



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 유래되며, pH 2.5 내지 4 이하의 산성조건에서 안정적이며, 온도 범위 0 내지 35℃ 이하에서 효소활성을 유지하며, 및 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 금속이온에서 적어도 150% 이상의 효소활성을 나타내는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 저온 활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제 단백질.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제 단백질.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

서열번호 1의 염기서열을 가지며, 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 청구항 6

제 5항의 유전자 핵산서열을 포함하는 벡터.

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

제 6항의 벡터를 도입하여 형질전환된 형질전환체.

### 청구항 9

- 1) 제 5항에 따른 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)의 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체를 카나마이신이 포함된 LB(Luria-Bertani)배지에서 배양하는 단계;
- 2) 상기 배양액에 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하여 단백질을 유도하는 단계;
- 3) 상기 세포를 침전시켜 분쇄한 후 얻어진 상등액을 금속친화성 레진을 가진 컬럼에 통과시켜 용출하는 단계 및
- 4) 상기 용출된 단백질을 히스티딘-태깅된 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계를 포함하는, 저온 활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제의 제조방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)으로부터 분리한 저온활성 및 내산성 베타(beta)-1,4-만난아제

(mannanase) 효소를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 형질전환체 및 이로부터 생산되는 상기 효소의 제조방법에 관한 것이다.

- <8> 베타(Beta)-1,4-D-만난아제(mannanase; EC 3.2.1.78)는 코프라(copra)의 내유, 상아야자의 견과, 구아검(guar gum), 로커스트빈검(locust bean gum), 커피 및 곤약(konjak)의 뿌리 등과 같은 식물체에 존재하는 베타-만난(beta-mannan)의 베타(beta)-1,4-mannosidic linkage를 가수분해하는 효소로 알려져 있다(McCleary, B. V., Methods Enzymol., 160: 596-610, 1998). 이러한 베타-1,4-D-만난아제는 베타-만난을 함유하는 난분해성 폴리사카라이드를 분해할 수 있기 때문에 양질의 펄프를 생산하는데 사용되어져 왔으며(Paice, M. G., et al., J. Wood Chem. Technol. 4: 187-198, 1984), 인스턴트 커피, 초콜릿 및 카카오 음료를 생산하는 공정 중 원료를 추출하는 단계에서 발생하는 점성을 제거하는데 유용하게 사용되어져 왔다(Belitz, H. D & Grosch, W., 1987 및 Francoise, M., et al., Appl. Environ. Microbiol., 62: 4656-4658, 1996). 또한, 최근에는 상기 효소에 의해 분해된 만노올리고사카라이드(mannooligosaccharide)가 장내정상 균총인 유산균(Bifidobacteria)의 증식에 유용한 에너지원임이 밝혀지게 되었다(Kobayasi, P. J., Biol. Rev., 28: 416-436, 1984).
- <9> 지금까지 식물(Shimahara et al., 1975), 박테리아(Araki, 1983; Akino, T., et al., Agric. Bio. Chem., 52: 773-779, 1988; Araujo and Ward, 1990; Takahashi, R., et al., Agric. Bio. Chem., 48: 2189-2195, 1984; Oda, Y., et al., J. Ferment. Bioeng., 76: 14-18, 1993), 곰팡이(Reese, E. T. & Shibata, Y., J. Microbiol., 11: 167-, 1965; Johnson, 1990; Stalbrand, H., et al., J. Biotechnol., 29: 229-242, 1993) 및 연체동물(Yamaura and Matsumoto, 1993; Yamaura, I., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60: 674-676, 1996; Charrier and Rouland, 2001; Xu, B., et al., Eur. J. Biochem., 269: 1753-1760, 2002; Oousuka et al., 2006)과 같은 균에서는 다양한 베타-1,4-D-만난아제 효소의 정제 및 특성이 밝혀졌으나, 그 외 다른 다세포 동물에서 상기 효소가 정제되거나 유전자 염기서열이 밝혀진 예는 아직까지 보고된 바가 없다. 또한, 종래에 알려진 베타-1,4-D-만난아제들은 대부분 중온 및 고온에서 높은 활성을 보이지만, 본 발명의 남극톡토기에서 분리된 베타-1,4-D-만난아제는 저온에서 높은 활성을 갖는 독특한 특징을 가지고 있다.
- <10> 남극 또는 북극과 같은 초저온 환경에 서식하는 많은 생물들은 이러한 극한 환경 조건에서 생존하기 위해서, 생체 대사과정에 관여하는 효소들을 저온에서 높은 활성을 갖도록 하게 한다(Margesin, R. & Schinner, F., 1999; Russel, 2000; Goodchild, A., et al., Mol. Microbiol., 53: 309-321, 2004). 특히, 본 발명에서 사용된 남극에 서식하는 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)는 주로 곰팡이, 조류 및 유기퇴적물을 섭취하면서(Broady, 1979) 초냉각(supercooling) 방법에 의해 영하 20~30℃의 초저온 환경에서 생존할 수 있는 특징을 가지고 있다고 보고되었다(Block, W., et al., Experientia, 34: 1166-1167, 1978).

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <11> 이에, 본 발명자들은 남극톡토기(*C. antarcticus*)로부터 연체동물을 제외한 다세포 동물에서 아직까지 존재한다고 보고된 바 없는, 베타-1,4-D-만난아제 유전자를 최초로 분리하여 클로닝한 후 대장균에서 발현시키고, 정제하며, 베타-1,4-D-만난아제의 효소활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <12> 본 발명의 목적은 저온에서도 활성을 유지할 수 있기 때문에 저온공정이 필요한 식품, 제지 및 발효 산업뿐 아니라 식품첨가물 및 사료첨가물로서 유용하게 이용될 수 있는, 남극톡토기의 베타-1,4-D-만난아제를 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 또다른 목적은 상기 남극톡토기의 베타-1,4-D-만난아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 및 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- <14> 또한, 본 발명은 상기 남극톡토기의 베타-1,4-D-만난아제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

- <15> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 유래되며, pH 2.5 내지 4 이하의 산성조건에서 안정적이며, 온도 범위 0 내지 35℃ 이하에서 효소활성을 유지하며, 및 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 금속이온에서 적어도 150% 이상의 효소활성을 나타내는 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제 단백질을 제공한다.
- <16> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 가지며, 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 저온활

성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

- <17> 또한, 본 발명은 상기 유전자의 핵산서열을 포함하는 벡터, 바람직하게는 pETCaMan 발현벡터를 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 도입하여 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- <19> 아울러, 본 발명은 1) 상기 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)의 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환체를 카나마이신이 포함된 LB(Luria-Bertani)배지에서 배양하는 단계; 2) 상기 배양액에 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하여 단백질을 유도하는 단계; 3) 상기 세포를 침전시켜 분쇄한 후 얻어진 상등액을 금속친화성 레진을 가진 컬럼에 통과시켜 용출하는 단계 및 4) 상기 용출된 단백질을 히스티딘-태깅된 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계를 포함하는, 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제의 제조방법을 제공한다.
- <20> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <21> 본 발명은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 신규한 저온활성 및 내산성 베타-1,4-D-만난아제(mannanase)를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- <22> 남극톡토기로부터 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 유전자를 분리하기 위하여, 남극에 서식하는 남극톡토기로부터 전체 RNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하였고, 이를 클로닝하여 약 2000여개의 클론들을 수득한 후 서열분석을 실시하였다. 그 결과, 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 유전자는 전체 1,248 bp의 전장서열(서열번호 3)을 가지며, 21개의 시그널 펩타이드를 포함하는 382개의 아미노산 서열(서열번호 2), 이를 코딩하는 1,149 bp의 개방해독틀(ORF, 서열번호 1), 및 3'-말단에 폴리아데닐레이션A(aataaa)를 포함하는 1218 bp의 폴리뉴클레오타이드로 구성됨을 확인할 수 있었다(도 1 참조). 이때, 상기 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 유전자 서열은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 서열의 일부가 변형된 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 코딩서열은 특별히 제한되는 것은 아니나, 연체동물, 박테리아, 곰팡이 및 식물 유래의 베타-1,4-D-만난아제 유전자 서열과 비교분석하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 아미노산 서열은 특별히 제한되는 것은 아니나, 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5에 속하는 균주 즉, *H. discus hannai*(HdMan), *B. glabrata*(BgMan), *M. edulis*(MeMan), *A. aculeatus*(AaMan), *A. bisporus*(AbMan), *L. esculentum*(LeMan), *H. jecorina*(HjMan), *T. fusca*(TfMan), *C. saccharolyticus*(CsMan) 및 *C. cellulovorans*(CcMan) 유래의 베타-1,4-D-만난아제 아미노산 서열과 비교분석하는 것이 바람직하다. 상동성 분석결과, 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제의 아미노산 서열은 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5에 속하는 균주의 베타-1,4-D-만난아제의 아미노산 서열과 각각 37.9, 37.2, 35.7, 13.8, 13, 12.6, 11.9, 9.8, 8.3 및 8%의 서열 상동성을 보였다(도 3 참조). 반면, 효소활성에 중요한 Glu181과 Glu312의 두 잔기(Koshland, P. J., Biol. Rev., 28: 416-436, 1953) 및 Gly41과 Gly76의 두 잔기(Lo Leggio, L. & Larsen, S., FEBS Letters, 523: 103-108, 2002)는 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5의 균주에서와 같이 모두 보존되었고, 이외에 9개의 잔기(Arg81, Asn180, Pro182, Phe276, His280, Tyr282, Pro307, Gly337 및 Trp341) 또한 보존됨을 확인할 수 있었다(도 2a 및 2b 참조). 이는, 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제가 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5에 속하는 효소임을 의미한다. 이와 함께, 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제는 계통발생학적으로 진핵생물내에 상기 효소가 주로 존재하는 그룹인 하위그룹 7 및 원핵생물내에 상기 효소가 주로 존재하는 그룹인 하위그룹 8에 속하지 않고, 연체동물 유래의 베타-1,4-D-만난아제와 같은 그룹(하위그룹 10)에 포함되어 있음을 확인하였는데(도 3 참조), 이는 *Mytilus edulis* 유래의 베타-1,4-D-만난아제가 기존의 보고와 달리 새로운 하위그룹 10에 존재한다는 보고와도 일치한다(Larsson, A. M., et al., J. Mol. Biol. 357: 1500-1510, 2006). 따라서, 도 3의 결과와 남극톡토기의 먹이습성(주로 박테리아 및 조류 등을 섭식; Broady, 1979) 등을 고려할 때, 상기 베타-1,4-D-만난아제는 남극톡토기에 존재하는 소화효소임을 확인할 수 있다. 또한, 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제는 표 1에서와 같이 연체동물인 *H. discus*, *B. glabrata* 및 *M. edulis*의 베타-1,4-D-만난아제에 비해 아스파라긴(Asn, 10.21%), 글루타민(Gln, 5.24%) 및 세린(Ser, 10.21%)의 함량이 높고, 알기닌(Arg, 1.05%) 및 알기닌/알기닌+라이신(0.14) 비율이 상대적으로 낮으며, 소수성 아미노산 함량(37.96) 및 지방족 지수 함량(69.45)이 낮고, 두 개의 알라닌(Ala)이 세린226 및 세린227으로 치환되어 있음을 확인하였다(도 2a 및 2b 참조). 이러한 아미노산 구성은 대부분의 저온활성 단백질이 갖는 특징으로서, 단백질의 구조적 유연성(structural flexibility)을 증가시켜 저온에서 활성을 유지하도록 해준다(Cieslinki, H., et al., Protein Expr. Purif., 39: 27-34, 2005; Asgeirsson, B., et al., Comp. Biochem. Physiol. Part B, 136: 45-60, 2003; Russel, N., Extremophiles, 4: 83-90, 2000). 따라서, 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제도 저온에서 높은 활성을 유지하기 위한 구조적 특징을 가지고 있음을 알 수 있다.

- <23> 또한, 본 발명은 상기 유전자의 핵산서열을 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- <24> 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제 유전자의 코딩서열을 포함하는 발현벡터를 제조하기 위하여, 상기에서 분리한 전장 유전자를 주형으로 cDNA를 증폭하였다. 이때, 사용된 프라이머는 각각 서열번호 4인 정방향 프라이머(5'-NNNNGGCATATGGTGAAATTATTCAGTTTC-3') 및 서열번호 5인 역방향 프라이머(5'-NNNNGGCTCGAGATTAATATTCAGTAAAC-3')를 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 발현벡터는 플라스미드, 코스미드 및 파지체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 T7 lac 프로모터를 가진 pET-24a(+) 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다. 도 4는 상기 발현벡터의 제작 과정 및 개열 지도를 나타낸 것이다. 또한, 상기 발현 벡터를 형질전환시킬 수 있는 숙주세포로는 대장균, 원핵생물, 곰팡이, 식물 및 동물세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 Roseetta(DE3) 대장균을 사용할 수 있다.
- <25> 아울러, 본 발명은
- <26> 1) 상기 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)의 저온활성 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질전환체를 카나마이신이 포함된 LB(Luria-Bertani)배지에서 배양하는 단계;
- <27> 2) 상기 배양액에 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하여 단백질을 유도하는 단계;
- <28> 3) 상기 세포를 침전시켜 분쇄한 후 얻어진 상등액을 금속친화성 레진을 가진 컬럼에 통과시켜 용출하는 단계 및
- <29> 4) 상기 용출된 단백질을 히스티딘-태깅된 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계를 포함하는, 저온활성 베타-1,4-D-만난아제의 제조방법을 제공한다.
- <30> 상기 제조방법에 의해 생산된 단백질은 0 내지 35℃ 이하의 온도, 바람직하게는 30℃에서 최적활성을 갖고, pH 2.5 내지 4 이하의 산성조건, 바람직하게는 pH 3.5에서 최적의 안정성을 보이며, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 금속이온에서 적어도 150% 이상, 바람직하게는 Ca<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 금속이온에 대해 각각 200% 이상의 효소활성을 보였다(표 3 참조). 이는, 본 발명의 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 (CaMan)가 종래에 보고된 베타-1,4-D-만난아제와는 상당히 다른 생화학적 특징을 가지고 있음을 의미한다. 즉, 상기 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제는 기존의 박테리아, 곰팡이, 식물 및 연체동물 유래의 베타-1,4-D-만난아제 [*Vibrio sp*에서는 40℃(Tamaru, Y., et al., Appl. Environ. Microbiol., 61: 4454-4458, 1995); *H. discus*에서는 45℃; *M. edulis*에서는 50℃에서 최적활성을 보임]에 비해 가장 낮은 온도에서 최적활성(30℃)을 보였으며, 20℃ 이하의 저온 특히, 0-5℃에서 약 40%의 높은 활성을 나타내었다(도 6a 참조). 또한, 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제가 pH 3.5에서 최적의 효소활성 및 산성조건에서 안정성을 갖는 특징은 대부분 중성 및 약산성에서 높은 활성을 보이는 기존의 베타-1,4-D-만난아제 즉, 박테리아는 대부분 pH 5.0-9.0(Akino, T., et al., Agric. Bio. Chem., 52: 773-779, 1988), 곰팡이는 pH 2.9-6.0(Gubitz et al., 1965; Reese, E. T. & Shibata, Y., J. Microbiol., 11: 167-, 1965) 및 연체동물은 pH 5.2-7.5에서 각각 효소활성을 나타낸 것과 구별된다. 또한, 상기 효소는 Ag<sup>+</sup> 및 Hg<sup>2+</sup>에 의해 효소활성이 현저하게 억제되었는데(표 3 참조), 이러한 특징은 대부분의 모든 베타-만난아제 효소(Akino, T., et al., Agric. Bio. Chem., 52: 773-779, 1988; Araki, 1983; Ootsuka, S., et al., J. Biotechnol., 125: 269-280, 2006; Yamamura, I., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60: 674-676, 1996)들과 일치한다. Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 이온에 의한 효소활성의 증가(Araki, 1983)는 *A. hydrophila* 및 *P. purprogenum* 유래의 효소 특징과 유사한 반면, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 이온에 의한 효소활성 증가는 기존에 보고된 효소 특징과는 구별된다.
- <31> 또한, 본 발명의 남극톡토기 유래의 저온활성 베타-1,4-D-만난아제 단백질은 저온공정이 필요한 식품, 제지 및 발효 산업뿐 아니라 식품첨가물 및 사료첨가물로 유용하게 사용될 수 있다. 이때, 상기 저온공정이 필요한 식품 및 발효 산업으로는 특별히 제한되는 것은 아니나, 열처리에 치명적이며 풍미를 유지해야 하는 과실추출 산업, 저온공정이 필요한 햄 및 소시지와 같은 발효육제품, 발효생식제품, 김치 및 발효주 산업을 포함할 수 있다. 또한, 상기 단백질을 식품첨가물로 사용할 경우 첨가되는 양은 특별히 제한되는 것은 아니며, 그 용도에 따라 다르게 이용될 수 있다. 또한, 사료첨가물로 사용할 경우, 상기 단백질을 직접 사료에 첨가하거나 또는 적당한 부형제와 혼합한 후 동결건조를 통해 고형화(또는 분말화)하여 이를 사료에 첨가하여 섭취시키는 것이 바람직하다. 상기 부형제로는 예를 들면, 옥수수분말, 대두분말 및 대두박 등을 포함할 수 있다. 사료첨가물

로 사용할 경우, 상기 단백질은 특별히 제한되는 것은 아니나, 사료조성물 당 0.05중량% 이상 첨가되는 것이 바람직하다 (<http://www.chemgen.com/hemicell-d.shtml>; <http://www.chemgen.com/docs/beta-mannanase.pdf>).

<32> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<33> <실시예 1> 남극톡토기(*C. antarcticus*) 유래의 베타-1,4-D-만난아제 유전자 분리 및 아미노산 서열분석

<34> <1-1> 시료 준비 및 전체 RNA 분리

<35> 사우스 셰틀랜드 아이슬랜드(South Shetland Island)에 위치한 남극세종과학기지 주변의 이끼로부터 남극톡토기(*C. antarcticus*)를 수집한 후, 곧바로 99.9% 알코올에 첨가하여 -70℃에서 보관하였다. 급속동결된 상기 남극톡토기로부터 전체 RNA를 분리하기 위하여, 알코올을 완전히 제거한 후 트리졸(Trizol) 용액(Invitrogen, 미국)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA는 1% 포름알데하이드 아가로스 겔에서 그 순도를 확인한 후, ND-1000 분광분석기(Nanodrop, 미국)를 이용하여 그 양을 측정하였다.

<36> <1-2> cDNA 라이브러리 제작 및 베타-1,4-D-만난아제 클론 유전자 분석

<37> Creator SMART cDNA 라이브러리 키트(Clontech, 미국)를 이용하여 상기 RNA로부터 cDNA 라이브러리를 합성하였다. cDNA를 합성한 후 양쪽 말단에 어댑터 DNA를 연결하였고, 이를 *Sfi*I 제한효소(Promega, 미국)로 절단하여 pDNR-LIB 벡터에 연결한 후 DH5 $\alpha$  균주에 형질전환하였다. 이로부터 약 2000여개의 발현 유전자가 클로닝된 클론을 얻었고, Big dye terminator 키트(PE Applied Biosystems) 및 자동서열분석기(ABI3100)를 이용하여 상기 클론들의 서열을 분석하였다. 분석된 염기서열들은 NCBI 데이터베이스, Pfam 데이터베이스 및 ExPASy 프로테오믹스 데이터베이스를 각각 이용하여 다른 베타-1,4-D-만난아제 유전자의 서열과 비교분석하였다. 상기 약 2000여개 클론들의 염기서열을 분석한 결과, 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제 유전자는 전체 1,248 bp의 전장서열(서열번호 3)을 가지며, 21개의 시그널 펩타이드를 포함하는 382개의 아미노산 서열(서열번호 2), 이를 코딩하는 1,149 bp의 개방해독틀(ORF, 서열번호 1), 및 3'-말단에 폴리아데닐레이션A(aataaa)를 포함하는 1218 bp의 폴리뉴클레오티드로 구성됨을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

<38> <1-3> 상동성 분석 및 계통수(Phylogenetic tree) 분석

<39> 상기 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제의 아미노산 서열은 *H. discus hannai*(HdMan), *B. glabrata*(BgMan), *M. edulis*(MeMan), *A. aculeatus*(AaMan), *A. bisporus*(AbMan), *L. esculentum*(LeMan), *H. jecorina*(HjMan), *T. fusca*(TfMan), *C. saccharolyticus*(CsMan) 및 *C. cellulovorans*(CcMan) 유래의 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5 효소(하위그룹 10, 하위그룹 7 및 하위그룹 8)의 아미노산 서열과 상동성을 비교하였고, 그 결과 도 2에서와 같이 상기 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제는 상기 균주의 아미노산 서열과 각각 37.9, 37.2, 35.7, 13.8, 13, 12.6, 11.9, 9.8, 8.3 및 8%의 상동성이 있음을 확인하였다. 반면, 효소활성에 중요한 Glu181과 Glu312의 두 잔기 및 Gly41과 Gly76의 두 잔기는 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5 효소와 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제에 모두에서 보존되어 있었고, 이 외에도 9개의 잔기(Arg81, Asn180, Pro182, Phe276, His280, Tyr282, Pro307, Gly337 및 Trp341)가 모두 보존됨을 확인할 수 있었다(도 2a 및 2b). 이는, 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제가 글리코실 하이드롤라아제 그룹 5에 속하는 효소임을 의미한다.

<40> 지금까지 베타-1,4-D-만난아제 효소는 계통발생학적으로 진핵생물내에 상기 효소가 주로 존재하는 그룹인 하위 그룹(subfamily) 7 및 원핵생물내에 상기 효소가 주로 존재하는 그룹인 하위그룹 8로 구분되어 왔다(Hilge, M., et al., Structure, 6: 1433-1444, 1998). 이에, 본 발명자들은 남극톡토기에서 분리된 베타-1,4-D-만난아제가 상기 그룹에 포함되는지 혹은 다른 독립된 그룹으로 이루어져 있는지 계통수 분석을 수행하였고, 그 결과 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제는 연체동물 유래의 베타-1,4-D-만난아제와 같은 그룹(하위그룹 10)을 이룬 반면, 박테리아(하위그룹 8)와 곰팡이 및 식물(하위그룹 7)과는 다른 그룹으로 존재하고 있음을 확인하였다(도 3).

<41> <1-4> 아미노산 조성분석

<42> 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제가 저온활성 단백질의 특징이 있는지 확인하기 위하여 아미노산 조성을 분석하였고, 그 결과 표 1에서와 같이 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제는 연체동물 유래의 베타-1,4-D-만난아제보다 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln) 및 세린(Ser)의 양은 높은 반면, 알기닌(Arg) 및 알기닌/(알기닌+라이신) 비율이 상대적으로 낮았고, 소수성 아미노산 함량 및 지방족 지수(aliphatic index) 함량이 낮음을 확인하였다(표 1). 또한, 두 개의 알라닌(Ala) 잔기가 세린(세린226 및 세린227) 잔기로 치환되어 있었다(표 1). 이는, 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제가 저온에서도 높은 활성을 가질 수 있음을 시사한다.

<43> [표 1] 아미노산 조성 비교

Amino acid	<i>C. antarcticus</i>	<i>H. discus</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>M. edulis</i>
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
Ala	27 ( 7.07 %)	34 ( 9.02 %)	23 ( 6.22 %)	28 ( 7.63 %)
Cys	4 ( 1.05 %)	5 ( 1.33 %)	4 ( 1.08 %)	3 ( 0.82 %)
Asp	17 ( 4.45 %)	23 ( 6.10 %)	31 ( 8.38 %)	16 ( 4.36 %)
Glu	9 ( 2.36 %)	10 ( 2.65 %)	6 ( 1.62 %)	17 ( 4.63 %)
Phe	22 ( 5.76 %)	15 ( 3.98 %)	19 ( 5.14 %)	18 ( 4.90 %)
Gly	40 (10.47 %)	41 (10.88 %)	40 (10.81 %)	37 (10.08 %)
His	6 ( 1.57 %)	16 ( 4.24 %)	12 ( 3.24 %)	19 ( 5.18 %)
Ile	13 ( 3.40 %)	20 ( 5.31 %)	21 ( 5.68 %)	14 ( 3.81 %)
Lys	25 ( 6.54 %)	22 ( 5.84 %)	18 ( 4.86 %)	17 ( 4.63 %)
Leu	31 ( 8.12 %)	31 ( 8.22 %)	29 ( 7.84 %)	28 ( 7.63 %)
Met	7 ( 1.83 %)	13 ( 3.45 %)	6 ( 1.62 %)	11 ( 3.00 %)
Asn	39 (10.21 %)	23 ( 6.10 %)	30 ( 8.11 %)	25 ( 6.81 %)
Pro	10 ( 2.62 %)	9 ( 2.39 %)	11 ( 2.97 %)	8 ( 2.18 %)
Gln	20 ( 5.24 %)	15 ( 3.98 %)	19 ( 5.14 %)	17 ( 4.63 %)
Arg	4 ( 1.05 %)	8 ( 2.12 %)	11 ( 2.97 %)	13 ( 3.54 %)
Ser	39 (10.21 %)	22 ( 5.84 %)	21 ( 5.68 %)	34 ( 9.26 %)
Thr	16 ( 4.19 %)	18 ( 4.77 %)	17 ( 4.59 %)	20 ( 5.45 %)
Val	23 ( 6.02 %)	25 ( 6.63 %)	20 ( 5.41 %)	17 ( 4.63 %)
Trp	12 ( 3.14 %)	12 ( 3.18 %)	14 ( 3.78 %)	12 ( 3.27 %)
Tyr	18 ( 4.71 %)	15 ( 3.98 %)	18 ( 4.86 %)	13 ( 3.54 %)
Total no. of amino acids	382	377	370	367
Molecular weight (kDa)	41.99	41.45	41.61	40.96
Isoelectric point	5.99	6.04	5.97	6.07
% charged <sup>a</sup>	15.97	20.96	21.08	22.34
% acidic <sup>b</sup>	6.81	8.75	10	8.99
% basic <sup>c</sup>	7.59	7.95	7.84	8.74
Arg/(Arg+Lys)	0.14	0.27	0.38	0.43
% hydrophobic <sup>d</sup>	37.96	42.18	38.65	37.06
% aromatic	15.18	15.39	17.03	16.89
(Ile+Leu)/(Ile+Leu+Val)	0.66	0.67	0.71	0.71
GRAVY <sup>e</sup>	-0.352	-0.158	-0.413	-0.476
Aliphatic index <sup>f</sup>	69.45	81.01	74.59	65.69

<44>

<45> <실시예 2> 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 유전자의 클로닝, 발현 및 정제

<46> 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위하여, 서열번호 4인 정방향 프라이머(5'-NNNNGGCATATGGTGAAATTATTCAGTTTC-3') 및 서열번호 5인 역방향 프라이머(5'-NNNNGGCTCGAGATTAATATTCAGTAAAC-3')를 이용하여 증폭하였다. 이때, 상기 정방향 및 역방향 프라이머의 밑줄친 부분은 각각 *Nde* I 및 *Xho* I 제한효소를 가리키며, PCR 산물을 *Nde* I 및 *Xho* I으로 절단한 후 *Nde* I/*Xho* I으로 절단된 pET-24a(+) 벡터(Novagen, 미국)에 클로닝하기 위하여 설계되었다(도 4). 그 결과, 최종 발현벡터인 pETCaMan를 제조하였으며, 상기 벡터의 서열분석 및 발현을 위해서 숙주세포인 Rosetta(DE3) 대장균에 형질전환하여 형질전환체를 제조하였다. 상기 유전자의 발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 첨가한 후 18℃에서 24시간 동안 배양함으로써 유도하였다. 상기 세포를 4℃에서 20분간 6,000g에서 원심분리하여 수득한 후 500mM 염화나트륨 및 5 mM 이미다졸 (Sigma, 미국)이 첨가된 20 mM 트리스-HCl 완충용액(pH 7.9)에서 재현탁하

였다. 초음파를 이용하여 상기 세포를 분쇄하였고, 4℃에서 20분간 17,000g에서 원심분리하여 얻은 상등액을 금속친화성 레진(Ni-NTA His-Bind Resin, Novagen, 미국)을 가진 컬럼에 통과시킨 후 60 mM 이미다졸이 첨가된 500mM 염화나트륨을 포함하는 20 mM 트리스-HCl 완충용액(pH 7.9)으로 세척하였고, 1M 이미다졸이 첨가된 상기 완충용액으로 베타-1,4-D-만난아제를 용출하였다. 상기 분획물은 10% 글리세롤이 첨가된 50 mM 소듐아세테이트(pH 6.0)완충용액으로 바꿔주었다. 단백질 농도는 브래드포드(Bradford, M. M., Ana. Biochem., 72: 248-254, 1976) 방법으로 측정하였고, 히스티딘-태깅된 affinity 크로마토그래피를 이용하여 정제된 상기 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하여 그 순도를 확인하였다. 그 결과, 도 5에서와 같이 상기에서 분리된 효소(CaMan)는 약 42 kDa의 크기임을 확인하였고(도 5), 단백질 회수율은 약 20.25 %임을 확인할 수 있었다(표 2).

<47> [표 2] 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 효소 정제

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
Crude extract	115.28	293.14	2.54	100
His-tagged affinity chromatography	2.07	60.15	29.06	20.52

<48>

<49> <실시예 3> 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 효소의 생화학적 특징 분석

<50> 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제(CaMan) 효소의 활성을 조사하기 위하여, 상기 효소(0.5 U/ml) 및 0.5%(w/v)의 로커스트빈검(Locust Bean Gum: LBG)을 50 mM의 소듐시트레이트 완충용액(pH 3.5)에서 혼합한 후 30℃에서 30분간 배양하여 상기 효소분해에 의해 유리되는 로커스트빈검의 환원당량을 측정하였다. 상기 환원당량은 디니트로살리실릭산(Dinitrosalicylic acid: DNS) 방법(Stalbrand, H., et al., J. Biotechnol., 29: 229-242, 1993)을 이용하여 측정하였고, 베타-1,4-D-만난아제 효소활성의 1단위는 분(min) 당 만노오스 및 등가의 1μ mole의 환원당을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

<51> 표 2에서와 같이, 분리된 남극톡토기 베타-1,4-D-만난아제(CaMan)의 특이적 활성은 29.06 U/mg<sup>-1</sup> 이었다(표 2). 또한, 상기 효소는 30℃에서 최적 활성을 보였으며, 0 내지 5℃에서도 38-42%의 효소활성을 유지하고 있었다(도 6a). 또한, 상기 효소의 최적 pH는 3.5로서 산성 pH 조건에서는 안정적이었으나, 중성 및 염기성 pH에서는 효소활성이 거의 나타나지 않고 불안정하였다(도 6b). 또한, 금속이온에 대한 상기 효소의 활성변화를 측정한 결과, 표 3에서와 같이 무처리군에 비해 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>를 처리한 군에서는 효소활성이 증가된 반면, Ag<sup>+</sup> 및 Hg<sup>2+</sup>를 처리한 군에서는 효소활성이 현저하게 억제됨을 확인하였다(표 3). 특히, Ca<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>에 의해서는 효소활성이 2배 이상 증가하였다(표 3)

<52> [표 3] 베타-1,4-D-만난아제의 활성에 대한 금속이온의 효능

Metal ion	Residual activity <sup>a</sup> (%)
None	100
Na <sup>+</sup>	131.4
K <sup>+</sup>	145.8
Ca <sup>2+</sup>	237.4
Mg <sup>2+</sup>	180
Cu <sup>2+</sup>	155
Zn <sup>2+</sup>	227.9
Ag <sup>+</sup>	18
Hg <sup>2+</sup>	25

<53>

<54> 이와 같은 남극특토기 베타-1,4-D-만난아제(CaMan)의 생화학적 특징은 기존에 알려진 다른 만난아제와 현저한 차이를 보였다(표 4). 즉, 상기 효소가 저온의 산성조건에서 높은 효소활성을 보인 반면, 박테리아, 균류 및 연체동물 유래의 만난아제는 모두 40℃ 이상의 중온 또는 고온에서 최고 활성을 보였으며, pH 조건이 중성, 약한 산성, 또는 염기성에서 높은 활성을 보였다(예외: *Sclerotium rofsii*, 산성에서 활성 보임).

<55> [표 4] 베타-1,4-D-만난아제의 생화학적 특징 비교

Phylum	Species	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Specific activity (U/mg)	References
Arthropoda	<i>Cryptopygus antarcticus</i>	3.5	30	29.1	this study
Mollusca	<i>Mytilus edulis</i>	5.2	50	45.6	B. Xu et al., 2002
	<i>Haliotis discus</i>	7.5	42	11.48	S. Ootsuka et al., 2006
	<i>Littorina brevicula</i>	6.5	50	n.a	I. Yamamura et al., 1996
Fungi	<i>Sclerotium rofsii</i>	2.9 (41 kDa)	72	380	GM. Gubitz et al., 1996
		3.3 (61 kDa)	74	475	
	<i>Penicillium wortmanni</i>	6	60	n.a	E.T. Reese and Y. Shibata, 1965
Bacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	5.5	40	201	T. Araki, 1983
	<i>Vibrio sp.</i>	6.5	40	51.9	Y. Tamaru et al., 1995
	<i>Bacillus sp.</i>	9 (I and II)	60	470	T. Akino et al., 1988
		8.5 (III)	65		

<56>

발명의 효과

<57> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의해 최초로 분리된 남극톡토기 유래의 베타-1,4-D-만난아제 효소는 저온에서 그 활성을 유지할 수 있으며, 산성조건에서도 활성이 높기 때문에 저온공정이 필요한 식품, 제지 및 발효 산업뿐 아니라 식품첨가물 및 사료첨가물로서 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- <1> 도 1은 남극톡토기(*C. antarcticus*)으로부터 분리한 베타-1,4-D-만난아제의 코딩 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면으로, 단일선은 예측된 시그널 펩타이드를, \* 표시는 종결코돈을, 이중선은 예측된 폴리아닐레이션 부위를 각각 가리킨다.
- <2> 도 2a 및 2b는 남극톡토기(CaMan으로 표시함)로부터 분리한 베타-1,4-D-만난아제의 아미노산 서열과 다른 종의 베타-1,4-D-만난아제의 아미노산 서열의 상동성 분석을 나타낸 도면으로, 음영부위는 각 효소 사이의 보전된 잔기를, \* 표시는 효소 활성에 중요한 촉매활성 잔기를 각각 가리킨다.
- <3> 도 3은 남극톡토기로부터 분리한 베타-1,4-D-만난아제(CaMan)의 계통수 (phylogenetic tree)를 나타낸 도면이다.
- <4> 도 4는 베타-1,4-D-만난아제 효소를 생산하기 위한 재조합 발현벡터 (pETCaMan)의 제조 과정 및 개열 지도를 나타낸 도면이다.
- <5> 도 5는 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 Rosetta(DE3) 균주에서 발현된 베타-1,4-D-만난아제를 SDS-PAGE로 분석한 사진이다.
- <6> 도 6은 온도(a) 및 pH(b)에 따른 본 발명의 베타-1,4-D-만난아제 효소의 활성 변화를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1

I teataatcatttatctgtaattttactogattatagaa  
39 ATCGTGAAATTATTCAGTTTCITGCTCCTCGTTTGGGTCCCAAGTCCAGCATTTCCTCA  
I N V K L F S F L L L V W V A S P A F S S  
99 GAATTTTTGAAGBCTAGCGGTTCCAACITTTACTATGGAGGACAAAAGGTGTTGCTTTCT  
21 E F L K A S G S N F Y Y G G Q K V F L S  
159 GGGGTCAACTTTGCGTGGAGAAGTTACGGCTCTCACTTTGGCAATGGTGAATATGCATCT  
41 G V N F A W R S Y G S D F G N G Q Y A S  
219 AACGGCCCGCGTTAAAGGATTGGATAAACAACTCAAGGCCAGTGGTGGAAATACTGCA  
61 N G P A L K D W I N K V K A S G G N T A  
279 CGAGTTTGGGTTTCATGTTGAGGGTCAGGTAAGTCCTGCTTTTGATTCTCATGGATTGTA  
81 R V W V H V F G C V S P A F D S H G F V  
339 ACCTCAACGGATTCTAAAAAACTCTAATAAATCACCTCTCGGATCTATTGGACTATGCA  
101 T S T D S K K T L I N D L S D L L D Y A  
399 AATGGGCAAACGTCITCCTTATTTTGGTCTCTTTAATGGAGCACTACAAAATAATTCA  
121 N G Q N V F L I L V L F N G A L U N N S  
459 AATGTCGAGAATTTGTTTTGGGATCAGAGTAACTCAACTGTTATATTAACAATGGCCTC  
141 N V Q N L F W D E S K L N S Y I N N A L  
519 ACACCCATGGTCAAGGCATTAATAAATCCAAACCAAGTTTGGCAGCCTGGGAAGTGTAAAT  
161 T P M V K A L K S K P S L A A W E V L N  
579 GAACCCAGAAGGAACCCCTCAACCTCCATCAGATCAAAATTCCTGTTACGACACATCAACC  
181 E F E G T L Q P G S D Q N S C Y D T S T  
539 CTCGCAGCCCAAGBAGCAGGGTGGGCTGGAAAAAATTCGGATGAAACAGATTTTGAA  
201 L A A Q G A G W C G K K F P M K Q I L K  
599 ACTATAAATTGGATATGTTCACTATCCACAATCGTGATTGAAAAGCGGTTGTGAGTGT  
221 T I N W I S S A I H N G D S K A L V T Y  
759 GGTTCATGGAGTGAATTGACBAAAAGTGAATTTTTTGGATACCGAAATCATTACAAAGAC  
241 G S W S E L T Q T D F F G Y R N H Y K D  
819 TCTTGTCTCACTGGGGCTGGBBGAAAGTCCAATCGGATTATTAATTTTATCAGATGCAC  
261 S C L T G A G G K S N G I I N F Y Q M H  
879 ACTTATTCCTCACTTTGGAAAATGGAACCAAAATCCTCCATTAAGGTTAACAGATGGGCT  
281 T Y S H F G K W N Q N A P F K V N R W A  
939 TACAATGTTAATGACAAACCTCTTTTTATTCCACAATTTGCATCAGTCTGTTACAGAAC  
301 Y N V N D K P L F I G E F A S V G S Q N  
999 GAAGGCATCCAAAATCTTTACAAATACGCTTACAACAATGGGTACAACGGTGCATTGACC  
321 F G I Q N I Y K Y A Y N N G Y N G A I T  
1059 TGGCAATTTAATAGCGGAGGGBACTETTCGACACATATTCAAATCAAATGTATGGAATG  
341 W Q F N S G G D C S D T Y S N Q M Y G M  
1119 CAAGCCCTCAAAGBACAGAATGACCAAGTGGTGGCAAAGGGGAATGGTTTCAGTGAAT  
361 Q A L K G O N D G S G G K G G M V S V N  
1179 ATTAATTGAaaaaagtttcaataaaactaattggotaatg 1213  
381 I N \*

도면2a

CalMan	22	-----FLIK	ASGSNFYYG	-GQKVFLSGV	NFAWRSYGSQ	FGNGQYASNG	P---ALKDWI	NKVKASGGNT	ARVMVHVEGQ	89	
HdMan	19	-----RLS	VQGNHFVKQ	-GQKVFLSGA	NLAHWQYAYD	FGNNHYKGRV	QG--LLEGYI	RDLSKAGGNS	MRVVTHMEGA	88	
BglMan	21	-----RLA	VSGNQFTYN	-GGRIFLSGG	NLPWIQYAYD	FGDHQWDSRK	---GTFENQL	TQLKNAGGNS	IRLHWHTQGE	88	
WclMan	18	-----RLS	VSGTNLNYN	-GHIFLCSGA	NQAWVNYARD	FGHNQYSKGG	---STFESTL	SDTQSHGGNS	VRVWLHTEGE	85	
AalMan	27	AATAFPST	S-GLHFTID	-GKTCYFAGT	NSYHWIGFL	-----	TNDDVDLVM	SQLAASDLKI	LRVWGF-NDV	89	
AbMan	82	PVSTGFVKA	S-GTRFTLN	-GQKYTVVGG	NSYHWIGLG	-----	LSTSAMNQAF	SDIANAGGTTI	VRTWGF----	142	
LelMan	32	-----FVYT	D-GTTFALN	-GKSLYINGF	NAYWLMYIA	-----YDPSTR	---IKVTNIF	QQASKYGMNV	ARTWAFSHGG	94	
HjMan	31	-----FVTI	S-GTGFNID	-GKVGCFAGT	NCYWCSFL	-----	TNHADVSTF	SHISSSGLKV	VRVWGF-NDV	88	
TfMan	37	-----	-GRLYEAN	-GQEFIRGV	SHPHWY	-----	-PQHTQ-AF	ADIKSHGANI	VRVWLSNGVR	86	
CslMan	36	-----VGAATS	NDG-VVKIDT	STLI----GT	NHAWHWY	-----	--RDRLDLAL	RGIRSHGMNS	VRVWLSNGYR	91	
CclMan	462	TPTPTSTPTP	SGGPNLSVNT	QGLV---GI	NPHAWY	-----	--RDRLSSSL	QGIRSHGANA	VRTVLSNGCR	522	
CalMan	90	-----	-----VSPA	FDSHGCVTS	TDSKKTLLND	LSQLLDYANG	QWFLTLVLF	NGALQNN-SN	--VQ-----	143	
HdMan	89	N-----	-----TPE	FDSSGHVIG	MDKGGTMLAD	LKSHLNYYAAS	HNMLIFLCLW	NGAVNQG-SH	AHLD-----	144	
BglMan	89	-----	-----STPA	FDGNGYVT-A	PDHQGTLLND	FKMLDIAQR	HNILVFPTLW	NAAVDQNSH	-RLD-----	144	
WclMan	86	-----	-----STRE	FDNNGYVT-G	IDN--TLISD	WRAYLHAQR	HNILIFFTLW	NGAVKQS--T	HYRLN-----	139	
AalMan	90	NTKPTDGTVM	YQLHANGTST	IN-----	--TGADGLQR	LDYVYVTSAEK	YGVKLTINFLV	NEWTDYGGMG	AYVTAYGAA-	158	
AbMan	143	NEVTSPNGNY	YQSWSGARPT	IN-----	--TGASGLLN	FDNVI AAKA	NGIRLIVALT	NNWADYGGND	VYVNGMVGNG	212	
LelMan	95	SRPLQSA---	-----PCV	YN-----	---EQMFGQ	LDYVISEAKK	YGIHLTMSLV	NNWDAFGGKK	QYVEW---AV	149	
HjMan	89	NTQPSPGQIW	FQKLSATGST	IN-----	--TGADGLQT	LDYVYVQSAEQ	HNILKLTIPFV	NNWSDYGGIN	AYVNAFGG--	156	
TfMan	87	WS-----	-----	-----	---KINGPSD	VANVTSLCK-	QNRLLCMLEV	HDITTYGEGS	GASTLDQAV-	132	
CslMan	92	WT-----	-----	-----	---KIPASE	VANVTSLSRS	LGFKATILEV	HDITTYGEDG	AACSLAQAV-	138	
CclMan	523	WT-----	-----	-----	---KIPASE	VADITSQART	LGYRAWLLEV	HDITTYGEDA	AACSMITAV-	569	
*											
CalMan	144	-----	NLFWDESKLN	SYIN-NALTP	WVKA-----	--LKSQPSLA	AMEVLNEPEG	TLQPG-SQGN	SCYDTSILAA	203	
HdMan	145	-----	GLIRDINKLQ	SYIN-KALIP	WVKG-----	--LAGLPGLG	GHEVINEPEG	VLMFDVNTSD	PCFDITHLKN	205	
BglMan	145	-----	GFIVDWRKLQ	SYID-KALVP	LASA-----	--VRGHPALG	AMDIMNEPEG	MINTDISNMD	RCYDSTALKN	205	
WclMan	140	-----	GLMVDTRKLQ	SYID-HALKP	MANA-----	--LKNEKALG	GNDIMNEPEG	EIKPGESSE	PCFDTRHLSG	200	
AalMan	159	-----	AQTD	FYTNTAIQAA	-YKN--YIKA	VVSR-----	--YSSAAIF	AMELGNEPR-	CQGCDS---	207	
AbMan	213	Q-----	PHDL	FYTNTAIRDA	-FKS--YVRT	FVSR-----	--YANEPTVM	AMELGNEPR-	CKGSTGTTSG	265	
LelMan	150	QRGQKLTSD	DIFFNPMWKG	FY--KNWVY	VLTRVNTITK	VAYKDDPTIL	SHELINEPR-	----CPSD--	-----	210	
HjMan	157	-----	NATT	WYTNTAAQTQ	-YRK--YVQA	VVSR-----	--YANSTAF	AMELGNEPR-	CNGCSTD---	205	
TfMan	133	-----	-----	-----	---DYWIE	LKSVLQ----	---GEEDYV	LINIGNEPYG	NDSATVAAWA	TDT-----	172
CslMan	139	-----	-----	-----	---EYWKE	IKSVLD----	---GNEDFV	IINIGNEPYG	NN--NYQNWV	NDT-----	176
CclMan	570	-----	-----	-----	---NYWIE	LKNMLA----	---GQENFV	IVNIGNEPYG	NN--NYQNWV	TDT-----	607

도면2b

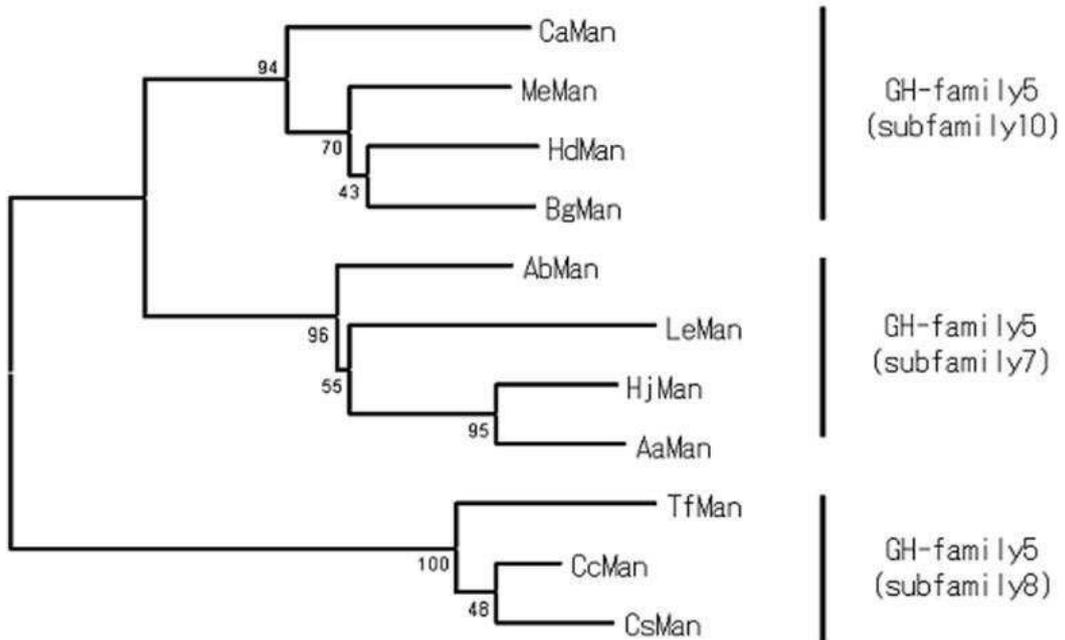
CalMan	204	QGAGWGGRKF	PMKQILKKTIN	WISSATHNGD	SKALVTVGS	---WSEL---	-----TQT	DFFGYRNH--	YKDSCLTGAG	267
HolMan	206	SGAGWAGKLY	KYDDFLRFIN	WQAAATKSAD	AHTLVTVGS	---WNAK---	-----SNV	NIKGYYNH--	YSDACLTKAG	269
BolMan	206	SGAGWAGKLY	SYDDTLRFIN	WQADATKNVD	SGFLVTVGS	---WNP--KS	NTDQF-----	---GFVDH---	YSDNCLVKLG	269
MelMan	201	SGAGWAGHLY	SAGETGRFVN	WQAAATKEVD	PGAMVTVGS	---WNM--KA	DTDAM-----	---GFHNL---	YSDHCLVKAG	264
AalMan	208	-----	---VLYNHLIS	DTSKYIKSLD	SKHLVTVGD	---EGFGLDV	DS-DGSYPYT	YGEGLNFTKN	LGIS-----	263
AbMan	266	-----TC	TTTTVTNNAK	EMSAFIKTID	SNHLVAIGD	---EGFYN--	QPGAPTYPYQ	GSEGVDFEAN	LATS-----	325
LelMan	211	-----L	SGKTFQMWL	EMAGYKSID	SNHLEIGL	---EGF--YG	NOMRQYNPNS	YIFGTNFTSN	NQVQ-----	269
HjMan	206	-----	---VIVQWAT	SVSQYVKSLD	SNHLYTVGD	---EGL--GL	STGDGAYPYT	YGEGLTDFAKN	VQIK-----	260
TfMan	173	-----	-----S	AATQRLRAAG	FEHTLVVDAP	NWGQDWTNTM	RNNADQVYA-	-----	-----	212
CsMan	177	-----	-----K	NATKALRDAG	FRHTIMVDAP	NW-GQDWSNT	MRDNAGSIME	-----	-----	216
ColMan	608	-----	-----R	NAVQALRNAG	INNTIMVDAP	NW-GQDWSFT	MRDNAPTIFN	-----	-----	647

*										
CalMan	268	GKSNGITNEY	QMHITYS----	HFGKHN----	---QNAPEKVN	---RWAYN-VN	DKPLF TGEFA	SVCSQN----	---EGTONL	326
HolMan	270	GKKGVLDFE	QIHSYD----	WQGFED----	---EVSPEFMA	---ASVYH--M	DKPITVGEFR	ESQAG----	---MTTGEM	327
BolMan	270	-KPNGKLDYF	QFHITYS----	YQGNF----	---DNVSPFRHS	---AGDYG--T	GKPIVYGEFV	EQDGGG----	---MNIDQL	326
MelMan	265	GKQSGTLEFY	QVHTYD----	WQNH----	---GNESPEKHS	---FSNFR--L	KKPMV TGEFN	QEHGAG----	---MSSESM	322
AalMan	326	-----TIDEG	TLHLYP--DS	WGTS-----	YDHGNGWIT-	AHAAACK-AV	GKPCLEEFY	VTSNH-----	---CAVESP	319
AbMan	326	-----SVDEA	TFHSYP--EP	WGGG---ADA	KAWGTQWIT-	DHAASMKRY	NKPYILEEFG	VTTNQ-----	---PDTYAEW	385
LelMan	270	-----GIDFT	TTHMYP--NQ	WLPGLTQEAQ	DKWASQWIOV	-HIDDSK-ML	KKPLLTAEFG	KSTKTPGYTV	AKRONYFEKT	340
HjMan	261	-----SLDEG	TFHLYP--DS	WGTN-----	YTHGNGWIQ-	THAAACL-AA	GKPCVFEFY	AQONP-----	---CTNEAP	316
TfMan	213	SDPTGNTVES	-IHMVGVS-	-----	---QASTITS-	---YLEHFVNA	GLPLITGEFG	HDSHSGN----	---PDE-DTI	268
CsMan	217	ADPLRNLVF-	SIHMVGVYN-	-----	---TASKVEE-	---YIKSFVDK	GLPLVIGEFG	HQHTDGD----	---PDE-EAT	272
ColMan	648	ADPQRNLVF-	SIHMVGVDY-	-----	---TAAEVGS-	---YIESFVNR	GLPLVIGEFG	HMSDGD----	---PNE-QAI	703

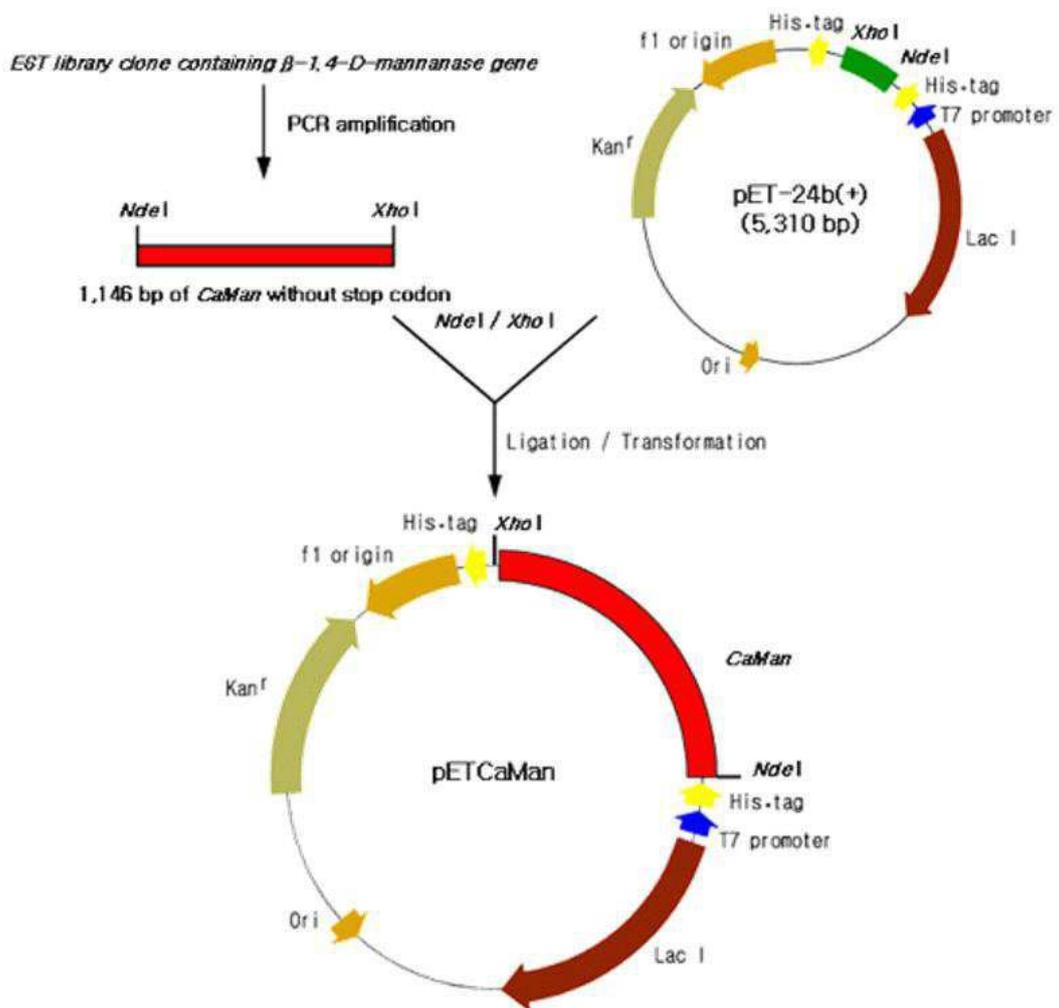
CalMan	327	YKYAYNN--	-GY-NGALTW	QFNSG----	-----	GDCSDTYSNQ	---MYG---	WQALKGQ--N	DQSGGKGM--	376
HolMan	328	FNHAYNT--	-GY-SGAWTW	AITDDWTPKD	TWAAH-----Q	QVGTITVANR	HDHGLVKFTL	-----	-----	377
BolMan	327	FDYVYNNH--	-GY-AGAWSN	DLM-----	-----	---AHG-DNQ	---RGG---	ISHIKNY--N	WNGQIGINL-	370
MelMan	323	FEWAYTK--	-GY-SGAWTW	SRT-----	-----	---DVSNNQ	---LRG---	IQHLKSR--T	DHGQVQFGL-	367
AalMan	320	WQQTAGNA--	-TGISGDLYH	QYGTTF-SWQ	S-----P	NDGNTFYNT	SDFTCLVTDH	VAAINAGSK-	-----	377
AbMan	386	FNEVESS--	-GLTGDLIHW	QAGSHLSTGD	T-----H	NDGYAVYPDG	PVYPLMKSH	ASAMKNRA--	-----	439
LelMan	341	YGTIFNCAKS	GPPCGGLFHW	QVLGQGMSSF	DDGY-----	---QVVLQESP	STSRV I----	LLQSLRLSKL	S-----	399
HjMan	317	WQTTSLTT--	-RCMGGDMFH	QMGDTF-ANGA	-----QSN	SDPYTVWYNS	SNWQCLV---	KNHVDAT--N	-----	371
TfMan	269	MAEAERLK--	---LGYTGN	SWS-GNGGGV	EYLDWVYNFD	QDNLSPWGER	I---FYQPNG	IATAKEAVI	FG-----	330
CsMan	273	VRYAKQYK--	---IGLFSH	SWC-GNSSYV	GYLDWVYNFD	PNNPTPWGQ-	---WYKTNA	IGTSSPTPT	STVTPTPPR	340
ColMan	704	VQYAKQYN--	---IGLFGH	SWS-GNGGGV	EYLDWVYTNF	ANSPTAWGT-	---WFRINA	IGTSTSPPT	PTPTPTPTPT	771

CalMan	377	VSVNIN----	382
HolMan	377	-----	
BolMan	370	-----	
MelMan	367	-----	
AalMan	377	-----	
AbMan	439	-----	
LelMan	399	-----	
HjMan	372	GGTITPPVPS	381
TfMan	330	-----	
CsMan	341	QHQR	346
ColMan	772	PTPTPSAGGN	881

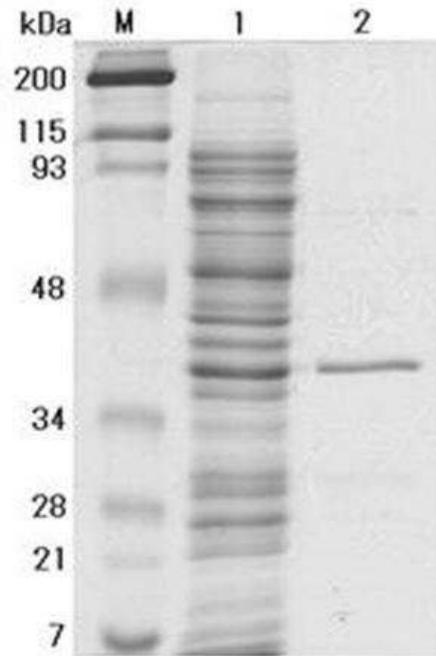
도면3



도면4

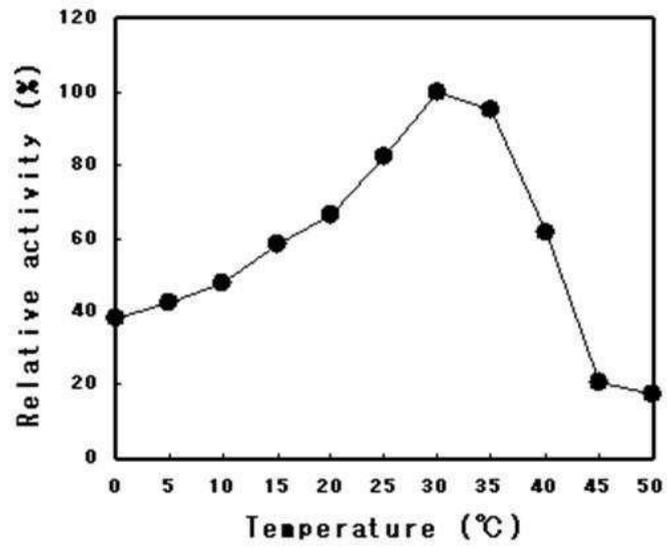


도면5

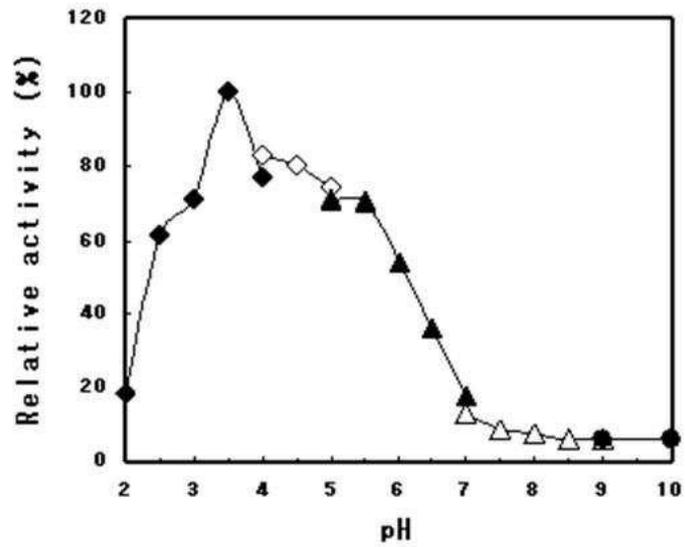


도면6

(a)



(b)



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)

=