(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 9/20

(45) 공고일자 2000년01월15일
(11) 등록번호 10-0236540
(24) 등록일자 1999년10월01일

(21) 출원번호	10-1992-0702509	(65) 공개번호	특1993-0700647
(22) 출원일자	1992년10월10일	(43) 공개일자	1993년03월15일
(86) 국제출원번호	PCT/EP 91/00664	(87) 국제공개번호	WO 91/16422
(86) 국제출원일자	1991년04월08일	(87) 국제공개일자	1991년10월31일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴 그리스 국내특허 : 일본 대한민국 미국		
(30) 우선권주장	P4012070.8 1990년04월14일 독일(DE)		
(73) 특허권자 칼리케미 악티엔 게젤샤프트 레클로우크스 라우에르
독일 디-3000 하노버1 한스뵈클러알레20 포스트파하220
(72) 발명자 버나드 묄러
독일 디-3 하노버61 뤼넨버거 담 28
로만 베터
독일 디-3167 부그도르프 봐넥케베그 1
데트레프 뷜케
독일 디-3015 베니그젠 란트베르 6
비르기트 포울로이스
독일 디-3 하노버 91 달렘스트라세 1
(74) 대리인 김동엽, 임석재

심사관 : 이처영

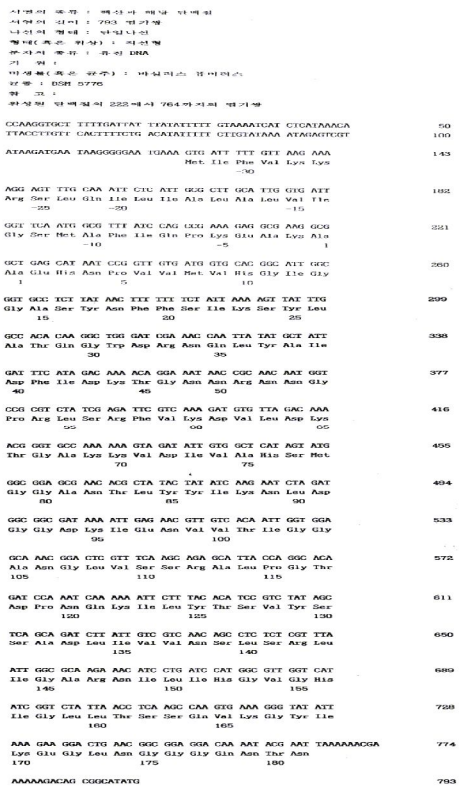
(54) 알카리성 바실러스-리파제, 이를 코-딩하는 DNA 서열 및 리파제를 생산하는 바실러스 균주

요약

본 발명은 알카리성 바실러스 리파제 및 이를 코딩(coding)하는 DNA 서열, 이 리파제의 분리와 생산방법 및 이러한 리파제를 생성하는 능력을 가진 바실러스 균주에 관한 것이다.

알칼리성 리파제는 세정제, 세제 및 표백제를 위한 성분으로 사용하기에 적합하다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

알카리성 바실러스-리파제, 이를 코-딩하는 DNA 서열 및 리파제를 생산하는 바실러스 균주

[발명의 상세한 설명]

제출된 본 발명은 알카리성 바실러스-리파제와 이를 코-딩(coding)하는 DNA 서열, 이 리파제의 이용과 생산 방법 및 이러한 리파제를 생성하는 능력을 지닌 바실러스 균주에 관한 것이다.

세제, 세정제 및 표백제를 위한 효소 성분은 현 기술상 잘 알려진 바이다. 이러한 응용분야에 있어 이미 여러 종류의 효소가 소개되었으나, 이 중 주로 흥미있는 것은 프로테아제와 아밀라제이었다. 현 기술상 현재까지 소개된 세제, 세정제 및 표백제 성분으로서 리파제는 슈도모나스(Pseudomonas), 라이조푸스(Rhizopus), 크로모박터(Chrmobacter) 및 휴미코라(Humicola) 속 등의 미생물(테르모마이세스 속을 포함한) 배양을 통하여 얻어왔다.

비록 그와 같은 리파제가 언급한 응용분야에 가능한 효소로서 선택되어 졌지만 세제, 제정제 및 표백제 성분으로 현재까지 거의 사용되지 못하였다. 그것은 여러 구성 성분들이 리파제의 역사를 저해하는 작용 때문이다, 예를 들면 특히 음이온성의 합성 계면활성제가 리파제의 역가를 저해한다는 사실은 잘 알려져 있다. 리파제의 분류에 속하는 많은 효소들은 현 기술상 각개의 효소들이 특수한 장점을 지니고 있기는 하지만 여러 단점들 때문에 응용 가능성에 제한을 받고 있다.

더구나 리파제는 자체가 단백질이기 때문에 세제, 제정제 및 표백제의 세정 성분으로서 프로테아제와 혼합 사용되는 경우, 세제의 프로테아제에 의해 단백분해가 일어나게 된다. 이로 인하여 프로테아제와 리파제의 혼용시 지방 분해력이, 역가의 손실 때문에, 일부 혹은 전부 이용될 수 없다는 위험성이 있다.

또 한편, 예를 들어 섭씨 40도까지 정도의 낮은 세정 온도에서는, 세탁 및 세정 과정상 지방 분해능을 지닌 효소의 보조 역할이 없이는, 지방이나 유지 성분이 현 세제, 세정제 성분에 의해 섬유조직이나 다른 물질로 부터 불량하게 혹은 불완전하게 제거된다.

그 때문에 다음과 같은 과제가 도출된다. 즉, 세제, 세정제 및 표백제 성분에 유용한 첨가제로서 섭씨 40도까지 높은 역가를 지닌, 그리고 프로테아제에 대응하여 다양한 이용성을 지니고 또한 넓은 pH 범위, 특히 중성 및 알카리성에서 사용될 수 있는 리파제를 개발되어야 한다.

놀랍게도 바실러스 속에서 부터 분비되는 리파제가, 요구되는 특성인, 알카리 범위에서 적정 pH를 지니며 적정 온도가 섭씨 30-40도 범위를 가진다는 것이 발견되었다.

본 발명은 특히 바실러스 퓨미러스(Bacillus pumilus)의 배양을 통하야 얻을 수 있는 알라카성 바실러스-리파제에 관한 것이다.

본 발명의 요점은 제1도에 표기된 아미노산 서열과 비교하여 최소한 70%, 바람직하게는 최소 80%, 더욱

바람직하게는 최소 90%의 동질성을 보여주는, 상기의 미생물 속으로 부터 얻어지는 바실러스-리파제에 관한 것이다. 여기서 동질성(Homology)이란 어떤 바실러스-리파제의 해당 아미노산 서열이 자연 분리된 바실러스인 DSM 5776, 5777 혹은 5778 특히 제1도의 5776 아미노산 서열과 유사한 정도를 나타낸다. 동질성의 측정을 위하여는 분리된 바실러스의 리파제, 특히 제1도에 표시된 리파제의 특정 부위에 비교할 아미노산을 최대의 일치성이 보이도록 비교하여 결정한다. 여기서 개개의 아미노산이 절단 혹은 삽입됨으로서 서열이 달라지는 것을 고려하여 비교하였다. 동질성의 %는 전술한 분리된 바실러스-리파제가 가진 총 아미노산의 수와 서열상에서 일치하는 아미노산(동질성 부위) 수와의 백분율을 나타낸다. 서열 상의 유의차는 아미노산의 변형, 삽입 및 절단에 의해 생길 수 있다.

발명의 요점은 발명에 따른 리파제, 특히 알카리성 바실러스-리파제로써 바실러스 퓨미러스 종인 DSM 5776, 5777 혹은 5778의 배양을 통하여 얻을 수 있는 것으로서, 예를 들면, 하기한 방법에 의해 분리될 수 있다.

본 발명을 통하여 제시한 새로운 알카리성 바실러스-리파제눈 특히 다음과 같은 특성을 보여준다.:

(1) 기능 : 지방 및 지방산에스터 화합물의 분해

(2) 적정 pH : pH 범위 약 9-10

(3) pH에 안정성 : pH 범위 6.5-11 사이에서 효소는 아주 안정함; pH 11, 섭씨 4도에서 21시간 방지 후에도 잔존 효소역가가 최소 90%에 달한다.

(4) 적정온도 : 섭씨 약 30-40도

(5) 열 안정성 : 섭씨 40도까지의 온도에서 30분간 방치 후에도 효소역가에 별다른 영향을 주지 않는다; 이때 효소의 잔존역가의 최소 90%에 달하였다.

본 발명에 따른 바실러스-리파제는 중성에서 알카리 pH 범위에서 그리고 낮은온도, 특히 섭씨 40도까지의 저온에서 사용되어야 하는 세제 및 세정제 성분의 장점이 많은 유리한 첨가제로 적합하다. 본 발명은 따라서 본 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제가 세제, 세정제, 표백제 및 식기용세제에 사용될 수 있다는 내용을 포함한다. 이 효소는 또한 여타 다른 효소와, 특히 프로테아제와 혼용하여 유리하게 사용될 수 있다. 특히 본 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제의 장점은 저온에서, 바람직하게는 섭씨 30-40도 사이에서 세제, 세정제, 표백제 및 식기용세제에 사용될 수 있다는 것이다.

이러한 응용 분야를 본 발명은 바실러스 속으로 부터 얻어지는 일련의 새로운 개선된 특성을 가진, 세제, 세정제, 표백제 및 식기용세제에 사용될 수 있는 알카리성 리파제를 제공할 수 있다. 이러한 제제의 요점은 프로테아제와는 무관한 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제를 함유한다는 것이다. 전술한 제제의 우선적인 요점은 이러한 제제가 저온에서, 바람직하게는 섭씨 30-40도 사이의 적용 온도를 지닌 알카리성 바실리스-리파제를 함유한다는 사실이다.

본 발명에 따른 리파제는 세제, 세정제의 조제, 예를 들어 분말세탁제의 조제시, 개별 혹은 경우에 따라 리파제를 배합하여 사용될 수 있으며 또한 세정, 세정용 프로테아제 혹은 첨가제로 흔히 사용되는 아밀라제, 리파제, 펙틴아제, 뉴크리아제 및 옥시도리덕타제(Oxidoreductase) 등과 혼용할 수 있는 본 발명에 따른 리파제는 세제 및 세정제 조제에 있어 타 세제용 효소 첨가량 (적정량은 약 0.1중량%)과 같이, 특히 3중량% 까지 (전체 성분의 건조량으로 환산하여), 바람직하게는 0.2-1.5중량%로 첨가 사용될 수 있다.

이미 언급한 세제용 효소외에도 발명에 의한 세탁 및 세정제는 현 기술상 일반적인 세제 함유성분들 즉, 계면활성제, 표백제 및 지지체(Builder) 그리고 제제상 필요한 보편적인 보조제 등을 보편적인 양 만큼 함유할 수 있다.

보조제에 속한 것으로 강화제, 효소안정제, 오물질 운반체, 착화합물화 혹은 킬레이트화 물질, 거품조절제 그리고 시각적 선명도향상제, 형광제, 부식방지제, 정전방지제, 착색제, 항세균제, 표백촉진제 및 과산화 표백제의 전구물질 등을 들 수 있다.

그렇게 얻어진 발명에 따른 세탁제제는, 건조 중량의로 환산하여, 전형적인 예를 들면 다음과 같은 조성을 지닌다.

a) 최소 5중량%, 예를 들어 10에서 50중량%의 계면활성제나 이의 혼합물.

b) 40중량% 까지의 지지체(Builder)나 의의 혼합물.

c) 40중량% 까지의 표백제나 이의 혼합제, 바람직하게는 나트리움 퍼보레이트 4수화물(Sodiumperborate tetrahydrate)이나 나트리움 퍼보레이트 1수화물(Sodiumperborte monhydrate)등의 퍼보레이트(Perborate).

d) 0.1에서 3중량%, 바람직하게는 0.2에서 1.5중량%의 본 발명에 따른 리파제 중의 하나, 경우에 따라 0.1에서 3중량%의 프로테아제.

e) 이외에 보조제 등의 내용 성분을 합하여 100중량%로 한다.

이와 같은 세탁제제는 흔히 일반적인 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 리파제는 이들 제제에 미립자, 프릴(Prill)이나 펠릿(Pellet) 형태로 또는 표면 도말제 형태로 다른 성분들과 혼합될 수 있다.

본 발명에 따른 바실러스-리파제는 그 이외에도 일반 액상의 세정제, 예를 들어 식기용세제나 액상 세탁제에 아주 잘 이용될 수 있다. 이런 제제에는 본 발명에 따를 바실러스-리파제를 액상효소제의 형태로 혼합될 수 있다.

본 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제는 다음과 같이 얻을 수 있다. 바실러스속에 속하고 알카리성

바실러스-리파제 형성 능력을 지닌 박테리아를 일반적 방법으로 배양하고 균체를 여과나 원심분리에 의해 분리한다. 효소는 멤브레인 여과나 침전에 의해 농축, 정제하거나 분리하여 원하는 목적에 사용한다.

본 발명에 따른 바실러스-리파제를 생산, 회수하는 데에는 그 효소를 생산하는 자연으로 부터 분리된 바실러스가 적합하다. 그와 같은 바실러스는 자연으로 부터 분리될 수 있는데, 예를 들어 동,식물성 유지를 함유한 물질을 일정시간 리파제 생성하는 바실러스 균주와 적당한 조건에서 방치한 후, 경우에 따라 살균하고(Pasteurization) 얻어진 시험구를 리파제를 생성하는 바실러스 종의 생육에 적합한 배지에 접종한다. 충분한 배양이 끝난 후 생장세포들은 열처리에 의해 살균하고, 경우에 따라 희석한 후, 예를 들어 선별 평판배지에 도말하고 다음과 같이 배양한다. 충분히 배양 후 리파제 선별배지 상에서 알려진 방법으로 리파제를 형성하는 콜로니를 찾아내어 분리한다. 이러한 방법으로 적합한, 알카리성 바실러스-리파제를 생산하는 자연의 바실러스 균주를 분리할 수 있다. 예를 들어 바실러스 퓨미러스 속인데 특히 본 발명의 대상으로써, 자연 분리된 바실러스 균주는 독일 종균 및 세포 협회(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)에 DSM 번호 5776, 5777 및 5778로써 1990년 2월 7일자로 기탁되었다.

한편 생산의 용이성과 적합성 및 회수율 증가를 위하여 다른 종의 바실러스 균주를 본 발명에 따른 바실러스-리파제의 생산 및 회수에 이용할 수 있다. 이것은 본 발명에 따른 리파제의 유전 정보를 타 균주에 형질전환시켜 발현시킴으로써 가능하다.

따라서 본 발명은, 전술한 발명에 따른 바실러스-리파제와 동일한 아미노산 서열을 코드(code)하는 DNA-서열을 지닌 벡터(Vecter)를 함유하고 있는, 형질변환된 바실러스를 이용하여 본 발명에 적합한 리파제를 생산하는 공정을 포함한다. 본 발명에 따라 형질전환된 미생물은 전술한 바와 같이 배양하고 배양액으로 부터 알카리성 바실러스-리파제를 분리한다. 본 발명에 따른 바실러스-리파제의 생산 및 회수에 유리한 형질전환 미생물로서는 바실러스 서티리스(Bacillus subtils), 바실러스 알카로피러스(Bacillus alcalophilus), 바실러스 리케니포르미스(Bacillus licheniformis) 또는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(Bacills amyloliquefaciens)등이다. 바실러스-리파제의 발현에 적합한, 발명에 따른 형질전환 미생물은 본 발명에 따른 바실러스-리파제를 위한 유전 정보를 지닌 벡터로 형질전환되었다는 특성을 지닌다. 본 발명에 따른 바실러스-리파제를 위한 유전 정보는 여기에서 DNA-서열로 표시되는데, 이는 바실러스-리파제의 아미노산 서열을 코드하는 것으로서, 제1도에서 표기된 아미노산 서열과 비교하여 최소한 70%, 바람직하게는 최소 80%, 더욱 바람직하게는 최소 90%의 동질성을 보여주는 것이다. 이러한 DNA-서열, 형질전환에 적합함 벡터, 특히 새로운 DNA-서열을 지닌 발현 벡터 및 이런 벡털 형질전환된 미생물, 특히 전술한 형질전환된 바실러스 속 등이 본 발명의 대상이 된다.

전술한 공정에 사용될 형질전환된 미생물을 만들기 위하여 다음과 같은 방법을 행한다.

a) 제1도에서 표기된 아미노산 서열과 비교하여 최소한 70%, 바람직하게는 최소 80%, 더욱 바람직하게는 최소 90%의 동질성을 보여주는 알카리성 리파제를 생성하는 적합한 바실러스 균주로 부터 리파제를 코드(code)하는 DNA-서열 (즉, 리파제의 구조 유전자)을 분리한다.

b) 경우에 따라 리파제의 정밀한 구별을 위하여 DNA-서열의 헥산순서를 측정한다.

c) 분리된 DNA-서열을 이용하여 발현 벡터를 만든다.

d) 알카리성 바실러스-리파제 생산에 이용될 적합한 미생물에 이 발현 벡터를 형질전환시킨다.

전술한 방법으로 본 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제의 분리 및 회수하는 과정, 여기에서 얻어지는, 발명의 대상이 될 수있는 리파제 유전자를 지닌 DNA-서열이나 DNA-인서트(Insert) 형태의 중간물질, 벡터, 특히 발현벡터 및 형질전환된 미생물에 관하여서는 다음에서 상세히 설명될 것이다.

알카리성 바실러스-리파제의 아미노산 서열을 코드하는 구조 유전자(structure gene)는 일반적인 잘 알려진 바실러스(공여 바실러스), 특히 DSM 번호 5776, 5777 및 5778중의 한 바실러스, 로 부터 알려진 방법에 따라 크로모솜 DNA를 분리하고 적합한 제한효소를 이용하여 부분 가수분해 한다. 제한효소란 선택적으로 이중나선 DNA를 각 핵산 사이의 포스포디에스터 결합을 절단하여 절편(Fragment)을 만들어 내는 효소이다. 모든 제한효소는 DNA의 특정 염기서열을 인식하며, 이 염기서열은 해당 제한효소의 선택적 작용부위를 나타내주는 것이다. 이중나선 DNA를 절단함에 따라 몇몇 제한효소를 특이적인 소위 “잔존 말단”이 생긴다. 이 말단은 특정한 복원 조건에서 다시 스스로 혹은 다른 과정에서 얻어진 DNA 절편 중 해당하는 보족(coplementary) 말단기와 봉합(Ligation)될 수 있다(재조합, Recombination). 다른 효소로 절단 시에는 브런트(blunt) 말단을 지닌 이중나선 DNA가 생긴다. 브런트(blunt) 말단을 지닌 이중나선 DNA는 다른 브런트(blunt) 말단을 지닌 이중나선 DNA와 재조합될 수 있다.

얻어진 공여-DNA(Donor-DNA)의 제한 절편은 겔전기영동이나 슈크로즈-농도구배를 통한 원심분리로서 분리될 수 있고, 이 원하는 크기의 절편은 적절한, 이중나선 벡터 DNA와 재조합될 수 있다. 벡터란 DNA분자로서, 상이한 DNA를 숙주체에 형질전환시키는 운송 역할을 하는 분자로 적합하며, 거기에서 스스로 증식할 수 있는 능력을 가지고 있으며 경우에 따라 소위 마-커(Marker)를 지니고 있다. 마-커는 특정의, 인식할 수 있는 특성(예, 항생물질에 대한 저항성)을 코드하는 DNA 절편이며 형질전환될 미생물체를 선택하는데 기여한다. 흔히 사용되는 벡터는 일명 프라즈미드(Plasmid)로서 크로모좀 외부에 존재하는, 원형의 이중나선 박테리아 DNA이며 적절한 방법으로 타 미생물체로 삽입이 가능하며 거기에서 증식 능력을 지닌 것을 말한다.

본 발명에서 사용되는 pUB 110으로 표시되는 프라즈미드는, 실시예에서 상세히 기술되는 바와 같이, 상품으로 구입할 수 있는 바실러스 서틸리스(Bacillus subtilis) BD366으로 부터 분리될 수 있다.

전술한 바와 같이 얻어진, 실험실 적으로 재조합된 DNA는 적당한 숙주체, 예들 들어 본 발명에서 사용되는 구입가능한 바실러스 서틸리스(Bacillus subtilis) PSL 1에 삽입될 수 있다. 형질전환체는 벡터 DNA상의 마-커(예, 네오마이신 저항성)의 도움으로 선택될 수 있다. 이러한 항생물질에 저항성을 지닌 형광

전환체 중에서 리파제를 분비하는 크론(Clone), 즉 유전적으로 동일한 형질전환체를 찾을 수 있다. 리파제 역가를 가진 크론을 부터 이 형질전환체에 전입된 프라즈미드 DNA가 분리될 수 있으며, 반복하여 새로이 바실러스 종에 형질전환시킴으로써 리파제 역가가 프라즈마미드와 연관된 것인지 또는 마-커의 특성을 가지는 지를 확인한다.

이렇게 분리한 프라즈미드는 알려진 제한부위를 지닌 벡터 DNA(여기서는 특히 프라즈미드 pUB 110 으로부터의) 외에도 찾고자하는 알카리성 바실러스-리파제의 구조 유전자를 가지고 있으며 경우에 따라서는 공여 바실러스로 부터의 불필요한 DNA-서열을 가지고 있다. 이러한 리파제 유전자를 가진 절편을 포함한 벡터의 예로서 pL2-22-11, pL4-23-14 그리고 pL11-8-20으로 표시되는 프라즈미드를 들 수 있다. 이러한 프라즈미드내의 각개의 바실러스 리파제를 코-드하는 DNA-서열과 이에 따른 아미노산 서열은 현 기술 상 알려진 방법에 의해 그 서열이 확정지어 질 수 있다. 예를 들어 제1도에 표시된 DNA-서열 및 부수되는 아미노산 서열을 얻을 수 있다.

이러한 프라즈미드의 능력, 예를 들어 pL2-22-11, pL4-23-14 및 pL11-8-20과 같은 프라즈미드 들의 알카리성 바실러스-리파제 역가에 관하여 검토할 수 있는바, 한 박테리아, 특히 한 바실러스 종을 이 프리즈미드를 이용 형질전환시킨 후 배양하여 리파제 역가를 측정함으로써 테스트 할 수 있다. 이렇게 얻어진 형질전환체는 본 발명에 따른 바실러스-리파제의 생산 및 회수를 위해 배양될 수 있으며, 전술한 바와 같이 이를 얻을 수 있다.

본 발명에 따른 바실러스-리파제는 훌륭한 장점을 지닌 것을 특징으로 한다. 이 효소는 5 부터 11사이의 넓은 pH 범위에서 안정성을 가지며 특히 pH 범위 6.5-11 사이에서 효소는 아주 안정하다. 본 발명에 따른 바실러스-리파제는 적정 pH가 세제 및 세정제 성분으로서 적당한 응용 pH 범위인 9 에서 10 사이에 놓여있다. 더우기 본 발명에 따른 바실러스-리파제는 섭씨 약 30-40도에서 적정온도를 가진다. 또한 이 효소는 세탁용 알카리용액 및 세제용 프로테아제에 아주 안정성을 보인다. 본 발명에 따른 바실러스-리파제는 섭씨 40도까지의 온도에서 적합한 역가를 보여, 낮은 온도, 특히 섭씨 40도까지의 온도에서 사용되어야 하는 세제 및 세정제의 성분으로 아주 적합하다. 그와 같은, 본 발명에 따른 바실러스-리파제를 함유한 세제 및 세정제는 제거해야 할 유지나 지방에 대해 우수한 세탁 능력을 발휘한다.

[도면의 간단한 설명]

제1도 바실러스 퓨미러스 DSM 5776에서 유래한 리파제의 DNA-서열 및 부수되는 아미노산 서열.

제2도에서 제4도는 리파제의 적정온도 곡선; 바실러스 퓨미러스 DSM 5776 유래(제2도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5777(제3도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5778(제4도).

제5도에서 제7도는 리파제의 열 안정성 곡선; 바실러스 퓨미러스 DSM 5776 유래(제5도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5777(제6도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5778(제7도).

제8도에서 제10도는 리파제의 적정 pH 곡선; 바실러스 퓨미러스 DSM 5776 유래(제8도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5777(제9도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5778(제10도).

제11도에서 제13도는 리파제의 pH 안정성; 바실러스 퓨미러스 DSM 5776 유래(제11도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5777(제12도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5778(제13도). pH 맞추는데 사용되는 완충용액으로, 포스페이트 버퍼(Phosphate buffer)(·), 트리스-염산-버퍼(Tris-HCl-buffer)(+), 글라이신-수산화나트리움-버퍼(Glycine-NaOH-Buffer)(*).

제14도에서 제16도는 IEC-표준세제 제제 중에서 및 알카리성 프로테아제에 대한 바실러스-리파제의 세정효과에 관한 도식적 설명; 세정효능, 바실러스 퓨미러스 DSM 5776 유래(제14도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5777(제15도), 바실러스 퓨미러스 DSM 5778(제16도).

[실시예]

다음과 같은 개념에 대한 약정은, 본 발명의 범위를 제약함이 없이, 발명을 앞으로 기술함에 전형적인 실시예에서 반복되어 나타나게 된다.

실시예를 단순화하기 위하여 몇몇 자주 반복되는 방법 및 개념을 다음에 자세히 설명하게되며 각 예에서는 단지 약식으로 참고 표시한다. 달리 기술하지 않는 한 일반적으로 Maniates 등(Maniatis et al. =T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning,, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)에 서술된 방법에 의한다.

여러 종류의 제한효소는 현 기술상 존재하는 것으로 상품으로 구입할 수 있는 것이다. 알려진 제한효소의 사용에 요구되는 반응, 조효소 및 타 조건 등은 알려져 있다. 예를 들어 약 1㎍의 DNA를 위하여 한 단위(=1 U=Unit)의 제한효소를 약 20㎕의 완충용액에 녹여 사용된다. 보통 섭씨 37도에서 약 1시간 가량의 충분한 배양시간이 적용되며 배양 조건은 요구에 따라 변화시킬 수 있다. 제한효소와 반응시킨 후 단백질은 추출(예를 들어 페놀과 클로로포름)에 의해 제거되며 DNA 절편은 분리(예를 들어 에탄올 침전에 의한 수용성 분획으로 부터)하여 다른 용도에 쓰인다.

제한효소를 이용한 DNA 혹은 벡터의 절단은 경우에 따라 알카리성 포스파테이즈(Phosphatase)를 이용하여 말단 5′ -포스페이트의 가수분해(Dephospho-rylzation)에 의해 종결지을 수 있다. 이를 통하여 제한 절단된 벡터가 스스로 재조합하거나 원하는 외부의 DNA 절편의 삽입(Insertion)이 방해되는 것을 방지할 수 있다.

실시예에서 이러한 5′ -말단의 디포스포릴라이제이션은 알려진 방법에 의한다. 디포스포릴라이제이션 시키는 자세한 방법 및 필요한 시약은 Maniatis 등 (페이지 133-134)에 따른다.

부분 가수분해(Partial Hydrolysis)는 제한효소를 이용 DNA를 불완전하게 가수분해 하는 것을 의미한다. 그 반응조건은, DNA 기질이, 첨가된 제한효소에 의해 모든 인식 부위가 절단되는 것이 아니라 한두 군데

에서만 절단되도록 선택되어야 한다.

특정한 DNA 절편은, 예를 들어 DNA를 제한효소로 처리한 후, 다음과 같이 분리하여 얻을 수 있다. 원하는 DNA 절편은 일반적인 겔전기영동 (예, 아가로즈겔 상에서)에 의해 분리한 후, 분자량에 따라 (분자량을 알고 있는 표준 DNA 절편과 비교하여 확정) 구분하여, 원하는DNA 절편만을 해당 겔부위로 부터 절단하여 얻는다.

봉합(Ligation)은 DNA 절편 간에 포스포다이에스터 결합을 형성하는 방법을 의미한다 (예, Maniatis 등, 페이지 146 참조). 봉합은 일반적 조건, 예를 들어 봉합될 DNA 절편 0.5 ㎍당 약 10단위의 티4-DNA-라이게이즈 (T4-DNA-Ligase)를 함유한 완충용액 중에서, 하에서 행해진다.

형질환이란 DNA를 한 미생물체에 이식함을 의미하며, 그럼으로써 DNA가 그 내부에서 재생되고 발현 될 수 있다. 이. 콜라이(E. Coli)를 형질전환하는데는 예를 들어 Mandel등의 칼시움크로라이드(Calciumchloride)-방법 (1970, J. Mol. Biol. 53: 159)이나 Maniatis등 (페이지 250-251)의 방법이 적합하다. 바실러스 종 에게는 Anagnostopoulos 등의 방법 (1961, J. Bact, 81: 741-746)이 적합하다.

후술한 실시예에서 효소의 안정성에 관하여: “아주 안정함”은 잔존역가가 최소한 90%, “안정함”은 잔존역가가 최소 80% 존재함을 의미한다.

실시예 1에서 분리된 바실러스 균주들은 독일 종균 및 세포 협회(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH = DSM), 독일 연방공화국 (주소:Marscheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig),에 DSM 번호 5776, 5777 및 5778로써 1990년 2월 7일자로 기탁되었다.

[실시예 1]

[리파제를 분비하는 바실러스 균의 분리]

a) MMII-배지 (2% 올리브오일, 0.05% 효모추출물, 0.1% 염화나트리움, 0.5% 황산암모니움, 황산마그네시움.2수화물, 0.2% 요소, 10mM 소디움카보네이트 완충액 pH 9)에 한 식품시험구(생치즈, 실온에서 일주일간 방치된)를 접종한 후 섭씨 37도에서 72시간 진탕 배양한다. 생육세포는 섭씨 80도에서 30분 열 처리하여 살균하여 얻어진 배양액을 여러 농도로 희석한 후 리파제 선별배지에 도말한다. 리파제 선별배지는 2.5% 올리브오일, 0.8% 뉴트리언트 브로스(Nutrient Broth), 0.4% 염화나트리움, 2% 아가(Agar), 0.001% 로다민 비(Rhodamin B) 그리고 10mM 소디움카보네이트 완충액(pH 9)을 함유한 배지이다(Kouker and Jaeger, 1987, Appl. Envirn. Microbiol. 53, 211-213의 변형된 방법). 이 평판배양기를 섭씨 37도에서 배양한다. 2일간의 배양후의 자외선하에서 오렌지 색을 띠는 콜로니를 발견할 수 있다. 이로 부터 한 콜로니를 분리하여, 분리균주를 독일 종균 및 세포 협회(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH=DSM)에 번호 DSM 5776으로 기탁하였다.

b) 일주일간 실온에 방치된 버터를 80도에서 30분간 살균한다. 이중의 한 시험굴를 YMI-배지 (1% 트윈 80, 1% 트립톤, 0.5% 효모추출물, 0.5% 염화나트리움, 10mM 소디움카보네이트 완충액 pH 9)에서 섭씨 37도, 48시간 진탕 배양 한다. 배양액을 여러 농도로 희석한 후 리파제 선별배지에 도말한다. 2일간의 배양 후에 자외선 하에서 오렌지 색을 띠는 콜로니를 발견할 수 있다. 이로 부터 한 콜로니를 분리하여, 분리 균주를 독일 종균 및 세포 협회(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH=DSM)에 번호 DSM 5777로 기탁하였다.

c) 사일간 실온에 방치된 돼지비계를 섭씨 80도에서 30분간 살균한다. 이중의 한 시험구를 VMII-배지 (1% 트윈 80, 1% 올리브오일, 1% 트립톤, 0.5% 효모추출물, 0.5% 염화나트리움, 10mM 소디움카보네이트 완충액 pH 9)에서 섭씨 37도, 48시간 진탕 배양한다. 배양액을 여러 농도로 희석한 후 리파제 선별배지에 도말한다. 2일간의 배양 후에 자외선 하에서 오렌지 색을 띠는 콜로니를 발견할 수 있다. 이로 부터 한 콜로니를 분리하여, 분리 균주를 독일 종균 및 세포 협회(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH=DSM)에 번호 DSM 5778로 기탁하였다.

[실시예 2]

[실시예 1에서 분리된 바실러스의 동정]

실시예 1에서 분리된 균주인 DSM-번호 5776, 5777, 5778 이 그람 양성이고, 포자 형성하는 통기성 미생물로서, 바실러스 속에 속한다는 것에 관한 예이다. 세포 및 콜로니의 형태학적인 기술은 다음과 같으며 생화학적 반응 및 특정 생육조건에 따른 반응에 관한 것은 표 1에 명시되었다.

[바실러스 종 DSM 5776:]

둥근 모서리를 지닌 단간형 박테리아이다. 그람 반응(Gram reaction)은 양성. 티와이-아가배지(후술 참조) 상에서 섭씨 37도, 2일간 배양 후 지름이 3.5-4mm인 콜로니를 형성하며 베이지색을 띠고 평평하거나 굴곡형의 표면을 가진다. 경우에 따라 콜로니 상에 소형 돌기형태가 관찰되며 광택이 있거나 건조하면서 굴곡이 있다. 세포의 크기는 티와이-아가 상에서 0.7에서 0.9㎛, 1.2에서 2.8㎛이며 보통 단세포 혹은 둘 또는 세쌍으로 존재한다. 포자는 타원형이며 중심부 혹은 말단부 근처에 존재한다. 균주는 포자 형성을 매우 잘한다.

[바실러스 종 DSM 5777:]

둥근 모서리를 지닌 단간형 박테리아이다. 그람 반응(Gram reaction)은 양성. 티와이-아가배지(후술 참조) 상에서 섭씨 37도, 2일간 배양 후 지름이 3.2-4.2mm인 콜로니를 형성하며 베이지색을 띠고 평평하거나 굴곡형의 표면을 가진다. 경우에 따라 콜로니 상에 소형 돌기형태가 관찰되며 광택이 있거나 건조하면서 굴곡이 있다. 세포의 크기는 티와이-아가 상에서 0.8에서 0.9㎛, 1.2에서 2.8㎛이며 보통 단세포 혹은 둘 또는 세쌍으로 존재한다. 포자는 타원형이며 중심부 혹은 말단부 근처에 존재한다. 균주는 포자

형성을 매우 잘한다.

[바실러스 종 DSM 5778:]

둥근 모서리를 지닌 단간형 박테리아이다. 그람 반응(Gram reaction)은 양성. 티와이-아가배지(후줄 참조) 상에서 섭씨 37도, 2일간 배양 후 지름이 2.2-3mm 인 콜로니를 형성하며 베이지색을 띠고 평평하거나 굴곡형의 표면을 가진다. 경우에 따라 콜로니 상에 소형 돌기형태가 관찰되며 광택이 있거나 건조하면서 굴곡이 있다. 세포의 크기는 티와이-아가 상에서 0.7에서 0.9㎛, 1.3에서 3.7㎛이며 보통 단세포 혹은 둘 또는 세쌍으로 존재한다. 포자는 탄원형이며 중심부 혹은 말단부 근처에 존재한다. 균주는 포자 형성을 매우 잘한다.

[티와이-아가 (TY-Agar):]

효모추출물	5g
염화마그네시움·6수화물	8.75g
염화망간·6수화물	0.016g
아가	16g
이중 증류수	합하여 1000ml
pH	7.0±0.3

표 1에 표시된 실험 (Bergys Manual of Deteminative Bacteriology, Vol.2, 1121-1125, P.H.A Sneath (ed.): Williams and Wilins, Baltimore -London- Sydney, 1986에 의거) 결과에 의하면 바실러스 퓨미러스로 추정되어 졌다. 분리 균주는 약간의 특성이 (Voges-Proskauer 테스트, V-P 영양액의 pH와 난황-레시티나제 및 DSM 5777 균주의 7% 염용액 에서의 성장) 상기 문헌 상 표기된 바실러스 퓨미러스와 차이가 있다.

바실러스 퓨미러스는 아주 널리 분포된 미생물로써 배지상에서 다양한 외형의 콜로니를 형성한다. 실시예 1에 따라 분리된 균주는 다음과 같다:

바실러스 퓨미러스 DSM 5776 (실시예 1A)

바실러스 퓨미러스 DSM 5777 (실시예 1B)

바실러스 퓨미러스 DSM 5778 (실시예 1C)

[표 1]

특 성	바 실 러 스			
	DSM 5776	DSM 5777	DSM 5778	류미러스
세포지름 > 1 ㎛	-	-	-	-
포자형태 원형	-	-	-	-
포자낭 부풀상태	-	-	-	-
부포자 절정형	-	-	-	-
카타레이즈	+	+	+	+
혐기성 성장	-	-	-	-
Vogas-Proskauer 테스트	-	-	-	-
V-P 영양액 중의 pH < 6 > 7	+ +	+ +	+ +	+ +
산의생성				
포도당	+	+	+	+
L-아라비노즈	+	+	+	+
D-자이로즈	+	+	+	+
D-만니톨	+	+	+	+
포도당에 의한 가스 생성	-	-	-	-
가수분해				
카세인	+	+	+	+
젤라틴	+	+	+	+
전분	-	-	-	-
대사물로 이용				
호박산	+	+	+	+
프로피온산	-	-	-	-
타이로신 (Tyrosin)의 분해	-	-	-	-
페닐알라닌의 탈아미노반응	-	-	-	-
난황-레시틴에이즈	+	+	+	-
질산의 아질산으로의 환원	-	-	-	-

특 성	바 실 러 스			
	DSM 5776	DSM 5777	DSM 5778	퓨미러스
생성여부	-	-	-	-
인돌 (Indol)	-	-	-	n.b.
디하이드록시아세톤				
혐화나트리움 및 -칼리움 요구	n.b.	n.b.	n.b.	-
아민프인 혹은 요소 요구성	n.b.	n.b.	n.b.	-
성장 pH				
6.8 영양액체배지 내	+	+	+	+
5.7 영양액체배지 내	+	+	+	+
혐화나트리움 에서의 성장				
2 %	n.b.	n.b.	n.b.	+
5 %	+	+	+	+
7 %	+	-	+	d
10 %	-	-	+	n.b.
성장온도				
섭씨 5 도	n.b.	n.b.	n.b.	-
10 도	n.b.	n.b.	n.b.	+
30 도	+	+	+	+
40 도	n.b.	n.b.	n.b.	+
50 도	n.b.	n.b.	n.b.	d
55 도	n.b.	n.b.	n.b.	-
65 도	n.b.	n.b.	n.b.	-
라이소자임 존재하의 성장	+	+	+	d
수소 + 이산화 혹은 일산화탄소 화의 영양 요구성	n.b.	n.b.	n.b.	-

* 바실러스 퓨미러스에 대한 특성은 Bergys Mamual of Deteminative Bacteriology, Vol.2, 1121-1125, P.H.A. Sneath (ed.): Williams and Wilins, Baltimore-London-Los Angeles-Sydney, 1986에 의거하였다.

+, 90% 혹은 그 이상 양성

-, 90% 혹은 그 이상 음성

d, 11-89% 양성

n.b., 측정 안함

NB, 완전영양 액체배지

[실시예 3]

[실시예 1의 바실러스 자연 분리균으로 부터 리파제 형성]

실시예 1에서 분리하여 실시예 2q에서 동정된 바실러스 균주 DSM 5776, 5777 및 5778 pH 9.0, 섭씨 30도에서 300rpm으로 다음과 같은 배지조성 중에서 배양되었다.

배지 조성 : 20g 대두분 (Soyameal), 10g 펩톤, 10g 수용성 전분, 2g 디칼리움하이드로젠포스페이트, 1g 황산마그네시움 7수화물, 5.88g 소디움하이드로젠카보네이트, 3.18g 소디움카보네이트, 10g 트윈 80(Tween 80), 이중 증류수를 합하여 1000ml로 함, 전체 용액의 pH는 9.0±0.1.

바실러스 균주 DSM 5777 및 5778의 경우 22시간 및 DSM 5776의 경우 41.5시간의 배양시간이 경과한 후 배양액은 15분간의 원심분리에 의하여 균체를 제거한 후 배양여액의 리파제 역가는 실시예 8에 따라 측정되었다. 역가 측정의 결과는 다음과 같다.

바실러스 리파제	역가
DSM 5776	8.5 U/ml
DSM 5777	10.3 U/ml

DSM 5778 12.8 U/ml

[실시예 4]

[자연 분리 바실러스의 유전적 DNA-서열 확정과 알카리성 바실러스-리파제 유전자 분리]

실시예 1에서 자연 분리한 바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778로 부터 Saito 등의 방법(1963, Biochem. Biophys. Acta. 72, 619-629)에 따라 각각의 크로모좀 DNA를 분리하였고 제한효소인 Sau 3A로 부분 가수분해하였다. 제한 절편은 아가로즈 겔 상에서 전기영동을 통하여 분리되었고, 3 내지 8킬로 베이스 (Kb)크기의 절편 들이 분리되었다.

바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778로 부터 분리되고 크기가 나뉜 DNA 절편 들은 각각 프라즈미드 pUB 110의 벡터 DNA와 실험실 적으로 재조합시켰다.

프라즈미드 pUB 110을 제한효소인 Bam HI으로 제한 절단한 후, 송아지 내장에서 유래한 알카리성 포스파테이즈로 디포스포리라이제이션 시켰다. 각 4㎍의 처리된 벡터 DNA와 바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778의 DNA절편 20㎍을 총 부피 200㎕ 중에서 티4-DNA 라이게이즈로 24 시간, 섭씨 16도에서 반응시켰다.

각 개의 실험실 적으로 재조합시킨 DNA를 바실러스 서틸리스 PSL 1 (Bacillus Genetic Stock Center 1A501)의 프로토플라스트 (protoplast)에 S. Chang and N. Cohen (1979,Mol. Gen. Genet. 168,111-115) 방법에 따라 형질전환시켰다. 형질전환체는 배지 상에서 네오마이신으로 선별되었고 리파제 선별배지에 옮겨졌다. 약 100.000개의 얻어진 형질전환체 중 형광을 띠는 환형 부위를 보아 리파제를 분비하는 것으로 판단되는 몇개의 형질전환체가 발견되었다.

이 크론으로 부터 Maniatis 등의 방법에 따라 각각의 프라즈미드 DNA가 분리되었다. 바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778로으로 부터 유래한 이 프라즈미드에 포함되어 있는 크론된 절편은 (실시예 5에서 증명 됨) 개개의 알카리성 바실러스-리파제의 옳바른 DNA-서열을 지니고 있다. 바실러스 균주 DSM 5776 DNA에서 유래한 인서트를 지닌 프라즈미드를 pL2-22-11, DSM 5777 DNA에서 유래한 인서트를 지닌 프라즈미드를 pL4-2-14 및 DSM 5778 DNA에서 유래한 인서트를 지닌 프라즈미드를 pL11-8-20이라 명하여졌다.

이 프라즈미드는 여러 종류의 제한효소로 절단되었고, 얻어진 DNA 절편 들은 아가로즈 겔상에서 전기영동에 의해 분리되었다. 그리고 이러한 밴드 모형으로부터 전술한 프라즈미드 내의 리파제 유전자의 인서트에 대한 임시적인 제한 지도를 작성하였다. 상기한 프라즈미드내의 리파제 유전자의 인서트에 대한 제한 효소의 인식 부위에 대한 임시적 순서는 다음과 같다. 크기 약 3.5 키로베이스의 pL2-22-11 내의 인서트: ClaI, PvuII, NcoI, XbaI, AcyI, PvuII, MluI, EcoRV, Bc1I, EcoRV; 크기 약 2.6 키로베이스의 pL4-23-14 내의 인서트: EcoRV, ClaI, NcoI, XbaI, AvaII, ClaI, BglII, XbaI, EcoRV; 크기 약 1.7키로베이스의 pL11-8-20 내의 인서트:NcoI, AvaII, ClaI, XbaI, EcoRV.

[실시예 5]

[리파제 유전자의 발현 및 바실러스 리파제의 지방 분해 역가 측정과 확인 방법]

프라즈미드 pL2-22-11, pL4-23-14 및 pL11-8-20등을 새로이 바실러스 서틸리스 PSL 1 균주에 형질전환시키고 이를 배양하였다. 프라즈미드 pL2-22-11을 바실러스 균주 DSM 5776에, PL4-23-14을 바실러스 균주 DSM 5777 그리고 pL11-8-20을 바실러스 균주 DSM 5778에 각각 형질전환 시킨 후 배양한다.

대조균주로 형질전환하지 않은 바실러스 서틸리스 PSL 1, pUB110 프라즈미드로 형질전환시킨 서틸리스 PSL 1, 리파제 유전자의 분리에 이용되었던 원래의 바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 pUB 110 프라즈미드로 형질전환된 이 원 바실러스 균주 들도 배양되었다. 형질전환은 실시예 4의 S. Chang and N. Cohen 의 방법에 따른다. 프라즈미드 pL2-22-11, pL4-23-14 및 pL11-8-20로 형질전환된 바실러스 균주와 대조균주는 50ml 전배양 배지 (1.5% 트립톤, 1% 효모추출물, 2% 전분)를 담은 진탕프라스크에서 섭씨 37도, 18 시간 280 RPM으로 배양된다. 이 배양액 1.5ml를 본배양 배지 (1.0%트윈 80, 1% 트립톤, 1% 효모추출물, 4% 전분, 2% 대두분)를 담은 진탕프라스크에서 섭씨 37도, 350rpm 으로 배양한다. 프라즈미드를 가진 균주를 위한 배지는 추가로 10㎍ 네오마이신/ml를 함유한다. 바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778 및 그의 프라즈미드를 지닌 전환체 들을 위한 배지는 추가로 1 리터 배지당 10ml의 소디움 카보네이트(1 몰농도,pH 9.75)를 함유한다.

48시간 후에 배양액에서 시험액을 취하여 원심분리한 후, 실시예 8에서 기술하는 바와 같이, 지방 분해 역가를 측정한다. 표 2에 이의 역가 측정 결과를 나타낸다.

[표 2]

바실러스 균주	역 가 (U/ml)
바실러스 서틸리스 PSL 1	<0,1
바실러스 서틸리스 PSL 1 (pUB110)	<0,1
바실러스 서틸리스 PSL 1 (pL2-22-11)	5,3
바실러스 서틸리스 PSL 1 (pL4-23-14)	7,2
바실러스 서틸리스 PSL 1 (pL11-8-20)	6,4
바실러스 DSM 5776	4,8
바실러스 DSM 5776 (pUB110)	4,5
바실러스 DSM 5776 (pL2-22-11)	112
바실러스 DSM 5777	6,2
바실러스 DSM 5777 (pUB110)	5,8
바실러스 DSM 5777 (pL4-23-14)	224
바실러스 DSM 5778	5,8
바실러스 DSM 5778 (pUB110)	5,2
바실러스 DSM 5778 (pL11-8-20)	153

[실시예 6]

[바실러스 균주 DSM 5776, DSM5777 및 DSM 5778 유래의 바실러스-리파제 구조 유전자의 서열 확정]

바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778 DNA 유래의 리파제 유전자 인서트를 지닌 프라즈미드를 각기 다양한 제한효소로 절단한다. 가 세개의 리파제 유전자 인서트로 부터 한 군의 절편을 얻는다. 이로부터 리파제 역가를 나타내는 가장 작은 절편을 일반적 방법에 의 바실러스 서틸리스 PSL 1을 숙주로 서브크로닝 (Subclooning)한다. 이로 부터 얻어낸 프라즈미드는 각각 다음과 같은 크기의 리파제 유전자를 지닌 인서트 절편을 가지고 있다: 바실러스 균주 DSM 5776, 약 1.45 킬로베이스의 DNA 절편; 바실러스 균주 DSM 5776, 약 1.38 키로베이스의 DNA 절편; 바실러스 균주 DSM 5776, 약 1.09 키로베이스의 DNA 절편.

상기로 부터 얻은 리파제 유전자 절편을 지닌 프라즈미드는 다음과 같이 구조 유전자의 서열을 확정할 수 있다. 각 프라즈미드는 제한효소를 이용 절단되고, 단일나선 DNA를 만들기 위해 파지미드 (Phagemid) pBS(+) 혹은 pBS(-)로 옮겨진다. 파지미드 (Phagemid) pBS (+/-)은 스트라타진 (Stratagene) (La Jolla, Califonia)으로 부터 유래한 것이다. 각 분리된 파지미드를 지닌 리파제유전자의 핵산서열은 알려진 방법, 예를 Sanger 등의 디옥시-쳬인터미네이터-방법(1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA74:5436) 혹은 Maxma 등의 염기 선택적인, 단일나선 DNA의 화학적 분해 방법 (1980, in Methods in Enzymology, Grossmann L., Modave K., eds., Academic Press Inc., New York and London, Vol. 65, 499)에 따라 확정된다.

바실러스 균주 DSM 5776의 DNA 절편으로 부터 알아낸 핵산서열 및 리파제의 아미노산 서열은 제1도에 보여주고 있다. 완성된 리파제의 아미노산 서열의 시작은 리파제의 엔(N)-터미날의 말단 서열을 측정하여 알 수 있다. 바실러스 균주 DSM 5777 및 DSM 5778의 DNA-서열과 아미노산 서열은 동일한 방법으로 확정하였다.

바실러스 균주 DSM 5777의 리파제 아미노산 서열은 제1도에서와는 달리 149위치에서 이소류이신 대신 발린(Valin)이 존재하는 차이 밖엔 없다. 그리하여 제1도의 아미노산 서열과 99%이상의 동질성을 지닌다.

바실러스 균주 DSM 5778의 리파제 아미노산 서열은 제1도의 서열과는 7 군데에서 아래와 같이 차이가 난다: 위치 20에서 Phe 대신 Tyr: 위치 27-28에서 Ala-Thr 대신 Val-Gly; 위치 57과 147에서 각각 Arg 대신 Lys; 위치 149-150에서 Ile-Leu 대신 Val-Gln. 그리하여 바실러스 균주 DSM 5778의 리파제 아미노산

서열은 제1도의 아미노산 서열과 96%이상의 동질성을 지닌다.

[실시예 7]

[프라즈미드 pUB 110의 분리 및 정제]

바실러스 서틸리스 BD366 (Bacillus Genetic Stock Center 1 E 6)으로 부터 T.J. Gryczan 등의 방법(1978, J Bacteriol. 134:318-329)에 따라 프라즈미드 pUB110이 분리되었고 Maniatis 등의 방법에 따라 케시움크로라이드-밀도구배 원심분리에 의해 정제되었다. 벡터 pUB110는 제한효소 BamHI에 대해 오직 한 군데의 제한위치를 가지며, 미-커로서 네오마이신에 대한 항생물질 저항성을 코드하는 DNA 서열을 가지고 또한 바실러스 종에서 증식에 필요한 DNA-서열을 지녔다.

[실시예 8]

[바실러스-리파제의 역가 측정]

리파제는 분휴 E.C.3.1. (Enzyme Commission에 따른 분류)의 트리아실그리세롤-아실-하이드로라제로서 긴 사슬의 지방산으로 된 트리그리세라이드를 가수분해하는 효소이다. 리파제가 작용하는 부위는 미세 지방구와 수층 사이의 경계면이다. 이것으로 보아도 리파제는 수용성인 기질을 분해하는 에스터라제와는 구별된다. 리파제 역시 수용성 기질을 분해할 수 있지만 계면에 유화된 지방의 반응에 대한 영향은 확실한 것이다. 그에 따라 리파제의 기질 농도는 mol/1 대신 ㎡/1으로 표기된다. 기질의 유화 및 재현성 있는 기질 에멀젼을 만드는 것은 리파제 역가 측정에 아주 큰 의미를 지닌다. 유화제로 쓰이는 것은 예를 들어 아라비아 검, 폴리비닐알콜 혹은 소디움디옥시코레이트를 들 수 있다.

가수분해의 산물인 지방산은 보통 적정에 의해 측정된다. 알려진 적정방법의 보충 수단으로 여기에선 반응이 진행되는 동안 자동 pH측정 장치에 의해 직접적인 연속 적정 방법을 행하였다. 이러한 방법을 사용시, 기질로 긴 사슬의 지방을 사용할 때 개략적인 그의 pka 값이 pH (pH) 9정도 인 것에 유의해야 한다. 측정이 낮은 pH 값에서 행해지면, 오직 형성된 산물의 일부 만이 적정에 의해 측정된다. 개략적인 pka 값은 염화나트리움을 첨가함으로써 영향을 받게 된다.

[역가 측정 방법]

-기질 에멀젼: 트리오레인 10g, 아라비아 검 10g, 이중 증류수 100ml.

에멀젼은 실험실용 믹서로 15분간 높은 회전수로 유화시킨다.

-완충용액: 염화나트리움 100mM; 염화칼슘 2수화물 20mM

-알카리용액: 수산화나트리움 10mM

-온도: 섭씨 30도

-pH-자동측정 장치: pH 측정기, 제어장치, 펌프와 알카리용액

소모량 표식장치로 이루어짐

[실험방법]

20ml 완충액과 10ml 기질에멀젼을 잘 섞은 후 섭씨 30 도로 데운다음 혼합액의 pH를 9.5로 한다. 0.2-0.5ml의 시료액 및 공시험액(시험액과 성분은 같으나 리파제의 역가가 없는; 열처리에 의해 역가를 불활성화 시킨다)을 가한 후 pH 값을 알카리 용액으로 항상 9.5가 되도록 적정한다. 알카리액 소모량은 전 시험기간 동안을 통하여 표식 장치에 표시된다. 1 단위 (Unit)의 리파제 역가는 위의 조건에서 분당 1㎛ol의 지방산을 생성하는 것에 해당된다.

[실시예 9]

[바실리스-리파제의 효소 특성의 측정]

적정 온도, 열 안정성, 적정 pH 및 pH 안정성 등의 효소 특성을 측정하기 위해서, 배양액 중의 균체를 제거할 목적으로, 실시예 5에서 바실러스 배양액으로부터 얻은 배양 여액을 30분간 중력의 100,000배로 원심분리 한다.

원심분리하여 얻은 투명한 상등액을 다음의 A) 에서 D)까지의 측정에 사용한다.

A) 배양 여액에 함유한 리파제의 적정 온도를, 실시예 8에 서술된 역가 측정 방법을 이용하여 측정한다. 온도는 섭씨20 도에서 50도까지 변화사켰다. 결과는 표 3 및 제2도, 제3도와 제4도에 나타내었다.

바실러스 균주 DSM 5776 유래의 리파제는 적정온도가 섭씨 30도 (제2도).

바실러스 균주 DSM 5776 유래의 리파제는 적정온도가 섭씨 30도 (제4도).

[표 3]

바실러스 유래의	리파제 역가 %, 섭씨 온도의 영향에 따른				
알카리성 리파제	20	24	30	40	50
DSM 5776	66.8	-	100	74.9	5.3
DSM 5777	-	81.2	90.4	100	15.9
DSM 5778	64.7	-	100	68.4	3.2

B) 열 안정성을 측정하기 위하여 리파제 함유한 여액을 30 분간 각 온도에서 방치한 후 실시예 8에서 기술한 역가 측정법에 따라 잔존 역가를 측정하였다. 결과는 표 4 및 제5도, 제6도와 제7도에 나타내었다.

바실러스 균주 DSM 5776 유래의 리파제는 섭씨 40도까지 안정하였으며 섭씨 50도에서 30분 간 방치 후에도 16.1%의 잔존 역가를 보였다. (제5도).

바실러스 균주 DSM 5777 유래의 리파제는 섭씨 40도까지 안정하였으며 섭씨 50도에서 30분 간 방치 후에도 21.3%의 잔존 역가를 보였다. (제6도).

바실러스 균주 DSM 5778 유래의 리파제는 섭씨 40도까지 안정하였으며 섭씨 50도에서 30분 간 방치 후에도 22.5%의 잔존 역가를 보였다. (제7도).

[표 4]

바실러스 유래의	리파제 역가 %, 방치온도의 영향에 따른				
알카리성 리파제	30	40	50	60	70
DSM 5776	105	100	16	2	2
DSM 5777	96	102	22	9	-
DSM 5778	95	90	24	0	-

C) 바실러스-리파제의 적정 pH를 측정하기 위하여 여러 pH 중에서 실시예 8에서 기술한 역가 측정법에 따라 측정하였다. pH 값이 9보다 낮은 경우 효소의 분해 산물 측정이 어려운 관계로 여기에선, 연속적이 아니라 pH가 최초 9.5까지 반응이 경과된 후 부터 측정하였다. 결과는 표 5 및 제8도, 제9도와 제10도에 나타내었다.

바실러스 균주 DSM 5776 유래의 알카리성 리파제의 적정 pH 9.5 pH 10에서도 역가는 90% 이상 (제8도).

바실러스 균주 DSM 5777의 알카리성 리파제의 적정 pH는 약 10(제9도).

바실러스 균주 DSM 5778 유래의 알카리성 리파제의 적정 pH는 9. 그러나 pH 10에서도 최대역가의 80% 이상 존재한다. (제10도).

[표 5]

바실러스 유래의	리파제 역가 %, pH의 영향에 따른								
알카리성 리파제	5	6	7	7.8	8	9	9.5	10	10.5
DSM 5776	-	53	65	76	-	95	100	95	55
DSM 5777	30	56.8	76	-	88	92.2	99.8	100	78
DSM 5778	25	53	73	-	88	100	93.5	80	40

D) pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여 리파제를 여러 pH 값을 지닌 완충용액 중에서 21 시간, 섭씨 4도에서 방치하였다. 실시예 8에서 기술한 역가 측정법에 따라 잔존역가를 측정하였다. pH 범위 5에서 7까지에는 포스페이트 버퍼를, 7에서 9까지에는 트리스-염산-버퍼 (Tris(hydroxymethyl) aminoethane-Buffer) 그리고 9 에서 12.8까지는 글라이신/나트리움하이드록사이드-버퍼를 사용하였다. 결과는 제11도, 제12도와 제13도에 나타내었다.

바실러스 균주 DSM 5776 유래의 효소는 pH 범위 5에서 11까지 안정하였으며 pH 12에서 21시간 방치 후에도 22%의 잔존역가를 보였다. (제11도).

바실러스 균주 DSM 5777 유래의 효소는 pH 범위 6에서 11까지 안정하였다. (제12도)

바실러스 균주 DSM 5778 유래의 효소는 pH 범위 6.5에서 11.5까지 아주 안정하였다. (제13도)

[실시예 10]

[세탁시험]

바실러스 균주 DSM 5776, DSM 5777 및 DSM 5778로 얻은 바실러스-리파제의 세탁효능을 저온에서 표준 세탁제제를 이용한 세탁시험을 통하여 측정하였다. 결과에 의하면 본 발명에 따른 바실러스-리파제는 저온에서도, 일반 세탁제가 오일이나 지방 오물질을 거의 제거하지 못하는 데 비해, 월등하게 세탁제에 이용될 수 있음을 보여준다.

A) 시험 섬유조직

세탁제로써 응용을 위해, 효소의 적합성에 관하여 세탁시험을 함으로서 검토하였다. 이를 위해 특수한 시험 섬유조직을, 예를 들어 세인트 갈렌 (St. Gallen, Swiss)에 있는 연방 재료시험 및 연구소 (Eidgenoessische Materialpruefungs- und Vesuchsanstalt = EMPA)로 부터 구입할 수 있다. EMPA에서 취급하는 섬유조직은 원래 세탁용 프로테아제의 시험에 염두를 둔 것이다. 세탁용 리파제를 위해서는 특별히 가공된 섬유가 필요하다. 예를 들어 시험 섬유는 부분적으로 오일 혹은 색소, 단백질과 오일로 오염되 있거나 또는 전체가 오리브유 등으로 흡착되어져야 한다.

다음의 세탁실험을 위해 면포를 오리브유로 적시고 과량의 오일은 없애도록하였다. 그 후 면포를 섭씨 30도에서 건조시킨다. 지방의 노화를 방지하기 위하여 필요시 까지 섭씨 4도에서 질소 중에 보관 한다.

B) 세탁시험 방법

세탁시험을 위하여 A)에서 제작된 시험포를 적당한 크기, 예를 들어 5㎝ × 5㎝ 크기로 자른다. 이 시험표 조각을 Linitest 세탁기내에서, 다음과 같은 성분을 지닌, 퍼버레이트 (Perborate)를 함유한 IEC-시험세탁제 (농축액 6g/1)로 된 100ml의 알카리 세탁액으로 섭씨 40도에서 30분간 세탁한다.

퍼보레이트 (Perborate)를 함유한 IEC-시험세탁제, 타입 1 (Lever Sunlicht GmbH, Mannheim): 6.4 중량% 직선형 알킬설페이트, 2.3 중량% 에톡시화된 지방 알콜(14% 에톡시기를 지닌), 2.8 중량% 나트리움 비누, 35 중량% 나트리움트리폴리포스페이트, 6 중량% 나트리움 실리케이트, 1.5 중량% 마그네시움실리케이트, 1 중량% 카복시메틸셀뤌로즈, 0.2 중량% 에틸렌다이아민테트라아세테이트 (EDTA), 0.2 중량% 선명도 향상제 (Stilbentype), 16.8 중량% 나트리움설페이트 그리고 7.8 물중량%, 분무건조된 분말로서 표백촉진제가 없고 20 중량%의 나트리움퍼보레이트 4수화물을 포함한다.

면포를 15° dH(독일식 물의 경도)의 물로 세척한다. 이것을 수돗물로 씻는다. 그와같은 세탁과정을 5번 반복한다. 전체 세탁과정이 끝난 수 직물 조각을 다시 한번 수돗물로 씻은 후 건조시키고 붙어있는 잔존 오일을 크로로포름으로 추출한다. 이렇게 얻은 잔존 오일의 양을 중량을 재어 측정하였다. 이런 방법으로 리파제 간의 차이점을, 즉 효소 들을 세탁제에 사용하는 것이 부적합 한지, 그런데로 적합한 지 아니면 아주 적합지 지를 잘 알 수 있게 해준다. 알카리 세탁액 주의 일부에, 바실러스-리파제의 세탁 능력과 프로테아제 대한 안정성을 살피기 위해, 추가로 세탁용 프로테아제를 첨가하였다. 첨가된 리파제 역가는 5 DU/ml (DU=Delft Unit). 알카리 세탁액에서 첨가된 리파제 역가는 다음과 같이 결과와 함께 요약하였다.

바실러스 균주 DSM 5776 에서 유레한 알카리성 바실러스-리파제를 이용한 세탁 시험, 알카리 세탁액 내에서의 리파제 농도는 60 U/ml (제14도 역시 참조).

알카리 세탁액	잔존 오일, 중량%
IEC-시험세탁제 (대조구)	100
IEC-시험세탁제 + 리파제	54.5
IEC-시험세탁제 + 리파제 + 알카리 프로테아제	57.0

바실러스 균주 DSM 5777에서 유래한 알카리성 바실러스-리파제를 이용한 세탁 시험, 알카리 세탁액 내에서는 리파제 농도는 45U/ml(제15도 역시 참조).

알카리 세탁액	잔존 오일, 중량%
IEC-시험세탁제 (대조구)	100
IEC-시험세탁제 + 리파제	44.9
IEC-시험세탁제 + 리파제 + 알카리 프로테아제	50.0

바실러스 균주 DSM 5778에서 유래한 알카리성 바실러스-리파제를 이용한 세탁 시험, 알카리 세탁액 내에서는 리파제 농도는 55U/ml(제16도 역시 참조).

알카리 세탁액	잔존 오일, 중량%
IEC-시험세탁제 (대조구)	100
IEC-시험세탁제 + 리파제	54.5

IEC-시험세탁제 + 리파제

+ 알카리 프로테아제 57.0

이 결과는 본 발명에 따른 바실러스-리파제가 세탁제에 아주 적합함을 나타낸다. 본 발명에 따를 리파제는 대조구에 비하여 잔존오일의 양을 아주많이 낮추었으며 세탁용 프로테아제 존재하에서도 세정 능력을 잃지 않았다.

[실시예 11]

[알카리성 세탁용 프로테아제를 첨가 혹은 미첨가한 알카리 세탁액 중에서 바실러스-리파제의 안정성]

알카리성 세탁용 프로테아제를 첨가 혹은 미첨가한 알카릴 세탁액 중에서 본 발명에 따른 리파제의 안정성을 증명하기 위하여 실시예 10에서 행한 바와 같이 세탁시험을 행하였다. 세탁과정의 시작 (시간=0)에서 부터 끝 (시간=30)까지 실시예 8에서와 같이 리파제의 역가를 측정하였다. 세탁과정이 시작될 때의 초기역가와 비교하여 과정이 끝났을 때의 상대적 잔존역가를 다음에 나타냈다.

알카리 세탁액	상대적 잔존역가%
바실러스 DSM 5776 유래의 리파제	50.5%
바실러스 DSM 5776 유래의 리파제 + 알카리성 프로테아제	47.5%
바실러스 DSM 5777 유래의 리파제	69.4%
바실러스 DSM 5777 유래의 리파제 + 알카리성 프로테아제	65.5%
바실러스 DSM 5778 유래의 리파제	49.9%
바실러스 DSM 5778 유래의 리파제 + 알카리성 프로테아제	42.3%

이 결과는 본 발명에 따른 알카리성 바실러스-리파제가 알카리 세탁액 혹은 프로테아제에 대하여서도 아주 좋은 안정성을 가진다는 것을 보여주고 있다. 본 발명에 따른 리파제는 그리하여 세탁제 성분으로, 특히 프로테아제를 함유한 세탁 성분에도 아주 적합하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

제1도에 표시된 아미노산 서열과 70%이상의 동질성을 지닌 단백질로서 지방 및 지방산에스터 화합물을 분해하는 능력이 있고, 적정 pH는 9 내지 10, 적정 온도 30 내지 40℃이며, pH 6.5 내지 11 사이에서 매우 안정하고, pH 11, 4℃에서 21시간 방치후 90%이상의 효소역가가 잔존하며, 40℃에서 30분 방치후 90%이상의 효소역가가 잔존하는 것을 특징으로 하는 바실러스 퓨미러스(Bacillus pumilus) DSM 5776, DSM 5777 또는 DSM 5778 균주 유래의 알카리성 바실러스-리파아제.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1도에 표시된 아미노산 서열과 80%이상의 동질성을 지닌 알카리성 바실러스-리파아제.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 알카리성 바실러스-리파아제를 코딩하는 DNA 서열.

청구항 4

제5항에 있어서, 제1도에 표시된 아미노산 서열과 90%이상의 동질성을 지닌 알카리성 바실러스-리파아제를 코딩하는 DNA 서열.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 따른 알카리성 바실러스-리파아제를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 플라스미드인, 미생물의 형질전환에 적합한 벡터.

청구항 6

제5항에 따른 벡터로 형질전환된, 알카리성 바실러서-리파제의 발현에 적합한 형질전환된 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물을 바실러스 서티리스(Bacillus subtilis), 바실러스 알카로피러스(Bacillus alcalophilus), 바실러스 리케니포르미스(Bacillus licheniformis) 또는 바실러스 아미로리퀴파시엔스(Bacillus amyloliquefaciens)인 형질전환된 미l생물.

청구항 8

바실러사 퓨미러스 DSM 5776 균주.

청구항 9

제1항에 또는 제2항에 따른 알카리성 바실러스-리파제를 함유하는 세탁, 세정, 표백 혹은 식기세정을 목적으로 하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 프로테아제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 저온의 사용온도를 위한 조성물.

청구항 12

제6항 또는 제7항에 따른 미생물 또는 바실러스 퓨미러스를 배양한 후, 생성된 알카리성 바실러스-리파제를 분리함으로써 제1항 또는 제3항에 따른 알카리성 바실러스-리파제를 생산하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 바실러스 퓨미러스는 DSM 5776, DSM 5777 또는 DSM 5778 균주인 방법.

청구항 14

바실러스 퓨미러스 DSM 5777 균주.

청구항 15

바실러스 퓨미러스 DSM 5778 균주.

청구항 16

제10항에 있어서, 저온의 사용온도를 위한 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 사용온도는 30 내지 40℃인 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 사용온도는 30 내지 40℃인 조성물.

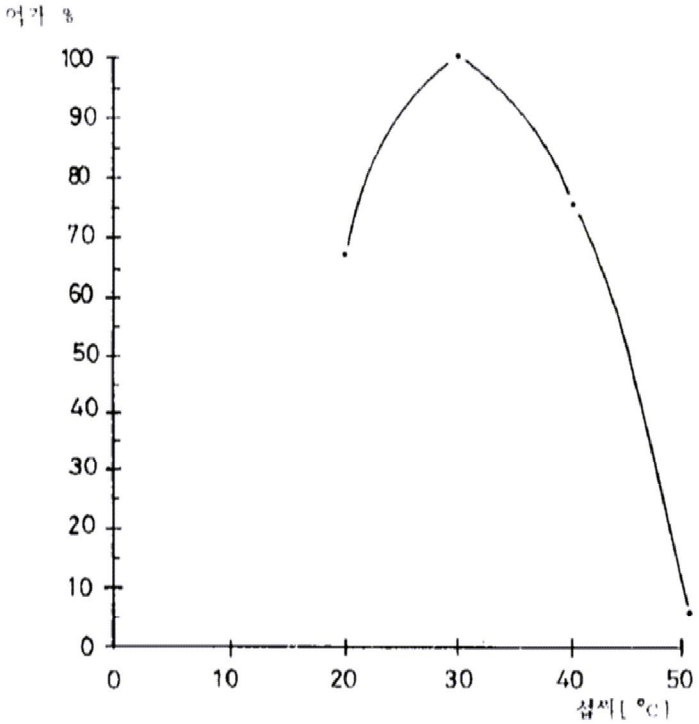
도면

도면1

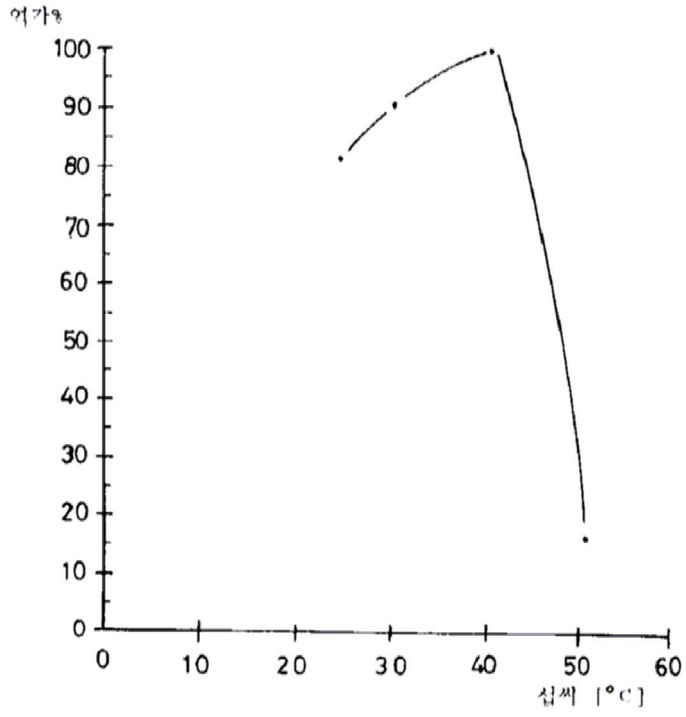
서열의 종류 : 핵산과 해당 단백질
서열의 길이 : 793 염기쌍
나선의 형태 : 단일나선
형태(혹은 위상) : 직선형
분자의 종류 : 유전 DNA
기 원 :
미생물(혹은 균주) : 바실러스 퓨미러스
균종 : DSM 5776
한 고 :
완성된 단백질의 222에서 764까지의 염기쌍

```
CCAAGGTGCT TTTIGATTAT TTATATTTTT GTAAAATCAT CTCATAAACA                50
TTACCTTGTT CACTTTTCTG ACATATTTTT CTTGTATAAA ATAGAGTCGT               100

ATAAGATGAA TAAGGGGGAA TGAAA GTG ATT TTT GTT AAG AAA                  143
                            Met Ile Phe Val Lys Lys
                             -30

AGG AGT TTG CAA ATT CTC ATT GCG CTT GCA TTG GTG ATT                  182
Arg Ser Leu Gln Ile Leu Ile Ala Leu Ala Leu Val Ile
    -25          -20                     -15

GGT TCA ATG GCG TTT ATC CAG CCG AAA GAG GCG AAG GCG                  221
Gly Ser Met Ala Phe Ile Gln Pro Lys Glu Ala Lys Ala
           -10                  -5                  -1

GCT GAG CAT AAT CCG GTT GTG ATG GTG CAC GGC ATT GGC                  260
Ala Glu His Asn Pro Val Val Met Val His Gly Ile Gly
  1               5                  10

GGT GCC TCT TAT AAC TTT TTT TCT ATT AAA AGT TAT TTG                  299
Gly Ala Ser Tyr Asn Phe Phe Ser Ile Lys Ser Tyr Leu
     15                  20                  25

GCC ACA CAA GGC TGG GAT CGA AAC CAA TTA TAT GCT ATT                  338
Ala Thr Gln Gly Trp Asp Arg Asn Gln Leu Tyr Ala Ile
          30                  35

GAT TTC ATA GAC AAA ACA GGA AAT AAC CGC AAC AAT GGT                  377
Asp Phe Ile Asp Lys Thr Gly Asn Asn Arg Asn Asn Gly
 40                  45                  50

CCG CGT CTA TCG AGA TTC GTC AAA GAT GTG TTA GAC AAA                  416
Pro Arg Leu Ser Arg Phe Val Lys Asp Val Leu Asp Lys
     55                  60                  65

ACG GGT GCC AAA AAA GTA GAT ATT GTG GCT CAT AGT ATG                  455
Thr Gly Ala Lys Lys Val Asp Ile Val Ala His Ser Met
          70                  75

GGC GGA GCG AAC ACG CTA TAC TAT ATC AAG AAT CTA GAT                  494
Gly Gly Ala Asn Thr Leu Tyr Tyr Ile Lys Asn Leu Asp
 80                  85                  90

GGC GGC GAT AAA ATT GAG AAC GTT GTC ACA ATT GGT GGA                  533
Gly Gly Asp Lys Ile Glu Asn Val Val Thr Ile Gly Gly
          95                  100

GCA AAC GGA CTC GTT TCA AGC AGA GCA TTA CCA GGC ACA                  572
Ala Asn Gly Leu Val Ser Ser Arg Ala Leu Pro Gly Thr
105                 110                 115

GAT CCA AAT CAA AAA ATT CTT TAC ACA TCC GTC TAT AGC                  611
Asp Pro Asn Gln Lys Ile Leu Tyr Thr Ser Val Tyr Ser
          120                 125                 130

TCA GCA GAT CTT ATT GTC GTC AAC AGC CTC TCT CGT TTA                  650
Ser Ala Asp Leu Ile Val Val Asn Ser Leu Ser Arg Leu
               135                 140

ATT GGC GCA AGA AAC ATC CTG ATC CAT GGC GTT GGT CAT                  689
Ile Gly Ala Arg Asn Ile Leu Ile His Gly Val Gly His
     145                 150                 155

ATC GGT CTA TTA ACC TCA AGC CAA GTG AAA GGG TAT ATT                  728
Ile Gly Leu Leu Thr Ser Ser Gln Val Lys Gly Tyr Ile
          160                 165

AAA GAA GGA CTG AAC GGC GGA GGA CAA AAT ACG AAT TAAAAAACGA           774
Lys Glu Gly Leu Asn Gly Gly Gly Gln Asn Thr Asn
170                 175                 180

AAAAAGACAG CGGCATATG                                                793
```

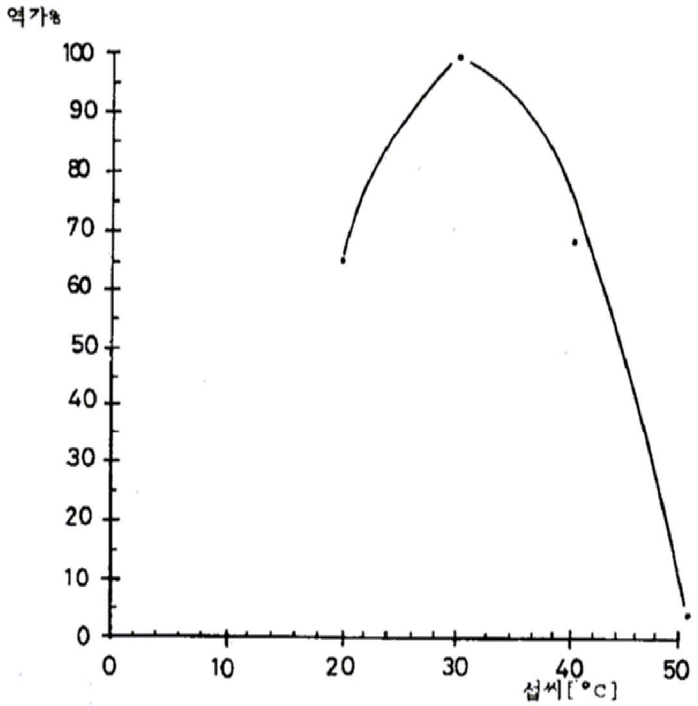
도면2


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50

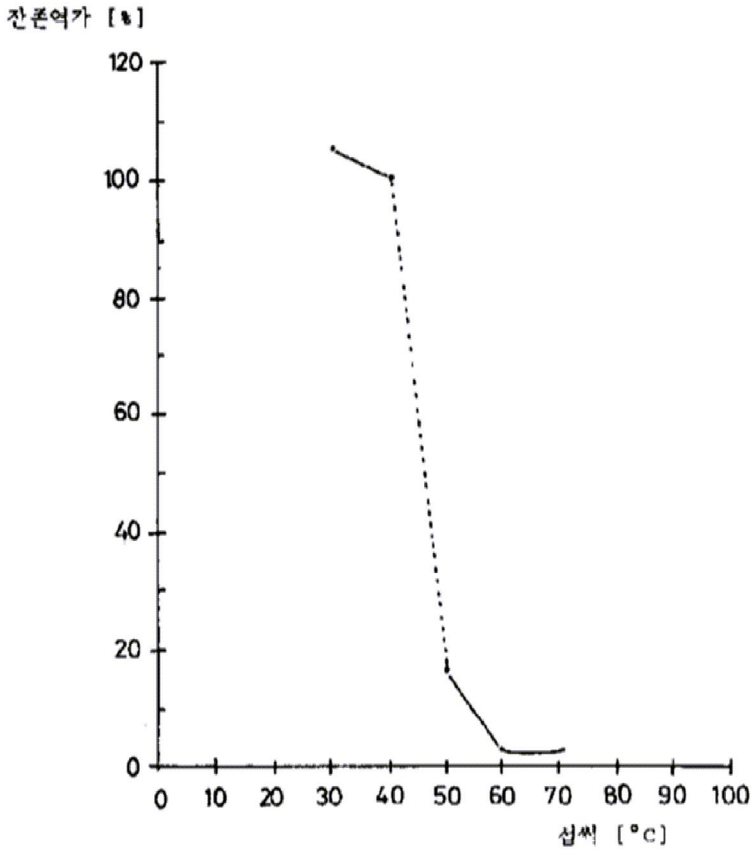
도면3


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60

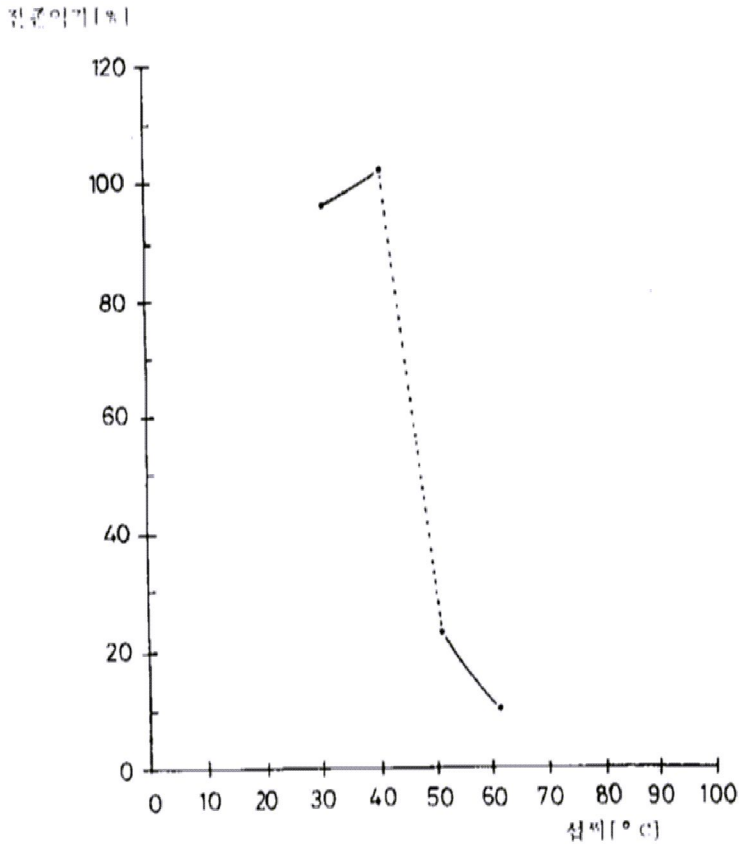
도면4


역가%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
섭씨[°C]

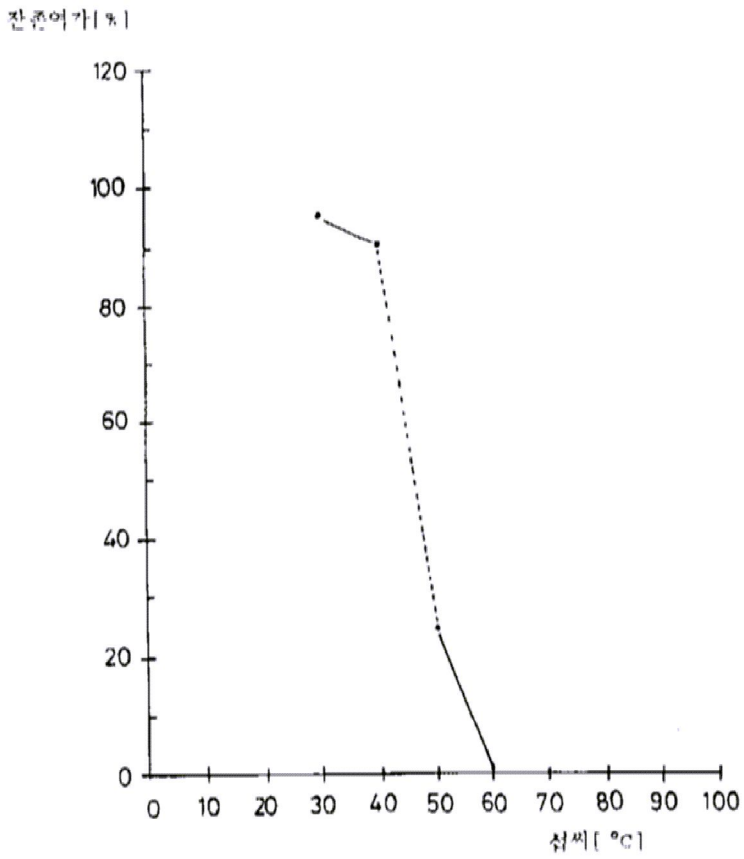
도면5


잔존역가 [%]
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
섭씨 [°C]

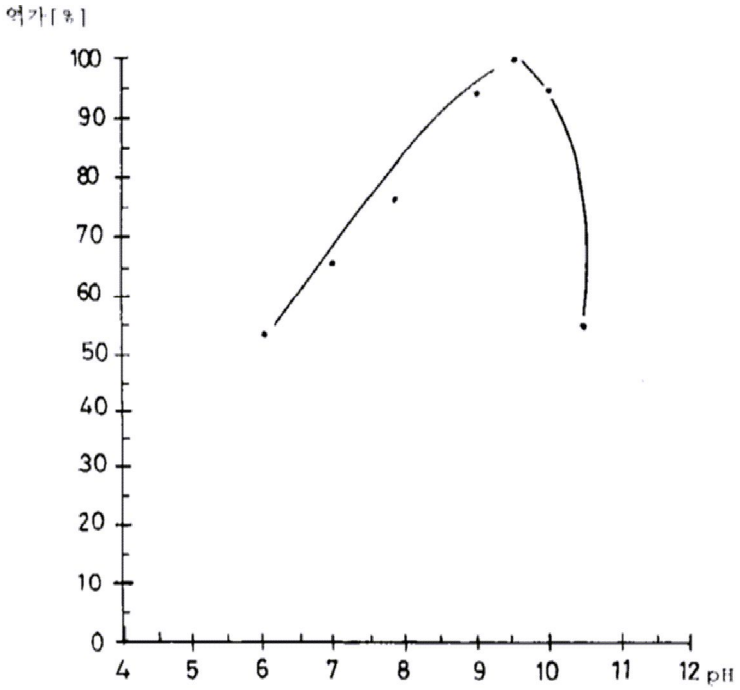
도면6


잔존억제[%]
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
섭씨[°C]

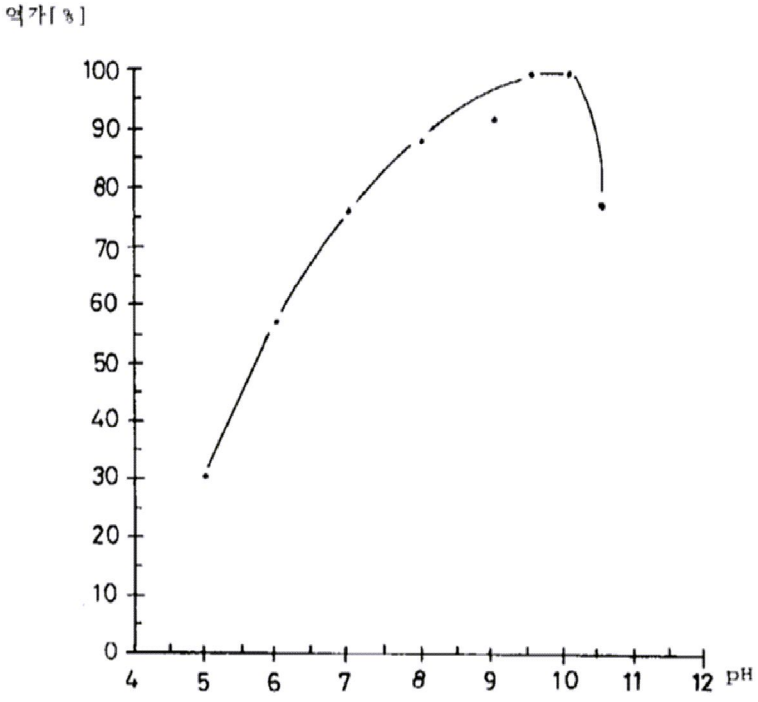
도면7


잔존억제[%]
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
섭씨[°C]

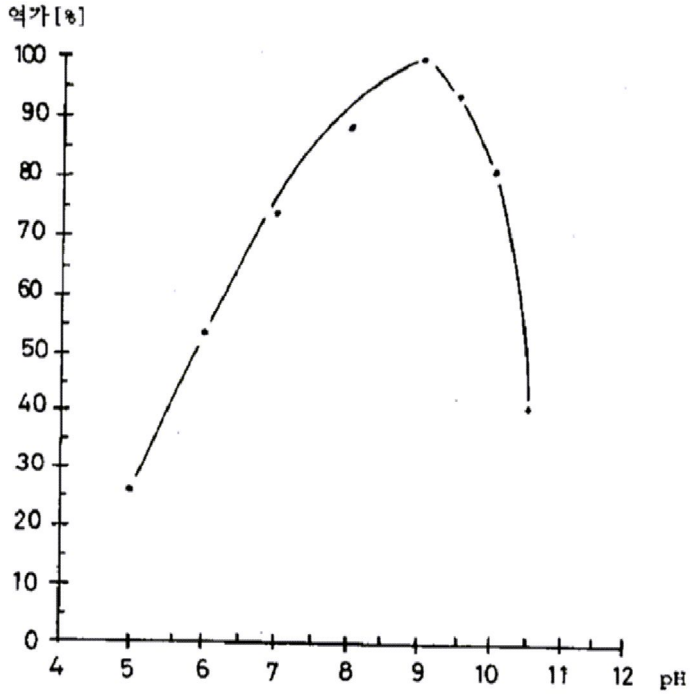
도면8


역가[%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH

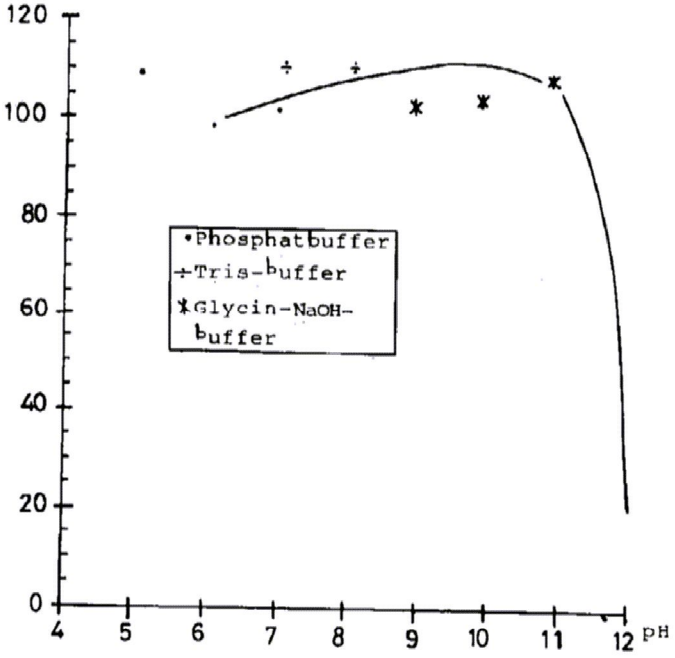
도면9


역가[%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH

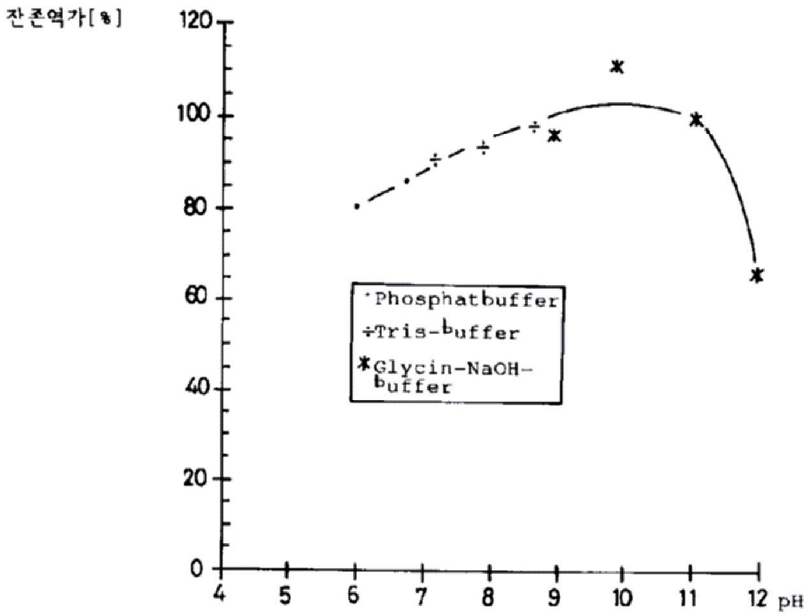
도면10


역가[%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH

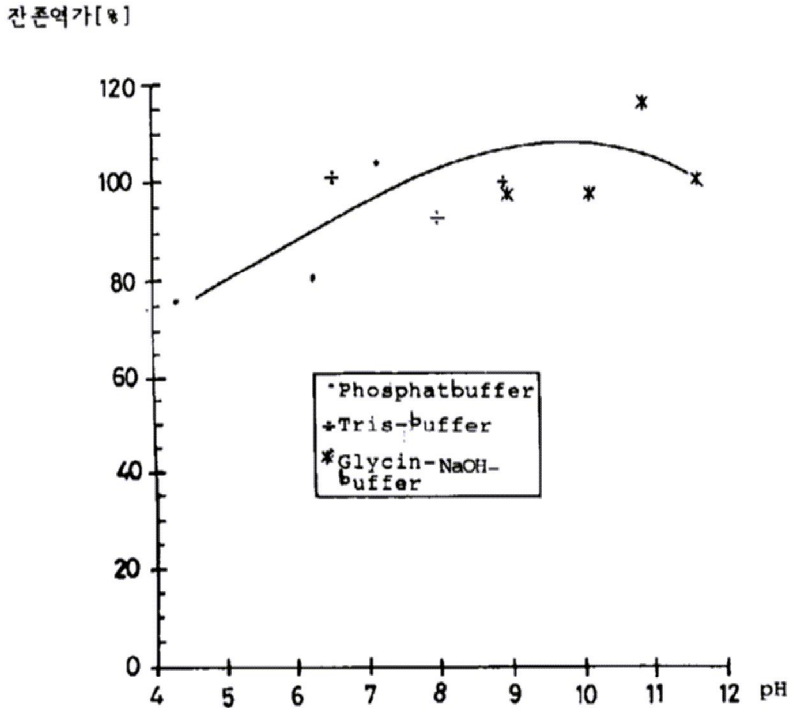
도면11


120
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH
•Phosphatbuffer
÷Tris-buffer
*Glycin-NaOH-buffer

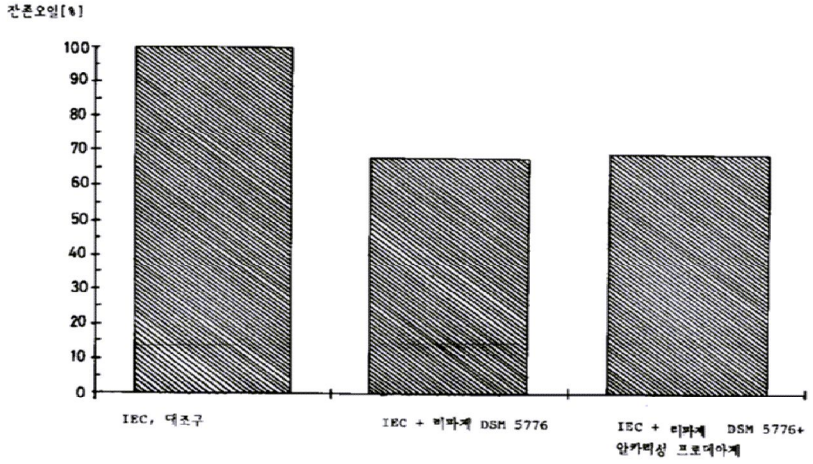
도면12


잔존역가[%]
120
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH
·Phosphatbuffer
÷Tris-buffer
*Glycin-NaOH-buffer

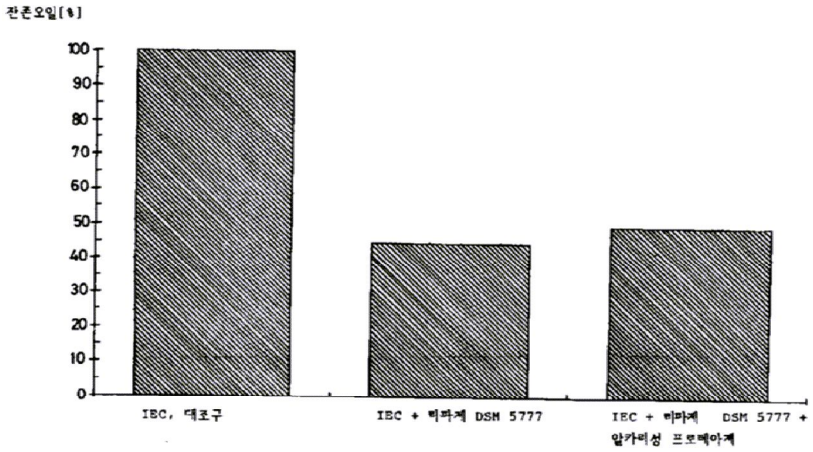
도면13


잔존역가[%]
120
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH
·Phosphatbuffer
÷Tris-buffer
*Glycin-NaOH-buffer

도면14



도면15



도면16

