(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0114379
(43) 공개일자 2017년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 1/08 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)
C12P 19/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 1/08 (2013.01)
C12P 19/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0041058
(22) 출원일자 2016년04월04일
심사청구일자 2016년04월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초동,삼풍아파트)
최인걸
서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 501호 (사당동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

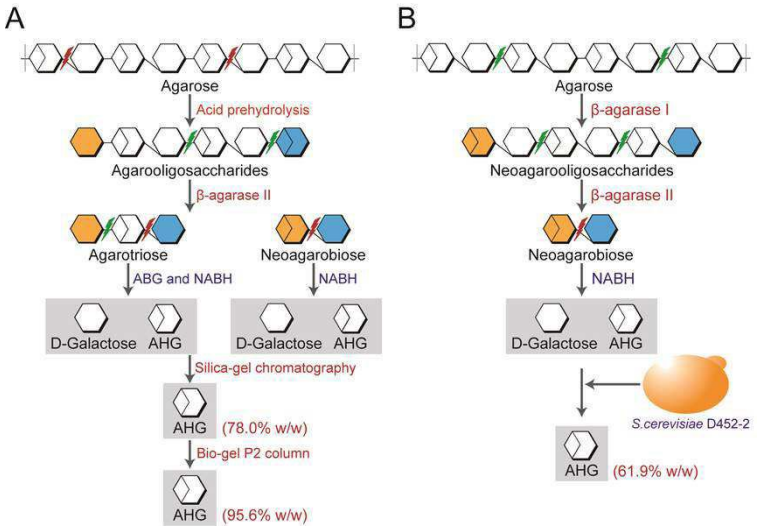
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **미생물을 이용한 3, 6-안하이드로-L-갈락토오스의 신규한 정제방법**

(57) 요 약

본 발명은 미생물을 이용한 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 신규한 정제방법에 관한 것으로, 아가로스 또는 한천의 효소적 가수분해 후 정제과정에서 미생물을 사용함으로써 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선한 효과를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 19/20 (2013.01)
C12Y 302/01081 (2013.01)
C12Y 302/01159 (2013.01)

(72) 발명자
유소라
경기도 남양주시 홍유릉로248번길 51(금곡동 LG아파트) 103동 1002호
윤은주
서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라)

조경문
경기도 성남시 분당구 장미로 55(야탑동 장미마을) 동부아파트 107동 1101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	G01201506010421
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오의료기기산업핵심기술개발사업
연구과제명	[RCMS](2세부)미백·보습 기능의 바이오슈가 및 화장품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계;

상기의 반응물을 탄소원으로 하여 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

상기의 미생물 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

효소군과 기질의 반응은 아가로스 또는 한천의 전처리 없이 수행되는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 효소군과 기질의 반응은

내열성 한천분해효소와 아가로스 또는 한천을 반응시키고,

상기의 반응물과 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 반응시키는 것인, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

내열성 한천분해효소와 아가로스 또는 한천의 반응은 40 내지 60℃의 온도 범위에서, 0 내지 300 rpm의 조건으로, pH 5 내지 9에서, 30분 내지 7일 동안 수행되는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

엑소-타입의 한천분해효소는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 4에 기재된 아미노산 서열로 표시되는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소에 의한 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 수행되는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 락토바실러스, 비피도박테리움, 바실러스, 스트렙토마이세스, 코리네박테리움, 자이모모나스, 대장균 또는 효모 중 어느 하나인, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계는 미생물 배양액을 원심분리 또는 여과하여 얻는 것인, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법.

청구항 10

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군; 및

갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

엑소-타입의 한천분해효소는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 4에 기재된 아미노산 서열로 표시되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

효소군은 기질로 아가로스 또는 한천을 사용하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 락토바실러스, 비피도박테리움, 바실러스, 스트렙토마이세스, 코리네박테리움 또는 효모 중 어느 하나인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아가로스 또는 한천의 효소적 가수분해 후 정제과정에서 미생물을 사용함으로써 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선한 미생물을 이용한 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 신규한 정제방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 홍조류를 구성하는 주요한 다당체는 아가로스이며, 아가로스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하 'AHG'라 함)와 D-갈락토오스가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아 가며 연결되어 있는 중합체이다. 이 중에서도 AHG는 화장품 미백 및 보습 기능성뿐만 아니라 항충치 기능성 및 대장암 예방 기능성을 가진 복합기능성 고부가가치 소재이다. 따라서 홍조류의 주요 탄수화물인 한천 또는 아가로스로부터 AHG를 효율적으로 생산하고 정제하는 기술은 매우 중요하다.

[0004] 첫째로, AHG를 생산하기 위해서 종래에는 약산인 아세트산 또는 낮은 농도의 중성 버퍼인 Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)로 아가로스 또는 한천을 전처리하여 아가로올리고당(agarooligosaccharides)을 얻고, 이를 엑소-타입 베타-아가라아제(exo-type β-agarase Ⅱ) 효소반응을 통해 네오아가로바이오스(neoagarobiose)를 생산한다. 그러나 이때 아가로트리오스(agarotriose)가 부산물로 함께 생성이 된다는 단점이 있으며 이를 분해하기 위해서는 아가로라이틱 베타-갈락토시다아제(agarolytic β-galactosidase, ABG)라는 추가적인 효소 도입이 필요하다. 이후 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(NABH)의 효소반응을 통해 단당류인 AHG와 D-갈락토오스를 획득할 수 있다. 그러나 이 공정의 첫 단계인 전처리 반응 시 아세트산을 사용하게 되면 이후 중화 과정에서 다량의 염이 생성되는 문제점이 있으며, 낮은 농도의 중성 버퍼를 사용하게 되면 전처리 반응이 고온(170℃)에서 이루어지므로 대량생산 시 고온고압 반응기가 요구된다는 문제점이 있다. 또한 전처리 공정 중에 AHG가 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF)로 과분해가 되어 이것이 AHG 생산 수율을 떨어뜨리는 단점이 있다. 특히, 아세트산의 경우 불쾌취를 유발하기 때문에 AHG를 화장품 소재로 이용할 경우 문제가 될 수 있다. 뿐만 아니라 전처리 과정 중에서 알파 결합이 우선적으로 분해됨에 따라 이후 효소당화공정에서 부산물로 남게 되는 아가로트리오스(agarotriose)를 분해하는 ABG 효소를 추가적으로 사용해야 하므로 공정이 더욱 복잡해진다는 단점이 있다.

[0005] 둘째로, 현재까지 AHG를 정제하는 방법은 효소가수분해 최종산물인 AHG와 D-갈락토오스를 실리카 젤 크로마토그래피와 bio-gel p2 컬럼 크로마토그래피인 두 단계의 크로마토그래피 방법을 이용하였다. 이 방법을 사용하게 되면 실리카 젤 크로마토그래피 과정에서 인체에 유해한 유기용매(즉, 디클로로메탄, 클로로포름, 메탄올)를 사용하게 되며, 정제과정 중에 손실되는 AHG의 양이 많아서 최종적인 AHG 획득수율이 떨어진다는 문제점이 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) HT Kim et al., Bioresour. Technol. (2012) 107:301-306

(비특허문헌 0002) HT Kim et al., Bioresour. Technol. (2013) 136:582-587

(비특허문헌 0003) CH Lee et al., Appl. Environ. Microbiol. (2014) 80:5965-5973

(비특허문헌 0004) CH Lee et al., Process Biochem. (2015) 50: 1629-1633

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 아가로스 또는 한천의 효소적 가수분해 후 정제를 통한 AHG 생산 과정에서 정제에 의한 AHG 손실을 막기 위해 미생물을 이용하는 신규한 AHG 정제방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법을 이용하여 AHG의 생산 수율을 개선할 수 있는 AHG 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계;

[0012] 상기의 반응물을 탄소원으로 하여 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

[0013] 상기의 미생물 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군; 및

[0015] 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소로 이루어진 효소군을 사용하여 아가로스 또는 한천에 대한 기존의 화학적 전처리, 중화 과정, 아가로트리오스 분해효소 처리 없이 아가로스 또는 한천을 갈락토오스 및 AHG로 분해하고, 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 통해 상기 갈락토오스를 대사함으로써 기존의 정제과정을 별도로 거치지 않고 AHG를 수득하므로 AHG 손실을 줄일 수 있어 AHG를 고수율로 얻을 수 있는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 아가로스로부터의 AHG 생산 및 정제 공정 모식도를 도시한 것으로, (A)는 종래의 아세트산 전처리와 효소당화 공정에 의한 AHG 생산 및 두 단계 크로마토그래피를 통한 AHG 정제공정, (B)는 본 발명의 효소당화에 의한 AHG 생산 및 미생물을 이용한 AHG 정제공정이다.

도 2는 본 발명에 따른 세 단계의 효소반응에 의한 아가로스로부터 AHG 생산 및 미생물을 이용한 AHG 정제를 보여주는 TLC 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 GRAS 미생물인 효모를 이용한 AHG 정제 결과를 도시한 것으로, (A)는 효모 배양 전과 후의 TLC 결과, (B)는 효모 배양 전과 후의 GC/MS 분석 결과이다.

도 4는 NABH 유전자를 도입한 재조합 효소의 NABH 활성 측정 결과로, (A)는 TLC 분석결과, (B)는 NABH의 특이활성 측정 결과이며, Control은 빈 벡터가 도입된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces serevisiae*) D452-2, NABH는 NABH가 도입된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces serevisiae*) D452-2이다.

도 5는 이당체인 네오아가로바이오스를 기질로 하여 시간별 (A) 세포 생장 및 (B) 배지 내 탄소원 변화를 TLC로 분석한 결과를 도시한 것으로, Control은 빈 벡터가 도입된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces serevisiae*) D452-2, NABH는 NABH가 도입된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces serevisiae*) D452-2이다.

도 6은 D-갈락토오스 대사능이 있는 대장균(*E. coli*)(A), 피키아 파스토리스(*P. pastoris*)(B) 및 자이모모나스 모빌리스(*Z. mobilis*)(C)를 이용한 AHG 정제 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계;

[0022] 상기의 반응물을 탄소원으로 하여 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

[0023] 상기의 미생물 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는, 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소(agarase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 효소군; 및

[0025] 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명자들은 기존에 알려진 아세트산을 이용한 전처리 방법과 Tris-HCl 버퍼(pH7.4)를 사용한 열수 전처리 방법에서 한 걸음 더 나아가 이 전처리 방법들이 수반하는 중화과정에서의 염 발생의 문제점과 고온의 처리과정 동안에 AHG가 5-HMF로 과분해되어 당화수율이 낮아지는 문제점을 해결하고자 내열성 베타-한천분해효소인 Aga16B를 공정에 적용하여 화학적 전처리 과정을 생략하고 3가지 효소들을(Aga16B, Aga50D, NABH) 아가로스 또는 한천과 순차적으로 반응시켜 효소적 당화만을 통해 아가로스 또는 한천을 분해하여 AHG와 D-갈락토오스를 높은 수율로 생산하는 공정방법을 개발하였다.

[0027] 이러한 공정은 다음과 같은 장점이 있다:

[0028] 1) 값비싼 아세트산을 사용하지 않아 비용 절감의 효과가 있다. 뿐만 아니라 최종 분해산물 중에서 AHG는 화장품 기능성 소재로도 이용할 수 있는 물질이므로 불쾌한 냄새를 유발하는 아세트산을 사용하지 않는다는 점은 가장 큰 장점 중 하나이다.

[0029] 2) 중화과정을 통해 생성되는 소듐 아세테이트와 같은 염이 생성되지 않는다.

[0030] 3) 5-HMF와 같은 과분해 산물이 생성되지 않으므로, 단당류 생산 수율을 높일 수 있다.

[0031] 4) 기존의 화학적 처리공정은 마이크로웨이브 같은 장비가 필요하나 효소공정은 낮은 온도에서 시행하기 때문에 고온조절장비가 필요하지 않으므로 스케일 업 함에 있어 이점이 있다.

[0032] 5) 세 종류의 효소군을 사용하는 경우 분해산물로 아가로트리오스가 생성되지 않으므로 아가로트리오스 가수분해효소를 사용할 필요가 없다.

[0033] 다음으로, 기존의 AHG 정제과정에서 손실되는 AHG를 막기 위해, 인체에 안전하면서 갈락토오스 대사능이 있는 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물을 통해 갈락토오스를 대사함으로써 효소 가수분해 산물 내에 AHG만 존재하도록 한다. 이러한 정제방법은 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않으며, 정제과정 중에 손실되는 AHG 양이 거의 없어 정제된 AHG를 고수율로 획득할 수 있다.

[0034] 따라서, 본 발명의 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법은 도 1에 도시된 바와 같이,

[0035] 전처리 없이 아가로스 또는 한천을 효소적으로 가수분해하는 단계;

[0036] 상기의 효소적 가수분해 산물을 탄소원으로 하여 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

[0037] 상기의 미생물 배양액을 원심분리 또는 여과하여 AHG를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 아가로스 또는 한천의 효소적 가수분해 반응은

[0039] 내열성 한천분해효소와 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계; 및

[0040] 상기의 반응물과 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 내열성 한천분해효소와 아가로스 또는 한천은 40℃ 내지 60℃의 온도 범위에서, 0 내지 300 rpm의 조건으로, pH 5 내지 9에서, 30분 내지 7일 동안 반응하여 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로헥사오스를 생산할 수 있다.

[0042] 상기 내열성 한천분해효소는 엔도-타입(endo-type) 한천분해효소로, 실온에서 50℃까지 열 안정성을 유지하고, 실온에서 60℃까지 아가로스 또는 한천 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 약 55℃에서 최적 활성을 나타낸다. 따라서, 아가로스 또는 한천이 액체 상태로 유지되는 온도 범위, 즉, 약 35℃ 이상에서 활성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0043] 상기 내열성 한천분해효소는 아가로스 또는 한천을 기질로 사용하며, 효소 반응 산물은 중합도(Degree of polymerization (DP)) 4 및 6인 네오아가로테트라오스 및 네오아가로헥사오스인 것으로 확인되었다.

[0044] 상기 내열성 한천분해효소는 엑소-타입 한천분해효소인 엑소-타입의 한천분해효소와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 처리한 경우, 종래의 화학적 전처리를 통해 얻은 당화수율 대비 개선된 당화수율을 나타낼 수 있다. 일 구체예에 따르면, 기존 버퍼 전처리 대비 약 1.6배(72.5% of theoretical maximum) 증가된 당화수율을 얻었다.

[0045] 상기 내열성 한천분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로헥사오스로의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^{T}에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0047] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^{T} 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^{T} 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[0048] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 아가로올리고당을 이당체인 네오아가로바이오스와 아가로트리오스(D-갈락토오스-베타-1,4 결합-3,6-안하이드로-L-갈락토오스-알파-1,3 결합-D-갈락토오스)로 분해하는 효소로, 아가로스의 D-갈락토오스와 AHG 사이의 β-1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(이하, 'Aga50D'라고도 함)이다.

[0049] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 SEQ ID NO:3에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로올리고당 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열 및 상기 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0050] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^{T}에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0051] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^{T}의 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[0052] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대

상기 엑소-타입의 한천분해효소는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액을 대체하여 이용할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2010-0040438호(2010.04.20)를 참조할 수 있다.

[0053] 상기 아가로올리고당과 엑소-타입의 한천분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.

[0054] 상기 네오아가로바이오스를 AHG와 D-갈락토오스로 분해할 수 있는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소('*Sc*NABH'라고도 함)는 SEQ ID NO: 4에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 4에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^{T}에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0056] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2013-0085017호(2013.07.26)를 참조할 수 있다.

[0057] 상기 네오아가로바이오스와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0059] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci* USA 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[0060] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.

[0061] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.

[0062] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[0063] 본 발명의 미생물을 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정제방법에 있어서, 상기 네오아가로바이오스의 분

해 산물을 탄소원으로 하여 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양할 수 있다.

[0064] 상기 갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 비피도박테리움 롱굼(*B. longum*), 비피도박테리움 비피둠(*B. bifidum*), 액티레귤라리스(*Actiregularis*) 등의 락토바실러스 및 비피도박테리움을 포함하는 유산균; 바실러스; 스트렙토마이세스; 코리네박테리움; 자이모모나스 모빌리스(*Z. mobilis*) 등의 자이모모나스; 대장균; 또는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*P. pastoris*) 등의 효모 중 어느 하나일 수 있다. 이들은 앞서 언급한 인체에 무해한 GRAS 미생물로, 갈락토오스를 대사하므로 미생물 배양액에는 미생물과 AHG만 남게 된다.

[0065] 따라서, 기존의 정제과정 없이 상기의 미생물 배양액을 원심분리 또는 여과 등을 통해 미생물 또는 세포 찌꺼기들을 제거하고 남은 액체 내에는 AHG가 남게 되어 고수율로 AHG를 얻을 수 있다.

[0066] 상기 갈락토오스 대사능이 있는 미생물의 배양 조건, 예를 들어, 배양 배지, 배양 온도, 시간 등은 당업자의 이해 범주 내에서 수행될 수 있어 특별히 제한하지는 않는다.

[0067] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0069] <실시예 1> Aga16B, Aga50D 및 NABH 재조합 효소 생산

[0070] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40 유래 엔도-타입 베타-아가라아제인 Aga16B 유전자(Sde_1175), 엑소-타입 베타-아가라아제인 Aga50D 유전자 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소 NABH 유전자를 pET21a 벡터를 사용하여 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에 도입하였다(Aga50D의 경우, 대한민국 공개특허 제2010-0040438호(2010.04.20), NABH의 경우, 대한민국 공개특허 제2013-0085017호(2013.07.26를 참고함).

[0071] Aga16B의 경우, 게놈 DNA는 상업적인 DNA 키트(바이오니아, 한국)를 사용하여 정제하였고, Aga16B는 PCR로 증폭시켰다. 이때 프라이머는 Aga16B-N, 5'-AAA GGATCC ATGGCAGATTGGGACGGAATT-3' (Tm: 59.4); Aga16B-C, 5'-AAA GCGGCCGC GTTGCTAAGCGTGAACTTATCTA-3' (Tm: 59.3)이다. PCR 산물은 Aga16B의 N-말단의 아미노산 19-20에 위치하는 시그널 시퀀스를 제거한 것이다. 제한 효소로는 *Bam*HI과 *Not*I을 사용하였으며 N-과 C-말단 끝부분의 5'와 3' 부분에 위치한다. PCR 산물과 pET21a는 각각 *Bam*HI과 *Not*I으로 자르고 T4 DNA 라이게이즈를 사용하여 이 둘을 붙였다. 그리고 *E.coli* BL21로 형질전환 시켰다.

[0072] 각각의 유전자가 도입된 재조합 대장균을 전배양(pre-culture)하기 위해 50mL-코니칼 튜브에 엠피실린(ampicillin) 100㎍/mL가 있는 10mL의 LB 브로스에서 37℃, 9시간 배양하였다. 그 후 전 배양액 10mL을 같은 배지 조성의 본 배양액 1L에 접종한 후, 광학밀도분광기(Optical density spectroscope)을 이용하여 광학밀도값이 미드익스포넨셜 단계(OD 0.4~0.6)까지 자라면 0.1mM 이소프로필-베타-디-씨오갈락토파이라노사이드(IPTG)를 넣고 16℃에서 16시간 동안 인덕션(induction) 시켰다. 그 후 세포 배양액을 500mL-튜브에 옮겨 4℃에서 20분간 10,000 rpm에서 원심분리를 한 뒤 세포를 수득하였다. 단백질의 변성을 방지하기 위하여 Tris 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 7.4) 30mL에 모은 세포를 다시 풀어주고 초음파기기(sonicator)를 이용하여 세포를 파쇄(cell lysis)하였다. 이후 4℃에서 1시간 동안 16,000 rpm에서 원심분리 하였다. 히스트랩 컬럼(5mL GE health care)을 사용하여 단백질을 정제한 뒤, SDS-PAGE gel을 사용하여 정제된 각각의 단백질의 크기를 확인하였다. 탈염(Desalting) 컬럼을 사용하여 단백질 정제에 사용하였던 염(Imidazole)을 제거하였다. 염이 제거된 재조합 단백질 효소는 BCA 분석 방법으로 농도를 정량하였다.

[0074] <실시예 2> Aga16B, Aga50D 및 NABH의 효소반응

[0075] Aga16B 효소 반응 시 기질은 5%(w/v) 농도의 아가로스를 사용하였으며 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)에서 55℃, 200 rpm 조건에서 10시간 동안 반응을 실시하였다.

[0076] Aga16B 효소 반응 산물인 네오아가로올리고당을 기질로 하여 Aga50D 효소 반응을 실시하였으며 25℃, 200 rpm 조건에서 24시간 동안 효소 반응을 실시하였다. 마지막으로 NABH 효소반응은 Aga50D 효소 반응 산물이 네오아가로바이오스를 기질로 하여 30℃, 200 rpm 조건에서 12시간 동안 효소 반응을 실시하였다.

[0077] 각 단계별 효소 반응 후 반응 산물은 thin layer chromatography(TLC)를 통해 분석하였다. TLC 분석 조건은 고

정상인 실리카 겔 플레이트에 1㎕의 효소 반응산물을 로딩하고, 이동상 용매로는 n-부탄올: 에탄올: 물, 3:1:1 (v/v/v)로 하여 1시간 동안 전개시킨 뒤 에탄올에 녹인 10% 황산과 에탄올에 녹인 0.2%의 1,3-디하이드록시나프탈렌을 사용하여 발색시켰다.

[0078] 도 2에 나타낸 바와 같이, 엔도-타입의 β-agarase Ⅰ인 Aga16B 효소 반응을 통해 아가로스 기질은 네오아가로올리고당으로 분해되었으며, 이때 주요 산물은 중합도(degree of polymerization, DP) 4와 DP6에 해당하는 네오아가로테트라오스와 네오아가로헥사오스였다. 그 후 엑소-타입의 β-agarase Ⅱ인 Aga50D 효소 반응을 통해 이당체인 네오아가로바이오스가 생성이 되었으며, NABH 효소 반응을 통해 AHG와 D-갈락토오스가 생성되었다.

[0079] 효소 반응 단계별 생산 수율을 계산한 결과, Aga16B의 반응 산물은 단일 물질이 아니므로 정량이 불가하였으며 Aga50D 반응산물인 네오아가로바이오스를 정량한 결과, 10g의 아가로스로부터 9.44g의 NAB를 얻었다(0.944g NAB/g agarose)(표 1). 또한 NABH 반응 결과 10g의 아가로스로부터 획득한 단당 수율은 7.52g이었다(0.752g monomeric sugars/g agarose)(표 1).

표 1

[0080] 효소적 당화 및 미생물을 이용한 정제과정에서의 단계별 생산 수율

정제과정의 단계	분해산물	수율 (초기 아가로스 기준) (%, w/w)
초기 기질	아가로스	100.0
Aga16B	네오아가로올리고당(DP 4, 6)	NA
Aga50D	네오아가로바이오스(DP 2)	94.4
NABH	AHG, 갈락토오스	75.2
효모	AHG	37.3
NA: DP4 + DP6의 혼합물로 구성되어 각각의 수율을 구하기 어려움		

[0082] <실시예 3> GRAS 미생물인 효모를 이용한 AHG 정제

[0083] 실시예 1과 2에서 획득한 최종 반응 산물은 주로 AHG와 D-갈락토오스이며, 이 중에서 D-갈락토오스를 제거하기 위하여 효모 배양을 실시하였다. 효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2 균주를 사용하였으며 전배양은 YPD 브로스에서 30℃, 200 rpm에서 24시간 동안 실시하였다. 배양 후 세포 펠렛을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리를 통해 얻고, 세포 펠렛은 Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 사용하여 세척한 후 다시 한번 같은 조건에서 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다.

[0084] 배양을 위해 3.35g/L의 yeast nitrogen base 및 0.4 g/L의 CSM을 함유한 최소배지에 AHG와 D-갈락토오스가 있는 효소반응산물을 탄소원으로 하여 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) D452-2의 세포 펠렛을 접종하였다. 30℃, 200rpm에서 24시간 배양 후 GC/MS 분석하였다.

[0085] 도 3에 나타난 바와 같이, D-갈락토오스는 모두 없어지고 AHG만 남은 것을 확인하였으며, 수율을 계산한 결과 10g의 아가로스로부터 3.73g의 정제된 AHG를 얻었으며(0.373g의 AHG/g agarose), AHG 순도는 61.9% (w/w)였다.

[0087] <실시예 4> NABH를 도입한 재조합 효모의 효소활성 측정

[0088] NABH를 pRS425GPD 벡터(auxotrophic marker, Leu-)에 클로닝하여 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2에 도입하여 인 비트로 분석을 통해 활성을 측정하였다. NABH 유전자를 가진 플라스미드가 있는 효모 세포를 Y-PER(Yeast protein extraction reagent)를 사용하여 파쇄한 후, 용해성 단백질을 BCA 분석을 통해 정량하였다. 조 단백질을 NAB기질과 30℃, 200rpm 조건에서 NABH 효소반응을 실시하였다. NABH 효소의 활성은 TLC 분석으로 통해 반응 산물을 정성적으로 확인하였으며, NABH의 특이 활성을 측정하였다(도 4).

[0090] <실시예 5> NABH를 도입한 재조합 효모를 이용한 AHG 정제

[0091] NABH를 도입한 재조합 효모의 NABH 효소 활성을 실시예 4를 통해 확인하였다. 이를 이용하여 AHG와 D-갈락토오

스가 아닌 이당체 네오아가로바이오스로부터 AHG를 정제하는 실험을 실시하였다. 이때 배양을 위해 3.35g/L의 yeast nitrogen base 및 0.4 g/L의 CSM (Leu-)을 함유한 최소배지에 Aga50D 반응 산물인 네오아가로바이오스를 탄소원으로 NABH를 도입한 재조합 효모의 배양을 실시하였다. 30℃, 200rpm에서 배양하였으며 이때 시간 별 세포 배양액의 탄소원을 관찰하였다.

[0092] 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군인 pRS425GPD 벡터만을 도입한 재조합 효모는 NAB를 대사하지 못하지만 NABH를 도입한 재조합 효모의 경우 NAB를 분해하여 갈락토오스를 대사하여 자랄 뿐만 아니라 AHG는 세포 밖으로 내보내는 것을 관찰하였다.

[0093] 이를 통해 NABH를 도입한 재조합 효모를 이용하여 NAB로부터 AHG를 정제할 수 있다.

[0095] <실시예 6> 기타 D-갈락토오스 대사능이 있는 미생물에서의 AHG 정제 효과 확인

[0096] 실시예 1과 2에서 획득한 최종 반응 산물은 주로 AHG와 D-갈락토오스이며, 이 중에서 D-갈락토오스를 대사하는 기능을 가진 대장균(*E. coli*), 피키아 파스토리스(*P. pastoris*), 자이모모나스 모빌리스(*Z. mobilis*)를 이용하여 AHG를 정제하였다.

[0097] 대장균은 *E. coli* K12 균주를 사용하였으며 전배양은 LB 브로스에서 37℃, 200 rpm에서 16시간동안 실시하였다. 효모 계통의 피키아는 피키아 파스토리스(*P. pastoris*) X33 균주를 사용하였으며 전배양은 YPD 브로스에서 30℃, 200 rpm에서 16시간동안 실시하였다. 그람음성균인 자이모모나스는 자이모모나스 모빌리스(*Z. mobilis*) ATCC 31821 균주를 사용하였으며 전배양은 100mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.0)가 들어있는 RM 배지에서 30℃, 200 rpm에서 16시간동안 실시하였다. 배양 후 각각 세포 펠렛을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 얻고, 세포 펠렛은 Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 사용하여 세척한 후 다시 한번 같은 조건에서 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다.

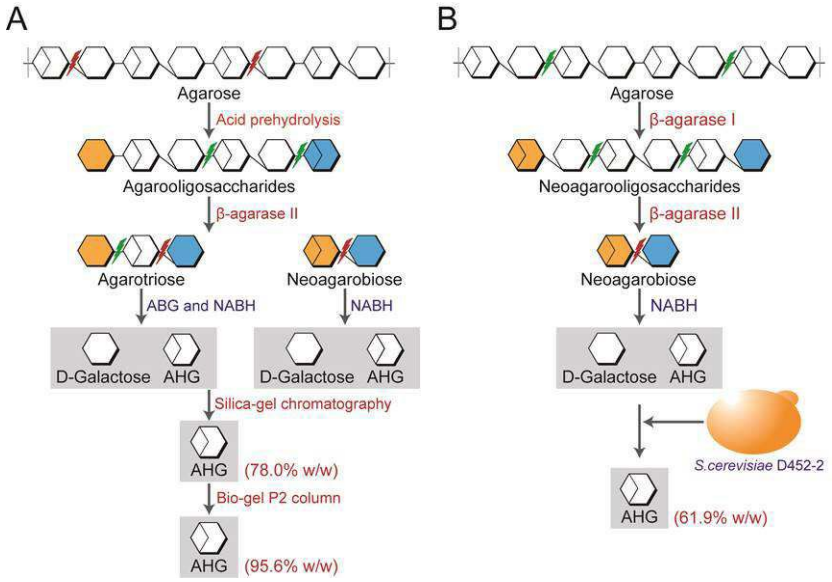
[0098] 배양을 위해 2.5g/L의 yeast nitrogen base 및 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 함유한 최소배지에 AHG와 D-갈락토오스가 있는 효소반응산물을 탄소원으로 하여 *E. coli* K12의 세포 펠렛을 접종하였다.

[0099] 배양을 위해 3.35g/L의 yeast nitrogen base 및 0.4 g/L의 CSM을 함유한 최소배지에 AHG와 D-갈락토오스가 있는 효소반응산물을 탄소원으로 하여 피키아 파스토리스(*P. pastoris*) X33의 세포 펠렛과 자이모모나스 모빌리스(*Z. mobilis*) ATCC 31821의 세포 펠렛을 각각 접종하였다. 30℃, 200rpm에서 24시간 배양 후 TLC로 정성 분석을 하였다.

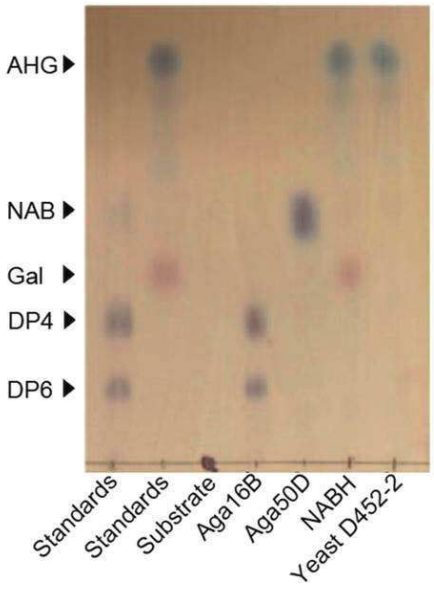
[0100] 도 6에 나타난 바와 같이, 24시간이 지난 후 D-갈락토오스는 모두 없어지고 AHG만 남은 것을 확인하였다.

도면

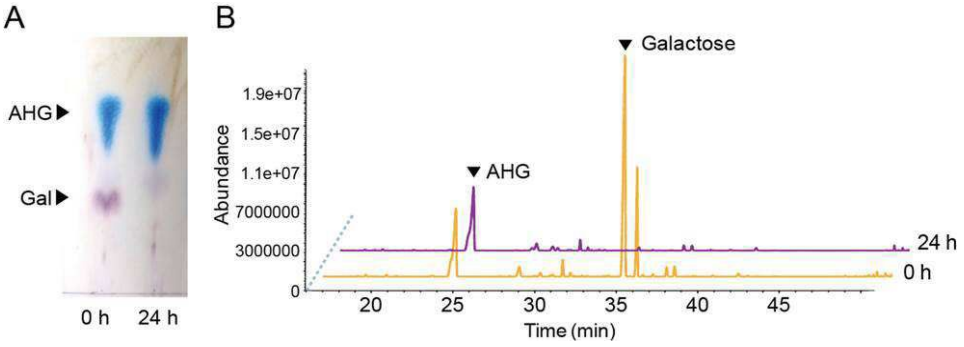
도면1



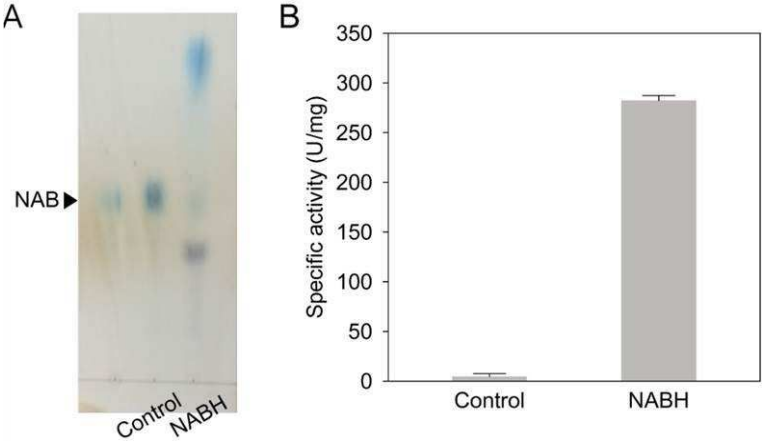
도면2


AHG
NAB
Gal
DP4
DP6
Standards
Standards
Substrate
Aga16B
Aga50D
NABH
Yeast D452-2

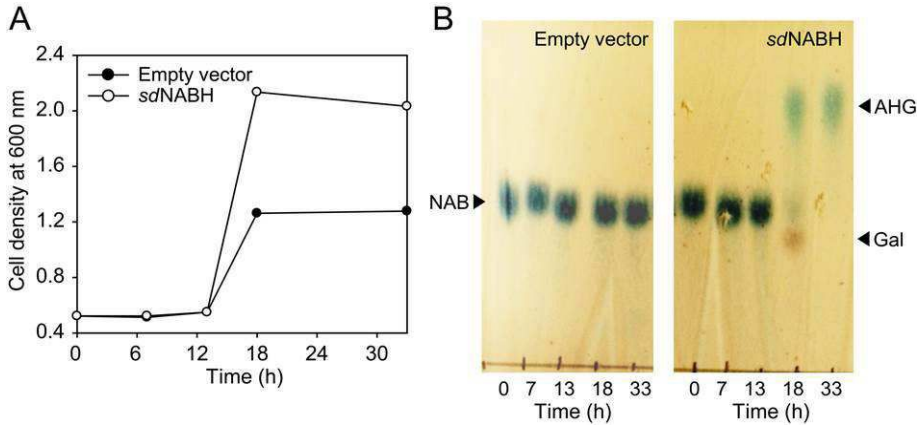
도면3


A
AHG
Gal
0 h
24 h
B
Galactose
AHG
Abundance
1.9e+07
1.5e+07
1.1e+07
7000000
3000000
0
20
25
30
35
40
45
Time (min)
24 h
0 h

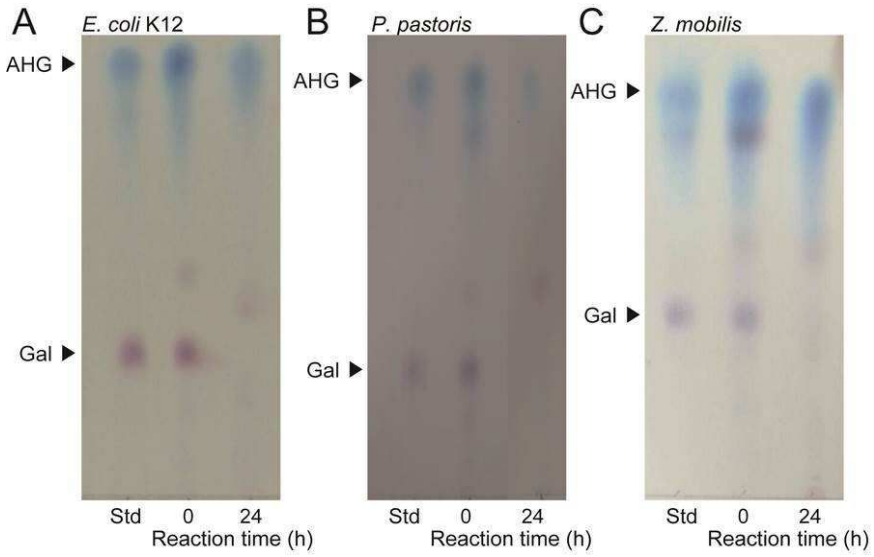
도면4


A
NAB
Control
NABH
B
Specific activity (U/mg)
350
300
250
200
150
100
50
0
Control
NABH

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Novel purification method of 3,6-anhydro-L-galactose using microorganisms

<130> P16U13C0036

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 598

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 1

Met Lys Thr Thr Lys Cys Ala Leu Ala Ala Leu Phe Phe Ser Thr Pro

1 5 10 15

Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp Gly Ile Pro Val Pro Ala Asp Pro Gly

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Trp Glu Leu Gln Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr

35 40 45

Ala Ala Pro Ala Asn Gly Lys Ser Thr Thr Phe Tyr Ser Arg Trp Ser

50 55 60

Glu Gly Phe Ile Asn Ala Trp Leu Gly Pro Gly Gln Thr Glu Phe Tyr

65 70 75 80

Gly Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Gly His Leu Ile Ile Lys Ala Thr

85 90 95

Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gln Ile Tyr Thr Gly Ala Ile His Ser Asn

100 105 110

Glu Ser Phe Thr Tyr Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Thr Lys Ile Thr

115 120 125

Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr

130 135 140

Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Ala Thr Glu

145 150 155 160

Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg

165 170 175

Gln Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro

180 185 190

Asn Pro Asp Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val

195 200 205

Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu Leu

210 215 220

Val Arg Thr Val Ser Gly Pro Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr

225 230 235 240

Asn Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu

245 250 255

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

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

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

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

Val Ala Gln Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Ser Tyr Gln Ala Gly Ser Gly
515 520 525

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

595

<210> 2
<211> 1797
<212> DNA
<213> Saccharophagus degradans 2-40
<400> 2

atgaaaacca ccaaatgcgc cctagctgcg ctcttcttca gtacccctct tatggctgca 60
gattgggacg gaattcctgt cccagcggac ccagggaatg gcaacacctg ggagctacag 120
tccctttctg acgatttcaa ctatgcggcc ccagctaacg gcaaaagcac caccttctat 180
agccgctgga gcgaaggctt tatcaatgct tggctcggcc cggggcaaac cgagttttac 240
ggccccaatg cttcggtaga aggcggccac cttattatta aggccactcg caagccaggt 300

actactcaaa tttacactgg agcaattcac tccaatgaaa gttttaccta cccattgtat 360
ttggaagcgc gcaccaaaat tacaaacctc accctcgcca acgcattttg gctactaagc 420
tcagattcca ccgaagagat tgatgtgctg gagtcttacg gcagcgaccg tgcaacagaa 480
acgtggtttg acgaacgcct acacttaagc catcacgttt ttatccgcca gccatttcaa 540
gactaccaac cgaaagatgc aggcagctgg taccccaacc ccgatggcgg cacttggcgc 600
gaccaatttt tccgtatagg tgtttattgg atagacccat ggacactgga gtattacgtg 660
aatggcgaat tagtgcgcac tgtaagcggc ccagaaatga ttgacccgta cggttacacc 720

aacggcacag gcctaagtaa acccatgcaa gttattttcg atgcagagca tcagccttgg 780
cgcgacgaac aaggtactgc cccacccacc gacgcagagc tagccgactc gagtcgcaat 840

caattcttaa ttgactgggt gcgattctac aaacccgtgg caagcaacaa tggtggcggc 900

gacccaggca atggcggcac cccaggtaat ggtggcagtg gcgatactgt agtggtagaa 960

atggccaact tctctgccac aggtaaagaa ggctctgcag ttgcaggcga cactttcaca 1020

ggcttcaacc ccagcggcgc gaacaacatc aactacaaca ccttagggga ttgggcagac 1080

tacacggtga acttccccgc tgccggtaat tacaccgtaa acctaattgc agcctcgccg 1140

gttacatctg ggctgggtgc agatattttg gtagacagca gttacgcagg caccatacct 1200

gttagcagca ccggagcttg ggagatatac aacaccttta gcttgcccag ctcgatttat 1260

atcgcaagcg caggcaatca tactattcgc gtacaaagct ccggcggtag cgcttggcag 1320

tggaacggcg acgaacttcg ctttacccaa acggatgcgg atacaggcac caatccaccc 1380

agtacagcca gcatagcggt tgaagccgaa aactttaacg cggtgggcgg cacctttagc 1440

gatggtcaag ctcaacctgt tagcgtttac accgttaacg gcaacactgc cattaactac 1500

gtaaaccaag gcgattatgc cgactacacc attgctgttg cccaagcggg taactacacc 1560

attagctatc aagctggcag tggcgtaaca ggtggtagca tagagttttt ggttaacgaa 1620

aacggaagct gggccagtaa aaccgttacc gccgtaccaa accaaggttg ggataacttc 1680

caacccttaa acggaggcag cgtttaccta agcgcaggca cccaccaagt tcgtttacac 1740

ggcgctggca gcaacaactg gcagtggaac ctagataagt tcacgcttag caactaa 1797

<210> 3

<211> 747

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 3

Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe
1 5 10 15

Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu
20 25 30

Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr
35 40 45

Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe
50 55 60

Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser
65 70 75 80

Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr

85 90 95

Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys

100 105 110

Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp

115 120 125

Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser

130 135 140

Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu

145 150 155 160

Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp

165 170 175

Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln

180 185 190

Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala

195 200 205

Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala

210 215 220

Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser

225 230 235 240

Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr

245 250 255

Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp

260 265 270

Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu

275 280 285

Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val

290 295 300

Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu

305 310 315 320

Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro

325 330 335

Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu

340 345 350

Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys

355 360 365

Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr

370 375 380

Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr

385 390 395 400

Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr

405 410 415

Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly

420 425 430

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

435 440 445

Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met

450 455 460

Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys

465 470 475 480

Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser

485 490 495

Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser

500 505 510

Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys

515 520 525

Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser

530 535 540

Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val

545 550 555 560

Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala

565 570 575

Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro

580 585 590

Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met
595 600 605
Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn
610 615 620
Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu
625 630 635 640
Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp
645 650 655
His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp

660 665 670
Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro
675 680 685
Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr
690 695 700
Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val
705 710 715 720
Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn
725 730 735

Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys
740 745

<210> 4
<211> 368
<212> PRT
<213> Saccharophagus degradans 2-40
<400> 4
Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15
Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
20 25 30
Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val

35 40 45

Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His
50 55 60
Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp
65 70 75 80
Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His
85 90 95
Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile
100 105 110
Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro

115 120 125
Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val
130 135 140
Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr
145 150 155 160
Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu
165 170 175
Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe
180 185 190

Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro
195 200 205
Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu
210 215 220
Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly
225 230 235 240
Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr
245 250 255
Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys

260 265 270
Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
275 280 285

Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile
290 295 300
Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser
305 310 315 320
Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp
325 330 335

Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln
340 345 350
Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val
355 360 365