



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년01월17일  
(11) 등록번호 10-1223666  
(24) 등록일자 2013년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 7/40 (2006.01) C12N 9/78 (2006.01)  
C12N 15/55 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0007945  
(22) 출원일자 2011년01월26일  
심사청구일자 2011년01월26일  
(65) 공개번호 10-2012-0086605  
(43) 공개일자 2012년08월03일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR100715744 B1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
재단법인 경북해양바이오산업연구원  
경상북도 울진군 죽변면 해양바이오길 22  
한국해양과학기술원  
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)  
(72) 발명자  
우정희  
경상북도 울진군 울진읍 월변1길 12-5, 한울빌 501호  
강성균  
경기도 안산시 상록구 감골로 59, 월드아파트 702동 1502호 (사동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

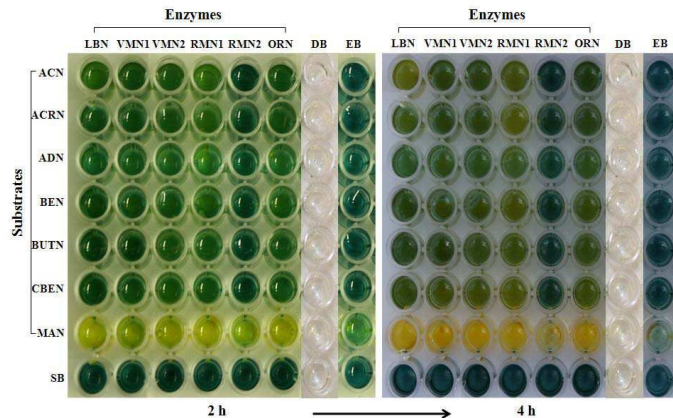
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **나이트릴레이즈 ORN을 이용한 카르복실산의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 신규한 나이트릴레이즈 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈를 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법, 및 상기 나이트릴레이즈를 포함하는 카르복실산 제조용 생축매 조성물에 관한 것이다.

**대표도** - 도6



(72) 발명자

**이정현**

경기도 성남시 분당구 불정로 219, 한솔청구아파트  
116동 101호 (정자동)

**김상진**

서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 201동 1903호  
(방배동, 방배래미안타워)

**박상이**

서울특별시 광진구 동일로56가길 27 (군자동)

**김준태**

서울특별시 중랑구 용마산로112가길 34, 104동  
1601호 (망우동, 예성그린캐슬아파트)

**김충곤**

경상북도 울진군 울진읍 공세항길 19-13, 501호 (리치빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PM56201
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술사업
연구과제명	해양극한생물분자유전체연구단
주관기관	경북해양바이오산업연구원/한국해양연구원
연구기간	2010.01.01~2013.12.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 5의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 ORN 또는 상기 나이트릴레이즈 ORN을 포함하는 생축매 조성물을 준비하는 단계; 및

상기 나이트릴레이즈 ORN 또는 생축매 조성물을 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 나이트릴레이즈 ORN을 포함하는 생축매 조성물은 나이트릴레이즈 ORN을 포함하는 세포, 상기 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 파쇄물을 포함하는 것인 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 나이트릴 기질은 아세토나이트릴(acetonitrile), 아크릴로나이트릴(acrylonitrile), 아디포나이트릴(adiponitrile), 벤조나이트릴(benzonitrile), 부틸로나이트릴(butyronitrile), 4-클로로벤조나이트릴(4-chlorobenzonitrile) 및 만델로나이트릴(mandelonitrile)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 것인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 나이트릴레이즈 ORN은 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체로부터 얻어진 것인 방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것인 방법.

**청구항 6**

서열번호 5의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 ORN을 포함하는 카르복실산 제조용 생축매 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 생축매 조성물은 나이트릴레이즈 ORN을 포함하는 세포, 상기 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 파쇄물을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 나이트릴레이즈 ORN은 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체로부터 얻어진 것인 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것인 조성물.

**청구항 10**

제6항에 있어서, 상기 나이트릴레이즈 ORN은 아세토나이트릴(acetonitrile), 아크릴로나이트릴(acrylonitrile), 아디포나이트릴(adiponitrile), 벤조나이트릴(benzonitrile), 부틸로나이트릴(butyronitrile), 4-클로로벤조나이트릴(4-chlorobenzonitrile) 및 만델로나이트릴(mandelonitrile)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상에 대하여 분해 활성을 갖는 것인 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 나이트릴레이즈 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈를 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법, 및 상기 나이트릴레이즈를 포함하는 카르복실산 제조용 생축매 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 의약 및 약학분야에서 광학활성 카르복실산 및 그의 유도체의 사용이 크게 증가하고 있다. 특히, 광학활성 카르복실산은 고지혈증 치료제, 항바이러스제(에이즈 치료제), 항암제, 항응혈제, 심장병 치료제 및 알츠하이머 치료제 등 의약품의 제조 원료로서 유용성이 높은 것으로 알려지면서 최근에 더욱 주목되고 있어 카르복실산의 고효율 생물학적 제조방법의 확립이 요구되고 있다.

[0003] 카르복실산의 생산을 위한 화학 공정법은 여러 단계의 반응과 고온 및 고압으로 라세믹 혼합물을 생성한다는 단점을 가지고 있는데 비해, 나이트릴레이즈(nitrilase)를 사용한 효소 반응 공정법은 원-스텝으로 이루어지고 기질인 독성물질(나이트릴 화합물)로부터 광학선택적으로 광학활성 의약품 중간체(카이랄 의약품)를 생산하기 때문에 환경적인 면뿐만 아니라 경제적인 면에서도 상당한 잠재성을 보이고 있다. 따라서, 미생물 및 그의 효소를 사용하여 나이트릴로부터 광학활성 카르복실산을 생화학적으로 생산하는 방법이 시도되고 있다 (Banerjee et al., (2006) Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 77-87; Robertson et al., (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70: 2429-2436; Rustler et al., (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 87-97). 대부분의 나이트릴레이즈는 보존된 3개의 촉매성 잔기가 있는데, 이것을 촉매성 3가 원소(catalytic triad motifs)라고 부른다. 촉매성 3가 원소는 글루타메이트(Glutamate, E), 라이신(Lysine, K) 및 시스테인(Cysteine, C) 잔기들로 되어 있으며 항상 보존된 잔기이다.

[0004] 본 발명자들은 다양한 나이트릴 기질로부터 고효율로 카르복실산을 제조할 수 있는 신규한 나이트릴레이즈를 개발하고자 노력한 결과, 해양 유래 미생물들로부터 촉매성 3가 원소를 보존하고 있는 단백질들을 분리 및 정제할 수 있었다. 나아가, 본 발명자들은 상기 단백질들이 다양한 나이트릴 기질들로부터 카르복실산을 생산할 수 있는 나이트릴레이즈 활성을 가진다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈를 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈를 포함하는 카르복실산 제조용 생축매 조성물을 제공하는 것이

다.

**과제의 해결 수단**

- [0007] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 또는 이를 포함하는 생촉매 조성물을 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0008] 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 또는 상기 나이트릴레이즈를 포함하는 생촉매 조성물을 준비하는 단계; 및 상기 나이트릴레이즈 또는 생촉매 조성물을 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 카르복실산을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈를 포함하는 카르복실산 제조용 생촉매 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0011] 본 발명에서 용어, "나이트릴레이즈(nitrilase)" 란 나이트릴 화합물을 카르복실산으로 변환하는 반응을 촉매하는 효소를 말하며, 나이트릴레이즈 활성을 가지는 한, 부분 정제된 효소 또는 정제된 효소의 형태일 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 용어, "나이트릴레이즈를 포함하는 생촉매 조성물"이란 나이트릴레이즈 효소를 포함하면서 나이트릴레이즈 활성을 나타내는 모든 형태의 조성물을 포함하는 개념이며, 바람직하게는 나이트릴레이즈 활성을 가지는 완전 미생물 세포 또는 상기 나이트릴레이즈가 형질전환된 미생물 세포일 수 있다. 또한, 상기 미생물 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 파쇄물일 수 있다.
- [0013] 바람직한 양태로서, 본 발명에서 사용되는 나이트릴레이즈는 서열번호 1의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 RMN1 단백질이다.
- [0014] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명에서 사용되는 나이트릴레이즈는 서열번호 3의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 RMN2 단백질이다.
- [0015] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명에서 사용되는 나이트릴레이즈는 서열번호 5의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 ORN 단백질이다.
- [0016] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명에서 사용되는 나이트릴레이즈는 서열번호 7의 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 VMN1 단백질이다.
- [0017] 또한, 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 이의 정상형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라, 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내며 동시에 나이트릴레이즈 활성을 유지하는 범위 내에서의 아미노산 서열을 포함한다. 상기의 실질적인 동일성은 정상형의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지나 천연 단백질과 동등한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).
- [0018] 또한, 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 나이트릴레이즈 활성을 유지하면서 이의 단백질의 특성을 변형시킨 변이체 또는 수식체일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열상의 변이와 수식(modification)에 의해서 단백질의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질일 수 있다. 예컨대, 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation) 또는 파네실화(farnesylation) 등으로 수식될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 예컨대, 본 발명의 RMN1 및 RMN2 단백질은 *Reinekea* sp. MED297 균주로부터 추출 및 정제할 수 있고, ORN 단백질은 *Oceanobacter* sp. RED65 균주로부터 추출 및 정제할 수 있으며, VMN1 단백질은 *Vibrio* sp. MED222 균

주로부터 추출 및 정제할 수 있다.

- [0020] 또한, 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 서열번호 1, 3, 5 및 7의 아미노산 서열 정보를 바탕으로 화학적으로 합성(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156, 1963)하거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 나이트릴레이즈 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 나이트릴레이즈 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 상기한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "핵산 분자" 또는 "핵산" 은 DNA 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 개념으로, 핵산 분자의 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)).
- [0023] 바람직한 양태로서, 나이트릴레이즈 RMN1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다. 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.
- [0024] 또 하나의 바람직한 양태로서, 나이트릴레이즈 RMN2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다. 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.
- [0025] 또 하나의 바람직한 양태로서, 나이트릴레이즈 ORN 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다. 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.
- [0026] 또 하나의 바람직한 양태로서, 나이트릴레이즈 VMN1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다. 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 7의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 핵산 분자는 천연에서 분리하거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem Int Ed Engl. 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스페이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0028] 보다 바람직한 양태로서, 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 가지는 핵산은 재조합 벡터에 삽입되어 발현된다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "벡터"란 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포로 도입되기 위한 수단을 의미한다. 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 게놈 DNA에 통합될 수 있다.
- [0030] 바람직하게는 벡터 내로 삽입되어 전달된 유전자가 숙주세포의 게놈 내로 비가역적으로 융합되어 세포 내에서 유전자 발현이 장기간 안정적으로 지속되도록 하는 벡터이다.
- [0031] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주

세포도 이용할 수 있으며, DNA의 도입효율이 높고 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주가 통상 사용될 수 있다. 구체적으로 세균, 예를 들어 대장균, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)과 같은 곤충 세포, CHO, COS1, COS7, BSC1, BSC40, BMT10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 대장균이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DH5  $\alpha$  및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 세포(Stratagene, LaJolla, CA)를 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였다.

- [0032] 벡터를 숙주세포에 도입하는 것은 공지된 방법, 예를 들면 염화칼슘법(Journal of Molecular Biology, 53권, 159페이지, 1970), 염화루비듐법(Methods in Enzymology, 68권, 253페이지, 1979), 일렉트로포레이션법(Current Protocols in Molecular Biology, 1권, 184페이지, 1994), 및 인비트로펙킹법(Current Protocols in Molecular Biology, 1권, 571페이지, 1994) 등을 이용할 수 있다.
- [0033] 나이트릴레이즈는 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용하여 분리 및 정제할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명의 나이트릴레이즈를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 균주를 배양한 뒤, 상기 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 뒤 세포를 파쇄시켜, 파쇄된 용액을 원심분리하여 형성된 침전물을 제거하여 재조합 나이트릴레이즈 조효소액을 분리하였으며, 이렇게 분리된 조효소액을 공지된 컬럼 크로마토그래피법으로 정제하여 본 발명의 신규 나이트릴라제 효소를 획득하였다(실시예 5).
- [0035] 상기와 같이 획득된 나이트릴레이즈 단백질은 나이트릴 기질과 반응하여 카르복실산을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0036] 카르복실산 제조에 사용하기 위하여, 본 발명에서는 나이트릴레이즈 활성을 가지는 한, 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 나타내는 나이트릴레이즈 단백질을 사용하거나, 상기 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 사용하거나, 상기 핵산 분자 및 조절 신호 서열이 연결된 핵산 구성체 또는 벡터를 사용할 수 있다. 또는, 나이트릴레이즈 활성을 가지는 완전 미생물 세포 또는 상기 나이트릴레이즈가 형질전환된 미생물 세포, 상기 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 그 파쇄물의 형태로 사용할 수 있다.
- [0037] 바람직한 하나의 양태로서, 1) 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 형질전환하여 형질전환체를 제조하는 단계, 2) 상기 형질전환체로부터 나이트릴레이즈를 정제하는 단계, 및 3) 상기 정제된 나이트릴레이즈를 나이트릴 기질과 반응시키는 단계를 포함하여 카르복실산을 제조할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 나이트릴레이즈는 다양한 나이트릴 기질과 반응을 일으킨다.
- [0039] 본 발명에서 용어, "나이트릴" 은 시아노기(-C $\equiv$ N)가 탄화수소기(R)의 탄소원자에 직접 결합한 유기화합물(R-CN)을 총칭한다. 시아노기를 포함한 유기화합물이라면 본 발명의 나이트릴레이즈의 기질로 제한없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 아세토나이트릴(acetonitrile, ACN), 아크릴로나이트릴(acrylonitrile, ACRN), 아디포나이트릴(adiponitrile, ADN), 벤조나이트릴(benzonitrile, BEN), 부틸로나이트릴(butyronitrile, BUTN), 4-클로로벤조나이트릴(4-chlorobenzonitrile, CBEN) 및 만델로나이트릴(mandelonitrile, MAN)을 예시할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "카르복실산(carboxylic acid)"은 카복시기(-COOH)를 가지는 화합물을 총칭한다.
- [0041] 본 발명에 따른 방법은 pH4 내지 pH11, 바람직하게는 pH4 내지 pH9의 조건에서 수행하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 0  $^{\circ}$ C 내지 80  $^{\circ}$ C, 바람직하게는 10  $^{\circ}$ C 내지 60  $^{\circ}$ C, 보다 바람직하게는 15  $^{\circ}$ C 내지 50  $^{\circ}$ C의 온도에서 수행하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명에 따른 방법으로 제조된 카르복실산은 추출 또는 결정화에 의해 수성 반응 용액으로부터 분리될 수 있다. 수성 반응 용액은 무기산 또는 유기산에 의해 산성화시킨 후에 유기 용매로 추출할 수 있다. 추출은 수율을 증가시키기 위해 수차례 반복시킬 수 있다. 상기 유기 용매는 염 첨가 후에 물과 상 경계를 나타내는 모든 용매를 사용할 수 있으며, 예컨대 톨루엔, 벤젠, 핵산, 메틸 3차 부틸 에틸르 또는 에틸 아세테이트와 같은 용매를 사용할 수 있다.
- [0043] 생성물 카르복실산을 포함하는 유기상을 결정화하여 분리하는 경우, 용액을 0 $^{\circ}$ C 내지 10 $^{\circ}$ C의 온도로 냉각시키는

것이 바람직하다. 결정화는 유기 용액으로부터 직접 일어날 수 있다. 결정화를 반복하기 위해 결정화된 생성물을 동일하거나 상이한 용매에 재차 용해하여 다시 한 번 결정화시킬 수 있으며, 후속 결정화는 생성물의 거울상이성질체 순도를 더욱 증가시킬 수 있다. 또한, 카르복실산을 산에 의해 산성화시킨 후 즉시 수성 반응 용액으로부터 결정화시킬 수 있다. 이 경우 수용액을 가열하여 그 부피가 10 내지 90%, 바람직하게는 20 내지 80%, 특히 바람직하게는 30 내지 70% 정도로 감소되도록 농축시키는 것이 바람직하며, 결정화는 0℃ 내지 10℃의 온도에서 냉각에 의해 행하는 것이 바람직하다.

[0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 단백질 RMN1(서열번호 1), RMN2(서열번호 3), ORN(서열번호 5), 및 VMN1(서열번호 7)이 실제로 나이트릴레이즈 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 상기 단백질을 다양한 나이트릴 기질과 반응시킨 후 pH 민감성에 의한 비색분석법을 이용하여 색깔의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 만델로나이트릴(MAN) 기질에 대해서는 사용한 모든 효소가 2시간 만에 모두 노란색으로 바뀌어 나이트릴레이즈 효소 활성을 보임을 알 수 있었고, RMN2를 제외한 모든 효소들은 다른 기질(ACN, ACRN, AND, BEN, BUTN 및 CBEN)들에 대해서도 4시간째에 노란색에 가까워지는 것을 관찰할 수 있었다(도 6).

[0045] 따라서, 본 발명의 단백질들은 만델로나이트릴 기질에 대해 높은 나이트릴레이즈 활성을 갖고 있으며 넓은 범위의 기질특이성을 보이는 효소들임을 확인할 수 있다. 본 발명의 효소들은 앞으로 다양한 범위의 카르복실산 제조 및 생산에 기여할 것으로 기대된다.

### 발명의 효과

[0046] 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질은 다양한 기질특이성을 가지므로 카르복실산을 고효율로 생합성하는데 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 나이트릴레이즈에 의해 제조된 카르복실산은 산업적으로 고부가가치를 가지는 의약품 합성의 재료로 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 나이트릴레이즈의 촉매 반응의 모식도와, pH의 민감성을 이용한 비색분석법에 의하여 나이트릴레이즈의 반응 여부를 측정할 결과를 나타낸 것이다. Pi 버퍼는 포스페이트 버퍼를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 사용된 나이트릴 기질들의 화학구조식을 나타낸 것이다. A는 아세토나이트릴(acetonitrile, ACN), B는 아크릴로나이트릴(acrylonitrile, ACRN), C는 아디포나이트릴(adiponitrile, ADN), D는 벤조나이트릴(benzonitrile, BEN), E는 부틸로나이트릴(butyronitrile, BUTN), F는 4-클로로벤조나이트릴(4-chlorobenzonitrile, CBEN), 및 G는 만델로나이트릴(mandelonitrile, MAN)을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 나이트릴레이즈 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현벡터의 제조 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에서 분리 및 정제한 나이트릴레이즈 RMN1, RMN2, VMN1, VMN2, ORN 및 LBN 의 아미노산 서열을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다. 막스친 부분은 촉매성 3가 원소인 글루타메이트(Glutamate, E), 라이신(Lysine, K) 및 시스테인(Cysteine, C)을 나타낸다.

도 5는 본 발명에서 분리 및 정제한 나이트릴레이즈 RMN1, RMN2, VMN1, VMN2, ORN 및 LBN 을 SDS-PAGE로 나타낸 사진이다. (A)는 각각 효소의 발현 패턴을 나타낸다. M은 분자량 표준 마커, BL 은 대장균 BL-21 세포 추출물을 나타낸다. 라인 1, 3, 5, 7, 9 및 11는 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 넣지 않아 과발현을 유도하지 않은 대장균 BL-21 세포 추출물이고, 라인 2, 4, 6, 8, 10 및 12 는 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 넣어 과발현을 유도시킨 대장균 BL-21 세포 추출물이다. (B)는 각각 효소의 정제 패턴을 나타낸다.

도 6은 본 발명에서 분리 및 정제한 나이트릴레이즈 RMN1, RMN2, VMN1, VMN2, ORN 및 LBN 에 대하여 비색분석법을 통해 나이트릴레이즈 활성을 측정할 결과를 나타낸 것이다. EB(enzyme blank)는 효소 비처리군, SB(substrate blank)는 기질 비처리군, 및 DB(dye blank)는 염색약 비처리군을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용



[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 재료 및 시약**

[0050] 균주 배양에 사용된 기본 배지는 디프코사(USA)의 제품을 사용하였다. 본 연구에 사용된 다양한 나이트릴 기질인 아세토나이트릴(acetonitrile, ACN), 아크릴로나이트릴(acrylonitrile, ACRN), 아디포나이트릴(adiponitrile, ADN), 벤조나이트릴(benzonitrile, BEN), 부틸로나이트릴(butyronitrile, BUTN), 4-클로로벤조나이트릴(4-chlorobenzonitrile, CBEN) 및 만델로나이트릴(mandelonitrile, MAN)은 알드리치사(USA)에서 구입하였다. 도 2는 본 발명에 사용된 나이트릴 기질들의 화학구조식을 나타낸 것이다. 그리고 본 연구에 사용된 모든 제품은 HPLC Grade로서 알드리치사에서 구입하였다.

[0051] **실시예 2. 미생물 균주 및 배양 조건**

[0052] 본 연구에서는 *Leeuwenhoekiiella blandensis* MED217, *Oceanobacter* sp. RED65, *Reinekea* sp. MED297 및 *Vibrio* sp. MED222 균주를 사용하였다. 상기 네 균주들은 스웨덴 칼마르 대학(University of Kalmar)의 제론 피나시(Jarone Pinhassi) 박사에게 분양 받았으며, *Leeuwenhoekiiella blandensis* MED217 균주의 게놈 서열은 유전자은행 등록번호 NZ\_AANCO00000000, *Oceanobacter* sp. RED65 균주의 게놈 서열은 유전자은행 등록번호 NZ\_AAQH00000000, *Reinekea* sp. MED297 균주의 게놈 서열은 유전자은행 등록번호 NZ\_AAOE00000000, 및 *Vibrio* sp. MED222 균주의 게놈 서열은 유전자은행 등록번호 NZ\_AAND00000000 에 공개되어 있다.

[0053] 본 발명에서는 상기 균주들을 해양 미생물 배양 배지(marine broth)에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 180 rpm 으로, 온도 30 °C에서 3-4 일간 배양하였다.

[0054] DH5 α 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 세포(Stratagene, LaJolla, CA, USA)를 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37 °C 에서 배양하였다.

[0055] **실시예 3. 해양 미생물 유래의 나이트릴레이즈 유전자의 ORF 서열 분석**

[0056] *Leeuwenhoekiiella blandensis* MED217, *Oceanobacter* sp. RED65, *Reinekea* sp. MED297 및 *Vibrio* sp. MED222 균주들로부터 나이트릴레이즈 유전자를 동정하기 위하여, Moore foundation (www.moore.org)으로 분석한 상기 균주들의 각 게놈 DNA 서열 중에서 개방해독틀(open reading frame, ORF)에 상응하는 서열(catalytic traid motifs)을 Ensoltek의 ProteinFinder(www.ensoltek.com) 및 BLAST 프로그램을 이용하여 분석하였다. 또한, 후보 나이트릴레이즈 아미노산 서열을 CLUSTAL W 프로그램(Thompson, et al., (1994) Nucleic. Acids. 22: 4673-4680)으로 분석하였다.

[0057] 한편, 상기 균주들에 있어서 본질적인 나이트릴레이즈 활성-부위가 존재하는지 통상적인 방법으로 측정하였다. 이를 위해, 촉매성 3가 원소(catalytic traid motifs)가 포함된 서열을 선택하여 분석하였다.

[0058] **실시예 4. 나이트릴레이즈 유전자 클로닝**

[0059] *Leeuwenhoekiiella blandensis* MED217, *Oceanobacter* sp. RED65, *Reinekea* sp. MED297 및 *Vibrio* sp. MED222 균주들의 ORF 서열 내에 있는 나이트릴레이즈 유전자를 클로닝하기 위하여, 우선 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR 방법으로 상기 균주의 게놈 DNA를 증폭시켰다. 이때, 제한효소인 NdeI 과 XhoI 을 각각 프라이머 양 끝에 붙였으며, *lbn*, *orn*, *rmn1*, *rmn2*, *vmn1* 및 *vmn2* 유전자의 정방향 및 역방향 프라이머 서열과 PCR 조건은 각각 표 1과 같다.

**표 1**

유전자	프라이머 종류	서열	서열번호	어닐링(°C)
<i>lbn</i>	정방향( <i>lbn</i> F)	5'-CGACCCGGCATATGAAAGAAGTAGATCACATAGAT-3'	13	63, 45
	역방향( <i>lbn</i> RH)	5'-CTCCACATCTCGAGTTTTTCTTCCACTTAAGCTGAAA-3'	14	63, 49
	역방향( <i>lbn</i> RX)	5'-CTCCACATCTCGAGTATTTTTCTTCCACTTAAGCTG-3'	15	64, 51

orn	정방향( <i>ornF</i> )	5'-CGACCCGGCATATGACGCAAACGTGATTACCGT-3'	16	57, 50
	역방향( <i>ornRH</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTAATCGTTTATGCTTCAACAATGG-3'	17	64, 51
	역방향( <i>ornRX</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTCATAATCGTTTATGCTTCAACAA-3'	18	63, 49
<i>rmn1</i>	정방향( <i>rmn1F</i> )	5'-CGACCCGGCATATGAGAGAAGTTACCGTAGCGG-3'	19	68, 51
	역방향( <i>rmn1RH</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGAGCGGCTCCGCTTTGGTCATT-3'	20	69, 57
	역방향( <i>rmn1RX</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGCTAAGCGCGTCCGCTTTGGTC-3'	21	70, 59
<i>rmn2</i>	정방향( <i>rmn2F</i> )	5'-CGACCCGGCATATGAAGTTAGCATTGGCCAGC-3'	22	68, 51
	역방향( <i>rmn2RH</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGGACCCCGCGGCCAGCCAT-3'	23	74, 64
	역방향( <i>rmn2RX</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTCAGACCCCGCGGCCAGC-3'	24	74, 64
<i>vmn1</i>	정방향( <i>vmn1F</i> )	5'-CGACCCGGCATATGCTTCAACCATGGCGTCTG-3'	25	69, 57
	역방향( <i>vmn1RH</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGACGATTCAACGCAGACGCTATC-3'	26	68, 55
	역방향( <i>vmn1RX</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTTAACGATTCAACGCAGACGCTA-3'	27	67, 53
<i>vmn2</i>	정방향( <i>vmn2F</i> )	5'-CGACCCGGCCATGGCTAAGAAAGACATCAAAGTAGCG-3'	28	69, 49
	역방향( <i>vmn2RH</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTTTCTCAGCAAACGCGCTTGG-3'	29	68, 55
	역방향( <i>vmn2RX</i> )	5'-CTCCACATCTCGAGTTATTTCTCAGAAAACGCGCTT-3'	30	66, 52

[0061] 표 1에서 정방향 및 역방향 프라이머의 밑줄친 부분은 각각 NdeI 및 XhoI 부위를 가리키며, 히스티딘-태그가 없는 *lbn*, *orn*, *rmn1*, *rmn2*, *vmn1* 및 *vmn2* 유전자의 발현을 위하여, 표 1에 기재한 *lbnRX*, *ornRX*, *rmn1RX*, *rmn2RX*, *vmn1RX* 및 *vmn2RX* 역방향 프라이머를 추가로 제작하였다. PCR 반응조건은 표준 조건을 사용해서 (1) 95 °C 에서 1분간 초기 변성, (2) 94 °C 에서 20초간 변성, 45~74 °C (통상 50~55 °C) 에서 30초간 어닐링, 72 °C 에서 1분간 신장 (30 사이클), 및 (3) 72 °C 에서 10분간 최종 신장 조건으로 수행하였다. 각유전자 증폭에 있어서 정확한 어닐링(annealing) 온도는 표 1에 나타낸 바와 같다. PCR 반응 후, NdeI 및 XhoI 제한효소 부위를 가진 증폭된 단편을 NdeI/XhoI 부위를 가진 pET-24a (+) 벡터에 연결한 후, 이 재조합 발현벡터를 DH5 α에 형질 전환시켰고, 상기 재조합 발현벡터를 BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Novagen) 균주에 도입하여 발현 유무를 확인하였다.

[0062] **실시예 5. 나이트릴레이즈 유전자 발현 및 정제**

[0063] 상기 실시예 4에서 제조한 나이트릴레이즈 유전자 발현벡터가 실질적으로 세포에서 발현되는지 확인하기 위하여, 상기 형질전환체를 37 °C에서 배양한 후 600 nm에서 0.D 값이 0.4 내지 0.6이 됐을 때 1 mM의 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 첨가하여 발현을 유도하였다. 3 시간 배양한 후, 상기 세포를 5,000g 에서 20분간 원심분리하여 수득하였고, 수득한 세포를 50 mM 포스페이트(pH 7.0), 0.5M KCl 및 10% 글리세롤을 포함한 용액에 현탁시켜 분쇄기로 균질화하였다. 세포 분쇄물은 His·Bind Purification Kit(Novagen)을 이용하여 15,000 g에서 30 분간 원심분리시켜 제거하였다.

[0064] 용해성 단편은 500 mM NaCl, 20 mM 포스페이트(pH 7.0) 및 5 mM 이미다졸을 포함하는 결합용액으로 평형상태를 유지한 Ni-NTA(Ni-nitrilotriacetic) 컬럼에 적재한 후, 500 mM NaCl, 20 mM 포스페이트(pH 7.0) 및 60 mM 이미다졸을 포함한 세척용액으로 세척하였다. 다음으로, 결합된 효소를 500 mM NaCl, 20 mM 포스페이트(pH 7.0) 및 1 M 이미다졸을 포함하는 용출용액으로 용출하였고, 50 mM 인산화용액(pH 7.0)으로 투석하였다. 단백질 정제는 Laemmli(1970)에 기재된 방법으로 SDS-PAGE를 실시하여 분리하였다. 단백질 농도는 표준 단백질인 BSA와 함께 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 이용한 Bradford 방법으로 측정하였다(Bradford (1976) Anal. Biochem 72: 248-254).

[0065] **실시예 6. 나이트릴레이즈 활성 측정**

[0066] 상기 실시예 5에서 수득한 단백질의 나이트릴레이즈 활성을 확인하기 위하여 본 발명자들은 pH 민감성에 의한 비색분석법(colorimetric assay)을 이용하였다(Banerjee et al., (2003) J. Biomol. Screen. 8: 559-565). 96-웰 마이크로플레이트에 총 반응양 230 μl에 201 μl의 인산용액[10 mM 포스페이트(pH 7.2)]을 넣고, 0.01%가 되도록 브로모티몰 블루를 넣고, 5.75 μl의 나이트릴 기질들(500 mM stock in ethanol)을 넣고 마지막으로 23.25 μl의 나이트릴레이즈 첨가하여 30 내지 50 °C에서 2 내지 4시간 반응시켰다. 나이트릴레이즈 활성을 보이게 되면 나이트릴 기질들이 카르복실산을 생성하기에 pH가 산성화되기에 파란색에서 노란색으로 변하게 된다

(도 1). 위와 같은 방법으로 다양한 나이트릴레이즈를 사용하여 다양한 나이트릴 기질들에 대한 활성을 측정하였다.

[0067] **실험결과**

[0068] **1. 해양미생물유래의 나이트릴레이즈 유전자의 ORF 서열 분석 결과**

[0069] *Leeuwenhoekiella blandensis* MED217, *Oceanobacter* sp. RED65, *Reinekea* sp. MED297 및 *Vibrio* sp. MED222 균주로부터 나이트릴레이즈 유전자의 ORF 서열을 비교 분석한 결과를 도 4에 나타냈다. 즉, 도 4는 분리 및 정제된 나이트릴레이즈들의 아미노산 서열을 비교 분석한 것으로서, 비교 분석된 단백질의 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 등록번호 및 서열번호는 하기와 같다:

[0070] RMN1 (*Reinekea* sp. MED297), ZP\_01112744, 서열번호 1;

[0071] RMN2 (*Reinekea* sp. MED297), ZP\_01116337, 서열번호 3;

[0072] ORN (*Oceanobacter* sp. RED65), ZP\_01308306, 서열번호 5;

[0073] VMN1 (*Vibrio* sp. MED222), ZP\_01063455, 서열번호 7;

[0074] VMN2 (*Vibrio* sp. MED222), ZP\_01063485, 서열번호 9; 및

[0075] LBN (*Leeuwenhoekiella blandensis* MED217), ZP\_01060838, 서열번호 11.

[0076] 상기와 같이 *Reinekea* sp. MED297 와 *Vibrio* sp. MED222 균주로부터 각각 두 개의 유전자를 선별할 수 있었고, *Oceanobacter* sp. RED65 와 *Leeuwenhoekiella blandensis* MED217 균주로부터 각각 한 개의 유전자를 선별할 수 있었다. 또한, 상기 선별된 나이트릴레이즈 효소는 모두 보존된 촉매성 3가 원소 (catalytic traid motifs) 를 가지고 있었다(도 4).

[0077] 구체적으로 보면, *Reinekea* sp. MED297 균주 유래의 RMN1는 ORF가 289개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소(E43, K116, 및 C153)가 존재하였고, 동 균주 유래의 RMN2은 ORF가 589개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소 (E41, K108, 및 C144)가 존재하였다. *Vibrio* sp. MED222 균주 유래의 VMN1 은 ORF가 297개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소(E77, K148 및 C180)가 존재하였고, 동 균주 유래의 VMN2 은 ORF가 320개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소(E45, K120 및 C151)가 존재하였다. 또한, *Oceanobacter* sp. RED65 균주 유래의 ORN는 ORF가 274개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소(E45, K118, 및 C160)가 존재하였고, *Leeuwenhoekiella blandensis* MED217 균주의 LBN은 ORF가 523개의 아미노산으로 구성되어 있으며 촉매성 3가 원소(E279, K354, 및 C388)가 존재하였다(도 4 및 표 2).

**표 2**

[0078]

균주	길이 (아미노산)	분자량 (kDa)	촉매성 3가 원소			서열번호	효소명
			글루타메이트	라이신	시스테인		
<i>Reinekea</i> sp. MED297	289	32.1	E43	K116	C153	1	RMN1
<i>Reinekea</i> sp. MED297	538	60.2	E41	K108	C144	3	RMN2
<i>Oceanobacter</i> sp. RED65	274	30.0	E45	K118	C160	5	ORN
<i>Vibrio</i> sp. MED222	297	32.8	E77	K148	C180	7	VMN1
<i>Vibrio</i> sp. MED222	320	35.7	E45	K120	C151	9	VMN2
<i>Leeuwenhoekiella</i> <i>blandensis</i> MED217	523	60.5	E279	K354	C388	11	LBN

[0079] **2. 나이트릴레이즈 유전자 클로닝, 발현 및 정제 결과**

[0080] *Leeuwenhoekiella blandensis* MED217, *Oceanobacter* sp. RED65, *Reinekea* sp. MED297 및 *Vibrio* sp. MED222 균주로부터 나이트릴레이즈를 클로닝, 발현 및 정제한 결과, *Reinekea* sp. MED297 유래의 재조합 나이트릴레이

즈 RMN1와 RMN2의 분자량은 각각 32.1 kDa 과 60.2 kDa 이었고, *Vibrio* sp. MED222 유래의 재조합 나이트릴레이즈 VMN1와 VMN2의 분자량은 각각 32.8 kDa 과 35.7 kDa 이었으며, *Leeuwenhoekiella blandensis* MED217 과 *Oceanobacter* sp. RED65 유래의 재조합 나이트릴레이즈 LBN 과 ORN의 분자량은 각각 60.5 kDa 과 30.0 kDa 이었다(표 2).

[0081] 도 5는 상기 나이트릴레이즈 효소들의 발현 패턴과 정제도를 잘 보여주고 있다.

[0082] **3. 나이트릴레이즈 활성 측정 결과**

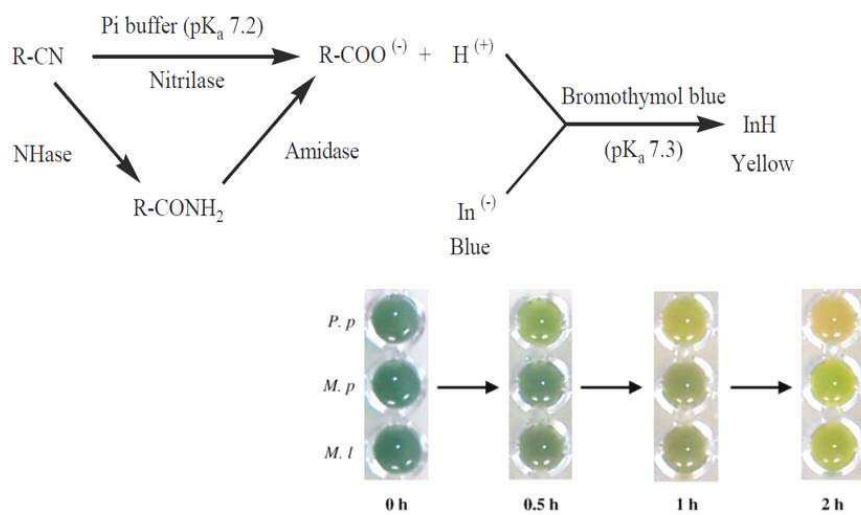
[0083] pH 민감성에 의한 비색분석법을 이용하여, 96-웰 마이크로플레이트에 총 반응양 230  $\mu$ l에 201  $\mu$ l의 인산용액 [10 mM 포스페이트(pH 7.2)]을 넣고, 0.01%가 되도록 브로모티몰 블루를 넣고, 5.75  $\mu$ l의 다양한 나이트릴 기질들(도 2; 500 mM stock in ethanol)을 넣고 마지막으로 23.25  $\mu$ l의 다양한 효소들(표 2 및 도 5)을 첨가하여 30 내지 50  $^{\circ}$ C에서 2 내지 4시간 반응시켰다.

[0084] 그 결과 만델로나이트릴(MAN) 기질에 대해서는 사용한 모든 효소가 2시간 만에 모두 노란색으로 바뀌어 나이트릴레이즈 효소 활성을 보임을 알 수 있었고, RMN2를 제외한 모든 효소들은 다른 기질(ACN, ACRN, AND, BEN, BUTN 및 CBEN)들에 대해서도 4시간째에 노란색에 가까워지는 것을 관찰할 수 있었다(도 6).

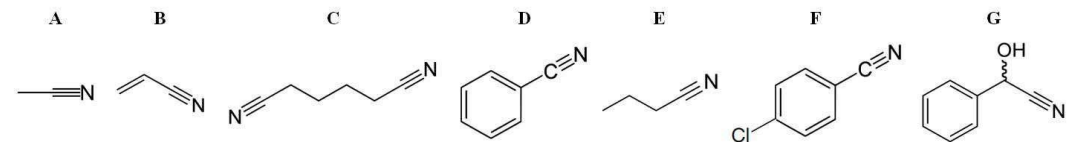
[0085] 이 결과들을 종합해 보면, 본 발명자들이 분리한 효소들은 만델로나이트릴 기질에 대해 높은 나이트릴레이즈 활성을 갖고 있으며 넓은 범위의 기질특이성을 보이는 효소들임을 확인할 수 있다.

**도면**

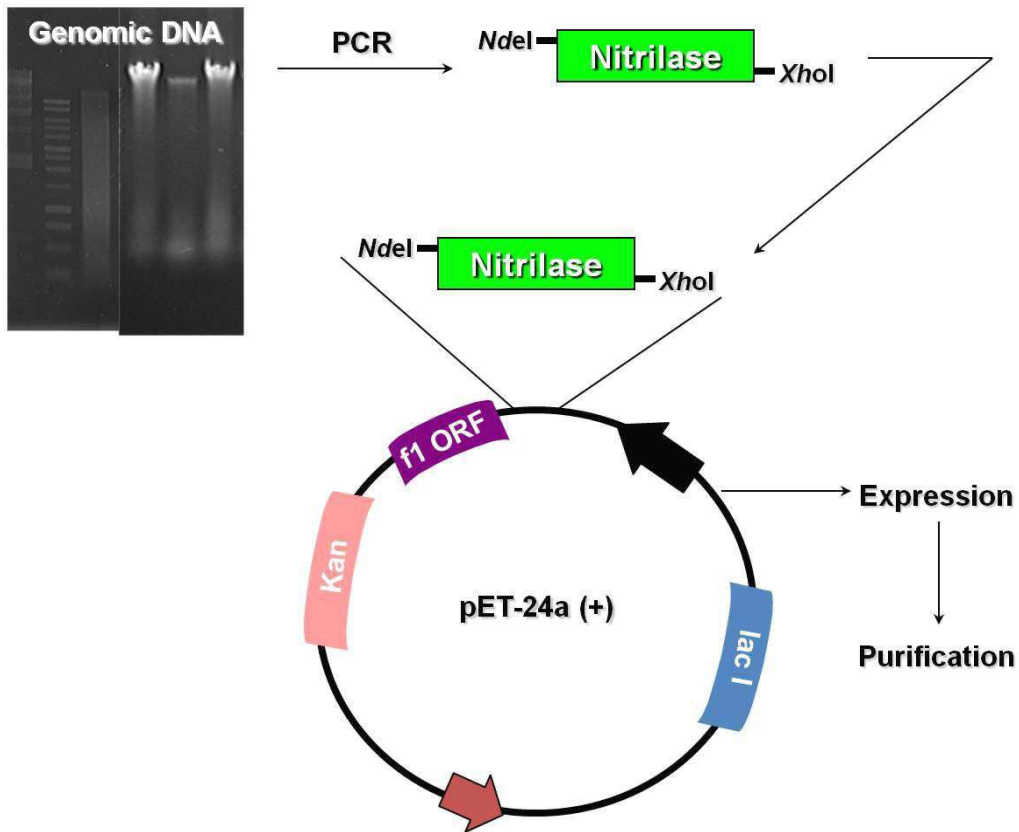
**도면1**



**도면2**



도면3



도면4

RMN1	-----MREVTVAAT	9
VMN1	-----MLQPLALESASDGGLSYPVVL	44
VMN2	-----MKKDKVASVQ	11
RMN2	-----MKLALAQ	7
ORN	-----MTQTVITVGLV	11
LBN	INDPVLDFQLSNDHFVKKRITITNYLEGDKQSKYAALEWDNIYYQKPAKKPNAIKTVVRL	240

RMN1	----QMPGQWDVSENKTAERLVREAAASGAQVILLDELFERPFYCOHQ--KEEFRRFA	62
VMN1	----LEVEYKNGMNI SRVSELLEAETAVG-DITLLPELFFSTGYIFND--AAEIHLC	95
VMN2	----FNHAGDKAYNLSVIEQYVQKAADSDVQIVSFPENCITGYWHVSALSRDEIEALA	66
RMN2	----QRFPVGDIDGNVDKILTLRSREAMAGADMVFPPELLTLGYPPED-----LLLR	55
ORN	----QMTSGKAVQPNLRAAEAAIKRCVEQGATTVLLPEMFVCLGVKNG-----VEIAQT	61
LBN	GLVQWQMRITYKNFEELFEQAEYFIDTISGYRSDFALFPEFFNAPLMAAYNHLSEPDARE	300

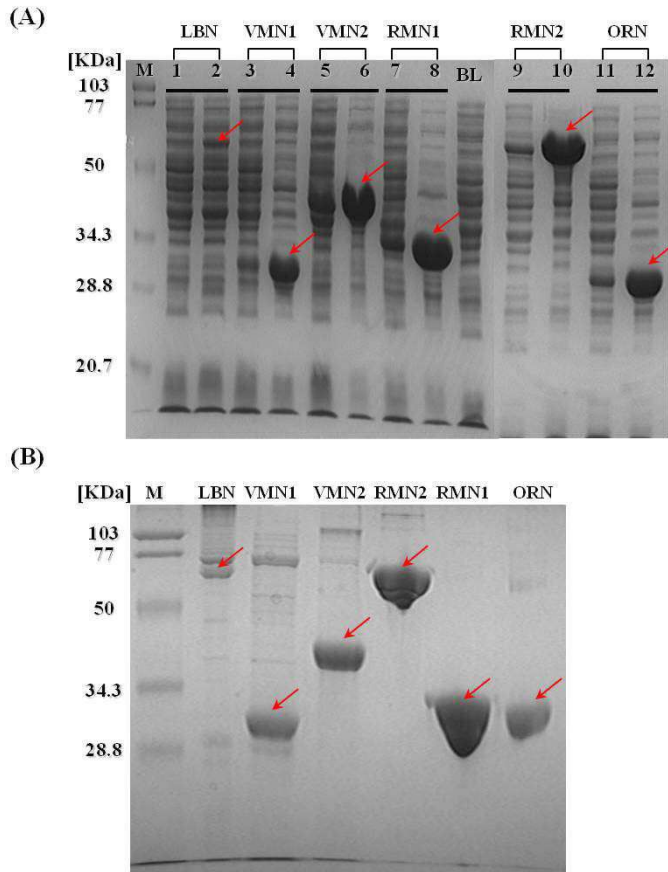
  

RMN1	TAIDDNPAIAHFAPIARELGWVLPISFF--EQCG-PVAYNSVVLDADGE-NLGLYRKH	118
VMN1	EDFNNSPTIDSLTALATKHOTLIVAGVA--EEDN-GQYNSVVVD--GSLRHKYS	150
VMN2	EPVPGGESTQKLI ALATQFGISVQAGLI--EGGIDGELYNTYVFAMPNGE--VQKHKLH	122
RMN2	PSLAKRVSQAMHRLFDARLPIAMVVGYP--QRED-GKLYNKVMVIS--EQQVIADYRKH	110
ORN	QQCKGGPVRSQLSALAKDFKVINI IAGSMLMSSVEDKVLAAQLVFAADGS-EVQYDKVH	120
LBN	LAKYTERIRDRESEL SVSYNIN IITGSMF--YMEDGTLVNGFLCKRDGT--IEKFKLH	356

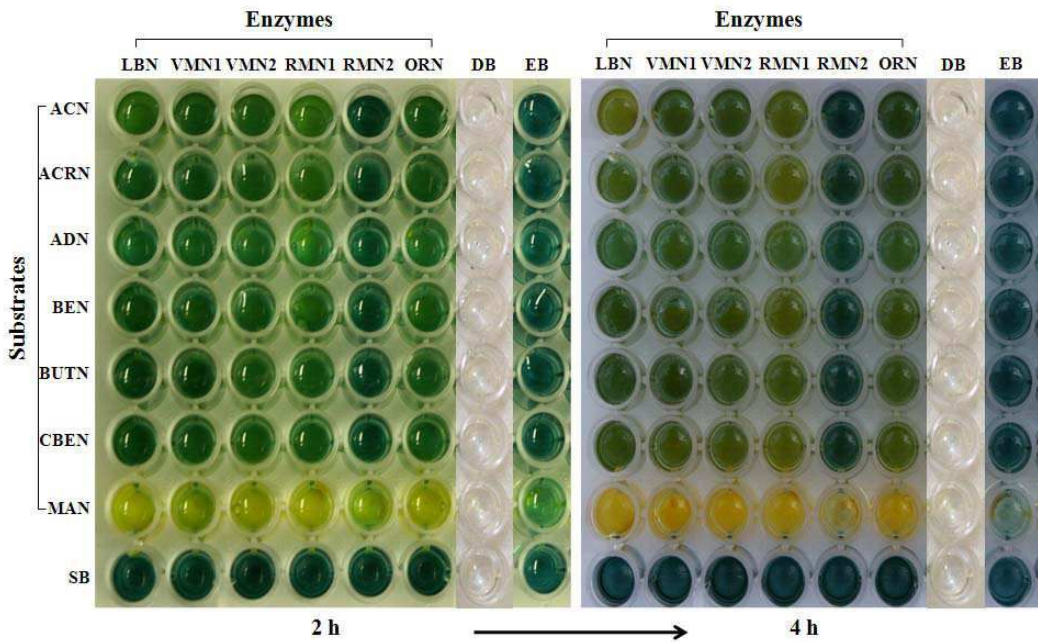
  

RMN1	IPDGPYCEKFFYTP----GDTGFQVSTRFGRI GVGICQDQWFPETARAMTLMGAEL-	172
VMN1	QT----KFDKEYFSR----GNE-LLTFEYKGLKFGVAICFDIWFPEIMR--PYQSDVQ-	197
VMN2	TF----VSPHMSS----GDQYTVFDTPHGCKVGI L I CQNNLVENVRITVLRGADI-	170
RMN2	LPNYQVDFDEKRYFQK----GDQ-TCVDFMGARIGLSICEDIIWYDGPARRAYEAGAI N	164
ORN	LFDVDVSDNKGRYRESDTFIAGTQSKTVSLDGTLYGLSVCDLRFPELYQDQKQSCQV-	179
LBN	VTP--DEAKAWGMS----GGEKLTFTDCCGKIGILICQDVEFPELGRLLADEGMDI-	407

도면5



도면6



서열 목록

<110> GYEONGBUK INSTITUTE FOR MARINE BIOINDUSTRY

KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

<120> Method for preparing a carboxylic acid using nitrilase ORN

<130> DPP20110090KR

<160> 30

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 289

<212> PRT

<213> Reinekea sp. MED297

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(289)

<223> amino acid sequences of nitrilase RMN1

<400> 1

Met Arg Glu Val Thr Val Ala Ala Thr Gln Met Pro Cys Gly Trp Asp  
 1 5 10 15

Val Ser Glu Asn Leu Lys Thr Ala Glu Arg Leu Val Arg Glu Ala Ala  
 20 25 30

Ala Ser Gly Ala Gln Val Ile Leu Leu Gln Glu Leu Phe Glu Arg Pro  
 35 40 45

Tyr Phe Cys Gln His Gln Lys Glu Glu Phe Arg Arg Phe Ala Thr Ala  
 50 55 60

Ile Asp Asp Asn Pro Ala Ile Ala His Phe Ala Pro Ile Ala Arg Glu  
 65 70 75 80

Leu Gly Val Val Leu Pro Ile Ser Phe Phe Glu Gln Cys Gly Pro Val  
 85 90 95

Ala Tyr Asn Ser Val Val Val Leu Asp Ala Asp Gly Glu Asn Leu Gly  
 100 105 110

Leu Tyr Arg Lys Thr His Ile Pro Asp Gly Pro Gly Tyr Cys Glu Lys  
 115 120 125

Phe Tyr Phe Thr Pro Gly Asp Thr Gly Phe Gln Val Phe Ser Thr Arg  
 130 135 140

Phe Gly Arg Ile Gly Val Gly Ile Cys Trp Asp Gln Trp Phe Pro Glu

145                      150                      155                      160

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

                                 165                      170                      175

Thr Ala Ile Gly Ser Glu Pro Tyr Asn Pro Asp Ile Asp Ser Ser Gly

                                 180                      185                      190

His Trp Gln Arg Thr Gln Gln Gly His Ala Ala Ala Asn Val Ile Pro

                                 195                      200                      205

Leu Ile Ala Ser Asn Arg Ile Gly Thr Glu Val Ile Asp Asp Thr Gln

                                 210                      215                      220

Ile Thr Phe Tyr Gly Ser Ser Phe Ile Ala Asp Asn Thr Gly Ala Leu

225                      230                      235                      240

Val Thr Ser Met Asp Arg Thr Ser Thr Gly Phe Ile Gln Ala Thr Phe

                                 245                      250                      255

Asp Leu Asp Ala Leu Asn Ala Gln Arg Ser Glu Trp Gly Leu Phe Arg

                                 260                      265                      270

Asp Arg Arg Pro Ser Gln Tyr Gly Thr Leu Met Thr Lys Asp Gly Arg

                                 275                      280                      285

Ala

<210> 2

<211> 870

<212> DNA

<213> Reinekea sp. MED297

<220><221> gene

<222> (1)..(870)

<223> nucleotide sequences of nitrilase RMN1

<400> 2

atgagagaag ttaccgtagc ggccacacag atgccctgtg gttgggacgt cagtgaaaat 60

ctcaagacgg cggaaaggct ggtacgcgaa gccgcggcca gcggggctca ggtcattctt 120

ttgcaggagc tgtttgaacg gccttacttc tgcagcadc agaaagaaga atttcggcgc 180

tttgccaccg ccatcgatga taaccgggcc attgcgcatt ttgccccat cgccccggaa 240

ctgggcgtgg tcttaccat cagctttttt gagcaatgcg gtccggtggc ctacaactcc 300



gtcgtttgtgc tggatgcgga tggcgaaaac ctgggtctgt atcggaaaac gcacattccg 360

gacgggtccc gctactgcga gaagttttat ttacccccg gagataccgg ttttcaggtg 420

ttttcgacgc gcttcgggcg catcggcgtc gggatctgct gggatcaatg gtttccgga 480

actgcgcggg cgatgacact gatgggggcg gaactgctgt tttaccgac cgccatcggc 540

agtgaacctt acaatccgga catcgattct tccggtcatt ggcagcgtac ccaacagggt 600

cacgcggcgg ccaatgtgat accgetgatt gccagcaacc gtataggac agaggtcac 660

gacgacactc agatcacctt ttacggttct tcgttcatcg ccgataacac gggcgactg 720

gtgacgtcga tggatgcac aagtaccggg tttatccagg caacgtttga tctggatgcc 780

ctgaacgctc agcgcagtga atgggggctg ttccgtgac gccggcccag tcagtatggc 840

acgttaatga ccaaagacgg acgcgcttag 870

<210> 3

<211> 538

<212> PRT

<213> Reinekea sp. MED297

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(538)

<223> amino acid sequences of nitrilase RMN2

<400> 3

Met Lys Leu Ala Leu Ala Gln Gln Arg Phe Pro Val Gly Asp Ile Asp

1 5 10 15

Gly Asn Val Asp Lys Ile Leu Thr Leu Ser Arg Glu Ala Met Ala Gln

20 25 30

Gly Ala Asp Met Ile Val Phe Pro Glu Leu Thr Leu Thr Gly Tyr Pro

35 40 45

Pro Glu Asp Leu Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ala Lys Arg Val Ser Gln

50 55 60

Ala Met His Arg Leu Phe Asp Ala Arg Leu Pro Ile Ala Met Val Val

65 70 75 80

Gly Tyr Pro Gln Arg Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Asn Lys Val Met Val

85 90 95

Ile Ser Glu Gly Gln Val Ile Ala Asp Tyr Arg Lys Gln His Leu Pro

100 105 110  
 Asn Tyr Gln Val Phe Asp Glu Lys Arg Tyr Phe Gln Lys Gly Asp Gln  
 115 120 125  
 Thr Cys Val Phe Asp Phe Met Gly Ala Arg Ile Gly Leu Ser Ile Cys  
 130 135 140  
 Glu Asp Ile Trp Tyr Asp Gly Pro Ala Arg Arg Ala Tyr Glu Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Ile Asn Leu Asn Ile Asn Gly Ser Pro Tyr Ser Ile Asn Arg  
  
 165 170 175  
 Thr Ala Glu Arg His Glu Gln Val Thr Arg Val Val Ser Gln Trp Pro  
 180 185 190  
 Met Ala Thr Val Tyr Val Asn His Val Gly Gly Gln Asp Glu Leu Val  
 195 200 205  
 Phe Asp Gly Gly Ser Phe Val Val Gly Ala Asp Ala Thr Val Gln Ala  
 210 215 220  
 Ser Leu Pro Glu Phe Gln Glu Ala Leu Gln Tyr Val Glu Leu Thr Gln  
 225 230 235 240  
  
 Glu Ala Asn Gly Trp Gln Val Lys Ser Gly Glu Val Thr Pro Pro Met  
 245 250 255  
 Ser Val Glu Ala Ala Leu Tyr Glu Ala Leu Lys Thr Gly Leu Ala Asp  
 260 265 270  
 Tyr Val Asn Arg Asn Arg Phe Pro Gly Val Val Leu Gly Met Ser Gly  
 275 280 285  
 Gly Ile Asp Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ile Ala Val Asp Ala Leu Gly  
 290 295 300  
 Pro Asp Arg Val Met Gly Val Met Met Pro Tyr His Tyr Thr Ala Lys  
  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Leu Glu Asp Ala Glu Asp Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ile Arg  
 325 330 335  
 Tyr Glu Val Leu Pro Ile Gly Glu Ala Phe Glu Ala Ala Leu Thr Thr  
 340 345 350  
 Leu Gln Pro Gln Phe Gly Asp Arg Pro Ala Asp Val Thr Glu Gln Asn

355                            360                            365  
 Met Gln Ser Arg Met Arg Gly Leu Phe Leu Met Ala Leu Ser Asn Lys  
 370                            375                            380

Thr Gly Asn Met Val Leu Thr Thr Gly Asn Lys Ser Glu Met Ala Val  
 385                            390                            395                            400

Gly Tyr Ala Thr Leu Tyr Gly Asp Met Cys Gly Gly Tyr Asn Cys Leu  
 405                            410                            415

Lys Asp Val Pro Lys Leu Trp Val Tyr Arg Leu Ser Arg Trp Arg Asn  
 420                            425                            430

Ser Phe Gly Glu Val Ile Pro Glu Arg Val Ile Thr Arg Pro Pro Ser  
 435                            440                            445

Ala Glu Leu Ala Pro Asp Gln Leu Asp Glu Asp Ser Leu Pro Pro Tyr

450                            455                            460

Glu Val Leu Asp Ala Ile Ile Glu Arg Tyr Val Glu His Asp Glu Ser  
 465                            470                            475                            480

Gln Gln Thr Ile Ile Glu Ser Gly Phe Asn Glu Asp Asp Val Lys Arg  
 485                            490                            495

Val Ile Arg Leu Ile Asp Leu Asn Glu Tyr Lys Arg Arg Gln Ala Pro  
 500                            505                            510

Glu Gly Val Arg Val Thr Lys Arg Gly Phe Gly Arg Asp Arg Arg Tyr  
 515                            520                            525

Pro Ile Thr His Gly Trp Ala Pro Gly Val

530                            535

- <210> 4
- <211> 1617
- <212> DNA
- <213> Reinekea sp. MED297
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1617)
- <223> nucleotide sequences of nitrilase RMN2
- <400> 4

tcagaccccc ggcgcccagc catgtgtaat cgggtagcgc cggtcacgac caaacccccg

cttagtgaca cgaacacct caggtgcctg acggcgctta tactcattca gatcaatcaa 120  
 ccgatgaca cgttgacat cgtcttcatt gaaaccggac tcgataatgg ttgtctgact 180  
 ttcatcatgc tcgacatagc gttcaatgat ggcatccagc acttcatagg gcggcaagct 240  
  
 gtcttcgtcc agctgatccg gagccagctc ggccgatggc ggtcgggtaa tgacccttc 300  
 agggattacc tctccaagg agttgcgcca gcgagacaag cgatacacc agagtttcgg 360  
 cacgtcttcc aaacagttat agccccaca catatcgccg tacaaggagg cgtatccgac 420  
 cgccatctca ctcttatgac cggtaggtcag caccatattg ccggttttgt tcgacaacgc 480  
 catcaaaaac aaccgcgca tacgcgattg catgttctgc tcggtaacat ccgccggccg 540  
 gtcacaaaac tgaggctgaa gcgtgggtaa gcgggcttca aatgcctcac cgatgggcag 600  
 cacttcgtat cggataccga gacgacgagc ttctgttctt gcatcctcca gagaaatfff 660  
  
 cgcggtgtag tgatagggca tcatcagcc catcaccga tcaggtecca gggcatccac 720  
 agcaatggcg gcacttaacg ccgagtcgat tccgcctgac ataccagaa ctacgcggg 780  
 gaagcggttt cgattgacat agtcggccag ccccgcttg agcgttcat agagcctgc 840  
 ctcgaccgac atcgcggtg ttacctgcc tgatttacc tgccagccat ttgcttctg 900  
 cgtcagctca acgtactgca atgcctcctg aaactcaggc aacgaagcct gcacggtggc 960  
 gtcagctccg acaacaaagg agccaccatc aaaaaccagt tcgtcctgac cacctacatg 1020  
 gtttacgtag acggtcgcca tcggccattg agacaccacc cgagtcacct gttcgtgacg 1080  
  
 ctctgctgtt cgattaatgg agtaaggct gccgttaata ttcagattga tctgcgcacc 1140  
 ggccatcatag gcacgacgcg ccgggccgtc ataccagatg tcttcgaaa tactcaatcc 1200  
 gatacgtgca cccatgaaat caaagacaca ggtctgatcc ccttctgaa aataccgctt 1260  
 ttcatcaaag acctgatagt ttggcaaatg ctgtttgagg tagtcggcaa tcacctgccc 1320  
 ttcgctgate accatgacct tgtttgaaag cttgccgtct tcacgttgag gatagccaac 1380  
 gaccatggca attggaagc gcgcatcaa caagcgatgc atggcctgac taacacgttt 1440  
 cgccagactc gggcgacgca aaagatcttc tggcgggtac ccggtcaagg tcagttccgg 1500  
  
 aaagacgac atactctgc cctgcgccat ggccctcacgg ctcagggtga gaatffffatc 1560  
 cacattgccc tcaatatctc cgactggaac acgctgctgg gccaatgcta acttcat 1617  
  
 <210> 5  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Oceanobacter sp. RED65  
 <220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(274)

<223> amino acid sequences of nitrilase ORN

<400> 5

Met Thr Gln Thr Val Ile Thr Val Gly Leu Val Gln Met Thr Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Val Glu Gln Gly Ala Thr Thr Val Leu Leu Pro Glu Met Phe Val

35 40 45

Cys Leu Gly Val Lys Asn Gln Val Glu Ile Ala Gln Thr Gln Cys Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Val Asn Ile Ile Ala Gly Ser Met Pro Leu Met Ser Ser Val Glu

85 90 95

Asp Lys Val Leu Ala Ala Cys Leu Val Phe Ala Ala Asp Gly Ser Glu

100 105 110

Val Cys Gln Tyr Asp Lys Val His Leu Phe Asp Val Asp Val Ser Asp

115 120 125

Asn Lys Gly Arg Tyr Arg Glu Ser Asp Thr Phe Ile Ala Gly Thr Gln

130 135 140

Ser Lys Thr Val Ser Leu Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Leu Ser Val Cys

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Arg Phe Pro Glu Leu Tyr Gln Gln Tyr Gln Lys Gln Ser

165 170 175

Cys Gln Val Val Thr Val Pro Ser Ala Phe Thr Tyr Thr Thr Gly Gln

180 185 190

Lys His Trp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Arg Ala Ile Glu Thr Gln Ser

195 200 205

Phe Val Met Ala Ala Asn Gln Val Gly Thr His Glu Asp Gly Arg Ile

210 215 220

Thr Trp Gly Gln Ser Ile Val Ile Asn Pro Asp Gly Glu Ile Val Gly

225                                    230                                    235                                    240

Glu Leu Asp Ser Glu Lys Ala Gly Glu Leu Val Val Glu Leu Asp Leu

    245                                    250                                    255

Glu Leu Cys Gln Lys Ile Arg Gln Ser Met Pro Leu Leu Lys His Lys

    260                                    265                                    270

Arg Leu

<210> 6

<211> 825

<212> DNA

<213> Oceanobacter sp. RED65

<220><221> gene

<222> (1)..(825)

<223> nucleotide sequences of nitrilase ORN

<400> 6

tcataatcgt ttatgcttca acaatggcat agactgacga atcttttgac agagttcaag 60

atcaagttca acaaccaact cacctgcttt ttcgctgtct aactcgccca ctattctec 120

gtctggattg atgacaatag attgccccca ggtgatgcgt ccatcctcgt gggtgcccac 180

ctgattcgcg gccataacaa aactttgagt ttcaatagct cttgccttta ataaggtcaa 240

ccaatgcttt tgacctgtgg tataaggtaaa cgcagagggt acggtcacga cctgacatga 300

ctgcttttga tactgttgat acaattcggg aaaacgcaaa tcatagcaaa cacttaaac 360

atacagagta cgtcaaggc taaccgtctt actttgagtc ccagctatga aagtatcaga 420

ttcacgataa cgacccttat tatcgcttac gtctacatca aacaaatgga ctttatcgta 480

ctggcaaacc tcgcttccat ctgcagcaaa aactaaacag gcagccaaca cttatcttc 540

aacgctggac atcaacggca tagaacctgc gataatattt accttaaat cctttgcaag 600

agcagataat tgagagcggg caggcccccc tttctgacat tgagtttgtg cgatctccac 660

ttgattcttt actcccaagc aaacaacat ttcaggaagt aaaacggtag tggcgccttg 720

ttctacacag cgetttatcg cagcctctgc tgctcgtaaa ttaggttga ctgctttgcc 780

actggtcate tgtaccaagc cgacggtaat cacagtttgc gtcac 825

<210> 7

<211> 297

<212> PRT

<213> Vibrio sp. MED222

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(297)

<223> amino acid sequences of nitrilase VMN1

<400> 7

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

1 5 10 15

Tyr Pro Val Val Leu Ser Leu Lys Phe Glu Val Leu Pro Ser Lys Asp

20 25 30

Ser Ile Leu Asn Ser Val Ser Val Thr Leu Val Gln Leu Glu Val Glu

35 40 45

Tyr Lys Asn Lys Gln Met Asn Ile Ser Arg Val Ser Glu Leu Leu Glu

50 55 60

Ala Glu Thr Ala Val Gly Asp Ile Thr Leu Leu Pro Glu Leu Phe Ser

65 70 75 80

Thr Gly Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Ala Glu Ile His Glu Leu Cys Glu

85 90 95

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

100 105 110

Lys His Gln Thr Leu Ile Val Ala Gly Val Ala Glu Glu Asp Asn Gly

115 120 125

Gln Tyr Tyr Asn Ser Val Val Val Val Asp Gly Ser Gly Leu Arg His

130 135 140

Lys Tyr Arg Lys Val Ser Gln Thr Lys Phe Asp Lys Glu Tyr Phe Ser

145 150 155 160

Arg Gly Asn Glu Leu Leu Thr Phe Glu Tyr Lys Gly Leu Lys Phe Gly

165 170 175

Val Ala Ile Cys Phe Asp Ile Trp Phe Pro Glu Ile Met Arg Pro Tyr

180 185 190

Gln Ser Val Asp Val Ile Leu His Pro Ala Asn Phe Gly Gly His His

195	200	205
Ser Phe Ala Ile Ala Gln Ala Arg Ala Leu Glu Glu Gly Cys His Ile		
210	215	220
Val Thr Cys Asn Arg Val Gly Gln Asp Val Val Asp Ala Phe Thr Ala		
225	230	235
240		
Thr Tyr Cys Gly Gly Ser Arg Thr Tyr Ser Pro Lys Gly Asp Leu Met		
245	250	255
Leu Gln Leu Ser Glu His Gln Ser Val Glu Thr Ile Asn Ile Gln Asp		
260	265	270

Leu Ser Ile Ala Pro Gln Tyr Asn Gly Val Asp Val Leu Asp Glu Ile		
275	280	285
Gln Gln Ile Ala Ser Ala Leu Asn Arg		
290	295	

<210> 8  
 <211> 894  
 <212> DNA  
 <213> Vibrio sp. MED222  
 <220><221> gene  
 <222> (1)..(894)  
 <223> nucleotide sequences of nitrilase VMN1  
 <400> 8

ttgcttcaac cattggcgt cgagtcagca agcgatgggg gattatctta cctgtcgtt	60
cttagtctca agttgaagt gttaccgagt aaggattcga ttttgaatag tgtcagcgtc	120
actcttgcc agcttgaagt tgaatacaaa aataa caaaa tgaacatctc gcgagtctct	180
gagcttttgg aagetgagac ggcagtggt gatatcacgt tgctgcctga actgttctct	240
actggatata tctttaacga tgccgcagaa attcatgaac tgtgtgaaga cttcaataac	300
agcccgacca ttgattcatt aactgcgctt gccacgaac atcagacgtt aatcgttgcg	360
ggtgtcgtg aggaagataa tggtcagtat tacaatagcg ttgtgggtgt tgatggttca	420
ggtttgcgtc ataaatacag aaaagtcagt caaacgaaat tcgacaaaga gtacttttct	480
agaggaaatg aacttttac ttttgaatac aaaggcttga agttcgggtgt cgcgatttgc	540
tttgatatat ggttcccgga gatcatgaga ccgtatcagt cggtagacgt tatttccat	600
cctgcgaatt ttggtgtca tcatagcttt gccattgcac aagcaagagc gttagaagaa	660



gggtgcatata tcgtgacctg taatcgcgtc gggcaagatg tggttgatgc ctttaccgcg 720  
 acatattgtg gcggcagtag aacctattca ccgaaggag acttaatgct tcaactcagt 780  
 gagcatcagt ctgttgaaac gattaatatt caagacttgt ctattgcgcc tcaatacaat 840  
 ggtgttgatg tgttagatga aatacaacag atagcgtctg cgttgaatcg ttaa 894

<210> 9  
 <211> 320  
 <212> PRT

<213> Vibrio sp. MED222

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(320)

<223> amino acid sequences of nitrilase VMN2

<400> 9

Met Lys Lys Asp Ile Lys Val Ala Ser Val Gln Phe Asn His His Ala

1 5 10 15

Gly Asp Lys Ala Tyr Asn Leu Ser Val Ile Glu Gln Tyr Val Gln Lys

20 25 30

Ala Ala Asp Ser Asp Val Gln Ile Val Ser Phe Pro Glu Met Cys Ile

35 40 45

Thr Gly Tyr Trp His Val Ser Ala Leu Ser Arg Asp Glu Ile Glu Ala

50 55 60

Leu Ala Glu Pro Val Pro Gly Gly Glu Ser Thr Gln Lys Leu Ile Ala

65 70 75 80

Leu Ala Thr Gln Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Gly Leu Ile Glu Gln

85 90 95

Gly Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Asn Thr Tyr Val Phe Ala Met Pro Asn

100 105 110

Gly Glu Val Gln Lys His Arg Lys Leu His Thr Phe Val Ser Pro His

115 120 125

Met Ser Ser Gly Asp Gln Tyr Thr Val Phe Asp Thr Pro His Gly Cys

130 135 140

Lys Val Gly Ile Leu Ile Cys Trp Asp Asn Asn Leu Val Glu Asn Val

145 150 155 160

Arg Ile Thr Val Leu Lys Gly Ala Asp Ile Leu Ile Ala Pro His Gln  
 165 170 175

Thr Gly Gly Cys His Ser Arg Ser Pro Asn Ala Met Lys Arg Ile Asp  
 180 185 190

Pro Glu Leu Trp Phe Asn Arg Asp Glu Asn Pro Asp Ala Ile Arg Ala  
 195 200 205

Glu Met Gln Gly Lys Asn Gly Arg Glu Trp Leu Met Arg Trp Leu Pro  
 210 215 220

Ala Arg Ala His Asp Asn Gly Leu Phe Val Val Phe Ser Asn Gly Val  
 225 230 235 240

Gly Val Asp Met Asp Glu Val Arg Thr Gly Asn Ala Met Ile Leu Ser  
 245 250 255

Pro Tyr Gly Glu Ile Ile Ala Glu Thr Asp Ser Val Asp Asn Asp Met  
 260 265 270

Val Ile Ala Glu Leu Lys Ala Glu Glu Leu Asp Met Cys Thr Gly Arg  
 275 280 285

Arg Trp Ile Arg Gly Arg Lys Pro Glu Leu Tyr His Ser Leu Thr Gln  
 290 295 300

Pro Leu Gly His Glu Leu Asp Pro His Gln Ala Arg Phe Ala Glu Lys  
 305 310 315 320

<210> 10

<211> 963

<212> DNA

<213> Vibrio sp. MED222

<220><221> gene

<222> (1)..(963)

<223> nucleotide sequences of nitrilase VMN2

<400> 10

atgaagaaag acatcaaagt agcgtcgggt caatttaacc accacgcagg tgataaggcg 60  
 tataacttat cggttataga gcaatacgtt caaaaggctg cggacagtga cgtgcagatc 120  
 gtcagtttcc cggagatgtg catcactggc tactggcatg tgtctgcttt gtcgagat 180  
 gagattgaag cgtagcggga acctgtaccg ggtggtgaat cgactcaaaa gctgattgca 240

ctggcaacac agtttgaat cagtgttggc gcgggcttga tagagcaggg catcgatggc 300  
 gaattataca acacctactg attcgccatg cccaatggtg aggtacaaaa gcaccgtaaa 360  
 ctgcacacct tcgttagccc acatatgagc agtggcgacc aatacacagt gtttgatacg 420

cctcatgggt gcaaagtcgg tatcttgatt tgttgggata acaacttggg tgagaacgtc 480  
 aggatcactg ttttgaagg cgccgatata ttgattgcgc cacaccaaac gggcggttgt 540  
 cattcacgaa gccgaacgc gatgaagcga attgaccctg agttatggtt taaccgagat 600  
 gaaaaccag atgcgattcg tgcagaaatg cagggcaaga atggccgcga gtggctaatg 660  
 cgttggctgc ctgaagagc gcacgataac ggcctctttg tgggtttcag taatggtgta 720  
 ggtgttgata tggacgaagt gaggacaggc aacgcgatga tcttgagccc ttacggtgaa 780  
 atcattgctg agaccgatag tgttgataac gatatggtga ttgcagagct aaaagcagaa 840

gagttagata tgtgtacggg cagacgttgg attcgtggtc gtaagccaga getttatcat 900  
 tcaactcacac aacctcttgg tcatgaactt gatccgcacc aagcgcgttt tgctgagaaa 960  
 taa 963

<210> 11

<211> 523

<212> PRT

<213> Leeuwenhoekiella blandensis MED217

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(523)

<223> amino acid sequences of nitrilase LBN

<400> 11

Met Lys Glu Val Asp His Ile Asp Asn Ser Asp Ser Ala Glu Lys Arg  
 1 5 10 15

Glu Arg Ile Asp Thr Ile Asn Leu Glu Tyr Leu Lys Val Lys Asp Phe  
 20 25 30

Glu Glu Leu Lys Glu Ile Met Ile Ala Val Tyr Pro Asn Ile Pro Asp  
 35 40 45

Pro Tyr Trp Lys Lys Lys Glu Leu Gln Lys Leu Val Ser Ile Phe Pro  
 50 55 60

Glu Gly Gln Val Val Val Lys Val Asn Gly Glu Ile Ala Gly Cys Ala  
 65 70 75 80

Leu Ser Ile Val Val Asp Tyr Glu Lys Phe Ser Asp Ser His Thr Tyr  
 85 90 95  
 Met Glu Ile Thr Gly Asp Glu Thr Phe Ser Thr His Thr Pro Lys Gly  
 100 105 110  
 Asn Val Leu Tyr Gly Ile Asp Ile Phe Ile Ser His Lys Tyr Arg Gly  
 115 120 125  
 Met Arg Ile Gly Arg Arg Leu Tyr Asp Tyr Arg Lys Glu Leu Cys Glu  
 130 135 140  
 Asn Leu Asn Leu Glu Arg Ile Val Phe Gly Gly Arg Leu Pro Asn Tyr  
 145 150 155 160  
 His Gln Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Pro Lys Ala Tyr Ile Glu Lys Val  
 165 170 175  
 Arg Ala Arg Glu Ile Asn Asp Pro Val Leu Asp Phe Gln Leu Ser Asn  
 180 185 190  
 Asp Phe His Val Lys Arg Ile Ile Thr Asn Tyr Leu Glu Gly Asp Lys  
 195 200 205  
 Gln Ser Lys Glu Tyr Ala Ala Leu Leu Glu Trp Asp Asn Ile Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Gln Lys Pro Ala Lys Lys Pro Asn Ala Ile Lys Thr Val Val Arg Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Val Gln Trp Gln Met Arg Thr Tyr Lys Asn Phe Glu Glu Leu  
 245 250 255  
 Phe Glu Gln Ala Glu Tyr Phe Ile Asp Thr Ile Ser Gly Tyr Arg Ser  
 260 265 270  
 Asp Phe Ala Leu Phe Pro Glu Phe Phe Asn Ala Pro Leu Met Ala Ala  
 275 280 285  
 Tyr Asn His Leu Ser Glu Pro Asp Ala Ile Arg Glu Leu Ala Lys Tyr  
 290 295 300  
 Thr Glu Arg Ile Arg Asp Arg Phe Ser Glu Leu Ser Val Ser Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Asn Ile Ile Thr Gly Ser Met Pro Tyr Met Glu Asp Gly Thr Leu

325                      330                      335  
 Tyr Asn Val Gly Phe Leu Cys Lys Arg Asp Gly Thr Ile Glu Lys Phe  
 340                      345                      350  
 Tyr Lys Leu His Val Thr Pro Asp Glu Ala Lys Ala Trp Gly Met Ser  
 355                      360                      365  
 Gly Gly Glu Lys Leu Lys Thr Phe Asn Thr Asp Cys Gly Lys Ile Gly  
  
 370                      375                      380  
 Ile Leu Ile Cys Tyr Asp Val Glu Phe Pro Glu Leu Gly Arg Leu Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Ala Asp Glu Gly Met Asp Ile Leu Phe Val Pro Phe Leu Thr Asp Thr  
 405                      410                      415  
 Gln Asn Gly Tyr Ser Arg Val Arg His Cys Ala Gln Ala Arg Ala Ile  
 420                      425                      430  
 Glu Asn Glu Cys Tyr Val Ala Ile Ala Gly Ser Val Gly Asn Ile Pro  
 435                      440                      445  
  
 Lys Val His Asn Met Asp Met Gln Phe Ala Gln Ser Met Val Leu Thr  
 450                      455                      460  
 Pro Cys Asp Phe Gln Phe Pro Thr Asn Gly Val Lys Ala Glu Ala Thr  
 465                      470                      475                      480  
 Pro Asn Ala Glu Met Ile Leu Val Ala Asp Val Asp Leu Asp Leu Leu  
 485                      490                      495  
 Lys Glu Leu Asn Gln Phe Gly Ser Val His Asn Leu Val Asp Arg Arg  
 500                      505                      510  
 Lys Asp Leu Phe Gln Leu Lys Trp Lys Lys Lys

- <210> 12
- <211> 1572
- <212> DNA
- <213> Leeuwenhoekiella blandensis MED217
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1572)
- <223> nucleotide sequences of nitrilase LBN

<400> 12

ctatTTTTTc ttccacttaa gctgaataa atctTTTTctt cggTctacca aattatgaac 60  
actaccaaT tgatttagtt ctttcaatag atcaagatct acatctgcaa cgagaatcat 120  
ctcagcattt ggcgtcgctt ccgccttaac gccgtttgta ggaaactgaa agtcacaggg 180  
tgTtaacacc atacttttgTg caaatTgcat atccatatta Tgtacttttg ggatgttccc 240

cacgcttccg gcgatagcca cataacattc gttctcaata gcccgTgcct gcgcacaaTg 300  
acgcacacgg ctgtatccat tttgcgtatc ggTtaagaag ggaacgaaga gaatatccat 360  
tccttcatct gctagTaaac gacccaattc Tggaaactca acatcataac aaatgaggat 420  
tccaatctta ccgcaatcgg tattgaaggt tttcagtttt Tcgccaccgc tcatcccca 480  
ggctttggct TcgtccggTg ttacgtgcag ttataaaac ttttctatcg Taccgtcacg 540  
tttacataag aatcccagT tatacaacgt accgtcttcc atatacgga tactccctgt 600  
aatgatattg atattatagc Taccgaaaag ctcaactaac cgatctctta Tgcgctcggt 660

atattttgct aattctcgta Tcgcatcagg ttctgataag Tgattgtacg ctgccataag 720  
cggagcatta aagaactctg gaaacaatgc aaagtctgaa cgataccag aatggtgtc 780  
gataaaatat Tcggcctgct caaaaagTtC ttcaaaattt ttataggtac gcattcgcca 840  
ttgcaccaag cctaaacgta caacggtttt gatcgcatTT ggctTTTTtg ccggctTTtg 900  
ataatagata ttgtccatt cTaaaagcgc cgcatactct tttgattgct tatctcttc 960  
taggtaattt gtaataatcc gttttacgtg aaaatcatta ctcaactgaa agtcaagcac 1020  
gggatcgTta atctcacgG cacgcacttt ctctatgtag gcttttgag aaagtcttt 1080

ggcatactga Tgatagttgg gTaatcttcc gccaaaaaca atgcgttcta aattaagatt 1140  
ctcacacaat Tctttacgat aatcataaag acgtcgacca atgcgatgc cacggtactt 1200  
atgagaaata aagatatcta Taccgtacaa tacatttccc ttgggcgtat gcgtactaaa 1260  
agtttcatcg cctgtgattt ccatataggt atgcgaatca gaaaacttct cgtaatctac 1320  
cacgatagaa agggcacaac cagcgatctc cccgtttacc ttgaccacta cttgacctc 1380  
cggaaaaatg gaaaccagtt tttgcagctc cttttcttc caataaggat ctggaatatt 1440  
gggataaaca gcgatcatga Tctccttgag ttcttcaaag tctttactt tTaaactc 1500

aagattgatg gtgtctatgc gttcgcgctt ttctgcactg tctgaattat ctatgtgatc 1560  
tacttctttc at 1572

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer lbnF  
 <400> 13  
 cgaccggca tatgaaagaa gtagatcaca tagat 35  
 <210> 14  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer lbnRH  
 <400> 14  
 ctccacatct cgagtttttt cttccactta agctgaaa 38  
  
 <210> 15  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer lbnRX  
 <400> 15  
 ctccacatct cgagctatatt tttcttccac ttaagctg 38  
 <210> 16  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer ornF  
 <400> 16  
 cgaccggca tatgacgcaa actgtgatta ccgt 34  
 <210> 17  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer ornRH  
  
 <400> 17  
 ctccacatct cgagtaatcg tttatgcttc acaatgg 38  
 <210> 18

<211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer ornRX  
 <400> 18  
 ctccacatct cgagtcataa tcgtttatgc ttcaacaa 38  
 <210> 19  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer rmn1F  
 <400> 19  
 cgacccggca tatgagagaa gttaccgtag cgg 33  
 <210> 20  
  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer rmn1RH  
 <400> 20  
 ctccacatct cgagagcgcg tccgtctttg gtcatt 36  
 <210> 21  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer rmn1RX  
 <400> 21  
 ctccacatct cgagctaagc gcgtccgtct ttggtc 36  
 <210> 22  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer rmn2F  
 <400> 22



cgaccggca tatgaagtta gcattggccc agc 33  
 <210> 23  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer rmn2RH  
 <400> 23  
 ctccacatct cgaggacccc cggcgcccag ccat 34  
 <210> 24  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer rmn2RX  
 <400> 24  
 ctccacatct cgagtcagac ccccgcgccc cagc 34  
 <210> 25  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer vmn1F  
 <400> 25  
 cgaccggca tatgcttcaa ccattggcgc tcg 33  
 <210> 26  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer vmn1RH  
 <400> 26  
 ctccacatct cgagacgatt caacgcagac gctatc 36  
 <210> 27  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer vmn1RX

<400> 27  
ctccacatct cgagttaacg attcaacgca gacgcta 37

<210> 28  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> forward primer vmn2F  
<400> 28  
cgaccgggc atggctaaga aagacatcaa agtagcg 37

<210> 29  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> reverse primer vmn2RH  
<400> 29  
ctccacatct cgagtttctc agcaaaacgc gcttgg 36

<210> 30  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> reverse primer vmn2RX  
<400> 30  
ctccacatct cgagttatct ctcagcaaaa cgcgctt 37