



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0104303
(43) 공개일자 2024년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C08J 11/10 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0073 (2013.01)
C08J 11/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0185423
(22) 출원일자 2022년12월27일
심사청구일자 2022년12월27일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장유신
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 103동 1404호
(가좌동, 주공그린빌아파트)
윤예린
경상남도 창원시 진해구 해원로 5, 105동 406호
(이동, 남흥아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 8 항

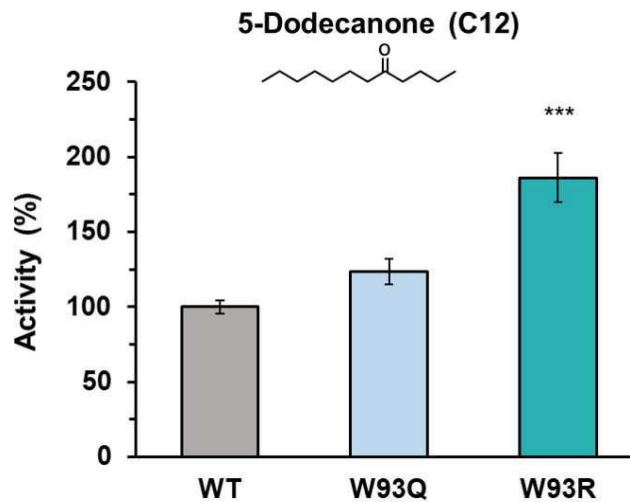
(54) 발명의 명칭 효소 활성이 향상된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제의 활성 부위(active site)에 위치하는 아미노산이 변이되어 기질에 대한 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 반응이 강화된 것을 특징으로 하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체, 이의 제조방법 및 폴리케톤 분해에 대한 상기 변이체의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 카보닐기를 가지는 기질에 대한 높은 활성을 나타내어 야생형 효소보다 효율적으로 베이어-빌리거 산화반응을 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 리파아제와 함께 사용하는 경우 폴리케톤을 분해할 수 있어, 재활용산업에 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 9/16 (2013.01)

C12Y 114/13 (2013.01)

C12Y 301/00 (2013.01)

C08J 2373/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395072131

과제번호 PJ014926012022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 미생물 활용 폐플라스틱분해기술 개발

연구과제명 시스템대사공학 기반 미생물 효소를 이용한 농업용 폴리에틸렌 분해 기술 개발(3차
년도)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에 있어서, W93 아미노산에 변이를 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, W93R 또는 W93Q의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체.

청구항 3

제1항의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 암호화하는 핵산.

청구항 4

제3항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터

청구항 5

제3항의 핵산 또는 제4항의 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물.

청구항 6

제5항의 재조합 미생물을 배양하여 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 생성시키는 단계; 및
상기 생성된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 수득하는 단계를 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체의 제조방법.

청구항 7

제1항의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 또는 제5항의 재조합 미생물을 이용하여 카보닐기를 함유하는 화합물을 베이어-빌리거 산화시키는 방법.

청구항 8

제1항에 따른 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 포함하는 폴리케톤 분해용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제의 활성 부위(active site)에 위치하는 아미노산이 변이되어 기질에 대한 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 반응이 강화된 것을 특징으로 하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체, 이의 제조방법, 상기 변이체를 이용한 카보닐기 함유 화합물의 베이어-빌리거 산화방법 및 폴리케톤 분해에 관한 상기 변이체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 산화환원 효소는 당뇨병 진단(혈당센서)과 관련한 glucose oxidase가 가장 큰 시장을 형성하고 있지만, 여러 가지 단점으로 2세대로서 PQQ-GDH(pyrrroloquinoline quinone-Glucose Dehydrogenase), 3세대 시장으로서 FAD-GDH(Flavin Adenine Dinucleotide-Glucose Dehydrogenase)로 연구가 진행되고 있으며, 이들 역시 효소 안정성이 떨어지는 등의 문제점이 있다. 이외에도, 다양한 기능을 가진 P450, dehydrogenase, reductase, Baeyer-Villiger monooxygenase, laccase, peroxidase 등은 바이오 합성에 있어서 산업적으로 매우 중요하지만, 산화환원 바이오 물질의 개발 및 활용성이 떨어지는 이유는 조효소인 NADP 혹은 NADPH에 의존적이며 발현이 매우 어렵기 때문이다.

[0003] 이렇게 다양한 화학 반응에 쓰이는 높은 유용성에도 불구하고 산화환원 바이오 부품의 종류는 매우 제한적이며 이를 효율적으로 스크리닝, 개량할 수 있는 방법은 노동집약적일 뿐만 아니라 고가이며 많은 시간이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 높은 산업적 유용성을 지닌 산화환원효소 중 베이어 빌리거 모노옥시게나아제(Baeyer-Villiger monooxygenase; BVMOs)는 NADP(H) 의존적 플라보 효소로써 선형 또는 고리형 케톤 등 카보닐 화합물의 탄소 사이에 산소를 첨가하여 에스테르 또는 락톤(lactone)을 생성하는 베이어-빌리거 산화(Baeyer-Villiger oxidation)활성을 갖는 바이오부품이다. 베이어-빌리거 산화 반응은 화학반응 중에서도 매우 독특한 것으로 여겨지고 있으며 화학적으로 접근하기 어려운 유용한 화합물의 chemoenzymatic 합성에 사용될 수 있다.

[0004] 베이어-빌리거 산화반응에 효소를 사용하는 것은 산업 공정을 간편하게 할 뿐만 아니라, 수송과 저장기간 동안 폭발의 위험을 줄 수 있는 엄청난 양의 산화제 사용을 피할 수 있는 산업적 장점을 지니고 있다.

[0006] 플라스틱 폐기물이 급증하면서 이를 처리하기 위해 플라스틱의 생물학적 분해에 대한 관심이 높아지고 있다. 플라스틱은 크기 에스터 본드를 가지는 PET, 우레탄본드를 가지는 PU와 같은 가수분해성 플라스틱과 탄소-탄소 백본으로 이루어진 비가수분해성 플라스틱으로 분류할 수 있다. 가수분해성 플라스틱의 생물학적 분해는 비교적 쉽지만, 비가수분해성 플라스틱의 경우 강한 소수성을 가지고 있고 분자량이 커서 효소의 접근이 어려워 생물학적 분해가 어려운 것으로 알려져 있다. 자연계에 존재하는 비가수분해성 플라스틱 분해 미생물들에 관하여 보고된 바 있으나, 아직까지 비가수분해성 플라스틱 분해 관여 효소들은 정확히 밝혀지지 않았다.

[0007] 폴리케톤은 비가수분해성 플라스틱인 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌의 산화된 형태로 이들의 분해 산물로 볼 수 있기 때문에 폴리케톤 분해능을 가지는 효소는 비가수분해성 플라스틱의 생물학적 분해를 위해 산업적으로 활용될 수 있을 것이다.

[0009] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 베이어-빌리거 산화반응에 대한 뛰어난 촉매 활성을 가지는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 아미노산의 치환을 통해 선형 케톤 기질에 대해 높은 활성을 나타내는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 개발하였으며, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 리파아제와 함께 사용하는 경우, 폴리케톤을 분해할 수 있음을 추가로 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 유전자 또는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은, 상기 변이체 또는 상기 재조합미생물을 이용하여 카보닐기를 함유하는 화합물을 베이어-빌리거 산화시키는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 포함하는 폴리케톤 분해용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에 있어서, W93 아미노산에 변이를 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 코딩하는 유전자 및 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 유전자 또는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 생성시키는 단계; 및
- [0022] 상기 생성된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 수득하는 단계를 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 변이체 또는 상기 재조합미생물을 이용하여 카보닐기를 함유하는 화합물을 베이어-빌리거 산화시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 포함하는 폴리케톤 분해용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 카보닐기를 가지는 기질에 대한 높은 활성을 나타내어 야생형 효소보다 효율적으로 베이어-빌리거 산화반응을 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 리파아제와 함께 사용하는 경우 폴리케톤을 분해할 수 있어, 재활용산업에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 부위 포화 돌연변이가 유발된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 유전자를 포함하는 벡터 제작하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 돌연변이가 유발된 PIBVMO 유전자를 포함하는 벡터가 삽입된 형질전환체의 조추출물을 이용한 PIBVMO 변이체를 무작위 스크리닝한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 선별된 PIBVMO 변이체의 염기서열 분석 결과, W93-11은 아미노산 서열 93번 제 트립토판이 글루타민으로 치환된 변이체 W93Q, W93-13은 93번째 트립토판이 아르기닌으로 치환된 변이체 W93R임을 확인하였다.
- 도 3은 5-dodecanone에 대한 PIBVMO 야생형 및 변이체의 활성을 비교한 그래프이다.
- 도 4는 8-pentadecanone에 대한 PIBVMO 야생형 및 변이체의 활성을 비교한 그래프이다.

도 5은 PIBVMO-W93R로 유도된 폴리케톤 필름 표면의 C1s Spectra 이다. 맨 왼쪽부터 아무런 처리하지 않은 폴리케톤 필름, lipases 와 반응시킨 폴리케톤 필름, BVMO와 lipases와 반응시킨 폴리케톤 필름의 C1s Spectra 이다.

도 6는 PIBVMO-W93R 및 lipase를 처리한 폴리케톤 필름의 무게 감소를 나타낸 그래프이다. Treatment의 경우 PIBVMO-W93R과 lipase를 처리한 후 감소한 필름 무게를 나타낸 것이고, control의 경우 효소 없이 동일한 조건에서 배양된 후 감소한 필름 무게를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0031] 본 발명에서는 야생형 효소에 비해 활성이 현저히 개선된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 개발하기 위하여, 단백질의 아미노산 서열에 변이를 가하고 활성을 측정하여 스크리닝을 하였고, 그 결과 아미노산 치환을 통해 기질에 대한 활성이 향상된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 선별할 수 있었다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 베이어-빌리거 산화반응에 대한 촉매능이 향상된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 본 발명의 변이체의 주형(또는 야생형)이 되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제는 기질(예, 화합물, 단백질 등)의 카보닐기의 탄소 및 그 인접 탄소 사이에 산소원자가 삽입되는 베이어-빌리거 산화반응을 유도하는 효소를 의미한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제는 서열번호 1로 표시되었으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 특정 아미노산 잔기 위치에서, 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 단백질을 포함하는 의미로 해석되어야 한다.
- [0035] 본 명세서에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 또는 이의 변이체의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제의 변형을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 용어, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.
- [0037] 따라서, 본 발명의 변이체의 주형이 되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제는 서열번호 1뿐만 아니라, 이와 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과를 가지며, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상 또는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제, 재조합 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 및 이의 절편들을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0038] 본 발명의 용어, "절편"은 모 단백질이 절단된 일부 단편을 의미하며, C'-말단 및/또는 N'-말단이 절단된 것일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 절편은 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제와 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과를 갖는 절편을 의미한다. 예를 들어, 상기 절편은 전장 단백질에서 신호 서열이 절단된 단편을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제는 서열번호 1로 표시되는 파비바쿨럼 라바멘티보란스

(*Parvibaculum lavamentivorans*) 유래 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 이외에도 다른 균주 또는 다른 생물로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 아시네토박터 칼코아세트익스(*Acinetobacter calcoaceticus*) 유래 BVMO, 오세아니콜라 바센시스(*Oceanicola batsensis*) 유래 BVMO, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 유래 BVMO, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래 BVMO, 또는 노카르디아 시리아시조르지카(*Nocardia cyriacigeorgica*) 유래 BVMO 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서, 야생형 베이어-빌리거 모노옥시게나아제의 아미노산 일부를 치환하여 변이체를 생성하는 경우, 베이어-빌리거 산화반응에 대해 현저히 뛰어난 활성을 가지게 됨을 확인하였다.

[0043] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 서열번호 1로 표시되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에서 W93 아미노산에 변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어 “변이체”는 참조서열(정상 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 서열; 예시로, 서열번호 1)의 아미노산 서열에서, 일부 아미노산 잔기의 변이, 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환, 결실 및/또는 삽입, 더욱 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것뿐 아니라, 그러한 아미노산 잔기의 치환, 결실 및/또는 삽입과 함께, N-말단 또는 C-말단에서의 일부 아미노산 잔기의 결실이 일어난 것을 모두 포함하는 개념으로 사용된다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 변이체는 서열번호 1의 일부 아미노산을 치환하여 제조하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 '변이'는 아미노산의 치환인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 서열번호 1로 표시되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에서 W93R 또는 W93Q의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 보다 바람직하게는 W93R의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 1로 표시되는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에서 W94R 아미노산 치환을 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체가 가장 뛰어난 활성을 나타내는 것을 확인하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 아미노산 변이의 아미노산 잔기의 상기 위치는 참조로써(as reference) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 사용하여 정확하게 잔기를 넘버링할 수 있으며, 여기서 "잔기 Xn(residue Xn)"은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서 위치 n에 상응하는 잔기 X를 나타내고, n은 양의 정수이며, X는 임의의 아미노산 잔기의 약어이다. 예를 "잔기 W93"은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서 위치 93에 상응하는 아미노산 잔기 W를 지칭한다.

[0050] 본 발명에서 "아미노산 변이"는 "아미노산 치환 Xn(amino acid substitution Xn)"일 수 있으며, 일 양태로서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 위치 n의 아미노산 잔기 X에서 발생하는 아미노산 치환을 의미하고, 여기서 n은 양의 정수이고, X는 임의의 아미노산 잔기의 약어이다. 예를 들어, "아미노산 치환 V93"은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 위치 93에 상응하는 아미노산 잔기 V에서 발생한 아미노산 치환을 의미한다. “아미노산 치환 XnY(amino acid substitution XnY)”는 일 양태로서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 위치 n의 아미노산 잔기 X가 아미노산 잔기 Y로 치환되는 아미노산 치환을 지칭한다.

[0051] 본 발명에 있어서, 참조서열로 사용되는 서열번호 1의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 외의 다른 아미노산 서열을 갖는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제를 참조서열로 사용하는 경우, 서열번호 1을 참조로 하여 기재된 특정 아미노산 잔기에 "상응하는" 아미노산 잔기는 일반적으로 최적화 조건 하에서 아미노산 서열의 정렬에 의해 얻어 질 수 있다. 상기 서열 정렬은 당업자가 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, NEEDLE 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어 등을 사용하여 이해하는 수단에 의해 수행될 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에서 최적의 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬에 사용하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0052] 본 발명의 아미노산 치환은 비 보존 치환(non-conserved substitutions)일 수 있다. 상기 비 보존 치환은, 예를 들어, 특정 측쇄 크기 또는 특정 특성 (예를 들어, 친수성)을 갖는 아미노산 잔기를 상이한 측쇄 크기 또는 상이한 특성 (예를 들어, 소수성)을 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 것과 같은 비 보존 방식으로, 표적 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 잔기를 변경하는 것을 포함할 수 있다.

- [0053] 상기 아미노산 치환은 또한 보존된 치환(conserved substitutions)일 수 있다. 상기 보존된 치환은, 예를 들어, 특정 측쇄 크기 또는 특정 특징 (예를 들어, 친수성)을 갖는 아미노산 잔기를 동일하거나 유사한 측쇄 크기 또는 동일하거나 유사한 특성 (예: 여전히 친수성)을 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 것과 같이, 보존된 방식으로 표적 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 잔기를 변경하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 보존된 치환은 일반적으로 생산된 단백질의 구조 또는 기능에 큰 영향을 미치지 않는다. 본 출원에서, 융합 단백질의 돌연변이인 아미노산 서열 변이체, 이의 단편, 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된 이의 변이체는 단백질의 구조 또는 기능을 현저하게 변화시키지 않는 보존된 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 다음 그룹 각각에서 아미노산 간의 상호 치환(mutual substitutions)은 본 출원에서 보존적 치환으로 간주될 수 있다:
- [0055] 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 그룹: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌.
- [0056] 극성 측쇄를 갖는 비하전 아미노산 그룹: 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민.
- [0057] 극성 측쇄를 갖는 음전하 아미노산 그룹: 아스파르트산 및 글루탐산.
- [0058] 양전하를 띤 염기성 아미노산 그룹: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘.
- [0059] 페닐을 갖는 아미노산 그룹: 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신.
- [0060] 본 발명에 포함된 단백질, 폴리펩티드 및/또는 아미노산 서열은 또한 적어도 다음 범위를 포함하는 것으로 이해될 수 있다: 상기 단백질 또는 폴리펩티드와 동일하거나 유사한 기능을 갖는 변이체 또는 상동체(homologues).
- [0061] 본 발명에서, 상기 변이체는 야생형 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드 일 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 적어도 1 개의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입, 예를 들어 1-30, 1-20 또는 1-10, 대안적으로, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의한 아미노산 변화를 갖는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 기능적 변이체는 변화 (예를 들어, 치환, 결실 또는 첨가) 전에 상기 단백질 또는 상기 폴리펩티드의 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 변경 전에 상기 단백질 또는 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성의 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 또는 100 % 이상을 보유할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 상동체(homologue)는 상기 단백질 및/또는 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 약 80 % (예를 들어, 적어도 약 85 %, 약 90 %, 약 91 %, 약 92 %, 약 93 %, 약 94 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 이상) 서열 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드 일 수 있다.
- [0063] 본 발명에서, 상기 상동성은 일반적으로 둘 이상의 서열 간의 유사성(similarity), 유의성(analogousness) 또는 연관성(association)을 지칭한다. "서열 상동성 백분율(percent of sequence homology)"은 동일한 핵산 염기 (예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 존재하는 위치의 수를 결정하는 비교 창에서 정렬된 두 서열을 비교하는 방식에 의해 계산될 수 있으며, 비교 창(즉, 윈도우 사이즈)의 일치하는 위치의 수를 제공하기 위하여 일치하는 위치의 수를 총 위치 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 상동성의 백분율을 제공한다. 서열 상동성의 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계에 알려진 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열 내에서 또는 표적 서열 영역 내에서 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 상기 상동성은 또한 다음 방법에 의해 결정될 수 있다: FASTA 및 BLAST. FASTA 알고리즘은 예를 들어 W. R. Pearson and D. J. Lipman's "Improved Tool for Biological Sequence Comparison", Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 2444-2448, 1988; 및 D. J. Lipman and W. R. Pearson's "Fast and Sensitive Protein Similarity Search", Science, 227:1435-1441, 1989에 개시되어 있고, BLAST 알고리즘에 대한 설명은 S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. Lipman, "A Basic Local Alignment Search Tool", Journal of Molecular Biology, 215: 403-410, 1990를 참조할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 사용하는 경우, 카보닐기를 함

유하는 다양한 화합물을 기질로 하여, 야생형에 비해 현저히 높은 베이어-빌리거 산화반응을 유도할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 카보닐기를 함유하는 다양한 화합물을 기질로 하여 상기 기질을 베이어-빌리거 산화하기 위한 용도로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 기질은 카보닐기를 함유하는 화합물일 수 있으며, 바람직하게는 일 실시예에서 확인한 것과 같이 5-도데카논(5-dodecanone) 또는 8-펜타데카논(8-pentadecanone)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0068] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 암호화하는 핵산에 관한 것이다.

[0069] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0070] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 핵산 또는 벡터로 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0071] 본 발명에서 용어 "핵산(nucleic acid)"은 일반적으로 자연 환경으로부터 분리되거나 인공적으로 합성된 분리된 형태의 뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 임의의 길이의 이들의 유사체를 의미한다. 본 발명의 핵산은 분리될 수 있다. 예를 들어, 이는 다음과 같은 방법으로 생산 또는 합성될 수 있다: (i) 증합 효소 연쇄 반응 (PCR) 증폭과 같은 시험관 내 증폭, (ii) 클론 재조합, (iii) 정제, 예를 들어 제한 효소 분해에 의한 분별 (fractionation) 및 겔 전기 영동, 또는 (iv) 합성, 예를 들어 화학적 합성. 일부 구체예에서, 상기 단리된 핵산은 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 핵산 분자이다. 본 발명에서, 상기 변이체를 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 제한 단편 작업 또는 합성 올리고 뉴클레오타이드를 사용하는 중첩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 제조 방법과 원리는 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 및 Ausube et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York NY, 1993에서 확인할 수 있다.

[0072] 본 발명에서, 용어 "플라스미드(plasmid)"는 벡터(vector)와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 일반적으로 삽입된 핵산을 숙주 세포(이는 숙주 미생물을 포함함)로 전달하여, 숙주 세포나 미생물에서 자가 복제가 가능한 핵산 분자를 지칭한다. 상기 벡터는 주로 DNA 또는 RNA를 세포에 삽입하는데 사용되는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA 복제에 사용되는 벡터, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역 발현에 주로 사용되는 벡터를 포함할 수 있다. 상기 벡터는 또한 다중의 기능을 갖는 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 적합한 숙주 세포에 도입될 때 폴리펩티드로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 일반적으로, 상기 벡터를 함유하는 적합한 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 벡터는 원하는 발현 생성물을 생산할 수 있다. 본 발명에서, 상기 벡터는 상기 핵산 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 상기 변이체를 암호화하는데 필요한 모든 핵산 분자를 포함할 수 있다. 이 경우, 본 출원의 융합 단백질을 얻기 위해 오직 하나의 벡터만 필요하다. 일부 구체예에서, 상기 벡터는 상기 변이체의 일부를 암호화하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 벡터는 예를 들어 상기 재조합 미생물에서 유전자 발현을 조절하기 위한 핵산 분자를 포함할 수 있다. 이때, 본 발명의 재조합 미생물을 얻기 위해서는 2 개 이상의 서로 다른 벡터가 필요할 수 있다.

[0073] 또한, 상기 벡터는 적절한 숙주 세포 및 적절한 조건 하에서 벡터를 선별하는 마커 유전자와 같은 다른 유전자를 포함할 수도 있다. 또한, 상기 벡터는 적절한 숙주에서 코딩 영역이 적절하게 발현되도록 하는 발현 제어 요소(control element)를 포함할 수도 있다. 이러한 제어 요소는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 이들은 프로모터, 리보솜 결합 부위, 인핸서 및 유전자 전사 또는 mRNA 번역을 조절하는 기타 제어 요소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 발현 제어 서열은 조절 요소(regulatory element)이다. 상기 발현 조절 서열의 특정 구조는 종 또는 세포 유형의 기능에 따라 달라질 수 있지만, 일반적으로 TATA 박스, 캡피드 서열(capped sequences), CAAT 서열 등과 같은 전사 및 번역 개시에 관여하는 5' 비-전사 서열 및 5' 및 3' 비-번역 서열을 포함한다. 예를 들어, 5' 비-전사 발현 조절 서열은 프로모터 영역을 포함할 수 있고, 프로모터 영역은 기능적으로 연결된 핵산의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 벡터는 pCold일 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 통상의 기술자는 상기한 벡터 이외에도 본 기술분야에서 통상적으로 사용되는 벡터를 적절히 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0074] "발현 조절 서열(expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한

전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의의 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.

[0075] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 Φ 은 E. coli에서 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0076] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동가능하게 연결(operably linked)” 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인헨서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된”은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인헨서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0077] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터”는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0078] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0079] 본 발명의 변이체를 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adenovirus-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 E. coli에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ 10과 λ NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

[0080] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 미생물은 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질전환”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질감염”은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

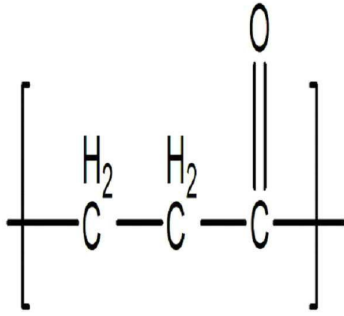
[0081] 본 발명에서 용어 “숙주 세포”, “세포”, “숙주 미생물” 및 “숙주”는 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 일반적으로 본 발명의 핵산을 포함하거나 포함할 수 있는 플라스미드 또는 벡터 또는 본 발명의 변이체 또는 발현이 조절되는 단백질이나 폴리펩티드들을 발현할 수 있는 개별 세포, 세포주, 미생물 또는 세포 배양물을 지칭한다.

상기 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함할 수 있다. 자연적, 우발적(accidental) 또는 고의적(deliberate) 돌연변이로 인해, 자손 세포와 원래의 모세포는 본 발명의 목적 단백질이나 폴리펩티드를 발현할 수 있는 한, 형태나 게놈이 반드시 완전히 동일할 수는 없다. 상기 숙주 세포는 본 발명의 벡터로 시험관 내 세포를 형질 감염시킴으로써 수득될 수 있다. 상기 숙주 세포는 바람직하게는 미생물일 수 있으며, 예컨대, 대장균(*E. coli.*), 리조비움(*Rhizobium*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 칸디다 (*Candida*), 에르위니아(*Erwinia*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 파스테렐라(*Pasteurella*), 맨하이미아 (*Mannheimia*), 액티노바실러스(*Actinobacillus*), 아그레가티박터 (*Aggregatibacter*), 잔토모나스(*Xanthomonas*), 비브리오(*Vibrio*), 아조토박터(*Azotobacter*), 애시네토박터(*Acinetobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 로도박터(*Rhodobacter*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*Cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0083] 본 발명은 일 관점에서 상기 핵산이 도입된 재조합 미생물을 배양하여 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 수득하는 단계를 포함하는 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 LB 배지에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0085] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 암호화하는 핵산을 가지는 벡터를 *E.coli* BL21(DE3) 균주에 도입하고 배양하여 미생물로부터 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 제조하였으며, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 야생형 효소와 비교하여 현저히 높은 효소 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0087] 베이어-빌리거 모노옥시게나아제는 베이어-빌리거 산화반응을 유도하는 효소로써, 탄소화합물이 가지는 카보닐기의 탄소와 그 인접 탄소 사이에 산소원자의 삽입을 촉매한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 이용하여 카보닐기를 함유하는 화합물을 기질로써 베이어-빌리거 산화반응이 유도됨을 확인하였고, 상기 변이체가 야생형 베이어-빌리거 모노옥시게나아제에 비하여 베이어-빌리거 산화반응에 대한 효소활성이 향상되었음을 확인하였다.
- [0088] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 또는 상기 재조합 미생물을 이용하여 카보닐기를 함유하는 화합물을 베이어-빌리거 산화시키는 방법에 관한 것이다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 카보닐기를 함유하는 화합물, 특히, 선형 또는 고리형 케톤화합물일 수 있으나, 화합물의 탄소 사이에 산소를 첨가하여 에스테르 또는 락톤(lactone)산화되는 베이어 빌리거 산화가 일어날 수 있는 화합물이라면, 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 이용하면 베이어-빌리거 산화반응 속도를 높일 수 있다.
- [0091] 본 발명의 일 실시예에서, 폴리케톤을 기질로 하여 본 발명의 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 처리하여 반응 수행 시, 폴리케톤이 분해됨을 확인하였다.
- [0092] 따라서, 본 발명은 일 관점에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 포함하는 폴리케톤 분해용 조성물에 관한 것이다.
- [0093] 본 발명에서 용어 “폴리케톤”은 일산화탄소, 에틸렌, 프로필렌을 단량체로 하여 중합되는 삼중공중합체(terpolymer)를 지칭한다. 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트 등의 일반 엔지니어링 플라스틱 소재에 비해 원료 및 중합 공정비가 저렴한 신소재로써 기계적 특성과 내열성, 내화학적, 연료투과성, 내마모성 등이 우수하여 기존 엔지니어링 플라스틱 소재를 대체할 수 있는 환경 친화적인 소재로 주목을 받고 있는 물질이다 (Yun ju-ho, et al., *Elastomers and composites* v.49 no. 1 pp. 37-42 (2014)). 폴리케톤은 $[-CH_2CH_2CO-]_n$ 의

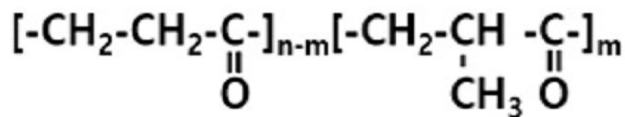
화학식을 가지는 물질로써 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[화학식 1]



본 발명의 일 실시예에서, 상기 폴리케톤은 Hyosung (Korea)에서 시판되는 폴리케톤 레진(resin)일 수 있으며, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[화학식 2]



본 발명에서 용어 “리파아제”는 지방을 분해하여 지방산과 모노글리세리드로 분해하는 효소를 지칭한다. 용어 “지질가수분해효소” 또는 “지질분해효소”와 동일한 의미에서 상호호환적으로 사용될 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서는, 폴리케톤 필름에 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 및 리파아제를 처리한 결과 폴리케톤이 분해됨을 확인하였다. 본 발명에 있어서, 상기 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체는 바람직하게는 W93R의 아미노산 치환을 포함하는 변이체일 수 있고, 상기 리파아제는 바람직하게는 *Burkholderia cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei* 유래 리파아제일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체 벡터의 제조

PIBVMO에서도 관찰되는 Type I BVMO의 주요 모티프(motif) 중 하나인 [A/G]GXWXXX[F/Y]P[G/M]XXD는 촉매 잔기로서 FAD와 상호작용하는 것으로 보고 되어있었으며, FAD는 BVMO의 보철 그룹(prosthetic group)으로써 보조인자(cofactor)와 함께 기질의 산화환원반응을 위한 nucleophile의 형성에 매우 중요한 역할을 한다(Nguyen, Tien Duc, et al. Biochemical and biophysical research communications 512(3) pp. 564-570 (2019)). 따라서 BVMO의 촉매 반응에 중요한 역할을 하는 FAD와 활성 부위에 인접한 4개의 부위 I55, V66, R89, W93을 site-saturation mutagenesis를 위한 mutation site로 선정하였다.

PIBVMO의 아미노산 서열 93번 아미노산 트립토판은 64번 알라닌, 95번 글루타민, 97번 아르기닌과 총 3개의 수소결합을 형성하고 있다(Nguyen, Tien Duc, et al. Biochemical and biophysical research communications 512(3) pp. 564-570 (2019)). 부위 포화 돌연변이(site-saturation mutagenesis)로 인해 PIBVMO의 93번째 아미노산 잔기가 트립토판에서 아르기닌으로 치환되면서 아미노산 서열 56번째 트립토판 백본의 카르보닐 산소와 치환된 아르기닌의 곁사슬의 수소가 추가로 수소결합을 형성할 수 있으며, 곁사슬(side chain)의 크기가 감소하였음을 확인하였다. 이러한 구조적 변화가 PIBVMO-W93R의 활성에 기여할 것이라 예측된다.

따라서, 본 발명자들은 돌연변이 유발 PCR(mutagenic PCR)을 통해 부위 포화 돌연변이를 유발하는 방법으로 BVMO 변이체 코딩 유전자가 삽입된 벡터를 구축하였다. 기탁번호 KCTC 22775 파비바쿨럼 라바멘티보란스

(*Parvibaculum lavamentivorans*)의 BVMO 코딩 유전자(*PIBVMO*)를 주형으로 하여(서열번호 4), 서열번호 1로 표시되는 BVMO의 아미노산 서열 93번째 위치에 degenerate codon NNN을 포함하는 프라이머 및 제한효소 NdeI과 PstI으로 절단된 pCold의 오버래핑 말단을 포함하는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 벡터 pCold I를 제한효소 NdeI과 PstI으로 절단시키기 위해서 pCold I 벡터 10 μ L, 10*Buffer 5 μ L, NdeI 0.5 μ L, PstI 0.5 μ L, dH₂O 34 μ L로 구성된 반응 용액을 제조하여 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응 용액에 대해 전기영동 및 겔 정제를 수행하여 절단된 벡터 DNA를 얻었다. 상기 벡터 pCold 는 Takara에서 구입하였으며, 상기 제한효소 NdeI 및 PstI는 enzygomics에서 구입하였다. 베이어빌리지 모노옥시게나아제의 아미노산 서열 및 그 코딩 유전자의 염기서열의 서열번호를 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0108]

단백질 및 유전자 서열	서열번호
PIBVMO-WT의 아미노산 서열	1
PIBVMO-W93-11의 아미노산 서열	2
PIBVMO-W93-13의 아미노산 서열	3
PIBVMO-WT의 염기서열	4
W93-11 (W93Q)의 염기서열	5
W93-13 (W93R)의 염기서열	6

[0110]

MEGAquick-spinTMplus Fragment DNA Purification kit (iNtRON Biotechnology, Korea)을 사용하여 상기 증폭된 2개의 PCR 절편에 대해 겔 정제(gel purification)하고, 상기 정제된 PCR 2개의 PCR 절편을 주형으로 오버랩 PCR(overlap extension PCR)을 수행함으로써 단일 부위 포화 돌연변이가 유발된 *PIBVMO* 유전자의 DNA 절편을 제작했다. 생성된 DNA 절편은 NdeI과 XbaI으로 절단된 pCold와 함께 Gibson assembly를 수행하여 pCold-*PIBVMO* 변이체 벡터를 제작하였다(도 1). 상기 벡터들을 E. coli Top10 균주에 형질전환시켰다. 벡터의 제작에 사용된 프라이머들은 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

[0111]

프라이머	염기서열(5' →3')	서열번호
PIBVMO-F	ATGAGTTCGGTACAATCCAGCC	7
PIBVMO-R	TCAATCCAAGACGAATCCCTCATAA	8
pCold-PIBVMO-F	GTGCATCATCATCATCATATCGAAGGTAGGCATATGAGTTCGGTACAATCCAGCC	9
pCold-PIBVMO-R	CTGTGCTTTTAAGCAGAGATTACCTATCTAGACTGCATCAATCCAAGACGAATCCCTCATAA	10

[0113]

실시예 2. 베이어-빌리지 모노옥시게나아제 변이체 스크리닝

[0114]

PIBVMO 변이체 단백질의 1차 스크리닝을 위해 상기 형질전환된 E. coli Top 10 균주의 조추출물(crude extract)을 이용하여 활성 분석을 수행했다. 50 μ g/mL 암피실린을 함유하는 LB agar 플레이트에서 pCold-*PIBVMO* 변이체 플라스미드를 가지는 단일 콜로니를 무작위 선별하여, 50 μ g/mL 암피실린을 함유하는 LB 배지 10mL에 접종했다. 배양액의 OD600 값이 0.8에 도달하였을 때, 아이소프로필 베타-D-1-티오갈락토피라노사이드(isopropyl β ; IPTG)를 첨가하여 1mM의 농도로 만들고, 15°C에서 약 12시간 배양하여 PIBVMO 변이체 단백질을 생산하였다.

[0115]

이후 13000rpm, 4°C에서 5분간 원심분리를 통해 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 버퍼에 현탁하고 원심분리 후 상등액을 제거하여 세포를 분리했다. 분리된 세포를 다시 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 버퍼에 재현탁한 후 세포를 얼음에 접촉시킨 후 초음파처리(sonication)를 수행하고, 13000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하여 펠릿(pellet)으로 남은 조추출물을 수득하였다. 상기 조추출물은 PIBVMO 변이체 단백질을 함유한다.

[0116]

상기 PIBVMO 변이체 단백질이 함유된 조추출물을 이용하여 활성이 향상된 PIBVMO 변이체 단백질을 1차 선별하였다. BVMO 활성 평가를 위하여, 야생형 PIBVMO 단백질 및 PIBVMO 변이체 단백질이 포함된 조추출물에 기질 및 NADPH를 각각 0.5mM 및 0.2mM의 농도가 될 때까지 첨가하여 1mL의 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물의 제

조 후에 즉시, 25℃에서 60초 동안 340nm 파장에 대해 spectrophotometer를 사용하여 NADPH의 흡광도를 측정하여 활성을 평가했다. 단백질 함량은 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin; BSA)을 표준물질로 사용한 Bradford assay에 의해 결정되었다. BVMO는 NADPH를 보조인자로 활용하므로, NADPH의 감소는 효소가 활성을 나타내어 베이어-빌리거 산화반응을 촉매하였음을 의미한다.

[0117] 조추출물을 이용한 PIBVMO 변이체 무작위 스크리닝을 통해 5-도데카논(5-dodecanone) 및 8-펜타데카논(8-pentadecanone) 기질에 대한 활성이 높은 W93-11과 W93-13 변이체가 선별되었다(도 2).

[0119] 실시예 3. 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체의 제조 및 그 활성 분석

[0120] 무작위 스크리닝을 통해 선별한 W93-11 및 W93-13 유전자를 가진 벡터를 함유하는 E. coli Top10에 대해 mini-prep을 수행하여 벡터를 추출하고, 추출된 벡터를 E. coli BL21(DE3) 균주에 형질전환 시켰다. 상기 E. coli Top10 균주는 Thermo Fisher에서 구입하였고, E. coli BL21(DE3) 균주는 enzynomics에서 구입하였다. 선별된 W93-11 및 W93-13의 염기 서열을 분석한 결과, 각각 93번째 아미노산을 코딩하는 염기서열이 TGG(WT)에서, CAG(W93-11) 및 CGA(W93-13)로 치환되어, 93번째 아미노산인 트립토판이 글루타민 및 아르기닌으로 치환된 것을 확인하였다.

[0121] 항생제 엠피실린이 함유된 LB 배지에서 배양하여 플라스미드를 함유하는 E. coli pCold-PIBVMO/BL21 균주를 선별하였다. 상기 균주를 포함하는 용액이 담긴 테스트 튜브(test tube)에 LB 배지를 5mL 첨가한 후 37℃ 200 rpm의 조건으로 종 배양(seed culture)하였다. 이를 100 mL의 LB 배지에 1% 접종하여 배양한 후, 1L의 LB 배지에 5% 접종하여 최종적으로 계대 배양 하였다. OD600 값이 0.8 정도에 도달하였을 때, 이소프로필티오갈락토사이드(isopropylgalactoside; IPTG)를 1mM이 될 때까지 첨가하여 BVMO 코딩 유전자를 발현시킨 후, 15℃에서 약 15시간 배양한 후 cell을 4℃에서 5분동안 1,5000 g 수확하여 정제를 진행하였다.

[0122] 수득한 세포를 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 희석하고 얼음에서 초음파 처리(sonication)하여 파쇄했다. 그 후 4℃에서 30분동안 1,5000g 으로 원심분리한 후 단백질이 함유된 상등액을 분리하고 Ni-NTA 컬럼(Millipore)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 30mM의 이미다졸(imidazole) 완충용액으로 세척한 후 PIBVMO 야생형 및 변이체를 300mM 이미다졸(imidazole)을 포함한 완충용액으로 용출시켰다. 10kDa MWCO Amicon centrifugal concentrator(Millipore)을 사용하여 용출 분획으로부터 이미다졸(imidazole)을 씻어내고 PIBVMO 야생형 및 변이체를 농축하였다.

[0123] BVMO는 보조인자(cofactor)로 NADPH를 이용하므로 BVMO의 활성을 분석하기 위해 NADPH의 감소량을 340nm 파장에 대해 60초 동안의 흡광도 변화를 확인하였다. 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 100 μM BVMO 10 μL, 50mM 기질 10 μL, 20mM NADPH 10 μL를 첨가하여 assay용 1mL 시료를 제작하였다. 카보닐기가 중앙에 위치한 구조의 화합물인 5-도데카논(5-dodecanone) 및 8-펜타데카논(8-pentadecanone)을 기질로 사용하였다.

[0124] 정제된 PIBVMO 야생형 및 변이체들의 5-dodecanone 및 8-pentadecanone에 대한 활성을 한 결과(도 3 및 도 4), 야생형 PIBVMO와 대비하여;

[0125] PIBVMO-W93Q 변이체는 8-펜타데카논에 대해서는 약 0.5배 활성이 감소하였고, 5-도데카논에 대해서 유의미한 활성 차이가 나타나지 않았다.

[0126] PIBVMO-W93R 변이체는 8-펜타데카논에 대한 활성이 증가하였으며, 5-도데카논에 대해서는 약 1.8배로 현저히 높은 활성을 나타냈다.

[0128] 실시예 4. 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체를 이용한 폴리케톤 필름 분해능 확인

[0129] 실시예 4-1: 폴리케톤 분해 방법(Method)

[0130] 폴리케톤(polyketone, PK) 필름은 0.5cm x 0.5cm으로 절단하여 실험에 사용하였다. 0.5 mg/mL PIBVMO-W93R 단백질 및 1mM NADPH가 용해된 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 3mL가 들어있는 유리로 된 바이알(vial)에 폴리케톤 필름 3장을 넣었다. 바이알(vial)을 30℃ 150rpm으로 3주 동안 배양하고, 반응 용액을 하루에 두 번 교환하였다. 3주 후, 필름을 꺼내어 남아있는 단백질을 2% SDS 용액과 20%(v/v) 에탄올 용액으로 세척하고 마지막으로 증류수로 세척하였다. 세척한 필름을 70℃ 오븐에서 건조시켰다.

[0131] 건조된 폴리케톤 필름을 Sigma-Aldrich에서 구매한 *Burkholderia cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei* 유래 lipase 3종이 각각 0.1 mg/mL 용해된 50 mM phosphate (pH 7.0) 완충용액 3 mL이 들어있는 새로운 바이알에 넣었다. 바이알은 40℃ 150rpm에서 1주일 동안 배양하였고, 반응 용액은 2일 마다 교체하였음. 이후 상기와 동일한 절차에 따라 필름을 세척 및 건조하였다.

[0133] 실시예 4-2: XSP분석을 통한 폴리케톤의 분해여부 확인

[0134] 본 실시예에서는 PIBVMO-W93R의 폴리케톤 필름에 대한 활성을 평가하기 위해서 폴리케톤 필름 X선 광전자 분광 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 분석 및 무게 감소를 측정하였다. 폴리케톤 필름 표면의 화학적 결합 상태 변화를 분석하기 위해서 한국고분자시험연구소(주)에서 X선 광전자 분광계 (Thermo Fisher Scientific, K-ALPHA)를 사용하여 어떠한 효소와도 처리하지 않은 폴리케톤 필름, 리파아제(lipase)만 처리한 폴리케톤 필름, 베이어-빌리거 모노옥시게나아제 변이체(PIBVMO-W93R)와 리파아제 둘 다 처리한 폴리케톤 필름을 XPS 분석하였다. X선은 12,000V, 6mA, 72W 조건으로 사용되었다. 폴리케톤 필름의 무게는 microbalance(Mettler Toledo, WXTS3DU)을 사용하여 측정되었다. 처리 전 폴리케톤 필름의 무게($W_{\text{non-treated film}}$)를 측정하고, PIBVMO-W93R과 리파아제(lipase)를 처리한 후 폴리케톤 필름무게($W_{\text{treated film}}$)를 측정하여 하기 수학적 식 1에 따라 필름무게 감소(Weight loss of polyketone film)를 계산하였다.

[0135] [수학적 식 1]

[0136]
$$\text{Weight loss of polyketone film (\%)} = 100 \times (W_{\text{non-treated film}} - W_{\text{treated film}}) / W_{\text{non-treated film}}$$

[0138] XPS 분석 결과를 보면 무처리 폴리케톤 필름 및 리파아제만 처리한 폴리케톤 필름의 C_{1s} spectra에서 285 eV에서 C-C 결합, 286.3 eV에서 C-O 결합, 287.7 eV에서 C=O 결합에 의한 피크가 검출되었다. PIBVMO-W93R과 리파아제를 처리한 폴리케톤 필름 표면에서는 O-C=O 결합에 의한 피크가 288.7 eV에서 추가로 검출되었으며, C-O 피크가 커진 것으로 나타난다. 이는 PIBVMO-W93R에 의해 생성된 에스터 결합이 리파아제에 의해 가수분해 되면서 카복실산과 알코올이 생성되며 나타난 피크로 보인다(도 5).

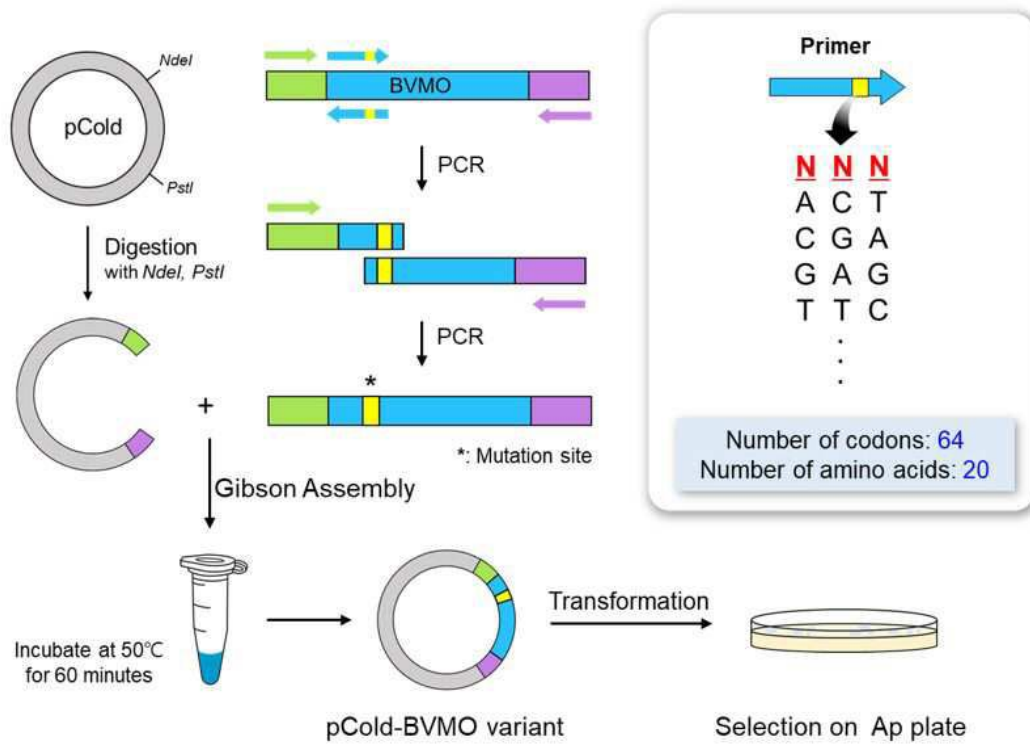
[0139] 실시예 4-3: 폴리케톤 필름의 무게 감소 측정을 통한 분해능 평가

[0140] BVMO는 카보닐기 옆에 산소를 삽입하는 반응을 촉매하는 효소이다. 삽입된 산소원자로 인해 증가된 폴리케톤 필름 무게를 측정하여 효소 활성을 평가하는데 어려움이 있다. 따라서 PIBVMO-W93R과 미리 반응시킨 폴리케톤 필름과 중합체(polymer)를 분해하는 것으로 보고된 리파아제 3종을 반응시키고, 무게 감소를 측정하여 간접적으로 PIBVMO-W93R의 활성을 평가하였다.

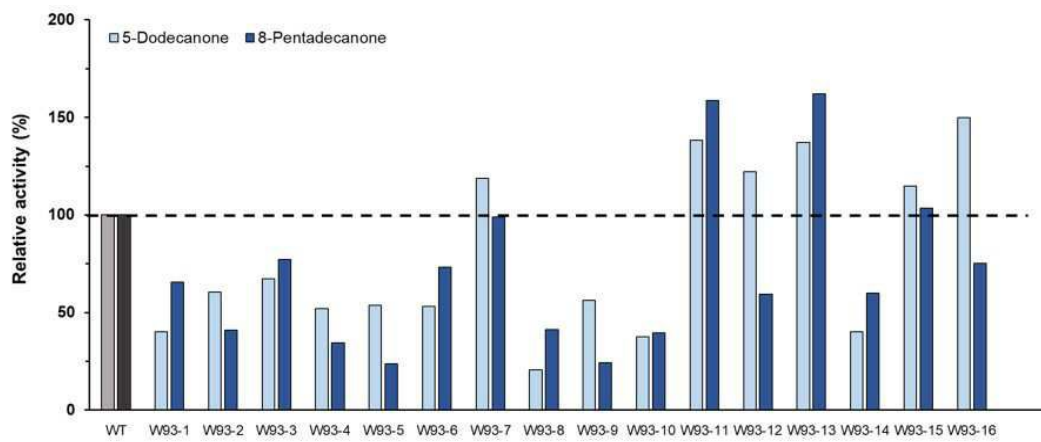
[0141] PIBVMO-W93R 및 리파아제를 처리 후 폴리케톤 필름의 무게가 약 1.7 % 감소되었다(도 6). 이 결과는 XPS 분석 데이터와 함께 PIBVMO-W93R이 폴리케톤 필름에 활성을 가진다는 사실을 뒷받침한다.

도면

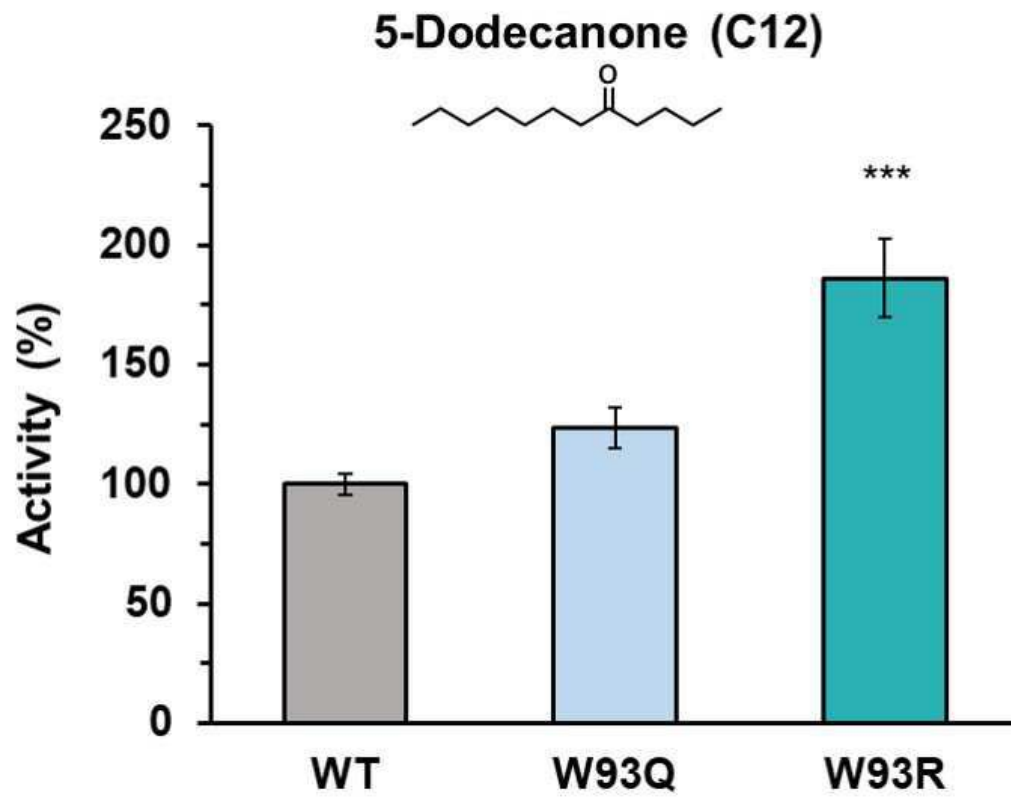
도면1



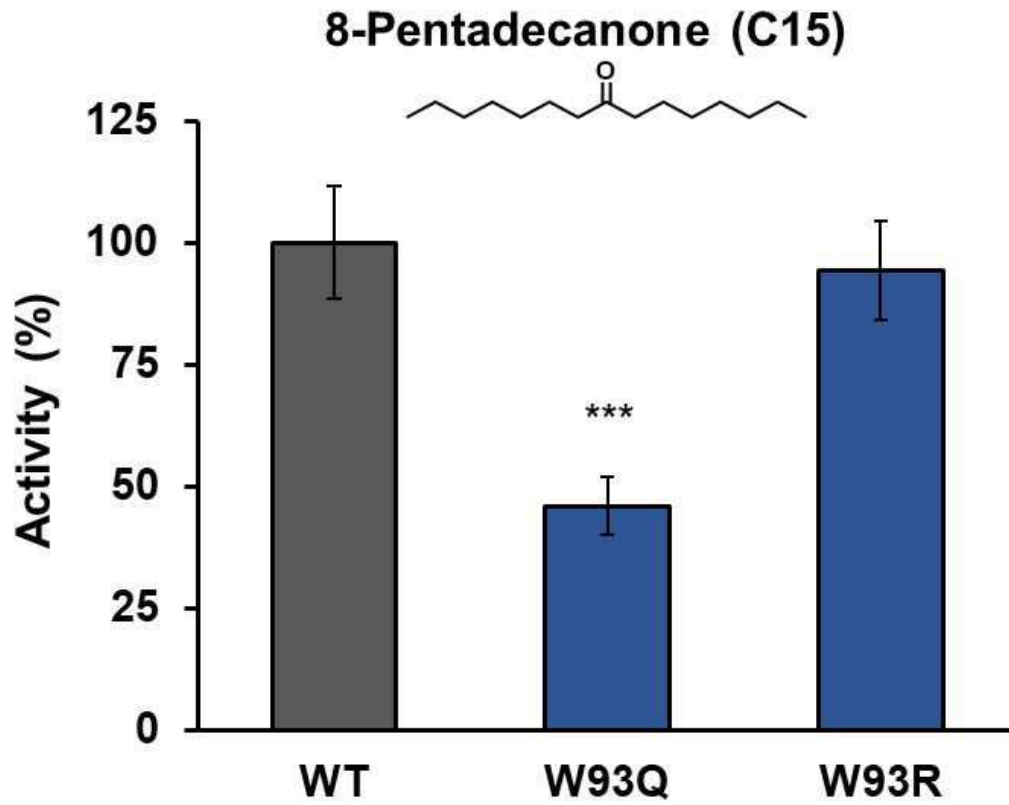
도면2



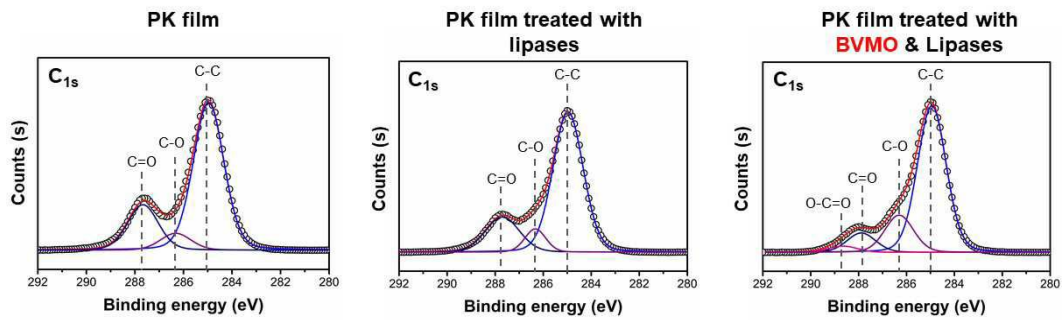
도면3



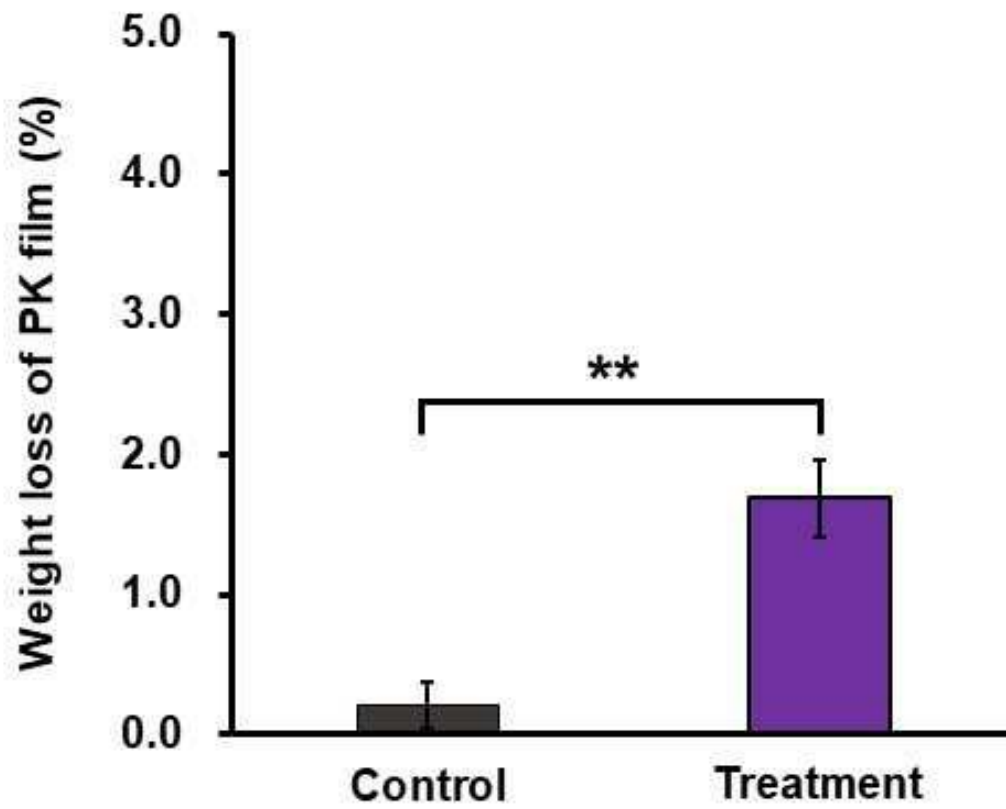
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.