



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월16일
(11) 등록번호 10-2166572
(24) 등록일자 2020년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/02 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/02 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0137921(분할)
(22) 출원일자 2019년10월31일
심사청구일자 2019년10월31일
(65) 공개번호 10-2020-0087064
(43) 공개일자 2020년07월20일
(62) 원출원 특허 10-2019-0003273
원출원일자 2019년01월10일
심사청구일자 2019년01월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180041377 A*
NCBI Reference Sequence No. WP_017446943.1
(2013.06.28.)*
J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 23, pp.
1509-1518 (2013.08.22.)
KR1020100108241 A
*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)
이창로
경기도 용인시 수지구 신봉1로 214, 505동 1301호 (신봉동, 신봉마을 동부센트레빌 5단지)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 황상필

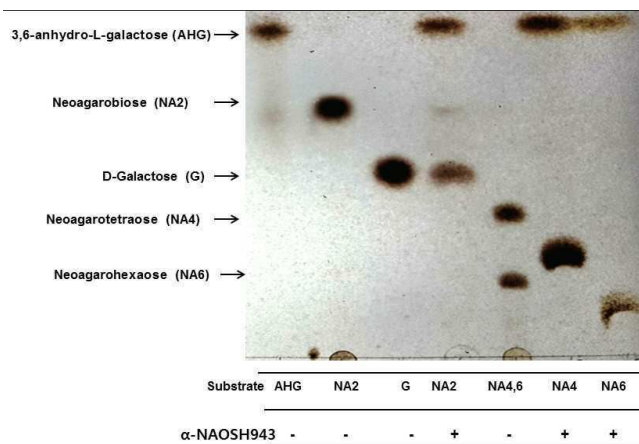
(54) 발명의 명칭 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소의 이용

(57) 요약

본 발명은 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명을 통해 기능을 새롭게 밝힌 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소를 이용하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법, 무수갈락토오스, 비환원성말단

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8



의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법 및 이들 방법을 위한 효소 조성물, 및 상기 효소의 유전자, 재조합 벡터, 형질전환체, 효소 대량생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소를 이용하여 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 효율적으로 유리시킬 수 있으며, 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스를 효율적으로 생산할 수 있고, 또한 본 발명의 효소 조성물을 사용하면 상기와 같은 공정을 용이하게 수행할 수 있다. 이에 따라 본 발명의 방법과 조성물은 바이오매스로부터 당화를 통해 바이오연료 및 의약품 원료를 생산하는 산업분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 그리고 본 발명의 유전자, 재조합 벡터, 형질전환체 또는 효소 대량생산방법을 이용하면 상기 효소를 효율적으로 생산할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01328801
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	명지대학교 산학협력단
연구사업명	차세대BG21사업
연구과제명	네오아가로올리고당의 대사질환(비만/지질혈중) 개선 효능검증
기여율	1/1
과제수행기관명	농생명바이오식약의 소재개발사업단
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 네오아가로올리고당과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법.

청구항 4

i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 포함하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키기 위한 용도의 효소 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 효소 조성물.

청구항 7

i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 네오아가로올리고당과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법.

청구항 10

i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 포함하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토

오스를 생산하기 위한 용도의 효소 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 효소 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명을 통해 기능을 새롭게 밝힌 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소를 이용하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법, 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법 및 이들 방법을 위한 효소 조성물, 및 상기 효소의 유전자, 재조합 벡터, 형질전환체, 효소 대량생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오매스는 태양에너지를 사용하여 대기 중의 이산화탄소를 환원시켜 고정함으로써 언제나 대규모로 얻을 수 있는 지속 가능한 자원이다. 바이오매스를 구성하는 환원된 탄소의 형태는 자연계에서 이산화탄소로 다시 산화되며, 결국 지구상의 탄소순환에 기여한다. 따라서 바이오매스는 지속가능하고 재생가능한 신에너지를 얻기 위한 가장 중요한 자원 중 하나로 간주되고 있다. 그 중에서도 해양 바이오매스는 전분 또는 리그노셀룰로오스 기반의 바이오매스에 비해 몇 가지 장점이 있다. 예를 들어, 농산물 생산에 필요한 토양을 사용하지 않으며, 살충제와 비료를 사용하지 않고, 빛과 CO₂만의 단순한 성장요구조건 하에서 효율적으로 재배할 수 있다. 또한, 리그노셀룰로오스 바이오매스의 실제 적용에 있어서 주요 장애물인 리그닌(lignin)을 함유하지도 않는다. 이러한 관점에서, 조류 기반의 바이오연료 생산은 많은 연구자들에 의해 아주 중요한 제3세대 바이오연료로 강조되고 있다(Nigam and Singh 2011).

[0003] *Gelidium amansii*와 같은 홍조류는 높은 탄소 함량(갈락탄 60%, 셀룰로오스 20%)을 가지며, 따라서 단당 및 바이오 연료 생산을 위한 경제적으로 가치 있는 탄소 공급원이 될 것으로 기대된다(Park et al. 2012). 홍조류 갈락탄의 주성분은 3-O-β-D-갈락토피라노오스(G)와 4-O-α-L-갈락토피라노오스(L)가 교대로 배열된 선형의 다당류인 한천(agar)이다. 한천의 주요 성분인 아가로오스(agarose)는 성분 L이 3,6-anhydro-α-L-galactose(AHG)로 대체된 구조(도 1 참조)이다(Knutsen et al. 1994; Hehemann et al. 2010). 따라서 아가로오스를 AHG 및 G로 효율적으로 분해하는 공정개발은 홍조류 생물자원을 이용하기 위한 가장 중요한 전제 조건이다.

[0004] 현재까지, 산 처리(Park et al., 2012), 효소 처리(Yun et al., 2011), 산과 효소 처리의 조합(Kim et al., 2013)과 같은 한천의 완전가수분해를 위한 많은 연구 결과가 보고되었다. 한천의 산촉매 가수분해는 간단하고 편리한 과정인 것으로 보이지만, 고온 처리, 중화 및 염 제거 등의 공정이 필요하고, 5-하이드록시메틸푸르푸랄과 같은 독성 화합물을 축적하는 등의 많은 문제점이 있다(Lee et al., 2015). 이러한 단점을 극복하기 위해서는, 한천 가수분해를 위한 효율적인 효소공정의 개발이 필요하다.

[0005] 아가로오스 다당류를 분해하는 효소 아가레이즈는 절단 패틴에 기초하여, α-1,3 결합에 작용하는 α-아가레이즈(EC 3.2.1.158)와 β-1,3 결합에 작용하는 β-아가레이즈(EC 3.2.1.81)로 구분한다. 현재까지, α-아가레이즈는 몇 개의 효소만 동정되었지만(Hassairi et al., 2001; Zhang et al., 2018), β-아가레이즈는 다양한 미생물에서 많은 예가 보고되었다(Chi et al. 2012). 따라서 β-아가레이즈 분해 경로(β-agarolytic pathway)가 대다수의 미생물에 의해 채택된 한천 가수분해의 주경로인 것으로 보인다. β-아가레이즈 분해 경로(도 1 참조)에서 아가로오스는 endo-type β-아가레이즈 I에 의해 환원말단에 G를 갖는 일련의 올리고당인 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharides, NAOSs)으로 빠르게 분해된다(Araki 1959, Chi et al., 2012). 이후, NAOS는

exo/endo-type(주로 exo-) β -아가레이즈 II에 의해 연속적으로 가수분해되어 네오아가로바이오스(neoagarobiose, NA2)를 생성한다. 마지막으로, NA2(AHG-G)는 exo-type 1,3- α -3-anhydro-L-galactosidases(EC 3.2.1.)에 의해 AHG와 G의 단량체로 완전히 가수분해된다. 1,3- α -3-anhydro-L-galactosidases는 α -1,3-L-neoagarobiase/neoagarobiose hydrolase(α -NABH)와 α -1,3-L-neoagarooligosaccharide hydrolase(α -NAOSH)를 포함한다. 엄격하게 구분하면, α -NABH는 기질로서 NA2에만 작용하고, NA2의 α -1,3 결합을 절단함으로써 AHG 및 G를 유리시킨다. 반면 α -NAOSH는 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose, NA4)와 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose, NA6) 뿐만 아니라 NA2에도 기질로 작용하며 비환원말단에서 NAOS의 α -1,3 결합을 절단하여 AHG를 유리한다. 따라서 한천을 AHG 및 G로 완전히 가수분해하려면 β -아가레이즈 I, β -아가레이즈 II 및 α -NABH/NAOSH와 같은 여러 가수분해 효소의 컨소시엄이 필요하다(도 1 참조).

[0006] 지금까지 수백여 종의 β -아가레이즈가 문헌에 인용되었지만, α -NABHs/ α -NAOSH의 경우 12개의 효소만이 보고되었고, 이중 유전자 서열이 밝혀진 것은 8개에 불과하다. 따라서 해조류 바이오매스를 효율적으로 활용하기 위해서는 완전한 한천 분해 시스템을 구축하는 것이 필요하지만, 분해 과정의 마지막 단계에 사용할 α -NABH/ α -NAOSH에 대한 연구자료가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Pergamon Press, London, 1959, 15-30.
 (비특허문헌 0002) Prog Energy Combust Sci 2011;37:52-68.
 (비특허문헌 0003) Anal Biochem 1976;72:248-54.
 (비특허문헌 0004) Appl Microbiol Biotechnol 2012;94:917-30.
 (비특허문헌 0005) Korea. J Microbiol Biotechnol 2013;23:1509-18.
 (비특허문헌 0006) Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2015;18:422-27.
 (비특허문헌 0007) Biosci Biotechnol Biochem 2010;74:766-70.
 (비특허문헌 0008) Biochem Biophys Res Commun 2011;412:238-44.
 (비특허문헌 0009) Bioresour Technol 2001;79:47-51.
 (비특허문헌 0010) Nature 2010;464:908-12.
 (비특허문헌 0011) J Gastroenterol 2013;48:897-909.
 (비특허문헌 0012) Mar Drugs. 2017, DOI: 10.3390/md15040090.
 (비특허문헌 0013) Bioresour Technol 2013;136:582-87.
 (비특허문헌 0014) J Microbiol Biotechnol 2012; 22:1621-28.
 (비특허문헌 0015) Bot Mar 1994;37:163-69.
 (비특허문헌 0016) J Bacteriol. 2012;194:6961-62.
 (비특허문헌 0017) Nature 1970;227:680-85.
 (비특허문헌 0018) Process Biochem 2015;50:1629-33.
 (비특허문헌 0019) BMB Rep 2017;50:263-268.
 (비특허문헌 0020) Biotechnol Biofuels 2015, DOI: 10.1186/s13068-015-0327-7.
 (비특허문헌 0021) Anal Chem 1959;31:426-28.
 (비특허문헌 0022) Prog Energy Combust Sci 2011;37:52-68.
 (비특허문헌 0023) Bioresour Technol 2012;108:83-8.

- (비특허문헌 0024) Appl Biochem Biotechnol 2016;179:715-727.
- (비특허문헌 0025) Bioprocess Biosyst Eng 2015;38:1715-22.
- (비특허문헌 0026) Bioprocess Biosyst Eng 2014;37:2505-13.
- (비특허문헌 0027) Environ Microbiol 2011;13:1253-70.
- (비특허문헌 0028) J Bacteriol 1994;176:6812-18.
- (비특허문헌 0029) J Funct Foods 2017;38:529-39.
- (비특허문헌 0030) Process Biochem 2011;46:88-93.
- (비특허문헌 0031) Appl Microbiol Biotechnol 2017;101:5581-89.
- (비특허문헌 0032) Appl Microbiol Biotechnol 2018;102:2203-12.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서 본 발명의 주된 목적은 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas jubiniege* G7) 균주 유래 단백질의 기능을 밝히고, 이 단백질을 해조류 바이오매스를 활용하는데 이용할 수 있는 새로운 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법을 효율적으로 수행하는데 필요한 효소조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 효율적으로 생산하는데 필요한 유전자, 재조합 벡터, 형질전환체 및 효소 대량생산방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 네오아가로올리고당과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법에 있어서, 상기 단백질은 i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되는 단백질인 것이 바람직하다.
- [0013] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키는 방법에 있어서, 상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 포함하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키기 위한 용도의 효소 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키기 위한 용도의 효소 조성물에 있어서, 상기 단백질은 i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되는 단백질인 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 유리시키기 위한 용도의 효소 조성물에 있어서, 상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 네오아가로올리고당과 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산방법에 있어서, 상기 단백질은 i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말

단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되는 단백질인 것이 바람직하다.

- [0019] 본 발명의 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스 생산 방법에 있어서, 상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 나타내는 단백질을 포함하는 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스를 생산하기 위한 용도의 효소 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스를 생산하기 위한 용도의 효소 조성물에 있어서, 상기 단백질은 i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되는 단백질인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스를 생산하기 위한 용도의 효소 조성물에 있어서, 상기 ii)의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 i) 서열번호 3의 염기서열; 또는 ii) 상기 서열번호 3의 5' 말단 또는 3' 말단에 태그(tag) 아미노산을 암호화하는 서열이 부가된 염기서열;로 표시되는 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 유전자를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 유전자에 있어서, 상기 ii)의 염기서열은 서열번호 4의 염기서열인 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 유전자를 함유하는 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 생산용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하고 상기 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 유전자를 과발현시키는 것을 특징으로 하는 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 대량생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따르면, 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소를 이용하여 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스를 효율적으로 유리시킬 수 있으며, 네오아가로올리고당으로부터 무수갈락토오스, 비환원성말단의 무수갈락토오스가 제거된 네오아가로올리고당 또는 갈락토오스를 효율적으로 생산할 수 있고, 또한 본 발명의 효소 조성물을 사용하면 상기와 같은 공정을 용이하게 수행할 수 있다. 이에 따라 본 발명의 방법과 조성물은 바이오매스로부터 당화를 통해 바이오연료 및 의약품 원료를 생산하는 산업분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 그리고 본 발명의 유전자, 재조합 벡터, 형질전환체 또는 효소 대량생산방법을 이용하면 상기 효소를 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 아가로오스(agarose)가 효소에 의해 갈락토오스와 무수갈락토오스로 분해되는 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 가야도모나스 주비니에게 G7의 유전체 내에서 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소의 암호화 영역을 나타낸 것이다.
- 도 3은 가야도모나스 주비니에게 G7 유래 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소와 기존 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 또는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 아미노산 서열을 비교하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 재조합 벡터(pET28a-943)를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 재조합 벡터(pET28a-943)를 제한효소처리하여 유전자의 함유 여부를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 단백질(α -NAOSH943)의 SDS-PAGE 결과이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따라 발현 및 정제된 단백질(α -NAOSH943)의 겔 여과 크로마토그래피 분석 결과이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 네오아가로올리고당에 대한 가수분해활성을 TLC로 분석한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 네오아가로올리고당(네오아가로바이오스) 분해산물을 질량 분광계 분석한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 네오아가로올리고당(네오아가로테트라오스) 분해산물을 질량 분광계 분석한 결과이다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 네오아가로올리고당(네오아가로헥사오스) 분해산물을 질량 분광계 분석한 결과이다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 pH에 따른 효소활성을 분석한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 단백질(α -NAOSH943)의 온도에 따른 효소활성을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명의 단백질은 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas joobiniege* G7) 유래의 효소단백질로, 지금까지는 그 기능이 밝혀지지 않았었으나 본 발명을 통해 새롭게 밝혀졌다.
- [0031] 가야도모나스 주비니에게 G7로부터는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질의 형태로 생산되지만, 이 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시되며 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질이라도 본 발명의 단백질로 이용할 수 있을 것이다.
- [0032] 예를 들어, 알파-네오아가로올리고당 가수분해 활성을 해치지 않는 한도 내에서 서열번호 1의 아미노산 서열에 다른 구조 단백질 혹은 효소 단백질의 아미노산 서열의 일부 또는 전부가 부가된 형태일 수 있으며, 정제 혹은 사용상의 편의를 위한 인공 아미노산 서열이 부가된 형태일 수 있다.
- [0033] 바람직하게는 i) 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 ii) 상기 서열번호 1의 N-말단 또는 C-말단에 태그(tag) 아미노산이 부가된 아미노산 서열;로 표시되는 단백질을 사용하는 것이 좋다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 상기와 같은 본 발명의 단백질은 네오아가로바이오스(이하, NA2로 약기), 네오아가로테트라오스(이하, NA4로 약기) 및 네오아가로헥사오스(이하, NA6으로 약기)와 같은 네오아가로올리고당(이하, NAOS로 약기)의 α -1,3-glycosidic 결합을 절단하여 비환원 말단에서 무수갈락토오스(이하, AHG로 약기)를 유리시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 단백질을 NAOS와 효소반응시키는 방법으로 NAOS로부터 AHG를 유리시킬 수 있으며, AHG 또는 비환원성말단의 AHG가 제거된 NAOS, 특히 흡수개의 당분자로 이루어지며 분자의 양끝단이 갈락토오스 분자로 이루어진 특이적인 구조의 올리고당을 생산할 수 있다. 또한, NA2의 경우 비환원성말단의 AHG가 제거되면 갈락토오스가 남기 때문에 갈락토오스를 생산할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 단백질은 pH 4 ~ 8에 걸쳐서, 그리고 0 ~ 60°C에 걸쳐 효소활성을 나타낼 수 있다. 특히, pH 4 ~ 6에서 높은 활성을 나타내고 0°C에서도 40% 정도의 활성을 나타내기 때문에, 본 발명의 방법은 산성 조건에서 수행되는 공정 또는 저온 조건의 공정에 매우 유용할 것이다. 본 발명을 통해 밝힌 효소활성 조건을 바탕으로 본 발명 방법의 효율을 높이기 위해서는 pH 4 ~ 6 및 0 ~ 40°C에서 효소반응이 이루어지도록 하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 pH 4 ~ 6 및 25 ~ 30°C가 좋을 것이다.
- [0036] 본 발명의 효소 조성물은 상기 본 발명의 방법을 보다 용이하게 적용할 수 있도록 하는 것으로, 본 발명의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명의 효소 조성물은 NAOS가 포함된 조성물에 첨가하는 방법으로 사용할 수 있으며, 아가로오스가 포함된 조성물에 아가로오스를 NAOS로 전환시킬 수 있는 효소와 함께 첨가하는 방법으로도 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 효소 조성물에는 본 발명의 단백질 이외에도 효소활성을 안정적으로 유지할 수 있도록 하기 위한 완충제, 또는 부형제 등의 첨가제를 포함할 수 있으며, 다른 효소도 추가로 포함될 수 있을 것이다.
- [0039] 본 발명의 단백질은 가야도모나스 주비니에게 G7의 세포 파쇄물로부터 정제 등의 과정을 통해 수득하거나, 가야

도모나스 주비니에게 G7의 유전체로부터 본 발명의 유전자를 클로닝하고 이를 이중발현시키는 방법으로 취득할 수 있다. 이중발현방법으로는 예를 들어, 대장균 발현 시스템을 이용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 단백질의 근원인 가야도모나스 주비니에게 G7은 우리나라 가야섬의 연안 바닷물에서 분리된 균주로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC23721^T로, 미국균주은행(American Type Culture Collection, ATCC)에 ATCC BAA-2321로, 독일균주은행(Deutsche Sammlung von Microorganismund Zellkulturen Gmb H, DSM)에 DSM25250^T로 기탁되어 있다.

[0041] 본 발명의 유전자는 가야도모나스 주비니에게 G7의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하거나 통상적인 올리고뉴클레오티드 합성방법을 통해 취득할 수 있다. 본래 가야도모나스 주비니에게 G7의 유전체 내에 서열번호 3의 염기서열로 존재하지만, 이 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 태그(tag) 아미노산을 암호화하는 서열이 부가된 염기서열일 수 있다. 이때 태그는 예를 들어 단백질의 정제 등의 용이성을 위한 GST(Glutathione S-transferase) 서열 또는 다수개의 히스티딘(Histidine)이 연결된 형태의 아미노산일 수 있다.

[0042] 본 발명의 재조합 벡터는 상기와 같은 본 발명의 유전자를 함유하여 이루어진다. 이때 벡터는 숙주세포의 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.

[0043] 본 발명의 형질전환체는 상기와 같은 재조합 벡터를 숙주생물체에 도입하여 제조될 수 있다. 이때 숙주로는 다양한 생물체를 이용할 수 있을 것으로 판단되며, 본 발명 단백질의 안정적인 발현 또는 생산 효율을 위해 미생물을 이용하는 것이 보다 바람직할 것이다. 본 발명에 따르면 본 발명의 유전자가 대장균의 발현시스템에서도 매우 원활하게 발현될 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서 대장균을 숙주로 이용하여 형질전환체를 제조하면 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소를 매우 용이하게 생산할 수 있다. 숙주생물체의 형질전환은 각 숙주생물체에 이용되고 있는 통상의 형질전환방법을 적용하여 상기 재조합 벡터를 숙주생물체에 도입하는 방법으로 달성할 수 있다.

[0044] 본 발명의 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소 대량생산은 상기 형질전환체를 배양하고 상기 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.

[0045] 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.

[0046] [실시예]

[0047] 1. 재료 및 방법

[0048] 1-1. 미생물 및 벡터

[0049] 본 발명의 알파-네오아가로올리고당 가수분해효소(이하, 'α-NAOSH943'로 약기) 유전자를 클로닝하기 위해 가야도모나스 주비니에게 G7(*Gayadomonas joobiniege* G7)(ATCC BAA-2321 = DSM25250^T = KCTC23721^T)을 염색체 DNA 공급원으로 사용하였다(Chi et al. 2013). 유전자의 클로닝 및 발현을 위해, 플라스미드 pET-28a(+) 및 *Escherichia coli* ER2566을 사용하였다. *G. joobiniege* G7은 0.1%(w/v) 한천을 함유한 ASW(artificial sea water) 한천 플레이트 또는 ASW-YP 액체 배지에서 배양하였다(Kim and Hong 2012). 대장균은 LB(Luria-Bertani) 배지에서, 온도 37℃로 배양하였다. 필요한 경우 Kanamycin(50μg/ml)을 첨가했다.

[0050] 1-2. 효소와 화학 물질

[0051] 제한효소, T4 DNA 리가제 및 Taq 폴리머라제는 New England Bio Labs(Ipswich, MA, USA)에서 구입하였다. PCR 용 프라이머는 Genotech(한국)에서 제조하였다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich Corporation(St. Louis, MI, USA)에서 구입했다. TLC 실리카겔 플레이트(60G F254)는 Merck KGaA(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 표준품 NAOS는 DyneBio Inc.(성남, 한국)에서 구입했다.

[0052] 1-3. α-NAOSH943의 유전자 클로닝

[0053] *G. joobiniege* G7 세포를 ASW 한천 플레이트에서 24시간 배양하였다. ASW 한천 플레이트에서 자란 세포를 PBS 버퍼(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM NaHPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.4)에 현탁하고, 10,000×g에서 10분간 원심분리

하였다. 침전된 세포로부터 하이일드 게놈 DNA 미니 키트(RBC Company, Taiwan)를 사용하여 제조사가 추천하는 방법으로 염색체 DNA를 분리하였다. α -NAOSH943의 전체 코딩영역을 포함하는 1,272-bp의 DNA 단편을 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 이때 정방향 프라이머는 5'-AAGGTGAGCTAGCATGCAGCAAAATAGATT-3' (서열번호 5)(NheI 부위는 밑줄로 표시) 및 역방향 프라이머는 5'-ACTGAATGGATCCTTTTACTTATAATTTT-3' (서열번호 6)(BamHI 부위는 밑줄로 표시)를 사용하였다. 증폭 반응은 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient(Takara Bio, Japan)를 사용하여 수행하였고, 95°C의 초기 온도에서 5분 동안 평형화시킨 후, Ex-Taq 중합 효소로 96°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초 반응을 30회 실시하였으며, 마지막 반응은 72°C에서 10분 반응하였다. PCR 산물(1,301bp)(서열번호 7)을 제한효소(NheI 및 BamHI)로 절단한 후, NheI/BamHI으로 처리한 pET28a(+) 벡터에 연결시켰다. 완성된 재조합 플라스미드(pET28a-943)는 *E. coli* ER2566으로 형질 전환시켰다.

[0054] 1-4. α -NAOSH943의 발현 및 정제

[0055] *E. coli* ER2566/pET28a-943 세포를 50ml LB 배지에서 37°C에서 진탕배양하였다. 배양액의 600nm에서 광학밀도(OD600)가 0.6이 되었을 때, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 0.3mM(최종 농도) 농도로 첨가하고 28°C에서 12시간 배양하였다. 세포를 원심분리로 침전시켜, 5ml PBS 완충액에 재현탁하고, Branson Sonifier 450(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)을 사용하여 초음파 파쇄하였다. 원심분리 후 얻어진 상층액을 TALON metal affinity resin(Takara Bio, Japan)에 흡착시킨 후, His-tag을 갖는 재조합 α -NAOSH943($r\alpha$ -NAOSH943)을 200mM 이미다졸을 함유하는 PBS 완충액으로 용출시켰다. 정제된 단백질을 PBS 완충액(1 ℓ)으로 투석하여 이미다졸을 제거한 후, 추가 실험에 사용하였다. 단백질의 분자량과 순도는 SDS-PAGE(Laemmli, 1970), 단백질 농도는 Bradford(1976)의 방법에 따라 결정하였다.

[0056] 1-5. 겔 여과 크로마토그래피에 의한 $r\alpha$ -NAOSH943의 분자량 측정

[0057] 정제한 $r\alpha$ -NAOSH943의 분자량을 겔 여과 크로마토그래피로 측정하였다. 겔 여과 크로마토그래피는 AKTA-FPLC 시스템(GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA)에서 100mM NaCl을 함유하는 50mM Tris-HCl(pH 8.0)로 평형화된 Superose 12 10/300 GL 컬럼으로 실시하였다. 겔 여과는 실온에서 0.5ml/분의 유속으로 수행하였고, 단백질 용출을 280nm에서 모니터링하였다.

[0058] 1-6. 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)법에 의한 α -NAOSH 활성의 평가

[0059] 효소 활성을 측정하기 위해, 효소에 의해 기질로부터 유리된 환원당의 농도를 DNS 방법(Miller 1959)으로 측정하였다. NA2 기질 10 μ l(100 μ g)을 480 μ l의 50mM 시트레이트 완충액(pH 6)에 혼합한 후 10 μ l(15 μ g)의 효소를 반응에 첨가했다. 25°C에서 30분 반응 후, DNS 용액(DNS 6.5g, 2N NaOH 325ml, 글리세롤 45ml를 1 ℓ 증류수에 녹임) 500 μ l를 첨가하여 반응을 멈추게 하였다. 각 샘플을 100°C에서 10분간 열처리한 후, 2분간 얼음물에서 냉각시키고 540nm에서의 흡광도(A540)를 Spectronic Unicam Genesys 8 분광 광도계(Thermo Scientific™, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 생성된 환원당의 양은 기질만 함유(효소가 없는 반응)하는 공시험과 효소 반응의 값을 뺀 값으로 계산하였다. 정량용 직선은 D-갈락토오스를 환원당으로 사용하여 계산하였다.

[0060] 1-7. 효소의 생화학적 특성

[0061] α -NAOSH943 효소의 생화학적 특성연구를 위해 효소반응의 기질은 NA2를 사용하였고 반응시간은 30분 동안 실시하였다. 효소활성의 pH 프로파일은 25°C에서 30분 동안 다양한 pH(pH 4-11)범위에서 수행하였으며, 50mM 시트레이트 완충액(pH 4-6), 50mM 나트륨포스페이트 완충액(pH 6-9), 50mM 글리신-NaOH 완충액(pH 9-11)을 사용하였다. 효소활성의 온도 프로파일은 50mM 시트레이트 완충액(pH 6) 조건에서 0 ~ 60°C의 온도 범위에서 30분 동안 실시하였다.

[0062] 1-8. 가수분해 생성물의 박층크로마토그래피 및 질량 분석

[0063] $r\alpha$ -NAOSH943(5 μ g)을 50 μ g(5 μ l)의 기질(NA2, NA4 또는 NA6)과 함께 15 μ l의 반응 부피에서 25°C에서 16시간 동안 배양했다. TLC 실리카겔 플레이트(60G F254)에 가수분해생성물(10 μ l)을 스폿팅하고 용매(n-부탄올:에탄올:물=3:1:1, v/v)로 전개시켰다. 가수분해 생성물은 메탄올에 녹인 20%(v/v) 황산용액을 분무함으로써 발색하였다(Sugano et al.1994).

[0064] 질량 분광계 분석을 위해, 100 μ g 기질을 25°C에서 16시간 동안 30 μ l의 반응 부피에서 $r\alpha$ -NAOSH943(15 μ g)과 함께 배양했다. 반응물은 Eyela 원심 증발기 CVE-2000(EYELA, Japan)에서 건조시켰다. 건조된 반응산물은 메탄올에 녹여 Agilent 1200 series high-performance liquid chromatography system-4000 QTRAP MS/MS detector(AB SCIEX, Foster City, CA, USA)으로 메스(MS) 분석을 실시하였다. MS 스펙트럼의 분석 질량 범위는 150,000 ~

1,000m/z, 분석 해상도는 80,000(200m/z)를 사용했다.

[0065]

1-9. 다중서열정렬(Multiple sequence alignment)

[0066]

α -NAOSH943 아미노산 서열의 다중 서열 정렬에는 Clustal 프로그램 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)을 사용하였다.

[0067]

2. 결과

[0068]

2-1. α -NAOSH943의 생명정보학적 분석

[0069]

α -NAOSH943은 *G. jobiniege* G7(Kwak et al. 2012)의 게놈 분석으로부터 가상단백질(hypothetical protein)로 인용되었다. α -NAOSH943은 423개의 아미노산(서열번호 1)으로 구성되며, 예상 분자량은 48.1kDa이다. NCBI BLAST 조사 결과, α -NAOSH943은 *Saccharophagus degradans* 2-40(Ha et al. 2011)의 SdNABH와 36%, *Zobellia galactanivorans*의 AhgA(Rebuffet et al. 2011)와 40%의 상동성을 보이는 등, 지금까지 알려진 모든 α -NABH/NAOSH와 40% 이하의 낮은 상동성을 보였다(도 3 참조). 또한, glycosyl hydrolase family 43(GH43)의 잘 보존된 단백질 도메인(cd08992)이 Asn-61과 Asp-389사이의 넓은 영역에서 발견되었는데, e-value는 3.24×10^{-74} 이다(도 2 참조). 지금까지 보고된 모든 α -NABH/NAOSH는 GH43 도메인을 가지고 있지만, 이 효소들의 특이한 촉매 활성에 기반하여 새로운 패밀리에 GH117로 분류되고 있다(Rebuffet et al. 2011). 기존의 효소들과의 낮은 상동성으로 인해 가능성은 낮다고 생각하였지만, α -NAOSH943이 GH43 도메인을 보유하고 있다는 점에 착안하여 이 단백질의 α -NABH/ α -NAOSH로서의 생화학적 기능을 규명하기로 하였다.

[0070]

2-2. r α -NAOSH943의 이종 발현 및 정제

[0071]

SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 분석 결과, α -NAOSH943에는 신호 펩타이드가 존재하지 않아, 이 단백질은 세포내 단백질일 것으로 예상되었다. 따라서 전체 α -NAOSH943 단백질을 대장균에서 발현시켰으며, 정제를 위해 N-말단에 6xHis-tag을 포함한 20개의 아미노산이 추가된 형태(서열번호 2)로 발현되도록 고안하였다(도 4 및 5 참조). 결과, 발현하여 정제한 제조합 r α -NAOSH943 단백질은 SDS-PAGE 분석에서 예상 크기(50.26 kDa)와 일치하는 50kDa의 분자량을 가지는 것을 확인하였다(도 6 참조). 또한, Superose 12 10/300 GL 컬럼을 이용한 겔 여과 크로마토그래피에서 r α -NAOSH943가 약 93kDa의 겔보기 분자량을 가짐으로써 이 단백질이 다imer로서 존재함을 확인하였다(도 7 참조).

[0072]

2-3. r α -NAOSH943의 효소적 특성

[0073]

r α -NAOSH943은 0.2% 아가로스에 대한 어떠한 가수분해 활성도 나타내지 않았지만, NA2를 AHG(3,6-anhydro- α -L-galactose) 및 G(β -D-galactose)로 가수분해함을 TLC 분석으로 확인할 수 있었다. 또한, NA4와 NA6을 가수분해하여 AHG 및 나머지 부분에 해당하는 올리고당을 만드는 것을 확인하였다(도 8 참조).

[0074]

반응산물을 규명하기 위해 질량 분광계 분석을 실시하였다. 그 결과, r α -NAOSH943은 NA2를 가수분해하여 실제로 AHG(m/z 185 [M+Na]⁺) 및 G(m/z 203 [M+Na]⁺)에 해당하는 최종 산물을 만드는 것을 확인하였다(도 9 참조). 또한, NA4를 AHG(m/z 185 [M+Na]⁺)와 neoagarotriose(m/z 509 [M+Na]⁺)로 가수분해하고(도 10 참조), NA6는 AHG(m/z 185 [M+Na]⁺)와 neoagaropentaose(m/z 815 [M+Na]⁺)로 가수분해한다는 사실을 증명하였다(도 11 참조). 이러한 결과는 α -NAOSH943이 α -1,3-glycosidic 결합을 절단하여 비환원 말단에서 AHG만을 유리시키는 전형적인 exo-type의 1,3- α -3,6-anhydro-L-galactosidase(α -NAOSH)임을 증명한 것이다.

[0075]

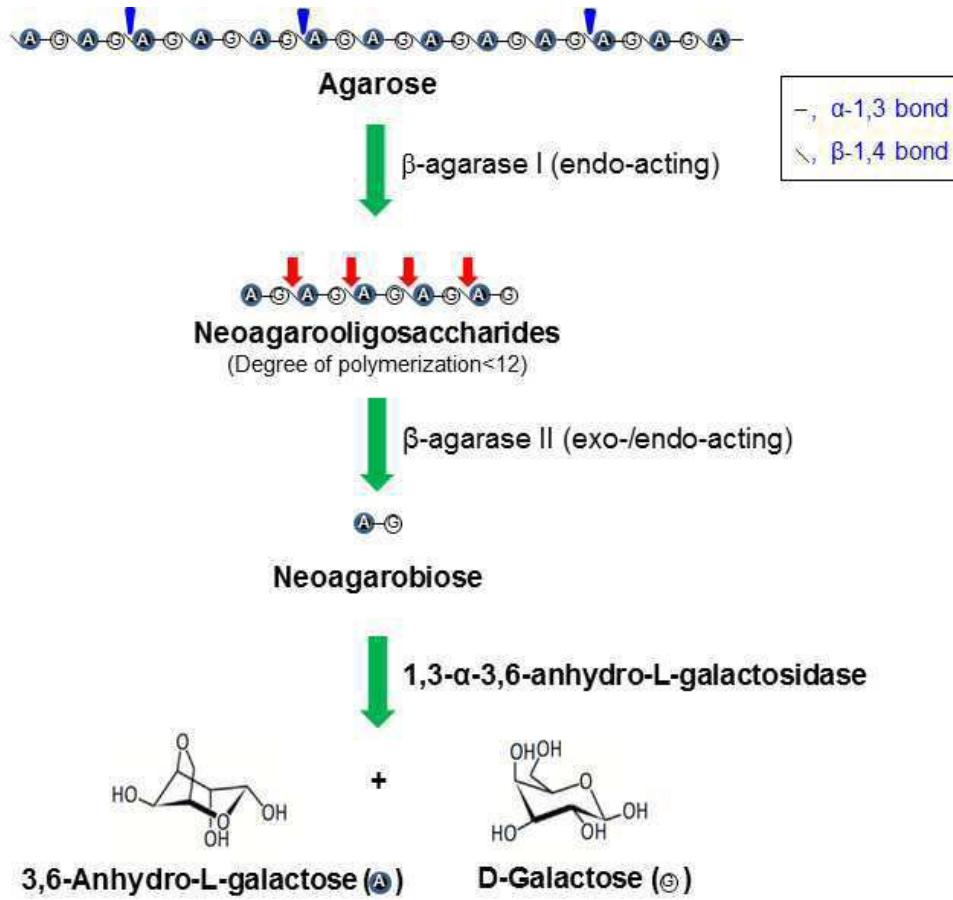
2-4. r α -NAOSH943의 생화학적 특성

[0076]

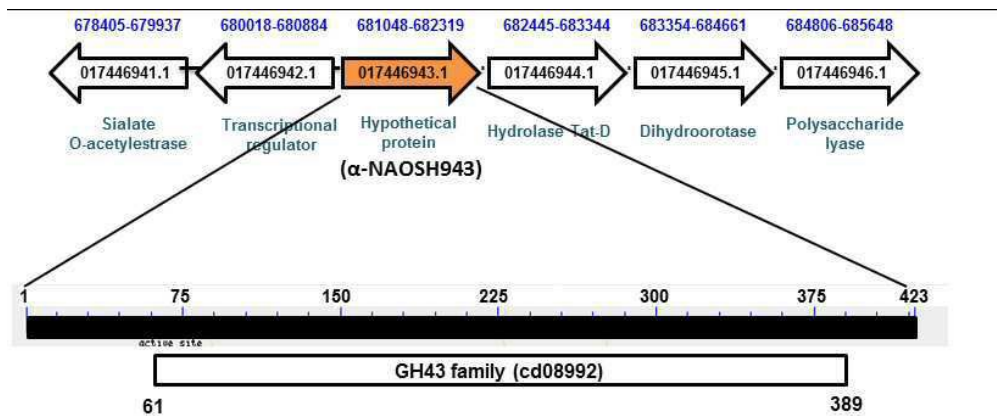
r α -NAOSH943의 생화학적 특성은 기질로서 NA2를 사용하여 연구하였다. 효소활성의 최적 pH는 6.0이며, pH 4-6의 산성범위에서 비교적 좋은 활성을 유지했다(도 12 참조). 최적온도는 25°C였으며, 25 ~ 30°C 범위에서 좋은 활성을 유지하였고, 0°C에서도 최대활성의 40% 활성을 보이는 등 저온에서의 효소반응도 가능할 것으로 판단된다(도 13 참조).

도면

도면1



도면2

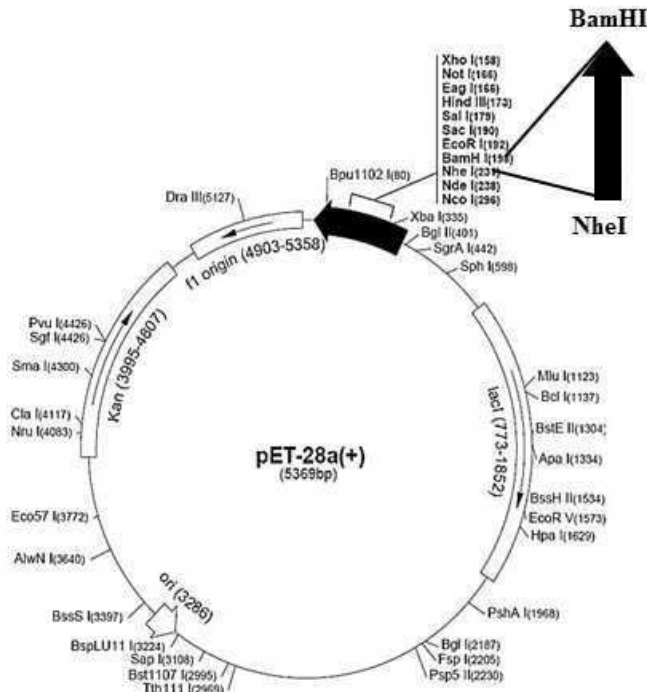


도면3

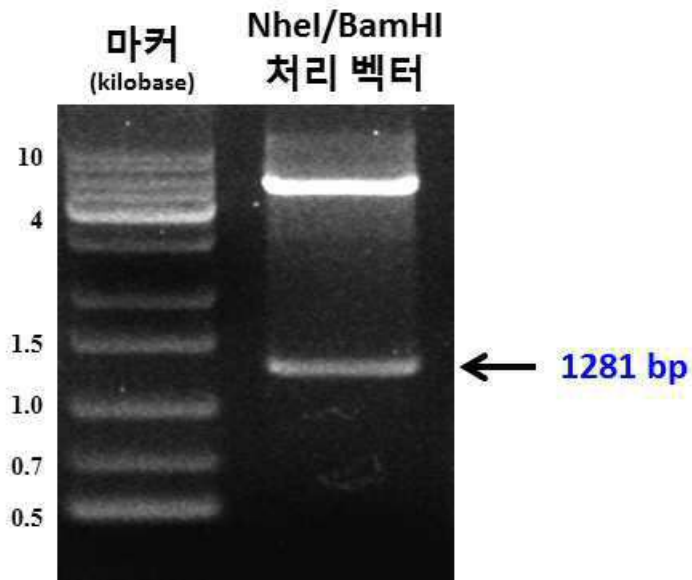
α-NAOSH943	MQ-QNRFTWLGLSLMAASYSLMAG-----QTI GAFPYDMPAEKPARPLSEAVA	47-
AhgA	MNKYSQFLIFAAVLVSACHSPKTTKEMKSTDDCPEKVTFTPEQIDHLGITDTHLSAASK	60-
SdNABH	-----MSDSKVNKKLSKASL	15-
	* * * *	
α-NAOSH943	RNYDNYMSPRQEKNELYSLFK-YTKLKGFDYNGEDGTVSRRPFSKI IKENGQYIWIYTKR	106-
AhgA	RALK-W--PTDLGHEWF IQFGPLQPLKG-DLA-YEEGVVRRPFSAI IKENGKYVWYYSKS	115-
SdNABH	RAIERG--YDEKGPWLFEDF-ITPLKG-DLA-YEEGVIRRPSAVLKVDDYHVWYTKG	70-
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
α-NAOSH943	HTKAVPVGLSNAHLASDEIP SADWDLADIWYATSKDGF TWQEQGVAVPRPPKQIGWRSV	166-
AhgA	TGPTQGFGGDIE----KDKVFPWDRCDI WYATSE DGWTWKEEPAVTRGEK GAYDDRSV	170-
SdNABH	EGETVGFSGDNP----EDKVF PWDKTEVWHATSKDKITWKEIGPAIQRGAAGAYDDRAV	125-
	: * : * : *	
α-NAOSH943	ATPDILKWKGYLYYQGFNAPSGLTDND CPVAVSVAESPDGPWKAINKV IIPNGK----	222-
AhgA	FTVEIMKWEDKYLYCYQTVKSPYNVRV-KNQVGLAWADSPDGPWTKSEEP ILSPADNGVW	229-
SdNABH	FTPEVLRHNGTYLYLVYQTVKAPYLNRS-LEHIAIAYS DSPFGPWTKSDAP ILSPENDGVW	184-
	* : : : : *	
α-NAOSH943	-----KGEWDQNSIH PPHIVHNGKIYLYYKADFDIRGSKDRPQAVRMQGLA	270-
AhgA	KGEEQDRFAVIKKGDFD SHKVP CIIPYKKG FYLYYKGEQMG E--AITFGGRQIRHGVA	287-
SdNABH	DTDEDNRFVLVKEKGSFDSHKVHPCLMFFNRFYLYYKGETMGE--SMNMGGREIKHGVA	242-
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
α-NAOSH943	IADNPLGPFKKHPLNPVLSGH TSLFPFKEGVAALI I RDGNERSTIQYAEDWVNFNIAS	330-
AhgA	IADNPKGPYKSPYNPISNSGH I CVWVYNGGIASLITTDGPEKNTIQWAPDGINFEIKS	347-
SdNABH	IADSP LGPYTKSEYNPITNSGH VAVWPYKGMATMLTTD GPEKNTQWAE DGINFDIMS	302-
	* *	
α-NAOSH943	VVELMP-NAAGFYVPDAFTD TKYGRGVTWGLSHFTAVNGWDTNHSQ LTRFDTLSLDLHD	389-
AhgA	VIPGVNAHAIGLNR TADVE-KEPTEILRWGLTHIYNN-GDYQSIMR--FSSERKTRHVA	402-
SdNABH	HIKGAP-EAVGFFRPESDS-DDPISGIEWGLSHKYDA-SWNWNYLC--FFKTRRQVL-D	355-
	: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
α-NAOSH943	PEMKKHNYKYSPEHHYKFGLSAKQKERIKNQNYK	423-
AhgA	KGVKKQ-----	408-
SdNABH	AGSYQQ-----TGDS-----GAV-----	368-
	: : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

AhgA *Zobellia galactanivorans*
SdNABH *Saccharophagus degradans* 2-40

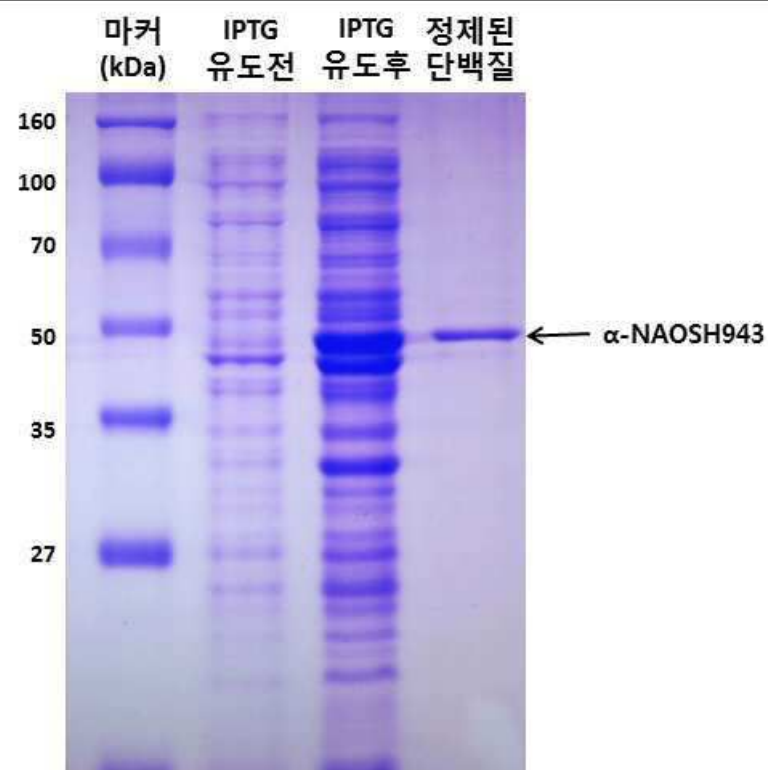
도면4



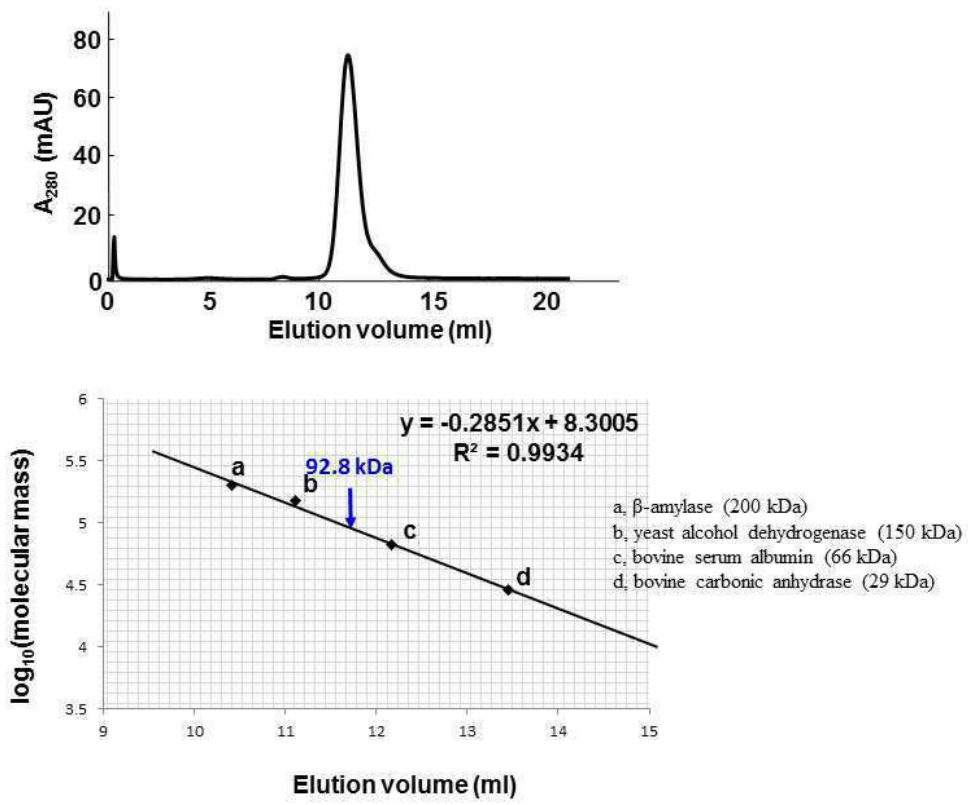
도면5



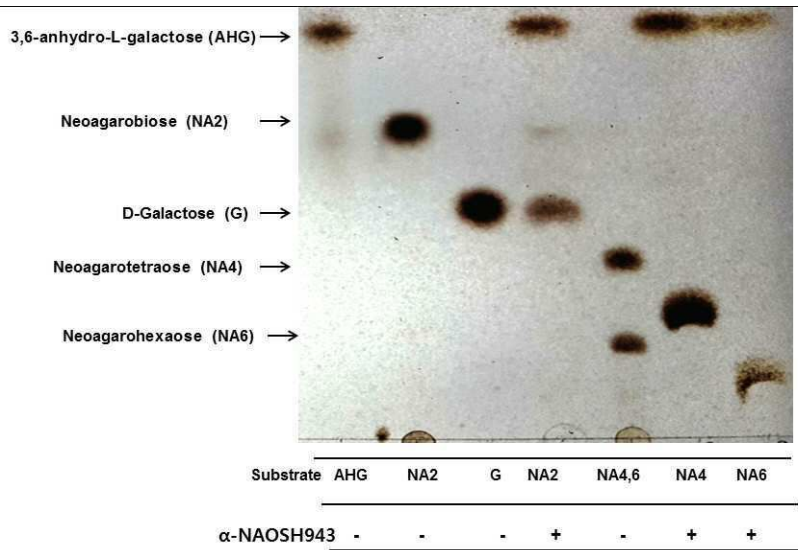
도면6



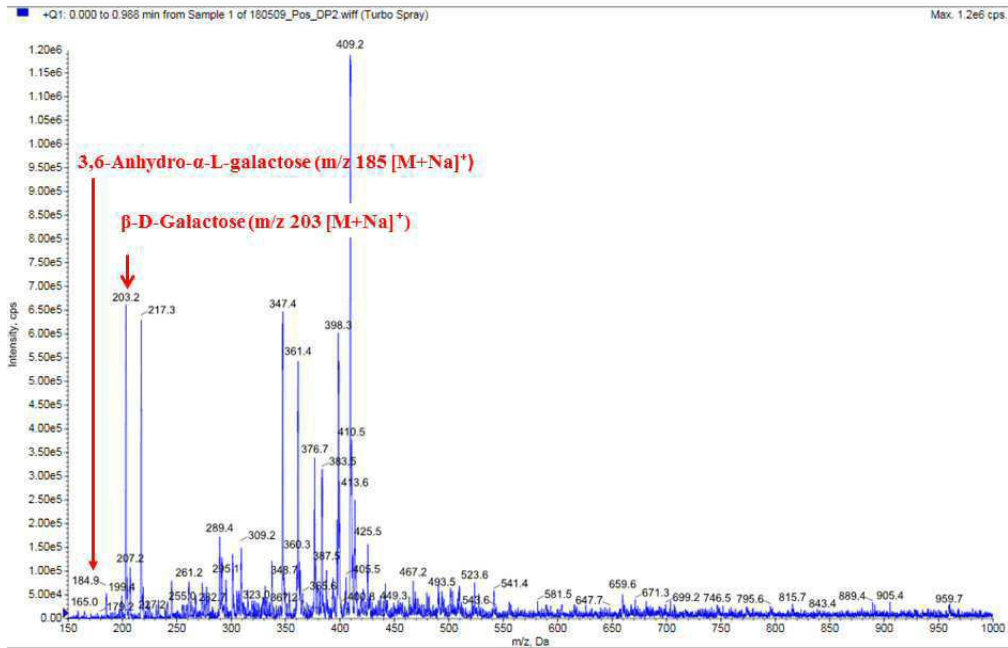
도면7



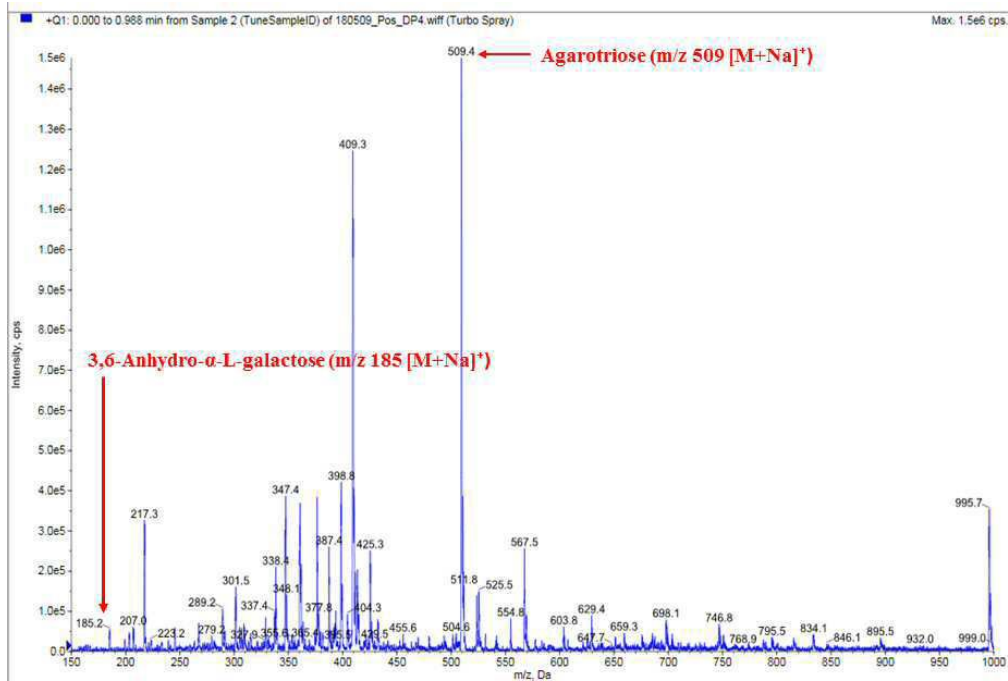
도면8



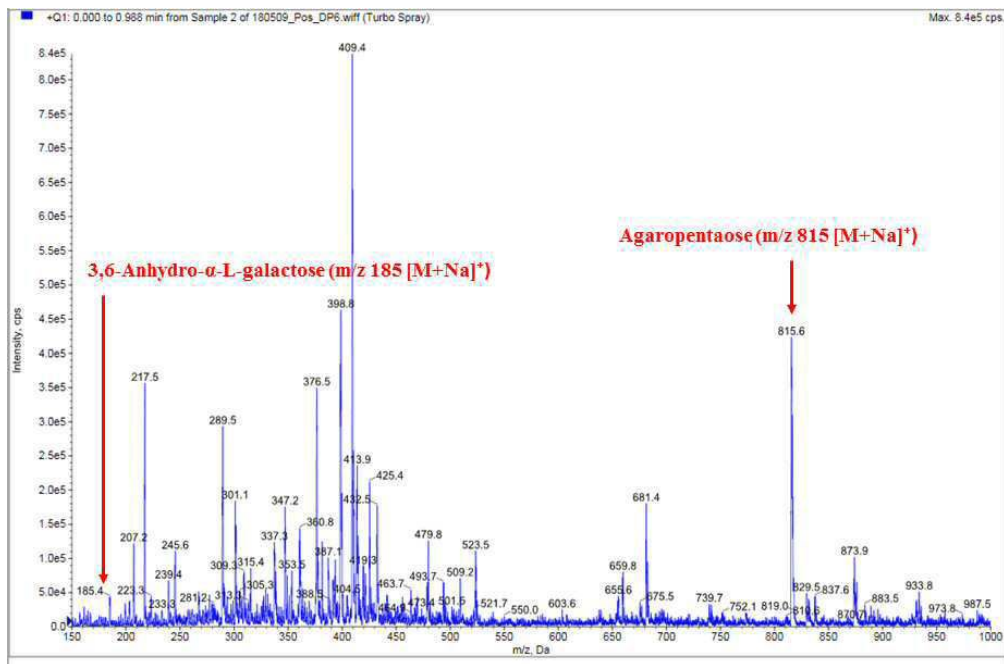
도면9



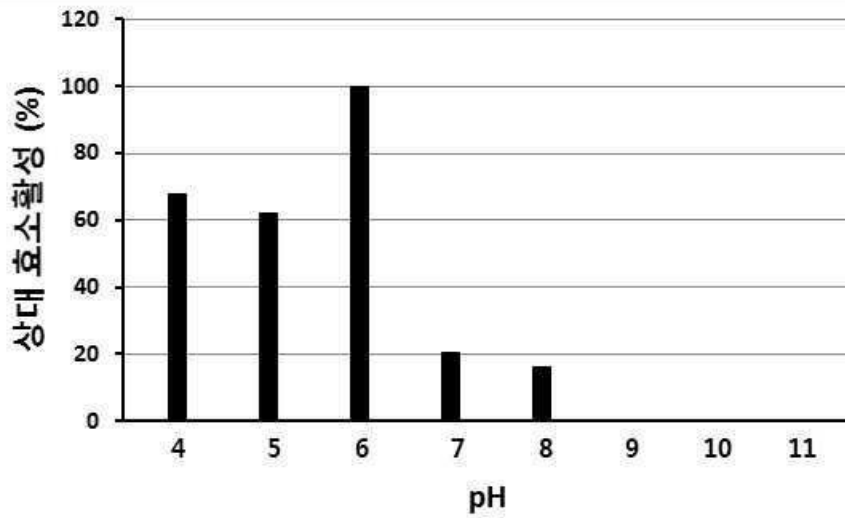
도면10



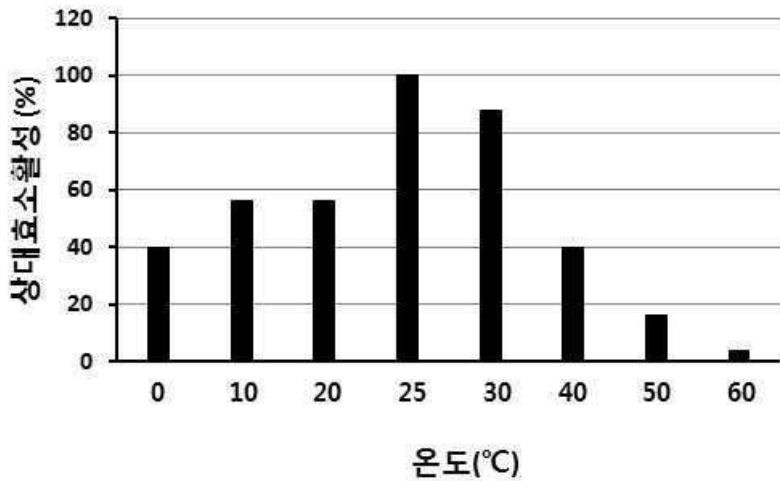
도면11



도면12



도면13



서열목록

- <110> Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation
- <120> Use of alpha-neoagarooligosaccharide hydrolase from Gayadomonas joobiniege G7
- <130> PA-D19221
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 423
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> Gayadomonas jubiniege G7
- <400> 1

Met Gln Gln Asn Arg Phe Thr Trp Leu Gly Leu Ser Leu Met Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ser Leu Met Ala Gly Gln Thr Ile Gly Ala Phe Pro Tyr Asp
 20 25 30
 Met Pro Ala Glu Lys Pro Ala Arg Pro Leu Ser Glu Ala Val Ala Arg
 35 40 45
 Asn Tyr Asp Asn Tyr Met Ser Pro Arg Gln Glu Lys Asn Glu Leu Tyr
 50 55 60
 Ser Leu Phe Lys Tyr Thr Lys Leu Lys Gly Phe Asp Tyr Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Asp Gly Thr Val Ser Arg Arg Asp Pro Ser Lys Ile Ile Lys Glu Asn
 85 90 95

 Gly Gln Tyr Tyr Ile Trp Tyr Thr Lys Arg His Thr Lys Ala Val Pro
 100 105 110
 Val Gly Leu Ser Asn Ala His Leu Ala Ser Asp Glu Ile Pro Ser Ala
 115 120 125
 Asp Trp Asp Leu Ala Asp Ile Trp Tyr Ala Thr Ser Lys Asp Gly Phe
 130 135 140
 Thr Trp Gln Glu Gln Gly Val Ala Val Pro Arg Pro Pro Lys Pro Gln
 145 150 155 160
 Ile Gly Trp Arg Ser Val Ala Thr Pro Asp Ile Leu Lys Trp Lys Gly
 165 170 175
 Lys Tyr Tyr Leu Tyr Tyr Gln Gly Phe Asn Ala Pro Ser Gly Leu Thr
 180 185 190
 Asp Asn Asp Cys Pro Val Ala Val Ser Val Ala Glu Ser Pro Asp Gly
 195 200 205
 Pro Trp Lys Ala Ile Asn Lys Val Ile Ile Pro Asn Gly Lys Lys Gly
 210 215 220
 Glu Trp Asp Gln Asn Ser Ile His Asp Pro His Pro Ile Val His Asn
 225 230 235 240

 Gly Lys Ile Tyr Leu Tyr Tyr Lys Ala Asp Phe Asp Arg Ile Arg Gly
 245 250 255
 Ser Lys Asp Arg Pro Gln Ala Val Arg Met Gln Gly Leu Ala Ile Ala
 260 265 270
 Asp Asn Pro Leu Gly Pro Phe Lys Lys His Pro Leu Asn Pro Val Leu
 275 280 285
 Asn Ser Gly His Glu Thr Ser Leu Phe Pro Phe Lys Glu Gly Val Ala
 290 295 300
 Ala Leu Ile Ile Arg Asp Gly Asn Glu Arg Ser Thr Ile Gln Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Asp Trp Val Asn Phe Asn Ile Ala Ser Val Val Glu Leu Met Pro

325 330 335
 Asn Ala Ala Gly Phe Tyr Val Pro Asp Ala Phe Thr Asp Thr Lys Tyr
 340 345 350
 Gly Arg Gly Val Thr Trp Gly Leu Ser His Phe Thr Ala Val Asn Gly
 355 360 365
 Trp Asp Thr Asn His Ser Gln Leu Thr Arg Phe Asp Thr Asp Leu Ser
 370 375 380

Leu Asp Leu His Asp Pro Glu Met Lys Lys His Asn Tyr Lys Tyr Ser
 385 390 395 400
 Pro Glu His His Tyr Lys Phe Gly Leu Ser Ala Lys Gln Lys Glu Arg
 405 410 415

Ile Lys Asn Gln Asn Tyr Lys
 420

<210> 2
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant sequence of alpha-NAOSH943
 <400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Gln Gln Asn Arg Phe Thr Trp Leu Gly Leu Ser
 20 25 30
 Leu Met Ala Ala Ser Tyr Ser Leu Met Ala Gly Gln Thr Ile Gly Ala
 35 40 45
 Phe Pro Tyr Asp Met Pro Ala Glu Lys Pro Ala Arg Pro Leu Ser Glu
 50 55 60
 Ala Val Ala Arg Asn Tyr Asp Asn Tyr Met Ser Pro Arg Gln Glu Lys
 65 70 75 80

Asn Glu Leu Tyr Ser Leu Phe Lys Tyr Thr Lys Leu Lys Gly Phe Asp
 85 90 95
 Tyr Asn Gly Glu Asp Gly Thr Val Ser Arg Arg Asp Pro Ser Lys Ile

aaacatccgc taaatccggt tttgaactca ggtcatgaaa cctcactttt cccgtttaaa 900
 gaggggtgttg ccgcacttat tatccgtgat ggcaacgagc gaagcaccat tcaatacgcc 960
 gaagactggg tcaattttaa catcgctct gtagttagt taatgccgaa tgccgctggt 1020
 ttttatgtac cggatgcttt tactgatact aaatatggcc gcggggtgac ttggggatta 1080
 tcgcatttta ctgcggtcaa tggttgggac acaaatcact cgcaattaac tcggtttgat 1140

 actgatttaa gtttagatct gcacgatect gagatgaaaa aacacaatta taaatacagt 1200
 ccagagcacc actacaaatt tggtttatcg gccaaacaaa aagaacgtat aaaaaaccaa 1260
 aattataagt aa 1272

 <210> 4
 <211> 1332
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant sequence of alpha-NAOSH943 gene
 <400> 4

 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60
 atgcagcaaa atagattcac atggctcgga ttaagcttaa tggccgcgag ctatagtttg 120

 atggctgggc aaacaattgg agccttccca tatgacatgc cggcagaaaa accggccccg 180
 ccattaagtg aagcggttgc gcgaaactat gataattaca tgtcgccaag acaagaaaaa 240
 aacgaactct attccttgtt caaatatacc aagctgaaag ggtttgacta caatggagaa 300
 gacggcacag tctcgcgccg cgaccctcc aaaattatta aagaaaacgg ccaatattat 360
 atctggtata ccaaagaca tactaaagct gtgcctgttg gtttagtaa tgcacatttg 420
 gcaagcgacg aaattccgtc ggctgactgg gatttggcag atatttgta tgccacttct 480
 aaagatggtt ttacttggca agagcaaggc gttgctgtgc cgcgtccacc caaacctcaa 540

 attggctggc gtcggttgc gacgccagat attttaaagt ggaaaggtaa atattacctt 600
 tattaccaag ggtttaatgc acctagcggga ctaactgaca acgattgcc agttgcagtt 660
 tcggttgcgg aatcaccaga cggtcctgga aaagccatca ataaagtgat tataccta 720
 ggcaaaaaag gagagtggga tcaaaactcc atccatgatc cacatcctat tgtccacaat 780
 ggcaaaatct acctgtatta caaagccgat tttgatcgca tacgtggcag taaagacaga 840
 ccacaagcag tacgtatgca agggtagcg attgcgata atccactagg gcctttttaa 900
 aaacatccgc taaatccggt tttgaactca ggtcatgaaa cctcactttt cccgtttaaa 960

 gaggggtgttg ccgcacttat tatccgtgat ggcaacgagc gaagcaccat tcaatacgcc 1020

gaagactggg tcaattttaa catgcctct gtagttgagt taatgccgaa tgccgctggt 1080
 ttttatgtac cggatgcttt tactgatact aaatatggcc gcggggtgac ttggggatta 1140
 tcgcatttta ctgcggtcaa tggttgggac acaaatcact cgcaattaac tcggtttgat 1200
 actgatttaa gtttagatct gcacgatcct gagatgaaaa aacacaatta taaatacagt 1260
 ccagagcacc actacaaatt tggtttatcg gccaaacaaa aagaacgtat aaaaaaccaa 1320
 aattataagt aa 1332

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for alpha-NAOSH943 gene

<400> 5

aaggtgagct agcatgcagc aaaatagatt 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for alpha-NAOSH943 gene

<400> 6

actgaatgga tcctttttac ttataatttt 30

<210> 7

<211> 1301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR product of alpha-NAOSH943 gene

<400> 7

aaggtgagct agcatgcagc aaaatagatt cacatggctc ggattaagct taatggccgc 60

gagctatagt ttgatggctg ggcaacaat tggagccttc ccatatgaca tgccggcaga 120

aaaaccggcc cggccattaa gtgaagcggc tgcgcgaaac tatgataatt acatgtcgcc 180

aagacaagaa aaaaacgaac tctattcctt gttcaaatat accaagctga aagggtttga 240

ctacaatgga gaagacggca cagtctcgcg ccgcgacccc tccaaaatta ttaaagaaaa 300

cggccaatat tatatctggt atacaaaag acatactaaa gctgtgcctg ttggtttgag 360

taatgacat ttggcaagcg acgaaattcc gtcggctgac tgggatttgg cagatatttg	420
glatgccact tctaaagatg gttttacttg gcaagagcaa ggcgttgctg tgccgcgtcc	480
accctaacct caaattggct ggcgctcggc tgcgacgcca gatatttta agtggaagg	540
taaatattac ctttattacc aagggtttta tgcacctagc ggactaactg acaacgattg	600
cccagttgca gtttcggtg cggaatcacc agacggtccg tggaaagcca tcaataaagt	660
gattatacct aatggcaaaa aaggagagtg ggatcaaac tccatccatg atccacatcc	720
tattgtccac aatggcaaaa tctacctgia ttacaaagcc gattttgatc gcatacgtgg	780
cagtaaagac agaccacaag cagtacgtat gcaagggtta gcgattgcgg ataatccact	840
agggcctttt aaaaaacatc cgctaaatcc ggttttgaac tcaggtcatg aaacctcact	900
tttcccgttt aaagagggtg ttgccgcact tattatccgt gatggcaacg agcgaagcac	960
cattcaatac gccgaagact gggtaaat taaatcgcc tctgtagtgt agttaatgcc	1020
gaatgccgct ggtttttatg taccgatgc ttttactgat actaaatag gccgcggggt	1080
gacttgggga ttatcgatt ttactgcgt caatggttg gacacaaatc actcgcaatt	1140
aactcggttt gatactgatt taagtttaga tctgcacgat cctgagatga aaaaacacia	1200
ttataaatac agtccagagc accactacia atttggttta tccgccaac aaaaagaacg	1260
tataaaaaac caaattata agtaaaaagg atccattcag t	1301