

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2014-0102885 2014년08월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)	(71) 출원인	고려대학교 산학협력단
(21) 출원번호	10-2013-0016334	(72) 발명자	서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(22) 출원일자	2013년02월15일	(72) 발명자	한성옥
심사청구일자	2013년02월15일	(72) 발명자	서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트))
		(72) 발명자	전상덕
		(72) 발명자	서울특별시 강동구 올림픽로71길 23-7, 203호 (천호동)
		(72) 발명자	이지은
		(72) 발명자	서울특별시 성북구 성북로8길 50, 103동 301호 (성북동, 남경빌리지)
		(74) 대리인	이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

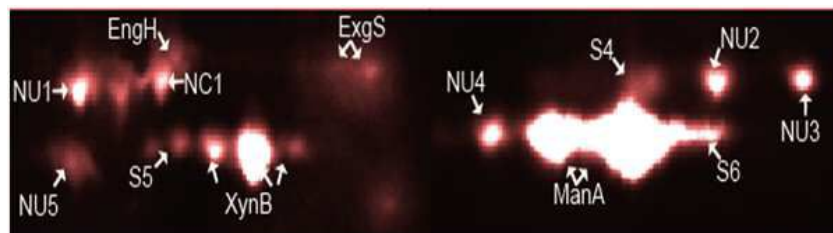
(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 포함하는 셀룰로좀 복합체 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 포함하는 셀룰로좀 복합체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 상기 셀룰로좀 형성 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 함유하는 셀룰로좀 복합체 및 상기 셀룰로좀 복합체를 이용한 결정형 셀룰로오스의 분해방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 셀룰로좀 복합체는 우수한 결정성 셀룰로오즈 분해활성 가지고 있어, 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환 공정이나 직물 처리공정에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 309016054SB030

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [3세부] 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 전처리 및 당화공정 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.04.10 ~ 2013.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이이 결합된 셀룰로좀 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 셀룰로좀 복합체.

청구항 3

제1항의 셀룰로좀 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법.

청구항 4

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로좀 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 셀룰로좀 복합체.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 엑소글루카나아제 S는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 셀룰로좀 복합체.

청구항 7

제4항의 셀룰로좀 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법.

청구항 8

다음 단계를 포함하는, 제1항의 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이이 결합된 셀룰로좀 복합체의 제조방법:

- (a) 재조합 미생물을 이용하여, 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 각각 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 제조된 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는, 제4항의 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로좀 복합체의 제조방법:

(a) 제조합 미생물을 이용하여 엔도글루카나아제, 소형셀룰로오스 결합단백질 에이 및 글루카나아제 S를 각각 제조하는 단계; 및

(b) 상기 제조된 엔도글루카나아제, 소형셀룰로오스 결합단백질 에이 및 글루카나아제 S를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 엑소글루카나아제 S는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 포함하는 셀룰로좀 복합체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 상기 셀룰로좀 형성 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 함유하는 셀룰로좀 복합체 및 상기 셀룰로좀 복합체를 이용한 결정형 셀룰로오스의 분해방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근, 화석연료의 과다 사용으로 인한 연료 고갈 및 지구 온난화와 기상 이변으로 대표되는 환경오염에 대한 우려로 인하여 재생 가능한 에너지에 대한 관심이 모아지고 있다. 이에 대체에너지중 하나인 바이오 에너지는 기존에 사용하지 않던 비식용 식물자원을 이용하여 바이오 에탄올, 부탄올, 디젤과 같은 바이오 연료를 만드는 것에 목표를 둔다. 식물자원 바이오매스는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스, 리그닌 등으로 구성되어 각각 특이한 분해효소가 있어야만 분해가 가능하다.

[0003] 다시 말해서, 식물 세포벽은 크리스탈린 구조를 지닌 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스로 이루어진 리그닌에 의해 둘러싸여 있어서 분해하기 어렵다. 따라서 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 분해하는 효소를 형성할 수 있는 많은 미생물들에 대해 연구가 되고 있다. 그 연구는 혐기성 미생물에서 생성된 거대 엔자임 복합체인 셀룰로좀에 초점이 맞춰지고 있다 (Waeonukul *et al.*, *Bioresour Technol*, 107:352-357, 2012). 셀룰로좀은 결정형 셀룰로오스나 자일란, 만난, 펙틴과 같은 다양한 기질에 대하여 작용하고 셀룰로좀 형성 효소들과 지지체 단백질로 이루어져 있다. 셀룰로좀의 형성은 하나의 셀룰로좀 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 여러개의 코히신 도메인중 하나의 결합으로 이루어진다. 모든 셀룰로좀 형성 효소들은 도커린 도메인을 가지고 있고 도커린 도메인이 없는 효소들은 비 셀룰로좀 형성 효소이다 (Bayer *et al.*, *Annual Review of Microbiol* 58:521, 2004)).

[0004] 셀룰로좀 형성 효소들은 셀룰로좀을 형성하기 전에 비하여 향상된 셀룰로오스 분해능을 나타내게 된다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 셀룰로오스 분해효과가 뛰어난 셀룰로좀 복합체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 엔도글루카나아제를 분리하고, 상기 엔도글루카나아제가 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이와 셀룰로좀을 형성할 경우, 결정성 셀룰로오스에 대한 분해 활성이 뛰어나다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 셀룰로오스 분해능이 뛰어난 셀룰로좀 복합체를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 셀룰로좀 복합체를 이용하여, 결정성 셀룰로오스를 분해하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명이 또다른 목적은 상기 셀룰로좀 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이가 결합된 셀룰로좀 복합체를 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 셀룰로좀 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로좀 복합체를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 셀룰로좀 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a) 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 제조하는 단계; 및 (b) 사이 제조된 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 상기 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이이 결합된 셀룰로좀 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, (a) 엔도글루카나아제, 소형셀룰로오스 결합단백질 에이 및 글루카나아제 S 제조하는 단계; 및 (b) 사이 제조된 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 상기 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로좀 복합체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 본 발명의 셀룰로좀 복합체는 우수한 결정성 셀룰로오스 분해활성 가지고 있어, 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환 공정이나 식물 처리공정에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 셀룰로좀 형성효소인 엔도글루카나아제를 코히신 마커를 통하여 분리 동정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 pET 22b 벡터에 삽입시킨 pET 22b-endoglucanase 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 대장균에 발현시켜 정제한 것과 자이모그램을

통해 엔도글루카나제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 a는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나제와 미니-시비피에이가 조립된 그림을 나타낸 것이며, b는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엑소글루카나제S와 미니-시비피에이가 조립된 그림을 나타낸 것이다.

도 5의 a는 엔도글루카나제와 엑소글루카나아제를 일정 비율로 혼합하여 ASC 분해에 상승효과를 확인한 것이고, b는 엔도글루카나제와 엑소글루카나아제를 일정 비율로 혼합하여 제조된 셀룰로솜 복합체를 이용한 filter paper 분해에 대한 상승 효과를 확인한 것이다.

도 6은 엔도글루카나아제와 세포벽의 결합을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

(1: EngG와 NPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 펠렛, 2:EngG와 NPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 상층액, 3:EngG와 HF-EPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 펠렛, 4:EngG와 HF-EPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 상층액, 5: 대조군 단백질과 NPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 펠렛, 6: 대조군 단백질과 NPCS를 혼합한뒤 원심분리뒤 추출한 상층액).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 일 관점에서 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이가 결합된 셀룰로솜 복합체 및 상기 셀룰로솜 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터, 신규 엔도글루카나아제를 기존에 발명한 코히슨 마커를 통하여 분리, 선별하였고, 이를 대장균(*Escherichia coli*)에 클로닝한 후, 재조합 엔도글루카나아제를 수득하였다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 유전자는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 코스미드 벡터, YAC(Yeast Artificial Chromosome) 벡터를 포함한 다양한 벡터들에 도입될 수 있다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다.
- [0020] 그러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 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.
- [0021] 본 발명에서 사용된 T-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 클로닝 되었는지 여부를 확인시켜 주기 때문에 더욱더 유용하게 이용될 수 있다.
- [0022] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 E.coli균주 DH5a, E.coli균주 JM101, E.coli K12균주 294, E.coli균주 W3110, E.coli균주 X1776, E.coli XL-1Blue(Stratagene) 및 E.coli B 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 E. coli균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 진술한 E. coli에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서틸리스(*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.
- [0023] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하

게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1: 841,1982)이 또한 이러한 세포들을 형질전환하는데 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일례로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

[0025] 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.

[0026] 본 발명에서 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 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, 임의로 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 α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0027] 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 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.

[0028] 본원 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 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0029] 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 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0030] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발

현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

- [0031] 물론 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, 발현조절 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. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서는, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절 가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 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 범위내에서, 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 본 발명에 따른 단백질의 cDNA를 클로닝하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법) 등이 적용될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서는 상기 수득된 엔도글루카나아제 활성을 분석하고 기질에 대한 특이성도 확인하였다.
- [0033] 또한, 상기 엔도글루카나아제의 결정성 셀룰로오스에 대한 효과를 증대시키기 위하여, 본 발명의 엔도글루카나아제와 셀룰로솜에 있는 시비피에이 (CbpA)의 일부분인 미니-시비피에이 (mini-CbpA) 단백질과 엑소글루카나아제를 사용하여 미니-시비피에이 단백질과 결합시킨 셀룰로솜 복합체가, 결정성 셀룰로오스에 대해 활성이 증가한 결과와 미니-시비피에이에 결합된 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S가 상승 효과(synergistic effect)를 가짐을 확인하였다.
- [0034] 본 발명의 일양태에서, 사용한 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 셀룰로솜 복합체를 사용하여, 결정성 셀룰로오스를 분해할 경우, 엔도글루카나아제 단독 사용때보다 높은 분해능을 나타내는 상승효과를 나타내었다.
- [0036] 또한, 본 발명의 엔도글루카나아제가 코히슨과 낮은 결합력을 갖는다는 특징을 나타내었으나, 본 발명의 엔도글루카나아제가 세포벽과 결합능을 가지고 있어, 셀룰로솜 형성능이 높은 것을 확인하였다.
- [0037] 셀룰로솜 형성 효소인 엑소글루카나아제 S는 비 셀룰로솜 형성 효소들과는 다르게 두번 반복된 단백질 서열(도커린 도메인)을 가지고 있고 이 도커린 도메인이 지지체 단백질의 코히신 도메인과의 단백질-단백질 결합으로 셀룰로솜을 형성하는 효소들을 의미한하고, 엑소글루카나아제 S의 도커린과 미니-시비피에이의 코히신 부분이 결합하게된다.
- [0038] 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로솜 복합체 및 상기 셀룰로솜 복합체를 이용하는 것을 특징으로 하는 결정성 셀룰로오스의 분해방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명에서는 Murashima 방법(Murashima *et al.* *J Bacteriol* 184:5088, 2002)에 따라, 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S를 미니-시비피에이에 결합시킨 복합체를 제조하였다.
- [0040] 본 발명의 셀룰로솜 복합체는 엑시드 스왈른 셀룰로오스와 필터 페이퍼에서 복합체를 기질로 사용하여 분해할 경우, 엔도글루카나아제 단독사용 때보다 높은 상승효과를 관찰할 수 있었다.
- [0041] 본 발명의 일양태에서 사용한 엑소글루카나아제 S는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 양태에서는 엑시드 스왈른 셀룰로오스에서는 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S의 비율이 1:3으로 혼합된 셀룰로솜 복합체가, 최대의 상승효과인 2.08배의 분해효과를 나타내었고(도 5의 (a)), 필터 페이퍼를 기질로 사용한 경우에는 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S의 비율이 3:1 일때 최대의 상승효과인 1.67배의 분해효과를 나타내었다(도 5의 (b)).
- [0043] 또다른 관점에서, 본 발명은 (a) 재조합 미생물을 이용하여, 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질

에이를 각각 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제조된 엔도글루카나아제 및 소형셀룰로오스 결합단백질 에이를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 상기 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이이 결합된 셀룰로좀 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0044] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 재조합 미생물을 이용하여, 엔도글루카나아제, 소형셀룰로오스 결합단백질 에이 및 글루카나아제 S를 각각 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제조된 엔도글루카나아제, 소형셀룰로오스 결합단백질 에이 및 글루카나아제 S를 혼합하여 셀룰로좀 복합체를 형성시키고, 형성된 셀룰로좀 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 상기 엔도글루카나아제(endoglucanase)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 및 엑소글루카나아제 S가 결합되어 있는 셀룰로좀 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예 1: 클로스트리디움 셀룰로보란스 셀룰로좀 형성효소 탐색

[0047] 기존의 코히신 마커(Cho *et al.*, *J Biotechnol* 45 233-239(2010))를 통하여 확인한 단백질 서열(SQIDYALGSTGR)을 클로스트리디움 셀룰로보란스 게놈서열에서 상이한 핵산을 탐지하였고 도 1에 도시하였다.

[0048] 클로스트리디움 셀룰로보란스(ATCC 35296)를 1% 셀로바이오스를 탄소원으로 하는 GS 배지를 통하여 완전 혐기상 태에서 37℃에서 1일간 배양을 한 후, DNA purification kit (Promega Genomic, USA)를 이용하여, 게놈 DNA를 추출하였다. 코히신 마커를 제작하기 위하여 코히신 도메인 6 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer) GGGGATCCTGTATAAACTGTAACAGCTACA(서열번호 5)의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향프라이머 (Reverse primer) CCCCTCGAGTTGACTTGGTTCTATTGTAACGC(서열번호 6)의 5'에는 제한효소 XhoI 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95℃에서 5분동안 denaturation을 시킨후 35번의 싸이클(95℃에서 15초 58℃에서 30초 72℃에서 1분 30초)을 진행하였다. 마지막으로 72℃에서 10분간 타겟 유전자의 연장을 시킨다. 그 결과 436 bp의 코히신 6 도메인 유전자가 포함되어 있는 PCR밴드를 확인 할 수 있었다. 이를 pET22b (Novagen, USA)에 클로닝 하여 pET22b-Coh6의 재조합 벡터를 제작하였다.

[0049] 이후, 코히신 6도메인 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 이용하여 대장균에 형질전환 시켰다. 이후, 상기 유전자를 발현하고 정제하여 순수한 상시 단백질을 얻었으며 형광염료로 표지하고 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 생성되는 세포막 분비 단백질을 pH 4 ~ 7 범위의 IPG (immobilized pH gradient) 스트립을 이용하여 이차원 전기영동 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행하였다. 이후 겔 (gel)을 코마시 블루 (Coomassie Blue) 염색을하여 단백질의 발현 양상을 조사하고 형광표지된 코히신 마커와 결합시켜 도커린을 가진 셀룰로좀 형성 효소들만을 선택적으로 확인 하였다. 그 결과 40 ± 10 스팟들 14 ± 3의 셀룰로좀 형성 효소를 탐색 할 수 있었다. 이 후 분석된 스팟을 LC/MS/MS기기 분석으로 신규 셀룰로좀 형성 효소들을 동정 하였다.

[0050] 상기 확인된 효소의 염기서열을 서열번호 2에 나타내었으며, 아미노산 서열을 서열번호 1에 나타내었다.

[0051] 실시예 2: 엔도글루카나아제 유전자 클로닝, 발현 및 정제

[0052] 실시예 1에서 확인된 엔도글루카나아제 (endoglucanase)를 코딩하는 DNA를 하기 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였으며, 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 *EcoRI* 인식사이트를 삽입하였고, 역방향 프라이머의 5'에는 제한효소 *XhoI* 인식 서열을 삽입하였다.

[0053] 정방향 프라이머: 5'-TACGGAATTCTATGAAAAAATTAGG TTCTA TCTTAGCTAG-3'(서열번호 7)

[0054] 역방향프라이머: 5'-AGCTCTCGAGGAAAC TAGTTATTTG-3'(서열번호 8)

- [0055] 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기 영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 gel extraction kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 회수하였다. 이후, 제한효소 *EcoRI*, *XhoI*으로 절단한 후 대장균 단백질 발현 벡터인 pET-22b (Novagen, USA)에 라이게이션시켜 *E. coli* BL21 DE3에 형질전환하였고, 완성된 벡터는 도 2에 도시하였다. 이후, 형질전환된 대장균을 엠포실린 (50 μ g/mL)이 포함된 루리아-버타니 배양액에 접종하여 37℃에서 $A_{600} = 0.6$ 이 될 때까지 배양한 후 IPTG를 전체 농도가 0.5 mM이 되게 첨가한 후 30 ℃에서 12 시간 배양했다. 이후, 대장균을 원심분리 (4,000 X g, 30 분)하여 분리한 후 10 mL 라이시스 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 녹인후 초음파로 분쇄하였다.
- [0056] 이후, 불용성 단백질을 원심분리 (10,000 X g, 30 분) 하여 제거하고 수용성 단백질을 분리하여 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토그래피로 엔도글루카나아제 단백질을 정제하였고, SDS-PAGE를 통하여 76kDa의 단백질 크기를 확인하였다.
- [0057] 이후, Zymogram을 수행하여, 상기 수득한 단백질의 엔도글루카나아제 활성을 확인하였다. 수용성 셀룰로오스인 CMC(carboxymethylcellulose)를 0.2% 포함한 PAGE gel을 내리고, 2시간동안 상온에서 1mM dithiothreitol 과 10 mM CaCl₂ 가 포함된 0.1 M 숙신산 버퍼(pH 6.3)로 배양한 후, 0.1% congo red로 염색하였고, 1M NaCl로 씻어 주었다.
- [0058] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 분리된 단백질은 CMC를 분해하여 엔도글루카나아제 활성을 가지는 것으로 나타났다.
- [0059] 실시예 3:엔도글루카나아제 효소 활성 분석
- [0060] 엔도글루카나아제 효소 활성분석은 아세트산 버퍼 (pH 7.0)에서 1%의 기질을 첨가하여 40℃에서 2시간 반응시켜 측정하였다. 효소반응은 반응액을 5분간 가열하여 종료하였으며, 환원당(reducing sugar)의 양은 DNS방법을 이용하여 측정하였다.
- [0061] 단백질의 농도 측정은 브래트포드(bradford's method) 방법에 기초한 Protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다. 엔도글루카나아제의 기질 특이성은 표 1에 나타내었다.
- [0062] 엔도글루카나아제의 단독 효소활성과 mini-CbpA와의 복합체를 형성하였을 때의 효소활성의 시너지 효과를 확인하였다.
- [0063] 클로스트리디움 셀룰로보란스를 1% 셀로바이오스를 탄소원으로 하는 GS 배지를 통하여 완전 혐기상태에서 37℃에서 1일간 배양을 한 후, DNA purification kit (Promega Genomic, USA)를 이용하여, 게놈 DNA를 추출하였다. mini-CbpA를 제작하기 위하여, 정방향 프라이머 (Forward primer) TAGCGATCCGATATTGTAACGCTACCTGCTGCTGT(서열번호 9)의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향프라이머 (Reverse primer) TAGCGGATCCGATATTGTAACGCTACCTGCTGCTGT(서열번호 10)의 5'에는 제한효소 XhoI 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95℃에서 5분동안 denaturation을 시킨후 35번의 사이클(95℃에서 15초 57℃에서 30초 72℃에서 3분)을 진행한다. 마지막으로 72℃에서 10분간 타겟 유전자의 연장을 시킨다. 그 결과 436 bp의 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR밴드를 확인할 수 있었다. 이를 pET22b (Novagen)에 클로닝 하여 pET22b-miniCbpA의 재조합 벡터를 제작하였다.
- [0064] 상기 pET22b-miniCbpA를 *E. coli* BL21 DE3에 형질전환 하였다. 이후, 형질 전환된 대장균을 엠포실린 (50 μ g/mL)이 포함된 LB 배양액에 접종하여 37℃에서 OD₆₀₀ 값이0.6이 될 때 까지 배양 후 IPTG를 전체 농도가 0.5 mM 이 되게 첨가한후 37℃에서 4 시간 배양했다. 이후, 대장균을 원심분리 (4,000 X g, 20 분)하여 분리한 후 10 mL 라이시스 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 녹인 후 초음파로 분쇄 하였다. 이후, 불용성 단백질들은 원심분리 (10,000 X g, 30 분) 하여 제거하고 수용성 단백질을 분리하여 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토 그래피를 사용하여 미니-시비피에이 단백질을 정제하였고 SDS-PAGE를 확인하여 크기를 확인하였다.
- [0065] Mini-CppA와 엔도글루카나아제 결합은 미니-시비피에이에 포함되어 있는 코히슨 도메인과 셀룰로솜 형성효소에 존재하는 도커린 모듈을 이용하여 효소 복합체의 형성을 확인하였다. 엔도글루카나아제와 엔도글루카나아제 E의 미니-시비피에이에 대한 조립은 Murashima 방법으로 수행하였다 (Murashima *et al.* J Bacteriol 184:5088, 2002). 미니-시비피에이 (5.0 μ mol)과 만난아제, 그리고 미니-시비피에이 (5.0 μ mol)과 엔도글루카나아제 E

(10.0 nmol)을 100 μ l 바인딩 버퍼(25 mM sodium acetate buffer [pH 6.0], 15 mM CaCl_2)에 섞는다. 4℃에서 1 시간 배양시키고 native PAGE를 통해 조립된 복합체를 확인하였다.

표 1

기질	활성(U/ μ mol)		
	mini-CbpA와 함께	mini-CbpA 없이	시너지 효과 정도
carboxy-methyl cellulose	5.62 $\pm$ 0.05	5.31 $\pm$ 0.07	1.1
Avicel	0.22 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	1.6
Acid-swollen cellulose	0.17 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	1.4
Filter paper	0.67 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01	1.4

그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, mini-CbpA와 엔도글루카나아제의 복합체는 아비셀과 셀룰로오스, 필터페이퍼 및 CMC에서 모두 엔도글루카나아제 단독보다 높은 분해활성을 나타내었다.

실시예 4: 미니-시비피에이에 대한 엔도글루카나제와 엑소글루카나아제 S의 조립

Murashima 방법(Murashima *et al.* *J Bacteriol* 184:5088, 2002)에 따라, 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S를 미니-시비피에이에 결합시킨 복합체를 제조하였다.

엑소글루카나아제 S 단백질을 제조하기 위하여, 클로스트리디움 셀룰로보란스를 1% 셀로바이오스를 탄소원으로 하는 GS 배지를 통하여 완전 혐기상태에서 37℃에서 1일간 배양을 하여, DNA purification kit를 이용하여, 게놈 DNA를 추출하였다. ExgS를 제작하기 위하여 상기 게놈 DNA로부터 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer) ATCGCTCGAGAGCAAGAAGTGTCTTTCTTAATAAAG(서열번호 11)의 5'에는 제한효소 SalI, 역방향 프라이머 (Reverse primer) TAGCGTCGACATGAGAAAAAGATTA(서열번호 12)의 5'에는 제한효소 XhoI 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95℃에서 5분 동안 변성시킨후 35번의 사이클(95℃에서 15초 58℃에서 30초 72℃에서 4분)을 진행한다. 마지막으로 72℃에서 10분간 타겟 유전자의 연장을 시킨다. 그 결과 436 bp의 ExgS 유전자가 포함되어 있는 PCR밴드를 확인 할 수 있었다. 이를 pET22b (Novagen)에 클로닝 하여 pET22b-ExgS의 재조합 벡터를 제작하였다.

상기 재조합 벡터를 *E.coli* BL21 DE3에 형질전환 하였다. 형질 전환된 대장균을 엠퍼실린 (50 μ g/mL)이 포함된 루리아-버타니 배양액에 접종하여 37℃에서 A600 = 0.6이 될 때 까지 배양 얼음에서 30분동안 배양하고, 그후 아이소 프로필--D-시오갈락토파이라노사이드 (IPTG)를 전체 농도가 0.2 mM이 되게 첨가한후 18℃에서 16 시간 배양했다. 이후, 대장균을 원심분리 (4,000 X g, 20 분)하여 분리한 후 10 mL 라이시스 버퍼 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 녹인후 초음파로 분쇄 하였다. 이후, 불용성 단백질을 원심분리 (10,000 X g, 30 분) 하여 제거하고 수용성 단백질을 분리하여 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토 그래피를 사용하여 엑소글루카나아제 단백질을 정제하였고 SDS-PAGE로 크기를 확인하였다.

정제된 미니-시비피에이(5.0 nmol)와 엔도글루카나아제, 엑소글루카나아제 S (10.0 nmol)을 100 μ l 바인딩 버퍼 (25 mM sodium acetate buffer [pH 6.0], 15 mM CaCl_2)에 혼합하였다. 상기 혼합된 반응액을 4℃에서 1시간 반응시키고 native PAGE를 통해 복합체의 형성여부를 확인하였다 (도 4).

실시예 5: 결정성 셀룰로오스에 대한 상승효과 측정

실시예 4에서 조립된 복합체효소의 활성은 100 μ l의 혼합물(0.5% 기질, 50 mM 소듐 아세트산 버퍼 [pH 7.0])에서 확인하였다.

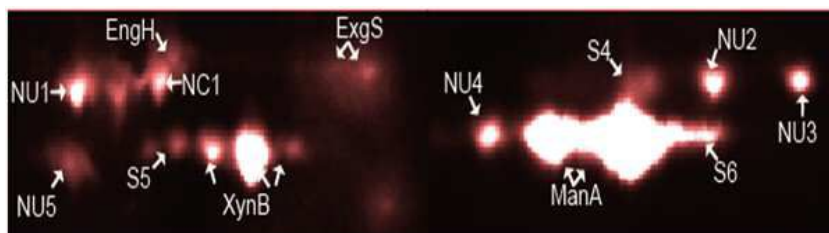
여기서, 기질은 각 실험마다 엑시드 스왈른 셀룰로오스(acid-swollen cellulose, ASC) 및 필터 페이퍼(filter paper)를 사용하였다.

복합체를 함유하는 혼합물은 37℃에서 4시간 반응시킨 후, 환원당은 DNS 방법으로 측정하였다. 각 효소의 농도는 2 nmol/ml로 측정하였다.

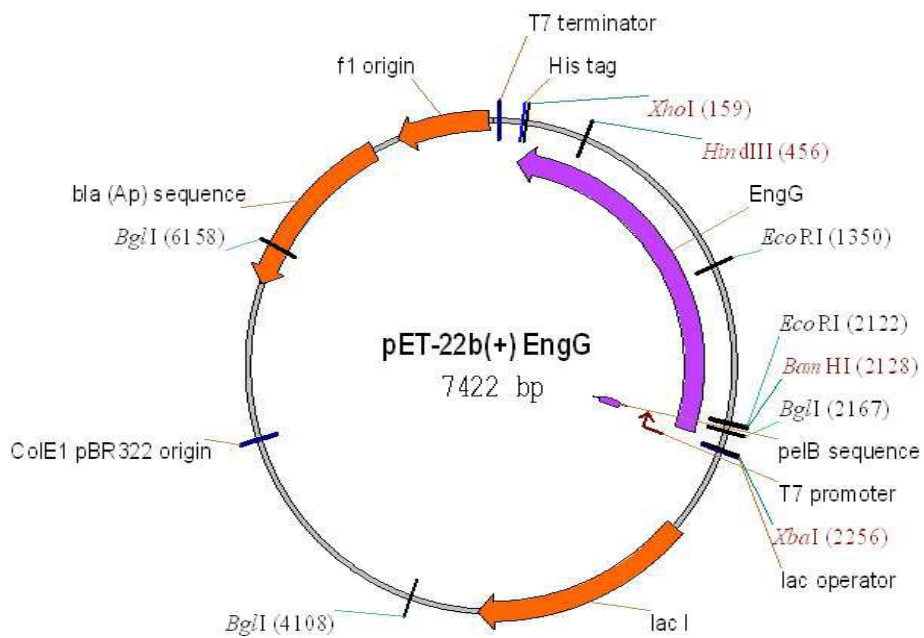
- [0077] 그 결과, 엑시드 스왈른 셀룰로오스와 필터 페이퍼에서 복합체의 상승효과를 관찰할 수 있었다.
- [0078] 엑시드 스왈른 셀룰로오스에서는 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제 S의 비율이 1:3으로 혼합되었을때, 최대의 상승효과인 2.08배를 확인할 수 있었고(도 5의 (a)), 필터 페이퍼를 기질로 사용한 경우에는 3:1의 비율에서 최대의 상승효과인 1.67배를 확인할 수 있었다(도 5의 (b)).
- [0079] 실시예 6:클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리한 세포벽에 엔도글루카나아제의 결합
- [0080] 실시예 2에서 수득한 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제가 표면층 상동성(surface layer homology, SLH)과 유사한 기능을 가진, 세포벽에 부착도메인을 가지는지 확인하기 위하여, 엔도글루카나아제를 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 세포벽과 부착시켰다.
- [0081] 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 세포벽을 분리시키기 위해서 0.5% (v/v) Triton X-100과 5 M Guanidine-HCl을 함유 하고 있는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에서 20℃에서 1시간 동안 배양시키고 원심분리(40,000 X g, 30 분)하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 8번 세척하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 4번 세척하여 분리하였다. 분리된 펠렛은 다시 풀어주고 1% SDS가 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에서 100℃에서 1시간 동안 배양시킨 다음, 증류수로 6회 세척하고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 다시 풀어주었다. 상기 과정을 통하여, 세포벽의 native peptidoglycan-containing sacculi (NPCS)를 분리하였고 이를 48% hydrofluoric acid (HF)와 4℃에서 170시간 배양시켜 원심분리 후에 24% HF로 1번 세척하고, 증류수로 5번 세척한 후, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에서 다시 현탁시킨 뒤에, 엔도글루카나아제와 반응시킨 후, SDS-PAGE를 통해서 세포벽의 펩티도글리칸과 엔도글루카나아제의 결합을 확인하였다 (도 6).
- [0082] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

도면

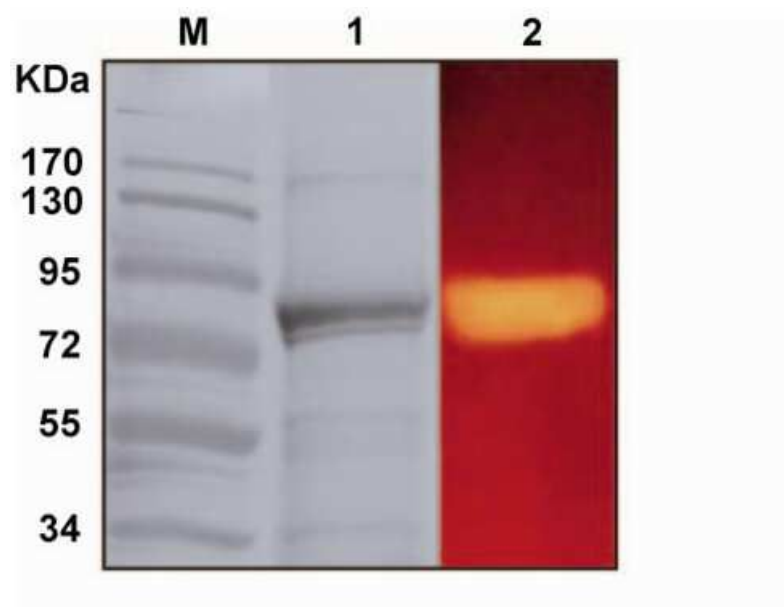
도면1



도면2

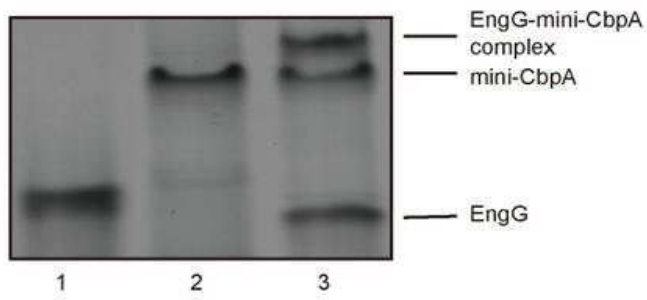


도면3

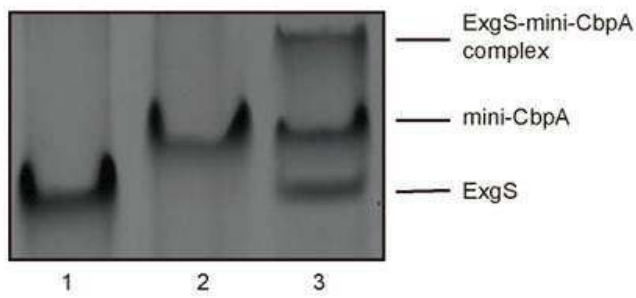


도면4

(a)

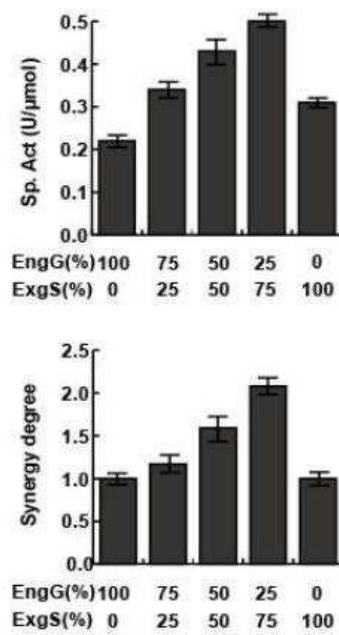


(b)

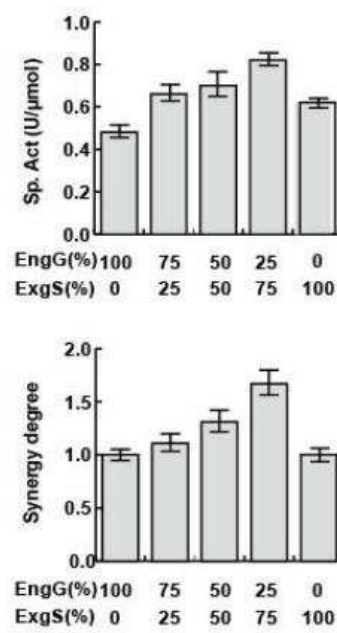


도면5

(a)



(b)



도면6

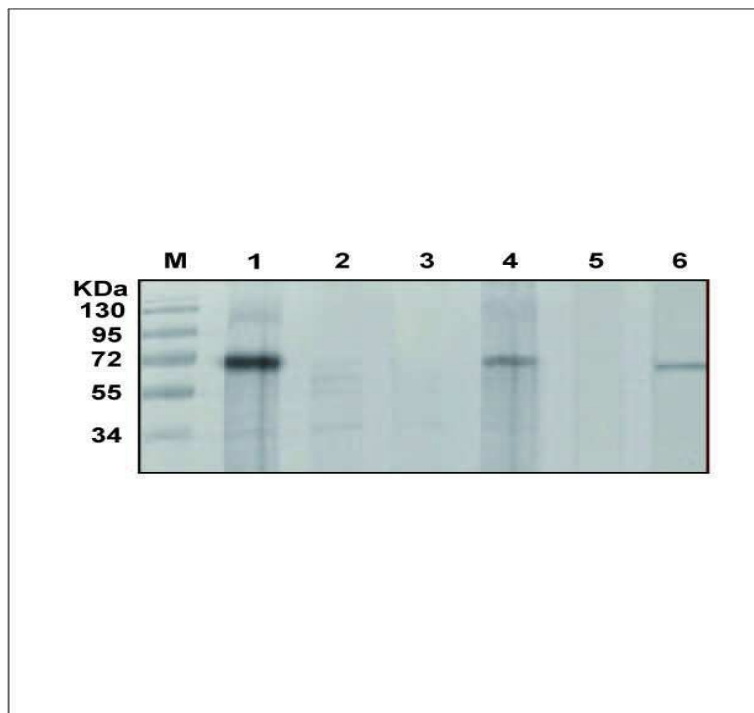


Fig. 5

서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Cellulosome Complex Containing Endoglucanase from Clostridium cellulovorans and Use thereof
- <130> P12-B252
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 652
- <212> PRT
- <213> Clostridium cellulovorans
- <400> 1

Met Asn Lys Tyr Cys Leu Lys Val Met Lys Cys Leu Phe Val Ser Val

1 5 10 15

Phe Ala Met Leu Leu Phe Thr Leu Ile Pro Thr Asn Gln Val Phe Ala

20 25 30

Ala Val Asp Glu Thr His Pro Gly Tyr Arg Val Glu Gly Arg Phe Leu

35 40 45

Tyr Asp Asn Thr Gly Glu Lys Val Ile Leu Tyr Gly Leu Asn Lys Met
 50 55 60
 Val Ile Trp Leu Asp Lys Asp Gly Asp Pro Ser Phe Lys Glu Ile Ala
 65 70 75 80
 Lys Thr Gly Ala Asn Ser Val Arg Ile Val Trp Thr Met Asp Gly Thr
 85 90 95

 Ala Ala Glu Leu Asp Thr Ala Ile Ser Asn Cys Arg Ala Glu His Met
 100 105 110
 Ile Pro Ile Val Glu Leu His Asp Ala Thr Gly Glu Met Ser Lys Leu
 115 120 125
 Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Trp Ile Lys Pro Glu Val Val Asn Val Ile
 130 135 140
 Lys Lys His Gln Glu Tyr Leu Leu Val Asn Ile Gly Asn Glu Val Gly
 145 150 155 160
 Asn Gly Asn Val Thr Glu Ala Asp Phe Lys Ile Asn Tyr Glu Thr Ser

 165 170 175
 Val Lys Gln Met Arg Ala Ala Gly Ile His Val Pro Leu Ile Ile Asp
 180 185 190
 Ala Pro Thr Trp Gly Gln Asn Ile Asn Val Leu Gln Ala Cys Gly Pro
 195 200 205
 Tyr Leu Thr Ser Val Asp Pro Asp Lys Asn Leu Met Tyr Ser Val His
 210 215 220
 Met Trp Trp Pro Tyr Met Tyr Gly His Thr Asp Gln Glu Val Val Asn
 225 230 235 240

 Glu Ile Ala Glu Ser Val Asn Met Asn Leu Pro Leu Ile Val Gly Glu
 245 250 255
 Phe Gly Asn Gln Trp Glu Ala Thr Glu Ser Gly Lys Ile Pro Tyr Lys
 260 265 270
 Leu Ile Met Glu Gln Cys Tyr Lys Asn Gln Val Gly Tyr Leu Ala Trp
 275 280 285
 Glu Trp Gly Pro Gly Asn Asn Pro Gln Thr Phe Leu Asp Met Thr Thr
 290 295 300

Asp Gly Thr Phe Ala Thr Leu Arg Asp Trp Gly Leu Glu Val Ala Ile

305 310 315 320

Thr Asp Thr Tyr Ser Val Lys Asn Ile Ala Lys Arg Pro Ala Ser Ile

325 330 335

Leu Gly Asn Leu Leu Pro Glu Leu Pro Lys Glu Pro Leu Pro Ala Gly

340 345 350

Asn Leu Ala Ala Gly Lys Thr Ala Thr Ala Ser Ser Ala Glu Ser Thr

355 360 365

Thr Tyr Ser Ala Ser Asn Val Thr Asp Gly Asp Phe Gly Thr Arg Trp

370 375 380

Ala Ser Ser Ala Ser Asp Pro Asn Trp Val Tyr Ile Asp Leu Gly Glu

385 390 395 400

Lys Lys Glu Ile Asn Arg Val Ile Ile Lys Trp Glu Ala Ala Tyr Ala

405 410 415

Thr Gln Tyr Lys Ile Gln Val Ser Asp Asp Ala Asn Thr Trp Thr Asp

420 425 430

Ile Tyr Thr Ser Tyr Ser Gly Lys Gly Gln Thr Glu Asp Ile Ser Leu

435 440 445

Thr Gly Ser Gly Arg Tyr Val Arg Val Tyr Gly Met Ala Arg Tyr Asn

450 455 460

Tyr Ser Trp Pro Tyr Ser Ile Phe Glu Ile Gly Ile Tyr Gly Pro Glu

465 470 475 480

Ser Ala Gln Ser Ala Ser Ile Ser Pro Thr Val Ala Val Phe Asp Lys

485 490 495

Asn Ile Glu Lys Gln Ala Asp Leu Thr Ile Thr Leu Ser Pro Gln Ser

500 505 510

Asn Thr Leu Ala Ala Ile Lys Asn Gly Thr Ala Thr Leu Val Ala Gly

515 520 525

Thr Asp Tyr Ile Val Ser Gly Asn Thr Leu Val Ile Lys Lys Ser Tyr

530 535 540

Leu Ala Ser Gln Ala Thr Gly Thr Ile Lys Leu Thr Leu Asp Tyr Asn

545 550 555 560
 Asn Gly Val Asp Pro Ile Phe Thr Val Ala Ile Gly Asp Thr Thr Pro
 565 570 575
 Val Gly Gly Pro Thr Pro Thr Ile Ile Tyr Gly Asp Val Asn Gly Asp
 580 585 590
 Lys Val Val Asn Ala Ile Asp Phe Ala Leu Leu Lys Lys Tyr Leu Leu

 595 600 605
 Gly Leu Ser Thr Leu Ser Glu Asp Thr Leu Lys Lys Val Asp Leu Asn
 610 615 620
 Gln Asp Ser Lys Val Asn Ala Ile Asp Leu Ala Ile Phe Lys Gln Tyr
 625 630 635 640
 Ile Leu Gly Thr Val Thr Ser Leu Pro Val Val Lys

 645 650

<210> 2

<211> 3918

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 2

tgacatttca ccagttgcat catgaagttc aactatagga atcatatgct ctgcacggca 60

attactaata gcagtatcaa gttctgctgc tgttccatcc actgtaaagt ggtcaacgta 120

gtacttcaag ttgatatcct tagtatacga gacgtgccgt taatgattat cgtcatagtt 180

caagacgacg acaaggtagg atagtccaaa caattctaac agagtttgct ccagtttttag 240

ctatttcctt aaaagatggg tcaccatctt tatctaacca aatgaccatt ttatttaate 300

tatcaggttt gtttagattg tctcaaacga ggtcaaaatc gataaaggaa ttttctaccc 360

agtggtagaa atagattggt ttactggtaa aataaattag cataaaggat taccttttcc 420

cccgatttat catatagaaa tcttccttca actctatata ctggatgagt ttcattccact 480

gctgcaaaaa cttgattagt gtatttccta atggaaaagg gggcataata gtatatcttt 540

agaaggaagt tgagatatag gacctactca aagtaggtga cgacgttttt gaactaatca 600

cggtatcagc gtaaataata gcattgcaaa cactgatata aataaacatt tcattacttt 660

taagcaatat ttgttcattt atttaactac tggtaggctt gccatagtcg catttattat 720

cgtaacgttt gtgactatgt ttatttgtaa agtaatgaaa attcgttata aacaagtaaa 780

taaattgatg accatccgaa gtaactgttc ccaatatata ttgcttaaag atagctaaat 840

ctattgcatt tactttggaa tcttgattta aatctacctt ctttaaagtg tcctcagata	900
cattgacaag ggttatatat aacgaatttc tatcgattta gataacgtaa atgaaacctt	960
agaactaaat ttagatggaa gaaatttcac aggagtctat aagtagaaag acctagaaga	1020
tatTTTTTaa gcaatgcaaa atctattgca ttaacaactt tatctccgtt aacatctccg	1080
tagataatag ttggagtagg ttcacatcttc tggatcttct ataaaaaatt cgttacgttt	1140
tagataacgt aattgttgaa atagaggcaa ttgtagagge atctattatc aacctcatcc	1200
tccgcccact ggagtgtgat cacctattgc aacagtgaaa ataggatcaa caccgttgtt	1260
ataatcaaga gtaagcttta ttgttcctgt agcttggctt aggcgggtga cctcaacata	1320
gtggataacg ttgtcacttt tatectagtt gtggcaacaa tattagttct cattcgaaat	1380
aacaaggaca tcgaaccgaa gctaaataac ttttcttaat tactaaagta ttaccgtta	1440
caatatagtc tgttccagca actaatgtag ctgtaccatt ctttattgca gcaagagtat	1500
cgatttattg aaaagaatta atgatttcat aatggcgaat gttatatcag acaaggtcgt	1560
tgattacatc gacatggtaa gaaataacgt cgttctcata tactttgtgg gcttaaagta	1620
atagtaagat ctgctgtttt ttcaatattt ttatcaaaaa ctgctactgt tggatgatt	1680
gatgcacttt gtgctgattc atgaaacacc cgaatttcat tatcattcta gacgaacaaa	1740
aagttataaa aatagttttt gacgatgaca accactataa ctacgtgaaa cacgactaag	1800
tggaccataa attccaattt cgaaaattga gtacggccaa ctatagttat atcttgccat	1860
tccatagact cttacataac ggccctgaacc tgttaaactt acctggtatt taaggttaaa	1920
gcttttaact catgccggtt gatatcaata tagaacggtg aggtatctga gaatgtattg	1980
ccggacttgg acaatttgaa atatcttcag ttgttccttt tccactgtat gaagtatata	2040
tgtcagtcca tgtgtttgca tcatcagaaa ctgtatctt atattgagtt gcatatgcag	2100
tatagaagtc aaacaggaaa aggtgacata cttcatatat acagtcaggt acacaaacgt	2160
agtagtcttt gaacatagaa tataactcaa cgtatacgtc cttcccattt tattattact	2220
ctattttattt ctttcttttc accaagatct atataaaccc agtttggatc agaagcactt	2280
gatgcccac ttttaccaa gaagggtaaa ataataatga gataaataaa gaaagaaaag	2340
tggttctaga tatatttggg tcaaacctag tcttcgtgaa ctacgggtag aacatggttt	2400
atcgccatca gtaacattgc ttgcgtata tgtttagat tctgcagatg aagcagttgc	2460
tgttttacca gcagctaaat ttccagccgg taacggttct tagcggtagt cattgtaacg	2520
aacgcgatat acaacatcta agacgtctac ttcgtcaacg acaaaatggt cgtcgattta	2580

aaggtcggcc attgccaaga ttgtgtaatt ctggaagaag atttcctaaa attgatgcag 2640
gtctttttgc aatattctta acactatatg tatctgttat agcaacttct agtccccaat 2700
aaaccattaa gaccttcttc taaaggattt taactacgtc cagaaaaacg ttataagaat 2760
tgtgatatac atagacaata tcgttgaaga tcaggggtta ctcttagggt agcaaaagtt 2820
ccatctgtag tcatatctaa gaatgtttga gggttgttac caggaccca ttcccatgct 2880
aaatagccta cttgattttt gagaatccca tcgttttcaa ggtagacatc agtatagatt 2940
cttacaaact cccaacaatg gtcctgggggt aagggtacga tttatcggat gaactaaaaa 3000

ataacattgt tccattataa gtttatatgg gatcttacca gactctgtag ctteccactg 3060
attaccgaat tctccaacta ttaaaggtaa attcataatt tattgtaaca aggtaattatt 3120
caaatatacc ctagaatggg ctgagacatc gaagggtgac taatggctta agagggtgat 3180
aatttccatt taagtataaa actgattctg caatttcatt tactacttct tgatctgtat 3240
gtccatacat atatggccac cacatatgca ctgaatacat aaggtttttg tcagggtcaa 3300
tgactaagac gttaaagtaa atgatgaaga actagacata caggatgta tataccgggtg 3360
gtgtatacgt gacttatgta ttccaaaaac agtcccagtt cagagggtta atatgggtcca 3420

caggcttgaa gcacgtttat attttgacc caagtaggtg catcaatgat taaaggtaca 3480
tgtatgccag ctgctctcat gtctccaatt tataccaggt gtccgaactt cgtgcaaata 3540
taaaactggg gttcatccac gtagttacta atttccatgt acatacgggtc gacgagagta 3600
ttgctttact gatgtttcat agttaatttt gaaatcagct tctgttacat taccattacc 3660
aacttcgtta ccgatgttga ctaataggta ttcttggtgt aacgaaatga ctacaaagta 3720
tcaattaaaa ctttagtga agacaatgta atggtaatgg ttgaagcaat ggctacaact 3780
gattatccat aagaaccaca ttcttgatta catttactac ttctggtttt atccagtagt 3840

ttataaggct tggtaaacta agaactaatg taaatgatga agacaaaat aggtcatcaa 3900
atattccgaa ccattgaa 3918

<210> 3

<211> 570

<212> PRT

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 3

Met Gln Lys Lys Lys Ser Leu Asn Leu Leu Leu Ala Leu Met Met Val

1 5 10 15

Phe Ala Leu Val Leu Pro Ser Ile Pro Ala Leu Ala Ala Thr Ser Ser

20 25 30

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser

35 40 45

Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn

50 55 60

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln

65 70 75 80

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser

85 90 95

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr

100 105 110

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val Glu Phe Gly Phe Ala

115 120 125

Ser Gly Arg Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe Ile Thr Ile Gln Gly

130 135 140

Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Thr Asn Asp Tyr

145 150 155 160

Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Pro Lys Val Thr

165 170 175

Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr Ala Pro Gly Pro Asp

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser Ala Thr Phe Asp Lys Asn

195 200 205

Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr Met Thr Leu Asn Gly Asn

210 215 220

Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly Thr Ala Leu Asn Ala Ser

225 230 235 240

Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val Thr Ile Ser Lys Ala Tyr

245 250 255

Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr Leu Asn Phe Asn Phe Ser

260 265 270

Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr Val Val Asp Thr Pro Val

275 280 285
 Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val Gln Val Asn Ala Gly Glu
 290 295 300
 Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys Val Pro Ala Ala Gly Leu
 305 310 315 320
 Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp Ser Ala Ser Leu Glu Val

 325 330 335
 Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn Pro Ser Val Asn Phe
 340 345 350
 Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys Leu Leu Phe Leu Asp Asp
 355 360 365
 Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly Val Phe Ala Thr Ile
 370 375 380
 Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr Thr Ala Lys Val Thr Ser
 385 390 395 400

 Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly Asp Ala Gln Leu Gln Glu
 405 410 415
 Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val Thr Ile Asn Pro Ile Asp
 420 425 430
 Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr Val Lys Ala Gly Glu
 435 440 445
 Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser Val Pro Ser Thr Gly Ile
 450 455 460
 Ala Thr Ala Glu Ala Gln Val Ser Phe Asp Ala Thr Leu Leu Glu Val

 465 470 475 480
 Ala Ser Val Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn Pro Thr Val Asn Phe
 485 490 495
 Ser Tyr Thr Val Asn Gly Asn Val Ile Lys Leu Leu Phe Leu Asp Asp
 500 505 510
 Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Ser Lys Asp Gly Val Phe Val Thr Ile
 515 520 525
 Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr Val Thr Thr Pro Val Thr

530 535 540
 Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly Thr Leu Ala Glu Val Gln
 545 550 555 560
 Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile
 565 570
 <210> 4
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Clostridium cellulovorans
 <400> 4
 Met Lys Arg Arg Ile Leu Ser Ile Leu Thr Ala Ala Leu Val Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Ile Ile Pro Phe Ser Ala Ser Ala Ala Thr Thr Leu Gly Asp Val
 20 25 30

 Asn Val Asp Gly Lys Val Asn Ser Ile Asp Met Ala Ile Val Lys Gln
 35 40 45
 Tyr Ile Leu Gly Thr Lys Thr Phe Ser Asp Ala Glu Leu Lys Ala Ala
 50 55 60
 Asp Val Asp Ala Asn Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Leu Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Lys Gln Tyr Ile Leu Gly Ser Ile Thr Lys Phe Pro Gly Asp Lys Gly
 85 90 95
 Val Val Asp Asn Arg Thr Thr Thr Gly Pro Gly Ile Thr Trp Met Asp

 100 105 110
 Gly Tyr Lys Leu Phe Pro Val Gly Val Asn Tyr Gly Trp Asn Asn Trp
 115 120 125
 Cys Tyr Glu Phe Ser Asp Ser Asn Trp Asp Thr Asn Phe Ala Lys Met
 130 135 140
 Lys Ser Asp Met Asp Ala Met Asn Leu Lys Gly Val Lys Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Trp Trp Val Phe Pro Asp Leu Ala Phe Gly Pro Thr Trp Ser Gly Thr

165 170 175
 Gly Lys Gly Ser Leu Cys Thr Gly Leu Pro Asn Asn Trp Val Asn His
 180 185 190
 Met Lys Ala Val Cys Asp Tyr Ala Leu Thr Lys Asn Ile Lys Ile Tyr
 195 200 205
 Trp Thr Leu Thr Ser Phe Asp Ala Ala Arg Gln Asp Gly Thr Asp His
 210 215 220
 His Ser Asp Ile Phe Thr Asn Glu Ala Val Arg Gln Ser Phe Phe Asp
 225 230 235 240
 Asn Ala Val Lys Pro Ile Val Thr Ala Leu Gly Asn His Glu Ala Val
 245 250 255
 Met Gly Trp Asp Cys Ile Asn Glu Pro Glu Trp Ile Ile Lys Lys Glu
 260 265 270
 Asp Asn Gly Glu Pro Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Ile Tyr Ala Leu Ser
 275 280 285
 Asp Ile Arg Asn Tyr Val Gln Ser Thr Thr Ala Leu Ile His Gln Tyr
 290 295 300
 Ala Lys Gln Pro Val Ser Val Gly Ser Ala Ser Met Lys Trp Ser Gly
 305 310 315 320
 Ala Gln Phe Ser Leu Trp Thr Gly Leu Gly Leu Asp Phe Tyr Asp Phe
 325 330 335
 His Trp Tyr Asp Trp Ala Thr Pro Trp Phe Asn Pro Met Thr Thr Pro
 340 345 350
 Ala Ser Ser Leu Lys Leu Asp Lys Pro Val Ile Ile Gly Glu Met Met
 355 360 365
 Ser Asp Thr Leu Ser Ser Ser Leu Lys Val Asp His Lys Val Val Met
 370 375 380
 Asp Ala Ile Met Ala Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Met Thr Trp Ala Trp
 385 390 395 400
 Asn Asp Gly Ser Cys Gly Asn Phe Ile Gly Ser Asn Phe Thr Asn Phe
 405 410 415

Gly Ala Gln His Thr Asp Ile Val Arg

420 425

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggggatcctg ttaaaactgt aacagctaca 30

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cccctcgagt tgacttggtt ctattgtaac gc 32

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tacggaattc tatgaaaaaa ttaggttcta tcttagctag 40

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> peimer

<400> 8

agctctcgag gaaactagtt atttg 25

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> peimer

<400> 9

tagcggatcc gatattgtaa cgctacctgc tgctgt

36

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> peimer

<400> 10

tagcggatcc gatattgtaa cgctacctgc tgctgt

36

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> peimer

<400> 11

atcgctcgag agcaagaagt gctttcttta ataaag

36

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> peimer

<400> 12

tagcgtcgac atgagaaaaa gatta

25