



(51) 국제특허분류:

C12N 15/56 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002846

(22) 국제출원일: 2012년 4월 13일 (13.04.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2011-0034162 2011년 4월 13일 (13.04.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동),
305-806 Daejeon (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 손정훈 (SOHN, Jung
Hoon) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52 번지,
305-806 Daejeon (KR). 김현진 (KIM, Hyun Jin)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52 번지, 305-806
Daejeon (KR). 김철호 (KIM, Chul Ho) [KR/KR]; 대
전광역시 유성구 어은동 52 번지, 305-806 Daejeon (KR).

서문지훈 (SEOMOON, Ji Hun) [KR/KR]; 대전광역시
유성구 어은동 52 번지, 305-806 Daejeon (KR). 성봉현
(SUNG, Bong Hyun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어
은동 52 번지, 305-806 Daejeon (KR). 임광목 (LIM,
Kwang Mook) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52
번지, 305-806 Daejeon (KR). 김미진 (KIM, Mi Jin)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52 번지, 305-806
Daejeon (KR). 김종현 (KIM, Jong Hyun) [KR/KR]; 대
전광역시 유성구 어은동 52 번지, 305-806 Daejeon
(KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 테헤란로 87 길
36, 6 층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워),
135-973 Seoul (KR).

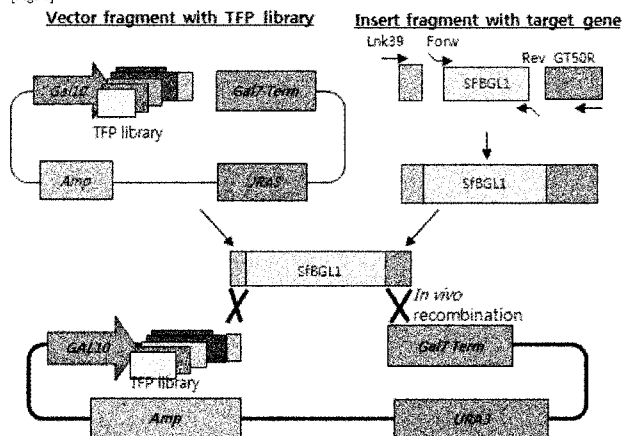
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ENHANCED-ACTIVITY MODIFIED BETA-GLUCOSIDASE AND A MANUFACTURING METHOD FOR BIOETHANOL USING SAME

(54) 발명의 명칭: 활성이 증진된 베타-글루코시다제 및 이를 이용한 바이오 에탄올의 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a beta-glucosidase which has been modified so as to enhance the activity thereof, and to a production method for bioethanol using same. More specifically, the present invention relates to: a polynucleotide coding for a beta-glucosidase which has been modified so as to enhance the activity thereof; beta-glucosidase expressed from the polynucleotide; an expression vector comprising the polynucleotide; a transformant genetically transformed by means of the expression vector; a method for producing the modified beta-glucosidase by using the transformant; and a method for producing bioethanol by using the transformant. The modified beta-glucosidase of the present invention can be used to implement a saccharification process which is even more efficient than with existing beta-glucosidase, and can therefore be widely put to use in the economic production of bioethanol.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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,

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

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제 및 이를 이용한 바이오 에탄올의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 베타-글루코시다제, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 베타-글루코시다제를 생산하는 방법 및 상기 형질전환체를 이용하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 변이된 베타-글루코시다제를 이용하면, 종래의 베타-글루코시다제 보다도 효율적인 당화공정을 수행할 수 있으므로, 바이오 에탄올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 활성이 증진된 변이 베타-글루코시다제 및 이를 이용한 바이오 에탄올의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제 및 이를 이용한 바이오 에탄올의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 베타-글루코시다제, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 베타-글루코시다제를 생산하는 방법 및 상기 형질전환체를 이용하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 전 세계적으로 원유고갈 및 지구온난화 문제로 인해 값싸고 재생가능한 바이오매스로부터 바이오에너지를 용이하게 얻기 위한 노력이 진행되고 있다. 섬유소 바이오매스는 지구상 가장 풍부한 유기물로서 기존 석유기반으로 생산되던 다양한 에너지 및 원료 플랫폼화합물을 생산할 수 있는 재생 가능한 원료이다(Hoffert 등, 2002, Science, 298, 981). 현재 이러한 섬유소 바이오매스를 이용하여 바이오에너지, 특히 바이오에탄올을 얻는 과정은 기술적으로 가능하지만 고가의 공정이며 현재 원유가와 대비하여 경제성이 결여된 문제가 있다(Zaldivar 등, 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 17). 섬유소 바이오매스로부터 바이오에탄올을 얻기 위해서는 바이오매스를 분해하고 분해된 당(sugar)을 발효하여 바이오에탄올을 얻게 되는데 자연계에 존재하는 미생물은 바이오매스의 분해와 발효를 동시에 고효율로 수행할 수 없기 때문에 현재의 기술은 바이오매스의 분해 및 발효 2단계로 나누어 진행하여 비효율적이다(Lynd 등 2002, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 506).
- [4] 특히 섬유소 바이오매스는 매우 단단한 구조로서 자연적으로 분해하는 과정이 매우 느리기 때문에 인위적으로 분해속도를 빨리 하기 위해서는 고비용의 전처리과정과 고가의 섬유소분해효소 처리과정을 반드시 필요로 한다(Lynd 등, 1999, Biotechnol. Prog. 15,777, Himmel 등, 2007, Science, 315, 804). 따라서 섬유소 바이오매스를 이용한 바이오 에너지 및 플랫폼 화합물 생산의 경제성을 확보하기 위해서는 섬유소 바이오매스를 효율적으로 분해할 수 있는 섬유소 분해효소(셀룰라제)의 저가 생산 기술이 필요하며 특히 이러한 효소 생산 제조합 균주를 바이오 에너지 생산기술에 직접 활용할 수 있는 통합공정(Consolidated bioprocess) 기술 개발이 요구된다(Hahn-Hagerdal 등, 2006, Trends Biotechnol., 24,

- 549, Lynd 등, 2008, Nat. Biotechnol., 26, 169).
- [5] 섬유소 바이오매스는 글루코스 폴리머인 셀룰로스, 자일로스 폴리머인 헤미셀룰로스, 그리고 리그닌(lignin)이 결합하여 매우 단단하고 안정적인 구조를 가지고 있다. 효소를 이용하여 이를 효과적으로 분해하기 위해서는 먼저 물리화학적인 전처리를 통해 식물체의 안정적인 구조를 와해시키고 효소가 기질에 접근할 수 있어야 하며 기질의 종류에 따라 다양한 섬유소 분해효소가 필요하다. 글루코스 폴리머인 섬유소의 분해를 위해서는 엔도셀룰라제(endo-1,4- β -D-glucanase), 엑소셀룰라제(exo-1,4- β -D-glucanase 또는 cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제(β -glucosidase 또는 cellobiase)가 필수적으로 필요하다(Kubicek 등, 1992, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 45,1). 자일로스 폴리머인 헤미셀룰로스의 분해를 위해서는 엔도자일라나제(endo-1,4- β -xylanase) 및 베타자이로시다제(β -xylosidase)가 대표적으로 필요하며 완전분해를 위해서는 다양한 디브랜칭(de-branching)효소가 필요하다. 이러한 효소들은 자연적으로 식물체를 부식시키는 미생물, 특히 곰팡이에서 발견되며 상업적으로 생산되는 섬유소분해효소 복합체는 곰팡이 트리코더마 레세이 (*Trichoderma reesei*) 유래의 효소복합체를 노보자임스(Novozymes)사, 다니스코 (Danisco)사에서 시판하고 있다.
- [6] 현재 전 세계적으로 바이오에너지 생산용 바이오매스 분해효소는 상기한 2개의 다국적 기업에서 독점적으로 생산 판매하고 있으나 상당히 고가이며 바이오매스에 따라 최적화된 상태가 아니므로 경우에 따라서 과잉의 효소를 사용해야 하는 문제점이 있다(Merino and Cherry, 2007, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 108, 95, Kabel 등, 2006, Bioeng. Biotechnol. 93, 56).
- [7] 따라서 각각의 효소를 박테리아나 효모(yeast)와 같은 재조합 숙주시스템을 이용하여 재조합 생산하고 생산된 각각의 재조합 효소를 조합하여 바이오매스의 종류에 따라 최적화하면 효소의 사용량을 줄일 수 있는 장점이 있다. 이와 같은 재조합 효소 생산을 위한 숙주세포로서 효모(yeast) 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 에탄올 발효능이 뛰어나 에탄올 생산균주로서 많이 이용되고 있으며 이 균주에 섬유소 분해능 도입을 위한 시도와 재조합 섬유소분해효소 생산을 위한 많은 연구가 진행되어 왔으나 (Lynd 등, 2002, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, 506) 곰팡이에 비해 섬유소 분해효소 분비 생산성이 낮아 재조합 효소 대량생산 목적으로는 활용 가능성이 낮았다.
- [8] 이와 같이, 종래의 효모를 이용한 바이오 에탄올 발효는 매우 우수하나 섬유소 바이오매스의 분해능이 전혀 없어 비 식량자원인 섬유소 바이오매스를 원료로 바이오에너지 생산시 고가의 섬유소 분해효소의 사용이 불가피한 문제점이 있으며, 또한 이를 해결하기 위하여 외래의 섬유소 분해효소유전자를 도입한 재조합 균주의 개발을 무수히 진행하였으나 효소의 분비 생산성이 낮아 생산된

효소가 효율적으로 배지 내 섬유소 기질을 분해하기 힘든 문제가 있었다. 이로 인해 생산된 당(sugar)을 이용한 바이오 에탄올의 생산에 한계가 있었다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에, 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 제조하고, 효모 재조합 단백질 고분비 생산기술인 단백질 분비 융합인자 기술을 이용하여 베타-글루코시다제를 대량 분비생산하였으며, 재조합 효소 생산 균주를 활용하여 고농도 셀로바이오스기반의 효율적인 바이오 에탄올 통합생산(consolidatedbioprocess, CBP) 기술과 효소비용이 대폭 절감된 동시당화(simultaneoussaccharificationandfermentation, SSF) 바이오 에탄올 생산기술을 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 목적은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 베타-글루코시다제를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현백터를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현백터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하고, 이의 배양물 또는 배양상등액으로부터 베타-글루코시다제를 회수하는 단계를 포함하는, 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현백터를 에탄올 발효능을 가지는 숙주세포에 도입하여 형질전환된 형질전환체를 이용하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명의 변이된 베타-글루코시다제를 이용하면, 종래의 베타-글루코시다제보다도 효율적인 당화공정을 수행할 수 있으므로, 바이오 에탄올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 SfBGL1 유전자의 효모 TFP 백터 도입을 위한 효소연쇄중합반응(PCR)

및 세포내 제조합과정을 나타내는 모식도이다.

- [22] 도 2는 효모 Y2805균주에 SfBGL1이 도입되어 형성된 24개 형질전환체들의 배양 상등액을 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- [23] 도 3은 효모 Y2805 $\Delta gal80$ 균주에 SfBGL1이 도입되어 형성된 24개 형질전환체들의 배양상등액을 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- [24] 도 4는 당쇄분석을 위해 엔도-에이치(Endo-H) 처리 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- [25] 도 5는 에스쿨린(esculin)이 포함된 EGDA(Esculin Gel Diffusion Assay) 평판배지에서 베타-글루코시다제 활성을 분석한 결과를 나타내는 사진이다.
- [26] 도 6은 클루이베로마이세스 마르시아누스 7155(*Kluyveromyces marxianus* 7155), YGaSW가 도입된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*), 3개의 형질전환체 균주들의 셀로바이오스 배지에서의 성장을 확인한 결과를 나타내는 사진이다.
- [27] 도 7은 자체 시그널, MF α , TFP19를 융합파트너로 이용한 균주들의 당쇄분석을 위해 엔도-에이치(Endo-H) 처리 후 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- [28] 도 8은 최종 선별된 플라스미드 pYGaST19-SfBGL1를 나타낸 모식도이다.
- [29] 도 9a는 변이주 라이브러리들의 EGDA 활성분석 결과를 나타내는 사진이다.
- [30] 도 9b는 변이주 라이브러리들의 pNPG 활성 분석결과를 나타내는 도표이다.
- [31] 도 10은 야생형(wt)SfBGL1과 변이주 SfBGL1 유전자의 단백질 서열을 비교한 결과를 나타내는 모식도이다.
- [32] 도 11a는 배양시간의 경과에 따른 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)의 성장수준 및 이로부터 분비생산된 변이된 베타-글루코시다제의 활성의 변화를 나타내는 그래프이다.
- [33] 도 11b는 배양시간의 경과에 따라 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)에서 배양액으로 분비된 베타-글루코시다제의 함량을 나타내는 전기영동사진이다.
- [34] 도 12a는 포도당을 기질로 포함하는 배지에서 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 형질전환체의 성장수준, 배지내 포도당의 농도 및 배지내 에탄올의 농도변화를 나타내는 그래프이다.
- [35] 도 12b는 셀로바이오스를 기질로 포함하는 배지에서 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 형질전환체의 성장수준, 배지내 포도당의 농도 및 배지내 에탄올의 농도변화를 나타내는 그래프이다.
- [36] 도 13a는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 10FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805

$\Delta gal80/ST19-SfBGL1-10$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.

- [37] 도 13b는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 10FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80/YGaSW$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [38] 도 14a는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80/ST19-SfBGL1-10$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [39] 도 14b는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80/YGaSW$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [40] 도 15a는 EFB를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80/ST19-SfBGL1-10$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [41] 도 15b는 EFB를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80/YGaSW$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [42] 도 16a는 돼지감자대를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80/ST19-SfBGL1-10$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 자일로스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [43] 도 16b는 돼지감자대를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80/YGaSW$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 자일로스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- [44] 도 17a는 10% 우뭇가사리 셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80/ST19-SfBGL1-10$)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및

에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.

- [45] 도 17b는 10% 우뭇가사리 셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 Δ gal80/YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.

[46]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [47] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 실시양태로서, 본 발명은 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 제공한다.
- [48] 본 발명에서 용어 "활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제"란 배당체 또는 올리고당을 분해하여 단당류를 생성하는 베타-글루코시다제 고유의 활성이 증대되도록, 베타-글루코시다제의 아미노산 서열이 변이된 베타-글루코시다제를 의미한다.
- [49] 상기 변이된 아미노산 서열은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 사카로마이콥시스 피부리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*)로부터 유래한 SfBGL1의 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 8의 폴리뉴클레오티드 서열에서 114번 아데닌이 구아닌으로 치환되거나, 1377번 티민이 시토신으로 치환되거나, 1527번 티민이 아데닌으로 치환되거나, 2251번 티민이 시토신으로 치환되거나 또는 이들이 조합을 포함하도록 변이된 폴리뉴클레오티드, 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 발현되는 베타-글루코시다제의 아미노산 서열이 될 수 있다. 또한, 상기 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 유전자에서 발현되는 베타-글루코시다제의 아미노산 서열에서 74번째의 아미노산인 트레오닌(T)이 알라닌(A)으로 치환되거나, 275번째의 아미노산인 발린(V)이 알라닌(A)으로 치환되거나 또는 상기 74번째 및 275번째의 아미노산이 모두 알라닌(A)으로 치환된 아미노산 서열이 될 수 있다.
- [50]
- [51] 본 발명의 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [52] 본 발명에서의 용어, 폴리뉴클레오타이드란, 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥으로서, 상기 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [53] 상기 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 사카로마이콥시스 피부리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*)로부터 유래한 베타-글루코시다제 유전자(서열번호 8)의

폴리뉴클레오티드 서열에서 114번 아데닌이 구아닌으로 치환되거나, 1377번 티민이 시토신으로 치환되거나, 1527번 티민이 아데닌으로 치환되거나, 2251번 티민이 시토신으로 치환되거나 또는 이들이 조합을 포함하도록 변이된 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 서열번호 8의 폴리뉴클레오티드에 의해 발현되는 폴리펩타이드의 74번째의 아미노산인 트레오닌(T)이 알라닌(A)으로 치환되거나, 275번째의 아미노산인 발린(V)이 알라닌(A)으로 치환되거나 또는 상기 74번째 및 275번째의 아미노산이 모두 알라닌(A)으로 치환된 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성됨이 바람직하다.

[54]

[55] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[56] 본 발명에서 용어, "백터"란 연결되어 있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 백터의 하나의 유형인 "플라스미드"는 그 안에 추가적으로 DNA 조각을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 말한다.

[57] 본 발명의 백터는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는데, 이러한 백터를 "발현 백터"라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에 있어서 발현 백터는 플라스미드 형태이다.

[58] 본 발명에서 "플라스미드" 와 "백터"는 플라스미드를 뜻하는 용어로서 서로 바꾸어 쓸 수 있는 용어이고, 백터 형태로 가장 일반적으로 사용된다.

[59] 상기 발현백터는 숙주세포에 따라, 사용가능한 발현백터의 종류가 결정될 수 있는데, 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현백터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 백터등이 이용가능하다.

[60] 프로모터로서는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다.

[61] 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.

[62] 아울러, 상기 발현백터에는, 목적 유전자의 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자, 난발현성 단백질에 적합한 맞춤형 융합인자 등을 추가로 포함할 수도 있다.

[63] 특히, 상기 난발현성 단백질에 적합한 맞춤형 융합인자로서, 단백질융합인자(translational fusion partner : TFP)를 사용함이 바람직하여 본 발명에서 사용가능한 단백질융합인자는 한국특허 제0626753호, 제0798894호, 제0975596호에 개시되어 있다.

[64] 본 발명에서 용어, "단백질융합인자(translational fusion partner: TFP)"란 발현율이 낮은 단백질을 코딩하는 유전자와 융합되어 발현율이 낮은 단백질의

분비생산을 유도하는 유전자를 의미하는데, 이러한 단백질을 합성하는 박테리아(예를 들어, 에스케리치아 속(*Escherichia sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 바실러스 속(*Bacillus sp.*) 미생물 등), 곰팡이(예를 들어, 효모, 아스퍼질러스 속(*Aspergillus sp.*), 페니실리움 속(*Penicillium sp.*), 라이조퍼스 속(*Rhizopus sp.*), 트리코더마 속(*Trichoderma sp.*) 미생물 등), 식물(예를 들어, 애기장대, 옥수수, 담배, 감자 등) 및 동물(예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이 및 원숭이 등)을 포함하는 모든 원핵 또는 진핵생물의 DNA로부터 선별될 수 있다.

- [65] 본 발명의 구체적 실시예에서는 본 발명의 활성이 증진된 변이 베타-글루코시다아제의 효율적 분비 생산을 위한 재조합 벡터의 융합파트너를 알아보고자, 자체시그널, MFa(mating factor alpha) 또는 단백질을 합성하는 인자(STF19)를 융합파트너로 이용하여, 베타-글루코시다아제의 활성을 분석해 보았다(표 3). 그 결과, 최적의 융합인자로서 STF19를 확인하였다(표 3 및 도 7).
- [66]
- [67] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [68] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [69] 본 발명에 따른 형질전환에 사용되는 숙주 세포는 당업계에 널리 알려져 있는 숙주세포는 어떤 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 변이된 베타-글루코시다아제 유전자의 도입효율이 우수하고, 상기 도입된 유전자의 발현효율이 높은 숙주를 사용할 수 있는데, 예를 들어 박테리아, 곰팡이(예컨대, 효모), 식물 또는 동물(예컨대, 포유동물 또는 곤충) 세포를 포함한다.
- [70] 바람직하게, 상기 숙주세포는 에탄올 발효능을 가지는 세포일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 에탄올 발효능을 가지는 세포는 자이모모나스, 효모, 바실러스 일 수 있다.
- [71] 상기 효모는 특별히 이에 제한되지 않으나, 캔디다(*Candida sp.*), 디베리오마이세스(*Debaryomyces sp.*), 한세놀라(*Hansenula sp.*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces sp.*), 피키아(*Pichia sp.*), 스키향사카로마이세스(*Schizosaccharomyces sp.*), 야로이아(*Yarrowia sp.*), 사카로마이세스(*Saccharomyces sp.*), 사카로마이코시스(*Saccharomycopsis sp.*), 슈완니오마이세스(*Schwanniomyces sp.*), 아르술라(*Arxula sp.*)속 미생물을 포함하고, 보다 바람직하게는 캔디다 유틸리스(*Candida utilis*), 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아스티피티스(*Pichia stipitis*), 스키향사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces*

cerevisiae), 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 야로이야 리포폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 슈완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*), 아르술라 아테니니모란스(*Arxula adeninivorans*) 등을 사용하며, 가장 바람직하게는 클루이베로마이세스 마르시아누스 7155(*Kluyveromyces marxianus* 7155), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*)를 사용할 수 있다.

- [72] 본 발명의 구체적 실시예에서, 발현된 베타-글루코시다제 효소활성을 EGDA 분석 및 pNPG 분석을 해 본 결과, 본 발명에 따른 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모 균주보다 효소활성이 높은 베타-글루코시다아제를 생산하였음을 확인하였다(표 4, 도 9a 및 9b).
- [73]
- [74] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하고, 이의 배양물 또는 배양상등액으로부터 상기 변이된 베타-글루코시다제를 회수하는 단계를 포함하는, 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제의 생산방법을 제공한다.
- [75] 이때, 상기 변이된 베타-글루코시다제를 회수하는 단계는 상기 배양물로부터 수득한 배양균체 또는 배양상등액을 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 이온교환크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 단백질 침전, 투석 등의 공지된 정제방법을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 수행될 수 있고, 회수된 목적 단백질의 확인은 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 등의 공지된 통상의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [76]
- [77] 본 발명의 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 베타-글루코시다제 기질의 존재하에 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 바이오 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 바이오 에탄올의 생산방법을 제공한다.
- [78] 구체적으로, 본 발명의 바이오 에탄올의 생산방법은 (i) 상기 발현백터를 에탄올 발효능을 가지는 숙주세포에 도입하여 형질전환된 형질전환체를 수득하는 단계; (ii) 상기 수득한 형질전환체를 베타-글루코시다제의 기질을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및 (iii) 상기 단계 (ii)에서 수득한 배양물 또는 배양 상등액으로부터 바이오 에탄올을 회수하는 단계를 포함한다.
- [79] 이때, 상기 에탄올 발효능을 가지는 숙주세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 에탄올 발효능을 갖는다고 알려진 자이모모나스(*Zymomonas Mobilis*) 균주, 효모균주, 바실러스 균주 등을 사용함이 바람직하다.
- [80] 상기 기질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 베타-글루코시다제에 의해 분해될 수 있는 배당체(glucoside), 올리고당(oligosaccharide), 바이오매스 등을 사용함이 바람직하며, 보다 바람직하게는 말토오스, 트레할로오스, 수크로스, 투라노스,

락토스, 셀로비오스, 말토트리오스, 라피노스, 케스토오스, 섬유소계 농업 바이오매스(팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB), 돼지감자대 등), 해조류 유래의 바이오매스(우뭇가사리 셀룰로오스 등) 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[81] 배양방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.

[82] 또한 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드가 도입된 발현벡터로 형질전환된 효모 형질전환체를 이용하여 포도당 및 셀로바이오스를 기질로 발효시킨 결과, 셀로바이오스 또는 포도당을 기질로 하여 보다 효과적으로 에탄올을 생산할 수 있었고(도 12a 및 12b), 섬유소계 농업 바이오매스 및 해조류 유래의 바이오매스인 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB), 돼지감자대, 우뭇가사리 셀룰로오스 등을 기질로 사용할 경우에도 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다(도 15a 내지 17b).

[83]

발명의 실시를 위한 형태

[84]

[85] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[86]

[87] 실시예 1. 베타-글루코시다제 (β -glucosidase) 유전자 클로닝

[88]

[89] 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 유전자를 클로닝 하기 위해 대전 한국생명공학연구원 소재 유전자은행에서 사카로마이콥시스 피브리게라 KCTC 7938 균주를 분양 받아 YPD(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당)배지에서 배양한 후, 게놈성 DNA를 추출하였다. 추출된 시료 1 μ l를 주형으로 센스 프라이머 H574(서열번호 1)과 안티센스 프라이머 H576(서열번호 2)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다(94°C에서 5분동안 1회; 94°C 30초간, 55°C 30초간, 72°C 3분간, 72°C 1분간 반응을 25회; 72°C에서 7분간 1회).

[90]

[91] H574: 5'-catgaattcaaaatgttgatgatagtag-3'(서열번호 1)

[92] H576: 5'-ctgccgagaccttgcattgc-3'(서열번호 2)

[93]

[94] 그런 다음, 증폭된 유전자를 아가로스젤 전기영동을 통해 2.6kb 절편을 회수하였다. 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T 이지 벡터 (pGEM-T Easy vector,

promega)에 클로닝하여 플라스미드 pT-SfBGL1를 제조하고 염기서열을 분석하였다.

- [95] 그 결과, 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*) 유래의 베타-글루코시다제(β -glucosidase)유전자 SfBGL1 임을 확인하였다(서열번호 8). 이는 기존의 Genbank에 등록된 서열(ACH90244)과 상이한 것으로 전체적으로 11개의 아미노산이 상이한 변이 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 유전자이다.

[96]

[97] **실시예 2. 단백질 분비융합인자(TFP) 이용 베타-글루코시다제 분비 생산**

[98]

- [99] 상기 실시예 1에서 분리한 베타-글루코시다제(β -glucosidase) 유전자 SfBGL1을 효모 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 발현하기 위하여 pT-SfBGL1을 주형으로 자체 분비 시그널이 없는 베타-글루코시다제 유전자를 얻기 위하여 프라이머 JJ12(서열번호 3)와 JJ13(서열번호 4)를 이용하여 1차 중합효소 연쇄반응하여 유전자를 얻고 여기에 효모 벡터 말단과 상보적인 서열을 도입하기 위하여 프라이머 LNK39 및 GT50R을 이용하여 2차 중합효소 연쇄반응을 수행하여 벡터와 세포내 재조합(in vivo recombination)이 가능한 유전자를 제작하였다(도 1). 도 1은 SfBGL1 유전자의 효모 TFP 벡터 도입을 위한 효소연쇄중합반응(PCR) 및 세포내 재조합과정을 나타내는 모식도이다.

[100]

- [101] JJ12: 5'-ctgccttagataaaaagagtcccaattcaaaactatac-3'(서열번호 3)

- [102] JJ13: 5'-cactccgttcaagtcgactaaatagtaaacaggacag-3'(서열번호 4)

- [103] LNK39: 5'-ggccgcctcggcctctgctggcctgccttagataaaaga-3'(서열번호 5)

- [104] GT50R: 5'-gtcattattaaatatatatatatattgtcactccgttcaagtcgac-3'(서열번호 6)

[105]

- [106] 증폭된 유전자를 포함하는 발현벡터(YGaSfBGL1)를 단백질 분비발현을 도와주는 24종의 단백질 분비융합인자를 함유한 벡터와 함께 효모 균주 Y2805(Mat a pep4::HIS3 prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주에 도입하여 세포내 재조합을 통하여 형질전환체가 형성되도록 하였다. 프라이머 LNK39(서열번호 5)과 GT50R(서열번호 6) 프라이머로 증폭한 중합효소 연쇄반응 산물은 40 베이스 이상의 벡터와 동일한 서열을 포함하고 있기 때문에 선형화된 벡터와 함께 효모세포로 도입하면 세포내에서 교차가 일어나서 원형의 플라스미드 벡터가 만들어지게 된다(도 1). 세포내 재조합을 통해 형성된 형질전환체는 우라실(우라실)이 없는 선택배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 포도당)에서 성장하므로 이를 통해 형질전환체를 선별하였다. YPDG(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토오스)배지에서 40시간 배양 후 상등액 0.6ml을 0.4ml의 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석하였다(도 2). 도 2는 효모 Y2805균주에 SfBGL1이 도입되어 형성된 24개 형질전환체들의 배양상등액을 SDS-PAGE 분석한 결과를

나타내는 전기영동사진으로서 각각의 벡터가 도입된 형질전환체의 배양 상등액에서 단백질의 크기가 서로 다른 강한 밴드들이 관찰되었다. 이것은 SfBGL1 유전자 크기로부터 유추되는 단백질 크기와 상당한 차이가 있었는데, 이는 SfBGL1 단백질 서열상에는 14개의 N-글리코실화 유발서열을 함유하고 있어 당쇄부가로 인한 차이일 것으로 추정된다.

[107] 분비된 단백질의 활성을 확인하기 위하여 0.1ml의 효소 용액을 0.9ml의 기질용액(100mM 구연산-인산완충용액(pH5.0), 1mM의 p-나이트로페닐 글루코피라노사이드(p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside; pNPG)과 50°C에서 10분간 반응시켰다. 이어, 상기 반응용액과 동량의 30% 탄산 나트륨을 첨가해 반응을 멈추고, 410nm에서 흡광도를 측정하여, 베타-글루코시다제 활성이 우수한 형질전환체를 선별하였다(도 1). 이때, 베타-글루코시다제의 활성은 1분에 1μM의 p-nitrophenol을 생성할 수 있는 효소량을 1 유닛(unit)으로 정하였다.

[108]

[109] 표 1

[Table 1]

각 발현 벡터를 함유한 균주의 베타-글루코시다제 활성 분석

번호	베타-글루코시다제 활성(U/ml)	번호	베타-글루코시다제 활성(U/ml)
1	229	13	464
2	0	14	296
3	156	15	84
4	664	16	327
5	155	17	0
6	262	18	0
7	542	19	1256
8	638	20	603
9	947	21	867
10	18	22	772
11	328	23	496
12	0	24	406

[110]

[111] 상기 도 1에서 보듯이, 24종의 단백질 분비융합인자 중에서, 9번, 19번, 21번 및 22번 단백질 분비융합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(ST9-SfBGL1,

ST19-SfBGL1, ST21-SfBGL1 및 ST22-SfBGL1)에서 발현된 베타-글루코시다제가 상대적으로 우수한 활성을 나타냄이 확인되었고, 그 중에서도 19번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(ST19-SfBGL1)에서 발현된 베타-글루코시다제가 가장 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다.

[112]

[113] 실시예 3: Y2805Δ gal80 균주를 이용한 베타-글루코시다제 분비 생산

[114]

[115] 실시예 3-1: 변이된 Y2805Δ gal80 균주의 제작 및 상기 변이된 Y2805Δ gal80 균주를 이용한 베타-글루코시다제 분비 생산

[116]

[117] SfBGL1 제조합 생산균주가 함유하고 있는 발현벡터는 GAL 프로모터를 이용하고 있는데, 단백질 발현을 위해서는 포도당보다 약 20배 상회하는 고가의 갈락토오스를 필요로 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 포도당만으로도 발현유도가 가능한 균주 Y2805Δgal80를 이용하였다.

[118] 구체적으로, Y2805 균주 대신에 Y2805Δgal80(Mat a pep4::HIS3 gal80::Tc190, prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주를 사용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 2와 동일한 방법을 이용하여, 24종의 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 24종의 형질전환체(Y2805Δgal80/ST1-SfBGL1 내지 Y2805Δgal80/ST24-SfBGL1)를 수득하였다. 상기 수득한 형질전환체를 YPD(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당) 배지에서 40시간 동안 배양하고, 이들 각각의 배양물을 원심분리하여 수득한 각각의 상등액을 아세톤으로 침전시킨 후 SDS-PAGE 분석하였다(도 3). 도 3은 Y2805Δgal80 균주에 단백질 분비용합인자와 SfBGL1이 도입되어 형성된 24개 형질전환체에서 발현된 베타-글루코시다제를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 상기 도 3에서 보듯이, Y2805균주에서 발현된 것과 유사하게, Y2805Δgal80 균주에서도 서로 다른 크기를 가지는 베타-글루코시다제가 발현됨을 확인하였다.

[119] 상기 실시예 2에서 분석한 바와 같이, Y2805Δgal80 균주에서 발현된 베타-글루코시다제 역시 N-글리코실화에 의해 당이 부가된 것으로 예측되었으므로, 이를 확인하고자, Y2805Δgal80에 19번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1)로부터 발현된 베타-글루코시다제에 엔도에이치(Endo-H) 효소를 처리하여 당을 제거하였으며, 당이 제거된 각 시료를 다시 SDS-PAGE로 분석하였다(도 4). 도 4는 Y2805Δgal80 균주로부터 유래된 형질전환체로부터 발현된 베타-글루코시다제에 엔도에이치(Endo-H) 효소를 처리한 후, SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 4에서 보듯이, 상기 각 형질전환체로부터 발현된 베타-글루코시다제에 엔도에이치 효소를 처리하면, 분자량이 상당히 감소함을 확인할 수 있었으므로, 상기 형질전환체로부터 발현된 베타-글루코시다제가 N-글리코실화 되어 있음을 알 수 있었다.

[120]

[121] 실시예 3-2: pNPG 활성분석법을 이용한 변이된 Y2805Δ gal80 균주에서 발현된 베타-글루코시다제의 활성비교

[122]

[123] 클루이베로마이세스 마르시아누스 7155(Kluyveromyces marxianus 7155), 사카로마이콕시스 피브리게라(Saccharomycopsis fiburigera), Y2805Δgal80에 YGaSW가 도입된 형질전환체 및 Y2805Δgal80에 15번, 19번 및 22번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 각각의 형질전환체(Y2805Δgal80/ST15-SfBGL1, Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1 및 Y2805Δgal80/ST22-SfBGL1)에서 발현된 각각의 베타-글루코시다제를 대상으로 pNPG 활성분석법을 수행하여 각 효소의 활성을 비교하였다(표 2).

[124]

[125] 표 2

[Table 2]

각 발현 균주에 따른 베타-글루코시다제 활성

균주명	베타-글루코시다제 활성(U/ml)
K.marxianus 7155	10
S.fibuligera	26
Y2805Δgal80/YGaSW	25
Y2805Δgal80/ST15-SfBGL1	293
Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1	1315
Y2805Δgal80/ST22-SfBGL1	1275

[126]

[127] 상기 표 2에서 보듯이, Y2805Δgal80에 19번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1)에서 발현된 베타-글루코시다제가 가장 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다.

[128]

[129] 실시예 3-3: EGDA(Esculin Gel Diffusion Assay)를 이용한 변이된 Y2805Δ gal80 균주에서 발현된 베타-글루코시다제의 활성비교

[130]

[131] 상기 실시예 3-2에서 사용한 각 균주를 원심분리하여 수득한 각각의 배양상등액 75μl를 에스쿨린이 포함된 EGDA(Esculin Gel Diffusion Assay)용 평판배지(Esculin Gel Diffusion Assay : 0.2 M 구연산 나트륨 완충용액(pH6), 0.2% 에스쿨린)에 코팅하고, 37°C에서 3시간 반응시켜 각 균주로부터 발현된 베타-글루코시다제의 활성을 확인하였다(도 5). 도 5는 클루이베로마이세스

마르시아누스 7155, 사카로마이콥시스 피브리게라, Y2805 $\Delta gal80$ 에 YGaSW가 도입된 형질전환체 및 Y2805 $\Delta gal80$ 에 15번, 19번 및 22번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 각각의 형질전환체에서 발현된 베타-글루코시다제 활성을 에스쿨린(esculin)이 포함된 EGDA용 평판배지에서 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 5에서 보듯이, Y2805 $\Delta gal80$ 에 19번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1)에서 수득한 배양상등액을 반응시킨 경우에, 상대적으로 가장 큰 환이 형성됨을 확인하였으므로, pNPG 활성분석법과 동일하게 Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1 균주에서 발현된 베타-글루코시다제가 가장 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[132]

[133] 실시예 3-4: 셀로바이오스를 이용한 변이된 Y2805 $\Delta gal80$ 균주의 성장성 비교

[134]

[135] 상기 실시예 3-2에서 사용한 각 균주를 셀로바이오스가 포함된 UD 평판배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물 및 2% 포도당)에 접종하고, 30°C에서 2일 동안 배양하여 각 균주의 성장성을 비교하였으며, 동일한 각 균주를 1 μ g/ml의 안티마이신 A와 셀로바이오스가 포함된 UD 평판배지에 접종하고, 30°C에서 6일 동안 배양하여 각 균주의 성장성을 비교하였다(도 6). 도 6은 클루이베로마이세스 마르시아누스 7155, 사카로마이콥시스 피브리게라, Y2805 $\Delta gal80$ 에 YGaSW가 도입된 형질전환체 및 Y2805 $\Delta gal80$ 에 15번, 19번 및 22번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 각각의 형질전환체를 셀로바이오스가 포함된 UD 평판배지에서 배양한 결과를 나타내는 사진이다. 도 6에서 보듯이, 안티마이신 A가 처리되지 않은 경우(좌측)에는, 각 균주별로 성장성의 차이를 나타내지 않았으나, 안티마이신 A가 처리된 경우(우측)에는, Y2805 $\Delta gal80$ 에 19번 단백질 분비용합인자가 SfBGL1과 함께 도입된 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1)가 상대적으로 우수한 성장성을 나타냄을 확인하였다.

[136]

[137] 실시예 4: 단백질분비용합인자에 따른 베타-글루코시다제의 발현량 및 활성 비교

[138]

[139] 상기 실시예 2 및 3에서 사용한 외래의 단백질 분비용합인자(ST19) 대신에 다른 단백질 분비용합인자를 사용하여도 베타-글루코시다제가 동일한 수준의 발현량 및 활성을 나타낼 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[140]

[141] 먼저, 사카로마이콥시스 피브리게라의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 H574(서열번호 1) 및 안티센스 프라이머 H576(서열번호 2)를 이용한 PCR을 수행하여(94°C에서 5분동안 1회; 94°C 30초간, 55°C 30초간, 72°C 2분간, 72°C

1분간 반응을 25회; 72°C에서 7분간 1회), 약 2kb의 크기를 가지는 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 단백질 분비용합인자 단편(자체 시그널)을 수득하였다.

- [142] 상기 수득한 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 단백질 분비용합인자 단편을 제한효소인 *EcoRI*과 *PstI*으로 각각 절단하고, 절단된 단편을 상기 실시예 2에서 제작한 베타-글루코시다제 발현벡터(YGaSfBGL1)에 도입하여, 자체 시그널과 SfBGL1을 포함하는 발현벡터를 제작하였으며, 상기 제작한 발현벡터를 대장균(*Escherichia coli*) DH5 α 에 도입하여 형질전환체를 제작하였다. 이어, 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 다량의 발현벡터를 수득하였으며, 상기 수득한 발현벡터를 Y2805 $\Delta gal80$ 균주에 도입하여 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 단백질 분비용합인자와 베타-글루코시다제를 발현하는 단일 콜로니를 선별하였다.

[143]

- [144] 다음으로, MF α (mating factor alpha) 시그널을 이용하기 위해, 상기 24종의 단백질 분비용합인자 중에서 MF α 에 해당하는 ST6을 포함하는 벡터를 사용하여 동일한 균주에 형질전환 후 형질전환체를 얻었다.

[145]

- [146] 상기 실시예 2 및 3에서 사용한 외래의 단백질 분비용합인자(ST19)를 포함하는 변이된 Y2805 $\Delta gal80$ 균주, 상기 제작한 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 단백질 분비용합인자를 포함하는 변이된 Y2805 $\Delta gal80$ 균주 및 MF α (mating factor alpha) 시그널을 포함하는 변이된 Y2805 $\Delta gal80$ 균주를 YPD(1% 효모추출물, 2% 펩톤 및 2% 포도당) 배지에서 40시간 동안 각각 배양하여, 베타-글루코시다제를 발현시키고, 상기 배양된 각 균주를 원심분리하여 베타-글루코시다제를 포함하는 각각의 배양상등액을 수득하였으며, 이들 배양상등액에 아세톤을 가하여 베타-글루코시다제를 침전시키고, 침전된 베타-글루코시다제에 Endo-H를 처리하거나(+) 또는 처리하지 않고(-) 12% SDS-PAGE로 분석하였다(도 7). 도 7은 서로 다른 단백질 분비용합인자를 사용하여 발현된 베타-글루코시다제를 Endo-H를 처리하거나(+) 또는 처리하지 않은 다음(-), SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 7에서 보듯이, 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 단백질 분비용합인자(자체 시그널)를 사용한 경우 보다는, 외래의 단백질 분비용합인자(ST19 또는 MF α 시그널)를 사용한 경우에 상대적으로 다량으로 베타-글루코시다제를 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

[147]

- [148] 아울러, 상기 각 균주로부터 발현된 베타-글루코시다제를 대상으로 pNPG 활성분석법을 수행하여, 베타-글루코시다제의 활성을 비교하였다(표 3).

[149]

- [150] 표 3

[Table 3]

각 균주의 베타-글루코시다제 활성 분석

		베타-글루코시다제 활성(U/ml)
ST19	1	1127
자체 시그널	1	253
	2	230
MF α	1	561
	2	582

[151]

[152] 상기 표 3에서 보듯이, 다른 단백질 분비융합인자(자체 시그널 또는 MF α 시그널)를 사용할 경우보다도, 단백질 분비융합인자로서 ST19를 사용할 경우에 베타-글루코시다제의 활성이 향상됨을 확인할 수 있었다.

[153] 이에, 본 발명자들은 단백질 분비융합인자 ST19와 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 베타-글루코시다제 유전자인 SfBGL1를 포함하는 베타-글루코시다제 발현백터를 "pYGaST19-SfBGL1"라 명명하였다(도 8). 도 8은 단백질 분비융합인자 ST19와 사카로마이콥시스 피브리게라 유래의 베타-글루코시다제 유전자인 SfBGL1를 포함하는 베타-글루코시다제 발현백터 pYGaST19-SfBGL1의 유전자 개열지도이다.

[154]

[155] 실시예 5: 활성이 증진된 베타-글루코시다제의 개발

[156]

[157] 실시예 5-1: 베타-글루코시다제를 발현시킬 수 있는 변이 라이브러리 제조

[158]

[159] 활성이 향상된 SfBGL1를 획득하기 위한 스크리닝을 수행하기 위하여, 변이유도증합효소연쇄반응(error-prone PCR) 방법을 이용하여 변이주 라이브러리를 제작하였다. 즉, 상기 실시예 4에서 결정한 베타-글루코시다제 발현백터 pYGaST19-SfBGL1를 주형으로 하여 GAL47(서열번호 7)과 GT50R 프라이머(서열번호 6)를 사용하여 변이유도 효소연쇄증합반응 키트(PCR random mutagenesis kit, Clontech)를 이용한 error-prone PCR을 수행하였다. 이때, 변이유도는 제품에 포함된 설명서에 의거하여 1kb당 2개의 변이를 유도하도록 하였으며, 94°C에서 30초 동안 1회; 94°C 30초간, 68°C 3분간 반응을 25회; 68°C에서 1분간 1회 반응조건으로 수행하였다.

[160]

[161] GAL47: 5'-gcgtccatccaaaaaaaagtaagaattttgaaaattcaagaattc-3'(서열번호 7)

[162]

[163] 상기 error-prone PCR의 결과로 획득한 절편을 YGa 백터에 클로닝하여, 변이주

라이브러리를 제작하였다.

[164]

[165] 실시예 5-2: 활성이 증진된 베타-글루코시다제를 발현시킬 수 있는 변이주의 제작

[166]

[167] 상기 제작한 변이주 라이브러리를 사카로마이세스 세레비지에 Y2805*Δgal1* (Mat a pep4::HIS3 gal1::Tc190, prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주에 도입하여 각각의 형질전환체를 획득하였다. 상기 획득한 형질전환체를 YNB-CB-gal-A(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 셀로바이오스, 0.3% 갈락토오스, 1μg/ml 안티마이신A) 평판배지에 접종하여, 약 200개의 콜로니를 획득하였다. 상기 획득한 콜로니로부터 각각의 형질전환체를 획득하고, 각 형질전환체로부터 발현된 베타-갈락토시다제를 대상으로 EGDA와 pNPG 활성분석법을 수행하여, 야생형인 pYGaST19-SfBGL1로부터 발현된 베타-갈락토시다제와 각 형질전환체로부터 발현된 베타-갈락토시다제의 활성을 비교하였다(도 9의 A 및 B). 도 9의 A는 변이주 라이브러리를 이용하여 제작된 형질전환체로부터 발현된 베타-갈락토시다제를 대상으로 하여 EGDA를 수행한 결과를 나타내는 사진이고, 도 9의 B는 변이주 라이브러리를 이용하여 제작된 형질전환체로부터 발현된 베타-갈락토시다제를 대상으로 하여 pNPG 활성분석법을 수행한 결과를 나타내는 도표이다. 도 9에서 보듯이, 야생형인 pYGaST19-SfBGL1로부터 발현된 베타-갈락토시다제의 활성보다도 우수한 활성을 나타내는 베타-갈락토시다제를 발현시킬 수 있는 15개의 형질전환체를 선발하였다. 상기 선발된 형질전환체 중에서도, 3개의 형질전환체(10번, 12번 및 14번)는 야생형인 pYGaST19-SfBGL1로부터 발현된 베타-갈락토시다제 활성보다도 약 30%이상 활성이 증가된 베타-갈락토시다제를 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

[168]

[169] 실시예 5-3: 활성이 증진된 베타-글루코시다제의 구조분석

[170]

[171] 상기 실시예 5-2에서 획득한 야생형인 pYGaST19-SfBGL1로부터 발현된 베타-갈락토시다제 활성보다도 약 30%이상 활성이 증가된 베타-갈락토시다제를 발현시킬 수 있는 3개의 형질전환체(10번, 12번 및 14번)에 포함된 변이된 SfBGL1의 염기서열을 분석한 결과, 각각의 변이된 SfBGL1는 공통된 특성을 나타내지는 않음을 확인하였다(도 10). 도 10은 야생형 베타-갈락토시다제와 변이된 베타-갈락토시다제의 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타내는 모식도이다. 도 10에서 보듯이, 10번 형질전환체는 베타-갈락토시다제의 아미노산의 변이 없이 4개의 뉴클레오티드가 변이(A114G, T1377C, T1527A, T2251C)된 변이된 폴리뉴클레오티드(서열번호 9)를 포함함을 확인하였고, 12번 형질전환체는 베타-갈락토시다제의 74번째 아미노산인

트레오닌(T)이 알라닌(A)으로 변이(T74A)됨을 확인하였으며, 14번 형질전환체는 베타-갈락토시다제의 275번째 아미노산인 발린(V)이 알라닌(A)으로 변이(V275A)되었음을 확인하였다.

[172]

[173] 실시예 5-4: 베타-글루코시다제의 변이의 조합

[174]

[175] 상기 실시예 5-3에서 확인된 각 변이를 통합할 경우, 베타-글루코시다제의 활성을 추가로 증진시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다.

[176] 이를 위하여, 야생형 SfBGL1가 도입된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1), 10번 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10), 10번 형질전환체의 변이된 SfBGL1에 T74A 변이가 도입된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-12) 및 10번 형질전환체의 변이된 SfBGL1에 T74A 변이 및 V275A 변이가 도입된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-14)를 각각 제작하고, 이들 형질전환체에서 발현된 베타-글루코시다제의 활성을 pNPG 활성분석법으로 측정하고 비교하였다(표 4).

[177]

[178] 표 4

[Table 4]

각 형질전환체에서 발현된 베타-글루코시다제 활성 비교

형질전환체	베타-글루코시다제 활성(U/ml)
Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1	1510
Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10	1928
Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-12	2050
Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-14	2063

[179]

[180] 상기 표 4에서 보듯이, 10번 형질전환체의 변이된 SfBGL1에 T74A 변이가 도입된 형질전환체에서 발현된 베타-갈락토시다제가 보다 활성이 증진되었고, 10번 형질전환체의 변이된 SfBGL1에 T74A 변이 및 V275A 변이가 도입된 형질전환체에서 발현된 베타-글루코시다제가 가장 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다.

[181]

[182] 실시예 6. 베타-글루코시다제의 대량생산

[183]

[184] 상기 실시예 5-4에서 제작한 변이된 베타-글루코시다제 생산용 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 이용하여 베타-글루코시다제를 대량생산하고자 하였다.

[185]

[186] 우선, 상기 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 50ml의 최소 액체배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노에시드 및 2% 포도당)에 1단계 초기배양한 후, 다시 200ml의 YPD 배지에서 배양하여 베타-글루코시다제의 발현을 활성화시켰다.

[187] 상기 베타-글루코시다제의 발현이 활성화된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 YPD 배지에 접종하고, 30°C에서 48시간 동안 유가식으로 배양하였다. 최초의 배양배지의 양은 2L 볼륨으로 진행하였고 배양 12시간 후부터 추가 포도당을 시간당 평균 0.2g/hr의 속도로 넣어주어 최종 볼륨을 2.5L에서 종료하였다. 배양이 종료된 후, 배양물을 원심분리하여 배양상등액을 수득하고, 상기 수득한 배양상등액에 포함된 베타-글루코시다제를 50mM의 트리스 완충용액(pH7.5)으로 한외여과(분자량 cut-off 30,000)를 이용하여 농축하였다.

[188] 한편, 배양시간이 경과하는 중에 시간에 따라 일부 배양물을 시료로 채취하여 배양시간의 경과에 따른 형질전환체의 성장수준(OD 600) 및 베타-글루코시다제의 활성(U/ml)의 변화를 비교하였다(도 11a). 도 11a는 배양시간의 경과에 따른 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)의 성장수준 및 이로부터 분비생산된 변이된 베타-글루코시다제의 활성의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 11a에서 보듯이, 시간의 경과에 따라, 형질전환체의 성장수준(OD 600) 및 베타-글루코시다제의 활성(U/ml)이 모두 증가함을 확인할 수 있었다. 48시간 동안 배양한 후 약 2g/l 농도로 베타-글루코시다제가 배지로 분비 생산되었고, 상기 생산된 베타-글루코시다제의 총 활성은 약 8000유닛(unit)임을 알 수 있었다.

[189]

[190] 또한, 상기 배양시간의 경과(배양후 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 및 48시간)에 따라 배양액의 일부를 시료로 채취하고, 이에 포함된 베타-글루코시다제를 12% SDS-PAGE로 분석하였다(도 11b). 도 11b는 배양시간의 경과에 따라 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)에서 배양액으로 분비된 베타-글루코시다제의 함량을 나타내는 전기영동사진이다. 도 11의 B에서 보듯이, 배양시간이 경과함에 따라 배양액에 분비된 베타-글루코시다제의 함량이 증가함을 알 수 있었다.

[191]

[192] 실시예 7: 베타-글루코시다제를 이용한 에탄올의 생산

[193]

[194] 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체를 이용하여 포도당, 셀로바이오스, 알파-셀룰로오스 뿐만 아니라, 섬유소계 농업 바이오매스 및 해조류 유래의 바이오매스인 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB), 돼지감자대 및 우뚝가사리 셀룰로오스로부터 에탄올을 생산할 수 있는지를 확인하고자

하였다.

[195]

[196] 실시예 7-1: 포도당을 기질로 사용한 에탄올의 생산

[197]

[198] 실시예 6에서 사용한 형질전환체(Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1-10)를 50ml의 최소 액체배지에서 1단계 초기배양하고, 200ml의 YPD 배지에서 배양한 다음, 상기 배양물을 10% 포도당을 기질로 포함하는 에탄올생산용 배양액(0.5% 효모추출물, 0.5% 펩톤, 0.5% 인산칼륨무수물, 0.2% 황산암모늄, 0.06% 황산마그네슘, pH 5.0)에 접종하고, 에탄올 발효조건(30°C, 40시간, RPM 100 및 에어레이션 0.1~2vvm)에서 배치식으로 배양하였다(도 12a). 도 12a는 포도당을 기질로 포함하는 배지에서 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 형질전환체의 성장수준, 배지내 포도당의 농도 및 배지내 에탄올의 농도변화를 나타내는 그래프이다. 도 12a에서 보듯이, 배양후 4시간이 경과한 시점에서부터 포도당을 소모하여 20시간이 경과한 시점에서 배지내 포도당을 모두 소모하여, 약 6%의 에탄올을 생산하였다.

[199]

[200] 실시예 7-2: 셀로바이오스를 기질로 사용한 에탄올의 생산

[201]

[202] 베타-글루코시다제에 의하여 포도당으로 분해될 수 있는 셀로바이오스를 기질로 포함한 배지를 이용하여 에탄올을 생산하고자 하였다.

[203] 즉, 100g/l의 셀로바이오스를 기질로 포함하고, 0.5g/l의 포도당을 탄소원으로 포함하는 에탄올생산용 배양액을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 7-1과 동일한 방법을 이용하여, 에탄올을 생산하였다(도 12b). 도 12b는 셀로바이오스를 기질로 포함하는 배지에서 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805Δgal80/ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 형질전환체의 성장수준, 배지내 포도당의 농도 및 배지내 에탄올의 농도변화를 나타내는 그래프이다. 도 12b에서 보듯이, 배양직후 부터 셀로바이오스를 분해하여 배지내 포도당의 농도가 다소 증가하는 양상을 나타내었으나, 24시간이 경과한 시점에서 배지내 포도당과 셀로바이오스가 동일한 수준으로 감소되었고, 40시간이 경과한 시점에서 배지내의 포도당과 셀로바이오스를 모두 소모하여, 약 6%의 에탄올을 생산하였다.

[204]

[205] 실시예 7-3: 알파-셀룰로오스를 기질로 사용한 에탄올의 생산

[206]

[207] 알파-셀룰로오스는 셀룰라아제에 의해 셀로바이오스로 분해되고, 상기 셀로바이오스는 베타-글루코시다제에 의하여 포도당으로 분해될 수 있으므로,

상기 알파-셀룰로오스를 기질로 포함한 배지를 이용하여 에탄올을 생산하고자 하였다.

[208]

[209] 실시예 7-3-1: 10FPU/g의 셀룰라아제를 사용한 에탄올의 생산

[210]

[211] 실시예 6에서 사용한 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 50ml의 최소 액체배지에서 1단계 초기배양하고, 200ml의 YPD 배지에서 배양한 다음, 상기 배양물을 10% α -셀룰로오스를 기질로 포함하고, 10FPU(filter paper unit)/g의 셀룰라아제(celluclast 1.5 ℓ , Novozyme)를 포함하는 에탄올생산용 배양액에 접종하고, 당화과정(8시간, 50°C, RPM300)을 수행한 다음, 에탄올 발효조건(30°C, 70시간, RPM 100~300 및 에어레이션 0.1~2vvm)를 수행하였다(도 13a). 도 13a는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 10FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 13a에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하기 시작할 때에 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였다. 배양이 종료된 후, 17.5g/l의 에탄올이 생산되었다.

[212] 한편, 대조군으로서, 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10) 대신에 숙주세포(Y2805 Δ gal80)를 사용하는 것을 제외하고는 상술한 바와 동일한 실험을 수행하였다(도 13b). 도 13b는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 10FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 Δ gal80/YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 13b에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하기 시작할 때에 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였다. 배양이 종료된 후, 11g/l의 에탄올이 생산되었다.

[213] 상기 도 13a 및 13b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 이용할 경우, 에탄올 생산성이 약 35% 정도 증가함을 알 수 있었다.

[214]

[215] 실시예 7-3-2: 5FPU/g의 셀룰라아제를 사용한 에탄올의 생산

[216]

[217] 10FPU/g의 셀룰라아제 대신에, 5FPU/g의 셀룰라아제를 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 7-3-1과 동일한 실험을 수행하였다(도 14a 및 14b).

[218] 도 14a는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 14a에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 배양 직후부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나, 일정시간 후에는 오히려 감소하는 양상을 나타내었다. 배양이 종료된 후, 약 12g/l의 에탄올이 생산되었다.

[219] 한편, 도 14b는 α -셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80$ /YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도, 자일로스의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 14B에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 배양 직후부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나, 일정시간 후에는 오히려 감소하는 양상을 나타내었다. 배양이 종료된 후, 약 6g/l의 에탄올이 생산되었다.

[220] 상기 도 14a 및 14b에서 보듯이, 상대적으로 적은량의 셀룰라아제를 처리하면서, 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 이용할 경우, 에탄올 생산성이 약 50% 정도 증가함을 알 수 있었다.

[221] 이는 배지내에서 α -셀룰로오스를 셀로바이오스로 전환시키는 효율이 낮아서 충분한 에탄올 생산이 수행되지 못한 것으로 분석되었다.

[222]

[223] 실시예 7-4: 바이오매스를 기질로 사용한 에탄올의 생산

[224]

[225] 섬유소계 농업 바이오매스 및 해조류 유래의 바이오매스인 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB), 돼지감자대 및 우뚝가사리 셀룰로오스를 기질로 포함한 배지를 이용하여 에탄올을 생산하고자 하였다.

[226]

[227] 실시예 7-4-1: 팜 열매 부산물을 기질로 사용한 에탄올의 생산

[228]

[229] 먼저, 팜 열매 부산물(EFB)에 10배 부피의 2% 수산화나트륨용액을 가하고,

120°C에서 1시간 동안 고온고압반응을 진행한 후, 세척하고 1M 염산을 이용하여 중화하였으며, 중화된 산물을 60°C 건조기에서 건조하여 수분율을 10% 내외로 적정하여 EFB 기질을 수득하였다.

- [230] 다음으로, 실시예 6에서 사용한 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 50mL의 최소 액체배지에서 1단계 초기배양하고, 200mL의 YPD 배지에서 배양한 다음, 상기 배양물을 10% EFB 기질을 기질로 포함하고, 5FPU/g의 셀룰라아제를 포함하는 에탄올생산용 배양액에 접종하고, 당화과정(8시간, 50°C 및 RPM300)을 수행한 다음, 에탄올 발효조건(30°C, 70시간, RPM 100~300 및 에어레이션 0.1~2vvm)를 수행하였다(도 15a). 도 15a는 EFB를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 15a에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였다. 배양이 종료된 후, 약 9g/L의 에탄올이 생산되었다.

[231]

- [232] 한편, 대조군으로서, 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10) 대신에 숙주세포(Y2805 Δ gal80)를 사용하는 것을 제외하고는 상술한 바와 동일한 실험을 수행하였다(도 15b). 도 15b는 EFB를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 Δ gal80/YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 15b에서 보듯이, 배양후 포도당과 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당과 셀로바이오스의 농도가 감소하기 시작하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였다. 배양이 종료된 후, 7g/L의 에탄올이 생산되었다.

[233]

- [234] 상기 도 15a 및 15b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체(Y2805 Δ gal80/ST19-SfBGL1-10)를 이용할 경우, 를 이용할 경우, 기질로서 섬유소계 농업 바이오매스인 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB)을 사용하더라도 에탄올 생산성이 약 33% 정도 증가함을 알 수 있었다.

- [235] 이는 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체가 대조군으로 사용한 숙주세포에 비하여, 배지내 셀로바이오스의

분해속도가 월등히 빠르기 때문에 에탄올 생산성도 증가한 것으로 분석되었다.

[236]

[237] 실시예 7-4-2: 돼지감자대를 기질로 사용한 에탄올의 생산

[238]

[239] 섬유평농업 바이오매스인 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB) 대신에 돼지감자대를 사용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 7-4-1과 동일한 실험을 수행하였다(도 16a 및 16b).

[240] 도 16a는 돼지감자대를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 자일로스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 16a에서 보듯이, 배양후 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 감소하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나 일정시간 후에는 일정수준을 유지하였다. 배양이 종료된 후, 약 14g/l의 에탄올이 생산되었다.

[241] 도 16b는 돼지감자대를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80$ /YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 자일로스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 16b에서 보듯이, 배양후 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당, 셀로바이오스 및 자일로스의 농도가 감소하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나 일정시간 후에는 일정수준을 유지하였다. 배양이 종료된 후, 약 11g/l의 에탄올이 생산되었다.

[242]

[243] 상기 도 16a 및 16b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 이용할 경우, 기질로서 섬유평농업 바이오매스인 돼지감자대를 사용하더라도 에탄올 생산성이 약 30% 정도 증가함을 알 수 있었다.

[244]

[245] 실시예 7-4-3: 우뚝가사리 셀룰로오스를 기질로 사용한 에탄올의 생산

[246]

[247] 팜 열매 부산물(empty fruit bunch, EFB) 대신에 해조류 유래의 바이오매스인 우뚝가사리 셀룰로오스를 사용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 7-4-1과 동일한

실험을 수행하였다(도 17a 및 17b).

[248] 도 17a는 10% 우뭇가사리 셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 변이된 베타-글루코시다제를 발현시키는 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 17a에서 보듯이, 배양후 포도당 및 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당 및 셀로바이오스의 농도가 감소하였고, 상기 포도당 및 셀로바이오스의 농도가 감소하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나 일정시간 후에는 일정수준을 유지하였다. 배양이 종료된 후, 약 12g/l의 에탄올이 생산되었다.

[249] 도 17b는 10% 우뭇가사리 셀룰로오스를 기질로 포함하는 배지에서 5FPU/g의 셀룰라아제를 처리한 조건에서, 벡터만 도입된 대조구 균주(Y2805 $\Delta gal80$ /YGaSW)를 배양하여 에탄올을 생산할 때, 배양시간의 경과에 따른 배지내 셀로바이오스의 농도, 포도당의 농도 및 에탄올의 농도 변화를 나타내는 그래프이다. 도 17b에서 보듯이, 배양후 포도당 및 셀로바이오스의 농도가 증가하였으나, 일정시간이 경과한 후에는 포도당의 농도는 급격히 감소하였으나, 셀로바이오스의 농도는 서서히 감소하였고, 상기 포도당 및 셀로바이오스의 농도가 감소하는 시점부터 에탄올이 생산되기 시작하였으며, 에탄올의 농도는 지속적으로 증가하였으나 일정시간 후에는 일정수준을 유지하였다. 배양이 종료된 후, 약 8g/l의 에탄올이 생산되었다.

[250] 상기 도 17a 및 17b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 변이된 베타-글루코시다제 유전자가 도입된 형질전환체(Y2805 $\Delta gal80$ /ST19-SfBGL1-10)를 이용할 경우, 기질로서 해조류 유래의 바이오매스인 우뭇가사리 셀룰로오스를 사용하더라도 에탄올 생산성이 약 40% 정도 증가함을 알 수 있었다.

[251]

청구범위

- [청구항 1] 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 변이된 베타-글루코시다제는 사카로마이콥시스 피부리게라(*Saccharomycopsis fiburigera*)로부터 유래한 폴리뉴클레오타이드(서열번호 8)로부터 발현되는 폴리펩타이드의 74번째의 아미노산인 트레오닌(T)이 알라닌(A)으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 것인 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 변이된 베타-글루코시다제는 사카로마이콥시스 피부리게라로부터 유래한 폴리뉴클레오타이드(서열번호 8)로부터 발현되는 폴리펩타이드의 275번째의 아미노산인 발린(V)이 알라닌(A)으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 것인 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 변이된 베타-글루코시다제는 사카로마이콥시스 피부리게라로부터 유래한 폴리뉴클레오타이드(서열번호 8)로부터 발현되는 폴리펩타이드의 74번째의 아미노산인 트레오닌(T)과 275번째의 아미노산인 발린(V)이 모두 알라닌(A)으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 것인 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
서열번호 9의 염기서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 베타-글루코시다제.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
단백질융합인자(translational fusion partner: TFP)를 추가로 포함하는 것인 발현벡터.
- [청구항 9] 제7항의 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 숙주세포는 에탄올 발효능을 가지는 것인 형질전환체.
- [청구항 11] 제9항의 형질전환체를 배양하고, 이의 배양물 또는 배양상등액으로부터 베타-글루코시다제를 회수하는 단계를 포함하는, 활성이 증진되도록 변이된 베타-글루코시다제의

생산방법.

[청구항 12]

(i) 제7항의 발현백터를 에탄올 발효능을 가지는 숙주세포에 도입하여 형질전환된 형질전환체를 수득하는 단계;
(ii) 상기 수득한 형질전환체를 베타-글루코시다제의 기질을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및
(iii) 상기 단계 (ii)에서 수득한 배양물 또는 배양상등액으로부터 바이오 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 바이오 에탄올의 생산방법.

[청구항 13]

제12항에 있어서,
상기 에탄올 발효능을 가지는 숙주세포는
자이모모나스(*Zymomonas Mobilis*) 균주, 효모균주 또는 바실러스 균주인 바이오 에탄올의 생산방법.

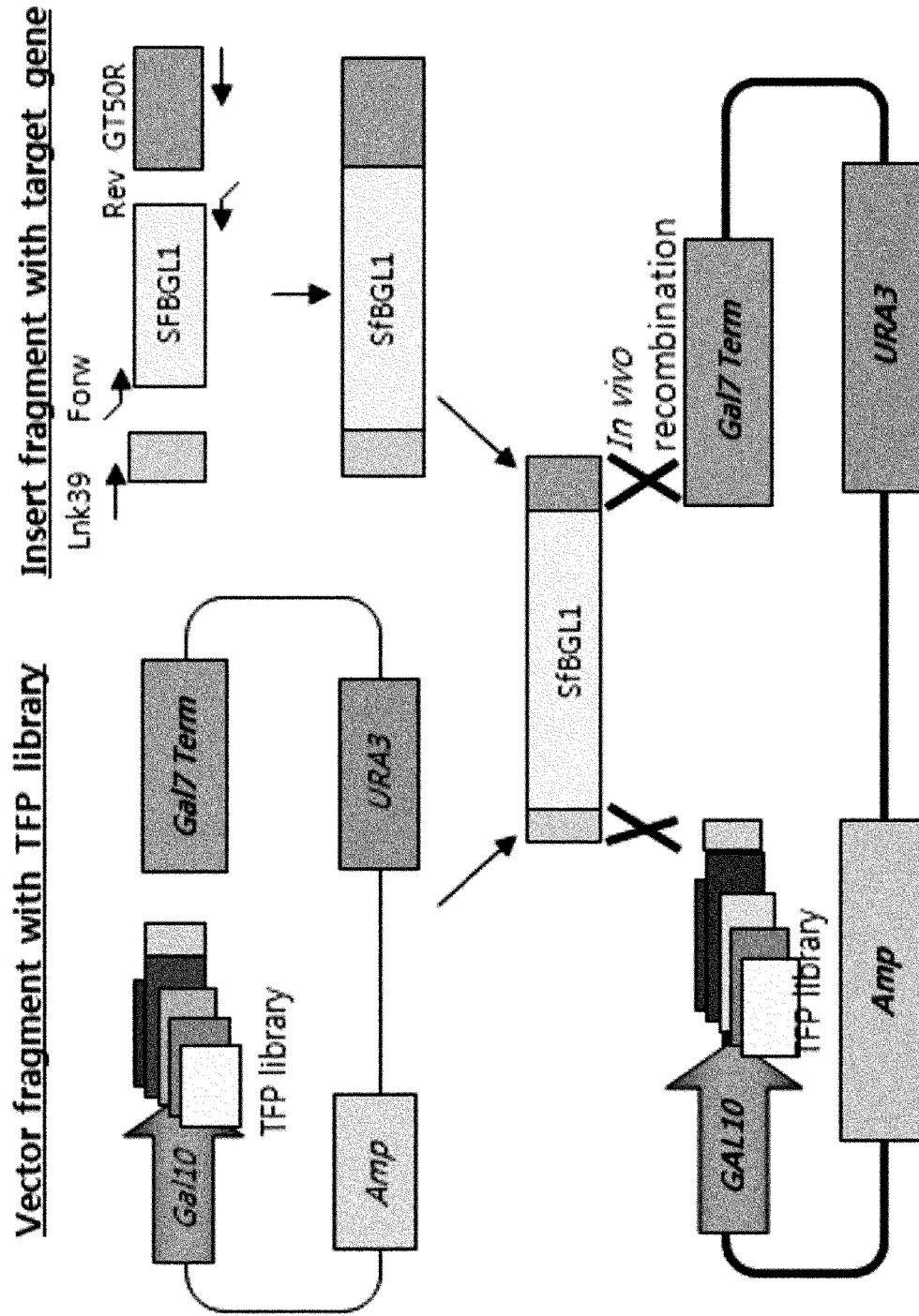
[청구항 14]

제12항에 있어서,
상기 기질은 배당체(glucoside), 올리고당(oligosaccharide) 또는 바이오매스인 것인 바이오 에탄올의 생산방법.

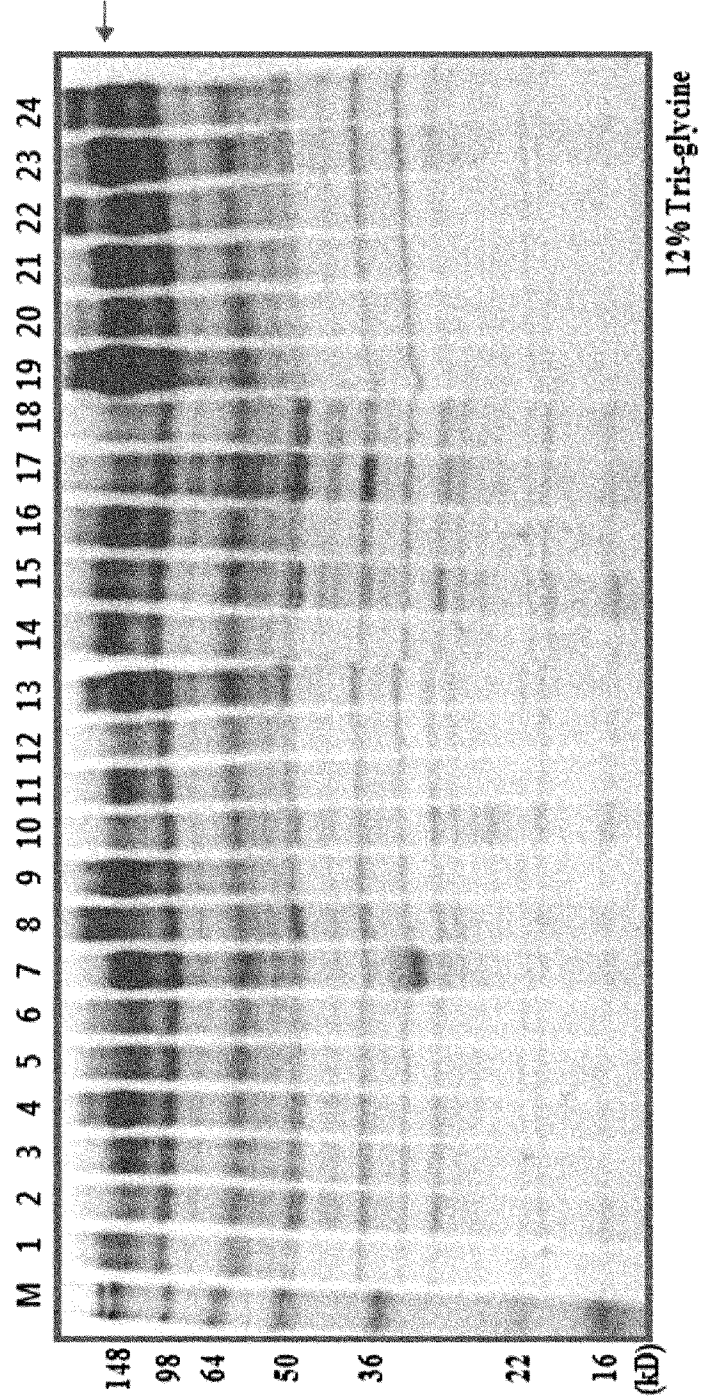
[청구항 15]

제12항에 있어서,
상기 기질은 말토오스, 트레할로오스, 수크로스, 투라노스, 락토스, 셀로비오스, 말토티리오스, 라피노스 및 케스토오스로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종 이상인 것인 바이오 에탄올의 생산방법.

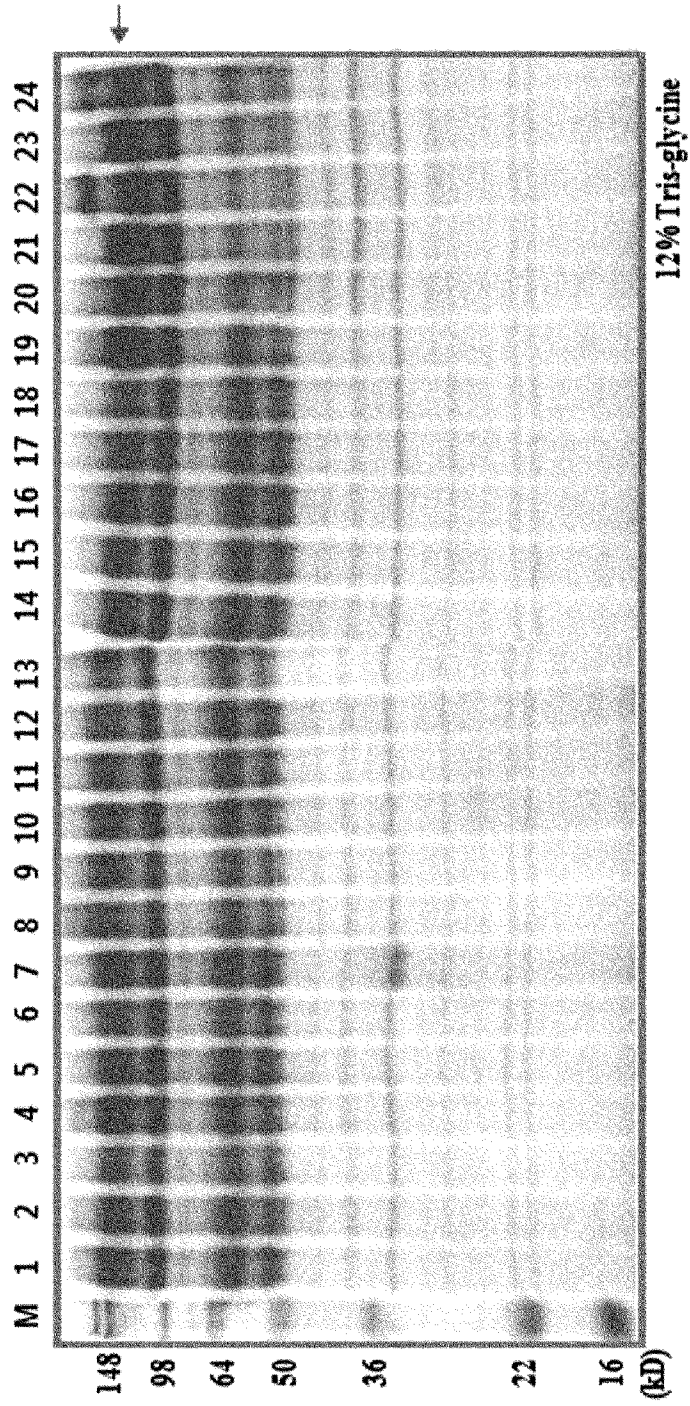
[Fig. 1]



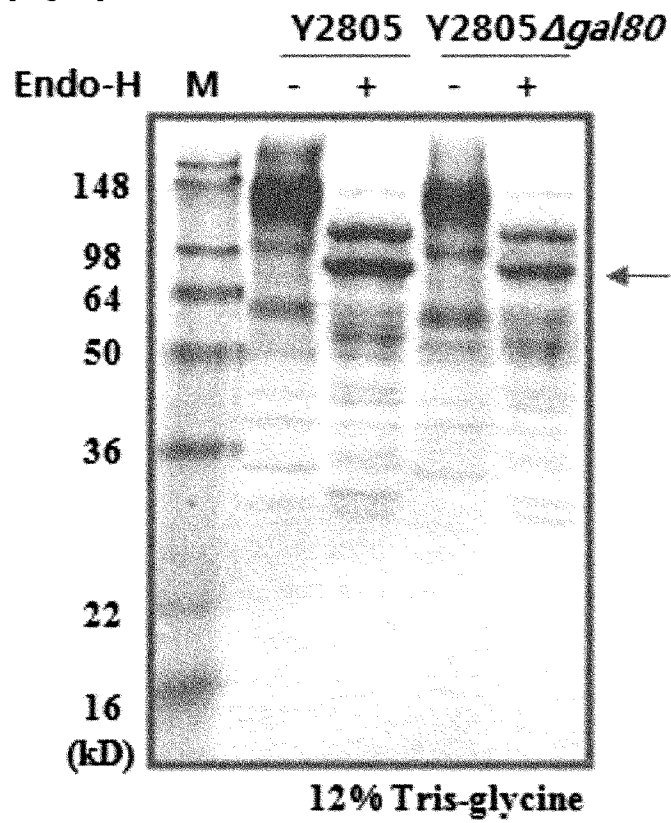
[Fig. 2]



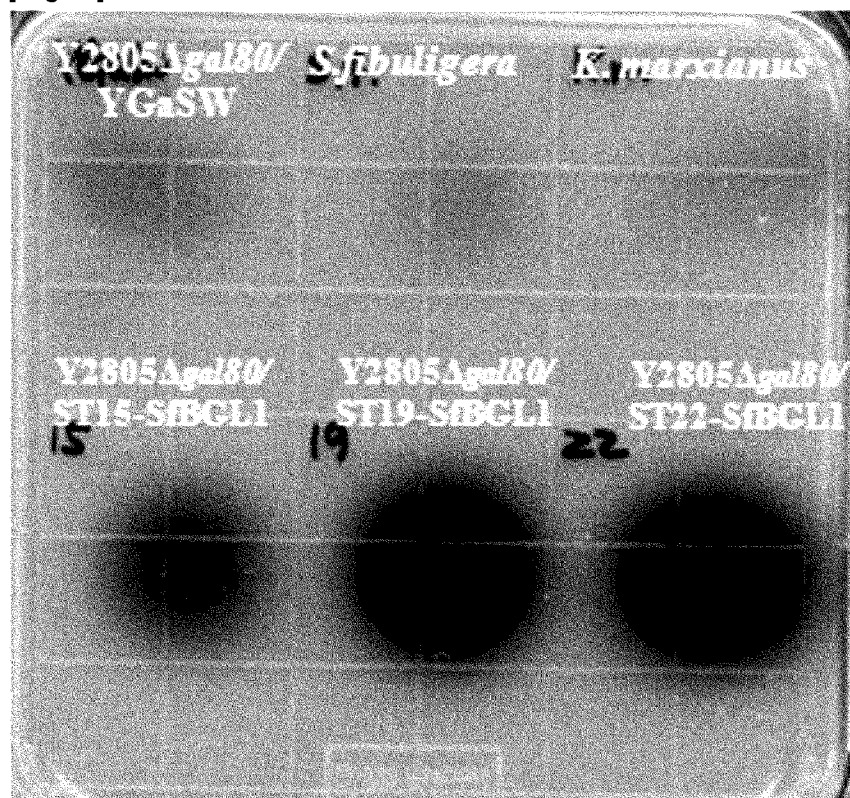
[Fig. 3]



[Fig. 4]



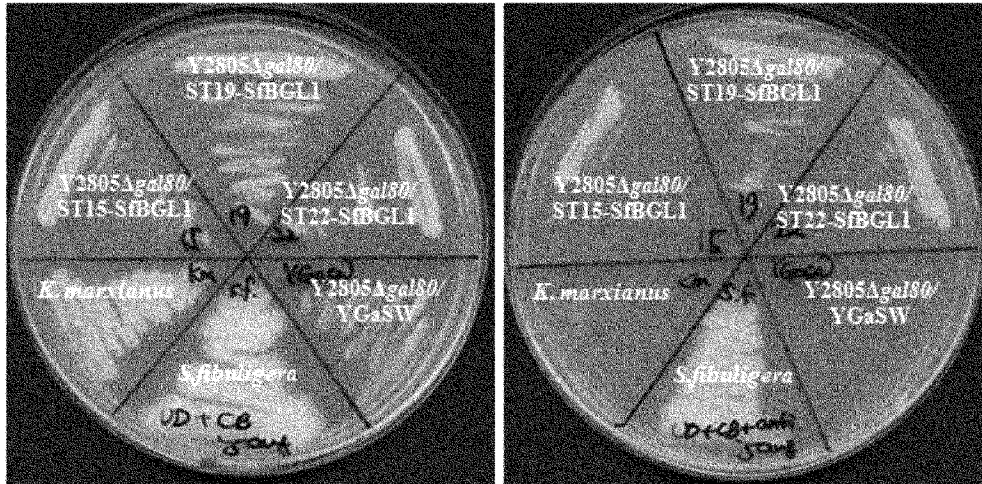
[Fig. 5]



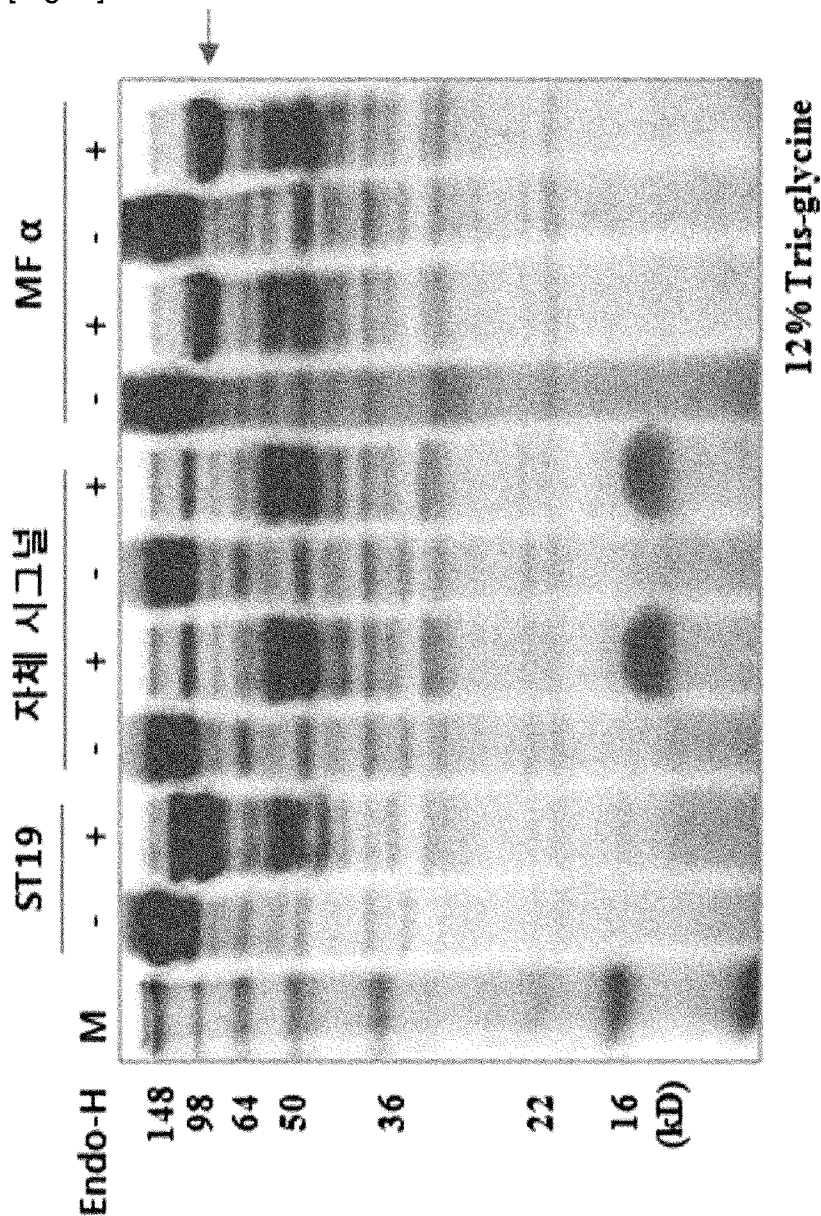
[Fig. 6]

YP-CB 2 day culture

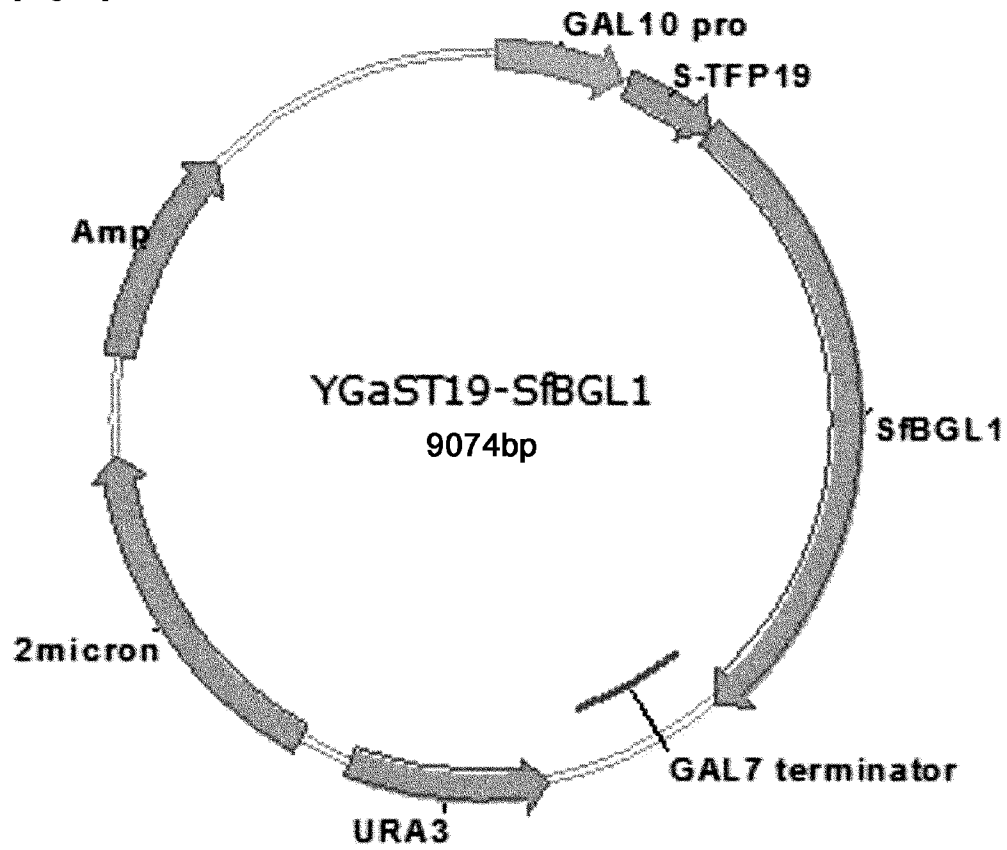
YP-CB-Antimycin 6 day



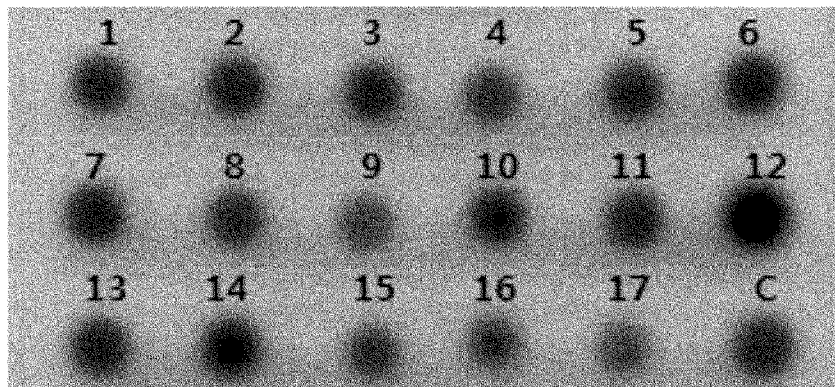
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9a]



[Fig. 9b]

	베타-글루코시다제 활성(U/ml)
Control	1378.6
1	1469.8
2	1458.4
3	1402.5
4	1413.5
5	1574.2
6	1545.6
7	1788.9
8	1678.2
9	1477.6
10	1793.8
11	1635.2
12	1994.5
13	1563.6
14	1874.1
15	1423.3
16	1310.3
17	1369.8

[Fig. 10]

SFBGL1 : VPICNTSPSGGESSCWYSPHYPTFGGRLQDVCEYARAKAIVGQNTIVKYNLTITGQCLDPCVGLGSSVRFPGIENICLDEPLAVRPADVTGYPSGLATGATNKRLFF : 120
 SFBGL1-10 : VPICNTSPSGGESSCWYSPHYPTFGGRLQDVCEYARAKAIVGQNTIVKYNLTITGQCLDPCVGLGSSVRFPGIENICLDEPLAVRPADVTGYPSGLATGATNKRLFF : 120
 SFBGL1-12 : VPICNTSPSGGESSCWYSPHYPTFGGRLQDVCEYARAKAIVGQNTIVKYNLTITGQCLDPCVGLGSSVRFPGIENICLDEPLAVRPADVTGYPSGLATGATNKRLFF : 120
 SFBGL1-14 : VPICNTSPSGGESSCWYSPHYPTFGGRLQDVCEYARAKAIVGQNTIVKYNLTITGQCLDPCVGLGSSVRFPGIENICLDEPLAVRPADVTGYPSGLATGATNKRLFF : 120

 SFBGL1 : RQALGHEHNSGVIHALGPAVGLGVARGGRNFFAFSGEPTFGIAAAATIGLGNWVWACVYKHFIENEGEKYKQCDENPAINTTKEALISANIPORAMHELIMFPADSVAGVG : 240
 SFBGL1-10 : RQALGHEHNSGVIHALGPAVGLGVARGGRNFFAFSGEPTFGIAAAATIGLGNWVWACVYKHFIENEGEKYKQCDENPAINTTKEALISANIPORAMHELIMFPADSVAGVG : 240
 SFBGL1-12 : RQALGHEHNSGVIHALGPAVGLGVARGGRNFFAFSGEPTFGIAAAATIGLGNWVWACVYKHFIENEGEKYKQCDENPAINTTKEALISANIPORAMHELIMFPADSVAGVG : 240
 SFBGL1-14 : RQALGHEHNSGVIHALGPAVGLGVARGGRNFFAFSGEPTFGIAAAATIGLGNWVWACVYKHFIENEGEKYKQCDENPAINTTKEALISANIPORAMHELIMFPADSVAGVG : 240

 SFBGL1 : SVNCSYRNNNTYACENSYMMHLLKEELIGCGFVSCWACLSGVYSAIGLIMSPEVYVGGNNTGTSFWGNTTKAIYNETVPIERIDEMATRILAAIYATNSPTECHLPNFSMT : 360
 SFBGL1-10 : SVNCSYRNNNTYACENSYMMHLLKEELIGCGFVSCWACLSGVYSAIGLIMSPEVYVGGNNTGTSFWGNTTKAIYNETVPIERIDEMATRILAAIYATNSPTECHLPNFSMT : 360
 SFBGL1-12 : SVNCSYRNNNTYACENSYMMHLLKEELIGCGFVSCWACLSGVYSAIGLIMSPEVYVGGNNTGTSFWGNTTKAIYNETVPIERIDEMATRILAAIYATNSPTECHLPNFSMT : 360
 SFBGL1-14 : SVNCSYRNNNTYACENSYMMHLLKEELIGCGFVSCWACLSGVYSAIGLIMSPEVYVGGNNTGTSFWGNTTKAIYNETVPIERIDEMATRILAAIYATNSPTECHLPNFSMT : 360

 SFBGL1 : TREYGNKYAUNTTEIVKYNVYDPSNDETTETALKVAEESIVLLKNENNTLPISEPKARILLSGIAAGDPFGYCCDQCTINGALFCWGSSEVGSVPKYCTPTEETSYLARKSNMC : 480
 SFBGL1-10 : TREYGNKYAUNTTEIVKYNVYDPSNDETTETALKVAEESIVLLKNENNTLPISEPKARILLSGIAAGDPFGYCCDQCTINGALFCWGSSEVGSVPKYCTPTEETSYLARKSNMC : 480
 SFBGL1-12 : TREYGNKYAUNTTEIVKYNVYDPSNDETTETALKVAEESIVLLKNENNTLPISEPKARILLSGIAAGDPFGYCCDQCTINGALFCWGSSEVGSVPKYCTPTEETSYLARKSNMC : 480
 SFBGL1-14 : TREYGNKYAUNTTEIVKYNVYDPSNDETTETALKVAEESIVLLKNENNTLPISEPKARILLSGIAAGDPFGYCCDQCTINGALFCWGSSEVGSVPKYCTPTEETSYLARKSNMC : 480

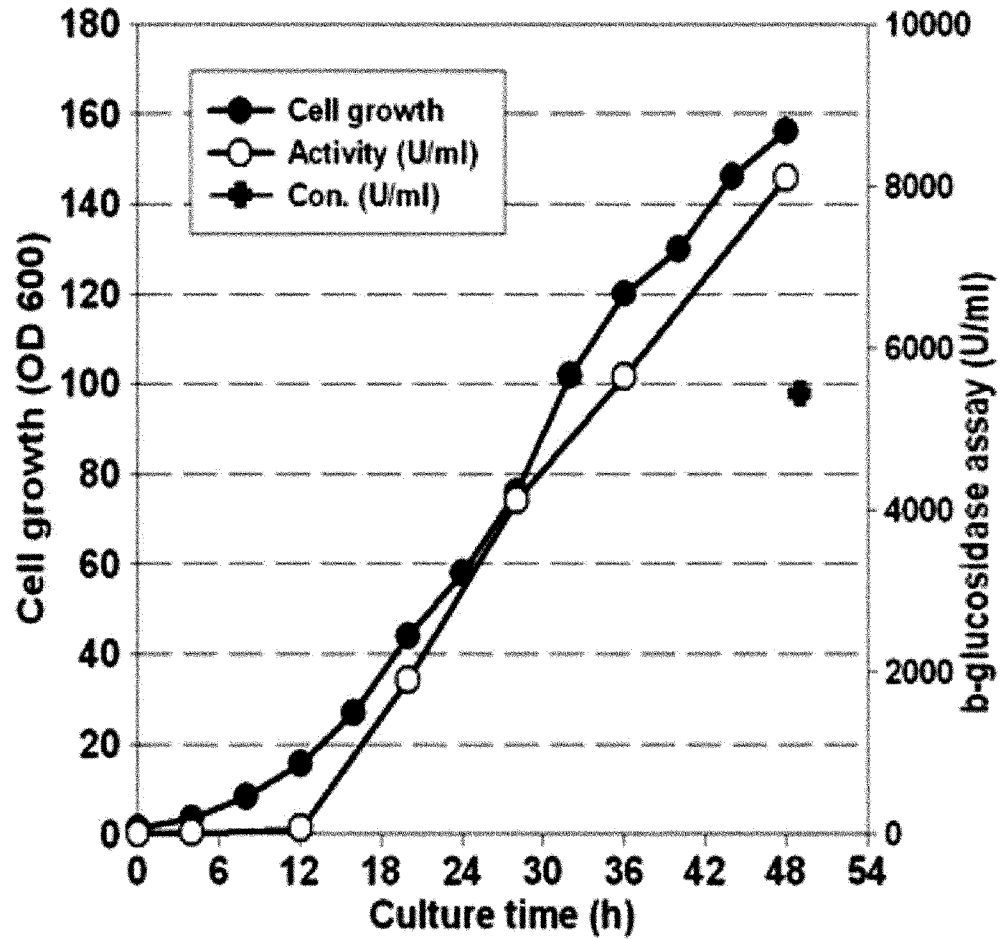
 SFBGL1 : FDYIRSEYDLACVTRKASDAHLSIVVWSAASGCVITVGCNCDRKNLTINNGDKLIETVAENCANTVWVVTSTQINFEFGAFHPNVTALVWAGPLDERSGTAIANILFGKANPSGHI : 600
 SFBGL1-10 : FDYIRSEYDLACVTRKASDAHLSIVVWSAASGCVITVGCNCDRKNLTINNGDKLIETVAENCANTVWVVTSTQINFEFGAFHPNVTALVWAGPLDERSGTAIANILFGKANPSGHI : 600
 SFBGL1-12 : FDYIRSEYDLACVTRKASDAHLSIVVWSAASGCVITVGCNCDRKNLTINNGDKLIETVAENCANTVWVVTSTQINFEFGAFHPNVTALVWAGPLDERSGTAIANILFGKANPSGHI : 600
 SFBGL1-14 : FDYIRSEYDLACVTRKASDAHLSIVVWSAASGCVITVGCNCDRKNLTINNGDKLIETVAENCANTVWVVTSTQINFEFGAFHPNVTALVWAGPLDERSGTAIANILFGKANPSGHI : 600

 SFBGL1 : PFTIARTDQDYPIETIYSPSSGEPENHLVENDLLVYRFEKNIETPRYAFGCGSYNEKVSNAKYSAAKVVDELPETATYLSSEFSYCNKACSNPSDAFAPADLNRVNYLYFYLL : 720
 SFBGL1-10 : PFTIARTDQDYPIETIYSPSSGEPENHLVENDLLVYRFEKNIETPRYAFGCGSYNEKVSNAKYSAAKVVDELPETATYLSSEFSYCNKACSNPSDAFAPADLNRVNYLYFYLL : 720
 SFBGL1-12 : PFTIARTDQDYPIETIYSPSSGEPENHLVENDLLVYRFEKNIETPRYAFGCGSYNEKVSNAKYSAAKVVDELPETATYLSSEFSYCNKACSNPSDAFAPADLNRVNYLYFYLL : 720
 SFBGL1-14 : PFTIARTDQDYPIETIYSPSSGEPENHLVENDLLVYRFEKNIETPRYAFGCGSYNEKVSNAKYSAAKVVDELPETATYLSSEFSYCNKACSNPSDAFAPADLNRVNYLYFYLL : 720

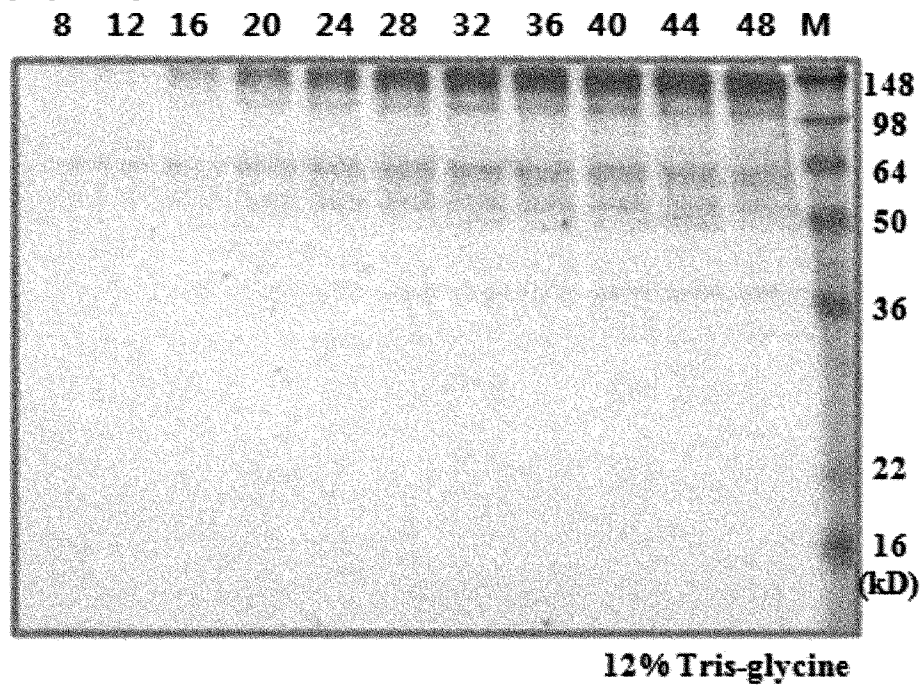
 SFBGL1 : SNVTLKGNRYEYPPGYSTECRTTIFCGGGLGNDALMEVAYKVEYVQVQNLGNSTEFVQCLIKHPEDCHFTPTQICRFEKVELSGEKTVEFELLRRLSVWDTIQCSWIVESGHI : 840
 SFBGL1-10 : SNVTLKGNRYEYPPGYSTECRTTIFCGGGLGNDALMEVAYKVEYVQVQNLGNSTEFVQCLIKHPEDCHFTPTQICRFEKVELSGEKTVEFELLRRLSVWDTIQCSWIVESGHI : 840
 SFBGL1-12 : SNVTLKGNRYEYPPGYSTECRTTIFCGGGLGNDALMEVAYKVEYVQVQNLGNSTEFVQCLIKHPEDCHFTPTQICRFEKVELSGEKTVEFELLRRLSVWDTIQCSWIVESGHI : 840
 SFBGL1-14 : SNVTLKGNRYEYPPGYSTECRTTIFCGGGLGNDALMEVAYKVEYVQVQNLGNSTEFVQCLIKHPEDCHFTPTQICRFEKVELSGEKTVEFELLRRLSVWDTIQCSWIVESGHI : 840

 SFBGL1 : EALIGVAVNNIKTSVLTFT : 859
 SFBGL1-10 : EALIGVAVNNIKTSVLTFT : 859
 SFBGL1-12 : EALIGVAVNNIKTSVLTFT : 859
 SFBGL1-14 : EALIGVAVNNIKTSVLTFT : 859

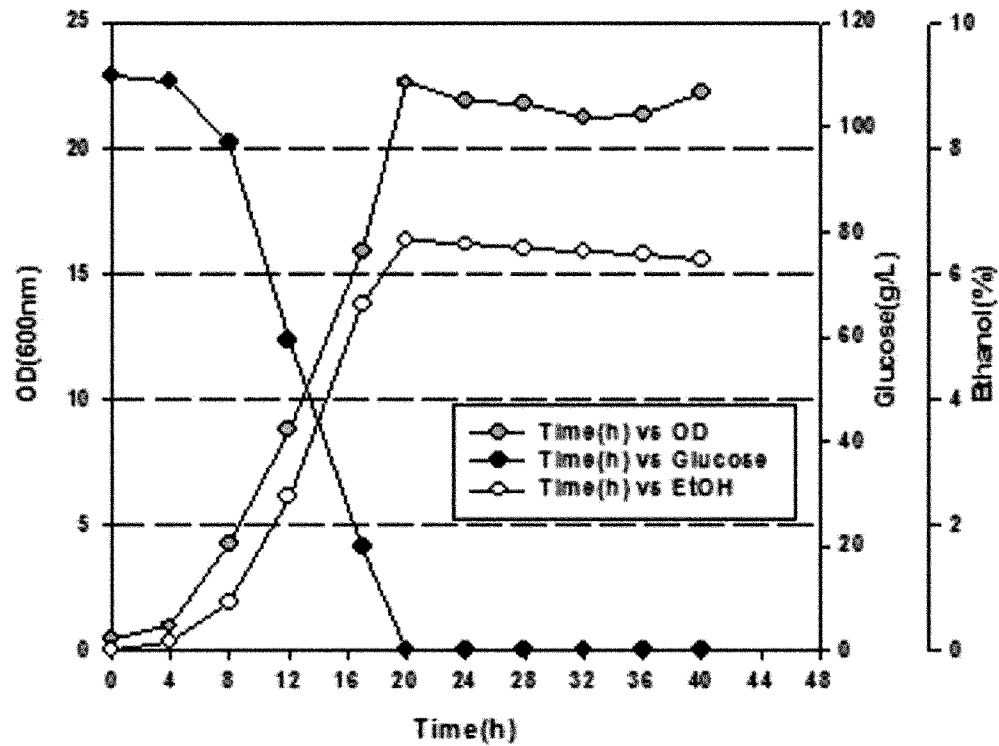
[Fig. 11a]



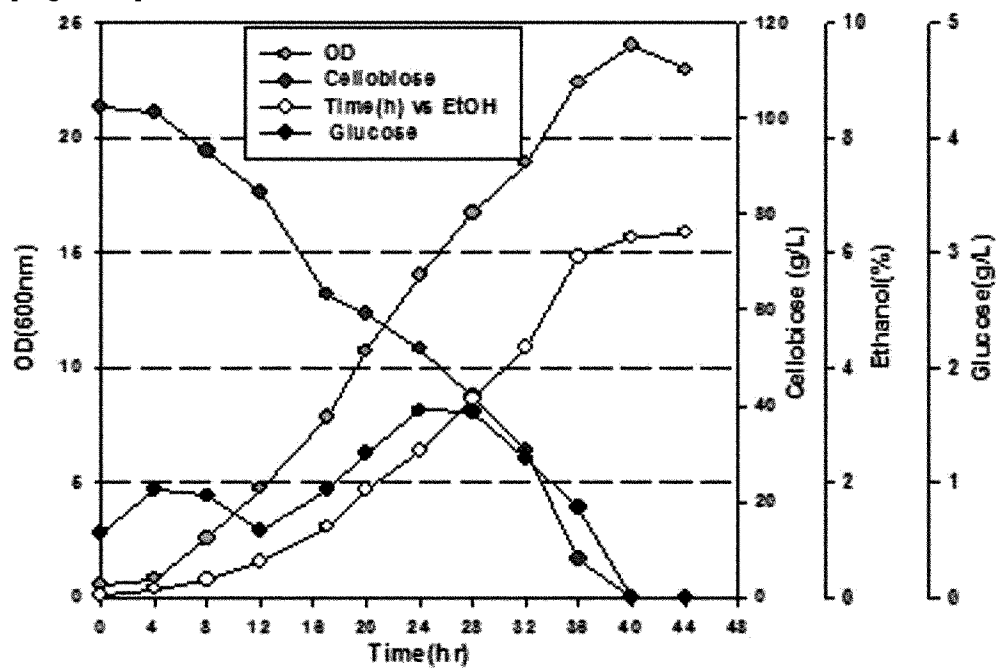
[Fig. 11b]



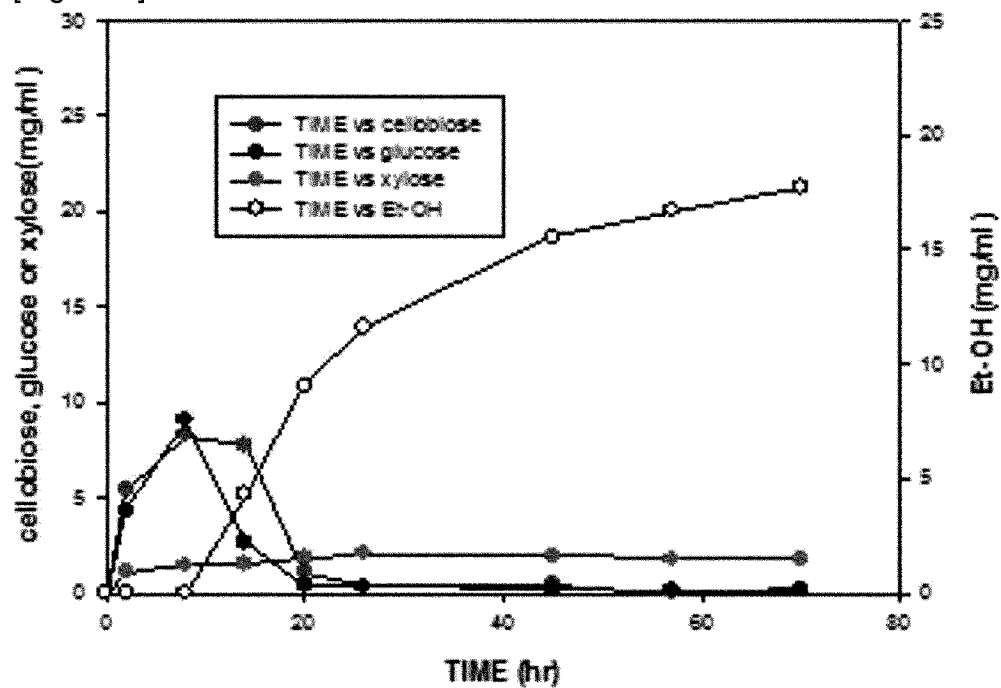
[Fig. 12a]



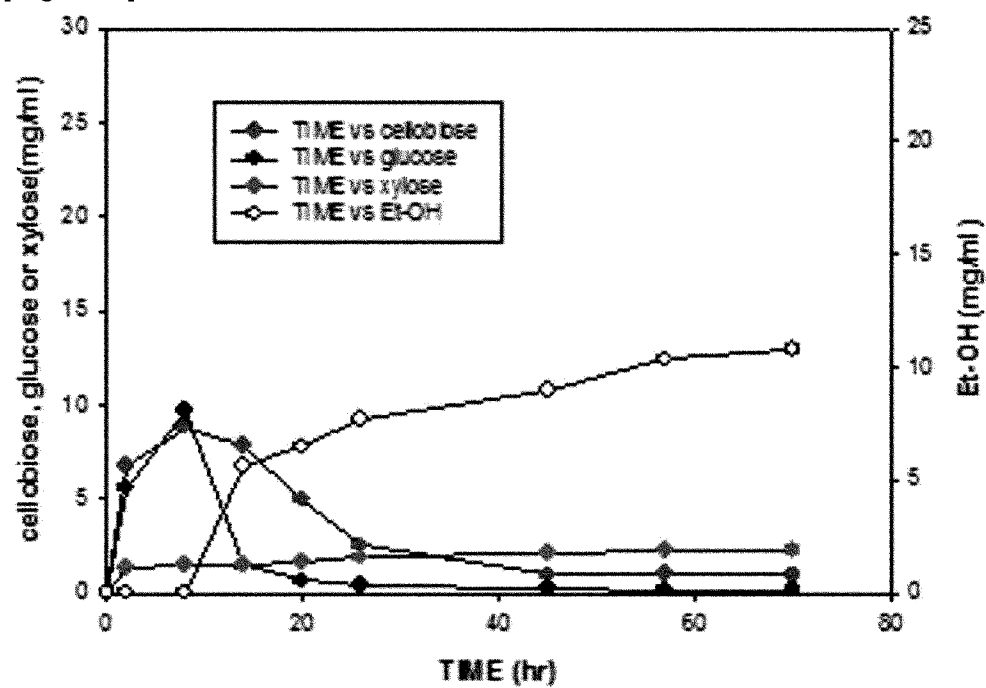
[Fig. 12b]



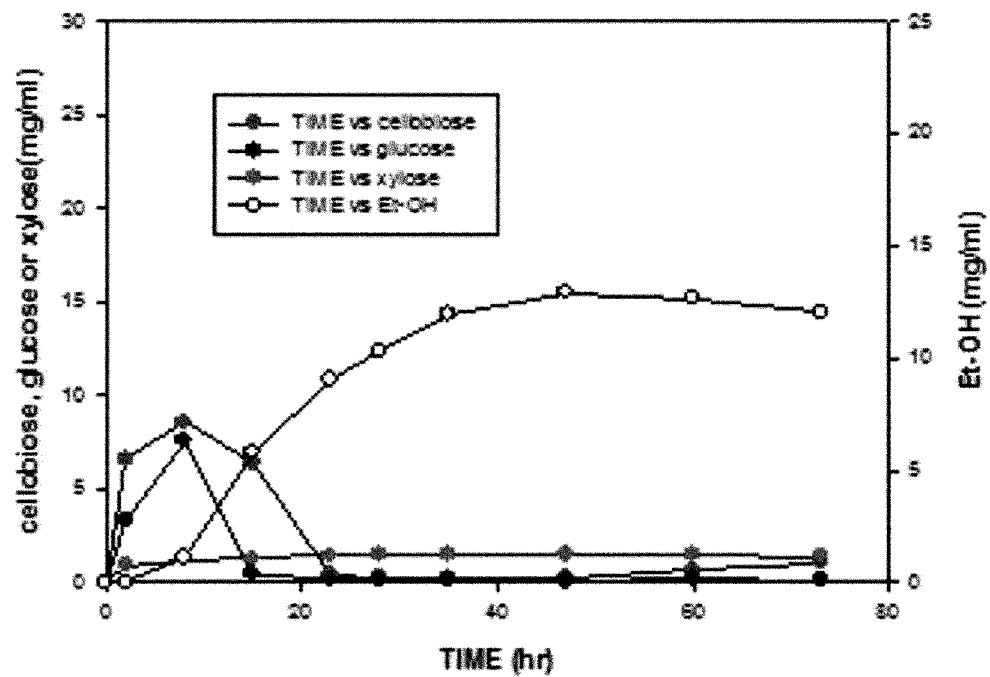
[Fig. 13a]



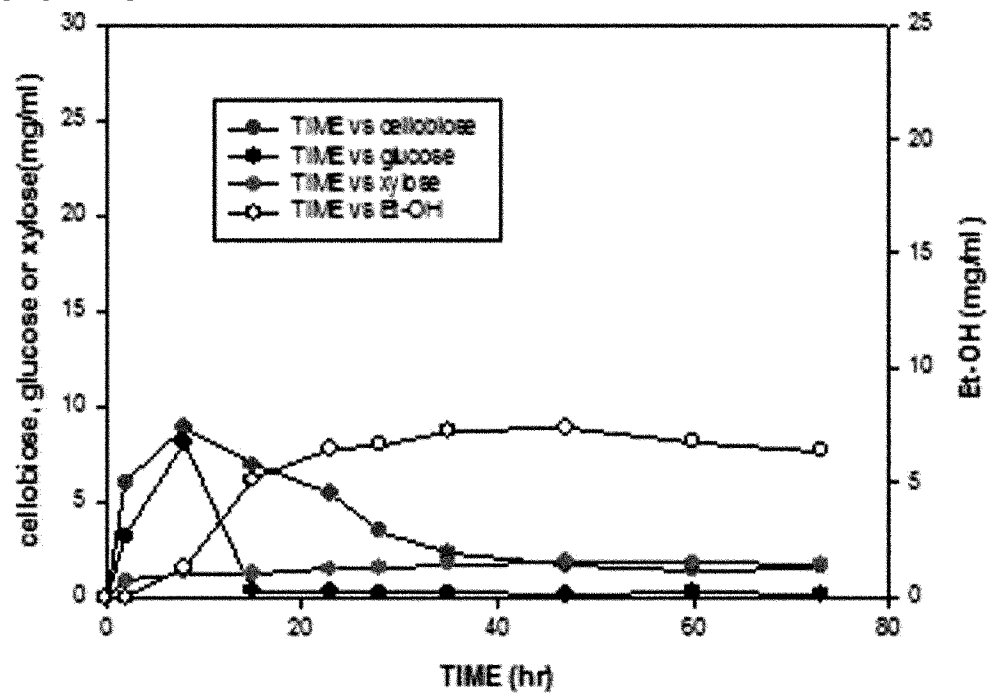
[Fig. 13b]



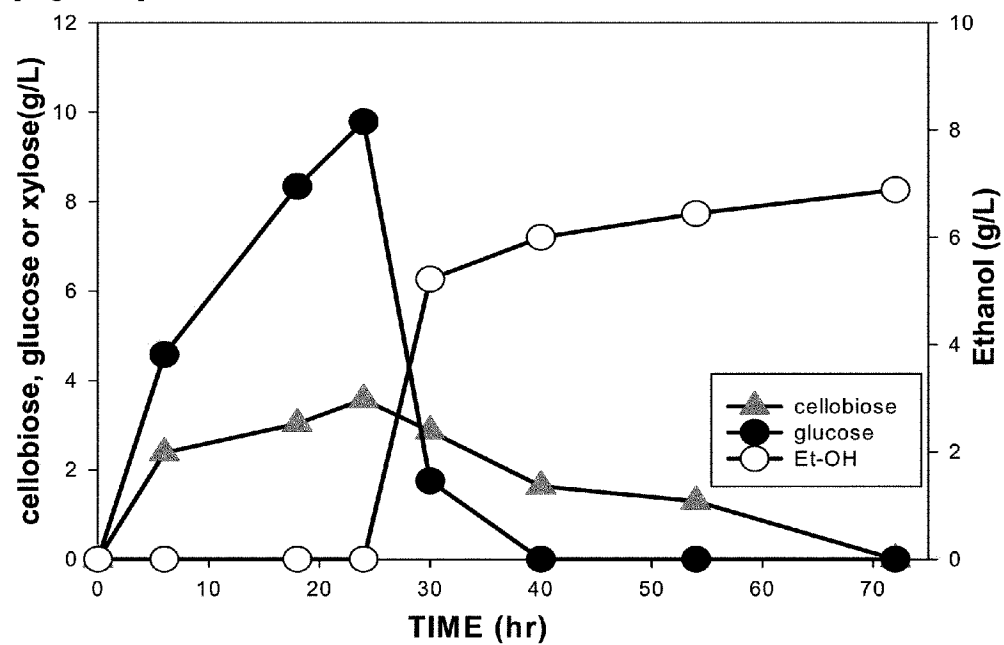
[Fig. 14a]



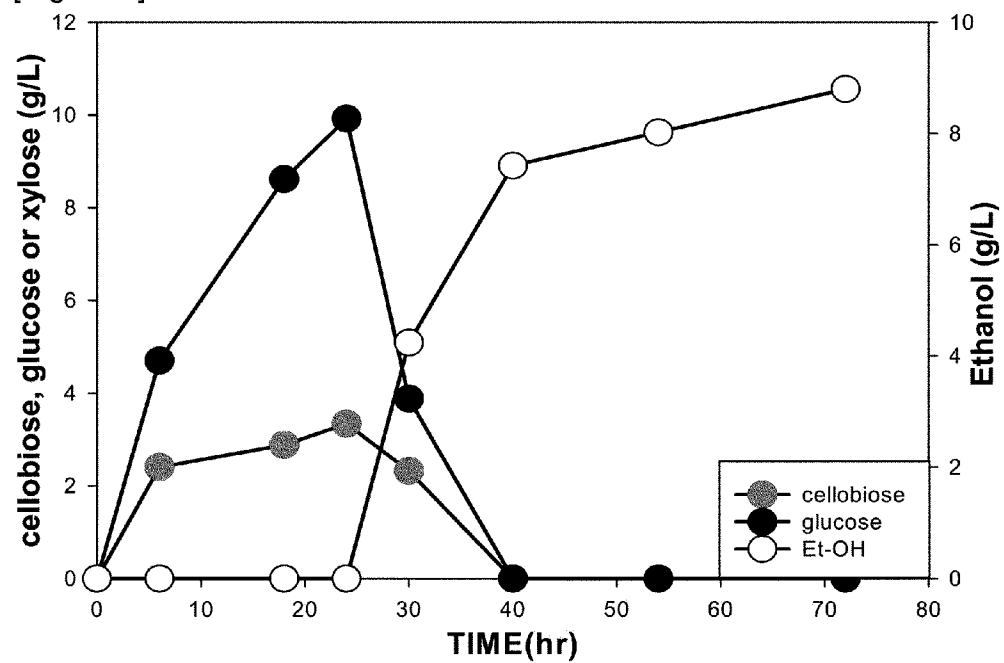
[Fig. 14b]



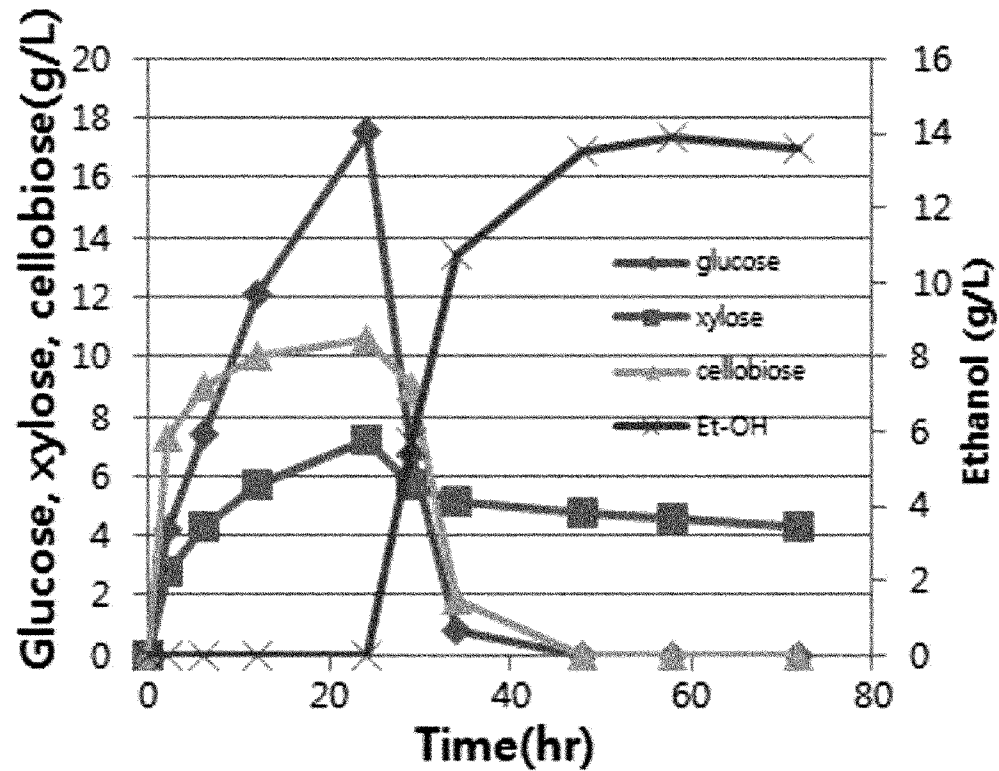
[Fig. 15a]



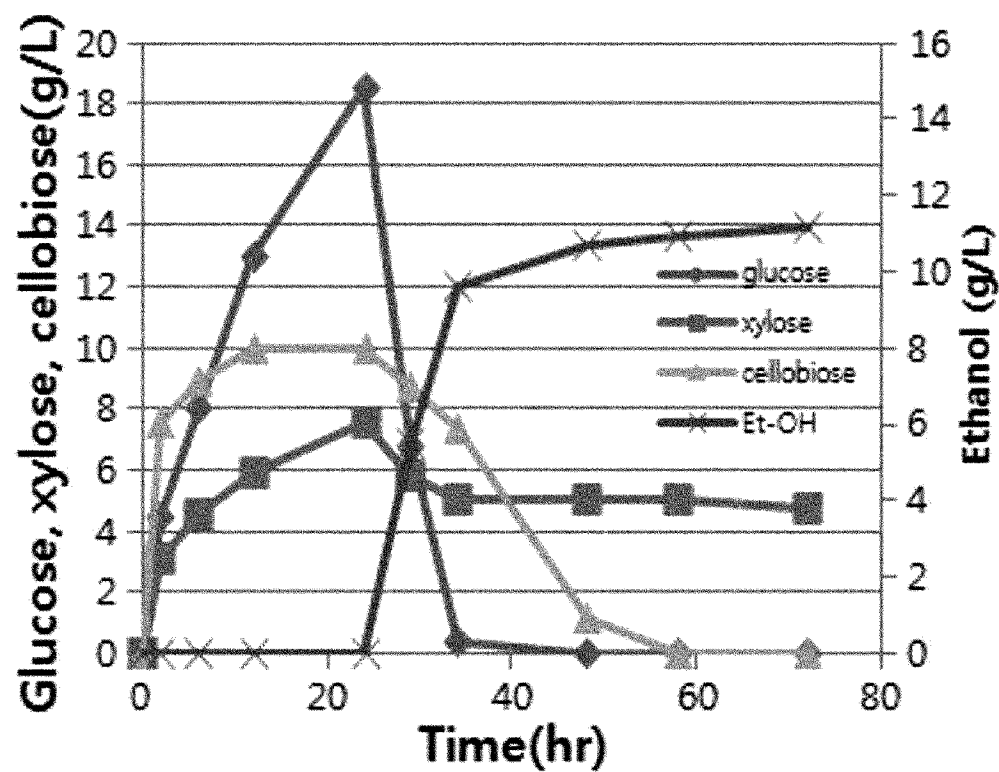
[Fig. 15b]



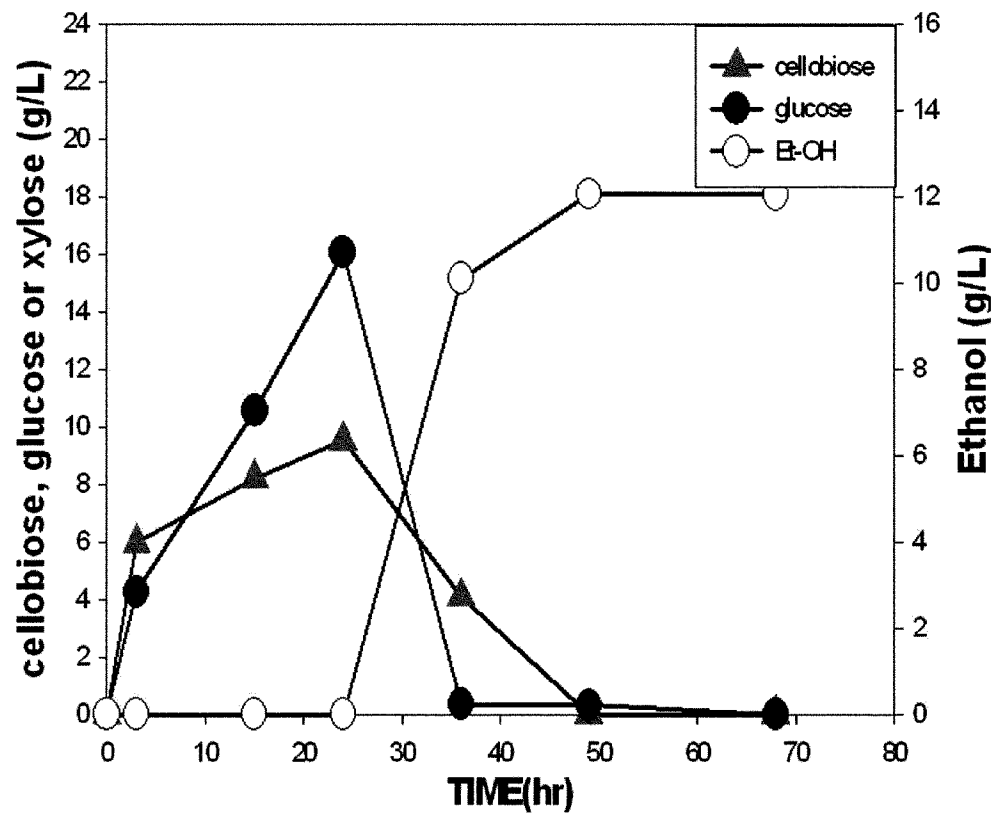
[Fig. 16a]



[Fig. 16b]



[Fig. 17a]



[Fig. 17b]

