



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0116979  
(43) 공개일자 2017년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 19/02 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)  
C12N 9/88 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12P 19/02 (2013.01)  
C12N 15/52 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0047231  
(22) 출원일자 2017년04월12일  
심사청구일자 2017년04월12일  
(30) 우선권주장  
1020160044616 2016년04월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
(주)케비젼  
전라북도 전주시 덕진구 반룡로 62 (팔복동2가)  
(72) 발명자  
신흥식  
전라북도 전주시 완산구 봉곡로 140, 202동 301호(효자동2가, 더샵효자2차아파트)  
장승환  
경기도 광명시 성채로 36, 310동 102호 (소하동, 광명역세권휴먼시아)  
(뒤편에 계속)  
(74) 대리인  
최규환

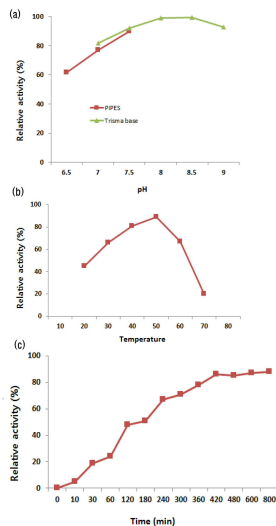
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 과당 6-인산으로부터 타가토스 6-인산으로의 전환 활성을 가진 락토바실러스 플라타룸에서 분리한 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 및 이를 이용한 타가토스 생산 방법

**(57) 요약**

본 발명은 과당으로부터 타가토스를 생산하는 공정에서 락토바실러스 플라타룸으로부터 분리된 과당 1,6-이인산 알돌레이즈를 이용한 과당 6-인산으로부터 타가토스 6-인산으로의 효소 전환 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 타가토스 생산 방법은 생물체로부터 얻은 효소를 이용하므로 환경 친화적이며, 간단한 효소 고정화 과정만을 필요로 하고, 종래 사이코스 생산과 비교하여 기질에 있어서는 단가가 낮은 기질을 사용하고, 수율에 있어서는 현저하게 높기 때문에 생산 경비를 크게 줄이는 한편 생산효과를 극대화할 수 있는 효과가 있다.

**대표도 - 도5**



(52) CPC특허분류

*C12N 9/88* (2013.01)

*C12Y 401/02013* (2013.01)

(72) 발명자

**김희정**

전라북도 전주시 완산구 봉곡로 140, 202동 301호  
(효자동2가, 더샵효자2차아파트)

**이상왕**

전라북도 전주시 완산구 당산로 11, 603동 1301호  
(서신동, 쌍용서신아파트)

**백민석**

전라북도 전주시 덕진구 인교9길 27-7, 401호(우아  
동1가, 노블원룸C)

**백진호**

전라북도 전주시 덕진구 진북로 15, 107동 1307호  
(진북동, 동국해성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0004011

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 경제협력권 육성사업

연구과제명 생물전환법을 통한 대체당 대량생산 및 사업화

기여율 1/1

주관기관 주식회사 케비젠

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 유효성분으로 함유하는 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)로부터 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하기 위한 조성물.

**청구항 2**

프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 처리하는 단계를 포함하는 락토바실러스 플란타룸 균주 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 이용한 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하는 방법.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 효소는 고정화된 효소인 것을 특징으로 하는 인산화 타가토스를 생산하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 과당으로부터 타가토스를 생산하는 공정에서 락토바실러스 플란타룸으로부터 분리된 과당 1,6-이인산 알돌레이즈를 이용한 과당 6-인산으로부터 타가토스 6-인산으로의 효소 전환 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 타가토스를 생산하는 첫 번째 방법으로 갈락티톨(D-galactitol)을 산화시켜서 타가토스를 생산할 수 있다. 이 경우 생체전환 최대 수율은 92%인 것으로 보고하였다. 그러나 갈락티톨의 원료로서의 사용 불가능성과 높은 비용 때문에 대규모 타가토스의 생산에는 사용되지 못하고 있다. 두 번째 방법으로 사이코스(D-psychose)로부터 타가토스를 제조하는 방법이 제안되었다. 사이코스는 희귀한 당이지만, 슈도모나스 시코리(*Pseudomonas cichorii*)나 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)로부터의 D-타가토스 3-에피머레이즈 또는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로부터의 D-사이코스 3-에피머레이즈를 사용하여 상대적으로싼 원료인 프럭토스(D-fructose)를 에피머화하여 생산할 수 있다. 그러나 사이코스를 통해 프럭토스로부터 타가토스를 생산하는 방법은 상업적인 적용성은 매우 희박한 것으로 알려져 있다. 세 번째 방법으로 갈락토스를 이성화시키는 경제적인 방법이 제안되었다. 갈락토오스는 화학적 또는 효소 이성화할 수 있다. 타가토스의 생산을 위한 화학적 방법은 Biospherics Inc. (USA)에 의해 개발 및 특허(미국등록특허 제5002612호)되었다. 상기 미국등록특허 제5002612호에 따르면, 수산화칼슘과 촉매로서 염화칼슘을 이용하여 갈락토오스를 이성화하여 타가토스를 생성할 수 있다고 보고했다. 수산화칼슘은 강 알칼리성 조건과 상대적으로 낮은 온도에서 타가토스와 불용성 복합체를 형성한다. 이러한 현탁액에 산, 바람직하게는 이산화탄소를 처리하면 복합체로부터 타가토스를 유리시킬 수 있다. 불용성 칼슘염은 여과과정을 통해 제거하고, 나머지 이온은 이온 교환 크로마토그래피를 이용해 제거할 수 있다. 이후 순수한 타가토스는 결정화를 통해 얻을 수 있다. 그러나 이 화학적 방법은 부산물 및 화학폐기물 형성과 같은 몇 가지 단점을 가지고 있다. 이 방법에는 반응 혼합물의 집중적인 냉각을 필요로 하기 때문에 에너지 소비가 많은 공정이라는 단점을 가지고 있다.

[0003] 갈락토오스에서 타가토스를 생산하는 효소 방법은 생체촉매로 L-아라비노스 이성화효소를 사용하는 방법이다. 대부분의 L-아라비노스 이성화효소는 최적활성을 보이는 온도가 60 내지 95℃로 매우 높고, 최적 pH 7 이상이다. 더욱이, 대부분의 L-아라비노스 이성화효소가 고활성과 안정성을 갖게 하기 위해서는  $Mn^{2+}$  또는  $Co^{2+}$ 와 같은 금속이온을 필요로 하고 있다. 산업적 적용을 위한 산성 pH와 저에너지 공정을 위한 낮은 반응 온도 및  $Co^{2+}$ 와 같은 식품적용 부적합한 이온 사용 등은 개선해야 할 문제점으로 지적되고 있다.

- [0004] 이와 같은 문제점을 해결하기 위해, 원료의 수급이 안정적이고 낮은 가격의 포도당이나 프럭토스를 기질로 하며, 화학적인 전환법이나 고비용 효소전환법이 아닌 저비용 효소전환법을 이용하여 타가토스를 생산하는 방법이 활발히 연구되고 있는 실정이다.
- [0005] 단당류는 탄소의 수에 따라 이탄당(glycoladehyde), 삼탄당(glyceraldehyse, dihydroxyacetone), 사탄당(erythrose, threose, erythrulose), 오탄당(arabinose, lyxose, bibose, xylose, ribulose, xylulose), 육탄당(allose, altrose, glucose, mannose, gulose, idose, galactose, talose, psicose, fructose, sorbose, tagatose), 칠탄당(sedoheptulose, mannoheptulose) 등 각각이 D- 및 L-forms 형태로 존재한다. 이들 상호간의 전환은 이성화 효소와 에피머화 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 단당류 에피머화와 이성화는 생물전환을 이용한 산업에서 매우 중요한 기반 기술이다. 에피머화 효소는 단당류의 특정 위치의 -OH기를 치환하는 기능을 가지고 있으며, 이러한 에피머화 효소를 이용한다면 하나의 단당류를 다양한 다른 단당류로의 전환이 가능하다.
- [0006] 예로서, D-글루코스(D-glucose)의 2번 탄소, 3번 탄소, 4번 탄소, 5번 탄소 각각의 -OH기를 전환하는 에피머화 효소를 이용한다면, 천연으로부터 풍부하게 얻을 수 있는 D-글루코스로부터 D-만노스(D-mannose), D-알로스(D-allose), D-갈락토스(D-galactose), L-아이도스(L-idose)와 같은 회소성이 높은 다양한 단당류로 전환이 가능하게 되고 특히, 육탄당에서 5번 탄소 -OH기와 오탄당에서 4번 탄소 -OH기를 전환하는 에피머화 효소의 경우는 D-form 단당에서 자연계에는 거의 존재하지 않는 L-form 단당으로 전환이 가능하기에 단당류 전환에 에피머화 효소를 이용할 경우 새로운 개념의 산업적 생산법에 의한 파급 효과는 매우 클 것으로 예상된다. 현재까지 보고된 단당 4-에피머화 효소는 보고된 바 없다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 단당의 에피머화에 관여하는 효소 발굴에 관하여 활발히 연구되고 있는 실정이다.
- [0007] 한편, 한국공개특허 제2015-0025703호에서는 '기질 및 효소 컴비네이션 반응을 이용한 프럭토스로부터 타가토스 생산용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2015-0042391호에 '기질 및 효소 컴비네이션 반응을 이용한 프럭토스로부터 타가토스 생산용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '락토바실러스 플란타룸 균주 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 유효성분으로 함유하는 프럭토스 6-포스페이트로부터 인산화 타가토스를 생산하기 위한 조성물'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 락토바실러스 플란타룸 균주 유래의 프럭토스로부터 타가토스를 생산하는 효소전환반응 중에서 과당 6-인산(fructose 6-phosphate)을 타가토스 6-인산(tagatose-6-phosphate)으로 전환하는 활성을 가진 과당 1,6-이인산 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 코딩하는 유전자를 확보하였고, 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 이용하여 대장균에서 상기 1,6-이인산 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 대량생산하였다. 분리정제한 상기 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소를 이용하여 과당 6-인산으로부터 고수율의 타가토스의 생산이 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 유효성분으로 함유하는 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)로부터 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 처리하는 단계를 포함하는 락토바실러스 플란타룸 균주 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 이용한 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 타가토스 생산 방법은 생물체로부터 얻은 효소를 이용하므로 환경 친화적이며, 간단한 효소 고정화 과정만을 필요로 하고, 종래 사이코스 생산과 비교하여 기질에 있어서는 단가가 낮은 기질을 사용하고, 수

율에 있어서는 현저하게 높기 때문에 생산 경비를 크게 줄이는 한편 생산효과를 극대화할 수 있는 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0012] 도 1은 과당 6-인산(fructose 6-phosphate)이 과당 1,6-이인산 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase)에 의한 에피머화 반응을 통하여 타가토스 6-인산(tagatose-6-phosphate)으로 전환되는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에서 분리한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소에 대한 아미노산 서열이다.
- 도 3은 대장균 K-12 및 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 유래의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈화 효소의 에피머화 효소 활성을 비교한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 유래의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈의 금속 특이성을 상대적인 활성(%)으로 비교한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 락토바실러스 플란타룸의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 pH(a), 온도(b) 및 시간경과(c)에 따른 과당 6-인산에서 타가토스 6-인산으로의 전환활성을 각각 그래프로 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 유효성분으로 함유하는 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)로부터 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서 사용한 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소의 유전자는 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈화 효소 유전자 또는 단백질로, 이에 대응되는 유전자를 클로닝하고, 상기 유전자를 포함한 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 과발현시켜 효소의 특성을 규명한 결과, 기질특이성이 프럭토스-6-포스페이트임을 입증하고, 상기 효소를 사용하여 타가토스-6-포스페이트를 생산 후 상업용 피타아제를 처리하여 타가토스를 생산하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 효소의 특성을 규명하기 위하여, 본 발명은 종래 실험을 통해 전혀 기능적으로 규명되지 않고 다만 염기서열의 특성만으로 평가되어 명명된 공지된 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소의 유전자를 함유하고 있는 균주로부터 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소 코딩 유전자를 대량으로 수득한 후, 적절한 발현 벡터에 삽입하여 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조한 후 상기 재조합 벡터로 적절한 미생물에 형질전환시킨 균주를 발효 배지에서 배양하여 과발현시킨 효소를 정제하여 사용한다.
- [0016] 상기 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소와 프럭토스와의 반응 조건으로 기질 농도는 0.15-30%(w/w) 범위에서 pH 8.5에서 50℃로 반응시키는 것이 인산화 타가토스 생산수율에 있어 바람직하다. 이는 프럭토스의 기질 농도가 0.15-1.5%(w/w) 범위에서 인산화 타가토스 생산수율이 우수하였으며, 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈화 효소의 최적 pH와 온도 범위이기 때문이다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물에서, 상기 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소는 고정화된 효소일 수 있으며, 고정화 방법은 흡착법, 공유결합법 또는 가두기법(entrainment)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 산업적으로 대량생산을 위해서, 효소를 이용한 생물공정은 화학공정에 비해 온화한 반응조건에서 반응이 진행되어 화학공정에 비해 에너지가 절약되며, 공정이 단순하여 공정비용이 적게 드는 장점이 있다. 하지만 이용되는 효소의 가격이 고가이며, 효소의 낮은 안정성이 극복해야 할 단점이다. 이러한 문제를 해결하고 공정비용의 감소를 위해 효소의 고정화가 널리 이용되고 있다. 효소를 고정화하면 반응에 사용한 효소를 다음 반응에 재사용할 수 있어 효소의 높은 가격 문제를 해결하여 공정비용을 감소시킬 수 있으며, 고정화하지 않는 효소보다 안정성이 증대되어 공정에 더 효율적으로 이용할 수 있다.
- [0019] 생산성을 향상시키기 위한 방법으로 세포를 고정화시키는 방법이 있는데, 세포를 고정화하는 이유는

일반적으로, 이차대사산물의 생합성이 유도(induction)되면, 그 생합성 속도는 빠르게 증가하여 최고값에 도달한 후, 점차 생합성 속도가 감소한다고 알려져 있다. 특히, 연속배양 또는 장기간의 회분식 배양시 흔히 관찰되는 현상으로서 돌연변이에 의해 얻은 고생산성 균주를 장기간 배양할 경우에 균주의 복귀돌연변이(back mutation)가 발생한다. 복귀 돌연변이 발생에 의해 생산성이 낮은 세포는 원래 균주보다 성장속도가 빨라, 결국 이들 세포가 배양기를 차지함으로써 공정의 생산성을 떨어뜨린다. 이와 비슷한 경우가 재조합 단백질을 생산하는 공정에서도 많이 지적되고 있다. 이와 같은 공정 안정성(operational stability)에 대한 문제는 이차대사산물 생산공정 개발에 있어서 필수적으로 해결해야 할 문제들 중의 하나이다. 이를 해결할 수 있는 방법들 중의 하나가 고정화세포를 이용한 공정으로서, 세포를 고정화할 경우 유전적 안정성(genetic stability)이 증가한다고 알려져 있다.

- [0020] 효소 또는 세포를 고정화시켜 생물반응제품을 생산하는 방법은 제조원가의 절감 등 그 경제적인 유용성으로 인해 지금까지 많은 연구가 행하여져 왔으며, 글루코스 이소머라제(Glucose isomerase) 고정화에 의한 프럭토스의 생산, 아미노아실라제(Aminoacylase) 고정화에 의한 아미노산의 생산 등이 공업적으로 실제 이용되고 있다.
- [0021] 일반적인 고정화 방법으로는 흡착법, 공유결합법, 포괄법(가두기법) 등이 있는데, 흡착법은 담체에 효소 또는 세포가 물리적으로 고정화되므로 연속운전으로 공업적 응용시 탈착이 우려되고, 공유결합법은 결합력은 강하나 효소의 실활이 쉽게 일어나기 때문에 실제 공업적으로는 알지네이트 등을 사용한 포괄법이 많이 이용되고 있다. 포괄법으로 효소나 세포를 고정화시켜 공업적으로 이용하고자 할 때는 먼저 담체의 선택이 중요한데, 가격이 저렴하고, 고정화 후 별도의 강도처리공정이 필요 없으며, 장기간 연속운전에도 안정한 제반 특성을 갖춘 것이 바람직하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate)에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 락토 바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase) 효소를 처리하는 단계를 포함하는 락토바실러스 플란타룸 균주 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 이용한 인산화 타가토스(tagatose)를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 효소는 고정화된 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 혼합효소 반응은 다른 한편으로는 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈화 효소를 세포 내에서 반응시켜 인산화 타가토스를 대량으로 생산하기 위한 방법으로, 대량으로 발현된 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈 효소를 과발현시켜 세포 내에서 사용하는 게 바람직하다. 이는 세포 내에 과발현된 효소는 활성이 장기간 유지될 수 있는 환경을 조성해 주고, 반응 시 필요한 cofactor 재생 가능성 때문인데, 본 발명에서 사용 가능한 대장균은 효소를 과발현할 수 있는 대장균이라면 그 어느 것을 사용해도 무방하다.
- [0025] 본 발명에 따른 인산화 타가토스 생산 방법은 미생물로부터 얻은 효소를 이용하므로 환경 친화적이며, 간단한 효소 고정화 과정만을 필요로 하고, 프럭토스 1-포스페이트(fructose 1-phosphate)로부터 인산화 타가토스 생산을 이전에 없던 방법으로 전환시키고, 생산경비를 크게 줄이는 한편 생산 효과를 극대화할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 효소 단백질에 대한 DNA를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 합성한다. 합성한 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 유전자를 pETDUET-1[Novagen] 발현 벡터에 삽입하여 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소를 포함하는 재조합 벡터를 제조한 후 상기 재조합 벡터로 적절한 미생물에 형질전환시킨 균주를 배양하여 과발현시킨 효소를 N-terminal 6-His tag를 이용하여 정제하였다. 과당 6-인산을 기질로 하는 에피머화 반응을 통해 과당 1,6-이인산 알돌레이즈화 효소의 효능을 확인하였다. 구체적으로는, 서열번호 1에 해당하는 효소에 대한 에피머화 활성을 비교분석하였다.
- [0027] 또한, 이들 효소에 대한 pH, 온도, 금속이온에 대한 특이성을 비교분석하였다. 이때 상기 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소와 과당 6-인산과의 반응조건으로 기질농도는 0.15-1.5%(w/w)의 범위로 pH 8.5에서 50℃로 반응시키는 것이 과당 생산수율에 있어 바람직하다. 이는 과당 6-인산의 기질 농도가 0.15-1.5%(w/w) 범위에서 타가토스 6-인산 생산 수율이 우수하였으며, 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 최적 pH와 온도 범위이기 때문이다.
- [0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] **실시예 1. 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소 생산을 위한 재조합 벡터 제조**
- [0030] 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소 유전자는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 과당 1,6-이인

산 알돌레이즈 효소 유전자의 디앤에이(DNA) 염기서열을 기본으로 PCR법을 이용하여 대량으로 증폭하고(서열번호 1, 도 2), 클로닝 사이트 *Sa*II와 *Not*I을 사용하여 pETDuet-1(노바젠)에 삽입하고, 재조합 벡터 pETDuet-1/과당 1,6-이인산 알돌레이즈를 제조하여, 이를 통상적인 형질전환 방법에 의해 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 대량생산을 위해 재조합 시드(seed) 균주를 액화질소에서 냉동보관하였다.

**[0031] 실시예 2. 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 대량생산을 위한 발현**

**[0032]** 재조합 벡터인 pETDuet-1/과당 1,6-이인산 알돌레이즈를 포함하고 있는 BL(DE21) 균주를 LB 배지 50ml가 들어있는 250ml의 플라스크에 접종하여, OD<sub>600</sub>가 2.0이 될 때까지 37°C의 진탕배양기에서 배양하고, 배양한 종균을 발효 배지(1% 글리세롤, 0.1% 펩톤, 3% 효모 추출물, 0.014% 이인산칼륨, 0.1% 일인산나트륨) 3.5 리터가 들어있는 5리터의 발효조에 첨가하여 본 배양을 수행하였다. 배양 후, OD<sub>600</sub>가 2.0일 때, ITPG를 1mM 되도록 첨가하여 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 대량생산을 유도하였다. 이때, 상기 과정 중의 교반 속도는 500 rpm, 통기량은 1.0 vvm, 배양 온도는 37°C가 유지되도록 하였다.

**[0033] 실시예 3. 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 정제**

**[0034]** 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소 정제를 위해서는, 과발현된 균주의 배양액을 6,000 g로 4°C에서 30분 동안 원심분리하고, 0.85% 염화나트륨 용액으로 두 번 세척하였다. 회수된 세포를 라이소자임이 1 mg/ml이 함유된 세포파쇄 완충용액(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, pH8.0)에 용해하고, 얼음 안에서 30분간 방치하였다. 세포 용액을 세포파쇄기(프렌치 프레스)로 15,000 lb/in<sup>2</sup>에서 파쇄한 다음, 세포 파쇄액을 12,000g로 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상등액은 0.45 μm 여과지로 여과하여 다음 정제과정에 이용하였다.

**[0035]** 정제를 위해서는 단백질 크로마토그래피(FPLC)를 수행하고, 상기 여과액을 pH 8.0인 300 mM 염화나트륨(NaCl)과 10 mM 이미다졸(imidazole)이 함유된 50 mM 인산 완충용액에 평형시킨 히스트랩 에이치피(HisTrap HP) 컬럼에 적용하였다. 이때 컬럼을 같은 완충용액으로 세척시킨 후 부착된 효소는 같은 완충용액에 10 mM에서 200 mM 사이의 기울기 농도의 이미다졸이 포함된 용액을 1 ml/min 속도로 하여 용출(elution)되게 하였다. 용출된 효소는 pH 7.5인 50 mM 피페스(PIPES) 완충용액에 평형시킨 하이프랩(HiPrep 16/60) 탈염 수지 컬럼을 이용하여, 6 ml/min 속도로 하여 씻어 내고, 회수된 효소용액을 pH 7.5인 0.15 M 염화나트륨이 포함된 50 mM 피페스 완충용액으로 평형화시킨 세파크릴 에스-100 에치알(Sephacryl S-100HR) 컬럼을 이용하여, 5 ml/min 속도로 용출하고, 용출된 용액은 최종적으로 50 mM 피페스 완충용액에서 투석하였다.

**[0036] 실시예 4. 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 및 대장균 유래의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 활성**

**[0037]** 기존에 공개된 특허에서 프럭토스 6-포스페이트를 타가토스 1,6-비스포스페이트로 전환하는 능력이 공개된 대장균(*Escherichia coli*) K-12 및 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 프럭토스 1,6-비스포스페이트 알돌레이즈를 활용하여 기질을 프럭토스 6-포스페이트하여 타가토스 전환능력을 확인했다. 30%의 각 기질을 800 μg의 각 효소가 함유된 1ml의 50mM Tris-HCl 완충용액을 pH8.5에서 16시간까지 반응을 시켰으며, 상기 반응 후 0.2M 염산용액을 첨가하여 pH를 4.5-4.7 범위로 적정한 후 500unit의 피타아제를 처리하여 50°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 효소활성의 측정은 Bio-액체크로마토그래피(Bio-Lc, Thermo Scientific Inc)를 활용하였다. 분석조건은 다음과 같다. 각 반응액 10 μl를 Dionex CarboPac PA1 컬럼에 주입한 후 200mM 수산화나트륨 용매를 1ml/min의 유속으로 운용하여 일렉트로케미컬 검출기를 통해 반응 후 남아 있는 과당과 타가토스 크로마토그램 내 면적으로 산출하였고, 그 결과는 기존의 대장균(*Escherichia coli*) K-12 보다 10% 높은 전환률을 보였다.

**[0038] 실시예 5. 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 에피머화 효능에 대한 금속이온의 영향**

**[0039]** 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소는 본래의 기능인 과당 1,6-이인산 기질을 다이하이드록시 아세트포스페이트와 글리세르알데하이드 3-포스페이트로 전환 시 금속 아연이 관여하며, 역가를 향상시킨다고 보고되어 있다.

**[0040]** 본 발명에서도 기질을 과당 6-인산으로 적용하고 타가토스 6-인산으로의 에피머화 역가에 대한 금속염의 영향을 분석하였다. 금속염 효과를 조사하기 위해서 이디티에이(EDTA)를 처리하거나 또는 1 mM 금속이온 첨가 후 측정하였으며, 반응은 0.2%의 과당과 0.06 단위/ml의 효소가 함유된 50 mM 피페스 완충용액에서 pH 8.5와 50°C에서 30분간 수행하였고 0.2M 염산용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 측정하였다.

**[0041]** 분석 결과, 본 발명의 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소는 이디티에이(EDTA) 첨가에는 별 영향을 받지 않으나, 염화아연(ZnCl<sub>2</sub>), 황산아연(ZnSO<sub>4</sub>), 염화마그네슘(MgCl<sub>2</sub>), 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 등을 첨가할 경우에는 30 내지

60% 정도로 활성이 감소하는 것으로 나타났다(도 4).

[0042] 실시예 5. 과당 1,6-이인산 알돌레이즈 효소의 에피머화 효능에 대한 pH 및 온도의 영향

[0043] 과당 1,6-이인산 알돌레이즈의 과당 6-인산에서 타가토스 6-인산으로의 에피머화에 대한 pH, 온도 및 시간 경과에 따른 활성을 확인하기 위해, 다양한 pH 및 온도에서 효소와 기질을 반응시키고, 효소 활성을 비교하였다.

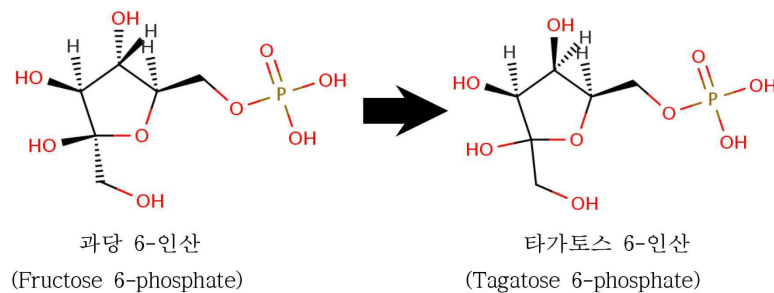
[0044] pH 변화에 대한 효과를 조사하기 위한 반응은 0.2%의 과당 6-인산과 0.06 단위/ml의 효소가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충용액 pH 7.0에서부터 9.0까지의 범위에서 반응시켰다. 반응 온도는 50°C에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후, 0.2 M 염산용액을 첨가하여 반응을 중단시키고, 효소의 활성을 측정하여 그 결과를 도 5a에 나타내었다. 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 유래 효소는 pH 7부터 9까지의 변화에 대한 활성 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

[0045] 온도 효과를 조사하기 위한 반응은, 30°C에서 70°C까지 0.2%의 과당 6-인산과 0.06 단위/ml의 효소가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충용액을 pH 8.5에서 1시간 동안 반응을 시켰으며, 반응 후 0.2 M 염산용액을 첨가하여 반응을 종료하고 효소의 활성을 측정하여 그 결과를 각각 도 5b에 나타내었다. 각 효소들의 최적온도는 50°C인 것으로 나타났다.

[0046] 과당 1,6-이인산 알돌레이즈의 과당 6-인산에서 타가토스 6-인산으로의 에피머화에 대한 시간 경과에 따른 최대 전환효율을 분석하기 위해, 0.2%의 과당 6-인산과 0.06 단위/ml의 효소가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충용액을 pH 8.5에서 800분까지 반응을 시켰으며, 반응 후 0.2 M 염산용액을 첨가하여 반응을 종료하고 효소의 활성을 측정하여 그 결과를 각각 도 5c에 나타내었다. 효소들의 최대 전환효율은 80% 정도이며, 최대 활성 도달시간은 420 분 정도로 나타났다.

도면

도면1



도면2

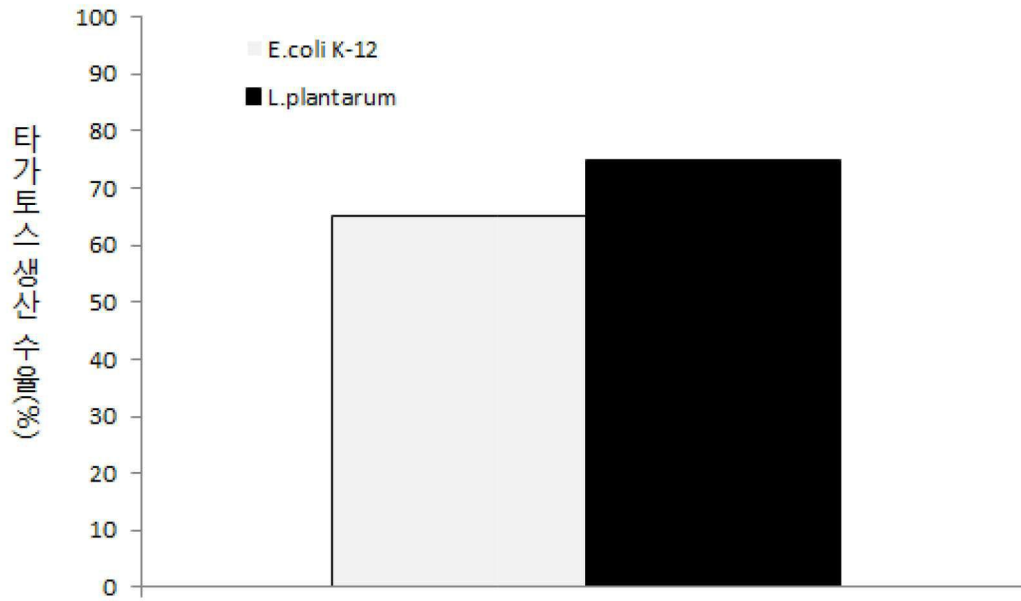
(서열번호 1)

fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II [*Lactobacillus plantarum*]

```

1    msfvnavdmt qdayknhyai gafntnnlew trcilkgaqd tntpviqvs mgaakymggy
61   klvmdlvade mesmnitvvp vmhldhgnye aakecievgy ssvmfghdl pfaenlektk
121  eivkklahakg isveaevgsi ggeedgiige geladveeak tlaatgidil aagignihgk
181  ypenwtglhf drlqaiseav kmplvlhggs gipkdqivka velgiskvnn ntenqvafan
241  atrayiesga dqigkgydpr kllapggkai vdvvtstrigw fktpavk
    
```

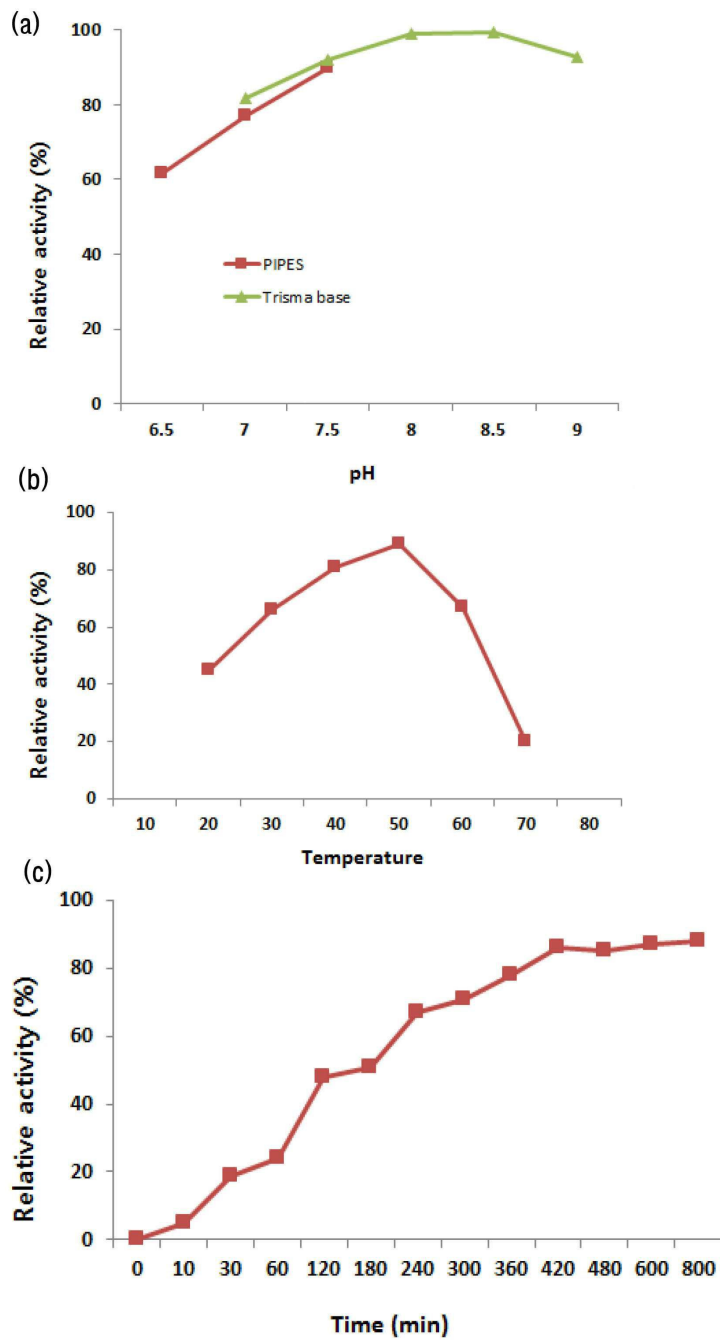
도면3



도면4

금속	상대활성
None	97.8
EDTA	89.9
MgCl <sub>2</sub>	51.2
MgSO <sub>4</sub>	69.9
ZnSO <sub>4</sub>	37.3
ZnCl <sub>2</sub>	30.9

도면5



서열목록

- <110> CHEBIGEN INC.
- <120> Fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Lactobacillus plantarum* with conversion activity from fructose 6-phosphate to tagatose 6-phosphate and method for producing tagatose using the same
- <130> PN17142
- <160> 1

<170> Kopatent In 2.0  
 <210> 1  
 <211> 287  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus plantarum  
 <400> 1

Met Ser Phe Val Asn Ala Val Asp Met Thr Gln Asp Ala Tyr Lys Asn  
 1 5 10 15

His Tyr Ala Ile Gly Ala Phe Asn Thr Asn Asn Leu Glu Trp Thr Arg  
 20 25 30

Cys Ile Leu Lys Gly Ala Gln Asp Thr Asn Thr Pro Val Ile Ile Gln  
 35 40 45

Val Ser Met Gly Ala Ala Lys Tyr Met Gly Gly Tyr Lys Leu Val Met  
 50 55 60

Asp Leu Val Ala Asp Glu Met Glu Ser Met Asn Ile Thr Val Pro Val  
 65 70 75 80

Val Met His Leu Asp His Gly Asn Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Cys Ile  
 85 90 95

Glu Val Gly Tyr Ser Ser Val Met Phe Asp Gly His Asp Leu Pro Phe  
 100 105 110

Ala Glu Asn Leu Glu Lys Thr Lys Glu Ile Val Lys Leu Ala His Ala  
 115 120 125

Lys Gly Ile Ser Val Glu Ala Glu Val Gly Ser Ile Gly Gly Glu Glu  
 130 135 140

Asp Gly Ile Ile Gly Glu Gly Glu Leu Ala Asp Val Glu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

Thr Leu Ala Ala Thr Gly Ile Asp Ile Leu Ala Ala Gly Ile Gly Asn  
 165 170 175

Ile His Gly Lys Tyr Pro Glu Asn Trp Thr Gly Leu His Phe Asp Arg  
 180 185 190

Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Val Lys Met Pro Leu Val Leu His Gly  
 195 200 205

Gly Ser Gly Ile Pro Lys Asp Gln Ile Val Lys Ala Val Glu Leu Gly  
210 215 220  
Ile Ser Lys Val Asn Val Asn Thr Glu Asn Gln Val Ala Phe Ala Asn  
225 230 235 240  
Ala Thr Arg Ala Tyr Ile Glu Ser Gly Ala Asp Gln Ile Gly Lys Gly  
245 250 255  
Tyr Asp Pro Arg Lys Leu Leu Ala Pro Gly Lys Lys Ala Ile Val Asp  
260 265 270  
Val Val Thr Ser Arg Ile Gly Trp Phe Lys Thr Pro Ala Val Lys  
275 280 285