(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월08일
(11) 등록번호 10-1610911
(24) 등록일자 2016년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/90 (2006.01) *C12N 15/61* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0052705
(22) 출원일자 2013년05월09일
심사청구일자 2014년04월25일
(65) 공개번호 10-2014-0133680
(43) 공개일자 2014년11월20일
(56) 선행기술조사문헌
Biochemistry, Vol. 39, No. 16, P.p. 4821-4830 (2000.04.25.)

(73) 특허권자
주식회사 삼양사
서울특별시 종로구 종로33길 31 (연지동)
(72) 발명자
김혜정
경기 부천시 원미구 상동로117번길 64, 2333동 2403호 (상동, 라일락마을)
허진솔
인천 남동구 백범로124번길 126, 411동 1008호 (만수동, 만수주공아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
팬코리아특허법인

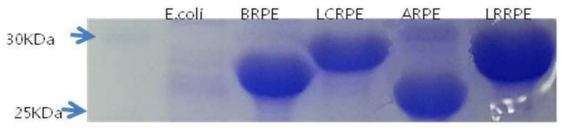
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 이용한 과당에서 타가토스 생산**

(57) 요 약

L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 과당 4-에피머화 효소로의 신규한 용도, 및 이를 이용하여 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

박종진

대전 유성구 엑스포로 448, 102동 104호 (전민동, 엑스포아파트)

이강표

서울 중랑구 신내로21길 16, 512동 104호 (묵동, 신내대림아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 유효성분으로 포함하는, 과당의 4-에피머화 효소 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 에시도써머스 셀루로리티쿠스 (*Acido thermos cellulolyticus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 박테로이데스 자일란이솔번스(*Bacteroides xylanisolvens*), 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)로 이루어진 군에서 선택된 미생물로부터 유래된 것인, 과당의 4-에피머화 효소 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 다음의 특성을 갖는 것인, 과당의 4-에피머화 효소 조성물:

(1) 단량체의 분자량: 22 내지 30 kDa;

(2) 최적 활성 pH: pH 6 내지 8;

(3) 최적 활성 금속 이온 농도: 0.1 내지 5mM; 및

(4) 최적 활성 온도: 45 내지 75℃.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 과당의 4-에피머화 효소 조성물, 상기 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함하는, 과당으로부터 타가토스를 생산하는, 타가토스 생산용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 아연 이온, 망간 이온, 니켈 이온, 철 이온, 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 금속이온을 추가로 포함하는, 타가토스 생산용 조성물.

청구항 7

제5항의 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시키는 단계를 포함하는, 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 반응은 45 내지 75℃에서 수행되는 것인, 타가토스를 생산하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 반응은 pH 6.0 내지 8.0에서 수행되는 것인, 타가토스를 생산하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 과당의 농도는 1 내지 10%(w/v)인 타가토스를 생산하는 방법.

청구항 11

서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 L-리불로스 5-인산 에피머화 효소를 이용하여 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, L-리불로스 5-인산 에피머화 효소가 과당의 4번째 탄소 위치를 에피머화하여 타가토스로 전환하는 단계를 포함하는, 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 과당 4-에피머화 효소로의 신규한 용도, 및 이를 이용하여 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0002] D-타가토스(D-tagatose)는 자연계에 드물게 존재하는 희소당의 하나로 설탕의 90%의 단맛을 가지고 있으며, 감미질 또한 설탕과 유사하다. 타가토스 섭취시 거의 대사되지 않아 열량으로 사용되지 않으며 당알콜이 가지고 있는 설사유발 특징을 가지고 있지 않아 설탕 대체재로 식품에 다양하게 사용할 수 있다. 또한, D-타가토스는 혈당억제와 인체의 기능적으로 우수한 몇몇 유산균의 증식을 도와주는 신바이오틱 기능이 있어 정장작용에 기여하며, 비충치성, 저칼로리의 특징이 있어 일반인 뿐 만 아니라 비만, 당뇨 등 대사성 질환을 가진 사람에게 유용한 감미료로 유용할 수 있다.

[0003] 타가토스는 2003년 알라 푸드 (Arla Foods)사에 의해 $Ca(OH)_2$ 촉매를 사용한 화학적 방법으로 갈락토스로부터 생산하여 산업화 하였다. 이 방법은 이성화 전환율은 좋으나 전체 생산 공정이 복잡하여 전체 수율 면에서 떨어지는 단점이 있고, 대부분의 화학 공정과 같이 고온, 고압 환경에서 촉매제의 사용으로 환경적으로 취약한 공정이다.

[0004] 이러한 문제를 해결하기 위한 대안으로, 효소를 사용한 생물학적 방법에 의한 타가토스의 생산이 제안되어 왔다. 현재, 생물학적 방법에 의한 타가토스 생산 방법으로는 L-아라비노스 이성화 효소(L-arabinose isomerase; EC 5.3.1.5)를 사용한 방법이 유일하다. L-아라비노스 이성화 효소는 생체내에서 L-아라비노스를 L-리불로스로 전환하는 기능을 가진 효소로서, 시험관 내에서는 넓은 기질 특이성을 가지고 있어 구조적으로 비슷한 당인 갈락토스를 타가토스로 전환할 수 있다. 써모토가 네아폴리타나 속 (Byoung뼳han Kim, et al. 2006), 써모언에어로박터 마스라니속 (F Jorgensen et. al. 2004), 및 지오바실러스 써모데니트리피컨스(Hye-Jung Kim et. al. 2005) 유래의 아라비노스 이성화 효소를 대장균에 과발현 시켜 갈락토스에서 타가토스를 생산하는 방법이 연구되어 왔다.

[0005] 산업적으로 타가토스 생물학적 생산은 유당을 가수분해한 후 갈락토스를 기질로 하여 아라비노스 이성화 효소를 사용하여 생산한다. 원료인 유당의 가격은 매우 유동적이고 비싸게 공급되고 있어, 타가토스 시장 진입 시 높은 가격 형성하기 때문에 산업화에 걸림돌이 되고 있다.

[0006] 따라서, 타가토스 산업화에 가장 큰 문제인 원료의 가격적 문제를 해결하기 위하여 자연계에서 손 쉽게 구할 수 있는 값싼 원료를 이용하여 타가토스를 제조하는 기술의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 예는 과당의 4-에피머화 효소 단백질을 제공한다. 상기 효소 단백질은 과당의 4번 탄소 위치를 에피머화하여 과당을 타가토스로 전환시키는 활성을 갖는다.

[0008] 다른 예는 상기 효소 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 또는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 균주를 제공한다.

[0009] 다른 예는 상기 효소 단백질, 상기 효소 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를

포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 균주로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 타가토스 생산용 조성물을 제공한다.

[0010] 다른 예는 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시키는 단계를 포함하는 타가토스 생산 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 타가토스 산업화에 가장 큰 문제인 원료의 가격적 문제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 포도당과 같이 자연계에서 손 쉽게 구할 수 있는 값싼 원료를 사용하는 방안이 제안된다.

[0012] 이에, 본 발명의 일 예는 포도당에서 과당으로 이성화하여 과당을 타가토스로 전환할 수 있는 효소를 개발하는 것을 목적으로 한다. 포도당에서 과당으로 이성화하는 방법은 이미 산업적으로 확립이 되어, 안정한 형태로 생산되고 있다. 과당으로부터 타가토스를 생산하는 가장 핵심이 되는 효소는 4-에피머화 효소이며, 현재까지 알려진 당류 4-에피머화 효소로는 핵산 활성형인 UDP 글루코스 4-에피머화 효소와 인산 활성형인 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소가 있다.

[0013] UDP 글루코스 4-에피머화 효소는 UDP 글루코스를 UDP 프락토스로 전환하는 효소로서, 과당에서 타가토스로 전환이 일어나지만 그 전환율이 극히 낮은 수준이어서, 산업적으로 적용하기에 난점이 있다. 이는 UDP 글루코스 4-에피머화 효소의 단백질 구조에서 기질 부착 부위가 넓기 때문에 단당인 과당이 기질 부착 부위에 들어 갔을 때 촉매 반응이 일어나기가 힘들기 때문이다. 분자 진화법을 이용한 효소 개량에 의해서도 약 3배 정도의 활성 증가를 보였으나 산업화에 적합한 활성까지는 미치지 못하였다.

[0014] L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 5번째 탄소가 인산화된 L-리불로스의 4번째 탄소를 에피머화 하여, 5번째 탄소가 인산화된 L-자일룰로스로 전환하는 효소이다. L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 UDP 글루코스 4-에피머화 효소보다 기질 결합 부위가 비교적 좁은 편이고 다른 에피머 효소와는 다른 메커니즘으로 에피머화를 수행한다. 현재까지 이 효소를 일반당에 적용한 경우에 대한 연구는 전무하다.

[0015] 이에, L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소들을 대상으로 과당에서 타가토스로의 전환이 가능한 유전자를 선별하여 타가토스로의 전환능이 있는 단백질에 대한 정보를 제공하고자 한다. 이를 위하여, 현재까지 그 기능이 밝혀지지 않은 폴리뉴클레오타이드 중에서, 유전자 은행의 정보를 이용하여 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 암호화하는 유전자를 스크리닝한 결과, 에시도써머스 셀루로리티쿠스 (*Acido thermos cellulolyticus*, 예컨대 ATCC 43068), 락토바실러스 카세이 (*Lactobacillus casei*, 예컨대 ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*, 예컨대, KCTC3594) 등으로 이루어진 군에서 선택된 미생물 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 암호화하는 유전자가 과당을 타가토스로 전환할 수 있는 효소를 발현할 수 있음을 최초로 밝혔다. 이를 기초로, 안전한 단백질 과발현을 위하여 최적화된 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하고, 이를 소정의 벡터에 삽입하고 숙주 세포에서 발현시켜, 고효율로 과당을 타가토스로 전환하는 활성을 갖는 효소를 확보함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0016] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.

[0017] 본 발명의 일 예는 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 유효성분으로 포함하는, 과당의 4-에피머화 효소 조성물을 제공한다. 상기 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 L-5-인산화 리불로스를 L-5-인산화 자일룰로스로 전환시키는 생화학적 기능을 갖는 효소이나, 본 발명에서 과당의 4번째 탄소 위치에서 에피머화 반응을 일으켜 타가토스로 전환 할 수 있는 기능을 가짐이 새롭게 발견되었다. 따라서, 본 발명은 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 과당의 4-에피머화 효소로서의 새로운 용도에 관한 것이다. 다르게 표현하면, 본 발명은 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 과당으로부터 타가토스를 제조하기 위한 새로운 용도에 관한 것이다

[0018] 다른 예는 L-리불로스 5-인산 에피머화 효소를 이용하여 과당으로부터 타가토스를 생산하는 방법을 제공한다.

[0019] 상기 효소 조성물 및 방법에서 상기 L-리불로스 5-인산 에피머화 효소는 과당(예컨대, D-fructose)의 4번 탄소 위치를 에피머화함으로써 과당을 타가토스(예컨대, D-tagatose)로 전환함으로써 과당으로부터 타가토스를 생산하는 기능을 갖는다.

[0020] 일 구체예에서, 상기 과당의 4-에피머화 효소 조성물에 유효성분으로 포함된 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소(이하, '효소 단백질'이라 칭함)는 에시도써머스 셀루로리티쿠스 (*Acido thermos cellulolyticus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 박테로이데스 자일란이솔번스(*Bacteroides xylanisolvens*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 등으로 이루어진 군에서 선택된 미생물로부터 유래된 효소 단백질일 수 있다.

보다 구체적으로, 상기 효소 단백질은, 예컨대, 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068 (*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068) 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A (*Bacteroides xylanisolvens* XB1A), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 등으로 이루어진 군에서 선택된 미생물로부터 유래된 것일 수 있다.

[0021] 보다 구체적으로, 상기 효소 단백질은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 효소 단백질은, 과당의 4번 탄소 위치를 에피머화함으로써 과당을 타가토스로 전환하는 기능을 유지하는 범위에서, 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열 중 일부가 다른 아미노산으로 치환되거나, 삽입 또는 결실된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 효소 단백질은, 과당의 4번 탄소 위치를 에피머화함으로써 과당을 타가토스로 전환하는 기능을 유지하면서, 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열과 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0022] 상기 효소 단백질, 예컨대, 서열번호 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 효소 단백질, 또는 상기 아미노산 서열과 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 효소 단백질은 다음으로 이루어진 특성 중 하나 이상을 갖는 것일 수 있다:

[0023] (1) 소디움 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동법(SDS-PAGE)으로 측정된 단량체의 분자량: 22 내지 30 킬로달톤, 또는 24 내지 27 킬로달톤;

[0024] (2) 최적 활성 pH: pH 6 내지 8, pH 6.5 내지 7.5, 또는 약 pH 7.0;

[0025] (3) 최적 활성 금속 이온 농도: 0.1 내지 5 mM, 0.1 내지 2mM, 0.5 내지 1.5mM, 또는 약 1mM; 및

[0026] (4) 최적 활성 온도: 45 내지 75℃, 50 내지 70℃, 또는 55 내지 65℃.

[0027] 상기 금속이온은 구리 이온, 망간 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 아연 이온, 니켈 이온, 코발트 이온, 철 이온, 알루미늄 이온 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 0.1 내지 5 mM의 아연 이온, 망간 이온, 철 이온, 니켈 이온, 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0028] 다른 예는 상기 효소 단백질을 암호화 하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 또 다른 예는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 예는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 균주를 제공한다.

[0029] 상기 폴리뉴클레오타이드는, 예컨대, 서열번호 2(서열번호 1의 효소 단백질을 암호화하는 대장균에 최적화된 염기서열), 서열번호 3(서열번호 1의 효소 단백질을 암호화하는 ATCC43068 유래 유전자의 염기서열), 서열번호 5(서열번호 4의 효소 단백질을 암호화하는 대장균에 최적화된 염기서열), 서열번호 6(서열번호 4의 효소 단백질을 암호화하는 ATCC334 유래 유전자의 염기서열), 서열번호 8(서열번호 7의 효소 단백질을 암호화하는 XB1A 유래 유전자의 염기서열), 또는 서열번호 10(서열번호 9의 효소 단백질을 암호화하는 KCTC3594 유래 유전자 염기서열)의 염기서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기한 염기서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 본 명세서에서 "실질적인 동일성"이라 함은, 상기한 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 8, 또는 서열번호 10의 염기서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 정렬된 서열을 분석한 경우에, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 98% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 갖는 것을 의미한다.

[0030] 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체로 이용되거나, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터의 형태로 이용될 수 있다.

[0031] 상기 재조합 벡터란 목적한 폴리뉴클레오타이드와, 특정 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 상기 폴리뉴클레오타이드를 발현하는데 필요한 발현 조절 요소를 포함하는 재조합 핵산 분자를 의미하며, 상기 발현 조절 요소는 전사 및 번역 종결인자(terminator), 전사 및 번역 개시 서열, 및/또는 특정 표적 핵산의 발현의 조절에 유용한 프로모터일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 예컨대, 화학물질 유도성 요소 (inducible element) 및/또는 온도 민감성 요소(temperature sensitive element) 등과 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 화학물질 유도성 요소(inducible element)는 lac 오페론, T7 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, pL 프로모터 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 T7 프로모터는 바이러스인 T7 파지에서 유래된 것으로 프로모터와 함께 T7 터미네이터를 포함한다.

[0032] 상기 벡터 시스템은 당업계에 널리 알려진 다양한 방법을 통해 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다(Francois Baneyx, current Opinion Biotechnology 1999, 10:411-421).

[0033] 상기 벡터에는, 예컨대, 플라스미드 또는 바이러스 유래 벡터 등이 포함된다. 플라스미드란 추가의 DNA가 연결될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 고리를 말한다. 본 발명에서 사용되는 벡터에는 예컨대, 플라스미드 발현벡터, 바이러스 발현벡터 (예컨대, 복제결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 연관 바이러스) 및 이들과 동등한 기능을 수행할 수 있는 바이러스 벡터가 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 대장균 내 발현에 적합한 pET, pBR, pTrc, pLex, pUC, pKK 벡터 등을 사용할 수 있으나, 상기 효소 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

[0034] 일 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 보다 바람직하게는 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하고, 도 1, 도 2, 도 3, 또는 도 4의 개열지도에 나타난 구조를 갖는 것일 수 있다.

[0035] 상기 재조합 균주는 숙주 세포를 상기한 재조합 벡터로 형질전환시킨 것으로, 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 포함하고, 이를 발현할 수 있는 세포이다. 본 명세서에서 "형질전환"은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 유전자가 있는 DNA 사슬 조각 또는 플라스미드가 세포에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합하여, 세포의 유전형질이 변화되는 분자생물학적 현상을 말한다.

[0036] 상기 재조합 벡터를 안정적이며 연속적으로 클로닝 및/또는 발현시킬 수 있는 형질전환 대상 미생물(숙주 세포)로는 활성형의 상기 효소 단백질을 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않고 당업계에 공지되어 있는 어떠한 미생물도 이용할 수 있다. 예컨대, 상기 숙주 세포는 *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* ER2566, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110 등의 다양한 대장균, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균, 코리네박테리움 글루타미쿰과 같은 코리네 박테리아 속 그리고 살모넬라 티피무리움 등의 살모넬사 속 균, 기타 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등으로 이루어진 군에서 선택된 미생물일 수 있으며, 일 구체예에서 대장균(*E.coli*)일 수 있다.

[0037] 상기 벡터를 사용하여 형질전환시키기 위한 방법으로, 특별한 제한은 없으며, 세균 원형질체의 융합, 전기천공법, 추진체 포격(projectile bombardment), 바이러스 벡터를 사용한 감염 등과 같이 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[0038] 다른 예는 상기 효소 단백질, 상기 효소 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 및 상기 재조합 균주의 파쇄물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 타가토스 생산용 조성물을 제공한다. 상기 타가토스 생산용 조성물은 과당을 타가토스로 전환하는 활성, 보다 구체적으로 과당의 4번 탄소 위치를 에피머화하여 타가토스로 전환하는 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 재조합 균주의 배양물은 세포를 포함하는 배양물 또는 세포를 포함하지 않는(cell-free) 배양물, 또는 상기 배양물의 농축물 또는 건조물일 수 있다. 상기 재조합 균주의 파쇄물은 상기 재조합 균주를 파쇄한 파쇄물 또는 상기 파쇄물을 원심분리하여 얻어진 상등액을 의미하는 것으로, 상기 재조합 균주로부터 생산된 효소 단백질을 포함하는 것이다.

[0039] 또한, 상기 과당으로부터 타가토스로의 전환 활성을 갖는 효소 단백질은 금속 이온에 의해 활성화가 조절되는 금속효소(metalloenzyme) 특성을 갖는 것일 수 있다. 따라서, 상기 타가토스 생산용 조성물은 금속 이온을 추가로 포함함으로써 타가토스의 생산 수율을 증진시킬 수 있다. 타가토스 생산 수율에 기여할 수 있는 금속이온은 구리 이온, 망간 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 아연 이온, 니켈 이온, 코발트 이온, 철 이온, 알루미늄 이온 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 0.1 내지 5 mM 아연 이온, 코발트 이온, 철 이온, 망간 이온, 니켈 이온으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 금속 이온의 함량은 0.1mM 내지 5mM, 0.1 내지 2mM, 0.5 내지 1.5mM, 또는 약 1mM일 수 있다. 상기 범위에 미달할 경우 효소 단백질의 활성 증가 효과를 충분히 얻을 수 없으며, 상기 범위를 초과할 경우 사용되는 양에 비해 얻게 되는 활성 증대 효과가 미미하므로, 금속 이온의 첨가량은 상기 범위로 하는 것이 좋다.

[0040] 다른 예는 상기 타가토스 생산용 조성물을 사용하는 타가토스의 생산 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 상기 생산 방법은 상기 타가토스 생산용 조성물을 준비하는 단계; 및 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 일 구현예에서, 상기 효소 단백질을 사용하는 경우, 상기 생산 방법은 에시도써머스 셀루로리티쿠스(*Acido thermos cellulolyticus*, 예컨대, ATCC43068) 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*, 예컨대, ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스(*Bacteroides xylanisolvens*, 예컨대, XB1A), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*, 예컨대, KCTC3594) 등으로 이루어진 군에서 선택된 미생물로부터 유래된 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소 단백질을 준비하는 단계; 및 상기 효소 단백질을 과당과 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 생산 방법은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 7, 또는 서열번호 9의 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 효소 단백질을 준비하는 단계; 및 상기 효소 단백질을 과당과 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 다른 구현예에서, 재조합 균주를 사용하는 경우, 상기 생산 방법은 상기 재조합 균주를 배양하는 단계; 및 상기 배양단계를 거쳐 얻어진 배양물 (세포 포함 또는 무세포) 또는 상기 배양물로부터 회수된 균체 또는 균체 파쇄물을 과당과 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 재조합 균주의 배양 단계는 사용되는 세포의 종류 및/또는 특성에 따라 당업자에 의해 용이하게 선택되는 배양 방법, 배양 배지 및/또는 배양조건하에서 이루어질 수 있다. 상기 배양은 당업계에 알려진 임의의 배양 방법, 예컨대, 회분식, 연속식, 유가식 배양 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배양에 사용되는 배지는 대장균을 비롯한 임의의 숙주 세포, 및 세포 내용물을 지지하거나 또는 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반고체 또는 강성 지지체를 포함하며, 예컨대, 2YT 배지, LB 배지, SOB 배지, TB 배지 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양 조건은 일반적으로 해당 숙주 세포 (예컨대, 대장균)를 배양하는데 적합한 조건일 수 있다. 예컨대, 상기 배양은 전 배양액(예컨대, 3ml LB-앰피실린 액체배지가 들어있는 15ml test tube에 한 개의 colony를 접종하여 37℃, 250rpm에서 16시간을 배양한 액)을 본 배양액(예컨대, 50ml LB-앰피실린 액체배지가 들어있는 250ml 플라스크)의 1%(v/v)로 접종 시킨 후, 35℃ 내지 37℃ 및 150 내지 250rpm 조건 하에서 배양하여 O.D600nm에서 0.5 내지 0.8까지 배양 후, 유도제를 첨가하고 16℃ 내지 30℃ 및 150 내지 250rpm 조건 하에서 추가로 배양하여, 단백질 과발현을 유도할 수 있다. 상기 유도제는 단백질의 발현을 유도할 수 있는 물질로, 예컨대 IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), 유당(lactose) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 유도제의 첨가량은 0.01 내지 1mM, 0.05 내지 0.5 mM, 또는 약 0.1mM 정도로 할 수 있다.

[0044] 상기 균체는 상기 재조합 균주의 배양물에 대하여 원심분리, 및/또는 여과 등을 수행하여 수득될 수 있다.

[0045] 또한, 상기 균체의 파쇄물은 상기 회수된 균체를 균질화시키고 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계, 상기 상등액을 분획화하는 단계, 및/또는 상기 상등액 또는 분획물에 대하여 크로마토그래피 등을 수행하여 효소 단백질을 분리 및/또는 정제하는 단계에 의하여 수득될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 회수된 균체를 소정의 완충용액 (예컨대, 약 10 mM 농도의 이미다졸이 포함된 50mM 인산 완충용액)으로 현탁한 후 파쇄하여 원심분리 한 후, 상등액만 취하여 적절한 컬럼 (예컨대, 니켈-NTA 컬럼 (Qiagen))에서 흡착 시킨 후, 약 20mM 농도의 이미다졸을 사용하여 약하게 흡착한 대장균 유래 단백질을 씻어낸 뒤 약 200mM 농도의 이미다졸을 사용하여 목적하는 효소 단백질을 회수할 수 있다.

[0046] 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시키는 단계는 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 접촉시키는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 접촉시키는 단계는, 예컨대, 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 혼합하는 단계 또는 상기 타가토스 생산용 조성물이 고정화된 담체에 과당을 접촉시키는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 또 다른 예에서 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시키는 단계는 상기 재조합 균주의 균체를 과당이 포함된 배양 배지에서 배양하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 이와 같이 상기 타가토스 생산용 조성물을 과당과 반응시킴으로써 과당을 타가토스로 전환하여 과당으로부터 타가토스를 생산할 수 있다.

[0047] 상기 과당과 반응시키는 단계는 바람직하게는 상기 효소 단백질의 활성화 조건하에 이루어질 수 있다. 예컨대, 상기 과당과 반응시키는 단계는 pH 6 내지 8, pH 6.5 내지 7.5, 또는 약 pH 7.0에서 수행될 수 있으며, 또한 45 내지 75℃, 50 내지 70℃, 또는 55 내지 65℃의 온도 조건하에 수행되는 것일 수 있다. 또한 상기 재조합 균주의 배양물로부터 회수된 균체를 사용할 경우, 상기 과당과 반응시키는 단계 전에, 상기 회수된 균체를 예컨대, 0.1 내지 1.5%(w/v) 또는 0.5 내지 1%(w/v), 예컨대 0.85%(w/v)의 NaCl 등을 사용하여 2회 이상 세척하여 사용할 수 있다. 상기 과당은 상기 효소 단백질의 기질로서, 효율적인 반응을 위하여, 상기 반응 단계에서의 과당의 사용량은 전체 반응 혼합물 기준으로 1 내지 10 %(w/v), 또는 1 내지 5 %(w/v) 범위일 수 있다. 과당의 농도가 상기 범위보다 낮으면 경제성이 낮아지고, 상기 범위보다 높으면 과당이 잘 용해되지 않고 오히려 효소 반응의

저해가 일어날 수 있으므로, 과당의 농도는 상기 범위로 하는 것이 좋다. 상기 과당은 완충용액 또는 물(예컨대 증류수)에 용해된 용액 상태로 사용될 수 있다.

[0048] 효율적인 타가토스 생산을 위하여, 상기 과당과 반응시키는 단계에 사용되는 효소 단백질의 양은 전체 반응물 기준으로 0.001 mg/ml 내지 1.0mg/ml, 0.005mg/ml 내지 1.0mg/ml, 0.01 mg/ml 내지 1.0mg/ml, 0.01 mg/ml 내지 0.1 mg/ml, 또는 0.05mg/ml 내지 0.1mg/ml일 수 있다. 효소 단백질의 사용량이 상기 농도보다 낮으면 사이코스 전환 효율이 낮아 질 수 있고, 상기 농도보다 높으면 산업에서의 경제성이 낮아지므로 상기 범위가 적당하다. 재조합 균주를 사용하는 경우, 사용되는 균주의 균체 농도는 전체 반응물을 기준으로 0.1 mg(dcw: 건조세포중량)/ml 이상, 예컨대, 0.1 내지 100mg(dcw)/ml, 0.1 내지 50mg(dcw)/ml, 0.1 내지 10mg(dcw)/ml, 1 내지 100mg(dcw)/ml, 1 내지 50mg(dcw)/ml, 1 내지 10mg(dcw)/ml, 2 내지 100 mg(dcw)/ml, 2 내지 50mg(dcw)/ml, 2 내지 10 mg(dcw)/ml, 3 내지 100mg(dcw)/ml 3 내지 50mg(dcw)/ml, 또는 내지 3 내지 10mg(dcw)/ml 일 수 있다.

[0049] 또한, 상기 과당으로부터 타가토스로의 전환 활성을 갖는 효소 단백질은 금속 이온에 의해 활성화가 조절되는 금속효소(metalloenzyme) 특성을 갖는 것일 수 있다. 상기 효소 단백질에 의한 반응을 금속 이온 존재 하에서 수행함으로써 타가토스의 생산 수율을 증진시킬 수 있다. 따라서, 상기 과당과 반응시키는 단계는 금속 이온을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 타가토스 생산 수율에 기여할 수 있는 금속이온은 구리 이온, 망간 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 아연 이온, 니켈 이온, 코발트 이온, 철 이온, 알루미늄 이온 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 아연 이온, 니켈 이온, 코발트 이온, 철 이온, 망간 이온으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 금속 이온의 첨가량은 0.1mM 내지 5mM, 0.1 내지 2mM, 0.5 내지 1.5mM, 또는 약 1mM 범위로 할 수 있다. 상기 범위에 미달할 경우 효소 단백질의 활성 증가 효과를 충분히 얻을 수 없으며, 상기 범위를 초과할 경우 사용되는 양에 비해 얻게 되는 활성 증대 효과가 미미하므로, 금속 이온의 첨가량은 상기 범위로 하는 것이 좋다.

[0050] 일 구현예에서, 상기 금속 이온은 기질인 과당에 첨가되거나, 상기 타가토스 생산용 조성물과 과당과의 혼합물에 첨가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 금속 이온은 상기 타가토스 생산용 조성물이 고정화된 담체에 첨가되거나(과당 첨가 전), 상기 타가토스 생산용 조성물이 고정화된 담체와 과당과의 혼합물에 첨가되거나(과당 첨가 후), 또는 과당 첨가시에 과당과 혼합물의 형태로 또는 각각 첨가될 수 있다. 재조합 균주를 사용하는 경우, 상기 금속 이온은 배양물에 첨가되거나, 금속 이온이 첨가된 배양 배지에서 배양이 수행될 수 있다.

[0051] 또한, 상기 타가토스 생산 방법은 상기 과당과 반응시키는 단계 이후에 생산된(과당으로부터 전환된) 타가토스를 회수(분리) 및/또는 정제하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 타가토스를 회수(분리) 및/또는 정제하는 단계는 특별한 제한이 없으며 당업계에 공지된 모든 방법에 의하여 수행될 수 있다. 예컨대, 상기 타가토스를 회수(분리) 및/또는 정제하는 단계는 원심분리, 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의하여 수행될 수 있다.

[0052] 한편, 상기 기질로 사용되는 과당은, 경제적 측면으로 고려하여, 전환효소에 의해 분해된 설탕에서 얻어지거나 또는 액상과당으로부터 수득한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0053] 본 발명은 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068 (Acido thermos cellulolyticus ATCC43068) 락토바실러스 카세이 ATCC334(Lactobacillus casei ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A (Bacteroides xylanisolvens XB1A), 또는 락토바실러스 루테리(Lactobacillus reuteri KCTC3594)로부터 유래된 L-리불로스 5-인산 에피머화 효소의 과당의 4번째 탄소 위치를 에피머화하여 타가토스로 전환하는 새로운 활성을 제안한다. 이 효소를 이용하여 과당에서 타가토스를 생산하는 방법을 최적화한다면 가격이 저렴한 과당에서 타가토스를 생산할 수 있게 되어 현재의 아라비노스 이성화 효소를 이용한 갈락토스에서 타가토스를 생산하는 방법의 정제적 취약점을 극복 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1 내지 도4는 일 실시예에 따른 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 발현을 위한 재조합 발현벡터 pET-RPE를 보여주는 개열지도로서,

도 1은 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068 유래의 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현벡터 pET-ARPE의 개열지도이고,

도 2는 락토바실러스 카세이 ATCC334 유래의 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현벡터 pET-LCRPE의 개열지도이고,

도 3은 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A 유래의 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현벡터 pET-BRPE의 개열지도이고,

도 4는 락토바실러스 루테리 KCTC3594 유래 재조합 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현벡터 pET-LRRPE의 개열지도이다.

도 5는 실시예 1에서의 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC 43068, 락토바실러스 카세이 ATCC334, 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A 및 락토바실러스 루테리 KCTC3594 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 암호화 하는 폴리뉴클레오타이드의 PCR 결과를 보여주는 사진이다.

도 6는 실시예 3.1에서 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소의 단백질 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 보여주는 사진이다.

도 7은 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 D-프럭토스로부터 D-타가토스로의 전환 활성을 보여주는 그래프이다.

도 8은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 D-프럭토스로부터 D-타가토스로의 전환 활성을 보여주는 그래프이다.

도 9는 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 D-프럭토스로부터 D-타가토스로의 전환 활성을 보여주는 그래프이다.

도 10은 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 D-프럭토스로부터 D-타가토스로의 전환 활성을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 더 상세히 설명하고자 한다. 하지만 본 발명은 하기 실시예에 한정된 것이 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정이 가능함은 이 분야에서 당업자에게 명백한 것이다. 따라서, 첨부된 청구항들은 넓게 본 발명의 사상과 범위에 부합되게 해석되어야 한다.

[0056] **실시예 1. L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소를 생산하는 재조합 균주 제조**

[0057] 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소(서열번호 1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 (서열번호 2) 및 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소(서열번호 4)의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 5)를 바이오니아(Bioneer.Co.Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 상기 서열번호 2 및 서열번호 5의 염기서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 4의 아미노산 서열의 발현에 있어서 발현 균주로 사용될 대장균에 최적화된 서열이다.

[0058] 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소(서열번호 7)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 8)과 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소(서열번호 9)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 10)를 준비하이 위하여, KCTC로부터 활성화 상태로 분양 받은 균주로부터 PureLink(Genomic DNA Mini Kit, invitrogen. Carlsbad, CA92008 USA)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 상기 추출된 게놈 DNA를 주형으로 제한효소 NdeI, XhoI, BamHⅠ, 또는 XhoⅠ 부위를 포함하여 디자인된 각각의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여, 각각 약 700bp 길이의 폴리뉴클레오타이드를 얻었다 (도 5 참조). 상기 PCR에 사용된 프라이머를 아래의 표 2에 정리하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 동안 cDNA의 이중가닥의 결합을 푼 후 95℃, 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분 의 조건으로 25회 반복 수행 하는 것이고, 마지막으로 72℃에서 5분 동안 목적 폴리뉴클레오타이드 합성을 종결한 후 4℃에서 보관하였다.

표 2

[0059]

L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소 별 유래 균주 프라이머	염기서열
박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A (pET-BRPE) 뻘orward	5'-AGATATACATATGCTGGAAGAACTAAAAGAAA-3' (서열번호 11)
박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A (pET-BRPE) - Reverse	5'-AAGGCTCGAG TTGTCCATAATAAGCATTCG-3' (서열번호 12)
락토바실러스 루테리(pET-LRRPE) -Forward	5'-CCGCGGATCCATGTTAGAAGATTTAAAGAAG-3' (서열번호 13)
락토바실러스 루테리(pET-LRRPE) - Reverse	5'-AAGGCTCGAGAGCGTGAGCTGCATGATC-3' (서열번호 14)

[0060] * 밑줄 친 부분은 제한효소 부위임

[0061] 상기 준비된 서열번호 2, 서열번호 5 및 서열번호 8의 폴리뉴클레오타이드는 제한효소 NdeI과 XhoI(NEB)을 사용하고, 서열번호 10의 폴리뉴클레오타이드는 BamH I 과 Xho I (NEB, New England Biolab. Co.)을 사용하여, 발현벡터인 pET21a(Novagen)의 동일한 제한효소 부위에 삽입하여 재조합 벡터 pET21a/L-리불로스 5-인산 4-에피머화효소(pET-RPE)를 제조하였으며, 각각 pETARPE(서열번호 2의 염기서열 포함), pETLCRPE(서열번호 5의 염기서열 포함), pETBRPE(서열번호 8의 염기서열 포함), 및 pETLRRPE(서열번호 10의 염기서열 포함)로 명명하였다 (도 1 내지 도 4 참조).

[0062] 상기 제조된 재조합 벡터를 이용하여 heat shock 방법(Sambrook and Russell: Molecular Cloning)으로 대장균 BL21(DE3)(invitrogen)를 형질전환 하여 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 8 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 각각 포함하는 재조합 균주를 제조하였다. 제조된 재조합 균주는 각각 *E.coli* pETARPE(서열번호 2의 염기서열 포함), *E.coli* pETLCRPE(서열번호 5의 염기서열 포함), *E.coli* pETBRPE(서열번호 8의 염기서열 포함), 및 *E.coli* pETLRRPE(서열번호 10의 염기서열 포함)로 명명하였다.

[0063] **실시예 2. L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 발현 균주의 배양**

[0064] 형질전환된 재조합 균주를 5ml LB-ampicilline 배지(Difco)에 접종한 후, 600nm에서의 흡광도(OD)가 1.5에 도달 할 때까지 37℃, 200rpm에서 진탕배양하였다. 상기 얻어진 배양액을 500ml LB-ampicilline 배지(Difco)에 접종하고, 37?, 200rpm에서 진탕배양하였다. 이 배양액의 600nm에서 흡광도가 0.5일 때 0.1mM의 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 목적 단백질의 과발현을 유도하였다. 이때 과발현 유도시점부터 배양조건은 16℃, 150rpm으로 전환하여 16시간 동안 유지하였다.

[0065] 이후 6000rpm에서 20분간 원심분리하여 침전된 균체만을 회수하였다. 회수한 균체는 0.85%(w/v) NaCl로 2회 세척 후 후술되는 균체를 이용한 타가토스 생산에 사용하였다.

[0066] **실시예 3. L-리불로스 5 인산 4-에피머화 특성 확인**

[0067] **3.1. L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소 분리**

[0068] 상기 실시예 2에서 회수된 균체를 1 mM $ZnSO_4$를 포함하는 50 mM PIPES(piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) pH 7.0 완충용액에 혼탁시킨 후, 음파진동기(Ultrasonic processor, ColepParmer)를 사용하여 4℃에서 10분 동안 파쇄하였다. 파쇄액을 13000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액만을 모은 후, SDS-PAGE를 통하여 단량체 크기를 측정하여, L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소의 발현을 확인하였다. 상기 얻어진 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서와 같이, 상기 L-리불로스 5 인산 4-에피머화 효소의 단량체의 크기는 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068) 유래의 경우에는 약 24 킬로달톤(kDa), 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334) 유래의 경우에는 약 27 킬로달톤(kDa), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A) 유래의 경우에는 약 25 킬로달톤(kDa), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래의 경우에는 약 27 킬로달톤(kDa)인 것으로 확인되었다.

[0069] **3.2. L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 활성 분석**

[0070] 기존에 알려진 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소는 금속 이온 중 Zn^{2+} 존재 하에서 L-인산화 리불로스를 L-인산화 자일룰로스로 전환하는 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며, L-인산화 리불로스 이외에 상기 효소가 기질 특이성을 보이는 물질은 보고된 바 없다.

[0071] L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소가 D-프럭토스를 기질로 하여 반응을 일으킬 수 있는지 알아보기 위하여, 상기 실시예 3.1에서 분리된 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068), 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A), 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소 단백질의 D-프럭토스에 대한 활성을 각각 살펴보았다.

[0072] 상기 효소 단백질에 의한 과당으로부터 타가토스로의 전환 시험은 Bio-LC(ICS-5000 system, DIonex사)를 이용한 크로마토그래피를 통해 수행하였다. 상기 Bio-LC에 칼럼(CarboPac® PA10 4X250mm Analytical)을 사용하여 이동상 용매 2종, 즉 100%(v/v) 물과 200mM NaOH를 각각 유속 1 ml/min로 농도구배 크로마토 그래피로 (30분 동안 200mM NaOH를 0→100%, 물은 100→0%로 변화 시키면서 분석함) 30분 동안 흘리면서 전기화학검출기(electrochemical detecto, DIonex사)로 전류값을 측정하여 전환(생산)된 타가토스를 정량 분석하였다.

[0073] 그 결과, 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068), 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334), 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A), 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소가 D-프럭토스로부터 타가토스로의 전환 활성을 나타내는 것으로 측정되었다. 또한, 상기 4개의 효소 단백질 모두 30 ℃에서는 활성을 나타내지 않았고, 50℃에서는 락토바실러스 루테리 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소가 약 4% 전환율을 보였다. 또한, 70℃에서는 4개의 효소 모두 5 내지 7%의 전환율을 나타냈다.

[0074] 상기 얻어진 결과는 도 7 내지 도 10에 나타내었다.

[0075] 도 7은 에시도써머스 셀루로리티쿠스 ATCC43068(*Acido thermos cellulolyticus* ATCC43068) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 결과 (70℃, 50 mM PIPES pH 7.0, 3 시간 반응)이고;

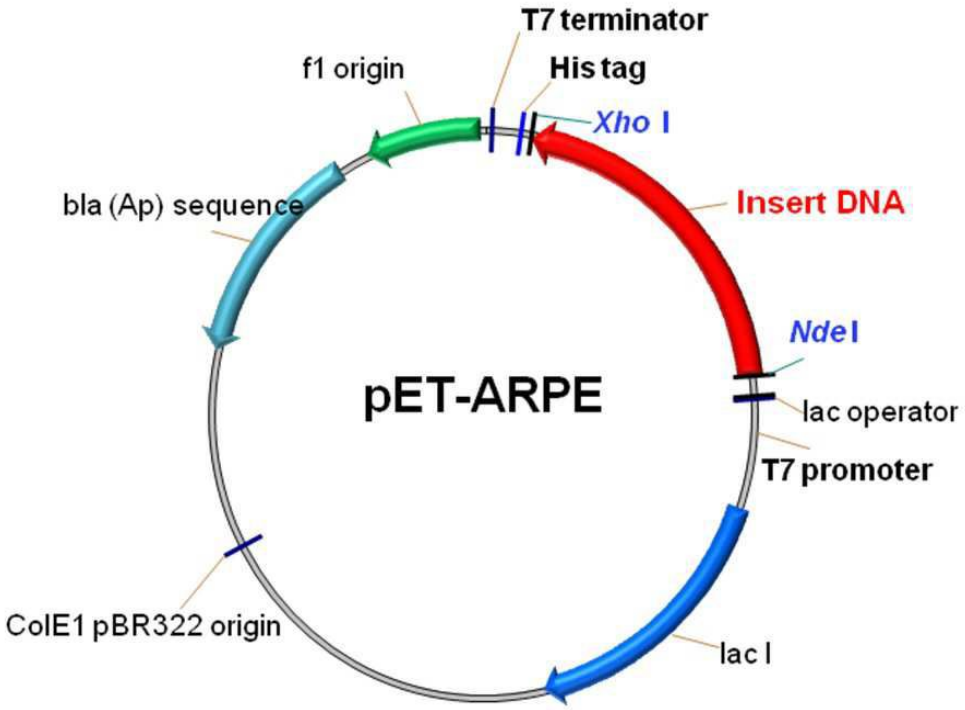
[0076] 도 8은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 결과 (검정색 30℃, 파란색 50℃, 분홍색 70℃, 50 mM PIPES pH 7.0, 3시간 반응)이며;

[0077] 도 9는 박테로이데스 자일란이솔번스 XB1A(*Bacteroides xylanisolvens* XB1A) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 결과 (검정색 30℃, 파란색 50℃, 분홍색 70℃, 50 mM PIPES pH 7.0, 3시간 반응)이고, 도 10은 락토바실러스 카세이 ATCC334(*Lactobacillus casei* ATCC334) 유래 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소의 결과 (검정색 30℃, 파란색 50℃, 분홍색 70℃, 50 mM PIPES pH 7.0, 3시간 반응)이다.

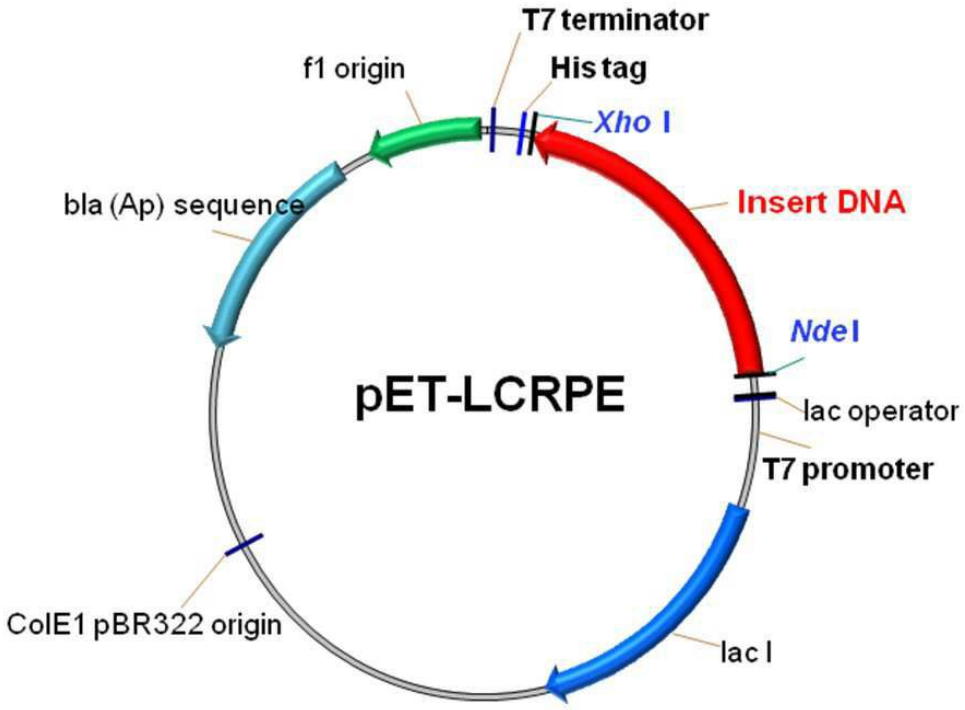
[0078] 상기 결과는 상기 4종의 L-리불로스 5-인산 4-에피머화 효소가 단당류의 4-에피머화 효소로서 신규한 활성을 가짐을 보여주는 것이며, 타가토스 생산에 새로운 방향을 제시할 수 있다.

도면

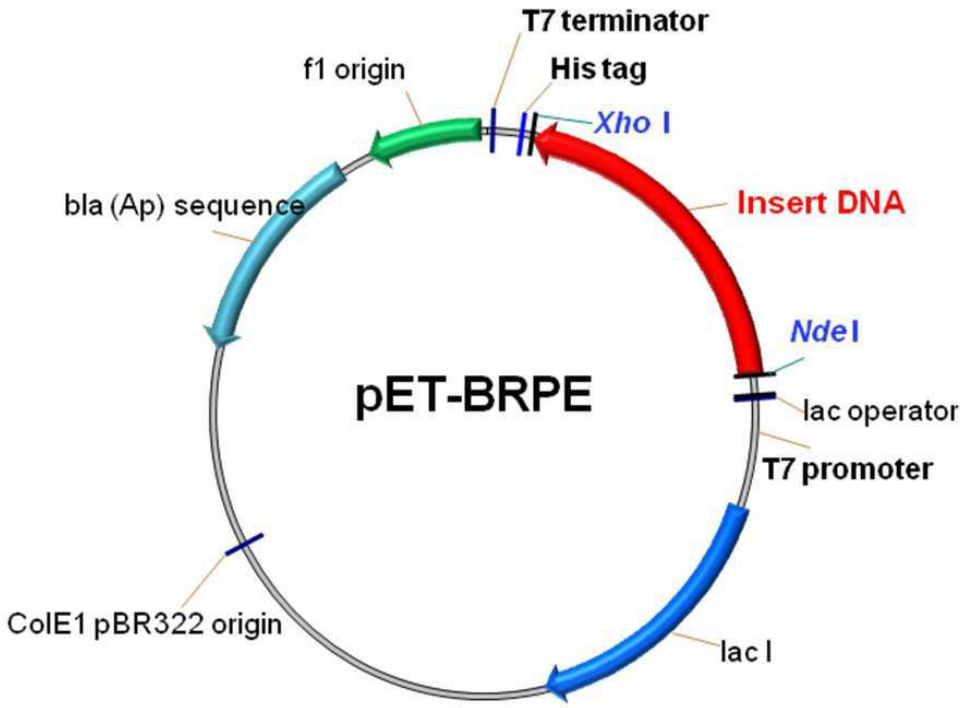
도면1


T7 terminator
f1 origin
His tag
Xho I
bla (Ap) sequence
Insert DNA
NdeI
pET-ARPE
lac operator
T7 promoter
ColE1 pBR322 origin
lac I

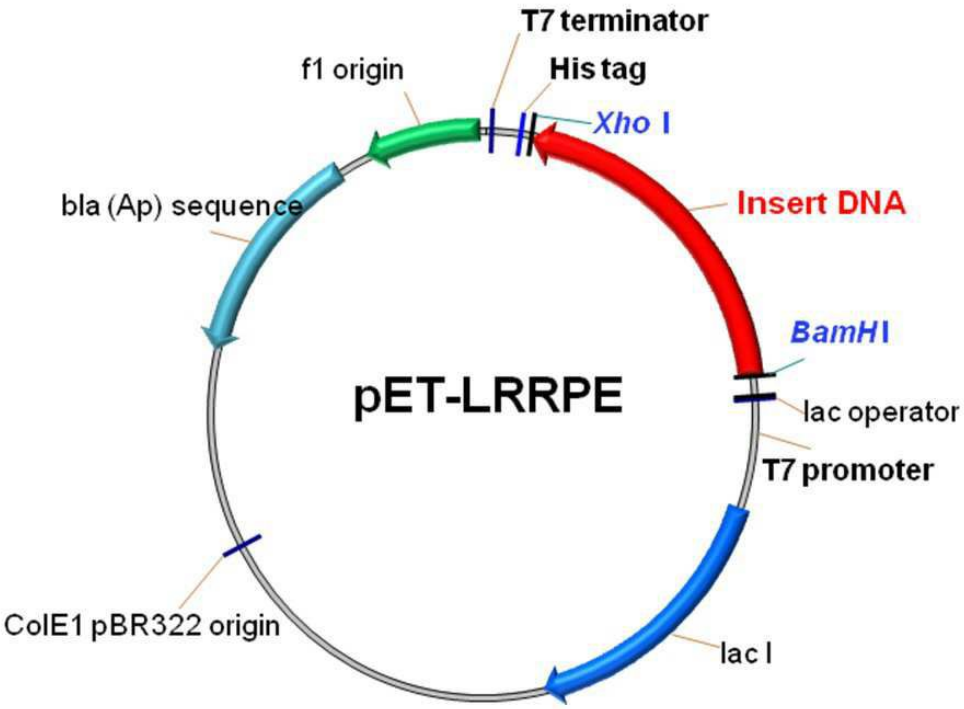
도면2


T7 terminator
f1 origin
His tag
Xho I
bla (Ap) sequence
Insert DNA
NdeI
pET-LCRPE
lac operator
T7 promoter
ColE1 pBR322 origin
lac I

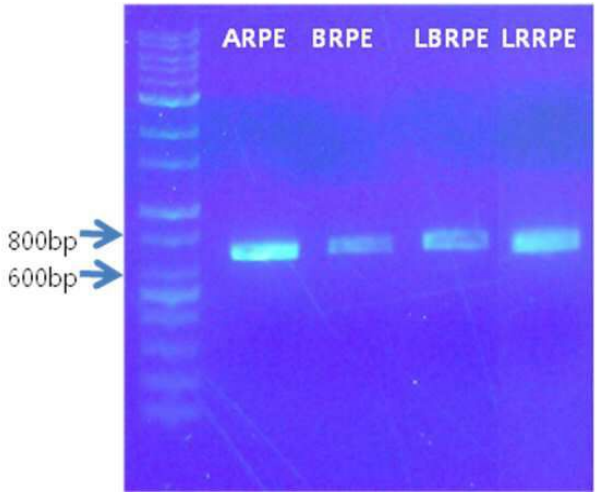
도면3


T7 terminator
f1 origin
His tag
Xho I
bla (Ap) sequence
Insert DNA
NdeI
pET-BRPE
lac operator
T7 promoter
ColE1 pBR322 origin
lac I

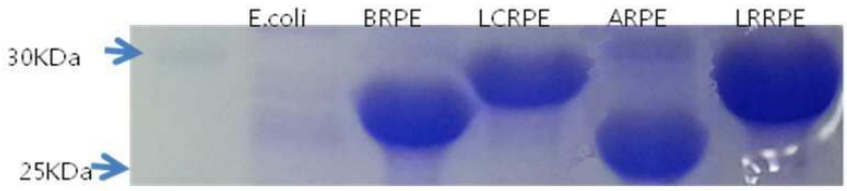
도면4


T7 terminator
f1 origin
His tag
Xho I
bla (Ap) sequence
Insert DNA
BamHI
pET-LRRPE
lac operator
T7 promoter
ColE1 pBR322 origin
lac I

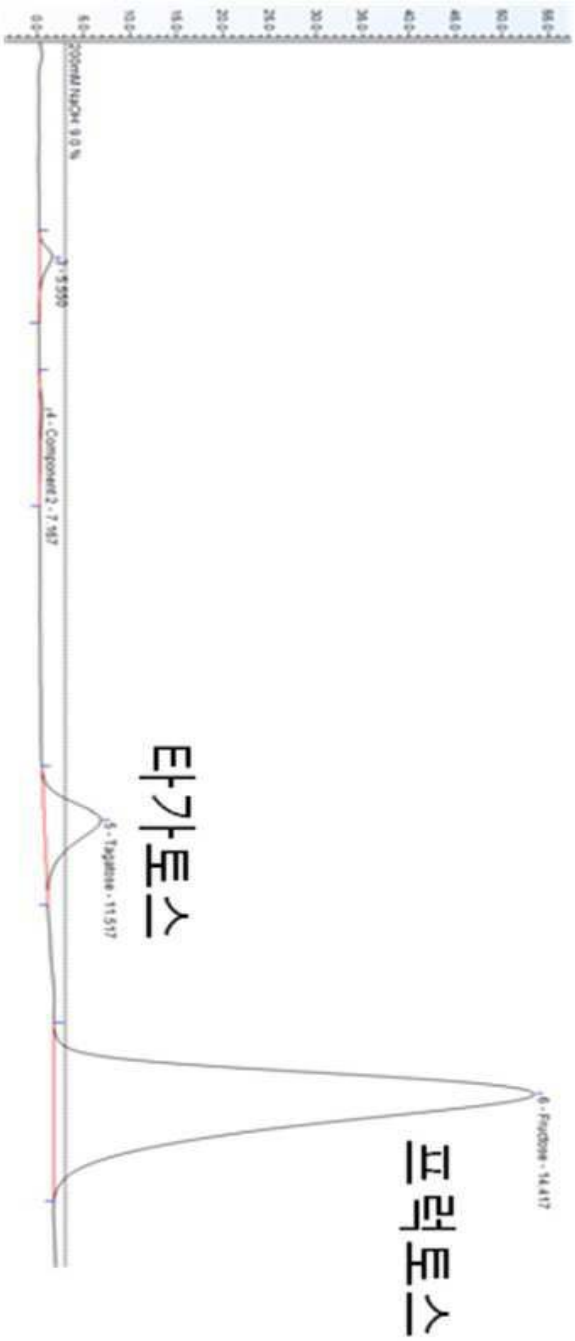
도면5


ARPE
BRPE
LBRPE
LRRPE
800bp
600bp

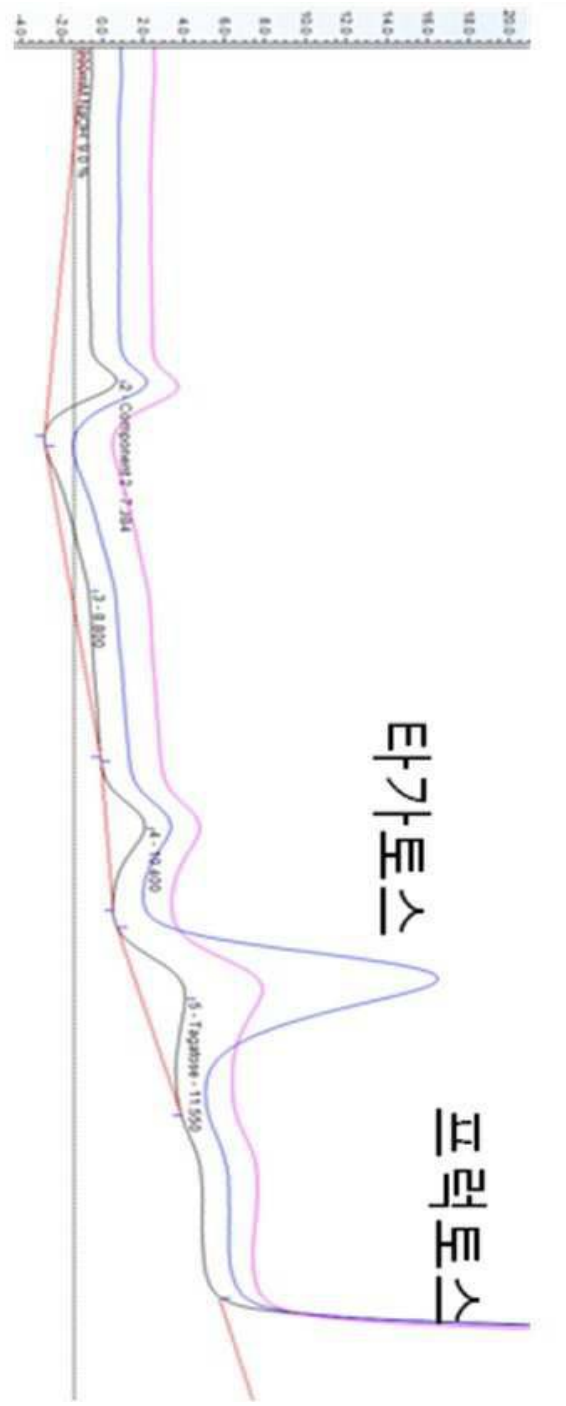
도면6


E.coli
BRPE
LCRPE
ARPE
LRRPE
30KDa
25KDa

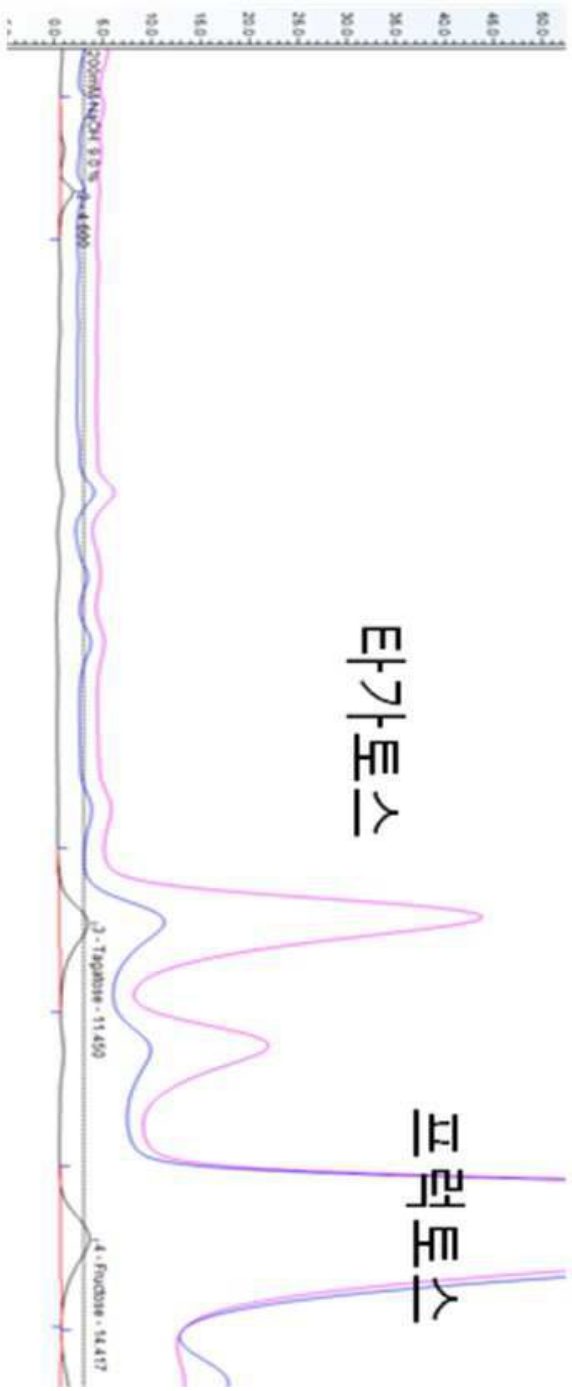
도면7



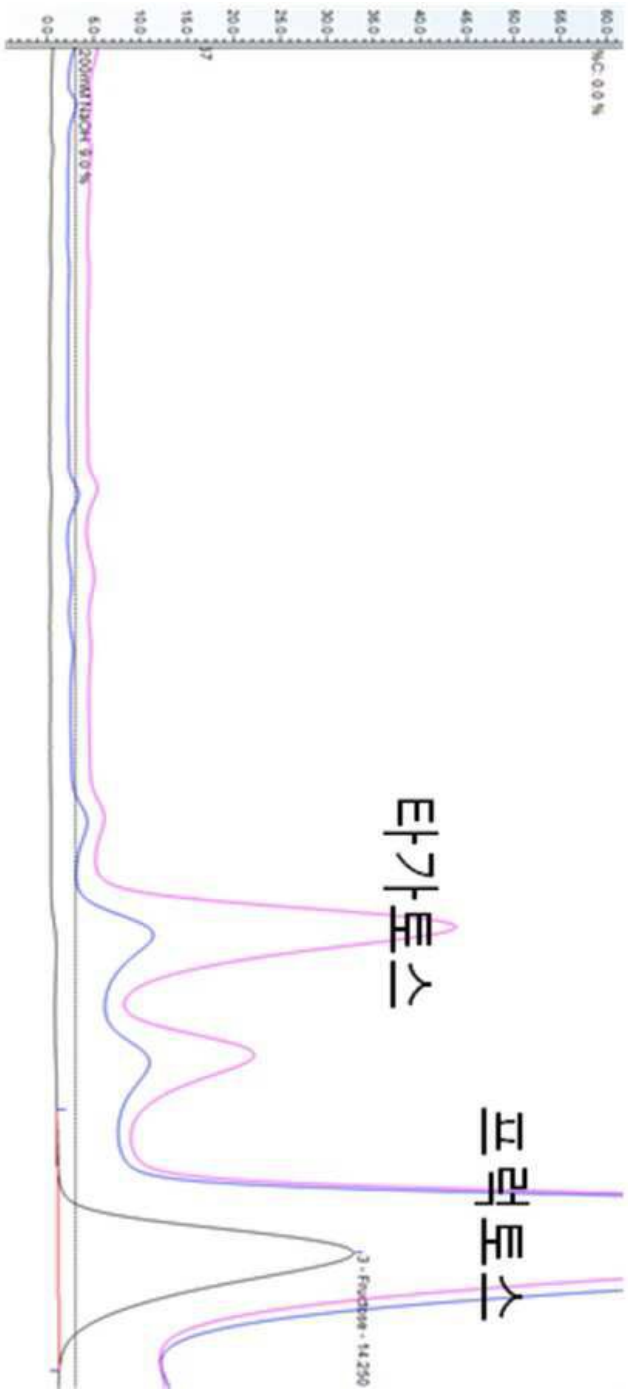
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

<110> SAMYANG GENEX CORPORATION

<120> PRODUCTION OF TAGATOSE FROM FRUCTOSE USING L-RIBULOSE 5-PHOSPHATE 4-EPIMERASE

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Acido thermos cellulolyticus ATCC43068

<400> 1

Met Thr Ile Ala Ser Ser Asp Val Ile Ala Gln Leu Arg Arg Glu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Leu His Arg Lys Leu Val Thr Trp Gly Leu Val Val Trp Thr
20 25 30

Ala Gly Asn Val Ser Ala Arg Ile Pro Gly Glu Pro Leu Met Leu Ile
35 40 45

Lys Pro Ser Gly Val Asp Tyr Asp Leu Leu Arg Glu Glu Ser Phe Val
50 55 60

Val Cys Asp Phe Ser Gly Gly Arg Val Glu Gly Ser Leu Thr Pro Ser
65 70 75 80

Ser Asp Ala Arg Ser His Gly Tyr Ile Tyr Ala His Met Pro His Val

85 90 95

Gly Gly Val Val His Thr His Ser Pro Tyr Ala Thr Ala Trp Ala Ala
100 105 110

Arg Gly Glu Pro Ile Pro Cys Ile Leu Thr Ala Met Ala Asp Glu Phe
115 120 125

Gly Gly Pro Ile Pro Val Gly Pro Phe Ala Pro Ile Gly Asp Glu Arg
130 135 140

Ile Gly Arg Gly Val Val Glu Thr Leu Arg Thr Ser Arg Ser Pro Ala
145 150 155 160

Val Leu Met Lys Asn His Gly Val Phe Ala Val Gly Ala Thr Ala Glu
165 170 175

Ala Ala Val Lys Ala Ala Val Met Cys Glu Asp Ala Ala Arg Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Ala Arg Asn Leu Gly Glu Val Glu Pro Leu Pro Ala His Asp
195 200 205

Ile Asp Ala Leu His Arg Arg Tyr Gln Thr Ala Tyr Gly Gln Arg

210 215 220

<210> 2

<211> 672

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Acido thermos cellulolyticus ATCC43068

<400> 2

gttaccatcg cgtcttctga cgttatcgcg cagctgcgtc gtgaactgct gatcctgcac 60

cgtaaactgg ttacctgggg tctggttgtt tggaccgcgg gtaacgtttc tgcgcgtatc 120

ccgggtgaac cgctgatgct gatcaaaccg tctggtgttg actacgacct gctgcgtgaa 180

gaatctttcg ttgtttgcga cttctctggt ggtcgtgttg aaggttctct gaccccgtct 240

tctgacgcgc gttctcacgg ttacatctac gcgcacatgc cgcacgttgg tggtgttgtt 300

cacacccact ctccgtacgc gaccgcgtgg gcggcgcgtg gtgaaccgat cccgtgcatc 360

ctgaccgcga tggcggacga attcggtggt ccgatcccgg ttggtccgtt cgcgccgatc 420

ggtgacgaac gtatcggtcg tggtgttgtt gaaaccctgc gtacctctcg ttctccggcg 480

gttctgatga aaaaccacgg tgttttcgcg gttggtgcga ccgcggaagc ggcggttaaa 540

gcggcggtta tgtgcgaaga cgcggcgcgt accgtttacc tggcgcgtaa cctgggtgaa 600

gttgaaccgc tgccggcgca cgacatcgac gcgctgcacc gtcgttacca gaccgcgtac 660

ggtcagcgtt ga 672

<210> 3

<211> 672

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Acido thermos cellulolyticus ATCC43068

<400> 3

gtgacaatcg cttcgtcgga cgtcatcgcg caactgcgac gcgagttgct catcctgcac 60

cgcaaactgg tgacctgggg tctggtggtc tggacggcgg gcaacgtctc cgcgcggatc 120

cccggcgaac cgctcatgct catcaaaccg agcggggtgg actacgatct gctgcgcgaa 180

gaatccttcg tcgtctgcga cttctccggt ggccgggtcg agggttcgct cacccctcc 240

agcgacgccc gcagtcacgg ctacatttac gcgcacatgc cacacgtcgg cggcgtcgtc 300

catacccatt cgccctacgc aacggcctgg gcggcgcgag gcgaaccgat accatgcatc 360

cttaccgcga tggccgatga attcggcggc cccattccag tcggaccgtt tgcaccgatc 420

ggcgacgagc ggatcggccg cggcgtggtg gagacgctcc gcacgtcacg atctccggct 480

gttctgatga agaaccacgg tgttttcgcc gtcggtgcga cggcggaggc tgcggtcaag 540

gcggccgtga tgtgcgaaga cgccgcccgc accgtctact tggcgcgcaa cctcggcgag 600

gtcgaaccat tgccggcgca cgacattgac gccctgcacc gccgctatca gacggcgtac 660

ggccaacggt ga 672

<210> 4

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Lactobacillus casei ATCC334

<400> 4

Met Leu Glu Gln Leu Lys Gln Glu Val Tyr Glu Ala Asn Met Gln Leu
1 5 10 15

Pro Lys Leu Asp Leu Val Thr Phe Thr Trp Gly Asn Val Ser Gly Ile
20 25 30

Asp Arg Glu Lys Gly Leu Phe Val Ile Lys Pro Ser Gly Val Asp Tyr
35 40 45

Glu Asp Leu Thr Pro Asp Asp Met Val Val Val Asn Leu Lys Gly Glu
50 55 60

Val Val Glu Gly Gln Leu Asn Pro Ser Ser Asp Thr Pro Thr His Thr
65 70 75 80

Val Leu Tyr Asn Glu Phe Pro Asp Ile Gly Gly Ile Val His Thr His
85 90 95

Ser Pro Trp Ala Val Ala Phe Ala Ser Ala His Met Asp Ile Pro Asn
100 105 110

Leu Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Phe Tyr Gly Asp Val Pro Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Ile Glu Asp Ala Tyr Glu Glu Asn Thr

130 135 140

Gly Lys Val Ile Val Lys Thr Phe Lys Asp Arg Gly Ile Asp His Asn

145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Val Leu Val Ser Gln His Gly Pro Phe Ser Trp Gly

165 170 175

Ala Thr Pro Ala Lys Ala Val Tyr Asn Ala Lys Val Leu Glu Val Val

180 185 190

Ala Glu Met Asp Tyr His Ala Leu Thr Leu Thr His Gln Asp Val His

195 200 205

Leu Pro Gln Tyr Leu Leu Asp Lys His Tyr Tyr Arg Lys His Gly Lys

210 215 220

Asp Ala Tyr Tyr Gly Gln Asp Asn Ala Lys Ser Val Gly His Ala Ala

225 230 235 240

Lys Ala

<210> 5

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Lactobacillus casei ATCC334

<400> 5

atgctggaac agctgaaaca ggaagtttac gaagcgaaca tgcagctgcc gaaactggac 60

ctggttacct tcacctgggg taacgtttct ggtatcgacc gtgaaaaagg tctgttcgtt 120

atcaaaccgt ctggtgttga ctacgaagac ctgaccccgg acgacatggt tgttgttaac 180

ctgaaaggtg aagttgttga aggtcagctg aacccgtctt ctgacacccc gacccacacc 240

gttctgtaca acgaattccc ggacatcggt ggtatcgttc acacccactc tccgtgggcg 300

gttgcgttcg cgtctgcgca catggacatc ccgaacctga acaccaccgc ggcggacacc 360

ttctacggtg acgttccgat ctctgaagcg ctgacccagc aggaaatcga agacgcgtac 420

gaagaaaaca ccggtaaagt tatcgttaaa accttcaaag accgtggtat cgaccacaac 480

gcggttccgg cggttctggt ttctcagcac ggtccgttct cttggggtgc gaccccggcg 540

aaagcggttt acaacgcgaa agttctggaa gttgttgcgg aaatggacta ccacgcgctg 600

accctgaccc accaggacgt tcacctgccg cagtacctgc tggacaaaca ctactaccgt 660

aaacacggta aagacgcgta ctacggtcag gacaacgcga aatctgttgg tcacgcggcg 720

aaagcgtag 729

<210> 6

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Lactobacillus casei ATCC334

<400> 6

atgcttgaac aattaaaaca agaagtctac gaagcaaata tgcagttgcc aaaattagat 60

ctggttactt ttacttgggg caatgtttcc ggcattgatc gggaaaaggg attgttcgtc 120

attaaaccat ctggcgttga ttacgaagac ttaacgccgg atgacatggt tgtcgtcaac 180

ctgaaaggcg aagttgtaga agggcaactg aacccttcaa gcgacacgcc gacacacacc 240

gtcctctata atgagttccc tgacatcggt gggattgtcc atacccattc accatgggca 300

gttgcgttcg cttcggcaca catggatatc cccaacctga atacaaccgc cgctgacacg 360

ttttatgggg atgtgcccat ctccgaagcg ttgacgcaac aagaaattga agatgcgtac 420

gaggaaaaca cgggtaaagt catcgtcaaa accttcaaag atcgcggtat tgatcacaac 480

gcagttcctg cagttctggt cagccaacat ggtccattca gctggggagc gaccccagct 540

aaggcggttt ataacgccaa agtcttggaa gttgtcgcag aaatggatta tcacgcatta 600

accttgacgc atcaagatgt gcatttgcca cagtatttgt tggacaagca ttattatcga 660

aaacatggta aggatgctta ttatgggcag gataatgcta agtcggtggg gcatgcggct 720

aaggcatag 729

<210> 7

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Bacteroides xylanisolvens XB1A

<400> 7

Met Leu Glu Glu Leu Lys Glu Lys Val Phe His Ala Asn Leu Glu Leu

1 5 10 15

Val Lys His Gly Leu Val Ile Phe Thr Trp Gly Asn Val Ser Ala Ile

20 25 30

Asp Arg Glu Ser Gly Leu Val Val Ile Lys Pro Ser Gly Val Ser Tyr

35 40 45

Asp Asp Met Lys Ala Glu Asp Met Val Val Val Asp Leu Asp Gly Lys

50 55 60

Val Val Glu Gly Arg Leu Lys Pro Ser Ser Asp Thr Pro Thr His Val

65 70 75 80

Val Leu Tyr Lys Ala Phe Pro Glu Ile Gly Gly Val Val His Thr His

85 90 95

Ser Thr Tyr Ala Thr Ala Trp Ala Gln Ala Gly Cys Asp Ile Pro Asn

100 105 110

Ile Gly Thr Thr His Ala Asp Tyr Phe His Asp Ala Ile Pro Cys Thr

115 120 125

Ala Asp Met Thr Glu Ala Glu Val Lys Gly Ala Tyr Glu Gln Glu Thr

130 135 140

Gly Asn Val Ile Val Lys Arg Phe Glu Gly Leu Asn Pro Val His Thr

145 150 155 160

Pro Gly Val Leu Val Lys Asn His Gly Pro Phe Ser Trp Gly Lys Asp

165 170 175

Ala His Asp Ala Val His Asn Ala Val Val Met Glu Gln Val Ala Lys

180 185 190

Met Ala Ser Ile Ala Tyr Ala Val Asn Pro Asn Leu Thr Met Asn Pro

195 200 205

Leu Leu Val Glu Lys His Phe Ser Arg Lys His Gly Pro Asn Ala Tyr

210 215 220

Tyr Gly Gln

225

<210> 8

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Bacteroides xylanisolvens XB1A

<400> 8

atgctggaag aactaaaaga aaaagtattt catgccaatc ttgaattggt aaagcatgga 60

ttagtcatct ttacctgggg caatgtctct gctatcgacc gtgaaagcgg actggtagta 120

atcaaaccca gtggtgtaag ttatgatgat atgaaagccg aagatatggt agtagtggat 180

ctggatggca aggtcgttga aggacgactg aagccatcct cggatactcc tactcacgta 240

gtactttaca aagcatttcc ggagattggc ggagtggtac acacccactc tacttatgca 300

actgcctggg cacaggcggg atgcgacatt ccgaacatcg gaacgactca cgcggattat 360

ttccatgacg ctattccctg cacggcagat atgacggaag cggaagtgaa aggcgcttac 420

gaacaggaaa ccggtaatgt gatagtgaaa cgttttgaag gattgaatcc tgtacataca 480

ccgggagtat tggtgaagaa tcacggtcct ttctcttggg gaaaagatgc gcacgatgct 540

gtacacaacg ccgtggtaat ggaacaggta gccaaaatgg caagtatcgc ttatgcggta 600

aacccgaatt taacaatgaa cccattgctg gtagaaaaac atttcagccg caagcatggt 660

ccgaatgctt attatggaca ataa 684

<210> 9

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Lactobacillus reuteri KCTC3594

<400> 9

Met Leu Glu Asp Leu Lys Lys Glu Val Tyr Lys Ala Asn Met Arg Leu
1 5 10 15

Pro Lys Leu Gly Leu Val Ser Phe Thr Trp Gly Asn Val Ser Gly Ile

20 25 30

Asp Arg Glu Lys Gly Leu Phe Val Ile Lys Pro Ser Gly Val Pro Tyr

35 40 45

Glu Glu Met Lys Pro Glu Asp Met Val Val Val Asn Leu Asp Gly Glu

50 55 60

Val Val Glu Gly Asp Leu Asn Pro Ser Ser Asp Thr Pro Thr His Thr

65 70 75 80

Tyr Leu Tyr Asn His Phe Pro Lys Ile Gly Gly Val Val His Thr His

85 90 95

Ser Pro Trp Ala Val Ala Phe Ala Ala Ala Arg Met Asp Val Pro Ala

100 105 110

Met Asn Thr Thr His Ala Asp Thr Phe Tyr Thr Asp Val Pro Ala Ala

115 120 125

Asp Ala Leu Thr Lys Glu Glu Ile Glu Glu Asp Tyr Glu Gly Asn Thr

130 135 140

Gly Lys Val Ile Val Arg Ser Phe Lys Glu Arg Gly Leu Asp Tyr Glu

145 150 155 160

Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Met Gln His Gly Pro Phe Thr Trp Gly

165 170 175

Pro Thr Pro Asp Lys Ala Val Tyr Asn Ala Lys Val Leu Glu Val Val

180 185 190

Ala Glu Glu Asp Tyr His Ala Met Gln Leu Thr His Gln Asp Leu His

195 200 205

Leu Pro Gln Tyr Leu Leu Asp Lys His Tyr Tyr Arg Lys His Gly Ala

210 215 220

Asn Ala Tyr Tyr Gly Gln Asn Asn Ala His Ser Lys Asp His Ala Ala

225 230 235 240

His Ala

<210> 10

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase derived from Lactobacillus reuteri KCTC3594

<400> 10

atgttagaag atttaaagaa agaagtttat aaagcaaata tgcggcttcc taaactaggc 60

cttgtttcct ttacatgggg caatgtttca gggattgacc gtgaaaaagg attgtttgtt 120

attaaacctt ctggagttcc atatgaagag atgaagccgg aagacatggt tgttgtcaac 180

ttggatggtg aggtagtcga gggtgacttg aatccatcca gtgatactcc tactcacact 240

tacctttata atcacttccc aaagattggt ggagtcgttc atactcattc accatgggca 300

gtagcgtttg cagctgcacg gatggatgtt ccagcaatga ataccactca cgctgatact 360

ttctatactg atgtcccagc tgctgatgct ttgacgaagg aagaaattga agaagactat 420

gaaggtaata caggaaaggt aatcgttcgt tcattcaagg aacggggttt ggactatgaa 480

gcaacccag cggcattagt aatgcaacat ggtccattta cctgggggcc aacacctgac 540

aaagcagttt ataatgctaa ggtgttagaa gttgtggcag aagaagatta tcatgcaatg 600

caattaacgc accaagacct tcacttacct caatacttgt tggacaaaca ctattaccgc 660

aagcatggtg cgaatgcata ttacggacaa aataatgcgc attcaaaaga tcatgcagct 720

cacgcttaa 729

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Bacteroides xylanisolvens XB1A derived L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase

<400> 11

agatatacat atgctggaag aactaaaaga aa 32

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Bacteroides xylanisolvens XB1A derived L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase

<400> 12

aaggctcgag ttgtccataa taagcattcg 30

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Lactobacillus reuteri KCTC3594 derived

L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase

<400> 13

ccgcggatcc atgttagaag atttaaagaa g 31

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Lactobacillus reuteri KCTC3594 derived

L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase

<400> 14

aaggctcgag agcgtgagct gcatgatc 28