



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024677

(43) 공개일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/00 (2006.01) B09B 101/70 (2022.01)

B09B 3/60 (2022.01) C07K 14/33 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01) C12N 9/26 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/00 (2013.01)

B09B 3/60 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0105675

(22) 출원일자 2023년08월11일

심사청구일자 2023년08월11일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 성북구 고려대로17가길 64 103동 1003호 (안암동1가, 래미안 안암)

이명은

세종특별자치시 달빛로 80 가재마을12단지 1220동 1702호

(74) 대리인

위병갑

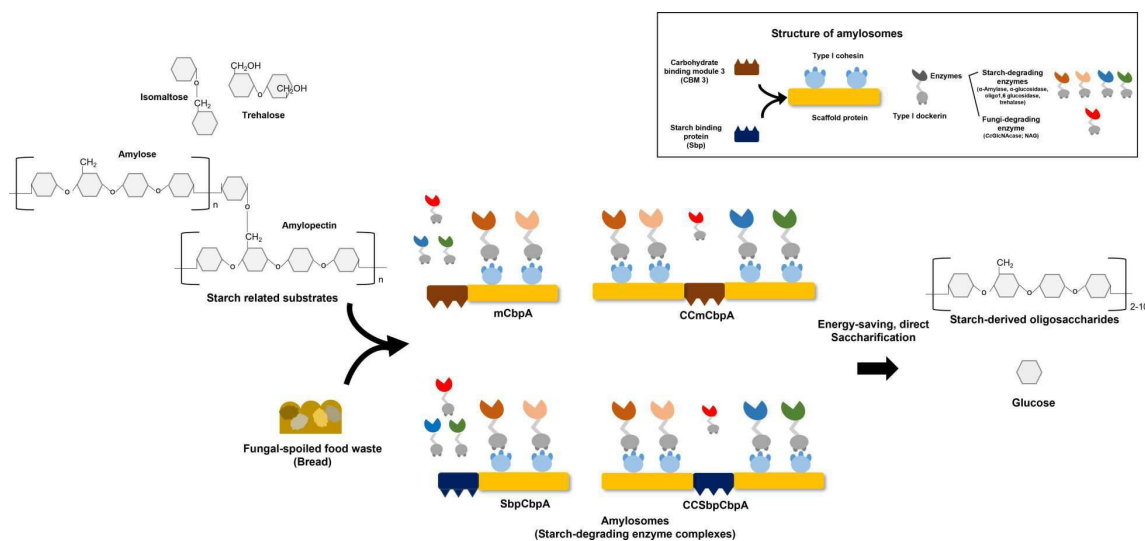
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 전분 당화가 가능한 아밀로솜 및 이를 이용한 폐음식물 처리 방법

(57) 요약

본 발명은 전분 당화가 가능한 아밀로솜 및 이를 이용한 폐음식물 처리 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)은 단일 단계만으로 중온에서 직접적인 전분 당화가 가능하며, 전분 분해 효소 이외에 곰팡이 분해 효소를 추가로 도입하여 곰팡이가 오염된 폐음식물을 효과적으로 분해할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/33 (2013.01)

C12N 9/2402 (2013.01)

C12N 9/2414 (2013.01)

B09B 2101/70 (2022.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013929
과제번호	202203092
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오산업소재국산화기술개발
연구과제명	포르피린 대량생산을 위한 공정표준화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3); 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A)를 변형하여 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)에서,

상기 변형은,

- a) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)으로 치환되거나,
- b) 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되거나,
- c) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)로 치환되고, 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되는 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)은 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 전분 분해 효소가 결합되는 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전분 분해 효소는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase), 트리할레이즈(Trehalase), 글루코아밀레이즈 (Glucoamylase), 포 알파 글루카노 트랜스퍼레이즈 (4- α -Glucanotransferase), 아밀로풀루라네이즈 (Amylopullulanase), 아밀로말테이즈 (Amylomaltase), 베타 아밀레이즈 (β -Amylase) 및 아이소아밀레이즈 (Isoamylase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소 인 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 전분 결합 단백질(Starch binding protein)는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 a) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)으로 치환된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 b) 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 c) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)으로 치환되고, 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein).

청구항 10

전분 분해 효소 및 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)을 포함하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome).

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 전분 분해 효소는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시테이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시테이즈(Oligo 1,6 glucosidase), 트리할레이즈(Trehalase), 글루코아밀레이즈 (Glucoamylase), 포 알파 글루카노 트랜스퍼레이즈 (4- α -Glucanotransferase), 아밀로풀루라네이즈 (Amylopullulanase), 아밀로말테이즈 (Amylomaltase), 베타 아밀레이즈 (β -Amylase) 및 아이소아밀레이즈 (Isoamylase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소인 것을 특징으로 하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome).

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 전분 분해 효소는 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 것을 특징으로 하는,

전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome).

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)은 곰팡이 분해 효소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome).

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 곰팡이 분해 효소는 N-아세틸글루코사미니다제(GlcNAcase), 베타 1,3 글루칸네이즈(β -1,3 Glucanase) 및 키틴 가수분해 효소(Chitinase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소인 것을 특징으로 하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome).

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항의 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 포함하는 폐음식물 처리용 조성물.

청구항 16

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항의 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 폐음식물에 처리하는 단계를 포함하는, 폐음식물 처리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전분 당화가 가능한 아밀로솜 및 이를 이용한 폐음식물 처리 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐음식물은 전세계적으로 많은 양 버려지고 있으며, 다수가 전분 또는 당류를 함유하고 있다. 이러한 폐음식물은 곰팡이가 오염되어 재활용이 어려우며, 곰팡이에 의한 당화과정 저해 현상(내부 전분 기질로의 접근 방해)로 인해 당화효율도 낮다.

[0003] 셀룰로솜(Cellulosome)은 셀룰로오스 분해 관련 효소복합체로 바이오매스를 분해하는 혐기성 미생물의 세포 외벽에 존재하는 것으로 알려져 있다. 셀룰로솜 스캐폴드 구조체에는 코헤신(Cohesin)이라는 도메인이 있고, 셀룰로솜 스캐폴드에 연결되는 외분비 효소 부분에는 도커린(Dockerin)이라는 도메인이 연결되어 있다. 코헤신과 도커린은 칼슘이온에 의해 서로 부착하는 기능이 있어 스캐폴드의 코헤신에 다양한 도커린 연결 외분비 효소들이 연결되어 효소복합체를 형성할 수 있다. 셀룰로솜을 가진 균주는 외부에 사용할 수 있는 기질의 종류에 따라서 관련된 효소들을 다양하게 발현, 부착하고 부착된 여러 효소들 간의 시너지를 이용하여 효율적으로 영양분을 얻고 사용한다. 코헤신-도커린의 상호작용을 응용하여 효소들을 셀룰로솜에 부착하고 이를 통해 향상된 시너지 작용의 효소반응을 일으킬 수 있다.

[0004] 아밀로솜(Amylosome)은 전분 분해 기능을 가진 효소복합체로 혐기성 장내미생물에서 많이 발견되는 것으로 알려져 있다. 그 구조는 셀룰로솜과 유사하게 코헤신, 도커린으로 구성되어 있으며 전분 부착 단백질, 전분 분해 관련 효소들로 다양하게 구성되어 있다. 하지만, 아직 까지 인공적인 형태로 만들어진 아밀로솜에 대한 연구는 많이 보고되고 있지 않다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 셀룰로오스를 분해하는 단백질 복합체인 셀룰로솜을 변형하여 전분을 직접적으로 당화시

킬 수 있는 아밀로솜을 제조하였으며, 상기 아밀로솜에 곰팡이 분해 효소를 추가하였을 때, 곰팡이가 오염된 폐음식물을 직접적으로 당화시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) MA Goldstein et al. "Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A." J Bacteriol. 1993 Sep; 175(18): 5762-5768.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3); 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A)를 변형하여 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)을 제공하는 데 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 전분 분해 효소 및 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)을 포함하는 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)을 제공하는 데 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 포함하는 폐음식물 처리용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 폐음식물에 처리하는 단계를 포함하는 폐음식물 처리 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3); 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A)를 변형하여 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질에서, 상기 변형은 a) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)로 치환되거나, b) 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되거나, c) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)로 치환되고, 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되는 것을 특징으로 하는 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)을 제공한다.
- [0012] 이어서, 본 발명은 전분 분해 효소 및 전분 결합 스캐폴드 단백질을 포함하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)을 제공한다.
- [0013] 또한, 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)은 곰팡이 분해 효소를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 나아가, 본 발명은 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 포함하는 폐음식물 처리용 조성물을 제공한다.
- [0015] 더불어, 본 발명은 상기 폐음식물에 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 처리하는 단계를 포함하는 폐음식물 처리 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)은 단일 단계만으로 중온에서 직접적인 전분 당화가 가능하며, 전분 분해 효소 이외에 곰팡이 분해 효소를 추가로 도입하여 곰팡이가 오염된 폐음식물을 효과적으로 분해할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 직접적인 전분 당화가 가능한 아밀로솜 개발 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 있어서, 4종의 전분 분해 효소 및 전분 결합 단백질의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 분해 효소들과 효소 혼합액의 최적 온도 조건 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 분해 효소들과 효소 혼합액의 최적 pH 조건 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 분해 효소들의 전분 관련 기질에 대한 글루코오스 또는 환원당 기반 specific activity 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 결합 스캐폴드 단백질의 수용성 전분 및 곰팡이가 오염된 전분이 많은 폐 음식물 기질에 대한 부착능 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 분해 효소, 효소혼합액 및 아밀로좀의 전분 관련 기질들에 대한 분해능 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 있어서, 다양한 비율의 전분 분해 효소가 결합된 아밀로좀의 전분 당화 효율을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 당화가 가능한 아밀로좀의 열안정성 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 있어서, 전분 분해 효소를 포함하는 아밀로좀 및 전분 분해 효소 이외에 곰팡이 분해 효소가 추가로 결합된 아밀로좀의 곰팡이가 오염된 폐음식물에 대한 당화 효율 비교 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0019] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0020] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어, “중온”은 25℃ 내지 40℃를 의미한다.
- [0022] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0024] 일 측면에 있어서, 본 발명은 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3); 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A)를 변형하여 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 변형은
- [0026] a) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)로 치환되거나,
- [0027] b) 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되거나,
- [0028] c) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding

protein)로 치환되고, 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)은 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 전분 분해 효소가 결합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어, “소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A)”는 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래 Cellulose-binding protein A (CbpA)에서 파생된 것으로, 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3) 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 셀룰로솜(Cellulosome)을 의미한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 분해 효소는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase), 트리할레이즈(Trehalase), 글루코아밀레이즈 (Glucoamylase), 포 알파 글루카노 트랜스퍼레이즈 (4- α -Glucanotransferase), 아밀로풀루라네이즈 (Amylopullulanase), 아밀로말테이즈 (Amylomaltase), 베타 아밀레이즈 (β -Amylase) 및 아이소아밀레이즈 (Isoamylase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소일 수 있으며, 바람직하게는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)에서 선택된 어느 하나 이상의 효소일 수 있고, 더욱 바람직하게는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)일 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어 “알파 아밀레이즈(α -Amylase)”는 전분 내 α -1,4 linkage를 분해하여 말토오스(Maltose)와 말토올리고당(Maltoooligosaccharide)을 생산하는 효소이다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어 “알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase)”는 엑소타입(Exo-type) 가수분해 효소로, α -1,4 linkage의 이당류와 올리고당의 말단을 분해하여 글루코오스를 만드는 효소이다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어 “올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase)”는 전분 내 가지구조(Branch)의 α -1,6 linkage 또는 α -1,6 linkage를 가진 이당류인 이소말토오스(Isomaltose)를 분해하는 효소이다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어, “트리할레이즈(Trehalase)”는 α -1,1 linkage를 가진 트리할로오스를 분해하는 효소이다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 결합 단백질(Starch binding protein)은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 a) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)으로 치환된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 b) 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 c) 상기 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3)이 전분 결합 단백질(Starch binding protein)으로 치환되고, 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 더 포함하도록 변형된 전분 결합 스캐폴드 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 일 측면에 있어서, 본 발명은 전분 분해 효소 및 상기 전분 결합 스캐폴드 단백질(Starch binding scaffold protein)을 포함하는, 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)에 관한 것이다.

- [0044] 본 발명의 전분 당화가 가능한 아밀로솜은 상술한 전분 결합 스캐폴드 단백질을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 전분 결합 스캐폴드 단백질과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 분해 효소는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase), 트리할레이즈(Trehalase), 글루코아밀레이즈(Glucoamylase), 포 알파 글루카노 트랜스퍼레이즈(4- α -Glucanotransferase), 아밀로풀루라네이즈(Amylopullulanase), 아밀로말테이즈(Amylomaltase), 베타 아밀레이즈(β -Amylase) 및 아이소아밀레이즈(Isoamylase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소일 수 있으며, 바람직하게는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)에서 선택된 어느 하나 이상의 효소일 수 있고, 더욱 바람직하게는 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 분해 효소는 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 분해 효소 및 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)은 링커(Linker)로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다,
- [0048] 또한, 상기 링커(Linker)는 3 내지 60개의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 17의 염기서열로 표시되는 링커(Linker)일 수 있으나, 당 업계에서 알려진 링커(Linker)라면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)은 서열번호 18의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 알파 아밀레이즈(α -Amylase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 19의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 20의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 트리할레이즈(Trehalase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜(Amylosome)은 곰팡이 분해 효소를 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 곰팡이 분해 효소는 N-아세틸글루코사미니다제(GlcNAcase), 베타 1,3 글루카네이즈(β -1,3 Glucanase) 및 키틴 가수분해 효소(Chitinase)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소일 수 있고, 바람직하게는 N-아세틸글루코사미니다제(CcGlcNAcase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 N-아세틸글루코사미니다제(GlcNAcase)는 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래 N-아세틸글루코사미니다제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 곰팡이 분해 효소는 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)이 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래 N-아세틸

글루코사미니다제(CcGlcNACase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 23의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다.

- [0059] 본 발명에서 사용되는 용어, “클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래 N-아세틸글루코사미니다제(CcGlcNACase)”는 디스코이딘 도메인(discoidin domain) 함유 단백질 및 키토비아제/ β -헥소사미니다제 C 말단 도메인과의 높은 상동성을 기반으로 하는 키틴 분해 효소로서, 다양한 길이의 N-아세틸-D-글루코사민으로부터 N-아세틸-D-글루코사민을 생산하며, 효소 내부에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin) 도메인을 포함한다(Myong-Eun Lee et al. 2021. *Bioresource Technology*).
- [0061] 일 측면에 있어서, 본 발명은 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 포함하는 폐음식물 처리용 조성물에 관한 것이다.
- [0062] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아밀레이스(Amylase), 셀룰레이스(Cellulase), 라이페이스(Lipase) 및 프로테아제(Protease)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 폐음식물 처리용 조성물에 일반적으로 포함되는 폐음식물 분해 기능을 가지는 미생물을 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 일 측면에 있어서, 본 발명은 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 폐음식물에 처리하는 단계를 포함하는, 폐음식물 처리 방법에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명의 폐음식물 처리 방법은 상술한 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 전분 당화가 가능한 아밀로솜과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0068] 상기 전분 당화가 가능한 아밀로솜은 아밀로오스, 아밀로펙틴, 이소말토오스, 트레할로스와 같은 전분 관련 기질에 높은 분해 활성을 가지며, 단일 단계만으로 폐음식물을 분해할 수 있고, 중온에서 우수한 전분 당화 효율을 나타내기 때문에, 상기 아밀로솜을 폐음식물에 적용할 경우 폐음식물을 유용 산물로 전환할 수 있어 경제적이고 환경친화적으로 활용될 수 있다.
- [0070] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.
- [0072] <실시예 1> 직접적으로 전분 당화가 가능한 아밀로솜의 제조
- [0073] 1-1. 아밀로솜을 위한 다양한 형태의 전분 결합 스캐폴드 단백질 유전자 증폭 및 클로닝
- [0074] 도 1을 참조하여, 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3); 및 2개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)을 포함하는 소형 셀룰로오스 결합 단백질 A(Mini cellulose binding protein A, 이하 mCbpA)를 변형하여 전분 결합 스캐폴드 단백질을 제조하였다. 상기 전분 결합 스캐폴드 단백질에 전분 분해 효소를 결합하면 직접적으로 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 제조할 수 있다.
- [0075] 아밀로솜에 쓰일 전분 결합 스캐폴드 단백질을 다양하게 디자인하고 발현하기 위해 기반이 되는 구조 단백질인 셀룰로솜 mCbpA의 유전자 확보 과정을 진행하였다. 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*)의 유전체 DNA(Genomic DNA)로부터 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3, 서열번호 9), 유형 1 코헤신(type 1 cohesin, 서열번호 10 또는 서열번호 11)을 포함하는 mCbpA(서열번호 16)의 염기서열을 증폭하였다. 기존 mCbpA에 포함된 탄수화물 결합 모듈 3(Carbohydrate binding module family 3, 이하 CBM3)을 전분 부착 단백질(Starch binding protein, 이하 Sbp)로 변형하기 위해 Sbp를 코딩하는 염기서열(서열번호 12)을 유전자 합성하였다. 본 발명에서 사용된 각 전분 결합 스캐폴드 단백질에 대한 프라이머 및 플라스미드는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0077]

프라이머	서열(5'→3')
mCbpA-F(EcoRI)	accctGAATTCgcagcgacatcatcaatg
mCbpA-R(PstI)	cccCTGCAGTcatataggatctccaatatttattgtaacg
CCmCbpA-F(SacI)	cccGAGCTCccagatgtaccatcttcaataattaa
CCmCbpA-R(XhoI)	ccccCTCGAGtataggatctccaatatttattgtaacgc
Sbp-F(EcoRI)	cccaaGAATTCTCTCGCAATCGTTACCTG
Sbp_CbpA-R(ov)	tgaagatggtacatctggGAACGTGCCGACACTC
Sbp_CbpA-F(ov)	GTGTCGGCACGTTCCcagatgtaccatcttcaataatt
플라스미드	특성
pColdII_mCbpA	pColdII carrying mCbpA gene
pColdII_CCmCbpA	pColdII carrying CCmCbpA gene
pColdII_SbpCbpA	pColdII carrying SbpCbpA gene
pColdII_CCSbpCbpA	pColdII carrying CCSbpCbpA gene

[0079]

mCbpA에서 CBM3를 Sbp로 치환시킨 전분 결합 스캐폴드 단백질은 SbpCbpA로 명명하였고, mCbpA에서 CBM3의 N 말단에 2개의 유형 1 코헤신을 더 포함하도록 재조합된 전분 결합 스캐폴드 단백질의 경우, CC라는 명칭을 더 붙여 CCmCbpA로 명명하였으며, 상기 두 가지 변형을 모두 포함하는 전분 결합 스캐폴드 단백질은 CCSbpCbpA로 명명하였다. 본 발명에서 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질에 대한 정보는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0081]

명칭	특징	서열번호	
		아미노산	엽기
SbpCbpA	Sbp(서열번호 12); type 1 cohesin(서열번호 10); type 1 cohesin(서열번호 11)	5	13
CCmCbpA	type 1 cohesin(서열번호 10); type 1 cohesin(서열번호 11); CBM3(서열번호 9); type 1 cohesin(서열번호 10); type 1 cohesin(서열번호 11)	6	14
CCSbpCbpA	type 1 cohesin(서열번호 10); type 1 cohesin(서열번호 11); Sbp(서열번호 12); type 1 cohesin(서열번호 10); type 1 cohesin(서열번호 11)	7	15

[0083]

1-2. 전분 분해 관련 효소들에 대한 유전자 중복 및 클로닝

[0084]

직접적으로 전분 당화 가능한 아밀로솜을 구성하는 효소로 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)를 선정하였다.

[0085]

알파 아밀레이즈(α -Amylase)는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 유전체 DNA(genomic DNA)에서 확보하였으며, 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)는 대장균(*Escherichia coli* k12)의 유전체 DNA(Genomic DNA)에서 유래하였다.

[0086]

각각의 효소는 각 효소를 코딩하는 유전자의 하류 서열에 링커(서열번호 17, GGATCCGCTGGCTCCGCTGCTGGTTCTGGGGAATTC) 및 유형 1 도커린(Type 1 dockerin, 서열번호 18)을 더 포함하도록 재

조합하여 효소의 C-말단에 유형 1 도커린이 연결된 재조합 효소를 제조하였다. 해당 유전자들은 대장균에서 이 중발현하기 위해 pColdII 벡터로 클로닝을 진행하였다. 최종적으로 각 효소 유전자-링커-유형 1 도커린의 형태로 유전자를 만들었으며 pColdII 벡터에 삽입하였다. 본 발명에서 사용된 각각의 효소에 대한 프라이머 및 플라스미드는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

프라이머	서열(5'→3')
α-Amylase-F(SacI)	attGAGCTCGAAACGGCGAACAATCG
α-Amylase-R(XhoI)	ccccCTCGAGTTGAAAGAATGTGTTACACCTGATT
α-Glucosidase-F(SacI)	aaaGAGCTCATGTTAAATGCATGGCACCTGC
α-Glucosidase-R(XhoI)	aattCTCGAGTTTCATCCATACCGTAGCCGA
Oligol,6 glucosidase-F(SacI)	aatGAGCTCAGTGAATGGTGGAAAGAAGCT
Oligol,6 glucosidase-R(XhoI)	aattCTCGAGTATACTAATGCCCATCACAGCTTCA
TreA-F(SacI)	aatGAGCTCGAAGAAACACCGGTAACACCaca
TreA-R(HindIII)	aatAAGCTTAGGTGTGGGTTGTGCCTC
플라스미드	특성
pColdII	PcspA, lacI, AmpR, ColE1 ori ; <i>E. coli</i> vector for regulating gene expression
pColdII_α-Amylase	pColdII carrying α-amylase doc gene
pColdII_α-Glucosidase	pColdII carrying α-glucosidase doc gene
pColdII_Oligol,6 glucosidase	pColdII carrying oligol,6 glucosidase doc gene
pColdII_Trehalase	pColdII carrying trehalase doc gene

1-3. 전분 분해 효소들과 다양한 전분 결합 스캐폴드 단백질들의 대장균에서의 발현 및 정제

상기 실시예 1-1 및 1-2에서 확보한 유전자 및 이를 클로닝한 플라스미드를 대장균으로 형질전환 하였다. 이렇게 만들어진 재조합 균주들을 하기 표 4와 같이 명명하였다. 해당 재조합 균주들로부터 효소 및 단백질을 발현 하기 위한 배양을 수행하였다. 엠펜실린(Ampicilin)이 함유된 5 ml LB 배지에 재조합 균주들을 접종하여 20시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 해당 초기 배양액을 엠펜실린이 함유된 500 ml LB 배지에 옮겨 본 배양을 진행하였다. 해당 본 배양은 37 °C에서 먼저 배양을 시작하고, O.D.600이 1에 도달하면 최종 농도 1mM이 되도록 IPTG를 넣어서 유전자 발현을 하였다. IPTG를 넣은 후, 16 °C에서 24시간 배양하였다. 해당 배양액은 원심분리를 통해 배지 상등액을 제거하였고 최종적으로 세포를 모았다. 모든 재조합 균주 세포들을 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심 분리하여 상등액을 확보하였다. 이미다졸(Imidazol) 농도 차이에 의한 친화성 크로마토그래피 방법을 이용해 단백질의 N-terminal에 연결되어 있는 His-tag으로 정제하였다. 10% SDS-PAGE gel로 전기영동을 수행하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다(Lane M: protein marker, Lane 1: α-Amylase(59.07 kDa), Lane 2: α-Glucosidase(76.78 kDa), Lane 3: Oligo 1,6 glucosidase(71.94 kDa), Lane 4: Trehalase(68.53 kDa), Lane 5: mCbpA(62.92 kDa), Lane 6: CCmCbpA(104.5 kDa), Lane 7: SbpCbpA(59.07 kDa), Lane 8: CCSbpCbpA(101.64 kDa))을 나타낸다.

도 2에 나타낸 바와 같이, 코마시블루(Comassie blue dye)를 통해 염색한 결과가 예상한 단백질 사이즈 [알파 아밀레이즈(α-Amylase 59.07 kDa), 알파 글루코시테이즈(α-Glucosidase; 76.78 kDa), 올리고 1,6 글루코시테이즈(Oligo 1,6 glucosidase; 71.94 kDa), 트리할레이즈(Trehalase; 68.53 kDa), mCbpA(62.92 kDa), CCmCbpA(104.5 kDa), SbpCbpA(59.07 kDa), CCSbpCbpA(101.64 kDa)]와 동일한 위치에서 나타남을 확인하였다.

표 4

재조합 균주명	특성
α-Amylase	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_α-Amylase
α-Glucosidase	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta harboring pColdII_α-Glucosidase
Oligol,6 glucosidase	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_Oligol,6 glucosidase

Trehalase	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_TreA
mCbpA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_mCbpA
CCmCbpA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_CCmCbpA
SbpCbpA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_SbpCbpA
CCSbpCbpA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_CCSbpCbpA

[0096] 1-4. 전분 분해 효소 및 전분 결합 스캐폴드 단백질이 결합된 아밀로솜의 제조

[0097] 알파 아밀레이즈(α -Amylase), 알파 글루코시데이즈(α -Glucosidase), 올리고 1,6 글루코시데이즈(Oligo 1,6 glucosidase) 및 트리할레이즈(Trehalase)를 상기 실시예 1-1에 기재된 전분 결합 스캐폴드 단백질과 결합시켜 직접적으로 전분 당화가 가능한 아밀로솜을 제조하였다.

[0098] 구체적으로, 해당 전분 분해 효소들 - 전분 결합 스캐폴드 단백질의 연결 반응은 전분 결합 스캐폴드 단백질 내 코헤신 갯수에 맞춰서 1 : 1이 되도록 농도를 맞추어 진행하였다. 연결하기 위한 반응 조건은 25 mM 시트르산나트륨(sodium citrate)(pH 6.0)과 15 mM 염화칼슘(Calcium chloride, CaCl_2)이 혼합된 완충액에서 4 °C, 18시간 동안 진행되는 것으로 하였다.

[0100] <실시예 2> 전분 분해 효소들과 효소 혼합액의 최적 조건

[0101] 상기 실시예 1에서의 재조합 균주들로부터 확보한 전분 분해 효소들 및 효소 혼합액의 최적 반응 조건을 확인하기 위해, 각 효소의 최적 기질과 반응을 수행하였다. 알파 아밀레이즈는 0.15% 수용성 전분(Soluble starch), 알파 글루코시데이즈는 1 mM 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside(pNPGlc), 올리고 1,6 글루코시데이즈는 1 mM 이소말토오스(Isomaltose), 트리할레이즈는 1 mM 트리할로오스(Trehalose)를 기질로 사용해서 반응을 진행하였다. 최적 온도는 25-60 °C에서 반응 진행하였으며, 최적 pH는 pH 4-9 구간을 완충하는 적절한 10 mM 버퍼를 사용하여 반응하였다. 반응 후, pNPGlc를 사용한 반응은 0.1 N NaOH를 통해 반응을 종결하였다. 반응 산물로 방출되는 4-nitrophenol은 400 nm에서 측정하였다. 수용성 전분과의 반응은 DNS 방식으로 540 nm에서 측정하였다. 이소말토오스와 트리할로오스와의 반응은 glucose oxidase kit를 사용하여 340 nm에서 측정하였다. 해당 결과들은 상대값으로 계산하였으며, 알파 아밀레이즈는 40 °C, 소듐 시트레이트(Sodium citrate) pH 6, 알파 글루코시데이즈는 45 °C, 소듐 시트레이트(Sodium citrate) pH 5, 올리고 1,6 글루코시데이즈는 35 °C, 소듐 포스페이트(Sodium phosphate) pH 6, 트리할레이즈는 35 °C, 트리스 에이치씨엘(Tris HCl) pH 7에서 가장 좋은 효소 활성을 보였다. 최종적으로 효소 혼합액은 35 °C, 소듐 시트레이트(Sodium citrate) pH 6에서 가장 좋은 효소 활성을 보이는 것을 확인하였다. 이 결과를 도 3 및 4에 도시하였다.

[0103] <실시예 3> 전분 분해 효소들의 specific activity 측정

[0104] 상기 실시예 1에서 확보한 전분 분해 효소들의 전분 관련 기질들에 대한 specific activity를 확인하기 위해, 관련 반응을 수행하였다. 0.15% 수용성 전분, 0.15% 아밀로오스, 0.15% 아밀로펙틴, 1 mM 이소말토오스, 1 mM 트리할로오스를 기질로 사용하고 35 °C, 소듐 시트레이트 pH 6 버퍼를 사용하여 18시간 동안 반응을 진행하였다. 해당 반응들은 glucose oxidase kit를 통해서 생성되는 글루코오스양과 DNS 방식을 통해 환원당량을 측정하였으며, 이를 통해서 specific activity(nmole/ min mg 또는 $\mu\text{mole/ min mg}$)를 계산하였다.

[0105] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 글루코오스 생산 측면에 있어서 수용성 전분, 아밀로오스, 아밀로펙틴에서 엔도 타입인 알파 아밀레이즈가 가장 높은 효소 활성을 보였다. 수용성 전분, 아밀로오스에 대해서는 차순으로 엑소 타입인 알파 글루코시데이즈가 높은 효소 활성을 보였다. 가지형 기질인 아밀로펙틴에 대해서는 차순으로 가지 형태를 잘 분해하는 올리고 1,6 글루코시데이즈가 높은 효소 활성을 보임을 확인하였다. α -1,6 linkage로 구성된 이당류인 이소말토오스에 대해서는 올리고 1,6 글루코시데이즈가 가장 높은 효소 활성을 보였다. α -1,1 linkage로 구성된 트리할로오스에 대해서 여러 효소들이 활성이 높은 편으로 나타났으나 그중에서도 트리할레이즈가 가장 높은 효소 활성을 보였다. 환원당 생산 측면에 있어서는 수용성 전분, 아밀로오스, 아밀로펙틴에 대해서 엔도 타입인 알파 아밀레이즈가 가장 높은 효소 활성을 보였다. 아밀로오스에 대해서 차순으로 엑소 타입인 알파 글루코시데이즈가 높은 활성을 보였다. 아밀로펙틴에 대해서는 가지 구조 분해 가능한 올리고 1,6 글루

코시테이즈가 차순으로 높은 활성으로 보였다.

[0106] 이러한 결과는 선정된 네 가지 효소들이 목표기질을 가장 잘 분해하는 효소로써 역할을 할 것이고, 이 효소들이 적절히 잘 선정되었음을 의미한다.

[0108] <실시예 4> 다양한 전분 결합 스캐폴드 단백질의 수용성 전분과 곰팡이가 오염된 전분이 많은 폐음식물에 대한 부착능

[0109] 실시예 1-1에서 제조된 전분 결합 스캐폴드 단백질 mCbpA, CCmCbpA, SbpCbpA 및 CCSbpCbpA의 수용성 전분과 곰팡이가 오염된 전분이 많은 폐음식물에 대한 부착능을 확인해보기 위해, 부착 반응을 수행해보았다. 곰팡이가 오염된 폐음식물은 식빵으로 선정하였고 해당 식빵은 지역 베이커리에서 구입하였다. 곰팡이가 오염된 폐음식물 형태의 기질을 만들기 위해 식빵을 autoclave 하였고, 드라이오븐에서 건조하였다. 건조된 식빵을 갈아서 가루 형태로 만들고, 15 g 식빵 가루를 플라스크에 넣고 아스퍼질러스 니듀란스(*Aspergillus nidulans*)를 접종하였다. 아스퍼질러스 니듀란스가 접종된 식빵 가루는 37 ° C에서 1주일간 배양하였다. 배양 후, 곰팡이가 오염된 식빵 기질을 원심분리하여 회수하고 멸균수로 3번 워시하였다. 워시한 폐음식물 기질을 드라이오븐에서 말리고 최종적으로 갈아 가루로 만들었다. 해당 접종 과정에 사용한 아스퍼질러스 니듀란스는 potato dextrose agar와 broth를 사용하여 37 ° C에서 1주일간 배양하였다. 배양한 곰팡이는 회수하여 멸균수로 3번 워시하였다. 균질화 기계로 고르게 만든 뒤, 앞서 설명한 식빵 가루에 접종하였다.

[0110] 이렇게 만들어진 곰팡이가 오염된 폐음식물과 수용성 전분 60 mg에 mCbpA, CCmCbpA, SbpCbpA 또는 CCSbpCbpA를 약 200 ug/mL 농도로 첨가하고 100 mM 소듐 포스페이트(Sodium phosphate) pH 7.0 버퍼에서 최종 볼륨 700 ul로 부착 반응을 수행하였다. 해당 반응은 15 ° C에서 45분간 300 rpm에서 수행하였다. 부착 반응 이후, 13000 rpm에서 1분간 원심분리하고 불지 않은 단백질의 양을 브래드포드 시약(Bradford reagent)을 통해서 595 nm에서 분석하였다. 기준이 되는 스탠다드는 알부민 단백질(BSA; Bovine serum albumin)를 사용하였다. 넣어준 단백질 양과 불지 않은 단백질양을 퍼센트화하여 부착능(%)를 계산하였다.

[0111] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 수용성 전분과 곰팡이가 오염된 전분이 많은 폐음식물에 대해서 높은 부착능을 보임을 확인할 수 있었으며, 특히 CBM 3가 Sbp로 치환된 아밀로솜인 SbpCbpA와 CCSbpCbpA가 가장 높은 부착능을 보임을 확인할 수 있었다.

[0113] <실시예 5> 단일효소, 효소혼합액, 아밀로솜의 효소 반응 비교

[0114] 4종의 전분 분해 효소들이 결합된 다양한 아밀로솜의 효소적 활성을 비교하기 위해, 실시예 1-4에 기재된 바와 같이 아밀로솜의 전분 결합 스캐폴드 단백질 내 코헤신(cohesin) 자리 수에 따라 총 4가지 전분 분해 효소들이 1:1:1:1로 연결되도록 아밀로솜과 효소의 결합 반응을 진행하였다. 해당 4종의 전분 분해 효소 및 아밀로솜의 결합 반응은 25 mM 소듐 시트레이트 pH 6.0, 15 mM CaCl₂가 섞인 버퍼용액에서 4 ° C, 18시간 동안 진행하였다. 이렇게 연결된 아밀로솜과 단순 효소 혼합액, 단일 효소를 0.15% 수용성 전분, 0.15% 아밀로오스, 0.15% 아밀로펙틴, 1 mM 이소말토오스, 1 mM 트리할로오스와 35 ° C에서 18시간 반응하였다.

[0115] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 전분 분해 효소가 결합된 아밀로솜이 단일 효소보다는 높은 글루코오스 생산능을 보였으나 단순 효소 혼합액과는 비슷한 글루코오스 생산량을 보임을 확인할 수 있었다. 환원당 생산에 대해서는 수용성 전분과 아밀로오스에 대해서 아밀로솜이 단일 효소, 단순 효소혼합액보다 많은 양 생산하는 것으로 확인되어 올리고당(Oligosaccharide)을 더 잘 생산하는 것으로 확인되었다.

[0117] <실시예 6> 전분에 대한 당화능 향상을 위한 아밀로솜 변형과 최적화

[0118] 4종의 전분 분해 효소들의 비율을 조정하여 mCbpA, CCmCbpA, SbpCbpA 및 CCSbpCbpA에 결합시키고 이를 통해 전분에 대한 당화능을 향상시키고자 하였다. 먼저, 하나의 효소가 다른 효소의 2배 만큼 포함하는 4개의 아밀로솜을 제조하고자 하였으며, 각 효소가 아밀로솜에 1:1로 연결될 수 있도록 아밀로솜의 비율도 조정하였다. 상기 실시예 4에서 설명한 전분 분해 효소 및 아밀로솜의 결합 반응을 통해 최종적으로 비율이 변경된 아밀로솜을 제조하였다. 각 효소의 비율을 달리하여 제조된 아밀로솜들은 수용성 전분, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 이소말토오스, 트리할로오스에 대해서 35 ° C에서 18시간 반응하였다. 해당 반응액을 DNS 반응을 통해 540 nm에서 측정하

여 생성된 환원당량을 상대적인 값으로 분석하였다.

[0119] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 전분에 대한 당화능에 있어서는 특정 효소를 더 많이 포함한다고 하여도 4종의 효소를 동일비율로 포함하는 아밀로솜과 큰 차이를 나타내지 않았으나, 아밀로오스에 대한 당화능에 있어서는 알파 아밀레이즈를 다른 효소에 비해 2배 만큼 포함하는 아밀로솜이 다른 아밀로솜에 비해 현저히 향상된 가수분해능을 보였으며, 아밀로펙틴에 대한 당화능에 있어서는 4종의 효소를 동일비율로 포함하는 아밀로솜과 비교하여 하나의 효소가 다른 효소의 2배 만큼 포함하는 4개의 아밀로솜이 약간 더 높은 가수분해능을 보이는 것을 확인하였다.

[0121] <실시예 7> 다양한 아밀로솜의 열 안정성 확인

[0122] 상기 실시예 5에 기재된 전분 분해 효소들이 결합된 아밀로솜에 대한 높은 온도에서의 열 안정성을 확인하기 위해, mCbpA, CCmCbpA, SbpCbpA, CCSbpCbpA 및 단순 효소혼합액에 대한 열안정성 반응 분석 실험을 수행하였다. 일반적인 전분 당화과정은 55~65 °C에서 이루어져서 조금 더 높은 온도인 70 °C에서의 열안정성을 테스트하였다. 아밀로솜들을 70 °C에서 0, 0.5, 1, 3, 6시간 동안 열처리를 하고 원심분리한 뒤, 상등액을 0.15% 수용성 전분과 반응하였다. 수용성 전분과의 반응은 상기 실시예 4에서 설명한 최적 반응 조건에서 수행하였고, 반응 시간은 18시간으로 하였다. 반응 후, 생산된 환원당은 DNS 방법으로 540 nm에서 최종 측정하였다. 측정된 값들은 상대값으로 산출하였다.

[0123] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 모든 아밀로솜들이 단순 효소 혼합액에 비해 높은 열 안정성을 보였으며, 특히 6시간 열처리 후에는 Sbp 기반의 아밀로솜들(SbpCbpA, CCSbpCbpA)이 유의적으로 높게 효소 활성을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0125] <실시예 8> 곰팡이가 오염된 폐음식물에 대한 아밀로솜들의 직접 당화능

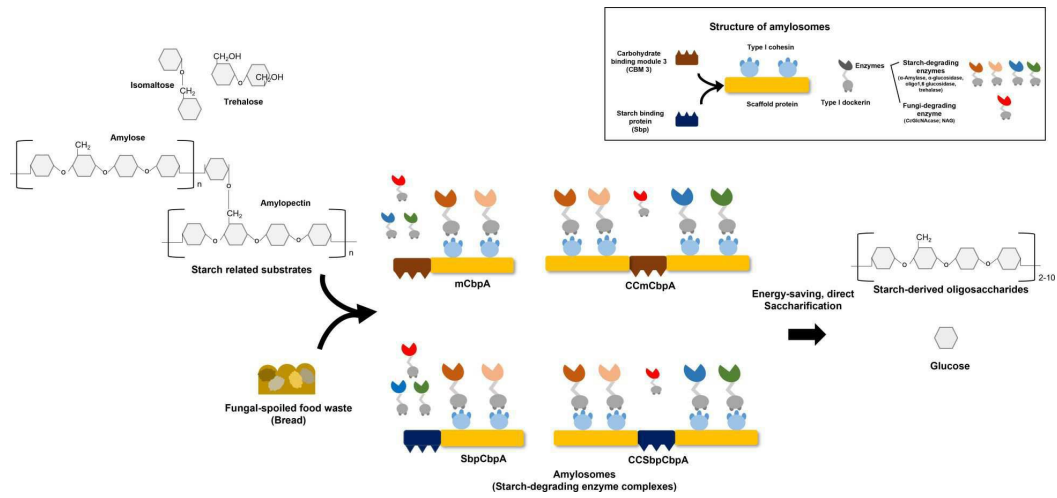
[0126] 곰팡이도 분해 가능한 전분 당화 아밀로솜을 제조하기 위해, C-말단에 유형 1 도커린이 연결된 4종의 전분 분해 효소(알파 아밀레이즈, 알파 글루코시데이즈, 올리고 1,6 글루코시데이즈 및 트리할레이즈) 이외에 NAG 효소(CcGlcNACase, 서열번호 23)를 추가로 첨가하여 실시예 1-4에 기재된 방법으로 mCbpA, CCmCbpA, SbpCbpA 및 CCSbpCbpA에 결합시키고, 이를 곰팡이가 오염된 전분이 많은 폐음식물에 접종하여 해당 폐음식물에 대한 응용 가능성을 확인하였다. 해당 반응은 0.06 g의 곰팡이가 오염된 폐음식물에 적용하였으며, 35 °C에서 18시간 수행하였다. 이를 통해 생산되는 환원당과 글루코오스의 양은 각각 DNS 방법(540 nm에서 측정)과 high-performance liquid chromatography(HPLC)(Detector: refractive index detector/ Column: Hi-plex H column)로 분석하였다.

[0127] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 환원당 생산에 있어서 곰팡이 분해 효소가 추가로 결합된 아밀로솜에서 곰팡이 분해 효소가 결합되지 않은 아밀로솜들과 비교하여 더 많은 환원당 및 글루코오스를 생성하는 것으로 나타났다. 특히, CCSbpCbpA는 곰팡이 분해 효소 결합 여부와 관계없이 다른 아밀로솜에 비해 가장 많은 글루코오스 생산량을 보였으며 곰팡이 분해 효소가 추가되었을 때 최대 62.44 ± 0.03 mM의 글루코오스를 생산하여, 곰팡이 분해 효소가 추가로 결합된 다른 아밀로솜들에 비해서도 글루코오스 생산성이 현저히 우수한 것으로 나타났다.

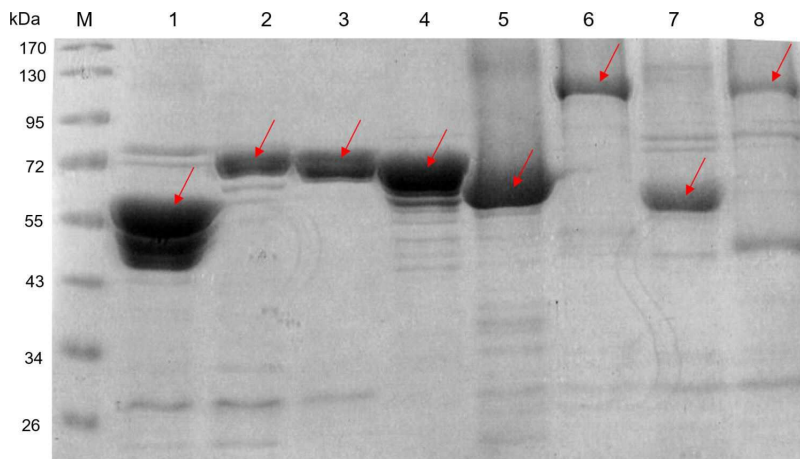
[0129] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

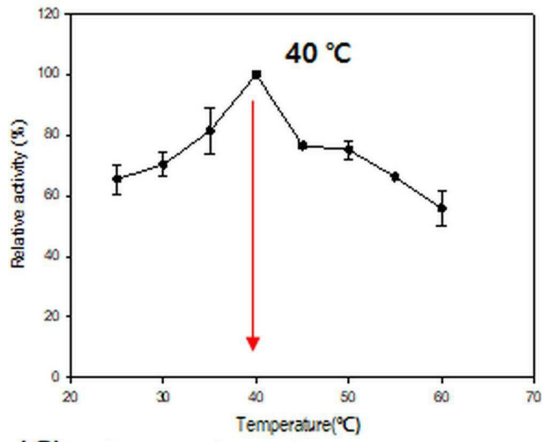


도면2

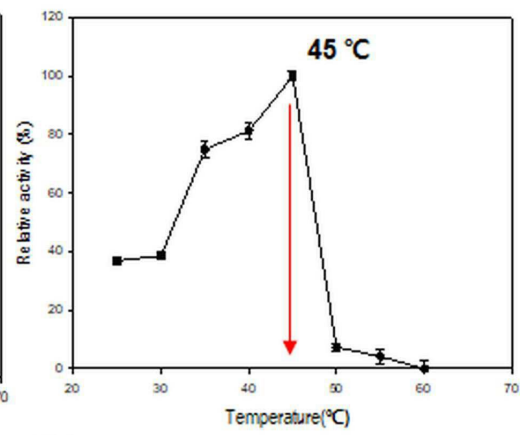


도면3

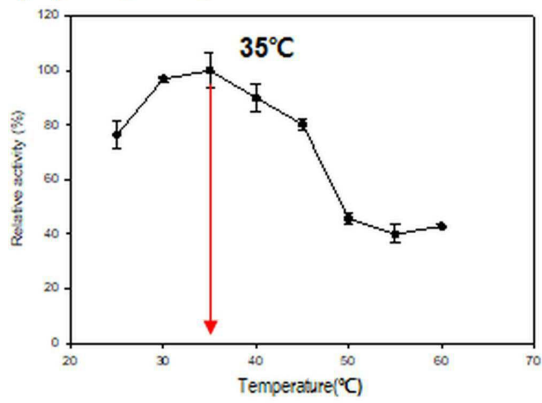
(A) α - Amylase



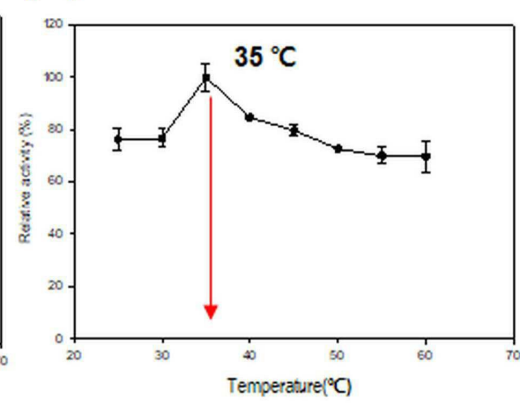
(B) α -Glucosidase



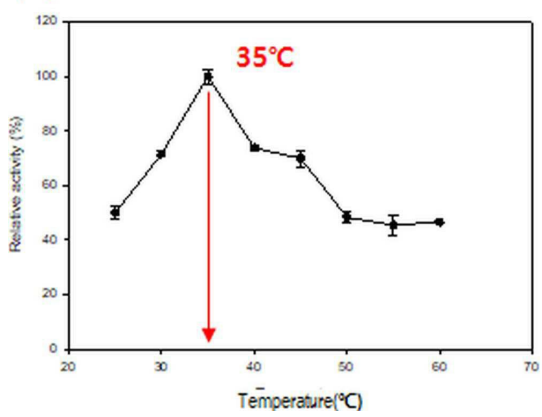
(C) Oligo1,6 glucosidase



(D) Trehalase

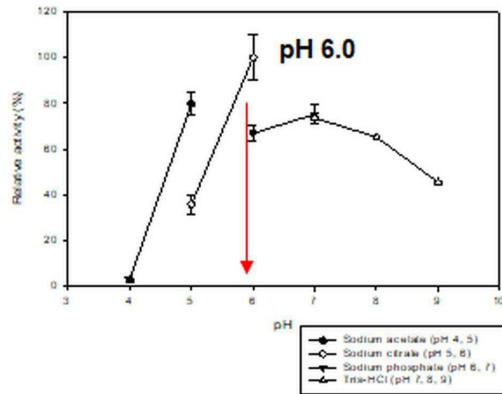


(E) Enzyme mixture

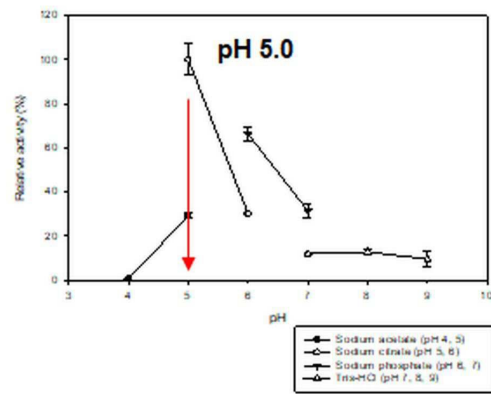


도면4

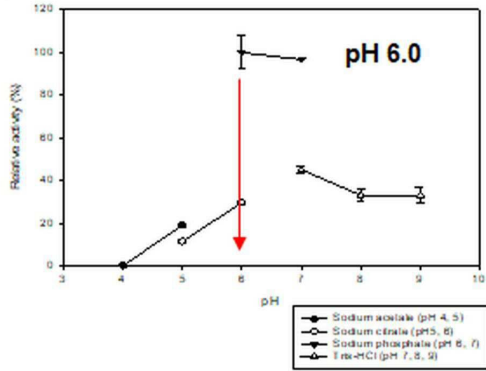
(A) α -Amylase



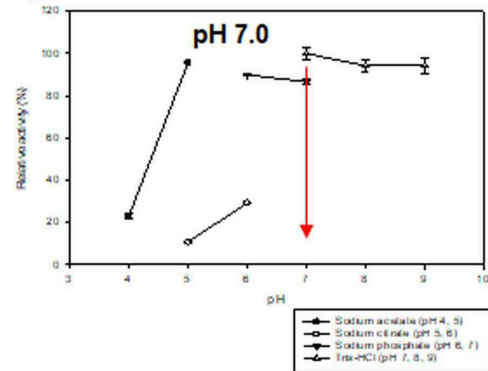
(B) α -Glucosidase



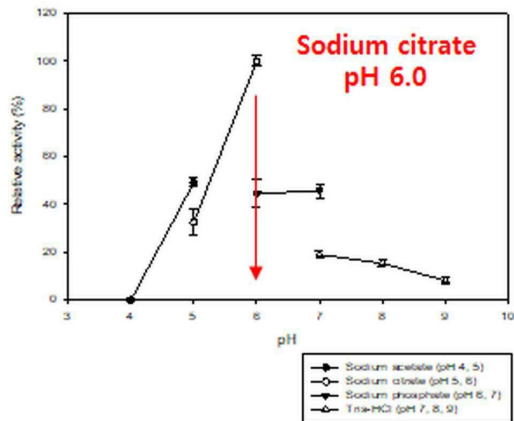
(C) Oligo 1,6 glucosidase



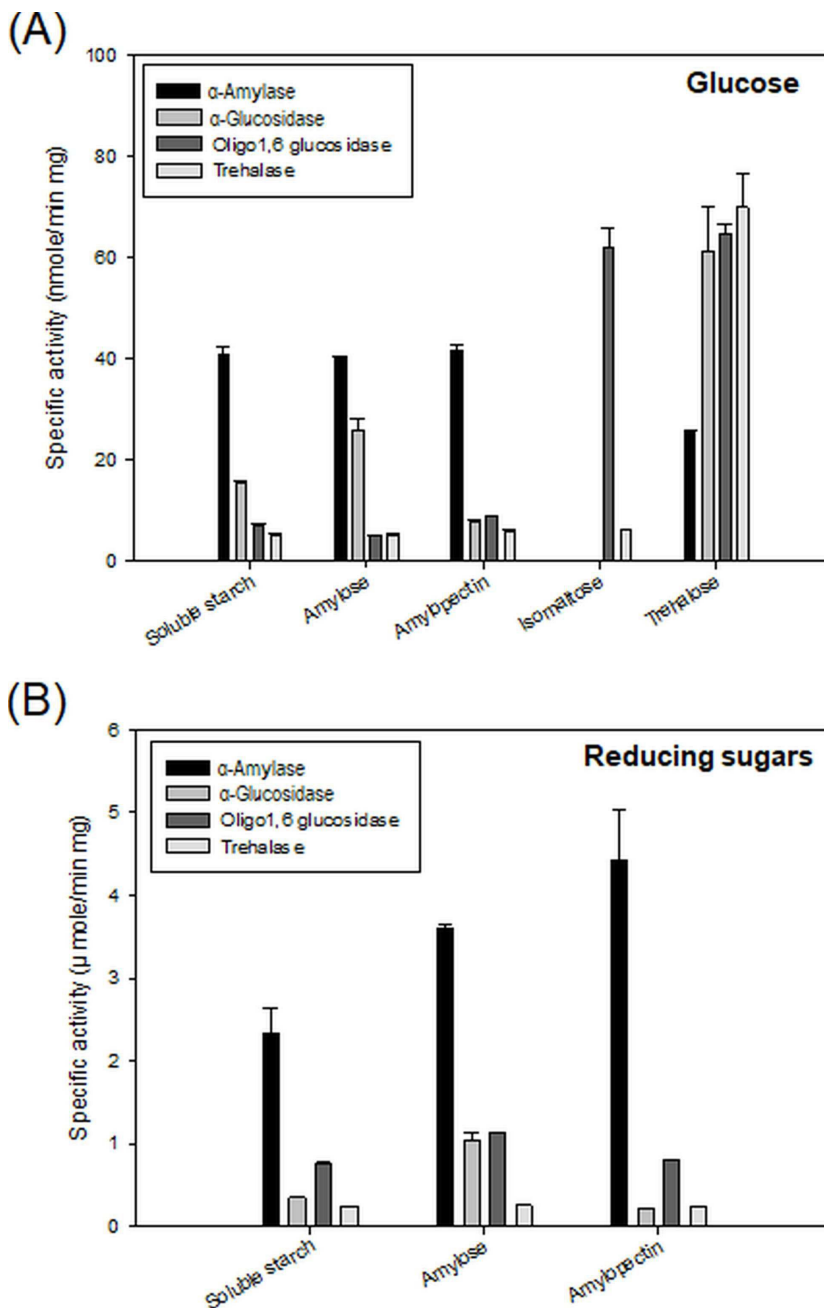
(D) Trehalase



(E) Enzyme mixture

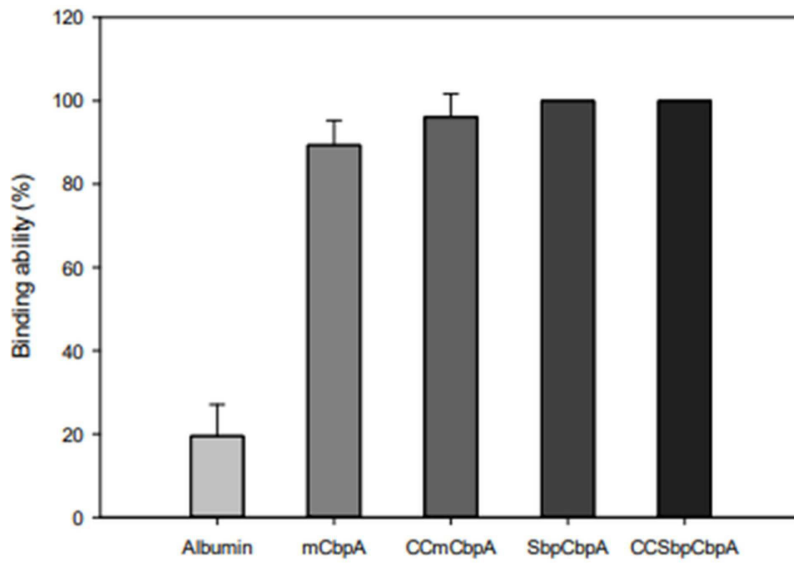


도면5

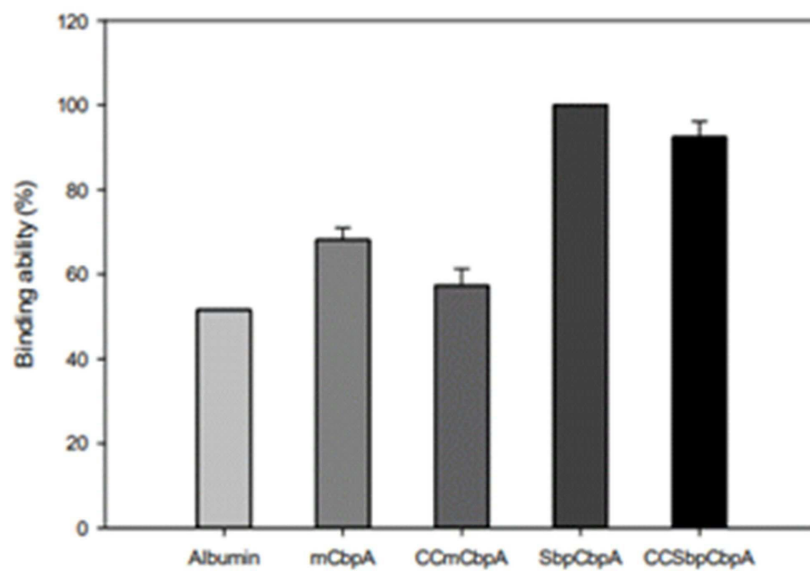


도면6

(A)

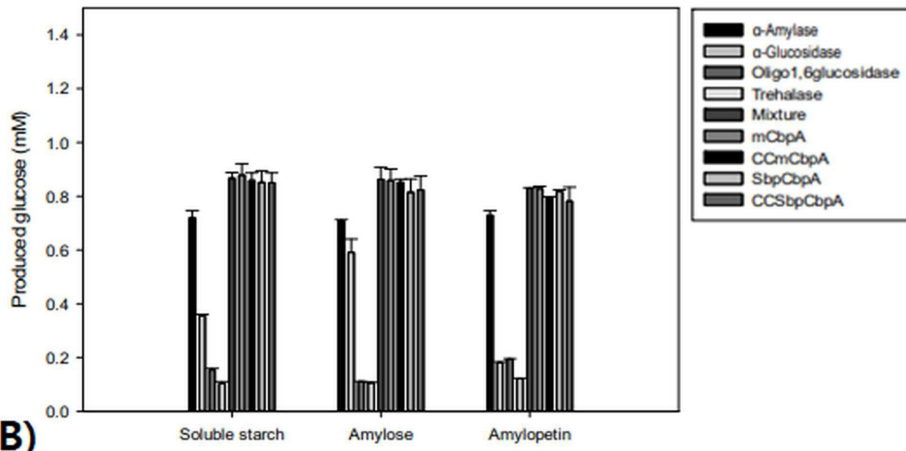


(B)

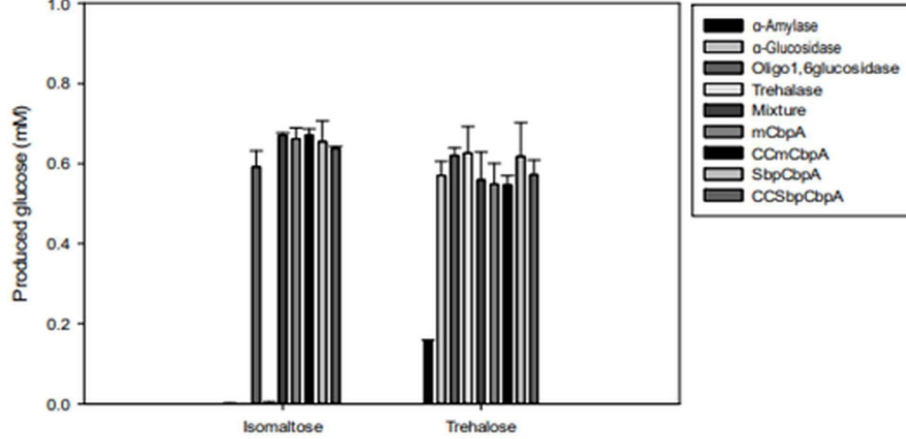


도면7

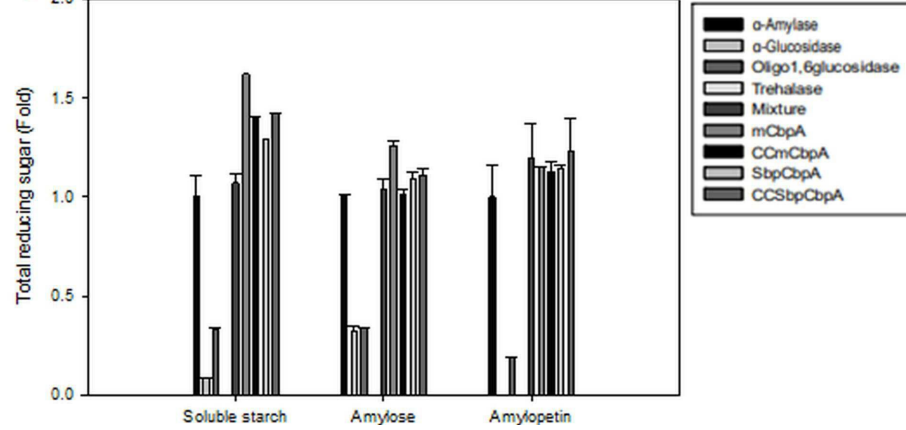
(A)



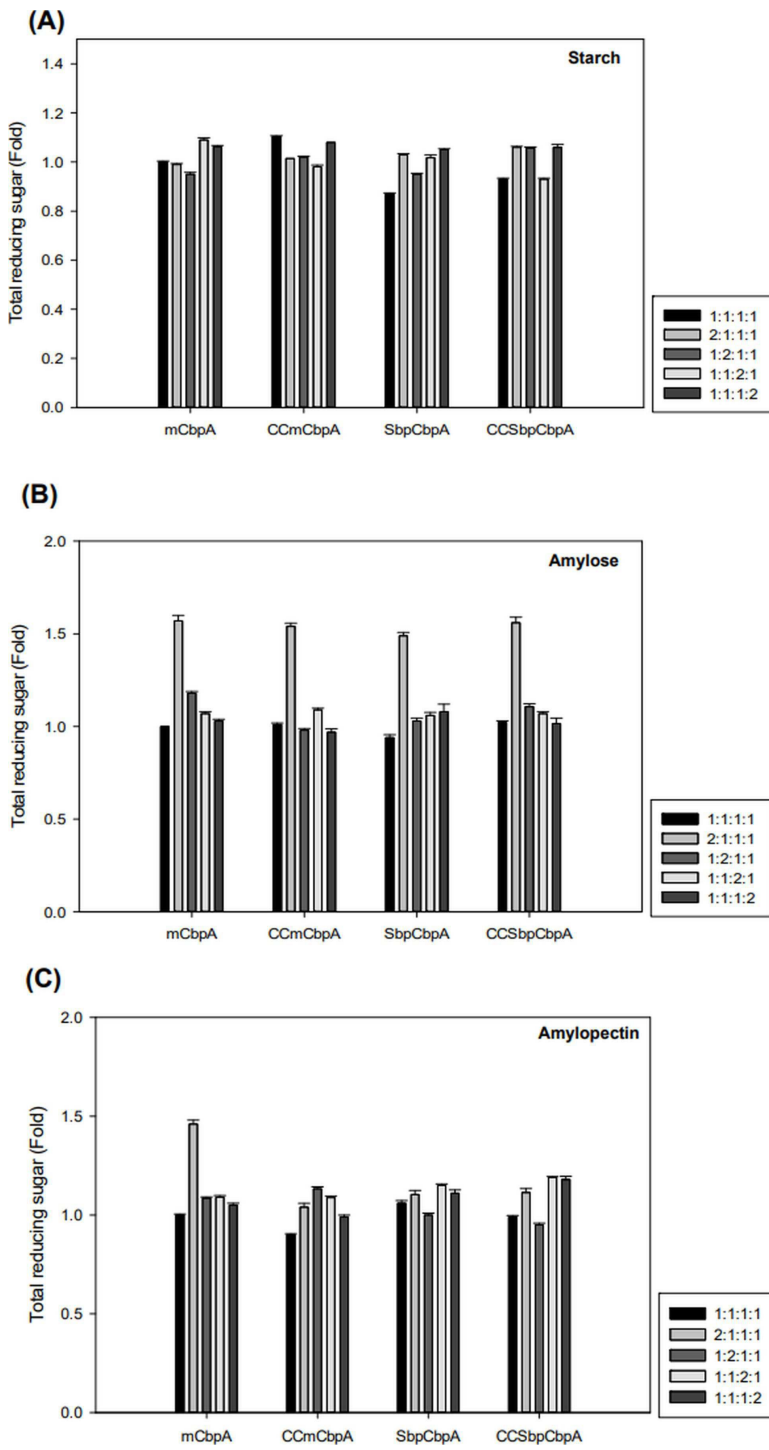
(B)



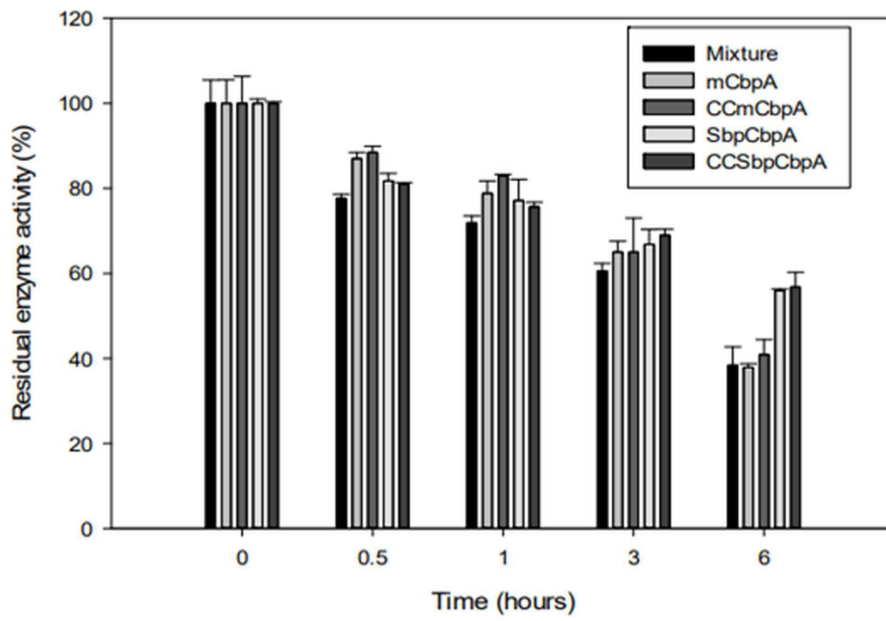
(C)



도면8

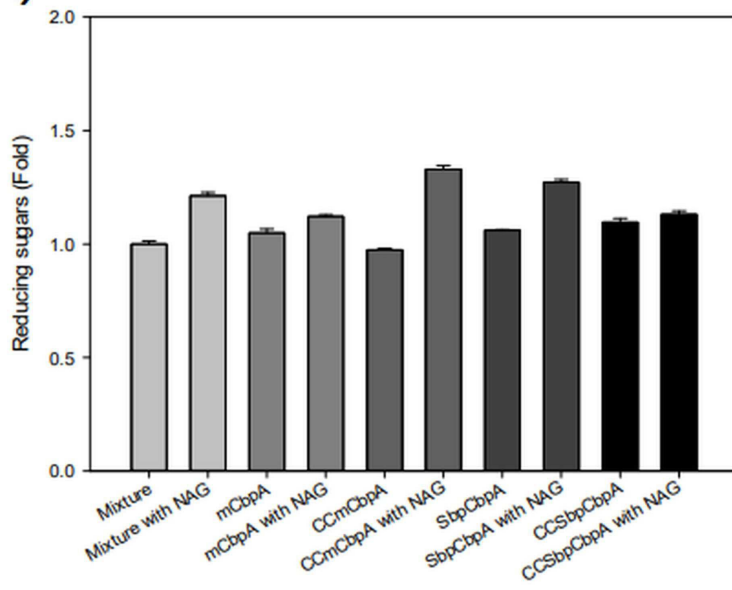


도면9

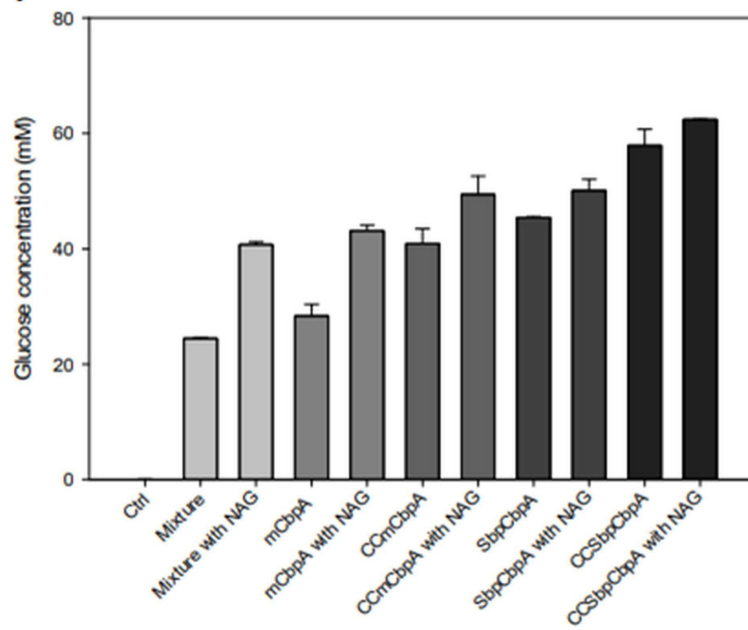


도면10

(A)



(B)



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.