(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월27일
(11) 등록번호 10-1539535
(24) 등록일자 2015년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/55 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0037837
(22) 출원일자 2014년03월31일
심사청구일자 2014년03월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140001161 A
US20130344541 A1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)
최인걸
서울 동작구 남부순환로263길 34, 501호 (사당동, 태영아트빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **곰팡이 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 6 1을 발현하는 미생물 및 이를 이용한 셀룰로스 분해 촉진 방법**

(57) 요 약

본 발명은 곰팡이 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 61을 발현하는 미생물 및 이를 이용한 셀룰로스 분해 촉진 방법에 관한 것으로, 셀룰로스 분해를 촉진하는 시너지 단백질로서 곰팡이 유래의 GH61을 대장균에서 발현시켜 단백질 생산 효율을 높이는 효과가 있다. 또한, 재조합 대장균에서 생산된 GH61 단백질의 상승 효과의 최적 조건을 확립함으로써 환원제 없이도 셀룰로스의 당 전환율을 상승시키는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1

시그널 펩타이드 제거 및 코돈 최적화 후에 합성된 GH61 유전자 (CHGG_09805)의 염기서열

- GGATCC: *Bam*HI 제한효소 부위
- GCGGCCGC: *Not*I 제한효소 부위

GGATCCCACTACACTTTTCCCAGCGTCGACGATTCTGCAGATTGGCAATATGTCCGTACAACGACTAA
CTATCAGTCAAACGGTCCAGTGACAGATGTTACTTCTGATCAGATACGTTGCTATGAACGCGATCCTG
GCACAGGTGCTCCAGAAACCTACTCGGTTACAGCCGGTAAAGTTCTTAATTACAATGCTAAAGCCAGT
GTTAGTCATCCGGGTCCAATGGCCTTCTATATTGCCAAAGTACCTGAGGGTGAAACCGCGGCTACCTG
GGACGGTTCTGGAGAGGTTTGGTCCAAAATCTATCAAGAAATGCCAGAGTTTGGCGCCAGCATGACCT
GGTCCAGCGATGGTGCTAAATCCATTCCCGTAACCATTCCTAGCTGTCTGTCGGATGGTGAATACCTG
CTGCGTGTGGAACATATCGCGTTGCATTCAGCGGGTTCAGCAGGAGGCGCGCAGTTTTATTTATCTTG
CGCACAGTTAAGTGTCACAGGTGGCAGTGGATCTTGGAGCCCGAAGTCAAAGGTGGCATTTCCCGGTG
CATACAGTGCTACTGACCCGGGAATATTAATTAATATTTATTATCCTGTACCGACGTCATATACGCCT
CCGGGGCCGGCTGTTGAATCATGTGCGGCCGC

(72) 발명자

김인정

서울 성북구 안암로 145, CJ식품안전관 209호 (안암동5가, 고려대학교이과대학)

이희진

서울 성북구 인촌로1길 36-5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031353

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)글로벌프론티어

연구과제명 [공동]화학 및 단백질촉매 융합시스템을 통한 생물친화형 목질계 바이오매스의 탈구조화 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

명 세 서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되고, 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.51 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 61을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항의 재조합 벡터로 형질전환된 대장균.

청구항 3

제2항의 형질전환된 대장균을 배양하고, 상기 형질전환된 대장균의 배양물 또는 배양상등액에서 글리코시드 하이드로레이즈 61을 회수하는 단계를 포함하는 글리코시드 하이드로레이즈 61의 대량 생산 방법.

청구항 4

셀룰로스 분해 효소; 및

제2항의 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물 또는 배양상등액을 포함하는 셀룰로스 분해용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

베타-글루코시데이즈, 헤미셀룰레이즈, 에스터레이즈, 프로테이즈, 락케이즈 및 페록시데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 셀룰로스 분해용 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스의 당화 효율 개선 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

효소적 당화는 0.45 내지 3.6 mg/g 셀룰로스 함량의 글리코시드 하이드로레이즈 61 단백질과 0.045 내지 3.6 FPU/g 셀룰로스 함량의 셀룰로스 분해 효소가 반응에 포함되고, 45 내지 55℃ 및 pH 3.5 내지 6.5의 반응 조건에서 수행하는 셀룰로스계 바이오매스의 당화 효율 개선 방법.

청구항 8

제4항 또는 제5항의 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화 및 발효를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 곰팡이 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 61을 발현하는 원핵생물 숙주 및 이를 이용한 셀룰로스 분해 촉진 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 석유 기반 연료 그리고 화학소재 생산은 석유 고갈로 인한 유가 급등 및 지구 온난화 같은 경제적 및 환경적 문제를 야기한다. 석유는 전 세계적으로 현대 사회의 주된 에너지원으로 이용되고 있으나 매장량이 한정되어 있으므로 대체 자원의 개발이 시급한 실정이다. 특히, 우리나라의 경우에는 에너지 소비 증가율이 매년 약 10% 정도로 높을 뿐만 아니라 석유의 수입의존도가 높기 때문에 이를 해결하지 않으면 에너지 수급 불균형이 초래될 것으로 예상된다. 따라서 정부는 기후변화에 대응하고 자원위기를 극복하기 위한 전략으로 신재생 에너지 수급 목표를 현재 2%(2011년 기준)에서 2020년 6.1%, 2030년 11%, 2050년 20%로 설정한 상황이다.

[0003] 석유대체자원으로서의 바이오매스는 주로 농산물 및 임산물 등의 소재 및 에너지 생산이 가능한 식물유기체를 의미하며, 광합성을 통해 이산화탄소를 리싸이클(CO_2 recycling)한다는 점에서 온실효과의 가속화를 방지할 수 있는 장점이 있다. 그 중에서도 2세대인 셀룰로스계의 바이오매스는 임산물(초본계·목질계)와 농부산물의 자원으로서 목재칩, 간벌재, 볏짚, 옥수수대·줄기, 왕겨, 밀짚, 사탕수수 찌꺼기 등이 이에 해당된다. 셀룰로스계의 바이오매스는 지구상에서 가장 풍부한 탄수화물원이라는 점에서 막대한 자원량의 확보가 가능하고, 비식용자원이기 때문에 1세대 전분계의 바이오매스(곡물, 감자류)와 달리 식량자원과의 경쟁이 없다는 장점이 있다.

[0004] 셀룰로스 기반 바이오매스로부터 소재 및 연료를 생산하는 공정은 바이오매스의 전처리, 효소 당화, 발효 공정으로 나눌 수 있다. 특히, 효소 당화 공정은 전체 공정의 병목 단계(bottleneck step)로서, 전체 공정가의 20-25% 정도를 차지한다. 따라서 효소 생산 비용 및 효소투입량 절감을 위한 기술개발이 전세계적으로 활발히 이루어지고 있는 실정이며, 대표적인 예로, 세계적인 효소 회사인 덴마크 기업 노보자임사(Novozymes)는 효소 개발을 통해서 에탄올 1갤런을 생산하는 데 필요한 효소비용 0.5달러(141원)를 2015년까지 0.3달러(87원)까지 저감하려는 노력을 기울이고 있다.

[0005] 최근에는 효소 비용 절감노력의 일환으로 보조 단백질(accessory protein) 혹은 시너지 단백질(synergistic protein)의 탐색 및 개발이 중요한 부분으로 인식되고 있다. 시너지 단백질은 셀룰로스의 물리적인 구조를 효소의 접근성이 높은 형태로 변화시켜 셀룰레이즈에 활성 상승효과를 준다. 시너지 단백질의 첨가로 필요로 하는 총 단백질의 투입량을 2배 정도 감소시킬 수 있다면, 전체 공정비용이 1.7-1.9배 정도 절감이 가능하다는 보고가 있다. 실제로 노보자임사에서는 시너지 단백질을 첨가한 상업용 효소 칵테일인 Cellic CTec2을 개발하여 당전환율 80-90%을 위해 필요한 총 효소량 절감을 위한 노력을 기울이고 있다.

[0006] 시너지 단백질을 효율적으로 셀룰로스 당전환 공정에 이용하기 위해서는, 첫째, 재조합 단백질의 값싸고 빠른 대량생산 기술 확보, 둘째, 보조 인자(cofactor)같은 효소 활성을 위한 첨가물 투입량의 최소화, 셋째, 효율성이 높은 시너지 단백질 발굴, 넷째, 시너지 단백질의 상승효과의 공정 최적화를 고려하여야 한다.

[0007] 현재까지 글리코시드 하이드로레이즈 61(GH61) 연구는 효소의 상승 작용을 보조하는 작용기작을 이해하는 데에 초점이 되어왔다. GH61은 진균을 숙주로 이용하여 발현시켜 왔으나 생산 수율이 낮은 단점이 있다. 또한, 기존의 GH61에 대한 연구는 기능 규명에 국한되어 있었다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 생장속도가 빠르고 유전자 정보가 많이 밝혀져 있는 대장균을 발현 숙주로 선정하고, 셀룰로스 분해 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.51 유래의 시너지 단백질인 GH61 단백질을 탐색하여 상기 사항들을 충족시키는 연구를 수행하여 셀룰로스의 당전환 기술을 향상시키는 결과를 얻음으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 제2007-0077630호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2014-0001161호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 시너지 단백질인 GH61 단백질을 대량생산하고, 공정 조건에서의 최적화를 확립하기 위해, 토양 곰팡이 유래의 GH61을 발현하는 재조합 벡터, 이로 형질전환된 대장균 및 이를 이용한 셀룰로스 분해 용도, 당화 효율 개선 용도 또는 에탄올 제조 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되고, 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.51 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 61을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 3 형질전환된 대장균을 배양하고, 상기 형질전환된 대장균의 배양물 또는 배양상등액에서 글리코시드 하이드로레이즈 61을 회수하는 단계를 포함하는 글리코시드 하이드로레이즈 61의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 셀룰로스 분해 효소; 및 상기 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물 또는 배양상등액을 포함하는 셀룰로스 분해용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스의 당화 효율 개선 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 상기 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화 및 발효를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 셀룰로스 분해를 촉진하는 시너지 단백질로서 곰팡이 유래의 GH61을 대장균에서 발현시켜 단백질 생산 효율을 높이는 효과가 있다. 또한, 재조합 대장균에서 생산된 GH61 단백질의 상승 효과의 최적 조건을 확립함으로써 환원제 없이도 셀룰로스의 당 전환율을 상승시키는 효과가 있다.

[0018] 따라서, 본 발명은 GH61을 대장균에서 발현시켜 기존의 진균 숙주 발현보다 용이하고 효율적인 생산 방법을 구축하고, 환원제 없는 조건에서 GH61의 상승 효과를 확인하여 공정상에서의 경제적 측면을 고려할 때 생산 단가를 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 재조합 GH61 제조를 위해 시그널 펩타이드를 제거하고 코돈 최적화 후의 GH61 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 재조합 GH61의 정제 후 얻은 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 재조합 GH61의 시간별 셀룰로스 분해 상승 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 재조합 GH61 상승작용에서 환원제가 미치는 효과를 확인한 것으로, A는 DNS 방법으로 정량한 환원당 수율, B는 HPLC 방법으로 정량한 당 산물 수율이다.

도 5는 본 발명에 따른 재조합 GH61 상승작용의 최적 GH61 농도 범위를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 재조합 GH61 상승작용의 최적 온도 범위를 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명에 따른 재조합 GH61 상승작용의 최적 pH 범위를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되고, 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.51 유래의 글리코시드 하이드로레이즈 61을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 재조합 벡터에 사용하는 글리코시드 하이드로레이즈 61을 코딩하는 유전자는 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.51 유래일 수 있고, 보다 구체적으로, SEQ ID NO: 1에 기재된 폴리뉴클레오티드로 표시될 수 있다.

[0023] 용어, '폴리뉴클레오티드'란, 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미한다.

[0024] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 1의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 이로부터 특정 위치에서 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드가 치환, 결실 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 이로부터 발현되는 GH61 단백질은 아미노산 서열의 특정 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 결실 또는 삽입된 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.

[0025] 본 발명의 GH61을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 활성이 증진되도록 변이된 GH61 또는 GH61을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 활성이 증진되도록 변이된 GH61의 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 포함됨은 당업자에게 자명하다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0026] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 발현 숙주로 대장균을 사용하여 대장균에 코돈 최적화된 서열을 가질 수 있다.

[0027] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 폴리뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.

[0028] 상술한 본 발명의 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: SEQ ID NO: 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 기초한 각각의 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.

[0029] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 효소-생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA 라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.

[0030] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(*Genetics*, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의

폴리뉴클레오티드는 RACE 방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).

[0031] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.

[0032] 본 발명에서 '재조합 벡터'란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0033] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0034] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 효소 코딩 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0035] 따라서, 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균을 제공한다.

[0036] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0037] 상기 형질전환체는 글리코시드 하이드로레이즈 61을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 임의의 대장균 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.

[0038] 본 발명은 또한 상기 형질전환된 대장균을 배양하고, 상기 형질전환된 대장균의 배양물 또는 배양상등액에서 글리코시드 하이드로레이즈 61을 회수하는 단계를 포함하는 글리코시드 하이드로레이즈 61의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0039] 본 발명에서 사용하는 글리코시드 하이드로레이즈 61은 자체로 발현이 용이하지 않은 난발현성 단백질이나, 시그널 펩타이드를 제거하고 대장균에 적합하게 코돈을 최적화한 서열을 가짐으로써 분비능을 증가시킨 것으로, 글리코시드 하이드로레이즈 61를 발현하는 대장균을 배양하여 이의 배양물 또는 배양상등액에서 글리코시드 하이드로레이즈 61를 회수함으로써 생산 수율을 높일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에 따르면 글리코시드 하이드로레이즈 61은 SDS-PAGE 분석 결과, 약 25kDa 크기의 밴드로 확인되었다.

[0041] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명의 형질전환체에 의해 발현된 GH61의 효소 활성을 확인하기 위해, 셀룰레이즈 및 기질과 반응시킨 후 셀룰로스 분해 상승 작용을 확인한 결과, 셀룰레이즈 단독 처리한 군에 비해 함께 처리한 군에서 글루코스 생성량이 증가함을 확인하였다.

[0042] 본 발명의 형질전환체를 배양하기 위한 배지 및 배양조건은 숙주세포에 따라 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 영양배지는 숙주세포의 생육에 필요한 탄소원, 무기질소원 또는 유기질소원을 포함하는 것이 바람직하다. 탄소원으로는 글루코스, 덱스트란, 가용성 전분, 수크로스 및 메탄올 등이 사용될 수 있다. 무기질소원 또는 유기질소원으로는 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘스팁리쿼(corn steep liquer), 펩톤, 카제인, 소추출물, 대두백 및 감자추출물 등이 사용될 수 있다. 필요에 따라 다른 영양소, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘과 같은 무기염, 비타민류 또는 항생물질(테트라사이클린, 네오마이신, 암피실린 및 카나마이신) 등을 추가로 포함할 수 있다. 배양시에는 세포의 생육과 단백질의 대량생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건을 적절히 조절할 수 있다.

[0043] 배양방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치(batch)식, 유가배치식(fed-batch), 연속배양, 반응기(reactor) 형식 등 통상의 미생물 배양에 사용되는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.

[0044] 상기 GH61을 회수하는 단계는 통상적인 생화학 분리기술에 의하거나 단백질의 한 부분 또는 다른 부분에 대한 항체를 사용하는 면역친화적인 방법으로 엔도글루카나제를 분리, 정제할 수 있다. 또 다른 방법은 단백질 서열에 태그(tag)를 가하여, 항체 또는 이러한 태그에 대하여 적절히 높은 친화력을 갖는 기타 물질을 이용하는 친화방법에 의해 정제할 수도 있다. 통상적인 생화학 분리기술로는 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피법 등이 있고, 통상적으로 이들을 조합하여 사용하여 고순도로 목적 단백질을 분리할 수 있다.

[0045] 본 발명에서는 상기 배양물로부터 수득한 배양균체 또는 배양상등액을 균체파쇄, 추출, 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 단백질 침전, 투석 등 공지된 정제 방법을 단독으로 또는 적절히 조합하여 수행하였다. 회수된 목적 단백질의 확인은 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 등의 공지된 통상의 방법을 이용하여 수행하였다.

[0046] 본 발명은 또한 셀룰로스 분해 효소; 및 상기 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물 또는 배양상등액을 포함하는 셀룰로스 분해용 조성물에 관한 것이다.

[0047] 본 발명은 또한, 상기 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스의 당화 효율 개선 방법을 제공한다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 셀룰로스 분해용 조성물을 셀룰로스계 바이오매스와 반응시켜 효소적 당화 및 발효를 실시하는 단계를 포함하는 셀룰로스계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 GH61은 셀룰로스 분해 효소의 셀룰로스 분해 활성을 촉진하는 시너지 단백질로서 그 자체로는 셀룰로스 분해 활성을 갖지 않으나 셀룰로스 분해 효소와 함께 반응시킬 경우 셀룰로스 분해 효소의 효소 활성을 촉진하는 특징이 있다. 따라서, 셀룰로스 분해 효소와 셀룰로스계 바이오매스의 반응에 GH61를 부가할 경우 셀룰로스 분해 효소 단독 처리한 군에 비해 글루코스 생성량이 증가하는 효과가 있어 셀룰로스의 당 전환율을 현저히 개선할 수 있다.

[0050] 상기 셀룰로스 분해 효소는 곰팡이, 세균 및 원생동물 등에 의해 주로 생산되는 효소로, 셀룰로스의 가수분해를 촉진시킬 수 있다. 이는 엔도글루카네이즈로도 불리며, 엔도-1,4-베타-글루카네이즈, 카르복시메틸 셀룰레이즈 등의 다양한 이름을 갖는다.

[0051] 본 발명의 셀룰로스 분해용 조성물은 셀룰로스 분해능을 높이기 위해, 베타-글루코시데이즈, 헤미셀룰레이즈, 에스터레이즈, 프로테이즈, 락케이즈 및 페록시데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0052] 상기 셀룰로스계 바이오매스는 셀룰로스 분해 효소에 의해 분해될 수 있는 셀룰로스, 리케닌, 베타-D-글루칸 등의 기질 또는 상기 기질을 포함하는 소재를 포함한다.

[0053] 효소적 당화는 셀룰로스 분해 효소와 이의 활성을 촉진하는 GH61에 의해 셀룰로스가 당으로 전환되는 것으로 말하며, 당화 효율을 개선하기 위해, 0.45 내지 3.6 mg/g 셀룰로스 함량의 글리코시드 하이드로레이즈 61 단백질과 0.045 내지 3.6 FPU/g 셀룰로스 함량의 셀룰로스 분해 효소가 반응에 포함되고, 45 내지 55℃ 및 pH 3.5 내지 6.5의 반응 조건에서 수행할 수 있다.

[0054] 상기 효소적 당화에 사용하는 GH61의 농도는 진균 및 세균 유래의 다른 시너지 단백질들에 비해 투입량이 현저히 적으며, 환원제가 없는 조건에서도 우수한 당 전환율을 나타내므로 공정상에서의 경제적인 면을 고려할 때 큰 장점이 될 수 있다.

[0055] 상기의 당화 반응 혼합물을 발효시켜 바이오에탄올을 회수하기 위한 발효 미생물로, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) P2, 브레타노마이세스 커스터시(*Brettanomyces curstersii*), 사카로마이세스 우브즈런(*Saccharomyces uvzrun*), 캔디다 브래시카에(*Candida brassicae*). 벤트리컬리(*Sarcina ventriculi*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) IMB3, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 베이저린키이(*Clostridium beijerinckii*), 클루이베로마이세스 푸레질리스(*Kluyveromyces fragilis*), 브레타노마이세스 커스터시이(*Brettanomyces custersii*), 클로스트리디움 아루란티부틸리컴(*Clostridiuim aurantibutylicum*) 및 클로스트리디움 테타노모품(*Clostridium tetanomorphum*) 등을 사용할 수

있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0056] 상기 발효 공정 조건은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 초기 글루코스 농도 2 내지 30%(w/v)에서, 25 내지 37℃의 온도, 4.0 내지 8.0의 pH 조건으로 100 내지 250 rpm의 속도로 교반하면서 반응을 수행할 수 있다.

[0057] 상기 당화과정과 발효과정은 각각 별도의 반응기에서 수행하는 분리 당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 공정으로 수행될 수도 있고, 하나의 반응기에서 당화와 발효를 동시에 수행하는 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 공정으로 수행될 수도 있다. 동시당화발효 공정에서는 당화과정에서 글루코오스가 생성되자마자 효모가 발효과정에 의해 글루코스를 바로 제거하고 반응기 내에 당의 축적을 최소화할 수 있으므로, 분리 당화발효 공정에서 나타나는 최종 생성물의 억제작용을 방지할 수 있고 효소의 가수분해 반응을 향상시킬 수 있다. 또한, 설비비용 저감과 낮은 효소 투입량에 의한 비용절감을 할 수 있고, 반응기 내에 에탄올이 존재하므로 오염문제를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는 동시당화발효가 좋다.

[0058] 필요에 따라, 당업자는 기타 추가단계 및/또는 공정을 수행할 수 있는바, 예를 들어, 상기 발효과정에 의해 수득한 발효액을 당업계에 공지된 방법에 따라, 정제하는 정제과정을 등을 들 수 있다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **<실시예 1> GH61 유전자 클로닝**

[0061] 본 발명의 GH61은 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) CBS 148.41 유래 단백질로서, CHGG_09805로 주석(annotation)이 달려있다. 재조합 GH61 단백질의 대장균 발현을 위하여 사용한 유전자 클로닝 전략은 다음과 같다.

[0062] 1) Neural networks and hidden Markov 모델을 이용하여, 본래 서열에서 시그널 펩타이드(Met1-Ala17)를 제거하였다.

[0063] 2) 대장균에게 적합하게 코돈을 최적화하였다.

[0064] 도 1은 상기 1)과 2)의 작업이 수행된 후의 CHGG_09805의 염기서열을 나타낸다.

[0065] 3) 도 1에 도시된 유전자를 합성하였다.

[0066] 4) 합성된 유전자를 *Not*I과 *Bam*HI 제한효소 부위를 절단한 pET21a 발현 벡터에 접합하여 클로닝을 완성하였다.

[0067] **<실시예 2> 재조합 GH61 단백질의 대장균 발현 및 정제**

[0068] 재조합 GH61 단백질의 발현 숙주로 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하였다. 재조합 유전자를 대장균 세포에 형질전환시킨 후, 대장균 세포를 액체 배지(LB broth) 20mL에서 16시간 가량 종균배양(seed culture)을 하였다. 이를 1L의 LB에 재접종하여 37℃에서 3-4시간 정도 더 배양하여 OD_{600}의 수치가 0.7-1.0 정도 되었을 때, 온도를 16℃로 낮추고 최종 농도가 0.5mM이 되도록 isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 16시간 정도 대장균을 더 배양한 다음 원심분리를 통하여 세포를 회수하였다. 전 과정에서 100㎕의 암피실린을 선별 마커로 사용하였다.

[0069] 회수한 세포는 초음파 분쇄기를 통하여 파쇄시킨 후, 세포 내의 조 단백질(crude protein)을 추출하여 정제를 시행하였다. 정제 과정은 His-trap column을 이용한 친화 크로마토그래피법으로 수행하였고, 100mM의 이미다졸에서 대부분의 목표 단백질이 회수되었다. 정제 후의 GH61 단백질은 SDS-PAGE에서 분석하였고, 약 25kDa 크기의 밴드가 확인되었다(도 2).

[0070] **<실시예 3> GH61의 셀룰로스 분해 상승 효과**

[0071] 기질로 1%(w/v) Avicel PH101로 하여 셀룰레이즈는 상업용 효소인 Celluclast 1.5L을 1.8FPU/g 셀룰로스 함량으로, 그리고 1mg/g 셀룰로스 함량의 GH61을 첨가하여 GH61의 셀룰로스 분해 상승작용을 확인하였다. 반응 조건은 온도 50℃, pH 5.0(50mM 소듐 아세테이트), 그리고 총 반응 부피는 220㎕이었다. 효소반응을 종결하기 위해,

열처리(95℃에서 5분) 하였고, 상승작용을 확인하기 위하여 DNS법을 이용한 환원당 정량을 하였다.

[0072] 도 3에 나타난 바와 같이, 셀룰레이즈 단독 처리군 대비 GH61을 함께 처리한 군에서 농도 의존적으로 환원당 함량이 증가하였다.

[0073] **<실시예 4> 환원제의 GH61 상승작용에 대한 효과**

[0074] 환원제의 효과 실험 조건은 아스코르빈산을 환원제로 첨가한 것 외에는 실시예 3과 모두 동일하다.

[0075] 도 4에서 나타나 있듯이, 아스코르빈산의 다양한 농도 조건, 0.5, 1, 2, 5, 10mM 하에서 수행했을 때, GH61의 상승작용은 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서, 본 발명의 GH61은 공정상에서 보조 인자를 넣어주지 않아도 된다는 장점이 있다.

[0076] **<실시예 5> GH61 상승작용의 농도 최적화**

[0077] 반응 조건은 실시예 3과 모두 동일하게 수행하였다. 단, 농도 최적화를 위하여 GH61(0, 0.9, 1.8, 3,6mg/g 셀룰로스)과 Celluclast 1.5L(0.045, 0.45, 0.9, 3.6FPU/g 셀룰로스)의 농도를 다양하게 조합하여 실시하였다.

[0078] 도 5에 나타난 바와 같이, 0.9, 1.8, 3,6mg/g 셀룰로스 함량의 GH61를 부가한 경우 Celluclast 단독 처리한 군에 비해 환원당 수율은 최대 1.7배까지 증가하였다.

[0079] 표 1은 농도 최적화 결과(도 5)를 토대로 본 발명의 GH61을 다른 시너지 단백질들과 비교하였을 때, 산업적 이용가치 면에서 우수함을 보여준다. 표 1에 나타난 바와 같이, *Pc*GH61D와 CBM33와 비교했을 때, 비슷한 시너지 효과를 얻는 데 필요한 단백질 로딩양이 *Cg*GH61의 경우에 더 적었다. 한편, *Bs*EXLX1과 *Hc*EXLX2의 경우는 시너지 효과가 매우 높음에도 불구하고, 가수분해율이 산업적으로 응용이 불가능한 당전환율 (1.8 또는 3,6%)이나, *Cg*GH61의 경우에는 산업적 응용이 가능한 당전환율 (18.2%)에서 시너지효과를 보였다.

표 1

[0080] 본 발명의 GH61과 다른 시너지 단백질들의 경제적 효용성 비교

	시너지 정도 (배)	시너지 단백질 로딩양 (mg/g 셀룰로스)	셀룰레이즈 로딩양 (mg/g 셀룰로스)	시너지 단백질 없이 가수분해율 (% 이론상 최대)	시너지 단백질 포함 가수분해율 (% 이론상 최대)
*Cg*GH61	1.2	0.9	2	15.4	18.2
	1.7	0.9	0.5	4.9	8.3
*Pc*GH61D	1.3	5.6	0.13	13.6	17.3
CBM33	2.5	4.0	0.08	3.6	9.1
*Bs*EXLX1	5.7	0.3	0.007	0.3	1.8
*Hc*EXLX2	5.1	1.3	0.03	0.7	3.6

*Cg*GH61: 토양 곰팡이(*Chaetomium globosum*) 유래의 glycoside hydrolase family 61

*Pc*GH61D: 파네로차에테 크리소스포리움(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래의 glycoside hydrolase family 61(*Plos one*, 2011, 6: e27807 참조)

CBM33: Carbohydrate binding module family 33(*Protein Science*, 2011, 20: 1479-1483 참조)

*Bs*EXLX1: 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래의 expansin-like protein(*Biotechnology and bioengineering*, 2009, 102: 1342-1353 참조)

*Hc*EXLX2: 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 expansin-like protein(Mol. cells, "An Expansin-Like Protein from *Hahella Chejuensis* Binds Cellulose and Enhances Cellulase Activity" 참조)

[0081] **<실시예 6> GH61 상승작용의 온도 최적화**

[0082] 반응 조건은 실시예 3과 모두 동일하게 수행하였다. 단, 온도 최적화를 위하여 6개의 다른 온도 조건 (20, 30, 40, 50, 60, 70℃)에서 수행하였다.

[0083] 도 6에 나타난 바와 같이, GH61에 의한 상승작용은 50℃에서 나타났다.

[0084] **<실시예 7> GH61 상승작용의 pH 최적화**

[0085] 반응 조건은 실시예 3과 모두 동일하게 수행하였다. 단, pH 최적화를 위하여 7개의 다른 pH 조건 (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)에서 수행하였다. pH별로 사용한 완충용액은 50mM 소듐 아세테이트(pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0), 50mM 포타슘 포스페이트(pH 7.0), 50mM Tris-HCl(pH 9.0)이다.

[0086] 도 7에 나타난 바와 같이, pH 3.5 내지 6.0의 조건에서 GH61에 의한 상승작용이 관찰되었다.

도면

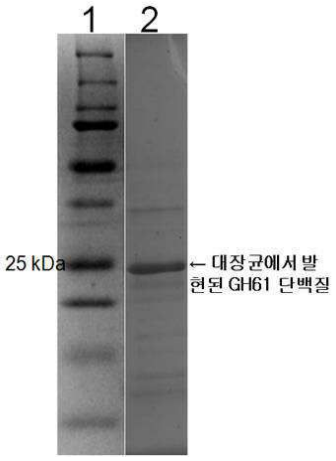
도면1

시그널 펩타이드 제거 및 코돈 최적화 후에 합성된 GH61 유전자 (CHGG_09805)의 염기서열

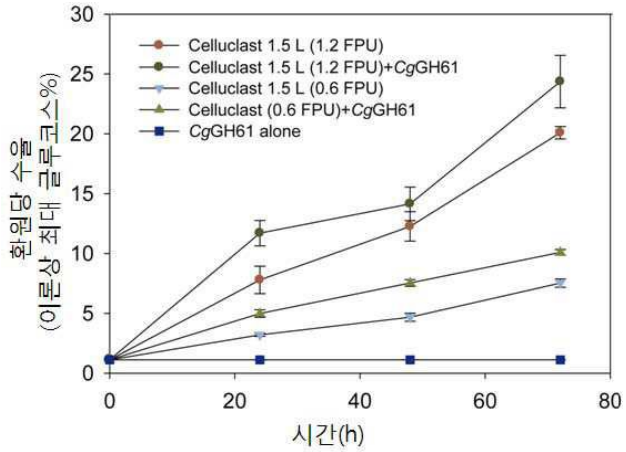
- GGATCC: *Bam*HI 제한효소 부위
- GCGGCCGC: *Not*I 제한효소 부위

GGATCCCACTACACTTTTCCCAGCGTCGACGATTCTGCAGATTGGCAATATGTCCGTACAACGACTAA
CTATCAGTCAAACGGTCCAGTGACAGATGTTACTTCTGATCAGATACGTTGCTATGAACGCGATCCTG
GCACAGGTGCTCCAGAAACCTACTCGGTTACAGCCGGTAAAGTTCTTAATTACAATGCTAAAGCCAGT
GTTAGTCATCCGGGTCCAATGGCCTTCTATATTGCCAAAGTACCTGAGGGTGAAACCGCGGCTACCTG
GGACGGTTCTGGAGAGGTTTGGTCCAAAATCTATCAAGAAATGCCAGAGTTTGGCGCCAGCATGACCT
GGTCCAGCGATGGTGCTAAATCCATTCCCGTAACCATTCCTAGCTGTCTGTCGGATGGTGAATACCTG
CTGCGTGTGGAACATATCGCGTTGCATTCAGCGGGTTCAGCAGGAGGCGCGCAGTTTTATTTATCTTG
CGCACAGTTAAGTGTCACAGGTGGCAGTGGATCTTGGAGCCCGAAGTCAAAGGTGGCATTTCCCGGTG
CATACAGTGCTACTGACCCGGGAATATTAATTAATATTTATTATCCTGTACCGACGTCATATACGCCT
CCGGGGCCGGCTGTTGAATCATGTGCGGCCGC

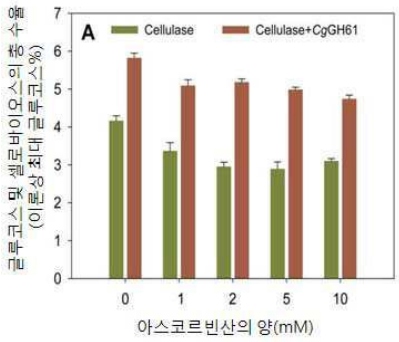
도면2

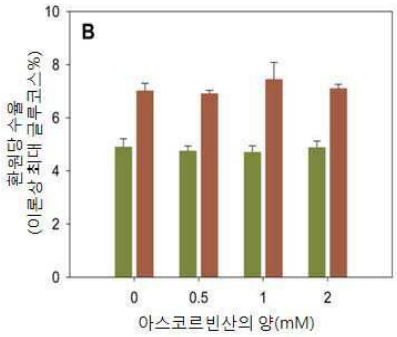


도면3

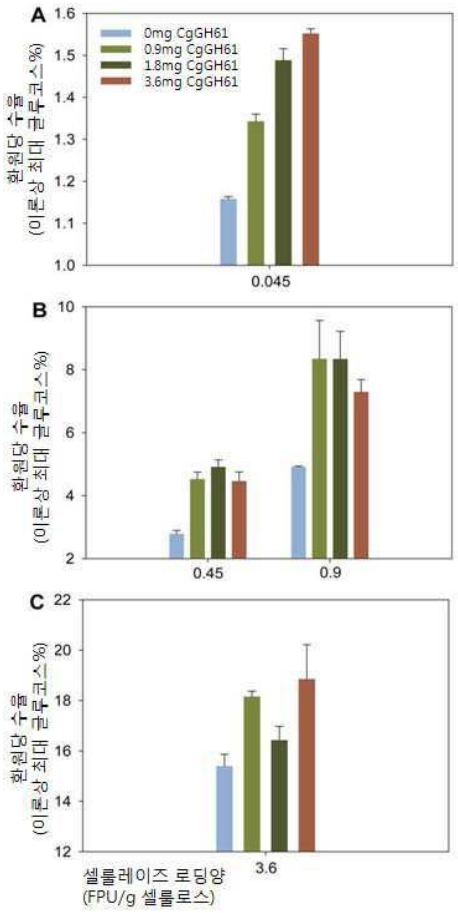

Celluclast 1.5 L (1.2 FPU)
Celluclast 1.5 L (1.2 FPU)+CgGH61
Celluclast 1.5 L (0.6 FPU)
Celluclast (0.6 FPU)+CgGH61
CgGH61 alone
환원당 수율
(이론상 최대 글루코스%)
시간(h)

도면4

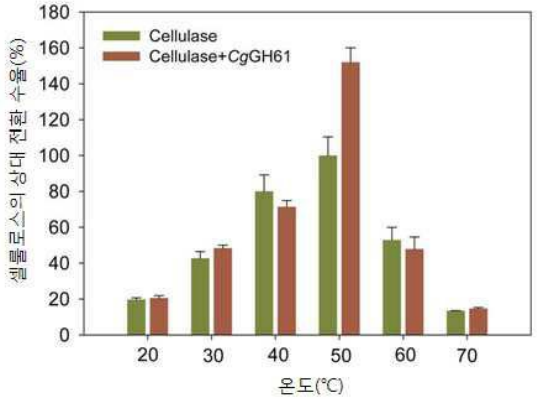

A
Cellulase
Cellulase+CgGH61
글루코스 및 셀로바이오스의 총 수율
(이론상 최대 글루코스%)
아스코르빈산의 양(mM)


B
환원당 수율
(이론상 최대 글루코스%)
아스코르빈산의 양(mM)

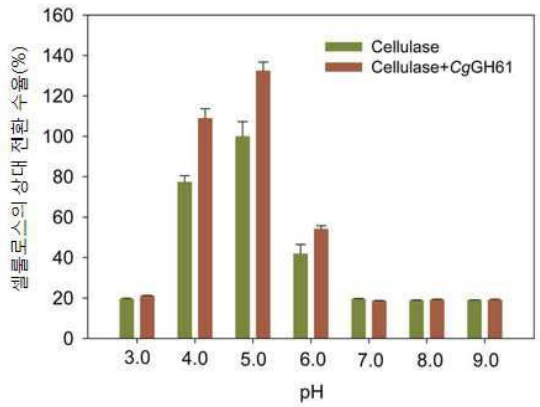
도면5


A
B
C
0mg CgGH61
0.9mg CgGH61
1.8mg CgGH61
3.6mg CgGH61
환원당 수율
(이론상 최대 글루코스%)
0.045
0.45
0.9
3.6
셀룰레이즈 로딩양
(FPU/g 셀룰로스)

도면6


Cellulase
Cellulase+CgGH61
셀룰로스의 상대 전환 수율(%)
온도(℃)

도면7



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Fungal glycoside hydrolase 61 expressing microorganism and method for promoting cellulose degradation by using the same

<130> P14U13C0128

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 644

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized GH61 gene derived from Chaetomium globosum CBS 148.51

<400> 1

ggatcccact acacttttcc cagcgtcgac gattctgcag attggcaata tgtccgtaca 60

acgactaact atcagtcaaa cggtccagtg acagatgtta cttctgatca gatacgttgc 120

tatgaacgcg atcctggcac aggtgctcca gaaacctact cggttacagc cggtaaagtt 180

cttaattaca atgctaaagc cagtgttagt catccgggtc caatggcctt ctatattgcc 240

aaagtacctg agggtgaaac cgcggctacc tgggacggtt ctggagaggt ttggtccaaa 300

atctatcaag aaatgccaga gtttggcgcc agcatgacct ggtccagcga tggtgctaaa 360

tccattcccg taaccattcc tagctgtctg tcggatggtg aatacctgct gcgtgtggaa 420

catatcgcgt tgcattcagc gggttcagca ggaggcgcgc agttttattt atcttgcgca 480

cagttaagtg tcacaggtgg cagtggatct tggagcccga agtcaaaggt ggcatttccc 540

ggtgcataca gtgctactga cccgggaata ttaattaata tttattatcc tgtaccgacg 600

tcatatacgc ctccggggcc ggctgttgaa tcatgtgcgg ccgc 644