

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0112331 (43) 공개일자 2016년09월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/80 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(52) CPC특허분류 C12N 15/63 (2013.01) C12N 15/80 (2013.01)		(72) 발명자 김승욱 서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호 최한석 서울특별시 동작구 사당로23바길 9, 105동 1002호
(21) 출원번호	10-2015-0037930	(74) 대리인 한양특허법인
(22) 출원일자	2015년03월19일	
심사청구일자	2015년03월19일	

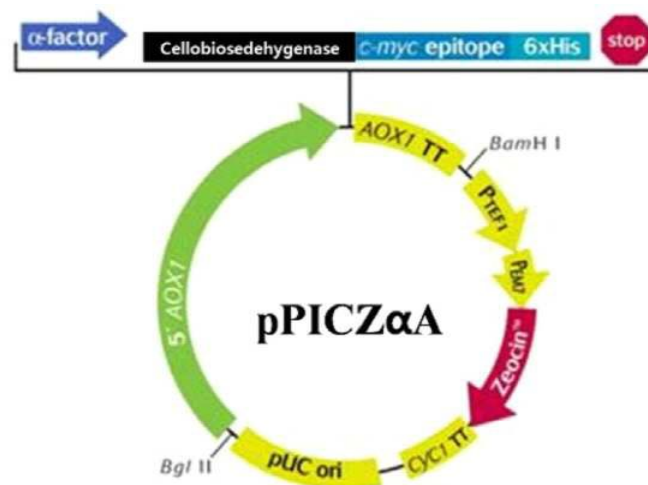
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 대량생산을 위한 메탄을 자화효모 발현**

(57) 요약

본 발명은 피키아 파스토리스를 이용한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 대량생산방법으로, 보다 상세하게는 대량생산을 위한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 발현 벡터 pPICZαA/CDH 로 형질전환된 숙주세포는 셀로비오스 디하이드로게나제를 발현하며, 단백질의 분리정제를 용이하게 하기 위해 His-tag이 결합되어 있어 비교적 간단한 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography column)을 이용해 분리정제 할 수 있는 것이 특징이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)

C12Y 101/99018 (2013.01)

C12R 1/84 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01007321

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 효소 전극 모듈 개발을 통한 친환경 효소 연료전지 및 마이크로 바이오센서 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

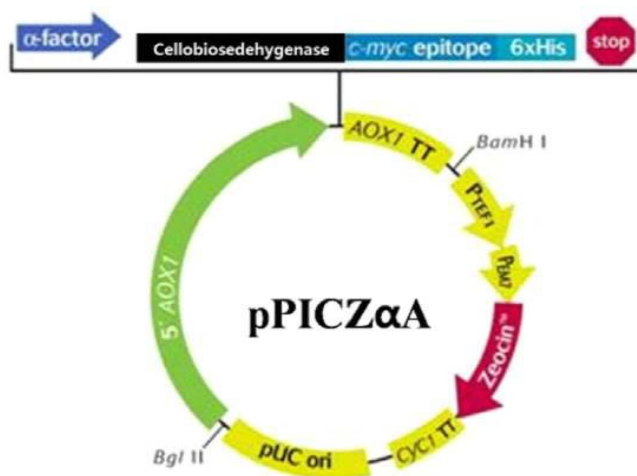
청구항 1

발현 벡터에 있어서, 백색부후균(*Phanerochate chrysosporium*) 유래의 셀로바이오스 디하이드로게나제(CDH, cellobiose dehydrogenase) 유전자를 포함하며, 상기 발현벡터는 pPICZ αA인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 발현 벡터가 하기 도 1의 개열 지도를 갖는 pPICZ αA인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터.

[도 1]



청구항 3

청구항 1의 발현 벡터로 형질 전환되는 숙주 세포.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균 및 효모로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 숙주세포.

청구항 5

청구항 3에 있어서,

상기 숙주세포는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)인 것을 특징으로 하는, 숙주세포.

청구항 6

청구항 3에 있어서,

상기 숙주세포는 수탁번호 KCTC18362P인 것을 특징으로 하는, 숙주세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피키아 파스토리스를 이용한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 대량생산방법으로, 보다 상세하게는 대량생산을 위한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*)는 목재성분을 분해하는 미생물로 리그닌 페록시다제(lignin peroxidases), 만가나제 페록시다제(manganase peroxidase), 글리옥살 옥시다제(glyoxal oxidase), 셀로비스 디하이드로게나제(cellobiosedehydrogenase) 및 자일라나제(xylanase) 등을 분비한다 (국립산림과학원 연구보고 제09-10호, 백색부후균의 분자생물학적 연구). 위와 같은 여러 종류의 효소는 리그닌 및 헤미셀룰로스의 분해하며 비슷한 활성도를 갖는 여러 종류의 효소가 포함되어 있어 분리 정제 및 특성을 파악하기가 쉽지 않다.

[0003] 백색부후균 효소 중 셀로비오스 디하이드로게나제(cellobiose dehydrogenase, CDH)는 미생물에 의한 셀룰로스(cellulose) 분해반응에서 세포외부로 분비되는 효소로서 여러 미생물들이 셀로비오스 디하이드로게나제를 생산한다고 보고되었고, 바이오 연료(biofuel), 바이오 리파이너 분야에 적용 하여 특성파악 및 대량 생산에 관한 연구가 점차 증가하는 추세에 있는 등 그 산업적 가치는 날로 증가하고 있다. 그러나 현재까지 미생물에 의한 셀로비오스 디하이드로게나제의 생산량이 매우 낮고, 상업적으로 판매되는 셀로비오스 디하이드로게나제 제품이 없는 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) 국립산림과학원 연구보고 제09-10호, 백색 부후균의 분자생물학적 연구, 2009년

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 백색 부후균으로부터 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 분리하고, 이를 발현 벡터를 이용하여 재조합시킨 후 메탄올 자화 효모를 이용하여 셀로비오스 디하이드로게나제를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 발현 벡터에 있어서, 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래의 셀로바이오스 디하이드로게나제(CDH, cellobiose dehydrogenase) 유전자를 포함하며, 상기 발현벡터는 pPICZ αA인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 제공한다.

[0007] 일 구현예는 발현 벡터가 도 1의 개열 지도를 갖는 pPICZ αA인 것일 수 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질 전환되는 숙주세포를 제공한다.

[0009] 일 구현예는 숙주세포가 대장균, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균 및 효모로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0010] 다른 일 구현예는 숙주세포가 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)인 것일 수 있다.

[0011] 또 다른 일 구현예는 숙주세포가 수탁번호 KCTC18362P인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 재조합 발현 벡터 pPICZ αA/CDH 로 형질전환된 숙주세포는 셀로비오스 디하이드로게나제를 발현하며, 단백질의 분리정제를 용이하게 하기 위해 His-tag이 결합되어 있어 비교적 간단한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography column)을 이용해 분리정제 할 수 있는 것이 특징이다.

[0013] 따라서, 본 발명에 따라 생산된 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제는 바이오 센서, 바이오 연료전지, 바이오

리파이너리 등 다양한 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 재조합 벡터(pPICZ αA/CDH를 포함)의 제조 모식도를 도시한 것이다.
- 도 2은 재조합벡터에서 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자가 클로닝된 형질 전환체를 선별하기 위해 PCR 반응을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3는 본 발명의 피키아 파스토리스(형질전환된 숙주세포)에서 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제의 발현 여부를 SDS-PAGE 방법으로 확인한 것을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 재조합 단백질 CDH 활성을 측정 하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 피키아 파스토리스를 이용한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 대량생산방법으로, 보다 상세하게는 대량생산을 위한 백색부후균 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.
- [0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0017] 본 발명은 백색 부후균(*Phanerochate chrysosporium*) 유래의 셀로비오스 디하이드로게나제(CDH) 단백질을 제공한다. 상기 백색 부후균은 기탁번호 ATCC 32629일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 셀로비오스 디하이드로게나제 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 상기 유전자는 셀로비오스 디하이드로게나제 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 본 발명에 따른 셀로비오스 디하이드로게나제 코딩 유전자는 총 2314bp 의 뉴클레오티드로 구성되어 있다. 여기서 cDNA는 전령 RNA(mRNA)를 주형으로 역전사 효소와 DNA 중합효소에 의하여 합성된 DNA이다.
- [0019] 본 발명은 재조합 발현 벡터를 제공한다. 여기서 "발현 벡터"는 외래 유전자를 숙주 세포로 도입하고 발현시킬 수 있는 DNA 분자를 의미하는 것으로서, 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 이러한 발현 벡터의 조절 서열에 본 발명의 재조합 단백질을 코딩하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 수득한 DNA 분자를 "재조합 발현 벡터"라 한다.
- [0020] 상기 발현 벡터는 백색부후균(*Phanerochate chrysosporium*) 유래의 셀로바이오스 디하이드로게나제(CDH, cellobiose dehydrogenase) 유전자를 포함하며, 상기 발현벡터는 pPICZ αA인 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 메탄올 자화 효모에서 발현시키기 위한 재조합 플라스미드 제작에 사용된 pPICZ αA 벡터는 AOX (alcohol oxidase) 프로모터, α-인자 분비 신호 서열 (α-factor secretion signal), C-말단의 폴리 히스티딘 부위 (6×His), AOX의 전사 종결 부위 및 선별 표지 유전자로서 제오신(zeocin) 저항성 유전자를 포함한다. 상기 AOX 프로모터는 비-탄소원이 존재할 때는 유전자 발현을 억제하고, 메탄올 첨가에 의해서만 발현이 유도되므로 하류에 연결된 유전자의 발현을 정교하게 조절할 수 있고, 피키아(Pichia) 속 효모에서 목적하는 외래 유전자를 높은 수준으로 발현시키는 장점을 갖는다. 또한, α-인자 분비 신호 서열은 균주로부터 대부분의 단백질을 분비형으로 얻을 수 있도록 하며, 6 ×His 부위는 재조합 단백질의 분리를 용이하게 하고, AOX의 전사 종결 부위는 mRNA의 폴리아데닐화와 같은 mRNA 프로세싱을 통해 안정성을 높이는 역할을 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질 전환되는 숙주 세포를 제공한다. 상기 숙주 세포는 원핵 생물 또는 진핵 생물 세포일 수 있다. DNA의 도입 효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 대장균, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들을 사용할 수 있다. 상기 숙주세포는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)가 바람직하며, 특히 수탁번호 KCTC18362P인 것이 더 바람직하다.
- [0023] 숙주 세포로 형질 전환하는 방법은 통상의 형질 전환 방법, 예를 들면 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 전기천공(electroporation), DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium phosphate transfection)을 사용할 수 있다. 당업

계에 공지된 바를 참조하여 숙주 세포 및 발현 벡터 등의 종류에 따라 또 다른 최적의 형질전환 방법을 도입할 수도 있다.

[0024] 형질 전환된 숙주 세포들은 본 발명에 따른 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제의 생산에 적합한 영양 배지에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포들은 적합한 배지와 재조합 단백질의 발현 및/또는 분리를 용이하게 하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해 배양될 수 있다. 배양은 공지 기술을 사용하여 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적합한 영양 배지에서 수행한다.

[0025] 형질 전환된 숙주 세포에서 생산된 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제는 통상의 단백질 분리방법을 이용하여 분리할 수 있으며, 본 발명에서는 특히 His-tag이 결합되어 있어 비교적 간단한 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography column)을 이용해 분리정제 할 수 있다.

[0026] 본 발명의 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제는 약 100 kDa의 분자량을 가지며, 셀로비오스 디하이드로게나제 고유의 생리활성을 가지고 있다.

[0027] 이하, 본 발명을 실시예를 이용하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 다양하게 수정 및 변경될 수 있다.

[0028] 실시예 1. 곰팡이 균주 및 배양

[0029] 본 발명에 사용된 백색부후균(*Phanerochate chrysosporium*) ATCC 32629 균주는 한국 미생물 보존센터 (KCCM)에서 분양 받았다. 상기 백색부후균을 배양하기 위하여, PDA(Potato dextrose agar) 배지에 27℃에서 배양을 하였다. RNA 추출을 위해, 상기 PDA 배지에 PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) 액체배지에 접종하여 27℃ 진탕 배양기에서 150 rpm으로 3 일간 배양하였다.

[0030] 실시예 2. 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자 클로닝

[0031] 셀로비오스 디하이드로게나제는 RNA Kit(퀴아젠, 미국)를 사용하여 수득하였다. 상기 RNA에서 상보적 DNA를 얻기 위해 역전사 중합효소 연쇄 반응(Reverse transcription polymerase chain reaction RT-PCR)를 수행하였다.

[0032] 셀로비오스 디하이드로게나제 cDNA를 증폭하기 위하여 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 수행하였다. 주형 (template)으로는 셀로비오스 디하이드로게나제 cDNA를 이용하였으며, PCR용 정방향 프라이머 5'-ATGCTAGGTCGATCGTTACTTGC-3' 서열번호 1) 및 역방향 프라이머 5'-TCAAGGACCTCCGCAAGC-3' 서열번호 2)를 이용하였다. PCR 조건은 열순환기(Mycycler, Bio-Rad, 미국)를 이용하여, Taq DNA 중합효소 1 unit를 포함하는 PCR 완충용액 (10mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 20mM Tris-Cl, 50mM KCl)에 상기 주형과 프라이머를 첨가하여 94℃에서 5분간 변성시킨 후, 94℃ 1분, 59℃ 1분, 74℃ 2분30초로 30 사이클을 수행하고, 최종적으로 74℃ 에서 5분간 반응시켰다. 상기와 같은 PCR을 통해 약 2300bp의 산물이 증폭되었다.

[0033] 증폭된 셀로비오스 디하이드로게나제 cDNA를 라이브러리 제작하기 위해 pGEM T-easy 클론 벡터를 이용 하였다. pGEM T-easy/CDH를 대장균에서 대량으로 증식시키기 위해, *E.coli*DH5 α를 형질전환시켰다. *E.coli*DH5 α에 도입한 후, SOC 배지를 첨가하여 가볍게 흔들어 주면서 37℃에서 약 1시간 배양함으로써 회복시켰다. 형질전환 된 대장균을 회복시킨 후, 25 μg/ml의 제오신 (zeocin)을 함유하는 저염(low-salt) LB 배지 (Luria Bertani media broth)에 도말 하여 37℃에서 배양하고, 콜로니 (colony)를 형성한 형질전환체를 선별하였다. 이들 중 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자가 제대로 클로닝된 형질전환체를 선별하기 위해 약 10개의 콜로니를 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 조건 및 프라이머는 상기 조건과 동일하게 사용하였다. PCR 산물에 대한 아가로스 겔 전기영동 결과, 2개의 콜로니에서 약 2300bp의 셀로비오스 디하이드로게나제가 증폭되었으며, 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

[0034] 실시예 3. 재조합 벡터(pPICZ αA/CDH)의 제조

[0035] 재조합 벡터는 pPICZ αA(인비트로젠사, 미국)에 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자를 삽입하여 제조하였다(도 1).

[0036] pGEM-T easy/CDH에 있는 셀로비오스 디하이드로게나제 DNA를 제한효소 EcorI(Invitrogen)으로 처리한 다음 동일 제한효소를 처리한 pPICZ αA 발현 벡터에 T4 DNA 라이게이즈(써모사, 미국)를 처리하여 pPICZ αA/CDH를 제조하였다. 열처리 방법으로 대장균 균주 *E.coli* DH5 α(Ecos 101, Yeastern)에 pGAPZ αA/CDH 형질전환시킨 후, 형질 전환체를 제오신을 포함하는 저염(low salt) LB 평판배지(1 % 트립톤, 0.5 % 효모 추출액, 0.5 % 염화나트륨, 1.5% 아가)에서 선별하였다. 선별된 클론은 PCR을과 제한효소처리를 통한검증실험으로 확인하였다.

[0037] 이때 PCR 조건은 상기 조건과 동일하게 하였으면 프라이머는 하기 표 1을 사용하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0038] 도 2은 재조합벡터에서 셀로비오스 디하이드로게나제 유전자가 클로닝된 형질 전환체를 선별하기 위해 PCR 반응을 수행한 결과를 나타낸 것이다:

[0039] M: 크기표지

[0040] L1: 프라이머 정방향 AOX, 역방향 AOX

[0041] L2: 프라이머 정방향 AOX, 역방향 CDH

[0042] L3: 프라이머 정방향 a-Factor, 역방향 CDH

[0043] L4: 프라이머 CDH 정방향, 역방향

표 1

프라이머 종류	시발체	서열
AOX	정방향	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' 서열번호 3)
AOX	역방향	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 서열번호 4)
a-Factor	정방향	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3' 서열번호 5)
CDH	정방향	5'-ATGCTAGGTCGATCGTTACTTGC-3' 서열번호 6)
CDH	역방향	5'-TCAAGGACCTCCCGCAAGC-3' 서열번호 7)

[0045] 최종적으로 셀로비오스 디하이드로게나제 DNA가 삽입된 재조합 벡터(pPICZ αA/CDH)와 형질전환체(pPICZ αA/CDH, *E.coli* DH5 α)를 확보하였다

[0046] **실시예 4. 셀로비오스 디하이드로게나제를 발현하는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 제조(수탁번호 KCTC18362P)**

[0047] 실시예 3에서 대량 정제된 pPICZ αA/CDH를 제한효소 Pme I 으로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들었다. 형질전환될 효모 균주로 피키아 파스토리스 X-33 (Invitrogen, 미국)을 YPD (yeast extract, peptone, dextrose) 배지에 10 ml에 접종 후 30 °C에서 200-250 rpm으로 12 - 14시간동안 진탕 배양하였다. 배양액을 YPD 배지 10 ml에 흡광도(OD₆₀₀) 0.1 - 0.2정도로 희석한 후 30 °C에서 지수증식기 (log phase)인 흡광도(OD₆₀₀) 1.0~1.3까지 배양하여 4°C 1500 x g로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 배양된 균주를 4°C, 1500×g로 5분간 원심분리하고 차가운 멸균 증류수로 펠렛을 녹이는 과정을 2회 반복하였다. 이후 1M의 솔비톨 (sorbitol)을 처리한 후 상기 원심분리 과정을 반복하여 최종 부피 0.5ml가 되는 컴피턴트 세포를 얻었다. 상기 컴피턴트 세포 80μl에, 제한효소 Pme I 을 처리하여 선형으로 만든 pPICZαA/CDH 10μl(5~10ug)를 혼합하여 0.2 cm 전기천공 큐벳 (electroporation cuvette)에 넣고 얼음에서 5분간 방치한 후 1.5 kV, 2000Ω의 조건으로 전기천공법을 통해 형질전환 시켰다. 즉 시, 1ml의 1M 솔비톨을 첨가하여 멸균된 튜브로 옮긴 후 30°C에서 1~2시간 정지 배양하여 세포들을 회복시켰다. 배양액 50~200μl를 100μg/ml의 제오신을 함유하는 YPDS (yeast extract, peptone, dextrose, sorbitol) 고체 배지에 도말한 후 30°C에서 콜로니가 형성될 때까지 2~3일간 배양하였다.

[0048] **실시예 5. SDS-PAGE를 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제 분석**

[0049] 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 기준으로 사용한 브래드포드 방법으로 정량하였다. 총 75mg/L의 단백질 추출물과 32mg/L의 정제된 재조합 단백질은 SDS-PAGE(dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 10% 젤)를 이용하여 분석하였다. SDS-PAGE 후에, 단백질 젤은 메탄올이 함유된 쿠마시 브릴리언트 블루 R250(Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 염색하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0050] 도 3는 본 발명의 피키아 파스토리스(형질전환된 숙주세포)에서 재조합 셀로비오스 디하이드로게나제의 발현 여부를 SDS-PAGE 방법으로 확인한 것을 나타낸 것이다:

[0051] M: 크기 표지

[0052] L1: 정제 전 셀로비오스 디하이드로게나제

[0053] L2: 정제 후 셀로비오스 디하이드로게나제

[0054] 실시예 6. 셀로비오스 디하이드로게나제 활성 분석

[0055] 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도는 전자 수용체인 2,6-디클로로페놀-인도페놀의 흡광도 감소로 측정하였다. 3 mM의 2,6-디클로로페놀-인도페놀 0.1 mL, 300 mM의 락토스 0.1 mL, 0.1 M의 나트륨-아세트산 완충용액 (pH 4.0) 0.8 mL, 및 생산된 셀로비오스 디하이드로게나제 10 mg/L을 첨가하여 55℃에서 5분간 반응시킨 후 520 nm에서 반응 전/후의 흡광도 감소를 측정하였다. 감소된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 측정하였고, 1유닛(unit)의 효소 활성도는 1분간 1 μmol의 2,6-디클로로페놀-인도페놀(2,6-Dichloroindophenol indophenols)을 환원시키는 효소의 양으로 계산하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

수탁번호

[0056]

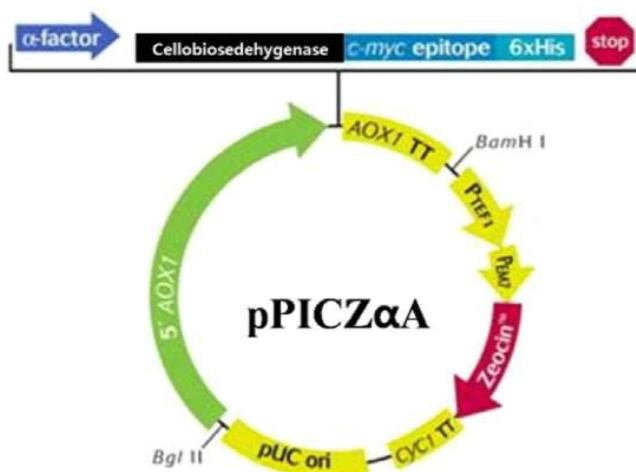
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18362P

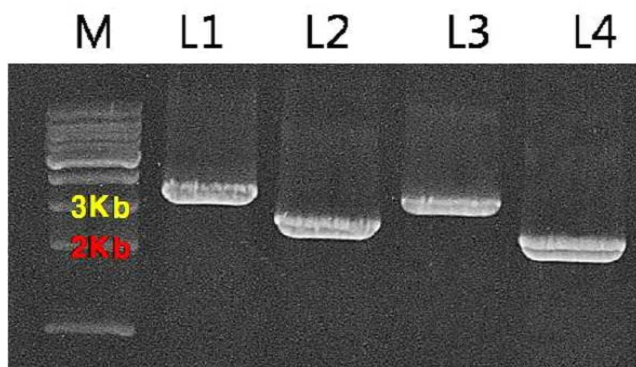
수탁일자 : 20150317

도면

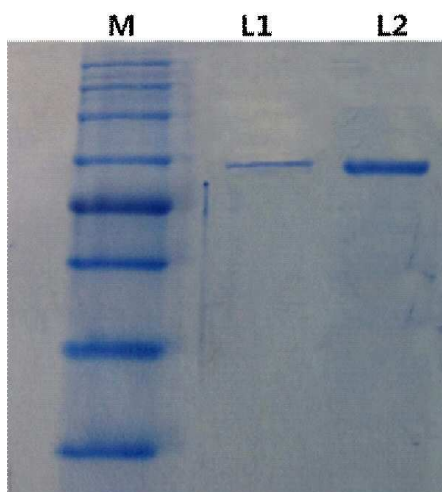
도면1



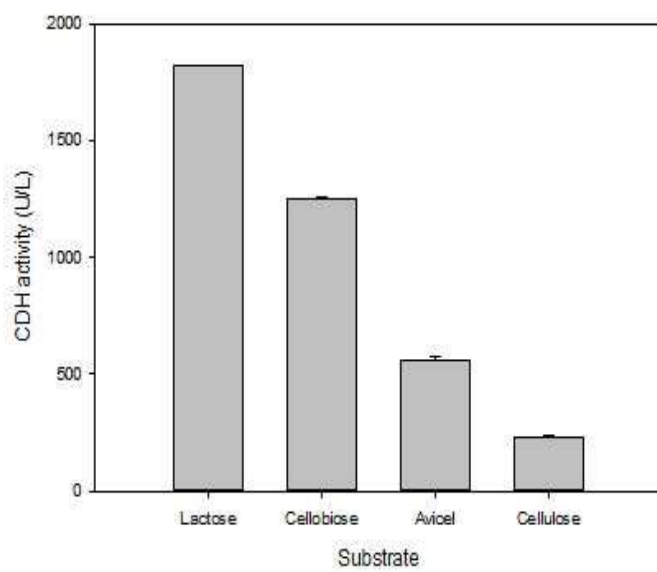
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	EXPRESSION OF RECOMBINANT CELLOBIOSE DEHYDROGENASE FROM PHANEROCHATE CHRYSOSPORIUM IN PICHIA PASTORIS FOR MASS PRODUCTION	
<130>	HY150232	
<160>	7	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	1	
	atgctaggtc gatcggttact tgc	23
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
	tcaaggacct cccgcaagc	19
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AOX primer	
<400>	3	
	gactggttcc aattgacaag c	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AOX primer	
<400>	4	

gcaaattggca ttctgacatc c	21
<210> 5	
<	
211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> a-Factor primer	
<400> 5	
tactattgcc agcattgctg c	21
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CDH primer	
<400> 6	
atgctaggtc gatcggttact tgc	23
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CDH primer	
<400> 7	
tcaaggacct cccgcaagc	19