



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0128561
(43) 공개일자 2016년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 33/00 (2006.01) C07J 17/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01) C12R 1/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 33/00 (2013.01)

C07J 17/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0060044

(22) 출원일자 2015년04월28일

심사청구일자 2015년04월28일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동, 풍성신미주아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

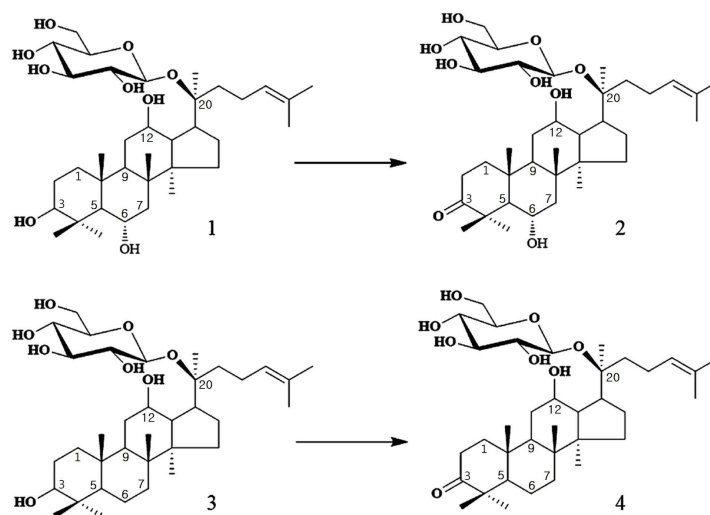
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 케톤화된 진세노사이드의 제조방법 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 (i) 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase) 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것으로, 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 진세노사이드에서 원하는 위치의 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
C12P 1/04 (2013.01)
C12R 1/24 (2013.01)

양동욱

대전광역시 유성구 엑스포로 448 509동 701호 (전민동, 엑스포아파트)

(72) 발명자

김엽

경기도 수원시 영통구 권광로260번길 36 111동 301호 (매탄동, 매탄현대힐스테이트)

민진우

경기도 화성시 동탄중앙로 213, 241동 1503호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313038-03-2-SB010

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00952903

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린

연구과제명 Probiotic(LAB)을 이용한 신규 유용사포닌의 합성 및 핵심 GT유전자 pool구축

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase) 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 F1, CK(compound K), Re, Rf, Rh₁, Rg₁, Rg₂, CY(compound Y), 지페노사이드(Gypenoside) LXXV, PPT 및 PPD로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방법은 진세노사이드의 3번 탄소의 하이드록시기를 케톤화시키는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단백질과 진세노사이드의 반응은 상기 단백질을 세포 안에 포함하고 있는 균주 또는 상기 균주의 배양물과 진세노사이드를 반응시키는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC12806BP로 기탁된 락토바실러스 브레비스 DCY65-1인 것인, 방법.

청구항 7

하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase) 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물을 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 진세노사이드는 F1, CK(compound K), Re, Rf, Rh₁, Rg₁, Rg₂, CY(compound Y), 지페노사이드(Gypenoside) LXXV, PPT 및 PPD로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 조성물은 진세노사이드의 3번 탄소의 하이드록시기를 케톤화시키는 것인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 것인, 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 단백질과 진세노사이드의 반응은 상기 단백질을 세포 안에 포함하고 있는 균주 또는 상기 균주의 배양물과 진세노사이드를 반응시키는 것인, 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC12806BP로 기탁된 락토바실러스 브레비스 DCY65-1인 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 (i) 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase) 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법 및 이의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진세노사이드는 인삼의 주요 약학 성분으로서, PPD(protopanaxadiol), PPT(protopanaxatriol) 및 올레아네인(oleanane)을 포함한 수 개의 그룹으로 분류될 수 있다. 주요 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rg1 및 Re를 포함한 40 종 이상의 진세노사이드가 인삼 뿌리에서 분리 및 동정되었다. 앞에서 발견된 주요 진세노사이드에는 Rg1, Re, Rd, Rb2 및 F2가 있다. 진세노사이드 F1, F2, F3 및 F5 및 노토진세노사이드 Fe와 같은 일부 사포닌은 앞에서만 발견되었다.

[0003] 주요 진세노사이드가 가수분해되어 생성되는 마이너 진세노사이드는 약학적 으로 높은 활성을 가지나, 인삼에서 천연으로 구하기는 어렵다. 아울러, 마이너 진세노사이드의 제조에 있어서, 미생물 또는 효소를 이용한 진세노사이드의 전환은 낮은 온도에서 진행할 수 있고, 조작이 간편하며, 기질특이성 때문에 부산물이 적다는 장점이 있고, 미생물의 종류에 따라 사포닌의 전환 산물 및 그 경로가 다양하여 특정사포닌을 선택적으로 생산할 수 있는 장점을 가진다. 한편, 미생물을 이용하여 진세노사이드를 탈당화시키는 방법이 보고되었다(J Ginseng Res, 2012, 36:291-297). 그러나, 이들 보고들은 생물 전환을 유발하는 효소를 구체적으로 특정하지 않았으며, 진세노사이드 전환에 사용되는 대부분의 미생물은 그라스(the generally regarded as safe, GRAS) 표준을 충족시키지 못하였다.

[0004] 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD)는 하이드록시스테로이드의 탈수소화를 촉매하는 스테로이드계 효소로서, 작용하는 탄소 번호에 의해 4 가지 유형, 즉 3 β -, 11 β -, 17 β - 및 20 β -HSD로 분류된다. 이러한 HSD의 각 그룹은 상이한 조직에 존재하며, 다른 기능을 갖는다. 3 β -HSD는 3 β -하이드록시스테로이드의 3-옥소 중간체로의 산화적 전환 및 그 역반응을 촉매한다.

[0005] 그러나, 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제가 진세노사이드에 있는 하이드록시기의 탈수소화를 촉매하여 케톤화된 진세노사이드를 생산할 수 있는 활성을 가지는지 여부는 알려진 바가 없으며, 진세노사이드의 케톤화 활성을 지닌다고 하여도, 그 기질 특이성 및 위치 특이성이 효소의 종류에 따라 상이하므로, 인삼 사포닌

인 진세노사이드에 특이적으로 작용하는 케톤화 활성을 지닌 효소인지 여부는 개별적으로 규명될 필요가 있다.

[0006] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 기질특이성 및 위치특이성을 지녀 특정 진세노사이드의 케톤화에 이용할 수 있는 미생물 및 효소를 개발하고자 예의 노력한 결과, 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질 및 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스가 진세노사이드에 있는 하이드록시기의 탈수소화를 촉매하여 진세노사이드를 케톤화하는 활성을 가짐을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 (i) 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase) 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스 균주; 또는 상기 균주의 배양물을 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 정의되는, 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 정의되는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, (i) 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD) 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 균주; 또는 상기 균주의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 HSD의 위치 특이성에 따라 진세노사이드의 3번, 6번, 12번 또는 20번 등의 탄소의 하이드록시기를 케톤화시킬 수 있으며, 더욱 구체적으로 진세노사이드의 3번 탄소의 하이드록시기를 케톤화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0012] 본 발명에서는, 상기 HSD 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스가 진세노사이드에 있는 하이드록시기의 탈수소화를 촉매하여 케톤화된 진세노사이드를 생산할 수 있음을 최초로 규명하였다. 특히, 다양한 HSD 중 3 β -HSD는 진세노사이드의 다양한 하이드록시기 중 특히, 3번 탄소의 하이드록시기에 특이적으로 탈수소화를 촉매하여, 3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드를 생산할 수 있음을 최초로 규명하였다. 또한, 본 발명에서 동정된 락토바실러스 브레비스 DCY65-1은 3 β -HSD를 생산하여, 진세노사이드의 다양한 하이드록시기 중 특히 3번 탄소의 하이드록시기에 특이적으로 탈수소화를 촉매하므로, 3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드를 생산할 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0013] 본 발명의 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법은, 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 진세노사이드에서 원하는 위치의 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있는 장점이 있으므로, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD)"는 하이드록시스테로이드의 탈수소화를 촉매하는 알콜 옥시도리덕타제(alcohol oxidoreductase)를 의미하며, 본 발명에서 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제는 HSD와 혼용될 수 있다.

[0015] 또한, 상기 HSD는 진세노사이드에 있는 하이드록시기를 케톤화할 수 있다면 제한없이 본 발명에 포함되나, 구체

적으로, 진세노사이드의 3번 탄소에 연결된 하이드록시기를 케톤화할 수 있다.

- [0016] 또한, 구체적으로, 상기 HSD는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 유래 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 락토바실러스 브레비스 유래 HSD 중 특히, 진세노사이드의 3번 탄소를 케톤화하는 3 β -HSD는 구체적으로, 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 서열로 정의될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가진 3 β -HSD는 HSDLb1와 혼용될 수 있다.
- [0017] 이와 같은 본 발명의 3 β -HSD는 서열번호 1로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 더욱더 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서, 실질적으로 진세노사이드에 있는 하이드록시기를 케톤화하는 활성을 갖는 단백질이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 실질적으로 3 β -HSD와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 상기 서열번호 1에 기재한 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0018] 또한, 구체적으로 3 β -HSD는 서열번호 2 기재된 염기서열을 포함할 수 있으며, 상기 염기서열로 정의될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 더욱더 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서, 실질적으로 상기 3 β -HSD와 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0019] 본 발명에서 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이티 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모이티로부터 다른 하나의 모이티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성은 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlignTM(DNASTAR Inc) 등일 수 있으나, 상동성을 결정할 수 있는 프로그램이라면 제한 없이 이용할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 간 상동성은 상동 영역 간의 안정된 이중가닥을 이루는 조건하에서 폴리뉴클레오티드를 혼성화한 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제로 분해시켜 분해된 단편의 크기를 결정함으로써 결정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질 및 진세노사이드의 반응"은 케톤화된 진세노사이드를 제조하기 위해, 상기 HSD 단백질과 진세노사이드를 반응시키는 것뿐만 아니라, 상기 HSD 단백질을 세포 안에 포함하고 있는 균주 또는 상기 균주의 배양물과 진세노사이드를 반응키는 것도 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "HSD 단백질을 세포 안에 포함하고 있는 균주"는 HSD 유전자를 내재적으로 가지고 있는 균주 또는 HSD 유전자가 도입된 형질전환체가 HSD를 발현한 후 세포 내 포함하고 있는 균주를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)"는 유산균의 일종인 그램 양성 미생물이며, 그라스(generally regarded as safe, GRAS) 균주로서 안전하고, 프로바이오틱 유기체로 간주된다. 구체적으로, 상기 락토바실러스 브레비스는 미생물자원센터에 수탁번호 KCTC12806BP로 기탁된 락토바실러스 브레비스 DCY65-1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 용어 "배양물"은 균주를 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다. 상기 배양물은 균주를 포함하는 형태 및 상기 균주를 포함하는 배양액에서 원심분리 등으로 균주를 제거한 형태도 모두 포함하는 개념이다.
- [0023] 상기 배양물은 본 발명의 락토바실러스 브레비스를 포함하므로, 진세노사이드에 있는 하이드록시기의 탈수소화를 유도하여 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 용어 "진세노사이드"는 인삼 유래 담마란(dammarane)계 사포닌 또는 이의 유도체를 의미하는 것으로,

다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있다. 본 발명의 진세노사이드는 하이드록시기를 하나 이상 가지고 있으며, 구체적으로 진세노사이드의 3번 탄소, 6번 탄소, 12번 탄소 및 20번 탄소에 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 탄소에 하이드록시기를 가지고 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용되는 진세노사이드의 탄소 번호는 도 4에 표시된 진세노사이드의 화학구조식 안에 나타내었다.

[0025] 상기 진세노사이드는 HSD에 의해 진세노사이드에 있는 하이드록시기가 하나 이상 케톤화될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 진세노사이드는 분리 및 정제된 형태의 진세노사이드를 이용할 수도 있고, 또는 식물, 예컨대 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 사포닌을 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 진세노사이드로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. 또한, 화학적으로 합성된 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 인삼으로는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 고려삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*P. quiquefolius*), 전칠삼(*P. notoginseng*), 죽절삼(*P. japonicus*), 삼엽삼(*P. trifolium*), 허말라야삼(*P. pseudoginseng*) 및 베트남삼(*P. vietnamensis*)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 구체적으로, 상기 진세노사이드는 F1, CK(compound K), Re, Rf, Rh₁, Rg₁, Rg₂, CY(compound Y), 지페노사이드(Gypenoside) LXXV, PPT 및 PPD로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 용어 "하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드"는 상기 진세노사이드의 하이드록시기가 하나 이상 탈수소화되어 케톤화된 진세노사이드를 의미하는 것으로, 구체적으로 3번 탄소의 하이드록시기가 탈수소화되어 케톤화된 진세노사이드일 수 있으며, 그 예로 F1, CK, Re, Rf, Rh₁, Rg₁, Rg₂, CY, 지페노사이드 LXXV, PPT, PPD 또는 이들의 조합의 3번 탄소의 하이드록시기가 탈수소화되어 케톤화된 진세노사이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 상기 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드는 케톤화되기 전의 진세노사이드보다 뛰어난 생리활성을 가져 다양한 분야에 널리 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서는 케톤화된 진세노사이드를 제조하기 위해, 김치로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 브레비스 DCY65-1(도 1)를 진세노사이드 CK 또는 F1와 반응시켜, 대사물 1 및 2를 제조하였다(실시예 2).

[0031] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 대사물 1 및 2를 분리한 후, NMR, TLC 및 HPLC 분석을 통해 대사물 1은 케톤화된 진세노사이드 CK인 12β-하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드(12β-hydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-CK)이고, 대사물 2는 케톤화된 진세노사이드 F1인 6α,12β-디하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드(6α,12β-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-F1)임을 확인하였다(실시예 3).

[0032] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 락토바실러스 브레비스 DCY65-1 유래 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(HSDLb1)를 얻기 위해, DCY65-1의 게놈 유전자에서 3β-HSD를 암호화하고 있는 유전자를 pMAL-c5X 벡터에 삽입하여 pMAL-HSDLb1 벡터를 제조하였고, 상기 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켰다. 또한, 상기 형질전환된 대장균을 배양한 후, MBP를 포함하는 융합 단백질(MBP-HSDLb1)을 아밀로오스 수지 컬럼(뉴잉글랜드 바이오랩, 영국)을 사용하여 정제하였다. 그 결과, MBP-HSDLb1 융합 단백질이 정제되었으며, 분자량은 71.1 KDa임을 확인하였다(도 5). 또한, 아미노산 서열을 통해 계산된 MBP-HSDLb1의 분자량은 SDS-PAGE에서 검출된 것과 유사한 71.15 KDa이었다(실시예 4).

[0033] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 HSDLb1 단백질의 진세노사이드 케톤화 활성을 분석하기 위해, HSDLb1 단백질과 CK를 반응시킨 후 TLC 및 HPLC 분석을 수행한 결과, 진세노사이드 CK가 3-옥소-CK로 전환됨을 확인하였다(도 7).

[0034] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 HSDLb1 단백질 활성에 대한 금속 이온의 영향을 분석한 결과, HSDLb1 단백질의 활성은 10 mM Co²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ 및 Zn²⁺에 의해 현저하게 억제되지만, NH₄⁺ 및 Mg²⁺에 의해 증가되었다(도 8).

[0035] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 HSDLb1 단백질 활성에 대한 pH의 영향을 분석한 결과, HSDLb1 단백질은 pH 2.0 내지 12.0에서 진세노사이드 CK를 3-oxo-CK로 전환시켰다. 또한, HSDLb1 단백질은 pH 6.0 및 8.0에서 다른

pH에서보다 더욱 강한 활성을 나타내었다(도 9).

- [0036] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 HSDLb1 단백질 활성에 대한 온도의 영향을 분석한 결과, HSDLb1 단백질 활성의 최적 온도는 20 내지 30 °C이었다. 또한, 제조합 HSDLb1 단백질은 20 °C 보다 30 °C에서 더 큰 활성을 나타내었다(도 10).
- [0037] 이를 통해, 제조합 HSDLb1 단백질의 최적 조건은 10 mM Mg^{2+} , pH 6.0 내지 8.0 및 30 °C임을 알 수 있었다.
- [0038] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질; 상기 단백질을 발현하는 락토바실러스 브레비스 균주; 또는 상기 균주의 배양물을 포함하는, 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물은 본 발명에서 사용되는 HSD의 위치 특이성에 따라 진세노사이드의 3번, 6번, 12번 또는 20번 등의 탄소의 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는데 이용될 수 있으며, 더욱 구체적으로 진세노사이드의 3번 탄소의 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는데 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 상기 조성물을 이용하면 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 진세노사이드에서 원하는 위치의 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.
- [0040] 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제, 락토바실러스 브레비스, 배양물 및 진세노사이드는 전술한 바와 같다.
- [0041] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 정의되는, 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질을 제공한다.
- [0042] 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제는 전술한 바와 같다.
- [0043] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 정의되는, 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 구체적으로 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제는 전술한 바와 같다.
- [0045] 본 발명의 폴리뉴클레오티드에는 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열 및 이의 변이체 또한 포함된다.
- [0046] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0047] 상기 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같다.
- [0048] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 상기 제조된 제조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 목적하는 단백질을 수득할 수 있게 된다.
- [0049] 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 아그로박테리움 매개 형질전환에 사용할 수 있는 Ti-플라스미드를 포함한다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP)가 있다. 또한, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 또는 백신시아 바이러스(vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 바큘로바이러스(baculovirus)와 같은 곤충 바이러스, 이중 가닥 식물 바이러스(예, CaMV), 단일가닥 바이러스 또는 게미니 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다.

- [0050] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질(예를 들어, B42같은)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 융합 플라스미드에는 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 태그(tag)로 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 또한, 상기 융합 단백질의 제조에 있어, 크로마토그래피 공정을 포함할 수 있으며, 상기 융합 단백질은 특히 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 헥사히스티딘이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 HSD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서(enhancer)와 같은 시스 요소(cis element), 스플라이싱 시그널(splicing signal), 폴리 A 추가 시그널(poly A addition signal), 선택 마커(selection marker), 라이보솜 결합 서열(ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0055] 상기 발현 벡터는 전술한 바와 같다.
- [0056] 본 발명의 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0057] 상기 형질전환으로 본 발명의 HSD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터의 일부를 숙주 세포 내에 도입할 수 있는데, 여기서 상기 발현 벡터의 일부란, 숙주 세포 내에 상기 HSD 단백질의 활성을 부여할 수 있도록 HSD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 부분을 포함하는 발현 벡터의 부분을 의미한다. 예컨대, 아그로박테리아 매개 형질전환법에서 숙주 세포 내로 전달되는 Ti 플라스미드의 T-DNA를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 HSD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 형질전환체 제조에 사용될 수 있는 숙주 세포의 종류는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 동물세포, 식물세포 및 곤충 세포가 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 CL41(DE3), BL21 또는 HB101이, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 또는 LKS87 등이 있다.
- [0060] 본 발명의 프로모터는, 본 발명의 핵산을 숙주에서 발현하도록 하는 한 어떠한 프로모터도 사용될 수 있다. 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터 또는 PR 프로모터 같은 대장균 또는 파아지-유래 프로모터; T7 프로모터 같은 대장균 감염 파아지-유래 프로모터, CaMV35S, MAS 또는 히스톤 프로모터가 사용될 수 있다.

또한 tac 프로모터 같은 인공적으로 변형된 프로모터도 사용될 수 있다.

[0061] 상기의 방법으로 형질전환된, 본 발명의 HSD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 진세노사이드에 있는 하이드록시기를 탈수소화하여 케톤화하는 활성을 가진다.

발명의 효과

[0062] 본 발명의 하이드록시기가 케톤화된 진세노사이드를 제조하는 방법 및 진세노사이드의 하이드록시기를 케톤화하기 위한 조성물은 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 진세노사이드에서 원하는 위치의 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있는 장점이 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 16S rRNA 유전자 서열을 토대로 작성한 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) DCY65-1의 계통수이다.

도 2는 F1 및 CK가 DCY65-1에 의해 케톤화되어 3-oxo-F1 및 3-oxo-CK로 각각 전환됨을 보여주는 TLC 결과를 나타낸 도이다(1, 진세노사이드 F1; 2, 3-oxo-F1; 3, 진세노사이드 CK; 4, 3-oxo-CK).

도 3은 F1 및 CK가 DCY65-1에 의해 케톤화되어 3-oxo-F1 및 3-oxo-CK로 각각 전환됨을 보여주는 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다(1, F1; 2, 3-oxo-F1; 3, CK; 4, 3-oxo-CK).

도 4는 DCY65-1에 의한 F1 및 CK의 미생물 케톤화 경로를 나타낸 도이다(1, F1; 2, 3-oxo-F1; 3, CK; 4, 3-oxo-CK).

도 5는 재조합 HSDLb1의 SDS-PAGE 분석 결과는 나타낸 도이다(M, 분자량 마커; 1, 단백질 발현을 유도하지 않은 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 파쇄액; 2, 단백질 발현을 유도한 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 파쇄액; 3, MBP-결합 아가로오스 수지를 이용한 정제 후의 pMAL-HSDLb1)

도 6은 3 β -HSD 서열을 비교하여 작성한 계통수이다.

도 7은 HSDLb1 단백질에 의해 CK가 3-oxo-CK로 전환됨을 확인한 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다

도 8은 HSDLb1 단백질 활성에 대한 금속 이온의 영향을 분석한 결과를 보여주는 TLC 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 HSDLb1 단백질 활성에 대한 pH의 영향을 분석한 결과를 보여주는 TLC 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 HSDLb1 단백질 활성에 대한 온도의 영향을 분석한 결과를 보여주는 TLC 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0065] 실시예 1. 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) DCY65-1의 분리 및 계통발생학적 분석

[0066] MRS(Difco, USA) 아가를 사용하여 표준 희석 플레이팅 방법 통해 김치로부터 콜로니 형태, 색깔 및 크기에 근거하여, 단일 콜로니를 형성하는 유산균을 분리하여 DCY65-1로 명명하고, 미생물자원센터에 수탁번호 KCTC12806BP로 기탁하였다.

[0067] 또한, 상기 DCY65-1의 16S rRNA 유전자의 서열을 제노텍(대한민국, 대전)에서 구입한 유니버설 박테리아 프라이머 세트 27F, 518F, 800R 및 1492R을 사용하여 분석하였다. 상기 프라이머를 표 1에 나타내었다. 분석된 16S RNA 유전자를 EzTaxon-e 서버(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)를 사용하여 관련 분류군의 16S rRNA 유전자 서열과 비교하였다. 1,000개 복제에 근거한 부트스트랩 값을 가진 MEGA 소프트웨어를 사용하여 이웃-결합 방법

(neighbour-joining method)을 통해 계통수를 제작하였다.

표 1

프라이머	서열	서열번호
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	3
518F	CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG	4
800R	TAC CAG GGT ATC TAA TCC	5
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	6

그 결과, 계통수에서 상기 DCY65-1이 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속에 포함되는 군주임을 확인하였다(도 1). 또한, DCY65-1의 16S rRNA 유전자 서열(유전자은행 수탁번호 KM507722)을 다른 락토바실러스 군주와 비교한 결과, DCY65-1은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) ATCC 14687T(99.93 %) 및 락토바실러스 브레비스 ATCC 367(99.79 %)와 유사함을 확인하였다. 따라서, DCY65-1 및 상기 락토바실러스 브레비스의 16S rRNA 유전자 서열은 1 % 미만에 불과한 차이를 가지므로, DCY65-1은 락토바실러스 브레비스임을 알 수 있었다.

실시예 2. 락토바실러스 브레비스를 이용한 케톤화된 진세노사이드의 제조

락토바실러스 브레비스를 이용하여 케톤화된 진세노사이드를 제조하기 위해, 먼저 DCY65-1를 37 °C의 MRS 배지에서 배양한 후, 초음파를 처리하고, 4 °C에서 15 분 동안 10,000 X g로 원심분리하여 조효소를 수득하였다. 상기 조효소에 아세톤 등을 처리하여 수득한 펠릿을 20 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.0) 중에 용해시키고, 1 mM 진세노사이드 F1 또는 CK와 혼합하였다. 상기 혼합물을 30 °C에서 인큐베이션하여 케톤화된 진세노사이드인 대사물 1 및 2를 제조하였다. 그 후 대사물 1 및 2를 포함하는 반응액을 수포화된(water-saturated) 부탄올로 추출하여 FT-NMR 분광계, TLC 및 HPLC로 분석하였다.

실시예 3. 락토바실러스 브레비스에 의해 케톤화된 진세노사이드의 분석

실시예 3-1. 케톤화된 진세노사이드 F1 및 CK의 분리 및 동정

상기 실시예 2에서 수득한, 케톤화된 진세노사이드인 대사물 1 및 2를 포함하는 부탄올 추출물을 실리카 겔 컬럼을 사용하여 CHCl₃-CH₃OH(15:1) 용매로 용출시켰다. 용출된 분획을 semi-preparative HPLC를 사용하여 추가로 정제하고, 케톤화된 진세노사이드인 대사물 1 및 2를 피리딘-d₅에 용해시키고, FT-NMR 분광계(400 MHz; Varian Inova AS 400, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 ¹H, ¹³C, 및 2D NMR을 통해 분석한 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 그 결과, 대사물 1 및 2는 하기와 같이 케톤화된 진세노사이드 CK 및 F1으로 확인되었다.

표 2

Metabolite 1				Metabolite 2			
Aglycone moiety		Sugar moiety		Aglycone moiety		Sugar moiety	
No.	ppm	No.	ppm	No.	ppm	No.	ppm
C-1	39.3	C-1'	98.2	C-1	39.7	C-1'	98.2
C-2	33.3	C-2'	75.1	C-2	34.2	C-2'	75.1
C-3	218.5	C-3'	79.3	C-3	216.3	C-3'	79.2
C-4	47.7	C-4'	71.8	C-4	47.3	C-4'	71.7
C-5	59.1	C-5'	78.2	C-5	55.3	C-5'	78.2
C-6	66.8	C-6'	63.0	C-6	19.9	C-6'	62.9
C-7	47.4			C-7	36.1		
C-8	41.4			C-8	39.9		
C-9	49.8			C-9	49.9		
C-10	39.3			C-10	36.9		
C-11	30.8			C-11	30.7		
C-12	70.9			C-12	70.0		
C-13	49.1			C-13	49.6		
C-14	51.4			C-14	51.4		
C-15	30.7			C-15	30.7		
C-16	26.5			C-16	26.6		
C-17	51.6			C-17	51.6		
C-18	17.3			C-18	17.2		
C-19	17.7			C-19	17.7		
C-20	83.3			C-20	83.3		
C-21	22.3			C-21	22.3		
C-22	36			C-22	36.1		
C-23	23.15			C-23	23.15		
C-24	125.9			C-24	126.0		
C-25	131			C-25	130.9		
C-26	25.6			C-26	25.7		
C-27	17.8			C-27	17.7		
C-28	31.9			C-28	26.7		
C-29	16.3			C-29	15.6		
C-30	17.8			C-30	15.8		

[0075]

[0076]

대사물 1: 케톤화된 진세노사이드 CK인 12β-히드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드(12β-hydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-CK)

[0077]

백색 비결정질 분말; ¹H-NMR(400 MHz, 피리딘-d₅, δ H) 5.25(1H, dd, *J* = 6.8, 6.4 Hz, H-24), 5.16(1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-10), 4.46-3.89(당 부분), 1.60(9H, s, H-28, 21, 29), 1.11(3H, H-26), 1.03(3H, s, H-27), 0.96(3H, s, H-18), 0.91(3H, s, H-19), 0.87(3H, s, H-30); ¹³C-NMR(400 MHz, 피리딘-d₅) 분광계 데이터(표 2).

[0078]

대사물 2: 케톤화된 진세노사이드 F1인 6α,12β-디히드록시다마르-3-온-20(S)-O-b-D-글루코피라노사이드(6α,12β-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-F1)

[0079] 백색 비결정질 분말; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 피리딘- d_5 , dH) 5.26(1H, dd, $J = 6.0, 6.4$ Hz, H-24), 5.16(1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-10), 4.45-3.84(당 부분), 1.66(3H, s, H-28), 1.63(3H, s, H-21), 1.61(3H, s, H-29), 1.59(6H, s, H-26, 27), 1.01(3H, s, H-18), 0.97(3H, s, H-19), 0.82(3H, s, H-30); $^{13}\text{CNMR}$ (400 MHz, 피리딘- d_5) 분광계 데이터(표 2).

[0080] 실시예 3-2. 케톤화된 진세노사이드 F1 및 CK의 TLC 및 HPLC 분석

[0081] 실리카 겔 60 플레이트 및 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (65:35:10, v/v/v, 저장) 전개 용매를 사용하여 상기 실시예 2에서 수득한, 케톤화된 진세노사이드인 대사물 1 및 2를 포함하는 부탄올 추출물의 TLC 분석을 수행하였다. TLC 플레이트의 스팟을 전개 후, TLC 플레이트에 10 %(v/v) H_2SO_4 를 분무하여 110 °C에서 10분 동안 가열하였다.

[0082] 또한, 상기 실시예 2에서 수득한, 케톤화된 진세노사이드인 대사물 1 및 2를 포함하는 부탄올 추출물을 진공상태에서 증발시키고, 잔여물을 CH_3OH 에 용해시켰다. 그 후, 진세노사이드를 C18 칼럼(250 9 4.6 mm, ID 5 μm)을 사용하여 하기 조건으로 HPLC 분석을 수행하였다; 0, 10, 42, 52, 65, 82, 83, 93, 94 및 100분의 시간마다, 20:80, 20:80, 29:71, 30:70, 48:52, 70:30, 90:10, 90:10, 20:80 및 20:80의 아세토니트릴: H_2O 용출 용액, 1.6/분의 유속, 203 nm의 검출 파장.

[0083] 상기 TLC 분석 결과, F1 및 CK가 DCY65-1에 의해 케톤화되어 3-oxo-F1(대사물 2) 및 3-oxo-CK(대사물 1)로 각각 전환되었음을 확인하였다(도 2).

[0084] 또한, HPLC 분석 결과, 보유 시간이 59.04, 60.10, 74.27 및 77.03분인 HPLC 피크는 각각 진세노사이드 F1, 3-oxo-F1, CK 및 3-oxo-CK임을 확인하였다(도 3).

[0085] 이를 통해, DCY65-1는 도 4에 나타난 바와 같이, 하기 2개의 대사 경로를 가짐을 알 수 있었다; $\text{F1} \rightarrow 3\text{-oxo-F}$ 및 $\text{CK} \rightarrow 3\text{-oxo-CK}$ (도 4). 또한, DCY65-1는 강력한 디카르복시라제(decarboxylase) 활성을 가지고 있어, PPT 및 PPD 계열의 진세노사이드 아글리콘의 C-3위치에 있는 OH기를 케톤화할 수 있음을 알 수 있었다

[0086] 실시예 4. 재조합 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD)의 발현 및 정제

[0087] 락토바실러스 브레비스 유래 하이드록시스테로이드 디하이드로게나제(HSDLb1) 유전자를 클로닝하기 위해, DCY65-1를 37 °C의 MRS 아가에서 배양하였다. 또한, 유전자 클로닝 및 발현을 위해 대장균 BL21(DE3) 및 pMAL-c5X 플라스미드(영국, 뉴일글랜드 바이오랩)를 앰피실린(100 mg/L)이 보충된 Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다.

[0088] 또한, DCY65-1의 게놈 유전자를 게놈 DNA 분리 키트(대한민국, GeneA11)를 사용하여 추출 및 정제하였다. 상기 게놈 DNA로부터 3 β -HSD를 암호화하고 있는 유전자(서열번호 2)를 증폭시키고, 증폭된 유전자를 *Pfu* DNA 중합효소(GeneA11, 대한민국)를 사용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 주형으로 사용하였다. PCR에 의해 수득된 DNA를 정제하고, Ez-융합 클로닝 키트(Enzynomics, 대한민국)를 사용하여 *Nde*I 및 *Eco*RV로 절단된 pMAL-c5X 벡터에 삽입하여 pMAL-HSDLb1 벡터를 제조하였다. 그 결과, 말토오스-결합 단백질(MBP) 유전자와 HSDLb1 유전자가 연결된 MBP-HSDLb1 유전자 융합체가 생성되었으며, 이를 서열분석에 의해 확인하였다.

[0089] 또한, 상기 pMAL-HSDLb1 벡터로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)을 미생물자원센터에 수탁번호 KCTC12805BP로 기탁하였다. 상기 형질전환된 대장균을 37 °C의 LB-앰피실린 배지에서 0.5의 OD600에 도달할 때까지 배양하였다. 또한, 0.3 mM 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 또한, 추가적으로 상기 대장균을 28 °C에서 9 시간 동안 배양한 후, 4 °C에서 20 분 동안 5,000 x g로 원심분리하였다. 그 후 펠렛을 20 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.4; 1 mM EDTA 및 1 mM

NaCl 포함)으로 2 회 세척하고, 20 mM 인산 나트륨 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. 그 후 상기 대장균에 초음파 처리한 후, 4 °C에서 20 분 동안 16,000 x g로 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. MBP를 포함하는 융합 단백질을 아밀로오스 수지 컬럼(뉴잉글랜드 바이오랩, 영국)을 사용하여 정제하였다. 또한, 상기 단백질의 동질성(homogeneity)을 12 % SDS-PAGE 및 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색 용액을 사용하여 분석하였다.

[0090] 그 결과, MBP-HSDLb1 융합 단백질이 정제되었으며, 분자량은 71.1 KDa임을 확인하였다(도 5). 또한, 아미노산 서열을 통해 계산된 MBP-HSDLb1의 분자량은 SDS-PAGE에서 검출된 것과 유사한 71.15 KDa이었다.

[0091] 실시예 5. HSDLb1 단백질의 계통발생학적 분석

[0092] 258개의 아미노산으로 구성된 HSDLb1 단백질은 5.30의 이론적인 pI 값 및 28.64 KDa의 분자량을 갖는다(http://web.expasy.org/compute_pi/). HSDLb1은 3 β -HSD의 단백질 도메인에 대해 상동성을 가지므로, 다른 종 유래 3 β -HSD 서열을 비교하여 작성한 계통수를 도 6에 나타내었다. 인간, 마우스, 랫트, 락토바실러스 브레비스 및 같은 하나의 분기군(clade)을 형성하고, 닭, 개구리 및 메기 등은 다른 분기군에 포함되었다.

[0093] 실시예 6. HSDLb1 단백질의 진세노사이드 케톤화 활성 분석

[0094] 실시예 6-1. 분석 방법

[0095] HSDLb1 단백질의 진세노사이드 케톤화 활성을 분석하기 위해, HSDLb1 단백질과 CK를 반응시킨 후 TLC 및 HPLC 분석을 수행하였다.

[0096] 먼저, TLC 분석을 상기 실시예 3-2의 방법으로 수행하였다.

[0097] 또한, HPLC 분석을 Agilent 1260 시스템(Agilent)을 사용하여, 하기 조건으로 수행하였다; 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5 및 34.5-40분의 시간마다, 81:19, 81:19, 71:29, 71:29, 60:40, 44:56, 30:70, 10:90, 10:90, 81:19 및 81:19의 아세토니트릴 및 H₂O 용출 용액, C18 컬럼(50 X 4.6 mm, ID 2.6 μ m), 0.6 mL/min의 유속 및 203 nm의 검출 파장.

[0098] 실시예 6-2. HSDLb1 단백질의 진세노사이드 케톤화 활성 분석 결과

[0099] 제조한 HSDLb1 단백질에 의해 전환된 진세노사이드 CK를 HPLC로 분석한 결과, HPLC 피크는 각각 진세노사이드 CK 및 3-oxo-CK임을 확인하였다(도 7). 48 시간 후, 진세노사이드 CK는 3-옥소-CK로 전환되었다. TLC 및 HPLC 분석 결과를 통해 하기의 대사 경로를 가짐을 알 수 있었다: CK $\rightarrow$ 3-oxo-CK(도 4). 또한, HSDLb1 단백질은 강력한 디카르복시라제 활성을 가지고 있어, 진세노사이드 아글리콘의 C-3위치에 있는 OH기를 케톤화할 수 있음을 알 수 있었다

[0100] 실시예 7. HSDLb1 단백질 활성에 대한 금속 이온, pH 및 온도의 영향 분석

[0101] 실시예 7-1. 분석 방법

[0102] HSDLb1 활성에 대한 금속 이온의 영향을 분석하기 위해, 하기 다양한 화합물을 사용하여 5.0 mM 진세노사이드 CK와 HSDLb1를 30 °C에서 30분 동안 반응시켰다; 최종 농도 10 mM의 CoCl₂, MgCl₂, FeCl₃, NaCl, CuSO₄, NH₄Cl,

KCl, CaCl₂ 또는 ZnSO₄. 또한, 금속 이온을 첨가하지 않은 대조군과 비교하였다.

[0103] 또한, HSDLb1 활성화에 대한 pH의 영향을 분석하기 위해, 하기의 다양한 pH의 완충액을 사용하여 5 mM 진세노사이드 CK를 HSDLb1와 최적의 금속 이온 농도에서 반응시켰다; 각각 20 mM의 Tris-HCl(pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0) 및 Tris-NaOH(pH 12.0).

[0104] 또한, HSDLb1 활성화에 대한 온도의 영향을 분석하기 위해, 하기의 다양한 온도에서 5 mM 진세노사이드 CK를 HSDLb1와 최적의 금속 이온 농도로 48시간 동안 반응시켰다; 20 내지 60 °C(20, 30, 37, 50 및 60 °C).

[0105] 또한, 상기 반응 후 각 활성을 비교하기 위해, 실시예 3-2의 방법으로 TLC 분석을 수행하였다.

[0106] 실시예 7-2. HSDLb1 단백질 활성화에 대한 금속 이온, pH 및 온도의 영향 분석 결과

[0107] HSDLb1 단백질 활성화에 대한 금속 이온의 영향을 분석한 결과, 도 8에서 알 수 있듯이, HSDLb1 단백질은 Ca²⁺를 필요로 하지 않았다. 또한, HSDLb1 단백질의 활성화는 10 mM Co²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ 및 Zn²⁺에 의해 현저하게 억제되지만, NH₄⁺ 및 Mg²⁺에 의해 증가되었다. 특히 HSDLb1 단백질의 활성화는 Mg²⁺에서 가장 높았다. 또한, HSDLb1 단백질의 활성화는 Na⁺ 및 K⁺에 영향을 받지 않았다.

[0108] 아울러, HSDLb1 단백질 활성화에 대한 pH의 영향을 분석한 결과, 도 9에서 알 수 있듯이, HSDLb1 단백질은 pH 2.0 내지 12.0에서 진세노사이드 CK를 3-oxo-CK로 전환시켰다. 또한, HSDLb1 단백질은 pH 6.0 및 8.0에서 다른 pH에서보다 더욱 강한 활성을 나타내었다.

[0109] 아울러, HSDLb1 단백질 활성화에 대한 온도의 영향을 분석한 결과, 도 10에서 알 수 있듯이, HSDLb1 단백질 활성화의 최적 온도는 20 내지 30 °C이었다. 또한, 재조합 HSDLb1 단백질은 20 °C 보다 30 °C에서 더 큰 활성을 나타내었다.

[0110] 이를 통해, 재조합 HSDLb1 단백질의 최적 조건은 10 mM Mg²⁺, pH 6.0 내지 8.0 및 30 °C임을 알 수 있었다.

[0111] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0112]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12805BP

수탁일자 : 20150428

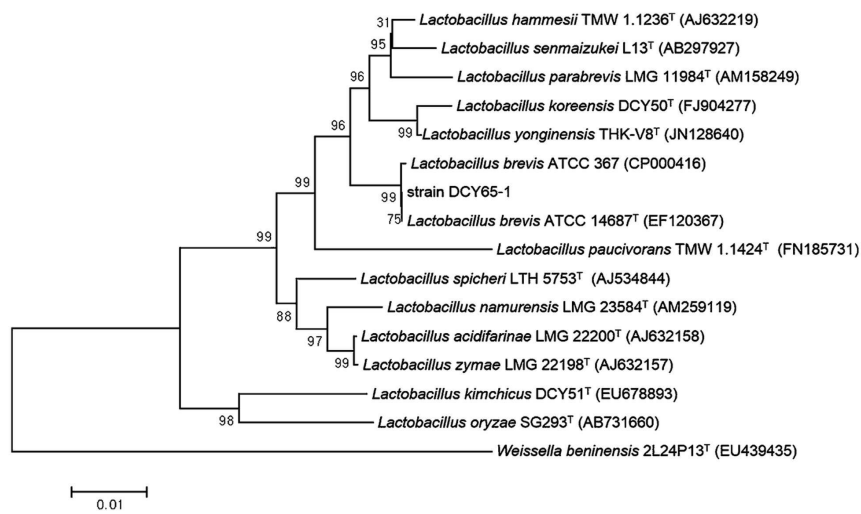
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12806BP

수탁일자 : 20150428

도면

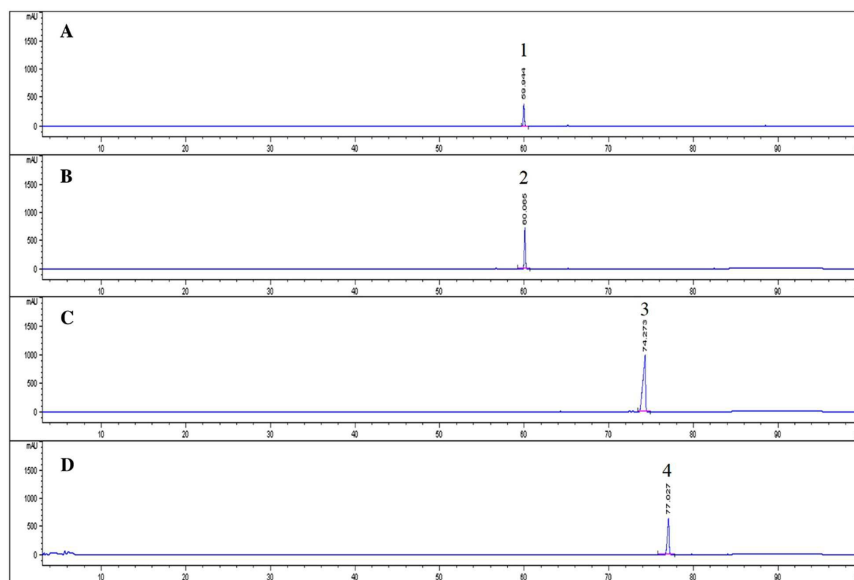
도면1



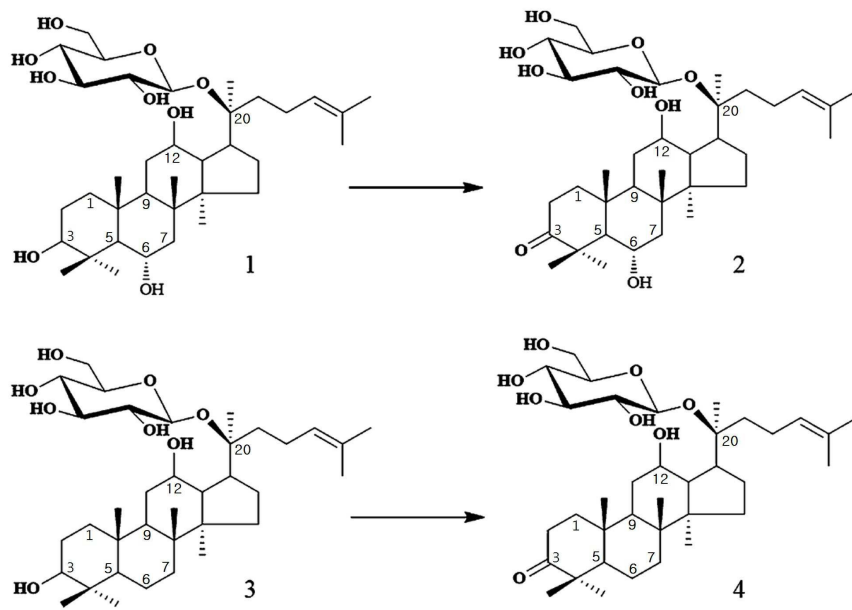
도면2



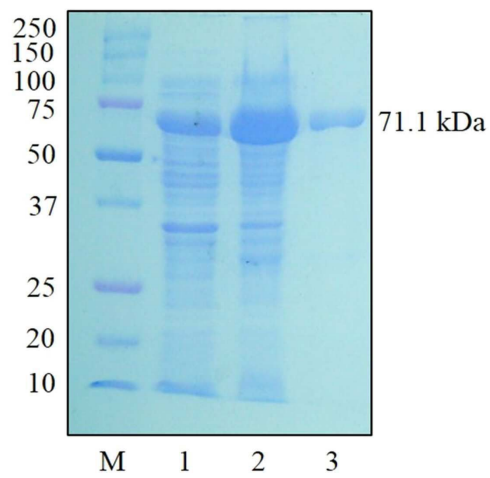
도면3



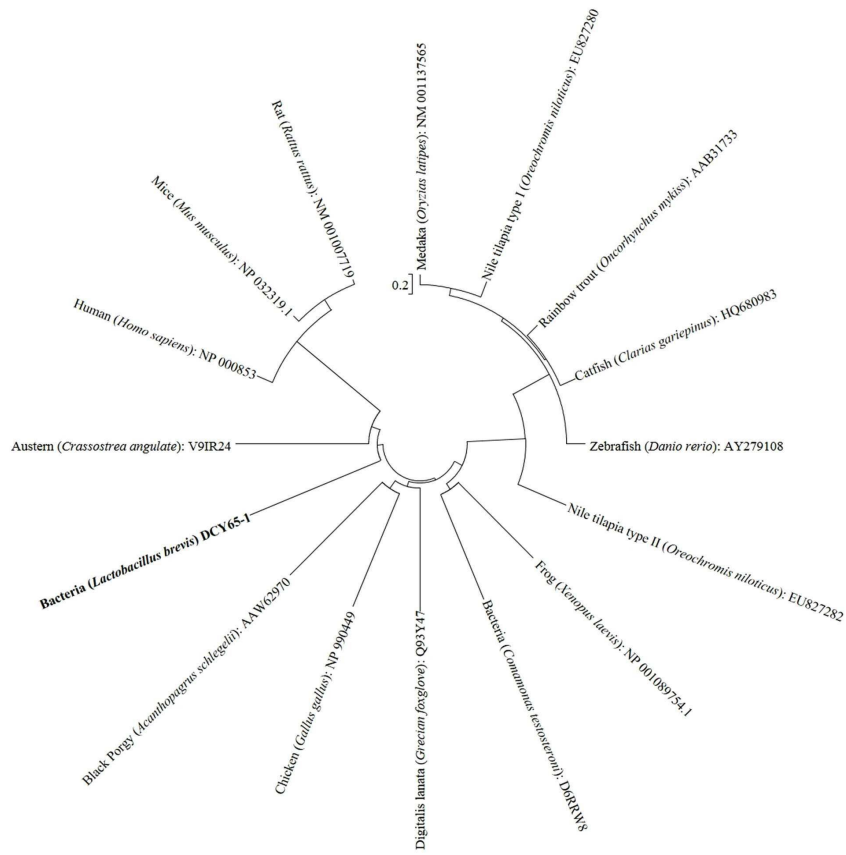
도면4



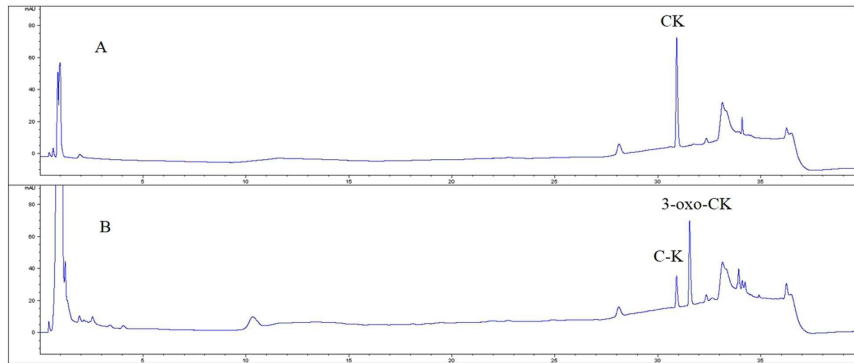
도면5



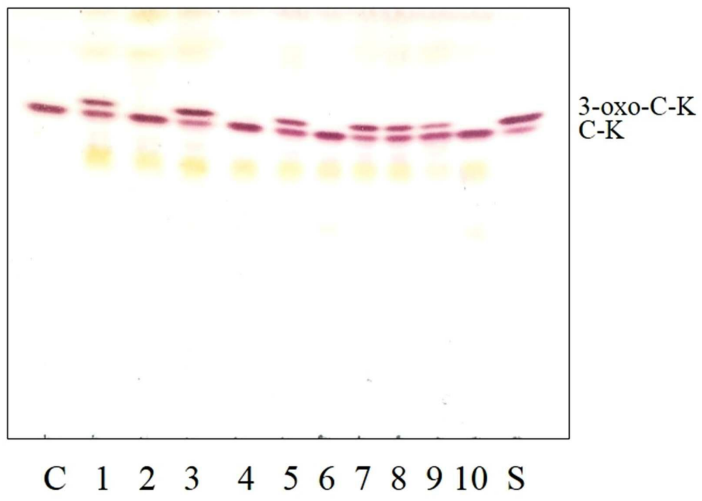
도면6



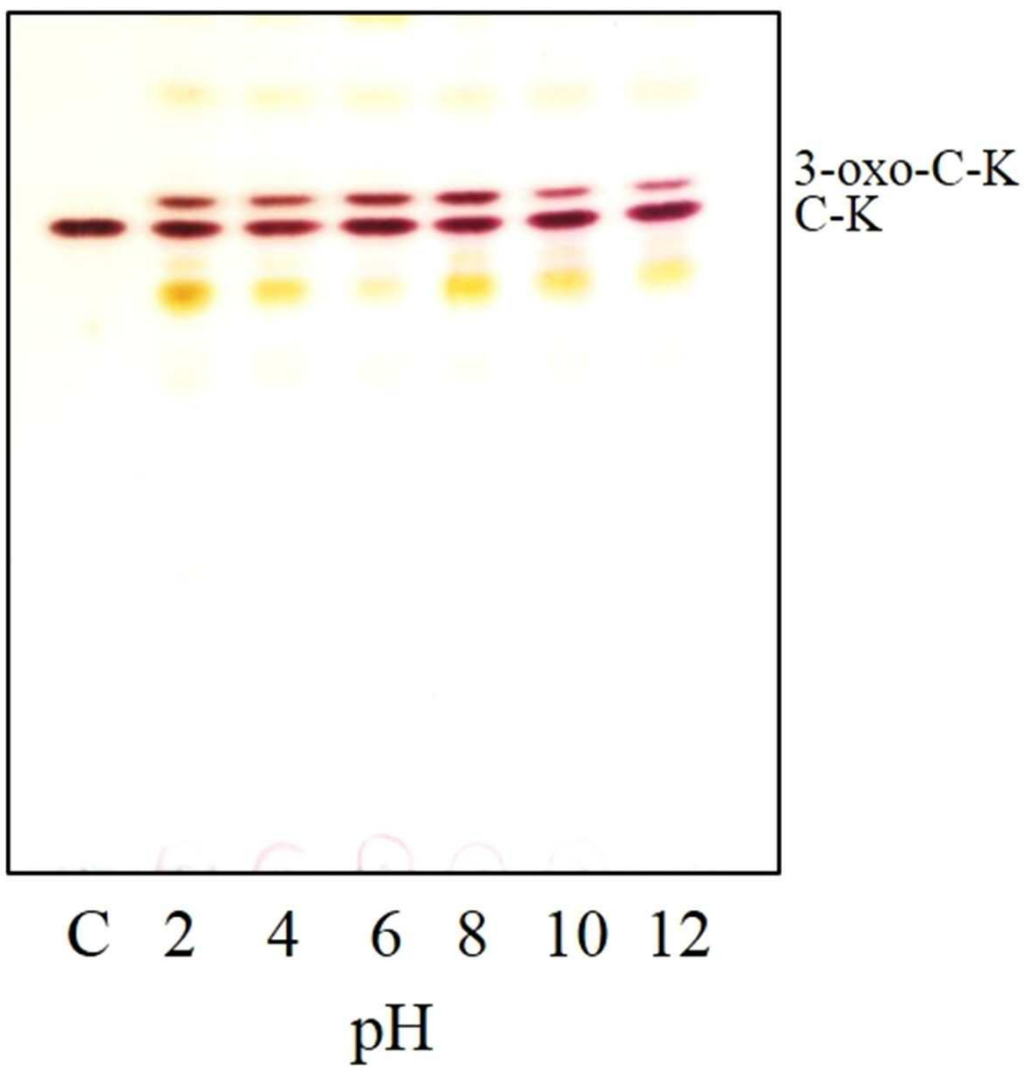
도면7



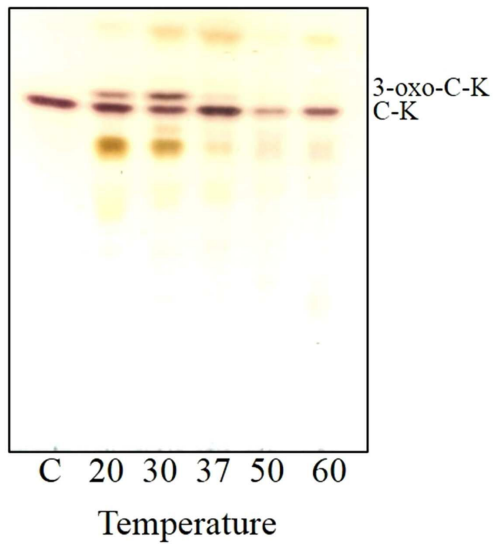
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for producing ketonized ginsenoside and use thereof
- <130> KPA141415-KR
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 257
- <212> PRT
- <213> Lactobacillus brevis DCY65-1
- <400> 1

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

1 5 10 15

Val Thr Gly Gly Thr Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe

20 25 30

Val Glu Glu Gly Ala Lys Val Met Ile Thr Gly Arg His Ser Asp Val

35 40 45

Gly Glu Lys Ala Ala Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe

50 55 60

Phe Gln His Asp Ser Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp

65 70 75 80

Ala Thr Glu Lys Ala Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala

85 90 95

Gly Ile Ala Val Asn Lys Ser Val Glu Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp

100 105 110

Arg Lys Leu Leu Ala Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg

115 120 125

Leu Gly Ile Gln Arg Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile

130 135 140

Asn Met Ser Ser Ile Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala

145 150 155 160

Tyr Asn Ala Ser Lys Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala

165 170 175

Leu Asp Cys Ala Leu Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His

180 185 190

Pro Gly Tyr Ile Lys Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu

195 200 205

Glu Ala Met Ser Gln Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu

210 215 220

Pro Asn Asp Ile Ala Tyr Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser

225 230 235 240

Lys Phe Ala Thr Gly Ser Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala

245 250 255

Gln

<210> 2

<211> 774

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis DCY65-1

<400> 2

atggaggtcg ttcaaatgtc aaatcgggta gatggaaaag tagcaatcgt tacaggtggt 60

acgttgggta tcggttttagc tatcgccacg aagttcgttg aagaaggggc taaggatcatg 120

attaccggcc ggcacagcga tgttggtgaa aaagcagcta agagtgtcgg cactcctgat 180

cagattcaat tttccaaca tgattcttcc gatgaagacg gctggacgaa attattcgac	240
gcaacggaaa aagcctttgg ccagtttct acattagtta ataacgctgg gatcgcggtt	300
aacaagagtg tcgaagaaac cagactgct gaatggcgta aattattagc cgtcaacctt	360
gatggtgtct tcttcggtac ccgattaggg attcaacgga tgaagaaca aggcttaggg	420
gcttccatca tcaacatgic ttcgatcgaa ggctttgtgg gtgatccgag tttaggggct	480
tacaatgcat ctaaaggggc cgtacggatt atgtccaagt cagctgcctt agattgtgcc	540
ctaaaggact acgatgttcg ggttaacacc gttcacctg gctacatcaa gacaccattg	600
gttgatgacc taccaggggc cgaagaagcg atgtcacaac ggactaagac gccaatgggc	660
catatcggtg aacctaacga tattgcctac atctgtgttt acttggttc taacgaatct	720
aaatttgcaa cgggttctga attttagtatt gatggtggtt ataccgctca ataa	774
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 27F primer	
<400> 3	
agagtttgat cctggctcag	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 518F primer	
<400> 4	
ccagcagccg cggtaatacg	20
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 800R primer	
<400> 5	
taccagggtg tctaattcc	18
<210> 6	

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 1492R primer
<400> 6

ggttaccttg ttacgactt

19