



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0086935
(43) 공개일자 2017년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/02 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/02 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0006589
(22) 출원일자 2016년01월19일
심사청구일자 2016년01월19일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초4동, 삼풍아파트)
최인걸
서울특별시 동작구 남부순환로263길 34, 501호(사당동, 태영아트빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

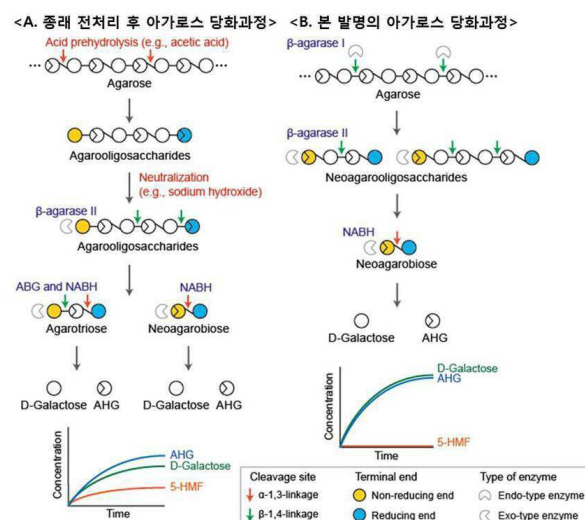
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 내열성 한천분해효소 및 이를 이용한 단당류의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 내열성 한천분해효소 및 이를 이용한 단당류의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 내열성 한천분해효소를 이용하여 화학적 전처리, 중화 과정, 아가로트리오스 가수분해 효소 처리 과정 없이 아가로스 또는 한천을 효율적으로 분해하여 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 고수율로 생산할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12Y 302/01081 (2013.01)

(72) 발명자

김정현

서울특별시 동작구 현충로 119, 제102동 1403호(후석동, 명수대현대아파트)

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10052721

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 미백·보습 기능의 바이오슈가 및 화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소;

엑소-타입의 한천분해효소(agarase); 및

알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

내열성 한천분해효소는 기질로 아가로스(agarose) 또는 한천(agar)을 사용하는, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

내열성 한천분해효소는 SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 취득되는, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

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

청구항 5

제1항에 있어서,

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

청구항 6

제1항의 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

반응은 아가로스 또는 한천의 전처리 없이 수행되는, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의

생산방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 내열성 한천분해효소 및 아가로스 또는 한천을 반응시킨 다음, 상기의 반응 산물과 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 반응시켜 생산되는, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

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

청구항 10

제8항에 있어서,

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 내열성 한천분해효소를 이용하여 화학적 전처리, 중화 과정, 아가로트리오스 가수분해 효소 처리 과정 없이 아가로스 또는 한천을 효율적으로 분해하여 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 구성된 환원당 생산 수율을 개선하는 내열성 한천분해효소 및 이를 이용한 단당류의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 홍조류를 구성하는 주요 다당체는 아가로스로, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스가 알파 1,3 결합과 베타 1,4 결합에 의해 교차적으로 연결되어 있는 중합체이다. 아가로는 상온에서 물에 대해 낮은 용해도를 갖고 있으며 고온에서는 물에 녹지만 식으면서 단단한 젤이 되는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성으로 인하여 효소적 당화만으로는 아가로를 분해하여 단당류를 얻는데 문제가 있다.

[0004] 이전 연구들에서는 아가로를 분해하기 위해서 약산인 아세트산(3%)을 사용하여 화학적 액화를 통해 전처리한 후 엑소-타입(exo-type) 베타-한천분해효소와 NABH(알파-네오아가로바이오스 가수분해효소)로 당화하여 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스를 생산하였다(HT Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* (2012) 107:301-306, HT Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* (2013) 136:582-587). 이로써 아가로스로부터 얻는 단당류의 수율을 높이는 데 성공하였다.

[0005] 또한 최근에는 약산 대신 중성 버퍼인 저농도의 Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 사용하여 한천 기질과 함께 고온에서 전처리한 후, 엑소-타입 베타-한천분해효소와 NABH 및 부산물로 남게 되는 삼탄당인 아가로트리오스를 분해하는 효소인 한천분해성 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase)(CH Lee *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* (2014) 80:5965-5973)를 사용하여 당화하여 단당류를 얻는 공정법을 개발하였다(CH Lee *et al.*,

Process Biochem. (2015) 50: 1629-1633). 이 공정은 값비싼 화학촉매인 아세트산을 사용하지 않는다는 이점과 중화과정을 최소화하여 염의 생성을 많이 줄일 수 있다는 장점이 있다.

- [0006] 그러나, 산이나 버퍼를 사용하는 전처리 방법은 염이 생성되거나 5-HMF(하이드록시 메틸 펄퍼럴)가 생산되는 문제점이 있다. 그뿐만 아니라 전처리가 고온에서(버퍼 전처리 시 170℃) 시행이 되므로 마이크로웨이브 장비를 사용해야 하는데 이는 대량생산 시 큰 제약이 될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) HT Kim et al., *Bioresour. Technol.* (2012) 107:301-306
(비특허문헌 0002) HT Kim et al., *Bioresour. Technol.* (2013) 136:582-587
(비특허문헌 0003) CH Lee et al., *Appl. Environ. Microbiol.* (2014) 80:5965-5973
(비특허문헌 0004) CH Lee et al., *Process Biochem.* (2015) 50: 1629-1633

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 물에 용해되어 있는 고온의 아가로스 또는 한천의 가수분해 반응에서 화학적 전처리 없이 내열성 한천분해효소를 포함하는 효소 각테일로 고수율의 환원당을 생산할 수 있는 신규한 내열성 한천분해효소 및 이를 포함하는 효소 각테일의 단당류 생산 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
[0012] SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소; 엑소-타입의 한천분해효소; 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물을 제공한다.
[0013] 본 발명은 또한 상기의 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 내열성 한천분해효소를 사용하여 기존의 화학적 전처리, 중화 과정, 아가로트리오스 분해효소 처리 없이 아가로스 또는 한천을 효과적으로 분해하여 공정이 단순하고, 부산물 없이 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 1%의 아가로스를 냉각하면서 확인한 아가로스의 졸-겔 상전이 분석 결과이다.
도 2는 Aga16B를 과발현시켜 정제한 SDS-PAGE 결과로, 라인 M은 단백질 래더, 라인 1은 조단백질, 라인 2는 히스트랩 컬럼을 순환하고 나온 샘플, 라인 3은 EQ 버퍼로 컬럼을 흘려준 샘플, 라인 4, 5, 6은 정제된 Aga16B를 나타낸다.

도 3은 Aga16B의 최적 pH(A)와 온도(B)를 측정한 결과이다.

도 4는 Aga16B의 온도별 안정성을 실험한 결과이다.

도 5는 Aga16B의 단백질 로딩량을 측정한 결과이다.

도 6은 Aga16B 반응 산물의 TLC 및 HPLC 분석 결과이다.

도 7은 Aga16B에 의한 아가로스의 액화 정도를 본 결과이다.

도 8은 아가로스의 Aga16B, Aga50D, NABH에 의한 효소적 당화 결과를 TLC(A) 및 HPLC(B)로 보여준 것으로, TLC 분석에서 Processing step 1번은 5% 아가로스 기질, Processing step 2번은 아가로스와 Aga16B 반응 후 반응산물, Processing step 3번은 Aga16B 반응산물에 대한 Aga15D의 반응산물, Processing step 4번은 Aga15D 반응산물에 대한 NABH의 반응산물이다.

도 9는 종래기술(A)와 본 발명에 따른 Aga16B, Aga50D 및 NABH에 의한 아가로스의 당화 과정(B)을 보여주는 도식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0019] 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 내열성 한천분해효소; 엑소-타입의 한천분해효소; 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기의 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산용 조성물과 기질로 아가로스 또는 한천을 반응시키는 단계를 포함하는 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명자들은 기존에 알려진 아세트산을 이용한 전처리 방법과 Tris-HCl 버퍼(pH7.4)를 사용한 열수 전처리 방법에서 한 걸음 더 나아가 이 전처리 방법들이 수반하는 중화과정에서의 염 발생의 문제점과 고온의 처리과정 동안에 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 5-HMF로 과분해되어 당화수율이 낮아지는 문제점을 해결하고자 내열성 베타-한천분해효소인 Aga16B를 공정에 적용하여 화학적 전처리 과정을 생략하고 3가지 효소들(Aga16B, Aga50D, NABH) 아가로스 기질과 순차적으로 반응시켜 효소적 당화만을 통해 아가로를 분해하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스를 높은 수율로 생산하는 공정방법을 개발하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명에 따른 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 내열성 한천분해효소 및 아가로스 또는 한천을 반응시킨 다음, 상기의 반응 산물과 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 반응시켜 생산될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약산 또는 버퍼 전처리 공정 없이 내열성의 엔도-타입의 한천분해효소, 엑소-타입의 한천분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 아가로스 또는 한천으로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스를 생산하는 방법은 다음과 같은 이점이 있다(도 9 참조). 1) 값비싼 아세트산을 사용하지 않아 비용 절감의 효과가 있다. 그뿐만 아니라 최종 분해산물 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 화장품 기능성 소재로도 이용할 수 있는 물질이므로 불쾌한 냄새를 유발하는 아세트산을 사용하지 않는다는 점은 가장 큰 장점 중 하나이다. 2) 중화과정을 통해 생성되는 소듐 아세테이트와 같은 염이 생성되지 않는다. 3) 5-HMF와 같은 과분해 산물이 생성되지 않으므로, 단당류 생산 수율을 높일 수 있다. 4) 기존의 화학적 처리공정은 마이크로웨이브 같은 장비를 필요로 하나 효소공정은 낮은 온도에서 시행하기 때문에 고온조절장비를 필요로 하지 않으므로 스케일 업 함에 있어 이점이 있다. 5) 세 종류의 효소군을 사용하는 경우 분해산물로 아가로트리오스가 생성되지 않으므로 아가로트리오스 가수분해효소를 사용할 필요가 없다.
- [0024] 상기 내열성 한천분해효소는 엔도-타입(endo-type) 한천분해효소로, 실온에서 50℃까지 열 안정성을 유지하고, 실온에서 60℃까지 아가로스 또는 한천 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 약 55℃에서 최적 활성을 나타낸다. 따라서, 아가로스 또는 한천이 액체 상태로 유지되는 온도 범위, 즉, 약 35℃ 이상에서 활성을 나타낼 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 상기 내열성 한천분해효소는 아가로스 또는 한천을 기질로 사용하며, 효소 반응 산물은 중합도(Degree of polymerization (DP)) 4 및 6인 네오아가로테트라오스 및 네오아가로헥사오스인 것으로 확인되었다.
- [0026] 상기 내열성 한천분해효소는 엑소-타입 한천분해효소인 엑소-타입의 한천분해효소와 알파-네오아가로바이오스

가수분해효소를 순차적으로 처리한 경우, 종래의 화학적 전처리를 통해 얻은 당화수율 대비 개선된 당화수율을 나타낼 수 있다. 일 구체예에 따르면, 기존 버퍼 전처리 대비 약 1.6배(72.5% of theoretical maximum) 증가된 당화수율을 얻었다.

[0027] 상기 내열성 한천분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로헥사오스로의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0029] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[0030] 상기 내열성 한천분해효소와 아가로스 또는 한천은 40℃ 내지 60℃의 온도 범위에서, 0 내지 300 rpm의 조건으로, pH 5 내지 9에서, 30분 내지 7일 동안 반응하여 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로헥사오스를 생산할 수 있다.

[0031] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 아가로올리고당을 이당체인 네오아가로바이오스와 아가르트리오스(D-갈락토오스-베타-1,4 결합-3,6-안하이드로-L-갈락토오스-알파-1,3 결합-D-갈락토오스)로 분해하는 효소로, 아가르스의 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β-1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(이하, 'Aga50D'라고도 함)이다.

[0032] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 SEQ ID NO:3에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로올리고당 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열 및 상기 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0033] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0034] 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T의 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[0035] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대 상기 엑소-타입의 한천분해효소는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액을 대체하여 이용할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2010-0040438호(2010.04.20)를 참조할 수 있다.

[0036] 상기 아가로올리고당과 엑소-타입의 한천분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.

[0037] 상기 네오아가로바이오스를 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해할 수 있는 알파-네오아가로바

이오스 가수분해효소('ScNABH'라고도 함)는 SEQ ID NO: 4에 기재된 아미노산 서열 뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 4에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

- [0038] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)²⁻⁴⁰에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0039] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2013-0085017호(2013.07.26)를 참조할 수 있다.
- [0040] 상기 네오아가로바이오스와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 30 분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [0041] 상기 네오아가로바이오스의 분해 산물에 대해 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 분리 정제할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [0043] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, *Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH)*, Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.
- [0044] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0045] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [0046] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [0047] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [0049] <실시예 1> 냉각에 의한 아가로스의 졸-겔 상전이 측정
- [0050] 고온에서 물에 녹인 용액 상태의 아가로스를 온도를 떨어뜨려 가며 겔 상태로 변하는 졸-겔 상전이가 일어나는 온도 구간을 관찰하기 위해 냉각 시 1%(w/v)의 아가로스를 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에 녹인 후, 80℃부터 10℃까지 냉각하면서 옵티컬 로테이션(specific optical rotation)을 사용하여 아가로스의 졸-겔 상전이를 측정하였다.
- [0051] 도 1에 나타난 바와 같이, 아가로스는 35℃보다 낮은 온도에서 겔화 되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0053] <실시예 2> Aga16B의 클로닝과 발현
- [0054] 해양미생물인 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 엔도-타입의 베타-한천분해효소인 aga16B 유전자(Sde_1175)를 pET21a 플라스미드에 클로닝하여 대장균에 도입한 후 과발현된 Aga16B효소를 정제하여 효소반응에 사용하였다.
- [0055] 이를 위해, 게놈 DNA는 상업적인 DNA 키트(바이오니아, 한국)를 사용하여 정제하였고, Aga16B는 PCR로 증폭시켰다. 이때 프라이머는 Aga16B-N, 5' -AAA GGATCC ATGGCAGATTGGGACGGAATT-3' (Tm: 59.4); Aga16B-C, 5' -AAA GCGGCCGC GTTGCTAAGCGTGAACCTATCTA-3' (Tm: 59.3)이다.
- [0056] PCR 산물은 Aga16B의 N-말단의 아미노산 19-20에 위치하는 시그널 시퀀스를 제거한 것이다. 제한 효소로는 *Bam*HI과 *Not*I을 사용하였으며 N-과 C-말단 끝부분의 5' 와 3' 부분에 위치한다. PCR 산물과 pET21a는 각각 *Bam*HI과 *Not*I으로 자르고 T4 DNA 라이게아제를 사용하여 이 둘을 붙였다. 그리고 BL21 *E.coli*로 형질전환 시켰다.
- [0057] 각 유전자로부터 재조합된 단백질을 생산하기 위하여 50 µg/mL의 엠포실린이 포함된 배지에 형질전환된 대장균을 접종하고 37℃에서 키웠다. 지수기 중간(mid-exponential phase)까지 자라면 0.1 mM IPTG(이소프로필-베타-D-췌오갈락토파이라노사이드)를 넣고 16℃에서 16시간 동안 유도시켰다. 그 후 4℃에서 20분간 8,000 rpm에서 원심분리를 하여 세포를 모은 뒤, 라이시스 버퍼(20 mM 소듐 포스페이트와 500 mM 소듐 클로라이드, pH 7.4)에 다시 풀어주고 초음파기기를 사용하여 세포를 파쇄하였다. 4℃에서 1시간 동안 16,000 rpm에서 원심분리하였다. 히스트랩 컬럼(GE 헬스케어)을 사용하여 단백질을 정제하고 아미콘 울트라필트레이션 멤브레인 튜브를 사용하여 농축한 후 SDS-PAGE로 Aga16B 단백질을 확인하였다. Aga16B의 농도는 BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다.
- [0058] 도 2에 나타난 바와 같이, Aga16B에 해당하는 64.5 kDa 크기의 밴드를 확인하였다.
- [0060] <실시예 3> Aga16B 활성화도, 최적 pH 및 온도 측정
- [0061] 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0) 3 mL에 1% 아가로스를 121℃에서 10분간 오토클레이브로 녹여 기질을 만든 뒤, 0.0625 µmol의 Aga16B 단백질을 넣고 45℃, 200rpm에서 30분 동안 반응시켰다.
- [0062] 또한, Aga16B의 반응 최적 온도와 pH를 알아보았다. 최적 온도 실험은 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH7.0)에 1%(w/v) 아가로스를 넣고 121℃에서 10분간 녹여 기질을 만든 뒤, 70℃에서 30℃까지 냉각하면서 상기 실시예 2에서 과발현된 Aga16B를 정제하여 아가로스 g당 4 mg이 되도록 넣어주고 200 rpm에서 반응시켰다.
- [0063] 최적 pH 실험은 20 mM의 소듐 포스페이트 버퍼(pH5-7), 20 mM의 Tris-HCl 버퍼(pH 8-9), 20 mM의 붕산 버퍼(pH 10-11)을 사용하여 각 버퍼에 1%(w/v) 아가로스가 되도록 만들어 준 뒤, 오토클레이브에서 121℃에서 10분 동안 녹여 기질을 만들고 최적 온도 실험과 동일한 단백질량을 넣고 45℃, 200 rpm에서 30분 동안 반응시켰다.
- [0064] 세 실험 모두 단백질 반응 후 95℃에서 1분간 단백질을 불활성화 시킨 후 16,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 후, 상등액과 DNS(디나이트로살리실릭 에시드) 시약을 1:1 비율로 섞어 95℃에서 5분간 반응시킨 후 마이크로 플레이트 리더기로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 반응산물의 환원당을 측정하였다.
- [0065] 도 3에 나타난 바와 같이, Aga16B는 아가로스가 졸(액체)상태로 존재하는 40℃ 이상의 온도에서 활성을 지닌 것으로 나타났으며 60℃까지 효소의 활성이 높게 나타났다.
- [0066] 또한, 효소의 최적 온도는 55℃로 나타났으며, 40℃에서 60℃까지 넓은 범위에서 높은 효소활성을 유지하는 것

으로 나타났다. 최적 pH는 7.5였지만 온도와 마찬가지로 pH 6에서 pH 8까지의 넓은 범위에서 높은 활성을 나타내었다.

[0068] <실시예 4> Aga16B의 열안정성 실험

[0069] Aga16B의 열안정성을 실험하기 위하여, 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0), 1%(w/v) 아가로스 기질을 넣고 121℃에서 10분간 오토클레이브를 사용하여 녹여 기질을 만든 뒤, Aga16B 단백질을 40, 45, 50, 55, 60 그리고 65℃에서 미리 인큐베이션 시키고 아가로스 g당 4 mg이 되도록 Aga16B를 넣어준 후, 45℃, 200rpm에서 반응시키면서 0, 10, 20, 30, 60, 90 그리고 120분에서 샘플링을 하여 DNS 반응을 통해 반응산물의 환원당을 측정하였다.

[0070] 도 4에 나타난 바와 같이, 40℃, 45℃, 50℃에서 안정하였고, 55℃에서는 10분 뒤부터 안정성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] <실시예 5> Aga16B 단백질의 적정 로딩양 측정

[0073] Aga16B 단백질을 공정에 적용하기 위해서는 효소의 로딩량을 정해야 하기 때문에 적정 로딩량을 측정하는 실험을 실시하였다.

[0074] 실시예 4와 같은 조건으로 1% 아가로스 기질을 준비한 뒤 Aga16B의 양을 g 아가로스당 mg의 단백질로 계산하여 조건을 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 mg/g 아가로스 하에 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60분에 각각 샘플링하여 실시예 4와 같이 샘플링한 샘플을 처리하여 DNS 시약으로 기질 분해 정도를 분석하였다.

[0075] 도 5에 나타난 바와 같이, 6 mg/g의 아가로스부터 10분 안에 기질 분해가 끝나는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] <실시예 6> Aga16B의 효소 반응산물 산물분석

[0078] Aga16B의 효소 반응산물을 보기 위하여 TLC와 HPLC 분석을 실시하였다. TLC는 실리카 겔 플레이트에 1 μ l의 효소 반응산물을 로딩하고 n-부탄올, 에탄올과 물을 3:1:1의 부피 비율(v/v/v)로 섞은 이동상에 1시간 동안 전개시킨 뒤 10% 황산과 0.2%의 1,3-디하이드록시나프탈레인을 사용하여 발색시켰다. HPLC 분석은 반응시간 0, 2, 10, 30분에서 얻는 반응산물 샘플을 KS-802컬럼(쇼텍스)을 사용하여 컬럼온도 80℃의 조건 및 0.5 mL/min의 유속으로 샘플을 분석하였다.

[0079] 도 6에 나타난 바와 같이, TLC 결과 반응시간 2분 이후부터 반응산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었고, HPLC 분석을 통해 이것이 DP4와 DP6인 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose)와 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose)인 것을 확인할 수 있었다.

[0081] <실시예 7> Aga16B에 의해 분해된 아가로스의 액화 확인 실험

[0082] Aga16B의 반응산물의 액화 정도를 알아보기 위해 아가로스 기질, Aga16B 반응산물, 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에 대해 흡광도를 측정하였다.

[0083] 이를 위해, 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에 1%(w/v) 아가로스를 녹인 기질과 Aga16B 단백질을 이용하여 효소반응 일으킨 산물과 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)를 스펙트로포토미터를 이용하여 600 nm에서 측정하고 투명도를 통해 액화된 정도를 확인하였다. 이때 20 mM Tris-HCl 버퍼에 1% 아가로스를 녹인 기질은 121℃에서 10분 오토클레이브 한 뒤 실온에서 냉각시킨 것이고, Aga16B 단백질과 기질을 반응시킨 산물은 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에 1% 아가로스를 121℃에서 10분간 오토클레이브한 기질에 45℃에서 30분 간 단백질과 반응시킨 뒤 95℃ 이상의 끓는 물에서 단백질 불활성화를 시키고 16,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 얻은 상등액이다.

[0084] 도 7에 나타난 바와 같이, 1% 아가로스는 젤화되어 불투명하게 변해 600 nm에서 흡광도가 높게 나타났고, Aga16B 반응 산물은 20 mM Tris-HCl과 같은 수준의 흡광도가 나타났다. 이를 통해 Aga16B는 아가로스를 효소적으로 액화시킨 것으로 확인되었다.

- [0086] <실시예 8> Aga16B, Aga50D 및 NABH를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산
- [0087] Aga16B를 효소공정에 적용하여 단당을 생산하기 위하여 Aga16B, Aga50D 및 NABH 효소를 이용하여 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하였다.
- [0088] 이를 위해, 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH7.0)의 200 mL에 5%의 아가로스를 만들고 121℃에서 10분 간 오토클레이브에서 녹인 후 아가로스를 분해하기 위하여 Aga16B를 19.7mg을 넣어주고 55℃, 200rpm에서 12시간 동안 반응시켰으며 반응 산물로는 DP4와 DP6를 생산하였다.
- [0089] 이 반응산물들을 분해하기 위해 엑소-타입의 이당체 생산 효소인 Aga50D(20 mg)와 25℃, 200rpm에서 반응시켰으며 반응산물로 네오아가로바이오스를 생산하였다.
- [0090] 이 반응 후 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하기 위하여 SdNABH(10 mg)을 반응시켰다.
- [0091] Aga50D는 대한민국 공개특허 제2010-0040438호(2010.04.20), SdNABH는대한민국 공개특허 제2013-0085017호(2013.07.26)에 기재된 대로 제조하여 사용하였다.
- [0092] 각 반응산물의 패턴은 HPLC 분석을 통해 확인하였다(도 8).
- [0094] <실시예 9> GC/MS 분석을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석
- [0095] 실시예 8을 통해 생산한 SdNABH의 반응 산물을 GC/MS로 분석하여 정량하였다. 이를 위해, GC/MS 분석을 위한 유도체화 과정을 진행하였다. 반응 산물 20 μ l을 스피드 백으로 건조시킨 뒤, 10 μ l의 4%(w/v) 농도의 O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30℃에서 90분간 반응시키고 45 μ l의 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시켜 분석 샘플을 준비하였다. GC/MS 분석을 위한 기기 조건은 DB5-MS capillary column을 사용하여 컬럼 온도를 100℃에서 3.5분 동안 유지하고 160℃까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. 200℃까지 승온한 후 15분간 유지하고 마지막으로 280℃까지 승온한 후 5분간 유지하였다. 0.5 μ l의 샘플을 로딩한 후 5 split ratio로 분석하였다.
- [0096] 표 1에 나타난 바와 같이, GC/MS 정량결과를 토대로 단당수율을 측정한 결과 0.81g/g 아가로스의 수율을 얻었으며 이는 이론적으로 얻을 수 있는 최대 수율의 72.5%에 해당하는 수치이다.

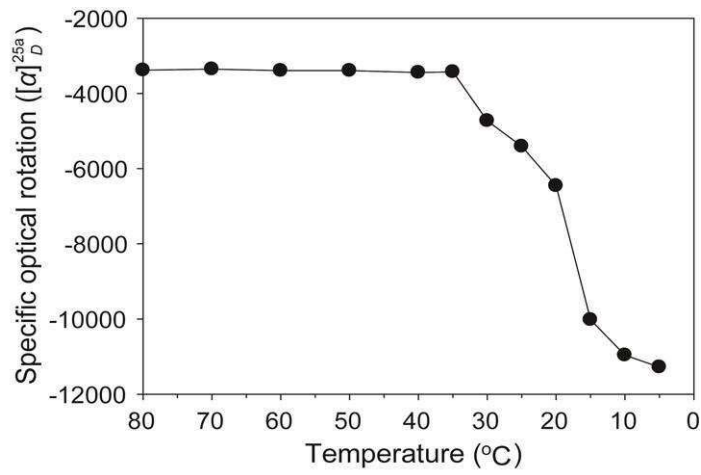
표 1

- [0097] 효소적 당화를 통해 생산한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생산 수율

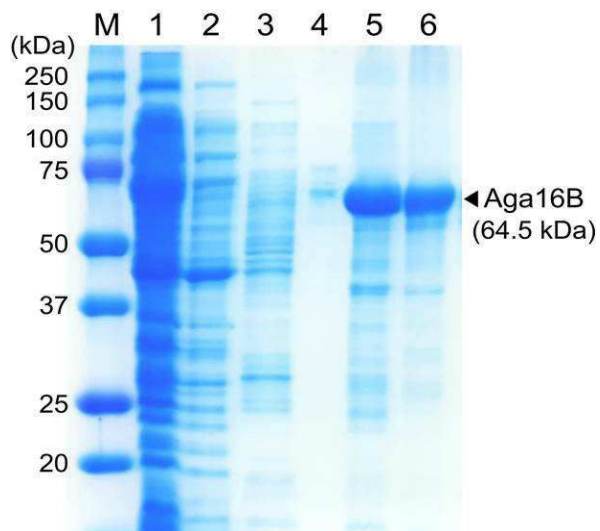
아가로스 당화 방법	아세트산 전처리 및 Aga50D, ABG 및 NABH를 이용한 효소당화법 (CH Lee et al., (2015) Process Biochem 50:1629-1633)	Tris-HCl 버퍼 전처리 및 Aga50D, ABG 및 NABH를 이용한 효소당화법 (CH Lee et al., (2015) Process Biochem 50:1629-1633)	Aga16B, Aga50D 및 NABH를 이용한 효소당화법
당화수율 (% of theoretical maximum)	50.5	44.9	72.5

도면

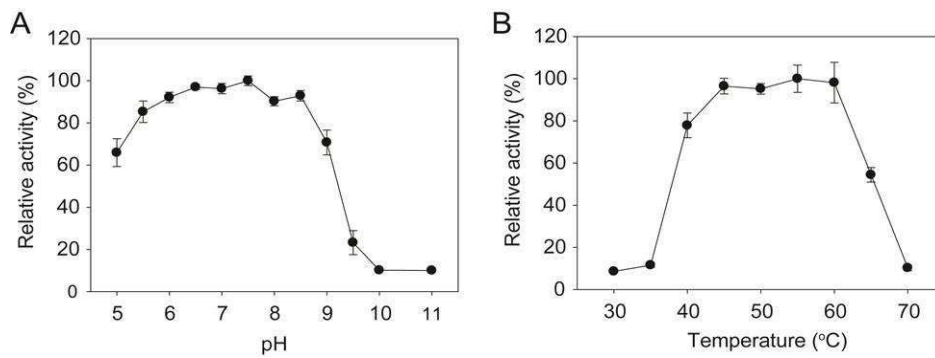
도면1



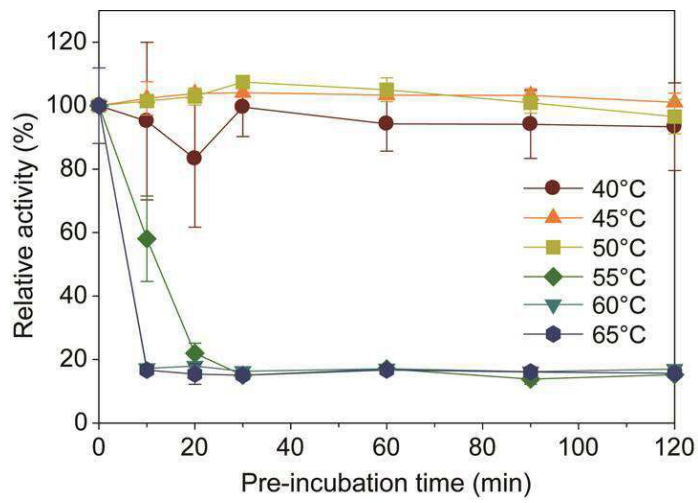
도면2



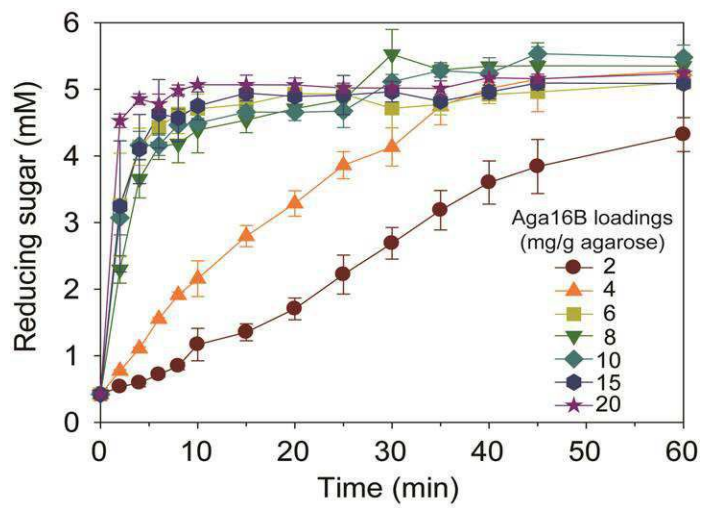
도면3



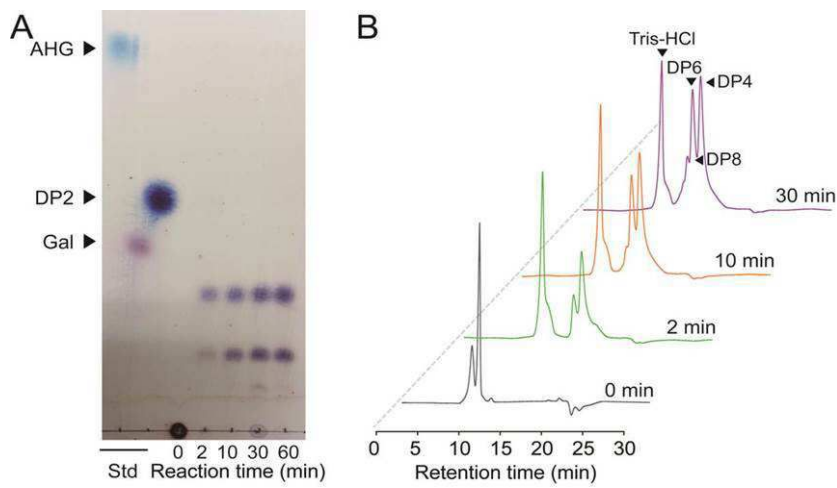
도면4



도면5



도면6

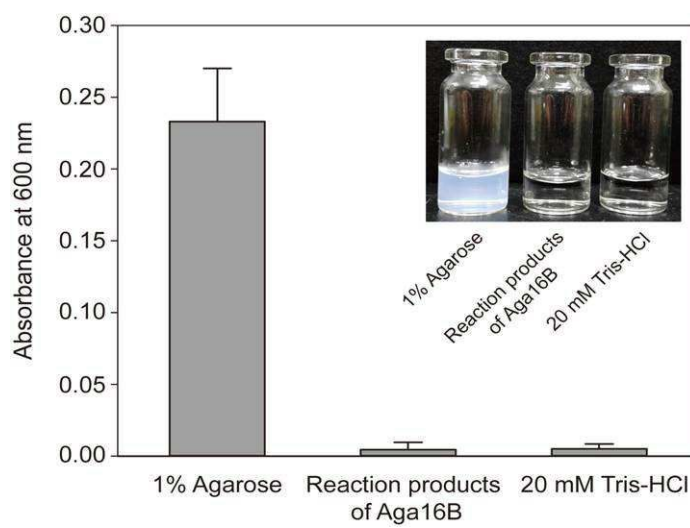


주요반응산물

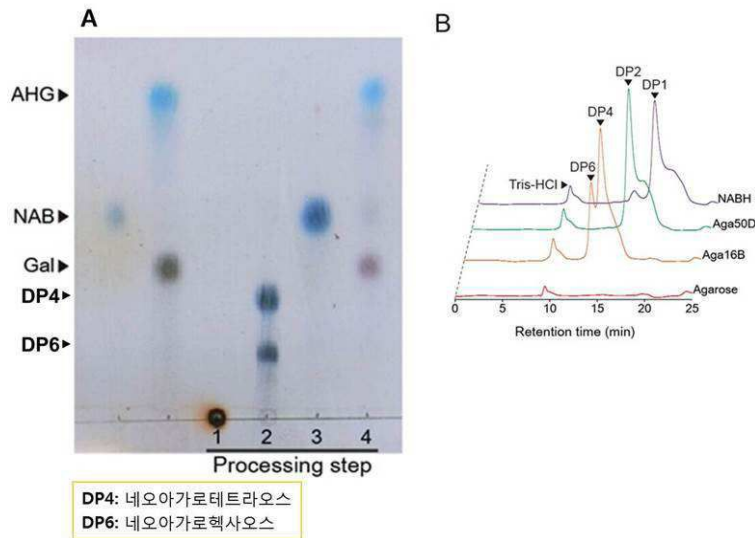
DP4: 네오아가로테트라오스

DP6: 네오아가로헥사오스

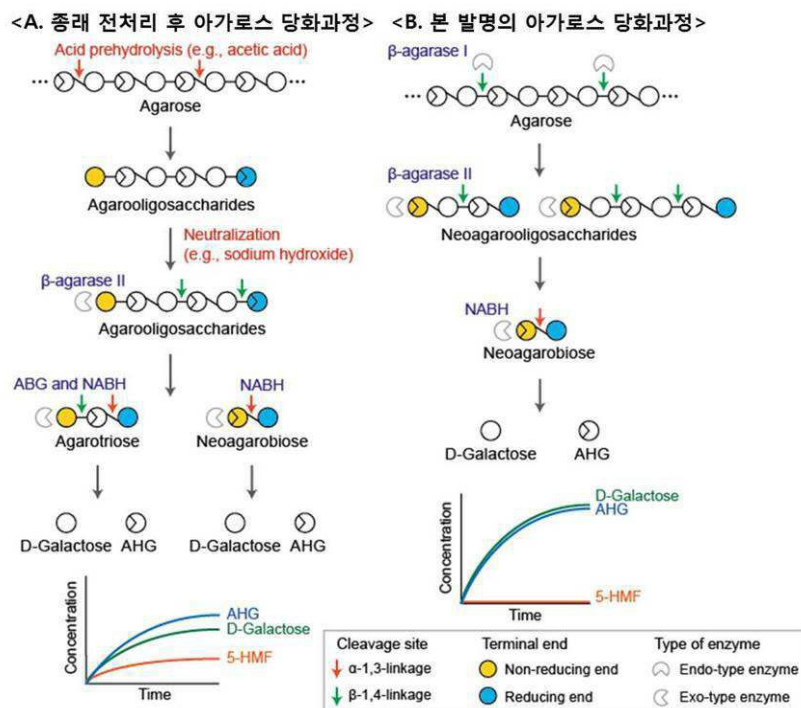
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Thermotolerant agarase and method for producing monomeric sugars using the agarase
- <130> P15U13C1620
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Saccharophagus degradans 2-40
 <400> 1

Met Lys Thr Thr Lys Cys Ala Leu Ala Ala Leu Phe Phe Ser Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp Gly Ile Pro Val Pro Ala Asp Pro Gly

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

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

165 170 175
 Gln Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro
 180 185 190
 Asn Pro Asp Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val
 195 200 205
 Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu Leu

210 215 220
 Val Arg Thr Val Ser Gly Pro Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr
 225 230 235 240

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

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

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

 450 455 460

Ile Ala Val Glu Ala Glu Asn Phe Asn Ala Val Gly Gly Thr Phe Ser
 465 470 475 480
 Asp Gly Gln Ala Gln Pro Val Ser Val Tyr Thr Val Asn Gly Asn Thr
 485 490 495
 Ala Ile Asn Tyr Val Asn Gln Gly Asp Tyr Ala Asp Tyr Thr Ile Ala
 500 505 510
 Val Ala Gln Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Ser Tyr Gln Ala Gly Ser Gly
 515 520 525

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

Lys Phe Thr Leu Ser Asn

595
 <210> 2
 <211> 1797
 <212> DNA
 <213> Saccharophagus degradans 2-40
 <400> 2
 atgaaaacca ccaaatgcgc cctagctgcg ctcttcttca gtacctctct tatggctgca 60
 gattgggacg gaattcctgt cccagcggac ccagggaatg gcaacacctg ggagctacag 120
 tccctttctg acgatttcaa ctatgcggcc ccagctaacg gcaaaagcac caccttctat 180
 agccgctgga gcgaaggctt tatcaatgct tggctcggcc cggggcaaac cgagttttac 240
 ggccccaatg cttcggtaga aggcgccac cttattatta aggccactcg caagccaggt 300
 actactcaaa ttactactgg agcaattcac tccaatgaaa gttttaccta cccattgtat 360
 ttggaagcgc gcacaaaaat taaaaacctc accctcgcca acgcattttg gctactaagc 420
 tcagattcca ccgaagagat tgatgtgctg gagtcttacg gcagcgaccg tgcaacagaa 480
 acgtggtttg acgaacgcct acacttaagc catcacgttt ttatccgcca gccatttcaa 540

gactaccaac cgaagatgc aggcagctgg tacccaacc ccgatggcgg cacttggcgc 600
gaccaat ttcgtatagg tggtttattgg atagacccat ggacactgga gtattacgtg 660
aatggcgaat tagtgcgcac tgtaagcggc ccagaaatga ttgaccgta cggttacacc 720

aacggcacag gcctaagtaa acccatgcaa gttattttcg atgcagagca tcagccttgg 780
cgcgacgaac aaggtactgc cccaccacc gacgcagagc tagccgactc gagtgcgaat 840
caattcttaa ttgactgggt gcgattctac aaaccctgg caagcaacaa tggcggcggc 900
gaccaggca atggcggcac cccaggtaat ggtggcagt gcgatactgt agtggtagaa 960
atggccaact tctctgccac aggtaaagaa ggctctgcag ttgcaggcga cactttcaca 1020
ggcttcaacc ccagcggcgc gaacaacatc aactacaaca ccttagggga ttgggcagac 1080
tacacggtga acttccccgc tgccggtaat tacaccgtaa acctaattgc agcctcgccg 1140

gttacatctg ggctgggtgc agatattttg gtagacagca gttacgcagg caccatacct 1200
gtagcagca ccggagcttg ggagatatac aacaccttta gcttcccag ctcgatttat 1260
atcgcaagcg caggcaatca tactattcgc gtacaaagct ccggcggtag cgcttggcag 1320
tggaacggcg acgaacttcg ctttacccea acggatgcgg atacaggcac caatccacc 1380
agtacagcca gcatagcggg tgaagccgaa aactttaacg cggcggcgg cacctttagc 1440
gatggtcaag ctcaacctgt tagcgtttac accgttaacg gcaacactgc cattaactac 1500
gtaaaccaag gcgattatgc cgactacacc attgctgttg cccaagcggg taactacacc 1560

attagctatc aagctggcag tggcgtaaca ggtggtagca tagagttttt ggtaacgaa 1620
aacggaagct gggccagtaa aaccgttacc gccgtaccaa accaaggttg ggataacttc 1680
caacccttaa acggaggcag cgtttacctt agcgcaggca cccaccaagt tcgtttacac 1740
ggcgtctgga gcaacaactg gcagtggaac ctagataagt tcacgcttag caactaa 1797

<210> 3

<211> 747

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 3

Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe

1 5 10 15

Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu

20 25 30

Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr

35 40 45
 Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe
 50 55 60
 Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser
 65 70 75 80
 Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr
 85 90 95
 Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys
 100 105 110
 Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp
 115 120 125
 Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser
 130 135 140
 Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp
 165 170 175
 Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln
 180 185 190
 Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala
 195 200 205
 Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala
 210 215 220
 Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser
 225 230 235 240
 Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr
 245 250 255
 Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp
 260 265 270
 Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu
 275 280 285
 Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val

290 295 300
 Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro
 325 330 335
 Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu
 340 345 350
 Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys
 355 360 365
 Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr

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

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

 515 520 525
 Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser
 530 535 540

Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val
545 550 555 560

Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala
565 570 575

Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro
580 585 590

Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met
595 600 605

Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn
610 615 620

Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu
625 630 635 640

Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp
645 650 655

His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp
660 665 670

Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro
675 680 685

Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr
690 695 700

Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val
705 710 715 720

Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn
725 730 735

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

<210> 4
<211> 368
<212> PRT
<213> Saccharophagus degradans 2-40
<400> 4

Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg

1 5 10 15
 Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
 20 25 30
 Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val
 35 40 45

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

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

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

Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys

260 265 270

Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr

275 280 285

Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile

290 295 300

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

305 310 315 320

Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp

325 330 335

Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln

340 345 350

Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val

355 360 365