

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2011/132835 A2

PCT

(43) 국제공개일
2011년 10월 27일 (27.10.2011)

(51) 국제특허분류:

C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12R 1/85 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/007863

(22) 국제출원일: 2010년 11월 9일 (09.11.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0038140 2010년 4월 23일 (23.04.2010) KR
10-2010-0038126 2010년 4월 23일 (23.04.2010) KR
10-2010-0101754 2010년 10월 19일 (19.10.2010) KR
10-2010-0101747 2010년 10월 19일 (19.10.2010) KR
10-2010-0110215 2010년 11월 8일 (08.11.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교, 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **최원자 (CHOI, Won Ja)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 자연과학대학 생명과학전공, 120-170

Seoul (KR). **김현수 (KIM, Hyun Soo)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 평촌동 꿈마을 라이프아파트 105동 2305 호, 431-070 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).

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

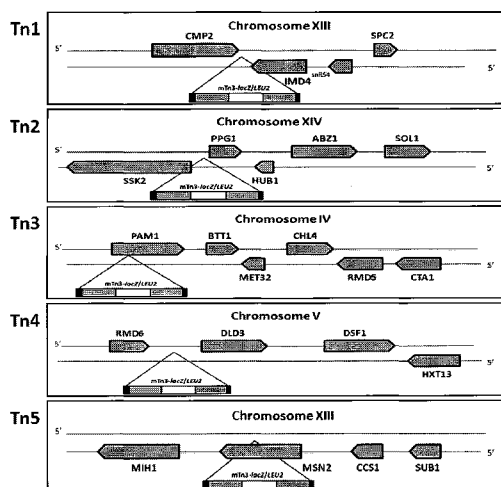
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ETHANOL-, HEAT- OR FURFURAL- RESISTANT YEAST STRAIN, AND GENE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 에탄올-, 열- 또는 퍼퓨랄-저항성 효모 균주, 및 이의 유전자

도 3



(57) Abstract: The present invention relates to an ethanol-, heat- or furfural- resistant transformed yeast strain comprising: inactivated CMP2 or IMD4 gene (Tn-1); SSK2 or PPG1 gene (Tn-2); PAM1 gene (Tn-3); DLD3 gene (Tn-4); or MSN2 gene (Tn-5), and a use thereof. The yeast strain of the present invention can grow in high concentrations of ethanol, preferably in high concentrations of ethanol (for example, 5-15%). In addition, the yeast strain of the present invention includes a yeast strain capable of growing even at a high temperature (for example, 42 °C or 43 °C) or even in a high concentration of furfural (for example, 15-50 mM). Therefore, the yeast strain of the present invention can more effectively produce ethanol in conditions of high temperature, high concentration of ethanol and high concentration of furfural which are necessary for an integrated process for overcoming existing ineffective multistep processes.

(57) 요약서: 본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-, 에탄올-/열- 또는 에탄올-/열-퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 효모 균주는 고농도에 에탄올, 바람직하게는 고농도 에탄올(예컨대, 5-15%)에서 성장할 수 있다. 또한, 본 발명의 효모 균주는 고온(예컨대, 42°C 또는 43°C) 또는 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15-50 mM)에서도 성장할 수 있는 효모 균주를 포함한다. 따라서, 본 발명의 효모 균주는 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에 필요한 고온, 고농도 에탄올 및 고농도 퍼퓨랄 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있다.



공개:

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

【명세서】

【발명의 명칭】

에탄올-, 열- 또는 퍼퓨랄-저항성 효모 균주, 및 이의 유전자

5 【기술 분야】

본 발명은 에탄올-, 열- 또는 퍼퓨랄-저항성 효모 균주 및 이의 유전자, 그리고 이의 용도에 대한 것이다.

【배경 기술】

10 효모 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)는 바이오매스
 자원으로부터 바이오에탄올의 생산을 포함하는 여러 산업 분야에서
 다양하게 이용되어 왔다(Schubert, 2006). 효모 세포는 산업적 에탄올 발효
 과정 동안 발생하는 고농도 에탄올 같은 여러 환경적 스트레스에 항상
 노출되고, 이는 결국 세포 성장, 세포 생존을 및 에탄올 생산에 있어서의
 15 감소를 초래한다(Casey & Ingledew, 1986; Suutari and Laakso, 1994).
 따라서, 주로 고농도 에탄올에 의해 야기된 스트레스를 극복할 수 있는
 효모 균주의 개발이 요구되어져 왔다. 한편, 새로운 기술로서 제안되어
 지는 목질계 분해효소 생산라인과 목질계 분해라인, 발효라인이 한
 반응기(reactor)에서 일어나도록 균주체계를 개발하고자 하는
 20 통합공정(CBP: Consolidated BioProcess)은 목질계 분해효소의 적정환경 과
 효모의 발효환경의 차이를 극복할 조건에 맞는 고에탄올 및 열 저항성을
 보유한 효모균주를 개발 하는 것이 향후 효율적인 에탄올 생산을 위한 가장
 중요한 요소이다. 또한, 목질계 분해과정에서 생성되는 발효저해제 일종인
 퍼퓨랄(furfural)에 저항성을 획득한 균주를 개발하는 것이 더욱 필요하다
 25 할 수 있다.

에탄올 스트레스 저항성에 대한 기작을 조사하기 위해 많은 연구들이
 있었다. 특히, 막 유동성과 관련된 불포화 지방산은 효모에서 에탄올
 저항성의 중요한 결정인자로 간주되어 보고되었다(Kajiwara, *et al.*, 2000;
 You, *et al.*, 2003). 또한, 트리할로오스(Kim, *et al.*, 1996) 또는
 30 프롤린(Takagi, *et al.*, 2005)의 세포내 축적이 효모의 에탄올 저항성을

개선시키고 에르고스테롤이 사카로미세스 세레비지에의 에탄올 저항성과 관련된 중요한 인자(Inoue, *et al.*, 2000)라는 것이 보고되었다.

더 나아가, 마이크로어레이 및 포괄적 발현 패턴 분석 같은 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석들의 이용이 에탄올 스트레스 관련된 신규한 유전자들을 동정하는 데 유용하였다(Hirasawa, *et al.*, 2007; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 이러한 접근방법을 통해, 에탄올 저항성에 관련된 많은 유전자들이 비-필수(nonessential) 유전자들로 동정되었다. 또한, 에탄올 저항성에 관련된 결과들은 각각 매치하지 않았고, 이러한 불일치는 균주 및 성장 조건에 기인한다고 보고하였다(Teixeira, *et al.*, 2009). 따라서, 상술한 유전 정보로부터 구축된 균주는 항상 에탄올 스트레스 조건에 대한 변화를 초래하지 않는다(Yoshikawa, *et al.*, 2009). 또한, 상업적으로 유용한 사카로미세스 세레비지에의 결실 돌연변이 라이브러리는 에탄올 저항성에 관련된 유전자들의 지놈 전반에 걸친 스크리닝에 이용되었다(Fujita, *et al.*, 2006; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 상술한 연구들은 주로 에탄올 민감성을 나타내는 돌연변이체들을 선택하여 상응하는 유전자를 고농도 에탄올 조건 하에서 성장에 필요한 유전자들로 동정하였다. 한편, 고온 조건에서는 주로 열충격 단백질(HSP: Heat shock protein)이 유도되어 성장을 유도한다고 보고 되었으며(Sanchez, *et al.*, 1990), 사카로미세스 지놈 결실 프로젝트에 의해 구축된 효모유전자 결실 돌연변이체들에 대한 온도를 포함한 여러 스트레스 민감조건에서 요구되어 지는 유전자들을 스크리닝 하였다(Auesukaree *et al.*, 2009). 또한, 퍼퓨랄에 대한 민감성을 나타내는 유전인자들을 동정한 결과 주로 펜토스 포스페이트 경로 (pentose phosphate pathway)에 포함된 유전자들(*ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, 및 *TKL1*)이 주요한 인자이며 이는 조효소 NADPH/NADH 의 레독스 조절(Redox balance)이 중요하다고 하였다 (Gorsich, *et al.*, 2006).

상술한 바와 같이, 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄 민감성 돌연변이들의 스크리닝을 통해 저항성을 책임지는 유전자들이 동정되었지만(Takahashi, *et al.*, 2001; Auesukaree *et al.*, 2009), 임의적 트랜스포존 삽입에 의해 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄 저항성 효모 균주를 직접적으로 구축하고 이에

관계된 타겟 유전자들을 동정하는 방법에 대해서는 아직까지 보고되어 있지 않다.

한편, 지속적인 대체 연료로서 바이오에탄올에 대한 요구가 증가하고 있다. 효모 사카로미세스 세레비지에는 강력한 에탄올 생산능 및
5 저항성으로 인해 에탄올-연관된 산업에서 폭넓게 이용되고 있다(Schubert 2006). 효모 세포는 고농도 에탄올, 고온 또는 고삼투압 같은 여러 환경 스트레스 및 산업적 에탄올 발효 동안 발생하는 억제인자들에 항상 노출되어 결국 세포 성장, 생존을 및 에탄올 생산율이 감소된다(Casey & Ingledew 1986; Suutari & Laakso 1994). 따라서, 다양한 스트레스를 견딜
10 수 있는 효모 스트레인의 개발이 절실하게 요구된다.

연료 에탄올 생산을 위해 가장 강력하게 대두되는 기술들 중 하나가 동일 반응기에서 동시에 리그노셀룰로오스계 바이오매스(lignocellulosic biomass)의 당화(saccharification) 및 발효로 특징지을 수 있는 CBP(consolidated bio-processing)이다(Lynd, *et al.*, 2005). CBP에서는
15 당화를 위한 최적 온도(45-50°C)가 발효를 위한 온도(25-35°C)와 다르기 때문에, 열-저항성 스트레인의 이용이 반드시 필요하다(Edgardo, *et al.*, 2008; Weber, *et al.*, 2010). 또한, 열-저항성 효모 스트레인의 이용은 냉각 비용, 증류 비용 및 더 빠른 발효율을 감소시키는 데 유용하고 발효 동안 오염 기회를 감소시키는 데 도움이 된다. 자외선
20 돌연변이유발법(Sridhar, *et al.*, 2002), 에러-프론 PCR(error-prone polymerase chain reaction; Shimoda, *et al.*, 2006) 및 고온에 장기간 적응(long-term adaptation to high temperatures; Edgardo, *et al.*, 2008)을 이용한 여러 보고들에서 열-저항성 스트레인의 개발을 소개하고 있다.

25 에탄올-저항성 효모 스트레인의 이용은 그 자체로 높은 에탄올 생산율을 위해 중요한데, 왜냐하면 에탄올 농도가 발효 과정 동안 세포에 해로운, 심지어는 치명적인 레벨까지 끊임없이 증가하기 때문이다. 트리할로오스(Kim, *et al.*, 1996), 프롤린(Takagi, *et al.*, 2005) 및 에르고스테롤(Inoue, *et al.*, 2000)의 세포내 축적을 포함하는 여러
30 생리학적 변화들이 에탄올-저항성 효모 스트레인에서 일어난다. 에탄올 저항성 스트레인들을 개발하기 위해, 진화적 적응(Stanley, *et al.*, 2010),

임의적 화학물질 돌연변이유발법(Mobini-Dehkordi, *et al.*, 2008) 및 유전자 서플링(Hou, 2010) 같은 고전적인 전략 이외에 여러 전략들이 최근에 이용되고 있다. 상술한 대체 전략들은 지놈 전반에 걸친 DNA 마이크로어레이 분석(Hirasawa, *et al.*, 2007), 트랜스포존-매개된 결실 돌연변이 라이브러리(Takahashi, *et al.*, 2001) 또는 단일 유전자 녹-아웃 single gene knockout(SGKO) 라이브러리(Auesukaree, *et al.*, 2009; Fujita, *et al.*, 2006; Kubota, *et al.*, 2004; Teixeira, *et al.*, 2009; van Voorst, *et al.*, 2006; Yoshikawa, *et al.*, 2009) 스크리닝 및 gTME(global transcriptional machinery engineering; Alper, *et al.*, 2006)를 포함한다. 비록 gTME 가 에탄올 저항성 스트레인을 양성적으로 선택하는 수단으로서 흥미로울지라도, 그 효용도가 논란이 되고 있다(Araki, *et al.*, 2009). 이와 대조적으로, 다른 3 가지 대체 전략들은 대부분 간접적이다: 타겟 유전자의 동정에 따른 확인 단계가 추가적으로 필요한데, 이는 에탄올 민감성 유전자의 동정이 에탄올 저항성의 분자 기반을 이해하는 데 도움을 주지만 에탄올 저항성 스트레인의 생산을 확실하게 하는 것은 아니기 때문이다. 더욱이, 동정된 타겟 유전자들의 많은 수가 복잡하게 고려해야 하는데, 이는 효모 지놈에서 인코딩된 유전자들의 5-10%는 다른 스트레스 인자들(stressors)일 수 있기 때문이다.

몇몇 연구들이 특이 유전자(들)의 파괴가 에탄올(Kubota, *et al.*, 2004; Yazawa, *et al.*, 2007)을 포함하는 여러 종류의 스트레인 인자들에 대한 저항성 스트레인의 창출로 이어진다는 것을 밝혔다. 최근에, 8% 에탄올에서 증가된 성장을 보이는 2 개의 클론 및 10 개의 삼투-저항성 클론들이 SGKO 라이브러리의 스크리닝을 통해 동정되었다(Yoshikawa, *et al.*, 2009). 특히, 본 연구는 특정 스트레스 인자에 대한 저항성(민감하지 않은)을 가지는 스트레인의 양성적(또는 직접적인) 분리를 위해 트랜스포존 또는 SGKO 를 이용하여 구축된 결실 돌연변이 라이브러리의 이용하였다.

어떠한 라이브러리를 이용하는 것이 현재 주된 이슈이다. 각 라이브러리는 대조적인 장점 및 단점들을 가지는데, 트랜스포존 돌연변이 라이브러리는 다양한 유전적 백그라운드를 가진 스트레인들에서 쉽게 구축될 수 있다. 상향- 또는 하향-조절된 유전자들을 가지는 돌연변이체들은 조절성 부위, 특히 발현 레벨에 있어서 중요한 부위(예컨대,

치사 유전자들)로의 트랜스포존 삽입에 의해 발생될 수 있다. 한편, 이러한 방법은 해당 유전자의 최종 동정을 위한 추가적인 단계(예컨대, 지놈 DNAs 에 의해 플랭킹된 트랜스포존의 회복)를 필요로 한다. 종종, 하나 이상의 유전자들이 영향 받을 수 있다.

5

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

10

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 고에탄올-저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올-저항성, 또는 에탄올-/열-저항성, 또는 에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 15% 에탄올), 고온(예컨대, 42℃, 43℃) 또는 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM)에서 성장할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

20

따라서, 본 발명의 목적은 에탄올-저항성 효모 균주 및 이와 관련된 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 에탄올- 및 열-저항성 효모 균주 및 이와 관련된 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 퍼퓨랄-저항성 효모 균주 및 이와 관련된 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 에탄올 생산방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주를 제공한다.

5 본 발명자들은 고에탄올-저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올-저항성, 또는 에탄올-/열-저항성, 또는 에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 10 15% 에탄올), 고온(예컨대, 42°C, 43°C) 또는 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM)에서 성장할 수 있다는 것을 확인하였다.

발효성, 휘발성 무색 액체인 에탄올은 가장 널리 이용되는 용매이다. 산업적으로, 에탄올은 자동차 연료 및 연료 첨가제로서 이용되며, 향수(scents), 향료(flavorings), 착색제(colorings) 및 15 의약품(medicines)으로도 이용된다. 또한, 에탄올은 알코올 음료 내 주요 정신활성 구성성분으로 중추신경계에 진정 효능을 가진다. 에탄올은 에틸렌의 수화를 통해 석유화학적으로 생산될 수 있으며, 효모를 이용하여 당을 발효시킴으로써 생물학적으로 생산될 수 있는데, 이러한 생물학적 생산은 석유 및 곡물 사료제의 가격에 의존적인 석유화학적 과정에 의한 20 생산보다 훨씬 경제적이다. 따라서, 생물학적 에탄올의 생산을 위한 효모 균주의 개발은 매우 중요하다.

트랜스포존 돌연변이유발법은 여러 연구들에서 세포 형태학에 포함된 유전자들을 분석하기 위해 이용되었고, 유전자 파괴 돌연변이들의 생존이 유지된 유전자들을 포괄적으로 스크리닝하기 위해 효과적인 수단을 25 제공한다. 본 연구의 목적은 임의적 트랜스포존 삽입에 의해 에탄올-저항성 효모 균주를 직접적으로 구축하고 이에 관계된 타겟 유전자들을 동정하는 것이다.

본 발명은 효모에서 트랜스포존-매개된 돌연변이에 의해 에탄올-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주를 제공한다.

30 본 명세서의 용어 “트랜스포존(transposon)”은 단일 세포의 지놈 내에서 다른 위치로 이동(transposition)할 수 있는 DNA 서열로,

돌연변이를 유발하는 DNA 서열을 의미한다. 점핑 유전자로 불리는 트랜스포존은 모바일 유전성 엘리먼트의 좋은 예이다. 다양한 종류의 모바일 유전성 엘리먼트들은 트랜스포지션 기작에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다: (a) 그룹 I 레트로트랜스포존, RNA 로 전사된 후 DNA 로 역전사되어 이동해 가는 트랜스포존; 및 (b) 그룹 II 점핑 트랜스포존, 트랜스포사제에 의해 DNA 의 한 위치에서 다른 위치로 점핑(“cut and paste”)하는 트랜스포존. 본 발명에서 이용된 트랜스포존 컨스트럭트는 mTn3-*lacZ*/*LEU2* 컨스트럭트로 유전자 상동 재조합(Homologous recombination)을 통해 효모 염색체 내로 도입된다.

본 발명은 (a) 효모 염색체에 돌연변이(mutations)를 유발시키는 단계; 및 (b) 상기 돌연변이된 효모를 고농도 에탄올 포함 배지에서 배양시키는 단계를 포함하는 에탄올-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 (a) 단계는 다양한 방법, 바람직하게는 트랜스포존을 이용하여 실시한다. 본 발명자들은 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT: <http://ygac.med.yale.edu/mtn/reagent>)로부터 얻어진 mTn3-*lacZ*/*LEU2* 컨스트럭트를 포함하는 효모(*S. cerevisiae*) 라이브러리 풀을 이용하였다(참고: 도 1). 제한효소를 이용하여 트랜스포존 컨스트럭트를 플라스미드 DNA 로부터 절단하고 그 단편을 효모 염색체로 유전자 상동 재조합을 통해 형질전환시킴으로써 돌연변이를 유발시켰다. 일반적인 재조합 과정으로 알려진 유전자 상동 재조합은 유사한 또는 동일한 두 개의 DNA 가닥 사이에서 발생하는 뉴클레오타이드 서열의 교환을 지칭하는 유전 재조합의 한 형태로, 대부분의 생명체에서 이용된다.

이후, 상기 (b) 단계에서 형질전환된 효모 균주를 고농도 에탄올에서 배양하여 성장이 가능한 균주를 분리/동정한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 에탄올(10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 대조군과 함께 형질변형된 효모 균주에 대한 성장 어세이(spot assay)를 실시하여 최종적으로 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주를 선택한다.

본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 효모 균주들을 분리/동정하였다.

본 명세서의 용어 “불활성화된(inactivated)”은 타겟 유전자의 기능이 차단되면 불활성화되었다고 표현하며, 예를 들어 트랜스포존-유발된 돌연변이, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 대체 돌연변이, 결실 돌연변이, 등을 포함하는 돌연변이에 의해서 유발된 타겟 유전자의 불활성화를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된 돌연변이를 통한 불활성화를 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 타겟 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된다.

상술한 타겟 유전자들, 즉 CMP2, IMD4, DLD3 및 MSN2 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제 1 서열, 제 2 서열, 제 6 서열 및 제 7 서열, 그리고 서열목록 제 8 서열, 제 9 서열, 제 13 서열 및 제 14 서열에 기재되어 있으며, 상기 유전자들의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 변형체도 이용될 수 있음은 당업계에서 자명하다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-15% 에탄올, 보다 바람직하게는 10-15% 에탄올, 및 가장 바람직하게는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주이며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 종이고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 L3262(*MAT- a ura3-52 leu2-3,112 his4-34*)이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성 형질변형 효모 균주를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) PAM1 유전자를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성 효모 균주를 제공한다.

본 발명의 방법은 상술한 트랜스포존을 이용한 방법을 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기
5 위하여 그 기재를 생략한다.

형질전환된 효모 균주를 고농도 에탄올에서 배양하여 성장이 가능한 균주를 분리/동정한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 에탄올(10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 효모 균주의 성장 어세이(spot assay)를 실시하였다. 선택된 에탄올-저항성 균주들을 대조군과 함께 30℃ 또는 42℃에서
10 배양하여 대조군과 비교하여 고온(42℃)에서도 성장할 수 있는 균주들을 에탄올- 및 열-저항성 형질변형 효모 균주로 선택하였다.

본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자, 또는 PAM1 유전자를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성 효모 균주들을 분리/동정하였다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 타겟 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된다. 상술한 타겟 유전자들, 즉 SSK2, PPG1 및 PAM1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제 3 서열, 제 4 서열 및 제 5 서열, 그리고 서열목록 제 10 서열, 제 11 서열 및 제 12 서열에 기재되어 있으며, 상기 유전자들의 아미노산을
15 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 변형체도 이용될 수 있음은 당업계에서 자명하다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-15% 에탄올, 보다 바람직하게는 10-15% 에탄올 및 가장 바람직하게는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 30-43℃, 보다 바람직하게는 37-43℃, 보다 더 바람직하게는 40-43℃ 및 가장 바람직하게는 42-43℃ 온도 조건에서 성장할 수 있다.
25

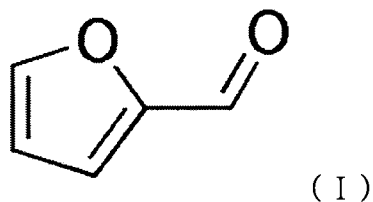
본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 유전자를 포함하는 퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주를 제공한다.
30

본 발명의 방법은 상술한 트랜스포존을 이용한 방법을 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

형질전환된 효모 균주를 고농도 에탄올에서 배양하여 성장이 가능한 균주를 분리/동정한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 에탄올(10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 효모 균주의 성장 어세이(spot assay)를 실시하였다. 선택된 에탄올-저항성 균주들을 대조군과 함께 30℃ 또는 42℃에서 배양하여 대조군과 비교하여 고온(42℃)에서도 성장할 수 있는 균주들을 에탄올- 및 열-저항성 형질변형 효모 균주로 선택하였다. 더 나아가, 선택된 에탄올-저항성 균주들을 대조군과 함께 다양한 농도의 퍼퓨랄 하에서 배양하여 대조군과 비교하여 고농도 퍼퓨랄(15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM)에서도 성장할 수 있는 균주들을 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성 형질변형 효모 균주로 선택하였다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 타겟 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발되며, 상술한 타겟 유전자인 *SSK2* 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제 3 서열 및 서열목록 제 10 서열에 기재되어 있으며, 상기 유전자들의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 변형체도 이용될 수 있음은 당업계에서 자명하다.

퍼퓨랄은 옥수수, 귀리, 밀기울 및 톱밥 같은 다양한 농산 부산물들로부터 유래된 유기 화합물로서, 하기의 화학식 I ($\text{OC}_4\text{H}_7\text{CHO}$)로 표시되는 링 구조를 가진 방향족 알데하이드이다:



퍼퓨랄은 아몬드 향을 가진 무색의 오일 액체이지만, 공기 중에 노출되면 빠르게 노란색으로 변한다. 보통, 퍼퓨랄은 다른 하이드로카본으로부터 디엔을 추출하는 석유화학적 정제 과정에서 용매로서 이용된다. 퍼퓨랄 및 이의 알코올 유도체들은 페놀, 아세톤 또는 우레아와 함께 고형 레진을 제조하는 데 이용된다. 이러한 레진들은 섬유유리,

비행기 구성성분 및 자동브레이크에 이용된다. 퍼퓨랄은 효모세포의 ADH, PDH, ALDH 등의 효소를 억제하고 해당과정을 억제하여 효모의 성장을 저해하는 활성을 지니는 억제인자로서, 효모를 이용한 에탄올 생산에 있어서 이에 대한 저항성을 가지는 스트레인을 개발하는 것이 매우
5 중요하다.

본 발명은 효모에서 트랜스포존-매개된 돌연변이에 의해 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주를 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-100 mM 퍼퓨랄, 보다 바람직하게는 10-75 mM 퍼퓨랄 및 가장 바람직하게는 15-50
10 mM 퍼퓨랄 배양 조건에서 성장할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-15% 에탄올, 보다 바람직하게는 10-15% 에탄올 및 가장 바람직하게는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 30-43℃, 보다 바람직하게는 37-43℃, 보다 더 바람직하게는 40-43℃ 및 가장 바람직하게는 42-43℃ 온도 조건에서 성장할 수 있다.
15

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 불활성화된 효모 균주들, 예컨대, 상술한 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)가 삽입된 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의
20 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법을 제공한다.

보다 바람직하게는, 상술한 불활성화된 효모 균주들, 예컨대, 상술한 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)가 삽입된 효모 균주를 이용하여 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에
25 필요한 고 에탄올 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있는 방법을 제공한다.

본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 상술한 불활성화된 효모 균주들, 예컨대, 상술한 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-
30

2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)로 형질전환된 효모 균주를 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

5 또한, 본 발명은 상술한 효모 균주에 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 에탄올-저항성 효모 균주 제조방법으로서 이용될 수 있다.

본 발명은 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된
10 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 재조합 벡터, 또는 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3);
15 DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하고, 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 C6 당은 글루코오스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은
20 아니다.

본 발명의 재조합 벡터는 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
25 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 및 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 원핵세포는 박테리아 세포 및 고세균을 포함하며, 진핵세포는 효모세포, 포유동물세포, 식물세포, 곤충세포, 줄기세포 및 곰팡이를 포함하고, 가장 바람직하게는
30 효모세포이다.

바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터는 (i) 상술한 본 발명의 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다

5 바람직하게는 (i) 상술한 본 발명의 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포,

10 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 상기 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 재조합 발현벡터를 포함한다.

바람직하게는, 상술한 발현대상물질은 불활성화된 CMP2 또는 IMD4

15 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서에서 용어 “프로모터”는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 발현벡터에서

20 발현대상물질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된(operatively linked)”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사

25 및/또는 번역을 조절하게 된다.

본 발명의 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac* UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터, T7

30 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서

이용되는 숙주 세포는 *E. coli* 이며, 가장 바람직하게는 *E. coli* DH5 α 이다. 또한, 숙주 세포로서 *E. coli* 가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445(1980))가
 5 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pRS316, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4, λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

10 또한, 본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포, 바람직하게는 효모 세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 효모 세포에서 유래된 프로모터, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, 효모(*S. cerevisiae*)
 15 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV 의 *tk* 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터,
 20 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리
 25 아데닐화 서열).

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법(Cohen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
 30 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, *et al.*, *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988))

등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC 에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 발현대상물질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 “프로모터-발현대상물질 인코딩 뉴클레오타이드 서열-폴리 아데닐화 서열”의 구조를 갖는다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 형질전환된 효모 세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 리튬 아세테이트/DMSO 방법(Hill, *et al.*, (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791), 리포솜-매개 전이방법(Wong, *et al.*, 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, *et al.*, (1990), *J. Reprod. Fert.* 41:173-182; Kopchick, *et al.*, (1991) *Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos.* In *Transgenic Animals*, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.* 16, 107-110) 등을 이용하여 실시하며, 가장 바람직하게는 리튬 아세테이트/DMSO 방법을 이용하여 실시한다.

한편, 본 발명의 발현대상물질 단백질을 유효성분으로써 유전자 도입에 이용하기 위해 발현대상물질 단백질이 효과적으로 세포 내로 침투할 수 있어야 한다. 예를 들어, 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)을 유효성분으로 이용하는 경우, 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 불활성화된 CMP2 또는 IMD4

유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)에 부착시키는 것이 바람직하다. 즉, 유효성분으로서 본 발명의 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)을 세포 내로 도입(permeable peptide transduction)하기 위하여 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 상기 단백질과 융합하여 융합 단백질을 만든다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 라이신/아르기닌 등 기본 아미노산 잔기들을 주로 포함하고 있어서 이와 융합된 단백질들을 세포막을 투과하여 세포내로 침투시키는 역할을 한다.

10 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 바람직하게는 HIV-1 Tat 단백질, 드로소필라 안테나페디아의 homeodomain, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF 에서 유도된 MTS 펩타이드, 페네트라틴, 트랜스포탄 또는 Pep-1 펩타이드에서 유래된 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

15 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 불활성화된 효모 균주들, 예컨대, 상술한 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); SSK2 또는 PPG1 유전자(Tn-2); PAM1 유전자(Tn-3); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 또는 에탄올-/열-저항성, 또는 에탄올-/열-/퍼퓨랄 형질변형 효모 균주 및

20 이의 용도에 관한 것이다.

(b) 본 발명의 효모 균주들은 고농도 에탄올, 바람직하게는 10-15% 에탄올에서 성장할 수 있는 효모 균주다.

(c) 또한, 본 발명의 효모 균주들은 고온(예컨대, 42°C)에서 성장할 수 있는 효모 균주들이다.

25 (d) 본 발명의 효모 균주는 고에탄올- 및 열-저항성 효모균주들 중에서 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15-50 mM)에서도 성장할 수 있는 효모균주이며 여기에는 불활성화된 SSK2 유전자를 포함하는 효모균주이다.

(e) 본 발명의 효모 균주들은 고 에탄올 저항성을 보유함으로써 향후 통합공정에서 에탄올을 보다 효율적으로 생산할 수 있다.

30

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 트랜스포존에 의해 돌연변이 유발된 효모 DNA 라이브러리를 이용한 사카로마이세스 세레지비에 L3262 의 형질전환 과정을 나타내는 도식이다.

도 2 는 사카로마이세스 세레지비에 트랜스포존 돌연변이체들의 에탄올 또는 열 저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다. 도 2a-2b 는 에탄올-저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다. 도 2c 는 열-저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다.

도 3 은 트랜스포존 삽입 위치를 나타내는 도식이다. 트랜스포존 삽입 위치는 5 개의 에탄올-저항성 또는 에탄올-/열-저항성 스트레인으로부터 회복된 트랜스포존의 시퀀싱을 통해 결정하였다. 주변 유전자 위치(genetic loci)가 보여진다.

도 4 는 트랜스포존에 의해 영향받은 유전자들의 발현을 나타내는 결과이다. 대조군 L3262 로부터 추출한 총 RNA 를 이용하여 노던 블롯 분석을 실시하였다. 스캐닝 밀도측정기(scanning densitometer)를 이용하여 시그널을 상대적으로 정량하고 ACT1 으로 표준화하였으며, % 대조군으로 제시하였다.

도 5 는 SGK0 돌연변이체들의 에탄올-저항성을 나타내는 성장 어세이 결과이다. 도 5a 및 도 5b 는 10 배씩 연속적으로 희석된 SGK0 돌연변이체들을 0%, 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0%), 3 일(10%), 4 일(12.5%) 또는 5 일(15%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 5c 는 스팟된 YPD 플레이트를 1 일(30℃) 또는 3 일(43℃) 동안 성장시킨 결과이다.

도 6 은 보충(complementation)에 의한 스트레스 민감성 회복을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 도 6a 및 도 6b 는 10 배씩 연속적으로 희석된 보충된 스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0%) 또는 4 일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 6c 는 스팟된 YPD 플레이트를 1 일(30℃) 또는 4 일(42℃) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316 을 Tn 돌연변이체들에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 7 은 스트레스 민감성에 대한 과다-발현의 효과를 관찰한 결과이다. 도 7a 및 도 7b 는 10 배씩 연속적으로 희석된 과다-발현

스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0%) 또는 4 일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 7c 는 스팟된 YPD 플레이트를 1 일(30℃) 또는 4 일(42℃) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316-GAPDH 을 L3262 에 형질전환시킴으로써

5 제조하였다.

도 8 은 Tn 돌연변이체들의 발효 프로파일을 보여주는 그래프이다. 도 8a-8d 는 지속적으로 성장하는 세포(0.5 OD₆₀₀)를 30℃에서 30% 글루코오스 및 6% 에탄올이 보충된 YPD 배지에서 성장시킨 결과이다. 발효 동안 세포 성장(도 8a 및 도 8c) 및 에탄올 생산(도 8b 및 도 8d)을

10 모니터링하였다. 도 8e-8f 는 에탄올이 없는 상태에서 실시한 유사한 실험을 42℃에서 실시하여 발효 동안 세포 성장(도 8e) 및 에탄올 생산(도 8f)을 모니터링한 결과이다. 심볼: L3262, 빈 삼각형; Tn1, 채워진 삼각형; Tn2, 채워진 원; Tn3, 채워진 사각형; Tn4, 채워진 다이아몬드; 및 Tn5, 빈 다이아몬드.

도 9 는 Tn-2 돌연변이체의 퍼퓨랄 저항성을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 10 배씩 연속적으로 희석된 Tn2 돌연변이체를 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 및 50 mM 퍼퓨랄이 보충된 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0%), 4 일(15 mM), 5 일(20 mM), 7 일(30 mM), 9 일(40 mM) 또는 11 일(50 mM) 동안 성장시킨 결과이다.

도 10 은 SGK0 돌연변이체들의 퍼퓨랄-저항성을 나타내는 성장 어세이 결과이다. 10 배씩 연속적으로 희석된 SGK0 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0 mM) 또는 7 일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다.

도 11 은 보충(complementation)에 의한 스트레스 민감성 회복을

25 보여주는 성장 어세이 결과이다. 10 배씩 연속적으로 희석된 SGK0 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0 mM) 또는 7 일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316 을 Tn-2 돌연변이체에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 12 는 스트레스 민감성에 대한 과다-발현의 효과를 관찰한

30 결과이다. 10 배씩 연속적으로 희석된 SGK0 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1 일(0 mM) 또는

7 일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인은 pRS316-GAPDH 을 L3262 에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

【실시예】

5 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

10

실시예

실험재료 및 실험방법

균주, 배지 및 배양 조건

15 본 연구에서 균주, 파괴된 유전자 및 트랜스포존-삽입위치는 표 1 및 도 3 에 기재되어 있다. 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) L3262(*MAT-a ura3-52 leu2-3, 112 his4-34*: 한국생명공학연구원 제공)를 숙주 균주로 이용하였다. 사카로미세스 세레비지에를 YPD 배지(1% 박토 효모 추출물, 2% 박토 펩톤, 2% 20 텍스트로오스, w/v; Difco, MI)에서 30℃로 배양하였다. 사카로미세스 세레비지에 형질전환체를 SD-루이신 배지[0.67% Difco YNB(yeast nitrogen base; 아미노산 부재), 2% 글루코오스, 0.069% 보충 혼합물(complete supplement mixture, CSM)-*leu*; MP, OH]에서 선택하였다. 플라스미드 25 구축을 위해, *E. coli* DH5 α(Stratagene, CA)를 숙주로 이용하여 100 mg/l 의 암피실린(Sigma-Aldrich, MO)이 보충된 루리아-베르타니 배지(LB; Difco, MI)에서 37℃ 배양시켰다.

트랜스포존 돌연변이법

30 트랜스포존의 임의적 삽입(random insertion)에 의해 mTn3-*lacZ/LEU2* 를 가지는 사카로미세스 세레비지에 지놈 라이브러리 풀을 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT:

<http://ygac.med.yale.edu/mtn/reagent>)로부터 얻었다. mTn3-돌연변이된 지놈 라이브러리 풀로부터 추출한 플라스미드 DNA 를 *NotI* 으로 절단하여 사카로미세스 세레지비에 L3262 의 형질전환을 위해 이용하였다. 효모 형질전환을 리튬 아세테이트 방법으로 실시하였다. 형질전환체를 SD-루이신 배지에서 선택하였다(도 1).

에탄올-저항성(tolerant) 돌연변이체의 분리

형질전환체들을 YPD 배지 및 12.5% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하여 30℃에서 48 시간 동안 배양하였다. 모든 배지 조건에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 선택하였다. 이들 돌연변이체들을 선택하기 위해 YPD 배지에서 OD₆₀₀ 값 1 까지 배양한 후, 살균수로 연속적으로 10 배씩 희석시켰다. 각 희석액의 분취액(5 μ l)을 에탄올이 없거나, 또는 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 함유한 YPD 아가(Difco, MI) 에 플레이팅하고 30℃에서 3-6 일 동안 배양하였다. 성장 어세이를 세 번에 걸쳐서(triplicate) 실시하였다. 대조군 균주와 비교하여 에탄올을 함유한 YPD 플레이트에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 에탄올-저항성 돌연변이체로 최종적으로 선택하였다. 이후, 돌연변이체들을 YPD 플레이트에 플레이팅하여 30℃에서 배양하였다.

20 에탄올-/열-저항성 돌연변이체의 분리

상술한 방법에 따라 동정된 에탄올 저항성 돌연변이체들을 42℃에서 4 일 동안 배양하여 잘 성장하는 돌연변이체들을 선택하였다. 이들 돌연변이체들을 확인하기 위해, 돌연변이체들을 YPD 배지에서 OD₆₀₀ 값 1 까지 배양한 후, 살균수로 연속적으로 10 배씩 희석시켰다. 각 희석액의 분취액(5 μ l)을 에탄올이 없거나, 또는 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 함유한 YPD 아가 플레이트에 플레이팅하고, 30℃ 또는 42℃에서 3-6 일 동안 배양하였다. 성장 어세이를 세 번에 걸쳐서(triplicate) 실시하였다. 대표적인 실험 결과들이 제시되었다. 대조군 스트레인과 비교하여 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 포함한 YPD 아가 플레이트와 42℃에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 에탄올- 및 열-저항성 돌연변이체로 최종적으로 선택하였다.

에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성(tolerant) 돌연변이체의 분리

상술한 방법에 따라 선택된 에탄올- 및 열-저항성 돌연변이체들의 배양액으로부터 희석액을 얻고 이들의 분취액(5 μ l)을 퍼퓨랄(furfural)이
 5 없거나, 또는 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM 퍼퓨랄을 함유한 YPD
 아가 플레이트에 플레이팅하고, 30°C에서 4-11 일 동안 배양하였다. 성장
 어세이를 세 번에 걸쳐서(triplicate) 실시하였다. 대표적인 실험 결과들이
 제시되었다. 대조군 스트레인과 비교하여 10%, 12.5%, 15% 에탄올을
 포함하거나 또는 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM 퍼퓨랄을 포함한
 10 YPD 아가 플레이트에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체를 에탄올-/열-/퍼퓨랄-
 저항성 돌연변이체로 최종적으로 선택하였다.

에탄올-저항성, 에탄올-/열-저항성, 또는 에탄올-/열-퍼퓨랄 표현형에 관련된 유전자의 동정

15 에탄올-저항성 돌연변이체에서 lacZ 서열에 인접한 lacZ 서열을
 이용한 플라스미드 회수(plasmid rescuing)에 의해 mTn3-lacZ/LEU2 삽입
 위치를 결정하였다. 복제 원점(origin of replication; *ori*)을 도입하기
 위해, *URA3* 로 표시된 플라스미드(회수 플라스미드; pRSQ2-URA3,
 예일지놈분석센터 제공)가 lacZ 서열의 플라스미드-유래(borne) 카피 및
 20 트랜스포존-유래 카피 간의 재조합에 의해 트랜스포존의 일부로 대체된다.
 이들 형질전환체로부터 효모 DNA 를 회수하여 적절한 효소(*EcoRI*, *SaII*,
HindIII, *PstI* 또는 *KpnI*)로 절단하였다. 이후 절단된 단편들을 원형화시켜
E. coli DH5 α 에서 회복시켰다. 얻어진 플라스미드를 트랜스포존의 5'
 말단에 상보적인 lacZ 프라이머를 이용하여 시퀀싱하였으며 이용된
 25 프라이머 서열은 다음과 같다: 5' -GTTTTCCAGTCACGAC-3'. 사카로미세스
 지놈 데이터베이스의 BLAST 서버(<http://www.yeastgenome.org/>)를 이용하여
 트랜스포존이 삽입된 유전자들을 분석하였다.

노던 블롯 분석

30 총 RNAs 가 추출되어 15 μ g을 이용하였다. 프로브로 이용된 DNA
 단편들은 L3263 게놈 DNA로부터 적절한 유전자-특이적 프라이머들을 이용한

PCR 을 통해 제조하였다. 정제된 PCR 단편들은 랜덤 프라이머를 이용하여 ^{32}P -dCTP(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 표지되었다. 이후 과정들은 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)).

5 ACT1 은 내적 대조군으로 이용하였다. 밴드 강도는 NIH image J, version 1.61 을 이용하여 정량하였다. 각 유전자에 대한 실험들은 세 번에 걸쳐서 실시하였다.

10 유전자 클로닝 및 분석 방법들

과다발현 실험을 위해, 동정된 유전자들의 ORFs(open reading frames)가 pRS316-GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 내로 클로닝되었다. 보충 실험(complementation experiments)을 위해, 프로모터 및 종결 서열(terminator sequences)과 융합된 ORFs 을 pRS316 벡터에

15 서브클로닝하였다. 증폭된 산물 및 벡터를 적합한 제한 효소로 절단한 후, *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 이용된 프라이머 쌍 및 얻어진 플라스미드는 표 2 에 기재되어 있다. 클론들은 시퀀싱을 통해 확인하였으며, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) L3262 또는 상응하는 트랜스포존 돌연변이체들에 형질전환시켰다.

20 유전자들은 표준 프로토콜에 의해 제조된 게놈 DNA 를 템플레이트로 이용하여 *pfu* DNA 폴리머라제에 의해 PCR-증폭되었다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)). PCR 단편들을 QIAquick 젤 추출 키트(Qiagen, Valencia, CA)로 정제하였다.

25 모든 PCR 컨스트럭트를 시퀀싱하여 확인하였다. ORF 중간에 존재하는 인트론으로 인하여, IMD4 의 ORF 는 역전사 (Reverse transcription, RT)-PCR 을 통해 제조하였다. 이후, 단일-가닥 cDNA 는 분리된 총 RNA 로부터 AMV(Avian Myeloblastosis virus) 역전사 효소(Promega, Madison, WI)에 의해 합성하였다. 일 μg 의 총 RNA, 1X 역전사 완충액[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% 트라이톤 X-100], 1 mM 디옥시뉴클레오시드

30 트리포스페이트(dNTPs), 0.5 유니트의 RNase 억제제, 100 pmol/ μl 의

특이적인 다운스트림 프라이머(IMD4-R; 표 1)을 포함하는 20 μ l의 역전사 반응 혼합물과 15 유닛의 AMV 역전사 효소를 42°C에서 15 분 동안 반응시키고, 99°C에서 5 분 동안 열을 가한 후, 0-5°C에서 5 분 동안 반응시켰다. PCR 조건은 다음과 같이 실시하였다: 95°C에서 3 분 동안

5 변성시키는 단계; 35 사이클(95°C에서 1 분 동안 변성, 65°C에서 1 분 동안 어닐링, 및 72°C에서 2 분 동안 연장하는 단계로 구성된 한 사이클)을 실시하는 단계; 및 72°C에서 10 분 동안 최종적으로 연장하는 단계. 세포

10

성장은 Beckman DU730 분광광도계(Beckman Coulter, Fullerton, CA)를 이용하여 600 nm 에서 측정하였으며, 혈구계측기(hemocytometry)로

모니터링하였다.

발효

지수적으로 성장하는 세포를 수득하여 100 ml 의 YPD30E6[30% 글루코오스 및 6%(v/v) 에탄올로 보충된 YP]로 옮겼다. 시작 세포 밀도는

15 0.3 의 OD₆₀₀ 값으로 조정하였다. 세포를 120 rpm 으로 흔들면서 30°C에서 배양하였다. 시료를 12 시간 마다 취한 후, 세포 성장 및 에탄올 농도를 각각 세포 밀도 측정 및 HPLC(high-pressure liquid chromatography)를 이용하여 결정하였다. 시료를 60°C로 세팅된 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 로딩하였다. 글루코오스 및 에탄올을 0.5 mM H₂SO₄ 를

20 이용하여 0.6 ml/분의 유동속도로 용출시켰다. 피크들은 굴절율(refractory index)에 의해 검출되고 지연시간(retention time)에 따라 동정되어 표준 곡선에 따라 정량화되었다. 세포 성장은 600 nm 에서 광학밀도를 측정함으로써 모니터링하였다.

25 실험결과

에탄올-저항성 돌연변이체들의 선택

약 3,000 개의 형질전환체들을 루이신 원영양체(prototroph)로서 선택하였으며(도 1), YPD 배지 및 10% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하였다. 선택된 약 40 개의

30 돌연변이체들을 30°C에서 3 일 동안 배양한 후 대조군 균주(사카로미세스 세레비지에 L3262)과 비교하여 10% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘

성장한 돌연변이체들을 에탄올-저항성 스트레인으로 선택하였다. 선택된 40 개의 돌연변이체들을 확인해 본 결과, 5 개의 돌연변이체들이 에탄올-저항성 돌연변이체들로 최종 선택되어 Tn1 내지 Tn5 로 명명되었다. 이들 돌연변이체들은 모두 대조군 균주와 비교하여 10%, 12.5% 또는 15% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘 성장하였다(도 2a 및 도 2b).

에탄올-/열-저항성 돌연변이체들의 선택

본 발명자들은 고온(42℃)에서 에탄올-저항성 돌연변이체들의 성장을 조사하였다. 도 2c 에서 확인할 수 있듯이, 두 개의 돌연변이체들(Tn-2 및 Tn-3)이 대조군 균주와 비교하여 42℃ YPD 플레이트에서 성장할 수 있었다. 따라서, 이들 두 개의 돌연변이체들은 15% 에탄올 스트레스 및 42℃까지 고온 스트레스 양자에 대해서 동시에 저항성을 나타낼 수 있었다.

저항성 돌연변이체들에서 트랜스포존 삽입 위치의 동정

각 저항성 돌연변이체들로부터 트랜스포존에 인접한 효모 염색체 DNA 를 대장균에서 회수하여 시퀀싱(마크로젠, 한국)하였다. 동정된 유전자들의 트랜스포존 삽입 위치 및 기능을 표 1 및 도 3 에 요약하여 기재하였다.

【표 1】

에탄올-저항성 표현형을 야기할 수 있는 동정된 유전자들.

균주	파괴된 유전자	삽입 위치 ^a	기능 ^c
Tn-1	<i>YML057W/CMP2</i>	110 bp ^b	<i>CMP2</i> : 칼시뉴린 A; 칼시뉴린의 촉매 서브유닛의 이소형(CNA1)으로, Crz1p(스트레스-반응성 전사인자)를 조절하는 Ca ⁺⁺ /칼모둘린-조절된 단백질 포스파타제이며, 다른 칼시뉴린 서브유닛은 CNB1.
	<i>YML056C/IMD4</i>	90 bp ^b	<i>IMD4</i> : 이노신 모노포스페이트 디하이드로게나제; GMP 생합성의 첫 번째

Tn-4	<i>YEL072W/RMD6</i> ~ <i>YEL071W/DLD3</i>	946 bp ^b -994 bp	<i>RMD6</i> : 포자형성에 필요한 단백질 <i>DLD3</i> : D-락테이트 디하이드로게나제; 레트로등급 레귤론의 한 부분으로, 마이토콘드리아 손상에 의해 자극되고 글루타메이트가 유일한 질소원인 조건에서 성장한 세포에서 감소되는 세포질 유전자들로 구성되어 있다.
Tn-5	<i>YMR037C/MSN2</i>	1152 bp	Msn4p 에 관계된 전사 활성인자; 스트레스 조건에서 활성화되며, 그 결과 세포질에서 핵으로 전이(translocation)되며, 스트레스- 반응성 유전자들의 DNA 내 반응 엘리먼트에 결합하여 이들의 발현을 유도한다.

a: 삽입 위치는 각 코딩 서열의 개시 ATG로부터의 위치이다.

b: 삽입 위치는 각 코딩 서열의 종결 코돈으로부터의 위치이다.

c: 효모 지놈 데이터베이스(YGD)의 주석.

5 파괴된 유전자들의 동정

트랜스포존이 삽입된 위치는 다음과 같았다: Tn1, CMP2 의 종결 부위 및 IMD4 의 종결 부위; Tn2, SSK2 의 프로모터 부위 및 PPG1 의 프로모터 부위; Tn3, PAM1 의 ORF 부위; Tn4, RMD6 의 종결 부위 및 DLD3 의 프로모터 부위; 및 Tn5, MSN2 의 ORF 부위. Tn1, Tn2 및 Tn4 에서 영향받은 유전자를 결정하고 Tn3 및 Tn5 에서 이의 파괴를 확인하기 위해, CMP2, IMD4, SSK2, PPG1, PAM1, RMD6, DLD3 및 MSN2 의 발현 레벨을 노던 블롯 분석을 통해 조사하였다(도 4a 및 도 4b). 대조군과 비교하여, CMP2 및 IMD4 의 레벨은 각각 약 10% 및 20% 정도 더 낮았다. 대조군과 비교하여, SSK2 및 PPG1 의 레벨은 각각 약 20% 및 50% 정도 더 낮았는데, 이는 PPG1 이 SSK2 보다 더 큰 정도로 영향을 받았다는 것을 의미한다. 대조군과 비교하여, DLD3 의

- 레벨은 약 25% 정도 더 낮았지만, RMD6 의 레벨은 변화가 없었기 때문에 RMD6 는 향후 실험에서 제외시켰다. 예상한 바와 같이, PAM1 및 MSN2 의 발현은 검출되지 않았다. 따라서, 트랜스포존 삽입은 CMP2, IMD4, SSK2, PPG1 및 DLD3 의 발현에 부분적으로 영향을 미쳤으며, PAM1 및 MSN2 의
- 5 발현을 완전하게 억제시켰다.

【표 2】

본 연구에서 이용된 올리고뉴클레오타이드.

올리고뉴클레오타이드	서열(5' → 3')
과다-발현 실험	
CMP2-F	CGCGGATCCATGTCTTCAGACGCTATA
CMP2-R	CGCCTTAAGCTATTTGCTATCATTCTT
IMD4-F	CGCGGATCCATGAGTGCTGCTCCATTG
IMD4-R	CGGGTCGACTCAATTGTATAGACGTTT
SSK2-F	CGCGGATCCATGTTCGATTCAGACTACTTC
SSK2-R	CGGGTCGACCTACTCTCTTTCCTCAGTATC
PPG1-F	CGCGGATCCATGGAATTGGACGAATGT
PPG1-R	CGGGTCGACCTACAAGAAGTAATCAAC
PAM1-F	CGCGGATCCATGACATCTGCATTAAGG
PAM1-R	CGGGTCGACAAAGACAAGGGCTCGCGT
DLD3-F	CGCGGATCCATGACGGCCGCACAT
DLD3-R	CGGGTCGACTCAAATGTACTTGTA
MSN2-F	CGCGGATCCATGACGGTCGACCATGAT
MSN2-R	CGCCTTAAGTTAAAAAATGGGGTCTA
보충(complementation) 실험	
CMP2-FU	CGCGGATCCATGGCTGAGGTTTCCTATGTTGTCT
CMP2-RL	CGCGGCCCGCCTGCCGGTGCCGATGGTTTA
PPG1-FU	CGCGGATCCCGCCCTAACTTTCCGACCTT
PPG1-RL	CGGGTCGACTCCTGGGCCAACAACGATAGC
PAM1-FU	CGCGGATCCCAAGATGAAACGCGCTGTATG

PAM1-RL	CGGGTCGACCTTCGGCAACGTTTTCAATGG
DLD3-FU	CGCGGATCCCTTTAAAGTGCTATG
DLD3-RL	CGGGTCGACTAGTCGCTTTAAAGT
MSN2-FU	CGCGGATCCCGGCCCCGAACGTACCTAAAG
MSN2-RL	CGCGGCCGCAAGCGCCATATAAAACATTGA

* 밑줄 친 서열은 제한효소 위치이다.

에탄올-저항성에 대한 기여

상술한 결과에 따르면, Tn1 에서 CMP2 및 IMD4 이 동시에 하향-
 5 조절(co-down-regulation)되며, Tn2 에서 SSK2 및 PPG1 이 동시에 하향-
 조절되고, Tn4 에서 DLD3 이 하향-조절되며, Tn3 및 Tn5 에서 각각 PAM1 및
 MSN2 이 파괴되었음을 확인할 수 있었다. CMP2, IMD4, SSK2, PPG1, PAM1,
 DLD3 및 MSN2 의 하향-조절 또는 결실의 에탄올- 및/또는 열-저항성에 대한
 기여도를 알아보기 위해, BY4741 백그라운드의 S. 세레비지에 단일 유전자
 10 녁-아웃(SGK0) 라이브러리(collection library)로부터 얻어진 7 개 유전자에
 대한 녁-아웃 돌연변이체들을 이용하여 개별적으로 조사하였다. 상기
 라이브러리가 허원기 박사(Seoul National University, Seoul,
 Korea)로부터 친절하게도 제공되었으며, 동정된 유전자의 확인에
 이용되었다. S. 세레비지에 BY4741 스트레인이 상술한 결실 돌연변이체들의
 15 모 스트레인(mother strain)이었다. $\Delta cmp2$, $\Delta imd4$, $\Delta ssk2$, $\Delta ppq1$, $\Delta pam1$,
 $\Delta dld3$ 및 $\Delta msn2$ 의 배양물을 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD
 플레이트에서 성장(spot-assay)시켰을 경우, 모든 결실 돌연변이체들의
 성장이 대조군 BY4741 스트레인과 비교하여 조사된 모든 에탄올 농도에서
 증대되었다(도 5a 및 도 5b). 스팟된 YPD 플레이트가 43°C에서 성장된 경우,
 20 Tn1 내지 Tn5 가 성장할 수 없는 온도에서 $\Delta ssk2$, $\Delta ppq1$ 및 $\Delta pam1$ 이 증가된
 성장을 나타냈다(도 5c). 하지만, 상기 돌연변이체들은 44°C에서 성장하지
 않았다(결과를 보이지 않음). 성장에 대한 최대 온도에서 1 도의 차이는
 BY4741 이 L3262 보다 더 열-저항성 스트레인이기 때문일 수 있다(결과를
 보이지 않음). 그러므로, 7 개의 유전자에 대한 SGK0s 이 에탄올-저항성을
 25 가졌으며, SSK2, PPG1 및 PAM1 에 대한 SGK0s 이 열-저항성도 나타냈다.
 SSK2 또는 PPG1, 또는 양 유전자의 하향-조절은 에탄올 및 열 모두에 대한

저항성을 부여하였다는 것이 중요하다. 또한, CMP2 및/또는 IMD4 및 DLD3 추가적인 하향-조절이 에탄올 저항성에 중요하였다. 상술한 결과들은 RNA 발현 레벨 및 아마도 단백질 레벨(비록 확인되지 않았을 지라도)이 에탄올- 및 열-저항성을 부여하는 데 중요하다는 것을 의미한다.

5

보충(complementation)에 의한 저항성 확인

Tn1-Tn5 가 특정 유전자들의 결실 또는 동시에 하향-조절을 통해 에탄올- 및/또는 열-저항성을 획득한다는 사실은 상술한 유전자들의 보충이 상기 스트레스에 대한 세포의 민감성을 나타낼 수 있다는 것을 의미한다.

10 이러한 고찰을 확인하기 위해, 프로모터, ORF 및 종결자(ORF +/- 700 bp)를 포함하는 증폭된 DNA 단편들을 pRS316 벡터에 클로닝하여 상응하는 Tn1-Tn5 돌연변이체에 형질전환시킴으로써, IMD4 를 제외한 각 유전자들을 자가적으로 발현시켰다. ORF 중간에 존재하는 인트론을 가지는 IMD4 의 경우, RT-PCT 을 실시하여 pRS316-GAPDH 에 클로닝함으로써 전체 ORF 를 얻은 후,

15 GAPDH 프로모터의 조절 하에서 클로닝된 DNA 를 과다발현시켰다. 대조군은 pRS316 벡터를 형질전환시킴으로써 구축하였다. 스팟 어세이가 10% 에탄올을 포함하는 YPD 아가에서 실시하는 경우, 보충된 세포의 저항성은 Tn 돌연변이체들과 비교하여 현저하게 감소하였다(도 6a 및 도 6b). SSK2 및 PPG1 으로 개별적으로 보충된 Tn2 및 PAM1 으로 보충된 Tn3 이 42°C에서

20 배양된 경우, 감소된 열-저항성이 관찰되었다(도 6c).

CMP2(10%까지), IMD4(20%까지), SSK2(20%까지) 및 PPG1(50%까지)의 동시 하향-조절, 그리고 DLD3 의 하향-조절이 에탄올 저항성을 부여하고, SSK2 및 PPG1 의 동시 하향-조절이 열-저항성을 부여한다는 사실은 스트레스 저항성이 특정 유전자(들)의 발현 레벨이 중요하다는 것으로 추측될 수

25 있다. 이를 위해, IMD4 를 제외한 각 유전자의 ORF 를 PCR-증폭되고 과다발현용 pRS316-GAPDH 벡터로 클로닝되어 L3262 스트레인으로 형질전환시켰다. pRS316-GAPDH 벡터는 대조군으로서 형질전환되었다. 에탄올(도 7a 및 도 7b) 및 열(도 7c)에 대한 스팟 어세이를 실시한 경우, 과다발현된 스트레인들은 일반적으로 대조군보다 에탄올 및 열 모두에 대해

30 더 민감하였는데, 이는 에탄올- 및/또는 열-민감성에 대한 유전자량 효과(dosage effect)를 의미한다.

Tn 돌연변이체들의 에탄올 또는 열에 대한 발효 능력

일반적으로 에탄올-저항성 세포들은 고농도의 에탄올에서 세포 생존율이 높기 때문에 비-저항성 스트레인에 비해 더 많은 에탄올을 생산한다는 것으로 알려져 있다. 발효능력(fermentation capacity)을 30% 글루코오스를 포함하는 배치 배양에서 30℃로 조사하였을 때, 돌연변이체들의 증가된 성장(약 20%)에도 불구하고 부모와 Tn1-Tn5 간에 유의한 차이점이 발견되지 않았다(결과를 보이지 않음). 부모 스트레인은 기본적으로 30% 글루코오스로부터 최대 약 9%의 에탄올을 생산할 수 있을 것으로 판단되며, 이는 증가된 에탄올 저항성의 효과로 보기 어렵다. 따라서, 최종적인 에탄올 역가(titer)가 9%를 초과하는 조건을 확립하는 것이 필요하였다. 이러한 면에서, 본 발명자들은 0.5 의 OD₆₀₀ 값을 가지는 개시 세포 및 6% 에탄올을 포함하는 배양액에서 발효를 시작하였다. 도 8a-8d 에서 볼 수 있듯이, Tn 돌연변이체들은 대조군과 비교하여 보다 빠르게 성장하였으며 더 많은 에탄올을 생산하였다. 이들 중, Tn2 는 11% 에탄올을 생산하는 가장 효율적인 스트레인임을 확인할 수 있었다. 따라서, Tn2 의 에탄올 생산 효율은 대조군과 비교하여 22%까지 개선되었다.

본 발명자들은 42℃에서 열-저항성 스트레인인 Tn2 및 Tn3 의 에탄올 생산 능력을 조사하였다. 상기 온도에서 에탄올 증발이 최종 역가에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 배치 발효 도중 증발된 에탄올의 양이 4-10% 에탄올을 표준으로 제작된 보정곡선(calibration curve)에 따라 산출되었다. 에탄올의 농도가 4%인 경우 천천히 증발되는 반면에, 4%를 초과하는 경우는 빠르게 증발하였다. 예를 들어, 8% 에탄올은 2 일 내에 3.7%로 감소하였으며, 10% 에탄올은 보다 더 현저하게 감소하였다(결과를 보이지 않음). 발효 프로파일이 42℃에서 산출된 경우, Tn2 및 Tn3 는 대조군에 비해 더 빠르게 성장하였다(도 8e). Tn2 의 가장 높은 에탄올 역가는 2.8%였는데, 이는 42℃에서 에탄올 증발을 고려하지 않은 경우에도 대조군 스트레인보다 더 높은 수치였다(도 8f). 열에 의해 야기되는 증발 및 손상된 성장 때문에, 에탄올의 농도는 3 일 후에 지속적으로 감소하였다.

에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성 돌연변이체들의 선택

또한, 본 발명자들은 퍼퓨랄에 대한 저항성을 조사하였다. 도 10에서 볼 수 있듯이, 하나의 돌연변이체(Tn-2)가 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 및 50 mM 퍼퓨랄이 보충된 YPD 플레이트에서 성장할 수 있었다. 결론적으로, 1 개의 돌연변이체(Tn-2)가 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-스트레스
5 모두에 대한 저항성을 동시에 가졌다(도 9).

에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성에 대한 기여

상술한 결과에 따르면, Tn-2 에서 *SSK2* 및 *PPG1* 이 동시에 하향-조절됨을 확인할 수 있었다. *SSK2* 및 *PPG1* 의 하향-조절의 퍼퓨랄-저항성에
10 대한 기여도를 알아보기 위해, BY4741 백그라운드의 사카로미세스 세레비지에 단일 유전자 녹-아웃 single gene knockout (SGKO) 라이브러리(collection library)로부터 얻어진 2 개 유전자에 대한 녹-아웃 돌연변이체들을 이용하여 개별적으로 조사하였다. 상기 라이브러리가
허원기 박사(Seoul National University, Seoul, Korea)로부터 친절하게도
15 제공되었으며, 동정된 유전자의 확인에 이용되었다. 사카로미세스 세레비지에 BY4741 스트레인이 상술한 결실 돌연변이체들의 모 스트레인(mother strain)이었다. $\Delta ssk2$ 및 $\Delta ppg1$ 의 배양물을 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에서 성장(spot-assay)시켰을 경우, *SSK2* 결실 돌연변이체의 성장이 대조군 BY4741 스트레인과 비교하여 조사된 모든
20 퍼퓨랄 농도에서 증대되었다(도 10). 반면 *PPG1* 결실 돌연변이체의 경우는 대조군과 차이가 없었다. 그러므로, *SSK2* 에 대한 SGKOs 이 에탄올- 및 열-저항성 뿐 아니라, 퍼퓨랄-저항성도 나타냈다. *SSK2* 유전자의 하향-조절은 에탄올, 열 및 퍼퓨랄 모두에 대한 저항성을 부여하였다는 것이 중요하다. 상술한 결과들은 RNA 발현 레벨 및 아마도 단백질 레벨(비록 확인되지
25 않았을 지라도)이 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 부여하는 데 중요하다는 것을 의미한다.

보충(complementation)에 의한 퍼퓨랄-저항성 확인

Tn-2 가 특정 유전자들의 결실 또는 동시에 하향-조절을 통해
30 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 획득한다는 사실은 상술한 유전자들의 보충이 상기 스트레스에 대한 세포의 민감성으로 다시 나타낼 수 있다는

것을 의미한다. 이러한 고찰을 확인하기 위해, 프로모터, *SSK2* ORF 및 종결자(ORF +/- 700 bp)를 포함하는 증폭된 DNA 단편들을 pRS316 벡터에 클로닝하여 상응하는 Tn-2 돌연변이체에 형질전환시킴으로써, 유전자를 자가적으로 발현시켰다. pRS316 벡터를 형질전환시킴으로써 구축하였다.

5 스팟 어세이 (Spot assay)가 20 mM 의 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 아가에서 실시하는 경우, 보충된 세포의 저항성은 Tn 돌연변이체와 비교하여 현저하게 감소하였다(도 11). *SSK2* 의 하향-조절이 에탄올 및 열 저항성 뿐 아니라 퍼퓨랄-저항성을 부여한다는 사실은 스트레스 저항성이 특정 유전자(들)의 발현 레벨이 중요하다는 것으로 추측될 수 있다. 이를 위해,

10 *SSK2* 유전자의 ORF 를 PCR-증폭되고 과다발현용 pRS316-GAPDH 벡터로 클로닝되어 L3262 스트레인으로 형질전환시켰다. pRS316-GAPDH 벡터는 대조군으로서 L3262 스트레인에 형질전환되었다. 20 mM 농도의 퍼퓨랄(도 12)에 대한 스팟 어세이를 실시한 경우, 과다발현된 스트레인은 일반적으로 대조군보다 퍼퓨랄에 대해 더 민감하였는데, 이는 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄

15 민감성에 대한 유전자량 효과(dosage effect)를 의미한다.

추가논의사항

효모 및 다른 생명체에서, 스트레스에 대한 대부분의 세포내 경로는 조절되는 많은 유전자들로 재프로그래밍된다(Kültz, 2005). 현재까지 많은

20 수의 연관 유전자들이 동정되었을 지라도, 시그널링 경로의 관점에서 에탄올, 열 및 퍼퓨랄을 포함하는 많은 스트레스 유발자들에 대한 저항성이 어떻게 획득되는 지에 대해서 거의 알려져 있지 않다. 일반적으로, 에탄올-또는 열-저항성의 기작은 매우 복잡하고 전체적으로 조절되며, 연관된 경로들의 포괄적 관점을 통해 이해될 필요가 있는 것으로 받아들여 진다(Ma,

25 *et al.*, 2010; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 에탄올 및 열 스트레스 모두는 세포막 지질 조성을 유사하게 변화(Okuyama, *et al.*, 1979; Suutari, *et al.*, 1994)시키고 세포막 H^+ -ATPase 활성(Coote, *et al.*, 1994) 열충격 단백질들을 인코딩하는 유전자들의 상향-조절(Ma, *et al.*, 2010)을 감소시킨다. 상술한 결과들은 에탄올-저항성에 필요한 경로들이 열-

30 저항성에 필요한 경로들과 중첩된다는 것을 나타낸다. 하지만, 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석에 기반하여 제조된 스트레인들은 일치되지 않는

에탄올-저항성 또는 열-저항성을 나타냈다(Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 본 연구에서, 본 발명자들은 3,000 개의 트랜스포존-매개된 파괴 돌연변이들을 스크리닝하여 에탄올에 대한 증가된 저항성을 가지는 스트레인들을 분리하였다. 이후, 두 개의 돌연변이들이 열에 대하여도 증가된 저항성을 가진다는 것을 발견하였으며 또한, 이중 한 개의 돌연변이가 퍼퓨랄에 대하여도 저항성을 가짐을 발견하였다. 상기 스트레인은 에탄올-저항성, 열-저항성 및 퍼퓨랄 저항성간의 가능한 연결점(interconnection)을 설명하는 데 유용할 것이다.

본 발명자들은 증가된 에탄올-저항성을 책임지는 일곱 개의 유전자들(CMP2, IMD4, SSK2, PPG1, PAM1, DLD3 및 MSN2), 그리고 트랜스포존 돌연변이유발법 및 SGK0 돌연변이체들의 조합을 통해 증가된 열-저항성을 나타내는 세 개의 유전자들(SSK2, PPG1 및 PAM1)을 동정하였으며, 1 개의 유전자 *SSK2* 에 의한 퍼퓨랄에 대한 저항성을 추가로 확인하였다. 또한, *SSK2* 및/또는 *PPG1* 의 하향-조절은 에탄올 및 열에 대한 저항성을 부여하였다. 이중에서 *SSK2* 유전자의 하향-조절은 에탄올, 열 및 퍼퓨랄 모두에 대한 저항성을 부여하였다.

도 3 에서 볼 수 있듯이, 트랜스포존은 영향받은 유전자들의 예상되는 조절 부위에 삽입되었다. 이는 트랜스포존 돌연변이유발법에 의해 발생된 라이브러리는 이론적으로 ORFs 에만 영향을 가지는 SGK0 컬렉션에 포함된 클론의 수와 유사한 4,500 개 이상의 클론들로 구성된다는 것을 의미한다. 본 연구에서, 본 발명자들은 이론적으로 필요한 클론 수보다 더 적은 3,000 개의 클론으로 구성된 라이브러리를 이용하여 증가된 에탄올 저항성을 가지는 다섯 개의 스트레인(Tn1-5)을 분리하였다. 따라서, 적절한 클론 수를 포함하는 라이브러리를 스크리닝한다면, 증가된 저항성을 가지는 더 많은 수의 스트레인을 분리하는 것이 가능할 것이다. 영향받은 유전자들의 하향-조절을 나타내는 Tn1, Tn2 및 Tn4 의 분리는 SGK0 컬렉션을 이용하지 않았다면 불가능했을 것이다. 본 발명자들의 지식으로는, 본 발명자들의 연구가 RNA 레벨이 에탄올- 및/또는 열-저항성에 대한 결정 인자라는 것을 처음으로 규명한 것이다.

하향-조절되는 Tn1 의 경우, 본 발명자들은 하나의 유전자만 하향-조절되는 스트레인의 부재로 인해, 상기 유전자가 실제로 스트레스

저항성을 담당하는 지 여부를 결정할 수 없었다. CMP2 유전자는 Crz1p(스트레스-반응 전사인자)를 조절하는 Ca^{2+} /칼모둘린-의존성 포스파타제의 활성 서브유니트의 이소형인 칼시뉴린 A(calcineurin A)를 인코딩한다. 칼시뉴린은 Crz1p 를 탈인산화시켜 세포질로부터 핵으로의 빠른 전이(translocation)을 야기한다. 이후, Crz1p 는 세포 생존과 관련된 유전자들의 전사를 활성화시킨다(Cyert, 2003; Panadero, *et al.*, 2007). CRZ1 은 에탄올-유도된 칼시뉴린/Crz1 경로에서의 기능을 통해 에탄올 스트레스 하에서 세포 성장에 중요하다(Araki, *et al.*, 2009). 한편, 칼시뉴린은 Msn2p 의 분해를 증가시켜 스트레스-반응 엘리먼트(stress-response element, STRE)를 가지는 유전자들의 불충분한 유도를 야기한다(Takatsume, *et al.*, 2010). 따라서, 칼시뉴린-Crz1p 경로가 효모에서 에탄올-보호성 기작으로 기능하는 지 여부는 논쟁의 여지가 있다. CMP2 핵-아웃이 증가된 에탄올 저항성을 초래한다는 본 발명의 결과는 후자를 지지한다. 한편, IMD4 는 GMP 생합성의 첫 번째 단계를 촉매하는 이노신 모노포스페이트 디하이드로게나제(IMPDH)의 이소자임을 인코딩한다. S. 세레비지에의 에탄올 저항성에 관련된 IMD4 에 대한 보고는 없다. 하지만, 젖산 박테리아인 오에노코커스 오에니(*Oenococcus oeni*)에서 에탄올 스트레스는 IMPDH 의 레벨을 감소시켜 니코틴아미드 뉴클레오타이드의 생산을 감소시킴으로써 글루타티온 환원효소의 유도를 초래하여 NADPH 레벨의 감소를 야기한다(39). 이는 레독스 밸런스의 유지가 에탄올 적응(ethanol adaptation)에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다(9, 39). 따라서, 비록 IMD4 의 기능이 S. 세레비지에에서 확인될 필요가 있을 지라도 CMP2 및 IMD4 모두가 에탄올 저항성에 중요할 것이다.

하향-조절되는 Tn2 의 경우도, 본 발명자들은 하나의 유전자만 하향-조절되는 스트레인의 부재로 인해, 상기 유전자가 실제로 스트레스 저항성을 담당하는 지 여부를 결정할 수 없었다. SSK2 는 HOG1 경로의 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 키나제(MAPKKK)를 인코딩하는데(Posas, *et al.*, 1998), 이는 고삼투압을 포함하는 다양한 환경 스트레스들에 대한 효모 생존에 필수적이다(Albertyn, 1994; Brewster, *et al.*, 1993). HOG1 경로는 두 개의 막-결합된 삼투센서(osmosensor) 단백질인 Sln1p 및 Sho1p 에 의해 서로 독립적으로 조절된다. Sln1p 에 의해

발생된 시그널들이 S 나 2p 로 전달되는 반면에, Sho1p 에 의해 발생된 시그널들은 MAPKKK 인 Ste11p 로 전달된 후, 두 개의 경로는 다운스트림 Pbs2p 로 합쳐진다(Winkler, *et al.*, 2002). 에탄올 스트레스에서 SSK2 의 포함은 거의 기술되어 있지 않다. 반면에, 열 스트레스는 SSK2 와는 무관한

5 SH01 경로를 포함한다(Winkler, *et al.*, 2002). 상술한 사실을 고려해볼 때, SSK2 의 파괴가 어떻게 에탄올- 및 열-저항성을 유도하는 지가 주요 관심사이다. 본 발명자들의 가설은 SSK2 파괴에 의해 야기된 SLN1 경로의 차단이 열에 대한 또 다른 경로인 SH01 경로의 시그널링 기능을 증가시킨다는 것이다. 에탄올 저항성이 SH01 경로에 의해 매개되는 지

10 여부는 흥미로운 주제일 것이다. PPG1 은 글라이코겐 축적에 필요한 잠재적인 세린/트레오닌 단백질 포스파타제를 인코딩한다(Posas, *et al.*, 1993). 글라이코겐 생합성 유전자들은 에탄올 충격에 반응하여 고발현된다(Hirasawa, *et al.*, 2007). PPG1 에 대한 관련 데이터는 본 연구에서 제시되지 않았기 때문에, PPG1 의 파괴가 에탄올 및 열 모두에

15 대한 저항성을 부여하는 본 발명자들의 데이터와의 불일치성을 고려하는 것은 시기상조이다.

한편, *PAM1* 의 녁-아웃은 에탄올 및 열 모두에 대한 저항성을 부여하였고 *PAM1* 은 기능이 알려지지 않은 필수 단백질을 인코딩하는 데, 이는 아마도 단백질 포스파타제 2A 멀티카피 억제인자(suppressor)일

20 것으로 판단된다. 이 유전자의 과다-발현은 성장을 억제하고 세포형태를 조절하는 조절 경로를 방해함으로써 섬유성 표현형(filamentous phenotype)을 유발한다(Hu, *et al.*, 1994). 아직까지, 상술한 유전자들이 스트레스 저항성과 연관되어 있다는 어떠한 증거도 없었다.

DLD3 는 미토콘드리아 손상에 의해 자극되어 발현되는 유전자들로

25 구성된 레트로등급 레굴론의 한 부분으로, D-락테이트 디하이드로게나제를 인코딩 한다. 현재까지 스트레스 저항성에 대한 이 유전자의 관련성에 대한 보고는 없다.

MSN2 는 일반적인 스트레스 반응을 조절하는 전사인자를 인코딩한다(Martínez-Pastor, *et al.*, 1996; Schmitt, *et al.*, 1996).

30 Msn2p 와 41%의 동일성을 가지는 Msn4p 와 연계하여 Msn2p 는 열 및 고농도 에탄올을 포함한 여러 스트레스에 반응하는 약 200 개의 유전자들의 발현을

이들 유전자들의 프로모터에 위치한 스트레스-반응 엘리먼트(Stress-response element, STRE)에 결합함으로써 조절한다(Causton, *et al.*, 2001; Gasch, *et al.*, 2000; Martínez-Pastor, *et al.*, 1996). MSN4 유전자 발현은 스트레스에 의해 유도되는 반면에, MSN2 유전자는 항상 발현된다(Gasch, *et al.*, 2000). *msn2* 및 *msn4* 의 단일염기 결실 돌연변이는 어떠한 표현형도 나타내지 않지만, *msn2* 및 *msn4* 이중 널 돌연변이(double null mutants)는 탄소원 결핍(starvation), 열충격, 삼투 스트레스 및 산화 스트레스에 과민반응성을 나타낸다. MSN2 및 MSN4 유전자의 과다-발현은 결핍 및 열 스트레스에 대한 민감성을 감소시킨다(Estruch, *et al.*, 1993). 따라서, MSN2 및 MSN4 는 비록 각각 특이 유전자들 및 특정 스트레스 조건에 따라 다를 지라도, 많은 생물학적 반응들에서 한 팀으로 기능한다(Fujita, *et al.*, 2006). 에탄올 저항성과 관련하여, MSN2 의 과다-발현은 셰이크 효모 스트레인에서 에탄올 저항성을 촉진시키고 발효능을 증진시킨다(Watanabe, *et al.*, 2009). 본 연구에서, MSN2 널-아웃은 이전 연구들과는 상충하는 표현형(증가된 에탄올 저항성)을 나타냈다. *Msn2p* 는 에탄올 저항성과 관련된 유전자들에 대한 음성 조절자로서 기능하는 것이 가능하다. 또한, *Msn2p* 및 *Msn4p* 는 스트레스 반응에서 부분적으로 중복된(redundant) 기능을 가진다(Estruch, *et al.*, 1993). 이런 맥락에서, 본 발명자들은 MSN4 가 MSN2 널-아웃 스트레인에서 MSN2 를 대신하여 에탄올 스트레스 반응을 조절한다는 것을 제안한다.

본 연구는 증가된 에탄올-저항성을 책임지는 일곱 개의 유전자들(CMP2, IMD4, SSK2, PPG1, PAM1, DLD3 및 MSN2), 그리고 증가된 열-저항성을 나타내는 세 개의 유전자들(SSK2, PPG1 및 PAM1)을 밝혔다. 상술한 표현형을 나타낸다는 보고는 아직까지 없었다. 상술한 유전들 간의 내적연관성(interrelationship)은 기재된(annotated) 기능들로부터 유추될 수 없었다. 하지만, CMP2, SSK2 및 MSN2 는 세포 경로에 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 에탄올 저항성에 관계된 분자 기작을 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다. 특히, 동정된 유일한 전사인자인 *Msn2p* 는 에탄올 저항성을 책임지는 유전자들을 음적으로 조절하기 때문에 관심의 대상이다. 또한, SSK2, PPG1 및 PAM1 에 대한 연구는 어떻게 에탄올-

및 열-저항성을 동시에 획득할 수 있는 지를 분자 레벨에서 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다.

결론적으로, 에탄올-, 열- 또는 펄스-스트레스에 대한 증가된 저항성을 가지는 스트레인을 개발하고자 하는 목적들 중 하나는 스트레스에 대한 저항성에 포함된 기작을 이해하는 것 이외에 산업적 적용에 대한 정보를 제공하는 것이다. 본 연구에서 동정된 신규한 유전자들은 에탄올 생산 능력의 측면에서 산업적 효모 스트레인을 개선하는 데 유용할 것이다. 또한, 본 연구는 트랜스포존 돌연변이유발법이 발현 레벨이 저항성 결정인자(tolerance determinan)인 유전자들의 동정에 특히 유용하다는 것을 실증하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조 문헌

- Abdel-Banat, B.M., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang, and R. Akada. 2010. High-temperature fermentation: how can process for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 861-867(2010).
- Albertyn, J., S. Hohmann, J. M. Thevelein, and B. A. Prior. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4135-4144(1994).
- Alper, H., J. Moxley, E. Nevoigt, G. R. Fink, and G. Stephanopoulos. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 314: 1565-1568(2006).

- Araki, Y., H. Wu, H. Kitagaki, T. Akao, H. Takagi, and H. Shimoï. Ethanol stress stimulates the Ca^{2+} -mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 1-6(2009).
- Auesukaree, C., *et al.*, Genome-wide identification of genes involved
5 in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet*, 50(3): 301-310(2009).
- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259: 1760-1763(1993).
- 10 Bro, C., B. Regenber, J. Förster, and J. Nielsen. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.*, 8: 102-111(2006).
- Casey, G. P., *et al.*, ETHANOL TOLERANCE IN YEASTS. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol 13(3): 219-280(1986).
- 15 Causton, H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander, and R. A. Young. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 12: 323-337(2001).
- Coote, P. J., M. V. Jones, I. J. Seymour, D. L. Rowe, D. P. Ferdinando,
20 A. J. McArthur, and M. B. Cole. Activity of the plasma membrane H^+ -ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 140: 1881-1890(1994).
- Cyert, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
25 311: 1143-1150(2003).
- Edgardo, A., P. Carolina, R. Manuel, F. Juanita, and B. Jaime. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.*, 43: 120-123(2008).
- Estruch, F., and M. Carlson. Two homologous zinc finger genes
30 identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 3872-3881(1993).

Fujita, K., A. Matsuyama, A. Kobayashi, and H. Iwahashi. The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res.*, 6: 744-750(2006).

- 5 Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 11: 4241-4257(2000).

- Gorsich, S. W., B. S. Dien, N. N. Nichols, P. J. Slininger, Z. L. Liu, and C. D. Skory. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 339-349 (2006).

- Hirasawa, T., *et al.*, Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of Biotechnology*, 131: 34-44(2007).

Hou, L. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 1084-1093(2010).

- 20 Hu, G. Z., and H. Ronne. Overexpression of yeast PAM1 gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. *J. Biol. Chem.*, 269: 3429-3435(1994).

- Inoue, T., *et al.*, Cloning and Characterization of a Gene Complementing the Mutation of an Ethanol-sensitive Mutant of Sake Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(2): 229-236(2000).

Kajiwara, S., *et al.*, Overexpression of the *OLE1* gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 568-574(2000).

- Kim, J., *et al.*, Disruption of the Yeast *ATH1* Gene Confers Better Survival after Dehydration, Freezing, and Ethanol Shock: Potential

Commercial Applications. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 62(5): 1563-1569(1996).

Kubota, S., I. Takeo, K. Kume, M. Kanai, A. Shitamukai, M. Mizunuma, T. Miyakawa, H. Shimoi, H. Lefuji, and D. Hirata. Effect of ethanol on
5 cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth
in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 968-
972(2004).

Kültz, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress
response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67: 225-257(2005).

10 Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser. Consolidated
bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.*,
16: 577-583(2005)

Ma, M., and Z. L. Liu. Mechanisms of ethanol tolerance in
Saccharomyces cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 829-
15 845(2010).

Mobini-Dehkordi, M., I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, K. Ghaedi, M.
Tavassoli, and R. Akada. Isolation of a novel mutant strain of
Saccharomyces cerevisiae by an ethyl methane sulfonate-induced
mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *J. Biosci.*
20 *Bioeng.*, 105: 403-408(2008).

Okuyama, H., and M. Saito. Regulation by temperature of the chain
length of fatty acids in yeast. *J. Biol. Chem.*, 254: 12281-12284(1979).

Panadero, J., M. J. Hernández-López, J. A. Prieto, and F. Randez-Gil.
Overexpression of the calcineurin target *CRZ1* provides freeze
25 tolerance and enhances the fermentative capacity of baker' s yeast.
Appl. Environ. Microbiol., 73: 4824-4831(2007).

Posas, F., J. Clotet, M. T. Muns, J. Corominas, A. Casamayor, and J.
Arino. The gene PPG encodes a novel yeast protein phosphate involved
in glycogen accumulation. *J. Biol. Chem.*, 268: 1349-1354(1993).

- Posas, F., and H. Saito. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.*, 17: 1385-1394 (1998).
- Sanchez, Y., *et al.*, Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, 11(6): 2357-2364(1992).
- Schmitt, A. P., and K. McEntee. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5777-5782(1996).
- 10 Schubert, C. Can biofuels finally take center stage? *Nat. Biotechnol.* 24:777-784 (2006).
- Shimoda, C., A. Itadani, A. Sugino, and M. Furusawa. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading-deficient DNA polymerase as an effective mutator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.*, 15 81:391-397(2006).
- Silveira, M. G., M. Baumgärtner, F. M. Rombouts, and T. Abee. Effects of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2748-2755(2004).
- Sridhar, M., N. Kiran Sree, and L. Venkateswar Rao. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of 20 *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresource Technol.*, 83: 199-202(2002).
- Stanley, D., S. Fraser, P. J. Chambers, P. Rogers, and G. A. Stanley. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of 25 *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 139-149(2010).
- Suutari, M., K. Liukkonen, and S. Laakso. Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1469-1474(1990).
- 30 Suutari, M. and S. Laakso. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20(4): 255-328(1994).

- Takagi, H., M. Takaoka, A. Kawaguchi, and Y. Kubo. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8656-8662(2005).
- Takahashi, T., H. Shimoi, and K. Ito. Identification of genes required
5 for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics*, 265:1112-1119(2001).
- Takatsume, Y., T. Ohdate, K. Maeta, W. Nomura, S. Izawa, and Y. Inoue. Calcineurin/Crz1 destabilizes Msn2 and Msn4 in the nucleus in response to Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 427: 275-287(2010).
- 10 Teixeira, MC., *et al.*, Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 75(18): 5761-5772(2009).
- van Voorst, F., J. Houghton-Larsen, L. Jønson, M. C. Kielland-Brandt, and A. Brandt. 2006. Genome-wide identification of genes required for
15 growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*, 23: 351-359(2006).
- Watanabe, M., D. Watanabe, T. Akao, and H. Shimoi. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 516-
20 518(2009).
- Weber, C., A. Farwick, F. Benisch, D. Brat, H. Dietz, T. Subtil, and E. Boles. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 1303-1315(2010).
- 25 Winkler, A., C. Arkind, C. P. Mattison, A. Burkholder, K. Knoche, and I. Ota. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot. Cell*, 1: 163-173(2002).

Yazawa, H., H. Iwahashi, and H. Uemura. Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24: 551-560(2007).

5 Yoshikawa, K., *et al.*, Genome-Wide Analysis of the Effects of Location and Number of Stress Response Elements on Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, vol 106(5): 507-510(2008).

Yoshikawa, K., T. Tadamasa, C. Furusawa, K. Nagahisa, T. Hirasawa, and H. Shimizu. Comprehensive phenotypic analysis for identification of
10 genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 9:32-44(2009).

You, K. M., *et al.*, Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 69(3): 1499-1503(2003).

15

【청구의 범위】

【청구항 1】

불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형
5 효모 균주.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발되는
것을 특징으로 하는 효모 균주.
10

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 형질변형 효모 균주는 5-15% 에탄올 농도
조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

15 【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 형질변형 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 농도
조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 5】

20 제 1 항에 있어서, 상기 형질변형은 사카로마이세스
종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces*
spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.),
클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.),
탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces*
25 spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스
종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주에서 실시하는 것을 특징으로 하는 효모
균주.

【청구항 6】

30 제 5 항에 있어서, 상기 형질변형은 사카로마이세스 종에서 실시하는
것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 7】

불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 에탄올-
및 열-저항성 형질변형 효모 균주.

5 【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 SSK2 또는 PPG1 유전자의 불활성화는
트랜스포존에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 9】

10 제 7 항에 있어서, 상기 효모 균주는 5-15% 에탄올 배양 조건에서
성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 10】

15 제 9 항에 있어서, 상기 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서
성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 11】

제 7 항에 있어서, 상기 효모 균주는 30-43℃ 온도 조건에서 성장할
수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

20

【청구항 12】

제 7 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스
종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces*
spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.),
25 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.),
탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces*
spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스
종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

30 【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종인 것을

특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 14】

불활성화된(inactivated) PAM1 유전자를 포함하는 에탄올- 및 열-
5 저항성 형질변형 효모 균주.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서, 상기 PAM1 유전자의 돌연변이는 트랜스포존에
의해 유발되는 것을 특징으로 하는 효모 균주.
10

【청구항 16】

제 14 항에 있어서, 상기 효모 균주는 5-15% 에탄올 배양 조건에서
성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서, 상기 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 배양
조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 18】

제 14 항에 있어서, 상기 효모 균주는 30-42℃ 온도 조건에서 성장할
수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.
20

【청구항 19】

제 14 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종,
25 시조사카로마이세스 종, 피키아 종, 파피아 종, 클루이베로미세스 종,
칸디다 종, 탈라로미세스 종, 브레타노미세스 종, 파키솔렌 종 또는
데바리오미세스 종 효모 균주인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종인 것을
특징으로 하는 효모 균주.
30

【청구항 21】

불활성화된(inactivated) SSK2 유전자를 포함하는 퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주.

5 【청구항 22】

제 21 항에 있어서, 상기 SSK2 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 23】

10 제 21 항에 있어서, 상기 효모 균주는 15-50 mM 퍼퓨랄 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 24】

15 제 21 항에 있어서, 상기 효모 균주는 에탄올 및 열에 대한 저항성을 추가적으로 가지는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 25】

20 제 21 항에 있어서, 상기 효모 균주는 5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 26】

제 25 항에 있어서, 상기 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

25 【청구항 27】

제 21 항에 있어서, 상기 효모 균주는 30-43℃ 온도 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 28】

30 제 21 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces*

- spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

【청구항 29】

제 28 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

10

【청구항 30】

제 1 항, 제 7 항, 제 14 항 또는 제 21 항의 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법.

15

【청구항 31】

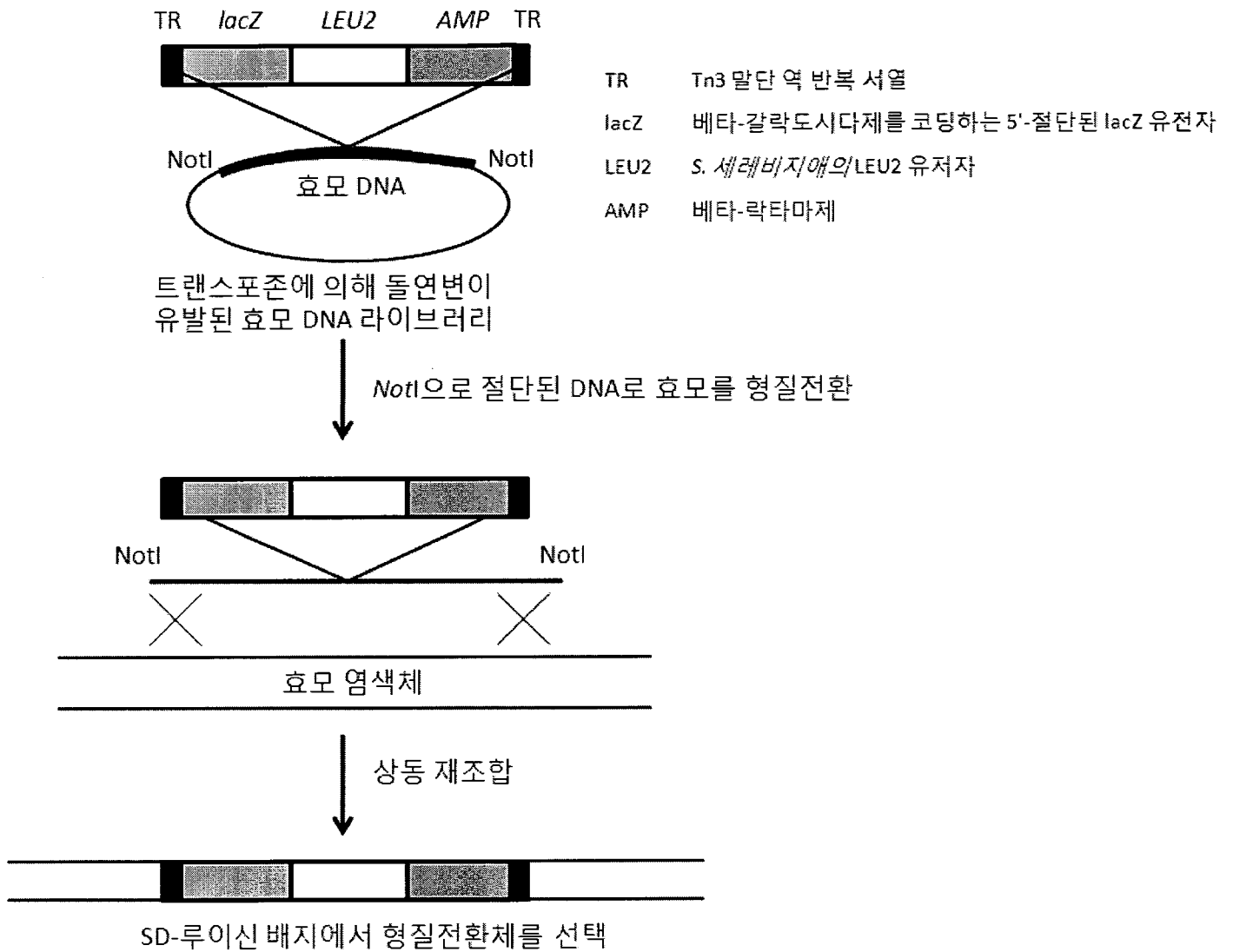
제 30 항에 있어서, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

20 【청구항 32】

제 31 항에 있어서, 상기 C6 당은 글루코오스인 것을 특징으로 하는 방법.

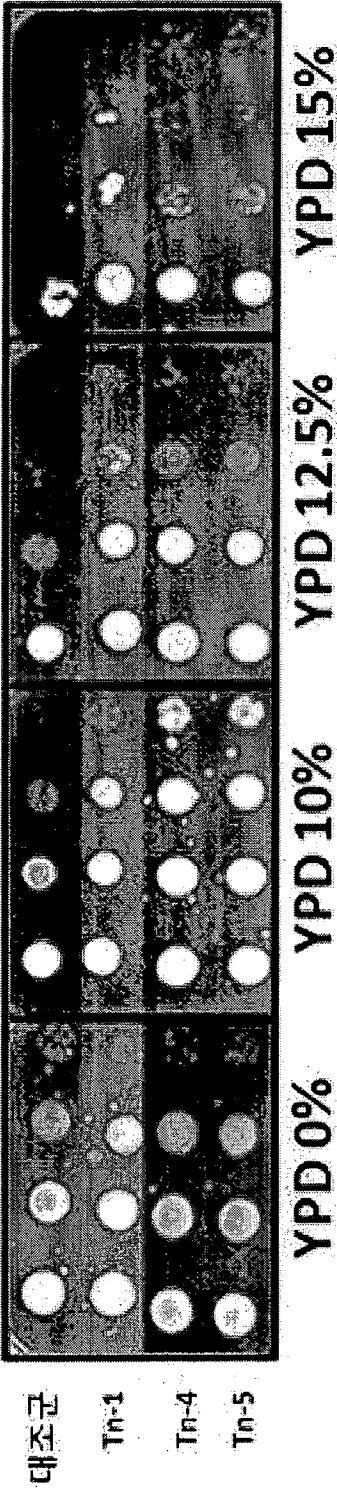
1/25

도 1

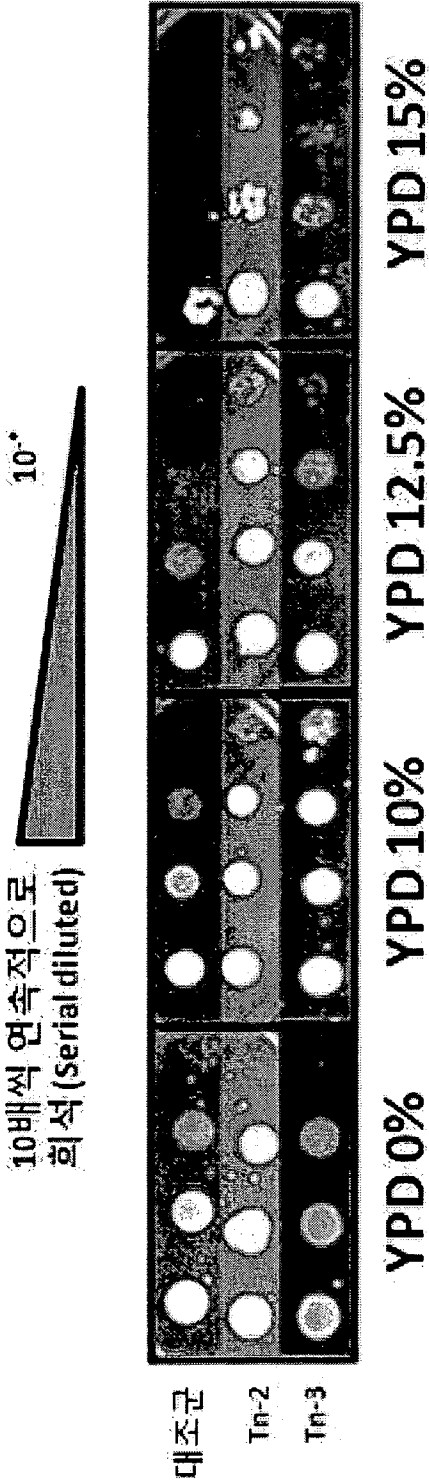


도 2a

10배씩 연속적으로
희석 (Serial diluted)
10⁻⁵

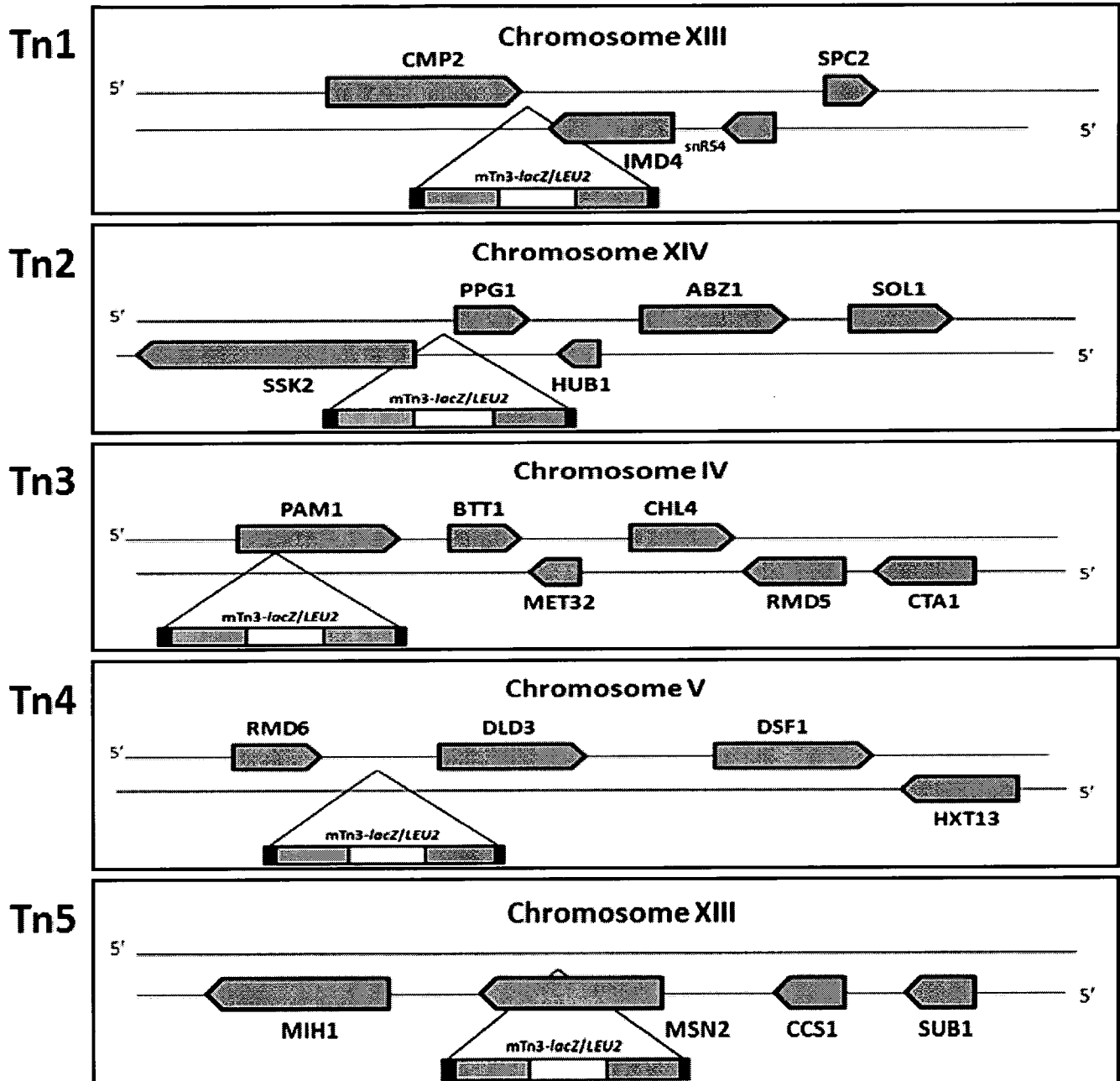


도 2b



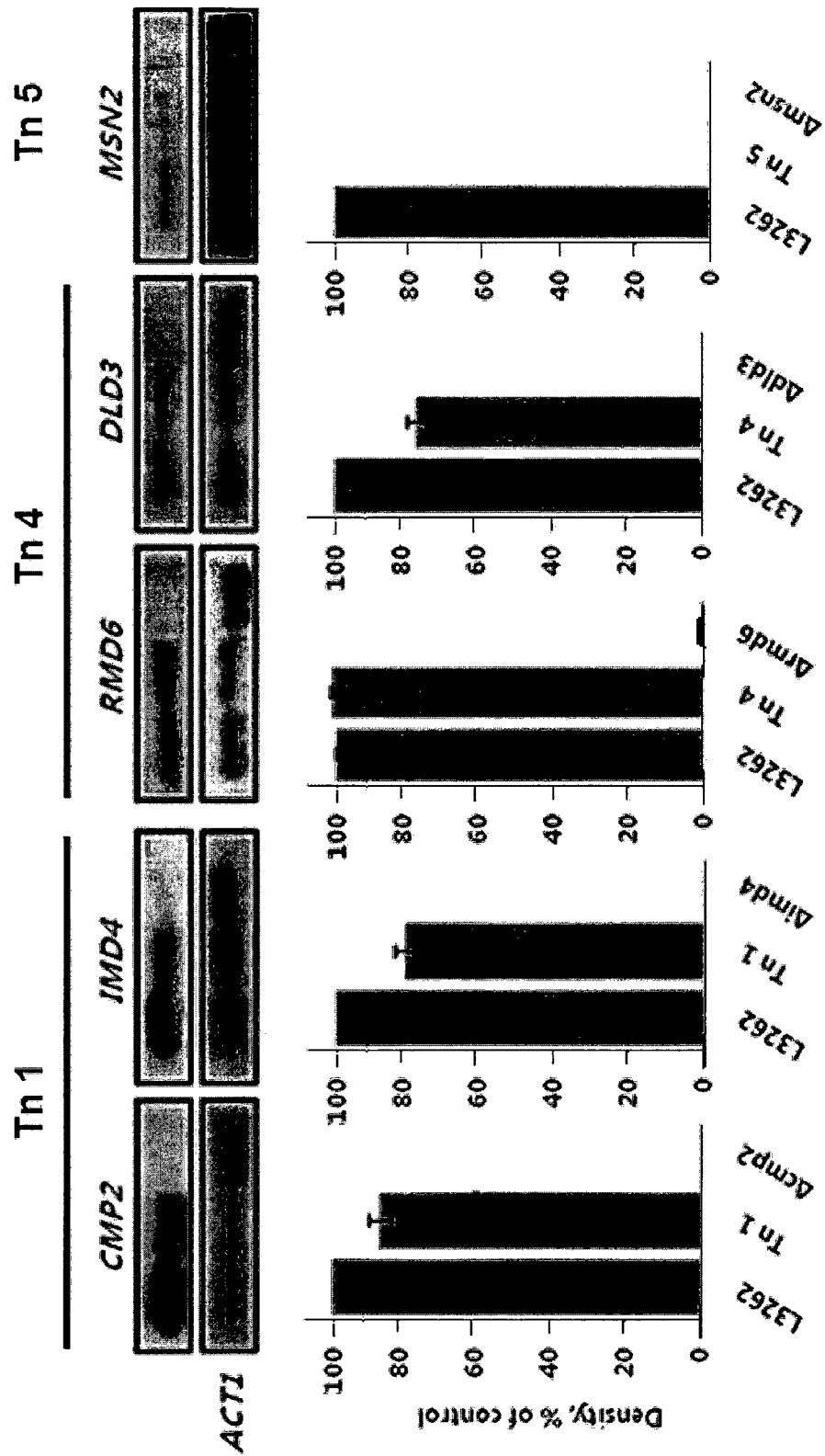
5/25

도 3



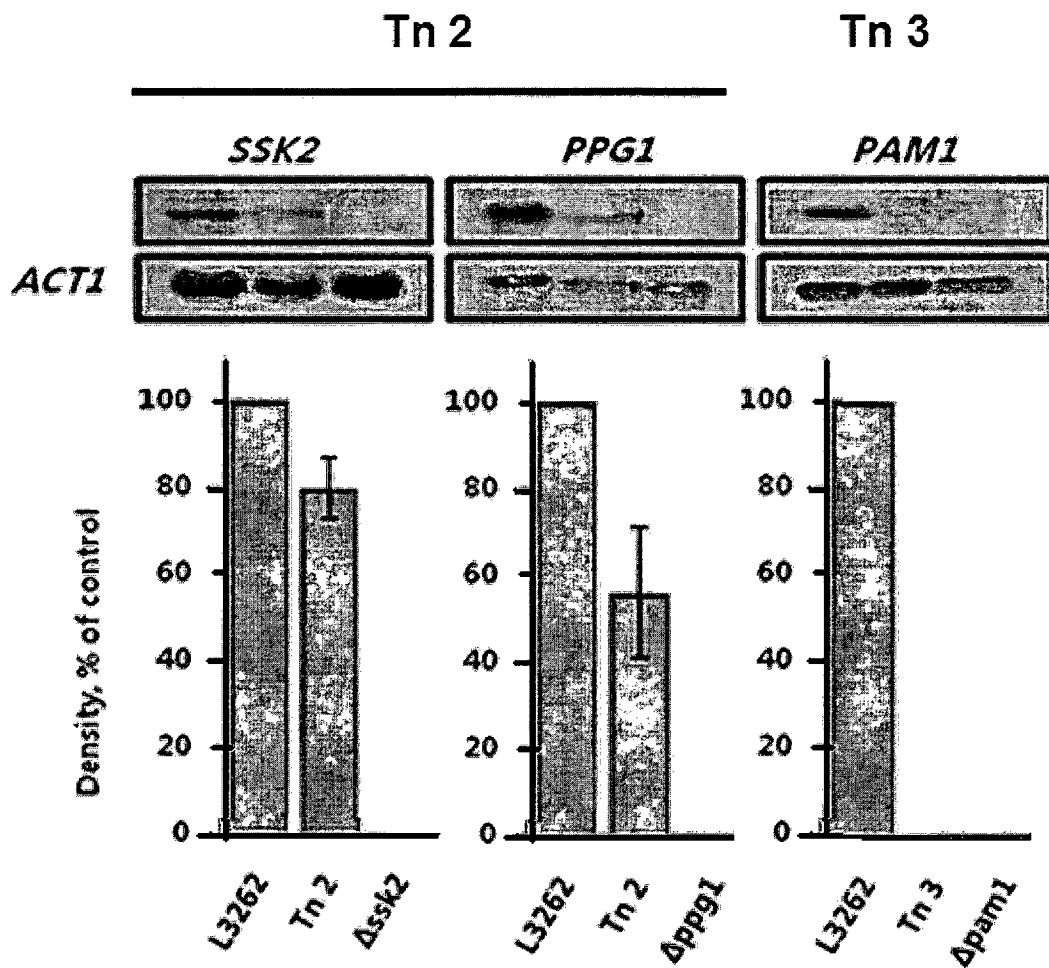
6/25

도 4a

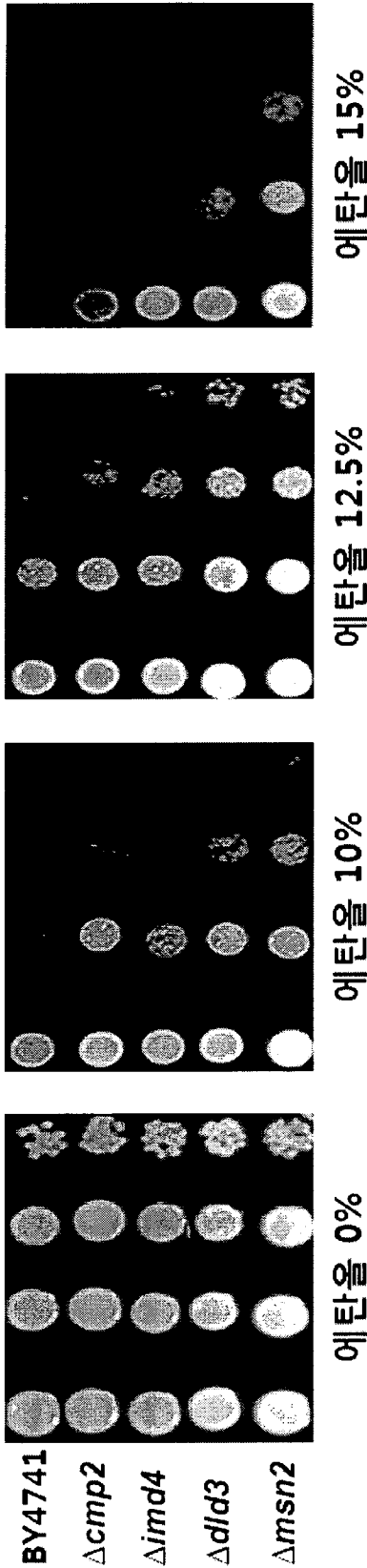


7/25

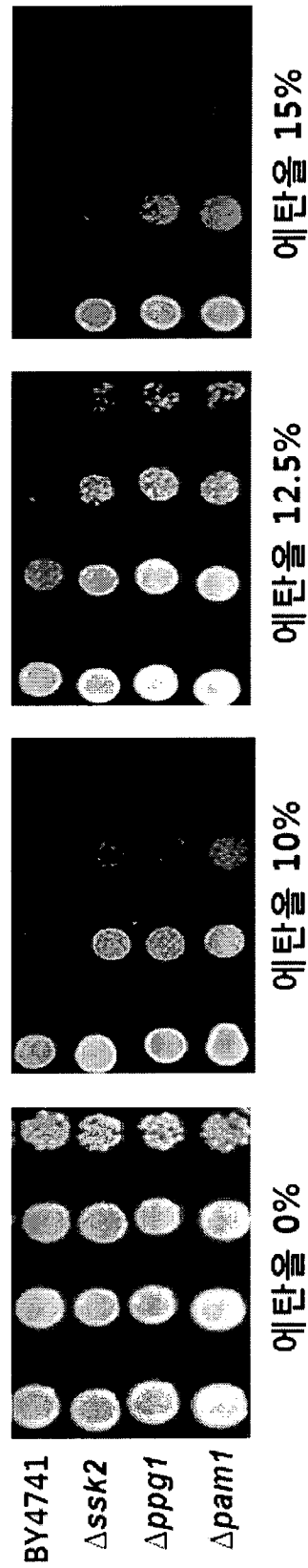
도 4b



도 5a

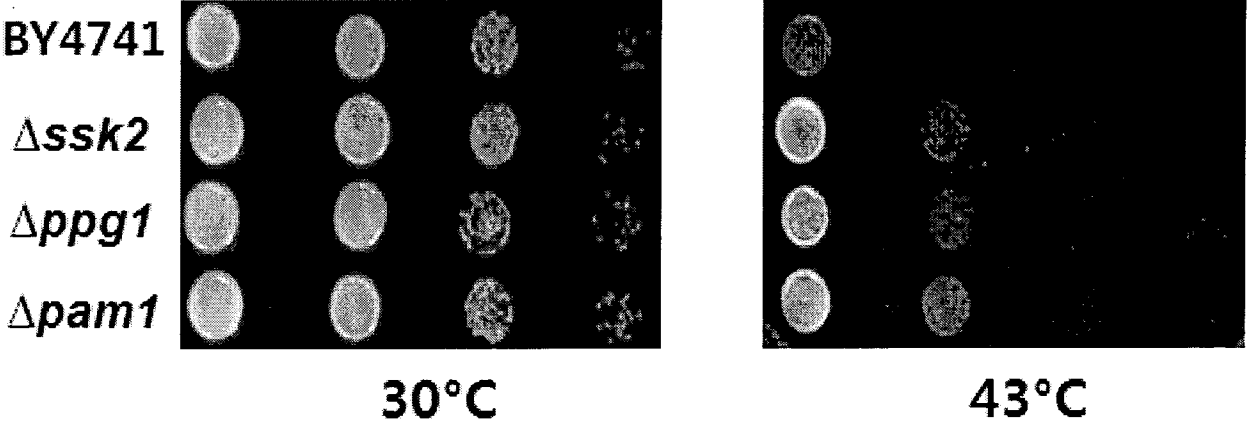


도 5b



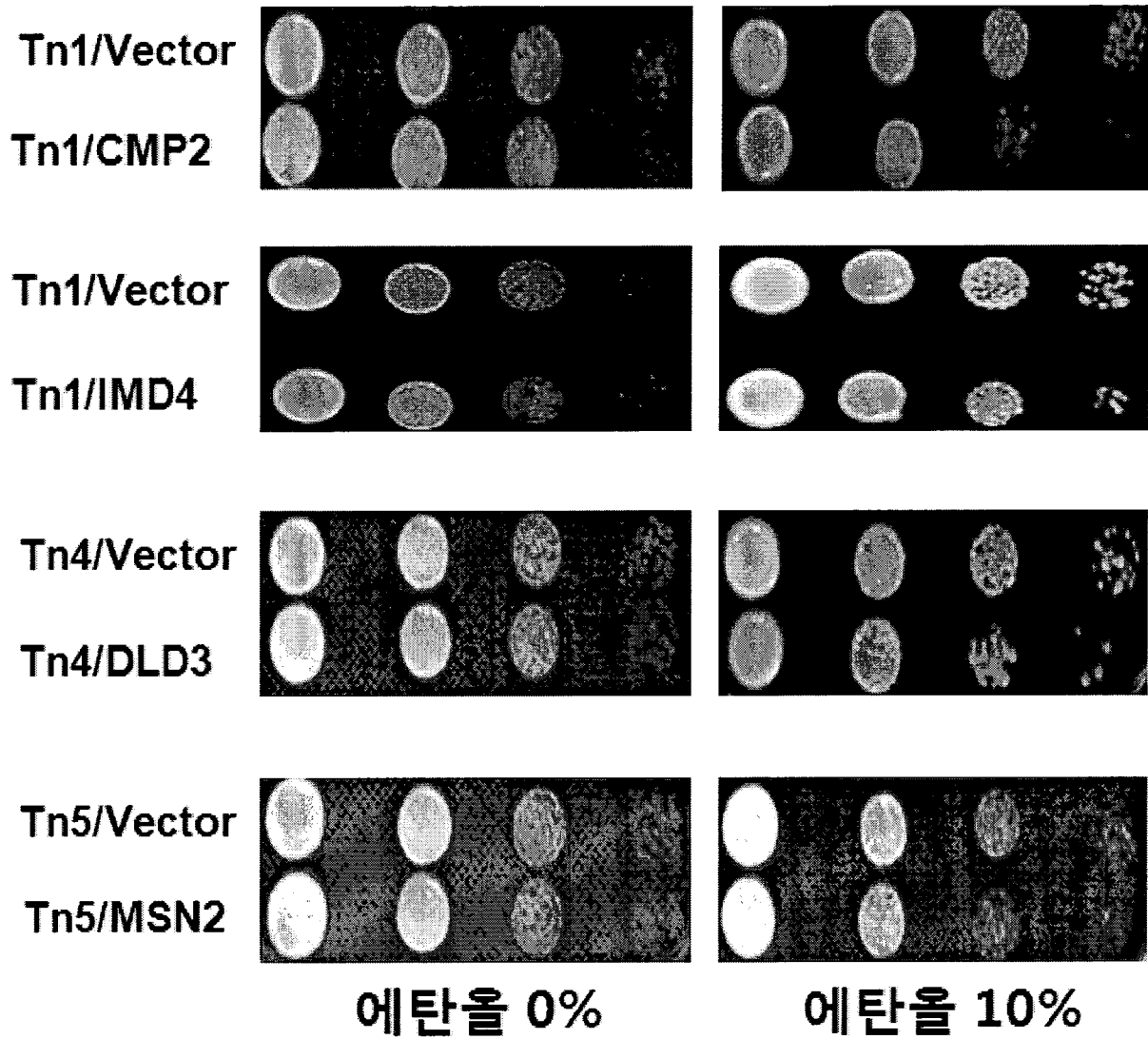
10/25

도 5c



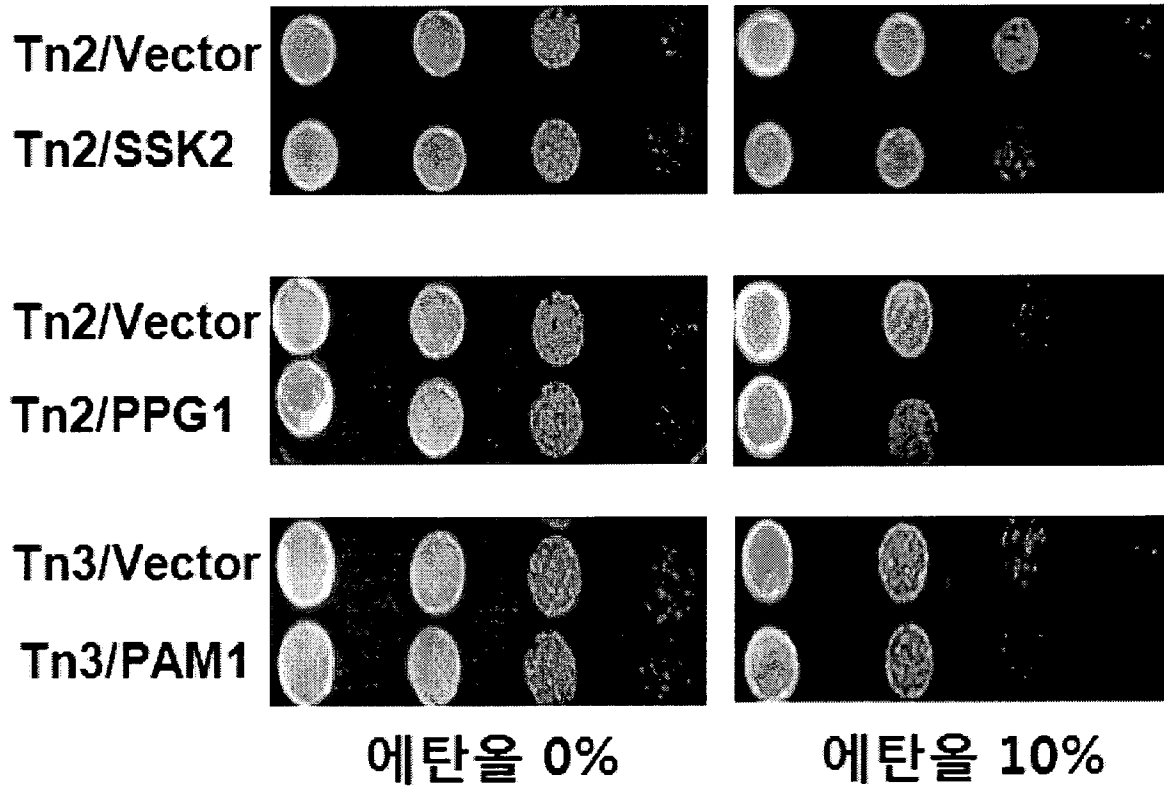
11/25

도 6a



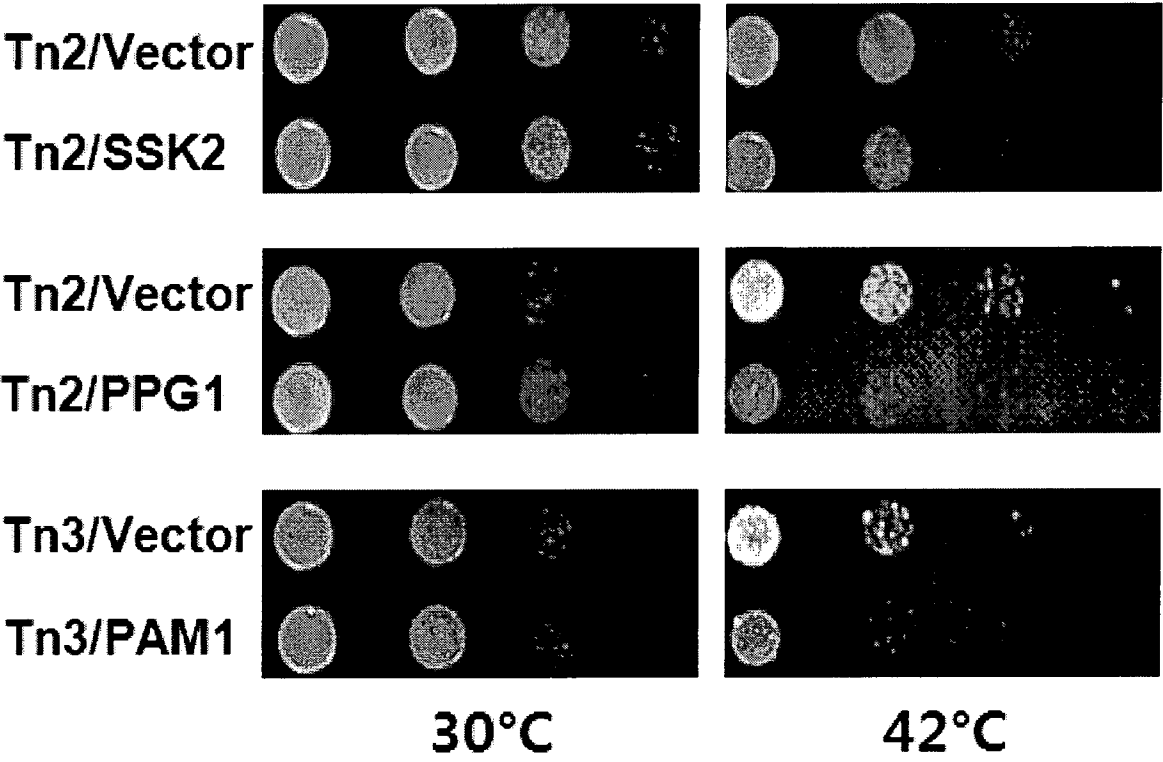
12/25

도 6b



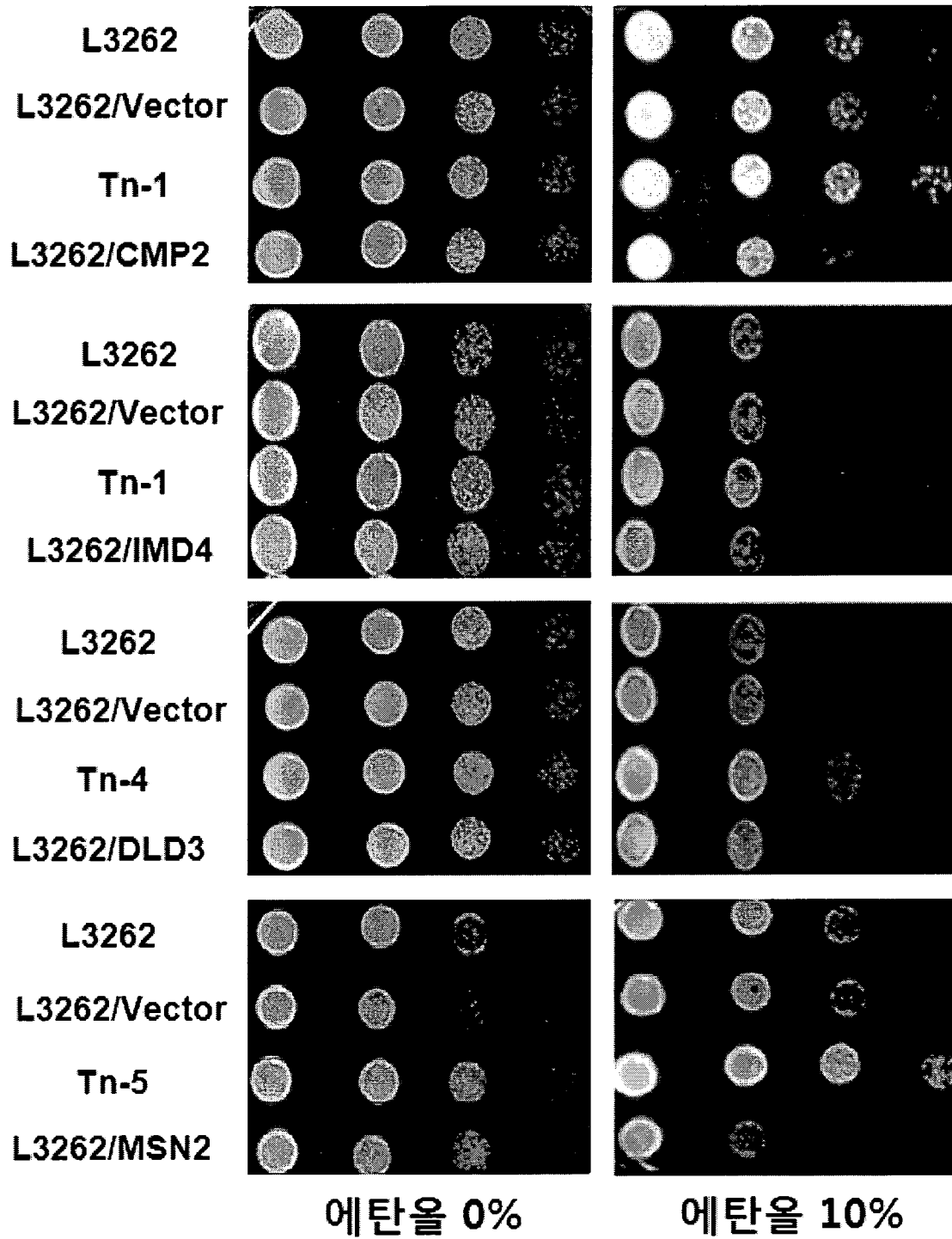
13/25

도 6c



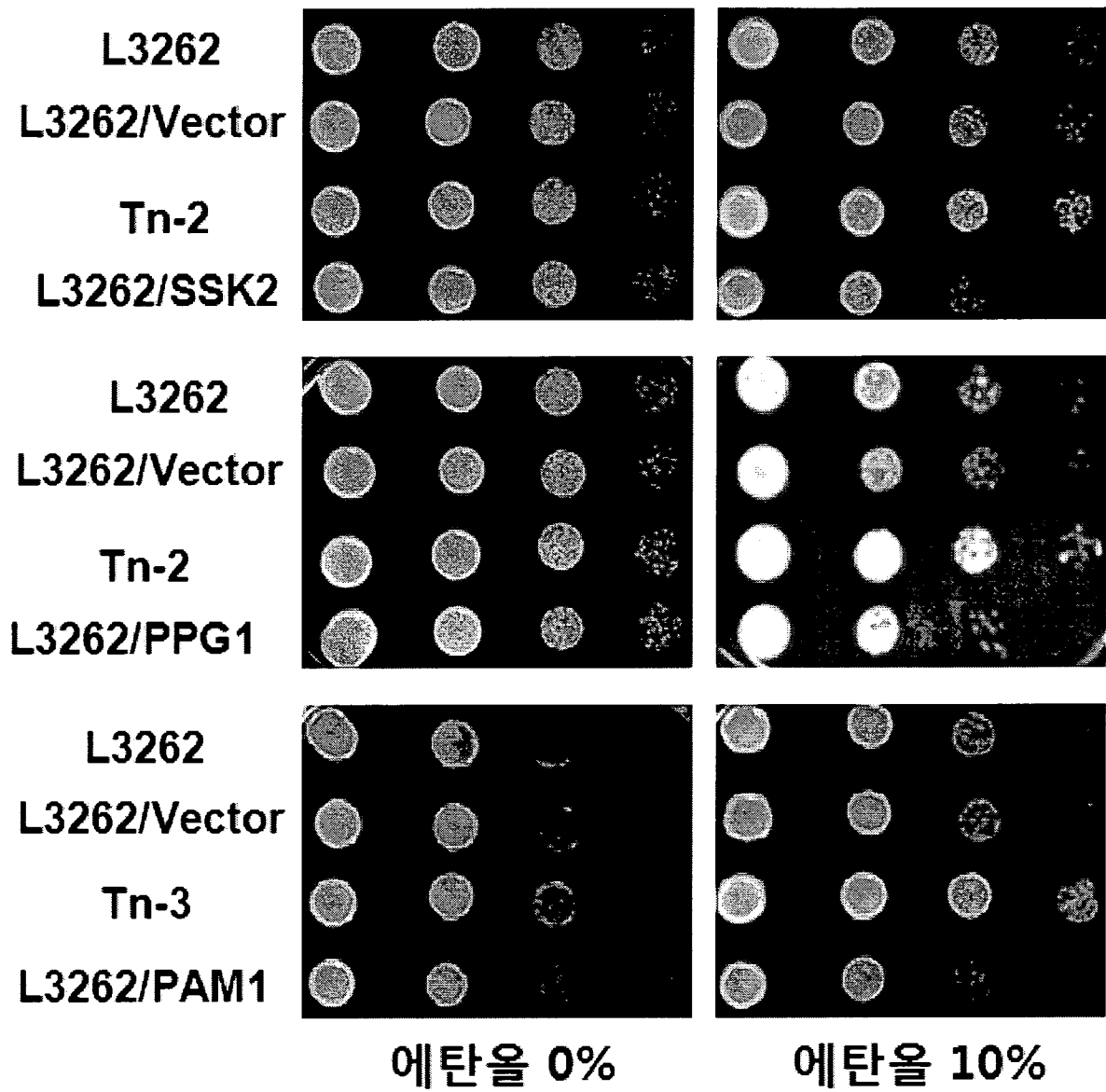
14/25

도 7a



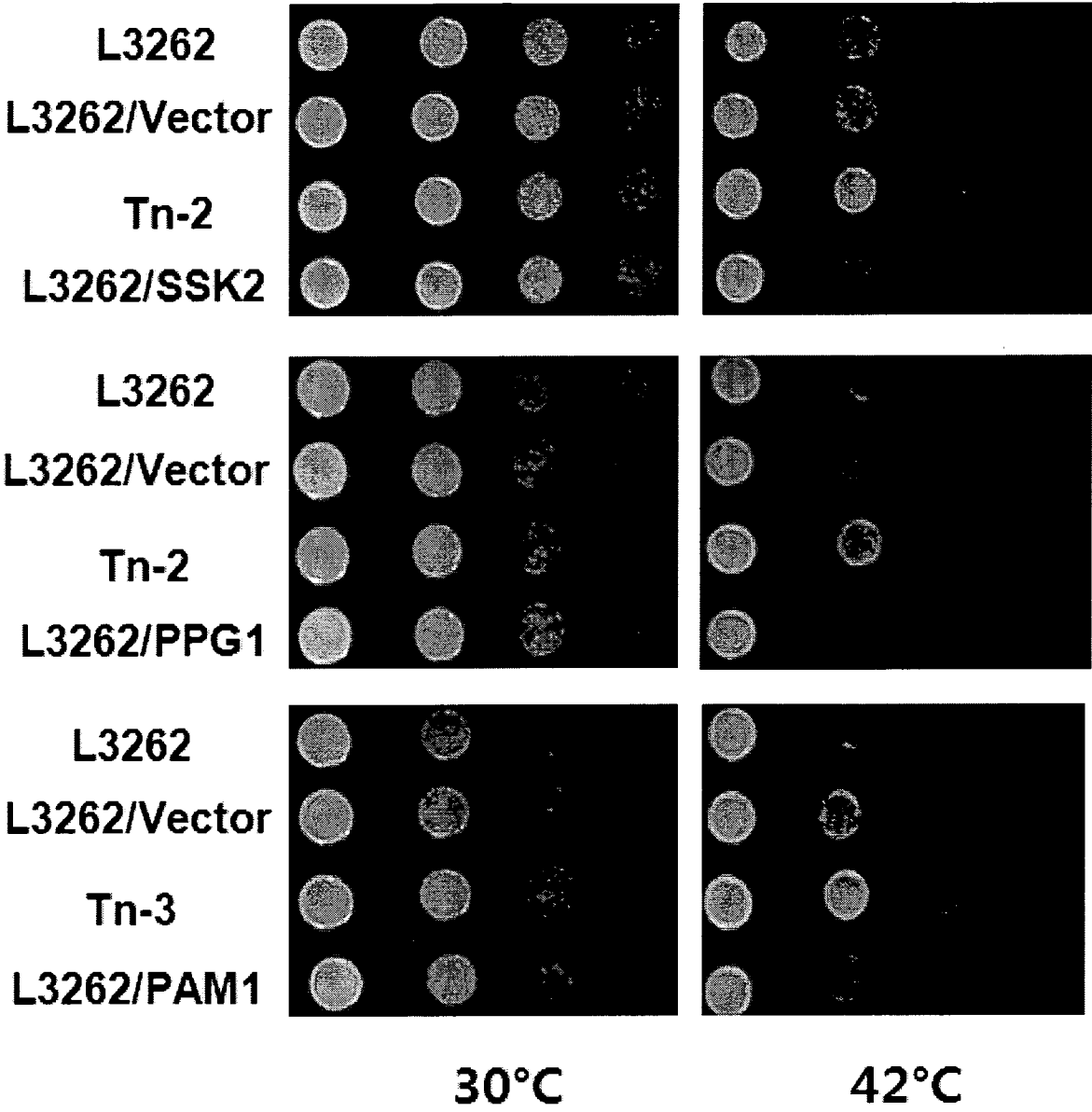
15/25

도 7b



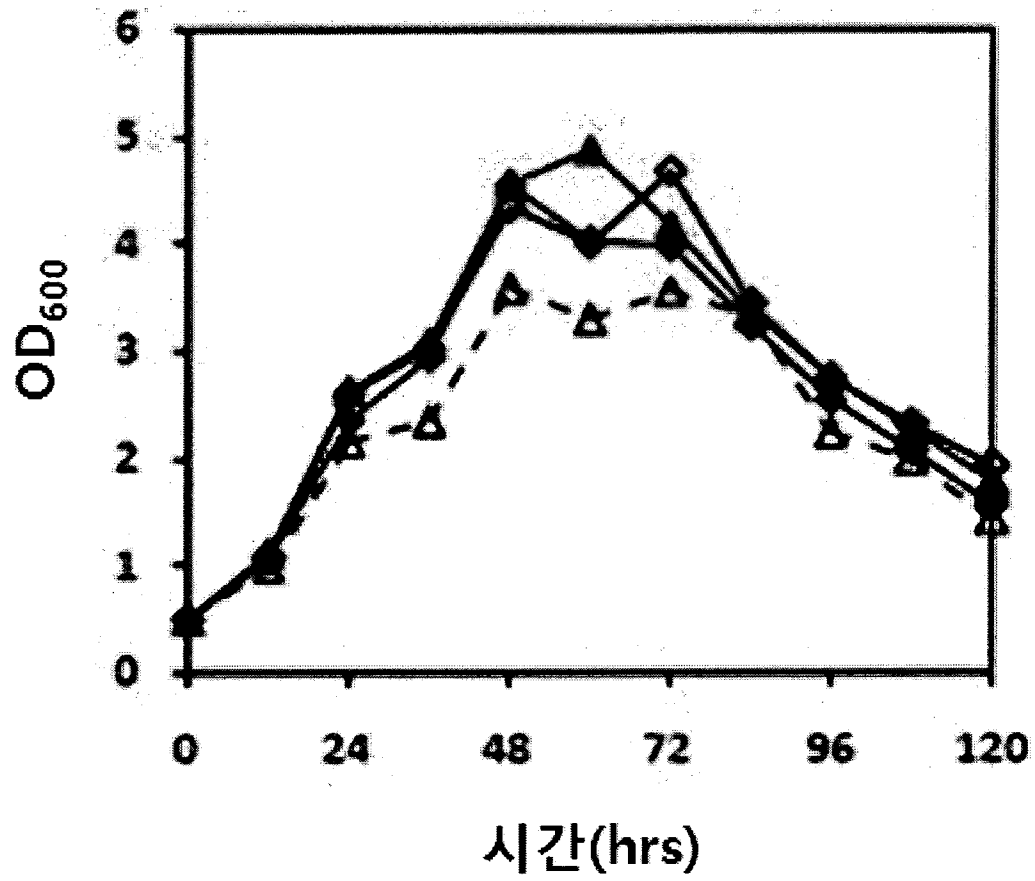
16/25

도 7c



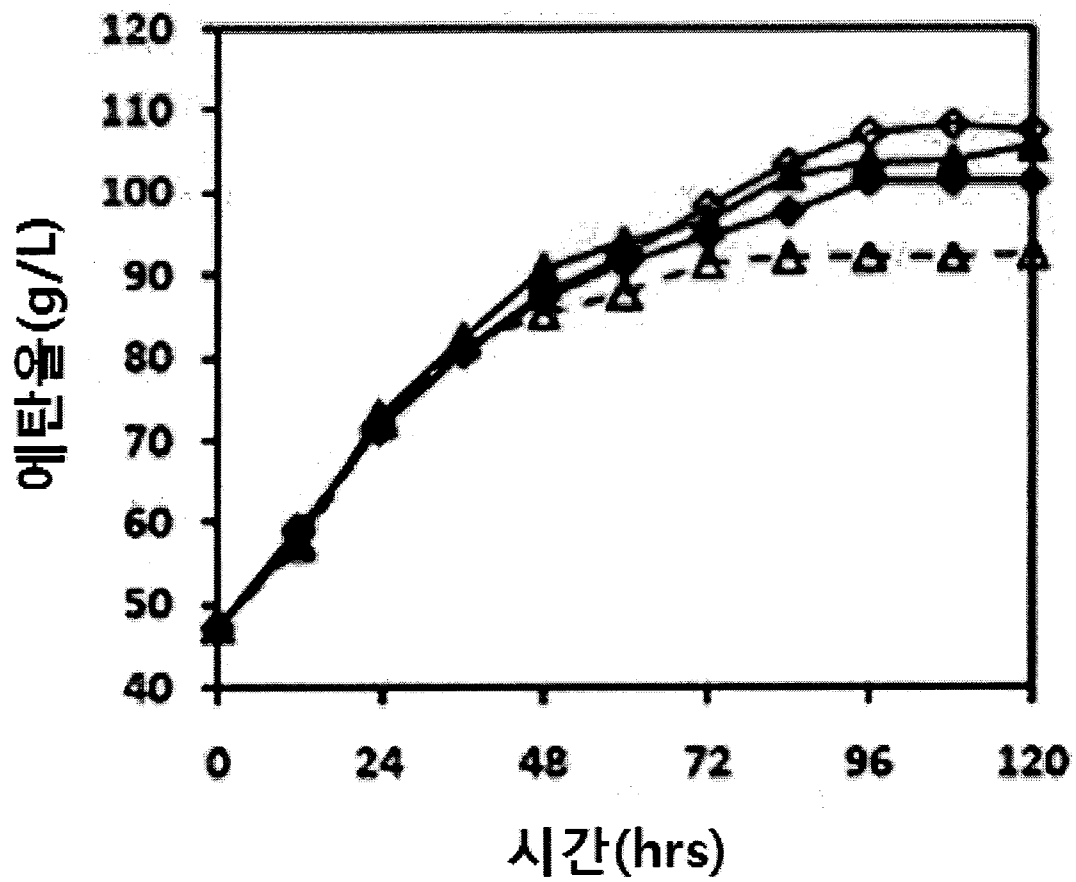
17/25

도 8a



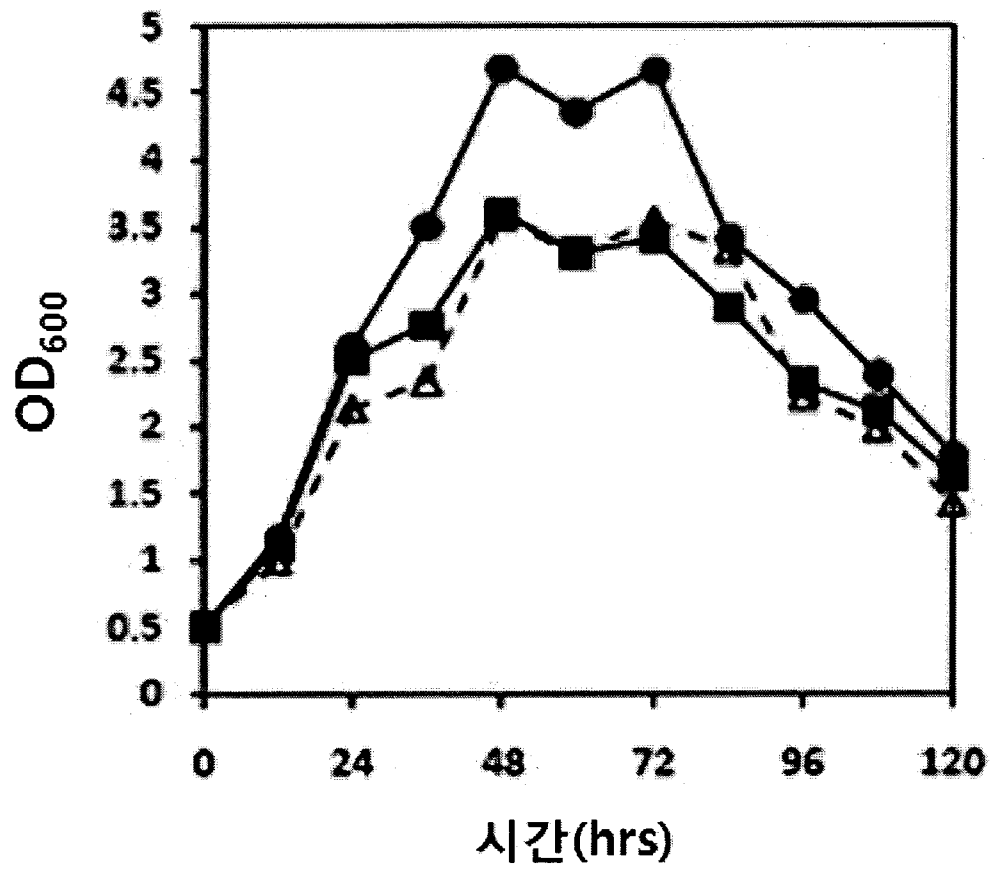
18/25

도 8b



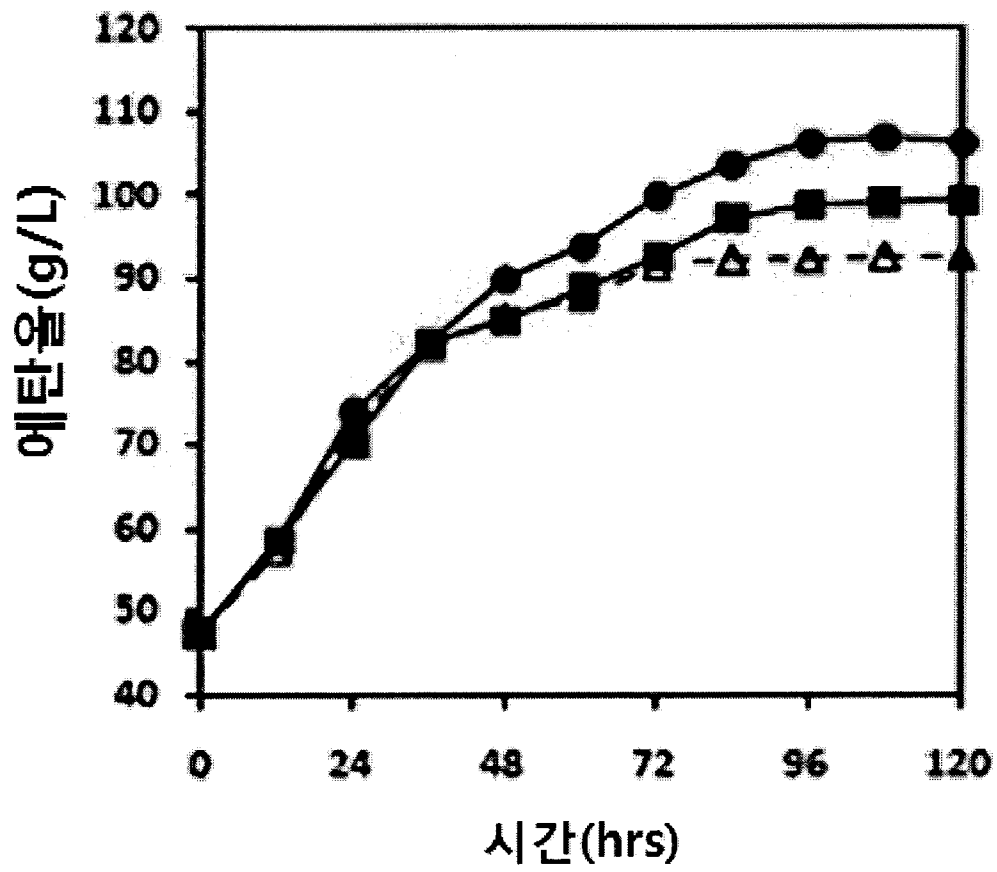
19/25

도 8c



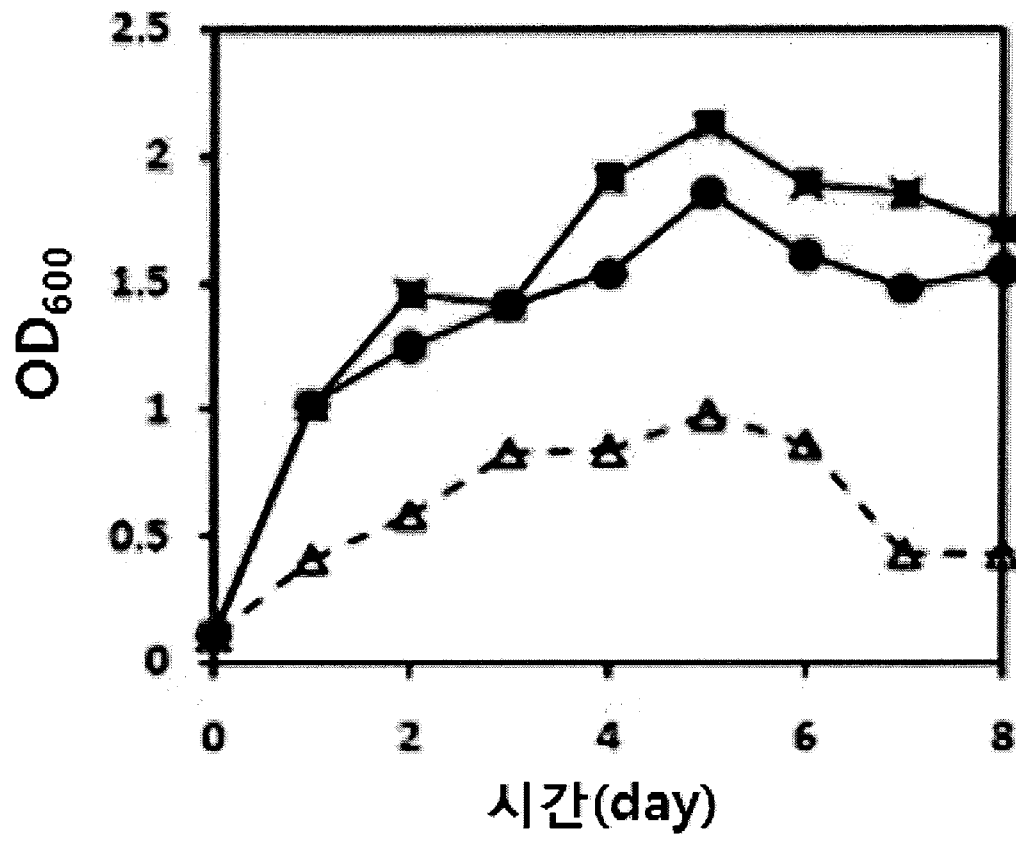
20/25

도 8d



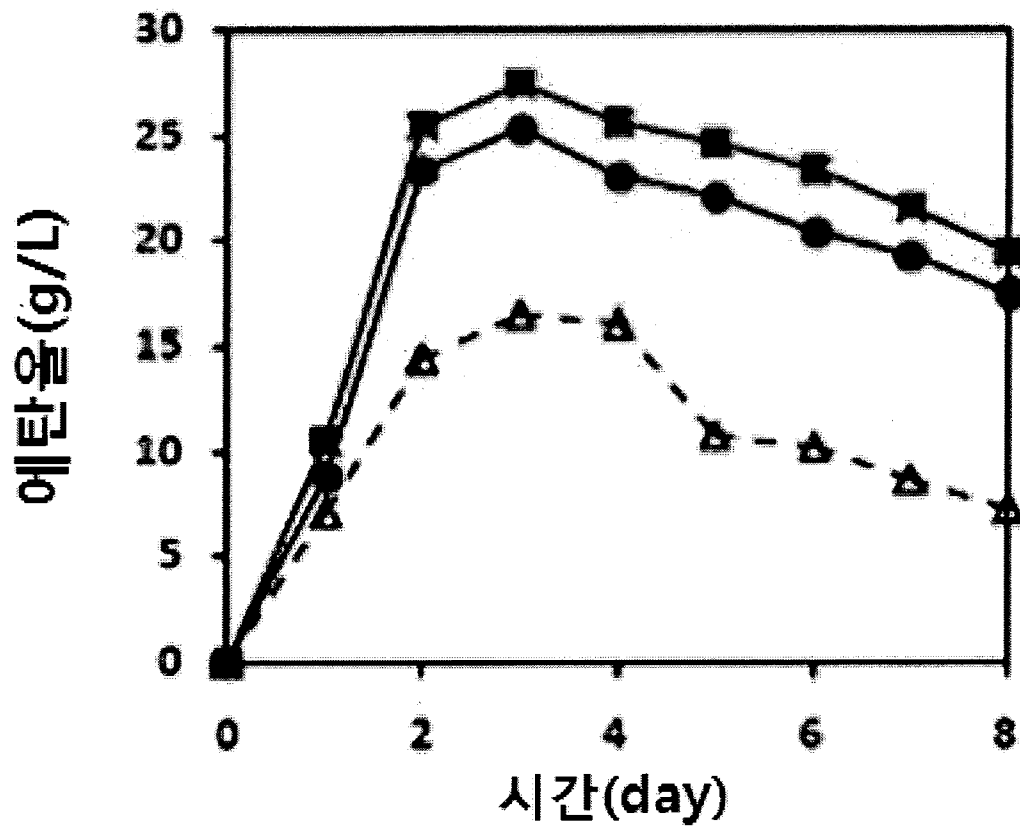
21/25

도 8e



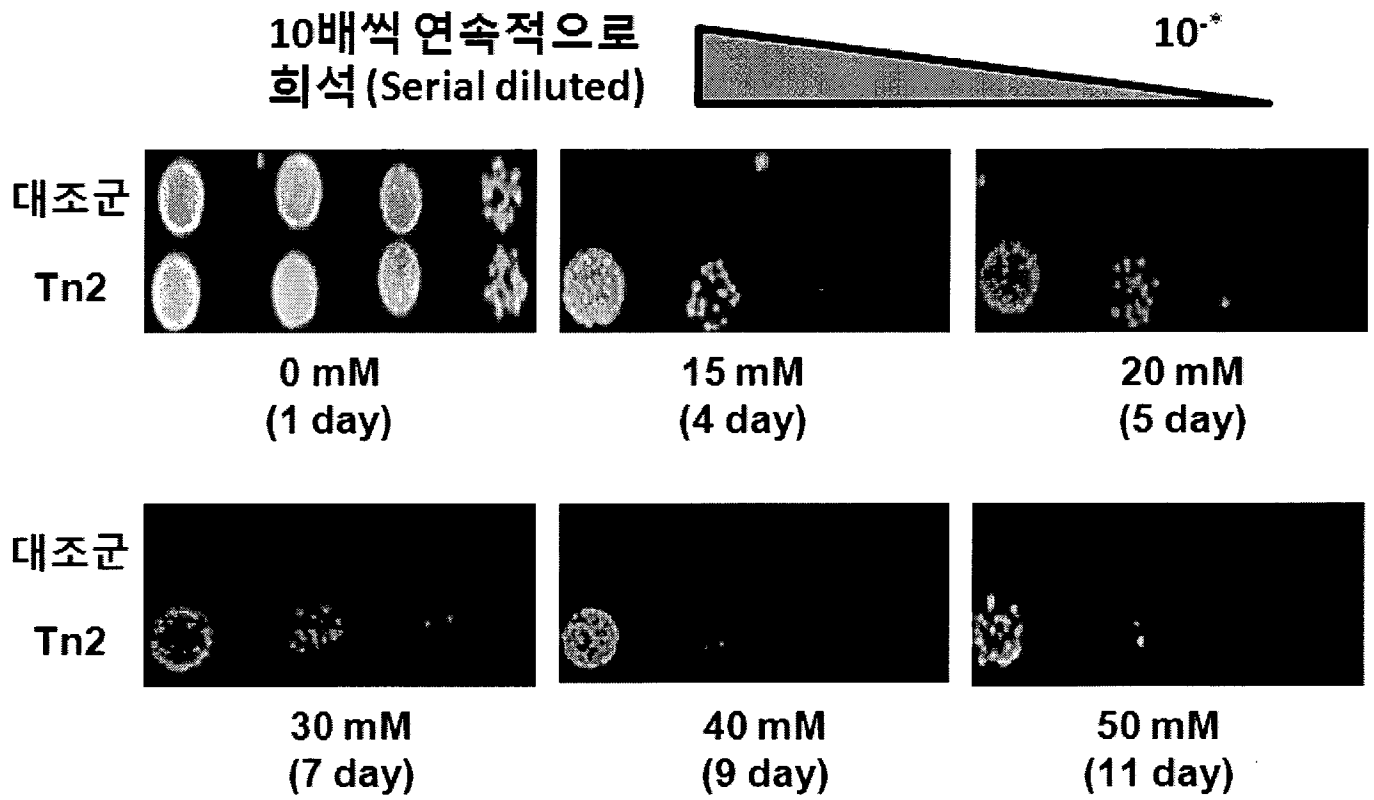
22/25

도 8f



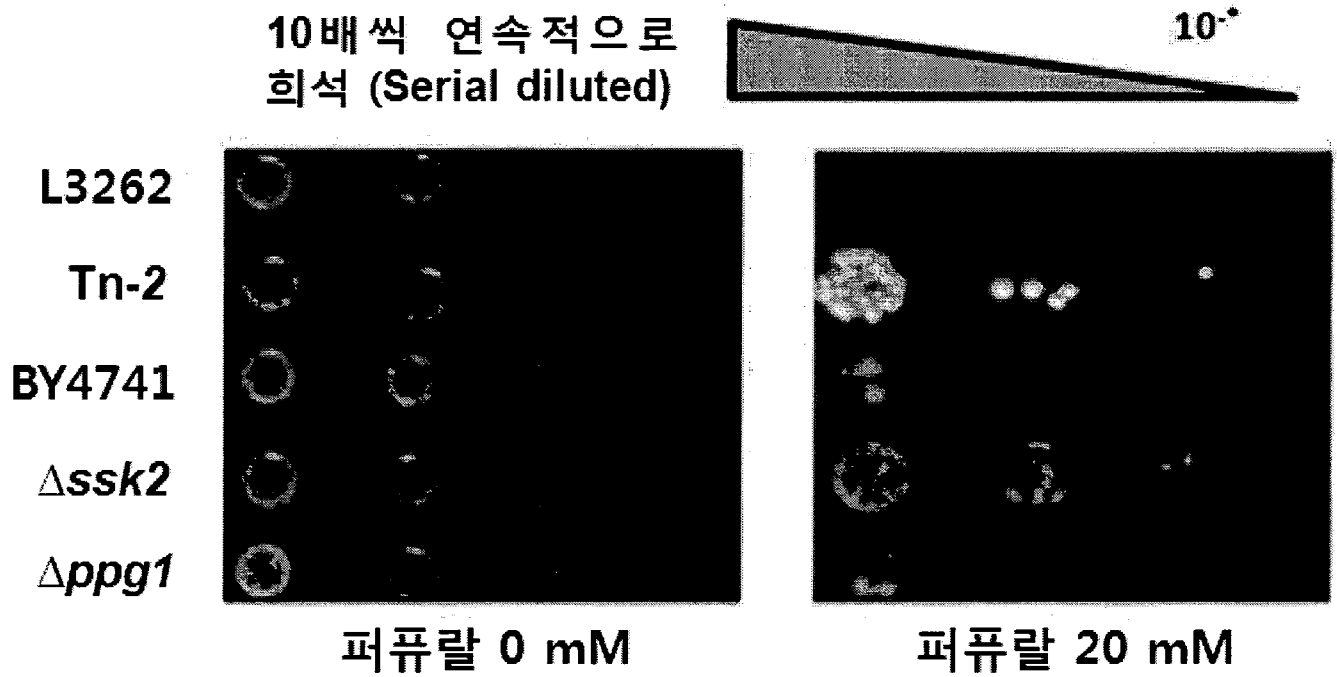
23/25

도 9



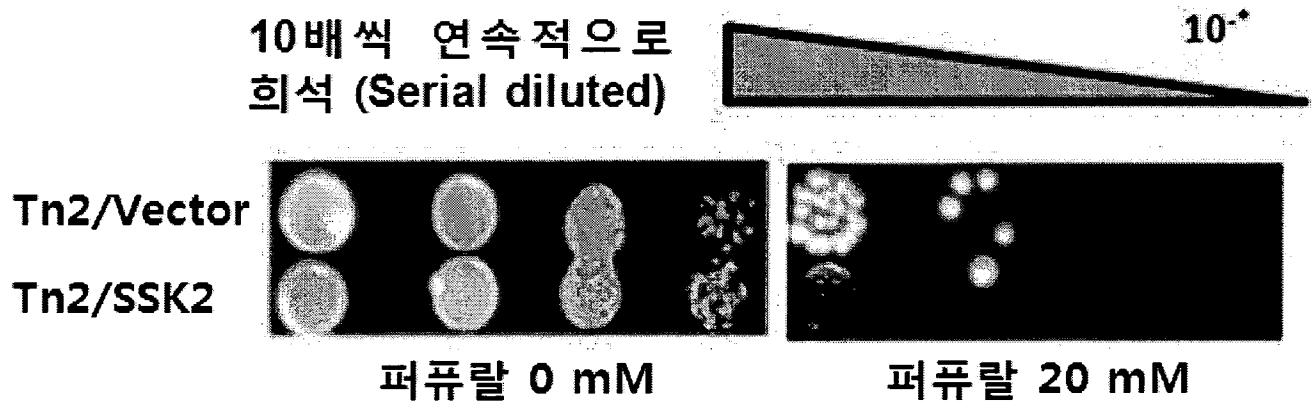
24/25

도 10



25/25

도 11



도 12

