



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월19일
(11) 등록번호 10-1855961
(24) 등록일자 2018년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/38 (2006.01) C07K 14/32 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2468 (2013.01)
C07K 14/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0000152
(22) 출원일자 2017년01월02일
심사청구일자 2017년01월02일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120098247 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성욱
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호 (잠실동, 리센즈아파트)
정다운
서울특별시 도봉구 노해로57길 60, 1층 (쌍문동)
현정은
서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21, 1층 (안암동2가)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 8 항

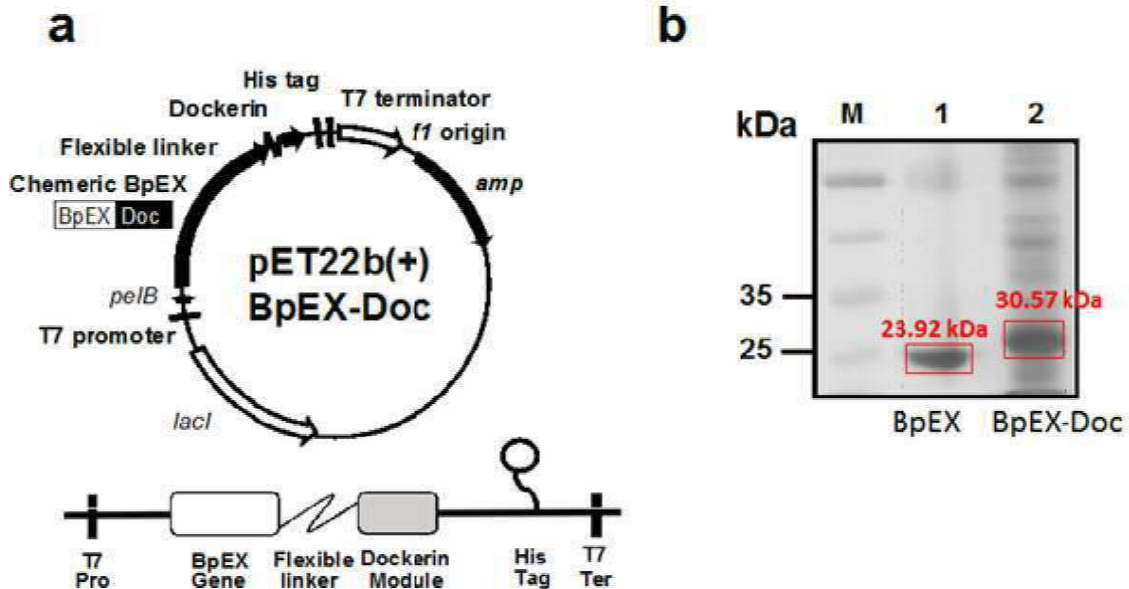
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 익스펜신-아가레이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천 분해방법

(57) 요약

본 발명은 익스펜신-아가레이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천 분해방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 효소복합체를 사용하면, 해양바이오매스로부터 얻어지는 한천을 효율적으로 분해할 수 있어, 에탄올 생산에 필요한 갈락토오스나 글루코오스뿐만 아니라, 이탄당, 삼탄당, 올리고당 등과 같은 유용한 생리활성물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/244 (2013.01)

C12N 9/96 (2013.01)

C12P 19/02 (2013.01)

C12Y 302/01006 (2013.01)

C12Y 302/01081 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

JP2010151789 A

US20110250668 A1

US20110151538 A1

Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,
100권, 5호, 페이지 2203-2212.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015065289

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 [2차년도] 친환경 고분자 기질을 이용하는 코리네박테리움의 지방족 및 함황 아미노산 생
합성 경로 연구 및 유용물질 합성

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)과 연결된 아가레이즈가 도커린-코히즌 결합에 의하여 연결되어 있는 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 도커린은 엔도-베타-1,4-클루칸아제-비 유래의 도커린인 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 익스팬신 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 코히즌 모듈은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)인 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아가레이즈는 서열번호 20의 염기서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 제1항의 효소복합체의 제조방법:

- (a) 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질을 준비하는 단계;
- (b) 코히즌 모듈(Cohesin module)과 연결된 아가레이즈를 준비하는 단계;
- (c) 상기 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)이 연결된 아가레이즈를 혼합하여 도커린-코히즌 상호작용을 이용한 효소복합체를 제조하는 단계.

청구항 7

제1항의 효소복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 한천의 분해방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 한천은 정제된 한천, 홍조류 유래 한천 또는 홍조류에 존재하는 한천인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 익스팬신-아가레이즈 효소복합체 및 이를 이용한 한천 분해방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈가 도커린-코히즌 결합에 의하여 연결되어 있는 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체 및 이를 이용한 한천분해방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근에는 많은 섬유질 및 다양한 다당류에 의해 세포벽이 구성되어 있는 해양조류가 새로운 바이오 에너지 원료로서 주목을 받고 있다. 해조류를 주로 생산하는 나라는 한국, 일본, 중국, 인도네시아 등의 아시아 국가들이며 육상보다 재배 가능한 바다 면적이 넓다. 또한, 해조류는 목재와 식물계 셀룰로오스보다 빠른 속도로 성장하며 광합성 반응으로 공기 중 이산화탄소를 흡수하므로 온실 가스를 줄일 수 있는 효과가 있고, 해조류 내 리그닌의 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 바이오 연료 원료로서의 많은 잠재성을 내포하고 있다.
- [0003] 한편 우리나라와 일본에서는 홍조류 중 김(주로 *Porphyra yezoensis*)양식이 활발하게 이루어지고 있으며, 홍조류는 우리나라에서 자생하는 해조류의 절반 이상을 차지하고 있다. 또한, 갈조류나 녹조류보다 서식 범위가 넓고 얕은 수심에서부터 광선이 닿는 깊은 수심에 이르기까지 자생하고 있어 다른 조류보다 종의 수효가 많아 원료 수급 측면에서 매우 우수하며, 타 해조류에 비해 탄수화물, 즉, 미생물이 에탄올로 전환할 수 있는 당당 전환물질을 많이 함유하고 있어 에너지 전환 측면에서도 장점을 지니고 있다. 대형 해조류는 종에 따라 구성하고 있는 다당류의 종류 및 결합 형태가 다양한데, 그 중에서 홍조류는 세포벽 내층의 구조 다당류인 셀룰로오스와 외층 및 세포 사이에 황산기를 가지는 점질성 다당류인 한천, 카라기난, 그리고 그 밖에 자일란, 만난 등으로 구성되어 있다.
- [0004] 특히 한천과 카라기난이 각각 28%, 24%로 대표적이며 셀룰로오스는 3~16%로 그다지 많지 않다. 홍조류 가공 공정 및 추출에서 발생하는 대표적 부산물인 한천은 단일당으로 형성된 다당류가 아니고 중성 다당류인 아가로오즈(60~80%)와 산성 다당류인 아가로펙틴(20~40%)의 혼합물로서, 아가로오즈는 D-갈락토오즈와 3,6-안하이드로-L-갈락토오즈(AG)가 β -1,4 결합을 하고 있는 이당류인 아가로바이오즈들 간에 α -1,3 결합을 반복하는 고분자 구조(또는 D-갈락토오즈와 3,6-안하이드로-L-갈락토오즈(AG)가 α -1,3 결합을 하고 있는 이당류인 네오아가로바이오즈들 간에 β -1,4 결합을 반복하는 고분자 구조)이고, 아가로펙틴은 아가로오즈와 마찬가지로 같은 기본구조로 되어 있으나 황산기 등의 산성기를 포함하고 있어 아가로오즈와 달리 젤화력이 약하다.
- [0005] 따라서, 토양, 깃벌, 해저 동물의 내장 등에서 순수 분리한 한천을 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 자원으로서 산업적으로 많이 유용하게 이용되고 있다.
- [0006] 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.
- [0007] 한편, 익스팬신은 식물세포벽에 흡착하고 작용하여 환원당을 생성시키는 작용은 하지 않지만 아마도 셀룰로스 간의 수소결합을 절단시켜 세포벽의 조직의 유연성을 늘리고 이에 따라 셀룰라제의 접근성을 높여 셀룰라제와 같이 작용시킬 경우 셀룰라제의 활성을 증진시키는 것으로 추측된다 (Kim ES, Lee HJ, Bang WG, Choi IG, Kim KH., *Biotechnology and Bioengineering* 102:1342-1353, 2009) 익스팬신은 크게 알파-익스팬신(EXPA)와 베타-익스팬신(EXPB)로 나뉘고 알파-익스팬신은 주로 쌍떡잎 식물의 세포벽에, 베타-익스팬신은 초본류의 세포벽에 잘 작용하고 베타-익스팬신의 경우 셀룰로스보다는 자일란에 흡착하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 기존에 한천을 분해하는 효소로 알려진 아가레이즈의 한천으로의 흡착력을 높여, 한천 분해효율이 높은 효소를 개발하고자 예의 노력한 결과, 아가레이즈와 익스팬신을 결합시킨 효소 복합체를 제조하고, 상기 효소 복합체가 아가레이즈 또는 익스팬신 단독 효소보다 우수한 한천분해능을 가지는 것을 확인하고

본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 한천분해능이 우수한 효소 복합체를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명이 다른 목적은 상기 효소 복합체를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명이 또 다른 목적은 상기 효소 복합체를 이용한 한천의 분해방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈가 도커린-코히즌 결합에 의하여 연결되어 있는 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a) 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질을 준비하는 단계; (b) 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈를 준비하는 단계; (c) 상기 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈를 혼합하여 도커린-코히즌 상호작용을 이용한 효소복합체를 제조하는 단계를 포함하는 상기 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 한천의 분해방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 효소 복합체를 사용하면, 해양바이오매스로부터 얻어지는 한천을 효율적으로 분해할 수 있어, 에탄올 생산에 필요한 갈락토오스나 글루코오스뿐만 아니라, 이탄당, 삼탄당, 올리고당 등과 같은 유용한 생리활성물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1a는 본 발명에서 바실러스 속 균주로부터 유래한 세균 유래 익스팬신 단백질 유전자의 설계를 통해 본 발명에서 제시된 도커린 융합 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+) BpEX-Doc의 모식도이며 도 1b는 재조합 벡터 pET22(+) BpEX-Doc가 삽입된 대장균의 도커린 융합 전 후의 설계한 세균 유래 익스팬신 단백질의 발현을 확인한 것이다.
- 도 2는 본 발명에서 제시된 도커린 융합 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc의 Carbohydrate Binding Module의 작용을 확인하기 위하여, PASC를 기질로 사용하여 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc의 상대적인 섬유소 결합 효율을 확인한 것이다.
- 도 3은 본 발명에서 제시된 도커린 융합 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc의 Agar Gelling에 대한 영향을 분석하기 위하여, Lugol Solution을 이용하여 BpEX-Doc의 존재 하에 Agar의 Gelling Temperature가 감소함을 증명한 것이다.
- 도 4는 본 발명에서 제시된 도커린 융합 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc이 온도에 따른 Agar의 Gel화에 주는 영향을 분석하기 위하여, Rheometer를 이용하여 BpEX-Doc의 존재 하에 Agar의 Storage Moduli 및 Loss Moduli의 온도에 따른 변화를 도 4a에 Viscosity의 온도에 따른 변화를 도 4b에 비교하여 보여주는 것이다.
- 도 5는 본 발명에서 제시된 도커린 융합 세균 유래 익스팬신 단백질 BpEX-Doc과 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 베타-아가레이즈 단백질을 어셈블리 시킨 복합체의 활성 분석을 실행하여 효소 활성의 증대를 증명한 그림으로, 도 5a는 정제된 Agar를 기질로, 도 5b는 우뭇가사리로부터 추출한 Agar를 기질로, 도 5c는 우뭇가사리 자체를 기질로 사용하여 분해 활성을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명에서는 바실러스 속 균주로부터 유래한 익스팬신과 해양바이오매를 분해하는 아가레이즈를 효소복합체로

만들어 사용함에 따라, 효소의 한천 분해 능력을 증대시켰다. 해양바이오매스 즉, 한천의 원료로 쓰이는 우뭇가사리에 적용하여, 이러한 효소복합체를 사용하여 한천 원료의 분해율이 증가하는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 한천으로부터 익스팬신의 작용기전이 수소결합에 의한 추론은 유변학적 특성의 변화를 확인하였다.

- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈가 도커린-코히즌 결합에 의하여 연결되어 있는 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 도커린은 엔도-베타-1,4-클루칸아제-비 유래의 도커린, 엔도-베타-1,4-자일라네이즈-비 유래 도커린, 엑소-글루칸아제-에스 유래 도커린을 사용할 수 있으며, 상기 익스팬신은 바실러스 (Bacillus) 유래, 클로스트리디움 (Clostridium) 유래, 클라비박터 (Clavibacter) 유래, 팩토박테리움 (Pectobacterium) 유래, 마이크로모노스포라 (Micromonospora) 유래의 것을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 있어서 상기 익스팬신 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 양태에서는, 바실러스 속 유래의 익스팬신 단백질을 코딩하는 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인 유전자의 융합 단편을 대장균 발현 벡터에 도입하여 발현시켰으며, 도커린 모듈이 연결된 익스팬신 융합 단백질이 생산되는 것을 확인하였다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 코히즌 모듈은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), Clostridium thermocellum 유래 소형 골격 단백질 (mCipA), Clostridium cellulolyticum 유래의 소형 골격 단백질 (mCipC) 것을 사용할 수 있으며, 상기 아가레이즈는 슈도모나스 (Pseudomonas) 유래, 사카로파거스 (Saccharophagus) 유래, 알토로모나스 (Aleromonas), 유래의 것을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에서는, 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA) 유전자와 아가레이즈를 코딩하는 유전자의 융합 단편을 대장균 발현 벡터에 도입하여 발현시켰다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 코히즌 모듈은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 아가레이즈는 베타-아가레이즈인 것을 특징으로 하는 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에서는 상기 도커린 모듈이 연결된 익스팬신 융합단백질과 상기 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈를 도커린-코히즌 결합에 의하여 결합시켜 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 제조하였다.
- [0026] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질을 준비하는 단계; (b) 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈를 준비하는 단계; (c) 상기 익스팬신 단백질에 섬유소분해효소의 도커린 모듈이 연결된 융합단백질 코히즌 모듈(Cohesin module)와 연결된 아가레이즈를 혼합하여 도커린-코히신 상호작용을 이용한 효소복합체를 제조하는 단계를 포함하는 상기 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0027] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 한천의 분해방법에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 한천은 정제된 한천, 홍조류 유래 한천 또는 홍조류에 존재하는 한천인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 양태에서는 아가레이즈, 아가레이즈-mCbpA 융합단백질, 도커린-익스팬신 융합단백질 및 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 이용하여, 정제된 Agar, 우뭇가사리로부터 추출한 Agar 및 우뭇가사리 자체를 각각 기질로 하여 분해활성을 분석하였으며, 그 결과, 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 처리한 경우, 정제된 Agar, 추출 Agar 및 우뭇가사리 자체의 경우 모두에서 단일 익스팬신이나 아가레이즈 보다 높은 분해효율을 나타내었다(도 5).
- [0030] 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 작제물을 말한다.
- [0031] 일반적으로 플라스미드 벡터는 염색체 외의 환형 이중가닥 DNA이고, 세포 내에 존재하며 다양한 기능을 한다. 항생물질에 내성을 가진 물질 및 박테리오킨(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.

- [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] 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 포함한다.
- [0036] 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 제한되지 않는다.
- [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 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 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] 폴리 아데닐화 시그널은 전사체의 안정성을 증가시키거나 세포질 수송을 용이하게 한다. 인핸서 서열은 프로모터에서 다양한 부위에 위치하여 인핸서 서열이 없을 때의 프로모터에 의한 전사 활성화와 비교하여, 전사 활성을 증가시키는 핵산 핵산 서열이다. 신호서열에는 숙주가 에스케리키아(Escherichia) 속 균인 경우에는 PhoA 신호서열, OmpA 신호서열 등이, 숙주가 바실러스 속 균인 경우에는 -아밀라아제 신호서열, 서브틸리신(Subtilisin) 신호서열 등을, 숙주가 효모인 경우에는 MF(Mating factor) 신호서열, SUC2 신호서열 등을, 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 또한, 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제 개시점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0041] 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 마커를 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.
- [0042] 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.

[0043] 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 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)등을 포함하나, 상기 예에 의해 본 발명의 벡터가 형질전환될 수 있는 숙주세포가 제한되는 것은 아니다.

[0044] 숙주 세포에 벡터를 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, 텍스트란 설페이트(Dextran sulfate), 리포펙타민(lipopectamine) 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 플라스미드를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서는 통상적으로 사용되는 형질전환 방법이 제한없이 사용될 수 있다.

[0045] 또한, 상기 방법으로 형질전환된 숙주세포는 필요에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 배양 방법을 통하여 배양될 수 있으며, 사용될 수 있는 배지 및 배양기간은 필요에 따라 당업자에 의해 임의적으로 선택될 수 있다.

[0046] 바람직하게 본 발명은 형질 전환된 대장균 균주를 LB(Luria Bertani) 배지에서 12시간 동안 배양한 후 재조합 유전자들로부터 형광 단백질의 생산을 유도하기 위하여 2시간 동안 추가 배양하였다. 상기 배지는 기술 분야에 일반적으로 사용될 수 있는 다양한 배지가 적용 가능할 것이다

[0047] 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.

[0048] 실시예 1: 세균 유래 익스팬신 단백질 유전자의 증폭

[0049] 익스팬신을 이용하여 한천의 젤화를 완화하고 분해효율을 증대시키기 위한 단백질들을 클로닝하기 위하여 바실러스 속 균주의 gDNA로부터 세균 유래 익스팬신 (BpEX) 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer, 서열번호 3)의 5'에는 제한효소 *Bam*HI 인식서열이, 역방향프라이머(Rreverse primer, 서열번호 4)의 5'에는 제한효소 *Hind*III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 664bp의 세균 유래 익스팬신 (BpEX) 유전자(서열번호 2)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0050]

[0051] 서열번호 3: ATAT ggatcc a ttgagtttcgctgtgccaa

[0052] 서열번호 4:GCGC aagctt attaggaagctgaacattgcc

[0053] 그 후, 세균 유래 익스팬신 유전자 BpEX 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터인 pET22b(+)에 라이게이션시켜 *Bam*HI 과 *Hind*III으로 *E. coli* BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) BpEX라 명명하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/BpEX 명명하였다.

[0054] 실시예 2: 도커린이 융합된 세균 유래 익스팬신 단백질 유전자의 증폭

[0055] 익스팬신이 결합된 한천 분해 효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 바실러스 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 세균 유래 익스팬신 (BpEX) 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 5)의 5'에는 제한효소 *Hind*III 인식서열이, 역방향프라이머(서열번호 6)의 5'

에는 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, 673bp의 세균 유래 익스펜신 (BpEX) 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0056] 또한, 클로스트리디움 셀룰로보란스의 gDNA로 부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 7)의 5'에는 바실러스 속 균주로부터 유래한 세균 유래 익스펜신 (BpEX) 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(서열번호 8)의 5'에는 제한효소 *Xho*I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 211bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자(서열번호 9)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0057] 서열번호 5: GCGCAAGCTTTTGAGTTTCGCTGTGCCAA

[0058] 서열번호 6: CAGCGATCCATTAGGAAGCTGAACATTGC

[0059] 서열번호 7: GCTTCCTAATGGATCCGCTGGCTCC

[0060] 서열번호 8: GCGCCTCGAGTAAAAGCATTTTTTAAGAACAGCTAAAT

[0061] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열(서열번호 9)

[0062] ggatccgctggctccgctgctggttctggggaattcgatgtaacaaagatggaaggtaaatgctatcgattatgcagtgcttaaatcaattcttttaggt
acaaataactaacgttgatttatcagtatcagacatgaataaggatggtaaagtaaatgctttggatttagctgttcttaaaaaaatgctttta

[0063] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분 N-terminal의 10bp 크기의 서열

[0064] 서열번호 10: ggatccgctg

[0065] 세균 유래 익스펜신 (BpEX) 유전자의 C-terminal 부분 10bp 크기의 서열

[0066] 서열번호 11: gcttcctaat

[0067] 상기에서 얻은 세균 유래 익스펜신 (BpEX) 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneA11)를 사용하여 회수하였다.

[0068] 그 후 세균 유래 익스펜신 (BpEX) 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 12)의 5'에는 제한효소 *Hind*III, 역방향프라이머(서열번호 13)의 5'에는 제한효소 *Xho*I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여서 그 결과 864bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자(서열번호 14)가 연결된 세균 유래 익스펜신 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0069] 그 후, 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 유전자 BpEX Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현벡터인 pET22b(+)에 라이게이션시켜 *Hind*III 와 *Xho*I으로 *E. coli* BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) BpEX-Doc라 명명하였다(도 1a). 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/BpEX-Doc 명명하였다.

[0070] 서열번호 12: GCGCAAGCTTTTGAGTTTCGCTGTGCCAA

[0071] 서열번호 13: GCGCCTCGAGTAAAAGCATTTTTTAAGAACAGCTAAAT

[0072] 서열번호 14:

[0073] gatgttaacaaagatggaaggtaaatgctatcgattatgcagtgcttaaatcaattcttttaggtacaaat

[0074] actaacgttgatttatcagtatcagacatgaataaggatggtaaagtaaatgctttggatttagctgttctta

[0075] aaaaaatgctttta

[0076] 실시예 3: 대장균 형질전환체의 세균 유래 익스펜신 단백질 및 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 단백질 BpEX-Doc 발현

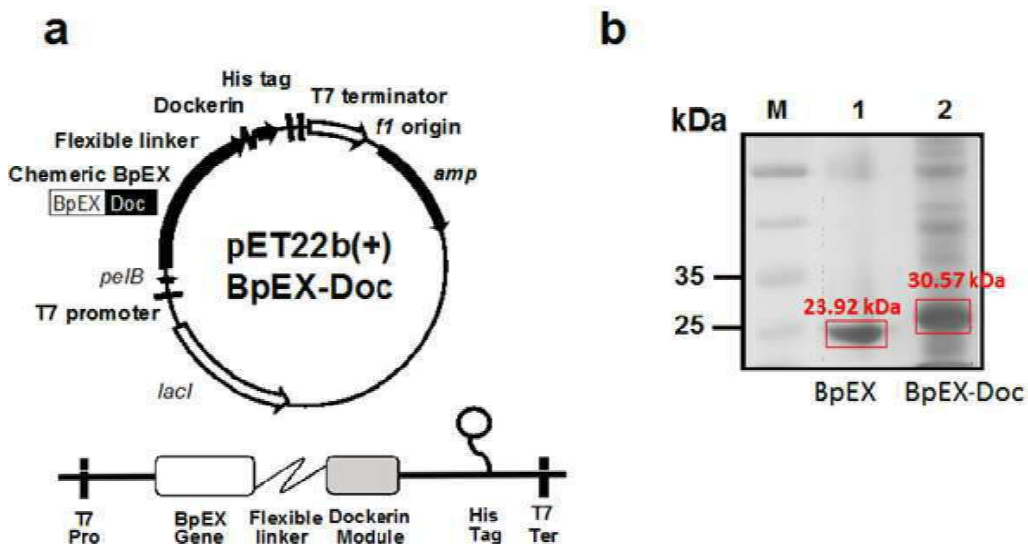
- [0077] 실시예 1 및 실시예 2에서 확보한 형질전환체의 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.
- [0078] 대장균 형질전환체를 IPTG로 발현 유도하여 익스펜신 단백질 및 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 단백질이 발현되도록 하는 조건을 조성하여 16℃에서 12시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 세포를 확보하였다. 이후 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻은 후 SDS-PAGE에 로딩하였다. 그 후, 단백질의 C-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 Western Blot 분석 기법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 예상한 익스펜신 단백질 및 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다(도 1b).
- [0079] **실시예 4: 대장균 형질전환체의 세균 유래 익스펜신 단백질 및 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 단백질의 섬유소 결합 효율 분석**
- [0080] 실시예 3에서 확보한 세균 유래 익스펜신 단백질 및 도커린 융합 세균 유래 익스펜신 단백질의 Carbohydrate Binding Module의 섬유소 결합 효율을 분석하기 위하여, Phosphoric acid-swollen cellulose (PASC)을 이용하여 Binding Assay를 수행하였다. 자세한 실험 조건은 아래와 같다.
- [0081] - Blocking Sample : 50 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 25℃, 1 h
- [0082] - Protein Sample : Final concentration of 1 mg/mL, 4℃ for 10 min
- [0083] - Binding Buffer : 500 μ L of binding buffer (50 mM sodium acetate, pH 5.0)
- [0084] - Wash Buffer : 50 mM sodium acetate, pH 5.0
- [0085] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 도커린이 융합된 익스펜신 단백질의 섬유소 결합능이 익스펜신 단백질보다 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0086] **실시예 5: 세균 유래 익스펜신 단백질의 한천 구조에 대한 유변학적 영향 분석**
- [0087] 실시예 3에서 확보한 세균 유래 익스펜신 단백질이 한천 구조에 주는 영향을 분석하기 위하여 Spectrometer 및 Rheometer를 이용하여 분석하였다. Spectrometer를 이용한 실험의 경우, Lugol solution을 염색시약으로 사용하여 Gel Temperature가 감소함을 측정하였으며, 이를 도 3에 나타내었다. Rheometer를 이용한 실험의 경우 세균 유래 익스펜신 단백질의 존재 하에 한천 기질의 Moduli 및 Loss Moduli의 온도에 따른 변화를 도 4a에 나타내었으며, Viscosity의 온도에 따른 변화를 도 4b에 나타내었다. 자세한 실험 조건은 아래와 같다.
- [0088] - Steel parallel plate geometry : 25 mm radius
- [0089] - Conditions : 2% strain, 2℃/min rate, 5 Hz frequency, 2% strain amplitude
- [0090] **실시예 6: 세균 유래 익스펜신 단백질 및 베타-아가레이즈 구성 효소 복합체 구축 및 다양한 한천 기질에 대한 활성 분석**
- [0091] 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 코히진 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulosebinding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (서열번호 15)의 5'에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머 (서열번호 16)에는 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 확인할 수 있었다.
- [0092] 서열번호 15: ggatccgcagcgacatcatcaa
- [0093] 서열번호 16: GCGCctcgaggctataggatctccaatatttat
- [0094] 그 후, 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이 mCbpA 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (*E. coli* expression vector)인 pET22b(+) Vector에 라이게이션(ligation)시켜 BamHI과 XhoI으로 에스세리시아 콜라이(대장균, *E. coli*) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22b-mCbpA라 명명하였고 도 2에 도시하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/mCbpA라 명명하였다.

- [0095] 도커린이 결합된 한천 분해 효소를 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 베타-아가레이즈 AgaB 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 18)의 5'에는 제한효소 *SacI* 인식서열이, 역방향프라이머(서열번호 19)의 5'에는 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, 1005bp의 베타-아가레이즈가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0096] 서열번호 18: GCGCGAGCTCCGGCGACAATTCAAAATTTGATA
- [0097] 서열번호 19: CAGCGGATCCTTTCTCTACAGGTTTATAGATC
- [0098] 또한, 클로스트리디움 셀룰로보란스의 gDNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 22)의 5'에는 조벨리아 속 균주의 지노믹디엔에이로부터 베타-아가레이즈 AgaB 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(서열번호 23)의 5'에는 제한효소 *NotI* 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 하였다. 그 결과 211bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자(서열번호 24)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0099] 서열번호 22:
- [0100] TGTAGAGAAAGGATCCGCTGGCTCCG
- [0101] 서열번호 23: GCGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGTAAAAGCATTTTTTTAAG
- [0102] 서열번호 24:
- [0103] ggatccgctggctccgctgctggttctggggaattcgatgttaacaaagatggaaaggtaaatgctatcgattatgcagtgttaaatcaattcttttaggtacaaataactaacgttgatttatcagtatcagacatgaataaggatggtaaaagtaaatgctttggatttagctgttcttaaaaaaatgctttta
- [0104] 상기에서 얻은 베타 아가레이즈 AgaB 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.
- [0105] 그 후 베타 아가레이즈 AgaB 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 25)의 5'에는 제한효소 *SacI*, 역방향 프라이머(서열번호 26)의 5'에는 제한효소 *NotI* 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여서 그 결과 1225bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자(서열번호 14)가 연결된 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 베타-아가레이즈 AgaB 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0106] 그 후, 도커린 융합 키메릭 베타-아가레이즈 AgaB 유전자 AgaB Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현벡터인 pET22b(+)에 라이게이션시켜 *SacI* 와 *NotI*으로 *E. coli* BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) AgaB-Doc라 명명하였다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/AgaB-Doc 명명하였다.
- [0107] 서열번호 25: GCGCGAGCTCCGGCGACAATTCAAAATTTGATA
- [0108] 서열번호 26:
- [0109] GCGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGTAAAAGCATTTTTTTAAG
- [0110] BL21/mCbpA 및 BL21/AgaB-Doc 재조합 균주를 IPTG로 발현 유도하여 단백질이 발현되도록 하는 조건을 조성하여 16℃에서 12시간동안 배양 후 원심분리하여 세포를 확보한다. 이 후 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻어 추후 실험에 이용하였다.
- [0111] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 세균 유래 익스펜신 단백질 및 베타-아가레이즈 단백질들의 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA과 결합으로 인한 복합체의 형성을 확인하기 위해 두 단백질을 저온에서 일정 비율로 섞어 배양한 후 복합체 형성을 유도하였다.

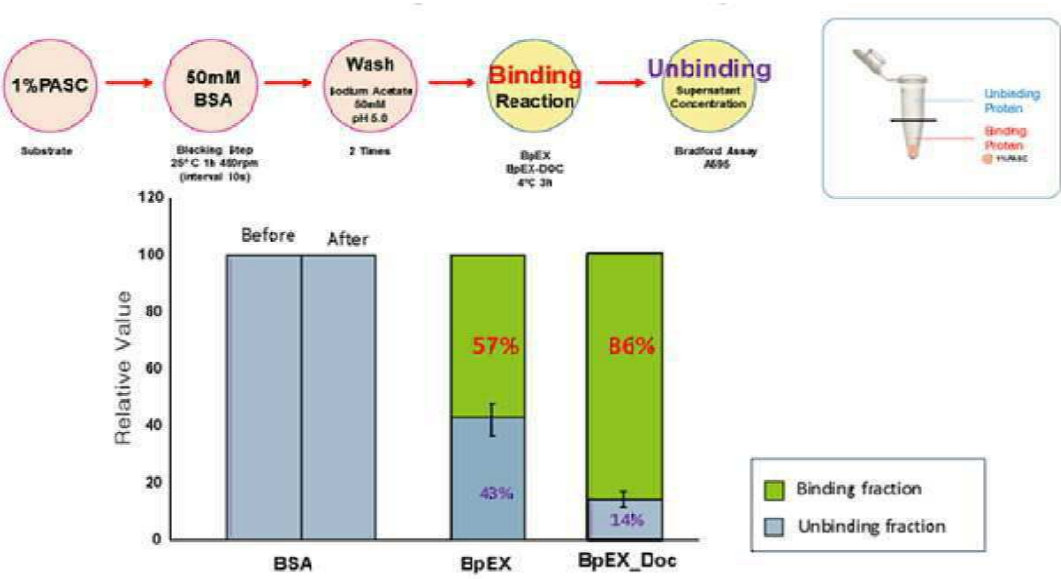
- [0112] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 세균 유래 익스팬신 단백질 및 베타-아가레이즈 단백질들의 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA과 결합을 통한 복합체 형성 확인은 증가된 베타-아가레이즈의 활성을 측정하여 증명하였다. 정제된 Agar를 기질로 하여 각각 아가레이즈, 아가레이즈-익스팬신, 아가레이즈-익스팬신-mCbpA를 구성 단백질로 하는 혼합 효소를 대상으로 분해 활성을 측정한 결과 아가레이즈, 아가레이즈-익스팬신, 아가레이즈-익스팬신-mCbpA 순서로 분해 활성이 증가됨을 확인할 수 있다 (도 5). 이 때 mCbpA는 분해 활성이 없는 비활성 단백질이므로, 증가된 활성은 효소 복합체 형성으로부터 오는 것임을 증명할 수 있다.
- [0113] 이로 인한 복합체의 활성을 보다 구체적으로 확인하기 위하여, 아가레이즈, 아가레이즈-mCbpA 융합단백질, 도커린-익스팬신 융합단백질 및 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 이용하여, 다양한 한천 (정제된 Agar, 우뭇가사리로부터 추출한 Agar, 우뭇가사리 자체)을 기질로 하는 활성 분석을 수행하였다.
- [0114] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 익스팬신-아가레이즈 효소 복합체를 처리한 경우, 정제된 Agar, 추출 Agar 및 우뭇가사리 자체의 경우 모두에서 단일 익스팬신이나 아가레이즈 보다 높은 분해효율을 나타내었다.
- [0115] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

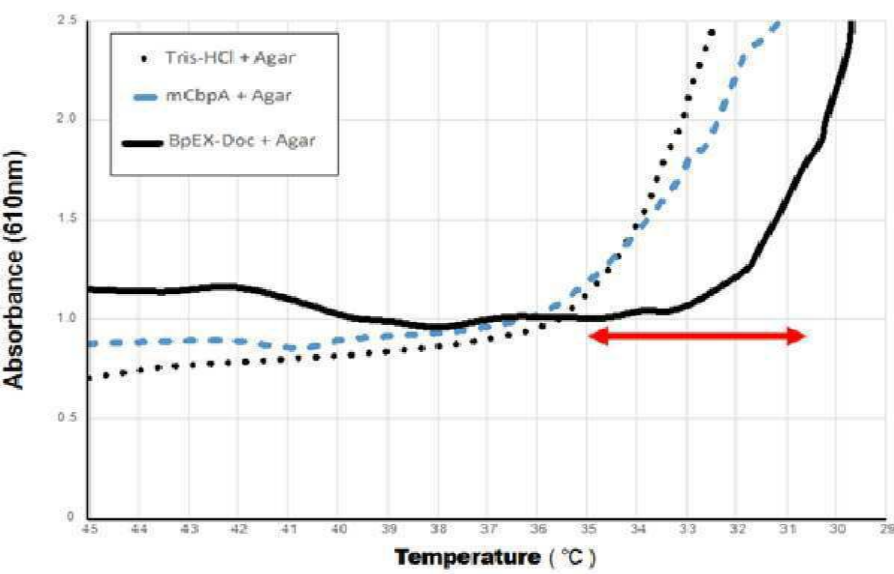
도면1



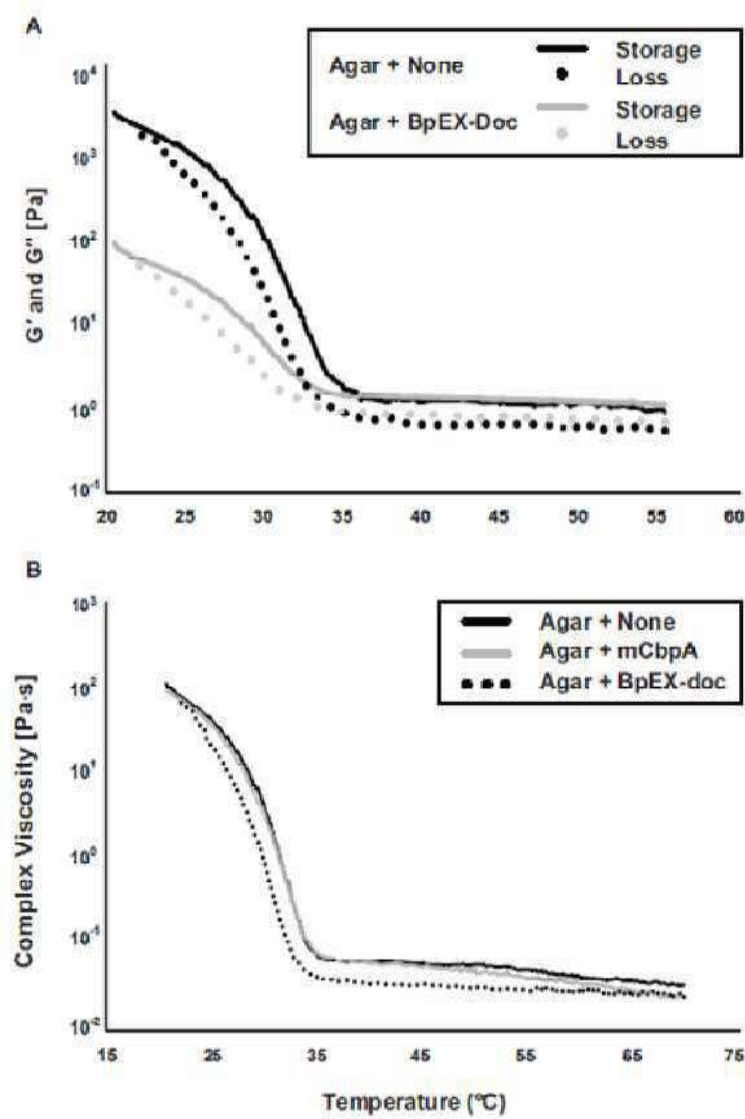
도면2



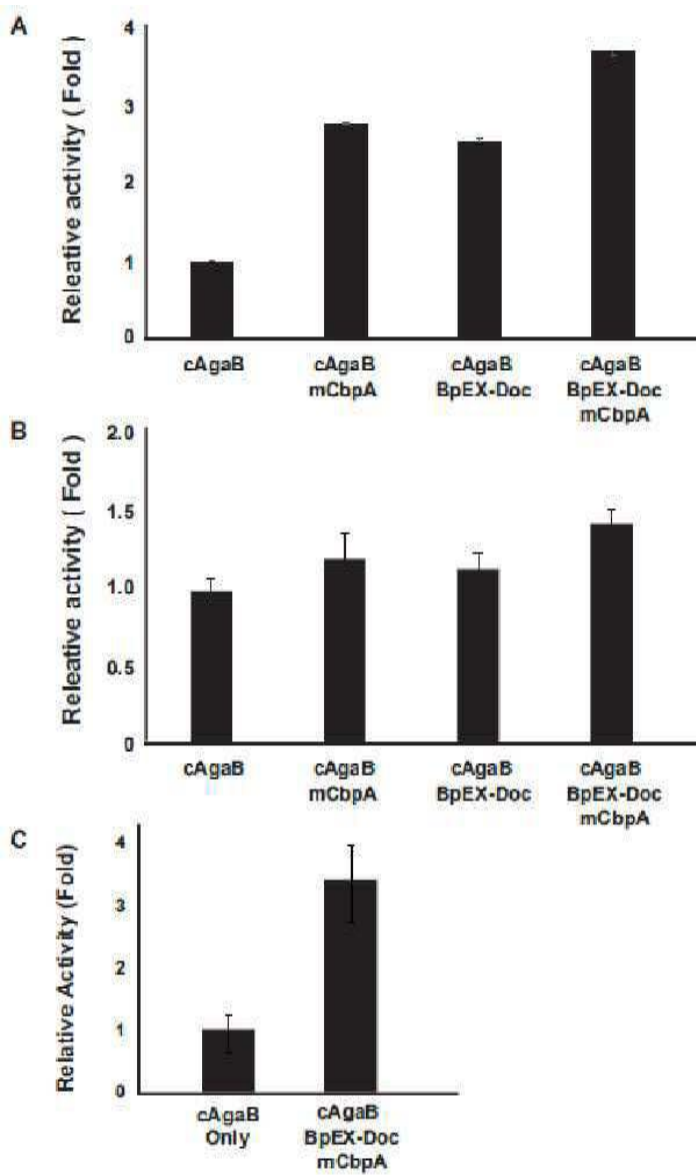
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research & Business Foundation
- <120> Enzyme Complex of Expansin-Agarase and Method for Degrading Agar Using The Same
- <130> P16-B282
- <160> 26
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Expansin from Bacillus sp.

<400> 1

Leu Ser Phe Ala Val Pro Asn Met Lys Ala Ala Ser Val Leu Asp Glu

1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Tyr Ala Thr Tyr Thr Gly Ser Gly Tyr Ser Gly Gly

20 25 30

Ala Ala Leu Leu Asp Pro Ile Pro Ser Asp Met Lys Ile Thr Ala Leu

35 40 45

Asn Pro His Asp Tyr Asn Tyr Lys Gly Ile Asn Ala Ala Leu Ala Gly

50 55 60

Ala Tyr Leu Glu Val Lys Gly Pro Lys Gly Lys Thr Val Val Tyr Val

65 70 75 80

Thr Asp Lys Tyr Pro Glu Gly Ala Lys Gly Ala Leu Asp Leu Ser His

85 90 95

Asn Ala Phe Ala Lys Ile Gly Asn Met Ala Asp Gly Lys Ile Pro Ile

100 105 110

Ser Trp Lys Ile Val Lys Ala Pro Ile Ser Gly Asn Val Val Tyr Arg

115 120 125

Ile Lys Glu Gly Ser Ser Lys Trp Trp Ala Ala Ile Gln Val Arg Asn

130 135 140

His Lys Tyr Pro Ile Met Lys Met Glu Tyr Tyr Lys Asp Gly Gln Trp

145 150 155 160

Val Asn Met Glu Lys Thr Asp Tyr Asn His Phe Leu Gly Phe Asn Met

165 170 175

Gly Ser Lys Ser Leu Pro Val Arg Ile Thr Asp Ile Arg Gly Val Ile

180 185 190

Val Lys Asp Lys Leu Pro Ala Leu Pro Ser Thr Ala Ala Ser Gln Ala

195 200 205

Tyr Thr Val Lys Gly Asn Val Gln Leu Pro Asn

210 215

<210> 2

<211> 664

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Expansin from Bacillus sp.

<400> 2

gatccattga gtttcgctgt gccaaacatg aaagcggcat ctgtccttga tgaagtacga	60
gaaagctatg caacttatac gggatcttgt tactcagggg gcgcgcgatt attagatcct	120
attccatctg acatgaaaat tacggcttta aatcccatg actataacta taaaggata	180
aatgcggcac ttgcaggggc ttaccttgaa gtaaagggtc caaaaggaaa aaccgttgtg	240
tatgtaaccg ataaatatcc agaaggagcg aaaggagctc ttgatctttc tcataatgcc	300
tttgccaaaa tcggcaatat ggcagatggg aaaatcccaa ttagttggaa aattgtaaaa	360
gcaccgatta gcggaaatgt agtttacaga ataaaagaag gtagcagtaa gtggtgggct	420

gcgattcaag tgcgcaatca taaatatccg attatgaaaa tggaatatta caaagatgga	480
caatgggtga acatggaaaa gacagactac aaccatttcc ttggatttaa tatgggtct	540
aaatctcttc ctgttcgaat cacagatata cgcggggtca tcgtaaagga taaattacc	600
gctcttccat ctactgtgc ttcacaggcc tatactgtaa aaggcaatgt tcagcttcct	660
aata	664

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atatggatcc attgagtttc gctgtgccaa	30
----------------------------------	----

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gcgcaagctt attaggaagc tgaacattgc c	31
------------------------------------	----

<210> 5

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gcgcaagctt ttgagtttcg ctgtgccaa 29
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 cagcgatcca ttaggaagct gaacattgc 29

 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gcttcctaatt ggatccgctg gctcc 25
 <210> 8
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 gcgcctcgag taaaagcatt tttttaagaa cagctaaat 39
 <210> 9
 <211> 195
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> endo-beta-glucanase-B
 <400> 9
 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> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal of endo-beta-glucanase-B gene

<400> 10

ggatccgctg 10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-terminal of BpEX

<400> 11

gcttcctaata 10

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gcgcaagctt ttgagtttcg ctgtgccaa 29

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcgcctcgag taaaagcatt tttttaagaa cagctaaat 39

<210>

14

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dockerin domain

<400> 14

gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctaa atcaattctt 60

ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120

aatgcttttg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

ggatccgcag cgacatcatc aa 22

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gcgccctcgag gctataggat ctccaatatt tat 33

<210> 17

<211> 1647

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCbpA gene

<400> 17

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaaaaaac 60

tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac 120

glaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac 180

catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac 240

ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt 300

gcaagcggag cagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360

aaatcagact ggicaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca 420
acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatataggtg gagctaaagt acttggtaca 480
gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa 540
aatgtaacta aacaagcaga tggtaaaaact 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
gtagttggtg atgcgcaatt acaagaaaaa cttgtgagc ttaaccagg aacagtaact 1200
atcaatccaa tcgataatag aatgcaaat tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga 1260
gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct 1320
gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat 1380
atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt 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> primer

<400> 18

gcgcgagctc cggcgacaat tcaaaatttg ata 33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

gcgcgagctc cggcgacaat tcaaaatttg ata 33

<210> 20

<211> 1005

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AgaB gene

<400> 20

ggcgacaatt caaaatttga tagtgcaacg gatttgccgg ttgaacaaga acaagaacag 60

gaaacggaac aagagggaga acccgaagaa agttcggagc aagaccttgt cgaggaggtc 120

gattggaagg atattccgt 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 gagtgggtcta tcctgtttat 420

attgaagcaa gggcaaaggt catgaactct accttggtt cggaatgttg gctcttaagt 480

gccgatgaca cccaagagat agatatctta gaggcataat gggccgatta ttccgaaagt 540

gccggaaagg atcattccta ttttctaaa aagggtacaca 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 cgggtctcaat 840

aaagaaatgg atattattat caatacagaa gaccaaactt ggcggtcttc accggcctcg 900

ggtttacagt ctaataccta tacgccaacg gacaatgaat tgagcaatat agaaaacaat 960

acgttcgggg tcgattggat caggatctat aaacctgtag agaaa 1005

<210> 21

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-agarase

<400> 21

Gly Asp Asn Ser Lys Phe Asp Ser Ala Thr Asp Leu Pro Val Glu Gln

1 5 10 15

Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gln Glu Gly Glu Pro Glu Glu Ser Ser

20 25 30

Glu Gln Asp Leu Val Glu Glu Val Asp Trp Lys Asp Ile Pro Val Pro

35 40 45

Ala Asp Ala Gly Pro Asn Met Lys Trp Glu Phe Gln Glu Ile Ser Asp

50 55 60

Asn Phe Glu Tyr Glu Ala Pro Ala Asp Asn Lys Gly Ser Glu Phe Leu

65 70 75 80

Glu Lys Trp Asp Asp Phe Tyr His Asn Ala Trp Ala Gly Pro Gly Leu

85 90 95

Thr Glu Trp Lys Arg Asp Arg Ser Tyr Val Ala Asp Gly Glu Leu Lys

100 105 110

Met Trp Ala Thr Arg Lys Pro Gly Ser Asp Lys Ile Asn Met Gly Cys

115 120 125

Ile Thr Ser Lys Thr Arg Val Val Tyr Pro Val Tyr Ile Glu Ala Arg

130 135 140

Ala Lys Val Met Asn Ser Thr Leu Ala Ser Asp Val Trp Leu Leu Ser

145 150 155 160

Ala Asp Asp Thr Gln Glu Ile Asp Ile Leu Glu Ala Tyr Gly Ala Asp

165 170 175

Tyr Ser Glu Ser Ala Gly Lys Asp His Ser Tyr Phe Ser Lys Lys Val

180 185 190

His Ile Ser His His Val Phe Ile Arg Asp Pro Phe Gln Asp Tyr Gln

195 200 205

Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Phe Glu Asp Gly Thr Val Trp Asn Lys

210 215 220

Glu Phe His Arg Phe Gly Val Tyr Trp Arg Asp Pro Trp His Leu Glu

225 230 235 240

Tyr Tyr Ile Asp Gly Val Leu Val Arg Thr Val Ser Gly Lys Asp Ile
245 250 255

Ile Asp Pro Lys His Phe Thr Asn Thr Thr Asp Pro Gly Asn Thr Glu
260 265 270

Ile Asp Thr Arg Thr Gly Leu Asn Lys Glu Met Asp Ile Ile Ile Asn
275 280 285

Thr Glu Asp Gln Thr Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ser Gly Leu Gln Ser
290 295 300

Asn Thr Tyr Thr Pro Thr Asp Asn Glu Leu Ser Asn Ile Glu Asn Asn
305 310 315 320

Thr Phe Gly Val Asp Trp Ile Arg Ile Tyr Lys Pro Val Glu Lys
325 330 335

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

tgttagagaaa ggatccgctg gctccg 26

<210> 23

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

gcgcggccgc tcaatgatga tgatgatgat gtaaaagcat tttttaag 49

<210> 24

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dockerin domain of endo-beta-1,4-glucanase-B gene

<400> 24

ggatccgctg gctccgctgc tggttctggg gaattcgatg ttaacaaaga tggaaaggta 60

aatgctatcg attatgcagt gcttaaatca attcttttag gtacaaatac taacgttgat 120

ttatcagtat cagacatgaa taaggatggg aaagtaaatg ctttggattt agctgttctt 180

aaaaaaatgc tttta 195

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

gcgcgagctc cggcgacaat tcaaaatttg ata 33

<210> 26

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

gcgcggccgc tcaatgatga tgatgatgat gtaaaagcat tttttaag 49

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

코히즌 모듈(Cohesin module)와

【변경후】

코히즌 모듈(Cohesin module)과

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

융합단백질 코히즌 모듈(Cohesin module)와

【변경후】

융합단백질과 코히즌 모듈(Cohesin module)이

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

(b) 코히즌 모듈(Cohesin module)와

【변경후】

(b) 코히즌 모듈(Cohesin module)과