(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0003863
(43) 공개일자 2017년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0093753
(22) 출원일자 2015년06월30일
심사청구일자 2016년01월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 삼성로 212 은마아파트 22동 908호 (대치동, 은마아파트)
김희숙
부산광역시 남구 황령대로 504 203동 603호 (대연동,대연삼익비치아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

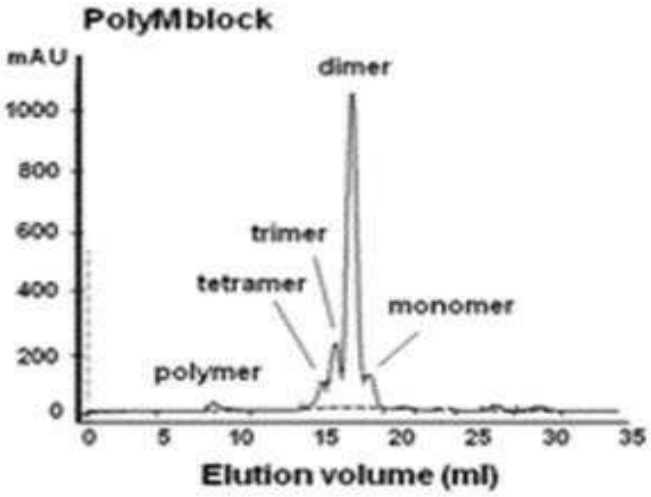
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **변이된 올리고 알긴산 분해효소 및 그의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3)의 올리고 알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제조하는 방법 및 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 올리고알긴산을 분해하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 종래의 알긴산분해효소에서는 나타내지 않았던 내부결합 분해활성을 새로이 나타내므로, 올리고알긴산을 이용한 다양한 제품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도8a



(52) CPC특허분류
C12P 19/00 (2013.01)
C12P 19/04 (2013.01)
C12P 19/12 (2013.01)

(72) 발명자
이옥경
경기도 수원시 영통구 청명로21번길 7 101호 (영통동)
이주희
경기도 수원시 팔달구 수성로244번길 25 110동 1101호 (화서동,화서위브하늘채아파트)
이은정
경기도 수원시 영통구 봉영로1482번길 7-1 405호 (영통동)
김해솔
부산광역시 북구 금곡대로 166 405동 1403호 (화명동,화명롯데캐슬카이저)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20140564
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원사업
연구과제명 비식용 갈조류를 이용한 바이오에탄올 제조를 위한 cell factory 개발
기 여 율 20/100
주관기관 경희대학교
연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20150530
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원장
연구사업명 해조류 바이오매스 통합활용기반 구축사업
연구과제명 해조류 바이오매스의 경제성 통합공정 구축_당화플랫폼 공정기술
기 여 율 80/100
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.30 ~ 2015.07.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 스핑고모나스 속 MJ-3 균주(*Sphingomonas* sp. MJ-3)의 올리고알긴산 분해효소의 237번 아미노산인 아르기닌이 알라닌으로 치환되어, 변이된 올리고알긴산 분해효소.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이된 올리고알긴산 분해효소는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것인 변이된 올리고알긴산 분해효소.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 변이된 올리고알긴산 분해효소는 내부분해효소 활성을 나타내는 것인 변이된 올리고알긴산 분해효소.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

서열번호 4의 염기서열로 구성되는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 7

제6항의 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체.

청구항 8

(a) 제7항의 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 배양물로부터 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 변이된 올리고알긴산 분해효소를 회수하는 단계를 포함하는, 변이된 올리고알긴산 분해효소의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 올리고알긴산과 반응시키는 단계를 포함하는 올리고알긴산의 분해방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 올리고알긴산을 분해하여, 이당류, 삼당류 또는 사당류를 수득하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 변이된 올리고알긴산 분해효소 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3)의 올리고 알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제조하는 방법 및 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 올리고알긴산을 분해하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알긴산은 대표적인 해양유래 바이오매스 중 하나인 갈조류의 주요 탄수화물 성분이며 만루노네이트(M. mannuronate)와 글루로네이트(G. guluronate)로 구성되어 있다. 구성방법에 따라 M 블록(poly M block), G 블록(poly G block)과 MG 블록(poly MG block)으로 분류할 수 있다.

[0003] 이러한 알긴산은 높은 점성과 젤을 형성할 수 있는 특성을 가지고 있으므로 식품, 섬유, 인쇄, 제약, 의료산업 등에서 널리 이용되고 있다.

[0004] 예를 들어, 알긴산 분해효소로 분해하여 얻은 올리고알긴산은 산으로 가수분해하여 얻은 올리고알긴산보다 식물의 성장촉진 및 인간의 케라틴세포(keratinocytes)의 성장을 촉진시키는 능력이 뛰어나며, 비피도박테리움(*Bifidobacterium* sp.) 의 성장률을 증진시켜 정장작용을 높이는 효과와 페니실리움 크리소게눔(*Penicillium chrysogenum*)으로부터 항생제 페니실린 생성을 증가시키는 효과 등의 생리활성에 중요한 역할을 한다. 또한 효소분해물인 올리고알긴산은 인간의 단핵세포에 처리했을 때 TNF-α 및 IL-6 등 세포독성 시토킨의 생성을 유발하여 면역증진에 도움을 주고, 뇌혈관 질병과 심혈관 질병의 예방 효과를 가지므로 중요하다고 보고된 바 있다.

[0005] 알긴산을 분해하여 당화시키는 방법은 두 가지로 나눌 수 있는데 물리·화학적 방법과 생물학적 방법이다. 물리·화학적인 방법은 황산 또는 염산과 같은 산을 열처리를 이용하여 알긴산을 분해한다. 산과 열처리를 이용한 물리·화학적 방법은 알긴산 분해가 비교적 쉽게 일어나지만, 반응을 조절하기 어려워 올리고알긴산을 만들기 어려우며, 알긴산이 과분해되어 퍼퍼럴(furfural), 하이드록시메틸퍼퍼럴(HMF)와 같은 독성 알데하이드가 다량 생산된다. 또한, 물리·화학적 방법을 통해 얻어진 우론산은 생리활성을 갖는 불포화 우론산이 아닌 포화 우론산만이 얻어져 기능성 소재를 생산하기에는 부적합하다. 그리고 산을 이용하여 알긴산 분해하였기 때문에 부수적으로 중화과정이 추가되는데 이때 환경 오염물질이 배출되어 문제가 된다.

[0006] 반면, 생물학적 방법은 효소를 이용하는 것은 사용하는 효소에 따라 알긴산을 특이적으로 분해되어 중합도를 조절하여 올리고알긴산을 생산할 수 있으며, 불포화 우론산이 얻어져 기능성 소재로 활용할 수 있다. 또한, 생물학적 방법은 효소를 통해 반응이 이루어져 반응 후 독성물질이 배출되지 않아 환경친화적이다.

[0007] 알긴산을 분해하여 당화시키는 효소는 내부 알긴산 분해효소, 외부 알긴산 분해 효소로 나눌 수 있다. 내부 알

긴산분해효소는 알긴산 사슬의 어느 위치에서도 당화할 수 있어 당화 속도가 빠르지만 최종 산물이 단당류 형태가 아닌 이당류, 삼당류의 형태로 얻어진다. 내부 알긴산 분해효소의 종류에는 M 블록을 특이적으로 분해하는 효소(polyM lyase, EC 4.2.2.3), G 블록을 특이적으로 분해하는 효소(polyG lyase, EC 4.2.2.11), MG 블록 또는 GM 블록을 분해하는 효소(polyMG lyase, EC 4.2.2-)가 있다. 반면, 외부 알긴산분해효소는 알긴산 사슬의 양 말단에서 분해가 진행된다. 따라서 당화속도는 느리지만 최종 산물이 단당류 형태의 불포화 우론산을 얻을 수 있다. 효소적 당화를 통해 당화수율을 극대화하여 다량의 불포화 우론산을 얻게 된다면 이를 다양한 산업 분야에서 활용 가능하다. 갈조류의 주요 탄수화물 성분인 알긴산의 당화를 통해 얻어진 불포화 우론산은 식품, 화장품, 제약 산업뿐만 아니라 바이오연료 생산에도 적용 가능하며 산업적 파급력이 높다.

[0008] 현재, 석유에너지의 고갈과 이산화탄소 배출권과 관련하여 석유 연료를 대체할 수 있는 바이오연료의 개발에 관심이 집중되고 있으며 특히 바이오디젤과 바이오 에탄올 분야에서 활발히 연구 진행 중에 있다. 바이오 연료를 생산하기 위한 바이오매스는 1세대 전분·당질계와 2세대 섬유소계를 거쳐서 3세대 해조류로 발전되어왔으며, 특히 거대조류인 갈조류에 대한 연구도 이루어지고 있다.

[0009] 예를 들어, 한국특허공개 제2008-0093525호에는 알지네이트를 포화 알지네이트 올리고머와 불포화 알지네이트 올리고머로 분해하는 알지네이트 분해활성을 갖는 스트랩토마이세스 속 균주 및 알지네이트 분해효소가 개시되어 있고, 한국특허공개 제2012-0128337호에는 해조류의 다당체 분해능이 우수한 미생물을 분리하여 안정적으로 해조류를 분해할 수 있는 알지네이트 라이아제 활성을 가진 신규 효소 AlyDW가 개시되어 있다. 그러나, 이러한 알지네이트 분해효소를 이용하여 알긴산을 분해하는데 기질인 알긴산의 농도가 0.5 %(w/v)도 채 되지 않아 실질적으로 당화된 알긴산을 다량 얻기 어렵고, 고농도의 알긴산을 당화하기 위하여 높은 당화 수율이 필요한데 현재 발견된 알지네이트 분해효소로는 고농도의 알긴산 당화에서 요구되는 당화 활성을 만족시키지 못하고 있는 실정이다.

[0010] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 변이된 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 고농도 알긴산을 보다 효과적으로 당화시키는 방법을 개발하기 위하여 연구 노력한 결과, 스핑고모나스 속 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 변이된 재조합 올리고알긴산 분해효소를 사용하여, 고농도의 알긴산으로부터 높은 당화 수율을 얻을 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 스핑고모나스 속 MJ-3 균주(*Sphingomonas* sp. MJ-3)의 올리고알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 올리고알긴산을 분해하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 스핑고모나스 속 MJ-3 균주(*Sphingomonas* sp. MJ-3)의 올리고알긴산 분해효소의 237번 아미노산인 아르기닌이 알라닌으로

치환되어, 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제공한다.

[0018] 본 발명의 용어 "올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase)"란, 우론산 단위체 사이에 있는 글리코시드 결합을 분해하는 β-제거 반응을 촉매하는 효소를 의미하는데, 내부 알긴산분해효소의 경우, 알긴산의 내부결합을 분해하여 이당류, 삼당류, 사당류 등 비환원 말단에 이중결합을 가진 올리고알긴산을 생성하고, 외부 알긴산분해효소의 경우, 알긴산 또는 올리고알긴산의 비환원 말단으로부터 분해하여 최종 생성물로 불포화 단량체를 생성하는 반응을 촉매할 수 있다.

[0019] 상기 올리고알긴산 분해효소는 일 예로서 스핑고모나스 속 MJ-3 균주 유래의 알긴산 분해효소가 될 수 있는데(한국공개특허 제10-2013-0037590호), 상기 알긴산 분해효소는 최종 생성물로 불포화 우론산 단당류를 생성하며, 스핑고모나스 속 A1 균주 유래의 올리고알긴산 분해효소인 A1-IV 및 아그로박테리움 투멘파시엔스 C58 균주(*Agrobacterium tumefaciens* C58) 유래 올리고알긴산 분해효소인 Atu3025에 비하여 반응속도가 빠르다는 장점이 있다.

[0020] 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 상기 스핑고모나스 속 MJ-3 균주의 올리고알긴산 분해효소(서열번호 1)의 237번 아미노산인 아르기닌이 알라닌으로 치환되어 변이된 효소이며, 일 예로서 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는데, 올리고알긴산의 내부결합을 분해하여 이당류, 삼당류, 사당류 등의 당류를 생성하는 효소활성을 나타낸다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 스핑고모나스 속 MJ-3 균주의 올리고알긴산 분해효소(서열번호 1)를 구성하는 아미노산을 변이시켜서 10종의 변이된 올리고알긴산 분해효소(Q175A, H177A, N178A, H179A, Y235F, R237A, H390A, R426A, Y427F 또는 K436A)를 제작하고, 이들의 올리고알긴산 분해활성을 비교한 결과(도 7), 5종의 변이된 올리고알긴산 분해효소(N178A, H179A, Y235F, H390A 또는 Y427F)는 올리고알긴산 분해활성이 대부분 소실되었고, 4종의 변이된 올리고알긴산 분해효소(Q175A, H177A, R426A 또는 K436A)는 서열번호 1의 올리고알긴산 분해효소와 유사한 수준의 올리고알긴산 분해활성을 나타내었으나, 1종의 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)는 서열번호 1의 올리고알긴산 분해효소와 전혀 다른 올리고알긴산 분해활성을 나타냄을 확인하였다. 즉, 상기 R237A는 올리고알긴산을 분해하여 이당류, 삼당류 또는 사당류의 분해산물을 생성하였는데, 올리고알긴산 분해효소를 사용하여 올리고알긴산을 이당류, 삼당류 또는 사당류로 분해시키는 활성은 지금까지 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 발견되었다.

[0022] 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 아울러, 올리고알긴산의 내부결합을 분해하여 이당류, 삼당류, 사당류 등의 당류를 생성하는 효소활성을 나타낼 수 있다면, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질도 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소의 범주에 포함될 수 있다.

[0024] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 서열번호 3의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다.

[0025] 끝으로, 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법으로 제조하거나, 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 유전자를 PCR에 의해 증폭하거나 공지된 방법으

로 합성한 후 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드를 구성하는 염기서열은 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열 또는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있고, 구체적으로, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 4의 염기서열 또는 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 부가될 수 있는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이 상기 서열번호 4의 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 부가된 형태가 될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 염기서열은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 야생형 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드와는 명백히 구별된다.

[0028] 또한, 알긴산으로부터 올리고알긴산을 대량으로 생산하는 효소활성을 나타낼 수 있는 단백질을 코딩할 수 있는 한, 상기 염기서열과 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드의 범주에 포함될 수 있는데, 구체적으로 80 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 보다 구체적으로 90 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으며, 가장 구체적으로, 95 % 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있다.

[0029] 한편, 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이된 것 일 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

[0030] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0031] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적절한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전자 삽입물을 포함하고, 상기 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0032] 상기 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어, 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 올리고알긴산 분해효소의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다. 아울러, 상기 발현벡터는 올리고알긴산 분해효소의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩티아이제

를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광 분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트랩타비딘 태그 등의 에피톱 태그일 수도 있다. 특히, 에피톱 태그를 사용할 경우, 구체적으로 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 구체적으로 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 본 발명에서 제공하는 올리고알긴산 분해효소를 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 구체적으로 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있으며, 보다 구체적으로 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50), λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus), 배큘로바이러스(baculovirus) 등이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[0036] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0037] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시켜서 제작되고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 생산하는데 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에서 제공하는 상기 발현벡터가 도입될 수 있는 숙주세포는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 등의 효모세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[0039] 또한, 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내는 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 형질전환체를 이용하여 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소의 제조방법을 제공한다.

[0041] 구체적으로, 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제조하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 회수하는 단계를 포함한다.

[0042] 또 다른 방법으로서, 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제조하는 방법은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득하는단계; (b) 상기 수득한 폴리뉴클레오티드를 클로닝하여 발현벡터를 수득하는 단계; (c) 상기 수득한 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및, (d) 상

기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 변이된 올리고알긴산 분해효소를 회수하는 단계를 포함한다.

[0043] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[0044] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족시킬 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0045] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0046] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27 ℃ 내지 37 ℃, 바람직하게는 30 ℃ 내지 3 5℃이다. 배양은 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성될 수 있다. 아울러, 배양물로부터 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소를 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0047] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 올리고알긴산을 분해하는 방법을 제공한다.

[0048] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 종래의 올리고알긴산 분해효소와는 달리 올리고알긴산의 내부결합을 분해하여 이당류, 삼당류, 사당류 등의 당류를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0049] 구체적으로, 본 발명의 올리고알긴산을 분해하는 방법은 상기 변이된 올리고알긴산 분해효소를 올리고알긴산과 반응시키는 단계를 포함한다. 상기 반응에 의하여 올리고알긴산을 분해함으로써, 이당류, 삼당류 또는 사당류의 당류를 수득할 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소는 종래의 알긴산분해효소에서는 나타내지 않았던 내부결합 분해활성을 새로이 나타내므로, 올리고알긴산을 이용한 다양한 제품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 pH에 따른 알긴산 당화수율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 반응온도의 변화에 따른 알긴산 당화수율의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3은 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 올리고알긴산분해효소의 농도변화에 따른 당화수율의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 기질 농도변화에 따른 당화 수율의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 5은 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소의 분자구조 및 돌연변이시킨 아미노산 잔기 위치를 나타내는 개략도이다.

도 6은 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소들의 알긴산 분해활성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7a은 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소의 ESI-MS Spectrum을 나타내는 그래프이고, 도 7b는 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 ESI-MS Spectrum을 나타내는 그래프이다.

도 8a는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 M 블록에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8b는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 G 블록에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8c는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 MG 블록에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] **실시예 1: 올리고알긴산 분해효소 활성 측정**

[0054] 본 발명자들은 올리고알긴산 분해능을 나타내는 신규한 스핑고모나스 속 MJ-3 균주(수탁번호 :KCTC12026BP)를 발굴하고, 이로부터 발현되는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 올리고알긴산 분해효소가 알긴산을 분해하여 당화시키는 효소활성을 나타냄을 보고하였다(한국공개특허 제10-2013-0037590호).

[0055] 이하에서는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 올리고알긴산 분해효소의 효소활성을 최적화 할 수 있는 반응조건을 확인하고자, 알긴산 당화 수율에 영향을 미치는 반응용매의 pH, 반응온도, 당화 효소량(올리고알

긴산 분해효소량), 기질 농도 및 반응시간을 연구하였다.

[0056] **실시예 1-1: 올리고알긴산 분해효소 조추출물의 수득**

[0057] 공지된 방법에 따라(한국공개특허 제10-2013-0037590호), 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 올리고알긴산 분해효소를 포함하는 조추출물을 수득하였다.

[0058] 구체적으로, 상기 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 pET21b(+) 벡터에 도입하여 올리고알긴산 분해효소 발현벡터(pET21b/MJ3)를 수득하였다. 상기 수득한 발현벡터를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 올리고알긴산 분해효소 발현용 형질전환체를 수득하였다. 상기 수득한 형질전환체를 50㎍/㎖ 앰피실린을 첨가한 LB 배지에 접종하여 250 rpm 및 37℃의 조건으로 진탕배양기에서 OD600 = 0.4 - 0.6 될 때 까지 2 - 3시간 진탕 배양하였다. 이후, MJ-3 알긴산 분해효소 유전자의 발현을 유도하기 위해 1 mM IPTG를 첨가하고 24시간 진탕 배양하였다.

[0059] 배양이 종료된 후, 상기 배양물을 원심분리하여 균체를 수득하고, 수득한 균체를 용해 완충용액(50 mM 포타슘 인산완충용액(pH 7.2), 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 10%(v/v) 글리세롤, 0.5%(v/v) Triton X-100, 1 mg/ml 리소자임, 1 mM PMSF)에 현탁시킨 다음, 이를 초음파 분쇄하여, 올리고알긴산 조추출물을 수득하였다.

[0060] **실시예 1-2: 반응 용매의 pH 및 온도 최적화**

[0061] 상기 실시예 1-1에서 수득한 올리고알긴산 분해효소의 조추출물을 이용하여 알긴산 분해 반응을 수행할 때 pH 및 반응온도가 알긴산 분해 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

[0062] 효소의 경우 pH에 따라 단백질의 3차 구조가 달라지며 이에 따라 효소 활성에 영향을 미칠 수 있으므로, pH를 각각 6.5, 7.5, 8.5으로 조절하고 1 % 알긴산을 기질로 하여 당화 반응을 수행한 결과 pH 6.5에서 효소의 활성이 가장 우수하였으며, 반응시간 24시간 후에 당화수율 78.9 %, 0.78 mg/ml의 불포화 우론산을 제조하였다(도 1).

[0063] 도 1은 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 pH 변화에 따른 알긴산 당화수율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1에서 보듯이, 최적 pH는 6.5임을 확인하였다.

[0064] 최적 pH 결정 후 25 ℃, 37 ℃, 40 ℃, 50 ℃로 다양한 반응온도에서 알긴산 당화 반응을 수행하였다(도 2).

[0065] 도 2는 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 반응온도의 변화에 따른 알긴산 당화수율의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 반응온도에 따른 초기 알긴산 분해 반응 속도는 비슷하였으나 반응온도가 50 ℃의 경우 높은 온도에 의한 효소의 불활성화로 인하여 최종 당화수율은 40%로 가장 낮았다. 최적 반응온도는 40 ℃로, 반응시간 8시간 후에 당화수율 79.2%, 0.79 mg/ml의 불포화 우론산을 제조하였다.

[0066] **실시예 1-3: 당화 효소 및 기질 농도의 최적화**

[0067] 1% 알긴산 기질에 대한 효소 농도를 최적화하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 수득한 올리고알긴산 분해효소의 조추출물을 40, 100, 200, 400, 800 ㎍/ml 이용하여 반응시간에 따른 당화 수율을 비교하였다(도 3).

[0068] 도 3은 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 올리고알긴산 분해효소의 농도변화에 따른 당화수율의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 재조합 올리고알긴산 분해효소(단백질 crude lysate) 40 ㎍/ml를 이용하여 당화 반응 수행시 12시간 반응 후에는 당화수율 40 %에서 포화되어 1 % 기질에 대한 효소의 양으로 현저히 적음을 알 수 있었고, 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 재조합 올리고알긴산 분해효소(단백질 crude lysate) 200 ㎍/ml 이상의 농도

로 반응시 8시간 반응 후에는 모두 당화 수율 80%를 얻을 수 있었다. 반응시간 및 당의 갈변화를 최소화하기 위하여 최적 효소 농도는 400 ㎍/ml로 결정하였고 4시간 반응 후 당화수율은 80 %, 0.8 mg/ml의 불포화 우론산을 제조하였다.

[0069] 한편, 고농도 불포화 우론산 제조을 위하여 1-10 % 기질 농도에 대한 반응시간 및 당화수율을 조사하였다(도 4).

[0070] 도 4는 올리고알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 당화반응에서 기질 농도변화에 따른 당화수율의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 4에서 보듯이, 기질 농도와 상관없이 8시간 반응 후 대부분의 기질 농도에서 당화수율이 포화되는 것을 확인하였고, 1 % 기질의 경우, 당화수율 85 %, 불포화 우론산 제조량 0.85 mg/ml, 2 % 기질의 경우, 당화수율 75 %, 불포화 우론산 제조량 1.5 mg/ml, 4 % 기질의 경우, 당화수율 70 %, 2.8 mg/ml, 6% 기질의 경우, 당화수율 60 %, 3.6 mg/ml이었으며 8%이상의 기질의 경우 당화수율이 50% 이하였다.

[0071] **실시예 2: 올리고알긴산 분해효소의 돌연변이 균주 제작 및 이의 활성 결정**

[0072] **실시예 2-1: 올리고알긴산 분해효소의 돌연변이 균주 제작**

[0073] 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 재조합 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 변이된 올리고알긴산 분해효소를 제작하고자, 각각의 프라이머를 설계 및 합성하였다(표 1).

표 1

[0074] 변이된 올리고알긴산 분해효소 합성용 프라이머

프라이머		5' - 올리고뉴클레오티드 서열 - 3'	서열번호
Q175A	forward	CCAGGCCGAGGAGTTCGACGCGATCCACAACCATGCCACC	5
	reverse	GGTGGCATGGTTGTGGATCGCGTCGAACTCCTCGGCCTGG	6
H177A	forward	GAGGAGTTCGACCAGATCGCCAACCATGCCACCTGGGC	7
	reverse	GCCCAGGTGGCATGGTTGGCGATCTGGTCGAACTCCTC	8
N178A	forward	GGAGTTCGACCAGATCCACGCCCATGCCACCTGGGCCTGC	9
	reverse	GCAGGCCCAGGTGGCATGGGCGTGGATCTGGTCGAACTCC	10
H179A	forward	TTCGACCAGATCCACAACGCTGCCACCTGGGCCTGCGCC	11
	reverse	GGCGCAGGCCCAGGTGGCAGCGTTGTGGATCTGGTCGAA	12
Y235F	forward	TGTCGAAGGACCCTATTTCCAGCGCTACGCGATGCC	13
	reverse	GGCATCGCGTAGCGCTGGAAATAGGGTCCTTCGACA	14
R237A	forward	CGAAGGACCCTATTACCAGGCCTACGCGATGCTGCCCTTC	15
	reverse	GAAGGGCAGCATCGCGTAGGCCTGGTAATAGGGTCCTTCG	16
H390A	forward	CCGCGATGGGCATGGGGGCCGGTCATTTCGACAAGCTG	17
	reverse	CAGCTTGTCGAAATGACCGGCCCCCATGCCCATCGCGG	18
R426A	forward	CGAGAGCAAGGATGGCGGGGCCTACCTCAAGGAAAATGAG	19
	reverse	CTCATTTTCCTTGAGGTAGGCCCCGCCATCCTTGCTCTCG	20
Y427F	forward	CAAGGATGGCGGGCGCTTCCTCAAGGAAAATGAGAG	21
	reverse	CTCTCATTTTCCTTGAGGAAGCGCCCGCCATCCTTG	22
K436A	forward	GAAAATGAGAGCTGGGCGGCGCAGACCGTCGCCCACAAC	23
	reverse	GTTGTGGGCGACGGTCTGCGCCGCCCAGCTCTCATTTTC	24

[0075] 상기 표 1에서 밑줄로 표시된 부분은 변이된 뉴클레오티드 염기를 의미한다.

[0076] 또한, 예측된 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 재조합 올리고알긴산 분해효소의 분자구조 및

돌연변이시킨 아미노산 잔기 위치는 도 5와 같다. 도 5는 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소의 분자구조 및 돌연변이시킨 아미노산 잔기 위치를 나타내는 개략도이다.

[0077] **실시예 2-2: 올리고알긴산 분해효소의 돌연변이 균주의 활성 결정**

[0078] 올리고알긴산 분해효소 및 10 종의 돌연변이효소를 함유한 재조합 균주를 이용하여 0.2 % 알긴산용액을 분해한 후 분해생성물을 FPLC로 분석하였다(도 6).

[0079] 도 6은 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소들의 알긴산 분해활성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 보듯이, N178A, H179A, Y235F, H390A 및 Y427F 돌연변이균주 파쇄액은 0.2 % 알긴산용액을 거의 분해하지 못하였고, R237A 돌연변이 균주의 경우, 0.2 % 알긴산 용액을 분해하여 이당류, 삼당류, 사당류 등 올리고알긴산을 생산하였으며 단당류는 거의 생산되지 않음을 확인하였다.

[0080] 상기 도 6의 결과는 Asp178, His179, Thr235, His390 및 Tyr427 잔기가 도 5에서와 같이 활성자리에 위치하여 기질을 분해하는데 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있고, 또한, Arg237을 Ala로 돌연변이 시키면 올리고알긴산 분해효소의 외부분해효소 활성을 잃어버리고 내부분해효소 활성만을 유지하는 것으로 분석되었다.

[0081] 한편, R237A 돌연변이 균주의 파쇄액과 알긴산 용액을 반응시켜 최종반응물을 ESI-MS로 분석하였다(도 7a 및 7b).

[0082] 도 7a는 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소의 ESI-MS Spectrum을 나타내는 그래프이고, 도 7b는 스핑고모나스 MJ-3의 올리고알긴산 분해효소로부터 유래된 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 ESI-MS Spectrum을 나타내는 그래프이다. 도 7a 및 7b에서 보듯이, 스핑고모나스 MJ-3(*Sphingomonas* sp. MJ-3) 유래의 재조합 올리고알긴산 분해효소의 경우, 단당류의 negative form인 175.0 peak만 생성되었으나, R237A 돌연변이효소의 경우, 이당류([M-H]-=351.0)및 삼당류([M-H]-=527.0)가 생성되므로, R237A 돌연변이 효소는 외부분해효소활성이 소실되었음을 확인하였다.

[0083] 아울러, 상기 R237A 돌연변이 효소의 기질특이성을 분석하기 위하여, 기질로서 M 블록, G 블록 또는 MG 블록의 올리고알긴산을 사용하여 효소반응을 수행한 후, 각각의 반응산물을 FPLC로 분석하였다(도 8a 내지 8c).

[0084] 도 8a는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 M 블록의 올리고알긴산에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 8b는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 G 블록의 올리고알긴산에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 8c는 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)의 MG 블록의 올리고알긴산에 대한 기질특이성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0085] 도 8a 내지 8c에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 변이된 올리고알긴산 분해효소(R237A)는 알긴산 내부분해활성을 가지며 M 블록과 MG 블록의 올리고알긴산을 분해하는 반면 G 블록의 올리고알긴산은 분해하지 못하는 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0086] 마지막으로, R237A 돌연변이 효소의 유전자를 BL21 균주에 형질전환시키고 IPTG를 이용하여 단백질을 발현시킨 후, SDS-PAGE를 수행하였다.

[0087] 그 결과, 상기 단백질은 N-말단 부분과 C-말단 부분으로 분해되었고, 두 조각의 단백질을 정제하여 이들의 효소활성을 평가하였다(표 2)

표 2

[0088] 재조합 변이된 올리고알긴산 분해효소의 효소활성

기질	특이적 활성 (U/mg)[a]		
	MJ-3 올리고알긴산 분해효소 야생형	R237A 돌연변이의 N-말단 절편	R237A 돌연변이의 C-말단 절편
삼량체(Trimer)[b]	13.04 (38.9%)	0	0
M 블록	33.48 (100%)	5.210^{-3}(71.1%)	2.80 (27.4%)
G 블록	0.75 (2.2%)	1.110^{-3}(15.0%)	0.61 (8.0%)
MG 블록	21.68 (64.8%)	7.310^{-3}(100%)	7.60 (100%)

[0089] a 효소활성의 하나의 유닛은 기질 농도가 0.05 % 일 때, 30 ℃에서 1분마다 β-포르밀피루빅산(β-formylpyruvic acid) 1 umol를 유리시키는 데 필요한 효소의 양으로 정의한다.

[0090] b 삼량체는 알긴산 나트륨이 polyM-특이적 분해효소 KS-408(Kam et al. 2011)에 의해 분해된 후 바이오겔 P2 젤 여과 크로마토그래피에 의해 정제되었다.

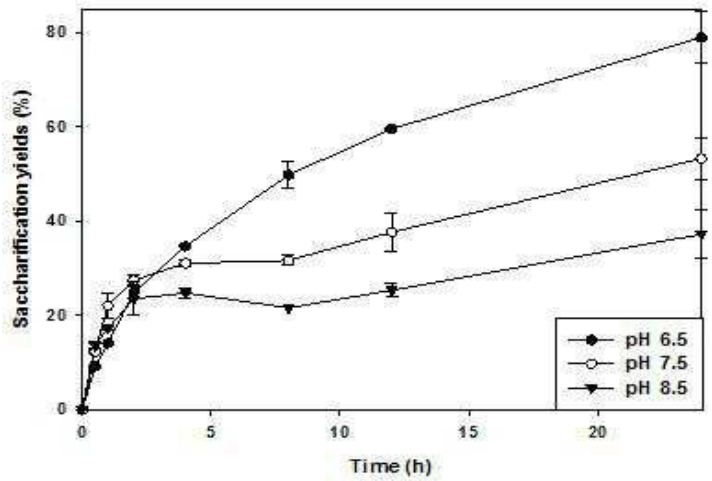
[0091]

[0092] 상기 표 2에서 보듯이, 모든 기질에 대하여 효소활성을 나타내는 변이된 올리고알긴산 분해효소와는 달리, N-말단 부분과 C-말단 부분으로 분해된 각각의 단편은 M 블록, G 블록 또는 MG 블록의 올리고알긴산에 대하여는 효소활성을 나타내었으나, 삼량체에 대하여는 효소활성을 나타내지 않음을 확인하였다.

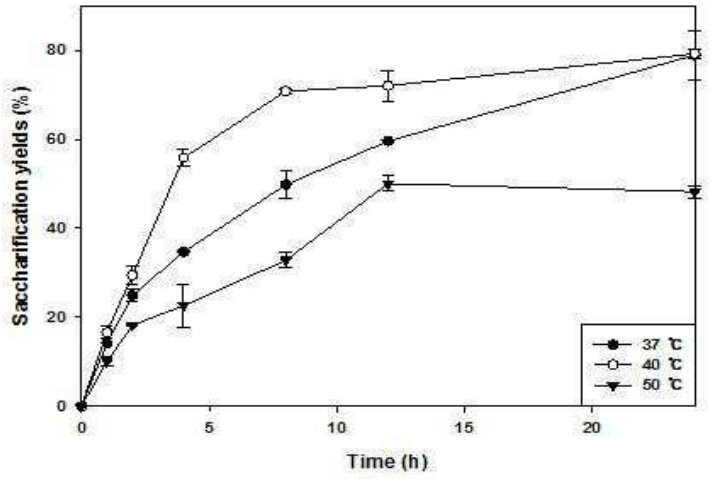
[0093] 따라서, 본 발명의 변이된 올리고알긴산 분해효소는 N-말단 부분과 C-말단 부분으로 분해되더라고, 분해된 각 단편이 일정수준의 내부분해 효소활성을 나타냄을 알 수 있었다.

도면

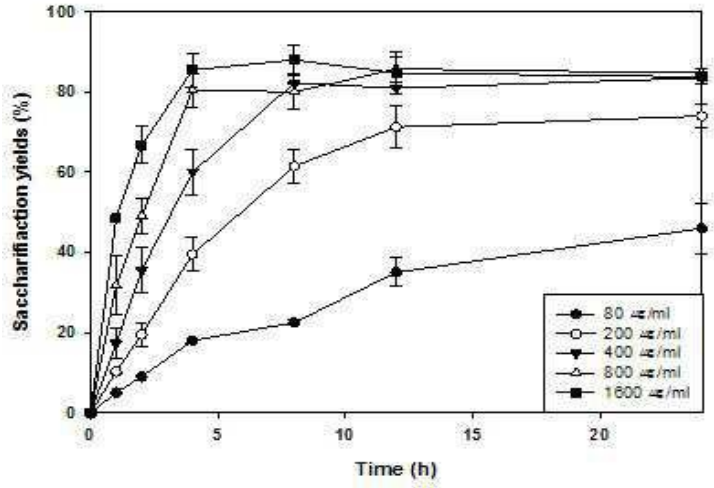
도면1



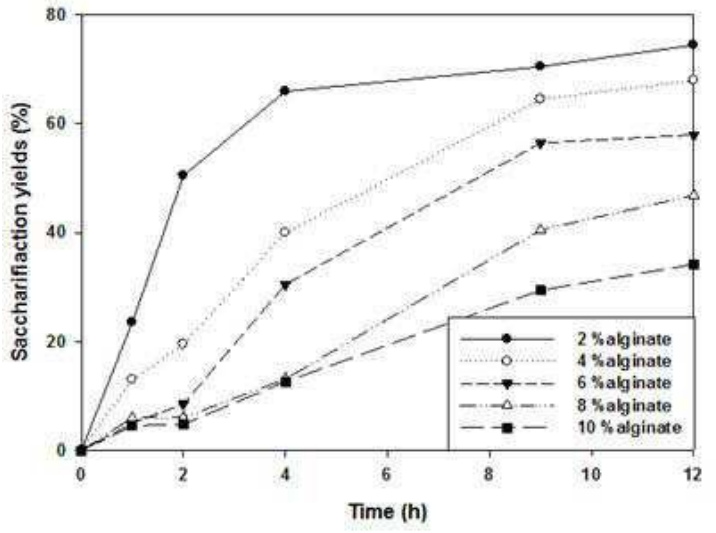
도면2


Saccharification yields (%)
Time (h)
37 ℃
40 ℃
50 ℃

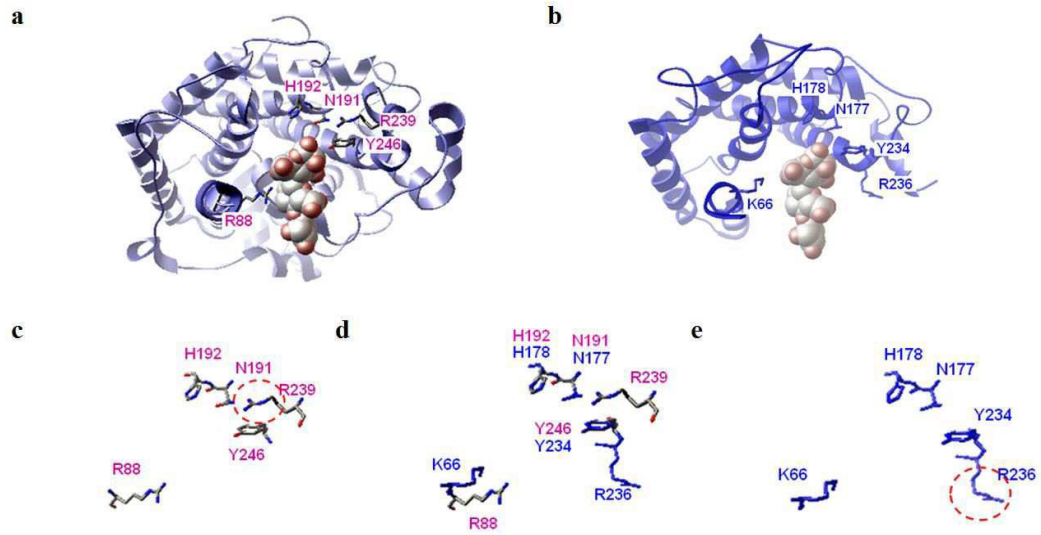
도면3


Saccharifiaction yields (%)
Time (h)
80 ㎍/ml
200 ㎍/ml
400 ㎍/ml
800 ㎍/ml
1600 ㎍/ml

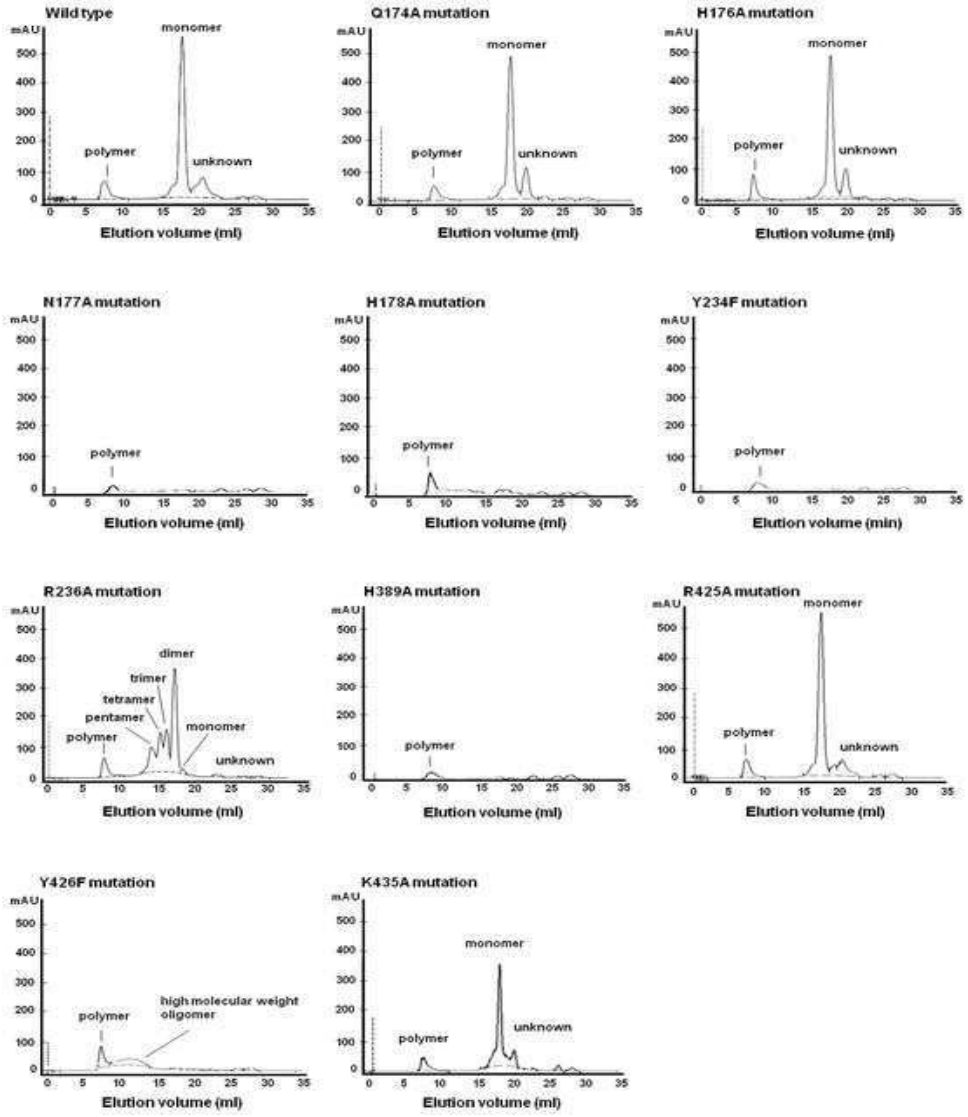
도면4


Saccharifiaction yields (%)
Time (h)
2 % alginate
4 % alginate
6 % alginate
8 % alginate
10 % alginate

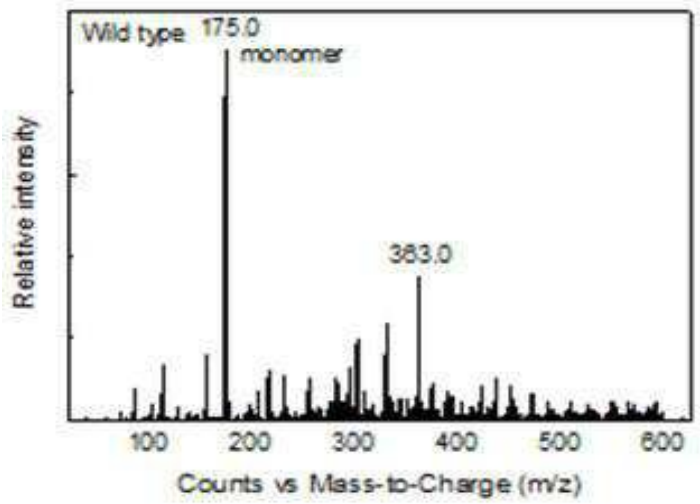
도면5


a
H192
N191
R239
Y246
R88
b
H178
N177
Y234
R236
K66
c
H192
N191
R239
Y246
R88
d
H192
H178
N191
N177
R239
Y246
Y234
R236
K66
R88
e
H178
N177
Y234
R236
K66

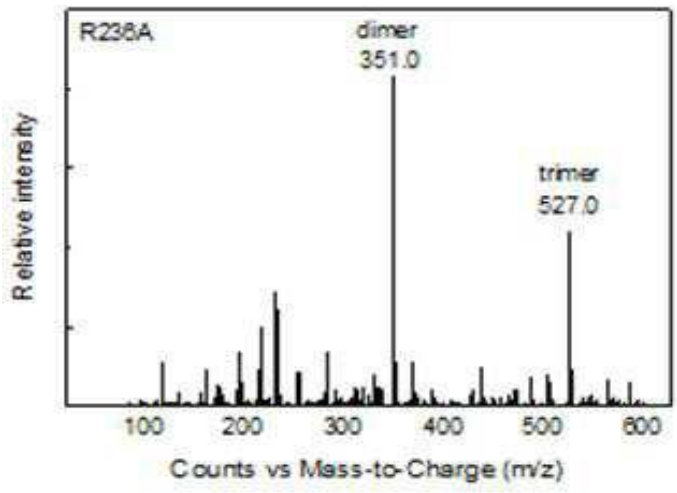
도면6


Wild type
monomer
polymer
unknown
Elution volume (ml)
Q174A mutation
monomer
polymer
unknown
Elution volume (ml)
H176A mutation
monomer
polymer
unknown
Elution volume (ml)
N177A mutation
polymer
Elution volume (ml)
H178A mutation
polymer
Elution volume (ml)
Y234F mutation
polymer
Elution volume (min)
R236A mutation
dimer
trimer
tetramer
pentamer
polymer
monomer
unknown
Elution volume (ml)
H389A mutation
polymer
Elution volume (ml)
R425A mutation
monomer
polymer
unknown
Elution volume (ml)
Y426F mutation
polymer
high molecular weight oligomer
Elution volume (ml)
K435A mutation
monomer
polymer
unknown
Elution volume (ml)

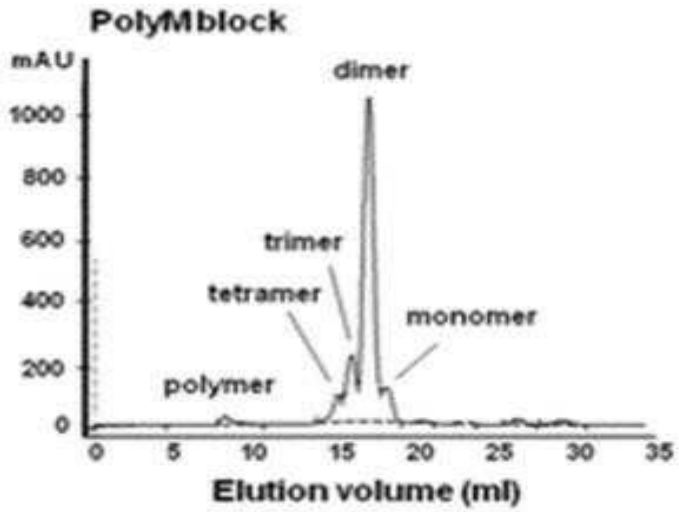
도면7a


Wild type
175.0
monomer
383.0
Relative intensity
100
200
300
400
500
600
Counts vs Mass-to-Charge (m/z)

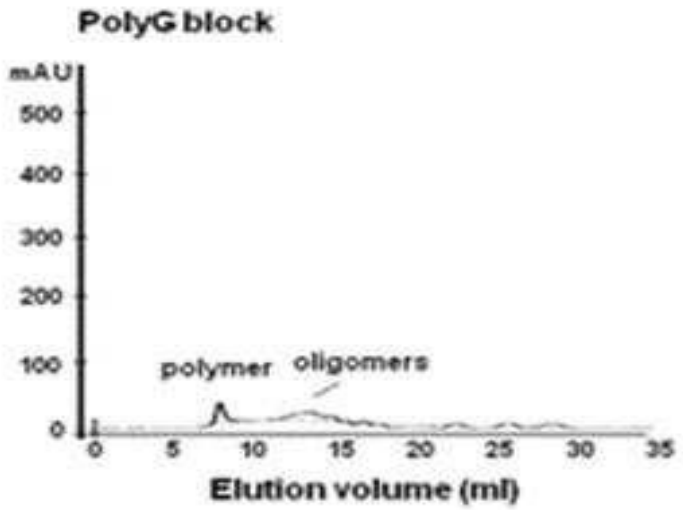
도면7b


R238A
dimer
351.0
trimer
527.0
Relative intensity
100
200
300
400
500
600
Counts vs Mass-to-Charge (m/z)

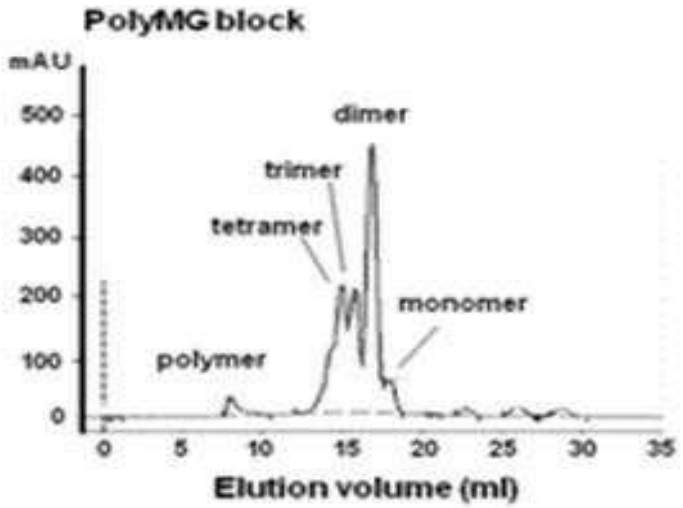
도면8a


PolyMblock
mAU
1000
800
600
400
200
0
dimer
trimer
tetramer
monomer
polymer
0
5
10
15
20
25
30
35
Elution volume (ml)

도면8b



도면8c



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Mutated oligoalginate lyase and process for preparing the same

<130> KPA150581-KR

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 725

<212> PRT

<213> Sphingomonas sp. MJ3-oligo_Wild type_amino acid sequence

<400> 1

Met Gln Thr Ala Pro Gly Asp Gln Pro Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu
1 5 10 15
Met Ala Ala Thr Ala Lys Glu Ala Thr Ala Tyr Pro Leu Phe Ala Ala

20 25 30
Glu Leu Lys Arg Val Arg Arg Glu Val Asp Lys Ala Ile Lys Ala Gly
35 40 45
Val Val Val Pro Gln Pro Lys Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Thr His Glu
50 55 60
Gln His Lys Arg Asn Tyr Thr Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Phe
65 70 75 80
Arg Ile Thr Gly Glu Gln Arg Tyr Ala Asp Phe Ala Arg Ala Glu Leu
85 90 95

Leu Glu Tyr Ala Arg Leu Tyr Pro Thr Leu Gly Asn His Pro Ala Ala
100 105 110
Ser Asp Gln Arg Pro Gly Arg Leu Phe Trp Gln Ser Leu Asn Asp Ala
115 120 125
Val Trp Ala Val Tyr Ala Val Gln Gly Tyr Asp Ala Ile Arg Asp Ser
130 135 140
Leu Ser Pro Ala Asp Arg Ala Thr Ile Asp Asp Lys Leu Phe Arg Pro
145 150 155 160
Met Ala Arg Phe Leu Ser Ala Gly Gln Ala Glu Glu Phe Asp Gln Ile

165 170 175
His Asn His Ala Thr Trp Ala Cys Ala Ala Val Gly Met Ile Gly Tyr
180 185 190
Thr Leu Arg Asp Lys Asp Phe Val Glu Val Ala Leu Lys Gly Leu Lys
195 200 205
Arg Asp Gly Lys Phe Gly Phe Leu Ala Gln Ile Asp Gln Leu Phe Ser
210 215 220
Pro Asp Gly Tyr Tyr Val Glu Gly Pro Tyr Tyr Gln Arg Tyr Ala Met
225 230 235 240

Leu Pro Phe Val Leu Phe Ala Arg Phe Ile Ala Ala Asn Gln Pro Glu

245 250 255

Gln Lys Ile Phe Gln His Arg Asp Gly Val Leu Leu Lys Ala Ile Arg

260 265 270

Thr Ser Ile Gln Thr Thr Tyr Asp Gly Tyr Phe Phe Pro Phe Asn Asp

275 280 285

Ala Met Pro Asp Lys Ser Leu Lys Thr Asp Glu Leu Tyr Gln Ser Val

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Trp Gln Gly Arg Thr Val Leu Thr Pro Asp Gly Leu Met Val Ala

325 330 335

Arg Asp Leu Ala Ala Gly Lys Ala Gln Pro Phe Pro Phe Val Ser Gln

340 345 350

Phe Leu Ser Asp Gly Pro Arg Gly Glu Met Gly Gly Leu Ala Ile Met

355 360 365

Arg Ser Gly Pro Gly Asp Ser Asp Gln Val Leu Val Ala Lys Asn Ala

370 375 380

Ala Met Gly Met Gly His Gly His Phe Asp Lys Leu Ser Tyr Ile Leu

385 390 395 400

Tyr Asp Asn Gly His Ala Ile Val Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Arg Phe

405 410 415

Leu Asn Val Glu Ser Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Leu Lys Glu Asn Glu

420 425 430

Ser Trp Ala Lys Gln Thr Val Ala His Asn Thr Leu Val Val Asn Glu

435 440 445

Thr Ser Asn Phe Gly Gly Lys Trp Lys Val Gly Asp Lys Leu Ala Pro

450 455 460

Gly Gln Leu Phe Trp Ala Ser Thr Pro Gln Ala Thr Ile Ser Thr Ala

465 470 475 480

Glu Met Ala Gly Ala Tyr Pro Gly Val Arg Tyr Arg Arg Thr Leu Val

485 490 495

Gln Leu Pro Val Ala Gly Ile Glu Ser Pro Met Ile Val Asp Leu Leu

500 505 510

Asp Val Thr Gly Asp Lys Pro Ala Thr Tyr Asp Leu Pro Leu His Tyr

515 520 525

Ala Gly Gln Ile Thr Ala Ile Gly Phe Pro Leu Gln Ser Asn Thr Ala

530 535 540

Glu Arg Pro Val Leu Gly Lys Ala Asn Gly Tyr Gln His Ile Trp Val

545 550 555 560

Asp Ala Thr Gly Thr Pro Gly Ala Glu Asn Gly Ala Val Thr Trp Ile

565 570 575

Asn Asp Asn Arg Phe Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Ala Pro Ala Gly Ala

580 585 590

Ser Val Ile Leu Gly Glu Ser Gly Ala Asn Asp Pro Arg Phe Asn Leu

595 600 605

Arg Arg Glu Pro Leu Leu Ile Glu Arg Val Ala Gly Val Ala Asn Ala

610 615 620

Gln Phe Val Asn Leu Leu Glu Pro His Gly Asn Tyr Asp Ala Gly Glu

625 630 635 640

Glu Arg Thr Thr Ala Ser Asn Ser Arg Val Lys Gly Phe Thr His Val

645 650 655

Arg Thr Asn Asp Ala Asp Leu Val Thr Ile Arg Leu Ala Asp Gly Arg

660 665 670

Ala Ile Thr Leu Ala Ile Ala Phe Ser Ala Asp Ala Asn Ala Ala His

675 680 685

Ser Ala Ala Val Asp Gly Arg Lys Leu Asp Trp Arg Gly His Phe Ala

690 695 700

Arg Phe Asp Ala Gly Lys Gly Asn Lys Leu Ala Ala Ala Leu Gln His

705 710 715 720

His His His His His

725

<210> 2

<211> 2178

<212> DNA

<213> Sphingomonas sp. MJ3-oligo_Wild type_nucleotide sequence

<400> 2

atgcagaccg cgccgggcga tcagccgact cttttccgcg cgcccgaaat ggcggcgacg 60

gcgaaggagg ccacggccta tccgctgttc gccgccgagc tgaagcgggt ccgccgcgaa 120

gtcgacaagg cgatcaaggc gggggtggtg gtgccccagc ccaaggatcc gggcggcggc 180

tatacgcacg agcagcacaa gaggaactac accgccatct atggcgccgg gctcttgttc 240

cgcatcaccg gcgagcagcg ttatgccgat ttcgccaggg cggagctgct cgaatatgcc 300

aggctctacc cgacgctcgg caatcatccg gcggcgagcg accagcggcc ggggcgtctg 360

ttctggcaga gcctcaacga cgcggtgtgg gcggtctatg ccgtgcaggg ctatgacgcg 420

atccgggact cgctgagccc cgccgaccgc gcgacgatcg acgacaagct gttccgcccg 480

atggcgcgct tcctgtcggc cggccaggcc gaggagttcg accagatcca caaccatgcc 540

acctgggcct gcgccgcggt gggcatgatc ggctacacgc tgcgcgacaa ggatttcgtc 600

gaggtcgcgc tgaagggcct gaagcgcgac ggcaagttcg gcttcctggc gcagatcgac 660

cagctcttct cgcccgacgg ctattatgtc gaaggaccct attaccagcg ctacgcgatg 720

ctgcccttcg tgctgttcgc ccgcttcatc gcggcgaacc agcccgagca gaagatcttc 780

cagcaccggg acggcgtgct gctgaaggcg atccgcacct cgatccagac gacctatgac 840

ggctatttct tcccgttcaa cgacgcgatg ccggacaaga gcctgaagac cgacgagctc 900

tatcagtcgg tggcgatcgg ctatgaagcg accagggacc cggcgctgct ctcgatcgcc 960

aaatggcagg gccgcaccgt gctgacgccg gatgggctga tggtggcgcg cgacctggcg 1020

gcgggcaagg cccagccctt ccccttcgtc tcgcaattcc tgagcgacgg gcccaggggc 1080

gagatgggcg gcctggcgat catgcgctcg ggcccgggcg acagcgacca ggtgctcgtc 1140

gccaagaatg ccgcgatggg catggggcac ggtcatttcg acaagctgtc atacattctc 1200

tacgacaatg gccatgccat cgtgaccgat tacggcgcgg cccgcttcct caatgtcgag 1260

agcaaggatg gcgggcgcta cctcaaggaa aatgagagct gggcgaagca gaccgtcgcc 1320

cacaacacgc tggtggtgaa cgagaccagc aatttcggcg gcaagtggaa ggtcggcgac 1380

aagctcgcgc ccgggcagct cttctgggca agcactccgc aggcgacgat cagcaccgcc 1440

gagatggccg gtgcctatcc gggggtgcgc tatcgccgca cgctggtgca gctgccggtc 1500

gccggcatcg agagcccgat gatcgtcgac ctgctcgacg tgaccggcga caagcccgcc 1560

acctatgacc tgccgctcca ttatgccggg cagatcaccg cgatcggctt cccgctccag 1620

tcgaacaccg ccgagcggcc ggtgctgggc aaggcgaacg gctatcagca catctgggtc 1680

gacgcgaccg gcacgccggg cgcggagaat ggcgcggtca cctggatcaa cgacaatcgc 1740

ttctacacct accgcatgct cgccccggcc ggtgccagcg tgatcctggg cgagagcggc 1800

gccaacgatc cccgcttcaa cctgcgccgg gagccgctgc tgatcgagcg cgtggcgggg 1860

gtggccaatg cccagttcgt caacctgctc gagccgcacg gcaattacga tgcgggcgag 1920

gaaaggacga cggcgagcaa cagccgggtg aagggcttta cccatgtccg cacgaacgac 1980

gcggatctgg tgacgatcag gctcgccgat ggccgcgcga tcacgctggc aatcgccttc 2040

tcggccgatg ccaatgctgc acattcggcg gcggtggatg gtcgcaagct cgactggagg 2100

ggccatttcg cgcgcttcga tgcgggcaag gggaacaagc ttgcggccgc actcgagcac 2160

caccaccacc accactga 2178

<210> 3

<211> 725

<212> PRT

<213> Sphingomonas sp. MJ3-oligo-R237A mutant_ amino acid sequence

<400> 3

Met Gln Thr Ala Pro Gly Asp Gln Pro Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu
1 5 10 15

Met Ala Ala Thr Ala Lys Glu Ala Thr Ala Tyr Pro Leu Phe Ala Ala
20 25 30

Glu Leu Lys Arg Val Arg Arg Glu Val Asp Lys Ala Ile Lys Ala Gly
35 40 45

Val Val Val Pro Gln Pro Lys Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Thr His Glu
50 55 60

Gln His Lys Arg Asn Tyr Thr Ala Ile Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Phe
65 70 75 80

Arg Ile Thr Gly Glu Gln Arg Tyr Ala Asp Phe Ala Arg Ala Glu Leu
85 90 95

Leu Glu Tyr Ala Arg Leu Tyr Pro Thr Leu Gly Asn His Pro Ala Ala

100 105 110

Ser Asp Gln Arg Pro Gly Arg Leu Phe Trp Gln Ser Leu Asn Asp Ala
115 120 125

Val Trp Ala Val Tyr Ala Val Gln Gly Tyr Asp Ala Ile Arg Asp Ser
130 135 140
Leu Ser Pro Ala Asp Arg Ala Thr Ile Asp Asp Lys Leu Phe Arg Pro
145 150 155 160
Met Ala Arg Phe Leu Ser Ala Gly Gln Ala Glu Glu Phe Asp Gln Ile
165 170 175

His Asn His Ala Thr Trp Ala Cys Ala Ala Val Gly Met Ile Gly Tyr
180 185 190
Thr Leu Arg Asp Lys Asp Phe Val Glu Val Ala Leu Lys Gly Leu Lys
195 200 205
Arg Asp Gly Lys Phe Gly Phe Leu Ala Gln Ile Asp Gln Leu Phe Ser
210 215 220
Pro Asp Gly Tyr Tyr Val Glu Gly Pro Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Met
225 230 235 240
Leu Pro Phe Val Leu Phe Ala Arg Phe Ile Ala Ala Asn Gln Pro Glu

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

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

Ala Met Gly Met Gly His Gly His Phe Asp Lys Leu Ser Tyr Ile Leu

385 390 395 400

Tyr Asp Asn Gly His Ala Ile Val Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Arg Phe

405 410 415

Leu Asn Val Glu Ser Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Leu Lys Glu Asn Glu

420 425 430

Ser Trp Ala Lys Gln Thr Val Ala His Asn Thr Leu Val Val Asn Glu

435 440 445

Thr Ser Asn Phe Gly Gly Lys Trp Lys Val Gly Asp Lys Leu Ala Pro

450 455 460

Gly Gln Leu Phe Trp Ala Ser Thr Pro Gln Ala Thr Ile Ser Thr Ala

465 470 475 480

Glu Met Ala Gly Ala Tyr Pro Gly Val Arg Tyr Arg Arg Thr Leu Val

485 490 495

Gln Leu Pro Val Ala Gly Ile Glu Ser Pro Met Ile Val Asp Leu Leu

500 505 510

Asp Val Thr Gly Asp Lys Pro Ala Thr Tyr Asp Leu Pro Leu His Tyr

515 520 525

Ala Gly Gln Ile Thr Ala Ile Gly Phe Pro Leu Gln Ser Asn Thr Ala

530 535 540

Glu Arg Pro Val Leu Gly Lys Ala Asn Gly Tyr Gln His Ile Trp Val

545 550 555 560

Asp Ala Thr Gly Thr Pro Gly Ala Glu Asn Gly Ala Val Thr Trp Ile

565 570 575

Asn Asp Asn Arg Phe Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Ala Pro Ala Gly Ala

580 585 590

Ser Val Ile Leu Gly Glu Ser Gly Ala Asn Asp Pro Arg Phe Asn Leu

595 600 605

Arg Arg Glu Pro Leu Leu Ile Glu Arg Val Ala Gly Val Ala Asn Ala

610 615 620

Gln Phe Val Asn Leu Leu Glu Pro His Gly Asn Tyr Asp Ala Gly Glu

625 630 635 640

Glu Arg Thr Thr Ala Ser Asn Ser Arg Val Lys Gly Phe Thr His Val

645 650 655

Arg Thr Asn Asp Ala Asp Leu Val Thr Ile Arg Leu Ala Asp Gly Arg

660 665 670

Ala Ile Thr Leu Ala Ile Ala Phe Ser Ala Asp Ala Asn Ala Ala His

675 680 685

Ser Ala Ala Val Asp Gly Arg Lys Leu Asp Trp Arg Gly His Phe Ala

690 695 700

Arg Phe Asp Ala Gly Lys Gly Asn Lys Leu Ala Ala Ala Leu Gln His

705 710 715 720

His His His His His

725

<210> 4

<211> 2178

<212> DNA

<213> Sphingomonas sp. MJ3-oligo_R237A mutant_nucleotide sequence

<400> 4

atgcagaccg cgccgggcga tcagccgact cttttccgcg cgcccgaaat ggcggcgacg 60

gcgaaggagg ccacggccta tccgctgttc gccgccgagc tgaagcgggt ccgccgcgaa 120

gtcgacaagg cgatcaaggc gggggtggtg gtgccccagc ccaaggatcc gggcggcggc 180

tatacgcacg agcagcacaa gaggaactac accgccatct atggcgccgg gctcttgttc 240

cgcatcaccg gcgagcagcg ttatgccgat ttcgccaggg cggagctgct cgaatatgcc 300

aggctctacc cgacgctcgg caatcatccg gcggcgagcg accagcggcc ggggcgtctg 360

ttctggcaga gcctcaacga cgcggtgtgg gcggtctatg ccgtgcaggg ctatgacgcg 420

atccgggact cgctgagccc cgccgaccgc gcgacgatcg acgacaagct gttccgcccg 480

atggcgcgct tcctgtcggc cggccaggcc gaggagttcg accagatcca caaccatgcc 540

acctgggcct gcgccgcggt gggcatgatc ggctacacgc tgcgcgacaa ggatttcgtc 600

gaggtcgcgc tgaagggcct gaagcgcgac ggcaagttcg gcttcctggc gcagatcgac 660

cagctcttct cgcccgacgg ctattatgtc gaaggaccct attaccaggc ctacgcgatg 720

ctgcccttcg tgctgttcgc ccgcttcatc gcggcgaacc agcccgagca gaagatcttc 780

cagcaccggg acggcgtgct gctgaaggcg atccgcacct cgatccagac gacctatgac 840

ggctatttct tcccgttcaa cgacgcgatg ccggacaaga gcctgaagac cgacgagctc 900

tatcagtcgg tggcgatcgg ctatgaagcg accagggacc cggcgctgct ctcgatcgcc 960

aaatggcagg gccgcaccgt gctgacgccg gatgggctga tggtggcgcg cgacctggcg 1020

gcgggcaagg cccagccctt ccccttcgtc tcgcaattcc tgagcgacgg gcccaggggc 1080

gagatgggcg gcctggcgat catgcgctcg ggcccgggcg acagcgacca ggtgctcgtc 1140

gccaagaatg ccgcgatggg catggggcac ggtcatttcg acaagctgtc atacattctc 1200

tacgacaatg gccatgccat cgtgaccgat tacggcgcgg cccgcttcct caatgtcgag 1260

agcaaggatg gcgggcgcta cctcaaggaa aatgagagct gggcgaagca gaccgtcgcc 1320

cacaacacgc tggtggtgaa cgagaccagc aatttcggcg gcaagtggaa ggtcggcgac 1380

aagctcgcgc ccgggcagct cttctgggca agcactccgc aggcgacgat cagcaccgcc 1440

gagatggccg gtgcctatcc gggggtgcgc tatcgccgca cgctggtgca gctgccggtc 1500

gccggcatcg agagcccgat gatcgtcgac ctgctcgacg tgaccggcga caagcccgcc 1560

acctatgacc tgccgctcca ttatgccggg cagatcaccg cgatcggctt cccgctccag 1620

tcgaacaccg ccgagcggcc ggtgctgggc aaggcgaacg gctatcagca catctgggtc 1680

gacgcgaccg gcacgccggg cgcggagaat ggcgcggtca cctggatcaa cgacaatcgc 1740

ttctacacct accgcatgct cgccccggcc ggtgccagcg tgatcctggg cgagagcggc 1800

gccaacgatc cccgcttcaa cctgcgccgg gagccgctgc tgatcgagcg cgtggcgggg 1860

gtggccaatg cccagttcgt caacctgctc gagccgcacg gcaattacga tgcgggcgag 1920

gaaaggacga cggcgagcaa cagccgggtg aagggcttta cccatgtccg cacgaacgac 1980

gcggatctgg tgacgatcag gctcgccgat ggccgcgcga tcacgctggc aatcgccttc 2040

tcggccgatg ccaatgctgc acattcggcg gcggtggatg gtcgcaagct cgactggagg 2100

ggccatttcg cgcgcttcga tgcgggcaag gggaacaagc ttgcggccgc actcgagcac 2160

caccaccacc accactga 2178

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Q175A_forward_primer

<400> 5

ccaggccgag gagttcgacg cgatccacaa ccatgccacc 40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Q175A_reverse_primer

<400> 6

ggtggcatgg ttgtggatcg cgtcgaactc ctcggcctgg 40

<210> 7

<211> 38

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H177A_forward_primer

<400> 7

gaggagttcg accagatcgc caaccatgcc acctgggc 38

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H177A_reverse_primer

<400> 8

gcccaggtgg catggttggc gatctggtcg aactcctc 38

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N178A_forward_primer

<400> 9

ggagttcgac cagatccacg cccatgccac ctgggcctgc 40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N178A_reverse_primer

<400> 10

gcaggcccag gtggcatggg cgtggatctg gtcgaactcc 40

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H179A_forward_primer

<400> 11

ttcgaccaga tccacaacgc tgccacctgg gcctgcgcc 39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H179A_reverse_primer

<400> 12

ggcgcaggcc caggtggcag cgttgtggat ctggtcgaa 39

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y235F_forward_primer

<400> 13

tgtcgaagga ccctatttcc agcgctacgc gatgcc 36

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y235F_reverse_primer

<400> 14

ggcatcgcgt agcgctggaa atagggtcct tcgaca 36

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R237A_forward_primer

<400> 15

cgaaggaccc tattaccagg cctacgcgat gctgcccttc 40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R237A_reverse_primer

<400> 16

gaagggcagc atcgcgtagg cctggtaata gggtccttcg 40

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H390A_forward_primer

<400> 17

ccgcgatggg catgggggcc ggtcatttcg acaagctg 38

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H390A_reverse_primer

<400> 18

cagcttgtcg aaatgaccgg cccccatgcc catcgcgg 38

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R426A_forward_primer

<400> 19

cgagagcaag gatggcgggg cctacctcaa ggaaaatgag 40

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R426A_reverse_primer

<400> 20

ctcattttcc ttgaggtagg ccccgccatc cttgctctcg 40

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y427F_forward_primer

<400> 21

caaggatggc gggcgcttcc tcaaggaaaa tgagag 36

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y427F_reverse_primer

<400> 22

ctctcatttt ccttgaggaa gcgcccgcca tccttg 36

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K436A_forward_primer

<400> 23

gaaaatgaga gctgggcggc gcagaccgtc gcccacaac 39

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K436A_reverse_primer

<400> 24

gttgtgggcg acggtctgcg ccgcccagct ctcattttc 39