

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 11월 22일 (22.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/157814 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/60 (2006.01) C40B 40/08 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005798
- (22) 국제출원일: 2011년 8월 9일 (09.08.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0046195 2011년 5월 17일 (17.05.2011) KR
10-2011-0046207 2011년 5월 17일 (17.05.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 광주광역시 북구 용봉동 300 전남대학교, 500-757 Gwangju (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김두운 (KIM, Du Woon) [KR/KR]; 광주광역시 북구 일곡동 동아아파트 105-103, 500-160 Gwangju (KR). 신태선 (SHIN, Tai-Sun) [KR/KR]; 전라남도 여수시 신월동 60 번지 금호아파트 12 동 902 호, 550-190 Jeollanam-do (KR). 성치남 (SEONG, Chi Nam) [KR/KR]; 전라남도 순천시 연

향동 현대 2 차 아파트 201-901, 540-140 Jeollanam-do (KR). 백근식 (BAIK, Keun Sik) [KR/KR]; 광주광역시 북구 신용동 첨단자이 1 차아파트 106-901, 500-250 Gwangju (KR). 심수정 (SIM, Su-Jung) [KR/KR]; 전라남도 여수시 둔덕동 라온유아파트 111 동 1003 호, 550-772 Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

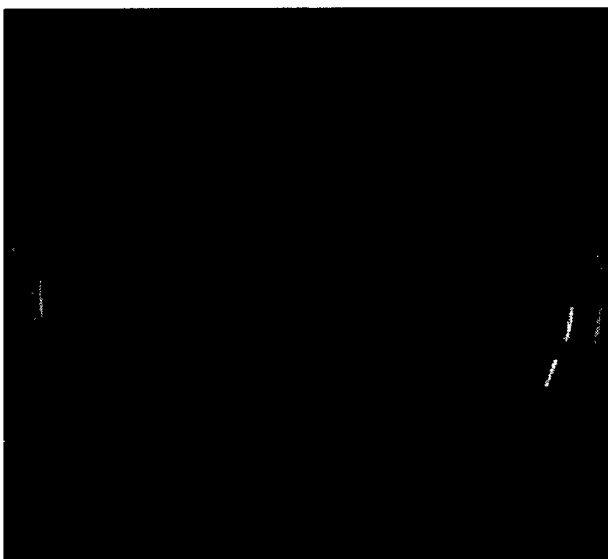
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METAGENOME LIBRARY HAVING ALGINATE LYASE ACTIVITY AND NOVEL ENZYME ALYDW

(54) 발명의 명칭 : 알지네이트 라이아제 활성을 가지는 메타지놈 라이브러리 및 신규 효소 A l y DW

Fig. 1



(57) Abstract: The present invention relates to a metagenome library having alginate lyase activity. The present invention provides a novel microorganism and a protein by analyzing an unknown metagenome which exist in a natural microorganism group. The present invention relates to alginate lyase and AlyDW having an amino acid sequence disclosed in the second sequence of the sequence listing. According to the present invention, provided is an enzyme for stably dissolving seaweeds by separating a microorganism having a superior ability in dissolving a polysaccharide in seaweeds. Also, the present invention provides a technique for reducing the amount of waste products derived during a seaweed processing process and enhancing resource utilization by using a technique in which a functional polysaccharide is mass-produced by means of bioengineering.

(57) 요약서: 본 발명은 알지네이트 라이아제 활성을 가지는 메타지놈 라이브러리에 관한 것이다. 본 발명은 자연의 미생물군에 존재하는 미지의 메타지놈을 분석하여 신규 미생물 및 단백질을 제공한다. 본 발명은 서열목록 제 2 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 알지네이트 라이아제(alginate lyase), AlyDW 에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 해조류의 다당체 분해능이 우수한 미생물을 분리하여 안정적으로 해조류를 분해할 수 있는 효소를 제공한다. 또한 본 발명은 기능성 다당류를 생물공학적으로 대량생산하는 기술을 활용하여 해조류 가공공정에서 파생되는 폐기물의 양을 감소시키고 자원의 활용도

를 높이는 기술을 제공한다.

WO 2012/157814 A1

MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

알지네이트 라이아제 활성을 가지는 메타지놈 라이브러리 및 신규
효소 AlyDW

5

【기술분야】

본 발명은 알지네이트 라이아제 활성을 갖는 메타지놈 라이브러리 및
신규 효소 AlyDW에 관한 것이다.

10 【배경기술】

해조류는 우리나라 연근해에 풍부하게 서식되고 있는 생물로서
잠재적인 자원이다. 대부분의 해조류는 단순가공을 거쳐 식용으로
활용되고 있으나 앞으로는 바이오에너지원으로서 또는 기능성 식품 및 의약
원료로서 활용이 기대되는 자원이다.

15 해조류의 구성 성분은 다당류가 대부분을 이루고 있으나 염분의
함량이 높으며 점액성의 다당체에 의해 표층이 둘러 쌓여있다. 따라서
해조류를 자원으로 활용하기 위해서는 다당체의 분해가 우선
수반되어야 한다. 섬유소와 한천 같은 다당체는 β -1,4-

20 글리코시드(glycoside)로서 여러 종류의 미생물에 의해 분해가 가능하다.
그러나 육상 식물체의 다당체를 기질로 이용하는 미생물과 해조류의
다당체를 기질로 이용하는 미생물은 서식환경이나 기질의 염분도 측면에서
서로 다르다. 예로써 매생이의 세포벽 분해능이 우수한 세균을 몇 차례
계대 배양할 경우 세포벽 분해능이 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있다.
이와 같은 문제를 해결하기 위해서는 해조류의 다당체 분해능이 우수한
25 다양한 미생물을 분리하고 이 미생물들이 안정적으로 해조류를 분해 할 수
있는 조건을 확립하는 것이 필요하다.

알긴산 같은 해조 다당체의 중합도를 낮추기 위하여 염산, 유기산에
의한 산가수분해법에 의하여 중합도를 낮추어 저분자화 알긴산을 제조하고
있다. 산에 의한 저분자화 알긴산 제조법은 공정상 과도한 산처리 때문에
30 내산성 장치와 폐기되는 강산을 중화시켜 배출해야 하기 때문에 다량의
알칼리가 소요됨으로써 공정비가 높다. 그러나 전복 유래 미생물 효소를

이용하여 강산과 강알칼리가 소요되지 않고 온화한 반응조건 하에서 저분자화 알긴산을 생산할 수 있는 반응 조건을 확립함으로써 기능성 다당류를 생물공학적으로 대량생산하는 기술을 활용하여 해조류 가공공정에서 파생되는 폐기물의 양을 감소시키고 자원의 활용도를 높이는 5 기술 확립이 필요하다.

자연 환경에 서식하고 있는 미생물들의 배양방법은 매우 복잡하고 까다롭다. 실제 환경 생태계로부터 분리 배양할 수 있는 미생물은 1% 미만으로 전통적인 배양기법으로는 배양이 불가능하다. 이러한 어려움을 극복하기 위해 미생물의 분리 및 배양 없이 세균군집의 다양성과 구조, 10 기능을 파악하기 위한 방법으로 분자 생물학적인 방법들이 응용되고 있다. 그 중 가장 많이 이용되는 부분이 핵산을 이용한 분자생물학적 방법인 16S rRNA 유전자의 염기 서열 결정을 통해 계통분류학적으로 분석함으로써 동정과 이를 응용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 16S rRNA 유전자는 15 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있으며, 이 유전자의 염기서열의 변화는 미생물간의 진화적 유연관계를 파악하는데 매우 유용하다. 그러나 분자생물학적 방법에 의해 생태계에 존재하는 미생물의 정보를 확인한다 하더라도 미생물을 분리하고 분리된 미생물의 특성을 파악하는 것은 유전자원의 확보 측면에서 매우 중요하다.

새로운 기능성 식품 및 발효성 바이오자원에 대한 수요로 신규 20 미생물의 효소에 대한 요구가 증가하고 있다. 해양 생물의 장관(intestinal tracts)에서 분리한 라이아제-생산 미생물은 아가라제(agarase), 라미나라제(laminarase), 셀룰라제(cellulase) 및 알지네이트 라이아제(alginate lyase)가 혼합된 해조류-분해 효소를 생산한다.¹⁸ 또한, 알지네이트 라이아제는 미생물의 갈조류를 β -체거 25 기작(elimination mechanism)에 따라 α -L-글루론산(guluronic acid)(G), β -D-만누론산(mannuronic acid)(M), alternating MG(GM) 및 heteropolymeric MG(GM)로 분해한다는 많은 보고가 있다.¹¹ 전복(abalone) 및 *Pseudoalteromonas* sp. IAM 14594(AF082561), *Sphingomonas* sp. A1(AB120939), *Klebsiella pneumonia* subsp. *aerogenes*(L19657), *Vibrio* sp. 30 QY101(AY221030) 및 *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9(AB003330)을 포함하는 많은 해양 박테리아의 내장으로부터 이러한 효소를 분리한다.^{2,4,13,15} 지금까지,

진뱅크(Genebank) 데이터베이스에 보고된 알지네이트 라이아제는 23 ORF 정도이다.²⁴ 이전의 연구에 따르면 많은 다른 미생물의 알지네이트 라이아제는 G 블록-특이 폴리구루로네이트(polyguluronate) 라이아제(EC 4.2.2.11) 및 M 블록-특이 폴리만누로네이트(polymannuronate) 라이아제(EC 4.2.2.3), 2 종류의 기질 특이성에 따라 분류할 수 있다.¹⁹ 최근, 고등식물의 뿌리 성장 촉진, *Bifidobacterium* sp. 성장 속도의 가속, 인간 단핵(mononuclear)세포의 세포독성 사이토카인 생산의 유도, IgE 의 억제, 항고혈압 효과와 같은 확실한 생물학적 활성을 갖는 효소에 의해 분해된 알지네이트를 발견하였다.⁵ 때문에, 알지네이트 라이아제 및 알지네이트 올리고사카라이드는 식품 및 의약품 산업의 연구자들에게 주목을 받고 있다.

16s rRNA 유전자의 클론 라이브러리를 이용한 독립적 배양 연구는 *Alpha-*, *Gamma-*, *Epsilonproteobacteria* 및 *mollicutes* 가 주요 미생물군인 전복 *Haliotis discus hannai* 의 내장 안의 전체 박테리아에 대한 다양성을 보여준다.²¹ 그러나, 상기 16s rRNA 유전자의 정보로는 미생물의 생물학적 기능을 알 수 있는 효과적인 정보를 제공하지 않는다.^{17,23} 대조적으로, 포스미드(fosmid) 클로닝 시스템을 이용한 메타지놈 라이브러리는 배양이 쉽지 않은 생물체의 신규 유전자를 확인할 수 있다.¹ 포스미드 벡터 및 다양한 환경의 샘플에서 직접 분리한 약 40 kb 의 삽입(insert) 사이즈를 이용한 상기 스크리닝 시스템은 키티나제(chitinase), 디하이드로제나제(dehydrogenase), 옥시도리덕타제(oxidoreductase), 아밀라제(amylase), 이스터라제(esterase), 엔도글루카나제(endoglucanase) 및 사이클로덱스트리나제(cyclodextrinase)와 같은 광범위한 유전자를 확인하는데 이용되어왔다.^{1,20} 발명자는 메타지놈 라이브러리를 이용하여 전복의 장내 미생물군에서 고효성의 알지네이트 라이아제 유전자를 규명하였다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 알지네이트 라이아제 활성을 가진 메타지놈 라이브러리 및 AlyDW 를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 전복 장내 유래의 미생물을 분리하여 알지네이트 라이아제 활성을 갖는 메타지놈 라이브러리 및 신규 효소를 규명하였고, 이러한 신규 효소가 갖는 최적 활성 조건을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 목적은 알지네이트 라이아제 활성을 갖는 메타지놈 라이브러리를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 신규한 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규한 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 알지네이트의 분해 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열의 1280-3652 번째 뉴클레오타이드 서열, 5025-6128 번째 뉴클레오타이드 서열, 6365-7492 번째 뉴클레오타이드 서열, 8687-9202 번째 뉴클레오타이드 서열, 9206-9823 번째 뉴클레오타이드 서열, 9823-11250 번째 뉴클레오타이드 서열, 11377-12189 번째 뉴클레오타이드 서열, 12290-13306 번째 뉴클레오타이드 서열, 13611-14642 번째 뉴클레오타이드 서열, 14646-15212 번째 뉴클레오타이드 서열, 15417-16388 번째 뉴클레오타이드 서열, 17370-19223 번째 뉴클레오타이드 서열, 19452-21017 번째 뉴클레오타이드 서열, 21253-22143 번째 뉴클레오타이드 서열, 22309-23121 번째 뉴클레오타이드

서열, 23333-24208 번째 뉴클레오타이드 서열, 24294-24989 번째 뉴클레오타이드 서열, 25446-26477 번째 뉴클레오타이드 서열, 26549-28063 번째 뉴클레오타이드 서열, 28362-29579 번째 뉴클레오타이드 서열, 30103-30930 번째 뉴클레오타이드 서열 및 31010-31696 번째 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 22 개의 ORF 을 포함하는 알지네이트 라이아제 활성을 갖는 메타지놈 라이브러리를 제공한다.

본 명세서에서 용어, "뉴클레오타이드"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

바람직하게는 상기 메타지놈 라이브러리는 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 보다 바람직하게는 상기 메타지놈 라이브러리는 전복의 내장의 미생물군(microflora)로부터 얻은 지놈 DNA 를 이용하여 구축된 것이다.

본 명세서에서 용어 "메타지놈(metagenome)" 은 자연계에 존재하는 총 미생물집합을 뜻하며, 토양, 해수, 갯벌, 하천, 대기 및 동물의 대장 등 다양한 자연 환경으로부터 채취한 미생물의 DNA 가 그 중에 따라 분리된 것이 아니라 서로 혼재돼 섞여 있는 형태가 메타지놈이다. 또한 미생물의 기능이나 다양성을 유전자 형태로 분석하는 기술을 말한다. 메타지놈은 자연계의 여러 환경에서 존재하는 총 미생물의 유전체인 메타지놈을 클로닝하여 숙주세포 등에서 유지, 발현시켜 메타지놈 라이브러리를 만들어 난배양 미생물의 계통을 분류하고, 유용한 효소와 이차 대사산물을 탐색하기 위한 연구이다.

본 발명의 메타지놈 라이브러리는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 바람직하게는, 코스미드(Bruce A. Voyles (2002) *The biology of viruses* 2nd ed. ISBN 0-07-237031-9) 및 포스미드(Barry G. Hall (July 2004). "Predicting the evolution of antibiotic resistance genes.". *Nature Reviews Microbiology* 2 (5). doi:10.1038/nrmicro888. PMID 15100696)를 이용하여 메타지놈 라이브러리를 구축한다.

본 발명의 메타지놈 라이브러리는, 유용한 효소(예컨대, 알지네이트 라이아제)와 이차 대사산물을 탐색하는 하기 위한 연구도구로서 유용성을 갖는다.

5 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 2 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 제공한다.

본 발명자들은 종래의 미생물을 이용한 알지네이트 분해 방법과 달리, 산에 의한 저분자화 알지네이트 제조법으로 강산을 중화시켜 배출해야 하는 높은 공정비를 해소하기 위해 해조류의 다당체 분해능이 우수한 미생물을 분리하여 안정적으로 해조류를 분해할 수 있는 조건을 확립하고자 노력하였다. 그 결과, 신규 알지네이트 라이아제 효소를 발굴하였고, 이에 따르면 보다 효율적이고 보다 안정적으로 알지네이트를 저분자화 할 수 있음을 확인하였다.

15 본 명세서에서 용어 “알지네이트 라이아제”는 G 블록-특이 폴리구루로네이트(polyguluronate) 및 M 블록-특이 폴리만뉴로네이트(polymannuronate)로 구성된 알지네이트를 분해하여 저분자화 하는 효소를 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알지네이트 라이아제는 미생물로부터 유래된 것이다. 가장 바람직하게는 상기 알지네이트 라이아제는 전복의 장내 미생물로부터 유래된 것이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알지네이트 라이아제를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

25 가장 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 서열목록 제 1 서열의 15417-16388 번째 뉴클레오타이드 서열로 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*,

John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

5 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

10 또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 알지네이트 라이아제 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 알지네이트 라이아제의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 알지네이트 라이아제와 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.

15 본 발명의 알지네이트 라이아제에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 알지네이트 라이아제와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 20 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

25 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소류이신(+4.5); 발린(+4.2); 류이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(- 30 0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2);

글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다.

5 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

10 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제 4,554,101 호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스팔테이트(+3.0 \pm 1); 글루타메이트(+3.0 \pm 1);
 15 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 \pm 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2
 20 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은
 25 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 알지네이트 라이아제 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된
 30 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의

서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 예컨대 최소 99%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한
 5 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl.*
 10 *BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx 와 같은 서열
 15 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT 는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html 에서 확인할 수 있다.

20 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 알지네이트 라이아제를 코딩하는 상술한 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory
 25 Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.

30 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac*

프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^λ 프로모터, p_{R^λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* 가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4, λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 추린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-

580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 알지네이트 라이아제를 얻게 된다. 예를 들어, 5
상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG 를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 제 1 항의 알지네이트 라이아제(alginate lyase) 또는 상기 제 5 항의 형질전환된 10
세포를 알지네이트에 접촉시키는 단계를 포함하는 알지네이트의 분해 방법을 제공한다.

본 발명자들은 알지네이트 분해능을 갖는 효소 및 이러한 효소를 생산하는 미생물 균주를 발견하고자 하였으며 상기 효소 또는 균주를 이용하여 저분자화 알지네이트를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 15
알지네이트를 종래의 공지된 합성 방법과는 다르게 분해시킬 수 있는 알지네이트 라이아제를 발굴하였고, 이로부터 저분자화 알지네이트의 생성을 확인 하였다.

【발명의 효과】

20 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 자연의 미생물군에 존재하는 미지의 메타지놈을 분석하여 신규 미생물 및 단백질을 제공할 수 있다.

(b) 본 발명은 해조류의 다당체 분해능이 우수한 미생물을 분리하여 안정적으로 해조류를 분해할 수 있는 효소를 제공할 수 있다.

25 (c) 본 발명은 기능성 다당류를 생물공학적으로 대량생산하는 기술을 활용하여 해조류 가공공정에서 파생되는 폐기물의 양을 감소시키고 자원의 활용도를 높이는 기술을 제공할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

30 도 1 은 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride)법을 활용한 알지네이트 가수분해능 평가 결과이다. 도 1 은 활성을 확인한

플레이트 스크리닝을 보여준다. (A) *Flavobacterium* sp. 유래의 양성대조군; (B) *E. coli* 유래의 음성대조군 및 (C) 알지노라이틱 메타지놈 절편(AlyDW)를 나타낸다.

5 도 2 는 알지노라이틱 메타지놈 프래그먼트(AlyDW)의 도식도이다. 도면에 나타나는 명암의 차이는 추정 유전자의 기능적인 분류를 나타낸다. 대각선 줄무늬는 세포의 프로세스와 관련된 ORF 이며, 블랭크 화살표는 대사와 관련된 ORF 이고, 밝은 회색은 정보저장과 관련된 ORF 이다. 진한 회색은 상동성이 없는 불분명 유전자를 나타낸다.

10 도 3 은 메타지놈 프래그먼트(AlyDW)의 알지네이트 라이아제 활성에 대한 pH(A) 및 온도(B)의 영향을 확인한 환원당 분석 결과를 보여준다.

도 4 는 박막크로마토그래피를 활용한 메타지놈 프래그먼트(AlyDW)에 의한 알지네이트의 디폴리머리제이션 결과를 보여준다. 왼쪽 패널(a)는 40°C, 3 시간 인큐베이션 후의 폴리(β -D-mannuronate, lane 1) 및 폴리(α -L-guluronate, lane 2)의 가수분해 프로필을 보여준다. 오른쪽 패널(b)는 15 알지네이트 및 알지노라이틱 메타지놈 프래그먼트(AlyDW)의 인큐베이션 후에 얻은 HPLC 분석의 분해된 알지네이트 산물을 보여준다. *Flavobacterium* sp. 유래의 양성대조군(lane 4), 음성대조군(알지네이트 유일, lane 5), 음성대조군(효소 유일, lane 6). M 은 G1(글루코즈), G2(셀로바이오즈), G3(셀로트라이오즈), G4(셀로테트라오즈), 20 G5(셀로펜타오즈), G6(셀로헥사오즈), G7(셀로헵타오즈) 및 G8(셀로옥타오즈)의 표준 혼합물이다.

도 5-6 은 메타지놈 프래그먼트 유래의 추정 알지네이트 라이아제 및 메타지놈 프래그먼트(ORF-11)단백질의 얼라인 결과를 보여준다. 아미노산 서열은 ClustalX 프로그램을 이용하여 얼라인하였다. 비교한 생물은 25 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *aerogenes*, *Saccharophagus degradans* 2-40, *Microbulbifer* sp. 6532A, *Vibrio harveyi* aDA3, *Cellulophaga lytica* DSM 7489, *Vibrio* sp. A9m, *Vibrio alginolyticus* 40B, *Pseudoalteromonas* sp. CY2, *Vibrio splendidus* 12B01, *Polaribacter* sp. MED152 및 *Agarivorans* sp. JAM-A1m 이며 상기 생물의 진뱅크 가입 넘버는 각각 Q59478, ABD81738, 30 BAJ62034, ZP_0617515, YP_004263738, BAH79133, ZP_06182095, ACM89454, ZP_00990010, ZP_01052859 및 BAG70358 이다.

도 7 은 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride)법을 활용한 알지네이트 가수분해능 평가 결과이다. 도 7 은 활성을 확인한 플레이트 스크리닝을 보여준다. (A) *Flavobacterium* sp. 유래의 양성대조군; (B) *E. coli* 유래의 음성대조군; (C) 알지노라이트 메타지놈 절편(AlyDW) 및 (D) 재조합 알긴산 분해효소(AlyDW11)를 나타낸다.

도 8 은 재조합 알긴산 분해효소(AlyDW11)의 SDS-PAGE 분석 및 자이모그램(zymogram) 활성 염색의 결과를 나타낸다. (a) SDS-PAGE 후 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250 을 이용하여 염색하였다. M 은 분자량 마커이며, 1 열은 IPTG 를 이용하여 발현된 pMAL-c2X-AlyDW1 의 세포 추출물, 2 열은 아밀로오스 친화 컬럼을 이용한 세척 과정, 3 열은 최종 용출된 재조합 알긴산 분해효소(AlyDW11)이다. (b)는 자이모그램 활성 염색 결과로, 1 열은 재조합 알긴산 분해효소이며, 2 열은 *Flavobacterium* sp. 유래의 양성대조군이다.

도 9 는 재조합 알긴산 분해효소의 알지네이트 라이아제 활성에 대한 pH(A) 및 온도(B)의 영향을 확인한 환원당 분석 결과를 보여준다.

도 10 은 재조합 알긴산 분해효소의 알긴산 분해능을 박막 크로마토그래피를 통해 보여준 결과이다. (a) 재조합 알긴산 분해효소를 폴리(β -D-만누로네이트, 1 열) 또는 폴리(α -L-구루로네이트, 2 열)를 45°C에서 3 시간 반응시켰을 때 나타나는 가수분해 결과를 보여준다. 3 열 및 4 열은 양성대조군으로 *Flavobacterium* sp.를 폴리 β -D-만누로네이트 또는 폴리 α -L-구루로네이트, lane 4)와 반응한 것이며, 5 열 및 6 열은 음성대조군을 폴리 β -D-만누로네이트 또는 폴리 α -L-구루로네이트와 반응한 결과이다. (b)는 재조합 알긴산 분해효소를 알긴산과 45°C, 3 시간 반응 후 알긴산 분해정도 결과(1 열)를 나타낸다. 2 열은 양성대조군, *Flavobacterium* sp. 이며, 음성대조군으로 각각 알지네이트(3 열) 및 효소(4 열)을 사용하였다. M 은 G1(글루코오스), G2(셀로바이오스), G3(셀로트라이오스), G4 (셀로테트라오스), G5(셀로펜타오스), G6(셀로헥사오스), G7(셀로헵타오스), G8(셀로옥타오스)의 혼합물을 기준으로 하였다.

30

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 5 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

10 실험 재료 및 방법

메타지놈 라이브러리 컨스트럭션(Metagenomic library construction)

2009 년 2 월, 대한민국 여수 근해에서 전복(abalone) 샘플을 수득하였다. 직접 DNA 추출 및 정제하여 DNA 를 준비하였다.⁷ 메타지놈 라이브러리를 이전에 설명된 적절한 프로토콜을 사용하여 샘플로부터 15 컨스트럭트하였다.²⁸ 순수 정제된 DNA 는 적당량의 Sau3AI 제한효소로 부분절단하고 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 40-50 kb 부분의 DNA 만을 용출하였으며 CIAP(Calf intestinal alkaline phosphatase)로 DNA 를 탈인산화 하였다. 메타지놈 DNA 를 포스미드 벡터(pCC1FOS ready vector, Epicentre, 미국)를 BamHI 제한효소로 자른 후 Sau3AI 로 부분절단된 DNA 와 20 16℃에서 16 시간 라이게이션 반응시켰다. MAX 람다 패키징 추출 키트(Epicentre, USA)로 인 비트로 패키징을 수행하였으며 카나마이신(50 μg/ml)이 들어간 LB 고체 배지에 도말하여 재조합 된 콜로니만 이용하였다. 이어, 대장균(*Escherichia coli*) 형질감염시켜 메가지놈 라이브러리를 구축하였다.

25

라이브러리 스크리닝 및 샷건(shotgun) 서열 분석

활성 알지네이트 라이아제(alginate lyase)의 분해능을 평가하기 위해 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride, CPC) 분석을 수행하였다. 메타지놈 DNA 를 포스미드 벡터(pCC1FOS ready vector, 30 Epicentre, 미국)에 라이게이션하여 람다(lambda) 파아지에 패키징하고 *Escherichia coli* 에 감염시켰다. 그 결과로 얻은 감염 세포를 0.1%

알지네이트가 포함된 LB(Luria-Bertani) 아가(agar) 배지에서 하루 동안 배양하였다. 상기 세포에 10% CPC 용액을 첨가하고 37°C에서 1 시간동안 대기하여 형성된 클리어존을 관찰하였다(도 1). 양성 클론의 전체 서열을 알기 위해 정제한 포스미드 DNA 및 PHRED/PHRAP/CONSED 패키지로부터
 5 준비한 샷건 DNA 라이브러리를 샷건 시퀀싱 리드로 조합하기 위해 사용하였다. DNA 서열은 제조업자의 공지에 따라 ABI 9700 써모싸이클러(Applied Biosystems) 및 ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems, version 3.1)를 사용하여 결정하였다. 데이터베이스 검색 및 서열 비교를 위해
 10 국제생명공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트 프로그램을 사용하였다. 완전한 포스미드 삽입서열 insert 을 Artemis 프로그램을 사용하여 주석을 달고 BLASTP 및 PSIBLAST 프로그램을 사용하여 단백질 코딩 부분의 기능을 확인하였다. 예상 단백질은 이중상동성 그룹(orthologous groups, COR)의 클러스터
 15 범주에 따라 분류하였다.^{12,22-23} CLUSTAL_X 프로그램을 사용하여 얻은 포스미드 클론 ORF(open reading frames: ORF)의 완전한 뉴클레오타이드 서열을 NCBI 뉴클레오타이드 데이터베이스로부터 얻은 동종 유전자와 열라인하였다.⁶

20 효소 활성의 결정

효소의 엔도글루카나제(endoglucanase) 활성은 대량의 환원당을 처리하여 카보네이트의 글라이코시딕 본드의 효소적 가수분해로 증가된 색의 세기를 측정하는 소모기 넬슨(Nelson-Somogyi) 분석으로 결정하였다.³ 표준곡선은 분광광도계(메카시스, 한국)를 사용하여 525 nm 흡광도 측정을
 25 기준으로 31.5 µg/ml-100 µg/ml 농도 범위의 글루코즈를 준비하였다. 0.1 M 시트레이트-포스페이트(citrate-phosphate) 버퍼(pH 4.0-7.0), 10 mM 포스페이트 버퍼(pH 8.0) 및 50 mM 글라이신-수산화나트륨(glycine-NaOH) 버퍼(pH 9.0-10.0)을 사용하여 온도(15°C-50°C) 및 pH(4.0-10.0)에 서
 30 2 시간 동안의 최적 효소 활성을 측정하였다. 최적 조건(pH 8.0 및 40°C)의 메탈 이온 및 니코틴아마이드 아데닌

다이뉴클레오타이드(nicotinamide adinine dinucleotide, NAD⁺) 존재시에 효소활성의 억제 및 증대를 결정하였다.

알지네이트 라이아제(alginate lyase) 활성 측정

5 알지네이트 라이아제의 생산을 위해 16 시간 동안 40℃로 LB(Luria-Bertani) 배지에서 클론을 배양하였다. 배양 배지는 단백질 농축 키트(Rapid-Con™ 단백질 농축 키트, 엘피스, 서울, 한국)를 사용하여 농축하였다. AlyDW 를 Laemmli 에 의해 설명된 방법에 따라 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol)이 없는 샘플버퍼를 처리하고 10% 아크릴아마이드(acrylamide) 젤로 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)하여 분석하였다.³ SDS-PAGE 후에, 젤 안의 단백질을 25% 메탄올이 첨가된 재생버퍼(50 mM Tris-HCl 버퍼, pH 7.0, 10 mg/ml 카세인(casein), 2 mM EDTA, 0.01% NaN₃)에서 3 회, 30 분 동안 재생하였다. 폴리아크릴아마이드 젤을 100 mM 포스페이트 버퍼 1(pH 8)로 세척한 후 1 mg/ml 소듐 알지네이트(sodium alginate), 10 mg/ml NaCl 및 100 mM 포스페이트 버퍼 1(pH 8)로 구성된 1.5% 아가로스 젤에 덮어씌웠다. 상기 젤을 37℃에서 20 시간 동안 인큐베이션 한 후에 10% CPC 용액에 1 시간 동안 담가 둔 후에 증류수에 담귀 세척하였다.

20 *박층크로마토그래피를 이용한 반응산물의 분석*

셀로올리고사카라이드(cellooligosaccharides) 표준 혼합물(셀로바이오즈(cellobiose), 셀로트라이오즈(cellotriose), 셀로테트라오즈(cellotetraose), 셀로펜타오즈(cellopentaose), 셀로헥사오즈(cellohexaose), 셀로헵타오즈(celloheptaose) 및 셀로옥타오즈(cellooctaose))은 시그마-알드리치로부터 구매하였다. 테스트 클론이 갖는 알지네이트 라이아제 활성을 결정하기 위해, 0.1% 알지네이트를 37℃의 100 mM 포스페이트 버퍼 1(pH 8)에 든 AlyDW(2.19 mg/ml) 50 μl와 반응하였다. 젤 여과크로마토그래피(gel filtration chromatography: GFC)에 의한 알지네이트 올리고머의 분획에 아사히팩(Asahipak) GS-310 컬럼(21.5 mm ID×500 mm, 쇼와 덴코 30 코교(Showa Denko Kogyo Co.Ltd.), 도쿄, 일본)을 이용한 HPLC(시마주

시스템, LC-6AD 펌프, RID-10A 디텍터, SPD-M20A 디텍터: 시마주, 도쿄, 일본)를 수행하였다. 물을 5 ml/min 으로 흘려 샘플을 분리하였다. 분해된 알지네이트 용액의 aliquot(2 ml)을 주입하여 분석을 수행하였다. 반응 산물을 1-프로판올(propanol), 나이트로메탄(nitromethane) 및 물 혼합물(5:3:2, v/v/v)에서 2 시간동안 반응한 후에 실리카 겔 플레이트(silica gel plate, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, 독일)을 이용한 박막 크로마토그래피로부터 가수분해 산물을 분리하였다. 분리 이후에, 당(sugar)에 1 ml 유황산(sulfuric acid) 및 10 ml 저장(stock) 용액(1 g 다이페닐아민(diphenylamine), 1 ml 아닐린(aniline), 100 ml 아세톤(acetone))의 혼합물을 분무하여 가시화 하였다.²⁶

결과 및 토론 사항

메타지놈 프래그먼트의 스크리닝 및 ORF 분석

전복(abalon)의 장내 미생물 식물군(flora)으로부터 구성된 총 9 만 클론 중 선별된 3,840 클론으로부터 알지네이트 라이아제 활성을 발현하는 하나의 박테리아 메타지놈 프래그먼트(AlyDW)를 선별하였다(도 1). 쏫건(shot-gun) 시퀀싱 데이터의 분석은 양성 메타지놈 프래그먼트는 평균 G+C 함량 43.3% 및 22 개의 예상 ORF 의 길이 31.7 kb 를 갖는 유전자를 나타낸다. a 는 TMHMM 조사를 기초로 작성되었으며, b 는 COG 그룹에 해당되지 않음을 나타낸다(도 2 및 표 1).

【표 1】

ORF No.	Homologous to BLASTP	Organism/Phylum or Domain	블라스트 e-값	TMHs ^a 의 수	COG No.	COG 분류
1	(NiFe) hydrogenase maturation protein hypF	<i>Ferrimonas balearica</i> /Gammaproteobacteria	0.00E+00	0	0	COG0068
2	Hydrogenase accessory protein HypB	<i>Ferrimonas balearica</i> /Gammaproteobacteria	5.00E-105	0	OK	COG0378
3	Hydrogenase expression /formation protein HypD	<i>Ferrimonas balearica</i> /Gammaproteobacteria	2.00E-137	0	0	COG0409
4	Hypothetical protein	<i>Vibrio sp</i>	1.00E-47	1	-	NA ^b

		<i>/Gammaproteobacteria</i>				
5	Hypothetical protein	<i>Vibrio sp</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	3.00E-258	1	-	NA
6	Hypothetical protein	<i>Vibrio coralliilyticus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	1.00E-73	1	-	NA
7	Transcriptional regulator	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	2.00E-79	0	K	COG0583
8	Hypothetical protein	<i>Photobacterium sp.</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	2.00E-61	1	-	NA
9	Multidrug resistance efflux pump	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	2.00E-166	2	Q	COG1566
10	Hypothetical protein	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	3.00E-55	3	-	NA
11	Alginate lyase (= Poly β -Dmannuronate lyase)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp.aerogenes/Gammaproteobacteria</i>	6.00E-117	0	-	NA
12	Lyase, putative	<i>Vibrio splendidus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	0.00E+00	-	-	NA
13	Alginate lyase	<i>Vibrio sp.</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	0.00E+00	0	-	NA
14	Transcriptional regulator, LysR family	<i>Vibrio splendidus</i> <i>/Gammaproteobacter</i>	9.00E-122	0	K	COG0583
15	Probable oxidoreductase	<i>Vibrio sp.</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	1.00E-95	0	QR	COG1028
16	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase, putative	<i>Vibrio splendidus</i> <i>/Gammaproteobacter</i>	6.00E-138	0	C	COG1032
17	Flavodoxin reductase family 1 protein	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	4.00E-72	0	R	COG3217
18	Dihydroorotase	<i>Vibrio coralliilyticus</i> <i>/Gammaproteobacteria</i>	2.00E-171	0	F	COG0418

19	Glycerol kinase	<i>Vibrio cholera</i> / <i>Gammaproteobacteria</i>	0.00E+00	0	C	COG0554
20	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>Vibrio shilonii</i> / <i>Gammaproteobacteria</i>	0.00E+00	0	0	COG0448
21	ABC transporter, periplasmic substratebinding protein	Vibrionales bacterium / <i>Gammaproteobacteria</i>	2.00E-88	0	P	COG0226
22	NodN-related protein	<i>Vibrio orientalis</i> / <i>Gammaproteobacteria</i>	6.00E-80	0	I	COG32030

상기 ORF 중 17 ORF 는 NCBI 뉴클레오타이드 데이터베이스에 알려진
기능의 유전자와 중요한 유사성을 보여주며, 5 ORF 는 NCBI 박테리아의 게놈
데이터베이스에 가설 단백질에 상응한다. 6 개의 ORF 는 세포의 프로세싱
5 및 정보 저장과 관련이 있으며, 10 ORF 는 대사작용과 관련이 있다. 3
ORF(11, 12 및 13)은 *Klebsiella pneumonia* 아종. *aerogenes*, *Vibrio*
splendidus 및 *Vibrio* 종 *Gammaproteobacteria* 문의 알지네이트 라이아제
유전자의 단백질 서열과 유사성을 보여주었다.

10 *AlyDW* 의 특징

환원당 분석에서 알지노라이틱(alginolytic) 활성은 30-45°C
조건에서 80% 이상의 활성을 보여주었으며, 40°C에서 최고치를 보여주었다.
저온(15-25°C)에서도 40°C에서 보인 활성의 60±5% 의 활성이 유지되어
15 저온 활성 효소의 특징을 보여주었다(도 3). pH 8 에서 최대 알지노라이틱
활성을 보였으며, pH 4 내지 pH 9 에서 약 90% 잔여 활성을 확인하였다.
그러나, 활성은 pH 9 이상에서 급감하였다(도 3). 알지네이트 라이아제의
활성에 대한 금속이온 및 NAD⁺와 같은 보조인자의 영향을 표 2 에
요약하였다. 음성대조군의 값을 '1' 로 하여 상대값으로 나타내었으며,
3 번의 독립적인 실험으로 표준편차값을 도출하였다.

20 【표 2】

화학물질	폴드 활성
------	-------

	단일	조합(양이온+NAD ⁺)
None	1.00±0.05	-
NAD ⁺ (0.1mM)	0.94±0.01	-
EDTA (1 mM)	0.80±0.01	-
CaCl ₂ (1 mM)	0.94±0.02	1.51±0.20
MgCl ₂ (1 mM)	0.93±0.01	1.29±0.10
KCl (1 mM)	0.90±0.01	1.40±0.36
MgSO ₄ (1 mM)	0.90±0.15	1.68±0.05
FeSO ₄ (1 mM)	0.86±0.03	1.11±0.04
CoCl ₂ (1 mM)	1.13±0.02	1.36±0.24
MnCl ₂ (1 mM)	0.81±0.01	1.11±0.14
CuCl ₂ (1 mM)	0.98±0.01	1.17±0.10
NaCl (1 mM)	0.94±0.02	1.16±0.05
AgNO ₃ (1 mM)	1.61±0.02	2.08±0.36

상기 결과는 NAD⁺, Mg²⁺ 및 Ag⁺의 조합은 알지네이트 라이아제 활성에 금속 양이온 및 NAD⁺가 없는 대조군에 비하여 최소 1.6-2.0 배 촉진효과(stimulatory effect)를 미치는 것을 나타낸다. NAD⁺는 알지네이트 라이아제 활성의 증가를 야기하나 EDTA 는 알지네이트 라이아제 활성을 약 20% 억제한다. 이는 효소활성에 필수적인 양이온의 킬레이션 때문일 것이다. 절대 효소 활성은 최적조건에서 0.15 μmoles/min/mg 단백질이다. *Haliotis spp.*, *Littorin spp.* 및 *Turbo cornutus* 를 포함하는 해양 연체동물(mollusk)로부터 수득한 알지네이트 라이아제는 25-50°C 및 pH 4.0-9.6 에서 최적값을 갖는 엔도-폴리(M) 및 엑소-폴리(G) 라이아제이다. 효소 활성은 Ca²⁺ 또는 Mg²⁺같은 2 가 양이온이 있을 때 효소활성이 증가하였다.^{9,16,26-27} 이는 GH4 와 같은 글리코시드 가수 분해 효소군에서 α-1,4 또는 β-1,4-글루코시딕 연결의 가수분해를 위해 NAD⁺ 및 금속이온이 요구된다는 보고가 있다.²⁵

알지네이트 올리고머의 다른 프로파일은 알지네이트 라이아제(AlyDW)의 알지네이트 분해로 확인하였다. AlyDW 의 알지네이트 가수분해 최종산물을 3 시간 후에 박막크로마토그래피(thin-layer chromatography)로

분석하였다(도 4). 도 4 를 보면, AlyDW 은 엔도라이틱(endolytic) 활성을 갖으며, 폴리(α -L-guluronate)보다 폴리(β -D-mannuronate)를 우선 분해하였다. 해양 연체동물로부터 분리한 알지네이트 라이아제는 엔도-폴리(M) 라이아제를 가장 선호한다.²⁷

5 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography: HPLC)를 수행하여 20 개의 분획 중 3 개의 분획은 *Flavobacterium sp.* 유래의 상업적 효소와 다르게 180 kDa-342 kDa 으로 분해된 알지네이트 산물 및 1,153-1,315 Da 의 헥사머(hexamer)를 구성되어 이는 상업적 효소보다 작은 분자량의 산물을 만드는 것으로 AlyDW 가 유용한 효소임을 말한다.

10

알지노라이틱 ORF-11 의 특징

AlyDW 는 3 ORF(ORF11, 12 및 13)은 이론적으로 35, 67 및 57 kDa 의 분자질량을 갖는다. 아미콘(Amicon) 농축기로 메타지놈 박테리아 세포 부유액을 농축한 후에, 관련 없는 단백질 10% SDS-PAGE 시 멀티 밴드를 나타냈다. SDS-PAGE 후에, 젤 안의 단백질은 재생조건에서 SDS-PAGE 로
15 분석하고 활성염색 하였다.

ORF 11(AlyDW)의 추측 아미노산 서열과 Sde_2478(*Saccharophagus degradans* 2-40) 및 alyA(*Klebsiella pneumoniae* subsp. *aerogenes*)유전자와의 상동관계는 각각 63% 및 65% 였다. 반면
20 algMsp(*Microbulbifer sp.* 6532A), VME_15370(*Vibrio harveyi* 1DA3), Celly_3050(*Cellulophaga lytica* DSM 7489), alg(*Vibrio sp.* A9m), VMC_35250(*Vibrio alginolyticus* 40B), alyPI(*Pseudoalteromonas sp.* CY2), V12B01_24259(*Vibrio splendidus* 12B01), MED152_06195(*Polaribactor sp.* MED152) 및 AlgL(*Agarivorans sp.* JAM-A1) 유전자와는 54%-60%였다(도 5-6).
25 폴리사카라이드 라이아제(polysaccharide lyase: PL) 패밀리 7 알지네이트 라이아제는 기질 바인딩 및 촉매 부위로 작용하는 것으로 여겨지는 (R/E)(S/T/N)EL, Q(I/V)H 및 YFKAG(V/I)YNQ 의 3 종류 고보존적인 아미노산 서열을 갖는다.²⁴ AlyDW 메타지놈 프래그먼트의 ORF 11 는 *K. pneumoniae* 의 G 및 M 특이 라이아제(AlyA), 해양 박테리아 ATCC 433367 의 M-특이
30 라이아제(AlxM), 및 *Corynebacterium sp.*의 G-특이 라이아제(ALY-1)에서도 확인된 RSEL, QIH 및 YFKAGVYNQ 를 갖는다. 상기 아미노산 서열은

알지네이트 라이아제의 안정한 3 차원 구조 및 기능을 유지하는 필수적인 부분으로 판단된다.¹³⁻¹⁴

AlyDW11 의 제조 및 분석

5 전복 소화기관에 존재하는 미생물의 DNA 를 추출한 후, 추출된 전체 지놈 DNA 를 약 32kb 의 DNA 절편을 만든 후 삽입 DNA 의 엔드 리페어링을 하고 크기 선별을 한 후, CopyControl Cloning-Ready 벡터, pCC1FOS(포스미드 라이브러리 제조 키트, Epicentre)에 라이게이션 하고 대장균에 형질전환을 시킨 뒤, 항생제를 함유하고 있는 평판배지에

10 도달하고 배양하여 항생제 내성을 나타내는 형질전환주를 선별하여 포스미드 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리로부터 알지네이트를 분해활성을 지닌 클론을 스크리닝 한 후 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 엔도라이틱(endolytic) 알지네이트 라이아제 활성을 가진 클론을

15 확보하였다(도 7). 알지네이트 라이아제 유전자 ORF-11 을 *Bam*HI 및 *Hind*III 절단부위를 가진 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. pMAL-c2X 벡터(NEW ENGLAND BioLabs, 영국)에 라이게이션 하여 *E.coli* BL21(DE3)에 넣은 후, IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 이용하여 발현된 pMAL-c2X-AlyDW11 을 아밀로오스 친화 컬럼을 이용하여 재조합 단백질을

20 용출하였다. 10% SDS-PAGE 를 이용해 약 76 kDa 에서 과발현 된 AlyDW11 을 확인하였다(도 8). AlyDW11 을 환원당 분석법을 통하여 알긴산 분해 효소의 적정 pH 및 온도를 탐색한 결과 45℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 최적 pH 는 pH 7 에서 나타났고 pH 8 보다 큰 pH 값에서는 활성이 감소하였다(도 9). 금속 이온과 같은 보조인자는 NAD^+ , Mg^{2+} 또는 Ag^+ 의 조합이 각각 금속 양이온과 NAD^+ 없는 조건보다, 알지네이트 라이아제

25 활성에 대해 1.6 내지 2.1 배 높은 것을 확인하였다(표 3).

【표 3】

화학물질	폴드 활성	
	단일	조합(양이온+NAD ⁺)
None	1.00±0.05	-
NAD ⁺ (0.1 mM)	0.96±0.01	-

EDTA (1 mM)	0.75±0.25	-
CaCl ₂ (1 mM)	0.95±0.03	1.53±0.20
MgCl ₂ (1 mM)	0.91±0.03	1.27±0.12
KCl (1 mM)	0.92±0.01	1.43±0.13
MgSO ₄ (1 mM)	0.93±0.15	1.65±0.05
FeSO ₄ (1 mM)	0.90±0.14	1.20±0.04
CoCl ₂ (1 mM)	1.08±0.05	1.30±0.14
MnCl ₂ (1 mM)	0.85±0.01	1.14±0.16
CuCl ₂ (1 mM)	1.01±0.08	1.10±0.10
NaCl (1 mM)	0.96±0.06	1.20±0.05
AgNO ₃ (1 mM)	1.31±0.03	2.10±0.21

알지네이트 라이아제(AlyDW11)를 갖는 알지네이트 가수분해의 최종물을 3 시간 뒤에 박막 크로마토그래피(Thin-layer Chromatography: TLC)로 관찰하였다. AlyDW11 은 엔도라이트 활성을 가지고 폴리(α -L-구루로네이트)보다 폴리(β -D-만누로네이트)의 활성이 좋은 것으로 나타났으며 이는 대부분의 해양 연체생물에서 엔도-폴리 (M) 라이아제가 관찰된 점과 의미를 같이한다. 알긴산과 반응하여 얻은 산물 중 180 에서 342 Da, 540 에서 720 Da, 1,080 에서 1,260 Da 에 이르는 알지네이트 저분자 올리고당을 수득하였으며, 이는 상업효소보다 적은 분자량을 생산할 수 있는 효소임을 보여준다(도 10). AlyDW11 DNA 서열은 진뱅크(GeneBank) 접속 번호, JN392921 로 등록하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조 문헌

1. Ammiraju J, Yu Y, Luo M, Kudrna D, Kim H, Goicoechea JL, Katayose Y (2005) Random sheared fosmid library as a new genomic tool

to accelerate complete finishing of rice (*Oryza sativa* spp. Nipponbare) genome sequence: sequencing of gap-specific fosmid clones uncovers new euchromatic portions of the genome. *Theor Appl Genet* 111:1596-1607

- 5 2. Baron AJ, Wong TY, Hicks SJ, Gacesa P, Willcock D, McPherson MJ (1994) Alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *aerogenes*: gene cloning, sequence analysis and high-level production in *Escherichia coli*. *Gene* 143:61-66
3. Green F, Clausen CA, Highley TL (1989) Adaptation of the
10 Nelson-Somogyi reducing sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Anal Biochem* 182:197-199
4. Han F, Gong QH, Song K, Li JB, Yu WG (2004) Cloning, sequence analysis and expression of gene alyVI encoding alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *DNA Seq* 15:344-350
- 15 5. Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T (2005) Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett* 579:4423-4429
6. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ
20 (1998) Multiple sequence alignment with CLUSTAL_X. *Trends Biochem Sci* 23:403-405
7. Kim SJ, Lee CM, Kim MY, Yeo YS, Yoon SH, Kang HC, Koo BS
(2007) Screening and characterization of an enzyme with beta-glucosidase activity from environmental DNA. *J Microbiol Biotechnol*
25 17:905-912
8. Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
9. Larsen B, Hoen K, Ostgaard K (1993) Kinetics 254 and specificity of alginate lyases. *Hydrobiologia* 260:557-561

10. Leemhuis H, Euverink GW, Dijkhuizen L (2003) High-throughput screening for gene libraries expressing carbohydrate hydrolase activity. *Biotechnol Lett* 25:1643-1645
11. Li JW, Dong S, Song JS, Li CB, Chen XL, Xie BB, Zhang YZ
5 (2011) Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar Drugs* 9:109-123
12. Lopez-Garcia P, Brochier C, Moreira D, Rodriguez-Valera F
(2004) Comparative analysis of a genome fragment of an uncultivated mesopelagic crenarchaeote reveals multiple horizontal gene transfers.
10 *Environ Microbiol* 6:19-34.
13. Maki H, Mori A, Fujiyama K, Kinoshita S, Yoshida T (1993) Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9. *J Gen Microbiol* 139:987-993
14. Malissard M, Duez C, Guinand M, Vacheron MJ, Michel G (1993)
15 Sequence of a gene encoding a (poly ManA) alginate lyase active on *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *FEMS Microbiol Lett* 110:101-106
15. Miyake O, Ochiai A, Hashimoto W, Murata K (2004) Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and-7 in *Sphingomonas* sp.
20 strain A1. *J Bacteriol* 186:2891-2896
16. Nakada HI, Sweeny PC (1967) Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem* 242:845-851
17. Quaiser A, Ochsenreiter T, Klenk HP, Kletzin A, Treusch AH, Meurer G, Eck J, Sensen CW, Schleper C (2002) First insight into the
25 genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ Microbiol* 4:603-611
18. Seiderer LJ, Newell RC, Cook PA (1982) Quantitative significance of style enzymes from two marine mussels (*Choromytilus meridionalis* 278 Krauss and *Perna perna* Linnaeus) in relation to diet.
30 *Mar Biol Lett* 3:257-271

19. Shimokawa T, Yoshida S, Takeuchi T, Murata K, Kobayashi H (1997) Some properties and action mode of (1→4)- α -L-guluronan lyase lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. Carbohydr Res 304:125-132
20. Suenaga H, Ohnuki T, Miyazaki K (2007) Functional screening
5 of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. Environ Microbiol 9:2289-2297
21. Tanaka R, Ootsubo M, Sawabe T, Ezura Y, Tajima K (2004) Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture independent techniques.
10 Aquaculture 241:453-463
22. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res 28:33-36
23. Treusch AH, Kletzin A, Raddatz G, Ochsenreiter T, Quaiser A,
15 Meurer G, Schuster SC, Schleper C (2004) Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. Environ Microbiol 6:970-980
24. Uchimura K, Miyazaki M, Nogi Y, Kobayashi T, Horikoshi K (2010) Cloning and sequencing of alginate lyase genes from deep-sea
20 strains of *Vibrio* and *Agarivorans* and characterization of a new *Vibrio* enzyme. Mar Biotechnol 12:526-533
25. Varrot A, Yip VLY, Li Y, Rajan SS, Yang X, Anderson WF, Thompson J, Withers SG, Davies GJ (2005) NAD⁺ and metal ions dependent hydrolysis by family 4 glycosidase: Structural insight into specificity for phospho- α -D-glucosides. J Mol Biol 346:423-435
26. Voget S, Steele HL, Streit WR (2006) Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. J Biotechnol 126:26-36
27. Wong TY, Preston LA, Schiller NL (2000) Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function
30 analysis, biological roles and applications. Annu Rev Microbiol 54:289-340

28. Yun S, Lee J, Kim S (2005) Screening and isolation of a gene encoding 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from a metagenomics library of soil DNA. J Korean Soc Appl Bio Chem 48:345-351

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열목록 제 1 서열의 1280-3652 번째 뉴클레오타이드 서열, 5025-6128 번째 뉴클레오타이드 서열, 6365-7492 번째 뉴클레오타이드 서열, 5
8687-9202 번째 뉴클레오타이드 서열, 9206-9823 번째 뉴클레오타이드 서열, 9823-11250 번째 뉴클레오타이드 서열, 11377-12189 번째 뉴클레오타이드 서열, 12290-13306 번째 뉴클레오타이드 서열, 13611-14642 번째 뉴클레오타이드 서열, 14646-15212 번째 뉴클레오타이드 서열, 15417-16388 번째 뉴클레오타이드 서열, 17370-19223 번째 뉴클레오타이드 서열, 19452-10
21017 번째 뉴클레오타이드 서열, 21253-22143 번째 뉴클레오타이드 서열, 22309-23121 번째 뉴클레오타이드 서열, 23333-24208 번째 뉴클레오타이드 서열, 24294-24989 번째 뉴클레오타이드 서열, 25446-26477 번째 뉴클레오타이드 서열, 26549-28063 번째 뉴클레오타이드 서열, 28362-29579 번째 뉴클레오타이드 서열, 30103-30930 번째 뉴클레오타이드 서열 및 15
31010-31696 번째 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 22 개의 오픈리딩프레임을 포함하는 알지네이트 라이아제 활성을 갖는 메타지놈 라이브러리.

【청구항 2】

20 제 1 항에 있어서, 상기 메타지놈 라이브러리는 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 메타지놈 라이브러리.

【청구항 3】

25 제 1 항에 있어서, 상기 메타지놈 라이브러리는 전복의 내장의 미생물군(microflora)로부터 얻은 지놈 DNA 를 이용하여 구축된 것을 특징으로 하는 메타지놈 라이브러리.

【청구항 4】

30 서열목록 제 2 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 알지네이트 라이아제(alginate lyase).

【청구항 5】

서열목록 제 2 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 코딩하는 핵산 분자.

5 **【청구항 6】**

제 5 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 1 서열의 15417-16388 번째 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

10 **【청구항 7】**

상기 제 4 항 내지 제 6 항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 8】

상기 제 7 항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포.

15 **【청구항 9】**

상기 제 4 항의 알지네이트 라이아제(alginate lyase) 또는 상기 제 8 항의 형질전환된 세포를 알지네이트에 접촉시키는 단계를 포함하는 알지네이트의 분해 방법.

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

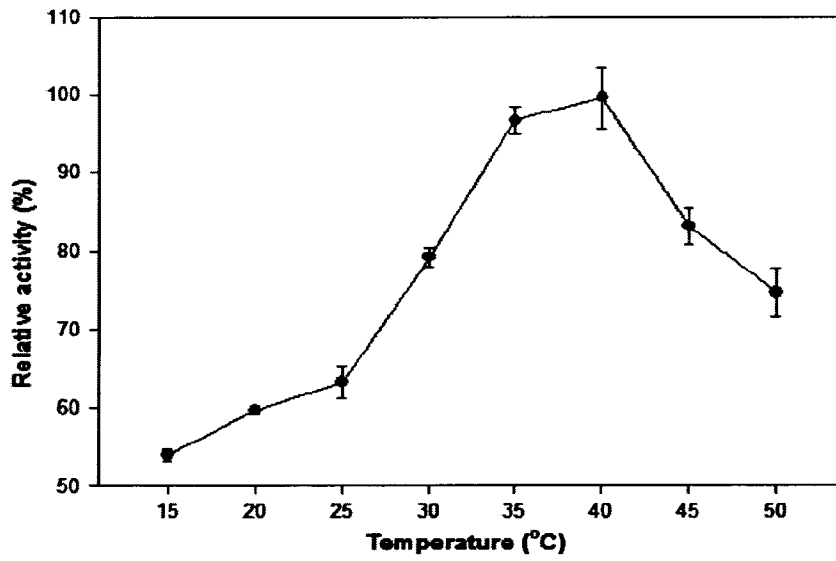
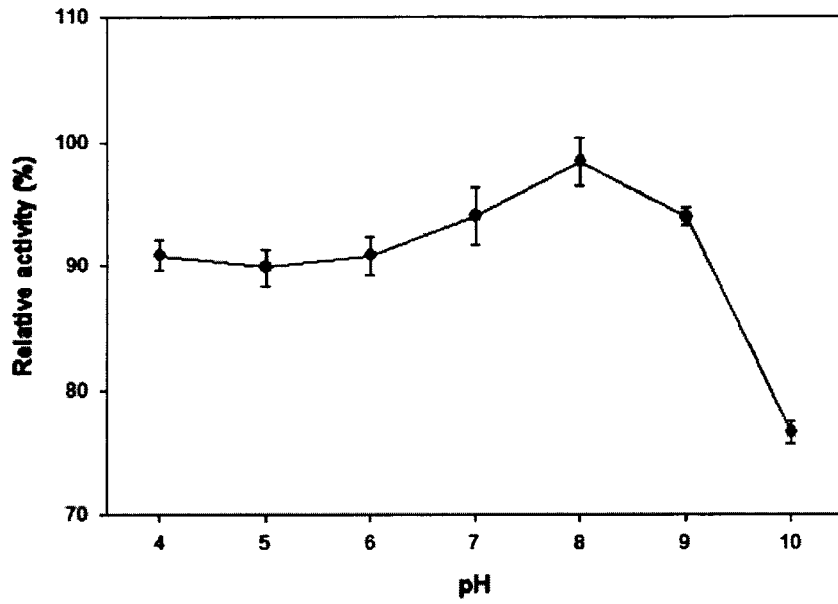


Fig. 4

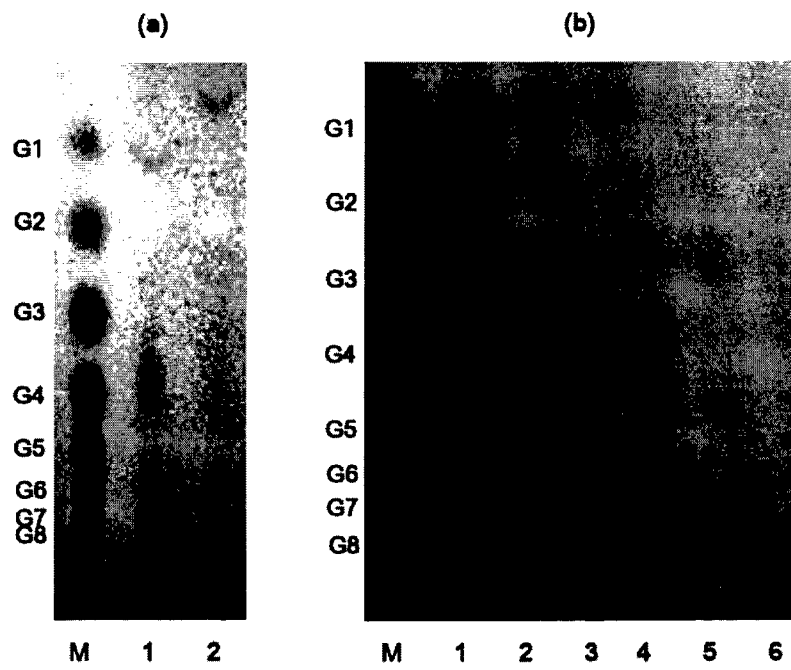


Fig. 5

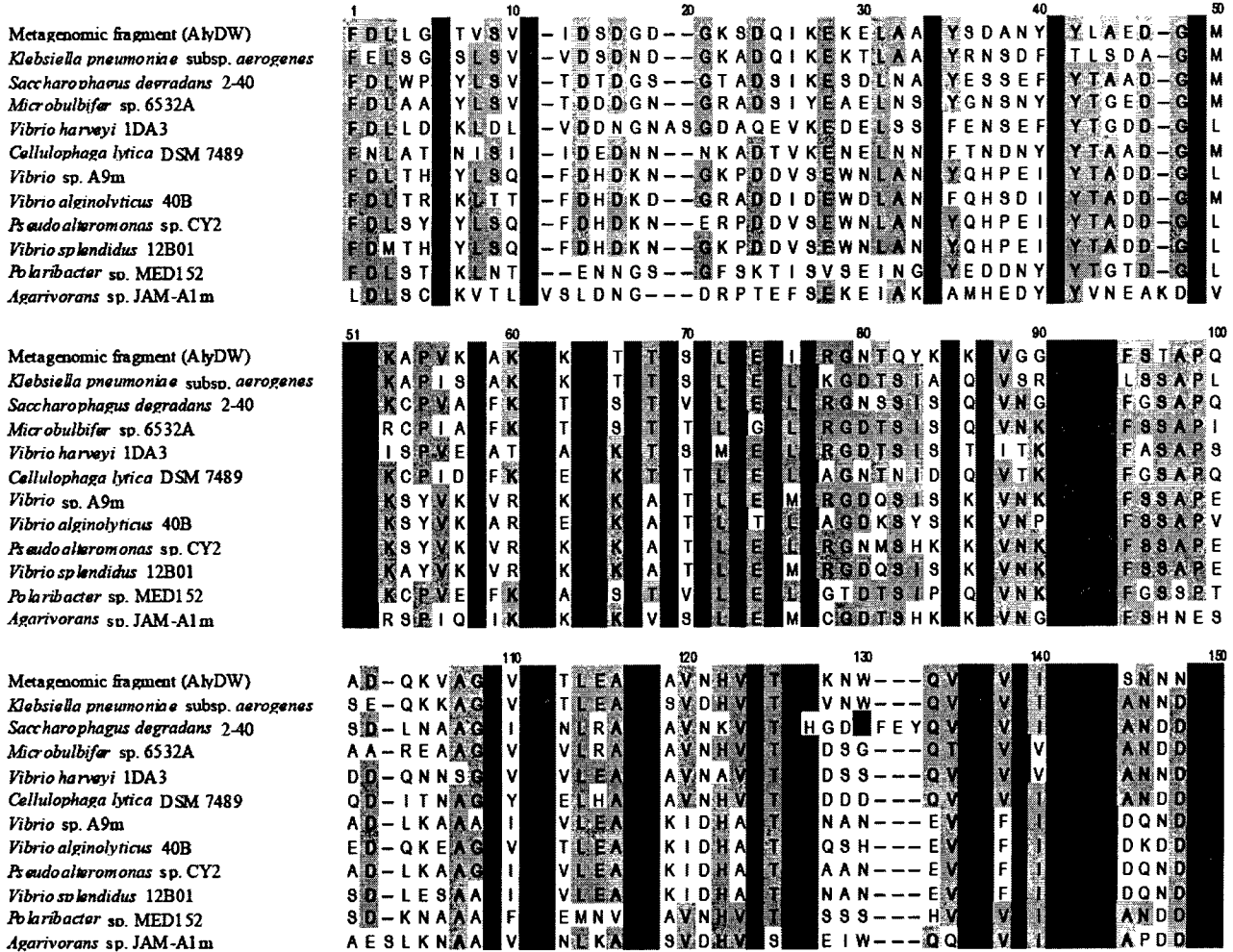


Fig. 6

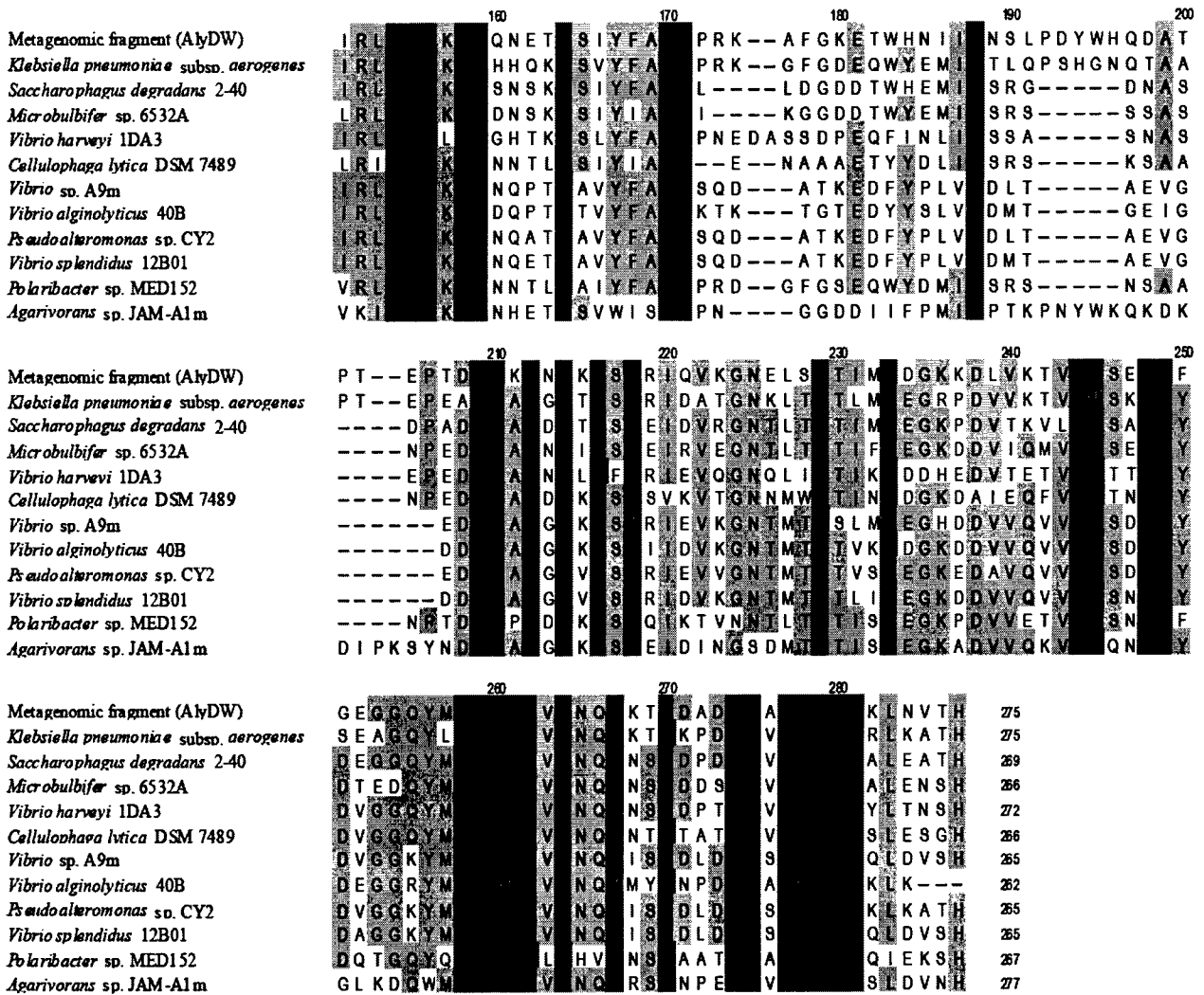


Fig. 7



Fig. 8

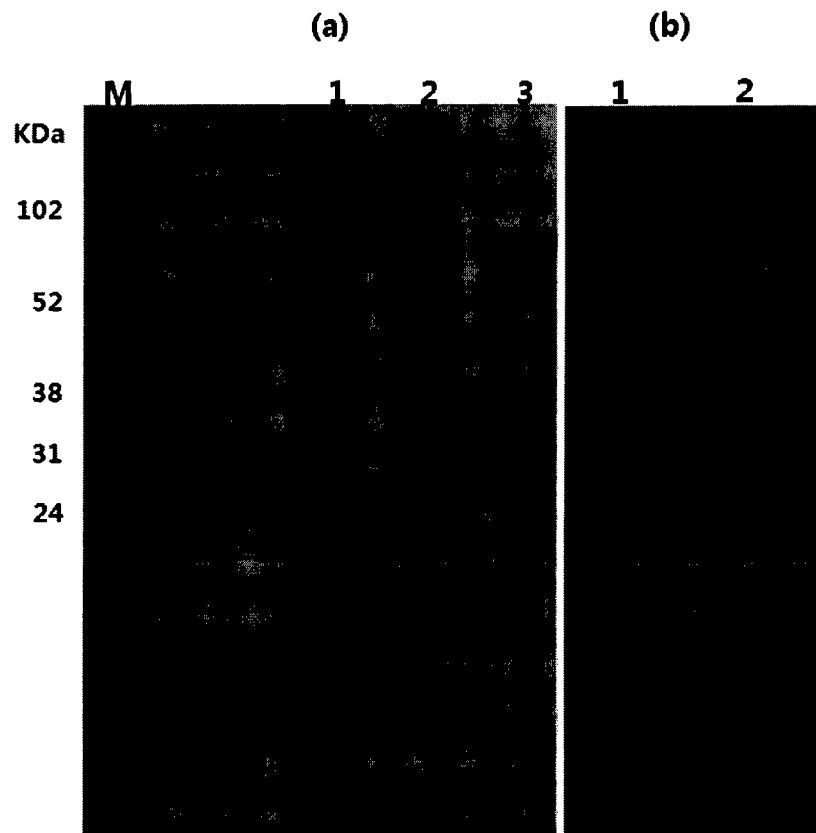
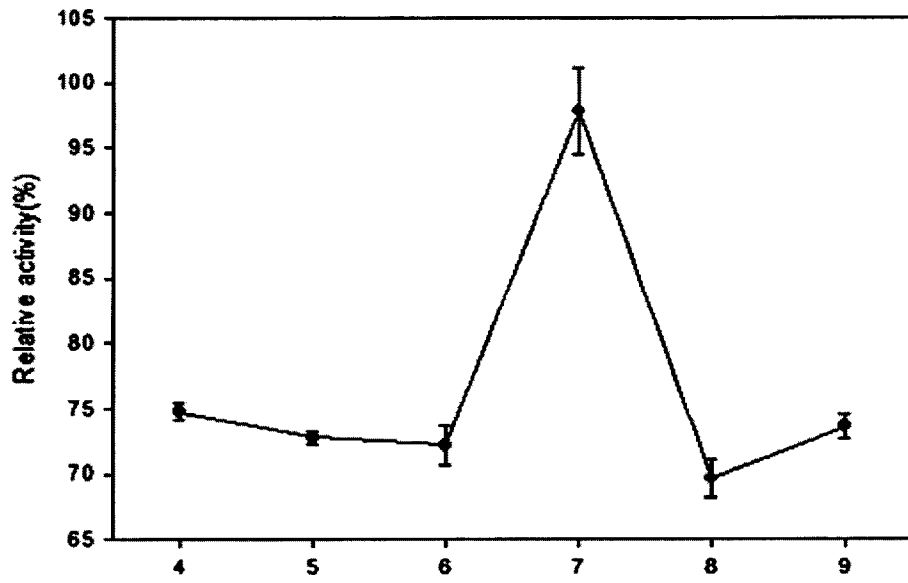


Fig. 9

(a)



(b)

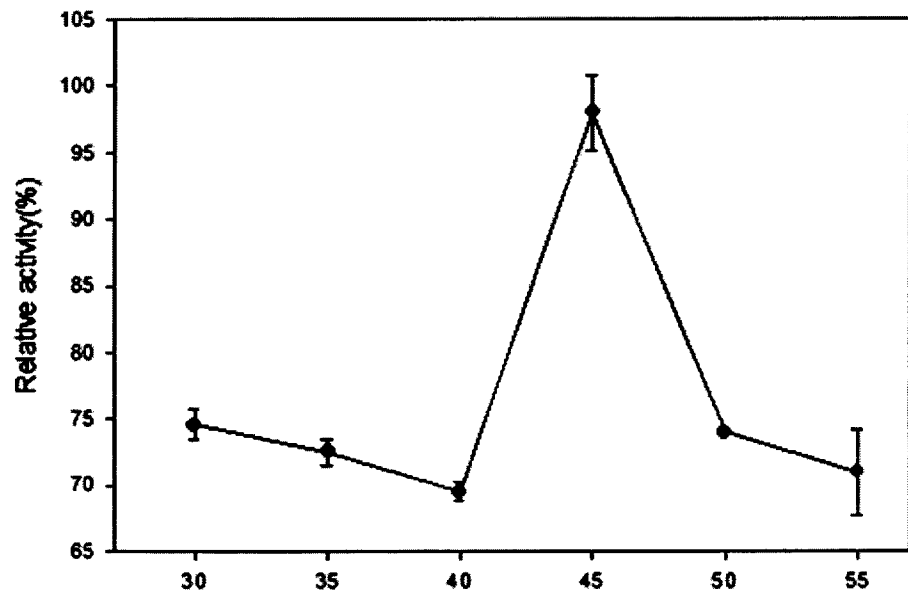
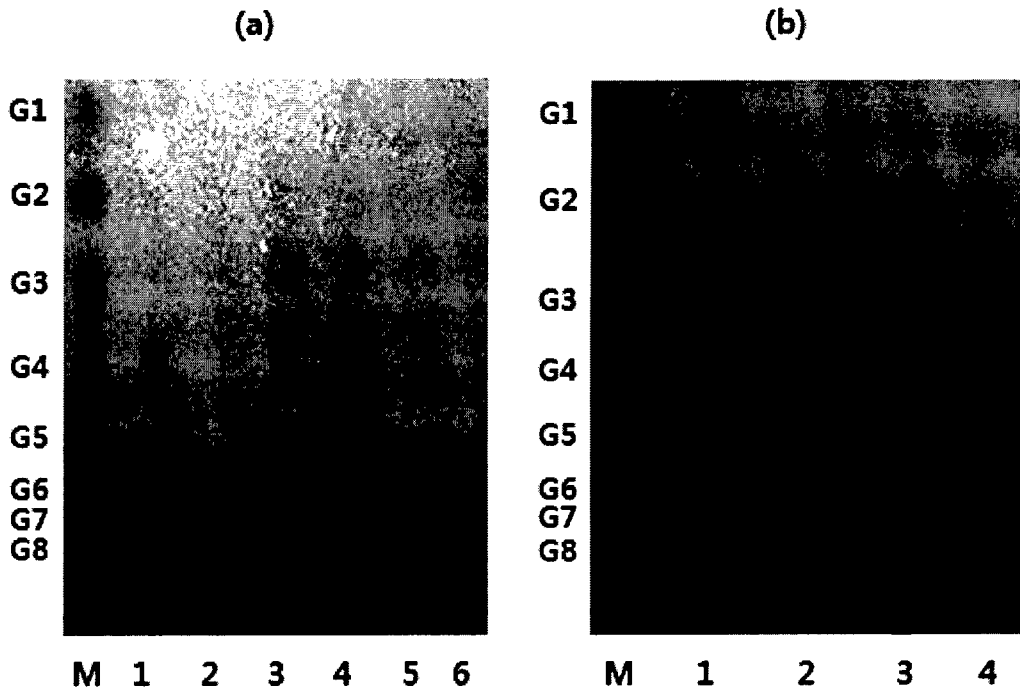


Fig. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/60(2006.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C40B 40/08(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/60; C12N 9/88; A61K 31/715; C12N 1/00; C12N 15/09; A61K 38/51; C12N 1/19; C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: alginate lyase, metagenome, library, abalone

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-319785 A (JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP) 11 November 2003 See the entire document	1-9
A	US 2010-0080788 A1 (BRADLEY P. BARNETT et al.) 01 April 2010 See the entire document	1-9
A	KR 10-2009-0092613 A (DONG-EUI EDUCATIONAL, FOUNDATION et al.) 01 September 2009 See the entire document	1-9
A	KR 10-2008-0093525 A (KYUNGSUNG UNIVERSITY INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION et al.) 22 October 2008 See the entire document	1-9
A	GenBank Accession Number AAA25049, alginate lyase [<i>Klebsiella pneumoniae</i>], 03 August 1994 See the entire document	1-9
A	GenBank Accession Number ABD81738, putative alginate lyase [<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40], 06 June 2008 See the entire document	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 MAY 2012 (02.05.2012)

Date of mailing of the international search report

03 MAY 2012 (03.05.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/005798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2003-319785 A	11.11.2003	NONE	
US 2010-0080788 A1	01.04.2010	EP 2081964 A2 WO 2008-127290 A2 WO 2008-127290 A3 WO 2008-127290 A3 WO 2008-127290 A9	29.07.2009 23.10.2008 23.10.2008 28.05.2009 24.12.2008
KR 10-2009-0092613 A	01.09.2009	NONE	
KR 10-2008-0093525 A	22.10.2008	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/60(2006.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C40B 40/08(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/60; C12N 9/88; A61K 31/715; C12N 1/00; C12N 15/09; A61K 38/51; C12N 1/19; C12N 1/20

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: alginate lyase, 메타지놈, 라이브러리, 전복

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2003-319785 A (JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP) 2003.11.11 전체 문헌 참조	1-9
A	US 2010-0080788 A1 (BRADLEY P. BARNETT 등) 2010.04.01 전체 문헌 참조	1-9
A	KR 10-2009-0092613 A (학교법인 동의학원 등) 2009.09.01 전체 문헌 참조	1-9
A	KR 10-2008-0093525 A (경성대학교 산학협력단 등) 2008.10.22 전체 문헌 참조	1-9
A	GenBank Accession Number AAA25049, alginate lyase [<i>Klebsiella pneumoniae</i>], 1994.08.03. 전체 문헌 참조	1-9
A	GenBank Accession Number ABD81738, putative alginate lyase [<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40], 2008.06.06. 전체 문헌 참조	1-9

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2012년 05월 02일 (02.05.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 05월 03일 (03.05.2012)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 최준호 전화번호 82-42-481-5569
--	-----------------------------------



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 게시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

- 서면
 전자적 형태

b. 제출시기

- 출원시 국제출원에 포함
 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 게시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2003-319785 A	2003.11.11	없음	
US 2010-0080788 A1	2010.04.01	EP 2081964 A2 WO 2008-127290 A2 WO 2008-127290 A3 WO 2008-127290 A3 WO 2008-127290 A9	2009.07.29 2008.10.23 2008.10.23 2009.05.28 2008.12.24
KR 10-2009-0092613 A	2009.09.01	없음	
KR 10-2008-0093525 A	2008.10.22	없음	