

Lab창의과제 최종보고서

조류 바이오매스로부터 신규 당화효소를 이용한
가수분해물 생산 기술 개발

2014. 2. 21.

한 국 해 양 과 학 기 술 원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “조류 바이오매스로부터 신규 당화효소를 이용한 가수분해물 생산 기술 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2014. 2.

총괄연구책임자 : 오 철 홍

참 여 연 구 원 : 김 지 형

“ : 이 수 진

“ : 권 영 경

“ : 김 주 연

보고서 초록

과제고유 번호		해당단계 연구기간	2013.01.01 - 2013.12.31	단계 구분	
연구사업명	중사업명				
	세부사업명				
연구과제명	대과제명	Lab 창의과제			
	세부과제명	조류 바이오매스로부터 신규 당화효소를 이용한 가수분해물 생산 기술 개발			
연구책임자	오 철 홍	해당단계 참여연구원수	총 : 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 5 명 내부: 1 명 외부: 4 명	총 연구비	정부: 85,000천원 기업: 천원 계 : 85,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원/ 해의생물자원연구센터		참여기업명		
국제공동연구 위탁연구					
요약				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오매스의 선정은 에탄올 생산에 이용할 수 있는 당의 세포내 함량, 높은 성장성, 전처리 효율성, 부산물 활용도 등을 분석하여 최종 남조류 2종 (<i>Spirulina maxima</i>, <i>Leptolyngbya</i> sp.)을 선정 ▪ 선정된 바이오매스의 당 함량 및 조성을 분석 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Spirulina maxima</i>, <i>Leptolyngbya</i> sp.의 일반성분 및 단당 조성 분석 ▪ 다양한 전처리 방법에 따른 효소 가수분해 효율 분석 - 부산물 미활용시 염산 및 황산 처리에 의해 가수분해 시간을 단축시킬 수 있음 - 부산물 활용시 물에 의한 고온고압 가수분해 후 글리코젠 분해 효소 처리가 효율성이 높음 ▪ 당화효소 개발을 위한 <i>Leptolyngbya</i> 의 유전체 분석 - 유전체 길이 6.1Mbp, 단백질 코딩 유전자원 5,516개, Gene Ontology (GO) 분석 ▪ <i>Leptolyngbya</i>로부터 글리코젠 분해 관련 신규 당화효소 유전자원 15개 확보 - glycogen debranching enzyme, alpha-amylase, glycogen phosphorylase, phosphoglucomutase ▪ 해양미생물로부터 글리코젠 분해 관련 신규 당화효소 유전자원 17개 확보 - alpha-amylase, alpha-glucosidase ▪ 당화효소 유전자원 활용 재조합 단백질 생산 5건 - glycogen debranching enzyme, alpha-amylase, glycogen phosphorylase 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	조류, 당화효소, 전처리, 재조합 단백질, 글리코젠			
	영 어	algae, saccharification enzyme, pre-treatment, recombinant protein, glycogen			

요 약 문

I. 제 목

조류 바이오매스로부터 신규 당화효소를 이용한 가수분해물 생산 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 바이오 에탄올 생산 공정은 전처리-당화-발효-증류 과정을 거쳐 생산된다. 이 중 당화 과정은 주로 효소 반응에 의해 의존하게 되는데 생물원료에 따라 그에 맞는 효소를 사용해야만 에탄올 전환에 필요한 당을 얻어낼 수 있음. 현재 바이오 에탄올 생산용 효소 개발 및 판매는 덴마크의 Novozyme 회사에서 전 세계 물량의 대부분을 주도 하고 있음.
- 선진 각국에서는 고부가가치의 효소를 재조합 단백질 생산 기술을 이용하여 다양한 생물의 유전자들을 특정 숙주에서 발현시켜 저비용으로 재조합 단백질을 대량 생산하고자 하는 기술개발 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 고부가가치의 효소 산업을 위해 다양한 종류의 숙주세포와 발현백터를 개발하고 특허화하여 많은 기술들을 독점적으로 보호하고 있음. 국내에서 또한 많은 연구자들이 다양한 재조합 단백질들을 생산하고 있으나, 거의 대부분이 산업적 접근을 이루지 못하고 있음. 그 이유로서 효소가 가지는 활성 또는 효소 특성이 산업적 수준에 이르지 못하거나 주로 일반화된 정제 기술들을 사용하기 때문에 정제 비용이 높게 형성되고 있기 때문임. 즉, 활성이 높은 효소를 발굴하고 저비용으로 대량생산하는 것이 산업적 접근을 위한 핵심이라 할 수 있음. 본 연구는 바이오에탄올 생산 공정에 필요한 효소를 자체 개발하여 해조류 및 미세조류 등의 생물원료를 토대로 바이오에탄올을 생산할 수 있는 기반을 마련하고자 함. 이러한 효소가 산업적으로 맞게 개발했을 시 앞으로 발전하고 있는 바이오에탄올 산업의 국내 자체 수급이 가능해지며, 국제적으로도 경쟁력을 갖추어 국내에서 처음으로 산업용 효소 시장에 나아갈 수 있는 토대를 마련할 수 있음.
- 미세조류는 성장 속도가 아주 빠르고 높은 중성지방을 함유하는 종들이 발견되면서 바이오디젤 연구에 각광을 받고 있다. 이들의 세포벽 또한 식물과 마찬가지로 셀룰로오스를 주 구성 성분으로 하고 있고 세포내에 전분 또는 글리코겐 형태로 에너지를 저장하고 있는 종들도 발견되면서 바

- 이오디젤과 더불어 바이오에탄올 연구에 동시 접목이 가능할 것으로 보여 짐.
- 당화 효소 상용화를 위해 필요한 기술 요소
 - 당 분해 능력이 높아야 함 : 고효성을 나타내는 당화효소 발굴
 - pH 및 열 안정성과 같은 특성을 향상 시켜야 함 : 전처리공정에 따른 적합한 효소를 발굴하거나 효소특성을 개량해 목적에 맞는 효소를 확보할 필요성이 있음.
 - 용도에 따른 최적 pH 조건 : 현재 많이 사용하고 있는 산전처리를 사용할 경우 당화과정도 효소가 산성에서 활성이 높아야 유리함. 만약 당화와 발효과정을 동시에 수행하는 과정을 도입할 경우 발효 미생물이 성장할 수 있는 pH (일반적으로 중성)에서 활성이 높아야 함.
 - 효소를 저비용으로 대량 생산할 수 있어야 함 : 재조합 단백질 생산, 신호서열을 이용한 숙주 분비 시스템 개발, 고발현 시스템 개발 등을 통해 저비용·고효율로 효소를 생산할 필요성이 있음.
 - 가장 경쟁력 있는 효소 시스템들의 개발은 바이오매스를 바이오연료로 전환시키는 공정의 경제성을 확보하는데 필수적인 요소로 작용함. 여러 조건에서 높은 활성을 가지는 다양한 효소들을 개발하고 생산비용을 기존 국외의 기업보다 낮출 수 있는 방법을 개발했을 때, 비로소 효소시장에서의 경쟁력을 키울 수 있으며, 안으로는 저렴한 가격에 자체 효소 공급을 원활히 하고 밖으로는 새로운 효소 산업 육성을 통한 수출 효과를 기대할 수 있음.
 - 화석 연료의 대체제로 이용되고 있는 바이오 에탄올 시장은 세계 제일의 바이오연료로서 브라질, 미국, EU 등을 중심으로 매년 빠르게 성장하고 있고 그에 따른 효소 시장도 빠른 폭으로 증가할 것으로 예상됨.
 - 바이오에탄올 생산을 위한 효소 개발은 주로 에탄올 생산에 필요한 전처리나 당화 과정에 쓰일 수 있고, 그 외에도 기능성 식품 및 화장품, 의약품, 산업용 세제, 동물 사료 개발, 식품 발효, 섬유, 펄프 산업 등에도 다양하게 사용되어질 수 있어, 산업 전반의 발전을 기대할 수 있음.

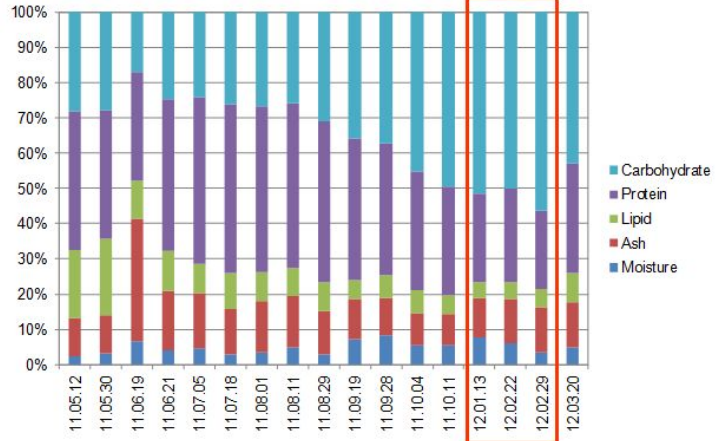
III. 연구개발의 내용 및 범위

- 성장률, 발효 당 함량, 부산물 활용 등을 분석하여 최적 조류 바이오매스 선정
- 스피룰리나 전처리 방법에 따른 가수분해 효율 분석
- 당화효소 유전자원 탐색을 위한 유전체 분석
- 글리코젠 분해 유전자원 탐색 및 유전적 분석
- 글리코젠 분해 관련 유전자원을 활용한 재조합 단백질 생산

IV. 연구개발결과

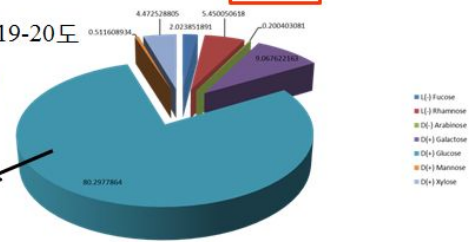
○ 바이오에탄올 생산용 최적 조류 선정

- 성장률, 발효 당 함량, 부산물 활용 등을 분석하여 최종 남조류 2종 (Spirulina maxima, Leptolyngbya sp.)을 선정



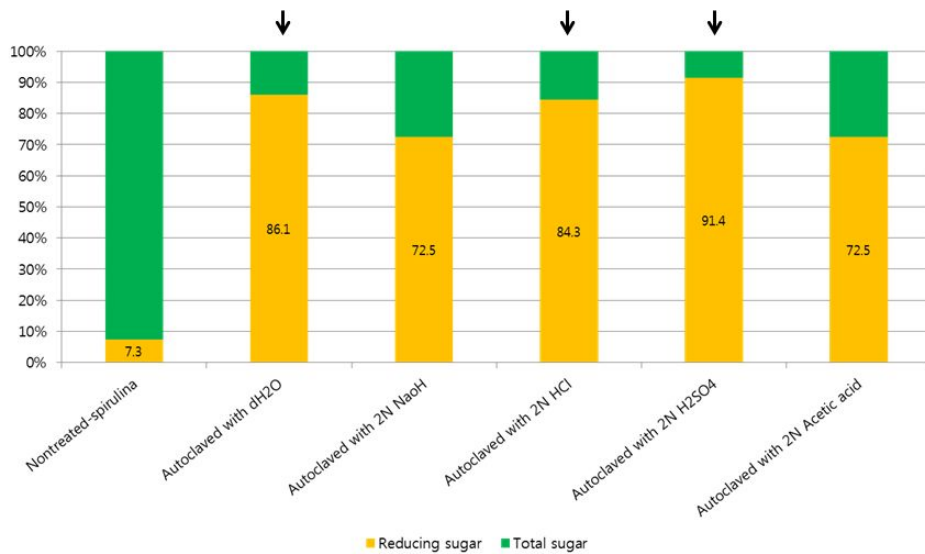
겨울철 평균 수온: 19-20도
탄수화물 : 50-56%

Glucose 약 80%



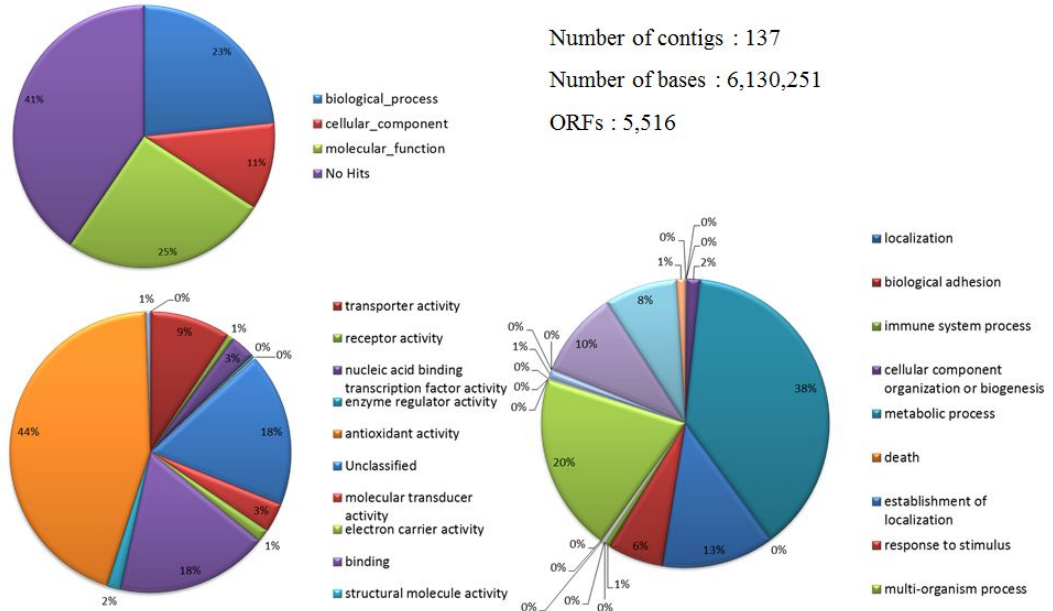
○ 남조류 가수분해 기술 확립

- 다양한 물, 산, 염기성 용매를 토대로 전처리 후 효소 가수분해 효율을 분석한 결과 황산과 염산을 2N 되도록 처리한 군에서 효소처리 되기전에도 당화 효율이 높게 형성 되었으며 (80% 이상) 물을 처리한 군의 경우는 효소처리 18시간 이후에 당화가 대부분 이루어졌음.



○ 남조류 유전체 분석

- *Leptolyngbya* sp.의 유전체 분석을 통해 전체 6.1Mbp의 유전체를 확보하고 5,516개의 단백질 코딩 유전자원을 확보



(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

○ 글리코겐 분해 관련 유전자원 확보

- *Leptolyngbya* sp.로부터 글리코겐 분해 유전자원 15개 확보
 : glycogen debranching enzyme, alpha-amylase, glycogen phosphorylase, phosphoglucomutase
- 해양성 박테리아로부터 글리코겐 분해 유전자원 17개 확보
 : alpha-amylase, alpha-glucosidase

○ 글리코겐 분해 유전자의 재조합 단백질 생산

- glycogen debranching enzyme, alpha-amylase, glycogen phosphorylase

V. 연구개발결과의 활용계획

- 조류를 활용한 바이오에탄올 생산의 전처리/당화 과정에 활용
- 재조합 생산된 효소들은 에탄올 생산 이외에도 식품 등의 산업에 적용 가능함
- 신규 당화효소들을 토대로 특허권 확보
- 에탄올 및 부산물 활용을 위한 복합 기술 개발 확립에 활용

목 차

제 1 장 서론.....	1
제 1 절 연구개발의 목적.....	1
제 2 절 연구개발의 필요성.....	1
1. 기술적 측면.....	1
2. 경제, 산업적 측면.....	3
3. 사회, 문화적 측면.....	4
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	5
1. 국외.....	5
2. 국내.....	5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	6
1. 최적 조류 바이오매스 분석 및 선정.....	6
2. 바이오매스 전처리에 따른 당화율 분석.....	9
3. 남조류 유전체 분석.....	10
4. 당화효소 유전자원 확보.....	11
5. 당화효소의 재조합 단백질 생산.....	14
제 4 장 연구개발결과의 활용계획.....	17
제 5 장 참고문헌.....	18

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

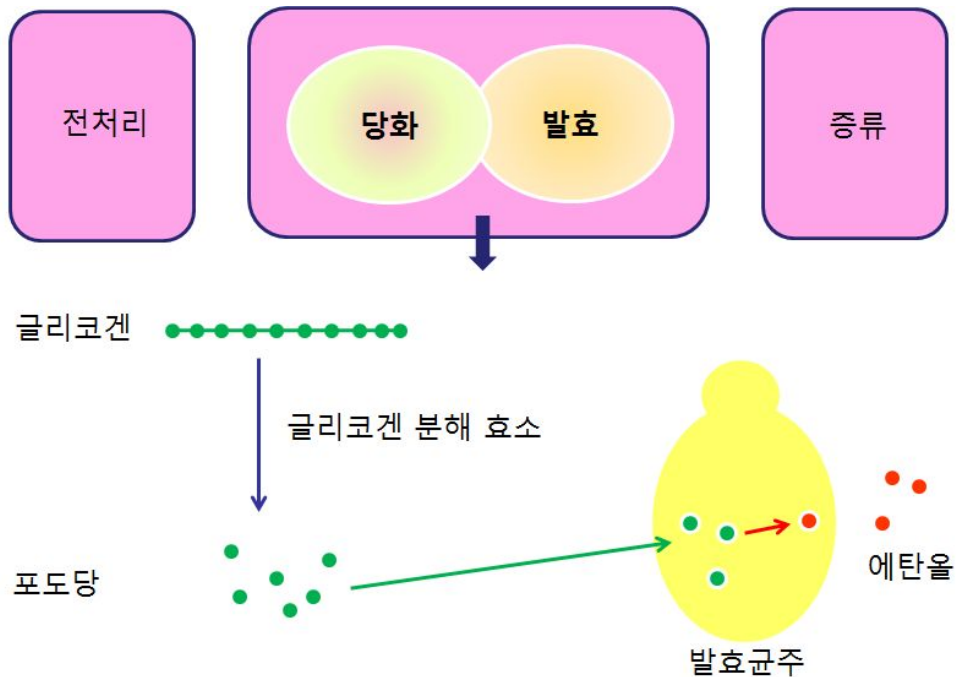
효율적 바이오연료 생산용 조류 선별 및 가수분해 기술 개발

1. 효율적 바이오연료 생산을 위한 조류 선별
2. 선별된 조류의 가수분해 최적 조건 구축
3. 신규 조류 가수분해 효소 발굴 및 재조합 단백질 생산

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 바이오 에탄올 생산 공정은 전처리-당화-발효-증류 과정을 거쳐 생산된다. 이 중 당화 과정은 주로 효소 반응에 의해 의존하게 되는데 생물원료에 따라 그에 맞는 효소를 사용해야만 에탄올 전환에 필요한 당을 얻어낼 수 있다. 현재 바이오 에탄올 생산용 효소 개발 및 판매는 덴마크의 Novozyme 회사에서 전 세계 물량의 대부분을 주도 하고 있다.



- 선진 각국에서는 고부가가치의 효소를 재조합 단백질 생산 기술을 이용하여 다양한 생물의 유전자들을 특정 숙주에서 발현시켜 저비용으로 재조합 단백질을 대량 생산하고자 하는 기술개발 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 고부가가치의 효소 산업을 위해 다양한 종류의 숙주세포와 발현벡터를 개발하고 특허화하여 많은 기술들을 독점적으로 보호하고 있다. 국내에서 또한 많은 연구자들이 다양한 재조합 단백질들을 생산하고 있으나, 거의 대부분이 산업적 접근을 이루지 못하고 있다. 그 이유로서 효소가 가지는 활성 또는 효소 특성이 산업적 수준에 이르지 못하거나 주로 일반화된 정제 기술들을 사용하기 때문에 정제 비용이 높게 형성되고 있기 때문이다. 즉, 활성이 높은 효소를 발굴하고 저비용으로 대량생산하는 것이 산업적 접근을 위한 핵심이라 할 수 있다. 본 연구는 바이오에탄올 생산 공정에 필요한 효소를 자체 개발하여 헤조류 및 미세조류 등의 생물원료를 토대로 바이오에탄올을 생산할 수 있는 기반을 마련하고자 한다. 이러한 효소가 산업적으로 맞게 개발했을 시 앞으로 발전하고 있는 바이오에탄올 산업의 국내 자체 수급이 가능해지며, 국제적으로도 경쟁력을 갖추어 국내에서 처음으로 산업용 효소 시장에 나아갈 수 있는 토대를 마련할 수 있다.

- 미세조류는 성장 속도가 아주 빠르고 높은 중성지방을 함유하는 종들이 발견되면서 바이오디젤 연구에 각광을 받고 있다. 이들의 세포벽 또한 식물과 마찬가지로 셀룰로오스를 주 구성 성분으로 하고 있고 세포내에 전분 또는 글리코겐으로 저장하고 있는 종들도 발견되면서 바이오디젤과 더불어 바이오에탄올 연구에 동시 접목이 가능할 것으로 보여 진다. 특히, 남조류는 특정환경에서 글리코겐을 전체 중량의 50% 이상 세포내로 저장할 수 있는 종들이 발견되면서 바이오에탄올 생산의 최적 종으로 사용 가능하다.

- 당화 효소 상용화를 위해 필요한 기술 요소
 - 당 분해 능력이 높아야 함 : 고효성을 나타내는 당화효소 발굴
 - pH 및 열 안정성과 같은 특성을 향상 시켜야 함 : 전처리공정에 따른 적합한 효소를 발굴하거나 효소특성을 개량해 목적에 맞는 효소를 확보할 필요성이 있음.
 - 용도에 따른 최적 pH 조건 : 현재 많이 사용하고 있는 산전처리를 사용할 경우 당화과정도 효소가 산성에서 활성이 높아야 유리함. 만약 당화와 발효과정을 동시에 수행하는 과정을 도입할 경우 발효 미생물이 성장할 수 있는 pH (일반적으로 중성)에서 활성이 높아야 함.
 - 효소를 저비용으로 대량 생산할 수 있어야 함 : 재조합 단백질 생산, 신호서열을 이용한 숙주 분비 시스템 개발, 고발현 시스템 개발 등을 통해 저비용·고효율로 효소를 생산할 필요성이 있음.



- 산업 생산이나 환경과 관련된 공정에 미생물 또는 효소 등을 이용하는 기술을 white biotechnology로 정의할 수 있다. 앞으로 white biotechnology의 영향을 가장 많이 받게 될 부문은 석유 등의 화석원료를 기반으로 하는 화학 산업이 될 전망이다. 본 연구는 white biotechnology를 바탕으로 효소 개발을 통해 바이오에탄올 산업을 가속화 시켜 대체 에너지로서의 전환을 도모할 수 있고, 환경적으로는 화석연료의 사용 감소에 따른 CO2 배출량 감소, 유해 화학물질의 사용감소에 따른 환경호르몬 발생 억제 등에 기여할 수 있다.

2. 경제, 산업적 측면

- 미국 에너지부(DOE)에서는 Novozymes 사 (Bagsvaerd, Denmark)에 옥수수 줄기와 같은 lignocellulosic 바이오매스를 발효 당으로 변환시키기 위한 효소 개발을 위해 1,480만 달러를 지원하였으며, 결과적으로, 바이오에탄올 생산에 필요한 효소 가격을 1/12로 줄일 수 있었다.
- 가장 경쟁력 있는 효소 시스템들의 개발은 바이오매스를 바이오연료로 전환시키는 공정의 경제성을 확보하는데 필수적인 요소로 작용한다. 여러 조건에서 높은 활성을 가지는 다양한 효소들을 개발하고 생산비용을 기존 국외의 기업보다 낮출 수 있는 방법을 개발했을 때, 비로소 효소시장에서의 경쟁력을 키울 수 있으며, 안으로는 저렴한 가격에 자체 효소 공급을 원활히 하고 밖으로는 새로운 효소 산업 육

성을 통한 수출 효과를 기대할 수 있다.

- 화석 연료의 대체제로 이용되고 있는 바이오 에탄올 시장은 세계 제일의 바이오연료로서 브라질, 미국, EU 등을 중심으로 매년 빠르게 성장하고 있고 그에 따른 효소 시장도 빠른 폭으로 증가할 것으로 예상된다.
- 바이오에탄올 생산을 위한 효소 개발은 주로 에탄올 생산에 필요한 전처리나 당화 과정에 쓰일 수 있고, 그 외에도 기능성 식품 및 화장품, 의약품, 산업용 세제, 동물 사료 개발, 식품 발효, 섬유, 펄프 산업 등에도 다양하게 사용되어질 수 있어, 산업 전반의 발전을 기대할 수 있다.

3. 사회, 문화적 측면

- 국내 지식 기반 사업과 더불어 국제적인 독점적 자원 정보력과 미래의 생물유전자원 분쟁에 대비한 중요한 위치를 차지할 수 있고, 효소를 이용한 산업적 이용에 따라 미래 지향적, 환경 친화적, 사회 친화적 기술의 확대를 도모하여 인류의 삶의 질을 향상시킬 수 있을 것이다.
- 산업용 효소라는 새로운 시장을 형성과 더불어 새로운 고용 창출 효과를 기대할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외

- 덴마크에서는 셀룰로오스를 주된 성분으로 하는 농작물 찌꺼기를 바탕으로 **바이오에탄올 생산을 위한 세계 최대 규모의 플랜트 설립**

▶ **Novozymes 사의 cellulosic 에탄올 생산에 적합한 효소 개발이 바탕이 됨.**

- Syngenta사와 Diversa Corporation사는 1천 6백만 달러를 지원받아 **셀룰로오스계 바이오매스를 경제적으로 바이오연료로 전환시키는 새로운 효소를 발견하고 개발하기 위해 10년의 연구 개발 협력 계약을 체결**

- 세계적인 석유회사인 Royal Dutch Shell사는 **바이오매스를 연료로 전환하는 새로운 최적화된 효소들을 개발하기 위하여 Codexis사와의 협력을 강화한다고 발표하였고, 다양한 종류의 바이오매스를 이용해 고품질의 연료들로 전환 효율을 증강시키기 위한 효소의 개조에 집중적으로 연구할 방침**

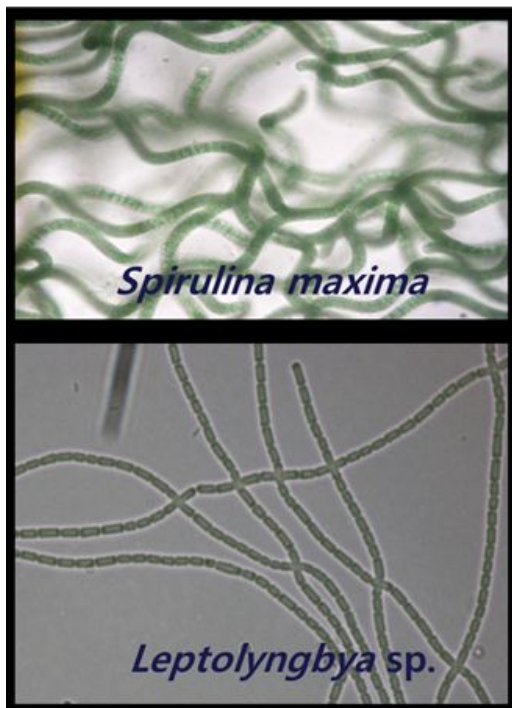
2. 국내

- 국내 바이오에탄올 연구는 식용작물인 벼, 감자 등과, 비식용 이용자원으로서 대형 해조류인 녹조류, 홍조류 및 잘피나 음식물 쓰레기 등을 대상으로 활발히 진행되어 지고 있으며 머지않아 상용화 수준에 이를 것으로 사료된다.
- 바이오에탄올에 대한 연구와 더불어 당화 효소에 대한 연구 역시 본격화 되고 있지만, 효소 활성 및 기능성, 효소 생산 단가 등의 복합적인 문제를 동시에 풀어낼 수 있는 당화용 효소 개발은 미약한 수준으로 바이오 에탄올을 국내에서 산업적으로 생산하더라도 효소의 수입이 불가피한 실정이다. 또한, 당화 효소와 관련하여 국외의 연구투자비와 비교했을 때 국내 투자되는 비용은 아주 미약한 수준으로 개발의 한계성을 나타나게 하는 원인으로 작용될 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 최적 조류 바이오매스 분석 및 선정

- 바이오매스의 선정은 에탄올 생산에 이용할 수 있는 당의 세포내 함량, 높은 성장성, 전처리 효율성, 부산물 활용도 등을 고려하여 최종 남조류 2종 (*Spirulina maxima*, *Leptolyngbya* sp.)을 선정하였음.



- 빠른 성장 (doubling time: 3-8시간)
- 쉬운 전처리 (세포 단위의 바이오매스)
- Glycogen 형태의 에너지 저장
- 높은 발효 당 함량 (높은 glucose 함량)
- 해수 등을 이용한 대량생산 가능
- 높은 CO₂ 흡수율 (육상식물의 5-10배)
- 부산물 활용 가능성 높음 (phycocyanin)

그림 1. 선정된 바이오매스의 유용성

- 스피룰리나는 20톤 수조에서 연중 배양된 샘플의 일반성분 및 당당 조성을 분석하였으며 분석 결과 겨울철 수온이 19-20℃ 되었을 때 탄수화물 함량이 50~56%를 나타내는 것을 확인하였고, 이때 glucose 단당이 80% 이상을 나타내는 것으로 확인하였음. 이는 스피룰리나가 에너지를 저장할 때 글리코젠으로 저장하기 때문인 것으로 향후 이를 바이오에탄올 생산시 쉽게 에탄올 전환이 가능할 것임. 또한 이 데이터는 환경적 또는 생화학적 변화를 유도하여 글리코젠의 함량을 증가시킬 수 있음을 시사함.

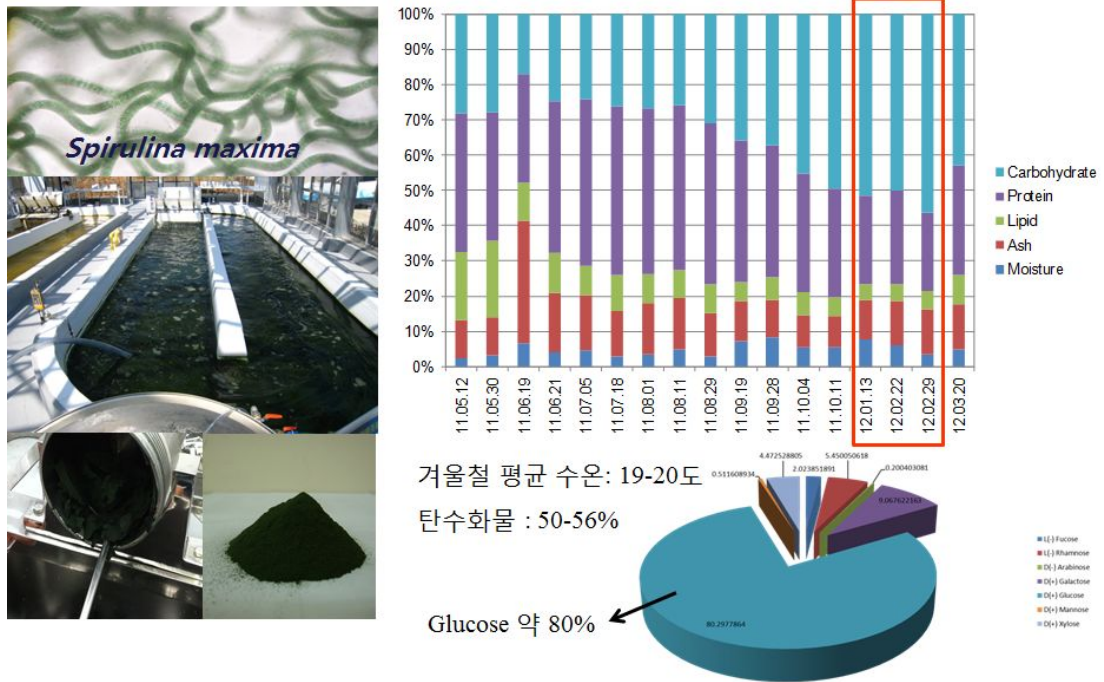


그림 2. 연중 배양된 스피룰리나의 일반성분 및 당당 조성

- Leptolyngbya는 SEM 사진을 통해 글리코젠으로 저장되는 것을 확인할 수 있었으며 기본 탄수화물 함량이 25%로 나타났지만 이 또한 스피룰리나의 예와 같이 인위적인 컨트롤에 의해 조절 가능할 것으로 보여 짐. 기본 당당 조성도 스피룰리나와 같이 glucose가 주를 이루고 있으며 75% 이상의 함량을 보여줌.

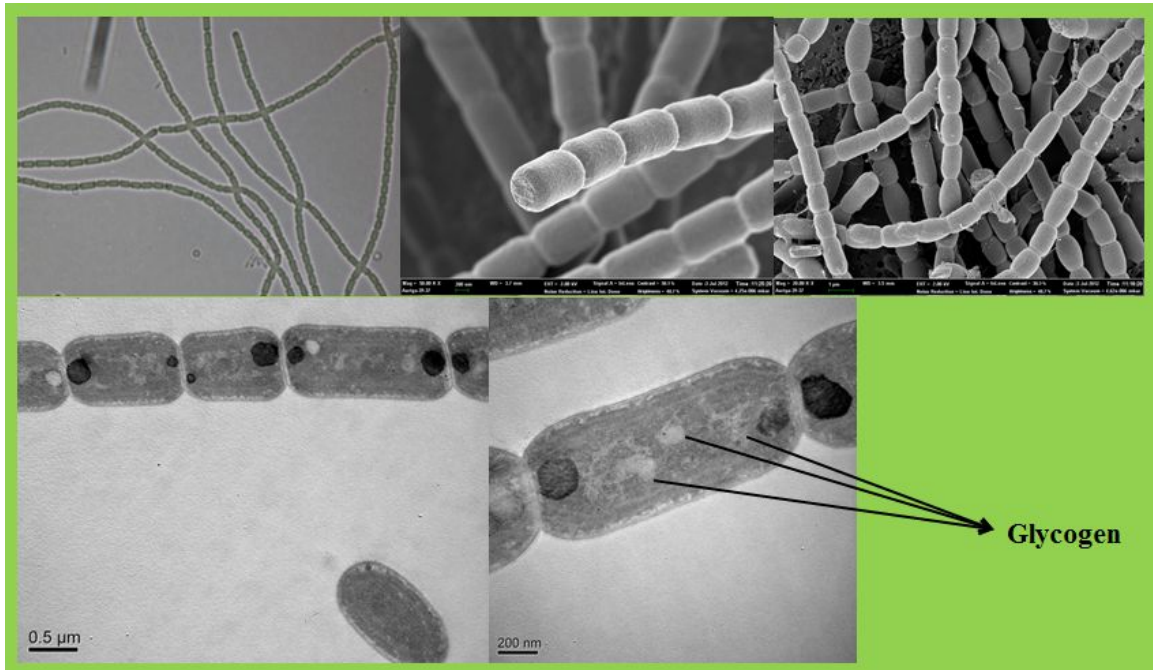


그림 3. Leptolyngbya sp.의 전자현미경 (SEM, TEM) 사진

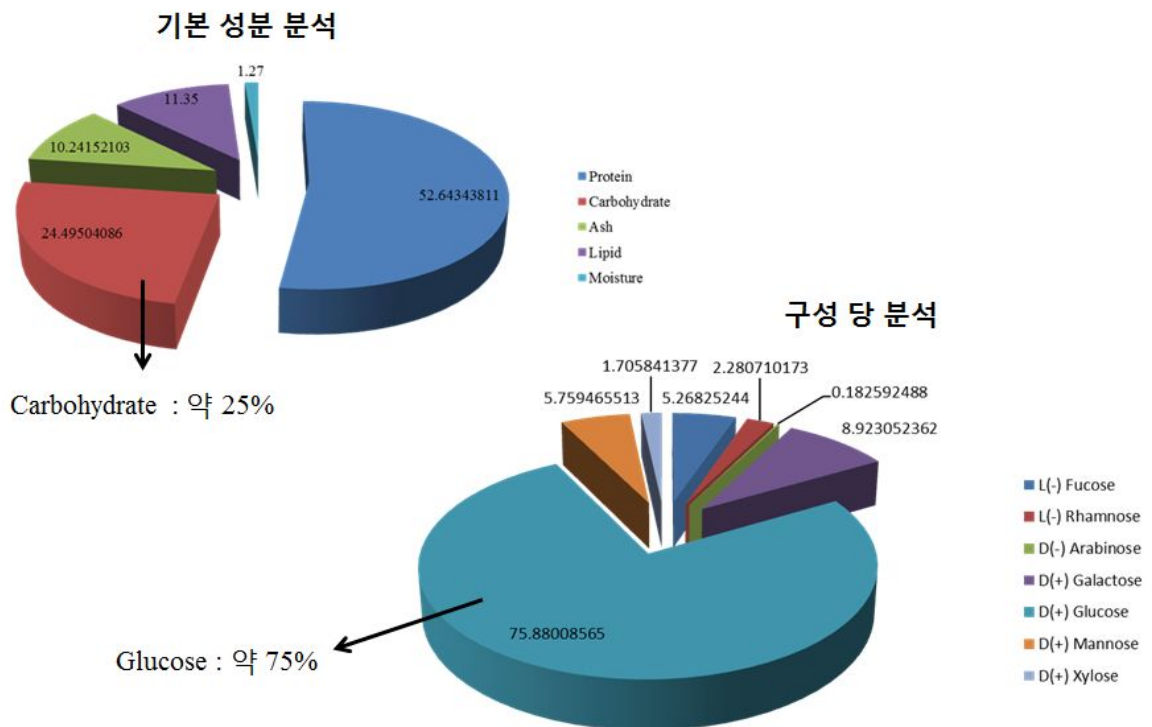


그림 4. Leptolyngbya sp.의 일반성분 및 단당 분석

2. 바이오매스 전처리에 따른 당화율 분석

- 전처리 방법에 따른 당화율을 분석하기 위해 2%의 스피롤리나를 가지고 다양한 용매 (물, 황산, 염산, 초산, 수산화나트륨)를 처리 후 autoclave (121°C, 30분) 하였으며 이를 다시 Novozymes 사의 Spirizyme을 처리하여 시간별 당 가수분해 효율을 분석 하였음. 그 결과 황산과 염산을 2N 되도록 처리한 군에서 효소처리 되기전에도 당화 효율이 높게 형성 되었으며 (80% 이상) 물을 처리한 군의 경우는 효소처리 18시간 이후에 당화가 대부분 이루어졌음. 이 결과는 향후 남조류 바이오매스로부터 에탄올 생산시 부산물을 이용하지 않을 경우 황산이나 염산처리에 의해 빠르게 발효에 사용할 수 있는 발효당을 생산할 수 있으며, 부산물의 이용을 위해서는 시간이 조금 걸리더라도 물에 효소처리 하는 방법을 권장할 수 있음. 최종 18시간 후 물 용매 사용시 86.1%의 당화율, 염산 용매 사용시 84.3%, 황산 용매 사용시 91.4%의 환원당 전환 비율을 나타냈음. 염산이나 황산 처리군의 경우 글리코젠을 제외한 다른 당도 비특이적으로 분해하기 때문에 실질적으로 발효에 사용할 수 있는 당은 물 용매에 글리코젠 분해 효소들을 처리한 군에 것이 오로지 발효에 사용될 수 있는 당을 만들기 때문에 상대적으로 높을 수 있음.

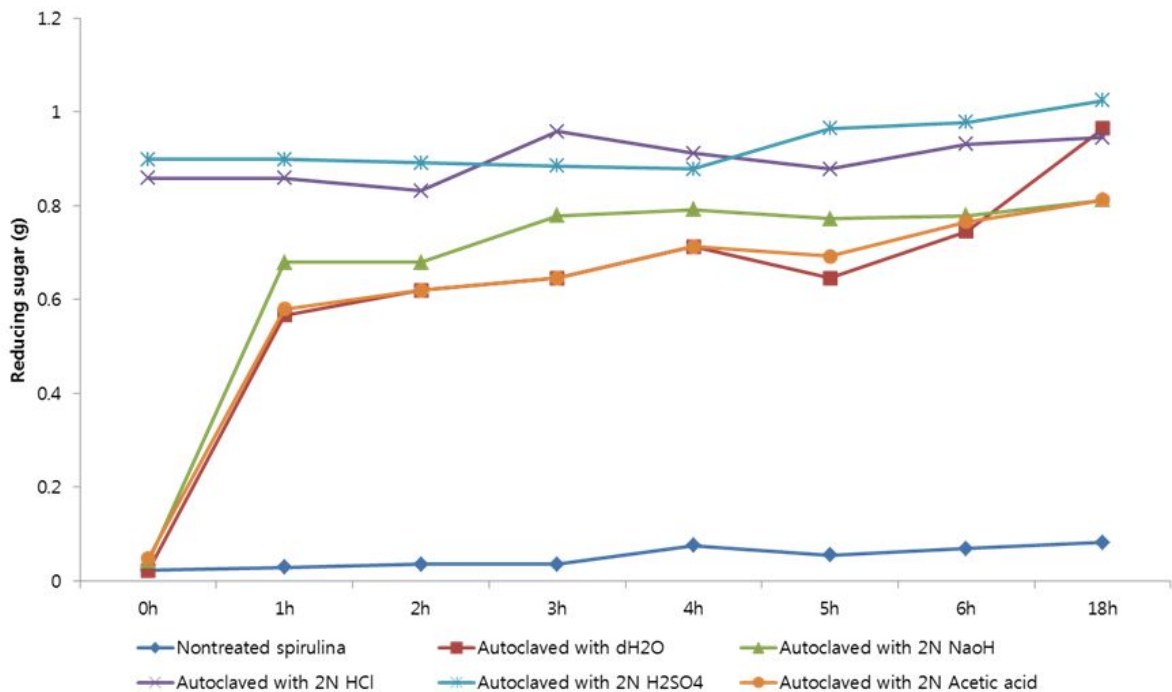


그림 5. 스피롤리나의 전처리방법에 따른 당 가수분해 효율 분석

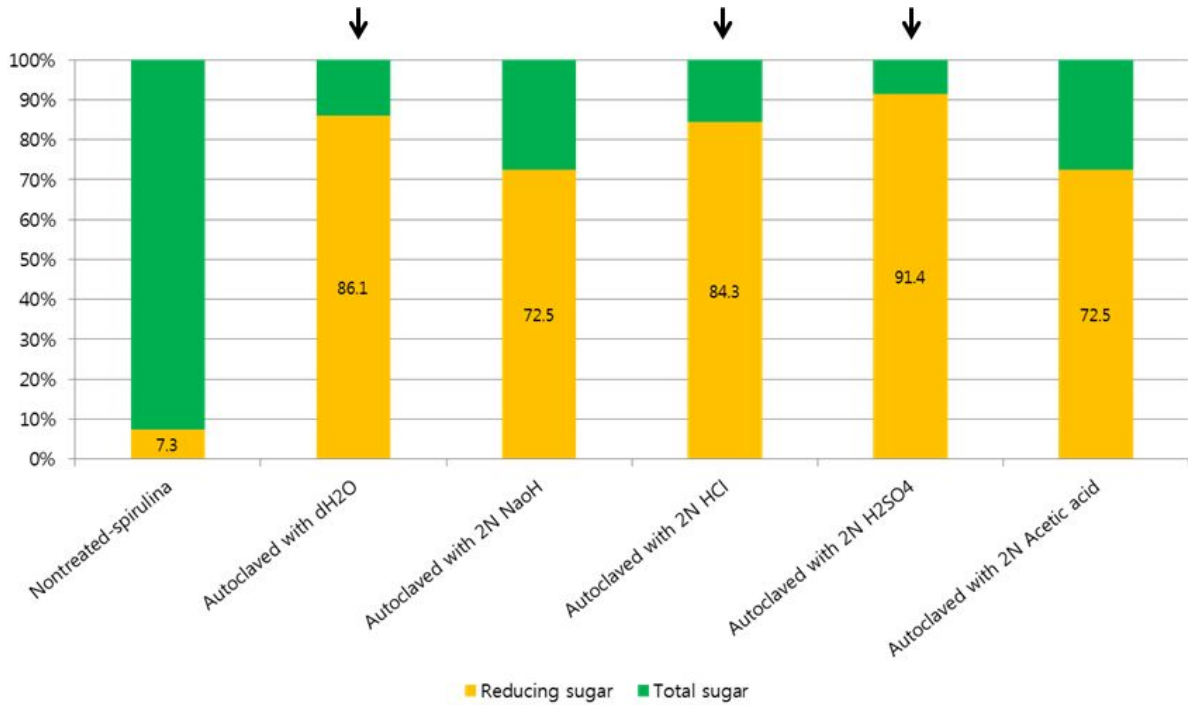


그림 6. 스피롤리나의 전처리방법에 따른 전체 당 대비 가수분해 효율

3. 남조류 유전체 분석

- 당분해 효소의 발굴을 위해 신규 발견된 종인 *Leptolyngbya*의 유전체를 GS-FLX를 이용해 분석하였으며 유전체의 전체 길이가 6.1Mbp, 단백질을 코딩하는 유전자 서열 5,516개가 확보되어졌음. GO 분석 결과 전체 유전체 중 23%는 생물학적 대사에 관련된 유전자들로 진단되어졌고, 11%는 세포 구성성분, 25%는 분자적 기능에 관련된 유전자들로 진단되어졌음.

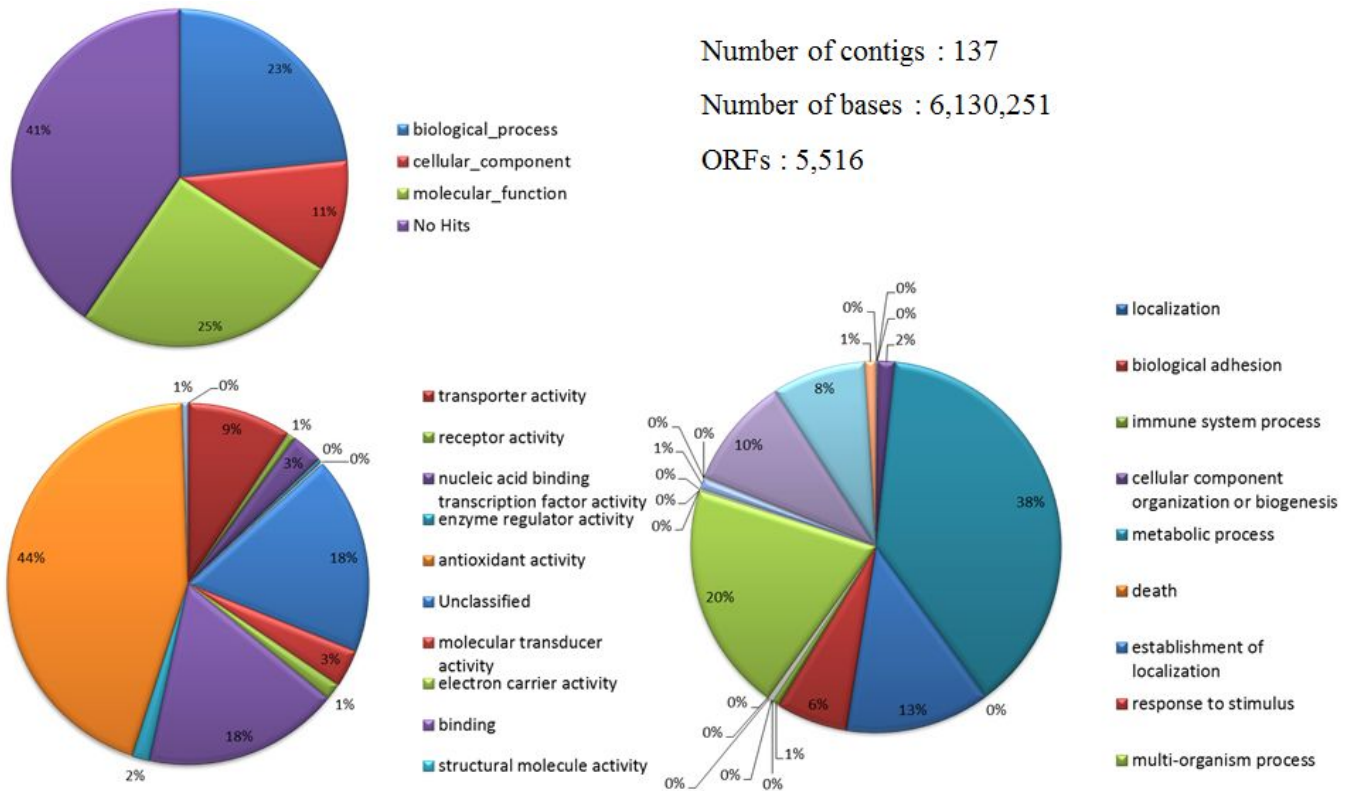


그림 7. *Leptolyngbya* sp. 의 유전체 분석

4. 당화 효소 유전자원 확보

- 전체 확보된 유전체로부터 글리코겐 합성과 분해에 관련된 신규 유전자원 17개를 확보하였음. 이 유전자들은 기존 밝혀진 유전자들과의 identity를 확인하기 위해 GenBank의 nucleotide Blast program을 사용하였으며 53-77%의 동일성을 나타내어 모두 신규한 유전자들임을 확인할 수 있었음. 진단된 합성에 관련된 유전자는 1,4-alpha-glucan branching enzyme, glycogen synthase이며, 분해에 관련된 유전자는 glycogen debranching enzyme, glycogen phosphorylase, alpha-amylase, phosphoglucomutase 임.

표 1. Leptolyngbya의 글리코겐 생성 및 분해관련 유전자원

Gene number	Similar enzymes	Identities (%)
LS_contig00001_orf00031	1,4-alpha-glucan branching enzyme [Microcoleus chthonoplastes PCC 7420]	72
LS_contig00045_orf00009	glycogen/starch synthase, ADP-glucose type [Cyanothecce sp. PCC 7424]	75
LS_contig00001_orf00187	glycogen debranching enzyme GlgX [Oscillatoria sp. PCC 6506]	66
LS_contig00001_orf00319	glycogen debranching enzyme GlgX [Nostoc punctiforme PCC 73102]	72
LS_contig00009_orf00138	glycogen debranching enzyme [Fischerella sp. JSC-11]	56
LS_contig00025_orf00103	glycogen debranching enzyme GlgX [Microcoleus chthonoplastes PCC 7420]	69
LS_contig00033_orf00057	glycogen phosphorylase [Thermosynechococcus elongatus BP-1]	63
LS_contig00045_orf00042	glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase [Cyanothecce sp. PCC 7822]	70
LS_contig00030_orf00009	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase [Microcoleus chthonoplastes PCC 7420]	64
LS_contig00045_orf00045	phosphoglucomutase/phosphomannomutase [Trichodesmium erythraeum IMS101]	77
LS_contig00002_orf00071	alpha amylase catalytic region [Oscillatoria sp. PCC 6506]	58
LS_contig00007_orf00082	alpha amylase, catalytic region [Lyngbya sp. PCC 8106]	65
LS_contig00024_orf00052	alpha amylase, catalytic domain subfamily, putative [Microcoleus chthonoplastes PCC 7420]	64
LS_contig00024_orf00054	alpha amylase, catalytic domain subfamily, putative [Microcoleus chthonoplastes PCC 7420]	66
LS_contig00045_orf00014	alpha-amylase [Chloroflexus sp. Y-400-fl]	53
LS_contig00065_orf00024	alpha amylase [Arthrospira platensis AV]	67
LS_contig00095_orf00006	cytoplasmic alpha-amylase [Cyanothecce sp. CCY0110]	76

- 확보된 유전자원들을 토대로 글리코겐 합성과 분해에 관련된 메카니즘을 예측함. 남조류는 빛과 이산화탄소를 이용해 글루코스를 합성할 수 있으며 Glycogen synthase로 전분을 합성하고 1,4-alpha-glucan branching enzyme을 통해 가지를 만들어 글리코겐으로 에너지를 저장할 것으로 예측됨. 다시 에너지가 필요한 시점에서 분해와 관련된 효소들이 만들어지는데 glycogen debranching enzyme이 먼저 작용하여 가지(alpha 1,6 결합)를 끊어내고 alpha-amylase와 glycogen phosphorylase에 의해 글루코스로 전환된 후 phosphoglucomutase에 의해 글루코스가 글루코스-6인산으로 전환되 에너지 생성 과정인 해당과정으로 진행될 수 있음.

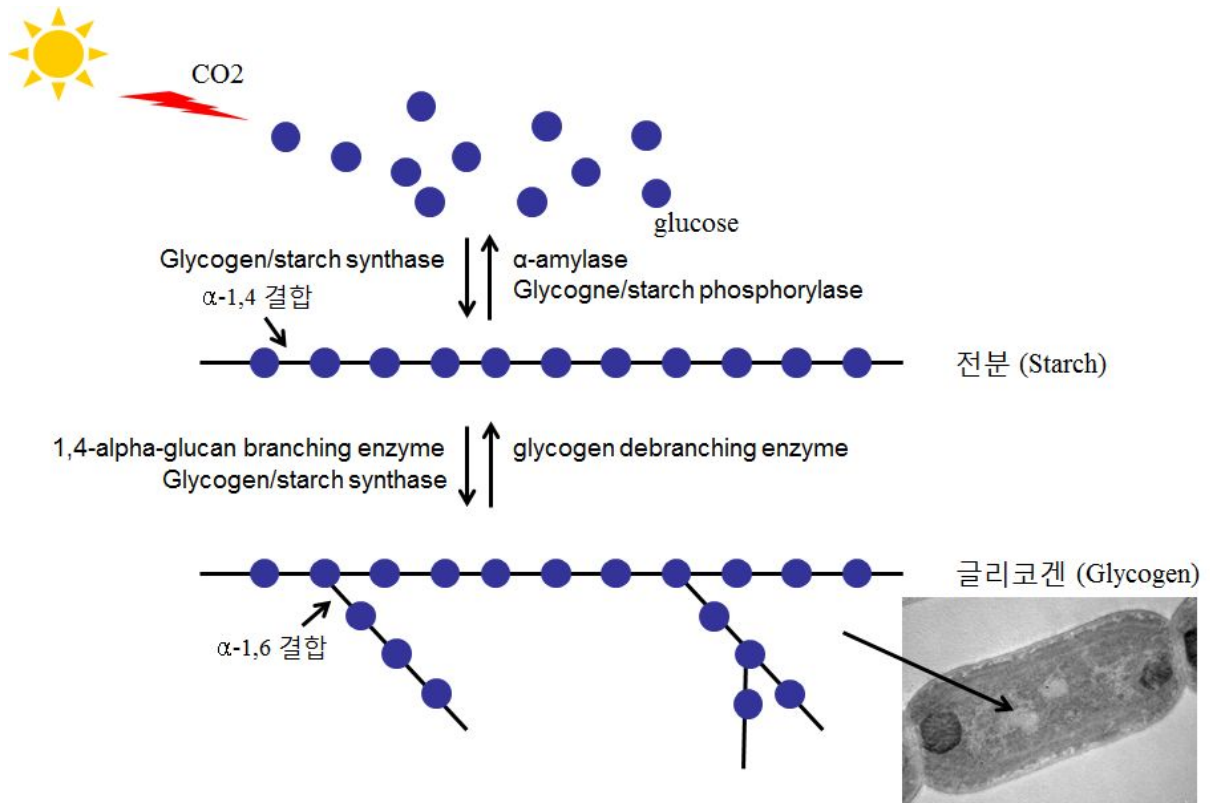


그림 8. 글리코겐 합성 및 분해 관련 예측 메카니즘

- alpha-amylase와 관련된 유전자원들을 추가 확보하기 위해 해양시료로부터 alpha-amylase를 생성하는 박테리아들을 변형된 DNS 방법에 의해 탐색하였으며 이를 토대로 유전체를 분석하여 신규 alpha-amylase 유전자 17개를 확보함.

표 2. 박테리아로부터 확보된 글리코젠 분해 관련 유전자원

Gene no.	Similar genes	Identities (%)
1	putative alpha-amylase [Kordia algicida OT-1]	62
2	alpha amylase catalytic region [Arcobacter nitrofigilis DSM 7299]	74
3	putative alpha-glucosidase [Flavobacteria bacterium BAL38]	75
4	a-glucosidase, glycoside hydrolase family 31 protein [Kordia algicida OT-1]	73
5	Glycoside hydrolase, family 15 [Flavobacteriales bacterium HTCC2170] (Glucoamylase)	72
6	periplasmic alpha-amylase precursor [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	68
7	alpha amylase catalytic region [Capnocytophaga ochracea DSM 7271]	48
8	Alpha-glucosidase, family 31 of glycosyl hydrolase [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	73
9	alpha-glucosidase [Gramella forsetii KT0803] (GH97)	68
10	Alpha amylase, catalytic domain subfamily [Methylophaga thiooxidans DMS010]	61
11	putative a-amylase [Saccharophagus degradans 2-40]	57
12	alpha amylase, putative, amy13D [Cellvibrio japonicus Ueda107]	61
13	alpha-amylase, putative, amy13E [Cellvibrio japonicus Ueda107]	57
14	alpha amylase, putative, amy13C [Cellvibrio japonicus Ueda107]	63
15	putative glucoamylase I (alpha-1,4-glucan glucosidase) [Psychromonas ingrahamii 37]	34
16	putative glucoamylase I (alpha-1,4-glucan glucosidase) [Psychromonas ingrahamii 37]	33
17	alpha amylase protein [Roseobacter sp. CCS2]	67

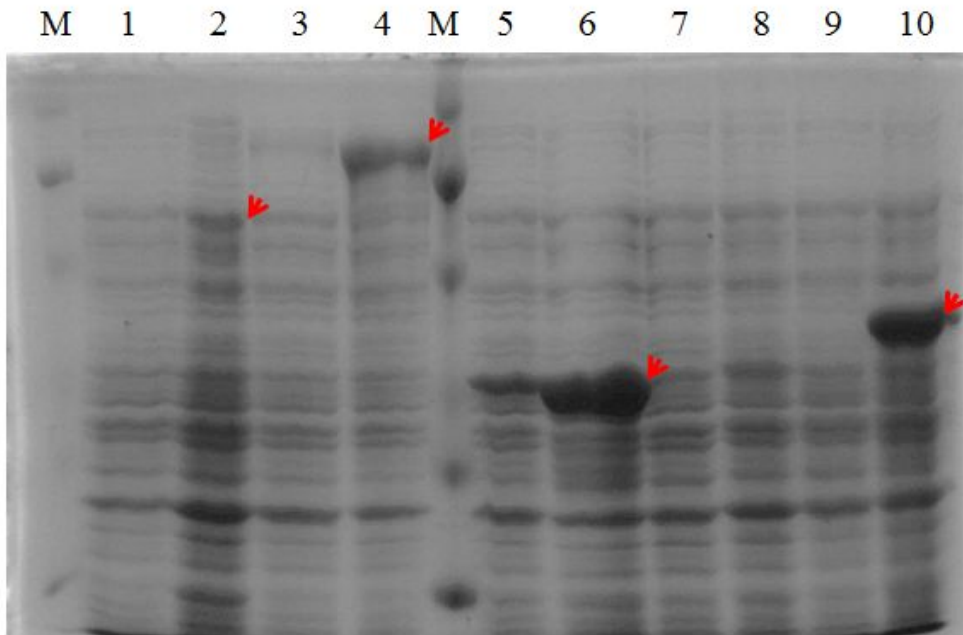
5. 당화효소의 재조합 단백질 생산

- 글리코젠 분해와 관련된 유전자들의 재조합 단백질 생산을 위해 유전자의 특성(신호서열, motif 등)을 확인하기 위해 GenBank의 protein BLAST program, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART), Motif Scan program을 사용하여 아미노산 배열을 진단하였음. 그 결과 표 3과 같이 모든 유전자에서 글리코젠 분해와 관련된 motif를 확인할 수 있었음.

표 3. 글리코겐 분해 관련 유전자원들의 motif 분석

Gene number	Similar enzymes	Signal peptide	motif
LS_contig00001_orf00187	glycogen debranching enzyme	X	CBM48, glycogen 6-glucanohydrolase
LS_contig00001_orf00319	glycogen debranching enzyme	X	CBM48, glycogen 6-glucanohydrolase
LS_contig00009_orf00138	glycogen debranching enzyme	X	Lipoprotein lipid attachment site, Amylo-alpha-1,6-glucosidase
LS_contig00025_orf00103	glycogen debranching enzyme	X	CBM48, glycogen 6-glucanohydrolase
LS_contig00033_orf00057	glycogen phosphorylase	X	glycogen phosphorylase
LS_contig00045_orf00042	glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase	X	glycogen phosphorylase
LS_contig00002_orf00071	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (trehalose synthetase)
LS_contig00007_orf00082	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (cyclomaltodextrinases)
LS_contig00024_orf00052	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (oligo-1,6-glucosidase)
LS_contig00024_orf00054	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (oligo-1,6-glucosidase)
LS_contig00045_orf00014	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (1,4-alpha-D-glucan-4-glucanohydrolase)
LS_contig00065_orf00024	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (sucrose glucosyltransferase)
LS_contig00095_orf00006	alpha amylase	X	alpha amylase catalytic domain (1,4-alpha-D-glucan-4-glucanohydrolase)

- 진단된 유전자들 중 5개의 유전자를 선별하여 재조합 단백질 생산을 위해 단백질을 코딩하는 유전자원을 PCR을 통해 증폭시키고 정제 후 PCR 산물과 pET11a vector를 각각 NdeI, BamHI 제한효소를 이용해 절단 시킨후 T4 DNA ligase를 이용해 PCR 산물을 pET11a vector 안으로 삽입시켰음. 이를 E. coli DH5a에 형질전환 하여 배양 후 plasmid DNA를 추출하고 이를 다시 E. coli BL21(DE3) cell 안으로 형질전환 하였음. 이를 37°C에서 O.D.600nm=1 이 되도록 배양 후 IPTG를 1mM되게 첨가시켜 30°C에서 6시간 단백질 발현을 유도하였고 12% SDS-PAGE 상에서 발현된 단백질을 확인하였음.

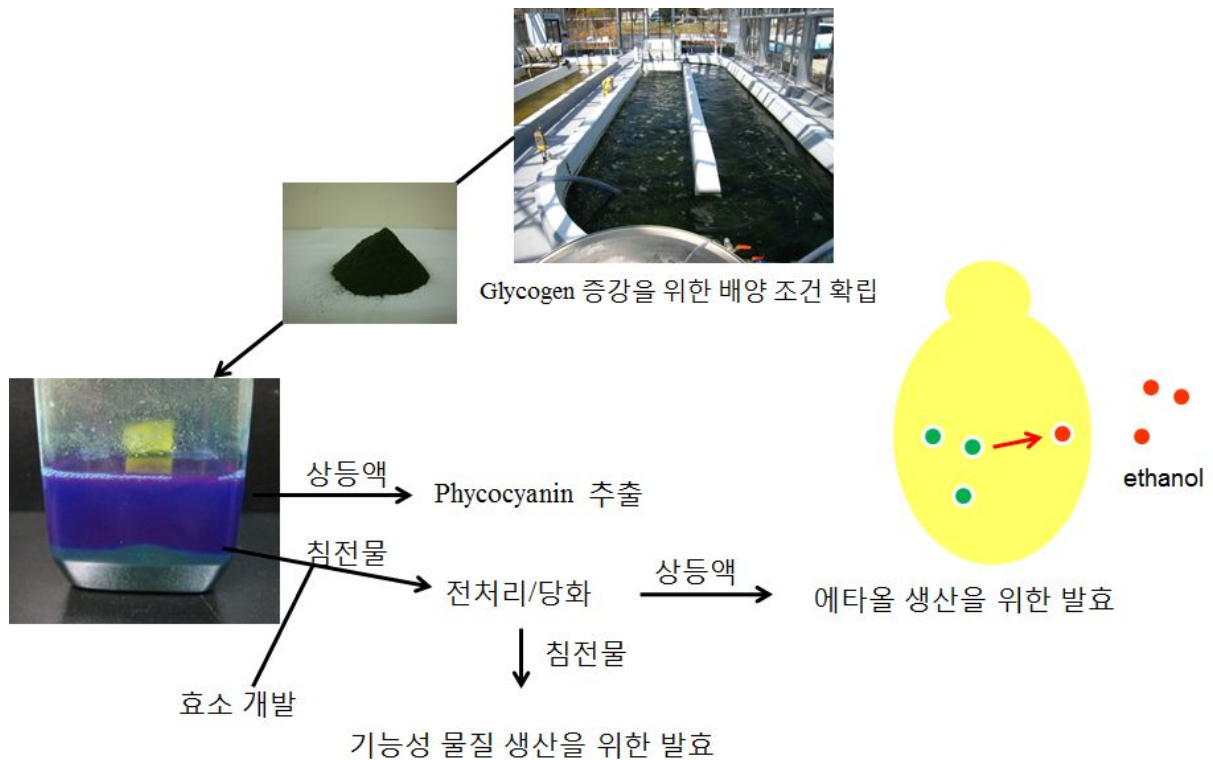


- 2; glycogen debranching enzyme (LS_contig00001_orf00319), 83kDa
- 4; glycogen phosphorylase (LS_contig00033_orf00057), 95kDa
- 6; alpha amylase (LS_contig00007_orf00082), 57kDa
- 8; alpha amylase (LS_contig00045_orf00014), 54kDa
- 10; alpha amylase (LS_contig00095_orf00006), 58kDa

그림 9. 글리코겐 분해관련 유전자원을 활용한 재조합 단백질 생산

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

1. 조류를 활용한 바이오에탄올 생산의 전처리/당화 과정에 활용
2. 재조합 생산된 효소들은 에탄올 생산 이외에도 식품 등의 산업에 적용 가능함
3. 신규 당화효소들을 토대로 특허권 확보
4. 에탄올 및 부산물 활용을 위한 복합 기술 개발 확립에 활용



제 5 장 참고문헌

1. Balat M. et al., 2008. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, 34:551-573
2. Chen H. et al., 2010. Key Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulose. Biotechnology Advances, 28:556-562
3. Demirbas A., 2010. Use of algae as biofuel sources. Energy Conversion and Management, 51:2738-2749
4. Harun R. and Danquah M. K., 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. Process Biochemistry. 46:304-309
5. Markou G. et al., 2013. Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Energies, 6:3937-3950
6. Nikolic S. et al., 2009. Bioethanol Production from Corn Meal by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Fuel, 88:1602-1607
7. Novozymes 2009. The Novozymes Report 2009.
8. Parmar A. et al., 2011. Cyanobacteria and Microalgae: A Positive Prospect for Biofuels. Bioresource Technology, 102:10163-10172
9. Quintana N. et al., 2011. Renewable Energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. Applied Microbiology and Biotechnology, 91:471-490

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 Lab창의사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.