



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0014818

(43) 공개일자 2016년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/90 (2006.01) C12N 15/61 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0096253

(22) 출원일자 2014년07월29일

심사청구일자 2015년07월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박천석

경기 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49, 106동 1303호 (현대홈타운아파트)

서동호

경기 수원시 영통구 매영로425번길 2, 402호 (영통동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 변이된 수크로스이성화효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 수크로스로부터 트레할로스를 다량으로 생산할 수 있는 수크로스이성화효소로부터 유래된 변이된 수크로스이성화효소, 상기 변이된 수크로스이성화효소를 코당하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 수크로스이성화효소를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 변이된 수크로스이성화효소는 종래의 수크로스이성화효소에서는 나타내지 않았던 당전이 활성을 새로이 나타내고, 이에 따라 수크로스를 이용하여 다른 이탄당인 이소말토스를 생성할 수 있으므로, 당의 합성연구에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도14

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
PCSI : MLAGLSFSAVNYAATNHNEQDKTKVIAVNDGVSAPVWKKAEAVFYQVYPRSFKDSNGDGIGDLKGLTEKIDYLTGLGNAIWINPHYDSNTNGYDIRDYRKINKEYGTMDDFDLIA : 120
R325K : MLAGLSFSAVNYAATNHNEQDKTKVIAVNDGVSAPVWKKAEAVFYQVYPRSFKDSNGDGIGDLKGLTEKIDYLTGLGNAIWINPHYDSNTNGYDIRDYRKINKEYGTMDDFDLIA : 120
MLAGLSFSAVNYAATNHNEQDKTKVIAVNDGVSAPVWKKAEAVFYQVYPRSFKDSNGDGIGDLKGLTEKIDYLTGLGNAIWINPHYDSNTNGYDIRDYRKINKEYGTMDDFDLIA

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
PCSI : EMKKRDMRLMIDVVVNHSTNEHKWFVESKSKDNFYRDYIWRDGDGTTPNNYPSFFGGSAWQKDNVTCCYYLHYFGVQCPDLNWNPKVREEVYDMLRFWIDGVSGLRMDTVATFSK : 240
R325K : EMKKRDMRLMIDVVVNHSTNEHKWFVESKSKDNFYRDYIWRDGDGTTPNNYPSFFGGSAWQKDNVTCCYYLHYFGVQCPDLNWNPKVREEVYDMLRFWIDGVSGLRMDTVATFSK : 240
EMKKRDMRLMIDVVVNHSTNEHKWFVESKSKDNFYRDYIWRDGDGTTPNNYPSFFGGSAWQKDNVTCCYYLHYFGVQCPDLNWNPKVREEVYDMLRFWIDGVSGLRMDTVATFSK

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
PCSI : NPAFDLTPECLKNFAFYTYTQGNLHRYICEMHCKVLAKYDVVSAGEIFGVPLEEAPFIDQRKELDMAFSFDLIRLDRAVEEWRNRNWTLSQFRQINNRLVDMAGQYGWNTFFLSNH : 360
R325K : NPAFDLTPECLKNFAFYTYTQGNLHRYICEMHCKVLAKYDVVSAGEIFGVPLEEAPFIDQRKELDMAFSFDLIRLDRAVEEWRNRNWTLSQFRQINNRLVDMAGQYGWNTFFLSNH : 360
NPAFDLTPECLKNFAFYTYTQGNLHRYICEMHCKVLAKYDVVSAGEIFGVPLEEAPFIDQRKELDMAFSFDLIRLDRAVEEWRNRNWTLSQFRQINNRLVDMAGQYGWNTFFLSNH

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
PCSI : DNPRVSHFGDDRPWIRSAKALATLALTQRAATFFIYGGDELGMTNYPPTSLSEFDDIEVKGFWQDFVETGKVKPDVFLNVKQTSRDNSTPFFQWSNAEQAGFTTGPWFRINPNYKN : 480
R325K : DNPRVSHFGDDRPWIRSAKALATLALTQRAATFFIYGGDELGMTNYPPTSLSEFDDIEVKGFWQDFVETGKVKPDVFLNVKQTSRDNSTPFFQWSNAEQAGFTTGPWFRINPNYKN : 480
DNPRVSHFGDDRPWIRSAKALATLALTQRAATFFIYGGDELGMTNYPPTSLSEFDDIEVKGFWQDFVETGKVKPDVFLNVKQTSRDNSTPFFQWSNAEQAGFTTGPWFRINPNYKN

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
PCSI : INAEDQCNPDSEIFHFYRQLIALRHATPAFTYGAYQDLDPNNNEVLAYTRELNQCRYLVVVNFKEKPVHYALPKTSLKQTLLESGCKKVPAPNATSELELQFWQSGIYQLN : 591
R325K : INAEDQCNPDSEIFHFYRQLIALRHATPAFTYGAYQDLDPNNNEVLAYTRELNQCRYLVVVNFKEKPVHYALPKTSLKQTLLESGCKKVPAPNATSELELQFWQSGIYQLN : 591
INAEDQCNPDSEIFHFYRQLIALRHATPAFTYGAYQDLDPNNNEVLAYTRELNQCRYLVVVNFKEKPVHYALPKTSLKQTLLESGCKKVPAPNATSELELQFWQSGIYQLN

```

(72) 발명자

정종현

서울 강서구 양천로57길 37, 402동 504호 (가양동,
가양4단지아파트)

김민지

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107 장안현대홈타
운아파트 105동 1901호

남천현

충청남도 서천군 서천읍 사곡로 43번길 27-1

정동현

경기 수원시 영통구 덕영대로1681번길 13, 203호
(영통동)

특허청구의 범위

청구항 1

펙토박테리움 속 미생물(Pectobacterium carotovorum KKH 3-1)로부터 유래된 수크로스이성화효소(sucrose isomerase)의 235번 아미노산인 아르기닌이 리신으로 치환되어, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 변이된 수크로스이성화효소.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이된 수크로스이성화효소는 수크로스이성화효소 활성과 당전이효소활성을 나타내는 것인 변이된 수크로스이성화효소.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항에 있어서,

서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체.

청구항 7

(a) 제6항의 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 배양물로부터 제1항의 변이된 수크로스이성화효소를 회수하는 단계를 포함하는, 변이된 수크로스이성화효소의 제조방법.

명 세 서

기술분야

본 발명은 변이된 수크로스이성화효소 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 수크로스로부터 트레할로스를 다량으로 생산할 수 있는 수크로스이성화효소로부터 유래된 변이된 수크로스이성화효소, 상기 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 수크로스이성화효

[0001]

소를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

당은 생명체에서 사용되는 에너지를 공급하는 주요 공급원으로 사용되고, 생체내의 다양한 활성성분을 구성하는 구성요소로서 사용될 뿐만 아니라, 다양한 식품의 기호성을 증진시키는 물질로서 사용되고 있다. 최근에는, 식품의 기호성을 증진시키기 위한 목적으로 과량의 당이 생체내로 유입되고 있으며, 이러한 당의 과도한 유입으로 인한 위험성이 우려되고 있는데, 예를 들어, 심혈관 질환의 발병을 증가, 비만 및 당뇨병 질환의 발병을 증가, 면역체계 대사교란성 질환의 발병을 증가 등이 우려되고 있다. 이러한 위험성을 저하시키기 위하여, 당의 과도한 유입을 억제하거나, 당의 유입량을 감소시키거나, 유입된 당을 효과적으로 소모시키거나, 위험성이 낮은 당을 개발하는 방안 등이 연구되고 있다.

[0003]

상기 방안 중에서 위험성이 낮은 당을 개발하려는 방안은 식품의 기호성을 증진시킬 수 있으면서도, 당의 과도한 유입으로 인한 위험성을 저하시키는 효과를 나타내기 때문에, 다양한 당 대용품을 개발하는 방향으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 지금까지 개발된 당 대용품은 크게 천연 화합물과 인공 화합물로 구분되는데, 상기 천연 화합물로는 이소말톨로스, 스테비아, 타가토스, 타우마린, 에리트ρί톨, 말티톨, 자일리톨 등이 알려져 있고, 상기 인공 화합물로는 아세실팜 칼륨, 아스파탐, 네오타, 사카린, 수크랄로스 등이 알려져 있다. 상기 당 대용품 중에서 인공 화합물은 제조가 용이하여 생산단가가 낮다는 장점이 있는 반면, 생체에 미치는 영향에 대한 연구가 아직 미흡하여 그의 사용이 제한되고 있는 반면, 천연 화합물은 생체에 대한 안전성이 입증되었다는 장점이 있는 반면, 상대적으로 생산단가가 높다는 단점이 있다. 현재로서는, 인공 화합물의 생체에 미치는 영향을 연구하는 것 보다는, 천연 화합물의 생산단가를 저하시키는 연구가 더욱 효율적인 것으로 간주되고 있어, 천연 화합물의 생산단가를 저하시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004]

상기 천연 화합물 중에서 이소말톨로스(palatinose™, α-D-글루코피라노실-1,6-D-프럭토폴라노스)는 수크로스(α-D-글루코피라노실-1,2-D-프럭토폴라노스)의 이성질체로서, 수크로스와 동일한 칼로리를 나타내지만, 글리세믹 지수(glycemic index, GI)가 낮아서, 이의 분해로부터 생성되는 글루코스 단량체가 혈액내로 천천히 유입되므로, 당뇨병 환자용 식품의 감미료로 사용될 수 있다고 알려져 있고, 고지혈증 환자에게 투여할 경우에는 혈관 병증에 대한 내성을 증진시킨다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, 우수한 산 안정성, 낮은 흡습성 등의 물리화학적 특성이 규명되고 있어, 상기 이소말톨로스의 사용범위가 확대되고 있는 실정이다.

[0005]

상기 이소말톨로스는 수크로스를 효소처리하여 생산될 수 있는데, 부산물로서 트레할룰로스(trehalulose 또는 α-D-글루코피라노실-1,1-d-프럭토폴라노스)가 함께 생성되며, 이러한 효소활성은 엔테로박터 속(*Enterobacter* sp.) 미생물, 에르위니아 속(*Erwinia* sp.) 미생물, 클렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 미생물, 판토에아 속(*Pantoea* sp.) 미생물, 프로타미노박터 속(*Protaminobacter* sp.) 미생물 등의 다양한 미생물에서 확인되었는데, 이들 미생물로부터 발현되는 수크로스이성화효소(sucrose isomerase) 또는 이소말톨로스 합성효소(isomaltulose synthase, siase, EC5.4.99.11)가 수크로스를 이소말톨로스 및 트레할룰로스로 전환시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 대부분의 수크로스이성화효소는 이소말톨로스를 트레할룰로스 보다는 더 많이 생성하는데, 일부 균주(*Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 및 *Agrobacterium radiobacter* MX-232)에서 발현되는 수크로스이성화효소는 트레할룰로스를 이소말톨로스보다도 더 많이 생산한다고 알려져 있다. 상기 미생물에서 수크로스이성화효소가 발현되는 원인은 상기 미생물의 특성과 연관된 것으로 알려져 있다. 즉, 상기 미생물 들은 대부분 식물체에 기생하는 미생물로서, 대부분의 식물체가 탄소원으로서 수크로스를 사용하고 있으므로, 식물체로부터 얻어진 수크로스를 식물체가 사용하지 못하는 이소말톨로스 또는 트레할룰로스로 전환시켜, 미생물의 생존성을 향상시키기 위하여, 상기 수크로스이성화효소가 발현되는 것으로 예측되고 있다.

[0006]

한편, 상술한 장점에도 불구하고, 이소말톨로스는 수크로스보다도 수용성이 낮아서, 식품의 사용이 제한되고 있다. 예를 들어, 잼, 음료 등에 수크로스 대신 이소말톨로스를 사용할 경우, 일정시간 동안 보관된 후에는 제품 내에서 이소말톨로스의 재결정화가 발생하여, 제품의 품질이 저하되는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로서, 이소말톨로스와 함께 생성되는 트레할룰로스를 사용하는 방안이 검토되고 있다. 트레할룰로스는 이소말톨로스와 유사한 특성을 나타내지만 수크로스와 동일한 수준의 수용성을 나타내기 때문에, 이소말톨로스를 대체할 수 있을 것으로 예상되었다. 다만, 수크로스이성화효소에 의하여 이소말톨로스보다 상대적으로 적은 양으로 생성되기 때문에, 이의 생산단가가 상대적으로 높아져, 산업적인 활용성이 낮다는 문제점이 있다.

[0007]

이러한 문제점을 해결하기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제1992-0008192호에는

슈도모나스(*Pseudomonas* sp.) 또는 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.) 속에 속하는 미생물에서 발현된 트레할로로스 생성효소를 이용하여 수크로스로부터 트레할로로스를 다량으로 생산하는 기술이 개시되어 있고, 미국공개특허 제2013-0295617호에는 껍토박테리움 속 미생물(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692)로부터 유래된 수크로스 이성화효소를 이용하여 수크로스로부터 트레할로로스를 생산하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 아직까지는 트레할로로스의 생산성이 낮아서, 산업적으로 트레할로로스를 이용하는데 어려움이 있으며, 이러한 어려움을 해결하기 위하여, 보다 높은 생산성으로 트레할로로스를 생산할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0008]

이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 높은 생산성으로 트레할로로스를 생산할 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 이소말토로스에 비하여 트레할로로스를 다량으로 생산하는 균주를 발굴하고, 이로부터 발현되는 수크로스이성화효소가 수크로스로부터 트레할로로스를 대량으로 생산할 수 있음을 확인하였으며, 상기 수크로스이성화효소의 변이체는 종래의 수크로스이성화효소에서 나타내지 못한 효소활성을 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명의 하나의 목적은 껍토박테리움 속 미생물(*Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1)로부터 유래된 수크로스 이성화효소로부터 유래된 변이된 수크로스이성화효소를 제공하는 것이다.

[0010]

본 발명의 다른 목적은 상기 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0011]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0012]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0013]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 수크로스이성화효소를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014]

본 발명자들은 보다 높은 생산성으로 트레할로로스를 생산할 수 있는 기술을 개발하고자, 종래의 수크로스이성화효소를 발현시키는 다양한 균주를 수크로스를 포함하는 배지에서 배양하고, 트레할로로스와 이소말토로스를 생산하는 균주를 1차 선별하였다. 상기 선별된 균주 중에서 트레할로로스의 생산성이 가장 우수한 균주를 선별하고, 이를 동정한 결과, 껍토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주(*Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1)임을 확인하였다. 상기 확인된 균주에서 수크로스이성화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하고 이의 서열을 결정정한 결과, 상기 폴리뉴클레오티드는 종래에 알려지지 않은 새로운 수크로스이성화효소를 코딩하는 유전자임을 확인하였다.

[0015]

상기 유전자로부터 수크로스이성화효소를 발현시키고, 이의 특성을 규명한 결과, 약 69kDa의 크기를 갖고, pH 5.0 내지 10.0에서 활성을 나타내며, pH 6.0에서 최대 활성을 나타내고, 글리신·NaOH 완충액(pH 9)에서는 최대 활성의 50% 이상을 유지하며, 55℃에서 25.7분의 반감기를 나타내고, 변성온도(melting temperature)가 55.5 ± 0.6℃이며, 30 내지 50℃의 온도범위에서 효소활성을 나타내고, 40℃에서 최적 활성을 나타내며, 반응온도가 낮을수록 트레할로로스의 생산성이 증가함을 확인하였다.

[0016]

아울러, 상기 수크로스이성화효소의 3차원 구조를 분석한 결과, 활성부위에 존재하는 235번 아르기닌이 중요한 역할을 수행하고, 상기 아르기닌을 리신으로 치환할 경우에는 효소의 활성부위의 구조가 변화되지 않으면서도, 효소활성이 변화될 것으로 예측하였다. 이를 입증하고자, 상기 235번 아르기닌이 리신으로 치환되어 변이된 수크로스이성화효소를 생산하고, 이의 활성을 야생형 수크로스이성화효소와 비교한 결과, 야생형 수크로스이성화효소와는 전혀 상이한 활성을 나타내며, 종래의 수크로스이성화효소에서는 나타나지 않았던 당전이 활성이 새로이 생성됨을 확인하였다. 끝으로, 이러한 당전이 활성에 따라, 수크로스를 기질로 사용하고 변이된 수크로스이성

화효소의 효소반응을 수행할 경우, 이소말토스가 새로운 반응산물로서 생성됨을 확인할 수 있었다.

- [0017] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 펙토박테리움 속 미생물(*Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1)로부터 유래된 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 수크로스로부터 대량의 트레할로스를 생산할 수 있는 신규한 수크로스이성화효소(sucrose isomerase)를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 용어 "수크로스이성화효소(sucrose isomerase)"란, 특정 물질에 작용하여 그의 분자입체구조 또는 특정 원자단의 배치를 변화시키는 효소인 이성화효소 중에서 수크로스를 대상으로 작용하는 효소를 의미하는데, 대체로 수크로스를 이소말토스로 또는 트레할로스로 변화시키는 효소를 의미한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 수크로스이성화효소는 펙토박테리움 속 미생물의 일종인 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1(*Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1) 균주로부터 유래된 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 수크로스로부터 대량의 트레할로스를 생산할 수 있는 신규한 수크로스이성화효소로 해석될 수 있는데, 수크로스로부터 이소말토스 보다도 트레할로스를 대량으로 생산하는 효소활성을 나타낼 수 있는 한, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0020] 아울러, 수크로스로부터 이소말토스 보다도 트레할로스를 대량으로 생산하는 효소활성을 나타낼 수 있다면, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질도 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소의 범주에 포함될 수 있다.
- [0021] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 서열번호 1의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 단백질의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다.
- [0022] 끝으로, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법으로 제조하거나, 상기 수크로스이성화효소를 코딩하는 유전자를 PCR에 의해 증폭하거나 공지된 방법으로 합성한 후 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 수크로스로부터 이소말토스와 트레할로스를 생성한다는 점에서는 종래의 수크로스이성화효소와 유사하지만, 상기 이소말토스 보다도 트레할로스를 더 많이 생산할 수 있다는 점에서 종래의 수크로스이성화효소와 구별된다. 뿐만 아니라, 효소반응온도에 따라, 수크로스로부터 생성되는 트레할로스와 이소말토스의 생산함량비가 변화되는데, 반응온도가 낮을수록 트레할로스의 생성량이 증가하고, 반응온도가 증가할수록 이소말토스의 생성량이 증가한다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소의 변성온도(T_m)는 55.5℃이고, 25 내지 55℃에서 효소활성을 나타낼 수 있으며, 30 내지 50℃에서는 최대활성의 60% 이상을 나타낼 수 있다. 본 발명자들이 규명한 바에 의하면, 상기 30 내지 50℃에서 본 발명의 수크로스이성화효소를 이용하여 수크로스로부터 트레할로스와 이소말토스를 생성할 경우, 50℃에서는 트레할로스와 이소말토스를 1:1(w/w)의 비율로 생성할 수 있으나, 30℃에서는 트레할로스와 이소말토스를 약 4:1(w/w)의 비율로 생성할 수 있으며, 이러한 특성을 갖는 수크로스이성화효소는 지금까지 어떠한 균주로부터도 공지되지 않았으며, 본 발명자에 의하여 최초로 밝혀진 것이다.
- [0024] 실제로, 본 발명의 수크로스이성화효소를 발현시키는 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주와 유사한 균주인 펙토박테리움 카로토보룸 브라질리엔시스 PBR1692(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692) 균주로부터 발현되는 수크로스이성화효소가 본 발명에서 제공하는 것과 유사한 특성을 나타냄이 공지되어 있다(미국특허공개 제2013-0295617호). 상기 공지된 균주에서 발현되는 수크로스이성화효소는 1 내지 30℃에서 트레할로스와 이소말토스를 95:5 내지 63:37(w/w)의 비율로 포함하는 반응산물을 생성할 수 있는데, 동일한 반

응온도에서는 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소에 비하여 트레할로스의 생산성이 상대적으로 낮은 수준을 나타낸다. 예를 들어, 30℃의 반응온도에서 본 발명의 수크로스이성화효소는 트레할로스와 이소말토스를 약 4:1(w/w)의 비율로 생성할 수 있으나, 공지된 상기 수크로스이성화효소는 트레할로스와 이소말토스를 약 1.7:1(w/w)의 비율로 생성할 수 있으므로, 본 발명의 수크로스이성화효소는 트레할로스의 생산성의 측면에서, 공지된 수크로스이성화효소보다도 약 2.3배 증가된 효소활성을 나타낸다고 할 수 있다. 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 효소활성을 증진시키기 위하여 인위적으로 변이시킨 것이 아니라, 자연계에 존재하는 미생물로부터 자연적으로 발현되는 것이라는 점을 감안한다면, 공지된 효소보다도 약 2.3배 증가된 효소활성을 나타내는 효소를 새로이 발굴한 것은 극히 이례적인 것이라 할 수 있다.

[0025] 이에, 본 발명자들은 본 발명에서 제공하는 신규한 수크로스이성화효소를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 상기 효소의 아미노산 서열을 2013년 8월 13일자로 GenBank에 기탁하고, 등록번호(accession number) KF317210.1을 부여받았다.

[0026] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 트레할로스의 생산성이 우수할 뿐만 아니라, 반응온도를 조절함에 따라, 생성되는 트레할로스와 이소말토스의 비율을 매우 큰 폭으로 변화시킬 수 있다는 특성을 나타내는데, 상기 인용한 종래의 수크로스이성화효소는 트레할로스를 이소말토스에 비하여 적어도 1.7배 이상의 비율로 생산함에 반하여, 본 발명의 수크로스이성화효소는 트레할로스와 이소말토스를 동일비율로 생산할 수도 있다는 특징을 나타낸다.

[0027] 이러한 특성은 산업적으로 매우 중요한 의미를 나타낸다. 즉, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소를 이용하여 트레할로스와 이소말토스를 산업적으로 생산할 때, 요구되는 트레할로스와 이소말토스의 생산요구량이 크게 변화될 경우에도, 설비의 별다른 변경없이 반응온도만을 조절하는 것만으로도, 상기 변화된 생산요구량을 맞출 수 있다. 아직까지는 트레할로스 보다는 이소말토스가 산업적으로 더 넓은 범위에서 사용되고 있어, 트레할로스 보다는 이소말토스의 수요량이 많다는 점을 감안한다면, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 종래의 수크로스이성화효소에 비하여 산업적인 유용성이 매우 높다고 할 수 있다. 즉, 본 발명의 수크로스이성화효소는 이소말토스의 생산을 위하여도 사용될 수 있다는 것이다.

[0028] 아울러, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소의 최적활성을 나타낼 수 있는 pH 범위는 pH 5.0 내지 7.0의 중성범위로서, 위험성이 높은 극단적인 pH 수준(예를 들어, 강산성 또는 강알칼리성)이 요구되지도 않으므로, 본 발명의 수크로스이성화효소를 사용할 경우, 생산단계에서 안전성을 최대한 보장할 수 있다는 장점도 있다.

[0029] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 수크로스이성화효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드를 구성하는 염기서열은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열 또는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 2의 염기서열 또는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 2의 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있다.

[0031] 또한, 수크로스로부터 이소말토스 보다는 트레할로스를 대량으로 생산하는 효소활성을 나타낼 수 있는 단백질을 코딩할 수 있는 한, 상기 염기서열과 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드의 범주에 포함될 수 있는데, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있다.

[0032] 한편, 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌

(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리메스테르, 포스포이트, 포스포아미다이트 및 H-포스포이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

[0033] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0034] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적절한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전자 삽입물을 포함하고, 상기 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0035] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질을 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 수크로스이성화효소의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다. 아울러, 상기 발현벡터는 수크로스이성화효소의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩타이제제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광 분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드를 발현시켜서 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화 효소를 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEpl3, YEp24 및 YCp50), λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus), 배큘로바이러스(baculovirus) 등이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[0039] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.

- [0040] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시켜서 제작되고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 본 발명의 수크로스이성화효소를 생산하는데 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 제공하는 상기 발현벡터가 도입될 수 있는 숙주세포는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에, 스킨조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내는 본 발명의 수크로스이성화효소를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl_2 침전법, CaCl_2 침전법에 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 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 본 발명의 수크로스이성화효소를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0044] 구체적으로, 본 발명의 수크로스이성화효소를 제조하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 수크로스이성화효소를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0045] 또 다른 방법으로서, 본 발명의 수크로스이성화효소를 제조하는 방법은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계; (b) 상기 수득한 폴리뉴클레오티드를 클로닝하여 발현벡터를 수득하는 단계; (c) 상기 수득한 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및, (d) 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 mRFP를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0046] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 수크로스이성화효소를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch processes)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0047] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족시킬 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

- [0048] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0049] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 상기 수크로스이성화효소의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성될 수 있다.
- [0050] 아울러, 배양물로부터 상기 수크로스이성화효소를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 본 발명의 수크로스이성화효소를 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0051] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 수크로스이성화효소의 235번 아미노산인 아르기닌이 리신으로 치환되어, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 변이된 수크로스이성화효소를 제공한다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 변이체는 본 발명자들이 수크로스이성화효소의 3차원 구조분석을 통해 설계한 것이다. 상기 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소는 수크로스로부터 트레할로스와 이소말토스를 생성하면서도, 부산물인 글루코스 또는 프럭토스를 거의 생성하지 않는 특성을 나타내는데, 이의 원인을 3차원 구조분석을 통해 분석한 결과, 수크로스는 상기 수크로스이성화효소의 촉매잔기인 223번 아스파르트산, 287번 글루탐산 및 361번 아스파르트산에 의해 분해되고, 이에 의하여 생성된 프럭토실 모이어티는 아로마틱 클램프(289번과 313번의 페닐알라닌)에 결합되고 325번 아르기닌과 수소결합을 형성하여, 가수분해산물이 발생되지 않을 것으로 분석되었다. 또한, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소와 바실러스 세레우스에서 유래된 올리고-1,6-글루코시다제(BCOGL)는 서로 다른 효소활성을 나타내지만, 이들의 활성부위를 비교하면, 구조적으로 볼 때, 325번 아미노산이 아르기닌(수크로스이성화효소)인지 아니면 리신(BCOGL)인지의 만 차이가 있을 뿐, 거의 유사한 구조를 나타내므로, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소의 325번 아르기닌을 리신으로 치환하면 효소 활성부위의 구조적인 변화를 유발하지 않고서도 효소활성이 변화된 수크로스이성화효소를 생성할 수 있을 것으로 예상하고, 통상적인 PCR 방법을 이용하여 목적하는 변이된 수크로스이성화효소를 제작하였다. 상기 변이된 수크로스이성화효소의 활성을 평가한 결과, 예상했던 바와 같이 수크로스로부터 이소말토스와 트레할로스를 생성하면서 동시에 그의 부산물인 글루코스와 프럭토스를 다량으로 생성함을 확인하였는데, 예상외로 추가적인 부산물이 생성됨을 확인하고, 이의 물성을 규명한 결과, 이소말토스임을 확인하였다.
- [0053] 상기 변이된 수크로스이성화효소는 그의 특성에 부합되도록 수크로스로부터 이소말토스와 트레할로스를 생성하고, 예측한 바와 같이 부산물인 글루코스와 프럭토스를 생성한다는 점에서는 종래의 수크로스이성화효소와 유사한 특성을 나타낸다고 할 수 있으나, 추가적으로 이소말토스를 생성하는 효과는 종래의 수크로스이성화효소로부터 보고되지 않았던 특성이며, 본 발명의 변이된 수크로스이성화효소를 통해 최초로 규명된 것이다.
- [0054] 이소말토스는 두개의 글루코스가 결합되어 생성된 이당류로서 글루코스와 프럭토스가 결합된 구조를 갖는 수크로스, 이소말토스와 트레할로스와는 전혀 다른 구조를 나타내므로, 상기 이소말토스의 생성은 수크로스이성화효소의 활성에 의하여 생성된 것은 아니라고 분석되었다. 이는, 상기 3차원 구조를 통해 예상된 바와 같이, 수크로스이성화효소의 촉매잔기인 223번 아스파르트산, 287번 글루탐산 및 361번 아스파르트산에 의해 수크로스가 분해되면서, 부산물로서 생성된 글루코스에 다른 글루코스가 전이되어 생성되었을 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여, 변이된 수크로스이성화효소에 수크로스와 글루코스를 가하여 반응시킨 결과, 이소말토스의 생성량이 증대됨을 확인하였다. 따라서, 상기 변이된 수크로스이성화효소는 수크로스이성화효소의 활성에 더불어 당전이효소로서의 활성이 겸비된 것임을 확인할 수 있었다.

[0055] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 본 발명의 수크로스이성화효소를 제조하는 방법을 제공한다.

[0056] 상기 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열 또는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 4의 염기서열 또는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 2의 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있는데, 그외의 특성은 상술한 바와 동일하다. 아울러, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 본 발명의 수크로스이성화효소를 제조하는 방법 역시 상술한 바와 동일하다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에서 제공하는 변이된 수크로스이성화효소는 종래의 수크로스이성화효소에서는 나타내지 않았던 당전이 활성을 새로이 나타내고, 이에 따라 수크로스를 이용하여 다른 이탄당인 이소말토스를 생성할 수 있으므로, 당의 합성연구에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 이소말톨로스와 트레할로로스를 생산하는 11종의 균주의 배양상등액(A) 또는 상기 배양상등액에 인버타제를 처리한 반응산물(B)을 TLC 분석에 적용한 결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 G 레인은 글루코스를 나타내고, F 레인은 프럭토스를 나타내며, S 레인은 수크로스를 나타내고, P 레인은 이소말톨로스를 나타내며, T 레인은 트레할로로스를 나타내고, 1번 레인은 13번 균주를 나타내며, 2번 레인은 14번 균주를 나타내고, 3번 레인은 15번 균주를 나타내며, 4번 레인은 16번 균주를 나타내고, 5번 레인은 23번 균주를 나타내며, 6번 레인은 24번 균주를 나타내고, 7번 레인은 33번 균주를 나타내며, 8번 레인은 34번 균주를 나타내고, 9번 레인은 39번 균주를 나타내며, 10번 레인은 44번 균주를 나타내고, 11번 레인은 45번 균주를 나타낸다.

도 2는 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주를 4종의 서로 다른 배지에서 배양하고, 균주의 증식수준(A)과 균주로부터 발현된 수크로스이성화효소의 활성(B)을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 배지에 포함된 수크로스의 농도에 따른 수크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에서 제공하는 신규한 수크로스이성화효소의 아미노산 서열을 공지된 수크로스이성화효소의 서열과 비교분석한 결과를 나타내는데, 수크로스 이성질화 모티프(RLDRD)는 적색 박스로 표시되었고, PCSI는 본 발명의 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1(Pectobacterium carotovorum KKH 3-1) 유래 효소를 나타내고, MutB는 슈도모나스 메소엑시도필라 MX-45(Pseudomonas mesoacidophila MX-45) 유래 효소를 나타내며, FMB-1은 엔테로박터 속 FMB-1(Enterobacter sp. FMB-1) 유래 효소를 나타내고, ERSI는 에르위니아 라폰티시 NCPPB 1578(Erwinia rhapontici NCPPB 1578) 유래 효소를 나타내며, PalI는 클렙시엘라 속 균주 LX3(Klebsiella sp. strain LX3) 유래 효소를 나타내고, KPSI는 클렙시엘라 플랜티콜라 UQ 14S(Klebsiella planticola UQ 14S) 유래 효소를 나타내며, PDSI는 판토에아 디스퍼사 UQ68J(Pantoea dispersa UQ68J) 유래 효소를 나타내고, SmuA는 프로타미노박터 루브럼 CBS574·77(Protaminobacter rubrum CBS574·77) 유래 효소를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 수크로스이성화효소를 정제하는 과정에서 얻어진 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 음성대조군(대장균 BL21)을 나타내고, 2번 레인은 세포 파쇄물을 나타내며, 3번 레인은 정제된 재조합 수크로스이성화효소를 나타낸다.

도 6은 재조합 수크로스이성화효소의 반응조건에 따른 활성변화를 나타내는데, (A)는 pH 변화에 따른 재조합 수

크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 소듐 아세테이트 완충액(pH 4.0-5.0)을 나타내고, (○)는 소듐 시트레이트 완충액(pH 5.0-6.0)을 나타내며, (▼)는 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.0-8.0)을 나타내고, (△)는 Tris-HCl 완충액(pH 7.0-9.0)을 나타내며, (■)는 글리신-NaOH 완충액(pH 9.0-10.0)을 나타내고; (B)는 온도 변화에 따른 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프이다.

도 7은 재조합 수크로스이성화효소의 온도특성을 나타내는데, (A)는 온도변화에 따른 효소활성의 변화를 로그값으로 표시한 그래프로서, (●)는 50℃를 나타내고, (○)는 55℃를 나타내며, (▼)는 60℃를 나타내고; (B)는 재조합 수크로스이성화효소의 변성온도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 재조합 수크로스이성화효소의 3차원 구조분석 결과를 나타내는데, 8a는 SmuA에 기반한, 수크로스이성화효소의 3차원 예상구조이고, 8b는 수크로스이성화효소 활성부위(결정구조)의 확대도이며, 8c는 수크로스 결합된 수크로스이성화효소 활성부위(결정구조)의 확대도로서, 구성요소는 연회색 만화형식으로 표현하고; 측매잔기인 D223, E287 및 D361는 분홍색으로 표시하며; 리간드와의 반응잔기인 D94, H137, R231, R325, H360 및 R448은 노란색으로 표시하고; 아로마틱 클램프 부위인 F289 및 F313는 적색으로 표시하며; RLDRD 모티프인 R317, L318, D319, R320 및 A321는 청색으로 표시하고; 리간드는 녹색막대로 표시하였다.

도 9는 바실러스 세레우스에서 유래된 올리고-1,6-글루코시다제(BCOGL)와 수크로스이성화효소의 각각의 활성부위를 3차원 구조분석하고 이를 비교한 결과로서, (A)는 BCOGL을 나타내고, (B)는 수크로스이성화효소를 나타낸다.

도 10은 수크로스 결합된 수크로스이성화효소(A) 및 변이된 수크로스이성화효소(B)의 활성부위를 연회색 만화형식으로 표시한 결과를 나타낸다.

도 11은 상기 활성부위를 연회색 표면으로 표시한 결과를 나타낸다.

도 12는 PCR 방법으로 수득한 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 7,140bp의 폴리뉴클레오타이드를 아가로스 겔 전기영동한 사진으로서, M 레인은 DNA 마커이고, 1번 레인은 pET-PCSI에서 증폭된 PCR 단편이다.

도 13은 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터인 pET-R325K의 벡터맵을 나타낸다.

도 14는 수크로스이성화효소의 아미노산 서열과, 발현벡터 pET-R325K가 도입된 형질전환체의 DNA로부터 유추된 변이된 수크로스이성화효소의 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타내는데, 치환된 잔기는 적색박스로 표시되었고, PCSI는 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1에서 유래된 수크로스이성화효소를 나타내고, R325K는 변이된 수크로스이성화효소를 나타낸다.

도 15는 pET-R325K로부터 변이된 수크로스이성화효소를 발현시키고, Ni-NTA 친화성 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제한 산물을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으로서, M 레인은 표준마커를 나타내고, 1번 레인은 음성대조군(대장균)을 나타내며, 2번 레인은 세포파쇄물을 나타내고, 3번 레인은 정제된 변이된 수크로스이성화효소를 나타낸다.

도 16은 수크로스이성화효소(검은색)와 변이된 수크로스이성화효소(적색)의 반응산물을 HPAEC로 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 트레할로스를 나타내며, 5번 피크는 이소말토스를 나타낸다.

도 17의 (A)는 수크로스이성화효소(검은색) 및 변이된 수크로스이성화효소(적색) 반응산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다.

도 17의 (B)는 글루코스를 사용하여 수행된 수크로스이성화효소(검은색) 및 변이된 수크로스이성화효소(적색)의 효소반응에 따라 생성된 반응산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다.

도 18의 (A)는 변이된 수크로스이성화효소의 반응산물을 recycling preparative HPLC 시스템에 적용한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 18의 (B)는 recycling preparative HPLC 시스템을 통해 수득한 9개의 분획 중에서 3번 분획을 HPAEC 분석에 적용한 결과를 나타내는 그래프로서, 검은색 그래프는 변이된 수크로스이성화효소 반응산물을 나타내고, 적색은 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다.

도 19의 (A)는 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획을 α -글루코시다제로 분해한 분해산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 검은색은 α -글루코시다제를 처리하지 않은 3번 분획을 나타내고, 적색은 α -글루코시다제를 처리한 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 미지물질을 나타낸다.

도 19의 (B)는 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획과 이소말토스를 HPAEC 분석에 적용한 결과를 나타내는 그래프로서, 검은색은 이소말토스를 나타내고, 적색은 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고 2번 피크는 미지물질을 나타낸다.

도 20은 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획의 TLC 분석결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 표준 글루코스를 나타내고, 2번 레인은 표준 프럭토스를 나타내며, 3번 레인은 표준 수크로스를 나타내고, 4번 레인은 표준 이소말토스를 나타내며, 5번 레인은 상기 3번 분획을 나타내고, 6번 레인은 1% 이소말토스를 나타낸다.

도 21은 다양한 6탄당에 대한 변이된 수크로스이성화효소의 당전이활성을 HPAEC 분석을 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 6탄당으로서 알로스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타내고, (B)는 6탄당으로서 갈락토스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타내며, (C)는 6탄당으로서 만노스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1: 트레할로로스 생산균주의 선발

[0061] 7종의 엔테로박터 속 미생물, 3종의 판토에아 속 미생물 및 43종의 팩토박테리움 속 미생물을 포함하는 53종의 식물연관 미생물을 야채 및 과일나무를 포함하는 다양한 작물로부터 분리하고, 분리된 균주를 LB 배지(1% (w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 및 1% (w/v) NaCl 포함)에서 배양하였다. 배양된 균주를 5 ml SPY(4% sucrose, 1% peptone, and 0.4% yeast extract, pH 6.5) 배지에 접종하고, 격렬하게 교반하면서 30℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 배양산물을 분석하여, 이소말토로스와 트레할로로스를 생산하는 11종의 균주(13, 14, 15, 16, 23, 24, 33, 34, 39, 44 및 45번 균주)를 1차 선발하였다.

[0062] 상기 선발된 균주의 배양물을 (4℃, 12,000 × g)하여 배양상등액을 수득하고, 이를 TLC 분석에 적용하였다. 구체적으로, 상기 배양상등액 3 μ l를 110℃에서 30분동안 활성화된 실리카겔 플레이트(silica gel K5F plates)에 점적하고, 전개액(에틸아세테이트:아세트산:물=4:3:0.8, v/v/v)을 상기 플레이트 상온에서 2회 가하였다. 이어, 상기 플레이트를 공기건조시키고, 발색시약(0.5%(w/v) N-(1-나프틸)-에틸렌디아민 및 5% (v/v) H₂SO₄이 용해된 메탄올)에 침지하여 발색시켰으며, 이를 110℃ 오븐에서 10분 동안 건조시켜서 당이 점적된 부위를 나타내었다(도 1의 (A)). 또한, 상기 배양상등액에 인버타제(invertase, Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 반응시킨 반응산물을 대상으로 동일한 방법을 수행하였다(도 1의 (B)). 이때, 표준물질로서, 글루코스, 프럭토스, 수크로스, 이소말토로스 및 트레할로로스를 사용하였다.

[0063] 도 1은 이소말토로스와 트레할로로스를 생산하는 11종의 균주의 배양상등액(A) 또는 상기 배양상등액에 인버타제를 처리한 반응산물(B)을 TLC 분석에 적용한 결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 G 레인은 글루코스를 나타내고, F 레인은 프럭토스를 나타내며, S 레인은 수크로스를 나타내고, P 레인은 이소말토로스를 나타내며, T 레인은 트레할로로스를 나타내고, 1번 레인은 13번 균주를 나타내며, 2번 레인은 14번 균주를 나타내고, 3번 레인은 15번 균주를 나타내며, 4번 레인은 16번 균주를 나타내고, 5번 레인은 23번 균주를 나타내며, 6번 레인

은 24번 균주를 나타내고, 7번 레인은 33번 균주를 나타내며, 8번 레인은 34번 균주를 나타내고, 9번 레인은 39번 균주를 나타내며, 10번 레인은 44번 균주를 나타내고, 11번 레인은 45번 균주를 나타낸다. 도 1에서 보듯이, 균주에 따라 트레할로스 및 이소말토스를 생산하는 수준이 서로 상이함을 확인하였다. 즉, 14번 균주(2번 레인), 16번 균주(4번 레인), 44번 균주(10번 레인) 및 45번 균주(11번 레인)는 대부분의 수크로스로부터 대량의 이소말토스와 트레할로스를 생성하였고, 13번 균주(1번 레인), 15번 균주(3번 레인) 및 39번 균주(9번 레인)는 일부의 수크로스로부터 일정수준의 이소말토스와 트레할로스를 생성하였으며, 23번 균주(5번 레인), 24번 균주(6번 레인) 및 33번 균주(7번 레인)는 미량의 수크로스로부터 소량의 이소말토스와 트레할로스를 생성하였고, 34번 균주(8번 레인)는 다양한 산물을 생성하였다. 또한, 배양상등액에 인버타제를 처리하여 배지내에 존재하는 수크로스를 글루코스와 프럭토스로 분해한 경우에는, 13번 균주(1번 레인), 15번 균주(3번 레인), 23번 균주(5번 레인), 24번 균주(6번 레인), 33번 균주(7번 레인), 34번 균주(8번 레인) 및 39번 균주(9번 레인)는 배양물에 잔류하는 수크로스가 분해되어 글루코스와 프럭토스를 형성하였으나, 14번 균주(2번 레인), 16번 균주(4번 레인), 44번 균주(10번 레인) 및 45번 균주(11번 레인)는 배양물에 잔류하는 수크로스가 없어서 글루코스와 프럭토스가 형성되지 못함을 확인하였다. 이에 따라, 모든 수크로스를 이소말토스와 트레할로스로 전환시킨 4종의 균주(14, 16, 44 및 45번 균주)를 2차 선발하였다.

[0064] 상기 2차 선발된 균주의 배양액을 HPAEC 분석법에 적용하여, 생성된 당을 정량하였다. 구체적으로, 상기 2차 선발된 균주의 배양상등액을 여과하여 불순물을 제거하고, 불순물이 제거된 각 배양상등액을 ED50 전기화학적 검출기가 구비된 Dionex model DX-600 시스템에 연결된 분석용 CarboPac PA1 컬럼(0.4 cm × 25 cm; Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA)에 적용한 다음, 200 mM NaOH를 사용하여 1 ml/min의 속도로 10 내지 40분동안 선형구배에 의한 등용매 분리를 수행하여 각각의 당을 정량분석하였다. 그 결과, 45번 균주에서 이소말토스와 트레할로스의 생산수율이 가장 우수함을 확인하여, 상기 45번 균주를 최종 선발하였다.

[0065] 상기 최종 선발된 45번 균주를 동정한 결과, 상기 45번 균주는 펙토박테리움 속 미생물의 일종인 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1(*P. carotovorum* KKH 3-1)임을 확인하였다.

[0066] 실시예 2: 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주의 특성분석

[0067] 상기 실시예 1에서 최종 선발된 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주를 LB 배지, 영양배지(NB; 0.5% peptone and 0.3% beef extract), 우수배지(TB; 1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, and 0.4% glycerol) 및 펩톤-효모추출물 함유 배지(PY; 1% peptone and 0.4% yeast extract)에 각각 접종하고 30℃에서 30시간 동안 배양한 다음, 균주의 증식정도 및 각 균주에서 발현된 수크로스이성화효소의 활성을 비교하였다(도 2).

[0068] 도 2는 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주를 4종의 서로 다른 배지에서 배양하고, 균주의 증식수준(A)과 균주로부터 발현된 수크로스이성화효소의 활성(B)을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, TB 배지에서 배양된 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주는 가장 높은 증식수준과 가장 낮은 수크로스이성화효소 활성을 나타낸 반면, PY 배지에서 배양된 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주는 낮은 증식수준과 가장 높은 수크로스이성화효소 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0069] 이어, 상기 PY 배지에 0 내지 20%(w/v)의 수크로스를 가하여, 서로 다른 함량의 수크로스를 포함하는 배지를 제작하고, 상기 제작된 각 배지에 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주를 접종한 후, 30℃에서 30시간 동안 배양하고, 수크로스이성화효소의 활성을 측정하였다(도 3). 이때, 수크로스이성화효소의 활성은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 방법을 사용하여 수행하였고, 수크로스이성화효소 1unit의 활성도는 1분동안 1 μM 의 수크로스 이성질체를 제조할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

[0070] 도 3은 배지에 포함된 수크로스의 농도에 따른 수크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 14%(w/v)까지의 수크로스를 포함하는 배지에서는 수크로스의 함량이 증가할 수록 수크로스이성화효소의 활성이 증가하였으나, 그 이상의 수크로스를 포함하는 배지에서는 수크로스의 함량이 증가할 수록 수크로스이성화효소의 활성이 감소함을 확인하였다.

[0071] 실시예 3: 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주로부터 유래된 수크로스이성화효소 유전자의 클로닝

[0072] 실시예 3-1: 수크로스이성화효소 유전자의 규명

[0073] 먼저, 다양한 수크로스이성화효소에서 보존적인 아미노산 서열에 기초하여 하기 프라이머를 설계하였다.

[0074] 정방향 프라이머: 5'-CAT ATG TAC GAA CAA GTC TCC CAC TCG-3'(서열번호 5)

[0075] 역방향 프라이머: 5'-CTC GAG AAG CTG TAA CCA ATA AAA GCC-3'(서열번호 6)

[0076] 다음으로, 상기 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주의 배양물로부터 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 설계한 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 DNA 단편을 획득하였다. 이때, PCR은 95℃ 5분, 25 사이클(95℃ 30초, 55℃ 30초 및 72℃ 2분) 및 72℃ 5분의 조건으로 수행하였다. 상기 획득한 DNA 단편의 염기서열을 분석하고(서열번호 1), 분석된 염기서열을 BLASTN 및 BLASTP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 적용하여 뉴클레오타이드 서열 및 이로부터 유추된 아미노산 서열(서열번호 2)의 동일성을 검색하였다(도 4).

[0077] 도 4는 본 발명에서 제공하는 신규한 수크로스이성화효소의 아미노산 서열을 공지된 수크로스이성화효소의 서열과 비교분석한 결과를 나타내는데, 수크로스 이성질화 모티프(RLDRD)는 적색 박스로 표시되었고, PCSI는 본 발명의 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1(*Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1) 유래 효소를 나타내고, MutB는 슈도모나스 메소엑시도필라 MX-45(*Pseudomonas mesoacidophila* MX-45) 유래 효소를 나타내며, FMB-1는 엔테로박터 속 FMB-1(*Enterobacter* sp. FMB-1) 유래 효소를 나타내고, ERSI는 에르위니아 라폰티시 NCPPB 1578(*Erwinia rhapontici* NCPPB 1578) 유래 효소를 나타내며, PalI는 클렙시엘라 속 균주 LX3(*Klebsiella* sp. strain LX3) 유래 효소를 나타내고, KPSI는 클렙시엘라 플랜티콜라 UQ 14S(*Klebsiella planticola* UQ 14S) 유래 효소를 나타내며, PDSI는 판토에아 디스퍼사 UQ68J(*Pantoea dispersa* UQ68J) 유래 효소를 나타내고, SmuA는 프로타미노박터 루브럼 CBS574·77(*Protaminobacter rubrum* CBS574·77) 유래 효소를 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 상기 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주로부터 유래된 수크로스이성화효소는 아미노산 서열의 측면에서 종래의 다른 미생물로부터 유래된 수크로스이성화효소와 동일하지 않은 아미노산 서열로 구성됨을 확인하였다. 뿐만 아니라, 본 발명의 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주와 동일한 속에 속하는 펙토박테리움 속 미생물(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692)로부터 유래된 수크로스이성화효소와도 약 95%의 동일성을 나타낼 뿐, 완전히 동일하지는 않은 새로운 아미노산 서열로 구성됨을 확인하였다.

[0078] 이에, 본 발명자들은 상기 신규한 수크로스이성화효소를 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 상기 효소의 아미노산 서열을 2013년 8월 13일자로 GenBank에 기탁하고, 등록번호(accession number) KF317210.1을 부여받았다.

[0079] 실시예 3-2: 수크로스이성화효소 유전자의 클로닝, 발현 및 정제

[0080] 상기 실시예 3-1에서 획득한 DNA 단편을 정제키트(QIA quick Gel extraction kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)에 적용하여 정제하고, 상보적 제한효소 절단부위를 사용하여 pGEMT-easy 벡터에 클로닝하였다. 이어, 클로닝된 벡터에서 수크로스이성화효소 유전자를 추출하고, 추출된 유전자를 pET-21a(+) 벡터에 도입하여 발현벡터인 pET-PCSI를 제작하였다. 이때, 상기 발현벡터에서 발현된 수크로스이성화효소는 단백질의 C-말단에 6개의 히스티딘이 결합된 형태로 발현되도록 발현벡터를 설계하였다.

[0081] 상기 제작된 발현벡터 pET-PCSI를 대장균 BL21에 도입하여 형질전환체를 획득하고, 획득한 형질전환체를 0.1 mg/ml의 엠포실린이 포함된 1L의 LB 배지에 접종한 다음, 37℃에서 교반하면서 배양하였다. 600 nm에서 배양물의 흡광도가 0.5가 될 때, 1 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 가하여 37℃에서 3시간 동안

수크로스이성화효소의 발현을 유도하였다. 그런 다음, 배양물을 4℃에서 6000 × g 로 20분 동안 원심분리하여 균체를 수득하고, 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)으로 2회 세척하였다. 상기 세척된 균체를 10ml의 세포용해 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 및 10 mM 이미다졸, pH 7.0)에 현탁시키고, 냉온수조에서 초음파를 처리(4분 × 5분, output control 4, 50% duty cycle; VC-600, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)한 다음, 4℃에서 12,000 × g 로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 수득하였다.

[0082] 상기 상등액을 세포용해 완충액으로 평형화시킨 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) 친화성 컬럼 크로마토그래피에 적용하고, 세척용 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸, pH 7.0)으로 3회 세척한 다음, 용출완충액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸, pH 7.0)을 사용하여 재조합 수크로스이성화효소를 용출하였다. 끝으로, 용출된 재조합 수크로스이성화효소를 포함하는 분획을 투석하여 과량의 이미다졸을 제거함으로써, 재조합 수크로스이성화효소를 정제하였다(도 5).

[0083] 도 5는 본 발명의 수크로스이성화효소를 정제하는 과정에서 얻어진 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 음성대조군(대장균 BL21)을 나타내고, 2번 레인은 세포 파쇄물을 나타내며, 3번 레인은 정제된 재조합 수크로스이성화효소를 나타낸다.

[0084] 실시예 4: 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1 균주로부터 유래된 수크로스이성화효소의 특성 평가

[0085] 상기 실시예 3-2에서 정제한 재조합 수크로스이성화효소의 특성을 분석하였다.

[0086] 실시예 4-1: pH 변화에 따른 효소활성분석

[0087] 소듐 아세테이트 완충액(pH 4.0-5.0), 소듐 시트레이트 완충액(pH 5.0-6.0), 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.0-8.0), Tris-HCl 완충액(pH 7.0-9.0) 및 글리신-NaOH 완충액(pH 9.0-10.0)의 조건하에서, 상기 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 DNS 방법으로 측정된 후, 비교하였다(도 6의 (A)).

[0088] 도 6의 (A)는 pH 변화에 따른 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 소듐 아세테이트 완충액(pH 4.0-5.0)을 나타내고, (○)는 소듐 시트레이트 완충액(pH 5.0-6.0)을 나타내며, (▼)는 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.0-8.0)을 나타내고, (△)는 Tris-HCl 완충액(pH 7.0-9.0)을 나타내며, (■)는 글리신-NaOH 완충액(pH 9.0-10.0)을 나타낸다. 도 6의 (A)에서 보듯이, pH 5.0 내지 7.0에서 재조합 수크로스이성화효소가 높은 활성을 나타내었고, pH 6.0에서 최적 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0089] 실시예 4-2: 온도 변화에 따른 효소활성분석

[0090] 25 내지 60℃의 온도조건하에서, 상기 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 DNS 방법으로 측정된 후, 비교하였다(도 6의 (B)).

[0091] 도 6의 (B)는 온도 변화에 따른 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 나타내는 그래프이다. 도 6의 (B)에서 보듯이, 30 내지 50℃의 온도조건하에서 재조합 수크로스이성화효소가 높은 활성을 나타내었고, 40℃에서 최적 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0092] 실시예 4-3: 반감기온도(half-life temperature) 측정

[0093] 소듐 시트레이트 완충액(pH 6.0)에서 50, 55 및 60℃의 온도조건하에서 30분동안 상기 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화를 측정하여, 반감기온도를 결정하였다(도 7의 (A)).

[0094] 도 7의 (A)는 온도변화에 따른 효소활성의 변화를 로그값으로 표시한 그래프로서, (●)는 50℃를 나타내고, (○)는 55℃를 나타내며, (▼)는 60℃를 나타낸다. 도 7의 (A)에서 보듯이, 50℃에서는 수크로스이성화효소의 활성이 지속적으로 유지되었으나, 55℃에서는 25.7분이 경과된 시점에서 수크로스이성화효소의 활성이 50%로 감소하였으며, 60℃에서는 수크로스이성화효소의 활성이 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

[0095] **실시예 4-4: 변성온도(melting temperature) 측정**

[0096] DSF(differential scanning fluorimetry) 방법을 이용하여 재조합 수크로스이성화효소의 변성온도(melting temperature)를 측정하였다.

[0097] 구체적으로, 10 μ l의 효소용액(0.1 mg/ml)과 10 μ l의 SYPRO orange(10 $\times$)를 혼합하여 시료를 준비하고, 상기 시료를 실시간 PCR 시스템에 적용하고, 30 내지 99℃ 까지 1℃씩 증가시켰다. 이때, 모든 형광값의 측정은 Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR system (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 수행되었고, 컴퓨터 프로그램(Sigma Plot 12.0 software, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA 및 엑셀 프로그램)을 사용하여 그래프분석 및 데이터 통계분석을 수행하였다(도 7의 (B)).

[0098] 도 7의 (B)는 재조합 수크로스이성화효소의 변성온도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 7의 (B)에서 보듯이, 재조합 수크로스이성화효소의 변성온도는 $55.5 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 임을 확인하였다.

[0099] **실시예 4-5: 수크로스 이성질체의 생산**

[0100] 재조합 수크로스이성화효소의 반응온도에 따라, 반응산물이 변화되는지의 여부를 확인하기 위하여, 30 내지 50℃의 온도범위에서 수크로스를 기질로 사용하여 효소반응시켰다. 반응산물은 HPAEC 분석법에 적용하여, 생성된 글루코스, 프럭토스, 트레할로로스 및 이소말토로스를 정량하였다(표 1).

표 1

[0101] 반응온도변화에 따른 재조합 수크로스이성화효소의 활성변화

반응온도 (℃)	글루코스 및 프럭토스(%)	트레할로로스 (%)	이소말토로스 (%)	비율 (트레할로로스/이소말토로스)
30	0.06	79.16	20.72	79/21
35	0.35	70.92	28.38	71/29
40	0.89	63.26	34.96	64/36
45	1.64	54.61	42.10	56/44
50	2.56	47.54	47.33	50/50

[0102] 상기 표 1에서 보듯이, 반응온도가 낮을수록 트레할로로스의 생성량이 증가하는 반면, 반응온도가 증가할수록 이소말토로스의 생성량이 증가하는 양상을 나타냄을 확인하였다.

[0103] **실시예 4-6: 다양한 수크로스이성화효소의 특성 평가**

[0104] 본 발명에서 제공하는 재조합 수크로스이성화효소와 종래에 알려진 다양한 균주로부터 발현되는 수크로스이성화효소의 주요 특성을 비교하여, 본 발명에서 제공하는 수크로스이성화효소의 특성을 평가하였다(표 2).

표 2

[0105]

다양한 균주에서 유래된 수크로스이성화효소의 정보 및 효소특성

균주 번호	등록번호	상동성 (%)	분자량 (kDa)	pI	최적온도 (℃)	최적 pH	산물비(%)	
							트레할로로스	이소말토로스
#1	KF317210	100	68.8	5.96	40	6.0	64	36
#2	ACF42098.1	66	70.2	6.02	50	5.0-6.0	22	78
#3	AAP57084.1	67	73.3	6.62	30	7.0	15	85
#4	AAP57085.1	70	70.0	6.62	35	6.0	15	66
#5	AAK82938.1	70	69.9	6.58	35	6.0	21	83
#6	AAP57083.1	66	69.4	6.99	35	5.0	3	91
#7	EKF64560	68	69.6	7.11	30	5.5	9	86
#8	ABC33903.1	67	66.8	5.30	40	5.8	91	8

[0106]

균주번호 #1은 *Pectobacterium carotovorum* KKH 3-1을 나타내고, #2는 *Enterobacter* sp. FMB-1을 나타내며, #3은 *Erwinia rhapsodici* NCPPB 1578을 나타내고, #4는 *Klebsiella planticola* UQ 14S를 나타내며, #5는 *Klebsiella* sp. LX3을 나타내고, #6은 *Pantoea dispersa* UQ68J를 나타내며, #7은 *Protaminobacter rubrum* CBS574-77을 나타내고, #8은 *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45를 나타낸다.

[0107]

실시예 5: 수크로스이성화효소의 3차원 구조분석 및 변이체 제작

[0108]

상기 재조합 수크로스이성화효소의 3차원 구조를 분석하고, 이에 기반하여, 변이된 효소활성을 나타내는 변이된 수크로스이성화효소를 제작하고자 하였다.

[0109]

실시예 5-1: 3차원 구조분석

[0110]

재조합 수크로스이성화효소의 3차원 구조분석은 automated comparative protein modeling server 인 SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)을 이용하여 공지된 방법에 따라 수행하였다(Arnold K, et al., Bioinformatics., 22:195-201, 2006; Kiefer F, et al., Nucleic Acids Research., 37:D387-D92, 2009; Peitsch M., Bio/technology., 13:658-660, 1995). 이때, 이미 결정구조가 규명된 수크로스이성화효소인 SmuA(pdb code = 3GBD)의 결정구조를 Brookhaven Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) 에서 확보하고, 리간드인 수크로스의 구조는 PubChem database로부터 확보한 다음, 이에 기반하여 재조합 수크로스이성화효소의 3차원 구조를 예측하였다.

[0111]

또한, AutoDock 4.2 software 를 이용하여 수크로스를 수크로스이성화효소의 활성부위에 결합시키고, 이를 위하여 Grid box를 사용하였으며, 결합분석결과는 AutoDock Tools 1.5.6 를 이용하여 AutoDock4 에서 사용할 수 있는 file 로 변경하였고, PyMOL(<http://www.pymol.org>)을 이용하여 분석결과를 시각화하였다(도 8a 내지 8c).

[0112]

도 8a는 SmuA에 기반한, 수크로스이성화효소의 3차원 예상구조를 나타내고, 도 8b는 수크로스이성화효소 활성부위(결정구조)의 확대도를 나타내는데, 구성요소는 연회색 만화형식으로 표현하였다: 촉매잔기인 D223, E287 및 D361는 분홍색으로 표시하고; 리간드와의 반응잔기인 D94, H137, R231, R325, H360 및 R448은 노란색으로 표시하며; 아로마틱 클램프 부위인 F289 및 F313는 적색으로 표시하고; RLDRD 모티프인 R317, L318, D319, R320 및 A321는 청색으로 표시하였다. 각 잔기는 수크로스이성화효소의 단백질번호에 따라 표시하였다. 도 8c는 수크로스과 결합된 수크로스이성화효소 활성부위(결정구조)의 확대도를 나타내는데, 구성요소는 연회색 만화형식으로 표현하였고, 리간드는 녹색막대로 표시하였다.

[0113] 도 8a 내지 8c에서 보듯이, 수크로스이성화효소는 전형적인 글리코시드 하이드롤라제 패밀리 13군에 속하는 효소의 구조를 나타내고, 활성부위는 GH13 효소의 특성을 나타냄을 확인하였다. 아울러, 수크로스와의 최적결합 형태를 규명하기 위하여 분자결합연구를 수행한 결과, 수크로스는 촉매잔기인 223번 아스파르트산, 287번 글루탐산 및 361번 아스파르트산에 의해 분해되고, 이에 의하여 생성된 프럭토실 모이어티는 아로마틱 클램프(289번과 313번의 페닐알라닌)에 결합되고 325번 아르기닌과 수소결합을 형성하여, 가수분해산물이 발생되지 않을 것으로 분석되었다.

[0114] **실시예 5-2: 변이된 수크로스이성화효소의 설계**

[0115] 상기 325번 아르기닌은 프럭토스 결합부위의 일부이면서도, 리간드인 수크로스와 결합한다고 알려져 있고, 수크로스와 결합된 후에는 프럭토실 모이어티와 수소결합을 형성할 것으로 예상되고, 이로 인하여 글루코스와 프럭토스와 같은 부산물이 생성되지 않고, 이성화반응이 수행되는 것으로 예측되었다. 따라서, 상기 325번 아르기닌을 다른 아미노산으로 치환하면, 수크로스이성화효소의 활성에 변화가 발생할 것으로 예상하였다.

[0116] 바실러스 세레우스에서 유래된 올리고-1,6-글루코시다제(BCOGL)와 수크로스이성화효소는 서로 다른 효소활성을 나타내지만, 이들의 활성부위를 비교하면(도 9), 구조적으로 볼 때, 325번 아미노산이 리신(BCOGL, 도 9의 (A))인지 아니면 아르기닌(수크로스이성화효소, 도 9의 (B))인지만 차이가 있을 뿐, 거의 유사한 구조를 나타낸다. 이에, 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환할 경우, 수크로스이성화효소의 활성을 변화시킬 수 있을 것으로 예상하였다.

[0117] 이에, 시뮬레이션 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환하는 실험을 가상으로 실행하였다(도 10 및 11).

[0118] 도 10은 수크로스와 결합된 수크로스이성화효소(A) 및 변이된 수크로스이성화효소(B)의 활성부위를 연회색 만화 형식으로 표시한 결과를 나타내고, 도 11은 상기 활성부위를 연회색 표면으로 표시한 결과를 나타낸다. 도 10 및 11에서 보듯이, 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환하여도 활성부위가 개방되어, 수크로스가 결합될 수 있음을 확인하였다. 다만, 아르기닌이 존재하지 않으므로, 프럭토실 모이어티와 수소결합을 형성하지 못하고, 이로 인하여 글루코스와 프럭토스와 같은 부산물이 생성되어, 반응산물이 변화될 것으로 예측할 수 있었다.

[0119] **실시예 5-3: 변이된 수크로스이성화효소의 제작**

[0120] **실시예 5-3-1: 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 획득**

[0121] pET-PCSI를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하며, QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)를 이용한 PCR을 수행하여, 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 7,140bp의 폴리뉴클레오티드를 획득하였다(도 12). 이때, PCR 조건은 25cycle(94℃ 1분, 57℃ 1분 및 72℃ 8분) 이었다.

[0122] R325K-F: 5'-cgatcgcccgtagaagaaaatggcgacgga-3'(서열번호 7)

[0123] R325K-R: 5'-tcgctgccatttttcttctacggcgcatcg-3'(서열번호 8)

[0124] 도 12는 PCR 방법으로 획득한 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 7,140bp의 폴리뉴클레오티드를 아가로스 겔 전기영동한 사진으로서, M 레인은 DNA 마커이고, 1번 레인은 pET-PCSI에서 증폭된 PCR 단편이다. 상기 도 12에서 보듯이, 목적하는 폴리뉴클레오티드를 증폭시켰음을 확인할 수 있었다.

였다.

[0125] **실시에 5-3-2: 변이된 수크로스이성화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터의 제작**

[0126] 상기 실시예 5-3-1에서 수득한 폴리뉴클레오티드에 제한효소인 DpnI을 처리하고, 이를 pET21a 벡터에 도입하여, 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 pET-R325K를 제작하였다(도 13).

[0127] 도 13은 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌을 리신으로 치환시킨 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터인 pET-R325K의 벡터맵을 나타낸다.

[0128] **실시에 5-3-3: 변이된 수크로스이성화효소를 발현시키는 형질전환체의 제작**

[0129] 상기 실시예 5-3-2에서 제작된 발현벡터 pET-R325K를 숙주세포인 E.coli BL21에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 이로부터 수득한 DNA의 염기서열을 분석하였다(도 14).

[0130] 도 14는 수크로스이성화효소의 아미노산 서열과, 발현벡터 pET-R325K가 도입된 형질전환체의 DNA로부터 유추된 변이된 수크로스이성화효소의 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타내는데, 치환된 잔기는 적색박스로 표시되었고, PCSI는 펙토박테리움 카로토보룸 KKH 3-1에서 유래된 수크로스이성화효소를 나타내고, R325K는 변이된 수크로스이성화효소를 나타낸다. 도 14에서 보듯이, 상기 형질전환체는 235번 아르기닌이 리신으로 치환된 수크로스이성화효소를 코딩하는 유전자를 내포함을 확인하였다.

[0131] **실시에 5-3-4: 형질전환체로부터 변이된 수크로스이성화효소의 생산**

[0132] 상기 실시예 5-3-3에서 제작된 형질전환체를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 3-2와 동일한 방법을 사용하여, 상기 형질전환체를 배양하고, 배양된 형질전환체를 분쇄한 다음, Ni-NTA 친화성 컬럼 크로마토그래피에 적용로부터 변이된 수크로스이성화효소를 정제하였다. 이어, 정제과정 중에 수득한 시료를 SDS-PAGE로 분석하였다(도 15).

[0133] 도 15는 pET-R325K로부터 변이된 수크로스이성화효소를 발현시키고, Ni-NTA 친화성 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제한 산물을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으로서, M 레인은 표준마커를 나타내고, 1번 레인은 음성대조군(대장균)을 나타내며, 2번 레인은 세포파쇄물을 나타내고, 3번 레인은 정제된 변이된 수크로스이성화효소를 나타낸다. 도 15에서 보듯이, 약 69kDa의 크기를 갖는 변이된 수크로스이성화효소를 정제할 수 있었는데, 이는 이론적으로 예측된 수준(68,723.91Da)과 동일한 수준임을 확인하였다.

[0134] **실시에 6: 변이된 수크로스이성화효소의 특성평가**

[0135] **실시에 6-1: 변이된 수크로스이성화효소의 효소활성**

[0136] 상기 실시예 5-3-4에서 생산된 변이된 수크로스이성화효소의 특성을 평가하기 위하여, 기질로서 5%(w/v) 수크로스를 사용한, 수크로스이성화효소와 변이된 수크로스이성화효소의 효소반응을 수행한 다음, 반응산물을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 16).

[0137] 도 16은 수크로스이성화효소(검은색)와 변이된 수크로스이성화효소(적색)의 반응산물을 HPAEC로 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 트레할로스를 나타내며, 5번 피크는 이소말톨로스를 나타낸다. 도 16에서 보듯이,

거의 모든 수크로스를 소모하여 주된 반응산물로서 트레할로스과 이소말토스를 생산하는 수크로스이성화효소와는 달리, 변이된 수크로스이성화효소는 수크로스를 모두 소모하지 않고, 트레할로스과 이소말로스 이외에 글루코스 및 프럭토스를 생성함을 확인하였다.

[0138] 실시예 6-2: 반응온도에 따른 변이된 수크로스이성화효소의 효소활성

[0139] 상기 실시예 4-4의 표 1에서 보듯이, 수크로스이성화효소는 반응온도에 따라, 반응산물이 변화되므로, 변이된 수크로스이성화효소도 유사한 특성을 나타내는지 확인하고자 하였다.

[0140] 구체적으로, 30 내지 50℃에서 효소반응을 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 6-1과 동일한 방법을 수행하여 각각의 반응산물을 수득하고, 이를 HPAEC 분석에 적용하였다(표 3).

표 3

[0141] 다양한 반응온도에서 수크로스이성화효소(야생형) 및 변이된 수크로스이성화효소(변이체) 반응산물의 HPAEC 분석결과

반응온도(℃)	글루코스/프럭토스 합량		트레할로스과 이소말토스의 합량비	
	야생형	변이체	야생형	변이체
30	0.06	2.40	79/21	51/49
35	0.35	3.20	71/29	50/50
40	0.89	4.00	64/36	39/61
45	1.64	5.60	56/44	25/75
50	2.56	5.60	50/50	23/77

[0142] 상기 표 3에서 보듯이, 수크로스이성화효소와 변이된 수크로스이성화효소는 반응산물에 포함된 글루코스 및 프럭토스의 합량과 트레할로스과 이소말토스의 합량비의 측면에서 차이를 나타냄을 확인하였다. 구체적으로, 변이된 수크로스이성화효소는 야생형 수크로스이성화효소에 비하여 반응부산물인 글루코스 및 프럭토스를 다량으로 생성하고, 트레할로스 보다는 이소말토스를 더욱 많이 생성함을 알 수 있었다.

[0143] 그러나, 반응온도가 증가함에 따라, 반응부산물인 글루코스 및 프럭토스의 생성량이 증가하고, 트레할로스 보다는 이소말토스의 생성량이 증가하는 특성은 수크로스이성화효소와 변이된 수크로스이성화효소에서 공유함을 알 수 있었다.

[0144] 실시예 6-3: 반응시간에 따른 변이된 수크로스이성화효소의 효소활성

[0145] 하룻밤동안 효소반응을 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 효소반응을 수행하고, 이로부터 얻어진 반응산물을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 17의 (A)).

[0146] 도 17의 (A)는 수크로스이성화효소(검은색) 및 변이된 수크로스이성화효소(적색) 반응산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질(4)을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다. 도 17의 (A)에서 보듯이, 변이된 수크로스이성화효소를 사용하여 장시간 동안 효소반응을 수행하면, 야생형 수크로스이성화효소의 반응산물에는 포함되어 있지 않은 미지물질(4번 피크)이 생성됨을 확인하였다.

[0147] 상기 미지물질의 생성에 당당류가 영향을 미치는지의 여부를 확인하고자, 5%(w/v) 글루코스를 추가하고, 하룻밤 동안 효소반응을 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 효소반응을 수행하고, 이로부터

터 얻어진 반응산물을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 17의 (B)).

[0148] 도 17의 (B)는 글루코스를 사용하여 수행된 수크로스이성화효소(검은색) 및 변이된 수크로스이성화효소(적색)의 효소반응에 따라 생성된 반응산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다. 도 17의 (B)에서 보듯이, 글루코스를 가하여 수크로스이성화효소 및 변이된 수크로스이성화효소의 효소반응을 장시간 수행하면, 미지물질이 생성되며, 수크로스이성화효소를 사용할 경우 보다는 변이된 수크로스이성화효소를 사용할 경우에 상기 미지물질이 더욱 다량으로 생성됨을 확인하였다.

[0149] 상기 실시예 5-2에서는 변이된 수크로스이성화효소의 활성부위에 아르기닌이 존재하지 않으므로, 프럭토실 모이 어티와 수소결합을 형성하지 못하고, 이로 인하여 글루코스와 프럭토스와 같은 부산물이 생성될 것으로 예측한 바 있으므로, 글루코스를 처리하지 않은 경우에도, 변이된 수크로스이성화효소는 글루코스를 생성하고, 이에 의하여 미지물질이 생성되는 것으로 분석되었다.

[0150] 실시예 6-4: 미지물질의 규명

[0151] 실시예 6-4-1: recycling preparative HPLC 시스템을 이용한 활성분획 수득

[0152] 상기 실시예 6-3에서 얻어진 3mL의 변이된 수크로스이성화효소의 반응산물을 recycling preparative HPLC 시스템(LC-9104, JAI, Tokyo, 일본)에 적용하여 상기 미지물질을 정제하고자 하였다. 이때, JAIGEL-W251(JAI, Tokyo, 일본) 컬럼, JAIGEL-W252(JAI, Tokyo, 일본) 컬럼 및 RI 검출기인 RI-50(JAI, Tokyo, 일본)을 사용하고, 이동상으로는 탈이온수를 사용하였으며, 속도는 3mL/분 으로 설정하였다(도 18의 (A)).

[0153] 도 18의 (A)는 변이된 수크로스이성화효소의 반응산물을 recycling preparative HPLC 시스템에 적용한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 18의 (A)에서 보듯이, recycling preparative HPLC 시스템을 통하여 총 9개의 분획을 수득하였고, 상기 수득한 9개의 분획을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 18의 (B)).

[0154] 도 18의 (B)는 recycling preparative HPLC 시스템을 통해 수득한 9개의 분획 중에서 3번 분획을 HPAEC 분석에 적용한 결과를 나타내는 그래프로서, 검은색 그래프는 변이된 수크로스이성화효소 반응산물을 나타내고, 적색은 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 프럭토스를 나타내며, 3번 피크는 수크로스를 나타내고, 4번 피크는 미지물질을 나타내며, 5번 피크는 트레할로스를 나타내고, 6번 피크는 이소말토스를 나타낸다. 도 18의 (B)에서 보듯이, 상기 9개의 분획을 HPAEC 분석에 적용한 결과, 3번 분획이 미지물질을 대량으로 포함함을 확인하였다.

[0155] 실시예 6-4-2: α-글루코시다제 가수분해 반응산물 분석

[0156] 상기 실시예 6-4-1에서 수득한 3번 분획 20μL에 5μL의 α-글루코시다제 효소액을 가하고, 37℃에서 반응시킨 다음, 이로부터 얻어진 반응산물을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 19의 (A)).

[0157] 도 19의 (A)는 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획을 α-글루코시다제로 분해한 분해산물의 HPAEC 분석결과를 나타내는 그래프로서, 검은색은 α-글루코시다제를 처리하지 않은 3번 분획을 나타내고, 적색은 α-글루코시다제를 처리한 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고, 2번 피크는 미지물질을 나타낸다. 도 19의 (A)에서 보듯이, 상기 미지물질은 모두 α-글루코시다제에 의해 글루코스로 분해됨을 확인하였다. 따라서, 상기 미지물질은 글루코스만으로 구성된 당류임을 알 수 있었고, 미지물질의 분자량에 비추어 볼 때, 상기 미지물질은 두개의 글루코스로 구성된 물질이면서, 상기 두개의 글루코스는 α-글루코시다제에 의해 분해되는 α-1,6 결합에 의해 결합된 것이므로, 상기 미지물질은 두개의 글루코스가 α-1,6 결합에 의해 결합된 이소말토스인 것으로 예상되었다.

[0158] 이에, 상기 3번 분획과 이소말토스를 HPAEC 분석에 적용하였다(도 19의 (B)).

[0159] 도 19의 (B)는 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획과 이소말토스를 HPAEC 분석에 적용한 결과를 나타내는 그래프로써, 검은색은 이소말토스를 나타내고, 적색은 3번 분획을 나타내며, 1번 피크는 글루코스를 나타내고 2번 피크는 미지물질을 나타낸다. 상기 도 19의 (B)에서 보듯이, 미지물질과 이소말토스는 HPAEC 분석결과 동일한 위치에서 피크를 나타냄을 확인하였으므로, 예상했던 바와 같이, 상기 미지물질은 이소말토스임을 확인하였다.

[0160] 상기 결과로부터, 변이된 수크로스이성화효소는 수크로스를 분해하여 글루코스를 생성할 뿐만 아니라, 상기 글루코스에 다른 글루코스를 전이시켜서, 이당류를 생성하는 당전이활성을 나타냄을 알 수 있었다. 상기 당전이활성은 종래의 수크로스이성화효소에서는 전혀 나타내지 않았던 효소활성이며, 수크로스이성화효소의 235번 아르기닌이 리신으로 치환됨에 따라 새로이 생성된 효소활성인 것으로 분석되었다.

[0161] **실시예 6-4-3: 3번 분획의 TLC 분석**

[0162] 상기 실시예 6-4-2를 통하여, recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획에 포함된 미지물질이 이소말토스임을 확인하였고, TLC 분석을 통하여, 이를 재확인하였다(도 20).

[0163] 도 20은 recycling preparative HPLC 시스템에서 얻어진 3번 분획의 TLC 분석결과를 나타내는 사진으로서, 1번 레인은 표준 글루코스를 나타내고, 2번 레인은 표준 프럭토스를 나타내며, 3번 레인은 표준 수크로스를 나타내고, 4번 레인은 표준 이소말토스를 나타내며, 5번 레인은 상기 3번 분획을 나타내고, 6번 레인은 1% 이소말토스를 나타낸다. 도 20에서 보듯이, 3번 분획에 포함된 미지물질은 이소말토스와 동일한 TLC 분석결과를 나타냄을 확인하였다.

[0164] **실시예 6-4-4: 변이된 수크로스이성화효소의 당전이활성 검증**

[0165]

[0166] 상기 변이된 수크로스이성화효소의 당전이활성을 평가하기 위하여, 기질로서 다양한 6탄당(수크로스, 글루코스, 프럭토스, 알로스, 갈락토스 또는 만노스)을 단독으로 조합하여 사용한 효소반응을 수행하였다. 이때, 반응완충액은 50mM 구연산나트륨 완충액(pH 6.0)을 사용하였고, 변이된 수크로스이성화효소의 농도는 0.01mg/ml로 설정하였으며, 수크로스 및 각 6탄당의 최종농도는 5%(w/v)가 되도록 설정하였고, 반응조건은 40℃에서 1시간으로 설정하였다(표 4).

표 4

[0167] 다양한 당류를 기질로 사용한 수크로스이성화효소(야생형 및 변이체)의 당전이활성 측정결과

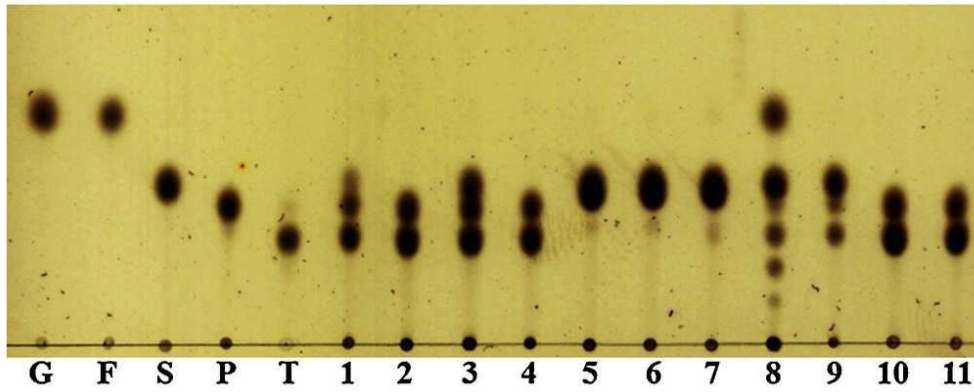
기질	당전이활성 산물(이소말토스) 생성여부	
	야생형	변이체
글루코스	×	×
프럭토스	×	×
수크로스	×	○
글루코스+프럭토스	×	×
수크로스+글루코스	×	○
수크로스+프럭토스	×	×
수크로스+알로스	×	○
수크로스+갈락토스	×	○
수크로스+만노스	×	○

- [0168] 상기 표 4에서 보듯이, 당전이활성을 통해 생성된 이소말토스는 야생형 수크로스이성화효소를 사용한 반응산물에서는 검출되지 않았고, 변이된 수크로스이성화효소를 사용한 반응산물에서만 검출되었다. 또한, 변이된 수크로스이성화효소를 사용한 반응산물 중에서도 당수용체인 글루코스 또는 이에 상응하는 6탄당(알로스, 갈락토스 및 만노스)을 포함하는 반응산물에서만 이소말토스가 검출되었다.
- [0169] 한편, 수크로스와 프럭토스를 포함하는 반응산물에는 글루코스를 생성할 수 있는 수크로스가 포함되어 있으므로, 이론적으로는 이소말토스가 생성될 수 있으나, 과량의 프럭토스로 인하여 수크로스로부터 생성된 글루코스가 과량의 프럭토스와 반응하여 수크로스를 형성할 뿐, 미량의 글루코스가 서로 결합되어 이소말토스를 형성하지 못하기 때문에, 상기 표 4와 같은 결과를 나타낸 것으로 분석되었다.
- [0170] 아울러, 상기 결과로부터, 수크로스와 6탄당(알로스, 갈락토스 및 만노스)을 사용할 경우에 이소말토스가 생성됨을 확인하였으므로, 상기 반응산물을 HPAEC 분석에 적용하였다(도 21).
- [0171] 도 21은 다양한 6탄당에 대한 변이된 수크로스이성화효소의 당전이활성을 HPAEC 분석을 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 6탄당으로서 알로스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타내고, (B)는 6탄당으로서 갈락토스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타내며, (C)는 6탄당으로서 만노스를 사용한 반응산물의 분석결과를 나타내고, 1번 피크는 글루코스를 나타내며, 2번 피크는 프럭토스를 나타내고, 3번 피크는 이소말토스를 나타내며, 4번 피크는 트레할로스를 나타내고, 5번 피크는 이소말톨로스를 나타내며, 청색점은 사용된 6탄당(알로스, 갈락토스 및 만노스)을 나타내고, 적색점은 아직 규명되지 않은 산물을 나타낸다. 도 21에서 보듯이, 6탄당을 사용하더라도 사용된 6탄당의 종류에 따라 이소말토스의 생성수준이 변화되었는데, 만노스를 사용할 경우에 가장 높은 수준의 이소말토스 생성수준을 나타냄을 확인하였다.

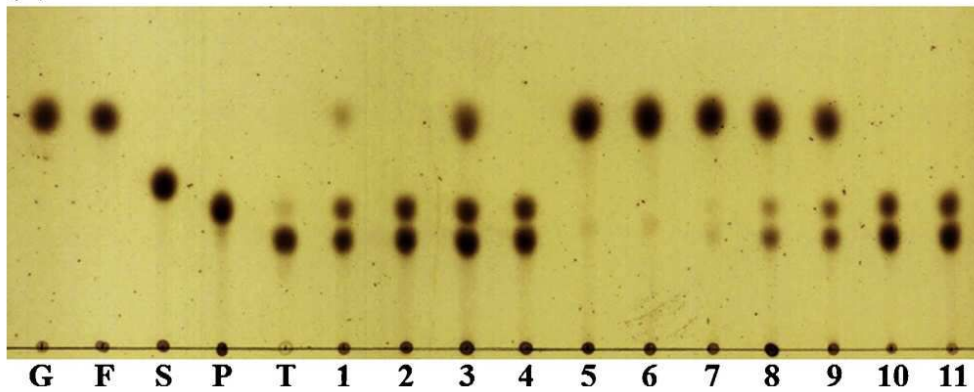
도면

도면1

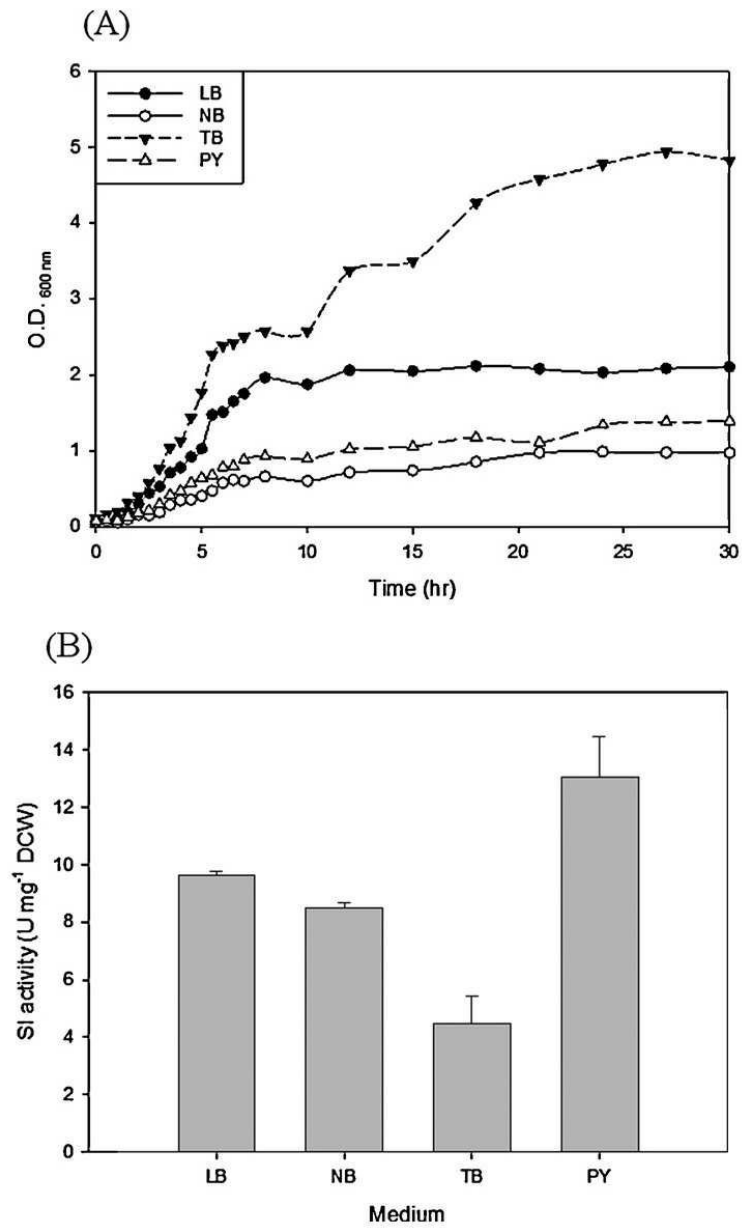
(A)



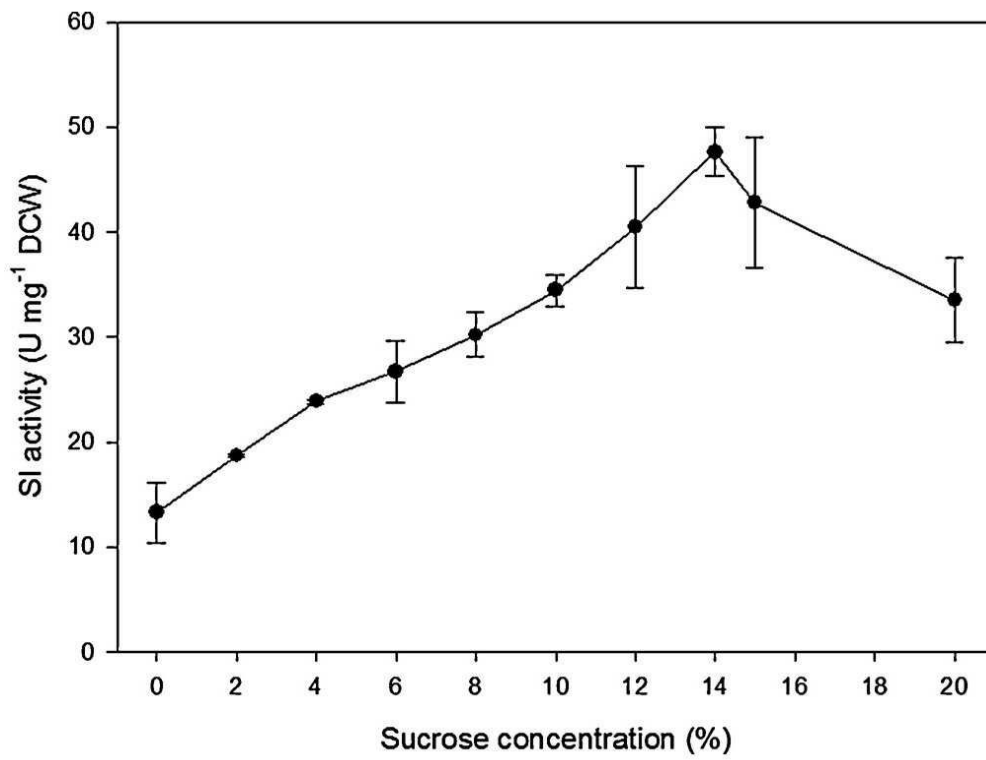
(B)



도면2



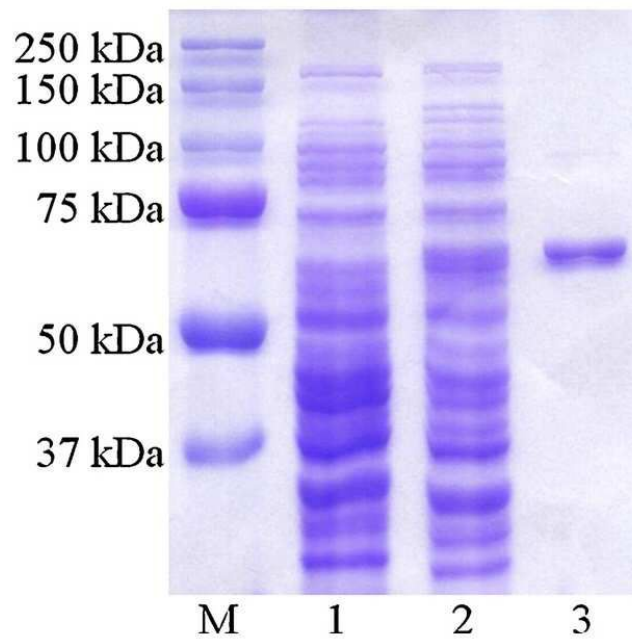
도면3



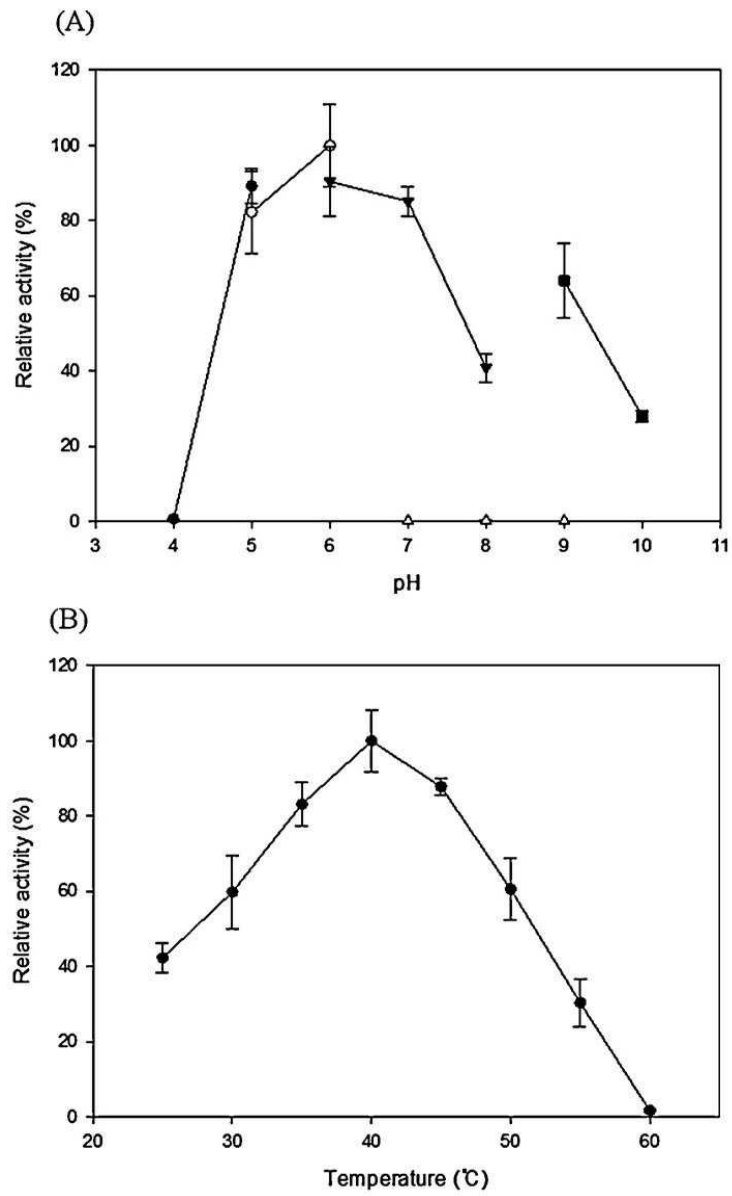
도면4

PCSI	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
MetB	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131
MetB-1	12	22	32	42	52	62	72	82	92	102	112	122	132
ERSI	13	23	33	43	53	63	73	83	93	103	113	123	133
ERSI-1	14	24	34	44	54	64	74	84	94	104	114	124	134
PalI	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115	125	135
PalI-1	16	26	36	46	56	66	76	86	96	106	116	126	136
PCSI	17	27	37	47	57	67	77	87	97	107	117	127	137
PCSI-1	18	28	38	48	58	68	78	88	98	108	118	128	138
SmuA	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109	119	129	139
PCSI	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
MetB	141	151	161	171	181	191	201	211	221	231	241	251	261
MetB-1	142	152	162	172	182	192	202	212	222	232	242	252	262
ERSI	143	153	163	173	183	193	203	213	223	233	243	253	263
ERSI-1	144	154	164	174	184	194	204	214	224	234	244	254	264
PalI	145	155	165	175	185	195	205	215	225	235	245	255	265
PalI-1	146	156	166	176	186	196	206	216	226	236	246	256	266
PCSI	147	157	167	177	187	197	207	217	227	237	247	257	267
PCSI-1	148	158	168	178	188	198	208	218	228	238	248	258	268
SmuA	149	159	169	179	189	199	209	219	229	239	249	259	269
PCSI	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
MetB	271	281	291	301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
MetB-1	272	282	292	302	312	322	332	342	352	362	372	382	392
ERSI	273	283	293	303	313	323	333	343	353	363	373	383	393
ERSI-1	274	284	294	304	314	324	334	344	354	364	374	384	394
PalI	275	285	295	305	315	325	335	345	355	365	375	385	395
PalI-1	276	286	296	306	316	326	336	346	356	366	376	386	396
PCSI	277	287	297	307	317	327	337	347	357	367	377	387	397
PCSI-1	278	288	298	308	318	328	338	348	358	368	378	388	398
SmuA	279	289	299	309	319	329	339	349	359	369	379	389	399
PCSI	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
MetB	401	411	421	431	441	451	461	471	481	491	501	511	521
MetB-1	402	412	422	432	442	452	462	472	482	492	502	512	522
ERSI	403	413	423	433	443	453	463	473	483	493	503	513	523
ERSI-1	404	414	424	434	444	454	464	474	484	494	504	514	524
PalI	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495	505	515	525
PalI-1	406	416	426	436	446	456	466	476	486	496	506	516	526
PCSI	407	417	427	437	447	457	467	477	487	497	507	517	527
PCSI-1	408	418	428	438	448	458	468	478	488	498	508	518	528
SmuA	409	419	429	439	449	459	469	479	489	499	509	519	529
PCSI	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
MetB	531	541	551	561	571	581	591	601	611	621	631	641	651
MetB-1	532	542	552	562	572	582	592	602	612	622	632	642	652
ERSI	533	543	553	563	573	583	593	603	613	623	633	643	653
ERSI-1	534	544	554	564	574	584	594	604	614	624	634	644	654
PalI	535	545	555	565	575	585	595	605	615	625	635	645	655
PalI-1	536	546	556	566	576	586	596	606	616	626	636	646	656
PCSI	537	547	557	567	577	587	597	607	617	627	637	647	657
PCSI-1	538	548	558	568	578	588	598	608	618	628	638	648	658
SmuA	539	549	559	569	579	589	599	609	619	629	639	649	659

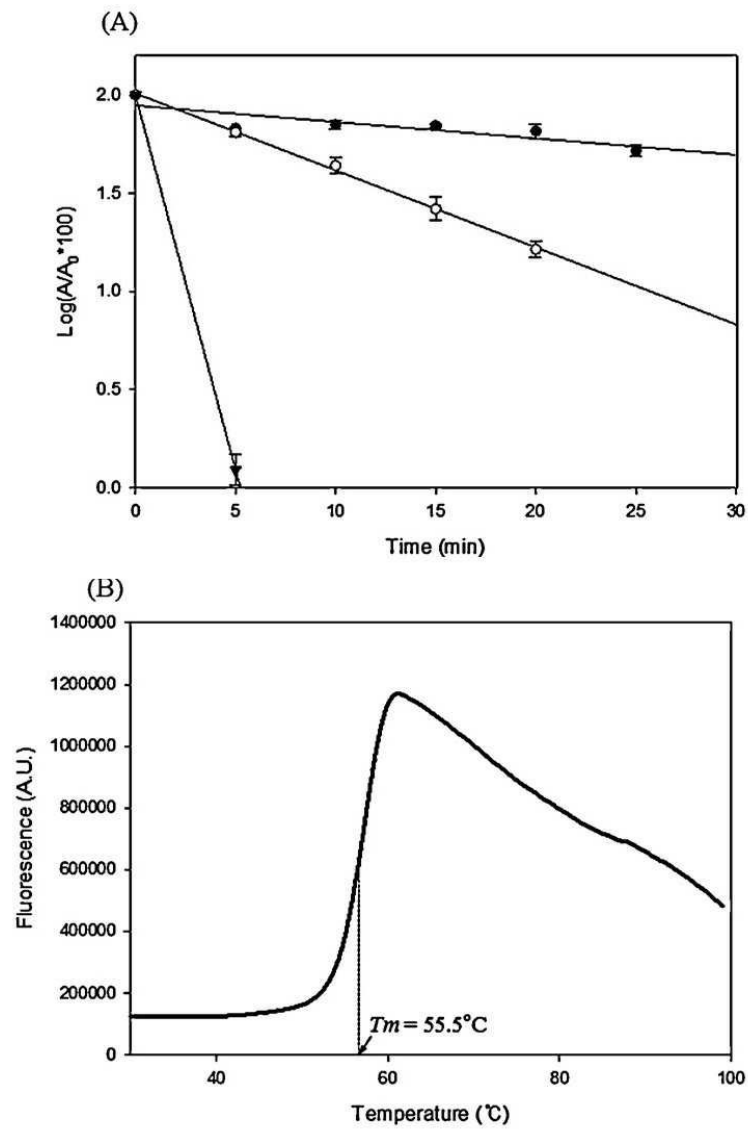
도면5



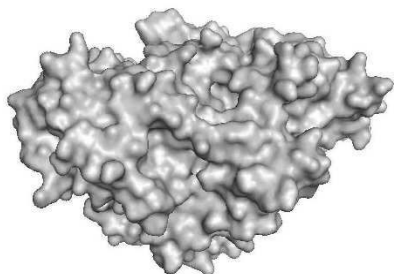
도면6



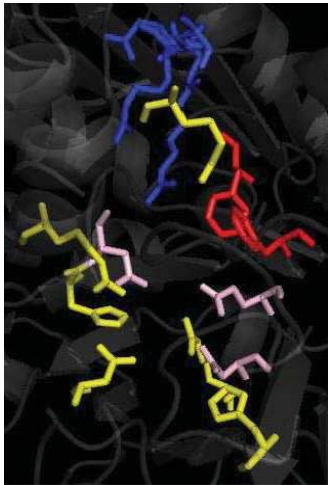
도면7



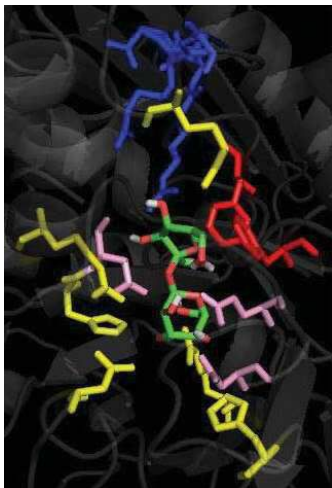
도면8a



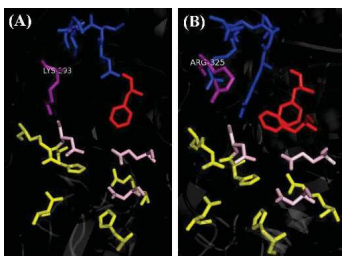
도면8b



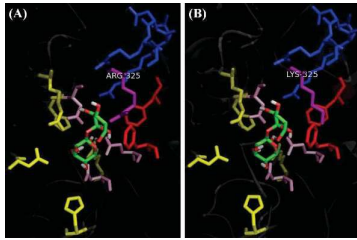
도면8c



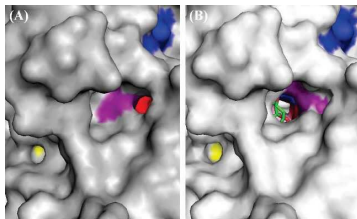
도면9



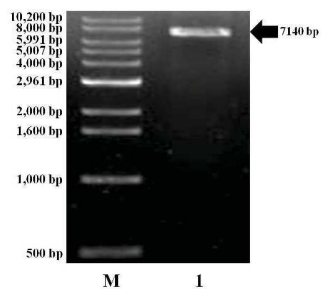
도면10



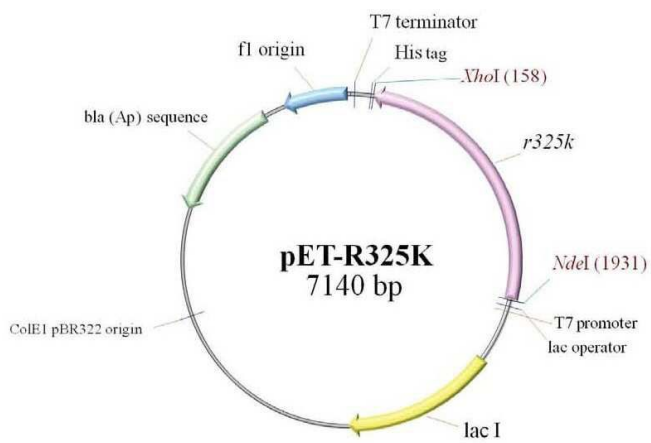
도면11



도면12



도면13



도면14

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120
PCSI : MLAAGLSFSAVNYAATNHNQDTRTVIAVNDGVSASHPVWVKAEAVFYQYPRSFCSNGDGIGDLKGLTEKLDYLRKLGINAWINPHYDSFNTDNGYDIRDYRAIMKEYGTMDDFDNLIA : 120
R325K : MLAAGLSFSAVNYAATNHNQDTRTVIAVNDGVSASHPVWVKAEAVFYQYPRSFCSNGDGIGDLKGLTEKLDYLRKLGINAWINPHYDSFNTDNGYDIRDYRAIMKEYGTMDDFDNLIA : 120

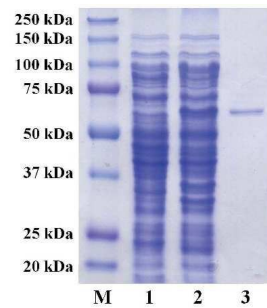
      *      140     *      160     *      180     *      200     *      220     *      240
PCSI : EMKKRDMRLMIDVVVNHTSNEHWFVESKSKSDNRYDYIWRDGDGTFFNNYPSFFGSSAWCKDNVTQYYLHYFGVCCPDLNWKNPKVREEVYDMLRFWIDKGVSGLRMDTVATFSK : 240
R325K : EMKKRDMRLMIDVVVNHTSNEHWFVESKSKSDNRYDYIWRDGDGTFFNNYPSFFGSSAWCKDNVTQYYLHYFGVCCPDLNWKNPKVREEVYDMLRFWIDKGVSGLRMDTVATFSK : 240

      *      260     *      280     *      300     *      320     *      340     *      360
PCSI : NPAPFDLTPEQLKNFAIYITQGNLHRYICEMHKQVLAHYDVVSAGEIFGVPLEEAPFDORRKELDMAFSFDLIRLDRAVEEWRNRNWTLSQFRQINNRLVMAGQYQWNTFFLSNH : 360
R325K : NPAPFDLTPEQLKNFAIYITQGNLHRYICEMHKQVLAHYDVVSAGEIFGVPLEEAPFDORRKELDMAFSFDLIRLDRAVEEWRNRNWTLSQFRQINNRLVMAGQYQWNTFFLSNH : 360

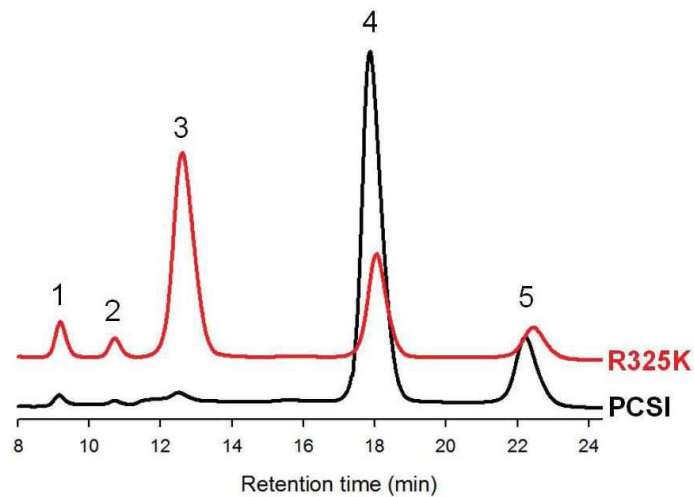
      *      380     *      400     *      420     *      440     *      460     *      480
PCSI : CNPRAVSHFGDDRPEWIRISAKALATLALTQRAITFFIYQGGDELGMTNYPFTSLSEFDDIEVKGFWQDFVETGKVKPDVFLNVKQTSRDNSTPFCWSNAECAGFTTGPWFRINPNYKN : 480
R325K : CNPRAVSHFGDDRPEWIRISAKALATLALTQRAITFFIYQGGDELGMTNYPFTSLSEFDDIEVKGFWQDFVETGKVKPDVFLNVKQTSRDNSTPFCWSNAECAGFTTGPWFRINPNYKN : 480

      *      500     *      520     *      540     *      560     *      580
PCSI : ENAEDCTQNPDSIFHYRQLIALRHATPAFTYGAQDLDPNNNEVLAYTRELNQQRVLYVVFNEKEKPVHYALPKTISIKQTLLESGCKKVAFNATSLQLQWQSGIYQLN : 591
R325K : ENAEDCTQNPDSIFHYRQLIALRHATPAFTYGAQDLDPNNNEVLAYTRELNQQRVLYVVFNEKEKPVHYALPKTISIKQTLLESGCKKVAFNATSLQLQWQSGIYQLN : 591
  
```

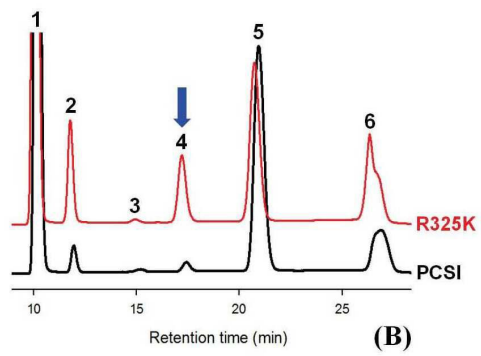
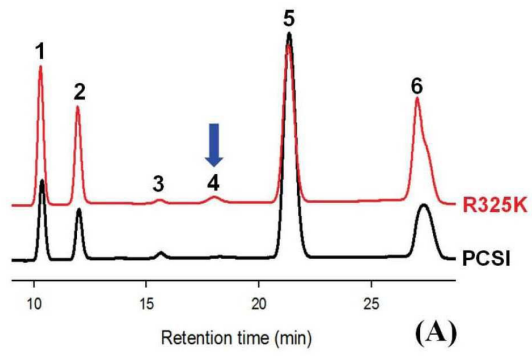
도면15



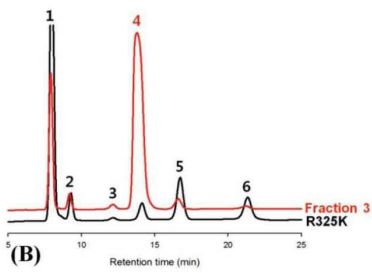
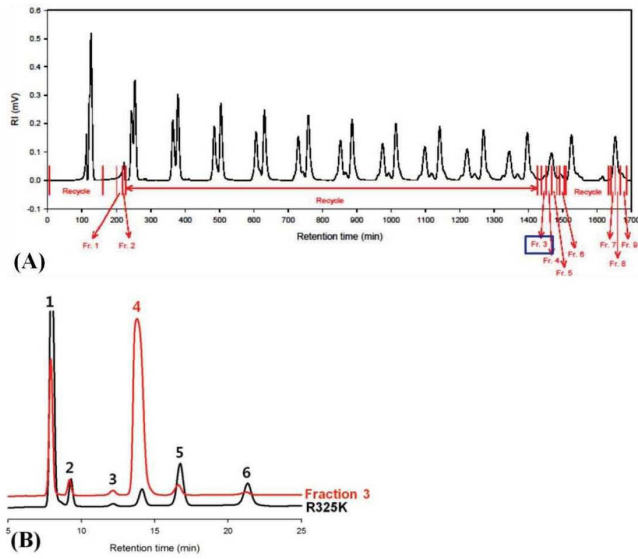
도면16



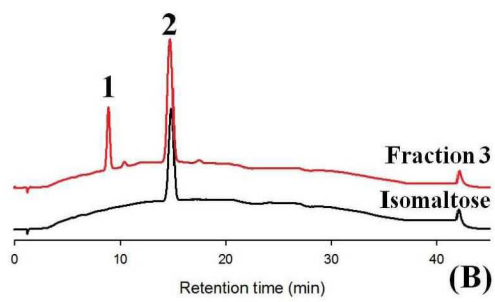
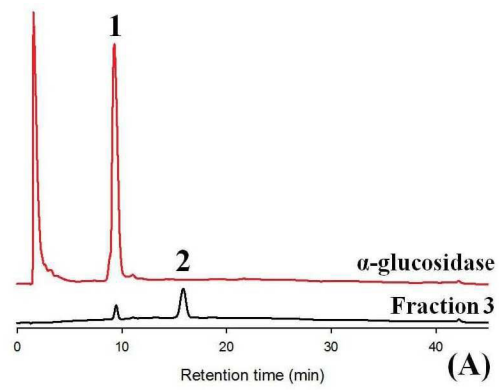
도면17



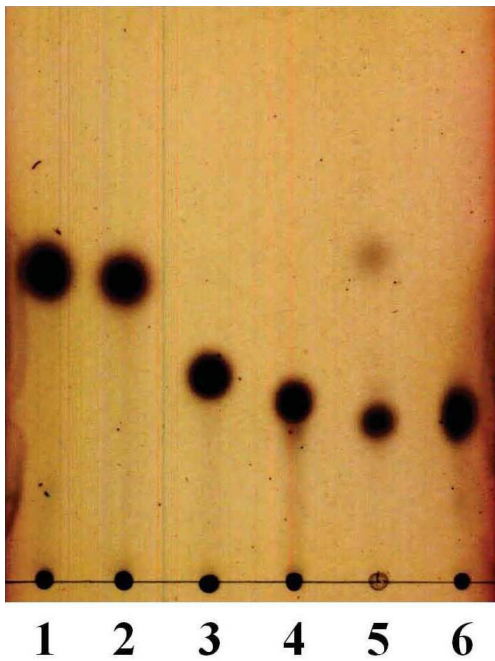
도면18



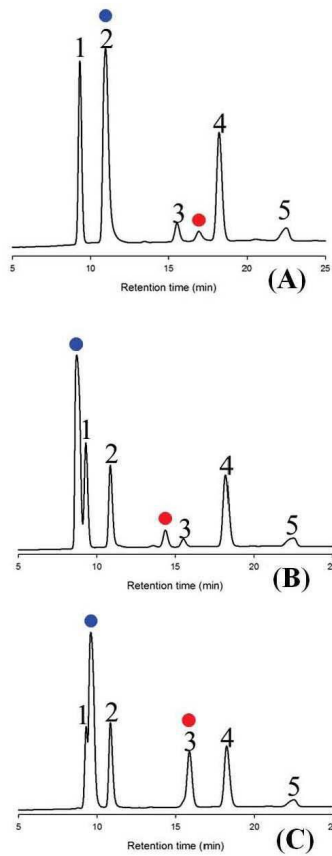
도면19



도면20



도면21



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Mutated sucrose isomerase and process for preparing the same
- <130> PA131372/KR
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 591
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Pectobacterium carotovorum KKH 3-1, sucrose isomerase
- <400> 1

Met Leu Ala Ala Gly Leu Ser Phe Ser Ala Val Asn Tyr Ala Ala Thr

1 5 10 15

Asn His Asn Glu Gln Asp Thr Lys Thr Val Ile Ala Val Asn Asp Gly

20 25 30

Val Ser Ala His Pro Val Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val

35 40 45

Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu

50 55 60

Lys Gly Leu Thr Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Thr Leu Gly Ile Asn

65 70 75 80

Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly

85 90 95

Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met

100 105 110

Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ile Ala Glu Met Lys Lys Arg Asp Met Arg

115 120 125

Leu Met Ile Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asn Glu His Lys Trp

130 135 140

Phe Val Glu Ser Lys Lys Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr

145 150 155 160

Ile Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly Thr Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser

165 170 175

Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Asn Val Thr Gln Gln Tyr

180 185 190

Tyr Leu His Tyr Phe Gly Val Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn

195 200 205

Pro Lys Val Arg Glu Glu Val Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp Ile Asp

210 215 220

Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Met Asp Thr Val Ala Thr Phe Ser Lys

225 230 235 240

Asn Pro Ala Phe Pro Asp Leu Thr Pro Glu Gln Leu Lys Asn Phe Ala

245 250 255

Tyr Thr Tyr Thr Gln Gly Pro Asn Leu His Arg Tyr Ile Gln Glu Met

260 265 270
 His Gln Lys Val Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Ser Ala Gly Glu Ile
 275 280 285
 Phe Gly Val Pro Leu Glu Glu Ala Ala Pro Phe Ile Asp Gln Arg Arg
 290 295 300
 Lys Glu Leu Asp Met Ala Phe Ser Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg

 305 310 315 320
 Ala Val Glu Glu Arg Trp Arg Arg Asn Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe
 325 330 335
 Arg Gln Ile Asn Asn Arg Leu Val Asp Met Ala Gly Gln Tyr Gly Trp
 340 345 350
 Asn Thr Phe Phe Leu Ser Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His
 355 360 365
 Phe Gly Asp Asp Arg Pro Glu Trp Arg Ile Arg Ser Ala Lys Ala Leu
 370 375 380

 Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Thr Ser Leu Ser Glu Phe
 405 410 415
 Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Phe Val Glu Thr Gly
 420 425 430
 Lys Val Lys Pro Asp Val Phe Leu Glu Asn Val Lys Gln Thr Ser Arg
 435 440 445
 Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Ser Asn Ala Glu Gln Ala Gly

 450 455 460
 Phe Thr Thr Gly Thr Pro Trp Phe Arg Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Asn
 465 470 475 480
 Ile Asn Ala Glu Asp Gln Thr Gln Asn Pro Asp Ser Ile Phe His Phe
 485 490 495
 Tyr Arg Gln Leu Ile Ala Leu Arg His Ala Thr Pro Ala Phe Thr Tyr
 500 505 510
 Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asp Pro Asn Asn Asn Glu Val Leu Ala Tyr

515	520	525
Thr Arg Glu Leu Asn Gln Gln Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys		
530	535	540
Glu Lys Pro Val His Tyr Ala Leu Pro Lys Thr Leu Ser Ile Lys Gln		
545	550	555
Thr Leu Leu Glu Ser Gly Gln Lys Asp Lys Val Ala Pro Asn Ala Thr		
565	570	575
Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Gln Leu Asn		
580	585	590
<210>	2	
<211		
>	1776	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pectobacterium carotovorum KKH 3-1, sucrose isomerase	
<400>	2	

atgctggcgg	caggattatc	attctcagcc	gttaattatg	cggcaacaaa	tcataatgag	60
caggatacaa	agacggtaat	agccgtcaat	gatggcgttt	ctgcgcatcc	cgtgtggtgg	120
aaagaagctg	tgttctatca	ggtttatcca	cgttcattta	aagacagtaa	cggtgatggg	180
attggtgatc	ttaaaggcct	gaccgaaaag	ctcgattatt	taaaaacact	cgggtattaat	240
gccatctgga	ttaaccccca	ttatgattca	ccgaataccg	ataacggata	cgatattcgt	300
gattatcgaa	agataatgaa	agaatatggc	acaatggatg	acttcgacaa	cctcattgca	360
gaaatgaaaa	agcgtgatat	gcgactaatg	atagatgttg	tcgttaatca	caccagcaat	420
gaacacaaat	ggttttgtga	aagtaagaaa	tcaaaagata	atccttatcg	cgactattac	480
atttggcgcg	atggttaaaga	tggcacaccg	cctaataatt	accctctctt	cttcggcgggt	540
tccgcctggc	agaaaagataa	cgtaacacag	caatattatt	tacactatit	tggcgtagag	600
cagccccgatc	tgaattggga	taatcccaa	gtacgtgaag	aagtgtagca	tatgctgcgt	660
ttctggattg	ataaaggcgt	ttccgggcta	cgtatggata	ccgtagcaac	cttctctaag	720
aatccggcat	ttcccgatct	cacgccagaa	caattgaaaa	acttcgctta	tacctacaca	780
caagtgccaa	atctgcaccg	ttacattcag	gaaatgcacc	agaaggtgct	ggcaaaatac	840
gacgtcgttt	ccgcaggtga	aattttcggt	gtaccgcttg	aagaagcggc	cccgtttatc	900
gatcaacgtc	gtaaaagagct	cgatatggcc	ttctcattcg	atcttatccg	tctcgatcgc	960

gccgtagaag aaagatggcg acggaatgat tggacgctat cccagttccg tcagatcaac 1020
aatcgactgg tcgatatggc cgggcaatat ggctggaata ctttcttcct gagcaaccat 1080
gataacccgc gtgctgtatc acacttcggt gacgatcgcc ctgagtggcg tatccgttct 1140

gctaaagcgt tggcaaccct agcgtaaca cagcgagcga ccccgtttat ttatcaaggg 1200
gacgaattgg gcatgaccaa ctatccgttt acctccttgt ctgaatttga tgacattgaa 1260
gttaaagggt tctggcagga cttttagag accggaaaag tgaacctga tgtctttttg 1320
gaaaacgtga aacaaacgag tcgagataac agccgaaccc cattccaatg gagcaatgag 1380
gaacaggcgg gctttactac aggtacgccc tggttccgta ttaaccccaa ctacaagaac 1440
atcaatgcag aggatcaaac gcaaaaccca gattccatct tccatttcta ccgtcagctg 1500
atcgactgc gtcacgccac gccggcgctt acctacggag cctatcagga tctcgatccg 1560

aataataacg aggtacttgc ttatactcgt gaactcaacc agcaacgtta tctggttgtg 1620
gtgaacttta aagagaaacc ggtgcattac gcgctgccga aaacgcttcc catcaagcaa 1680
acactgttgg aaagtgggca gaaagataag gtagcaccga atgcaacctc acttgagctc 1740
cagccgtggc aatctggtat ttatcagctg aactag 1776

<210> 3

<211> 591

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated sucrose isomerase

<400> 3

Met Leu Ala Ala Gly Leu Ser Phe Ser Ala Val Asn Tyr Ala Ala Thr

1 5 10 15

Asn His Asn Glu Gln Asp Thr Lys Thr Val Ile Ala Val Asn Asp Gly

20 25 30

Val Ser Ala His Pro Val Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val

35 40 45

Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu

50 55 60

Lys Gly Leu Thr Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Thr Leu Gly Ile Asn

65 70 75 80

Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly

	85	90	95
Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met			
	100	105	110
Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ile Ala Glu Met Lys Lys Arg Asp Met Arg			
	115	120	125
Leu Met Ile Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asn Glu His Lys Trp			
	130	135	140
Phe Val Glu Ser Lys Lys Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr			
145	150	155	160
Ile Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly Thr Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser			
	165	170	175
Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Asn Val Thr Gln Gln Tyr			
	180	185	190
Tyr Leu His Tyr Phe Gly Val Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn			
	195	200	205
Pro Lys Val Arg Glu Glu Val Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp Ile Asp			
	210	215	220
Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Met Asp Thr Val Ala Thr Phe Ser Lys			
225	230	235	240
Asn Pro Ala Phe Pro Asp Leu Thr Pro Glu Gln Leu Lys Asn Phe Ala			
	245	250	255
Tyr Thr Tyr Thr Gln Gly Pro Asn Leu His Arg Tyr Ile Gln Glu Met			
	260	265	270
His Gln Lys Val Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Ser Ala Gly Glu Ile			
	275	280	285
Phe Gly Val Pro Leu Glu Glu Ala Ala Pro Phe Ile Asp Gln Arg Arg			
	290	295	300
Lys Glu Leu Asp Met Ala Phe Ser Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg			
305	310	315	320
Ala Val Glu Glu Lys Trp Arg Arg Asn Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe			
	325	330	335
Arg Gln Ile Asn Asn Arg Leu Val Asp Met Ala Gly Gln Tyr Gly Trp			

340 345 350
 Asn Thr Phe Phe Leu Ser Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His
 355 360 365
 Phe Gly Asp Asp Arg Pro Glu Trp Arg Ile Arg Ser Ala Lys Ala Leu

 370 375 380
 Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Thr Ser Leu Ser Glu Phe
 405 410 415
 Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Phe Val Glu Thr Gly
 420 425 430
 Lys Val Lys Pro Asp Val Phe Leu Glu Asn Val Lys Gln Thr Ser Arg
 435 440 445

 Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Ser Asn Ala Glu Gln Ala Gly
 450 455 460
 Phe Thr Thr Gly Thr Pro Trp Phe Arg Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Asn
 465 470 475 480
 Ile Asn Ala Glu Asp Gln Thr Gln Asn Pro Asp Ser Ile Phe His Phe
 485 490 495
 Tyr Arg Gln Leu Ile Ala Leu Arg His Ala Thr Pro Ala Phe Thr Tyr
 500 505 510
 Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asp Pro Asn Asn Asn Glu Val Leu Ala Tyr

 515 520 525
 Thr Arg Glu Leu Asn Gln Gln Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys
 530 535 540
 Glu Lys Pro Val His Tyr Ala Leu Pro Lys Thr Leu Ser Ile Lys Gln
 545 550 555 560
 Thr Leu Leu Glu Ser Gly Gln Lys Asp Lys Val Ala Pro Asn Ala Thr
 565 570 575
 Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Gln Leu Asn
 580 585 590

<210> 4

<211> 1776

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated sucrose isomerase

<400> 4

atgctggcgg caggattatc attctcagcc gttaattatg cggcaacaaa tcataatgag	60
caggatacaa agacggtaat agccgtcaat gatggcggtt ctgcgcaccc cgtgtggtgg	120
aaagaagctg tgttctatca ggtttatcca cgttcattta aagacagtaa cggatgatggg	180
attggtgatc ttaaaggcct gaccgaaaag ctcgattatt taaaaacact cggatattaat	240
gccatctgga ttaaccccca ttatgattca ccgaataccg ataacggata cgatattcgt	300
gattatcgaa agataatgaa agaatatggc acaatggatg acttcgacaa cctcattgca	360
gaaatgaaaa agcgtgatat gcgactaatg atagatgttg tcgttaatca caccagcaat	420
gaacacaaat ggtttgttga aagtaagaaa tcaaaagata atccttatcg cgactattac	480
atttggcgcg atggtaaaga tggcacaccg cctaataatt acccctcctt cttcggcggt	540
tccgcctggc agaaagataa cgtaacacag caatattatt tacactatct tggcgtagag	600
cagcccgatc tgaattggga taatcccaaa gtacgtgaag aagtgtacga tatgctgcgt	660
ttctggattg ataaaggcgt ttccgggcta cgtatggata ccgtagcaac cttctctaag	720
aatccggcat ttcccgatct cagccagaa caattgaaaa acttcgctta tacctacaca	780
caaggtccaa atctgcaccg ttacattcag gaaatgcacc agaaggtgct ggcaaaatac	840
gacgtcggtt ccgagggtga aattttcggg gtaccgcttg aagaagcggc cccgtttatc	900
gatcaacgtc gtaaagagct cgatattggc ttctcattcg atcttatccg tctcgatcgc	960
gccgtagaag aaaaatggcg acggaatgat tggacgctat ccagttccg tcagatcaac	1020
aatcgactgg tcgatatggc cgggcaatat ggctggaata ctttcttcct gagcaaccat	1080
gataaccgcg gtgtgtatc acacttcggt gacgatcgcc ctgagtggcg tatccgttct	1140
gctaaagcgt tggcaaccct agcgttaaca cagcgagcga ccccgtttat ttatcaaggg	1200
gacgaattgg gcatgaccaa ctatccgttt acctccttgt ctgaatttga tgacattgaa	1260
gttaaagggt tctggcagga cttttagag accggaaaag tgaaacctga tgtctttttg	1320
gaaaacgtga aacaaacgag tcgcgataac agccgaaccc cattccaatg gagcaatgcg	1380
gaacaggcgg gctttactac aggtacgccc tggttccgta ttaaccccaa ctacaagaac	1440
atcaatgcag aggatcaaac gcaaaaccca gattccatct tccatttcta ccgtcagctg	1500

atcgactgc gtcagccac gccggcggtc acctacggag cctatcagga tctcgatccg 1560

aataataacg aggtacttgc ttatactcgt gaactcaacc agcaacgtta tctggttg 1620

gtgaacttta aagagaaacc ggtgcattac gcgctgccga aaacgcttgc catcaagcaa 1680

acactgttgg aaagtgggca gaaagataag gtagcaccga atgcaacctc acttgagctc 1740

cagccgtggc aatctggtat ttatcagctg aactag 1776

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 5

catatgtacg aacaagtctc ccactcg 27

<

210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 6

ctcgagaagc tgtaaccaat aaaagcc 27

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R325K-F

<400> 7

cgatcgcgcc gtagaagaaa aatggcgacg ga 32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R325K-R

<400> 8

tccgtcgcca tttttcttct acggcgcat cg 32