



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042291
(43) 공개일자 2020년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/52 (2006.01) A23K 20/189 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) C11D 3/38 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C14C 1/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/52 (2013.01)
A23K 20/189 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2018-0122695
(22) 출원일자 2018년10월15일
심사청구일자 2018년10월15일

(71) 출원인
한국해양과학기술원
부산광역시 영도구 해양로 385(동삼동)
(72) 발명자
임정한
경기도 성남시 분당구 정자일로 30, 110동 1104호(금곡동, 청솔마을계룡아파트)
김일찬
경기도 성남시 수정구 공원로339번길 30(신흥동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

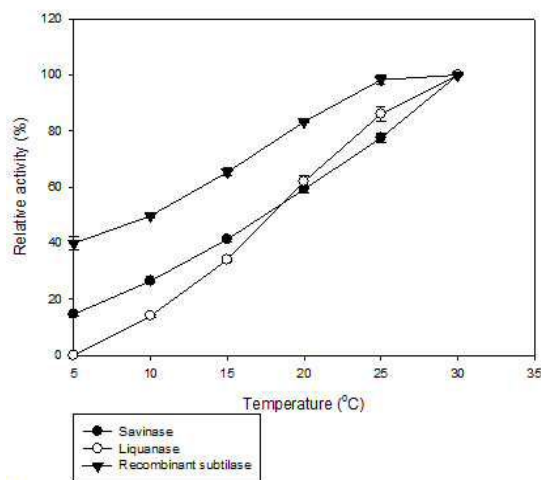
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 저온 활성 서브틸라아제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 남극에서 분리한 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.) 유래 저온 활성 서브틸라아제(subtilase), 이의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 서브틸라아제는 기존 서브틸라아제 유래 효소에 비해 저온에서 활성이 우수하며, 형질전환체에서 대량 생산이 가능한 바, 다양한 산업적 용도로 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 29/06 (2016.08)

C11D 3/381 (2013.01)

C12N 15/52 (2013.01)

C12Y 304/21112 (2013.01)

C14C 1/04 (2013.01)

(72) 발명자

한세중

경기도 화성시 서신면 고래물길 38-18

박하주

경기도 안양시 동안구 동안로 11, 709동 606호(호계동, 무궁화코오롱, 건영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525008010

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 극지연구소

연구사업명 극지연구소운영지원(주요사업비)

연구과제명 극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업

기 여 율 1/1

주관기관 극지연구소

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는, 저온 활성 서브틸라아제(subtilase).

청구항 2

제1항의 저온 활성 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기 서열로 표시되는 것인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 발현 벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 6

제5항의 형질전환체를 회분식 배양하여 서브틸라아제를 불활성화(inactivated) 봉입체(inclusion body)로 발현시키는 단계; 및

상기 불활성화 봉입체를 리폴딩하여 활성화하는 단계;를 포함하는, 저온 활성 서브틸라아제의 제조 방법.

청구항 7

제1항의 저온 활성 서브틸라아제 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 세제 또는 세척용 조성물.

청구항 8

제1항의 저온 활성 서브틸라아제 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 소독용 조성물.

청구항 9

제1항의 저온 활성 서브틸라아제 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 사료 첨가제 조성물.

청구항 10

제1항의 저온 활성 서브틸라아제 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 식품 첨가제 조성물.

청구항 11

제1항의 저온 활성 서브틸라아제 또는 제6항의 방법에 의해 제조된 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 섬유 또는 가죽 가공 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 남극에서 분리한 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.) 유래 저온 활성 서브틸라아제(subtilase), 이의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 들어, 저온 활성 효소들은 차세대 생명공학작 적용 후보 물질로 관심이 증가되고 있다(Georlette et al., *FEMS Microbiol Rev*, 28:25-42, 2004). 저온 적응 미생물 유래 저온 활성 효소들은 낮은 온도에서 중온성 효소들 보다 효율적인 촉매작용을 보이기 때문에, 15℃ 이하의 물을 주로 사용하는 세탁과 세척 영역의 산업에서 저온 활성 효소 사용이 주로 요구되고 있다. 알칼리성 프로테아제들(protease)은 표백제와 계면활성제가 포함된 알칼리 조건에서 높은 활성과 더불어 좋은 효소 안정성을 갖기 때문에 특히 세탁 및 세척 용도로 많이 사용되지만(Gupta et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:15-32, 2002; Haddar et al., *Bioresour Technol*, 100:3366-3373, 2009), 산업적 요구에 비해 저온 활성의 알칼리성 프로테아제에 대한 보고는 드물게 이루어 졌다(Chen et al., *Microbiology*, 153:2116-2125, 2007; Huston et al., *Appl Environ Microbiol*, 70:3321-3328, 2004; Kulakova et al., *Appl Environ Microbiol*, 65:611-617, 1999; Wang et al., *Biotechnol Lett*, 27:1195-1198, 2005).

[0004] 서브틸라아제(subtilase)는 신호 펩티드(signal peptide), 프로시퀀스(prosequence), 촉매 도메인(catalytic domain)과, 2 개의 세균성 프리펩티다아제 C-말단 도메인(bacterial pre-peptidase C-terminal domain)으로 구성된 단백질 분해 효소이다(Yan et al., *Extremophiles*, 13:725-733, 2009; Ying et al., *Adv Polar Sci*, 22:124-130, 2011). 서브틸라아제는 해양성의 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.)에서 주로 발견되고, 바실러스(*Bacillus* sp.)의 서브틸리신(subtilisin) 단백질 분해 효소와 같이 알칼리 환경에서 활성을 유지하며, 동시에 저온 활성 특성을 가지고 있다. 이러한 특징으로 인해, 서브틸라아제는 차세대 핵심 효소로서 높은 이용 가치가 있으나, 재조합 효소 생산법으로도 극히 소량 생산되기 때문에 산업적으로 적용하기 위해서는 효율적인 생산 방법을 개발하는 것이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 활성이 우수한 저온 활성 서브틸라아제 및 이의 대량 생산 방법을 개발하고, 이를 다양한 산업적 용도에 이용하기 위해 노력하였다. 그 결과, 남극에서 분리한 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.)로부터 신규한 서열로 이루어진 저온 활성 서브틸라아제(subtilase)를 동정하였으며, 이를 재조합 미생물에서 대량 생산하는 제조 방법을 개발하고, 이의 산업적인 용도를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에 본 발명의 목적은 신규한 저온 활성 서브틸라아제 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 저온 활성 서브틸라아제의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 세제 또는 세척용 조성물, 소독용 조성물, 사료 첨가제 조성물, 식품 첨가제 조성물 및 섬유 또는 가죽 가공 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는, 저온 활성 서브틸라아제(subtilase)를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 회분식 배양하여 서브틸라아제를 불활성화(inactivated) 봉입체(inclusion

body)로 발현시키는 단계; 및 상기 불활성화 봉입체를 리폴딩하여 활성화하는 단계;를 포함하는, 저온 활성 서브틸라아제의 제조 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 세제 또는 세척용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 소독용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 사료 첨가제 또는 식품 첨가제 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 섬유 또는 가죽 가공 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 신규한 서브틸라아제는 기존 서브틸리신 유래 효소에 비해 저온에서 활성이 우수하며, 형질전환 체에서 대량 생산이 가능한 바, 세척, 소독, 첨가제, 섬유 또는 가죽 가공 등 다양한 산업적 용도로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 슈도알테로모나스 균주로부터 분리한 서브틸라아제가 삽입된 재조합 대장균을 회분식 배양하여, 시간에 따른 세포 양(원형으로 표시) 및 효소 활성(사각형으로 표시)을 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 circular dichroism spectroscopy를 이용하여 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제와 서브틸리신 Carlsberg의 효소변성 온도 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제와 산업적으로 사용되는 프로테아제인 Savinase 16L 및 Liquanase의 온도에 따른 상대활성 특성을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제에 의해 분해되는 탈지유를 정성적으로 분석한 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제의 혈액, 우유, 및 잉크로 오염된 오염포에 대한 세척 능력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는, 저온 활성 서브틸라아제(subtilase)를 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 저온 활성 서브틸라아제는 남극 해저토로부터 분리한 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.) 균주에서 유래된 것으로, 708 개의 아미노산으로 구성되어 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 저온 활성 서브틸라아제는 신호 펩티드(1-27의 아미노산 서열), 프로시퀀스(28-142의 아미노산 서열), 촉매 도메인(145-483의 아미노산 서열) 및 2 개의 세균성 프리펩티다아제 C-말단 도메인(489-593과 611-708의 아미노산 서열)으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명에 따른 서브틸라아제에는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 서브틸라아제 뿐만 아니라, 상기 서브틸라아제의 기능적 동등물도 포함된다. 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 본 발명의 서브틸라아제와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0028] 일반적으로 저온 활성 효소는 중온 활성 효소에 비해 0~40℃의 온도 범위에서 높은 효소 활성을 보이기 때문에, 본 발명에 있어서, 상기 "저온"은 0~40℃의 온도 범위를 의미하며, 바람직하게는 본 발명의 재조합 서브틸라아제의 효소변성 온도 이하의 온도, 더욱 바람직하게는 25 내지 30℃ 이하의 온도를 의미한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

- [0031] 본 발명에서 "폴리뉴클레오티드"란, 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미한다. 본 발명에서는 상기 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 의미하는데, 상기 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 서브틸라아제를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 서브틸라아제의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0035] 본 발명에서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환 되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터에 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포 당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 사용하면 벡터와 DNA를 용이하게 라이게이션할 수 있다. 본 발명에 따른 목적 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에서 형질전환 방법은 본 발명의 발현벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposem-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 스페로플라스트법, 아세트산리튬법 등의 공지 방법으로 숙주세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 형질전환에 사용되는 숙주 세포는 당업계에 널리 알려져 있는 숙주세포는 어떤 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 서브틸라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입효율이 우수하고, 상기 도입된 폴리뉴클레오티드의 발현효율이 높은 숙주를 사용할 수 있는데, 예를 들어 박테리아(예컨대, 대장균), 곰팡이(예컨대, 효모), 식물 또는 동물(예컨대, 포유동물 또는 곤충) 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 숙주 세포로 대장균을 이용하였으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 회분식 배양하여 서브틸라아제를 불활성화(inactivated) 봉입체(inclusion body)로 발현시키는 단계; 및 상기 불활성화 봉입체를 리폴딩하여 활성화하는 단계;를 포함하는, 저온 활성 서브틸라아제의 제조 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 제조방법에 있어서, 상기 회분식 배양은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , 구연산, 트립톤, 효모 추출물, 락토스, 글리세롤, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 미량 금속 원소(trace metal solution) 및 항생제가 포함된 배지에서 수행될 수 있으며, 이에

제한되지 않는다.

- [0043] 상기 회분식 배양은 약 37℃에서 수행될 수 있으며, pH 6.8-7.0에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0044] 상기 제조방법에 있어서, 상기 활성화는 언폴딩 완충액 또는 리폴딩 완충액의 처리에 의해 수행될 수 있으며, 보다 구체적으로는, 언폴딩 완충액을 처리하여 봉입체를 가용화하고, 상기 가용화된 용액을 리폴딩 완충액에 처리하여 활성화하는 단계를 순차적으로 수행함으로써 이루어질 수 있다. 이때 언폴딩 완충액 및 리폴딩 완충액은 시판 중인 것을 이용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명에 따른 제조 방법을 통하여 생산된 재조합 서브틸라아제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하며 저온 활성이 우수하고, 상기 형질전환체 내에서 재조합 서브틸라아제를 쉽고 빠르게 대량 생산할 수 있는바 산업적으로 유용하다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 세제 또는 세척용 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명에 따른 서브틸라아제는 오염 물질 (예를 들어, 잉크, 혈액, 우유 등의 식품 등)의 제거능이 매우 우수한 바, 세탁용, 식기 세척용, 콘택트렌즈 세척용, 의치 세척용 등 매우 다양하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 서브틸라아제 외에 기타 효소 성분 및 첨가제를 포함하는 세제 또는 세척용 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 세제 또는 세척용 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수 있으며, 계면활성제는 음이온성, 비-이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 양이온성 형태(zwitter ionic type), 또는 이것의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 세제 또는 세척용 조성물은 또한 연마제, 표백제, 표면활성제, 부식방지제, 금속봉쇄제, 얼룩-제침착 방지제, 향수, 효소 및 표백제의 안정화제, 제형 보조제, 광증백제, 거품부스터, 킬레이트화제, 충전제, 식물연화제 등과 같은 당업계에서 공지된 다른 세제 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 분제, 액제 등의 임의의 편리한 형태로 제형화될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 소독용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명에 따른 서브틸라아제는 오염 물질, 특히 혈액의 제거능이 우수한 바, 수술 또는 치료 기구용 소독제로 사용될 수 있으며, 구체적으로 수술 또는 치료 기구, 내시경, 카테터 등의 체내로 삽입되는 의료용 기구의 소독을 위해 사용될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 사료 첨가제 또는 식품 첨가제 조성물을 제공한다. 또한 본 발명에 따른 서브틸라아제는 목적에 따라 약학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 서브틸라아제는 식품의 연화제, 육질 개질제, 유지 분리제 등의 용도로 사용될 수 있으며, 소화기의 질환, 소화 이상, 소화기 수술 후의 비정상적 질환을 개선하기 위한 소화 효소제, 혈전에 직접 작용하여 피브린을 용해시키는 혈전 용해제 및 외래 독성 물질이 침입하면 생체 내 방어 시스템으로서 작용하여 염증성 물질 또는 괴사 조직을 제거하는 소염 효소 또는 수술 또는 외상 후 부종을 경감시키기 위한 소염제로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 서브틸라아제와 혼합된 제약학적 허용되는 담체를 포함한다. 제약학적 제형은 잘 알려져 있으며 상기 서브틸라아제와 혼합된 제약학적 조성물은 당업자에 의해 용이하게 제형화시킬 수 있다. 비경구 투여는 정맥 내, 피하, 근육 내 등에 투여할 수 있으며, 정맥 내 투여가 바람직한 경로이다. 이들은 충분한량의 염, 글루코오스 또는 텍스트로오스를 포함하여 용액을 등장성으로 되게 하는 멸균 수용액의 형태로 사용되는 것이 바람직하다. 경구 투여는 정제, 캡슐제, 로젠지제, 트로치제, 분제, 시럽제, 엘리시르제, 용액제 및 현탁제 등의 형태로 사용될 수 있으며, 전분 등의 다양한 봉쇄제 및 활택제를 사용해도 좋다.
- [0056] 또한, 본 발명은 상기 저온 활성 서브틸라아제를 포함하는 섬유 또는 가죽 가공 조성물을 제공한다.
- [0057] 상기 조성물은 견섬유의 고무질 제거, 가죽의 침지(soaking) 등의 용도로 사용될 수 있다.
- [0059] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하

기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0061] 실시예 1: 신규한 서브틸라아제의 동정

[0062] 남극 해저토로부터 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.) 균주를 분리하였다. 상기 분리된 슈도알테로모나스 균주를 대상으로, CopyControl Fosmid Library Production Kit (Epicentre)를 이용하여, 34-45kb의 DNA 조각이 포함된 재조합 pCCP1FOS 벡터를 대장균 EPI300에 삽입함으로써 유전자 라이브러리를 제작하였다. 제작된 fosmid 클론을 12.5 µg/mL 클로람페니콜, 1.2% 탈지유, 및 CopyControl fosmid autoinduction solution이 포함된 LB 고체배지에 도말하고, 25℃에서 48시간동안 배양하여, 콜로니 주변에 clear zone이 형성된 재조합 fosmid EPI-P38 삽입 대장균을 분리하였다. 분리한 fosmid EPI-P38을 8 종의 제한효소로 절단한 후, pUC19 벡터에 클로닝하여 대장균 Rosetta에 삽입하였다. 제한효소로 처리된 DNA를 포함하는 클론을 100 µg/mL 카르베니실린(carbenicillin) 및 1.2% 탈지유가 포함된 LB 고체배지에 도말하고, 25℃에서 48시간동안 배양하여 프로테아제 활성이 있는 Rosetta-P38-4 클론을 확보하였다.

[0063] 분리된 Rosetta-P38-4 클론은 4,909bp의 유전정보를 가지고 있었으며, 상기 유전정보 내에 2,127bp 크기의 뉴클레오티드, 즉, 708 개의 아미노산으로 구성되는 서브틸라아제의 서열을 확인하였다.

[0064] 상기 과정을 통해 새롭게 동정된 서브틸라아제의 아미노산 서열을 2018년 3월 4일 GenBank에 보고(accession number MG720561, 서열번호 2)하였으며, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 것을 확인하였다.

[0065] 본 발명에 따른 서열번호 2의 서브틸라아제는 신호 펩티드(1-27의 아미노산 서열), 프로시퀀스(28-142의 아미노산 서열), 촉매 도메인(145-483의 아미노산 서열) 및 2 개의 세균성 프리펩티다아제 C-말단 도메인(489-593과 611-708의 아미노산 서열)으로 구성되어 있다.

[0067] 실시예 2: 재조합 서브틸라아제의 대량 생산

[0068] 2-1: 재조합 서브틸라아제 생산 시스템 구축

[0069] 상기 실시예 1에서 분리한 서열번호 1로 표시되는 서브틸라아제의 전체 유전자, 시그널 펩티드 결핍 유전자, 촉매 도메인, 또는 프로시퀀스 및 촉매 도메인 부위를 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 발현벡터 pEXP5-CT/TOPO 벡터에 삽입하였다. 상기 재조합 벡터를 대장균 BL21star(DE3)pLysS 세포에 형질전환하였다. 이하 하기의 모든 실시예는 프로시퀀스 및 촉매 도메인 부위를 증폭한 재조합 서브틸라아제 생산 및 활성에 대한 것이다.

[0071] 2-2: 회분식 배양을 통한 재조합 서브틸라아제 봉입체 대량 생산

[0072] 실시예 2-1의 프로시퀀스 및 촉매 도메인 부위를 증폭한 재조합 서브틸라아제 유전자가 삽입된 재조합 대장균 BL21star(DE3)pLysS 세포를 100mL의 LB 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕배양하였다. 진탕배양액을 5L jar fermenter(Minifors) 내 2L의 변형된 R 액체배지[4.0g/L (NH₄)₂HPO₄, 13.5g/L KH₂PO₄, 1.7g/L 구연산(citric acid), 10.0g/L 트립톤(tryptone), 20.0g/L 효모 추출물(yeast extract), 20.0g/L 락토스(lactose), 50.0g/L 글리세롤(glycerol), 1.2g/L MgSO₄·7H₂O, 10mL/L 미량 금속 원소(trace metal solution)]에 접종하였다. 미량 금속 원소(trace metal solution)는 10g/L FeSO₄·7H₂O, 2.0g/L CaCl₂·2H₂O, 2.25g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.5g/L MnSO₄·4-5H₂O, 1.0g/L CuSO₄·5H₂O, 0.1g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·7H₂O, 0.23g/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 5.0mL HCl(35%)로 구성되어 있다. 재조합 서브틸라아제의 대량생산을 위한 상기 회분식 배양은 37℃에서 수행되었으며, 14%(v/v) NH₄OH의 첨가로 pH 6.8-7.0을 유지하도록 하였다. 상기 배양 및 발효에 의해 재조합 대장균 균체 건량이 4g/L에 도달하면, 1mM IPTG를 첨가하여 재조합 서브틸라아제 봉입체(inclusion body) 생산을 유도하였다.

[0074] 2-3: 서브틸라아제 봉입체의 리폴딩을 통한 활성화

[0075] 실시예 2-2의 봉입체 생산 유도가 완료된 재조합 대장균을 원심분리($10,000\times g$, 30분, 4°C)를 통해 회수한 후, 8mL의 50mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.6)에 현탁하고, 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액으로부터 불용성 물질을 원심분리($10,000\times g$, 10분, 4°C)를 통해 회수한 후, 40mL의 0.5% Triton X-100으로 2회 세척하였다. 세척된 서브틸라아제 봉입체 1g에 20mL 언폴딩 완충액(unfolding buffer, pH 8.5; 20mM Tris-HCl, 8M urea, 50mM mercaptoethanol)을 첨가하여 봉입체를 가용화(37°C , 1시간)하고, 가용화 용액을 60mL의 리폴딩 완충액(refolding buffer, pH 8.0; 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 20mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20)에 희석하고, 희석용액을 1.6L의 리폴딩 완충액 내에서 3일 동안 4°C 에서 투석하였다. 리폴딩된 활성형의 서브틸라아제 용액을 Sephacryl S-100 레진에 전개하여 정제된 재조합 서브틸라아제를 생산하였다.

[0076] 상기 과정을 통해 정제된 서브틸라아제의 효소 활성 측정은 0.65% 아조카세인(azocasein)이 포함된 50mM 인산 나트륨 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7.6)에 상기 효소를 첨가한 1.1mL의 반응 혼합액을 이용하여 이루어졌다. 30°C 에서 반응 혼합액을 30분 동안 배양한 후, 0.9mL의 110mM 트라이클로로초산(trichloroacetic acid)을 첨가하고 37°C 에서 30분 동안 방치하여 반응 혼합액 내 효소 반응을 종결시켰다. 원심분리($12,000\times g$, 4°C , 3분)를 통해 얻은 0.5mL의 반응 종결액에 0.25mL Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 1.25mL의 500mM 탄산나트륨(sodium carbonate)을 첨가하였다. 이를 37°C 에서 30분 동안 방치한 후, 660nm에서 흡광도를 측정하고, L-타이로신(tyrosin)을 이용한 표준 곡선을 이용하여 효소 활성값을 산출하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0077] 도 1에 나타난 바와 같이, 재조합 대장균의 균체는 발효시간에 따라 증가하였고, 발현 유도 14시간 후 대장균 균체 건량은 16g/L에 도달하였다 (원형으로 표시). 또한, 프로테아제 활성을 측정한 결과, 발현 유도 14시간 후 봉입체 리폴딩에 의해 20,000U/L의 재조합 서브틸라아제를 생산함을 확인하였다 (사각형으로 표시).

[0079] 실시예 3: 재조합 서브틸라아제의 활성 측정

[0080] 3-1: 재조합 서브틸라아제의 온도 특성

[0081] 실시예 2와 같이 생산 및 정제한 10 μg 의 재조합 서브틸라아제와 6 μg 의 서브틸리신 Carlsberg를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, 상기 두 단백질의 변성 온도(T_m)를 5°C 에서 시작하여 95°C 까지 2.5°C 간격으로 온도를 상승시키며 circular dichroism spectroscopy에서 220nm의 신호를 기록하고 신호변화를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0082] 도 2에 나타난 바와 같이, 서브틸리신 Carlsberg의 효소변성 온도는 67.6°C 인 것과 비교하여 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제의 효소변성 온도는 45.5°C 였으며, 이를 통해 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제의 저온 활성 특성을 확인하였다.

[0084] 3-2: 재조합 서브틸라아제와 산업 효소의 활성 비교

[0085] 실시예 2와 같이 생산 및 정제한 재조합 서브틸라아제의 온도에 따른 활성을 산업 효소와 비교하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, 0.65% 아조카세인(azocasein)이 포함된 50mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.6)에 각각의 프로테아제(100 μL 의 재조합 서브틸라아제, 0.2 μL 의 Savinase 16L, 또는 0.3 μL 의 Liquanase)를 첨가한 1.1mL의 반응 혼합액을 이용하여, 온도 구간에 따른 효소 활성을 비교하였다. 이를 위해 $5-30^{\circ}\text{C}$ 에서 각 반응 혼합액을 30분 동안 배양한 후, 실시예 2-3과 같이 효소 반응 종결 및 효소 활성값을 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0086] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제, Savinase 16L 및 Liquanase의 30°C 에서의 활성은 각각 21.8 ± 1.9 , 21.3 ± 0.2 , 및 $21.9\pm 0.4\text{U/mL}$ 이었으며, 각 효소의 30°C 활성을 100%로 하여 5°C 에서의 상대 활성을 계산한 결과, 상기 재조합 서브틸라아제, Savinase 16L 및 Liquanase의 활성은 각각 40, 15, 및 0%임을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제는 산업 효소인 Savinase 16L 및 Liquanase에 비해 저온에서 안정하고, 활성이 우수함을 확인하였다.

[0088] 3-3: 재조합 서브틸라아제를 이용한 세척 테스트

[0089] 실시예 2와 같이 생산 및 정제한 재조합 서브틸라아제 20 μ g을 0.5, 1.0, 또는 5.0%의 탈지유가 포함된 1mL의 인산 나트륨 완충액(pH 7.6)에 첨가하고 4분 동안 상온에서 반응하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0090] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제는 상온에서 1분 내에 0.5와 1.0%의 탈지유의 탁도를 정성적으로 확인 가능하게 감소시켰으며, 4분의 반응으로 탈지유의 탁도를 완전히 제거하는 거대 단백질 분자 분해 능력을 나타냄을 확인하였다.

[0092] 다음으로, 혈액, 우유 및 잉크로 오염시킨 오염포(8×8cm, Testfabrics)에 대한 재조합 서브틸라아제 세척능을 확인하였다. 구체적으로, LG 생활건강에서 제공받은 500mL의 LAS 계면활성제가 포함된 세제 구성액에 오염포와 13mg의 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제를 첨가한 후, 15℃에서 오염포를 세척하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

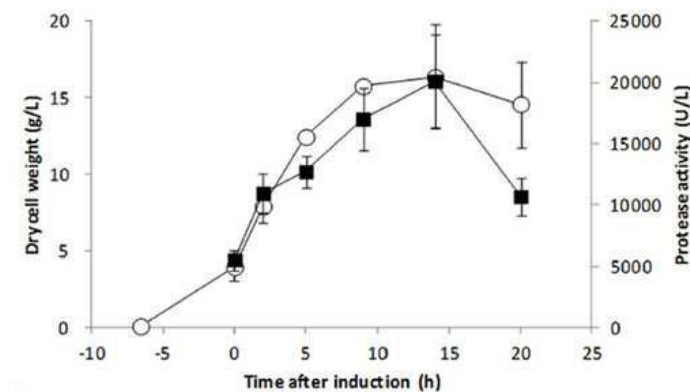
[0093] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제는 계면활성제에 대한 내성을 보유하며 저온에서 혈액, 우유 및 잉크 등 다양한 오염 물질에 대한 세척 능력이 있는 것을 확인하였다.

[0095] 이상의 실험 결과를 통하여, 남극에서 분리한 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas* sp.)로부터 분리한 본 발명에 따른 재조합 서브틸라아제는 기존에 공개되지 않은 서열로 이루어진 신규한 효소로서 재조합 형질전환체에서 대량 생산이 가능하고, 저온에서의 높은 활성으로 인해 다양한 산업적 용도로 활용될 수 있음을 확인하였다.

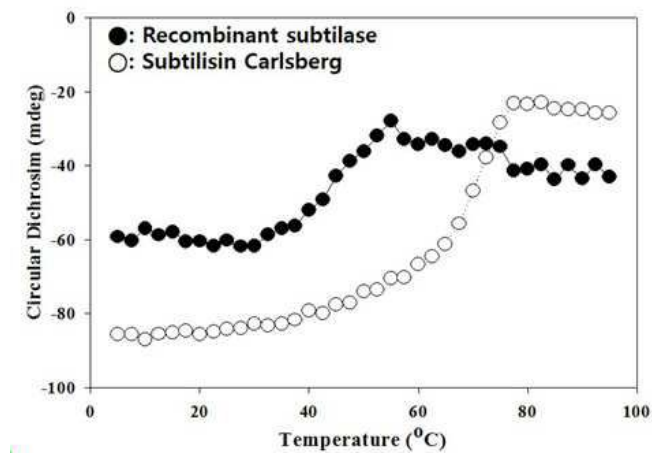
[0097] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

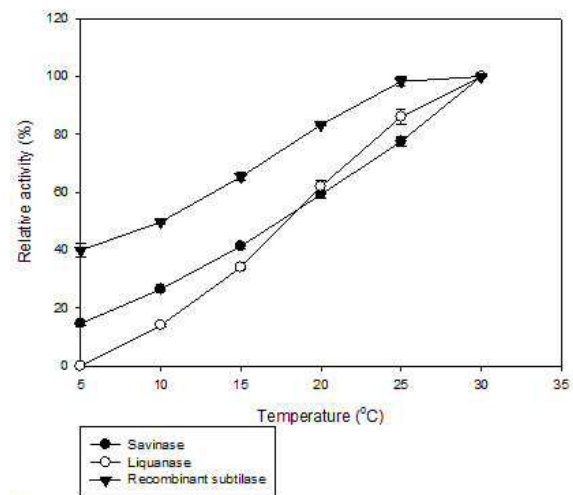
도면1



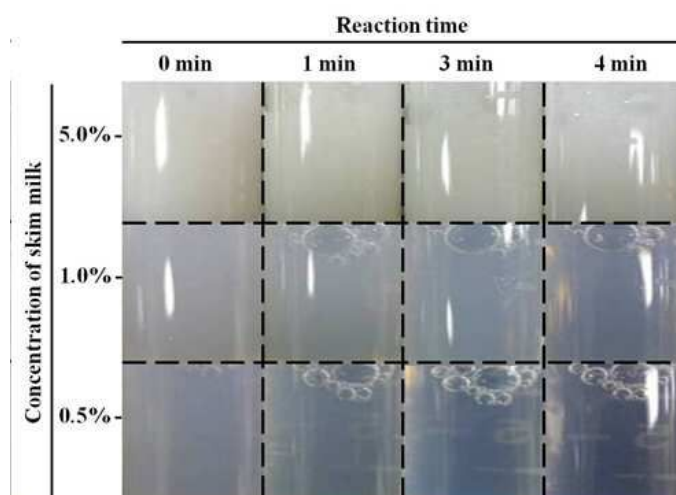
도면2



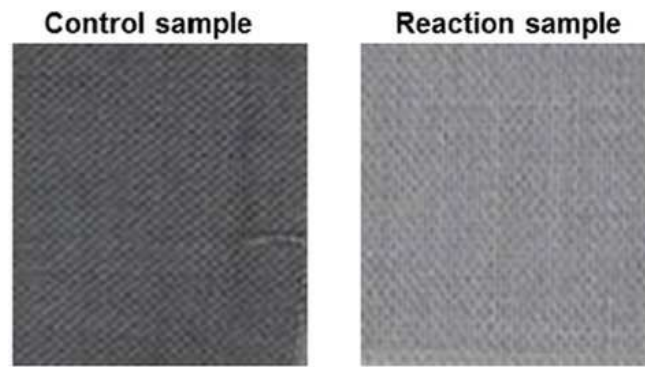
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Korea Institute of Ocean Science and Technology

<120> Novel Cold-active subtilase and Uses thereof

<130> 1-1P

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2127

<212> DNA

<213> Pseudoalteromonas sp.

<400> 1

atgacaacaa gtaaaacttt taaaagatgc gcaattgcaa ttacagttag tacgcttttt	60
gcagcaacat ctggcatggc tcaatcagtt tcaagttcaa tggctgaaac atcggtctaaa	120
ctacaaagcc aaggtggctt tgaaactcag ttatttatta aatataaaaa taataacgaa	180
atggcgagtt tttcaactgc agacgtaagt cgtctagca tgaaaaagcg cgcacagagc	240
tttggttaaaa acttcgctcc taaaaaaggc aaagtaaaag ctaaataatat tcgtgcaatg	300
gcacttaata accaccacgt catgcgtgct gataaaaagt taagtacagc agaagcgcaa	360
gaattcatgc aagaaatggt tgattcaggc aatgtggaat acattgaagt ggatcaaattg	420
ttaaagccgt tttcgactcc taacgatccg cgctttgatg accaatggca ctactacgag	480
caagccggtg gtttaaactt acctactgca tgggataccg caacgggtag cgggtgtagtt	540
gtagctgtac tagatacggg ttaccgcccc catgccgatt taaatgctaa cattttaccg	600
ggttacgata tgatctctaa cctatcggta gctaacgatg gcggtgggtcg cgatagcgat	660
gcacgtgatc ctggtgatgc agttgctgcg aatgaatgtg gcaactaacgg tgcacaaaac	720
tctagctggc acggcacgca cgtagccggc acagttgctg cggtaaccaa taacggcgaa	780

gggtgttcag gcgtagctta taacgcaaaa gtagtgccctg ttcgtgtact tggtaagtgt 840
 ggtgggttta cctctgatat tgcagatggt attatttggg catctggcgg aagtgtttca 900
 ggcatctctg ctaactcaaa ccctgcagat gtaataaata tgagtttagg tggcagcgg 960
 tcatgtagct ctacaactca aaatgcaatt aacaccgcgc gtagtaacgg cactgtggta 1020
 gttattgctg caggtaacga taacgataac tcagcaaact acaatccagg taactgtaat 1080

gggtgtagta acgtagcatc agtaggtcgt aatggcggcc gagcttatta ctcaaactac 1140
 ggtagcaata ttgatgttc agcacgggt ggcgcgcaa gctttgcaa cgactcagaa 1200
 ggtgttctat caacttaca ttcaggttcg tctacacct caagcgacag ctatggctac 1260
 tcacaaggta catcaatggc tgcgccccac gtagcaggtg ttgcggcact tattaagcaa 1320
 gcaaaaccag atgcaacgcc tgacgaaata gaaagtattt taaaatcaac aaccggttcg 1380
 ttccctgcta catgtactag ctgtggtagc ggtattgttg atgctgccgc agctgttgca 1440
 gcagcaagtg gcggcactac tccacctaca ggcggtgata gcgagcttat taatggtgaa 1500

gctaaaacag gttaaagtgg ggctgcaaat gcacaagcgt tttacacgat gaccgtacca 1560
 agcggtgcaa ctaatgtaac attcactatg agtgggtgta ctggtgatgc tgatttatac 1620
 glacgtgcgg gcagtaaac tacaactact acctatgact gtcgccctta taaaggcgg 1680
 aatagcgaag agtgttctat tgataacct actgcgggaa cttaccacgt aatgcttaac 1740
 ggctactctg cgtattcage tgtgagcttg gtaggtaata ttactggtgg ttcacgtct 1800
 ggtggcggt caggcactcc acaagctggc ggcggcacta taagcgatgt gacagccaat 1860
 actggtcagt ggaacatta cacgttagat gtaccttcag gaatgagtac gtttacagta 1920

acaacgtcgg gtggaagtgg cgatgcagac ttatttgtaa aatatggcag ccaaccaaca 1980
 accactacgt acgattgtcg ccttataaa aatggcaacg cagaacatg tacatttacc 2040
 aatccacaag caggtaactg gcacttgagc gttaacgctt atagcacttt ctctggttta 2100
 acacttagcg gacaatacca accgtaa 2127

<210> 2

<211> 708

<212> PRT

<213> Pseudoalteromonas sp.

<400> 2

Met Thr Thr Ser Lys Thr Phe Lys Arg Cys Ala Ile Ala Ile Thr Val

1 5 10 15

Ser Thr Leu Phe Ala Ala Thr Ser Gly Met Ala Gln Ser Val Ser Ser

20 25 30
 Ser Met Ala Glu Thr Ser Ala Lys Leu Gln Ser Gln Gly Gly Phe Glu
 35 40 45
 Thr Gln Phe Ile Ile Lys Tyr Lys Asn Asn Asn Glu Met Ala Ser Phe
 50 55 60
 Ser Thr Ala Asp Val Ser Pro Ser Ser Met Lys Lys Arg Ala Gln Ser
 65 70 75 80
 Phe Val Lys Asn Phe Ala Pro Lys Lys Gly Lys Val Lys Ala Lys Tyr
 85 90 95
 Ile Arg Ala Met Ala Leu Asn Asn His His Val Met Arg Ala Asp Lys
 100 105 110
 Lys Leu Ser Thr Ala Glu Ala Gln Glu Phe Met Gln Glu Met Val Asp
 115 120 125
 Ser Gly Asn Val Glu Tyr Ile Glu Val Asp Gln Met Leu Lys Pro Phe
 130 135 140
 Ser Thr Pro Asn Asp Pro Arg Phe Asp Asp Gln Trp His Tyr Tyr Glu
 145 150 155 160
 Gln Ala Gly Gly Leu Asn Leu Pro Thr Ala Trp Asp Thr Ala Thr Gly
 165 170 175
 Ser Gly Val Val Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Tyr Arg Pro His Ala
 180 185 190
 Asp Leu Asn Ala Asn Ile Leu Pro Gly Tyr Asp Met Ile Ser Asn Leu
 195 200 205
 Ser Val Ala Asn Asp Gly Gly Gly Arg Asp Ser Asp Ala Arg Asp Pro
 210 215 220
 Gly Asp Ala Val Ala Ala Asn Glu Cys Gly Thr Asn Gly Ala Gln Asn
 225 230 235 240
 Ser Ser Trp His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Val Thr
 245 250 255
 Asn Asn Gly Glu Gly Val Ala Gly Val Ala Tyr Asn Ala Lys Val Val
 260 265 270
 Pro Val Arg Val Leu Gly Lys Cys Gly Gly Leu Thr Ser Asp Ile Ala

275 280 285
 Asp Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Gly Ser Val Ser Gly Ile Pro Ala
 290 295 300

 Asn Ser Asn Pro Ala Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ser Gly
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Ser Thr Thr Gln Asn Ala Ile Asn Thr Ala Arg Ser Asn
 325 330 335
 Gly Thr Val Val Val Ile Ala Ala Gly Asn Asp Asn Asp Asn Ser Ala
 340 345 350
 Asn Tyr Asn Pro Gly Asn Cys Asn Gly Val Val Asn Val Ala Ser Val
 355 360 365
 Gly Arg Asn Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Ile

 370 375 380
 Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Gln Ser Phe Ala Asn Asp Ser Glu
 385 390 395 400
 Gly Val Leu Ser Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Ser Thr Pro Ser Ser Asp
 405 410 415
 Ser Tyr Gly Tyr Ser Gln Gly Thr Ser Met Ala Ala Pro His Val Ala
 420 425 430
 Gly Val Ala Ala Leu Ile Lys Gln Ala Lys Pro Asp Ala Thr Pro Asp
 435 440 445

 Glu Ile Glu Ser Ile Leu Lys Ser Thr Thr Arg Ser Phe Pro Ala Thr
 450 455 460
 Cys Thr Ser Cys Gly Thr Gly Ile Val Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala
 465 470 475 480
 Ala Ala Ser Gly Gly Thr Thr Pro Pro Thr Gly Gly Asp Ser Glu Leu
 485 490 495
 Ile Asn Gly Glu Ala Lys Thr Gly Leu Ser Gly Ala Ala Asn Ala Gln
 500 505 510
 Ala Phe Tyr Thr Met Thr Val Pro Ser Gly Ala Thr Asn Val Thr Phe

 515 520 525

Thr Met Ser Gly Gly Thr Gly Asp Ala Asp Leu Tyr Val Arg Ala Gly
 530 535 540
 Ser Lys Pro Thr Thr Thr Thr Tyr Asp Cys Arg Pro Tyr Lys Gly Gly
 545 550 555 560
 Asn Ser Glu Glu Cys Ser Ile Asp Asn Pro Thr Ala Gly Thr Tyr His
 565 570 575
 Val Met Leu Asn Gly Tyr Ser Ala Tyr Ser Ala Val Ser Leu Val Gly
 580 585 590

 Asn Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly Thr Gly Thr Pro Gln
 595 600 605
 Ala Gly Gly Gly Thr Ile Ser Asp Val Thr Ala Asn Thr Gly Gln Trp
 610 615 620
 Lys His Tyr Thr Leu Asp Val Pro Ser Gly Met Ser Thr Phe Thr Val
 625 630 635 640
 Thr Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ala Asp Leu Phe Val Lys Tyr Gly
 645 650 655
 Ser Gln Pro Thr Thr Thr Thr Tyr Asp Cys Arg Pro Tyr Lys Asn Gly

 660 665 670
 Asn Ala Glu Thr Cys Thr Phe Thr Asn Pro Gln Ala Gly Thr Trp His
 675 680 685
 Leu Ser Val Asn Ala Tyr Ser Thr Phe Ser Gly Leu Thr Leu Ser Gly
 690 695 700
 Gln Tyr Gln Pro
 705