(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0098240
(43) 공개일자 2012년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0018070
(22) 출원일자 2011년02월28일
심사청구일자 2011년02월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 성북구 길음로 119, 대우푸르지오아파트 210동 201호 (길음동)
전상덕
서울특별시 강동구 상암로11길 29, 2층 (암사동)
김승욱
서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트 104-905
(74) 대리인
이처영

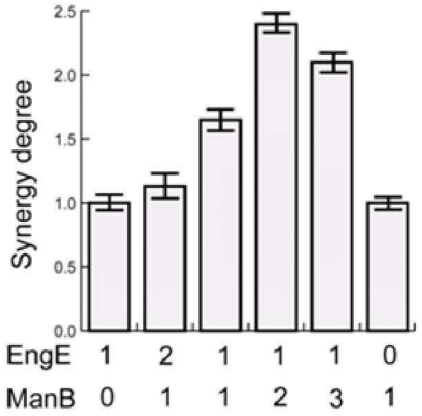
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규 만난아제와 갈락토만난 분해를 위한 셀룰로좀 복합체 활용**

(57) 요 약

본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에 있는 만난아제 (mannanase)에 관한 것이다. 본 발명의 만난아제는 우수한 만난아제 활성을 가지고, 셀룰로좀 복합체로써 셀룰레이즈와 함께 목질계의 주성분인 만난을 분해하는데 탁월한 효과를 발휘함으로 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 공정에 응용이 가능하다.

대 표 도 - 도8a



이 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 만난아제(mannanase).

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 셀룰로보란스으로부터 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 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 분해 방법.

청구항 10

제 1항의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환 방법.

청구항 11

제 1항의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 분해용 조성물.

청구항 12

제 1항의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혐기성 셀룰로좀 형성 세균인 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리해낸 만난아제를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 목질계 바이오 매스 분해를 위한 셀룰로좀 복합체 활용에 관한

방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 목질계 섬유소는 식물의 세포벽의 구성 성분이며 셀룰로우즈와 헤미셀룰로우즈의 복합체로 이루어져 있다. 셀룰로우즈는 -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 셀룰로우즈를 분해하기 위해서는 여러 개의 다른 효소들의 작용이 필요 하다 (Ximenes *et al.* Hemicellulases and biotechnology. Recent Res Develop Microbiol 2 (1998) 165-176). 헤미셀룰로우즈에는 β-1.4-xylose 인 자일란과 β-1,4-glucose,mannose인 글루코만난 등이 있다. 대부분의 셀룰로우즈를 분해 할수 있는 혐기성 미생물들은 셀룰로좀이라는 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). 셀룰로좀은 결정형 셀룰로우즈나 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 효소들은β 도커린 도메인을 가지고 있고 도커린 도메인이 없는 효소들은 비 셀룰로좀 형성 효소이다 (Bayer *et al.* The cellulosome: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annual Review of Microbiol 58 (2004) 521-554).

[0003] 만난아제는 만난을 분해하는데 사용되는 효소로써, 만난은 목질계 바이오매스에 풍부한 기질로써 침엽수에 갈락토만난 (galactomannan)으로 2-5%, 경목에 글루코갈락토만난으로 15-25%정도를 함유하고 있다 (Pham *et al.* J Biotechnol1 48 (2010) 163-170).

[0004] 한편, 셀룰로좀 복합체에서 지지체 단백질인 CbpA는 카보하이드레이트 결합 모듈 (Carbohydrate binding module)을 가지고 있어, 불용성 바이오매스에 분해효소들이 접근하는 것을 도와준다. 그리고 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제 E (Endoglucanase E)는 GH5로써 엔도글루카나제 활성 이외에도 만난아제 활성이 있을 것으로 기대되어 본 연구에 이용하였다(Vlasenko *et al.* Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. Bioresour Technol 101 (2009) 2405-2411).

[0005] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출되 것으로서 본 발명의 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 효소를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 목질계 바이오매스 분해를 효과적으로 분해하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 갈락토만난 분해에 상승효과를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)에서 분리된 만난아제(mannanase)를 제공한다.

[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, 유

전자 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 만난아제 유전자에 포함된다.

[0014] 또 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스으로부터 유래한 상기 본 발명의 유전자를 함유한 재조합 벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 벡터는 도 4에 기재된 개열지도를 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0017] 또 본 발명은 상기 본 발명의 제 1항의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 분해 방법을 제공한다.

[0018] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환 방법을 제공한다.

[0019] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 분해 방법을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 목질계 바이오매스에 처리하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환 방법을 제공한다.

[0021] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 분해용 조성물을 제공한다.

[0022] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소와 셀룰로좀 복합체 형성 단백질인 미니 시비피에이와 엔도글루카나아제 E의 복합체를 유효성분으로 포함하는 목질계 바이오매스 당 전환용 조성물을 제공한다.

[0023] 이하 본 발명을 설명한다.

[0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 핵산 또는 아미노산 서열을 포함하는 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제를 제공한다.

[0025] 본 발명자들은 복질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환공정에 필요한 만난아제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 중온 혐기성, 셀룰로좀 형성균으로부터 공지된 만난아제 아미노산 서열과 상동성을 갖는 신규 유전자를 클로닝한 후 이 클로딩된 유전자를 이콜라이에 발현시켜 만난아제 활성을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0026] 본 발명의 셀룰라아제는 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제의 서열 상동성에 기초하여 분리된 신규 효소이다.

[0027] 본 반명의 명세서에서 용어 만난아제(mannanase)는 만난에서 1,4--D-만노필라노실 결합(mannopyranosyl linkages)을 가수분해하여 단당류의 하나인 만노오스(mannose)의 생성을 촉매하는 효소를 의미한다. 효소 엔도-베타-1,4-만난아제 (endo-1,4--mannanase; EC 3.2.1.78)를 포함하는 의미이다.

[0028] 본 발명에서 상기 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)는 셀룰로좀 형성균의 일종으로서 결정성 셀룰로오스나 자일란, 펙틴등의 가수분해능이있고, 자일란이나 Avicel과 자일란, 펙틴 혼합 매양을 할 때 만난아제를 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).

[0029] 본 발명의 신규 만난아제는 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 만난아제는 도 3에 도시한 657개 아미노산 서열을 포함하여 이루어지고, 글리코실 하이드롤라아제 (Glycosyl hydrolase)의 패밀리(family) 26 계열에 속하는 Clostridium cellulolyticum의 만난아제와 서열 유사성 (sequence similarity)을 보였으며, 만난아제 활성을 나타내었다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0031] 본 발명의 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 도면 2에 도시된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0033] 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.

[0034] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내영 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0035] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 만난아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0036] 본 발명의 상술한 만난아제를 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-ManB 기탁번호 KCCM11161P로 기탁하였다.

[0037] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙제 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 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0038] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae)등이 이용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제와 셀룰로좀 형성 단백질인 시비피에이 단백질의 일부인 미니 시비피에이 단백질과 엔도글루카나아제 E를 이용하여 갈락토만난 분해에 상승효과를 제공하는데 있다.

[0040] 본 발명의 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제와 미니-시비피에이를 이용하여 만난을 포함한 바이오매스 분해를 위해 이용하는 것을 포함한다.

[0041] 본 발명은 바이오매스의 분해를 위해 본 발명의 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 만난아제와 미니-시비피에이 및 기타 셀룰로좀 형성효소를 이용하는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명으로 목질계 섬유소를 에너지원으로 이용한 바이오연료 생산에 효율적인 방법을 제공할 것이다.

[0043] 이하 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0044] 본 발명은 신규 만난아제를 기존에 발명한 코히슨 마커를 통하여 분리, 선별하였고 (도면 1 참조), 이를 이콜라이(*Escherichia coli*)에 클로닝하여 발현시켰다. 또한 만난아제 활성을 분석하였고, 최적 온도와 pH를 확인하였다. 갈락토만난을 효과있게 분해하기 위하여 셀룰로좀에 있는 시비피에이(CbpA)의 일부분인 미니-시비피에이 (mini-CbpA) 단백질과 엔도글루카나아제 E를 사용하였다. 만난아제는 미니-시비피에이 단백질과 결합하여 갈락토만난에 대한 활성이 증가하였고, 미니-시비피에이에 결합된 만난아제와 엔도글루카나아제 E는 갈락토만난을 분해하는데에 상승 효과(synergistic effect)를 가져왔다 (도면 8 참조).

[0045] 이에, 본 발명자들은 신규 만난아제를 이용하여 만난을 효과적으로 분해할 수 있음을 확인하였고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0046] 본 발명은 중온 혐기성, 셀룰로좀 형성균의 일종인 클로스트리드움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규의 반난아제에 관한 것이다. 본 발명의 만난아제는 우수한 만난아제 활성을 갖으며 만난을 포함한 목질계 바이오매스로부터 바이오 연료 제조를 위한 당 변환 공정에 사용 될 수 있다. 또한 셀룰로좀 형성 단백질인 시비피에이의 일부분 미니-시비피에이와 엔도글루카나아제 E를 이용하여 갈락토만난을 포함하는 목질계 바이오매스 분해에

상승작용을 보여주고 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 셀룰로좀 형성효소인 만난아제를 코히신 마커를 통하여 분리 동정하는 그림이며;

도 2는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제를 코딩하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열이며;

도 3은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제를 코딩하는 아미노산 서열이며;

도 4는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제를 pET 22b 벡터에 삽입시킨 pET 22b-mannanase 모식도이며;

도 5는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제를 이콜라이에 발현시켜 정제한 것과 자이모그람을 통해 만난아제 활성을 확인한 그림이며;

도 6는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제의 효소활성을 나타내는 표이며;

도 7a은 클로스트리디움 셀룰로보란스의 만난아제와 미니-시비피에이가 조립된 그림이며;

도 7b는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 엔도글루카나아제 E와 미니-시비피에이가 조립된 그림이며;

도 8a는 조립된 만난아제와 엔도글루카나아제를 일정 비율로 혼합하여 갈락토만난인 LBG 분해에 상승효과를 얻는 그림이며;

도 8b는 조립된 만난아제와 엔도글루카나아제를 일정 비율로 혼합하여 갈락토만난인 기어 검 분해에 상승효과를 얻는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 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.

[0049] 실시예 1:클로스트리디움 셀룰로보란스 셀룰로좀 형성효소 탐색

[0050] 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 서열을 클로스트리디움 셀룰로보란스 지놈서열에서 상이한 핵산을 탐지하였고 도 1에 도시하였다.

[0051] 실시예 2:유전자 증폭 및 클로닝

[0052] 추정의 만난아제 (Mannanase)를 코딩하는 DNA의 증폭은 도시된 도 4를 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer) 5'GGATCCGATGAAAAAAATTTTCGGCAGAGCGATG-3'(서열번호 3)의 5에는 제한효소 *BamHI*, 역방향프라이머 (Reverse primer) 5'GAATTCGAGCTAAGTAATATCTTCT-3'(서열번호 4)의 5'에는 제한효소 *EcoR1* 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0053] 실시예 3:만난아제 유전자 클로닝, 발현 및 정제

[0054] 증폭산물을 0.8% 아가로즈 겔 상에서 전기 영동하였고 아가로즈 겔 상의 DNA 절편은 gel extraction kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 회수하였다. 이후, 제한효소 *BamHI*, *EcoRI*으로 절단한후 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 A_{600} = 0.6이 될 때 까지 배양 후 아이소 프로필--D-시오갈락토파이라노사이드 (IPTG)를 전체 농도가 0.5 mM이 되게 첨가한후 30℃에서 12 시간 배양했다. 이후, 대장균

을 원심분리 (4,000 X g, 20 분)하여 분리한 후 10 mL 라이시스 버퍼 (50 mM $NaH2PO_4$, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 녹인후 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 만난아제 단백질을 정제하였고 SDS-PAGE를 확인하여 70kDa의 크기를 확인하였다. Zymogram을 통하여 만난아제 활성을 확인하였다. 갈락토만난인 LBG (locust bean gum)을 0.2% 포함한 PAGE gel을 내리고, 2시간동안 상온에서 1mM dithiothreitol 과 10 mM $CaCl_2$ 가 포함된 0.1 M 숙신산 버퍼(pH 6.3)로 배양한 후, 0.1% congo red로 염색하였고, 1M NaCl로 씻어주었다. SDS-PAGE와 Zymogram은 도 5에 도시하였다.

[0055] 실시예 4:만난아제 효소 활성 분석

[0056] 만난아제 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. 만난아제의 기질 특이성은 도 6에 도시하였다.

[0057] 실시예 5:미니-시비피에이에 대한 만난아제와 엔도글루카나아제 E의 조립

[0058] 미니-시비피에이에 붙어있는 코히슨 도메인과 셀룰로좀 형성효소에 존재하는 도커린 모듈을 이용하여 효소 복합체를 만든다. 셀룰로좀 조립을 위해 필요한 미니-시비피에이와 엔도글루카나아제 E는 Murashima가 사용한 벡터를 이용하고 대장균 *E.coli* BL21에서의 발현 및정제 방법은 Murashima가 사용한 방법을 따른다. 만난아제와 엔도글루카나아제 E의 미니-시비피에이에 대한 조립은 Murashima 방법을 따른다 (Murashima *et al*. J Bacteriol 184 (2002) 5088-5095). 미니-시비피에이 (5.0 mnol)과 만난아제, 그리고 미니-시비피에이 (5.0 mnol)과 엔도글루카나아제 E (10.0 nmol)을 100ul 바인딩 버퍼(25 mM sodium acetate buffer [pH 6.0], 15 mM $CaCl_2$에 섞는다. 4℃에서 1시간 배양시키고 native PAGE를 통해 조립된 복합체(만난아제와 미니-시비피에이, 엔도글루카나아제 E와 미니-시비피에이)를 확인하였다. 확인된 조립은 도 7에 도시하였다.

[0059] 실시예 6:갈락토만난에 대한 상승효과 측정

[0060] 각 조립된 효소들의 활성 측정은 100 ul의 혼합물(0.5% 기질, 50 mM 소듐 아세트산 버퍼 [pH 7.0])에서 확인하였다. 혼합물은 37℃에서 4시간 배양한 후 환원당은 DNS 방법으로 측정하였다. 각 효소의 농도는 2 nmol/ml로 측정하였다. 그 결과 갈락토만난인 LBG와 구아 검(guar gum)에서 상승 효과를 관찰할 수 있었다. LBG에서는 만난아제와 엔도글루카나아제의 비율이 2:1일 때 최대의 상승효과인 2.4배를 확인할 수 있었고, 구아 검을 기질로 사용할시는 3:1의 비율에서 최대의 상승효과인 2.8배를 확인할 수 있었다. 갈락토만난에 대한 상승효과는 도 8에 도시하였다.

수탁번호

[0061]

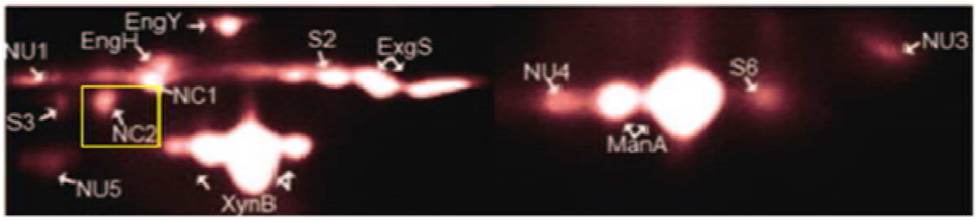
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11161P

수탁일자 : 20110107

도면

도면1



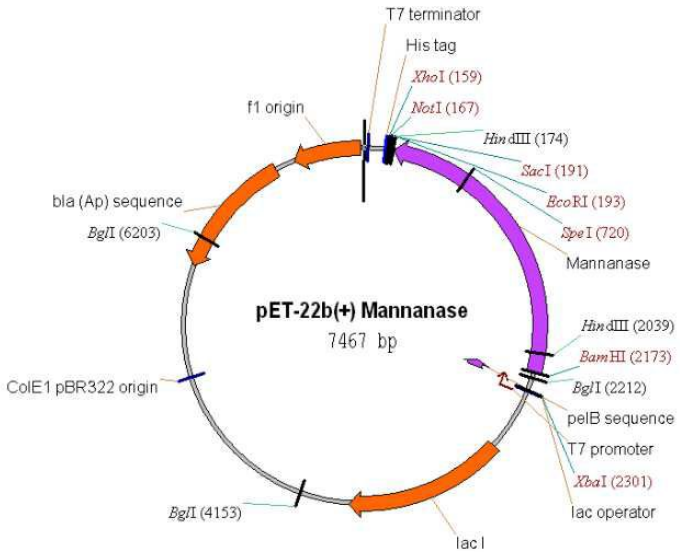
도면2

```
   1 ATGAAAAAAA TTTTCGGCAG AGCGATGTCT CTGTTGGCAA CGTTTGCATT
  51 GGTATGTTCG TTTTTCGTGG CAATGCCAAC AACGCCAGTT AAAGCTGAAA
 101 CTTCTTTGCC TGTAAAGGTC GAAGCGGAAG CTTGTACTCT TAGTAACGGT
 151 GCTGCTGTTA CTACAAATGT CTACGGAACT AACTATCCAG GTTATTCTGG
 201 CAATGGATTT GTGTGGGCAT CTAATTCAGG GACAATAACA TTTAATGTTA
 251 CAGTTCCTAA AAATGGTATG TATGAGATTT CATCAAGATG CTGGATGTAT
 301 CTTGGAAATG TCGGGGACAC AAGACTTCAA GTGCTTAGCA TCAATGGTGC
 351 AGCACAAGGC AATTTCTACG TTCCAAACAA AGGTGGCTGG GCTGATTACA
 401 GCTTTGGATA CTTCTATCTT GAAGCAGGTA CAGCTAAAAT TGAGATTGGA
 451 TCATCTGGAA GCTGGGGCTT CATACTGTAT GATACAGTAA CATTTGACAA
 501 TGCTAAAATG CCAGCTCTTA AGGCTGACCC AACTCCATGT GATGTAAATG
 551 CAACTTCAGA AACAAAGAAC TTAAAACAAT ATCTTACTAG CGTTTATGGC
 601 AATCATGTTA TTTCTGGCCA ACAAGAAATT TATGGTGGCG GAAATGACGG
 651 TAATGCAGAA CTTGAATTTG ATTACATTTA TAATAAGACA GGCAAATACC
 701 CTGCAATTAG AGGCTTTGAT TTTATGAACT ACAATCCTCT ATACGGATGG
 751 GAAGACGGTA CAACAAACCG TATGATTAAG TGGGTTAAAG AACGTGGTGG
 801 TATTGCAACT GCATCTTGGC ATATCAACGT ACCATCTGAT TTTACAAACT
 851 ATAAGTTAGG TGATAAATTA GATTGGAAAA GTTGTACATA CAAGCCTACT
 901 GCTAGTTTTA AAACAGCTAA CTGTCTTGAT AAAACATCAA AAGAATACGC
 951 TTATTTAATG CTTGCAGTTG ATGACCTTGC AAAGCAATTA CTAATTCTTC
1001 AAGATGCAAA AGTTCCTGTA CTTTTACGTC CTTTCCATGA AGCAGAAGGT
1051 AATAACAATA CAAATGGTTC AGGAGCATGG TTCTGGTGGG GTTCTGGCGG
1101 TGCTGATGTG TACAAGCAAC TTTGGAAACT TCTTTATTCA ACCCTAACAG
1151 AAAAGTACGG TATCCATAAT GTAATATGGG AAGTAAATCT TTATTCTTAT
1201 GCAAATTCAG CTCAATGGTA TCCAGGAGAT GATTGTGTAG ATATCGTTGG
1251 ATATGATAAG TATGAAGGCT CACCTTACAC TTGGAAAACA AGTGCTGCAA
1301 CATCAGTATT TTTGACACTT GTAAATCATA CAAATGATAC AAAGATGGTT
1351 GCATTAACTG AAAATGATGT TATACCTGAC ATTCAGAATA TAGTTAATCA
1401 AGGAGCTTGG TGGTTGTATT TCTGTCCATG GTATGGTGAT TTCATTACTA
1451 GTTCAACTTA TAATGATCCT GTACTTCTTA AAACTACCTA CAATAGCCCA
1501 TATGTAGTTA CTTTAGATGA ATTACCAAAA GATCTTTATG CATCTTCTTC
1551 TAAAGTTCAA GCACCAACTT TAAGTGTTAA AGAAGGTACA TATAGTGTTA
1601 CTCAAACAGT AGCTCTTAGC AGTGCAACAG AAGGAGCAAC TATTTATTAT
1651 ACTCTTGATG GAACTGAGCC TACTGTTGCA TCTACTGTAT ATGATAAGCC
1701 AATAGAAGTA GCTAAAACTA CAACTATCAA AGCTATTGCA ATTAAAGCTG
1751 GGCTGACAAA TTCAGACGTA GTTACTGCTA CTTATACAAT TTCAGTTTCT
1801 ATGCTTGGTG ATGTTAACAA CGATGGCAAA GTTAATGCAA TAGATTATGC
1851 AATGGTAAAA AGTTATTTAC TTGGAAATCC AGTGACTATA AATCTAAAAA
1901 ATGCAGACTT AAATAGTGAT GGTAAGATAA ATGCTATTGA CCTAGCATCT
1951 ATAAAGAAGA TATTACTTAG CTAA
```

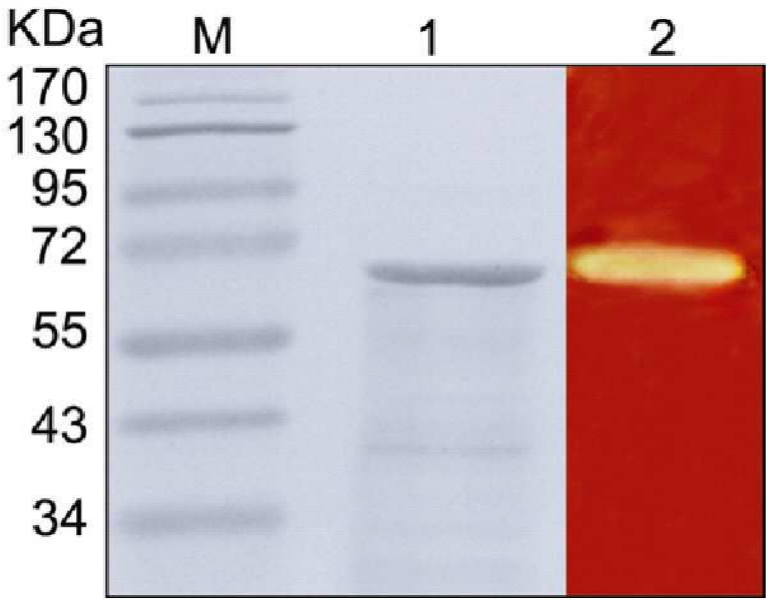
도면3

```
  1  MKKIFGRAMS LLATFALVCS FFVAMPTTPV KAETSLPVKV EAEACTLSNG
 51  AAVTTNVYGT NYPGYSGNGF VWASNSGTIT FNVTVPKNGM YEISSRCWMY
101  LGNVGDTRLQ VLSINGAAQG NFYVPNKGGW ADYSFGYFYL EAGTAKIEIG
151 SSGSWGFILY DTVTFDNAKM PALKADPTPC DVNATSETKN LKQYLTSVYG
201 NHVISGQQEI YGGGNDGNAE LEFDYIYNKT GKYPAIRGFD FMNYNPLYGW
251 EDGTTNRMIK WVKERGGIAT ASWHINVPSD FTNYKLGDKL DWKSCTYKPT
301 ASFKTANCLD KTSKEYAYLM LAVDDLAKQL LILQDAKVPV LLRPFHEAEG
351 NNNTNGSGAW FWWGSGGADV YKQLWKLLYS TLTEKYGIHN VIWEVNLYSY
401 ANSAQWYPGD DCVDIVGYDK YEGSPYTWKT SAATSVFLTL VNHTNDTKMV
451 ALTENDVIPD IQNIVNQGAW WLYFCPWYGD FITSSTYNDP VLLKTTYNSP
501 YVVTLDELPK DLYASSSKVQ APTLSVKEGT YSVTQTVALS SATEGATIYY
551 TLDGTEPTVA STVYDKPIEV AKTTTIKAIA IKAGLTNSDV VTATYTISVS
601 MLGDVNNDGK VNAIDYAMVK SYLLGNPVTI NLKNADLNSD GKINAIDLAS
651 IKKILLS
```

도면4



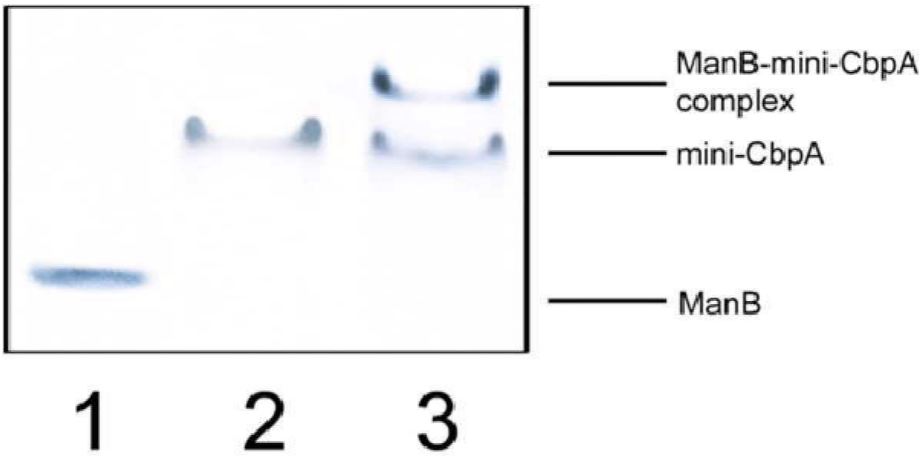
도면5



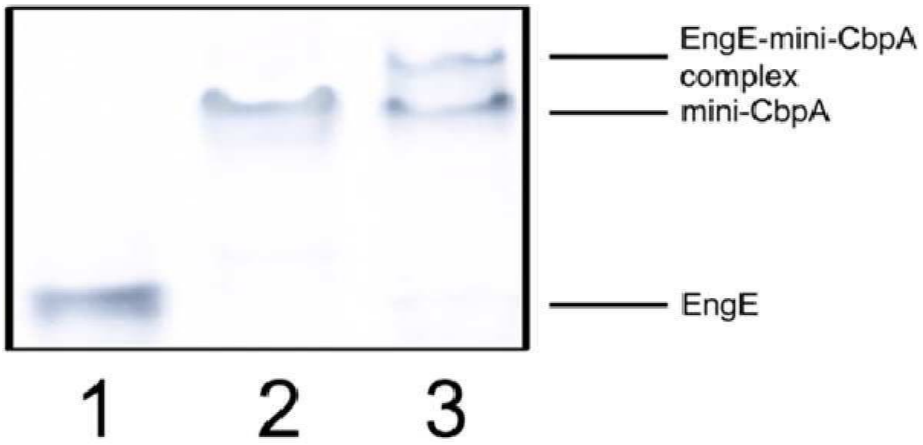
도면6

기질	비활성 (U/mg)
글루코만난	18.5 ± 0.05
로커스트 콩 검	12.2 ± 0.06
구아 검	2.2 ± 0.04
카르복시메틸셀루로스	ND
버치우드 자일란	ND

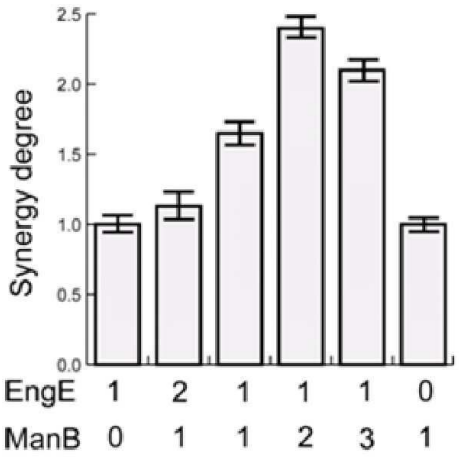
도면7a



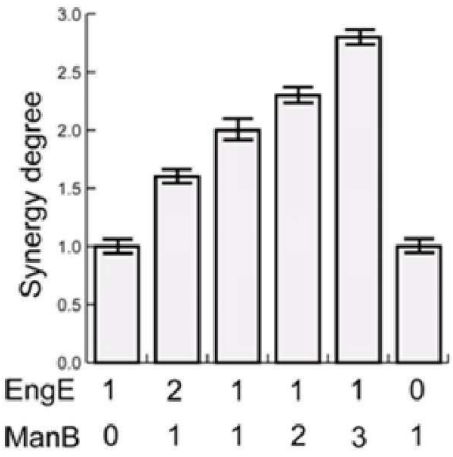
도면7b



도면8a



도면8b



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Identification of Mannanase from Clostridium cellulovorans and application of cellulosome complex for hydrolysis of galactomannan

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 657

<212> PRT

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 1

Met Lys Lys Ile Phe Gly Arg Ala Met Ser Leu Leu Ala Thr Phe Ala
1 5 10 15

Leu Val Cys Ser Phe Phe Val Ala Met Pro Thr Thr Pro Val Lys Ala
20 25 30

Glu Thr Ser Leu Pro Val Lys Val Glu Ala Glu Ala Cys Thr Leu Ser
35 40 45

Asn Gly Ala Ala Val Thr Thr Asn Val Tyr Gly Thr Asn Tyr Pro Gly
50 55 60

Tyr Ser Gly Asn Gly Phe Val Trp Ala Ser Asn Ser Gly Thr Ile Thr
65 70 75 80

Phe Asn Val Thr Val Pro Lys Asn Gly Met Tyr Glu Ile Ser Ser Arg
85 90 95

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

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

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

305 310 315 320
Leu Ala Val Asp Asp Leu Ala Lys Gln Leu Leu Ile Leu Gln Asp Ala
325 330 335
Lys Val Pro Val Leu Leu Arg Pro Phe His Glu Ala Glu Gly Asn Asn

340 345 350

Asn Thr Asn Gly Ser Gly Ala Trp Phe Trp Trp Gly Ser Gly Gly Ala

355 360 365

Asp Val Tyr Lys Gln Leu Trp Lys Leu Leu Tyr Ser Thr Leu Thr Glu

370 375 380

Lys Tyr Gly Ile His Asn Val Ile Trp Glu Val Asn Leu Tyr Ser Tyr

385 390 395 400

Ala Asn Ser Ala Gln Trp Tyr Pro Gly Asp Asp Cys Val Asp Ile Val

405 410 415

Gly Tyr Asp Lys Tyr Glu Gly Ser Pro Tyr Thr Trp Lys Thr Ser Ala

420 425 430

Ala Thr Ser Val Phe Leu Thr Leu Val Asn His Thr Asn Asp Thr Lys

435 440 445

Met Val Ala Leu Thr Glu Asn Asp Val Ile Pro Asp Ile Gln Asn Ile

450 455 460

Val Asn Gln Gly Ala Trp Trp Leu Tyr Phe Cys Pro Trp Tyr Gly Asp

465 470 475 480

Phe Ile Thr Ser Ser Thr Tyr Asn Asp Pro Val Leu Leu Lys Thr Thr

485 490 495

Tyr Asn Ser Pro Tyr Val Val Thr Leu Asp Glu Leu Pro Lys Asp Leu

500 505 510

Tyr Ala Ser Ser Ser Lys Val Gln Ala Pro Thr Leu Ser Val Lys Glu

515 520 525

Gly Thr Tyr Ser Val Thr Gln Thr Val Ala Leu Ser Ser Ala Thr Glu

530 535 540

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

545 550 555 560

Ser Thr Val Tyr Asp Lys Pro Ile Glu Val Ala Lys Thr Thr Thr Ile

565 570 575

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

580 585 590

Ala Thr Tyr Thr Ile Ser Val Ser Met Leu Gly Asp Val Asn Asn Asp

595 600 605

Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Leu

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Ser

<210> 2

<211> 1971

<212> DNA

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 2

atgaaaaaaa ttttcggcag agcgatgtct ctgttggcaa cgtttgcatt ggtatgttcg 60

tttttcgtgg caatgccaac aacgccagtt aaagctgaaa cttctttgcc tgtaaaggtc 120

gaagcggaag cttgtactct tagtaacggt gctgctgtta ctacaaatgt ctacggaact 180

aactatccag gttattctgg caatggattt gtgtgggcat ctaattcagg gacaataaca 240

tttaatgtta cagttcctaa aaatggtatg tatgagattt catcaagatg ctggatgtat 300

cttggaaatg tcggggacac aagacttcaa gtgcttagca tcaatggtgc agcacaaggc 360

aatttctacg ttccaaacaa aggtggctgg gctgattaca gctttggata cttctatctt 420

gaagcaggta cagctaaaat tgagattgga tcatctggaa gctggggctt catactgtat 480

gatacagtaa catttgacaa tgctaaaatg ccagctctta aggctgaccc aactccatgt 540

gatgtaaatg caacttcaga aacaaagaac ttaaaacaat atcttactag cgtttatggc 600

aatcatgtta tttctggcca acaagaaatt tatggtggcg gaaatgacgg taatgcagaa 660

cttgaatttg attacattta taataagaca ggcaaatacc ctgcaattag aggctttgat 720

tttatgaact acaatcctct atacggatgg gaagacggta caacaaaccg tatgattaag 780

tgggttaaag aacgtggtgg tattgcaact gcatcttggc atatcaacgt accatctgat 840

tttacaaact ataagttagg tgataaatta gattggaaaa gttgtacata caagcctact 900

gctagtttta aaacagctaa ctgtcttgat aaaacatcaa aagaatacgc ttatttaatg 960

cttgcagttg atgaccttgc aaagcaatta ctaattcttc aagatgcaaa agttcctgta 1020

cttttacgtc ctttccatga agcagaaggt aataacaata caaatggttc aggagcatgg 1080

ttctggtggg gttctggcgg tgctgatgtg tacaagcaac tttggaaact tctttattca 1140

accctaacag aaaagtacgg tatccataat gtaatatggg aagtaaatct ttattcttat 1200

gcaaattcag ctcaatggta tccaggagat gattgtgtag atatcgttgg atatgataag 1260

tatgaaggct caccttacac ttggaaaaca agtgctgcaa catcagtatt tttgacactt 1320

gtaaatcata caaatgatac aaagatggtt gcattaactg aaaatgatgt tatacctgac 1380

attcagaata tagttaatca aggagcttgg tggttgtatt tctgtccatg gtatggtgat 1440

ttcattacta gttcaactta taatgatcct gtacttctta aaactaccta caatagccca 1500

tatgtagtta ctttagatga attaccaaaa gatctttatg catcttcttc taaagttcaa 1560

gcaccaactt taagtgttaa agaaggtaca tatagtgtta ctcaaacagt agctcttagc 1620

agtgcaacag aaggagcaac tatttattat actcttgatg gaactgagcc tactgttgca 1680

tctactgtat atgataagcc aatagaagta gctaaaacta caactatcaa agctattgca 1740

attaaagctg ggctgacaaa ttcagacgta gttactgcta cttatacaat ttcagtttct 1800

atgcttggtg atgttaacaa cgatggcaaa gttaatgcaa tagattatgc aatggtaaaa 1860

agttatttac ttggaaatcc agtgactata aatctaaaaa atgcagactt aaatagtgat 1920

ggtaagataa atgctattga cctagcatct ataaagaaga tattacttag c 1971

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggatccgatg aaaaaaattt tcggcagagc gatg 34

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gaattcgagc taagtaatat cttct 25