



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월28일
(11) 등록번호 10-1580488
(24) 등록일자 2015년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0137344
(22) 출원일자 2013년11월13일
심사청구일자 2013년11월18일
(65) 공개번호 10-2015-0055249
(43) 공개일자 2015년05월21일
(56) 선행기술조사문헌
논문 1 : APPL ENVIRON MICROBIOL
논문 2 : MOL MICROBIOL
KR1020130122385 A
논문 3 : APPL ENVIRON MICROBIOL

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이정현
경기도 성남시 분당구 불정로 219, 116-101 (정자동, 한솔마을청구아파트)
강성균
경기도 안산시 상록구 갑골로 59, 702-1502 (사동, 상록수월드타운아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 16 항

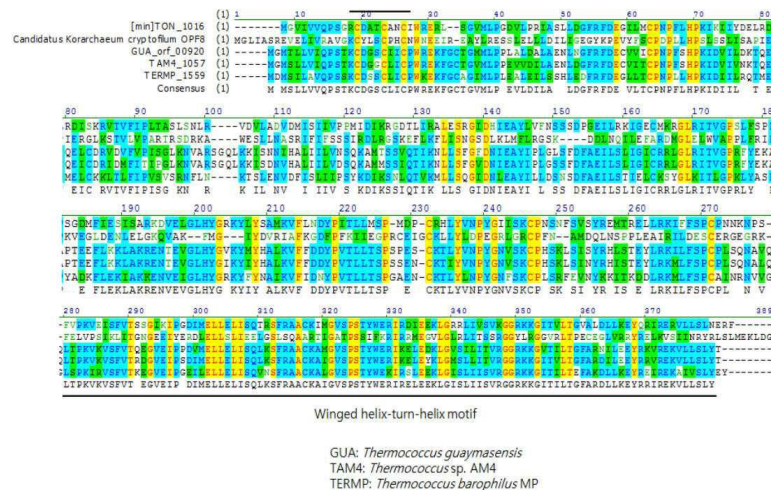
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **써모코커스 온누리누스 MC02 및 이를 이용한 수소생산방법**

(57) 요약

본 발명은 rchA 유전자의 발현이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 MC02(*Thermococcus onnurineus* MC02, 수탁번호: KCTC12511BP) 균주를 제공한다. 또한, 써모코커스 속 균주의 rchA 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 속 균주 제조 방법을 제공하고, 써모코커스 온누리누스 MC02 균주를 이용한 수소생산방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이현숙

경기도 안산시 상록구 갑골로 59, 702-1502 (사동, 상록수월드타운아파트)

권개경

경기도 안산시 상록구 성호로 5길 7, 2층 (일동)

이성혁

경기도 안산시 상록구 성안2길 34, 301호 (사동)

김윤재

경기도 안산시 상록구 성안2길 34, 301호 (사동)

배승섭

경기도 안산시 상록구 천문4길 19, 402호 (사동)

최애란

경기도 안산시 상록구 성안2길 39, 204호 (사동)

김민식

경기도 안산시 상록구 장화2길 26, 202호 (사동)

김태완

경기도 안산시 상록구 삼리2길 17, 203호 (사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM57720

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양 초고온 고세균 이용 바이오수소 생산기술 개발

기 여 율 7/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2009.07.01 ~ 2015.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM57371

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양극한생물분자유전체연구

기 여 율 3/10

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2004.10.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

써모코커스 온누리누스 NA1(*Thermococcus onnurineus* NA1) 균주의 rchA 유전자의 발현이 증가되도록 돌연변이화된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1(*Thermococcus onnurineus* NA1)의 돌연변이 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 발현율의 증가는 상기 유전자 복제수의 증가, 상기 유전자 전사율의 증가, 상기 유전자 번역율의 증가, 상기 유전자 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 유전자 전사율의 증가는 프로모터를 이용하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터, 시그마 70 프로모터, 박테리오파지 λ 의 pL; Plac; Ptrp; Ptac(Ptrp-lac 혼성 프로모터), 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드(IPTG)-유도성 프로모터, 테트라사이클린 유도성 프로모터, 아라비노스 유도성 프로모터, 자일로스-유도성 프로모터, 트립토판 프로모터, lac 프로모터, 알콜-유도성 프로모터, 열-유도성 프로모터로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 프로모터인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주는 수탁번호가 KCTC12511BP 호인 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 7

써모코커스 속 균주의 rchA 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 속 균주 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 발현율의 증가는 상기 유전자 복제수의 증가, 상기 유전자 전사율의 증가, 상기 유전자 번역율의 증가, 상기 유전자 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합을 사용하는 것을 특징으로 하는 써모코커스 속 균주 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 유전자 전사율의 증가는 프로모터를 이용하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터, 시그마 70 프로모터, 박테리오파지 λ 의 pL; Plac; Ptrp; Ptac(Ptrp-lac 혼성 프로모터), 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드 (IPTG)-유도성 프로모터, 테트라사이클린 유도성 프로모터, 아라비노스 유도성 프로모터, 자일로스-유도성 프로모터, 트립토판 프로모터, lac 프로모터, 알콜-유도성 프로모터, 열-유도성 프로모터로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 프로모터인 것을 특징으로 하는 씨모코커스 속 균주 제조 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터인 것을 특징으로 하는 씨모코커스 속 균주 제조 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 씨모코커스 속 균주는 수탁번호가 KCTC12511BP 호인 것을 특징으로 하는 씨모코커스 속 균주 제조 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 씨모코커스 온누리누스 NA1의 돌연변이 균주를 이용한 수소생산방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 수소생산은 60 내지 90 °C의 온도에서 배양되는 것을 특징으로 하는 수소생산방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 수소생산은 1 내지 3 기압의 압력에서 일산화탄소를 공급하는 것을 특징으로 하는 수소생산방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 일산화탄소는 합성가스 또는 제강산업의 부생가스의 형태로 공급되는 것을 특징으로 하는 수소생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 씨모코커스 온누리누스 MC02 및 이를 이용한 수소생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수소에너지는 중량당 발열량이 석유보다 3배 이상 높으면서도, 이산화탄소, NOx, SOx 등 환경에 악영향을 미칠 수 있는 물질들을 배출하지 않아, 장차 화석에너지를 대체할 에너지로써 각광받고 있다.

[0003] 종래부터 사용된 수소 생산 방법에는 물의 전기분해, 천연가스나 나프타의 열분해 (thermal-cracking) 또는 수증기 개질법 (steam reforming) 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 다시 화석연료를 사용하여 고온, 고압 조건을 만들어야 하는 문제가 있으며, 일산화탄소를 포함한 혼합가스를 발생시키므로 그러한 가스로부터 일산화탄소를 제거하여야 하는 어려운 문제를 발생시킨다.

[0004] 반면 미생물을 이용한 생물학적 수소 생산 방법은 별도의 에너지를 투입하여 고온, 고압 조건을 만들 필요가 없고, 생성된 가스에 일산화탄소를 포함하지 않는다는 장점이 있다. 이러한 생물학적 수소생산방법은 크게 광합성 미생물을 이용하는 것과 비-광합성 미생물(주로 혐기성 미생물)을 이용하는 것으로 나뉘볼 수 있다.

[0005] 그러나 빛을 에너지원으로 사용하는 광합성 세균들의 고농도 배양기술이 아직 충분히 개발되어 있지 않으며, 종래의 광합성 세균들은 높은 분압의 기질이 있을 경우 기질저해가 심하다는 단점이 있다. 또한, 이들은 빛이 존재하는 경우에만 수소생산능이 지속 될 수 있다는 문제점이 있다.

[0006] 본 발명자들은 *codh-mch-mnh3* 클러스터의 앞에 존재하는 *rchA* 유전자를 발견하였고, *rchA* 유전자와 *codh-mch-mnh3* 클러스터의 발현을 증가시키기 위한 강력한 프로모터를 삽입함으로써, 일산화탄소로부터 수소생산을 증가시키는 것을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 특허출원 제 10-2011-0021390 호에서는 혐기성 조건에서 씨모코쿠스 속 균주를 이용한 수소가스 생산 방법에 관하여 기재하고 있다.

(특허문헌 0002) 한국 특허출원 제 10-2011-7014737 호에서는 씨모코쿠스 속에 속하는 고호열성 신균주로부터 분리한 신규한 수소화효소, 이를 암호화하는 유전자 및 이들을 이용하여 수소를 생산하는 방법에 관하여 기재하고 있다.

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Bae SS 등은 고호열성 균주인 씨모코쿠스 온누리누스를 사용하여 일산화탄소, 포름산 또는 전분으로부터 수소를 생산하는 것에 관하여 기재하고 있다(Biotechnol Lett. 2012 Jan;34(1):75-9).

(비특허문헌 0002) Moon YJ, Kwon 등은 수소를 생산하는 씨모코쿠스 온누리누스 균주에 대한 를 사용하여 단백질체(proteome) 분석에 대한 결과를 기재하고 있다(Mol Cell Proteomics. 2012 Jun;11(6):M111.015420).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 *rchA* 유전자의 발현이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 씨모코쿠스 온누리누스 MC02(*Thermococcus onnurineus* MC02, 수탁번호: KCTC12511BP) 균주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 씨모코쿠스 속 균주의 *rchA* 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 씨모코쿠스 속 균주 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 씨모코쿠스 온누리누스 MC02 균주를 이용한 수소생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 제 1 의 형태는 *rchA* 유전자의 발현이 증가된 것을 특징으로 하는 수소생산능력이 증가된 씨모코쿠스 온누리누스 MC02 (*Thermococcus onnurineus* MC02, 수탁번호: KCTC12511BP) 균주를 제공한다.

[0013] 보다 구체적으로는, 상기 *rchA* 유전자의 발현율의 증가는 상기 유전자 복제수의 증가, 상기 유전자 전사율의 증가, 상기 유전자 번역율의 증가, 상기 유전자 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합에 의해 이루어진다.

[0014] 보다 더 구체적으로는, 상기 유전자 전사율의 증가는 강력한 프로모터를 이용하여 얻어진다. 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터, 시그마 70 프로모터, 박테리오파지 λ의 pL; Plac; Ptrp; Ptac(Ptrp-lac 혼성 프로모터), 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드(IPTG)-유도성 프로모터, 테트라사이클린 유도성 프로모터, 아라비노스 유도성 프로모터, 자일로스-유도성 프로모터, 트립토판 프로모터, lac 프로모터, 알콜-유도성 프로모터 또는 열-유도성 프로모터이다.

[0015] 보다 구체적으로는, 상기 씨모코쿠스 온누리누스 MC02의 균주는 KCTC12511BP 호이다.

[0016] 본 발명의 제 2 의 형태는 씨모코쿠스 속 균주의 *rchA* 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는 것을 특징

으로 하는 수소생산능력이 증가된 써모코커스 속 균주 제조 방법을 제공한다.

- [0017] 보다 구체적으로는, 상기 rchA 유전자의 발현율의 증가는 상기 유전자 복제수의 증가, 상기 유전자 전사율의 증가, 상기 유전자 번역율의 증가, 상기 유전자 발현 단백질의 안정성의 증가 또는 이들의 조합을 사용한 것이다.
- [0018] 보다 더 구체적으로는, 상기 유전자 전사율의 증가는 강력한 프로모터를 이용하여 얻어진다. 상기 프로모터는 글루코우스 디하이드로게나아제(*gdh*)의 프로모터, 시그마 70 프로모터, 박테리오파지 λ 의 pL; Plac; P_{trp}; P_{tac}(P_{trp}-lac 혼성 프로모터), 이소프로필-베타-D44 티오갈락토피라노시드(IPTG)-유도성 프로모터, 테트라사이클린 유도성 프로모터, 아라비노스 유도성 프로모터, 자일로스-유도성 프로모터, 트립토판 프로모터, lac 프로모터, 알콜-유도성 프로모터 또는 열-유도성 프로모터이다.
- [0019] 보다 구체적으로는, 상기 써모코커스 속 균주는 KCTC12511BP 호이다.
- [0020] 본 발명의 제 3 의 형태는 상기 써모코커스 온누리누스 MC02의 균주를 이용한 수소생산방법을 제공한다.
- [0021] 보다 구체적으로는, 상기 수소생산은 60 내지 90 °C 의 온도에서 배양되는 균주를 이용하고, 1 내지 3 기압의 압력에서 일산화탄소를 공급하는 환경에 배양되는 균주를 이용한 수소생산방법을 제공한다.
- [0022] 보다 더 구체적으로는, 상기 일산화탄소는 합성가스 또는 제강산업의 부생가스의 형태로 공급된다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 써모코커스 온누리누스 MC02의 균주는 종래의 야생형의 균주보다 고농도의 일산화탄소에서 성장 속도가 증가하고 수소생산능력이 증가한다.
- [0024] 본 발명에 따른 수소생산방법은 적은 비용으로 고효율적으로 수소를 생산할 수 있고, 합성가스 또는 제강산업의 부생가스를 이용하여 수소를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 TON_1016 서열 정렬을 한 것이다.
- 도 2는 TON_1016 과 TON_1016-1 유전자의 닉아웃 돌연변이에 대한 세포성장(a)과 수소생산속도(b)를 비교한 결과이다.
- 도 3은 프로모터 삽입을 통한 돌연변이를 제작한 것이다.
- 도 4는 MC02 우수균주의 세포성장(a)과 수소생산속도(b)를 비교한 것이다.
- 도 5는 야생형(NA1), MC01 및 MC02 우수균주의 최대세포성장(a)과 최대수소생산속도(b)를 비교한 것이다.
- 도 6은 MC02 우수균주의 일산화탄소(CO) 공급량에 따른 세포성장(a)과 수소생산속도(b)를 비교한 것이다.
- 도 7은 MC02 우수균주의 일산화탄소(CO) 공급량에 따른 최대세포성장(a)과 최대수소생산속도(b)를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0027] 실시예 1. 돌연변이 균주의 개발

- [0028] rchA 유전자(TON_1016, TON_1016-1)는, 일산화탄소에서 자라는 *Thermococcus onnurineus* NA1, *Thermococcus* sp. AM4, *Thermococcus* sp. MP 등의 균주에 있는 codh-mch-mnh3 클러스터의 앞 부분에서 공통적으로 발견되었

고, 균주들로부터 유래한 rchA 단백질을 서열정렬(alignment)한 결과를 보면, N-말단 부위에 Fe-S 모티프와 C-말단 부위에 winged helix-turn-helix 모티프가 있어 일산화탄소의 변화에 따라 DNA 바인딩을 할 수 있는 조절 인자로 추정되었다(도 1).

[0029] 이러한 추정을 바탕으로 rchA 유전자(TON_1016 과 TON_1016-1)의 녹아웃 돌연변이를 만들었고, 일산화탄소를 이용한 균주의 성장과 수소생산을 야생형과 비교한 결과로부터 rchA 유전자(TON_1016, TON_1016-1)는 일산화탄소를 이용한 균주의 성장과 수소생산에 필수적인 유전자임을 확인할 수 있었다(도 2).

[0030] 따라서, 이러한 결과를 바탕으로 유전자 발현 조절 인자인 rchA의 과량발현을 통해 일산화탄소 조건에서 codh-mch-mnh3 클러스터를 과량 발현시키고 동시에 일산화탄소의 독성과 연관이 있을 수 있는 다른 유전자들의 발현 조절 향상을 통해 우수균주 확보를 시도하였다. rchA 유전자의 upstream 지역에 강한 프로모터(gdh promoter)를 삽입하여 우수균주(MC02)의 제작을 시도하였다 (도 3).

[0031] **실시예 2. 돌연변이 균주의 수소생산능력**

[0032] 제작된 우수균주(MC02)의 세포생장과 수소생산성을 측정하기 위해 메쉬 5 μm 스파저(sparger)가 부착된 3L CSTR (continuous stirred-tank reactor)반응기에 working volume 2에서 10 g/l의 효모가 첨가된 MM1 배지를 이용하여 80°C 와 300 rpm 조건으로 100% 일산화탄소 가스를 0.2 vvm 으로 공급하여 비교실험을 수행 하였다.

[0033] 선별된 우수 균주(MC02)의 최대세포농도 비교 시 0.2 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 MC02 균주는 배양 후 12시간에 OD(600nm) 5, MC01 균주는 배양 후 8시간에 2.5, 야생형 NA1은 배양 후 10시간에서 0.5의 최대균체농도를 보였다(도 4a). 수소생산성 비교시 야생균주는 최대수소생산속도가 약 32mmol/l/h, MC01 우수균주는 약 100mmol/l/h, MC02 우수균주는 약 140mmol/l/h으로 나타났다(도 4b). MC02 우수균주는 야생형에 비해 약 4.4배, 이미 보고된 우수균주인 MC01에 비해 약 1.4배 향상된 수소생산성을 나타낸 것이고(도 5), 이는 현재 보고된 균주 중 최고의 수소생산능력을 보여 주는 것이다.

[0034] **실시예 3. 돌연변이 균주의 일산화탄소 독성 극복**

[0035] 일산화탄소를 기질로 이용하기 위해서는 일산화탄소 물질전달속도를 향상시켜 기질 이용을 용이하게 만들어 주는 부분이 상당히 중요하다. 하지만 일산화탄소 물질전달속도를 높여 줌에 따라 세포내에 금속을 함유한 효소나 일산화탄소를 이용하는 주요 효소인 CODH의 활성저해를 야기할 수 있고 이는 일산화탄소 독성이 작용하여 세포 성장과 수소생산성 저해라는 결과를 야기할 수 있다.

[0036] 그러나, MC02 우수균주의 경우에는 rchA라는 조절인자를 과발현시킨 균주이며, 이는 codh 클러스터 외에 다른 regulon들의 발현을 조절함으로써 일산화탄소 독성을 극복할 수 있는 충분한 가능성이 있다. 따라서 일산화탄소 공급량을 0,2 vvm에서 0.3과 0.4 vvm 조건까지 올려 일산화탄소 독성의 극복 여부에 대한 실험을 실시하였다.

[0037] 선별된 우수균주 (MC02)의 세포생장과 수소생산성을 측정하기 위해 메쉬 5 μm 스파저(sparger)가 부착된 3L CSTR (continuous stirred-tank reactor)반응기에 working volume 2에서 10 g/l의 효모가 첨가된 MM1 배지를 이용하여 80 와 300 rpm 조건으로 100% 일산화탄소 가스를 0.2, 0.3, 0.4 vvm 으로 공급하여 비교실험을 수행하였다.

[0038] 선별된 우수 균주(MC02)의 최대세포농도 비교 시 0.2 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 배양 후 10시간에 OD(600nm), 5의 최대균체농도를 보였고, 0.3 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 배양 후 10시간에 OD(600nm), 5.3의 최대균체농도를 보였으며, 0.4 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 배양 후 8시간에 OD(600nm), 2.5의 최대균체농도를 보였다(도 6a). 수소생산성 비교시 0.2 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 약 140mmol/l/h, 0.3 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 약 170mmol/l/h, 0.4 vvm으로 일산화탄소를 공급한 경우 약 140mmol/l/h의 수소생산성을 나타내었다(도 6b). 선별된 우수균주 (MC02)은 야생형과 달리 최대균체농도가 0.2 vvm 뿐만 아니라 0.3 vvm까지 성장에 영향이 없고, 0.4 vvm에서 영향을 받는 것을 나타내었고(도 7a), 최대수소생산성 또한 0.2 vvm 뿐만 아니라 0.3 vvm까지 영향이 없고, 0.4 vvm에서 영향을 받는 것을 나타내었다(도 7b).

[0039] 결과적으로 선별된 우수균주 (MC02)은 야생형과 달리 0.3 vvm까지 성장과 수소생산에 영향이 없고, 최대균체농도와 최대수소생산성을 보여 주고 있다.

수탁번호

[0040]

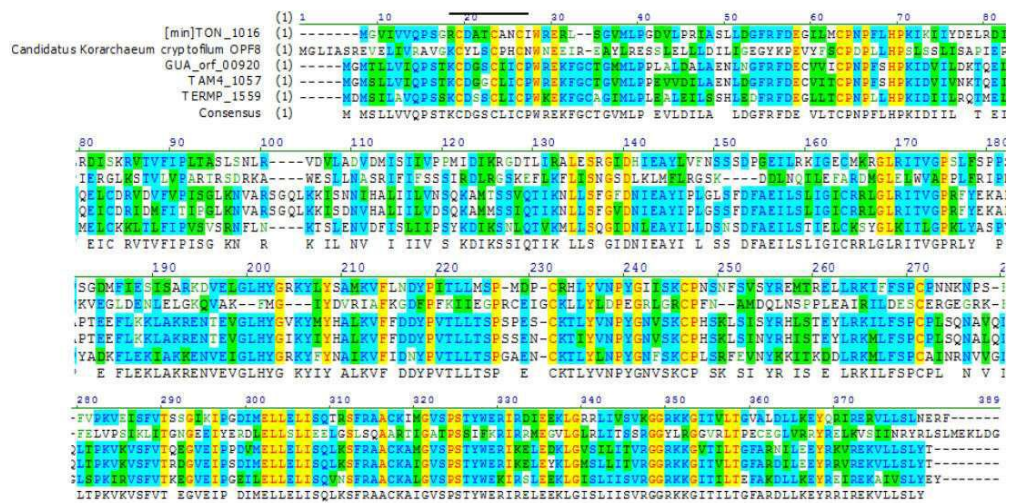
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12511BP

수탁일자 : 20131031

도면

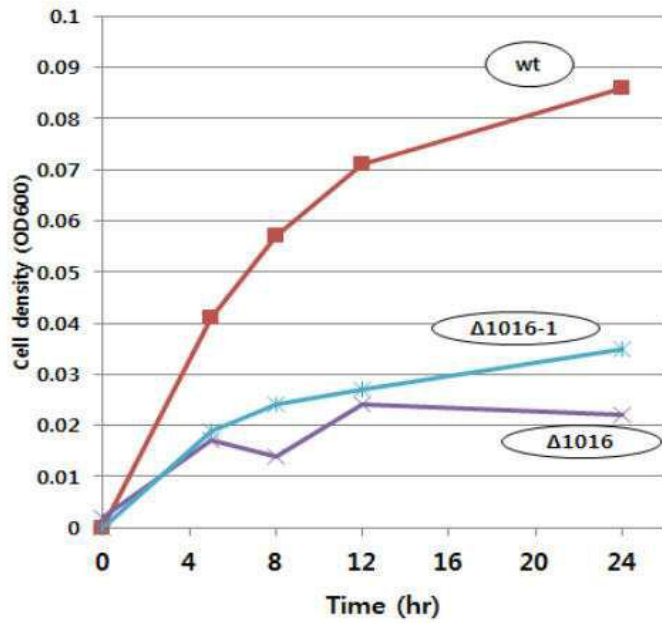
도면1



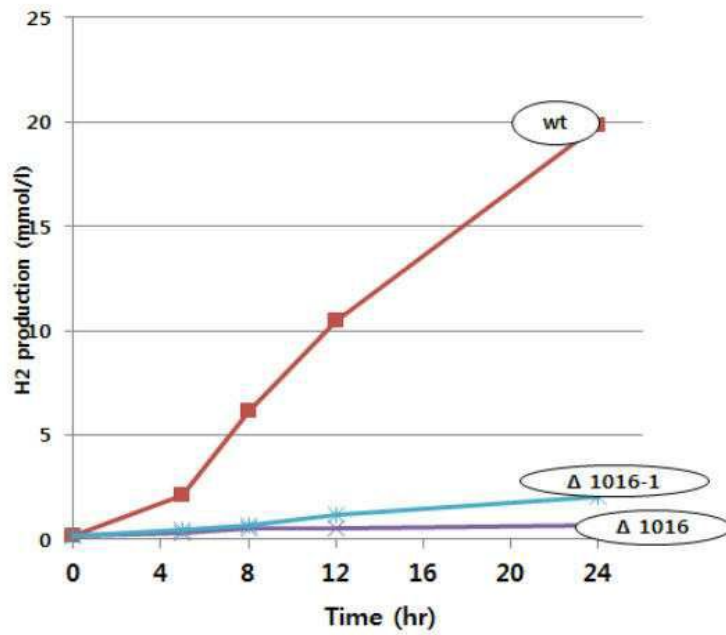
Winged helix-turn-helix motif

GUA: *Thermococcus guaymasensis*
 TAM4: *Thermococcus* sp. AM4
 TERMP: *Thermococcus barophilus* MP

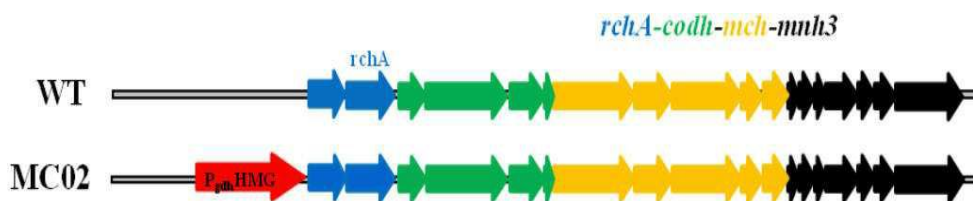
도면2a



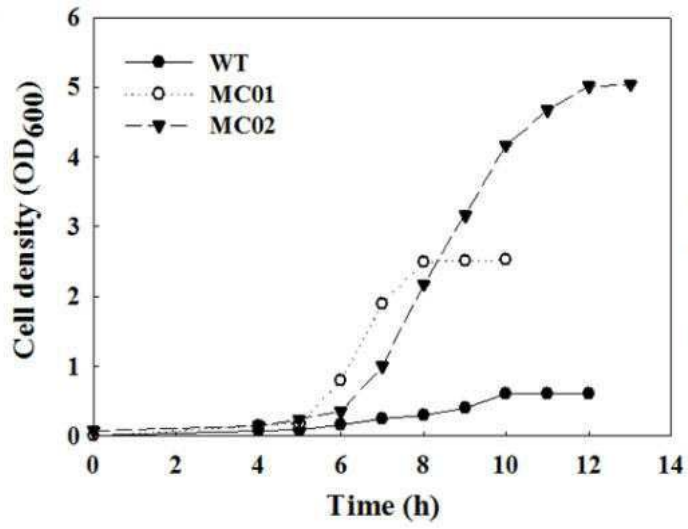
도면2b



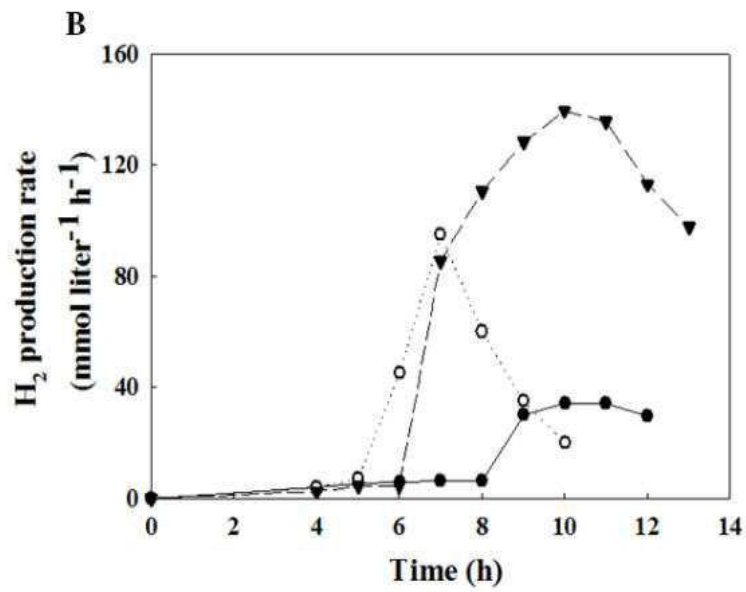
도면3



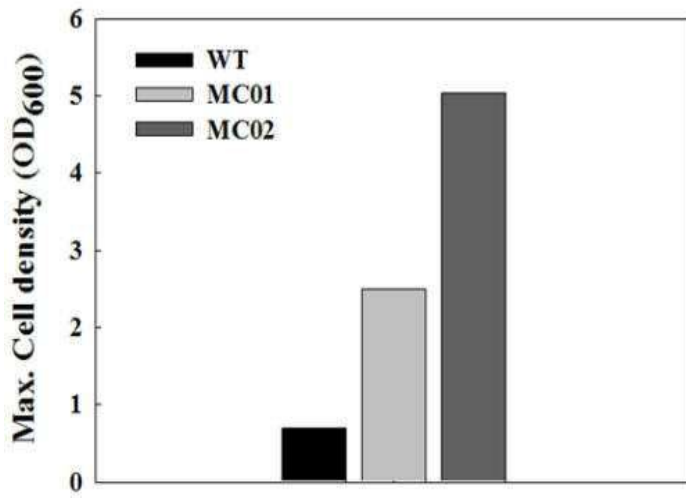
도면4a



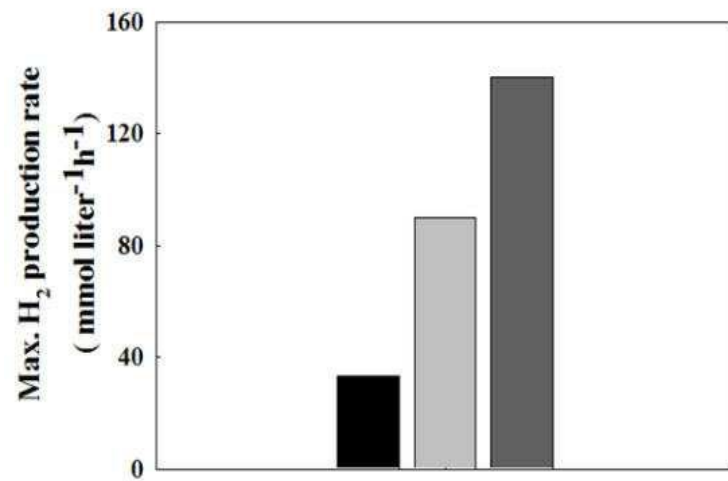
도면4b



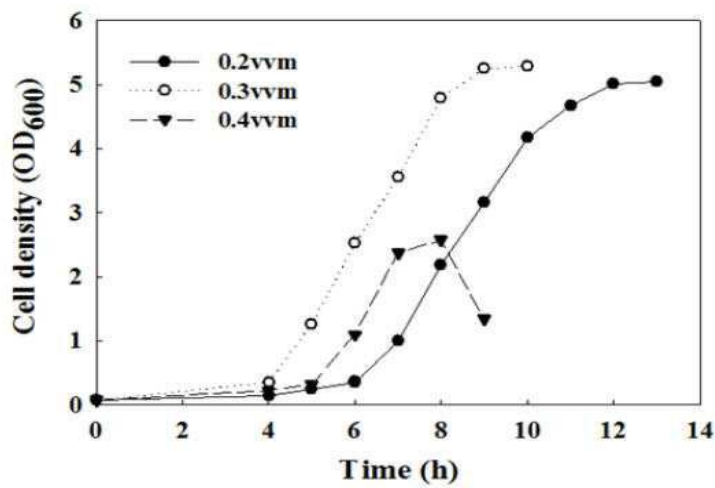
도면5a



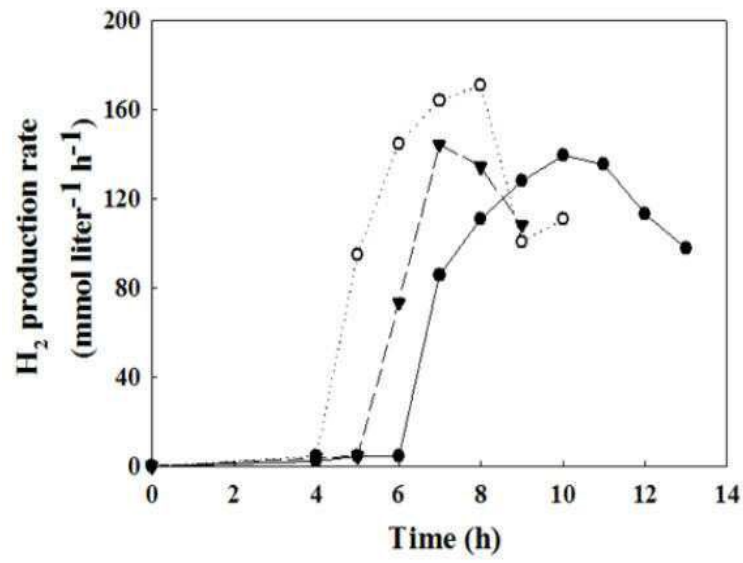
도면5b



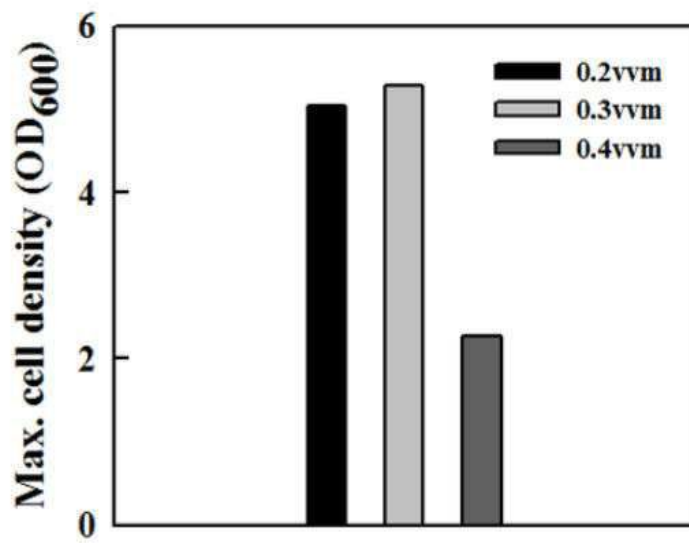
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

