(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098093
(43) 공개일자 2013년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0019933
(22) 출원일자 2012년02월27일
심사청구일자 2013년02월06일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
조훈
광주광역시 남구 서문대로663번안길 12 104동 601호(진월동, 금광하늘연가)
최철희
광주광역시 남구 제석로80번안길 11 101-1404호 (봉선동, 한국아델리움1차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 충정

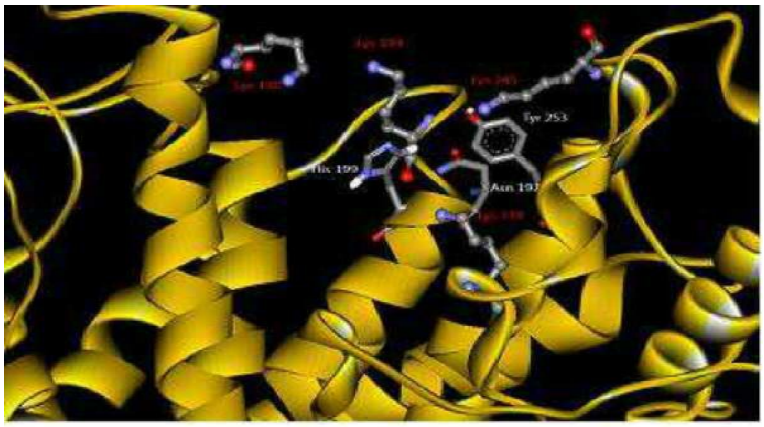
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **아조토박터 비네란디에서 유래한 돌연변이 알긴산 분해효소**

(57) 요 약

본 발명은 *A. vinelandii* 에서 유래한 알긴산 분해효소의 돌연변이 단백질들에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 돌연변이 알긴산 분해효소, 이의 생산방법, 및 이들을 함유한 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 돌연변이 알긴산 분해효소들은 야생형 효소보다 분해 활성이 높은 것을 확인하였으므로 알긴산을 저분자화 또는 소멸시키기 위한 목적으로 이용될 수 있다. 특히 세균이 감염을 위하여 형성하는 생물막의 알긴산을 제거하는 역할을 수행할 수 있으므로 기존의 항생제와 함께 사용할 경우 효과적으로 세균의 감염을 억제시킬 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

장철호

광주광역시 남구 용대로53번길 9 111-406(봉선동)

박옥란

광주광역시 동구 필문대로273번길 307호(지산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R13-2003-009
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터 육성사업 기초의약학분야
연구과제명	항생제 내성 장벽인 Biofilm의 극복전략 개발에 관한 연구
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2003.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 알긴산 분해효소의

1) 아미노산 위치 145에서 L이 A로 치환;

2) 아미노산 위치 86에서 T가 A 또는 S로 치환;

3) 아미노산 위치 138에서 K가 E로 치환;

4) 아미노산 위치 152에서 Y가 A 또는 F로 치환;

5) 아미노산 위치 190에서 D가 K로 치환;

6) 아미노산 위치 194에서 K가 A 또는 E로 치환;

7) 아미노산 위치 245에서 K가 A, D, G 또는 L로 치환;

8) 아미노산 위치 247에서 R이 A, G, L 또는 D로 치환;

9) 아미노산 위치 309에서 Q가 H 또는 K로 치환;

10) 아미노산 위치 312에서 E가 A, D 또는 Q로 치환;

11) 아미노산 위치 319에서 K가 A 또는 E로 치환;

12) 아미노산 위치 350에서 R이 D로 치환;

13) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환;

14) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환;

15) 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환;

16) 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환;

17) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환;

18) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환;

19) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환;

20) 아미노산 위치 350에서 R이 L로 치환 및 아미노산 위치 245에서 K가 L로 치환;

21) 아미노산 위치 245에서 K가A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환;

22) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환;

23) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환;

24) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K 가 E로 치환;

25) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환;

26) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환;

27) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가

A로 치환; 또는

28) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환된 돌연변이 알긴산 분해효소.

청구항 2

제1항의 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열.

청구항 3

제2항의 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 4

제3항의 발현 벡터를 포함하는 원핵생물 세포.

청구항 5

제4항의 원핵생물 세포를 배양하는 단계를 포함하는 돌연변이 알긴산 분해효소의 제조방법.

청구항 6

제1항의 돌연변이 알긴산 분해효소를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 병원균의 외부에 형성된 생물막을 파괴하거나 그 형성을 억제하는 역할을 하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 병원균은 녹농균인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 *A. vinelandii* 에서 유래한 알긴산 분해효소의 돌연변이 단백질들에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 돌연변이 알긴산 분해효소, 이의 생산방법, 및 이들을 함유한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알긴산은 두 종류로 나눌 수 있다. 한 종류는 해조류에서 추출된 알긴산(seaweed alginate)이고 다른 한 종류는 박테리아에서 유래한 알긴산(bacteria alginate)이다. 해조류에서 추출된 알긴산은 M type (β-D-mannuronate)과 C5 epimer인 G type(a-L-guluronate) 형태이거나 M type과 G type이 적절히 포함된 헤테로폴리머(heteropolymer) (polymer MG) 형태로 구분할 수 있으며 겔 형성능력은 두 가지 다른 유론산(uronic acid) 비율에 의해 결정된다(Haug A. and Larsen B., 1962, Quantitative determination of the uronic acid composition of alginate, Acta Chem, Scand., 16:1908-1918, Haug A., et al., 1967, Structure on the sequence of uronic acid residues in alginic acid, Acta Chem, Scand., 21:691-704 및 768-778). 박테리아에서 생긴 알긴산은 해조류에서 추출된 알긴산과는 달리 β-D-mannuronate의 2번 또는 3번 위치에 O-acetylation이 되어있으며 대부분이 polymannuronate로 이루어져 있다(Skjak-Brak G., et al., 1986, Monomer sequence and acetylation pattern in sae bacterial alginates, Carbohydr., Res. 154:239-250). 해조류 알긴산은 비만 억제효과, 대장의 연동운동 촉진을 통한 변비 치유, 콜레스테롤 억제 작용, 체내의 중금속 흡수와 제거, 유해물질의 독성을 억제하는 효과 등의 다양한 생리활성을 나타내며 기능성 식품소재로 활용이 가능하고

상처를 보호하는 창상피복재 및 지혈 등의 생리활성효과를 가지고 있다(Lee J. H. and Lee E. Y., 2003, Isolation of alginate degrading marine bacteria and characterization of alginase. J. Life Sci. 23:718-222, Lee B. H., et al., 2009, Alginate fiber. Fiber Technol, Ind., 13:21-24). 해조류 알긴산은 분자량이 크기 때문에 상온에서 용해시간이 길고, 농도가 높을수록 높은 점성으로 인한 첨가과정에서 문제를 일으켜 식품산업에 이용 제한을 받고 있으므로 저분자화에 대한 연구가 많이 진행되어왔다(Lim Y. S. and You B. J. 2007. Effects of hydrolysis temperature on the distribution of the molecular weights of alginates prepared from sea *tangle, Laminaria japonica*. J. Kor. Fish. Soc. 40:187-192).

[0003] 지금까지 알긴산으로부터 당화를 위해 효소(alginate lyase), 열분해. 가스화, 액화 같은 열화학적 방법과 발효로부터 생산되는 효소를 이용하는 미생물학적 방법, 가수분해법이 많이 연구되었다. 산업적 이용이 가능한 알긴산 올리고당의 생산을 위해서는 알긴산 분해효소가 필요하며, 이들 알긴산 분해효소를 분비하는 미생물을 찾기 위한 연구가 진행되어 왔다(Uo M. H., Joo D. S, Cho S. Y, and Min T. S. 2006. Purification and characterization of the extracellular alginase produced by *bacillus ichenformis* AL-577. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35:231-237). 알긴산 분해효소는 갈조류, 해조류 섭식연체동물, *Straptomyces sp*, *Vibrio sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Alginomons alginica* 와 *Azotobacter vineladii* 등에서 확인되었으며, 이외에도 해수, 해저토양, 섭식연체동물들의 분변 등에서 알긴산 분해 능력이 우수한 균주들을 찾아내고 있다(Kim et al., 2010, Isolation and characteristics of alginatedegrading *methylobacerium sp*. HJM27. Kor. J. Microbiol. Biotechno. 38:144-150 등 참조).

[0004] 알긴산 분해효소에는 M type을 분해하는 poly(M) lyase, G type을 분해하는 poly (G) lyase와 M type과 G type이 적절히 포함된 heteropolymer (polymer MG)을 분해하는 알긴산으로 나눌 수 있다. *P. aeruginosa*와 *A. vineladii* 등의 박테리아에서 생긴 알긴산 분해효소는 두 종류의 알긴산을 모두 분해할 수 있다. 하지만 모든 알긴산 분해효소가 박테리아 알지네이트를 분해할 수 있는 것은 아니다.

[0005] 한편 알긴산 분해효소는 생물막을 분해하여 세균의 부착능력을 감소시킬 수 있다. 단일세균 또는 여러 가지 세균들이 자연적인 환경에 적응하기 위하여 군집형태의 중합체인 생물막을 형성한다. 생물체나 비 생물체의 표면에 부착하여 생물막을 형성하는 세균들은 자신들이 생성한 세포외 중합체에 파묻혀 존재한다. 특히 병원성 미생물의 경우 숙주의 상피조직에 침입 시 부착 및 증식 단계를 수반하게 되는데, 이때 숙주의 방어기작 또는 외부에서 투여되는 항생물질에 대응하기 위하서 생물막의 형성은 매우 효과적인 방법일 수 있다. 생물막 조성은 세균의 종류, 부착 물체, 부착 위치와 영양성분에 따라 다르다. 생물막은 고도의 조직적인 구조와 불 균질적인 성질을 가지고 있으며, 탑 모양 혹은 버섯 모양의 미세 군락으로 조성되었으며, 이는 미생물과 이들이 분비한 EPM (extracellular polymeric matrix)으로 이루어진 비교적 견고한 구조물이다. 임상에서는 세균 생물막에 의한 감염을 흔히 볼 수 있다. 특히 병원내의 의료기기 감염이나 의료용 생물재료(인공판막)와 같은 감염이 날로 증가하고 있는 추세이다. 병원성세균 생물막 감염에 의해 야기되는 병을 BBF (bacterial biofilm)병이라고 부른다. 충치(dental caries), 치은염(gingivitis,) 치주염(periodontitis), 중이염(otitis media), 인공고관절(prosthetic hip), 만성세균성전립선염(chronic bacterial prostatitis), 심내막염(valvular endocarditis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 등이 있다. 녹농균은 호기성 그람 음성의 주요 병원내 감염세균으로서 주로 인공호흡기를 사용하는 호흡기계 감염, 화상 감염, 낭포성 섬유증 환자의 폐렴, 요로감염 등을 유발하는 원인균이며(Yoon S. S. 2010. Anaerobiosis of *Pseudomonas aeruginosa*: Implication for treatments of airway infection. Bcteriology. Viology. 40:59-66), 여러 종류의 항생제에 대해 내성을 가지므로 세균 감염증의 치료가 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 특히 유전적 질환으로 미국에서 발병률이 높은 낭포성 섬유증은 환자의 경우 녹농균에 감염되면 녹농균이 세포 외부에 알긴산을 분비하여 생물막을 형성함으로써 항생제에 대해 내성을 갖게 되므로 치료가 힘들게 된다. 녹농균 생물막은 수분이 97%이고, 세균은 10-20% 정도만 차지하고 있으며, 주요성분은 알긴산이다. 녹농균 생물막에 의한 감염에서 박테리아 알긴산은 다음과 같은 여러 가지 작용을 한다. (1) 박테리아 알긴산은 세균표면을 감싸주어 세균의 부착능력을 증가시킨다. (2) 박테리아 알긴산은 세균의 면역성을 높여준다. (3) 박테리아 알긴산은 면역 복합형 과민반응을 일으킨다. 알긴산은 항원성을 가지고 있으며 세균으로 하여금 항체를 가지게끔 자극한다. 이전의 연구에 따르면 생물막을 형성하는 녹농균에 항생제만 사용하였을 때 녹농균은 완전하게 사멸되지 않았으나 항생제와 알긴산 분해효소를 같이 사용하였을 때 녹농균을 완전하게 사멸하는 결과를 얻었다(Alkawash MA., Soothill JS, and Schiller NL. 2006. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. APMIS. 114:131-8).

[0006] 본 발명자는 3D computational 연구를 바탕으로 알긴산 분해효소의 작용기전을 규명하던 중 야생형(야생형) 보다 활성이 높은 알긴산 분해효소를 찾고자 돌연변이체들을 제작하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 아조토박터 비네란디(*A. vinelandii*)에서 유래한 돌연변이 알긴산 분해효소를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 돌연변이 알긴산 분해효소를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 돌연변이 알긴산 분해효소의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 돌연변이 알긴산 분해효소를 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아조토박터 비네란디(*A. vinelandii*)의 알긴산 분해효소(서열번호 1 및 2)에서 유래한 돌연변이 알긴산 분해효소를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 서열번호 2의 아미노산 서열 중의 하나의 아미노산이 치환된 돌연변이(single point mutation)일 수 있으며, 바람직하게는, 1) 아미노산 위치 145에서 L이 A로 치환; 2) 아미노산 위치 86에서 T가 A 또는 S로 치환; 3) 아미노산 위치 138에서 K가 E로 치환; 4) 아미노산 위치 152에서 Y가 A 또는 F로 치환; 5) 아미노산 위치 190에서 D가 K로 치환; 6) 아미노산 위치 194에서 K가 A 또는 E로 치환; 7) 아미노산 위치 245에서 K가 A, D, G 또는 L로 치환; 8) 아미노산 위치 247에서 R이 A, G, L 또는 D로 치환; 9) 아미노산 위치 309에서 Q가 H 또는 K로 치환; 10) 아미노산 위치 312에서 E가 A, D 또는 Q로 치환; 11) 아미노산 위치 319에서 K가 A 또는 E로 치환; 또는 12) 아미노산 위치 350에서 R이 D로 치환된 것이다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 서열번호 2의 아미노산 서열 중의 두 곳의 아미노산이 치환된 돌연변이(two point mutation)일 수 있으며, 바람직하게는, 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 또는 아미노산 위치 350에서 R이 L로 치환 및 아미노산 위치 245에서 K가 L로 치환된 것이다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 서열번호 2의 아미노산 서열 중의 세 곳의 아미노산이 치환된 돌연변이(three point mutation)일 수 있으며, 바람직하게는, 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K 가 E로 치환; 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 또는 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환된 것이다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 서열번호 2의 아미노산 서열 중의 네 곳의 아미노산이 치환된 돌연변이일 수 있으며, 바람직하게는, 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환된 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 원핵생물 세포를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 원핵생물 세포를 배양하는 단계를 포함하는 돌연변이 알긴산 분해효소의 제조방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 알긴산 분해효소를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물에서 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 병원균의 외부에 형성된 생물막을 파괴하거나 그 형성을 억제하는 역할을 하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 병원균은 녹농균일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 돌연변이 알긴산 분해효소들은 야생형 효소보다 분해 활성이 높은 것을 확인하였으므로 알긴산을 저분자화 또는 소멸시키기 위한 목적으로 이용될 수 있다. 특히 세균이 감염을 위하여 형성하는 생물막의 알긴산을 제거하는 역할을 수행할 수 있으므로 기존의 항생제와 함께 사용할 경우 효과적으로 세균의 감염을 억제시킬 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 AlgL의 감소된 활성 부위를 나타낸 그림이다.

도 2는 AlgL의 증가된 활성 부위를 나타낸 그림이다.

도 3은 AlgL의 상호작용을 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명의 돌연변이 알긴산 분해효소(AlgL)들은 *A. vinelandii*에서 유래된 *AlgL* 유전자(서열번호 1)로부터 위치특이적 돌연변이생성 키트(site mutagenesis kit)를 이용하여 제작되었다. *A. vinelandii*은 *AlgL* 외에도 *AlgE7, AlyA1, AlyA2, AlyA3*와 같은 알긴산 분해효소를 암호화하는 유전자를 가지고 있다(Gimmestad M., *et al.*, 2009. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. J. Bcteriol. 191:4845-4853). AlgL은 녹농균 생물막으로부터 생긴 β-D-mannuronate의 2번 또는 3번 위치에 O-acetylation 알긴산을 분해하는 M type 효소이다. 그리고 해조류에서 추출된 알긴산도 분해한다. 따라서 본 발명의 실시예에서는 박테리아에서 유래된 알긴산과 해조류에서 추출된 알긴산을 기질로 사용하여 돌연변이 효소들의 활성을 실험하였다.

[0028] 본 발명은 3D 모델을 통해 79개 돌연변이(표 1 참조)를 이용하여 알긴산 분해효소인 AlgL의 기질과의 반응 메카니즘을 찾아내고 메카니즘에 근거하여 활성을 증가시키는 돌연변이를 제작함으로써 완성하였다(표 2 내지 20 참조). 3D 모델로부터 메카니즘에 관여하는 아미노산이 티로신(tyrosine), 히스티딘(histidine) 및 아스파라긴(asparagine)임을 알 수 있었다.197번과 198번 아스파라긴, 199번 히스티딘 및 253번과 256번 티로신을 다른 종류의 아미노산으로 바꾸어본 결과, 253번 티로신과 199번 히스티딘은 활성이 없어지는 것을 알 수 있었으며 197번 아스파라긴(asparagine)은 활성이 떨어지기는 하지만 없어지지는 않았다(표 9 및 12). 이로부터 티로신과 히스티딘은 직접 기질과의 반응에 참여하며 아스파라긴은 히스티딘으로 하여금 전자를 받아들이는 능력을 강화하여 히스티딘의 염기성을 강화하는 역할을 해주는 것으로 판단된다. N198A와 N198D은 두 가지 기질에서 모두 활성을 잃었으므로, 아스파라긴의 $-NH_2$가 활성에 중요한 영향을 미치는 것으로 생각된다. Y256A와 Y64A은 두 가지 기질에서 활성을 잃었지만 Y256F와 Y64F는 두 가지 기질에서 활성을 가지고 있는 것으로 보면 256번 티로신에서 253번 티로신에서처럼 $-O^-$가 활성에 관여하는 것이 아니라 전체 페닐기가 활성에 관여하는 것을 알 수 있다.

[0029] 활성 부위 부근에 있는 138, 194, 245, 319번 염기성 아미노산인 리신(리신)을 산성 아미노산으로 바꾸었을 때 활성이 모두 증가되는 것을 알 수 있었다. 산성 아미노산으로 바꿈으로 인해 메커니즘에 관여하는 아미노산인 티로신이나 히스티딘으로 하여금 수소를 얻는 능력을 높여주기 때문에 히스티딘의 염기성을 증가시켜 활성이 증가되는 것으로 예상된다. 측쇄가 짧은 알라닌으로 바꾸었을 경우도 활성이 증가하는 것은 측쇄가 짧기 때문에 기질과의 반응에서 입체적 장애를 줄여주는 것으로 예상된다. R247A, R247G 및 R247L은 측쇄가 짧아졌기 때문에

기질과의 반응에서 입체적 장애를 줄여서 활성이 증가된 것으로 추측된다.

[0030] 63번 리신과 같은 경우에 중성 아미노산인 알라닌이나 산성 아미노산인 글루탐산(글루탐산)로 바꾸었을 경우에는 활성을 잃었으며 같은 염기성 아미노산인 히스티딘(histidine)으로 바꾸었을 경우에 활성이 있지만 야생형(wild type)에 비해 많이 떨어진 것을 알 수 있다. 63번 아미노산은 염기성이 아주 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 이는 기질과의 반응에서 기질의 친화력과 관련이 되는 것으로 생각된다. 기질은 대체적으로 산성을 띠고 있으므로 63번 리신이 기질과 결합함으로써 활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 같은 염기성 아미노산인 히스티딘(histidine)으로 바꾸었을 경우 히스티딘(histidine)은 측쇄가 짧기 때문에 기질과의 접촉이 리신보다 강하지 않은 것으로 예상된다.

[0031] E93A, E93K 및 E93Q의 분해율이 K_{cat} 값이 야생형에 비해 뚜렷하게 감소하였다. E93Q에서 글루탐산의 $-COO^-$기에서 $-O^-$가 $-NH_2$로 바뀌었을 때 활성이 떨어진 것은 $-COO^-$기가 활성에 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0032] W202D는 활성이 감소하였지만 활성은 존재하고 W202R은 활성이 존재하지 않는 것은 산성 아미노산이 티로신(tyrosine)과 히스티딘(histidine)에 전하를 공급하지만 arginine과 같은 염기성 아미노산은 히스티딘(histidine)에 전하를 공급하지 못한다. W143A와 W202A에서 활성이 감소한 것은 트립토판이 기질을 고정시켜주는 역할을 할 것이며 기질을 고정시키는 것은 전하를 공급하는 것보다 더 중요한 역할임을 알 수 있다.

[0033] L148A와 L148G는 활성이 감소하였으나 L148I에서 활성이 크게 변하지 않았다. Q309A, Q309H 및 Q309K에서 활성에 크게 변화가 없었지만 Q309E와 Q309N은 활성이 감소한 것을 알 수 있다. Q309E에서 glutamine $-NH_2$가 활성에 큰 영향을 끼친 것을 알 수 있다. Q309N은 측쇄가 짧아져서 활성이 증가될 것으로 예상했으나 glutamine과 티로신(tyrosine) 사이의 거리가 더 멀어지기 때문에 활성이 감소하는 것으로 생각된다.

[0034] E312A, E312K 및 E312Q는 활성에 거의 변화가 없었으나 E312D는 활성이 2배 증가하였다. 글루탐산의 측쇄가 짧아져 입체적 장애를 줄여주기 때문에 활성이 증가한 것으로 예상된다.

[0035] R350A, R350D 및 R350L는 K_{cat} 값이 크게 변화가 없었으나 K_m 값이 많아 떨어졌다. 350번 아미노산인 arginine의 염기성이 산성인 기질과의 반응에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0036] F60A와 F82A는 활성이 야생형에 비해 뚜렷하게 감소한 것을 알 수 있다. 페닐알라닌에서 페닐기가 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. D68A와 D68N은 활성이 떨어진 것은 aspartate에서 $-COO^-$ 기가 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0037] T86A, T86S, L145A, S147T, Y152A, Y152F, D190A 및 D190K 등의 돌연변이는 야생형과 비슷한 활성을 나타냈다

[0038] 활성이 좋은 single point 돌연변이로부터 two point 돌연변이, three point 돌연변이 및 four point 돌연변이를 만들었다. two point 돌연변이는 대부분 활성이 증가되었으며 그 중 활성이 비교적 강한 돌연변이는 K245D/K194E와 K245D/K319A이다(표 16 및 17). K245D/K194E는 동시에 염기성 아미노산을 산성으로 바꾸어 줌으로서 K245D는 티로신(tyrosine), K194E는 히스티딘(histidine)으로 하여금 수소를 받아들이는 능력을 강화함으로써 활성을 single 돌연변이일 경우보다 훨씬 많이 증가하는 것을 알 수 있다. K245D/K319A는 K245D는 티로신(tyrosine)의 수소를 받아들이는 능력을 높여주고 K319A는 측쇄가 짧아짐으로 하여 입체적 장애를 최소화하며 활성은 two point 돌연변이중 가장 높은 것으로 야생형에 비해 6배 높게 나타났다. Three point 돌연변이와 four point 돌연변이 중에서 활성이 가장 높은 것은 K245D/K319A/K194E와 K245A/R247A/K319A/K194E로 야생형에 비해 6배 높게 나타났다(표 18-20). 하지만 이는 two point 돌연변이에서와 달리 K_{cat} 값이 높아짐으로 하여 활성이 증가된 것이며 two point 돌연변이는 K_m값이 감소됨으로 하여 활성이 6배 높게 나타났다. K245D/K319A/K194E와 K245A/R247A/K319A/K194E에서 친화력이 감소되게끔 돌연변이를 개선하면 활성이 더 좋은 돌연변이를 만들 수 있을 것이다.

[0039] 따라서 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 알긴산 분해효소의, 1) 아미노산 위치 145에서 L이 A로 치환; 2) 아미노산 위치 86에서 T가 A 또는 S로 치환; 3) 아미노산 위치 138에서 K가 E로 치환; 4) 아미노산 위치 152에서 Y가 A 또는 F로 치환; 5) 아미노산 위치 190에서 D가 K로 치환; 6) 아미노산 위치 194에서 K가 A 또는 E로 치환; 7) 아미노산 위치 245에서 K가 A, D, G 또는 L로 치환; 8) 아미노산 위치 247에서 R이 A, G, L 또는 D로 치환; 9) 아미노산 위치 309에서 Q가 H 또는 K로 치환; 10) 아미노산 위치 312에서 E가 A, D 또는 Q로 치환; 11) 아미노산 위치 319에서 K가 A 또는 E로 치환; 12) 아미노산 위치 350에서 R이 D로 치환; 13) 아미노

산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환; 14) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환; 15) 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환; 16) 아미노산 위치 245에서 K가 G로 치환 및 아미노산 위치 247에서 R이 G로 치환; 17) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환; 18) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 19) 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 20) 아미노산 위치 350에서 R이 L로 치환 및 아미노산 위치 245에서 K가 L로 치환; 21) 아미노산 위치 245에서 K가A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환; 22) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 23) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 24) 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K 가 E로 치환; 25) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 312에서 E가 D로 치환; 26) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 27) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 D로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환; 또는 28) 아미노산 위치 194에서 K가 E로 치환, 아미노산 위치 245에서 K가 A로 치환, 아미노산 위치 247에서 R이 A로 치환 및 아미노산 위치 319에서 K가 A로 치환된 돌연변이 알긴산 분해효소를 제공할 수 있다.

[0040] 상기 본 발명에 따른 알긴산 분해효소의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 치환한 상기 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 여기에서 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 치환된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 상기 치환된 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열을 제공할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 상기 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다.

[0042] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 돌연변이 알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 발현 벡터는 바람직하게는 재조합 플라스미드, 재조합 효모 발현 벡터 또는 재조합 식물 발현 벡터일 수 있다. 여기에서 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 지칭하는 것이다. 상기 벡터로 형질전환된 재조합 세포는 상기 세포의 자연 형태에서는 발현되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 자연 상태의 세포에서 발현되는 유전자를 발현할 수 있으나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다. 여기에서 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다. 상기 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 상기 형질전환체는 원핵생물의 세포 또는 효모일 수 있다. 형질전환은 핵산 분자 또는 벡터를 당업자에게 공지된 표준 방법, 바람직하게는 전기천공, 화학적 형질 전환, 원형질 융합에 의한 형질전환, 또는 입자 봄바드먼트(bombardment) 등의 방법으로 수행할 수 있다(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Edited by: Fred M. Ausubel et al.;Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition), J. Sambrook and D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0044] 또한, 상기 본 발명의 발현 벡터를 포함한 형질전환체를 공지의 방법으로 배양하여 발현 벡터에 포함된 원하는 유전자를 발현시킨 후, 정제하는 방법으로 본 발명의 돌연변이 단백질들을 생산할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 돌연변이 알긴산 분해효소를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 상기 돌연변이 알긴산 분해효소는 병원균의 외부에 형성된 생물막을 파괴하거나 그 형성을 억제하는 역할을 할 수 있으므로 기존의 항생제 등과 함께 투여될 경우 병원균을 효과적으로 방어할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 돌연변이 알긴산 분해효소를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 병원균의 침입으로 인해 발생되는 질환을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환의 증상 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **<실시예 1>**

[0050] **<u>알긴산 분해효소를 암호화(암호화)하는 유전자의 서브클로닝(subcloning)</u>**

[0051] **<1-1> *A. vinelandii*로부터 알긴산 분해효소를 암호화하는 유전자의 분리**

[0052] 실험에서 사용된 *A. vinelandii* 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받았다. 균 배양체로부터 RNA를 분리한 후 그것을 주형으로 하여 cDNA를 합성한 후 PCR로 증폭하였다. PCR 반응은 nPfu DNA 중합효소(Biostream Co., Korea)를 사용하고, 95℃ 2분; 95℃ 1분, 55℃ 30초, 72℃ 2.5분의 30 사이클; 및 72℃ 10분의 조건으로 PCR cycler (Applied Biosystems, Boston, USA.)를 사용하여 수행하였다. 본 실험에서는 AlgL의 신호 펩티드(signal peptide)를 제거한 후 실험을 진행하였고, 사용한 프라이머는 다음과 같다:

[0053] Forward: 5' GTGGTCATATGCTGGTTCCGCCCAAGGG 3'(서열번호 3),

[0054] Reverse: 5' CCACCGAATTCCTAGTCGCGCTTGCCGA 3'(서열번호 4).

[0055] 신호 펩티드의 존재 여부는 단백질구조 프로그램 www.expacy.org (signal IP 3.0)으로부터 확인하였고, 확인결과 절단부위가 26번 아미노산과 27번 아미노산 사이에 있는 것을 알 수 있었으며, 프라이머는 27번 아미노산으로부터 시작하여 제작하였다. 프라이머 제작시 벡터 도입을 위하여 제한효소 부위를 삽입하였다(Forward 프라이머는 NdeI, Reverse 프라이머는 EcoRI).

[0056] **<1-2> 분리한 *algl* 유전자의 pET28a(+) 벡터로의 도입**

[0057] PCR 산물 10를 1% 아가로오스 젤에서 전기영동시켜 크기(1044bp), 정제 정도, 반응 정도를 확인하였다. PCR purification kit (Geneall Biotechnology Co., Korea)를 이용하여 불순물을 제거하였다. Nde과 EcoR (TaKaRa Co., Japan)을 이용하여 pET28a(+) 벡터(Novagen, Co., USA) 및 삽입 DNA인 *algL* 유전자에 제한효소 부위를 만들었다. pET-28a(+) 벡터는 37에서 두 시간 반응시켰고 삽입 DNA는 5시간 반응시킨 후 아가로오스 젤 전기영동

을 진행하여 DNA와 벡터를 회수하고 gel extraction kit (Geneall Biotechnology Co., Korea)를 이용하여 제한효소 부위가 삽입된 순수한 벡터와 삽입 DNA를 분리하였다. 정제 분리한 pET-28a(+) 1, 삽입 DNA 6, 5x ligation buffer 2, T4 DNA ligase (Invitrogene Co., USA) 1를 16에서 6시간 동안 반응시켰다. XL10-Gold ultracompetant cells (Stratagene Co., USA) 50에 클로닝 된 플라스미드 DNA 5를 넣고 얼음에서 30분 반응시킨 후, 42에서 30초 열 충격을 준 다음 2분 동안 얼음에서 반응시켰다. 그 다음 SOC 배지 250㎕을 넣고 37℃ 진탕배양기에서 1시간 반응시킨 후 카나마이신(kanamycin) (Duchefa Biochemie Co., Netherlands)이 첨가된 LB 아가(agar) 배지에 도말하였다. 37℃ 배양기에서 16시간 동안 배양하였다. 5 ml LB(Luria bertani, Difco Co., USA) 액체 배지에서 생성된 콜로니를 팁에 조금만 묻혀서 약 16시간 진탕배양하고 6000 rpm, 4℃, 원심분리기에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고, DNA extraction kit (Geneall Biotechnology Co., Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA의 서열을 분석하여 정확히 삽입되었는지를 확인하였다.

[0058] **<실시예 2>**

[0059] **대장균에 의한 단백질 발현과 정제**

[0060] **<2-1> 단백질 발현 과정**

[0061] 서브클로닝된 플라스미드 DNA를 *Escherichia coli* BL21(DE_3) competant cell에 형질전환(transformation)시킨다. 15 ml 코니칼 튜브(conical tube)에 배지로부터 얻은 콜로니를 100 /ml의 카나마이신(kanamycin)이 들어있는 LB 액체배지에 5 ml 넣고 37℃, 250 rpm에서 16시간 동안 진탕배양하였다. 배양균을 새로운 LB 액체배지 500 ml에 100분의 1 이하의 용량으로 넣고 농도가 600 nm에서 흡광도가 0.6-0.8이 될 때까지 37℃, 250 rpm에서 진탕배양한 후 발현 유도제인 IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Sigma Co., USA)를 농도가 1 mM 되게 넣고 20℃, 220 rpm에서 12시간 동안 진탕배양 하였다(*E. coli*에서 쓰이는 단백질 발현벡터 등에는 프로모터 뒤에 위 Lac operator가 있어 단백질을 발현할 때 IPTG를 넣어주어야만 충분한 양의 단백질이 발현된다).

[0062] **<2-2> 단백질 정제**

[0063] pET28a(+) 발현 벡터의 N 말단에는 6X 히스티딘(histidine) 아미노산이 있다. 6X His tag은 Ni-NTA agarose beads (Qiagen Co., Germay)와 결합한다.

[0064] 발현된 단백질을 7000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액은 제거하고 펠렛(pellet)에 용해 버퍼(lysis buffer) [50 mM Tris-HCl buffer, (pH 8.0), NaCl 300 mM, 5 mM imidazole, 1 mM DTT (Dithiothreital, Sigma, Co., USA), 1 mM PMSF (페닐methylsulfonyl fluoride Sigma Co., USA)] 50 ml을 넣고 현탁시킨 후 1회당 30초 동안 35% 강도에서 sonication을 4회 반복한 후 20000 g에서 30분 동안 원심분리하였다. Ni-NTA agarose beads 400을 컬럼(1.5 x 2 cm)에 넣고 평형화시킨 후 원심분리 된 상층액을 넣어 결합시켰다. 세척 버퍼[50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), NaCl 500 mM, 20 mM imidazole (Sigma Co., USA), 1 mM DTT (dithiothreital, Sigma Co., USA), 1 mM PMSF (페닐methylsulfonyl fluoride, Sigma Co., USA)] 200 ml로 beads를 세척해준 후 10 ml 용출 버퍼(elution buffer) [50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), NaCl 300 mM, 300 mM imidazole, 1 mM DTT(Dithiothreital), 1 mM PMSF (페닐methylsulfonyl fluoride)]로 용출시켰다. 정제가 끝난 후 10000 Mw 의 투석 튜브(dialysis tube)를 이용하여 투석함으로써 단백질에 들어있는 이미다졸(imidazole)을 제거한 후 정제된 단백질로 SDS-PAGE을 진행하였다.

[0065] **<2-3> 단백질 정량**

[0066] 정제된 단백질의 농도를 Bradford법으로 측정하였다. 우선 표준곡선을 만들기 위해 소 혈청 알부민(bovine serum albumin) (Bioshop Co., Canada)을 농도 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.3125 mg/ml 및 0.10625 mg/ml이 되도록 100씩 만들고 1ml Bradford (Bio Rad Rabboratories, Inc., USA)용액에 소 혈청 알부민 3㎕와 정제된 단백질을 3씩을 넣고 잘 섞어준 뒤 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciense., Sweden)을 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소 혈청 알부민 3㎕ 을 넣은 용액의 흡광도로 표준곡선을 만들어 정제된 단백질들의 농도를 계산하였다.

[0067] **<2-4> 아가로오스 젤 전기영동 및 DNA 용출**

[0068] 전기영동 완충용액으로는 TAE [40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma Co., USA)]를 사용하였고 1%의 아가로오스 수평 젤을 사용하였고 시료의 1/10배량의 4X 로딩을 DNA용액에 넣고 100V에서 전기영동 하였다. 아가로오스 젤로부터 DNA 단편의 회수는 gel extraction kit (Geneall Biotechnology Co., Korea)을 사용하였다.

[0069] **<2-5> AlgL의 SDS-PAGE**

[0070] 단백질의 분자량, 정제 정도, 단백질 정량의 정확성 등을 확인하기 위하여 정량된 단백질로 SDS-PAGE을 진행하였다. 0.1% (w/v) SDS-12% (w/v) polyacrylamide(Welgne Inc., Korea)의 젤을 사용하였다.Brilliant Blue R-250 (Sigma Co., USA)시약,50% (v/v) methanol, 10% (v/v) 아세트산으로 젤 염색제를 만들었고,5% (v/v) 메탄올과 7% (v/v) 아세트산으로 젤 탈색제를 만들었다.

[0071] **<실시예 3>**

[0072] ***algl*로부터 돌연변이 제작**

[0073] 27개 아미노산이 제거된 a*lgl*을 His tag vector pET28a(+)에 삽입시킨 플라스미드를 주형으로 하고 표 1의 프라이머를 사용하여, site-directed mutagenesis kit (Stratagene Co., USA)로 본 발명의 돌연변이를 제작하였다.

표 1

[0074]

Num	Mutants	Primer type	Primer seqeunces
1	F60A	Forward	5'ACCGGGGAACTGGTCGCCCGCAGCAA-GTACGAA3'
		Reverse	5'TTCGTACTTGCTGCGGGCGACCAGTT-CCCCGGT3'
2	K63A	Forward	5'CTGGTCTTTCGCAGCGCATACGAAGG-CTCGGAC3'
		Reverse	5'GTCCGAGCCAACGTATGCGCTGCGAA-AGACCAG3'
3	K63E	Forward	5'CTGGTCTTTCGCAGCGAGTACGAAGG-CTCGGAC3'
		Reverse	5'GTCCGAGCCAACGTACTCGCTGCGAA-AGACCAG3'
4	K63H	Forward	5'CTGGTCTTTCGCAGCCACTACGAAGG-CTCGGAC3'
		Reverse	5'GTCCGAGCCAACGTAGTGGCTGCGAA-AGACCAG3'
5	Y64A	Forward	5'GTCTTTCGCAGCAAGGCCGAAGGCTC-GGACGCG3'
		Reverse	5'CGCGTCCGAGCCTTCGGCCTTGCTGCG-AAAGAC3'
6	Y64F	Forward	5'CGCGTCCGAGCCTTCGAACTTGCTGC-GAAAGAC3'
		Reverse	5'AAGTACGAAGGCTCGGCAGCGGCCCG-GTCGACC3'
7	D68A	Forward	5'AAGTACGAAGGCTCGGCAGCGGCCCG-GTCGACC3'
		Reverse	5'GGTCGACCGGGCCGCTGCCGAGCCTTC-GTACTT3'
8	D68N	Forward	5'AAGTACGAAGGCTCGAACGCGGCCCG-GTCGACC3'
		Reverse	5'GGTCGACCGGGCCGCGTTCGAGCCTT-CGTACTT3'
9	F82A	Forward	5'GAAGCGGAAAAGGCCGCCCGCACCAA-GACCGCG3'
		Reverse	5'CGCGGTCTTGGTGCGGGCGGCCTTTT-CCGCTTC3'
10	T86A	Forward	5'GCCTTCCGCACCAAGGCGGCGCCGAT-CACCCAG3'
		Reverse	5'CTGGGTGATCGGCGCCGCCTTGGTGC-GGAAGGC3'
11	T86S	Forward	5'GCCTTCCGCACCAAGTCTGCGCCGAT-CACCCAG3'
		Reverse	5'CTGGGTGATCGGCGCAGACTTGGTGC-GGAAGGC3'
12	E93A	Forward	5'ATCACCCAGATCGCCCGCGGCGTCAG-CCGGATG3'
		Reverse	5'CATCCGGCTGACGCCGCGGGCGATCT-GGGTGAT3'
13	E93K	Forward	5'ATCACCCAGATCAAACGCGGCGTCAG-CCGGATG3'
		Reverse	5'CATCCGGCTGACGCCGCGTTTGATCT-GGGTGAT3'
14	E93Q	Forward	5'ATCACCCAGATCCAACGCGGCGTCAG-CCGGATG3'
		Reverse	5'CATCCGGCTGACGCCGCGTTGGATCT-GGGTGAT3'

15	K138A	Forward	5'TACAACCACACCGGCGCTTCCATGCG-CAAGTGG3'
		Reverse	5'CCACTTGCGCATGGAAGCGCCGGTGT-GGTTGTA3'
16	K138E	Forward	5'TACAACCACACCGGCGAATCCATGCG-CAAGTGG3'
		Reverse	5'CCACTTGCGCATGGATTCGCCGGTGT-GGTTGTA3'
17	W143A	Forward	5'AAATCCATGCGCAAGGCCGCCCTCGG-CAGCCTG3'
		Reverse	5'CAGGCTGCCGAGGGCGGCCTTGCGCA-TGGATTT3'
18	L145A	Forward	5'ATGCGCAAGTGGGCCGCCGGCAGCCT-GGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGGCTGCCGGCGGCCCACTTGC-GCAT3'
19	S147T	Forward	5'AAGTGGGCCCTCGGCACACTGGCCGG-CGCCTAC3'
		Reverse	5'GTAGGCGCCGGCCAGTGTGCCGAGGG-CCCACTT3'
20	L148A	Forward	5'TGGGCCCTCGGCAGCGCAGCCGGCGC-CTACCTG3'
		Reverse	5'CAGGTAGGCGCCGGCTGCGCTGCCGA-GGGCCCA3'
21	L148G	Forward	5'TGGGCCCTCGGCAGCGGAGCCGGCGC-CTACCTG3'
		Reverse	5'CAGGTAGGCGCCGGCTCCGCTGCCGA-GGGCCCA3'
22	L148I	Forward	5'TGGGCCCTCGGCAGCATCGCCGGCGC-CTACCTG3'
		Reverse	5'CAGGTAGGCGCCGGCGATGCTGCCGA-GGGCCCA3'
23	Y152A	Forward	5'AGCCTGGCCGGCGCCGCTCTGCGCCT-GAAATTC3'
		Reverse	5'GAATTTCAGGCGCAGAGCGGCGCCGG-CCAGGCT3'
24	Y152F	Forward	5'AGCCTGGCCGGCGCCTTTCTGCGCCT-GAAATTC3'
		Reverse	5'GAATTTCAGGCGCAGAAAGGCGCCGG-CCAGGCT3'
25	D190A	Forward	5'ATCAAGGACTGGAGCGCTCTGCCGCT-CAAGCGG3'
		Reverse	5'CCGCTTGAGCGGCAGAGCGCTCCAGT-CCTTGAT3'
26	D190K	Forward	5'ATCAAGGACTGGAGCAAACTGCCGCT-CAAGCGG3'
		Reverse	5'CCGCTTGAGCGGCAGTTTGCTCCAGT-CCTTGAT3'
27	K194A	Forward	5'AGCGACCTGCCGCTCGCTCGGATCAA-CAACCAC3'
		Reverse	5'GTGGTTGTTGATCCGAGCGAGCGGCA-GGTCGCT3'
28	K194E	Forward	5'AGCGACCTGCCGCTCGAACGGATCAA-CAACCAC3'
		Reverse	5'GTGGTTGTTGATCCGTTCGAGCGGCA-GGTCGCT3'
29	N197A	Forward	5'CCGCTCAAGCGGATCGCCAACCACTC-CTACTGG3'
		Reverse	5'CCAGTAGGAGTGGTTGGCGATCCGCT-TGAGCGG3'
30	N197D	Forward	5'CCGCTCAAGCGGATCGACAACCACTC-CTACTGG3'
		Reverse	5'CCAGTAGGAGTGGTTGTCGATCCGCT-TGAGCGG3'
31	N198A	Forward	5'CTCAAGCGGATCAACGCGCACTCCTA-CTGGGCG3'
		Reverse	5'CGCCCAGTAGGAGTGCGCGTTGATCC-GCTTGAG3'
32	N198D	Forward	5'CTCAAGCGGATCAACGATCACTCCTA-CTGGGCG3'
		Reverse	5'CGCCCAGTAGGAGTGATCGTTGATCC-GCTTGAG3'
33	H199A	Forward	5'AAGCGGATCAACAACGCCTCCTACTG-GGCGGCC3'
		Reverse	5'GGCCGCCCAGTAGGAGGCGTTGTTGA-TCCGCTT3'
34	W202A	Forward	5'AACAACCACTCCTACGCTGCGGCCTG-GGCGGTT3'
		Reverse	5'AACCGCCCAGGCCGCAGCGTAGGAGT-GGTTGTT3'
35	W202D	Forward	5'AACAACCACTCCTACGATGCGGCCTG-GGCGGTT3'
		Reverse	5'AACCGCCCAGGCCGCATCGTAGGAGT-GGTTGTT3'
36	W202R	Forward	5'AACAACCACTCCTACAGAGCGGCCTG-GGCGGTT3'
		Reverse	5'AACCGCCCAGGCCGCTCTGTAGGAGT-GGTTGTT3'
37	K245A	Forward	5'CTGCCCAACGAACTCGCCCGCCGCCA-ACGTGCG3'
		Reverse	5'CGCACGTTGGCGGCGGGCGAGTTCGT-TGGGCAG3'
38	K245D	Forward	5'CTGCCCAACGAACTCGACCGCCGCCA-ACGTGCG3'
		Reverse	5'CGCACGTTGGCGGCGGTCGAGTTCGT-TGGGCAG3'
39	K245G	Forward	5'CTGCCCAACGAACTCGGCCGCCGCCA-ACGTGCG3'
		Reverse	5'CGCACGTTGGCGGCGGCCGAGTTCGT-TGGGCAG3'
40	K245L	Forward	5'CTGCCCAACGAACTCCTCCGCCGCCA-ACGTGCG3'
		Reverse	5'CGCACGTTGGCGGCGGAGGAGTTCGT-TGGGCAG3'
41	K245R	Forward	5'CTGCCCAACGAACTCAGGCGCCGCCA-ACGTGCG3'
		Reverse	5'CGCACGTTGGCGGCGCCTGAGTTCGT-TGGGCAG3'
42	R247A	Forward	5'AACGAACTCAAGCGCGCCCAACGTGC-GCTGGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGCGCACGTTGGGCGCGCTTGA-GTTCGTT3'

43	R247G	Forward	5'AACGAACTCAAGCGCGGCCAACGTGC-GCTGGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGCGCACGTTGGCCGCGCTTGA-GTTCGTT3'
44	R247L	Forward	5'AACGAACTCAAGCGCTTGCAACGTGC-GCTGGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGCGCACGTTGCAAGCGCTTGA-GTTCGTT3'
45	Y253A	Forward	5'CAACGTGCGCTGGCCGCCCACAACTA-CAGCTTG3'
		Reverse	5'CAAGCTGTAGTTGTGGGCGGCCAGCG-CACGTTG3'
46	Y253F	Forward	5'CAACGTGCGCTGGCCTTCCACAACTA-CAGCTTG3'
		Reverse	5'CAAGCTGTAGTTGTGGAAGGCCAGC-GCACGTTG3'
47	Y256A	Forward	5'CTGGCCTACCACAACGCCAGCTTGCC-GCCCCTG3'
		Reverse	5'CAGGGGCGGCAAGCTGGCGTTGTGGT-AGGCCAG3'
48	Y256F	Forward	5'CTGGCCTACCACAACTTCAGCTTGCC-GCCCCTG3'
		Reverse	5'CAGGGGCGGCAAGCTGAAGTTGTGG-TAGGCCAG3'
49	Q309A	Forward	5'GCCGGCGACGAGGATGCCGACATGGA-GGATCTG3'
		Reverse	5'CAGATCCTCCATGTCGGCATCCTCGT-CGCCGGC3'
50	Q309E	Forward	5'GCCGGCGACGAGGATGAAGACATGG-AGGATCTG3'
		Reverse	5'CAGATCCTCCATGTCTTCATCCTCGT-CGCCGGC3'
51	Q309H	Forward	5'GCCGGCGACGAGGATCACGACATGGA-GGATCTG3'
		Reverse	5'CAGATCCTCCATGTCGTGATCCTCGT-CGCCGGC3'
52	Q309K	Forward	5'GCCGGCGACGAGGATAAAGACATGG-AGGATCTG3'
		Reverse	5'CAGATCCTCCATGTCTTTATCCTCGT-CGCCGGC3'
53	Q309N	Forward	5'GCCGGCGACGAGGATAATGACATGG-AGGATCTG3'
		Reverse	5'CAGATCCTCCATGTCATTATCCTCGT-CGCCGGC3'
54	E312A	Forward	5'GAGGATCAGGACATGGCAGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCTGCCATGTCCT-GATCCTC3'
55	E312D	Forward	5'GAGGATCAGGACATGGATGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCATCCATGTCCT-GATCCTC3'
56	E312K	Forward	5'GAGGATCAGGACATGAAAGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCTTTCATGTCCT-GATCCTC3'
57	E312Q	Forward	5'GAGGATCAGGACATGCAAGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCTTGCATGTCCT-GATCCTC3'
58	K319A	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGCATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATGCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
59	K319E	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGAATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATTCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
60	R350A	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCGCCCTGGGTGG-CGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGGGCGAAATTCT-TGAACGG3'
61	R350D	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCGATCTGGGTG-GCGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGATCGAAATTCT-TGAACGG3'
62	R350G	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCGGCCTGGGTGG-CGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGGCCGAAATTCT-TGAACGG3'
63	R350L	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCCTCCTGGGTGG-CGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGGAGGAAATTCT-TGAACGG3'
64	K245A/R247A	Forward	5'AACGAACTCGCTCGCGCTCAACGTGC-GCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGAGCGCGAGCGAGTT-CGTT3'
65	K245A/R247G	Forward	5'CCCAACGAACTCGCCCGCGGACAACG-TGCGCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGGGCGCGTCCGAGTT-CGTTGGG3'
66	K245D/K194E (template K245D)	Forward	5'AGCGACCTGCCGCTCGAACGGATCAA-CAACCAC3'
		Reverse	5'GTGGTTGTTGATCCGTTCGAGCGGCA-GGTCGCT3'
67	K245D/E312D (template K245D)	Forward	5'GAGGATCAGGACATGGATGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCATCCATGTCCT-GATCCTC3'
68	K245D/K319A (template K245D)	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGCATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATGCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
69	K245G/R247G	Forward	5'CCCAACGAACTCGGACGCGGACAACG-TGCGCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGTCCGCGTCCGAGTT-CGTTGGG3'
70	K245G/R247A	Forward	5'CCCAACGAACTCGGACGCGCCCAACG-TGCGCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGTCCGCGGGCGAGTT-CGTTGGG3'

71	K245L/R350L (template K245L)	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCCTCCTGGGTGG-CGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGGAGGAAATTCT-TGAACGG3'
72	R247L/R350L (template R247L)	Forward	5'CCGTTCAAGAATTTCCTCCTGGGTGG-CGACGTG3'
		Reverse	5'CACGTCGCCACCCAGGAGGAAATTCT-TGAACGG3'
73	K245A/R247A/K194E (template K245A/R247A)	Forward	5'AGCGACCTGCCGCTCGAACGGATCAA-CAACCAC3'
		Reverse	5'GTGGTTGTTGATCCGTTCGAGCGGCA-GGTCGCT3'
74	K245A/R247A/E312D (template K245A/R247A)	Forward	5'GAGGATCAGGACATGGATGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCATCCATGTCCT-GATCCTC3'
75	K245A/R247A/K319A(template K245A/R247A)	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGCATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATGCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
76	K245A/R247A/K319E(template K245A/R247A)	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGAATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATTCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
77	K245D/K194E/E312D (template K245D/K194E)	Forward	5'GAGGATCAGGACATGGATGATCTGG-AGACCGAC3'
		Reverse	5'GTCGGTCTCCAGATCATCCATGTCCT-GATCCTC3'
78	K245D/K194E/K319A(template K245D/K194E)	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGCATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATGCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
79	K245A/R247A/K194E/K319 (templateK245A/R247A/K194E)	Forward	5'CTGGAGACCGACGCCGCATTCTCCTG-GCTGGAA3'
		Reverse	5'TTCCAGCCAGGAGAATGCGGCGTCGG-TCTCCAG3'
80	R247D	Forward	5'AACGAACTCAAGCGCGATCAACGTGC-GCTGGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGCGCACGTTGATCGCGCTTGA-GTTCGTT3'
81	K245D/R247D	Forward	5'AACGAACTCGATCGCGATCAACGTGC-GCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGATCGCGATCGAGTT-CGTT3'
82	K194E/R247D/K319A(template K194E/K245A/R247A/K319A)	Forward	5'AACGAACTCAAGCGCGATCAACGTGC-GCTGGCC3'
		Reverse	5'GGCCAGCGCACGTTGATCGCGCTTGA-GTTCGTT3'
83	K194E/K245D/R247D/K319A(templateK194E/K245A/R247A/K319A)	Forward	5'AACGAACTCGATCGCGATCAACGTGC-GCTG3'
		Reverse	5'CAGCGCACGTTGATCGCGATCGAGTT-CGTT3'

[0075] 돌연변이는 총 79개이며 유전자 a*lgl*를 기준으로 60, 63, 64, 68, 82, 86, 93, 138, 143, 145, 147, 148, 152, 190, 194, 197, 198, 199, 202, 245, 247, 253, 256, 309, 312, 319 및 350 번째 아미노산을 바꾸어 1개 아미노산을 바꾼(single point) 돌연변이 63개, 2개 아미노산을 바꾼 돌연변이 9개, 3개 아미노산을 바꾼 돌연변이 6개, 4개 아미노산을 바꾼 돌연변이 1개로 제작하였다.

[0076] PCR 반응을 하기 위해 10 ng/㎕의 주형 3㎕와 10 ng/㎕의 10 pmol primer 1.5㎕ 첨가하고 site-directed mutagenesis kit의 reaction buffer 5㎕와 quick solution buffer 3㎕, dNTP 1㎕ 및 pfu turbo polymerase 1 ㎕을 첨가하여 부피를 50㎕로 맞춘 후 95℃에서 50초 변성, 60℃에서 50초 부착, 68℃에서 10분 신장하여 18 cycles 반응시켰다. PCR 반응이 끝난 후 Dpn 1㎕을 37℃에서 1시간 처리하여 주형을 제거하였다. 반응결과물 2 ㎕을 채취하여 ultra-competent cell 50㎕와 mercaptoethanol 2㎕을 넣어 10분 반응시킨 후 얼음에서 30분 반응시키고 42℃에서 30초 열 충격을 주어 플라스미드가 잘 들어갈 수 있도록 하였다. 얼음에서 2분 반응시킨 후 SOC배지 250㎕를 넣어 37℃ 진탕배양기에서 1시간 배양하였다. 250㎕ 모두를 암피실린이 들어있는 LB agar배지에 도말하여 37℃ 배양기에서 16시간 배양하여 콜로니를 얻었다. 콜로니를 다시 LB배지에 배양한 후 6,000 rpm에서 10분 원심분리하여 cell pellet을 모아 DNA 플라스미드 purification을 통해 순도가 높고 많은 양의 돌연변이 플라스미드를 만들었다. 추출된 돌연변이 플라스미드 DNA의 서열을 분석하여 서브클로닝(subcloning)의 정확 여부를 확인하였다.

[0077] 단백질 발현을 위해 이 플라스미드를 다시 BL21 (DE_3) competent cell에 형질전환하여 콜로니를 배양한 후 단백질 발현, 정제를 진행하였다.

[0078] **<실시예 4>**

[0079] **알긴산 분해효소의 활성 측정 실험**

[0080]

[0081] **<4-1> Thiobarbituric acid (TBA) 발색 원리**

[0082] TBA 방법은 thiobarbituric acid 두 분자가 불포화지방의 산화생성물인 malonaldehyde 한 분자와 붉은 색의 복합체를 형성하는 원리를 이용하는 것이다.

[0083] Alginate 분해반응에서 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepyranosyluronate와 같은 이중결합을 가진 불포화 결합이 생성된다. 분해산물을 periodic acid ($HIO_4 \cdot 2H_2O$)로 전처리 후 TBA 용액과 반응시키면 붉은 색의 복합체가 얼마나 생성되는지 흡광도를 측정함으로써 각 효소의 활성도를 측정할 수 있다.

[0084] **<4-2> TBA 활성 실험**

[0085] 실험에 사용된 기질은 나트륨 알긴산 (Junsei Chemical Co., Japan)와 *P. alkylphenolia* 로부터 얻어진 아세틸 알긴산 (Acetylate polymannuronat AcPM, From Chang Won University)로 실험을 진행하였다.

[0086] 사용된 alginate lyase의 농도는 5 ㎍/ml이며, 기질은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용해하였다. 나트륨 알긴산 기질의 농도는 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml 및 1.6 mg/ml 로 정하여 측정하였고, 아세틸 알긴산 기질의 농도는 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.6 mg/ml, 2 mg/ml 및 4 mg/ml 로 정하여 측정하였다.

[0087] 각 농도별 기질과 5㎍/ml 효소 반응액 100 ml을 37℃에서 20분 반응시켰다. 20분 반응이 끝나고 난 후 효소의 활성을 제거하기 위하여 100℃ 수조에서 10분 가열하였고, 식힌 후 실험을 시작하였다. 반응액 100㎕에 0.125 N의 H_2SO_4와 0.025 N의 HIO_4 (Junsei Chemical Co., Japan)이 섞여있는 용액을 125㎕ 넣고 상온에서 20분간 반응시켰다. 그리고 0.5 N HCl과 2% sodium arsenite (Sigma Co., USA)가 섞인 용액을 250㎕ 넣고 잘 섞어서 2분 반응시킨 후 0.3% TBA (Acros Co., USA)시약 1 ml을 첨가하고 100℃ 수조에서 10분 가열하였다. UV-spectrophotometer (Amersham Bioscienses., Sweden)을 이용하여 549 nm에서 흡광도를 측정하였다(Weissbach A and Hurwtz J. 1959. The formation of2-keto-3-deoxyheptonic acid in extract of *E. coli*. J. Biol. Chem. 234:705-709).

[0088] **<4-3> Michaelis-Menten 및 Lineweaver-Burk kinetics**

[0089] TBA 실험에서 얻은 결과값을 바탕으로 Michaelis-Menten plot 과 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하였다. K_m 값은 기질에 대한 효소의 친화력을 나타내는 것으로 K_m 값이 클수록 활성이 약하여 기질과의 결합력이 약한 것이고 K_m 값이 작을수록 활성이 강하여 기질과의 결합력이 강한 것이다. 반면 K_{cat} 값은 단위시간당 기질이 분해산물로 바뀌는 수를 말하는데 K_{cat} 값은 주로 V_{max} 값을 단위시간으로 나누어 준다. 또한 K_{cat} 값이 클수록 분해산물이 많고 이는 효소의 활성이 높다는 의미를 갖는다. 즉 효소의 K_m 값이 작을수록, K_{cat} 값이 클수록 활성이 높다는 뜻이고 K_{cat} 값을 K_m 값으로 나눈 K_{cat}/K_m 값은 효소에 대한 활성도라고 정의될 수 있으며 여러 효소들의 활성비교도 가능하다. 이 실험에서는 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하기 위해 Michaelis-Menten plot을 구한 후 이를 x축과 y축 값의 역수를 취하여 도시한 Lineweaver-Burk plot을 이용하였다. 또한, Lineweaver-Burk plot에서 R^2 값이 0.99이상일 경우 그에 대한 방정식을 이용해 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하였다. 특히 K_{cat} 값은 효소 1 mg이 단위시간 1 분동안 분해산물을 얼마나 낼 수 있는 지로 정의하기 위해 반응에 사용되었던 효소 총량인 0.5×10^{-3} mg과 반응시간 20분을 나누어 구하였다.

[0090] **[실험예 1] 돌연변이 K63A, K63E, K63H 및 야생형의 활성비교**

[0091] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 63번 아미노산인 리신을 알라닌, 글루탐산 및 히스티딘 등의 아미노산으로 바꾸고 해조류 알긴산(sodiun alginate)과 박테리아 알긴산(acetylated alginate)의 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형의 활성과 비교하였다(표 2).

표 2

[0092]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.91	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K63A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
K63E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
K63H	ND	28.13	ND	0.563	ND	49.96	-	0.27

[0093] ND, not detectable activity; S. A., 나트륨 알긴산; A. A., 아세틸 알긴산(이하의 표에서도 같음).

[0094] 63번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우에는 나트륨 알긴산(sodiun alginate)과 아세틸 알긴산(acetylated alginate) 기질에서 모두 활성을 완전히 잃었다. 리신을 글루탐산로 바꾸었을 경우에도 두 가지 기질에서 모두 활성을 잃은 것으로 나타났다. 63번 아미노산은 음전하를 띤 산성 아미노산이나 중성 아미노산보다 양전하를 딴 염기성 아미노산이 더 효율적으로 작용할 수 있다는 것을 알 수 있다. 리신을 히스티딘으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 활성을 완전히 잃었지만 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 1/3로 감소하였고 K_m 값은 증가하였다. K_{cat}/K_m 값을 비교해볼 때 야생형보다 활성이 1/4로 감소한 것으로 나타났다. 리신은 히스티딘 보다 염기성이 강하기 때문에 같은 양전하를 띤 염기성일지라도 강한 염기성에서 활성이 더 강한 것을 알 수 있다. 이로부터 63번 아미노산인 리신의 염기성이 알긴산 분해효소에서 중요한 부위임을 알 수 있다(도 1).

[0095]

[0096] **[실험예 2] 돌연변이 Y64A, Y64F, D68A, D68N 및 야생형의 활성비교**

[0097] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 64번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌으로 바꾸고 68번 아미노산인 아스파르트산(aspartate)을 알라닌과 아스파라긴(asparagine)으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산과 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였다(표 3).

표 3

[0098]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
Y64A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Y64F	43.44	41.09	0.124	0.247	351.30	165.89	0.86	0.90
D68A	52.65	56.14	0.211	0.421	249.44	133.14	0.61	0.72
D68N	47.29	66.83	0.171	0.468	276.71	142.81	0.68	0.78

[0099] 64번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 기질에서 활성을 잃었다. 티로신(tyrosine)을 페닐알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 야생형에 비해 감소하였고 K_m 값도 야생형에 비해 감소하였으나 K_{cat}/K_m 값은 다소 감소함으로 하여 활성이 약간 감소한 것으로 나타났다. 이는 Y64F는 야생형에 비해 분해 산물은 적지만 나트륨 알긴산에 대한 친화력은 야생형 보다 다소 증가하였고 활성은 감

소하였다. 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 야생형에 비해 1/2로 감소하였고 K_m 값도 야생형에 비해 감소한 것으로 나타났으며 K_{cat}/K_m 값은 감소함으로 활성이 약간 감소된 것으로 나타났다. 티로신(tyrosine)이나 페닐알라닌 구조식에서 보면 벤젠고리를 가지고 있으며 벤젠고리를 메틸기를 가지고 있는 알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성을 잃는 점에서 보면 벤젠고리가 알긴산 분해효소에 있어서 중요한 부위임을 알 수 있다.

[0100] 68번 아미노산인 아스파르트산을 알라닌과 아스파라긴으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 K_{cat} 값은 모두 감소하였고 K_m 값은 증가하였다. K_{cat}/K_m 값을 비교해 볼 때 활성이 야생형 비해 감소한 것으로 나타났다. D68N과 같은 돌연변이는 COO^-기에서 NH_2로 바꾸었을 때 활성이 감소함으로써 COO^-의 음전하가 알긴산 분해효소에 작용하는 것을 알 수 있다.

[0101] **[실험예 3] 돌연변이 F60A, F82A, W143A, L145A, S147T 및 야생형의 활성비교**

[0102] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 60번 아미노산인 페닐알라닌을 알라닌으로 바꾸고 82번 아미노산인 페닐알라닌을 알라닌으로 바꾸었으며 143번 아미노산인 트립토판(trytophan)을 알라닌으로 바꾸었다. 145번 아미노산인 류이신(leucine)을 알라닌으로 바꾸고 147번 아미노산인 세린(serine)을 트레오닌(threonine)으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 4와 같다.

표 4

[0103]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
F60A	53.40	52.74	0.181	0.452	294.57	116.65	0.72	0.63
F82A	29.86	52.09	0.115	0.459	258.31	113.34	0.63	0.62
W143A	11.28	13.08	0.129	0.263	87.15	49.66	0.21	0.27
L145A	61.68	66.13	0.139	0.406	441.69	162.84	1.08	0.88
S147T	104.73	81.19	0.281	0.462	372.63	175.64	0.91	0.96

[0104] 60번 아미노산인 페닐알라닌을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 감소하였고 K_m 값은 증가하였으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 활성이 떨어졌으며 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 감소하였고 K_m 값은 거의 변하지 않았으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 활성이 떨어졌다. 82번 아미노산인 페닐알라닌을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 1/2로 감소하였고 K_m 값은 다소 감소하였으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 활성이 떨어졌으며 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 감소하였고 K_m 값은 거의 변하지 않았으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 활성이 떨어졌다. 같은 중성의 무극성 아미노산인 페닐알라닌을 페닐기보다 체인길이가 짧은 알라닌으로 바꾸었을 경우 활성이 증가할 것으로 예상했지만 활성이 오히려 떨어졌으니 페닐알라닌에 있는 벤젠고리가 알긴산 분해효소에 있어서 중요한 부위임을 알 수 있다. 143번 아미노산인 트립토판을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 모두 K_m 값이 다소 감소하여 기질에 대한 친화력은 증가하였으나 K_{cat} 값이 현저하게 감소하였으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 활성이 1/4 로 감소한 것을 알 수 있다. 트립토판에 있는 헤테로고리가 활성에 큰 영향을 주는 것을 알 수 있다. 145번 아미노산인 류신(leucine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 활성이 거의 비슷하게 나타났지만 아세틸 알긴산에서 활성이 약간 감소된 것을 알 수 있다. 147번 아미노산인 세린을 트레오닌(threonine)으로 바꾸었을 경우에는 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 현저하게 높아졌고 K_m 값도 높아져서 기질에 대한 친화력이 많이 떨어졌으며 K_{cat}/K_m 값을 야생형과 비교해 볼 때 비슷한 것을 알 수 있다. 아세틸 알긴산에서 K_{cat}, K_m 및 K_{cat}/K_m에서 별 차이가 없음을 알 수 있다.

[0105] **[실험예 4] 돌연변이 T86A, T86S, E93A, E93K, E93Q 및 야생형의 활성 비교**

[0106] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 86번 아미노산인 threonine을 알라닌과 serine으로 바꾸고 93번 아미노산인 글루탐산을 알라닌, 리신 및 글루타민(glutamine) 아미노산으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 5와 같다.

표 5

[0107]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
T86A	60.01	100.17	0.139	0.565	430.36	177.14	1.05	0.96
T86S	67.82	96.46	0.164	0.516	412.86	186.91	1.01	1.02
E93A	23.32	10.09	0.097	0.146	240.47	69.14	0.59	0.37
E93K	26.07	27.20	0.088	0.220	296.45	123.68	0.72	0.67
E93Q	51.42	13.77	0.103	0.103	274.31	133.22	0.67	0.72

[0108] 86번 아미노산인 트레오닌을 알라닌과 세린 아미노산으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 K_{cat}, K_m 및 K_{cat}/K_m 값은 비슷한 양상을 보였으며 활성도 야생형과 비해 뚜렷한 차이가 보이지 않았다.

[0109] 93번 아미노산인 글루탐산을 알라닌, 리신 및 글루타민 아미노산으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 감소하였고 K_m 값도 감소하였으며 기질에 대한 친화력은 강하나 알긴산 분해율은 매우 낮으므로 활성이 모두 감소한 것으로 나타났다. 특히 K_{cat} 값은 야생형에 비해 크게 감소하였다. 93번 아미노산은 전하를 띠지 않은 중성 아미노산이나 양전하를 띤 염기성 아미노산보다 음전하를 띤 산성 아미노산에서 더 효과적으로 분해할 수 있음을 알 수 있다.

[0110] **[실험예 5] 돌연변이 K138A, K138E, L148A, L148G, L148I 및 야생형 활성비교**

[0111] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 136번 아미노산인 리신을 알라닌과 글루탐산으로 바꾸고 148번 아미노산인 류신을 알라닌, 글리신(glycine) 및 이소류신(isoleucine) 아미노산으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산과 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였다(표 6).

표 6

[0112]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		$K_{cat}/K_m(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A.	S. A.	A. A.	S. A.	A. A.	S. A.	A. A.
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K138A	101.19	140.95	0.267	0.861	379.16	163.77	0.93	0.89
K138E	88.84	212.73	0.269	0.690	329.70	308.29	0.81	1.68
L148A	47.77	62.02	0.159	0.439	300.75	141.12	0.74	0.77
L148G	59.31	42.83	0.162	0.525	366.86	81.60	0.90	0.44
L148I	44.30	66.31	0.125	0.381	355.04	174.12	0.87	0.95

[0113] 138번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산과 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 야생형에 비해 1.5배 정도 높아졌고 K_m 값도 야생형에 비해 높아졌으며 K_{cat}/K_m 값은 야생형과 비교해 볼 때 활성이 떨어지긴 했지만 차이가 뚜렷하지 않다. 리신을 글루탐산로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat}와 K_m 값이 동시에

증가함으로 하여 K_{cat}/K_m 값은 오히려 감소하였다. 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 2배 넘게 증가하였고 K_m 값도 증가하기는 하였으나 K_{cat}/K_m 값은 야생형과 비해 증가하여 활성이 증가한 것을 알 수 있다. 138번 아미노산은 나트륨 알긴산에서 양전하를 띤 염기성 아미노산이 중성이나 산성 아미노산보다 더 효과적으로 분해할 수 있으나 아세틸 알긴산에서는 양전하를 띤 염기성 아미노산이 중성이나 산성 아미노산보다 활성이 강하다는 것을 알 수 있다.

[0114] 148번 아미노산인 류신(leucine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 활성이 야생형과 비해 감소하였으며 글리신(glycine)으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서는 야생형과 비슷한 활성을 나타냈지만 아세틸 알긴산에서는 활성이 절반으로 줄어든 것으로 나타났다. 류신을 이소류신(isoleucine)으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 야생형과 활성이 비슷하게 나타났다. 148번 아미노산은 같은 중성 아미노산에서 측쇄의 체인길이의 영향을 받는 것을 알 수 있다.

[0115] **[실험예 6] 돌연변이 Y152A, Y152F, D190A, D190K 및 야생형의 활성 비교**

[0116] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 152번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌으로 바꾸고 190번 아미노산인 아스파르트산(aspartate)을 알라닌과 리신 아미노산으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산과 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였다(표 7).

표 7

[0117]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
Y152A	31.37	41.44	0.076	0.246	413.97	168.66	1.01	0.92
Y152F	72.97	82.88	0.177	0.445	412.25	186.42	1.01	1.01
D190A	37.99	100.24	0.094	0.568	400.49	176.49	0.98	0.96
D190K	50.84	92.57	0.118	0.582	429.26	159.03	1.05	0.86

[0118] 152번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 K_{cat} 값은 모두 절반으로 떨어졌지만 기질과의 친화력은 증가하였고 활성은 야생형과 차이가 없었다. 티로신(tyrosine)을 페닐알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 분해율이나 기질과의 친화력이 모두 야생형과 비슷하게 나타났으며 활성도 야생형과 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다.

[0119] 190번 아미노산을 알라닌과 반대의 전하를 가진 리신과 바꾸었을 경우 활성이 증가될 것으로 예상했으나 두 가지 기질에서 야생형에 비해 활성이 증가되지 않았다. 기질과의 친화력은 나트륨 알긴산에서 아세틸 알긴산에서보다 증가하였고 분해율은 아세틸 알긴산에서 높게 나타났다.

[0120] **[실험예 7] 돌연변이 K194A, K194E, W202A, W202D, W202R 및 야생형의 활성비교**

[0121] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 194번 아미노산인 리신을 알라닌과 글루탐산 아미노산으로 바꾸고 202번 아미노산인 트립토판을 알라닌, 아스파르트산 및 아르기닌(arginine) 아미노산으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 8과 같다.

표 8

[0122]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K194A	104.64	190.23	0.119	0.458	880.41	415.28	2.15	2.26
K194E	149.89	310.69	0.159	0.349	942.87	890.39	2.30	4.85
W202A	67.34	38.63	0.198	0.351	339.19	109.97	0.83	0.60
W202D	28.24	36.32	0.156	0.485	181.03	74.85	0.44	0.41
W202R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

[0123] 194번 아미노산을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 알긴산 분해율이나 기질과의 친화력이 모두 증가하였으며 활성도 2배 정도 증가하였다. 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값이 나트륨 알긴산에서 보다 많이 증가하였고 친화력은 야생형에 비해 차이가 뚜렷하지 않았지만 활성은 분해율이 증가한 만큼 증가하였다. 글루탐산로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 2배 넘게 증가하였으나 K_m 값은 크게 변하지 않았다. 활성도 알라닌으로 바꾸었을 경우와 비슷하게 증가하였다. 아세틸 알긴산에서 분해율은 무려 4배 가까이 증가하였고 기질과의 친화력도 증가하였다. 활성은 5배 가까이 증가하였으며 본 실험에서 single point 돌연변이 중에서 가장 활성이 좋은 돌연변이이다. K194에서 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우 알라닌은 리신보다 측쇄의 길이가 많이 짧아짐으로 하여 기질과의 반응에서 입체적 장애를 최소화하여 활성이 증가된 것으로 예상되며 양전하를 띤 염기성 아미노산인 리신에서 보다는 음전하를 띤 산성 아미노산에서 활성이 많이 증가되는 것을 알 수 있다(도 2).

[0124] 202번 아미노산인 tryptophan을 알라닌과 aspartate로 바꾸었을 경우에 분해율이나 기질과의 친화력이 야생형에 비해 감소하였으며 활성도 감소하였다. 같은 중성의 아미노산인 알라닌보다 음전하를 띤 산성 aspartate에서 감소율이 더 크다는 것을 알 수 있다. 양전하를 띤 염기성 아미노산인 arginine으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 활성을 완전히 잃는 것을 알 수 있다.

[0125] **[실험예 8] 돌연변이 N197A, N197D, N198A, N198D, H199A 및 야생형의 활성비교**

[0126] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 197번 아미노산인 아스파라긴(asparagine)을 알라닌과 aspartate으로 바꾸고 198번 아미노산인 아스파라긴(asparagine)을 알라닌과 aspartate 아미노산으로 바꾸고 199번 아미노산인 히스티딘(histidine)을 알라닌으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 9와 같다.

표 9

[0127]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
N197A	42.87	25.42	0.205	0.435	208.93	58.43	0.51	0.31
N197D	63.73	12.10	0.239	0.207	266.10	58.45	0.65	0.21
N198A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
N198D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
H199A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

[0128] 197번 아미노산인 아스파라긴(asparagine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 분해율이나 기질과의 친화력이 모두 감소하였으며 아세틸 알긴산에서 분해율은 크게 감소하였고 기질과의 친화력은 크게 차이가 없었으나 야생형에 비해 나트륨 알긴산에서보다 아세트 알긴산에서 활성이 더 크게 감소하였다. 3D model에서 보면 197번 아스파라긴(asparagine)이 199번 히스티딘(histidine)과 수소결합을 함으로써 알긴산 분해효소에

(AlgL) 있어서 반응 활성 부위일 것으로 예상된다(도 3).

[0129] 198번 아미노산인 아스파라긴(asparagine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 완전히 잃는 것으로 나타났다. 아스파라긴(asparagine)에 있는 $-NH_2$가 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 아스파라긴(asparagine)에 있는 $-NH_2$을 $-O^-$로 바꾸었더니 두 가지 기질에서 모두 활성을 잃는 것을 알 수 있었다. 이는 아스파라긴(asparagine)에 있는 $-NH_2$가 아세틸 알긴산를 분해하는데서 중요한 작용을 하는 것으로 예상된다.

[0130] 199번 아미노산인 히스티딘(histidine)을 알라닌으로 바꾸었을 경우 두 가지 기질에서 활성을 완전히 잃었다. 히스티딘(histidine)은 3D model을 이용해 찾은 mechanism 싸이트중의 하나일 것으로 예상하고 실험한 결과 다른 아미노산으로 바꾸었을 경우 활성을 완전히 잃는 것을 알 수 있다. 히스티딘(histidine)과 aspragine은 기질과의 반응에서 메카니즘 아미노산임을 알 수 있다(도 3).

[0131] **[실험예 9] 돌연변이 K245A, K245D, K245G, K245L, K245R 및 야생형의 활성비교**

[0132] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 245번 아미노산인 리신을 알라닌, aspartate, glycine, leucine 및 arginine으로 바꾸고 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 10과 같다.

표 10

[0133]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K245A	100.28	145.20	0.245	0.361	408.41	402.22	0.99	2.19
K245D	137.32	324.87	0.150	0.652	916.15	498.21	2.24	2.71
K245G	86.12	192.80	0.108	0.679	798.52	283.95	1.95	1.55
K245L	52.50	134.00	0.064	0.385	814.76	348.05	1.99	1.90
K245R	45.77	69.44	0.119	0.435	384.50	159.61	0.94	0.87

[0134] 245번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 1.5배정도 증가하였고 기질과의 친화력은 야생형에 비해 증가하였으며 활성은 야생형와 차이를 보이지 않았지만 아세틸 알긴산에서 K_{cat} 값은 증가하였고 K_m 값은 감소하였고 활성은 야생형에 비해 2배정도 증가된 것을 알 수 있다. Aspartate로 바꾸었을 경우에는 나트륨 알긴산에서 활성이 2배정도 증가되었다. Acetylalated alginate에서는 분해율이 4배정도 증가하였고 K_m 값도 따라서 증가함으로써 활성은 2.5배정도 증가한 것을 알 수 있다. Glycine으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값 증가율보다 K_m 값 감소율이 더 큼으로 하여 활성이 증가하였으나 acetylate alginate에서 K_m 값은 K_{cat} 값이 증가함에 따라 증가함으로써 활성은 오히려 나트륨 알긴산에서 아세틸 알긴산보다 야생형에 비해 증가율이 더 큰 것을 알 수 있다. Leucine으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 분해율이 알라닌이나 glycine으로 바꾸었을 경우보다 작았지만 친화력은 오히려 증가하였으며 활성도 2배정도 증가한 것을 알 수 있다. Arginine으로 바꾸었을 경우에 두 가지 분해율도 감소하고 활성도 소폭으로 감소한 것을 알 수 있다. K245A, K245G 및 K245L에서 보면 아미노산을 전하를 띠지 않은 중성으로 바꾸었을 경우에 -R기의 체인길이를 줄여줌으로써 기질이 효소와의 반응에서 입체적 장애를 줄여줌으로써 활성이 증가된 것으로 예상된다. K245D와 K245R에서 보면 음전하를 띤 산성 아미노산이 양전하를 띤 염기성 아미노산보다 활성이 훨씬 좋아진 것을 알 수 있다.

[0135] **[실험예 10] 돌연변이 R247A, R247G, R247L 및 야생형의 활성비교**

[0136] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 247번 아미노산인 arginine을 알라닌, glycine, 및 leucine으로 바꾸고 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형와 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 11과 같다.

표 11

[0137]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.80	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
R247A	64.23	140.6	0.059	0.397	717.40	354.15	1.75	1.92
R247G	73.10	108.2	0.097	0.361	753.65	299.72	1.84	1.63
R247L	40.05	72.00	0.055	0.245	720.17	293.87	1.76	1.60

[0138] 247번 아미노산인 arginine을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서 알긴산 분해율은 야생형에 비해 변화가 없었으나 기질의 친화력을 표시하는 K_m 값이 크게 감소함으로 하여 활성은 2배 가까이 증가하였다. 아세틸 알긴산에서 분해율은 야생형에 비해 1.7배 정도 증가하였고 K_m 값은 약간의 감소를 보였고 활성도 2배 증가하였다. Glycine으로 바꾸었을 경우에 야생형에 비해 활성이 증가하였다. Leucine의 경우에 분해율은 두 가지 기질에서 모두 야생형에 비해 감소하였고 K_m 값은 야생형보다 크게 감소함으로써 활성은 오히려 1.7배 정도 증가하였다. 247번 아미노산인 arginine의 경우에 아미노산에서 -R기의 체인길이를 줄여줌으로써 기질이 효소와의 반응에서 입체적 장애를 줄여줌으로써 활성이 증가된 것으로 예상된다. Arginine을 반대의 전하를 가진 산성 아미노산으로 바꾸어주면 arginine이 히스티딘(histidine)으로 하여금 염기성을 강하게 함으로써 활성이 증가될 것으로 예상하고 있다.

[0139] **[실험예 11] 돌연변이 Y253A, Y253F, Y256A, Y256F 및 야생형의 활성 비교**

[0140] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 253번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌으로 바꾸고 256번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌 아미노산으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 12와 같다.

표 12

[0141]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
Y253A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Y253F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Y256A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Y256F	46.31	56.03	0.141	0.378	329.34	148.05	0.81	0.81

[0142] 253번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 모두 활성을 완전히 잃었다. 253번 아미노산 티로신(tyrosine) 역시 3D 모델에서 나타난 활성 부위(mechanism site) 중의 하나인 것을 알 수 있다. 실험결과 예상대로 다른 아미노산으로 바꾸었을 경우 활성을 잃는 것을 알 수 있다. 특히 티로신(tyrosine)을 아미노산 구조가 비슷한 페닐알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성을 완전히 잃는 것으로 보아 티로신(tyrosine) 구조 중에서 -OH기가 기질과의 반응에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다

[0143] 256번 아미노산인 티로신(tyrosine)을 알라닌과 페닐알라닌으로 바꾸었을 경우에 알라닌과 같은 경우는 두 가지

기질에서 활성을 완전히 잃었고 페닐알라닌과 같은 경우에는 두 가지 기질에서 모두 활성이 약간의 감소를 보이고 있었다. 이는 256번 티로신(tyrosine) 구조 중에 -OH가 253번 티로신(tyrosine)처럼 mechanism에 크게 관여하지 않지만 알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성을 잃는 것으로 보면 티로신(tyrosine) 아미노산 구조 중에 페닐기가 활성에 크게 관여하는 것을 알 수 있다.

[0144] **[실험예 12] 돌연변이 Q309A, Q309E, Q309H, Q309K, Q309N 및 야생형의 활성 비교**

[0145] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 309번 아미노산인 glutamine을 알라닌, 글루탐산, 히스티딘(histidine), 리신 및 아스파라긴(asparagine)으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 13과 같다.

표 13

[0146]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
Q309A	20.93	55.62	0.067	0.378	313.95	167.99	0.77	0.91
Q309E	64.92	52.10	0.249	0.521	260.10	101.72	0.63	0.55
Q309H	89.14	69.44	0.220	0.359	405.19	193.03	0.99	1.05
Q309K	48.92	58.25	0.188	0.302	260.22	192.61	0.64	1.05
Q309N	45.15	66.21	0.158	0.584	286.06	113.42	0.69	0.62

[0147] 309번 아미노산인 glutamine을 측쇄가 짧은 알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성이 높아질 것으로 예상했지만 두 가지 기질에서 모두 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. Glutamine 아미노산 구조에 있는 $-NH_2$의 영향을 알아보기 위해서 NH_2을 $-O^-$로 바꾸었더니 두 가지 기질에서 활성이 모두 절반 가까이 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 음전하를 띤 아미노산보다 전하를 띠지 않는 중성 아미노산이 활성이 더 높은 것을 알 수 있다. 기질이 음전하이므로 양전하를 띤 아미노산으로 바꾸면 활성이 증가될 것으로 예상했지만 양전하를 띤 히스티딘(histidine)과 리신으로 바꾸었을 경우에도 활성에 큰 변화가 없었다. Glutamine을 체인길이가 짧은 아스파라긴(asparagine)으로 바꾸었을 경우에 활성이 증가할 것이라고 예상했지만 알라닌의 경우와 마찬가지로 활성이 절반 가까이 감소된 것을 알 수 있다. 309번 glutamine 맞은편에 68번 aspartate가 있으며 Q309을 N309로 바꾸었을 경우 N309가 D68과의 거리가 멀어지기 때문에 활성이 감소하는 것으로 예상된다.

[0148] **[실험예 13] 돌연변이 E312A, E312D, E312K, E312Q 및 야생형의 활성 비교**

[0149] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 312번 아미노산인 글루탐산를 알라닌, 아스파르트산, 리신 및 글루타민으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 14와 같다.

표 14

[0150]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.80	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
E312A	52.60	81.71	0.141	0.434	372.72	188.08	0.91	1.02
E312D	69.64	152.46	0.094	0.391	744.07	389.37	1.82	2.21
E312K	39.30	54.31	0.154	0.320	254.33	169.35	0.62	0.92

E312Q	66.04	106.04	0.181	0.570	364.33	185.86	0.89	1.01

[0151] 312번 아미노산인 글루탐산를 전하를 띠지 않고 측쇄가 짧은 알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성이 증가할 것으로 예상하였으나 분해율이나 기질과의 친화력은 야생형에 비해 차이가 크게 없었으며 활성도 변화가 거의 없었다. 같은 산성 아미노산인 aspartate로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서는 K_{cat} 값은 크게 증가하지 않았고 K_m 값은 많이 감소하였고 활성은 1.8배 증가하였다. 아세틸 알긴산에서는 K_{cat} 값은 2배 가까이 증가하였고 K_m 값은 약간의 감소를 보였으며 활성은 야생형에 비해 2.2배 정도 증가하였다. 이는 같은 음전하를 띤 산성 아미노산이지만 측쇄가 짧은 aspartate에서 더 높은 활성을 가지는 것을 알 수 있다. 측쇄가 짧은 알라닌으로 바꾸었을 경우에 활성에 변화가 크게 없는 것으로 보아 음전하를 띤 아미노산이 중요한 역할을 하는 것으로 예상된다. 양전하를 띤 염기성 아미노산인 리신으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서는 활성이 감소하였지만 아세틸 알긴산에서는 활성이 거의 변화가 없는 것을 알 수 있다. Glutamine으로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 활성이 거의 비슷하였다. 글루탐산에 있는 $-O^-$기와 glutmine에 있는 $-NH_2$기는 활성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 예상된다.

[0152] **[실험예 14] 돌연변이 K319A, K319E, R350A, R350D, R350G, R305L 및 야생형의 활성비교**

[0153] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 319번 아미노산인 리신을 알라닌과 글루탐산로 바꾸고 350번 아미노산인 arginine을 알라닌, aspartate, glycine 및 leucine으로 바꾸었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 15와 같다.

표 15

[0154]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K319A	64.06	165.11	0.126	0.396	508.44	416.55	1.24	2.27
K319E	86.16	154.73	0.151	0.630	568.73	245.66	1.39	1.34
R350A	49.30	80.14	0.202	0.645	243.34	124.13	0.60	0.67
R350D	91.79	95.60	0.212	0.550	431.75	173.81	1.05	0.95
R350G	51.54	38.50	0.177	1.650	290.73	23.24	0.71	0.30
R350L	82.45	88.29	0.281	0.889	293.12	99.29	0.72	0.54

[0155] 319번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우에 나트륨 알긴산에서는 활성이 조금 증가하였고 아세틸 알긴산에서는 활성이 2.2배 정도 증가하였다. 염기성 아미노산인 리신을 산성 아미노산인 글루탐산로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 활성이 다소 증가하는 것을 알 수 있다. 319번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었을 경우 측쇄가 짧아져서 효소와 기질의 반응에서 입체적 장애를 줄여준 것으로 예상된다.

[0156] 350번 아미노산 arginine을 중성 아미노산인 알라닌, glycine 및 leucine으로 바꾸었을 경우에 측쇄가 짧아짐으로 하여 활성이 높아질 것으로 기대하였으나 활성은 오히려 감소하였다. 염기성 아미노산인 arginine을 산성 아미노산인 aspartate로 바꾸었을 경우에 두 가지 기질에서 야생형에 비해 활성 변화가 거의 없었다. Arginine을 여러 가지 아미노산을 바꾸었을 경우에 기질과의 친화력이 감소하고 활성이 떨어지는 것을 알 수 있다.

[0157] **[실험예 15] 돌연변이 K245A/R247A, K245A/R247G, K245G/R247A, K245G/R247G 및 야생형의 활성비교**

[0158] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *alg1*의 245번 아미노산인 리신을 알라닌으로 247번 아미노산인 arginine을 알라닌으로 바꾸었다. 같은 방법으로 K245A/R247G, K245G/R247A 및 K245G/R247G 등의 돌연변이를 만들었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 16과 같다.

표 16

[0159]

효소	K_{cat}(min^{-1})		K_m($mg.ml^{-1}$)		K_{cat}/K_m ($ml.min^{-1}.mg^{-1}$)		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K245A/R247A	90.24	126.60	0.117	0.372	771.29	340.46	1.88	1.85
K245A/R247G	128.78	128.67	0.178	0.485	721.48	264.95	1.76	1.44
K245G/R247A	123.92	86.63	0.167	0.375	740.90	230.96	1.81	1.25
K245G/R247G	92.47	317.59	0.129	0.709	716.88	447.54	1.75	2.44

[0160] K245A, R247A 및 R247G는 모두 활성이 증가된 단일 돌연변이이다. 활성이 증가된 single point 돌연변이로 two point 돌연변이를 만들었을 경우에 활성이 크게 증가 될 것으로 예상하였으나 K245A/R247A는 두 가지 기질에서 기질을 분해하는 분해율이나 기질과의 친화력이 야생형에 비해 증가하였으며 활성도 야생형에 비해 1.8배 정도 증가하였다. K245A/R247G는 나트륨 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 1.7배 증가하였고 아세틸 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 1.4배 증가하였다. 이는 나트륨 알긴산에서는 single point 돌연변이인 K245A에 비해 활성이 증가하였지만 아세틸 알긴산에서는 K245A와 R247G에 비해 활성이 오히려 떨어졌다.

[0161] K245G/R247A와 K245G/R247G는 두 가지 기질에서 야생형에 비해 활성이 모두 증가하였다. K245G/R247A는 나트륨 알긴산에서는 single point 돌연변이인 K245G와 R247A에 비해 활성이 비슷하였지만 아세틸 알긴산에서 K245G에 비해 활성이 떨어진 것을 알 수 있다. K245G/R247G는 나트륨 알긴산에서 single point 돌연변이인 K245G와 R247G에 비해 활성이 비슷하였지만 아세틸 알긴산에서는 활성이 1.6배에서 2.4배로 증가한 것을 알 수 있다.

[0162]

[0163] **[실험예 16] 돌연변이 K245D/K194E, K245D/E312D, K245D/K319A, R350L/K245L, R350L/R247L 및 야생형의 활성비교**

[0164] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 245번 아미노산인 리신을 aspartate로 바꾼 다음 K245D을 template로 하여 194번 아미노산인 리신을 글루탐산로 바꾸었다. 같은 방법으로 K245D/E312D, K245D/K319A, R350L/K245L 및 R350L/R247L 등의 돌연변이를 만들었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 17과 같다.

표 17

[0165]

효소	K_{cat}(min^{-1})		K_m($mg.ml^{-1}$)		K_{cat}/K_m ($ml.min^{-1}.mg^{-1}$)		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K245D/K194E	256.26	504.30	0.153	0.625	1672.95	806.37	4.10	4.39
K245D/E312D	122.10	376.90	0.148	0.792	822.31	475.56	2.01	2.59
K245D/K319A	197.92	352.93	0.134	0.308	1476.56	1145.47	3.61	6.24
R350L/K245L	175.89	115.78	0.480	0.561	366.44	206.41	0.89	1.12
R350L/R247L	86.12	86.63	0.238	0.631	360.83	137.25	0.88	0.75

[0166] Single point 돌연변이 중 활성이 가장 강한 두 개 돌연변이인 K194E와 K245D에 근거하여 K245D/K194E two point 돌연변이로 만들었을 경우 나트륨 알긴산에서는 야생형에 비해 활성이 4.1배 증가하였으며 아세틸 알긴산에서도 야생형에 비해 활성이 4.4배 증가된 것을 알 수 있다. 하지만 활성이 가장 강한 single point 돌연변이인 K194E에 비해서 나트륨 알긴산에서는 활성이 2.3배에서 4.1배로 증가하였지만 아세틸 알긴산에서는 활성이 차이가 크지 않았으며 오히려 약간 감소하였다. 245번과 194번 염기성 아미노산인 리신을 산성 아미노산인 글루탐산와 aspartate으로 바꾸었을 경우에 야생형에 비해 활성이 높은 것은 염기성 아미노산보다 산성 아미노산이

활성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 예상된다.

[0167] K245D/E312D는 두 가지 기질에서 야생형에 비해 활성이 2배 넘게 증가하였으며 single point 돌연변이인 K245D와 E312D에 비해서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

[0168] K245D/K319A는 두 가지 기질에서 야생형에 비해 기질에 대한 분해율이나 친화력이 증가하였으며 활성도 야생형에 비해 나트륨 알긴산에서는 3.6배 증가하였고 acetylated algiante에서는 6.2배 증가하였다.

[0169] Single 돌연변이인 K245D와 K319A에 비해서도 활성이 뚜렷하게 증가된 것을 알 수 있다. 염기성 아미노산을 산성 아미노산으로 바꿔줌과 동시에 측쇄가 긴 리신을 알라닌으로 바꾸어서 입체적 장애를 줄여줌으로 하여 활성이 크게 증가한 것으로 예상된다.

[0170] R350L/K245L와 R350L/R247L은 나트륨 알긴산에서 야생형에 비해 활성이 감소하였고 아세틸 알긴산에서 R350L/K245L은 야생형과 활성이 비슷하였지만 R350L/R247L은 야생형에 비해 활성이 감소하였다. K245L와 R247L은 활성이 증가하는 돌연변이임에도 불구하고 활성이 감소하는 돌연변이인 R350L로 인하여 활성이 감소하는 것을 알 수 있다.

[0171] **[실험예 17] 돌연변이 K245A/R247A/K194E, K245A/R247A/E312D, K245A/R247A/K319A, K245A/R247A/K319E 및 야생형의 활성비교**

[0172] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 245번 아미노산인 리신을 알라닌으로, 247번 아미노산인 arginine을 알라닌으로 바꾼 다음 K245A/R247A를 template로 하여 194번 아미노산인 리신을 글루탐산로 바꾸었다. 같은 방법으로 K245A/R247A/E312D, K245A/R247A/K319A 및 K245A/R247A/K319E 등의 돌연변이를 만들었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 18과 같다.

표 18

[0173]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K245A/R247A/K194E	223.61	278.58	0.125	0.552	1789.06	505.67	4.37	2.75
K245A/R247A/E312D	92.94	184.81	0.096	0.622	964.27	296.93	2.36	1.60
K245A/R247A/K319A	254.98	296.37	0.175	0.423	1455.92	699.46	3.56	3.81
K245A/R247A/K319E	110.55	197.71	0.183	0.498	602.87	397.01	1.47	2.61

[0174] K245A/R247A/K194E는 나트륨 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 4.3배 증가하였고 K245A/R247A와 K194E에 비해서도 활성이 2배 정도 증가한 것을 알 수 있다. 아세틸 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 활성이 2.7배 증가하였으며 K245A/R247A에 비해 활성이 1.8배에서 2.7배로 약간의 증가를 보였으며 K194E에 비해서 활성이 크게 증가할 것으로 예상했으나 활성이 오히려 4.8배에서 2.7배로 감소한 것을 알 수 있다.

[0175] K245A/R247A/E312D는 나트륨 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 2.3배 증가하였지만 K245A/R247A와 E312D에 비해 활성이 뚜렷하게 증가하지 않았다. Acetlylated alginate에서는 활성이 야생형에 비해 1.6배 증가하였으나 K245A/R247A와 E312D에 비해 활성이 오히려 감소하였다.

[0176] K245A/R247A/K319A는 두 가지 기질에서 모두 활성이 야생형에 비해 3.5배 정도 증가하였으며 K245A/R247A와 K319A에 비해 활성이 증가한 것을 알 수 있다.

[0177] K245A/R247A/K319E는 나트륨 알긴산에서는 활성이 야생형에 비해 1.4배 증가하였고 K319E에 비해 활성이 변화가 없었으며 K245A/R247A에 비해 활성이 약간 감소하였다. Acetlylated alginate에서는 활성이 야생형에 비해 2.6배 증가하였으며 K245A/R247A와 K319E에 비해 활성이 증가하였다.

[0178] K319A와 K319E의 경우 아세틸 알긴산에서 K245A/R247A에 비해 활성이 높아졌고 K194E와 E312D경우 활성이

K245A/R247A에 비해 감소하였다. 특히 K194E는 single point 돌연변이 중에서 아세틸 알긴산에서 활성이 가장 강한 것으로 나타났으며 K245A/R247A/K194E의 경우에 활성이 아주 강할 것으로 예상하였지만 활성이 오히려 감소하였다.

[0179] **[실험예 18] 돌연변이 K194E/K245D/K312D, K194E/K245D/K319A, K194E/ K245A/R247A/K319A및 야생형의 활성비교**

[0180] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 194번 아미노산인 리신을 글루탐산로 바꾼 다음 K194E를 주형으로 하여 245번 아미노산인 리신을 aspartate로 바꾸고 K194E/K245D를 template로 하여 312번 아미노산인 리신을 asprtate로 바꾸었다. 같은 방법으로 K194E/K245D/K319A와 K194E/K245A/R247A/K319A 등의 돌연변이를 만들었다. 나트륨 알긴산와 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 19와 같다.

표 19

[0181]

효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
K194E/K245D/E312D	282.27	839.80	0.095	0.955	2950.15	879.09	7.21	4.79
K194E/K245D/K319A	280.88	901.52	0.103	0.768	2718.91	1173.69	6.65	6.39
K194E/K245A/R247A/K319A	702.44	728.72	0.239	0.643	2936.60	1136.60	7.18	6.17

[0182] K194E/K245D/E312D는 나트륨 알긴산에서 활성이 야생형에 비해 7.2배 증가하였고 K245D/K194E에 비해 활성이 4.1배에서 7.2배로 증가하였으며 K245D/E312D에 비해 2배에서 7.2배로 증가하였다. 나트륨 알긴산에서 분해율은 크게 증가를 보이지 않았으나 기질과의 친화력은 크게 증가하였고 활성이 크게 증가된 것을 알 수 있다. 아세틸 알긴산에서 활성이 야생형에 4.8배 증가하였고 K245D/K194E에 비해 활성은 큰 변화가 없었으며 K245D/E312D에 비해 활성이 2.6배에서 4.8배로 증가하였다. K194E/K245D/E312DK에서 K194E 부위는 두 가지 기질에서 모두 K245D/K194E에 비해 증가하는 효과를 나타냈고 E312D는 나트륨 알긴산에서 K245D/K194E에 비해 증가하는 효과를 나타냈고 아세틸 알긴산에서 K245D/K194E에 비해 활성이 크게 변화가 없었다.

[0183] K194E/K245D/K319A는 나트륨 알긴산에서 활성이 야생형에 비해 6.6배 증가하였고 K245D/K194E에 비해서 활성이 4.1배에서 6.6배로 증가하였으며 K245D/K319A에 비해 활성이 3.6배에서 6.6배로 증가하였다. 아세틸 알긴산에서 활성이 야생형에 비해 6.4배 증가하였고 K245D/K194E에 비해서 활성이 3.6배에서 6.3배로 증가하였으며 K245D/K319A에 비해 크게 증가하지 않았다. 아세틸 알긴산에서 K245D/K319A는 K_{cat} 값이 야생형에 비해 4배 증가하였고 K194E/K245D/K319A는 K_{cat} 값이 야생형에 비해 10.5배 증가하였다. 이로부터 K194E는 분해율이 크게 증가하였고 기질에 대한 친화력이 감소하였으며 활성에는 크게 영향을 주지 못한 것으로 예상된다. K319A는 두 가지 기질에서 K245D/K194E에 비해 활성이 증가하였다.

[0184] K194E/K245A/R247A/K319A는 나트륨 알긴산에서 활성이 야생형에 비해 7.2배 증가하였고 K194E/K245A/R247A에 비해 활성이 4.3배에서 7.2배로 증가하였으며 K245A/R247A/K319A에 비해 활성이 3.5배에서 7.2배로 증가하였다. 아세틸 알긴산에서 활성이 야생형에 비해 6.2배 증가하였고 K194E/K245A/R247A에 비해 활성이 2.7배에서 6.2배로 증가하였으며 K245A/R247A/K319A에 비해 활성이 3.8배에서 6.2배로 증가하였다. 나트륨 알긴산에서 K_{cat} 값은 K194E/K245A/R247A와 K245A/R247A/K319A에 비해 3.5배에서 11배로 증가하였고 아세틸 알긴산에서 K194E/K245A/R247A와 K245A/R247A/K319A에 비해 3.2배에서 8.4배 증가하였다.

[0185] K194E/K245A/R247A/K319A 4개 point 돌연변이에서 K194E와 K319A는 활성이 증가하는 효과를 나타냈다.

[0186] **[실험예 19] 돌연변이 R247D, K245D/R247D, K194E/R247D/K319A, K194E/K245D/R247D/K319A 및 야생형의 활성비교**

[0187] 알긴산 분해효소를 암호화하고 있는 유전자 *algl*의 194번 아미노산인 arginine을 aspartate로 바꾼 다음 R247D를 주형으로 하여 245번 아미노산인 리신을 aspartate로 바꾸고 K194E/R247D를 주형으로 하여 319번 아미노산인 리신을 알라닌으로 바꾸었다. 같은 방법으로 K194E/K245D/R247D/K319A 등의 돌연변이를 만들었다. 나트륨 알긴산과 아세틸 알긴산 두 가지 기질에서 활성을 측정하여 야생형과 활성을 비교하였으며 그 결과는 표 20과 같다.

표 20

[0188]

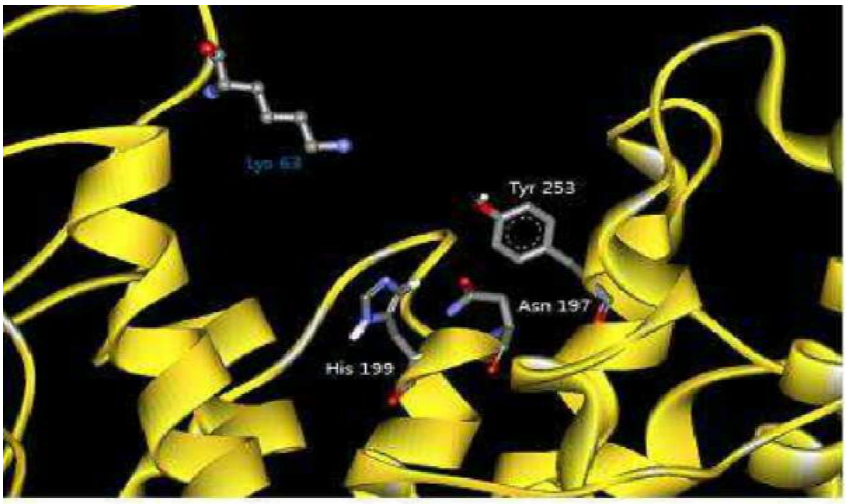
효소	$K_{cat}(min^{-1})$		$K_m(mg.ml^{-1})$		K_{cat}/K_m $(ml.min^{-1}.mg^{-1})$		상대적 비율	
	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A	S. A.	A. A
야생형	63.81	85.90	0.156	0.468	408.97	183.55	1.00	1.00
R247D	69.14	104.55	0.116	0.501	593.73	208.75	1.45	1.14
K245D/R247D	61.07	59.38	0.201	0.831	303.09	71.47	0.74	0.39
K194E/R247D/K319A	135.99	370.42	0.245	0.506	554.92	732.51	1.36	3.99
K194E/K245D/R247D/K319A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

[0189] R247D는 활성이 아세틸 알긴산에서 야생형과 비슷하게 나타났으며 나트륨 알긴산에서 활성이 조금 증가한 것을 알 수 있다. 245번 리신과 247번 arginine을 모두 aspartate로 바꾸었을 때 두 가지 기질에서 활성이 모두 감소되는 것을 알 수 다. 이는 247번 aiginine과 245번 리신 염기성 아미노산이 활성에 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. K194E/R247D/K319A의 경우 나트륨 알긴산에서 활성에 큰 변화가 없었으나 아세틸 알긴산에서 활성이 4배 정도 증가한 것을 알 수 있다. 그러나 K194E/K245D/R247D/K319A에서 두 가지 기질에서 활성을 모두 잃는 것을 알 수 있다. 이는 활성을 증가시키는 부위를 산성으로 바꾸면 모두 활성을 잃음으로써 부위 중 염기성 아미노산이 중요한 작용을 하는 것을 알 수 있다.

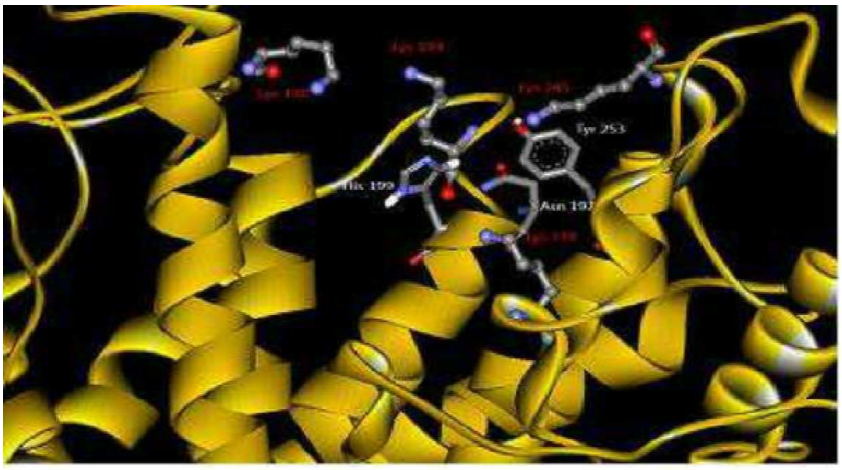
[0190] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

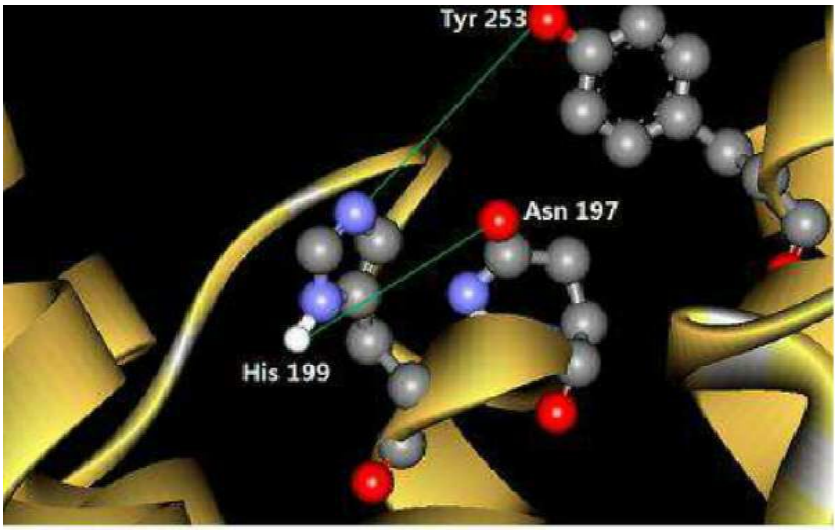
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> Mutant alginate degrading enzymes derived from A. vinelandii

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1124

<212> DNA

<213> Azotobacter vinelandii

<400> 1

atgcacaaga ccagactcgc cctctcctgc ctgctcggca gcctgctgtt gagcggcgcc 60

gtccacgccg ccgaagccct ggttccgccc aagggctact acgcgccggt ggatatccgc 120

aaaggcgagg cgccggcctg tccggtggtg cccgaaccct tcaccgggga actggtcttt 180

cgcagcaagt acgaaggctc ggacgcggcc cggtcgaccc tcaacgagga agcggaaaag 240

gccttccgca ccaagaccgc gccgatcacc cagatcgagc gcggcgtcag ccggatggtc 300

atgcgctaca tggagaaagg ccgcgccggc gacctggaat gcaccctggc ctggctggac 360

gcctgggccg aagacggcgc cctgctcacc accgagtaca accacaccgg caaatccatg 420

cgcaagtggg ccctcggcag cctggccggc gcctacctgc gcctgaaatt ctccagctcg 480

cagccgctgg cggcctatcc cgaacaggca cggcgcatcg agagctggtt cgccaaggtg 540

ggcgaccagg tgatcaagga ctggagcgac ctgccgctca agcggatcaa caaccactcc 600

tactgggcgg cctgggcggt catggccgcc ggcgtggcga ccaaccgccg gccgctgttc 660

gactgggcgg tcgagcagtt ccacatcgcc gccgggcagg tcgactcgaa tggcttcctg 720

cccaacgaac tcaagcgccg ccaacgtgcg ctggcctacc acaactacag cttgccgccc 780

ctgatgatgg tcgccgcctt cgccctggcc aacggtgtcg acctgcgcgg cgacaacgat 840

ggcgccctgg gccgcctggc cggcaacgtg ctggccggcg tcgagaagcc cgaaccgttc 900

gccgaacggg ccggcgacga ggatcaggac atggaggatc tggagaccga cgccaagttc 960

tcctggctgg aaccctactg cgcgctctac tcctgctccc ccgccctgcg ggaaaggagg 1020

ccgagatggg cccgttcaag aatttccgcc tgggtggcga cgtgacccgg atcttcgatc 1080

cggccgagaa gtcgcccaga tcgaccgtcg gcaagcgcga ctag 1124

<210> 2

<211> 374

<212> PRT

<213> Azotobacter vinelandii

<400> 2

Met His Lys Thr Arg Leu Ala Leu Ser Cys Leu Leu Gly Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Val His Ala Ala Glu Ala Leu Val Pro Pro Lys Gly
20 25 30

Tyr Tyr Ala Pro Val Asp Ile Arg Lys Gly Glu Ala Pro Ala Cys Pro
35 40 45

Val Val Pro Glu Pro Phe Thr Gly Glu Leu Val Phe Arg Ser Lys Tyr
50 55 60

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

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

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

260 265 270
Val Asp Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Ala Leu Gly Arg Leu Ala Gly
275 280 285
Asn Val Leu Ala Gly Val Glu Lys Pro Glu Pro Phe Ala Glu Arg Ala
290 295 300
Gly Asp Glu Asp Gln Asp Met Glu Asp Leu Glu Thr Asp Ala Lys Phe
305 310 315 320

Ser Trp Leu Glu Pro Tyr Cys Ala Leu Tyr Ser Cys Ser Pro Ala Leu
325 330 335

Arg Glu Arg Lys Ala Glu Met Gly Pro Phe Lys Asn Phe Arg Leu Gly
340 345 350

Gly Asp Val Thr Arg Ile Phe Asp Pro Ala Glu Lys Ser Pro Arg Ser
355 360 365

Thr Val Gly Lys Arg Asp
370

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AlgL gene forward primer

<400> 3

gtggtcatat gctggttccg cccaaggg 28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AlgL gene reverse primer

<400> 4

ccaccgaatt cctagtcgcg cttgccga 28