



- (51) 국제특허분류:
C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C07K 14/33 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003389
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 1일 (01.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0184782 2015년 12월 23일 (23.12.2015) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 한성옥 (HAN, Sung Ok); 02714 서울시 성북구 길음로 119, 209-1503, Seoul (KR). 강대희 (KANG, Dae-Hee); 12728 경기도 광주시 초월읍 지월로 55 번길 24, 103-1203, Gyeonggi-do (KR). 현정은 (HYEON, Jeong-Eun); 02843 서울시 성북구 인촌로 13 길 18-21, 1층, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

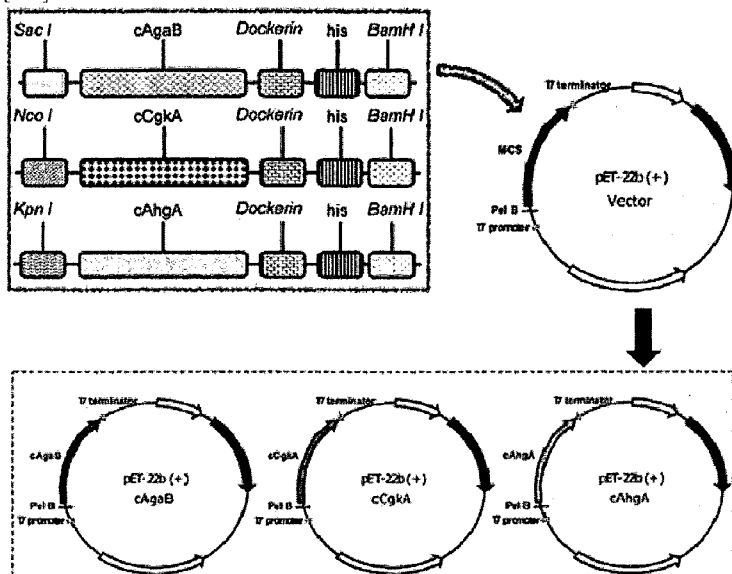
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ENZYME COMPLEX COMPRISING BETA-AGARASE, KAPPA-CARRAGEENASE AND ANHYDRO-GALACTOSIDASE, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제 및 무수갈락토시다아제를 함유하는 효소 복합체 및 그 용도

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to: an enzyme complex in which chimeric beta-agarase, in which beta-agarase and a dockerin module of endo-β-1,4-glucanase-B are fused, chimeric kappa-carrageenase, in which kappa-carrageenase and a dockerin module of endo-β-1,4-glucanase-B are fused, chimeric anhydro-galactosidase, in which anhydro-galactosidase and a dockerin module of endo-β-1,4-glucanase-B are fused, and small cellulose binding protein A are bound; and a method for degrading red algal biomass by using the same. According to the present invention, it is expected that, in the production of agar degradation products, introducing a degradation step using an enzyme to a conventional method having relied on physical and chemical pre-treatment steps, would greatly contribute to effective conversion of marine algae into valuable products by using an ecofriendly degradation system having excellent efficiency, control over a product, convenient usability and a low-cost and high-efficiency property.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 카파-카라기나아제, 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 무수갈락토시다아제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체 및 이를 이용한 홍조류 바이오매스의 분해 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 아가 분해 생산물 제조에 있어서 물리적, 화학적 전처리 공정에 의존하였던 기존의 방식에서 엔자임을 이용한 분해 공정을 도입함으로써 뛰어난 효율성, 생산물의 제어, 간편한 활용성, 저비용 고효율의 친환경적 분해 시스템을 이용하여 해양조류부터 가치 있는 생산물을 효율적으로 전환하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제 및 무수갈락토시다아제를 함유하는 효소 복합체 및 그 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 키메릭 카파-카라기나아제 및 키메릭 베타-아가레이즈 및 키메릭 무수갈락토시다아제를 함유하는 효소 복합체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제, 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합 되어 있는 효소 복합체 및 이를 이용한 홍조류 바이오매스의 분해 방법에 관한 것이다.
- [2] **배경기술**
- [3] 한천(agar)은 홍조류의 세포벽에서 주로 발견되는 다당류로, 일종의 식이섬유원이며, 주로 미생물 배양을 위한 고체 배지에 사용되고, 제과, 제육가공에서는 안정제로 사용되며, 화장품이나 음식물에서는 겔화제로 사용되기도 한다. 이러한 아가는 약 70%의 아가로스(agarose)와 약 30%의 아가로펙틴(agarpectin)으로 구성되어 있다. 상기 아가로스는 중성 다당류로서, 아가로스 내에는 갈락토스(galactose)간의 α -1,3 결합과 β -1,4 결합이 번갈아 존재하고 있다. 한편, 아가로펙틴은 산성 다당류로서, 아가로펙틴은 아가로스에 황산기, 구체적으로 황산염, 글루콘 산(gluconic acid)이나 피루베이트(pyruvate)가 결합된다. 아가로스 이외 홍조류의 다른 구성물 중 카라기난(Carrageenan)은 선형 다당류로서 갈락토스 잔기로 연결된 갈락탄 구성물인데, 보다 정확하게는 α -1,3 결합과 β -1,4 결합이 번갈아가며 결합된 갈락토스 잔기가 연결된 갈락탄이다. 그 구조적으로는 아가로스와 동일하나, 3,6-anhydro-D-galactose와 sulphate ester 그룹이 모든 혹은 몇몇 갈락탄 유닛에 결합되어 있는 형태가 나타나며, 잔기의 위치에 따라 구조적인 변형이 되는 것이 차이점이다. 대표적인 이상화된 구조로는 카파(Kappa), 아이오타(Iota), 람다(Lambda)구조가 있다.
- [4] 한천을 분해하는 효소인 아가레이즈는 아가로스의 갈락토스 중합체 내의 β -1,4 결합을 분해하여 네오아가로올리고당으로 가수분해하여 이당 혹은 삼당의 갈락토스 잔기를 만들어내며, 카파-카라기난을 분해하는 효소인 카파-카라기나아제는 카파-카라기난의 3,4-결합 갈락토스 유닛을 끊어냄으로 이당류의 카라기난 잔기를 만들어낸다.
- [5] 또한, 신규 효소 무수갈락토시다아제는 베타-아가레이즈와 카파-카라기나아제 효소로 가수분해된 가수분해물인 네오아가로올리고당의 1,3- α -3,6-l-galacosidic

결합을 끊어내는 역할을 하여 당당류로 분해시킴으로써 발효가능 당 전환이 가능하다.

- [6] 한편, 목질계 섬유소는 식물의 세포벽의 구성 성분이며 셀룰로즈와 헤미셀룰로즈의 복합체로 이루어져 있다. 셀룰로즈는 β -1,4-glucose 복합체이며 자연상태에서 가장 풍부한 재생 가능한 물질이다(Reiter et al. Curr Opin Plant Biol 5: 536, 1998). 비록 화학적 구성은 단순하지만 효율적으로 셀룰로즈를 분해하기 위해서는 여러 개의 다른 효소들의 작용이 필요하다(Ximenes et al. Hemicellulases and biotechnology. Recent Res Develop Microbiol 2:165, 1998). 헤미셀룰로즈에는 β -1,4-xylose인 자일란과 β -1,4 glucose, mannose인 글루코만난 등이 있다. 대부분의 셀룰로즈를 분해 할 수 있는 혐기성 미생물들은 셀룰로좀이라는 효소복합체를 형성한다(Roy H. Doi, The Chemical Record 1:24, 2001). 셀룰로좀은 결정형 셀룰로즈나 자일란, 만난, 펙틴과 같은 다양한 기질에 대하여 작용하고 셀룰로좀 형성 효소들과 지지체 단백질로 이루어져 있다. 셀룰로좀의 형성은 하나의 셀룰로좀 형성 효소의 도커린 모듈과 지지체 단백질의 여러 개의 코히신 모듈 중 하나의 결합으로 이루어진다. 모든 셀룰로좀 형성 효소들은 도커린 모듈을 가지고 있고 도커린 모듈이 없는 효소들은 비셀룰로좀 형성 효소이다(Bayer et al. Annual Review of Microbiol 58:521, 2004).
- [7] 기존 기술에서는 한천 분해효소 베타-아가레이즈를 이용한 효소 복합체를 통해 한천 분해능을 증진한 연구와 카라기난 분해효소인 카파-카라기나아제와 람다-카라기나아제를 이용한 효소 복합체를 통해 카라기난 분해능을 증진한 것을 선행연구로 다루고 있다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 기존 효소들과 신규 효소의 조합으로 고효성 가수분해 효소 복합체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 베타-아가레이즈, 카파-키라가나아제 및 무수갈락토시다아제를 함유하는 효소 복합체가 높은 홍조류 바이오매스 분해능을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [9] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.
- [10]
- [11] **발명의 요약**
- [12] 본 발명의 목적은 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제 및 무수갈락토시다아제를 함유하는 홍조류 바이오매스 분해능이 우수한 효소 복합체를 제공하는데에 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 효소 복합체를 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미생물을 제공하는데에 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 효소 복합체의 제조방법을 제공하는데에 있다.

- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 효소 복합체를 이용하여 홍조류 바이오매스를 분해하는 방법을 제공하는데에 있다.
- [16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제, 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합 되어 있는 효소 복합체를 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한, 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈를 코딩하는 유전자, 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제를 코딩하는 유전자, 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A를 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미생물을 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한, 상기 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 효소 복합체를 이용하여 홍조류 바이오매스를 분해하는 방법을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명에서 제시된 키메릭 카파-카라기나아제, 키메릭 베타-아가레이즈, 키메릭 무수갈락토시다아제 유전자 및 소형 골격 단백질 miniCbpA 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+)-cCgkA, pET22(+)-cAgaB, pET22(+)-cAhgA 및 pET22b(+)-mCbpA의 모식도이다.
- [22] 도 2는 본 발명에서 제시된 키메릭 재조합 벡터 pET22b(+)-cCgkA, pET22b(+)-cAgaB, pET22b(+)-cAhgA 및 pET22b(+)-mCbpA의 크기를 확인한 SDS-PAGE 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- [23] 도 3의 A는 소형 골격 단백질 miniCbpA의 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module;CBM)을 이용한 정제결과를 나타낸 것이고, B는 Ni-NTA(Nickel-nitrilotriacetic acid;NTA)를 이용한 정제 결과를 나타낸 것이다. 또한, C는 다양한 조합의 가수분해 효소 복합체의 크기를 확인하기 위한 Non-denaturing PAGE 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 4의 A는 다양한 조합의 가수분해 효소 복합체의 아가와 카라기난 기질에서의 환원당 측정 결과를 나타낸 것이며, B는 다양한 조합의 가수분해 효소 복합체의 아가 기질에서의 환원당 측정 결과를 나타낸 것이다. 또한, C는 다양한 조합의 가수분해 효소 복합체의 카라기난 기질에서의 환원당 측정

결과를 나타낸 것이다.

- [25] 도 5의 A는 아가와 카라기난 기질에서, 혹은 아가 기질에서, 혹은 카라기난 기질에서의 mCbpA, cCgkA, cAgaB 및 cAhgA 조합의 가수분해 효소 복합체를 이용한 환원당 생산 평균을 단합체효소(monomeric enzyme)를 이용한 환원당 생산 평균과 비교한 결과를 나타낸 것이며, B는 아가와 카라기난 기질에서의 mCbpA, cCgkA, cAgaB 및 cAhgA 조합의 가수분해 효소복합체를 이용한 환원당 생산값을 단합체효소(monomeric enzyme) cAgaB를 이용한 환원당 생산값과 비교한 결과를 나타낸 것이다.

- [26] 도 6은 본 발명의 전체적인 공정 전략도를 나타낸다.

[27]

- [28] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

- [29] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [30] 본 발명에서는 한천 분해효소인 베타-아가레이즈와 카라기난 분해효소인 카파-카라기나아제와 함께 신규 효소인 무수갈락토시다아제를 이용한 효소 복합체를 통해 한천 분해에 더욱 효과적인 가수분해능을 갖도록 하는 연구를 진행하였다. 기존 기술에서 개발된 효소복합체는 효소-기질 특이성에 의한 제한된 기질에서의 각각의 가수분해 활성을 보였다면, 본 발명에서는 선행 연구를 통해 개발된 복합체 기술을 응용하여 한천 가수분해를 서로 다른 효소들의 단계적인 가수분해 과정을 통하여 기존 기술 결과보다 향상된 가수분해능을 가진 고효율 가수분해 효소 복합체 기술을 보여준다. 따라서 본 발명에 따른 고효율 가수분해 효소 복합체를 이용하여 저부가가치의 한천을 고부가가치의 발효성 단당과 무수갈락토오스로의 효율적인 전환의 가능성을 제시한다.

- [31] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 베타-아가레이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제, 무수갈락토시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체에 관한 것이다.

- [32] 본 발명에 있어서 상기 무수갈락토시다아제는 조벨리아 갈락토니보란스(*Zobellia galactanivorans*) 또는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 또는 아가리보란스 길버스(*Agarivorans gilvus*)로부터 유래한 것을 특징으로 할 수 있다.

- [33] 본 발명에서 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈이란 클로스트리디움 속의

셀룰로즈-결합 단백질의 일부분인 코히즌 모듈과의 상호작용으로 효소 복합체인 셀룰로솜을 형성하는 섬유소 분해효소인 셀룰라아제(cellulosomal cellulase) 단백질이 가지는 모듈을 의미한다.

- [34] 본 발명에서 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A는(mCbpA)는 셀룰로솜 기본골격 소단위체를 만드는 셀룰로즈에 결합하는 단백질을 의미하며, 본 발명에서 사용한 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A는 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.
- [35] 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.
- [36] 본 발명은 다른 관점에서, 베타-아가레이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈를 코딩하는 유전자, 카파-카라기나아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제를 코딩하는 유전자, 무수갈락토시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A를 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [37] 본 발명에서 용어 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능 할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 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.
- [38] "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합

부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 $SR\alpha$ 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.

- [39] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다.
- [40] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결 (operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합 될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나, 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [41] 본 명세서에 사용된 용어 "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 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.
- [42] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는

전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다.

바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 고풍이 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다.

- [43] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다.

- [44] 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서는, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성 있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩 시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 조건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다. 이들 변수의 범위 내에서, 당업자는 본 발명의 DNA 서열을 발효 또는 대규모 동물 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다. 발현 클로닝에 의해 NSP 단백질의 cDNA를 클로닝 하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.

- [45] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

- [46] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 효소 복합체를 이용하여 홍조류 바이오매스를 분해하는 방법에 관한 것이다.

- [47] 본 발명에 있어서, 상기 홍조류 바이오매스는 아가나 카라기난인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [48] 아울러, 본 발명에서는 셀룰로즈 결합 모듈(CBM)을 이용한 가수분해 효소 복합체의 분리정제를 수행하였으며, 수득된 mCbpA, cCgkA, cAgaB 및 cAhgA 조합의 가수분해 효소 복합체가 순수한 베타-아가레이즈 cAgaB보다 아가와 카라기난 기질에서 3.9배 높은 환원당 생산값을 가지는 것을 확인하였다.

- [49]

- [50] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는

오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[51]

[52] 실시예 1: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자, 카파-카라기나아제와 베타-아가레이즈 및 무수갈락토시다아제 유전자의 증폭

[53] 한천 분해 효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열 서열번호 4를 참고로 하여 서열번호 6의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 슈도알테로모나스 카라기노보라로부터 유래한 카파-카라기나아제 CgkA와 조벨리아 갈락타니보란스로부터 유래한 베타-아가레이즈 AgaB 그리고, 무수갈락토시다아제 AhgA 유전자의 C-terminal 부분에서 각각 10bp 크기의 서열이 들어가도록 하고, 서열번호 7의 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 212bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 각각 확인할 수 있었다.

[54] 프라이머 서열번호 6: GCGCggatccATTCACCGCAAT

[55] 프라이머 서열번호 7: ATATccatggATGCATCTATGCAACC

[56] 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 키메릭 카파-카라기나아제 cCgkA 유전자를 클로닝하기 위하여 조벨리아 갈락토니보란스의 지노믹디엔에이로부터 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 서열번호 8의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 SacI, 서열번호 9의 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 NotI 인식서열이 삽입되도록 하고, 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입된 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여서 그 결과 1311bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 키메릭 카파-카라기나아제 cCgkA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[57] 프라이머 서열번호 8: ccatggATTCTCAATCGGCTATTTAAAGTA

[58] 프라이머 서열번호 9: ggatccACGAACACTATGACGTGAATTTTCT

[59] 또한, 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 베타-아가레이즈 cAgaB 유전자를 클로닝하기 위하여 조벨리아 갈락토니보란스의 지노믹디엔에이로부터 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 서열번호 10의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 SacI, 서열번호 11의 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp

크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 그 결과 1201bp의 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 베타-아가레이즈 cAgaB 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[60] 프라이머 서열번호 10: GCGCgagctcCGGCGACAATTCAAAATTTGATA

[61] 프라이머 서열번호 11: CAGCggtaccTTTCTCTACAGGTTTATAGATC

[62] 또한, 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 무수갈락토시다아제 cAhgA 유전자를 클로닝하기 위하여 조벨리아 갈락토니보란스의 지노믹디엔에이로부터 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 서열번호 12의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 EcoRI, 서열번호 13의 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 HindIII 인식서열이 삽입되도록 하고, 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입된 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여서 그 결과 1382bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 키메릭 무수갈락토시다아제 cAhgA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[63] 프라이머 서열번호 12: GCGCgaattcGATGAACAAATACTCCCAATTTTAAAT

[64] 프라이머 서열번호 13: tgtaacatcTTGTTTTTTTACTCCTTTAGCTA

[65] 그리고 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히진 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 서열번호 14의 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 BamHI, 서열번호 15의 역방향 프라이머(Reverse primer)에는 제한효소 KpnI 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 그 결과 1647bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[66] 프라이머 서열번호 14: ggatccGCAGCGACATCATCAAT

[67] 프라이머 서열번호 15: GCGCggtaccGCTATAGGATCTCCAATATTTATT

[68]

[69] 실시예 2: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인과 연결된 유전자의 클로닝

[70] 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 각각의 CgkA, AgaB와 AhgA 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[71] 그 후 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 카파-카라기나아제, 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 베타-아가레이즈, 섬유소

분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 무수갈락토시다아제 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(overlap) PCR 반응을 각각 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 서열번호 16의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 SacI, 서열번호 17의 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 1311bp의 키메릭 카파-카라기나아제 cCgkA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 각각 확인할 수 있었다.

[72] 프라이머 서열번호 16: ATATccatggATGCATCTATGCAACC

[73] 프라이머 서열번호 17: GCGCg gatccATTCACCGCAAT

[74] 서열번호 18의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 SacI, 서열번호 19의 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 SalI 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 1217bp의 키메릭 베타-아가레이즈 cAgaB 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 각각 확인할 수 있었다.

[75] 프라이머 서열번호 18: GCGCgagctcCGGCGACAATTCAAAATTTGATA

[76] 프라이머 서열번호 19:

GCGCg gccgcTCAATGATGATGATGATGATGTAAAAGCATTTTTTTTAAG

[77]

[78] 서열번호 20의 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 EcoRI, 서열번호 21의 역방향 프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Hind III 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 1382bp의 키메릭 무수갈락토시다아제 cAhgA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 각각 확인할 수 있었다.

[79] 프라이머 서열번호 20: GCGCgaattcGATGAACAAATACTCCCAATTTTTTAAT

[80] 프라이머 서열번호 21: GCGCaagcttTAAAAGCATTTTTTTAAGAACAGCTA

[81] 그 후, 키메릭 카파-카라기나아제 cCgkA, 키메릭 베타-아가레이즈 cAgaB와 키메릭 무수갈락토시다아제 cAhgA 유전자는 각각의 제한효소로 절단한 후 대장균 발현 벡터(E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, E.coli) DH5α에 형질전환을 하였다. 이어 재조합 미생물로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+)/cCgkA, pET22(+)/cAgaB와 pET22(+)/cAhgA라 명명하였다(도 1). 그리고 상기 대장균 재조합 미생물을 DH5α/cCgkA, DH5α/cAgaB와 DH5α/cAhgA라 명명하였다.

[82]

- [83] 실시예 3: 대장균 재조합 미생물의 활성 측정
- [84] 실시예 2에서 확보한 대장균 재조합 미생물을 IPTG로 발현 유도하여 cCgkA와 cAgaB 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 28°C에서 90분 동안 진탕배양 후 원심분리하여 세포내 단백질을 sonication을 통하여 분해하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) cCgkA, cAgaB 효소 단백질을 얻었다. 다만, cAhgA 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건은 상기 cCgkA와 cAgaB 보다 낮은 온도인 16°C에서 240분 이상 진탕배양 후 원심분리하여 분리하고, 세포내 단백질을 sonication하여 단백질을 얻었다. 얻어진 재조합 미생물의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, SDS-PAGE와 Western Blot을 실행하였으며 목적 단백질들의 크기별로 분리됨을 확인하였다(도 2).
- [85]
- [86] 실시예 4: 효소단백질과 소형 골격 단백질의 효소복합체 형성
- [87] 정제된 효소단백질 키메릭 카파-카라기나아제 cCgkA 및 키메릭 베타-아가레이즈 cAgaB 및 키메릭 무수갈락토시다아제 cAhgA와 소형 골격 단백질 mCbpA와의 효소 복합체 형성방법은 다음과 같다.
엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 조벨리아 갈락토니보란스로부터 유래한 키메릭 베타-아가레이즈 cAgaB와 소형 셀룰로즈 결합 단백질 mCbpA과의 결합으로 인한 복합체의 형성을 확인하기 위해 세 가지 단백질을 저온에서 100 μ l의 결합완충액과 함께 일정 비율로 섞어 배양한 후 우선 셀룰로즈-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제 후에 Western-blotting을 통해 분석하였다.
- [88] 결합완충액은 25mM Sodium acetate buffer와 15mM CaCl₂ [pH 6.0]의 조성으로 제조하고, 1:1:1:1:6=cAgaB:cCgkA:cAhgA:miniCbpA:binding buffer 비율로 섞어 4°C에서 하룻밤 동안(18시간) 반응시켰다. 다음날 반응액을 이용하여 PAGE analysis를 하였으며, Western-blotting은 anti-His-tag primary antibody (ELPIS)와 goat anti-rabbit HRP conjugated(Santacruz) secondary antibody를 사용하였고 luminol reagent(Santacruz)로 효소 단백질의 발현을 확인하였다(도 3의 C).
- [89]
- [90] 실시예 5: 카보하이드레이트 바인딩 모듈을 이용한 효소복합체의 분리정제
- [91] 카보하이드레이트 바인딩 모듈(이하 CBM)을 이용한 정제는 셀룰로즈 1mg당 10 μ g의 재조합 미생물의 비율로 상온에서 1시간 동안 교반배양으로 인하여 결합되었으며, 셀룰로즈와 결합된 CBM융합 단백질은 1,600 × g에서 10분간 원심분리 되었다. 20mM Tris(pH 8.0)에 1M NaCl이 함유된 버퍼와 20mM Tris(pH 7.5) 버퍼로 각각 세척을 한 다음 50mM Tris(pH 12.5) 버퍼로 용출하여 얻었으며, 이의 샘플을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(도 3의 A).
- [92]
- [93] 실시예 6 : 효소복합체를 이용한 다양한 기질에서의 환원당 측정

- [94] 구축된 가수분해 효소복합체의 분해능을 시험하기 위하여 reducing sugar assay와 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay를 이용하여 분석하였다. 0.5ml agar solution과 0.5ml carrageenan solution을 동일 비율로 배합하고, 0.5ml (i) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAM), (ii) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CHM), (iii) 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(AHM), (iv) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAHM)으로 구성된 군의 각각의 샘플들을 50°C에서 배양하였으며, 각각 2시간 간격으로 0.075ml 샘플링 하였다. 0.15ml의 DNS solution을 첨가하여 PCR 기기에서 10분간 가열한 후, 상온에서 식힌 샘플을 550nm 파장에서 absorbance를 측정하였다(도 4의A).
- [95] 또한, 구축된 가수분해 효소복합체의 분해능을 시험하기 위하여 reducing sugar assay와 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay를 이용하여 분석하였다. 1.0ml agar solution과 0.5ml (i) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAM), (ii) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CHM), (iii) 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(AHM), (iv) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAHM)으로 구성된 군의 각각의 샘플들을 50°C에서 배양하였으며, 각각 2시간 간격으로 0.075ml 샘플링 하였다. 0.15ml의 DNS 솔루션을 첨가하여 PCR 기기에서 10분간 가열한 후, 상온에서 식힌 샘플을 550nm 파장에서 absorbance를 측정하였다(도 4의B).
- [96] 또한, 구축된 가수분해 효소복합체의 분해능을 시험하기 위하여 reducing sugar assay와 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay를 이용하여 분석하였다. 1.0ml carrageenan solution과 0.5ml (i) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAM), (ii) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CHM), (iii) 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(AHM), (iv) 키메릭 카파-카라기나아제와 키메릭 베타-아가레이즈와 키메릭 무수갈락토시다아제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체(CAHM)으로 구성된 군의 각각의 샘플들을 50°C에서 배양하였으며,

각각 2시간 간격으로 0.075ml 샘플링 하였다. 0.15ml의 DNS 솔루션을 첨가하여 PCR 기기에서 10분간 가열한 후, 상온에서 식힌 샘플을 550nm 파장에서 absorbance를 측정하였다(도 4의C).

[97]

[98] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[99]

산업상 이용가능성

[100] 본 발명에 따르면, 아가 분해 생산물 제조에 있어서 물리적, 화학적 전처리 공정에 의존하였던 기존의 방식에서 효소 복합체를 이용한 분해 공정을 도입함으로써 뛰어난 효율성, 생산물의 제어, 간편한 활용성, 저비용 고효율의 친환경적 분해 시스템을 이용하여 해양조류부터 가치 있는 생산물을 효율적으로 전환하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

[101]

서열목록 Free Text

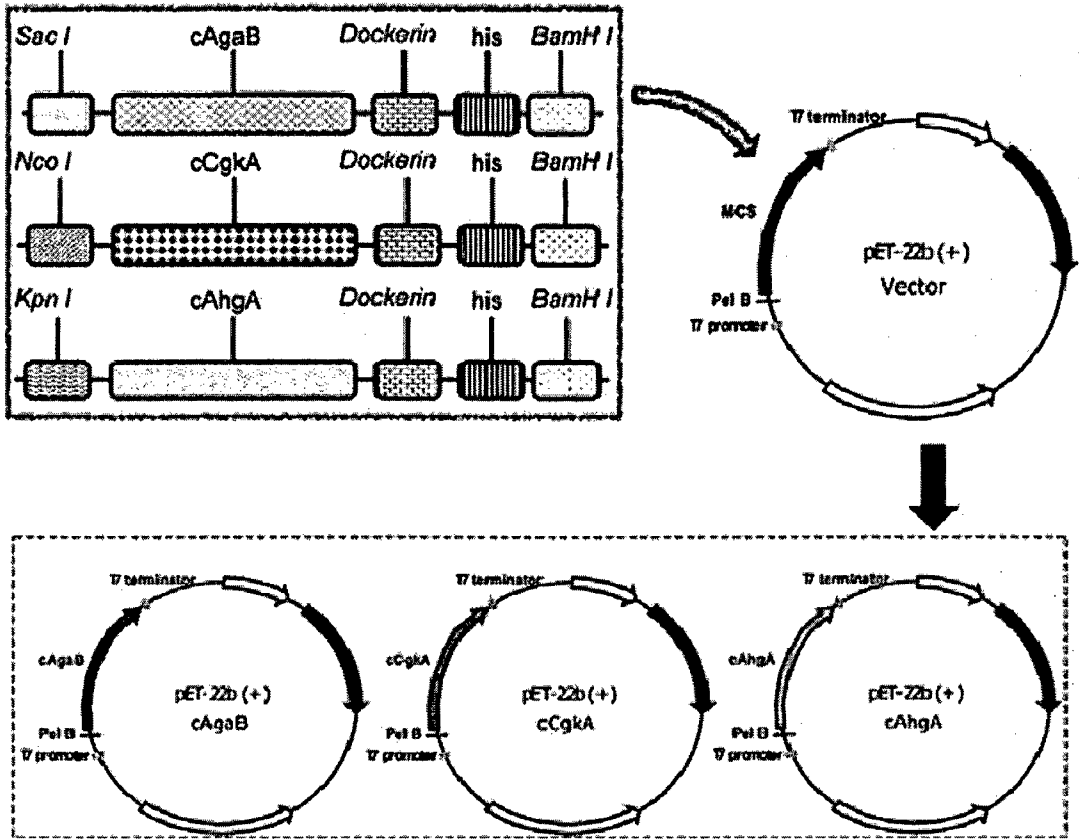
[102] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

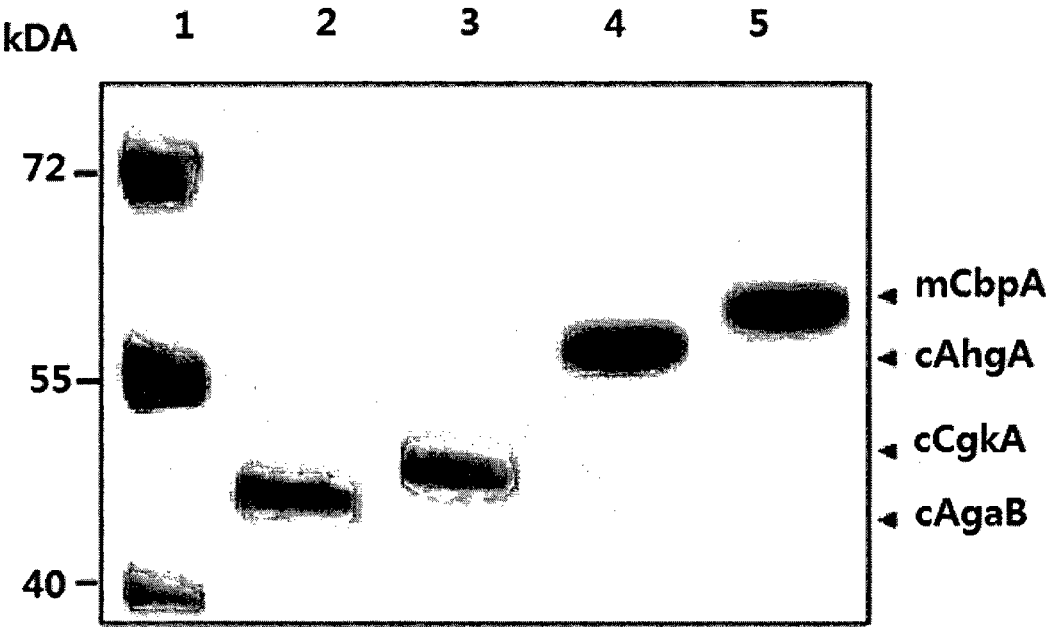
- [청구항 1] 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈; 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제; 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합 되어 있는 효소 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 베타-아가레이즈는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 카파-카라기나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 무수갈락토시다아제는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 엔도- β -1,4-글루카나아제-B는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.
- [청구항 7] 베타-아가레이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 베타-아가레이즈를 코딩하는 유전자; 카파-카라기나아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 카파-카라기나아제를 코딩하는 유전자; 및 무수갈락토시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 베타-아가레이즈는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 카파-카라기나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 무수갈락토시다아제는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 엔도- β -1,4-글루카나아제-B는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 12] 다음 단계를 포함하는 제1항의 효소 복합체의 제조방법:
 (a) 제7항의 재조합 미생물을 배양하여, 키메릭 베타-아가레이즈, 키메릭 카파-카라기나아제 및 키메릭 무수갈락토시다아제를 생성시키는 단계; 및
 (b) 상기 생성된 키메릭 베타-아가레이즈, 키메릭 카파-카라기나아제, 키메릭 무수갈락토시다아제를 수득한 다음, 소형 셀룰로즈-결합 단백질

- A와 결합시켜 효소 복합체를 제조하는 단계.
- [청구항 13] 제1항의 효소 복합체를 이용하여 홍조류 바이오매스를 분해하는 방법.
- [청구항 14] 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 무수갈락토시다아제와 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 무수갈락토시다아제.
- [청구항 15] 제15항의 키메라 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자.
- [청구항 16] 제15항의 키메라 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자를 함유하는 제조합 벡터.
- [청구항 17] 제16항의 키메라 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자 또는 제17항의 키메라 무수갈락토시다아제를 코딩하는 유전자를 함유하는 제조합 벡터가 도입된 제조합 미생물.

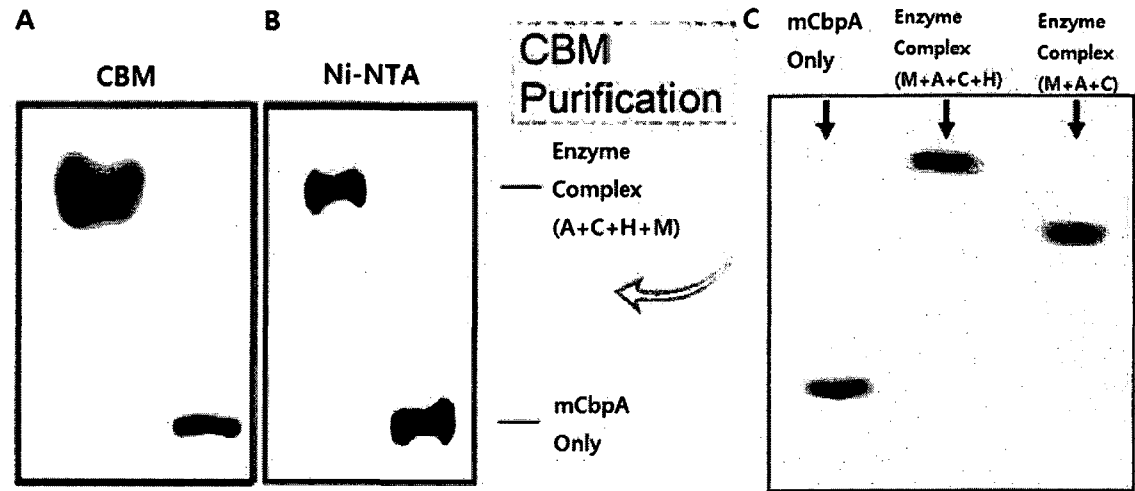
[도1]



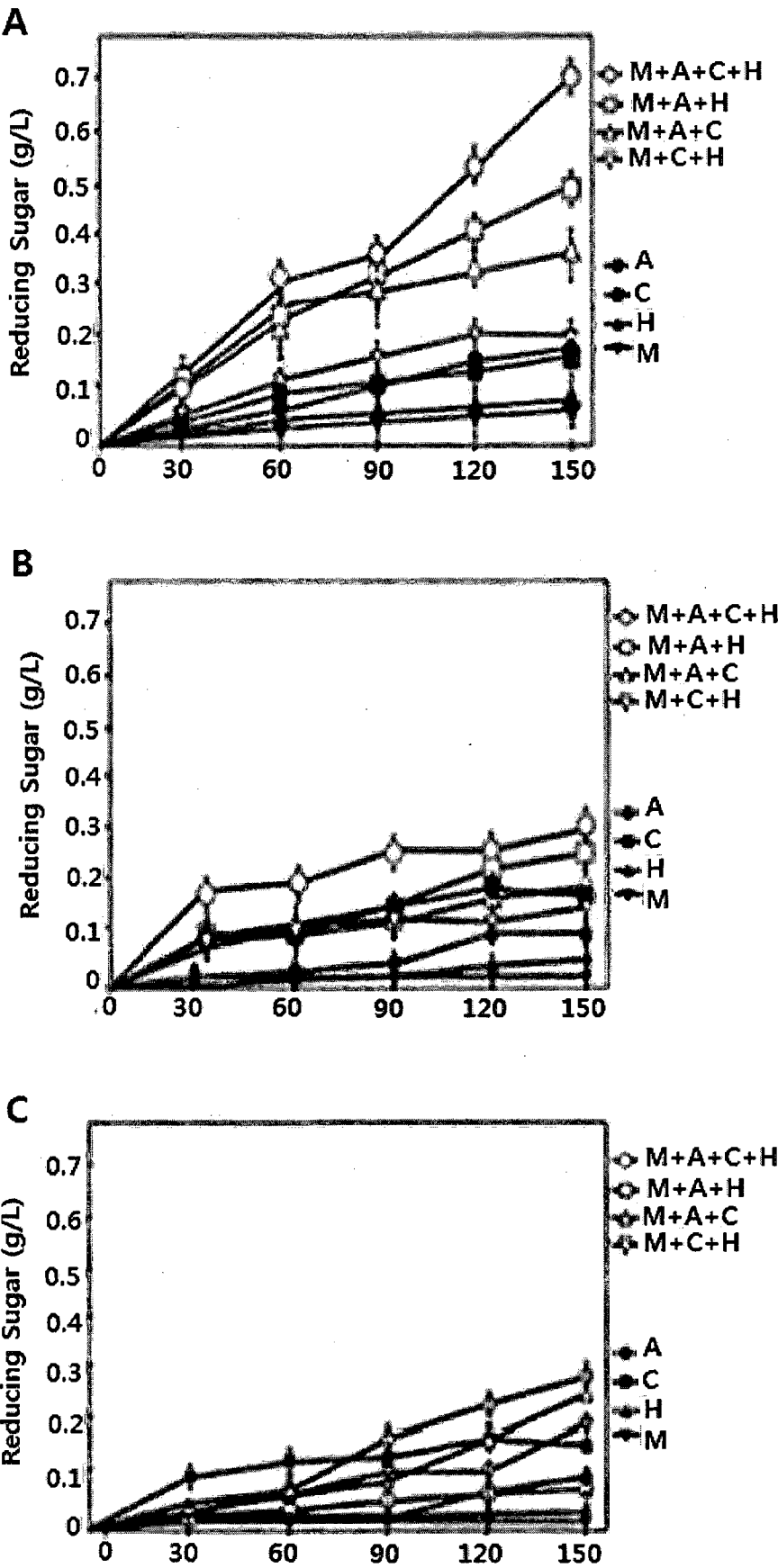
[도2]



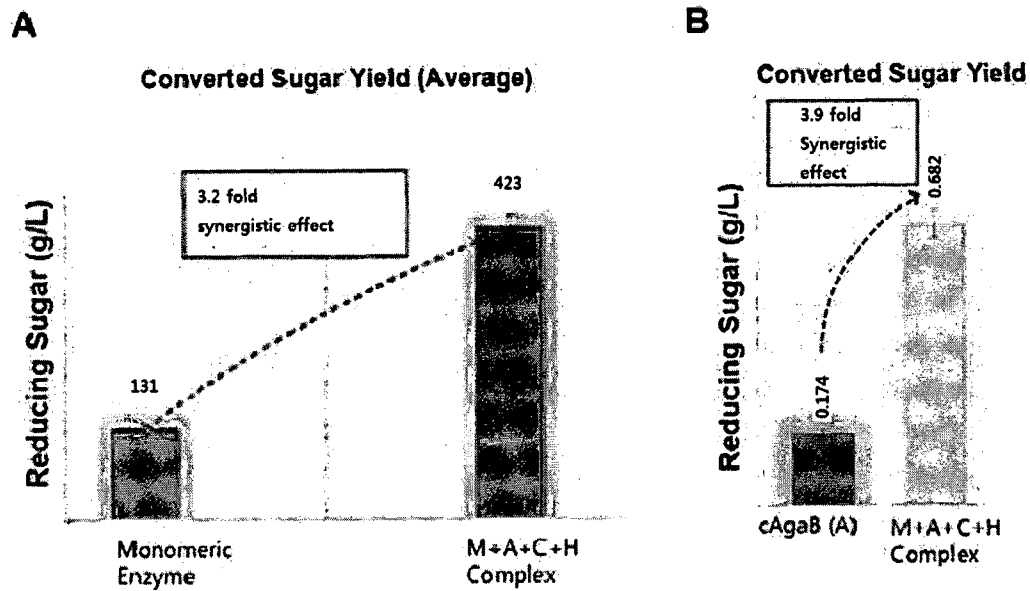
[도3]



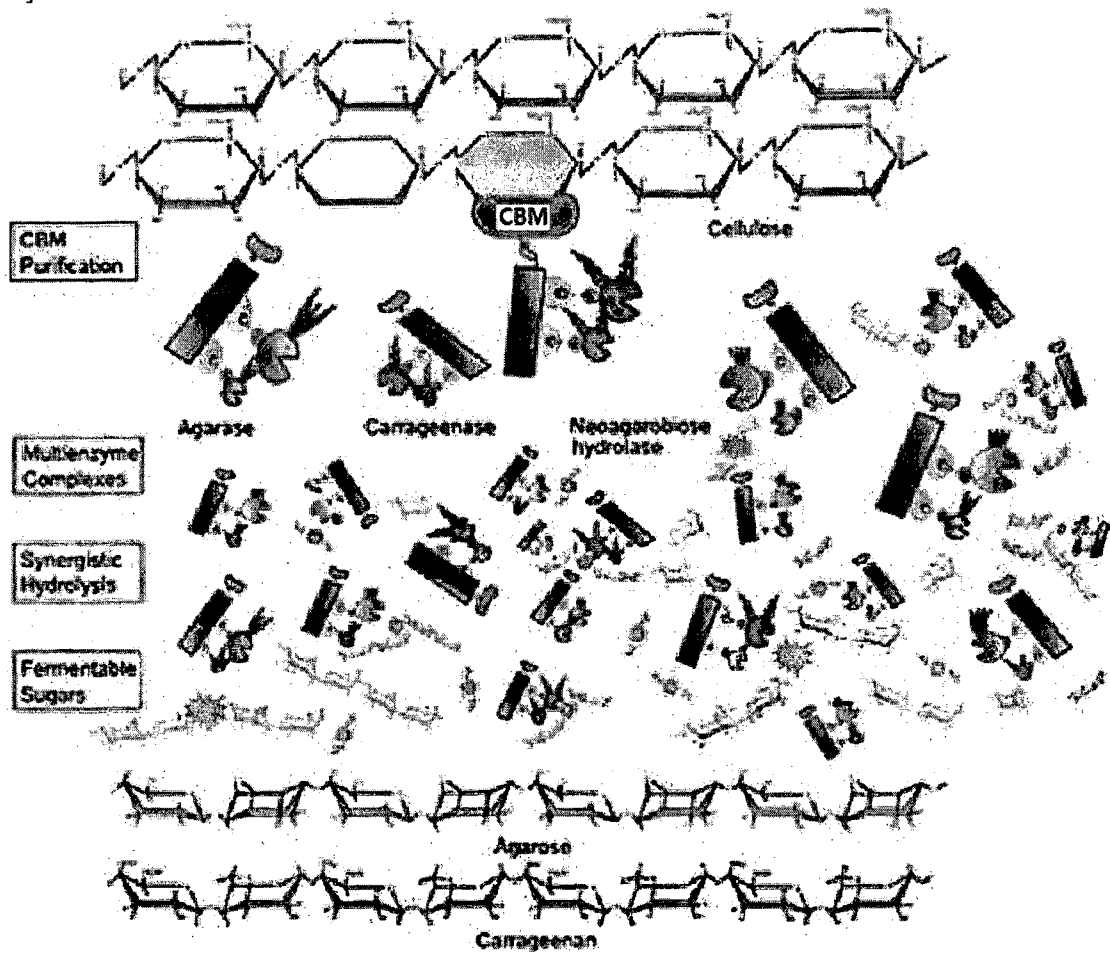
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003389**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 9/24(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C07K 14/33(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/24; C12N 15/63; C12N 15/70; C12N 15/62; C12N 15/56; C12N 15/31; C12N 15/52; C07K 14/33

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: enzyme complex, beta-agarase, kappa-carrageenase, anhydrous galactosidase, dockerin module

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KANG, Dae Hee et al., "Convenient Purification Method and Efficient Degradation of Red Algal Biomass by Protein Complexes Comprising of Various Hydrolytic Enzymes", Advanced Biomass R&D Center Workshop, 22-23 January 2015 See abstract; figures 3 and 5.	1,7,12-13
A		2-6,8-11,14-17
Y	KR 10-1367348 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 26 February 2014 See claims 1 and 6; examples 1-5.	1,7,12-13
Y	KR 10-2015-0028564 A (REPUBLIC OF KOREA (NATIONAL INSTITUTE OF FOREST SCIENCE)) 16 March 2015 See paragraph [0005]; abstract.	1,7,12-13
A	KANG, Dae Hee et al., "Efficient Enzymatic Degradation Process for Hydrolysis Activity of the Carrageenan from Red Algae in Marine Biomass", Journal of Biotechnology, 02 October 2014, vol. 192, pages 108-113 See abstract.	1-17
A	KR 10-2011-0044410 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 29 April 2011 See abstract.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 SEPTEMBER 2016 (19.09.2016)

Date of mailing of the international search report

20 SEPTEMBER 2016 (20.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003389

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANG, Dae Hee et al., "Synergistic Effect of the Hydrolytic Enzyme Complexes Based on Cellulosome System for Efficient Utilization of Red Algae", 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, 15-17 April 2015 See the entire document. (※ The above document is a document related to a declaration concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty of the present international application.)	1,7,12-13
X	KANG, Dae Hee et al., "Degradation of Red Algae Substrate by Multi-enzyme Complexes Comprising of Agarase, Carrageenases and Neogarobiose Hydrolase with Scaffolding Protein MiniCbpA", The Australian Society for Microbiology, 15 July 2015 See the entire document. (※ The above document is a document related to a declaration concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty of the present international application.)	1,7,12-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/003389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1367348 B1	26/02/2014	KR 10-2012-0098247 A	05/09/2012
KR 10-2015-0028564 A	16/03/2015	NONE	
KR 10-2011-0044410 A	29/04/2011	KR 10-1102458 B1	05/01/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/24(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C07K 14/33(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/24; C12N 15/63; C12N 15/70; C12N 15/62; C12N 15/56; C12N 15/31; C12N 15/52; C07K 14/33

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 효소 복합체, 베타-아가레이즈, 카파-카라기나아제, 무수갈락토시다아제, 도커린 모듈

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KANG, DAE HEE 등, 'Convenient purification method and efficient degradation of red algal biomass by protein complexes comprising of various hydrolytic enzymes', 차세대바이오메스연구단 워크숍, 2015.01.22-23 초록; 도면 3 및 5 참조.	1,7,12-13
A		2-6,8-11,14-17
Y	KR 10-1367348 B1 (고려대학교 산학협력단) 2014.02.26 청구항 1 및 6; 실시예 1-5 참조.	1,7,12-13
Y	KR 10-2015-0028564 A (대한민국(산림청 국립산림과학원장)) 2015.03.16 단락 [0005]; 요약 참조.	1,7,12-13
A	KANG, DAE HEE 등, 'Efficient enzymatic degradation process for hydrolysis activity of the Carrageenan from red algae in marine biomass', Journal of Biotechnology, 2014.10.02, 192권, 페이지 108-113 초록 참조.	1-17
A	KR 10-2011-0044410 A (고려대학교 산학협력단) 2011.04.29 요약 참조.	1-17

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 19일 (19.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 20일 (20.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

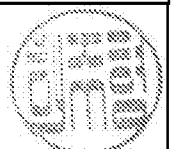
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KANG, DAE HEE 등, 'Synergistic effect of the hydrolytic enzyme complexes based on cellulosome system for efficient utilization of red algae', 2015 한국생물공학회, 2015.04.15-17 문서 전체 참조. (※ 상기 문헌은 본 국제출원의 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언서와 관련된 문헌입니다.)	1,7,12-13
X	KANG, DAE HEE 등, 'Degradation of red algae substrate by multi-enzyme complexes comprising of agarase, carrageenases and neoagarobiose hydrolase with scaffolding protein miniCbpA', The Australian Society for Microbiology, 2015.07.15 문서 전체 참조. (※ 상기 문헌은 본 국제출원의 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언서와 관련된 문헌입니다.)	1,7,12-13

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1367348 B1

2014/02/26

KR 10-2012-0098247 A

2012/09/05

KR 10-2015-0028564 A

2015/03/16

없음

KR 10-2011-0044410 A

2011/04/29

KR 10-1102458 B1

2012/01/05