



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0025804
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C12N 9/92 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C12N 9/90 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0122782
(22) 출원일자 2015년08월31일
심사청구일자 2015년08월31일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
구자룡
충청남도 보령시 웅천읍 외성1길 19
김세경
인천광역시 남동구 만수로75번길 85, 6-1005 (만수동, 신동아아파트)
윤현식
인천광역시 남구 인화로 100 인하대학교
(74) 대리인
김순웅

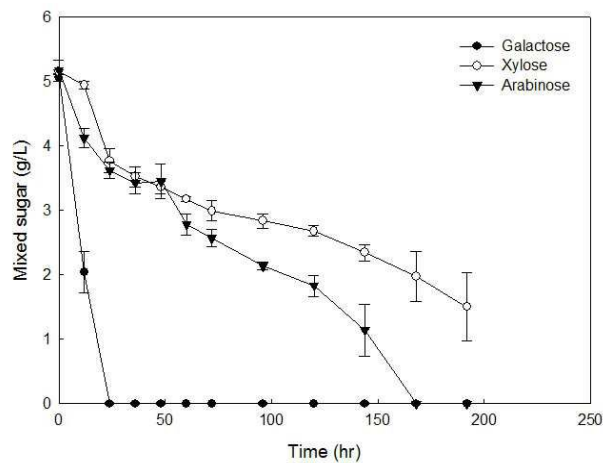
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 혼합당을 이용할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 혼합당을 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 재조합 미생물은 통상 탄소원으로 이용할 수 없는 오탄당 및 육탄당의 혼합당을 탄소원으로 하여 바이오에탄올을 생산할 수 있으므로 다양한 바이오리파이너리 및 바이오에너지의 분야에 적용 가능한 원천 기술로서 산업 원료 수입 절감에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



JSMS 1.

(52) CPC특허분류

C12N 9/92 (2013.01)

C12P 7/06 (2013.01)

C12Y 503/01005 (2013.01)

C12Y 504/02002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2044388

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 혼합당으로부터 지방산 에틸 에스터 생산

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코무타아제(phosphoglucomutase)를 코딩하는 유전자가 도입된, 혼합당 이용 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 효모인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자는 *iolI* 유전자인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 *iolI* 유전자는 *Lactobacillus rhamnosus* GG 유래인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 포스포글루코무타아제(phosphoglucomutase)를 코딩하는 유전자는 *pgm2* 유전자인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 *pgm2* 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae* 유래인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미생물은 혼합당을 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 혼합당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose), 리불로오스(ribulose), 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose), 만노오스(mannose) 및 프럭토오스(fructose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 당을 포함하는 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 미생물.

청구항 9

효모에 *iol1* 유전자 및 *pgm2* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 혼합당 이용 효모의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주인 것을 특징으로 하는, 혼합당 이용 효모의 제조방법.

청구항 11

제1항의 혼합당 이용 미생물을 혼합당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올의 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 혼합당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose), 리불로오스(ribulose), 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose), 만노오스(mannose) 및 프럭토오스(fructose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 당을 포함하는 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혼합당을 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 유지되는 화석연료 기반 산업의 대안으로 바이오리파이너리가 제시되고 있다. 미국 에너지 정보국의 조사 결과, 한국은 OECD 국가들 중에서 멕시코(2.1%)에 이어 두 번째로 높은 CO₂ 배출 연평균 증가율(1.7%)이 예측되었다(2005~2030년 OECD 연평균 증가율 0.5%). 화석연료 고갈, 유가 상승, 기온상승과 기후변화 등이 국가안전보장과 국가성장전략 차원의 정책을 유도하고 있어, 신재생 에너지 사업과 같은 환경친화적 전략이 요구된다.

[0003] 바이오리파이너리는 바이오매스로부터 재생가능한 연료, 전력 및 화합물을 생산하기 위한 바이오매스 전환 공정과 장치를 아우르는 표현이다. 바이오매스란 광합성에 의해 빛에너지가 화학에너지로 축적된 식물자원을 의미하는데 크게 곡물자원을 활용한 1세대 바이오매스, 작물의 줄기나 폐목재 등을 사용하는 2세대 바이오매스 그리고 해조류를 활용한 3세대 바이오매스로 구분된다. 이중 2세대 바이오매스로 분류되는 목질계 바이오매스는 막대한 자원량과 저장성 및 대체성이 용이한 장점이 있는 반면 주성분인 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 물리화학적 방법이나 특정효소에 의하여 사용 가능한 오탄당을 생산하는 분해과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. 리그노셀룰로오스는 리그닌 가수분해공정을 통하여 글루코오스, 자일로오스와 아라비노오스등 여러 당류로 분해하여 회수할 수 있다. 그러나 자연계의 대부분의 미생물들은 이용하기 가장 편리한 글루코오스를 사용하고 나머지 자일로오스와 아라비노오스 등의 오탄당은 효과적으로 사용하지를 못한다. 따라서 리그노셀룰로오스의 가수분해물에 존재하는 여러 오탄당을 최대한 이용할 수 있는 균주의 능력이 바이오리파이너리 또는 바이오에너지 분야의 경쟁력을 증가시키기 위해 필수적인 요소이다. 자연계에서 자일로오스와 아라비노오스 등의 오탄당을 이용하는 박테리아나 효모는 많이 알려지지 않았으며, 최근 *Pichia stipitis* 등의 XR(Xylose Reductase), XDH(Xylulose Dehydrogenase)을 통한 유전자 조절 및 발현에 대한 연구가 이루어지고 있을 뿐이다. 최근에는 홍조류를 바이오매스로 이용한 바이오 에너지 생성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으나 해조류의 주성분인 갈락탄(galactan), 즉 갈락토오스(galactose)의 폴리머를 기질로 이용할 수 있는 균주는 거의 없다. 따라서 바이오매스로부터 바이오리파이너리 기술을 이용하여 유용한 화학원료물질을 생산하고 바이오매스 선택의 다양성을 위해 갈락토오스와 자일로오스, 아라비노오스 등의 대사에 관련된 효소와 그 메커니즘을 이해하고 효소반응이 효율적

으로 이루어지도록 하는 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 이에 본 발명자들은 혼합당을 이용할 수 있는 균주 개발에 대한 연구를 수행한 결과, 유전자 도입을 통해 혼합당을 이용할 수 있는 균주를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0005] 본 발명의 목적은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코무타아제(phosphoglucumutase)를 코딩하는 유전자가 도입된 혼합당 이용 미생물을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 또다른 목적은 효모에 *iolI* 유전자 및 *pgm2* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 혼합당 이용 효모의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또다른 목적은 상기 혼합당 이용 미생물을 혼합당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코무타아제(phosphoglucumutase)를 코딩하는 유전자가 도입된 혼합당 이용 미생물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 효모에 *iolI* 유전자 및 *pgm2* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 혼합당 이용 효모의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 혼합당 이용 미생물을 혼합당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 통상 탄소원으로 이용할 수 없는 오탄당 및 육탄당의 혼합당을 탄소원으로 하여 바이오에탄올을 생산할 수 있으므로 다양한 바이오리파이너리 및 바이오에너지의 분야에 적용 가능한 원천 기술로서 산업 원료 수입 절감에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 재조합 효모에 의해 소비되는 갈락토오스의 양을 나타낸 도이다.
- 도 2는 재조합 효모에 의해 소비되는 자일로오스의 양을 나타낸 도이다.
- 도 3은 재조합 효모에 의해 소비되는 아라비노오스의 양을 나타낸 도이다.
- 도 4는 재조합 효모 JSMS 1에 의해 소비되는 혼합당의 양을 나타낸 도이다.
- 도 5는 재조합 효모 JSMS 2에 의해 소비되는 혼합당의 양을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코무타아제(phosphoglucumutase)를 코딩하는 유전자가 도입된 혼합당 이용 미생물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 미생물은 육안으로 확인할 수 없는 0.1mm 이하의 크기인 미세한 생물로서 통상 오탄당을 탄소원으로 이용할 수 없는 미생물을 제한없이 포함 할 수 있으나, 바람직하게는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있

다. 효모는 다른 미생물에 비해 세포분리가 쉽고 인체 안정성이 보장되는 장점이 있다.

- [0016] 본 발명에서 "자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)"는 자일로오스(알도오스)와 자일룰로오스(케토오스) 사이의 이성질화 반응을 촉매하는 효소를 의미한다. 본 발명의 일실시예에서 *Lactobacillus rhamnosus* GG(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주)에서 분리한 자일로오스 아이소머레이즈 유전자인 *iolI*(Xylose isomerase domain-containing protein 2-keto-myo-inositol isomerase) 유전자를 사용하였으며, 바람직하게는 서열목록 1의 염기서열로 나타낼 수 있으며, 서열목록 2의 아미노산 서열로 전사된다. 본 발명의 유산균 유래 *iolI* 유전자를 미생물에 도입하면 통상적으로 XR(Xylose Reductase) 및 XDH(Xylose Dehydrogenase)를 통해야 하는 에탄올 생산 과정을 자일로오스 아이로머레이즈만으로도 가능하게 한다는 장점이 있다. 특히, 본 발명의 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주 유래의 *iolI* 유전자를 도입하는 경우 다른 유산균의 자일로오스 아이소머레이즈보다 바이오에탄올 생산 효과가 뛰어나다.
- [0017] 본 발명에서 "포스포글루코무타아제(phosphoglucumutase)"는 글루코오스-1-인산과 글루코오스-6-인산의 상호전환을 촉매하는 효소를 의미한다. 본 발명의 일실시예에서 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분리한 포스포글루코무타아제 유전자를 사용하였으며, 바람직하게는 서열목록 3의 염기서열로 나타낼 수 있으며, 서열목록 4의 아미노산 서열로 전사된다.
- [0018] 통상적으로 혼합당 내의 오탄당은 육탄당과 달리 효모에 의해 발효되지 않는 특징이 있다. 본 발명에서 혼합당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose), 리불로오스(ribulose), 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose), 만노오스(mannose) 및 프럭토오스(fructose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 당이 혼합되어있는 것을 말한다. 본 발명의 일실시예에서는 재조합 효모의 탄소원으로서 갈락토오스, 자일로오스, 아라비노오스 또는 이의 혼합물을 사용하였으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 "혼합당 이용"은 재조합 미생물이 자일로오스, 아라비노오스, 리보오스, 리불로오스, 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스 및 프럭토오스로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 당, 바람직하게는 2종 이상의 당을 포함하는 혼합당을 탄소원으로 소비하여 대사 산물을 생산할 수 있음을 의미한다.
- [0020] 본 발명에 따른 재조합 효모는 혼합당을 탄소원으로 하여 에탄올을 생산할 수 있으므로 바이오에너지 및 바이오파이너리 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 효모에 *iolI* 유전자 및 *pgm2* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 혼합당 이용 효모의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 상기 효모는 당업자에게 공지된 효모 균주를 제한 없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주일 수 있다.
- [0023] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 혼합당 이용 효모의 제조방법은 *Saccharomyces cerevisiae* 균주에서 *pgm2* 유전자를 분리하는 단계, 이를 인테그레이션하여 효모의 chromosomal DNA에 도입하는 단계, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주에서 *iolI* 유전자를 분리하는 단계, 이를 증폭시켜 벡터에 클로닝하는 단계, 상기 재조합 벡터를 *pgm2* 유전자가 도입되어있는 효모에 추가로 도입하는 단계를 포함한다. 상기 벡터는 효모에 형질전환시킬 수 있는 당업계에 공지된 벡터를 제한 없이 포함하나, 바람직하게는 YCplac33 벡터일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 혼합당 이용 효모의 제조방법은 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주에서 *iolI* 유전자를 분리하는 단계, 이를 인테그레이션하여 효모의 chromosomal DNA에 도입하는 단계, *Saccharomyces cerevisiae* 균주에서 *pgm2* 유전자를 분리하는 단계, 이를 증폭시켜 벡터에 클로닝하는 단계, 상기 재조합 벡터를 *iolI* 유전자가 도입되어있는 효모에 추가로 도입하는 단계를 포함한다. 상기 벡터는 효모에 형질전환시킬 수 있는 당업계에 공지된 벡터를 제한 없이 포함하나, 바람직하게는 pESC-ura 벡터일 수 있다.
- [0024] 상기 벡터의 숙주 효모 내로의 도입은 당업계에 널리 알려진 삽입 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, CaCl_2 방법, 전기천공법, 리튬 아세테이트 방법, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 바람직하게는 CaCl_2 방법, 리튬 아세테이트 방법, 전기천공법을 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 재조합 혼합당 이용은 혼합당을 발효시켜 바이오에탄올을 생산할 수 있는 특

징이 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 혼합당 이용 미생물을 혼합당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공한다.

[0027] 상기 혼합당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose), 리불로오스(ribulose), 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose), 만노오스(mannose) 및 프럭토오스(fructose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다.

[0028] 상기 바이오에탄올의 생산방법에 의하면 혼합당을 이용하여 바이오에탄올을 높은 수율로 생산할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 실시예 1 - 재조합 미생물의 제조

[0032] 혼합당을 이용하여 바이오에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물을 제조하기 위하여 하기와 같이 수행하였다.

[0033] 1.1 *iolI* 유전자의 분리 및 재조합 벡터의 제조

[0034] *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주)에서 자일로오스 아이소머레이즈인 *iolI* 유전자(Xylose isomerase domain-containing protein 2-keto-myo-inositol isomerase)를 분리하였고 이를 PCR 기법으로 증폭한 후, PCR 생성물을 PCR purification 키트를 이용하여 정제하였다. 정제한 *iolI* 유전자를 YCplac33 벡터에 삽입하여 형질전환용 재조합 벡터를 제조하였다. 이후 CaCl₂ 방법을 이용하여 *E. coli* XL1-blue에 상기 재조합 벡터를 형질전환시켰다. 형질전환시킨 *E. coli*에서 plasmid miniprep 키트를 이용하여 플라스미드 DNA를 정제하였다.

[0035] 1.2 *pgm2* 유전자의 분리 및 재조합 벡터의 제조

[0036] 효모가 보유하고 있는 *pgm2* 유전자를 추가적으로 도입함으로써 갈락토오스의 소비를 더 빠르게 하기 위하여, *Saccharomyces cerevisiae*에서 *pgm2* 유전자를 분리하였고 이를 PCR 기법으로 증폭한 후, PCR 생성물을 PCR purification 키트를 이용하여 정제하였다. 정제한 *pgm2* 유전자를 pESC-ura 벡터에 삽입하여 형질전환용 재조합 벡터를 제조하였다. 이후 CaCl₂ 방법을 이용하여 *E. coli* XL1-blue에 상기 재조합 벡터를 형질전환시켰다. 형질전환시킨 *E. coli*에서 plasmid miniprep 키트를 이용하여 플라스미드 DNA를 정제하였다.

[0037] 1.3. JSMS 1 균주의 제조

[0038] EUROSCARF(EUROpean *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis)에서 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주를 입수하였다. 상기 1.1에서 정제된 플라스미드 DNA를 *Saccharomyces cerevisiae* 균주에서 분리된 *pgm2* 유전자가 도입된 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주에 리튬 아세테이트 방법 및 전기천공법 (Bio-rad, CA, US)을 병행하여 추가적으로 형질전환시켜 재조합 효모를 제조(이하 'JSMS 1' 균주라 함)하였으며, 이후 실시예에 사용하였다.

[0039] 1.4 JSMS 2 균주의 제조

[0040] EUROSCARF(EUROpean *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis)에서 *Saccharomyces*

cerevisiae BY4742 균주를 입수하였다. 상기 1.2에서 정제된 플라스미드 DNA를 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주)에서 분리된 자일로오스 아이소머레이즈인 *iolI* 유전자(Xylose isomerase domain-containing protein 2-keto-myo-inositol isomerase)가 도입된 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주에 리튬 아세테이트 방법 및 전기천공법 (Bio-rad, CA, US)을 병행하여 추가적으로 형질전환시켜 제조합 효모를 제조(이하 'JSMS 2' 균주라 함)하였으며, 이후 실시예에 사용하였다.

[0041] 실시예 2 - 제조합 미생물의 혼합당 이용 확인

[0042] 상기 실시예 1에서 제조한 제조합 효모 JSMS 1 및 JSMS 2가 혼합당을 이용하는 능력이 있는지 확인하기 위하여 제조합 효모와 함께 배양될 경우 혼합당의 농도 변화를 측정하였다.

[0043] 먼저, 배양 시작시의 OD를 0.5로 하고 30℃에서 200rpm의 조건으로 전배양하였다. 전배양은 호기 상태에서 YPD 배지를 이용해 수행하였으며, 초기 정제 단계까지 배양한 후 증류수로 세척했다. 제조합 효모를 혼합당 배지에 접종하였고 30℃에서 200rpm의 조건과 1 mM의 IPTG로 유전자 발현을 유도하였다. 이후의 배양은 혼합당(갈락토오스, 자일로오스, 아라비노오스) 배지에서 혐기 상태로 수행하였다. 전배양 및 이후의 배양을 200시간 내외로 수행하였으며, 배양시작 후 72시간까지는 12시간마다, 72시간 이후에는 24시간마다 배지 내의 갈락토오스, 자일로오스, 아라비노오스 및 혼합당의 농도를 측정하여 그 결과를 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

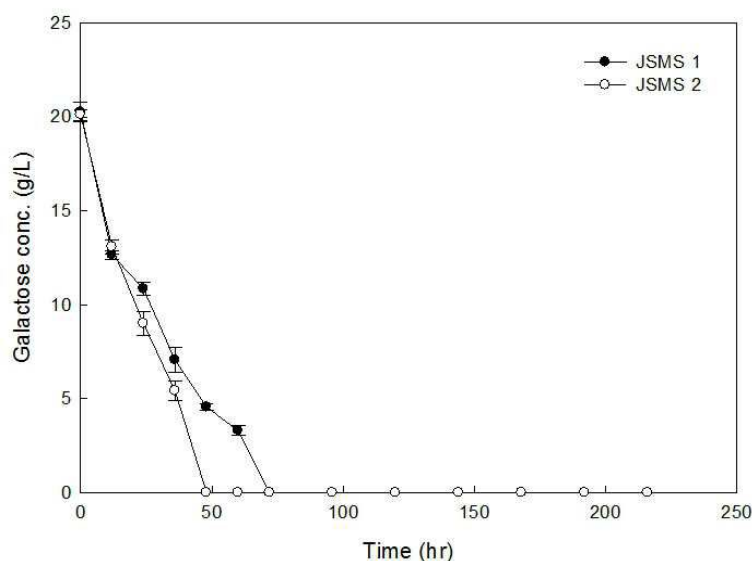
[0044] 도 1 내지 도 5에 나타낸 바와 같이 갈락토오스, 자일로오스, 아라비노오스 및 혼합당의 농도가 시간에 따라 감소함을 확인하였으며, 이는 제조합 미생물이 에탄올 생산에 갈락토오스, 자일로오스, 아라비노오스 및 혼합당을 탄소원으로 이용함을 의미한다. 따라서 효모에 도입된 *iolI* 유전자 및 *pgm2* 유전자가 효모 시스템에서 작동가능하여 세가지 혼합당 배지에서 모든 당을 다 소비할 수 있음을 확인하였다.

[0045] 또한 JSMS 1 균주의 경우 JSMS 2 균주에 비해 아라비노오스를 24시간 정도 더 빨리 소비함을 확인하였다.

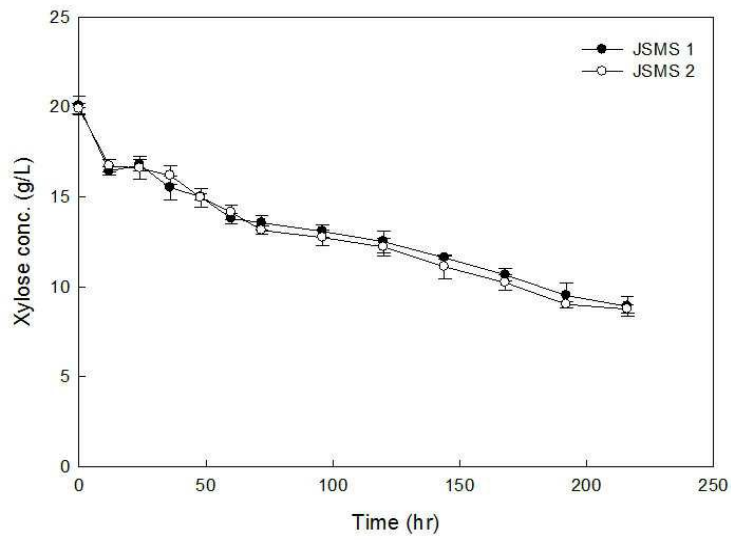
[0046] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

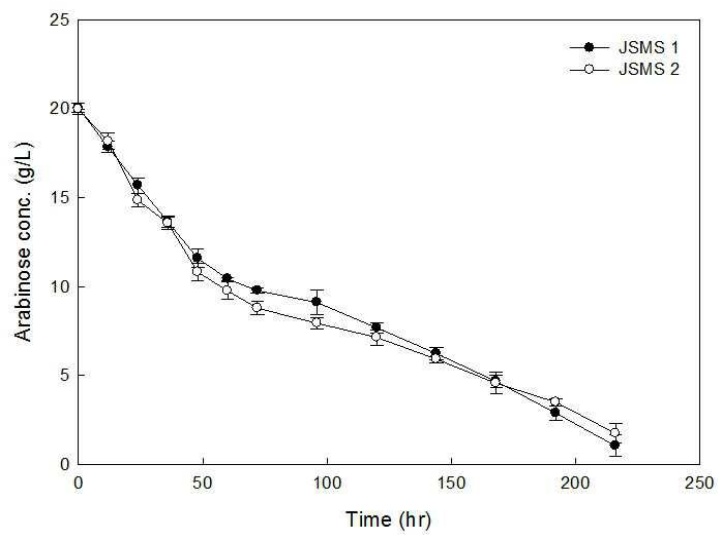
도면1



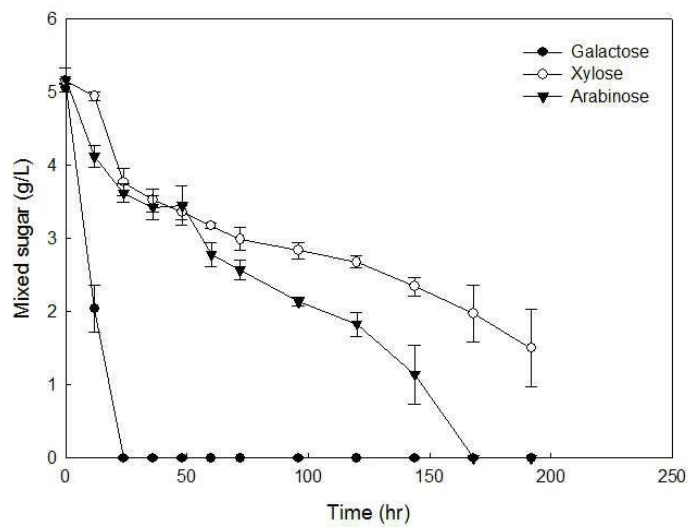
도면2



도면3

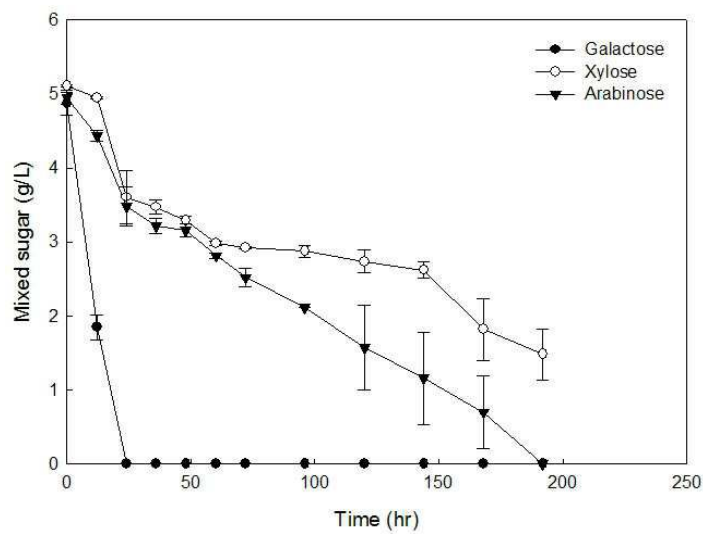


도면4



JSMS 1.

도면5



JSMS 2.

서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Recombinant microorganism using mixed-sugar and method for producing bioethanol using the same
- <130> 1-167P
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 888
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus rhamnosus GG
 <400> 1
 atggggatag aactgacaca aatggctttg aatcgaaaaa ttgctcagaa gcggccactg 60
 gaaaactttt ttcaattagc cgaagctgct ggcatcctac aagtcgagtt acgcaatgat 120
 atgaccactt ctgatggctc agagactgtc attgatggca tgcaggttgc agaatttcag 180

 acgttaaagc aaaaatacga cctgcagatt ttaacgatta atgcgattca gcaattcaat 240
 aatccagcca aattaacaa aaatcgcat cttttgacca aactggcgga attgtcggcg 300
 caaattggca atcaggcgat tatctttgta ccggaagtta acgcacagga caagcgaacc 360
 gagcaacagc gacttgatga tgccgttagc agtttacagg tgtttgggga cattctgtct 420
 gcttatcatt tgacgggatt cattgaaccg ttgggcttta gggccagcac aatgcggtat 480
 ccgtggacag cgctggacgc cattaattta tctggccgga ccgagtttaa gctgacgatt 540
 gatacgtttc atttcttctt ggcacatcta acagccgaac aattcaaagc aggtgttgat 600

 attaacgcgc ttggattaat tcatctgtcg ggaattgagc cgatccacgc attgcgagaa 660
 gttgtggatg aagatcgat tctgattacc gagcgggata tcatgcaaaa cattgagcag 720
 gttcatttgt ttgaggcaat gggttatcgg ggccattatt catttgagcc attttcaagc 780
 cggttggcag ccgaaaccaa ccagcaactt actcagcaga tattagcaag tattgaacgg 840
 ttgaatcagc caactgcagt gtttagtacg gaggtgacgc aaccatga 888

<210> 2
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus rhamnosus GG
 <400> 2
 Met Gly Ile Glu Leu Thr Gln Met Ala Leu Asn Arg Lys Ile Ala Gln

1	5	10	15
Lys	Arg	Pro	Leu
Glu	Asn	Phe	Phe
Gln	Leu	Ala	Glu
Ala	Ala	Gly	Ile
20	25	30	
His	Gln	Val	Glu
Leu	Arg	Asn	Asp
Met	Thr	Thr	Ser
Asp	Gly	Ser	Glu
35	40	45	
Thr	Val	Ile	Asp
Gly	Met	Gln	Val
Ala	Glu	Phe	Gln
Thr	Leu	Lys	Gln
50	55	60	

Lys Tyr Asp Leu Gln Ile Leu Thr Ile Asn Ala Ile Gln Gln Phe Asn
65 70 75 80

Asn Pro Ala Lys Leu Asn Lys Asn Arg Asp Leu Leu Thr Lys Leu Ala
85 90 95

Glu Leu Ser Ala Gln Ile Gly Asn Gln Ala Ile Ile Phe Val Pro Glu
100 105 110

Val Asn Ala Gln Asp Lys Arg Thr Glu Gln Gln Arg Leu Asp Asp Ala
115 120 125

Val Ser Ser Leu Gln Val Phe Gly Asp Ile Leu Ser Ala Tyr His Leu
130 135 140

Thr Gly Phe Ile Glu Pro Leu Gly Phe Arg Ala Ser Thr Met Arg Tyr

145 150 155 160

Pro Trp Thr Ala Leu Asp Ala Ile Asn Leu Ser Gly Arg Thr Glu Phe
165 170 175

Lys Leu Thr Ile Asp Thr Phe His Phe Phe Leu Ala His Leu Thr Ala
180 185 190

Glu Gln Phe Lys Ala Gly Val Asp Ile Asn Arg Val Gly Leu Ile His
195 200 205

Leu Ser Gly Ile Glu Pro Ile His Ala Leu Arg Glu Val Val Asp Glu
210 215 220

Asp Arg Ile Leu Ile Thr Glu Arg Asp Ile Met Gln Asn Ile Glu Gln
225 230 235 240

Val His Leu Phe Glu Ala Met Gly Tyr Arg Gly His Tyr Ser Phe Glu
245 250 255

Pro Phe Ser Ser Arg Leu Ala Ala Glu Thr Asn Gln Gln Leu Thr Gln
260 265 270

Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Arg Leu Asn Gln Pro Thr Ala Val Phe
275 280 285

Ser Thr Glu Val Thr Gln Pro

290 295

<210> 3

<211> 1710

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

atgtcatttc aaattgaaac ggttcccacc aaaccatag aagacaaaa gcctgtgacc	60
tctggtttgc gtaagaagac aaaggtgttt aaagacgaac ctaactacac agaaaatttc	120
attcaatcga tcatggaagc tattccagag ggttctaaag gtgccactct tgttgtcggt	180
ggtgatgggc gttactaca tgatgtcatt ctccataaga ttgccgctat cgggtgctgcc	240
aacggtatta aaaagttagt tattggccag catggtcttc tgtctacgcc agccgcttct	300
cacatcatga gaacctacga ggaaaaatgt actggtggta ttatcttaac cgcctcacat	360
aatccaggtg gtccagaaaa tgacatgggt attaatgata acttatccaa tgggggtcct	420
gtcctgaat ccgtcacaaa tgctatttgg gagatttcca aaaagcttac cagctataag	480
attatcaaag acttcccaga actagacttg ggtacgatag gcaagaacaa gaaatacgggt	540
ccattactcg ttgacattat cgatattaca aaagattatg tcaacttctt gaaggaaatc	600
ttcgatttcg acttaataca gaaattcatc gataatcaac gttctactaa gaattggaag	660
ttactgtttg acagtatgaa cgggtgtaact ggaccatacg gtaaggctat tttcgttgat	720
gaatttggtt taccggcgga tgaggtttta caaaactggc atccttctcc ggattttggt	780
ggtatgcac cagatccaaa cttaacttat gccagttcgt tagtgaaaag agtagatcgt	840
gaaaagattg agtttggtgc tgcacccgat ggtgatgggt atagaaatat gatttacgggt	900
tacggcccat ctttcgttcc tccaggtgac tccgtcgcaa ttattgccga atatgcagct	960
gaaatcccat atttcgcca gcaaggtata tatggtctgg ccggttcatt ccctacctca	1020
ggagccatag accgtgttgc caaggcccat ggtctaaact gttatgaggt cccaactggc	1080
tggaaatfff tctgtgcttt gttcgacgct aaaaaattat ctatttgtgg tgaagaatcg	1140
tttggtactg gttccaacca cgtaagggaa aaggacggtg tttgggcat tatggcgtgg	1200
ttgaacatct tggccattta caacaagcat catccggaga acgaagcttc tattaagacg	1260
atacagaatg aattctgggc aaagtacggc cgtactttct tcaactgtta tgattttgaa	1320
aaagtggaaa cagaaaaagc taacaagatt gtcgatcaat tgagagcata tgttaccaaa	1380
tccgggtgtt ttaattccgc ctcccagcc gatgagcttc ttaaggtcac cgattgtggt	1440
gatttttcat acacagattt ggacggttct gtttctgacc atcaaggttt atatgtcaag	1500
ctttccaatg gtgcaagatt cgttctaaga ttgtcaggta caggttcttc aggtgctacc	1560
attagattgt acattgaaaa atactgcgat gataaatcac aatacaaaa gacagctgaa	1620

gaatacttga agccaattat taactcgggc atcaagttct tgaactttaa acaagtttta 1680
ggaactgaag aaccaacggt tcgtacttaa 1710

<210> 4
<211> 569
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 4

Met Ser Phe Gln Ile Glu Thr Val Pro Thr Lys Pro Tyr Glu Asp Gln
1 5 10 15
Lys Pro Gly Thr Ser Gly Leu Arg Lys Lys Thr Lys Val Phe Lys Asp
20 25 30
Glu Pro Asn Tyr Thr Glu Asn Phe Ile Gln Ser Ile Met Glu Ala Ile
35 40 45
Pro Glu Gly Ser Lys Gly Ala Thr Leu Val Val Gly Gly Asp Gly Arg
50 55 60
Tyr Tyr Asn Asp Val Ile Leu His Lys Ile Ala Ala Ile Gly Ala Ala
65 70 75 80
Asn Gly Ile Lys Lys Leu Val Ile Gly Gln His Gly Leu Leu Ser Thr
85 90 95

Pro Ala Ala Ser His Ile Met Arg Thr Tyr Glu Glu Lys Cys Thr Gly
100 105 110
Gly Ile Ile Leu Thr Ala Ser His Asn Pro Gly Gly Pro Glu Asn Asp
115 120 125
Met Gly Ile Lys Tyr Asn Leu Ser Asn Gly Gly Pro Ala Pro Glu Ser
130 135 140
Val Thr Asn Ala Ile Trp Glu Ile Ser Lys Lys Leu Thr Ser Tyr Lys
145 150 155 160
Ile Ile Lys Asp Phe Pro Glu Leu Asp Leu Gly Thr Ile Gly Lys Asn
165 170 175
Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Leu Val Asp Ile Ile Asp Ile Thr Lys Asp
180 185 190
Tyr Val Asn Phe Leu Lys Glu Ile Phe Asp Phe Asp Leu Ile Lys Lys

195 200 205
 Phe Ile Asp Asn Gln Arg Ser Thr Lys Asn Trp Lys Leu Leu Phe Asp
 210 215 220
 Ser Met Asn Gly Val Thr Gly Pro Tyr Gly Lys Ala Ile Phe Val Asp
 225 230 235 240

 Glu Phe Gly Leu Pro Ala Asp Glu Val Leu Gln Asn Trp His Pro Ser
 245 250 255
 Pro Asp Phe Gly Gly Met His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Ser
 260 265 270
 Ser Leu Val Lys Arg Val Asp Arg Glu Lys Ile Glu Phe Gly Ala Ala
 275 280 285
 Ser Asp Gly Asp Gly Asp Arg Asn Met Ile Tyr Gly Tyr Gly Pro Ser
 290 295 300
 Phe Val Ser Pro Gly Asp Ser Val Ala Ile Ile Ala Glu Tyr Ala Ala

 305 310 315 320
 Glu Ile Pro Tyr Phe Ala Lys Gln Gly Ile Tyr Gly Leu Ala Arg Ser
 325 330 335
 Phe Pro Thr Ser Gly Ala Ile Asp Arg Val Ala Lys Ala His Gly Leu
 340 345 350
 Asn Cys Tyr Glu Val Pro Thr Gly Trp Lys Phe Phe Cys Ala Leu Phe
 355 360 365
 Asp Ala Lys Lys Leu Ser Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly
 370 375 380

 Ser Asn His Val Arg Glu Lys Asp Gly Val Trp Ala Ile Met Ala Trp
 385 390 395 400
 Leu Asn Ile Leu Ala Ile Tyr Asn Lys His His Pro Glu Asn Glu Ala
 405 410 415
 Ser Ile Lys Thr Ile Gln Asn Glu Phe Trp Ala Lys Tyr Gly Arg Thr
 420 425 430
 Phe Phe Thr Arg Tyr Asp Phe Glu Lys Val Glu Thr Glu Lys Ala Asn
 435 440 445

Lys Ile Val Asp Gln Leu Arg Ala Tyr Val Thr Lys Ser Gly Val Val

450

455

460

Asn Ser Ala Phe Pro Ala Asp Glu Ser Leu Lys Val Thr Asp Cys Gly

465

470

475

480

Asp Phe Ser Tyr Thr Asp Leu Asp Gly Ser Val Ser Asp His Gln Gly

485

490

495

Leu Tyr Val Lys Leu Ser Asn Gly Ala Arg Phe Val Leu Arg Leu Ser

500

505

510

Gly Thr Gly Ser Ser Gly Ala Thr Ile Arg Leu Tyr Ile Glu Lys Tyr

515

520

525

Cys Asp Asp Lys Ser Gln Tyr Gln Lys Thr Ala Glu Glu Tyr Leu Lys

530

535

540

Pro Ile Ile Asn Ser Val Ile Lys Phe Leu Asn Phe Lys Gln Val Leu

545

550

555

560

Gly Thr Glu Glu Pro Thr Val Arg Thr

565