



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월19일
(11) 등록번호 10-2124317
(24) 등록일자 2020년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/90 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01) C12P 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/90 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0019901
(22) 출원일자 2019년02월20일
심사청구일자 2019년02월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100001209 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
한성욱
서울시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호 (잠
실2동, 리센즈아파트)
정다운
서울특별시 도봉구 도봉로123길 59 B102호 (쌍문
동)
현정은
서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21 1층(안암동
2가)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 최성호

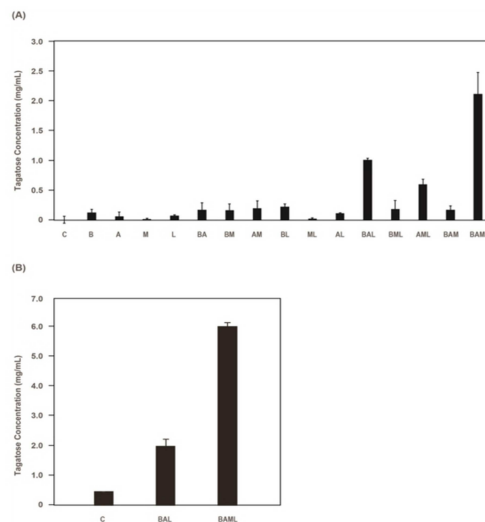
(54) 발명의 명칭 아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈-아라비노오즈 아이소머레이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천으로부터의 타가토오즈 생산방법

(57) 요약

본 발명은 아라비노스 아이소머레이즈 효소, 아가레이즈, 3,6-안하이드로 갈락토시데이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천 분해에 의한 타가토오즈 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 효소 복합체를 사용하면, 해양바이오매스로부터 얻어지는 한천을 효율적으로 분해하여 생산되는 분해 산물로부터 타가토오즈와 같은 유용한 생리활성물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/96 (2013.01)
C12P 19/02 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
C12P 19/24 (2013.01)
C12Y 302/01081 (2013.01)
C12Y 302/01159 (2013.01)
C12Y 503/01003 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170075303 A
 KR1020120098247 A
 KR101855961 B1
 KR1020180049641 A
 Appl Biochem
 Biotechnol., 179(5):715-727(2016.2.27.)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2B2003704

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 생명자원연구소

연구사업명 기초연구사업-중견연구

연구과제명 식물 광호흡 기작 모방 신규 Porphyrin 생합성경로 연구 기반 코리네박테리움을 통한 태양
 전지 유기소재 Zinc-Porphyrin 생산 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 아라비노오즈 아이소머레이즈(Arabinose Isomerase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1;
- 2) 아가레이즈(agarase) 및 도커린 모듈이 결합된 융합 단백질 2; 및
- 3) 3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈(3,6-anhydro-L-galactosidase) 및 도커린 모듈이 결합된 융합 단백질 3;

코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 골격단백질에 대하여 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된 한천 분해 효소 복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 아라비노오즈 아이소머레이즈는 락토바실러스 유래인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 아라비노오즈 아이소머레이즈는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 도커린은 섬유소 분해효소 유래인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 도커린은 서열번호 35로 표시되는 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 섬유소 분해효소는 엔도-베타-1,4-클루칸아제-비, 엔도-베타-1,4-자일라네이즈-비 및 엑소-글루칸아제-에스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 아가레이즈는 슈도모나스(Pseudomonas), 사카로파거스 (Saccharophagus) 및 알토로모나스(Aleromonas)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 유래인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 아가레이즈는 베타-아가레이즈인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 베타-아가레이즈는 서열번호 26으로 표시되는 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈는 조벨리아 (Zobellia) 유래인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈는 서열번호 36으로 표시되는 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 소형 골격단백질은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), Clostridium thermocellulm 유래 소형 골격 단백질 (mCipA) 및 Clostridium cellulolyticum 유래의 소형 골격 단백질 (mCipC)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 소형 골격단백질은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)인 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이는 서열번호 17로 표시되는 것을 특징으로 하는, 효소 복합체.

청구항 15

제 1항의 효소 복합체를 이용하여 바이오매스(biomass)를 분해하여 타가토오즈를 생산하는 방법으로서,

상기 바이오매스는 한천 또는 홍조류 유래의 한천인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

다음의 단계를 포함하는 효소 복합체의 제조 방법:

- (a) 아라비노오즈 아이소머레이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 1을 준비하는 단계;
- (b) 베타-아가레이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 2를 준비하는 단계;
- (c) 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 3을 준비하는 단계;
- (d) 코히즌 모듈(Cohesin module)을 보유한 소형 골격단백질을 준비하는 단계;
- (e) 상기 융합 단백질 1 내지 3 및 상기 (d) 단계의 소형 골격단백질을 동일한 농도 및 비율로 정량하여 25mM 염화칼슘(CaCl_2)를 포함하는 결합 용액에 혼합하여 코히신 모듈과 도커린 모듈을 결합시켜 한천 분해 효소 복합체를 제조하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈-아라비노오즈 아이소머레이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천으로부터의 타가토오즈 생산방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 해양바이오매스원료(한천)에 존재하는 아가올리고당을 이용한 타가토오즈(tagatose)의 제조방법에 관한 것으로, 아가레이즈, 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 및 아라비노오즈 아이소머레이즈로 구성된 한천 분해 효소 복합체, 이를 이용한 한천 분해 및 타가토오즈 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근에는 많은 섬유질 및 다양한 다당류에 의해 세포벽이 구성되어 있는 해양조류가 새로운 바이오 에너지 원료로서 주목을 받고 있다. 해조류 내 리그닌(난활성용 성분)의 함량이 적어 전처리 공정을 간소화 할 수 있을 뿐만 아니라 이러한 대형 해조류에는 60~95 % 정도가 수분이며 나머지 성분들 가운데 50 % 이상이 탄수화물로 이루어져 있어서 바이오에너지 및 바이오케미컬을 생산하기 위한 원료물질인 단당으로 전환될 수 있는 장점이 있다.
- [0003] 우리나라와 일본에서는 홍조류 중 김(주로 *Porphyra yezoensis*) 양식이 활발하게 이루어지고 있으며, 홍조류는 우리나라에서 자생하는 해조류의 절반 이상을 차지하고 있다. 발명에 이용될 수 있는 홍조류는 주로 우뚝가사리의 주원료이며 이와 같은 우뚝가사리는 홍조류 중에서 종의 종류가 가장 다양하고 생장성이 우수하며, 갈락탄이 주성분인 한천이 약 50%~70% 정도 차지되며, 이 외에 셀로오스 성분인 섬유소가 약 15%~25%정도이며, 이외에 15% 미만의 단백질과 7% 미만의 지질로 구성되어 있다.
- [0004] 홍조류 가공 공정 및 추출에서 발생하는 대표적 부산물인 한천은 효과적으로 분해하면 에탄올 생산에 필요한 갈락토오스나 글루코오스 생산뿐만 아니라, 분해 반응 시 생성 되는 이탄당, 삼탄당, 올리고당 등과 같은 분해 대사산물들이 유용한 생리활성물질이 될 수 있다. 현재까지 홍조류로부터 알칼리, 산 또는 효소 처리 등의 가공 방법을 통해 해조다당류인 한천, 카라기난을 추출하여 식품 및 화장품 첨가제, 건강 식량 자원으로 산업적으로 많이 유용하게 이용되고 있다. 그러나 홍조류 자체의 분해하기 어려운 복잡한 구조로 인해 바이오 연료 생산용 기질로서 사용하기에 어려움이 있으며, 현재 이용되고 있는 물질 이외에 발생하는 부산물 및 폐기물들의 처리가 문제점으로 남아 있다. 상기 한천을 분해하는 효소인 아가레이즈는 아가로의 갈락토스 중합체 내의 β -1,4 결합을 분해하여 네오아가로올리고당으로 가수분해하여 이당 혹은 삼당의 갈락토스 잔기를 만들어내며, 카파-카라기난을 분해하는 효소인 카파-카라기나아제는 카파-카라기난의 3-,4-결합 갈락토스 유닛을 끊어냄으로

이당류의 카라기난 잔기를 만들어낸다. 아가레이즈는 결합을 분해하는 부위에 따라 알파-아가레이즈와 베타-아가레이즈로 구분될 수 있다. 상기 알파-아가레이즈는 아가로스의 갈락토스 중합체 내의 α -1,3 결합을 분해하여, 아가로올리고당을 제조하며, 상기 아가로올리고당은 apoptosis 유도 활성, 항암활성(Kato, 2000), 항바이러스 활성, 항산화 활성(Chen et al., 2005; Kato, 2000), 면역조절 활성(Yoshizawa et al., 1995), 항알레르기 활성 및 항염증 활성 등을 가진다고 보고되어 있다. 또한, 상기 베타-아가레이즈는 아가로스의 갈락토스 중합체 내의 β -1,4 결합을 분해하여 네오아가로올리고당을 제조하며, 상기 네오아가로올리고당은 세균성장 억제(Kono et al., 1989), 항산화 활성, 전분노화 방지, 보습효과(Kobayashi et al., 1997), 미백효과(Kobayashi [0005] et al., 1997) 등의 효과를 가진다고 보고되어 있다.

[0005]

한편, 자연에서 가장 풍부한 바이오폐소로서 셀룰로오스를 들 수 있다. 이를 분해하는 효소는 섬유소 곰팡이나 여러 세균에서 생산되는데, 그 중 혐기성 균주인 클로스트리디아 계열(Clostridia, sp.)에서 코히진(Cohesin)과 도커린(Dockerin)이라는 도메인을 이용한 효소 복합체를 생산한다(Jeong Eun Hyeon et al., Biotechnol Adv. (2013) 31:936-944). 효소 복합체는 골격 단백질(scaffolding protein) 내 코히진 도메인을 여러 개 가지고 있어서 도커린 도메인을 가진 효소들과 결합하여 이루어지고, 골격 단백질(scaffolding protein)에 탄수화물 결합 부분(carbohydrate binding module; CBM)을 가지고 있어서 복합체를 형성하는 효소들의 효율을 향상시키는 특징을 가지고 있다. 효소 복합체를 형성할 수 있는 도커린을 가진 효소를 키메릭 효소라고 부르는데, 특정 코히진과 결합이 가능한 도커린 도메인을 재조합한 효소를 이용하여 여러 종류의 효소를 임의대로 붙일 수 있어서, 목적에 맞게 임의대로 효소를 선택하여 그 복합체를 형성할 수 있다. 이렇게 형성된 효소 복합체는 순차적으로 다당류를 먼저 작은 단위의 다당류로 분해하고 분해된 작은 단위의 다당류를 다음 효소가 바로 분해하여 더 작은 이당류 혹은 단당류로 분해할 수 있는 구성을 가지게 된다.

[0006]

타가토오스는 자연계에 흔하게 존재하는 것이 아니라 유제품 또는 일부 식물에 미량 함유되어 있는 희소당으로 저칼로리 감미료로 다이어트 제품으로 사용되고 있다. 통상적으로 타가토오스(D-tagatose)는 갈락토스(Galactose)의 이성질체이고 과당(D-fructose)의 C4 에피머로서 설탕에 대하여 92%의 당도를 나타내지만 칼로리는 1.5 kcal/g으로 설탕의 약 30%인 저칼로리 감미료이다. 또한 체내에 흡수과정 중에 거의 대사가 되지 않는 비 열량(non-caloric) 감미료로서 섭취한 양의 15~20퍼센트가 체내에 흡수 되는데, 이는 인간이 갖는 자체적인 소화 능력이 아닌 대장 내 미생물에 의한 분해로 인한 흡수이므로 혈당 수치에 영향을 끼치지 않으며, 이로 인해 당뇨병 환자에게 혈당 조절 효과를 기대 할 수 있고, 장내 미생물에 먹이를 제공하게 되고, 이로 인해 미생물에 의한 배변활동에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 충치를 유발하지 않는 기능적 특성을 가지고 있어 어린이들이 좋아하는 초콜릿, 껌, 빵, 사탕 등에 설탕 대신 넣어 어린이들이 안심하고 섭취할 수 있게 해주는 건강 감미료이며, 설탕 과잉으로 인한 질병의 예방에도 기여할 수 있는 물질로서 많은 관심을 받고 있다. 또한 타가토오스는 끓는점이 134, pH 2-7로 열과 pH에 대한 안정성이 높아서 대부분의 인공 감미료와 달리 잘 파괴되지 않고 설탕과 가장 유사한 물리적, 화학적 성질을 가지며 특히 가열시 갈색화 반응(browning reaction)의 특성이 과당과 비슷한 ketose이므로 대체당으로서 중요한 특징을 갖는다.

[0007]

이와 같은 이유로 타가토오스는 식품보조제 및 다이어트 감미료 같은 기능성 당으로서 각광받고 있어 식품 산업 분야에 있어서 효율적으로 생산할 수 있는 방법에 대한 개발의 필요성이 높아지고 있다. 이는 유제품이나 일부 식물에 미량 함유되어 있는 희소당(rare sugar)이고 화학법으로는 합성되지 못하기 때문이다. 한편 L-알라비노오스 아이소머레이즈(Arabionse isomerase)는 L-아라비노오스를 L-리불로오스로 전환시키는 것으로 보고되었으며 최근에는 D-갈락토오스를 타가토오스로 전환하는 방법이 보고되었다(특허문헌 1). 현재는 L-arabinose isomerase를 이용한 생물전환법으로 갈락토오스를 이성화해서 타가토오스를 생산하고 있고(특허문헌 2) 갈락토오스는 유당으로부터 얻고 있으나 수급이 불안정 하고 포도당이나 과당에 비하여 고가이고 낙농시장의 변동에 따라 공급가격의 변화폭이 크기 때문에 안정적이고 지속적인 대량 생산량 확보에 어려움이 제기되고 있다.

[0008]

이에, 수급이 안정적이고 원가가 낮은 포도당이나 과당을 기질로 하여 효소를 이용하여 타가토오스를 생산하는 방법이 활발히 연구되고 있는 실정이지만, 현재까지 단일 효소반응으로 과당에서 타가토오스를 생산하는 단일 enzyme 반응은 알려져 있지 않은 상태이다. 또한, 이러한 단일 효소의 경우 현재까지 알려진 에피머화 효소들의 메커니즘으로는 전환이 거의 일어나지 않고 생산수율이 현저히 낮아 산업화하기에는 부족함이 있다. 따라서, 수급이 안정적이고 원가가 낮은 홍조류를 기질로 이용하기 위한 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 KR 10-2010-0001209호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 KR 10-0872694호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 해양 바이오매스인 홍조류 유래 한천을 타가토오스로 전환하는 효소 복합체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한 본 발명의 목적은 상기 효소 복합체를 이용하여 홍조류 바이오매스를 분해하여 타가토오스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양태에서 1) 당당류 전환효소와 도커린 모듈(dockerin module)이 연결된 융합 단백질 1; 2) 아가레이즈(agarase)와 도커린 모듈이 결합된 융합 단백질 2; 및 3) 3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈(3,6-anhydro-L-galactosidase)와 도커린 모듈이 결합된 융합 단백질 3이 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 골격단백질에 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된 한천 분해 효소 복합체를 제공한다.
- [0013] 상기 당당류 전환효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 락토바실러스 유래의 아라비노오스 아이소머레이즈(Arabinose Isomerase)일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0014] 상기 도커린은 엔도-베타-1,4-클루칸아제-비, 엔도-베타-1,4-자일라네이즈-비 및 엑소-글루칸아제-에스로 구성된 섬유소 분해효소 군으로부터 선택된 어느 하나의 섬유소 분해효소 유래 도커린을 사용할 수 있고 상기 도커린은 서열번호 35의 염기 서열을 가지는 것이 바람직하지만, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 3에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 도커린 유전자 서열에 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0015] 상기 아가레이즈는 슈도모나스 (Pseudomonas), 사카로파거스 (Saccharophagus) 및 알토로모나스 (Aleromonas)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 유래의 아가레이즈일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 상기 아가레이즈는 보다 바람직하게는 베타-아가레이즈일 수 있고 서열번호 26의 염기 서열을 가지는 것이 바람직하지만, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 26에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 베타-아가레이즈 유전자 서열에 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0016] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈는 조벨리아 (Zobellia) 유래의 것을 사용할 수 있고 서열번호 36의 염기 서열을 가지는 것이 바람직하지만, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 36에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈 유전자 서열에 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0017] 상기 소형 골격단백질은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), Clostridium thermocellum 유래 소형 골격 단백질 (mCipA) 및 Clostridium cellulolyticum 유래의 소형 골격 단백질 (mCipC)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있고, 보다 바람직하게는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)일 수 있으며 서열번호 17로 표시되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하지만, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 17에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA) 유전자 서열에 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0018] 상기 효소 복합체는 아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈-아라비노스 아이소머레이즈 또는 베타-아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시데이즈-아라비노스 아이소머레이즈일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

- [0019] 본 발명의 다른 일 양태에서, 본 발명은 상기 한천 분해 효소 복합체를 이용하여 바이오매스를 분해하여 타가토 오즈를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0020] 상기 바이오매스는 한천으로서 정제된 한천, 홍조류 유래 한천 또는 홍조류에 존재하는 한천 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 일 양태에서, 본 발명은 (a) 아라비노오즈 아이소머레이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 1을 준비하는 단계; (b) 베타-아가레이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 2를 준비하는 단계; (c) 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈에 도커린 모듈을 연결하여 융합 단백질 3을 준비하는 단계; (d) 코히즌 모듈(Cohesin module)을 보유한 소형 골격단백질을 준비하는 단계; (e) 상기 융합 단백질 1 내지 3 및 상기 (d) 단계의 소형 골격단백질을 2 내지 20 nmol, 보다 바람직하게는 10nmol의 같은 농도 및 같은 비율(1:1:1:1)로 정량하여 25mM 염화칼슘(CaCl_2)를 포함하는 결합 용액에 혼합하고 4°C에서 24시간 동안 반응시켜 도커린 모듈과 코히즌 모듈을 결합시킴으로써 효소 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 한천 분해 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 상기 (e) 단계에서, 융합 단백질 및 소형 골격단백질의 농도를 2nmol 미만 또는 20nmol을 초과하여 사용하는 경우 및 동일한 비율로 혼합하지 않는 경우 도커린 모듈과 코히즌 모듈의 결합 효율이 낮아져서 비효율적이다.
- [0023] 본 발명에서 "엔도글루칸아제(endoglucanase)"는 셀룰로오스에서 β -1,4-D-글리코시딕 결합을 가수분해하여 이탄당 이상의 포도당 폴리머 (cellobiose, cellotriose 등)의 생성을 촉매하는 효소를 의미하며, 효소 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4, endoglucanase)를 포함하는 의미이다.
- [0024] 본 발명에서 "셀룰로오스 바인딩 프로테인 A (cellulose binding protein A)"는 클로스트리디움 셀룰로보란스 (Clostridium cellulovorans)에서 유래한 단백질로 셀룰로오스를 형성하는 단백질의 요소로써 골격을 이루는 단백질(scaffolding protein)을 의미한다. 상기의 셀룰로오스 바인딩 프로테인은 셀룰로오스를 인식하여 강력하게 결합하는 특징을 지닌 탄수화물 결합 부분 (carbohydrate binding module)을 가지고 있어서 상기의 단백질에 결합하는 효소가 탄수화물 혹은 셀룰로오스에 접근이 용이하게 해준다. 상기의 셀룰로오스 바인딩 프로테인에는 코히즌 도메인이 있는데, 이는 셀룰로오스 생산 균주의 효소가 가지고 있는 도커린 도메인과 특정한 결합을 이루고 있어서 코히즌의 갯수에 따라 결합하는 효소의 수가 결정된다.
- [0025] 본 발명에서 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈이란 클로스트리디움 속의 셀룰로오스-결합 단백질의 일부분인 코히즌 모듈과의 상호작용으로 효소 복합체인 셀룰로오스를 형성하는 섬유소 분해효소인 셀룰라아제 (cellulosomal cellulase) 단백질이 가지는 모듈을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 "도커린-코히즌 결합"은 셀룰로오스를 분해할 수 있는 셀룰로오스가 형성되는 과정에서 셀룰로오스 형성 효소의 도커린 모듈과 지지체 단백질의 코히즌 모듈의 결합을 의미한다(Bayer et al. Annual Review of Microbiol, 2004, 58, 521-554).
- [0027] 본 발명의 도커린과 코히즌의 결합에는 셀룰로오스(cellulosome)를 생산하는 균주의 타입 I 도커린과 코히즌이라면 제한 없이 사용할 수 있으나, 중간 특이성을 가지므로, 같은 종의 균주에서 유래된 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 도커린과 코히즌의 조합은 클로스트리디움 셀룰로보란스(Clostridium cellulovorans) 유래의 도커린 타입 I인 EngH, EngK, ExgS, EngL, ManA, EngM 및 EngN 과 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래의 cbpA의 코히즌 타입 I을 사용할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0028] 본 발명에서 "벡터(Vector)"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다. 또한, 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제 개시점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0029] 일반적으로 플라스미드 벡터는 염색체 외의 환형 이중가닥 DNA이고, 세포 내에 존재하며 다양한 기능을 한다. 항생물질에 내성을 가진 물질 및 박테리옌(Bacteriocin)을 생산하여 유사한 균주나 종들을 죽이는 저해 물질로 작용하고, 색소 생성, 화합물 분해, 질소 고정과 같은 생리학적 기능을 수행한다. 최고 약 10kb되는 길이의 외래 DNA 절편을 삽입하기 위해서 제한효소 부위를 가지고 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택 마커는 벡터로 형질 전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선택 마커

를 발현하는 세포만 생존하므로 형질 전환된 세포를 선별 가능하다. 선택 마커의 대표적인 예로써, 영양 요구 마커(auxotrophic marker)인 *ura4*, *leu1*, *his3* 등을 들 수 있으나 상기 예에 의해 본 발명에서 사용될 수 있는 마커의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명과 관련된 벡터는 플라스미드 벡터(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79 및 pUC19 등), 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터(예: gt4B, -Charon, z1 및 M13 등), 바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0032] 벡터로 사용되는 플라스미드와 박테리오파지의 중대한 단점인 상대적으로 작은 DNA 절편만 삽입할 수 있는 것은 플라스미드와 파지 DNA의 조작된 혼성체인 코스미드(Cosmid)를 사용하여 더 큰 DNA 절편을 클로닝 할 수 있다.

[0033] 파지 입자 안으로 포장되어 들어가는 코스(cos) 부위가 있고, 세균 숙주에서 복제하는 플라스미드의 복제 시작점과 플라스미드를 선별할 수 있는 유전자를 가지고 있다. 박테리오파지 벡터 같이 시험관 내에서 단백질 외피로 포장되지만, 포장된 DNA가 대장균 숙주세포를 감염한 후에, 그 DNA는 박테리오파지 DNA보다는 플라스미드 형태로 복제하고, 용균되지 않는다. 크기는 2.5kb, 숙주세포를 감염하여 포장된 후에 cos 부위가 37kb에서 52kb까지 분리되면, 외래 DNA를 삽입체로 수용한다. 일반적으로 35kb에서 45kb가 코스미드 벡터(Cosmid vector)로 클로닝 될 수 있다.

[0034] 또한 박테리오파지의 벡터의 일반적인 형태인 파지의 경우는 염기쌍을 이룰 수 있는 12개 뉴클레오티드의 단일 가닥의 상보적인 말단으로 된 점착성 말단(cohesive termini) 혹은 cos를 가지는 50kb의 이중가닥으로 된 야생형 게놈에서 비롯된 것으로 용균성 경로에서 숙주세포는 새로운 바이러스가 복제되고, 자손 바이러스가 방출된 후에 용균된다. 이 형태의 DNA는 전체 52kb 크기에 3kb를 더하거나 그 게놈의 5% 만도 수용할 수 있으며, 외래 DNA를 위한 공간을 만드는 벡터는 비필수적인 DNA 조각이 제거된 형태이다.

[0035] 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 인간면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV), 생쥐백혈병 바이러스(Murine leukemia virus, MLV), 백혈증 바이러스(Avian sarcoma and leukosis virus, ASLV), 비장괴사바이러스(Spleen necrosis virus, SNV), 라우스육종바이러스(Rous sarcoma virus, RSV), 마우스 유방암 바이러스(Mouse mammary tumor virus, MMTV) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0036] 본 발명에서 "프라이머"란 단일가닥의 올리고뉴클레오티드 중 하나로, 리보뉴클레오티드도 포함할 수 있으며 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오티드 일 수 있다. 상기 프라이머는 주형(template)의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중가닥 구조를 형성한다. 본 발명에서 프라이머는 NGS 시퀀싱 아답터 서열에 혼성화(hybridization) 또는 어닐링(annealing)될 수 있다. 어닐링(annealing)은 주형 핵산에 올리고뉴클레오티드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소(polymerase)가 뉴클레오티드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다. 혼성화(hybridization)는 2개의 단일가닥 핵산이 상보적인 염기서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 상기 프라이머는 주형에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0038] 본 발명에서 "조절 요소"란 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 전사, 번역 또는 발현의 증진을 돕거나 이에 영향을 미치는 비해독화된 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 발현벡터는 조절 요소로 본 발명의 유전자 회로를 필수적으로 포함하고, 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리 아데닐화 시그널, 인핸서(enhancer), 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 "숙주세포"란 다른 미생물 또는 유전자를 기생시켜 영양을 공급하는 세포로, 벡터가 숙주세포에 형질전환됨으로써 숙주세포 내에서 다양한 유전적 또는 분자적 영향을 미치게 되는 세포를 의미한다. 숙주세포는 외부 DNA를 받아들일 수 있는 수용성(competence) 상태에서, 벡터와 같은 외부 DNA가 삽입될 수 있는데, 벡터가 숙주세포에 성공적으로 도입되면, 해당 벡터의 유전형질을 숙주세포에 제공하게 된다.

[0040] 바람직하게 본 발명의 숙주 미생물은 그람 음성 균일 수 있으며, 상기 그람음성균은 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 아시네박터 속(*Acinebacter* sp.), 에스케리아 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 또는 크렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주 등을 포함하고, 예를 들면, 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 아시네박터 칼코아세티쿠스(*Acinebacter calcoaceticus*), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 크렙시엘라 아에로제네스(*Klebsiella aerogenes*), 아시네박터 바우마니 또는 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)등을 포함하나, 상기 예에 의해 본 발명의 박테가 형질전환될 수 있는 숙주세포가 제한되는 것은 아니다.

[0041] 숙주 세포에 박터를 도입하는 방법은 형질전환 방법이 이용될 수 있다. "형질전환"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO (dimethyl sulfoxide)라는 환원 물질을 사용함으로써 효율을 높인 하나한(Hanahan)방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아(*Agrobacteria*) 매개된 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트(Dextran sulfate), 리포펙타민(lipopectamine) 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 플라스미드를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 방법으로 형질전환된 숙주세포는 필요에 따라 당 업계에서 통상적으로 사용되는 배양 방법을 통하여 배양될 수 있으며, 사용될 수 있는 배지 및 배양기간은 필요에 따라 당업자에 의해 임의적으로 선택될 수 있다.

[0043] 바람직하게 본 발명은 형질 전환된 대장균 균주를 LB(Luria Bertani) 배지에서 8시간 동안 배양한 후 재조합 유전자들로부터 단백질의 생산을 유도하기 위하여 12시간 동안 추가 배양하였다. 상기 배지는 기술 분야에 일반적으로 사용될 수 있는 다양한 배지를 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 타가토오즈 생산 방법은 미생물로부터 얻은 효소를 이용하므로 환경 친화적이고, 간단한 효소 복합체 형성 과정만을 필요로 하며, 기존 방법과 비교하여 기질로서 단가가 낮은 바이오매스 기질을 사용하기 때문에 생산경비를 크게 줄이는 한편 생산 효과를 극대화 할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 효소 복합체를 사용하면, 해양 바이오매스인 홍조류로부터 얻어지는 한천을 효율적으로 분해할 수 있고, 분해 산물로 얻어지는 갈락토오스를 유용한 희귀당인 타가토오즈로 변환시켜 타가토오즈를 효율적으로 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 본 발명에 따라 제조된 재조합 박테에 관한 것으로 상기 박터의 모식도(도 1A) 및 상기 박터의 대장균 내 발현(도 1B)에 관한 것이다.

도 2는 본 발명에 따라 제조된 효소 복합체를 이용하여 D-갈락토오즈를 D-타가토오즈로 전환하는 활성에 관한 것이다.

도 3은 본 발명에 따라 제조된 효소 복합체의 한천(Agar)분해 활성 및 타가토오즈 전환 활성에 관한 것이다.

도 4는 본 발명에 따라 제조된 효소 복합체의 기질(도 4A - Agar, 도 4B - 우뭇가사리)에 대한 활성 분석에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예

[0048] 실시예 1. 신규 효소 복합체의 발현 박터

[0049] 본 발명자들은 신규 효소 복합체를 제조하기 위해, 효소 복합체를 구성하는 각각의 구성요소를 암호화하는 유전

자들을 포함하는 벡터 및 형질전환체를 제조하였다.

1.1 락토바실러스 유래 아라비노스 아이소머레이즈 발현 벡터

한천 분해 산물을 기질로 하여 타가토오스를 생산하기 위한 단백질을 클로닝하기 위하여, 우선 아라비노스 아이소머레이즈 유전자를 발현하는 벡터를 제조하였다.

락토바실러스 속 균주의 gDNA로부터 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer, 서열번호 2)의 5' 말단에는 제한효소 *Sac* I 인식서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer, 서열번호 3)의 5' 말단에는 제한효소 *Hind* III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 1479bp의 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자(서열번호 4)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

이후에, 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자를 정제한 후 대장균 발현 벡터인 pColdII에 라이게이션시켜 *Sac* I 과 *Hind* III으로 *E. coli* BL21에 형질전환을 실시하였고 형질전환체를 BL21/LsAraA로 명명하였다. 상기 형질전환체로부터 라이게이션된 제조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 제조합 플라스미드 벡터를 pColdII LsAraA라 명명하였다.

1.2 도커린이 융합된 락토바실러스 유래 아라비노스 아이소머레이즈 발현 벡터 및 형질전환체의 제조

상기 실시예 1.1의 아라비노스 아이소머레이즈 효소와 섬유소 분해효소 유래 도커린 도메인의 유전자의 융합 발현 벡터 및 형질전환체를 제조하였다.

가. 아라비노스 아이소머레이즈 유전자 단편

락토바실러스 속 균주의 지노믹DNA(Genomic DNA)로부터 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 5)의 5' 말단에는 제한효소 *Sac* I 인식서열이, 역방향 프라이머(서열번호 6)의 5' 말단에는 클로스트리디움 셀룰로보란스 속 균주로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 상기 도커린 부분을 인식할 수 있는 *Sac* I 인식서열 및 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자 서열을 포함하는 1512bp 크기의 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

나. 도커린 단편

또한, 클로스트리디움 셀룰로보란스의 gDNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 7)의 5' 말단에는 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(서열번호 8)의 5' 말단에는 제한효소 *Kpn* I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.

상기 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분 N-terminal 10bp 크기 서열은 서열번호 9로 표시하였고, 상기 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자의 C-terminal 부의 10bp 크기 서열은 서열번호 10으로 표시하였다.

이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 195bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자(서열번호 11)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

다. 융합 단백질 발현 벡터 및 형질전환체 제조

상기에서 얻은 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭 산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 실시하였고, 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 12)의 5' 말단에는 제한효소 *Sac* I, 역방향프라이머(서열번호 13)의 5' 말단에는 제한효소 *Kpn* I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.

이후, 아라비노스 아이소머레이즈 (LsAraA) 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 오버랩 PCR 반응은 94 °C 2 min 반응 후 94 °C에서 30초, 52 °C에서 25분, 72 °C에서 5분 씩 10 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. PCR 반응을 수행하여서 그 결과 1671bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 세

균 유래 익스팬신 유전자 (서열번호 14)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0066] 상기 도커린 융합 아라비노스 아이소머레이즈 LsAraA Doc 유전자는 정제한 후 대장균 발현벡터인 pColdII에 SacI 및 KpnI 제한효소 서열을 포함하도록 라이게이션을 실시하여 재조합 발현벡터를 제조한 후, E. coli BL21에 형질전환을 실시하여 형질전환체를 제조하였다. 상기 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 발현 벡터의 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pColdII LsAraA-Doc라 명명하였다(도 1a). 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/LsAraA-Doc으로 명명하였다.

[0067] 1.3 형질전환체 내 신규 효소 복합체의 발현 확인

[0068] 실시예 1에서 확보한 형질전환체의 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

[0069] 대장균 형질전환체를 1 mM IPTG 농도로 16℃에서 12시간 동안 IPTG로 발현 유도하여 아라비노스 아이소머레이즈 효소 및 도커린 융합 아라비노스 아이소머레이즈 효소가 발현되도록 하는 조건을 조성하여 16℃에서 12시간 동안 진탕배양 후 원심분리하여 세포를 획득하였다. 상기 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻은 후 SDS-PAGE에 로딩하였다. 이후, 단백질의 N-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 Western Blot 분석 기법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 예상한 아라비노스 아이소머레이즈 효소 및 도커린 융합 아라비노스 아이소머레이즈 효소 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인하였다(도 1b).

[0070] 실시예 2. 소형 셀룰로즈-결합 단백질이 연결된 아라비노스 아이소머레이즈 효소 복합체 구축 및 갈락토오스 기질에 대한 활성 분석

[0071] 2.1 효소 복합체의 발현 벡터 제작

[0072] 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulosebinding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고하여 정방향 프라이머(서열번호 15)의 5' 말단 영역에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머(서열번호 16)의 5' 말단 영역에는 제한효소 XhoI 인식서열(ctcgag)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 그 결과, 1659bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자(서열번호 17)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0073] 2.2 효소 복합체의 형성 확인

[0074] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 아라비노스 아이소머레이즈 효소와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA과의 결합으로 인한 복합체의 형성을 확인하기 위해 두 단백질을 저온에서 일정 비율로 섞어 배양한 후 복합체 형성을 유도하였다. 복합체 형성 조건은 소형 골격단백질과 아라비노스 아이소머레이즈를 10 nmol의 모두 같은 비율로 정량하여 25 mM의 CaCl₂를 포함하는 결합 용액에 혼합한다. 코히신 모듈과 도커린 모듈의 결합을 위하여 4 ℃에서 24 hr 동안 반응시킨다.

[0075] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 아라비노스 아이소머레이즈 효소와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA과 결합을 통한 복합체 형성 확인은 증가된 타가토오스 전환 활성을 측정하여 증명하였다. 갈락토오스를 기질로 하여 각각 mCbpA, 아라비노스 아이소머레이즈, 아라비노스 아이소머레이즈-mCbpA를 구성 단백질로 하는 혼합 효소를 대상으로 타가토오스 전환 활성을 측정한 결과 mCbpA(도 2 내 M으로 표시), 아라비노스 아이소머레이즈(LsAraA, 도 2 내 L로 표시), 아라비노스 아이소머레이즈-mCbpA(도 2 내 LM으로 표시) 순서로 분해 활성이 증가됨을 확인할 수 있다(도 2). 이 때 mCbpA는 타가토오스 전환 활성이 없는 비활성 단백질이므로, 증가된 활성은 효소 복합체 형성으로부터 오는 것임을 증명하였다.

[0076] 또한, 아라비노스 아이소머레이즈(LsAraA) 단독에 비해 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA와의 융합 단백질의 타가토오스 전환 활성이 높으므로, mCbpA가 아라비노스 아이소머레이즈(LsAraA)의 타가토오스 전환 활성을 향상시키는 것을 확인하였다.

[0077] 실시예 3. 한천 분해 산물에 대한 효소 복합체의 발현 벡터 제작

[0078] 타가토오스를 보다 저렴한 기질인 한천으로부터 생산하기 위하여, 아가레이즈 및 도커린을 포함하는

융합단백질, 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 및 도커린을 포함하는 융합 단백질을 설계하였다.

[0079] **3.1 효소 복합체(베타-아가레이즈 및 도커린 융합)의 제조**

[0080] 가. 베타-아가레이즈 유전자의 분리

[0081] 한천 분해 효소인 섬유소 분해효소(베타-아가레이즈)에 도커린 유전자를 결합시키기 위해, 베타-아가레이즈 유전자의 양 말단을 가공하는 프라이머를 제작하였다. 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 베타-아가레이즈 AgaB 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 18)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Sac* I 인식서열이, 역방향프라이머(서열번호 19)의 5' 말단 영역에는 클로스트리디움 셀룰로보란스 속 균주로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. 그 결과, 1005bp의 베타-아가레이즈 유전자 (서열번호 20)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0082] 나. 베타-아가레이즈 유전자의 가공

[0083] 클로스트리디움 셀룰로보란스의 gDNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 21)의 5' 말단 영역에는 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 베타-아가레이즈 AgaB 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머(서열번호 22)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Not* I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. 그 결과 211bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자 (서열번호 23)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0084] 다. 효소 복합체(베타 아가레이즈-도커린)의 발현 벡터 제작

[0085] 상기에서 얻은 베타 아가레이즈 AgaB 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 실시하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0086] 베타 아가레이즈 AgaB 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 오버랩 PCR 반응은 94 °C 2 min 반응 후 94 °C에서 30초, 52 °C에서 25분, 72 °C에서 5분 씩 10 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 24)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Sac*I, 역방향프라이머(서열번호 25)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Not*I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 조건의 PCR 반응을 수행하여 PCT 결과물인 1225bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 베타-아가레이즈 AgaB 유전자(서열번호 26)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0087] 이후에, 도커린 융합 키메릭 베타-아가레이즈 AgaB 유전자 및 AgaB Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현벡터인 pET22b(+)에 라이게이션시켜 *Sac*I 와 *Not*I으로 *E. coli* BL21에 형질전환을 실시하였고, 제조된 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) AgaB-Doc라 명명하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/AgaB-Doc 명명하였다.

[0088] **3.2 효소 복합체(3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 및 도커린 융합)의 제조**

[0089] 가. 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 유전자의 분리

[0090] 도커린이 결합된 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 효소를 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 AhgA 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 27)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Eco*RI 인식서열이, 역방향 프라이머(서열번호 28)의 5' 말단 영역에는 클로스트리디움 셀룰로보란스 속 균주로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은

95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. 그 결과, 1224bp의 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈(서열번호 29)가 포함되어 있는 PCR 밴드 를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0091] 나. 도커린 유전자의 분리

[0092] 클로스트리디움 셀룰로보란스의 gDNA로 부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 30)의 5' 말단 영역에는 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 AhgA 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(서열번호 31)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Hind* III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 반응시킨다. 그 결과 211bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자 (서열번호 32) 가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다.

[0093] 다. 효소 복합체(갈락토시테이즈-도커린)의 발현 벡터 제작

[0094] 상기에서 얻은 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 AhgA 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 실시하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneA11)를 사용하여 회수하였다.

[0095] 이후, 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 AhgA 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 33)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Eco*R I, 역방향프라이머(서열번호 34)의 5' 말단 영역에는 제한효소 *Hind*III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 95 °C 5 min 반응 후 95 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분 씩 30 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72 °C에서 5분 조건의 PCR 반응을 수행하여 그 결과 1383bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 (서열번호 35)가 연결된 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈 AhgA 유전자 (서열번호 36)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다(결과는 나타내지 않음).

[0096] **실시예 4. 한천 분해 산물에 대한 효소 복합체(도커린 복합체)의 활성 분석**

[0097] BL21/AgaB-Doc 및 BL21/AhgA-Doc 재조합 균주를 1 mM IPTG 농도로 16°C에서 12시간 동안 IPTG로 발현 유도하여 단백질이 발현되도록 하는 조건을 조성하여 16°C에서 12시간동안 배양 후 원심분리하여 세포를 획득하였다. 상기 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻어 추후 실험에 사용하였다.

[0098] 한천을 기질로 하여 타가토오즈 전환 활성을 보다 구체적으로 확인하기 위하여, 도커린-아가레이즈(cAgaB), 도커린-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈(cAhgA), 도커린-아가레이즈(cAgaB)와 도커린-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈(cAhgA)의 혼합 조성 각각을 이용하여 정제된 Agar을 기질로 하여 분해 산물을 생성하고, 그 후 도커린-아라비노스 아이소머레이즈 융합단백질(LsAraA)를 추가하여 타가토오즈 전환 활성 분석을 수행하였다.

[0099] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 도커린-아가레이즈(cAgaB)와 도커린-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈(cAhgA)의 혼합 조성으로 처리한 경우(cAgaB/cAhgA + LsAraA)가 기질인 정제된 Agar에 대하여 보다 높은 타가토오즈 전환 활성을 나타내었다.

[0100] **실시예 5. 효소 복합체의 제조 방법**

[0101] 본 발명에 따른 최종 효소 복합체 (베타-아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈-아라비노스 아이소머레이즈)를 제조하는 방법은 아래와 같다. 구성요소의 비율은 소형 골격단백질, 베타-아가레이즈, 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈, 아라비노스 아이소머레이즈를 10 nmol의 같은 농도 및 비율로 정량하여 25 mM의 CaCl₂를 포함하는 결합 용액에 혼합하였다. 코히신 모듈과 도커린 모듈의 결합을 위하여 4 °C에서 24 hr 동안 반응시켰다.

[0102] **실시예 6. 효소 복합체의 다양한 한천 기질에 대한 활성 분석**

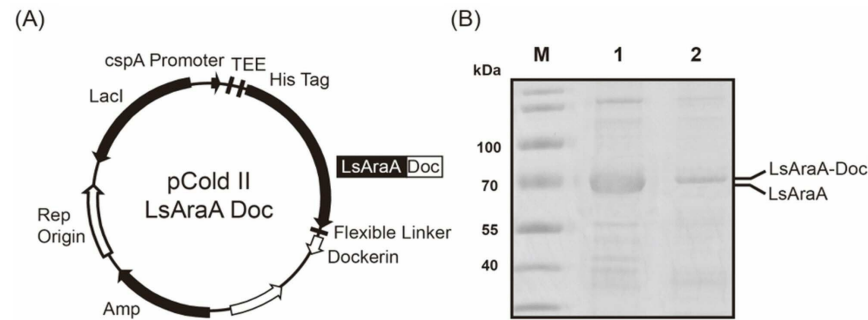
[0103] 복합체의 활성을 보다 구체적으로 확인하기 위하여, 베타-아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈-아라비노스 아이소머레이즈, mCbpA를 구성으로 하는 다양한 조성의 효소 복합체를 이용하여, 다양한 한천 (정제된 Agar, 실제 홍조류 우뚝가사리)을 기질로 하는 활성 분석을 수행하였다.

[0104]

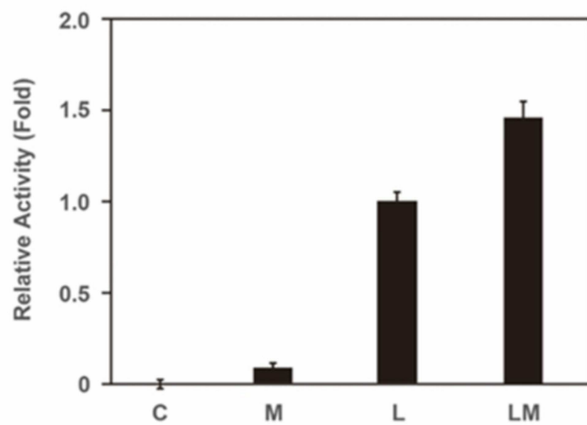
그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 베타-아가레이즈-3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈-아라비노스 아이소머레이즈 효소 복합체를 처리한 경우, 정제된 Agar(4A) 및 실제 홍조류 우뚝가사리(4B) 모두에서 단일 아가레이즈와 아라비노스 아이소머레이즈 보다 높은 타가토오즈 전환 효율을 나타내었다. 각각의 기호는 혼합한 단백질을 나타내며 C는 Control, B는 베타-아가레이즈, A는 3,6-안하이드로-L-갈락토시테이즈, M은 소형 골격단백질, L은 아라비노스 아이소머레이즈를 의미한다.

도면

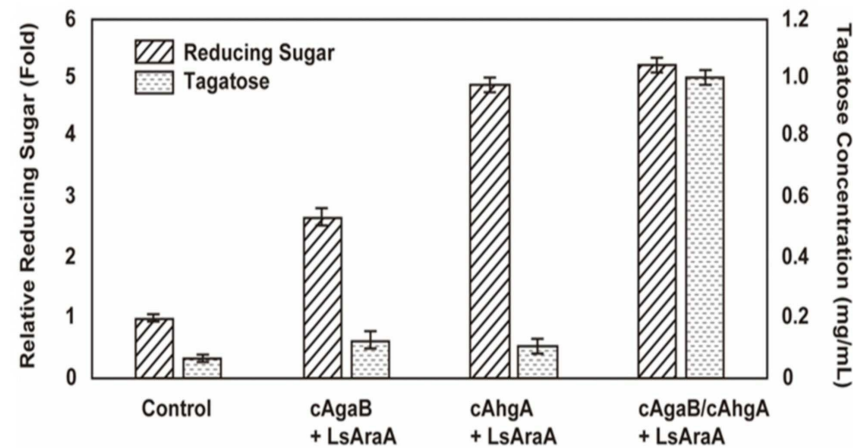
도면1



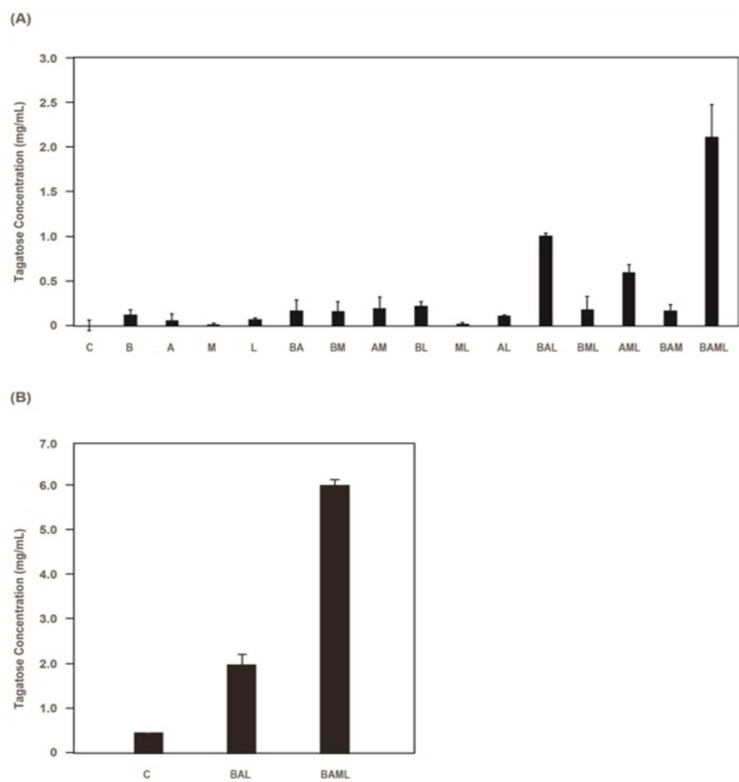
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Enzyme Complex of Agarase-Anhydro galactosidase-Arabinose isomerase and Method for Production of Tagatose from Agar Using The Same
- <130> DHP18-656
- <160> 36
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 492
- <212> PRT
- <213> Lactobacillus casei
- <400> 1

Ser Leu Ser Ala Arg Val Ser Phe Lys Lys His Val Lys Lys Gly Val
1 5 10 15
Phe Ile Met Leu Asn Thr Glu Asn Tyr Glu Phe Trp Phe Val Thr Gly

20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Tyr Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ser Val Glu Lys Asp
 35 40 45
 Ala Lys Glu Ile Val Glu Lys Leu Asn Ala Ser Arg Gln Leu Pro Tyr
 50 55 60
 Pro Ile Val Phe Lys Leu Val Ala Thr Thr Ala Asp Asn Ile Thr Lys
 65 70 75 80
 Val Met Lys Glu Ala Asn Tyr Asn Asp His Val Ala Gly Val Ile Thr
 85 90 95

 Trp Met His Thr Phe Ser Pro Ala Lys Asn Trp Ile Arg Gly Thr Lys
 100 105 110
 Leu Leu Gln Lys Pro Leu Leu His Leu Ala Thr Gln Phe Leu Asn Lys
 115 120 125
 Ile Pro Tyr Asp Thr Ile Asp Phe Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser
 130 135 140
 Ala His Gly Asp Arg Glu Tyr Ala Phe Ile Asn Ala Arg Leu Arg Lys
 145 150 155 160
 Asn Asn Lys Ile Ile Ser Gly Tyr Trp Gly Asp Glu Asp Val Gln Lys

 165 170 175
 Ala Met Ala Lys Trp Met Asp Val Ala Val Ala Tyr Asn Glu Ser Phe
 180 185 190
 Lys Ile Lys Val Val Thr Phe Ala Asp Lys Met Arg Asn Val Ala Val
 195 200 205
 Thr Asp Gly Asp Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Phe Gly Trp Thr Val
 210 215 220
 Asp Tyr Trp Gly Val Gly Asp Leu Val Ala Glu Val Asn Ala Val Ser
 225 230 235 240

 Glu Ala Asp Ile Asp Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Asp
 245 250 255
 Phe Val Glu Gly Gln Asn Thr Pro Glu Lys Phe Glu His Asn Val Lys
 260 265 270
 Tyr Gln Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Leu Lys Lys Phe Met Asp Asp Arg

275 280 285
 Gly Tyr Thr Ala Phe Thr Thr Asn Phe Glu Asp Leu Val Gly Leu Glu
 290 295 300
 Gln Leu Pro Gly Leu Ala Ala Gln Leu Leu Met Ala Glu Gly Tyr Gly

305 310 315 320
 Phe Ala Gly Glu Gly Asp Trp Lys Thr Ala Ala Leu Asp Arg Leu Leu
 325 330 335
 Lys Ile Met Ala His Asn Glu Lys Thr Val Phe Met Glu Asp Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Asp Leu Arg Gln Gly His Glu Ala Ile Leu Gly Ser His Met Leu
 355 360 365
 Glu Val Asp Pro Ser Ile Ala Ser Asp Lys Pro Arg Val Glu Val His
 370 375 380

Pro Leu Asp Ile Gly Asp Lys Asp Asp Pro Ala Arg Leu Val Phe Thr
 385 390 395 400
 Gly Met Gln Gly Asp Ala Val Asp Val Thr Met Ala Asp Tyr Gly Asp
 405 410 415
 Glu Phe Lys Leu Met Ser Tyr Asp Val Arg Gly Asn Lys Pro Glu Ala
 420 425 430
 Asp Thr Pro His Leu Pro Val Ala Lys Gln Leu Trp Thr Pro Lys Gln
 435 440 445
 Gly Leu Arg Glu Gly Ala Val Gly Trp Leu Thr Val Gly Gly Gly His

450 455 460
 His Thr Val Leu Ser Phe Ala Val Asp Ser Glu Gln Leu Gln Asp Leu
 465 470 475 480
 Ser His Leu Phe Asp Leu Thr Tyr Val Asn Ile Lys
 485 490

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LsAraA Sac I FORWARD PRIMER

<400>	2	
gcgcgagctc ctcgttaagc gcaagagtc		29
<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LsAraA Hind III REWARD PRIMER	
<400>	3	
gcgcgagctc ctcgttaagc gcaagagtc		29
<210>	4	
<211>	1479	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Lactobacillus Arabinose Isomerase	
<400>	4	
tcgttaagcg caagagtcag tttcaaaaag cacgttaaaa aaggagtctt tatcatgtta		60
aacacagaaa attatgaatt ttggtttgtc acagggagtc aatcattata cggcgaagaa		120
accctccgat cagttgaaaa agacgctaag gaaatcgttg aaaaattaaa tgcgagtcgc		180
caattacctt acccaatcgt tttcaaatta gtcgcaacaa ctgctgataa tattacgaaa		240
gtgatgaaag aagctaacta caacgatcac gttgctggtg tgatcacttg gatgcatact		300
ttctcacctg ctaaaaactg gatccgcggg acaaaattat tacaaaaacc attacttcat		360
ttagcaaccc aattcttaaa caagattcca tacgacacaa tcgatttcga ttacatgaac		420
ttaaaccaat cagctcatgg tgatcgcgaa tatgccttca tcaatgcgcg ttacgtaaa		480
aataacaaga ttatctcagg ttactggggt gatgaagacg ttcaaaaagc aatggctaaa		540
tggatggacg ttgcggtagc ttacaacgaa tcattcaaga ttaaagtcgt gacatttgc		600
gataaaatgc ggaacgtggc cgtcacagac ggtgataaag tcgaagctca aatcaaattt		660
ggttggacgg ttgattatgt ggggtgtcggg gatttagtcg cagaagtcaa tgctgtctca		720
gaggctgata ttgatgctaa gtatctgat ttacaaaaag aatacgactt tgttgaaggt		780
caaaatacac ctgaaaaatt cgaacacaat gttaaatacc aaattcgtga atacttcggt		840
ttgaagaaat ttatggacga tcgtggctac acagccttca caaccaactt cgaagattta		900
gttgggttgg aacaattacc tggtttagca gcccaattat tgatggctga aggttatggt		960

ttcgccggtg aaggggactg gaagacagct gctttagatc gcttggtgaa gattatggct 1020

cataatgaaa agacggtctt catggaagat tacacacttg atttacgtca aggccacgaa 1080

gctatcttgg ggtcacatat gcttgaagtt gatccttcaa tcgctcaga taaaccacgg 1140

gttgaagttc acccattaga tatcggcgat aaagacgac ctcacgcttt agtcttcaca 1200

gggatgcaag gcgatgctgt ggacgtcaca atggctgatt atggcgacga attcaaattg 1260

atgtcatatg atgttcgcgg caacaaacca gaagccgata caccacactt gccagttgct 1320

aaacaactct ggacacaaaa acaaggctta cgcgaagggtg ccgttggttg gttaacggtt 1380

ggtggtggtc accatacagt cttatcattt gctgttgatt cagaacaatt acaagattta 1440

agtcacttgt ttgatttaac ttacgtcaat attaaataa 1479

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LsAraA Sac I forward primer

<400> 5

gcgcgagctc ctcgttaagc gcaagagtc 29

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dockerin Sac I reward primer

<400> 6

cagcggatcc tttaatattg acgtaagtta aatcaaac 38

<210> 7

<211>

> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arabinose Isomerase c-terminal forward primer

<400> 7

caatattaaa ggatccgctg gctcc 25

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arabinose Isomerase Kpn I reward primer

<400> 8

ggtaccttat aaaagcattt ttttaagaac agcta 35

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Endo-beta-1,4-glucanase-B N-terminal

<400> 9

ggatccgctg 10

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-beta-1,4-glucanase-B C-terminal

<400> 10

caatattaaa 10

<210> 11

<211> 195

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 11

ggatccgctg gctccgctgc tggttctggg gaattcgatg ttaacaaaga tggaaaggta 60

aatgctatcg attatgcagt gcttaaatca attcttttag gtacaaatac taacgttgat 120

ttatcagtat cagacatgaa taaggatggt aaagtaaatg ctttggattt agctgttctt 180

aaaaaaatgc tttta 195

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LsAraA-Dockerin Sac I Forward primer

<400>	12	
gcgcgagctc ctcgttaagc gcaagagtc		29
<210>	13	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LsAraA-Dockerin Kpn I Reward primer	
<400>	13	
ggtaccttat aaaagcattt ttttaagaac agcta		35
<210>	14	
<211>	1686	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LsAraA-Dockerin	
<400>	14	
gagctctcgt taagcgcaag agtcagtttc aaaaagcacg ttaaaaaagg agtctttatc		60
atgttaaaca cagaaaaatta tgaattttgg ttgttcacag ggagtcatac attatacggc		120
gaagaaaccc tccgatcagt tgaaaaagac gctaaggaaa tcgttgaaaa attaaatgcg		180
agtcgccaat taccttacc aatcgttttc aaattagtcg caacaactgc tgataatatt		240
acgaaagtga tgaagaagc taactacaac gatcacgttg ctgggtgatg cacttggatg		300
catactttct cacctgctaa aaactggatc cgcgggacaa aattattaca aaaaccatta		360
cttcatttag caacccaatt cttaacaag attccatacg acacaatcga ttctgattac		420
atgaacttaa accaatcagc tcatggatg cgcgaatatg cttcatcaa tgcgcgttta		480
cgtaaaaata acaagattat ctacagttac tggggatgat aagacgttca aaaagcaatg		540
gctaaatgga tggacgttgc ggtagcttac aacgaatcat tcaagattaa agtcgtgaca		600
tttgctgata aaatgcggaa cgtggccgtc acagacggtg ataaagtcga agctcaaadc		660
aaatttggtt ggacggttga ttattggggt gtcggtgatt tagtcgcaga agtcaatgct		720
gtctcagagg ctgatattga tgctaagtat gctgatttac aaaaagaata cgactttgtt		780
gaaggtcaaa atacacctga aaaattcgaa cacaatgtta aataccaaat tcgtgaatac		840
ttcggtttga agaaatttat ggacgatcgt ggctacacag ccttcacaac caacttcgaa		900
gatttagttg ggttgaaca attacctggt ttagcagccc aattattgat ggctgaaggt		960
tatggtttcg ccggtgaagg ggactggaag acagctgctt tagatcgctt gttgaagatt		1020

atggctcata atgaaaagac ggtcttcatg gaagattaca cacttgattt acgtcaaggc 1080

cacgaagcta tcttggggtc acatatgctt gaagttgac cttcaatcgc gtcagataaa 1140

ccacgggttg aagttcaccc attagatatc ggcgataaag acgatcctgc acgttttagtc 1200

ttcacaggga tgcaaggcga tgctgtggac gtcacaatgg ctgattatgg cgacgaattc 1260

aaattgatgt catatgatgt tcgcggcaac aaaccagaag ccgatacacc aacttgcca 1320

gttgctaaac aactctggac accaaaacaa ggcttacgcg aaggtgccgt tggttggtta 1380

accgttgggtg gtggtcacca tacagtctta tcatttgctg ttgattcaga acaattacaa 1440

gatttaagtc acttgtttga tttaacttac gtcaatatta aaggatccgc tggtccgct 1500

gctggttctg gggaattcga tgtaacaaa gatggaaagg taaatgctat cgattatgca 1560

gtgcttaaat caattctttt aggtacaaat actaacgttg atttatcagt atcagacatg 1620

aataaggatg gtaaagtaaa tgctttggat ttagctgttc ttaaaaaaat gcttttataa 1680

ggtacc 1686

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-CelluloseBinding protein A Forward primer

<400> 15

ggatccgcag cgacatcatc aa 22

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-CelluloseBinding protein A Reward primer

<400> 16

gcgcctcgag gctataggat ctccaatatt tat 33

<210> 17

<211> 1647

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clostridium cellulovorans CelluloseBinding protein gene mCbpA

<400> 17

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac	60
tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac	120
gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac	180
catgctgggt cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac	240
ttcgtttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt	300
gcaagcggag cagctactct taaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca	360
aaatcagact ggtcaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca	420
acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatatagtg gagctaaagt acttggtaga	480
gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa	540
aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact actatgactt taaatggtaa cacatttaaa	600
acaattacag atgcaaacgg tacagctcta aatgcaagca ctgattatag tgtttctgga	660
aatgatgtaa caataagcaa agcttattta gcaaaacaat cagtaggaac aactacatta	720
aactttaact ttagtgcagg aaatcctcaa aaattagtaa ttacagtagt tgacacacca	780
gttgaagctg taacagctac aattggaaaa gtacaagtaa atgctggaga aacggtagca	840
gtaccagtta acttaacaaa agttccagca gctggtttag caacaattga attaccatta	900
acttttgatt ctgcatcatt agaagtagta tcaataactg ctggagatat cgtattaaat	960
ccatcagtaa acttctcttc tacagtaagt ggaagcacia taaaattatt attcttagat	1020
gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa	1080
gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca	1140
gtagttgggt atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaaccagg aacagtaact	1200
atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga	1260
gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct	1320
gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat	1380
atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaatgt aataaaatta	1440
ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgtaaca	1500
ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga	1560
acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc	1620
gttacaataa atattggaga tcctata	1647
<210> 18	
<211> 33	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-Agarase AgaB Sac I Forward primer

<400> 18

gcgcgagctc cggcgacaat tcaaaatttg ata 33

<210> 19

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-Agarase AgaB Reward primer

<400> 19

cagcgatcc tttctctaca ggtttataga tc 32

<210> 20

<211> 1005

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-Agarase

<400> 20

ggcgacaatt caaaatttga tagtgcaacg gatttgccgg ttgaacaaga acaagaacag 60

gaaacggaac aagagggaga acccgaagaa agttcggagc aagaccttgt cgaggaggtc 120

gattggaagg atattcccgat acccgccgat gcaggaccga atatgaagtg ggagtttcaa 180

gagatttccg ataattttga atatgaggcc cctgcggata ataaggggag tgaatttctc 240

gaaaagtggg acgattttta tcacaatgcc tgggcaggcc cagggtgac cgaatggaaa 300

cgggacaggt cctatgtagc cgatggcgag ctaaagatgt gggcgacaag aaaaccgggc 360

tccgataaaa taaacatggg gtgcattact tctaagacc gagtggctta tctgtttat 420

attgaagcaa gggcaaaggt catgaactct accttggtt cggatgtttg gctcttaagt 480

gccgatgaca cccaagagat agatatttcta gaggcatatg gggccgatta ttccgaaagt 540

gccggaagg atcattccta tttttctaaa aaggtacaca taagccatca cgtctttatt 600

cgagacccat ttcaagatta tcaaccaaag gatgccggtt cttggttcga agacggcacc 660

gtctggaaca aagagttcca taggtttggt gtgtattgga gggatccatg gcatctagaa 720

tattacatag acggtgttct ggtgaggacc gtttcgggaa aggacattat cgaccccaaa 780

cactttacga atacaacgga tcccggtaat acggaaatcg ataccgcac cggcttcaat 840

aaagaaatgg atattattat caatacagaa gaccaaactt ggcggtcttc accggcctcg 900

ggtttacagt ctaataccta tacgccaacg gacaatgaat tgagcaatat agaaaacaat 960

acgttcgggg tcgattggat caggatctat aaacctgtag agaaa 1005

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-Agarase AgaB C-terminal Forward primer

<400> 21

tgtagagaaa ggatccgctg gctccg 26

<210> 22

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-Agarase AgaB Not I Reward primer

<400> 22

gcgcggccgc tcaatgatga tgatgatgat gtaaaagcat tttttaag 49

<210> 23

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dockerin of Endo-beta-1,4-glucanase-B

<400> 23

ggatccgctg gctccgctgc tggttctggg gaattcgatg ttaacaaaga tggaaaggta 60

aatgctatcg attatgcagt gcttaaatca attcttttag gtacaaatac taacgttgat 120

ttatcagtat cagacatgaa taaggatggt aaagtaaag ctttgattt agctgttctt 180

aaaaaaatgc tttta 195

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AgaB-Dockerin Sac I Forward Primer

<400> 24

gcgcgagctc cggcgacaat tcaaaatttg ata	33
<210> 25	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AgaB-Dockerin Not I Reward Primer	
<400> 25	
gcgcggccgc tcaatgatga tgatgatgat gtaaaagcat tttttaag	49
<210> 26	
<211> 159	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chimeric Beta-Agarase AgaB	
<400> 26	
gatgttaaca aagatggaaa ggtaaagtct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt	60
ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta	120
aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta	159
<210> 27	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3,6-Anhydro-L-Galactosidase EcoR I Forward primer	
<400> 27	
gcgcgaattc gatgaacaaa tactccaat tt	32
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Endo-beta-1,4-glucanase-B N-terminal Reward primer	
<400> 28	
cagcggatcc ttgttttttt actccttttag	30
<210> 29	
<211> 1224	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3,6-Anhydro-L-Galactosidase

<400> 29

atgaacaaat actcccaatt ttttaattttt gctgcggtgc tggatcggc ctgcaattct 60

cccaaaacta caaaagaaat gaaatctaca gatgattgcc cagagaaggt gacgtttact 120

cccgaacaaa ttgaccatct cggcattacg gataccaacc attigagcgc tgcgtcaaaa 180

agagccttga aatggcctac ggacttgggt aatgaatggt ttattcaatt tggtcggtta 240

caacctttta agggggattt ggcttatgag gaaggtgtcg ttcgtcgtga tccaagtgcc 300

ataatcaaag agaattgaaa gtactacgtg tggatttcta aaagtaccgg gccaacgcaa 360

ggttttggtg gggatattga aaaagataag gtttttccgt gggatcgtg tgatatttgg 420

tatgctacct ccgaagatgg ttggacgtgg aaagaagaag gtcccgaggt aacaagaggt 480

gaaaaagggg cttatgatga tcgctccgtt ttaccgttg agatcatgaa atgggaagat 540

aagtactacc tctgctatca aacggtaaaa tcaccctata atgtccgtgt taaaaatcaa 600

gtaggtctgg cttagggcgga ttctcccgac gggccatgga ccaaaagtga agagcctatt 660

ttgagtcctg ccgataacgg agtgtggaag ggtgaagagc aagatcgttt cgccgtgatt 720

aaaaaagggt attttgatag ccataaagta catgatccat gtattatacc ttataagggg 780

aaattctatc tctattacaa aggggaacag atgggtgaag cgattacttt cggcggaaga 840

cagatacgtc atggtgtggc catagccgac aatcccaaag ggccttacgt gaaatctcca 900

tataacccta ttagcaatag tggatcatgaa atctgtgttt ggccttataa cggaggtatt 960

gcttcgttga tctactacaga tggctctgaa aagaatacga tccagtgggc tccagacgga 1020

attaactttg aaattaaatc ggtaatacca ggggtcaatg cccatgctat cggactgaac 1080

cgaacagcgg atgttgaaaa ggaaccgacc gaaattttac gatggggatt gacgcatata 1140

tacaataatg gcgattacca gagtatcatg cgtttttctt cggaagaaaa aacacgtcac 1200

gtagctaaag gagtaaaaaa acaa 1224

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-beta-1,4-Glucanase-B Forward primer

<400> 30

aaaaaaacaa ggatccgctg gctccg 26

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-beta-1,4-Glucanase-B Hind III Reward primer

<400> 31

gcgcaagctt taaaagcatt tttttaagaa cagcta 36

<210> 32

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dockerin of Endo-beta-1,4-Glucanase-B

<400> 32

ggatccgctg gtcgcgtgc tggttctggg gaattcgatg ttaacaaaga tggaaaggta 60

aatgctatcg attatgcagt gcttaaatca attcttttag gtacaaatac taacgttgat 120

ttatcagtat cagacatgaa taaggatggt aaagtaaatg ctttggattt agctgttctt 180

aaaaaaaaatgc tttta 195

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3,6-Anhydro-L-Galactosidase linked Dockerin EcoR I Forward primer

<400> 33

gcgcgaattc gatgaacaaa tactccaat tt 32

<210> 34

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3,6-Anhydro-L-Galactosidase linked Dockerin Hind III Reward primer

<400> 34

gcgcaagctt taaaagcatt tttttaagaa cagcta 36

<210> 35
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric Dockerin
 <400> 35
 gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgccttaa atcaattctt 60
 ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120
 aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159
 <210> 36
 <211> 1224
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric 3,6-Anhydro-L-Galactosidase
 <400> 36
 atgaacaaat actcccaatt tttaattttt gctgcggtgc tggatcggc ctgcaattct 60

 cccaaaacta caaaagaaat gaaatctaca gatgattgcc cagagaaggt gacgtttact 120
 cccgaacaaa ttgaccatct cggcattacg gataccaacc atttagcgc tgcgtcaaaa 180
 agagccttga aatggcctac ggacttgggt aatgaatggt ttattcaatt tggtcctgta 240
 caacctttaa agggggattt ggcttatgag gaaggtgtcg ttcgtcgtga tccaagtgcc 300
 ataatcaaag agaatggaaa gtactacgtg tggatttcta aaagtaccgg gccaacgcaa 360
 ggttttggtg gggatattga aaaagataag gttttccgt gggatcgatg tgatatttgg 420
 tatgctacct ccgaagatgg ttggacgtgg aaagaagaag gtcccgagcgt aacaagaggt 480

 gaaaaagggg cttatgatga tcgctccgtt ttaccgttg agatcatgaa atgggaagat 540
 aagtactacc tctgctatca aacggtaaaa tcacctata atgtccgtgt taaaaatcaa 600
 gtaggtctgg ctgggcgga ttctcccgac gggccatgga ccaaaagtga agagcctatt 660
 ttgagtcctg ccgataacgg agtgtggaag ggtgaagagc aagatcgttt cgccgtgatt 720
 aaaaaaggtg atttgatag ccataaagta catgatccat gtattatacc ttataagggg 780
 aaattctatc tctattacaa aggggaacag atgggtgaag cgattacttt cggcgggaaga 840
 cagatacgtc atggtgtggc catagccgac aatcccaaag ggccttacgt gaaatctcca 900

 tataacccta ttagcaatag tggatcatgaa atctgtgttt ggccttataa cggaggtatt 960
 gcttcgttga tcactacaga tggctctgaa aagaatacga tccagtgggc tccagacgga 1020

attaactttg aaattaaatc ggtaatacca ggggtcaatg cccatgctat cggactgaac	1080
cgaacagcgg atgttgaaaa ggaaccgacc gaaattttac gatggggatt gacgcatata	1140
tacaataatg gcgattacca gagtatcatg cgtttttctt cggaagaaaa aacacgtcac	1200
gtagctaaag gagtaaaaaa acaa	1224