(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 9 월 18 일 (18.09.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/142529 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/42 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002024

(22) 국제출원일: 2014 년 3 월 11 일 (11.03.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0026268 2013 년 3 월 12 일 (12.03.2013) KR

(71) 출원인: **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE)** [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **송재준 (SONG, Jae Jun)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **최종현 (CHOI, Jong Hyun)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **고경철 (KO, Kyong-Cheol)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **한윤전 (HAN, Yun Jon)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 135-748 서울시 강남구 테헤란로 123 (여삼빌딩 11 층), Seoul (KR).

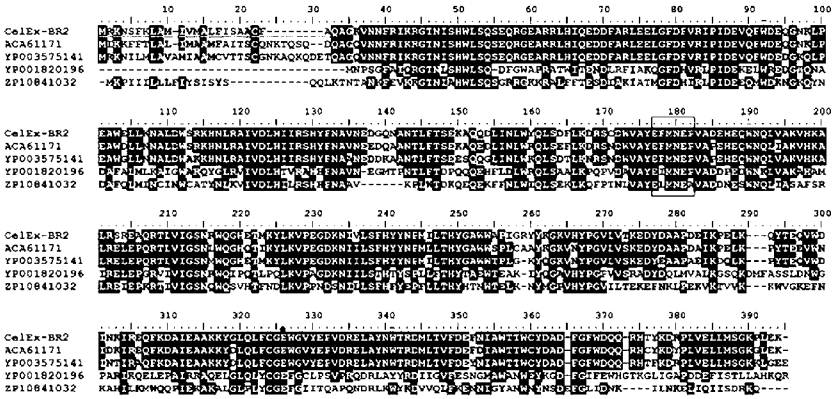
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: NOVEL CELLULASE DERIVED FROM METAGENOME, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) **발명의 명칭** : 메타게놈 유래 신규 셀룰라아제 및 이의 제조방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel cellulase derived from a metagenome, and a preparation method therefor, and more specifically, to: a cellulase (CelEx-CBR12) selected using a robot-based high-throughput screening system, from a metagenomic library extracted from suspended solids of bovine rumen; a gene encoding the same; and a method for preparing a recombinant cellulase. The cellulase CelEx-CBR12 selected in the present invention has exocellulase activity and endocellulase activity, and thus can be used for producing bioethanol using cellulosic biomass, and can be applied to various industries such as fibers, detergents, feed, food, pulp, paper production and the like.

(57) **요약서**: 본 발명은 메타게놈(metagenomic) 유래 신규 셀룰라아제(cellulase) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 소의 루멘(rumen) 부유물에서 추출한 메타게놈 라이브러리로부터 로봇기반 초고속 탐색 시스템을 이용하여 선별된 셀룰라아제(CelEx-CBR12), 이를 코딩하는 유전자 및 재조합 셀룰라아제의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에서 선별한 셀룰라아제 CelEx-CBR12 는 엑소셀룰라아제 활성 및 엔도셀룰라아제 활성을 가지고 있으므로, 섬유소계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에 이용될 수 있으며, 섬유, 세제, 사료, 식품, 펄프 및 종이 생산 등 다양한 산업 분야에 적용할 수 있다.

WO 2014/142529 A1

명세서

발명의 명칭: 메타게놈 유래 신규 셀룰라아제 및 이의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 메타게놈(metagenomic) 유래 신규 셀룰라아제(cellulase) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 소의 루멘(rumen) 부유물에서 추출한 메타게놈 라이브러리로부터 로봇기반 초고속 탐색 시스템을 이용하여 선별된 셀룰라아제(CelEx-BR12), 이를 코딩하는 유전자 및 재조합 셀룰라아제의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 화석 연료 고갈에 대비하기 위해서 원유 의존도가 가장 높은 수송용 연료 분야에 원유를 대체할 수 있는 에너지 기술 개발이 중요한 이슈로 떠오르고 있다. 바이오에탄올은 현존의 화석 연료대비 가격 경쟁력이 낮음에도 미국을 비롯한 브라질, EU 다수의 국가에서는 사용 중에 있으며 최근에는 동남 및 중국과 같은 서남아시아 일부의 국가에서 사회, 공익적 편익을 감안하여 정책적으로 개발하여 사용하기 위한 연구가 수행중이다.

[4] 국내 휘발유 중 바이오에탄올 5% 전국적 보급 시 CO_2 약 105만톤/년 감축 예상이 예상되며, 국가 신 재생에너지 사용 비중이 약 0.11% 증가하고 2030년 45,323백만원 정도의 사회적 편익 발생할 것으로 예상된다. 옥수수 및 사탕수수와 같은 식량 자원을 이용한 바이오에탄올 생산은 식량 자원과의 충돌 및 원자재 가격 상승이라는 본질적인 취약점이 있기 때문에 곡물 자원과 경합이 없는 섬유소계 바이오매스 자원에서 바이오에탄올 생산 기술 개발이 주목받고 있다.

[5] 섬유소계 바이오매스는 전처리 및 효소처리 과정 등을 거쳐서 당분으로 전환되고 이후 미생물 발효에 의해서 에탄올 등 유용한 화학제품들이 만들어지게 된다. 바이오매스의 주성분이 셀룰로오스이기 때문에 셀룰로오스를 발효 가능한 포도당과 같은 단당류로 효과적으로 분해하는 것은 바이오매스 유래의 화학제품 제조과정에 있어서 매우 중요한 과정이라고 할 수 있다.

[6]

[7] 셀룰로오스(cellulose)는 포도당이 베타-1,4-글리코시드 결합(beta-1,4-glycosidic bond)으로 연결된 고분자의 선형 다당류로서 자연계에 존재하는 가장 풍부한 유기물이며 재활용될 수 있는 에너지 자원으로 가치가 매우 높다. 셀룰로오스는 셀룰라아제(cellulase)라는 가수분해 효소에 의해서 구성성분인 포도당으로 분해된다. 현재까지 알려진 셀룰라아제는 크게
엔도-베타-1,4-글루카나아제(endo-beta-1,4-glucanase, EC 3.2.1.4),
엑소-베타-1,4-글루카나아제(exo-beta-1,4-glucanase, EC 3.2.1.91), 그리고

베타-글루코시다아제(beta-glucosidase, EC3.2.1.21)의 세 가지 형태로 분류될 수 있다. 엔도-베타-1,4-글루카나아제는 셀룰로오스 내부 사슬의 베타-1,4 결합을 무작위로 가수분해하고, 엑소-베타-1,4-글루카나아제는 엔도-베타-1,4-글루카나아제에 의해 생성된 셀룰로오즈 중합체의 환원말단 및 비환원말단을 차례로 가수분해하여 2 분자의 포도당이 결합된 셀로비오스(cellobiose)를 생산한다. 상기의 셀로비오스는 베타-글루코시다아제에 의하여 가수분해되어 최종적으로 포도당이 생성된다.

[8] 섬유소 분해균류로 알려진 트리코데르마 라이드(*Trichoderma ride*) 이외에도 다양한 다른 균류도 셀룰로오스 분해효소를 생산하고 셀룰로오스 화합물이나 카복실메틸셀롤로오스와 같은 용해되지 시운 셀룰로오스 유도체를 분해하는 것으로 알려져 있으나, 이들의 균류로부터 생산되는 셀룰라아제는 결정의 셀룰로오스 화합물에는 효과적으로 작용하지는 않는다. 아스파질러스(*Aspergillus*)로부터 생산되는 셀룰레이즈는 보통 높은 베타-글루코시데이즈 활성을 가지지만, 엔도-글루카네이즈 활성은 낮은 것으로 알려져 있으며, 트리코데르마(*Trichoderma*) 속 균주는 높은 엔도- 및 엑소-글루카네이즈 활성을 가지며, 베타-글루코시데이즈 활성은 낮은 것으로 알려져 있다. 기존의 셀룰라아제들은 셀룰로오스를 분해하는 과정에서 속한 유형에 따라 부분적인 역할만 할 수 있을 뿐 하나의 효소가 셀룰로오스를 포도당으로 직접 분해할 수는 없기 때문에 다수의 효소제를 혼합해서 사용해야 한다는 불편함을 가지고 있다.

[9] 높은 셀룰로오스 분해활성을 가지는 셀룰라아제의 선별과정에서, 일반적인 셀룰라아제 기질로 사용되는 CMC(carboxymetyl cellulase)를 이용할 경우에는 엑소-셀룰라아제에 의한 활성으로 클리어 존(clear zone) 형성이 어렵기 때문에, 플레이트 어세이(plate assay)에서 클리어 존을 형성할 수 있는 기질의 선택이 어려워 엑소-셀룰라아제의 스크리닝은 그 방법이 매우 노동집약적이고, 시간 및 비용이 많이 소모되는 단점이 있어, 현재까지 연구된 셀룰라아제는 엔도-셀룰라아제에 비해 엑소-셀룰라아제의 수가 낮다.

[10] 그러나, 최근 분자미생물 생태학의 연구를 통해서 자연계에 존재하는 미생물의 99% 이상이 전형적인 배지에서 배양되지 않는다는 사실이 증명되었다 (Amann *et al., Microbiol. Rev.*, 59:143, 1995; Hugenholtz and Pace, Trends Biotechnol., 14:190, 1996; Ward et al., Nature, 345:63, 1990). 따라서, 실제로 배양되어 동정된 적이 없는 대다수 미생물의 효소를 찾으려는 노력이 필요하며, 이는 분자생물학적인 유전자 재조합 발현을 통하여 가능하리라 여겨지고 있다.

[11] 이러한 접근방법의 하나로 메타게놈(metagenome)에 관한 연구가 시도되고 있는데, 메타게놈은 자연계에 존재하는 모든 미생물의 유전체를 통칭하는 것으로 정의된다. 일반적으로, 메타게놈 연구는 자연계 시료로부터 미생물을 배양하지 않고 메타게놈을 분리한 후, 이들을 라이브러리로 작성하여 배양가능한 대장균에 도입하는 단계로 구성된다. 이는 배양이 불가능했던 미생물로부터 유용 산물을 확보하기 위한 방법으로, 유전자의 유래가 되는

미생물에 대한 정보는 얻기가 어려우나 미생물의 산물과 유전자를 동시에 확보할 수 있는 장점이 있다.

[12] 이에, 본 발명자들은 메타게놈으로부터 셀룰로오즈 분해능이 우수한 효소를 선별하기 위해 예의 노력한 결과, 소의 루멘(rumen) 부유물에서 추출한 메타게놈 라이브러리로부터 로봇기반 초고속 탐색 시스템을 이용하여 셀룰라아제 활성을 가지는celEx-BR12 유전자를 선별하였으며, 선별된 셀룰라아제의 엑소룰라아제 및 엔도셀룰라아제 활성을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

[14] 발명의 요약

[15] 본 발명의 목적은 메타게놈(metagenomic) 유래의 셀룰라아제(cellulase), 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 함유하는 재조합 벡터 및 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 배양하여 재조합 셀룰라아제를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[17] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰라아제를 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 상기 셀룰라아제를 코딩하는 유전자(celEx-BR12), 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 유전자 또는 재조합 벡터가 숙주미생물에 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 셀룰라아제 생산능을 가지는 재조합 미생물을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 셀룰라아제 생산능을 가지는 재조합 미생물을 배양하여 재조합 셀룰라아제를 생성하는 단계; 및 (b) 생성된 재조합 셀룰라아제를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 셀룰라아제의 제조방법을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 로봇 기반의 초고속 탐색 시스템을 나타낸 그림이다.

[22] 도 2는 초고속 탐색 시스템을 이용한 메타게놈 유래 셀룰라아제 선별과정을 나타낸 모식도이다.

[23] 도 3은 초고속 탐색 시스템을 이용하여 메타게놈 라이브러리 클론을 분석한 결과, 셀룰라아제 활성을 보이는 pFOS-CBR12 클론을 나타낸 그래프이다.

[24] 도 4는 본 발명에서 샷건 클로닝 방법으로 제조된 pHSG-CBR12의 셀룰라아제 유전자 구조 및 전사해독프레임을 도식화하여 나타낸 것이다.

[25] 도 5는 CelEx-BR12 셀룰라아제의 상동성을 비교한 것이다.

[26] 도 6은 정제된 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제를 나타낸 것이다.

[27] 도 7은 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제의 (A) 최적 pH, (B) pH에 따른 안정성, (C) 최적 온도 및 (D) 온도에 따른 안정성을 나타낸 그래프이다.

[28] 도 8은 TLC(thin-layer chromatography) 분석을 통해 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제 분해활성을 측정한 데이타이다.

[29]

[30] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[31] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[32] 본 발명에서는 신규한 셀룰라아제(exocellulase)를 선별하기 위하여, 분자생물학적 방법(*Sambrook et al., Molecular cloning*, 1989)으로 메타게놈 DNA 라이브러리(metagenomic library)를 제작하였으며, 소의 루멘 부유물에서 메타게놈 라이브러리 제작을 위한 DNA를 추출하여 포스미드 라이브러리(fosmid library)를 구축하기 위해, 포스미드 pCC1FOS 벡터에 연결한 후 λDNA 패키징 키트에 포장하여 대장균(*E. coli*) EPI300-T1에 형질도입하였다.

[33] 본 발명의 '메타게놈'은 "특정 자연환경에 존재하는 모든 미생물의 유전체 집합"으로 정의되고 있으며, 환경시료로부터 추출한 유전체 또는 유전자를 포함하는 클론을 총칭하여 메타게놈이라고 부르고 있다 (Handelsman, J. *et al., Chem Biol.,* 5:R245, 1998). 메타게놈 라이브러리는 일반적으로, 토양, 해수, 갯벌, 하천, 동물 장내 등 다양한 환경에 혼재되어 있는 수백억 개의 미생물로부터 유전체를 직접 추출하여 벡터에 삽입하여 클로닝을 하게 된다. 벡터(vector)로는 일반적으로 많이 사용되어온 플라스미드도 사용되고 있지만 보다 큰 크기의 유전자 또는 유전자 클러스터(gene cluster)를 클로닝할 수 있는 BAC, YAC, 포스미드(Fosmid), 코스미드(Cosmid) 등이 사용되고 있으며, 본 발명에서 사용한 '포스미드(Fosmid)'는 대략 37~52kb 크기의 유전자 또는 유전체를 삽입할 수 있으며 높은 형질전환 효율을 나타내는 장점이 있는 것으로 알려져 있다 (Alduina, R. *et al., FEMS Microbiol Lett.*, 218:181, 2003).

[34] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 메타게놈 라이브러리에서 셀룰라아제 활성을 지닌 클론을 선별하기 위해, 로봇 기반의 초고속 탐색 시스템(도 1)을 이용한 셀룰라아제 활성을 지닌 클론을 스크리닝 방법(도 3)으로, 총 20,000개의 클론을 분석하였으며, 이 중 셀룰라아제 활성을 보이는 pFOS-CBR12 클론을 선별하였다 (도 4).

[35] 본 발명의 일 실시예에서는, 높은 셀룰라아제 활성을 보인 pFOS-CBR12 클론을 선별하였으며, 선별된 클론에서 포스미드(fosmid)를 분리한 다음, 정제된 *celEx-BR12* 유전자를 pHSG298 벡터에 서브클로닝하여 샷건 라이브러리(pHSG-CBR12)를 제작하였으며, 샷건 클로닝된 pHSG-CBR12는 대장균(*E. coli*) XL1-Blue에 형질전환시킨 후에, 셀룰라아제 활성을 가진 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드를 분리하여, 염기서열 및 아미노산 서열을 분석하였다.

[36] 본 발명에서 샷건 클로닝된 *celEx-BR12* 유전자의 전사해독프레임(open reading frame; ORF)을 분석한 결과(도 4 및 표 1), 샷건 클로닝된 *celEx-BR12*의 유전자는 4kb로 이루어져 있으며, 2개의 ORF로 구성되어져 있다. ORF1은 약 1.8 kb로 이루어져 있으며 프리보텔라 루미니콜라(*Prevotella ruminicola*) 23의 페니실린 결합 단백질(penicillin-binding protein)과 약 84% 상동성을 보이는 것을 확인하였다. 또한, ORF2는 380개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 난배양성 미생물(uncultured microorganism)의 셀로덱스트리나아제(cellodextrinase)와 약 92%, 프리보텔라 루미니콜라(*Prevotella ruminicola*) 23의 글라이코실 가수분해효소(glycosyl hydrolase) family 5와 약 83%의 상동성을 보이는 것을 확인하였다 (도 5).

[37] 따라서, 본 발명의 방법으로 소의 루멘 부유물 유래의 메타게놈에서 선별한 셀룰라아제는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되며, 본 발명에서는 *CelEx-BR12* 셀룰라아제로 명명하였다.

[38] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 2의 아미노산으로 표시되는 셀룰라아제 및 상기 셀룰라아제를 코딩하는 유전자(*celEx-BR12*)에 관한 것이다.

[39] 본 발명에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[40] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 셀룰라아제를 코딩하는 유전자(*celEx-BR12*)를 함유하는 재조합 벡터, 상기 셀룰라아제를 코딩하는 유전자 또는 상기 재조합 벡터가 숙주미생물에 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 셀룰라아제 생산능을 가지는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 재조합 셀룰라아제의 제조방법에 관한 것이다.

[41] 본 발명에서, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 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.

[42] 본 발명에 따른 상기 재조합 미생물은 통상의 방법에 따라 상기 유전자를 미생물의 염색체(chromosome) 상에 삽입시키거나, 상기 재조합 벡터를 미생물의 플라스미드(plasmid) 상에 도입시킴으로써 제조할 수 있다.

[43] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli XL-1Blue(Stratagene), E. coli DH5α, E. coli JM101, E. coli K12, E. coli W3110, E. coli X1776, E. coli BL21* 등을 포함한다. 그러나 *FMB101, NM522, NM538* 및 *NM539*와 같은 *E.coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(speices) 및 속(genera) 등이 또한 사용될 수 있다. 상기 E. coli에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*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.

[44] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook *et al., supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann *et al., EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[45] 본 발명에서 셀룰라아제 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 물리적인 방법으로서, microinjection(세포에 DNA를 직접 넣는 것), liposome, directed DNA uptake, receptor~mediated DNA transfer 또는 Ca^{++}을 이용한 DNA 운반 방법 등이 있으며, 최근에는 바이러스(virus)를 이용한 유전자 운반 방법이 많이 사용되고 있다. 일례로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 이용하는 방법 등이 있으며, 특히, 레트로바이러스는 유전자 전달 효율이 높고 gross deletion이나 숙주 DNA와 재정렬(rearrangement : 숙주 DNA 중 자기 DNA와 유사한 부위를 바꾸는 것으로 숙주 DNA 기능의 변화를 초래함)에 의한 결합 없이 넓은 범위의 세포들에서 사용할 수 있다.

[46] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 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 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 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 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커 (linker)를 사용한다.

[47]

[48] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 *Agrobacterium* 속, *Aspergillus* 속, *Acetobacter* 속, *Aminobacter* 속, *Agromonas* 속, *Acidphilium* 속, *Bulleromyces* 속, *Bullera* 속, *Brevundimonas* 속, *Cryptococcus* 속, *Chionosphaera* 속, *Candida* 속, *Cerinosterus* 속, *Escherichia* 속, *Exisophiala* 속, *Exobasidium* 속, *Fellomyces* 속, *Filobasidium* 속, *Geotrichum* 속, *Graphiola* 속, *Gluconobacter* 속, *Kockovaella* 속, *Curtzmanomyces* 속, *Lalaria* 속, *Leucospoidium* 속, *Legionella* 속, *Psedozyma* 속, *Paracoccus* 속, *Petromyc* 속, *Rhodotorula* 속, *Rhodosporidium* 속, *Rhizomonas* 속, *Rhodobium* 속, *Rhodoplanes* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Rhodobacter* 속, *Sporobolomyces* 속, *Spridobolus* 속, *Saitoella* 속, *Schizosaccharomyces* 속, *Sphingomonas* 속, *Sporotrichum* 속, *Sympodiomycopsis* 속, *Sterigmatosporidium* 속, *Tapharina* 속, *Tremella* 속, *Trichosporon* 속, *Tilletiaria* 속, *Tilletia* 속, *Tolyposporium* 속, *Tilletiposis* 속, *Ustilago* 속, *Udenlomyce* 속, *Xanthophilomyces* 속, *Xanthobacter* 속, *Paecilomyces* 속, *Acremonium* 속, *Hyhomonus* 속, *Rhizobium* 속 등을 예시할 수 있으며, 대장균(*Escherichia coli*)인 것이 바람직하다.

[49] 본 발명의 일 실시예에서는, CelEx-BR12 셀룰라아제를 발현시키기 위하여 *celEx-BR12* 유전자(서열번호 1)의 염기서열을 코돈 최적화(codon optimization)를 통해 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *celEx-BR12* 유전자를 합성하여, pET-22b(+) 벡터 (Novagen, 미국) 에 삽입하여, 셀룰라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pET-CBR12을 제조한 다음, 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)에 형질전환시켰다.

[50] 본 발명의 pET-22b(+) 벡터는 삽입된 셀룰라아제 유전자가 발현될 수 있도록 T7 프로모터를 포함하며, 발현된 셀룰라아제를 쉽게 정제할 수 있도록 C-말단에 hexa-histidine tag(His-tag) 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[51] 본 발명에서는 상기에서 제조된 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제 생산능을 가지는 대장균을 배양하여, 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제를 Ni-NTA 흡착 크로마토그래피방법을 사용하여 정제하였으며, 상기 정제된 CelEx-BR12 설룰라아제는 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 약 42kDa의 크기를 가지고 있는 것을 확인하였다 (도 6).

[52] 본 발명의 방법으로 생산된 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 효소활성을 측정하기 위하여, pH 및 온도변화에 따른 셀룰라아제 활성을 특정한 결과, 약

35℃, pH5.0에서 최대활성을 보이는 것을 확인하였으며, pH7 내지 9의 중성부분에서 안정성이 높게 유지되는 것을 확인하였다. 또한, CelEx-BR12 셀룰라아제는 20 내지 30℃에서 2시간 이상 활성이 유지되는 것을 확인하였으며, 40℃이상에서는 불안정한 것을 확인하였다 (도 7).

[53] 본 발명의 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 기질특이성을 확인한 결과, 자작나무 자일란(132.3U/㎎), 카복실메틸셀룰로오즈(105.9U/㎎), 오트-스펠트 자일란(67.9U/㎎) 및 2-하이드록시에틸-셀룰로오즈(26.3U/㎎)에 높은 활성을 보이는 것을 확인하였지만, 아비셀에는 낮은 활성을 보였으며, 라미나린, 녹말, 커들란, α-셀룰로오즈, D-글루콘산 및 살리신에는 활성을 보이지 않았다 (표 2).

[54] CelEx-BR12 설룰라아제의 미카엘리스-멘텐 상수(Michaelis-Menten constants; K_m) 및 최대 반응 속도(maximal reaction velocities; V_{max})를 라인웨버-버크식(Lineweaver-Burk) 방법에 따라 측정한 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 본원발명의 방법으로 제조된 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 K_m 값은 12.92μM 및 V_{max} 값은 1.55×10^{-4}μmol/min을 나타내는 것을 확인하였다.

[55] 또한, 본 발명의 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 효소활성을 측정하기 위해 TLC(thin-layer chromatography) 분석을 수행한 결과, 셀로트리오스(cellotriose; G3), 셀로테트로스(cellotetrose; G4), 셀로펜토오스(cellopentaose; G5)를 각각 분해하는 것으로 보아 엑소셀룰라아제(exocellulase)의 활성 및 엔도셀룰라아제(endocellulase)의 활성을 동시에 보유함을 확인하였으며(도 8), 금속이온의 종류에 따라 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 다양한 금속이온의 최종농도가 1mM이 되도록 CelEx-BR12 설룰라아제에 첨가하여 반응시킨 결과, 대부분의 금속이온에서 상대적인 셀룰라아제의 활성이 130 내지 150% 정도 증가한 것을 확인하였고, 아연이온(Zn^{2+})을 처리한 경우에는 최대 177% 셀룰라아제 활성이 증가한 것을 확인하였다. 하지만, 철이온(Fe^{2+}) 및 수은이온(Hg^{2+})에서는 오히려 셀룰라아제 활성이 감소하였다 (표 4).

[56]

[57] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[58]

[59] 실시예

[60] 실시예 1 : 메타게놈 라이브러리 제작

[61] 본 발명에서는 신규한 셀룰라아제를 선별하기 위하여, 메타게놈 라이브러리를 제작하였으며, 이전에 알려진 분자생물학적 방법을 사용하여 메타게놈 DNA로부터 라이브러리를 제작하였다 (Sambrook *et al., Molecular cloning*, 1989; a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Habor Laboratory., Cold Spring Habor, NY.).

[62] 먼저, 소(한우)의 루멘 부유물에서 메타게놈 라이브러리 제작을 위한 DNA를 추출하여 포스미드 라이브러리(fosmid library)를 구축하였다. 샘플 10 g 에 27㎖의 추출버퍼(extraction buffer; 2%(w/v)CTAB, 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH8.0) 및 100㎕의 프로테나아제 K(proteinase K; 10㎎/㎖)을 첨가한 다음, 200rpm에서 30분 동안 교반하였다.

[63] 각 샘플에 6㎖의 10%(w/v) SDS(sodium dodecyl sulfate)를 첨가하여 65℃에서 2시간 동안 부드럽게 흔들어준 다음, 4℃에서 16,000× g 조건으로 20분 동안 원심분리하였으며, 각 상등액을 새로운 튜브에 옮기고, 동량의 페놀/클로로포름/이소아밀알콜(phenol/chloroform/isoamyl alcohol; 25:24:1(v/v/v))을 첨가한 다음, -20℃에서 1 시간 동안 방치하였다. 그 후, 4℃에서 20,000× g 조건으로 20분 동안 원심분리하여 남아있는 펠렛을 70% 에탄올(v/v)로 세척한 다음 200㎕의 TE 버퍼로 재현탁하였다.

[64] 메타지노믹 DNA(metagenomic DNA)는 페놀산(phenolic acid) 및 부식산(humic acid)을 제거하기 위해 Q 세파로오즈(Q-Sepharose)를 이용하여 분리하였으며, 분리된 DNA에 DNA end-repair 효소 혼합액(Epicentre, USA)을 처리하여 5' 말단을 블런트 엔드(blunt end)로 수선하였다.

[65] 블런트 엔드(blunt end)로 수선된 DNA를 1%(w/v) 저융점 아가로오즈겔(low melting point agarose gel)에 로딩한 후, CHEF(clamped homogeneous electric field)-DR II 시스템(Bio-Rad, 미국)을 사용하여 6V/cm 조건에서 펄스장겔전기영동법(pulsed field gel electrophoresis ; PFGE)을 수행하였으며, GELase(Epicentre Technologies, 미국)를 이용하여 30 내지 40kb 크기를 가지는 DNA를 분리하였다.

[66] 분리된 30 내지 40kb 크기를 가지는 DNA는 포스미드 라이브러리 제조 키트(Copy Control Fosmid Library Production Kit, Epicentre Technologies, 미국)를 이용하여 pCC1FOS 포스미드 벡터(Epicentre Technologies, 미국)에 연결한 후 λDNA 패키징 키트에 포장하여 대장균(E. coli) EPI300-T1(Epicentre Technologies, 미국)에 형질도입하여 4℃에서 보관하였다.

[67]

[68] 실시예 2 : 초고속 탐색 시스템을 이용한 메타게놈 라이브러리 유래의 셀룰라아제 선별

[69] 본 발명에서는 로봇기반의 초고속 탐색 시스템(High-throughput screening; HTS)(도 1)을 이용하여, 도 3의 초고속 탐색 시스템을 이용한 셀룰라아제 스크리닝 과정의 방법으로, 실시예 1에서 제작된 메타게놈 라이브러리에서 셀룰라아제활성을 가진 클론을 선별하였다

[70] 먼저, 메타게놈 라이브러리에서 셀룰라아제 활성이 있는 재조합 플라스미드를 선별하기 위하여, 메타게놈 라이브러리를 12.5㎍/㎕의 클로람페니콜(chloramphenicol)이 포함된 LB 평판배지에 도말한 다음, 콜로니(colony)가 형성되도록 배양하였다. 양성 대조군으로 셀룰라아제 활성을

가진 celEdx12 유전자가 포함된 pHSGC12 벡터를 샷건 방법(Ko *et al., Appl. Microbiol. Biotech.*, 89:1453, 2011)을 사용하여 대장균(*E. coli*) XL1-Blue(Stratagene Inc., 미국)에 형질전환시켜 사용하였으며, 음성대조군으로 메타게놈 DNA가 삽입되지 않은 pCC1FOS 벡터로 형질전환된 대장균(*E.coli*) EPI300-T1를 사용하였다.

[71] 형광기질인 10μM 4-methylumbelliferyl-β-d-cellobioside ($MeUmbG_2$: Sigma-Aldrich), 아라비노오스(arabinose) 및 12.5㎍/㎕의 클로람페니콜(chloramphenicol)이 포함된 LB 액체배지를 Janus Automated Workstation의 Janus Liquid Handler (Perkin Elmer, 미국)을 이용하여 96웰 플레이트(96well plate)에 200㎕씩 분주하였다. 그 후, 96웰 플레이트를 K3 colony picker(KBiosystems, 영국)로 옮겨 상기 LB 평판배지에 배양되어있는 각각의 콜로니를 96웰 플레이트에 접종한 다음, Liconic STX40 Automated Incubator(Woburn, 미국)를 이용하여 37℃에서 12 내지 16시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음, 배양액(배지+균체) 100㎕를 0.5M 글라이신 버퍼(glycine buffer, pH10.4)가 100㎕씩 분주 되어 있는 블랙 96웰 플레이트(black 96well plate)에 넣어준 후, 셀룰라아제 활성에 따른 $MeUmbG_2$의 형광 정도를 1420 VICTOR multilabel counter(Perkin Elmer, 미국)에서 λexcitation=365 nm, λemission≥460 nm로 측정하여 Workout software(Perkin Elmer, 미국)에서 분석하였다.

[72] 본 발명에서는 총 20,000개의 클론을 분석하였으며, 이 중 셀룰라아제 활성을 보이는 pFOS-CBR12의 클론을 선별하였다 (도 4).

[73]

[74] 실시예 3 : CelEx-BR12의 샷건 라이브러리 제작 및 염기서열 분석

[75] 본 발명의 실시예 2에서 pFOS-CBR12 클론(hit clone)을 선별하였으며, 선별된 클론에서 알칼리 용혈(alkali lysis)방법으로 포스미드(fosmid)를 분리하였으며(H.C. Birnboim *et al., Nuc. Acid Res.*, 7:1513, 1979), 분리된 DNA(chromosomal DNA)는 제한효소인 *Bfu*CI(New England Biolabs, 미국) (65℃에서 20분 동안 배양)으로 절단한 후, 전기영동하여 4 내지 5kb 크기를 가지는 DNA 단편을 겔 추출 키트(Gel Extraction kit ; QIAGEN Inc, 미국)로 정제하였다. 정제된 DNA는 제한효소 BamHI(New England Biolabs, 미국)을 처리한 다음, pHSG298 (Takara, 미국)벡터에 서브클로닝 하였으며(pHSG-CBR12) *celEx-BR12* 유전자의 샷건 라이브러리를 제작하였다 (Ko *et al., Appl. Microbiol. Biotech.*, 89:1453, 2011).

[76] 상기에서 제조된 celEx-BR12 유전자의 샷건 라이브러리는 대장균(*E. coli*) XL1-Blue에 형질전환시켜 20㎍/㎖ 카나마이신(kanamycin) 및 10μM $MeUmbG_2$이 포함된 LB 액체배지에서 배양하였다. 형질전환된 대장균(*E. coli*) XL1-Blue에서 플라스미트 미디 키트(Plasmid Midi kit ;QIAGEN, 미국)을 사용하여 셀룰라아제 활성을 가진 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드(pHSG298)를 분리하여,

염기서열을 분석하였다 (솔젠트; SolGent Co, 한국), 분석된 염기서열은 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)에서 BLAST를 수행하였으며, BioEdit(version 7.0.9.0.)의 다중정렬 프로그램(multialignment program)으로 분석하였다.

[77]

[78] 표 1

[Table 1]

메타게놈에서 선별된 셀룰라아제 상동성 비교

Vector	Gene	Homologous	Similarity (%)
pHSG-CBR12	*orf1*	Penicillin-binding protein [*Prevotellaruminicola23*]	84
	celEx-BR12	family 5 glycosyl hydrolase [*Prevotellaruminicola23*]	83

[79]

[80] *celEx-BR12*의 유전자는 4 kb로 이루어져 있으며, 2개의 ORF로 구성되어져 있다. ORF1은 약 1.8 kb로 이루어져 있으며 프리보텔라 루미니콜라(*Prevotella ruminicola*) 23의 페니실린 결합 단백질(penicillin-binding protein)과 약 84% 상동성을 가진다. ORF2는 380개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 난배양성 미생물(uncultured microorganism)의 셀로덱스트리나아제(cellodextrinase)와 약 92%, 프리보텔라 루미니콜라(*Prevotella ruminicola*) 23의 글라이코실 가수분해효소(glycosyl hydrolase) family 5와 약 83%의 상동성을 보이는 것을 확인하였으며(도 5), 본 발명에서는 이 효소를 CelEx-BR12 셀룰라아제로 명명(서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 아미노산 서열)하였다.

[81]

[82] 실시예 4 : 셀룰라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물 제작

[83] 본 발명의 CelEx-BR12 셀룰라아제를 발현시키기 위하여 *celEx-BR12* 유전자(서열번호 1)의 염기서열에서 개시코돈(ATG)의 위치를 포함하는 DNA 단편들을 *Nde*I(New England Biolabs, 미국) 와 *Xho*I(New England Biolabs, 미국) 제한효소 부위가 포함되도록 PCR(TProfessional thermalcycle(Biometra, 독일)을 사용하여 증폭시켰으며, PCR과정에 사용된 프라이머는 *celEx-BR12* 유전자를 증폭할 수 있도록 디자인하였다.

[84]

[85] *celEx-BR12* 프라이머

[86] [서열번호 3] CBR12-F : 5'- GGAATTCCAT**ATG**CGGAAGAATTCCTTTAAA-3'

[87] [서열번호 4] CBR12-R : 5'-CCGCTCGAGTTTCTCTAGGGGCTTTCCT-3'

[88] (NdeI site : CATATG, *Xho*I site : CTCGAG, 굵은 글씨 ATG 개시코돈)

[89]

[90] PCR로 증폭된 DNA는 약 1.2kb이며, 클로닝된 DNA 단편은 NdeI 와 *Xho*I 제한효소를 처리한 다음, pET-22b(+) 벡터 (Novagen, 미국) 에 삽입하여, 셀룰라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하였으며, pET-22b(+) 벡터는 삽입된 셀룰라아제 유전자가 발현될 수 있도록 T7 프로모터를 포함하며, 발현된 셀룰라아제를 쉽게 정제할 수 있도록 C-말단에 hexa-histidine tag(His-tag) 서열을 포함한다.

[91] 상기 클로닝된 pET-22b(+) 벡터(pET-CBR12)는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)(Novagen, 미국)에 형질전환시킨 후, 셀룰라아제의 발현정도를 확인하였으나, 발현상태가 미비한 것을 확인하고, 코돈 최적화(codon optimization)를 통해 celEx-BR12 유전자를 합성(서열번호 5)하여 상기와 같은 방법으로 재조합 벡터를 제조한 다음, 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)에 형질전환시켰다.

[92]

[93] 실시예 5 : 재조합 미생물에서 생산된 재조합 셀룰라아제의 생산 및 정제

[94] 실시예 4에서 코돈 최적화를 통해 제조한 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제 생산능을 가지는 대장균을 30℃에서 50㎍/㎖ 앰피실린(Ampicillin)이 첨가된 LB 배지에서 배양하였으며, 셀룰라아제 발현을 유도하기 위해 0.5mM IPTG(isopropyl-d-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 30℃에서 4시간 동안 배양하여 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제를 생산하였다. 그 다음, 7,000× g 조건으로 10분 동안 원심분리하여, 남아있는 세포 펠렛을 차가운(ice-cold) PBS 버퍼(200 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4, and 1 mM Na_2HPO_4; pH 7.5)로 세척하였다. 세척된 세포는 VCX750 소니케이터(VCX750 sonicator; Sonics Materials. Inc., 미국)를 이용하여 파쇄하였으며, 파쇄된 세포 추출액에서 C-말단에 His-tag이 포함된 CelEx-BR12 설룰라아제를 분리하기 위해, Ni-NTA 흡착 크로마토그래피방법을 사용하여 정제하였다.

[95] 500mM 염화나트륨(NaCl)이 포함된 PBS 버퍼에 0 내지 500mM 이미다졸(imidazole)의 농도변화(gradient)를 주어 HiTrap chelating HP 컬럼(GE Healthcare, 미국)을 이용하여 1차 정제를 하였으며, 1차 정제된 셀룰라아제는 염화나트륨을 제거하기 위해 HiPrep 26/10 탈염(desalting) 컬럼(GE Healthcare)를 사용하여 2차 정제를 하였다. 모든 정제 단계는 FPLC 시스템(AKTA Explorer; GE Healthcare, 미국)을 사용하였다.

[96]

[97] 상기 정제된 CelEx-BR12 설룰라아제는 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 약 42kDa의 크기를 가지고 있는 것을 확인하였으며(도 6), 정제된 CelEx-BR12 설룰라아제는 BSA를 스탠다드로 사용하여 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, 미국)로 정량하였다.

[98]

[99] 실시예 6 : 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제의 효소활성 및 기질특이성 측정

[100] 6-1 : 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제 특성 확인

[101] 상기 실시예 5에서 정제한 CelEx-BR12 셀룰라아제의 반응 최적 조건을 확인하기 위해, pH 및 온도의 변화에 따른 셀룰라아제 활성을 측정하였다.

[102] CelEx-BR12 셀룰라아제의 최적 pH를 확인하기 위해, pH3.0 내지 pH13.0의 다양한 버퍼에 0.1mM MeUmbG2를 첨가하여 37℃에서 20분 동안 반응시켰으며, 효소 활성은 엑소셀룰라아제 기질로 사용되는 4-methylumbelliferyl-β-d-cellobioside (MeUmbG_2 ;MeUmb glycosides)가 효소에 의해 분해되어 생성되는 MeUmb(4-methylumbelliferylliferone)의 양을 측정하였다. CelEx-BR12의 pH 안정성은 각각의 버퍼에서 4℃에서 24시간 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다.

[103] 최적 pH 측정을 위하여 사용된 버퍼는 다음과 같다 : 100mM 소듐 아세테이트(sodium acetate; pH 3.0-6.0), 100mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate; pH 6.0-8.0), 100mM Tris-HCl(pH 8.0-9.0), 100mM 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate; pH 9.0-11.0), 100mM 디소듐 포스페이트(disodium phosphate; pH 11.0-12.0), 100mM 포타슘 클로라이드(potassium chloride; pH 12.0-13.0).

[104] CelEx-BR12 셀룰라아제의 최적 반응온도를 측정하기 위해, 100mM 소듐 아세테이트(sodium acetate; pH5.0) 버퍼에 0.1mM MeUmbG2를 첨가하여 20 내지 60℃에서 0 내지 120분 동안 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다.

[105] 그 결과, 본 발명의 CelEx-BR12 셀룰라아제는 약 35℃, pH5.0에서 최대활성을 보이는 것을 확인하였으며, pH 7 내지 9의 중성부분에서 안정성이 높게 유지되는 것을 확인하였다. 또한, CelEx-BR12 셀룰라아제는 20 내지 30℃에서 2시간 이상 활성이 유지되는 것을 확인하였으며, 40℃이상에서는 불안정한 것을 확인하였다 (도 7).

[106]

[107] 6-2 : 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제 기질특이성

[108] 상기 실시예 5에서 정제한 CelEx-BR12 셀룰라아제의 기질특이성(substrate specificity)을 측정하기 위해, 0.1mM MeUmbG_2 및 1%(w/v) 아비셀(avicel), 1%(w/v) 자작나무 자일란(birch wood xylan), 1%(w/v) α-셀룰로오즈(α-cellulose), 1%(w/v) 카복실메틸셀룰로오즈(carboxymethyl cellulose; CMC), 1%(w/v) 커들란(curdlan), 1%(w/v) 2-하이드록시에틸-셀룰로오즈(2-hydroxyethyl-cellulose), 1%(w/v) 라미나린(laminarin), 1%(w/v) 오트-스펠트 자일란(oat-spelt xylan), 0.5%(w/v) 살리신(salicin), 50μM D-글루콘산(D-gluconic acid) 및 1%(w/v) 녹말(starch)를 포함하는 다양한 탄수화물을 이용하여 기질 특이성을 측정하였다.

[109]

[110] 표 2

[Table 2]

재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 기질 특이성 측정

Substrate	Specific activity (U/㎎)
CMC	105.9
Avicel pH101	LA
Birch wood xylan	132.3
Oat spelt xylan	67.9
Laminarin	NA
Starch	NA
2-hydroxyethyl-cellulose	26.3
Curdlan	NA
α-cellulose	NA
Salicin	NA
d-Gluconic acid	NA
$MeUmbG_2$	0.3

[111]

[112] 그 결과, 본 발명의 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제는 자작나무 자일란(132.3U/㎎), 카복실메틸셀룰로오즈(105.9U/㎎), 오트-스펠트 자일란(67.9U/㎎) 및 2-하이드록시에틸-셀룰로오즈(26.3U/㎎)에 높은 활성을 보이는 것을 확인하였다. 하지만, 아비셀에는 낮은 활성을 보였으며, 라미나린, 녹말, 커들란, α-셀룰로오즈, D-글루콘산 및 살리신에는 활성을 보이지 않았다 (표 2).

[113]

[114] 6-3 : 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제 효소활성 측정

[115] 상기 실시예 5에서 정제한 CelEx-BR12 설룰라아제의 효소활성을 측정하기 위해, 셀룰라아제에 100mM 소듐 아세테이드(sodium acetate) 버퍼에 MeUmbG2의 최종농도가 0.1 mM이 되도록 처리한 후, pH5.0, 37℃에서 20분 동안 반응시켰으며, 4-methylumbelliferylliferone의 표준용액은 0.05 내지 1nM로 설정하여 측정하였다.

[116] 셀룰라아제에 의해 $MeUmbG_2$가 분해되어 생성된 MeUmb의 형광 정도는 1420 VICTOR multilabel counter(Perkin Elmer, 미국)에서 λexcitation=365 nm, λemission≥460 nm로 측정하여 Workout software(Perkin Elmer, 미국)에서 분석하였다.

[117] 분석과정은 0.1mM MeUmb glycosides이 포함된 100mM 소듐 아세테이즈

버퍼(pH5.0) 100㎕를 반응용액으로 하여 수행하였으며, 500mM 글라이신(glycine) 버퍼(pH10.4)를 100㎕ 첨가하여 반응을 종결시켰다. 효소의 유닛(U)은 단위시간 당(1min) 당 공여체의 1μmol당 수용체에 전이하는데 필요한 효소의 양으로 정의된다.

[118] CelEx-BR12 설룰라아제의 미카엘리스-멘텐 상수(Michaelis-Menten constants; K_m) 및 최대 반응 속도(maximal reaction velocities; V_{max})는 라인웨버-버크식(Lineweaver-Burk) 방법에 따라 측정되었다.

[119]

[120] 표 3

[Table 3]

CelEx-BR12 설룰라아제의 효소 활성

Km(μM)	V_{max} (μmol/min)	K_{cat}(/min)	K_{cat}/K_m(/min/μM)
12.92	1.55×10^{-4}	1.2×10^{-5}	9.29×10^{-7}

[121]

[122] 표 3에 나타난 바와 같이, 본원발명의 방법으로 제조된 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 K_m 값은 12.92μM 및 V_{max} 값은 1.55×10^{-4}μmol/min을 나타내는 것을 확인하였다.

[123]

[124] 6-4 : TLC 분석을 통한 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제 효소활성 측정

[125] 상기 실시예 5에서 정제한 CelEx-BR12 설룰라아제의 효소활성을 측정하기 위해 TLC(thin-layer chromatography) 분석을 수행하였다.

[126] TLC는 세포 추출물에 포함된 셀룰라아제에 의해 셀룰로올리고사카라이드(cellooligosaccharides; cellobiose to cellopentaose) 및 카복실메틸셀룰로오즈(carboxymethyl cellulose; CMC)의 분해정도를 측정한 것으로, 효소와 반응된 각각의 기질은 실리카 겔(silica gel) 60(Merck, 미국)에서 용매(1-부탄올:아세트산:물 = 2:1:1(v/v/v)) 조건에서 분리시킨 다음, 에탄올로 희석시킨 5% 황산(H_2SO_4(v/v))으로 도포 후 200℃에서 5분간 발색시켜 최종산물을 확인하였다.

[127] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제는 셀로트리오스(cellotriose; G3), 셀로테트로스(cellotetrose; G4), 셀로펜토오스(cellopentaose; G5)를 각각 분해하는 것으로 보아 엑소셀룰라아제(exocellulase)의 활성 및 엔도셀룰라아제(endocellulase)의 활성을 동시에 보유함을 확인하였다.

[128]

[129] 6-5 : 금속이온에 따른 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제 효소활성

[130] 금속이온의 종류에 따라 재조합 CelEx-BR12 설룰라아제의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 다양한 금속이온의 최종농도가 1mM이 되도록

CelEx-BR12 셀룰라아제에 첨가하여 반응시켰다.

[131] 금속이온과 반응시킨 CelEx-BR12 셀룰라아제는 최종농도가 1mM이 되도록 EDTA를 처리하여 4℃에서 3시간 동안 반응시킨 후, EDTA를 제거하기 위해 PBS 버퍼를 이용하여 투석시킨 다음, 효소 활성을 측정하였다.

[132]

[133] 표 4

[Table 4]

금속이온에 따른 재조합 CelEx-BR12 셀룰라아제 효소활성

Metallic ion	Relative activity (%)
None	100
Ca^{2+}	139
Co^{2+}	147
Cu^{2+}	137
Fe^{2+}	45
Hg^{2+}	0
Mg^{2+}	142
Mn^{2+}	143
Ni^{2+}	149
K^{+}	149
Rb^{+}	149
Zn^{2+}	177

[134]

[135] 그 결과, 대부분의 금속이온에서 상대적인 셀룰라아제의 활성이 130 내지 150% 정도 증가한 것을 확인하였으며, 아연이온(Zn^{2+})을 처리한 경우에는 최대 177% 셀룰라아제 활성이 증가한 것을 확인하였다. 하지만, 철이온(Fe^{2+}) 및 수은이온(Hg2+)에서는 오히려 셀룰라아제 활성이 감소하였다 (표 4).

[136]

산업상 이용가능성

[137] 본 발명에서 선별한 셀룰라아제 CelEx-BR12는 엑소셀룰라아제 활성 및 엔도셀룰라아제 활성을 가지고 있으므로, 섬유소계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에 이용될 수 있으며, 섬유, 세제, 사료, 식품, 펄프 및 종이 생산 등 다양한 산업 분야에 적용할 수 있다.

[138]

[139] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의

통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[140]

서열목록 Free Text

[141] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 2의 아미노산으로 표시되는 셀룰라아제.

[청구항 2] 제1항의 셀룰라아제를 코딩하는 유전자(*celEx-BR12*).

[청구항 3] 제2항에 있어서, 서열번호 1 또는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자(*celEx-BR12*).

[청구항 4] 제2항 또는 제3항의 셀룰라아제를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합 벡터.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 pET-CBR12인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

[청구항 6] 제2항의 셀룰라아제를 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 함유하는 재조합 벡터가 숙주미생물에 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 셀룰라아제 생산능을 가지는 재조합 미생물.

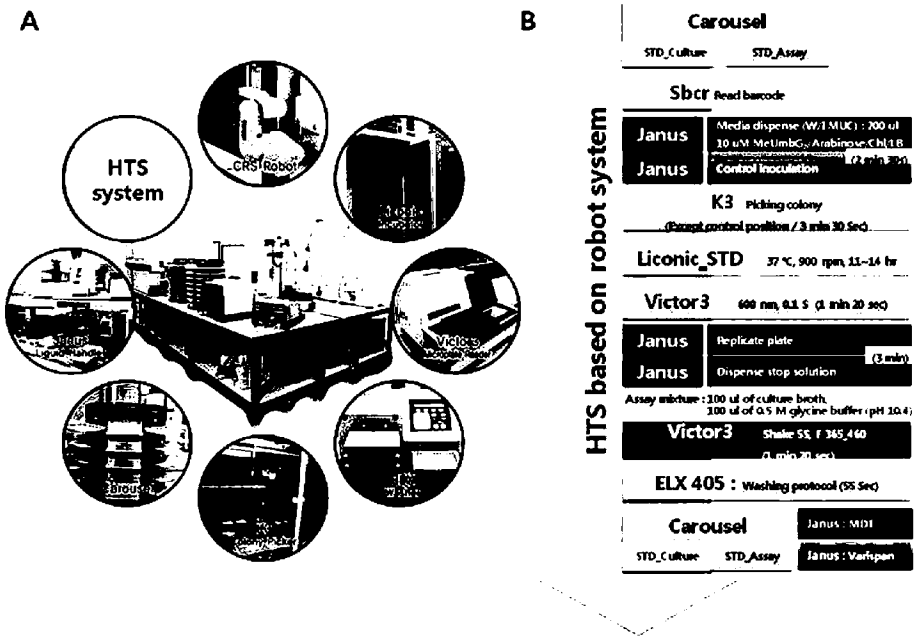
[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 숙주미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

[청구항 8] 다음의 단계를 포함하는 재조합 셀룰라아제의 제조방법;

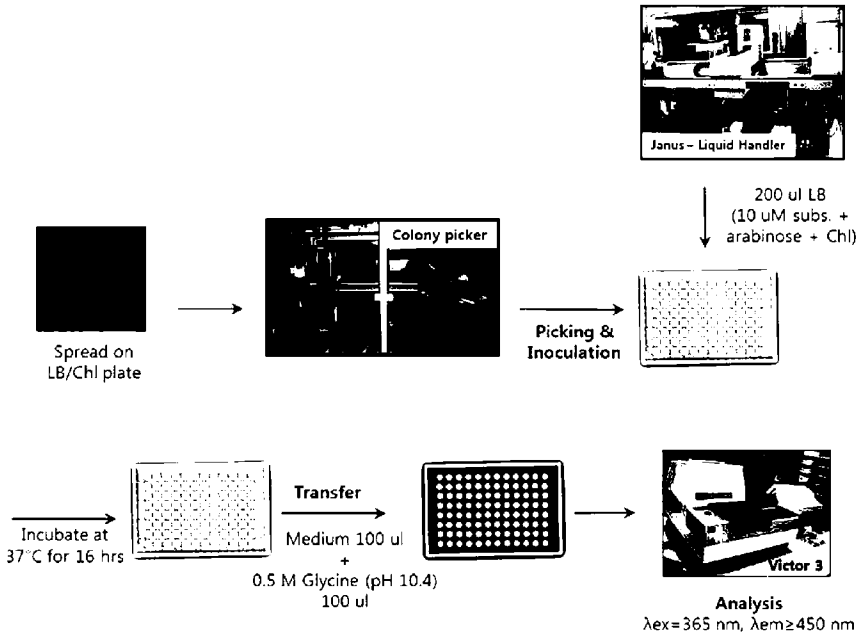
(a) 제6항의 재조합 셀룰라아제 생산능을 가지는 재조합 미생물을 배양하여 재조합 셀룰라아제를 생성하는 단계; 및

(b) 생성된 재조합 셀룰라아제를 회수하는 단계.

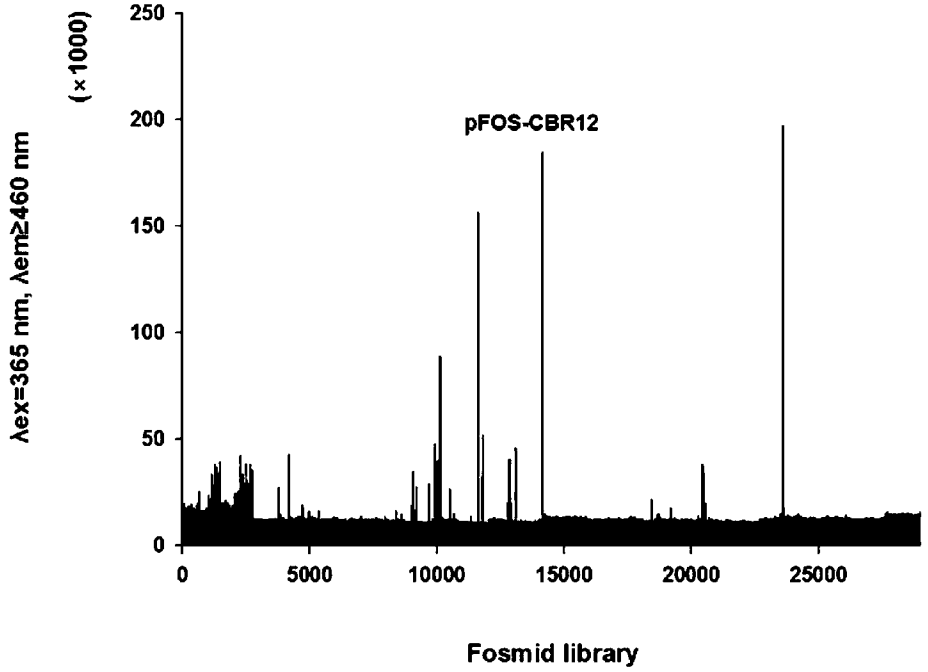
[Fig. 1]


A
B
HTS system
CRS Robot
Victor3
Carousel
STD_Culture
STD_Assay
Sbcr Read barcode
Janus
Janus
Control inoculation
K3 Picking colony
Liconic_STD
Victor3
Janus
Replicate plate
Janus
Dispense stop solution
Victor3
ELX 405 : Washing protocol (55 Sec)
Carousel
HTS based on robot system

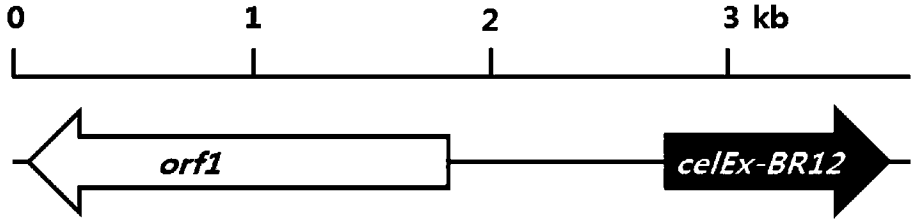
[Fig. 2]


Janus – Liquid Handler
200 ul LB
(10 uM subs. +
arabinose + Chl)
Colony picker
Spread on
LB/Chl plate
Picking &
Inoculation
Incubate at
37°C for 16 hrs
Transfer
Medium 100 ul
+
0.5 M Glycine (pH 10.4)
100 ul
Victor 3
Analysis
λex=365 nm, λem≥450 nm

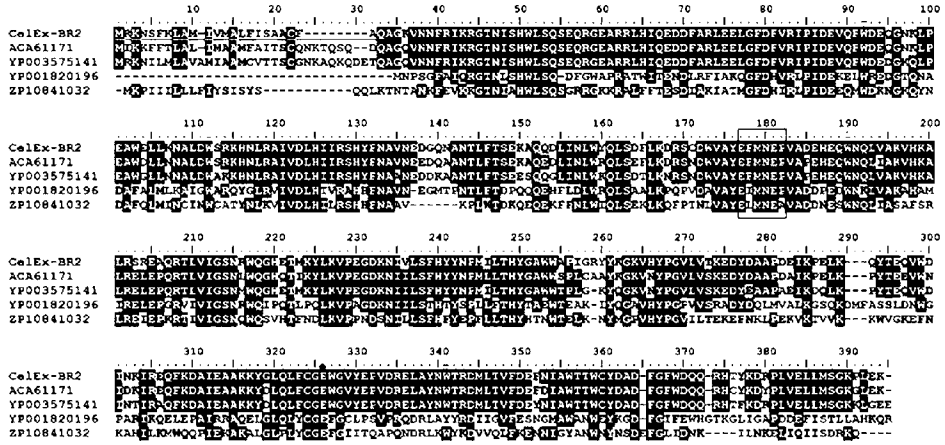
[Fig. 3]



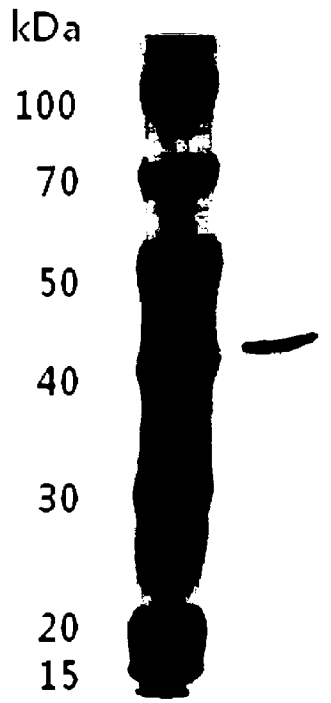
[Fig. 4]



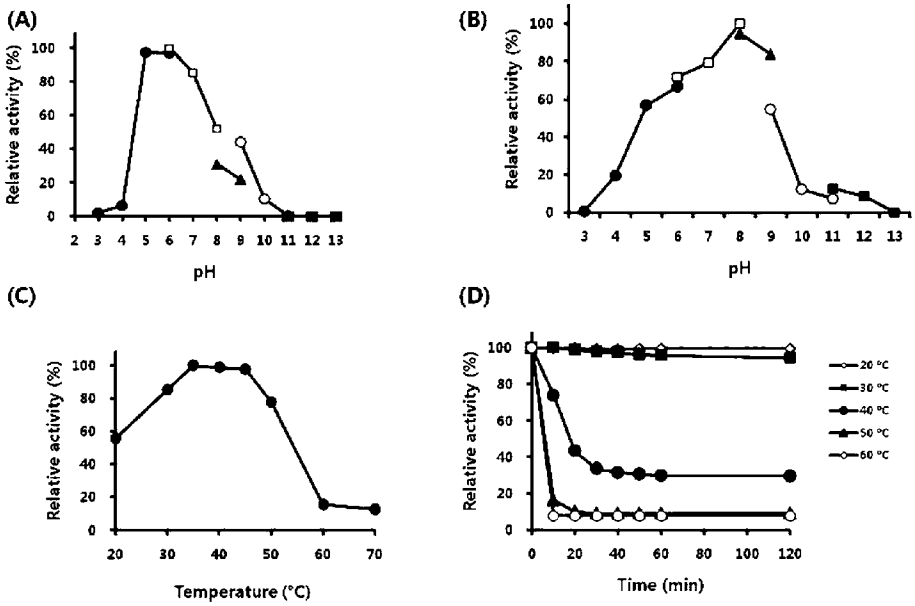
[Fig. 5]



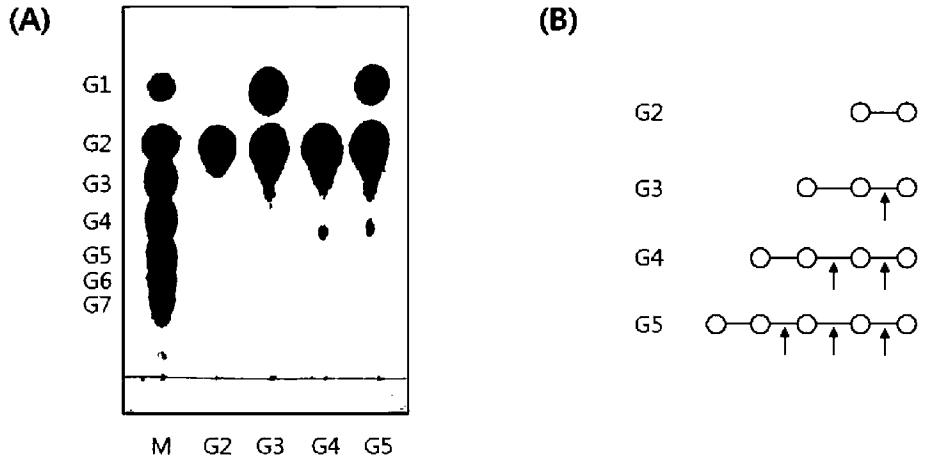
[Fig. 6]


kDa
100
70
50
40
30
20
15

[Fig. 7]


(A)
Relative activity (%)
pH
(B)
Relative activity (%)
pH
(C)
Relative activity (%)
Temperature (°C)
(D)
Relative activity (%)
Time (min)
20 °C
30 °C
40 °C
50 °C
60 °C

[Fig. 8]



G1 : glucose
G2 : cellobiose
G3 : cellotriose
G4 : cellotetraose
G5 : cellopentaose

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/002024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/42(2006.01)i, C12N 15/56(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/42; C12N 15/56; C12N 15/70; C12N 1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: metagenomic, cellulase, celEX-BR12, vector, recombination

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEL POZO, MERCEDES V. et al., "Microbial β-glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail", Biotechnology for Biofuels, 2012, vol. 5, no. 73, pp. 1-13 See abstract; page 5, right column and page 9, left column.	1-8
A	DUAN, C. -J. et al., "Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens", Journal of Applied Microbiology, 2009, vol. 107, vol. 1, pp. 245-256 See abstract and page 248.	1-8
A	DUAN, CHENG-JIE et al., "Mining metagenomes for novel cellulase genes", Biotechnology Letters, 2010, vol. 32, no. 12, pp. 1765-1775 See abstract and page 1773.	1-8
A	PANG, HAO et al., "Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase", Current Microbiology, 2009, vol. 58, no. 4, pp. 404-408 See abstract and pages 407-408.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 JUNE 2014 (10.06.2014)	**11 JUNE 2014 (11.06.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/002024

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FENG, YI et al., "Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases", Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, vol. 75, no. 2, pp. 319-328 See abstract and pages 325-327.	1-8
PX	NCBI, GenBank accession no. AGK74985.1 (06 May 2013) See the whole document.	1-8
PX	KO, KYONG-CHEOL et al.,"Strategy for screening metagenomic resources for excellulase activity using a robotic, high-throughput screening system", Journal of Microbiological Methods, Epub. 24 July 2013, vol. 94, no. 3, pp. 311-316 See page 313, left column.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/002024

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/002024

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/42(2006.01)i, C12N 15/56(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/42; C12N 15/56; C12N 15/70; C12N 1/21

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: metagenomic, cellulase, celEX-BR12, vector, recombination

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	DEL POZO, MERCEDES V. 외 14명, 'Microbial β-glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail', Biotechnology for Biofuels, 2012, Vol.5, No.73, pp.1-13 요약; 페이지 5, 오른쪽 칼럼 및 페이지 9, 왼쪽 칼럼 참조.	1-8
A	DUAN, C.-J. 외 8명, 'Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens', Journal of Applied Microbiology, 2009, Vol.107, Vo.1, pp.245-256 요약 및 페이지 248 참조.	1-8
A	DUAN, CHENG-JIE 외 1명, 'Mining metagenomes for novel cellulase genes', Biotechnology Letters, 2010, Vol.32, No.12, pp.1765-1775 요약 및 페이지 1773 참조.	1-8
A	PANG, HAO 외 5명, 'Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase', Current Microbiology, 2009, Vol.58, No.4, pp.404-408 요약 및 페이지 407-408 참조.	1-8

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 06월 10일 (10.06.2014)	2014년 06월 11일 (11.06.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/002024

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/002024

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	FENG, YI 외 9명, 'Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases', Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, Vol.75, No.2, pp.319-328 요약 및 페이지 325-327 참조.	1-8
PX	NCBI, GenBank accession no. AGK74985.1 (06 May 2013) See the whole document.	1-8
PX	KO, KYONG-CHEOL 외 4명, 'Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system', Journal of Microbiological Methods, Epub.2013.07.24., Vol.94, No.3, pp.311-316 페이지 313, 왼쪽 칼럼 참조.	1-8

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/002024

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음