



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년11월16일  
(11) 등록번호 10-1919105  
(24) 등록일자 2018년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12P 19/02 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)  
C12P 19/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 9/2402 (2013.01)  
C12N 15/63 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0133438  
(22) 출원일자 2016년10월14일  
심사청구일자 2016년10월14일  
(65) 공개번호 10-2018-0041377  
(43) 공개일자 2018년04월24일  
(56) 선행기술조사문헌  
NCBI Reference Sequence WP\_017446558.1  
(2013.06.28.)\*  
J. Microbiol. Biotechnol., 2013, Vol. 23, No. 11, pp. 1509-1518.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
명지대학교 산학협력단  
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)

(72) 발명자  
홍순광  
서울특별시 성동구 독서당로40길 37, 102동 1902호 (옥수동, 옥수 어울림)  
박재선  
서울특별시 동작구 상도로53길 8, 301동 1103호 (상도동, 래미안상도3차아파트)  
이창로  
경기도 용인시 수지구 신봉1로 214, 505동 1301호 (신봉동, 신봉마을 동부센트레빌 5단지)

(74) 대리인  
특허법인현문

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김재현

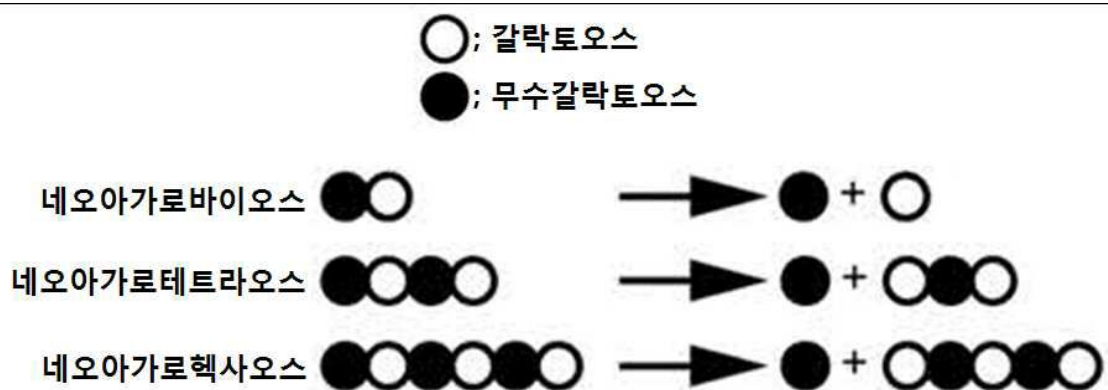
(54) 발명의 명칭 **가야도모나스 주비니에게 G7 유래 신규 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이의 이용**

**(57) 요약**

본 발명은 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 신규 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 가야도모나스 주비니에게 G7로부터 동정되어 이중균주에서 과발현이 가능하며 네오아가로 올리고당의 비환원성 말단의 무수갈락토오스를 분해하여 무수갈락토오스 분자와 비환원성 말단의 무수갈락토오스

(뒷면에 계속)

**대표도** - 도2



가 제거된 형태의 홀수개 당분자로 구성된 네오아가로올리고당을 생성할 수 있는 신규 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈는 네오아가로바이오스를 갈락토오스와 무수갈락토오스로 분해하는데 매우 효과적일 뿐만 아니라 이중숙주세포를 사용한 과발현 시스템을 통해 대량생산이 가능하고, 바이오매스로부터 당화를 통해 바이오연료 및 의약품 원료를 생산하는 산업분야에서 다른 효소들과 함께 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 베타-아가레이즈에 의해 형성되며 짝수개의 당으로 구성된 네오아가로올리고당(네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스 등)에 작용하여 비환원성 말단의 무수갈락토오스 분자 1개만을 제거함으로써, 홀수개의 당분자로 구성된 신규의 기능성 네오아가로올리고당(네오아가로트리오스, 네오아가로펜타오스 등)의 제조에 사용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

*C12P 19/02* (2013.01)

*C12P 19/04* (2013.01)

*C12P 19/14* (2013.01)

*C12Y 302/01159* (2013.01)

*C12N 2511/00* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01129301

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 식품 제조 기준 맞춤형 Agarase 고생산 균주 개발 및 네오한천올리고당 생산 공정 표준화

기여율 1/1

주관기관 명지대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자.

**청구항 4**

제 3항의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자를 함유하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 재조합 벡터.

**청구항 5**

제 4항의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 재조합 벡터로 형질 전환된 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 형질전환체.

**청구항 6**

제 5항의 형질전환체를 배양하고 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자를 과발현시키는 것을 특징으로 하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 대량생산방법.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase)를 네오아가로바이오스(neoagarobiose)를 제외한 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스 또는 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 생산방법.

**청구항 10**

제 9항에 있어서,

상기 효소반응이 pH 6 내지 8 및 30 내지 50℃에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스 또는 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 생산방법.

**청구항 11**

제 9항에 있어서,

상기 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)은 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose) 또는 네오아가

로핵사오스(neoagarohexaose)인 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스 또는 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 생산방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 신규 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 가야도모나스 주비니에게 G7로부터 동정되어 이중균주에서 과발현이 가능하며 네오아가로올리고당의 비환원성 말단의 무수갈락토오스를 분해하여 무수갈락토오스 분자와 비환원성 말단의 무수갈락토오스가 제거된 형태의 홀수개 당분자로 구성된 네오아가로올리고당을 생성할 수 있는 신규 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 해조류는 일반적으로 이용되는 에너지 곡물에 비해 연료 생산량이 월등히 높으며, 지구온난화의 주범인 이산화탄소 흡수능이 뛰어나고, 태양광 및 비식용수 만을 이용하며 매우 빠른 속도의 성장이 이루어지는 장점을 가진다. 해조류를 구성하고 있는 주요성분은 다당류로, 최근에는 건강에 대한 관심이 증대되면서 생체조절기능을 갖는 다기능성 올리고당의 소재로 많이 사용되고 있다. 특히 해조류 유래 기능성 소재는 항종양성, 항바이러스성, 항혈액응고 및 면역력 증강 등 다양한 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 해조류 중에서도 홍조류는 바다 속에 다량 존재하고 있으나 이용률이 높지 않은 농수산자원으로 셀룰로오스(cellulose) 20%, 아가(agar) 60%, 단백질 10%, 기타 10%로 구성되어 있으며, 주로 식용 및 화장품에 사용하거나, 정제하여 연구용 아가 또는 아가로오스(agarose)로 사용하여 왔다.

[0003] 해조류는 일년에 4 ~ 6회 정도 원료 수확이 가능하여 원료 확보가 유리하며, 또한 바다에 무한하게 존재하므로 생산 및 수확비용이 아주 저렴하다는 장점이 있다. 홍조류 우뭇가사리는 국내의 경우 매년 수확량이 4,000톤에 이르는 풍부한 농수산자원이지만, 전체 생산량의 10% 이하만이 단순가공 처리되어 공업용 또는 식용 등의 값싼 원료로 사용되고 있다. 따라서 우뭇가사리의 새로운 용도개발과 부가가치 향상에 대한 연구가 필요하며, 이에 다양한 분자생물학적 대사공학방법을 적용하여 방대한 농수산자원인 홍조류로부터 고부가가치 산물인 기능성 아가로올리고당을 생산할 수 있는 기술을 개발할 필요성이 있다. 또한 인체에 안전하게 적용하기 위해서는 염산과 같은 유해하지 않고 환경 오염원을 사용하지 않는 친환경적인 새로운 생물전환 방법으로 네오아가로올리고당을 제조하는 방법이 필요하며, 이를 응용하여 기존에 사용되어 왔던 다른 원료에 비해 경제성과 효능이 우수한 네오아가로올리고당 제품으로 개발할 필요가 있다. 이와 같은 기술개발은 국내에서 채취하는 천연농수산자원의 이용률을 높이고, 농수산 자원을 이용한 고부가가치 상품을 창출하며, 국민 건강에 기여할 수 있고, 세계의 생체 촉매 시장에서도 독자적 기술로 자생력을 갖출 수 있는 차세대 녹색 성장을 위하여 절대적으로 필요한 기술이라고 판단된다.

[0004] 한편 홍조류에 함유된 아가의 약 70%는 아가로오스(agarose)이며, 이 아가로오스는 갈락토오스(D-galactose)와 무수갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)가 β-1, 4 결합한 단위체인 아가로바이오스(agarbiose)가 반복하여 α-1, 3 결합으로 연결된 직쇄구조로 구성되어 있다. 아가로오스는 베타-아가레이즈(beta-agarase)에 의해 β-1, 4 결합이 가수분해되어 최소 단위체인 네오아가로바이오스로 되고 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈에 의해 갈락토오스와 무수갈락토오스로 분해된다(도 1 참조). 네오아가로바이오스를 구성하는 무수갈락토오스의 경우 신 물질로 새로운 생리활성의 연구대상이 되고 있으며, 그 효용 가치가 매우 높다. 그리고 갈락토오스는 감미료 타가토스(Tagatose)의 원료로 사용하는 고가의 화합물이며, 무수갈락토오스와 함께 바이오에탄올을 생산에 활용될 수 있다.

[0005] 본 발명자는 상기와 같은 해조류 유래 아가로올리고당을 보다 유용하게 이용할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하였으며, 특히 이러한 아가로올리고당을 특이적으로 분해하여 유용한 네오아가로올리고당을 생산할 수 있는 미생물 및 관련 효소를 발굴하기 위하여 노력하였다. 이의 결과, 우리나라 가야섬의 연안 바닷물에서 분리된 가야도모나스 주비니에게 G7(Gayadomonas jubiniege G7) 균주로부터 신규한 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 및 이의 유전자를 동정하고, 이의 재조합 효소를 대량생산할 수 있는 방법을 구축하였으며, 생산된 효소를 이용하여 네오아가로올리고당을 분해함으로써 매우 유용한 당의 형태, 즉 갈락토오스, 무수갈락토오스, 또는 비환원성 말단의 무수갈락토오스가 제거된 홀수개의 당으로 구성된 네오아가로올리

고당을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1618765호
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1615141호

**비특허문헌**

- [0007] (비특허문헌 0001) Ha SC, Lee S, Lee J, Kim HT, Ko HJ, Kim KH, Choi IG. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway,  $\alpha$ -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 26;412(2):238-44.
- (비특허문헌 0002) Hehemann JH, Smyth L, Yadav A, Vocadlo DJ, Boraston AB. Analysis of keystone enzyme in Agar hydrolysis provides insight into the degradation (of a polysaccharide from) red seaweeds. *J Biol Chem.* 2012 Apr 20;287(17):13985-95.
- (비특허문헌 0003) Ariga O, Okamoto N, Harimoto N, Nakasaki K. Purification and characterization of  $\alpha$ -neoagarooligosaccharide hydrolase from *Cellvibrio* sp. OA-2007. *J Microbiol Biotechnol.* 2014 Jan;24(1):48-51.
- (비특허문헌 0004) Kwak MJ, Song JY, Kim BK, Chi WJ, Kwon SK, Choi S, Chang YK, Hong SK, Kim JF. Genome sequence of the agar-degrading marine bacterium *Alteromonadaceae* sp. strain G7. *J Bacteriol.* 2012 Dec;194(24):6961-2.
- (비특허문헌 0005) Chi WJ, Park JS, Kwak MJ, Kim JF, Chang YK, Hong SK. Isolation and characterization of a novel agar-degrading marine bacterium, *Gayadomonas jobiniege* gen. nov., sp. nov., from the Southern Sea, Korea. *J Microbiol Biotechnol.* 2013 Nov 28;23(11):1509-18.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0008] 따라서 본 발명의 주된 목적은 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas jubiniege* G7) 균주로부터 유래한 신규한 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 암호화하는 유전자를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 생산하기 위한 재조합 벡터를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 생산하기 위한 형질전환체를 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 대량생산하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 이용한 무수갈락토오스 또는 갈락토오스 생산방법을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈를 이용한 무수갈락토오스 또는 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 생산방법을 제공하는데 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase)를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자를 제공한다. 본 발명의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자를 함유하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 재조합 벡터로 형질전환된 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하고 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 유전자를 과발현시키는 것을 특징으로 하는 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase) 대량생산방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase)를 네오아가로바이오스(neoagarobiose)와 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스 또는 갈락토오스 생산방법을 제공한다. 이때 상기 효소반응은 pH 6 내지 8 및 30 내지 50℃에서 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(alpha-neoagarobiose hydrolase)를 네오아가로바이오스(neoagarobiose)를 제외한 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스 또는 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 생산방법을 제공한다. 이때 상기 효소반응은 pH 6 내지 8 및 30 내지 50℃에서 이루어지는 것이 바람직하며, 상기 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)은 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose) 또는 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose)인 것이 바람직하다.

**발명의 효과**

- [0022] 본 발명의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈는 네오아가로바이오스를 갈락토오스와 무수갈락토오스로 분해하는데 매우 효과적일 뿐만 아니라 이중숙주세포를 사용한 과발현 시스템을 통해 대량생산이 가능하고, 바이오매스로부터 당화를 통해 바이오연료 및 의약품 원료를 생산하는 산업분야에서 다른 효소들과 함께 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 베타-아가레이즈에 의해 형성되며 짝수개의 당으로 구성된 네오아가로올리고당(네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스 등)에 작용하여 비환원성 말단의 무수갈락토오스 분자 1개만을 제거함으로써, 홀수개의 당분자로 구성된 신규의 기능성 네오아가로올리고당(네오아가로트리오스, 네오아가로펜타오스 등)의 제조에 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0023] 도 1은 아가로오스(agarose)가 베타-아가레이즈(beta-agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈에 의해 갈락토오스와 무수갈락토오스로 분해되는 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 본 발명의 알파-네오아가로바이오스 하이드로레이즈(이하, 'NABH-1'이라 한다)가 네오아가로바이오스(neoagarobiose)를 갈락토오스와 무수갈락토오스로, 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose) 및 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose)를 무수갈락토오스와 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 홀수개 당분자로 이루어진 네오아가로올리고당으로 분해하는 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 가야도모나스 주비니에게 균주의 게놈 DNA를 이용하여 PCR을 통해 수득한 NABH-1 유전자 DNA 단편의 아가로스젤 전기영동 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 NABH-1 유전자 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 이용하여 정제한 NABH-1의 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 NABH-1 유전자 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 이용하여 정제

한 NABH-1과 네오아가로올리고당의 반응산물을 TLC(thin-layer chromatography)를 이용하여 분석한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 NABH-1 유전자 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 이용하여 정제 한 NABH-1과 네오아가로바이오스의 반응산물을 MS(mass spectrometry)를 이용하여 분석한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 NABH-1 유전자 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 이용하여 정제 한 NABH-1과 네오아가로테트라오스의 반응산물을 MS(mass spectrometry)를 이용하여 분석한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 NABH-1 유전자 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 이용하여 정제 한 NABH-1과 네오아가로헥사오스의 반응산물을 MS(mass spectrometry)를 이용하여 분석한 결과이다.

도 9는 본 발명 NABH-1의 반응 적정 pH를 분석한 결과이다.

도 10은 본 발명 NABH-1의 반응 적정 온도를 분석한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] 본 발명의 NABH-1은 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas joobiniege* G7)이 생산하는 효소로, 서열번호 1의 359개 아미노산 서열로 이루어진다. 미생물 유래 아가레이즈 중에는 시그널 펩타이드가 포함된 형태의 전구 단백질로 발현된 다음 시그널 펩타이드 프로그램에 의해 세포 외부로 분비될 때 이 시그널 펩타이드가 잘려 성숙한 형태의 단백질로 되는 경우들이 다수 존재하는데, 본 발명의 NABH-1은 이러한 시그널 펩타이드(signal peptide)를 보유하지 않는 것으로 나타났다.
- [0025] 본 발명의 NABH-1의 근원인 가야도모나스 주비니에게 G7은 우리나라 가야섬의 연안 바닷물에서 분리된 균주로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC23721로, 미국균주은행(American Type Culture Collection, ATCC)에 ATCC BAA-2321로, 독일균주은행(Deutsche Sammlung von Microorganismund Zellkulturen Gmb H, DSM)에 DSM25250로 기탁되어 있다.
- [0026] 본 발명의 NABH-1 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 것으로, 가야도모나스 주비니에게 G7 균주로부터 확인된 본래의 염기서열은 서열번호 2의 염기서열이지만, 발현을 위한 숙주의 종류에 따라 적합한 코돈 서열로 변형하여 적용할 수 있을 것이다.
- [0027] 본 발명의 NABH-1 생산용 재조합 벡터는 상기와 같은 NABH-1 유전자를 함유하여 이루어진다. 이때 벡터는 숙주 세포의 종류 또는 프로모터, 선별마커 등을 고려하여 기존에 알려진 다양한 종류의 벡터 중에서 선택하여 적용할 수 있다. 예를 들어 대장균(*Escherichia coli*)을 숙주로 이용할 경우 pET 시리즈의 벡터를 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 NABH-1 생산용 형질전환체는 상기와 같은 재조합 벡터를 숙주생물체에 도입하여 제조될 수 있다. 이때 숙주로는 다양한 생물체를 이용할 수 있을 것으로 판단되며, NABH-1의 안정적인 발현 또는 생산 효율을 위해 미생물을 이용하는 것이 보다 바람직할 것이다. 본 발명에 따르면 본 발명의 NABH-1 유전자가 대장균의 발현시스템에서도 매우 원활하게 발현될 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서 대장균을 숙주로 이용하여 형질전환체를 제조하면 NABH-1을 매우 용이하게 생산할 수 있다. 숙주생물체의 형질전환은 각 숙주생물체에 이용되고 있는 통상의 형질전환방법을 적용하여 상기 재조합 벡터를 숙주생물체에 도입하는 방법으로 달성할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 NABH-1 대량생산은 상기 형질전환체를 배양하고 상기 NABH-1 유전자를 과발현시키는 방법으로 달성할 수 있다. 이때 배양배지의 종류, 배양온도, 배양시간 등의 조건은 숙주 및 벡터의 종류에 따라 선택적으로 적용할 수 있다. 예를 들어 숙주가 대장균이고 pET28 시리즈의 벡터를 이용하는 경우, LB(Luria Bertani) 배지에서 약 15 ~ 40℃로 12시간 ~ 5일간 배양하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 NABH-1은 네오아가로바이오스(neoagarobiose)의 α 1-3 결합을 잘라 무수갈락토오스(3,6-anhydro-α-L-galactose)와 갈락토오스(β-D-galactose)를 만드는 활성이 있는 것으로 확인되었다(도 1 참조). 따라서 본 발명의 NABH-1을 네오아가로바이오스와 효소반응시키는 방법으로 무수갈락토오스 또는 갈락토오스를 생산할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 NABH-1은 네오아가로바이오스 뿐만 아니라, 보다 큰 분자량의 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)을 기질로 하여 효소반응을 수행할 수 있다. 본 발명의 NABH-1은 특이하게도 네오아가로올리고당의 비환원성 말단의 무수갈락토오스와 갈락토오스 분자 사이의 α 1-3 결합 만을 자르는 활성을 나타낸다. 따라서 네오아가로바이오스 보다 분자량이 큰 네오아가로올리고당을 기질로 하여 본 발명의 NABH-1과 효소반응시키면, 무수갈락토오스와 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당을 생산할 수 있다. 이를 이용하면 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose) 또는 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose)를 기질

로 하여 홀수개의 당분자로 이루어지며 분자의 양끝단이 갈락토오스 분자로 이루어진 특이적인 구조의 올리고당을 생산할 수 있다(도 2 참조).

[0032] 본 발명의 NABH-1은 pH 4 내지 11에 걸쳐서, 그리고 20 내지 80℃에 걸쳐 효소활성을 나타낼 수 있다. 따라서 이러한 pH 범위와 온도 범위에서 상기와 같은 효소반응을 수행할 수 있으나, 효소활성을 높여 반응생성물의 생산효율을 높이기 위해서는 pH 6 내지 8 및 30 내지 50℃에서 효소반응이 이루어지도록 하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.5, 35 내지 45℃가 좋을 것이다.

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0034] **실시예 1. NABH-1 암호화 유전자 발현벡터 및 형질전환체 제작**

[0035] 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas joobiniege* G7)(KCTC23721) 게놈 DNA를 추출하고 Forward primer (5' - ATCACTCATATGTCGAAAAAATTAAGT-3' , 밑줄친 부분은 NdeI 인식부위)(서열번호 3)와 Reverse primer (5' - CTCCACAGGATCCCTTTATTTTAGTTGAG-3' , 밑줄친 부분은 BamHI 인식부위)(서열번호 4)를 이용하여 PCR을 통해 359개의 아미노산으로 구성되는 NABH-1의 암호화부위(1,080bp)를 포함하는 DNA단편(서열번호 5)을 증폭하였다(도 3 참조). 증폭된 DNA단편을 NdeI-BamHI 제한효소로 이중절단하고 pET28a(+)<sup>1</sup>의 NdeI-BamHI 제한효소부위에 접합하여 네오아가로바이오스 하이드로레이즈 C-말단에 His-tag가 포함되어 발현되는 pET28a-NABH1(NABH-1 암호화 유전자 발현벡터)을 제작하였다. 플라스미드 제작을 위한 형질전환에는 *E. coli* DH5 a가 이용되었고 pET28a(+)<sup>1</sup>는 항생물질인 카나마이신 내성 물질을 생성하므로 형질전환된 균주의 선별을 위해 pET28a-NABH1 제작 과정에 최종농도 50µg/ml의 카나마이신이 고체 및 액체 배지에 첨가되었다.

[0036] 제작된 pET28a-NABH1으로 *E. coli* ER2566를 형질전환하여 NABH-1을 생산하기 위한 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 제작하였다.

[0037] **실시예 2. NABH-1 생산 및 정제**

[0038] 상기 실시예 1의 형질전환체(*E. coli* ER2566/pET28a-NABH1)를 최종농도 50µg/ml의 카나마이신이 첨가된 50ml LB 배지에서 OD600 값이 0.6이 될 때까지 37℃에서 배양한 뒤, isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도 1mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 28℃에 12시간 더 배양하였다. 5,000rpm으로 10분간 원심리하여 균체를 회수하고, 5ml PBS 완충액(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 현탁한 다음, 소니케이션하여 파쇄하고 6,000rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 정제를 위해 사용하였다.

[0039] 단백질 정제를 위해 1.5ml Ni<sup>2+</sup>-NTA 레진(Clontech, Japan)을 컬럼에 채운 뒤 5ml PBS 완충액으로 세척하고 상등액을 로딩하였다. 컬럼을 10ml PBS 완충액으로 세척하고 200mM 이미다졸이 함유된 1ml PBS 완충액을 단계적으로 총 5ml 이용하여 레진에 결합된 단백질을 용출하였다.

[0040] 회수된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 359개의 아미노산으로 구성된 분자량 40.8kDa의 NABH-1의 분자량을 가지는 단백질을 확인하였다(도 4 참조).

[0041] **실시예 3. NABH-1의 기질 분해산물 분석**

[0042] 상기 실시예 2에서 수득한 NABH-1을 이용하여 각각의 네오아가로올리고당(네오아가로바이오스, 네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스)과 반응시킨 뒤, 분해산물을 분석하였다.

[0043] 기질 분해산물은 TLC와 MS (mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다.

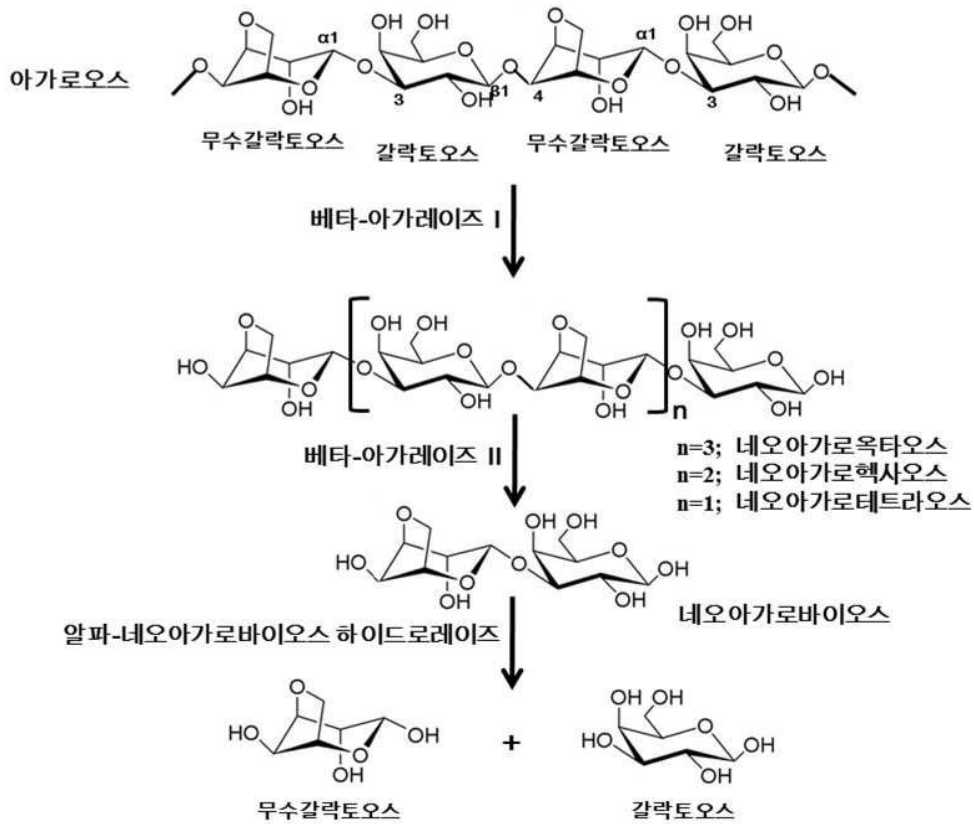
[0044] TLC를 이용한 기질 분해산물의 분석을 위하여 PBS 완충액(pH 7.4) 50µl에 각각의 네오아가로올리고당(네오아가로바이오스, 네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스) 0.2% 기질과 NABH-1(6µg)을 함유한 반응액을 준비하였다. 반응은 40℃에 12시간 동안 수행한 후 분해 산물을 TLC (thin-layer chromatography)를 이용하여 분석하였다. 반응액(10µl)을 Silica Gel 60 plate (EMD Merck AG, Darmstadt, Germany)에 로드하고 n-butanol, ethanol 및 물(2:1:1, v/v/v)의 용매시스템 상에서 이증으로 분리하였다. 30%(w/v) sulfuric acid가 함유된 에탄올 용액을 스프레이하여 분리된 산물을 가시화하고 플레이트를 120℃로 가열하였다.

[0045] 반응 후 TLC 분석에서 각각의 네오아가로올리고당(네오아가로바이오스, 네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스)를 함유한 반응액들은 두 종류의 분해산물을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

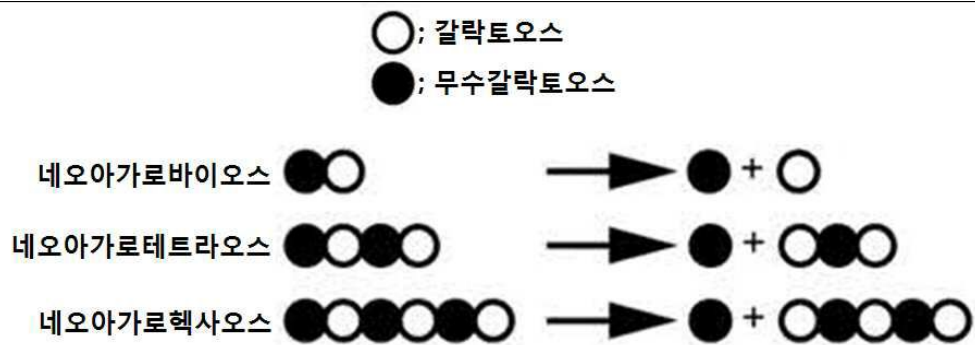
- [0046] MS(mass spectrometry)를 이용한 기질 분해산물의 분석을 위하여 PBS 완충액(pH 7.4) 300 $\mu$ l에 각각의 0.2% 네오아가로올리고당 기질(네오아가로바이오스, 네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스)과 NABH-1(36 $\mu$ g)를 함유한 반응액을 준비하였다. 40 $^{\circ}$ C에 12시간 동안 반응을 수행한 후, 분해된 네오아가로올리고당을 30배의 메탄올을 첨가하여 침전시키고 14,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액을 진공 건조하여 MS(mass spectrometry)로 분석하였다.
- [0047] 분석 결과, 기질로 네오아가로바이오스를 이용한 분해물로부터 무수갈락토오스[(M+Na)<sup>+</sup>=185m/z]와 갈락토오스[(M+Na)<sup>+</sup>=203m/z]의 분자량과 같은 위치에서 피크가 보였다(도 6 참조). 네오아가로테트라오스를 이용한 분해물로부터는 무수갈락토오스[(M+Na)<sup>+</sup>=185m/z]와 네오아가로트리오스[(M+Na)<sup>+</sup>=509m/z]의 분자량과 같은 위치에서 피크가 보였다(도 7 참조). 네오아가로헥사오스를 이용한 분해물로부터는 무수갈락토오스[(M+Na)<sup>+</sup>=185m/z]와 네오아가로펜타오스[(M+Na)<sup>+</sup>=815m/z]의 분자량과 같은 위치에서 피크가 보였다(도 8 참조).
- [0048] MS 분석 결과로부터, TLC 분석에서 확인된 각각의 네오아가로올리고당(네오아가로바이오스, 네오아가로테트라오스, 네오아가로헥사오스)으로부터의 두 종류의 분해산물은 기질의 비환원성 말단의 무수갈락토오스와 그 잔여물인 각각 갈락토오스, 네오아가로트리오스, 네오아가로펜타오스로 구성됨을 확인하였다.
- [0049] **실시예 4. NABH-1의 활성 분석**
- [0050] NABH-1의 효소반응 적정 pH와 효소반응 적정온도를 측정하여 효소의 생화학적 특성을 분석하였다.
- [0051] NABH-1의 효소반응 적정 pH 측정을 위해 각각의 pH에서 완충작용을 하는 완충액을 이용하였다. pH 4 ~ 6에서의 측정에는 50mM Sodium Citrate 완충액을 이용하였다. pH 7 ~ 8에서의 측정에는 50mM Sodium Phosphate 완충액을 이용하였다. pH 9 ~ 11에서의 측정에는 50mM Glycine-NaOH 완충액을 이용하였다. 각각의 pH에서의 반응액 500 $\mu$ l는 네오아가로바이오스 100 $\mu$ g과 NABH-1 14 $\mu$ g이 포함되도록 구성하였다. 반응은 40 $^{\circ}$ C에 10분 동안 수행한 후, 500 $\mu$ l DNS 용액과 혼합하고 10분간 수조에서 끓인 뒤, 얼음물에서 5분간 식혔다. 반응액의 흡광도를 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 O.D. 540nm에서 측정하여 효소활성을 측정하였다. 측정결과로부터 NABH-1의 효소반응 최적 pH가 pH 7임이 확인되었다(도 9 참조).
- [0052] NABH-1의 효소반응 적정온도 측정을 위해 50mM Sodium Phosphate 완충액(pH 7.0) 500 $\mu$ l에 네오아가로바이오스 100 $\mu$ g과 NABH-1 14 $\mu$ g이 함유된 반응액을 준비하였다. 반응은 20 ~ 80 $^{\circ}$ C의 10 $^{\circ}$ C 간격의 온도에서 10분 동안 수행한 후, 500 $\mu$ l DNS 용액과 혼합하고 10분간 수조에서 끓인 뒤, 얼음물에서 5분간 식혔다. 반응액의 흡광도를 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 O.D. 540nm에서 측정하여 효소활성을 측정하였다. 측정결과로부터 NABH-1의 효소반응 최적 온도가 40 $^{\circ}$ C임이 확인되었다(도 10 참조).

도면

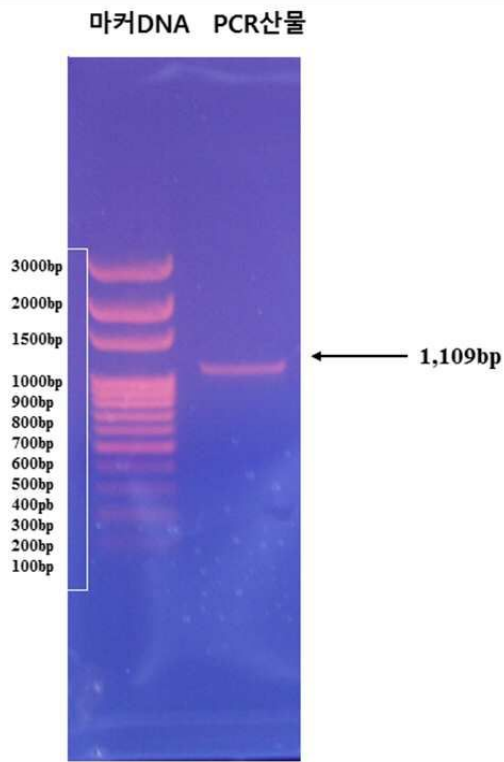
도면1



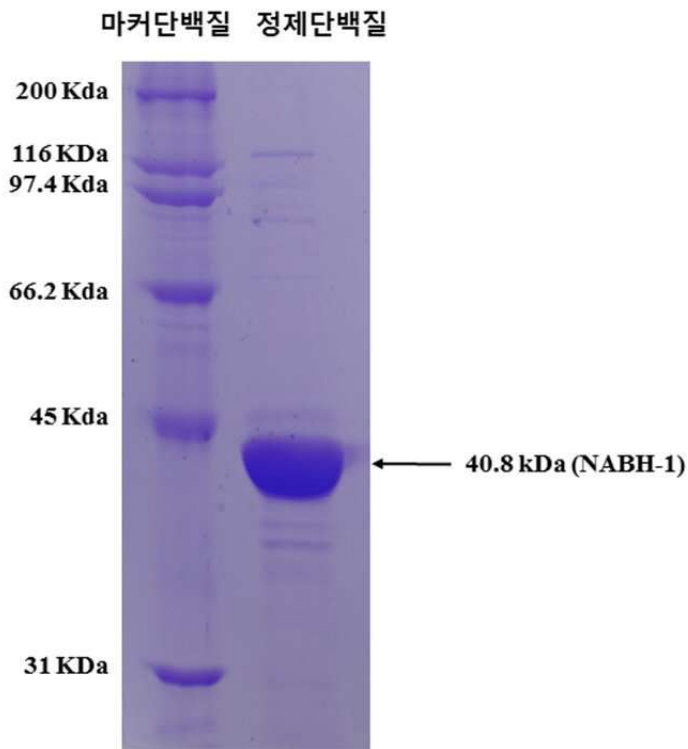
도면2



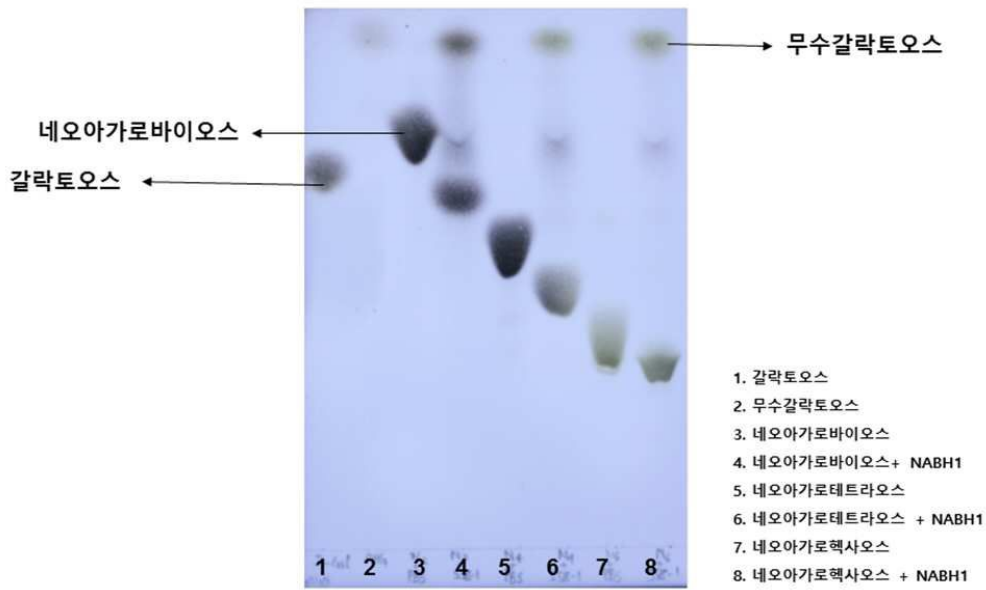
도면3



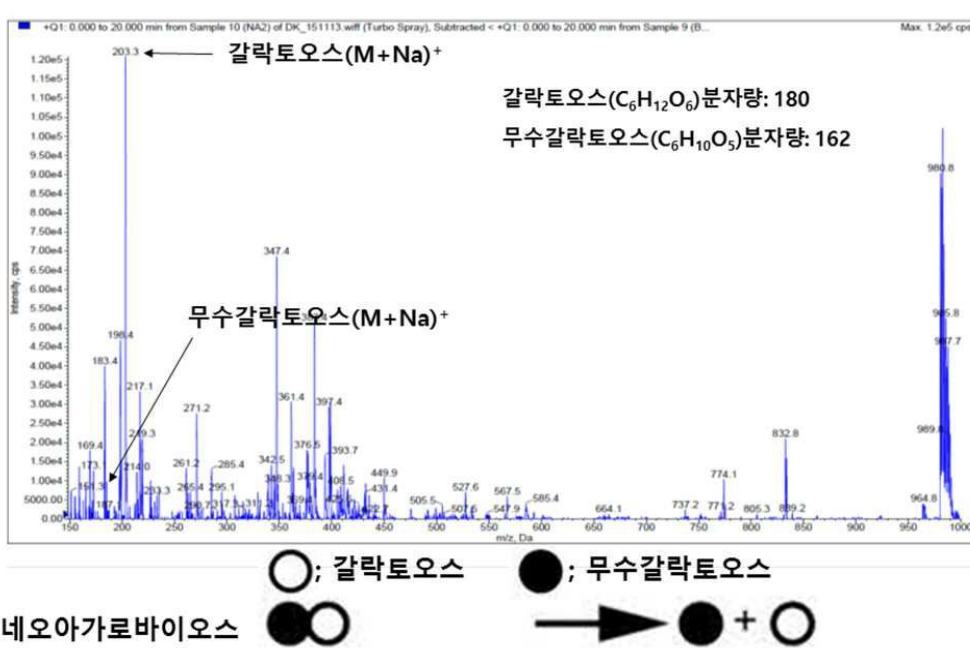
도면4



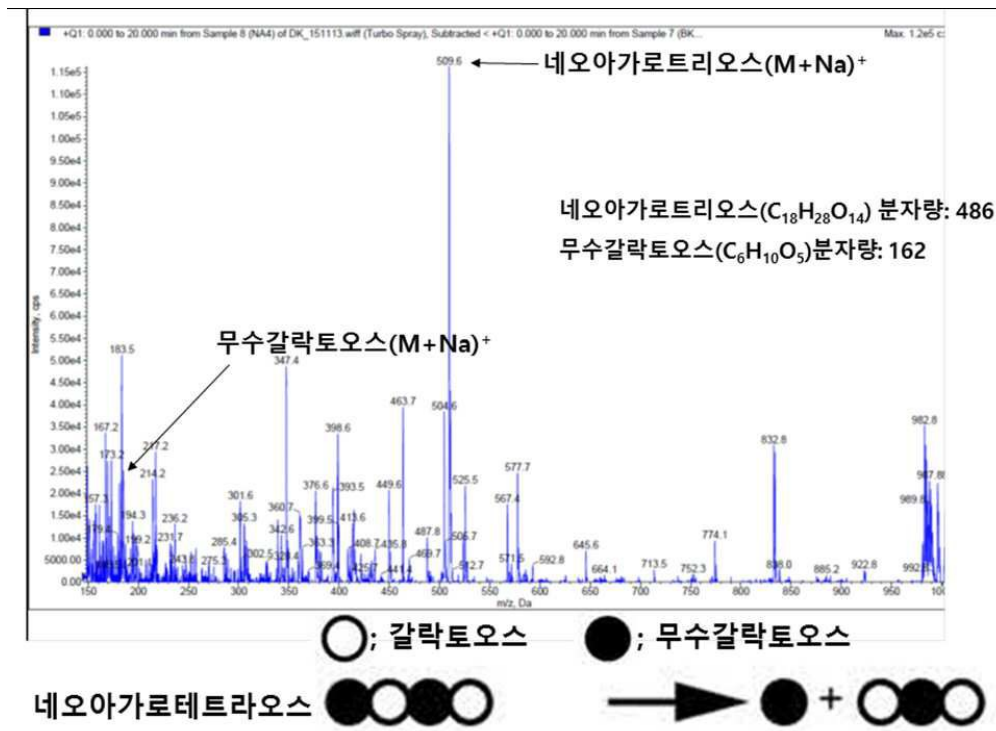
도면5



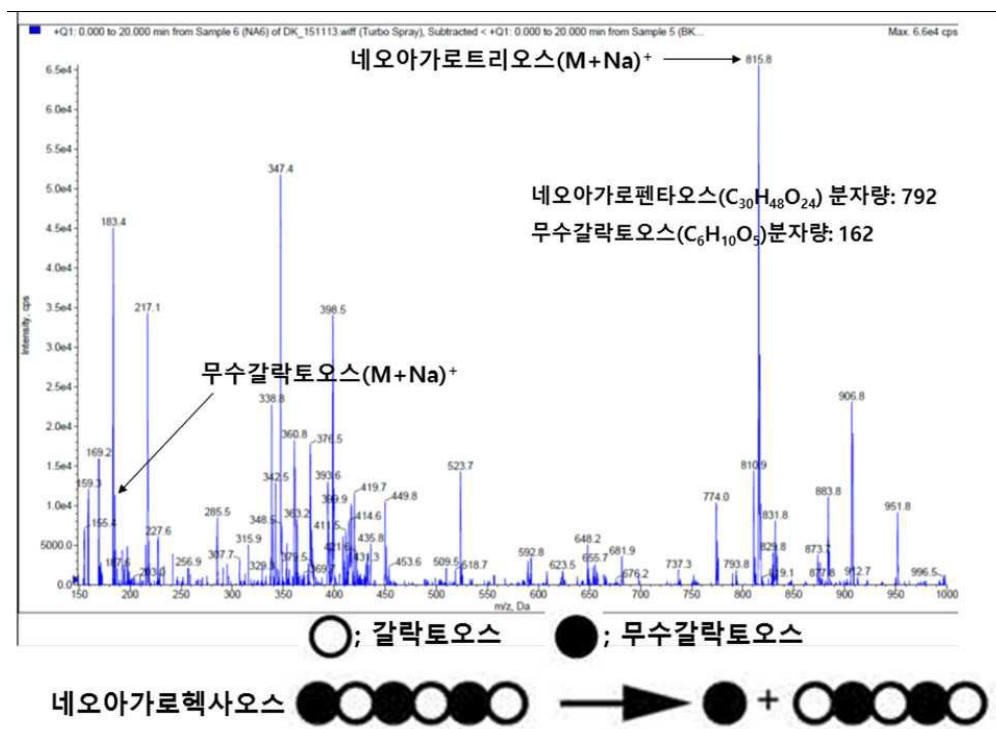
도면6



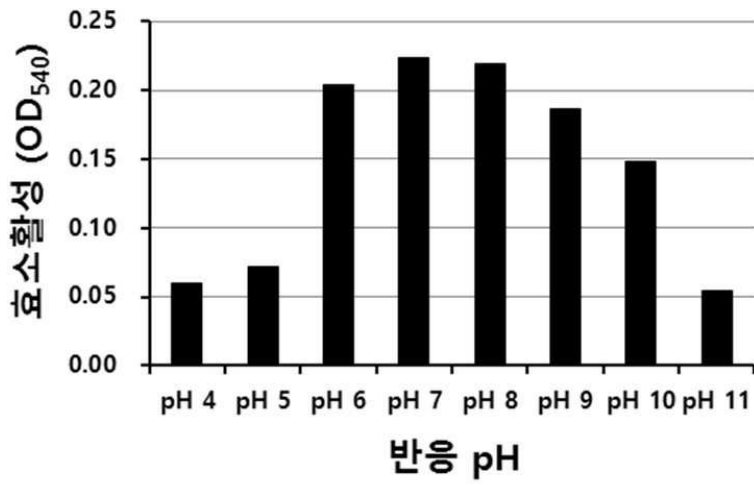
도면7



도면8

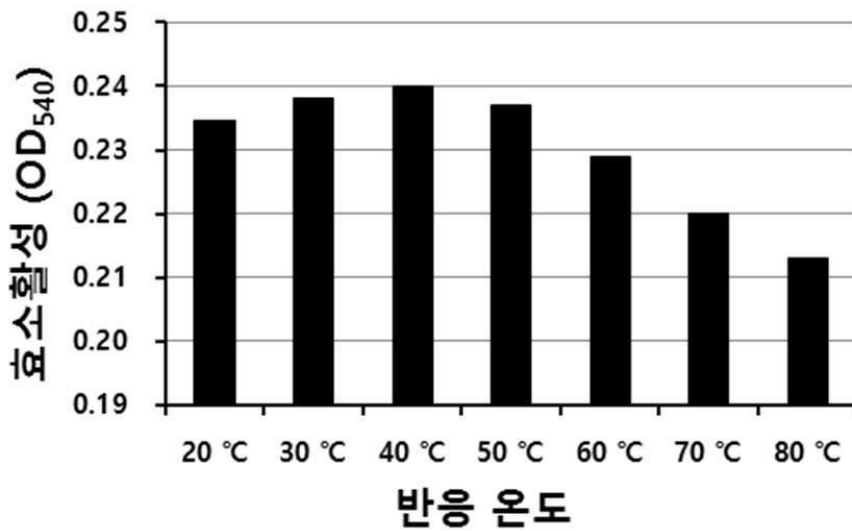


도면9



pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
0.06	0.0715	0.204	0.224	0.219	0.186	0.148	0.054

도면10



20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0.2345	0.238	0.24	0.237	0.229	0.22	0.213

서열목록

- <110> Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation
- <120> A Novel alpha-neoagarobiose hydrolase from Gayadomonas joobiniege G7 and use thereof
- <130> PA-D16462

<160> 5  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220><223> Gayadomonas jubiniege G7  
 <400> 1  
 Met Ser Glu Lys Lys Leu Ser Leu Ala Ser Lys Arg Ala Ile Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Tyr Asp Asn Lys Gly Pro Glu Trp Leu Ile Glu Phe Glu Glu Glu  
 20 25 30  
 Pro Leu Gln Gly Asp Phe Ala Tyr Glu Glu Gly Val Ile Arg Arg Asp  
 35 40 45  
 Pro Thr Ala Val Ile Gln Val Asp Gly Lys Tyr His Val Trp Tyr Thr  
 50 55 60  
 Lys Gly Thr Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Thr Asn Pro Cys Asp  
 65 70 75 80  
 Lys Val Phe Pro Trp Asp Leu Thr Glu Val Trp His Ala Thr Ser Asp  
 85 90 95  
 Asp Gly Leu Val Trp His Glu Glu Gly Cys Ala Ile Ala Arg Gly Glu  
 100 105 110  
 Ser Gly Arg Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala  
 115 120 125  
 His Asp Gly Arg Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val Gln Tyr Pro Tyr  
 130 135 140  
 Thr Asn Arg Gln Tyr Glu Glu Ile Ala Ile Ala His Ala Asp Ser Pro  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Pro Trp Leu Lys Ser Glu Gln Pro Ile Leu Ser Pro Ser Lys  
 165 170 175  
 Asp Gly Glu Trp Asp Gly Asp Glu Asp Asn Arg Phe Lys Val Lys Ser  
 180 185 190

Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Cys Leu Met Phe  
 195 200 205  
 Phe Asn Gly Gln Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Thr Met Gly Glu  
 210 215 220  
 Gly Met Asn Phe Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly Val Ala Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Asp Ile Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr Asn Pro Ile Ser  
 245 250 255  
 Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp His Tyr Asn Gly Gly Ile Ala  
 260 265 270  
 Ser Leu Ile Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr Ile Gln Trp Ala  
 275 280 285  
 Lys Asp Gly Ile Asn Phe Glu Ile Met Ser His Ile Lys Gly Ala Pro  
 290 295 300  
 Glu Ala Leu Gly Ile Phe Arg Asp Pro Gln Asp Arg Glu Ile Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Pro Gly Leu Tyr Trp Gly Leu Cys His Lys Tyr Asp Asp Ser Trp Asn  
 325 330 335  
 Trp Asn Tyr Ile Cys Arg Tyr Arg Val Lys Arg Gln Ile Leu Asp Ala  
 340 345 350  
 Gly Thr Phe Gln Asn Ser Asn  
 355

<210> 2

<211> 1080

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Gayadomonas jubiniege G7

<400> 2

atgtctgaaa aaaaattaag tcttgcaagt aaacgcgcca tcgaacgtgg ttatgataac 60

aaaggtcccg aatggttgat cgaatttgaa gaagaaccgt tacaaggtga ttttgcttac 120

gaagaagggtg ttatcagacg agatccgact gctgtcatac aggttgatgg aaaatatcat 180

gtttgtgata caaaggggac aggcgaaact gttggttttg gttctaccaa tccttgatgat 240

aaagtattcc cgtgggattt gactgaagtt tggcatgcga cctcagatga tggtttagta 300  
 tggcatgaag aaggttgtgc aattgcccggt ggtgaaagtg gtcgttacga tgatagggct 360  
 gtttttacgc cagaggttct agctcacgat gggcgatatt atctggtcta tcagacagtt 420  
 cagtatccgt atactaaccg ccaatatgaa gaaatagcga tagcacatgc ggatagccct 480

tatggtccat ggttaaaatc tgaacagcct attttgagcc catcaaaaga tggatgaatg 540  
 gacggtgatg aagataatcg ttttaagtt aaatcaaaag gtagctttga tagtcacaaa 600  
 gttcacgacc ctigttaaata gtttttaac ggccagtttt atttatatta taaaggcgaa 660  
 actatgggcg aggttatgaa ttttggtggt cgagaaatta aacatggtgt tgccatcgca 720  
 gacgatattt taggtccgta tactaagtct gaatacaacc caattagtaa ttcgggccat 780  
 gaagttgcag ttggcacta taatggtggt atagcgtcat tgattacgac ggatgggcca 840  
 gaaaaaata ccattcaatg ggcaaaagac ggtattaact ttgaataat gtcgcatatt 900

aaaggtgcac cagaagcttt aggtatattc agagaccac aagatcgca gatagaggca 960  
 cctggtttat actggggctt atgtcacaaa tatgatgatt cttggaactg gaattatatt 1020  
 tgccgatate gggtaaagcg tcagatatta gatgcagga catttcagaa ctccaactaa 1080  
 1080

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for NABH

<400> 3  
 atcactcata tgtctgaaaa aaaattaagt 30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for NABH

<400> 4  
 ctccacagga tcctttattt ttagttggag 30

<210> 5  
 <211> 1109  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR product for cloning of NABH gene

<400> 5

atcactcata tgictgaaaa aaaattaagt cttgcaagta aacgcgcat cgaacgtggt	60
tatgataaca aaggtcccga atggttgatc gaatttgaag aagaaccgtt acaaggtgat	120
tttgcttacg aagaaggtgt tatcagacga gatccgactg ctgtcataca ggttgatgga	180
aaatatcatg ttigtatatac aaaggggaca ggcgaaactg ttggttttgg ttctaccaat	240
ccttgtgata aagtattccc gtgggatttg actgaagttt ggcatgcgac ctcatgatgat	300
ggttttagtat ggcatgaaga aggtttgtgca attgccctg gtgaaagtgg tcgttacgat	360
gatagggctg tttttaccc agaggttcta gctcacgatg ggcgatatta tctggctcat	420
cagacagttc agtatccgta tactaacgc caatatgaag aatagcgat agcacatgcg	480
gatagccctt atggtccatg gttaaaatct gaacagccta tttgagccc atcaaaagat	540
ggtgaatggg acggtgatga agataatcgt tttaaagtta aatcaaaagg tagctttgat	600
agtcacaaag ttcagacacc ttgtttaatg ttttttaacg gccagtttta tttatattat	660
aaaggcgaac ctatgggcga gggatgaat ttgggtggc gagaaattaa acatggtggt	720
gccatcgag acgatatattt aggtccgtat actaagtctg aatacaacc aattagtaat	780
tcgggccatg aagtgcagt ttggcactat aatgggtgta tagcgtcatt gattacgacg	840
gatgggccag aaaaaatac cattcaatgg gcaaaagacg gtattaactt tgaataatg	900
tcgcatatta aaggtgcacc agaagcttta ggtatattca gagaccaca agatcgcgag	960
atagaggcac ctggtttata ctggggctta tgcacaaat atgatgattc ttggaactgg	1020
aattatattt gccgatatcg ggtaaagcgt cagatattag atgcaggac atttcagaac	1080
tccaactaaa aataaaggat cctgtggag	1109