

특허청구의 범위

청구항 1

소 반추위 메타게놈에서 동정된 반추세균 유래의 서열목록 서열번호 1에 기재된 염기서열을 가지는 지방을 가수분해하는 신종 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자.

청구항 2

소 반추위 메타게놈에서 동정된 반추세균 유래의 서열목록 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 지방을 가수분해하는 신종 그룹의 에스테라아제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <12> 본 발명은 소의 반추위 메타게놈에서 동정된 신종 그룹의 에스테라아제 유전자(est5S) 및 그것의 아미노산 서열에 관한 것이다. 보다 상세하게는 소의 반추위 메타게놈 라이브러리를 구축하여 기존의 4 그룹에 속하지 않는 신종 에스테라아제코딩 유전자(est5S)를 동정하고, 이로부터 생성된 효소의 생화학적 특징과 아미노산 서열을 제공함에 관한 것이다.
- <13> 환경 내 미생물군집 중 대부분의 미생물을 인공적으로 배양하기 어렵기 때문에 전통적인 배양기술로서는 신종 식물세포벽 분해효소 및 지방가수분해효소 등의 생축매를 선발하는데 한계에 도달하였다. 예로서, 토양 내에서 배양할 수 있는 미생물은 1% 미만이며 반추위는 극히 제한된 환경으로 비교적 많이 연구가 되었지만 아직 약 15% 미만 정도만 배양 가능한 것으로 알려져 있다. 이런 한계점을 극복하고 배양할 수 없는 미생물로부터 생축매 등을 선발하기 시작하였는데 그 대표적인 예가 1998년 미국의 위스콘신대학에서 알려지지 않은 토양미생물을 이용한 신약탐색이 시작되었고, 그 이후 해양, 사막, 강 및 온천 등으로부터 배양할 수 없는 미생물로부터 신종 생축매 선발이 활발히 진행되고 있는데 이 기술을 메타게놈(metagenome)이라고 한다. 최근 여러 환경으로부터 구축된 메타게놈 라이브러리로부터 신종 지방가수분해효소 및 에스테라제들이 보고되고 있다.
- <14> 지방가수분해효소에는 리파아제(lipase, EC 3.1.1.3), 에스테라아제(esterase, EC 3.1.1.1) 및 다양한 포스포리파아제(phospholipase)가 세균, 곰팡이, 식물, 동물 및 인간에서 발견되고 있다. 일반적으로 리파아제는 탄소수 10개 이상의 긴 지방산을 가수분해하는 효소이며 에스테라아제는 탄소수 10개 이하의 짧은 지방산을 가수분해하는 효소이다. 그러나 모든 지방가수분해효소는 촉매성 트리아드(catalytic triad)인 세린(Ser, S), 히스티딘(His, H), 아스파르트산(Asp, D) 혹은 글루탐산(Glu, E)을 가지고 있으며 촉매활성부위(catalytic active site)에는 Gly-X-Ser-X-Gly인 구조 모티프를 함유하고 있다. 현재 지방가수분해효소는 유전자 및 아미노산의 상동성 분석을 기초로 4 그룹의 나뉘어져 있다. 미생물 리파아제나 에스테라아제는 식품가공, 기름 제조 및 광학활성을 통한 신약제조 등의 많은 산업에서 상업적으로 이용되고 있다.
- <15> 따라서, 본 발명의 목적은 소의 반추위 메타게놈 DNA 라이브러리로부터 신종 그룹의 에스테라아제를 코딩하는 유전자와 아미노산 서열을 제공하고자 한다.
- <16> 본 발명의 다른 목적은 상기의 신종 그룹의 에스테라아제의 촉매활성부위를 제공하고자 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <17> 본 발명의 상기 목적은 소의 반추위로부터 메타게놈 라이브러리를 구축하여 신종 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자를 분리하고, 상기 유전자를 대장균에 이중 발현시킨 후 유전자의 염기 서열과 아미노산 서열을 결정하고, 유전자 산물의 확인 및 효소적 특징 분석과 신종 그룹의 에스테라아제의 촉매에 가장 중요한 필수 아미노산 잔기를 확인하고, 49종의 배양 가능한 반추세균의 게놈 DNA로부터 특이 프라이머를 사용한 중합효소연쇄반응을 통해 상기 에스테라아제가 종래기술로는 배양할 수 없는 반추세균으로부터 유래한 유전자임을 확인함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 본 발명은 소의 반추위 시료에서 메타게놈 DNA를 분리 및 메타게놈 라이브러리 제작단계; 상기 메타게놈 라이브러리에서 에스테라아제를 스크리닝하는 단계; 메타게놈 클론으로부터 서브클로닝하여 에스테라아제 클론을 스크리닝하는 단계; 중합효소연쇄반응을 이용하여 신종 그룹의 유전자를 구조적으로 분석하는 단계; 효소의 클로닝 및 형질전환하여 얻은 클론을 배양하여 그 상등액을 조효소로 사용하여 신종 그룹의 에스테라아제의 유전자 산물을 확인하는 단계; 파라-니트로 페닐 에스테르(*para*-nitrophenyl ester) 기질을 이용하여 신종 그룹의 에스테라아제의 생화학적 특징을 검정하는 단계 및 부위 직접 돌연변이법으로 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기를 확인하는 단계; 49종 배양 가능한 반추세균으로 *est5S* 유전자를 확인하는 단계로 구성된다.
- <19> 본 발명은 소 반추위 메타게놈에서 동정된 반추세균 유래의 서열목록 서열번호 1에 기재된 지방을 가수분해하는 신종 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자(*est5S*)의 염기서열과 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 제공함을 특징으로 한다.
- <20> 본 발명의 상기 에스테라아제는 기존의 4 그룹에 속하지 않는 신종 에스테라아제이며, 종래기술로는 배양되지 않는 반추세균에서 분리된다.
- <21> 본 발명의 에스테라아제 코딩 유전자는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 등록 번호 DQ788540으로 등록되었다.
- <22> 본 발명의 에스테라아제는 탄소수 2 내지 10로 구성된 지방산 사슬을 분해하며, 촉매활성부위는 세린과 히스티딘으로 구성되어 있다.
- <23> 이하 본 발명의 구성을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <24> [실시예]
- <25> **실시예 1: 반추위 시료에서 메타게놈 DNA 분리**
- <26> 반추위 시료는 중량 $400 \pm 10\text{kg}$ 인 진주산업대학교 농장의 한우를 대상으로 하였는데 자동시료추출장치 캐놀라를 이용하여 반추 시료를 확보하였다. 사료 자체의 미생물의 오염을 최소화하기 위하여 사료투여 직전에 시료 채취한 후 4℃에서 자연침전, 치즈 크러스를 이용한 여과 및 원심분리 방법으로 미생물체를 모은 후 TE 완충액에 완전히 푼 후 라이소자임(lysozyme)을 2.5mg/ml 되도록 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 다시 프로나아제(pronase) E를 1mg/ml 되도록, RNase는 100mg/ml이 되도록, SDS는 최종 1%가 되도록 첨가한 후 55℃에서 5분간 반응시켰다. 반응이 종료된 시료에 페놀/클로로포름(phenol/chloroform) 혼합 용액을 시료와 동량 첨가하여 처리하고 이소프로판올(isopropanol)으로 침전시킨 후 가느다란 유리막대로 메타게놈 DNA를 회수하고 70% 알코올(alcohol)로 정제한 후 전기영동하여 메타게놈 DNA의 농도와 사이즈를 확인하였다(도 1).
- <27> **실시예 2: 반추위 메타게놈 라이브러리 구축과 에스테라아제 선별**
- <28> 분리된 반추위 세균 메타게놈 DNA는 농도를 측정하여 100μg/ml 되게 희석하여 5~40%의 슈크로오스 밀도 구배 초원심분리법을 이용하여 원심분리한 후 정액펌프를 이용하여 500μl 씩 1.5ml 마이크로 튜브에 분취하고 전기영동하여 23~49kb의 사이즈를 확인하였다. 사이즈 확인된 라인을 모아서 DNA를 정제하고 DNA 끝을 수선(End-repair)한 후 코스미드 pCC1FOSTM 운반체에 연결하고 λDNA 패키징 키트에 포장하여 대장균(*E. coli*) EP1300TM에 형질도입하여(Epicentre, WI, USA), 약 2,000,000 클론의 코스미드 라이브러리 풀(pool)을 확보하였다. 이 코스미드 라이브러리를 384 격자에 넣어 배양한 후 한천 확산법으로 에스테라아제 활성 클론을 스크리닝 하였다(도 2 내지 4).
- <29> **실시예 3: 신종 그룹 에스테라아제 유전자의 DNA 서열 및 아미노산 서열**
- <30> 실시예 2에서 선별된 에스테라아제 활성 클론의 DNA 염기서열 분석은 PRISM Ready reaction dye terminator/primer cycle sequencing kit(Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 이용한 사슬종결법으로 실시하였다.
- <31> DNA와 아미노산의 상동성 조사는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트(BLAST) 네트워크 서비스와 DNAMAN 분석 시스템(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)을 이용하여 조사하였다.

- <32> 에스테라아제 활성이 있는 코스미드 클론(est51F)을 쿼야젠 중간 플라스미드(Qiagen midi plasmid kit, USA)를 이용하여 코스미드 플라스미드를 분리한 후 샷건(shotgun) 방법으로 서브클로닝하여 트리부틸린(tributyrin)이 들어있는 배지에서 접종하여 활성이 있는 클론 선별하고 플라스미드를 분리하여 여러 제한효소를 처리하여 DNA 지도를 작성하는 동시에 신종 에스테라아제를 코딩하는 유전자 서열을 분석한 후 아미노산 서열도 결정하였다.
- <33> 도 5 내지 7에 나타난 바와 같이, 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 코딩하는 유전자는 1,098 bp이며 아미노산은 366개로 구성되어 있었다. ATG가 시작 코돈이고 오판(opal) 코돈인 TAA가 종결 코돈이며, 프로모터 영역에 -35 지역 및 -10 지역으로 구성이 되어 있었다.
- <34> **실시예 4: 신종 그룹 에스테라아제의 상동성 비교**
- <35> 본 발명 에스테라아제 코딩 유전자(est5S)의 아미노산 서열과 기존에 알려진 지방가수분해효소 4가지 그룹 및 상기 유전자와 가장 가까운 아미노산 서열을 비교하여 계통발생수(phylogenetic tree)를 살펴보았다.
- <36> 도 8에 나타난 바와 같이, 4가지 그룹 어디에도 속하지 않는 신종 그룹의 에스테라아제임을 알 수 있었다. 그러나 모든 에스테라아제의 중요한 촉매 모티브인 Gly-X-Ser-X-Gly는 확인이 되었다.
- <37> 또한, 본 발명의 에스테라아제의 아미노산 서열의 상동성을 비교한 결과 디할로코키테 에센오젠스(*Dehalococcoides ethenogenes*) 195의 하이포세틱칼 단백질(hypothetical protein)과 43%, 디술포타레아 피시치코필리아(*Desulfotalea psychrophila*) LSv54의 하이포세틱칼 단백질과 35% 및 시토파가 후친소니이(*Cytophaga hutchinsonii*)의 하이포세틱칼 단백질과 27% 정도의 낮은 상동성을 나타내었다.
- <38> 따라서, 기존에 알려진 것과 상동성이 낮은 것으로 보아 본 발명 신종 그룹의 에스테라아제인 est5S는 신규한 효소이며 이를 코딩하는 유전자 역시 신규한 유전자인 것으로 확인이 되었다.
- <39> **실시예 5: 신종 그룹 에스테라아제의 유전자산물 확인 및 특징**
- <40> 본 발명 신종 그룹의 에스테라아제인 est5S 유전자의 산물은 단백질 발현벡터인 pET28(+)-a에 클로닝하여 pET28(+)-Est5S 융합단백질을 만든 후 HisTrap kit를 이용하여 효소를 정제하였다.
- <41> 도 9에 나타난 바와 같이, 정제된 효소의 분자량 확인은 전기영동한 후 코사민 블루로 염색하여 확인한 결과 약 40,000Da로 확인되었다. 또한 생물정보학 컴퓨터 등전점과 분자량을 측정한 결과 40,168Da로 동일한 결과를 보여 주었다(http://kr.expasy.org/tools/pi_tool.html).
- <42> 본 발명 신종 그룹의 에스테라아제인 est5S를 파라페닐니트로 뷰틸레이트(*p*-nitrophenyl butyrate)에서 pH, 온도, 금속이온 및 유기용매에 대한 영향을 살펴보았다.
- <43> 도 10A에 나타난 바와 같이, pH 7.0에서 최적 활성을 나타냈고, 40℃에서 최적 활성을 나타냈고(도 10B), 칼륨(K^+), 나트륨(Na^+) 및 마그네슘(Mg^{2+}) 이온에서는 효소활성이 증가되었다. 특히, 5 mM 마그네슘(Mg^{2+})에서 효소활성이 최대를 나타내었다. 그러나 다른 금속이온에서 저해가 되었다(도 10C). 또한, 모든 유기용매에 의해 효소활성이 저해되었으나 에탄올과 메탄올에서 상당한 저항성을 나타냈다(도 10D).
- <44> 또한, 신종 그룹의 에스테라아제인 est5S를 파라페닐니트로 아실에스테르의 탄소수 2개 내지 18개에서 효소활성을 살펴보았다.
- <45> 표 1에 나타난 바와 같이, 파라페닐니트로 프로피노네이트(탄소수 3개)에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 탄소수 10개 이상에서 거의 활성을 나타내지 않는 것으로 보아 Est5S는 짧은 지방산 사슬을 분해하는 에스테라아제(esterase)인 것으로 확인이 되었다.

표 1

<46> 신중 그룹 에스테라아제 Est5S의 다양한 지방산 기질의 탄소 길이에 대한 효소활성의 영향

기질	탄소 길이	상대적 활성(%)
pNP acetate	C ₂	81
pNP propionate	C ₃	100
pNP butyrate	C ₄	93
pNP valerate	C ₅	66
pNP caproate	C ₆	64
pNP caprylate	C ₆	32
pNP caprate	C ₈	9
pNP laurate	C ₁₀	3
pNP plamitate	C ₁₂	0
pNP stearate	C ₁₆	0
	C ₁₈	

<47> 실시예 6: 신중 그룹 에스테라아제의 필수 아미노산 잔기 확인

<48> 본 발명 신중 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자(*est5S*)의 활성 부위 조사는 부위 직접 돌연변이법으로 수행하였다(Site directed mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

<49> 본 발명 *est5S* 유전자가 코딩하는 아미노산 서열과 계통발생학적 유연관계가 가장 가까운 아미노산 서열을 정렬하여 글루탐산(glutamic acid, Glu, E), 아스파르트산(aspartic acid, Asp, D) 및 세린(serine, Ser, S)이 일치하는 5개의 지역을 선정한 후 글루탐산, 아스파르트산 및 세린 모두를 알라닌(Alanine, Ala, A)으로 대체한 프라이머를 제작한 후 pET-28(+)/*Est5S* 플라스미드를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 실시한 후 *DpnI*의 제한효소로 처리한 후 대장균(*E. coli*) DH5 α에 형질전환하여 얻은 클론에서 플라스미드를 정제하여 DNA 염기서열 분석하여 변화된 것을 확인 한 후 본 발명 신중 그룹의 에스테라아제인 *est5S* 유전자의 기존 효소와 돌연변이된(mutant) 효소들 간의 활성을 조사하였다.

표 2

<50> 본 발명 신중 그룹 에스테라아제 *est5S*의 부위 직접 돌연변이법을 위한 프라이머

명칭	시퀀스(5'→3')	DNA 서열	아미노산 서열
D92AF	CTCAAGGCGGTCCGCCGTGTTCTACATC	GAC→GCC	Asp→Ala
D92AR	GATGTAGAACACGGCGACCGCCTTGAG		
D166AF	GTCTCTAAGTTCGCCGCACTGACGCCC	GAC→GCC	Asp→Ala
D166AR	GGGCGTCAGTGGCGGGGAACCTAGAGAC		
D172AF	GCCACTGACGCCCTCGCCATTACCTCAACAAC	GAC→GCC	Asp→Ala
D172AR	GTTGTTGAGGTAATAGGCGAGGGCGTCAGTGGC		
S190AF	CCTCGCCGACACGCAAGGGCGCATC	TCA→GCA	Ser→Ala
S190AR	GATGCGCCCTGTGCGTGTCCGGCGAGG		
S247AF	ACGGTGTATCGTTGCGTGGAACACCGAGGGT	TCG→GCG	Ser→Ala
S247AR	ACCCTCGGTGTTCCAAGCAACGATGACACCGT		
H341AF	GGCCCCGAGAGTACGCTCTCCACGACTACGGC	CAT→GCT	His→Ala
H341AR	GCCGTAGTCGTGGAGAGCGTACTCTCGGGGCC		

표 3

<51> 본 발명 신종 그룹 에스테라아제 Est5S와 이들 뮤턴트 효소의 특징적 활성과 상대적 활성

단백질	특이적 활성(U/mg)/상대적 활성(%)
Est5S	756/100
D92A	388/51
D166A	346/45
D172A	397/53
S190A	ND ^b
S247A	743/98
H341A	351/46
[주] ND; 활성 없음	

<52> 표 3 및 도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명 신종 그룹의 에스테라아제인 *est5S*의 190번째 세린(S190A)을 알라닌(Alanine)으로 변화시킨 결과, 지방을 가수분해할 수 있는 효소 활성이 소실한 것으로 보아 지방을 가수분해하는데 이 아미노산이 필수 아미노산 잔기인 것으로 확인되었다. 그 외 다른 뮤턴트 단백질들은 활성이 기존 단백질과 비슷하거나 2 내지 4배 정도로 활성이 작아졌다.

<53> 한편, 일반적인 에스테라아제의 촉매성 트리아드(catalytic triad)인 세린(Ser, S), 히스티딘(His, H), 아스파르트산(Asp, D) 혹은 글루탐산(Glu, E)을 가지고 있으나 본 발명의 에스테라아제인 *est5S*는 촉매성 디아드(catalytic diad)인 세린(Ser, S)과 히스티딘(His, H)으로 구성된 신종 그룹의 에스테라아제임을 알 수 있었다.

<54> 실시예 7: 배양가능한 반추위 세균으로부터 *est5S* 유전자 확인

<55> 본 발명의 에스테라아제 코딩 유전자가 종래에 알려진 반추세균에서 분리 동정할 수 있는지를 확인하기 위해, 49종 배양 가능한 반추세균을 확보하고 이로부터 게놈 DNA를 분리하고, 이를 주형으로 하여 *est5S*의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 내부 프라이머를 제작한 후 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

<56> 표 4에 나타난 바와 같이, 49종 배양 가능한 어떠한 반추세균으로부터 특이한 중합효소연쇄반응 밴드를 확인할 수 없는 것으로 보아 본 발명의 *est5S* 유전자는 현재까지의 기술로서는 배양할 수 없는 반추세균으로부터 유래함을 확인할 수 있었다.

표 4

<57> 49종의 배양 가능한 반추위 세균과 신종 그룹 에스테라아제 *est5S*의 내부 프라이머를 이용한 특이적 PCR 밴드 확인

명칭	균주번호	PCR 확인
pSKCY100 plasmid	본 발명	+
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	ATCC43876	-
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	ATCC55618	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM20087	-
<i>Bifidobacterium boum</i>	ATCC27917	-
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	ATCC49391	-
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	ATCC25864	-
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	ATCC49390	-
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25866	-
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	DSM3071	-
<i>Clostridium aminophilum</i>	- ^{a)}	-
<i>Clostridium cellobioparum</i>	DSM1351	-
<i>Clostridium clostridioforme</i>	strain tB316 ^{a)}	-
<i>Clostridium longisporum</i>	ATCC49440	-
<i>Clostridium proteoclasticum</i>	- ^{a)}	-
<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	ATCC10234	-
<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	strain 2388 ^{b)}	-
<i>Eubacterium limosum</i>	ATCC10825	-
<i>Eubacterium ruminantium</i>	DSM3217	-
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	strain GA195 ^{b)}	-
<i>Lachnobacterium bovis</i>	strain S85 ^{b)}	-
<i>Lachnospira multipara</i>	strain YZ87 ^{b)}	-
<i>Lactobacillus ruminus</i>	strain L14-8 ^{b)}	-
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	ATCC27780	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	ATCC27783	-
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	ATCC25940	-
<i>Methanomicrobium mobile</i>	DSM1093	-
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	DSM1539	-
<i>Oxobacter pfennigii</i>	DSM13811	-
<i>Prauserella rugosa</i>	DSM3222	-
<i>Prevotella brevis</i>	ATCC43014	-
<i>Prevotella ruminicola</i> subsp. <i>ruminicola</i>	ATCC19188	-
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	ATCC19189	-
<i>Rumincoccus albus</i>	strain C78 ^{c)}	-
<i>Rumincoccus flavefaciens</i>	strain Sy3 ^{b)}	-
<i>Rumincoccus hansenii</i>	strain 007 ^{b)}	-
<i>Rumincoccus productus</i>	DSM 20285	-
<i>Schwartzia succinivorans</i>	ATCC27340	-
<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>lactilytica</i>	DSM10502	-
<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i>	strain HD4 ^{b)}	-
	ATCC12561	-

<58>

명칭	균주번호	PCR 확인
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC13637	-
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC33317	-
<i>Succiniclasticum ruminis</i>	DSM9236	-
<i>Succinivibrio dextrinsolvens</i>	strain 24 ^{b)}	-
<i>Succinomonas amylolytica</i>	DSM2873	-
<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	DSM3224	-
<i>Treponema bryantii</i>	DSM1788	-
<i>Treponema saccharophilum</i>	DSM2985	-
<i>Wolinella succinogenes</i>	ATCC29543	-
a)Graeme Attwood, Grasslands Research Centre, New Zealand. b)Jay Yanke, Lethbridge Research Centre, Alberta, Canada. c)Jan Copen, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Republic.		

발명의 효과

<59>

상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 소 반추위 메타게놈에서 동정된 신종 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자(*est5S*) 및 그것의 아미노산 서열에 관한 것으로, 소 반추위 메타게놈 라이브러리에서 종래의 기술로는 배양할 수 없는 반추세균으로부터 분리한 에스테라아제 코딩 유전자(*est5S*)의 염기서열을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명의 에스테라아제는 기존의 지방가수분해 그룹에 속하지 않는 전혀 다른 신종 에스테라아제이며, 금속이온 및 유기용매에 상당한 효과가 있어 식품산업, 유기농 생산을 위한 환경산업, 농업산업 및 의약산업에 있어 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 소 반추위 세균 총 DNA를 분리한 후 대장균의 게놈 DNA와 함께 전기영동하여 DNA 농도와 사이즈를 확인한 결과이다.

<2>

도 2는 소 반추위 세균 총 DNA를 5 내지 40%의 슈크로오즈 밀도 구배 초원심분리법을 이용하여 원심분리한 후 정액펌프를 이용하여 500 μ l씩 1.5ml 마이크로 튜브에 분취하고 전기영동한 결과이다.

<3>

도 3은 소 반추위 메타게놈의 코스미드 라이브러리로부터 에스테라아제 활성 클론을 스크리닝한 결과이다.

<4>

도 4는 에스테라아제 활성 클론의 코스미드 DNA를 대량 분리한 후 *Sau3AI*의 제한효소로 부분 절단한 결과이다.

<5>

도 5는 본 발명의 신종 그룹의 에스테라아제 코딩 유전자(*est5S*)의 DNA 염기서열, 프로모터 지역, 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)의 아미노산 서열을 나타낸 결과이다.

<6>

도 6은 본 발명의 에스테라아제 코딩 유전자의 구조와 에스테라아제 활성을 나타낸 결과이다.

<7>

도 7은 본 발명의 에스테라아제 코딩 유전자의 구조 분석을 통하여 서브클로닝한 클론의 한천확산법에 의한 에스테라아제 활성을 나타낸 결과이다.

<8>

도 8은 본 발명의 에스테라아제 코딩 유전자의 아미노산 서열과 기존에 알려진 지방가수분해효소 4 그룹 및 본 발명 유전자와 가장 가까운 아미노산 서열을 비교하여 제작한 계통발생수(phylogenetic tree)를 나타낸 것이다.

<9>

도 9는 본 발명 에스테라아제의 분자량을 측정한 결과이다.

<10>

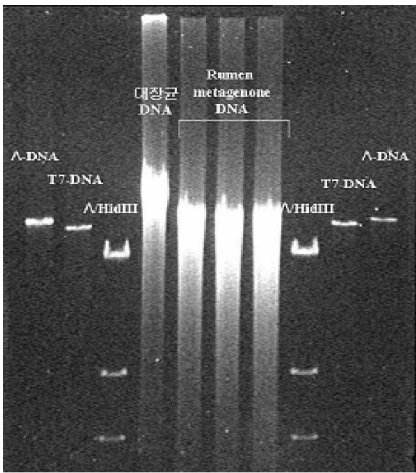
도 10A는 본 발명 에스테라아제 코딩 유전자 산물의 pH 변화에 따른 결과를 나타낸 것이고, 도 10B는 에스테라아제 코딩 유전자 산물의 온도의 변화에 따른 결과를 나타낸 것이고, 도 10C는 에스테라아제 코딩 유전자 산물의 각종 금속이온 영향에 따른 결과를 나타낸 것이고, 도 10D는 에스테라아제 코딩 유전자 산물의 유기용매 영향에 따른 결과를 나타낸 것이다.

<11>

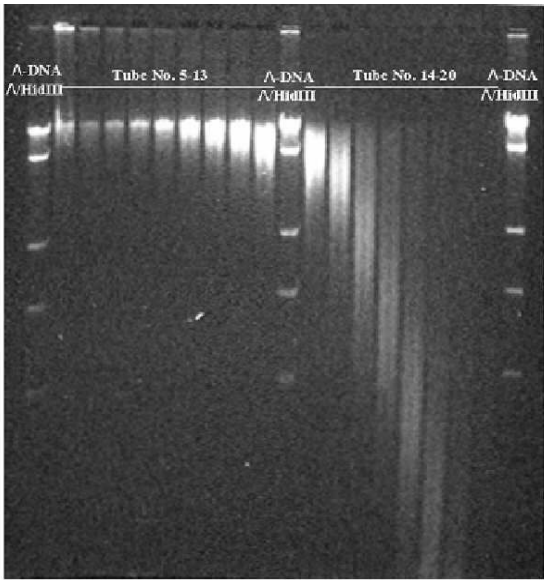
도 11은 부위 직접돌연변이법(site direct mutagenesis)를 위해 본 발명의 에스테라아제의 아미노산 서열과 계통발생학적 유연관계가 가장 가까운 기존의 3개의 아미노산 서열을 정렬하여 부위 직접돌연변이를 위한 부위를 나타낸 것이다.

도면

도면1



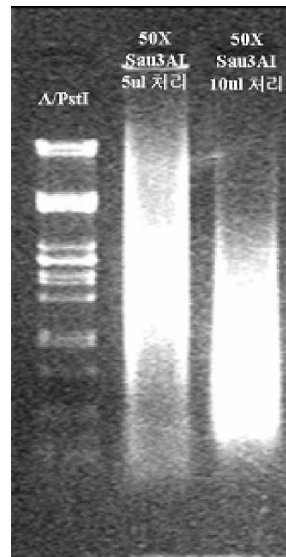
도면2



도면3



도면4



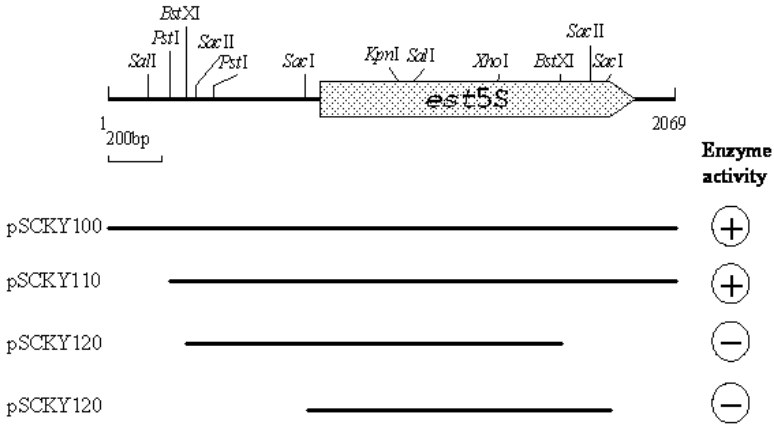
도면5

```

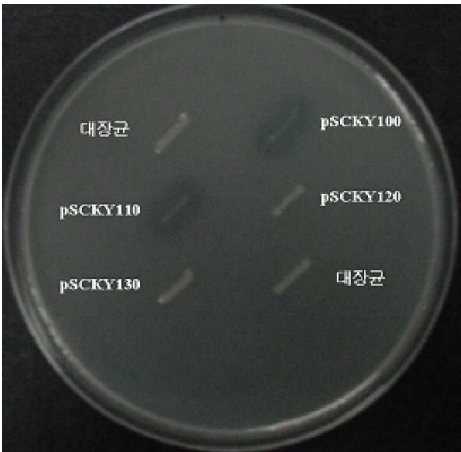
1      ATTGCGACATGTCGTTGATGCTTGCTTACAAGGCTGTTTACCAGACCGCGTGGTCGAAG
61     CCGGACGTCCTTGGTGC GGGCATGAACATCAAGAAGCGCGGCAACTATACCAAACGCGAGG
121    ATGCCATCACAGCACAAACCACTTGCCGTCGACGATGTAGCGATGTTCAATCCCTCGGGTG
181    GTCACGGCTCGTGTGTGTTGCCCGCTGTGCTCATGCTTATCCTGCAGCAGGCTATTGCC
241    TTGGCATCGGCATGGCTGCGGGTACTGCCCGCGAAGCCACCGCAATGGCCAGCTCATCC
301    CCGACGATGATCCGCACTACCGCGGCGCTACCGCAATTGCTCGGGCAAGGCGCTCTGTT
361    ACGGCATGATTGGTCCGCTGGCTGCAGCCTATCTTCGATGGCTGTGCCCGGATGTTCT
421    CGTTCACACAGTTCGGCACCGGCTGGACGCTGTTCTGGACGCTCTTGCCCTATACCTCG
481    CAAGCGTCTTCTTCGGTCTGACTATCTCGTGTATGATCCGCTATCGTGAGAACGTGATGC
541    TGATAATGGTGTTCGCTCTCGTACCGCTCCTCTTCCGTACGGGTGTGTCGTGGCCGAGT
601    CCAGCATCCCTGGCTATTGGCAGGGTGTCTCCTGGATCTTCCCCAGCACCTTCGGTGTTC
661    GCGCGTTCATCCGAGTGAACTCGATGGGCGCTTCGGTCAGTCAGGTCTCCCCGAGCTCC
721    GTATCCTCTGGATTCAAGGCTGCCGTCTATCTCGGTATGGCCTGCCTCGTCTTCGCTACC
781    AGTTCGGGCTGATGAAGAAATACGCAAAACAATTAATAATCAATATGATCATGA
1      M I M
841    AAAAAACAGAATTCTTCGTGCTTTTGGCATCGGTGATGCTGGTAGCCATGAACCTTGCTT
4      K K Q N F F V L L A S V M L V A M N L A
901    CGTGCAAGATGAGTAACAAACCCGAGCCGAGACTTCGCGTATCGGCGAGATCCCGGAGG
24     S C K M S N K P A A E T S R I G E I P E
961    CCGCACAAATACATCGTCGGCATCGAGAAGTATGACTCCGCTGATCGACTACGGCCAGGCTG
44     A A Q Y I V G I E K Y D S V I D Y G Q A
1021   CTAAGTGGCTCGATGTACCCGACGCCCTTGTGAAGGACGGCAGCTCGATGGTACCGCTG
64     A N W L D V P A A L V K D G T L D G T A
1081   CCGACAGCCTCAAGGCGGTGACGCTGTTCTACATCTATCCCACTGTGACCGGCTTCGCGC
84     A D S L K A V D V F Y I Y P T V T G F R
1141   CCGAGACCGAGGTTTGTGATATGACCGACACGATGATGATTTCGGGCGCCAAGATGGTGC
104     P E T E V C D M T D T M M I S G A K M V
1201   GCCAGATCCAGACTGGTGTGTTTGACGAGAGCTGCAACGTGTTTCATGCCCTACTATCGTC
124     R Q I Q T G V F D E S C N V F M P Y Y R
1261   AGATCTCCATGCCGAAGCCCGGCTCCGACTATCGTGCCATTATCGACTACGTCTCTAAGT
144     Q I S M P K P G S D Y R A I I D Y V S K
1321   TCGACGCCACTGACGCCCTCGACTATTACCTCAACAACCTGAACCGGGCCGCCCTTCA
164     F D A T D A L D Y Y L N N L N Q G R P F
1381   TCCTCGCCGGACACTCACAGGGCGCATCCGTGCTCATTGCCCTGCTCGAGAACTACATGA
184     I L A G H S Q G A S V L I A L L E N Y M
1441   CCAAGCATCCCGAGGCTTTGAAGCGTATGGTGTGCTTATCCCATCGGCTTTGCCGTGA
204     T K H P E A L K R M V A A Y P I G F A V
1501   CCAAGGACTGGCTCGCTAAGACAGGCTGAAGTTTGCTGAGGGTGCTACAGACACGGGTG
224     T K D W L A K T G L K F A E G A T D T G
1561   TCATCGTTTCGTGGAACACCGAGGGTCCCAACCACTGAAGGAGAATAACATGACGCTTG
244     V I V S W N T E G P T N L K E N N M T L
1621   CCCCTGGTGGCATCAGCATCAACCAATCAACTGGAAGCGCGACGATACTCCCGGCTCAG
264     A P G G I S I N P I N W K R D D T P A S
1681   TCAAGGAGAACCTCGGTTTCGCTTACCTATGACGGCAAGCTCGTCACTCCCGGCTCGCGG
284     V K E N L G S L T Y D G K L V T P G I A
1741   ATGCCCGTGTGACACCGTCCGCGGCTCCGTGCTGTTCTTCCATCGCCGAAAAAGAGC
304     D A R V D T V R G S V V V S S I A E K E
1801   TCTACGCCATTCTGCGGACGGCGCGTTATGTTGCGCCCGAGAGCTACCATCTCCACG
324     L Y A I P A D G A V M F G P E S Y H L H
1861   ACTACGGCTTCTTCTTCAACAATTTCAAGCAGAAGCTGCGGACCGGCTCAAGGCATTCC
344     D Y G F F F N N F K Q N V A D R V K A F
1921   TGGAGAAATAACAACATTTTCCCTGAAAAGTTTGTGCTTTCAGGGAATTGTTGATCTT
364     L E K *
1981   TGCCCCAATATGAATAAGAAAAAGCAAACTGTCAACGACGATACCTGGCGGCCATC
2041   GGGATTATGTTCTTCAATGTGTTGAT

```

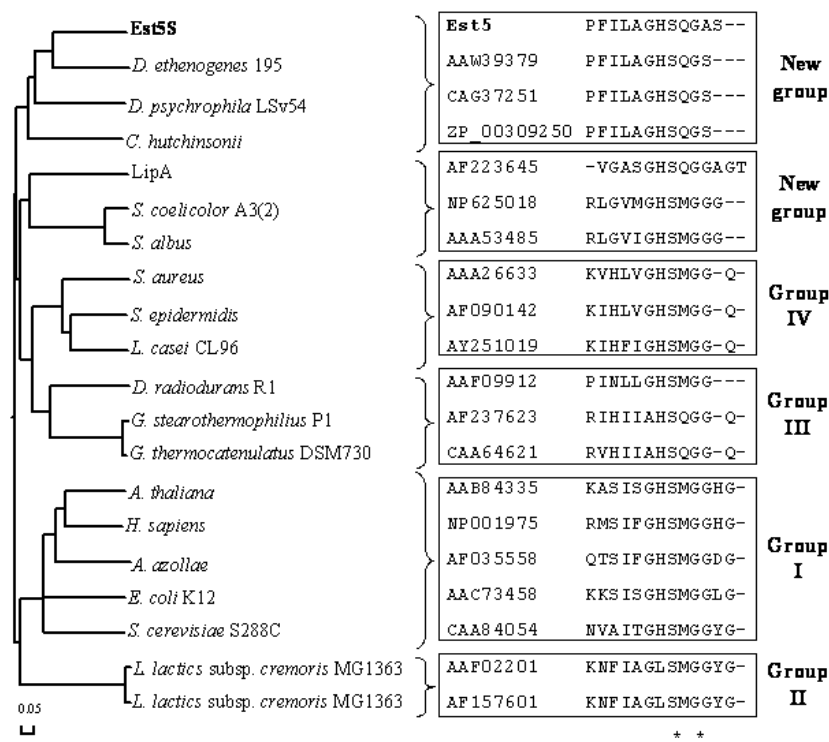
도면6



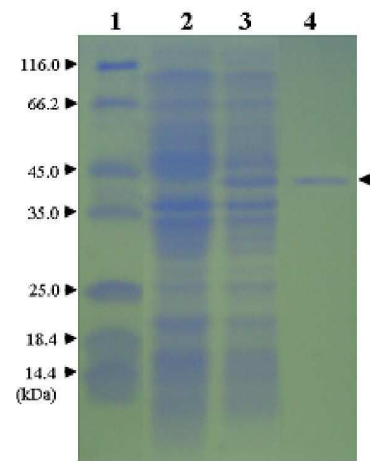
도면7



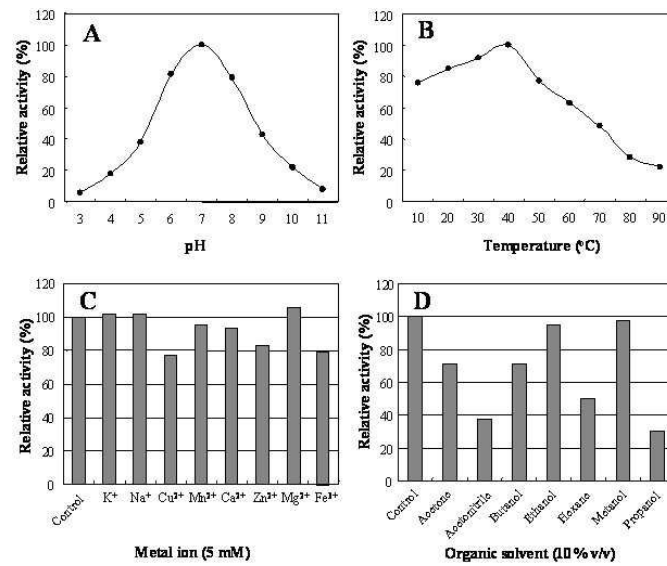
도면8



도면9



도면10



도면11

```

Est5S      VIDYQAAANWLDVPAALVKDGTLDGTAADSLK----AVDVFIYIPTVTGFRPET--EVCD
AAW39379   -----PDNWLALPPQAVME-----VDIFLYPTVYHKQASTDPDICE
CAG37251   -----QSSSWLYQPGRVNMKP-----IDLFYVYPTIYAEKNPAN--MNI
ZP_00309250 -----DEYNWVALPWRFDAADCIPQGCPTPDRQDSAADVFIYVYPTIYIIGTKWN---AK
               * . *
               * . *

Est5S      MTDMMISGAKMVRQIQTVGFDESCNVFMPYYRQISMFKPGS----DYRAI IDTVSKFDA
AAW39379   VMNDMMRFGAQMAYKLQATAFETVGNIIYAPYYRQGDAAACLSLTEEDRYNLLSGAPEEDA
CAG37251   GNRE-LRQARHL IDAQASVYGESANIFAPLYRQMSMARLDGNSD-ALQSPFFQKGYEDV
ZP_00309250 ISNPRIIGRVGTITESQASVYNNICKVYAPLYRQ---AILKSFFNKKSGLALDLAYS DV
               . * .
               * . *

Est5S      TDALDYLLNNLNQGRPFILAGHSQGSVLIALLENYMTKHPEALKRMVAAYPIGFAVTKD
AAW39379   MAAFDYYIKHFMNGRPFILAGHSQGS EILLYLLSDYMGKHPDVYKQMI AAYAIGYSVTD
CAG37251   ARAFDYFLQHLNGRPFILAGHSQGS MVL IQLMRKKFADR-ALQKKLVAA YLIGYSVTAE
ZP_00309250 KRAFDYYMAHWNNGRPFILAGHSQGSNHLIRLLKEEIDGK-EIQQLVAA YLIGMPVSDT
               * * . * *
               * * . * *

Est5S      WLAKE-TGLKFAEGATDTGVIVSUNTEGPTNLKENNMTLAPGGISINPINWKRDDTPASVK
AAW39379   YLAKNPHLRF AENATDTGVIISYNTQAAEIEGKN-LIVSEGALVINPISWTRDDVPASAS
CAG37251   DFKNYPWMKPAQGASDTGVIISYNTQSI TAKDSP--VLLPGAYGINPLNWSR-TEPANKS
ZP_00309250 TFKS---IKQAQTETQVNGYVSUNTF KYGTRLKP-SDYFSGGTCTNPLSWKSDTTLPVPS
               . . * . .
               . . * . .

Est5S      ENLGSITYDGKLVTPG-----IADARVDTVGRSVVSSIAEKELYAIPADGAVM
AAW39379   ENLGSYLPGADGYIPINPDTELKKIMGLADARVDSEKG-VLCSSVDAEAWFS---GNPV
CAG37251   MNRGAVFFRDNEIEREIP-----HYAGAYIDPATG-ALITQLPEKLNT----GSFP
ZP_00309250 LNPGGAPLKLNRIDQALCG-----A-----KINNGILVVQKPIKKGYIRL---GKSY
               * *
               * *

Est5S      FGPESVHLHDYGYFFNNFKQNVADRVKAFLEK-----
AAW39379   LGKGVYHSYDYSFYYNLRQNAADRAFLDNNG-----
CAG37251   AG--VYHRFDYALWFRNLEENVQNRCE TYLSTK-----
ZP_00309250 -----HLC DYSLFYLSIRNNAKARTDSYFKKYS AHTSN
               * * .
               * * .
    
```

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)