



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0055240
(43) 공개일자 2012년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/20 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0116858

(22) 출원일자 2010년11월23일

심사청구일자 2010년11월23일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

유진철

광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호
(진월동, 새한아파트)

유하영

광주광역시 서구 송풍로 30, 에스케이뷰아파트
102동 502호 (풍암동)

조승식

광주광역시 남구 봉선로9번길 22, 102동 1103호
(주월동, 현대)

(74) 대리인

최성용

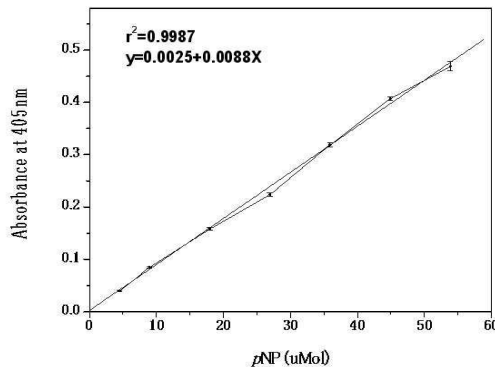
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 랄스토니아속 균주가 분비하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해 효소

(57) 요약

본 발명은 랄스토니아속 균주가 분비하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해 효소 및 이를 이용한 바이오디젤의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 *Ralstonia* sp. CS274에 의해 생산된 지방분해효소는 바이오디젤을 생산하는 트랜스에스테르화 반응을 촉매할 수 있으므로 바이오디젤의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

그의 16S rRNA 유전자 염기서열이 서열표 1에 나타난 랄스토니아(*Ralstonia*) 속의 균주(CS274 균주; 기탁번호 KCTC 18201p, 2010.11.15)에 의해서 생성되고, 효소의 겔 전기영동에 의한 분자량은 31 kDa이고, 최적 pH는 pH 8.0 내지 9.0이며, pH 8.0 내지 11.0에서 최대로 안정하고, 최적 활성 온도는 45 내지 55℃이며, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 존재하에서 지방분해효소 활성이 증가되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 생산에 유용한 지방분해효소.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 바이오디젤 생산에 유용한 랄스토니아속(*Ralstonia* sp.) 균주가 생산하는 지방분해 효소 및 이를 이용한 바이오디젤의 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 석유자원 부족과 이로 인한 원유가격 급상승 등의 문제를 해결하기 위한 방안으로 바이오매스를 이용한 바이오에너지 활용기술에 전 세계적으로 관심이 모아지고 있다. 그 중 바이오디젤은 식물성 유지 또는 동물성 지방을 원료로 화학적 촉매나 효소 촉매를 이용한 전이에스테르화반응을 통해 생산되는 친환경적인 연료로 각광받고 있다.

[0003] 현재 바이오디젤 생산에 주로 화학적 촉매 방법을 사용하고 있으나, 이 방법은 많은 에너지를 필요로 하고, 다량의 폐수 발생에 의한 2차 환경오염 등의 문제점을 안고 있어 이를 극복하기 위한 최적의 생물학적 촉매 공정이 필요한 실정이다. 바이오디젤을 생물학적 촉매 공정으로 생산하기 위한 핵심은 고기능성 지질분해효소의 사용에 달려있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서, 본 발명자들은 기존 지질분해 효소의 단점들을 보완할 수 있는 신규 지질분해효소를 개발하고자 직접 채취한 토양 미생물들의 효소를 이용하여 바이오디젤 생산능을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0005] 따라서, 본 발명은, 일면에 있어서, 바이오디젤 생산에 유용한 랄스토니아속 균주가 생산하는 지방분해 효소 및 이를 이용한 바이오디젤의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 효과

[0006] 본 발명에 따른 *Ralstonia* sp. CS274에 의해 생산된 지방분해효소는 바이오디젤을 생산하는 트랜스에스테르화 반응을 촉매할 수 있으므로 바이오디젤의 생산에 적합하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 pNP 표준 곡선을 나타내는 그래프도.

도 2는 405nm의 흡광도에서 4 균주의 지방분해효소 활성을 나타내는 그래프도.

도 3은 *Ralstonia* sp. CS274의 콜로니 형태학을 나타내는 사진.

도 4는 *Ralstonia* sp. CS274의 이웃하는 연결수(Neighbor-joining tree)를 나타내는 도면.

도 5는 다양한 1% 탄소원의 영향을 나타내는 그래프도.

- 도 6는 다양한 1% 질소원의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 7은 다양한 0.01% 금속-이온 원의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 8은 최적 배지의 성장 패턴을 나타내는 그래프도.
- 도 9는 세파로오스 CL-6B를 사용한 겔 투과 크로마토그래피 결과의 사진.
- 도 10은 세파로오스 CL-6B를 사용한 2차 겔 투과 크로마토그래피 결과의 사진.
- 도 11은 10% 겔 중의 SDS-PAGE 결과의 사진.
- 도 12는 LPR274의 최적 pH를 나타내는 그래프도.
- 도 13은 LPR274의 pH 안정성을 나타내는 그래프도.
- 도 14은 LPR274의 최적 온도를 나타내는 그래프도.
- 도 15는 LPR274의 온도 안정성을 나타내는 그래프도.
- 도 16는 LPR274의 안정성에 관한 유기 용매의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 17은 LPR274의 활성화에 대한 금속 이온의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 18은 LPR274의 활성화에 미치는 세제의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 19는 야자유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트 사진.
- 도 20은 대두유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트 사진.
- 도 21는 카놀라유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트 사진.
- 도 22는 바이오디젤 생산에 미치는 다양한 메탄올 농도의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 23은 Image_J software에 의해 측정된 FAME 생산에 미치는 다양한 메탄올 농도의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 24는 대두유와 카놀라유의 혼합물을 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 그래프도.
- 도 25은 실리카로 고정된 후 지방분해효소 활성을 나타내는 그래프도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0008] 본 발명자들은 바이오디젤 생산에 적용 가능한 지질분해효소를 미생물 자원으로부터 얻기 위하여 본 발명자들의 연구실에서 보유하고 있는 토양미생물 약 700여종을 대상으로 지질분해효소 생산능을 탐색하였고, 그 결과 높은 지질분해효소 생산능을 보이는 CS133, CS274, CS326, CS628 네 가지 균주를 선정하여 OSM(2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Yeast extract, 1% Mannitol) 배지에서 배양하였고, 배양액을 회수한 후 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 이용하여 단백질을 침전물을 얻었다. 단백질 침전물을 바이오디젤 합성을 위한 생촉매(효소)로 적량 첨가하여 바이오디젤 생성여부를 확인하였다.
- [0009] TLC(Thin layer chromatography)에서 바이오디젤 생성물을 보인 CS274 균주를 바이오디젤 생산을 위한 지질분해효소 생산용 균주로 최종 선별하였고, 16S rRNA 유전자 염기서열 자료를 토대로 CS274 균주는 *Ralstonia* 속에 속하는 세균으로 동정하였다. 상기 균주는 한국생명공학연구원에 2010.11.15일자로 기탁되어 기탁번호 KCTC 18201p를 부여받았다.
- [0010] 상기 균주의 최적배양조건을 설정하기 위해 탄소원, 질소원, 금속이온에 대한 영향을 조사한 결과 1% Mannitol, 1% Tryptone, 0.01% CaCl_2 를 함유한 배지가 지질분해효소 생산에 최적인 것으로 나타났고, 배양액 내의 지질분해효소는 암모늄 설페이트 침전(ammonium sulfate precipitation), 한외여과(ultra filtration), 겔 투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography), 이온교환 크로마토그래피(Ion-Exchange chromatography)를 수행하여 정제되었으며, SDS-PAGE를 통하여 순수한 단백질을 확인하였다. 그의 분자량은 대략 31 kDa으로 계산되었다. 효소 생산은 탄소, 질소 및 무기원으로서 만니톨, 트립톤 및 칼슘의 존재하에서 가장 높았다.
- [0011] 이어서, 정제된 지질분해효소를 이용하여 최적 반응온도와 최적 pH를 결정하였고, 온도, pH, 용매 안정성 및

금속, 계면활성제가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. CS274-지방분해효소는 최적 반응 온도와 pH는 50℃, pH 8 이었고, 54℃ 까지 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 활성이 떨어졌고, pH는 8-9에서 가장 안정함을 보였다.

[0012] 마찬가지로 활성은 바이오디젤 생산에 고도로 필요한 유기 용매의 범위에서 안정된 것으로 밝혀졌다. 활성은 칼슘 및 트리톤 X-100에 의해 상당히 증대되었다.

[0013] 용매안정성 실험결과, 메탄올 20%에서 대조군 기준 약 80% 활성을 보였으나 5mM 이상 첨가시 저해를 받았고, 계면활성제는 Triton X-100 1% 첨가시 대조군 기준 150%의 높은 활성을 보였으나, 5% 첨가시 심한 저해를 보였다.

[0014] 효소의 최적 반응 조건들을 이용하여 다양한 유지로 부터 바이오디젤 생산성을 비교 분석하였다. 팜유와 대두유의 경우 TLC상에서 바이오디젤 생성물을 보였으나, 카놀라유는 생성물이 보이지 않았다.

[0015] 효소는 실리카 겔로 고정화시켰으며, 활성은 각 사이클에서 점차 감소하긴 하였으나 고정화 효소는 8 연속 사이클까지는 활성이 유지되는 것으로 관찰되었다. 생산은 반응 후 1시간부터 관찰되었으며 60시간 이상 지속되었다. 바이오디젤 생산을 다양한 메탄올 농도에서 수행하였으며, 10% 메탄올에서 최대임이 확인되었다. 유지에 메탄올 5%, 정제된 효소 5% (wt%)를 첨가, 20℃, 300rpm으로 반응 하였을 때, 최적반응 시간은 12시간이었고, 매 12시간마다 메탄올 5% 씩 첨가한 후 분석한 결과 바이오디젤 생성량이 증가하였다.

[0016] 따라서, 바이오디젤을 생산하는 트랜스에스테르화 반응을 촉매 할 수 있는 *Ralstonia* sp. CS274에 의해 생산된 지방분해효소는 바이오연료생산 분야에서 매우 유용하게 활용될 수 있다.

[0017] <실시예>

[0018] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명하나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0019] 사용된 재료 및 시약은 다음과 같다.

[0020] *p*-니트로페놀(*p*NP), *p*-니트로페닐 아세테이트(*p*NPA), *p*-니트로페닐 부티레이트 (*p*NPB), *p*-니트로페닐 미리스테이트(*p*NPM), *p*-니트로페닐 팔미테이트(*p*NPP), 및 트리올렌은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 세파로오스 CL-6B, 디에틸아미노에틸(DEAE) 세파로오스 CL-6B 패스트 플로우(F.F), 세파텍스 G-75 및 카복시메틸(CM) 세파텍스 C-50 Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)으로부터 입수하였다. 아세트니트릴, 헥산, 메탄올 및 박층 크로마토그래피(TLC) 실리카 겔 60 F₂₅₄ 플레이트는 Merck (Darmstadt, Germany)사로부터 입수하였다. 나머지 모든 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

[0021] 실시예 1: 효소 활성의 측정

[0022] 지방분해효소 활성은 공지된 방법을 약간 변형하여 결정하였다[참조 문헌: M.M. Berekaa, T.I. Zaghoul, Y.R. Abdel-Fattah, H.M. Saeed. and M. Sifour. (2009) Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 287-294. 및 K.N. Kilcawley, M.G. Wilkinson, P.F. Fox (2002) Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 310-320]. 간단히 설명하자면, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 중의 0.15 M NaCl 및 0.5% Triton X-100을 함유하는 350 μ l 용액(용액 A) 중에 30℃에서 예비배양시켰다. 적절히 희석한 효소 시료 25 μ l 및 기질 25 μ l(아세트니트릴 중의 10 mM *p*NPP)을 용액 A와 혼합하여 30℃에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 원심분리 후, 유리된 *p*NP의 양을 마이크로플레이트 리더(Thermo, Multiskan EX)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 표준 *p*NP 곡선을 구하여 효소 활성을 측정하였으며 지방분해 효소 활성의 1 단위(U)는 표준 에세이 조건하에서 *p*NPP로부터 1 μ M *p*NP를 유리시키는 양으로 정의하였다. *p*NP 표준 곡선에 따른 지방분해효소 활성은 도 1에 나타내었다. 값은 평균(n=3)±표준 편차로 나타냈다.

[0023] 실시예 2: 단백질 결정법

[0024] 단백질 농도는 표준으로서 소혈청 알부민을 사용하여 Bradford 방법에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다[참고문헌: M.M. Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.].

[0025] 실시예 3: 지방분해효소 생산 미생물(*Ralstonia* sp. CS274)의 스크리닝 및 단리

[0026] 한국의 여러 지역으로부터 수집한 700 종의 토양 단리물을 본 발명자들의 실험실에 보관하였다. 모든 균주들은 고영양 풍부 배지인 OSYM (2% 오토밀, 1% 대두, 1% 효모 엑스, 1% 만니톨)에서 배양하였다. 3일 동안 배양하고 원심분리하여 얻은 배양 상층액을 상기한 바와 같은 기질로서 pNPP를 사용하여 일반적인 지질분해 효소 에세이에 의해 지질분해효소를 평가하였다. 수집한 균주 중에서 CS133, CS274, CS326 및 CS628로 명명한 4개의 균주가 강력한 지질분해효소 활성을 나타냈다(도 2). 따라서, 이들 균주를 추가의 연구를 위하여 선택하였다.

[0027] 실시예 4: 미생물의 동정

[0028] 지질 분해 효소를 사용한 바이오디젤 생산은 본 연구의 주된 목적 중 하나이다. 따라서, 지질분해효소를 생산할 수 있는 모두 4개의 균주를 후술하는 바와 같이무세포 배양 추출물로 바이오디젤 생산에 대하여 먼저 평가하였다. 이들 중, 균주 CS274는 에세이 조건하에서 바이오디젤을 가장 현저하게 생산하였으므로 이 균주를 선택하여 추가의 연구를 수행하였다. 이 균주는 공지된 방법에 따라 수행하여 그의 16S rRNA 서열에 기초하여 동정하였다[참고문헌: S.H. Kim, J.C. Yoo and T.S. Kim (2009) Nargenicin enhances 1,25-dihydroxy-vitamin D₃- and all-*trans* retinoic acid-induced leukemia cell differentiation via PKC β I/MAPK pathways. *Biochemical Pharmacology*, 77,1694-1701]. 상기 균주를 3일 동안 아가플레이트에서 성장시키고 형태학적 구조를 도 3에 나타냈다. 표 1은 *Ralstonia*.sp. CS274와 밀접하게 연관된 균주의 비교한 것이다.

표 1

[0029]

번호	생물명	균주	유사성	핵산 차이
1	<i>Ralstonia pickettii</i>	ATCC 27511(T)	99.86	2/1472
2	<i>Ralstonia solanacearum</i>	GMI1000	98.64	20/1475
3	<i>Ralstonia insidiosa</i>	AU2944(T)	98.53	21/1430
4	<i>Ralstonia syzygii</i>	R001(T)	98.47	22/1439
5	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	LMG 6866(T)	98.41	23/1443
6	<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG 2299(T)	98.10	28/1475
7	<i>Cupriavidus gilardii</i>	CIP 105966(T)	96.87	41/1308
8	<i>Cupriavidus campinensis</i>	WS2(T)	96.72	48/1464
9	<i>Cupriavidus necator</i>	ATCC 43291(T)	96.67	45/1350
10	<i>Cupriavidus gilardii</i>	LMG 5886(T)	96.25	53/1413

[0030] 이 균주는 그의 16S rRNA 서열이 *Ralstonia pickettii*에 고도로 상동성이었기 때문에(99.86%), *Ralstonia*의 속에 속하는 것으로 판단되었다[서열번호 1, 도 4 및 표 1 참조]. 그러나, 이 균주는 *picketti*의 종과는 상당히 달랐으므로 본 발명자들은 이를 *Ralstonia* sp. CS274로 명명하였다.

[0031] 실시예 5: 지방분해효소 생산을 위한 배양

[0032] 효소 생산에 영향을 미치는 다양한 변수들은 상기 균주를 250 ml 엘렌마이어 플라스크 내의 기본 배지 50 ml 중에서 180 rpm으로 지속적으로 진탕시키면서 발효시킴으로써 수행하였다.

[0033] 온도 영향을 평가하기 위하여 발효를 pH 7.5에서 다양한 배양 온도에서 수행하였다(25, 28, 30 및 32 °C). 이어서, pH의 영향을 소듐 카보네이트(20% w/v)로 적정하여 28 °C에서 다양한 pH(6.5, 7.0, 7.5 및 8.0)의 배지로 결정하였다. 지방분해효소 활성은 효소 생산이 최고조에 달했을 때 배양 배지를 원심분리시켜서 얻은 무세

포 배양 상층액으로 평가하였다.

- [0034] 효소 생산에 미치는 다양한 탄소원의 영향은 질소원으로서 1% 효모 엑스 및 글루코오스, 프락토오스, 말토오스, 수우크로스, 락토오스, 전분, 글리세롤, 만니톨 및 대조군(탄소원이 없음) 등의 다양한 탄소원(1%)으로 보충한 배지를 이용하여 평가하였다. 배지의 초기 pH는 pH 7.5로 조정하고 발효를 180 rpm 및 28 °C로 설정한 진탕배양기에서 96 시간 동안 수행하였다.
- [0035] 효소 생산에 미치는 질소원의 영향은 1% 최적의 탄소원 및 대두,オート밀, 비프 엑스, 효모 엑스, 펩톤, 말트 엑스, 암모늄 설페이트, 소듐 니트레이트 및 대조군(질소원 없음) 등의 다양한 질소원(1%)으로 보충한 배지로 결정하였다. 발효는 상기한 바와 같은 조건에서 수행하였다.
- [0036] 효소 생산에 미치는 금속이온의 영향은 최상의 탄소원 및 질소원을 함유한 배지로 평가하였다. $MgCl_2$, $FeCl_2$, $CuCl_2$, KCl , $NaCl$ 및 $CoCl_2$ 등의 다양한 금속 이온(0.01%)을 배지에 첨가하여 최상의 금속 이온 원을 평가하였다. 발효는 상기한 바와 같은 조건에서 수행하였다.
- [0037] 그 결과를 도 5 내지 8에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이 탄소원으로서 만니톨의 존재하여 가장 높은 수율을 보였다. 이어서, 공통 탄소원으로서 만니톨을 사용하여 균주를 다양한 질소원(1%)을 포함하는 배지에서 배양하였다. 도 6에 나타난 바와 같이 트립톤이 최적의 질소원으로 나타났다. 만니톨과 트립톤을 최적의 탄소원 및 질소원으로 선택한 후, 균주를 다양한 금속 이온(0.01%)을 포함하는 배지에서 성장시켰다. 이 경우 효소 생산은 도 7에 나타난 바와 같이 칼슘이온의 존재하에서 최적으로 나타났다.
- [0038] 균주로부터 최대 지방분해효소 생산에 적합한 최적 배지 조성을 선택한 후, 발효 프로필을 120 시간 까지 최적의 배지에서 관찰하고 그 결과를 도 8에 나타냈다. 최적 배지에서 지방분해효소 활성은, 심오한 활성은 48 시간 후에 얻어졌으나, 배양후 96 시간에 가장 높은 것으로 나타났다. 배지의 pH 뿐만 아니라 세포의 생물량은 작았으나 전체 배양 기간 동안 점차 증가하는 것으로 밝혀졌다
- [0039] 실시예 6: 지방분해효소 정제
- [0040] 달리 언급하지 않으면, 모든 정제 단계는 4 °C에서 수행하였다. 지방분해효소는 암모늄 설페이트 침전법으로 정제하였다. 1차 겔 투과 크로마토그래피는 세파로오스 CL-6B로 수행하였다. CM 세파텍스 C-50를 사용한 양이온 교환 크로마토그래피에 이어서 세파로오스 CL-6B를 사용한 2차 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다.
- [0041] 6-1: 암모늄 설페이트 침전
- [0042] *Ralstonia* sp. CS 274를 72 시간 동안 성장시키고, 조 상층액을 6,000 x g 로 1 시간 동안 원심분리하여 얻었다. 0-30%, 30-75% 및 75-95% 포화의 고상 $(NH_4)_2SO_4$ 을 상층액에 첨가하고 침전된 단백질을 6,000 x g에서 1시간 동안 원심분리에 의해 회수하였다. 효소 특이 활성은 30-75%에서 가장 높았으므로 이 분획을 한외여과막 (YM 30, Millipore Corp, Amicon Danvers, MA, USA)을 이용하여 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)으로 투석시켰다.
- [0043] 6-2: 세파로오스 CL-6B를 사용한 1차 겔투과 크로마토그래피
- [0044] 세파로오스 CL-6B 컬럼 (2.4 cm x 117 cm)을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)으로 평형시켰다. 이전 단계에서 얻은 농축 샘플을 컬럼에 부하하고 동일한 완충액으로 16.5 ml/h (5.5 ml/분획)으로 용출시켰다. 용출된 효소의 순도를 평가한 후 효소의 생화학적 특성을 검사하였다.
- [0045] 6-3: CM-세파텍스 C-50을 이용한 양이온교환 크로마토그래피
- [0046] CM 세파텍스 C-50 컬럼 (1.1 cm x 3 cm)을 시트레이트-NaOH 완충액 (pH 6.0)으로 평형시켰다. 투석물을 이온교환기에 부하하고 동일한 완충액에서 3 ml/h (1 ml/분획)으로 0 내지 1 M KCl의 선형 구배로 용출시켰다. 지방분해효소 활성 분획들을 모아서 농축하고 겔투과에 적용시켰다.
- [0047] 6-4: 세파로오스 CL-6B를 사용한 2차 겔투과 크로마토그래피
- [0048] 2차 세파로오스 CL-6B 컬럼 (1.1 cm x 95 cm)을 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형시켰다. 상기 단계로부터 얻은 농축 시료를 컬럼에 부하하고 6 ml/h (2 ml/분획)으로 동일한 완충액으로 용출시켰다. 용출 효소의 순도를 평가하고 효소의 생화학적 특성들을 결정하였다.
- [0049] 6-5: 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

[0050] 효소의 순도 및 분자량을 결정하기 위하여 최종적으로 정제한 효소를 Laemmli의 방법에 따라 10% 폴리아크릴아미드 슬랩 겔로 SDS-PAGE를 수행하였다[참조문헌: U.K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685]. 단백질 사이즈 마커(MBI, Fermentas)를 참고 단백질로서 사용하였다. 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 염색시켜 가시화하고, 메탄올:빙초산:증류수= 1:1:8 (부피)를 포함하는 용액으로 탈염색시켰다. 분자량은 참고 단백질의 상대 이동성에 의해 평가하였다.

[0051] 최종 활성 회수율 및 정제 배수는 다음의 표 2에 요약하였다. 염 분획화 후, 이를 세파로오스 CL-6B로 정제하였다(도 9 참조). 활성 분획들을 모으고 CM Sephadex C-50로 이온교환크로마토그래피에 의해 더 정제하였다. 마지막으로 효소를 세파로오스 CL-6B로 2차 겔 여과에 의해 정제하였다(도 10 참조). 다양한 정제 단계의 효소를 SDS-PAGE에 의해 분석하고 그 결과를 도 11에 나타냈다. 겔 전기영동에 의해 분자량은 31 kDa인 것으로 측정되었다. 도 9는 세파로오스 CL-6B를 사용한 겔 투과 크로마토그래피(2.4 x 117 cm = 444 ml)이고, 도 10은 세파로오스 CL-6B를 사용한 2차 겔 투과 크로마토그래피(1.1 x 95 cm = 90 ml)이며, 도 11은 10% 겔 중의 SDS-PAGE 결과의 사진이다. A는 암모늄 설페이트 침전, B는 1차 GPC = Sepharose CL-6B, C는 이온교환 = CM Sephadex C-50, D는 2차 GPC = Sepharose CL-6B이다.

표 2

정제 단계	전체 활성(U)	총 단백질 (mg)	특이활성(U/mg)	정제배수	수율(%)
조추출물	2,638,000	150.67	17,000	1.00	100
암모늄 설페이트	1,058,000	40.23	26,000	1.53	40
세파로오스 CL-6B	210,000	0.51	411,000	24.18	8
CM-Sephadex C-50	179,000	0.43	416,000	24.47	7
Sepharose CL-6B	96,000	0.11	872,000	51.29	4

[0053] 실시예 7: 효소 특성화

[0054] 7-1: 효소 활성 및 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향

[0055] 상대적 효소 활성은 100 mM 완충액을 사용하여 pH 5.0 내지 11.0에 걸친 다양한 pH에서 결정하였다. 표준으로 사용된 완충액은 시트르산-소듐 포스페이트(pH 5.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.5-9.5) 및 NaHCO₃ (pH 9.6-11.0)이었다.

[0056] pH 안정성을 평가하기 위하여, 효소 시료의 분취량을 각각의 pH 완충액(pH 5.0-11.0)으로 1-2 시간 동안 0-4 °C 냉장고에서 인큐베이션시켰다. 잔여 효소 활성은 표준 에세이 프로토콜에 따라 측정하였으며 초기 활성(다양한 온도 및 pH에 노출되기 전)을 100%로 고려하여 계산하였다. 효소의 최적 온도는 pH 8.0에서 다양한 온도에서 평가함으로써 평가하였다.

[0057] 열안정성을 평가하기 위하여, 효소 용액들을 다양한 온도에서 1-2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 시료의 분취량을 다양한 시간 간격으로 회수하고 잔여 효소 활성을 상기한 표준 에세이 프로토콜에 따라 측정하였다.

[0058] 효소의 최적 pH는 도 12에 나타났다. 효소는 pH 8.0 내지 9.0에서 고도로 활성을 나타냈고, pH 8.5에서 최대였다. 다만, 최대 활성의 약 60% 및 20%가 각각 pH 7.0 및 pH 10.0에서 발견되었다. 효소 활성은 각각의 완충액 중에서 1 및 2 시간 인큐베이션시킨 후 측정했을 때 pH 4.0 내지 11.0의 넓은 pH 범위에서 안정된 것으로 밝혀졌다[도 16 참조]. 안정성은 pH 8.0 내지 11.0에서 최대이었다.

[0059] 균주 CS274로 부터의 지방분해효소(LPR₂₇₄)의 생화학적 특성은 pNPP를 사용하여 결정하였으며, 달리 언급하지 않는 한 본 발명의 전체를 통하여 기질로 사용하였다. 이 효소는 45 내지 55 °C에서 가장 활성을 나타냈고, 최적 활성은 52 °C에서 나타났다[도 13 참조]. 활성은 50 °C까지 고도로 안정하였으며 그 이상에서는 급격히 떨어졌다[도 14 참조]. 2 시간 인큐베이션 후, 원 효소 활성의 약 40% 만이 60 °C에서 유지되었다. 도 12는 LPR₂₇₄의 최적 pH를 나타내는 그래프도이고, 도 13은 LPR₂₇₄의 pH 안정성을 나타내는 그래프도이며, 도 14는 LPR₂₇₄의 최적 온도를 나타내는 그래프도이고, 도 15는 LPR₂₇₄의 온도 안정성을 나타내는 그래프도이다.

[0060] 7-2: 지방분해 효소의 유기 용매 안정성

- [0061] 지방분해효소의 유기 용매 안정성은 2 시간 까지 다양한 농도의 다양한 용매로 평가하였다. 효소 시료들을 1%, 5% 및 10% 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 프로판올로 냉장고에서 인큐베이션시킨 후 잔여 효소 활성을 표준 에세이 프로토콜에 따라 평가하고 그 결과를 도 16에 나타냈다. 도 16은 LPR₂₇₄의 안정성에 미치는 영향을 나타내는 그래프도이다. 거의 온전한 활성이 1% 이하의 농도의 용매의 존재하에서 유지되는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 활성은 용매 농도를 증가시킴에 따라 감소하였다[도 16 참조].
- [0062] 7-3: 지방분해효소 활성에 미치는 금속이온 및 세제의 영향
- [0063] 효소 시료들을 1 mM 및 5 mM Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, K⁺로 인큐베이션시켰다. 상대 효소 활성을 상기한 표준 에세이 프로토콜에 따라 측정하였다. 마찬가지로, triton X-100, 테옥시콜린산 (DOCA), 소듐 도데실 설페이트 (SDS), tween 20, 폴리옥시에틸렌 (POE)의 다양한 세제의 영향을 1% 및 5%에서 결정하였다. 그 결과를 도 17에 나타냈다. 도 17은 LPR₂₇₄의 활성에 미치는 금속 이온의 영향을 나타내는 그래프도이다. 도 17에 설명한 바와 같이, 1 mM의 Ca²⁺ 및 Mg²⁺의 존재하에서 지방분해효소 활성은 각각 40% 및 20% 씩 증가되었다. 그러나, Mn²⁺를 제외하고는 기타 시험한 금속 이온들은 동일 농도에서 다양한 정도로 효소 억제를 유발하였다. 이온 농도를 증가시키자 활성은 모든 경우에 억압되는 것으로 나타났다(도 17 참조).
- [0064] 다양한 세제를 사용한 지방분해효소 활성의 영향은 도 18도에 그 결과를 나타냈다. 도 18은 LPR₂₇₄의 활성에 미치는 세제의 영향을 나타내는 그래프도이다. [DOCA: 테옥시콜린산, SDS: 소듐 도데실 설페이트, POE: 폴리옥시에틸렌]. 활성은 1%의 Triton X-100에 의해 증가된 반면, 5% 농도에서는 활성을 억제하였다. 테옥시콜린산 역시 1%에서 활성을 증대시켰으나, 이를 벗어나서는 그렇지 않았다. 기타 시험된 세제들은 다양한 정도로 효소 억제를 유발하였다[도 18 참조].
- [0065] 7-4: K_m 및 V_{max} 의 결정
- [0066] 효소의 운동 상수 K_m 및 V_{max} 는 Lineweaver-Burk double-reciprocal plot에 의해 결정하였다[M.H. Lineweaver and D. Burk (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666]. 효소 에세이는 pNPP 농도 및 상수 효소 농도 (1.3 ug)를 달리하여 최적 조건에서 수행하였다.
- [0067] 7-5: 기질 특이성
- [0068] C2, C4, C10, C14, C16 등의 다양한 사슬 길이를 가진 *p*-니트로페닐 지방산 에스테르류 기질들을 constant 농도(50 mM)로 사용하여 표준 에세이 프로토콜하에서 측정하였다.
- [0069] 실시예 8: 바이오디젤의 생산 및 분석
- [0070] 8-1: 효소적 방법에 의한 바이오디젤 생산
- [0071] 반응은 공지의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다[참조문헌: K.S. Yang, J.H. Sohn and H.K. Kim (2009) Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 599-604.]. 야자유, 대두유 또는 카놀라유(7.89 ml) 및 메탄올(최종 용적 0.99 ml)를 캡핑한 원뿔 튜브(15 ml)에 보관한 후 지방분해효소 시료(300 U, pNPP 분광광도계 에세이)와 혼합하였다. 반응은 200 rpm으로 지속적인 진탕을 하면서 30 °C에서 48 시간 동안 수행하였다. 3-단계 단위의 전환 공정에 있어서, 메탄올 0.33 ml을 반응의 시작부터 0, 12 및 24 시간의 3개의 다른 시간 대에 첨가하였다.

표 3

다양한 오일원의 지방산 조성

	C16:0 [wt%]	C18:0 [wt%]	C18:1 [wt%]	C18:2 [wt%]	C18:3 [wt%]	C20:1 [wt%]	C22:1 [wt%]
야자유	45	5	40	10	-	-	-
대두유	12	5	23	55	5	-	-
카놀라유	2	1	15	13	9	10	50

[0073] 8-2: 박층 크로마토그래피(TLC)에 의한 반응 생성물의 분석

[0074] 반응의 다양한 시간 간격에 있어서 반응 혼합물의 분취량(200 μ l)을 얻어서 1 ml 헥산과 혼합하였다. 2분 후, 혼합물을 원심분리시켜 상층(10 μ l)을 TLC 플레이트 (실리카 겔)에 부하하였다.

[0075] 상기 플레이트를 헥산:에틸아세테이트:아세트산(94:5:1)중에 전개하고 짧게 기건시킨 후, 플레이트를 문헌의 방법을 약간 변형하여 새로이 준비한 포타슘 퍼망가네이트 용액(증류수 중 0.5% KMnO_4)에 침지시켰다[Bansal, J. McCrady, A. Hansen, K. Bhalerao (2008) Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel. *Fuel*, 87, 3369-3372.]. 플레이트를 즉시 제거하고 스캐닝하였다. 지방산 메틸 에스테르 (FAME) (순도 99.9%) 표준을 TLC 플레이트에서 참고 바이오디젤로서 사용하였다.

[0076] 8-3: 바이오디젤 생산의 정량화

[0077] 지방산 메틸 에스테르 영역(FAME)을 정량화하기 위하여, Image J v. 1.42q (/로부터 무료 입수 가능함)에 부하하고, 메뉴 옵션 이미지→Type→16-bit를 통하여 16-bit 이미지로 전환시켰다. 이어서, 이미지를 메뉴 옵션 이미지→조정→쓰레쉬홀드를 사용하여 쓰레쉬홀드(threshold)시켰다. 이 타입을 Black & White로 세팅하고, 탭 슬라이드를 34의 값으로 이동시켰다(전문가들은 이 값을 이들의 데이터세트로 유용한 값으로 세팅할 수 있으나 상기 값은 실험으로부터 분석되는 모든 이미지들에서 사용되어야 한다). 결과의 쓰레쉬홀드 이미지는 바이너리이고 hemorrhage 영역만을 나타낼 것이다. 영역 및 픽셀의 수를 측정하기 위하여 메뉴 옵션 분석→측정을 선택하였다. 측정을 선택하고, 값을 기록하고 이 과정을 후속 이미지(보조 재료 및 도면) 상에서 반복하였다. 전체의 FAME 용적을 각 색선의 FAME 영역을 합하고 각 색선의 두께를 곱하여 계산하였다[X.N. Tang, A.E. Berman, R.A. Swanson, M.A. Yenari (2010) Digitally quantifying cerebral hemorrhage using Photoshop and Image J. *Journal of Neuroscience Methods*, In Press, Available online 7 May 2010].

[0078] 군주 274로 부터의 지방분해효소는 상기한 바와 같이 메탄올 및 야자유 또는 대두유의 존재하에서 바이오디젤의 생산을 촉매화하였다. 도 19는 야자유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트 사진이다. 도 20은 대두유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트의 사진이다. 도 21은 카놀라유를 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 TLC 플레이트 사진이다. 생산은 도 19, 20 및 표 4, 5]에서 알 수 있는 바와 같이 TLC 플레이트 상에서 1 시간부터 개시되었다. 생산은 48시간에 최고조에 달했다. 다른 오일을 사용한 동일한 프로토콜 하에서 지방분해효소는 48 시간까지 카놀라유로부터 바이오디젤 생산을 촉진할 수 없었다[도 21 참조. 이는 본 지방분해효소가 고도로 기질특이성임을 나타낸다.

표 4

[0079] 이미지_J 소프트웨어를 사용한 카놀라 FAME의 정량화

	BD	1h	3h	12h	24h	48h
Area	44100	7100	7900	8000	11500	13800
FAME (%)	100	16	18	18	26	31

표 5

[0080] 이미지_J 소프트웨어를 사용한 대두 FAME의 정량화

	BD	1h	3h	6h	12h	24h	48h
Area	41500	4100	5000	6300	7400	8800	11000
FAME (%)	100	10	12	15	18	21	27

[0081] 바이오디젤 생산에 미치는 5 내지 20% 범위의 메탄올 농도의 영향은 대두유를 표준 오일로 사용하여 관찰하였다. 생산은 10% 농도에서 가장 높았다[도 22 참조]. 도 22는 바이오디젤 생산에 미치는 다양한 메탄올 농도의 영향을 나타내는 사진이다. 지방분해효소는 메탄올 및 대두유로부터 바이오디젤 생산을 촉매화하였으나 카놀라유로부터 생산을 촉매화하지 못하였다. 따라서, 두 오일을 다양한 비율로 혼합하여 바이오디젤 생산을 관찰하였다. 이들 오일의 혼합은 바이오디젤 생산을 증대시키지는 못하였으나(도 24 참조), 도 23은 이미지_J 소프트웨어에 의해 측정된 FAME 생산에 미치는 다양한 메탄올 농도의 영향을 나타내는 그래프도이다. 도 24는

대두유 및 카놀라유의 혼합물을 사용한 바이오디젤 생산을 나타내는 사진이다. 그의 혼합물 중의 선택적인 오일을 가수분해할 수 있었으며, 이는 유의성을 갖는다.

표 6

대두유와 카놀라유의 혼합비

	혼합비 [w/w%]			
	A	B	C	D
대두유	20	40	60	80
카놀라유	80	60	40	20

실시예 9: 효소 고정화

부분적으로 정제한 효소의 고정화를 위하여, 실리카 겔을 캐리어로 사용하였다. 캐리어를 10 mM Tris-buffer (pH 8.0)로 세척하였다. 부분적으로 정제한 효소 1 ml를 지속적으로 진탕하면서 실온에서 캐리어 100 mg으로 밤새 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간의 말미에, 비결합 효소를 제거하고 캐리어들을 10 mM Tris-buffer (pH 8.0)으로 세척하였다[참조문헌: M.M. Berekaa, T.I. Zaghoul, Y.R. Abdel-Fattah, H.M. Saeed, and M. Sifour. (2009) Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 287-294].

효소 활성은 정상 에세이 프로토콜 하에서 고정화 효소를 사용하여 연속적으로 결정하였다. 도 25는 고정화 효소에 의한 효소 활성을 나타내는 그래프도이다. 활성은 점차 감소하였으며 거의 30%의 활성이 5번째 사이클 후에도 발견되었으며 이는 8번째 반응 사이클 까지 일정하게 남아 있었다[도 25 참조].

수탁번호

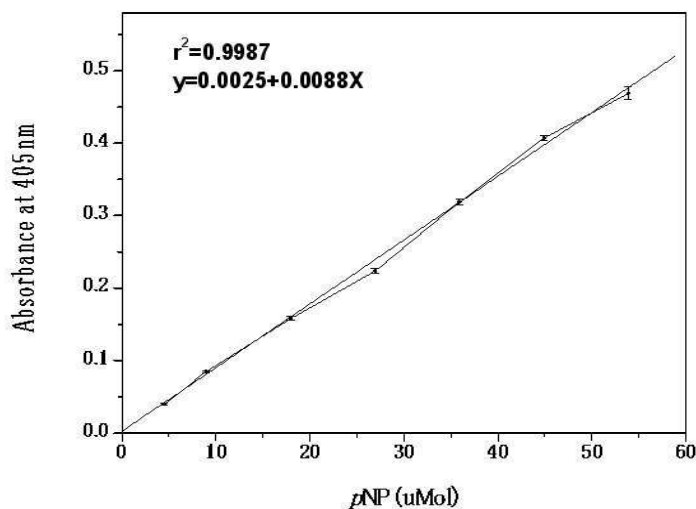
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18201P

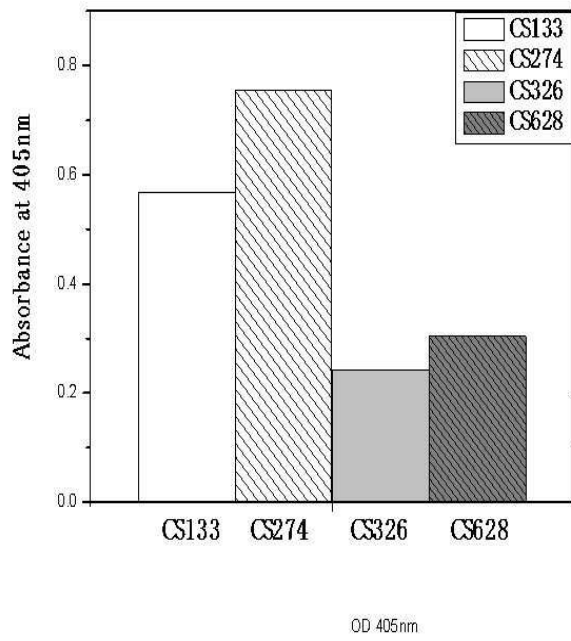
수탁일자 : 20101115

도면

도면1



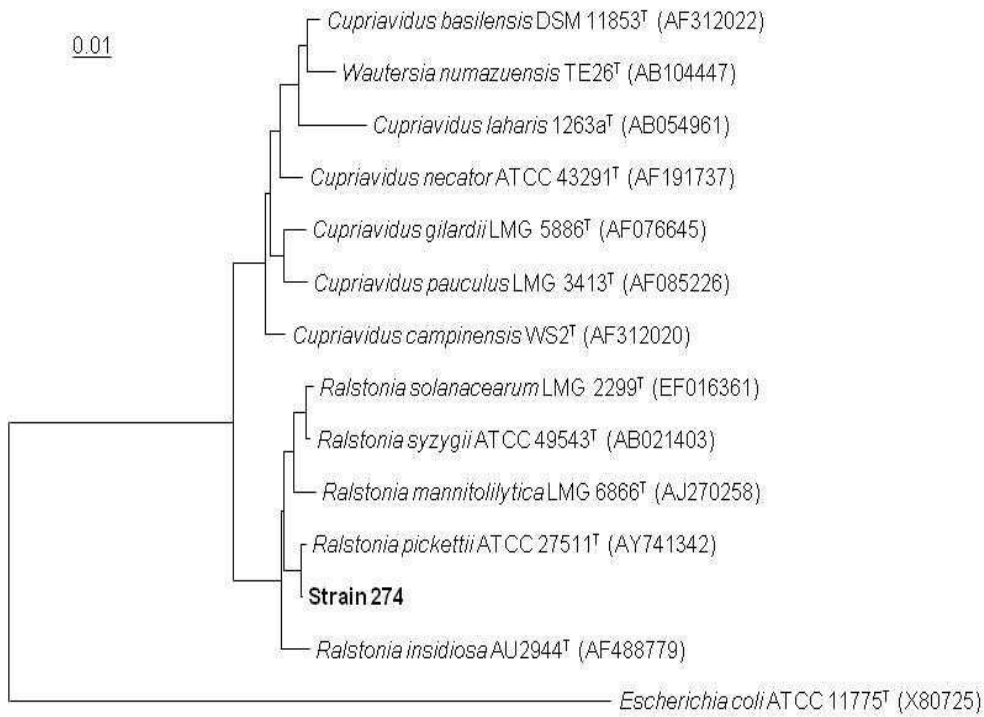
도면2



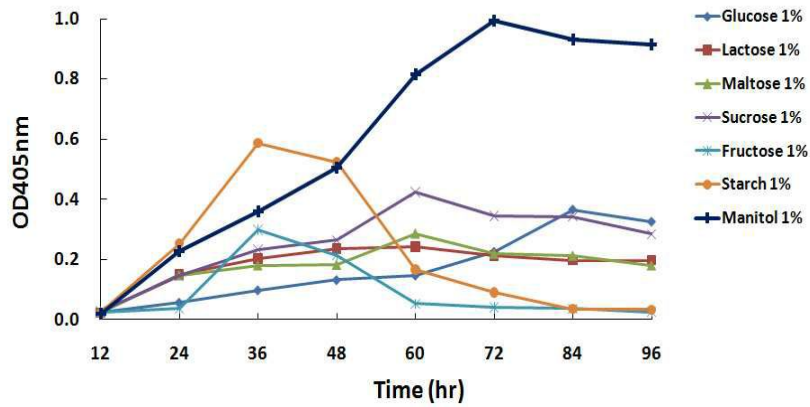
도면3



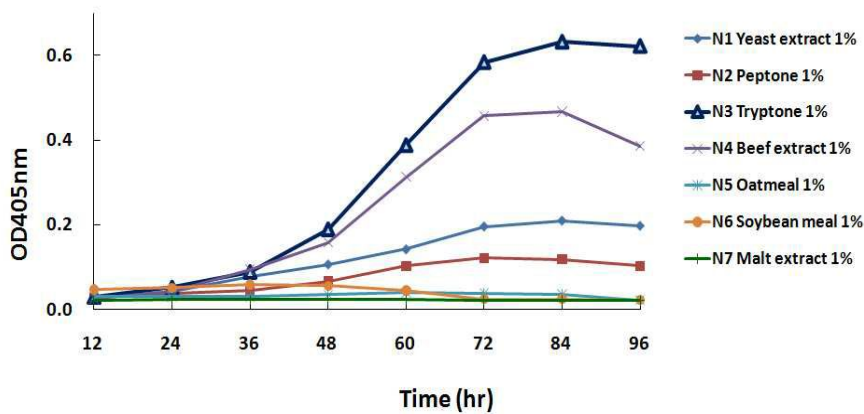
도면4



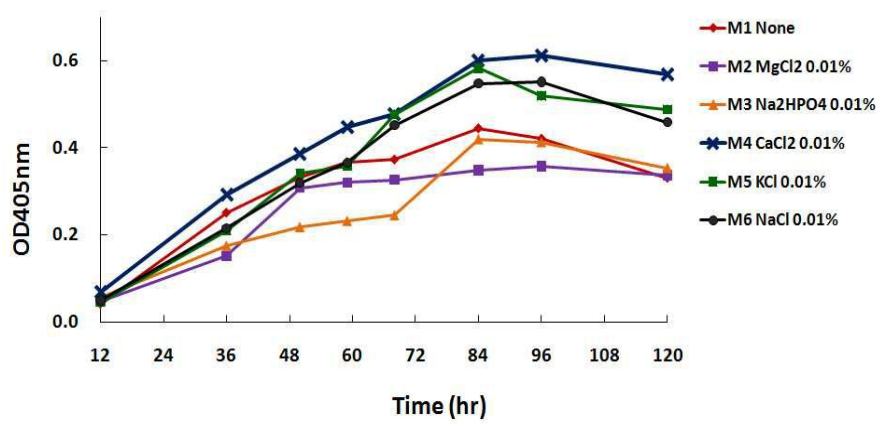
도면5



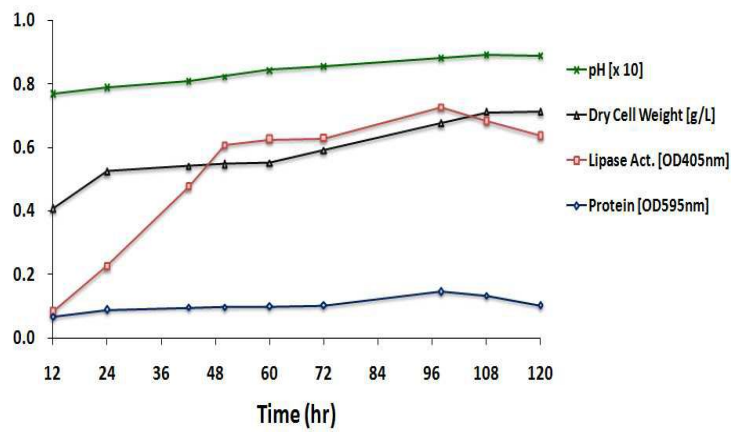
도면6



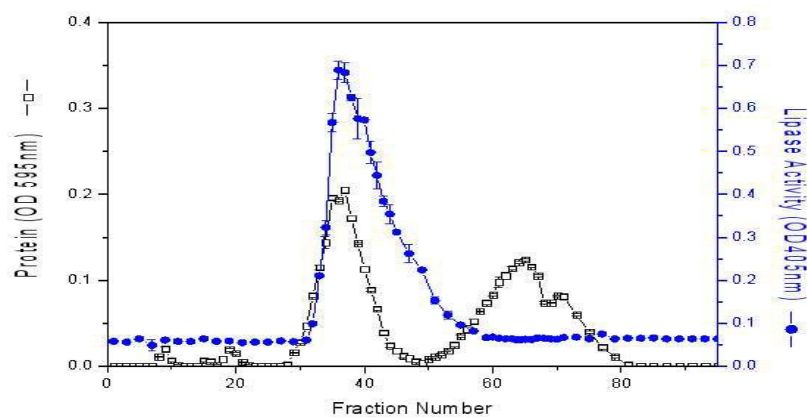
도면7



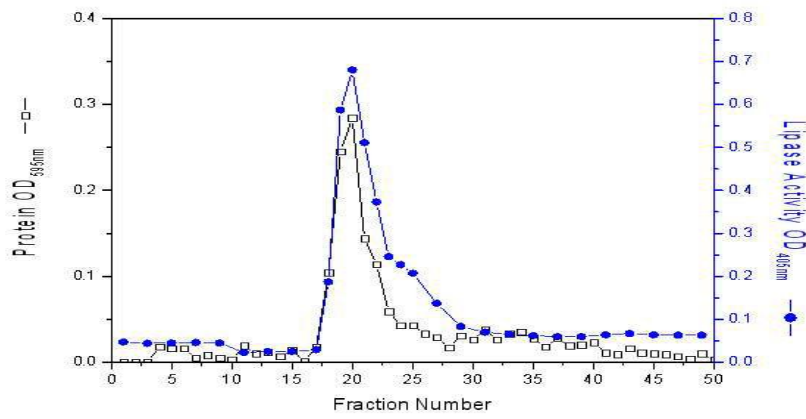
도면8



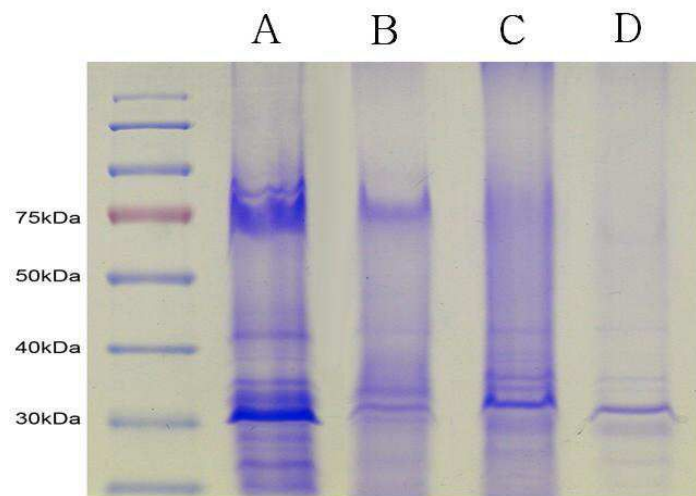
도면9



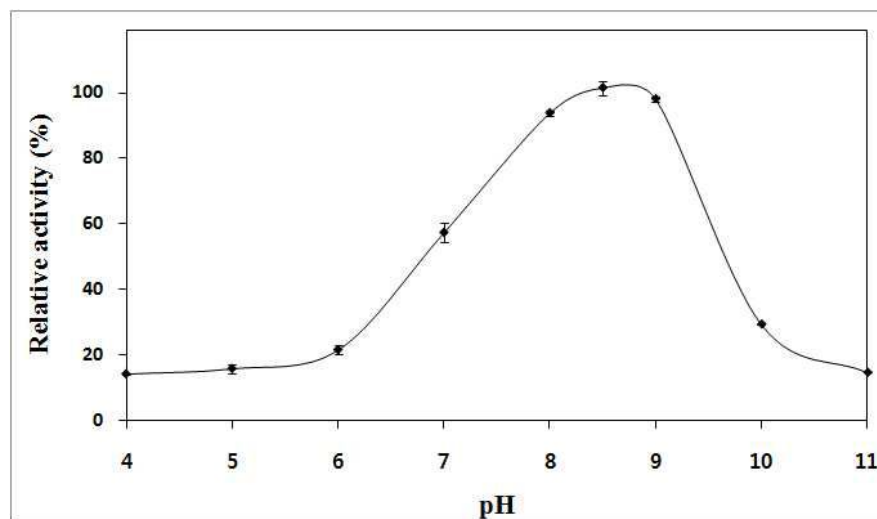
도면10



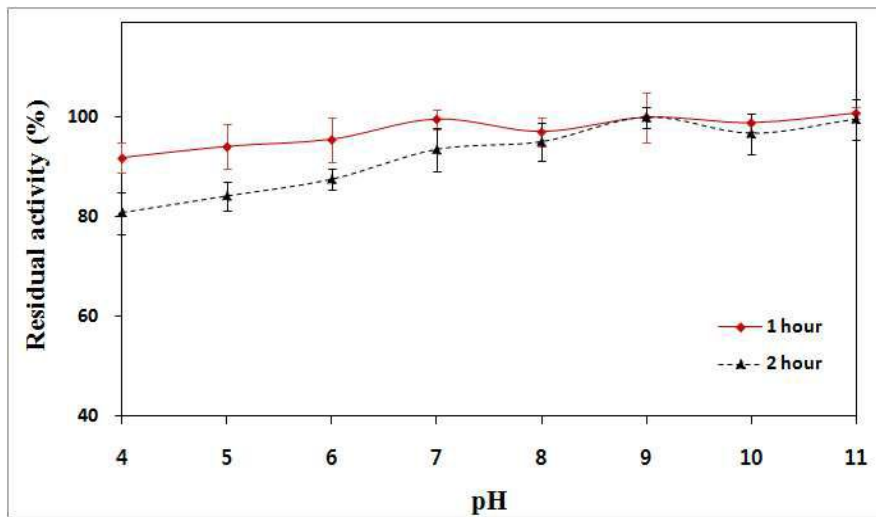
도면11



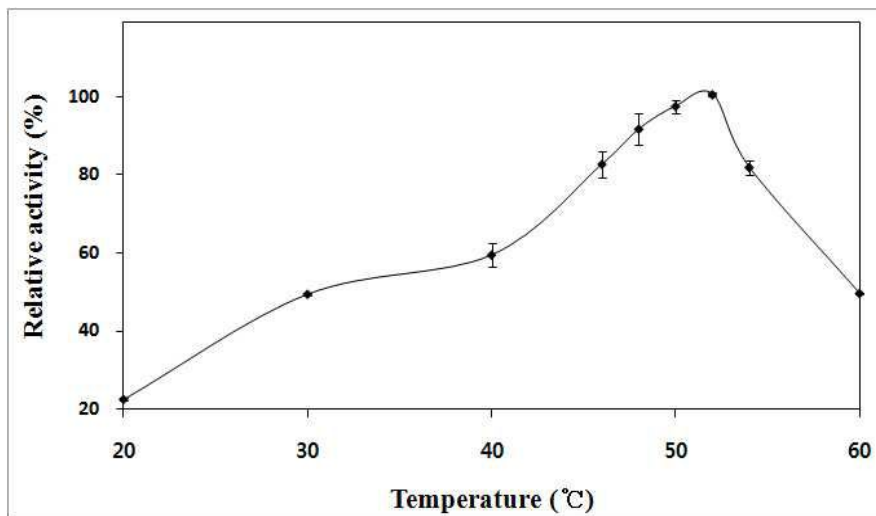
도면12



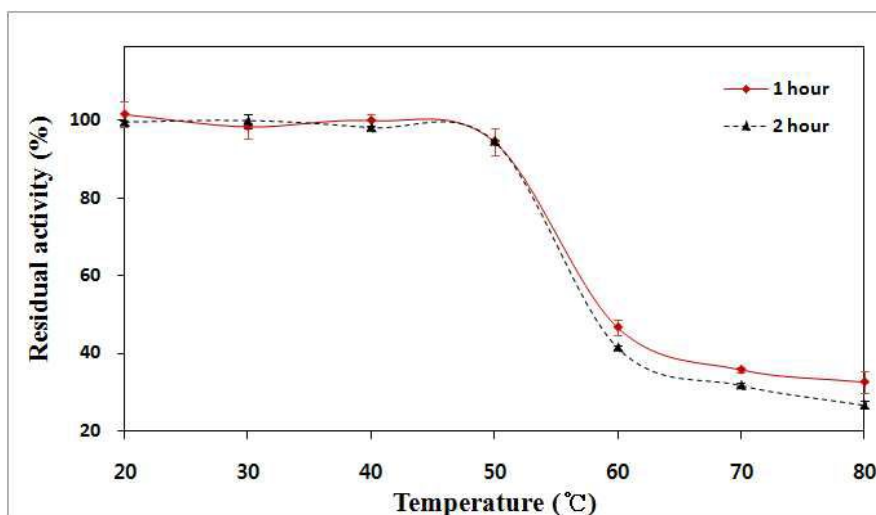
도면13



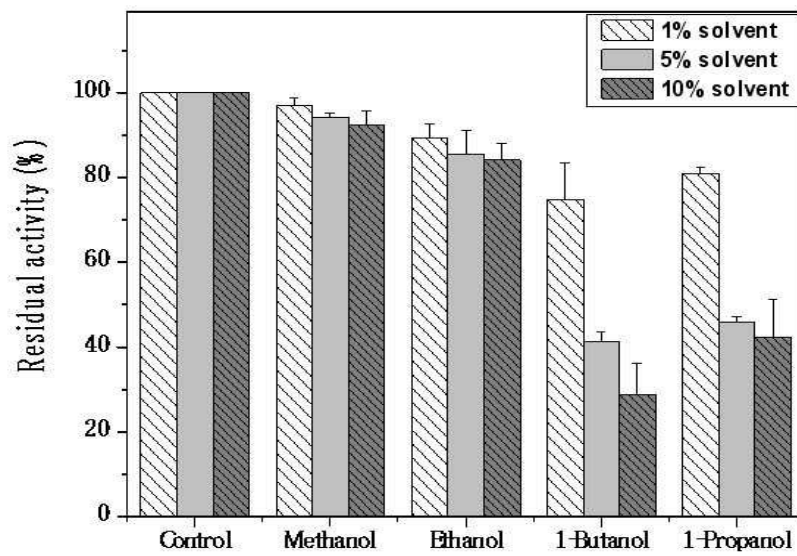
도면14



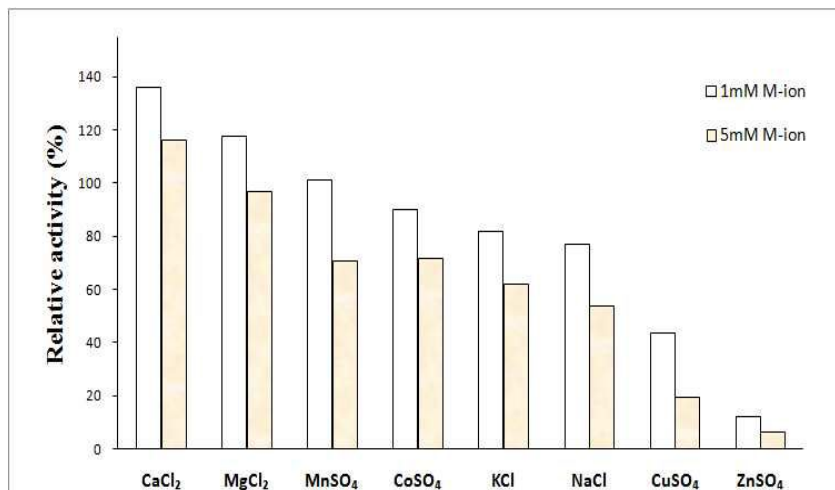
도면15



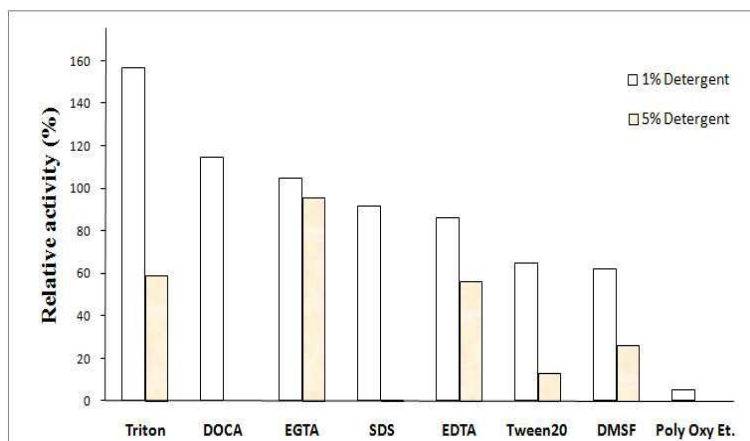
도면16



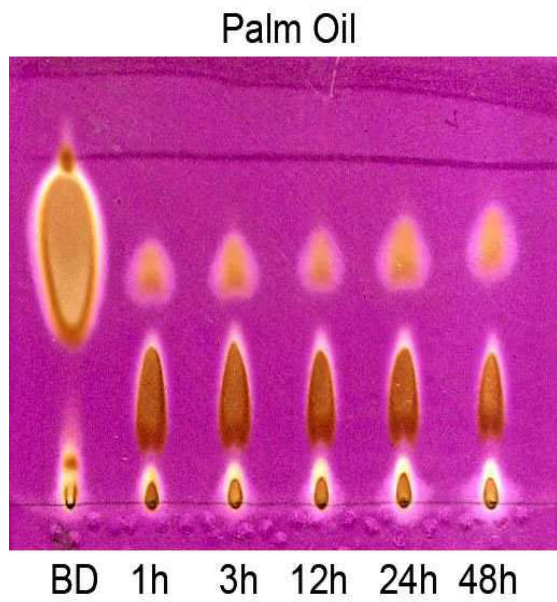
도면17



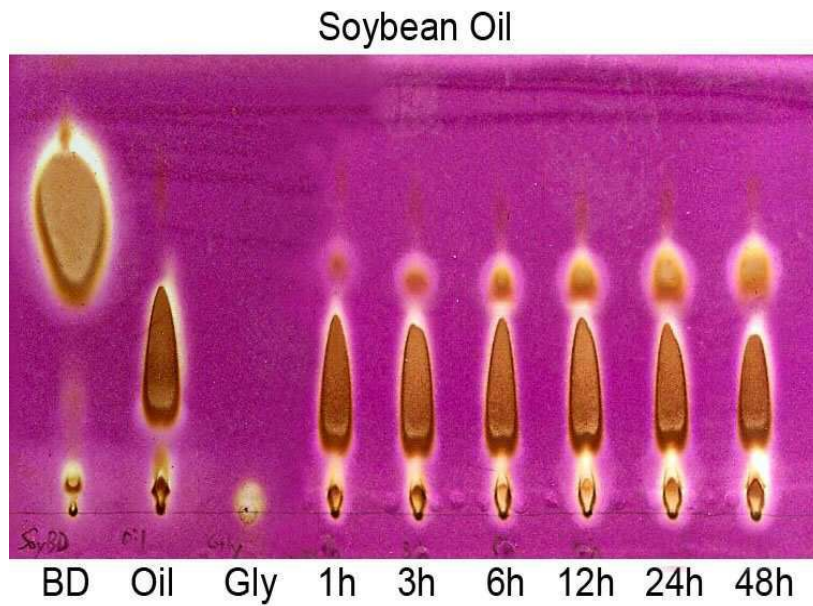
도면18



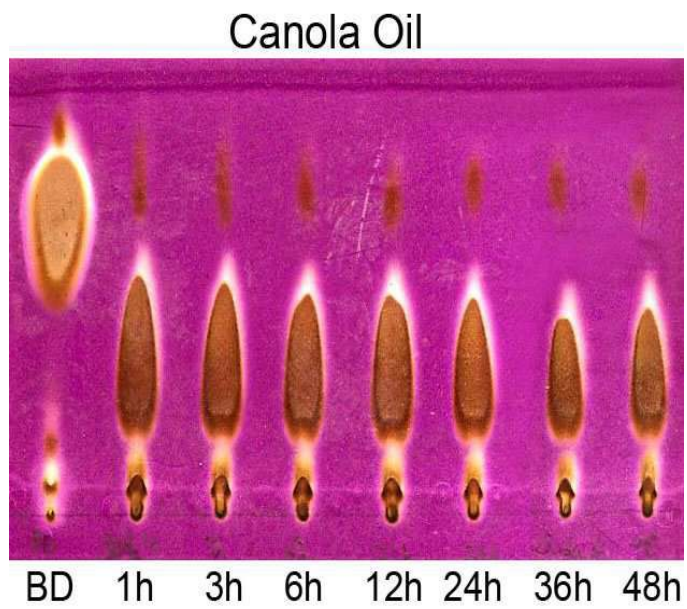
도면19



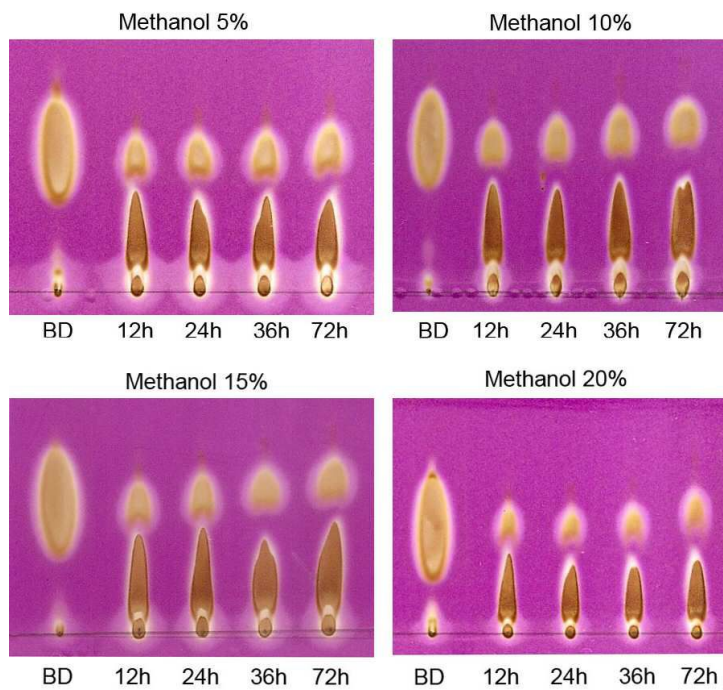
도면20



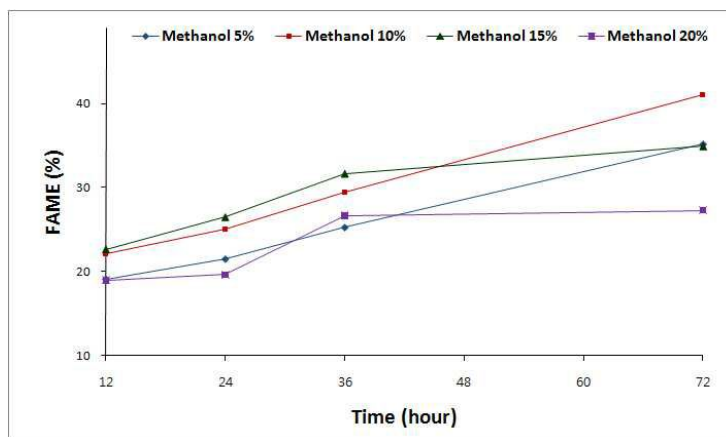
도면21



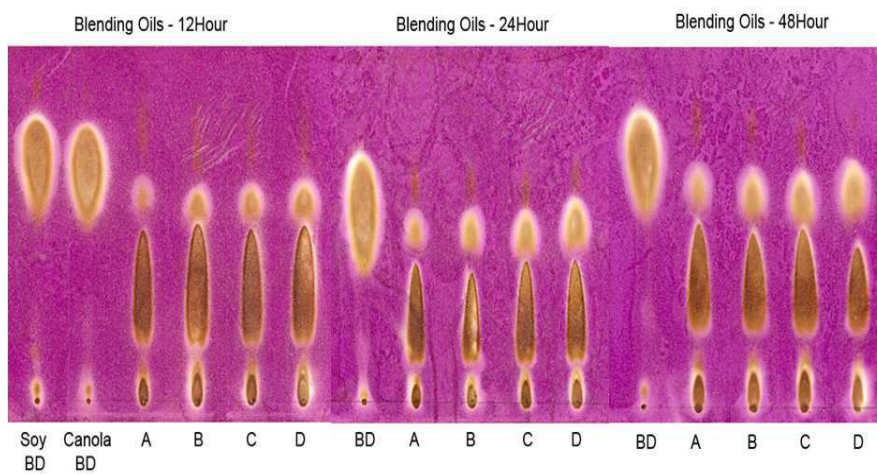
도면22



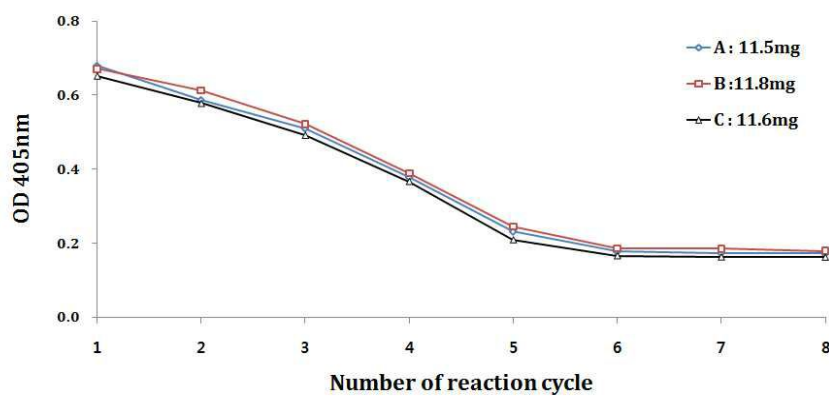
도면23



도면24



도면25



서열 목록

- <110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Lipase from Ralstonia sp. CS274 for Producing Biodiesel
- <130> pkr-0236
- <160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1505

<212> DNA

<213> Ralstonia sp.

<400> 1

ggctcagatt gaacgctggc ggcatgcctt acacatgcaa gtcgaacggc agcatgatct	60
agcttgctag attgatggcg agtggcgaac gggtgagtaa tacatcgga cgtgccctgt	120
agtgggggat aactagtcga aagattagct aataccgcat acgacctgag ggtgaaagt	180
ggggaccgca aggcctcatg ctataggagc ggccgatgtc tgattagcta gttggtgggg	240
taaaggccca ccaaggcgac gatcagtagc tggctcgaga ggacgatcag ccacactggg	300
actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatitttg acaatgggcg	360
aaagcctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct tcgggttgta aagcactttt	420
gtccggaaag aaatggctct ggttaatacc tggggtcgat gacggtaccg gaagaataag	480
gaccggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag ggtccaagcg taatcggaat	540
tactgggcgt aaagcgtgcg caggcgggtt tgcaagaccg atgtgaaatc cccgagctta	600
acttgggaat tgcatgtgtg actgcacggc tagagtgtgt cagagggggg tagaattcca	660
cgtgtagcag tgaatgcgt agagatgtgg aggaataccg atggcgaagg cagccccctg	720
ggataaact gacgtcatg cacgaaagcg tggggagcaa acaggattag atacctggt	780
agtccacgcc ctaaagcatg tcaactagtt gttggggatt catttcctta gtaacgtagc	840
taacgcgtga agttgaccg ctggggagta cggtcgcaag attaaactc aaaggaattg	900
acggggaccc gcacaagcg tggatgatgt ggattaattc gatgcaacgc gaaaaacctt	960
acctaccctt gacatgccac taacgaagca gagatgcatt aggtgctcga aagagaaagt	1020
ggacacaggt gctgcatggc tgcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg	1080
caacgagcgc aaccttgct tctagtgtc acgaaaggc actctagaga gactgccggt	1140
gacaaaccgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcctcat ggcccttatg gtagggctt	1200
cacacgtcat acaatggtgc atacagaggg ttgccaagcc gcgaggtgga gctaatccca	1260
gaaaatgcat cgtagtcgg atcgtagtct gcaactcgac tacgtgaagc tggaatcgct	1320
agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttccc ggtcttgtac acaccgccc	1380
tcacaccatg ggagtgggt ttaccagaag tagttagcct aaccgcaagg agggcgatta	1440
ccacggtagg gttcatgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc ggaagtgcg	1500

gctgg

1505