sense primer (5-ggatccatgt cagcatttaggttaaattccgtg-3;서열번호 15) 그리고 anti-sence primer (5-ggatccataatgtcgctgatcagcatcctg tct-3;서열번호 16)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터 (yeast integration vector)인 YIP-5에 클로닝하여 이를 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이에 유전자 삽입하였다.
- [113] 재조합된 벡터 pGcyDak, pGupCas를 유전자 결손된 균주(YPH499*fps1Δgpd2Δ*)에 클론테크 (clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)에 Zeocin과 Kanamycin을 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyDak, pGupCas)라 명명하였다.
- [114] <실시예 3> 효모의 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자의 형질전환
- [115] <실시예 3-1> 효모의 PDC1과 ADH1의 유전자의 증폭
- [116] 피루브산에서 에탄올로의 전환을 위하여 작용하는 두가지 핵심 효소인 PDC1과 ADH1의 과발현을 통한 에탄올 생산의 증대를 위하여 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이 (BY4741)로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 PDC의 클로닝을 위하여 *Pst*(5-ctgcagatga gttatactgt cggtacctat-3;서열번호 21), *Sph*(5-ttcggacaat tgttcgagga gatccgtacg-3;서열번호 22), ADH는 *Xba* (5-tctagaatgg ctcttcaac ttttatatt-3;서열번호 23), *Sal*(5-cttgagaagg actcgcgaaa gattcagctg-3;서열번호 24) 으로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 1.6kb, 1.0kb의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 10에 각각 도시하였다.
- [117]
- [118] <실시예 3-2> 효모의 PDC1과 ADH1의 유전자의 클로닝

- [119] 상기 실시예 3-1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [120] 그 후, PDC1은 *Pst*, *Sph* ADH1는 *Xba*, *Sal*로 절단한 후 각각의 제한효소로 절단한 후 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)와 디히드록시아세톤 키나아제 (dihydroxyacetone kinase)의 유전자가 양방향 삽입되어진 pGcyuDak에 라이게이션(ligation) 시켜 대장균(*E. coli*) DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각 pGupCaspGcyuDakAdhPdc이라 명명하였으며 이를 도11에 도식화 하였다.
- [121] 재조합된 벡터 pGcyuDakAdhPdc, pGupCas를 글리세롤 생산경로가 차단되어진 돌연변이체 균주(YPH499*fps1gpd2*)에 클론테크 (clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)을 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDakAdhPdc, pGupCas)라 명명하였다.
- [122] <실시예 4> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 형질전환
- [123] <실시예 4-1> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 증폭
- [124] 글리세롤을 기질로 이용한 에탄올 생산시에 저해 인자인 에탄올 내성 및 삼투압에 대한 내성의 증대를 위하여 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이 (BY4741)로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 SPT3의 클로닝을 위하여 *Spe*(5-actagtcctcg ccgccaccaa ggagatgatg gacaagcata agta-3;서열번호 29), *Spe*(5-actagtctac atgataattg gtttag-3;서열번호 30), SPT15는 *Bgl*(5-agatctcccg ccgccaccaa ggagatggcc gatgaggaac gttt-3;서열번호 31), *Bgl*(5-agatcttcac attttctaa attcactta-3;서열번호 32) 으로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 1.5kb, 0.7kb의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 13에 각각 도시하였다.
- [125]
- [126] <실시예 4-2> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 클로닝
- [127] 상기 실시예 4-1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [128] 그 후, SPT3은 *Spe* Dak는 *Bgl*로 절단한 후 제한효소 *Spe*1, *Bgl*으로 절단한 후 글리세롤 업테이크 프로테인이 삽입되어진 pGup1 에 라이게이션(ligation) 시켜

대장균(*E. coli*) DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각 pGupSpt3, pGupSpt3.15이라 명명하였으며 이를 14에 도식화 하였다.

- [129] 또한 pGupSpt3.15을 유전자 삽입하기 위하여 *Bam*H1 인식서열을 포함하도록 sense primer (5-ggatccatgt cagcatttttaggtaaattccgtg-3; 서열번호 15) 그리고 anti-sense primer (5-ggatccataatgtcgtgatcagcatctg tct-3; 서열번호 16)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터 (yeast integration vector)인 YIP-5(ATCC)에 클로닝하여 이를 pGupSpt3.15Cas이라 명명하였으며 도 14에 도식화하였으며 이를 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이에 유전자 삽입하였다. 재조합된 벡터 pGupSpt3.15Cas를 야생형의 균주(YPH499, Clontech Laboratories Inc.)에 클론테크 (clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)을 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499(pGcyaDak, pGupSpt3.Spt15Cas)라 명명하였다.

[130]

- [131] <실시예 5> 글리세롤 생산 경로가 차단되어진 균주에서의 삼투압에 대한 영향 측정

- [132] 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2와 효모 글리세롤 채널 Fps1 유전자가 결손되어진 균주에서의 삼투압에 대한 영향을 측정하기 위하여 각각의 서로 다른 배지에서 Growth test를 시행하였다. 균주를 glucose를 carbon source로 이용하는 배지에서 배양 후 OD600에서 1까지로 희석한 후 1/10로 각각 희석하여 10ul씩 분주하여 colony 생성을 확인한다. 삼투압에 대한 영향을 확인하기 위하여 NaCl의 농도를 늘려가며 이용하였다. 이 결과를 도면 6에 도시하였다.

[133]

- [134] <실시예 6> 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

- [135] 상기 실시예 2에서 제조된 YPH499*fps1*Δ*gpd2*(pGcyaDak, pGupCas)와 YPH499(pGcyaDak, pGupCas)를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 2%의 글리세롤이 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 1가 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30°C, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실험결과 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 와 효모 글리세롤 채널 Fps1 유전자가 결핍되어진 YPH499*fps1*Δ*gpd2*Δ(pGcyaDak, pGupCas)에서의 에탄올 생산수율이 YPH499 (pGcyaDak, pGupCas)보다 높게 측정이 되었다. 이 결과를 도면 7에 도시하였다.

[136] <실시예 7> 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

[137] 상기 실시예 2에서 제조된 사카로마이스스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDak, pGupCas)와 상기 실시예 3에서 제조된 사카로마이스스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDakAdhPdc, pGupCas)를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 2%의 글리세롤이 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 1가 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30°C, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)유전자 과발현되어진 균주 사카로마이스스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* YPH499 *fps1gpd2*(pGcyuDakAdhPdc, pGupCas)에서의 에탄올 생산수율이 사카로마이스스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDak, pGupCas)보다 높게 측정이 되었다. 이 결과를 도면 12에 도시하였다.

[138]

[139] <실시예 8> 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

[140] YPH499(pGcyuDak, pGupCas)와 상기 실시예 4에서 제조된 YPH499(pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 2%의 글리세롤이 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 1가 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30°C, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 TATA 결합 단백질이 과발현되어진 균주에서의 에탄올 생산수율이 YPH499 (pGcyuDak, pGupCas)보다 높게 측정이 되었다. 이 결과를 도면 16에 도시하였다.

[141]

출원인 또는 대리인
과연 접수번호 PCT11002

국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허법규약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____ 16 _____ 쪽, _____ 18-19 _____ 쪽에 기재된 기
탁된
미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.

B. 기탁물의 확인 이의의 추가시 기탁물은 다음 번호의 페이지에 기재
기탁기관의 명칭
한국미생물보존센터

기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함)

120-091 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 3층

기탁일자 2010년 3월 10일

기탁번호 KCCM11071P

C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 번호의 추가 페이지 계속

기탁자에 의한 식별표지:
Saccharomyces cerevisiae YPH499/*ps1-Δgnd2*Δ(pGeyaduk, pGup1Cas)

D. 표시사항이 지정되고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)

E. 표시사항의 번호 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)

하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일련의 상전은 '무정함' 것)

수리관청 사용란

당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음

담당관

국제사무국 사용란

당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음

담당관

Form PCT/RY/134 (July 1998; reprint January 2004)

출원인 또는 대리인
최현 환(최현호) PCT11002

국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(식허위타조약 규약 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____ 18 _____ 쪽, _____ 3-4 _____ 중에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.

B. 기탁물의 확인 이의의 추가지 기탁물은 다음 번호의 페이지에 기재된 기탁기관의 명칭

한국미생물보존센터

기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함)

120-021 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제1동 361-221 유단빌딩 3층

기탁일자 2010년 12월 17일

기탁번호 KCCM11152P

C. 추가지 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 번호의 추가 페이지 계속

기탁자에 의한 식별표지:
Saccharomyces cerevisiae Cyl499 *pts1Δgal2Δ*(pGycalokA-dhPdc, pGlcCas)

D. 표시사항이 지정되고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)

E. 표시사항의 번호 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)

하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출된 것임(표시사항의 일만시 상전을 부정한 것)

수리관청 사용란

당해 용지는 국제출원인 하에 접수되었음

담당관

국제사무국 사용란

당해 용지는 국제출원인 하에 접수되었음

담당관

Form PCT/RO/T34 (July 1998; reprint January 2004)

출원의 또는 대리의
화인: 김준원호 PCT11002

국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허법 제36조 제13호의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____ 19 _____ 쪽, _____ 214 _____ 중에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.

B. **기탁물의 확인** 이와의 추가지 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재된 기탁기관의 명칭, 한국미생물보존센터

기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함)

120-081 대한민국 서울특별시 서대문구 홍재1동 361-221 유원빌딩 3층

기탁일자 2010년 12월 17일

기탁번호 KCCM11153P

C. 추가지 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 제출

기탁자에 의한 식별표지:
Saccharomyces cerevisiae (YPI499(pGlyadlak, pGupSp13, 15Cas))

D. 표시사항이 지정되고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)

E. 표시사항의 별도의 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)

하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 알면 지 않음을 투명한 것)

수리원장 사용란

당해 용지: 국제출원제 함께 접수되었음

담당관

국제사무국 사용란

당해 용지: 국제출원제 함께 접수되었음

담당관

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

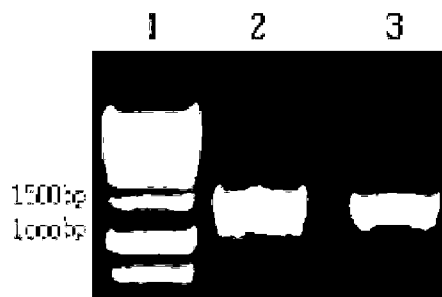
청구범위

- [청구항 1] 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel)의 유전자가 결손된 형질전환체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지고, 상기 효모 글리세롤 채널 FPS1는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지고, 상기 효모 글리세롤 채널 FPS1는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 가지는 형질전환체.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질전환체는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)인 형질전환체.
- [청구항 5] a) 효모 글리세롤 채널 FPS1의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 효모 글리세롤 채널 FPS1의 1971에서 스탱 코돈까지의 서열이 포함된 리버스 프라이머로 도 8의 개열지도를 가지는 pPICZ 벡터 디엔에이를 주형으로 하여 PCR반응을 수행하여 Fps1 유전자의 시작 코돈과 스탱 코돈이 포함된 PCR 산물을 얻는 단계;
- b) 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 1324에서 스탱 코돈까지의 서열이 포함된 리버스 프라이머로 도 9의 개열지도를 가지는 pET28a 벡터 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 PCR 산물을 얻는 단계; 및
- c) 상기 각각의 PCR 산물을 효모에 상동 재조합(homologous recombination) 하는 단계를 포함하는 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel) 유전자가 결손된 형질전환체 제조방법.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 효모 글리세롤 채널 FPS1의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 효모 글리세롤 채널 FPS1의 스탱 코돈이 포함된 리버스 프라이머는 각각 서열번호 5 및 서열번호 6에 기재된 프라이머인

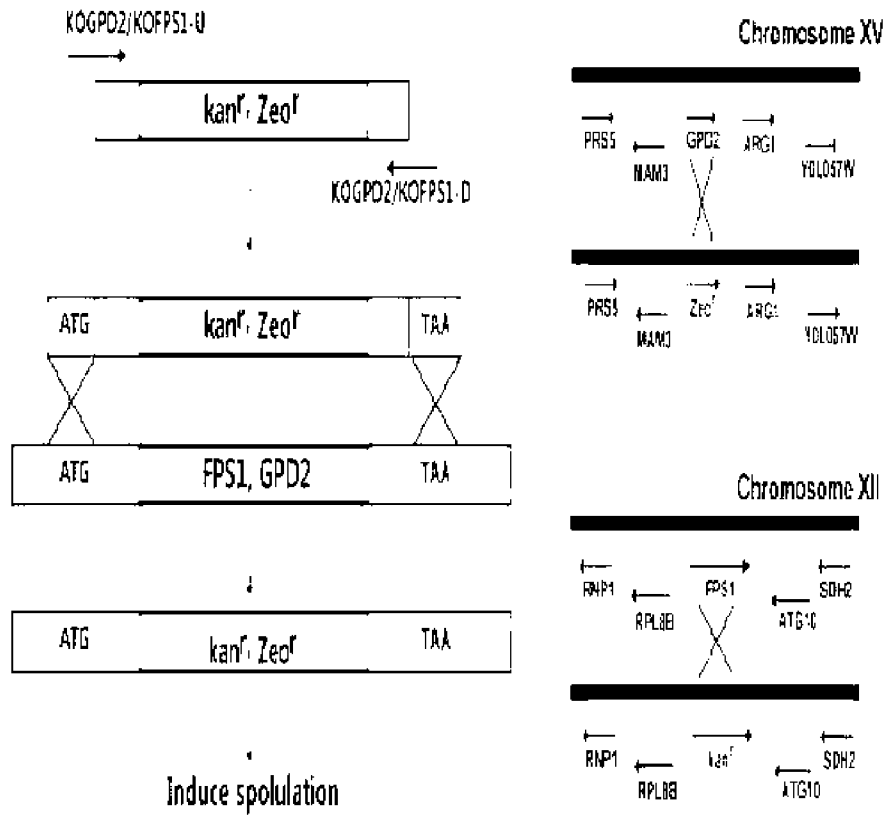
- [청구항 7] 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel) 유전자가 결손된 형질전환체 제조방법. 제 5항에 있어서, 상기 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 시작 코돈에서부터 40여까지의 유전자를 포함한 포워드 프라이머 및 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)의 스탑 코돈이 포함된 리버스 프라이머는 각각 서열번호 7 및 서열번호 8에 기재된 프라이머인 글리세롤-3-포스페이트 디히드로게나제2 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase2)와 효모 글리세롤 채널 FPS1을 인코딩하는 FPS1 (glycerol facilitator channel) 유전자가 결손된 형질전환체 제조방법.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 형질전환체에 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 추가로 포함하는 형질전환체.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11071P인 사카로마이시스 세레비지에 YPH499*fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDak, pGupCas) 형질전환체.
- [청구항 10] 제1항 또는 제8항 중 어느 한 항의 형질전환체에 사카로마이시스 세레비지에 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)를 코딩하는 유전자와 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자를 더욱 포함하는 형질전환체.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 가지고, 상기 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)는 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 피루브산 탈카르복실산 효소(pyruvate decarboxylase)는 서열번호 18에 기재된 염기 서열을 가지고, 상기 알코올 탈수소화 효소(alcohol dehydrogenase)는 서열번호 20에 기재된 염기서열을 가지는 형질전환체.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11152P인 형질 전환체 효모 사카로마이시스 세레비지에 YPH499 *fps1Δgpd2Δ* (pGcyuDakAdhPdc,pGupCas)인 형질전환체.
- [청구항 14] 사카로마이시스 세레비지에 SPT(Suppressor of Ty)3와 SPT15 유전자를 함유하는 발현벡터 pGupSpt3.15.
- [청구항 15] 제 14항의 발현벡터를 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 형질전환체에 도입하여 제조된 형질전환체.

- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11153P인 형질 전환체 효모 사카로마이시스 세레비지에 YPH499(pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)인 형질전환체.
- [청구항 17] 글리세롤을 기질로 하여 제8항, 제10항 또는 제15항의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 글리세롤을 이용한 에탄올 생산 방법.
- [청구항 18] 제8항, 제10항 또는 제15항의 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물.

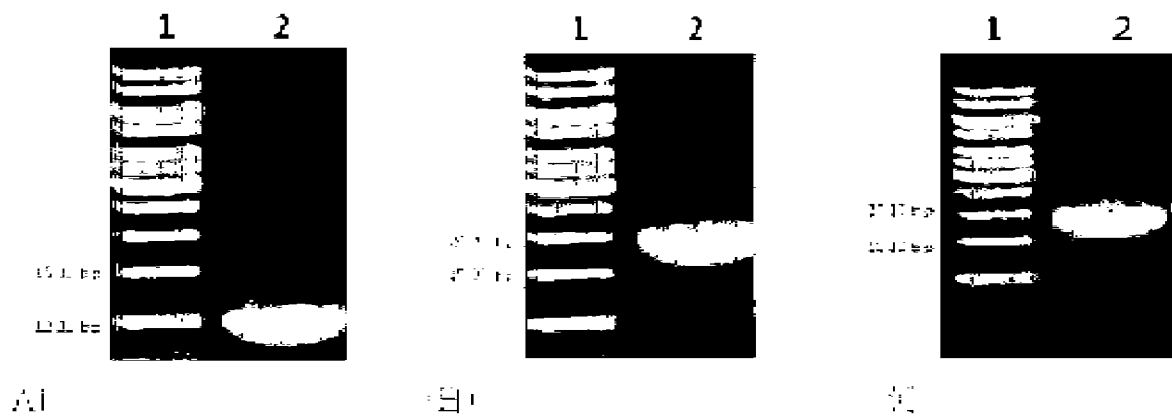
[Fig. 1]



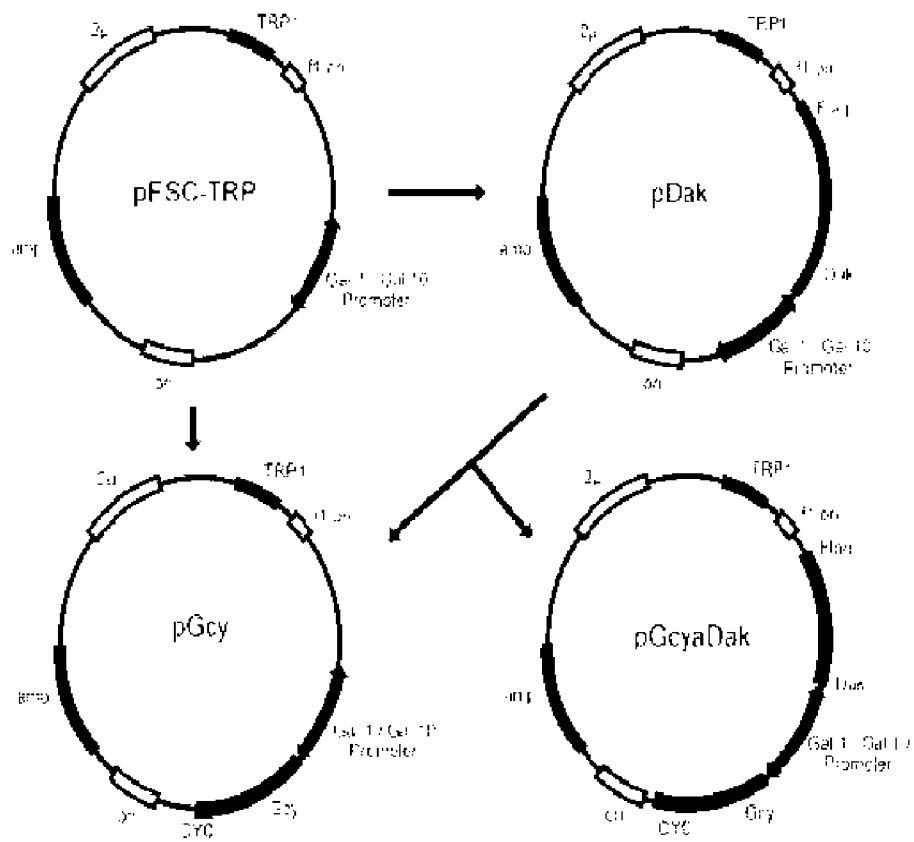
[Fig. 2]



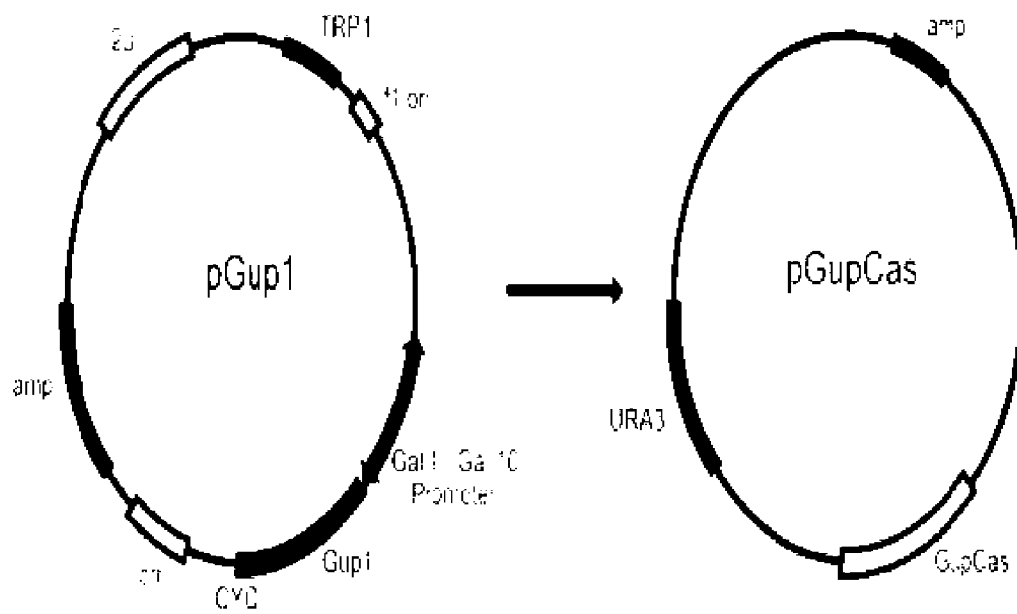
[Fig. 3]



[Fig. 4]



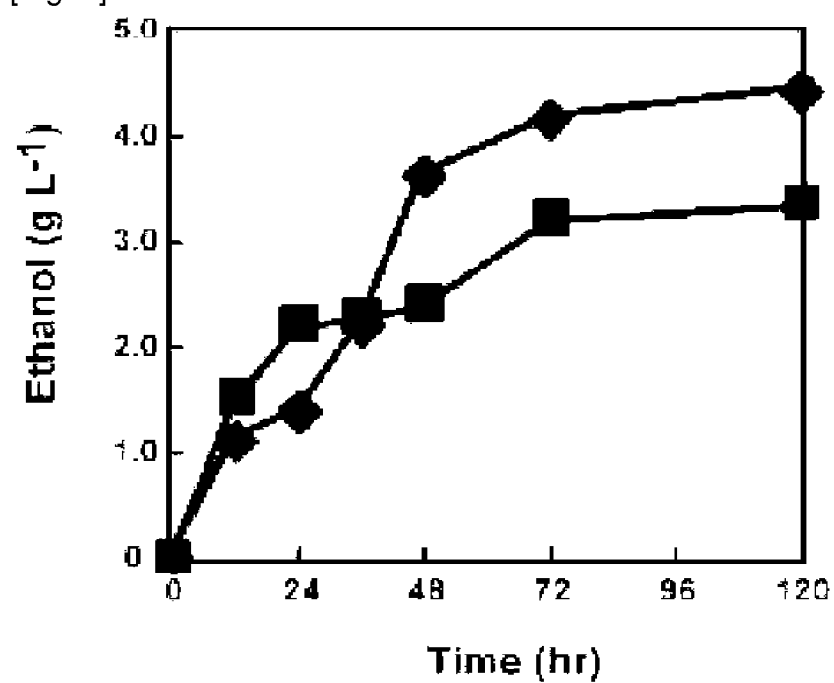
[Fig. 5]



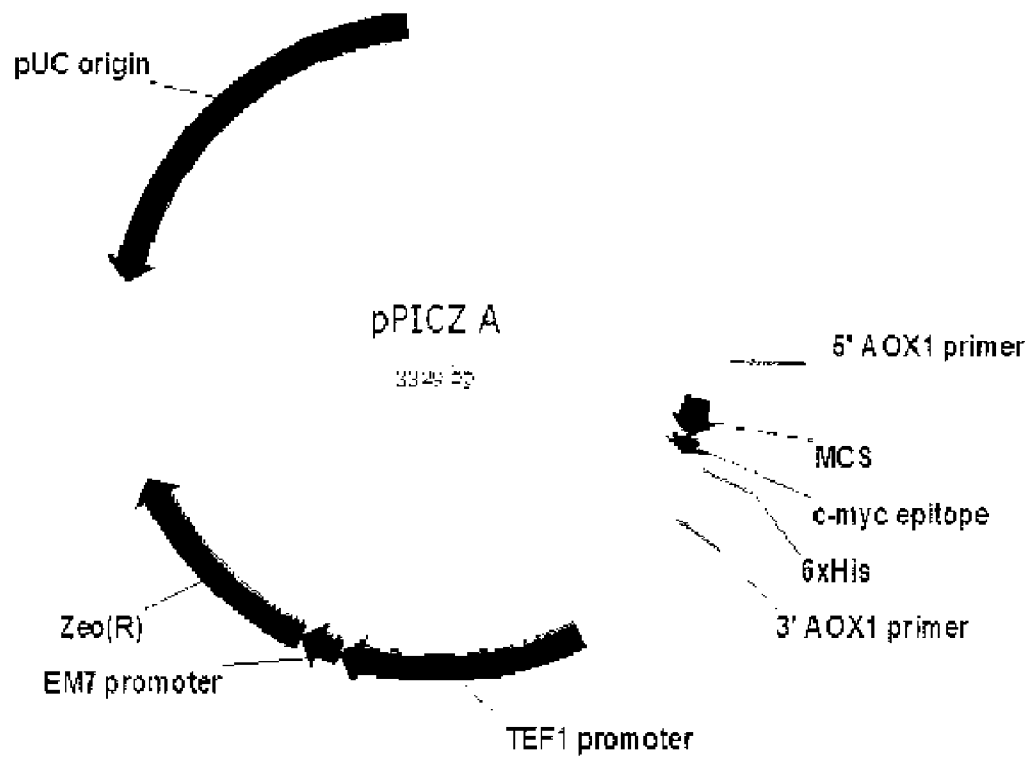
[Fig. 6]

(A)**(B)**

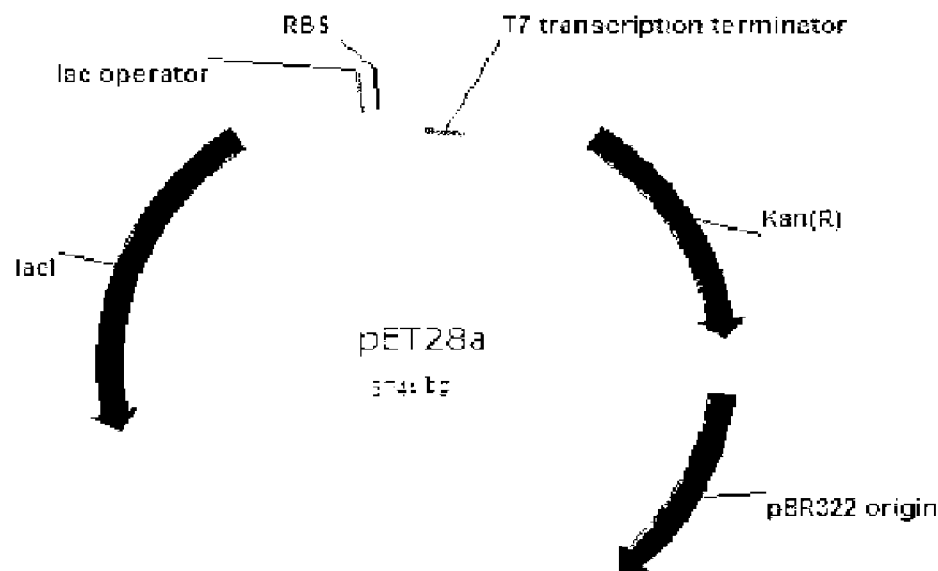
[Fig. 7]



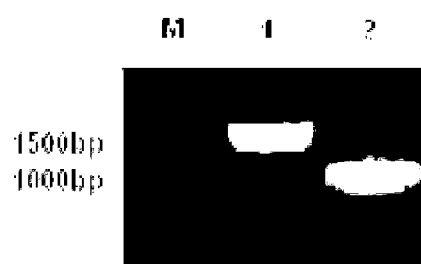
[Fig. 8]



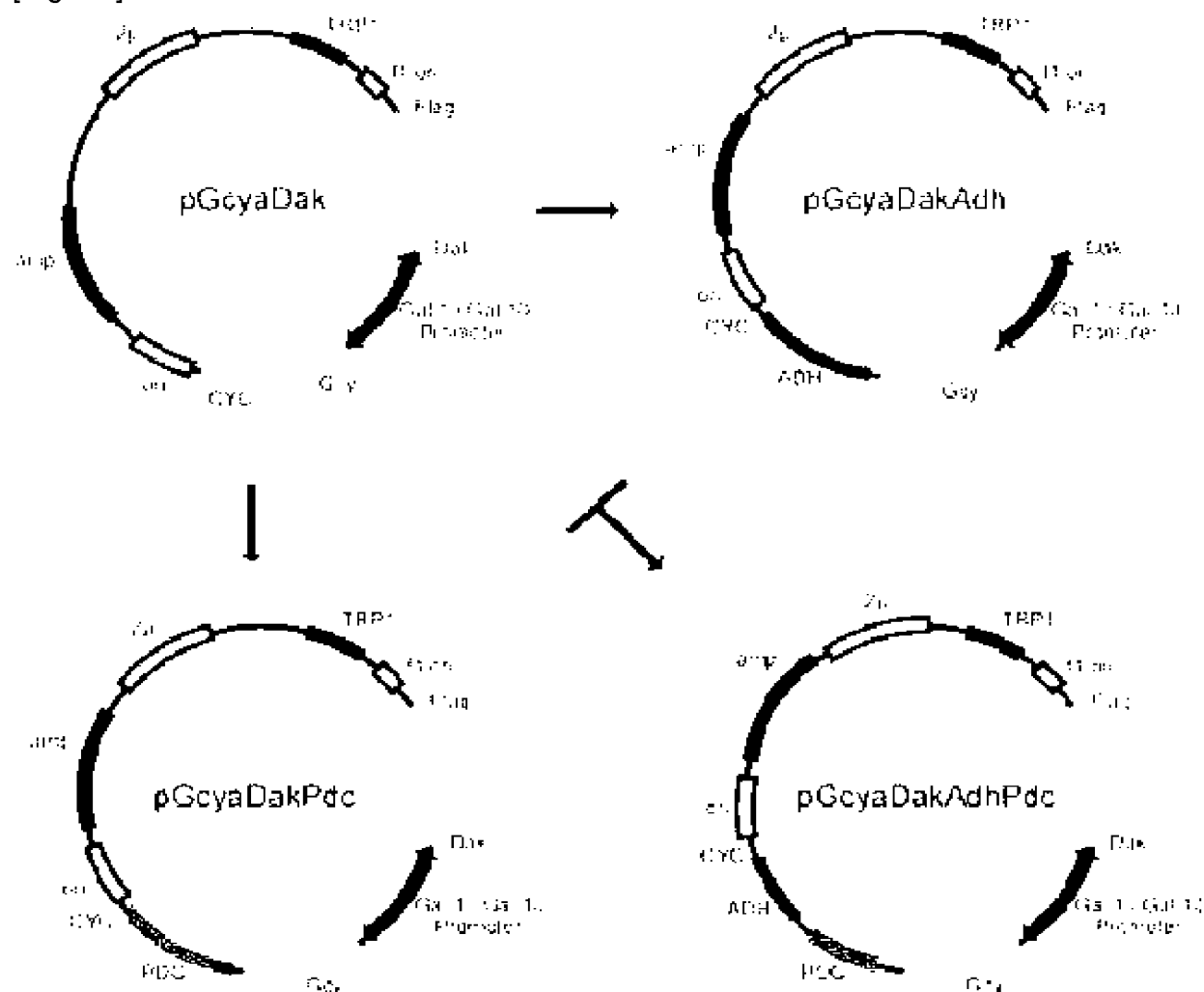
[Fig. 9]



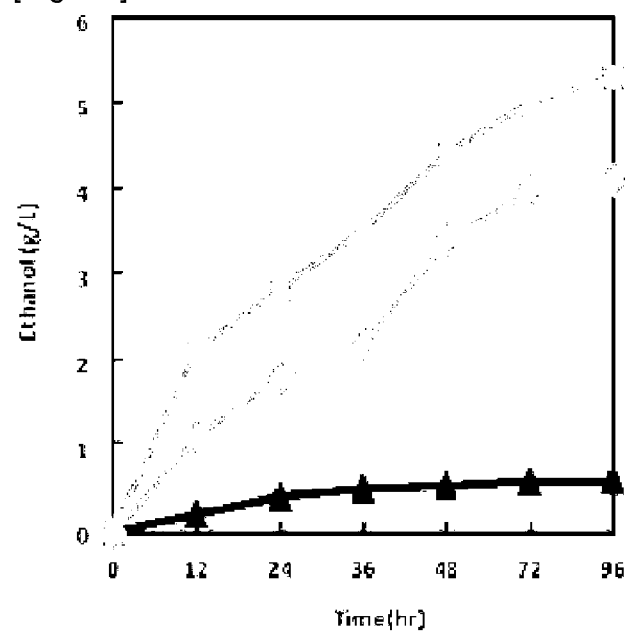
[Fig. 10]



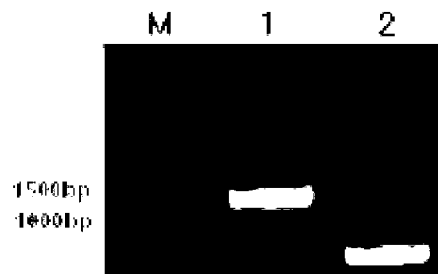
[Fig. 11]



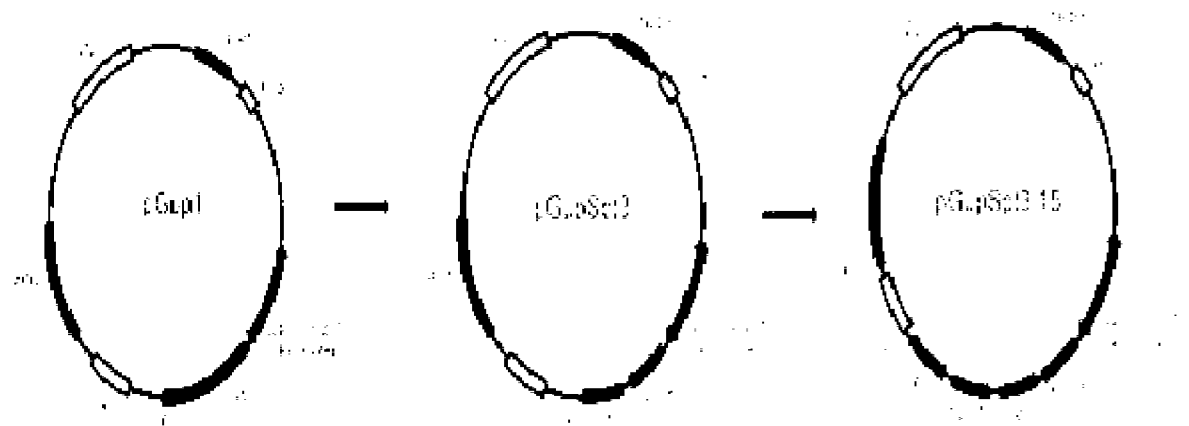
[Fig. 12]



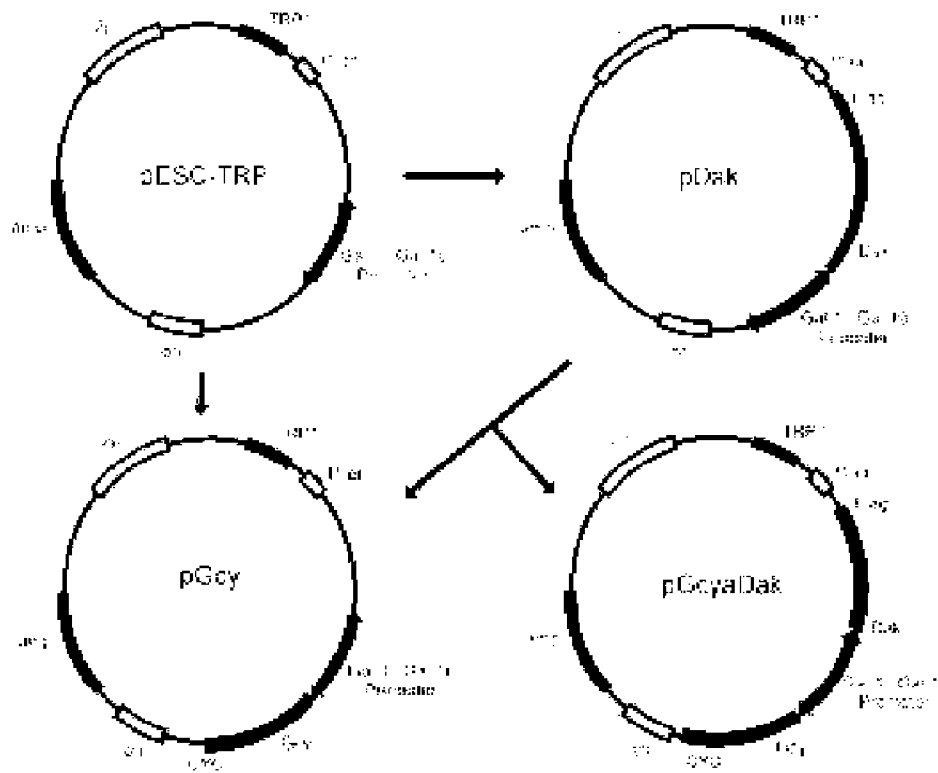
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]

