



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월13일

(11) 등록번호 10-1480855

(24) 등록일자 2015년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/42 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0103546

(22) 출원일자 2012년09월18일

심사청구일자 2012년09월18일

(65) 공개번호 10-2014-0036877

(43) 공개일자 2014년03월26일

(56) 선행기술조사문헌

GenBank Accession No. YP_005074431:

endo-1,4-beta-glucanase [Paenibacillus terrae HPL-003] (2012.06.15.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

황인택

충남 계룡시 업사면 연화동길 17,

박노중

대전 유성구 엑스포로 501, 107동 204호 (전민동, 청구나래아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 4 항

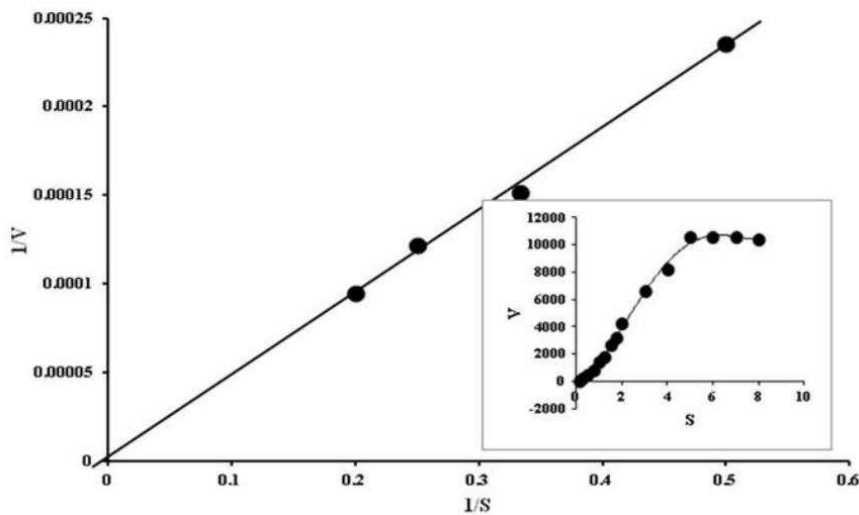
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 신규한 엔도글루카나아제 KR ICT PC-001

(57) 요약

본 발명은 서열목록 제3서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)를 제공한다. 본 발명의 엔도글루카나아제를 이용하면, 셀룰로오스 분해를 위한 기존의 화학적 방법을 대체할 수 있어 폐기물 및 고가의 정제비용을 절감할 수 있다. 또한, 우수한 셀룰로오스 분해활성을 나타내므로 사료 산업, 제지 및 세제 산업에서는 물론 섬유질계 바이오매스의 당화공정에 활용되어 석유 대체원료, 특수기능물질, 바이오 폴리머 등의 원료를 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

임희경

대전 유성구 어은로 57, 130동 202호 (어은동, 한빛아파트)

송하영

대전 유성구 궁동로72번길 9, 207호 (궁동)

김달례

부산 부산진구 당감로 80, 1동 1203호 (부암동, 화승삼성아파트)

이기인

대전 유성구 어은로 57, 113동 305호 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035574

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 바이오매스 화학/생물 전환공정을 통한 플랫폼 바이오화학소재의 생산기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.04.01 ~ 2013.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SK-1207

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 협동연구사업

연구과제명 초본계 바이오매스 전처리 및 바이오 플랫폼 생산기술 개발(3차)

기여율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

서열목록 제1서열로 이루어진 16S rRNA 서열을 갖는 페니바실러스 속 (*Paenibacillus sp.*) HPL-3 균주 (KCTC11987BP)를 글루코오스(glucose)-포함 폴리사카라이드에 접촉시키는 단계를 포함하는 폴리사카라이드의 분해 방법.

청구항 6

서열목록 제1서열로 이루어진 16S rRNA 서열을 갖는 페니바실러스 속 (*Paenibacillus sp.*) HPL-3 균주 (KCTC11987BP)를 포함하는 식품 내 셀룰로오스(cellulose) 가공용 조성물.

청구항 7

서열목록 제1서열로 이루어진 16S rRNA 서열을 갖는 페니바실러스 속 (*Paenibacillus sp.*) HPL-3 균주 (KCTC11987BP)를 포함하는 사료첨가제용 조성물.

청구항 8

서열목록 제1서열로 이루어진 16S rRNA 서열을 갖는 페니바실러스 속 (*Paenibacillus sp.*) HPL-3 균주 (KCTC11987BP)를 포함하는 제지공정용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 셀룰라아제(엔도글루카나아제) 활성을 갖는 신규 효소 KRICT PC-001에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 자연계에 존재하는 셀룰로오스는 식물 세포벽의 주요 구성 물질로서 바이오매스 건조 중량의 38-50%를 차지하는 지구상에 존재하는 매우 풍부한 탄소원이다. 셀룰로오스의 가수분해는 현재까지 화학적 방법으로 주로 이루어지고 있는데 바이오매스에 황산을 첨가하고 130℃에서 스팀으로 가압하여 분해하기 때문에 많은 양의 에너지를 소모할 뿐만 아니라, 산 및 고온에 견딜 수 있는 고가의 생산장비가 필요하다. 또한, 이때 발생하는 과반응 산물과 폐기물은 환경오염을 유발하거나 분리, 정제비용 상승 등으로 인하여 생산단가가 높아지게 된다.
- [0003] 이에 반하여 셀룰라아제의 3가지 타입인 엔도글루카나아제와 엑소글루카나아제, 베타글루코시다아제는 셀룰로오스를 분해하는 효소시스템으로써 엔도글루카나아제는 내부 β-1,4-글리코시드 결합을 무작위 절단하고 엑소글루카나아제는 비-환원당 말단에서(셀로비오하이드롤라아제는 환원말단에서) 글루코오스의 이당체인 셀로비오스 단위로 절단해 나간다. 생성된 셀로비오스에 세포 내 효소인 베타글루코시다아제가 작용하여 최종적으로 글루코오스를 생성하게 된다. 이와 같은 생물학적 방법에 의한 셀룰로오스의 분해방법은 화학적 분해방법과 비교할 때 에너지의 소모가 적고 발생하는 폐기물 역시 화학적 방법과 비교할 때 소량일 뿐만 아니라 그 처리가 용이하기 때문에 경제적으로도 매우 유리하다. 그러나 기존에 알려진 효소들의 특성이 산업적으로 이용하기에 적합한 내열성, 내알칼리성, 내산성 등을 충분히 가지지 못하고 있고, 우리나라의 경우 이들 효소를 전적으로 수입에 의존하고 있는 형편이다. 따라서 산업적으로 바이오매스 원료를 이용하여 바이오연료와 화학원료를 생산하는 바이오리파이너리 공정에 적용하기 위해서는 이러한 문제점들의 해결이 필요하다.
- [0004] 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 기본적으로 내알칼리성 및 내열성을 갖는 국산효소의 개발이 우선적으로 선행되어야 하며, 산업적으로 경제적인 셀룰라아제 생산을 위해서는 대량생산 시스템을 갖추어야 한다.
- [0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 38-50%를 차지하는 셀룰로오스(cellulose)를 산업적으로 이용하기 위해 셀룰로오스의 분해방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기존의 많은 에너지를 소모하는 화학적 방법을 대체할 수 있는 내열성 및 내산성을 갖는 신규한 엔도글루카나아제(endoglucanase)를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 엔도글루카나아제를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 형질전환된 세포를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 셀룰로오스의 분해 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 식품 내 셀룰로오스 가공용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 사료 첨가제용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 제지공정용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제3서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제(endoglucanase)를 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 자연계에 존재하는 바이오매스 건조 중량의 38-50%를 차지하는 셀룰로오스(cellulose)를 산업적으로 이용하기 위해 셀룰로오스의 분해방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 기존의 많은 에너지를 소모하는 화학적 방법을 대체할 수 있는 내열성 및 내산성을 갖는 신규한 엔도글루카나아제(endoglucanase)를 개발하였다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 “엔도글루카나아제”는 셀룰라아제(cellulase)와 혼용하여 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 엔도글루카나아제는 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 아미노산 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제는 35-53℃에서 최대 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 최적 온도는 40-53℃이며, 보다 더 바람직하게는 46-51℃이다.
- [0021] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 엔도글루카나아제는 40℃ 이상의 온도에서도 활성을 나타냈으며, 50℃ 온도 조건에서 60분간 노출되었을 경우에도 효소의 활성을 유지하였다. 본 발명의 엔도글루카나아제는 고온에서 효소 활성이 안정되게 유지되는 열 안정성 및 내열성을 갖는다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제는 pH 3.5-8.0에서 최대 효소활성을 나타내고, 보다 바람직하게는 최적 pH는 4.0-7.0이고, 보다 더 바람직하게는 pH 4.5-6.0, 보다 더욱 더 바람직하게는 pH 4.5-5.5이다.
- [0023] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 엔도글루카나아제는 pH 4.0-6.0에서 높은 활성을 나타낸다. 산성의 pH 조건에서 높은 효소 활성을 갖는 본 발명의 엔도글루카나아제는 내산성을 갖는다.
- [0024] 본 발명의 엔도글루카나아제는 기존에 알려진 효소들과 비교하여 내열성 및 내산성이 우수한 효소로서 산업적으로 이용 가능성이 높다.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제3서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 엔도글루카나아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0027] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.
- [0028] 또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 엔도글루카나아제 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 엔도글루카나아제의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 엔도글루카나아제와 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.
- [0029] 본 발명의 엔도글루카나아제에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 엔도글루카나아제와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0030] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아

르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [0031] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0032] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0033] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0034] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0035] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0036] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 엔도글루카나아제 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 2에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 예컨대 최소 98%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0037] 바람직하게는, 핵산 분자는 서열목록 제2서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 분자이다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0040] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, T7 프로모터, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터 및 *trp* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0042] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pIVEX, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0045] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0046] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0047] 숙주세포 내로 주입된 벡터는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 엔도글루카나아제를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용한 숙주세포는 *E. coli*(BL21)이다.
- [0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-3 균주(KCTC11987BP)를 글루코오스(glucose)-포함 폴리사카라이드에 접착시키는 단계를 포함하는 폴리사카라이드의 분해 방법을 제공한다.
- [0050] 본 명세서에서, 상기 ‘글루코오스(glucose)-포함 폴리사카라이드’은 당업계에 공지된 다양한 글루코오스-포함 폴리사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 글루코오스-포함 폴리사카라이드는 셀룰로오스(cellulose), 리케닌(lichenin) 및 글루칸(glucan) 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 바람직하게는, 상기 단계는 금속이온 예컨대, Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺², Cu⁺², Zn⁺² 또는 Fe⁺³을 추가적으로 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 Fe⁺³을 포함할 수 있다.

- [0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-3 균주(KCTC11987BP)를 포함하는 식품 내 셀룰로오스 가공용 조성물을 포함한다.
- [0053] 바람직하게는, 식품 재료의 연화 및 정제 효율개선, 점도감소 추출 및 여과 효율증대를 통한 품질향상에 활용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-3 균주(KCTC11987BP)를 포함하는 사료 첨가제용 조성물을 포함한다.
- [0055] 바람직하게는, 가축의 사료 비전분 탄수화물의 감소, 장내 점도개선, 단백질 및 전분의 소화흡수율 증대를 위해 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제, 형질전환된 세포 또는 HPL-3 균주(KCTC11987BP)를 포함하는 제지공정용 조성물을 포함한다.
- [0057] 바람직하게는, 제지공정의 생물학적 백화공정, 공정의 단축, 탈묵효과, 전분과 글루텐의 분리 및 화학연료생산에 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 따르면, 본 발명의 엔도글루카나아제는 셀룰로오스-포함 직물(fabric) 및 섬유(fiber)의 처리에 이용되는 세제(detergent) 조성물의 첨가제로도 이용될 수 있다. 본 발명에서 직물 및 섬유의 처리는 엔도글루카나아제를 포함하는 조성물을 이용하여 직물을 가공 또는 세척하는 것을 의미하며, 추가적으로 셀룰로오스 직물 또는 섬유로부터 '미성숙(immature)' 또는 '기능상실(dead)' 면직물(cotton)을 제거하는 것도 포함한다. 직물의 엔도글루카나아제 처리에 대한 일반적인 처리 방법은 EP Publication No. 220 016 및 GB Application Nos. 1,368,599 및 2,095,275에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0060] (a) 본 발명은 신규한 엔도글루카나아제를 제공한다.
- [0061] (b) 본 발명의 엔도글루카나아제는 셀룰로오스 분해를 위한 기존의 화학적 방법을 대체함으로써 폐기물 및 고가의 정제비용을 절감할 수 있다.
- [0062] (c) 본 발명은 우수한 셀룰로오스 분해활성을 나타내므로 사료 산업, 제지 및 세제 산업에서는 물론 섬유질계 바이오매스의 당화공정에 활용되어 석유 대체원료, 특수기능물질, 바이오 폴리머 등의 원료를 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 *페니바실러스* 속 HPL-3 균주의 엔도글루카나아제 활성에 대한 검정 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 2은 *페니바실러스* 속 HPL-3 균주의 전자현미경 사진이다.
- 도 3는 *페니바실러스* 속 HPL-3 균주의 전장 DNA 서열 분석 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 4는 형질전환체로부터 셀룰라아제 활성클론 선발결과를 나타낸 그림이다.
- 도 5는 ORF2 과발현 형질전환체로부터 엔도글루카나아제를 분리 정제하고 SDS-PAGE를 수행한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 6은 엔도글루카나아제 활성의 최적 pH를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 엔도글루카나아제 활성의 온도안정성 검정결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 엔도글루카나아제 활성에 영향을 미치는 중금속이온 검정그래프이다.

도 10은 엔도글루카나아제 분리정제 후 효소특성(kinetics)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 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.

[0065] **실시예**

[0066] **실시예 1: 균주 분리 및 선별**

[0067] **1-1. 균주 분리**

[0068] 본 발명의 균주는 경남 거제시 남부면 다대리에 위치한 가라산 중턱에서 채취한 것으로 버섯재배 후 폐목재잔여물이 포함된 토양으로부터 분리하였다. 상기 토양의 표층으로부터 2-5 cm 층에서 토양시료를 채취, 풍건 후 2 mm 체를 통과시켜 토양을 정선하였다. 정선된 토양 30 g을 270 ml의 멸균된 생리식염수(NaCl 8.0 g/l)에 넣어서 진탕배양기(37℃, 200 rpm)로 약 20분간 진탕 후 상온에 30분 정도 방치하여 굵은 토양입자 및 불순물 등을 바닥으로 침전시킨 후 상등액을 멸균된 용기로 옮겨 1차 희석액으로 하였다. 이것을 잘 교반한 후 10 ml을 취하여 90 ml의 생리식염수에 넣어 2차 희석액 100 ml을 제조하고, 2차 희석액을 충분히 교반하면서 위와 같은 방법으로 10 ml을 취하여 90 ml의 생리식염수에 넣어 3차 희석액 100 ml을 제조하였다. 이후 동일한 방법으로 6차 희석액까지 제조하였다. 균주 분리용 TSA(Tryptic Soy Agar, Difco Co.) 배지에 3, 4, 5 및 6차 희석액을 0.25 ml씩 3회 반복으로 분주한 후, 균일하게 도말하여 37℃ 평상 배양기에서 2일간 배양 후 형성된 미생물의 콜로니를 선별하였다. 이때 콜로니의 모양, 크기, 색상 등 여러 가지 요인을 고려하여 분리하며, 분리된 콜로니는 다시 TSA 배지에서 계대 배양하여 순수한 균주를 분리하였고 이것을 모 균주로 사용하기 위하여 -70℃에 보관하였다.

[0069] **1-2. 균주 선별**

[0070] 순수하게 분리된 균주들 중에서 엔도글루카나아제 활성을 가지는 활성 균주 선별은 TSA 배지에 셀룰로오스(Avicel, CMC)가 0.5-1.0% 함유된 소프트 아가 더블 배지를 만들고 균주를 접종하여 하룻밤 배양한 후 다음날 콩고레드 염색법(Theater RM, P.J. Wood. *Appl Environ Microbiol* 43, 777-780(1982); Beguin P. *Analytical Biochemistry*, 131(2):333-336(1983))을 통해 배양된 콜로니 주변에 투명환(Halo)을 형성하는 균주 및 활성클론을 선별하였다. 선별된 균주의 셀룰로오스 분해능을 다시 한 번 측정하여 재현성을 확인하였고, 그 중 셀룰로오스 분해 능력이 가장 우수한 균주를 선별하여 엔도글루카나아제를 생산하는 미생물로 최종 선별하였다.

[0072] **실시예 2: 균주 동정**

[0073] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 가장 높은 활성을 지닌 엔도글루카나아제 생산 균주를 30℃에서 배양한 후 그람 염색(Gram Staining) 및 포자 염색(Spore Staining)을 실시한 결과, 포자를 생성하는 그람양성 간균으로 확인되었다. 전자현미경으로 그 형태를 관찰한 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이 1.1 μm의 세포크기와 2.5 μm 내지 4 μm의 세포길이를 갖는 막대형(rod)이었으며 편모를 가지지 않는 운동성이 없는 간균으로 나타났다. 또한, 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 서열목록 제1서열로 기재되는 1,393 bp의 rDNA를 얻은 후 유전자는 핵 정보자료(GenBank database)를 검색한 결과, 판토애 아글로메란스 ZFJ-15(*Pantoea agglomerans* ZFJ-15; GenBank 등록번호 EU931554) 균주와 96.4%의 상동성이 있고 페니바실러스 속 WPCB158(*Paenibacillus* sp. WPCB158; GenBank 등록번호 FJ006910)과 96.3%가 일치함을 확인하였으나 그 이상 일치하는 상동성은 검색되지 않았기 때문에, 본 균주를 페니바실러스 속 (*Paenibacillus* sp.) HPL-3 균주로 명명하였고, 한국생명공학연구원에 2011년 7월 20일자로 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC11987BP이다.

[0075] **실시예 3: 신규 엔도글루카나아제 분리**

[0076] **실시예 3: 신규 엔도글루카나아제 분리**

[0077] 3-1. 페니바실러스 균주의 유전체(genome)정보 분석

[0078] 본 발명자들은 상기 실시예 1과 실시예 2에서 분리 동정한 페니바실러스 속 HPL-3 균주로부터 엔도글루카나아제 활성을 가지는 효소 단백질을 암호화하는 유전자를 분리하기 위하여 균주의 전장 유전체 정보를 분석하였다(도 3). 이에 암호화되어있는 ORF(open reading frame)을 대상으로 NCBI의 블라스트 프로그램을 통해 기존의 보고된 셀룰라아제 유전자와 비교적 유사성이 있어 효소기능이 예상되는 유전자들 8개를 분리하여(표 1) pGEM-T 이지 플라스미드 벡터에 삽입 후 *E.coli* JM109에 형질전환 하였다. 상기 실험을 통해 셀룰라아제 활성을 보이는 4개의 클론을 선별하였고(도 4), 본 발명자들은 상기 ORF중 가장 높은 활성을 보이는 ORF2(1722 bp, 573 A/a)를 pGEX(Amersham) 과발현 벡터에 삽입 후 *E.coli* BL21에 형질전환 시켰다.

[0079]

표 1

No.	ORF ID	길이 (A/a)	Blat P	상동성(%)
1	rPae00990	237	베타-글루카나아제 전구체(엔도-베타-1,3-1,4 글루카나아제)	99
2	rPae01983	573	엔도글루카나아제 B 전구체(엔도-1,4-베타-글루카나아제 B)	92
3	rPae03496	508	엔도-1,6-베타-D-글루카나아제 전구체(베타-1,6-글루카나아제 Neg1)	84
4	rPae03679	701	엑소글루카나아제 3 전구체(엑소 셀로비오가수분해효소 3)	95
5	rPae06293	897	엑소글루카나아제 II 전구체(엑소 셀로비오가수분해효소 II)	94
6	rPae07241	237	엔도글루카나아제	92
7	rPae07549	397	엔도글루카나아제(엔도-1,4-베타-글루카나아제)	93
8	rPae07643	524	엔도글루카나아제 V 전구체(엔도-1,4-베타-글루카나아제 V)	88

[0081] 3-2. 엔도글루카나아제 활성시험

[0082] 분리된 균주, 활성클론, 형질전환체 및 분리 정제된 효소 등의 엔도글루카나아제 활성(셀룰로오스 분해능력) 측정은 다음과 같은 2가지 방법 중 하나 또는 모두를 사용하였다. 첫 번째 방법은 고체배양 측정방법으로 TSA 배지에 Avicel(Sigma) 또는 CMC(carboxymethyl cellulose)가 1.0% 함유된 소프트 아가 더블 배지를 만들고 균주를 접종하여 18시간 배양한 후 다음날 콩고레드 염색법을 통해 배양된 콜로니 주변에 투명환(plaque)을 형성하는 균주 및 활성클론을 선별하였다. 두 번째 방법인 액체배양 효소활성은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 정량 방법(Miller G.L. *Anal Chem* 31,426-428(1959))을 사용하였고, 구체적으로는 50 μ l의 효소용액에 50 μ l의 기질용액(2% Avicel 또는 CMC)을 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 200 μ l의 DNS 용액을 첨가한 다음 100 $^{\circ}$ C에 5분간 처리한 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 효소의 1 유닛(unit)은 1분 동안에 1 μ mol의 환원당을 생산하는 효소활성으로 규정하였다.

[0083]

[0084] 3-3. 엔도글루카나아제 활성클론 선별 및 유전자 분석

[0085] 페니바실러스 속 HPL-3 균주의 전체 유전체에 암호화된 ORF(open reading frame)를 대상으로 NCBI의 블라스트 프로그램을 통하여 기존의 보고된 셀룰라아제(CMAase)와 비교적 상동성이 있는 8개의 ORF를 1차 클로닝 대상으로 정하고 실험을 수행하였다. 각각의 ORF 염기 서열에 따라 양말단에 *NdeI*(또는 *NcoI*)과 *XhoI* 제한효소 위치를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 제작하여 정방향 프라이머와 역방향 프라이머로 사용하였다. PCR 증폭 조건은 PCR Premix(GenetBio)를 각 ORF에 해당하는 프라이머 쌍 10 pmol, 주형으로 *P. terrae* HPL-003의 지노믹 DNA 100 ng을 혼합한 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 5분간의 변성(Denaturation)을 수행한 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초의 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 30초의 결합(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1-2분의 연장(extension)을 30회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장으로 마무리하고 4 $^{\circ}$ C에서 유지한 뒤 반응을 종결하였다. PCR을 통해 증폭된 산물을 GENCLEAN II Kit(Q-Biogene)을 사용하여 정제하였고 제한효소 NEB사의 *NdeI*(또는 *NcoI*)과 *XhoI*로 잘려진 T-이지 벡터(TaKaRa)에 T4 리가아제(RBC)를 사용하여 재조합 DNA를 만들었다. 이 재조합된 플라스미드를 *E. coli* JM109(RBC)에 형질전환 시켜 유전자 형질전환 대장균을 제작하였다. 이 형질전환체들을 암피실린이 첨가된 LB액체 배지에서 배양 후 HiYieldTM Plasmid Mini Kit(RBC)을 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소 *NdeI*(또는 *NcoI*)과 *XhoI*으로 절단하고, 목적하는 DNA절편이 삽입되었음을 확인하였다. 상기 8개(ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5,

ORF6, ORF7, ORF8 및 ORF9)의 형질전환체를 실시예 3-2에서와 같이 고상, 액상의 조건에서 엔도글루카나아제 활성을 시험한 결과 ORF2가 양쪽 모두에서 가장 강한 엔도글루카나아제 활성을 보임을 확인하였다.

[0086]

ORF2의 DNA 염기서열은 서열목록 제2서열과 같고 KRICT PC-001이라 재 명명하였다. KRICT PC-001은 1,722 bp의 염기로 이루어진 DNA로써 573개의 아미노산 잔기로 구성되어 있음을 확인하였고, 번역된 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 보고된 아미노산 서열과의 유사성(Blast P)을 BLAST 프로그램으로 Genbank에 등록된 자료들과 비교 분석한 결과 *Paenibacillus polymyxa* E681의 엔도-1,4-베타-글루카나아제와 92%, *Paenibacillus polymyxa*의 Ce15B와 90%, *Paenibacillus polymyxa* SC2의 엔도글루카나아제 B와 88%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다. 이로써 KRICT PC-001은 엔도글루카나아제 효소를 암호화 하고 있는 신규 셀룰라아제 유전자로 판명되었다.

[0087]

[0088]

3-4. 엔도글루카나아제 과발현체 제작(pGEX-no2)

[0089]

상기 신규 엔도글루카나아제를 과발현하는 형질전환체를 제작하기 위하여 액체 반응조건과 고체 반응조건 모두에서 셀룰라아제(CMCase)의 효소활성을 보인 ORF2 유전자의 염기서열을 바탕으로 시작코돈과 종결코돈을 포함하는 1,722bp 서열의 양 말단에 번역틀을 맞추어 *Bam* HI과 *Xho*I 제한효소 인식부위를 도입하여 한 쌍의 올리고뉴클레오티드(5' -GGATCCCATGTTAAAACGAAGACC-3' , 5' -CTCGAGTTAGGAT GCTGTCCCGTC-3')를 제작하였다. 이들 올리고뉴클레오티드를 양방향 프라이머로 사용하여 1/100로 희석한 ORF2-T 이지 벡터 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응액과 반응조건은 앞에서와 동일하였다. 증폭된 산물을 정제하여 제한효소 *Bam* HI(NEB)과 *Xho* I(NEB)으로 절단한 뒤, 단백질 과발현벡터 pGEX(Amersham)의 *Bam* HI과 *Xho* I 인식부위 사이에 삽입시켜 재조합 플라스미드를 제작하였다. 제작된 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(RBC)에 형질전환 시킴으로서 셀룰라아제(CMCase) 발현 대장균을 제작하였다. 제작된 형질전환 대장균을 배양하여 플라스미드 DNA 추출 후 넣어준 제한효소 인식 부위를 이용하여 절단한 뒤 전기영동을 통해 벡터와 목적 DNA가 성공적으로 재조합 되었는지 확인하였고, 확인된 균체를 LB 액체 배지에서(100 암피실린/mL 첨가) 18시간 배양시킨(37°C, 250 rpm, A₆₀₀=1.0)후 새로운 LB 액체 배지에 다시 접종하여 A₆₀₀ 흡광도 값이 0.6일 때 1 mM의 IPTG를 처리하고 18°C, 250 rpm조건에서 18시간 더 배양 후 균체를 수확하였다. 수확된 균체를 현탁하여 초음파 분쇄 후 13,000 g에서 원심분리하여 상정액과 침전물로 분리하고 SDS-PAGE를 통하여 분자량이 약 62 kD임을 확인하였다(도 5).

[0090]

[0091]

3-5. 엔도글루카나아제 활성발현 조건 분석

[0092]

실시예 3-4에서 제작한 신규 엔도글루카나아제 과발현 형질전환 대장균으로부터 과발현 및 분리된 엔도글루카나아제의 pH, 온도 및 금속이온별 활성을 실시예 3-2의 방법으로 조사하였다. 반응용액의 pH 조절은 시트릭산(Citric acid) 완충용액으로 pH 4-5, 인산(Phosphate) 완충용액으로 pH 6-8, 트리스/염산(Tris/HCl) 완충용액으로 pH 7-9, 글라이신/수산화나트륨(Glycine/NaOH) 완충용액으로 pH 9-11로 수행하였다. 금속이온으로는 1 mM의 CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, NaCl, LiCl, KCl, NH₄Cl, EDTA, 2-머캅토에탄올, 디티오트레이톨, PMSF, SDS 등을 첨가하여 엔도글루카나아제 활성발현에 미치는 영향을 조사하였다. 온도별 반응은 30°C에서 10°C간격으로 70°C까지의 조건에서 수행하였고, 열 안정성 조사는 40°C와 50°C조건에서 10분에서 60분까지 배양시킨 뒤 효소를 채취해 활성을 측정하였다. 그 결과 신규 엔도글루카나아제는 pH 5.0 에서(도 6), 온도는 50°C에서 최대 활성을 나타냄을 확인하였다(도 7). 또한 중금속 원소들 Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺², Cu⁺², Zn⁺², NaCl, LiCl, KCl, NH₄Cl, EDTA, 2-머캅토에탄올, 디티오트레이톨, PMSF 등에 대부분 활성 저해 영향을 받아 70% 수준까지 활성이 저해되는 반면 Fe⁺³에 의해서는 영향을 받지 않거나 효소활성을 다소 증가시키는 것으로 나타났다(도 9). 열 안정성에 있어서는 40°C, 50°C 온도조건 모두에서 60분까지 노출되었다 하더라도 효소의 활성을 80% 가까이 유지하였다(도 8).

[0093]

[0094]

실시예 4: 신규 엔도글루카나아제의 대량 생산

[0095]

서열목록 제2서열로 기재되는 신규 엔도글루카나아제를 암호화하는 유전자를 포함하는 pGEX-GM3-no2 재조합 플라스미드를 대장균 BL21-Gold(DE)(Stratagene, 미국)에 형질전환 시킨 후 암피실린이 첨가(50 µg/ml)된 액체 배

지(LB 25 g/L)에 접종하여 O.D.₆₀₀ 값이 0.4-0.6이 될 때까지 37°C에서 150 rpm으로 교반 배양하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가한 후에 18°C에서 150 rpm으로 18시간 교반 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 회수한 침전물을 완충용액(Potassium phosphate buffer solution, PBS)으로 2회 세척하였다.

세척된 침전물을 다시 PBS에 재현탁 후 초음파 파쇄기(Bio rad)를 이용하여 균체를 파쇄한 후, 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 완충용액(Washing buffer solution; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7.0)으로 평형화된 글루타치온에스-트렌스퍼레이즈 컬럼(GST binding resin column, Novagen)에 부착 시킨 후, factor Xa protease(NEB)를 처리하고, 완충용액(Washing buffer solution; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7.0)을 이용하여 엔도글루카나아제를 순수분리하였다.

[0096] 정제 단계에서 회수한 각각의 시료로부터 엔도글루카나아제 효소 활성을 측정하였으며, 효소 활성 분획의 정제 여부를 SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질 함량은 브래드포드 방법(Bradford, Sigma Aldrich)을 이용하여 측정하였고, 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. 그 결과, 글루타치온 레진 컬럼크로마토그래피법으로 간편하게 다량의 엔도글루카나아제를 생산할 수 있었다. 또한 레진에 결합된 엔도글루카나아제 상태로도 엔도글루카나아제 활성이 변화되지 않는 특성을 보여주었기 때문에 효소 고정화 방법을 통한 고효율 전환공정에 적용할 수 있음을 알 수 있다.

[0097]

[0098] **실시예 5: 대량생산된 신규 엔도글루카나아제의 효소 특성**

[0099] 효소의 특성을 알아보기 위하여 정제된 엔도글루카나아제를 시험관에 넣고 셀룰로오스를 포함하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액을 넣었다. 반응 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시켜서 효소반응 속도(Lineweaver-Burk)를 알아보았다(도 10). 그 결과, 셀룰로오스 기질에 대한 친화도 K_m 값은 0.2이었다.

[0100] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

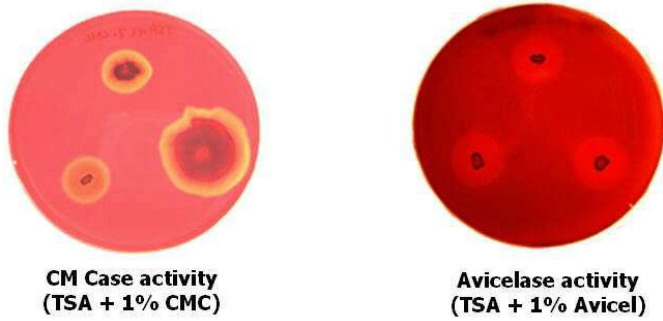
수탁번호

[0101]

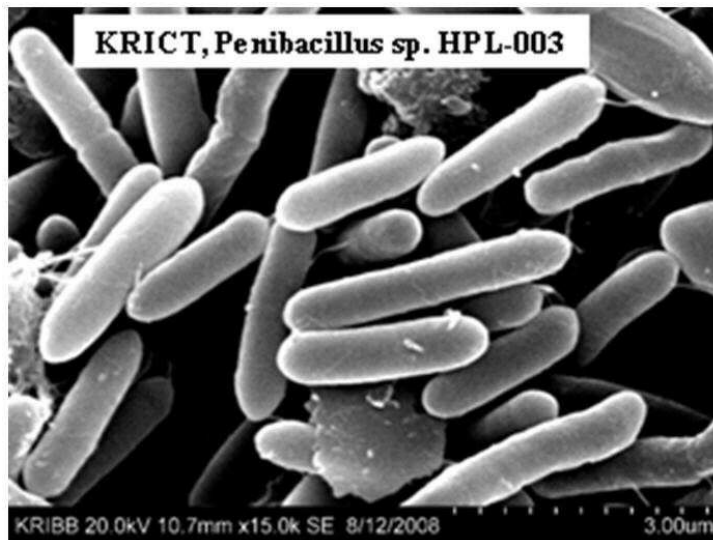
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 유전자은행
 수탁번호 : KCTC11987BP
 수탁일자 : 20110720

도면

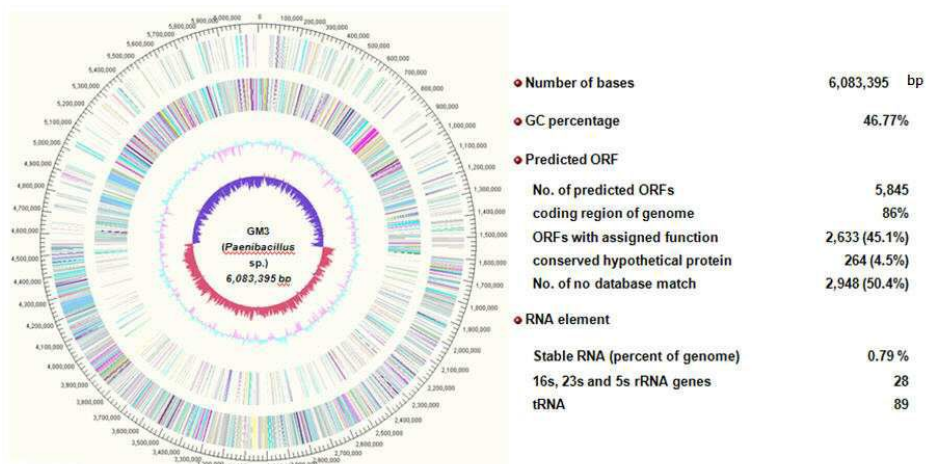
도면1



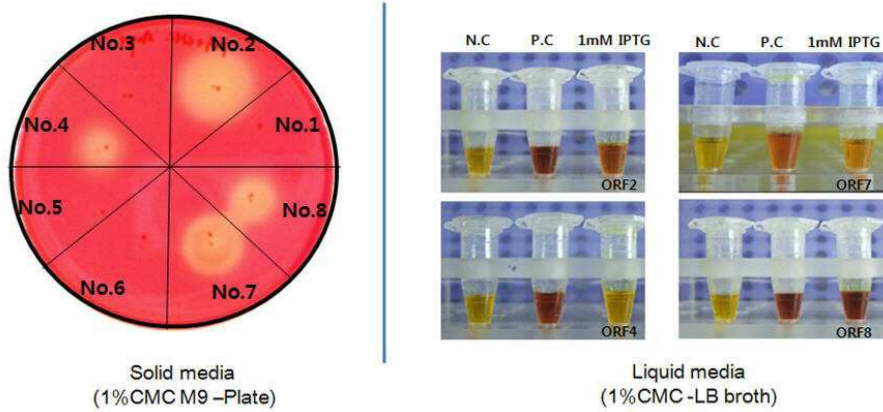
도면2



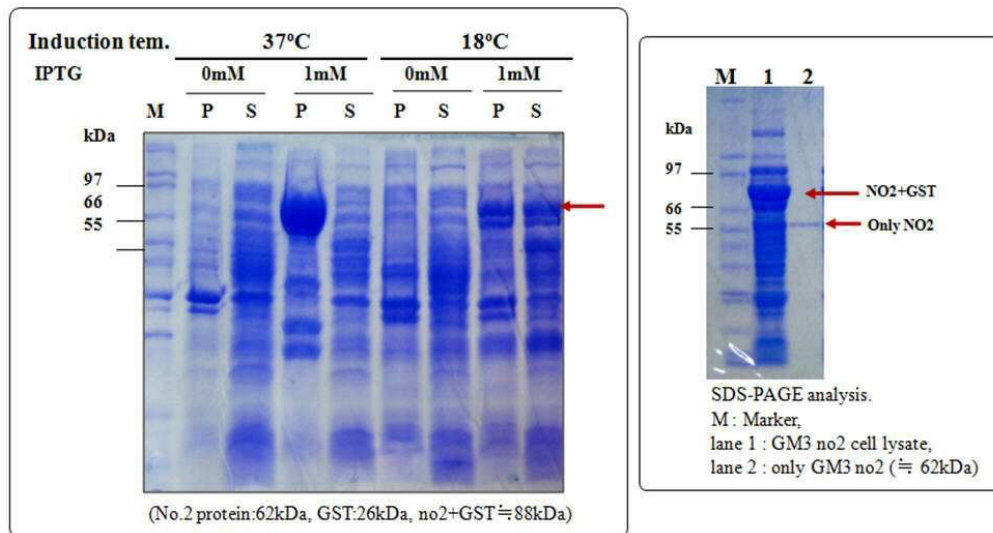
도면3



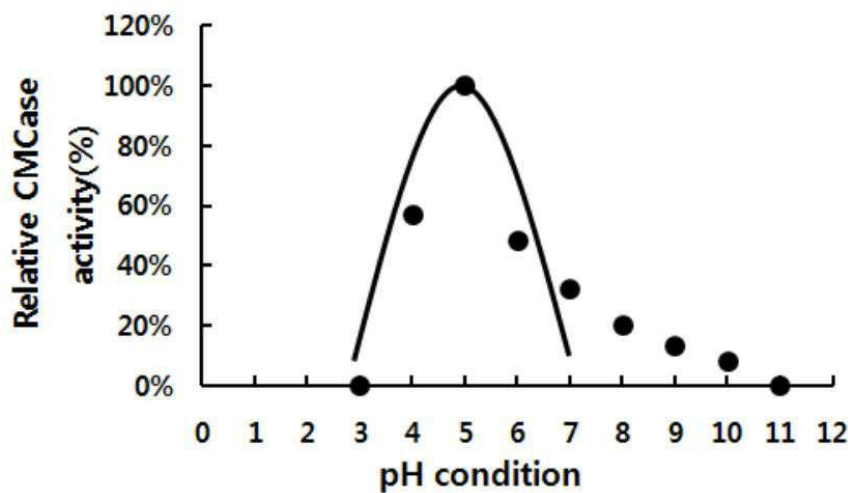
도면4



도면5



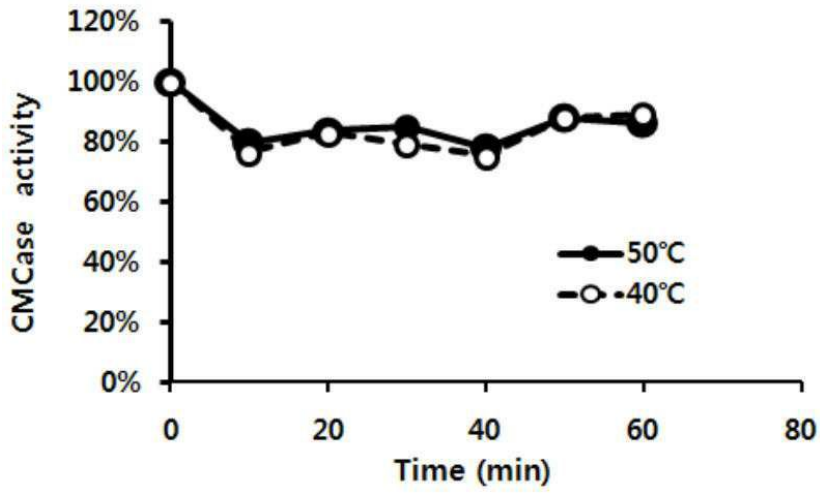
도면6



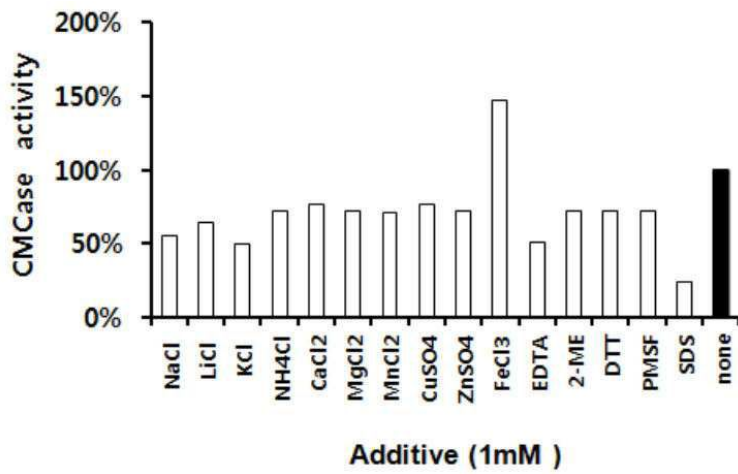
도면7

삭제

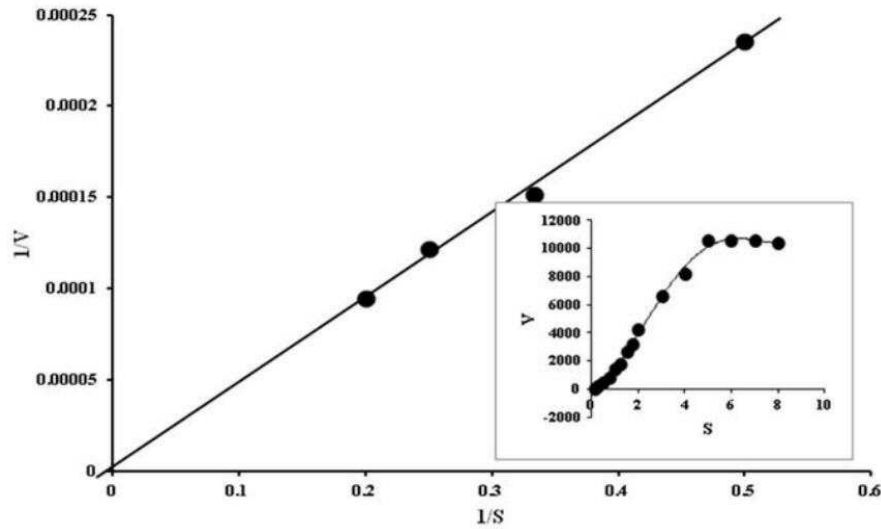
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY

<120> Novel endoglucanase

<130> PN120388

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1393

<212> DNA

<213> HPL-3 16S rDNA

<400> 1

```

ggctcaggac gaacgtggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcggg gttatgttaa      60
aagcttgctt ttaacataac ctagcggcgg acgggtgagt aacacgtagg caacctgcc      120
atcagactgg gataactacc ggaaacggta gctaataccg gatacatcct ttcctgcat      180
ggggagagga ggaaagacgg agcaatctgt cactgatgga tgggcctgcg gcgcattagc      240

tagttggtgg ggtgaagcc taccaaggcg acgatgcgta gccacctga gagggatgc      300
ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt agggaatctt      360
ccgcaatggg cgaaagcctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggt tttcgatcg      420
taaagctctg ttgccaggga agaacgtctt gtagagtaac tgctacaaga gtgacggtac      480
ctgagaagaa agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggggcaag      540
    
```


cgttgccgg aattattggg cgtaaagcgc ggcagggcgg ctctttaagt ctggtgttta 600
 atccccaggc tcaacttcgg gtcgcaactgg aaactgggga gcttgagtgc agaagaggag 660

 agtgaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatgt ggaggaacac cagtggcgaa 720
 ggcgactctc tgggctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 780
 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatgctag gtgttagggg tttcgatacc 840
 cttggtgccg aagttaacac attaagcatt ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa 900
 actcaaagga attgacgggg acccgcaaa gcagtggagt atgtggttta attcgaagca 960
 acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc cctctgatcg gtctagagat agatctttcc 1020
 ttcgggacag aggagacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg 1080

 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat gcttagttgc cagcaggcca agtggggcac 1140
 tctaagcaga ctgccggtga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc 1200
 cccttatgac ctgggctaca cacgtactac aatggccggt acaacgggaa gcgaaagagc 1260
 gatctggagc gaatcctaga aaagccggtc tcagttcgga ttgcaggctg caactcgctt 1320
 gcatgaagtc ggaattgcta gtaatcgcgg atcagcatgc ccgcggtgaa tacgttcccc 1380
 ggtcttgtac aca 1393
 <210> 2
 <211> 1722
 <212> DNA

 <213> KRICT PC-001
 <400> 2
 atgttaaacc gaagaccctt ttcattgctg tcggtgacgc ttgccatcac tctattatta 60
 tccatgtttg cgtecggttc cgctgctgcc gaatctgacg gacaagcacc tcaagccacc 120
 gctgcaagca gtatgcaatc gtatgtggaa gccatgcagc cgggatggaa tttaggaaat 180
 tctctggatg ctgtcggagc agatgagaca gcctggggca atccgcgtat taccaggcgg 240
 ttgatcaagc aaattgctgc ccaaggttac aaaagtattc gtattccggt tacctgggat 300
 aaacacatag gagcagcacc gaattatacc gttgacgctg cctacatgaa ccgtgtggat 360
 gaggtgttcc gctgggcact ggatgccaat ctgtacgtca tgetcaatgt ccatcatgat 420

 tcatggttat gggcagcag tatggagccc aagcatgatg aagtgctggc tcgttataac 480
 gcattatgga cacaattgc caatcgcttt aaagatcagc caaacaagct gatgttcgag 540
 agcattaacg aacccccgtt ctccgaagga ggaacgacga atgaagcga aatgaaccag 600
 atgctccaag aactgaatgt ttccttcac aaaattgtcc gcgcctctgg cggtataat 660

gcaaccgcc cactgttct gcccggcctg gatacttcac ctgcccagaa caaaatcaac 720
 gaactgtaca acacgataac caagctgaac gatccaacc tgattgcgac cattcactat 780
 tatggctatt ggcccttttag tgtgaatatt gccggatata ctacatttga gaaagatacc 840

aaaaacgata taattcaaac ctttgataat gcctataaca cctttgtagc caagggcatt 900
 ccggtcatcg tccgtgaatt cggcctgctc ggcttcgata aaaatacagg cgttattgaa 960
 caagtgaaa agctgaaatt ctttgaatac ctgacttatt atatgaaaga gaaaaaagta 1020
 acaggcatcc tctgggataa cggccaacat tttaacgca caacgttcaa gtggtccgat 1080
 cctgaactct ttaatgtcat gaaatccagc ttaaaaggac gttcctcaa tgcagtcagt 1140
 gacctcattc acttgaagaa aggcacttcc gttcaggatg ccaaggtcac tttaaacctg 1200
 aacggcaatc agttgagcac actcagcgc aatagcaagc aactgaaaca gggtaccgac 1260

tacacactga gcggagataa attaaccttg aaggccagct tgcttaccgg cctaaccact 1320
 tccggtaaat atggtgagaa tgcagtaatt aacccaagt ttaataaggg ggacagactgg 1380
 aattttaag tagtctgta tgatacaca aaattaagcg ctaccgaggg tactacgcaa 1440
 acctttacca ttccaacgga cttccgtggc agccagcttg ccacaatgga agctgtttat 1500
 accaatggcg gcaatgccgg accgcaggac tggacaccgt ataaggaatt tggcaacacc 1560
 tttgcccctg cctatgatag caatggcatc aagetgctgc ctgaattttt taacagtga 1620
 aaggatggtg aagtcacgct gaagttccat ttctggagcg gcatgtggt aacatacaag 1680

attaccaaga gcggaaccg tgtgacggga acagcatcct aa 1722

<210> 3

<211> 573

<212> PRT

<213> Endoglucanase amino acid sequence

<400> 3

Met Leu Lys Arg Arg Pro Val Ser Leu Leu Ser Leu Thr Leu Ala Ile

1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Ser Met Phe Ala Ser Val Ala Ala Ala Ala Glu Ser

20 25 30

Asp Gly Gln Ala Pro Gln Ala Thr Ala Ala Ser Ser Met Gln Ser Tyr

35 40 45

Val Glu Ala Met Gln Pro Gly Trp Asn Leu Gly Asn Ser Leu Asp Ala

50 55 60

Val Gly Ala Asp Glu Thr Ala Trp Gly Asn Pro Arg Ile Thr Gln Ala
 65 70 75 80
 Leu Ile Lys Gln Ile Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Ser Ile Arg Ile Pro
 85 90 95
 Val Thr Trp Asp Lys His Ile Gly Ala Ala Pro Asn Tyr Thr Val Asp
 100 105 110
 Ala Ala Tyr Met Asn Arg Val Asp Glu Val Val Arg Trp Ala Leu Asp
 115 120 125
 Ala Asn Leu Tyr Val Met Leu Asn Val His His Asp Ser Trp Leu Trp
 130 135 140
 Val Ser Ser Met Glu Pro Lys His Asp Glu Val Leu Ala Arg Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Trp Thr Gln Ile Ala Asn Arg Phe Lys Asp Gln Pro Asn Lys
 165 170 175
 Leu Met Phe Glu Ser Ile Asn Glu Pro Arg Phe Ser Glu Gly Gly Thr
 180 185 190

 Thr Asn Glu Ala Lys Met Asn Gln Met Leu Gln Glu Leu Asn Val Ser
 195 200 205
 Phe His Lys Ile Val Arg Ala Ser Gly Gly Asn Asn Ala Thr Arg Pro
 210 215 220
 Leu Val Leu Pro Gly Leu Asp Thr Ser Pro Ala Gln Asn Lys Ile Asn
 225 230 235 240
 Glu Leu Tyr Asn Thr Ile Thr Lys Leu Asn Asp Pro Asn Leu Ile Ala
 245 250 255
 Thr Ile His Tyr Tyr Gly Tyr Trp Pro Phe Ser Val Asn Ile Ala Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Thr Phe Glu Lys Asp Thr Lys Asn Asp Ile Ile Gln Thr Phe
 275 280 285
 Asp Asn Ala Tyr Asn Thr Phe Val Ala Lys Gly Ile Pro Val Ile Val
 290 295 300
 Gly Glu Phe Gly Leu Leu Gly Phe Asp Lys Asn Thr Gly Val Ile Glu
 305 310 315 320

Gln Gly Glu Lys Leu Lys Phe Phe Glu Tyr Leu Thr Tyr Tyr Met Lys
 325 330 335

Glu Lys Lys Val Thr Gly Ile Leu Trp Asp Asn Gly Gln His Phe Asn
 340 345 350

Arg Thr Thr Phe Lys Trp Ser Asp Pro Glu Leu Phe Asn Val Met Lys
 355 360 365

Ser Ser Leu Lys Gly Arg Ser Ser Asn Ala Val Ser Asp Leu Ile His
 370 375 380

Leu Lys Lys Gly Thr Ser Val Gln Asp Ala Lys Val Thr Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Asn Gly Asn Gln Leu Ser Thr Leu Ser Ala Asn Ser Lys Gln Leu Lys
 405 410 415

Gln Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Ser Gly Asp Lys Leu Thr Leu Lys Ala
 420 425 430

Ser Leu Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ser Gly Lys Tyr Gly Glu Asn Ala
 435 440 445

Val Ile Asn Ala Lys Phe Asn Lys Gly Ala Asp Trp Asn Phe Lys Val
 450 455 460

Val Val Tyr Asp Thr Pro Lys Leu Ser Ala Thr Glu Gly Thr Thr Gln
 465 470 475 480

Thr Phe Thr Ile Pro Thr Asp Phe Arg Gly Ser Gln Leu Ala Thr Met
 485 490 495

Glu Ala Val Tyr Thr Asn Gly Gly Asn Ala Gly Pro Gln Asp Trp Thr
 500 505 510

Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Asn Thr Phe Ala Pro Ala Tyr Asp Ser Asn
 515 520 525

Gly Ile Lys Leu Leu Pro Glu Phe Phe Asn Ser Val Lys Asp Gly Glu
 530 535 540

Val Thr Leu Lys Phe His Phe Trp Ser Gly Asp Val Val Thr Tyr Lys
 545 550 555 560

Ile Thr Lys Ser Gly Thr Arg Val Thr Gly Thr Ala Ser

565

570