

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0098245 (43) 공개일자 2012년09월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12P 19/00 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0018078	(72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 대우푸르지오아파트 210동 201호 (길음동)	
(22) 출원일자 2011년02월28일 심사청구일자 2011년02월28일	전상덕 서울특별시 강동구 상암로11길 29, 2층 (암사동) 김승욱 서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트 104-905	
	(74) 대리인 이처영	

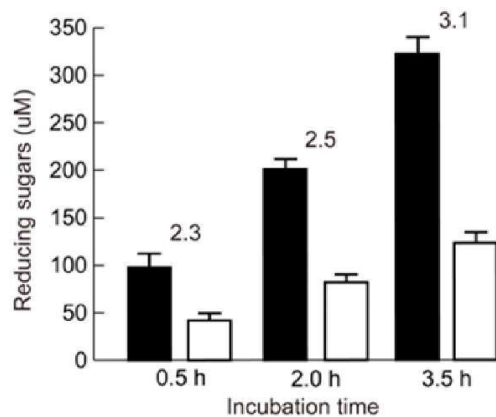
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규 전진적인 엔도글루카나아제와 결정성 셀룰로오스 분해에 대한 응용**

(57) 요약

본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에 있는 엔도글루카나아제 (endoglucanase)에 관한 것이다. 본 발명의 엔도글루카나아제는 우수한 엔도글루카나아제 활성을 가지고, 특히 본 발명의 엔도글루카나아제는 전진적인 엔도글루카나아제로써 (processive endoglucanase) 결정화된 셀룰로오스 분해에 탁월한 능력을 지니고 있다. 이를 통해 본 발명의 엔도글루카나아제는 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당화 공정 및 식물 처리공정에 있어서 응용이 가능하다.

대표도 - 도8a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0027563
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업(중견연구자지원사업)
연구과제명	고활성 당화효소 생산 에탄올 발효균주 개발과 다양한 배양시스템의 공정최적화를 통한
고효율수송용 바이오	에탄올 생산공정에 관한연구
주관기관	한국연구재단
연구기간	2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	309016052SB030
부처명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	농림기술개발사업
연구과제명	[3세부] 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 전처리 및 당화공정 시스템 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.10 ~ 2011.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에서 분리된 전진적인 엔도글루카나아제(endoglucanase).

청구항 2

제 1항의 효소를 코딩하는 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 제 2항 또는 제3항의 유전자를 함유한 재조합 벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서 상기 벡터는 도 4에 기재된 개열지도를 갖는 재조합 벡터.

청구항 6

제 4항 또는 제5항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 7

제 1항의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 분해 방법.

청구항 8

제 1항의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환 방법.

청구항 9

제 1항의 효소를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 분해용 조성물.

청구항 10

제 1항의 효소를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혐기성 셀룰로솜 형성 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리해낸 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 목질계 바이오 매스 분해를 위한 활용에 관한 방법에 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, 리그닌등으로 구성되어 각각 특이한 분해효소가 있어야만 분해가 가능하다.

- [0003] 목질계 섬유소는 식물의 세포벽의 구성 성분이며 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 복합체로 이루어져 있다. 셀룰로오스는 -1,4-glucose 복합체이며 자연상태에서 가장 풍부한 재생가능한 물질이다 (Reiter *et al.* Biosynthesis and properties of the plant cell wall. Curr Opin Plant Biol 5 (2002) 536-42). 비록 화학적 구성은 단순하지만 효율적으로 셀룰로오스를 분해하기 위해서는 여러개의 다른 효소들의 작용이 필요 하다 (Ximenes *et al.* Hemicellulases and biotechnology. Recent Res Develop Microbiol 2 (1998) 165-176). 헤미셀룰로오스에는 β -1,4-xylose 인 자일란과 β -1,4-glucose, mannose인 글루코만난 등이 있다. 대부분의 셀룰로오스를 분해 할수 있는 혐기성 미생물들은 셀룰로솜이라는 효소복합체를 형성한다 (Roy H. Doi, The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: An enzyme complex with plant cell wall degrading activity. The Chemical Record 1(2001) 24-32). 셀룰로솜은 결정형 셀룰로오스나 자일란, 만난, 펙틴과 같은 다양한 기질에 대하여 작용하고 셀룰로솜 형성 효소들과 지지체 단백질로 이루어져 있다. 셀룰로솜의 형성은 하나의 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 여러개의 코히신 도메인중 하나의 결합으로 이루어진다. 모든 셀룰로솜 형성 효소들은 도커린 도메인을 가지고 있고 도커린 도메인이 없는 효소들은 비 셀룰로솜 형성 효소이다 (Bayer *et al.* The cellulosome: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annual Review of Microbiol 58 (2004) 521-554).
- [0004] 글리코실 하이드롤라아제(glycosyl hydrolase) 패밀리 (family) 9에 속하는 효소들은 대부분 엔도글루카나아제 분해활성을 가지고 있다. 그 중 subfamily theme B에 속하는 효소들은 전진적인 엔도글루카나아제 활성을 가지고 있고 고유의 염기서열을 보유하고 있다 (Gilad *et al.* CellI, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. J Bacteriol 185 (2003) 391-398).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출되 것으로서 본 발명의 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 효소를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 결정성 셀룰로오스를 분해할 수 있는 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에서 분리된 전진적인 엔도글루카나아제(endoglucanase)를 제공한다.
- [0011] 본 발명에서 '전진적인 엔도글루카나아제'란 셀룰로오스 체인을 순차적으로 분해할수 있는 엔도글루카나아제를 의미한다. 도 9에서 도시한 바와 같이, 이러한 전진적인 엔도글루카나아제는 엔도-타입의 활성 뿐만 아니라 전진적인(processive)한 특성을 가지는 엑소-타입의 활성도 가지고 있기 때문에 '전진적인 엔도글루카나아제'라고 불리운다(A.I. Chiriac *et al.* Engineering a family 9 processive endoglucanase from *Paenibacillus barcinonensis* displaying a novel architecture, Appl Microbiol Biotechnol, 86 (2010) 1125-1134).
- [0012] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 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 엔도글루카나아제 유전자에 포함된다.
- [0014] 또 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 상기 본 발명의 유전자를 함유한 재조합 벡터 pET

22b-endoglucanase를 제공한다.

- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 벡터는 도 4에 기재된 개열지도로 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 분해 방법을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 전환 방법을 제공한다.
- [0019] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 분해용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환용 조성물을 제공한다.
- [0021] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 핵산 또는 아미노산 서열을 포함하는 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 제공한다.
- [0023] 본 발명자들은 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환공정에 필요한 엔도글루카나아제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 중온 혐기성, 셀룰로좀 형성균으로부터 공지된 엔도글루카나아제 아미노산 서열과 상동성을 갖는 신규 유전자를 클로닝한 후 이 클로딩된 유전자를 이콜라이에 발현시켜 만난 아제 활성을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0024] 본 발명의 셀룰라아제는 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제의 서열 상동성에 기초하여 분리된 신규 효소이다.
- [0025] 본 발명의 명세서에서 용어 엔도글루카나아제(endoglucanase)는 셀룰로오스에서 β -D-글리코시딕 결합을 가수 분해하여 포도당 (glucose, 글루코오스)의 생성을 촉매하는 효소를 의미하며, 효소 엔도-베타-1,4글루카나아제(endo-1,4-glucanase, EC 3.2.1.4, endoglucanase)를 포함하는 의미이다. 본 발명에서 상기 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 셀룰로좀 형성균의 일종으로서 결정성 셀룰로오스나 자일란, 펙틴 등의 가수분해능이있고, Avicel이 탄소원으로 제공될 때 엔도글루카나아제를 생성하는 것으로 알려져 있다 (Cho *et al.*, Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker. J Biotechnol 45 (2010) 233-239).
- [0026] 본 발명의 신규 엔도글루카나아제는 공지된 핵산 서열에 기초하여 제작된 올리고-뉴클레오타이드를 프라이머 (primer)로 사용하고 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 PCR(polymerase chain reaction)방법에 의해 증폭하였다. 본 발명의 엔도글루카나아제는 글리코실 하이드롤라아제 (Glycosyl hydrolase)의 패밀리(family) 9 계열에 속하는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제 H와 서열 유사성 (sequence similarity) (72%) 보였으며, 엔도글루카나아제 활성을 나타내었다.
- [0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 도면 2에 도시된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 이용한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 재조합 펩타이드 또는 단백질을 발현시키기 위한 벡터이다. 또한, 본 발명의 벡터는 발현 벡터이고, 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주세포로 하여 구축될 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* DH5, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*)등이 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상술한 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 대장균에 형질전환한 형질 전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2011년 1월 7일 *E. coli* BL 21(DE3) pET22b-EngZ 기탁번호 KCCM11162P로 기탁하였다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 엔도글루카나아제를 이용하여 결정성 셀룰로오스를 분해 또는 분해하는데 기여하는 것에 제공될 수 있다.
- [0037] 본 발명으로 목질계 섬유소를 에너지원으로 이용한 바이오연료 생산에 효율적인 방법을 제공할 것이다.
- [0038] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0039] 본 발명은 신규 엔도글루카나아제를 기존에 발명한 코히슨 마커를 통하여 분리, 선별하였고 (도면 1 참조), 이를 이 콜라이(*Escherichia coli*)에 클로닝하여 발현시켰다. 또한 엔도글루카나아제 활성을 분석하였고 기질에 대한 특이성도 확인하였다. 본 발명의 엔도글루카나아제는 전진적인 엔도글루카나아제와 염기서열 상이성이 있고, 결정성 셀룰로오스에 활성을 보이는 바, 전진적인 엔도글루카나아제 여부를 판단하기 위해 환원당의 분배에 관한 실험을 통해 확인하였다 (도면 8 참조).
- [0040] 이에, 본 발명자들은 신규 엔도글루카나아제를 이용하여 셀룰로오스를 효과적으로 분해할 수 있음을 확인하였고 특히 결정성 셀룰로오스를 분해하는데 우수한 효과를 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명은 중온 혐기성, 셀룰로좀 형성균의 일종인 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규의 엔도글루카나아제에 관한 것이다. 본 발명의 만난아제는 우수한 만난아제 활성을 갖으며 만단을 포함한 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환 공정이나 직물 처리공정에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 셀룰로좀 형성효소인 엔도글루카나아제를 코히슨 마커를 통하여 분리 동정하는 그림이며;
- 도 2는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열이며;
- 도 3은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 코딩하는 아미노산 서열이며;
- 도 4는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 pET 22b 벡터에 삽입한 pET 22b-endoglucanase 모식도이며;
- 도 5는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제를 이콜라이에 발현시켜 정제한 것과 자이모그램을 통해 엔도글루카나아제 활성을 확인한 그림이며;
- 도 6는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제의 효소활성을 나타내는 표이며;
- 도 7은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제의 기질분석을 위해 TLC(Thin layer chromatography)를 수행한 그림이며;
- 도 8은 본 발명의 엔도글루카나아제가 전진적인 엔도글루카나아제임을 확인하기 위하여 수용성 환원당(검정색)과 비수용성 환원당(흰색)의 비율을 확인하는 실험이다. 8a는 본 발명의 전진적인 엔도글루카

나아제를 처리한 경우, 8b는 통상의 엔도글루카나아제를 처리한 경우를 나타낸다.

도 9는 전진적인 엔도글루카나아제와 통상의 엔도글루카나아제의 작용 차이를 도식적으로 그린 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 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.
- [0044] 실시예 1: 클로스트리디움 셀룰로보란스 셀룰로좀 형성효소 탐색
- [0045] 기존의 코히신 마커(Cho *et al.* Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker. J Biotechnol 45 (2010) 233-239)를 통하여 확인한 단백질 서열(SQIDYALGSTGR)을 클로스트리디움 셀룰로보란스 지놈서열에서 상이한 핵산을 탐지하였고 도 1에 도시하였다.
- [0046] 실시예 2: 유전자 증폭 및 클로닝
- [0047] 추정의 엔도글루카나아제 (endoglucanase)를 코딩하는 DNA의 증폭은 도시된 도 4를 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer) 5'GAATTCTATGAAAAAATTAGGTTCTATCTTAGCTAG-3' (서열번호 3)의 5'에는 제한효소 *EcoRI*, 역방향프라이머 (Reverse primer) 5'CTCGAGGAACTAGTTATTG-3' (서열번호 4)의 5'에는 제한효소 *XhoI* 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- [0048] 실시예 3: 엔도글루카나아제 유전자 클로닝, 발현 및 정제
- [0049] 증폭산물을 0.8% 아가로즈 겔 상에서 전기 영동하였고 아가로즈 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 라이게이션 (ligation)시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) BL21 DE3에 형질전환 하였고 완성된 벡터는 도 4에 도시하였다. 이후, 형질 전환된 대장균을 엠피실린 (50 µg/mL)이 포함된 루리아-버타니 배양액에 접종하여 37℃에서 A₆₀₀ = 0.6이 될때 까지 배양 후 아이소 프로필--D-시오갈락토파이라노사이드 (IPTG)를 전체 농도가 0.5 mM이 되게 첨가한후 30℃에서 12 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 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 만난아제 단백질을 정제하였고 SDS-PAGE를 확인하여 70kDa의 크기를 확인하였다. Zymogram을 통하여 엔도글루카나아제 활성을 확인하였다. 수용성 셀룰로오스인 시엠시 (carboxymethylcellulose)을 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. SDS-PAGE와 Zymogram은 도 5에 도시하였다.
- [0050] 실시예 4: 엔도글루카나아제 효소 활성 분석
- [0051] 엔도글루카나아제 효소 활성분석은 아세트산 버퍼 (pH 7.0)에서 1%의 기질을 첨가하여 40℃에서 2시간 배양함으로써 측정하였다. 효소활성은 5분간 가열함으로써 종료하였다. 환원당(reducing sugar)의 양은 DNS방법을 이용하여 측정하였다. 단백질의 농도 측정은 브래트포드(bradford's method) 방법에 기초한 Protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다. 엔도글루카나아제의 기질 특이성은 도 6에 도시하였다.
- [0052] 실시예 5: 티엘씨 (Thin layer chromatography)를 통한 엔도글루카나아제 생성물 확인

[0053] 엔도글루카나아제의 생성물을 확인하기 위하여 티엘씨를 수행하였다. 올리고당에는 글루코오스 (G1), 셀로바이오스 (G2), 셀로트리오스 (G3), 셀로 테트라오스 (G4)가 사용되었다. 각 올리고당을 엔도글루카나아제와 함께 0.2 ml의 50mM 소듐 아세트산 버퍼에 4시간 동안 37℃에서 배양한다. 그 후의 과정은 Macek 방법을 참고로 수행한다 (Macek *et al.* Bibliography of paper and thin-layer chromatography 1961-1965 and survey of applications. J Chromatogr Suppl. 1 (1968) 1-1041). 그 결과 본 발명의 엔도글루카나아제는 결과물로 셀로바이오스를 주로 생성하는 것을 확인 할 수 있었다.

[0054] 실시예 6: 전진적인 엔도글루카나아제 활성 확인

[0055] 본 발명의 엔도글루카나아제가 결정성 셀룰로오스에 높은 활성을 보이므로, 전진적인 (processive) 엔도글루카나아제인지 확인하기 위하여 환원당의 분배를 test해 보았다. 엔도글루카나아제를 Acid swollen cellulose를 기질로 하여 50 mM 소듐 아세테이트 버퍼 (pH 6.0)에 37℃에서 배양을 시킨다. 수용성 환원당과 비수용성 환원당은 원심분리기로 분리시킨뒤, DNS방법으로 정량적으로 측정한다. 본 연구의 엔도글루카나아제 환원당의 분배결과는 도 8에 도시하였다. 그 결과 수용성 환원당의 비율이 높고, 시간이 지날수록 그 비율이 높아지는 것을 봐서 전진적인 엔도글루카나아제임을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0056]

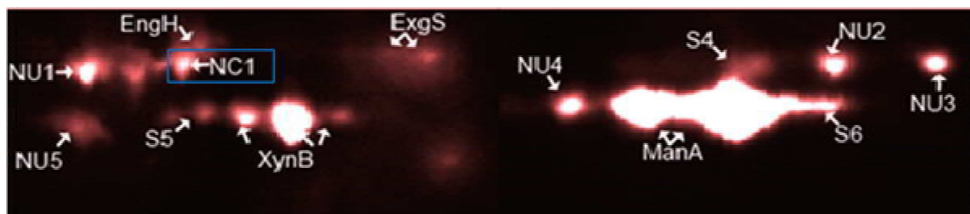
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11162P

수탁일자 : 20110107

도면

도면1



도면2

```

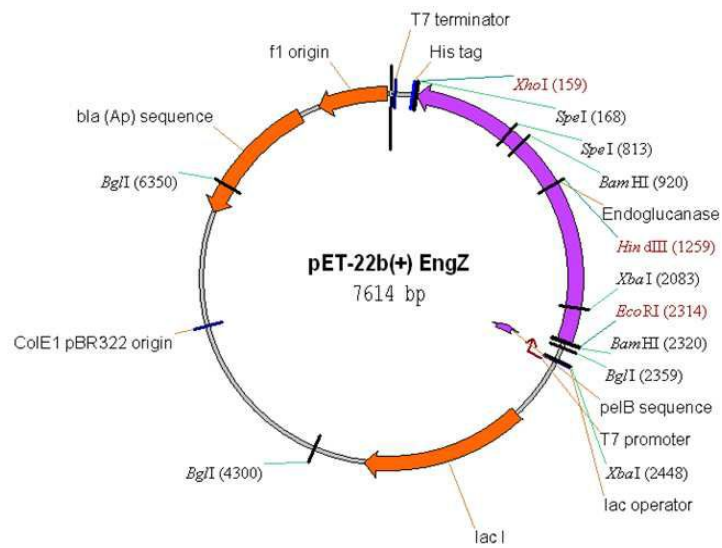
1  ATGAAAAAAT TAGGTTCTAT CTTAGCTAGC GTGGTTATGT TAGCTTCTAT
51  CACAGCACCA TTAAAGGCAC CAGTAAAAAGT GTCAGCTACA GAAAATTACA
101 ACTACGGGGA AGCATTACAA AAGGGAATTA TGTTCATGA ATTTCAAAGA
151 TCAGGAGACT TACCTGAAAA CGGTAGAAAT AACTGGCGTG GAGATTCTGG
201 ATTGACTGAT GGTAAAGACA ATGGTCTAGA TCTTACTGGA GGTGGGTATG
251 ATGCTGGAGA TCACGTAAAA TTCAATTGTC CAATGGCTTA CACTGTTTCA
301 ATGTTATCAT GGAGTGTTTA TGAAAGTCGT GGTGCATATG AAAAAAGTGG
351 TCAACTTCCT TACATATTAG ACAATATAAA ATGGGCTACA GATTACTTGA
401 TAAAATGCCA TCCAAGTCCA AATGAATACT ACTATCAAGT TGGTGATGCT
451 GCAGCGGATC ATTCATGGTG GGGATCTGCG GAAGTTATGC CAATGGCAAG
501 ACCATCATTT AAAGTTGATA CAGCTAATCC CGGATCAGCT GTCGTAGGAC
551 AAAC TGCCGC TGCGTTAGCA GCAGCTTCAA TAATTTTCAA GGATACAGAT
601 CCTTCTTATT CTGAGCTTTG CTTAAAGCAC GCAAAAGAAT TATTCACTTT
651 TGCAGATACT ACAAGAAAGT ATGCTGGATA TAAGGCAGCT CAGGGATGTT
701 ATAGTTCATG GAGTGGTTTT TATGATGAAT TAACTTGGGC GGCTACATGG
751 CTGAATATGG CAACTGGCGA CTCAGCTTAT CTGATAAGG CAGAGTCTTA
801 TGTGCCAAAC TGGGGAGTAG AGCTTGGAAC AAGCACGCCT AAATATACTT
851 GGGCGCATAA TTGGGATAAC TGTATCTTTG GTTCTTACTT ACTACTTGCT
901 AGGTTGACAA ATAAACCACT TTATAAAGAA TGCGCAGAAA GAAATTTAGA
951 TTGGTGGTCA ACAGGCGTTG GTACACAAAG AGTACCATAT AGCGCAAAAG
1001 GGCTAGCAGT TTTAGATATG TGGGGATCTC TTAGATACGC AACAAC TCAA
1051 GCTTTCCTTG CAAGTGTTTA TGCTGATTGG TCTGGTTGTG ATGTTACAAA
1101 GGCAACTGCT TATGAAAAAT TTGCAAAGAG TCAAATTGAT TATGCTCTTG
1151 GAAGCACTGG AAGAAGTTTT GTAGTAGGCT TTGGGGAAAA TTCTCCAACA
1201 CATCCTCATC ATAGAACTGC ACACAGTACT TGGATGGGAT ATTTAACATG
1251 TAATATTCCT GATTACAGTA GGCATACGCT TTATGGAGCA TTAGTTGGAG
1301 GTCCAGATAC TAGCGATAAG TACACTGATG ACATAAATAA CTATCAAAAT
1351 AATGAGGTTG CTTGTGATTA TAATGCAGGC TTTGTTGGGA TCCTTGCTAA
1401 AATGTACGAC AAATACGGTG GTACACCAAT TGAAAAATTC AAAGCTATTG
1451 AAACGCCAGT TGATGAATAC CTAGCTTATG GTAGTTCAAG TGGAAGTAGT
1501 GGAAATGAAC TTCAATTAAT GGTTCCTATT CGTAATCAAA CTGGTTGGCC
1551 AGCAAGAGGT AGTGATAAAC TATCTGCTAG ATACTTTATG GATATTACAG
1601 AAGAAATTAA AGCTGGTATA AAACCAAGTG ACTTTACAGC AAAGGCTAGT
1651 ACCTCAGGAG TTAAACTTTC TGGGCTTATA CCTTGGGATG TTGATAAAAA
1701 CATATACTAT ATAAATATTG ATTTTACAGG AACTAATATC TCTCCTATAA
1751 ACAACAACAC TTACAAAAAA GATGTTTATA TGTCGATAGG TATTCCTTAT
1801 GGAACAGCGA TAACTGTGC AAATGATTTT TCATTCCAAG GGCTTACAGC
1851 TACTACTGGT GGACAAGATG GAGTTAAAC AAAATATATT CCTATCTACG
1901 ATAATGGAGT AAAGGTTGCT GGTGAAGAAC CTA CTCTAAT AGTTAACCCCT
1951 ACTATAAAAA AGGGTGATGT TAATAATGAT ACAAAGATAT CTGCCATGGA
2001 TCTTGCACTA CTGAAGAAAC ATATTATGGG TACCTCAACC TTAACAGGAG
2051 ATGCATTTAC AGCAGCAGAT GTAGATTCAA ATGGGAAAAGT AAATTCAATA
2101 GATTTAGCTT TATTGAAAAA ATACATTTTA GGTCAAATAA CTAGTTTCTA
2151 G

```

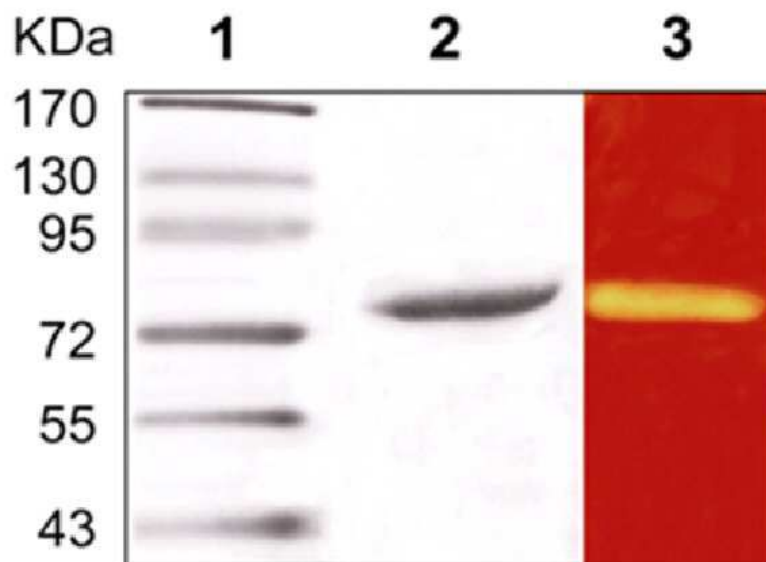
도면3

1 MKKLGSI LAS VV MLASITAP LKAPVKVSAT ENYNYGEALQ KGIMFYEFQR
 51 SGDL PENGRN NWRGDSGLTD GKDNGLDLTG GWYDAGDHVK FNLPMAYTVS
 101 MLSWSVYESR GAYEKSGQLP YILDNIKWAT DYLIKCHPSP NEYYYQVGDA
 151 AADHSWWGSA EVMPMARPSF KVD TANPGSA VVGQTAAALA AASIIFKDTD
 201 PSYSELCLKH AKELFTFADT TRSDAGYKAA QGCYSSWSGF YDELTWAATW
 251 LN MATGDSAY LDKAESYVPN WGVELGTSTP KYTWAHNWDN CIFGSYLLLA
 301 RL TNKPLYKE CAERNLDWWS TGVGTQRPY SAKGLAVLDM WGS LRYATTQ
 351 AFLASVYADW SGCDVT KATA YENFAKSQID YALGSTGRSF VVGFGENSPT
 401 HPHHRTAHST WMGYLTCNIP DYSRHTLYGA LVGGPDTS DK YTDDINNYQN
 451 NEVACDYNAG FVGILAKMYD KYGGTPIENF KAIETPVDEY LAYGSSSGTS
 501 GNELQLM VSI RNQTGW PARG SDKLSARYFM DITEEIKAGI KPSDFTAKAS
 551 TSGVKLSGLI PWDVDKNIYY INIDFTGTNI SPINNNTYKK DVYMSIGIPY
 601 GTAINCANDF SFQGLTATTG GQDGVKTKYI PIYDNGVKVA GEEPTLIVNP
 651 TIKKGDVNND TKISAMD LAL LKKHIMGTST LTGDAFTAAD VDSNGKVNSI
 701 DLALLKKYIL GQITSF

도면4



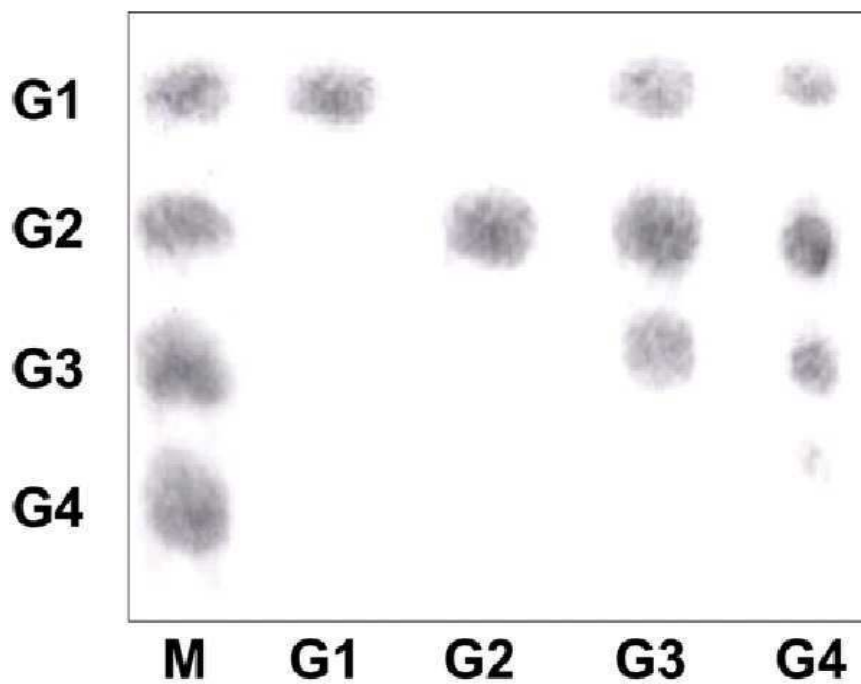
도면5



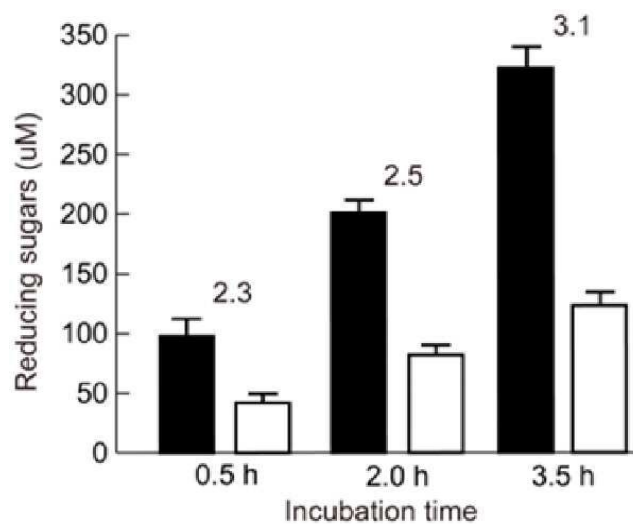
도면6

기질	비 활성 (U/mg)
Acid-swollen cellulose	0.308 ± 0.005
Avicel	0.281 ± 0.004
카르복시메틸 셀룰로스	0.765 ± 0.004
β -글루칸	1.021 ± 0.007
미강	0.871 ± 0.009
버치우드 자일란	ND

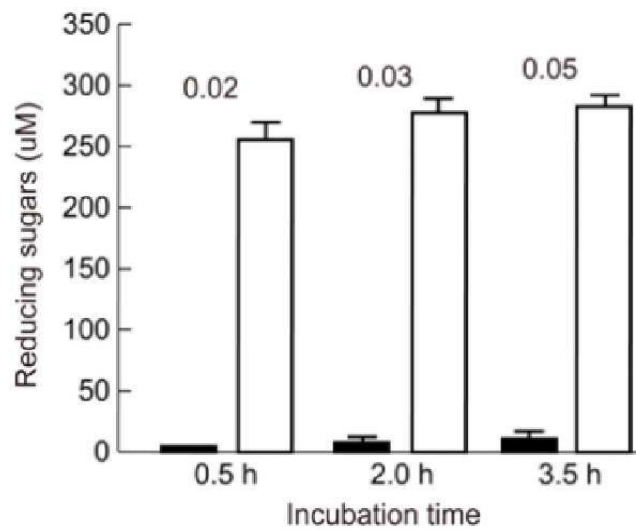
도면7



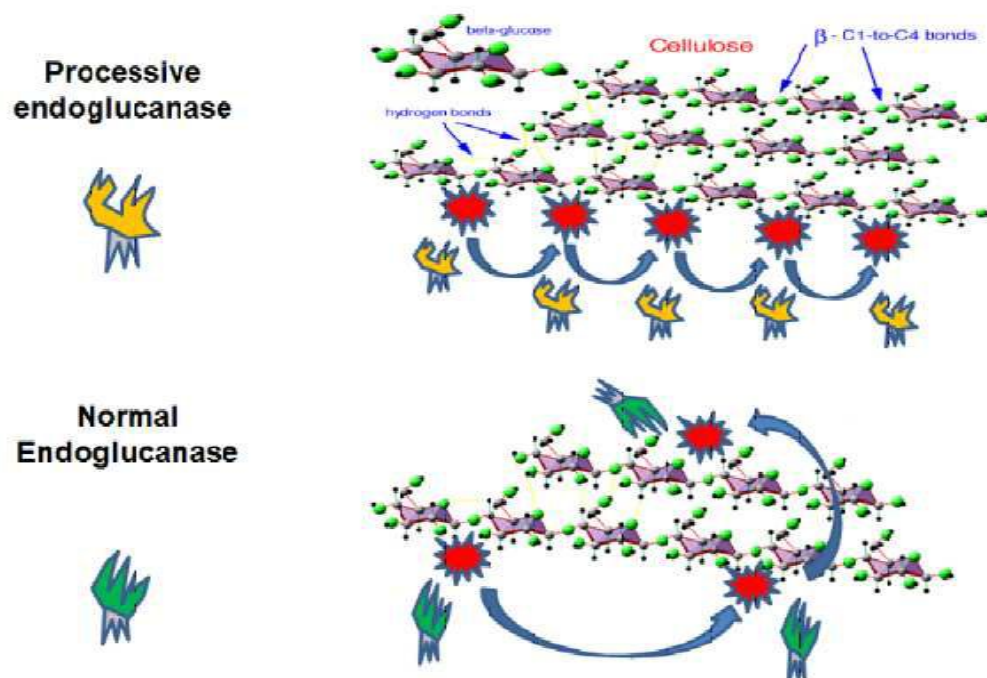
도면8a



도면8b



도면9



서 열 목 록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Identification of processive endoglucanase from Clostridium cellulovorans and application of endoglucanase for hydrolysis of crystallin cellulose
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 716

<212> PRT

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 1

Met Lys Lys Leu Gly Ser Ile Leu Ala Ser Val Val Met Leu Ala Ser

1 5 10 15

Ile Thr Ala Pro Leu Lys Ala Pro Val Lys Val Ser Ala Thr Glu Asn

20 25 30

Tyr Asn Tyr Gly Glu Ala Leu Gln Lys Gly Ile Met Phe Tyr Glu Phe

35 40 45

Gln Arg Ser Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Arg Asn Asn Trp Arg Gly

50 55 60

Asp Ser Gly Leu Thr Asp Gly Lys Asp Asn Gly Leu Asp Leu Thr Gly

65 70 75 80

Gly Trp Tyr Asp Ala Gly Asp His Val Lys Phe Asn Leu Pro Met Ala

85 90 95

Tyr Thr Val Ser Met Leu Ser Trp Ser Val Tyr Glu Ser Arg Gly Ala

100 105 110

Tyr Glu Lys Ser Gly Gln Leu Pro Tyr Ile Leu Asp Asn Ile Lys Trp

115 120 125

Ala Thr Asp Tyr Leu Ile Lys Cys His Pro Ser Pro Asn Glu Tyr Tyr

130 135 140

Tyr Gln Val Gly Asp Ala Ala Ala Asp His Ser Trp Trp Gly Ser Ala

145 150 155 160

Glu Val Met Pro Met Ala Arg Pro Ser Phe Lys Val Asp Thr Ala Asn

165 170 175

Pro Gly Ser Ala Val Val Gly Gln Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala

180 185 190

Ser Ile Ile Phe Lys Asp Thr Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Leu Cys Leu

195 200 205

Lys His Ala Lys Glu Leu Phe Thr Phe Ala Asp Thr Thr Arg Ser Asp

210 215 220

Ala Gly Tyr Lys Ala Ala Gln Gly Cys Tyr Ser Ser Trp Ser Gly Phe

225 230 235 240
 Tyr Asp Glu Leu Thr Trp Ala Ala Thr Trp Leu Asn Met Ala Thr Gly
 245 250 255
 Asp Ser Ala Tyr Leu Asp Lys Ala Glu Ser Tyr Val Pro Asn Trp Gly
 260 265 270
 Val Glu Leu Gly Thr Ser Thr Pro Lys Tyr Thr Trp Ala His Asn Trp
 275 280 285
 Asp Asn Cys Ile Phe Gly Ser Tyr Leu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Asn
 290 295 300
 Lys Pro Leu Tyr Lys Glu Cys Ala Glu Arg Asn Leu Asp Trp Trp Ser

 305 310 315 320
 Thr Gly Val Gly Thr Gln Arg Val Pro Tyr Ser Ala Lys Gly Leu Ala
 325 330 335
 Val Leu Asp Met Trp Gly Ser Leu Arg Tyr Ala Thr Thr Gln Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ala Ser Val Tyr Ala Asp Trp Ser Gly Cys Asp Val Thr Lys Ala
 355 360 365
 Thr Ala Tyr Glu Asn Phe Ala Lys Ser Gln Ile Asp Tyr Ala Leu Gly
 370 375 380

 Ser Thr Gly Arg Ser Phe Val Val Gly Phe Gly Glu Asn Ser Pro Thr
 385 390 395 400
 His Pro His His Arg Thr Ala His Ser Thr Trp Met Gly Tyr Leu Thr
 405 410 415
 Cys Asn Ile Pro Asp Tyr Ser Arg His Thr Leu Tyr Gly Ala Leu Val
 420 425 430
 Gly Gly Pro Asp Thr Ser Asp Lys Tyr Thr Asp Asp Ile Asn Asn Tyr
 435 440 445
 Gln Asn Asn Glu Val Ala Cys Asp Tyr Asn Ala Gly Phe Val Gly Ile

 450 455 460
 Leu Ala Lys Met Tyr Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Pro Ile Glu Asn Phe
 465 470 475 480

Lys Ala Ile Glu Thr Pro Val Asp Glu Tyr Leu Ala Tyr Gly Ser Ser
 485 490 495
 Ser Gly Thr Ser Gly Asn Glu Leu Gln Leu Met Val Ser Ile Arg Asn
 500 505 510
 Gln Thr Gly Trp Pro Ala Arg Gly Ser Asp Lys Leu Ser Ala Arg Tyr
 515 520 525

 Phe Met Asp Ile Thr Glu Glu Ile Lys Ala Gly Ile Lys Pro Ser Asp
 530 535 540
 Phe Thr Ala Lys Ala Ser Thr Ser Gly Val Lys Leu Ser Gly Leu Ile
 545 550 555 560
 Pro Trp Asp Val Asp Lys Asn Ile Tyr Tyr Ile Asn Ile Asp Phe Thr
 565 570 575
 Gly Thr Asn Ile Ser Pro Ile Asn Asn Asn Thr Tyr Lys Lys Asp Val
 580 585 590
 Tyr Met Ser Ile Gly Ile Pro Tyr Gly Thr Ala Ile Asn Cys Ala Asn

 595 600 605
 Asp Phe Ser Phe Gln Gly Leu Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gln Asp Gly
 610 615 620
 Val Lys Thr Lys Tyr Ile Pro Ile Tyr Asp Asn Gly Val Lys Val Ala
 625 630 635 640
 Gly Glu Glu Pro Thr Leu Ile Val Asn Pro Thr Ile Lys Lys Gly Asp
 645 650 655
 Val Asn Asn Asp Thr Lys Ile Ser Ala Met Asp Leu Ala Leu Leu Lys
 660 665 670

 Lys His Ile Met Gly Thr Ser Thr Leu Thr Gly Asp Ala Phe Thr Ala
 675 680 685
 Ala Asp Val Asp Ser Asn Gly Lys Val Asn Ser Ile Asp Leu Ala Leu
 690 695 700
 Leu Lys Lys Tyr Ile Leu Gly Gln Ile Thr Ser Phe
 705 710 715
 <210> 2
 <211> 2148

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 2

atgaaaaaat taggttctat cttagctagc gtggttatgt tagcttctat cacagcacca	60
ttaaaggcac cagtaaaagt gtcagctaca gaaaattaca actacgggga agcattacaa	120
aagggaatta tgttctatga atttcaaaga tcaggagact tacctgaaaa cggtagaaat	180
aactggcgtg gagattctgg attgactgat ggtaaagaca atggctctaga tcttactgga	240
ggttggatg atgctggaga tcacgtaaaa ttcaatttgc caatggctta cactgtttca	300
atgttatcat ggagtgttta tgaaagtcgt ggtgcatatg aaaaaagtg tcaattcct	360
tacatattag acaatataaa atgggctaca gattacttga taaaatgcca tccaagtcca	420
aatgaatact aciatcaagt tggatgatgct gcagcggatc attcatggtg gggatctgcg	480
gaagttatgc caatggcaag accatcattt aaagttgata cagctaattc cggatcagct	540
gtcgtaggac aaactgccgc tgcgttagca gcagcttcaa taattttcaa ggatacagat	600
ccttcttatt ctgagctttg cttaaagcac gcaaaagaat tattcattt tgcagatact	660
acaagaagt atgctggata taaggcagct cagggatgtt atagttcatg gagtggtttt	720
tatgatgaat taacttgggc ggctacatgg ctgaatatgg caactggcga ctgagcttat	780
cttgataagg cagagtctta tgtgccaac tggggagtag agcttgaac aagcacgcct	840
aaataactt gggcgcataa ttgggataac tgtatctttg gttcttactt actacttgc	900
aggttgacaa ataaaccact ttataaagaa tgcgcagaaa gaaatttaga ttggtggtca	960
acaggcgttg gtacacaaag agtaccatat agcgcaaaag ggctagcagt tttagatatg	1020
tggggatctc ttagatacgc aacaactcaa gctttccttg caagtgttta tgctgattgg	1080
tctggttgtg atgttacaaa ggcaactgct tatgaaaatt ttgcaaagag tcaaattgat	1140
tatgctcttg gaagcactgg aagaagtttt gtagtaggct ttggggaaaa ttctccaaca	1200
catcctcacc atagaactgc acacagtact tggatgggat atttaacatg taatattcct	1260
gattacagta ggcatacgtt ttatggagca ttagttggag gtccagatac tagcgataag	1320
tacactgatg acataaataa ctatcaaaat aatgaggttg cttgtgatta taatgcaggc	1380
tttgttggga tccttgctaa aatgtacgac aaatacggtg gtacaccaat tgaaaatttc	1440
aaagctattg aaacgccagt tgatgaatac ctgacttatg gtagttcaag tggaactagt	1500
ggaaatgaac ttcaattaat ggtttctatt cgtaatcaaa ctggttggcc agcaagaggt	1560
agtgataaac tatctgctag atactttatg gatattacag aagaaattaa agctggtata	1620
aaaccaagtg actttacagc aaaggctagt acctcaggag ttaaactttc tgggcttata	1680

ccttgggatg ttgataaaaa catatactat ataaatattg attttacagg aactaatatc 1740
tctcctataa acaacaacac ttacaaaaaa gatgtttata tgtcgatagg taticcttat 1800

ggaacagcga taaactgtgc aaatgatttc tcattccaag ggcttacagc tactactggt 1860
ggacaagatg gagttaaacc aaaatatatt cctatctacg ataatggagt aaaggttgct 1920
ggtgaagaac ctactctaag agttaaccct actataaaaa agggatgatgt taataatgat 1980
acaaagatat ctgcatgga tcttgacctt ctgaagaac atattatggg tacctcaacc 2040
ttaacaggag atgcatttac agcagcagat gtagattcaa atgggaaagt aaattcaata 2100
gatttagctt tattgaaaaa atacatttta ggtcaaataa ctagtttc 2148

<210> 3
<211> 36
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gaattctatg aaaaaattag gttctatctt agctag 36

<210> 4
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ctcgaggaaa ctagttatctt g 21