



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년07월09일
(11) 등록번호 10-0969328
(24) 등록일자 2010년07월02일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/56* (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/145* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0061643

(22) 출원일자 2009년07월07일

심사청구일자 2009년07월07일

(56) 선행기술조사문헌

Genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient polysaccharide utilization', April 2005. Dissertation presented for the Degree of Coctor of Philosophy at Stellenbosch University.

(73) 특허권자

(주) 나노텍스텍

경기 성남시 분당구 수내동 6-2 동양그래피아 1114

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

한성욱

서울 성북구 길음동 대우아파트 210동 201호

전유진

서울 노원구 월계3동 미성아파트 16동 203호

(74) 대리인

팬코리아특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

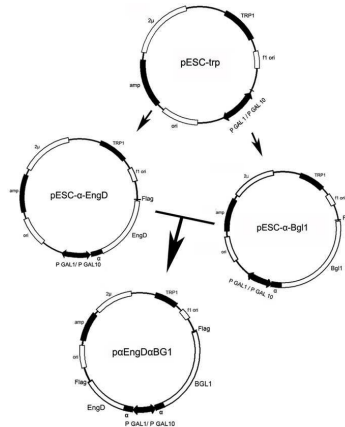
심사관 : 안규정

(54) 바이오 에탄올 생산능이 향상된 효모 형질전환체

(57) 요약

바이오 에탄올 생산능이 향상된 효모 형질전환체의 제조와 관련된 것으로, 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.) 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제 (endo- β -1,4-glucanase) 코딩 유전자 및/또는 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제 (β -glucosidase) 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 이용하여 형질전환된 효모 형질전환체 및 이를 배양하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*) 유래의 서열번호 1의 엔도-베타-1,4-글루칸아제 (endo- β -1,4-glucanase) 코딩 염기 서열 및 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) 유래의 서열번호 2의 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 코딩 염기 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 재조합 벡터로 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 형질전환체.

청구항 5

제4항에 있어서,

기탁번호가 KCCM11005P인 형질전환체.

청구항 6

제4항의 형질전환체를 바이오매스와 함께 배양하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올 생산 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 형질전환체는 기탁번호가 KCCM11005P인 것인 바이오 에탄올 생산 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 바이오매스는 셀룰로오스계 바이오매스인 바이오 에탄올 생산 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 바이오 에탄올 생산능이 향상된 효모 형질전환체의 제조와 관련된 것으로, 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.) 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제 (endo- β -1,4-glucanase) 코딩 유전자 및/또는 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제 (β -glucosidase) 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이를 이용하여 형질전환된 효모 형질전환체 및 이를 배양하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 원유가격의 급등과 에너지 고갈에 대한 우려가 심각해지면서 대체 에너지 생산에 관한 관심이 증폭되고 있다. 대체 에너지 중 수송용 연료의 경우 가장 활발하게 대두되고 있는 소재가 바로 바이오 에탄올이다. 이는 자동차의 최종 기술 목표인 전기자동차 또는 수소자동차의 개발단계까지 현재의 아직도 개발초기 단계여서 이의 완료까지 이를 대체할 수 있는 절충형의 대체에너지가 필요하다. 현재 바이오 에탄올은 휘발유와 혼합하여 사용할 수 있어 바이오 디젤과 더불어 대표적인 재생자원 에너지이며, 바이오 에탄올 연소 시 발생하는 이산화

탄소는 교토의정서에서 규정한 온실가스 계산에서 예외 적용을 받아 온실가스 감축효과가 있다. 또한 보급에 별도의 인프라 (주유소 등) 구축이 필요한 다른 청정연료와는 달리 기존 인프라에서 보급이 가능해 조기 상용화가 용이하다.

[0003] 현재 바이오 에탄올은 주로 사탕수수 및 옥수수로 대표되는 당질계 바이오매스, 목재와 같은 셀룰로오스계 바이오매스, 그리고 폐목자원, 잉여농산물 및 초본계 작물과 같은 리그노 셀룰로오스계 바이오매스로부터 생산될 수 있다. 당질계의 사탕수수 및 옥수수는 현재 대표적인 바이오 에탄올 생산의 재료로 실제 브라질의 경우 풍부한 사탕수수 재배지를 근간으로 하여 이를 활용하여 에탄올의 연료상업화에 성공하여 2004년에 이르러 전체 차량 연료 소비량의 약 30%를 바이오 에탄올로 대체하는 데 성공하였다. 미국의 경우 풍부한 옥수수를 활용한 바이오 에탄올 생산의 상당한 상업화 기술을 축적하여 2017년까지 전체 수송용 에너지 수요의 20%를 바이오 에탄올로 대체할 예정이다.

[0004] 기존에 사용되어 온 옥수수 등을 중심으로 한 당질계 바이오매스의 경우 2008년 초 곡물가격의 급등으로 인한 애그플레이션의 영향으로 원료수급 및 가격경쟁력의 측면에서 부정적인 평가를 받게 되면서, 최근 가장 많이 활용되고 있는 것이 목질계 또는 리그노 셀룰로오스계 바이오매스이다. 이들은 기존의 당질계와는 달리 원료수급이나 윤리적인 문제에 제한이 없어 이러한 재료를 사용하여 바이오에탄올을 생산하려는 여러 연구가 시도되고 있다. 그러나 이러한 원료들의 주요성분은 대부분이 셀룰로오스로 구성되어 있는데 이를 직접 에탄올 발효에 활용하기 위해서는 이들의 충분한 당화가 필요하다. 그러나 당화공정을 거처도 대부분이 분해되지 않은 올리고머 또는 폴리머 형태로 남아있는 경우가 많다.

[0005] 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 식물성 원료물질인 전분이나 셀룰로오스를 활용하는 다양한 생물공정분야에 이용되고 있다. 하지만 효모는 전분분해효소를 소량으로 생산 및 분비하여 셀룰로오스 기질을 전혀 분해할 수 없는 단점이 있다. 따라서 유전자 재조합 기술을 이용하여 셀룰로오스 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 셀룰로오스 분해 효소를 분비하는 유전자 재조합 효모를 제조하기 위한 연구가 활발히 진행 중이나 미흡한 실정이고 이를 위해서는 열 안정성이 높거나 활성이 우수한 셀룰로오스 분해 효소 유전자의 확보가 필요하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 일례는 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.) 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase) 코딩 유전자 및/또는 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 예는 상기 재조합 벡터가 도입된 효모 형질전환체를 제공한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 예는 상기 재조합 벡터를 효모에 형질전환시키는 단계를 포함하는 바이오 에탄올 생산능이 증가된 효모 형질전환체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 예는 상기 효모 형질전환체를 배양하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법을 제공한다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명자들은 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 엔도글루칸아제-D 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질 전환된 효모 형질전환체를 개발하여 이를 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM))에 기탁번호 KCCM11005P로 기탁하고, 상기 효모 형질전환체가 엔도글루칸아제를 효과적으로 분비하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모가 기질로 제공되는 바이오매스, 특히 셀룰로오스계 바이오매스를 보다 효과적으로 분해하여 바이오 에탄올의 생산능이 향상되도록 형질전환된 효모 형질 전환체를 제조하는 기술에 관한 것이다.

- [0012] 보다 상세하게, 본 발명의 일례는 클로스트리디움 속 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4) 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환되어 상기 효소를 발현시키고 세포 외로 분비할 수 있는 효모 형질전환체를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase)는 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*) 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제 D (endo- β -1,4-glucanase D, 코딩 유전자: Accession No. M37434, 코딩 서열: Accession No. M37434의 337번째부터 1788번째까지의 염기서열, 서열번호 1) 일 수 있다.
- [0014] 상기 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제는 결정형 셀룰로오스 (crystalline cellulose)를 직접 분해할 수 있어서, 상기 효소의 코딩 유전자를 바이오 에탄올 생산능이 있는 효모에 형질 전환 시키면, 셀룰로오스 자체를 분해할 수 있는 능력이 부여되어, 기존의 셀룰로오스를 직접 에너지원으로 사용할 수 없는 효모의 단점이 극복될 수 있다.
- [0015] 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 혐기중온성 세균으로서, 다양한 셀룰로오스 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 클로스트리디움 셀룰로보란스가 생산하는 셀룰로오스 분해 효소들은 기질 특이성과 반응기작에 큰 차이를 보이는 하나, 모두 베타-1,4-글루코시드 (β -1,4-glycoside) 결합을 분해하며, 균체 외 배지로 분비되는 특징이 있다.
- [0016] 효모로 도입된 엔도-베타-1,4-글루칸아제 코딩 유전자는 효모 형질전환체에서 성공적으로 발현하여 엔도글루칸아제를 생성하며, 이와 같이 효모 형질전환체로부터 생성된 엔도글루칸아제는 효과적으로 결정형 셀룰로오스를 분해하여 에탄올 생산효과를 상승시키는 효과를 가져온다. 또한 본 발명의 효모 형질전환에 사용된 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래의 엔도글루칸아제는 그 안정성이 매우 뛰어나 효소에서 단백질로 만들어 질 때에 인클루전 바디 (inclusion body)를 형성하거나 절단(truncate)되지 않고 완전한 효소로서 (mature protein) 만들어지며 효소 세포 외로 분비된 후에도 매우 오랫동안 안정한 상태를 유지하며 활성을 가질 수 있고, 세포외 분비 효율이 높다는 이점을 갖는다. 유사한 작용을 하는 효소라도 그 유래에 따라서 processing 과정 등의 차이로 인하여 안정성이나 분비효율 측면에서 상이할 수 있는 바, 본 발명에서는 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래의 엔도글루칸아제를 사용함으로써, 높은 세포외 분비효율과 안정성이 달성될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 일례에서, 본 발명은 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase, EC 3.2.1.21) 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환되어 상기 효소를 발현시키고 세포 외로 분비할 수 있는 효모 형질전환체를 제공한다.
- [0018] 사카로마이콥시스 속 미생물로부터 유래한 베타-글루코시다제는 셀로비오스를 분해하여 글루코오스로 만들 수 있는 능력이 있는 효소로서 엔도글루칸아제의 산물을 기질로 사용함으로써, 효모가 에너지원으로 글루코오스를 사용하도록 할 수 있다. 본 발명의 구체예에 있어서, 사카로마이콥시스 속 미생물로부터 유래한 베타-글루코시다제는 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) 유래의 베타-글루코시다제 (코딩 유전자: Accession No.M22475.1, 코딩 서열: Accession No.M22475.1의 328번째부터 2904번째까지의 염기서열, 서열번호 2)일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일례에서, 클로스트리디움 속 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase) 코딩 유전자 (Accession No. M37434, 서열번호 1) 및 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 코딩 유전자 (Accession No.M22475.1, 서열번호 2)를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환되어 상기 효소를 발현시키고 세포 외로 분비할 수 있는 효모 형질전환체가 제공된다.
- [0020] 본 발명에 따라 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제 유전자와 베타-글루코시다아제 유전자가 도입된 효모 형질 전환체는 동시당화배양 (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 공정에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 결정형 셀룰로오스의 효과적인 분해를 위하여 엔도글루칸아제 (endoglucanase) 이외에 베타-글루코시다제 (β -glucosidase)가 동시에 작용하는 것이 유리하며, 이들의 상승작용으로 셀룰로오스 분해능 및 이로 인한 바이오 에탄올 생산능이 크게 증가할 수 있다. 실제, 베타글루칸을 기질로 한 발효결과 상기 유전자들이 도입된 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하는 것으로 나타났다.

- [0021] 상기 형질전환되는 효모는 사카로마이스스 속 (*Saccharomyces* sp.) 균주에서 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 사카로마이스스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 효모 형질전환체는 기탁번호 KCCM11005P의 균주일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 예는
- [0023] 클로스트리디움 속 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase) 코딩 유전자 (예컨대, 서열번호 1) 및 사카로마이콥시스 속 (*Saccharomycopsis* sp.) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 코딩 유전자 (예컨대, 서열번호 2)를 포함하는 제조합 벡터를 준비하는 단계; 및
- [0024] 상기 제조합 벡터를 이용하여 효모를 형질전환시키는 단계
- [0025] 를 포함하는 바이오 에탄올 생산능이 향상된 효모 형질전환체의 제조 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 예는 상기에서 얻어진 효모 형질전환체를 바이오매스와 함께 배양하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올 제조 방법을 제공한다. 상기 바이오매스는 사탕수수, 옥수수 등의 당질계 바이오매스, 목재, 폐목자원, 잉여농산물, 초본계 작물과 같은 셀룰로오스계 바이오매스 등이 있다. 특히, 본 발명에 따른 효모 형질전환체는 기존에 효모가 직접 분해할 수 없었던 셀룰로오스계 바이오매스를 직접 분해하여 바이오 에탄올을 효율적으로 생산할 수 있다는 이점을 갖는다.
- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 셀룰로오스(cellulose)는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 다당류로서, 셀룰로오스 분해 효소인 셀룰라제(cellulase)에 의해 분해된다. 셀룰로오스 섭취 시 초식동물의 위에 기생하는 미생물이 분비하는 셀룰로오스 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. 본 발명에서 사용된 클로스트리디움 속 균주로부터 셀룰로오스 분해 효소인 엔도글루칸아제(EngD)는 실온에서도 활성이 오래 유지되는 이점이 있으며, 상기 클로스트리디움 속 균주로부터 셀룰로오스 분해 효소인 엔도글루칸아제(EngD)의 유전자를 효모에 도입하여 제조한 효모 형질전환체 균주는 EngD를 높은 수준으로 발현 및 분비한다는 것을 확인하였다.
- [0029] 본 발명의 실시예에서는 엔도글루칸아제 유전자를 클로스트리디움 셀룰로보란스의 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통하여 얻었고, 얻어진 상기 유전자를 효모-대장균 셔틀벡터(yeast-*E. coli* shuttle vector)에 서브 클로닝하여 제조합 벡터를 제작하였다. 이후, 상기 엔도글루칸아제 유전자가 삽입된 제조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, 상기 유전자로부터 발현되는 단백질이 엔도글루칸아제임을 조사하기 위해, EngD가 도입된 제조합 효모 형질 전환체를 배양하여 엔도글루칸아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 클로스트리디움 속 유래의 엔도글루칸아제가 도입된 제조합 효모 형질전환체는 야생형 효모 (사카로마이스스 세레비시아 YPH499균주)보다 현저히 높은 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, 본 발명에 따라 제조합되고 형질전환된 효모 형질전환체의 EngD 유전자가 엔도글루칸아제를 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0030] 또한, 상기 제조합 효모 형질전환체의 엔도글루칸아제 분비 여부와 CMC (carboxymethylcellulose) 분해능을 조사한 결과, 상기 효모 형질전환체로부터 엔도글루칸아제가 활발히 분비되는 것과 셀룰로오스를 분해하는 기능이 매우 효율적으로 이루어지고 있음을 확인하였고, 이로 인하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인하였다 (도 5 참조).

효 과

- [0031] 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 셀룰로오스의 분해와 분해산물로부터 알코올을 생산하는 동시당화발효 융합공정(SSF, simultaneous saccharification and fermentation 혹은 consolidated bioprocessing)에 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0033] <실시예 1> 유전자 클로닝
- [0034] 효모 외부로 효과적으로 효소를 분비하기 위한 시그널 펩타이드 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이스스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae* strain BY4741, 고려대학교 윤철원교수님)의 게놈 DNA로부터 α -factor의 시그널 펩타이드 부분의 염기서열 (Accession no. AAFW02000135, 서열번호 3)을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 EcoRI, 역방향 프라이머 (Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Not I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0035] forward primer: 5'-aacggaattcatgagatttccttcaatttttactgcagtt-3' (서열번호 4),
- [0036] reverse primer: 5'-gccagcgccgcgtcttttatccaagatacccttcttcttag-3'(서열번호 5).
- [0037] 상기 합성된 프라이머를 이용하여 사카로마이스스 세레비지에 게놈 DNA에 대하여 PCR을 수행하였다 (PCR 조건: 94℃, 5 min; 30cycle - 94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 1 min; 72℃, 10 min).
- [0038] 상기 얻어진 결과를 도 1a에 나타내었다. 도 1a의 Lane 1은 100bp DNA 마커이고, Lane 2는 α -factor PCR 산물을 나타내는 것이다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 255 bp의 효모 시그널 펩타이드 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있다.
- [0039] 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*, ATCC 35296) 유래의 엔도글루칸아제D(EngD, Accession No. M37434, 서열번호 1) 유전자를 클로닝하기 위하여, 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 *Bam*HI, 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 *Xho*I 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0040] Forward primer: 5'-ggcggccgctctactgcttttacaggtgtacg-3' (서열번호 6)
- [0041] Reverse primer: 5'-gactagtgtcttttactgtgcattcagtagcat-3' (서열번호 7).
- [0042] 상기 합성된 프라이머를 이용하여 클로스트리디움 셀룰로보란스 게놈 DNA에 대하여 PCR을 수행하였다 (PCR 조건: 94℃, 5 min; 30cycle-94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 1 min; 72℃, 10min).
- [0043] 상기 얻어진 결과를 도 1b에 나타내었다. 도 1b의 Lane 1은 1kb DNA 마커이고, Lane 2는 EngD PCR 산물을 나타내는 것이다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 1452bp의 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래의 EngD 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있다.
- [0044] 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*, KCCM, accession no. M22475.1) 유래의 베타-글루코시다제(Bgl1, 서열번호 2) 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 프라이머를 합성하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0045] Forward primer: 5'-ggcgcggccgcgtcccaattcaaaactatacc-3' (서열번호 8)
- [0046] Reverse primer: 5'-ggcactagtgaatagtagaacaggacagatgtct-3' (서열번호 9).
- [0047] 상기 합성된 프라이머를 이용하여 사카로마이콥시스 피불리게라 게놈 DNA에 대하여 PCR을 수행하였다 (PCR 조건: 94℃, 5 min; 30cycle - 94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 1 min; 72℃, 10 min).
- [0048] 상기 얻어진 결과를 도 1c에 나타내었다. 도 1c에서 Lane 1은 1kb DNA 마커이고, Lane 2는 Bgl1 PCR 산물을 나타내는 것이다. 도 1c에 나타난 바와 같이, 2577bp의 사카로마이콥시스 피불리게라 유래의 Bgl1유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있다.

[0049] <실시예 2> 발현백터 및 형질전환체 제조

[0050] 상기 실시예 1에서 얻은 효모 시그널 펩타이드(α -factor)와 EngD와 Bgl1의 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고, 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.

[0051] 그 후, 효모 시그널 펩타이드의 경우는 *EcoRI*와 *Not I*으로 절단하고, 이를 *Not I*와 *Spe I*으로 절단된 EngD 증폭 산물 및 Bgl1 증폭 산물과 각각 효모-대장균 셔틀 벡터 (yeast-*E. coli* shuttle vector)인 pESC-trp (Clontech)에 라이게이션 (ligation)시켜 대장균 DH5 α (RBC Co.) 각각 형질전환시켰다. 상기 얻어진 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다 (DOKDO prep plasmid miniprep kit, ELPIS). 상기 재조합 벡터를 각각 pESC- α -EngD, 및 pESC- α -Bgl1이라 명명하였다.

[0052] 그 후 pESC- α -EngD를 주형으로 효소 시그널 펩타이드와 엔도글루칸아제 부분을 유전자 증폭하여 (forward primer: 5'-aacggaattcatgagatttccttcaatttttactgcagtt-3'(서열번호 10), reverse primer: 5'-gactagtgtcttttactgtgcattcagtagcat-3'(서열번호 11)), 상기 증폭 산물을 pESC- α -Bgl1의 *BamHI* 및 *Xho I* 부위에 라이게이션시켜 대장균 DH5 α 에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다 (DOKDO prep plasmid miniprep kit, ELPIS). 상기 재조합 벡터를 p α EngD α Bgl1이라 명명하고, 이를 도 2에 도시하였다.

[0053] 이후, 상기 재조합 벡터들을 이용하여 클론테크(clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2)에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 상기 효모 숙주세포로는 사카로마이스스 세레비지에 YPH499 (*S. cerevisiae* YPH499, ura3-52lys2-801amberade2-101ochretrp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)를 사용하였다.

[0054] 그리고 난 후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)를 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 선별된 균주를 *S. cerevisiae* YPH499/p α EngD α Bgl1라 명명하였다. 상기 균주를 대한민국 서울시 서대문구 홍제동에 소재하는 한국미생물보존센터에 2009년 04월 22일자로 기탁하여, 수탁번호 KCCM11005P를 부여받았다

[0055] <실시예 3> 효모 형질 전환체의 엔도글루칸아제 활성 측정

[0056] 상기 실시예 2에서 제작한 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, 배지상에서 효소 활성대 (halo) 측정, SDS-PAGE와 Zymogram을 실행하였다.

[0057] YPH499/p α EngD α Bgl1를 갈락토오스로 발현 유도하여 EngD 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여, 30° C 에서 48시간동안 진탕배양 후, 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 준비하고 13,000rpm에서 30분 동안 농축하여 (Millipore, amicon 10kDa cut off), EngD 효소 단백질을 얻었다.

[0058] 효소활성대 (halo)를 확인하기 위해 YPD한천배지에 0.3wt% CMC (carboxy methyl cellulose, Sigma)을 녹여 효소반응의 기질로 사용하였다. 형질 전환된 효모의 콜로니를 YPG한천배지(1wt% yeast extract, 2wt% peptone, 2wt% galactose, 2wt% agar, Duchefa)에 접종하여 48시간동안 30° C에서 배양한 것과, 형질 전환된 효모를 YPG 액상배지(1wt% yeast extract, 2wt% peptone, 2wt% galactose, Duchefa)에서 48시간동안 30° C에서 배양한 배양액 5 μ l을 기질 (0.3wt% CMC, carboxymethylcellulose, Sigma, 1wt% yeast extract, 2wt% peptone, 2wt% galactose, 2wt% agar, Duchefa)이 포함된 한천배지에 올려 흡수시킨 후 50° C에서 24시간 반응시켰다. 0.25% 콩고레드(Congo-Red, Sigma)로 20분간 염색하고, 1M NaCl로 여러 번 행구어 낸 후 효소활성대(halo)를 확인하여 콜로니 및 배양액에 대한 결과를 도 3a 및 도 3b에 각각 나타내었다. 도 3a에 나타난 바와 같이, 형질 전환 된 효모의 콜로니로부터 엔도글루칸아제가 성공적으로 분비됨이 확인되었고, 또한 도 3b에 나타난 바와 같이, 배양액에서 얻은 엔도글루칸아제 역시 셀룰로오스를 분해하는 활성을 가지고 있음이 확인되었다.

[0059] EngD와 Bgl1의 발현을 확인하기 위해, 10% 폴리아크릴아미드 겔 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)과 0.1% CMC (carboxymethylcellulose)을 녹인 폴리-아크릴아마이드 겔 (CMC, Sigma; 폴리아크릴아마이드, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)을 사용하여 효소 단백질을 전기 영동하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 53kDa과 95kDa 위치에 단백질 밴드를 확인하였으며, 이를 도 4a에 도시하였다. 도 4a에서 Lane1은 단백질 마커 (Elpis)를 나타내고, Lane2는 쿠마지 블루로 염색된 p α EngD α Bgl1 유래의 EngD와 Bgl1의 SDS-PAGE 겔

과를 나타낸다.

- [0060] 정확한 위치에서의 효소발현을 확인하기 위하여 Zymogram을 실행하였다 ('Schwarz WH, Bronnenmeier K, Grabnitz F & Staudenbauer WL (1987) Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans. *Anal Biochem* 164: 72-77' 참조). 이를 실시하기 위해, 기질(0.1wt% CMC)이 첨가된 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 SDS-PAGE를 수행한 겔을 renature buffer (100mM Succinate, 10mM CaCl₂, 1mM dTT)에 형질전환체를 넣고 2시간동안 1시간 마다 renature buffer를 갈아준 후 50° C에서 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 겔을 0.25% 콩고레드 (Congo-Red)로 30분간 염색 후 1M NaCl로 수차례 행구어 내어, EngD 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 효소 활성대 (halo)를 확인할 수 있었다. 이 결과를 도 4b에 도시하였다. 도 4b에서 Lane1는 단백질 마커(Elpis)를 나타내고, Lane2는 EngD halo를 나타낸다.

[0061] <실시예 4> 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

- [0062] YPH499/p α EngD α BG1와 YPH499/pESC-trp를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 50g/l 셀로비오스 (Sigma)와 20g/l CMC (carboxymethylcellulose, Sigma)가 기질로 첨가된 발효 배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 5와 20이 되도록 하였다. 상기 발효배양액을 30° C, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법으로 실행결과 얻어진 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제가 삽입된 YPH499/p α EngD α BG1에서의 에탄올 생산수율과 YPH499/pESC-t에서의 생산 수율을 도 5에 도시하였다. 도 5는 20 g/L CMC 및 β -글루칸으로부터 에탄올 생산량을 나타낸 것으로, ●는 p α EngD α BG1로부터 얻어진 결과이고, ■는 pESC-trp로부터 얻어진 결과이다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제가 삽입된 YPH499/p α EngD α BG1에서의 에탄올 생산수율이 YPH499/pESC-trp보다 높게 측정되었다.

[0063] [참고문헌]

- [0064] Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H., 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol* 184(18), 5088-5095.
- [0065] Schwarz, W.H., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 56(5-6), 634-649.
- [0066] Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol* 7(7), 275-281.
- [0067] Shoseyov, O., Hamamoto, T., Foong, F., Doi, R.H., 1990. Cloning of *Clostridium cellulovorans* endo-1,4-beta-glucanase genes. *Biochem Biophys Res Commun* 169(2), 667-672.
- [0068] Schwarz WH, Bronnenmeier K, Grabnitz F & Staudenbauer WL (1987) Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans. *Anal Biochem* 164: 72-77
- [0069] Roy H. Doi, Yutaka Tamaru, 2001. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem Rec* 1(1), 24-32.

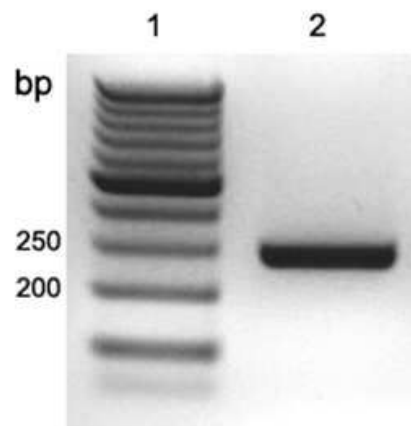
도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1a는 실시예 1에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 효모의 시그널 펩타이드 유전자의 PCR 산물을 확인한 결과이며,
- [0071] 도 1b는 실시예 1에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 엔도-베타-1,4-글루칸아제-D 유전자의 PCR 산물을 확인한 결과이며,
- [0072] 도 1c는 실시예 1에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 베타-글루코시다제 유전자의 PCR 산물을 확인한 결과이다.
- [0073] 도 2는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-D 유전자와 베타-글루코시다제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 p α EngD α BG1와 재조합 과정을 나타낸 모식도이다.

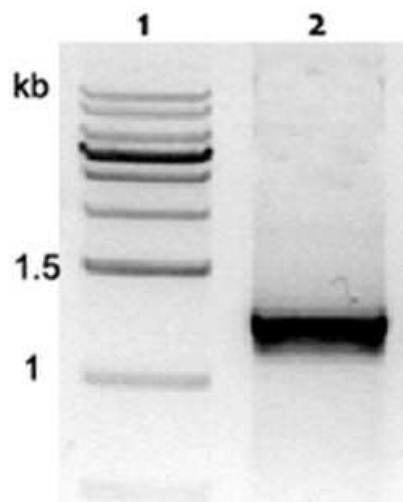
- [0074] 도 3a는 재조합 벡터 p α EngD α BG1가 삽입된 효모 형질 전환체의 콜로니에서의 효소 활성을 보임으로써 효소 분비를 확인한 결과이며,
- [0075] 도 3b는 재조합 벡터 p α EngD α BG1가 삽입된 효모 형질 전환체의 배양액에서의 효소 활성을 보임으로써 배양액에서의 효소 분비를 확인한 결과이다.
- [0076] 도 4a는 효모 형질전환체에서의 효소의 발현을 SDS-PAGE기법으로 확인한 결과를 보여주는 것이고,
- [0077] 도 4b는 효모 형질전환체에서의 효소의 발현을 Zymogram 기법으로 확인한 결과를 보여주는 것이다.
- [0078] 도 5는 재조합 벡터 p α EngD α BG1가 삽입된 효모 형질 전환체 및 야생형 효모의 CMC를 기질로 하는 에탄올 생산 정도를 보여주는 그래프이다.

도면

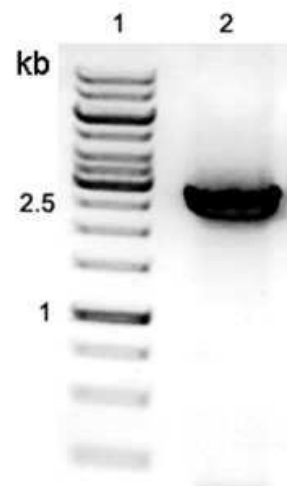
도면1a



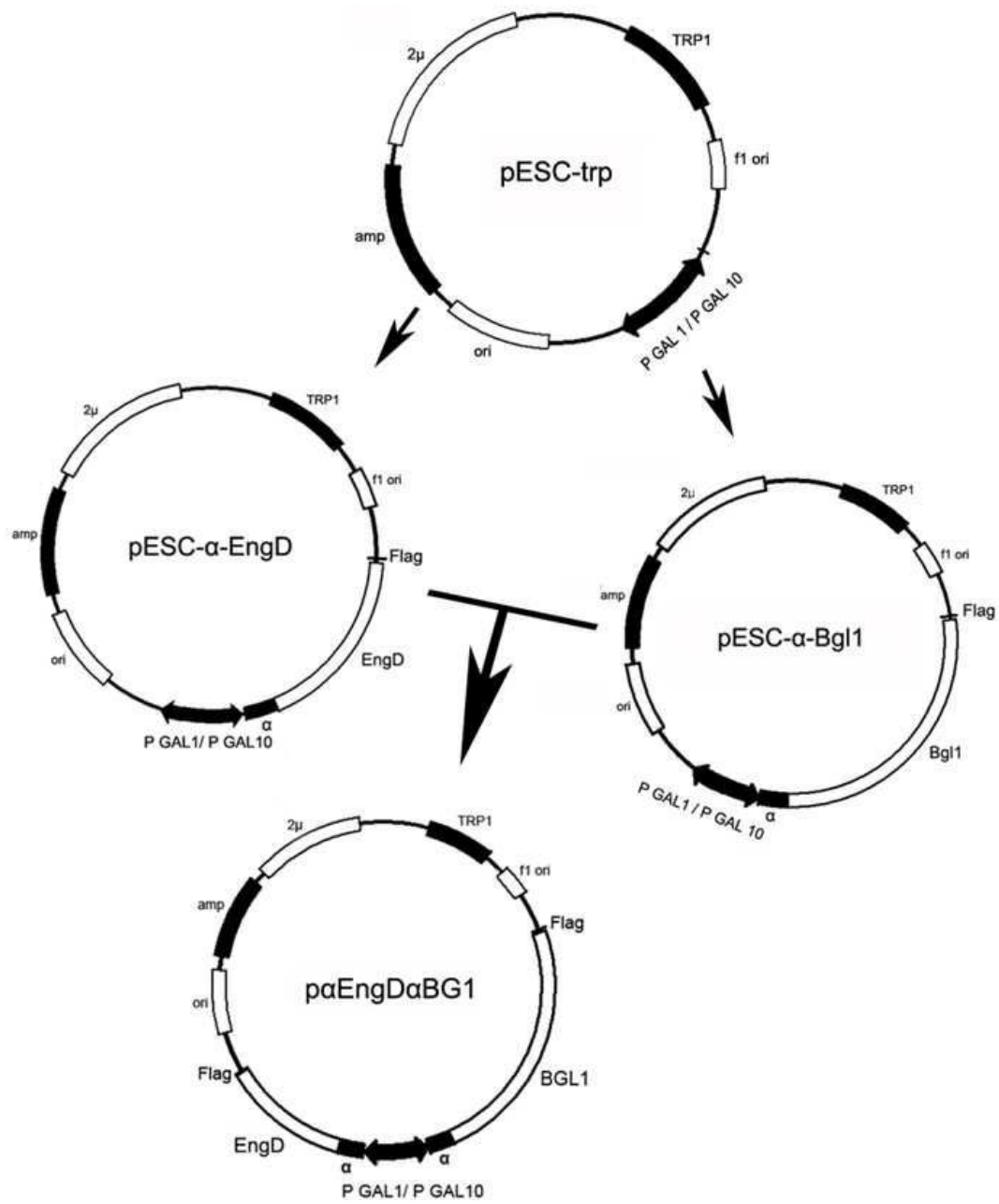
도면1b



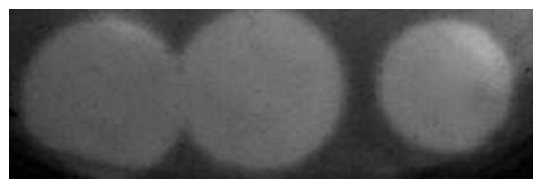
도면1c



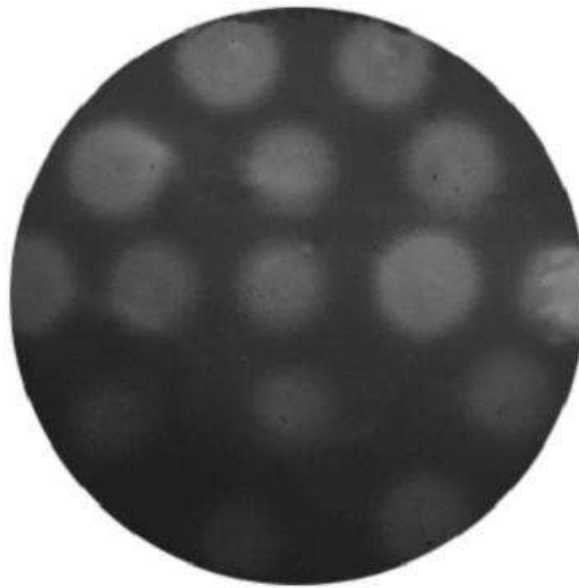
도면2



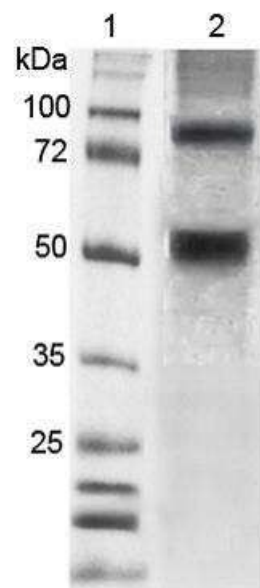
도면3a



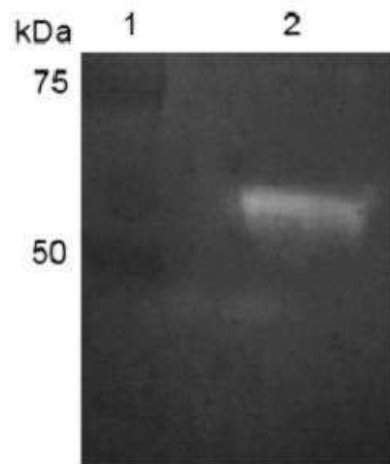
도면3b



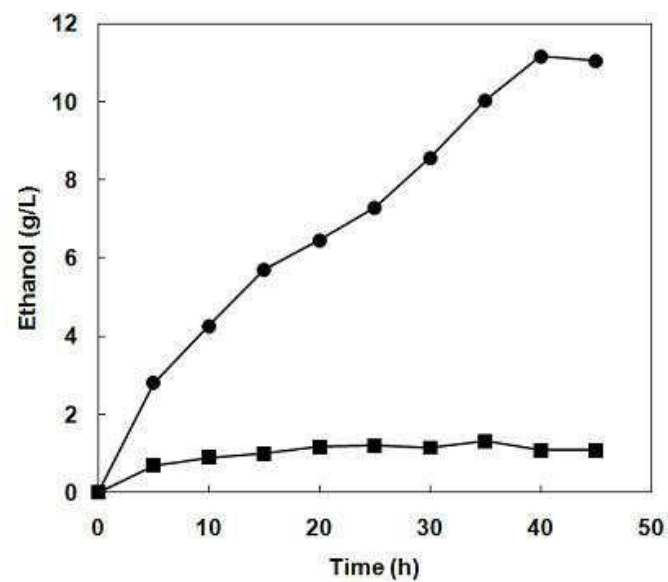
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

- <110> Nanotoxtech Inc.
KOREA UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMY COLLABORATION FOUNDATION
- <120> Yeast transformant with improved productivity of bio-ethanol
- <130> DPP-2009-1666-KR
- <160> 11
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 1452
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Coding gene for endo-beta-1,4-glucanase D originated from
 Clostridium cellulovorans

<400> 1
 tctactgctt ttacaggtgt acgtgacgta ccagcacaaac agattgttaa tgaaatgaag 60

 gttggttga atttaggaaa tacaatggat gccataggtg gagaaactaa ctggggaaat 120

 cctatgacaa ctcacgctat gattaataaa attaaagaag caggctttta tactttaaga 180

 cttccagtaa ctgggatgg tcatatggga gcagcacctg aatatactat cgatcaaaca 240

 tggatgaaaa gagtagagga aatagcaaat tatgcttttg ataatgatat gtatgttatt 300

 atcaatctcc atcatgagaa tgaatggctt aagcctttct acgcaaatga agctcaagta 360

 aaagcgcaac ttacaaaagt ttggactcaa attgcaaata acttcaaaaa atatggtgat 420

 catttaattt tcgaaacaat gaatgagcca agaccagtag gcgcttcgtt acagtggaca 480

 ggcggttctt atgaaaatcg tgaagtagtt aatagatata atttaactgc tgtaaatgca 540

 attagagcaa ctggaggaaa taacgaaca agatatatca tggtaaccaac tcttcagct 600

 tctgcgatga gtactacaat aaatgattta gtgattccaa ataacgatag caaagtcac 660

 gtatctttac atatgtattc accatatttc ttgctatgg atattaacgg aacatcatct 720

 tggggaagtg attacgataa gagttcactt gattcagaat ttgatgctgt ttacaataag 780

 tttgtgaaaa atggtagagc tgtagttatt ggtgaaatgg gctctattaa taaaaataat 840

 acagctgcta gagtaactca tgcagaatat tatgctaagt cagcaaaagc tagaggactt 900

actcctatat ggtgggataa cggatattct gttgctggaa aagcagagac ttttgggtata 960

ttaataagaa gcaatcttac atgggatgct ccagaagtta tgaaagcctt tataaaaggt 1020

attggtgggt caagcacaac aacgccaacg acaccaacga cgccaacaac accaacaaca 1080

ccaacaacgc caacaacacc aacaacacca acgacaccta caacaccaca atcagcagtt 1140

gaggttacat atgctattac aaatagttgg ggatcaggag cttctgttaa tgtaacaata 1200

aagaacaatg gtacaacacc tattaatgga tggacattaa agtggacaat gcctattaac 1260

caaaactataa caaatatgtg gagtgcctagt tttgtagcaa gtggaactac tttatcagta 1320

actaacgcag gttataatgg tacaatagca gtaacggag gtactcaaag ctttggcttc 1380

aatataaact atagtggagt attaaagcaa ccaactgggt tcacagttaa tggtagtgaa 1440

tgcacagtaa aa 1452

<210> 2
 <211> 2577
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Coding gene for beta-glucosidase originated from Saccharomycopsis fibuligera

<400> 2
 gtccaattc aaaactatac ccagctcca tcccagagag atgagagctc ccaatgggtg 60

agcccgcat attatccaac tccacaaggt gtaggctcc aagacgtctg gcaagaagca 120

tatgctagag caaaagccat cgttggccag atgactattg ttgaaaaggt caatttgacc 180

actggtaccg gttggcaatt agatccatgt gttggttaata ccggttctgt tccaagattc 240

ggcatcccaa acctttgcct acaagatggg ccattgggtg ttcgattcgc tgactttgtt 300

actggetatc catccggtct tgctactggt gcaacgttca ataaggattt gtttcttcaa	360
agaggtaag ctctcggta tgagttaac agcaaagggtg tacatattgc gttgggccct	420
gctgttgcc cacttggtgt caaagccaga ggtggcagaa atttgaagc ctttggttcc	480
gaccatata tccaaggta tgctgtgct gcaacatca aaggtctcca agagaataat	540
gttatggctt gtgtcaagca ctttattggt aacgaacaag aaaagtacag acagccagat	600
gacataaacc ctgccacaa ccaactact aaagaagcta ttagtgcaa cattccagac	660
agagccatgc atgcgttgta cttgtggcca ttgccgatt cggttcgagc aggtgttggt	720
tctgttatgt gctcttataa cagagtcaac aacacttacg cttgcgaaaa ctcttacatg	780
atgaaccact tgcttaaga agagtgggt tttcaaggct ttgtgtttc ggactggggt	840
gcacaattaa gtggggttta tagcgtatc tcgggcttag atatgtctat gcctggtgaa	900
gtgtatgggg gatggaacac cggcacgtct tttcggggtc aaaacttgac gaaagctatt	960
tacaatgaga ctgttcgat tgaaagatta gatgatattg caaccaggat cttggctgct	1020
ttgtatgcta ccaatagttt cccaacagaa gatcaccttc caaattttc ttcattggaca	1080
acgaaagaat atggcaataa atattatgct gacaacacta ccgagattgt caaagtcaac	1140
tacaatgttg acccatcaaa tgactttacg gaggacacag ctttgaaggt tgctgaggaa	1200
tctattgtgc ttttaaaaa tgaaaacaac actttgccaa tttctccga 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 acigtgccaa tactgttgtt gttgttactt ctactggtca aattaatfff	1680
gaaggctttg ctgatcacc aaatgttacc gcaattgtct gggccggccc attaggtgac	1740
agatccggga ctgctatcgc caatattctt ttggtaaag cgaacccatc aggtcatctt	1800
ccattcacta ttgctaagac tgacgatgat tacattccaa ttgaaaccta cagtccatcg	1860
agtggatgaac ctgaagacaa ccacttggtt gaaaatgact tgcttgttga ctatagatat	1920
tttgaagaga agaatatga gccaaagatac 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 cggaactat gagtatcctg atggctacag cactgagcaa	2220
agaacaacac ctaaccaacc tgggggcggc ttgggaggca acgatgcttt gtgggaggtc	2280
gcttataact ccactgataa gtttgttcca cagggttaact ccactgataa gtttgttcca	2340
cagttgtatt tgaacacccc tgaggatggc aagtttgaaa cccctattca attgagaggg	2400
tttgaaaagg ttgagttgtc cccgggtgag aagaagacag ttgatttgag gcttttgaga	2460
agagatctta gtgtgtggga taccaccaga cagtcttggg tcgttgaatc tgggtacttat	2520
gaggccttaa ttggcgttgc tgtaaatgat atcaagacat ctgtcctgtt tactatt	2577

<210> 3

<211> 255
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> nucleotide sequence for signal peptide of alpha factor of
 Saccharomyces cerevisiae strain BY4741

<400> 3
 atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120

 tacttagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180

 aacgggttat tgttataaaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240

 tctttggata aaaga 255

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for alpha factor

<400> 4
 aacggaattc atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt 40

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for alpha factor

<400> 5

gccagcggcc gcgtctttta tccaaagata ccccttcttc tttag 45

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for EngD

<400> 6
 ggccggccgct ctactgcttt tacaggtgta cg 32

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

<220>
 <223> Reverse primer for EngD

<400> 7
 gactagtgtc tttactgtgc attcagtacc at 32

<210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for Bgl1

<400> 8
 ggccggccg cgtcccaatt caaaactata cc 32

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for Bgl1

<400> 9
ggcactagtc gaatagtaaa caggacagat gtct 34

<210> 10
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for alpha factor-EngD

<400> 10
aacggaattc atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt 40

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for alpha factor-EngD

<400> 11
gactagtgtt tttactgtgc attcagtacc at 32