(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월14일
(11) 등록번호 10-1394470
(24) 등록일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 9/16* (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
*C12N 15/63* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0153802
(22) 출원일자 2012년12월26일
심사청구일자 2012년12월26일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession No. YP_007203421: esterase/lipase [Singulisphaera acidiphila DSM 18658] (2012.12.18.)

(73) 특허권자
**한국화학연구원**
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
**송재광**
대전 유성구 배울1로 35, 405동 1701호 (관평동, 쌍용스윗닷홈)
**최지은**
대전광역시 유성구 신성동 엘림빌라 202호
**권민아**
세종 장군면 전원마을1길 35-11,
(74) 대리인
**제일특허법인**

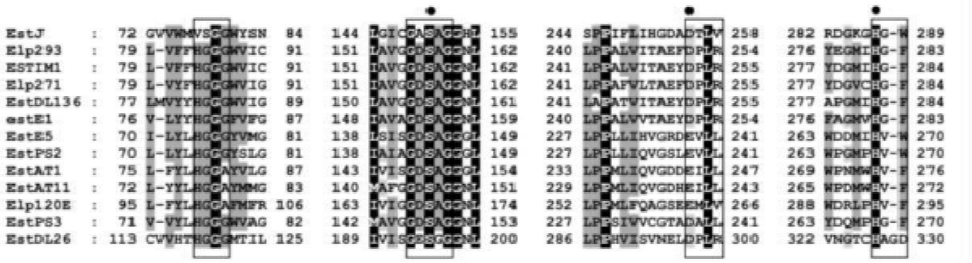
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **메타게놈 유래의 에스터라제**

## (57) 요 약

본 발명은 신규 에스터라제 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하며, 상기 에스터라제는 종래 알려진 에스터라제와는 달리 매우 넓은 범위의 pH에서 고활성을 유지하는 바, 다양한 생물학적 반응에 생물촉매로서 활용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20110027902
부처명 교육과학기술부
연구사업명 미래기반기술개발사업
연구과제명 메타게놈 라이브러리로부터 유용 효소 발굴과 이용 기술 확립을 통한 효소 탐색 통합시스템의 유효성 검증
기 여 율 1/2
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2011.08.01 ~ 2012.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011K000395
부처명 교육과학기술부
연구사업명 21세기프론티어연구개발사업
연구과제명 포화 탄화수소(alkane)의 활용을 위한 메타게놈 자원 확보 및 분해/전환효소 탐색
기 여 율 1/2
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 에스터라제.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에스터라제가 pH 6.5 내지 11.0에서 최적 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 에스터라제.

### 청구항 3

제1항의 에스터라제를 코딩하는 에스터라제 유전자.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 에스터라제 유전자가 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 에스터라제 유전자.

### 청구항 5

제3항의 에스터라제 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

### 청구항 6

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

## 명 세 서

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메타게놈으로부터 분리한 에스터라제, 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 에스터라제와 리파아제는 카르복시 에스테르 가수분해효소(carboxylic ester hydrolases, EC 3.1.1)로서, 8개의 하위그룹(family)으로 분류되며(J.L. Arpigny and K.E. Jaeger, *Biochem. J.*, 343:177-183, 1999), 에스터라제(EC 3.1.1.1)는 탄소수 10개 이하의 짧은 지방산 에스테르 결합을 분해하고, 리파아제(EC 3.1.1.3)는 탄소수 10개 이상의 긴 지방산 에스테르 결합을 가수분해한다. 최근 몇몇의 에스터라제/리파아제 유전자가 고온 환경의 침전물과 진흙, 유류 오염 토양, 퇴비, 심해 침전물, 북극지방 침전물, 침출수, 토양 등에서 추출한 메타게놈 라이브러리로부터 분리되었다(J.K. Rhee, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:817-825, 2005; C. Elend, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3637-3645, 2006; C. Elend, et al., *J. Biotechnol.*, 130:370-377, 2007; K. Lammle, et al., *J. Biotechnol.*, 127:575-592, 2007; J.H. Jeon, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81:865-874, 2009; J.H. Jeon, et al., *Mar. Biotechnol.*, 11:307-316, 2009; K. Rashamuse, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83:491-500, 2009; P. Wei, et al., *Arch. Microbiol.*,

191:233-240, 2009). 에스터라제와 리파아제는 세제, 낙농, 제지, 농약과 제지산업에서 널리 이용되고 있다(K.E. Jaeger and T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:390-397, 2002).

[0003] 메타게놈(metagenome)은 자연계에 존재하는 모든 미생물로부터 회수한 유전체를 통칭한다. 메타게놈은 특정한 미생물이 아니라, 토양미생물로부터 직접 추출하는 유전자원이기 때문에, 실험실에서 배양가능한 미생물에서 얻을 수 있는 유전자원보다도 월등하게 다양한 유전자원을 수득할 수 있고, 이러한 다양한 유전자원으로부터 종래의 단백질보다 우수한 특성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 검출할 수도 있다는 장점이 있다. 따라서, 메타게놈으로부터 에스터라제 또는 리파아제와 같은 효소를 암호화하는 유전자를 스크리닝할 경우, 종래의 에스터라제 또는 리파아제와 구별되는 특성을 나타내는 신규한 에스터라제 또는 리파아제를 암호화하는 유전자를 검출할 수도 있을 것으로 예상되고 있으나, 아직까지는 별다른 연구성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0004] 본 발명자들은 다양한 미생물이 존재하는 환경에서 구축된 다양한 메타게놈 라이브러리로부터 신규 에스터라제를 분리하였고, 상기 에스터라제의 특성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 메타게놈으로부터 분리한 신규 에스터라제를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 에스터라제를 코딩하는 에스터라제 유전자를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적에 따라, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 에스터라제를 제공한다.

[0010] 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 에스터라제를 코딩하는 에스터라제 유전자를 제공한다.

[0011] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명의 에스터라제는 종래 알려진 에스터라제와는 달리 매우 넓은 범위의 pH에서 고활성을 유지하는 바, 다양한 생물학적 반응(의약, 식품, 정밀화학, 바이오매스 처리 등)에 생물촉매로서 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 에스터라제 EstJ 및 이와 상동성을 보이는 다른 단백질과의 아미노산 서열을 비교한 것이다.

도 2는 본 발명의 에스터라제 EstJ의 계통발생트리(phylogenetic tree)를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 에스터라제 EstJ의 분자량을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다. 도 3의 첫 번째 레인(lane)은 IPTG를 넣기 전에 대장균을 채취하여 초음파분쇄(sonication)에 의해 세포를 파쇄한 후 얻은 총 단백질 용액을 로딩한 것이고, 두 번째 레인은 IPTG를 넣어준 후 세포를 파쇄하여 얻은 총 단백질 용액을 로딩한 것이며, 세 번째 레인은 IPTG를 넣고 배양한 다음, 세포를 파쇄하여 수득한 수용성 단백질 용액을 로딩한 것이고, 네 번

째 레인은 IPTG를 넣고 배양한 다음 세포를 파쇄하여 수득한 비수용성 단백질을 로딩한 것이며, 다섯 번째 레인은 상기 수용성 단백질을 정제한 후 수득한 정제 단백질을 로딩한 것이다.

도 4는 다양한 탄소 길이를 갖는 기질에 대한 본 발명의 에스터라제 EstJ의 상대 활성을 나타낸 것이다.

도 5의 A는 다양한 온도 범위에서 본 발명의 에스터라제 EstJ의 상대 활성을 나타낸 것이며, B는 다양한 온도 조건 하에서 본 발명의 에스터라제 EstJ의 잔존활성을 나타낸 것이다. 도 5의 B에서 ●는 30℃, ▽는 45℃, ■는 50℃, ◇는 55℃, ▲는 60℃ 및 ○는 65℃에서의 실험 결과이다.

도 6의 A는 다양한 pH 범위에서 본 발명의 에스터라제 EstJ의 상대 활성을 나타낸 것이며, B는 다양한 pH 조건 하에서 본 발명의 에스터라제 EstJ의 잔존활성을 나타낸 것이다. 도 6의 A 및 B에서 ●는 pH 4.5 내지 6.0 (소디움 시트레이트), □는 pH 6.0 내지 8.0(소디움 포스페이트), ▲는 pH 8.0 내지 9.0(소디움 보레이트), ◇는 pH 9.0 내지 10.0(글리신 소디움 하이드록사이드), ■는 pH 10 내지 11(소디움 카보네이트), △는 pH 11 내지 12(디소디움 하이드로젠)에서의 실험 결과이다.

도 7은 5 내지 50%의 메탄올의 존재시 본 발명의 에스터라제 EstJ의 잔존 활성을 나타낸 것이다. 도 7에서 ●는 5%, ○는 10%, ▼는 20%, ▽는 30%, ■는 40% 및 □는 50%의 메탄올 농도에서의 실험 결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0015] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 에스터라제를 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 상기 에스터라제를 코딩하는 에스터라제 유전자를 제공한다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 에스터라제 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 에스터라제는 다양한 자연환경에서 채취한 토양 시료를 이용하여 구축한 메타게놈 라이브러리(metagenome library)로부터 얻어진 것이다. 구체적으로, 메타게놈 라이브러리를 구축하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 Epicentre사의 게놈 DNA 라이브러리 생산 방법 등을 참조하여 수행될 수 있으며, 상기 구축된 메타게놈 라이브러리로부터 적절한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행함으로써, 에스터라제가 포함된 유전자 부위를 탐색할 수 있다. 이후, 상기 유전자 부위의 염기서열 분석 및 종래 알려진 서열과의 상동성 분석을 통해, 에스터라제를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있다.

[0018] 본 발명의 에스터라제는 종래 알려진 에스터라제 효소와 매우 낮은 서열 상동성을 나타낸다. 즉 본 발명의 에스터라제는 기존의 알려진 에스터라제 또는 리파아제 효소들과 최대 45%의 상동성을 나타내며, 낮게는 10% 정도의 상동성을 보인다. 구체적으로, 본 발명의 에스터라제는 젬마타 옵스쿠리글루부스(*Gemmata obscuriglobus*) UQM2246 유래의 에스터라제/리파아제와 45%, 박테리움(bacterium) Ellin514 유래의 알파/베타 가수분해효소 단백질과 42%, 박테리움(bacterium) Ellin514 유래의 또 다른 알파/베타 가수분해효소 단백질과 41% 및 스피로소마 린구알레(*Spirosoma linguale*) DSM74 유래의 에스터라제/리파아제-유사 단백질과 38%의 상동성을 나타낸다.

[0019] 본 발명의 에스터라제는 다음과 같은 효소 특성을 갖는다.

[0020] 첫째, 본 발명의 에스터라제는 긴 탄소 길이를 갖는 기질보다 짧은 탄소 길이, 예를 들어, C2 내지 C10의 길이를 갖는 기질에 대해 우수한 활성을 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 에스터라제는 파라-니트로페닐 부틸레이트(p-nitrophenyl butyrate, C4)에 대해 가장 높은 활성을 나타내며, 탄소 길이가 길어질수록 활성이 감소된다.

[0021] 둘째, 본 발명의 에스터라제는 40 내지 60℃의 범위에서 높은 활성을 나타내며(55℃에서 최대 활성), 50℃ 이하의 온도에서 60분 이상 활성을 유지한다.

[0022] 셋째, 본 발명의 에스터라제는 pH 6.5 내지 11의 범위에서 양호한 활성을 나타내고, pH 9 내지 10의 범위에서 높은 활성을 나타내며(pH 9.5에서 최대 활성), pH 5.5 내지 10.5의 범위에서 약 1시간 동안 활성을 유지한다.

[0023] 넷째, 본 발명의 에스터라제는 촉매 작용시 금속 이온을 필요로 하지 않고, 세제, 예를 들어 Triton X-100 및 트윈 80과 같은 비이온성 계면활성제의 존재시 활성이 증가되며, 유기 용매의 존재하에도 안정성을 나타내는데, 예를 들어 30% 이하 농도의 메탄올의 존재시 활성이 유지된다.

[0024] 본 발명의 에스터라제는 종래 알려진 에스터라제와는 달리, 매우 넓은 범위의 pH에서 활성 및 안정성을 나타내며, 특히 높은 pH에서도 활성을 나타내는 호염기성 에스터라제이다. 따라서, 본 발명의 에스터라제는 종래 알려진 에스터라제보다 훨씬 다양한 pH 반응 조건에서 생물촉매로 사용될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 에스터라제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 숙주 내에서 복제가능하여야 하며, 바람직하게는 프로모터 및 전사종결서열 등의 발현에 필요한 구성을 가질 수 있다. 재조합 벡터의 제조에 사용될 수 있는 벡터의 예로는, 광범위한 숙주에 있어서 복제 유지되는 RK2 복제기점을 가진 pLA2917(ATCC 37355), RSF1010 복제기점을 가진 pJRD215(ATCC 37533), pUC19, YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 프로모터는, 숙주에서 발현할 수 있는 것이면 어느 것이나 사용가능하고, 예를 들면, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터, PR 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, GAL 프로모터, AOD 프로모터 등을 사용할 수 있다. 또한, 재조합 벡터는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 분비 신호 등을 코딩하는 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 나아가, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다. 상기 형질전환체는 재조합 벡터를 적합한 숙주에 도입함으로써 제조된다. 상기 숙주의 예로는 에세리키아(*Esherichia*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 알칼리게네스(*Alcaligenes*)속, 코마모나스(*Comamonas*)속, 버크홀데리아(*Burkholderia*)속, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)속, 플라보박테리움(*Flabobacterium*)속, 비브리오(*Vibrio*)속, 엔테로박터(*Enterobacter*)속, 리조비움(*Rhizobium*)속, 글루코노박터(*Gluconobacter*)속, 아시네토박터(*Acinetobacter*)속, 모라셀라(*Moraxella*)속, 니트로조모나스(*Nitrosomonas*)속, 아에로모나스(*Aeromonas*)속, 파라코커스(*Paracoccus*)속, 바실루스(*Bacillus*)속, 클로스트리디움(*Clostridium*)속, 락토바실루스(*Lactobacillus*)속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*)속, 아르트로박터(*Arthrobacter*)속, 아크로모박터(*Achromobacter*)속, 미크로코커스(*Micrococcus*)속, 마이코박테리움(*Mycobacterium*)속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 악티노마이세스(*Actinomyces*)속, 노카르디아(*Nocardia*)속, 메틸로박테리움(*Methylobacterium*)속 등의 각종 세균을 들 수 있다. 또한, 상기 세균 이외에, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 칸디다(*Candida*)속 등의 효모와 각종 곰팡이 등을 들 수 있다.

[0027] 한편, 본 발명의 에스터라제는 1) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 2) 상기 배양물로부터 에스터라제를 분리하는 단계를 포함하는 과정을 통해 생산될 수 있다.

[0028] 상기 과정은 전술한 형질전환체를 배양하고, 배양물(배양균체 또는 배양상등액) 속에 유전자 산물인 에스터라제를 축적시켜, 배양물로부터 에스터라제를 취득함으로써 행하여진다. 상기 형질전환체의 배양은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 또한 상기 배양은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양 등 통상의 미생물의 배양에 사용되는 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 형질전환체가 대장균인 경우 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB 배지, M9 배지 등에서 25~37℃의 범위에서 호기적으로 8~72시간 배양함으로써 에스터라제를 균체 내에 축적시킨 다음 회수할 수 있다. 배양 배지에 사용될 수 있는 탄소원의 예로는 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 들 수 있으며, 질소원의 예로는 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또한, 무기물의 예로는 인산제1칼륨, 인산제2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가할 수 있다. 또한, 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 벡터가 사용되는 경우, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가할 수 있다. 예를 들면, 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.

[0029] 상기 에스터라제의 수득 및 정제는, 배양물을 원심분리하여 균체 또는 상등액을 회수한 후, 균체파쇄, 추출, 친

화성 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다. 상기 수득한 에스터라제는 통상의 방법, 예를 들면 SDS-PAGE, 웨스턴블로팅 등에 의해 확인될 수 있다. 또한, 균체로부터의 에스터라제의 회수는, 통상 행하여지고 있는 클로로포름 등의 유기용매에 의한 추출이 가장 간편하기는 하나, 유기 용매를 사용하기 어려운 환경에서는 SDS 등의 계면활성제에 의한 처리, 리소자임 등의 효소에 의한 처리, EDTA, 차아염소산나트륨, 암모니아 등의 약제에 의한 처리에 의해서 에스터라제 이외의 균체 성분을 제거하여 에스터라제를 회수하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0030] 이하 본 발명을 실시예를 들어 설명하고자 하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1: 메타게놈 라이브러리의 제조**

[0032] 제주도(오름, 한림항, 용두암, 천지연 폭포, 한라산 영실), 목재폐기장 및 주유소에서 채취한 각 토양 시료 5 g에 DNA 추출용 완충액[100 mM 트리즈마 완충액(Tris-HCl, pH 8.0, Sigma, 미국); 100 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma, 미국); 100 mM 인산 나트륨 완충액(sodium phosphate, pH 8.0, Sigma, 미국); 1.5 M 염화나트륨(NaCl, Junsei, 일본); 1%(w/v) CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, Sigma, 미국)] 및 50 ㎍/㎖의 프로티나아제(proteinase) K를 동일부피로 넣어 현탁시킨 후, 37℃ 진탕배양기에서 100 rpm으로 30분간 진탕배양하였다. 이후 소듐 도데실 설페이트(SDS)(Sigma, USA)를 최종 농도가 2%(v/v)가 되도록 첨가하여 65℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응액을 원심분리한 후 상등액에 동일부피의 클로로포름/이소아밀알코올(chloroform/isoamylalcohol)(24:1) 혼합액을 첨가하여 DNA를 추출하였다. 이를 다시 원심분리하여 단백질 및 세포 찌꺼기를 제거한 후 상등액에 0.6배의 이소프로판올을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 상기 DNA 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조시켜 멸균수에 녹인 후, PFGE(pulse-field gel electrophoresis, Bio-Rad, 미국)를 이용하여 DNA의 크기 분포를 확인하였다. 이후 상기 DNA 침전물을 1% 저온융해 아가로즈(Low-melting agarose)에 전기영동하고 겔라아제(Gelase; Epicentre, 미국)를 사용하여 겔 용출을 수행한 후 양말단 보수효소(end-repair enzyme; Epicentre Biotechnologies, 미국)를 이용하여 양말단을 보수하였다. 상기 보수된 DNA를 포스미드(fosmid) 라이브러리 제작 키트(Epicentre, 미국)를 사용하여 포스미드(EpiFos™-5, Epicentre, 미국)에 클로닝한 다음, 이를 대장균(TransforMax EC100-T1®; Epicentre, 미국)에 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 대장균을 배양하여 메타게놈(metagenome) 라이브러리를 구축하였다.

[0033] 라이브러리의 질을 검사하기 위해, 무작위로 선택한 형질전환체들로부터 재조합 플라스미드를 추출하고 제한효소 *Bam*HI으로 처리한 후 전기영동으로 확인한 결과, 모두 재조합 플라스미드가 포함되어 있었으며, 삽입된 메타게놈의 평균 크기는 35 kb였다.

[0034] 상기 제조된 라이브러리와 마이크로뱅크에서 자원 분양받은 북극기지연안퇴적물로부터 제조된 메타게놈 라이브러리(총 60,000 클론)를 이후 실험에 사용하였다. 상기 라이브러리의 정보를 하기 표 1에 나타내었다.

*표 1*

[0035]

| 라이브러리 이름 | 채취장소 | 플라스미드 | DNA 크기 | 총 클론수 | 출처 |
|---|---|---|---|---|---|
| M10 | 북극기지 연안퇴적물 | 포스미드 | 35 kb | 60,000 | 마이크로뱅크 |
| JO | 제주도 오름 | 포스미드 | 35 kb | 4,800 | 제작 |
| JH | 제주도 한림항 | 포스미드 | 35 kb | 30,000 | 제작 |
| YM | 제주도 용두암 | 포스미드 | 35 kb | 17,600 | 제작 |
| CP | 제주도 천지연 폭포 | 포스미드 | 35 kb | 1,000 | 제작 |
| HY | 제주도 한라산 영실 | 포스미드 | 35 kb | 10,500 | 제작 |
| WD | 목재 폐기장 | 포스미드 | 35 kb | 3,600 | 제작 |
| LI | 유류 | 포스미드 | 35 kb | 2,800 | 제작 |
| GS | 주유소 | 포스미드 | 35 kb | 22,100 | 제작 |

[0036]

[0037] **실시예 2: 에스터라제 유전자의 탐색**

[0038] <2-1> 1차 탐색

[0039] 실시예 1에서 수득한 메타게놈 라이브러리로부터 에스터라제 활성을 갖는 콜로니를 하기와 같이 1차 탐색하였다.

[0040] 구체적으로, 실시예 1에서 얻은 각각의 라이브러리를 0.8%(v/v) 트리부티린(tributyrin) 에멀젼이 첨가된 영양 고체배지[1%(w/v) 트립톤, 0.5%(w/v) 효모 추출물, 0.5%(w/v) 염화나트륨, 2%(w/v) 한천]에 도말하여 37℃에서 20시간 동안 배양한 후 4℃ 냉장고에서 5일간 보관하였다. 에스터라제가 트리뷰티린을 분해하므로, 저온에서 트리뷰티린을 분해하여 투명환을 형성하는 총 140개의 콜로니를 선별하였다(북극기지연안퇴적물 라이브러리 121개, 주유소 라이브러리 13개, 제주도 한림항 라이브러리 2개, 제주도 한라산 영실 라이브러리 1개, 제주도 용두암 라이브러리 3개).

[0041] <2-2> 2차 탐색

[0042] 2차 탐색을 위하여, 상기 140개 콜로니를 20 ml의 영양액체배지[1%(w/v) 트립톤, 0.5%(w/v) 효모 추출물, 0.5%(w/v) 염화나트륨]에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 상기 배양물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수한 후, 이를 20 mM 트리즈마 완충액(Tris-HCl, pH 8.0) 1 ml을 넣고 초음파 파쇄기(Sonics & materials, 미국)를 이용하여 20% 세기, 파쇄 4초 및 정지 4초 조건 하에서 45번 파쇄하였다. 상기 파쇄된 세포를 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 수용성 단백질로 구성된 상등액을 얻었다. 상기 각 콜로니로부터 얻은 수용성 단백질 용액을 하기 에스터라제 선별 실험에 사용하였다.

[0043] 첫 번째 실험으로서, 에스터라제 효소활성을 측정하기 위해, 기질로서 파라-니트로페닐 에스테르(p-nitrophenyl ester) 2.5 ㎕, 에탄올 10 ㎕, 1000 mM 트리즈마 완충액(Tris-HCl, pH 8.0) 12.5 ㎕, 1차 정제수 175 ㎕ 및 상기에서 준비된 수용성 단백질 용액 50 ㎕를 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 기질 분해시 생성되는 파라-니트로페놀의 양을 405 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 1 유닛(U)을 가수분해에 의해 분당 1 μmol의 파라-니트로페놀을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

[0044] 두 번째 실험으로서, 트리글리세라이드(트리부티린, 트리카프릴린, 트리올레인)에 대한 효소 활성을 측정하기 위해, 상기 세 종류의 트리글리세라이드를 5 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에 희석시켜 최종 농도가 20-25 mM이 되게 만든 후 파쇄하여 최종 pH가 7.2인 기질 용액을 만들었다. 브로모티몰 블루 나트륨염(Bromothymol Blue sodium salt, BTB)을 증류수에 녹여 10 mM 용액을 만들고 상기 각 기질에 0.1 mM씩 첨가하였다. 96-웰 플레이트에 상기 단백질 용액 50 ㎕ 씩 첨가한 후 기질-브로모티몰 블루 용액 200 ㎕를 첨가하여 37℃에서 반응시켰다. 12시간 후 에스터라제의 작용으로 트리글리세라이드가 분해되면서 지방산이 생성되어 pH 저하가 일어나는지 관찰하였다. 이는 pH 지시약인 브로모티몰 블루가 중성 pH일 때 초록색을 나타내다가 산성일 때 노란색을 띄므로 웰의 색변화를 관찰함으로써 확인할 수 있다.

[0045] 세 번째 실험으로, 왁스 에스테르(wax ester) 합성 활성이 있는지를 조사하였다. 상기 수용성 단백질 용액 50 ㎕를 각 웰에 분주하고, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액 150 ㎕를 섞은 다음, 올레산 및 도데카놀(1:1) 혼합액 100 ㎕를 가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 30℃에서 72 시간이 지난 뒤 다시 흡광도를 측정하여 탁도(turbidity)가 증가한 것을 선별하였다.

[0046] 상기 세 가지 실험을 통하여 140개 클론 중 가장 우수한 활성을 보이는 제주도 한림항의 메타게놈으로부터 얻은 에스터라제를 최종적으로 선별하였으며, 상기 선별된 에스터라제를 "EstJ"라 명명하였다.

[0047] **실시예 3: 에스터라제 유전자의 염기서열 및 상동성 분석**

[0048] <3-1> 에스터라제 유전자의 염기서열 분석

[0049] 상기 실시예 2에서 선별한 EstJ 에스터라제 유전자가 포함된 포스미드("pEpiFOS5/EstJ"라 함)를 *Sau3*AI 효소로 부분 절단(partial digestion)한 다음, PFGE(pulse field gel electrophoresis)에 의해 3-5 Kb의 DNA를 분리하였다. 상기 분리된 DNA를 *Bam*HI 제한 효소로 처리한 후 포스파타제(calf intestinal phosphatase, TaKaRa, 일본)를 처리한 pUC19 벡터(Novagen, USA)에 삽입시켰다. 상기 재조합 벡터를 대장균 XL-1 Blue (RBC bioscience, 대만)에 형질전환시켰다. 형질전환된 균주를 암피실린이 함유된 트리부티린 영양고체배지(1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 0.5% 염화나트륨, 0.8% 트리부티린, 2% 한천)에 도말하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 4℃에서 2일간 보관하여 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하였다. 상기 콜로니로부터 에스터라제 유전자 EstJ가 포함된 재조합 플라스미드를 얻고, 샷건 시퀀싱(shot-gun sequencing) 방법을 이용하여 상기 에스터라제 유전자의 염기 서열을 분석하였다.

[0050] 상기 수득한 염기 서열로부터 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 ORF finder(www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)를 이용하여 전사해독 프레임(open reading frame, ORF)을 동정하였고, 블라스트(Blast; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)를 이용하여 전사해독 프레임의 기능을 예측하였다.

[0051] 상기 분석 결과, 본 발명에 따른 에스터라제 유전자는 서열번호 2의 염기서열(954 bp)을 가지며, 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산(317개)을 갖는 에스터라제를 코딩함을 알 수 있었다. 또한, 상기 에스터라제는 약 34.4kDa의 분자량 및 약 7.6의 등전점(isoelectric point)을 갖는 것으로 확인되었다. 한편, 상기 아미노산 서열을 SigmalP 프로그램으로 분석한 결과, EstJ의 1-29번째 아미노산 서열은 그람음성 또는 그람양성 세균의 신호 펩타이드(signal peptide)로 예측되었고, 이를 뺀 에스터라제 EstJ의 분자량은 약 32 KDa이며 등전점은 약 7인 것으로 분석되었다.

[0052] <3-2> 에스터라제 유전자의 상동성 분석

[0053] <3-1>에서 얻은 에스터라제 EstJ의 아미노산 서열을 블라스트(BLAST) 프로그램을 이용하여 GenBank 및 SWISSPROT에 있는 아미노산 서열과 비교 분석하였다. 상기 분석 결과를 표 2에 나타내었다.

*표 2*

[0054]

| 단백질 명 | 미생물 소스 | GenBank 번호 | 동일 아미노산 비율(%) | E-Value |
|---|---|---|---|---|
| 에스터라제/리파아제 | Gemmata obscuriglobus UQM2246 | ZP_02731213.1 | 45 | 5.00E-76 |
| 알파/베타 가수분해효소 도메인-함유 단백질 | bacterium Ellin514 | ZP_03632535.1 | 42 | 5.00E-76 |
| 알파/베타 가수분해효소 도메인 함유 단백질 | bacterium Ellin514 | ZP_03632536.1 | 41 | 1.00E-71 |
| 에스터라제/리파아제-유사 단백질 | Spirosoma linguale DSM74 | YP_003389158.1 | 38 | 4.00E-66 |
| 알파/베타 가수분해효소 | Verrucomicrobium spinosumD SM4136 | ZP_02927629.1 | 37 | 2.00E-63 |
| 알파/베타 가수분해효소 | Planctomyces maris DSM8797 | ZP_01853484.1 | 33 | 1.00E-50 |
| 펩티다아제 S9 프롤릴롤리고펩티다아제 활성 부위 도메인-함유 단백질 | Planctomyces limnophilus DSM3776] | YP_003629594.1 | 31 | 1.00E-46 |
| 에스터라제/리파아제 | Planctomyces maris DSM8797 | ZP_01853066.1 | 27 | 8.00E-45 |
| 리파아제/에스터라제 | uncultured sludge bacterium | ADC79146.1 | 32 | 2.00E-42 |
| 알파/베타 가수분해효소 | Candidatus Koribacter versatilis Ellin345 | YP_591100.1 | 22 | 6.00E-26 |
| 펩티다아제 S9 프롤릴롤리고펩티다아제 활성 부위 도메인-함유 단백질 | Pirellula staleyi DSM6068 | YP_003370072.1 | 22 | 2.00E-24 |
| 알파/베타 가수분해효소 폴드-3 도메인-함유 단백질 | Caulobacter segnis ATCC21756 | YP_003592879.1 | 21 | 8.00E-23 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 에스터라제/리파아제 | Hahella chejuensis KCTC2396 | YP_432845.1 | 20 | 1.00E-22 |
| 알파/베타 가수분해효소 폴드-3 도메인-함유 단백질 | Pirellula staleyi DSM6068 | YP_003371499.1 | 21 | 3.00E-22 |
| 유기용매 내성 에스터라제 | uncultured bacterium | ACH99848.1 | 20 | 3.00E-22 |
| 알파/베타 가수분해효소 폴드-3 도메인-함유 단백질 | Chthoniobacter flavus Ellin428 | ZP_03128903.1 | 20 | 5.00E-22 |
| 알파/베타 가수분해효소 | Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076 | YP_822452.1 | 21 | 6.00E-22 |
| 에스터라제/리파아제 | Planctomyces maris DSM8797 | ZP_01852660.1 | 21 | 8.00E-22 |
| 에스터라제/리파아제 | Verrucomicrobium spinosum DSM4136] | ZP_02926430.1 | 17 | 1.00E-21 |
| 에스터라제 | Rhodococcus opacus B4 | YP_002780964.1 | 17 | 2.00E-21 |
| 알파/베타 가수분해효소 폴드-3 도메인-함유 단백질 | uncultured Verrucomicrobia bacterium | ACO70919.1 | 10 | 8.00E-20 |

[0055] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 에스터라제는 젬마타 옵스쿠리글루부스(*Gemmata obscuriglobus*) UQM2246 유래의 에스터라제/리파아제와 45%, 박테리움(bacterium) Ellin514 유래의 알파/베타 가수분해효소 단백질과 42%, 박테리움(bacterium) Ellin514 유래의 또 다른 알파/베타 가수분해효소 단백질과 41% 및 스피로소마 린구알레(*Spirosoma linguale*) DSM74 유래의 에스터라제/리파아제-유사 단백질과 38%의 상동성을 나타내었다.

[0056] 또한, 아미노산 서열과 효소의 생화학적 특성에 따라 분류된 8개 에스터라제 패밀리(family)에 속하는 에스터라제 아미노산 서열과 EstJ의 아미노산 서열을 비교하기 위해 계통발생트리(phylogenetic tree)를 구축하였다. 계통발생트리는 단백질 서열을 ClustalW 프로그램을 이용하여 배열하고, 이를 Mega4 프로그램에 넣어 트리를 생성하였다. 그 결과, 본 발명의 효소와 상동성을 보이는 에스터라제 효소들은 에스터라제 패밀리 4(Family IV)에 가깝지만 에스터라제 패밀리 4에 속하지 않는 에스터라제인 것으로 확인되었다(도 2). 또한 기존에 논문으로 발표된 패밀리 4에 속하는 에스터라제 아미노산 서열과 EstJ 서열을 비교한 결과 다음과 같이 유사한 특징을 나타내었다. 첫째, 에스터라제 패밀리 4에 속하는 리파아제와 에스터라제들은, 포유류 호르몬 민감성 리파아제와 매우 유사하게도, 서열 상에 글리신-아스파르트산-세린-알라닌-글리신(Gly-Asp-Ser-Ala-Gly) 및 히스티딘-글리신-글리신-글리신(His-Gly-Gly-Gly)의 특이적인 구조를 가지고 있었다. EstJ 단백질은 148-152번째 서열에 글리신-아스파르트산-세린-알라닌-글리신과 유사한 글리신-알라닌-세린-알라닌-글리신의 서열을 가지고 있으며, 히스티딘-글리신-글리신-글리신의 구조와 유사하게 77-80번째 서열에 발린-세린-글리신-글리신을 가지고 있었다. 또한 종래 알려진 리파아제 및 에스터라제가 갖는 세 군데의 촉매 부위(catalytic triad)로서, 150번째 서열에 세린, 255번째 서열에 아스파르트산, 287번째 서열에 히스티딘도 가지고 있었다(도 1).

[0057] **실시예 4: 에스터라제 생산**

[0058] <4-1> 형질전환체의 제조

[0059] 본 발명의 에스터라제 EstJ를 대량으로 생산하기 위해, EstJ를 포함하는 발현벡터를 제조하고, 이를 대장균에 형질전환시켰다.

[0060] 구체적으로, 주형(template)으로서 실시예 2에서 선별한 에스터라제 유전자가 포함된 포스미드 pEpiFOS5/EstJ 및 각각 *Nde*I 및 *Xho*I 제한효소 절단부위를 갖는 하기 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 에스터라제 유전자를 증폭시켰다. PCR은 94℃에서 15초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 구성되는 사이클을 30회 반복하여 실시하였다.

*표 3*

[0061]

| 프라이머명 | 서열 | 서열번호 | 비고 |
|---|---|---|---|
| 정방향 프라이머 (Lig1-F) | 5'-CATATGAAGCTCTCTACAAGCAA-3' | 3 | *NdeI* 제한효소 절단부위 포함 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 역방향 프라이머 (Lig1-R) | 5'-CTCGAGTCATTTCTGCGCT-3' | 4 | *XhoI* 제한효소 절단부위 포함 |

[0062] 상기 PCR 산물을 정제하여 *Nde*I/*Xho*I으로 절단한 후, 동일한 제한효소와 포스파타제(Calf intestinal phosphatase)로 처리한 발현용 벡터 pET21a(Novagen사, 독일)에 클로닝하여 발현 벡터 pET21a/EstJ를 제조하였다. 상기 벡터를 화학적 방법으로 대장균 BL21(RBC사, 대만)에 형질전환시켜 형질전환체 BL21-pET21a/EstJ를 제조하였다.

[0063] <4-2> 에스터라제의 발현 및 정제

[0064] 상기 수득한 대장균 BL21-pET21a/EstJ를 50 μg/ml의 암피실린이 함유된 액체영양배지에서 600 nm에서의 흡광도가 0.7이 될 때까지 37℃에서 배양한 후, IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하여 18℃에서 20시간 동안 추가로 배양하였다. 원심분리를 통해 균체를 회수한 다음, IMAC 파쇄용액[300 mM KCl, 50 mM $KH_2PO_4$, 5 mM 이미다졸, pH 8.0](Bio-rad사, 미국)에 현탁시키고, 초음파 분쇄법으로 파쇄하였다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 회수한 후, 프로피니아(Profinia) 정제기계(Bio-rad사, 미국)를 이용하여 에스터라제를 용출시켰다. 이때, 분리를 위해 IMAC 컬럼(Bio-rad사, 미국) 및 탈염(Desalting) 컬럼(Bio-rad사, 미국)을 사용하였고, 이미다졸 농도구배를 이용하였다.

[0065] <4-3> 에스터라제의 확인

[0066] 상기 수득한 에스터라제 효소액 중의 단백질 농도를 브래드포드법(Bio-rad, 미국)에 의해 측정한 결과, 0.57 mg/ml로 확인되었다.

[0067] 또한, 상기 에스터라제 효소액에 대해 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하여 에스터라제의 분자량을 확인하였다. 우선, 10%의 폴리아크릴아마이드 겔(Biorad사, 미국)의 웰에 상기 에스터라제 효소액을 로딩하고 80 V에서 30분 및 110 V에서 1시간 동안 시료를 전개한 다음, 겔을 쿠마시 블루(Coomassie Brilliant Blue)로 염색하고 탈색하여 단백질을 확인하였다. 상기 실험 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 첫 번째 레인(lane)은 IPTG를 넣기 전에 대장균을 채취하여 초음파분쇄(sonication)에 의해 세포를 파쇄한 후 얻은 총 단백질 용액을 로딩한 것이고, 두 번째 레인은 IPTG를 넣어준 후 세포를 파쇄하여 얻은 총 단백질 용액을 로딩한 것이며, 세 번째 레인은 IPTG를 넣고 배양한 다음, 세포를 파쇄하여 수득한 수용성 단백질 용액을 로딩한 것이고, 네 번째 레인은 IPTG를 넣고 배양한 다음 세포를 파쇄하여 수득한 비수용성 단백질을 로딩한 것이며, 다섯 번째 레인은 상기 수용성 단백질을 정제한 후 수득한 정제 단백질을 로딩한 것이다. 도 3에서 보는 바와 같이, 분자량 34.4 KDa인 에스터라제가 효과적으로 생산되었음을 확인할 수 있었다.

[0068] **실시예 5: 에스터라제의 특성 조사**

[0069] 상기 실시예 4에서 정제한 에스터라제 EstJ의 다양한 탄소길이를 갖는 기질에 대한 특이성, 온도 및 pH 변화에 따른 효소 활성 및 안정성, 및 금속 이온, 세제 및 유기용매에 대한 효소 활성 및 안정성을 측정하였다.

[0070] <5-1> 다양한 탄소길이를 갖는 기질에 대한 효소 활성 분석

[0071] 다양한 탄소 길이의 아실 사슬을 갖는 파라-니트로페닐 에스테르(p-Nitrophenyl ester)에 대한 본 발명의 에스터라제의 활성을 하기와 같이 분석하였다. 파라-니트로페닐 에스테르(p-Nitrophenyl ester) 기질로는 파라-니트로페닐 아세테이트(p-nitrophenyl acetate, C2), 파라-니트로페닐 부틸레이트(p-nitrophenyl butyrate, C4), 파라-니트로페닐 카프로에이트(p-nitrophenyl caproate, C6), 파라-니트로페닐 카프릴레이트(p-nitrophenyl caprylate, C8), 파라-니트로페닐 카프레이트(p-nitrophenyl caprate, C10), 파라-니트로페닐 라우레이트(p-nitrophenyl laurate, C12), 파라-니트로페닐 미리스테이트(p-nitrophenyl myristate, C14) 및 파라-니트로페닐 팔미테이트(p-nitrophenyl palmitate, C16)를 사용하였다. 상기 활성 실험은 각 기질을 아세토니트릴에 녹

여 10 mM 스탁(Stock)을 만든 후 50 mM 트리스 완충용액(Tris-HCl, pH 8.0), 에탄올 및 파라-니트로페닐 에스테르 스탁 용액을 95:4:1이 되게 섞고 나서, 96-웰 플레이트에 상기 기질 용액 180 μl 및 에스터라제 EstJ 20 μl를 넣고, 37℃에서 10분 동안 1분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정함으로써 수행하였다.

[0072] 실험 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, 본 발명의 에스터라제 효소는 파라-니트로페닐 부틸레이트에 대한 활성이 제일 높았으며, 상기 활성을 100%로 보았을 때, 파라-니트레페닐 아세테이트에 대해 54%, 파라-니트로페닐 카프릴레이트에 대해 50% 및 파라-니트로페닐 카프레이트에 대해 42%의 상대활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명의 에스터라제는 기질의 길이가 길어질수도록 상대활성이 감소하는 경향을 나타내었고, 파라-니트로페닐 미리스테이트부터는 활성을 거의 나타내지 않았다. 상기 결과로부터 본 발명의 에스터라제가 상대적으로 짧은 아실 사슬을 가진 기질을 더 잘 분해함을 알 수 있었다.

[0073] <5-2> 온도에 따른 효소 활성 및 안정성 분석

[0074] 본 발명의 에스터라제의 최적 반응 온도를 살펴보기 위하여, 하기와 같이 실험하였다. 파라-니트로페닐 카프레이트(p-nitrophenyl caprate, C10)를 기질로 사용하고, 각각 10℃, 20℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃ 및 70℃에서 5분간 반응시킨 후 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 흡광도값을 측정하였다.

[0075] 상기 결과를 도 5A에 나타내었다. 도 5A에서 보는 바와 같이, 본 발명의 에스터라제는 55℃에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 40 내지 60℃ 범위에서 60% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 또한 10℃에서 20% 활성을 나타내었고 35℃에서 40%까지 활성이 증가하는 반면 65℃ 이상의 고온에서는 활성을 거의 나타내지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명의 에스터라제는 새로운 중온성 에스터라제임을 확인할 수 있었다.

[0076] 본 발명의 에스터라제의 열안정성을 확인하기 위하여 0℃, 30℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ 및 65℃에서 효소액을 10, 20, 30, 40, 50 및 60분간 처리한 후 잔존 효소활성을 파라-니트로페닐 카프레이트(p-nitrophenyl caprate, C10)를 이용하여 측정하였다.

[0077] 상기 결과를 도 5B에 나타내었다. 도 5B에서 ●는 30℃, ▽는 45℃, ■는 50℃, ◇는 55℃, ▲는 60℃ 및 ○는 65℃에서의 실험 결과이다. 도 5B에서 보는 바와 같이, 본 발명의 에스터라제는 30℃ 및 45℃에서 60분간 활성이 거의 떨어지지 않고 안정되게 유지되었으나, 50℃에서는 60분째에 약 64%의 활성을 유지하였다. 또한 55℃로 처리하였을 때 10분 만에 활성이 40%까지 급감하였으며, 60℃ 및 65℃의 고온에서는 처리 후 10분 만에 활성이 20%로 감소하여 60분까지 유지되었다. 상기 결과를 통해 50℃ 이하의 온도 범위에서는 에스터라제 활성이 유지되어 안정하지만 그 이상의 온도범위에서는 활성이 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] <5-3> pH에 따른 효소 활성 및 안정성 분석

[0079] 본 발명의 에스터라제의 최적 반응 pH를 알아보기 위하여 pH 4.5 내지 pH 12의 완충액을 이용하여 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 흡광도값을 측정하였다.

[0080] 상기 결과를 도 6A에 나타내었다. 도 6A에서 ●는 pH 4.5 내지 6.0 (소디움 시트레이트), □는 pH 6.0 내지 8.0(소디움 포스페이트), ▲는 pH 8.0 내지 9.0(소디움 보레이트), ◇는 pH 9.0 내지 10.0(글리신 소디움 하이드록사이드), ■은 pH 10 내지 11(소디움 카보네이트), △는 pH 11 내지12(디소디움 하이드로젠)에서의 실험 결과이다. 도 6A에서 보는 바와 같이, 본 발명의 에스터라제는 pH 9.5에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 9~10의 범위에서 70% 이상의 활성을 나타내었고, pH 6.5~8.5 및 pH 10~11의 범위에서도 50% 이상의 활성을 나타낸 반면, pH 11.5 이상에서는 활성을 나타내지 않았다.

[0081] 또한, 다양한 pH 조건하에서 28℃에서 1시간 처리한 후 잔존한 효소활성을 측정하였다. 측정 결과를 도 6B에 나타내었으며, 도면 내의 범례는 도 6A와 동일하다. 도 6B에서 보는 바와 같이 본 발명의 에스터라제는 매우 넓은 범위의 pH, 즉 pH 5.5에서 pH 10.5의 범위에서 최초 효소활성의 90% 이상을 유지하는 것으로 나타났다.

[0082] 상기 결과는 본 발명의 에스터라제가 종래 공지된 에스터라제와 달리 염기성의 pH 환경에서 상대적으로 높은 활성을 나타내며, 특히 매우 넓은 범위의 pH에서 비교적 오랜 시간 동안 안정적으로 활성을 유지하는, pH 내성이자 호염기성 에스터라제임을 보여준다. 그러므로, 본 발명의 에스터라제는 비교적 높은 pH 조건에서 활성과 안정성이 요구되는 다양한 생물학적 반응에서 생물촉매로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[0083] <5-4> 금속 이온, 세제 및 유기용매에 대한 효소 안정성 분석

[0084] 본 발명의 에스터라제의 금속 이온, 세제 및 유기용매에 대한 잔존 활성을 측정하기 위해, 효소 용액에 1 mM 및 10 mM의 $MgSO_4(Mg^{2+})$, $CaCl_2(Ca^{2+})$ 및 $CuSO_4(Cu^{2+})$를 첨가하여 28℃에서 1시간 동안 배양한 후 잔존 활성을 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 측정하였다. 또한, 상기와 동일한 방법으로 각각 0.1 및 0.5% 농도의 Triton X-100, 트윈(Tween) 80 및 SDS(Sodium dodecyl sulfate) 존재시 본 발명의 에스터라제의 잔존 활성을 측정하였다. 나아가, 메탄올, 에탄올 및 디메틸설폭사이드(DMSO)의 존재시 본 발명의 에스터라제의 잔존 활성을 측정하였고, 특히 메탄올의 경우 5, 10, 20, 30, 40 및 50%의 농도에서 잔존 활성을 측정하였다. 상기 측정 결과를 하기 표 4 및 도 7에 나타내었다. 도 7에서 ●는 5%, ○는 10%, ▼는 20%, ▽는 30%, ■는 40% 및 □는 50%의 메탄올 농도에서의 실험 결과이다.

*표 4*

[0085]

| 화합물 | | 농도 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 mM | 10 mM |
| 금속이온 | $MgSO_4$ | 102.4±1.4 | 101.0±0.38 |
| | $CaCl_2$ | 91.2±3.2 | 13.4±0.4 |
| | $CuSO_4$ | 33.1±5.1 | 8.1±0.1 |
| | | 0.1% | 0.5% |
| 세제 | Triton X-100 | 129.2±8.5 | 142.6±7.0 |
| | 트윈 80 | 136.0±1.7 | 136.8±3.0 |
| | SDS | 11.5±0.3 | 15.9±0.4 |
| | | 10% | 50% |
| 용매 | 메탄올 | 104.2±0.9 | 8.6±0.0 |
| | 아세토니트릴 | 105.4±1.9 | 9.2±0.2 |
| | 에탄올 | 102.6±1.5 | 8.3±0.0 |
| | DMSO | 89.2±2.3 | 86±1.5 |

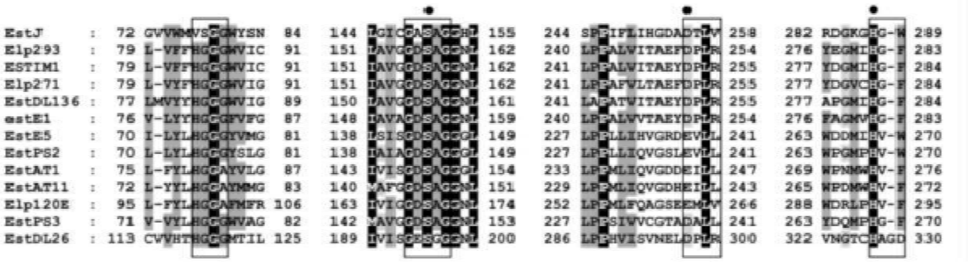
[0086] 상기 측정 결과, 본 발명의 에스터라제는 $MgSO_4$를 1 및 10 mM으로 처리시 활성이 크게 저해되지 않았고, $CaCl_2$ 1mM에서는 잔존 활성이 90% 이상이었지만 10 mM에서는 잔존 활성이 약 13%로 크게 감소하였다. 한편, $CuSO_4$ 처리시 비교적 낮은 농도인 1 mM에서도 잔존 활성이 33%로 감소했으며 10 mM에서는 10% 이하의 낮은 잔존 활성을 나타내었다(표 4). 상기 결과는 본 발명의 에스터라제의 촉매 작용시 금속이온이 요구되지 않는다는 것을 보여준다.

[0087] 또한, 세제의 일종인 Triton X-100 및 트윈 80을 각각 0.1% 및 0.5%로 처리한 결과 잔존 활성이 오히려 증가된 반면, SDS의 경우 0.1 및 0.5% 농도에서 약 11% 및 16%의 낮은 잔존 활성을 나타내었다(표 4). 이는 호염기성 에스터라제인 EstJ의 활성이 Triton X-100 및 트윈 80과 같은 일부 세제에서 증가할 수 있다는 것을 나타낸다.

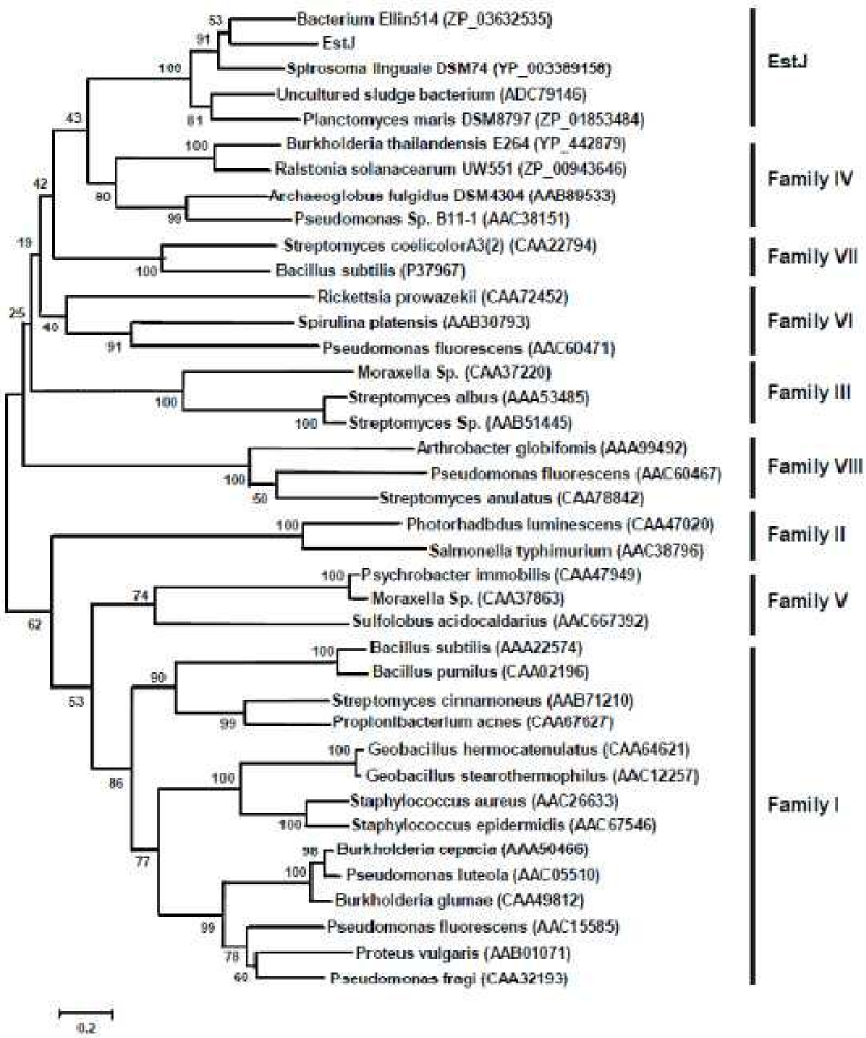
[0088] 나아가, 유기용매인 메탄올, 에탄올 및 아세토니트릴은 10%의 농도에서 에스터라제 효소의 잔존 활성에 큰 영향을 미치지 않았으며 50% 농도로 처리했을 때, 모두 10% 이하의 활성을 나타내었다. 반면, DMSO는 10%와 50%로 처리 했을 때, 모두 86~89%의 잔존 활성을 나타내었다(표 4). 한편, 메탄올을 10~50%까지 농도를 다르게 하여 효소에 처리했을 때, 10~30% 농도에서 60분까지 70% 이상의 잔존활성이 관찰되었으나 40% 이상의 메탄올 농도로 처리시 10분째부터 잔존 활성이 20%로 저하되어 60분까지 일정하게 유지되었다(도 7). 따라서 본 발명의 에스터라제를 이용한 기질 전환 반응시 가용할 수 있는 메탄올의 농도는 30%까지이며 또한 1시간 정도 반응시켜도 활성이 저해되지 않는다는 것을 알 수 있다.

도면

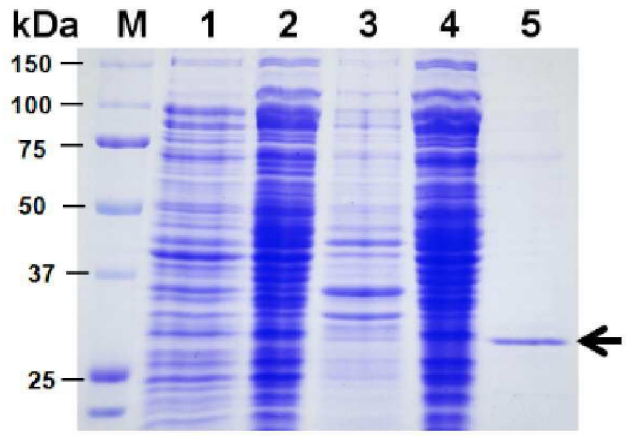
도면1


EstJ
Elp293
ESTIM1
Elp271
EstDL136
estE1
EstE5
EstPS2
EstAT1
EstAT11
Elp120E
EstPS3
EstDL26

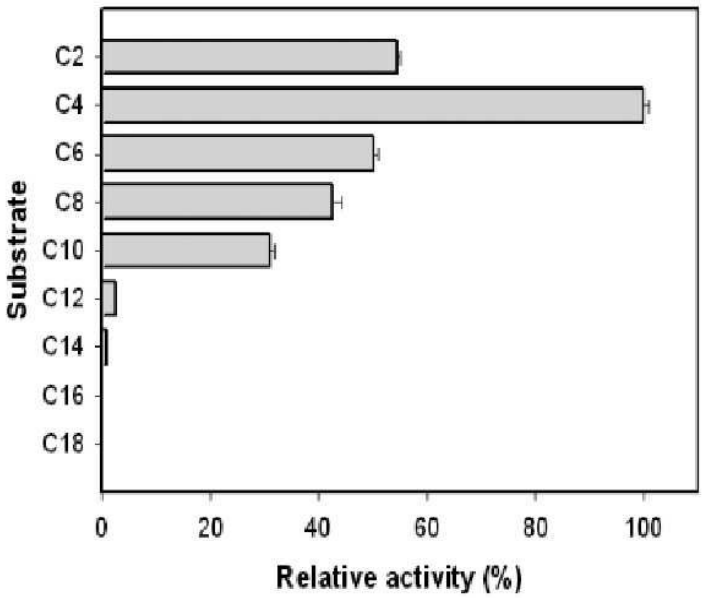
도면2


Bacterium Ellin514 (ZP_03632535)
EstJ
Spirosoma linguale DSM74 (YP_003389156)
Uncultured sludge bacterium (ADC79146)
Planctomyces maris DSM8797 (ZP_01853484)
Burkholderia thailandensis E264 (YP_442879)
Ralstonia solanacearum UW551 (ZP_00943646)
Archaeoglobus fulgidus DSM4304 (AAB89533)
Pseudomonas Sp. B11-1 (AAC38151)
Streptomyces coelicolorA3(2) (CAA22794)
Bacillus subtilis (P37967)
Rickettsia prowazekii (CAA72452)
Spirulina platensis (AAB30793)
Pseudomonas fluorescens (AAC60471)
Moraxella Sp. (CAA37220)
Streptomyces albus (AAA53485)
Streptomyces Sp. (AAB51445)
Arthrobacter globifomis (AAA99492)
Pseudomonas fluorescens (AAC60467)
Streptomyces anulatus (CAA78842)
Photorhadbdus luminescens (CAA47020)
Salmonella typhimurium (AAC38796)
Psychrobacter immobilis (CAA47949)
Moraxella Sp. (CAA37863)
Sulfolobus acidocaldarius (AAC667392)
Bacillus subtilis (AAA22574)
Bacillus pumilus (CAA02196)
Streptomyces cinnamoneus (AAB71210)
Propionibacterium acnes (CAA67627)
Geobacillus hermocatenulatus (CAA64621)
Geobacillus stearothermophilus (AAC12257)
Staphylococcus aureus (AAC26633)
Staphylococcus epidermidis (AAC67546)
Burkholderia cepacia (AAA50466)
Pseudomonas luteola (AAC05510)
Burkholderia glumae (CAA49812)
Pseudomonas fluorescens (AAC15585)
Proteus vulgaris (AAB01071)
Pseudomonas fragi (CAA32193)
EstJ
Family IV
Family VII
Family VI
Family III
Family VIII
Family II
Family V
Family I
0.2

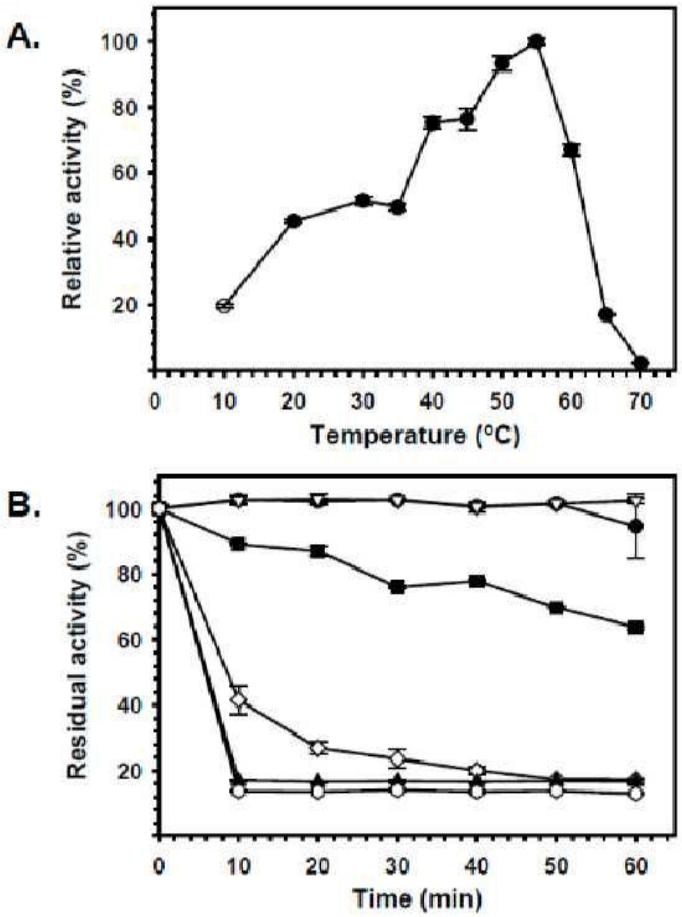
도면3


kDa
M
1
2
3
4
5
150
100
75
50
37
25

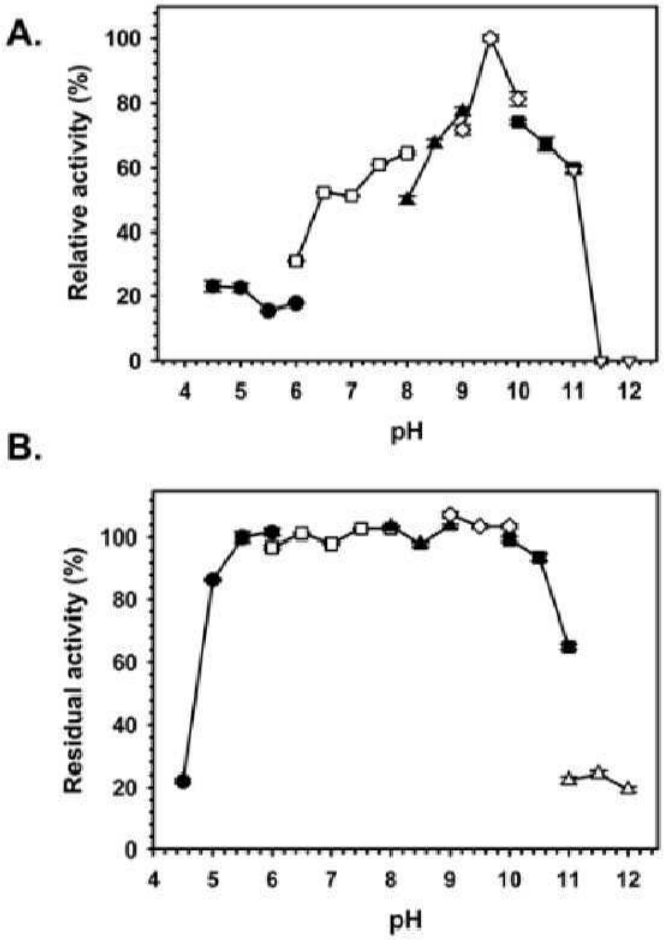
도면4


C2
C4
C6
C8
C10
C12
C14
C16
C18
Substrate
0
20
40
60
80
100
Relative activity (%)

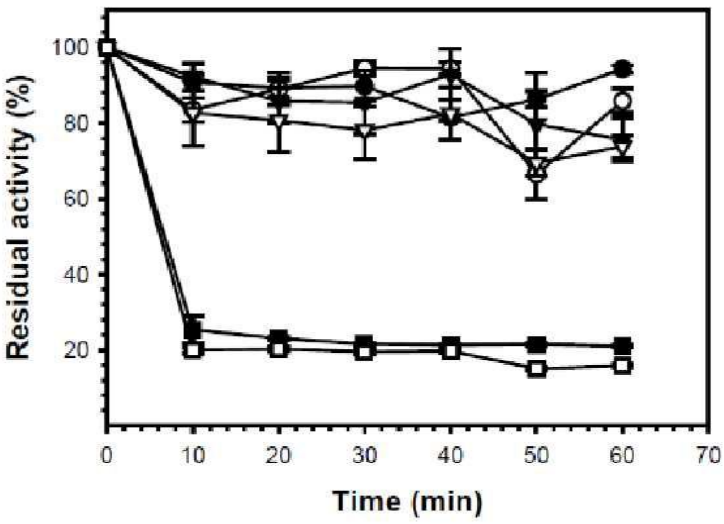
도면5


A.
Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
70
Temperature (°C)
B.
Residual activity (%)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)

도면6


A.
Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH
B.
Residual activity (%)
100
80
60
40
20
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
pH

도면7


Residual activity (%)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (min)

서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부