



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1204366 호 (PATENT NUMBER) 출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2011-7019596 호
 출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2011년 08월 23일
 등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2012년 11월 19일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자의 기능을 소실시킨 재조합 사카로마이세스 세레비지애를 이용하여 자일로오스로부터 에탄올을 생산하는 방법

특허권자 (PATENTEE)
 서울대학교산학협력단(114371-0*****)
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

발명자 (INVENTOR)
 등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2012년 11월 19일



특 허 청
 COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 11월 19일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

특허청구의 범위

청구항 1

자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR) 및 자일리톨 데하이드로지나아제(xylitol dehydrogenase; XDH)를 발현할 수 있도록 형질전환되고, 자이룰로키나아제(xylulokinase; XK)를 과발현할 수 있도록 형질전환된 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 자일로오스(xylose)로부터 에탄올(ethanol)을 생산함에 있어서, 상기 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것을 특징으로 하는 에탄올 생산방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR)는 보효소(cofactor)로 NADH를 사용하는 것을 특징으로 하고, 상기 자일리톨 데하이드로지나아제(xylitol dehydrogenase; XDH)는 보효소로 NAD⁺를 사용하는 것을 특징으로 하는 에탄올 생산 방법

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자는, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPM1*, *TOR1*, *TPD3* 및 *MAF1* 중 선택되는 어느 하나의 유전자인 것을 특징으로 하는 에탄올 생산방법

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는, 아세트알데하이드(acetaldehyde)를 아세트산(acetic acid)으로 전환시키는 아세트알데하이드 데하이드로지나아제(acetaldehyde dehydrogenase) 암호화 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것을 특징으로 하는 에탄올 생산방법

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 아세트알데하이드 데하이드로지나아제 암호화 유전자는, *ALD6*인 것을 특징으로 하는 에탄올 생산방법

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 자일로오스로부터 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자의 기능을 소실시킨 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 자일로오스로부터 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 인류는 지구상에 존재하는 자원의 고갈이라는 심각한 문제에 직면하고 있다. 자원의 고갈은 환경 오염과 더불어 인류 문명에 심각한 위협이 되고 있는데, 자원 중 석유의 고갈은 특히 심각한 문제이다. 수십 년 전부터 석유의 고갈을 예측하는 보고들이 나오고 있고, 일부 보고들은 굴착기술이 아무리 발전한다 하더라도 100 ~ 150년 후에는 석유가 지구상에서 완전히 고갈될 것이라고 예측하고 있다.

[0003] 따라서, 태양력, 풍력, 원자력 등을 이용한 대체 에너지의 개발이 필요하고, 산업화하기 위한 노력이 많이 수행되어 왔는데, 원자력은 석유 더불어 지구상에 필요한 에너지의 주요 공급원 중 하나로 확실히 자리매김했고, 태

양력, 풍력 등도 점차 그 비중을 확대하고 있다.

- [0004] 하지만, 상기와 같은 원자력 등의 대체 에너지들은 전력의 생산에만 집중해 있기 때문에, 수송용 에너지 쪽에서는 여전히 석유의 비중이 높다. 이에 석유를 대체할 수 있는 수송용 원료의 개발이 왕성히 요구되는데, 현재 에탄올이 그 대안으로 각광받고 있고, 브라질 및 미국에서는 이미 석유 대체 수송용 에너지로 사용되고 있는 현실이다.
- [0005] 에탄올은 술의 주성분으로 인류는 술의 탄생과 더불어 에탄올을 음용해 오고 있는데, 종래에 석유의 가격이 낮은 저유가 시대에는 에탄올 생산에 드는 비용이 유가보다 높아 가격경쟁력이 없었으나, 점차적으로 고갈되는 석유의 매장량 및 상승 추이를 보이는 유가를 고려할 때 에탄올의 가격경쟁력은 점차 극복되고 있고, 조만간 석유의 가격경쟁력을 추월할 것이라는 보고도 있다.
- [0006] 수송용 연료로 사용되는 에탄올은 현재 사탕수수나 옥수수 등으로부터 생산되고 있는데, 사탕수수는 원당(原糖)의 원재료이고, 옥수수는 식량의 재료이기 때문에 이를 광범위하게 이용하여 에탄올을 생산할 경우, 설탕 또는 옥수수의 가격 상승을 유발시키는 부작용과 곡물을 식량이 아닌 연료의 원료 사용한다는 윤리적인 문제를 불러 일으키고 있다.
- [0007] 따라서, 사탕수수나 옥수수를 대체할 수 있는 소재의 개발이 광범위하게 연구되고 있는데, 폐목재 또는 임산 가공의 부산물 내에 다량 존재하는 자일로오스(xylose)도 유력한 후보 소재 중 하나이다.
- [0008] 자일로오스는 펄프 등의 제조시 발생하는 목재 분산물로부터 회수될 수 있어 지구상에서 반영구적으로 확보될 수 있는 소재인데, 대체재의 가격 상승을 유도하지 않고, 윤리적인 문제에서도 자유로울 수 있어, 최근에 많은 연구가 이루어지고 있다.
- [0009] 한편, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 탁주 등의 발효주 제조에서 에탄올 생성 균주로 널리 알려져 있는데, 최근에는 유용 의약품 등의 생산에 호스트로 많이 활용되고 있으며, 에탄올 생산을 위한 호스트로도 많이 연구되고 있다. 하지만, 야생형의 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 자일로오스의 대사 측면에서 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR) 및 자일리톨 데하이드로지나아제(xylitol dehydrogenase; XDH)라는 효소가 존재하지 않아 자일로오스를 대사할 수 없는 문제점이 있다.
- [0010] 따라서, 자일로오스를 대사할 수 있도록 상기 효소들을 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 내에 도입시키고자 하는 연구가 많이 수행되어 왔고, 자일로오스가 실질적으로 대사됨이 확인되었다. 이때, 대사 부산물로 에탄올이 생산되는 것도 확인되었는데, 이로부터 일부 연구자들은 대체 에너지로서 각광받는 에탄올 생산을 위한 탄소원으로 자일로오스를 주목하게 되었다.
- [0011] 하지만, 자일로오스로부터 에탄올을 생산할 경우, 생산 수율 및 생산성이 낮은 문제점이 있다. 이에 자일로오스의 균주 내 흡수율 증대 및 대사 경로 상 속도 결정 단계의 극복 등에 맞춰 낮은 생산 수율 및 생산성을 극복하고자 하는 노력이 경주되어 왔다. 하지만, 산업계에서는 더 높은 생산 수율 및 생산성을 요구하고 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하여 자일로오스로부터 에탄올을 생산할 때, 종래에 많이 연구된 속도 결정 단계의 극복을 위한 대사공학만으로는 생산 수율 및 생산성 증대에 있어 한계가 있어 왔다.
- [0013] 본 발명자들은 자일로오스로부터 에탄올 발효를 수행하는 경우 상기와 같은 한계가 발생한 이유로 세포 내에서 발생하는 신호 전달 경로에 변화로 말미암은 유전자 발현 양상의 변화를 주목하고, 영양 결핍 상태에서 작동되는 토르(Tor) 신호 전달 경로의 중간 유전자를 결손시켜 에탄올의 생산 수율 및 생산성을 향상시키고자 하였다.
- [0014] 또한, 이미 생산된 에탄올의 재흡수에 관여하는 유전자를 결손시켜 에탄올 생산 수율 및 생산성을 더욱 향상시키고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR) 및 자일리톨 데하이드로지나아제(xylitol dehydrogenase; XDH)를 발현할 수 있도록 형질전환되고, 자이룰로키나아제(xylulokinase;

XK)를 과발현할 수 있도록 형질전환된 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 자일로오스(xylose)로부터 에탄올(ethanol)을 생산함에 있어서, 상기 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것을 특징으로 하는 에탄올 생산방법을 제공한다.

[0016] 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 산업적으로 에탄올 생산 균주로 사용되지만, 자일로오스를 탄소원으로 이용하지는 못한다. 이는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR)와 자일리톨 데하이드로지나아제(xylitol dehydrogenase; XDH)를 갖고 있지 않아 자일로오스를 자일룰로오스(xylulose)로 전환하는 대사활성이 없기 때문이다.

[0017] 따라서, 자일로오스로부터 에탄올을 생산하기 위해서는 XR과 XDH 효소를 호스트에 도입해야 한다. XR과 XDH가 도입되어 형질전환된 본 발명의 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 자일로오스는 자일룰로오스로 전환되며, 자일룰로오스는 추가적으로 도입된 자일룰로키나아제(xylulokinase; XK)에 의해 자일룰로오스 5-포스페이트(xylulose 5-phosphate)로 전환되어, 5탄당 인산회로를 통해 대사가 진행된다. XK는 효모 내에 존재하는 효소이기는 하나 이를 과발현하지 않고 XR과 XDH만 균주 내로 도입하면, 자일로오스로부터 에탄올을 생산할 수는 있지만, 생산 수율 및 생산성이 현저히 낮은 문제가 있다. 이를 해소하기 위해서는 XK를 과발현시키는 것이 좋다. (도 1 참조)

[0018] 한편, 본 발명은 상기와 같이 형질전환되어 에탄올을 생산할 수 있는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에 대해 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것에 특징이 있다.

[0019] 토르 신호 전달 경로는 영양-결핍 신호 경로(Nutrient-starvation signaling pathway)로서, 균주 외부에 포도당이 부족할 경우 작동되는 회로인데, 에탄올 생산을 위한 탄소원으로 자일로오스를 사용하는 경우에도 작동된다. 본 발명에서는 토르 신호 전달 경로에 관여하는 것으로 알려진 유전자의 일부를 과쇄하거나, 전부를 제거하여 그 기능을 소실시킴으로써, 토르 신호 전달 경로(Tor signal transduction pathway)의 정상적인 작동을 막아 포도당에서 발효하는 것처럼 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 혼동시키는 것이다. 하기에서 실험한 바에 의하면 토르 신호 전달 경로에 관여하는 유전자의 기능을 소실시킨 결과, 에탄올의 생산 수율 및 생산성이 그렇지 않은 경우에 비해 향상됨을 확인할 수 있었다.

[0020] 유전자 기능을 제거하기 위한 방법으로 유전자의 일부를 과쇄하는 것은 도 2에 모식화된 상동적 재조합(homologous recombination) 방법에 의하고, 유전자 전부를 제거하는 것은 도 3에 모식화된 이중 상동적 재조합(double homologous recombination) 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0021] 한편, 본 발명에서 그 기능을 소실시키고자 하는 토르 신호 전달 경로에 관여하는 유전자는 일 예로, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPM1*, *TOR1*, *TPD3* 및 *MAF1* 중 선택되는 어느 하나의 유전자일 수 있다. (참고문헌: *Saccharomyces Genome Database*, <http://www.yeastgenome.org/>)

[0022] 한편, 본 발명에서 사용되는 자일로오스 리덕타아제(XR)는 보조소로 NADPH를 사용하는 것이 일반적이고, 자일리톨 데하이드로지나아제(XDH)는 보조소로 NAD^+ 를 사용하는 것이 일반적이다. 다만, NADPH가 아닌 NADH 의존성 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase; XR)를 사용하면, 자일로오스 리덕타아제(XR) 및 자일리톨 데하이드로지나아제(XDH) 간에 NADH 및 NAD^+ 의 커플링이 형성되어 보조소 공급 장애로 말미암은 생산성의 하락을 극복할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 보조소로 NADH를 사용하는 자일로오스 리덕타아제(XR)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 한편, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 추가적으로 아세트알데하이드(acetaldehyde)를 아세트산(acetic acid)으로 전환시키는 아세트알데하이드 데하이드로지나아제(acetaldehyde dehydrogenase) 암호화 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 과쇄되거나, 유전자 전부가 제거된 것이 좋은데, 부산물인 아세트산의 생성을 막아 고수율 및 고생산성으로 에탄올을 생산할 수 있기 때문이다. 이때, 상기 아세트알데하이드 데하이드로지나아제 암호화 유전자는 일 예로 *ALD6*일 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명의 명세서에서 유전자명은 이탤릭체로 기울여 기재하기로 하고, 단백질명은 정자체로 세워서 기재하기로 한다.

발명의 효과

[0025] 토르(Tor) 신호 전달 경로에 관여하는 유전자의 기능이 소실되도록 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용함으로써, 에탄올 생산 수율 및 생산성이 향상되고, 부산물인 아세트산의 생산을 매개하는 아세트알데하이드 데하이드로지나아제를 추가적으로 제거함으로써, 에탄올을 더욱 더 높은 수율 및 생산성으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 자일로오스로부터 에탄올의 생성 과정을 보여주는 흐름도이다.
 도 2는 상동적 재조합 방법에 의해 목적 유전자가 파쇄되는 과정을 보여주는 모식도이다.
 도 3은 이중 상동적 재조합 방법에 의해 목적 유전자가 제거되는 과정을 보여주는 모식도이다.
 도 4는 SX3 균주, SX3:: $\Delta pph21$ 균주, SX3:: $\Delta pph22$ 균주 및 SX3:: $\Delta pph3$ 균주의 발효 결과이다.
 도 5는 SX3 균주, SX3:: $\Delta pph21$ 균주, SX5:: $\Delta ald6$ 균주 및 SX3:: $\Delta pph21::\Delta ald6$ 균주의 발효 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**

[0028] 이하, 상기 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0029] **실시예 1: 형질전환 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주들의 제작**

[0030] 본 실시예에서는 하기 실시예에서 사용될 재조합 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 제조하였다.

[0031] 본 실시예에서 상세하기 기재하지 않은 유전자 재조합 및 형질전환체 제작방법 등은 당업계인 유전공학계에 널리 알려진 공지의 사실이기 때문에 이에 대한 기술은 생략하기로 한다.

[0032] 한편, PPH21, PPH22, PPH3 및 ALD6는 도 2에 모식된 상동적 재조합 방법(Burke, Dawson et al., Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 2000)으로 그 기능을 제거하였고, 그 PPM1, TOR1, TPD3 및 MAF1는 도 3에 모식된 이중 상동적 재조합 방법(Burke, Dawson et al., Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 2000)에 의해 그 기능을 제거하였다.

[0033] 도 2에 기재된 유전자 파쇄 방법에 의할 경우, 파쇄하고자 하는 유전자(ORFs)는 상동적 재조합에 의해 ORF'과 R'Fs의 두 가지 형태로 염색체 내에 재조합되는데, 완벽한 형태의 ORFs가 형성되지 않아 두 형태 중 어느 것도 ORFs로 발현되지 않게 되지 않고, 결국 균주 내에서 ORFs는 그 기능이 제거되는 것이다.

[0034] 도 3에 기재된 유전자 제거 방법에 의할 경우, 제거하고자 하는 유전자(ORFs)의 앞쪽 500 bp와 뒤쪽 500bp를 클로닝한 후, 그 사이에 마커(*AURI-C*)를 넣어 핵산 절편을 제조하고, 이를 균주 내에 삽입함으로써, ORFs의 앞, 뒤에서 상동적 재조합을 유도하는데, 이로 말미암아 ORFs는 제거되고, 그 자리는 마커가 대신하게 된다.

[0035] 한편, 본 실시예에서 호스트로 사용된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2는 일본 교토대의 마키노 교수로부터 분양받아 사용하였다. (Seiya Watanabe, Ahmed Abu Saleh, Seung Pil Pack, Narayana Annaluru, Tsutomu Kodaki and Keisuke Makino, 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. Microbiol.153:3044-3054).

[0036] 벡터인 YEpM4XR(WT), YEpM4XR(R276H) and pPGKXDH(WT) 역시 일본 교토대의 마키노 교수로부터 분양받아 사용하였는데, 야생형의 XR에 대해 점 돌연변이를 주어 돌연변이된 XR(R276H) 효소는 야생형에 비해 NADPH보다 NADH에 대해 친화력이 더 높은 특성이 있다. (Seiya Watanabe, Ahmed Abu Saleh, Seung Pil Pack, Narayana Annaluru, Tsutomu Kodaki and Keisuke Makino, 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. Microbiol.153:3044-3054).

[0037] YIpXR^{WT}-XDH^{WT} 및 YEpM4XR(R276H)제작에 사용된 모벡터인 YIp5 및 ISXK는 전 서울대학교 연구원 이태희로부터 분양받아 사용하였다. (이태희 저, Metabolic engineering studies on production of ethanol from xylose by

recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, 서울대학교 석사학위 논문, 2000).

[0038] 유전자 과쇄에 사용된 pAUR101와 유전자 제거에 사용된 pET-26b(+)는 다카라(Takara, Japan)에서 판매되고 있는 벡터이고, PPH21, PPH22, PPH3, PPM1, TOR1, TPD3, MAF1 및 ALD6 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) CEN.PK2-1D로부터 클로닝해서 사용하였다.

[0039] 하기의 표 1은 본 실시예에서 제작된 균주 및 그 유전형이다. 이중 일부는 하기 실시예에서 발효 균주로 사용되었다.

표 1

본 실시예에서 제작된 균주

균주	유전형	사용된 플라스미드
D452-2	<i>Mata, leu2 his3 ura3 can1</i>	
D452-2/pXR ^{WT} /pXD H	D452-2, <i>ura3::URA3,leu2::LEU2</i> YEpM 4XR(WT),pPGKXDH(WT)	YEpm4XR(WT), pPGKXDH(WT)
D452-2/pXR ^{MUT} /pX DH	D452-2, <i>ura3::URA3,leu2::LEU2</i> ,YEpM 4XR(R276H),pPGKXDH(WT)	YEpm4XR(R276H), pPGKXDH(WT)
D452-2/YIpXR ^{WT} -X DH	D452-2, <i>ura3::URA3</i> P _{PGK} - <i>XYL1</i> ^{WT} -T _{PGK} ,P _{PGK} - <i>XYL2</i> ^{WT} -T _{PGK}	YIpXR ^{WT} -XDH ^{WT}
SX2	D452-2, <i>ura3::URA3</i> P _{PGK} - <i>XYL1</i> ^{MUT} -T _{PGK} ,P _{PGK} - <i>XYL2</i> ^{WT} -T _{PGK}	YIpXR ^{R276H} -XDH ^{WT}
SX3	SX2, <i>Ty1-delta::P_{GPD}-XKS1-T_{GPD}-neo^r</i>	delta ISXX
SX3:: <i>Δppm1</i>	SX3, <i>PPM1::AUR1_C</i>	pET-26b(+)
SX3:: <i>Δtor1</i>	SX3, <i>TOR1::AUR1_C</i>	
SX3:: <i>Δtpd3</i>	SX3, <i>TPD3::AUR1_C</i>	
SX3:: <i>Δmaf1</i>	SX3, <i>MAF1::AUR1_C</i>	
SX3:: <i>Δpph21</i>	SX3, <i>PPH21::pAUR_d_PPH21</i>	
SX3:: <i>Δpph22</i>	SX3, <i>PPH22::pAUR_d_PPH22</i>	pAUR101
SX3:: <i>Δpph3</i>	SX3, <i>pph3::pAUR_d_PPH3</i>	
SX3:: <i>Δald6</i>	SX3, <i>ALD6::pAUR_d_ALD6</i>	
SX3:: <i>Δpph21::Δald6</i>	SX3:: <i>Δpph21, ALD6::p425_d_ALD6</i>	

1) WT: 야생형(wild type)을 의미2) MT: 돌연변이(mutant)를 의미

[0040]

[0041] SX2는 XR^{MUT}와 XDH가 상동적 재조합(homologous recombination) 방식에 의해 염색체 내에 삽입된 균주이고, SX3는 SX2에 대해 에탄올 생산성을 증대시키고자 XK를 추가적으로 염색체 상의 델타 시퀀스 내에 삽입한 것이다.

[0042] 'SX3::*Δppm1*' 균주는 SX3 균주에서 PPM1 유전자를 제거한 균주이고, 'SX3::*Δtor1*' 균주는 SX3 균주에서 TOR1 유전자를 제거한 균주이며, 'SX3::*Δtpd3*' 균주는 SX3 균주에서 TPD3 유전자를 제거한 균주이고, 'SX3::*Δmaf1*' 균주는 SX3에서 MAF1 유전자를 제거한 균주이며, 'SX3::*Δpph21*' 균주는 SX3에서 PPH21 유전자를 제거한 균주이고, 'SX3::*Δpph22*'는 SX3에서 PPH22 유전자를 제거한 균주이며, 'SX3::*Δpph3*' 균주는 SX3에서 PPH3 유전자를 제거한 균주이고, 'SX3::*Δald6*' 균주는 SX3에서 ALD6 유전자를 제거한 균주이다. 'SX3::*Δpph21::Δald6*' 균주는 SX3에서 PPH21 및 ALD6 유전자를 제거한 균주이다.

[0043] 실시예 2: 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3::*Δpph21* 균주, SX3::*Δpph22* 균주 및 SX3::*Δpph3* 균주를 이용하여 에탄올 발효

[0044] 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3:: $\Delta pph21$ 균주, SX3:: $\Delta pph22$ 균주, SX3:: $\Delta pph3$ 균주를 이용하여 에탄올 발효를 수행하였다.

[0045] 발효는 1L 크기의 멀티 발효조(KF-1L, 'Kobiotech.'사 제조)를 사용하였으며, 운전 부피는 500 mL이었다. 발효조의 온도는 30°C로 유지하였고, 발효액의 pH는 5.5로 유지하였다. 200 rpm으로 교반하였고, 0.05 vvm으로 에어레이션(aeration)을 수행하였다. 초기 균주 접종 농도는 OD₆₀₀으로 8이었다.

[0046] 발효 결과는 하기 표 2와 같았다(도 4 참조).

표 2

균주	자일로오스 소모 속도(xylose consumption rate) (g/L·hr)	최종 에탄올 농도(final ethanol concentration) (g/L)	에탄올 생산성(g/L·hr)	수율(g 생산물/g 자일로오스)		
				에탄올	자일리톨	글리세롤
SX3	0.25	5.45	0.08	0.30	0.07	0.03
SX3:: $\Delta pph21$	0.39	10.41	0.13	0.37	0.14	0.05
SX3:: $\Delta pph22$	0.31	6.39	0.09	0.29	0.12	0.04
SX3:: $\Delta pph3$	0.31	6.14	0.09	0.27	0.11	0.03

[0047]

[0048] 상기의 표 2에 나타난 바와 같이, 자일로오스 소모 속도, 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성이 SX3 균주에 비해 SX3:: $\Delta pph21$ 균주, SX3:: $\Delta pph22$ 균주, SX3:: $\Delta pph3$ 균주에서 공히 상승했으며, 특히 SX3:: $\Delta pph21$ 균주는 SX3 균주에 비해 자일로오스 소모 속도가 1.6배, 최종 에탄올 농도가 1.9배, 에탄올 생산성이 1.9배나 증가하였다.

[0049] 실시예 3: 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3:: $\Delta ppm1$ 균주, SX3:: $\Delta tor1$ 균주, SX3:: $\Delta tpd3$ 균주 및 SX3:: $\Delta maf1$ 균주를 이용하여 에탄올 생산

[0050] 발효 균주로 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3:: $\Delta ppm1$ 균주, SX3:: $\Delta tor1$ 균주, SX3:: $\Delta tpd3$ 균주 및 SX3:: $\Delta maf1$ 균주를 이용하여 에탄올 발효를 수행하였다. 발효 균주를 제외한 나머지 발효 조건은 상기 실시예 2와 동일하게 하였다.

[0051] 발효 결과는 하기 표 3과 같았다.

표 3

균주	자일로오스 소모 속도(xylose consumption rate) (g/L·hr)	최종 에탄올 농도(final ethanol concentration) (g/L)	에탄올 생산성(g/L·hr)	수율(g 생산물/g 자일로오스)		
				에탄올	자일리톨	글리세롤
SX3	0.25	5.45	0.08	0.30	0.07	0.03
SX3:: Δ ppm1	0.43	7.60	0.11	0.25	0.12	0.04
SX3:: Δ tor1	0.31	6.70	0.09	0.30	0.18	0.03
SX3:: Δ tpd3	0.29	6.54	0.09	0.32	0.17	0.05
SX3:: Δ maf1	0.40	8.19	0.11	0.29	0.14	0.04

[0052]

[0053]

상기의 표 3에 나타난 바와 같이, 자일로오스 소모 속도, 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성이 SX3 균주에 비해 SX3:: Δ ppm1 균주, SX3:: Δ tor1 균주, SX3:: Δ tpd3 균주 및 SX3:: Δ maf1 균주에서 공히 상승했다.

[0054]

실시예 4: 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3:: Δ pph21 균주, SX5:: Δ ald6 균주 및 SX3:: Δ pph21:: Δ ald6 균주를 이용하여 에탄올 발효

[0055]

발효 균주로 상기 실시예 1에서 제작한 균주 중 SX3 균주, SX3:: Δ pph21 균주, SX5:: Δ ald6 균주 및 SX3:: Δ pph21:: Δ ald6 균주를 이용하여 에탄올 발효를 수행하였다. 발효 균주를 제외한 나머지 발효 조건은 상기 실시예 2와 동일하게 하였다.

[0056]

발효 결과는 표 4와 같았다(도 5 참조).

표 4

균주	자일로오스 소모 속도(xylose consumption rate) (g/L·hr)	최종 에탄올 농도(final ethanol concentration) (g/L)	에탄올 생산성(g/L·hr)	건조 균주 무게(dry cell weight)(g/L)	수율(g 생산물/g 자일로오스)	
					에탄올	자일리톨
SX3	0.25	5.45	0.08	3.08	0.30	0.07
SX3:: Δ pph21	0.39	10.41	0.13	5.28	0.37	0.14
SX5:: Δ ald6	0.26	6.13	0.09	2.82	0.32	0.16
SX3:: Δ pph21:: Δ ald6	0.46	9.58	0.13	6.90	0.29	0.04

[0057]

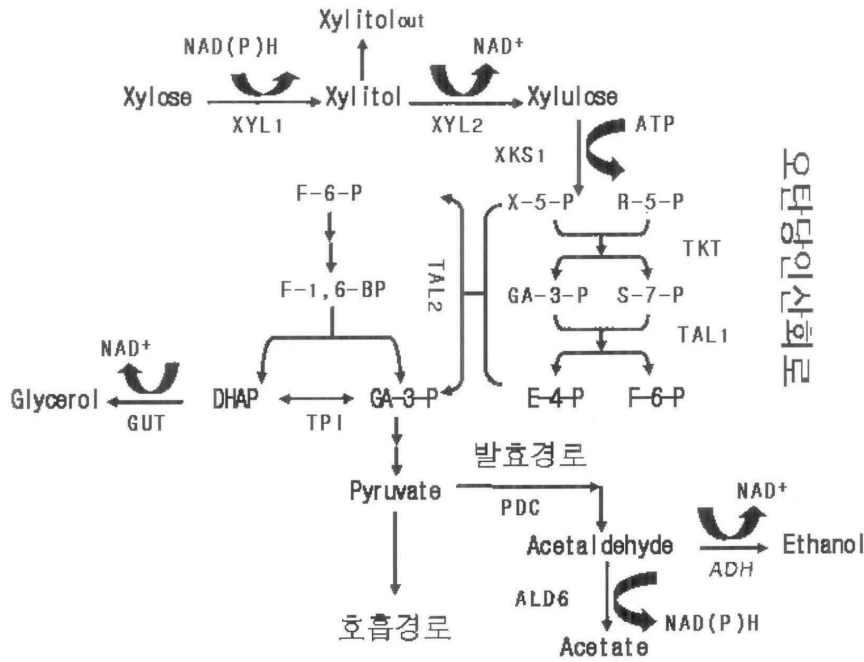
[0058]

상기의 표 4에 나타난 바와 같이, SX3:: Δ pph21:: Δ ald6 균주가 자일로오스 소모 속도, 최종 에탄올 농도 및 에

탄올 생산성에 있어, SX3 균주 및 SX3:: $\Delta pph21$ 에 비해 높게 나타났다. 특히, SX 균주 대비 SX3:: $\Delta pph21$:: $\Delta ald6$ 균주의 자일로오스 소모 속도는 1.84배, 최종 에탄올 농도는 1.76배, 에탄올 생산성은 1.76배 향상됐다.

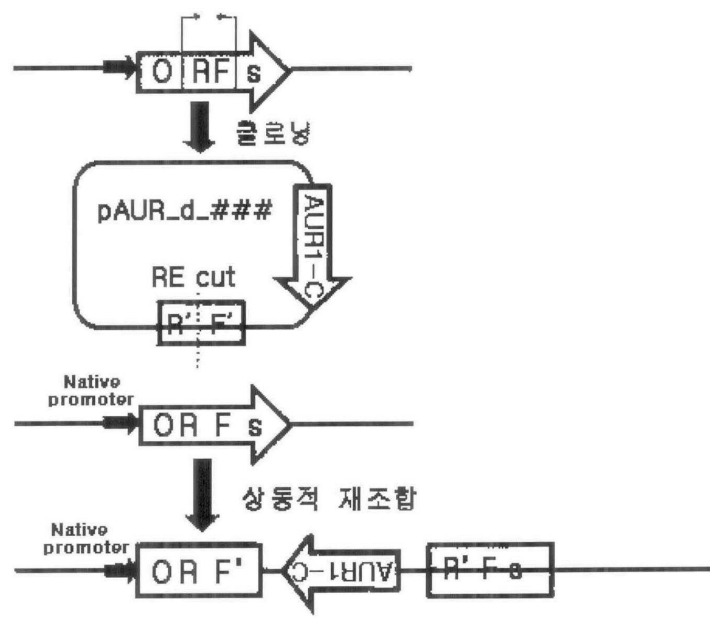
도면

도면1

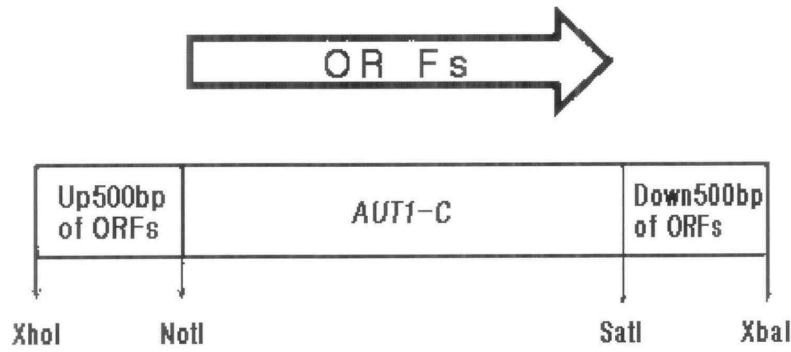


오터담의사회권

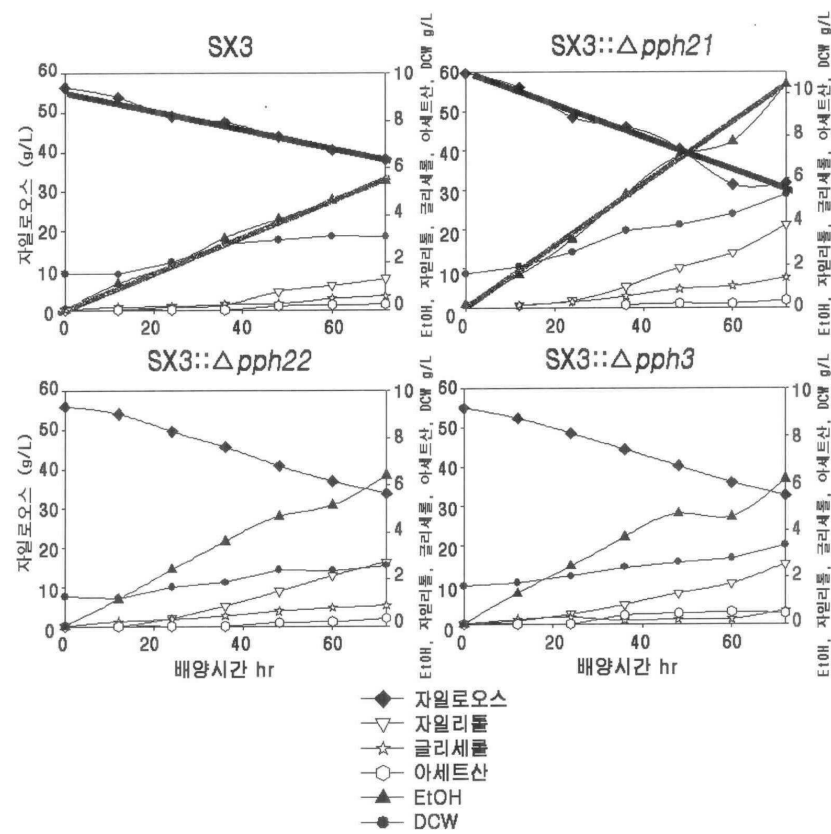
도면2



도면3



도면4



도면5

