

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0111240 (43) 공개일자 2014년09월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0109736(분할) (22) 출원일자 2014년08월22일 심사청구일자 2014년08월22일 (62) 원출원 특허 10-2013-0012273 원출원일자 2013년02월04일 심사청구일자 2013년02월04일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트)) 강대희 서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 현정은 서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 (74) 대리인 이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

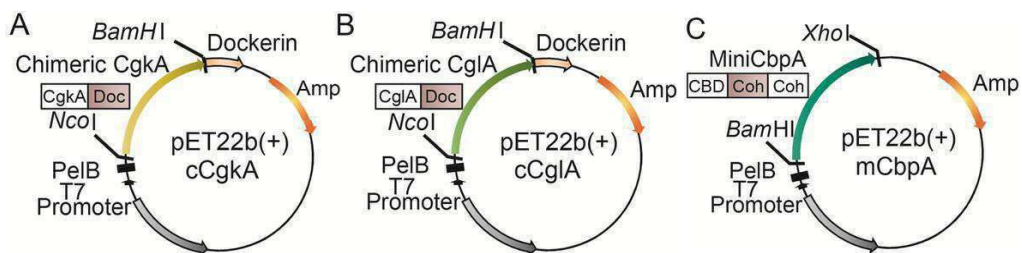
(54) 발명의 명칭 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물

(57) 요약

본 발명은 키메릭 카파-카라기나제 또는 람다-카라기나제의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 슈도알테로모나스 카라기노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovora*) 유래의 카파-카라기나제(kappa carrageenase) 또는 람다-카라기나제(lambda carrageenase)의 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 모듈을 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 카라기나제의 분리 및 정제 공정에 있어서 고가의 레진 대신 상대적으로 저렴한 저가의 셀룰로오스를 이용하여 정제가 가능하므로 경제적인 효과가 있다. 또한, 카라기난 분해 효소 제조에 있어서 물리적, 화학적 전처리 공정에 의존하였던 기존의 방식에서 엔자임을 이용한 분해 공정을 도입함으로써 생산물의 제어, 간편한 활용성 및 저비용 고효율의 친환경적 분해 시스템을 이용하여 해양조류로부터 가치 있는 생산물을 효율적으로 전환하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012005630

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 (이공)일반연구자-기본

연구과제명 바이오매스 당화능을 가진 *Corynebacterium glutamicum*의 당대사에 관여하는 전사 조절자
에 대한 유전체 및 단백질체 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

섬유소 분해효소의 도커린 모듈의 유전자와 람다-카라기나제 유전자가 결합된 키메릭 람다-카라기나제 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 람다-카라기나제 유전자는 슈도알테로모나스 카라기노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovorans*) 유래인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 람다-카라기나제 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈의 유전자는 서열번호 3에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1b에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항의 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제6항의 재조합 미생물을 배양하여 키메릭 람다-카라기나제를 생성시킨 다음, 생성된 키메릭 람다-카라기나제를 회수하는 것을 특징으로 하는 키메릭 람다-카라기나제의 제조방법.

청구항 8

제6항의 재조합 미생물로부터 분리된 키메릭 람다-카라기나제와 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합단백질-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 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물로부터 분리된 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합하여, 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성되는 것을 특징으로 하는 키메릭 람다-카라기나제 효소 복합체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)의 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 람다-카라기나제 효소 복합체의 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 두 개의 코히진 모듈(Cohesin module)의 유전자는 서열번호 5 또는 서열번호 6에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 람다-카라기나제 효소 복합체의 제조방법.

청구항 11

제8항의 방법에 의해 제조되고 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합되어 있는, 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성되는 것을 특징으로 하는 키메릭 람다-카라기나제 효소 복합체.

청구항 12

제11항의 키메릭 람다-카라기나제 효소 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 카라기난 함유 바이오매스의 분해방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 슈도알테로모나스 카라기노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovora*) 유래의 카파-카라기나제(kappa carrageenase) 또는 람다-카라기나제(lambda carrageenase)의 유전자에 섬유소 분해효소의 도커린 모듈이 결합된 키메릭 카라기나제를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 카라기난은 특정 홍조류 중: 홍조강(Rhodophyceae) 강(Greer, C.W. and Yaphe, W., *Hydrobiologia*, 116:563, 1984)으로부터 수득되는 천연 성분이다. 카나기난은, A 잔기라고 하는 1,3 연결된 α-D-갈락토피라노스와 B 잔기라고 하는 1,4 포지션으로 연결된 β-D-갈락토피라노스 잔기의 반복적인 이당류 배열로 구성된 선형 당류이다. 카라기난은, 카라기난에서 B 유닛이 D 형태이지만, 한천의 경우에는 L 형태라는 점에서, 한천과 구분된다. 카라기난의 기본 구조의 규칙적인 백본에는 설페이트 헤미 에스테르기의 다소 정형화된 분포가 존재한다. 또한, 카라기난은 일부 메톡시기와 피루베이트기를 포함할 수 있다. 일반적인 카라기난 원료는 콘드루스(Chondrus), 유케마(Eucheuma), 카파피쿠스(Kappaphycus), 기가르티나(Gigartina) 및 이리다(Iridaea) 종이다.

[0003] 기본적인 3가지 타입의 카라기난을 이용할 수 있다. 콘드루스, 유케마 및 기가르티 종으로부터 수득되는 카파(κ), 이오타(ι) 및 람다(λ) 카라기난은 설페이트 에스테르 치환기의 갯수와 위치에 차이가 있다. κ 및 ι-카라기난은 K⁺, Ca²⁺ 또는 NH⁴⁺의 존재시에 열에 의해 가역적으로 젤이 되지만, Na⁺ 형태에서는 젤이 되지 않는다.

[0004] 베타-1,4 연결부에서 카라기난을 분해하는 하이드롤라제를 카라기나제라고 한다. 다양한 조류 박테리아로부터 3가지 타입의 효소, κ, ι 및 λ-카라기나제가 분리되었다. 이것은 모두 카라기난의 베타-1,4 연결을 잘라 내는 카라바이오스(neocarrabiose) 시리즈 산물을 만드는, 엔도하이드롤라제이다(Michel, G. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 276(43):40202, 2001). κ-카라기나제는 향후 다양한 활용 및 산업적 수요를 갖는다

(Ostgaard, K. et al., *Enzyme and Microbial Technology*, 15(4):326, 1993).

- [0005] 종래의 기술로는 해양 박테리아 유래 ι - 및 κ -카라기나제에 의한 유케마 스피노섬(*Eucheuma spinosum*) 및 유케마 코토니(*Eucheuma cottoni*) 카라기난의 분해가 연구된 바 있으며(Belion et al., *Canadian Journal of Microbiology*, 28(7):874, 1982), 해양 슈도모나스 카라기노보라 유래 ι - 및 κ -카라기나제에 의한 유케마 스피노섬 및 유케마 코토니 카라기난의 분해를 보고하였고, 가수분해된 산물을 동정하였다. 박테리아는 1^{-1} NaCl 25; K_2HPO_4 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2; 카사미노산 2.5; 카라기난 2.5; 0.3 % $FeSO_4$ (10ml/lit)로 구성된 배지 중에서, 최적 배양 온도 22 °C에서 배양되었다. 그러나, 박테리아에 의해 카라기나제를 제조하는데 이용되는 배지가 7가지의 성분이 요구되며, 최적 배양 온도로 22°C를 사용하고 있어, 온대 국가에서는 특히 여름에 냉각 장치 없이 이러한 타입의 박테리아를 배양하긴 어렵다는 문제가 있다.
- [0006] 해양 사이토파가(Cytophaga) 종에 의한 카라기나제 생산에서의 인공 해수 염의 잠재성에 대한 연구 및 해양 사이토파가 종으로부터 κ -카라기나제의 정제에 대한 연구에서는 해양 사이토파가 종에 의한 카라기나제 생산을 위해 배지에 8가지의 성분들을 사용하였으며, 이 배지에는 카라기나제 생산에 적합한 NaCl과 $MgCl_2$ 의 조합이 필요하였고, 최적 pH 및 온도는 각각 7.6 및 25 °C이었다. 그러나 고가의 배지와 복잡한 정제 단계에 사용함에도 불구하고, 효소 활성은 5.0 갈락토스 유닛/mg 단백질에 불과하여, 이러한 낮은 수율로 인해 이 방법을 통한 효소의 상업적 생산은 비경제적이다(Sawar. et al., *Microbiology and Immunology*, 31(9):869, 1987).
- [0007] pH 6.5-6.8에서 최대 활성을 가지며 산성 및 염기성 조건에서 낮은 활성을 가지는 κ -카라기나제가 보고된 바 있으나, 이 기술의 문제점은 효소가 중성 pH에서만 활성을 띄어 산성 및 염기성 조건에서는 사용할 수 없으며, 저온에서의 저조한 활성은 효소의 사용을 높은 온도만으로 제한한다(Florence et al., *Journal of Applied Phycology*, 7:393, 1995).
- [0008] 카라기나제 생산력이 없는 박테리아의 존재 또는 이의 배양 산물의 존재하에 카라기나제 생산 박테리아를 배양함으로써, 이 박테리아의 카라기나제 생산력을 조절하는 방법에 관한 특허(일본공개특허 JP2001136961)가 있으나, 카라기나제의 생산이 카라기나제 생산자와 카라기나제 비생산자의 공-배양에 의해서만 조절된다는 한계가 있다.
- [0009] 한편, 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 혐기중온성 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다.
- [0010] 상기 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.
- [0011] 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.
- [0012] 클로스트리디움 셀룰로보란스가 생산하는 섬유소 분해 효소들은 기질 특이성과 반응기작에 큰 차이를 보이기는 하나, 모두 베타-1,4-글루코시드 (β -1,4-glycoside) 결합을 분해하며, 균체 외 배지로 분리되는 특징이 있다고 보고되었다(Shoseyov et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169(2):667, 1990). 또한, 결정형 섬유소의 효과적인 분해에는 적어도 세 가지의 섬유소 분해효소, 즉, 엔도글루칸아제(endoglucanase), 엑소글루칸아제(exoglucanase) 또는 로비오하이드롤라제(cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제(β -glucosidase)가 동시에 필요하며, 이들의 상승작용으로 섬유소 분해능이 크게 증가한다고 보고되었다(Murashima et al., *J Bacteriol*, 184(18):5088, 2002; Schwarz, *Appl Microbiol Biotechnol*, 56(5-6):634, 2001; Shoham et al., *Trends Microbiol*, 7(7):275, 1999).
- [0013] 이에, 본 발명자들은 분리정제가 용이하고, 전환효율이 우수한 카라기나제를 제조하기 위하여 예의 노력한 결과, 클로스트리디움 속 균주 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈과 슈도알테로모나스 카라기노보란스 유래의 카파-카라기나제 또는 람다-카라기나제가 결합된 키메릭 카파-카라기나제 cCgkA 또는 키메릭 람다-카라기나제 cCg1A와 셀룰로오스 결합단백질이 세포 밖으로 분비되어 카라기나제 복합체를 형성하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 카라기나제 효소 복합체 형성이 가능한 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 배양하여 키메릭 카라기나제를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 키메릭 카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(mini-cellulose-binding protein A)의 복합체의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 키메릭 카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(mini-cellulose-binding protein A)의 복합체를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 섬유소 분해효소의 도커린 모듈의 유전자와 카파-카라기나제 또는 람다-카라기나제 유전자가 결합된 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제를 생성시킨 다음, 생성된 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제를 회수하는 것을 특징으로 하는 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물로부터 분리된 키메릭 카파-카라기나제 및/또는 키메릭 람다-카라기나제와 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합단백질-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 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물로부터 분리된 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합하여, (i) 키메릭 카파-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, (ii) 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, 또는 (iii) 키메릭 람다카라기나제와 키메릭 람다-카라기나제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성된 군에서 선택되는 카라기나제 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한, 상기 카라기나제 효소 복합체의 제조방법에 의해 제조되고 키메릭 카파-카라기나제 및/또는 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합되어 있는, (i) 키메릭 카파-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, (ii) 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, 또는 (iii) 키메릭 람다카라기나제와 키메릭 람다-카라기나제 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성된 군에서 선택되는 카라기나제 효소 복합체 및 그 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따르면, 카라기나제의 분리 및 정제 공정에 있어서 고가의 레진 대신 상대적으로 저렴한 저가의 셀룰로오스를 이용하여 정제가 가능하므로 경제적인 효과가 있다. 또한, 카라기난 분해 효소 제조에 있어서 물리적, 화학적 전처리 공정에 의존하였던 기존의 방식에서 엔자임을 이용한 분해 공정을 도입함으로써 생산물의 제어, 간편한 활용성 및 저비용 고효율의 친환경적 분해 시스템을 이용하여 해양조류로부터 가치 있는 생산물을 효율적으로 전환하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명에서 제시된 키메릭 카파-카라기나제 cCgkA, 키메릭 람다-카라기나제 cCglA 및 소형 골격 단백질 miniCbpA 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+)-cCgkA(A), pET22(+)-cCglA(B) 및 pET22b(+)-mCbpA(C)의 모식도이다.
- 도 2(A)는 본 발명에서 제시된 키메릭 재조합 벡터 pET22b(+)-cCgkA, pET22b(+)-cCglA와 pET22b(+)-mCbpA의 크기를 확인한 SDS-PAGE 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2(B)는 pET22b(+)-cCgkA, pET22b(+)-cCglA와 pET22b(+)-mCbpA의 활성 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3(A)는 mCbpA와 cCgkA로 이루어진 complex의 Native-PAGE 결과 및 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 3(B)는 mCbpA와 cCglA로 이루어진 complex의 Native-PAGE 결과 및 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 4(A)는 완성된 재조합 미생물의 환원당 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4(B)는 두 가지 타입의 컴플렉스의 환원당이 각각의 환원당의 합 보다 월등하게 높다는 것을 보인 그래프이다.
- 도 5(A)는 CBM으로 정제한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5(B)는 Ni-NTA로 정제한 결과의 비교와 그 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 일 관점에서, 섬유포 분해효소의 도커린 모듈의 유전자와 카파-카라기나제 또는 람다-카라기나제 유전자가 결합된 키메릭 카파-카라기나제 또는 키메릭 람다-카라기나제 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 카파-카라기나제 및 람다-카라기나제 유전자는 슈도알테로모나스 카라기노보라(Pseudoalteromonas carrageenovorans)로부터 유래한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 상기 카파-카라기나제 및 람다-카라기나제 유전자는 서열번호 1 (accession number : X71620.1) 및 서열번호 2(accession number : AM397269)에 기재된 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 1 및 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 카파-카라기나제 및 람다-카라기나제 유전자에 포함된다.
- [0028] *본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 도커린 모듈의 유전자는 서열번호 3에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 3에 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.
- [0029] 서열번호 3 :
- [0030] GATGTTAACAAGATGGAAGGTAATGCTATCGATTATGCAGTGCTTAATCAATTCTTTAGGTACAAATACTAACGTTGATTATCAGTATCAGACATGAATAAGGATGGTAAAGTAAATGCTTTGGATTAGCTGTTCTTAAAAAATGCTTTTA
- [0031] 본 발명의 실시예에 있어서 상기 재조합 벡터는 도 1에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0032] 본 발명에 있어서, "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 계놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 계놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 계놈 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. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포 당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록

하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0033] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 Sambrook, *et. al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann, *et. al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있다.

[0035] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 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 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0036] 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 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0037] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

[0038] 물론 모든 벡터가 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. 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.

[0039] 또한 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포 당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있으며, pET 계열 벡터(Novagen)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 pET 계열 벡터를 사용하여 클로닝을 수행하면, 발현되는 단백질의 말단에 히스티딘기들이 결합되어 나오므로, 상기 단백질을 효과적으로 정제할 수 있다. 클로닝된 유전자로부터 발현된 단백질을 분리하기 위해서는 당업계에 공지된 일반적인 방법이 이용될 수 있으며, 구체적으로, Ni-NTA His-결합 레진(Novagen)을 사용하는 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용된 pET 계열 벡터를 포함한 다양한 벡터들은 여러개의 제한효소 절단부위를 모아놓은 멀티클로닝사이트(MCS)를 포함하고 있는데 이들은 lacZ 유전자 내에 위치한다. MCS는 lacZ 유전자의 리딩 프레임

(reading frame)을 파괴하지 않으므로 적당한 숙주세포에서는 lacZ의 발현이 이루어져 생물학적 활성을 지닌 β-갈락토시다제 효소를 합성해낸다. 이 숙주세포를 무색 화학물질인 X-gal을 포함하는 배지에서 배양하면 이 효소에 의해서 X-gal이 분해되어 불용성의 청색물질을 만들게 된다. 그러므로 MCS에 외래 DNA의 삽입이 이루어지지 않은 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포 콜로니는 청색을 띤다. 반대로 MCS에 외래 DNA가 삽입되면 플라스미드 벡터의 lacZ 리딩 프레임이 깨지면서 β-갈락토시다제가 만들어지지 않고 그 결과 무색의 숙주세포 콜로니가 형성된다. 본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법에서, 상기 벡터는 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA가 벡터에 정상적으로 클로닝되었는지 여부를 확인시켜 주기 때문에 더욱더 유용하게 이용될 수 있다.

[0042] 따라서, 본 발명에서는 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된, 슈도알테로모나스 카라기노보라로부터 유래한 키메릭 카파-카라기나제 cGkA 유전자 또는 키메릭 람다-카라기나제 cG1A 유전자가 포함되어 있는 1225bp의 PCR 밴드를 확인하였고, 그 후 상기 키메릭 카파-카라기나제 cGkA 유전자 또는 키메릭 람다-카라기나제 cG1A 유전자를 대장균 발현 벡터인 pET22b(+)에 삽입한 pET22(+)cGkA 및 pET22(+)cG1A를 수득하였음을 확인하였다.

[0043] 다른 관점에서, 본 발명은 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0044] 상기 재조합 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 하며, 본 발명에 있어서 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E.coli* 균주 DH5a, *E.coli* 균주 JM101, *E.coli* 균주 K12 294, *E.coli* 균주 W3110, *E.coli* 균주 X1776, *E.coli* XL-1Blue(Stratagene) 및 *E.coli* B 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E.coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E.coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서 상기 재조합 미생물은 DH5a인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0046] 따라서, 본 발명에서는 상기 섬유소 분해효소의 도커린 모듈의 유전자와 락케이즈 유전자를 포함하는 키메릭 카파-카라기나제 유전자 또는 키메릭 람다-카라기나제 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pET22(+)cGkA 또는 pET22(+)cG1A를 대장균 DH5a에 형질전환하여 재조합 미생물 DH5a/cGkA 및 DH5a/cG1A를 수득하였음을 확인하였다.

[0047] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 재조합 미생물로부터 분리된 키메릭 카파-카라기나제 및/또는 키메릭 람다-카라기나제와 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합단백질-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 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물로부터 분리된 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합하여, (i) 키메릭 카파-카라기네이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, (ii) 키메릭 람다-카라기네이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, 또는 (iii) 키메릭 람다카라기네이즈와 키메릭 람다-카라기네이즈 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성된 군에서 선택되는 카라기나제 효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0048] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 카라기나제 효소 복합체의 제조방법에 의해 제조되고 키메릭 카파-카라기나제 및/또는 키메릭 람다-카라기나제와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)가 결합되어 있는, (i) 키메릭 카파-카라기네이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, (ii) 키메릭 람다-카라기네이즈와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체, 또는 (iii) 키메릭 람다카라기네이즈와 키메릭 람다-카라기네이즈 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이가 결합된 효소복합체로 구성된 군에서 선택되는 카라기나제 효소 복합체 및 그 용도에 관한 것이다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)의 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 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 셀룰로즈 결합 모듈 유전자에 포함된다.

[0050] 서열번호 4 :

[0051] GTTGAATTTTACAACCTCTAACAAATCAGCACAAACAACTCAATTACACCAATAATCAAAATTACTAACACATCTGACAGTGATTTAAATTTAAATGACGTA

AAAGTTAGATATTATTACACAAGTGATGGTACACAAGGACAACTTTCTGGTGTGACCATGCTGGTGCATTATTAGGAAATAGCTATGTTGATAACACTAGC
AAAGTGACAGCAAACTTCGTAAAGAAACAGCAAGCCCAACATCAACCTATGATACATATGTTGAATTTGGA

- [0052] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)의 유전자는 서열번호 5 또는 6에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 5 또는 6에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 코히즌 모듈 유전자에 포함된다.
- [0053] 서열번호 5 :
- [0054] GCTACTCTTAAAAAGGACAATTTATACTATTCAAGGAAGAATAACAAAATCAGACTGGTCAAACACTCAACAAATGACTATTCATTTGATGCAAGT
AGTTCAACACCAGTTGTAAATCCAAAAGTTACA
- [0055] 서열번호 6 :
- [0056] GGTGGAGCTAAAGTACTTGGTACAGCACCAGGTCCAGATGTACCATCTTCAATAATTAATCCTACTTCTGCAACATTTGATAAAAAATGTAACATAACAAGCA
GATGTTAAAACACTACTATGACTTTAAATGGTAACA
- [0057] 따라서, 본 발명에서는 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 포함하는 재조합 벡터 pET22b(+)-mCbpA를 제작하고, pET22b(+)-mCbpA를 발현 유도하여 mCbpA 단백질이 배양액으로 분비되는 것을 확인하였다.
- [0058] 또한, 본 발명에서는 셀룰로즈 결합 모듈(CBM)을 이용한 키메릭 카라기나제의 분리정제를 수행하였으며, 수득된 키메릭 카파-카라기나제 및/또는 키메릭 람다-카라기나제가 순수한 카파-카라기나제 또는 람다 카라기나제보다 높은 당 환원능을 가지는 것을 확인하였다.
- [0059] [실시예]
- [0060] 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.
- [0061] **실시예 1 : 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자, 카파-카라기나제와 람다-카라기나제 유전자의 증폭**
- [0062] 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 3을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer, 서열번호 7)의 5'에는 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 키메릭 카파-카라기나제와 람다-카라기나제 CgkA CglA 유전자의 C-terminal 부분의 각각 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머(Reverse primer, 서열번호 8)의 5'에는 제한효소 Nco I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다(도 1(A), 도 1(B)). 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 212 bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0063] 서열번호 7: ATATccatggATGCATCTATGCAACC
- [0064] 서열번호 8: GCGCggatccATTCACCGCAAT
- [0065] 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 키메릭 카파-카라기나제와 람다-카라기나제 CgkA CglA 유전자를

클로닝하기 위하여 조벨리아 갈락토니보란스의 지노믹디엔에이로부터 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열 (서열번호 1, 2)을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer, 서열번호 9)의 5'에는 제한효소 Nco I, 역방향 프라이머(Reverse primer, 서열번호 10)의 5'에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 1005bp의 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 카파-카라기나제CgkA와 람다-카라기나제CglA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0066] 서열번호 9: ccatggATTCTCAATCGGCTATTAAGTA

[0067] 서열번호 10: ggatccCAATGTTGAACCTTGCATGTT

[0068] 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, 서열번호 4과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module, 서열번호 5, 서열번호 6)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer, 서열번호 11)의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향프라이머(Reverse primer, 서열번호 12)에는 제한효소 KpnI 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다(도 1(C)).

[0069] 서열번호 11: GGATCC GCAGCGACATCATCAAT

[0070] 서열번호 12: GCGCGGTACCGCTATAGGATCTCCAATATTTATT

[0071] *그 결과 1647bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0072] 실시예 2 : 섬유소 분해효소의 도커린 도메인과 연결된 유전자의 클로닝

[0073] 상기 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 각각의 CgkA, CglA 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0074] 그 후 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 카파-카라기나제와 람다-카라기나제 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 SacI, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Not I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여서 그 결과 1225bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 슈도알테로모나스 카라기노보란스로부터 유래한 키메릭 카파-카라기나제CgkA와 람다-카라기나제 CglA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0075] 그 후, 카파-카라기나제 CgkA와 람다-카라기나제 CglA 유전자는 BamH I 과 Nco I 으로 절단한 후 대장균 발현 벡터(E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E.coli*) DH5 α에 형질전환을 하였다. 이어 재조합 미생물로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+)-cCgkA와 pET22(+)-cCglA라 명명하였다(도 1). 그리고 상기 대장균 재조합 미생물을 DH5 α /cCgkA와 DH5 α /cCglA라 명명하였다.

[0076] 실시예 3 : 대장균 재조합 미생물의 카라기나제 활성 측정

[0077] 상기 실시예 2에서 확보한 재조합 미생물의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, 배지상에서 효소 활성대(halo) 측정, SDS-PAGE, Western Blot을 실행하였다. 대장균 재조합 미생물을 IPTG로 발현 유도하여 키메릭 CgkA, CglA 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 28℃에서 90분 동안 진탕배양 후 원심 분리하여 세포내 단백질을 sonication을 통하여 분해하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) CgkA, CglA 효소 단백질을 얻었다.

[0078] 효소활성대(halo)를 확인하기 위해 LB한천배지에 0.3% 카라기난을 첨가하여 효소반응의 기질로 사용하였다. 형

질전환된 대장균의 콜로니를 LB 배지에 접종하여 24시간동안 37℃에서 배양하고, IPTG를 함유한 LB 액상배지에서 90분 동안 28℃에서 배양한 세포내 단백질을 분해 후 농축하여 얻은 효소 단백질을 LB 한천배지에 올려 흡수시킨 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. Alcian blue 8GX (0.3%, pH 1.0) 으로 24시간 염색 후 D.W 로 여러 번 헹구어 낸 후 효소활성대(halo)를 확인하였다(도 2(A), 도 2(B)).

[0079] SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하여 그 크기를 측정하였다(도 2(A)). 그 후에 정확한 위치에서의 효소발현을 확인하기 위하여 Zymogram을 실행하였고 이를 실시하기 위해 기질이 첨가된 renature buffer(100mM Succinate, 10mM CaCl₂, 1mM DTT)에 2시간동안 1시간 마다 renature buffer를 갈아준 후 50℃에서 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 겔을 0.1% Lugol solution으로 5분간 염색 후 D.W. 로 수차례 헹구어 내어 cCgkA 및 cCglA 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 효소활성대(halo)를 확인할 수 있었다.

[0080] 실시예 4 : 스카폴딘프로테인과 카라기나아제 효소의 복합체 형성

[0081] 스카폴딘프로테인 mCbpA 단백질을 얻기 위해서 pET22b(+)mCbpA를 발현 유도하여 mCbpA 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하였으며, LB 배지에 접종하여 24시간 동안 37℃에서 배양하고, IPTG를 함유한 LB 액상배지에서 5시간 동안 37℃에서 배양한 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) mCbpA 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 얻었다.

[0082] *상기 대장균 재조합 미생물을 IPTG로 발현 유도하여 키메라 CgkA, CglA를 발현 및 정제, 농축하여 얻은 단백질을 클로스트리디움 속 균주 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈을 가지는 mCbpA와의 결합을 위하여 5X 바인딩 버퍼(125 mM Sodium Acetate, 0.5 mM CaCl₃[pH 6.0])와의 비율을 각각 다르게 하여 4℃에서 24시간 결합시켰으며, 이의 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하였다. 그 결과 도 3(A)와 (B)에서 확인 한 것과 같이 각각의 카라기나아제 복합체를 형성하였음을 검증하였다(도3).

[0083] 실시예 5 : 재조합 미생물을 이용한 환원당 측정

[0084] 구축된 카라기난 분해 재조합 미생물의 분해능을 시험하기 위하여 reducing sugar assay와 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay를 이용하여 분석하였다. 0.5mL carrageenan solutions과 0.5 ml carrageenase nano-complexes을 동일 비율로 첨가한 샘플을 50° C에서 배양하였으며, 각각 2시간 간격으로 0.075 ml 샘플링 하였다. 0.15 ml의 DNS 솔루션을 첨가하여 PCR 기기에서 10분간 가열한 후, 상온에서 식힌 샘플을 550 nm파장에서 absorbance를 측정하였다(도 4).

[0085] 또한, 셀룰로즈-결합 단백질-A (mCbpA)와 결합된 카라기나아제 효소 복합체가 단일 카파-카라기나아제 또는 단일 람다-카라기나아제보다 3.1 내지 12배 높은 당 환원능을 갖는 것을 확인하였다.

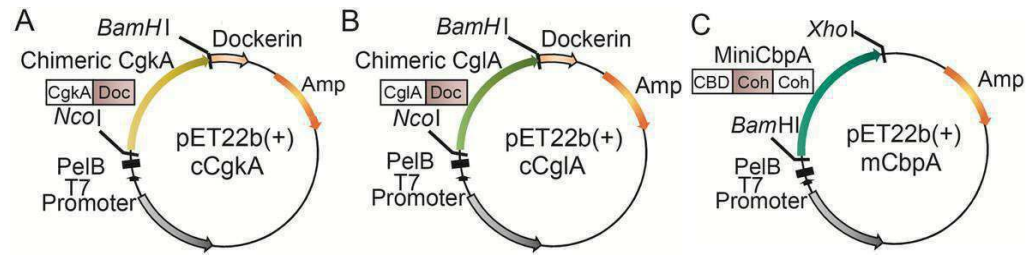
[0086] 실시예 6 : 카보하이드레이트 바인딩 모듈을 이용한 재조합 미생물의 분리정제

[0087] 카보하이드레이트 바인딩 모듈(이하 CBM)을 이용한 정제는 셀룰로오스 1 mg당 10 ug의 재조합 미생물의 비율로 상온에서 1시간 동안 교반배양으로 인하여 결합되었으며, 셀룰로오스와 결합된 CBM융합 단백질은 1,600 × g에서 10분간 원심분리 되었다. 20 mM Tris (pH 8.0)에 1 M NaCl이 함유된 버퍼와 20 mM Tris (pH 7.5) 버퍼로 각각 세척을 한 다음 50 mM Tris (pH 12.5) 버퍼로 용출하여 얻었으며, 이의 샘플을 Ni-NTA 컬럼으로 정제하였던 샘플과 비교하여 SDS-PAGE 15% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하였다. 그 결과 비슷한 위치 및 단백질 밴드를 확인할 수 있었으며, 이는 CBM을 이용한 정제가 가능함을 증명하였다(도 5).

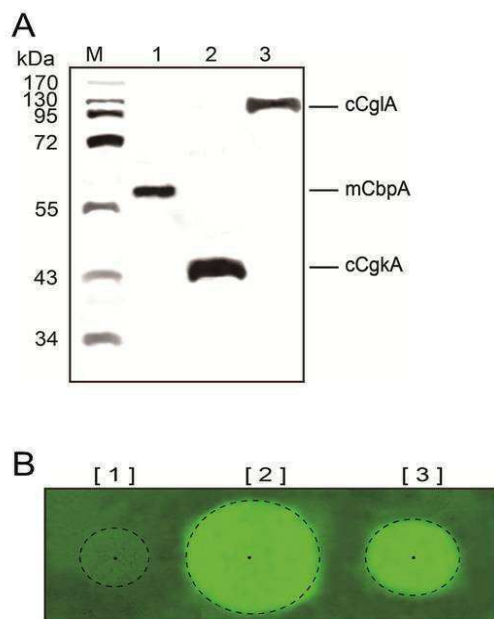
[0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

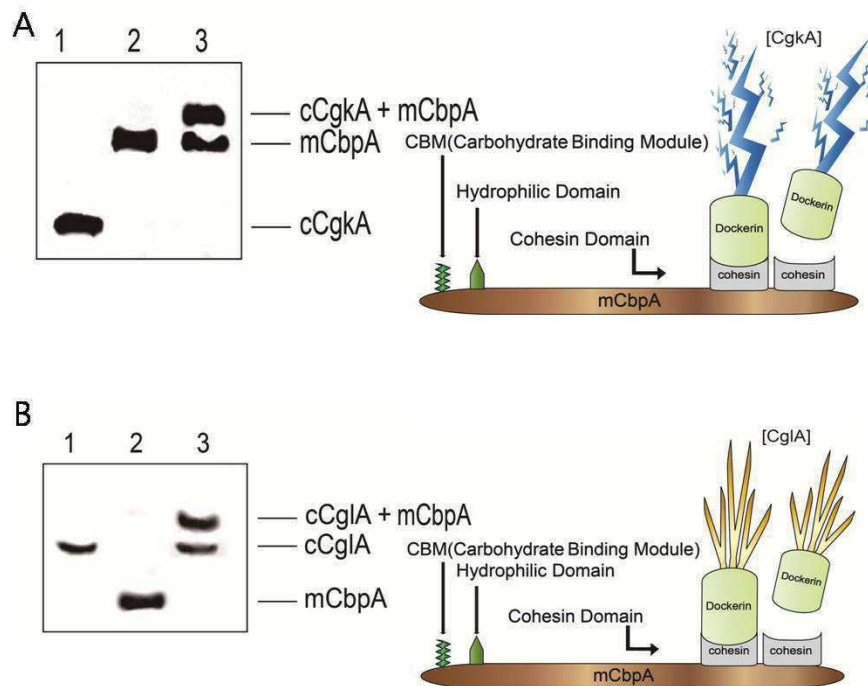
도면1



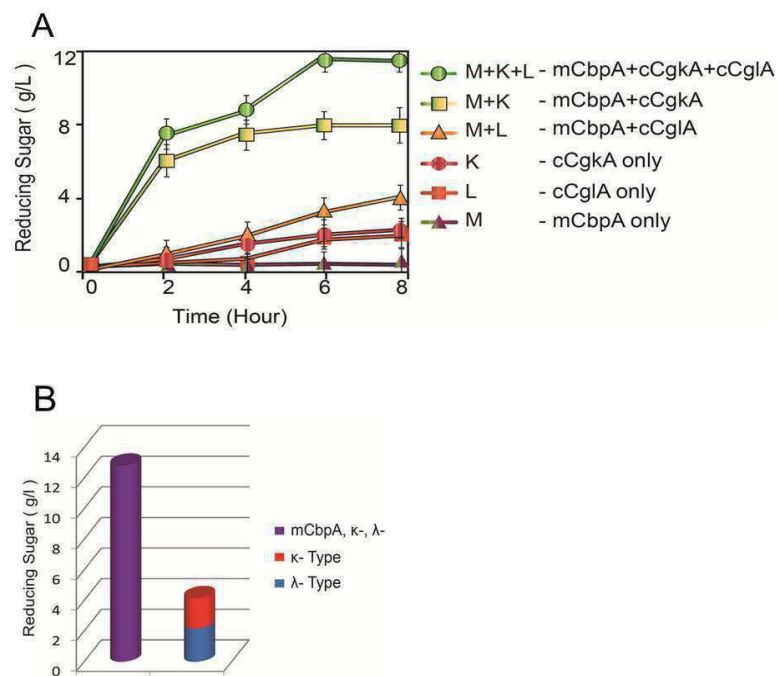
도면2



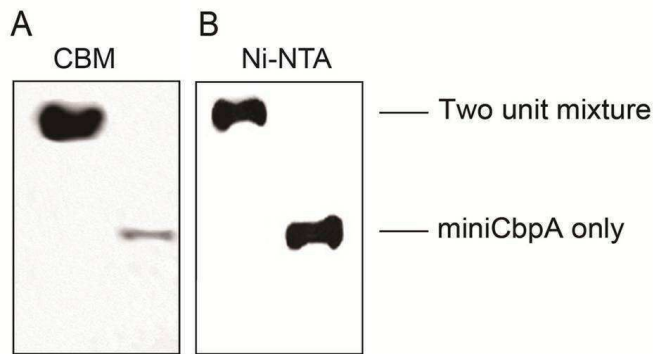
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110>	Korea University	
<120>	Recombinant Vector and Recombinant Microorganism Comprising Chimeric kappa-Carrageenase Gene and Chimeric lamda-Carrageenase Gene	
<130>	P12-B250	
<160>	12	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	1194	
<212>	DNA	
<213>	Pseudoalteromonas carrageenovora	
<400>	1	
atgaaaccta taagtattgt ggcattccct ataccagcta taagtatgct tcttttaagt		60
gcagtatcac aagcagcatc tatgcaacct cccatcgcaa aacctggtga aacatggatt		120
ttacaagcca aacgctctga cgaatttaac gtaaaagatg cgacaaagtg gaactttcaa		180
acagaaaact atgggggatg gtcttggaat aatgaaaatg cgacagtatc taatggcaaa		240
ctaaaattaa ccaactaagcg agaattctcat caacgtacat tctgggatgg ctgtaatcag		300
cagcaagttg caaattaccc actttattat acatcggttg tcgctaaatc cagagctaca		360
ggtaattatg gctattacga agctcgaatc aaaggagcga gtacatttcc tggcgtatcg		420
cctgcttttt ggatgtatag caccattgac cgttcattaa cgaaagaagg ggatgtccaa		480
tatagcgaaa tagacgtagt ggaacttact caaaaaagtg cagtgagaga gtctgatcat		540
gaattacaca atattgtagt aaaaaatgga aaaccaacat ggatgcgtcc agggctcttt		600
ccgcagacaa atcataacgg ataccatcta cctttcgatc ctcgaaatga ctttcacacc		660

tatgggtgtca atgtactaa agacaagatc acttgggtacg tagatgggtga aattgtgggc	720
gaaaaggata acttatactg gcatcgtcaa atgaatctca cattatcaca aggccttacgc	780
gcgccgcata cacaatggaa atgtaatcaa ttttaccat cagcgaataa atcagcagaa	840
ggcttcccaa catcaatgga agttgattat gtaagaacgt gggtaaaggt gggcaataac	900
aactctgctc caggcgaggg gcagtcatgt cctaacacgt ttgtagctgt caatagtgtt	960
caactaagcg cagcaaaaaca aacacttcga aagggccaat ctacaacgct agaaagcaca	1020
gttcttccaa actgtgcaac caacaagaaa gtcatttatt catcaagcaa taaaaatgtg	1080
gcaactgtga acagtgtctg cgttgtaaaa gctaaaaata aaggcactgc gacgattacg	1140
gttaaaaacta aaaacaaagg gaaaatagat aaattaacca ttgcggtgaa ttaa	1194
<210> 2	
<211> 2829	
<212> DNA	
<213> Pseudoalteromonas carrageenovora	
<400> 2	
atgaaaataa aaattctatc tgcaatggta gctagctcgt tattaattgg ctgcgttate	60
cctaccgtta aagcttctca atcgctatt aaaagtattg aaacaaaccg aacaattact	120
aaagttagaa caggaatgtt gagtggaggg tcatcaatca taactacaag ctatgaaggg	180
actgtagctg catataagtt taatggagaa aaactgtggg aaaatgaact ctcggtttt	240
atgaatcatg atatttgggt tcaagatatt aatggtgatg gacttgtaga gatatttgc	300
gcgaatgccg atggcaatgt ttactgtatt aatagtatg gttctttaaa gtggacgttt	360
ggtctaaatg aagtcctat gaactctgta actgtaatct ctgatgcaga taaaaagtat	420
gttgtggcag gtggttacga taaaaacttg tattacatat cgactaatgg tgaactttta	480
aaaacaattg aatcaggta ttaactcagaa gaaggggtgt ttggggatgg cgtcaagcct	540
gaagctcgaa ctacatactg aaatttcgtc cgtccagtaa aatctagtga cggcactgaa	600
aaactagtag ttctaggac taataatagc cttcagagtt ctggtcgggt ctatatTTTT	660
gaaccatttg ctgatttacc cagtgaag agtcgaatat ctattaaaaa ggggatagga	720
gaccttcga ctgtagattt tgataatgat ggtaatgacg aacttacgt aggtaatagt	780
gcacagatag gtgatgtgc aatttctgtt atgaatttgg atgatctgc acagaagaaa	840
agccaaatta atgacattgc acgtagaata gatcgctttg ggtatagggt tgctcaaaca	900
gaagtgttta tgaatgaagg cactcctaca tacctgacac tttttggctc taggatactt	960
ctaaccacag agtcatttga cgtgaacgat tctgaaatac ttgcaataa atactcttat	1020

tatgacatgt ggaaagataa aagttcaaat aagttggttt tagctagtgc acaaagtgg	1080
ggcagccaag tgcatattat tgatacttct aacccaagtt ggaagtctgc ttacaggaa	1140
ttagagcctc aaggtaaatt agctgcaata caagaaaata ctagagcaat tgaaaggcaa	1200
ctatctaact ttcaaaagcc tacgcgagag cgtgctcctt tgcccgtgta ttttatttca	1260
gaaagtagaa atgaaattcc aacaacaatc gagcgaagtg agtttttgta tgactacca	1320
gtatttttaa attactcaac tctaccaaat gtagagaact gggatagaag tgaagttctt	1380
gctgataatc ctaaatacag agataagaga gaccgtcgta aaaactatac actatcatct	1440
gaagaaatgt ttaataagct ttcggtgga tatgataata gcgatgggat atcacaatgg	1500
gcaggcatg gaaatgatcc gtatatgatt agtttagcta ctatgaaaag aattattagt	1560
agtggcgatg ggaaaaaaac ggtcaatata tatccagaga tagaaggaca tggagatgca	1620
tttaataaag tactaagtga tcatctctac cctttggctg agtttagtag tgagaataat	1680
gctaatttgi ttatgcgcaa taaacataca ttttggcaat caactatata tgctccagag	1740
tggtcggagt tacgttctgg acgtttagct gatgcgttg tacctgcaat ggaagaaaca	1800
acagataaat caatggaaat gagtgtggcc gggagaatgg ggttatgggc tgcaggctct	1860
gtagataatt ggggtgaaag atacgcaaga gacaatccta gttttgaccg tttacgcaa	1920
cactctcctc aaatggtccc caacctgca ctaaggcaaa taatatataa gatagcgtct	1980
ggtgccagat atataaataa cttcggcttc aatcaggagt atatgagcct tgcttgggag	2040
ttaatggta aaggcgctct ttatgtacca aagcgtgaag aattattaag ctgtcacca	2100
gttcacataa gtatgaaaga accagatcca atctacagag aaacatcaaa taatgtgaag	2160
tggactacgt tctatgatga agaaaaagac tctattccat atgtgtttag tcgcttaaat	2220
ggtacttggc caggtgcaaa aactttgcct tgggattact ctaattatgc tgccgatact	2280
aaagaaagga gattagattt tataccaaaa tttcctaag gattagtttt aattacgcct	2340
gttcagcaag gtaaatttaa agatgaaggc accgttagag gcacattagc tgataacatg	2400
caccctatct ataaagatat aatgaaagag tatattactg acggtaaaaa ctactataac	2460
cctaattggtg agcaagtaat ggctgctgat agtgtagat acagacaaat taaaaataag	2520
attgaagaaa aatcgaatct ttaccaatg actgtatcag gagaagccgc ttgggttgtt	2580
gctcaatctg ctgaaaagca tttgcgactg acgtggttg atagtgtta tttaaatccg	2640
agtaacaaag ttgctaaggt taaatttaac tctgtaacac ctgtagcgaat agtagatgta	2700
ttgtcaggtg agacattttc gccagattca aatggggttg tagaaatacc ggtcttagct	2760
ggtgctttta ggttcattga tgtgaaaatt actgaagacc ttagaaacat gcaaagtcca	2820
acattgtaa	2829

<210>	3	
<211>	159	
<212>	DNA	
<213>	Clostridium cellulovorans	
<400>	3	
	gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt	60
	ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta	120
	aatgcttttg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta	159
<210>	4	
<211>	276	
<212>	DNA	
<213>	Clostridium cellulovorans	
<400>	4	
	gttgaatfff acaactctaa caaatcagca caaacaact caattacacc aataatcaaa	60
	attactaaca catctgacag tgatttaaaf ttaaatgacg taaaagttag atattattac	120
	acaagtgatg gtacacaagg acaaaactttc tgggtgtgacc atgctgggtgc attattagga	180
	aatagctatg ttgataaac tagcaaagtg acagcaaact tcgttaaaga aacagcaagc	240
	ccaacatcaa cctatgatac atatgttgaa ttggga	276
<210>	5	
<211>	135	
<212>	DNA	
<213>	Clostridium cellulovorans	
<400>	5	
	gctactctta aaaaaggaca atttataact attcaaggaa gaataacaaa atcagactgg	60
	tcaaactaca ctcaaacaaa tgactattca ttgatgcaa gtagttcaac accagttgta	120
	aatccaaaag ttaca	135
<210>	6	
<211>	136	
<212>	DNA	
<213>	Clostridium cellulovorans	
<400>	6	
	ggtggagcta aagtacttgg tacagcacca ggtccagatg taccatcttc aataattaat	60

cctacttctg caacatttga taaaaatgta actaacaag cagatgttaa aactactatg	120
acttttaatg gtaaca	136
<210> 7	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
atatccatgg atgcatctat gcaacc	26
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
gcgcggatcc attcaccgca at	22
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
ccatggattc tcaatcggct attaaaagta	30
<210> 10	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
ggatcccaat gttgaacttt gcatgtt	27
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ggatccgcag cgacatcatc aat

23

<210> 12

<211

> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gcgcggtacc gctataggat ctccaatatt tatt

34