

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 10월 23일 (23.10.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/171570 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/003316
- (22) 국제출원일: 2013년 4월 18일 (18.04.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 건국대학교 산학협력단 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) [KR/KR]; 143-701 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김태수 (KIM, Tae Su); 143-701 서울시 광진구 아차산로 263 건국대학교 공학관 A동 1507호, Seoul (KR). 이정걸 (LEE, Jung Kul); 143-861 서울시 광진구 능동로 50 이튼타워리버 2차 A-2401, Seoul (KR). 고휘 (GAO, Hui); 133002 지린 엔지시티 공위엔 로드 977, Jilin (CN).
- (74) 대리인: 특허법인 수 (SU INTELLECTUAL PROPERTY); 135-909 서울시 강남구 논현로 523 2층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

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

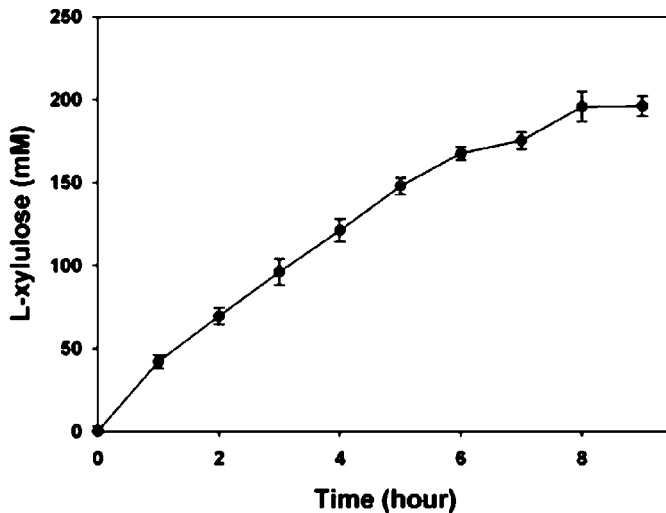
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PRODUCTION OF L-XYLULOSE THROUGH COUPLING OF NOVEL NADH OXIDASE DERIVED FROM STREPTOCOCCUS PYOGENES AND L-ARABINITOL OXIDASE

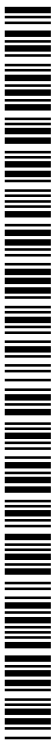
(54) 발명의 명칭 : 화농연쇄구균 유래 신규 NADH 산화효소 및 L-아라비니톨 산화효소와의 커플링에 의한 L-자일룰로스의 생산



(57) Abstract: The present invention relates to a novel *Streptococcus pyogenes* strain producing an NADH oxidase, an NADH oxidase derived from the strain and producing water and a gene thereof, and a method for producing the enzyme, and more specifically, to an NADH oxidase producing water, to a nucleic molecule coding the enzyme, to a vector comprising the nucleic molecule, to a transformant comprising the vector, and to a regeneration of a coenzyme using the NADH oxidase producing water. In addition, it was verified that a high-priced coenzyme is regenerated and repeatedly used through a coupling reaction of an L-arabinitol dehydrogenase producing L-rare saccharides and a novel NADH oxidase producing water, thereby economically producing L-rare saccharides. Further, a purification process can be simplified by using the NADH oxidase producing water to no longer generate byproducts other than water.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/171570 A2



본 발명은 신규 NADH 산화효소를 생산하는 화농연쇄구균 (*Streptococcus pyogenes*), 그 균주로부터 유래한 물을 생성하는 NADH 산화효소와 유전자 및 그 효소의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 물을 생성하는 NADH 산화효소, 이를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소를 이용한 조효소의 재생에 관한 것이다. 또한 L-회소당을 생성하는 L-아라비니톨 탈수소화효소와 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소와의 커플링 반응을 통하여 고가의 조효소를 재생시켜 반복 사용함으로써 경제적으로 L-회소당을 생산할 수 있음을 입증하였으며, 물을 생성하는 NADH 산화효소를 이용함으로써 물 이외에 부산물이 생성되지 않아 정제 공정을 간소화할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 화농연쇄구균 유래 신규 NADH 산화효소 및 L-아라비니톨 산화효소와의 커플링에 의한 L-자일롤로스의 생산 기술분야

- [1] 본 발명은 화농연쇄구균 유래의 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소와 L-아라비니톨 산화효소를 커플링 반응시켜 L-자일롤로스를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 화농연쇄구균 유래의 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소, 이를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 이를 이용하여 NADH 산화효소와 L-아라비니톨 산화효소와의 커플링 반응을 통한 L-자일롤로스의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생화학적으로 산화환원 반응은 비대칭 반응에서 중요할 뿐만아니라 광학적 순도를 가지는 화학물질이나 의약학에서 주목하고 있는 분야이다. 그러나 이러한 산화환원 반응에는 NAD(P)⁺ 또는 NAD(P)H와 같은 고가의 조효소가 필요로 하기 때문에 산업적인 응용이 어려운 실정이다. 따라서 이러한 고가의 조효소를 재생하여 연속적으로 사용하는 것이 경제적 확보를 위해 필요하다. 보통 조효소의 재생은 효소 반응 시에 화학적, 전기적, 광촉매적 물질을 첨가하거나 효소를 첨가하여 이루어진다. 효소를 사용한 조효소 재생에는 두 가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 효소와 화학첨가물을 넣어 재생하는 것이고, 두 번째 방법은 두 개의 효소를 넣고 커플링시켜 조효소를 재생하는 방법이다. NAD(P)⁺ 및 NAD(P)H를 재생하기 위한 대표적 방법으로는 formate dehydrogenase와 glucose dehydrogenase를 이용한 방법이 잘 알려져 있으나, 반응 중 부산물이 생성되어 산물의 순도를 낮추고 정제비용을 높이는 문제점이 있다. 하지만 물을 생성하는 NADH 산화효소를 사용하면 부산물로 물만 생성되기 때문에 높은 경제성을 확보할 수 있다.

- [3] 본 발명에서는 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제시하고, 이를 L-아라비니톨 탈수소화효소와 커플링하여 조효소를 재생시킴으로써 L-아라비니톨로부터 L-자일롤로스를 고수율 및 연속적으로 생산할 수 있는 최적 반응 조건을 제시함으로써, L-자일롤로스를 높은 수율로 저렴하게 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 첫 번째 목적은 화농연쇄구균으로부터 유래된 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자를 제공하는 것이다.
- [5] 본 발명의 두 번째 목적은 상기 유전자로부터 발현된 물을 생성하는 NADH

산화효소를 제공하는 것이다.

- [6] 본 발명의 세 번째 목적은 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자를 포함한 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 네 번째 목적은 형질전환된 재조합 대장균을 포함하는 모든 형질전환 균주를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다섯 번째 목적은 형질전환된 재조합 대장균을 이용한 재조합 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 여섯 번째 목적은 상기 효소와 L-아라비니톨 탈수소화효소를 커플링시켜 조효소를 재생시킴으로써 L-자일룰로스를 생산하는 최적 조건을 제시하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 L-자일룰로스의 생산방법에 있어서, 화농연쇄구균균주의 물을 생성하는 NADH 산화효소와 히포크레아 제코리나(*Hypocrea jecorina*) 유래의 L-아라비니톨 탈수소화효소를 커플링시켜 조효소를 재생시키는 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명은 서어던 하이브리다이제이션과 콜로니 혼성화를 통하여 화농연쇄구균으로부터 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 클로닝하는 것을 특징으로 한다.
- [12] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 그 기능적 단편을 가지는 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일 구체예에 있어서 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소는 화농연쇄구균에서 유래한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [14] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 효소의 분자량은 50 kDa인 것을 특징으로 한다.
- [15] 또한 본 발명은 본 발명의 상기 효소를 코딩하는 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 제공한다.
- [16] 본 발명의 상기 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 것이 바람직하다.
- [17] 또한 본 발명은 본 발명의 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 균주를 배양하여 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제조하는 방법을 제공한다.
- [18] 또한 본 발명은 본 발명의 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소를 히포크레아 제코리나(*Hypocrea jecorina*) L-아라비니톨 탈수소화효소와 커플링 반응을 통하여 조효소를 재생시킴으로써 L-아라비니톨로부터 L-자일룰로스를 저비용 및 고수율로 제조하는 방법을 제공한다.
- [19] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 유효성분으로 포함하는 L-자일룰로스 생산용 조성물을 제공한다.

- [20] 이하, 본 발명을 설명한다.
- [21] 본 발명의 물을 생성하는 NADH 산화효소는 서열번호 4로 표시되는 아미노산서열을 가진 것을 특징으로 한다. 또, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해서, 이들 아미노산서열을 가진 단백질이 표시하는 물을 생성하는 NADH 산화효소 활성이 손상되지 않는 범위 내에서, 1이상의 아미노산의 결실, 치환 및 부가의 적어도 1종의 변이가 도입된 변이체 NADH 산화효소도 본 발명에 관한 물을 생성하는 NADH 산화효소에 포함된다.
- [22] 또, 본 발명에는 서열번호 4의 아미노산서열을 가진 물을 생성하는 NADH 산화효소를 코딩하는 NADH 산화효소 유전자가 포함되고, 그 유전자 서열로서는 서열번호 3으로 표시되는 것을 들 수 있다. 또, 이들 서열번호 3의 염기서열을 변이시켜서 얻게 되는 상기한 변이체 물을 생성하는 NADH 산화효소를 코딩하는 변이 유전자도 본 발명에 관한 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자에 포함된다.
- [23] 또, 본 발명에는 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 함유하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터에 의해서 형질전환된 형질전환체가 포함된다. 또한, 본 발명에는 이 형질전환체를 배양하여 얻게 되는 배양물로부터 물을 생성하는 NADH 산화효소를 분리하는 것을 특징으로 하는 물을 생성하는 NADH 산화효소의 제조방법이 포함된다.
- [24] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [25] 본 발명의 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자는 화농연쇄구균의 균체로부터 분리된 것이다. 먼저 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 보유한 균주로부터 염색체 DNA를 취득한다.
- [26] 다음에, 설계한 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하고 화농연쇄구균 균주의 염색체 DNA를 주형으로 해서 폴리머라제 연쇄반응(PCR)을 행하여, 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 부분적으로 증폭한다. 이와같이 얻은 PCR 증폭 단편은 화농연쇄구균 균주의 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자에 100% 상동성을 가진 단편으로서, 콜로니 하이브리다이제이션을 행할 때의 프로브로서 높은 S/N비를 기대할 수 있는 동시에, 하이브리다이제이션의 스트린전시(stringency) 제어를 용이하게 한다. 상기의 PCR 증폭 단편을 적당한 시약을 사용해서 표지하고, 상기 염색체 DNA 라이브러리에 대해서 콜로니 하이브리다이제이션을 행하여, 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 선발한다 (Current Protocols in Molecular Biology, 1권, 603페이지, 1994년).
- [27] 상기의 방법에 의해 선발된 대장균으로부터 알칼리법 (Current Protocols in Molecular Biology, 1권, 161페이지, 1994년)을 사용해서 플라스미드를 회수함으로써, 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 함유하는 DNA 단편을 얻을 수 있다. 또한, 상기 방법에 의해 염기서열을 결정 한 후에는, 상기 염기서열을 가진 DNA 단편의 제한효소 분해에 의해 조제한 DNA 단편을 프로브로 해서 하이브리다이제이션으로써 본 발명의 전체 유전자를 얻는 것이

가능하다. 서열번호 3에는 본 발명의 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자의 염기서열을, 서열번호 4에는 상기 유전자가 코딩하는 아미노산 서열을 표시한다.

- [28] 본 발명의 형질전환된 미생물은, 본 발명의 재조합백터를 상기 재조합백터의 제작 시 사용한 발현백터에 적합한 숙주 속에 도입함으로써 얻게 된다. 예를 들면 대장균 등의 세균을 숙주로서 사용하는 경우, 본 발명에 관한 재조합백터는 그 자신이 숙주 속에서 자율복제 가능한 동시에, 프로모터와 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 함유하는 DNA 및 전사종결서열 등의 발현에 필요한 구성을 가진 것임이 바람직하다. 본 발명에 사용된 발현백터로서는 pET28a를 사용하였으나 상기의 요건을 만족하는 발현백터이면 어느 것이나 사용가능하다.
- [29] 본 발명에 관한 물을 생성하는 NADH 산화효소의 제조는, 이를 코딩하는 유전자를 가진 재조합백터에 의해 숙주를 형질전환해서 얻은 형질전환체를 배양하고, 배양물(배양균체 또는 배양상청액) 속에 유전자 산물인 물을 생성하는 NADH 산화효소를 생성 축적시켜, 배양물로부터 효소를 취득함으로써 행하여진다.
- [30] 물을 생성하는 NADH 산화효소의 취득 및 정제는, 얻게 되는 배양물의 균체를 원심분리를 통해 회수하고, 균체파쇄, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환 크로마토그래피 등을 단독으로 또는 조합함으로써 행할 수 있다.
- [31] 본 발명자는 물을 생성하는 NADH 산화효소를 개발하고자 화농연쇄구균으로부터 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자를 클로닝하였다. 전기 유전자를 삽입한 재조합 NADH 산화효소와 하이포크레아 제코리나 L-아라비니톨 탈수소화효소와의 커플링 반응을 통해 L-아라비니톨로부터 높은 수율로 L-자일로스르를 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 부산물의 생성을 크게 감소시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [32] 본 발명은 산업적으로 유용한 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제조하기 위하여 화농연쇄구균의 유전자로부터 NADH 산화효소를 암호화하는 유전자를 클로닝하고, 전기 유전자의 염기서열 및 그로부터 유추되는 아미노산 서열을 분석한다.
- [33] 전기 유전자를 삽입한 재조합 균주에 의해 NADH를 산화할 수 있으며, 조효소인 NADH와 NAD⁺를 재생하는데 있어서 물을 제외한 부산물을 생성하지 않는 목적으로 사용할 수 있다.
- [34] 또한 물을 생성하는 NADH 산화효소와 하이포크레아 제코리나 L-아라비니톨 탈수소화효소의 커플링 반응을 통해 L-자일로스르를 생산하는 최적 조건은 효소 농도 4.9 U/ml, 8.2 mM NAD⁺, 반응 pH 8.0, 반응온도 30.9°C인 것을 특징으로 한다.
- [35]

발명의 효과

- [36] 본 발명에서 분리한 화농연쇄구균 유래 물을 생성하는 NADH 산화효소는 조효소인 NAD⁺를 재생하는데 이용될 수 있고, 특히 물을 생성하는 NADH 산화효소와 하이포크레아 제코리나 유래의 L-아라비니톨 탈수소화효소의 커플링 반응에 의해 L-자일롤로스를 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 벡터 pUC-LOX의 벡터맵으로 화농연쇄구균의 염색체에서 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 지니고 있는 단편을 찾아 대장균에서 이용되는 벡터에 클로닝한 것이다.
- [38] 도 2는 화농연쇄구균 균주로부터 유래된 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 포함하는 발현벡터의 제조방법을 나타내는 도면이다.
- [39] 도 3은 화농연쇄구균 균주로부터 유래된 물을 생성하는 NADH 산화효소의 SDS-PAGE 젤 사진이다. 1; 사이즈 마커, 2; 물을 생성하는 NADH 산화효소의 불용성 단백질, 3; 물을 생성하는 NADH 산화효소의 수용성 단백질, 4; 정제된 물을 생성하는 NADH 산화효소.
- [40] 도 4는 L-아라비니톨의 농도에 따른 L-아라비니톨로부터 생산되는 L-자일롤로스의 전환율.
- [41] 도 5 내지 7은 반응표면분석을 통하여 L-아라비니톨로부터 생산되는 L-자일롤로스의 전환율의 분석. (도 5) L-아라비니톨 탈수소화효소 농도 (U/ml)와 NAD의 농도 (mM) 사이의 상관관계, (도 6) L-아라비니톨 탈수소화효소 농도 (U/ml)와 pH 사이의 상관관계, (도 7) L-아라비니톨 탈수소화효소 농도 (U/ml)와 생산 온도 (°C) 상이의 상관관계.
- [42] 도 8은 커플링 반응을 통하여 사용하여 L-자일롤로스 생산 시 L-아라비니톨로부터 L-자일롤로스가 생산되는 것을 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 분석한 결과를 나타낸 도이다. A. 커플링 반응전 B. 커플링 반응 후
- [43] 도 9는 커플링 반응을 통해 최적화된 조건에서 시간대별 L-자일롤로스의 생산량을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 이하, 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명하나, 본 발명이 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [45] 실시예 1: 물을 생성하는 NADH 산화효소 생산균의 선별
- [46] 물을 생성하는 NADH 산화효소를 생산하는 고효성 콜로니를 분리하기 위하여 화농연쇄구균의 배양액 10 ul를 생리식염수 10 ml에 현탁하고, 현탁액의 10 ul (1×10^4 cfu ml⁻¹)를 취하여 3% malt extract가 첨가된 웹톤 한천배지 (Malt extract peptone agar)에 도말한 후, 37 °C에서 2일간 배양하였다. 고체 웹톤배지에서 콜로니가 형성된 후 콜로니를 취하여 물을 생성하는 NADH 산화효소 활성을 갖는 콜로니를 선별하는 방법으로 물을 생성하는 NADH 산화효소를 생산하는

고활성 화농연쇄구균을 탐색하였다.

[47] 실시에 2: 화농연쇄구균 (KCTC 3208)으로부터 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자의 클로닝

[48] L-아라비니톨 분해 효소인 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자의 염기서열을 얻기 위해 세균인 화농연쇄구균 (KCTC 3208)을 사용하였다. 일반적으로 유사한 기능을 지니는 유전자의 경우에는 각 염기서열과 크기가 어느 정도 유사하다고 알려져 있다. 따라서 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자도 약 1.4 kb 정도의 크기를 지녔을 것으로 추정하고 다른 세균의 이미 알려진 물을 생성하는 NADH 산화효소 염기서열을 바탕으로 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 물을 생성하는 NADH 산화효소 전체 유전자를 클로닝 하였다.

[49] 클로닝에는 대장균 XL1-Blue와 pUC18 벡터를 사용하였다. 대장균의 배양 배지로는 일반적 조성의 LB 배지를 사용하였고, 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 배양에는 상기 펩톤천배지(Malt extract peptone agar)를 사용하였다. 대장균의 평판(plate) 배지로는 각각 LB 아가(agar)와 3~5% 설탕, 0.3~0.5% 쇠고기 추출물, 0.9~1.1% 박토 펩톤, 1.3~1.7% 아가 조성의 플레이트를 사용하였다. 필요에 따라 50 µg/ml 엠피실린(ampicillin)을 첨가하였다.

[50] 배양 방법은 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 경우, 배지 50 ml이 들어 있는 250 ml의 삼각 플라스크에 접종하여 37°C, 200 rpm 조건에서 1일간 배양하였고, 대장균의 경우에는 37°C, 200 rpm 조건에서 16 시간 배양하였다.

[51] 대부분의 DNA는 아가로스겔(TAE buffer, 0.5%) 전기영동법으로 확인하였고, 겔 상에서 DNA 밴드의 정제는 QiaXII 겔 추출장치(QIAGEN, USA)를 이용하였으며, DNA간의 연결(ligation) 반응은 T4 DNA 연결효소(NEB)를 이용하였다. 또한 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 RNA 추출은 Qiagen plant total RNA kit(QIAGEN)를 이용하였으며, cDNA 합성을 위한 역전사 효소는 Oligo-dT RT-mix(intron)를 이용하였다.

[52] 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 클로닝하기 위하여 화농연쇄구균 (KCTC 3208) 염색체를 분리하였다. 화농연쇄구균 (KCTC 3208) 내의 NADH 산화효소 유전자의 일부분을 증폭하기 위해 다른 세균에서 이미 알려진 물을 생성하는 NADH 산화효소 염기서열을 바탕으로 비특이적 프라이머(degenerated primer), DhLOX F-5'- TCH TTY YTH TCW TGT GGD AT -3' (서열번호 1)와 DhLOX R-5'- CGH AYW GCR TTV GTD GCY A -3' (서열번호 2)를 제작하였다. 이를 이용하여 연쇄중합반응에 의해 784 bp 크기에 해당하는 NADH 산화효소 유전자 일부를 화농연쇄구균 (KCTC 3208) 염색체에서 증폭하였다.

[53] 그리고 증폭된 상기의 부분 염기서열 중 그 절단 부위가 존재하지 않는 제한 효소인 BamHI, EcoRI, HindIII, Sall, XbaI을 이용하여 화농연쇄구균 (KCTC 3208)의 genomic DNA를 완전히 절단하였다. 그리고 앞서 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻은 DNA 단편을 이용하여 방사능 표지된 탐침자(probe)를 만들었다.

이를 이용하여 서어던 하이브리다이제이션으로 찾고자 하는 유전자를 지닌 DNA 단편을 탐색하였다. BamHI, HindIII, XbaI으로 염색체를 자른 경우에 있어서는 서어던 하이브리다이제이션의 결과 나타난 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자를 지닌 DNA의 크기가 약 20~23 kb정도 되어 너무 큰 관계로 이용하지 않았고, 2.5kb 정도의 EcoRI으로 잘린 조각과 약 5.8 kb정도의 SalI으로 잘린 조각을 이용하여 원하는 유전자를 탐색하였다. 염색체를 EcoRI으로 절단한 후 분리한 2.5kb 정도 크기의 DNA 조각과 SalI으로 절단한 5.8kb 정도의 DNA 단편들을 pUC18에 클로닝하고 이를 pUC-LOX라고 명명하였다(도 1).

- [54] pUC-LOX 라이브러리에서 앞서 만든 1 kb 크기의 탐침자를 이용하여 콜로니 혼성화를 수행하여 원하는 물을 생성하는 NADH 산화효소의 유전자를 지닌 클론을 결정하였다. 결정한 클론의 염기서열을 분석하여 물을 생성하는 NADH 산화효소 전체 유전자 염기서열 1,371 bp를 밝혔다 (서열번호 3). 이는 앞서 예상한 바와 같이 다른 여러 세균에서 밝혀진 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자와 크기가 비슷하였다. 또한 화농연쇄구균 (KCTC 3208) 물을 생성하는 NADH 산화효소는 다른 물을 생성하는 NADH 산화효소에서 공통적으로 나타나는 염기서열을 지니고 있음을 확인하였다.

[55] 실시에 3: 재조합 발현 벡터 및 재조합 균주 제조

- [56] 실시예 2에 따른 물을 생성하는 NADH 산화효소를 암호화하는 유전자를 이용하여, NADH 산화효소를 대장균에서 대량으로 발현시키기 위하여 발현 벡터 pET28a(Novagen, 미국)의 BamHI과 XhoI 부위에 상기 효소 유전자를 삽입한 후 대장균 BL21(DE3)(NEB, 영국)에 형질 전환시켰다 (도 2).

[57] 실시에 4: 재조합 물을 생성하는 NADH 산화효소의 발현 및 순수 분리

- [58] 상기 실시예 3에서 제조된 재조합 균주를 LB 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 SDS-PAGE 젤에서 발현된 단백질을 확인하였다 (도 3).

- [59] 상기 실시예 4의 방법으로 발현시킨 재조합 물을 생성하는 NADH 산화효소를 정제하기 위하여, 재조합 균주 배양액을 원심분리 (8000×g, 10분)하여 균체만을 모은 후, 초음파 처리하여 대장균의 세포벽을 파쇄하고, 20,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물(균체)을 제거하고 상등액을 수득하였다. 수득 후, 최종적으로 Ni-NTA His-tag 결합 크로마토그래피(Qiagen, 독일)를 수행하여, 재조합 물을 생성하는 NADH 산화효소를 순수 분리하였다.

[60] 실시에 4: NADH 산화효소와 L-아라비니톨 탈수소화효소의 커플링 반응을 통한 L-자일톨로스의 최적 생산 조건 실험

- [61] (1) 커플링 반응을 통한 L-자일톨로스의 최적생산에 L-아라비니톨의 농도가 미치는 영향

- [62] 신규 물을 생성하는 NADH 산화효소의 농도는 5.0 U/ml, L-아라비니톨 탈수소화효소효소의 농도는 4.9 U/ml, NAD⁺ 농도는 8.2 mM, pH는 8, 온도는 30°C 및 L-자일톨로스의 생산온도를 50 ~ 300 mM로 달리하여 효소 활성을 비교하였다. L-아라비니톨의 농도를 달리하여 실험한 결과 도 4와 같았고, 50

mM ~ 150 mM의 L-아라비니톨 농도에서 L-자일톨로스로 전환되는 수율이 90%이상으로 최적 전환율을 보였다.

[63] (2) 커플링 반응을 통한 L-자일톨로스의 최적생산 실험 조건

[64] 물을 생성하는 NADH 산화효소의 농도는 6.25 U/ml, L-아라비니톨 농도는 250 mM, L-아라비니톨 탈수소화효소의 농도는 1.37~6.86 U/ml, NAD⁺ 농도는 2.5~12.5, pH는 2.5~12.5 및 생산온도를 20 ~ 40°C로 달리하여 L-아라비니톨로부터 L-자일톨로스의 전환율을 비교하였다 (표 1).

[65] 표 1

[Table 1]

	암호화된 수치				
	-α	-1	0	+1	+ α
효소 농도 (U/ml)	1.37	2.74	4.12	5.49	6.86
NAD ⁺ 농도 (mM)	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
pH	6	7	8	9	10
온도 (°C)	20	25	30	35	40

[66] 표 1은 효소활성 최적화를 위한 조건 실험 표이다.

[67] (3) 커플링 반응에 의한 L-자일톨로스의 전환효율에 최적화

[68] 상기 실시예 4(2)의 조건을 바탕으로 커플링 반응을 통하여 L-아라비니톨로부터 L-자일톨로스의 전환 효율을 최적화하기 위하여 NAD 농도, pH, 반응 온도, L-아라비니톨 탈수소화효소의 농도를 달리하여 실험하였다. L-자일톨로스의 생산을 최적화하기 위하여 Reaction Surface Methodology를 통하여 30개의 실험을 디자인 하였다. 각각의 실험을 통한 L-자일톨로스 전환율은 표 2와 같았으며, 각 실험 변수들의 상관관계는 도 5 내지 7과 같았다.

[69] 표 2

[Table 2]

번호	HjLAD (U/mL)	NAD+(m M)	pH	온도 (°C)	전환율 (%)	예상전환율 (%)
1	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
2	5.49	5	9	25	63.71	65.87
3	4.12	12.5	8	30	70.74	73.07
4	2.75	5	7	25	61.39	61.01
5	2.75	10	7	25	70.36	71.04
6	2.75	5	9	35	50.00	50.52
7	5.49	10	9	25	72.04	69.33
8	5.49	10	7	35	68.87	68.53
9	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
10	2.75	5	7	35	63.33	65.03
11	5.49	10	9	35	69.07	70.02
12	5.49	10	7	25	62.16	62.22
13	2.75	10	9	25	64.29	64.07
14	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
15	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
16	4.12	7.5	6	30	67.52	66.37
17	2.75	10	7	35	73.62	72.04
18	2.75	5	9	25	52.80	52.12
19	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
20	5.49	5	9	35	71.26	69.57
21	2.75	10	9	35	61.39	59.46
22	4.12	7.5	8	30	76.94	76.94
23	4.12	2.5	8	30	64.48	62.59
24	4.12	7.5	8	40	60.00	60.57
25	5.49	5	7	35	69.19	70.01
26	4.12	7.5	8	20	56.00	55.87
27	1.37	7.5	8	30	63.32	64.04
28	6.86	7.5	8	30	74.56	74.27

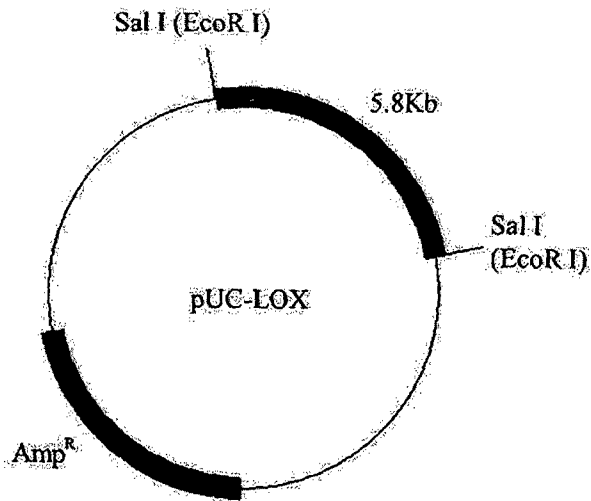
29	5.49	5	7	25	59.77	60.68
30	4.12	7.5	10	30	57.38	58.97

- [70] 표 2는 RSM을 통한 L-자일톨로스 생산 최적화 표이다.
- [71] (4) 최적 조건에서 커플링을 통한 L-아라비니톨로부터 L-자일톨로스의 생산실험
- [72] 본 발명 균주 화농연쇄구균 (KCTC 3208) 유래의 물을 생성하는 NADH 산화효소와 히포크레아 제코리나 유래의 L-아라비니톨 탈수소화효소를 이용한 커플링 실험을 수행하였다. 커플링 반응액 내의 물을 생성하는 NADH 산화효소의 농도는 6.25 U/ml, L-아라비니톨 농도는 250 mM, L-아라비니톨 탈수소화효소의 농도는 4.9 U/ml, NAD⁺ 농도는 8.2 mM, pH는 8.0, 온도는 30.9°C로 조절하였다. 상기 최적화된 커플링 반응에서 생성된 L-자일톨로스를 HPLC에서 확인하였다 (도 8). 최적화 된 조건에서 실험한 결과 반응 시간 별 전환수율을 도 7에 나타내었으며, 8시간 반응시켰을 때 78.4%의 최대 전환율을 나타내었다 (도 9).
- [73]
- [74]

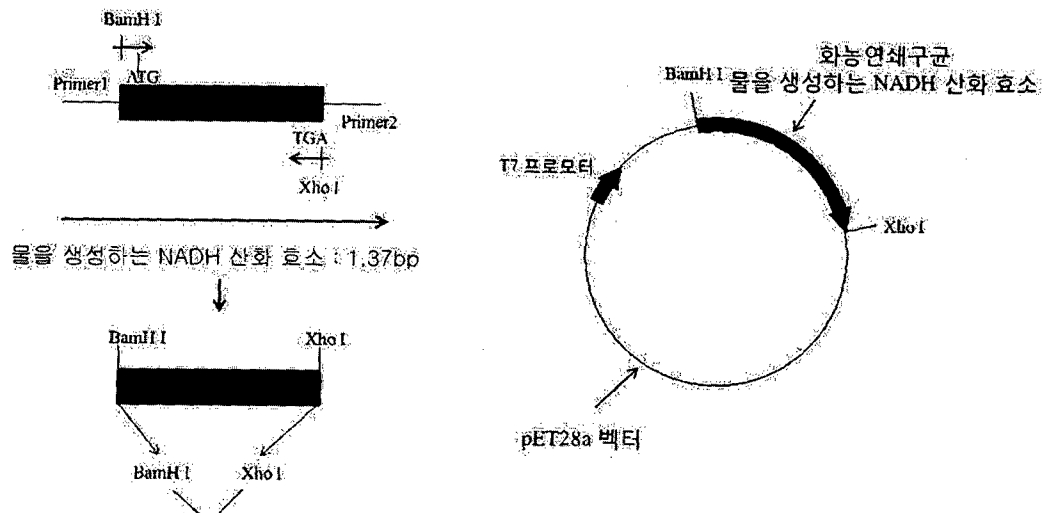
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 물을 생성하는 신규한 NADH 산화효소.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 물을 생성하는 NADH 산화효소는 NADH 산화 시에 물을 생성하는 하는 것을 특징으로 하는 신규한 NADH 산화효소.
- [청구항 3] 제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 효소를 코딩하는 유전자.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 가지는 유전자.
- [청구항 5] 제 3항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 물을 생성하는 NADH 산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 6] 제 5항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 균주를 배양하여 물을 생성하는 NADH 산화효소를 제조하는 방법.
- [청구항 7] 기질에 제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 효소를 처리하여 기질을 산화하는 방법.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 효소를 이용하여 NADH로부터 NAD⁺를 재생하는 방법.
- [청구항 9] 물을 생성하는 제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 NADH 산화효소와 L-아라비니톨 탈수소효소를 커플링시켜 L-자일룰로스를 생산하는 방법.
- [청구항 10] 제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 효소를 유효성분으로 포함하는 L-자일룰로스 생산용 조성물.

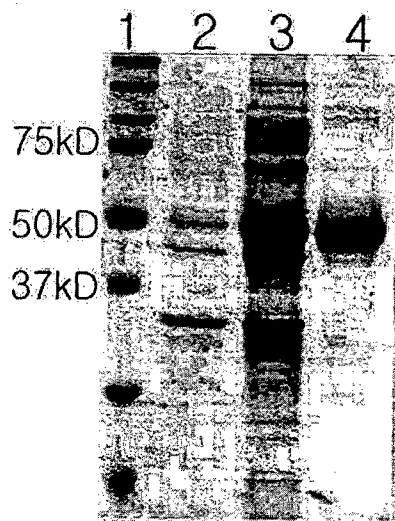
[Fig. 1]



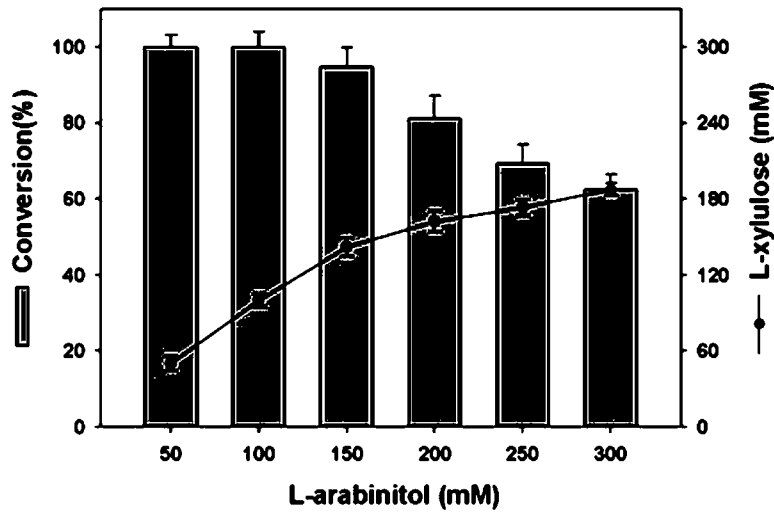
[Fig. 2]



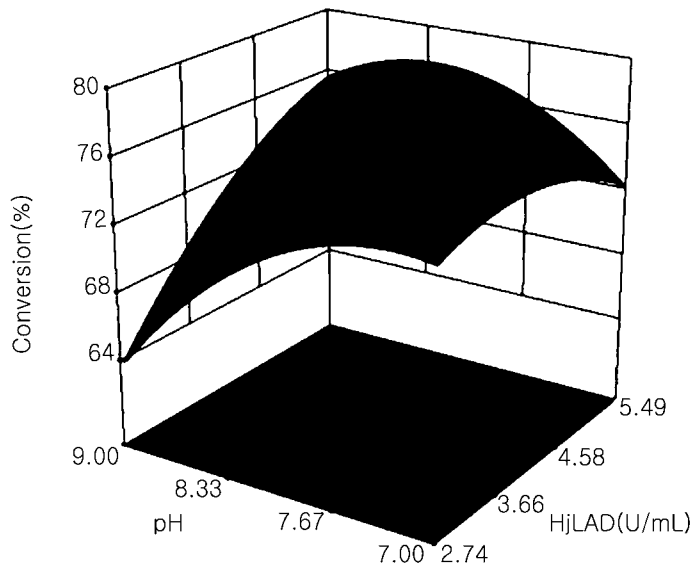
[Fig. 3]



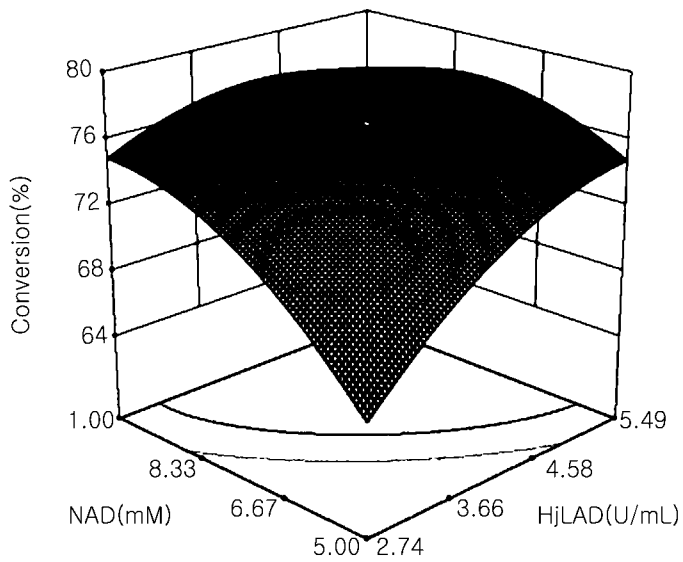
[Fig. 4]



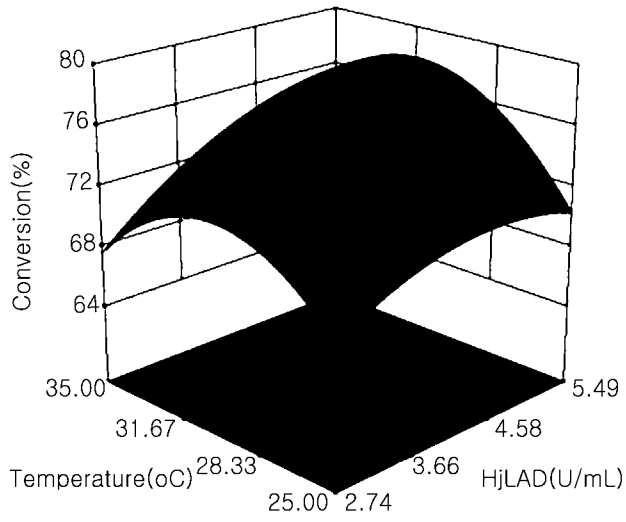
[Fig. 5]



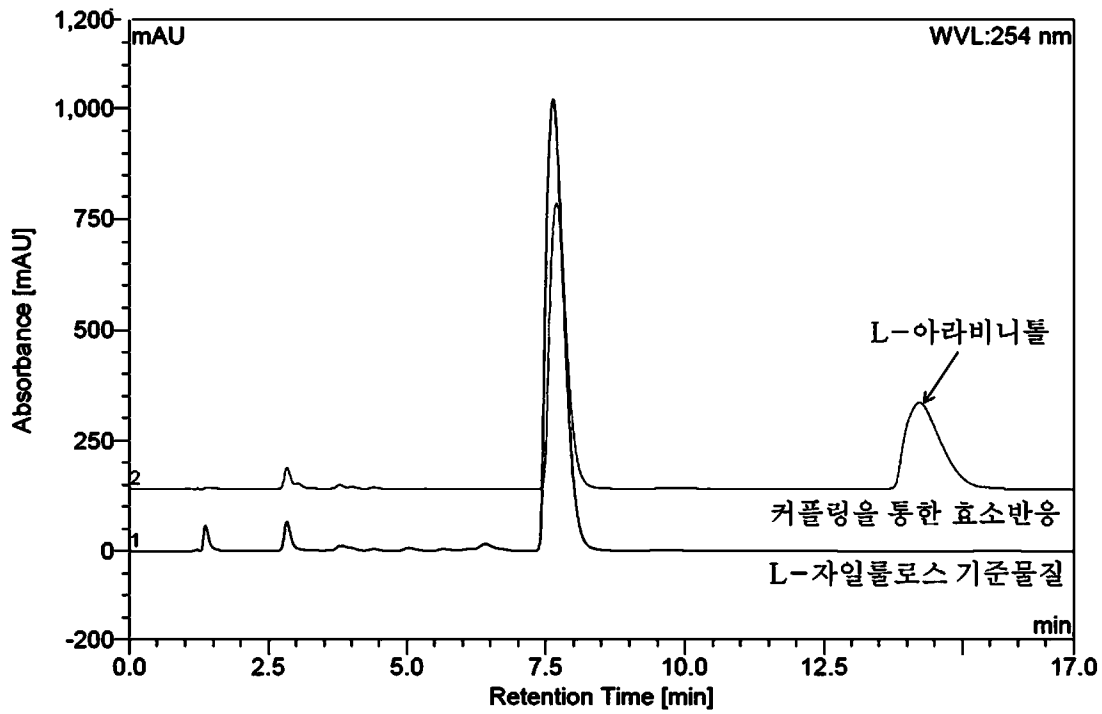
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

