



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0076296
(43) 공개일자 2011년07월06일

(51) Int. Cl.

C07K 1/36 (2006.01) *C07K 1/16* (2006.01)

C07K 1/26 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0132972

(22) 출원일자 2009년12월29일

심사청구일자 2009년12월29일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

신현재

광주광역시 남구 봉선동 삼익@ 107동 1304호

(74) 대리인

허수준

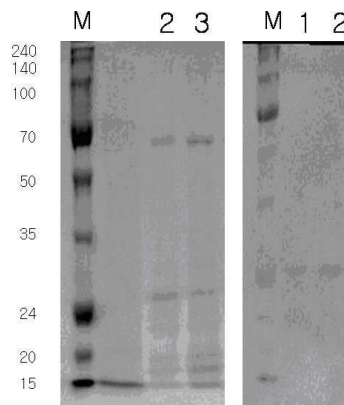
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법 및 이에 의해 정제된 꽃송이버섯 유래 알칼리성 에스테라아제

(57) 요약

본 발명은 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법에 관한 것으로, (1) 꽃송이버섯을 취하여 동결 건조시키는 단계; (2) 상기 단계 (1)에서 동결 건조된 버섯을 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 분쇄된 버섯을 4 ℃에서 아세트이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출하는 단계; (4) 상기 단계 (3)에서 추출된 버섯을 65 % 포화 황산 암모늄 중에서 침전시킨 다음 원심분리하는 단계; (5) 상기 단계 (4)에서 수득된 버섯 조효소액을 DEAE 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계; 및 (6) 상기 단계 (5)에서 수득된 버섯 용액을 분취용 등전점 전기영동에 의해 알칼리성 에스테라아제를 수득하는 단계를 포함하는 본 발명의 정제방법에 따르면 꽃송이버섯의 자실체로부터 고 분자량, 단쇄 에스테르에 대한 높은 특이성, 적당한 열안정성 및 알칼리 특성을 갖는 신규한 알칼리성 에스테라아제를 정제할 수 있으며, 이렇게 정제된 본 발명의 꽃송이버섯 에스테라아제의 모든 특징은 다른 보고된 에스테라아제와 매우 유사하며, 향 증강 및 아로마 산업 용도에서 도움이 되고, 식품, 화합물 및 약학 업계에서 생체촉매로서 사용될 수 있어 당분야에서 매우 유용할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S110909L020120

부처명 산림청

연구관리전문기관

연구사업명 임업기술연구개발사업(임업특정연구)

연구과제명 기능성 버섯류를 이용한 건강증진 식품 개발 및 산업화

기여율

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2009년03월12일~2013년03월11일(4년)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법:

- (1) 꽃송이버섯을 취하여 동결 건조시키는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)에서 동결 건조된 버섯을 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄하는 단계;
- (3) 상기 단계 (2)에서 분쇄된 버섯을 4 °C에서 아세트이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$ 및 1 mM 페닐메틸설폰일 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출하는 단계;
- (4) 상기 단계 (3)에서 추출된 버섯을 65 % 포화 황산 암모늄 중에서 침전시킨 다음 원심분리하는 단계;
- (5) 상기 단계 (4)에서 수득된 버섯 조효소액을 DEAE 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계; 및
- (6) 상기 단계 (5)에서 수득된 버섯 용액을 분취용 등전점 전기영동에 의해 알칼리성 에스테라아제를 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

꽃송이버섯이 자실체 또는 균사체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

단계 (2)에서 버섯을 예비냉각된 세라믹 막자사발 유평(pestle)을 이용하여 미세 분말로 분쇄하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 정제된 하기와 같은 특성을 갖는 에스테라아제.

- (1) 기질 특이성: p-니트로페닐 부티레이트 기질에 대해 매우 활성임;
- (2) 분자량: SDS-PAGE에 의해 65 kDa임;
- (3) 최적의 pH: 9.0임;
- (4) 최적 온도: 30 °C임;
- (5) pH 변화 안정성 프로파일: 알칼리 특성에서 보다 안정함; 및
- (6) 온도 변화 안정성 프로파일: 30 내지 40 °C에서 안정함.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법 및 이에 의해 정제된 꽃송이버섯 유래 알칼리성 에스테라아제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 황산 암모늄 침전, DEAE 컬럼 크로마토그래피, 예비 등전점 전기영동 등의 과정을 거쳐 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법 및 이로부터 정제된 꽃송이버섯 유래 알칼리성 에스테라아제에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 버섯은 특유의 자실체를 갖는 거대진균류이고, 전세계에 걸쳐 인간이 수 세기동안 식품 및 전통 의약으로서 사용하였다. 그 밖에, 버섯은 저 칼로리 식이요법 및 양호한 미네랄 공급원, 폴리페놀, 유리 라디칼 소거 활성을 제공한다[만지(Manzi) 등, 2001년; 일디즈(Yildiz) 등, 1998년; 이(Lee) 등, 2007년; 리우(Liu) 등, 1997년]. 꽃송이버섯은 사이토카인 합성, 상처 치유, IFN- γ 유도, 신생혈관생성 억제 및 전이억제 효과, 꽃송이버섯의 배양 자실체로부터의 항종양 특성, 사이클로포스파미드-유발된 백혈구감소성 마우스에서의 조혈 반응을 증강시키는 것과 같은 특성을 갖는다[나메다(Nameda) 등, 2003년; 권(Kwon) 등, 2009년; 하라다(Harada) 등, 2002년; 야마모토(Yamamoto) 등, 2009년; 오노 등, 2000년; 하라다 등, 2002년]. 최근에는 신규 생물활성 화합물을 스크리닝하는 나노입자 추출과 같은 연구가 보고되었다[박(Park) 등, 2009년; 가와기시(Kawagishi) 등, 2007년].
- [0003] 버섯은 담자균(Basidiomycete)으로 분류되며, 특히 꽃송이버섯은 식용/약용 버섯이고, 컬리플라워 버섯으로도 알려져 있다. 상기 버섯의 자실체는 연한 갈황색 내지 연회색이거나 또는 크림같은 백색 컬리플라워 색상이다. 최근, 상기 버섯의 자실체에 대한 시스템적 프로테오믹스 분석 및 이들의 경제적 중요성에 대하여 보고된 바 있다[호리에(Horie) 등, 2008년].
- [0004] 또한, 버섯은 좋은 효소 공급원이다. 3가지 버섯 중, 즉, 아마니타 바지나타(*Amanita vaginata*) var. 바지나타, 트리콜로마 테레움(*Tricholoma terreum*), 라이코페르돈 펄라툼(*Lycoperdon perlatum*)으로부터 에스터라아제 활성 특징이 보고되었다[어통가(Ertunga) 등, 2009년; 콜락(Colak) 등, 2007년].
- [0005] 에스터라아제(EC.3.1.1.1)는 에스터 화합물의 가수분해 및 합성을 촉진시키는 카복실 에스터 하이드로라아제이다. 에스터라아제는 단쇄 지방산을 가수분해하는 편인 반면, 리파아제는 장쇄 아실기의 트리글리세라이드를 가수분해한다[버거(Verger), 1997년]. 현재, 점점 많은 키랄 약물 및 유기인 화합물이 에스터라아제 촉매화된 반응을 통해 생산되고 있다[본슈어(Bornscheuer), 2002년, 호른(Horne) 등, 2002년]. 그러나, 에스터라아제 및 리파아제는 기질 특이성 및 효소 역동학 면에서 상이하다[롱(Long), 1971년]. 이들 효소는 동물, 식물 및 미생물에 존재한다고 보고되었다[본슈어, 2002년]. 다양한 공급배지로부터 여러 가지 에스터라아제가 생산될 수 있으며, 이들의 용도는 다양한 분야에서 광범위하게 사용될 수 있다. 구체적으로, 생체촉매 용도 측면에 따르면, 식품, 지방, 오일 및 약학 업계에서 잠재적 용도를 갖는 신규 효소의 특이성 및 선택성에 관한 연구가 주류를 이루고 있다.
- [0006] 에스터라아제는 식품 가공, 음료 및 화장품에서도 이용된다. 이들의 에스터는 씨리얼에 존재한다고 보고되었으며[에스터(Asther) 등, 2002년], 상기 효소는 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*)로부터 치즈를 제조하는 경우에 향을 강화시킨다고 알려져 있다[최(Choi) 및 이(Lee), 2001년]. 슈도모나스 프라기(*Pseudomonas fragi*)로부터 아로마가 발생하며[커마샤(Kermasha) 등, 2000년], 유중수적형(water-in-oil) 유화액을 이용하는 화장품에서는 향 전구체인 펜틸페놀레이트 에스터가 보고되었다[기우리아니(Giuliani) 등, 2001년].
- [0007] 해당분야에서는 이들 효소에 대한 관심으로 인해, 적합한 생산 방법을 사용하여 신규 에스터라아제를 개발하기 위한 노고를 아끼지 않고 있다. 현재까지는 꽃송이버섯으로부터 분리된 에스터라아제는 보고되지 않았다. 이에 본 발명자들은 꽃송이버섯의 6가지 상이한 균주로부터 친알칼리 활성과 같은 흥미로운 독특한 특성을 갖는 에스터라아제를 분리하기 위해 계속 연구를 진행하던 중 황산 암모늄 침전, DEAE 컬럼 크로마토그래피, 예비 등전점 전기영동 등의 과정을 거침으로써 꽃송이버섯로부터 알칼리성 에스터라아제의 정제하고 이들의 생화학 특성을 분석함으로써 이렇게 정제된 꽃송이버섯 에스터라아제의 모든 특징이 다른 보고된 에스터라아제와 매우 유사하며, 향 증강 및 아로마 산업 용도에서 도움이 될 수 있다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스터라아제를 정제하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 수득된 꽃송이버섯 유래 알칼리성 에스터라아제를 제공한다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법을 제공한다:
- [0011] (1) 꽃송이버섯을 취하여 동결 건조시키는 단계;
- [0012] (2) 상기 단계 (1)에서 동결 건조된 버섯을 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄하는 단계;
- [0013] (3) 상기 단계 (2)에서 분쇄된 버섯을 4 °C에서 아세트이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출하는 단계;
- [0014] (4) 상기 단계 (3)에서 추출된 버섯을 65 % 포화 황산 암모늄 중에서 침전시킨 다음 원심분리하는 단계;
- [0015] (5) 상기 단계 (4)에서 수득된 버섯 조효소액을 DEAE 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계; 및
- [0016] (6) 상기 단계 (5)에서 수득된 버섯 용액을 분취용 등전점 전기영동에 의해 알칼리성 에스테라아제를 수득하는 단계.
- [0017] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 상기 방법에 따라 정제된 하기와 같은 특성을 갖는 꽃송이버섯 유래 알칼리성 에스테라아제를 제공한다:
- [0018] (1) 기질 특이성: p-니트로페닐 부티레이트 기질에 대해 매우 활성임;
- [0019] (2) 분자량: SDS-PAGE에 의해 65 kDa임;
- [0020] (3) 최적의 pH: 9.0임;
- [0021] (4) 최적 온도: 30 °C임;
- [0022] (5) pH 변화 안정성 프로파일: 알칼리 특성에서 보다 안정함; 및
- [0023] (6) 온도 변화 안정성 프로파일: 30 내지 40 °C에서 안정함.

효과

- [0024] 본 발명에 따르면 꽃송이버섯의 자실체로부터 고 분자량, 단쇄 에스테르에 대한 높은 특이성, 적당한 열안정성 및 높은 알칼리 특성을 갖는 신규한 알칼리성 에스테라아제를 정제할 수 있으며, 이렇게 정제된 본 발명의 꽃송이버섯 에스테라아제의 모든 특징은 다른 보고된 에스테라아제와 매우 유사하며, 향 증강 및 아로마 산업 용도에서 도움이 되고, 식품, 화합물 및 약학 업계에서 생체촉매로서 사용될 수 있어 당분야에서 매우 유용할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 갖는 것으로 해석될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 꽃송이버섯으로부터 알칼리성 에스테라아제를 정제하는 방법은 (1) 꽃송이버섯을 취하여 동결 건조시키는 단계; (2) 상기 단계 (1)에서 동결 건조된 버섯을 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 분쇄된 버섯을 4 °C에서 아세트이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출하는 단계; (4) 상기 단계 (3)에서 추출된 버섯을 65 % 포화 황산 암모늄 중에서 침전시킨 다음 원심분리하는 단계; (5) 상기 단계 (4)에서 수득된 버섯 조효소액을 DEAE 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계; 및 (6) 상기 단계 (5)에서 수득된 버섯 용액을 분취용 등전점 전기영동에 의해 알칼리성 에스테라아제를 수득하는 단계를 포함한다.

- [0027] 본 발명에서는 꽃송이버섯의 자실체를 비롯하여 균사체도 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서는 약용 및 식용 버섯인 꽃송이버섯의 균사체 혹은 자실체는 알칼리 특성을 갖는 신규한 에스테라아제를 생산한다. 꽃송이버섯 에스테라아제는 황산 암모늄 침전, 음이온 교환 크로마토그래피 및 등전점 전기영동을 이용하여 정제되었다.
- [0029] 구체적으로, 버섯의 신선한 자실체 혹은 배양한 균사체를 분리하여 동결 건조한다. 약간의 변형을 가한 것 이외에는 종래 보고된 바와 같이 조질의 효소 추출물을 준비한다. 버섯의 동결된 신선한 자실체를 분취용냉각된 세라믹 막자사발 유봉(pestle)을 이용하여 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄한다. 이어서, 버섯 시료를 4 °C에서 아세테이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출한다. 모든 완충액의 농도는 10 mM로 하여 사용한다. 현탁액을 4 °C에서 10분동안 10,000 g으로 원심분리한다. 수득된 상청액을 상청액을 (65 % 포화) 황산 암모늄에 의해 침전시키고, 용액을 8000 g, 15분 및 4 °C에서 원심분리한 후에, 침전물을 트리스-HCl 완충액(10 mM, pH 9.0)에 용해시키고, 동일한 완충액에 의해 PD-10 탈염 칼럼에서 투석시킨 후 0.15 M NaCl을 함유하는 트리스-HCl 완충액(100 mM, pH 9.0)으로 평형화시킨 DEAE-패스트 플로우 컬럼(5 ml)에 여과된 효소 용액을 넣고, 이어서 0.5 ml/분의 유속에서 선형 염 구배로 용출시켰다. 에스테라아제의 높은 비활성을 갖는 분획물을 수거하고, 농축시키고, 분취용 등전점 전기영동 로토포 셀(Rotofor Cell)에 로딩시킨다.
- [0030] 본 발명에서는 단백질을 분리하기 위하여 예비 등전점 전기영동법을 이용하며, 이 방법을 이용함으로써 단백질 손실이 최소화된다. 로토포 분획물의 SDS-PAGE 분석에 따르면, 65 kDa 단백질이 15 내지 18 분획물에 각각 집중된 것으로 나타난다. 이들 분획물의 pH는 7.5 내지 8.0 범위이다. 상기 단백질의 등전점은 각각 대략 8.0이었다. 담체 양성전해질(1 % 최종 농도 바이오-라이트(Bio-Lyte) 3-10)를 이용한다. 평균 전기영동의 실시(run)는 최종 부피 20 ml중에 총 단백질 9 mg을 함유하였다. 2시간동안 4 °C에서 12W 정 출력으로 소형 로토포 셀에서 단백질을 전기영동한다. 최종적으로, 20개 분획물을 수거한 후에, 에스테라아제 활성을 갖는 분획물을 합치고, 농축시키고, 추가적인 효소 특징 연구를 위해 4 °C에서 보관한다.
- [0031] 본 발명에서 수득된 에스테라아제의 기질 특이성은 p-니트로페닐 부티레이트 기질에 대해 매우 활성이었다. 상기 에스테라아제의 회수율 및 정제도는 꽃송이버섯의 6가지 상이한 균주로부터 각각 17 내지 15 % 및 72.9 내지 70이었다. 정제된 에스테라아제의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 약 65 kDa로 결정되었다. 트리부티린 기질을 이용한 효소도(zymogram) 분석에 의하면, 상기 효소는 에스테라아제인 것으로 밝혀졌다. 최적의 pH 및 온도는 각각 9.0 및 30 °C이었다. pH 및 온도 변화의 안정성 프로파일은 상기 효소가 알칼리 특성에서 보다 안정하고, 30 내지 40 °C에서 안정함을 나타내었다.
- [0032] 본 발명의 꽃송이버섯의 자실체로부터 정제된 신규한 알칼리성 에스테라아제는 식품, 화합물 및 약학 업계에서 생체촉매로서 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 약용 버섯인 꽃송이버섯의 자실체로부터 고 분자량, 단쇄 에스테르에 대한 높은 특이성, 적당한 열안정성 및 알칼리 특성을 갖는 에스테라아제를 정제할 수 있다. 본 발명에서 정제된 꽃송이버섯 에스테라아제의 이러한 모든 생화학적 특징은 다른 보고된 에스테라아제와 매우 유사하며, 향 증강을 위한 산업 용도에서 도움이 되고, 페디코쿠스 펜타사우세스(*Pedicoccus pentasaucis*) SV6[오스트달(Ostdal) 등, 1996년], 푸사리움 옥시스포류[차아보우니(Chaabouni) 등, 1996년; 크리타코폴로스(Chrihtakopoulos) 등, 1998년], 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)[파쿠다(Fakuda) 등, 1998년]과 같은 방향 화합물 및 락토바실러스 팔란타룸(*Lactobacillus palantarum*)[고베티(Gobetti) 등, 1997a]에 의한 아로마를 생성시키는데 도움이 된다. 따라서, 본 발명에서 정제된 알칼리성 에스테라아제의 독특한 특성은 식품 가공에서 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0033] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 구체적인 실험방법 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 재료 및 화합물
- [0035] 사용 시약은 분석용이었다. 모든 p-니트로페닐 에스테르 기질, 트리부티린 및 β-머캅토에탄올은 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co.)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서 구입하였고, 트리톤 X-100은 (주)바이오세상(Biosesang, Inc.)(한국)에서 구입하였으며, DEAE-패스트 플로우(fast flow)(5 ml)는 아머샴 바이오사이언스 이즈(Amersham biosciences)(스웨덴 소재)에서 입수하였고, 분취용 등전점 전기영동(로토포(Rotofor), 바이오-래드(Bio-Rad)) 및 PD10 탈염 컬럼 Mr5000 아머샴 바이어사이언스 이즈(스웨덴)이었다. 6가지 꽃송이버섯 버섯

중은 대한민국 및 일본에서 채집하였다.

[0036] 실시예 1: 꽃송이버섯으로부터 에스테라아제의 정제

[0037] (단계 1) 추출단계

[0038] 버섯의 신선한 자실체를 분리하여 동결 건조하였다. 약간의 변형을 가한 것 이외에는 종래 보고된 바와 같이 조질의 효소 추출물을 준비하였다[어통가(Ertnga) 등, 2009년; 콜쿠오글루(Kolcuoglu) 등, 2007년]. 버섯의 동결된 신선한 자실체(50g) 각각을 예비냉각된 세라믹 막자사발 유봉(pestle)을 이용하여 액상 질소중에서 미세 분말로 분쇄하였다. 이어서, 버섯 샘플을 4 °C에서 아세트이트 완충액(pH 5.0), 포스페이트 완충액(pH 7.0), 및 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM 페닐메틸설폰일 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 트리스-HCl 완충액(pH 9.0)에서 분리 추출하였다. 모든 완충액은 10 mM 농도이었다. 현탁액을 4 °C에서 10분동안 10,000g으로 원심분리하였다. 수득된 상청액을 조효소 추출물(crude enzyme)로 사용하였다.

[0039] (단계 2) 정제단계

[0040] 효소를 3 단계: 1) 황산 암모늄 침전, 2) DEAE 컬럼 크로마토그래피, 3) 예비 등전점 전기영동에 의해 조효소액의 상청액으로부터 정제하였다. 상청액을 (65 % 포화) 황산 암모늄에 의해 침전시켰다. 용액을 8000g, 15분 및 4 °C에서 원심분리한 후에, 침전물을 트리스-HCl 완충액(10 mM, pH 9.0)에 용해시키고, 동일한 완충액에 의해 PD-10 탈염 칼럼에서 투석하였다. 0.15M NaCl을 함유하는 트리스-HCl 완충액(100 mM, pH 9.0)으로 평형화시킨 DEAE-패스트 플로우 컬럼(5 ml)에 여과된 효소 용액을 넣고, 이어서 0.5 ml/분의 유속에서 선형 염 구배로 용출시켰다. 에스테라아제의 높은 비활성을 갖는 분획물을 수거하고, 농축시키고, 예비 등전점 전기영동 로토포 셀에 로딩하였다. 본 발명에서는 단백질을 분리하기 위하여 예비 등전점 전기영동법을 이용하였고, 이 방법을 이용함으로써 단백질 손실이 최소화되었다. 유사한 방법이 [마스오카(Masuoka) 등, 1998년]에 보고되었다. 로토포 분획물의 SDS-PAGE 분석에 따르면, 65kDa 단백질이 15 내지 18 분획물에 각각 집중된 것으로 나타났다(도 2). 이들 분획물의 pH는 7.5 내지 8.0 범위이었다. 상기 단백질의 등전점은 각각 대략 8.0이었다. 담체 양성전해질(1 % 최종 농도 바이오-라이트(Bio-Lyte) 3-10)를 이용하였다. 평균 전기영동의 실시(run)는 최종 부피 20 ml중에 총 단백질 9 mg을 함유하였다. 2시간동안 4 °C에서 12W 정 출력으로 소형 로토포 셀에서 단백질을 전기영동하였다. 최종적으로, 20개 분획물을 수거한 후에, 에스테라아제 활성을 갖는 분획물을 합치고, 농축시키고, 추가적인 효소 특징 연구를 위해 4 °C에서 보관하였다[마스오카(Masuoka) 등, 1998년].

[0041] 전체적인 정제 결과를 표 1에 요약하였다. 결과로서, 175U/mg의 비활성과 함께 72.9의 정제도 및 17 % 회수율을 수득하였다. 수율은 모든 6가지 버섯 중에서 거의 유사하였다.

표 1

[0042] 꽃송이버섯으로부터의 에스테라아제의 정제 단계

분획물	총 단백질(mg)	총 활성(U)	중 활성(U/mg)	수율(%)	정제도
조효소액	841.5	2037.5	2.4	100	1
황산 암모늄 침전	161.6	1034.75	6.4	50	2.6
DEAE-세파로오즈 컬럼	20	700	35	34	14.5
분취용 IEF	2	350	175	17	72.9

[0043] 실시예 2: 에스테라아제 분석

[0044] 방출된 p-니트로페놀의 양을 측정함으로써 에스테라아제 활성을 분석하였다[이 등, 1999년]. 기질로서 p-니트로페닐 에스테르를 이용하여 활성을 측정하였다. 기질 혼합물은 10 mM p-니트로페닐 부티레이트, 에탄올 및 트리스-HCl 완충액(10 mM pH 9.0)을 각각 1:4:95(v/v/v)의 비로 함유하였다. 분석을 위해, 반응 혼합물은 효소 추출물 0.6 ml¹ 및 기질 용액 1.8 ml를 함유하였다. 효소 기질 혼합물을 20분동안 30 °C에서 배양하였다. p-니트로페놀 방출에 대해 405nm에서 분광학적으로 반응을 관찰하였다. 에스테르 첨가분해성(esterolytic) 활성은 p-니트로페놀

표준 그래프에 의해, 방출된 p-니트로페놀의 양으로 결정하였다. 효소를 함유하지 않은 블랭크(blank)로 비효소적 반응을 실시하였다. 효소 활성 1유닛은 표준 분석 조건하에서 1분당 p-니트로페놀 1 μmol 을 방출하는데 필요한 효소의 양으로 정의되었다.

[0045] 효소도 데이터에 따르면, 정제된 에스테라아제가 트리부티린(TBN) 기질을 가수분해할 수 있다고 나타났다(도 1b). 본 실험에서 쿠마시에 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue) R-250에 의해 염색된 겔위의 65kDa에서 가수분해 활성을 볼 수 있었다. 이 결과는 상기 효소가 에스테라아제이고 다른 가수분해 효소는 겔에 존재하지 않음을 증명하였다. 백색 밴드보다는 효소의 가수분해만을 볼 수 있었다. 효소도 결과는 정제된 단백질이 에스테라아제 활성을 보유함을 시사하고, 이 결과는 다른 연구와 유사하였다[박 등, 2007년; 김(Kim) 및 박, 2002년]. 상기 단백질의 pI는 8.0으로 결정되었다.

[0046] 실시예 3: 에스테라아제 순도 및 분자량 결정

[0047] 에스테라아제의 순도 및 분자량을 결정하기 위하여, SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 상기 방법에 따라 10 % 폴리아크릴아마이드 겔에 의해 실시하였다[라엠블리(Laemmli), 1970년]. 고분자량 단백질 마커가 표준으로 이용되었다. 단백질은 표준물로 BSA를 이용하는 BCA 방법에 의해 정량화되었다[스미스(Smith), 1985년]. 등전점(pI)은 폴리아크릴아마이드 겔상에서 결정하였다. 트리부티린 한천 플레이트를 이용하는 효소도 분석을 실시하여, SDS-PAGE 겔상에서 단백질의 가수분해 활성을 검출하였다[박 등, 2007년]. 이어서, 실시 이후에, 트리스-HCl 완충액(10 mM pH 9.0) 및 1 % 트리톤 X-100을 함유하는 혼합물로 겔을 세척하였다. 이어서, 겔을 1 % TBN, 20 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 및 0.5 % 아라비아 검을 함유하는 TBN(트리부티린) 아가 플레이트에 놓고, 37 °C에서 배양하였다.

[0048] 에스테라아제의 분자량은 약 65 kDa이었다(도 1a). 이 결과는 SDS-PAGE에 의해 결정되었다. 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)(62 kDa)[모우코울리(Moukoulis) 등, 2008년], 페니실리움 푸니쿨로숨(*Penicillium funiculosum*)(65 kDa)[도나기(Donaghy) 및 맥케이(McKay), 1997년], 탈라로마이세스 스티피타투스(*Talaromyces stipitatus*)(66 kDa)[크레핀(Crepin) 등, 2003b; 가르시아-코네사(Garcia-conesa) 등, 2004년], 아스페길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)(61 kDa)[고세키(Koseki) 등, 2009년] 및 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*)(63 kDa)[파울즈(Faulds) 및 윌리엄슨(Williamson), 1993년]로부터 정제된 유사한 분자량을 갖는 몇몇 진균류 페룰로일 에스테라아제가 보고되었다. 꽃송이버섯 에스테라아제의 분자량은 스포로트리쿰 쉐모파일(*Sporotrichum thermophile*)(23 kDa)[토파카스(Topakas) 등, 2005년], 아스페길러스 아와모리(*Aspergillus awamori*)(35kDa)[고세키 등, 1998년; 2005년] 및 푸사리움 옥시스포룸(31 kDa)[토파카스 등, 2003b]으로부터 보고된 에스테라아제의 분자량보다 크다. 꽃송이버섯 에스테라아제의 분자량은 아스페길러스 아와모리(112 kDa)[신(Shin) 및 첸(Chen), 2007년] 및 아우레오바시디움 풀룰란스(*Aureobasidium pullulans*)(210kDa)[럼볼드(Rumbold) 등, 2003년]의 분자량보다 작다. 또한, 꽃송이버섯 에스테라아제는 로도코쿠스 종(*Rhodococcus* sp.) 균주 MB1로부터의 재조합 코카인 에스테라아제의 분자량과 유사하다[매튜(Matthew) 등, 2000년].

[0049] 실시예 4: 에스테라아제의 기질 특이성 및 역동학 연구 분석

[0050] p-니트로페닐 에스테르에 대한 기질 특이성을 결정하였다. p-니트로페닐 부티레이트(pNPB), p-니트로페닐 카프릴레이트(pNPC), p-니트로페닐 팔미테이트(pNPP)의 용액을 10 mM 농도로 준비하였다. 이전에 기재된 표준 방법을 이용하여 에스테라아제 활성을 분석하였다. 에스테라아제의 K_m 및 V_{max} 는 [라인위버(Lineweaver) 및 버크(Burk) 플롯, 1934]에 의한 미카엘리스-멘텐 식에 따라 분석하였다. 기질 p-니트로페닐 부티레이트를 본 분석을 위해 이용하였다.

[0051] 정제된 에스테라아제는 상이한쇄 길이를 갖는 다양한 p-니트로페닐 에스테르에 대하여 시험되었다. 잔류 활성 백분율을 계산하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 C4: p-니트로페닐 부티레이트; C8: p-니트로페닐카프릴레이트; C16: p-니트로페닐팔미테이트이다. 탄소원자 수가 증가할수록 에스테라아제의 친화도가 감소하였다. p-니트로페닐 부티레이트에 대하여 보다 높은 친화도가 관찰된 반면, 장쇄 기질에 대하여는 낮거나 무의미한 활성이 관찰되었다. p-니트로페닐 에스테르-C4에 대한 기질을 나타내는 수도모나스 시트로넬로리스(*Pseudomonas citroneololis*) ATCC 13674 에스테라아제에서 유사한 결과가 얻어졌다[차오(Chao) 등, 2003년]. 버섯 종에서 아마니타 바지나타 var. 바지나타 및 트리콜로마 테레움(*Tricholoma terreum*)[어통가 등, 2009년] 및 라이코페르돈 펄라툼(*Lycoperdon perlatum*)[콜락 등, 2009년] 에스테라아제가 p-니트로페닐 부티레이트, p-

니트로페닐 아세테이트와 같은 단쇄 지방산에 대하여 특이성을 나타내었다. 명백하게, 기질 특이성 연구는 상기 효소가 에스테라아제이고 리파아제가 아님을 시사하였다.

[0052] 실시예 5: 에스테라아제의 활성에 대한 pH 분석

[0053] 에스테라아제의 최적 pH는 pH 3.0 내지 10 범위에서 효소 활성을 측정함으로써 결정하였다. 본 분석을 위해 이하의 완충액을 이용하였다: 글리신-HCl 완충액(pH 3.0), 아세테이트 완충액(pH 4.0 및 5.0), 포스페이트 완충액(pH 6.0 및 7.0), 트리스-HCl 완충액(pH 8.0 및 9.0) 및 글리신-NaOH 완충액(pH 10). pH 안정성은 효소 및 완충액의 혼합물을 24시간동안 4 °C에서 배양하며 동일한 완충액에 의해 관찰하였다. 배양되지 않은 효소와 비교함으로써 전술된 표준 분석 조건에서 효소 잔류 활성을 계산하였다[콜라르(Colar) 등, 2005년].

[0054] 꽃송이버섯 에스테라아제는 산성 pH에서 민감하다. 꽃송이버섯 에스테라아제에 대한 최적 pH는 9.0이었다(도 4). 따라서, 알칼리성 에스테라아제임을 나타낸다. 또한, 알칼리성 조건에서의 안정성은 생물공학 적 용도에서 유리할 수 있다. 본 실험에서 pH 7.0에서 50 % 에스테라아제 활성을 볼 수 있었다. 유사하게, 심부-침사(deep-sediment) 메타게놈[박 등, 2007년], 에이. 파투아(*A. fatua*)[모하메드(Mohamed) 등, 2000년], 토마토[스터펠더(Stuhfelder) 등, 2002년]로부터 알칼리성 에스테라아제가 보고되었다. 꽃송이버섯 에스테라아제의 pH 안정성은 다른 pH 값에서 24시간 배양한 후에 잔류 활성을 측정함으로써 결정되었다. 이는 pH 6.0 내지 10.0의 광범위한 범위에서 에스테라아제가 안정함을 나타낸다(도 5). 도 5는 꽃송이버섯 효소의 pH 안정성 프로파일을 나타낸다. 여기에서, 잔류 활성은 상이한 pH에서 4 °C로 24시간 배양한 후에 계산되었다. 스포로트리쿰 써모파일(*Sporotrichum thermophile*)[토파카스 등, 2005년](pH 6.0 내지 10.0), 아스퍼길러스 오리자에[고세키 등, 2009년](pH 7.0 내지 10.0) 및 푸사리움 옥시스포룸[모우코울리(Moukoulis) 등, 2008년](pH 4.0 내지 11.0)으로부터의 진균류 페룰로일 에스테라아제로부터 유사한 결과가 얻어졌다. 본 결과는 표 2에 나타난 아마니타 바지나타 var. 바지나타, 트리콜로마 테레움[어통가 등, 2009년] 및 라이코페르돈 펠라툼[콜락 등, 2009년]으로부터의 다른 버섯 에스테라아제와 비교되었다. 그러나, 꽃송이버섯 에스테라아제는 산성 조건보다는 알칼리성에서 보다 안정하였다. 대조적으로, 아마니타 바지나타 var. 바지나타, 트리콜로마 테레움 및 라이코페르돈 펠라툼은 산성 및 염기성 조건에서 안정하다고 보고되었다. 따라서, 꽃송이버섯 에스테라아제는 전술한 버섯 종과 구별되는 독특한 알칼리 특성을 갖는다. 모든 실험은 3회 반복(triplicate)으로 실시되었고, 통계 분석을 위해 평균값을 취하였다.

표 2

[0055] 보고된 버섯 에스테라아제의 특성 비교

버섯 종	기질	상대 활성(%)	최적 pH	최적 온도(°C)	pH 안정성	온도 안정성(°C)
꽃송이버섯	p-니트로페닐 부티레이트	100	9.0	30	7-12	30-40
라이코페르돈 펠라툼	p-니트로페닐 아세테이트	100	8.0	40	5-8	20
아마니타 바지나타 var. 바지나타	p-니트로페닐 부티레이트	100	8.0	30	3-10	30-40
트리콜로마 테레움	p-니트로페닐 부티레이트	100	8.0	30	3-10	30-40

[0056] 실시예 6: 에스테라아제의 온도 영향 분석

[0057] 최적 온도를 결정하기 위하여, 20 내지 80 °C 범위의 다양한 온도에서 효소 활성을 측정하고, 이들의 열 안정성을 동일한 온도 범위에서 20분 내지 4시간동안 10 °C 간격으로 관측하였다. 효소 활성을 표준 분석 조건에 따라 계산하였고, 배양되지 않은 효소와 비교하였다[파이즈(Faiz) 등, 2007년].

[0058] 꽃송이버섯 에스테라아제는 30 °C에서 최적 온도를 나타낸다(도 6). 다른 에스테라아제, 즉, 30 내지 40 °C의 최적 온도인 쿠쿠르비타 페포(*Cucurbita pepo*)의 Elc 및 EII 에스테라아제[파미(Fahmy) 등, 2007년], 40 °C인 마이크로코쿠스(*Micrococcus*) 중 ATCC 8459[보우믹(Bhowmik) 및 마트(Marth), 1990년], 30 내지 35 °C인 락토

바실러스 카세이 아종 카세이[이 및 이, 1990년], 락토바실러스 페르멘툼[고베티(Gobbetti) 등, 1997년]와 유사한 반면, 65 내지 75 °C인 에이. 파투아의 에스테라아제[모하메드 등, 2000년]보다는 낮았다. 안정성 프로파일 에 따르면, 상기 에스테라아제는 20 내지 30 °C의 온도에서 보다 안정하였다. 그러나, 본 발명자들은 4시간동안 40 °C에서 70 %의 잔류 효소 활성을 볼 수 있었다. 따라서, 상기 효소는 각각 30 내지 40 °C에서 안정하였다. 효소의 잔류 활성은 50 °C에서 4시간동안 최대 30 내지 40 %인 반면, 온도가 70 °C 및 80 °C보다 높게 증가할수록 상기 활성은 급격히 감소하였다(도 7). 도 7은 20분 내지 4시간동안 10 °C씩 증가시킨 20 내지 80 °C의 온도 범위에서 효소 용액을 수조에서 배양시킨 것을 나타낸다. 여기에서, 잔류 활성 백분율은 배양되지 않은 효소와 비교하여서 계산되었다. 본 발명의 결과는 30 °C에서의 몇몇 진균류 페로울릴 에스테라아제 푸사리움 옥시포름[토파카스 등, 2003b]과 유사하다. 그러나, 아스피길러스 오리자에[고세키 등, 2009년]와 같은 일부 진균류 페로울릴 에스테라아제는 60 °C에서 안정성을 나타내고, 스포로트리쿰 써모파일[토파카스 등, 2005]은 60 °C에서 안정성을 나타낸다고 보고되었다. 본 발명의 결과와 비교할 때, 아마니타 바지나타 var. 바지나타, 트리콜로마 테레움[나지한 등, 2009년]으로부터의 다른 버섯 에스테라아제는 30 °C 및 40 °C에서 안정하고, 라이코페르돈 필라툼(콜락 등, 2009년)은 20 °C에서 안정하였다(도 2). 그러므로, 본 발명의 결과는 상기 보고된 에스테라아제와 일치한다. 실험은 3회 반복으로 실시되었고, 통계 분석을 위해 평균값을 취하였다.

[0059] 실시예 7: 에스테라아제의 금속 이온 및 일부 화합물의 영향 분석

[0060] Na^+ , K^+ , Li^+ , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} 와 같은 다양한 금속 이온 및 EDTA, 소듐 아지드(NaN_3), PMSF, 다이티오프레이톨(DTT)과 같은 화합물에 대한 영향을 p-니트로페닐 부티레이트 기질에 대하여 스크리닝하였다. 효소를 10 mM 농도의 다양한 금속 이온 및 화합물과 함께 30분동안 실온에서 배양하였다. 금속 이온 분석을 반응 혼합물에 첨가하고, 금속 이온 및 화합물을 함유하지 않은 표준 분석 조건과 비교하여서 잔류 활성을 결정하였다[콜락(Colak) 등, 2005년].

산업이용 가능성

[0061] 본 발명에 따르면 꽃송이버섯의 자실체로부터 고 분자량, 단쇄 에스테르에 대한 높은 특이성, 적당한 열안정성 및 알칼리 특성을 갖는 신규한 알칼리성 에스테라아제를 정제할 수 있으며, 이렇게 정제된 본 발명의 꽃송이버섯 에스테라아제의 모든 특징은 다른 보고된 에스테라아제와 매우 유사하며, 향 증강 및 아로마 산업 용도에서 도움이 되고, 식품, 화합물 및 약학 업계에서 생체촉매로서 사용될 수 있어 당분야에서 매우 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1a는 DEAE-세파로즈 컬럼 크로마토그래피 분석결과로서, SDS-PAGE 레인, 표준 마커, 레인 2-3은 DEAE-세파로즈 컬럼 크로마토그래피로부터 정제된 에스테라아제를 나타낸다.

[0063] 도 1b는 효소도 분석 결과로서, 겔상의 65 kDa에서 레인 2 및 3의 TNB 가수분해를 나타낸다.

[0064] 도 2는 SDS-PAGE 상에서 예비 등전점 전기영동 로토판 분석물을 나타낸다.

[0065] 도 3은 p-니트로페닐 에스테라아제에 대한 에스테라아제의 기질 특이성을 나타낸다.

[0066] 도 4는 에스테라아제 활성에 대한 pH의 영향을 나타낸다.

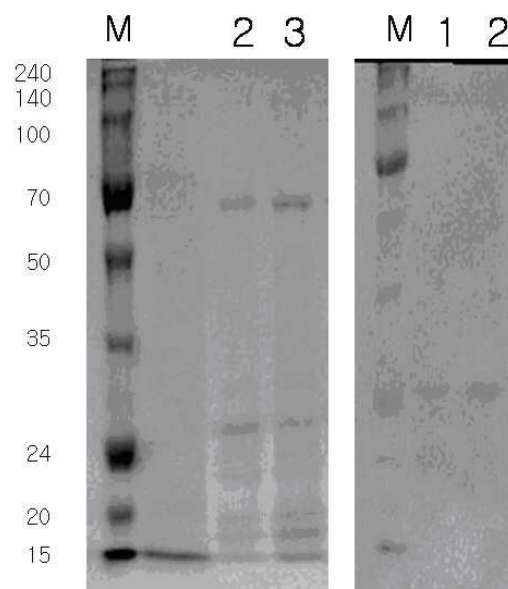
[0067] 도 5는 꽃송이버섯 효소의 pH 안정성 프로파일을 나타낸다.

[0068] 도 6은 기질인 p-니트로페닐 부티레이트에 의한 꽃송이버섯의 에스테르 첨가분해 활성의 열 안정성을 나타낸다.

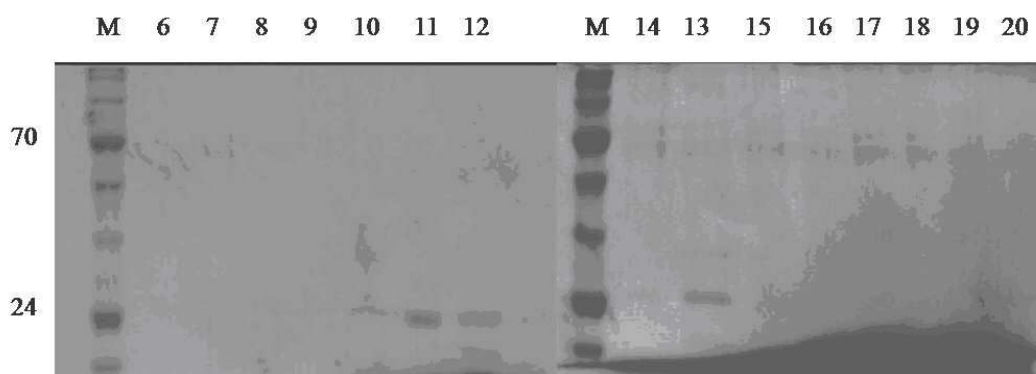
[0069] 도 7은 20분 내지 4시간동안 10 °C씩 증가시킨 20 내지 80 °C의 온도 범위에서 효소 용액을 수조에서 배양시킨 것을 나타낸다.

도면

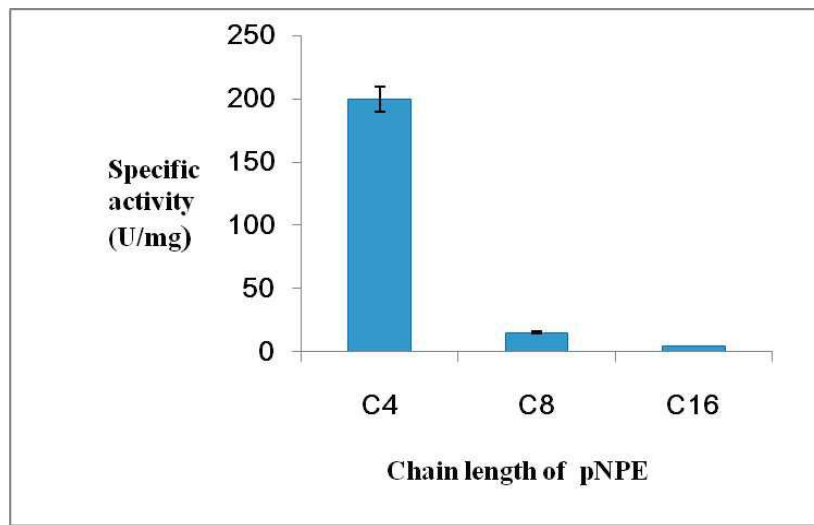
도면1



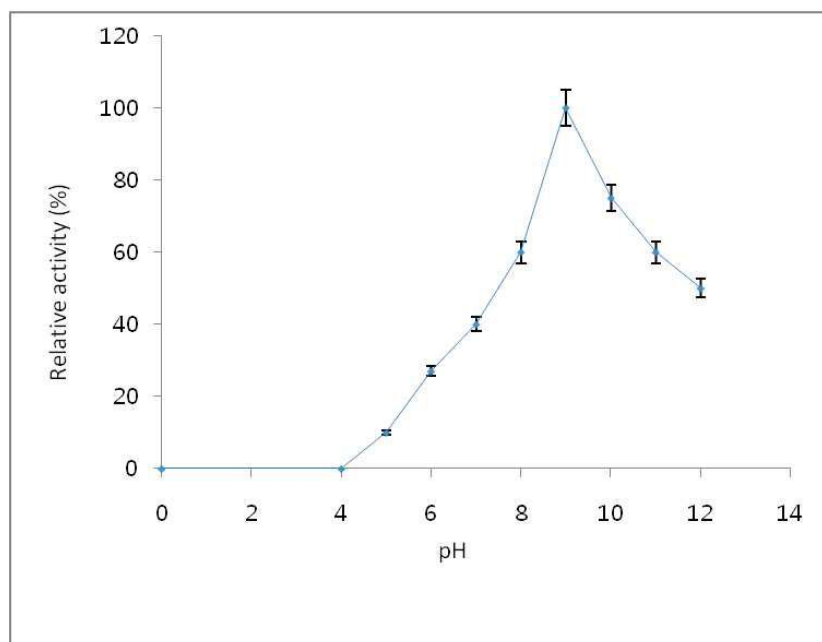
도면2



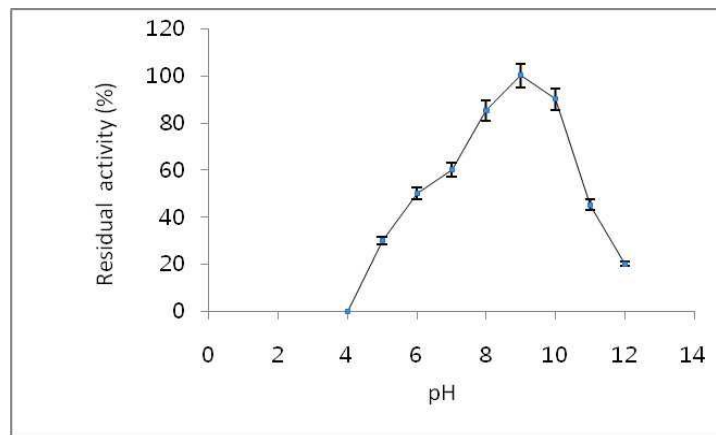
도면3



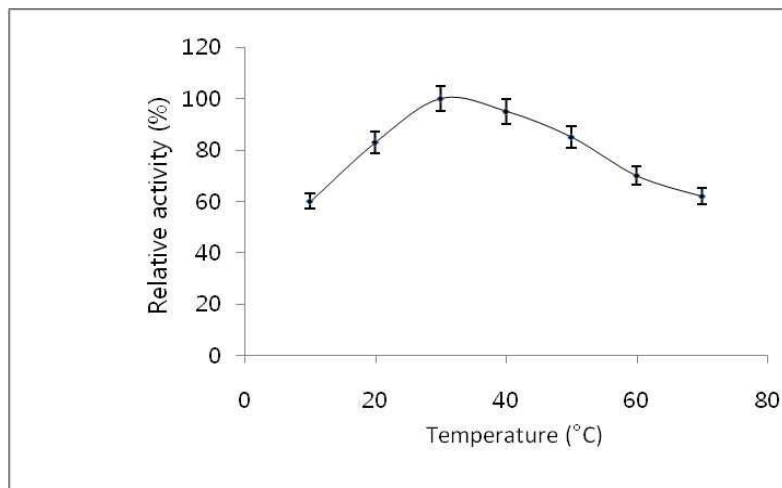
도면4



도면5



도면6



도면7

