

(72) 발명자

이종민

부산광역시 수영구 광안해변로15번길 68 508동 302호(남천동, 삼익뉴비치아파트)

김은영

부산광역시 금정구 서금로 41-5(서동)

오륜경

부산광역시 금정구 중앙대로 1617-12 102동 403호(부곡동, 푸르지오아파트)

김중균

부산광역시 해운대구 해운대해변로 163 104동 1103호(우동, 현대베네시티아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2010-0833

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림수산식품 연구개발사업

연구과제명 수, 해양폐기물 분해, 미생물 탐색, 분리 및 분해산물의 다양한 생리활성 평가

주관기관 농림수산식품기술기획평가원

연구기간 2010.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 효소 활성을 갖는 단백질.

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 핵산 분자가 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질은 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주로부터 유래된 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주는 기탁번호 KCCM 90078인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 6

제3항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 벡터는 pET22B(+)인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

제6항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형질전환체는 대장균(*E. coli*) 또는 효모인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 형질전환체는 기탁번호 KCCM 11264P인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및 배양물로부터 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)를 회수하는 단계;를 포함하는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 생산 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 활성을 갖는 단백질, 이를 코딩하는 아미노산 서열과 핵산 서열, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체로부터 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 베타글루칸(β -glucan)은 포도당이 베타-1,3 결합으로 중합된 다당을 총칭하는데 버섯류, 곡류, 효모의 세포벽에 존재하며 세포의 다당으로 생산되는 미생물 유래의 베타글루칸이 있다 (Zekovic D.B. 등, Crit. Rev. Biotechnol. 25:205-230, 2007). 베타글루칸은 중합체를 구성하고 있는 결합의 종류에 따라 베타-1,3-글루칸, 베타-1,3-1,4-글루칸, 베타-1,3-1,6-글루칸으로 나누어지며, 이와 같이 중합체를 구성하는 결합과 베타글루칸 유래가 상이함으로 인하여 약리적인 특성의 차이가 발생하는데, 보리와 귀리에 주로 존재하는 베타-1,3-1,4-글루칸은 혈당강화와 콜레스테롤 저하의 효과를 나타내며 미생물, 효모와 버섯에 존재하는 베타-1,3-글루칸과 베타-1,3-1,6-글루칸은 생물학적 면역반응의 증대에 효과를 보이고 있다. 하지만 대부분의 베타글루칸은 구조적인 특징으로 인하여 물에 녹지 않는 불수용성의 특징을 보이고 있어 다양한 약리 효능을 내포하고 있음에도 불구하고 제품으로서의 사용에 제약을 받고 있는 실정이다.

[0003] 물에 불용성인 베타글루칸을 수용성 다당으로 생산하는 방법으로는 크게 화학적 분해법과 효소 분해법이 있다. 화학적 분해법은 강산을 사용하여 분해하는 방법으로 분해공정이 간단한 장점이 있지만 동일한 반응산물을 얻기가 어려우며 분리정제에 따른 환경오염 등의 문제를 내포하고 있다. 효소 분해법은 효소의 반응특성에 따라 중합도가 조절된 특정 올리고머를 생산할 수 있는 이점이 있고, 환경 오염물질 배출의 문제가 없다. 하지만 효소 분해법은 활성이 우수한 효소를 개발하여야 하고, 최적의 생산물을 얻기 위하여 효소의 최적 반응 조건을 탐색해야 한다.

[0004] 한편, 베타-글루카네이즈(β -glucanase)는 베타글루칸(β -glucan)을 분해하는 효소로서, 이러한 베타-글루카네이즈는 작용하는 양식에 따라 엑소-베타-글루카네이즈와 엔도-베타-글루카네이즈 나누어지며, 엔도-베타-글루카네이즈는 베타글루칸 사슬 안에서 규칙성 없이 절단하여 초기부터 다당류는 급속히 저분자화 되어 D-글루코오스 단당류로 변한다. 이에 반해, 엑소-베타-글루카네이즈는 베타글루칸을 사슬 말단에서부터 차례대로 순차적으로 D-글루코오스를 생성시키는 효소이다. 또한 베타-글루카네이즈에는 β -(1,3), β -(1,4), β -(1,6)결합을 가수분해하는 형태로 나누어져서 각자의 결합을 분해한다.

[0005] 특히 글리코실 가수분해 효소의 패밀리 16에 속하는 엔도-베타-1,3-1,4-글루카네이즈(endo- β -1,3-1,4-glucanase, EC 3.2.1.73)는 베타-1,3에 인접한 베타-1,4 결합만을 특이적으로 가수분해시키고, 그 반응 산물로 글루코-트리올리고사카라이드(gluco-trioligosacchride; G3), 글루코-테트라올리고사카라이드(gluco-tetraoligosaccharide; G4)를 생성하며, 라미나린(laminarin)의 베타-1,3 결합이나 카르복시메틸 셀룰로스(carboxymethyl cellulose; CMC)의 베타-1,4 결합은 기질로서 인식하지 못하는 것으로 알려져 있다. 이러한 엔도-베타-1,3-1,4-글루카네이즈는 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)와 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*), 바실러스 마세란스(*B. macerans*), 바실러스 써큐란스(*B. circulans*), 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 폴리믹사(*B. polymyxa*) 등의 여러 바실러스 종(*Bacillus* sp.)에서 보고되었다.

[0006] 그러나 현재까지 연구된 베타-글루카네이즈(β -glucanase)는 최적의 활성을 나타내는 온도 및 pH 범위가 제한적인바, 이들 효소를 이용하여 글루코오스 생산, 올리고당 생산 또는 분해된 당을 이용한 에탄올을 생성하고자 하는 경우 효소의 취급에 어려움이 있어왔다.

[0007] 이에 본 발명자들은 넓은 범위의 조건에서 최적의 활성을 유지할 수 있는 베타-글루카네이즈를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 오징어 젓갈로부터 동정된 신규 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주(기탁번호 KCCM 90078)에서 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 단백질을 코딩하는 DNA 염기서열을 클로닝하고, 이러한 핵산 서열을 대장균에 형질전환시켜 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 생산하였으며, 이러한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈가 넓은 범위의 온도 및 pH 조건에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 효소 활성을 갖는 신규 단백질을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하는 단계 및 배양물로부터 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)를 회수하는 단계를 포함하는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 효소 활성을 갖는 단백질을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질은 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주로부터 유래될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주는 기탁번호 KCCM 90078일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터는 pET22B(+)일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균(*E. coli*) 또는 효모일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질전환체는 기탁번호 KCCM 11264P일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계 및 배양물로부터 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)를 회수하는 단계를 포함하는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 신규 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)는 30~70℃ 온도 범위와 pH 4~9의 pH 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 유지할 수 있어, 넓은 범위의 조건에서 효율성을 가지고 용이하게 취급할 수 있는바, 글루코오스 생산, 올리고당 생산 또는 분해된 당을 이용한 에탄올을 생성과 같은 다양한 분야의 산업 공정에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) DNA 염기서열과 추정 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 핵산서열이 포함된 재조합 벡터의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 분리 과정을 SDS-PAGE로 분석하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)의 온도별 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)의 pH별 상대적 활성도를 나타낸

그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상의 상동성을 가지며, 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 효소 활성을 갖는 단백질에 관한 것이다.
- [0027] "베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase)"는 베타-1,3에 인접한 베타-1,4 결합만을 특이적으로 가수 분해시키고, 그 반응 산물로 글루코-트리올리고사카라이드(gluco-trioligosacchride; G3), 글루코-테트라올리고사카라이드(gluco-tetraoligosaccharide; G4)를 생성하는 것으로 알려져 있다.
- [0028] 상기와 같은 특성을 갖는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈는 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)와 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*), 바실러스 마세란스(*B. macerans*), 바실러스 써큐란스(*B. circulans*), 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 폴리믹사(*B. polymyxa*) 등의 여러 바실러스 종(*Bacillus* sp.)에서 주로 분리되고 있다.
- [0029] 본 발명에서는 오징어 젓갈로부터 동정된 기탁번호 KCCM 90078의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 유래된 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 아미노산 서열 및 이들의 핵산 서열을 최초로 규명하였다.
- [0030] 본 발명에서 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은, 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 효소 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 서열번호 1의 서열로 정의되는 야생형 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [0032] 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 90% 이상의 상동성이 유지되고 본 발명에서 효소 활성을 보유하는 한 균등한 단백질임을 쉽게 이해할 것이다.
- [0033] 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 효소 활성을 보유하는 한 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0034] 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 단백질을 포함한다. 바람직하게는 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알칼리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다. 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변이체일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 기탁번호 KCCM 90078의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.
- [0036] 먼저, 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 기탁번호 KCCM 90078의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 직접 분리하여 제조할 수 있다. 세포에 함유된 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [0037] 또한 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 폴리펩티드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. IL-1 β 는 보호된 아미노산간의 응축반응(condensation reaction)에 의하여 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 폴리펩티드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

- [0038] 또한 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈(β -1,3-1,4-glucanase) 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 상기 핵산 분자는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있으며, 이와 90% 이상의 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 핵산 분자는 이들과 기능적으로 동일한 작용을 수행하는 이의 작용성 등가물을 포함하는데, 상기 작용성 등가물은 인위적인 변형에 의해 뉴클레오타이드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution), 삽입(insertion) 또는 이들의 조합(combination)에 의해 변형된 변이체(variants) 또는 동일한 작용을 수행하는 상기 핵산 분자의 작용성 단편(fragments)을 포함할 수 있다.
- [0042] 본 기술분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70% 이상 상동성이 유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소 활성을 보유하는 한, 본 발명의 핵산 분자와 균등물로서 본 발명의 권리 범위에 속함을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.
- [0043] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명의 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 이를 발현하는 벡터에 의해 제공되어 단백질로 발현될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0046] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0047] 본 발명의 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트, 분비시그널 등을 포함할 수 있으며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다.
- [0048] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 예컨대 플라스미드, 코즈미드, 파지 입자, 바이러스 벡터 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 바람직하게는 pET22b(+), pET 계열의 벡터, pHCE, pGEX계열, pTRP, pMAL 계열 등의 단백질 발현벡터를 예시할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 대장균용 발현벡터 pET22B(+))를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 벡터는 효모에서 발현되는 벡터일 수 있는데, 이때 상기 효모발현 벡터는 핵산분자를 전사시키기 위한 프로모터 및 생성된 단백질을 세포 외로 분비시키기 위한 분비시그널 유전자를 포함하는 것이 바람직하

다.

[0050] 또한, 본 발명의 벡터는 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉, 목적 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나, 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[0051] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다. 본 발명의 형질전환체는 벡터를 프로모터가 작용할 수 있는 양태로 숙주세포 내에 도입시키는 것에 의해 구축될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 형질전환은 핵산 분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 포함될 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0053] 발현벡터로 형질전환되는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 본 발명에서 이용될 수 있는 숙주세포로는 효모, 진균, 세균 또는 조류가 가능하며, 예를 들면, 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 아스페르길러스(*Aspergillus*), 파라코커스(*Paracoccus*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 알칼리제네스(*Alcaligenes*), 에르위니아(*Erwinia*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 등이 있다. 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 효모이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 하기 실시예에서는 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 유래한 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 핵산 분자를 포함하는 플라스미드 발현벡터(pET22b+)를 *E. coli* BL21에 형질전환시켜 이를 *E. coli* pETbg1314로 명명하고, 2012년 3월 15일자로 한국미생물보존센터(Korean culture center of microorganisms: KCCM)에 기탁하여, 기탁번호 KCCM 11264P를 부여받았다.

[0055] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계 및 배양물로부터 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 회수하는 단계를 포함하는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 생산 방법에 관한 것이다.

[0056] 본 발명에서 형질전환체의 배양은 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 배양 온도, 배양 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다. 이들 공지된 배양 방법은 문헌[Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), 및 Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]에 상세히 기술되어 있다. 또한, 배양 방법에는 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(cintinuous culture) 및 유가식 배양(fed-batch culture)이 포함되며, 바람직하게는 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 사용되는 배양 배지는 특정한 균주의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 다양한 미생물에 대한 배양 배지는 공지되어 있다(예를 들면, "Manual of Methods for General Bacteriology" from American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)). 배지 내 탄소 공급원은 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 이용할 수 있다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 질소 공급원은 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄)을 이

용할 수 있으며, 이들 물질 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 인 공급원으로서 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨 함유 염을 이용할 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필수적인 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철)을 함유할 수 있으며, 최종적으로, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장-촉진 물질을 상기 언급한 물질 외에 사용할 수 있다. 적합한 전구체를 상기 배양 배지에 추가로 가할 수 있다. 상기 공급 물질은 배양물에 한번에 모두 가하거나, 배양 중 적절하게 공급할 수 있다.

[0058] 배양물의 pH는 염기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 적절히 사용하여 조절할 수 있다. 발효는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 거포제를 사용하여 조절할 수 있다. 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물, 예를 들어 공기를 배양물 중으로 도입시켜 호기성 조건을 유지시킬 수 있다. 배양 온도는 통상적으로 20 내지 45℃, 바람직하게는 25 내지 40℃이며, 가장 바람직하게는 30℃이다. 배양은 원하는 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속할 수 있다.

[0059] 본 발명의 상기 배양에 의해 생성된 배양물 내의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 회수는 원심분리, 여과 등 당 분야의 통상의 방법으로 회수할 수 있다. 또한, 상기 방법으로 회수된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질은 당 분야의 통상의 방식으로 정제될 수 있으며, 예를 들어, 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 단백질을 정제할 수 있다.

[0060] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 생산 방법으로 수득된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 이용하여 보리 유래 베타글루칸을 올리고당인 글루코-테트라올리고사카라이드 또는 글루코-트리올리고사카라이드로 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0061] 상기와 같은 방법으로 제조된 올리고당은 항당뇨와 같은 생리활성 물질로서 사용할 수 있는바, 의약산업 및 기능성 식품산업에 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] <실시예 1>

[0064] 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주로부터 분리한 신규한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 염기서열 결정

[0065] *Bacillus* sp. SJ-10의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 NCBI database를 통해 확보된 다양한 *Bacillus* 종의 β -1,3-1,4-glucanase 유전자를 비교분석하고, 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자 내에 상보적인 서열을 기반으로 universal primer를 제작하였다. 이를 *Bacillus* sp. SJ-10의 chromosomal DNA를 주형으로 PCR을 수행하였고, 생산된 PCR 산물을 sequencing하여 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자의 일부 서열을 밝혔다. 밝혀진 일부 서열을 기준으로 DNA Walking Speedup™ Premix Kit(Seegene, Korea)를 이용하여 5' 말단 및 3' 말단의 염기서열을 모두 밝혔다.

[0066] 그 결과, *Bacillus* sp. SJ-10 균주로부터 분리한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자는 244개의 아미노산을 암호화하는 732개의 핵산서열로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다(도 1 참조). 상기 유전자의 핵산 서열 및 추정 아미노산 서열은 각각 서열번호 2 및 서열번호 1로 나타내었다.

[0067] <실시예 2>

[0068] *Bacillus* sp. SJ-10 균주 유래 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자의 염기서열 비교 분석

[0069] *Bacillus* sp. SJ-10의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자의 염기서열과 다른 *Bacillus* 종의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 염기서열의 상동성을 알아보기 위하여, 이들 서열을 ClustalW(Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids

Res. 22, 4673-4680.) 프로그램을 이용하여 다중서열정렬하였다. 정렬된 서열을 비교하여 그 상동성의 정도를 백분율로 나타냈다.

[0070] 그 결과 하기 표 1에 나타난 바와 같이, *Bacillus* sp. SJ-10의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 염기서열을 다른 바실러스 종과 비교했을 때, *B. amyloliquefaciens* FZB42와 95.9%로써 가장 높은 유사도를 나타냈다. 그 외에 *B. atrophaeus* 1942, *Bacillus* sp. 289, *subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10, 그리고 *B. licheniformis* strain XRK4는 각각 94.8%, 93.3%, 93.1%, 92.6%, 90%의 유사도를 나타냈다. 또한 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 아미노산 서열의 유사도는 *B. amyloliquefaciens* FZB42와 96.7%, *Bacillus* sp. 289와 94.3%, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10와 93.4%, 그리고 *B. licheniformis*와 90.9%로 나타났다.

표 1

	Similarity/Identity with strain no. (%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	1	96.7	95.4	93.8	94.2	91.7	93.4	92.1	92.1	90.9	90.9	90.1	85.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	2	95.9	97.1	93.0	95.4	90.5	93.0	90.9	93.4	90.5	90.5	91.3	88.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> strain TB2	3	94.8	97.2	91.7	98.3	90.1	91.7	91.3	92.5	89.7	89.7	93.8	86.4
<i>B. atrophaeus</i> 1942	4	93.3	93.0	91.8	90.5	93.4	98.3	93.8	89.7	93.4	93.4	87.2	83.1
<i>Bacillus</i> sp. 289	5	93.1	95.4	98.0	90.4	90.4	90.5	91.7	94.1	88.4	88.4	95.3	87.8
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	6	92.6	90.7	89.6	93.4	89.7	93.4	98.7	90.0	88.4	88.4	87.6	83.0
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10	7	92.2	92.0	90.8	98.2	89.6	92.6	93.8	89.7	92.5	92.5	87.6	83.5
<i>Bacillus</i> sp. UEB-S	8	91.9	90.5	89.7	93.3	89.8	98.7	92.4	90.4	88.8	88.8	88.8	83.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> strain BS5582	9	90.8	91.2	90.8	90.8	92.6	89.3	89.8	89.1	86.0	86.0	90.3	86.6
<i>B. licheniformis</i> strain XRK4	10	90.0	90.3	88.9	94.1	87.7	89.3	93.4	89.2	87.2	97.5	84.7	80.6
<i>B. licheniformis</i> KCCM41412	11	89.8	90.1	88.7	93.9	87.5	88.9	93.3	88.7	87.4	98.4	84.7	80.6
<i>B. subtilis</i> strain MA139	12	89.3	91.6	94.1	86.8	95.6	86.1	86.3	86.2	88.7	84.0	84.0	91.7
<i>B. subtilis</i> strain SU40	13	84.2	87.8	85.9	82.7	87.3	81.8	82.2	81.6	83.8	79.6	79.6	91.1

Identity (%) of the β -1,3-1,4-glucanase nucleotide sequences is shown below the diagonal, and the deduced amino acid sequence similarity with the β -1,3-1,4-glucanase protein is shown above the diagonal. Sequence data from GenBank: 2) CP000560.1, 3) EU368224.1, 4) CP002207.1, 5) FJ031233.1, 6) Z46862.1, 7) CP002905.1, 8) JN039020.1, 9) EU623974.1, 10) GQ901889.1, 11) AY383603.1, 12) EU082110.1, 13) HQ834722.1

[0071]

[0072] <실시예 3>

[0073] 형질전환체의 제조

[0074] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 대량으로 생산할 수 있는 재조합 플라스미드를 제조하기 위해, pET22b(+)의 제한효소 EcoR I 과 Xho I 부위에 서열번호 2의 핵산분자를 클로닝하고, 이를 과발현 숙주인 *E. coli* BL21(DE)에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하였다. 또한 이를 *E. coli* pETbg1314라 명명하여 한국미생물보존센터에 기탁하였으며, 기탁번호 KCCM 11264P를 부여받았다.

[0075] 자세하게는 *Bacillus* sp. SJ-10으로부터 추출한 chromosomal DNA를 주형 DNA로 하고, 합성된 하기 표 2의 프라이머 BSbg1314-up 및 BSbg1314-rp를 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분 동안 초기 변성단계를 거친 후, 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초를 30cycle 수행하였다. 마지막으로 7분 동안 72℃에서 신장시켰다. 중합효소연쇄반응을 통해 대량 증폭된 DNA 단편을 제한효소 EcoR I 과 Xho I 으로 완전히 자른 후, 동일한 제한효소를 처리한 발현용 벡터 pET22b(+)와 연결하여 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 발현용 재조합 플라스미드를 제조하였다(도 2 참조). 본 발명의 *Bacillus* sp. SJ-10 균주 유래 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 유전자 N-말단 프라이머와 C-말단 프라이머는 각각 EcoRI과 XhoI의 제한효소 절단부위를 가지는 하기 표 2에 나타난 올리고 뉴클레오티드이다. 재조합 벡터에는 강력한 T7 프로모터와 판독신호가 내재되어 있어서, 이를 T7 RNA 중합효소를 갖고 있는 *E. coli* BL21(DE)를 숙주로 사용하는 경우 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질 대량생산이 가능하다. 또한 C-말단에는 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단

백질의 정제를 수월하게 수행할 수 있게 하는 6개의 히스티딘을 암호화하는 태그가 형성되어 있다. 상기 재조합 플라스미드는 고농도의 CaCl_2 를 처리한 *E. coli* BL21(DE)에 열충격(heat shock)을 통한 형질전환을 수행하여 형질전환된 균주를 제조하였다. 상기 형질전환체를 *E. coli* pETbg1314라 명명하고, 한국미생물보존센터에 2012년 3월 15일자로 기탁하였으며, 기탁번호 KCCM 11264P를 부여받았다.

표 2

[0076] PCR에 사용된 프라이머 서열

프라이머 서열(5'-3')		서열번호
포워드 (BSbg1314-up)	GGC CGA ATT CGA TGT CTT ATC GTA TGA AAC G	서열번호 3
리버스 (BSbg1314-rp)	GGC CCT CGA GTT TTT TTG TAT AGC GCA CC	서열번호 4

[0077] <실시예 4>

[0078] 형질전환체에서 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 발현 및 정제

[0079] 상기 실시예 3에서 제조한 *E. coli* pETbg1314를 암피실린(ampicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$)이 포함된 LB 배지에서 배양한 후, 최종 농도 1mM의 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 배양액에 넣어 4시간 동안 세포를 배양하여 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 과발현시켰다. 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질이 과발현된 세포를 과쇄하여 얻은 활성 없는 inclusion body를 6M 유레아(urea)로 renaturation 시킨 후, 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 8.0)에서 투석하여 refolding 하였다. His-tag가 융합된 재조합 단에 융합된 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈를 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 수지를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 약 30kDa의 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 확인하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0080] 도 3은 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질 분리 과정을 SDS-PAGE로 분석하여 나타낸 것으로, Lane M은 마커이며, Lane 1은 IPTG 첨가하지 않고 배양한 *E. coli* pETbg1314 세포 과쇄물을, Lane 2는 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1314 세포 과쇄물을, Lane 3은 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1314 세포 과쇄물 중 수용성 분획물을, Lane 4는 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1314 세포 과쇄물 중 불용성 분획물을, Lane 5는 정제된 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 단백질을 나타낸 것이다.

[0081] <실험예 1>

[0082] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소의 활성 측정 및 기질 특이성

[0083] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 기질 특이성을 확인하기 위하여, 보리의 베타-글루칸, 귀리의 (1,3)(1,4) 베타-글루칸, 베타-1,3-글루칸, 라미나린, (1,3)(1,6) 베타-글루칸, 커들란, 셀룰로오스 및 텍스트란 0.5%를 기질로써 이용하였으며, 이를 정제된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 1 μg 과 30분 동안 반응시켰다. 효소의 활성 측정은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법에 의하여 생성된 잔당량을 측정함으로써 수행되었다 (Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 31: 426-428). 효소활성단위는 1분당 1 μmole 의 glucose를 생산하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

[0084] 그 결과 하기 표 3에서 나타낸 바와 같이, 보리로부터 분리한 베타-D-글루칸에서 60.8 U/mg의 가장 높은 활성을 나타냈으며, 귀리로부터 분리한 (1,3)(1,4) β -글루칸을 사용하였을 때는 2.8 U/mg을 나타냈다. 한편, (1,3)(1,6) 베타글루칸, 커들란, 셀룰로오스, 텍스트란에서는 어떠한 활성도 보이지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이를 통해 상기 실시예 4를 통해 정제한 본 발명의 단백질이 베타-(1,3)과 베타-(1,4) 결합이 함께 존재할 때 베타-(1,4) 결합을 분해하는 효소인 베타-1,3-1,4-글루카네이즈임을 확인할 수 있었다.

표 3

[0085]

기질	효소 활성 (U/mg)	Main Linkage type
β -D-glucan (barley)	60.8	β -(1,3) : (1,4) = 1:2.7
(1,3)(1,4) β -glucan (Oat)	2.8	β -(1,3) : (1,4) = 1:1
β -1,3-glucan	1.4	β -(1,3)
Laminarin	0.4	β -(1,3) : (1,6)
(1,3)(1,6) β -glucan(yeast β -glucan)	-	β -(1,3) : (1,6)
Curdian (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	-	β -(1,3)
Cellulose	-	β -(1,4)
Dextran	-	α -(1,6) : (1,4)

[0086] <실험예 2>

[0087] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소의 최적 온도 및 pH 결정

[0088] <2-1> 최적의 온도 조건 결정

[0089] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소 활성의 최적 온도를 결정하기 위하여 정제된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 1 μ g과 0.5% 보리의 베타-글루칸을 다양한 온도(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, 반응액 내에 존재하는 잔당량을 DNS 방법을 이용하여 측정하였다.

[0090] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 상기 효소활성의 최적온도는 50 $^{\circ}$ C이었으며, 특히 30~70 $^{\circ}$ C의 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 나타내는 것으로 나타나, 다른 균주에 의해 생산된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 효소 활성과 비교하여 매우 넓은 범위의 온도조건에서 효소활성이 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(하기 표 4 참조).

표 4

[0091]

유래 균주	최적 온도 ($^{\circ}$ C)	Relative activity (%)			
		20 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C	80 $^{\circ}$ C
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	50	75	88	90	66
<i>B. halodurans</i> C-125	60	-	40	100	20
<i>B. subtilis</i> 168	50	43	80	77	-
<i>B. subtilis</i> GN156	60	18	52	100	-
<i>B. subtilis</i> M139	40	35	100	54	2
<i>B. brevis</i>	65	-	40	80	32
<i>B. licheniformis</i>	40	-	100	48	12
<i>B. amyloliquefaciens</i>	55	-	-	-	-
Alkalophilic <i>Bacillus</i> strain N137	60-70	5	40	100	28
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	50-60	40	80	100	-

[0092] <2-2> 최적의 pH 조건 결정

[0093] 본 발명의 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 효소 활성의 최적 pH 조건을 결정하기 위하여 정제된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈 1 μ g과 0.5% 베타-글루칸을 pH 2~11 조건하에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, 반응액 내에 존재하는 잔당량을 DNS 방법을 이용하여 측정하였다.

[0094] 그 결과 도 5에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 상기 효소활성의 최적의 pH는 pH 6이었으며, 특히 pH 4~9의 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 나타내는 것으로 나타나, 다른 균주에 의해 생산된 베타-1,3-1,4-글루카네이즈의 효소 활성과 비교하여 매우 넓은 범위의 pH조건에서 효소활성이 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(하기 표 5 참조).

표 5

[0095]

유래 균주	최적 pH	Relative activity (%)	
		pH 4	pH 9
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	6	82	84
<i>B. halodurans</i> C-125	6	18	45
<i>B. subtilis</i> 168	6	5	10
<i>B. subtilis</i> GN156	6	5	45
<i>B. subtilis</i> M139	6.5	0	0
<i>B. brevis</i>	9	5	100
<i>B. licheniformis</i>	5.5	15	-
<i>B. amyloliquefaciens</i>	5-6	50	-
Alkalophilic <i>Bacillus</i> strain N137	7.5	-	85
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	5	98	0

[0096]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0097]

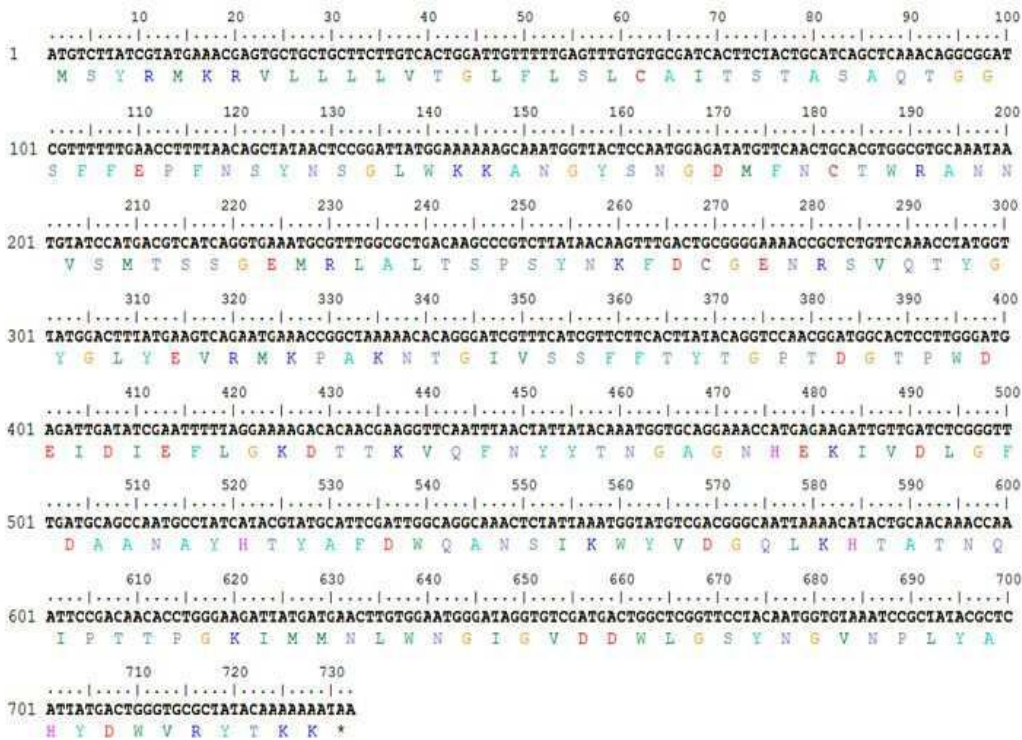
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11264P

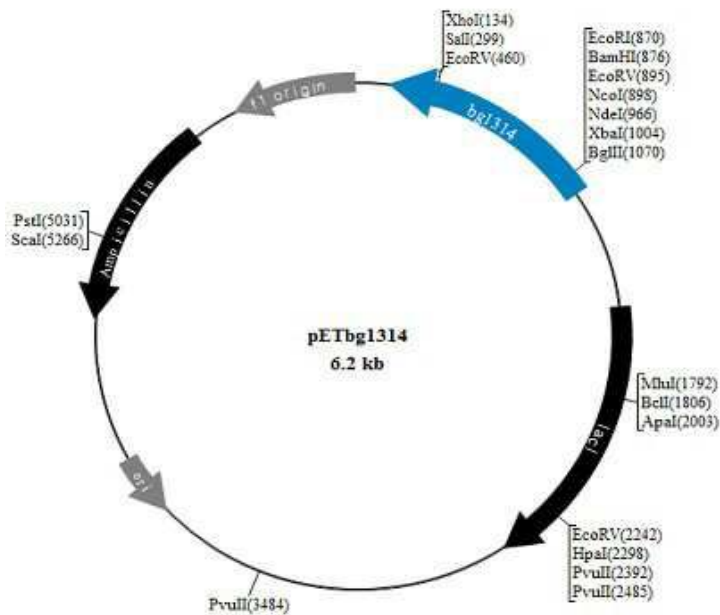
수탁일자 : 20120315

도면

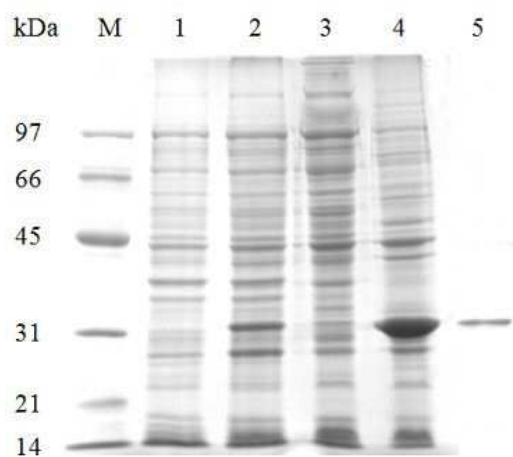
도면1



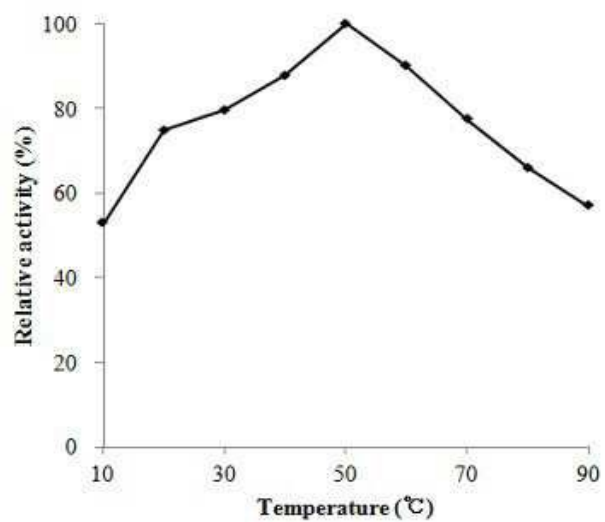
도면2



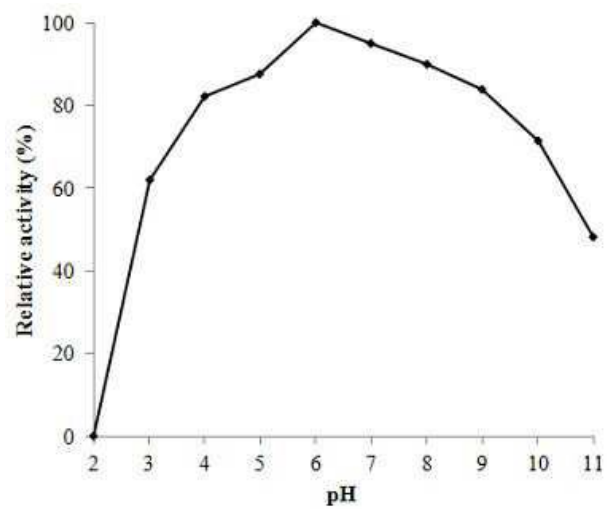
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 <120> Novel beta-1,3-1,4-glucanase and Method for Producing Thereof
 <130> PN1203-038
 <160> 4
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> beta -1,3-1,4-glucanase amino acid sequence

<400> 1

Met Ser Tyr Arg Met Lys Arg Val Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Leu

1 5 10 15

Phe Leu Ser Leu Cys Ala Ile Thr Ser Thr Ala Ser Ala Gln Thr Gly

20 25 30

Gly Ser Phe Phe Glu Pro Phe Asn Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Trp Lys

35 40 45

Lys Ala Asn Gly Tyr Ser Asn Gly Asp Met Phe Asn Cys Thr Trp Arg

50 55 60

Ala Asn Asn Val Ser Met Thr Ser Ser Gly Glu Met Arg Leu Ala Leu

65 70 75 80

Thr Ser Pro Ser Tyr Asn Lys Phe Asp Cys Gly Glu Asn Arg Ser Val

85 90 95

Gln Thr Tyr Gly Tyr Gly Leu Tyr Glu Val Arg Met Lys Pro Ala Lys

100 105 110

Asn Thr Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Thr Asp

115 120 125

Gly Thr Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr

130 135 140

Thr Lys Val Gln Phe Asn Tyr Tyr Thr Asn Gly Ala Gly Asn His Glu

145 150 155 160

Lys Ile Val Asp Leu Gly Phe Asp Ala Ala Asn Ala Tyr His Thr Tyr

165 170 175
Ala Phe Asp Trp Gln Ala Asn Ser Ile Lys Trp Tyr Val Asp Gly Gln
180 185 190
Leu Lys His Thr Ala Thr Asn Gln Ile Pro Thr Thr Pro Gly Lys Ile
195 200 205
Met Met Asn Leu Trp Asn Gly Ile Gly Val Asp Asp Trp Leu Gly Ser
210 215 220
Tyr Asn Gly Val Asn Pro Leu Tyr Ala His Tyr Asp Trp Val Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Lys Lys

<210> 2

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta -1,3-1,4-glucanase DNA sequence

<400> 2

atgtcttatac gatatgaacg agtgcctgctg cttcttgtca ctggattgtt tttgagtttg 60
tgtgcgatca cttctactgc atcagctcaa acaggcggat cgttttttga accttttaac 120
agctataact ccggattatg gaaaaaagca aatggttact ccaatggaga tatgttcaac 180
tgcacgtggc gtgcaataa tgtatccatg acgtcatcag gtgaaatgcg tttggcgtg 240
acaagcccg cttataaca gtttgactgc ggggaaaacc gctctgttca aacctatggt 300

tatggacttt atgaagtcag aatgaaaccg gctaaaaaca cagggatcgt ttcacgttc 360
ttcacttata cagggtccaac ggatggcact ccttgggatg agattgatat cgaattttta 420
ggaaaagaca caacgaaggt tcaatttaac tattatacaa atggtgcagg aaaccatgag 480
aagattgttg atctcgggtt tgatgcagcc aatgcctatc atacgtatgc attcgattgg 540
caggcaaact ctattaaatg gtatgtcgac gggcaattaa aacatactgc aacaaccaa 600
attccgacaa cacctgggaa gattatgatg aacttgtgga atgggatagg tgcgatgac 660
tggtcgggtt cctacaatgg tgtaaatccg ctatacgtc attatgactg ggtgcgctat 720

acaaaaaaat aa 732

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSbg1314-up

<400> 3

ggccgaattc gatgtcttat cgtatgaaac g

31

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSbg1314-rp

<400> 4

ggccctcgag tttttttgta tagcgcacc

29