



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0001197
(43) 공개일자 2015년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0074014

(22) 출원일자 2013년06월26일

심사청구일자 2013년06월26일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

공인수

부산광역시 해운대구 해운대해변로 83, 101동 204호(우동, 경남마리나아파트)

이종민

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

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신규한 아릴-포스포-베타-디-글루코시다제 단백질 및 이의 대량 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제 단백질, 이를 코당하는 아미노산 서열과 염기 서열, 상기 염기 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체로부터 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC)를 대량 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 아릴-

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도 1



포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 p-니트로페닐-베타-D-글루코피루라노사이드(p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside)를 기질로 하여 40℃의 온도 및 pH 6.0에서 인산화-베타-글루코사이드(phosphorylated-beta-glucoside) 및 비인산화-베타-글루코사이드(non-phosphorylated-beta-glucoside) 모두를 가수분해하는 활성을 가지고 있으며, 또한 35 ~ 43℃ 온도 범위와 pH 4 ~ 7의 pH 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 유지할 수 있어, 넓은 범위의 조건에서 효율성을 가지고 용이하게 취급할 수 있는바, 사료 내의 셀룰로오스를 분해하는 사료첨가제로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 세제산업, 섬유산업 또는 제지산업으로서도 이용되어 산업적으로 섬유소의 분해 등에 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

김유리

부산광역시 사상구 강선로 10(덕포동)

김중균

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2010-0833

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 부경대학교

연구사업명 농림수산식품 연구개발사업

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

기 여 율 1/1

주관기관 농림수산식품기술기획평가원

연구기간 2010.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질은 p-니트로페닐-베타-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside)를 기질로 하여 40℃의 온도 및 pH 6.0에서 인산화-베타-글루코사이드(phosphorylated-beta-glucoside) 및 비인산화-베타-글루코사이드(non-phosphorylated-beta-glucoside) 모두를 가수분해하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 3

제1항의 단백질을 코딩하는 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 유전자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제3항의 유전자를 함유하는 제조함 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 벡터는 pETDuet-1인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 7

제5항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

청구항 9

제7항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

배양된 배양물을 크로마토그래프를 수행하여, 제1항의 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질의 대량 생산 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제 단백질, 이를 코딩하는 아미노산 서열과 염기 서열, 상기 염기 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체로부터 아릴-포스포-베타-글루

코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC)를 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 지구상 자연계에서 석탄에 이어 가장 풍부하게 존재하는 유기화합물인 섬유소(cellulose)는 미래자원으로 그 이용가치가 크게 주목받고 있다. 섬유소는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 다당류이다. 또한, 베타-글루코오스(β -glucose)는 β -1,4 결합으로 다수 중합되어 이루어진 중합체로, 섬유소의 끈은 사슬이 나란히 배열하여 결정상을 이루고 있다. 자연계에 존재하는 섬유소는 녹말, 펙틴, 목질류 등과 결합된 안정된 형태로 존재하므로 자연상태에서의 분해속도는 대단히 느리다. 섬유소는 주로 균류, 세균, 연체동물 등의 셀룰라아제(cellulase)에 의해 분해된 후 최종적으로 글루코오스가 된다. 이러한 섬유소를 분해시켜 저분자 물질로 만드는 방법으로 효소나 산을 이용하거나 열분해 시키는 방법 등이 알려져 있는데 (Okada amp; Nisizawa, J. Biochem., vol 78, p297-306, 1975 Lee amp; Fan, Biotechnol. Bioeng., vol 24, p2183-2406, 1982), 그 중에서도 효소반응을 이용한 섬유소의 가수분해 방법이 가장 활발하게 연구되고 있다.
- [0003] 셀룰라아제는 복합효소로서 기질에 따른 가수분해 특성에 따라 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose, CMcellulose)에 대한 가수 분해능이 우수한 엔도글루카나아제(endoglucanase, EG), 아비셀(Avicel)에 대한 분해능이 우수한 엑소글루카나아제(exoglucanase, CBH) 및 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 등의 3종으로 분류되는데, 섬유소의 분해에는 이들 세 종류의 효소가 관여한다고 알려져 있다.
- [0004] 엔도글루카나아제는 셀룰로오스를 무작위로 공격하여 비환원성 말단기를 만드는데, 저분자량의 수용성 섬유소, 인산 가수분해된 섬유소 등은 쉽게 분해하나, 결정성 섬유소를 단독으로 분해하지는 못한다. 엑소글루카나아제는 섬유소 사슬의 비환원성 말단기를 공격하여 셀로비오스(cellobiose)를 생성시키며, 특히 기질이 결정상으로 존재할 때 이 효소의 존재는 커다란 의미를 갖는다. 즉, 여러 유기화학, 물리화학적 연구 결과, 셀룰로오스의 분자는 많은 글루코오스가 탈수축합하여 셀로비오스 모양으로 결합하여 생긴 고분자로 추정되는데 이와 같은 결합을 β -1,4-글루코시드 결합이라 한다. 마지막으로 베타-글루코시다아제는 저분자량의 수용성 섬유소를 분해하여 글루코오스(glucose)를 생성한다(Beldman et al., Eur. J. Biochem., vol 146, p301-308, 1985; Kim et al., Korean J. Biotechnol. Bioeng., vol 13, p162-167, 1998).
- [0005] 셀룰라아제의 이러한 특성 때문에, 이를 이용하고자 다양한 생물체로부터 분리된 셀룰라아제 및 그 유전자가 보고되고 있다. 지금까지 셀룰라아제 및 그 유전자는 주로 세균과 곰팡이 등의 미생물로부터 분리된 것들이 많이 알려져 왔다 (Eberhardt et al., Microbiology, vol 146, p1999-2008, 2000; Guiseppi et al., Mol. Microbiol., vol 2, p159-164, 1988; Hagen et al., Gen, vol 150, p163-167, 1994; Nakatani et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., vol 64, p1238-1246, 2000; Takashima et al., J. Biotechnol., vol 67, p85-97, 1999).
- [0006] 그러나 현재까지 연구된 베타-글루코오스(β -glucose)는 최적의 활성을 나타내는 온도 및 pH 범위가 제한적인바, 이들 효소의 취급에 어려움이 있어왔다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 넓은 범위의 조건에서 최적의 활성을 유지할 수 있는 aryl-phospho- β -glucosidase를 개발하기 위하여 노력한 결과, 오징어 젓갈로부터 동정된 신규 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주에서 aryl-phospho- β -glucosidase 효소 중 BglC 단백질을 코딩하는 DNA 염기서열을 클로닝하고, 이러한 핵산 서열을 대장균에 형질전환시켜 BglC를 생산하였으며, 이러한 BglC가 넓은 범위의 온도 및 pH 조건에서 최적활성의 80% 이상의 활성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2003-0015943호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-

phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC)를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 배양된 배양물을 크로마토그래프를 수행하여, 제1항의 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질은 p-니트로페닐-베타-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside)를 기질로 하여 40℃의 온도 및 pH 6.0에서 인산화-베타-글루코사이드(phosphorylated-beta-glucoside) 및 비인산화-베타-글루코사이드(non-phosphorylated-beta-glucoside) 모두를 가수분해하는 활성이 있을 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 유전자를 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터는 pETDuet-1일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균(*E.coli*)일 수 있다.

[0022] 나아가 본 발명은 형질전환체를 배양하는 단계; 및 배양된 배양물을 크로마토그래프를 수행하여, 제1항의 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질의 대량 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 신규 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 p-니트로페닐-베타-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside)를 기질로 하여 40℃의 온도 및 pH 6.0에서 인산화-베타-글루코사이드(phosphorylated-beta-glucoside) 및 비인산화-베타-글루코사이드(non-phosphorylated-beta-glucoside) 모두를 가수분해하는 활성을 가지고 있으며, 또한 35 ~ 43℃ 온도 범위와 pH 4 ~ 7의 pH 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 유지할 수 있어, 넓은 범위의 조건에서 효율성을 가지고 용이하게 취급할 수 있는바, 사료 내의 셀룰로오스를 분해하는 사료첨가제로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 세제산업, 섬유산업 또는 제지산업으로서도 이용되어 산업적으로 섬유소의 분해 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제 DNA 염기서열과 추정 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제 분리 과정을 SDS-PAGE로 분석하여 나타낸 것이다.

도 3A는 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제의 온도별 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.

도 3B는 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제의 pH별 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상의 상동성을 가지는 신규한 아릴-포스포-베타-글로코

시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질에 관한 것이다.

- [0026] 4가지 종류의 아릴-포스포-베타-글로코시다제 효소 중 *bglC*는 글리코실 하이드로라아제 패밀리 1(glycosyl hydrolase family 1)에 속하는 세포내의 베타 글루코시다아제(β -glucosidase)를 부호화한 것을 의미한다.
- [0027] 상기와 같은 아릴-포스포-베타-글로코시다제는 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.
- [0028] 본 발명에서는 오징어 젓갈로부터 동정된 기탁번호 KCCM 90078의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 유래된 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제의 아미노산 서열 및 이들의 염기 서열을 최초로 규명하였다.
- [0029] 본 발명에서 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 효소 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어 “상동성”이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 서열번호 1의 서열로 정의되는 야생형 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 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 단백질을 쉽게 이해할 것이다.
- [0033] 또한, 본 발명의 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 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. 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.
- [0034] 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 기탁번호 KCCM 90078의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 직접 분리하여 제조, 화학적으로 합성 또는 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다. 본 발명의 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질을 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 있으며, 보다 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.
- [0036] 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질은 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질을 코딩하는 유전자를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-

glucosidase; BglC)단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주세포에서 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.

[0037] 또한, 본 발명은 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC)단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

[0038] 본 발명의 상기 유전자는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있으며, 이와 90% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 유전자는 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.

[0039] 본 기술분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70% 이상 상동성이유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 효소 활성을 보유하는 한, 본 발명의 핵산 분자와 균등물로서 본 발명의 권리 범위에 속함을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 유전자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글로코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 효소 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 이를 발현하는 벡터에 의해 제공되어 단백질로 발현될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는DNA 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.

[0042] 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 코딩하는핵산 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.

[0043] 본 발명의 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트, 분비시그널 등을 포함할 수 있으며, 목적에 따라다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작동물이 투여되었을때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다.

[0044] 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 pETDuet-1, pET 계열의 벡터, pHCE, pGEX계열, pTRP, pMAL 계열등의 단백질 발현벡터를 예시할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 대장균용 발현벡터pETDuet-1를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그자체에 통합될 수 있다.

[0045] 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 바람직하다.

[0046] 또한, 본 발명의 벡터는 선별 마커(selection market)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 또는표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다.

[0047] 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나, 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

- [0048] 또한, 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.
- [0049] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가가능하게 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.
- [0050] 발현벡터로 형질전환되는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이다르게 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 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 등이 있다. 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 효모이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 하기 실시예에서는 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로부터 유래한 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 유전자를 포함하는 플라스미드 발현벡터(pETDuet-1)를 *E. coli* BL21에 형질전환시켰다.
- [0052] 나아가 본 발명은 형질전환체를 배양하는 단계; 및 배양된 배양물을 크로마토그래프를 수행하여, 제1항의 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질의 대량 생산 방법에 관한 것이다.
- [0053] 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. Einfuhrung 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.
- [0054] 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 이용할 수 있으며, 이들 물질 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 인 공급원으로서 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨 함유 염을 이용할 수 있다.
- [0055] 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.
- [0056] 배양물의 pH는 염기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아)또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 적절히 사용하여 조절할 수 있다. 발포방지제인 폴리글리콜 에스테르와 같은 거포제를 사용하여 조절할 수 있다. 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물, 예를 들어 공기를 배양물 중으로 도입시켜 호기성 조건을유지 시킬

수 있다. 배양 온도는 통상적으로 20 내지 45℃, 바람직하게는 25 내지 40℃이며, 가장 바람직하게는 30℃이다. 배양은 원하는 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속할 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 배양에 의해 생성된 배양물 내의 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 회수는 원심분리, 여과 등 당 분야의 통상의 방법으로 회수할 수 있다. 또한, 상기 방법으로 회수된 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 단백질을 당 분야 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, 이온교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 단백질을 정제할 수 있다.

[0058] 본 발명은 상기 생산 방법으로 수득된 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC)는 섬유소를 분해시킬 수 있는 효소로서 본 발명의 신규한 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-beta-glucosidase; BglC) 효소를 사용할 시 사료 내의 셀룰로오스를 분해하는 사료첨가제로 이용될 수 있을 뿐 아니라, 세제산업, 섬유산업 또는 제지산업으로서도 이용되어 산업적으로 섬유소의 분해 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[0059] 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.

[0060] <실시예 1>

[0061] Bacillus sp. SJ-10 균주로부터 분리한 신규한 bglC의 염기서열 결정

[0062] 오징어 젓갈로부터 동정된 *Bacillus sp.* SJ-10이 생산하는 4가지 종류의 아릴-포스포-베타-글루코시다제(aryl-phospho-β-glucosidase) 효소 중 BglC 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 NCBI database를 통해 확보된 다양한 *Bacillus* 종의 *bglC* 유전자를 비교분석하고, *bglC* 유전자 내에 상보적인 서열을 기반으로 다용도 프라이머(universal primer)를 제작하였다. 이를 *Bacillus sp.* SJ-10의 chromosomal DNA를 주형으로 PCR을 수행하였고, 생산된 PCR 산물을 시퀀싱하여 *bglC* 유전자의 일부 서열을 밝혔으며, 밝혀진 일부 서열을 기준으로 DNA Walking Speedup™ Premix Kit(Seegene, Korea)를 이용하여 5' 말단 및 3' 말단의 염기서열을 모두 밝혔다.

[0063] 그 결과, *Bacillus sp.* SJ-10 균주로부터 분리한 *bglC* 유전자는 478개의 아미노산을 암호화하는 1437개의 핵산 서열로 이루어져 있음을 확인할 수 있었으며(도 1 참조), 상기 유전자의 핵산 서열 및 추정 아미노산 서열은 각각 서열번호 2 및 서열번호 1로 나타내었다.

[0064] <실시예 2>

[0065] Bacillus sp. SJ-10 균주 유래 bglC 유전자의 염기서열 비교 분석

[0066] *Bacillus sp.* SJ-10의 *bglC* 유전자의 염기서열과 다른 *Bacillus* 종과 *bglC* 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 다중서열 정렬하였다. 정렬된 서열을 비교하여 그 상동성의 정도를 백분율로 나타냈다.

[0067] 그 결과, *Bacillus sp.* SJ-10의 *bglC*의 염기서열을 다른 바실러스 종과 비교 했을 때, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum) YAU B9601-Y2가 99.1%로 가장 높은 유사도를 보였으며, 그 외 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) Y2, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) FZB42, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum) UCMB5036, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum) AS43.3, 그리고 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) XH7는 각각 98.5%, 97.6%, 97.5%, 97.4% 92.7%의 유사도를 나타냈다.

[0068]

또한 아미노산 서열은 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) YAU B9601-Y2와 98.1%, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) Y2와 97.5%, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) FZB42와 97.6%, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) UCMB5036와 97.2%, 바실러스 아밀로리퀴파리엔스 아종 플래타럼(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) AS43.3와 97.0%, 그리고 바실러스 아밀로리퀴파리엔스(*B. amyloliquefaciens*) XH7과 94.7%로 나타났다(표 1 참조).

[표 1] *Bacillus* sp. SJ-10의 *bgIC* 유전자의 염기서열과 다른 *Bacillus* 종과 *bgIC*

염기서열의 상동성 분석 비교

		Similarity / Identity with strain no. (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	1	ID	98.1	97.5	97.6	97.2	97.0	94.7	83.0	83.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2	2	99.1	ID	99.3	99.5	99.1	98.9	95.8	84.3	84.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> Y2	3	98.5	99.3	ID	98.9	98.6	98.3	95.2	83.7	83.9
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	4	97.6	98.4	97.8	ID	99.1	98.9	95.6	84.3	84.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5036	5	97.5	98.3	97.7	99.0	ID	98.9	95.6	84.3	84.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> AS43.3	6	97.4	98.3	97.7	98.7	98.8	ID	95.6	84.5	84.7
<i>B. amyloliquefaciens</i> XH7	7	92.9	93.5	92.9	93.8	93.5	93.7	ID	84.9	85.1
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	8	76.8	77.3	76.9	77.3	77.5	77.5	77.3	ID	98.3
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>natto</i> BEST195	9	76.6	77.2	76.7	77.1	77.3	77.4	77.3	98.9	ID

Identity (%) of the aryl-phospho-β-D-glucosidase (*bgIC*) nucleotide sequences is shown below the diagonal, and the deduced amino acid sequence similarity with the aryl-phospho-β-D-glucosidase (*bgIC*) protein is shown above the diagonal. Sequence data from GenBank: 2) CP003332.1 3) HE774679.1 4) CP000560.1 5) AJ575642.1 6) HF563562.1 7) CP003838.1 8) NC000964.3 9) NC017196.1

[0069]

[0070]

<실시예 3>

[0071]

형질전환체 제조

[0072]

본 발명의 *BgIC*를 대량으로 생산할 수 있는 제조합 플라스미드를 제조하기 위해, pETDuet-1의 제한효소 BamH와 SalI 부위에 ORF를 클로닝하고, 이를 과발현 숙주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하였다.

[0073]

자세하게는 *Bacillus* sp. SJ-10 으로부터 추출한 chromosomal DNA를 주형 DNA로 하고, 합성된 프라이머 BSbgIC-up 및 BSbgIC-rp를 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분 동안 초기 변성단계를 거친 후, 94℃ 30초 58℃ 1분, 72℃ 30초를 30사이클 수행하였다. 마지막 7분 동안 72℃에서 신장시켰다. 중합효소연쇄반응을 통해 대량 증폭된 DNA 단편을 제한효소 BamH 과 SalI 으로 완전히 자른 후, 동일한 제한효소를 처리한 발현용 벡터 pETDuet-1와 연결하여 본 발명의 *bgIC* 발현용 플라스미드를 제조하였다.

[0074]

본 발명의 *Bacillus* sp. SJ-10 균주 유래 *bgIC* 유전자 N-말단 프라이머와 C-말단 프라이머는 각각 BamH 과 SalI 제한효소 절단부위를 가지는 올리고 뉴클레오티드이다. 제조합 벡터는 강력한 T7 프로모터와 판독신호가 내제되어 있어서, 이를 T7 RNA 중합효소를 갖고 있는 *E. coli* BL21(DE3)를 숙주로 사용하는 경우 본 발명의 BgIC 단백질 대량생산이 가능하다. 또한 C-말단에는 본 발명의 BgIC 단백질의 정제를 수월하게 수행할 수 있게 하는 6개의 히스티딘을 암호화하는 태그가 형성되어 있다. 상기 제조합 플라스미드는 고농도의 CaCl₂를 처리한 *E. coli* BL21(DE3)에 열충격(heat shock)을 통한 형질전환을 수행하여 형질전환된 균주를 제조하였다.

[표 2] PCR에 사용된 프라이머 서열

프라이머 서열 (5'-3')	
포워드 (BSbglC-up)	GGC CGG ATC CGA TGA TAC ATR AAA AAC MGG G
리버스 (BSbglC-rp)	GGC CGT CGA CTA AAC TYT TAC CGT TTG TTT CAA

[0075]

[0076] <실시예 4>

[0077] 형질전환체에서 본 발명의 BglC 발현 및 정제

[0078] 상기 실시예 3에서 제조한 *E. coli* pETbg1를 암피실린(ampicillin, 100 µg/ml)이 포함된 LB 배지에서 배양한 후, 최종 농도 1mM의 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 배양액에 넣어 4시간 동안 세포를 배양하여 본 발명의 BglC 단백질을 과발현시켰다. 본 발명의 BglC 단백질이 과발현된 세포를 파쇄하여 얻은 활성 없는 inclusion body를 6M 유레아(urea)로 renaturation 시킨 후, 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 8.0)에서 투석하여 리폴딩(refolding) 하였으며, His-tag가 융합된 재조합 단에 융합된 본 발명의 BglC를 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 수지를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 약 52kDa의 본 발명의 BglC 단백질을 확인하였다.

[0079]

도 2는 본 발명의 BglC 단백질 분리 과정을 SDS-PAGE로 분석하여 나타난 것으로, Lane M은 마커이며, Lane 1은 IPTG 첨가하지 않고 배양한 *E. coli* pETbg1 세포 파쇄물을, Lane 2는 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1 세포 파쇄물을, Lane 3은 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1 세포 파쇄물 중 수용성 분획물을, Lane 4는 IPTG의 첨가에 따른 본 발명의 단백질이 과발현된 *E. coli* pETbg1 세포 파쇄물 중 불용성 분획물을, Lane 5는 정제된 본 발명의 BglC 단백질을 나타낸 것이다.

[0080] <실험예 1>

[0081] 본 발명의 BglC 효소의 활성 측정 및 기질 특이성

[0082] 본 발명의 BglC의 기질 특이성을 확인하기 위하여, *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 및 *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside을 기질로써 이용하였으며, 이를 Tri-HCl pH6 완충 용액에 5mM의 기질과 10ug의 정제된 BglC를 첨가하여 40℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 시킨 산물을 405nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 니트로페놀(nitrophenol)의 양을 산출하였다.

[0083]

BglC의 non-phosphorylated β-glucoside에 대한 기질 특이성을 확인하기 위하여 다양한 인공배지(artificial substrate)를 이용하여 반응시킨 결과 *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside에 대한 활성이 9.1 U/mg으로 가장 높게 나왔으며, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside를 기질로 사용하였을 때는 *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside에 대한 활성의 85.7%에 해당하는 7.8 U/mg을 나타내었다. 한편, *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside에서는 어떠한 활성도 보이지 않았다. 효소 1U은 1분당 1nmol의 니트로페놀(nitrophenol)을 가수분해시키는 효소의 양으로 정의하였다(표 3 참조).

[표 3] BglC의 비인산화 베타-글루코시다아제에 대한 기질 특이성 측정

Substrate (non-phosphorylated β -glucoside)	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	9.1	100
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	7.8	85.7
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	-	-

<실험예 2>

본 발명의 BglC 효소의 최적 온도 및 pH 결정

<2-1> 최적의 온도 조건 결정

본 발명의 BglC 효소 활성의 최적 온도를 결정하기 위하여 정제된 BglC는 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 을 기질로 하여 50mM Tri-HCl을 완충용액으로하고 다양한 온도(10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃)에서 30 분 동안 반응시켰다. 반응 후, 반응액 내에 존재하는 가수분해된 니트로페놀의 양을 효소면역측정기를 이용하여 흡광도 405nm에서 측정하였다.

그 결과, BglC 효소의 활성이 35 ~ 43℃에서 약 6 ~ 9 U/mg로 나타났으며, 그 중 효소활성의 최적온도는 40℃임을 알 수 있었다(도 3A 참조).

<2-2> 최적의 pH 조건 결정

본 발명의 BglC 효소 활성의 최적 pH 조건을 결정하기 위하여 정제된 BglC 1 μ g과 50mM Tri-HCl을 pH 2 ~ 10 조건하에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 반응액 내에 존재하는 니트로페놀의 양을 효소면역측정기를 이용하여 흡광도 405nm에서 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 상기 효소활성의 최적의 pH는 pH 6이었으며, 특히 pH 4 ~ 7의 범위에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 나타내는 것으로 나타나, 다른 균주에 의해 생산된 BglC의 효소 활성과 비교하여 매우 넓은 범위의 pH조건에서 효소활성이 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 3B 참조).

<실험예 3>

본 발명의 BglC 효소의 활성 측정

본 발명자들은 BglC 효소의 활성을 측정하기 위하여 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside 및 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside을 기질로써 이용하였다. *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside와 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside를 기질로 하였을 때 BglC와의 기질 친화도(K_m)는 각각 8.28mM, 7.36mM 로써 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside에 대한 BglC의 기질 친화도가 약 1.13배 높음을 알 수 있었다. 또한, BglC 효소가 각 기질과 반응하는 최대속도(V_{max})는 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside을 기질로 하였을 때 1.12배 높음을 알 수 있었으며, 대사 회전수(turnover number, K_{cat})는 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside에 대해 1.12배 높음을 알 수 있었다.

나아가, BglC의 촉매효율(catalytic efficiency, K_{cat}/K_m)은 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 및 *o*-

nitrophenyl- β -D-galactopyranoside를 기질로 이용하였을 때 매우 근사한 값을 나타냈으며, 반면 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside에 대해서는 어떠한 활성도 나타내지 못하였음을 알 수 있었다(표 4 참조).

[표 4] BglC의 운동성(kinetic) 특성

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (mM min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	8.28	21.72	11.29×10^5	1.363×10^5
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	7.36	19.39	10.07×10^5	1.368×10^5
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	-	-	-	-

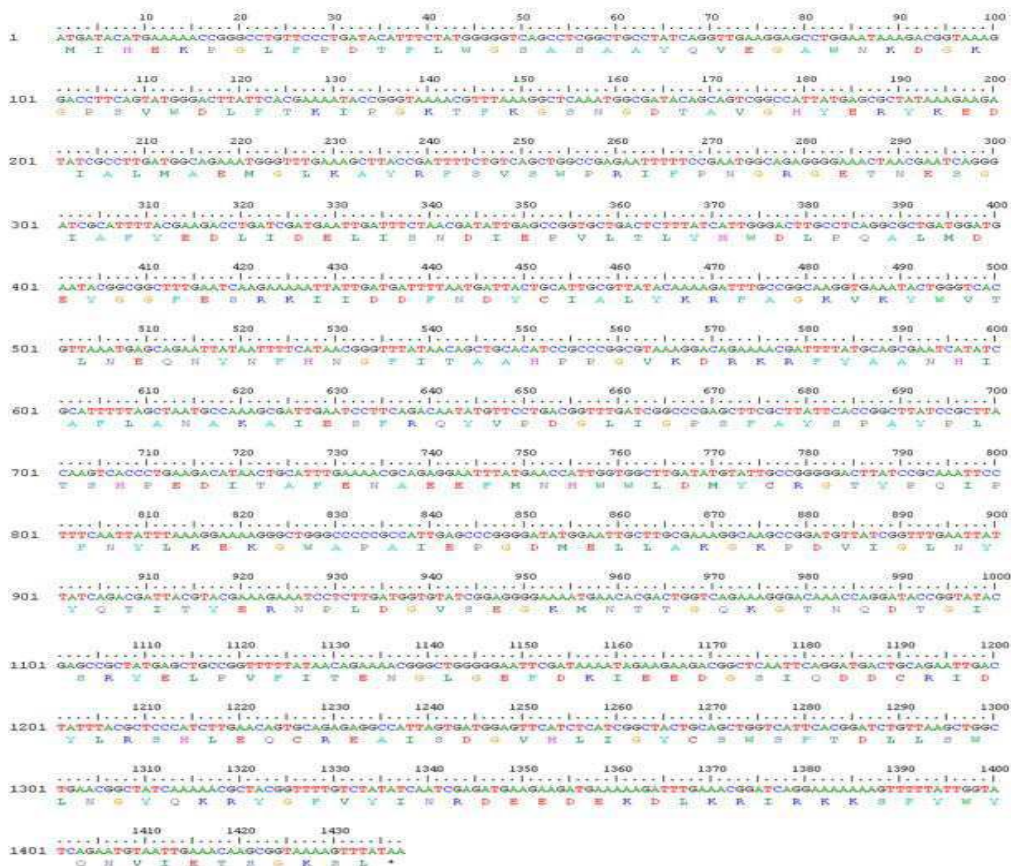
[0097]

[0098]

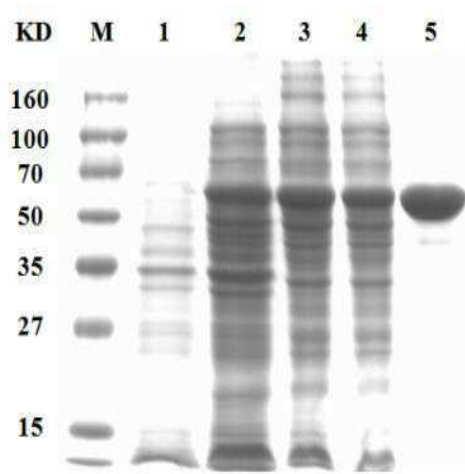
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

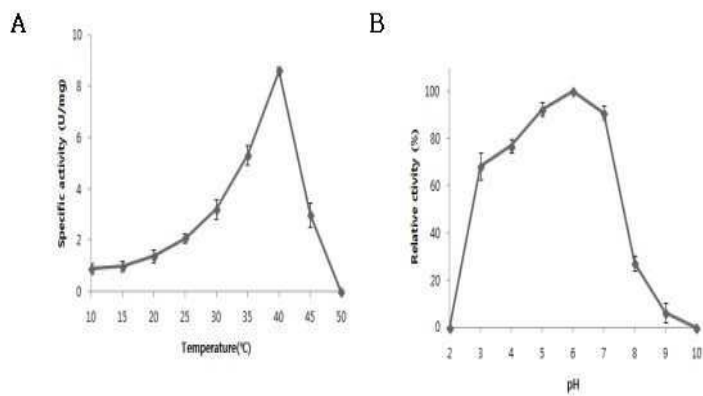
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Novel aryl-phospho-beta-glucosidase protein and method for mass producing

<130> PN1306-194

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 478

<212> PRT

<213> Bacillus sp. sj-10(BglC)

<400> 1

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

1	5	10	15
Ser	Ala	Ser	Ala
Ala	Tyr	Gln	Val
Glu	Gly	Ala	Trp
Asn	Lys	Asp	Gly
20	25	30	
Lys	Gly	Pro	Ser
Val	Trp	Asp	Leu
Phe	Thr	Lys	Ile
Pro	Gly	Lys	Thr
35	40	45	
Phe	Lys	Gly	Ser
Asn	Gly	Asp	Thr
Ala	Val	Gly	His
Tyr	Glu	Arg	Tyr
50	55	60	
Lys	Glu	Asp	Ile
Ala	Leu	Met	Ala
Glu	Met	Gly	Leu
Lys	Ala	Tyr	Arg
65	70	75	80
Phe	Ser	Val	Ser
Trp	Pro	Arg	Ile
Phe	Pro	Asn	Gly
Arg	Gly	Glu	Thr
85	90	95	
Asn	Glu	Ser	Gly
Ile	Ala	Phe	Tyr
Glu	Asp	Leu	Ile
Asp	Glu	Leu	Ile
100	105	110	
Ser	Asn	Asp	Ile
Glu	Pro	Val	Leu
Thr	Leu	Tyr	His
Trp	Asp	Leu	Pro
115	120	125	
Gln	Ala	Leu	Met
Asp	Glu	Tyr	Gly
Gly	Phe	Glu	Ser
Arg	Lys	Ile	Ile
130	135	140	
Asp	Asp	Phe	Asn
Asp	Tyr	Cys	Ile
Ala	Leu	Tyr	Lys
Arg	Phe	Ala	Gly
145	150	155	160
Lys	Val	Lys	Tyr
Trp	Val	Thr	Leu
Asn	Glu	Gln	Asn
Tyr	Asn	Phe	His
165	170	175	
Asn	Gly	Phe	Ile
Thr	Ala	Ala	His
Pro	Pro	Gly	Val
Lys	Asp	Arg	Lys
180	185	190	
Arg	Phe	Tyr	Ala
Ala	Asn	His	Ile
Ala	Phe	Leu	Ala
Asn	Ala	Lys	Ala
195	200	205	
Ile	Glu	Ser	Phe
Arg	Gln	Tyr	Val
Pro	Asp	Gly	Leu
Ile	Gly	Pro	Ser
210	215	220	
Phe	Ala	Tyr	Ser
Pro	Ala	Tyr	Pro
Leu	Thr	Ser	His
Pro	Glu	Asp	Ile
225	230	235	240
Thr	Ala	Phe	Glu
Asn	Ala	Glu	Glu
Phe	Met	Asn	His
Trp	Trp	Leu	Asp
245	250	255	

Met Tyr Cys Arg Gly Thr Tyr Pro Gln Ile Pro Phe Asn Tyr Leu Lys
260 265 270

Glu Lys Gly Trp Ala Pro Ala Ile Glu Pro Gly Asp Met Glu Leu Leu
275 280 285

Ala Lys Gly Lys Pro Asp Val Ile Gly Leu Asn Tyr Tyr Gln Thr Ile
290 295 300

Thr Tyr Glu Arg Asn Pro Leu Asp Gly Val Ser Glu Gly Lys Met Asn
305 310 315 320

Thr Thr Gly Gln Lys Gly Thr Asn Gln Asp Thr Gly Ile Pro Gly Leu
325 330 335

Phe Glu Thr Lys Lys Asn Pro Asn Leu Val Thr Ser Asn Trp Asp Trp
340 345 350

Thr Ile Asp Pro Ile Gly Leu Arg Ile Gly Leu Arg Arg Ile Thr Ser
355 360 365

Arg Tyr Glu Leu Pro Val Phe Ile Thr Glu Asn Gly Leu Gly Glu Phe
370 375 380

Asp Lys Ile Glu Glu Asp Gly Ser Ile Gln Asp Asp Cys Arg Ile Asp
385 390 395 400

Tyr Leu Arg Ser His Leu Glu Gln Cys Arg Glu Ala Ile Ser Asp Gly
405 410 415

Val His Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Trp Ser Phe Thr Asp Leu Leu Ser
420 425 430

Trp Leu Asn Gly Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly Phe Val Tyr Ile Asn Arg
435 440 445

Asp Glu Glu Asp Glu Lys Asp Leu Lys Arg Ile Arg Lys Lys Ser Phe
450 455 460

Tyr Trp Tyr Gln Asn Val Ile Glu Thr Ser Gly Lys Ser Leu
465 470 475

<210> 2
<211> 1437
<212> DNA
<213> Bacillus sp. sj-10 arly-phospho-b-D-glucosidase(bglC)

<400> 2

atgatacatg aaaaaccggg cctgttcct gatacatttc tatgggggtc agcctcggct	60
gcctatcagg ttgaaggagc ctggaataaa gacggtaaag gaccttcagt atgggactta	120
ttcacgaaaa taccgggtaa aacgttttaa ggctcaaatg gcgatacagc agtcggccat	180
tatgagcgct ataaagaaga tatcgcttg atggcagaaa tgggtttgaa agcttacga	240
ttttctgtca gctggccgag aatttttccg aatggcagag gggaaactaa cgaatcaggg	300
atcgcathtt acgaagacct gatcgatgaa ttgatttcta acgatatga gccggtgctg	360
actctttatc attgggactt gcctcaggcg ctgatggatg aatacggcgg ctttgaatca	420
agaaaaatta ttgatgattt taatgattac tgcattgcgt tatacaaaag atttgccggc	480
aagggtgaaat actgggtcac gttaaatgag cagaattata attttcataa cgggtttata	540
acagctgcac atccgcccgg cgtaaaggac agaaaacgat tttatgcagc gaatcatatc	600
gcatttttag ctaatgcaa agcgattgaa tccttcagac aatatgttcc tgacggtttg	660
atcgccccga gcttcgttta ttcaccgctt tatccgttta caagtcaccc tgaagacata	720
actgcatttg aaaacgcaga ggaatttatg aaccattggt ggcttgatat gtattgccgg	780
gggacttatc cgcaatttcc tttcaattat ttaaaggaaa agggctgggc ccccgccatt	840
gagccccggg atatggaatt gcttgcgaaa ggcaagccgg atgttatcgg tttgaattat	900
tatcagacga ttacgtacga aagaaatcct cttgatggtg tatcgagggg gaaaatgaac	960
acgactggtc agaaaggac aaaccaggat accggtatc cggggctgtt tgaacgaaa	1020
aagaatccta acctcgtgac gagtaattgg gattggacga ttgaccgat aggtctgcgc	1080
atcgcccttc ggcgtataac gagccgtat gagctgccgg tttttataac agaaaacggg	1140
ctgggggaat tcgataaaat agaagaagac ggctcaattc aggatgactg cagaattgac	1200
tatttacgct cccatcttga acagtgcaga gaggccatta gtgatggagt tcatctcatc	1260
ggctactgca gctggtcatt cacggatctg ttaagctggc tgaacggcta tcaaaaacgc	1320
tacggttttg tctatatcaa tcgagatgaa gaagatgaaa aagatttgaa acggatcagg	1380
aaaaaaagt tttatttgta tcagaatgta attgaaacaa gcggtaaaag tttataa	1437