



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0046231
(43) 공개일자 2009년05월11일

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Int. Cl.
C12N 9/24 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-0112241</p> <p>(22) 출원일자 2007년11월05일
심사청구일자 2007년11월05일</p> | <p>(71) 출원인
한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지</p> <p>(72) 발명자
이윤호
서울 강남구 도곡1동 961번지 현대아파트 2동 1011호
김충곤
경기 용인시 수지구 상현2동 현대아이파크아파트 10단지 1002동1401호
송정민
경기 수원시 장안구 율전동 265-58호</p> <p>(74) 대리인
유미특허법인</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 남극톡토기 유래의 베타-1,3-글루카나아제, 이를 코딩하는유전자, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 효소를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 발현벡터가 도입된 형질전환체, 형질전환체에 의해 생산된 베타(beta)-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 효소 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 베타-1,3-글루카나아제는 베타-1,3-글루칸인 라미나린을 올리고당화하여 섭취율이 높은 기능성 탄수화물로 전환시키거나 당생물학 연구분야에서 탄수화물의 특정부위만을 선택적으로 절단하는 효소로 이용할 수 있고, 나아가 전분 분해공정, 식품, 음료, 사료 및 섬유 산업 등에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1

```

acagtcagtcggaattaatctggaanaac
1 ATGAAGCATTACATTTCCCTACTTTGGGCTTCTGGCCCTTGCACCAGGTGCATGG
1 M N N A F T F P L L L A F C A F A H G A W
61 GTGTTGACTGGGAGGATGAATTCACGGAGGAATTTAGCAGATAGATGGAATTCGAG
21 V L D W E D E F N G G N L A D R W N F E
121 TTGGGTCGATGTTGGGGAACATGACTTCATGCTACCGCTACACAGAGGTGCC
41 L G C N G W G N N E L Q C Y T D N R G A
181 AATGCCAGACAAGAGGACGGAATTTGGTCACTCGGCCCTGAGGGAGTGGTGGGCGAT
61 N A R Q E D G K L V I S A V R E W W G D
241 GGAGTAAATCCAGACAAAGAAATTCACCTCTGCCGATGACCAAAAGGCTAATGGCTT
81 G V H P D K E P T S A R M T T K A N W L
301 GATGGAAGTTGAGATGAGAGCAGATTGCCCAAGGTAACATCTCTGCCCTGCATTC
101 H G K F E M R A R L P K G K H L W P A F
361 TGGATGATGCCCAAATTCAGAAATACGGCGGTGGCCCGGAGTGGAGAAATGATATT
121 W M M P Q N S E Y G G W P R S G E I D I
421 ACTGATACAGGGGCAAAAGCCACAAAGATTTGGGACCCCTTCACTTTGAGGTGCA
141 T E Y R G Q K P Q Q I L G T L H F G A A
481 TGGACAACAAGGATGATGCCGGAATCGGCAAGAGACTTCCAATCGACTTTCTGCC
161 W D N K G D A G T G A R D F P I D F S A
541 GATTTCCACACTTTGGATGGAATGGTCCCTGATTCATTCATGGCTTTGGATGAC
181 D F H T F S L D W S P D S I Q W L L D D
601 CAGTTTACCAAGAGGTCTCTTCAGAAACTTCTGGGATGGCTACAAACCAAT
201 Q V Y H T E S L Q R N F W D G V Y N Q N
661 GGTCTCCCTTTGATAAAAATTTTCATCATTGAACTTGGCCGTTGGTGAACACTTC
221 G S P F D K N F F I I L N L A V G G N F
721 TTTGGGTTGACCTTCCGATCCAGTGTGATGGCTGGCAAGATATCTTTGAA
241 F G G E P F D P S E S D G W A K N T F E
781 GTTGAATGTCAAGAAATGGACTGGAATTAAtcttttcatctagaatctttatctt
261 V E Y V K K W T W N
841 aatatcccgtyttaattcgagctattataaattttgcaaatgttattttgag
    
```

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 것인, 단백질.

청구항 3

제1항에 따른 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 29 내지 841 번째의 염기서열로 구성되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제4항의 유전자 핵산서열을 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 4에 도시된 개열지도로 표현되는 pET-Trx-CaLam인 것인, 발현벡터.

청구항 7

제5항 또는 제6의 발현벡터를 도입하여 형질전환된 형질전환체.

청구항 8

a) 제7항에 따른 형질전환체 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 코딩서열을 갖는 세포를 배양하는 단계;

b) 상기 배양된 세포에서의 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 발현을 유도하는 단계;

c) 상기 베타-1,3-글루카나아제 단백질이 발현된 세포를 분쇄한 후 침전시켜 얻어진 상등액으로부터 단백질을 용출하는 단계; 및

d) 상기 용출된 단백질을 정제하는 단계

를 포함하는, 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제의 제조방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 병원성 곰팡이 또는 효모에 대한 항균제.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 식품 또는 식품 첨가제.

청구항 11

제1항 또는 제2항의 단백질을 유효성분으로 포함하는 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 사료.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 효소를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 발현벡터가 도입된 형질전환체, 형질전환체에 의해 생산된 베타(beta)-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 효소 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 베타-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase)는 1959년 리즈 등에 의해 처음으로 보고된 효소로서(Reese, B.T. and M. Mandels, Can. J. Microbiol., 5, 173-185, 1959), 곰팡이, 효모, 세균 등 많은 미생물에서 발견되며(Clark and Stone, Bio. Chem. J., 96, 793-801, 1965; Abd-El-A1 and Phaff, Bio. Chem. J., 109, 347-360, 1968; Notario, V. et al., Biochem. J., 159, 555-562, 1976), 해조류, 콩, 발아중의 곡류, 곰팡이 및 효모 등의 세포벽에 존재하는 베타-1,3-글루칸의 베타-1,3-글루코사이드 결합을 선택적으로 분해하는 효소로서 알려져 있다(Whistler R.L. and C.L. Smart, Polysaccharide Chemistry, Academic Press, New York, 350, 1953; Manners D.J. et al., Biochem. J., 135, 19-30, 1973).

<3> 지금까지, 베타-1,3-글루카나아제는 바이러스(*Chlorella Virus PBCV-1*, Virology, 276, 27-36, 2000), 고세균(*Pyrococcus furiosus*, J. Biol. Chem., 272, 31258-31264, 1997), 곰팡이(*Trichoderma harzianum*, J. Bacteriol., 177, 6937-6945, 1995) 및 다양한 종류의 박테리아(*Risocetonia solani*; *Phytophthora infestans*; *Bacillus circulans*, Biochim. Biophys. Acta., 73, 267-275, 1963; *Oerskovia xantineolytica*, J. Bacteriol., 178, 4751-4757, 1996; *Thermotoga neapolitana*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 1359-1364, 1993; *Rothothermus marinus* Eur. J. Biochem., 224, 923-930, 1994) 등의 미생물과, 해양 무척추 동물(*Strongylocentrotus purpuratus* Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A., 93, 6808-6813, 1996; *Mizuhopecten yessoensis* Comp. Biochem. Physiol. Part B. 143, 473-485, 2006)등에서 분리 및 정제되어 효소적 특성이 밝혀졌으나, 그 외 다른 다세포 동물에서 상기 효소가 정제되거나 유전자 염기서열이 밝혀진 예는 아직까지 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<4> 따라서, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 베타-1,3-글루칸인 라미나린을 올리고당화하여 섭취율이 높은 기능성 탄수화물로 전환시키거나 당생물학 연구분야에서 탄수화물의 특정부위만을 선택적으로 절단하는 효소로서 이용할 수 있는, 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 단백질을 제공하는 것이다.

<5> 또 다른 본 발명의 기술적 과제는 상기 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

<6> 또 다른 본 발명의 기술적 과제는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

<7> 또 다른 본 발명의 기술적 과제는 상기 발현벡터를 도입하여 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

<8> 또 다른 본 발명의 기술적 과제는 상기 형질전환체를 이용하여 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<9> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 제공한다. 상기 단백질은 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)에서 분리한 것일 수 있다.

<10> 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 29 내지 841 번째의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

<11> 또한, 본 발명은 상기 유전자의 핵산서열을 포함하는 벡터, 바람직하게는 pET-Trx-CaLam인 발현벡터를 제공한다.

- <12> 또한, 본 발명은 상기 발현백터를 도입하여 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- <13> 또한, 본 발명은 a) 상기 형질전환체 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 코딩서열을 갖는 세포를 배양하는 단계; b) 상기 배양된 세포에서의 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 발현을 유도하는 단계; c) 상기 베타-1,3-글루카나아제 단백질이 발현된 세포를 분쇄한 후 침전시켜 얻어진 상등액으로부터 단백질을 용출하는 단계; 및 d) 상기 용출된 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제의 제조방법을 제공한다.
- <14> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <15> 다당류는 이들을 구성하는 구성당 및 그 결합양식에 따라 여러 가지로 구분되며, 생체에너지의 저장(ex. 녹말, 글리코젠, 이눌린 등)과 구조지지(ex. 셀룰로오스, 키틴, 글리코사미노글리칸 등)와 같은 생물학적 기능을 수행한다. 또한, 세포막이나 세포벽의 다당성분은 세포분열의 과정에 직접 관여하거나 세포와 세포, 세포와 바이러스, 세포와 항체 등의 상호인식, 생체방어 메커니즘에 관여한다.
- <16> 이러한 다당류 중 글루칸은 글루코오스를 구성당으로 하는 다당류를 총칭하며, D-글루코오스간의 결합양식에 따라 분류되는데 특히 부제탄소원자의 배치에 따라 α -글루칸과 β -글루칸으로 나눌 수 있다. α -글루칸의 대표적인 예로는 아밀로오스(α -1,4 결합), 아밀로펙틴(α -1,4 및 α -1,6 결합), 글리코젠(α -1,4 및 α -1,6 결합) 및 세균의 텍스트란(α -1,6 결합) 등이 포함될 수 있고, β -글루칸은 셀룰로오스(β -1,4 결합), 갈조류의 라미나린(β -1,3 결합) 및 지의류의 리케난(β -1,3 및 β -1,4 결합) 등이 포함될 수 있다.
- <17> 특히, 베타-1,3-글루칸인 라미나린은 해양에 다량 존재하는 갈조류인 라미나리아 디지타타(*Laminaria digitata*), 라미나리아 사카리나(*Laminaria saccharina*) 등의 주된 구조 및 저장 다당류인 라미나린의 결합 형태(β -1,3 포도당)이며, 키틴과 함께 병원성 곰팡이나 효모의 세포벽 성분으로 잘 알려져 있다.
- <18> 이러한 베타-1,3-글루칸을 가수분해하는 효소 즉, 베타-1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase)는 베타-1,3-글루칸에 존재하는 베타-1,3-글리코시드 결합(β -1,3-glycosidic linkage)을 가수분해하는 효소로서, 가수분해 작용 패턴에 따라 엑소-베타-1,3-글루카나아제(EC3.2.1.58) 및 엔도-베타-1,3-글루카나아제(EC3.2.1.6 또는 EC3.2.1.39)로 분류된다. 엑소-베타-1,3-글루카나아제는 베타-1,3-글루칸의 비환원성 말단부터 절단하여 글루코스를 생산하며 베타-1,6-결합 형태를 가진 푸스탈린에도 작용하는 특징이 있다. 반면, 엔도-베타-1,3-글루카나아제는 베타-1,3-글루칸을 무작위적으로 가수분해하여 글루코스와 약간의 라미나리올리고당(Laminarioligosaccharide)을 생산하며(J. Biol. Chem., 272, 31258-31264, 1997), 이러한 엔도-베타-1,3-글루카나아제 효소에 의해 분해된 다양한 형태의 올리고당은 장내에 서식하는 유용한 균총의 증식을 향상시키는 기능 및 다양한 생리활성을 촉진시키는 작용을 한다.
- <19> 지금까지, 베타-1,3-글루카나아제는 바이러스, 고세균, 곰팡이 및 다양한 종류의 박테리아 등의 미생물에서 많은 연구가 진행되었고, 최근에는 해양 무척추동물(*strongylocentrotus purpuratus*) 및 곤충강 툽토기목(Collembola)에서 베타-1,3-글루카나아제 효소가 존재한다는 것이 알려진 바 있으나, 상기 효소를 암호화하는 염기서열을 밝힌 적은 없으며, 특히 곤충강 툽토기목의 베타-1,3-글루카나아제 효소가 공생박테리아에서 유래된 것인지, 툽토기 자체에 존재하는 유전자로부터 유래된 것인지 명확하게 알려진 바가 없다. 또한, 지금까지 베타-1,3-글루카나아제 효소는 대부분 박테리아나 곰팡이로부터 발견되었기 때문에, 이외 다른 종인 본 발명의 남극툽토기로부터 유래된 베타-1,3-글루카나아제를 코딩하는 유전자를 분리하는 것은 또 다른 신규한 베타-1,3-글루카나아제의 유전자원을 제공하고, 이를 통해 산업적 이용가능성을 높일 수 있다는 점에서 의의가 있다.
- <20> 이에, 본 발명자들은 남극툽토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 베타-1,3-글루카나아제 유전자를 최초로 분리하여 클로닝 한 후 대장균에서 발현시키고, 정제하여, 기질인 베타-1,3-글루칸에 대한 베타-1,3-글루카나아제의 분해활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <21> 후술하는 본 발명의 바람직한 구체예에서는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 제공한다. 상기 단백질은 인공적으로 합성한 것일 수 있고, 남극툽토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 것일 수 있다.
- <22> 본 발명에 따른 베타-1,3-글루카나아제는 다음과 같은 특징을 가진다:
- <23> 1) 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 기질로서 글루칸인 라미나린(laminarin)에만 작용하는 특이성을 가진다. 이와 관련하여, 후술하는 본 발명의 실시예에서는 다양한 기질에 대한 베타-1,3-글루카나아제의 효소활성을 측정하였고, 그 결과 표 2에 나타난 바와 같이 라미나린은 효과적으로 가수분해되지만, 셀룰로오스 등 다른 형태

의 다당류 기질은 가수분해되지 않음을 확인할 수 있다(표 2). 또한, 박막크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)를 사용하여 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제에 의한 라미나린의 분해산물을 확인한 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 라미나리바이오스(L2), 라미나리트리오스(L3), 및 포도당(G1)을 주로 생산함을 확인하였다(도 10). 이러한 반응산물은 *P. furiosus*(Gueguen et al., J. Biol. Chem., 272, 31258-31264) 및 *B. xylophilus*(Kikuchi et al., Biochem. J., 389, 117-125, 2005)의 결과 즉, 엔도-베타-1,3-글루카나아제는 베타-1,3-글루칸을 가수분해할 경우 글루코스와 라미나리올리고당을 생산한다는 것과 일치하며, 이는 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제가 엔도 베타-1,3-글루카나아제를 의미한다. 특히, 엔도-베타-1,3-글루카나아제 효소에 의해 분해된 다양한 형태의 올리고당은 장내에 서식하는 유용한 균종의 증식을 향상시키는 기능 및 다양한 생리활성을 촉진시키는 작용을 한다.

- <24> 2) 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 최적 pH 범위가 4.5 내지 9.5이고, 바람직하게는 pH 5 내지 7.5이며, 더욱 바람직하게는 pH 5.5 내지 6.5이고, 더더욱 바람직하게는 pH 5.5이다. 이러한 pH 범위는 본 발명의 도 6b로부터 기인된 결과이며, 이는 일부 호염성 박테리아 유래의 효소(*Bacillus* sp., Nogi and Horikoshi, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 704-707, 1990)를 제외하고는 대부분 pH가 4 내지 6에서 최적의 효소활성을 갖는 기존의 박테리아와 유사하다.
- <25> 3) 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 최적 온도 범위가 0 내지 60 °C이고, 바람직하게는 20 내지 60 °C이며, 더욱 바람직하게는 40 내지 55 °C이고, 더더욱 바람직하게는 50 °C이다. 이러한 온도 범위는 본 발명의 도 6a로부터 기인된 결과이며, 이는 와타나베 등이 보고한 효소의 바람직한 최적 온도인 37 °C와는 상이합니다(Watanabe T. et al., Agric. Biol. Chem., 53, 1759, 1989; Watanabe T. et al., J. Bacteriol., 174, 186, 1992). 특히, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 50 °C에서 열안정성을 가지는 특징이 있다.
- <26> 4) 또한, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 Ca^{2+} , Na^{+} 및 K^{+} 로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 금속이온, 바람직하게는 Ca^{2+} 금속이온 처리시 효소활성 유지 및 열 안정성을 증가시키는 특징을 가진다. 이와 관련하여, 후술하는 본 발명의 실시예에서는 기질인 라미나린에 대한 베타-1,3-글루카나아제의 효소활성 측정시 Ca^{2+} , Na^{+} 및 K^{+} 과, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , 및 Fe^{+} 의 금속이온을 각각 처리하여 효소활성 변화를 측정하였고, 그 결과 표 3에 나타낸 바와 같이 Ca^{2+} 의 경우 비처리군에 비해 114.7 % 정도 효소활성이 증가됨을 확인할 수 있다(표 3). 또한, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 Ca^{2+} 금속이온 처리시 15 내지 35 °C, 바람직하게는 20 내지 30 °C, 및 45 내지 55 °C, 바람직하게는 50 °C에서 비처리군에 비해 열 안정성 다소 증가됨을 확인할 수 있다(도 7).
- <27> 또한, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- <28> 구체적으로, 상기 베타-1,3-글루카나아제 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하기 위하여, 남극에 서식하는 남극 톱토기로부터 전체 RNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하였고, 이를 클로닝하여 약 2000여개의 클론들을 수득한 후 서열분석을 실시하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 전장 cDNA는 서열번호 1의 1 내지 18 번째에 해당하는 시그널 펩타이드(도 1의 밑줄친 부위)를 포함하는 270개의 아미노산 서열(서열번호 3) 즉, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 1의 29 내지 841 번째에 해당하는 813 bp의 개방판독틀(서열번호 2)을 포함하고 있으며, 서열번호 1의 1 내지 18 번째에 해당하는 28 bp의 5'-UTR과, 3'-말단에 폴리아데닐레이션A(aataaa)를 포함하는 서열번호 1의 841 내지 925 번째에 해당하는 85 bp의 3'-UTR로 구성된 926 bp의 염기서열(서열번호 1)임을 확인할 수 있다(도 1). 상기 유전자 서열은 특별히 한정되어 있는 것은 아니나, 바람직하게는 연체동물, 극피동물(성게), 및 박테리아 유래의 베타-1,3-글루카나아제와 절지동물문 곤충강 유래의 글루카나아제 유사 단백질(beta-1,3-glucanase like protein)을 코딩하는 유전자 서열과 비교분석하여 염기서열의 상동성 여부를 측정할 수 있고, 또한 상기 아미노산 서열은 글리코실 하이드롤라아제 그룹 16 에 속하는 균주 즉, *O. xanthineolytica* (41.2%, GenBank accession numb. AAC44371), *B. circulans* (39.9%, GenBank accession numb. BAC06195), *R. marinus* (39.6%, GenBank accession numb. AAC69707), *P. puriosus* (39.5%, GenBank accession numb. AAC25554), *B. xylophilus* (38.4%, GenBank accession numb. BAE02683), *T. neapllitana* (36.9%, GenBank accession numb. CAA88008), *T. tridentatus* (35.3%, GenBank accession numb. BAA04044), *X. axonopodis* (33.9%, GenBank accession numb. AAM36156), *B. circulans* (33.6%, GenBank accession numb. AAC60453), *S. purpuratus* (34%, GenBank accession numb.

AAC47235), *P. sachalinensis* (32.1% GenBank accession numb. AAP74223) 및 *M. yessoensis* (31.9%, GenBank accession numb. AAW34372) 유래의 베타-1,3-글루카나아제 아미노산 서열; 및 *A. aegypti* (36.4%, GenBank accession numb. AAL76017), *E. fetida* (35.5%, GenBank accession numb. CAB70460), *P. leniusculus* (34.9%, GenBank accession numb. CAB65353), *L. terrestris* (34.3%, GenBank accession numb. AAL09587), *P. monodon* (34%, GenBank accession numb. AAM21213), *A. gambiae* (34%, GenBank accession numb. CAA04496) 및 *L. stylirostris* (34%, GenBank accession numb. AAM73871) 유래의 글루카나아제 유사단백질 아미노산 서열과 비교분석하여 아미노산 서열의 상동성 유무를 측정할 수 있다(도 2).

- <29> 또한, 본 발명은 상기 유전자의 핵산서열을 포함하는 발현벡터, 바람직하게는 pET-Trx-CaLam인 발현벡터를 제공한다.
- <30> 본 발명의 발현벡터는 플라스미드, 코스미드 및 파이지로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 T7 lac 프로모터를 가진 pET-32a(+) 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다.
- <31> 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 도입하여 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- <32> 본 발명에 따른 발현벡터를 형질전환시킬 수 있는 숙주세포로는 대장균, 원핵생물, 곰팡이, 식물 및 동물세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 Rosetta-gami(DE3) 대장균을 사용할 수 있다.
- <33> 또한, 본 발명은
- <34> a) 상기 형질전환체 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되고 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 코딩서열을 갖는 세포를 배양하는 단계;
- <35> b) 상기 배양된 세포에서의 베타-1,3-글루카나아제 단백질의 발현을 유도하는 단계;
- <36> c) 상기 베타-1,3-글루카나아제 단백질이 발현된 세포를 분쇄한 후 침전시켜 얻어진 상등액으로부터 단백질을 용출하는 단계; 및
- <37> d) 상기 용출된 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 베타-1,3-글루칸 분해활성을 갖는 베타-1,3-글루카나아제의 제조방법을 제공한다.
- <38> 상기 제조방법에 있어서, 단계 a)의 세포 배양은 LB(Luria-Bertani) broth 배지에서 배양할 수 있으며, 바람직하게는 엠펜실린, 가나마이신 및 테트라사이클린 등의 항생제를 포함한 LB broth 배지, 더욱 바람직하게는 상기 형질전환체 또는 세포를 선별적으로 증식시킬 수 있는 가나마이신을 함유한 LB broth 배지에서 배양할 수 있다.
- <39> 단계 b)의 단백질의 발현 유도는 알로락토오즈(allolactose) 및 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) 등의 유도물질을 처리하여 유도할 수 있으며, 바람직하게는 IPTG를 최종농도가 0.01 내지 1 mM, 바람직하게는 0.05 내지 0.5 mM, 더욱 바람직하게는 0.1 mM가 되도록 처리하여 유도할 수 있다.
- <40> 단계 c)의 단백질 용출은 상기 단백질의 생물학적 기능에 손실을 주지 않는 무기산 또는 유기산의 염을 포함하고 있는 완충용액, 예를 들면 구연산염, 초산염, 호박산염, 유산염, 타르타르산염, 포름산염, 프로피온산염, 인산염, 또는 붕산염을 포함하는 완충용액일 수 있다.
- <41> 또한, 단계 d)의 단백질 정제는 당업계에 공지된 단백질 정제 방법을 이용하여 정제할 수 있으며, 바람직하게는 이온교환 크로마토그래피, 겔-투과 크로마토그래피, 역상-HPLC, 프렙용 SDS-PAGE, 및 친화성 컬럼 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법으로 정제할 수 있다.
- <42> 또한, 본 발명은 베타-1,3-글루카나아제를 유효성분으로 포함하는 병원균에 대한 항균제를 제공한다. 상기 병원균은 세포벽 성분이 베타-1,3-글루칸으로 구성된 동물 또는 식물에 병을 유발하는 병원성 곰팡이 또는 효모를 일컬으며, 예를 들면 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 디바리요마이세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 한세놀라 시페리(*Hansenula ciferrii*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 피리쿠라리아 오리제(*Pyricularia oryzae*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 및 뉴로스포아 크라사(*Neurospora crassa*) 등을 포함할 수 있다.
- <43> 상기 항균제에 함유된 베타-1,3-글루카나아제의 함량은 목적으로 하는 병원균에 따라 다르나, 병원균에 대한 항균활성을 효과적으로 나타내는 범위 내에서 사용 가능하며, 바람직하게는 액상으로 이용하는 경우에는 전체 항균제 100 중량부에 대하여 0.01 내지 99.99 중량부, 바람직하게는 0.1 내지 25 중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량부의 베타-1,3-글루카나아제를 포함할 수 있고; 동결건조 또는 열풍건조 상태의 분말 또는 과립상의

제품으로 이용하는 경우에는 전체 항균제 100 중량부에 대하여 0.002 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.01 내지 10 중량부, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 2.5 중량부의 베타-1,3-글루카나아제를 포함할 수 있다.

- <44> 상기 항균제는 베타-1,3-글루카나아제를 유효성분으로 포함하고, 상기 유효성분 외에 병원균에 대한 항균활성을 증진시킬 수 있는 보조성분으로서 적절한 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 부형제는 제형에 따라 통상의 물질을 사용할 수 있으며, 제제화할 경우 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제 등을 사용할 수 있다. 대표적으로 사용되는 희석제 또는 부형제로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수 등을 포함할 수 있다. 상기 보조성분의 함량은 바람직하게는 상기 베타-1,3-글루카나아제 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위 내에서 추가할 수 있다.
- <45> 상기 항균제의 제형은 사용목적에 따라 과립제(GRANULES), 로션제(LPTIONS), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 액체(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 정제(TABLETS), 주정제(SPIRITS), 캡셀제(CAPSULES) 또는 크림제(CREAMS)로 제조될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <46> 또한, 본 발명은 탄수화물 분해방법에 있어서, 베타-1,3-글루카나아제를 사용하는 것을 특징으로 하는 탄수화물 분해방법을 제공한다. 즉, 본 발명에 따른 베타-1,3-글루카나아제는 다당류를 단당류 또는 저분자량의 다당류로 전환시키는 효소적 공정에서, 다당류에 상기 베타-1,3-글루카나아제를 적합한 효소반응조건에서 접촉시킴으로써 용이하게 단당류 또는 저분자량의 다당류를 수득할 수 있다.
- <47> 상기 효소반응조건에 있어서, 베타-1,3-글루카나아제의 최적 pH 범위는 4.5 내지 9.5이고, 바람직하게는 pH 5 내지 7.5이며, 더욱 바람직하게는 pH 5.5 내지 6.5이고, 더더욱 바람직하게는 pH 5.5이며; 최적 온도범위는 0 내지 60 °C이고, 바람직하게는 20 내지 60 °C이며, 더욱 바람직하게는 40 내지 55 °C이고, 더더욱 바람직하게는 50 °C이며; Ca^{2+} , Na^{+} 및 K^{+} 로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 금속이온, 바람직하게는 Ca^{2+} 금속이온을 추가로 처리할 수 있다.
- <48> 또한, 본 발명은 베타-1,3-글루카나아제를 유효성분으로 포함하는 베타-1,3-글루칸 분해활성을 가진 식품 또는 식품 첨가제를 제공한다.
- <49> 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 베타-1,3-글루카나아제를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 베타-1,3-글루카나아제의 함량은 사용 목적에 따라 적절하게 조절할 수 있으며, 예컨대, 전체 식품에 대하여 상기 베타-1,3-글루카나아제를 0.001 내지 99.99 중량부, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량부 범위 내에서 첨가할 수 있다.
- <50> 상기 베타-1,3-글루카나아제를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵류, 스낵류, 과자류, 떡류, 면류, 껌류, 캔디류, 초콜렛류 및 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 스프류, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있을 수 있으나, 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 바람직하게는 해조류를 이용한 다이어트 식품의 첨가물로 사용될 수 있다. 이는, 상기 베타-1,3-글루카나아제를 해조류를 이용한 다이어트 식품의 첨가물로 사용할 경우, 해조류의 다당류 성분을 효율적으로 분해시켜 소화효율을 증진시키고, 분해되어 생성된 다양한 형태의 올리고당이 장내에 서식하는 유용한 박테리아를 증식시켜 장내활성을 촉진시키기 때문이다. 이러한 이유로, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 또한 해조류를 이용한 동물사료의 첨가물로도 사용될 수 있으며, 예컨대, 상기 베타-1,3-글루카나아제의 함량은 해조류를 이용한 동물사료 100 중량부 당 0.001 내지 50 중량부, 바람직하게는 0.01 내지 25 중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량부 범위 내에서 첨가될 수 있다.
- <51> 또한, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제는 당생물학 연구분야에서 탄수화물의 특정부위만을 선택적으로 절단하는데 사용될 수 있기 때문에 이와 유사한 용도로 사용되는 고부가가치의 효소를 대체할 수 있고, 섬유 산업 등에도 활용될 수 있다.

효 과

- <52> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 남극톡토기로부터 분리한 베타-1,3-글루카나아제는 베타-1,3-글루칸인 라미나린을 올리고당화하여 섭취율이 높은 기능성 탄수화물로 전환시키거나 당생물학 연구분야에서 탄수화물의 특정부위만을 선택적으로 절단하는 효소로 이용할 수 있고, 나아가 전분 분해공정, 식품, 음료, 사료 및 섬유 산업 등에 유용하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <53> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <54> [실시예]
- <55> 실시예 1: 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*) 유래의 베타-1,3-글루카나아제 유전자 분리 및 아미노산 서열 분석
- <56> **1-1: 시료 준비 및 전체 RNA 분리**
- <57> 사우스 셰틀랜드 아이슬랜드(South Shetland Island)에 위치한 남극세종과학기지 주변의 이끼로부터 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)를 수집한 후, 곧바로 99.9 % 알코올에 첨가하여 -70 °C에서 보관하였다. 급속동결된 상기 남극톡토기로부터 전체 RNA를 분리하기 위하여, 알코올을 완전히 제거한 후 트리졸(Trizol) 용액(Invitrogen, 미국)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA는 1 % 포름알데하이드 아가로스 겔에서 그 순도를 확인한 후, ND-1000 분광분석기(Nanodrop, 미국)를 이용하여 그 양을 측정하였다.
- <58> **1-2: cDNA 라이브러리 제작 및 베타-1,3-글루카나아제 클론 유전자 분석**
- <59> Creator SMART cDNA 라이브러리 키트(Clontech, 미국)를 이용하여 상기 RNA로부터 cDNA 라이브러리를 합성하였다. cDNA를 합성한 후 양쪽 말단에 어댑터 DNA를 연결하였고, 이를 *Sfi*I 제한효소(Promega, 미국)로 절단하여 pDNR-LIB 벡터에 연결한 후 DH5 α 균주에 형질전환하였다. 이로부터 약 2000여개의 발현 유전자가 클로닝된 클론을 얻었고, Big dye terminator 키트(PE Applied Biosystems) 및 자동서열분석기(ABI3100)를 이용하여 상기 클론들의 서열을 분석하였다. 분석된 염기서열들은 NCBI 데이터베이스, Pfam 데이터베이스 및 ExPASy 프로테오믹스 데이터베이스를 각각 이용하여 다른 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 서열과 비교분석하였다.
- <60> 상기 약 2000여개 클론들의 염기서열을 분석한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 전장 cDNA는 서열번호 1의 1 내지 18 번째에 해당하는 시그널 펩타이드(도 1의 밑줄친 부위)를 포함하는 270개의 아미노산 서열(서열번호 3) 즉, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 1의 29 내지 841 번째에 해당하는 813 bp의 개방관독틀(서열번호 2)을 포함하고 있으며, 서열번호 1의 1 내지 18 번째에 해당하는 28 bp의 5'-UTR과, 3'-말단에 폴리아데닐레이션(Aataaa)를 포함하는 서열번호 1의 841 내지 925 번째에 해당하는 85 bp의 3'-UTR로 구성된 926 bp의 염기서열(서열번호 1)임을 확인할 수 있었다(도 1).
- <61> **1-3: 상동성 분석**
- <62> 남극톡토기 베타-1,3-글루카나아제의 아미노산 서열은 글리코실 하이드롤라아제 그룹 16효소에 속해있는 *O. xanthineolytica* (41.2%, GenBank accession numb. AAC44371), *B. circulans* (39.9%, GenBank accession numb. BAC06195), *R. marinus* (39.6%, GenBank accession numb. AAC69707), *P. puriosus* (39.5%, GenBank accession numb. AAC25554), *B. xylophilus* (38.4%, GenBank accession numb. BAE02683), *T. neaplittana* (36.9%, GenBank accession numb. CAA88008), *T. tridentatus* (35.3%, GenBank accession numb. BAA04044), *X. axonopodis* (33.9%, GenBank accession numb. AAM36156), *B. circulans* (33.6%, GenBank accession numb. AAC60453), *S. purpuratus* (34%, GenBank accession numb. AAC47235), *P. sachalinensis* (32.1% GenBank accession numb. AAP74223) 및 *M. yessoensis* (31.9%, GenBank accession numb. AAW34372) 유래의 베타-1,3-글루카나아제 아미노산 서열; 및 *A. aegypti* (36.4%, GenBank accession numb. AAL76017), *E. fetida* (35.5%, GenBank accession numb. CAB70460), *P. leniusculus* (34.9%, GenBank accession numb. CAB65353), *L. terrestris* (34.3%, GenBank accession numb. AAL09587), *P. monodon* (34%, GenBank accession numb. AAM21213), *A. gambiae* (34%, GenBank accession numb. CAA04496) 및 *L. stylirostris* (34%, GenBank accession numb. AAM73871) 유래의 글루카나아제 유사단백질 아미노산 서열과 상동성을 비교하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.
- <63> 도 2에 나타난 바와 같이, 효소활성에 중요한 Glu137, Asp139 및 Glu142의 3개의 잔기는 글리코실 하이드롤라아제 그룹 16 의 균주에서와 같이 모두 보존되었고, 이외에 15개의 잔기(F28, Gly45, N48, Glu50, P111, W117, W121, W132, Gly136, His156, F224, N233, A235, Gly238 및 Val263) 또한 보존됨을 확인할 수 있었다(도 2). 이는, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제가 글리코실 하이드롤라아제 그룹 16에 속하는 효소임을 의미한다.

<64> **1-4: 게놈 DNA에서 증폭된 베타-1,3-글루카나아제 유전자 분석**

<65> 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제 유전자가 남극톡토기의 장내에 공생하는 박테리아로부터 유래된 것인지, 남극톡토기 자체에서 유래된 것인지를 조사하기 위하여, 남극톡토기에서 게놈 DNA를 추출한 후 이로부터 베타-1,3-글루카나아제 유전자를 증폭하여 그 서열을 분석하였다. 상기 유전자는 정방향 프라이머(5'-ATG AAC GCA TTT ACA TTT CCC CT-3', 서열번호 5)와 역방향 프라이머(5'-TTA ATT CCA GCT CCA TTT CTT GA-3', 서열번호 6)를 이용하여 증폭하였고, 그 결과 약 1.2kb 정도의 단편이 증폭됨을 확인하였다(도 3a). 증폭된 유전자 단편은 pCR2.1-Topo(Iinvtrogen, USA) 벡터에 클로닝된 후 서열분석을 실시하였다. 결과를 도 3b 및 3c에 각각 나타내었다.

<66> 도 3b 및 3c에 나타난 바와 같이, 베타-1,3-글루카나아제 유전자는 5개의 인트론(intron)과, 6개의 엑손(exon)으로 구성된 1,117 bp의 뉴클레오타이드(서열번호 4)임을 확인하였다(도 3b 및 3c). 특히, 인트론과 엑손으로 구성된 유전자 구조는 진핵생물 게놈에 특이적인 구조로서 박테리아 게놈에서는 볼 수 없으며, 박테리아 및 조류 등을 주로 섭식하는 남극톡토기의 먹이습성을 고려해 볼 때(Broady, Br. Antarct. Surv. Bull. 48, 37-46, 1979), 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제 유전자는 남극톡토기 자체에 존재하는 유전자임을 알 수 있다.

<67> **실시예 2: 남극톡토기 유래의 베타-1,3-글루카나아제 유전자 클로닝, 단백질 발현 및 정제, 및 효소활성 분석**

<68> 남극톡토기 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 개방해독틀에서 시그널 시퀀스가 제거된 성숙된 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위하여, 정방향 프라이머(5'-NNNNNNGGATCCGCATGGGTGTGGACTGGGAGGA-3', 서열번호 5) 및 역방향 프라이머(5'-NNNNNAAGCTTTTAATTCCAGTCCATTTCTGA-3', 서열번호 6)를 이용하여 상기 유전자를 증폭하였다. 상기 정방향 및 역방향 프라이머의 밀줄친 부분은 각각 Bam HI 및 Hind III제한효소의 인지부위를 가리키며, PCR 산물을 Bam HI 및 Hind III으로 절단한 후 동일효소로 절단된 pET-32a(+) 벡터(Novagen, 미국)에 클로닝하기 위하여 설계되었다(도 4). 도 4는 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제를 발현하는 발현벡터의 클로닝 과정 및 개열지도를 나타낸 것이다.

<69> 도 4와 같은 방법으로 클로닝한 후, 최종 발현벡터인 pET-Trx-CaLam를 제조하였고, 상기 벡터의 서열분석 및 단백질 발현을 확인하기 위하여 숙주세포인 Rosetta-gami(DE3) 대장균에 형질전환하여 형질전환체를 제조하였다. 형질전환된 세포내에서의 베타-1,3-글루카나아제 단백질 발현은 0.1 mM의 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)를 첨가한 후 18 °C에서 24시간 동안 배양함으로써 유도하였다. 상기 세포를 4 °C, 4,000 g에서 20 분간 원심분리하여 침전시킨 후 5 mM 이미다졸(Sigma, 미국)이 첨가된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.9)에서 재현탁하여 초음파를 이용하여 분쇄하였다.

<70> 분쇄 후, 4 °C, 17,000 g에서 20 분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 금속친화성 레진(Ni-NTA His-Bind Resin, Novagen, 미국)을 가진 컬럼에 통과시킨 후 60 mM 이미다졸이 첨가된 100 mM 염화나트륨을 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.9)으로 세척하였고, 300 mM 이미다졸이 첨가된 상기 완충용액으로 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제 융합단백질(Trx-CaLam)을 용출하였다. 용출된 단백질 용액은 10 % 글리세롤이 첨가된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.9)으로 교환하였다.

<71> 또한, 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제 융합단백질(Trx-CaLam)의 티오리독신이 제거된 베타-1,3-글루카나아제 단백질(CaLam)을 얻기 위하여, 상기 용출된 단백질 용액을 10 % 글리세롤이 첨가된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.9)으로 교환한 후 트롬빈을 처리하여 티오리독신을 절단하였다. 절단된 단백질 용액은 센트리콘(Centricon, 미국)을 이용하여 농축하였고, 10 % 글리세롤이 첨가된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.9)으로 교환한 다음 히스티딘-태깅된 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

<72> 단백질 농도는 브래드포드(Bradford, M. M., Ana. Biochem., 72: 248-254, 1976) 방법을 이용하여 측정하였고, 정제된 상기 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하여 그 순도를 확인하였다. 결과를 도 5에 나타내었다.

<73> 도 5에 나타난 바와 같이, 분리 정제된 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제 융합단백질(Trx-CaLam) 및 베타-1,3-글루카나아제(CaLam)는 각각 그 크기가 41 kDa 및 29 kDa임을 확인할 수 있었다(도 5). 또한, 단백질 회수율에 있어서 Trx-CaLam는 12.06 %이며, CaLam은 9.22 %이었고(표 1), 효소활성에 있어서 Trx-CaLam는 15.1 U/mg이며, CaLam은 20.6 U/mg임을 확인할 수 있었다(표 1).

표 1

<74>

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Percentage yield (%)
Crude extract	112.74	145.23	1.29	100
Trx-CaLam (1 st His-tagged affinity chromatography)	1.16	17.52	15.1	12.06
CaLam (Thrombin removal and 2 nd His-tagged affinity chromatography)	0.65	13.39	20.6	9.22

<75>

실시예 3: 남극톡토기 유래의 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제 및/또는 베타-1,3-글루카나아제의 생화학적 특징 분석

<76>

실시예 2에서 분리 정제된 남극톡토기의 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제(Trx-CaLam) 및/또는 베타-1,3-글루카나아제(CaLam)의 생화학적 특징을 조사하기 위하여, 1) 기질에 대한 효소활성; 2) pH 및 온도에 따른 효소활성 변화; 및 3) 금속이온에 따른 효소활성 변화를 각각 측정하였다. 구체적으로, 다당류인 라미나린(Laminarin), 리체난(Lichenan), 씨엠 셀룰로오스(CM cellulose), 푸스툴란(Pustulan), 및 로커스트 빈 검(Locust bean gum) 기질 1%(w/v)와 10 μl(0.04 U)의 상기 효소를 50 mM의 소듐포스페이트 완충용액(pH 5.0)에 혼합한 후 50 °C에서 30분간 배양하여 상기 효소분해에 의해 유리되는 글루코오스의 환원당량을 측정하였다. 상기 환원당량은 디니트로살리실릭산(Dinitrosalicylic acid: DNS) 방법(Stalbrand, H., et al., J. Biotechnol., 29: 229-242, 1993)을 이용하여 측정하였고, 베타-1,3-글루카나아제 효소활성의 1단위는 분(min) 당 글루코오스 및 등가의 1 μmole의 환원당을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

<77>

기질에 대한 효소활성과 관련하여, 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제(CaLam)는 라미나린(효소활성: 20.6 U/mg)만 효과적으로 가수분해할 뿐 셀룰로오스 등 다른 형태의 다당류 기질은 가수분해하지 않음을 알 수 있었다(표 2).

표 2

<78>

Substrate	Main linkage type (monomer)	Specific activity (Units/mg)
Laminarin	β-1,3 (Glucose)	20.6
Lichenan	β-1,3-1,4 (Glucose)	0
CM cellulose	β-1,4 (Glucose)	0
Pustulan	β-1,6 (Glucose)	0
Locust bean gum	β-1,4 (Manose)	0

<79>

또한, pH(도 6a) 및 온도(도 6b)에 따른 효소활성 변화와 관련하여, 본 발명의 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제(■) 및 베타-1,3-글루카나아제(□)는 모두 pH 5.5에서 최적 활성을 보였고, pH 4.5-9.5이하의 약산성부터 약알칼리성 조건에서 비교적 효소활성이 안정하였으며(도 6a), 50 °C에서 최적 활성을 보였고(도 6b), 0-60 °C 온도 범위에서 효소활성을 유지함을 관찰할 수 있었다(도 6b).

<80>

또한, 금속이온에 따른 효소활성 변화와 관련하여, 표 3에 나타낸 바와 같이, 무처리군에 비해 Ca²⁺, Na⁺ 및 K⁺을 처리한 군에서는 효소활성이 다소 증가하였으나, 다른 금속이온(Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, 및 Fe⁺)을 처리한 군에서는 오히려 무처리군에 비해 효소활성이 억제됨을 관찰할 수 있었다(표 3).

표 3

<81>

Metal ion	Residual activity (%)
None	100
Ca ²⁺	114.7
Mg ²⁺	93.2
Mn ²⁺	64.2
Cu ²⁺	53.3
Zn ²⁺	74.3
Fe ⁺	62.5
Na ⁺	105.4
K ⁺	103.3
EDTA	98.9

<82>

특히, Ca²⁺을 처리한 군에서는 무처리군에 비해 114.4 % 증가하였는데, 이러한 결과로부터 Ca²⁺의 존재유무에 따른 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 조사하였고, 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, Ca²⁺에 의해서 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성이 다소 증가함을 관찰할 수 있었다(도 7).

<83>

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 Ca²⁺의 존재유무에 따른 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 나타낸 그래프로서, (●)는 2.5 mM의 Ca²⁺이 첨가된 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 측정된 그래프이고, (○)는 Ca²⁺이 비첨가된(1 mM의 EDTA 첨가) 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 측정된 그래프이다.

<84>

또한, 표 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 남극톡토기 유래의 베타-1,3-글루카나아제는 기존에 알려진 박테리아 유래의 베타-1,3-글루카나아제 유사한 생화학적 특징을 보였는데(표 4), 이는 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제가 기존에 사용되는 베타-1,3-글루카나아제를 대체할 수 있음을 의미한다.

표 4

<85>

Phylum	Species	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Specific activity (U/mg)	References
Arthropoda	<i>Cryptopygus antarcticus</i>	5.5	50	20.6	This study
Nematoda	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	4.9	65	337	T. Kikuchi et al., 2005
Mollusca	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	4.5	45	6.0 for laminaran	S. Ootsuka et al., 2006
	<i>Spisula sacchalinensis</i>	5.8	45	350	B. Valeri et al., 2004
Fungi	<i>Sclerotium rofsii</i>	2.9 (41 kDa)	72	380	G.M. Gubitzi et al., 1996
	<i>Penicillium wortmanni</i>	6	60	n.a	E.T. Reese and Y. Shibata, 1965
Bacteria	<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	8.0	37	8	
	<i>Bacillus circulans</i>	5.5		4.1	Y. Nogi and K. Horikoshi, 1990
	<i>Bacillus sp.</i>	9.0	60	396.6	

	<i>Thermotoga neapolitana</i>		85		V. Zverlov et al., 1997
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	5.5	40	201	T. Araki, 1983
	<i>Vibrio sp.</i>	6.5	40	51.9	Y. Tamaru et al., 1995
	<i>Rhodothermus marinus</i>	7.0	85	542	R. Spilliaert et al., 1994
Archaea	<i>Pyrococcus furiosus</i>	6.0	100	922	Y. Gueguen et al., 1997

<86> **실시예 4: 박막크로마토그래피를 이용한 베타-1,3-글루카나아제에 의한 라미나린의 분해산물 확인**

<87> 본 발명의 일 실시예에서는 베타-1,3-글루카나아제에 의해 가수분해된 라미나린의 분해산물을 확인하기 위하여, 실시예 2에서 제조된 형질전환체에 의해 생산된 베타-1,3-글루카나아제에 의한 라미나린 가수분해산물을 통상적으로 사용되는 박막크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)법을 이용하여 분석하였다(A.I. Vogel et al., Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Edition). 결과를 도 8에 나타내었다.

<88> 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타-1,3-글루카나아제에 의해 가수분해된 라미나린의 분해산물을 박막크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)로 분석한 결과로서, M.K는 마커, G1은 포도당(글루코스), L2는 라미나리바이오스, L3는 라미나리트리오스, L4는 라미나리테트로오스, L5는 라미나리펜토오스, L6은 라미나리헥소오스, 및 Lam.은 라미나린을 각각 가리킨다.

<89> 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제를 이용하여 L2 내지 L6 올리고당을 분해하였을 때, L2 올리고당은 절단되지 않았으나, L3 내지 L6 올리고당은 절단되어 글루코스(G), 라미나리바이오스(L2) 및 라미나리트리오스(L3)의 라미나린의 분해산물이 생성됨을 확인하였다(도 8). 이는, 본 발명의 베타-1,3-글루카나아제 효소가 엔도-베타-1,3-글루카나아제라는 것을 의미하며, 또한 기질이 분해되기 위해서는 글루코스가 최소한 3개 이상인 올리고당이 되어야 하며, 라미나린의 경우 그 분해산물은 대부분 글루코스, 라미나리바이오스 및 라미나리트리오스임을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<90> 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 남극톡토기(*Cryptopygus antarcticus*)로부터 분리한 베타-1,3-글루카나아제의 전장 cDNA 서열을 나타낸 것으로, 단일선은 예측된 신호서열을, * 표시는 종결코돈(TAA)을, 이중선은 예측된 폴리아닐레이션 서열을 각각 가리킨다.

<91> 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 남극톡토기(*C. antarcticus*로 표시함)로부터 분리한 베타-1,3-글루카나아제의 아미노산 서열과 다른 종의 베타-1,3(4)-글루카나아제 및 글루카나아제 유사 단백질의 아미노산 서열의 상동성 분석을 나타낸 도면으로, * 표시는 각 효소 사이의 보전된 잔기를, # 표시는 효소활성에 중요한 촉매활성 잔기를 각각 가리킨다.

<92> 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 남극톡토기로부터 분리한 베타-1,3-글루카나아제 유전자를 분석한 것으로, 도 3a는 베타-1,3-글루카나아제의 게놈 DNA 및 cDNA를 증폭한 PCR 사진이고, 도 3b는 게놈 DNA로부터 증폭된 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 엑손(exon; 대문자로 표시함) 및 인트론(intron; 소문자로 표시함)의 염기서열을 나타낸 것이고, 도 3c는 게놈상에 존재하는 베타-1,3-글루카나아제 유전자의 구조를 나타낸 것이다.

<93> 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타-1,3-글루카나아제를 발현하는 발현벡터의 클로닝 과정 및 개열지도를 나타낸 것이다.

<94> 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 발현벡터로 형질전환된 형질전환체에서의 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제 융합단백질(Trx-CaLam) 및 상기 단백질의 티오리독신을 제거한 베타-1,3-글루카나아제(CaLam)의 발현양상을 SDS-PAGE로 분석한 겔(gel) 사진이다.

<95> 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 pH(a) 및 온도(b)에 따른 본 발명의 티오리독신-베타-1,3-글루카나아제(■) 및 베타-1,3-글루카나아제(□)의 효소활성 변화를 나타낸 그래프이다.

<96> 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 Ca^{2+} 의 존재유무에 따른 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 나타낸 그래프로서, (●)는 2.5 mM의 Ca^{2+} 이 첨가된 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를, (○)는 Ca^{2+} 이 비첨가된 (1 mM의 EDTA 첨가) 베타-1,3-글루카나아제의 열안정성 변화를 각각 측정한 그래프이다.

<97> 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타-1,3-글루카나아제에 의해 가수분해된 라미나린의 분해산물을 박막크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)로 분석한 결과로서, M.K는 마커, G1은 포도당(글루코스), L2는 라미나리바이오스, L3는 라미나리트리오스, L4는 라미나리테트로오스, L5는 라미나리펜토오스, L6은 라미나리헥소오스, 및 Lam.은 라미나린을 각각 가리킨다.

도면

도면1

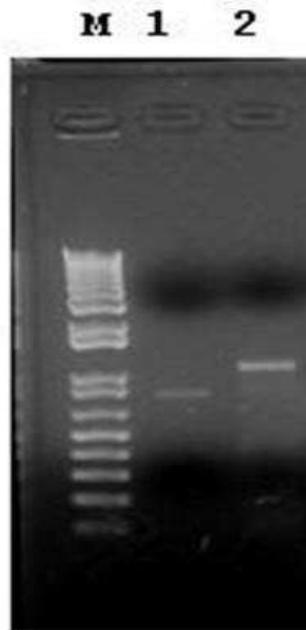
```

acagtcagtcggaattaatctggaaaac
1 ATGAACGCATTTACATTTCCCCTACTTTTGGCGTTCTGCGCCTTTGCCACGGTGCATGG
1 M N A F T F P L L L A F C A F A H G A W
61 GTGTTGGACTGGGAGGATGAATTCACCGGAGGAAAATTTAGCAGATAGATGGAATTTTCGAG
21 V L D W E D E F N G G N L A D R W N F E
121 TTGGGGTGCATGTTGGGGAAACAATGAGCTTCAATGCTACACCGACAACAGAGGTGCC
41 L G C N G W G N N E L Q C Y T D N R G A
181 AATGCCAGACAAGAGGACGGAAAATTTGGTCACTCTCGGCCGTGAGGGAGTGGTGGGGCGAT
61 N A R Q E D G K L V I S A V R E W W G D
241 GGAGTTAATCCAGACAAAGAATTCACCTCTGCCCGTATGACCACAAAGGCTAATTTGGCTT
81 G V N P D K E F T S A R M T T K A N W L
301 CATGAAAGTTTGGATGAGAGCAGATTGCCAAGGGTAAACATCTCTGGCCTGCATTC
101 H G K F E M R A R L P K G K H L W P A F
361 TGGATGATGCCCCAAAATTCAGAATACGGCGGTTGGCCCCGGAGTGGAGAAATTTGATATT
121 W M M P Q N S E Y G G W P R S G E I D I
421 ACTGAATACAGGGGGCAAAGCCACAACAGATTTTGGGAACCCCTCACTTTGGAGCTGCA
141 T E Y R G Q K P Q Q I L G T L H F G A A
481 TGGGACAACAAGGGTGTGCGGAACTGGCGCAAGAGACTTTCCAATCGACTTTTCTGCC
161 W D N K G D A G T G A R D F P I D F S A
541 GATTTCCACACTTTTGGATTGGACTGGTCCCCTGATTCCATTCATGGCTTTTGGATGAC
181 D F H T F G L D W S P D S I Q W L L D D
601 CAAGTTTACCACACAGAGTCTCTCAAAGAACTTCTGGGATGGCGTCTACAACCAAAT
201 Q V Y H T E S L Q R N F W D G V Y N Q N
661 GGGTCTCCCTTTGATAAAAACCTTTTTCATCATTTTGAACTTGGCCGTTGGTGGAACTTC
221 G S P F D K N F F I I L N L A V G G N F
721 TTTGGGGTGAACCTTTTCGATCCCAGTGAGTCTGATGGCTGGGCAAAGAATACTTTGGAA
241 F G G E P F D P S E S D G W A K N T F E
781 GTTGAATATGTCAAGAAATGGACGTGGAATTAatcttttcatctagaaatttttatctt
261 V E Y V K K W T W N
841 aatattcccgttgtaaatcogagctattaataaaattttgccaaattggtattttgag
    
```

도면2

C. antarcticus	22	LDWEDEFNGG---NLADRWNFELGCN-----GWMNNELQCCTDNRGANARQEDGKLV	71
B. xylophilus	17	VIWQEDFN-----SLDTSKWNFPETGN-----NNGWGNSELECYTT-SSNNVVRVENG	65
T. neapolitana	218	LVWSQEFDDG---VIDPNVWFIEIGHGARGIPGMGNABLEYT---DKNAFVENGKLV	271
R. marinus	42	LVWSDEFDYSG--LPDPEKWDYDVGG-----HGWMNQELQYYTRARIENARVGGVLLI	93
P. puriosus	48	LIWHDEFEGS---EVNKEYWTFEKGNGIAYGIPGMNGELEYYT---ENNTYIVNGTLVI	101
X. axonopodis	37	LVWEDNFNFGP---SIDGPKWYDVGNCGQIGLCGMNGEMQYYT-SRTENARIENGRUV	92
T. tridentatus	27	LVWSDEFTNG-----ISSDWEFEMGNG-----LNGWMNNELQYY---RRENAQVEGGKLV	74
O. xanthineolyti	68	LAWSDEFDGAAGSAPNPDVWNHETGAG-----GWMGNAELQNYTTSRVNSALDGGQNLVI	121
B. circulans	33	LVWSDEFNGTS--L-NRANWTFEIGTG---SGGWMNNELQYYT-DRAQNVQVTGGNLVI	84
B. cirulans	428	LIWQDEFNGTALDQSKWNYETGYLLNDDPNTW-GWGNSELQHYT-DRAQNVFVQGNLNI	485
		: * : : *	**** * : : *
			.. * * :
C. antarcticus	72	SAVREWWGD-GVNPD---KEPTSARMT--TRANWL-HGKFEMRARLPKPKG-HLWPAFWMM	123
B. xylophilus	66	BARRENVDG-----CSFTSGRIHTRGKDFPK-YGTIEARIKLPNLANGLWPAFWML	115
T. neapolitana	272	EARKEQVSD-EYGT---YDYTSARITTEGKFEIK-YGKIEIRAKLPKPKG-GIWPALWML	324
R. marinus	94	EARHEFYEG-----REYTSARLVTRGKASWT-YGRFEIRARLP SGR-GTWPALWML	142
P. puriosus	102	EARKEIITDPNEG---FLYTSRLKTEGKVEFSPVVVEARIKLPKPKG-GLWPAFWML	156
X. axonopodis	93	BARREAFGG-----MPPTSARLKTGEMHFT-YGTLEARIKTPVVVNGLWPAFWML	142
T. tridentatus	75	TAKREDYDG-----FKYTSARLKTQFDKSWK-YGKIEARMAIP SFR-GVWVWFMM	123
O. xanthineolyti	122	TALQESDGS-----YTSARLTTQGNVQPG-FGRIEARIQIPRQG-GIWSAFWMM	168
B. circulans	85	TAQKESYGG-----MNYTSARLKTQDLKST-YGKVEARIKLPKSG-GLWPAFWML	133
B. cirulans	486	KALNEPKSFPQDPSRYAQ--YSSGKINTKDHFSLK-YGRVDFRAKLPKGN-GIWPALWML	541
		* . *	: : * : *
			: : * * **
C. antarcticus	124	PQNSEYG--GWPRSGEIDITEYRQKQPQ-----ILGTLHFGAAWDNKGDAGTGARDF	174
B. xylophilus	116	GAESN---TWPDQGEIDIMEAGVADAIAGNVNKEILGTFHWSN-NGQHAQYGTNYVAP	170
T. neapolitana	325	GNNIGEV--GWPTCGEIDIMENLGHDRTR-----VLRTAHGEFGYSGGASIGVAYHLP	375
R. marinus	143	PDRQTYGSAYWPDNGEIDIMEHVGFNPDV-----VHGTVHTKAYNHLLGTQRGGSIRV	195
P. puriosus	157	GSNIREV--GWPNCGEIDIMEFLGHEPRT-----IHGTVHGFYSGSKITRAYTLPE	207
X. axonopodis	143	GTIG-----VMPGRGEIDIMEAGMAAAIANGTANRRIGAAVHWDY-NGSQADYDTSYTNP	196
T. tridentatus	124	GDNTNYV--RWPSGGEIDIFIEHRNT-----NNEKVRGTIHWSTPDGAHAHNNRES---	171
O. xanthineolyti	169	GANLEDT--EWPTSGEIDIMENVGNAPHE-----VHGTVHGFYSGDNGIMGTYQHPQ	219
B. circulans	134	GSNISSV--GWPKSGEIDIMERNV-----NNPYVNGTVHMDA--GGHADFRVRSV--	179
B. cirulans	542	PQDNVYG--TWASSGEIDVMEAKGRLPGS-----TSGAVHFGGQWPTNRYLSGEYHFP	592
		* . * : # : #	: *
C. antarcticus	175	PIDFS---ADFHTPGLDWSPDSIQWLLDDQVYHTESLQRNFWDGVYVQ-NG--SPFDKNF	228
B. xylophilus	171	----NDLTTDFHVYKLTWSQSEIKMFIIDDIQYMFV-----ITPLP-----VFQKNF	213
T. neapolitana	376	EVVD--FSEDFHVF SIEWDENEVEWYVDGQLYHVLS---KDELAELGL---EWVDFHFP	426
R. marinus	196	PTART---DFHVYAIETWPEIRWVDDSLYRFF--NERLTDPEADWR---HWPFDPQF	247
P. puriosus	208	GVVD--FTEDFHVFGIVWYDPDKIKWYVDGTFYHEVT---KEQVEAMGY---EWVFDKPF	258
X. axonopodis	197	----VNLHDDFHVYRLTWDPQFIRVSDIGQQYFEFA---IPNIEGASL---HEFHQQQ	244
T. tridentatus	172	----NTNGIDYHIYSVEWNSSVKWFVNGNQYFEVK---IQGGVNGK---SAPRNKV	218
O. xanthineolyti	220	GWS---FADDHFTPGIDWTPGEITWLVDDGQYHRVT---TADVGN-----QWVFDQPF	267
B. circulans	180	----NLDFSQFHVYSIEWDSKYIRWVVDGQFNEFY---IENGTGNT---EEFQRPF	226
B. cirulans	593	--EGQTFANDYHVYSVVVEEDNIKWYVDGKFFPKVT--RDQWYSAAAP-NNPNAPFDQPF	647
		: * : : *	: : . :
			* .
C. antarcticus	229	FILNLAVGGNFFGGEPDPSES DGMAKNTFEVEYVKKWTWN----	270
B. xylophilus	214	YVLLNLAVGG-NFPNIHDAGA-VTAPLPGQMLVDYIKVTQ-----	251
T. neapolitana	427	FLILNVAMGG-YWPGYPDE---TTOFPQRMVYIDYIRVYKDMNF--	465
R. marinus	248	HLIMNLAVGG-AWGGQQGVD---PEAFPAQLVVDYVRVYRWVE---	286
P. puriosus	259	YIILNLAVGG-YWPGNPD-----TTPPAKMVVDYVRVYSPVSG--	297
X. axonopodis	245	YLLLNLAVGG-TFTGVTSPAA-VTAPLPGKMEVDYIRLYQNPFS--	286
T. tridentatus	219	FVILNMAIGG-NWPGFDVA---DEAPPAKMYIDYVRVYQDASTS-	258
O. xanthineolyti	268	FLILNVAIGG-QWPGNPD-----TTPFPQMKVDYVRVYDNTAQ--	306
B. circulans	227	FILLNLAVGG-NWPGSPNN---STPPSQMLVDYVRVYQDTGA--	265
B. cirulans	648	YLIMNLAIGG-TPDGGRTPD---PSDIPATMQVDYVRVYKEGEGGG	689
		..: : * : * * : .	: : * : :

도면3a

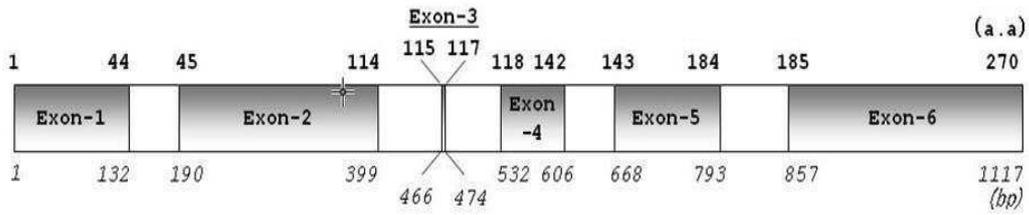


도면3b

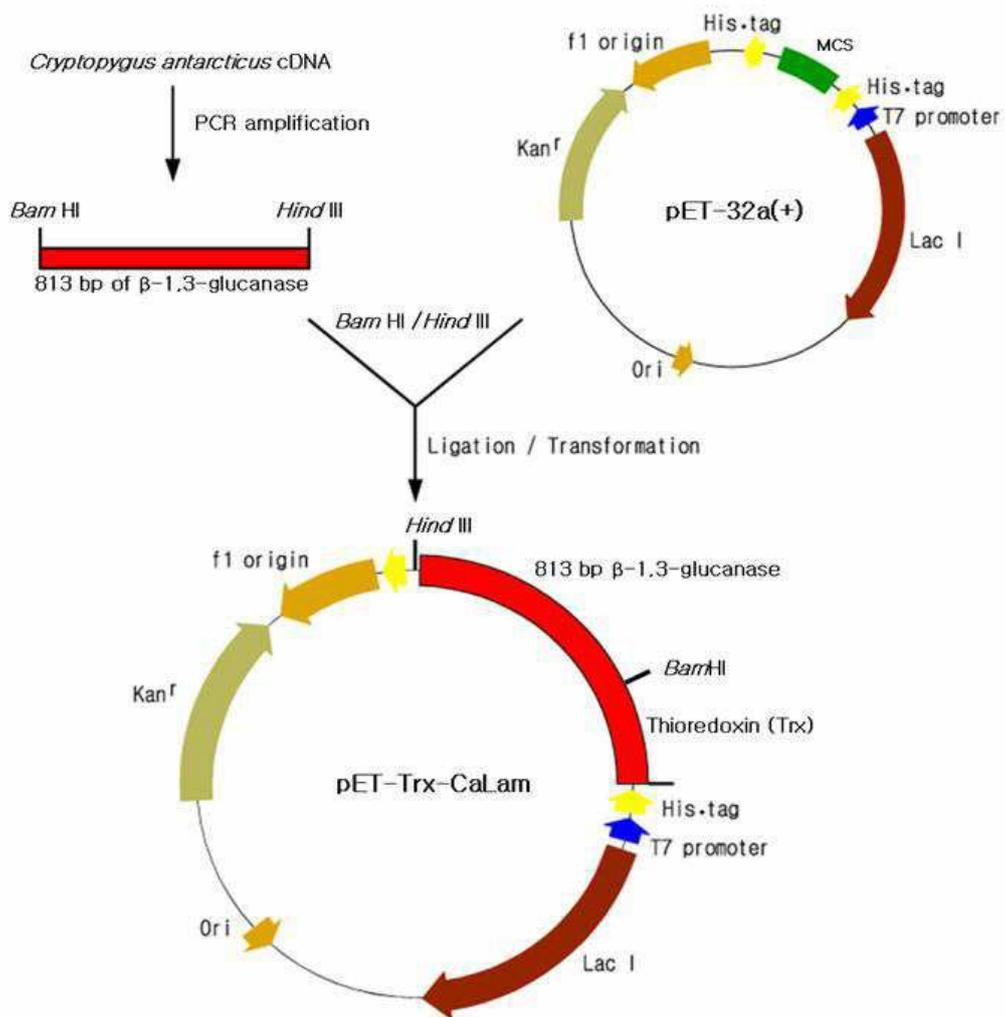
```

1 ATGAACGCATTTACATTTCCCTACTTTTGGCGTTCTGCGCCTTTGCCACGGTGCATGG
61 GTGTTGGACTGGGAGGATGAATTCACGGAGGAAATTTAGCAGATAGATGGAATTTGAG
121 TTGGGGTGCAATggttaagttatttaaaggtatTTTTTTTaaacataaaacaagattgt
181 attcccaaaGGTTGGGAAACAATGAGCTTCAATGCTACACCGACAACAGAGGTGCCAAT
241 GCCAGACAAGAGGACGAAAATTGGTCATCTCGGCCGTGAGGGAGTGGTGGGGCGATGGA
301 GTTAATCCAGACAAAGAATTCACCTCTGCCCGTATGACCACAAAGGCTAATTGGCTTCAT
361 GGAAAGTTTGAGATGAGAGCAGGATTGCCAAGGGTAAAatTTgaaacttatcaaaaaat
421 gcaatgataactaatcttaagattcTTTTataaattataggcaaaCATCTCTGGtaacat
481 tttaaagcctatttaaacatactgtgtTTTTatctttctatatgatctaggCCTGCATTC
541 TGGATGATGCCCCAAAATTCAGAATACGGCGGTTGGCCCCGGAGTGGAGAAATTGATATT
601 ACTGAAgtatgtatagtttatttaaataattaatgatttttatttttatttttaactctt
661 tatttagTACAGGGGGCAAAGCCACAACAGATTTTGGGAACCCTTCACTTTGGAGCTGC
721 ATGGGACAACAAGGGTGTGCCGGAAGTGGCGCAAGAGACTTTCCAATCGACTTTTCTGC
781 CGATTTCCACACTgtaatttcaaatTTTTattttattagattacattttcttaatttatt
841 tgaattatttgaatagTTTGGATTGGACTGGTCCCCTGATTCATTCAATGGCTTTTGG
901 TGACCAAGTTTACCACACAGAGTCTTTCAAAGAACTTCTGGGATGGCGTCTACAACCA
961 AAATGGGTCTCCCTTTGATAAAAACTTTTTCATCATTTTGAACCTTGGCCGTTGGTGGAAA
1021 CTTCTTTGGGGTGAACCTTTGATCCCAGTGAGTCTGATGGCTGGGCAAAGAATACTTT
1081 TGAAGTTGAATATGTCAAGAAATGGACGTGGAATTAA
    
```

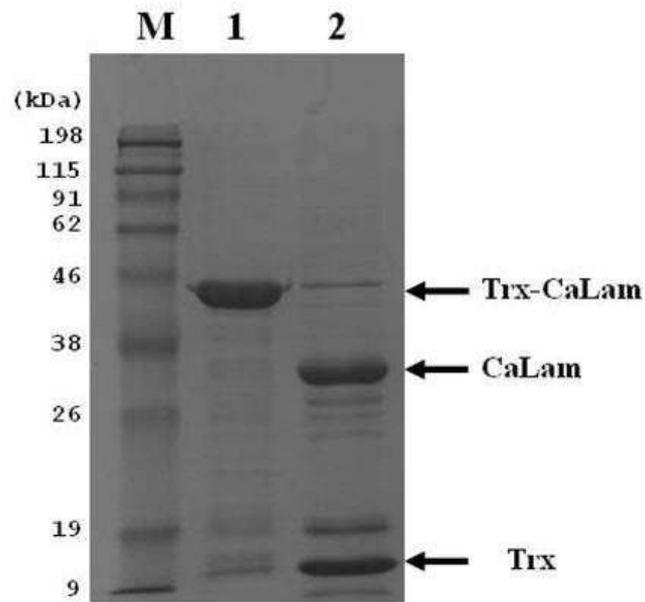
도면3c



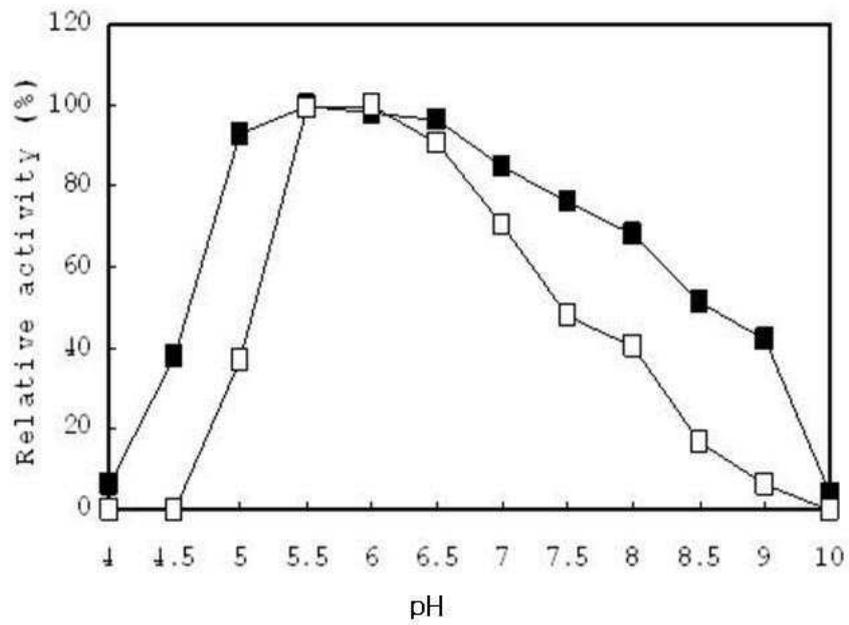
도면4



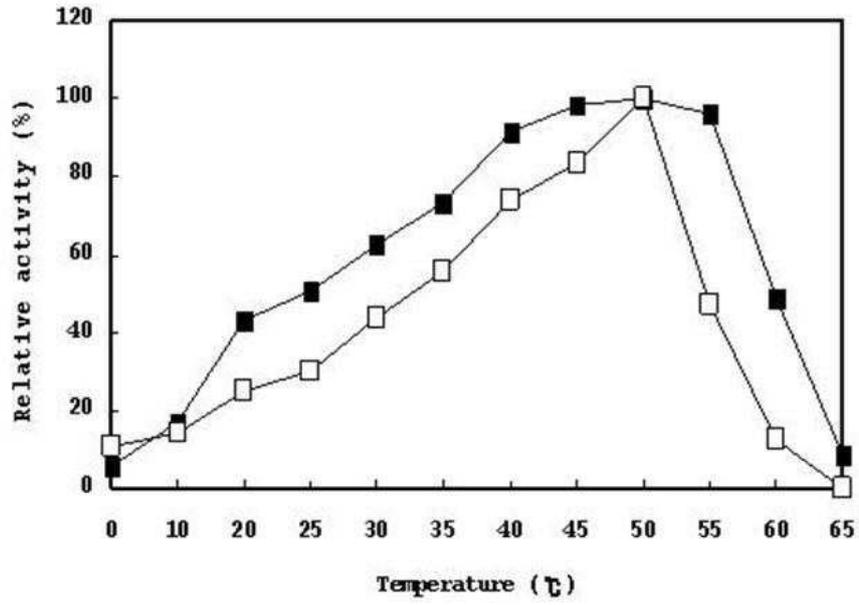
도면5



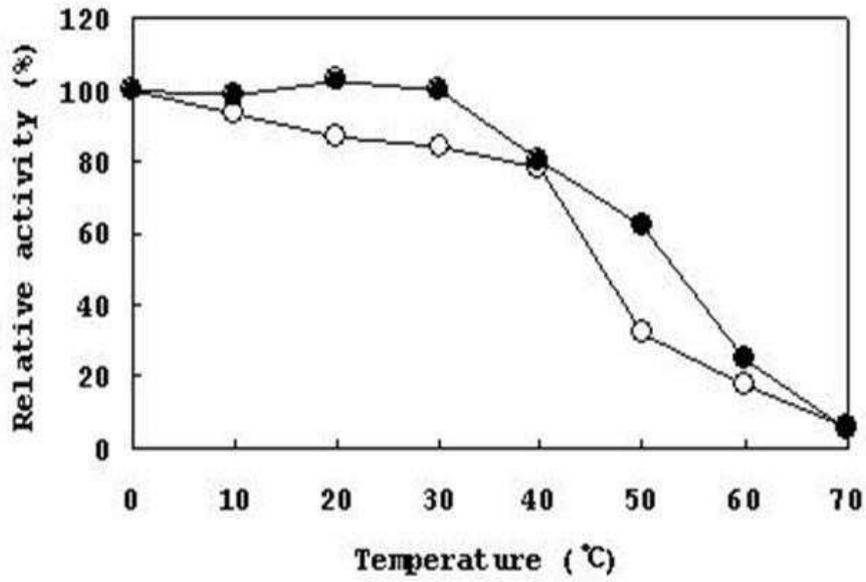
도면6a



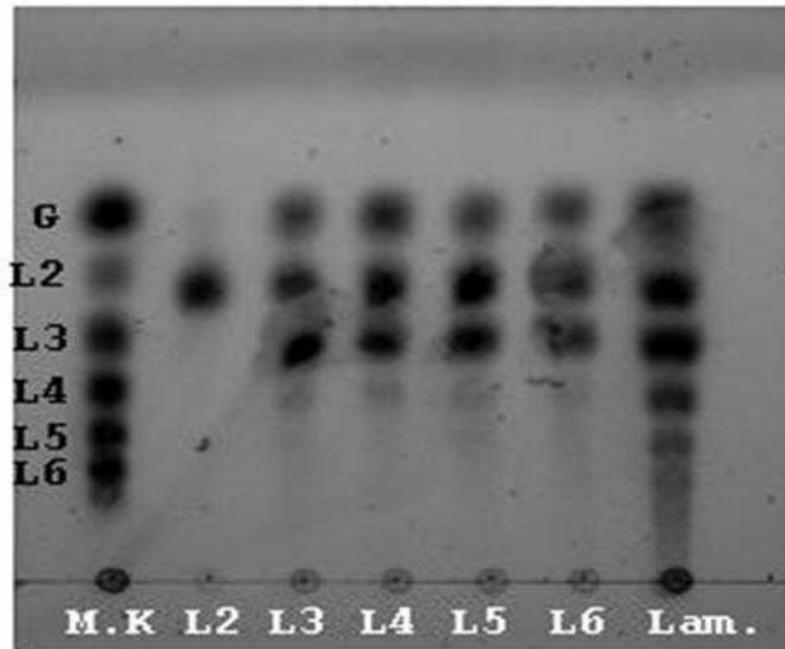
도면6b



도면7



도면8



서열 목록

<110> Korea Ocean Research & Development Institute
 <120> BETA-1,3-GLUCANASE FROM CRYPTOPYGUS ANTARCTICUS, GENE ENCODING THE SAME, AND USE THEREOF

<130> DPP-2007-2598-KR

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 926
 <212> DNA
 <213> Full length sequence for beta-1,3-gluconase gene

<400> 1
 acagtcagtc ggaattaatc tggaaaacat gaacgcattt acatttcccc tacttttggc 60

gttctgcgcc tttgccacg gtgcatgggt gttggactgg gaggatgaat tcaacggagg 120

aaatttagca gatagatgga atttcgagtt ggggtgcaat ggttggggaa acaatgagct 180

tcaatgctac accgacaaca gaggtgccaa tgccagacaa gaggacggaa aattggtcat 240

ctcggccgtg agggagtggg ggggcgatgg agttaatcca gacaaagaat tcacctctgc 300

ccgtatgacc acaaaggcta attggcttca tggaaagttt gagatgagag cacgattgcc 360

caagggtaaa catctctggc ctgcattctg gatgatgccc caaaattcag aatacggcgg 420

ttggccccgg agtggagaaa ttgatattac tgaatacagg gggcaaaagc cacaacagat 480

tttgggaacc cttcactttg gagctgcatg ggacaacaag ggtgatgccg gaactggcgc 540

aagagacttt ccaatcgact tttctgccga tttccacact tttggattgg actggtcccc 600

tgattccatt caatggcttt tggatgacca agtttaccac acagagtctc ttcaaagaaa 660

cttctgggat ggcgtctaca accaaaatgg gtctcccttt gataaaaact ttttcatcat 720

tttgaacttg gccgttgggt gaaacttctt tgggggtgaa cctttcgatc ccagtgagtc 780

tgatggctgg gcaaagaata cttttgaagt tgaatatgtc aagaaatgga cgtggaatta 840

aatcttttca tctagaaatt tttatcttaa tattccggtt gttaaattcg agctattaat 900

aaattttgcc aaattgttat tttgag 926

<210> 2
 <211> 813
 <212> DNA
 <213> Coding sequence for beta-1,3-glucanase gene

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(810)

<400> 2
 atg aac gca ttt aca ttt ccc cta ctt ttg gcg ttc tgc gcc ttt gcc 48
 Met Asn Ala Phe Thr Phe Pro Leu Leu Leu Ala Phe Cys Ala Phe Ala
 1 5 10 15

cac ggt gca tgg gtg ttg gac tgg gag gat gaa ttc aac gga gga aat 96

His Gly Ala Trp Val Leu Asp Trp Glu Asp Glu Phe Asn Gly Gly Asn
 20 25 30

tta gca gat aga tgg aat ttc gag ttg ggg tgc aat ggt tgg gga aac 144
 Leu Ala Asp Arg Trp Asn Phe Glu Leu Gly Cys Asn Gly Trp Gly Asn
 35 40 45

aat gag ctt caa tgc tac acc gac aac aga ggt gcc aat gcc aga caa 192
 Asn Glu Leu Gln Cys Tyr Thr Asp Asn Arg Gly Ala Asn Ala Arg Gln
 50 55 60

gag gac gga aaa ttg gtc atc tcg gcc gtg agg gag tgg tgg ggc gat 240
 Glu Asp Gly Lys Leu Val Ile Ser Ala Val Arg Glu Trp Trp Gly Asp
 65 70 75 80

gga gtt aat cca gac aaa gaa ttc acc tct gcc cgt atg acc aca aag 288
 Gly Val Asn Pro Asp Lys Glu Phe Thr Ser Ala Arg Met Thr Thr Lys
 85 90 95

gct aat tgg ctt cat gga aag ttt gag atg aga gca cga ttg ccc aag 336
 Ala Asn Trp Leu His Gly Lys Phe Glu Met Arg Ala Arg Leu Pro Lys
 100 105 110

ggt aaa cat ctc tgg cct gca ttc tgg atg atg ccc caa aat tca gaa 384
 Gly Lys His Leu Trp Pro Ala Phe Trp Met Met Pro Gln Asn Ser Glu
 115 120 125

tac ggc ggt tgg ccc cgg agt gga gaa att gat att act gaa tac agg 432
 Tyr Gly Gly Trp Pro Arg Ser Gly Glu Ile Asp Ile Thr Glu Tyr Arg
 130 135 140

ggg caa aag cca caa cag att ttg gga acc ctt cac ttt gga gct gca 480
 Gly Gln Lys Pro Gln Gln Ile Leu Gly Thr Leu His Phe Gly Ala Ala
 145 150 155 160

tgg gac aac aag ggt gat gcc gga act ggc gca aga gac ttt cca atc 528
 Trp Asp Asn Lys Gly Asp Ala Gly Thr Gly Ala Arg Asp Phe Pro Ile
 165 170 175

gac ttt tct gcc gat ttc cac act ttt gga ttg gac tgg tcc cct gat 576
 Asp Phe Ser Ala Asp Phe His Thr Phe Gly Leu Asp Trp Ser Pro Asp
 180 185 190

tcc att caa tgg ctt ttg gat gac caa gtt tac cac aca gag tct ctt 624
 Ser Ile Gln Trp Leu Leu Asp Asp Gln Val Tyr His Thr Glu Ser Leu

Ala Asn Trp Leu His Gly Lys Phe Glu Met Arg Ala Arg Leu Pro Lys
 100 105 110

Gly Lys His Leu Trp Pro Ala Phe Trp Met Met Pro Gln Asn Ser Glu
 115 120 125

Tyr Gly Gly Trp Pro Arg Ser Gly Glu Ile Asp Ile Thr Glu Tyr Arg
 130 135 140

Gly Gln Lys Pro Gln Gln Ile Leu Gly Thr Leu His Phe Gly Ala Ala
 145 150 155 160

Trp Asp Asn Lys Gly Asp Ala Gly Thr Gly Ala Arg Asp Phe Pro Ile
 165 170 175

Asp Phe Ser Ala Asp Phe His Thr Phe Gly Leu Asp Trp Ser Pro Asp
 180 185 190

Ser Ile Gln Trp Leu Leu Asp Asp Gln Val Tyr His Thr Glu Ser Leu
 195 200 205

Gln Arg Asn Phe Trp Asp Gly Val Tyr Asn Gln Asn Gly Ser Pro Phe
 210 215 220

Asp Lys Asn Phe Phe Ile Ile Leu Asn Leu Ala Val Gly Gly Asn Phe
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Glu Pro Phe Asp Pro Ser Glu Ser Asp Gly Trp Ala Lys
 245 250 255

Asn Thr Phe Glu Val Glu Tyr Val Lys Lys Trp Thr Trp Asn
 260 265 270

- <210> 4
- <211> 1230
- <212> DNA
- <213> Genome sequence for beta-1,3-glucanase gene

<400> 4
 acagtcagtc ggaattaatc tggaaaacat gaacgcattt acatttcccc tacttttggc

gttctgcgcc ttgcccacg gtgcatgggt gttggactgg gaggatgaat tcaacggagg 120

aaatttagca gatagatgga atttcgagtt ggggtgcaat ggtaagttat ttaaaggtat 180

tttttttaa acatataaac aagattgtat tcccaaaggt tgggaaaca atgagcttca 240

atgctacacc gacaacagag gtgccaatgc cagacaagag gacggaaaat tggatcatctc 300

ggccgtgagg gagtgggtgg gcgatggagt taatccagac aaagaattca cctctgcccc 360

tatgaccaca aaggctaatt ggcttcatgg aaagtttgag atgagagcac gattgcccac 420

gggtaaaatt tgaacttat caaaaaatgc aatgatacta atcttaagat tccttttata 480

aattataggc aaacatctct ggtaacattt taaagcctat ttaaacatac tgtgttttta 540

tctttctata tgatctagc ctgcattctg gatgatgccc caaaattcag aatacggcgg 600

ttggccccgg agtggagaaa ttgatattac tgaagtatgt atagtttatt ttaaataatta 660

atgattttta tttttattt taactcttta tttagtagag ggggcaaaag ccacaacaga 720

ttttgggaac ccttcacttt ggagctgcat gggacaacaa gggatgatcc ggaactggcg 780

caagagactt tccaatcgac ttttctgccg atttccacac tgtaatttca aatttttatt 840

ttattagatt acattttctt aatttatttg aattatttga atagtttgga ttggactggt 900

ccctgattc cattcaatgg cttttggatg accaagttta ccacacagag tctcttcaaa 960

gaaacttctg ggatggcgtc tacaacaaa atgggtctcc ctttgataaa aactttttca 1020

tcattttgaa ctggccggtt ggtggaaact tctttggggg tgaacctttc gatcccagtg 1080

agtctgatgg ctgggcaaag aatacttttg aagttgaata tgtcaagaaa tggacgtgga 1140

attaaatctt ttcatctaga aatttttatc ttaatatcc cgttggttaa ttcgagctat 1200

taataaattt tgccaaatig ttattttgag 1230

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for beta-1,3-glucanase gene

<400> 5
 atgaacgcat ttacatttcc cct 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for beta-1,3-glucanase gene

<400> 6
 ttaattccag ctccatttct tga 23

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for signal sequence deleted beta-1,3-glucanase gene

<400> 7
 nnnnnnggat ccgcatgggt gttggactgg gagga 35

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for signal sequence deleted beta-1,3-glucanase gene

<400> 8

nnnnnaagc tttaattcc acgtccattt cttga

35