(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월10일
(11) 등록번호 10-2154123
(24) 등록일자 2020년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/96* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0041362
(22) 출원일자 2019년04월09일
심사청구일자 2019년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
WO2018042433 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호(잠실2동,리센츠아파트)
이미정
인천광역시 서구 검단로 446 (왕길동 검단e편한세상아파트 113동) 804호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 최성호

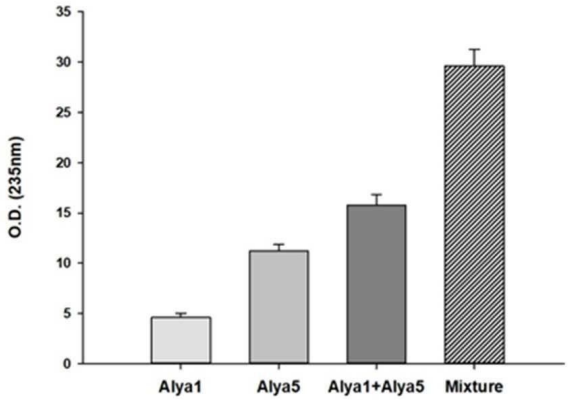
(54) 발명의 명칭 **알지네이트 분해 효소 복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

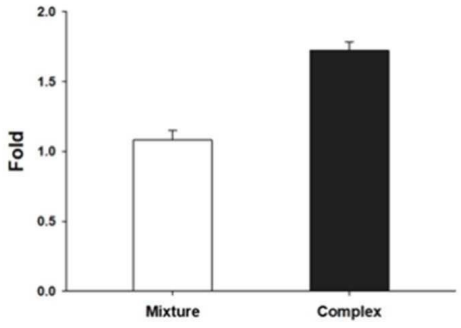
본 발명은 알지네이트 분해 효소 복합체 등에 관한 것으로서, 상기 효소 복합체는 엔도와 엑소 타입의 알지네이트 라이에이즈를 도커린 및 코헤신과 함께 사용함으로써 갈조류의 주 성분인 알지네이트 분해에 시너지 효과를 나타내고, 셀룰로좀을 소형화한 소형 골격단백질을 골격 단백질로 제공함으로써 안정적인 알지네이트 분해 효소 복합체를 제공할 수 있다. 또한, 소형 골격단백질은 탄수화물 결합 모듈을 포함하여 분해 대상 기질에 대한 접근성을 높여 보다 빠르고 효율적인 알지네이트 분해활성을 가질 수 있도록 한다. 본 발명은 알지네이트의 분해산물을 이용한 바이오 연료 등의 바이오 신소재 개발활용 분야에서 활발하게 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도

(A)



(B)



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
C12N 2800/101 (2013.01)

(72) 발명자
정다운
서울특별시 도봉구 도봉로123길 59 B102호 (쌍문동)
현정은
서울특별시 안암동 안암로 145

(56) 선행기술조사문헌
KR1020160040088 A*
KR1020140146856 A*
Bioprocess Biosyst Eng.,37:2105-2111(2014.5.3.)*
Process Biochem.,47:877-881(2012.1.16.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018003704
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원(3억초과~5억이하)
연구과제명 식물 광호흡 기작 모방 신규 Porphyrin 생합성경로 연구 기반 코리네박테리움을 통한 태양전지 유기소재 Zinc-Porphyrin 생산 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

엑소-알지네이트 라이에이즈(Exo-Alginate lyase) 및 도커린 모듈(Dokerin module);과 엔도-알지네이트 라이에이즈(Endo-Alginate lyase) 및 도커린 모듈(Dokerin module);이 코헤신 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 골격단백질에 결합된 알지네이트 분해 효소 복합체로서,

상기 효소 복합체는 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module: CBM)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 알지네이트 분해 효소 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

하기 단계를 포함하는 알지네이트 분해 효소 복합체의 제조방법:

(1) 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 엑소-알지네이트 라이에이즈(Exo-Alginate lyase)를 암호화하는 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 도커린 모듈(Dokerin module)을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제1형질전환체 제조단계;

(2) 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 엔도-알지네이트 라이에이즈(Endo-Alginate lyase)를 암호화하는 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 도커린 모듈(Dokerin module)을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제2형질전환체 제조단계;

(3) 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 코헤신 모듈(Cohesin module)을 암호화하는 유전자 및 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제3형질전환체 제조단계;

(4) 상기 제1 내지 제3 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및

(5) 상기 형질전환체의 배양 상등액을 분리하는 단계.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제3항에 있어서,

상기 (1) 내지 (3) 단계의 벡터는 pColdⅡ 플라스미드 벡터인 것을 특징으로 하는, 알지네이트 분해 효소 복합체의 제조방법.

청구항 10

제3항에 있어서,

상기 (1) 내지 (3) 단계의 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는, 알지네이트 분해 효소 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알지네이트 분해 효소 복합체 등에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 엑소-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈;과 엔도-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈;이 코헤신 모듈을 포함하는 소형 골격단백질에 결합된 알지네이트 분해 효소 복합체와 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 갈조류(Brown algae)는 보통 해양성 다세포 조류에 속하는 원생생물의 한 군으로서, 전세계적으로 약 1500종이 알려져 있으며 그 대부분이 바다에 산다. 갈조류를 구성하는 주요 성분은 알지네이트(Alginate)로 갈조류의 약 40%를 차지하고 있다. 국내에서 많이 볼 수 있는 갈조류의 종류로는 부채말, 다시마, 미역, 톳, 모자반 등이 있다.

[0003] 한편, 알지네이트는 갈조류의 세포벽을 구성하는 만누론산 (β-D-mannuronic acid)과 이의 구조 이성질체인 글루론산(α￥α-L-guluronic acid)으로 구성되어 유로네이트(urinate)의 임의적 반복으로 구성되어 있다. 또한, 알지네이트 분자구조식은 (C6H8O6)n이고, 그 세부적인 구조에 있어서, 만누론산(M)이 반복된 부분을 폴리-M-블록(poly-M block), 글루론산(G)이 반복된 부분을 폴리-G-블록(poly-G block), 만누론산과 글루론산이 반복된 부분을 폴리-MG-블록(poly-MG block)이라고 부른다.

[0004] 알지네이트 라이에이즈(Alginate lyase)는 알지네이트를 분해하는 효소로서, 효소가 분해하는 알지네이트의 부분에 따라 엑소(exo-)와 엔도(endo-) 타입으로 나뉘며, β-elimination을 통해 글리코시드 결합(glycosidic bond)를 절단하여 알지네이트를 분해한다. 엑소-알지네이트 라이에이즈는 비환원 말단으로부터 단량체인 알지네이트를 외인성 방식으로 절단하며, 엔도-알지네이트 라이에이즈는 내인성 방식으로 알지네이트를 절단한다.

[0005] 알지네이트 라이에이즈에 의해 최종적으로 분해된 유로네이트 단량체(uronate monomer)는 비효소적으로 4-디옥시-L-에리쓰로-5-헥소세울로우즈 우론산 (4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid: DEH)로 전환되고, DEH는 대사공학적으로 재조합된 미생물 (Yeast 등)의 탄소원으로 이용되어 바이오 에탄올 등의 바이오 연료와 바이오 신소재 등을 제공할 수 있다.

[0006] 본 발명자들은 갈조류에 풍부하게 존재하는 알지네이트의 분해산물로 고품질의 바이오 신소재 및 연료를 공급하기 위하여 알지네이트의 빠르고 효율적인 분해 방법에 대해 예의 연구함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1120359

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 엑소- 및 엔도- 타입의 알지네이트 라이에이즈, 도커린, 및 코헤신이 소형 골격단백질에 결합된 알지네이트 분해 효소 복합체와 그 효소 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 엑소-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈;과 엔도-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈;이 코헤신 모듈을 포함하는 소형 골격단백질에 결합된 알지네이트 분해 효소 복합체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 효소 복합체는 탄수화물 결합 모듈(carbohydrate binding module: CBM)을 포함할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 알지네이트 분해 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0013] (1) 엑소-알지네이트 라이에이즈를 암호화하는 유전자 및 도커린 모듈을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제1형질전환체 제조단계;

[0014] (2) 엔도-알지네이트 라이에이즈를 암호화하는 유전자 및 도커린 모듈을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제2형질전환체 제조단계;

[0015] (3) 코헤신 모듈을 암호화하는 유전자 및 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 주입한 제3형질전환체 제조단계;

[0016] (4) 상기 제1 내지 제3 형질전환체를 각각 또는 하나의 배지에서 배양하는 단계; 및

[0017] (5) 상기 형질전환체의 배양 상등액을 분리하는 단계.

[0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 엑소-알지네이트 라이에이즈를 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계의 엔도-알지네이트 라이에이즈를 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (1) 및 (2) 단계의 도커린 모듈을 암호화하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계의 코헤신 모듈을 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계의 소형 골격단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 유전자 일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 제조방법에서 상기 벡터가 주입되어 숙주로 이용되는 세포는 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 벡터는 상기 숙주 세포에서 활발하게 발현되는 것이라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 pColdⅡ 플라스미 벡터일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 엔도와 엑소 타입의 알지네이트 라이에이즈를 도커린 및 코헤신과 함께 사용함으로써 갈조류의 주 성분인 알지네이트 분해에 시너지 효과를 나타내고, 셀룰로좀을 소형화한 소형 골격단백질을 골격 단백질로 제공함으로써 안정적인 알지네이트 분해 효소 복합체를 제공할 수 있다. 또한, 상기 소형 골격단백질은 탄수화물 결합 모듈을 포함하여 분해 대상 기질에 대한 접근성을 높여 보다 빠르고 효율적인 알지네이트 분해활성을 가질 수 있도록 한다. 본 발명은 알지네이트의 분해산물을 이용한 바이오 연료 등의 바이오 신소재 개발활용 분야에서 활발하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 알지네이트 분해 효소 복합체 제작의 모식도 이다.

도 2a는 재조합 엑소-알지네이트 라이에이즈 유전자가 삽입된 재조합 벡터의 모식도 이고, 도 2b는 엔도-알지네이트 라이에이즈 유전자가 삽입된 재조합 벡터의 모식도 이다.

도 3은 His-tag 부착 단백질의 정제 및 전기영동을 수행하여 형질전환체의 단백질 발현을 확인한 도면이다[(A) BL21/alya1-doc (57 kDa) (B) BL21/alya5-doc (47 kDa) (C) BL21/mCbpA (56.8 kDa)].

도 4는 셀룰로스 결합특성을 이용하여 엑소- 및 엔도- 알지네이트 라이에이즈의 소형 골격단백질과의 결합을 확인한 도면이다.

도 5는 엑소- 및 엔도- 알지네이트 라이에이즈의 알지네이트 분해 활성을 확인한도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명자들은 빠르고 효율적으로 갈조류를 분해하는 효소 복합체 기술에 대해 연구하여, 엔도- 및 엑소 타입의 알지네이트 라이에이즈를 동시에 이용하는 경우 갈조류의 분해 활성에 시너지 효과(synergistic effect)가 발생하며, 소형 골격단백질을 골격단백질로써 이용하여 하나의 알지네이트 분해 효소 복합체로 제공함으로서 보다 활발한 알지네이트 분해 활성을 나타냄을 구체적인 실험으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0028] 이에, 본 발명은 엑소-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈;과 엔도-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈; 이 코헤신 모듈을 포함하는 소형 골격단백질에 결합된 알지네이트 분해 효소 복합체를 제공한다.

[0029] 본 발명에서 “알지네이트 라이에이즈(Alginate lyase)”는 갈조류의 주 성분인 알지네이트 분해효소로서 알지네이트를 구성하는 만누론산(β-D-mannuronic acid: M)과 글루론산(α￥α-L-guluronic acid: G)의 글리코시드 결합(glycosidic bond)를 절단하여 알지네이트를 분해하고, 절단 부위에 따라 엑소-(exo-)와 엔도-(endo-) 타입으로 구분된다. 본 발명에서 알지네이트 라이에이즈 유전자는 조벨리아 갈락타니보란스 속 (*Zobellia galactanivorans sp.*) 균주 유래의 엑소-(서열번호 1) 및 엔도-(서열번호 2) 유전자를 이용하였으나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0030] 본 발명에서 “도커린(Dokerin)”은 알지네이트 라이에이즈의 분해활성을 증강시키는 기능을 수행하는 것으로서, 클로스트리듐(*Clostridium*), 보다 구체적으로 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*C. cellulovorans*) 균주 유래의 도커린 유전자(서열번호 3)를 이용하였으나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0031] 본 발명에서 “코헤신(Cohesin)”은 도커린과 상호작용하여 알지네이트 라이에이즈의 분해활성 증강과 함께 소형 골격단백질과의 결합할 수 있도록 하는 기능을 수행하는 것으로서, 클로스트리듐(*Clostridium*), 보다 구체적으로 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*C. cellulovorans*) 균주 유래의 코헤신 유전자(서열번호 4)를 이용하였으나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0032] 한편, 셀룰로좀은 자연계에서 코헤신 모듈과 결합된 상태로 알지네이트 라이에이즈의 골격단백질로 기능하지만 그 크기가 매우 커서 제작과 이용에 어려움이 있다. 이에, 본 발명은 자연계의 셀룰로좀을 소형화하여 알지네이트 분해 효소 복합체의 골격단백질로 제공하고자 하였으며, 이를 소형 골격단백질이라 명명하였다.

[0033] 이에, 본 발명에서 “소형 골격단백질 (miniCbpA: mCbpA)”은 본 발명의 효소 복합체의 골격을 이루는 단백질이며, 이와 동시에 탄수화물 결합 모듈(Carbohydrate binding module: CBM)을 포함하여 본 발명의 효소 복합체의 분해 대상이 되는 기질, 즉 갈조류의 알지네이트에 대한 접근성을 향상시키는 기능을 수행할 수 있다. 상기 소형 골격단백질은 클로스트리듐(*Clostridium*), 보다 구체적으로 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*C. cellulovorans*) 균주 유래의 유전자(서열번호 5)를 이용하였으나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 엑소- 또는 엔도- 알지네이트 라이에이즈와 도커린 유전자를 플라스미드

(plasmid)에 클로닝한 재조합 발현 벡터를 제조하고, 이를 대장균에 주입하여 형질전환체를 제작하였다.

[0035] 또한, 다른 구체적인 실시예에서, 코헤신 모듈을 가진 소형 골격단백질 유전자를 플라스미드에 클로닝한 재조합 발현 벡터를 제조하고, 이를 대장균에 주입하여 형질전환체를 제작하였다.

[0036] 이에, 상기 제작된 각 형질전환체를 배양하고 그 배양물로부터 확보한 엑소-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈 결합체; 엔도-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 모듈 결합체; 및 코헤신 모듈을 포함하는 소형 골격단백질을 혼합하여 엑소- 및 엔도- 알지네이트 라이에이즈, 도커린, 코헤신, 및 소형 골격단백질을 포함하는 알지네이트 분해 효소 복합체를 제작하고, 이의 분해 활성을 확인한 결과 소형 골격단백질을 포함하지 않는 Mixture보다 본원의 효소 복합체가 알지네이트 분해 활성에 있어 약 170 % 이상 우수함을 확인할 수 있었다.

[0037] 본 발명의 구체적인 실시예에서 "벡터 (vector)"는 pColdⅡ 플라스미드를 이용하고 있으나, 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물이라면 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서 이용하고 있는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다.

[0038] 또한, 본 명세서에 "재조합 발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0039] 상기 벡터는 클로닝되는 유전자와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함할 수 있으며, 본 명세서에서 “프로모터”는 형질주입하고자 하는 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로서 상기 프로모터에는 전사에 필요한 기본인자(Basal element)뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서(enhancer)가 더 포함될 수 있다.

[0040] 또한, 본 명세서에서 "형질전환" 또는 “형질주입”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.

[0042] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0044] **[실시예]**

[0045] **실시예 1. 알지네이트 라이에이즈 및 도커린 유전자의 확보**

[0046] 조벨리아 갈락타니보란스(Zobellia galactanivorans) 유래의 alya1, alya5 유전자를 참고하여 서열번호 6-7 및 8-9의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 이용하여 알지네이트 라이에이즈 유전자를 증폭하였다. 상기 서열번호 6 및 8의 염기서열을 갖는 프라이머 세트에서 정방향 프라이머 (서열번호 6 및 8)는 증폭산물 유전자가 벡터에 삽입될 위치에서 10bp 상단을 인식할 수 있도록 디자인하였으며, 역방향 프라이머 (서열번호 7 및 9)는 상기 위치에서 10bp 하단을 인식할 수 있도록 디자인하여 제작하였다(Bioneer사의 Cloning Kit 이용).

[0047] 또한, 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)의 게놈(genome)으로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 (Endo-β-1,4-Glucanase-B) 유전자를 참고서열로 하여 서열번호 10-11 및 12-13의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 이용하여 도커린 유전자를 증폭하였다. 증폭 산물은 서던블롯(southern bolt)을 수행하여 159bp의 크기를 갖는 도커린 도메인을 암호화하는 영역의 유전자임을 확인할 수 있었다.

[0048] 이어서, 상기 확보한 알지네이트 라이에이즈 유전자와 도커린 유전자가 연결된 DNA 절편을 제작하기 위하여 overlap PCR을 수행하였다. 구체적으로, 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머의 5’에는 pColdⅡ 벡터의 앞쪽 결합부위 10 bp만큼, 역방향 프아미머의 5’에는 pColdⅡ 벡터의 뒤쪽 결합부위 10 bp의 인식서열이 삽

입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.

[0049] 그 결과, 1540 bp (endo-type), 1250bp (exo-type) 의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 재조합 알지네이트 라이에이즈의 유전자를 증폭할 수 있었다.

[0051] **실시예 2. 엔도-알지네이트 라이에이즈와 도커린 도메인 융합을 위한 클로닝**

[0052] 상기 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 엔도타입 알지네이트 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동 하였고, 아가로스 겔 상의 DNA절편은 Gel extraction Kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0053] 이어서, 회수한 DNA 절편과 pColdⅡ 벡터를 sacⅠ 및 kpnⅠ 제한효소를 절단하고, bioneer kit를 이용하여 50℃ 중탕에서 15 분간 접합(ligation)하여 재조합 플라스미드(pColdⅡalya1-doc)를 제조하였다.

[0054] 상기 플라스미드 벡터를 *E. coli* BL21에 주입하여 형질전환체(BL21 Rosetta alya1-doc)를 제조하고, 이를 배양하여 그 배양물로부터 다시 상기 재조합 플라스미드(pColdⅡalya1-doc)를 분리하였다(도 2a 참조).

[0056] **실시예 3. 엑소-알지네이트 라이에이즈 및 도커린 발현 벡터 및 형질전환체 제작**

[0057] 상기 실시예 2와 마찬가지로, 상기 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 엑소타입 알지네이트 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동 하였고, 아가로스 겔 상의 DNA절편은 Gel extraction Kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0058] 이어서, 회수한 DNA 절편과 pColdⅡ 벡터를 sacⅠ 및 kpnⅠ 제한효소로 절단하고, bioneer kit를 이용하여 50℃ 중탕에서 15 분간 접합(ligation)하여 재조합 플라스미드(pColdⅡalya5-doc)를 제조하였다.

[0059] 상기 플라스미드 벡터를 *E. coli* BL21에 주입하여 형질전환체(BL21 Rosetta alya5-doc)를 제조하고, 이를 배양하여 그 배양물로부터 다시 상기 재조합 플라스미드(pColdⅡalya5-doc)를 분리하였다(도 2b 참조).

[0061] **실시예 4. 코헤신 및 소형 골격단백질 발현 벡터 및 형질전환체 제작**

[0062] 4-1. 코헤신 및 소형 골격단백질 유전자의 확보

[0063] 클로스트리디움(*Clostridium*) 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 탄수화물 결합 모듈 (Carbohydrate binding module; CBM)과 두 개의 코헤신 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈 결합 단백질-에이(Mini-Cellulose binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (서열번호 14)의 5'에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머 (서열번호 15)에는 제한효소 XhoI 인식서열(ctcgag)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다.

[0064] 그 결과, 1659bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 소형 골격단백질 유전자(mCbpA) (서열번호 5) 가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0066] 4-2. 코헤신 및 소형 골격단백질 발현 벡터 및 형질전환체 제작

[0067] 상기 실시예 2 및 3과 마찬가지로, 상기 실시예 4-1에서 얻은 코헤신 유전자를 포함하는 소형 골격단백질 유전자 증폭산물을 아가로스 겔 상에서 전기영동 하고, DNA 절편은 Gel exraction Kit(GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0068] 이어서, 회수한 mCbpA 유전자와 pET22b(+) 벡터를 BamHI 및 XhoI 제한효소로 절단하고 bioneer kit를 이용하여 50℃ 중탕에서 15 분간 접합(ligation)하여 재조합 플라스미드(pET22b-mCbpA)를 제조하였다.

[0069] 상기 플라스미드 벡터를 E. coli BL21에 주입하여 형질전환체(BL21/mCbpA)를 제조하고, 이를 배양하여 그 배양물로부터 다시 상기 재조합 플라스미드(pET22b-mCbpA)를 분리하였다.

[0071] **실시예 5. 대장균 형질전환체의 재조합 알지네이트 라이에이즈 단백질 발현 확인**

[0072] 상기 실시예 2 및 실시예 3 에서 제작한 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다. BL21/alya1-doc, BL21/alya5-doc 및 BL21/mcbpA 재조합 균주의 단백질 발현을 유도하는 조건을 조성하여 LB 배지에 접종하여 24시간 동안 37℃에서 배양하고, 500 μ￥μM IPTG와 암피실린, 클로람페니콜을 함유한 LB 액상배지에서 12시간 동안 배양한 뒤 원심 분리하여 세포를 확보하였다.

[0073] 이어서, 상기 확보된 세포를 초음파로 파쇄하고 원심 분리하여 수득한 상등액을 농축하여 단백질의 N-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 정제하였다. 이후 10% SDS-PAGE 전기영동을 수행하였고, 쿠마시 블루(Coomassie Blue)를 통해 염색한 결과가 예상한 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0075] **실시예 6. 재조합 endo-와 exo-type의 알지네이트 라이에이즈 단백질을 어셈블리 시킨 복합체 확인**

[0076] 상기 실시예 4 및 실시예 5에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 복합체 형성을 확인하기 위하여 셀룰로스 결합모듈과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용하여 효소복합체의 형성을 관찰하였다.

[0077] 상기 실시예 4 및 실시예 5에서 확보한 3종의 효소복합체 형성을 관찰하기 위해 소형 골격단백질이 포함하고 있는 탄수화물-결합 모듈(Carbohydrate binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로즈(Sigmacell Type 50, SIGMA)를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1 M 소듐 클로라이드(sodium chloride) 20 mM Tris buffer (pH 8.0)로 3번 헹구어낸 후 50 mM 트리스 버퍼(pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 12% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동 하였다(도 4 참조).

[0079] **실시예 7. 엑소- 및 엔도- 알지네이트 라이에이즈 복합체의 활성 분석**

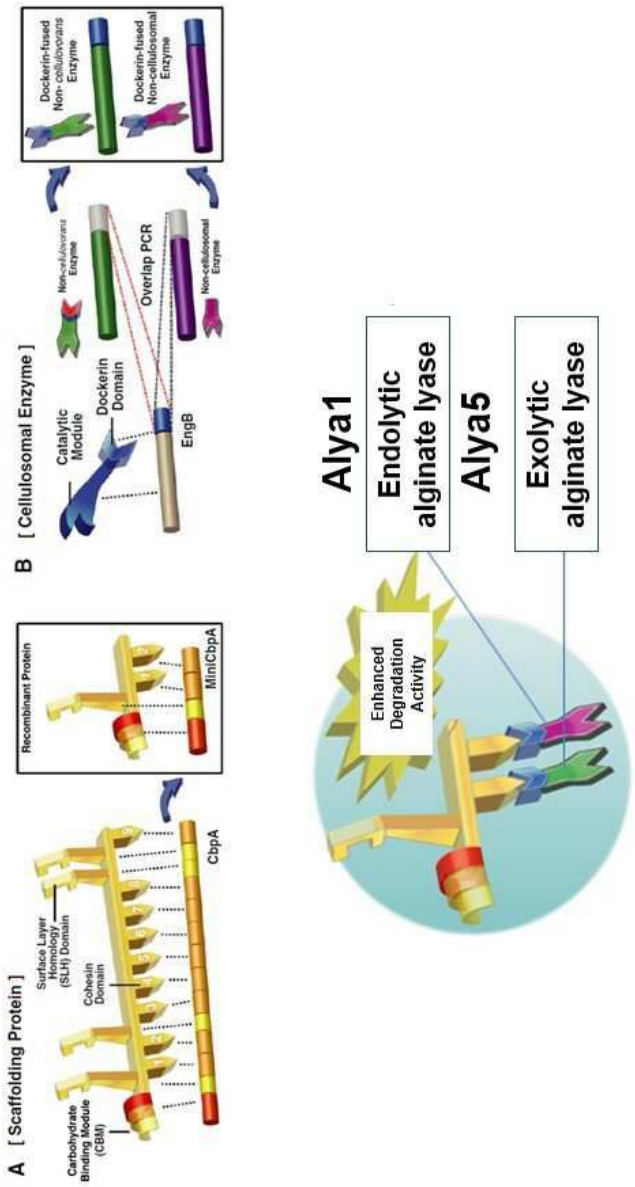
[0080] endo-와 exo-type 알지네이트 라이에이즈 조합으로 인한 활성을 확인하기 위해 알지네이트를 기질로 하는 알지네이트 분해활성 분석을 수행하였다. 효소 활성 분석 방법은 100 mM Tris-Hcl의 용매에 녹인 0.1 % 알지네이트를 기질로 하고, 100 mM Tris-Hcl (pH 7.0)를 반응버퍼로 하여 30 ℃에서 15분 반응 시킨 후 분해된 알지네이트 monomer 흡광기를 이용해 235 nm 파장의 흡광도를 분석하였다.

[0081] 그 결과 endo-와 exo-type 알지네이트 라이에이즈의 조합으로 중합한 경우 단일 효소보다 활성이 높게 측정되었고 endo-와 exo-type 알지네이트 라이에이즈의 복합체를 형성한 경우 분해된 DEH의 양이 그렇지 않은 경우보다 170% 더 증가되었음을 확인하였다(도 5 참조).

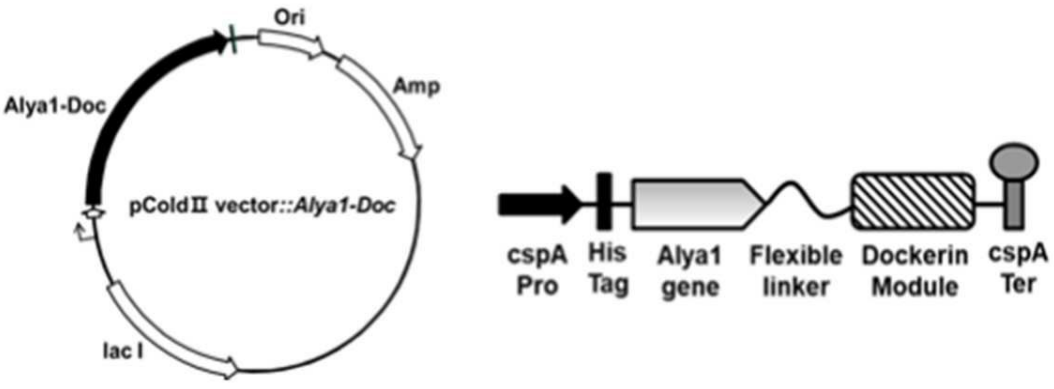
[0083] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

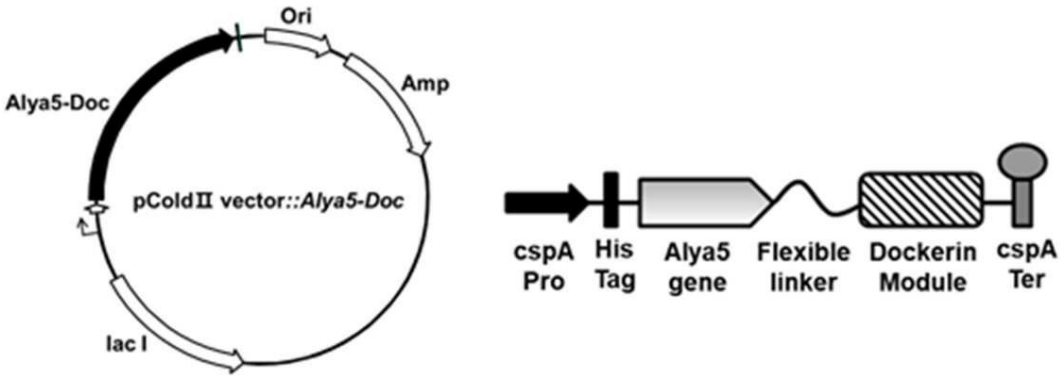
도면1


Dockerin-fused Non-cellulovorans Enzyme
Dockerin-fused Non-cellulosomal Enzyme
Overlap PCR
Non-cellulosomal Enzyme
Dockerin Domain
Catalytic Module
EngB
B [Cellulosomal Enzyme]
Recombinant Protein
MiniCbpA
CbpA
Surface Layer Homology (SLH) Domain
Cohesin Domain
Carbohydrate Binding Module (CBM)
A [Scaffolding Protein]
Alya1
Endolytic alginate lyase
Alya5
Exolytic alginate lyase
Enhanced Degradation Activity

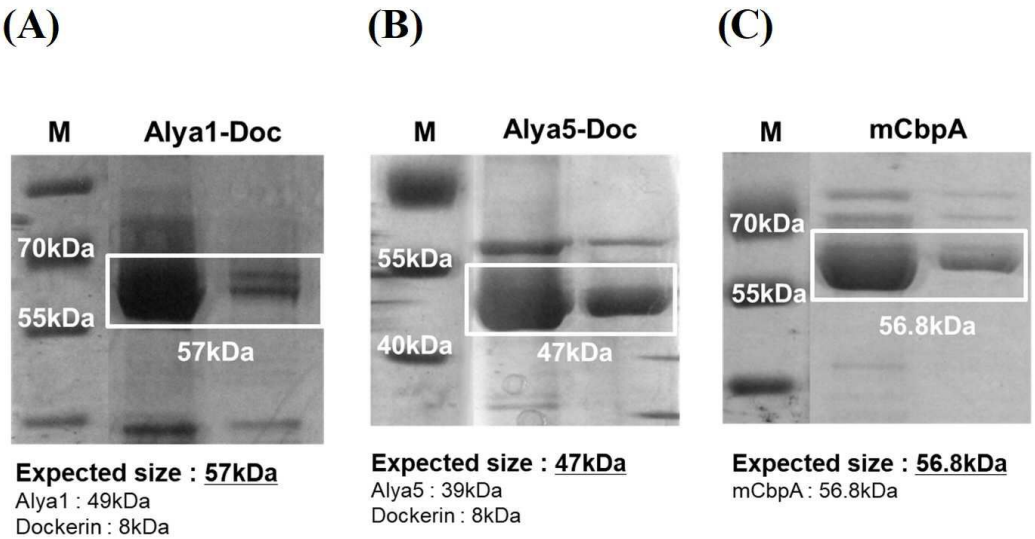
도면2a


Ori
Amp
Alya1-Doc
pColdII vector::Alya1-Doc
lac I
cspA Pro
His Tag
Alya1 gene
Flexible linker
Dockerin Module
cspA Ter

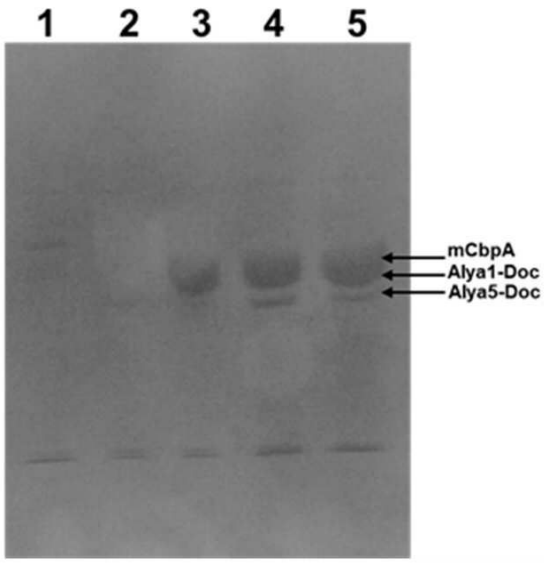
도면2b


Ori
Amp
Alya5-Doc
pColdII vector::Alya5-Doc
lac I
cspA Pro
His Tag
Alya5 gene
Flexible linker
Dockerin Module
cspA Ter

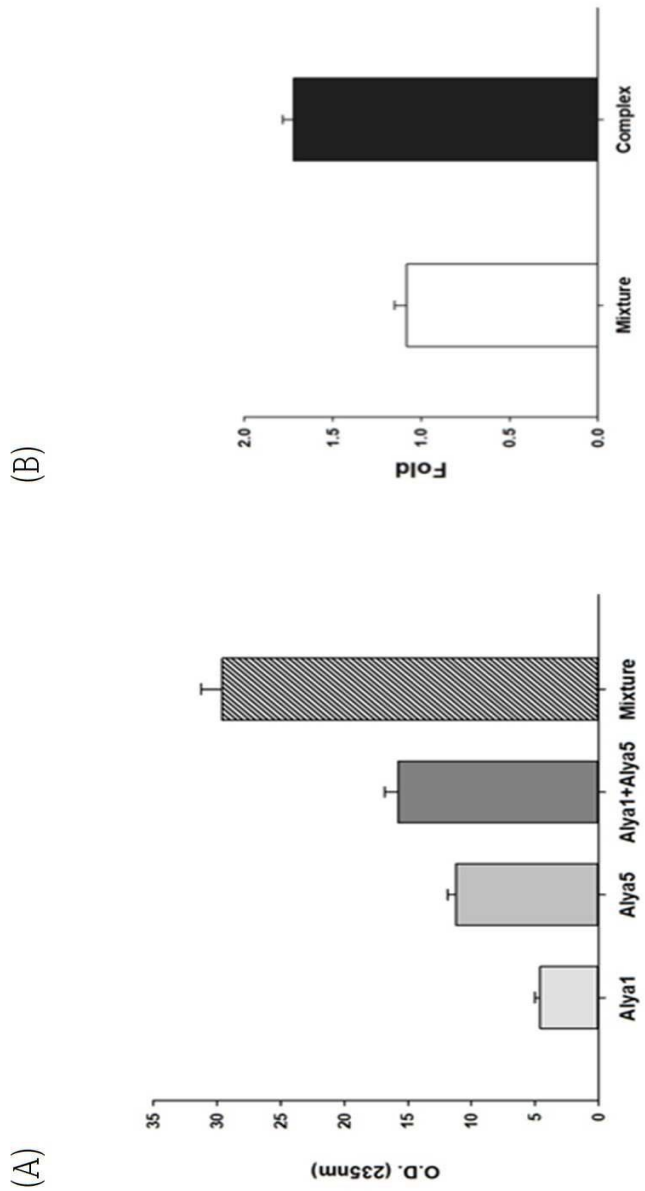
도면3


(A)
(B)
(C)
M
Alya1-Doc
70kDa
55kDa
57kDa
Expected size : 57kDa
Alya1 : 49kDa
Dockerin : 8kDa
M
Alya5-Doc
55kDa
40kDa
47kDa
Expected size : 47kDa
Alya5 : 39kDa
Dockerin : 8kDa
M
mCbpA
70kDa
55kDa
56.8kDa
Expected size : 56.8kDa
mCbpA : 56.8kDa

도면4


1 2 3 4 5
mCbpA
Alya1-Doc
Alya5-Doc

도면5



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Buisness Foundation

<120> Alginotytic enzyme complex and method for preparing thereof

<130> DHP19-189

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1059

<212> DNA

<213> Zobellia galactanivorans

<400> 1

atgaaaaaaa cagtattagc tacagttacc gtattcgtcc ttttcgcctg taaagacaaa 60

cctaaggcca ctacggacag tgcatcggaa tcggccgttg caatgaaaaa caccactaaa 120

tacccaagtg agcttatccc tcaaatggat gaatggaaaa ttctcttagg cgatggcacc 180

cataaagaag accttgtgaa ttatgcgaag gatgactttt tttatgttga acatgaaaat 240

gaaacagatt gggtagtatt caaaacaccg aactcgggca ttacctcaag gacctcaagt 300

aataccagaa cggaattagg gcagaaaaaa cactggattc ccgaaacagg agggaagttg 360

aatgcaacct taaaggttca acacgtctcc acttcgggcg atgctagggt tgccgcgtca 420

tactctgtcg tggtcggcca aattcacagc gatgaaggac acgaaaacga accgataaaa 480

atcttttaca aaaaatttcc aggccataca aaaggctccg ttttttggaa ttacgagatt 540

aacaccaagg gtgataattc aaagcgatgg gattactcca cggcagtttg gggatacgat 600

atgtcggtcg ttggcccaac ggctacctca taccccgaag aaccggaaga cggtatagcc 660

ttgggggagg agtttagtta tgaaatcaac gtttatgaag gtatcatgta cctcactttt 720

tctagtgaag gccacaagac cattaaattc accaaaaacc tattaaaatc caattttacc 780

aagaagtccg atattcctca acagataaag acgctgtatg cttcaatagg tcgtgacggt 840

atcgaacgtg aaaatgccta tgccggggaa atacaatact ttaagctagg agcctacaac 900

caaaccaacg gaaaatcccc agaggataat ctggtatgga gtacaggggc cgacgtttac 960

gatggtgaca ttgccaagca atatgcaaat ggaagctatg ccgaggtatg gttcaaagaa 1020

gcgacgcttg gaagtggaag cgccccagaa gcccagtga 1059

<210> 2

<211> 1341

<212> DNA

<213> Zobellia galactanivorans

<400> 2

atgaaaaaaa atgtatttac gacgcttcgc acggtcgtca acggagacat tatgtggaaa 60

cttattcccg tatttttctt ggccttatgc ctaggaagtt gttcggaaga accagtcgac 120

ccagaggaag aagcggtcct taccaaactt tccgccaatt caacggccat tggaatttct 180

tcggtctcgg ccagcacctc acaatcaccg aatgtagcca gtaataccct agacggatct 240

acgtctaccc gttggtcagg ttatggtgat ggggcttcca tcacatacga ccttggcagt 300

tcggccaata ttgattacgt gaaaatcgct ttctataaag gagacagcag aaagaccaag 360

tatgaagttt gggtaggtaa ttctacttct agcctaacga aaatcaaatc gaaaaccagt 420

tcaggttcta cttcagatta cgaaactatt gacctcccca actctaccgc ccgttatatt 480

aggattgtcg gtaagggcta tgtacttaac agcggtggaa gcaccgtttt atggaacagc 540

attaccaaat tccaagcatg gggctccggt ggttcgtcca cccttcccat tagcggaaac 600

tcacctgcct cagttctagg aatcacggca aacacttgga aaataaacag ttttatagga 660

agtccaggct catctgccac ctattacgat gacattaccg atgccagtgg catttcgtac 720

aatacctatt ccgatgacaa ttacttctat accgatggcg aatgggtata ctttaaatgc 780

tacagaggtt tgggcggttc ggccaattca caaaacccaa gggtagagct acgtgagatg 840

gacaacggca acttggcaag ttggaccggc gatagcggca cccataccat ggaatggacc 900

gtacaggtaa accagctccc acaagatacc gacggcgatg gcggggtact ctgctttggt 960

caaatacatg ggccaagtaa aaattcagac ggcgttgaag tcgatgatgt agtaagggtt 1020

cagttcattg gtgaagaaaa ccaatcatcg ggatcggtaa aactaaagat cagcggctat 1080

gttaccgaag aacaaggagg cagccaaacc ttcagcggct acagtcttga caccacttac 1140

aactgtaaac tggtatattc cggaggttac gtagaactct ttatgaacgg ctctagcgta 1200

ttcagaaaga aaatggaagt tgacgatcta tctgaaaact attttaaagt cggtaactac 1260

ttgcaatccg ttaaaggcgc aagttatacg ggatcctacg gtttggttcg tatcaaaaac 1320

ctaagcgtaa cccacaatta a 1341

<210> 3

<211> 159

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 3

gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcttaa atcaattctt 60

ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120

aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159

<210> 4

<211> 407

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 4

gtaacagcta caattggaaa agtacaagta aatgctggag aaacggtagc agtaccagtt 60

aacttaacaa aagttccagc agctggttta gcaacaattg aattaccatt aacttttgat 120

tctgcatcat tagaagtagt atcaataact gctggagata tcgtattaaa tccatcagta 180

aacttctctt ctacagtaag tggaagcaca ataaaattat tattcttaga tgatacatta 240

ggaagccaat taatcataag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa gcaaaagcta 300

taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca gtagttggtg 360

atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaacccagg aacagta 407

<210> 5

<211> 1647

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 5

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac 60

tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac 120

gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac 180

catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac 240

ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt 300

gcaagcggag cagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360

aaatcagact ggtcaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca 420

acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatataggtg gagctaaagt acttggtaca 480

gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa 540

aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact 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 ggaagcacaa taaaattatt attcttagat 1020

gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa 1080

gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca 1140

gtagttggtg 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 ttttgtaaca 1500

ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga 1560

acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc 1620

gttacaataa atattggaga tcctata 1647

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-Alginate lyase_primer_F

<400> 6

gcgcgagctc atgaaaaaaa atgtatttac gacgctt 37

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-Alginate lyase_primer_R

<400> 7

cagcggatcc attgtgggtt acgcttaggt 30

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exo-Alginate lyase_primer_F

<400> 8

gcgcgagctc atgaaaaaaa cagtattagc tacagttacc 40

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exo-Alginate lyase_primer_R

<400> 9

cagcggatcc ctgggcttct ggggc 25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dokerin_primer_F

<400> 10

aacccacaat ggatccgctg gctcc 25

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dokerin_primer_F

<400> 11

gcgcgcggta cctcataaaa gcatttttt aagaacagct 40

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dokerin_primer_R

<400> 12

agaagcccag ggatccgctg gctcc 25

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dokerin_primer_R

<400> 13

gcgcgcggta cctcataaaa gcatttttt aagaacagct 40

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-cellulose binding protein A_primer_F

<400> 14

ggatccgcag cgacatcatc aa 22

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-cellulose binding protein A_primer_R

<400> 15

gcgcctcgag gctataggat ctccaatatt tat 33