



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월05일
(11) 등록번호 10-1996863
(24) 등록일자 2019년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 9/24 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0176729
(22) 출원일자 2017년12월21일
심사청구일자 2017년12월21일
(65) 공개번호 10-2019-0075269
(43) 공개일자 2019년07월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150006581 A
International Union of Biochemistry and
Molecular Biology, Inc. Vol.63, No. 2, p.
230-237, 2016
Bioprocess Biosyst Eng (2014) Vol.37, p.
383-391
GenBank: CUV01046.1

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

(72) 발명자
정육진
경기도 성남시 분당구 내정로 186 파크타운대입아
파트 102동 1306호
크리스틴 라모스
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김정아

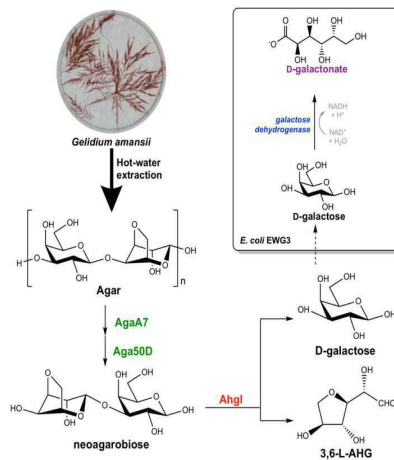
(54) 발명의 명칭 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소 및 이의 응용

(57) 요약

본 발명은 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소 및 이의 응용에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아가로바이오스를 가수분해하여 식품, 약품 및 화장품 원료로 이용 가능한 가수분해 산물을 생산할 수 있는 신규의 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소와 이의 응용 기술에 관한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



것이다.

본 발명에 따르면 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래하는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 제공할 수 있다. 또한 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소 유전자를 분리하여 재조합 대장균을 제조함으로써 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 대량 생산할 수 있다. 생산된 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소는 식품, 약학 및 화장품 산업에 유용하게 활용할 수 있는 D-갈락토네이트의 기질인 D-갈락토오스를 생산할 수 있다.

(52) CPC특허분류

- C12N 9/0006 (2013.01)
- C12N 9/1205 (2013.01)
- C12P 19/02 (2013.01)
- C12P 7/42 (2013.01)
- C12Y 101/01048 (2013.01)
- C12Y 207/01006 (2013.01)
- C12Y 207/01058 (2013.01)

루디스 카부롱

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
이원근
 경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

(72) 발명자

크리스 발테후에사

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

그레이스 니솔라

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 제2
 공학관8807호

페리 마자

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 용인
 캠퍼스 명현관 108호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093816

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 에너지환경융합기술연구소(3단계)-바이오매스기반 바이오화학제품 생산공정 요소기술 개발

기여율 1/3

주관기관 명지대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015H1D3A1062172

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수신진연구자유치사업

연구과제명 페바이오매스 유래 탄수화물의 효율적 활용 기술을 이용한 바이오에너지/화학제품 생산용
 생합성 공정기술 개발

기여율 1/3

주관기관 명지대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1C1B1013252

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업

연구과제명 제조합 미생물 균주를 이용한 C5 xylose 기반 C2 및 C4 플랫폼 케미컬 생산 기술 개발

기여율 1/3

주관기관 명지대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C(*Cellulophaga omnivescoria* W5C) 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주의 수탁번호는 KCTC 13157BP인 것을 특징으로 하는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자로 코딩되는 것을 특징으로 하는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소.

청구항 4

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

청구항 6

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 도입한 발현벡터를 제조하는 단계(단계 a); 및

상기 발현벡터를 대장균에 도입하여 형질전환시키는 단계(단계 b)를 포함하는 재조합 대장균의 제조방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균의 제조방법.

청구항 8

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균을 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소의 생산방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 재조합 대장균은 20℃ 내지 40℃에서 배양되는 것을 특징으로 하는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소의 생산방법.

청구항 10

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 그 용해물을, 네오아가로바이오스에 처리하여 D-갈락토오스를 생산하는 방법.

청구항 11

셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 그 용해물을, 아가로바이오스에 처리하여 D-갈락토오스를 수득한 후, 갈락토오스 탈수소효소를 코딩하는 유전자(*gld*)를 포함하는 재조합 대장균을 이용하여 D-갈락토오스로부터 D-갈락토네이트를 생산하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 용해물은 상기 재조합 대장균을 배양한 후, 원심분리 및 초음파 처리한 다음 상청액에서 용해물을 수득하는 단계를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 D-갈락토네이트를 생산하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

재조합 대장균은 갈락토키나아제(*galK*) 및 2-옥소-3-디옥시갈락토네이트키나아제(*dgoK*)를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 D-갈락토네이트를 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소 및 이의 응용에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아가로바이오스를 가수분해하여 식품, 약품 및 화장품 원료로 이용 가능한 가수분해 산물을 생산할 수 있는 신규의 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소와 이의 응용 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사탕수수, 보리, 감자 및 옥수수과 같은 농작물은 발효성 당이 풍부한 자원이므로 바이오연료와 플랫폼 케미컬

(platform chemicals)을 생산하는데 사용되어 왔다. 작물을 식용으로 사용함에 따라, 바이오연료 생산을 위한 작물 이용은 식량 공급과 경쟁하게 되었다. 따라서, 리그노셀룰로오스 바이오매스와 같은 비식용자원이 대체 공급원으로 사용되어 왔다. 비록 리그노셀룰로오스는 식량 공급과 경쟁하지 않지만, 리그닌이 존재하면 가수분해가 어렵기 때문에 전체 에너지 수요량과 생산 비용이 증가하게 된다. 최근, 재생 가능한 바이오매스 자원에 대한 관심이 해양 대형조류 또는 해조류로 옮겨졌다. 육상의 바이오매스 및 리그노셀룰로오스 바이오매스에 비해, 해조류는 경작을 위한 경지 및 담수가 필요하지 않고, 단위면적당 생산량이 상당히 높으며, 리그닌 함유량이 작거나 없다.

[0003] 아가(agar) 및 카라기난(carrageenan)은 대형 홍조류에 존재하는 주요 다당류이다. 특히, 아가는 아가로오스(agarose)와 아가로펙틴(agarpectin)으로 구성되어 있다. 아가로오스는 α -1,3 및 β -1,4-글리코시드 결합이 교대로 있는 D-갈락토오스(D-galactose, D-gal)와 3,6-무수-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose, L-AHG)가 선형의 폴리머로 구성되어 있는 반면, 아가로펙틴은 부분적으로 황산인 β -1,3-결합의 D-gal 잔기로 구성되어 있다. 반면에, 카라기난은 아가의 D-gal과 L-AHG 단위에 대한 황산 구조와 유사한 구조를 갖는다. 이러한 복합 다당류를 사용하기 위해서는, 선형 중합체가 적절한 미생물에 의해 용이하게 이화될 수 있는 단량체성 당을 방출(생산)하도록 우선 아가레이드로 가수분해되어야 한다.

[0004] 아가레이즈는 아가의 해중합에서 중요한 역할을 하고 절단 형식에 따라 분류된다. 베타 아가레이즈(β -agarase)는 β -1,4-글리코시드 결합을 절단하여 환원 말단에서 네오아가로-올리고당(NAOSs)과 D-gal을 생산(release)한다. 한편, 알파 아가레이즈(α -agarase)는 α -1,3-결합을 절단하여 환원 말단에 L-AHG를 갖는 아가로-올리고당을 생산한다. 아가-분해 유기체(agar-degrading organisms)에서는, 아가로오스의 완전한 가수분해를 위해 아가분해 효소(agarolytic enzymes)의 조합이 필요하다.

[0005] 아가로오스 분해효소의 조합은 아가로오스의 가수분해를 완성하기 위해 필요하다. 한편 네오아가로바이오스(neoagarobiose, NA2)로부터 발효성 당인 D-갈락토오스의 생산(방출)을 촉진하는 효소로는 (α -아가레이즈로 유명한) 네오아가로바이오스 가수분해효소(neoagarobiose hydrolase)가 주요 효소인 것으로 보여진다(도 1 참조).

[0006] 본 발명자는, 최근 신규 해양 세균(*Cellulophaga* sp. W5C)을 분리하였고, 상기 균주는 유전체 서열 분석을 통해 해양 조류에서 유래한 중합체를 분해하는 유전자 클러스터를 포함하는 것으로 확인되었다. 본 발명에서는, 셀룰로파가 sp. W5C의 유전체로부터 신규의 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(α -neoagarobiose hydrolase, α -NABH) 효소를 동정하였다. 셀룰로파가 속(genus)의 멤버들은 카라기난 분해효소와 다른 가수분해효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 상기 속(genus)에서 유래된 α -NABH는 지금까지 보고된 바가 없다. 상기 α -NABH는 대장균에서 과발현시켰다. 정제된 효소는 *G. amansii* 바이오매스를 식품, 약학 및 화장품 산업에 적용되는 고가의 화합물인 D-갈락토네이트로 전환하는 프로토타입 프로세스(prototype process)에 적용하였다. 셀룰로파가로부터 획득한 α -NABH는 본 발명자가 최초로 발견한 것으로 대형 홍조류로부터 D-갈락토네이트를 생합성하는 데 적용될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) S. Ma, G. Duan, W. Chai, C. Geng, Y. Tan, L. Wang, et al., Purification, cloning, characterization and essential amino acid residues analysis of a new α -carrageenase from *Cellulophaga* sp. QY3, PLoS ONE. 8 (2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 제공한다.

[0009] 또한 상기 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균 및 그 제조방법을 제공한다.

[0010] 아울러 상기 재조합 대장균으로 생산한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 D-갈락토네이트를 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C(*Cellulophaga omnivescoria* W5C) 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 제공한다.
- [0012] 상기 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주의 수탁번호는 KCTC 13157BP이다.
- [0013] 상기 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자로 코딩될 수 있다.
- [0014] 또한 상기 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0016] 또한 본 발명은, 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균을 제공한다.
- [0017] 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성될 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은, 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 도입한 발현벡터를 제작하는 단계(단계 a); 및 상기 발현벡터를 대장균에 도입하여 형질전환시키는 단계(단계 b)를 포함하는 재조합 대장균의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서, “벡터(vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물로, “플라스미드(plasmid)”와 상호 교환적으로 사용된다. 상기 재조합 대장균의 제조는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 통해 벡터에 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 삽입한 후 대장균에 도입하는 방법 등으로 수행될 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있으며, pET 계열 벡터(Invitrogen)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0024] 또한 본 발명은, 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균을 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소의 생산방법을 제공한다.
- [0025] 상기 재조합 대장균은 20℃ 내지 40℃에서 배양될 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은, 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 그 용해물을, 네오아가로바이오스에 처리하여 D-갈락토오스를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0029] 또한 본 발명은, 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래한 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 그 용해물을, 아가로바이오스에 처리하여 D-갈락토오스를 수득한 후, 갈락토오스 탈수소효소(*gld*)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 대장균을 이용하여 상기 D-갈락토오스로부터 D-갈락토네이트를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 용해물은 상기 재조합 대장균을 배양한 후, 원심분리 및 초음파 처리한 다음 상청액에서 용해물을 수득하는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.
- [0031] 상기 재조합 대장균은 갈락토키나아제(*galK*) 및 2-옥소-3-디옥시갈락토네이트키나아제(*dgoK*)를 코딩하는 유전자가 결실될 수 있다.
- [0032] 상기 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주의 수탁번호는 KCTC 13157BP이다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따르면 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 유래하는 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 제공할 수 있다. 또한 셀룰로파가 옴니베스코리아 W5C 균주로부터 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소 유전자를 분리하여 재조합 대장균을 제조함으로써 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소를 대량 생산할 수 있다. 생산된 알파 네오아가로바이오스 가수분해효소는 식품, 약학 및 화장품 산업에 유용하게 활용할 수 있는 D-갈락토네이트의 기질인 D-갈락토오스를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 해양 바이오플라스미드인 *G. amansii*에서 D-갈락토네이트로 전환하는 프로토타입 프로세스(prototype process)에 관한 모식도이다.
- 도 2는 (a) 셀룰로파가 sp. W5C에서 L-AHG 대사에 대한 유전자 클러스터; (b) GH96 및 GH117 패밀리의 아가레이즈에 대한 계통수이다.
- 도 3은 AhgI과 α -NABH/NAOS 가수분해효소의 아미노산 정렬에 관한 것으로, 역삼각형은 신호 펩티드 서열 절단 자리를 의미하고, 사각형은 기질 결합에 관여하는 잔기를 의미하며, 별은 촉매 잔기를 의미한다.
- 도 4는 (a) 온전한 AhgI과 절단된 AhgI의 SDS-PAGE 분석 결과; (b) AhgI으로 가수분해된 NA2의 TLC 분석 결과이다.
- 도 5는 AhgI의 생화학적 특성에 관한 것으로, 효소 활성에 대한 (a) pH 효과, (b) 온도 효과 및 (c) 금속 이온 효과에 관한 것이다. AhgI 활성에 대한 pH 효과는 30°C에서 15분 동안 반응을 수행하여 측정하였고, 온도 분석은 pH 7.0에서 수행하였다. 금속 이온 효과는 효소 활성에 대해 최적 조건에서 측정하였다. (a)와 (b)에서 색칠된 마커와 빈 마커는 각각 사전 배양을 하지 않은 상태에서 측정된 상대적인 효소 활성과 사전 배양을 한 상태에서 측정된 상대적인 효소 활성을 의미한다.
- 도 6의 (a)는 β -아가레이즈와 AhgI로 *G. amansii*에서 추출된 아가의 가수분해 산물을 나타내는 것이다. (b)는 가수분해된 아가에서 생산되는 D-갈락토네이트 양과 시간과의 관계를 나타내는 그래프이다. (a)의 TLC 플레이트에서; 2번째 레인은 아가가 AgaA7으로 가수분해될 때 생성되는 반응 산물인 NA4와 NA6를 나타내고, 3번째 레인은 2번째 레인의 반응 산물이 Aga50D로 가수분해될 때 생성되는 반응 산물인 NA2와 미량의 NA4 및 NA6를 나타내며, 4번째 레인은 3번째 레인의 반응 산물이 AhgI으로 가수분해될 때 생성되는 반응 산물인 L-AHG, D-gal와 미량의 NA2 및 NA3를 나타낸다.
- 도 7은 (a) *B. subtilis*의 Aga50D 발현 및 분비; (b) *B. subtilis* pBE-Aga50D의 성장 및 올리고당 농도로 표시되는 분비된 Aga50D의 활성; 및 (c) Aga50D 가수분해 산물(NA2)에 대한 TLC 분석결과이다.
- 도 8은 AgaA7 및 Aga50D의 아가 가수분해에 대한 (A) TLC 분석 및 (B) DNS 분석결과이다.
- 도 9는 AhgI에 의한 NAOS(AgaA7로 아가로오스를 가수분해하여 수득)가수분해에 대한 TLC 분석 결과에 관한 것이다. 레인 1: D-갈락토오스; 레인 2: D-AHG; 레인 3: NA2; 레인 4: NA2가 AhgI으로 가수분해되었을 때 생성되는 산물인 L-AHG 및 D-gal; 레인 5: 아가가 AgaA7으로 가수분해되었을 때 생성되는 산물인 NA4 및 NA6; 레인 6: NA4/NA6 기질이 AhgI으로 가수분해되었을 때 생성되는 산물인 L-AHG, NA3 및 미량의 NA5.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.
- [0037] 도 1은 해양 바이오플라스미드인 *G. amansii*에서 D-갈락토네이트로 전환하는 프로토타입 프로세스(prototype process)에 관한 모식도이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 셀룰로파가 sp. W5C로부터 동정한 신규의 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(α -neogarobiose hydrolase, α -NABH)를 이용하여 네오아가로바이오스로부터 D-갈락토오스를 수득할 수 있다.
- [0039] <재료 및 방법>
- [0040] 1. AhgI의 클로닝, 발현 및 정제
- [0041] 모든 DNA 조작은 표준 프로토콜을 이용하여 수행하였다. *ahgI* 유전자는 셀룰로파가 sp. W5C(KCTC 13157BP; GenBank Acc. No. MDDP0000000.1)의 유전체 서열에서 동정하였다. *ahgI*용 타겟 개방형 해독틀(open reading frame)은 표 1의 적절한 프라이머를 사용하여 셀룰로파가 sp. W5C의 DNA를 PCR로 증폭하였다.

표 1

[0042]

프라이머	서열(5' →3') ^a	기능
W5CNABH-F	CTCGGATCCATTAATAAAAAAGCATAGCATT(서열번호 3)	온전한(intact) <i>ahgI</i> 증폭용 정방향 프라이머
W5CNABH' -F	CTCGGATCCGCCTGTAAAAATAATACCAA(서열번호 4)	절단된(truncated) <i>ahgI</i> 증폭용 정방향 프라이머
W5CNABH-R	GTAGAATTCTTTAGATTTTACACCTTTAG(서열번호 5)	<i>ahgI</i> 증폭용 역방향 프라이머

[0043]

^a 밑줄은 제한효소 자리임

[0045]

PCR 산물은 BamHI-EcoRI 자리에서 pET28a 벡터(Invitrogen, South Korea)로 삽입되었다. *E.coli* DH5 α는 플라스미드 유지를 위해 사용하였고 *E.coli* BW25113(DE3)는 발현숙주로 사용하였다. 아울러, EWG3 균주(*E. coli* Δ*galK* Δ*dgoK* pET28a-*gld*)는 D-갈락토네이트 생산용으로 사용하였다(H. Liu, K.R.M. Ramos, K.N.G. Valdehuesa, G.M. Nisola, L.B. Malihan, W.-K. Lee, et al., Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of D-galactonate, Bioproc Biosyst Eng. 37 (2014) 383391. doi:10.1007/s00449-013-1003-6.)

[0046]

SDS-PAGE 분석은 *E.coli* BW25113(DE3) pET28a-*ahgI* 균주에 클로닝된 AhgI의 발현을 확인하기 위해 수행하였다. AhgI의 발현은 0.5 mM 이소프로필 β-D-1-티오갈락토포라노사이드(IPTG)를 첨가하여 유도하였다. 6×히스티딘-태그된 단백질은 Protino® Ni-TED pre-packed column(Macherey-Nagel, BMS, Korea)을 사용하여 정제하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법으로 측정하였고 시료 순도는 SDS-PAGE로 확인하였다.

[0048]

2. AhgI 서열 분석

[0049]

AhgI의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 Uniprot(<http://www.uniprot.org/blast/>)의 BLAST 프로그램과 National Center for Biotechnology Information(NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)으로 분석하였다. SignalP 4.1은 효소가 아미노-말단 신호 펩티드 서열을 가지는지 확인하기 위해 사용하였다. 다중 서열 정렬(Multiple sequence alignment)은 Clustal Omega program(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)으로 수행하였다.

[0051]

3. 효소 특성(characterization) 분석

[0052]

효소는 AgaA7 및 Aga50D로 아가로오스를 연속 가수분해하여 생성되는 NA2 3 mM과 단백질 100 μg을 혼합하여 분석하였다(하기 보충 실험 방법 참고). 시료는 30℃에서 2시간동안 배양하였고 반응 진행은 박막 크로마토그래피(TLC)로 관찰하였다. 시료는 Silica Gel 60 plate(Merck, USA)상에 점 찍어두고 *n*-부탄올-에탄올-물(3:2:2 부피비) 용액으로 크로마토그래피를 진행하였다. 반응 산물은 0.2% 레조르시놀(resorcinol) 용액과 에탄올 내 10% H₂SO₄ 용액으로 플레이트를 스프레이하여 시각화한 후 열에 노출시켰다. 상업적으로 사용가능한 L-AHG가 부족하기 때문에, D-AHG(Dextra Laboratories, UK)를 대신 표준물질로 사용하였다. AhgI 활성에 대한 최적 pH는 우선 다음의 완충액을 사용하여 서로 다른 pH값에서 30℃에서 15분간 반응시켜 확인하였다: 50 mM 시트르산(pH 5.0-6.0), 50 mM Tris-Cl(pH 7.0-8.0) 및 50 mM 글리신-NaOH(pH 9.0-10.0). 효소 활성에 대한 온도 효과는 pH 7.0에서 20℃에서 60℃ 온도 범위에서 확인하였다. 유사하게, 반응 혼합물은 15분간 배양하였다. AhgI의 안정성은 1시간동안 다른 pH와 온도에서 효소를 사전 배양하여 측정하였다. 추가로, 효소 활성에 대해 10 및 100 mM 농도의 Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ 및 Na⁺ 효과를 실험하였다. 반응은 최적 pH 및 온도에서 수행하였다. 역학 계수 K_m 및 V_{max}는 1-30 mM 범위의 NA2 농도에 AhgI(8.5 μg)을 배양하고 라인위버-버크 식으로부터 도출하였다. 반응은 pH 7.0에서 10분간 30℃에서 수행하였다.

[0054]

4. 대형 홍조류로부터 D-갈락토네이트 생산

[0055]

1) 아가 추출

[0056]

건조 젤리듐 아만시(*Gelidium amansii*)는 대한민국 목포 산정동의 Natural Food(<http://0808.or.kr>)에서 구입하였다. 해조류 원재료는 잔여 염분을 제거하기 위해 탈이온수로 세척하고 건조한 후 분쇄하였다. 아가는 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0) 500 mL에 10 g *G. amansii*를 현탁하고 4시간동안 끓는물 수조에 두어 건조 해조류에서 추출하였다. 고체는 여과하여 제거하였다.

- [0058] 2) 아가 가수분해
- [0059] 추출된 아가의 초기 당화를 수행하였다. 아가 일부 10 mL를 25 μ g의 AgaA7으로 3시간동안 40°C에서 가수분해하였다(추가 실험 방법 단락 참고). 짧아진 올리고당은 25 μ g의 Aga50D를 첨가하고 30°C에서 배양하여 NA2로 변환하였다(추가 실험 방법 단락 참고). 아가에서 단당류로의 해중합을 완성하기 위해, 15 μ g의 AhgI을 가수분해산물에 첨가하였고 상온에서 12시간동안 배양하였다. 최종 가수분해산물은 D-갈락토네이트 생산에 사용하였다.
- [0061] 3) D-갈락토오스의 미생물 전환
- [0062] EWG3은 LB 배지에서 하룻밤동안 배양하였고 M9 미니멀 솔트(M9 minimal salts)와 적절한 항생제를 보충한 최종 가수분해산물로 옮겼다. 배양은 30°C에서 교반하면서 배양하였다. 3시간동안 배양 후, 0.5 mM IPTG는 갈락토오스 탈수소효소의 발현을 유도하기 위해 첨가하였다. 시료는 세포 성장과 대사산물 농도를 관찰하기 위해 시간간격을 설정하고 확인하였다.
- [0064] 5. 분석 방법
- [0065] 가수분해동안 방출된 D-gal 및 L-AHG의 양은 공지된 방법을 약간 변형하여 GC-MSD(HP 6890 GC/ HP5973 Mass selective detector)로 측정하였다. 시료 일부 500 μ L는 40°C와 133 mbar에서 Labconco Freeze dryer로 탈수시켰다. 당의 카보닐기는 시료를 피리딘 내 2% 메톡시아민 하이드로클로라이드(methoxyamine hydrochloride) 500 μ L에 용해시키고 10 mM 도데칸(dodecane)을 내부 표준으로 하여 메톡시메이션(methoxymation)을 통해 보호하였다. 혼합물은 75°C에서 30분동안 배양하고 45°C에서 30분동안 80 μ L N-메틸-N-트리메틸실릴트리플루오로아세트아마이드(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide)로 유도체화하였다(MSTFA; Fluka, St Louis, MO, USA). D-갈락토네이트는 Lien(O.G. Lien, Determination of gluconolactone, galactonolactone, and their free acids by hydroxamate method, Anal Chem. 31 (1959) 13631366. doi:10.1021/ac60152a035)에 공지된 하이드록사메이트 방법(hydroxamate method)으로 측정하였다. 다른 대사산물들은 Liu et al(H. Liu, K.R.M. Ramos, K.N.G. Valdehuesa, G.M. Nisola, L.B. Malihan, W.-K. Lee, et al., Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of D-galactonate, Bioproc Biosyst Eng. 37 (2014) 383391. doi:10.1007/s00449-013-1003-6)에 공지된 방법인 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 측정하였다.
- [0067] 6. 보충(supplementary) 실험 내용
- [0068] 1) β -아가레이즈를 과발현 및 분비하는 *Bacillus subtilis* 균주의 컨스트럭션(construction)
- [0069] *B. subtilis* pBE-AgaA7은 AgaA7(K.R.M. Ramos, K.N.G. Valdehuesa, R.B. Cabulong, L.S. Moron, G.M. Nisola, S.-K. Hong, et al., Overexpression and secretion of AgaA7 from *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. nov in *Bacillus subtilis* for the depolymerization of agarose, Enzyme Microbial Technol. 90 (2016) 1925. doi:10.1016/j.enzymictec.2016.04.009.)을 발현하기 위해 사용하였다. 한편, Aga50D 발현 숙주는 공지된 방법으로 구성(constructed)하였다. 우선 *aga50D* 유전자는 다음의 프라이머를 사용하여 증폭하였다:Aga50DF(5' \rightarrow 3') CGTGAGCTCTTATTCGATTTGAAAACGA(서열번호 6) 및 Aga50DR(5' \rightarrow 3') CTTTCTAGATTGCTGCCTAGCCTTTCGG(서열번호 7). 증폭된 절편은 pBE-S 벡터의 SacI-XbaI 자리로 삽입하였고 *B. subtilis*를 형질전환하였다. 효소 활성은 Ramos et al에 개시된 프로토콜에 따라 액체 배양하여 측정하였다.
- [0071] 2) 세포의 Aga50D 분석
- [0072] *B. subtilis*를 통한 Aga50D의 발현 및 분비는 LB 아가와 카나마이신(kanamycin)을 함유하는 배지에서 재조합 균주를 배양하여 입증하였다. 가수분해 구역은 Lugol's 아이오딘 용액으로 염색하여 시각화하였다. pBE를 담지하는 *B. subtilis* 세포와 pBE-*agaA7*을 담지하는 *B. subtilis* 세포는 각각 음성 대조군과 양성 대조군으로 사용하였다(도 7). 음성 대조군 균주와 비교하여, 아가 플레이트에서 Lugol's 아이오딘 반응을 통해 *B. subtilis*에서의 Aga50D 분비를 관찰할 수 있었다. 그러나, 아가 플레이트 상에서 Aga50D의 아가분해 활성은 AgaA7 발현 균주(양성 대조군)만큼 높지 않았다. 이는 엑소분해(exolytic) 활성의 Aga50D가 아가에서 NA2로의 해중합을 기본적으로 느리게 진행하기 때문이다. 반면에 엔도분해(endolytic) 활성의 AgaA7은 한 개의 긴 아가 중합체 사슬에서 짧은 올리고당을 빠르게 생산할 수 있다.
- [0073] pBE-*aga50D*를 담지하는 *B. subtilis*는 카나마이신을 포함하는 LB 액체배지에서 30°C에서 배양하였다. 시료는 세포 성장과 분비된 Aga50D의 활성을 측정하기 위해 액체배지에서 시간간격을 두고 채취하였다. 200 μ L 깨끗한 상층액은 50 mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)에 800 μ L의 0.25% 아가로오스 용액과 혼합하였다. 시료는 30°C에서 2시간동안 배양하였다. 아가로오스에서 방출된 올리고당 함량(mM)은 디니트로살리실릭산

(dinitrosalicylic acid, DNS) 방법으로 측정하였다. 간단하게, 1 mL DNS 시약(1 L 증류수 내 6.5 g 디니트로살리실릭산, 325 mL 2 M NaOH 및 45 mL 글리세롤)을 1 mL 반응 혼합물에 첨가하였다. 용액은 발색을 위해 10분간 끓는물 수조에 두었다. 시료를 얼음 욕조에 두면서 반응을 마쳤다. 540 nm에서의 흡광도를 기록한 반면 아가로오스 가수분해 후 방출된 올리고당의 수는 D-갈락토오스를 레퍼런스로 하여 측정하였다(도 7b). 아가로오스 분해산물은 박막 크로마토그래피로 분석하였다(도 7c).

[0075] 3) 효소 준비

[0076] pBE-AgaA7 또는 pBE-Aga50D를 담지하는 *B. subtilis*는 10 µg/mL 카나마이신을 포함하는 LB 액체배지에서 배양하였다. 30°C에서 24시간 배양 후, 세포는 원심분리로 제거하고 세포의 단백질을 고체 암모늄 황산을 80% 포화될 때까지 첨가하여 침전시켰다. 침전물은 원심분리로 수득하고 pH 7.0, 50 mM Tris-Cl 완충액으로 투석하였다.

[0078] 4) AgaA7 및 Aga50D를 통한 아가 가수분해

[0079] 아가는 AgaA7과 Aga50D로 연속적으로 가수분해하였다. 아가 용액은 3시간동안 AgaA7으로 처리된 후 48시간까지 Aga50D를 처리하였다. 가수분해 과정은 TLC(도 8A)와 DNS 분석법(도 8B)으로 관찰하였다.

[0081] <실험 결과>

[0082] 1. AhgI의 동정 및 서열 분석 결과

[0083] 도 2a는 셀룰로파가 sp. W5C에서의 L-AHG 대사에 대한 유전자 클러스터(Gene cluster for L-AHG metabolism in Cellulophaga sp. W5C)를 나타내는 것이다. 도 2b는 GH96 및 GH117 패밀리의 아가레이즈에 대한 계통수(Phylogenetic tree of agarases from the GH96 and GH117 families)를 나타내는 것이다. 잠정적 α-NABH(putative α-NABH)를 코딩하는 *ahgI* 유전자는 클러스터의 하류(downstream)에서 발견되었고 가설 글리코실 가수분해효소 단백질(hypothetical glycosyl hydrolase protein)로 주석을 달았다(도 2a). 근접성(proximity)과 유전적 맥락(genomic context)의 관점에서, 상기 유전자는 아가로-콜로이드 이화와 연관되어 있을 것으로 보인다. *ahgI* 유전자는 1227 염기쌍을 가지고 408-아미노산 단백질인 AhgI으로 번역된다. 아미노산 서열 분석 결과 AhgI는 글리코실 가수분해효소 117(GH117) 패밀리에 속하는 것으로 나타났는데, 이는 α-1,3-L-네오아가로-올리고당 가수분해효소 활성 또는 α-1,3-L-네오아가로바이오스 가수분해효소 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 계통학적 분석 결과, AhgI와 가장 가까운 효소는 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*) 유래 AhgA로, 83%의 상동성을 공유하는 것으로 나타났(도 2b). 또한 열계는 GH96 패밀리의 멤버인 다른 α-아가레이즈와 연관되어 있는 것으로 나타났다.

[0084] α-NABH/NAOS 가수분해효소로 알려진 AhgI의 단백질 서열 정렬은 GH117 패밀리의 멤버인 효소와 일부 보존 영역이 일치하는 것으로 나타났다(도 3). AhgI는 N-말단 헬릭스-턴-헬릭스 도메인에서 SxAxxR 모티프를 갖는다. 상기 서열은 GH117의 다합체성 단백질을 형성하는 기본 요건으로 알려져 왔다. 상기 영역에서 형성된 헬릭스-턴-헬릭스(HTH) 이차 구조는 두 개의 단백질 분자의 이합체화(dimerization) 상호작용에 관여한다. 따라서, AhgI은 *Z. galactanivorans* 유래 AhgA와 유사한 이량성 4차 구조 단백질을 갖는 것으로 보여진다. AhgI의 펩티드 서열에서 가장 잘 보존된 영역은 기질 결합과 연관이 있다. AhgI에서 보존된 잔기인 Trp-127, Thr-172, Gln-187, His-251 및 His-309은 네오아가로-올리고당 기질의 조합과 연관이 있는 것으로 보여진다. 반면에, 산성 잔기 Asp-97, Asp-252 및 Glu-310은 촉매 자리(site)인 것으로 보여진다(도 3).

[0085] AhgI와 α-NABH/NAOS 가수분해효소로 알려진 다른 효소들 사이에서 유전적 및 펩티드 콘텐츠의 비교를 통하여 셀룰로파가 sp. W5C의 광범위한 이화 경로에서의 AhgI의 역할을 알 수 있다. AhgI 부근에 존재하는 잠정적인 L-AHG 대사 유전자는 AhgI의 가수분해활성에 대한 단서가 될 수 있다. 아울러, AhgI의 아미노산 서열에서 기질 결합 및 촉매 잔기의 보존(spatial conservation)은 글리코사이드 가수분해효소(glycoside hydrolase)의 활성을 나타낸다. AhgI은 실제로 GH117 패밀리의 멤버이고 올리고당의 비환원성 말단에서 L-AHG의 절단에 대해 촉매작용을 할 수 있다.

[0086] 셀룰로파가 sp. W5C에 있는 AhgI의 위치를 확인하기 위해, SignalP로 아미노산 서열을 분석하였다. 분석 결과 아미노 말단 신호 펩티드 서열이 존재하는 것으로 나타났는데, 이는 18번째와 19번째 잔기 사이에서 절단 가능한 것으로 판단된다(도 3). 이는 AhgI이 셀룰로파가 sp. W5C에서 분비될 수 있다는 것을 나타내는 최초의 징후(initial indication)일 수 있다. 또한 AhgI의 펩티드 서열은 세포의 α-NABH/NAOS 가수분해효소에 내재되어 있는 완전한 HTH N-말단 도메인을 갖는다. 이에 비해, ScNABH, AgaNash 및 AgaWH117은 N-말단에 HTH의 α1 헬릭스가 존재하지 않는다(도 3).

[0088] **2. AhgI 발현 및 크루드 어세이(crude assay)**

[0089] 온전한(full-length) *ahgI*과 잘려진(N-말단 신호 펩티드 서열이 없는) *ahgI* 개방형 해독틀을 W5C 유전체 DNA(genomic DNA)로부터 클로닝하였고 T7 프로모터 하에서 *E. coli* BW25113(DE3)에서 발현시켰다. 전체 세포 분획에 대한 SDS-PAGE 분석 결과, 세포가 잘려진 AhgI 단백질이 발현되는 것으로 확인되었다(도 4a). 신호 펩티드 서열이 배제는 AhgI의 적절한 세포질이 과발현되게 하였다. 신호 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 구역의 DNA/RNA 이차 구조 및 RNA 안정성과 같은 요인들이 AhgI의 발현을 중단시키는 원인인 것으로 보여진다. 신호 펩티드의 배제는 성숙 단백질의 발현에 유리하였다. 또한 상기와 동일하게 *E. coli*에서의 W5C 유래 β-아가레이즈의 과발현이 관찰되었다. 다음으로 조세포내 추출물(crude intracellular extracts)을 준비하고 NA2에 대한 활성을 분석하였다. 30℃에서 15분간 배양하면서, L-AHG 및 D-gal이 NA2에서 생산된 것을 TLC 플레이트 내에 해당하는 점들이 나타나는 것으로 확인하였다(도 4b). 반응이 진행됨에 따라 NA2에 해당하는 점의 강도가 감소하는 것으로 관찰되었다. GH117 효소 또한 NA4 및 NA6에 대해 활성을 가지기 때문에, AhgI 또한 긴 사슬의 NAOS에 대해 활성을 보이는지 실험하였다(도 9 참조). 활성 분석을 통해, AhgI가 주요 산물로 L-AHG를 방출하는 짧은 사슬 및 중간 길이 사슬의 NAOS(NA2, NA4 및 NA6) 가수분해를 촉매하는 α-NABH라는 초기 가정을 뒷받침하는 것으로 확인되었다.

[0091] **3. AhgI의 생화학적 특성(characterization) 분석 결과**

[0092] 첫 번째로 AhgI 활성에 대한 pH의 효과를 다양한 버퍼 시스템을 사용하여 분석하였다. 30℃에서 15분간 pH=5.0-10.0에서 가수분해 반응을 수행하는 방법으로 분석하였다. 효소는 pH=7.0에서 최적 활성을 보였다(도 5a). 효소 활성에 대한 온도의 효과는 pH=7.0에서 다른 온도 조건으로 가수분해를 수행하여 측정하였다. 최대 활성은 20℃ 및 30℃에서 관찰하였고 40℃로 온도가 증가할 때 활성이 급격히 감소하는 것으로 확인되었다(도 5b). 또한 다른 pH 및 온도 조건에서 사전 배양 후 AhgI의 residual activities를 관찰하였다. 효소는 pH=7.0-9.0에서 안정하였고, 본래 활성의 84-97%를 보유하는 것으로 확인되었다. 또한 약산성(pH=5.0-6.0)이거나 약염기성(pH=10.0)인 조건에서, 본래 활성의 절반 이상을 잃는 것으로 확인되었다. 사전 배양했을 때, AhgI은 20℃에서만 안정하였고 활성이 급격히 감소하는 것으로 관찰되었다. 또한, 2가 이온이 AhgI의 활성을 향상시키는 것을 확인하였다(도 5c). Ca²⁺은 10 mM에서 AhgI 활성을 2배 이상 향상시켰으며, 100 mM에서는 2.5배 정도 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. Na⁺, K⁺ 및 Mg²⁺과 같은 다른 금속 이온들은 효소 활성에 대해 명백한 효과를 보이지 않았다(도 5c). 동역학 파라미터(kinetic parameters) 측정을 위해, AhgI를 pH 7.0 및 30℃에서 서로 다른 농도의 NA2로 10분간 배양하였다. AhgI의 K_m 및 V_{max}는 각각 1.03 mM 및 10.22 U mg⁻¹로 나타났다.

[0093] AhgI와 다른 α-NABH/NAOS 가수분해효소의 생화학적 특성을 비교하여 표 2에 나타내었다(표 2).

표 2

[0094]

α-NABH/NAOS 가수분해효소 (유기물 재료)	크기 (kDa) ^b	최적 pH	최적 온도 (℃)	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	보조 인자	기질	참고 문헌
<i>Pa</i> NABH (<i>Pseudomonas atlantica</i>)	10	7.3	n.a.	n.a.	n.a.	Na ⁺	NA2	D.F. Day et al., Can J Microbiol. 21(1975)1512-1518.
<i>Cf</i> NABH (<i>Cytophaga flevensis</i>)	n.a.	6.8	25	n.a.	n.a.	n.a.	NA2	H.J. van der Meulen et al., Ant Van Leeu. 42(1976)81-94.
<i>Vs</i> NAOSH (<i>Vibrio</i> sp. JT0107)	42 (84)	7.7	30	5.37	92.00	n.a.	NA2/4/6	Y. Sugano et al., J Bacteriol. 176(1994)6812-6818.

BsNAOSH (<i>Bacillus</i> sp. MK03)	42 (320)	6.1	30	n.a.	n.a.	Mg ²⁺	NA2/4/6	H. Suzuki et al., J Biosci Bioeng. 93(2002)45 6463.
AhgA (<i>Zobellia galactanivorans</i>)	42	n.a.	20	n.a.	n.a.	n.a.	NA4/6	E. Rebuffet et al., Environ Microbiol. 13(2011)12 531270.
SdNABH (<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40)	42	6.5	42	3.50	n.a.	-	NA2/4/6	S.C. Ha et al., Biochem Biophys Res Comm. 412(2011)2 38244.
AgaWH117 (<i>Agarivorans gilvus</i> WH0801)	41	6.0	30	6.45	6.98	n.a.	NA2/4	N. Liu et al., Biotechnol Appl Biochem. 63(2016)23 0237.
AhgI (<i>Cellulophaga</i> sp. W5C)	48	7.0	20	1.03	10.22	Ca ²⁺	NA2/4/6	본 발명

[0095] ^a n.a.-데이터 없음

[0096] ^b 괄호 안은 단백질의 다합체형(multimeric forms)을 의미함

[0098] 상기 효소들은 pH=7.0에 가까운 중성 및 주위 온도(ambient temperature)에서 최대 활성을 보였으나, SdNABH는 약간 승강한 온도(42℃)를 더 선호하였다. 보조인자(co-factor)에 대해, α-NABH/NAOS 가수분해효소는 일반적으로 금속 이온을 필요로 하지 않는다. BpGH117에 대한 결정학상 데이터(Crystallographic data of BpGH117)는 단백질이 Mg²⁺와 결합하는 보여주었지만 이는 *in vitro*에서 증명되지 않았다. 반면, Zn²⁺은 다른 효소들에 대해 다양한 효과를 나타내었다. AhgA 활성은 Zn²⁺이 존재할 때 향상된 반면 C/NABH 효소는 활성이 감소되었다. 반면에, Zn²⁺은 SdNABH에 대해서는 영향을 미치지 않는다. 결론적으로 AhgI은 Ca²⁺을 양이온 보조인자로 선호한다는 면에서 차별화된 특징이 있다.

[0100] **4. *Gelidium amansii*로부터 D-갈락토네이트 생산**

[0101] *G. amansii*에서 D-갈락토네이트를 생산하기 위한 파이프라인을 설치하였다. 아가는 공지된 열추출 방법을 통해 *G. amansii*로부터 수득하였다. 수득한 줄-겔 재료는 1.02%(w/v)의 아가를 함유하였다. 추출물은 pH 7.0, 40℃에서 3시간 동안 AgaA7 0.1625 U/mg로 가수분해하였다. TLC 분석에서 NA4 및 NA6에 해당하는 두 개의 주요 점(major spots)이 확인되었다. 이는 엔도분해형(endolytic type) 아가레이즈인 AgaA7가 주요 가수분해 산물인 NA4 및 NA6를 생산한다고 개시하고 있는 종래 연구를 기반으로 한다. 이후 NA4/NA6로부터 NA2를 형성하기 위해, Aga50D(1.725×10⁻³ U/mg)를 용액에 첨가하고 30℃에서 배양하였다. 반응은 주요 올리고당인 NA2가 나타날 때까지 48시간 동안 모니터링하였다. 최종적으로, NA2로부터 발효성 D-gal를 생성하기 위해, 반응 혼합물에 AhgI 0.0153 U/mg를 첨가하였다(도 6a). 최종 가수분해산물은 D-gal 3.74±0.13 mM을 함유하였고 D-갈락토네이트로 전환시키는데 사용하였다. 또한 가수분해산물은 L-AHG와, 미량(trace amounts)의 NA2 및 NA3을 함유하였다(도 6a). 상기 화합물들은 비환원성 화합물이다.

[0102] D-gal을 D-갈락토네이트로 전환시키기 위해, 종래 연구에서 제안한 EWG3 균주(대한민국 공개특허 제10-2015-0006581호 참조)를 사용하였다. 상기 균주는 D-gal 및 D-갈락토네이트의 소비를 저해하는 *galK* 및 *dgoK* 결실 돌연변이이다. 또한 상기 균주는 단일 단계로 D-gal을 D-갈락토네이트로 전환하는 갈락토오스 탈수소효소를 코딩

하는 *gld* 유전자를 담지한다. EWG3의 초기 배양물(starter culture)을 다른 필수 배지 성분과 함께 최종 가수분해산물에 첨가하였다. 72시간동안 배양한 후, 배지에서 D-갈락토네이트 2.30 ± 0.15 mM을 확인하였다(도 6b). 특히, 상기 균주는 어떠한 성장 저해도 보이지 않았는데, 이는 배양액에서 효소 처리된 가수분해산물이 공지된 어떠한 저해 화합물도 포함하고 있지 않기 때문이다. 아세트산과 같은 다른 발효 산물은 관찰되지 않았다.

[0103] *G. amansii*로부터 D-갈락토네이트를 생산하기 위한 프로토타입 프로세스(prototype process)는 하기 방법으로 진행하였다. 프로세스는 세 단계로 나뉜다(도 1);(1) *G. amansii*로부터 아가 생산, (2) 아가를 효소적 가수분해하여 D-gal을 생산, (3) D-gal을 D-갈락토네이트로 전환(microbial conversion). *G. amansii*로부터 아가를 열수 추출하는 방법은 실험의 간편함과 독성 물질을 생산하지 않기 때문에 선택하였다. 산/염기 또는 마이크로파 보조 추출을 포함하는 다른 추출 기술은 추출 과정의 속도를 증가시키거나 아가의 물리화학적 특성을 향상시키기 위한 것으로 보여진다. 본 발명에서, 열수 추출 방법은 *G. amansii* g당 0.51 g까지 아가를 추출하는데, 이는 해조류 아가 함량의 90-97%에 해당하는 양이다.

[0104] 한편, 아가로부터의 D-gal을 얻기 위해서는 세 가지 가수분해 효소를 필요로 한다. 우선 AgaA7은 아가의 초기 해중합에 사용되어 NA4 및 NA6 분자를 생산한다. 여기서 AgaA7를 선택한 이유는, 이러한 엔도 β-아가레이즈(endolytic β-agarase)는 1% 아가 용액의 졸-겔 전이 온도보다 5°C 더 높은 40°C에서 효소의 최적 활성을 보이기 때문이다. 이는 바이오리파이너리(biorefinery)용으로 아가를 이용할 때 중요하게 고려해야 할 요소이다. 왜냐하면 아가는 낮은 온도에서 고체화되어 폴리머 체인이 효소성 어택에 덜 민감하게 하기 때문이다. AgaA7을 적용함에 따라, 아가 용액은 액체 상태를 유지하였고 연속적인 기질-효소 상호작용을 촉진하였다. 두 번째 효소인 엑소효소 β-아가레이즈 Aga50D는 NA4와 NA6을 NA2로 가수분해하기 위해 선택하였다. 짧은 사슬 올리고당 용액은 고체화되지 않기 때문에, 낮은 가수분해 온도에서 Aga50D로 반응을 수행함에 있어서 문제가 발생하지 않는다. 반응 혼합물은 주요 다당류인 NA2를 포함한다. 세 번째 효소인 AhgI는 상기 재료 및 방법 섹션에서 설명한 바와 같이 동정하고 분석하였다. AhgI는 NA2의 가수분해를 촉매하여 L-AHG와 D-gal를 생성한다. 여기서 D-gal은 D-갈락토네이트 생산을 위한 기질로 사용된다. 또한 AhgI는 NA4 및 NA6에 대해 활성을 나타내어 L-AHG 및 홀수의 짧은 사슬의 NAOS를 생성시킬 수 있다(도 9). 상기 세 가지 모든 효소에 대한 아가의 동시 가수분해는 낮은 D-gal 수율로 이어질 수 있다. 연속적인 방법으로 가수분해를 수행하는 것은 아가의 해중합과정동안 홀수의 NAOS(odd-numbered NAOS)를 형성하는 것을 저해시킬 수 있다.

[0105] 세 번째 단계에서, 첫 번째와 두 번째 단계에서 생성된 D-gal을 EWG3 균주를 이용하여 D-갈락토네이트로 산화시켰다. EWG3의 배양물에서 성공적으로 D-갈락토네이트를 축적하면 *G. amansii*로부터의 D-갈락토네이트 생산과정이 완료된다. 본 프로세스의 흐름은 L-AHG에 대한 미생물 이화작용을 가능하게 함으로써 향상될 수 있고, 이는 바이오리파이너리에서 경제적으로 이용 가능한 공급 원료로서 대형 홍조류의 사용이 유용하다는 것을 입증할 것이다.

[0106]

[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0108]

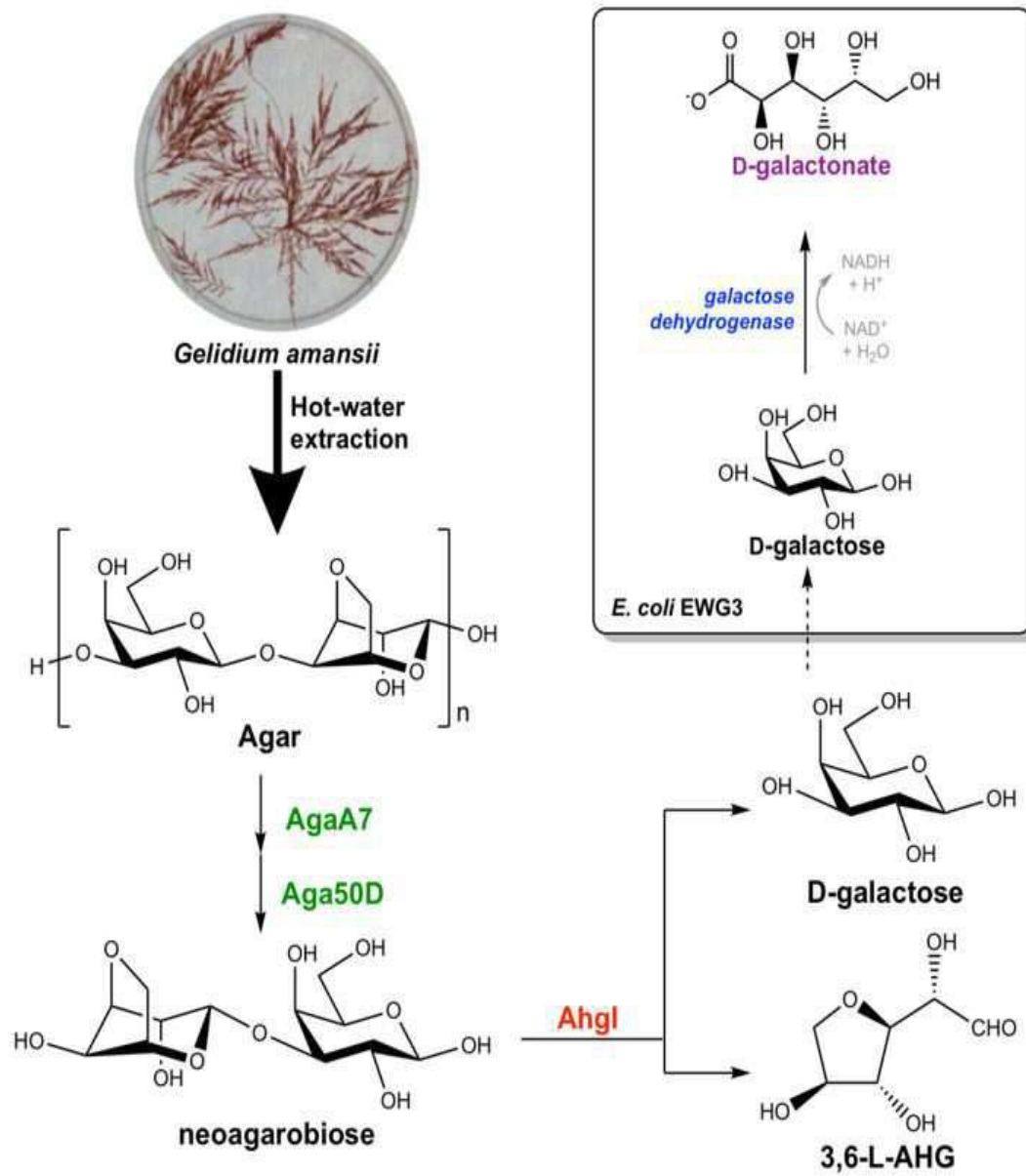
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13157BP

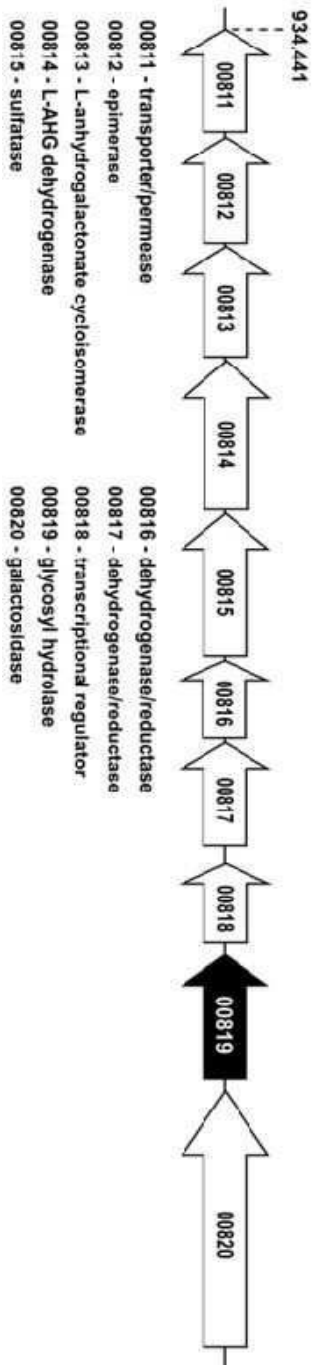
수탁일자 : 20161123

도면

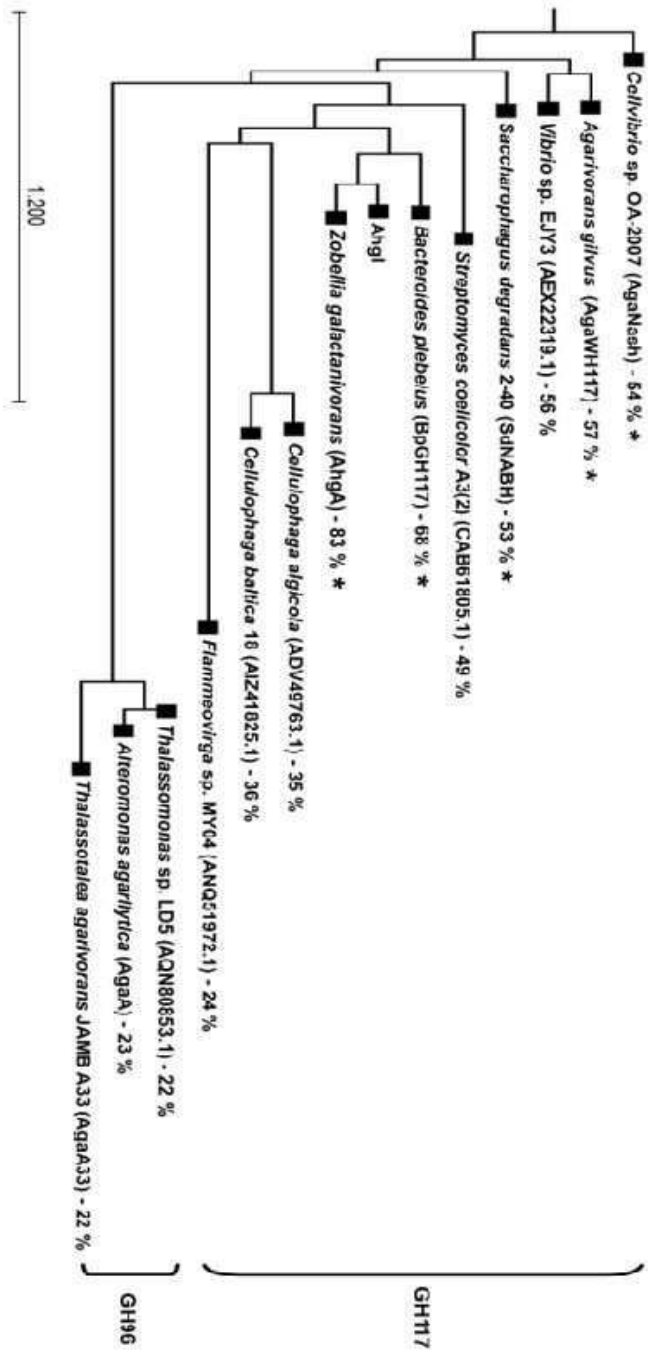
도면1



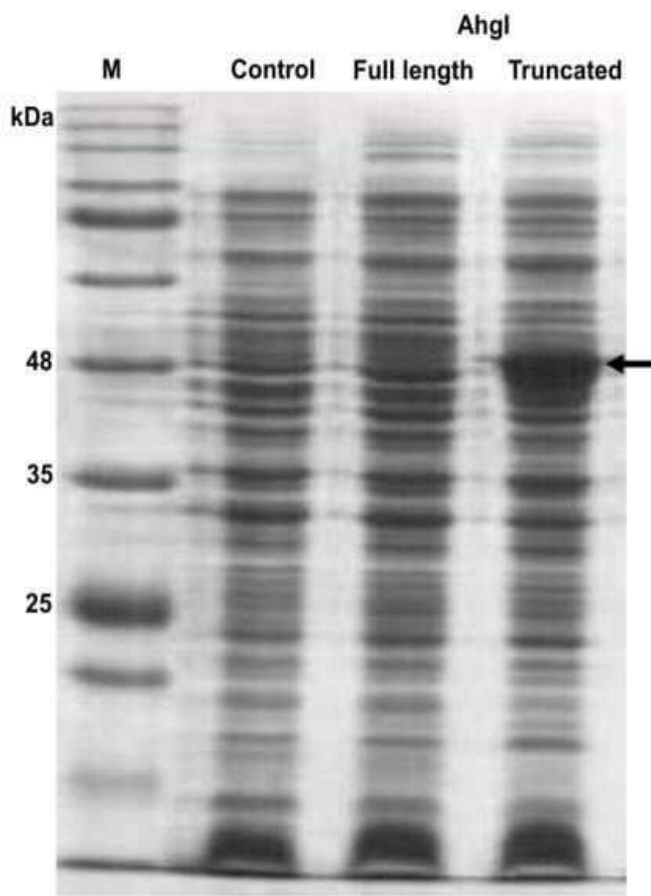
도면2a



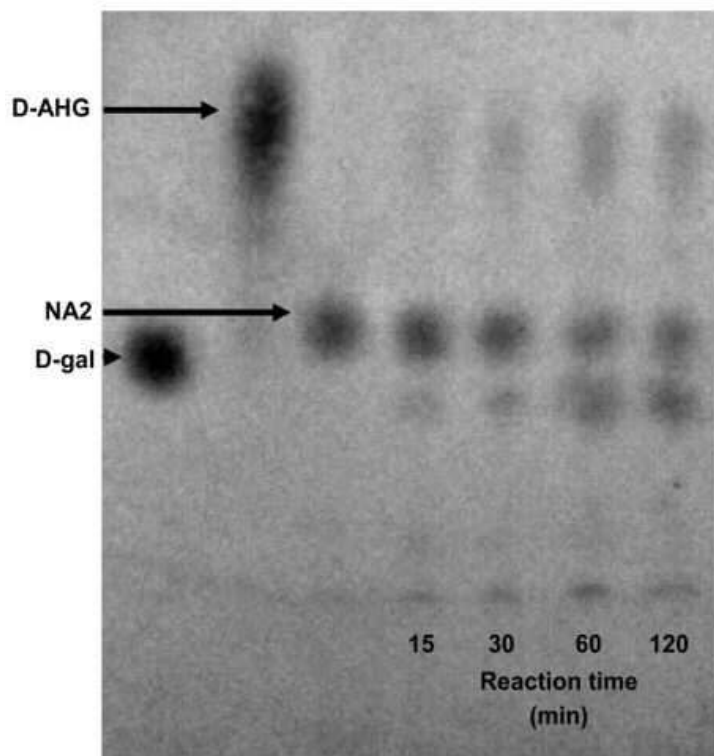
도면2b



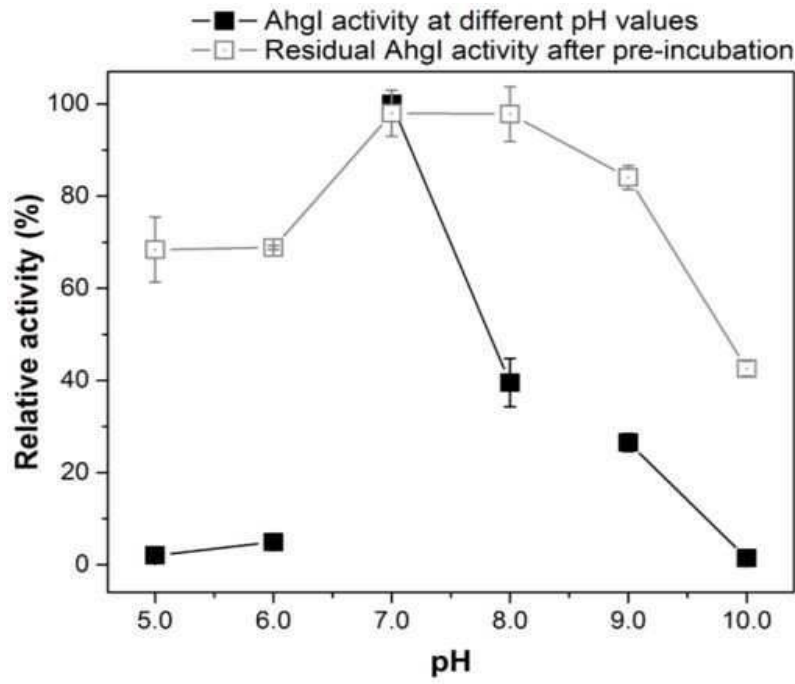
도면4a



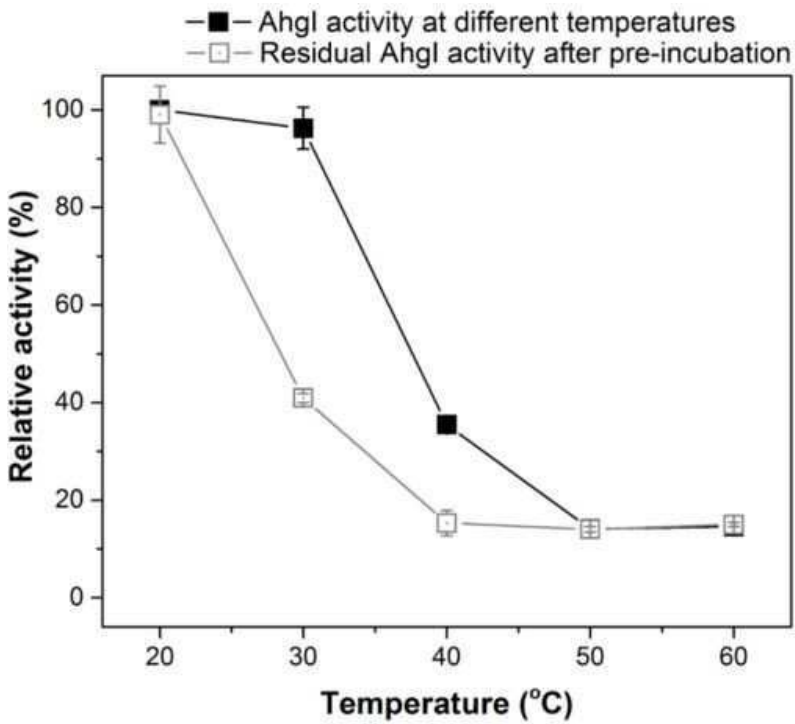
도면4b



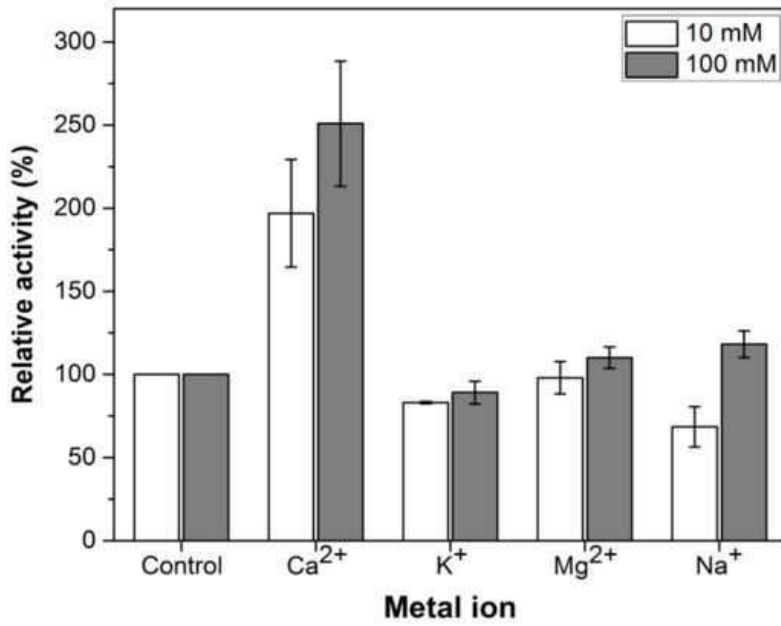
도면5a



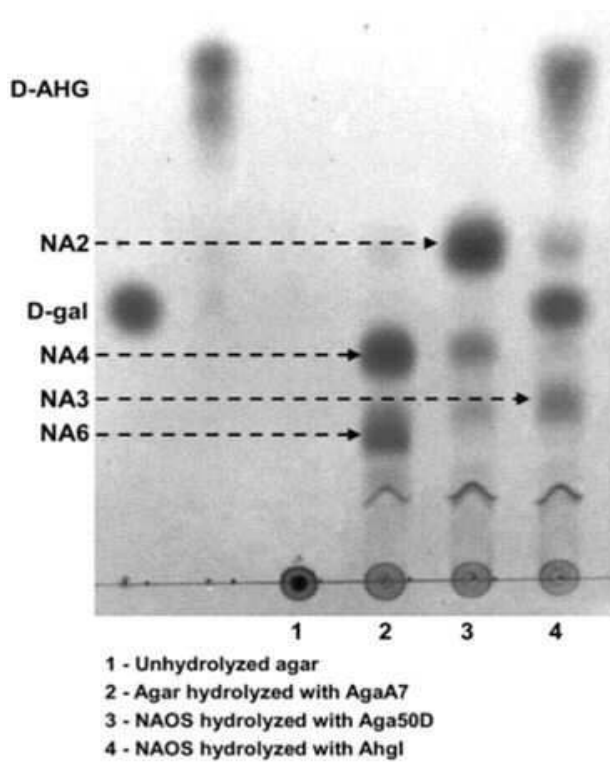
도면5b



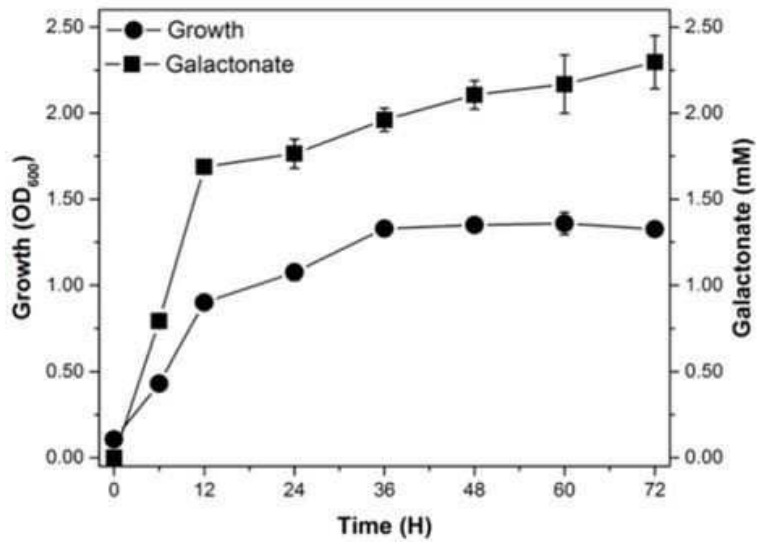
도면5c



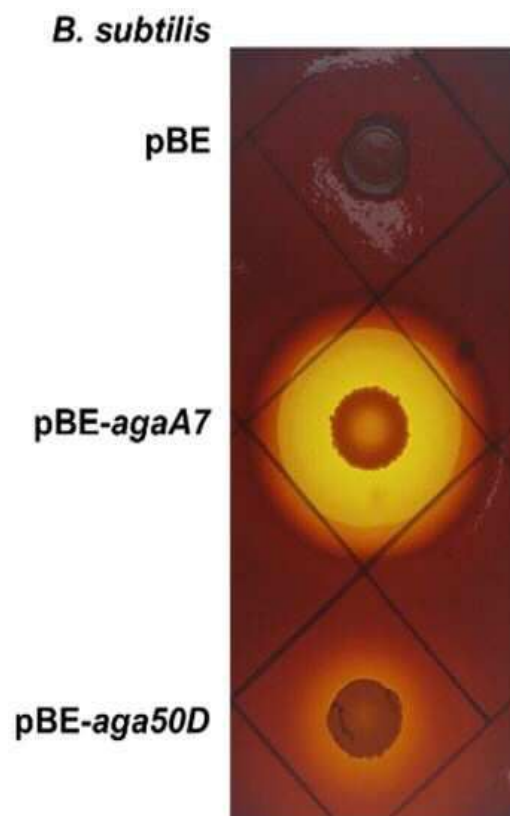
도면6a



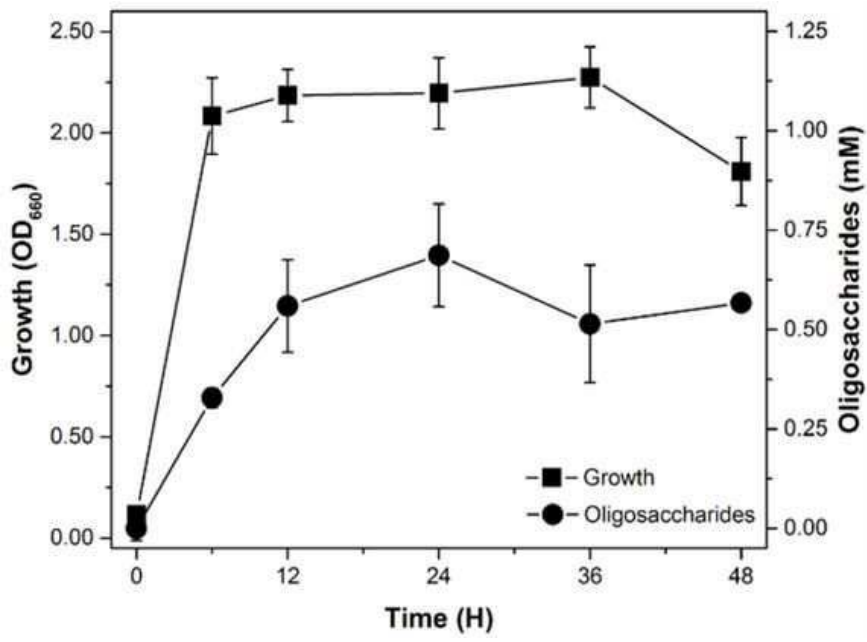
도면6b



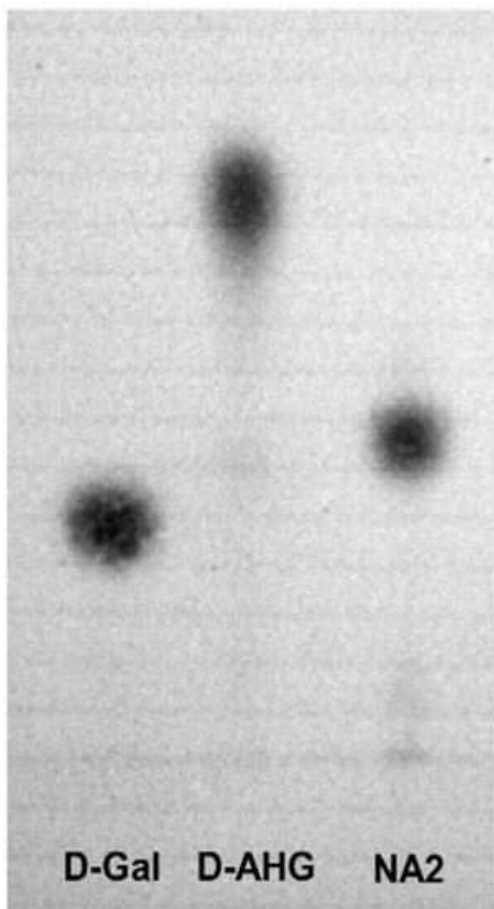
도면7a



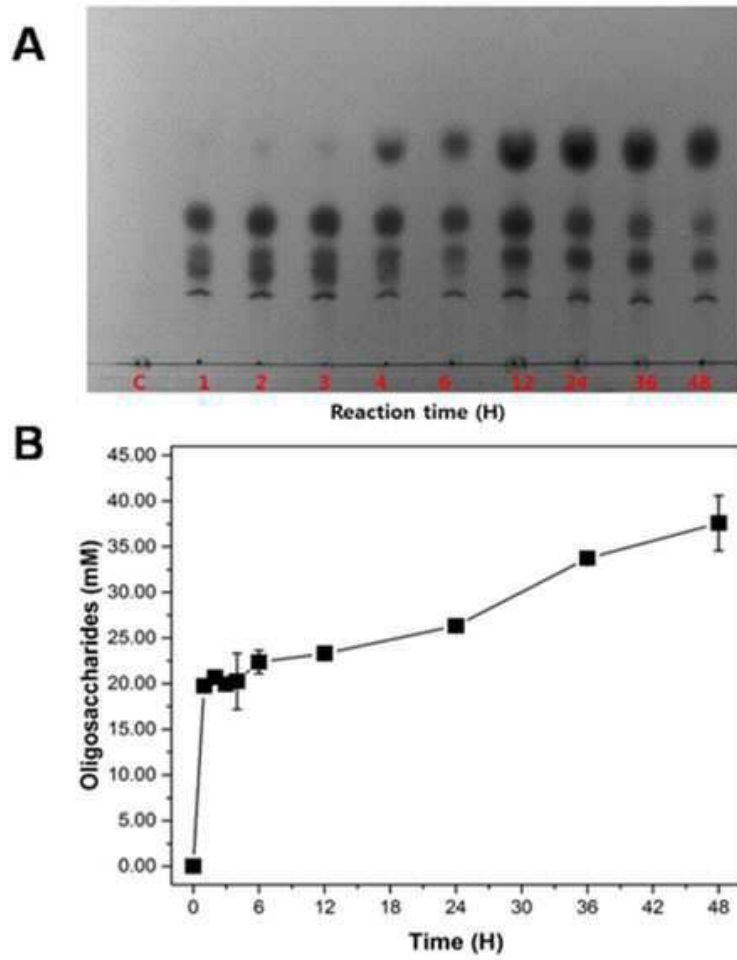
도면7b



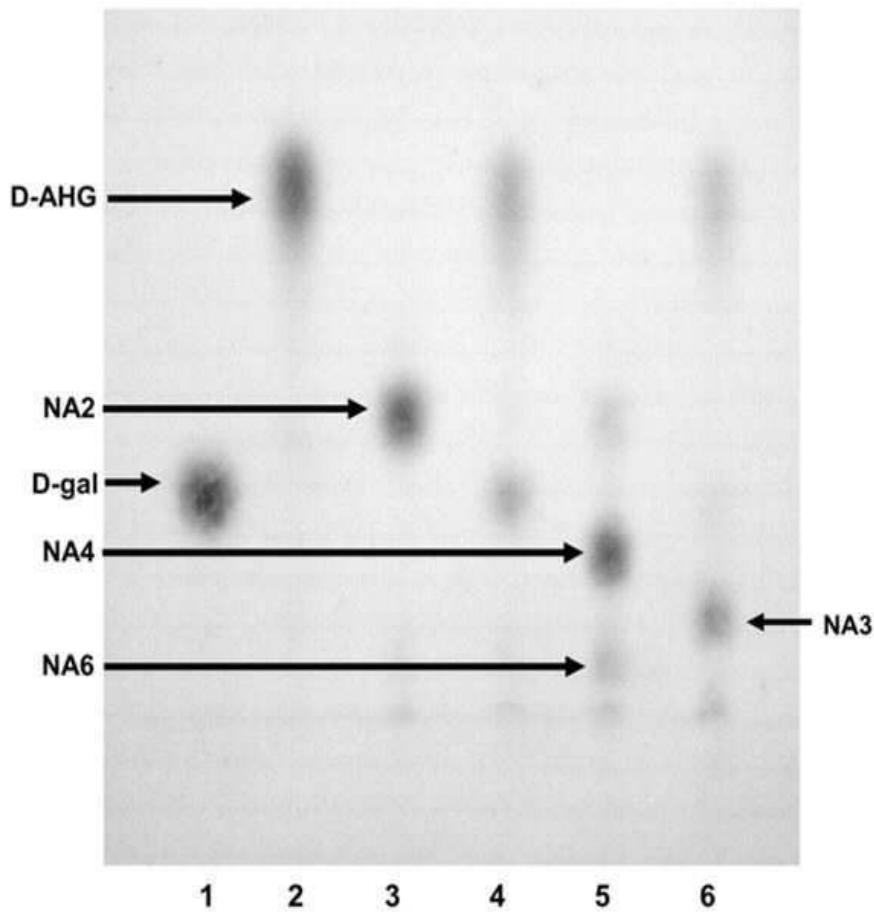
도면7c



도면8



도면9



서열목록

<110> MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION

<120> ALPHA NEOAGAROBIOSE HYDROLASE DERIVED FROM CELLULOPHAGA
OMNIVESCORIA W5C STRAIN AND APPLICATION THEREOF

<130> P17-0204

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1227

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AhgI DNA sequences

<400> 1

atgattaaaa aaagcatagc attttgca atagcttggt tattgctaag ggctgcctgt 60

aaaaataata ccaagctac aaatactgcc atagagcaag aaaccaaact agaaattacc 120

ccaaaacaaa ttgatgagtt aggtataaca aaccagact ctttaagtgc tgcaacaaaa 180
 agagctttgc aatggccaaa agatttagga aatgaatggt ttatacagtt ctctaacctt 240
 aaacctttaa aaggatgatt agcttatgaa gaaggtgttg tacgtagaga ccctagtgca 300
 gtaattaaag aaaatggtaa atactacggt tggtagacga aaagcacagg accttcacaa 360
 ggttttgggt gtgatgtaga aatgaaaaa gtttttcctt gggatagatg tgatatttgg 420
 tacgtacat ctgaagacgg tgaacttgg aaagaagaag gtattgccgt tgcaagaggt 480
 gaaaaaggcg cttatgatga cagatctgtt ttacagtag aaataatgaa atatcagaac 540

aaatattact tatgctacca aaccgtaaaa tctccttaca cagtacgct taaaaatcag 600
 gttggttag cctggcaga ttcgccaac ggaccttga caaaaagtga agagcctata 660
 cttagtcctg cagataatgg tatttggaaa ggagaagaac aagaccgttt tgctgtagag 720
 aaaaaaggag atttgatag tcacaaagta catgatcctt gtattttggc ttacaagggc 780
 aaatattact tgiactataa aggcgagcaa atgggcgaaa aaattacatt tgggtgtaga 840
 caaatacgcc atggtgttgc tattgcagac aatcctttag ggccttacgt aaaatcacct 900
 tacaaccaa taagtaatag tggatcagaa atttgtgttt ggccatacaa tgggtgtatt 960

gcgtcattaa ttactacaga tggccagaa aaaaatacta tccaatgggc tccagatggt 1020
 attaattttg aaattaaatc tgttattcct ggtgtaccag ctcatgcaat aggcttaaac 1080
 agatctgcag atacagaaaa agaaccaaca gaaatattac gctggggact tacacatata 1140
 tacaatagta gcgactacca aagtattatg agttttacat ctgccagaaa aactacacac 1200
 agagctaaag gtgtaaaatc taaataa 1227

<210> 2
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AhgI amino acid sequences

<400

> 2

Met Ile Lys Lys Ser Ile Ala Phe Cys Ala Ile Ala Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Cys Lys Asn Asn Thr Lys Ala Thr Asn Thr Ala Ile Glu
 20 25 30
 Gln Glu Thr Lys Leu Glu Ile Thr Pro Lys Gln Ile Asp Glu Leu Gly
 35 40 45
 Ile Thr Asn Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ala Thr Lys Arg Ala Leu Gln

Ser Asn Ser Gly His Glu Ile Cys Val Trp Pro Tyr Asn Gly Gly Ile
 305 310 315 320
 Ala Ser Leu Ile Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr Ile Gln Trp
 325 330 335
 Ala Pro Asp Gly Ile Asn Phe Glu Ile Lys Ser Val Ile Pro Gly Val
 340 345 350
 Pro Ala His Ala Ile Gly Leu Asn Arg Ser Ala Asp Thr Glu Lys Glu

 355 360 365
 Pro Thr Glu Ile Leu Arg Trp Gly Leu Thr His Ile Tyr Asn Ser Ser
 370 375 380
 Asp Tyr Gln Ser Ile Met Ser Phe Thr Ser Ala Arg Lys Thr Thr His
 385 390 395 400
 Arg Ala Lys Gly Val Lys Ser Lys

405

- <210> 3
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer for amplification of intact AhgI
- <400> 3

ctcggatcca ttaaaaaag catagcatt 29

- <210> 4
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer for amplification of truncated AhgI
- <400> 4

ctcggatccg cctgtaaaaa taataccaa 29

- <210> 5
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Reverse primer for amplification of AhgI

<400> 5
 gtagaattct ttagatttta cacctttag 29

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Aga50DF
 <400> 6
 cgtgagctct tattcgattt tgaaaacga 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Aga50DR
 <400> 7
 ctttctagat ttgctgccta gcctttcgg 29