

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024711

(43) 공개일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/96 (2006.01) C12N 9/38 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/96 (2013.01)

C12N 9/2445 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0145363

(22) 출원일자 2023년10월27일

심사청구일자 2023년10월27일

(30) 우선권주장

1020230105676 2023년08월11일 대한민국(KR)

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 성북구 고려대로17가길 64, 103동 1003호 (안암동1가, 래미안 안암)

이명은

세종특별자치시 달빛로 80, 1220동 1702호 (종촌동, 가재마을 12단지)

(74) 대리인

위병갑

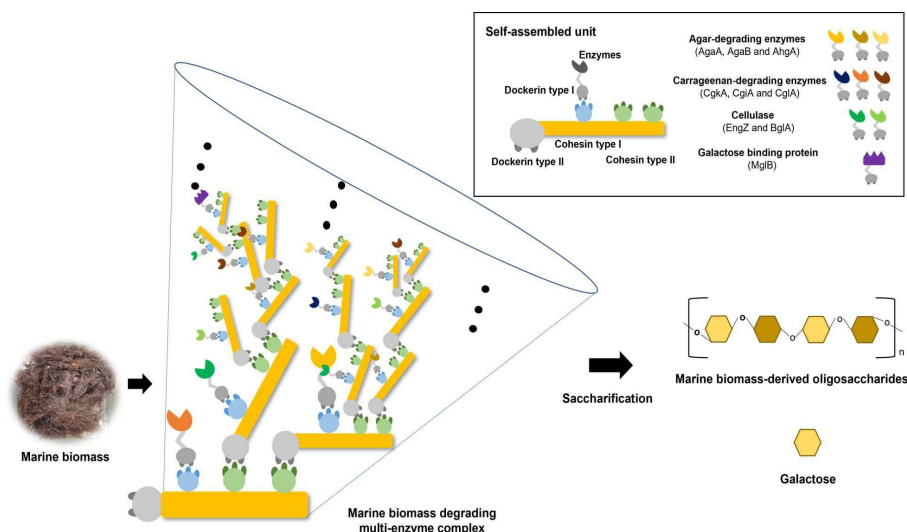
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체

(57) 요약

본 발명은 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체에 관한 것으로, 본 발명의 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스인 홍조류의 여러 구성 성분들을 한 번에 효과적으로 분해하여 발효성 당인 갈락토오스 생산 효율이 증가하는 효과를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스인 홍조류를 효과적으로 당화하고 여러 용도로 사용 가능한 발효성 갈락토오스와 같은 유용한 생리활성물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/2468 (2013.01)
C12N 9/90 (2013.01)
C12Y 302/01021 (2013.01)
C12Y 302/01081 (2013.01)
C12Y 302/01083 (2013.01)
C12Y 302/01157 (2013.01)
C12Y 302/01162 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013929
과제번호	202203092
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오산업소재국산화기술개발
연구과제명	포르피린 대량생산을 위한 공정표준화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

1개의 유형 2 도커린(Type 2 dockerin);
1개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin); 및
2개의 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin);을 포함하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 유형 2 코헤신, 유형 1 코헤신 및 유형 2 도커린이 순차적으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 유형 1 코헤신은 유형 1 도커린과 연결된 효소 또는 단백질과 결합하는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 유형 1 도커린은 형광 단백질(Fluorescent protein; FP)과 융합된 것을 특징으로 하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 형광 단백질은 초록 형광 단백질(Green fluorescent protein; GFP), 적색 형광 단백질(Red fluorescent protein; RFP), 청색 형광 단백질(Blue fluorescent protein; BFP), 황색 형광 단백질(Yellow fluorescent protein; YFP) 및 시안 형광 단백질(Cyan fluorescent protein; CFP)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 형광 단백질인 것을 특징으로 하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 단위체는 유형 2 코헤신에 다른 자가조립형 스캐폴드 단위체의 유형 2 도커린과 결합하여 자가조립되는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유형 2 도커린은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유형 1 코헤신은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 유형 2 코헤신은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 자가조립형 스캐폴드 단위체는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 자가조립형 스캐폴드 단위체.

청구항 11

제1항의 자가조립형 스캐폴드 단위체를 2개 이상 포함하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 자가조립형 효소 복합체는 베타-아가레이즈(β -Agarase), 3,6-안하이드로-알파-L-갈락토시데이즈(3,6-Anhydro- α -L-galactosidase), 카파-카라기네이즈(Kappa-carrageenase), 아이오타-카라기네이즈(Iota-carrageenase), 람다-카라기네이즈(Lambda-carrageenase), 엔도글루카나아제(Endoglucanase) 및 베타-글루코시다아제(β -Glucosidase)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 해양 바이오매스 분해 효소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 해양 바이오매스 분해 효소는 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린이 연결된 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 해양 바이오매스는 홍조류인 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 자가조립형 효소 복합체는 갈락토오스 부착 단백질, 만노스 부착 단백질, 리보오스 부착 단백질, 글루코오스 부착 단백질 및 펙틴 부착 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 단백질은 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린이 연결된 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스를 분해하는 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 18

제11항에 있어서,

상기 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스에 부착능이 우수한 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

청구항 19

제11항에 있어서,

상기 자가조립형 효소 복합체는 열 안정성이 우수한 것을 특징으로 하는, 자가조립형 효소 복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 해양 바이오매스(Marine Biomass)는 전 세계적으로 많은 양 존재하는 바이오매스이며, 해양 바이오매스로는 대표적으로 해양 조류(Marine Algae)가 있다. 해양 조류는 크게 갈조류(Brown Algae), 홍조류(Red Algae), 녹조류(Green Algae)로 구분되어지며, 이러한 해양 조류는 난분해성 성분들인 아가(Agar), 카라기난(Carrageenan) 및 셀룰로오스(Cellulose)로 구성되어 있어 재활용이 어려운 것으로 알려져 있다.

[0004] 혐기성 미생물에서 주로 발견되는 셀룰로솜(Cellulosome)은 외부의 에너지를 얻기 위해 세포 외벽에 존재하는 효소 복합체이다. 셀룰로솜의 구조는 코헤신(Cohesin) 도메인이 여러 개 존재하고 있다. 세포 외분비 효소 부분에는 도커린(Dockerin) 도메인이 연결되어 있으며, 코헤신과 도커린은 칼슘 이온에 의해 서로 부착하는 기능이 있어, 효소 복합체를 이루게 해준다. 코헤신-도커린 상호작용을 응용하여 효소들을 셀룰로솜에 연결하여 효소

작용에 대한 향상된 시너지 효과를 도모할 수 있으므로, 이를 이용하여 해양 바이오매스를 효과적으로 분해하는 효소 복합체를 만들고자 하였다.

[0005] 본 발명자들은 해양 조류의 난분해성 성분인 아가, 카라기난 및 셀룰로오스를 한번에 효과적으로 분해할 수 있는 효소 복합체를 만들고자 하였다. 난분해성 성분을 효과적으로 분해하기 위해서는 다양한 효소와 보조단백질을 사용해야 하므로, 아가, 카라기난 및 셀룰로오스를 분해하는 효소인 아가레이즈, 카라기네이즈 및 셀룰레이즈를 사용하여 자가조립형 효소 복합체를 제조하였다. 자가조립형 효소 복합체는 해양 조류에 대한 부착 관련 구조를 가지고 있지 않은 문제점이 있으므로, 이를 해결하기 위해 갈락토오스 부착 단백질을 추가하여 부착능을 부여 및 향상시켜 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1864350호(2018.05.29.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 자가조립형 스캐폴드 단위체를 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 자가조립형 스캐폴드 단위체를 2개 이상 포함하는 자가조립형 효소 복합체를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 1개의 유형 2 도커린(Type 2 dockerin); 1개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin); 및 2개의 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin);을 포함하는 자가조립형 스캐폴드 단위체를 제공한다.

[0012] 이어서, 본 발명은 자가조립형 스캐폴드 단위체를 2개 이상 포함하는 자가조립형 효소 복합체를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스인 홍조류의 여러 구성 성분들을 한 번에 효과적으로 분해하여 발효성 당인 갈락토오스 생산 효율이 증가하는 효과를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 해양 바이오매스 분해 효소를 포함하는 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스인 홍조류를 효과적으로 당화하고 여러 용도로 사용 가능한 발효성 갈락토오스와 같은 유용한 생리활성물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 효소 단위체 및 효소 복합체를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 제조합 균주들로부터 효소 및 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 스캐폴드 단위체의 확장성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 도커린이 연결된 초록 형광 단백질(GFP doc) 또는 해양 바이오매스 분해

효소들과 함께 구성된 자가조립형 스캐폴드 단위체의 확장성을 전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 해양 바이오매스 분해 효소들의 기질 특이성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 6는 본 발명의 일 실시예에 있어서, MgIB의 해양 바이오매스에 대한 부착능 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 효소 복합체의 분해 효율을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 효소 복합체의 효소 비율 최적화를 나타낸 도이다.

도 9은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 효소 복합체의 열 안정성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 10는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 자가조립형 효소 복합체의 해양 바이오매스 2종에 대한 분해능을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0018] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0019] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0021] 일 측면에서, 본 발명은 1개의 유형 2 도커린(Type 2 dockerin); 1개의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin); 및 2개의 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin);을 포함하는, 자가조립형 스캐폴드 단위체를 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 “코헤신(Cohesin)”은 셀룰로좀 구조에 존재하는 도메인으로, 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)과 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin)이 존재한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “도커린(Dockerin)”은 세포 외분비 효소 부분에 연결되어 있는 도메인으로, 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)과 유형 2 도커린(Type 2 dockerin)이 존재한다. 코헤신과 도커린은 칼슘 이온에 의해 서로 부착하는 기능이 있어, 효소 복합체의 형태를 이룰 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 “유형 2 도커린(Type 2 dockerin)”은 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin)과 연결되어 자가조립 부분으로 사용된다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 “유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)”은 유형 1 도커린(Dockerin)이 있는 효소 또는 단백질과 연결이 가능하다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 스캐폴드 단위체는 상기 유형 2 코헤신, 유형 1 코헤신 및 유형 2 도커린이 순차적으로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 코헤신은 유형 1 도커린과 연결된 효소 또는 단백질과 결합하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 도커린은 형광 단백질(Fluorescent protein; FP)과 융합된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형광 단백질은 초록 형광 단백질(Green fluorescent protein; GFP), 적색 형광 단백질(Red fluorescent protein; RFP), 청색 형광 단백질(Blue fluorescent protein; BFP), 황색 형광

단백질(Yellow fluorescent protein; YFP) 및 시안 형광 단백질(CFP; Cyan fluorescent protein)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 형광 단백질, 더 바람직하게는 초록 형광 단백질인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어 “초록 형광 단백질(Green fluorescent protein; GFP)”은 유전자에 발현되는 형광을 내는 단백질로, 특정 조건이나 시점에서 특정 유전자의 발현 상태를 시각적으로 관찰하기 위하여 사용된다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단위체는 유형 2 코헤신에 다른 자가조립형 스캐폴드 단위체의 유형 2 도커린과 결합하여 자가조립되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 2 도커린은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 1 코헤신은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유형 2 코헤신은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 스캐폴드 단위체는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 상기 자가조립형 스캐폴드 단위체를 2개 이상 포함하는 자가조립형 효소 복합체를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 효소 복합체는 베타-아가레이즈(β -Agarase), 3,6-안하이드로-알파-L-갈락토시다이스(3,6-Anhydro- α -L-galactosidase), 카파-카라기네이스(Kappa-carrageenase), 아이오타-카라기네이스(Iota-carrageenase), 람다-카라기네이스(Lambda-carrageenase), 엔도글루카나아제(Endoglucanase) 및 베타-글루코시다아제(β -Glucosidase)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 해양 바이오매스 분해 효소를 더 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 해양 바이오매스 분해 효소는 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)과 융합하여 사용되거나, 효소 자체적으로 보유하고 있는 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)을 이용하여 사용된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어 “엔도글루카나아제(Endoglucanase)”는 섬유소를 분해하는 효소 중 하나로서, 주로 식물의 세포벽에서 발견되는 섬유소 중에서도 베타-글루칸 결합을 가진 부분을 분해하는 효소이다. 엔도글루카나아제(EngZ)는 효소 내에 유형 1 도커린(Type 1 dockerin) 도메인을 포함한다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 해양 바이오매스 분해 효소는 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린이 연결된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 해양 바이오매스는 홍조류인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 효소 복합체는 갈락토오스 부착 단백질, 만노스 부착 단백질, 리보오스 부착 단백질, 글루코오스 부착 단백질 및 펩틴 부착 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질, 더 바람직하게는 갈락토오스 부착 단백질을 더 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단백질은 유형 1 도커린(Type 1 dockerin)과 융합하여 사용된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단백질은 C-말단(C-terminal)에 유형 1 도커린이 연결된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 갈락토오스 부착 단백질은 MglB인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스를 분해하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 효소 복합체는 해양 바이오매스에 부착능이 우수한 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립형 효소 복합체는 열 안정성이 우수한 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명하였으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0053] <실시예 1> 유전자 증폭 및 클로닝

[0054] 해양 바이오매스인 홍조류의 주요 구성 성분인 아가, 카라기난, 셀룰로오스 분해에 관련된 효소들로 베타-아가레이즈 2종(β -Agarase; *agaA*, *agaB*), 3,6-안하이드로-알파-L-갈락토시테이즈 1종(3,6 Anhydro- α -L-galactosidase; *ahgA*), 카라기네이즈 3종(Kappa-carrageenase; *cgkA*, Iota-carrageenase; *cgiA*, Lamda-carrageenase; *cglA*), 셀룰레이즈 2종(EndoglucanaseZ; EngZ; *Cloce1_2741*, β -Glucosidase; *bg1A*)을 선정하였으며, 상기 효소들을 여러 균주 유래에서 증폭하여 유전자를 확보하였다.

[0055] *agaA*, *agaB*, *ahgA*, *cgiA* 유전자들은 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*) 균주의 지노믹 DNA(Genomic DNA)에서 해당 유전자를 증폭하여 확보하였다. *bg1A* 유전자는 클로스트리디움 써모세럼(*Clostridium thermocellum*) 균주의 지노믹 DNA에서 해당 유전자를 증폭하여 확보하였다. *cglA* 유전자는 슈도알테로모나스 카라지노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovora*) 균주의 지노믹 DNA에서 해당 유전자를 증폭하여 확보하였다. 갈락토오스 부착 단백질인 *mg1B* 유전자는 대장균 k12(*Escherichia coli* k12) 지노믹 DNA에서 해당 유전자를 증폭하여 확보하였다. *cgkA*와 *Cloce1_2741*(EngZ) 유전자는 각각 슈도알테로모나스 카라지노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovora*), 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*)에서 유래하였으며, 해당 유전자와 제조합 유전자원은 연구실 자원(Lab stock)을 활용하였다.

[0056] 모든 해양 바이오매스 분해 관련 효소들에 대한 유전자들은 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래의 엔도글루칸네이즈 비(Endoglucanase B; *engB*) 구조 내 유형 1 도커린(Type 1 dockerin; GenBank accession no. M75706.1)과 융합 또는 효소 자체적으로 보유하고 있는 유형 1 도커린을 이용하였다. 셀룰로솜 기반 자가조립형 스캐폴드 단위체(Self-assembled scaffold unit; SA)(서열번호 5)은 클로스트리디움 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래의 유형 1 코헤신(Type 1 cohesin)(서열번호 2), 클로스트리움 써모세럼(*Clostridium thermocellum*) 유래의 2개의 유형 2 코헤신(Type 2 cohesin)(서열번호 3 또는 서열번호 4) 및 1개의 유형 2 도커린(Type 2 dockerin)(서열번호 1)을 융합하여 만들어졌으며(도 1 참조), 해당 유전자와 유전자원은 연구실 자원(Lab stock)을 활용하였다.

[0057] 초록 형광 단백질(Green fluorescent protein; GFP)는 *engB* 유래의 유형 1 도커린으로 융합(GFP doc)하였으며, 유전자는 연구실 자원(Lab Stock)을 통해 확보하였다. 이와 같이 확보한 해양 바이오매스 분해 관련 유전자들과 GFP doc 유전자를 pColdII 벡터 또는 pET22b(+)로 클로닝을 진행하여 최종적으로 각 효소 유전자-유형 1 도커린의 형태로 만들었다. 본 발명에서 사용된 유전자 증폭 및 클로닝에 대한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머 이름	서열 (5'→3')
AgaA-F(SacI)	aatGAGCTCCAGGACTGGAACGGAAT
AgaA-R(HindIII)	cccAAGCTTTTGGACAATAAGTTTGTACTCTG
AgaB-F(SacI)	cccGAGCTCGGCGACAATTCAAAATT
AgaB-R(HindIII)	attGAGCTCTGCAATCTCCCAAACTAC

AhgA-F(SacI)	attGAGCTCTGCAATTCTCCCAAACTAC
AhgA-R(HindIII)	cccAAGCTTTTGTGTTTTTACTCCTTTAGCTACG
CgiA-F(SacI)	attGAGCTCTGCACCAAGAAGTGACG
CgiA-R(XhoI)	aaccCTCGAGGTTACACGAAGTAATACTACCTAG
CglA-F(NcoI)	aatCCATGGATTCTCAATCGGCTATTA
CglA-linker-EngB doc-R(ov)	GGAGCCAGCGGATCCCAATGTTGAACTTGCGATG
CglA-linker-EngB-F(ov)	CAAAGTTCAACATTGGGATCCGCTGGCTCCGCT
CglA-R(NotI)	cccGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGTAAGCATTTTAAAG
BglA-F(SacI)	cccGAGCTCtcaaagataaactttcccaaaagatttca
BglA-linker-EngB doc-R(ov)	GTTAACATCACCAATgaattccccagaaccagcagcgagccagcgatccaaaaccgtgtttttg attac
BglA-linker-EngB doc-F(ov)	aaaaacaacggttttggatccgctggctccgctgctgttctgggaattcATTGGTGATGTTAACG ATGA
BglA-R(KpnI)	cccGGTACCtcaCAATATAAAAACTTTCAAATTAGCAAAATC
GFP doc-F(SacI)	cccGAGCTCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG
GFP doc-R(HindIII)	cccAAGCTTTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
MglB-F(SacI)	aatGAGCTCGCTGATACTCGCATTTGGTG
MglB-R(HindIII)	cccAAGCTTTTCTTGCTGAATTCAGCCAG
Linker-EngB doc-F(SalI)	atatGTCGACggatccgctggctccgctgc
Linker-EngB doc-R(PstI)	cgcgCTGCAGtaaaagcatTTTTtaagaacagctaaatc
SA-F(EcoRI)	ccccGAATTCaaacgaaaaataaagattatcaattttgttaac
SA-R(PstI)	aatCTGCAGctgtgcgtcgtaatacact

[0061] <실시예 2> 효소 및 단백질 발현 확인

[0062] 상기 실시예 1에서 확보한 유전자 및 이를 클로닝한 플라스미드를 대장균에 도입하여 형질전환하였다. 재조합 균주의 명칭을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

서열번호	재조합 균주명	특성
서열번호 11	AgaA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_AgaA
서열번호 12	AgaB	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta harboring pColdII_AgaB
서열번호 13	AhgA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_AhgA
서열번호 14	CgkA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_CgkA
서열번호 15	CgiA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_CgiA
서열번호 16	CglA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET22b(+)_CglA
서열번호 17	EngZ	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET22b(+)_EngZ
서열번호 18	BglA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_BglA
서열번호 19	MglB	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_MglB
서열번호 5 (아미노산 서열)/ 서열번호 10 (염기서열)	SA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pColdII_SA
서열번호 20	GFP doc	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta harboring pColdII_GFP

[0066] 상기 표 2의 재조합 균주들로부터 효소 및 단백질을 발현하기 위하여 배양을 하였다. 엠포실린(Ampicilin)이 함유된 5 mL LB 배지에 재조합 균주들을 접종하여 20시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 배양 후, 엠포실린이 함유된 500 mL LB 배지에 옮겨 본 배양을 진행하였다. 본 배양은 37 °C에서 진행하였으며, OD₆₀₀이 1에 도달하면 최종 농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가한 후, 16 °C에서 24시간 동안 배양하여 유전자 발현을 유도하였다. 배양

후, 원심분리를 통해 상등액을 제거하여 세포를 모았다. 모은 재조합 균주 세포들을 초음파를 이용하여 파쇄한 후, 원심분리를 통해 상등액을 얻었다. 이를 이미다졸(Imidazol) 농도 차이 (~20 mM)에 의한 친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 단백질의 N-terminal에 연결되어 있는 His-tag으로 정제하였다. 정제 후, 10% SDS-PAGE gel로 전기영동을 수행하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.

[0067] 도 2에서 보듯이, 코마시블루(Comassie blue dye)를 통해 염색한 결과가 예상한 단백질 사이즈[AgaA(66.77 kDa), AgaB(46.53 kDa), AhgA(52.69 kDa), CgkA(48.48 kDa), CgiA(62.26 kDa), CglA(109.01 kDa), EngZ(78.87 kDa), BglA(58.08 kDa), SA(70.95 kDa), MglB(43.67 kDa)]와 동일한 위치에서 나타났다.

[0068] 이를 통해, 재조합 균주들로부터 해당 효소 및 단백질이 발현되었다는 것을 확인하였다.

[0070] <실시예 3> 자가조립형 스캐폴드 단위체의 확장성 측정

[0071] 3-1. Native PAGE, 형광 흡광도 및 발광 세기 측정

[0072] 상기 실시예 2에서 발현된 자가조립형 스캐폴드 단위체(SA), GFP doc을 사용하여 자가조립형 스캐폴드 단위체의 확장성을 확인하기 위하여, 자가조립형 스캐폴드 단위체와 GFP doc의 연결 반응을 진행하였다.

[0073] 다양한 농도의 자가조립형 스캐폴드 단위체(SA)과 GFP doc(8, 9, 10, 11, 12, 30, 50, 80 μ M)를 4 $^{\circ}$ C에서 25 mM 시트르산나트륨(Sodium citrate)(pH 6.0)과 15 mM 염화칼슘(Calcium chloride, CaCl_2)이 혼합된 용액에서 1 시간 동안 연결 반응을 진행하였다. 반응 후, 13000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 상등액을 분리하였으며, 상기 상등액을 10% Native PAGE와 형광 흡광도 측정기(Fluorescence microplate reader)를 통해 excitation 485 nm, emission 510 nm, flash 10 조건에서 측정하였다. 대조군은 GFP doc만 있는 샘플로 하였다. Native PAGE를 수행하여 측정된 결과를 도 3(A)에 나타내었으며, 형광 흡광도 측정기를 수행하여 측정된 결과를 도 3(B) 내지 3(C)에 나타내었다.

[0074] 도 3(A)에서 보듯이, Native PAGE에서 SA와 GFP doc이 단일로 존재했을 때에 비하여 SA와 GFP doc를 혼합하였을 때 높은 위치에 여러 밴드들이 생성되었다. 도 3(B)에서 보듯이, 형광 발광 정도 또한 SA와 GFP doc를 혼합하였을 경우 더 높은 발광 정도를 보였다. 도 3(C)에서 보듯이, SA의 농도를 증가시키기에 따라 발광 정도 차이가 증가되었다. 도 3(D)에서 보듯이, 육안으로 발광의 세기가 세졌다.

[0075] 이를 통해, GFP doc을 사용하여 자가조립형 스캐폴드 단위체가 연장되었음을 확인하였다.

[0077] 3-2. 전자현미경 측정

[0078] 상기 실시예 2 및 3-1에서 확보한 GFP doc과 해양 바이오매스 분해 효소들을 자가조립형 스캐폴드 단위체(SA)와 연결하여, 자가조립형 스캐폴드 단위체의 확장성을 확인하기 위하여, 전자현미경(Field emission scanning electron microscopy; FESEM)을 통해 해당 샘플들을 측정하였다.

[0079] 자가조립형 다중 효소 복합체의 스캐폴드 단백질 내 코헤신(Cohesin) 자리 수에 따라 GFP doc 또는 총 8가지 또는 9가지(갈락토오스 부착 단백질 MglB 포함) 해양 바이오매스 분해 효소들이 1:1로 연결되도록 연결 반응을 진행하였다. 해당 GFP doc 또는 해양 바이오매스 분해 효소들 - 자가조립형 다중 효소복합체 스캐폴드 단백질 연결 반응은 25 mM 시트르산나트륨(Sodium citrate)(pH 6.0)과 15 mM 염화칼슘(Calcium chloride, CaCl_2)이 혼합된 완충액에서 4 $^{\circ}$ C, 18시간 동안 진행하였다. 해당 시료들은 얇은 유리에 떨어뜨려 상온에서 건조시킨 후 전자현미경을 통해 관찰하였으며, 이를 도 4에 나타내었다.

[0080] 도 4에서 보듯이, GFP doc 단독 또는 해양 바이오매스 분해 효소 혼합액 과 비교하여 GFP doc 또는 해양 바이오매스 분해 효소 혼합액에 SA가 추가된 경우, 상대적으로 더 큰 사이즈의 구조를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 해양바이오매스 분해 효소 혼합액, SA, MglB까지 추가된 경우, 가장 큰 사이즈의 구조를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 이를 통해, GFP doc 또는 해양 바이오매스 분해 효소 혼합액에 자가 조립형 스캐폴드(SA)가 추가되면 해당 효소들이 연결된 거대 효소 복합체가 형성 가능함을 확인하였다.

[0083] <실시예 4> 해양 바이오매스 분해 효소들의 기질 특이성 측정

[0084] 상기 실시예 2에서 발현된 해양 바이오매스 분해 효소들의 해양 바이오매스 관련 기질들에 대한 기질 특이성을 확인하기 위하여, 관련 반응을 수행하여 특정 활성(Specific activity)을 측정하였다.

[0085] 0.5% 아가(Agar), 0.5% 아가로오스(Agarose), 0.5% 카파 카라기난(Kappa carrageenan), 0.5% 아이오타 카라기난(Iota carrageenan), 0.5% 람다 카라기난(Lamda carrageenan), 0.1 mM 셀로트리오스(Cellotriose)를 기질로 사용하였으며, 50 °C에서 10 mM 시트르산나트륨 완충액(pH 6.0)을 사용하여 18시간 동안 반응을 진행하였다. 반응은 glucose oxidase kit를 통해서 생성되는 글루코오스 양을 측정하였으며, DNS 방식을 통해서 환원당량을 측정하였다. 측정된 특정 활성(specific activity)(nmole/min·mg 또는 μmole/min·mg)를 계산하여 도 5에 나타내었다.

[0086] 도 5에서 보듯이, 아가레이즈인 AgaA 및 AgaB는 아가에 대한 분해능이 높았으며(도 5(A)), AgaA, AgaB 및 AhgA는 아가로오스에 대한 분해능이 높았고(도 5(B)), 카라기네이즈인 CgkA, CgiA 및 CglA는 각각의 목표 기질 카라기난에 대한 분해능이 높았다(도 5(C), 5(D) 및 5(E)). 셀룰레이즈인 EngZ 및 BglA는 셀로트리오스에 대한 분해능이 높았다(도 5(F)).

[0087] 이를 통해, 홍조류의 주요 구성 성분인 아가, 카라기난, 셀룰로오스를 분해하는 효소들이 잘 선정되었음을 확인하였다.

[0089] <실시예 5> Mg1B의 해양 바이오매스에 대한 부착능 측정

[0090] 상기 실시예 2에서 발현한 갈락토오스 부착 단백질인 Mg1B의 아가 및 2종의 해양 바이오매스에 대한 부착능을 확인하기 위하여, 부착 반응을 진행하였다.

[0091] 2종의 해양 바이오매스 중 하나는 구입하여 사용하였으며, 하나는 (주)3FC를 통해 제주도에서 획득한 것을 사용하였다. 2종의 해양 바이오매스를 물로 3회 세척하여 드라이오븐에서 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 제조하였다. 제조한 2종의 해양 바이오매스 기질 또는 아가 60 mg에 200 μg/mL의 Mg1B를 첨가하여 100 mM 인산 나트륨(Sodium phosphate) 완충액(pH 7.0)에서 최종 부피 700 μL로 부착 반응을 수행하였다. 부착 반응은 15 °C에서 45분 동안 300 rpm에서 수행하였다. 부착 반응 후, 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고 불지 않은 단백질의 양을 브래드포드 시약(Bradford reagent)을 통해서 595 nm에서 분석하였다. 기준이 되는 스탠다드는 알부민 단백질(BSA; Bovine serum albumin)을 사용하였다. 넣어진 단백질 양과 불지 않은 단백질 양을 퍼센트화하여 부착능(%)을 계산하였으며, 이를 도 6에 나타내었다.

[0092] 도 6에서 보듯이, 아가에 대해서는 알부민 단백질의 부착능은 33.35%, Mg1B의 부착능은 43.43%로 Mg1B의 부착능이 대략 10% 가량 높았다. 한편, 알부민 단백질의 자연 유래 해양 바이오매스에 대한 부착능은 74.34%이며, 구매된 해양 바이오매스에 대한 부착능은 73.00%인 반면, Mg1B의 부착능은 2종 해양 바이오매스에 대하여 모두 100%였다.

[0093] 이를 통해, 갈락토오스 부착 단백질인 Mg1B가 해양 바이오매스에 대한 높은 부착능을 보이는 것을 확인하였다.

[0095] <실시예 6> 자가조립형 다중 효소 복합체의 분해 효율 측정

[0096] 상기 실시예 2, 3 및 5에서 확보한 해양 바이오매스 분해 효소들이 결합된 자가조립형 다중 효소 복합체의 효소적 활성을 확인하기 위하여, 해양 바이오매스 분해 효율을 측정하였다.

[0097] 자가조립형 다중 효소 복합체의 스캐폴드 단백질 내 코헤신(Cohesin) 자리 수에 따라 총 8가지 또는 9가지(갈락토오스 부착 단백질 Mg1B 포함) 해양 바이오매스 분해 효소들이 1:1로 연결되도록 연결 반응을 진행하였다. 해당 해양 바이오매스 분해 효소들 - 자가조립형 다중 효소복합체 스캐폴드 단백질 연결 반응은 25 mM 시트르산나트륨(Sodium citrate)(pH 6.0)과 15 mM 염화칼슘(Calcium chloride, CaCl₂)이 혼합된 완충액에서 4 °C, 18시간 동안 진행하였다. 이렇게 연결된 자가조립형 다중 효소복합체와 단순 효소 혼합액, 단일 효소를 0.5% 아가(Agar), 0.5% 아가로오스(Agarose), 0.5% 카파 카라기난(Kappa carrageenan), 0.5% 아이오타 카라기난(Iota carrageenan), 0.5% 람다 카라기난(Lamda carrageenan), 0.5% 카르복시메틸 셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose, CMC) 및 0.1 mM 셀로트리오스(Cellotriose), 아가, 3종의 카라기난, 카르복시메틸 셀룰로오스 및

셀로트리오스 혼합 기질을 50 °C에서 18시간 동안 반응하였다. 반응 후, 측정된 분해 효율을 도 7에 나타내었다.

[0098] 도 7에서 보듯이, 아가에서는 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소에 대해 높은 환원당 생산능을 보였으며, 효소 혼합액(Mixture)에 비해서는 비슷하거나 살짝 더 높은 환원당 생산능을 보였다(도 7(A)). 아가로오스에서는 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소와 단순 효소 혼합액(Mixture)보다는 높은 환원당 생산능을 보였다(도 7(B)). 카파 카라기난에서는 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소보다는 높은 환원당 생산능을 보였으나, 효소 혼합액과는 비슷하거나 낮은 경향을 보였다(도 7(C)). 아이오타 카라기난에서는 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소 및 효소 혼합액의 환원당 생산량과 유사한 경향을 보였다(도 7(D)). 람다 카라기난에서는 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소보다는 높으나 효소 혼합액과는 비슷한 정도의 환원당 생산능을 보였다(도 7(E)). 셀로트리오스에서는 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소보다는 높으나 효소 혼합액과 비슷한 정도의 환원당 생산능을 보였다(도 7(F)). 또한, 아가, 3종의 카라기난, 카르복시메틸셀룰로오스 및 셀로트리오스 혼합 기질에 대해서 SA 및 MgIB가 도입된 SA가 단일 효소 및 효소 혼합액에 비해 높은 환원당 생산능을 보였다(도 7(G)).

[0099] 이를 통해, 해양 바이오매스가 분해 가능한 효소 복합체는 아가, 아가로오스에 대해서 높은 분해능을 보여 향상된 효소 반응이 있는 반면, 다른 기질에 대해서 효소 혼합액과 비교 시 비슷하거나 효소 활성 저해 현상이 거의 없는 것을 확인하였다. 또한 혼합 기질에 대해서 더 효과적인 것을 확인하였다.

[0101] <실시예 7> 자가조립형 다중 효소 복합체의 enzyme kinetics 측정

[0102] 상기 실시예 2, 3 및 5에서 확보한 해양 바이오매스 분해 효소들이 결합된 자가조립형 다중 효소 복합체의 효소적 활성을 확인하기 위하여, enzyme kinetics를 측정하였다.

[0103] 자가조립형 다중 효소 복합체, 효소 혼합액 및 단일 효소를 4-Nitrophenyl-β-galactopyranoside (pNPβGal; 0.0625-1mM), 아가로오스(Agarose)(0.125-2%), 아가(Agar)(0.03125-0.5%)와 10 mM 시트르산나트륨(Sodium citrate)(pH 6.0)과 50 °C에서 pNPβGal은 1시간 동안, 아가 및 아가로오스는 18시간 동안 반응하였다. pNPβGal의 반응은 0.1 N NaOH를 통해 반응을 종결하였으며, 방출되는 4-나이트로페놀 (4-Nitrophenol)을 400 nm에서 측정하였다. 아가, 아가로오스의 반응은 생산되는 환원당을 DNS 방법으로 540 nm에서 측정하였다. 측정된 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0105]

Substrates	Enzymes	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$)	k_{cat}/K_m ($\text{mM} \cdot \text{min}$)
pNPβGal	Mixture	$1.22 \pm 7.66 \times 10^{-6}$	1.69 ± 0.01	$0.16 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	$0.72 \pm 0.06 \times 10^{-1}$
	Mixture with SA	1.83 ± 0.11	2.26 ± 0.18	0.24 ± 0.01	0.81 ± 0.04
	Mixture with SA and MgIB	$2.29 \pm 0.02 \times 10^{-2}$	2.70 ± 0.02	$0.30 \pm 0.02 \times 10^{-3}$	$0.85 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
Substrates	Enzymes	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$)	k_{cat}/K_m ($\text{mM} \cdot \text{min}$)

Agarose	Mixture	$0.12 \pm 0.03 \times 10^{-1}$	7.45 ± 0.03	$0.16 \times 10^{-1} \pm 0.33 \times 10^{-3}$	$0.16 \times 10^{-1} \pm 0.03 \times 10^{-2}$
	Mixture with SA	$0.14 \pm 0.03 \times 10^{-1}$	7.81 ± 0.02	$0.18 \times 10^{-1} \pm 0.30 \times 10^{-3}$	$0.18 \times 10^{-1} \pm 0.03 \times 10^{-2}$
	Mixture with SA and MglB	$0.14 \pm 0.04 \times 10^{-1}$	9.31 ± 0.04	$0.18 \times 10^{-1} \pm 0.45 \times 10^{-3}$	$0.15 \times 10^{-1} \pm 0.04 \times 10^{-2}$
Agar	Mixture	1.22 ± 0.22	6.42 ± 0.30	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Mixture with SA	0.99 ± 0.17	4.36 ± 0.30	0.13 ± 0.02	0.23 ± 0.02
	Mixture with SA and MglB	0.91 ± 0.13	3.90 ± 0.12	0.12 ± 0.01	0.23 ± 0.02

[0106] 상기 표 3에서 보듯이, ρ NP β Gal의 반응에서 SA가 효소 혼합액인 Mixture보다 높은 k_{cat} , V_{max} 및 k_{cat}/K_m 을 보였으며, 갈락토오스 부착 단백질인 MglB가 추가된 경우, 더 높은 수치를 보였다. 아가로오스에 대해서도 Mixture에 비해 SA가 더 높은 k_{cat} 및 V_{max} 을 보였으며, 아가에 대해서는 SA 및 MglB가 추가된 SA에서 Mixture에 비해 K_m 이 더 낮아졌다.

[0107] 이를 통해, SA와 MglB가 기질에 따라 상대적으로 빠른 효소 반응 속도와 기질에 대한 높은 친화도에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

[0109] <실시예 8> 자가조립형 다중 효소 복합체 최적화

[0110] 해양 바이오매스는 여러 성분의 혼합 형태로 존재하므로, 다양한 조성의 인공 해양 바이오매스 기질에 대한 당화 효율을 향상시키기 위하여, 상기 실시예 2에서 발현한 해양 바이오매스 분해 효소들의 비율을 조정하여 최적의 당화 효율을 가지는 효소 비율을 찾고자 하였다.

[0111] 아가, 3종의 카라기난, CMC(0.1 mM 셀로트리오스 추가) 혼합액의 비율은 60:10:10:10:10로 목표 기질에 따라서 그 비율을 조정하였으며, 목표 기질에 관련된 효소의 양을 1배 또는 2배 증대시키고 이 효소들이 자가조립형 스캐폴드 단백질에 1:1로 연결될 수 있도록 자가조립형 스캐폴드 단백질의 비율을 조정하였다. 최종적으로 비율이 변경된 자가조립형 다중 효소 복합체를 제조하였다. 이렇게 만든 자가조립형 다중 효소 복합체는 다양한 비율의 기질들과 50 °C에서 18시간 동안 반응을 진행하였다. 해당 반응액을 DNS 반응을 통해 540 nm에서 측정하여 생성된 환원당량을 상대적인 값으로 분석하였으며, 이를 도 8에 나타내었다.

[0112] 도 8에서 보듯이, 아가(Agar)가 60 비율일 때, 아가레이즈 및 3,6-안하이드로-알파-L-갈락토시데이즈 (AgaA, AgaB 및 AhgA)의 비율을 2배 증대시키면 분해 효율이 증가하였다. 이와 마찬가지로, 람다 카라기난(Lamda carrageenan)이 60 비율일 때, CglA의 비율을 2배 증대시키면 분해 효율이 증가하였다.

[0113] 이를 통해, 아가와 람다 카라기난 관련 효소의 비율을 증대시키면, 더 높은 당화 효율을 얻을 수 있다는 것을 확인하였다.

[0115] <실시예 9> 자가조립형 다중 효소복합체의 열 안정성 확인

[0116] 상기 실시예 2, 3 및 5에서 확보한 해양 바이오매스 분해 효소들과 효소가 결합된 자가조립형 다중 효소 복합체의 열 안정성을 확인하기 위하여, 열 안정성 반응을 진행하였다. 일반적인 해양 바이오매스 관련 반응은 50 °C에서 이루어지므로, 더 높은 온도인 60 °C에서의 열 안정성을 확인하였다.

[0117] 효소 혼합액과 자가조립형 다중 효소 복합체를 60 °C에서 0, 0.5, 1, 3, 6시간 동안 열처리를 하고 원심분리한 후, 상등액을 1 mM pNP β Gal과 반응하였다. pNP β Gal과의 반응은 50 °C에서 3시간 동안 수행하였다. ρ NP β Gal와의 반응은 0.1 N NaOH를 통해 반응을 종결하였으며, 방출되는 4-나이트로페놀 (4-Nitrophenol)을 400 nm에서 측정하였다. 측정된 값들은 상대값으로 산출하여 도 9에 나타내었다.

[0118] 도 9에서 보듯이, 자가조립형 다중 효소 복합체들이 효소 혼합액에 비해 높은 열 안정성을 보였으며, 특히 6시간 열처리 후에는 효소 혼합액의 효소 활성은 41.94%였으며, 자가조립형 다중 자가조립형 다중 효소 복합체는 56.04%, 55.76% (Mg1B 추가된 형태의 자가조립형 다중 효소복합체)로 상대적, 유의적으로 높게 효소 활성을 유지하였다.

[0119] 이를 통해, 자가조립형 다중 효소 복합체가 효소 혼합액에 비하여 열 안정성이 높다는 것을 확인하였다.

[0121] <실시에 10> 홍조류 2종에 대한 성분 함량 측정

[0122] 홍조류 2종에 대한 주요 성분(아가(agar), 카라기난(carrageenan) 및 셀룰로오스를 포함하는 글루칸(glucan)) 함량을 분석하였다.

[0123] 홍조류 2종은 각각 지역 가게에서 구입, ㈜3FC를 통해 제주도에서 획득하였다. 아가(agar) 함량을 측정하기 위하여, 홍조류 10 g에 100 mL의 증류수를 넣고 1 M HCl을 첨가하여 pH 7.0이 되도록 하였다. 그 후, 121 °C에서 15분 동안 가열하였으며, 뜨거운 용액을 거즈를 통해 거르고 25 °C에서 식혀 겔(Gel)로 만들었다. 해당 겔의 불순물은 85% 및 99% 아이소프로판올(Isopropanol) 100 mL로 2번 세척하여 제거하였다. 세척 후 남은 겔은 60 °C에서 완전 건조하고 그 무게를 측정하였다.

[0124] 카라기난(carrageenan) 함량을 측정하기 위하여, 홍조류 10 g에 500 mL의 증류수를 넣고 16시간 동안 침지하였다. 2 g 수산화칼슘(Ca(OH)₂)을 넣고 60 °C에서 1시간 동안 가열하였다. 추출된 카라기난은 95 °C에서 3시간 동안 섞으면서 가열하였으며, 그 후 규조토를 2%가 되게 첨가하고 80 °C까지 온도를 내리며 30분 동안 혼합하였다. 이를 거즈를 통해 거르고 5% HCl을 첨가하여 pH 9가 되도록 하였다. 96% 에탄올(Ethanol)을 1:1로 섞어서 카라기난을 침전하였으며, 침전된 카라기난은 60 °C에서 완전 건조하고 그 무게를 측정하였다. 넣어진 홍조류 무게 대비 나온 아가, 카라기난 무게를 비율로 계산하여 함량을 도출하였다.

[0125] 글루칸(glucan) 함량을 측정하기 위하여, 홍조류 0.3 g에 72% 황산 3 mL를 첨가하고 30 °C에서 1시간 동안 반응하였다. 이후 4% 황산이 되도록 증류수로 희석한 후, 121 °C에서 1시간 동안 반응하였다. 이에 칼슘카보네이트(Calcium carbonate)를 첨가하여 pH 5~6이 되도록 중성화하였다. 중성화된 샘플을 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)를 통해 분석하였다. 스탠다드 샘플은 셀로바이오스(Cellobiose)와 글루코오스(Glucose)로 선정하였으며, 상기 샘플 준비 과정을 동일하게 수행하였다. 분석을 통해 나온 샘플은 하기 수학적식을 1 통해 계산하여 최종 글루칸 함량을 계산하였다.

수학식 1

$$\text{글루칸(\%)} = 100 \times \frac{(\text{글루코오스} + \text{셀로바이오스} \times 1.053) / 1.111}{\text{홍조류(g)}}$$

[0127]

[0129] 측정한 아가, 카라기난 및 글루칸 함량을 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Components	Red algae (Natural resource)	Red algae (Commercial resource)
Agar(%)	25.70 ± 4.59	34.94 ± 5.09
Carrageenan(%)	17.20 ± 2.21	32.01 ± 4.19
Glucan(%)	35.48 ± 0.38	6.47 ± 0.02
Others(%)	21.62 ± 10.15	26.58 ± 13.15

[0131]

[0132] 표 4에서 보듯이, 홍조류 2종의 주요 성분 함량이 달랐으며, 지역 가게에서 구입한 홍조류의 경우, 아가와 카라기난 함량이 자연에서 얻는 홍조류에 비해 상대적으로 높았다.

[0134] <실시에 11> 자가조립형 다중 효소 복합체의 분해 효율 측정

[0135] 상기 실시예 2, 3 및 5에서 확보한 효소가 결합된 자가조립형 다중 효소 복합체의 해양 바이오매스 분해능을 확인하기 위하여, 홍조류 2종과의 효소 반응을 진행하였다. 홍조류 2종은 각각 지역 가게에서 구입, (주)3FC를 통해 제주도에서 획득하였다. 2종의 홍조류를 물로 3회 세척하여 드라이오븐에서 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 제조하여 200 mesh로 걸렀다. 2% 홍조류 가루에 0.1 N 황산(Sulfuric acid)을 섞고 121 °C에서 15분 동안 열처리를 하였다. 산처리 및 열처리된 홍조류 가루를 NaOH를 통해 중성화하였다. 그 후, 1% 홍조류를 10 mM 시트르산나트륨(Sodium citrate)(pH 6.0) 완충액에서 효소 혼합액 및 자가조립형 효소복합체와 50 °C, 18시간 동안 반응하였다. 반응하여 생성되는 환원당은 DNS 방법을 통해 540 nm에서 측정하였으며, 이를 도 10(A)에 나타내었다. 생성되는 갈락토오스는 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 통해 분석하였으며, 이를 도 10(B)에 나타내었다.

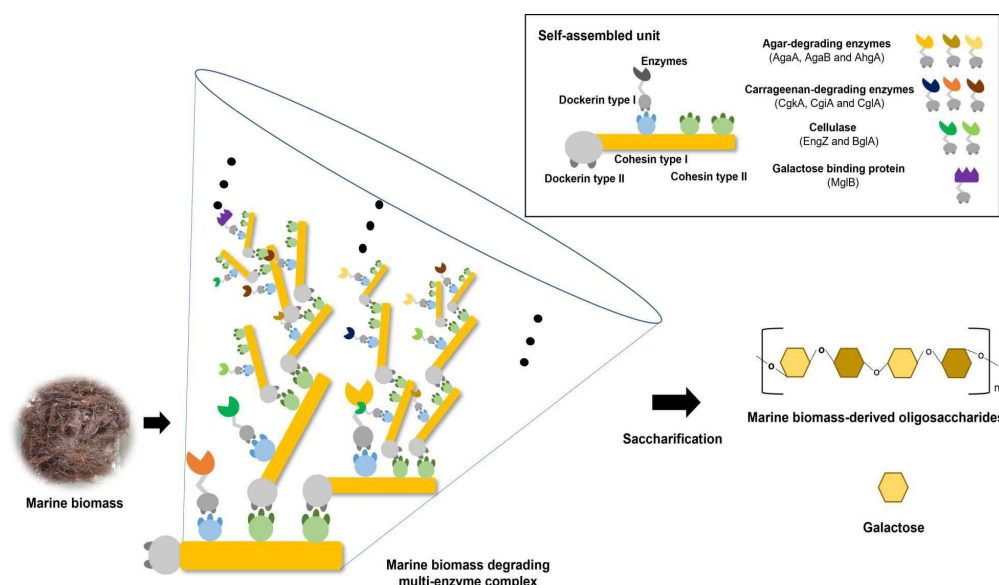
[0136] 도 10(A)에서 보듯이, 효소 혼합액에 비하여 자가조립형 다중 효소 복합체에서 환원당 생산량이 증가하였다. 도 10(B)에서 보듯이, 효소 혼합액에 비해 자가조립형 다중 효소 복합체 및 Mg1B가 도입된 자가조립형 다중 효소 복합체에서 더 많은 갈락토오스가 생산되었다. 또한, 자연 유래 홍조류에 비하여 구매한 홍조류에서의 갈락토오스 생산량이 유의하게 많았다.

[0137] 이를 통해, 효소 혼합액에 비하여 자가조립형 다중 효소 복합체가 높은 분해능을 가진다는 것을 확인하였다.

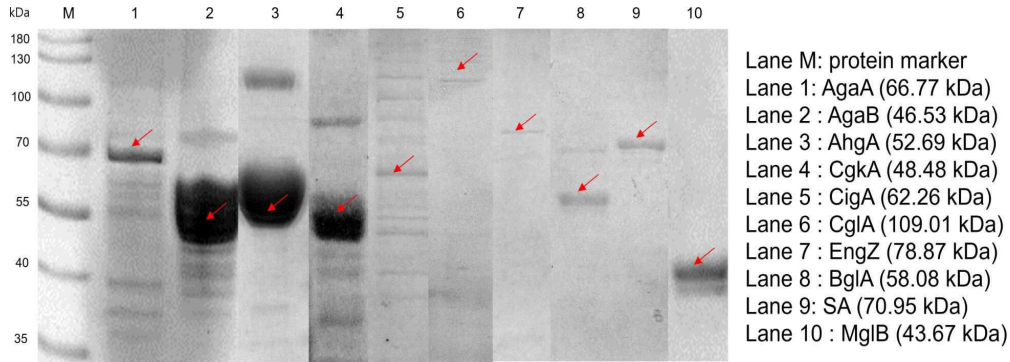
[0139] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

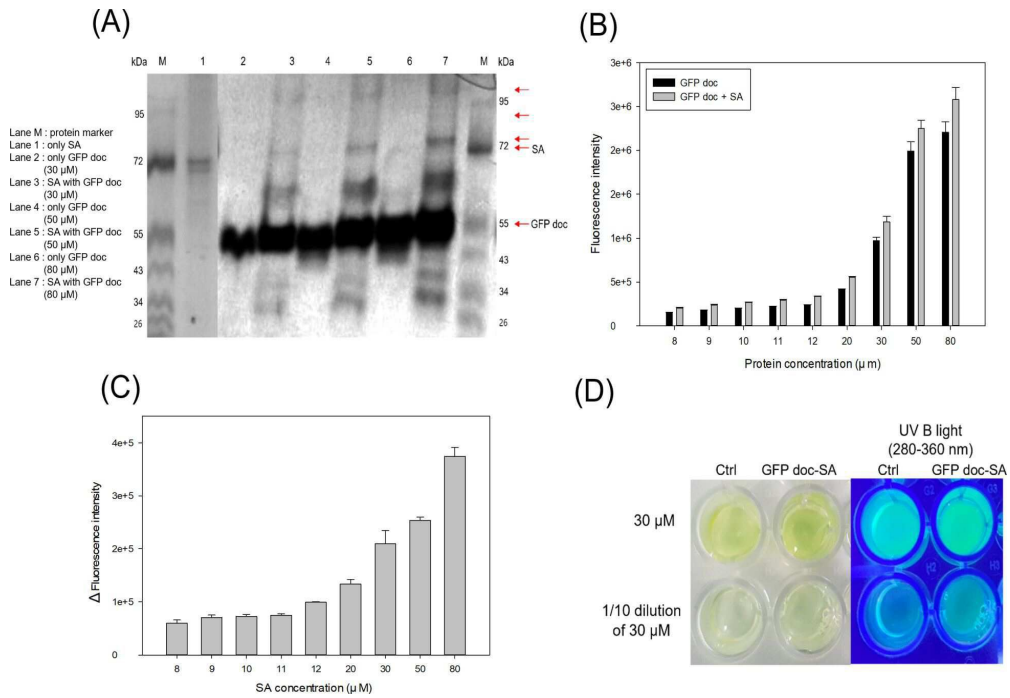
도면1



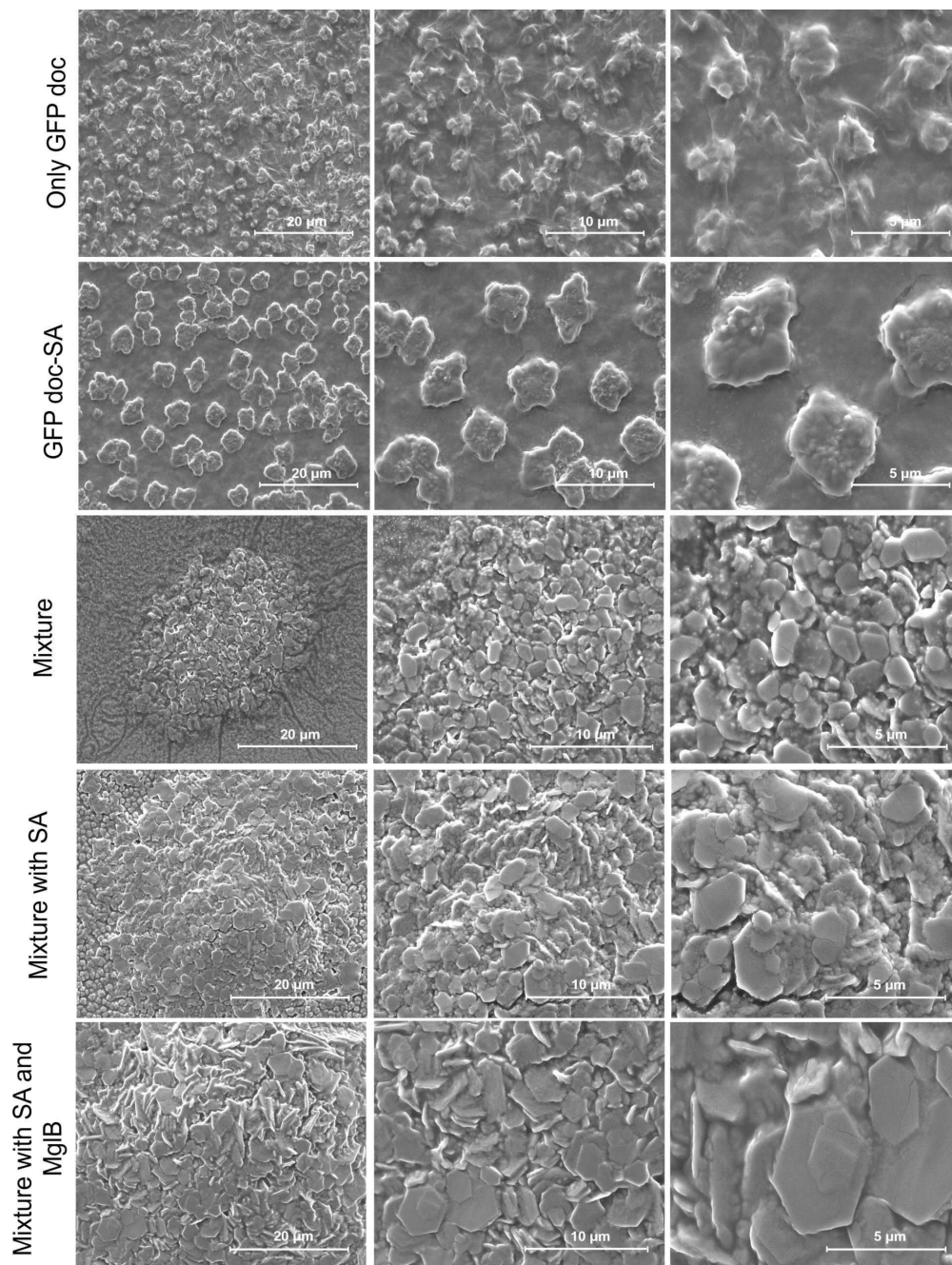
도면2



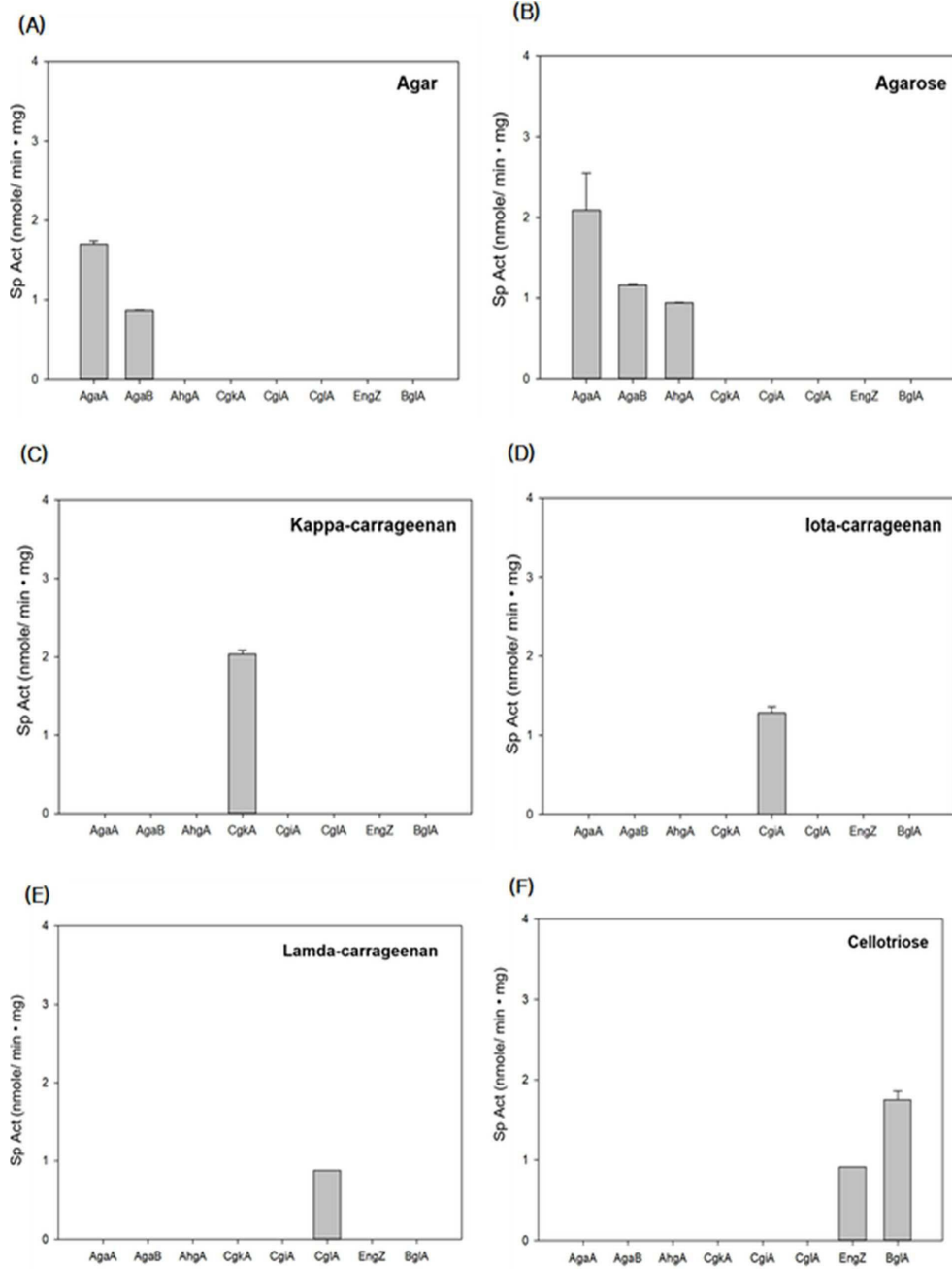
도면3



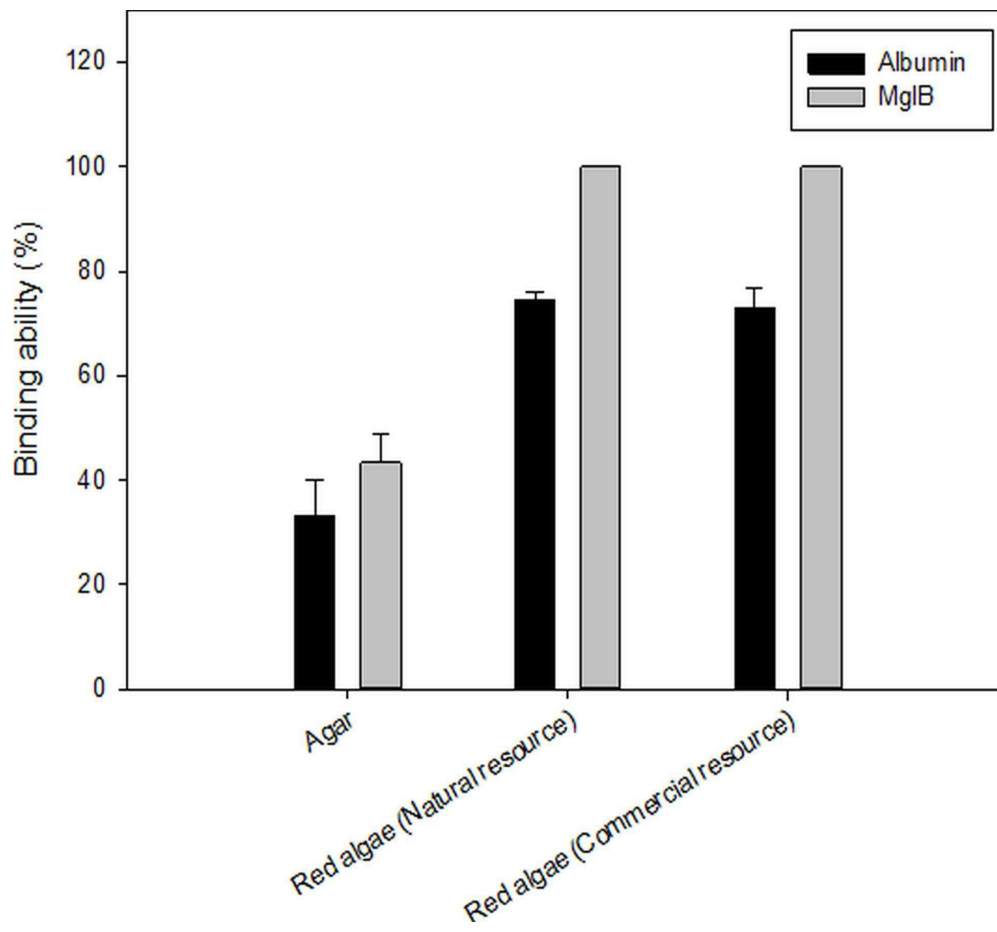
도면4



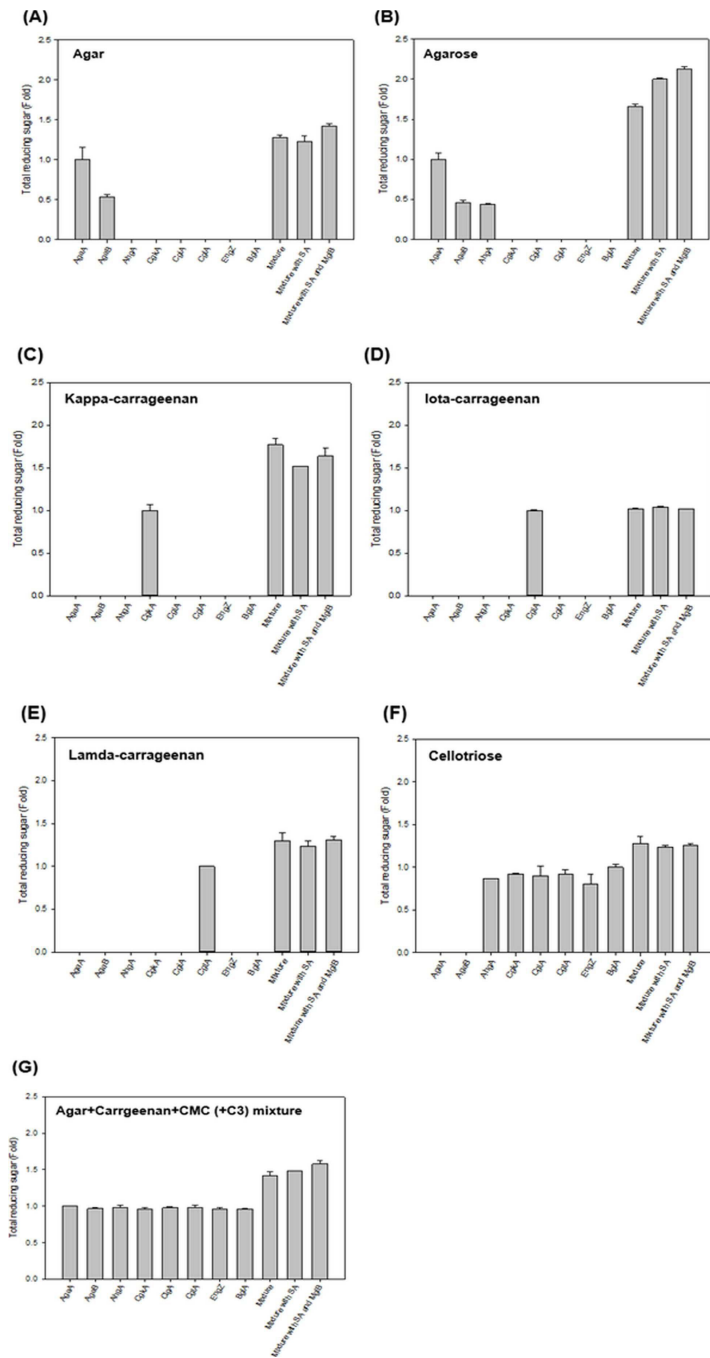
도면5



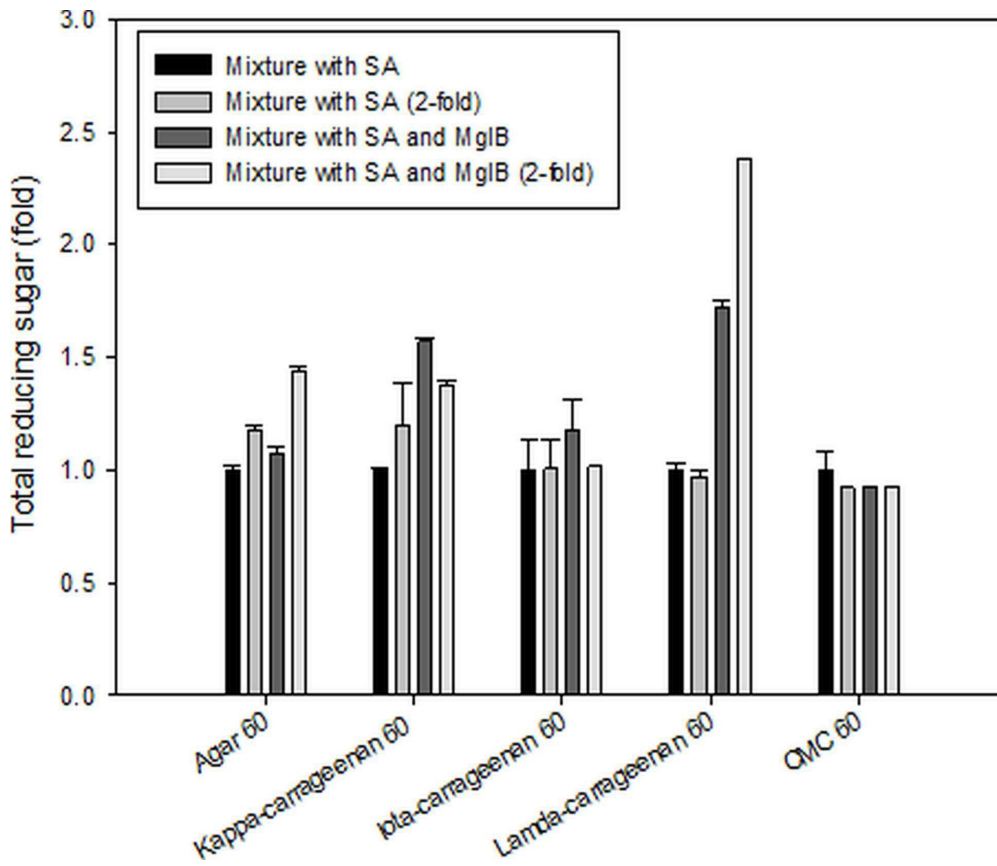
도면6



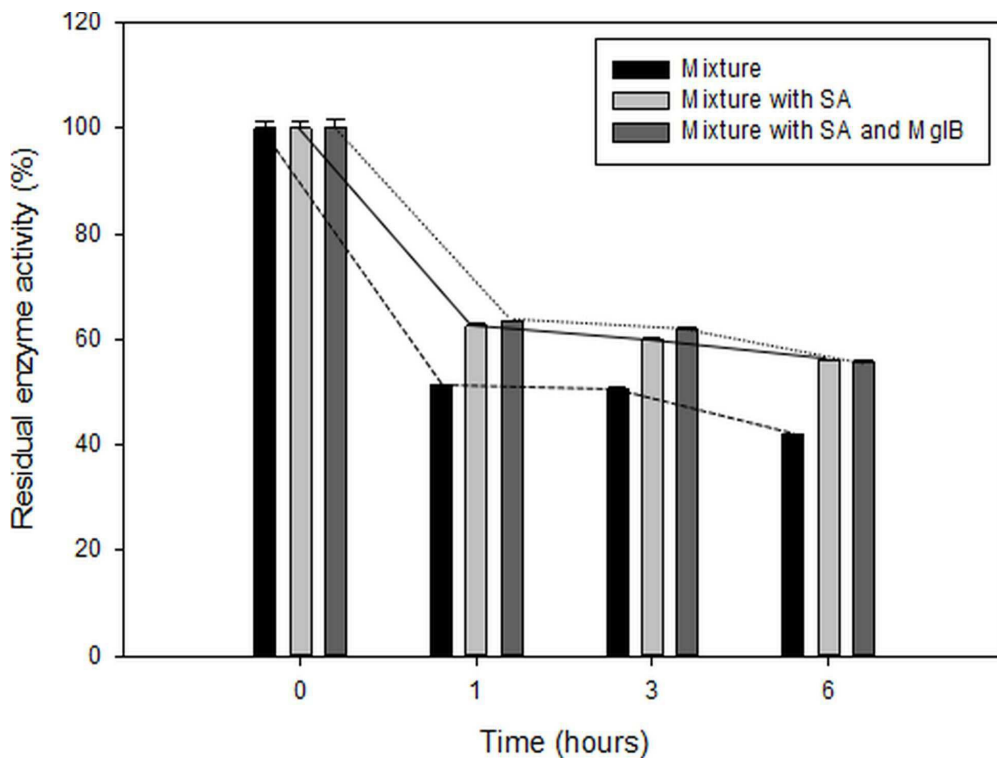
도면7



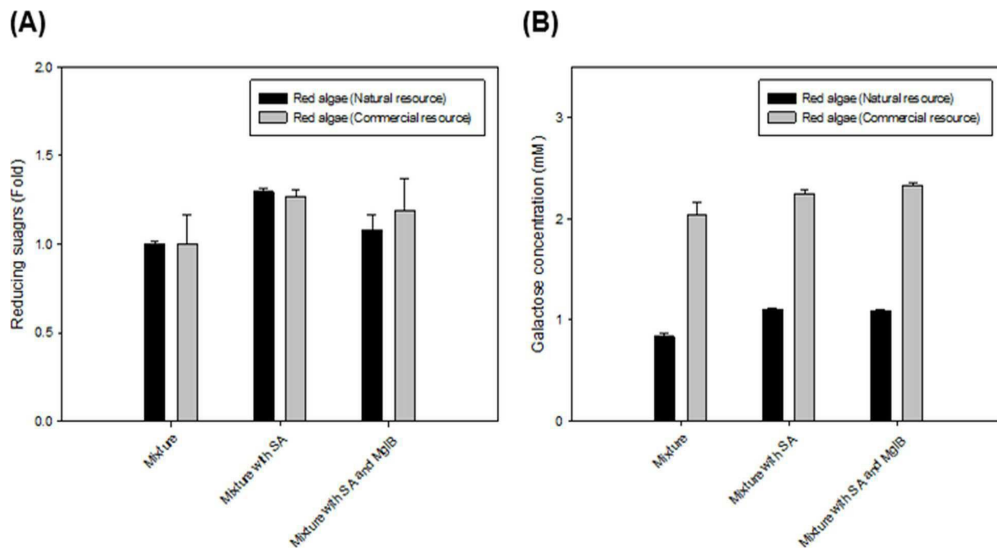
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.