(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월07일
(11) 등록번호 10-1784665
(24) 등록일자 2017년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12P 19/02* (2006.01) *C07H 3/02* (2006.01)
*C12N 9/24* (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12P 19/02* (2013.01)
*C07H 3/02* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0085868
(22) 출원일자 2016년07월07일
심사청구일자 2016년07월07일
(56) 선행기술조사문헌
HONG WU ET AL.,BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM., 66 (11), 2515_2519, 2002

(73) 특허권자
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**김경헌**
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초동,삼풍아파트)
**왕대모**
서울특별시 성북구 안암로 145 CJ식품안전관 209호 (안암동5가,고려대학교안암캠퍼스)
**김도형**
경기도 용인시 수지구 대지로 139 107동 1401호 (죽전동,동부아파트)
(74) 대리인
**특허법인다나**

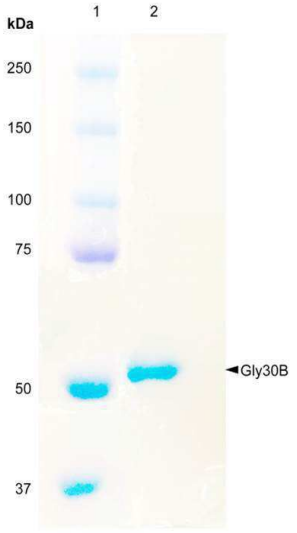
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 **베타-글루칸으로부터 젠티오바이오스 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,6-엔도글루카네이즈**

*(57) 요 약*

본 발명은 베타-글루칸으로부터 젠티오바이오스 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,6-엔도글루카네이즈에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이는 베타-1,6-엔도글루카네이즈를 통해 젠티오바이오스 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12N 9/2402* (2013.01)
*C12P 19/14* (2013.01)
*C12Y 302/01075* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0031359
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌프런티어사업(차세대바이오매스연구단)
연구과제명 인간 올리고당 fucosyllactose 생산을 위한 미생물 전환공정
기 여 율 1/1
주관기관 서울대학교산학협력단
연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)를 포함하고,

상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

베타-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40$^{T}$에서 유래한 것인, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

베타-1,6-엔도글루카네이즈는 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 얻은 것인, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

유전자는 SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열로 표시되는 것인, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물.

### 청구항 5

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 젠티오바이오스 또는 글루코스의 생산방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

반응은 20 내지 45℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행되는, 젠티오바이오스 또는 글루코스의 생산방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 베타-글루칸으로부터 젠티오바이오스 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,6-엔도글루카네이즈에

관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0003] 베타-글루칸(β-glucan)은 글루코스 잔기가 글리코시드 결합(glycosidic bond)을 이룬 다당류(polysaccharides)로서, 효모, 버섯 등의 세포벽을 이루는 매우 필수적인 성분이다. 베타-글루칸은 이미 오래전부터 항산화 효과, 항암기능성, 피부보호제 등의 용도로 널리 사용되어 왔다.

[0004] 베타-글루칸은 중합체를 구성하고 있는 결합의 종류에 따라 베타-1,3-글루칸, 베타-1,4-글루칸, 베타-1,6-글루칸으로 나누어지는데 베타-1,6-글루칸은 다른 베타-1,3- 또는 베타-1,4- 결합에 비해 자연계에 소량 존재하는 것으로 알려져 있다. 라살리아 푸스툴라타(*Lasallia pustulata*)로 부터 유래한 푸스툴란은 기존에 이미 잘 알려진 대표적인 베타-1,6-글루칸이며 라미나린 역시 갈조류를 구성하는 베타-1,3-1,6-글루칸으로 잘 알려져 있다.

[0005] 베타-1,6-글루카네이즈는 베타-글루칸의 1,6-글리코시드 결합(1,6-glycosidic linkages)을 무작위적으로 절단하는 것으로 알려져 있으며 Carbohydrate Active enZYmes database(CAZy; http://www.cazy.org/)에 따르면 위 효소는 glycoside hydrolase(GH) family 5와 30에 속하는 것으로 알려져 있다. 베타-1,6-글루카네이즈는 주로 균계로부터 유래한 베타-1,6-글루카네이즈가 보고되어 왔으며 박테리아 유래 베타-1,6-글루카네이즈에 대한 보고는 현재까지 없는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) M.T. Pereyra et al. The Lichenologist, vol.35(2), pp.177-185(2003.03)

(비특허문헌 0002) Rajan SS et al. Structure, vol.12, pp.1619-1629(2004)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 베타-글루칸으로부터 젠티오바이오스 또는 글루코스를 생산할 수 있는 신규한 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 용도를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 젠티오바이오스 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이는 베타-1,6-엔도글루카네이즈를 제공하는 효과가 있다.

[0014] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린 또는 푸스툴란을 기질로 사용할 수 있어 젠티오바이오스 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 발현을 확인한 젤 사진도이다.

도 2는 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 pH 확인 결과이다.

도 3은 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 온도 확인 결과이다.

도 4는 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 열 안정성 확인 결과이다.

도 5는 푸스툴란의 가수분해에 대한 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 푸스툴란에 대한 가수분해 산물의 TLC(a) 및 HPLC(b) 분석 결과이다.

도 7은 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 라미나린에 대한 가수분해 산물의 TLC(a) 및 HPLC(b) 분석 결과이다.

도 8은 본 발명의 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 계통수를 도시한 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0017] 본 발명자들은 베타-글리코시데이즈 활성을 가질 것으로 추정되는 GH30 패밀리에 속한 Gly30B 단백질의 베타-글루칸 분해 활성을 확인하였다. 그 결과, Gly30B 단백질은 글루코스가 베타-1,3-결합의 주 골격과 베타-1,6-결합으로 곁가지가 연결된 다당류인 라미나린을 기질로 사용하여 라미나린의 β-1,6-글리코시드 결합을 절단함으로써 젠티오바이오스와 글루코스를 생산하고, 글루코스가 베타-1,6-결합으로 연결된 다당류인 푸스툴란의 β-1,6-글리코시드 결합을 절단함으로써 젠티오바이오스와 글루코스를 생산하였다.

[0018] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 젠티오바이오스 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,6-엔도글루카네이즈와, 기질로, 라미나린(laminarin) 및 푸스툴란(pustulan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 젠티오바이오스 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.

[0020] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 베타-글루칸에 대해 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 약 20 내지 약 45℃까지 열 안정성을 유지하고, 라미나린 또는 푸스툴란에 대해 최적 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 약 20 내지 40℃에서 최적 활성을 나타낼 수 있다.

[0022] 또한, 완충 용액 내 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 4 내지 10일 수 있고, 더 구체적으로 약 6 내지 8, 가장 구체적으로 약 7일 수 있다.

[0023] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린 또는 푸스툴란 등을 기질로 사용할 수 있다.

[0024] 상기 효소의 반응 산물은 중합도 2의 젠티오바이오스 또는 글루코스일 수 있다.

[0025] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0026] 또한, 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 올리고당 또는 글루코스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$ 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스

(*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$ 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[0028] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대, 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자, 즉, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다. 상기 숙주세포로 대장균을 사용하나, 이에 제한하는 것은 아니다.

[0029] 상기 베타-1,6-엔도글루카네이즈와 기질의 반응은 20 내지 45℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 기질로 라미나린 또는 푸스툴란을 사용하는 경우, 30 내지 40℃의 온도 범위에서, pH 6 내지 8에서, 5분 내지 5시간 동안 수행될 수 있다.

[0030] 상기 효소의 분해산물은 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 올리고당 또는 글루코스를 분리 정제할 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0032] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci* USA 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[0033] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적(비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.

[0034] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.

[0035] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈(예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[0037] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0039] **<실시예 1> 클로닝 기법을 통한 *gly30b* 유전자의 확보**

[0040] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$ (ATCC 43961)로부터 유래한 추정적인 베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)(sde_2994)를 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α에 클로닝 하였다. 보다 구체적인 설명은 다음과 같다.

[0041] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$(ATCC 43961)는 23 g/L의 인스턴트 해수염, 50 mM Tris-HCl, 2 g/L의 글루코스, 2 g/L의 효모 추출물 및 0.5 g/L의 암모늄 클로라이드를 함유하는 최소배지에서 30℃에서 12시간 동안 배양하였다.

[0042] 시판중인 DNA 분리 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40$^T$(ATCC 43961)의 게놈 DNA를 얻었다.

[0043] 표적 유전자 *gly30b*(GeneBank ID. ABD82251.1)는 Solg 2×Taq PCR smart mix 2(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 증폭하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다.

[0044] 5'-GCGGGATCCCACCACCACCACCACCACCAATACTGGTTAACCAGCGGTGATCTAAGT-3' 및 5'-GCGCTCGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGATCTATAACTAGCGTTACAACGCTCTGTGC-3′

[0045] 이들은 5' 부위에 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 사이트를 가지고 있다. 또한 HisTrap 컬럼의 친화도를 높이기 위해 히스티딘을 코딩하고 있는 유전자의 염기서열을 추가하였다.

[0046] PCR 산물과 pET28a 벡터는 *Bam*HI 및 *Xho*I 으로 이중 절단하고, 최종 DNA 단편을 라이게이션 하였다. *Gly30b*가 탑재된 플라스미드는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α에 형질전환 하였다.

[0048] **<실시예 2> Gly30B 단백질의 과발현 및 정제**

[0049] 실시예 1을 통해 확보한 유전자의 과발현을 위해 단백질 발현용 숙주인 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) B121(DE3)에 형질전환 하였다.

[0050] 세포는 50 mg/L의 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 브로스(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도가 0.6에 도달할 때까지 37℃의 온도 조건에서 배양하였다. 0.1 mM IPTG를 사용하여 단백질의 발현을 유도하였으며 유도온도는 16℃로 설정하여 수용성 형태로 재조합 단백질을 발현하였다.

[0051] 발현시킨 Gly30B 단백질을 분리하기 위하여, 세포를 초음파로 분쇄하고 원심분리 후 그 상등액을 HisTrap column(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용해 정제하였다. 그 정제된 단백질을 Amicon Ultra Centrifugal filter(millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하였다. 그 발현된 Gly30B의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 대략 52kDa으로 측정되었다(도 1). 단백질의 농도는 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다.

[0053] **<실시예 3> Gly30B 단백질의 기질특이성 및 양이온효과 확인**

[0054] Gly30B 단백질의 효소활성을 확인하기 위해 2%의 푸스툴란 또는 라미나린(Wako, Osaka, Japan) 등과 같은 기질을 포함하는 100 ㎕의 20 mM Tris-HCl(pH6.0)에서 1.89 nM의 단백질과 함께 40℃에서 30분간 반응하였다. 또한 Gly30B 단백질의 기질 특이성을 확인하기 위해 푸스툴란, 라미나린, 커들란(Wako, Osaka, Japan), 카보시메틸셀룰로즈(Sigma-Aldrich, St Louis,MO, USA), 자일란(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 등과 같은 다양한 글루칸을 포함하는 100 ㎕의 20 mM Tris-HCl(pH6.0)에서 10.5 μM의 Gly30B 단백질과 함께 40℃에서 30분간 반응시켰다. 생산된 환원당은 DNS 방법을 이용해 측정하였다.

[0055] 표 1에 나타난 바와 같이, Gly30B 단백질은 푸스툴란에서 가장 높은 활성을 보였으며 라미나린을 기질로 사용하였을 경우 푸스툴란을 단독 기질로 사용하였을 경우와 비교하여 약 22%의 상대활성을 보였다. Gly30B 단백질은 커들란을 가수분해하지 않는 것으로 확인되었으며, 이를 통해 Gly30B 효소는 베타-1,6-글루칸 결합을 선택적으로 절단하는 것으로 확인되었다. 또한, Gly3B 단백질은 아비셀, CM-cellulose, 자일란과 같은 β-1,4-글리코시드 결합에는 반응하지 않는 것으로 확인되었다.

[0056] Gly3B 단백질의 양이온 효과를 확인한 결과, $Ni^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Mg^{2+}$과 같은 양이온에 의해 반응성이 저해되는 것을 확인하였으며 그 중 $Cu^{2+}$에서 가장 큰 저해효과를 확인하였다(표 2).

*표 1*

[0057] Gly30B 단백질의 기질 특이성

| 기질 | 주 골격 글루코시드 결합 타입 | 단당류 | 상대 효소 활성(%) |
|---|---|---|---|
| 푸스툴란 | β-1,6 | 글루코스 | 100 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 라미나린 | β-1,3: β-1,6 | 글루코스 | 22.37 |
| 커들란<br>β-글루칸(보리) | β-1,3<br>β-1,3: β-1,4 | 글루코스<br>글루코스 | ND<br>ND |
| 자일란 | β-1,4 | 자일로스 | ND |
| 카보시메틸셀룰로즈(CMC) | β-1,4 | 글루코스 | ND |
| ND: 검출 안됨 | | | |

*표 2*

[0058] Gly30B 단백질의 양이온 효과 확인

| 양이온 | 상대 효소 활성(%) |
|---|---|
| 대조군 | 100±0.8 |
| $K^+$ | 93.3±1.1 |
| $Na^+$ | 94.5±1.1 |
| $Mg^{2+}$ | 57.0±2.5 |
| $Ca^{2+}$ | 99.0±0.7 |
| $Mn^{2+}$ | 85.0±1.2 |
| $Ni^{2+}$ | 54.7±1.7 |
| $Cu^{2+}$ | 29.4±0.2 |
| $Fe^{2+}$ | 61.5±1.9 |
| $Co^{2+}$ | 70.9±3.1 |
| 양이온과 반응하지 않은 효소 활성을 100%로 정함<br>실험데이터는 3반복 실험에 대한 평균±표준편차로 나타냄 | |

[0060] **<실시예 4> Gly30B 단백질의 최적 활성 온도 및 pH 확인**

[0061] Gly30B 단백질의 활성에 대한 최적 온도 및 pH를 조사하기 위해 10.5 μM의 Gly30B 단백질과 2%(W/V)의 라미나린 혼합물을 다양한 온도범위(20-70℃)와 pH 조건(2.0-10.0)에서 반응시켰다.

[0062] 도 2는 2.0-10.0 범위의 pH에서 Gly30B의 상대적 활성을 나타낸다. Gly30B 단백질은 pH 7.0일 때 최대 활성을 나타내었고 그 전후의 pH에서 급격하게 효소활성이 떨어지는 것을 확인하였다. Gly30B 단백질은 pH 2.0(20 mM glycine-HCl buffer)에서 약 40%의 상대활성을 보였으며, pH 10.0(20 mM glycine-NaOH buffer)에서 약 50%의 상대활성을 보였다.

[0063] 도 3은 20-70℃의 온도 범위에서 Gly30B 단백질의 상대적 활성을 나타내었다. 효소 활성은 20℃에서 40℃의 범위에서는 온도가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 40℃에서 최대 값에 도달하였다. 20℃ 및 60℃의 반응온도에서의 활성은 40℃에서 관찰한 것과 비교하여 효소 활성이 감소하였다. Gly30B 단백질의 열 안정성을 확인한 결과 40℃ 이하의 반응온도에서는 안정하나 그보다 높은 반응 온도에서는 상대활성이 급격히 줄어듦을 확인하였다(도 4). 따라서 40℃를 Gly30B 단백질의 최적 반응 온도로 결정하였고 이 온도를 모든 후속 실험에 사용하였다.

[0065] **<실시예 5> Gly30B 단백질의 효소 반응속도 확인**

[0066] Gly30B 단백질의 푸스툴란과 라미나린에 대한 효소 반응속도를 확인하기 위하여 이를 0.45%에서 9.1%에 이르는 다양한 농도의 기질을 포함하는 20mM Tris-HCl 완충용액과 단백질을 pH 7.0, 40℃에서 반응시켰다.

[0067] 그 결과, Lineweaver-Burk plot(도 5)으로부터 푸스툴란 기질을 사용한 경우 Km, Vmax, Kcat 값은 각각 100.8 g/L, 32.8 U/mg, 28.9 $s^{-1}$로 확인되었으며, 라미나린 기질을 사용한 경우 Km, Vmax, Kcat 값은 각각 24.2 g/L, 153.8 U/mg, 135.6 $s^{-1}$ 로 확인되었다.

[0069] <실시예 6> TLC, HPLC를 사용한 Gly30B 단백질의 효소 반응 특성 확인

[0070] 반응 시간에 따른 Gly30B 단백질의 효소 반응 특성을 분석하기 위해 Thin Layer Chromatography(TLC), High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 사용하여 분석하였다.

[0071] TLC 분석을 위한 반응산물은 n-부탄올:아세트산:물(3:2:2 부피비) 혼합용매 시스템을 사용하여 silica gel 60 plate(Merck)에 전개하였으며 시각화를 위해 10% (v/v) 황산 처리 후 130℃에서 5분간 열처리하였다.

[0072] HPLC 분석은 gel permeation and ligand exchange column(KS-802; Shodex)을 장착한 Agilent 1100 HPLC(Agilent)를 사용해 분석하였으며 refractive index detector(Agilent)를 통해 탐지하였다. HPLC 분석을 위한 용매로는 멸균수를 사용하였으며 flow rate은 0.5 mL/min, 컬럼온도는 80℃로 설정하였다. 분석을 위한 표준물질로는 라미나리바이오스(degree of polymerization, DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜토스(DP5), 라미나리헥소스(DP6)를 사용하였다.

[0073] Gly30B 단백질과 푸스툴란을 반응한 반응산물의 TLC 분석결과(도 6a), 반응시작 5분 이후부터 젠티오바이오스와 글루코스가 생산되는 것을 확인할 수 있으며 시간이 지남에 따라 젠티오바이오스 또한 글루코스로 전환됨을 확인하였다. 120분간 반응을 진행시킨 결과 글루코스가 주 생산물로 확인되었으며 소량의 젠티오바이오스가 생산됨을 확인하였다. 동일한 반응 산물을 HPLC를 통해 분석한 결과(도 6b), 반응시간이 지남에 따라 젠티오바이오스에 해당하는 피크는 줄어들고 글루코스에 해당하는 피크가 생성되었음을 확인하였다.

[0074] Gly30B 단백질과 라미나린을 반응시킨 경우, 푸스툴란 기질을 사용한 경우와는 다르게 반응이 진행된 이후에도 초기의 라미나린과 라미나린으로부터 유래한 올리고당은 완전히 분해되지 않고 남아있으며(도 7a), 글루코스와 젠티오바이오스가 생성됨을 확인하였다(도 7b). 이를 통해 Gly30B 단백질은 베타-1,3-결합을 제외한 베타-1,6-결합을 선택적으로 절단함을 확인하였다.

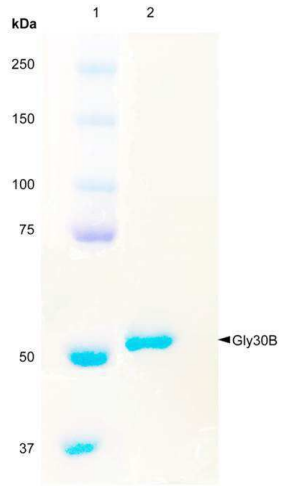
[0076] <실시예 7> Gly30B 단백질의 계통분류학적 분석

[0077] Gly30B 단백질의 신규성을 확인하기 위해 이전까지 알려진 미생물 유래 베타-1,6-엔도글루카네이즈의 유전자 정보를 CAZy database (http://www.cazy.org)로부터 획득하여 계통수를 그려보았다.

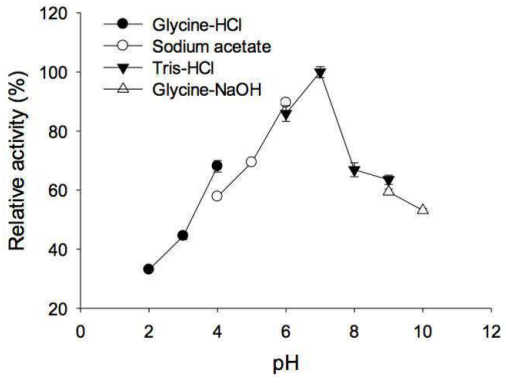
[0078] 그 결과 이전에 알려진 다른 베타-1,6-엔도글루카네이즈와 계통학적으로 분리됨을 확인할 수 있었으며 이전에 보고된 바 없는 최초의 박테리아 유래 효소임을 확인하였다(도 8).

## 도면

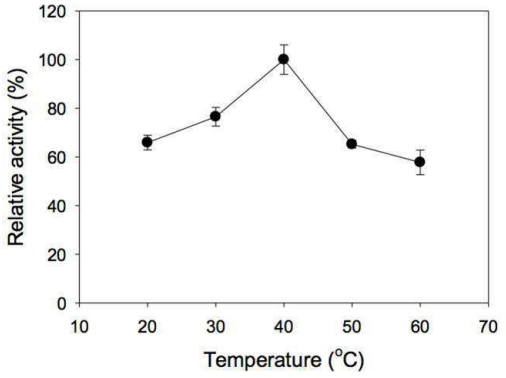
### 도면1



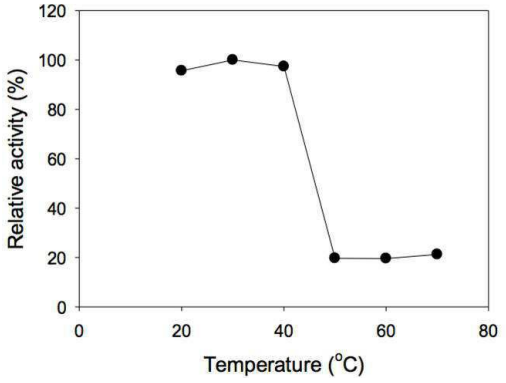
도면2


Glycine-HCl
Sodium acetate
Tris-HCl
Glycine-NaOH
Relative activity (%)
pH
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12

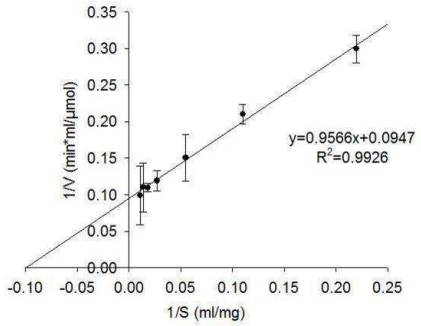
도면3


Relative activity (%)
Temperature (°C)
120
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
70

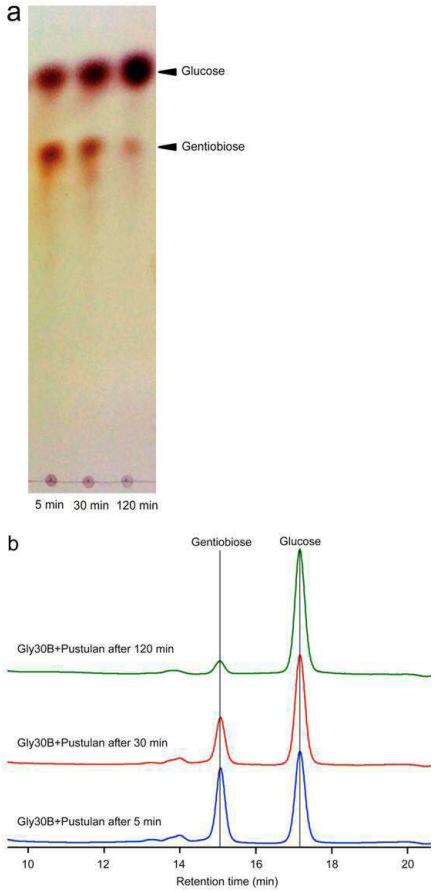
도면4


Relative activity (%)
Temperature (°C)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80

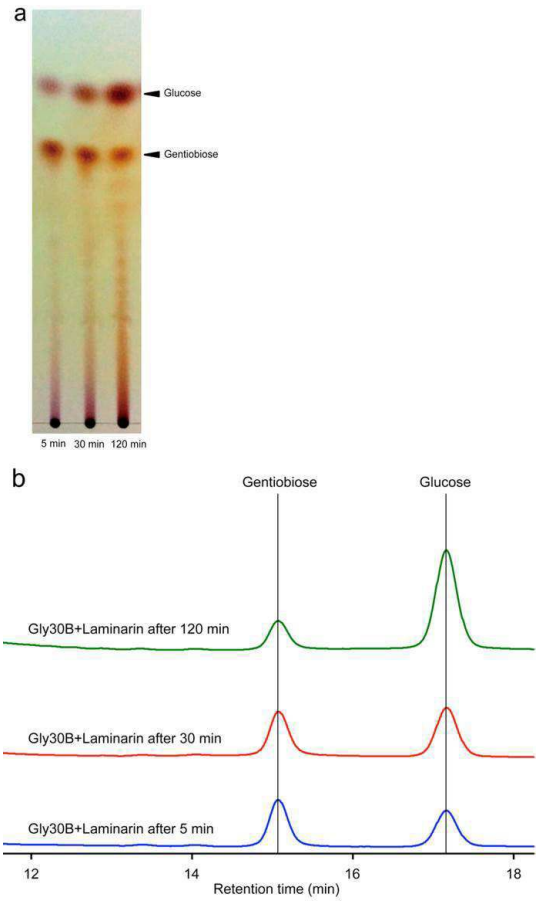
도면5


0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1/V (min*ml/μmol)
y=0.9566x+0.0947
R2=0.9926
-0.10
-0.05
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
1/S (ml/mg)

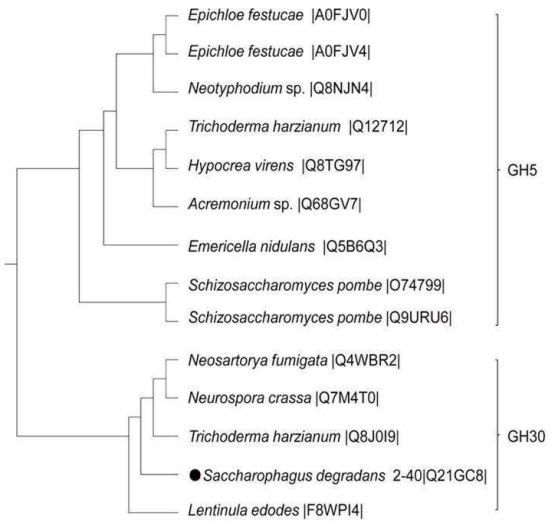
도면6


a
Glucose
Gentiobiose
5 min
30 min
120 min
b
Gentiobiose
Glucose
Gly30B+Pustulan after 120 min
Gly30B+Pustulan after 30 min
Gly30B+Pustulan after 5 min
10
12
14
16
18
20
Retention time (min)

도면7




도면8




서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Novel beta-1,6-endoglucanase for producing gentiobiose and glucose from beta-glucan

<130> P16U13C1146

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 481

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40T

<400> 1

Met Thr Leu Leu Lys Asn Ile Asn Lys Gln Arg Leu Ala Arg Lys Val
1 5 10 15

Lys Leu Val Cys Ser Ala Ile Ser Leu Val Val Met Gly Phe Ser Cys
20 25 30

Ala Ala Ser Ala Asn Gln Tyr Trp Leu Thr Ser Gly Asp Leu Ser Ala
35 40 45

Ala Phe Glu Glu Gln Gly Glu Lys Tyr Ala Val Ala Pro Ser Pro Glu
50 55 60

Met Pro Leu Ile Thr Ile Asp Lys Ser Gln Ala Phe Gln Thr Met Glu
65 70 75 80

Gly Phe Gly Tyr Thr Leu Asn Gly Gly Ser Ala Thr His Leu Ala Asn
85 90 95

Met Ser Asp Ala Ala Arg Ala Arg Leu Leu Gln Glu Ile Phe Gly Gln
100 105 110

Ser Asp Gly Ala Asn Thr Asn Lys Pro Ser Ile Gly Val Ser Tyr Leu
115 120 125

Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Asp Leu Asp Pro Ala Pro Phe Ser Tyr
130 135 140

Asn Asp Leu Pro Pro Gly Glu Val Asp Leu Lys Leu Glu Lys Phe Thr
145 150 155 160

Ile Ala Gln Asp Glu Lys Thr Leu Ile Pro Ile Leu Lys Gln Ile Leu
165 170 175

Ala Ile Asn Pro Asn Ile Thr Phe Met Ala Ser Pro Trp Ser Pro Pro
180 185 190

Val Trp Met Lys Thr Asn Gly Ser Thr Ile Gly Gly Glu Leu Asn Pro
195 200 205
Glu Tyr Tyr Ser Val Tyr Ala Gln Tyr Phe Val Lys Tyr Val Gln Ala
210 215 220
Met Ala Glu His Gly Ile Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ile Gln Asn Glu
225 230 235 240

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

305 310 315 320
Gln Val His Asn Ala His Pro Asp Lys His Leu Tyr Phe Thr Glu Gln
325 330 335
Trp Val Gly Ala Asn Ser Asn Phe Trp Gly Asp Val Ala Trp His Val
340 345 350
Glu Asn Leu Ile Val Gly Ala Thr Arg Asn Trp Cys Lys Thr Val Leu
355 360 365
Glu Trp Asn Leu Ala Ala Asp Ser Asn Leu Gln Pro His Thr Leu Gly
370 375 380

Gly Cys Asp Ala Cys Leu Gly Ala Leu Thr Ile Asp Gly Asp Asn Val
385 390 395 400
Lys Arg Asn Ala Ala Tyr Tyr Ile Ile Ala His Ala Ala Lys His Val
405 410 415
Pro Pro Gly Ser Val Arg Ile His Ser His Arg Val Ala Gly Leu Pro
420 425 430
Asn Val Ala Phe Leu Thr Pro Gln Lys Lys Val Val Val Val Val Leu
435 440 445

Asn Asn Thr Thr Gln Leu Gln Ser Phe Thr Leu Val His Asp Arg Gln

450 455 460

Lys Phe Ala Tyr Ser Met Pro Ala Gln Ser Val Val Thr Leu Val Ile

465 470 475 480

Asp

<210> 2

<211> 1446

<212> DNA

<213> Saccharophagus degradans 2-40T

<400> 2

atgacgttac taaaaaatat aaataagcaa cgcctagcac gtaaagttaa actcgtctgt 60

agcgcgataa gcctagtggt tatggggttc agctgtgccg cgtcagccaa tcaatactgg 120

ttaaccagcg gtgatctaag tgcggcgttc gaagagcagg gcgaaaagta cgcggtagct 180

cccagccccg aaatgcccct tattaccata gataaaagcc aagcatttca aaccatggaa 240

ggctttggct ataccccttaa tggcggcagt gcaactcacc tagccaatat gagtgacgca 300

gctagagcgc ggctattaca agaaatattt ggtcaaagtg atggtgcgaa tactaataag 360

cccagtattg gcgtgtctta tttgcgttta agcctaggcg catcagattt agaccccgcc 420

ccgtttagct acaacgattt gccgcctggc gaagtggatt taaagctaga aaaatttact 480

atcgcccaag atgaaaaaac tcttatcccc atacttaagc aaatattagc tattaaccca 540

aatattacat ttatggctag cccttggtct ccgcctgtat ggatgaaaac aaacggctct 600

accattggtg gtgagctaaa cccagaatac tacagcgtat atgcacaata ttttgttaaa 660

tatgttcaag caatggctga gcacggcata aacatagatg ccattactat tcaaaatgaa 720

cctatgcacc cgggtaataa cccaagcttg ctcatgcatg caaaagatca agccgacttt 780

attgctaatc acttaggccc cgcgtttaag caggcagagc taaaaacaaa aatcattgtg 840

tgggatcaca acgcagacaa acccgaatac cccatagagg tactgaatca ccccgttgcc 900

aatcaatata ttcacggctc ggcattccat ttatatggcg gcgatgtaaa tgccataagc 960

caagtgcaca atgctcaccc agataagcac ttatatttta ctgagcagtg ggtaggcgca 1020

aattccaact tttggggcga tgtagcttgg catgtagaaa atttaattgt tggggcaacc 1080

cgcaattggt gcaaaacggt attggagtgg aatttagccg cagacagtaa cttacagcct 1140

cacactcttg gtggatgcga cgcctgctta ggcgcgctaa ctattgatgg cgataacgtg 1200

aagcgcaatg ccgcgtatta cattattgcc cacgcagcta aacatgtacc gccaggctcg 1260

gtgcgtatcc attcgcaccg tgtggcgggt ttacctaatg ttgcttttct tacgccgcag 1320

aaaaaggttg ttgtagtagt gcttaataat actactcaat tacagtcatt tacattggtg 1380

cacgaccgtc aaaagtttgc ctattccatg cccgcacaga gcgttgtaac gctagttata 1440

gattaa 1446

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제5항

【변경전】

베타-1,6-엔도글루카네이 즈(β-1,3-1,6-endoglucanase)

【변경후】

베타-1,6-엔도글루카네이즈(β-1,6-endoglucanase)