(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0131208
(43) 공개일자 2010년12월15일

(51) Int. Cl.
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) *C12R 1/145* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0049985
(22) 출원일자 2009년06월05일
심사청구일자 2009년06월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 성북구 길음2동 대우푸르지오아파트 210-1101
전유진
서울특별시 노원구 월계3동 미성아파트 16-203
현정은
서울특별시 종로구 연건동 118-2 형제빌라 301호
(74) 대리인
구현서

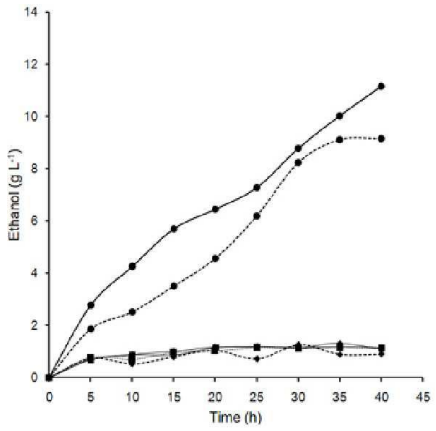
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 바이오 에탄올 생산능이 향상된 재조합 벡터 및 그 형질 전환체

(57) 요 약

본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.) 미생물 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (endo-β-1,4-glucanaseE, 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4) 와 사카로마이콥시스 속(*Saccharomycopsis* sp.) 미생물 유래의 베타-글루코시다제 (β-glucosidase; EC 3.2.1.21) 유전자가 도입된 재조합 벡터 및 그 형질 전환체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0120080002043802008 / -

부처명 한국과학재단 / 한국과학기술연구원

연구관리전문기관

연구사업명 특정기초연구 / 위탁연구

연구과제명 고활성 당화효소 생산 에탄올 발효균주 개발과 다양한 배양시스템의공정최적화를통한고효율수송용 바이오 에탄올생산공정에 관한연구 / 바이오에탄올 생산용 목질계 바이오매스 당화 및 에탄올 발효용 균주 개발

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단 / 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일 / 2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자와 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 4

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자는 서열번호 3에 기재된 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 5

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 상기 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 2에 기재된 개열지도를 갖는 재조합 벡터 pαEgEαBG1.

청구항 7

클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자와 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pαEgEαBG1제 1항의 벡터로 형질 전환된 형질전환체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 형질전환체는 기탁번호가 KCCM11006P인 형질 전환체.

청구항 9

제 7항 또는 제8항의 형질 전환체 효모를 배양하는 것을 특징으로 하는 엔도글루칸아제의 생산방법.

청구항 10

기질 존재하에서 제 7항 또는 제8항의 형질 전환체 효모를 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오 에탄올의 생산 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 기질은 전분 또는 섬유소인 것을 특징으로 하는 바이오 에탄올의 생산방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모가 기질로 제공되는 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 효모 형질 전환체에 관한 것으로 보다 자세하게는 클로스트리디움 써모셀럼으로부터 분리된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (endo-β-1,4-glucanaseE, 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4) 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 이를 도입한 효모 형질 전환체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 국가 에너지의 97% 이상을 해외에 의존하고 있으며 에너지 공급라인을 보장하기 어렵고 휘발유 가격이 리터당 1,600원에 달하고 수입 원유에 대한 의존도가 매우 높은 국내의 사정을 고려한다면 우리나라에서는 반드시 바이오매스와 같은 천연 자원으로부터의 재생 에너지 생산기술 개발은 반드시 추진되어야 한다.

[0003] 세계적으로 화석 연료의 과다 사용에 따른 환경오염 및 자원고갈에 대한 우려가 증가함에 따라 자연과 공존하며 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 이런 가운데 환경 친화적 신재생 에너지의 보급을 확산하려는 정책이 세워지고 있으며 이 중에서도 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 식물자원을 대표하는 목질계 리그노셀룰로오스 (lignocellulose)가 가장 주목받고 있다. 리그노셀룰로오스는 좁은 의미의 바이오 매스 (biomass)로서 이러한 바이오매스로부터 생산되는 알코올, 디젤, 수소 같은 각종 수용연료를 총칭하여 일반적으로 바이오에너지 (bioenergy)라 한다.

[0004] 자연 상태의 유기물질을 포함한 바이오매스의 분해는 혐기적 (anaerobic)인 생물학적 과정을 통해 이루어지며 혐기성 분해과정에는 다당류 (polysaccharides)인 목질계 바이오매스를 발효가 가능한 당으로 만들거나 이 생선된 당을 통해 메탄과 이산화탄소를 만드는 여러 종류의 미생물 집단이 관여한다. 목질계 바이오매스를 분해하는 방법적인 하나인 전처리 공정에는 물리적 공정, 열-화학 처리공정 그리고 특정한 혼합효소 (enzyme cocktail) 처리공정이 있다. 이때 최종적으로 사용하는 분해효소의 역할이 매우 중요하기 때문에 바이오 매스의 생물학적 분해에서 제일 중요한 전처리 공정을 거친 목질계 바이오매스 분해에 매우 효과적인 미생물로부터 세포 밖으로 생산되는 가수분해 효소 (extracellular hydrolytic enzyme)의 체계를 연구하고 개발하는 것이 가장 시급한 과제이다.

[0005] 기존의 미생물을 통한 셀룰라아제 생산은 특이적 활성보다는 생산량에 치중하였다. 이에 사용된 대표적 균주는 *Trichoderma reesei* 이다. 그러나 이 같은 호기성 진균주는 복합체를 이루지 않는 독립된 셀룰라아제를 생성하는데 이는 셀룰로오스 근간의 바이오매스를 완전 분해하지 못하기 때문에 반드시 여러 전처리 단계를 거쳐야 하기에 경제적인 면에서도 부족하다고 볼 수 있다. 이것을 극복할 방법으로는 유전자 조작이 간편하고 바이오매스 분해 효율이 높은 혐기성 세균을 이용한 '거대 세포외 셀룰라아제 효소 복합체 (large extracellular enzyme complexes)' 인 셀룰로좀 (cellulosome) 을 이용한 바이오매스 분해에 대한 연구가 주목 받고 있다.

[0006] 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 는 식물성 원료물질인 전분이나 섬유소를 활용하는 다양한 생물공정분야에 이용되고 있다. 하지만 효모는 전분분해효소를 소량으로 생산 및 분비하여 섬유소 기질을 전혀 분해할 수 없는 단점이 있다. 따라서 유전자 재조합 기술을 이용하여 섬유소 분해 효모를 새로이 육종하게 되면 양조, 제빵, 알코올 생산, 생균제 개발, 특별히 신재생 에너지인 바이오

에탄올 생산에 응용될 수 있기 때문에, 이들 유전자 재조합 효모들의 활용성이 기대되고 있다. 또한 효모는 이형질체 단백질을 세포외로 분비하는데 탁월한 균주로 사용되고 있다. 현재 섬유소 분해 효소를 분비하는 유전자 재조합 효모를 제조하기 위한 연구가 활발히 진행 중이나 미흡한 실정이고 이를 위해서는 열 안정성이 높거나 활성이 우수한 섬유소 분해 효소 유전자의 확보가 필요하다.

[0007] 한편, 클로스트리디움 써모셀럼 (*Clostridium thermocellum*)은 혐기고온성 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulose)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로좀(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 클로스트리디움 써모셀럼이 생산하는 섬유소 분해 효소들은 기질 특이성과 반응기작에 큰 차이를 보이기는 하나, 모두 베타-1,4-글루코시드 (β-1,4-glycoside) 결합을 분해하며, 균체 외 배지로 분비되는 특징이 있다고 보고되었다 (Shoseyov et al. 1990, Biochem Biophys Res Commun 169(2), 667-672). 또한, 결정형 섬유소의 효과적인 분해에는 적어도 세가지의 섬유소 분해효소, 즉, 엔도글루칸아제 (endoglucanase), 엑소글루칸아제 (exoglucanase) (또는 셀로비오하이드롤라제, cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제 (β-glucosidase) 가 동시에 필요하며, 이들의 상승작용으로 섬유소 분해능이 크게 증가한다고 보고되었다(Murashima et al. 2002, J Bacteriol 184(18), 5088-5095; Schwarz 2001,Appl Microbiol Biotechnol 56(5-6), 634-649; Shoham et al. 1999,Trends Microbiol 7(7), 275-281).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모가 기질로 제공되는 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 효모 형질 전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질 전환체를 이용한 엔도글루칸아제 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자와 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pαEgEαBG1을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하고, 상기 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자는 서열번호 3에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하고, 상기 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 또한 본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제를 코딩하는 유전자와 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.)으로부터 유래한 베타글루코시다제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pαEgEαBG1제 1항의 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 형질전환체는 기탁번호가 KCCM11006P이고, 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제동 소재 한국미생물보존센터에 2009년 05월 06일에 기탁한 미생물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 또 본 발명은 본 발명의 상기 형질 전환체 효모를 배양하는 것을 특징으로 하는 엔도글루칸아제의 생산방법을

제공하다.

[0018] 또한 본 발명은 기질 존재하에서 제 6항 또는 제7항의 형질 전환체 효모를 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 기질은 전분 또는 섬유소인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 본 발명과 같이 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 도입방법으로서는, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스페로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.

[0021] 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.

[0022] 본 발명의 엔도글루칸아제의 제조는, 예를 들면, 이것을 코딩하는 유전자를 가진 재조합벡터에 의해 숙주를 형질전환해서 얻은 형질전환체를 배양하고, 배양물(배양균체 또는 배양상청액)속에 유전자 산물인 엔도글루칸아제를 생성축적시켜, 배양물로부터 취득함으로써 행하여진다.

[0023] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다.

[0024] 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,M9배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 상기 언급한 적온의 범위에서 배양함으로써 엔도글루칸아제를 균체 내에 축적시키고, 회수한다.

[0025] 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.

[0026] 질소원으로서는, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 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.

[0027] 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

[0028] (IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.

[0029] 엔도글루칸아제의 취득 및 정제는, 얻게 되는 배양물중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.

[0030] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동, 웨스턴블로팅등에 의해 행할 수 있다.

[0031] 또한, 숙주로서 미생물을 사용한 형질전환체의 배양, 형질전환체에 의한 엔도글루칸아제의 생산과 균체내에의 축적, 및, 균체로부터의 엔도글루칸아제의 회수는, 상기의 방법에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033] 본 발명자는 클로스트리디움 써모셀럼으로부터 유래한 엔도글루칸아제-이 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질 전환된 효모 형질 전환체를 개발하여 이를 KCCM11006P로 20099년 05월 06일에 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였다. 뿐만 아니라 상기 효모 형질 전환체가 엔도글루칸아제를 효과적으로 분비하여 에탄올 생

산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0034] 본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.) 미생물 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (endo-β-1,4-glucanaseE, 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4) 와 사카로마이콥시스 속(*Saccharomycopsis* sp.) 미생물 유래의 베타-글루코시다제 (β-glucosidase; EC 3.2.1.21) 유전자가 도입된 재조합 벡터 및 그 형질 전환체에 관한 것으로서, 보다 자세하게는 상기 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질 전환되어 단백질이 효모에서 세포외로 분비되도록 만든 효모 형질 전환체에 관한 것이다. 본 발명의 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이는 결정형 셀룰로오스 (crystalline cellulose) 를 직접 분해할 수 있는 능력이 있어 이 유전자를 바이오 에탄올 생산능이 있는 효모에 형질 전환 시키면 셀룰로오스 자체를 분해할 수 있어 직접 에너지원으로 사용 할 수 없는 효모의 단점이 극복될 수 있다. 또 본 발명의 사카로마이콥시스 속 미생물로부터 유래한 베타-글루코시다제는 셀로비오스를 분해하여 글루코오스로 만들 수 있는 능력이 있는 효소로서 엔도글루칸아제의 산물을 기질로 사용함으로 효모가 에너지원으로 글루코오스를 사용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자와 베타-글루코시다아제 유전자가 도입된 효모 형질 전환체는 동시당화배양 (simulateous saccharification and fermentation, SSF) 공정에 유용하게 사용될 수 있다. 베타글루칸을 기질로 한 발효결과 상기 유전자들이 도입된 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하였다.

[0035] 섬유소 (cellulose)는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 다당류로서, 섬유소 분해 효소인 셀롤라제 (cellulase) 에 의해 분해된다. 섬유소 섭취 시 초식동물의 경우 위에 기생하는 미생물이 분비하는 섬유소 분해 효소는 엔도글루칸아제 (endoglucanase) 를 비롯하여 자일라나제 (xylanase), 엑소글루카나제 (exoglucanase), 베타-글루코시다제 (β-glucosidase) 등이 있다. 그 중에서도 엔도글루칸아제는 β-D-글루칸 (β-D-glucan) 을 가수분해한다.

[0036] 본 발명에서는 실온에서도 활성이 오래 유지된다고 알려진 클로스트리디움 속 균주로부터 섬유소 분해 효소인 EgE의 유전자를 효모에 도입하여 제조한 재조합 효모 균주가 EgE를 높은 수준으로 발현 및 분비한다는 것을 확인하였다.

[0037] 본 발명의 실시예에서는 EgE 유전자를 클로스트리디움 써모셀럼의 지노믹 디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 얻었고, 얻어진 상기 유전자를 효모-대장균 셔틀벡터(yeast-*E. coli* shuttle vector)에 서브 클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였다. 이후, 상기 EgE가 삽입된 재조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질전환시켰다. 이후, 상기 유전자로부터 발현되는 단백질이 엔도글루칸아제임을 조사하기 위해, EgE가 도입된 재조합 효모 형질 전환체를 배양하여 엔도글루칸아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 EgE가 도입된 재조합 효모 형질전환체가 야생형 사카로마이시스 세레비지애 YPH499 균주보다 현저히 높은 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환 된 EgE 유전자가 엔도글루칸아제를 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0038] 또한, 상기 재조합 효모 형질 전환체의 분비 여부와 CMC(carboxymethylcellulose) 분해능을 조사한 결과, 효모로부터 EgE가 활발히 분비되는 것과 섬유소를 분해하는 기능이 매우 효율적으로 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 효모 형질 전환체를 한국미생물보존센터에 기탁번호 KCCM 11006P로 기탁하였으며 상기 효모 형질 전환체가 엔도글루칸아제를 효과적으로 분비하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

효 과

[0039] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 클로스트리디움 속 균주로부터 얻은 엔도글루칸아제 유전자를 효모 균주에 도입하였다. 이후, 상기 엔도글루칸아제 유전자가 상기 효모 균주에서 높은 수준으로 발현되어 분비되는 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 클로스트리디움 속 균주로부터 유래한 엔도글루칸아제 유전자가 도입된 효모 형질 전환체 및 상기 유전자로부터 발현되는 엔도글루칸아제는 양조, 제빵, 알코올 생산, 사료 생산 및 생균제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있고 특히 섬유소의 분해와 분해산물로부터 알코올을 생산하는 동시당화발효 융합공정(SSF, simulateous saccharification and fermentation 혹은 consolidated bioprocessing)에 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 비한정적인 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1: 효모 시그널 펩타이드 유전자 및 엔도글루칸아제 유전자와 베타글루코시다제 유전자의 증폭

[0042] 효모 외부로 효과적으로 효소를 분비하기 위한 시그널 펩타이드 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지애의 지노믹디엔에이 (BY4741) 로부터 α-factor의 시그널 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 제한효소 *EcoR*Ⅰ, 역방향 프라이머 (Reverse primer)의 5' 에는 제한효소 *Not*Ⅰ 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 255 bp의 효모 시그널 펩타이드 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 1(A)에 도시하였다.

[0043] 클로스트리디움 유래의 써모셀럼의 EgE 유전자를 클로닝하기 위하여 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 에는 제한효소 *BamH*Ⅰ, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5' 에는 제한효소 *Xho*Ⅰ 인식서열이 각각 삽입된 프라이머((5' -gcgcggccgctcgggaacaaagctttt gga-3' (서열번호 5) 및 5' -gtgcggccgctattgctttttttaagaatgcaag-3' (서열번호 6)) 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 1452bp의 클로스트리디움 유래의 써모셀럼의 EgE 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 1(B)에 도시하였다.

[0044] 사카로마이콥시스 유래의 피불리게라의 *bgl1* 유전자를 클로닝하기 위하여 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5 '에는 제한효소 *Not*Ⅰ, 역방향 프라이머(Reverse primer)에는 제한효소 *Spe*Ⅰ 인식서열이 각각 삽입된 프라이머(5' -ggcgcggccgcgtcccaattcaaa actatacc-3' (서열번호 7) 및 5' -ggcactagtcgaatagtaaacaggacagatgtct-3' (서열번호 8))을 합성하였다. 그 결과 2577bp의 사카로마이콥시스 유래의 피불리게라의 *bgl1* 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 1(C)에 도시하였다.

[0045] 실시예 2: 시그널 펩타이드와 EgE 유전자의 클로닝

[0046] 상기 실시예 1에서 얻은 시그널 펩타이드와 EgE 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Qiaex Ⅱgel extraction kit (Qiagen) 를 사용하여 회수하였다.

[0047] 그 후, 효모 시그널 펩타이드의 경우는 *EcoR*Ⅰ, *Not*Ⅰ, *egE*와 *bgl1*은 *Not*Ⅰ, *Spe*Ⅰ으로 절단한 후 효모-대장균 셔틀 벡터 (yeast-*E. coli* shuttle vector) 인 pESC-trp (Clontech) 에 라이게이션 (ligation) 시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) DH5α(RBC Co.)에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각pESC-α-EgE, pESC-α-Bgl1이라 명명하였다. 그 후 pESC-α-EgE를 주형으로 효소 시그널 펩타이드와 엔도글루칸아제 부분을 유전자 증폭하여 pESC-α-Bgl1의 *BamH*Ⅰ, *Xho*Ⅰ 사이트에 라이게이션 시켜 에스세리시아 콜라이 DH5α에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pαEgEαBG1이라 명명하였고 도면 2에 도시하였다. 이후, 상기 재조합 벡터들을 이용하여 클론테크(clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다.

[0048] 상기 효모 숙주세포로는 사카로마이시스 세레비지애 YPH499 (*S. cerevisiae* YPH499, ura3-52lys2-801amberade2-101ochretrp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1) 를 사용하였다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nigrogen base w/o trp, 2% agar)를 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 사카로마이시스 세레비지애 YPH499/pαEgEαBG1라 명명하였다.

[0049] 실시예 3: 효모 형질 전환체의 엔도글루칸아제 활성 측정

[0050] 상기 실시예 2에서 확보한 형질 전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, 배지상에서 효소 활성대 (halo)

측정, SDS-PAGE와 Zymogram을 실행하였다.

[0051] YPH499/pαEgEαBG1를 galactose로 발현 유도하여 EgE 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 30℃에서 48시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여 (Millipore, amicon 10kDa cut off) EgE 효소 단백질을 얻었다.

[0052] 효소활성대 (halo)를 확인하기 위해 YPG한천배지에 0.3% CMC (carboxy methyl cellulose) 을 녹여 효소반응의 기질로 사용하였다. 형질 전환된 효모의 콜로니를 YPG한천배지에 (yeast extract, peptone, galactose) 접종하여 48시간동안 30℃에서 배양하고, YPG 액상배지에서 48시간동안 30℃에서 배양한 배양액 5㎕을 기질 (CMC, carboxymethylcellulose, Sigma) 이 포함된 한천배지에 올려 흡수시킨 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. 0.25% 콩고레드 (Congo-Red, Sigma) 로 20분간 염색 후 1몰 소듐 클로라이드 (sodium chloride) 로 여러 번 헹구어 낸 후 효소활성대(halo)를 확인하였고 그 결과를 각각 도면 3a, 3b에 도시하였다.

[0053] EgE와 Bgl1의 발현을 확인하기 위해 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel과 0.1% CMC (carboxymethylcellulose) 을 녹인 poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기 영동하였다. 그 결과 53kDa과 95kDa 위치에 단백질 밴드를 확인하였다. 이 결과를 도면 4에 도시하였다.

[0054] 정확한 위치에서의 효소발현을 확인하기 위하여 Zymogram을 실행하였고 이를 실시하기 위해 기질이 첨가된 renature buffer (100mM Succiniate, 10mM CaCl2, 1mM dTT) 에 2시간동안 1시간 마다 renature buffer를 갈아준 후 50℃에서 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 겔을 0.25% 콩고레드 (Congo-Red) 로 30분간 염색 후 1M NaCl로 수차례 헹구어 내어 EgE 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 효소 활성대 (halo) 를 확인할 수 있었다. 이 결과를 도면 4에 도시하였다.

[0055] 실시예 4: 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

[0056] YPH499/pαEgEαBG1와 YPH499/pESC-trp를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 50g/l 셀로비오스와 20g/l CMC (carboxymethylcellulose) 그리고 20g/l β-glucan이 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 5와 20이 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30℃, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제가 삽입된 YPH499/pαEgEαBG1에서의 에탄올 생산수율이 YPH499/pESC-trp보다 높게 측정되었고 이 결과를 도면 5에 도시하였다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1(A)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 효모의 시그널 펩타이드 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이며,

[0058] 도 1(B)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이며,

[0059] 도 1(C)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 베타 글루코시다제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이며, 그림에서 (A)의 Lane 1, 100bp DNA marker; Lane 2, 알파 인자 신호 서열 PCR product이고, (B) Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, *egE* PCR product이며, (C) Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, *bgl1* PCR product를 나타낸다.

[0060] 도 2는 본 발명에서 제시된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자와 베타글루코시다제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pαEgEαBG1와 재조합 과정을 나타낸 모식도이며,

[0061] 도 3a는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pαEgEαBG1가 삽입된 효모 형질 전환체의 콜로니에서의 효소활성을 보임으로 효소분비를 확인한 그림이며,

[0062] 도 3b는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pαEgEαBG1가 삽입된 효모 형질 전환체의 배양액에서의 효소 활성을 보임으로 배양액으로의 효소 분비를 확인한 그림이며,

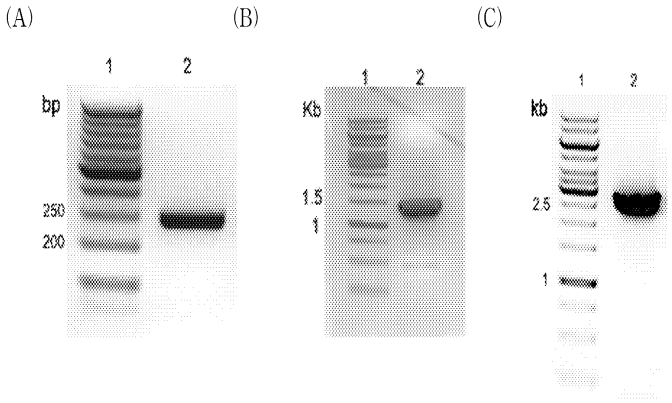
[0063] 도 4는 본 발명에서 발현한 효소의 발현을 SDS-PAGE기법과 Zymogram 기법으로 확인한 그림이며, 그림에서 Lane 1은 단백질 마커(Elpis); Lane 2는 코마시블루 염색한 pαEgEαBG1 SDS-PAGE로부터 얻은 EgE 및 Bgl1의 밴드 그리고, Lane 3은 zymogram 기법으로 0.1% CMC가 기질로 첨가된 SDS-PAGE 상에서 엔도글루칸아제의 활성을 나타

낸 EgE halo이다.

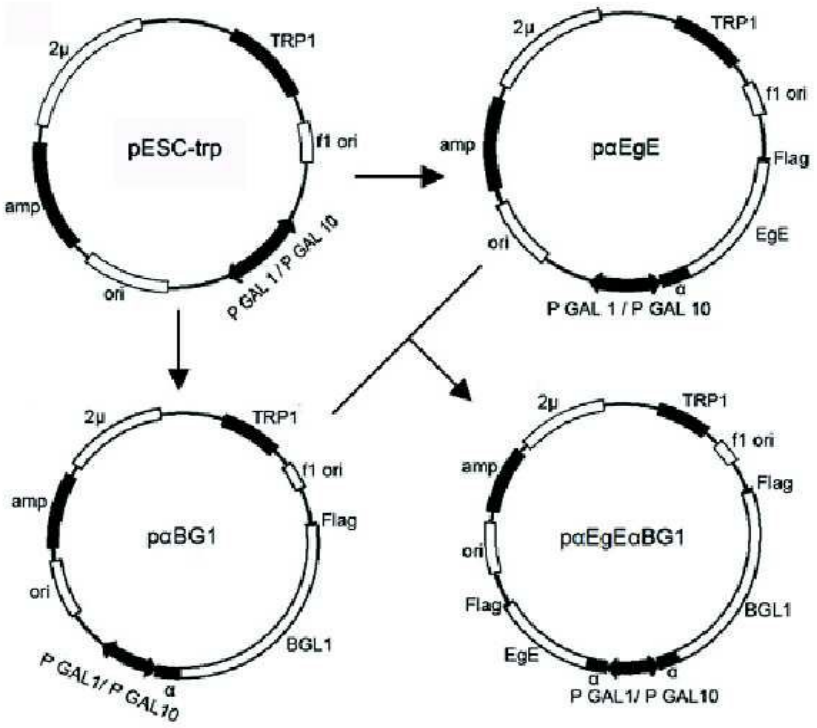
[0064] 도 5는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pαEgEαBG1가 삽입된 효모 형질 전환체가 CMC와 β-glucan을 기질로 하여 에탄올을 생산함을 확인한 그래프이다. closed circles, pαEgEαBG1; closed squares, pESC-trp; Closed diamond, pαEgE; lines, CMC; dotted lines, β-glucan을 나타낸다.

도면

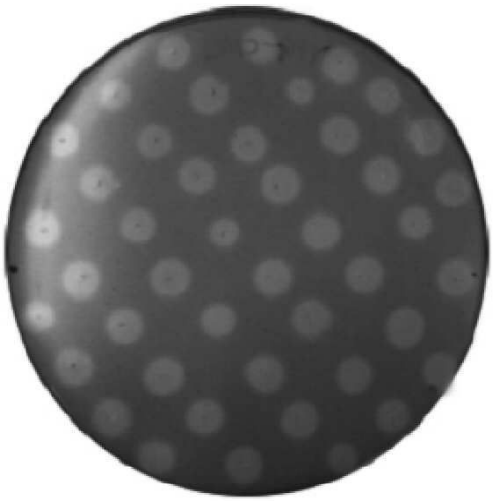
도면1



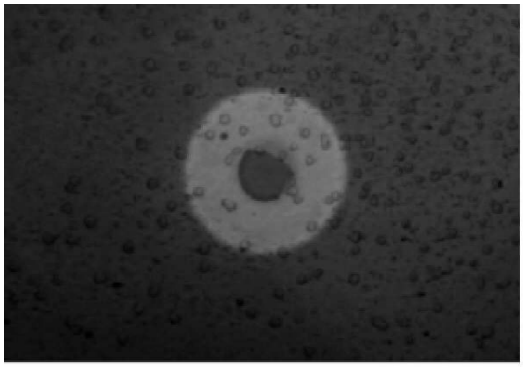
도면2



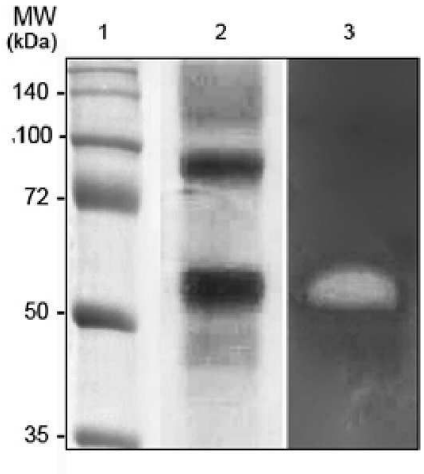
도면3a



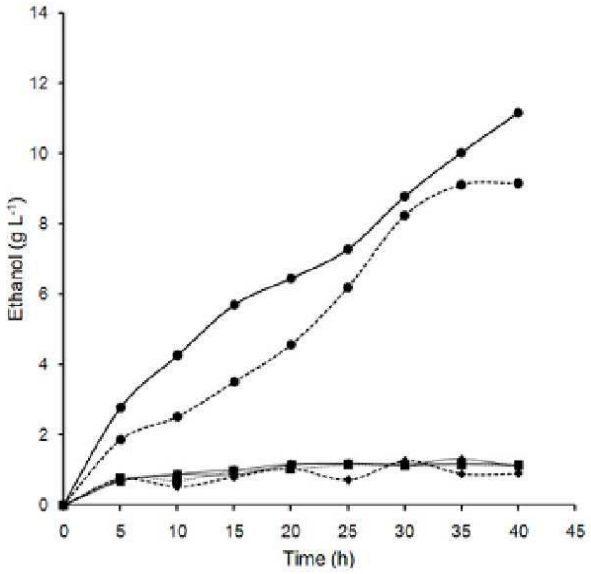
도면3b



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
<120> A recombinant vector and a transformant with an improved productivity of bio-ethanol

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 440
<212> PRT
<213> Clostridium sp.

<400> 1
Ser Gly Thr Lys Leu Leu Asp Ala Ser Gly Asn Glu Leu Val Met Arg
1 5 10 15

Gly Met Arg Asp Ile Ser Ala Ile Asp Leu Val Lys Glu Ile Lys Ile
20 25 30

Gly Trp Asn Leu Gly Asn Thr Leu Asp Ala Pro Thr Glu Thr Ala Trp

```
          35                  40                  45

Gly Asn Pro Arg Thr Thr Lys Ala Met Ile Glu Lys Val Arg Glu Met
     50                  55                  60

Gly Phe Asn Ala Val Arg Val Pro Val Thr Trp Asp Thr His Ile Gly
 65                  70                  75                  80

Pro Ala Pro Asp Tyr Lys Ile Asp Glu Ala Trp Leu Asn Arg Val Glu
                 85                  90                  95

Glu Val Val Asn Tyr Val Leu Asp Cys Gly Met Tyr Ala Ile Ile Asn
            100                 105                 110

Leu His His Asp Asn Thr Trp Ile Ile Pro Thr Tyr Ala Asn Glu Gln
        115                 120                 125

Arg Ser Lys Glu Lys Leu Val Lys Val Trp Glu Gln Ile Ala Thr Arg
    130                 135                 140

Phe Lys Asp Tyr Asp Asp His Leu Leu Phe Glu Thr Met Asn Glu Pro
145                 150                 155                 160

Arg Glu Val Gly Ser Pro Met Glu Trp Met Gly Gly Thr Tyr Glu Asn
                165                 170                 175

Arg Asp Val Ile Asn Arg Phe Asn Leu Ala Val Val Asn Thr Ile Arg
            180                 185                 190

Ala Ser Gly Gly Asn Asn Asp Lys Arg Phe Ile Leu Val Pro Thr Asn
        195                 200                 205

Ala Ala Thr Gly Leu Asp Val Ala Leu Asn Asp Leu Val Ile Pro Asn
    210                 215                 220

Asn Asp Ser Arg Val Ile Val Ser Ile His Ala Tyr Ser Pro Tyr Phe
225                 230                 235                 240

Phe Ala Met Asp Val Asn Gly Thr Ser Tyr Trp Gly Ser Asp Tyr Asp
                245                 250                 255

Lys Ala Ser Leu Thr Ser Glu Leu Asp Ala Ile Tyr Asn Arg Phe Val
            260                 265                 270
```

```
Lys Asn Gly Arg Ala Val Ile Ile Gly Glu Phe Gly Thr Ile Asp Lys
        275                 280                 285

Asn Asn Leu Ser Ser Arg Val Ala His Ala Glu His Tyr Ala Arg Glu
    290                 295                 300

Ala Val Ser Arg Gly Ile Ala Val Phe Trp Trp Asp Asn Gly Tyr Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Pro Gly Asp Ala Glu Thr Tyr Ala Leu Leu Asn Arg Lys Thr Leu
                325                 330                 335

Ser Trp Tyr Tyr Pro Glu Ile Val Gln Ala Leu Met Arg Gly Ala Gly
            340                 345                 350

Val Glu Pro Leu Val Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Leu Met Pro Thr
        355                 360                 365

Pro Ser Pro Thr Val Thr Ala Asn Ile Leu Tyr Gly Asp Val Asn Gly
    370                 375                 380

Asp Gly Lys Ile Asn Ser Thr Asp Cys Thr Met Leu Lys Arg Tyr Ile
385                 390                 395                 400

Leu Arg Gly Ile Glu Glu Phe Pro Ser Pro Ser Gly Ile Ile Ala Ala
                405                 410                 415

Asp Val Asn Ala Asp Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp Leu Val Leu Met
            420                 425                 430

Lys Lys Tyr Leu Leu Arg Ser Ile
        435                 440
```

<210> 2
<211> 859
<212> PRT
<213> Saccharomycopsis sp.

<400> 2

```
Val Pro Ile Gln Asn Tyr Thr Gln Ser Pro Ser Gln Arg Asp Glu Ser
  1               5                  10                  15

Ser Gln Trp Val Ser Pro His Tyr Tyr Pro Thr Pro Gln Gly Gly Arg
```

```
             20                  25                  30

Leu Gln Asp Val Trp Gln Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Lys Ala Ile Val
         35                  40                  45

Gly Gln Met Thr Ile Val Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Thr Gly
     50                  55                  60

Trp Gln Leu Asp Pro Cys Val Gly Asn Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe
 65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Asn Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Val Arg Phe
                 85                  90                  95

Ala Asp Phe Val Thr Gly Tyr Pro Ser Gly Leu Ala Thr Gly Ala Thr
            100                 105                 110

Phe Asn Lys Asp Leu Phe Leu Gln Arg Gly Gln Ala Leu Gly His Glu
        115                 120                 125

Phe Asn Ser Lys Gly Val His Ile Ala Leu Gly Pro Ala Val Gly Pro
    130                 135                 140

Leu Gly Val Lys Ala Arg Gly Gly Arg Asn Phe Glu Ala Phe Gly Ser
145                 150                 155                 160

Asp Pro Tyr Leu Gln Gly Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ile Lys Gly Leu
                165                 170                 175

Gln Glu Asn Asn Val Met Ala Cys Val Lys His Phe Ile Gly Asn Glu
            180                 185                 190

Gln Glu Lys Tyr Arg Gln Pro Asp Asp Ile Asn Pro Ala Thr Asn Gln
        195                 200                 205

Thr Thr Lys Glu Ala Ile Ser Ala Asn Ile Pro Asp Arg Ala Met His
    210                 215                 220

Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ser Val Arg Ala Gly Val Gly
225                 230                 235                 240

Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Arg Val Asn Asn Thr Tyr Ala Cys Glu
                245                 250                 255
```

```
Asn Ser Tyr Met Met Asn His Leu Leu Lys Glu Glu Leu Gly Phe Gln
            260                 265                 270

Gly Phe Val Val Ser Asp Trp Gly Ala Gln Leu Ser Gly Val Tyr Ser
        275                 280                 285

Ala Ile Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Glu Val Tyr Gly Glu
    290                 295                 300

Trp Asn Thr Gly Thr Ser Phe Trp Gly Gln Asn Leu Thr Lys Ala Ile
305                 310                 315                 320

Tyr Asn Glu Thr Val Pro Ile Glu Arg Leu Asp Asp Met Ala Thr Arg
                325                 330                 335

Ile Leu Ala Ala Leu Tyr Ala Thr Asn Ser Phe Pro Thr Glu Asp His
            340                 345                 350

Leu Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Thr Lys Glu Tyr Gly Asn Lys Tyr
        355                 360                 365

Tyr Ala Asp Asn Thr Thr Glu Ile Val Lys Val Asn Tyr Asn Val Asp
    370                 375                 380

Pro Ser Asn Asp Phe Thr Glu Asp Thr Ala Leu Lys Val Ala Glu Glu
385                 390                 395                 400

Ser Ile Val Leu Leu Lys Asn Glu Asn Asn Thr Leu Pro Ile Ser Pro
                405                 410                 415

Glu Lys Ala Lys Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Ala Ala Gly Pro Asp
            420                 425                 430

Pro Ile Gly Tyr Gln Cys Glu Asp Gln Ser Cys Thr Asn Gly Ala Leu
        435                 440                 445

Phe Gln Gly Trp Gly Ser Gly Ser Val Gly Ser Pro Lys Tyr Gln Val
    450                 455                 460

Thr Pro Phe Glu Glu Ile Ser Tyr Leu Ala Arg Lys Asn Lys Met Gln
465                 470                 475                 480

Phe Asp Tyr Ile Arg Glu Ser Tyr Asp Leu Ala Gln Val Thr Lys Val
                485                 490                 495
```

Ala Ser Asp Ala His Leu Ser Ile Val Val Val Ser Ala Ala Ser Gly
500 505 510

Glu Gly Tyr Ile Thr Val Asp Gly Asn Gln Gly Asp Arg Lys Asn Leu
515 520 525

Thr Leu Trp Asn Asn Gly Asp Lys Leu Ile Glu Thr Val Ala Glu Asn
530 535 540

Cys Ala Asn Thr Val Val Val Val Thr Ser Thr Gly Gln Ile Asn Phe
545 550 555 560

Glu Gly Phe Ala Asp His Pro Asn Val Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly
565 570 575

Pro Leu Gly Asp Arg Ser Gly Thr Ala Ile Ala Asn Ile Leu Phe Gly
580 585 590

Lys Ala Asn Pro Ser Gly His Leu Pro Phe Thr Ile Ala Lys Thr Asp
595 600 605

Asp Asp Tyr Ile Pro Ile Glu Thr Tyr Ser Pro Ser Ser Gly Glu Pro
610 615 620

Glu Asp Asn His Leu Val Glu Asn Asp Leu Leu Val Asp Tyr Arg Tyr
625 630 635 640

Phe Glu Glu Lys Asn Ile Glu Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Tyr Gly Leu
645 650 655

Ser Tyr Asn Glu Tyr Glu Val Ser Asn Ala Lys Val Ser Ala Ala Lys
660 665 670

Lys Val Asp Glu Glu Leu Pro Glu Pro Ala Thr Tyr Leu Ser Glu Phe
675 680 685

Ser Tyr Gln Asn Ala Lys Asp Ser Lys Asn Pro Ser Asp Ala Phe Ala
690 695 700

Pro Ala Asp Leu Asn Arg Val Asn Glu Tyr Leu Tyr Pro Tyr Leu Asp
705 710 715 720

Ser Asn Val Thr Leu Lys Asp Gly Asn Tyr Glu Tyr Pro Asp Gly Tyr

725 730 735

Ser Thr Glu Gln Arg Thr Thr Pro Ile Gln Pro Gly Gly Gly Leu Gly
740 745 750

Gly Asn Asp Ala Leu Trp Glu Val Ala Tyr Lys Val Glu Val Asp Val
755 760 765

Gln Asn Leu Gly Asn Ser Thr Asp Lys Phe Val Pro Gln Leu Tyr Leu
770 775 780

Lys His Pro Glu Asp Gly Lys Phe Glu Thr Pro Ile Gln Leu Arg Gly
785 790 795 800

Phe Glu Lys Val Glu Leu Ser Pro Gly Glu Lys Lys Thr Val Glu Phe
805 810 815

Glu Leu Leu Arg Arg Asp Leu Ser Val Trp Asp Thr Thr Arg Gln Ser
820 825 830

Trp Ile Val Glu Ser Gly Thr Tyr Glu Ala Leu Ile Gly Val Ala Val
835 840 845

Asn Asp Ile Lys Thr Ser Val Leu Phe Thr Ile
850 855

<210> 3
<211> 1320
<212> DNA
<213> Clostridium sp.

<400> 3
tcgggaacaa agcttttgga tgcaagcgga aacgagcttg taatgagggg catgcgtgat 60

atttcagcaa tagatttggt taaagaaata aaaatcggat ggaatttggg aaatactttg 120

gatgctccta cagagactgc ctggggaaat ccaaggacaa ccaaggcaat gatagaaaag 180

gtaagggaaa tgggctttaa tgccgtcaga gtgcctgtta cctgggatac gcacatcgga 240

cctgctccgg actataaaat tgacgaagca tggctgaaca gagttgagga agtggtaaac 300

tatgttcttg actgcggtat gtacgcgatc ataaatcttc accatgacaa tacatggatt 360

atacctacat atgccaatga gcaaaggagt aaagaaaaac ttgtaaaagt ttgggaacaa 420

atagcaaccc gttttaaaga ttatgacgac catttgttgt ttgagacaat gaacgaaccg 480

agagaagtag gttcacctat ggaatggatg ggcggaacgt atgaaaaccg agatgtgata 540

aacagattta atttggcggt tgttaatacc atcagagcaa gcggcggaaa taacgataaa 600

agattcatac tggttccgac caatgcggca accggcctgg atgttgcatt aaacgacctt 660

gtcattccga acaatgacag cagagtcata gtatccatac atgcttattc accgtatttc 720

tttgctatgg atgtcaacgg aacttcatat tggggaagtg actatgacaa ggcttctctt 780

acaagtgaac ttgatgctat ttacaacaga tttgtgaaaa acggaagggc tgtaattatc 840

ggagaattcg gaaccattga caagaacaac ctgtcttcaa gggtggctca tgccgagcac 900

tatgcaagag aagcagtttc aagaggaatt gctgttttct ggtgggataa cggctattac 960

aatccgggtg atgcagagac ttatgcattg ctgaacagaa aaactctctc atggtattat 1020

cctgaaattg tccaggctct tatgagaggt gccggcgttg aacctttagt ttcaccgact 1080

cctacaccta cattaatgcc gacccctcg cccacggtga cagcaaatat tttgtacggt 1140

gacgtaaacg gggacggaaa aataaattct acagactgta caatgctaaa gagatatatt 1200

ttgcgtggca tagaagaatt cccaagtcct agcggaatta tagccgctga cgtaaatgcg 1260

gatctgaaaa tcaattccac cgacttggta ttgatgaaaa aatatctact gcgctcaata 1320

1320

<210> 4
<211> 2577
<212> DNA

<213> Saccharomycopsis sp.

<400> 4

gtcccaattc aaaactatac ccagtctcca tcccagagag atgagagctc ccaatgggtg 60

agcccgcatt attatccaac tccacaaggt ggtaggctcc aagacgtctg gcaagaagca 120

tatgctagag caaaagccat cgttggccag atgactattg ttgaaaaggt caatttgacc 180

actggtaccg gttggcaatt agatccatgt gttggtaata ccggttctgt tccaagattc 240

ggcatcccaa acctttgcct acaagatggg ccattgggtg ttcgattcgc tgactttgtt 300

actggctatc catccggtct tgctactggt gcaacgttca ataaggattt gtttcttcaa 360

agaggtcaag ctctcggtca tgagttcaac agcaaaggtg tacatattgc gttgggccct 420

gctgttggcc cacttggtgt caaagccaga ggtggcagaa atttcgaagc ctttggttcc 480

gacccatatc tccaaggtac tgctgctgct gcaaccatca aaggtctcca agagaataat 540

gttatggctt gtgtcaagca ctttattggt aacgaacaag aaaagtacag acagccagat 600

gacataaacc ctgccaccaa ccaaactact aaagaagcta ttagtgccaa cattccagac 660

agagccatgc atgcgttgta cttgtggcca tttgccgatt cggttcgagc aggtgttggt 720

tctgttatgt gctcttataa cagagtcaac aacacttacg cttgcgaaaa ctcttacatg 780

atgaaccact tgcttaaaga agagttgggt tttcaaggct ttgttgtttc ggactggggt 840

gcacaattaa gtggggttta tagcgctatc tcgggcttag atatgtctat gcctggtgaa 900

gtgtatgggg gatggaacac cggcacgtct ttctggggtc aaaacttgac gaaagctatt 960

tacaatgaga ctgttccgat tgaaagatta gatgatatgg caaccaggat cttggctgct 1020

ttgtatgcta ccaatagttt cccaacagaa gatcaccttc caaatttttc ttcatggaca 1080

acgaaagaat atggcaataa atattatgct gacaacacta ccgagattgt caaagtcaac 1140

tacaatgtgg acccatcaaa tgactttacg gaggacacag ctttgaaggt tgctgaggaa 1200

tctattgtgc ttttaaaaaa tgaaaacaac actttgccaa tttctcccga aaaggctaaa 1260

agattactat tgtcgggtat tgctgcaggc cctgatccga taggttatca gtgtgaagat 1320

caatcttgca caaatggcgc tttgtttcaa ggttggggtt ctggcagtgt tggttctcca 1380

aaatatcaag tcactccatt tgaggaaatt tcttatcttg caagaaaaaa caagatgcaa 1440

tttgattata ttcgggagtc ttacgactta gctcaagtta ctaaagtagc ttccgatgct 1500

catttgtcta tagttgttgt ctctgctgca agcggtgagg gttatataac cgttgacggt 1560

aaccaaggtg acagaaaaaa tctcactttg tggaacaacg gtgataaatt gattgaaaca 1620

gttgctgaaa actgtgccaa tactgttgtt gttgttactt ctactggtca aattaatttt 1680

gaaggctttg ctgatcaccc aaatgttacc gcaattgtct gggccggccc attaggtgac 1740

agatccggga ctgctatcgc caatattctt tttggtaaag cgaacccatc aggtcatctt 1800

ccattcacta ttgctaagac tgacgatgat tacattccaa ttgaaaccta cagtccatcg 1860

agtggtgaac ctgaagacaa ccacttggtt gaaaatgact tgcttgttga ctatagatat 1920

tttgaagaga agaatattga gccaagatac gcatttggtt atggcttgtc ttacaatgag 1980

tatgaagtta gcaatgcaaa ggtctcggca gccaaaaaag ttgatgagga gttgcctgaa 2040

ccagctacct acttatcgga gtttagctat caaaatgcaa aagacagcaa aaatccaagt 2100

gatgcttttg ctccagcaga tttaaacaga gttaatgagt acctttatcc atatttagat 2160

agcaatgtta ccttaaaaga cggaaactat gagtatcctg atggctacag cactgagcaa 2220

agaacaacac ctaaccaacc tgggggcggc ttgggaggca acgatgcttt gtgggaggtc 2280

gcttataact ccactgataa gtttgttcca cagggtaact ccactgataa gtttgttcca 2340

cagttgtatt tgaaacaccc tgaggatggc aagtttgaaa cccctattca attgagaggg 2400

tttgaaaagg ttgagttgtc cccgggtgag aagaagacag ttgatttgag gcttttgaga 2460

agagatctta gtgtgtggga taccaccaga cagtcttgga tcgttgaatc tggtacttat 2520

gaggccttaa ttggcgttgc tgttaatgat atcaagacat ctgtcctgtt tactatt 2577

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
gcgcggccgc tcgggaacaa agcttttgga 30

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
gtgcggccgc tattgctttt tttaagaatg caag 34

<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7
ggcgcggccg cgtcccaatt caaaactata cc 32

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
ggcactagtc gaatagtaaa caggacagat gtct 34