



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0015041
(43) 공개일자 2023년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/18 (2006.01) C08J 11/10 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/20 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/18 (2013.01)
C08J 11/105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0096317

(22) 출원일자 2021년07월22일

심사청구일자 2021년07월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호
(잠실동, 리센츠)

황동혁

충청남도 홍성군 광천읍 홍남로620번길 98

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 14 항

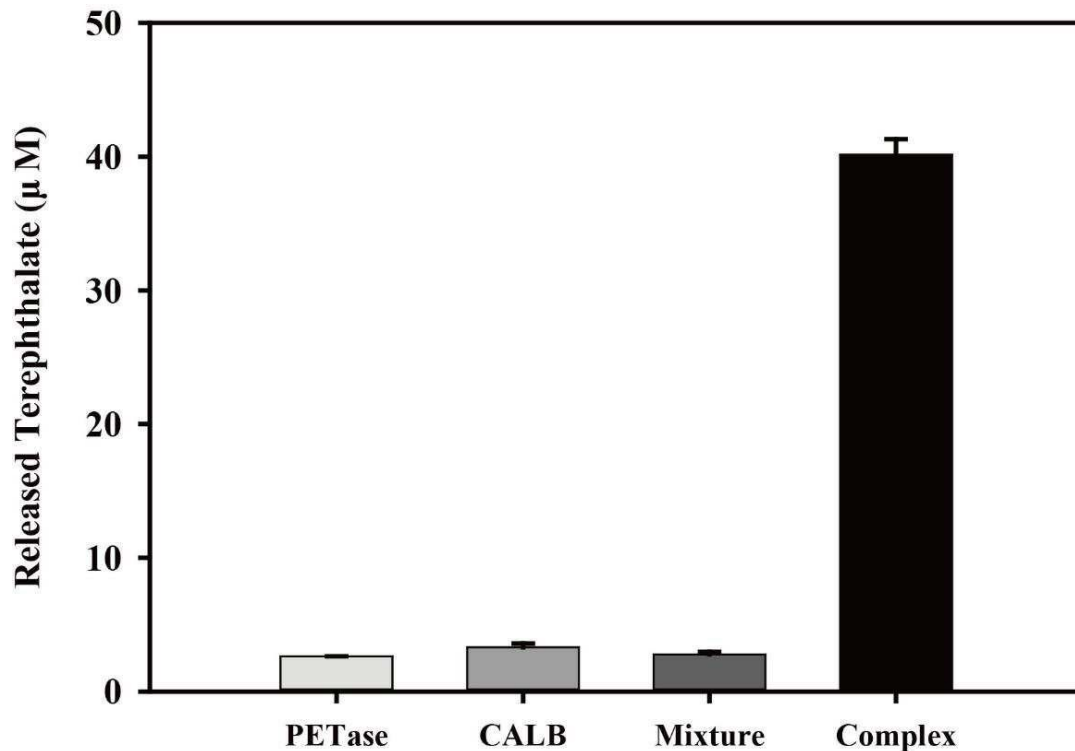
(54) 발명의 명칭 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethyleneterephthalat, PET) 분해용 효소 복합체; 상기 효소 복합체를 이용한 폐플라스틱 분해 방법; 및 상기 효소 복합체 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 효소 복합체는 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주 유래의 페테이스(PETase) 및 칸디다 안타티카(*Candida*

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



antarctica) 균주 유래의 리파아제(CALB)를 도커린-코히즌 결합에 의해 복합된 형태로 분해 대상 기질에 동시에 적용가능함으로써 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해에 시너지 효과를 나타낼 수 있으며, 셀룰로솜을 소형화한 소형 골격단백질을 골격 단백질로 제공함으로써 안정적인 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해 효소 복합체를 제공할 수 있다. 특히, 상기 소형 골격단백질은 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)로 A 타입의 CBM3 모듈을 포함함으로써 분해 대상 기질인 폴리에틸렌 테레프탈레이트에 대한 접근성을 높여 빠르고 효율적으로 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해활성을 가질 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 9/20 (2013.01)

C12N 9/244 (2013.01)

C12Y 301/01 (2013.01)

C12Y 301/01003 (2013.01)

C12Y 301/01006 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C08J 2367/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1; 및 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2;가

코히즌 모듈(Cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질에 대하여 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질 2는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)은 CBM3 모듈(carbohydrate-binding module family 3)인 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 CBM3 모듈은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 폐플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는, 폐플라스틱 분해 방법.

청구항 8

a) 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제1 형질전환체, 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제2 형질전환체, 및 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입

된 제3 형질전환체 준비하는 단계;

b) 상기 제1 내지 제3 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및

c) 배양 상등액을 분리하는 단계를 포함하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 융합 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 융합 단백질 2는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)은 CBM3 모듈(carbohydrate-binding module family 3)인 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 CBM3 모듈은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 코히진 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 제1 내지 제3 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethyleneterephthalat, PET) 분해용 효소 복합체; 상기 효소 복합체를 이용한 폐플라스틱 분해 방법; 및 상기 효소 복합체 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플라스틱이란 화학 성분 기반으로 제조된 유용한 폴리머로 자연적으로 분해되기 어렵다는 단점을 지니고 있다.

[0003] 플라스틱의 한 종류인 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)는 에틸렌글리콜과 테레프탈레이트로 구성된 중합체로 두 화학성분 사이에 에스터 결합이 존재하고 모노 하이드록시 에틸 테레프탈레이트, 비스 하이드록시 에틸 테레프탈레이트 등과 같은 형태를 기반으로 폴리머를 형성한다.

- [0004] 플라스틱의 처리 방법은 고온, 고압 조건에서 반응시키는 물리적인 방법이 가장 많이 쓰였으며, 이차적인 환경 오염 물질을 방출하여 또 다른 문제점을 지니고 있다. 이에, 물리적인 방법보다는 환경적인 생물학적 처리 방식에 대한 관심도가 높아지고 있는 실정이다.
- [0005] 한편, 생물학적 처리 방식은 곤충, 박테리아 등을 이용하여 플라스틱을 분해하는 방식으로 이와 관련된 효소들이 동정 되면서 생물학적 분해 연구들이 활발히 이어지고 있다.
- [0006] 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 분해 과정은 PET로부터 비스(2-하이드록시에틸) 테레프탈레이트(Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET)와 모노(2-하이드록시에틸) 테레프탈레이트(Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET)로 전환된 이후에 단량체인 테레프탈레이트(terephthalate, TPA)와 에틸렌 글리콜(Ethylene Glycol, EG)로 전환된다. PET를 분해하여 BHET와 MHET로 전환하는 효소는 큐티네이스(Cutinase), 페테이스(PETase) 및 리파아제(Lipase) 등이 연구되어 지고 있다.
- [0007] 한편, 자연에서 가장 풍부한 바이오매스로서 셀룰로오스를 분해하는 효소는 섬유상 곰팡이나 여러 세균에서 생산되는데, 그 중 혐기성 균주인 클로스트리디아 계열에서 코히즌(Cohesin)과 도커린(Dockerin)이라는 도메인을 이용한 효소 복합체를 생산하는 것으로 알려져 있다. 효소 복합체는 골격 단백질(scaffolding protein) 내 코히즌 도메인을 여러개 가지고 있어서 도커린 도메인을 가진 효소들과 결합하여 이루어지고, 골격 단백질(scaffolding protein)에 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module, 이하 간략하게 'CBM'이라 약칭함)을 가지고 있어서 복합체를 형성하는 효소들의 효율을 향상시키는 특징을 가지고 있다. 효소 복합체를 형성할 수 있는 도커린을 가진 효소를 키메릭 효소라고 부르는데, 특정 코히즌과 결합이 가능한 도커린 도메인을 재조합한 효소를 이용하여 여러 종류의 효소를 임의대로 붙일 수 있어서, 목적에 맞게 임의대로 효소를 선택하여 그 복합체를 형성할 수 있다.
- [0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 생물학적으로 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 효과적으로 분해할 수 있는 효소 복합체 기술을 개발하고자 하였다. 그 결과 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주 유래의 페테이스(PETase) 및 칸디다 안타티카(*Candida antarctica*) 균주 유래의 리파아제(*C. antarctica* lipase 1B, 이하 간략하게 'CALB'라 약칭함) 각각에 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(Endo- β -1,4-Glucanase-B)의 도커린 모듈을 융합하여 재조합 단백질을 제조하고, 이들 단백질의 도커린 모듈과 결합을 형성할 수 있는 코히즌 모듈을 포함하는 소형 골격단백질을 이용하여, 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 제조하였으며, 이러한 효소 복합체가 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 효과적으로 분해하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2020-0067665호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 효과적으로 분해할 수 있는 효소 복합체를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 이용하여 폐플라스틱을 분해하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1; 및 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2;가 코히즌 모듈(Cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질에 대

하여 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 제공한다.

- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 융합 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 융합 단백질 2는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)은 CBM3 모듈(carbohydrate-binding module family 3)일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CBM3 모듈은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 폐플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는, 폐플라스틱 분해 방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 a) 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제1 형질전환체, 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제2 형질전환체, 및 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제3 형질전환체 준비하는 단계; b) 상기 제1 내지 제3 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및 c) 배양 상등액을 분리하는 단계를 포함하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 융합 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 융합 단백질 2는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)은 CBM3 모듈(carbohydrate-binding module family 3)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CBM3 모듈은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제1 내지 제3 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)일 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 효소 복합체는 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주 유래의 페테이스(PETase) 및 칸디다 안타티카(*Candida antarctica*) 균주 유래의 리파아제(CALB)를 도커린-코히즌 결합에 의해 복합된 형태로 분해 대상 기질에 동시에 적용가능함으로써 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해에 시너지 효과를 나타낼 수 있으며, 셀룰로좀을 소형화한 소형 골격단백질을 골격 단백질로 제공함으로써 안정적인 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해 효소 복합체를 제공할 수 있다. 특히, 상기 소형 골격단백질은 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)로 A 타입의 CBM3 모듈을 포함함으로써 분해 대상 기질인 폴리에틸렌 테레프탈레이트에 대한 접근성을 높여 빠르고 효율적으로 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해활성을 가질 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 효소 복합체는 지속적으로 시장이 커지고 있는 폴리에틸렌 테레프탈레이트 재활용 시장에 새로운 기술로 사용될 수 있어 화학적인 처리 방법보다 경제적으로 저렴하고, 환경적으로도 안전한 효소제제의 발명인 것으로 기대된다. 그리고 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 재활용을 통해 다양한 산업에 전구체 및 화학 물질로 이용될 수 있는 테레프탈산과 에틸렌글리콜을 확보하여 부가적인 이익을 창출할 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1a는 본 발명에서 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주로부터 유래한 페테이스(PETase)와 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 균주로부터 유래한 도커린 모듈이 결합된 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pColdII PETase Doc의 모식도이다.

도 1b는 본 발명에서 칸디다 안타티카(*Candida antarctica*) 균주로부터 유래한 리파아제(CALB)와 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 균주로부터 유래한 도커린 도메인이 결합된 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pColdII CALB Doc의 모식도이다.

도 1c는 *Clostridium thermocellum* 유래의 CBM3 모듈과 *Clostridium cellulovorans* 유래의 두 개의 코헤신 모듈(Cohesin module)을 포함하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22b-mCbpA의 모식도이다.

도 2는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pColdII PETase Doc, pColdII CALB Doc, pET22b-mCbpA이 삽입된 대장균에서 발현된 각각의 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다.

도 3a는 PET 필름을 기질로 하여 본 발명에서 제시된 두 가지 효소인 페테이스(PETase)와 리파아제(CALB) 처리에 따른 반응 양상을 확인한 결과이다.

도 3b는 BHET를 기질로 하여 본 발명에서 제시된 두 가지 효소인 페테이스(PETase)와 리파아제(CALB) 처리에 따른 반응 양상을 확인한 결과이다.

도 4a는 복합체 구성성분인 탄수화물 결합 모듈 유형별(CBM3, CBM6, CBM66) PET 필름과의 부착능을 비교한 결과이다.

도 4b는 CBM3 모듈을 실제로 적용했을 때 소형 골격단백질(mCbpA)의 부착능 향상을 확인한 결과이다.

도 5a는 PET 필름에 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex)를 각각 처리한 후 30℃에서 7일 동안 효소 반응에 따른 PET 필름의 무게 감소율(%)을 나타낸 것이다.

도 5b는 PET 필름에 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex)를 각각 처리한 후 30℃에서 7일 동안 효소 반응에 따른 테레프탈산(TPA)으로의 전환량을 나타낸 것이다.

도 6은 PET 필름에 단일효소(PETase, CALB) 및 본 발명의 효소 복합체(complex)를 각각 처리한 후 30℃에서 1일 내지 5일 동안 효소 반응에 따른 테레프탈산(TPA)으로의 전환량을 나타낸 것이다.

도 7은 실제 폐플라스틱(스프라이트병)에 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex)를 각각 처리한 후 30℃에서 3일 동안 효소 반응에 따른 테레프탈산(TPA)으로의 전환량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1; 및 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2;가 코히즌 모듈(Cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질에 대하여 도커린-코히즌 결합에 의해 연결된, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체에 대한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 "페테이스(PETase)"는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 플라스틱을 단량체 모노-2-하이드록시에틸 테레프탈레이트(MHET)로 가수분해하는 것을 촉매하는 에스테라아제 효소이다.
- [0032] 본 발명에서 "도커린(dockerin)"은 혐기성 박테리아의 셀룰로솜 세포 구조에서 발견되는 단백질 도메인으로서, 엔도글루카나아제 효소에서 많이 발견된다. 도커린(dockerin)의 결합 파트너는 스캐폴딩(scaffoldin) 단백질에 위치한 코히즌(cohesin) 도메인으로, 셀룰로솜의 효소 성분의 도커린 도메인과 스캐폴딩 단백질의 코헤신 도메인 사이의 이러한 상호작용은 셀룰로솜 복합체의 구성에 필수적이다. 본 발명에서, 도커린(dockerin)은 도커린 모듈(dockerin module) 또는 도커린 도메인(dockerin domain)과 동일한 의미이다.
- [0033] 본 발명에서 "융합 단백질 1"은 페테이스(PETase) 단백질에 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 형태의 융합 단백질로서, 페테이스 재조합 단백질을 의미한다.
- [0034] 본 발명에서 "융합 단백질 2"는 리파아제 단백질에 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 형태의 융합 단백질로서, 리파아제 재조합 단백질을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 "코히즌(cohesin)"은 도커린과 상호 작용하여 소형 골격단백질과 결합할 수 있도록 하는 기능을 수행하는 도메인이다. 본 발명에서, 코히즌(cohesin)은 코히즌 모듈(cohesin module) 또는 코히즌 도메인(cohesin domain)과 동일한 의미이다.

- [0036] 본 발명에서 "탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module, CBM)"은 탄수화물 활성 효소(예: 글리코시드 가수분해효소)에서 발견되는 단백질 도메인으로, 이들 도메인의 대부분은 탄수화물 결합 활성을 갖는다. 이러한 도메인 중 일부는 셀룰로오스 스캐폴딩 단백질에서 발견된다. CBM은 이전에 셀룰로오스 결합 도메인으로 알려져 있었다. CBM은 아미노산 서열 유사성에 따라 수많은 패밀리로 분류되며, 2011년 6월 기준 CAZy 데이터베이스에는 64개의 CBM 계열이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0037] 한편, 셀룰로솜의 형성은 하나의 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 여러 개의 코히신 도메인 중 하나의 결합으로 이루어진다. 그러나, 자연계의 셀룰로솜은 그 크기가 매우 커서 제작과 이용에 어려움이 있다. 이에, 본 발명에서는 자연계의 셀룰로솜을 소형화하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체의 골격단백질로 제공하고자 하였으며, 이를 소형 골격단백질이라 명명하였다.
- [0038] 본 발명에서 "소형 골격단백질 (miniCbpA: mCbpA)"은 본 발명의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체의 골격을 이루는 단백질을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 소형 골격단백질은 코히즌 모듈(Cohesin module)과 함께 탄수화물 결합 모듈(CBM)을 포함함으로써, 효소 복합체의 분해 대상이 되는 기질, 즉 폴리에틸렌 테레프탈레이트에 대한 접근성을 향상시키는 기능을 수행할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 효소 복합체는 3가지 단백질이 연결된 형태의 복합체로서, 자세하게는 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1; 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2; 및 코히즌 모듈(Cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질로 이루어져 있으며, 상기 융합 단백질 1 및 2의 도커린 도메인이 소형 골격단백질의 코히즌 도메인과 결합되어 복합체를 형성할 수 있다.
- [0041] 상기 페테이스(PETase)는 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주로부터 유래한 페테이스(PETase)일 수 있으며, 이는 서열번호 8 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0042] 상기 리파아제는 칸디다 안타티카(*Candida antarctica*) 균주 유래의 리파아제(CALB)일 수 있으며, 이는 서열번호 10 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0043] 상기 도커린 모듈(dockerin module)은 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 균주로부터 유래한 도커린 도메인일 수 있으며, 이는 서열번호 12 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0044] 상기 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)은 *Clostridium cellulovorans* 균주로부터 유래한 CBM3 모듈(carbohydrate-binding module family 3)일 수 있으며, 이는 서열번호 7 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 융합 단백질 1은 서열번호 1 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 융합 단백질 2는 서열번호 3 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 소형 골격단백질은 서열번호 5 또는 이와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동등한 기능을 나타내는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 서열번호로 표시된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의

서열 상동성을 갖는 것으로, 해당 서열번호로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0049] 상기 융합 단백질 1, 2 및 소형 골격단백질이 복합된 형태의 본 발명의 효소 복합체는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)의 분해 활성을 가짐에 따라, PET가 포함되는 다양한 형태의 포장재, 필름, 플라스틱병, 생활 용품, 장난감 등의 폐기물의 분해에 유용하게 사용될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체를 폐플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는, 폐플라스틱 분해 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명의 일 구체예에서, 폐플라스틱 분해 방법은 분해 대상이 되는 폴리에틸렌 테레프탈레이트 기반의 폐플라스틱을 일정 크기로 분절한 다음 본 발명의 효소 복합체를 처리한 후 20℃ 내지 37℃의 온도 조건에서 1시간 내지 10일 동안 효소 반응을 통해 분해시킬 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 a) 페테이스(PETase) 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 1을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제1 형질전환체, 리파아제 및 도커린 모듈(dockerin module)이 결합된 융합 단백질 2를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제2 형질전환체, 및 코히즌 모듈(cohesin module) 및 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module)을 포함하는 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 제3 형질전환체 준비하는 단계; b) 상기 제1 내지 제3 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및 c) 배양 상등액을 분리하는 단계를 포함하는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 분해용 효소 복합체 제조방법을 제공한다.

[0053] 본 발명의 효소 복합체 제조방법에서 상기 a) 단계는 제1 내지 제3 형질전환체를 준비하는 단계로서, 자세하게는 융합 단백질 1, 2 및 소형 골격단백질을 코딩(암호화)하는 각각의 유전자를 플라스미드에 클로닝한 재조합 발현 벡터를 제조하고(도 1a 내지 1c 참조), 이를 대장균에 주입하여 각각의 형질전환체를 제조하는 단계이다.

[0054] 본 발명의 융합 단백질 1, 2 및 소형 골격단백질 각각을 코딩(암호화)하는 폴리 뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리 뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0055] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 융합 단백질 1을 코딩(암호화)하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있으며; 상기 융합 단백질 2를 코딩(암호화)하는 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열일 수 있고; 상기 소형 골격단백질을 코딩(암호화)하는 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 유전자가 클로닝될 수 있는 "벡터(vector)"로는 융합 단백질 1 및 2의 경우 pColdII 플라스미드를 이용하고 있으며, 소형 골격단백질의 경우 pET22b 플라스미드를 이용하고 있으나, 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제제물이라면 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서 이용하고 있는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다.

[0057] 또한, 본 발명에서 "재조합 발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0058] 상기 벡터는 클로닝되는 유전자와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함할 수 있으며, 본 발명에서 "프로모터"는 형질주입하고자 하는 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로서 상기 프로모터에는 전사에 필요한 기본인자(Basal element)뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서(enhancer)가 더 포

함될 수 있다.

- [0059] 또한, 본 발명에서 "형질전환" 또는 "형질주입"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0060] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 재조합 발현 벡터가 도입되는 숙주세포는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 효소 복합체 제조방법에서 상기 b) 단계는 상기 a) 단계를 통해 준비한 제1 내지 제3 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계로서, 자세하게는 재조합 균주(제1 내지 제3 형질전환체)를 배양 배지에 접종하여 16 내지 24시간 동안 15~37℃에서 배양하면서 단백질 발현을 유도할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 효소 복합체 제조방법에서 상기 c) 단계는 배양 상등액을 분리하는 단계로서, 자세하게는 상기 b) 단계를 통해 배양이 완료된 배양물을 원심 분리하여 세포를 수거한 후, 세포를 파쇄하고 원심 분리하여 상등액을 분리할 수 있다. 이렇게 분리된 상등액에서 단백질의 C-terminal에 연결된 His-tag을 이용하여 본 발명의 효소 복합체 정제할 수 있다.
- [0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0066] <실시예 1>
- [0067] 페테이스, 리파아제 및 도커린 유전자의 확보
- [0068] 이디오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주의 gDNA로부터 페테이스(PETase) 유전자의 염기서열(서열번호 9)을 참고하여 서열번호 14 및 15의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 제작하고, 이를 이용하여 페테이스 유전자를 증폭하였다.
- [0069] 칸디다 안타티카(*Candida antarctica*) 균주의 gDNA로부터 리파아제(*C. antarctica* lipase 1B, 이하 간략하게 'CALB'라 약칭함) 유전자 염기서열(서열번호 11)을 참고하여 서열번호 16 및 17의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 제작하고, 이를 이용하여 리파아제 유전자를 증폭하였다.
- [0070] 또한, 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*)의 게놈(genome)으로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(Endo- β -1,4-Glucanase-B) 유전자의 염기서열(서열번호 13)을 참고하여 서열번호 18(또는 19); 및 서열번호 20의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 이용하여 도커린 유전자를 증폭하였다.
- [0072] <실시예 2>
- [0073] 도커린 모듈의 유전자와 페테이스 및 리파아제 유전자의 연결
- [0074] 상기 <실시예 1>에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 모듈의 유전자와 페테이스(PETase) 및 리파아제(CALB) 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneA11)를 사용하여 회수하였다.
- [0075] 페테이스(PETase) 및 리파아제(CALB) 각각의 유전자와 도커린 유전자가 연결된 DNA 절편을 제작하기 위하여 overlap PCR을 수행하였다. 구체적으로, 회수한 두 DNA(페테이스(또는 리파아제) + 도커린) 절편으로부터 서열번호 21 내지 24의 재조합 페테이스용 프라이머 세트 및 서열번호 25 내지 28의 재조합 리파아제용 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 상기 프라이머 세트는 정방향 프라이머의 5'에는 페테이스(또는 리파아제) 유전자 및 pColdII 벡터의 제한효소 KpnI 인식서열이 포함되도록, 3'에는 도커린 모듈의 연결자 부분을 기준으로 15bp만큼 중첩되도록 제작하였으며; 역방향 프라이머의 5'에는 페테이스(또는 리파아제) 뒤 서열이 15bp만큼 중첩되도록, 3'에는 pColdII 벡터에 포함된 제한효소 PstI 인식서열과 도커린 앞부분 서열이 포함되도록 디자인하였다. 오버랩 PCR 반응은 94℃ 2 분 반응 후 94℃에서 30초, 56℃에서 1분 30초, 72℃에서 5분 씩 10 Cycle 반응을 수행한 후, 마지막으로 72℃에서 5분 반응 시켰다.
- [0076] PCR 반응을 수행한 결과, 1050 bp의 '도커린 모듈의 유전자가 연결된 재조합 페테이스(PETase)' 및 1218 bp의

‘도커린 모듈의 유전자가 연결된 재조합 리파아제(CALB)’의 유전자를 증폭할 수 있었다(서열번호 2 및 4 참조). 본 발명에서는 상기 재조합 유전자를 각각 ‘PETase Doc’ 및 ‘CALB Doc’이라 명명하였다.

[0078] <실시예 3>

[0079] 페테이스 및 리파아제 각각의 유전자와 도커린 유전자가 연결된 재조합 페테이스와 재조합 리파아제 발현 벡터 및 형질전환체 제조

[0080] 상기 <실시예 2>에서 수득한 ‘PETase Doc’ 및 ‘CALB Doc’ 유전자 증폭 산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 확인하였고, PCR purification kit (Geneall)을 이용하여 회수하였다.

[0081] 이어서, 회수한 DNA 절편과 pColdII 벡터를 KpnI 및 PstI 제한효소로 절단하고, T4 ligase kit (Enzymomics)를 이용하여 25℃에서 2시간 동안 접합(ligation)하여 재조합 플라스미드를 제조하였으며, 동시에 대장균 (*Escherichia coli*) DH5 α에 형질전환하였다. 이후에 콜로니 PCR을 통해 재조합된 벡터의 도입 유무를 확인하였다. 확인된 콜로니를 암피실린 및 클로로암페니콜을 포함한 LB배지에 키우고 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 재조합 플라스미드를 염기서열을 확인하였고, 상기 재조합 플라스미드 벡터를 각각 ‘pColdII PETase Doc’ 및 ‘pColdII CALB Doc’이라 명명하였다(도 1a 및 1b 참조).

[0082] 이후, 상기 재조합 플라스미드 벡터를 *E. coli* BL21에 주입하여 형질전환체를 제조하고, 이 균주를 각각 ‘BL21(DE3)/PETase Doc’, ‘BL21(DE3)/CALB Doc’라 명명하였다.

[0084] <실시예 4>

[0085] CBM3 모듈과 코헤신 유전자를 포함하는 소형 골격단백질 발현 벡터 및 형질전환체 제조

[0087] <4-1> 코헤신 유전자를 포함하는 소형 골격단백질 유전자의 확보

[0088] 클로스트리디움(*Clostridium*) 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 CBM3 모듈과 두 개의 코헤신 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈 결합 단백질-에이(Mini-Cellulose binding protein A, 이하 간략하게 ‘mCbpA’라 약칭함) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(서열번호 29)의 5'에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머(서열번호 30)에는 제한효소 XhoI 인식서열(ctcgag)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다.

[0089] 그 결과, 1713bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 소형 골격단백질 유전자(mCbpA)(서열번호 6)가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다(결과 미도시).

[0091] <4-2> 코헤신 유전자를 포함하는 소형 골격단백질 발현 벡터 및 형질전환체 제작

[0092] 상기 실시예 <4-1>에서 수득한 mCbpA 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 확인하였고, PCR purification kit (Geneall)을 이용하여 회수하였다.

[0093] 이어서, 회수한 mCbpA 유전자를 pET22b(+) 벡터에 삽입하여 대장균 DH5 α에 형질전환 후 서열을 확인하였다

[0094] 서열 확인이 완료된 상기 플라스미드 벡터(pET22b-mCbpA)를 단백질 발현용 대장균인 Rosetta BL21 균주에 주입하여 형질전환체를 제조하고, 이 균주를 ‘R. BL21/mCbpA’라 명명하였다.

[0096] <실시예 5>

[0097] 대장균 형질전환체의 재조합 페테이스 및 재조합 리파아제 단백질 발현

[0098] 상기 <실시예 3>에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 및 <실시예 4>에서 확보한 소형 골격단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag or Flag-tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

- [0099] BL21(DE3)/PETase Doc, BL21(DE3)/CALB Doc, R. BL21(DE3)/mCbpA 재조합 균주의 단백질 발현을 유도하는 조건을 조성하여 암피실린이 포함된 LB 배지에 접종하여 16시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후에 500ml 삼각 진탕 플라스크에 200ml 배지를 만들어 멸균을 진행한 후 암피실린 및 재조합 균주를 접종하여 배양하여 광학 밀도 값을 0.8에 맞춘 후 IPTG를 넣어 24시간 동안 15℃에서 단백질 발현을 유도하였다. 단백질 발현을 유도한 세포들을 원심 분리하여 확보하였고, 이 세포들을 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심 분리하여 상등액을 얻어 단백질의 C-terminal에 연결된 His-tag을 이용하여 정제 및 농축하였다. 이후 10% SDS-PAGE 전기영동을 수행하였고, 코마시블루를 통해 염색하여 예상한 단백질 크기와 동일한 위치에서 나타남을 확인하였다(도 2 참조).
- [0101] <실시예 6>
- [0102] 페테이스 및 리파아제의 분해 양상 확인
- [0103] 페테이스 및 리파아제의 분해 양상을 확인하기 위해 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 비스-하이드록시 에틸 테레프탈레이트를 기질로 하는 분해 활성 분석을 수행하였다.
- [0104] 효소 활성 분석 방법은 50mM Glycine-NaOH buffer (pH 9.0) 반응용액에 5mm X 5mm 크기로 자른 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 최종 농도 700 μ M의 비스-하이드록시 에틸테레프탈레이트를 기질로 하여 30℃에서 1~7일 동안 반응을 시킨 후 HPLC 분석을 통해 테레프탈산의 양을 분석하였다.
- [0105] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, PET 필름으로부터 비스-하이드록시 에틸 테레프탈레이트로(BHET)의 전환 반응은 페테이스(PETase)가 리파아제(CALB)에 비해 좋은 것으로 나타났고(도 3a 참조), 이해 반해 비스-하이드록시 에틸 테레프탈레이트(BHET)를 기질로 하여 테레프탈산(TPA)으로 전환하는 반응은 리파아제(CALB)가 페테이스(PETase)에 비해 반응이 좋은 것을 확인할 수 있었다(도 3b 참조).
- [0107] <실시예 7>
- [0108] 탄소 결합 모듈을 이용한 폴리에틸렌 테레프탈레이트와의 부착능 확인
- [0109] 폴리에틸렌 테레프탈레이트 표면의 특성은 소수성을 갖고 있어 효소들의 접근에 방해가 된다. 이를 해결하기 위하여 세 가지 유형의 탄소부착단백질(CBM)을 비교하여 가장 부착능이 좋은 단백질을 복합체에 접목하여 사용하고자 하였다. 탄소부착단백질(CBM)은 부착되는 기질의 특성에 따라 A 타입, B 타입, C 타입으로 구분된다. 본 실험에서는 유형별로 A 타입으로 CBM3, B 타입으로 CBM6, C 타입으로 CBM66을 각각 사용하였으며, 이 유전자들은 실험실에서 보유하고 있는 *Clostridium thermocellum*을 통해 CBM3과 CBM6을 *Bacillus subtilis*를 통해 CBM66을 확보 하였다. 이를 각 각 pColdII vector 내부의 제한효소 사이트인 KpnI과 BamHI을 이용하여 클로닝을 진행하였고, 완성된 플라스미드를 단백질 발현 균주인 Rosetta BL21 (DE3)에 형질전환 하였다. 이를 항생제인 암피실린을 첨가한 LB배지에 균주를 접종하여 37° C에서 OD 1까지 키운 후 IPTG를 넣어 15° C에서 인덕션을 진행하였다. 24시간이 지난 후 균주들을 원심분리를 통해 모아서 초음파 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 단백질 정제를 진행 하였다. 이를 SDS-PAGE를 통해서 확인 하였다. (결과는 미표기함) 발현을 확인한 후 각 유형의 단백질을 50mM Glycine-NaOH로 구성된 버퍼에 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 함께 넣어 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후에 2번의 세척 과정을 거친 후 필름에 붙어 있는 단백질을 용출 용액을 통해 용출시켜 잔존하는 단백질의 양을 브래드포드 분석을 통해 분석하였다.
- [0110] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, CBM3가 폴리에틸렌 테레프탈레이트와의 부착능이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었으며(도 4a 참조), CBM3이 연결된 소형골격단백질(mCbpA)도 PET 필름에 부착능이 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 4b 참조).
- [0111] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 효소 복합체가 CBM3 모듈을 포함함에 따라 PET 필름과의 반응에 도움을 줄 것으로 예상하였다.
- [0113] <실시예 8>
- [0114] 재조합 페테이스와 재조합 리파아제의 단백질을 부착시킨 복합체 형성
- [0115] 상기 <실시예 5>에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 복합체 형성을 확인하기 위하여 셀룰로스 결합 모듈과

셀룰로스 사이의 상호작용을 이용하여 효소복합체의 형성을 관찰하였다(결과 미도시).

[0116] 자세히는, 상기 <실시예 5>에서 확보단 3종의 효소 복합체 형성을 관찰하기 위해 미니셀룰로좀이 포함하고 있는 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로즈 (Sigmacell Type 50, SIGMA)를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1 M 소듐 클로라이드(sodium chloride), 20 mM 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 행구어낸 후 50 mM 트리스 버퍼(pH 12.5)로 용리하였다.

[0118] <실시예 9>

[0119] 본 발명 효소 복합체의 PET 필름 분해 효과

[0120] PET 필름에 대한 단일효소(PETase, CALB) 및 이들의 단순 혼합물(mixture) 대비 본 발명의 효소 복합체(complex)의 분해 향상 정도를 확인하기 위하여, 두 가지의 실험을 진행하였다.

[0121] 사용된 버퍼는 50mM 글라이신-수산화나트륨 (pH9.0)으로 여기에 각각의 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex)와 PET 필름 조각 (5mm X 5mm)을 넣고 1~7일간 30℃에서 효소 반응을 진행하였다. 각 효소의 최종농도는 50nmol로 일괄적으로 적용하였고, 혼합물의 경우 페테이즈와 리파아제를 1:1비율로 섞어서 진행 하였다. 각 실험은 PET 필름의 분해를 단일효소 대비 본 발명의 효소 복합체에서 결과와, 장기간 반응 시 효소의 안정성을 확인하기 위해 진행하였다. 반응 이후의 샘플들은 HPLC로 분석하였는데 이동상 버퍼A는 0.1% 포름산을 포함한 FDW로 구성되었고, 이동상 버퍼B는 20% 아세토니트릴이 포함된 FDW로 제조하였다. 분석 조건은 이동상 버퍼B를 8 분 동안 60 %에서 90 %로 점진적으로 비율이 변화하고, 16분 동안 100% 까지 흘렸다. 그리고 최종적으로 25분까지 버퍼를 흘려줬다. 분석 파장은 260nm이었다.

[0122] 그 결과 도 5에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 효소 복합체(complex)를 처리한 경우 단일효소(PETase, CALB) 처리군 대비 PET 필름의 분해 효과가 두드러지게 우수한 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 단일효소인 PETase 및 CALB를 혼합한 단순 혼합물(mixture)과 비교해서도 두드러지게 우수한 PET 필름의 분해 활성을 보여주었다. 즉, PET 필름 중량 감소를 비교했을 때, 단일 효소(PETase, CALB) 및 단순 혼합물(mixture) 대비 본 발명의 효소 복합체(complex)에서의 무게 감소율이 두드러지게 우수하였으며(도 5a 참조), PET 필름 중량 감소 양상과 비슷하게 테레프탈산 전환량을 봤을 때, 효소 복합체(complex)가 가장 높은 것을 확인하였다(도 5b 참조)

[0123] 또한, 도 6에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 효소 복합체(complex)의 경우 단일효소(PETase, CALB) 대비 PET 필름에 처리 후 장기간 반응 시 안정성이 우수함을 확인하였다.

표 1

[0125] 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex) 처리에 따른 PET 필름 무게 감소량

	CALB	PETase	Mixture	Complex
평균(%)	3.46	5.14	6.49	12.47
표준편차	1.68	0.37	2.60	1.47

표 2

[0127] 단일효소(PETase, CALB), 이들의 단순 혼합물(mixture) 및 본 발명의 효소 복합체(complex) 처리에 따른 테레프탈산(Terephthalic acid, TPA) 상대적 전환량

	CALB	PETase	Mixture	Complex
평균(%)	6.18	11.22	20.72	83.38
표준편차	0.00	0.12	0.74	2.13

표 3

단일효소(PETase, CALB) 및 본 발명의 효소 복합체(complex) 처리에 따른 시간 경과별 테레프탈산 농도

	1일	2일	3일	4일
CALB	0.00 ± 0.00	3.70 ± 1.39	2.86 ± 0.16	2.87 ± 0.03
PETase	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.64 ± 0.48	2.71 ± 0.13
Complex	4.33 ± 0.93	6.43 ± 1.86	7.42 ± 2.59	8.47 ± 0.59

<실시예 10>**본 발명 효소 복합체의 실제 폐플라스틱 분해 효과**

실제 폐플라스틱 분해를 확인하기 위하여 페 스프라이트 병을 확보하였다. 그리고 이를 세척한 후 건조하였고, 효소 반응을 위해 5mm x 5mm 크기로 절단하였다. 그리고 상기 <실시예 9>의 효소 반응 조건과 같게 효소 반응을 진행하였다. 최종 산물은 HPLC로 분석하였는데 이동상 버퍼A는 0.1% 포름산을 포함한 FDW로 구성되었고, 이동상 버퍼B는 20% 아세토니트릴이 포함된 FDW로 제조하였다. 분석 조건은 이동상 버퍼B를 8분 동안 60%에서 90%로 점진적으로 비율이 변화하고, 16분 동안 100% 까지 흘렸다. 그리고 최종적으로 25분까지 버퍼를 흘려줬다. 분석 파장은 260nm이었다.

그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 실제 폐플라스틱을 기질로 하여 본 발명의 효소 복합체(complex)를 처리한 경우, 단일효소(PETase, CALB) 및 이들의 단순 혼합물(mixture)을 처리한 실험군 대비 테레프탈산 전환량이 현저하게 우수한 것을 확인할 수 있었다.

표 4

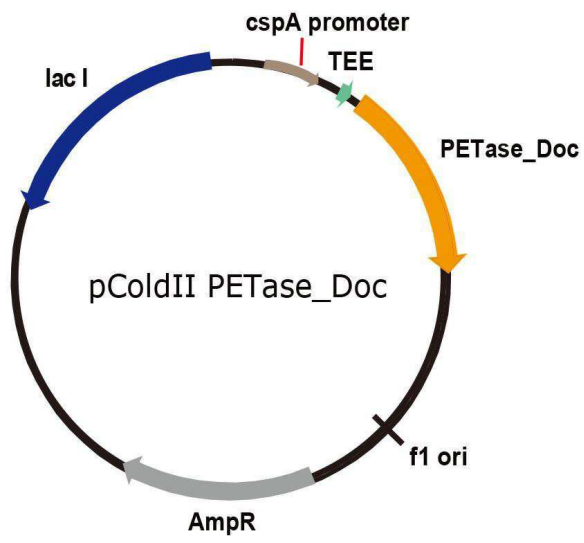
실제 폐플라스틱을 기질로 한 테레프탈산 전환량(μM)

	CALB	PETase	Mixture	Complex
평균(%)	3.30	2.63	2.77	40.15

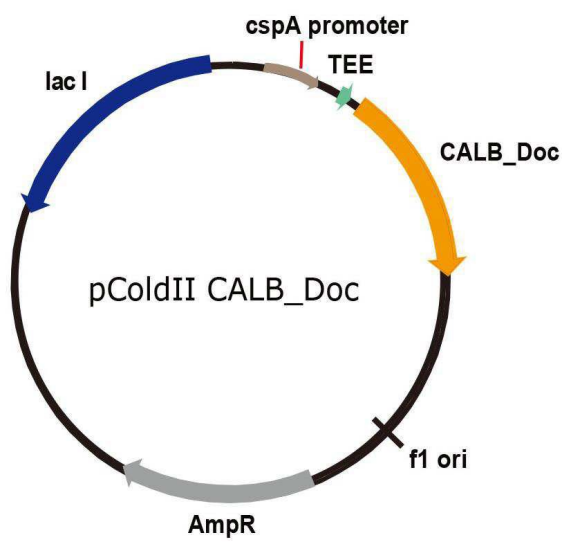
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

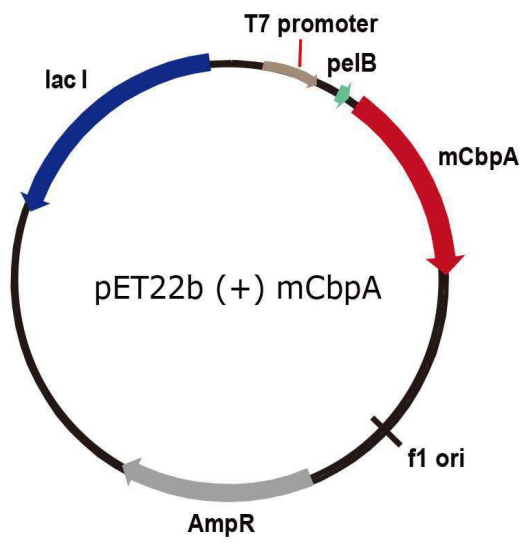
도면1a



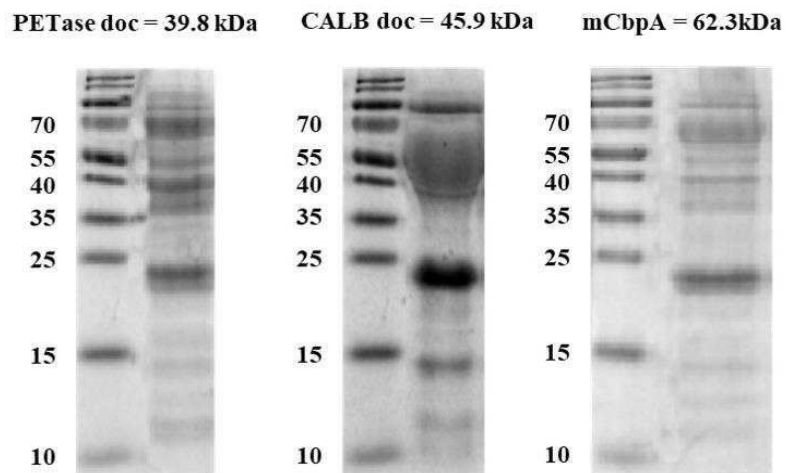
도면1b



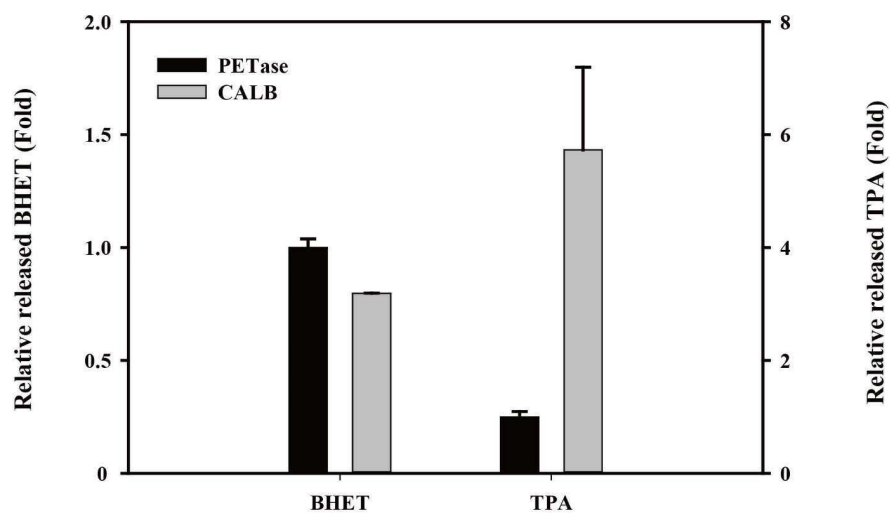
도면1c



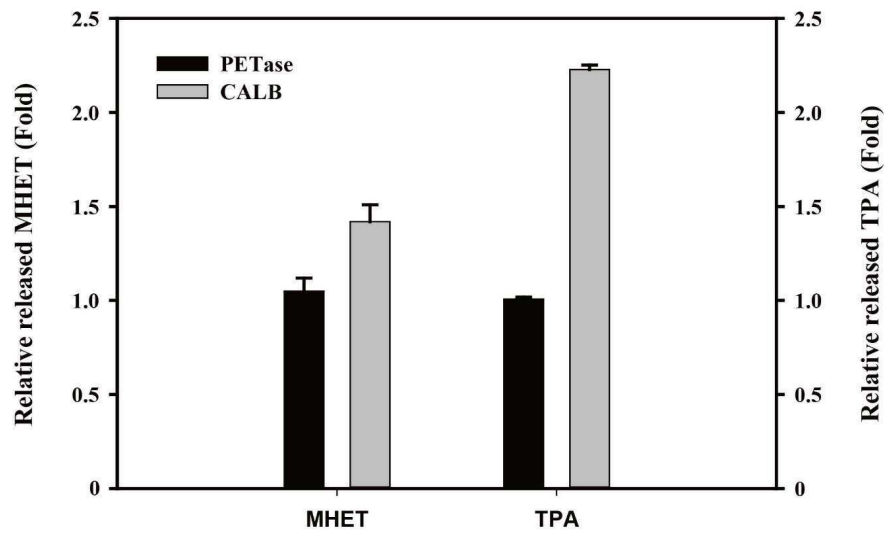
도면2



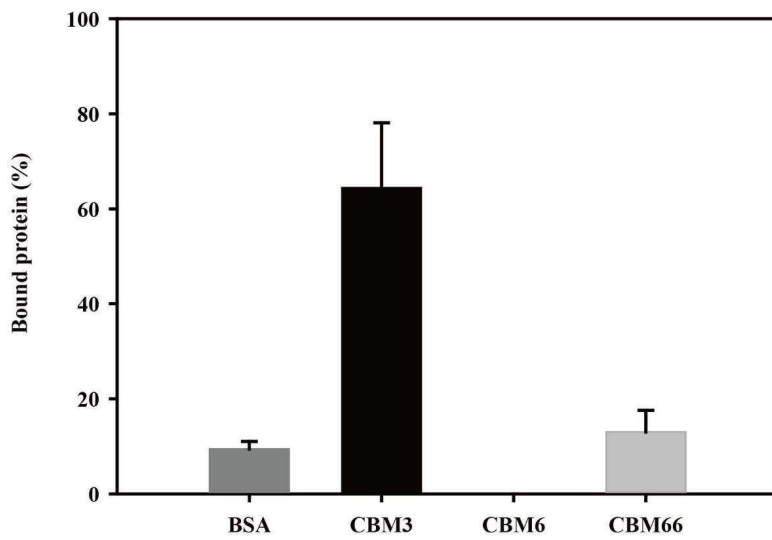
도면3a



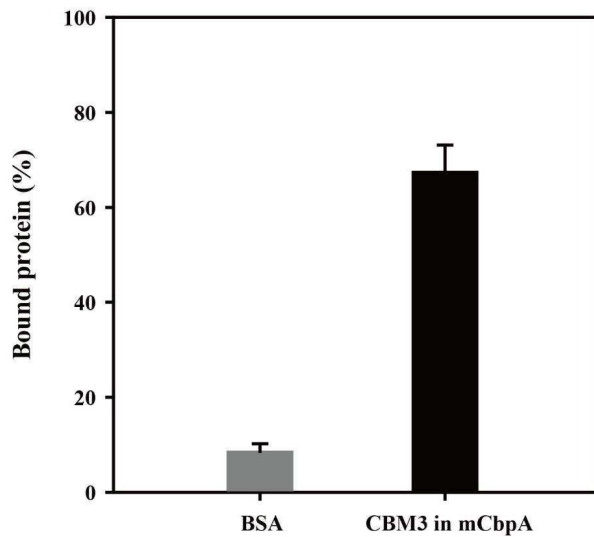
도면3b



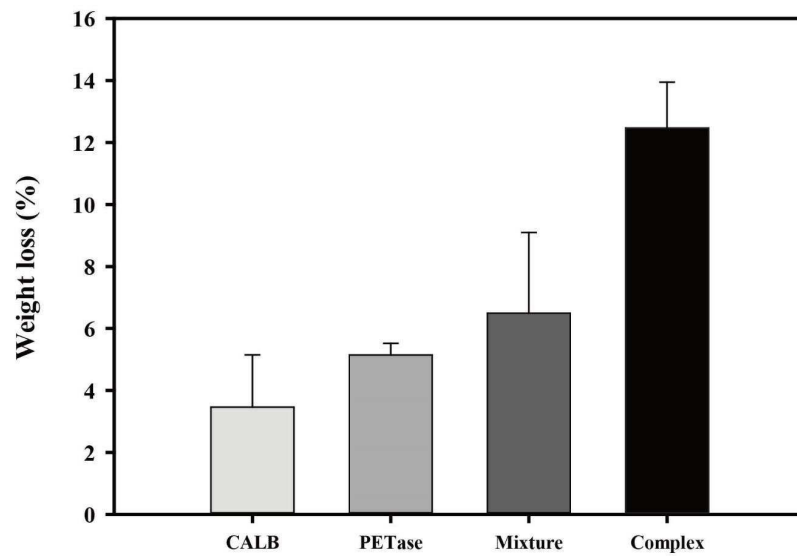
도면4a



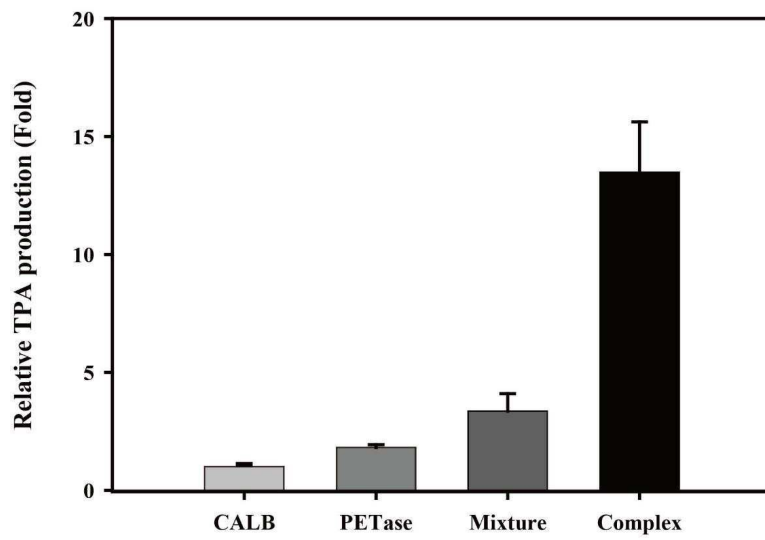
도면4b



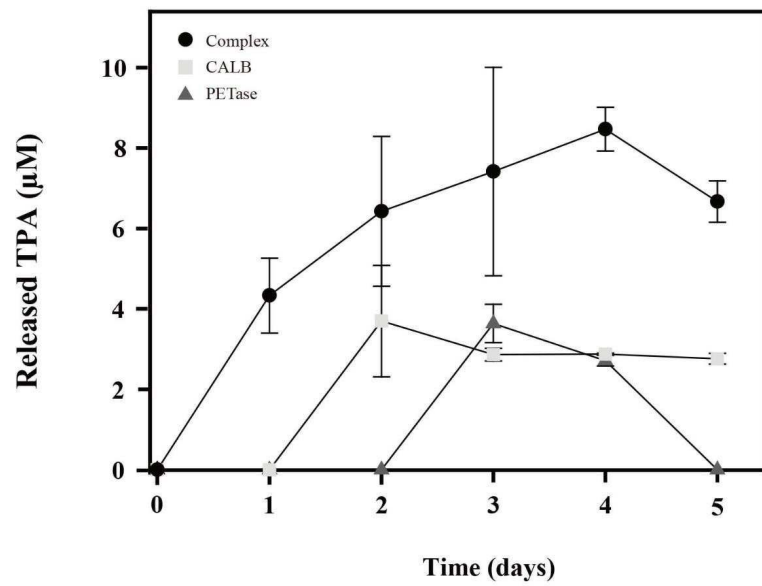
도면5a



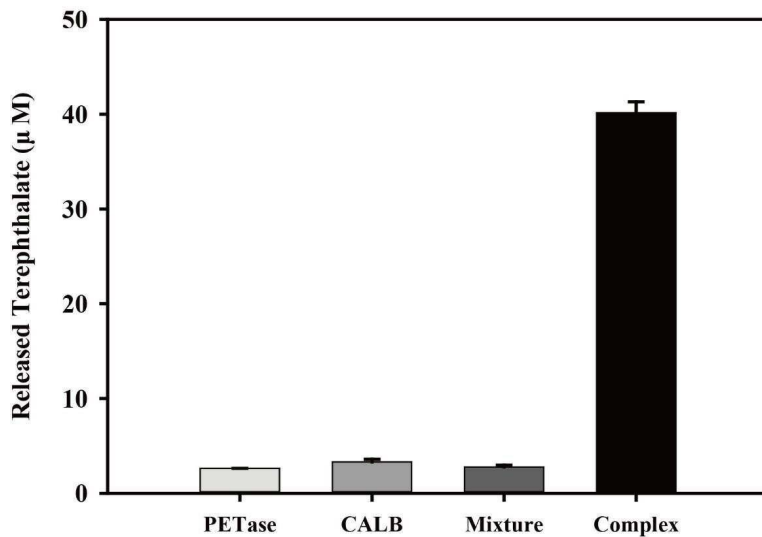
도면5b



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Enzyme complex for decomposing polyethylene terephthalate and manufacturing method thereof
- <130> NPDC-96937
- <160> 30
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of fusion protein 1

<400> 1

Met Glu Leu Gly Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Thr Asn Pro Tyr Ala Arg

1 5 10 15

Gly Pro Asn Pro Thr Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ser Ala Gly Pro Phe

20 25 30

Thr Val Arg Ser Phe Thr Val Ser Arg Pro Ser Gly Tyr Gly Ala Gly

35 40 45

Thr Val Tyr Tyr Pro Thr Asn Ala Gly Gly Thr Val Gly Ala Ile Ala

50 55 60

Ile Val Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Gln Ser Ser Ile Lys Trp Trp Gly

65 70 75 80

Pro Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val Val Ile Thr Ile Asp Thr Asn

85 90 95

Ser Thr Leu Asp Gln Pro Ser Ser Arg Ser Ser Gln Gln Met Ala Ala

100 105 110

Leu Arg Gln Val Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Ser Ser Pro Ile Tyr

115 120 125

Gly Lys Val Asp Thr Ala Arg Met Gly Val Met Gly His Ser Met Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Leu Ile Ser Ala Ala Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ala

145 150 155 160

Ala Ala Pro Gln Ala Pro Trp Asp Ser Ser Thr Asn Phe Ser Ser Val

165 170 175

Thr Val Pro Thr Leu Ile Phe Ala Cys Glu Asn Asp Ser Ile Ala Pro

180 185 190

Val Asn Ser Ser Ala Leu Pro Ile Tyr Asp Ser Met Ser Arg Asn Ala

195 200 205

Lys Gln Phe Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser His Phe Cys Ala Asn Ser

210 215 220

Gly Asn Ser Asn Gln Ala Leu Ile Gly Lys Lys Gly Ala Ala Trp Met

225 230 235 240

Lys Arg Phe Met Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Ser Thr Phe Ala Cys Glu

245 250 255

Asn Pro Asn Ser Thr Arg Val Ser Asp Phe Arg Thr Ala Asn Cys Ser

260 265 270

Leu Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe Asp Val Asn

275 280 285

Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile

290 295 300

Leu Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser Val Ser Asp Met Asn

305 310 315 320

Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala Val Leu Lys Lys Met

325 330 335

Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Gln Ser Arg

340 345 350

<210> 2

<211> 1050

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of fusion protein 1

<400

> 2

atggagctcg gtaccathga rggncgncag accaatccgt atgcgcgcgg ccccaaccct 60

accgccgcct cgttggaagc cagcgcggga ccctttaccg ttcgtagctt taccgttagc 120

cgtccgtccg gatatggtgc agggaccgtc tattacccaa ccaatgcagg cggcacccgtt 180

ggcgcgattg caatcgcccc cgggtacacc gcgcgtcaaa gcagcattaa gtggtggggt 240

ccgcgcttag ctagccatgg ctttgtggtt attaccatcg atacgaacag cactctagac 300

cagcccagca gccgtagctc gcaacagatg gccgcgttc gtcaagttgc gagcttgaac 360

gggaccagca gtagcccgat ttacggaaag gtcgatactg cccgcatggg tgtgatgggc 420

cactcaatgg ggggcggcgg ttactttatt agcgcgcga acaaccgag tttaaaagca 480

gcggcaccgc aggcgccatg ggactcttca accaacttca gcagtgttac cgtgccgacg 540

ctgattttcg cgtgcgagaa tgatagcatt gcaccggtga acagcagcgc gctgccgatt 600
tatgatagca tgtccccgaa cgcaaacag tttctggaaa ttaacggcgg tagccacttc 660
tgtgccaaact ctgggaacag caaccaggca ctgatcggaa aaaaaggggc tgcattggatg 720
aaacgattca tggataatga caccggttac tcaaccttcg cctgtgagaa tcccaacagc 780
acacgcgtgt cggattttcg caccgcgaac tgttcctcgc gatccgctgg ctccgctgct 840

ggtttctgggg aattcgatgt taacaaagat ggaaaggtaa atgctatcga ttatgcagtg 900
cttaaatcaa ttcttttagg tacaataact aacgttgatt tatcagtatc agacatgaat 960
aaggatggta aagtaaatgc tttggattta gctgttctta aaaaaatgct tttagattac 1020
aaggatgacg acgataagct gcagtctaga 1050

<210> 3

<211> 406

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of fusion protein 2

<400> 3

Met Glu Leu Gly Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Leu Pro Ser Gly Ser Asp

1	5	10	15
Pro	Ala	Phe	Ser
Gln	Pro	Lys	Ser
Val	Leu	Asp	Ala
Gly	Leu	Thr	Cys
20	25	30	
Gln	Gly	Ala	Ser
Pro	Ser	Ser	Val
Ser	Lys	Pro	Ile
Leu	Leu	Val	Pro
35	40	45	
Gly	Thr	Gly	Thr
Thr	Gly	Pro	Gln
Ser	Phe	Asp	Ser
Asn	Trp	Ile	Pro
50	55	60	
Leu	Ser	Thr	Gln
Leu	Gly	Tyr	Thr
Pro	Cys	Trp	Ile
Ser	Pro	Pro	Pro
65	70	75	80
Phe	Met	Leu	Asn
Asp	Thr	Gln	Val
Asn	Thr	Glu	Tyr
Met	Val	Asn	Ala
85	90	95	
Ile	Thr	Ala	Leu
Tyr	Ala	Gly	Ser
Gly	Asn	Asn	Lys
Leu	Pro	Val	Leu
100	105	110	
Thr	Trp	Ser	Gln
Gly	Gly	Leu	Val
Ala	Gln	Trp	Gly
Leu	Thr	Phe	Phe
115	120	125	
Pro	Ser	Ile	Arg
Ser	Lys	Val	Asp
Arg	Leu	Met	Ala
Phe	Ala	Pro	Asp

130 135 140
 Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser

 145 150 155 160
 Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala

 165 170 175
 Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu

 180 185 190
 Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro

 195 200 205
 Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala

 210 215 220

 Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser
 225 230 235 240
 Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly

 245 250 255
 Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro

 260 265 270
 Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Leu

 275 280 285
 Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu

 290 295 300
 Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr
 305 310 315 320
 Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser Leu Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala

 325 330 335
 Gly Ser Gly Glu Phe Asp Val Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile

 340 345 350
 Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Leu Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val

 355 360 365

 Asp Leu Ser Val Ser Asp Met Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu
 370 375 380

Asp Leu Ala Val Leu Lys Lys Met Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 385 390 395 400
 Asp Lys Leu Gln Ser Arg

405

<210> 4

<211> 1218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide sequence of fusion protein 2

<400> 4

atggagctcg gtaccathga rggncngca ttgccgtcag gttctgaccc ggccttttagc 60

cagccgaagt ctgttctgga tgctggcctg acatgtcagg gtgcaagccc gtcgtccgta 120

agcaaacc aa tttctgttgt accaggcacg ggcaactacg gccgcagag ctttgattct 180

aattggattc cctgtctac ccagcttggg tacacccctt gttggattag cccgcctccc 240

ttcatgctga acgatacaca agtgaatact gactacatgg tcaacgcaat taccgccttt 300

tatgcgggaa gtggttaaca taaacttccc gtgctgacat ggagtcaggg gggcctggtg 360

gcacagtggg gattgacgtt tttcccatcg atccgctcga aagttgatcg tctgatggca 420

tttgcgcctg attataaagg cacagtgtc gcggggccat tagatgccct ggctgtgtca 480

gcacctagtg tctggcaaca gacgaccggt tccgcgtga cgaccgcct ccggaacgca 540

ggtggactga cccaaattgt gccgacaacc aacttgtata gcgccaccga cgaaattgtt 600

cagccgcagg tctccaattc gcctctcgat tcaagctatc tgtttaacgg caaaaatgta 660

caggcacagg ctgtttgcgg gccattattc gtcacgacc atgccggtag cttaacctcc 720

cagttcagtt acgtggttgg tcgctctgcc ctgcgtagta ccacgggcca agcgcgtca 780

gcggactacg gtatcactga ttgcaatccg ttaccggcga atgacctgac tccggaacaa 840

aaggtagcgg ctgcggcttt gttagcgccg gccgctgccg cgattgtggc aggtcctaaa 900

caaaactgtg aaccgatct gatgcctat gcccgctcgt ttgcggtcgg caaacgtact 960

tgctcaggta tcgttacgcc aagcttagga tccgttggt cgcgtgctgg ttctggggaa 1020

ttcgatgtta acaaagatgg aaaggtaaat gctatcgatt atgcagtgt taaatcaatt 1080

cttttaggta caaatactaa cgttgattta tcagtatcag acatgaataa ggatggtaaa 1140

gtaaatgctt tggatttagc tgttcttaaa aaaatgcttt tagattacaa ggatgacgac 1200

gataagctgc agtctaga 1218

<210> 5

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence of mCbpA

<400> 5

Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Asn Ser Ala Ala Thr Ser Ser

1 5 10 15

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser

20 25 30

Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn

35 40 45

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln

50 55 60

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser

65 70 75 80

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr

85 90 95

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala

100 105 110

Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly

115 120 125

Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr

130 135 140

Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr

145 150 155 160

Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro Gly Pro Asp

165 170 175

Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser Ala Thr Phe Asp Lys Asn

180 185 190

Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr Met Thr Leu Asn Gly Asn

195 200 205

Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly Thr Ala Leu Asn Ala Ser
 210 215 220
 Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val Thr Ile Ser Lys Ala Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr Leu Asn Phe Asn Phe Ser
 245 250 255
 Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr Val Val Asp Thr Pro Val
 260 265 270

 Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val Gln Val Asn Ala Gly Glu
 275 280 285
 Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys Val Pro Ala Ala Gly Leu
 290 295 300
 Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp Ser Ala Ser Leu Glu Val
 305 310 315 320
 Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn Pro Ser Val Asn Phe
 325 330 335
 Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys Leu Leu Phe Leu Asp Asp

 340 345 350
 Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly Val Phe Ala Thr Ile
 355 360 365
 Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr Thr Ala Lys Val Thr Ser
 370 375 380
 Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly Asp Ala Gln Leu Gln Glu
 385 390 395 400
 Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val Thr Ile Asn Pro Ile Asp
 405 410 415

 Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr Val Lys Ala Gly Glu
 420 425 430
 Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser Val Pro Ser Thr Gly Ile
 435 440 445
 Ala Thr Ala Glu Ala Gln Val Ser Phe Asp Ala Thr Leu Leu Glu Val
 450 455 460

Ala Ser Val Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn Pro Thr Val Asn Phe
 465 470 475 480
 Ser Tyr Thr Val Asn Gly Asn Val Ile Lys Leu Leu Phe Leu Asp Asp

485 490 495
 Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Ser Lys Asp Gly Val Phe Val Thr Ile
 500 505 510
 Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr Val Thr Thr Pro Val Thr
 515 520 525
 Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly Thr Leu Ala Glu Val Gln
 530 535 540
 Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile Asn Ile Gly Asp Pro Ile
 545 550 555 560

Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 565 570

<210> 6
 <211> 1713
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Polynucleotide sequence of mCbpA
 <400> 6

atggatatcg gaattaattc ggatccgaat tcggcagcga catcatcaat gtcagttgaa	60
ttttacaact ctaacaaatc agcacaaaca aactcaatta caccaataat caaaattact	120
aacacatctg acagtgatit aaatttaaag gacgtaaaag ttagatatta ttacacaagt	180
gatggtacac aaggacaaac tttctggtgt gaccatgctg gtgcattatt aggaaatagc	240
tatgttgata aactagcaa agtgacagca aacttcgtta aagaacagc aagccaaca	300
tcaacctatg atacatatgt tgaatttga tttgcaagcg gagcagctac tcttaaaaa	360
ggacaattta taactattca aggaagaata acaaaatcag actggtcaaa ctacactcaa	420
acaaatgact attcatttga tgcaagtagt tcaacaccag ttgtaaatcc aaaagttaca	480
ggatatatag gtggagctaa agtacttggc acagcaccag gtccagatgt accatcttca	540
ataattaatc ctacttctgc aacatttgat aaaaatgtaa ctaaacagc agatgtttaa	600
actactatga ctttaaatgg taacacattt aaaacaatta cagatgcaaa cggtagcgt	660

ctaaatgcaa gcactgatta tagtgtttct ggaaatgatg taacaataag caaagcttat 720
ttagcaaaac aatcagtagg aacaactaca ttaaacttta actttagtgc aggaaatcct 780
caaaaattag taattacagt agttgacaca ccagttgaag ctgtaacagc tacaattgga 840
aaagtacaag taaatgctgg agaaacggta gcagtaccag ttaacttaac aaaagttcca 900
gcagctgggt tagcaacaat tgaattacca ttaacttttg attctgcatc attagaagta 960
glatcaataa ctgctggaga tatcgtatta aatccatcag taaacttctc ttctacagta 1020
agtggaagca caataaaatt attattctta gatgatacat taggaagcca attaactact 1080

aaggatggag tttttgcaac aataacattt aaagcaaaag ctataactgg aacaactgca 1140
aaagtaactt cagttaaatt agctggaaca ccagtagttg gtgatgcgca attacaagaa 1200
aaacctgtg cagttaaccc aggaacagta actatcaatc caatcgataa tagaatgcaa 1260
atttcagttg gaacagcaac agtaaaagct ggagaaatag cagcagtgcc agtaacatta 1320
acaagtgttc catcaactgg aatagcaact gctgaagcac aagtaagttt tgatgcaaca 1380
ttattagaag tagcatcagt aactgctgga gatatcgtat taaatccaac agtaaaactc 1440
tcttatacag taaacggaaa tgtaataaaa ttattatcc tagatgatac attaggaagc 1500

caattaatta gtaaagatgg agtttttgta acaataaact tcaaagcaaa agctgtaaca 1560
agcacagtaa caacaccagt tacagtatca ggaacacctg tatttgcaga tggtaatta 1620
gcagaagtac aatctaaaac agcagcaggt agcgttacia taaatattgg agatcctata 1680
gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac cac 1713

<210> 7

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of CBM3

<400> 7

Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser Ile Thr

1	5	10	15
Pro	Ile	Ile	Lys
Ile	Thr	Asn	Thr
Ser	Asp	Ser	Asp
Leu	Asn	Leu	Asn
20	25	30	
Asp	Val	Lys	Val
Arg	Tyr	Tyr	Tyr
Thr	Ser	Asp	Gly
Thr	Gln	Gly	Gln
35	40	45	
Thr	Phe	Trp	Cys
Asp	His	Ala	Gly
Ala	Leu	Leu	Gly
Asn	Ser	Tyr	Val
50	55	60	

Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser
65 70 75 80

Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe
85 90

<210> 8

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of PETase

<400> 8

Met Glu Leu Gly Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Thr Asn Pro Tyr Ala Arg
1 5 10 15

Gly Pro Asn Pro Thr Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ser Ala Gly Pro Phe
20 25 30

Thr Val Arg Ser Phe Thr Val Ser Arg Pro Ser Gly Tyr Gly Ala Gly

35 40 45

Thr Val Tyr Tyr Pro Thr Asn Ala Gly Gly Thr Val Gly Ala Ile Ala
50 55 60

Ile Val Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Gln Ser Ser Ile Lys Trp Trp Gly
65 70 75 80

Pro Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val Val Ile Thr Ile Asp Thr Asn
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Gln Pro Ser Ser Arg Ser Ser Gln Gln Met Ala Ala
100 105 110

Leu Arg Gln Val Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Ser Ser Pro Ile Tyr
115 120 125

Gly Lys Val Asp Thr Ala Arg Met Gly Val Met Gly His Ser Met Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Leu Ile Ser Ala Ala Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ala
145 150 155 160

Ala Ala Pro Gln Ala Pro Trp Asp Ser Ser Thr Asn Phe Ser Ser Val
165 170 175

Thr Val Pro Thr Leu Ile Phe Ala Cys Glu Asn Asp Ser Ile Ala Pro

180 185 190
Val Asn Ser Ser Ala Leu Pro Ile Tyr Asp Ser Met Ser Arg Asn Ala
195 200 205
Lys Gln Phe Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser His Phe Cys Ala Asn Ser
210 215 220
Gly Asn Ser Asn Gln Ala Leu Ile Gly Lys Lys Gly Ala Ala Trp Met
225 230 235 240
Lys Arg Phe Met Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Ser Thr Phe Ala Cys Glu
245 250 255

Asn Pro Asn Ser Thr Arg Val Ser Asp Phe Arg Thr Ala Asn Cys Ser
260 265 270
Leu

<210> 9

<211> 819

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide sequence of PETase

<400> 9

atggagctcg gtaccathga rggncgncag accaatccgt atgcgcgcgg ccccaaccct 60

accgccgcct cgttggaagc cagcgcggga cctttaccg ttcgtagctt taccgttagc 120

cgtccgtccg gatatggtgc agggaccgtc tattaccaa ccaatgcagg cggcaccgtt 180

ggcgcgattg caatcgcccc cgggtacacc gcgcgtcaaa gcagcattaa gtggtggggt 240

ccgcgcttag ctagccatgg ctttgtggtt attaccatcg atacgaacag cactctagac 300

cagcccagca gccgtagctc gcaacagatg gccgcgcttc gtcaagttgc gagcttgaac 360

gggaccagca gtagcccgat ttacggaaag gtcgatactg cccgcatggg tgtgatgggc 420

cactcaatgg ggggcggcgg ttactttatt agcgcgcga acaaccgag tttaaaagca 480

gcggcaccgc aggcgccatg ggactcttca accaacttca gcagtgttac cgtgccgacg 540

ctgattttcg cgtgcgagaa tgatagcatt gcaccgtga acagcagcgc gctgccgatt 600

tatgatagca tgtccccgaa cgcaaaacag tttctggaaa ttaacggcgg tagccacttc 660

tgtgccaaact ctgggaacag caaccaggca ctgacggaa aaaaaggggc tgcattgatg 720
aaacgattca tggataatga caccgttac tcaaccttcg cctgtgagaa tccaacagc 780
acacgcgtgt cggattttcg caccgcgaac tgttcctc 819

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of CALB

<400> 10

Met Glu Leu Gly Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Leu Pro Ser Gly Ser Asp

1 5 10 15

Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys

20 25 30

Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro

35 40 45

Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro

50 55 60

Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro

65 70 75 80

Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala

85 90 95

Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu

100 105 110

Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe

115 120 125

Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp

130 135 140

Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser

145 150 155 160

Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala

165 170 175

Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu

180 185 190
Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro
195 200 205
Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala
210 215 220
Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser
225 230 235 240

Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly
245 250 255
Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro
260 265 270
Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Leu
275 280 285
Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu
290 295 300
Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr

305 310 315 320
Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser Leu
325

<210> 11

<211> 987

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide sequence of CALB

<400> 11

atggagctcg gtaccathga rggncgngca ttgccgtcag gttctgaccc ggcctttagc 60

cagccgaagt ctgttctgga tgctggcctg acatgtcagg gtgcaagccc gtcgtccgta 120

agcaaaccaa ttctgcttgt accaggcacg ggcaactacgg gcccgagag ctttgattct 180

aattggattc cctgtctac ccagcttggg tacaccctt gttggattag cccgcctccc 240

ttcatgctga acgatacaca agtgaatact gactacatgg tcaacgcaat taccgcctt 300

tatgcgggaa gtggtaacaa taaacttccc gtgctgacat ggagtcaggg gggcctggtg 360

gcacagtggg gattgacgtt tttcccatcg atccgctcga aagttgatcg tctgatggca 420

tttgcgcctg attataaagg cacagtgtc gcggggccat tagatgccct ggctgtgtca 480
gcacctagtg tctggcaaca gacgaccggt tccgcgtga cgaccgccct ccggaacgca 540
ggtggactga cccaaattgt gccgacaacc aacttgtata gcgccaccga cgaaattgtt 600

cagccgcagg tctccaattc gcctctcgat tcaagctatc tgtttaacgg caaaaatgta 660
caggcacagg ctgtttgcgg gccattattc gtcacgacc atgccgtag cttaacctcc 720
cagttcagtt acgtggttgg tcgctctgcc ctgcgtagta ccacgggcca agcgcgtca 780
gcggactacg gtatcactga ttgcaatccg ttaccggcga atgacctgac tccggaacaa 840
aaggtacgag ctgcggcttt gttacgccc gccgctgccg cgattgtggc aggtcctaaa 900
caaaactgtg aaccggatct gatgccctat gcccgctccgt ttgcggtcgg caaacgtact 960
tgctcaggta tcgttacgcc aagctta 987

<210> 12

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide sequence of dockerin module

<400> 12

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe Asp Val Asn Lys

1 5 10 15

Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Leu

20 25 30

Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser Val Ser Asp Met Asn Lys

35 40 45

Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala Val Leu Lys Lys Met Leu

50 55 60

Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Gln Ser Arg

65 70 75

<210> 13

<211> 1323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

atgaataaaa gattatcacg gggaaagata tctcttttag catcagtttt cgttaccaca	60
acttttatgg ggggagtaaa tgttctcgca tctacagcta agacaggtat tcgtgacata	120
acttctcaac aagtigttaa ggaaatgaag gttggttgga acttaggaaa tacaatggat	180
gctacaggag gagaaacaaa ttgggggaat ccattaacaa cacatgccat gattgacaaa	240
gtaaaagcag caggctttta tactttaagg ctccaataa cttgggatgg tcatattgga	300
gcagcaccag attatgctat tgatgcaaca tggatgaata gagtcgaaga aatagcaaat	360
tatgcttttg ataataatat gtatgttata ataaatcttc atcacgaaga tggatggctt	420
aagccttatt atgccaatga ggctgaagta aaagctaaaa tcacaaaagt atggacacaa	480
attgcaaatc gcittaaaga ttatggggat tatctaattt ttgaaacaat gaatgaacct	540
cgccagtag gcgcagctga tgaatggtct ggtggctcct atgaaaatcg agatatggtt	600
aatagatata attaacagc ggtaaacact attagagcta ctggtggaaa taatgcatta	660
aggcacatta tggttccaac tcttcagca gcagcactta gcacaacaat gaatgattac	720
atagtaccaa ataattgatag cagagttata gtatccttac atatgtattc accatatttc	780
ttctctgcag atcttactag tcaatggact acagcaactt ggggaagtga tgctgataag	840
gctgcactaa gtgctgactt tgatgcagtt tataataagt ttgttaagaa tggagagct	900
gtagttattg gcgaaatggg aacaatcaat aagaataatt tagattctag agtgaaacat	960
gcagaatatt atgctaaaga agcaacagtt agagggataa ctctatatg gtgggataat	1020
ggatatgtgt ttgctggaaa agagcaaacc ttcggaatat ttaatagaaa gaatcttact	1080
tgggtgtgtc cagaagttat gcaagctttc ataagaggag caggtgccac acaaaactcaa	1140
acttcttatt cactaggta tgtaacaaa gatggaaagg taaatgctat cgattatgca	1200
gtgcttaaat caattctttt aggtacaaat actaacgttg atttatcagt atcagacatg	1260
aataaggatg gtaaagtaaa tgctttggat ttagctgttc ttaaaaaaat gcttttaagc	1320
taa	1323
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for PETase gene amplification	
<400> 14	
tataggtacc aacttccccc gtgcctcg	28
<210> 15	

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PETase gene amplification
 <400> 15
 ggagccagcg gatccgaggg aacagttcgc ggtg 34
 <210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for CALB gene amplification
 <400> 16
 attaggtacc atggcattgc cgtcaggttc 30
 <210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for CALB gene amplification
 <400> 17
 ggagccagcg gatcctaagc ttggcgtaac gatacctgag 40
 <210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for dockerin gene amplification_1
 <400> 18
 gcgaactgtt ccctcggatc cgctggctcc g 31
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for dockerin gene amplification_2
 <400> 19

gttacgccaa gcttaggatac cgctggctcc	30
<210> 20	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for dockerin gene amplification	
<400> 20	
gcgcctgcag taaaagcatt tttttaagaa cagctaaatc caaagcat	48
<210> 21	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> recombinant PETase_Primer_Forward F	
<400> 21	
tataggtacc aacttcccc gtgcctcg	28
<210> 22	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> recombinant PETase_Primer_Forward R	
<400> 22	
ggagccagcg gatccgaggg aacagttcgc ggtg	34
<210> 23	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<	
<220><223> recombinant PETase_Primer_Reverse F	
<400> 23	
gcgaactgtt ccctcggatac cgctggctcc g	31
<210> 24	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> recombinant PETase_Primer_Reverse R
 <400> 24
 gcgcctgcag taaaagcatt tttttaagaa cagctaaatc caaagcat 48
 <210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> recombinant CALB_Primer_Forward F
 <400> 25
 attaggtacc atggcattgc cgtcaggttc 30
 <210> 26
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> recombinant CALB_Primer_Forward R
 <400> 26
 ggagccagcg gatacctaagc ttggcgtaac gatacctgag 40
 <210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> recombinant CALB_Primer_Reverse F
 <400> 27
 gttacgcaa gcttaggatac cgctggctcc 30
 <210> 28
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> recombinant CALB_Primer_Reverse R
 <400> 28
 gcgcctgcag taaaagcatt tttttaagaa cagctaaatc caaagcat 48
 <210> 29
 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for mCbpA gene amplification

<400> 29

ccatggcagc gacatcatca atgtcagttg 30

<210> 30

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for mCbpA gene amplification

<400> 30

caggtagcgt tacaataaat attggagatc ctatagactc gag 43