



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0045975
(43) 공개일자 2011년05월04일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01) C12R 1/145 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0102756

(22) 출원일자 2009년10월28일

심사청구일자 2009년10월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 성북구 길음1동 대우푸르지오아파트
210동 201호

현정은

서울특별시 종로구 연건동 118-2 형제빌라 301호

(74) 대리인

구현서

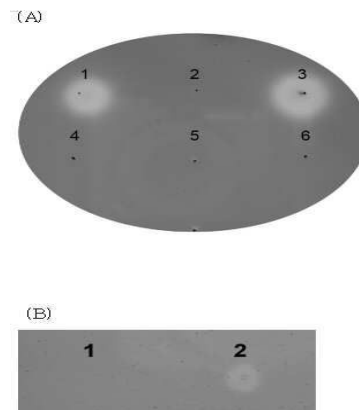
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 유전자가 삽입된 재조합 박터, 그 재조합박터를 포함하는 형질전환체, 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법

(57) 요약

본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위 유전자에 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자와 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자가 삽입된 재조합 박터, 상기 박터로 형질전환되어 단백질이 효모에서 세포외로 분비되어 재조합체 소형 셀룰로솜(Designer recominant mini-cellulosome)을 형성하도록 만든 효모 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 에탄올 생산에 관한 것이다. 본 발명의 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비의 도커린 모듈을 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이의 활성 부위에 연결한 키메라 단백질이 본 발명의 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)간의 상호작용에 의해 결합한 거대 복합체인 재조합체 소형 셀룰로솜(Designer recominant mini-cellulosome)은 결정형 셀룰로오스(crystalline cellulose)의 분해 효율을 높이는 능력이 있어 이 유전자를 바이오에탄올 생산능이 있는 효모에 형질전환 시키면 셀룰로오스 자체를 분해하는 효율을 높일 수 있다. 또 본 발명의 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)의 셀룰로스-결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로오스의 상호작용을 이용함으로써 단백질을 효과적으로 분리할 수 있게 한다. 또한, 본 발명에 따라 클로스트리디움 속 미생물로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이의 키메라 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)와 사카로마이콥시스 속 미생물로부터 유래한 베타-글루코시다아제 유전자가 도입된 효모 형질전환체는 에탄올 발효 공정에 유용하게 사용될 수 있다. CMC(carboxymethylcellulose)를 기질로 한 발효결과 상기 유전자들이 도입된 효모 형질전환체가 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 도입되지 않은 효모균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하였다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 309016051SB030

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발연구

발 연구과제명 [[3세부] 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 전처리 및 당화공정 시스템 개

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009년 04월 10일 ~ 2010년 04월 09일

특허청구의 범위

청구항 1

클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위 유전자에 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자와 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 셀룰로스-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 함유하는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 함유하는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 셀룰로스-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 셀룰로스-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기 서열을 가지는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 2b의 개열지도를 가지는 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기의 형질전환체는 기탁번호가 KCCM 11041P인 형질전환체 효모 사카로마이스스 세레비지에 YPH499/pADHcCelEmCbpA인 형질전환체.

청구항 11

제 9항 또는 제 10항의 형질전환체를 배양하여 엔도글루칸아제를 획득하는 방법.

청구항 12

제 9항 또는 제 10항의 형질전환체를 배양하여 소형 셀룰로스 결합-단백질을 획득하는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 방법은 셀룰로스를 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 소형 셀룰로스 결합-단백

질을 획득하는 방법.

청구항 14

제 9항 또는 제 10항의 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물.

청구항 15

제 9항 또는 제 10항의 형질전환체를 셀룰로스가 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 셀룰로스로부터 에탄올 생성 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모가 기질로 제공되는 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 효모형질전환체에 관한 것으로 보다 자세하게는 클로스트리디움 써모셀럼으로부터 분리된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(endo- β -1,4-glucanaseE, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4)의 활성부위와 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(endo- β -1,4-glucanaseB, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, carboxymethylcellulase, CMCase; EC 3.2.1.4)의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자와 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 이를 도입한 효모 형질전환체와 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질의 정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 원유가격의 급등과 에너지 고갈에 대한 우려가 심각해지면서 대체 에너지 생산에 관한 관심이 증폭되고 있다. 대체 에너지 중 수송용 연료의 경우 가장 활발하게 대두되고 있는 소재가 바로 바이오 에탄올이다. 이는 자동차의 최종 기술 목표인 전기자동차 또는 수소자동차의 개발단계까지 현재의 아직도 개발초기 단계여서 이의 완료까지 이를 대체할 수 있는 절충형의 대체에너지가 필요하다. 현재 바이오에탄올은 휘발유와 혼합하여 사용할 수 있어 바이오 디젤과 더불어 대표적인 재생자원 에너지이며 바이오 에탄올 연소 시 발생하는 이산화탄소는 교토의정서에서 규정한 온실가스 계산에서 예외 적용을 받아 온실가스 감축효과가 있다. 또한 보급에 별도의 인프라 (주유소 등) 구축이 필요한 다른 청정연료와는 달리 기존 인프라에서 보급이 가능해 조기 상용화가 용이하다.

[0003] 현재 바이오 에탄올은 주로 사탕수수 및 옥수수로 대표되는 당질계 바이오매스, 목재와 같은 셀룰로오스계 바이오매스, 그리고 폐목자원, 잉여농산물 및 초본계 작물과 같은 리그노 셀룰로오스계 바이오매스로부터 생산될 수 있다. 전분질계의 사탕수수 및 옥수수는 현재 대표적인 바이오에탄올 생산의 재료로 실제 브라질의 경우 풍부한 사탕수수 재배지를 근간으로 하여 이를 활용하여 에탄올의 연료상업화에 성공하여 2004년에 이르러 전체 차량 연료 소비량의 약 30%를 바이오 에탄올로 대체하는 데 성공하였다. 미국의 경우 풍부한 옥수수를 활용한 바이오 에탄올 생산의 상당한 상업화 기술을 축적하여 2017년까지 전체 수송용 에너지 수요의 20%를 바이오에탄올로 대체할 예정이다.

[0004] 기존에 사용되어 온 옥수수 등을 중심으로 한 당질계 바이오매스의 경우 2008년 초 곡물가격의 급등으로 인한 애그플레이션의 영향으로 원료수급 및 가격경쟁력의 측면에서 부정적인 평가를 받게 되어 최근 가장 많이 활용되고 있는 것이 목질계 또는 리그노 셀룰로오스계 바이오매스이다. 이들은 기존의 당질계와는 달리 원료수급이나 윤리적인 문제에 제한이 없어 이러한 재료를 사용하여 바이오에탄올을 생산하려는 여러 연구가 시도되고 있다. 그러나 이러한 원료들의 주요성분은 대부분이 셀룰로오스로 구성되어 있는데 이를 직접 에탄올 발효에 활용하기 위해서는 이들의 충분한 당화가 필요하다. 그러나 당화 공정을 거처도 대부분이 분해되지 않은 올리고머 또는 폴리머 형태로 남아있는 경우가 많다.

[0005] 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 식물성 원료물질인 전분이나 섬유소를 활용하는 다양한 생물공정분야에 이용되고 있다. 하지만 효모는 전분분해효소를 소량으로 생산 및 분비하여 섬유소 기질을 전혀 분해할 수 없는 단점이 있다. 따라서 유전자 재조합 기술을 이용하여 섬유

소 분해 효모를 새로이 육종하게 되면 양조, 제빵, 알코올 생산, 생균제 개발, 특별히 신재생에너지인 바이오에탄올 생산에 응용될 수 있기 때문에, 이들 유전자 재조합 효모들의 활용성이 기대되고 있다. 또한 효모는 이형질체 단백질을 세포외로 분비하는데 탁월한 균주로 사용되고 있다. 현재 섬유소 분해 효소를 분비하는 유전자 재조합 효모를 제조하기 위한 연구가 활발히 진행 중이나 미흡한 실정이고 이를 위해서는 열 안정성이 높거나 활성이 우수한 섬유소 분해 효소 유전자의 확보가 필요하다.

[0006] 한편, 클로스트리디움 써모셀럼 (*Clostridium thermocellum*)은 혐기성, 호열성이며 셀룰로오스를 가수분해하고 에탄올을 생산하는 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 또한 매우 높은 온도에서 자랄 수 있는 박테리아의 특성과 결합되어 미생물은 셀룰로오스계 바이오매스 자원들로부터 산업적으로 수소와 에탄올을 생산하는 공정들을 개발하기 위한 대상 물질로서 뛰어난 장점들을 지니고 있다. 또한, 결정형 섬유소의 효과적인 분해에는 적어도 세가지의 섬유소 분해효소, 즉, 엔도글루칸아제(endoglucanase), 엑소글루칸아제(exoglucanase)(또는 셀로비오하이드롤라제 cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제(β -glucosidase)가 동시에 필요하며, 이들의 상승작용으로 섬유소 분해능이 크게 증가한다고 보고되었다(Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H., 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. J Bacteriol 184(18), 5088-5095.;B Schwarz, 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 56(5-6), 634-649.;Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends Microbiol 7(7), 275-281).

[0007] 한편, 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 혐기중온성 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 이들 혐기성 세균에서 셀룰로솜 조합체 (Cellulosomal complex)의 기본적인 구조는 하나의 Cellulose binding module(CBM)을 가지고 있는 기본 골격 소단위체 (Primary scaffolding subunit)가 주축이 되어 Catalytic module을 가진 셀룰라아제 혹은 헤미셀룰라아제의 효소 소단위체 (Enzyme Subunits)들이 합쳐져서 이루어진다. 이 구조를 이루기 위해 기본 골격 소단위체에 있는 9개의 Cohesin module이 강력하게 각각의 효소 소단위체에 있는 Dockerin module에 단백질 간의 상호작용 (Protein-Protein interaction)에 의해 결합하게 된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 바이오에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모가 기질로 제공되는 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 재조합백터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합백터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 에탄올을 생산하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로스트리디움 속 (*Clostridium sp.*)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위 유전자에 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자와 클로스트리디움 속 (*Clostridium sp.*)으로부터 유래한 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자가 삽입된 재조합 백터 pADHcCelEmCbpA를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 (*Clostridium sp.*)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열인 것이 바람직하나, 서열번호 1의 펩타이드 뿐 아니라 이들 펩타이드에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 부가 등과 같은 돌연변이를 통하여 본 발명의 엔도글루칸아제 활성을 가지는 모든 변이 펩타이드를 포함한다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 엔도글루칸아제 활성부위 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 엔도글루칸아제 활성부위 유전자에 포함된다.

- [0014] 본 발명에서 클로스트리디움 속 (*Clostridium* sp.)으로부터 유래한 엔도글루칸아제 활성부위란 결정형 셀룰로오즈 (Crystalline cellulose)의 베타-1,4-결합을 파괴하여 분해하는 능력을 가지는 엔도글루칸아제 효소의 실질적인 작용 부위를 의미한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열인 것이 바람직하나, 서열번호 3의 펩타이드 뿐 아니라 이들 펩타이드에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 부가 등과 같은 돌연변이를 통하여 본 발명의 도커린 모듈 활성을 가지는 모든 변이 펩타이드를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 도커린 모듈 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 4에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 도커린 모듈 유전자에 포함된다.
- [0017] 본 발명에서 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈이란 클로스트리디움 속의 셀룰로즈-결합 단백질의 일부분인 코히즌 모듈과의 상호작용으로 셀룰로솜을 형성하는 셀룰레이즈(Cellulosomal cellulase) 단백질이 가지는 모듈을 의미한다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 5의 펩타이드 뿐 아니라 이들 펩타이드에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 부가 등과 같은 돌연변이를 통하여 본 발명의 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 활성을 가지는 모든 변이 펩타이드를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 6에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA 유전자에 포함된다.
- [0020] 본 발명에서 셀룰로즈-결합 단백질-에이의 일부분인 mCbpA란 클로스트리디움 속의 셀룰로즈-결합 단백질의 하나인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(CbpA) 중에서 하나의 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가지는 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 일 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 재조합 벡터는 도 2b의 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 본 발명은 또한 본 발명의 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기의 형질전환체는 대한민국 서울시 서대문구 소재 한국미생물보존센터에 기탁번호 KCCM 11041P로 2009년 10월 7일에 기탁한 형질전환체 효모 사카로마이스스 세레비지에 YPH499/pADHcCelEmCbpA인 형질전환체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 또한 본 발명은 본 발명의 상기 형질전환체를 배양하여 엔도글루칸아제를 획득하는 방법을 제공한다.
- [0025] 또 본 발명은 본 발명의 상기 형질전환체를 배양하여 소형 셀룰로스 결합- 단백질을 획득하는 방법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 셀룰로스를 첨가하여 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 또한 본 발명은 본 발명의 상기 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 에탄올 생성용 조성물은 예를 들어 상기 형질전환체를 배양하여 에탄올을 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물, 정제 또는 정제되지 않은 효소 추출물 또는 폴리펩타이드 등을 포함한다.
- [0028] 본 발명은 또한 본 발명의 형질전환체를 셀룰로스가 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 셀룰로스로부터 에탄올 생성 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등이 이용가능하다. 프로모터로서는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다. 효모에의 재조합체 DNA의 도입방법으로는, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스페로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.

- [0030] 또, 재조합백터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 또 가진 것도 가능하다.
- [0031] 본 발명에 관한 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질의 제조는, 예를 들면, 이것을 코딩하는 유전자를 가진 재조합백터에 의해 숙주를 형질전환해서 얻은 형질전환체를 배양하고, 배양물(배양균체 또는 배양상청액)속에 유전자 산물인 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질을 생성축적시켜, 배양물로부터 취득함으로써 행하여진다.
- [0032] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다.
- [0033] 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균 등의 세균을 숙주로 해서 얻게 된 형질전환체를 배양하는 배치로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 상기 언급한 적온의 범위에서 배양함으로써 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질을 균체 내에 축적시키고, 회수한다.
- [0034] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다.
- [0035] 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다.
- [0036] 또, 프로모터가 유도성의 발현백터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.
- [0037] 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질의 취득은, 얻게 되는 배양물중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.
- [0038] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동, 웨스턴블로팅 등에 의해 행할 수 있다.
- [0039] 또한, 숙주로서 미생물을 사용한 형질전환체의 배양, 형질전환체에 의한 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질의 생산과 균체 내의 축적, 및, 균체로부터의 엔도글루칸아제 또는 소형 셀룰로스 결합- 단백질의 회수는, 상기의 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0041] 섬유소(cellulose)는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 다당류로서, 섬유소 분해 효소인 셀룰라제(cellulase)에 의해 분해된다. 섬유소 섭취 시 초식동물의 경우 위에 기생하는 미생물이 분비하는 섬유소 분해 효소는 엔도글루칸아제(endoglucanase)를 비롯하여 자일라나제(xylanase), 엑소글루카나제(exoglucanase), 베타-글루코시다제(β-glucosidase) 등이 있다. 그 중에서도 엔도글루칸아제는 β-D-글루칸(β-D-glucan)을 가수분해한다.
- [0042] 본 발명에서는 실온에서도 활성이 오래 유지된다고 알려진 클로스트리디움 속 균주로부터 섬유소 분해 효소인 CelE의 활성부위 유전자에 클로스트리디움 속 균주로부터 셀룰로좀 형성 소단위체 효소인 EngB의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자를 효모에 도입하여 제조한 재조합 효모 균주가 키메라 CelE를 높은 수준으로 발현 및 분비한다는 것을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서는 클로스트리디움 썬모셀럼의 지노믹디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 얻어진 CelE 활성부위 유전자와 클로스트리디움 셀룰로보란스의 EngB 유전자를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 도커린 모듈 유전자를 스플라이스 중첩 연장 (SOE: Splice Overlap Extension) 기술에 의해 연결한 키메라 CelE 유전자를 얻고, 이후 얻어진 상기 유전자를 효모-대장균 셔틀백터(yeast-*E.coli* shuttle vector)에 서브클로닝하여

재조합 벡터를 제작하였다. 이후, 상기 키메라 CelE가 삽입된 재조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질전환시켰다. 이후, 상기 유전자로부터 발현되는 단백질이 엔도글루카나제임을 조사하기 위해, 키메라 CelE가 도입된 재조합 효모 형질전환체를 배양하여 엔도글루칸아제 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 키메라 CelE가 도입된 재조합 효모 형질전환체가 야생형 *S. cerevisiae* YPH499균주보다 현저히 높은 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질전환 된 키메라 CelE 유전자가 엔도글루칸아제를 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0044] 또, 본 발명의 일 실시예에서는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 얻어진 mCbpA 유전자를 얻고, 이후 얻어진 상기 유전자를 효모-대장균 셔틀벡터(yeast-*E. coli* shuttle vector)에 서브클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였다. 이후, 상기 키메라 CelE가 삽입된 재조합 벡터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질전환시켰다. 이후, 상기 유전자로부터 발현되는 단백질이 소형 셀룰로즈-결합 단백질임을 조사하기 위해, mCbpA가 도입된 재조합 효모 형질전환체를 배양하여 셀룰로즈와의 상호작용을 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 mCbpA가 도입된 재조합 효모 형질전환체가 셀룰로즈와 상호작용하는 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)를 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질전환 된 mCbpA 유전자가 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0045] 또한, 상기 재조합 효모 형질전환체의 결정형 섬유소를 분해하여 에탄올을 만드는 생산능을 조사한 결과, 효모로부터 엔도글루칸아제와 셀룰로즈-결합 단백질이 활발히 분비되는 것과 재조합체 소형 셀룰로솜을 형성하여 섬유소를 분해하는 기능이 매우 효율적으로 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 효모 형질전환체를 상기와 같이 기탁번호 KCCM 11041P로 기탁하였으며 상기 효모 형질전환체가 재조합체 소형 셀룰로솜을 효과적으로 형성하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것과 셀룰로즈-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용하여 쉽게 단백질을 정제할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0046] 즉, 본 발명자는 재조합체 소형 셀룰로솜 (Designer recombinant mini-cellulosome)을 효모에서 생체내 (in vivo) 상태에서 발현하기 위해 클로스트리디움 씨모셀럼으로부터 유래한 엔도글루칸아제-이의 활성부위 유전자에 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 엔도글루칸아제-비의 도커린 유전자를 연결한 키메라 단백질 유전자와 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 기본 골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 효모 형질전환체를 개발하여 이를 한국미생물보존센터에 기탁번호 KCCM 11041P로 기탁하였다. 뿐만 아니라 상기 효모 형질전환체가 재조합체 소형 셀룰로솜을 효과적으로 분비하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것과 또, 셀룰로 스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용하여 쉽게 단백질을 정제할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

효 과

[0047] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 클로스트리디움 속 균주로부터 얻은 엔도글루칸아제 활성부위 유전자와 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈을 연결한 키메라 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자를 효모 균주에 도입하였다. 이후, 상기 키메라 엔도글루칸아제 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자가 상기 효모 균주에서 높은 수준으로 발현되어 분비된 후 재조합체 소형 셀룰로솜을 형성하는 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 클로스트리디움 속 균주로부터 유래한 키메라 엔도글루칸아제 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자가 도입된 효모 형질전환체 및 상기 유전자로부터 발현되는 재조합체 소형 셀룰로솜은 양조, 제빵, 알코올 생산, 사료 생산 및 생균제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있고 특히 섬유소의 분해와 분해산물로부터 알코올을 생산하는 동시당화발효 융합공정(SSF, simultaneous saccharification and fermentation 혹은 consolidated bioprocessing)에 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

- [0049] 실시예 1: 효모 알코올 데히드로게나제의 프로모터와 시그널 펩타이드 유전자 및 엔도글루칸아제 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자의 증폭
- [0050] 효모 외부로 효과적으로 효소를 분비하기 위한 프로모터와 시그널 펩타이드 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이(BY4741)로부터 알코올 데히드로게나제의 프로모터 부분의 염기서열과 α -factor의 시그널 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 BamH1, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 EcoR1 인식서열이, 중첩프라이머 (Overlap primer)의 5'에는 각각 중첩 서열이 삽입되도록 프라이머 (ADH α P1 GCGCGGATCCAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGG(서열정보 7); ADH α P2 GAAATCTCATGAAAAGAGCGCGGA(서열정보 8); ADH α P3 CGCTCTTTTCATGAGATTCCTTCAATT(서열정보 9); ADH α P4 GCGCGAATTCGTCTTTTATCCAAAGATACC(서열정보 10))를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 스플라이스 중첩 연장 (SOE: Splice Overlap Extension) 기술에 의해 PCR을 수행하였다. 그 결과 707bp의 효모 알코올 데히드로게나제 프로모터와 255 bp의 효모 시그널 펩타이드 유전자가 연결된 962bp의 중첩 연장 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 1(A)에 도시하였다.
- [0051] 클로스트리디움 유래의 써모셀럼의 CelE 활성부위 유전자와 클로스트리디움 유래의 EngB 유전자의 도커린 모듈을 연결한 키메라 CelE 유전자를 클로닝하기 위하여 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 Not1, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Spe1 인식서열이, 중첩프라이머 (Overlap primer)의 5'에는 각각 중첩 서열이 삽입되도록 프라이머 (cCelE P1 ATATGCGGCCGCATCGGGAACAAAGCTTTTG(서열정보 11); cCelE P2 TTTGTAAACATCACCCTACAAAATATTGCTGTC(서열정보 12); cCelE P3 ATTTTGTACGGTGATGTTAACAAGATGGAAGG(서열정보 13); cCelE P4 GCGCACTAGTGCTAAAAGCATTTTTTAAGAACAG(서열정보 14))를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 스플라이스 중첩 연장 (SOE: Splice Overlap Extension) 기술에 의해 PCR을 수행하였다. 그 결과 1140bp의 클로스트리디움 유래의 써모셀럼의 CelE 활성부위 유전자와 159bp의 EngB 유전자의 도커린 모듈 유전자가 연결된 1299bp의 키메라 CelE가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 1(B)에 도시하였다.
- [0052] 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 Not1, 역방향 프라이머(Reverse primer)에는 제한효소 Spe1 인식서열이 각각 삽입된 프라이머 (mCbpA_f ATATGCGGCCGCAGCGACATCATCAAT(서열정보 15); mCbpA_r GCGCACTAGTGCTATAGGATCTCCAATTTTATT(서열정보 16))를 합성하였다. 그 결과 1647bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 1(C)에 도시하였다.
- [0053] 사카로마이콥시스 유래의 피블리게라의 Bgl1유전자를 클로닝하기 위하여 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 Not1, 역방향 프라이머(Reverse primer)에는 제한효소 Spe1 인식서열이 각각 삽입된 프라이머 (Bgl1_f GGCGAATTCAAGTCCCAATTCAAACTATAC(서열정보 17); Bgl1_r ATATGCGGCCGAATAGTAAACAGGACAGATGT(서열정보 18))를 합성하였다. 그 결과 2577bp의 사카로마이콥시스 유래의 피블리게라의 Bgl1유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 1(D)에 도시하였다.
- [0054] 실시예 2: 효모 알코올 데히드로게나제 프로모터와 시그널 펩타이드의 중첩 유전자 및 키메라 CelE 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자 mCbpA 유전자와 Bgl1 유전자의 클로닝
- [0055] 상기 실시예 1에서 얻은 알코올 데히드로게나제 프로모터와 시그널 펩타이드의 중첩 유전자와 키메라 CelE와 mCbpA와 Bgl1 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [0056] 그 후, 효모 알코올 데히드로게나제 프로모터와 시그널 펩타이드의 중첩 유전자의 경우는 BamH I, EcoR I, 키메라 CelE와 mini-CbpA와 Bgl1은 Not I, Spe I 으로 절단한 후 효모-대장균 셔틀 벡터(yeast-*E.coli* shuttle vector)인 pESC-trp(Clontech)에 라이게이션(ligation)시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E.coli*) DH5 α (Real biotech corporation)에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드

DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각 pADH-a-cCelE, pADH-a-mCbpA, pADH-a-Bgl1이라 명명하였다. 그 후 pADH-a-cCelE를 주형으로 알코올 데히드로게나제 프로모터와 효소 시그널 펩타이드와 엔도글루칸아제와 알코올 데히드로게나제 터미네이터 부분을 유전자 증폭하여 pADH-a-mCbpA의 Xho1, Sal1 사이트에 라이게이션시켜 에스세리시아 콜라이 DH5 α에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pADHcCelEmCbpA라 명명하였고 도면 2에 도시하였다. 이후, 상기 재조합 벡터들을 이용하여 클론테크(clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2)에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질전환시켰다.

[0057] 상기 효모 숙주세포로는 클론테크(clontech)사의 사카로마이시스 세레비지에 YPH499 (*S. cerevisiae* YPH499, ura3-52lys2-801amberade2-10lochretrp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1)를 사용하였다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)를 이용하여 형질전환체를 선별하였으며, 벡터 pADHcCelEmCbpA의 형질전환체를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499/pADHcCelEmCbpA로 벡터 pADH-a-bgl1의 형질전환체를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499/pADH-a-bgl1라 명명하였다.

[0058] 실시예 3: 효모 형질전환체의 엔도글루칸아제 활성 측정

[0059] 상기 실시예 2에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, 배지상에서 효소 활성대(halo) 측정을 실행하였다.

[0060] YPH499/pADHcCelEmCbpA를 발현 유도하여 키메라 CelE 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 30℃에서 48시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 키메라 CelE 효소 단백질을 얻었다.

[0061] 효소활성대(halo)를 확인하기 위해 YPD한천배지에 0.3% CMC (carboxy methyl cellulose)을 녹여 효소반응의 기질로 사용하였다. 형질전환된 효모의 콜로니를 YPD한천배지에 (yeast extract, peptone, glucose) 접종하여 48시간동안 30℃에서 배양하고, YPD 액상배지에서 48시간 동안 30℃에서 배양한 배양액 5μl을 기질(CMC, carboxymethylcellulose, SIGMA)이 포함된 한천배지에 올려 흡수시킨 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. 0.25% 콩고레드(Congo-Red)로 20분간 염색 후 1몰 소듐 클로라이드(sodium chloride)로 여러 번 행구어낸 후 효소활성대(halo)를 확인하였고 그 결과를 각각 도면 3a, 및 3b에 도시하였다.

[0062] 실시예 4: 효모 형질전환체의 소형 셀룰로즈-결합 단백질 발현

[0063] 상기 실시예 2에서 확보한 형질전환체의 소형 셀룰로즈-결합 단백질 발현을 확인하기 위하여, 소형 셀룰로즈-결합 단백질이 가진 셀룰로즈-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 실행하였다.

[0064] YPH499/pADHcCelEmCbpA를 발현 유도하여 키메라 CelE 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 30℃에서 48시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) mCbpA 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 얻었다.

[0065] 셀룰로즈-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로즈 (Sigmacell Type 50, SIGMA)를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1몰 소듐 클로라이드(sodium chloride) 0.02몰 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 행구어낸 후 0.05몰 트리스 버퍼 (pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하였다. 그 결과 58kDa위치에 단백질 밴드를 확인하였다. 이 결과를 도면 4에 도시하였다.

[0066] 실시예 5: 효모 형질전환체를 이용한 바이오에탄올의 생산

[0067] YPH499/pADHcCelEmCbpA와 YPH499/pADH-a-cCelE와 YPH499/pADH-a-bgl1를 발현 유도되는 SD배지에서 24시간 전 배양 후 48시간 진탕배양하여 YPH499/pADHcCelEmCbpA와 YPH499/pADH-a-cCelE를 각각 YPH499/pADH-a-bgl1와 함께 10g/l CMC(carboxymethylcellulose)가 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 20이 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30℃, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마

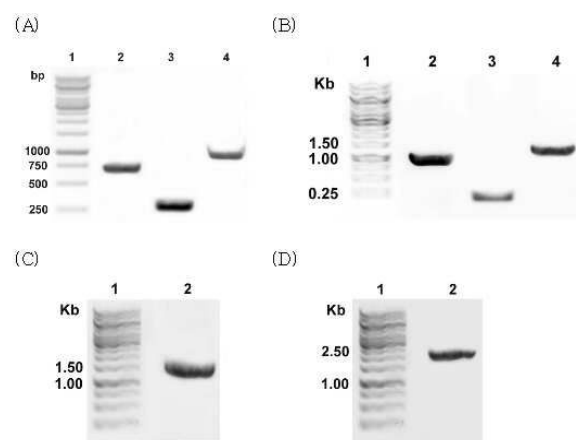
토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자가 삽입된 YPH499/pADHcCelEmCbpA에서의 에탄올 생산수율이 YPH499/pADHcCelE보다 높게 측정되었고 이 결과를 도면 5에 도시하였다.

도면의 간단한 설명

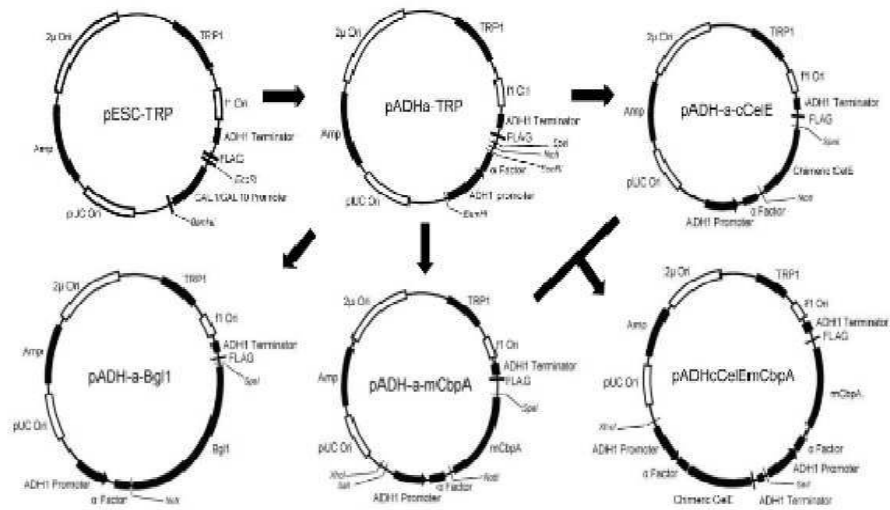
- [0068] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인한 그림이며, 도면 1(A)는 효모 알코올 데히드로게나제의 프로모터와 시그널 펩타이드의 중첩 유전자로 (A)에서 Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, ADH promoter PCR 산물, Lane 3, alpha factor PCR product; Lane 4, promoter alpha factor Overlap PCR 산물이고 ; 도 1(B)는 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자이고 (B)에서 Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, CelE Catalytic Domain PCR product; Lane 3, EngB Dockerin Module PCR product ; Lane 4, Chimeric CelE Overlap PCR 산물이며, 도 1(C)는 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자이고, (C)에서 Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, mCbpA PCR 산물이며, 도 1(D)는 베타-글루코시다제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림으로 (D)에서 Lane 1, 1kb DNA marker; Lane 2, Bgl1 PCR 산물을 나타낸다.
- [0069] 도 2a 및 b는 본 발명에서 제시된 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자와 소형 셀룰로즈-결합 단백질 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA의 모식도이다.
- [0070] 도 3은 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pADHcCelEmCbpA가 삽입된 효모형질전환체의 콜로니와 배양액에서의 효소활성을 보임으로 배양액으로의 효소분비를 확인한 그림으로, (A)는 플레이트 배양으로 재조합 *S. cerevisiae* YPH499 균주들을 한 것으로, [1] YPH499/pADH-a-cCelE [2] YPH499/pADHa control, [3] YPH499/pADHcCelEmCbpA [4] YPH499/pADH-a-mCbpA, [5] YPH499/pADHa Control [6] YPH499/pADH-a-Bgl1, 을 나타내고, (B)는 플레이트 배양으로 재조합 Supernatant of Recombinant *S. cerevisiae* YPH499 균주의 상등액으로, [1] YPH499/pADHa control [2] YPH499/pADHcCelEmCbpA를 나타낸다.
- [0071] 도 4는 본 발명에서 발현한 소형 셀룰로즈-결합 단백질 발현을 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용한 정제방법으로 확인한 그림으로, Lane1. 단백질 마커(Fermentas); Lane2. Wash1; Lane3. Wash2; Lane4. Wash3; Lane5. 코마시 블루로 Elution of mCbpA 용출액을 SDS-PAGE 염색한 것을 나타낸다.
- [0072] 도 5는 효모 형질전환체를 이용한 바이오에탄올의 생산으로부터 재조합체 소형 셀룰로좀의 형성을 확인한 그림으로, 재조합 효모 균주에 의한 단일 탄소원으로 10g/l CMC로부터 에탄올 발효의 시간 경과를 나타낸 그래프이다. closed diamond, YPH499/pADHa control; closed square, YPH499/pADH-a-CelE 및 YPH499/pADH-a-Bgl1; 및 closed triangle, YPH499/pADHcCelEmCbpA 및 YPH499/pADH-a-Bgl1를 나타낸다.

도면

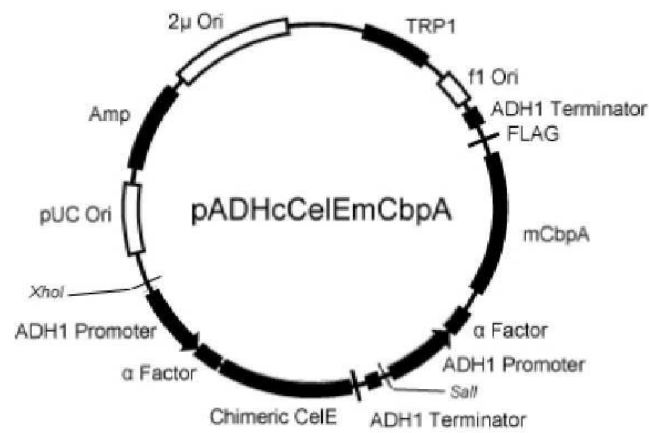
도면1



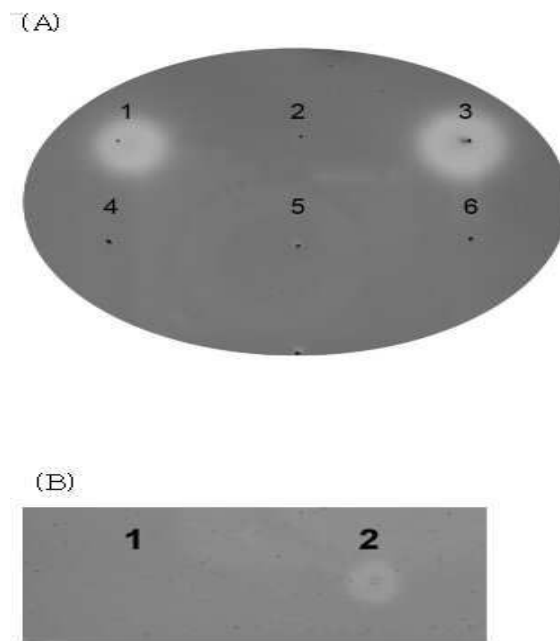
도면2a



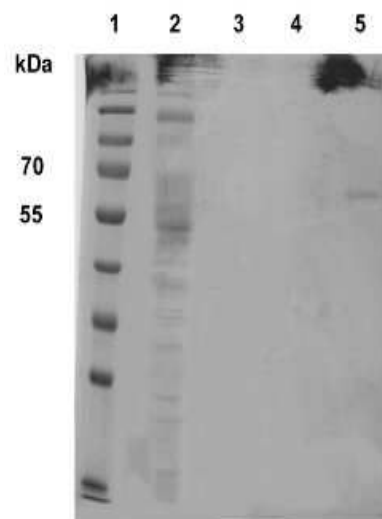
도면2b



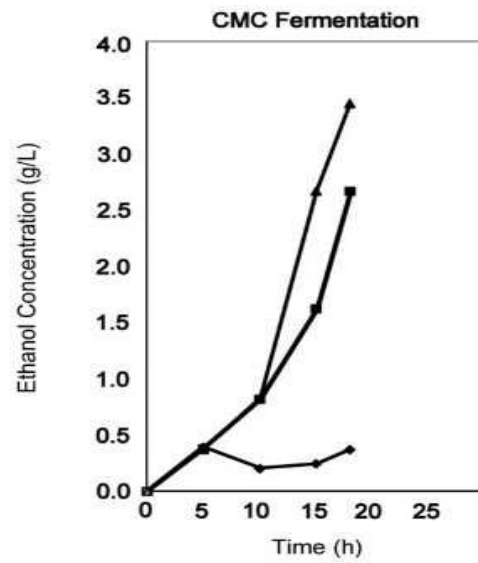
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> A recombinant vector introduced with gene which effectively
 degrade cellulose, a transformant comprising the vector and a
 method for producing ethanol using the same

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 426

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Active region

<400> 1

Ser Gly Thr Lys Leu Leu Asp Ala Ser Gly Asn Glu Leu Val Met Arg
 1 5 10 15

Gly Met Arg Asp Ile Ser Ala Ile Asp Leu Val Lys Glu Ile Lys Ile
 20 25 30

Gly Trp Asn Leu Gly Asn Thr Leu Asp Ala Pro Thr Glu Thr Ala Trp
35 40 45

Gly Asn Pro Arg Thr Thr Lys Ala Met Ile Glu Lys Val Arg Glu Met
50 55 60

Gly Phe Asn Ala Val Arg Val Pro Val Thr Trp Asp Thr His Ile Gly
65 70 75 80

Pro Ala Pro Asp Tyr Lys Ile Asp Glu Ala Trp Leu Asn Arg Val Glu
85 90 95

Glu Val Val Asn Tyr Val Leu Asp Cys Gly Met Tyr Ala Ile Ile Asn
100 105 110

Leu His His Asp Asn Thr Trp Ile Ile Pro Thr Tyr Ala Asn Glu Gln
115 120 125

Arg Ser Lys Glu Lys Leu Val Lys Val Trp Glu Gln Ile Ala Thr Arg
130 135 140

Phe Lys Asp Tyr Asp Asp His Leu Leu Phe Glu Thr Met Asn Glu Pro
145 150 155 160

Arg Glu Val Gly Ser Pro Met Glu Trp Met Gly Gly Thr Tyr Glu Asn
165 170 175

Arg Asp Val Ile Asn Arg Phe Asn Leu Ala Val Val Asn Thr Ile Arg
180 185 190

Ala Ser Gly Gly Asn Asn Asp Lys Arg Phe Ile Leu Val Pro Thr Asn
195 200 205

Ala Ala Thr Gly Leu Asp Val Ala Leu Asn Asp Leu Val Ile Pro Asn
210 215 220

Asn Asp Ser Arg Val Ile Val Ser Ile His Ala Tyr Ser Pro Tyr Phe
225 230 235 240

Phe Ala Met Asp Val Asn Gly Thr Ser Tyr Trp Gly Ser Asp Tyr Asp
245 250 255

Lys Ala Ser Leu Thr Ser Glu Leu Asp Ala Ile Tyr Asn Arg Phe Val
260 265 270

Lys Asn Gly Arg Ala Val Ile Ile Gly Glu Phe Gly Thr Ile Asp Lys
275 280 285

Asn Asn Leu Ser Ser Arg Val Ala His Ala Glu His Tyr Ala Arg Glu
290 295 300

Ala Val Ser Arg Gly Ile Ala Val Phe Trp Trp Asp Asn Gly Tyr Tyr
305 310 315 320

Asn Pro Gly Asp Ala Glu Thr Tyr Ala Leu Leu Asn Arg Lys Thr Leu
325 330 335

Ser Trp Tyr Tyr Pro Glu Ile Val Gln Ala Leu Met Arg Gly Ala Gly
340 345 350

Val Glu Pro Leu Val Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Leu Met Pro Thr
355 360 365

Pro Ser Pro Thr Val Thr Ala Asn Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Thr Lys
370 375 380

Leu Leu Asp Ala Ser Gly Asn Glu Leu Val Met Arg Gly Met Arg Asp
385 390 395 400

Ile Ser Ala Ile Asp Leu Val Lys Glu Ile Lys Ile Gly Trp Asn Leu
405 410 415

Gly Asn Thr Leu Asp Ala Pro Thr Glu Thr
420 425

<210> 2
<211> 1140
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> active region

<400> 2
tcgggaacaa agcttttggga tgcaagcgga aacgagcttg taatgagggg catgcgtgat

atttcagcaa tagatttgggt taaagaaata aaaatcggat ggaatttggg aaatactttg	120
gatgctccta cagagactgc ctggggaaat ccaaggacaa ccaaggcaat gatagaaaag	180
gtaagggaaa tgggcttta tgccgtcaga gtgcctgtta cctgggatac gcacatcgga	240
cctgctccgg actataaaat tgacgaagca tggctgaaca gagttgagga agtggtaaac	300
tatgttcttg actgcggtat gtacgcgatc ataaatcttc accatgacaa tacatggatt	360
atacctacat atgccaatga gcaaaggagi aaagaaaaac ttgtaaaagt ttgggaacaa	420
atagcaaccc gttttaaaga ttatgacgac catttgttgt ttgagacaat gaacgaaccg	480
agagaagtag gttcacctat ggaatggatg ggcggaacgt atgaaaaccg agatgtgata	540
aacagattta atttggcgggt tgtaataacc atcagagcaa gcggcggaata taacgataaa	600
agattcatac tggttccgac caatgcggca accggcctgg atgttgcatl aaacgacctt	660
gtcattccga acaatgacag cagagtcata gtatccatac atgcttattc accgtatttc	720
tttgctatgg atgtcaacgg aacttcatat tggggaagtg actatgacaa ggctttcttt	780
acaagtgaac ttgatgctat ttacaacaga ttgtgaaaa acggaagggc tgtaattatc	840
ggagaattcg gaaccattga caagaacaac ctgtcttcaa gggiggctca tgccgagcac	900
tatgcaagag aagcagtttc aagaggaatt gctgttttct ggtgggataa cggtattac	960
aatccgggtg atgcagagac ttatgcattg ctgaacagaa aaactctctc atggtattat	1020
cctgaaattg tccaggctct tatgagaggt gccggcgttg aacctttagt ttcaccgact	1080
cctacaccta cattaatgcc gacccctcg cccacggtga cagcaaatat ttgtacggt	1140
	1140

<211> 53
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> module

<400> 3
 Asp Val Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu
 1 5 10 15

Lys Ser Ile Leu Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser Val Ser
 20 25 30

Asp Met Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala Val Leu
 35 40 45

Lys Lys Met Leu Leu
 50

<210> 4
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> module

<400> 4
 gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt 60

ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120

aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159

<210> 5
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> mCbpA

<400> 5

Ala Ala Thr Ser Ser Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser
20 25 30

Asp Ser Asp Leu Asn Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr
35 40 45

Ser Asp Gly Thr Gln Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala
50 55 60

Leu Leu Gly Asn Ser Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn
65 70 75 80

Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val
85 90 95

Glu Phe Gly Phe Ala Ser Gly Arg Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe
100 105 110

Ile Thr Ile Gln Gly Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr
115 120 125

Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val
130 135 140

Asn Pro Lys Val Thr Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr
145 150 155 160

Ala Pro Gly Pro Asp Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser Ala
165 170 175

Thr Phe Asp Lys Asn Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr Met
180 185 190

Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly Thr
195 200 205

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val Thr

210	215	220
Ile Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr Leu		
225	230	235 240
Asn Phe Asn Phe Ser Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr Val		
	245	250 255
Val Asp Thr Pro Val Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val Gln		
	260	265 270
Val Asn Ala Gly Glu Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys Val		
	275	280 285
Pro Ala Ala Gly Leu Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp Ser		
	290	295 300
Ala Ser Leu Glu Val Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn		
305	310	315 320
Pro Ser Val Asn Phe Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys Leu		
	325	330 335
Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly		
	340	345 350
Val Phe Ala Thr Ile Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr Thr		
	355	360 365
Ala Lys Val Thr Ser Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly Asp		
	370	375 380
Ala Gln Leu Gln Glu Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val Thr		
385	390	395 400
Ile Asn Pro Ile Asp Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr		
	405	410 415
Val Lys Ala Gly Glu Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser Val		
	420	425 430
Pro Ser Thr Gly Ile Ala Thr Ala Glu Ala Gln Val Ser Phe Asp Ala		
	435	440 445

Thr Leu Leu Glu Val Ala Ser Val Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn
450 455 460

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

Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Ser Lys Asp Gly
485 490 495

Val Phe Val Thr Ile Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr Val
500 505 510

Thr Thr Pro Val Thr Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly Thr
515 520 525

Leu Ala Glu Val Gln Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile Asn
530 535 540

Ile Gly Asp Pro Ile
545

<210> 6
<211> 1647
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mCbpA

<400> 6
gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaacaaaac 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 catagttga atttgattt 300

gcaagcggac gagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360

aaatcagact ggtcaaaact cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca	420
acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatatagggt gagctaaagt acttggtaca	480
gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaataccta cttctgcaac atttgataaa	540
aatgtaaact aacaagcaga tggtaaaact 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 ggaagcaca taaaattatt attcttagat	1020
gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa	1080
gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca	1140
gtagtgggtg atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaacccagg aacagtaact	1200
atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga	1260
gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct	1320
gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat	1380
atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt aataaaatta	1440
ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgaaca	1500

ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga	1560
acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc	1620
gttacaataa atattggaga tcctata	1647
<210> 7	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> P1	
<400> 7	
gcgcggatcc aagaaatgat ggtaaatgaa atagg	35
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> P2	
<400> 8	
gaaatctcat gaaaagagcg cgga	24
<210> 9	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> P3	
<400> 9	
cgctcttttc atgagatttc cttcaatt	28

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> P4

<400> 10
 gcgcgaattc gtcttttatc caaagatacc 30

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cCelE P1

<400> 11
 atatgcggcc gcatcgggaa caaagctttt g 31

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cCelE P2

<400> 12
 tttgttaaca tcaccgtaca aaatattgct gtc 33

<210> 13
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> cCelE P3

<400> 13
atattgtacg gtgatgttaa caaagatgga aagg

34

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cCelE P4

<400> 14
gcgactagt gctaaaagca tttttttaag aacag

35

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mCbpA_f

<400> 15
atatgcggcc gcgcagcgac atcatcaat

29

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mCbpA_r

<400> 16
gcgactagt gctataggat ctccaatatt tatt

34

<210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bgl1_f

<400> 17
 ggcgattca agtcccaatt caaaactata c 31

<210> 18
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bgl1_r

<400> 18
 atatgcgcc gcaatagtaa acaggacaga tgt 33