



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월05일  
(11) 등록번호 10-1771577  
(24) 등록일자 2017년08월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01) C12P 33/16 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-0018240  
(22) 출원일자 2011년02월28일  
심사청구일자 2016년02월23일
- (65) 공개번호 10-2012-0056188  
(43) 공개일자 2012년06월01일
- (30) 우선권주장  
1020100117515 2010년11월24일 대한민국(KR)  
1020100123092 2010년12월03일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
안동선, 인삼발토양에서 분리한 인삼사포닌전환세균에 대한 특성연구, 한국과학기술원 생명과학과 박사학위 논문 (2009.02).  
KR1020110018240 A  
KR1020080014188 A  
KR1020110031023 A
- (73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
한국과학기술원  
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
- (72) 발명자  
김성건  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
안동선  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 19 항

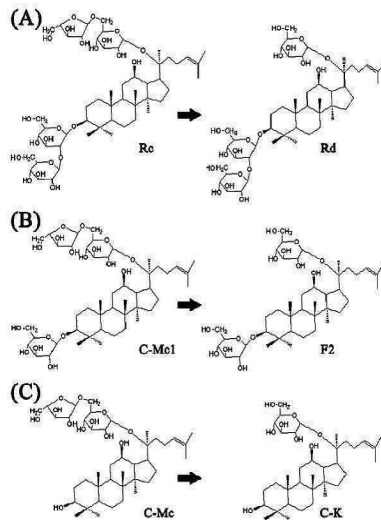
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 **로다노박터 진세노시디뮤탄스 유래의 알파-N-아라비노푸라노시다제 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 로다노박터 진세노시디뮤탄스(*Rhodanobacter ginsenosidimutans*) 유래의 알파-N-아라비노푸라노시다제 및 이의 용도에 관한 것으로, 이 단백질은 진세노사이드의 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 선택적으로 가수분해하여 PPD(*protopanaxadiol*) 타입 또는 PPT(*protopanaxatriol*) 타입 진세노사이드를 체내 흡수 가능한 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드로 전환하는 활성을 가진다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

**이성택**

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명과학과 (구성동)

**임완택**

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명과학과 (구성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IGM1751011

부처명 민간수탁

연구관리전문기관 주식회사 엠오에스

연구사업명 수탁과제

연구과제명 세균유래 재조합효소를 이용한 마이너 인삼사포닌 F2의 대량 생산기술개발

기여율 1/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.07.01 ~ 2010.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KBM4111022

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 생물자원확보 및 지원기반기술

기여율 1/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.01.01 ~ 2010.12.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 갖는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 있어서, PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드의 20번째 탄소에 위치한  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 가지는 것을 특징으로 하는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제.

**청구항 5**

제1항의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 핵산은 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 갖는 핵산.

**청구항 7**

제5항의 핵산을 포함하는 제조합 벡터.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 벡터는 pET-MBP-TEV-Araf3054로 도 9에 기재된 개열지도를 갖는 제조합 벡터.

**청구항 9**

제5항의 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 제조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균(E.coli)인 형질전환체.

**청구항 11**

- (a) 제9항의 형질전환체를 배양하는 단계,
- (b) 상기 배양된 형질전환체로부터  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 생산하는 단계, 및
- (c) 상기 생산된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 회수하는 단계를 포함하는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제의 제조방법.

**청구항 12**

제1항의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 제11항에 의해 제조된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 제9항의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하는 단계를 포함하여 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드를 제조하는 방법

**청구항 13**

제12항에 있어서, 제1진세노사이드는 PPD(*protopanaxadiol*) 타입 또는 PPT(*protopanaxatriol*) 타입 진세노사이드인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제12항에 있어서,  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제에 의해 PPD(*protopanaxadiol*) 타입 또는 PPT(*protopanaxatriol*) 타입 진세노사이드의 20번째 탄소에 위치한 비환원된  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기가 가수분해되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제12항에 있어서,  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제에 의해 진세노사이드 Rc로부터 진세노사이드 Rd로의 전환, C-MC1로부터 진세노사이드 F2로의 전환, 및 진세노사이드 C-MC로부터 C-K로의 전환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 전환 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제12항에 있어서, pH를 6 ~ 10로, 온도를 4~37 °C 조절하여  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제가 효소작용할 수 있게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제12항에 있어서,  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제는 pNP- $\alpha$ -L-아라비노푸라노사이드(pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside)를 기질로 이용할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제12항에 있어서,  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제의 효소작용은 MgCl<sub>2</sub>, EDTA, NaCl, KCl, DTT 및 베타-머캅토에탄올로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질과 함께 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제12항에 있어서,  $\beta$ -글루코시다제,  $\beta$ -갈락토시다제, 글리코시다제,  $\alpha$ -L-아라비노피라노시다제,  $\alpha$ -L-아라비노푸라노시다제,  $\beta$ -자일로시다아제, 및  $\alpha$ -L-람노시다제로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 효소를 더 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제1항의  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제, 제11항에 의해 제조된  $\alpha$ -*N*-아라비노푸라노시다제, 제9항의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 유효성분으로 포함하는, PPD(*protopanaxadiol*) 타입 또는 PPT(*protopanaxatriol*) 타입의 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드로의 전환용 키트.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 동일 또는 다른 용기에  $\beta$ -글루코시다제,  $\beta$ -갈락토시다제, 글리코시다제,  $\alpha$ -L-아라비노피라노시다제,  $\alpha$ -L-아라비노푸라노시다제,  $\beta$ -자일로시다아제, 및  $\alpha$ -L-람노시다제로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 효소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 로다노박터 진세노시디뮤탄스(*Rhodanobacter ginsenosidimutans*) 유래의 알파-N-아라비노푸라노시다제 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0001]

- [0002] 인삼은 한국, 중국 및 일본을 포함한 아시아에서 건강과 장수를 촉진하기 위한 의약품으로서 사용되어 왔으며, 또한 미국에서는 식물 수준에서의 치료 용도로 사용되고, 유럽, 특히 독일에서는 한방 치료를 목적으로 사용된다.
- [0003] 사포닌은 식물계에 널리 존재하는 배당체에서 당이 아닌 부분이 여러 고리 화합물로 이루어진 물질을 의미하며, 인삼 또는 홍삼에 주요 생리활성 성분으로 포함된 사포닌 성분인, 트리테르펜사포닌(triterpene saponin)은 타 식물에서 발견되는 사포닌과는 화학 구조가 상이하므로 이러한 인삼 사포닌을 타 식물계 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(Ginseng) 배당체(Glycoside)란 의미로 진세노사이드라고 부른다.
- [0004] 현재까지, 180개가 넘는 진세노사이드가 정제, 특성화 및 분류되었다(Christensen, L. P. 2008. Ginsenosides. Chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. Adv. Food Nutr. Res. 55:1-99). 진세노사이드의 기본 구조는 주 골격에 특이적 위치로 부착된, 하나 내지 세 개의 잔기, 즉 글리코피라노실, 아라비노피라노실, 아라비노퓨라노실, 자일로피라노실, 또는 람노피라노실 그룹을 가진 테트라사이클릭 트리테르펜 다마렌(dammarane) 또는 펜타사이클릭 올레아난(oleanane) 골격으로 구성된다. 다마렌 타입 진세노사이드는 주로 그들 고유의 아글리콘 잔기에 따라서 분류된다: 프로토파낙사이다이올계 (PPD), 프로토파나사트라이올계(PPT), 및 오코티롤(ocotillo).
- [0005] 진세노사이드 조성은 여러 가지 인삼 종으로 다양화된다. 예를 들어, 한국 인삼 (*Panax ginseng*)은 22개의 PPD 타입 진세노사이드와 14 개의 PPT 타입 진세노사이드를 포함하는 반면, 미국 인삼 (*Panax notoginseng*)은 13개의 PPD 타입 진세노사이드와 5개의 PPT 타입 진세노사이드를 포함한다(Choi, K. T. 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C A Meyer. Acta Pharmacol. Sin. 29:1109-1118). 특정한 종의 *Panax* 속에서, 진세노사이드의 조성은 뿌리, 잎, 및 열매와 같은 인삼 체의 다른 부분에서 또한 다양하게 나타난다(Wang, C. Z., J. A. Wu, E. McEntee, and C. S. Yuan. 2006. Saponins composition in American ginseng leaf and berry assayed by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 54:2261-2266).
- [0006] 일반적으로, 진세노사이드의 유효성은 그의 소수성과 세포 벽 투과율을 강화시키는, 탈글라이코실화 정도와 함께 증가한다(Shibata, S. 2001. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. J. Korean Med. Sci. 16 Suppl:S28-37). 그러나, 탈글라이코실화된 진세노사이드는 인삼 추출물에 미량인 반면, Rb1 {3-O-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-O-[β-D-글리코피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이다이올계}, Rb2 {3-O-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-O-[α-L-아라비노피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이다이올계}, Rb3 {3-O-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-O-[β-D-자일로피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이다이올계}, Rc {3-O-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-O-[α-L-아라비노퓨라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이다이올계}, 및 Rd {3-O-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-O-β-D-글리코피라노실-20(S)-프로토파낙사이다이올계}와 같은 PPD 부류의 더 큰 진세노사이드는 인삼 추출물 전체 진세노사이드의 3분의 2 이상을 구성한다.
- [0007] 진세노사이드 Rc는 메이저 PPD 타입의 진세노사이드 중의 하나로 백삼에서 전체 진세노사이드의 7-22%를 차지한다(Hu, C., and D. D. Kitts. 2001. Free radical scavenging capacity as related to antioxidant activity and ginsenoside composition of Asian and North American Ginseng extracts. J. Am. Oil Chem. Soc. 78:249-255). 4개의 당 잔기가 Rc의 주 골격인 다마렌 아글리콘에 결합되어 있다 α-L-아라비노퓨라노실-(1-6)-β-D-글루코피라노스는 C20(20번째 위치의 탄소)에 결합되고, β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글루코피라노스는 다마렌 아글리콘의 C3(3번째 위치의 탄소)에 결합된다. 진세노사이드 Rc은 분자량이 크고 세포막을 통과하는데 있어서 낮은 투과성을 가지므로, 높은 약리활성을 나타내기 위해서는 탈글라이코실화가 요구된다. 현재까지, 진세노사이드 Rc로부터 아라비노퓨라노실 잔기를 가수분해하는 아라비노퓨라노시다제에 대해서는 유전정보와 자세한 생화학적 특성이 밝혀진바 없다. Rc의 아라비노퓨라노스 잔기를 가수분해하여 Rd를 생산 가능한 α-L-아라비노퓨라노시다제가 장내세균으로부터 분리되어 보고되었으나, 그 서열 정보는 완전히 밝혀지지 않았다 (Shin, H. Y., S. Y. Park, J. H. Sung, and D. H. Kim. 2003. Purification and characterization of α-L-arabinopyranosidase and α-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc. Appl. Environ. Microbiol. 69:7116-7123).
- [0008] 희귀 진세노사이드의 의학적 적용과 분자적 수준의 생물학적인 특성에 대한 연구를 촉진하기 위해서, 탈글라이코실화된 진세노사이드를 생산하는 방법이 요구된다. 스티밍(가열)(Wang, C. Z., B. Zhang, W. X. Song, A.

Wang, M. Ni, X. Luo, H. H. Aung, J. T. Xie, R. Tong, T. C. He, and C. S. Yuan. 2006. Steamed American ginseng berry: ginsenoside analyses and anticancer activities. *J. Agric. Food Chem.* 54:9936-9942)과 산처리(Bae, E. A., M. J. Han, E. J. Kim, and D. H. Kim. 2004. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. *Arch. Pharm. Res.* 27:61-67)와 같은 물리화학적 과정이 진세노사이드의 주 구성성분을 탈글라이코실화된 진세노사이드로 전환하기 위해서 개발되었다. 그러나 가장 바람직한 방법은 목적인 생산물에 대하여 사전 계획에 따라 알려진 활성을 가진 효소를 순차적으로 반응시키거나 알려진 활성을 가진 효소를 두 가지 이상의 조합으로 사용하는 생물전환법인데, 이는 생물전환이 부산물의 생성과 같은 문제점들을 피하고 공지의, 정의된 산물을 생성하기 때문이다(Park, C. S., M. H. Yoo, K. H. Noh, and D. K. Oh. 2010. Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:9-19). 최근, 곰팡이류와 박테리아로부터 큰 분자량의 진세노사이드를 희귀한 저분자량의 진세노사이드로 전환할 수 있는 야생형의 효소를 동정하고, 이를 산업적으로 활용하기 위해 이에 대한 특성을 규명하는 연구에 일부 진전이 있었다. 그러나 이러한 연구들은 두 가지 제약에 직면했다: 1) 효소에 대한 서열정보의 부족으로 인하여 진세노사이드 생물전환 효소의 생화학적 특성의 발견에 관해서는 진전이 거의 없었다 및 2) 야생형 미생물을 배양하고 야생형 효소를 정제하는 방법은 경제적 타당성이 결여되는 것으로 판단된다.

[0009] 최근에, 미생물로부터 진세노사이드 생물전환활성을 나타내는 3종의 효소의 서열정보가 밝혀져서 글리코시드 가수분해효소(Glycoside Hydrolase) 패밀리에 속하는 효소로 동정되었다: (1) Rb1 또는 Rc를 화합물 (C)-K [20-O-(β-D-글리코피라노실)-20(S)-프로토파낙사이드아일계] 로 전환하는 열안정성 β-글루코시다제(Noh, K. H., J. W. Son, H. J. Kim, and D. K. Oh. 2009. Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable β-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:316-321) ; (2) Rb1를 Rd로 전환하는 토양 메타게놈으로부터의 β-글루코시다제(Noh, K. H., J. W. Son, H. J. Kim, and D. K. Oh. 2009. Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:316-321); 및 (3) Rb1를 C-K로, Rb2를 C-K로, 및 Rc를 C-Mc{20-O-[α-L-아라비노푸라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이드아일계}로 전환하는 *Sulfolobus acidocaldarius*로부터의 β-갈락토시다제 (Noh, K.H., and D. K. Oh. 2009. Production of the rare ginsenosides compound K, compound Y, and compound Mc by a thermostable β-glycosidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1830-1835). Rb1를 Gypenoside XVII {3-O-β-D-글리코피라노실-20-O-[β-D-글리코피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이드아일계}로, 그 후Gypenoside LXXV {20-O-[β-D-글리코피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(S)-프로토파낙사이드아일계}로 그리고 최종적으로 C-K로 연속적으로 전환하는 것을 촉매하는 GH 패밀리의 3의 효소가 최근에 본 발명자들에 의해서 보고되었다(An, D.-S., C.-H. Cui, H.-G. Lee, L. Wang, S. C. Kim, S.-T. Lee, F. Jin, H. Yu, Y.-W. Chin, H.-K. Lee, W.-T. Im, and S.-G. Kim. 2010. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov. β-glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenoside XVII and gypenoside LXXV *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5827-5836).

[0010] 그러나 Rc를 C-Mc로 전환하는 활성을 갖는 β-갈락토시다제 (Noh, K. H., and D. K. Oh. 2009. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1830-1835), 및 Rc를 C-Mc로, 그 후 C-K로 전환하는 *Sulfolobus solfataricus*로부터의 β-글루코시다제(Noh, K. H., J. W. Son, H. J. Kim, and D. K. Oh. 2009. 73:316-321)는 주로 아글리콘의 C3 상의 포도당 잔기를 가수분해하는 것으로 나타나며, 아라비노푸라노시다제와 다른 특성을 가진다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명자들은 인삼밭에서 분리되어 동정된, 토양균 로다노박터 진세노시디뮤탄스 균주 Gsoil13054로부터 신규한 GH 패밀리의 51 아라비노푸라노시다제를 클로닝하고 특성화하였다. 그 결과, 재조합 효소는 대장균에서 과발현되어 진세노사이드 Rc에 대하여 생물전환 활성을 보였고, 아글리콘의 20번째 탄소 위치의 아라비노푸라노시드 잔기의 가수분해를 통해 Rc를 Rd로 전환시킨다는 것을 발견하였다. 아울러, 재조합 효소는 다당체의 말단에 작용하는 엑소-액팅 아라비노푸라노시다제 활성을 가지며, 진세노사이드 Rc 또는 이의 유사물질의 아라비노푸라노시

드 잔기에만 작용함을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 본 발명의 제1양태는 로다노박터 진세노시디뮤탄스(*Rhodanobacter ginsenosidimutans*) 유래의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 제2양태는 상기 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 제3양태는 본 발명에 따른 핵산 또는 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 제4양태는 (a) 본 발명에 따른 형질전환체를 배양하는 단계 (b) 상기 배양된 형질전환체로부터  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 생산하는 단계 및 (c) 상기 생산된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 회수하는 단계를 포함하는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 제5양태는 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 본 발명에 따라 제조된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 본 발명에 따른 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하는 단계를 포함하여 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2진세노사이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 제6양태는 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 본 발명에 따라 제조된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 본 발명에 따른 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 유효성분으로 포함하는, PPD 또는 PPT 타입의 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 회귀 진세노사이드로의 전환용 키트를 제공한다.
- [0018] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0019] 본 발명자들은 처음으로 로다노박터로부터  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 정제 및 특성화하였다.
- [0020] 구체적으로 본 발명에 따라 로다노박터 진세노시디뮤탄스 KCTC22231<sup>T</sup>로부터 취득된 신규 효소는, 진세노사이드의  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기 또는 아라비노스를 포함하는 올리고당류 또는 다당류의  $\alpha$ -1,5 아라비노푸라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 가지는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제로서, 보다 바람직하게 하기와 같은 특성을 가진다:
- [0021] a) PPD(*protopanaxadiol*) 타입 진세노사이드의 20번째 탄소에 위치한  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 가진다.
- [0022] b) 상기 선택적 가수분해능을 통해, PPD 타입의 진세노사이드를 탈글라이코실화된 회귀 진세노사이드로 전환시킬 수 있는 전환 활성을 가진다.
- [0023] c) 외부-작용 (*exo-acting*) 효소이다.
- [0024] 상기 '외부-작용 효소'란 다당류의 말단으로부터 글리코시드 결합을 가수분해하는 활성을 갖는 것을 말한다.
- [0025] 본 발명에 따라 로다노박터 진세노시디뮤탄스 KCTC22231<sup>T</sup>로부터 취득된  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 GenBank 등록번호(*accession number*) HQ026482로 등록되어 있다. 등록된 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 518개의 아미노산으로 구성되고, 상기 단백질을 코딩하는 핵산의 길이는 1557bp 이다.
- [0026] 로다노박터 진세노시디뮤탄스 KCTC22231<sup>T</sup>(=KACC 12822<sup>T</sup>=DSM 21013<sup>T</sup>=LMG 24457<sup>T</sup>) 미생물은, 대한민국 포천 지역에 있는 인삼밭에서 분리하고 한국생명공학연구원에 2008년 1월 25일자에 기탁하였다.
- [0027] 로다노박터 진세노시디뮤탄스 KCTC22231<sup>T</sup> 유래의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 구성하는 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재된 서열이다. 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 상기 서열번호 1로 기재된 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 아미노산 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 유사성, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 알파-N-아라비노푸라노시다제의 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 또한, 이러한 유사성을 갖는 서열로서 실질적으로 알파-N-아라비노푸라노시다제와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.



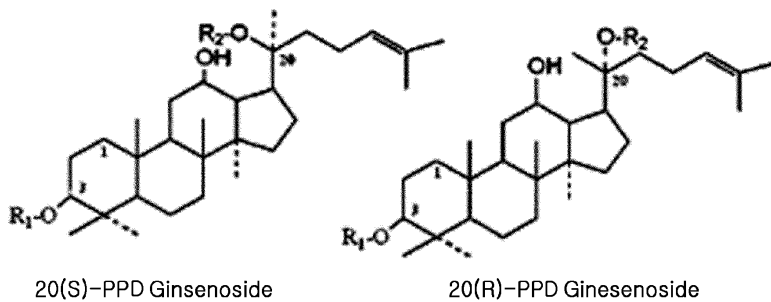
- [0028] 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2로 기재된 핵산이며, 상기 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 유사성, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 서열로서 실질적으로 핵산이 코딩한 단백질이 알파-N-아라비노푸라노시다제의 활성을 갖는 핵산을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 핵산은 본 발명자들에 의해 araf3054(이하, 'ARAF3054' 및 'AbfA'와 혼용)로 명명되었다.
- [0030] 본 발명의 용어 '유사성'이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 염기 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 유사성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 유사성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 유사성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [0031] 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 일정 수준 이상의 유사성이 유지되는 동시에 본 발명에서 목적하는 단백질의 활성을 보유하는 한 균등한 단백질임을 쉽게 이해할 수 있을 것이다. 따라서 본 발명의 단백질은 야생형의 아미노산 서열 변이체 및 염기 서열 변이체를 포함하는데, '변이체'란 천연 아미노산 서열 또는 염기 서열에 대해 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기 또는 염기 서열이 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 갖는 단백질 또는 상이한 서열을 갖는 핵산을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 용어, '벡터'란 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 본 발명은 알파-N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있다.
- [0033] 한편, 본 발명에 따라  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터는 숙주 세포에형질전환 (transformation) 또는 형질감염 (transfection) 시킴으로써, 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 수득할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 포스미드 라이브러리(fosmid library)를 통하여 스크리닝하는 한편, 알파-N-아라비노푸라노시다제를 코딩할 수 있는 ORF(open reading frame)를 동정하여 이를 pCC1FOS 발현 벡터에 삽입함으로써 재조합 벡터 pET-MBP-TEV-Araf3054를 제조하였다(도 9).
- [0034] 본 발명의 재조합 벡터는 본 발명의 핵산을 적당한 벡터에 연결 (삽입)하여 획득할 수 있다. 본 발명의 핵산이 삽입될 벡터는 그것이 숙주 안에서 복제될 수 있는 한 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pCDNA3.1+ (Invitrogen) 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용된 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드 (pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드 (YEpl3, YEpl24 및 YCp50)가 있다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는  $\lambda$ -파아지 (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4,  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11 및  $\lambda$ ZAP)가 있다. 또한, 리트로바이러스 (retrovirus), 아데노바이러스 (adenovirus) 또는 백신시아 바이러스 (vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스 (baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 pCC1FOS 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터 pET-MBP-TEV-Araf3054를 제조하였다.
- [0035] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질 (예를 들어, B42같은)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있으며, 이러한 융합 플라스미드에는 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등이 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 발현된 알파-N-아라비노푸라노시다제를 용이하게 정제 및 회수하기 위하여 MBP(maltose binding protein) 태그를 사용하였다.
- [0036] 본 발명의 핵산을 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, araf3054 유전자는 화살표로 표시된 BamHI과 HindIII으로 절단된 사이에 삽입되었다.
- [0037] 본 발명의 핵산은 벡터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서 (enhancer)와 같은 시스 요소(cis element), 스플라이싱 시그널 (splicing signal), 폴리 A 추가 시그널 (poly A addition signal), 선택 마커(selection marker), 라이보솜 결합 서열 (ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저



항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, '형질전환 (transformation)'이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl<sub>2</sub> 침전법, CaCl<sub>2</sub> 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 셀레이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.
- [0040] 본 발명의 알파-N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산 또는 이를 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0041] 목적 핵산인 알파-N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주로 도입함으로써 본 발명의 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.
- [0042] 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균 (*E. coli*)과 같은 에스케리키아 (*Escherichia*)속 세균 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)같은 바실러스 (*Bacillus*)속 세균 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스 (*Pseudomonas*)속 세균 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*)같은 효모 동물세포 및 곤충 세포가 있다.
- [0043] 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 CL41(DE3), BL21(DE3) 및 HB101이 있으며, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 및 LKS87이 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 대장균 세포 BL21(DE3)을 숙주 세포로 하여 알파-N-아라비노푸라노시다제를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제조하였다.
- [0044] 대장균과 같은 세균이 숙주로서 사용될 때, 본 발명의 재조합 벡터는 숙주 내에서 자율적인 복제를 할 수 있고, 프로모터, 라이보솜 결합서열, 본 발명의 핵산 및 전사 종료 서열 (transcription termination sequence)로 구성되어 있다.
- [0045] 본 발명의 프로모터는, 본 발명의 핵산을 대장균과 같은 숙주에서 발현하도록 하는 한 어떠한 프로모터도 사용될 수 있다. 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터 또는 PR 프로모터 같은 대장균 또는 파아지-유래 프로모터 T7 프로모터 같은 대장균 감염 파아지-유래 프로모터가 사용될 수 있다. 또한 tac 프로모터 같은 인공적으로 변형된 프로모터도 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가로 포함될 수 있는 서열은 단백질 정제용 태그 서열일 수 있으며, 예컨대, 글루타민 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), MBP(말토스 결합 단백질, USA), FLAG (IBI, USA) 및 핵사히스티딘(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있고, 가장 바람직하게는 MBP 일 수 있으나, 상기 예들에 의하여 목적 단백질의 정제를 위하여 필요한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 MBP 태그를 사용하여 정제를 용이하게 하였다.
- [0047] 또한, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질의 경우, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타민-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타민을 이용할 수 있고, MBP가 이용된 경우에는 아밀로오즈 컬럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 알파-N-아라비노푸라노시다제를 발현시키기 위해 상기의 방법으로 형질전환된 숙주 세포는 당업계에서 사용되는 통상적인 방법으로 배양할 수 있다. 예를 들면, 상기 알파-N-아라비노푸라노시다제를 발현하는 형질전환체는 다양한 배지에서 배양할 수 있으며, 페드-배치(fed-batch) 배양 및 연속 배양 등을 수행할 수 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 형질전환체의 배양방법이 제한되는 것은 아니다. 또한, 숙주 세포의 성장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.

- [0049] 적절한 숙주 세포를 선택하여 배지 조건을 조성하여 주면 목적 단백질이 성공적으로 형질전환된 형질전환체는 알파-N-아라비노푸라노시다제를 생산하게 되며, 박터의 구성 및 숙주 세포의 특징에 따라 생산된 알파-N-아라비노푸라노시다제는 숙주 세포의 세포질 내, 페리플라즈믹 스페이스(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다. 또한 목적 단백질은 가용성 형태 또는 불용성 형태로 발현될 수 있다.
- [0050] 숙주 세포 내 또는 외에서 발현된 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 정제 방법의 예로는 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산 나트륨 침전 등), 용매 침전(예를 들어, 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 컬럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용하여 본 발명의 단백질을 정제할 수 있다.
- [0051] 상기의 방법으로 분리된 알파-N-아라비노푸라노시다제를 이용하여 진세노사이드가 존재하는 인 비트로(in vitro) 또는 인 비보(in vivo) 시스템에서 용이 흡수가 가능한, 탈글리코실화된 진세노사이드를 생산할 수 있다.
- [0052] 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2진세노사이드 제조시, 적어도하나의 단계에서 본 발명은 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 출발물질로 이용되는 제1진세노이드는 PPD 타입 또는 PPT 타입의 진세노사이드일 수 있으며, 분리 및 정제된 형태의 진세노사이드를 이용할 수도 있고, 또는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 진세노사이드를 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 출발물질로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. 본 발명에서 이용되는 인삼으로는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 고려삼(*Panax ginseng*), 회기삼(*P. quiquefolius*), 전칠삼(*P. notoginseng*), 죽절삼(*P. japonicus*), 삼엽삼(*P. trifolium*), 히말라야삼(*P. pseudoginseng*) 및 베트남삼(*P. vietnamensis*)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드의 비제한적인 예로 하기의 화합물을 들 수 있다.



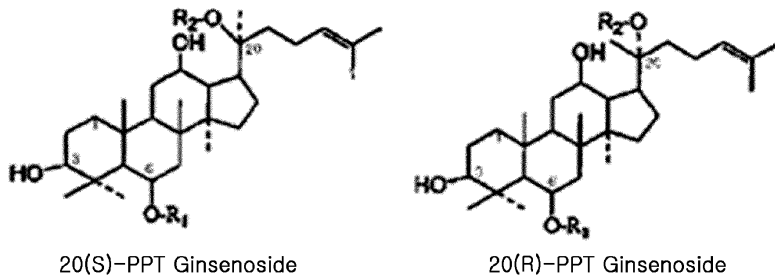
[0055]

Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Rb1	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Glc <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Rb2	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Ara(p) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Rb3	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Xyl <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Rc	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Ara(f) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Rd	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Glc-(S)
Gypenoside 17	Glc-	Glc <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Compound O	Glc-	Ara(p) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Compound Mc1	Glc-	Ara(f) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
F2	Glc-	Glc-(S)
Gypenoside 75	H-	Glc <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Compound Y	H-	Ara(p) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Compound Mc	H-	Ara(f) <sup>1-6</sup> Glc-(S)
Rg3	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	H-(R,S)
Rh2	Glc-	H-(R,S)
C-K	H-	Glc-(S)

[0056]

[0057]

또한, PPT(Protopanaxatriol) 타입 진세노사이드의 비제한적인 예로 하기의 화합물을 들 수 있다.



[0058]

Ginsenoside	R1	R2
Re	Rha <sup>1-2</sup> Glc-	Glc-(S)
Rf	Glc <sup>1-2</sup> Glc-	Glc-(S)
Rg1	Glc-	Glc-(S)
Rg2	Rha <sup>1-2</sup> Glc-	H-(S,R)
Rh1	Glc-	H-(S,R)

[0059]

[0060]

본 발명의 α-N-아라비노푸라노시다제는 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 가지는 진세노사이드라면 모두 선택적으로 가수분해할 수 있고, 바람직하게 당엽계에 알려진 모든 PPD 타입 또는 PPT 타입의 진세노사이드의 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 선택적으로 가수분해할 수 있으며, 예를 들어, PPD 타입의 진세노사이드 중 Rc, C-Mc1, 및 C-Mc가 C20(20번째 탄소를 의미함)에서 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 가지므로 상기 Rc, C-Mc1, 및 C-Mc의 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기는 본 발명의 α-N-아라비노푸라노시다제에 의해 선택적으로 가수분해할 수 있다.

[0061]

본 발명의 α-N-아라비노푸라노시다제는 PPD(protopanaxadiol) 타입 또는 PPT 타입 진세노사이드를 상대적으로 탈글라이코실화된 회귀 진세노사이드로 전환시킬 수 있는데, 이는 PPD 타입 또는 PPT 타입 진세노사이드의 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 선택적으로 가수분해하고, 보다 바람직하게는 PPD 타입 또는 PPT 타입 진세노사이드의 20번째 탄소에 위치한 비환원된 α-1,6 아라비노푸라노실 잔기를 선택적으로 가수분해함으로써 수행될 수 있다.

[0062]

이러한 전환은 생전환(bioconversion)을 통해 이루어지며, 연속 또는 비연속적으로 PPD 타입 또는 PPT 타입의

진세노사이드의 비환원된  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기를 선택적으로 가수분해함으로써 달성될 수 있다.

- [0063] 바람직하게, 본 발명의 단백질에 의한 생전환의 예로는 진세노사이드 Rc를 Rd로 전환, 진세노사이드 C-Mc1를 F2로 전환, 진세노사이드 C-Mc를 C-K로 전환하는 방법이 모두 포함된다.
- [0064] 보다 상세하게, 본 발명의 구체적인 실시예 4에서는 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 포함하는 조성물을 진세노사이드 Rc에 투여하는 경우, 진세노사이드 Rd로 탈글리코실화하였다. 또한, 진세노사이드 C-Mc1를 출발물질로 하여 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 처리하는 경우, 진세노사이드 F2로 탈글리코실화하는 것을 확인하였다. 또한, 진세노사이드 C-Mc를 출발물질로 하여 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 처리하는 경우, 진세노사이드 C-K로 탈글리코실화하는 것을 확인하였다.
- [0065] 이러한 PPD 또는 PPT 타입 진세노사이드의 탈글리코실화는 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제의 비환원된  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능에 의한 것이며, 상기와 같은 가수분해를 통해 생성된 탈글라이코실화된 회귀 진세노사이드는 체내 흡수가 용이하다. 아울러, 이러한 생전환은 PPD 타입 또는 PPT 타입 진세노사이드, 예를 들어 진세노사이드 Rc가 그의 가장 탈글라이코실화된 형태인, C-K 또는 Rh2로 전환되는 것을 촉진한다.
- [0066] 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 활성 및 안정성이 유지될 수 있는 한 다양한 온도 및 pH 조건에서, PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드 또는 PPT(Protopanaxatriol) 타입 진세노사이드의 비환원된  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기의 선택적 가수분해 및 PPD(protopanaxadiol) 타입 또는 PPT(Protopanaxatriol) 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 형태의 회귀 진세노사이드로의 전환에 사용될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 효소 특성을 분석하였는바 araf3054는 pH 6-10에서 효소의 안정성 및 활성이 탁월하였으며, 37°C의 인산나트륨 버퍼 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다(도 4A). 또한, 37°C 이하의 온도에서 안정하였고, 45°C에서 40분 동안 배양 후 활성이 100% 상실되었다. 활성은 온도 4-35 °C 온도에서는 온도의 고저와 무관하게 약 60% 정도가 유지되었다(도 4B). 따라서, 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제가 효소작용하기 위해, pH는 6 ~ 10으로, 온도는 4-37 °C 조절하는 것이 바람직하다.
- [0068] 아울러, 본 발명의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 MgCl<sub>2</sub>, EDTA, NaCl, KCl, DTT 및 베타-머캅토에탄올로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 및 화학 제제를 함께 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 아울러, 기질은 pNP- $\alpha$ -L-아라비노푸라노사이드(pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0069] 한편, 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드를 제조시, 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를, 동시에 또는 일정한 순서에 따라 다른 효소(들)와 함께 사용할 수 있다. 다른 효소들의 비제한적인 예로는  $\beta$ -글루코시다제,  $\beta$ -갈락토시다제, 글리코시다제,  $\alpha$ -L-아라비노피라노시다제,  $\alpha$ -L-아라비노푸라노시다제,  $\beta$ -자일로시다아제, 및  $\alpha$ -L-람노시다제 등이 있다.  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제 단독 또는 다른 효소와의 조합에 의해 제조되는 제2 진세노사이드들은 상이할 수 있으며, 이러한 제2진세노사이드는 1종 또는 2종 이상의 제2진세노사이드일 수 있다.
- [0070] 본 발명에 따른  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 다른 효소(들)와 동일 용기 또는 상이한 용기에 담아 제공될 수 있다.

**발명의 효과**

- [0071] 본 발명에 따른 알파-N-아라비노푸라노시다제는 진세노사이드를 탈글라이코실화된 회귀 진세노사이드로 전환시키는 우수한 활성을 나타낸다. 또한, 상기 알파-N-아라비노푸라노시다제를 코딩하는 핵산 또는 이를 포함하는 제조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양함으로써 대량생산이 가능하여 산업적으로 다양하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0072] 도 1은 제조합 AbfA의 정제 결과를 나타낸 것이다. 단백질은 10% SDS-PAGE를 이용해 분리한 후 쿠마시 블루 염색을 통해서 시각화하였다. 레인 1, IPTG로 12시간 동안 유도한 후의 불수용성 분획 레인 2, 12시간 동안 유도한 후의 수용성 분획 레인 3, 아밀로오스 크로마토그래피 후에 정제된 단백질 레인 4, DEAE-셀룰로스 크로마토

그래피 후에 정제된 단백질 레인 5, DEAE-셀룰로스 크로마토그래피 및 TEV 처리 후에 정제된 단백질. M: 분자적인 질량 마커.

도 2는 진세노사이드 기질 Rc (A), C-Mc1 (B) 및 C-Mc (C)를 사용한 AbfA 가수분해 산물의 TLC 분석 결과를 나타낸 것이다. STD, 진세노사이드 표준 C, 효소 부재 P, AbfA와 반응함. 모든 반응은 0.5mg/ml의 기질을 포함하였고 37°C, 24시간 동안 수행하였다.

도 3은 재조합 Araf3054의 가수분해 산물을 HPLC로 분석한 결과를 나타낸 것이다. A. 기준 B. 기질 Rc; C. Rc 대사산물 (Rd); D. 기질 C-Mc1; E. C-Mc1 대사산물 (F2); F. 기질 C-Mc; G. C-Mc 대사산물 (C-K). 모든 가수분해 작용은 0.01 mg/ml의 효소 농도에서 12시간 동안 수행되었다.

도 4는 재조합 Araf3054의 안정성 및 활성에 대한 pH (A)와 온도 (B)의 영향을 나타낸 것이다.

pH에 대해, 2.0 mM pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (pNPAf)를 포함하는 효소 용액을 잔여 활성이 결정된 후에, 4°C에서 24시간 동안 pH 2 내지 10의 다양한 pH의 완충액에서 배양하였다. 다음의 완충액 (각 50 mM)을 시험하였다: KCl-HCl (pH 2), glycine-HCl (pH 3), 아세트산 나트(pH 4 및 5), 인산 나트륨(pH 6 및 7), Tris-HCl (pH 8 및 9) 및 글라이신-수산화나트륨(pH 10). pH 영향에 대한 완충액 조성의 영향력은 McIlvaine 완충액 pH 6, 7, 7.5, 8 또는 9를 사용하여 또한 결정하였다.

효소의 최적온도 결정은 4 내지 90°C 범위의 온도의 50 mM 인산 나트륨 완충액에서 분석하였다. 열안정성 분석은 여러 가지 온도에서 30분 동안 50 mM 인산 나트륨 완충액 내의 효소 표본을 배양함으로써 수행하였다. 10분 동안 얼음에서 시료를 식힌 후에, 잔존 활성을 결정하였다.

도 5는 0.1 mg/ml의 효소 농도에서 BgpA(recombinant  $\beta$ -glucosidase)에 의한 진세노사이드 Rc의 생전환 모습을 시간 경과에 따라 나타낸 것이다. 대사산물은 TLC에 의해 분석하였다. 선: 기준 0 ~ 24 h, 작용시간

도 6은 재조합 AbfA에 의한 진세노사이드 Rc를 Rd로 (A), C-Mc1를 F2로 (B) 그리고 C-Mc를 C-K로 생전환하는 경로 (C)를 나타낸 것이다.

도 7은 AbfA의 다양한 arabino oligosaccharide에 대한 기질 특이성을 나타낸 TLC 분석결과다. 1, 10은 표준물인 arabinose이고, 2, 4, 6, 8은 반응 전의 arabinobiose, arabinotriose, arabinotetraose, 및 arabinopentaose 이며, 3, 5, 7, 9는 각각 물질의 AbfA와 반응 후 결과이다. 효소농도는 0.01mg/ml 이며 12 시간 동안 반응하였다.

도 8은 본 발명에 따른 기질 p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (A) and ginsenoside Rc (B)에 대한 AbfA 단백질의 Km과 Vmax를 나타내는 이중역수그래프(double reciprocal graph)이다.

도 9는 재조합 벡터인 pET-MBP-TEV-Araf3054을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 실시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0074] 실시예 1. 화학물질

[0075] 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2 및 C-K는 Dalian Green Bio Ltd (Dalian, China)로부터 구입하였다. 진세노사이드 C-Mc1와 C-Mc는 본 실험을 위하여 제작되었다. 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴  $\beta$ -D-글루코피라노시드(X-Glc), pNP- $\alpha$ -L-아라비노푸라노시드(pNPAf) 및 L-아라비노스는 Sigma로부터 구했다. 밀가루 아라비노자일란, 붉은 탈가지된 아라비난(RDA), 아라비노바이오스, 아라비노트리오스, 아라비노테트라오스 및 아라비노펜타오스는 Megazyme (Wicklow, Ireland)로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질들은 적어도 분석 시약 등급이었으며 출처는 각각 방법 섹션에서 각각 명시된다.

#### [0076] 실시예 2. 포스미드 라이브러리 스크리닝 및 구조화

[0077] 균주 Gsoi13054는 한국의 포천 지역의 토양에서 동정하였다. Gsoi13054로부터 진세노사이드를 가수분해하는 아라비노푸라노시다제 유전자를 클로닝하기 위해서, 포스미드 라이브러리 구조, 효소적 활성을 나타내는 포스미드



클론의 선별, 포스미드 벡터의 전체-서열, 그리고 최종적으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 사용한 표적 유전자의 클로닝을, 이전에 보고된 바와 같이, 순차적으로 수행하였다( An, D.-S., C.-H. Cui, H.-G. Lee, L. Wang, S. C. Kim, S.-T. Lee, F. Jin, H. Yu, Y.-W. Chin, H.-K. Lee, W.-T. Im, and S.-G. Kim. 2010. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov.  $\beta$ -glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenoside XVII and gypenoside LXXV Appl. Environ. Microbiol. 76:5827-5836). Gsoil3054 게놈 DNA는 페놀-클로로포름 추출에 의해서 분리하였고, CopyControl 포스미드 라이브러리 생성 키트(Epicentre, WI)를 제조자의 프로토콜에 따라서 포스미드 라이브러리를 생성하는데 사용하였다. 추정된  $\beta$ -글루코시다제 유전자를 포함한 포스미드 클론은 12.5  $\mu$ g/ml 클로람페니콜과 27  $\mu$ g/ml X-Glc를 포함하는 LB 플레이트 상에서 푸른색 콜로니의 선별을 통해서 시각적으로 스크리닝하였다. 최종적으로,  $\beta$ -글루코시다제 유전자와  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 포함하는 하나의 클론이, 진세노사이드 Rc를 가수분해하는 활성의 낮은 막 크로마토그래피(TLC) 분석에 의해서 진세노사이드를 가수분해하는 활성이 입증된 후에 선별되었다.

[0078] **실시예 3. 포스미드 서열**

[0079] 선별된 포스미드 클론의 전체 서열은 마크로젠(Seoul, Korea)에 의해서 상업적으로 결정하였다. 요약하면, 포스미드 DNA를 2-5kbp 단편으로 부순 후에, 아가로스 겔 전기영동에 의해서 분리하였고, 샷건 라이브러리(shotgun library)를 플라스미드 벡터 pCB31로 블린트 말단의 복구 DNA를 결합함으로써 구성하였다. 상기 벡터를 *E. coli*로 도입하였고 암피실린(100  $\mu$ g/ml), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- $\beta$ -D-갈락토시피라노시드(80  $\mu$ g/ml) 및 이소프로필- $\beta$ -D-티오갈락토피라노시드(IPTG, 0.3 mM)를 보충해 준 LB 아가 플레이트 상의 흰색 콜로니를 선별하였다. ABI3730 DNA 서열화 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 평균 길이 700 bp를 가진 전체 398 reads를 7개의 콘택으로 집합하였다. 6개의 겹은 34 kb의 전체 서열을 얻기 위해 미리-고안된 프라이머 이동(walking)으로 결정하여 서열분석을 완료하였다.

[0080] **실시예 4. 재조합 AbfA의 분자적인 클로닝, 발현 및 정제**

[0081] 집합된 DNA 서열은 추정의 오픈 리딩 프레임(ORFs)을 확인하기 위해 벡터 NTI (version 10.1)를 사용하여 분석하였다. 이러한 ORF는 GH 패밀리 51에 속하는  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제 유전자(*abfA*)에 대한 추정의 오픈 리딩 프레임을 확인하기 위해, BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용한 유사성 조사를 하였다. *E. coli*에서 가용성의  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 발현하기 위해서, 말토오스 결합 단백질(MBP)을 AbfA의 N 말단으로 융합하였다. 요약하면, MBP와 Tobacco Etch Virus (TEV) 단백질 분해효소 절단 위치를 코딩하는 DNA 단편을 프라이머 mbpF (5'-ATA CAT ATG AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG -3')와 mbp-tevR (5'-CTC GAA TTC CGA CTG 045GAA GTA GAG ATT CTC TGA AAT CCT TCC CTC GAT CCC GAG GTT G-3')를 사용하여 *E. coli* K-12 균주 MG1655(Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science 277:1453-62)의 게놈 DNA로부터 PCR을 통해 증폭하였다 (Esposito, D., and D. K. Chatterjee. 2006. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. Curr. Opin. Biotechnol. 17:353-358). 증폭된 단편을 *Nde*I와 *Eco*RI로 분해한 후 pET21a-MBP (TEV)을 생성하기 위해 pET21a의 *Nde*I/*Eco*RI 위치로 삽입하였다. *AbfA* 유전자는 다음의 프라이머(이탤릭체는 *Eco*RI와 *Hind*III 제한 위치)를 사용하여 PCR에 의해서 증폭하였다: abfAF, 5'- CGG AAT TCC GTT GTA AAT TGA TTG CC-3'; 및 abfAR, 5'- CCC GAA GCT TTC ACG ACC CCA CAG CCA GG-3'. 증폭된 단편은 *Eco*RI와 *Hind*III를 가지고 분해한 후, pET21a-MBP-*AbfA*를 생성하기 위해서 같은 위치에서 pET21a-MBP (TEV)로 삽입하였다. pET21a-MBP-*AbfA*를 *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (Agilent technologies, Santa Clara, CA)로 도입하고, 플라스미드를 품은 세포를 37° C의 100  $\mu$ g/ml 암피실린과 50  $\mu$ g/ml 플로람페니콜을 포함한 LB 배지 상에서 배양액이 600 nm에서 O.D가 0.6에 도달할 때까지 자라게 했는데, 이 시점에서 단백질 발현은 0.1 mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. 배양액을 18° C에서 8시간 동안 추가적으로 배양하고, 4° C에서 20분 동안 5,000  $\times$  g에서 원심분리를 하여 수득하였다. 세포 팽윤은 20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1 mM 디티오프레이트(DTT), 1 mM 페닐메탄에설포닐 플루오라이드 및 1% 트리톤 X-100 (pH 7.4)로 구성된 용액에서 재현탁시키고, 세포는 울트라소니케이션(Vibra-cell, Sonics & Materials, CT)을 통해서 파괴시켰다. 손상되지 않은 세포와 파편은 4° C에서 40분간 24,000  $\times$  g에서 원심분리에 의해서 제거하여 정제되지 않은 세포 추출물을 수득하였다. MBP가 표지된 융합 단백질은 아밀로오스 수지 컬럼(New



England BioLabs) 상에서 친화 크로마토그래피에 이은 DEAE-셀룰로스 DE-52 크로마토그래피(Whatman)에 의해서 정제하였다. MBP 에피토프는 TEV 단백질분해효소와 함께 배양함으로써 제거하였고, 그 후 재조합 AbfA는 DEAE-셀룰로스 DE-52 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 단백질의 동종성은 10% SDS-PAGE와 쿠마시 블루 염색으로 평가하였다. 정제된 단백질은 pH 7.5에서 50 mM 인산나트륨으로 투석시킨 후 Amicon Ultra-15 filter (Millipore, CA)를 사용하여 1 mg/ml로 농축하였다 단백질은 사용할 때까지 -80° C에서 저장하였다. 효소 분석과 운동상 분석은 pH 7.5에서 50mM 인산 나트륨에서 정제된 단백질을 사용하여 수행하였다. 재조합 단백질의 분자적 질량은 Superose 6 10/300 GL 컬럼(GE Healthcare), 뒤이은 SDS-PAGE를 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 결정하였다. Bio-Rad (catalog no. 151-1901)로부터의 단백질 표본은 참조 표본으로서 사용하였다.

[0082] **실시예 5. 진세노사이드의 효소적 가수분해**

[0083] AbfA의 특이성 및 선택성의 결정을 위해, 기질로서 Rb1, Rb2, Rc, Rd, C-Mc1 및C-Mc를 사용하였고 재조합 단백질을 정제하였다. 50 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.5) 내에서 농도 0.01 mg/ml의 효소 용액을 37° C에서 농도 0.1% (wt/vol)의 동일 부피인 Rc, C-Mc1 또는 C-Mc 용액과 함께 배양하였다. 시료는 일정한 시간에 규칙적으로 제거하였다. 동일 부피의 물-포화된 *n*-부탄올을 반응을 정지시키기 위해 첨가해주고 *n*-부탄올 분획에 존재하는 반응물은 건조한 상태가 되도록 기화시켰다. 잔여물은 CH<sub>3</sub>OH에서 녹이고, TLC와 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용해 분석하였다.

[0084] **실시예 6. 효소 특성화**

[0085] 정제된 AbfA의 특이적 활성은 pH 7.5, 37° C의 50 mM 인산 나트륨 완충액 내에서 대체 기질로서 pNPAf를 사용하여 측정하였다. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 추가하여 반응을 종결시켜 최종 농도가 0.5M가 되도록 하고, 405 nm (Bio-Rad Model 680, Hercules, CA)에서 마이크로플레이트를 사용하여 *p*-니트로페놀의 방출을 즉시 측정하였다. 활성 유닛(One unit of activity)을 분당 *p*-니트로페놀의 1 μmol을 생성하기 위해 필요한 단백질의 양으로서 정의하였다. 특이적 활성은 단백질 밀리그램 당 유닛으로서 표현하였다. 단백질 농도는 소혈청알부민(Sigma)을 표준으로 하는 BCA 단백질 분석(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 측정하였다. 모든 분석은 세 번 수행하였다.

[0086] **6-1. pH 변화에 따른 효과 측정**

[0087] 효소적인 활성에 대한 pH의 효과는 다음의 완충액(각 50 mM)에서 기질로서 2.0 mM pNPAf 를 사용하여 측정하였다: KCl-HCl (pH 2), 글라이신-HCl (pH 3), 아세트산 나트륨(pH 4 and 5), 인산 나트륨(pH 6.0 and 7.0), Tris-HCl (pH 8.0, and 9.0) 및 글라이신-수산화나트륨(pH 10). 완충액 조성이 효소적인 활성에 영향을 미치는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 6.0 내지 8.0 범위의 다양한 pH의 McIlvaine 완충액 (100 mM 시트르산, 200 mM 인산 이나트륨)에서 효소 활성을 또한 측정하였다(Margolles, A., and C. G. De los Reyes-Gavila'n. 2003. Purification and functional characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. Appl. Environ. Microbiol. 69:5096-5103). 재조합 AbfA의 pH 안정성은 4° C에서 24시간 동안 각 완충액(기질로서 50 mM 나트륨 완충액에서 2.0 mM pNPAf을 포함하는)에서 배양 후의 효소적인 활성인 측정함으로써 결정하였다. 결과는 최적 pH에서 수득된 활성의 퍼센트로서 표현하였다.

[0088] **6-2. 온도 변화에 따른 효과 측정**

[0089] 효소적인 활성에 대한 온도의 영향은 2.0 mM pNPAf를 포함하는 50 mM 인산 나트륨 완충액에서 5분 동안 최적 pH에서 4 내지 90° C 범위의 다양한 온도에서 효소를 배양함으로써 시험하였다. 효소의 열안정성은 여러 가지 온도에서 30분 동안 50 mM 인산 나트륨 완충액에서 효소를 배양함으로써 검사하였다. 10분간 얼음에서 시료를 식힌 후, 활성은 기질로서 pNPAf를 사용하여 결정하였다.

[0090] **6-3. 금속 및 화학 물질의 효과 측정**

[0091] AbfA 활성에 대한 금속 및 다른 화합물의 영향도 또한 결정하였다. AbfA 활성은 37° C에서 30분 동안 1 또는 10 mM (최종 농도) MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, EDTA, NaCl, KCl, CuCl<sub>2</sub>, SDS, ZnCl<sub>2</sub>, 디티오프레이톨 (DTT), 및 β-머캅토에탄올의 존재 하에서 시험하였다. 잔존 활성은 기질로서 pNPAf를 사용하여 결정하였고 화합물이 결여된 경우에 수득된 활성을 100%로 하여 상대적인 퍼센트로서 표현하였다.

[0092] **6-4. 기질 특이성 측정**

[0093] 효소의 기질 특이성은 다음의 크로모제닉 *o*-니트로페닐(ONP) 및 *p*-니트로페닐(PNP)-글리코시드를 사용하여 시험하였다: PNP-β-D-글루코피라노시드, PNP-β-D-갈락토피라노시드, PNP-β-D-퓨코피라노시드, PNP-N-아세틸-β-D-글루코스아마이드, PNP-β-L-아라비노피라노시드, PNP-β-D-만노피라노시드, PNP-β-D-자일로피라노시드, PNP-α-D-글루코피라노시드, PNP-α-L-아라비노피라노시드, PNP-α-L-아라비노피라노시드, PNP-α-L-람노피라노시드, PNP-α-D-만노피라노시드, 및 PNP-α-D-자일로피라노시드, 및 ONP-β-D-글루코피라노시드, ONP-β-D-갈락토피라노시드, ONP-β-D-퓨코피라노시드 및 ONP-α-D-갈락토피라노시드 (Sigma). 글리코시다제 활성은 37° C에서 5분 동안 하나의 활성 유닛이 분당 1 μmol의 ONP 또는 PNP를 방출하는 것으로 정의된, 2.0 mM 크로모제닉 기질을 사용해서 검사하였다.

[0094] 다른 아라비노시드-포함의 기질에 대해서, 반응 용액은 0.1 ml의 AbfA 용액 (1 U)을 2% (wt/vol) 밀가루 아라비노자일란, RDA, 아라비노바이오스, 아라비노트리오스, 아라비노테트라오스 또는 아라비노펜타오스 0.5 ml로 첨가하여 준비하였다. 반응 혼합물은 37° C에서 배양하였다. 시료는 규칙적인 시간에 꺼내서 반응을 중단시키기 위해 끓는 물로 5분간 가열해 주었다. 밀가루 아라비노자일란, RDA, 아라비노바이오스, 아라비노트리오스, 아라비노테트라오스 및 아라비노펜타오스로부터의 산물은 TLC에 의해서 분석하였다. 크로마토그래피는 실리카 겔 60 F<sub>254</sub> TLC 플레이트 (Merck)에서 상승법으로서 수행하였다. 용매 시스템은 에틸 아세테이트, 아세트산 및 물 (2:1:1)로 구성하였다. 플레이트 상의 당은 120° C에서 10분 동안 가열하여 검출한 후 에탄올에서 5% (vol/vol) 황산과 같이 전개하였다 (Wong, D. W. S., V. J. Chan, and S. B. Batt. 2008. Cloning and characterization of a novel *exo-α-1,5-L-arabinanase* gene and the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79:941-949).

[0095] 동역학 연구는 기질로서 pNPAf (0.05 mM to 5 mM)와 진세노사이드 Rc (0.1mM to 2 mM)를 사용하여 새롭게 정제 한 효소를 가지고 수행하였다. 전자에 대해서는, 37° C에서 20분 동안 405 nm에서 *p*-니트로페놀의 흡광도를 모니터링하였다 후자에 대해서는, 진세노사이드 Rc의 가수분해된 산물을 가수분해의 초기 단계에서 HPLC 분석으로서 결정하였다. 수득된 데이터는 Cleland에 의해 보고된 Enzyme Kinetics Program을 사용하여 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub> 을 결정하는데 사용하였다 (Cleland, W. W. 1979. Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods Enzymol.* 63:103-138).

[0096] **실시예 7. 진세노사이드 C-Mc1 및 C-Mc의 준비와 동정**

[0097] 진세노사이드 C-Mc1 및 C-Mc는 *Terrabacter* sp. Gsoil3082로부터의 재조합 β-글루코시다제, BgpA를 사용하여 진세노사이드 Rc의 생진환에 의해서 수득하였다 (An, D.-S., C.-H. Cui, H.-G. Lee, L. Wang, S. C. Kim, S.-T. Lee, F. Jin, H. Yu, Y.-W. Chin, H.-K. Lee, W.-T. Im, and S.-G. Kim. 2010. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimitans* sp. nov. β-glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenoside XVII and gypenoside LXXV *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5827-5836). 재조합 BgpA는 C3나 C20 위치에 하나 또는 두 개의 글루코스 잔기를 가지는 진세노사이드의 PPD 타입에 대해서 기질 특이성을 나타내고, C3 위치의 외부 글루코스, 다음으로 C3 위치의 내부 글루코스, 마지막으로 C20 위치의 외부 글루코스의 가수분해를 선호한다. 진세노사이드 Rc는 C20의 외부 위치에 말단이 비환원 α-L-아라비노피라노실 잔기를 가지기 때문에, BgpA는 C-Mc1 및 C-Mc를 각각 생성하기 위해서 Rc의 C3 위치에 부착된 외부 및 내부 잔기만을 가수분해한다 (도 2). BgpA 및 Rc의 반응 산물을 준비하기 위해서, 1 mg/ml의 Rc 및 0.1 mg/ml의 효소를 포함하는 500 ml 반응 혼합물을 37° C에서 모든 Rc가 대사산물 1으로 전환될 때까지 배양하여, 이를 TLC를 통해서 확인하였다. 이 반응 산물로부터, 0.36 g의 대사산물 1을 수득하여, 그 중 0.2 g를 0.15 g의 대사산물 2를 생성하도록 다른 라운드의 촉매작용(1.0 mg/ml의 효소를 사용하는)으로 넣어주었다. 이 두 번째 반응 혼합물은 물-포화 n-부탄올로 두 번 추출하고 *in vacuo*에서 증발시켰다. 핵자기공명(NMR) 분석을 위해 대사산물을 추가로 정제하기 위해서, 각각의 대사산물 1 및 2 100 mg을 UV/RI 검출기와 역상 컬럼(ODS, 500×

20 mm ID, 15 μm)을 갖춘 리사이클링 분취 HPLC 시스템 (LC-9201, Japan Analytical Instrument, Japan)을 사용하여 정제하였다. CH<sub>3</sub>CN의 isocratic 용매 시스템과 탈이온화된 H<sub>2</sub>O (7:3)를 사용하였고 검출 파장은 203 nm로 설정하였다. 이러한 방법을 사용하는 동안, 42 mg의 대사산물 1과 33 mg의 대사산물 2를 수득하여 NMR과 질량 분광 (MS) 분석을 위해 넣어주었다.

[0098] NMR 스펙트럼 데이터는 피리딘에서 Varian Unity 500 NMR 분광계 상에서 기록하였다. High resolution electrospray ionization mass spectra (HR-ESIMS)는 Waters Q-ToF Premier 질량 분광계 상에서 측정하였다.

[0099] **실시예 8. Thin-Layer Chromatography (TLC)를 이용한 진세노사이드 분석**

[0100] TLC는 용매로서 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (70:30:5, vol/vol, lower phase)를 사용하여 60F<sub>254</sub> 실리카 겔 플레이트 (Merck, Germany)를 사용하여 수행하였다. TLC 플레이트 상의 스팟은 10% (vol/vol) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가지고 전개시킨 다음, 110 °C에서 5분 동안 가열하여 검출하였다.

[0101] **실시예 9. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석**

[0102] 진세노사이드의 HPLC 분석은 4개 용매 펌프(quaternary pump), 자동 주입기(automatic injector), 단일 파장 UV 검출기(single wavelength UV detector) (model 730D)로 갖추진 HPLC 시스템 (Younglin Co. Ltd, Korea), 피크 확인과 통합에 대해서는 Younglin's AutoChro 3000 소프트웨어를 이용해서 수행하였다.

[0103] 분리는 보호 컬럼(Agilent XDB C<sub>18</sub>, 5 μm, 12.5 mm x 4.6 mm inner diameter)을 포함한 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 컬럼 (5 μm, 250 x 4.6 mm inner diameter) (Agilent, USA)을 사용하여 수행하였다. 25% 용매 A (acetonitrile)와 75% 용매 B (water)를 가지고 구배 용리(Gradient elution)를 시작한 후, 다음과 같이 진행하였다: A 25 내지 32% (vol/vol), 0-10분 A 32 내지 55% (vol/vol), 10-15분 A 55 내지 60% (vol/vol), 15-20분 A 60 내지 100% (vol/vol), 20-25분 A 100% (vol/vol), 25-27분 A 100 내지 25% (vol/vol), 27-30분 A 25% (vol/vol), 30-40분. 유속은 1.0 ml/min으로 유지하였고 검출은 흡광도 203 nm에서 모니터링하여 수행하였다. 주입 부피는 25 μl 였다.

[0104] **결과**

[0105] **실시예 10. abfA의 클로닝**

[0106] 이전에, 진세노사이드를 가수분해하는 박테리아(Gsoil13054로 명명된)의 균주를 한국, 포천의 인삼밭의 토양으로부터 동정하였다. 균주Gsoil13054는 PPD 타입 진세노사이드 Rb1, Rb2 및 Rc를 Rd로 동시에 전환할 수 있는데, 이 특성은 Gsoil13054가 다른 동정된 진세노사이드 대사 박테리아와 구별되는 점이다. Gsoil13054는 그의 분류 위치를 명백하게 하기 위한 다형 특성화 과정을 통해 *Rhodanobacter ginsenosidimutans*로 규명되었다 (An, D. S., H. G. Lee, S. T. Lee, and W. T. Im, 2009. *Rhodanobacter ginsenosidimutans* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:691-694).

[0107] Gsoil13054 균주가 Rb1, Rb2 및 Rc를 가수분해 할 수 있으므로, 세 가지 종류의 글루코시드-가수분해효소 활성인 β-D-글루코시다제, α-L-아라비노피라노시다제 및/또는 α-L-아라비노푸라노시다제 활성을 가질 수 있다. Gsoil13054로부터 진세노사이드를 가수분해하는 효소에 대하여 각각의 유전자를 동정하고 클로닝하기 위해서, 본 발명자들은 포스미드 라이브러리를 만들어내고, 포스미드 벡터의 전체 서열을 수득하였다. 포스미드 클론의 평균 삽입 사이즈는 약 40 kb였으며, 삽입물을 포함한 클론들의 비율은 약 91%였다. β-D-글루코시다제를 생성하는 포스미드 클론은 아가 배지 상에서 자라나는 콜로니 주변으로 푸른 지역을 생성하는, X-Glc의 발색 분해 (degradation)를 모니터링함으로써 스크리닝하였다. 이러한 초기의 스크리닝 프로토콜에 이어서, 본 발명자들은 α-L-아라비노피라노시다제 또는 α-L-아라비노푸라노시다제 활성에 따라서 선택된 클론들의 수의 범위를 줄여나갔다. 포스미드 라이브러리에서 1400 클론 중 25개는 12.5 μg/ml의 클로람페니콜 및 27 μg/ml 의 X-Glc를 포함하는 LB 아가 플레이트 상에 푸른색의 콜로니들과 연관이 있었다. 이러한 포스미드 클론 중 하나는 β-D-글루코시다제, α-L-아라비노피라노시다제 및 α-L-아라비노푸라노시다제 활성에 대해서 양성하였고, 진세노사이드 Rc, C-Mc1 및 C-Mc를 Rd로 전환할 수 있었다. 상기의 클론은 전체 서열화를 위해 선택되었다.

[0108] 양성의 클론의 삽입은 34kb 게놈 단편이었다. 뉴클레오티드 서열을 분석함으로써 그것이 34개의 추정된 ORFs를 포함하는 것을 밝혔다. 첫 번째 ORF의 재조합 효소는 Rb1 및 Rb2를 Rd로 변형시킬 수 있다 두 번째 ORF를 본 연구를 위해서 사용하였다.

[0109] **실시예 11. 재조합 AbfA의 발현 및 정제**

[0110] 추정의 α-N-아라비노푸라노시다제 유전자인 *abfA*를 PCR을 통해 증폭한 후, IPTG-유도적 T7 프로모터의 통제 아래 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL에서 발현될 수 있는 MBP 유전자 융합(MBP-AbfA)을 만들어내기 위해서, pET21a-MBP(TEV)로 서브클로닝시켰다. 융합 단백질의 산출량을 최대화하기 위해서, 본 발명자들은 여러 가지 유도 상태에서 시험하였다. 18° C에서 8시간 동안 0.1 mM IPTG를 이용한 유도는 가장 높은 수치의 가용성의 활성 융합 단백질을 생성하였다. MBP-AbfA 융합 단백질은 아밀로스 수지 컬럼, 뒤이어 DEAE-셀룰로스 DE-52 크로마토 그래피에 의해서 정제하고, MBP 잔기를 제거하기 위해서 TEV 단백질 분해 효소를 가지고 분해하였다. 재조합 AbfA는 DEAE-셀룰로스 컬럼 상에서 연속적인 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 이러한 절차는 AbfA의 18.4 배 순도와 조추출액으로부터의 57%의 회수율로 귀결되었다(표 1). 천연의 α-N-아라비노푸라노시다제의 분자적인 질량은 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의해 결정된 것과 같이, 247,000 Da였으며 SDS-PAGE에 의해서는 58,000Da였다(도 1). SDS-PAGE의 결과는 전환된 폴리펩티드 서열에 기반을 두고 추정된 크기와 일치하였다 (56,222 Da). 이러한 결과는 α-N-아라비노푸라노시다제가 4량체 단백질로서 생리학적으로 활성이라는 것을 시사한다(Canakci, S., A. O. Belduz, B. C. Saha, A. Yasar, F. A. Ayaz, and N. Yayli. 2007. Purification and characterization of a highly thermostable α-L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:813-820).

**표 1**

Purification steps	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U <sup>a</sup> )	Purification (Fold)	Yield (%)
Crude extract	1260	0.7	922	1.0	100
Amylose purification	67.5	12.9	873	17.7	95
DEAE-cellulose purification	38.9	13.5	524	18.4	57

<sup>a</sup>One unit(U) of α-N-arabinofuranosidase was defined as the of enzyme liberating 1 μmol/min of p-nitrophenol.

[0111]

[0112] **실시예 12. 효소 특성화**

[0113] **12-1. pH 변화에 따른 효과**

[0114] AbfA는 넓은 pH 범위 (pH 5.0 내지 10.0)를 넘어서는 활성을 보였다. 최적의 pH는 인산 나트륨 완충액 내에서 pH 7.5였다(도 4A). 효소는 pH 6.0 내지 10.0에서 그의 최상의 활성을 96% 이상 유지하였다 효소는 pH 5.0에서 잔여 활성을 나타냈고, pH 4.0에서는 활성이 나타나지 않았다.

[0115] **12-2. 온도 변화에 따른 효과**

[0116] AbfA 활성에 대한 최상의 온도는 37° C였다. 효소는 37° C 보다 낮은 온도에서 안정하였으나, 45° C에서 30분 동안 배양 한 후에는 그 활성의 거의 100%를 손실하였다(도 4B).

[0117] **12-3. 금속 및 화학 물질의 효과**

[0118] 금속 이온인 EDTA, β-머캅토에탄올의 효과와 AbfA 활성에 대한 SDS 또한 조사하였다(표 2). 효소는 활성화되는

데 Mg<sup>2+</sup>를 필요로 하지 않았고 1mM의 Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 또는 Cu<sup>2+</sup>와 10 mM의 Co<sup>2+</sup> 또는 Ca<sup>2+</sup>에 의해서 유의미하게 억제되었다. AbfA 활성은 공지의 티올 그룹 억제제인, DTT 또는 β-머캅토에탄올에 의해서 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 설프하이드릴 그룹이 효소의 촉매작용적 중심에 연관되지 않을 수 있으나, 활성 단백질의 삼차원 구조를 유지하는데 상당히 필수적인 것이라는 것을 시사한다. 킬레이트 약물인 EDTA은 AbfA 활성을 억제하지 않았는데, 이는 효소적인 활성에 대해서 2가의 양이온이 필요하지 않음을 지시한다. 효소적인 활성은 10 mM의 SDS 존재 하에서 눈에 띄게 억제되었다.

표 2

Metal ions or reagents	Relative activity <sup>a</sup> (%)	
	1mM	10mM
NaCl	99.9±0.70	101.7±0.78
KCl	100.5±0.80	97.6±0.39
MgCl <sub>2</sub>	100.9±0.73	101.8±0.92
MnCl <sub>2</sub>	51.8±1.67	19.6±0.73
CoCl <sub>2</sub>	96.6±0.51	4.5±0.16
ZnCl <sub>2</sub>	0	0
CaCl <sub>2</sub>	97.8±0.85	2.4±0.16
CuCl <sub>2</sub>	0	0
SDS	99.0±1.14	33.4±1.71
EDTA	100.4±0.48	96.6±0.22
β -Mercaptoethanol	98.8±0.99	99.4±0.70
DTT	99.2±0.62	97.7±0.52
Control	100±0.28	100±0.28

<sup>a</sup>The specific activity at 100% was 14.9 U/mg for α-L-arabinofuranosidase

[0119]

[0120]

12-4. 기질 특이성

[0121]

α-N-아라비노피라노시다제의 반응상수를 이중역수그래프(double reciprocal graph)로부터 계산하였을 때 pNPAf 가수분해에 대하여 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub> 는 각각 0.53 ± 0.07 mM 및 27.1 ± 1.7 μmolmin<sup>-1</sup>mg of protein<sup>-1</sup>였으며, 진세노사이드 Rc에 대해서는 각각 0.30 ± 0.07 mM 및 49.6 ± 4.1 μmolmin<sup>-1</sup>mg of protein<sup>-1</sup>였다.

[0122]

실시예 13. 진세노사이드의 생전환

[0123]

AbfA는 임의의 글루코스나 아라비노피라노스를 생성하기 위해 Rb1 및 Rb2와 반응하지 않았다. 보고된 진세노사이드 중에서, 단지 Rc, C-Mc1 및 C-Mc가 C20 위치에 말단의 비환원 α-L-아라비노피라노실 잔기를 가지고 있었다. 진세노사이드 Rc와 대조적으로, C-Mc1 및 C-Mc는 미가공의 인삼에 존재하지 않거나 미량으로 존재하며, C3 위치의 글리코피라노실 잔기의 가수분해를 통해 Rc로부터 생성될 수 있다. 본 발명자들은 C-Mc1 및 C-Mc를 상업적으로 얻을 수 없었기 때문에, 재조합 BgpA, 아글리코의 C3로부터 말단의 글리코피라노실 그룹을 특이적이며 연속적으로 가수분해하는 진세노사이드를 가수분해하는 β-글루코시다제를 사용하여 C-Mc1 및 C-Mc를 제작하였다(An, D.-S., C.-H. Cui, H.-G. Lee, L. Wang, S. C. Kim, S.-T. Lee, F. Jin, H. Yu, Y.-W. Chin, H.-K. Lee, W.-T. Im, and S.-G. Kim. 2010. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov. b-glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenoside XVII and gypenoside LXXV Appl. Environ. Microbiol. 76:5827-5836). Rc 상에 말단의 비환원 α-L-아라비노피라노실 잔기가 BgpA의 기질이 아니기 때문에, 효소는 오로지 Rc의 C3 위치의 외부와 내부의 글루코스 잔기만을 각각 C-Mc1 (대사산물 1) 및 C-Mc (대사산물 2)로 가수분해할 수 있었는데 (도 2), 이들의 화학적 구조는 NMR 및 MS 데이터 분석을 통해서 확인하였다. NMR 및 MS 분석에 의해서 그들의 화학적 구조를 확인한 후에, C-Mc1 및 C-Mc는 재조합 AbfA에 대하여 Rc와 함께 기질로서 사용되었다. 진세노사이드 Rc, C-Mc1 및 C-Mc의 가수분해 산물은 TLC 및 HPLC 분석에 의해 규칙적인 간격으로 확인하였다. 도 3 및 도 5에 나타난 바와 같이, 효소는 세 가지 모두의 진세노사이드로부터의 아라비노피라노실 잔기를 가수분해하였다. 표준의 진세노사이드들의 Rf 수치 (TLC에 의해서 결정된)와 대사산물 보존 시간(HPLC 분석에 의해 결정된)을 비교한 것을 기반으로, Rc, C-Mc1 및 C-Mc로부터의 대사산물은 각각 Rd, F2 및 C-K로 확인되었다(An, D.-S., C.-H. Cui, H.-G. Lee, L. Wang, S. C.



Kim, S.-T. Lee, F. Jin, H. Yu, Y.-W. Chin, H.-K. Lee, W.-T. Im, and S.-G. Kim. 2010. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov.  $\beta$ -glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenoside XVII and gypenoside LXXV Appl. Environ. Microbiol. 76:5827-5836, Ko, S. R., Y. Suzuki, K. Suzuki, K. J. Choi, and B. G. Cho. 2007. Marked production of ginsenosides Rd, F2, Rg3, and compound K by enzymatic method. Chem. Pharm. Bull. 55:1522-1527).

[0124] **실시예 14. C-Mc1와C-Mc의 구조적 동정**

[0125] 대사산물 1에 상응하는 양성자화된 분자적 이온 피크는 대사산물 1의 ESI MS 스펙트럼에서  $m/z$  917 ( $C_{47}H_{81}O_{17}$ )로 관찰하였다. 대사산물 1의  $^1H$  NMR 분광 데이터는(표 3) 4.92 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz) 및5.12 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz)에서  $\beta$ -글루코스에 속하는, 두 개의 아노머적 양성자 신호를 보였고, 5.63 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz)에서  $\alpha$ -아라비노피라노스에 속하는, 하나의 아노머적 양성자 신호를 보였다. 아노머적 양성자의 존재는 하나의 글루코스 유닛이 시작 물질인 진세노사이드 Rc로부터 제거되었음을 지시하였다. 대사산물 1의  $^{13}C$  NMR 화학적 변화는 문헌에서 Mb에 대한 신호와 밀접하게 연관이 있음을 보였다(Bae, E. A., M. K. Choo, E. K. Park, S. Y. Park, H. Y. Shin, and D. H. Kim. 2002. Metabolism of ginsenoside Rc by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin 25:743-747). 따라서 이 화합물은 C-Mc1로서 확인되었다. 대사산물 2의  $^1H$  및  $^{13}C$  NMR 데이터는 글루코스 유닛에 대한 신호가 부재하고 88.0부터 78.0까지의  $^{13}C$  화학적 변화가 이동하는 것을 제외하면, C-Mc1의 데이터와 아주 유사했다. 이러한 차이점들은 C-Mc1의 C3 위치에서 글루코스가 가수분해되고 자유 하이드록실 그룹이 대사산물 2의 구조 내에 존재한다는 것을 시사한다. 이것은 ESI MS에 의한  $m/z$  755 ( $C_{41}H_{71}O_{12}$ )에서 양성자화된 분자적 이온 피크의 검출과 문헌에서 보고된 수치와의 비교를 통해서 확인되었다. 따라서, 대사산물 2의 구조는 C-Mc로서 확인되었다.



표 3

기질	상대적 활성도 <sup>a</sup> (%)
pNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0
pNP- $\alpha$ -D-mannopyranoside	0
pNP- $\alpha$ -D-xylopyranoside	0
pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	100 $\pm$ 0.46
pNP- $\alpha$ -L-arabinopyranoside	0
pNP- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	0
pNP- $\beta$ -D-fucopyranoside	0
pNP- $\beta$ -D-galactopyranoside	0
pNP- $\beta$ -D-glucopyranoside	0
pNP- $\beta$ -D-glucosaminide	0
pNP- $\beta$ -D-mannopyranoside	0
pNP- $\beta$ -D-xylopyranoside	0
pNP- $\beta$ -L-binopyranoside	0
oNP- $\alpha$ -D-galactopyranoside	0
oNP- $\beta$ -D-fucopyranoside	0
oNP- $\beta$ -D-galactopyranoside	0
oNP- $\beta$ -D-glucopyranoside	0
oNP- $\beta$ -D-glucopyranoside	0

<sup>a</sup> Activity on pNPaf was taken as 100% and corresponds to a specific activity of 14.9 U/mg

[0126]

[0127]

**실시예 15. AbfA의 기질 특이성**

[0128]

AbfA의 기질 특이성은  $\alpha$ 와  $\beta$  구성을 가진 2.0 mM PNP- 및 ONP-글리코시드를 사용하여 시험하였다. AbfA는 오로지 pNPaf에 대해서만 활성이었다 PNP- $\beta$ -D-글루코피라노시드, PNP- $\beta$ -D-갈락토피라노시드, PNP- $\beta$ -D-퓨코피라노시드, PNP-N-acetyl- $\beta$ -D-글루코사아마이드, PNP- $\beta$ -L-아라비노피라노시드, PNP- $\beta$ -D-만노피라노시드, PNP- $\beta$ -D-자일로피라노시드, PNP- $\alpha$ -D-글루코피라노시드, PNP- $\alpha$ -L-아라비노피라노시드, PNP- $\alpha$ -L-람노피라노시드, PNP- $\alpha$ -D-만노피라노시드, 및 PNP- $\alpha$ -D-자일로피라노시드, 및 ONP- $\beta$ -D-글루코피라노시드, ONP- $\beta$ -D-갈락토피라노시드, ONP- $\beta$ -D-퓨코피라노시드 및 ONP- $\alpha$ -D-갈락토피라노시드를 포함하는 다른 기질은 가수분해되지 않았다. 아라비노스를 포함하는 중합체의 분해 양상은 AbfA가 오로지 비환원 말단 아라비노푸라노실 잔기 상에서만 활성이 되는 것을 밝혔다. AbfA의 작용(외부- 대 내부-작용) 방식을 식별하기 위하여, 아라비노스를 포함하는 올리고 또는 다당류의 가수분해를 시험하였다. 효소는 RDA에 대해서 어떠한 활성도 보이지 않았는데, 이는 내부적 아라비노스 가수분해효소(endoarabinanase)활성을 가지지 않음을 지시한다. AbfA는  $\alpha$ -1,5-연결의 아라비노바이오스, 아라비노트리오스, 아라비노테트라오스, 및 아라비노펜타오스에 관해서 활성을 보였다. 모든 경우에, 오로지 아라비노스만이 최종 산물로서 검출되었고 다른 잔여물들은 TLC에 의해 검출되지 않았다(도 7).  $\alpha$ -1,2 및  $\alpha$ -1,3 아라비노푸라노실 잔기를 포함하는 밀가루 아라비노자일란에 대해서는 어떠한 활성도 검출되지 않았다. 이러한 결과는 AbfA가 비환원적 말단  $\alpha$ -1,5-연결의 L-아라비노푸라노스 잔기를 가수분해하나, 비환원적 말단  $\alpha$ -1,2 또는  $\alpha$ -1,3-연결의 아라비노푸라노실 잔기를 가수분해 하지 않는 외부-작용 효소임을 지시한다. 또한, AbfA는 진세노사이드 Rc, C-Mc1 및 C-Mc의 C20 위치에서 각각 진세노사이드 Rd, F2, 및 C-K를 생성하도록, 말단의 비환원적  $\alpha$ -L-아라비노푸라노실 잔기를 가수분해할 수 있을 것이다. Rc, C-Mc1 및 C-Mc의 독자적인 아글리콘 구조와 더불어, 이러한 화합물의 말단적 비환원의  $\alpha$ -L-아라비노푸라노실 잔기가 C20 위치에서 내부 글루코스와  $\alpha$ -1,6-연결이라는 사실은 Rc, C-Mc1 및 C-Mc가  $\alpha$ -아라비노푸라노시다체의 기질 특이성을 조사하는데 훌륭한 기질일 것임을 시사한다. 게다가, 이러한 진세노사이드의 대사산물은 TLC 및 HPLC에 의해서 순

쉽게 검출될 수 있다. 이것은 효소가 아라비노푸라노실 그룹에 대해서 매우 높은 특이성을 가지며, 이전에 보고된 효소들과 달리, 오로지 외부-타입 효소로서 작용한다는 것을 의미한다. 예를 들어, GH 51 아라비노푸라노시다제는 아라비난과 자일란(Flipphi, M. J. A., J. Visser, P. Van der Veen, and L. H. De Graaff. 1994. Arabinase gene expression in *Aspergillus niger*: Indications for coordinated regulation. *Microbiology* 140:2673-2682)으로부터  $\alpha$ -1,2 및  $\alpha$ -1,3 아라비노푸라노실 잔기 둘다를 제거하며, 이 패밀리의 일부 효소는 카르복실 셀룰로스 및 자일란에 대해서  $\beta$ -1,4-내부글루카나제 활성을 나타낸다(Eckert, K., and E. Schneider. 2003. A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. *Eur. J. Biochem.* 270:3593-3602).

[0129] 결론적으로, 본 발명자들은 진세노사이드 Rc, C-Mc1 및 C-Mc로부터  $\alpha$ -1,6 아라비노푸라노실 잔기를 제거하여 각각 미량의 진세노사이드 Rd, F2 및 C-K를 생성하는 GH 패밀리의 51  $\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제를 클로닝하고 특성화하였다. 효소는 또한 아라비노바이오스, 아라비노트리오스, 아라비노테트라오스, 및 아라비노펜타오스로부터  $\alpha$ -1,5 아라비노푸라노실 잔기를 가수분해한다. 이것은 진세노사이드의 생전환을 통하여 진세노사이드 C-Mc1 및 C-Mc를 F2 및 C-K로 전환하는 효소를 클로닝하는 것에 관한 최초의 보고이다.

[0130]

**수탁번호**

[0131]

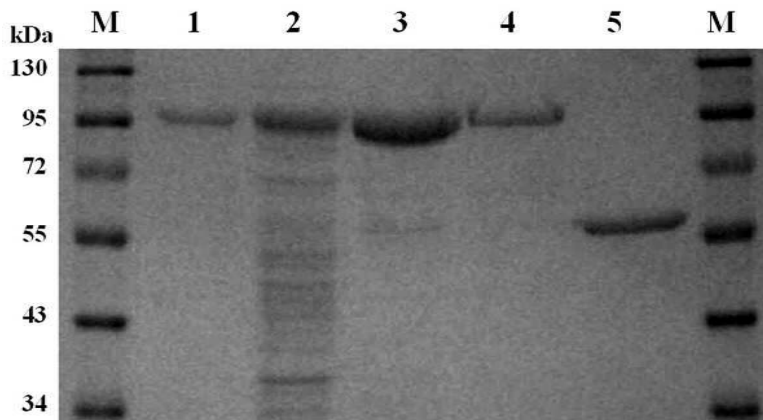
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC22231

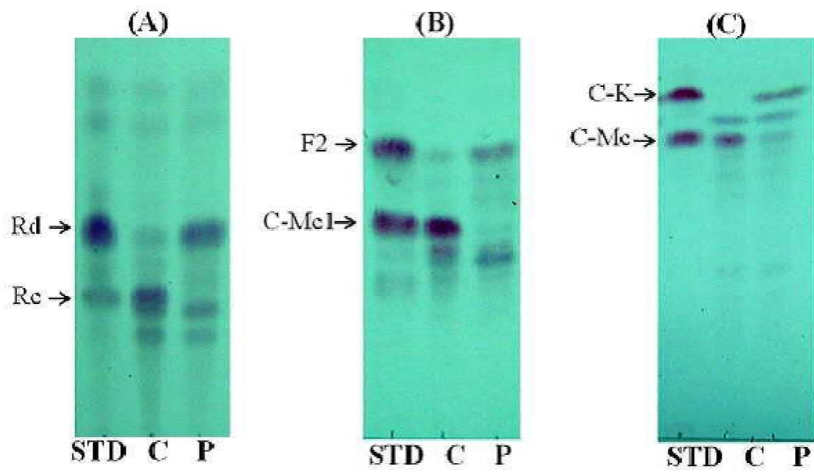
수탁일자 : 20080125

**도면**

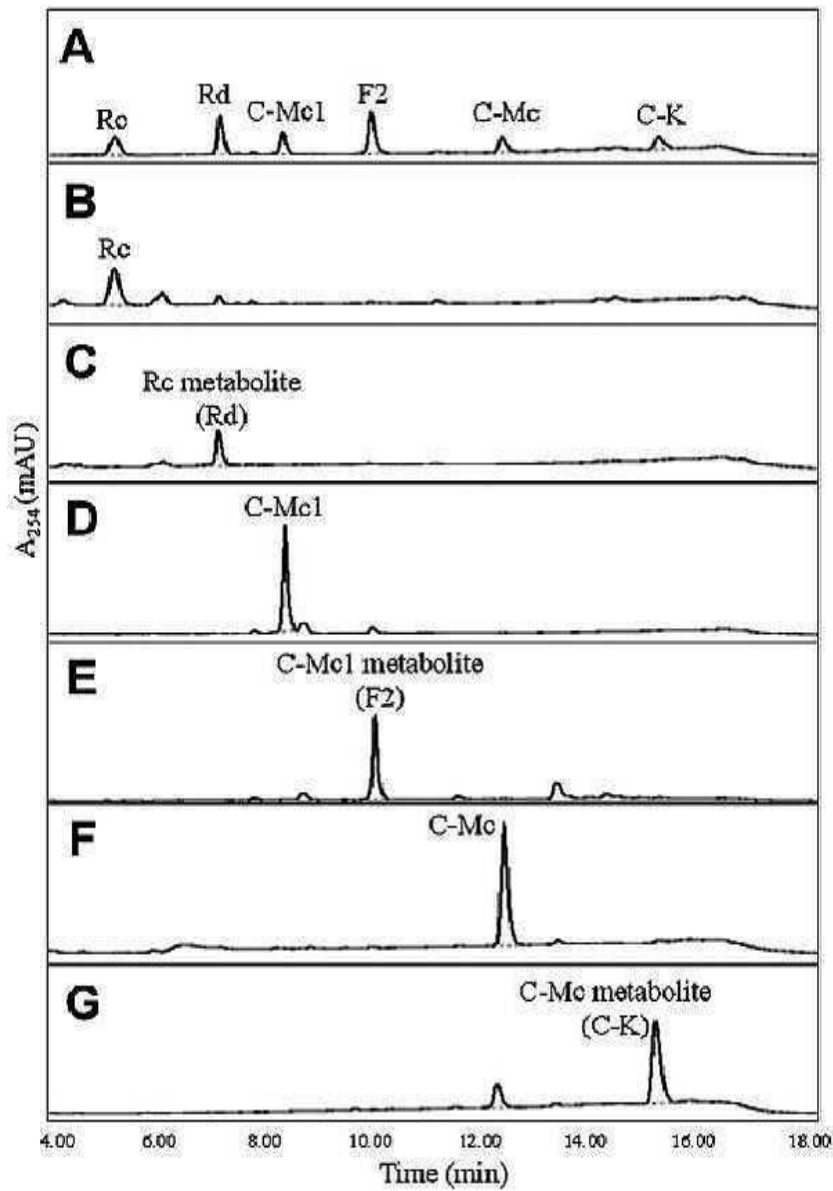
**도면1**



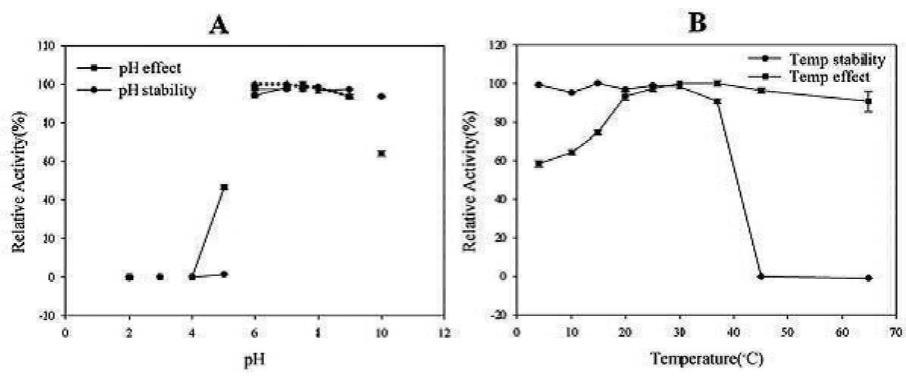
도면2



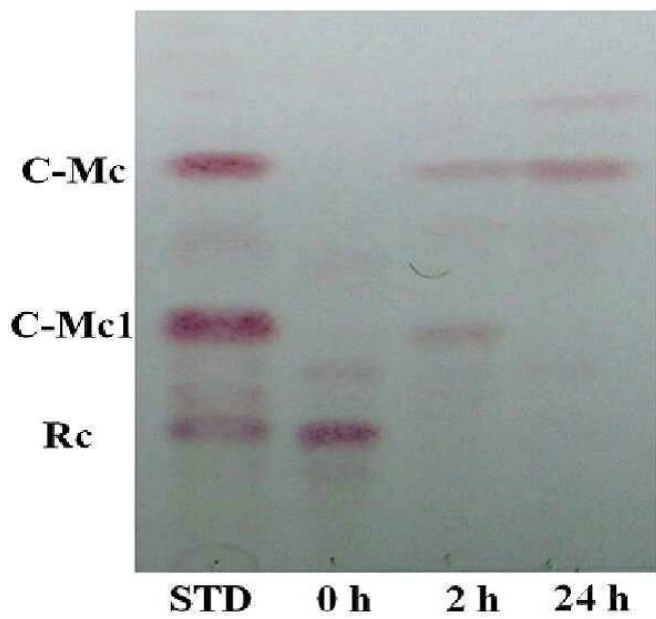
도면3



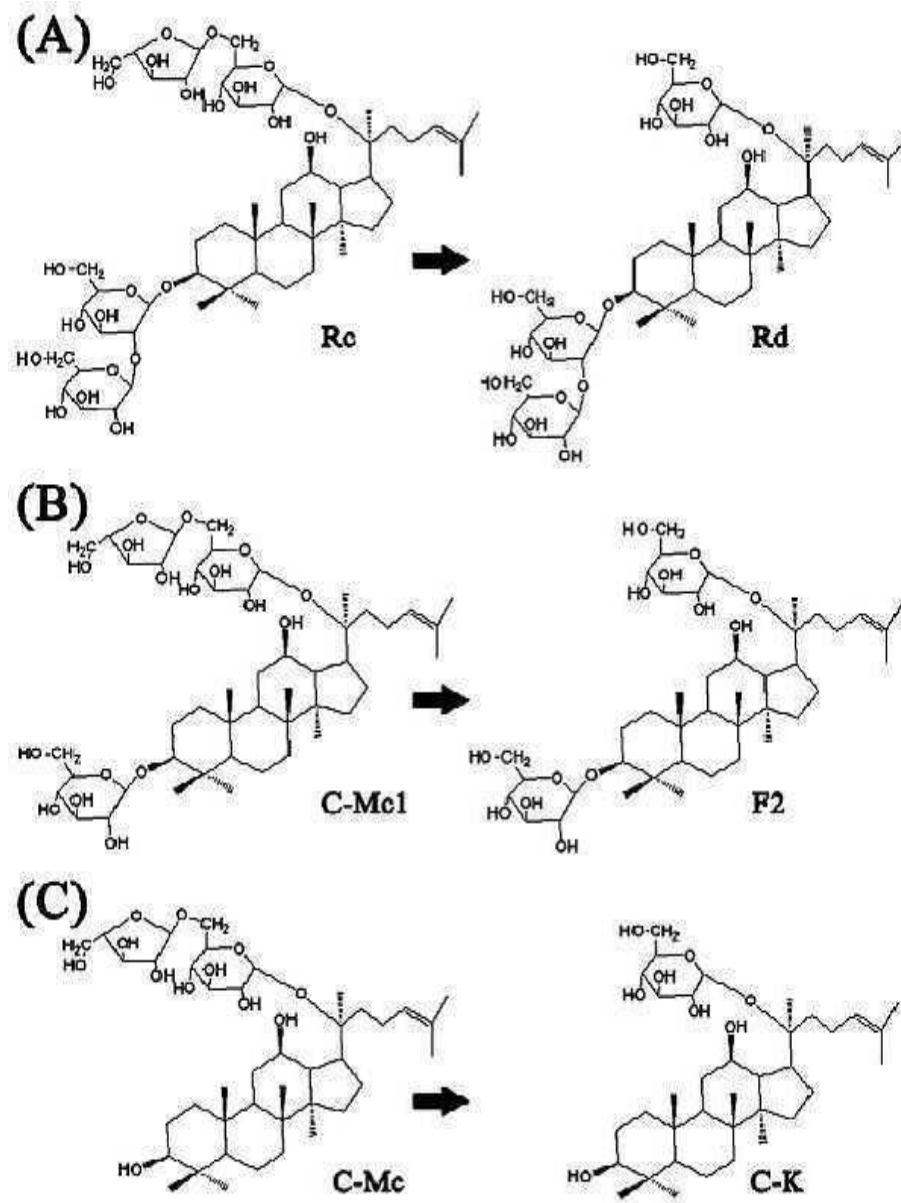
도면4



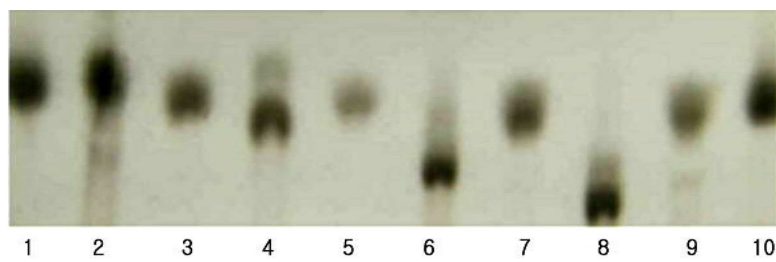
도면5



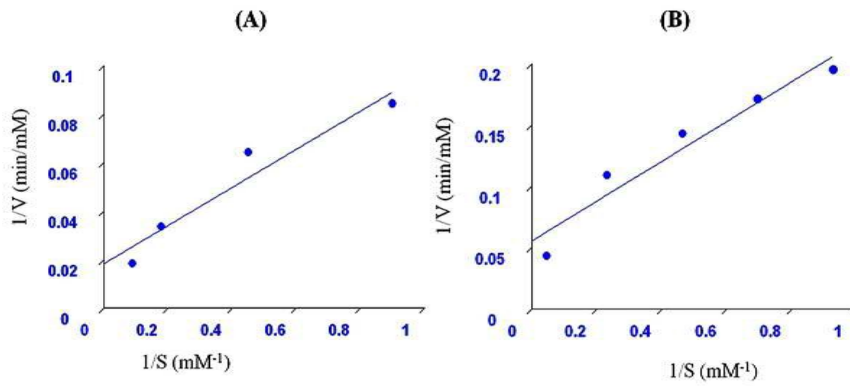
도면6



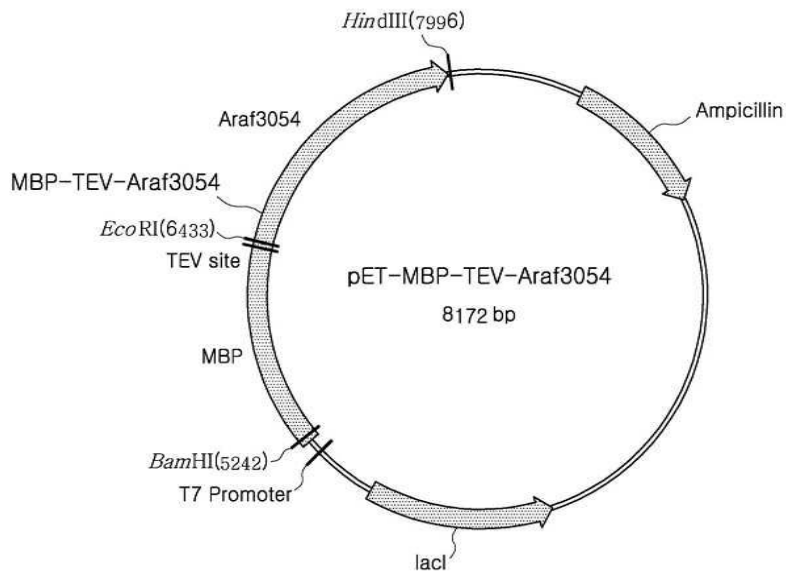
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology  
Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> Alpha-N-arabinofuranosidase From Rhodanobacter ginsenosidimutans  
And Use Thereof
- <130> PA110146KR
- <150> KR10-2010-0117515
- <151> 2010-11-24
- <150> KR10-2010-0123092
- <151> 2010-12-03
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1



<211> 518  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Alpha-N-arabinofuranosidase From *Rhodanobacter ginsenosidimutans*

KCTC22231T

<400> 1

Arg Cys Lys Leu Ile Ala Glu Asp Thr Phe Val Thr Gln Pro Gln Pro

1 5 10 15

Ala Ala Ala Lys Ile Thr Ile Asp Pro Ser Phe Thr Val Gly Pro Val

20 25 30

Arg Arg Arg Thr Phe Gly Ala Phe Val Glu His Leu Gly Arg Cys Val

35 40 45

Tyr Thr Gly Ile Phe Glu Pro Gly His Pro Gly Ala Asp Gln Asp Gly

50 55 60

Phe Arg Lys Asp Val Leu Glu Leu Thr Arg Glu Leu Gly Val Thr Thr

65 70 75 80

Val Arg Tyr Pro Gly Gly Asn Phe Val Ser Gly Tyr Arg Trp Glu Asp

85 90 95

Gly Val Gly Pro Val Asp Gln Arg Pro Val Arg Leu Asp Leu Ala Trp

100 105 110

His Ser Thr Glu Pro Asn Thr Val Gly Val Asp Glu Phe Ala Lys Trp

115 120 125

Ser Ala Lys Ala Gly Val Glu Leu Met Met Ala Val Asn Leu Gly Thr

130 135 140

Arg Gly Ile Gln Glu Ala Leu Asp Leu Leu Glu Tyr Cys Asn Ile Asp

145 150 155 160

Gly Gly Thr Thr Arg Ser Glu Gln Arg Arg Ala Asn Gly Ala Ala Asn

165 170 175

Gly Tyr Gly Val Thr Met Trp Cys Leu Gly Asn Glu Met Asp Gly Pro

180 185 190

Trp Gln Ile Gly His Lys Asn Ala Leu Glu Tyr Gly Arg Leu Ala Ala

195                                    200                                    205  
  
 Asp Thr Ala Arg Gly Met Arg Met Ile Asp Pro Gly Leu Glu Leu Val  
           210                                    215                                    220  
 Ala Cys Gly Ser Ser Ser Pro Ala Met Pro Thr Phe Gly Glu Trp Glu  
 225                                    230                                    235                                    240  
 Arg Val Val Leu Thr Glu Thr Tyr Asp Leu Val Asp Leu Ile Ser Ala  
     245                                    250                                    255  
 His Gln Tyr Phe Glu Asp Thr Gly Asp Leu Gln Glu His Leu Ala Ala  
     260                                    265                                    270  
 Gly His Lys Met Glu Ala Phe Ile His Asp Leu Val Ser His Ile Asp  
  
     275                                    280                                    285  
 His Val Arg Ser Ala Arg Lys Ser Ser Arg Gln Val Asn Ile Ser Phe  
           290                                    295                                    300  
 Asp Glu Trp Asn Val Trp His Met Ser Arg Glu Ala Ser Arg Val Pro  
 305                                    310                                    315                                    320  
 Thr Gly Lys Asp Trp Pro Val Ala Pro Ala Leu Leu Glu Asp Ser Tyr  
     325                                    330                                    335  
 Thr Val Ala Asp Ala Val Val Val Gly Asp Leu Leu Leu Thr Leu Leu  
     340                                    345                                    350  
  
 Arg Asn Thr Asp Arg Val His Ser Ala Ser Leu Ala Gln Leu Val Asn  
           355                                    360                                    365  
 Val Ile Ala Pro Ile Met Thr Glu Pro Gly Gly Arg Ala Trp Lys Gln  
           370                                    375                                    380  
 Thr Thr Phe His Pro Phe Ala Leu Thr Ser Arg His Ala Ser Gly Thr  
 385                                    390                                    395                                    400  
 Val Leu Gln Leu Ala Val Glu Ser Pro Pro Val Ser Gly Gly Thr Thr  
     405                                    410                                    415  
 Ala Asp Phe Ala Ala Leu Ser Ala Val Ala Thr Phe Asp Arg Glu Lys  
  
     420                                    425                                    430  
 Gly Glu Ala Val Leu Phe Ala Val Asn Arg Ser Ala Arg Gln Ala Leu  
           435                                    440                                    445

Thr Leu Asp Ala Ala Val Gly Ala Leu Gly Thr Met Arg Val Leu Glu  
 450                              455                              460  
 Ala Val Thr Tyr Ala Asn Lys Asp Pro Tyr Trp Gln Ala Ser Ala Asp  
 465                              470                              475                              480  
 Asp Ser Thr Ser Val Leu Pro Ser Gly Asn Ala Thr Val Lys Ala Asp  
                                     485                              490                              495

Asp Gly Arg Leu Thr Ala Glu Leu Pro Ala Val Ser Trp Ser Met Ile  
                                     500                              505                              510  
 Arg Leu Ala Val Gly Ser  
                                     515

<210> 2

<211> 1557

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alpha-N-arabinofuranosidase From *Rhodanobacter ginsenosidimitans*  
 KCTC22231T

<400> 2

cgttgtaaat tgattgccga ggataccttc gtgaccacgc cacagcccgc cgcagcaaaa              60  
 atcacaattg atccgtcgtt caccgtgggt cccgtccgtc gtcgtacgtt tggcgcgttc              120  
  
 gttgagcacc ttggccggtg cgtgtacacc gggatctttg aaccgggca cccgggggcc              180  
 gaccaggacg gtttccgcaa ggacgtcctg gaactgacc gcgagctggg cgtcaccacc              240  
 gtccgctacc cgggcgcaaa cttcgtctcg ggtaccgct gggaggacgg cgtgggtccg              300  
 gtggaccacg gtcccgtccg cctggacctg gcctggcatt cgactgaacc caacaccgtg              360  
 ggcggtggac agttcgcaa atgggtccgc aaggcgggcg tggaaactgat gatggccgtg              420  
 aacctgggca cgcgcggcat ccaggaggca ctggacctcc tggagtactg caacatcgac              480  
 ggcgggacaa cccgtccga acaacgccgc gccaacgggg cgcaccaacgg ctacggcgtc              540  
  
 accatgtggt gcctgggcaa cgagatggac ggcccgtggc agatcgcca caagaacgcc              600  
 ctcgaatacg gcaggctggc cgcggacacc gcccgcgaa tgcgcatgat cgaccccggc              660  
 ctggagctcg tggcctgcgg cagctccagc cccgccatgc ccacctttgg cgagtgggag              720  
 cgtgtggtcc tcaccgaaac ctatgacctg gtggacctca tttccgcgca ccagtacttc              780  
 gaggacaccg gcgacctgca ggaacacctg gccgccgggc acaagatgga agccttcac              840  
 cagacctcg tgagtcatat cgacctgtg agatcagcca ggaaatccag ccggcaggtg              900

aatatctcct tcgacgaatg gaacgtctgg cacatgagcc gcgaggcgtc caggggtcccc 960  
 accggcaagg actggccggt ggcacccgcc ctgctggagg acagctacac ggtggcggat 1020  
 gccgtggtgg tgggcgacct gctgetcacc ctgctccgga acaccgaccg cgtccacteg 1080  
 gccagcctgg cgcagctggt gaacgtgatc gcacccatca tgaccgaacc cggcggccgg 1140  
 gcctggaage agaccacctt ccaccggtt gccctgacct cgcggcacgc atccggcacg 1200  
 gtgctgcage tcgccgtcga atccccctt gtcagcggag gtacgacggc cgacttcgcc 1260  
 gccctgtccg ccgtcgccac gtttgaccgg gaaaaggcg aggccgtgct gttcgccgtg 1320  
 aaccgttcgg cgcgccaggc gtcaccctc gacgccgag tgggtgcct aggtaccatg 1380  
 cgctgctgg aagcggtagc ctaccacaac aaggaccctt actggcagcc cagcgcgat 1440  
 gactccatt ccgtcctgcc ttccggaaac gccacgtaa aggccgacga cggcggctc 1500  
 accgtgagc tccggcagt ctctgtgctc atgatccgc tggetgtggg gtcctga 1557

**【심사관 직권보정사항】**

**【직권보정 1】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 17

**【변경전】**

$\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제의 기질인 진세노사이드는 pNP- $\alpha$ -L-아라비노푸라노사이드(pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside)인 것을 특징으로 하는

**【변경후】**

$\alpha$ -N-아라비노푸라노시다제는 pNP- $\alpha$ -L-아라비노푸라노사이드(pNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside)를 기질로 이용할 수 있는 것을 특징으로 하는