



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월19일
(11) 등록번호 10-2011718
(24) 등록일자 2019년08월12일

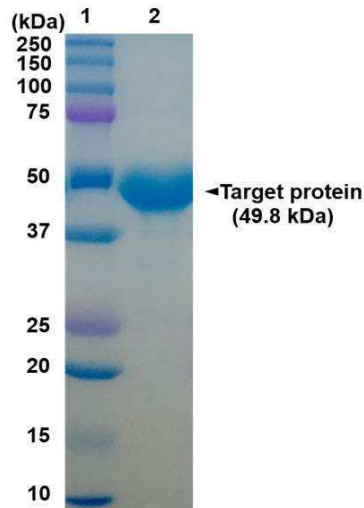
- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12P 19/02</i> (2006.01) <i>C12N 9/42</i> (2006.01)
 <i>C12P 19/04</i> (2006.01) <i>C12P 19/14</i> (2006.01)
 <i>C12P 19/18</i> (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 <i>C12P 19/02</i> (2013.01)
 <i>C12N 9/2445</i> (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2018-0028510
 (22) 출원일자 2018년03월12일
 심사청구일자 2018년03월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 NCBI GenBank Accession No. WP_011467876.1
 (2016.05.12.)*
 (뒷면에 계속)
 전체 청구항 수 : 총 8 항</p> | <p>(73) 특허권자
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 (72) 발명자
 김경현
 서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 805호
 김동현
 부산광역시 사하구 감천로105번길 40 (감천동 감천아파트) 2동 305호
 (74) 대리인
 특허법인다나</p> |
|---|---|
- 심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **해조류로부터 포도당 및 라미나리올리고당을 생산하는 신규한 베타-글루코시데이즈**

(57) 요약

본 발명은 해조류로부터 포도당 및 라미나리올리고당을 생산하는 신규한 베타-글루코시데이즈에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 베타-글루칸에 대해 엑소 타입의 글루카네이즈 활성을 보이면서, 트랜스글리코실레이즈 활성을 보이는 베타-글루코시데이즈로부터 포도당만을 생산할 뿐만 아니라, 반응조건을 달리하여 라미나린에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 보여 라미나리올리고당을 생산하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/04 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
C12P 19/18 (2013.01)
C12Y 302/01021 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

FEMS Microbiology Letters, Vol. 363, pp. 1-9
 (2016.03.29.)*
 NCBI GenBank Accession No. CP000282.1
 (2016.05.12.)
 KR1020170124149 A
 Journal of Biotechnology, Vol. 231, pp.
 129-135 (2016.06.07.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B2005628
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(중견연구)
연구과제명	식약 소재용 퓨코스의 생물공학적 생산 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 가지며 엑소-타입의 글루카네이즈 및 트랜스글리코실레이즈 활성을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase); 및
기질로서 라미나린을 포함하는 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

베타-글루코시데이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40[°]에서 유래한 것인, 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

베타-글루코시데이즈는 상기 베타-글루코시데이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 얻은 것인, 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

유전자는 SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열로 표시되는 것인, 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

베타-글루코시데이즈는 라미나린, 라미나리바이오스, 셀로바이오스, 젠티오바이오스, 락토오스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 기질에 대해 특이성을 갖는 것인, 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도(degrees of polymerizations) 2 내지 10의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 포도당 및 라미나리올리고당 생산용 조성물.

청구항 7

SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase)를 라미나린과 반응시켜 포도당 및

라미나리올리고당을 생산하는 단계를 포함하고,

상기 반응은 라미나린 (mg) 대비 0.005 내지 0.05 U의 베타-글루코시데이즈를 사용하여 2 내지 40 ℃, 30 내지 72 시간의 조건에서 수행하는 것인, 포도당 및 라미나리올리고당의 생산방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제7항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도 2 내지 10의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 포도당 및 라미나리올리고당의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류로부터 포도당 및 라미나리올리고당을 생산하는 신규한 베타-글루코시데이즈에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 지구온난화에 대한 관심과 함께, 지속 가능한 발전을 위해 재생 가능한 바이오매스의 관심이 증대되고 있다. 목질계 바이오매스는 풍부한 자원과 가격이 저렴하기 때문에 포도당과 같은 발효 가능한 당을 생산하기 위한 재생 가능한 바이오매스로 오랫동안 간주되었다. 그러나 이는 리그닌 함량이 높고, 구조가 매우 복잡하여 이를 사용하기에는 고강도 전처리와 효소 당화가 필수적이어서 쉽게 이용하기가 어렵다. 최근 목질계 바이오매스를 대체 할 바이오매스로 해조류가 각광받고 있는데, 이는 높은 탄수화물 함량을 가지고 있으며, 경작지가 따로 필요 없으며, 리그닌이 거의 없어서 구조가 복잡하지 않다는 장점이 있다.

[0004] 해조류 중, 갈조류는 전 세계적으로 매년 약 7천만 톤을 수확하고 있으며, 이의 주요 탄수화물의 구성요소는 알긴산 및 글루칸이고, 글루칸은 주로 라미나린이다. 라미나린은 베타-1,3 결합을 주요 결합으로 가지고 있으며, 베타-1,6 결합을 곁가지로 가지고 있다. 갈조류 중 라미나리나(*Laminarina*), 사카리나(*Saccharina*) 및 푸커스속(*Fucus* spp.)는 건조 중량의 30-80%의 높은 라미나린 함량을 가지고 있다. 라미나린은 포도당으로 이루어진 다당류이기 때문에 발효 가능한 당을 생산하기 위한 바이오매스로 매우 이상적이다. 또한, 라미나린으로부터 생산된 라미나리올리고당은 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있어 기능성 소재로 이용 가능하다.

[0005] 목질계 바이오매스를 이용하여 발효 가능한 당을 생성하기 위해서는 고강도의 전처리가 수반되어야 하며, 엔도-글루카네이즈, 엑소-글루카네이즈 및 베타-글리코시데이즈 등 최소 3가지의 효소 조합이 필요하다. 이와 같은 전처리 공정에서는 높은 열을 이용하기 때문에 많은 에너지가 필요하며, 효소 당화공정에서 사용되는 효소의 비용은 전체 바이오공정에서 매우 큰 비율을 차지한다.

[0006] 따라서, 최소한의 효소를 이용하여 생산단가를 줄이면서도 효율적으로 라미나린을 가수분해하여 발효당인 포도당과 기능성 소재인 라미나리올리고당을 생산하는 공정이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록 특허 제10-1483162호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 갈조류로부터 포도당과 라미나리올리고당을 생산할 수 있는 신규한 베타-글루코시데이즈의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 가지며 엑소-타입의 글루카네이즈 및 트랜스글리코실레이즈 활성을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase)를 포함하는 포도당 또는 라미나리올리고당 생산용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase)를 라미나린 또는 라미나리바이오스와 반응시켜 포도당 또는 라미나리올리고당을 생산하는 것을 포함하는 포도당 또는 라미나리올리고당의 생산방법을 제공한다.

[0013]

발명의 효과

[0014] 본 발명의 베타-글루코시데이즈는 다당류인 라미나린에 대해 엑소 타입의 글루카네이즈 활성을 보여 포도당만을 생산할 뿐만 아니라, 반응조건을 달리하여 라미나린 또는 라미나리바이오스에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 보여 포도당 및/또는 라미나리올리고당을 생산하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 베타-글루코시데이즈의 발현을 확인한 젤 사진도이다.
 도 2는 본 발명의 베타-글루코시데이즈의 최적 활성 pH 확인 결과이다.
 도 3은 본 발명의 베타-글루코시데이즈의 최적 온도 확인 결과이다.
 도 4는 본 발명의 베타-글루코시데이즈의 열 안정성 확인 결과이다.
 도 5는 다양한 이당류를 기질로 하여 베타-글루코시데이즈의 기질 특이성을 스크리닝한 TLC 분석 결과로 (a)는 옥상 유래 이당류이고, (b) 해양 유래 이당류이다.
 도 6은 라미나린을 가수분해하여 포도당을 주요 산물로 생성한 수율(a) 및 HPLC(b) 분석 결과이다.
 도 7은 라미나린에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 통해 라미나리올리고당을 생성한 HPLC(a) 및 TLC(b) 분석 결과이다.
 도 8은 라미나리바이오스에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 통해 라미나리트리오스 및 포도당을 생성한 HPLC(a) 및 TLC(b) 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명자들은 베타-글루코시데이즈 활성을 가질 것으로 추정되는 Bgl1B 단백질의 라미나린 분해 활성을 확인하였다. 그 결과, Bgl1B 단백질은 포도당이 베타-1,3-결합의 주 골격과 및 베타-1,6-결합으로 곁가지가 연결된 다당류인 라미나린을 기질로 사용하여 라미나린의 β -1,3, 또는 β -1,6-글리코시드 결합을 절단하는 엑소-타입의 글루카네이즈 활성을 가져 포도당을 단독으로 생산함을 확인하였다. 또한, 상기 효소의 농도 및 반응시간을 조절하여 라미나린 또는 라미나리바이오스로부터 높은 중합도를 갖는 올리고당을 생산하는 트랜스글리코실레이즈 활성을 확인하였다.

[0018] 따라서, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 가지며 엑소-타입의 글루카네이즈 및 트랜스글리코실레이즈 활성을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase)를 포함하는 포도당 또는 라미나리올리고당 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 베타-글루코시데이즈(β -glucosidase)를 라미나린 또는 라미나리바이오스와 반응시켜 포도당 또는 라미나리올리고당을 생산하는 것을 포함하는 포도당 또는 라미나리올

리고당의 생산방법을 제공한다.

- [0020] 상기 베타-글루코시데이즈는 라미나린에 대해 β -1,3 또는 β -1,6-글리코시드 결합을 절단하는 엑소-타입의 글루카네이즈 활성뿐만 아니라 라미나린 또는 라미나리바이오스에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 또한, 완충 용액 내 상기 베타-글루코시데이즈의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 pH 5 내지 7.5에서 80% 이상의 효소 활성을 나타내고, 구체적으로, pH6에서 가장 높은 활성을 나타낸다. 또한, pH6에서 10 내지 40℃에서 80% 이상의 높은 효소 활성을 나타낸다. 그러나 50℃ 이상에서는 효소 활성이 급격히 저하됨에 따라 상기 베타-글루코시데이즈는 실온에서도 충분히 효소 반응이 가능하므로 온도를 높이기 위한 에너지 소비 없이도 경제적으로 공정을 수행할 수 있는 장점이 있다. 또한, 기존 효소들에 비해 상대적으로 낮은 온도에서의 열처리에도 효소를 불활성화시킬 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 베타-글루코시데이즈의 효소 활성에 대한 금속이온의 효과를 확인한 결과, Mg^{2+} , Ni^{2+} 및 Co^{2+} 는 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았지만, Mn^{2+} 의 경우 약 50% 정도 효소 활성을 저해하며, Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 의 경우, 효소 활성을 약 10% 이하로 강력하게 저해한다.
- [0023] 상기 베타-글루코시데이즈는 사카로파거스 데그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0024] 또한, 베타-글루코시데이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 포도당 또는 라미나리올리고당의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 상기 베타-글루코시데이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0026] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대, 상기 베타-글루코시데이즈를 코딩하는 유전자, 즉, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다. 상기 숙주세포로 대장균을 사용하나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [0027] 상기 베타-글루코시데이즈는 라미나린, 라미나리바이오스, 셀로바이오스, 젠티오바이오스, 락토오스 또는 아가로바이오스 등을 기질로 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 베타-글루코시데이즈는 반응조건을 제어하여 포도당을 단독으로 생산하거나, 포도당과 라미나리올리고당을 생산할 수 있다.
- [0029] 상기 반응조건은 베타-글루코시데이즈의 농도와 반응시간 등일 수 있다.
- [0030] 예컨대, 기질인 라미나린 (mg) 대비 0.1 내지 3 U의 베타-글루코시데이즈를 25 내지 40 ℃, 2 내지 48 시간의 조건에서 반응시켜 생산될 수 있다.
- [0031] 라미나리올리고당은 기질인 라미나린 (mg) 대비 0.005 내지 0.05 U 또는 기질인 라미나리바이오스 (mg) 대비 0.0001 내지 0.005 U의 베타-글루코시데이즈를 2 내지 40 ℃, 2 내지 72 시간의 조건에서 반응시켜 생산될 수 있다.
- [0032] 상기 라미나린 또는 라미나리바이오스를 사용하여 생산될 수 있는 라미나리올리고당은 중합도(degrees of polymerizations, DP) 2 이상, 더 구체적으로, 2 내지 10의 라미나리올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 보다 구체적으로, 라미나리바이오스(DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜타오스(DP5),

라미나리헥사오스(DP6) 동일 수 있다.

- [0033] 상기 베타-글루코시데이즈의 분해산물은 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 포도당 또는 라미나리올리고당을 분리 정제할 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [0035] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR 25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.
- [0036] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0037] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [0038] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈(예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [0039] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0040] <실시예 1> Bgl1B의 과발현 및 정제
- [0041] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T (ATCC43961)의 게놈 DNA를 얻기 위해 2.3 g의 인스턴트 해수염, 20 mM Tris-HCl, 2 g glucose, 1 g yeast extract 및 0.5 g 암모늄 클로라이드를 1 L에 녹인 최소배지에서 30℃에서 12시간 동안 배양하였다. 게놈 DNA는 상용화 DNA 분리 키트 (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 게놈 DNA로부터 표적 유전자인 *bg11B*를 PCR에 의해 증폭되었다. 사용된 프라이머는 5'-ATACATATGAATAGACTTAACTACCGCCTTCTCTCGT-3' (정방향) 및 5'-ATAGCGGCCGCTCTACTCGAGACAACTCAGCAAATGC-3' (역방향)이다. 친화도 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 정제하기 위해 C-말단에 6개의 히스티딘을 코딩하고 있는 유전자의 염기서열을 추가하였다. PCR 산물과 pET21α 벡터는 *NdeI*과 *NotI*으로 각각 절단하고, 라이게이션하여 pET21α-Bgl1B 플라스미드 구축하였다. 이 플라스미드를 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α에 형질전환 하였다.
- [0042] 이렇게 확보한 유전자를 과발현하기 위해 단백질 발현용 숙주인 에스케리치아 콜라이 BL21(DE3)에 형질전환 하였다. 이 세포를 50 mg/L 옴피실린이 포함되어 있는 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37℃에서 600 nm 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.1 mM IPTG를 첨가하였고 유도 온도는 16℃로 설정하여 16시간 동안 수용성 형태로 단백질을 과발현하였다. 배양이 끝난 후, 원심분리하여 세포를 회수하고, 이를 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 이용하여 풀어준 다음, 초음파로 분쇄한 후, 다시 원심분리 하여

상층액을 획득하였다. 이 재조합 단백질을 HisTrap 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용해 정제하였다. 정제된 단백질은 Amicon Ultra Centrifugal filter(30,000 분자량 컷오프; Millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하였으며, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

[0043] 발현된 Bgl1B은 8% SDS-PAGE를 이용하여 49.8 kDa으로 확인되었다(도 1).

[0045] <실시예 2> Bgl1B 단백질의 최적 pH 및 활성 온도 확인

[0046] Bgl1B 단백질의 최적 활성을 나타내는 pH를 알아보기 위해 0.1% (w/v) 셀로바이오스를 포함하는 20 mM sodium acetate(pH 4.0-6.0), 20 mM sodium phosphate(pH 6.0-7.0) 및 20 mM Tris-HCl-NaCl(pH 7.0-9.0) 버퍼에 각각 Bgl1B 단백질과 함께 40℃에서 15분 반응하였다.

[0047] 도 2는 4.0-9.0 범위의 pH에서 Bgl1B의 상대적 활성을 나타낸다. pH 6에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 4와 pH 8 이상의 조건에서는 활성이 30% 이하로 감소하였다.

[0048] 도 3은 2-60℃ 범위의 온도에서 Bgl1B의 상대적 활성을 나타낸 것이다. pH 6에서 40℃에서 가장 높은 효소활성을 나타냈다. 그리고 20℃에서 약 83%의 효소활성을 유지하였다. 또한, 2-10℃의 매우 낮은 온도에서도 58% 이상의 효소활성을 나타냈다. 그러나 50℃ 이상에서는 급격하게 효소 활성이 감소하였다. 이는 실온에서도 충분히 효소반응이 가능함으로 온도를 올리기 위해 에너지를 가하지 않아도 되어 경제적인 공정을 이룰 수 있다. 또한, 간단한 열처리만으로도 효소를 불활성화 시킬 수 있다.

[0049] 도 4는 효소의 온도에 대한 안전성을 나타낸 것이다. 40℃에서 1시간 반응한 후 효소활성은 80% 유지되었으며, 50℃ 이상에서 1시간 반응한 후에는 거의 활성을 나타내지 않았다.

[0051] <실시예 3> Bgl1B의 금속이온 효과

[0052] Bgl1B 단백질 활성에 금속이온 효과를 알아보기 위해, 0.1% (w/v) cellobiose에 10 mM의 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} 및 Co^{2+} 를 첨가하여 금속이온이 넣지 않은 경우와 상대적인 활성을 비교하였다.

[0053] 표 1과 같이, Mg^{2+} , Ni^{2+} 및 Co^{2+} 는 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았지만, Mn^{2+} 의 경우 56.2%의 효소활성을 나타냈다. 또한, Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 의 경우, 효소 활성을 10%로 매우 낮게 나와 강력하게 저해하였다.

표 1

[0054]

금속이온	상대 효소 활성 (%)
대조군	100.0 ± 2.8
Mg^{2+}	98.9 ± 2.3
Ca^{2+}	82.0 ± 1.5
Mn^{2+}	52.6 ± 2.1
Ni^{2+}	90.3 ± 2.7
Cu^{2+}	0.0 ± 0.0
Fe^{2+}	8.2 ± 0.3
Co^{2+}	95.7 ± 1.6

[0056] <실시예 4> Bgl1B의 기질 특이성 확인

[0057] Bgl1B 단백질의 기질 특이성을 확인하기 위해, 각 이당류를 0.2% (w/v)의 농도가 되도록 하여 20 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6)에서 0.6 U의 Bgl1B과 1시간 반응시켰다. 사용된 기질은 두 그룹으로 첫 번째 그룹은 육상유래 이당류로서, 셀로바이오스(베타-1,4 결합), 락토오스(베타-1,4 결합), 젠티오바이오스(베타-1,6 결합), 수크로오스(알파-1,2 결합), 말토오스(알파-1,4 결합) 및 멜리바이오스(알파-1,6 결합)이며, 두 번째 그룹은 해양유래 기질로서, 라미나리바이오스(베타-1,3 결합), 아가로바이오스(베타-1,4 결합), 네오아가로바이오스 및 삼당류인(알파-1,4 결합), 아가로트리오스(베타-1,6 결합 및 알파-1,4 결합)를 사용하였다.

[0058] 도 5에서 나타난 것과 같이, Bgl1B는 모든 베타-결합을 가진 이당류를 가수분해할 수 있었다. 이에 반해 Bgl1B는 모든 알파-결합을 가진 이당류를 가수분해하지 못하였다. 또한, 아가로트리오스도 가수분해하지 못하였다. 따라서 Bgl1B는 베타-결합을 가진 이당류를 가수분해할 수 있는 광범위한 효소활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

[0060] <실시예 5> 다양한 기질에 대한 Bgl1B의 효소 반응속도 확인

[0061] Bgl1B 단백질의 다양한 기질에 대한 효소 반응속도를 확인하기 위하여, 각 기질을 0.1-0.4% (w/v)의 다양한 농도로 하여 pH 6, 40℃에서 반응시켰다. 효소 반응속도에 관련된 변수인 V_{max} , K_m 및 k_{cat} 는 Lineweaver-Burk plot 으로부터 결정되었다.

표 2

[0062]

효소	기질	글리코시드 결합	V_{max} (U/mg protein)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Bgl1B	라미나리바이오스	β-1,3	1.1×10^2	9.9×10^{-1}	9.1×10^1	9.2×10^1
	셀로바이오스	β-1,4	1.6×10^1	2.0×10^1	1.3×10^1	6.5×10^{-1}
	젠티오바이오스	β-1,6	1.1×10^0	1.3×10^1	8.8×10^{-1}	6.6×10^{-2}
	락토스	β-1,4	1.0×10^0	2.0×10^1	8.3×10^{-1}	4.1×10^{-2}
	아가로바이오스	β-1,4	3.1×10^{-1}	6.9×10^1	2.6×10^{-1}	3.7×10^{-3}
Novozyme 188	라미나리바이오스	β-1,3	4.2×10^{-1}	2.5×10^0	8.5×10^{-1}	3.4×10^{-1}
	셀로바이오스	β-1,4	3.9×10^0	3.4×10^0	7.8×10^0	2.3×10^0

[0064] 표 2에 나타난 결과처럼, 변수를 종합적으로 볼 때 Bgl1B는 라미나리바이오스에 대해 가장 높은 기질특이성을 보였다. 이는 상용화 효소인 Novozyme 188 보다 259배 높은 V_{max} 와 2.5 배 낮은 K_m 및 108배 높은 k_{cat} 을 보여, 촉매 효율이 108배 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로 Bgl1B이 높은 기질 특이성을 갖는 것은 셀로바이오스, 젠티오바이오스, 락토오스 및 아가로바이오스 순이다.

[0066] <실시예 6> HPLC 및 TLC를 이용한 Bgl1B 단백질의 효소 반응 특성 확인

[0067] 다당류인 라미나린을 기질을 이용하여 Bgl1B 단백질의 효소 반응 특성을 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)와 Thin Layer Chromatography(TLC)를 사용하여 분석하였다. HPLC 분석은 gel permeation and ligand exchange column(KS-802;Shodex)와 시차굴절 검출기(refractive index detector)를 장착한 Agilent 1100 HPLC 장비를 이용해서 분석하였으며, 분석 조건은 유속 0.5 mL/min, 컬럼온도 80℃ 및 이동상은 메탄올:물 (3:2:2 부피비) 혼합용매를 이용하여 전개하였으며, 시각화를 위해 10% (v/v) 황산 처리하였다.

[0068] 0.2% (w/v) 라미나린에 대하여 3 U Bgl1B를 40℃에서 24시간 반응시킨 결과, 도 6(a)와 같이 라미나린에서 포도당이 생성된 수율은 75%의 매우 높은 수율이며, 도 6(b)와 같이 Bgl1B에 의해 라미나린이 분해되면서 올리고당은 생성되지 않고 오직 포도당만 생성되는 것을 HPLC 분석으로 확인할 수 있었다.

[0069] 또한, 반응조건을 달리하여, 0.2% (w/v) 라미나린 기질 대비 Bgl1B의 농도를 0.03 U로 매우 낮게 반응시킨 결과, 도 7과 같이 24시간까지는 라미나린으로부터 포도당이 생성되다가 그 이후로 포도당은 더는 증가하지 않고 DP2, DP3, DP4 와 같은 낮은 중합도의 올리고당이 생성되었다. 이는 라미나리바이오스의 경우에서도 확인되었다.

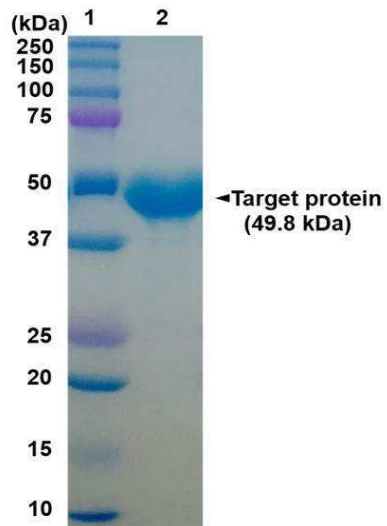
[0070] 0.3% (w/v) 라미나리바이오스에 대하여 0.002 U Bgl1B를 반응시킨 결과, 도 8과 같이 DP3가 생성되는 것을 확인하였다.

[0071] 이 결과들은 Bgl1B를 이용하여 원하는 조건을 통해 Bgl1B 단독으로 라미나린으로부터 발효가능성 당인 포도당을 주요산물로 생성할 수 있으며, 또한 라미나린 및 라미나리바이오스로부터 트랜스글리코실레이즈 활성을 통해 기

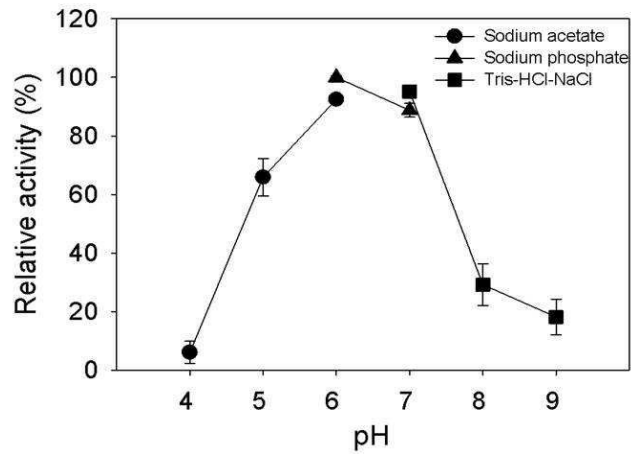
능성 소재인 올리고당이 생성됨을 확인하였다.

도면

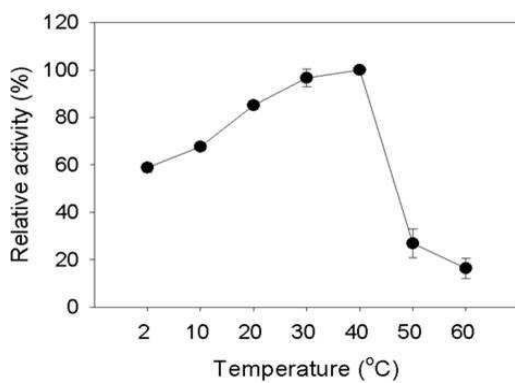
도면1



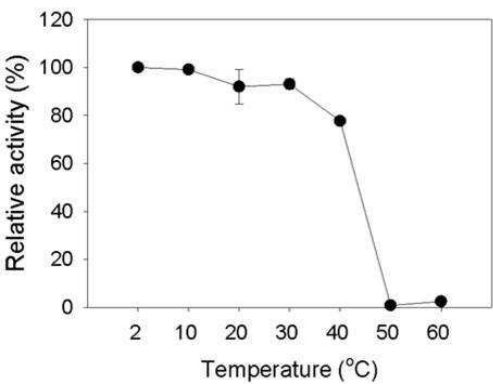
도면2



도면3

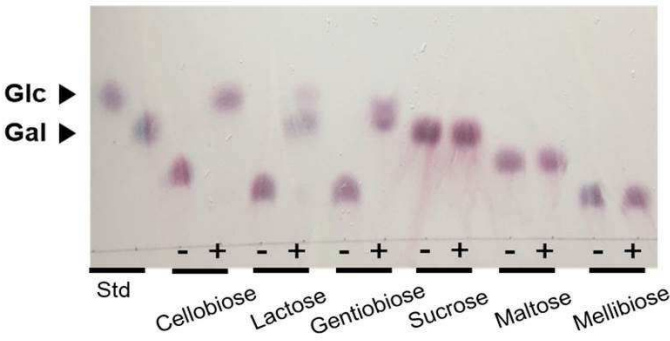


도면4

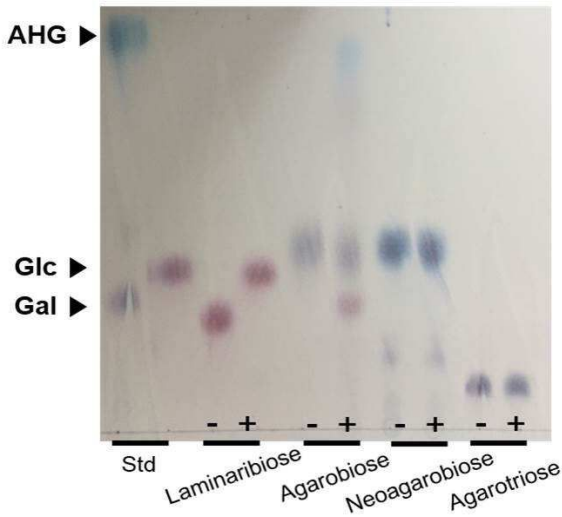


도면5

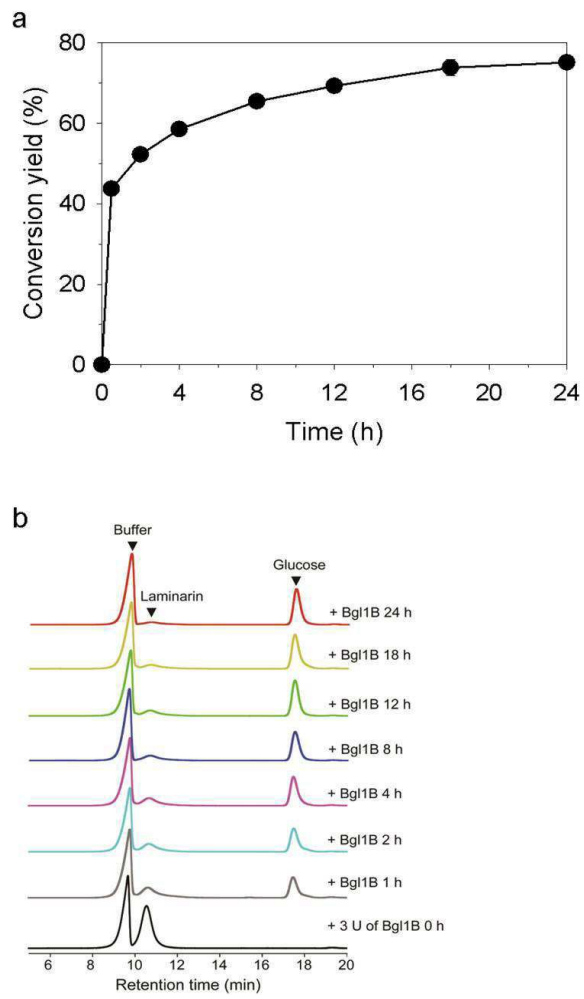
a



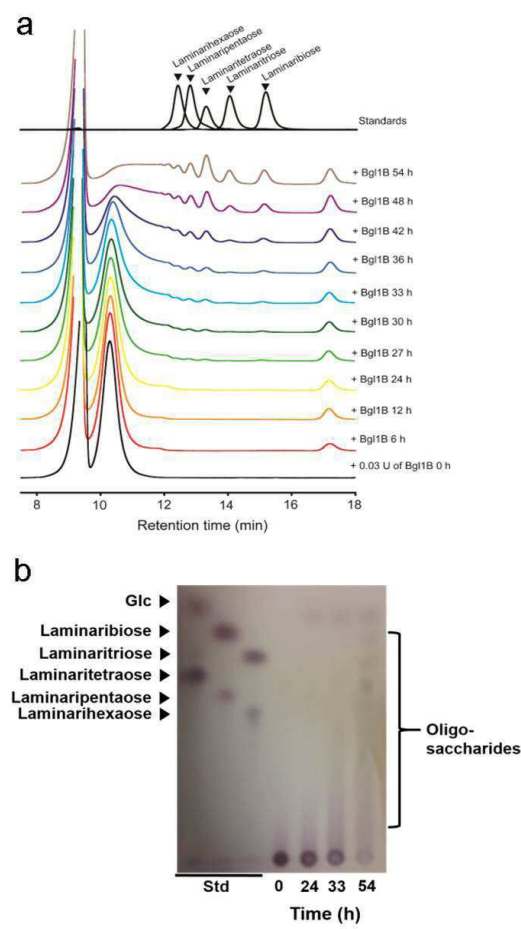
b



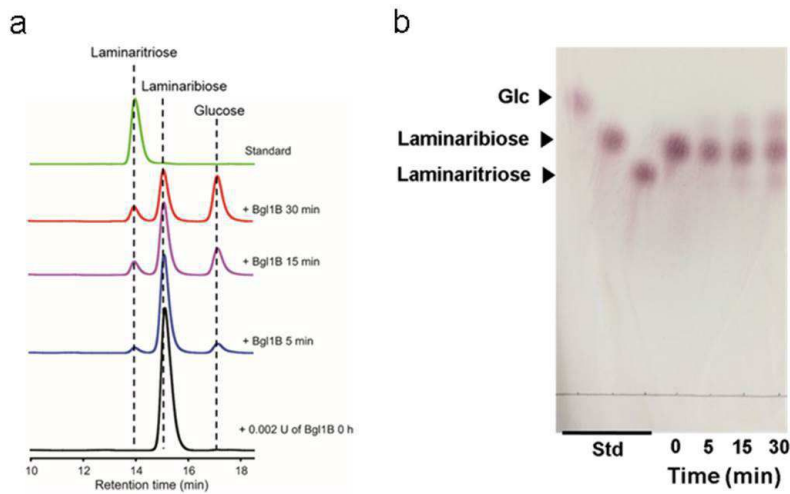
도면6



도면7



도면8



C. Bgl1B 염기서열

Atgaatagacttactacacgctcttctctgttgcgcagcaagagtttactcttgggtgtgcaacgtcgtcttaccaaattgaaggcggcatag
attctcGcctgcccgttaattgggatacgttctgtgagcagcccaataccattatgataacccaacggcgccattgctgacacataaataag
atggcaagaCgatatagaactatttgcacacacggggtagatgcctaccgcttttctattgctggtggcggtgttataatttagacggcagcct
caataatgaaggcgTtacattttacaaaaatatttaactaagcttcgcgaaaagaatttaaagcttatataacgctataaccactgggacttgcca
caacatttagaagatgctggCggctggttaaccgcgataccgctacaagtttcgcgactatgtaaccttataacccaagcgttgatgacga
tgattttgctacacacggttaaacgaGccctttgagtgccctaccttggtatgaattggtgtacacgcacgggtataaaagacttagccagt
gggcgcaaacgcgcacacattattacttgcCccatggcttagctatgcaagtgtcgcgaaaaaactgccccaatagtttaagcggcatagttt
aaacatgagccctgtttacgcggcagcaacgcacaAgcagatatagatgcagcaaacgcgcgggacgattattttcagtggtatgcaca
ccgctactactgctgctaccctgatgcaataaacagcctgcCagacaatgccaaccacattttgtgaaggcgacatggcggttaataagcca
acccttagattatttagccttaactatacccgagctatttttgcGacggtaatggcggttttaccgaacagtagctgagggttagag
ctaaccgatggtggcggaagtttaccgcaagcctaaccgattactaataagAcctaaccacgctataccctaccccgcttactattaccg
aaaacggcgagcaatggtggagcaactgttaacggcgaagttaacgatattgcccgaAtaaattatttcaaacatttacaacgggtacac
aacgcattgaacaaggtgtgtatgtacgcggttttttcttgagcctaattgataattttgagtgGgcactgggttacagcaaacgattcgg
tattactgttagattacaaacacaaaaagcgaacgctaaaagccagcggccacgcatgttgctgagttgtctcgagtaggagctaa

서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Novel beta glucosidase for producing glucose and
laminarioligosaccharides from macroalgae
- <130> P18U13C0084
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 444
- <212> PRT
- <213> Saccharophagus degradans 2-40T
- <400> 1

Met Asn Arg Leu Thr Leu Pro Pro Ser Ser Arg Leu Arg Ser Lys Glu

1 5 10 15

Phe Thr Phe Gly Val Ala Thr Ser Ser Tyr Gln Ile Glu Gly Gly Ile

20

25

30

Asp Ser Arg Leu Pro Cys Asn Trp Asp Thr Phe Cys Glu Gln Pro Asn
 35 40 45
 Thr Ile Ile Asp Asn Thr Asn Gly Ala Ile Ala Cys Asp His Ile Asn
 50 55 60
 Arg Trp Gln Asp Asp Ile Glu Leu Ile Ala Asn Leu Gly Val Asp Ala
 65 70 75 80
 Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Trp Gly Arg Val Ile Asn Leu Asp Gly Ser
 85 90 95

 Leu Asn Asn Glu Gly Val Thr Phe Tyr Lys Asn Ile Leu Thr Lys Leu
 100 105 110
 Arg Glu Lys Asn Leu Lys Ala Tyr Ile Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu
 115 120 125
 Pro Gln His Leu Glu Asp Ala Gly Gly Trp Leu Asn Arg Asp Thr Ala
 130 135 140
 Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Asp Asp
 145 150 155 160
 Asp Val Phe Cys Tyr Thr Thr Leu Asn Glu Pro Phe Cys Ser Ala Tyr

 165 170 175
 Leu Gly Tyr Glu Ile Gly Val His Ala Pro Gly Ile Lys Asp Leu Ala
 180 185 190
 Ser Gly Arg Lys Ala Ala His His Leu Leu Leu Ala His Gly Leu Ala
 195 200 205
 Met Gln Val Leu Arg Lys Asn Cys Pro Asn Ser Leu Ser Gly Ile Val
 210 215 220
 Leu Asn Met Ser Pro Cys Tyr Ala Gly Ser Asn Ala Gln Ala Asp Ile
 225 230 235 240

 Asp Ala Ala Lys Arg Ala Asp Asp Leu Leu Phe Gln Trp Tyr Ala Gln
 245 250 255
 Pro Leu Leu Thr Gly Cys Tyr Pro Asp Ala Ile Asn Ser Leu Pro Asp
 260 265 270
 Asn Ala Lys Pro Pro Ile Cys Glu Gly Asp Met Ala Leu Ile Ser Gln
 275 280 285

Pro Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val Phe Phe
290 295 300

Ala Asp Gly Asn Gly Gly Phe Thr Glu Gln Val Pro Glu Gly Val Glu

305 310 315 320

Leu Thr Asp Met Gly Trp Glu Val Tyr Pro Gln Gly Leu Thr Asp Leu

325 330 335

Leu Ile Asp Leu Asn Gln Arg Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Leu Ile Thr

340 345 350

Glu Asn Gly Ala Ala Met Val Asp Glu Leu Val Asn Gly Glu Val Asn

355 360 365

Asp Ile Ala Arg Ile Asn Tyr Phe Gln Thr His Leu Gln Ala Val His

370 375 380

Asn Ala Ile Glu Gln Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe Ala Trp Ser

385 390 395 400

Leu Met Asp Asn Phe Glu Trp Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly

405 410 415

Ile Thr Tyr Val Asp Tyr Gln Thr Gln Lys Arg Thr Leu Lys Ala Ser

420 425 430

Gly His Ala Phe Ala Glu Phe Val Ser Ser Arg Ser

435 440

<210> 2

<211> 1335

<212> DNA

<213> Saccharophagus degradans 2-40T

<400> 2

atgaatagac ttacactacc gccttcttct cgtttgcgca gcaaagagtt tacctttggt	60
gttgcaacgt cgtcttacca aattgaaggc ggcatagatt ctgcctgcc ctgtaattgg	120
gatacgttct gtgagcagcc caataccatt attgataaca ccaacggcgc cattgcttgc	180
gaccacataa atagatggca agacgatata gaacttattg ccaacctagg ggtagatgcc	240
taccgctttt ctattgcgtg gggccgtgtt attaathtag acggcagcct caataatgaa	300
ggcgttacat tttaaaaaa tattttaact aagcttcgcg aaaagaattt aaaagcttat	360

ataacgctat accactggga ctgcccacaa catttagaag atgctggcgg ctggcttaac	420
cgcgataccg cctacaagtt tcgcgactat gtaaacctta taaccaagc gcttgatgac	480
gatgtatttt gctacacaac gttaaacgag ccccttttga gtgcctacct tggctatgaa	540
attggtgtac acgcaccggg tataaaagac ttagccagtg ggcgcaaagc cgcacaccat	600
ttattacttg cccatggctt agctatgcaa gtgctgcgaa aaaactgccc caatagtta	660
agcggcatag tgtaaacaat gagcccttgt tacgccggca gcaacgcaca agcagatata	720
gatgcagcaa aacgcgcgga cgatttattia tticagtggg atgcacaacc gctacttact	780
ggctgctacc ctgatgcaat aaacagcctg ccagacaatg ccaaaccacc tatttgtgaa	840
ggcgacatgg cgtaataag ccaaccttta gattatttag gccttaacta ctataccgc	900
gcagtatttt ttgccgacgg taatggcggg ttaccgaac aagtacctga ggggttagag	960
ctaaccgata tgggctggga agtttaccg caaggcttaa ccgatttact aatagaccta	1020
aaccaacgct ataccctacc cccgttactt attaccgaaa acggcgcagc aatgggtggac	1080
gaacttgta acggcgaagt taacgatatt gccgaataa attattttca aaccattta	1140
caagcggtag acaacgcat tgaacaaggt gttgatgtac gcggttattt tgcttggagc	1200
ctaattggata attttgagtg ggcaactggg tacagcaaac gattcggat tacctatgta	1260
gattacaaaa cacaaaagcg aacgctaaaa gccagcggcc acgcatttgc tgagtttgc	1320
tcgagtagga gctaa	1335