



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0016381
(43) 공개일자 2016년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0100430

(22) 출원일자 2014년08월05일

심사청구일자 2014년08월05일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이규호

서울특별시 송파구 올림픽로4길 42

이경조

경기도 성남시 수정로306번길 15

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박원미

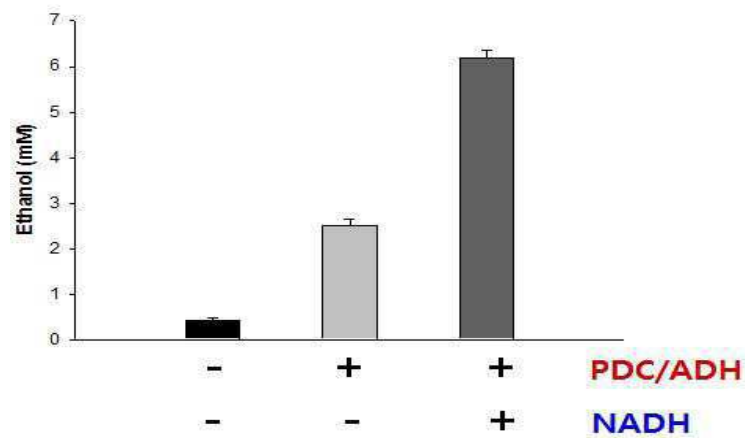
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **틸라코이드막을 이용한 에탄올 생산 증진 방법**

(57) 요약

본원은 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 반응물을 제공하는 단계; 상기 제 1 반응물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 혼합하여 제 2 반응물을 생성하는 단계; 및 상기 제 2 반응물에 광을 조사하는 단계를 포함하는, **인비트로**에서 에탄올 생산 증진 방법을 개시한다. 본원에 따른 방법은 광합성 유래의 환원력을 에탄올 생산 회로에 접목하여 에탄올을 생산능 향상에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

정유철

경상남도 김해시 내동 경원로55번길 9

이정국

서울특별시 마포구 백범로25길 63

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201331042

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 식품안전성 향상을 위한 식중독균의 위해인자 검출, 추적, 평가 및 제어 기반 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201432001

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 첨단융합기술개발사업

연구과제명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 반응물을 제공하는 단계;

상기 제 1 반응물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 혼합하여 제 2 반응물을 생성하는 단계; 및

상기 제 2 반응물에 광을 조사하는 단계를 포함하는, 인비트로에서 에탄올 생산 증진 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 반응물에서 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH) 중 하나 이상이고, 상기 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트인, 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 제 1 반응물은 NADP^+ , NAD^+ , 및 ADP를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 제 1 반응물은 0.1mM NADP^+ , 0.1mM NAD^+ , 0.1mM ADP, 10 내지 30mM 파이루베이트, 58nM PDC 및 440nM의 ADH를 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 틸라코이드 막은 시네코시스티스 (*Synechocystis* spp.), 클로로비움 테피디움 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클라미도모나스 레이하르트티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래인, 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 틸라코이드막은 총 부피 1ml의 조성물 중에 클로로필-a 당량으로 0.1 내지 10 μg 을 포함하는 것인, 에탄올 생산 증진용 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 제 2 반응물은 트랜스하이드로지나제를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 트랜스하이드로지나제는 제 2 반응물 총 1ml 당 0.2 μ g 내지 2.5 μ g으로 포함되는 것인, 방법.

청구항 9

광합성 세균 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 에탄올 생산 증진용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 조성물은 에탄올 생산에 환원력을 제공하는 것인, 조성물.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 틸라코이드막은 총 부피 1ml의 조성물 중에 클로로필-a 당량으로 0.1 내지 10 μ g을 포함하는 것인, 에탄올 생산 증진용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 조성물은 0.1mM NADP⁺, 0.1mM NAD⁺, 0.1mM ADP, 30mM 파이루베이트 및 58nM PDC 또는 440nM의 ADH 중 하나 이상의 성분을 추가로 포함하는 것인, 에탄올 생산 증진용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본원은 광합성 유래 환원력 사용 기술에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대부분의 나라에서 전적으로 수입에 의존해야만 하는 오일은 환경 문제와도 맞물려 대체 에너지를 찾으려는 노력으로 이어져 왔으며, 그 중 하나가 바로 미생물을 이용하여 바이오메스를 에탄올로 전환하는 것이다.

[0003] 그러나, 미생물을 이용한 에탄올의 생산은 생산비용에 비해 생산효율은 낮아 보다 경제적인 공정으로의 개선이 필요하다. 상기 공정에 대한 측면은 크게 글루코스 공급원으로서의 바이오메스를 미생물에서 사용될 수 있는 형태로 전환하는 것과 더불어 세포내에서의 효율적인 에탄올 생산을 위해 당 대사에 관여하는 효소를 발굴하거나 이의 효율을 개선하기 위한 방향으로 진행되고 있다.

[0004] 미생물을 이용한 에탄올 생산 공정에서는 사카로마이세스 서레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*) 또는 대장균 (*Escherichia coli*) 등을 이용하여 옥탄당 또는 오탄당과 같은 당을 발효하여 에탄올로 전환한다.

[0005] 에탄올은 NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) 의 존재하에서 파이루베이트 데카르복실라제(PDC)와 알콜

데하이드로지나제(ADH)와 같은 효소에 의한 연속적 반응을 통해 파이루베이트로부터 생산된다. 이들 효소는 세포내에서의 에탄올 생산효율을 높여서 전처리에 많은 비용이 드는 바이오메스의 사용량을 감소시킬 수 있다. 따라서, 이들 효소의 활성 개선은 어 전체 공정의 비용 감소에 있어 중요한 역할을 할 것이다.

- [0006] 이와 관련하여, US 공개특허공보 제2009/0155871호는 광 반응성 프로모터, 자이모모나스 모빌리스 유래의 PDC 코딩 서열 및 ADH 코딩서열을 포함하는 핵산 컨스트럭트 및 이를 시아노박테리움에 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있고,
- [0007] 대한민국 공개특허공보 제2011-0007981호는 신규한 알콜 탈수소효소 및 이를 미생물에 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있고,
- [0008] 대한민국 공개특허공보 제2011-0082141호는 글리세롤 생산능을 저감시킨 균주에 사카로마이세스 세레비지에 유래의 PDC 및 ADH 유전자를 도입하여 에탄올을 생산하는 방법을 개시하고 있다.
- [0009] 그러나, 본원발명과 같이 시네코시스티스 유래의 틸라코이드막을 이용하여 에탄올 생산능력을 증진시킨 예는 보고된 바 없으며, 새로운 에탄올 생산 시스템에 대한 개발 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본원은 광합성 유래의 환원력을 사용한 에탄올 생산 공정을 개발하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 한 양태에서 본원은 틸라코이드의 환원력을 이용한 에탄올 생산 증진 방법을 제공한다. 일 구현예에서 상기 방법은 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 반응물을 제공하는 단계; 상기 제 1 반응물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 혼합하여 제 2 반응물을 생성하는 단계; 및 상기 제 2 반응물에 광을 조사하는 단계를 포함한다.
- [0012] 일 구현예에서, 본원의 방법의 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트이고, 상기 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 및 알콜 데하이드로지나제(ADH)이나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0013] 본원에 따른 틸라코이드는 NADH를 제공하는 것이다.
- [0014] 본원의 방법에 따른 틸라코이드 막은 다양한 광합성 가능 균주/미세조류 유래의 것이 사용될 수 있으며, 예를 들면 상기 틸라코이드 막은 *Synechocystis* sp. *Chlorobium tepidum*, 또는 *Chlamydomonas reinhardtii* 의 것을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0015] 본원에 따른 방법에서, 상기 제 2 반응물은 트랜스하이드로지나제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 본원은 또한 광합성 세균 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 에탄올 생산 증진용 조성물을 제공한다. 본원에 따른 조성물은 에탄올 생산에 환원력을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 광합성 유래의 환원력을 에탄올 생산 회로에 접목하여 에탄올을 생산함으로써 광합성 유래 환원력의 유용성을 제시하였고, 이를 통해 알콜 또는 지방산이나 기타 유용한 물질 생산 회로에 광합성 유래 환원력을 사용할 수 있음을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1a는 본 발명의 한 구현예에 따라 배양된 *Synechocystis* sp.PCC 6803의 콘포칼 현미경 사진이다.

도 1b는 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막을 초원심분리기를 이용하여 분획한 사진이다.

도 1c는 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물의 콘포칼 현미경 사진으로 초록색의 베시클이 틸라코이드 막을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물의 흡광 스펙트럼이다.

도 3은 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물이 광 조사 환경에서 생산한 NADH의 양을 나타내는 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 한 구현예에 따른 PDC, ADH 효소를 포함하는 인비트로 에탄올 생산 시스템의 반응식을 나타낸다.

도 4b는 본 발명의 한 구현예에 따른 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 시간에 따른 NADH의 소비량을 나타내는 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 한 구현예에 따라 인비트로 에탄올 생산 시스템에 틸라코이드막 분획물을 첨가한 후 암 조건하에서의 에탄올 생산량을 나타내는 그래프이다.

도 5b는 본 발명의 한 구현예에 따라 인비트로 에탄올 생산 시스템에 틸라코이드막 분획물 첨가 후 광 조건하에서의 에탄올 생산량을 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 한 구현예에 따른 인비트로 에탄올 생산 시스템에 첨가된 틸라코이드막의 양에 따른 에탄올의 생산량 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막이 추가된 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH 첨가에 따른 에탄올 생산 증가 효과를 나타내는 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 한 구현예에 따른 분리된 재조합 UdhA(트랜스하이드로지나제, NADPH를 NADH로 전환하는 효소)의 SDS-PAGE 사진이다.

도 8b는 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막이 첨가된 인비트로 에탄올 생산 시스템에 재조합 UdhA를 농도별로 첨가한 후 생성된 에탄올의 생산량을 측정된 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본원은 빛 에너지 유래의 환원력(reducing power)을 유용물질의 생산에 사용할 수 있다는 발견에 근거한 것이다. 일 구현예에서 본원은 환원력으로서 광합성 세균의 틸라코이드 막을 유용물질의 한 예로서 에탄올 생산에 사용하였다.

[0020] 따라서 한 양태에서 본원은 광합성 세균의 환원력을 이용한 유용한 물질의 생산 방법에 관한 것으로, 예를 들면 광합성 세균의 환원력을 이용한 에탄올 생산 방법 또는 생산 증진 방법에 관한 것이다.

[0021] 일 구현예에서, 본원은 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 반응물을 제공하는 단계; 상기 제 1 반응물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 혼합하여 제 2 반응물을 생성하는 단계; 및 상기 제 2 반응물에 광을 조사하는 단계를 포함하는, 인비트로에서 에탄올 생산 방법 또는 생산 증진 방법에 관한 것이다.

[0022] 에탄올에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 반응물은 공지된 것을 사용할 수 있으며, 예를 들면 기질로서 파이루베이트를 포함할 수 있으며, 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 및/또는 알콜 데하이드로지나제(ADH)를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 에탄올 발효는 파이루베이트로부터 혐기대사경로를 통해 에탄올 및 이산화탄소를 생성하는 것이다. 이는 대표적으로 PDC (pyruvate decarboxylase) 및 ADH (alcohol dehydrogenase) 효소에 의해 발생한다. PDC는 파이루베이트를 아세트알데히드로 전환하는 효소이며, ADH는 NADH를 이용하여 알데하이드를 알코올로 전환하는 효소로 생산 반응은 도 4a에 기재된 바를 참조할 수 있다. 일 구현예에서 제 1 반응물은 에탄올 생산에 관여하는 효소로 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 및/또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH), 상기 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트, NADP^+ , NAD^+ , 및 ADP를 포함한다. 본원에 따른 다른 구현예에서, 상기 성분은 0.1mM NADP^+ , 0.1mM NAD^+ , 0.1mM ADP, 10 내지 30mM, 특히 30mM 파이루베이트, 58nM PDC 및 440nM의 ADH로 포함된다.

[0023] 본원에 따른 에탄올 생산 방법에서 생산된 에탄올의 양은 환원력의 추가에 의해 크게 향상될 수 있다. 환원력은

광합성 유래 세균의 틸라코이드 막에 의한 것이며, 틸라코이드 막은 NADPH를 제공한다. 본원에서는 인비트로 알콜 생산 시스템에서 NADH 생성단계가 속도제한 단계임을 발견하였다.

[0024] 본원의 제 2 반응물은 환원력으로서 틸라코이드 막(Thylakoid Membrane, TM)을 포함한다. 틸라코이드 막은 시아노박테리아와 같은 광합성 세균에서 클로로필과 같은 광합성 색소를 포함하는 광합성이 일어나는 다층의 동심원셀(concentric shell)을 형성하는 막을 일컫는 것이다. 본원에 따른 방법에서 광을 조사하는 경우, 본 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니나, 틸라코이드 막에서 H₂O로 비사이클릭 전자 흐름을 통하여 NADPH가 생성되며, 이어 NADH는 TM에 잔존하는 트랜스하이드로지나제에 의해 NADH로 전환되고, 이는 수소전환효소 활성을 증가시킴으로써 NADH가 필요한 반응 예를 들면 에탄올 반응의 효율이 증진된다. 일 구현예에서, 본원에서 틸라코이드 막은 총 1ml의 반응물 중에 0.1 내지 10 µg (chl-a 당량 기준으로), 특히 5 µg 을 포함한다.

[0025] 본원에 따른 일 구현예에서 틸라코이드를 포함한 경우, 틸라코이드를 포함하지 않은 경우에 비해 에탄올 생산이 100rpm으로 30℃에서 3시간 동안 빛 조건에서 반응시 약 600% 증가하였다.

[0026] 본원의 방법에 사용되는 틸라코이드는 위와 같은 효과를 나타내는 한 다양한 광합성 균주 또는 미세조류 유래일 수 있다. 예를 들면 시네코시스티스 (*Synechocystis* spp.), 클로로비움 테피디움 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클라미도모나스 레이하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서는 시아노박테리아 문(phylum)에 속하는 균주가 사용될 수 있으며, 예를 들면 시네코시스티스 속 박테리아, 특히 시네코시스티스 PPC 6803가 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0027] 틸라코이드 막은 당업계의 공지된 방법에 의해 분리될 수 있으며, 예를 들면 본원의 실시예에 기재된 방법 등을 참고할 수 있으며 예를 들면 Brigitta *et al.* 1998 FEBS Letters. 436:189-192에 기재된 것을 참고할 수 있다.

[0028] 본원에 따른 방법에 사용되는 반응물 제 1 또는 제 2 반응물은 트랜스하이드로지나제(UdhA)를 추가로 포함할 수 있다. 트랜스하이드로지나제는 NAD⁺의 존재하에서 NADPH를 NADH로 전환을 촉매하는 효소이다. 수소전달 효소는 세포상의 위치에 따라 막관통단백질 및 세포질에 존재하는 가용성 단백질의 두 종류로 분류된다. 다양한 유래의 UdhA 가 사용될 수 있으며 본원의 일 구현예에서는 *Escherichia coli* 유래의 가용성 단백질이 사용되나 이로 제한하는 것은 아니다. 이러한 단백질을 수득하는 방법은 공지되어 있으며 예를 들면 Boonstra *et al.* 1999 J. Bacteriol, 181(3), 1030-1034를 참조할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 UdhA는 제 2 반응물 총 1ml 당 0.2 µg 내지 2.5 µg으로 포함될 수 있다.

[0029] 본원은 틸라코이드 막에 의해 제공되는 환원력이 속도제한 단계를 해결하여 유용물질의 생산을 증가시킬 수 있다는 발견에 근거한 것으로, 이런 측면에서 본원은 또한 광합성 세균 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 에탄올 생산 증진용 조성물에 관한 것이다. 본원에 따른 조성물은 인비트로 에탄올 생산에 유용하게 사용될 수 있으며, 이에 관하여는 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 실시예

[0032] 실시예 1 시네코시스티스 속 PCC 6803 유래의 틸라코이드막 추출

[0033] *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.* 1996. DNA Res. 30:3(3):109-136)을 -80℃ 스톱으로부터 표 1과 같은 조성의 BG-11 고체 배지에 도달한 후 광합성 조건 (30℃, 25 µmol m⁻² s⁻¹)으로 14일동안 배양하였다. BG-11 고체 배지에 형성된 *Synechocystis* 균의 콜로니를 취하여 BG-11 액체 배지에 접종하여 100rpm, 광합성 하는 조건 (30℃, 25 µmol m⁻² s⁻¹)에서 5일간 배양하였다. 콘포칼 현미경(400X)으로 배양된 시네코시스티스를 촬영하였다(도 1a)

[표 1]

Stock solution	첨가 양 (1L 당)	
NaNO ₃ (powder)	5g	
K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O (20g/l)	2.0ml	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (200g/l)	2.5ml	◆ Microelements A6 (g/l of distilled water)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (30g/l)	2.0ml	H ₃ BO ₃ 2.86g
Citric acid (6g/l)	1.0ml	MnCl ₂ 1.81g
FeNH ₄ -Citrate (6g/l)	1.0ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.222g
Na ₂ CO ₃ (20g/l)	2.0ml	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.367g
A6 (◆첨부 조성 참조)	1.0ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.079g
Na thiosulfate (279g/l)	5.0ml	Co(NO ₃) ₂ 0.0494g
Glucose (20%)	9.0ml	
Up to 1L of distilled water		

BG-11 액체 배지에 배양한 균주를 수확하여 TM 완충액 (20mM Tris-Cl, EDTA 1mM, pH7.4) 10ml에 재현탁한 후 유리비드로 세포막을 파쇄 하였다. 이후, 4℃에서 8000rpm으로 15분간 2회 원심분리하고 수득한 상층액을 도 1b와 같이 수크로스 밀도 구배를 이용한 초원심분리(Brigitta et al. 1998 FEBS Letters. 436:189-192)를 이용하여 시네코시스티스의 틸라코이드막을 분리하였다. 콘포칼 현미경을 이용하여 분리한 틸라코이드막 분획물을 촬영하였다. 결과는 도 1c에 있으며, 이에 나타난 바와 같이, 초록색의 베시클(vesicle)을 관찰할 수 있었다.

실시에 2 틸라코이드막 정량 및 NADH 생성량 측정

실시에 1에서 수득한 틸라코이드막 분획물 10 μl를, 아세톤 및 메탄올을 7:2로 혼합한 용액 490 μl에 첨가하고 2분간 볼텍스 믹서를 이용하여 혼합한 후, 12000rpm으로 1분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 664nm와 750nm의 파장에서 UV-Visible 분광기를 이용하여 흡광도를 측정하고 하기 식을 이용하여 Brigitta et al., 1998에 기재된 바와 같이 클로로필-a 농도를 결정하였으며, 스펙트럼은 도 2에 나타난 바와 같다.

[μg / μl chl-a eq. = 11.47(0.D664nm - 0.D750nm)]

이어, 틸라코이드 막에서 생성되는 NADH 생산량을 측정하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다. 우선 상기와 같이 준비하고 정량한 1 μg 클로로필-a의 양을 포함하는 틸라코이드막 분획물, 100 μM NADP⁺, 100 μM NAD⁺, 및 100 μM ADP (Adenosine diphosphate)가 포함된 PBS(Phosphate buffered saline, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₃, 2mM KH₂PO₄, pH7.3)를 총 부피 1ml로 혼합하고 30℃에서 1시간 동안 빛을 조사하였다.

결과는 도 3에 기재되어 있다. 반응이 끝난 후 반응액 내 NADH 생성량은 분광광도계로 340nm의 흡광도를 측정하여 NADH 흡광계수(6,200 M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 계산하여 측정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이 NAD⁺를 반응 혼합물에 공급하는 경우, 유의한 양의 NADH가 생성되었으며, 이러한 결과는 본원에서 분리된 틸라코이드 분획물이 인/비트로 광합성 반응에서 활성을 가지며, 이후 에탄올 생산을 위한 효소 반응에 환원력을 제공할 수 있음을 나타내는 것이다.

실시에 3 에탄올 발효 효소를 이용한 인비트로 에탄올 생산

우선 효소를 다음과 같이 클로닝하여 사용하였다. *Zymomonas mobilis*의 게놈 DNA를 주형으로 *pdh* (pyruvate decarboxylase coding 유전자) 및 *adhB*(alcohol dehydrogenase coding 유전자)를 프라이머 셋트로 (각각 ZmPDC FBamHI - 5'-GATCGGATCCATGAGTTACTGTGCGTACCTATTAG-3' / ZmPDC RPstI -5'-

GATCCTGCAGCTAGAGGAGCTTGTTAACAGGCTTACGGC-3', ZmADH FSphI - 5'-GATCGCATGCATGGCTTCTCAACTTTTATATTC-3' / ZmADH RSaI - 5'-GATCGTCGACTTAGAAAGCGCTCAGGAAGAG-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 후 과발현 벡터인 pQE30에 클로닝하였다. 이어 ADHII 및 PDC가 각각 클로닝 된 과발현 벡터를 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 이어 PDC 및 ADHII 과발현 균주를 각각 LB (엠포실린 100 µg/ml) 200ml에 접종하여 37℃에서 200rpm 조건으로 2시간 30 분간 배양한 후, IPTG를 최종 1mM로 맞춰 첨가한 후 3 시간동안 추가 배양하였다. 이어 배양한 세포를 수확하여 용해 완충액 10ml에 재현탁하여 과쇄하여 얻은 용해물로부터 Ni-NTA resin을 이용한 히스티딘 친화성 크로마토 그래피(histidine affinity chromatography)를 사용하여 재조합 단백질을 정제하였다.

도 4a는 에탄올 생산에 관여하는 효소 및 촉매하는 반응을 도식적으로 나타낸 것이다. 재조합 PDC 및 ADH의 활성을 표 2에 나타낸 조성으로 반응 완충용액에 혼합하여 반응시킨 후 소멸되는 NADH의 양을 OD 340nm로 측정하여 확인하였다. PDC는 1 µg/µl의 PDC 8 µl와 20mM TPP (thiamine pyrophosphate) 1 µl와 20mM MgSO₄ 1 µl를 혼합하고 상온에서 30분 반응시키는 전처리를 통해 PDC apo-enzyme에서 PDC holo-enzyme으로 재구성하였다.

시간에 따른 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH의 소비 정도를 측정하였다. 파이루베이트 (0.1 µM), NADH (150 µM), PDC (0.044 µM), 및 ADH (0.44 µM)를 포함하는 반응 혼합물을 RT에서 반응시키고 잔존하는 NADH의 농도는 340nm에서 매 10초 마다 흡광도를 측정하였다.

[표 2]

반응 용액	부피
Citrate buffer, 0.3M, pH6.0	1.00 ml
Sodium pyruvate, 1M	0.1 ml
NADHNa ₂ , 5mM	0.1 ml
Alcohol Dehydrogenase(ADH), 0.5mg/ml	0.1 ml
Distilled water	1.69 ml
Pre-incubationed Pyruvate decarboxylase(PDC)	0.01 ml
총 부피	3 ml

결과는 도 4b에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH가 소멸되고 에탄올이 생성되는 것을 알 수 있다.

실시에 4 틸라코이드막을 이용한 에탄올 생산 증가

표 3 (틸라코이드 막 분획을 이용한 에탄올 합성 실험군 용액 구성표)과 같이 여섯 가지 조성의 반응액 (1: 분획을 넣지 않은 실험군; 2: pyruvate을 넣지 않은 실험군; 3: 에탄올 생성 단백질을 넣지 않은 실험군; 4: NAD⁺를 넣지 않은 실험군; 5: pyruvate 10mM; 6: pyruvate 30mM)을 준비하고 암조건 및 광조건 (photon 농도 25 µmol m⁻² s⁻¹), 100rpm 교반, 30℃ 조건의 인비트로 에탄올 생산 시스템을 이용하여 에탄올 생산 반응을 수행하였으며, 1h, 2h 및 3h에서 각각 시료를 채취하였다. 반응 혼합물의 조성은 다음과 같다: 틸라코이드 막 1 µg (chl-a eq.), NADP⁺ (100 µM), NAD⁺ (100 µM), ADP (100 µM), 및 파이루베이트 (0, 10, 또는 30 mM).

생성된 에탄올의 양은 에탄올 분석 키트 (Abchem)를 제조자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 5a (암조건) 및 도 5b (광조건)에 나타내었다.

이에 나타난 바와 같이 암조건 및 광조건 모두에서 파이루베이트가 존재하지 않는 반응용액2에서는 에탄올이 생산되지 않았다. 도 5a에 나타난 바와 같이 암조건에서는 유의한 양의 에탄올이 생산되지 않았으며, 도 5b의 광조건에서는 파이루베이트 농도 의존적으로 에탄올이 생산되었으며, 반응용액 6에서의 에탄올 농도가 가장 높게 나타났다. 10mM 및 30mM 파이루베이트의 존재하에서 각각 4mM 및 6mM의 에탄올이 생산되었다.

[표 3]

	1	2	3	4	5	6
Thylakoid Membrane (0.2μg chl-a eq. /μl)	×	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl
NADP⁺ (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
NAD⁺ (125mM)	0.8μl	0.8μl	0.8μl	×	0.8μl	0.8μl
ADP (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
Pyruvate (1M)	30μl	×	30μl	30μl	10μl	30μl
PDC (16.39μM)	3.4μl	3.4μl	×	3.4μl	3.4μl	3.4μl
ADH (13.2μM)	33.3μl	33.3μl	×	33.3μl	33.3μl	33.3μl
PBS	930.5μl	955.5μl	962.2μl	926.3μl	945.5μl	925.5μl

상기 반응용액 중에서 에탄올 생산이 가장 효율적이라고 판단되는 반응용액 6과 같은 조성에서 0, 0.5, 1 및 2 μg의 클로로필-a를 각각 포함하는 틸라코이드막 분획물을 파이루베이트 (30 mM), NAD⁺ (100 μM), NADP⁺ (100 μM), ADP (100 μM), PDC (0.044 μM), 및 ADH (0.44 μM)를 포함하는 반응 혼합물에 각각 첨가한 후 시간당 생성되는 에탄올의 농도를 측정하였다. 결과는 도 6에 나타내었다. 그 결과 틸라코이드막을 첨가하지 않은 반응용액에서는 에탄올 생산이 검출되지 않았으나 첨가한 틸라코이드 막의 증가에 따라 에탄올 생성량이 증가하는 것으로 나타났다.

실시예 5 추가적 NADH 첨가에 따른 에탄올 생산 증진

상기 실시예에 따라 확립한 인비트로 에탄올 생성 시스템에 NADH를 추가로 첨가하여 에탄올 생성 증진 실험을 수행하였다. 틸라코이드막 1μg (chl-a eq.), NADP⁺, NAD⁺, ADP 및 파이루베이트를 표 4의 농도로 혼합하여 기본 반응용액을 제조하고, 상기 반응용액에 에탄올 발효 효소 및 NADH를 첨가하지 않은 반응용액 1, 에탄올 발효 효소만 첨가한 반응용액 2, 에탄올 발효 효소 및 NADH를 첨가한 반응용액 3의 조성으로 광반응 시킨 후 생성된 에탄올의 농도를 에탄올 분석키트 (Abchem)를 제조자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0058]

[표 4]

	1	2	3
Thylakoid Membrane (0.2μg chl-a eq. /μl)	5μl	5μl	10μl
NADP⁺ (100mM)	1μl	1μl	1μl
NAD⁺ (125mM)	0.8μl	0.8μl	0.8μl
ADP (100mM)	1μl	1μl	1μl
Pyruvate (1M)	30μl	30μl	30μl
PDC (16.39μM)	X	3.4μl	3.4μl
ADH (13.2μM)	X	33.3μl	33.3μl
PBS	962.2μl	925.5μl	919.5μl
NADH (100mM)	X	X	1μl

[0059]

[0060]

그 결과 NADH를 추가로 첨가한 반응용액 2 및 3에서 유의한 에탄올 생산량을 나타냈으며, 특히 반응용액 3의 조건에서 월등한 에탄올 생산량을 나타냈다. 이는 틸라코이드막에 의해 생성된 NADPH로부터 전환된 NADH 양이 반응의 속도제한 단계임을 나타내며, 따라서 추가로 보충된 NADH에 의해 에탄올 생산이 증진되었다.

[0061]

실시예 6 UdhA 첨가에 따른 에탄올 생산 증진

[0062]

UdhA 단백질은 NADPH에서 NADH를 생산하는 트랜스하이드로지나제 효소이다. 이를 다음과 같이 클로닝하였다. 구체적으로 *E. coli* 유전체 DNA를 주형으로 하기 프라이머 세트 (EcudhAFKpnI- 5'-GATCGGTACCTAATTAAGAGGAGAAATTAAGTATGCCAGATTCTACGATTACGATG-3' / EcudhARHindIII - 5'-GATCAAGCTTTTGTAGTGATGGTGATGGAACAGGCGGTTTAAACCGTTTAAACGC-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 후 과발현 벡터인 pQE30에 클로닝하였다. 이를 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 이어 상기 과발현 균주를 각각 LB (엠펙실린 100 μg/ml) 200ml에 접종하여 37℃에서 200rpm 조건으로 2시간 30분 배양한 후, IPTG를 최종 1mM로 맞춰 첨가한 후 3시간동안 더 추가 배양하였다. 배양한 균주를 수확하여 용해완충액 10ml에 재현탁 시킨 후 과쇄하여 얻은 용해물로부터 Ni-NTA 레진을 이용한 히스티딘 친화성 크로마토그래피(histidine affinity chromatography)를 사용하여 재조합 단백질을 정제하였다. 분리된 단백질은 도 8a에 기재되어 있으며, UdhA의 예상 분자량은 53kDa이다.

[0063]

이어 위와 같이 생산된 UdhA(Transhydrogenase)를 인비트로 에탄올 생성 시스템을 이용하여 에탄올을 생산 실험을 수행하였다. 실험용액은 표 5와 같은 조성으로 틸라코이드막 분획물 1μg(chl-a eq.), NADP⁺, NAD⁺, ADP, 파이루베이트 및 에탄올 발효 효소(PDC 및 ADH)를 혼합 하고, 여기에 UdhA를 0, 0.2, 1 및 2.5μg 각각을 상기 반응용액에 추가한 후 광반응을 수행하였다. 생산된 에탄올의 양은 에탄올 분석키트를 제조자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 결과는 도 8b에 나타내었다. 이에 나타난 바와 같이 UdhA는 틸라코이드막에 의해 생성된 NADPH를 NADH로 전환을 촉진하여 에탄올 생성량을 증진 시킨다. 따라서 이는 에탄올 발효 효소 및 틸라코이드막이 존재하는 시스템에서 속도제한 단계는 NADH이며, 이를 해소할 경우, 에탄올 생산을 늘릴 수 있다는 것을 나타낸다.

[0064]

[표 5]

	1	2	3	4
Thylakoid Membrane (0.2μg chl-a eq. /μl)	5μl	5μl	5μl	5μl
NADP⁺ (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl
NAD⁺ (125mM)	0.8μl	0.8μl	0.8μl	0.8μl
ADP (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl
Pyruvate (1M)	30μl	30μl	30μl	30μl
PDC (16.39μM)	3.4μl	3.4μl	3.4μl	3.4μl
ADH (13.2μM)	33.3μl	33.3μl	33.3μl	33.3μl
PBS	925.5μl	925.1μl	923.5μl	920.5μl
UdhA (0.5μg/μl)	χ	0.4μl	2μl	5μl

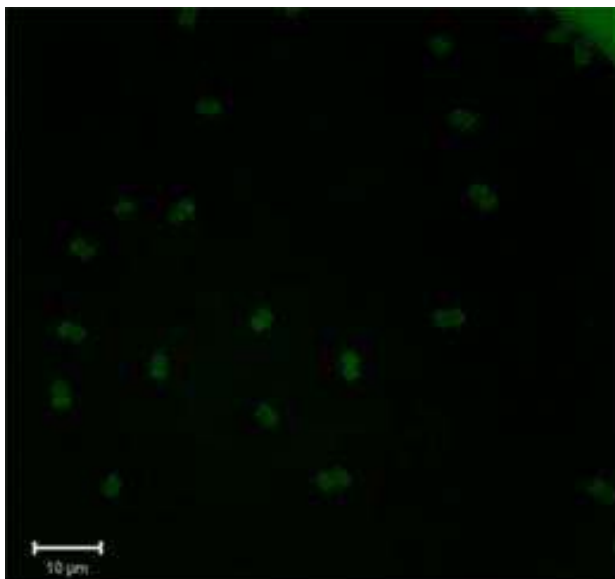
[0065]

[0066]

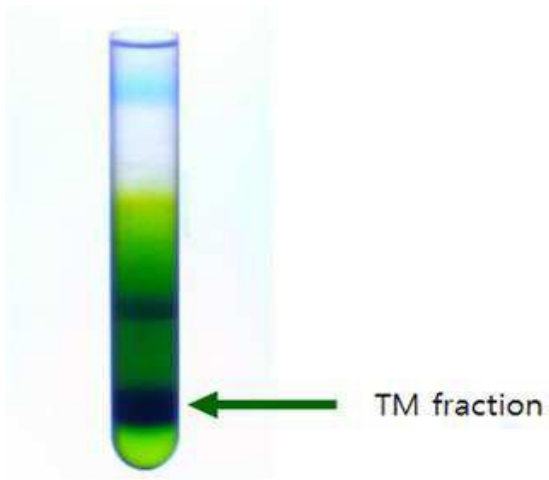
이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다. 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

도면1a



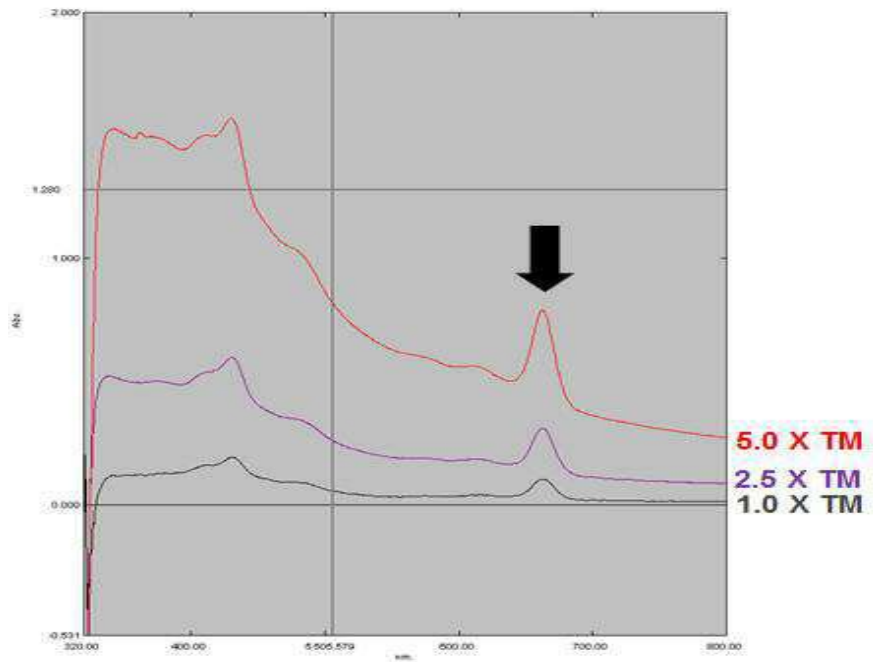
도면1b



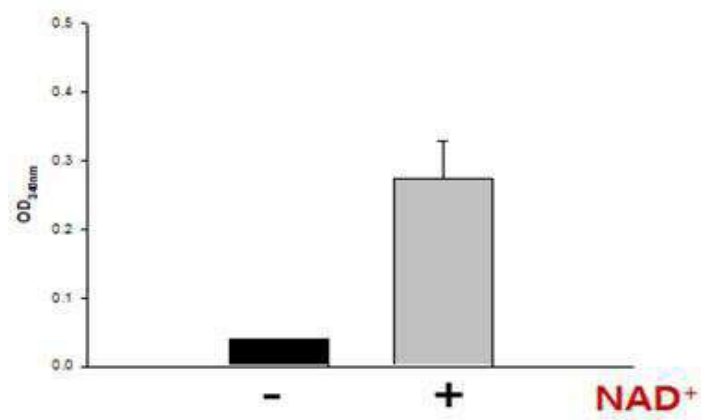
도면1c



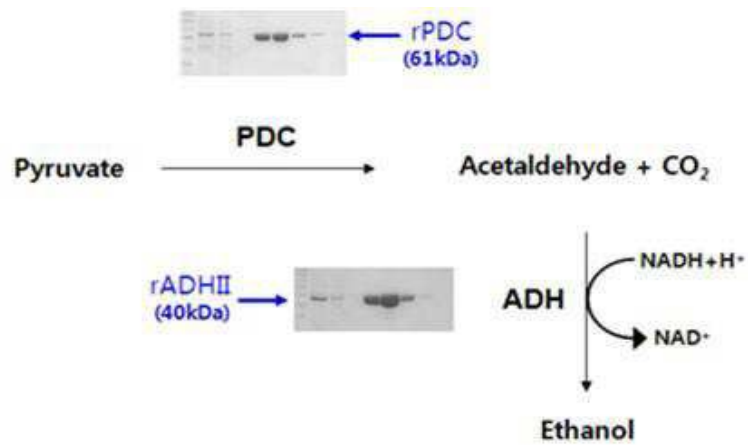
도면2



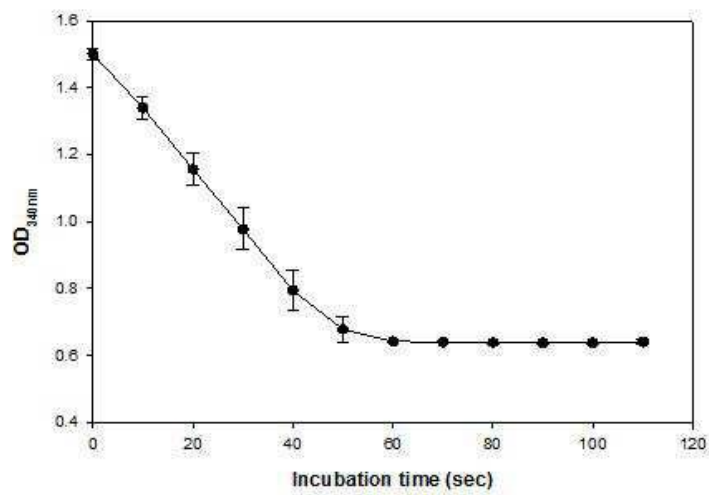
도면3



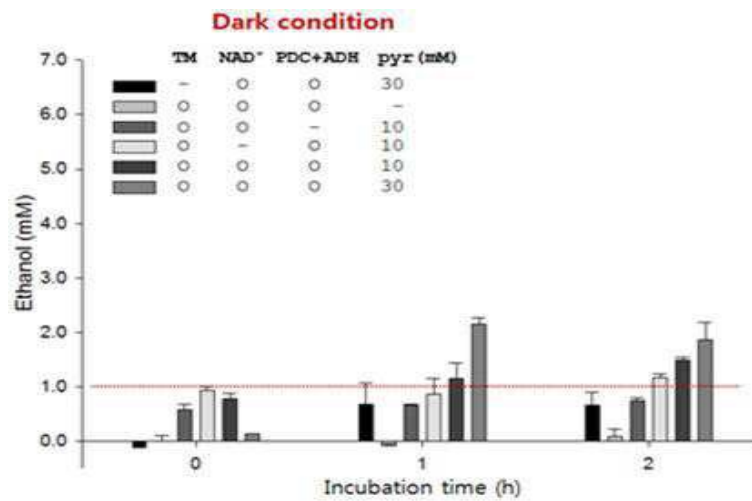
도면4a



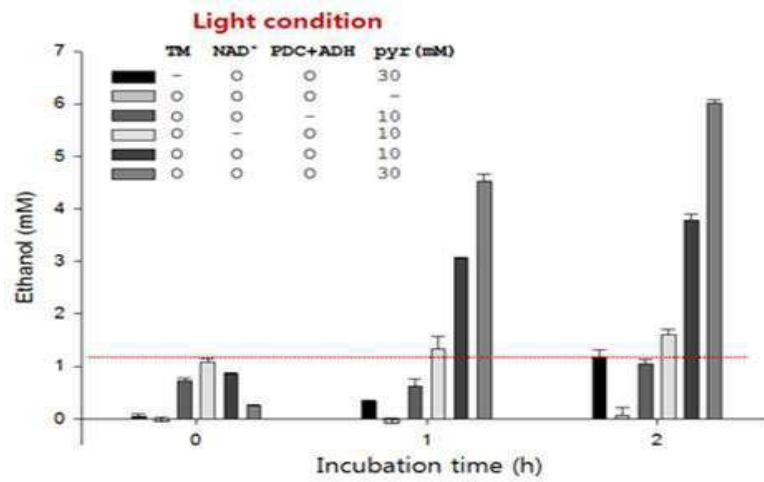
도면4b



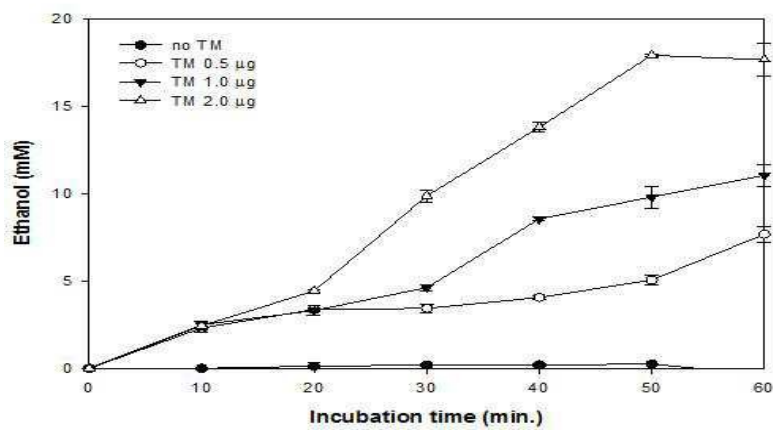
도면5a



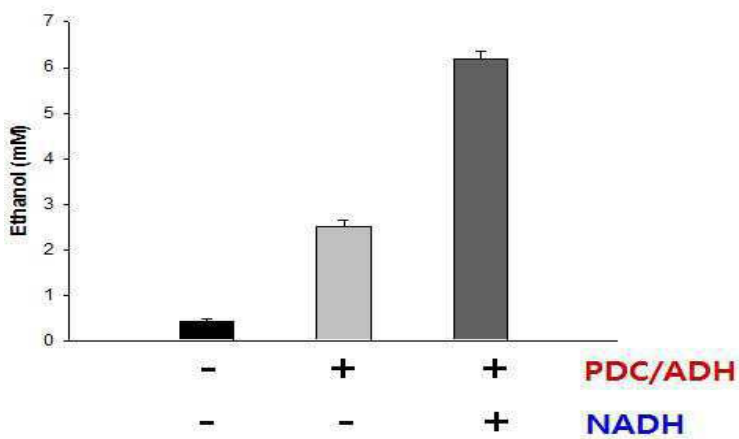
도면5b



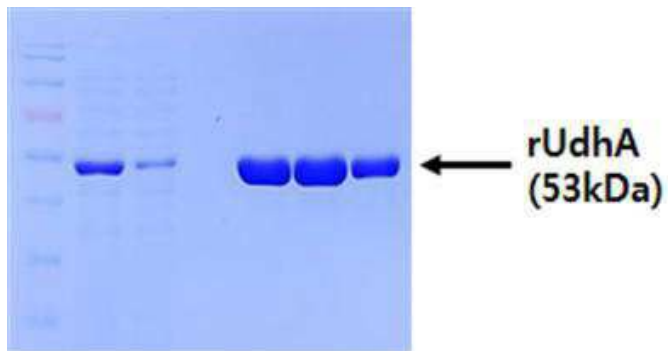
도면6



도면7



도면8a



도면8b

