(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 9/20 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년08월21일
(11) 등록번호 10-0613694
(24) 등록일자 2006년08월10일

(21) 출원번호 10-2004-0071130
(22) 출원일자 2004년09월07일
(65) 공개번호 10-2006-0022338
(43) 공개일자 2006년03월10일

(73) 특허권자 한국화학연구원
대전 유성구 장동 100번지

(72) 발명자 이선우
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 103-805

조광연
대전광역시 유성구 도룡동 383-21

원기훈
대전광역시 유성구 장대동 355-7번지 303호

임희경
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 130-202

김진철
대전광역시 유성구 신성동 대림아파트 110-1006

최경자
대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 104-1005

장경수
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 123-1002

김범태
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 102-505

이연수
대전광역시 서구 둔산동 한마루아파트 7동 302호

(74) 대리인 이현실
장성구

(56) 선행기술조사문헌
논문 * 서열검색 *
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 조영균

(54) 토양 메타게놈 유래 신규 리파제 유전자 및 이로부터코딩되는 리파제 단백질

요약

본 발명은 토양 미생물의 메타게놈에서 분리한 **서열번호: 3**의 염기서열을 갖는 리파제 유전자 및 이로부터 코딩되는 **서열번호: 4**의 아미노산 서열을 갖는 리파제 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 **서열번호: 3**의 유전자로부터 코딩되는 단백질은 우수한 리파제 활성을 나타낸다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 토양 메타게놈 유래 리파제 ELP45를 암호화하는 서브클론으로 형질전환된 대장균에서 목적하는 31 kDa의 리파제 ELP45의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 토양 미생물의 메타게놈에서 분리한 신규 리파제 유전자 및 이로부터 코딩되는 리파제 단백질에 관한 것이다.

미생물로부터 생산된 단백질을 산업적으로 이용하려는 연구는 지난 100여 년간 여러 분야에서 폭넓게 진행되어 왔다. 이러한 연구는 주로 배양이 가능한 미생물을 대상으로 이루어졌고, 이로부터 밝혀진 다양한 미생물 효소들이 산업적으로 이용되고 있다. 그러나, 배양이 가능한 미생물로부터 생산되는 효소에 대해서는 이미 많은 연구가 되어있어 현재는 다수의 미생물을 배양하여 신규한 효소를 탐색하기 위한 시도가 이루어지고 있다.

그러나, 최근 분자미생물 생태학의 연구를 통해서 자연계에 존재하는 미생물의 99% 이상이 전형적인 배지에서 배양되지 않는다는 사실이 증명되었다 (Amann et al., *Microbiol. Rev.* 59: 143-169, 1995; Hugenholtz and Pace, *Trends Biotechnol.* 14: 190-197, 1996; Ward et al., *Nature* 345: 63-65, 1990). 따라서, 실제로 배양되어 동정된 적이 없는 대다수 미생물들의 효소를 찾으려는 노력이 필요하며, 이는 분자생물학적인 유전자 재조합 발현을 통하여 가능하리라 여겨진다.

이러한 접근방법의 일환으로 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.

미국 위스콘신 대학 연구팀은 처음으로 대형의 메타게놈을 성공적으로 분리하여 세균성 인위적 염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC) 벡터에 클로닝하여 메타게놈 라이브러리를 구축하였고, 이로부터 광범위한 항생물질 및 그의 생합성에 관련된 유전자들을 분리하였다 (Gillespie et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4301-4306, 2002; Rondon et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547, 2000). TIGR (The Institute for Genomic Research) 연구팀에서도 해양 미생물의 총 미생물 메타게놈 라이브러리를 BAC 벡터에 구축하여 해양 생태계로부터 배양되지 않는 미생물의 유전자원 탐색을 시도하고 있다.

한편, 리파제 (lipase)는 트리글리세라이드 (triglyceride)를 가수분해하는 효소로 유지의 전환뿐만 아니라 수용액에서의 가수분해 및 유기용매 내에서의 (트랜스)에스터화 반응에 의해 다양한 정밀화학품, 특히 광학활성 의약품의 생산에 유용한 효소로 알려져 있다. 리파제는 다른 효소들에 비해 상대적으로 저렴하게 생산할 수 있으며 조효소를 필요로 하지 않아 산업적으로 큰 장점이 있어 최근에는 생물의약분야에서 생체촉매로 널리 활용되면서 그 중요성이 부각되고 있다.

이에 본 발명자들은 신규한 리파제 유전자를 토양 메타게놈으로부터 분리한 후 이로부터 생산된 단백질이 우수한 리파제 활성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 우수한 리파제 활성을 나타내는 신규 리파제 유전자 및 이로부터 코딩되는 신규 리파제 단백질을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 토양 메타게놈 유래 신규 리파제 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 리파제 유전자에 의해 코딩되는, 기질에 대해 우수한 광학선택성과 반응성을 갖는 리파제 단백질을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 토양 메타게놈으로부터 분리한 **서열번호: 3**의 염기서열을 갖는 리파제 유전자를 제공한다.

본 발명자들은 신규한 리파제 유전자를 토양으로부터 동정하기 위하여, 토양 미생물로부터 메타게놈을 분리한 후 포스미드 (fosmid)를 이용하여 대장균에 메타게놈 라이브러리를 작성하였다. 상기 라이브러리로부터 트라이뷰티린 (tributyrin)의 가수분해 여부를 통해 리파제 활성을 갖는 메타게놈 클론을 선별하였다. 리파제 활성관련 유전자를 다시 작게 재분리하여 유전자 부위를 결정하였고 이의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 토양 메타게놈으로부터 **서열번호: 3**으로 기재되는 1,326 bp의 염기서열 (GenBank 등재번호 제AY496576호)을 갖는 유전자를 분리하였다.

서열번호: 3의 염기서열에서, 뉴클레오티드 번호 373 내지 1263 부위 (1261-1263: 종결코돈)에 해당하는 전사 해독 프레임 (open reading frame)은 리파제 단백질 코딩 영역으로, 이로부터 유도되는 아미노산 서열은 **서열번호: 4**로 기재되는 296개 아미노산으로 구성되어 있다. 본 발명에서는 상기 단백질을 리파제 ELP45로 명명하였다. 상기 **서열번호: 3**의 리파제 유전자는 이전에 보고된 리파제 유전자 집단과 32~48% 정도의 낮은 상동성을 보여 리파제를 암호화하는 신규한 유전자로서 확인되었다.

그러나, 코돈의 축퇴성 (degeneracy)으로 인하여 또는 상기 리파제 유전자를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 본 발명의 리파제 유전자는 코딩영역으로부터 발현되는 리파제 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 **서열번호: 3**의 리파제 유전자와 실질적으로 동일한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 상기 유전자의 단편을 포함한다. 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오티드란 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.

본 발명의 리파제 유전자로부터 발현되는 리파제 단백질 ELP45는 296개의 아미노산으로 이루어져 있고 **서열번호: 4**와 같은 아미노산 서열을 가지며 크기는 약 31 kDa이다. 그러나, 상기 리파제 단백질의 아미노산 서열에서도 역시 단백질의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 아미노산의 치환, 부가 또는 결실이 이루어질 수 있으며, 목적에 따라 단백질의 일부만이 사용될 수도 있으며 이와 같이 변형된 아미노산 서열 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 리파제 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 그의 단편을 포함하며, 실질적으로 동일한 폴리펩티드란 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.

본 발명의 리파제 유전자 및 단백질은 토양의 메타게놈으로부터 분리하거나, 공지의 DNA 또는 펩티드 합성 방법에 따라 합성할 수도 있다. 또한, 이렇게 제조된 유전자를 당 분야에 공지된 미생물 발현용 벡터에 삽입하여 발현벡터를 제조한 후

이를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 도입시킬 수 있다. 이와 같이 형질전환된 숙주를 이용하여 본 발명의 유전자의 DNA를 대량으로 복제하거나 단백질을 대량 생산할 수 있다. 벡터의 제작 시에는, 상기 리파제 유전자 또는 단백질을 생산하고자 하는 숙주 세포의 종류에 따라 프로모터 (promoter), 종결자 (terminator) 등과 같은 발현 조절 서열, 자가-복제 서열 및 분비 시그날 등을 적절히 선택하고 조합할 수 있다.

본 발명의 **서열번호: 3**의 유전자로부터 코딩되는 단백질의 리파제 활성을 조사한 결과, 상기 유전자를 포함하지 않는 pUC119 벡터로만 형질전환된 대장균은 p-나이트로페닐 뷰티레이트 (nitrophenyl butyrate)를 전혀 분해하지 못한 반면, 본 발명의 리파제 ELP45 서브클론으로 형질전환된 대장균은 p-나이트로페닐 뷰티레이트를 효과적으로 분해하여 강한 리파제 활성을 나타내었다. 이로부터 토양 메타게놈에서 분리한 리파제 유전자가 대장균 형질전환체에서 발현되고 배지로 분비되어 우수한 리파제 활성을 나타냄을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 토양 메타게놈 유래 리파제 유전자로부터 코딩되는 단백질은 우수한 리파제 활성을 나타내므로, 상기 유전자는 유지의 전환뿐만 아니라 수용액에서의 가수분해 및 유기용매 내에서의 (트랜스)에스터화 반응능에 의해 다양한 정밀화학품, 특히 광학활성 의약품의 생산에 유용하고 생물의약분야에서 생체촉매로 널리 활용될 수 있는 리파제 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 토양 메타게놈 DNA의 분리

대전시 유성구 일대의 산림에서 채취한 토양 시료를 메타게놈 라이브러리의 작성에 사용하였다. 채취한 토양을 메쉬 직경이 1.4 ㎜인 체에 걸러서 직경 1.5 ㎜ 이상의 입자와 식물 잔재물 등을 제거한 후, 메타게놈 추출을 위하여 5 g씩 사용하였다. 토양 시료 5 g을 15 ㎖ 완충용액 (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM EDTA [pH 8.0], 100 mM 인산염 나트륨 (sodium-phosphate) [pH 8.0], 1.5 M NaCl 및 1% CTAB)에 현탁하였다. 상기 현탁액에 100 ㎎/㎖ 농도의 단백질 분해효소 (proteinase) K (Sigma)를 100 ㎕ 첨가한 후 37℃ 진탕 배양기에서 150 rpm의 속도로 30분간 진탕하였다. 여기에 20% SDS를 1.5 ㎖ 첨가하고 잘 흔들어 섞어주었다.

상기 혼합물을 65℃ 항온수조에서 30분마다 한번씩 섞어주면서 2시간 동안 유지하였다. 이후에 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였고, 동일한 부피의 클로로폼/아이소아밀 알콜 (24:1)을 첨가하여 섞어준 후 8,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA가 포함된 상등액만을 새 튜브로 옮겼다. 상등액 부피의 0.6배에 해당하는 아이소프로판올을 첨가하여 섞어준 후 11,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었다. 상기 DNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 원심분리로 에탄올을 제거하였다. 이로부터 얻은 침전물을 건조시켜서 0.5 ㎖의 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0])에 용해시킨 후 4℃에 보관하면서 라이브러리 작성에 이용하였다. 분리된 DNA의 양과 크기 결정은 PFGE (pulsed field gel electrophoresis)로 확인하였다. PFGE는 6 V/㎝에서 120㎸고정각 (fixed angle)으로 1 내지 6초의 교대시간 (switch time) 조건에서 6시간 동안 수행하였다.

이로부터 토양 시료 1 g당 약 1 내지 1.5 ㎍의 메타게놈 DNA를 회수하였고, 분리된 DNA 크기는 20 내지 100 kb 정도임을 확인하였다.

<실시예 2> 메타게놈 라이브러리의 작성 및 리파제 활성 클론의 선별

DNA 전기영동, 플라스미드 분리, DNA 절단 등은 통상적인 분자생물학적 방법 (Sambrook et al., *Molecular Cloning*: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989)에 따라 수행하였고, 시약 및 제한효소는 제조사의 지침에 따라 사용하였다.

상기 실시예 1에서 토양 시료로부터 추출한 메타게놈을 저융점 아가로스 겔 (low melting point agarose gel)에서 전기영동을 한 후 20 kb 이상의 DNA를 포함하는 아가로스 겔 블록 (block)만을 회수하였다. 회수된 겔 블록에 겔레이즈 (GeLase, Epicentre, USA)를 처리하여 DNA를 순화하였고, 이 과정을 통해 휴믹산 (humic acid) 등을 제거하였다. 순화된 DNA 조각의 양끝 말단을 DNA 말단-리페어 (end-repair) 효소로 처리하여 무딘 말단 (blunt end)을 갖는 20 kb 이상의 메타게놈 DNA를 얻었고, 이를 제한효소 *Eco*72I로 처리한 포스미드 벡터 pEpiFOS-5 (Epicentre, USA)에 라이게이션하고 라이게이션 혼합물을 상업적인 패키징 시스템 (packagene extract, Epicentre. USA)을 이용하여 *E. coli*에 도입한 후 50 ㎍/㎖ 의 클로람페니콜 (chloramphenicol)이 첨가된 LB 한천배지에서 자라는 형질전환체들을 선별하였다. 선별된

형질전환체들로부터 SDS-알칼리 용혈 (alkali lysis) 방법으로 분리한 플라스미드 DNA를 제한효소 *Bam*HI으로 절단한 후 전기영동을 수행한 결과, 선별된 80개의 형질전환체들 모두 재조합 플라스미드를 포함하고 있는 것으로 확인되어 라이브러리가 잘 작성되었음을 확인하였다. 삽입된 메타게놈 DNA의 평균 크기는 35 kb 이상이었다.

이렇게 작성된 메타게놈 라이브러리로부터 리파제 활성을 나타내는 클론을 선별하기 위하여, LB 배지에 1%의 트라이뷰티린 (tributyrin)을 첨가하여 유화한 후 각 클론들을 상기 배지에 도말하였다. 이를 37℃에서 2일간 배양하여 콜로니 주위에 투명한 후광 (halo)을 보이는 콜로니를 선발하였다. 선발된 활성 클론의 리파제 활성을 상기 방법에 의해 재검정하여 최종적으로 8종을 분리하였고, 이들을 -80℃에 보관하였다.

<실시예 3> 리파제 활성 유전자 부위 결정 및 염기서열 결정

토양으로부터 분리된 메타게놈에서 리파제 활성 유전자 부위를 결정하기 위하여, 리파제 활성을 보이는 8개의 클론들중 리파제 활성이 가장 우수한 pELP4으로부터 플라스미드 DNA를 대량으로 분리하였고, 플라스미드 DNA를 제한효소 *Bfu*CI으로 부분 절단하여 DNA 크기를 2 내지 5 kb로 만들었다. 상기 DNA 절편들을 *Bam*HI으로 절단한 pUC119 (Vieira and Messing, *Methods Enzymol.* 153: 3-11, 1987)에 라이게이션하여 2차 숏건 라이브러리 (shot gun library)를 작성하였다. 작성된 라이브러리를 암피실린 (ampicillin)과 트라이뷰티린이 첨가된 LB 배지에 도말하고 37℃에서 2일간 배양하여 리파제 활성 서브클론을 분리하였다. 분리한 활성 서브클론중 삽입 DNA가 가장 작은 서브클론을 선발하고 염기서열을 결정하여 서브클론을 pELP45로 명명하였다.

서브클론에 삽입된 DNA의 염기서열 중 리파제 활성부위를 결정하기 위하여, *in vitro* 트랜스포존 삽입변이 (insertional mutagenesis)를 유발한 후 염기서열 분석을 통해 리파제 단백질을 코딩하는 유전자를 분석하였다. 트랜스포존 삽입변이는 전이효소 (transposase)와 GPS3 트랜스포존을 함유하는 pGPS3 (New England Biolabs)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 이로부터 제한효소 *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI 및 *Eco*RV 절단 다형성을 평가하여 서로 다른 부위에 트랜스포존이 삽입된 변이체들을 분리하였고, 이들의 리파제 활성을 재검정하여 활성을 상실한 변이체를 다수 선별하였다.

리파제 활성을 상실한 변이체들의 트랜스포존 삽입부위의 DNA 염기서열을 결정하기 위하여, GPS3 트랜스포존의 염기서열에 기초하여 제작된 **서열번호: 1** 및 **2**의 프라이머 N과 S (New England Biolabs)를 사용하고 (주)제노텍에서 자동염기서열 분석기 ABI3700을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 리파제 활성을 가지는 서브클론이 **서열번호: 3**으로 기재되는 1,326 bp의 염기서열을 가짐을 확인하였고, 상기 염기서열을 포함하는 서브클론을 pELP45로 명명하였다. 리파제 활성을 상실한 변이체들의 트랜스포존 삽입부위가 **서열번호: 3**의 1,326 bp 부위에서도 코딩부위인 373 bp와 1263 bp 사이에 위치하여 리파제 활성 부위가 확인되었다. **서열번호: 3**의 염기서열을 갖는 리파제 활성 유전자를 기존에 보고된 리파제 유전자 집단과 비교한 결과, 32~46% 정도의 낮은 상동성을 보여 리파제를 암호화하는 신규한 유전자로서 확인되었다. 토양 메타게놈으로부터 분리한 리파제 활성을 나타내는 **서열번호: 3**의 유전자는 2004년 5월 1일자로 GenBank에 등재되었고 (등재번호 제AY496576호), 상기 염기서열로부터 코딩되는 **서열번호: 4**의 296개 아미노산 서열로 구성된 리파제 단백질을 리파제 ELP45로 명명하였다.

<실시예 4> 리파제 활성 유전자 부위를 포함하는 형질전환체의 제조

상기 서브클론 pEPL45를 콤피턴트 대장균 세포 DH5α 50 ㎕와 혼합한 후 얼음에서 20분간 정치시키고, 42℃에서 45초간 열처리하여 서브클론을 콤피턴트 세포내로 도입한 후, LB 배지 400 ㎕를 가하여 37℃에서 45분 동안 배양하였다. 이로부터 형질전환체를 선별하기 위하여 1%의 트라이뷰티린과 암피실린이 100 ㎍/㎖ 함유된 LB 플레이트에 도말하여 37℃에서 16시간 배양하였다. 배양된 플레이트로부터 트라이뷰티린을 가수분해하여 강한 후광을 보이는 콜로니들을 선별하고 pELP45 도입여부를 플라스미드 분리 키트 (Qiagen사)를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소 *Bam*HI *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I 및 *Sma*I의 절단양상을 판별하여 확인하였다. 이와 같이 강한 리파제 활성을 유지하는 pELP45를 함유한 대장균 DH5α 세포를 글리세롤 스톡으로 -80℃에 보관하면서 리파제 단백질 실험에 이용하였다.

<실시예 5> 리파제 활성 측정

신규한 리파제 단백질을 코딩하는 서브클론 pELP45를 포함하는 대장균 형질전환체를 LB 액체배지에 2일간 현탁 배양하였다. 배양액을 14,000 rpm에서 원심분리하여 상등액만을 분리한 후 다시 막 여과를 거쳐 균체가 제거된 배양액을 확보하였다. 상기 배양액은 농축하지 않은 상태로, 상기에서 분리된 대장균체는 10배로 농축한 후 12% SDS-PAGE 전기영동을 통해 단백질의 발현을 분석하였다. 그 결과, **도 1**에 나타난 바와 같이, 예상되는 크기의 31 kDa 단백질이 pUC119 벡터만 가진 대장균에 비해 강하게 발현되었고 배지로도 잘 분비됨을 확인하였다.

또한, 상기 대장균 형질전환체로부터 발현된 단백질의 리파제 활성을 p-나이트로페닐 뷰티레이트 (nitrophenyl butyrate)를 이용하여 검정하였다. 먼저, 대장균 형질전환체를 LB 액체배지에 접종하고 37℃에서 1일간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 2 mM의 p-나이트로페닐 뷰티레이트를 포함하는 기질용액 0.1 ㎖을 1.8 ㎖의 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.25)과 혼합한 후 상기에서 분리된 상등액에 0.1 ㎖ 첨가하여 상온에서 매 분당 반응의 진행을 분광학적으로 모니터링 하였다. 리파제 활성은 반응 생성물인 p-나이트로페놀 (nitrophenol)을 400 ㎚에서 분광학적으로 정량하여 결정하였고, 그 결과를 하기 **표 1**에 나타내었다. 효소 활성 1 단위 (unit, U)는 1분당 1 μmole의 p-나이트로페놀을 생성하는 데 필요한 효소의 활성으로 정의하였다.

[표 1]

U/㎖	pUC119	ELP45
p-나이트로페닐 뷰티레이트	0	0.19

그 결과, pUC119 벡터만 포함하는 대장균은 리파제 활성을 전혀 나타내지 않은 반면, 본 발명의 리파제 ELP45 서브클론으로 형질전환된 대장균은 강한 리파제 활성을 나타내었다. 이로부터 토양 메타게놈에서 분리한 리파제 유전자가 대장균 형질전환체에서 발현되고 배지로 분비되어 우수한 리파제 활성을 나타냄을 확인하였다.

발명의 효과

상기에서 전술한 바와 같이, 본 발명의 토양 메타게놈 유래 리파제 유전자로부터 코딩되는 단백질은 우수한 리파제 활성을 나타내므로 상기 유전자는 리파제 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 리파제 단백질.

청구항 2.

제 1항의 리파제 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3.

삭제

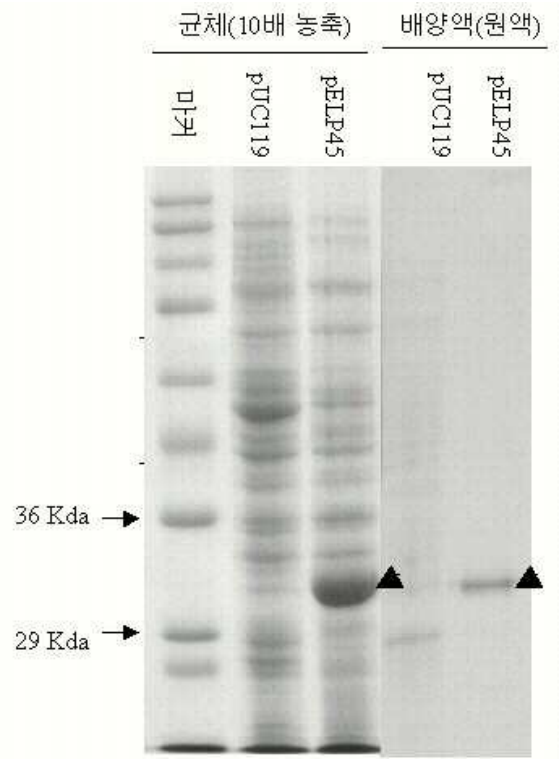
청구항 4.

제 2항에 있어서,

서열번호: 3의 염기 번호 373 내지 1263에 해당하는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

도면

도면1



서열목록

서열목록 전자파일 첨부