



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월17일
(11) 등록번호 10-1473918
(24) 등록일자 2014년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/90 (2006.01) C12N 15/61 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0064651
(22) 출원일자 2014년05월28일
심사청구일자 2014년05월28일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession No. WP_007494289: AP
endonuclease [Clostridiales] (2013.05.09.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대상 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 26 (신설동)
(72) 발명자
김태균
서울시 용산구 청파로43길 27
김민수
서울시 중랑구 용마산로81길 17(면목동, 경수하이
빌) B-501
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
고영갑, 권정기, 임상엽

전체 청구항 수 : 총 25 항

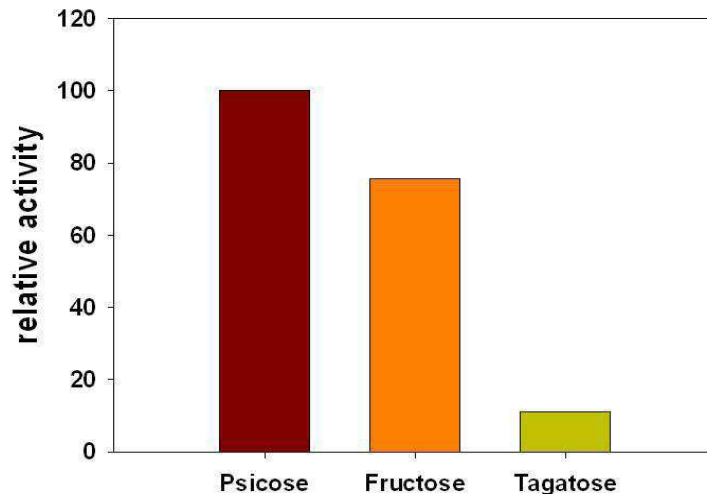
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 사이코스 에피머화 효소, 이의 제조방법 및 이를 이용한 사이코스의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래하고, 과당을 사이코스로 전환시킬 수 있는 신규 사이코스 에피머화 효소를 제공한다. 본 발명에 따른 신규한 사이코스 에피머화 효소는 과당의 3번째 탄소 위치를 에피머화하여 사이코스를 생산하는 활성을 보유한 효소로서, 상대적으로 높은 온도와 중성 이하의 pH에서 과당의 사이코스로의 전환에 대한 최대 활성을 가지고, 열 안정성이 우수하고, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 과당으로부터 사이코스의 대량 생산이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소는 사이코스를 산업적으로 제조하는데 유리하고, 이렇게 생산된 사이코스는 기능성 당 산업뿐만 아니라 이를 이용한 건강식품 소재, 의약품, 화장품용 소재 등 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

김태용

서울 광진구 아차산로39길 42(자양동, 대성빌라)
1동201호

송은범

서울시 서초구 서초대로74길 30 우성5차 501동
1402호

오덕근

경기도 과천시 별양로 85 주공아파트 406동 1002호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 포함하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 사이코스 에피머화 효소는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래하는 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 사이코스 에피머화 효소는 서열 번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 5

재조합 균주, 이의 배양물 또는 이의 파쇄물을 포함하는 조성물로서,

상기 재조합 균주는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 2의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 발현 벡터는 도 1의 개열 지도를 갖는 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 9

제 5항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 사이코스 생산용 조성물.

청구항 10

과당을 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소 또는 상기 사이코스 에피머화 효소를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 사이코스의 제조방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 사이코스 에피머화 효소는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래하는 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 사이코스 에피머화 효소는 서열 번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 조성물은 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 14

제 10항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 온도는 55~67℃이고, 반응 pH는 6.5~8인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 15

제 10항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과당의 농도는 35~75%(w/w)인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 16

제 10항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이코스 에피머화 효소는 담체에 고정화된 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 17

과당을 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하고,

상기 재조합 균주는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 2의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 발현 벡터는 도 1의 개열 지도를 갖는 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 21

제 17항에 있어서, 상기 조성물은 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 22

제 17항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 온도는 55~67℃이고, 반응 pH는 6.5~8인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 23

제 17항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과당의 농도는 35~75%(w/w)인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 24

제 17항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 균주는 담체에 고정화된 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

청구항 25

제 17항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 균주의 숙주 균주는 식품학적으로 안전한 균주인 것을 특징으로 하는 사이코스의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 과당을 D-사이코스로 전환시킬 수 있는 신규 사이코스 에피머화 효소, 재조합 균주로부터 이를 제조하는 방법 및 이를 이용하여 과당으로부터 D-사이코스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] D-사이코스(D-psicose)는 과당(fructose)의 3번 탄소의 에피머(epimer)로써 설탕과 비교했을 때 70% 감미도를 갖지만(Oshima 2006) 에너지는 0.3% 밖에 없으므로 다이어트 식품의 저칼로리 감미료로 적용 가능한 기능성 단당류이다(Matsuo et al. 2002). 또한 포도당의 흡수를 억제하여 혈당 억제 작용을 하는 기능이 있어 당뇨병 환자용 식품, 수신용 식품 등에 응용할 수 있으며, 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제하는 기능이

있어 북부지방 축적 억제할 수 있으므로 건강식품 등 여러 기능성 식품 등에 사용할 수 있다(Matsuo et al. 2001; Iida et al. 2008; Hayashi et al. 2010; Hossain et al. 2011).

[0003] 위와 같은 특징으로 사이코스는 설당을 대체 할 수 있는 좋은 소스이나 사이코스는 자연계에 극히 드물게 존재하는 단당류인 희소당에 속하기 때문에 식품산업에 적용하기 위해서는 사이코스를 효율적으로 생산하는 방법이 필요하다. 기존의 사이코스 생산 방법으로는 주로 화학적 과정을 거쳐 생산되었다. 빌릭(Bilik)등은 몰리브산 이온의 촉매작용을 이용하여 과당에서 사이코스로 전환하는 방법을 제안하였다. 맥도날드(McDonald)는 1,2:4,5-디- δ -이소프로필리덴-베타-D-프락토피라노스(1,2:4,5-di- δ -isopropylidene-beta-D-fructopyranose)로부터 3단계의 화학적 처리과정으로 사이코스를 생산하였다. 또한 도너 (Doner)는 에탄올과 트리메틸아민과 함께 과당을 가열하여 사이코스를 생산하였다. 그러나 이들 화학적 생산방법에는 비용이 많이 소모되는 반면 그 효율은 낮고 또한 부산물들이 많이 발생한다는 단점이 있다.

[0004] 생물학적 사이코스 생산방법으로는 미생물의 세포반응을 이용하여 갈락티톨 (galactitol), D-타가토스 또는 D-탈리톨 등으로부터 사이코스를 생산하는 방법이 제안되었다(Ken Izumori). 그러나 이 방법은 기질이 희소당에 속하기 때문에 산업적 생산에 응용하기 힘들다. 산업화에 가장 효율적인 방법은 D-케토오스 3-에피머화효소 군 중 과당에서 사이코스로 전환하는 효소를 찾는 방법이다. 기존에 발표된 내용은 크로스트리디움 셀룰로리티쿰 H(10)(Mu et al. 2011), 아그로박테리움 투메페이스언스(Kim et al. 2006), 슈도모나스 치코리(Itoh et al. 1994), 리조비움 스페로이데스 (Zhang et al. 2009) 유래의 D-타가토스 3-에피머화 효소를 대장균에 삽입하여 형질전환시킨 후 형질전환 된 대장균에서 발현된 D-타가토스 3-에피머화 효소를 사용하여 과당에서 사이코스를 생산하였다. 효소를 사용하여 과당에서 사이코스를 생산하는 기술과 관련하여, 대한민국 등록특허공보 제10-0744479호에는 아그로박테리움 투메페이스언스 유래의 사이코스 에피머화 효소에 의한 사이코스의 생산 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-0832339호에는 과당을 사이코스로 전환하는 활성을 지닌 시노리조비움 속 (Sinorhizobium) YB-58 KCTC 10983BP와 이를 이용하여 과당을 사이코스로 전환하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1106253호에는 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 아그로박테리움 투메페이스언스 C58의 사이코스 3-에피머화 효소가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균 및 이를 이용하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1339443호에는 공개특허공보 제10-2008-0071176호에는 리조븀속(genus Rhizobium)에 속하는 미생물로부터 유래하는 케토오스 3-에피머라아제(ketose 3-epimerase) 및 이를 이용하여 과당을 사이코스로 전환하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1318422호에는 크로스트리디움 신덴스(Clostridium scindens)로부터 유래된 D-사이코스 3-에피머화 효소 및 이를 이용하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 방법이 개시되어 있다.

[0005] 그러나 기존의 기능이 밝혀진 효소적 방법에 의하면 사이코스를 생산하는 방법은 중온 및 알칼리 조건의 pH 하에서 최적을 나타낸다. 알칼리 조건하에서의 반응은 비특이적 반응과 당의 갈변화를 유도하기 때문에 산업화에 적당하지 않다. 또한 기존의 효소들은 높은 온도에서 안정성이 떨어지거나 느린 반응속도적 측면으로 인해 산업화에 적용되는 사이코스 생산의 제조원가를 상승하는 요인을 가지고 있는 문제가 있었다. 그러므로 사이코스의 생산 수율, 온도, pH 및 반응 속도 모두가 산업화에 적합한 신규한 D-사이코스 3-에피머화 효소 개발이 필요하다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0021974호에는 유전자 수준에서 돌연변이를 유도하여 높은 온도에서의 빠른 사이코스 전환속도와 안정성을 보이는 트레포네마 프리미티아 ZAS-1 유래의 D-사이코스 3-에피머화 효소가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1203856호에는 아그로박테리움 투메페이스언스(Agrobacterium tumefaciens) 유래의 야생형 사이코스 에피머화 효소의 변이를 통해 수득한 열 안정성이 향상된 사이코스 에피머화 효소 변이체가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래의 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명은 첫 번째 목적은 과당을 사이코스로 전환하는 활성을 가지고 있고, 상대적으로 높은 온도 또는 중성 이하의 pH에서 최대 활성을 가지며, 열 안정성이 우수한 신규 D-사이코스 3-에피머화 효소를 제공하는데에 있다.

[0007] 본 발명의 두 번째 목적은 신규 D-사이코스 3-에피머화 효소를 제조하는 방법 또는 신규 D-사이코스 3-에피머화 효소를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들을 제공하는데에 있다.

[0008] 본 발명의 세 번째 목적은 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법 또는 과당으로부터 사이코스를 제조하기 위

해 필요한 다양한 요소들을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 발명자들은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 클로닝한 특정 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 얻은 효소가 과당의 사이코스로의 전환에 대한 높은 활성을 나타내고, 열 안정성이 우수하고, 고온 및 중성 또는 약 산성에 해당하는 pH 범위에서 최적 활성을 보인다는 점을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 상기 첫 번째 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 제공한다.
- [0011] 상기 두 번째 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 프라이머 쌍을 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주를 배양하여 사이코스 에피머화 효소를 발현시키는 단계; 및 상기 사이코스 에피머화 효소가 발현된 재조합 균주의 파쇄물로부터 사이코스 에피머화 효소를 분리하는 단계를 포함하는 사이코스 에피머화 효소의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 상기 세 번째 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 포함하는 사이코스 생산용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함하는 사이코스 생산용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 과당을 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소 또는 상기 사이코스 에피머화 효소를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 사이코스의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 과당을 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 사이코스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 신규한 사이코스 에피머화 효소는 과당의 3번째 탄소 위치를 에피머화하여 사이코스를 생산하는 활성을 보유한 효소로서, 상대적으로 높은 온도와 중성 이하의 pH에서 과당의 사이코스로의 전환에 대한 최대 활성을 가지고, 열 안정성이 우수하고, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 과당으로부터 사이코스의 대량 생산이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소는 사이코스를 산업적으로 제조하는데에 유리하고, 이렇게 생산된 사이코스는 기능성 당 산업뿐만 아니라 이를 이용한 건강식품 소재, 의약품, 화장품용 소재 등 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 재조합 발현벡터인 pET-FDPE의 개략 지도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 2에서 His 태그 어피니티 크로마토그래피를 통해 정제된 D-사이코스 3-에피머화 효소에 대해 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 첨가된 금속 이온 종류에 따라 나타낸 그래프이다. 도

3에서 각 금속 이온을 처리한 경우의 효소 활성은 대조군에서의 효소 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다.

도 4는 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 첨가된 금속 이온 종류 및 처리 농도별로 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 반응 pH별로 나타낸 그래프이다. 도 5에서 효소 활성은 최대 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다.

도 6은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 반응 온도별로 나타낸 그래프이다. 도 6에서 효소 활성은 최대 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다.

도 7은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 기질별 활성을 나타낸 그래프이다. 도 7에서 효소 활성은 사이코스를 기질로 하는 반응의 효소 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

본 발명의 일 측면은 과당을 사이코스로 전환시킬 수 있는 신규 D-사이코스 3-에피머화 효소(이하, 사이코스 에피머화 효소라 한다)에 관한 것이다. 상기 사이코스 에피머화 효소는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 것으로서, 상대적으로 높은 온도와 중성 이하의 pH에서 과당의 사이코스로의 전환에 대한 최대 활성을 가지고, 열 안정성이 우수하고, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 과당으로부터 사이코스의 대량 생산이 가능하다. 상기 사이코스 에피머화 효소는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유전체 DNA에 존재하는 무수한 DNA 중 특정 DNA를 중합효소반응에 의해 증폭시키고, 증폭된 특정 DNA를 발현 벡터에 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제조한 후, 상기 재조합 발현 벡터로 숙주 균주를 형질전환시켜 재조합 균주를 제조한 후, 상기 재조합 균주를 배양하여 발현시키는 방법으로 얻어질 수 있다. 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소는 바람직하게는 분자량이 30 내지 34 kDa이고 최적 활성 온도가 55~67℃의 범위이고, 최적 활성 pH가 6.5~8의 범위이다. 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지나, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소의 균등 범위는 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소의 균등 범위는 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 유지되는 한, 서열번호 1의 아미노산 중 일부가 치환, 삽입 및/또는 결실된 것일 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 바람직하게는 단백질의 특성이 바뀌지 않는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid replacement)에 의해 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 상기 아미노산의 변형은 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소의 균등 범위는 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 과당의 사이코스로의 전환에 대한 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 사이코스 에피머화 효소의 균등 범위는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 하기 표 1은 보존적 아미노산 치환에 의해 단백질 내 아미노산을 대체할 수 있는 아미노산들을 보여준다.

표 1

펩티드 내 아미노산 잔기	보존적 치환기
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Gln	Asn
Cys	Ser
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln
Met	Leu, Ile

Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr, Gly
Thr	Ser, Val
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0018] 본 발명의 다른 측면은 신규 사이코스 에피머화 효소를 제조하는 방법 또는 신규 사이코스 에피머화 효소를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들에 관한 것이다. 상기 신규 사이코스 에피머화 효소를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들로는 폴리뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 재조합 벡터, 재조합 균주 등이 있다.

[0019] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 이고, 바람직하게는 서열 번호 2의 염기 서열로 이루어진다. 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA 또는 이들의 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 균등 범위는 서열번호 2의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 상기의 실질적인 동일성은 서열번호 2의 염기 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 서열이 서열번호 2의 염기 서열과 70% 이상, 90% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미한다. 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자는 당해 분야에 공지된 유전자 재조합 기술 등을 이용하여 상기 폴리뉴클레오티드의 염기서열 중 하나 또는 그 이상의 염기를 치환, 부가 또는 결실시킴으로써 상기 실질적 상동성을 갖는 범위에서 동일한 활성을 갖는 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제조할 수 있음을 용이하게 이해할 수 있을 것이다. 이러한 상동성의 비교는 시판되는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산하여 수행될 수 있다.

[0020] 또한, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 것으로서, 바람직하게는 서열번호 3의 염기 서열을 가진 순방향 프라이머와 서열번호 4의 염기 서열을 가진 역방향 프라이머로 구성된다.

[0021] 또한, 상기 재조합 벡터는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 재조합 벡터는 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 공지의 표준 방법을 사용하여 클로닝 벡터나 발현 벡터 내로 삽입한 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에서 용어 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있고, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)가 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 적절한 숙주 안에서 클로닝된 DNA의 전사와 번역을 위해 필요한 DNA 서열로 정의된다. 또한, 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코드하는 유전자 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는 조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는 데 충분한

프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함된다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오티드 상의 폴리뉴클레오티드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보솜 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보솜 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 제조합 벡터는 바람직하게는 발현 벡터이고, 상기 발현 벡터는 바람직하게는 도 1의 개열 지도를 갖는다.

[0022] 또한, 상기 제조합 균주는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환되거나 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터에 의해 형질전환된 것이다. 본 발명에서 용어, "제조합 균주"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 갖는 발현 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 세포를 의미한다. 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposemmiated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 상기 숙주 세포는 대장균일 수 있다. 상기 대장균으로 BL21, JM109, K-12, LE392, RR1, DH5 α 또는 W3110 등을 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이 외에도, 상기 숙주 세포로서 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스속 균주, 코리네박테리움 글루타미쿰과 같은 코리네 박테리아속 균주, 살모넬라 티피무리움 등의 살모넬라속 균주, 기타 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등으로 이루어진 군에서 선택된 균주를 사용하여도 무방하다.

[0023] 또한, 상기 사이코스 에피머화 효소의 제조방법은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환되거나 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터에 의해 형질전환된 제조합 균주를 배양하여 사이코스 에피머화 효소를 발현시키는 단계; 및 상기 사이코스 에피머화 효소가 발현된 제조합 균주의 파쇄물로부터 사이코스 에피머화 효소를 분리하는 단계를 포함한다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 유도 인자인 IPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)를 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 사이코스 에피머화 효소는 제조합 균주의 파쇄물로부터 회수될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어, 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔 여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한편, 본 발명에서 제조합 균주의 파쇄물로부터 사이코스 에피머화 효소를 분리하는 단계는 바람직하게는 펩티드 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 수행될 수 있다. 상기 펩티드 태그로는 HA 태그, FLAG 태그, His 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein), c-myc 태그, V5 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST) 또는 MBP(maltose binding protein) 등과 같이 공지된 다양한 태그를 사용할 수 있으며, 이중 His 태그인 것이 바람직하다. His-태깅된 단백질은 Ni-NTA(니켈-니트릴로트리아세트산) 수지의 칼럼 상에 특이적으로 트랩핑되며, EDTA 또는 이미다졸에 의해 용출될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 측면은 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법 또는 과당으로부터 사이코스를 제조하기 위

해 필요한 다양한 요소들에 관한 것이다. 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들로는 사이코스 생산용 조성물이 있다.

[0025] 상기 사이코스 생산용 조성물의 일 예는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 포함한다. 또한, 상기 사이코스 생산용 조성물의 다른 예는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함한다. 이때, 상기 사이코스 생산용 조성물은 바람직하게는 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있고, 더 바람직하게는 니켈 이온 또는 코발트 이온을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 신규 사이코스 에피머화 효소는 금속 이온에 의해 활성화가 조절되는 금속효소(metalloenzyme) 특성을 나타내며, 상기 효소에 의한 반응을 니켈 이온 또는 코발트 이온과 같은 특정 금속 이온의 존재 하에서 수행함으로써 사이코스의 생산 수율을 증가시킬 수 있다.

[0026] 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법의 일 예는 과당을 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함한다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법의 다른 예는 과당을 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환되거나 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 사이코스 에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함한다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법은 금속 이온을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 금속 이온의 종류는 전술한 바와 같다. 일 예로, 상기 금속 이온은 기질인 과당에 첨가되거나, 효소와 과당의 혼합물에 첨가될 수 있다. 또한, 다른 예로 상기 금속 이온은 효소가 고정화된 담체에 첨가되거나(과당 첨가 전), 상기 효소가 고정화된 담체와 과당의 혼합물에 첨가되거나(과당 첨가 후), 또는 과당 첨가시에 과당과 혼합물의 형태로 첨가될 수 있다. 재조합 균주를 사용하는 경우, 상기 금속 이온이 배양물에 첨가되거나 금속 이온이 첨가된 배양 배지에서 배양이 수행될 수도 있다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법에서 상기 사이코스 에피머화 효소 또는 상기 재조합 균주는 바람직하게는 담체에 고정화된다. 상기 담체는 고정된 효소의 활성이 장기간 유지될 수 있는 환경을 조성할 수 있는 것으로, 효소 고정화 용도로 사용할 수 있는 공지된 모든 담체에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 담체로 알긴산나트륨(sodium alginate)을 사용할 수 있다. 알긴산나트륨은 해조류의 세포벽에 풍부하게 존재하는 천연 콜로이드성 다당류로, 만누로닉산(β -D-mannuronic acid)과 글루로닉산(α -L-gluronic acid)이 조성되어 있고, 함량 면에서는 무작위로 베타-1,4 결합을 이루어 형성되어, 균주 또는 효소가 안정적으로 고정되어 우수한 사이코스 수율을 나타내는 데 유리할 수 있다. 일 예로, 사이코스의 수율을 보다 증진시키기 위하여 1.5 내지 4.0%(w/v) 농도의 알긴산나트륨 용액(예컨대, 알긴산나트륨 수용액), 바람직하게는 약 2.5%의 (w/v) 농도의 알긴산나트륨 용액을 재조합 균주의 고정화에 사용할 수 있다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법에서 반응 온도는 55~67℃, 바람직하게는 55~65℃, 효소의 안정성을 고려할 때 더 바람직하게는 55~60℃의 범위이고, 반응 pH는 6.5~8, 바람직하게는 6.5~7.5, 더 바람직하게는 6.5~7의 범위이다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법에서 과당의 농도는 특별히 제한되지 않으나, 생산성 내지 경제성을 고려할 때 전체 반응물을 기준으로 35~75%(w/w)인 것이 바람직하고, 40~700%(w/w)인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 과당으로부터 사이코스를 제조하는 방법에서 사용되는 효소의 양은 전체 반응물 기준으로 0.001~0.1 mg/ml, 바람직하게는 0.01~0.1 mg/ml, 더 바람직하게는 0.02~0.05 mg/ml일 수 있다. 또한, 재조합 균주를 이용하여 과당으로부터 사이코스를 제조하는 경우 상기 재조합 균주의 숙주 균주는 식품학적으로 안전한 균주인 것이 바람직하다. 상기 식품학적으로 안전한 균주는 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally accepted as safe)급 균주를 의미하며, 예를 들어 사카로마이세스속 균주(*Saccharomyces* sp.), 바실러스속 균주(*Bacillus* sp.), 코리네박테리움속 균주(*Corynebacterium* sp.) 등에서 선택될 수 있다. 상기 균주들은 사료, 의약품 및 식품 등의 분야에서 다양한 용도를 갖는 화학물질을 생산하는 산업용 미생물이다. 이러한 균주들은 유전자 조작 및 대량 배양에 용이하거나, 다양한 공정 조건에서 높은 안정성을 가지는 균주이다. 또한, 이러한 균주들은 다른 세균에 비하여 상대적으로 단단한 세포막 구조를 보유하고 있기 때문에 높은 당 농도 등에 의한 삼투압의 영향 하에서도 균체가 안정적인 상태로 존재하는 생물학적 특성을 보인다. 상기 GRAS(generally accepted as safe)급 균주의 구체적인 예로는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus*

subtilis), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 등이 있다.

[0027] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1 : D-사이코스 3-에피머화 효소를 생산하는 재조합 균주의 제조**

[0029] 한국 미생물자원센터에서 분양받은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) KCTC 5970으로부터 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출한 후 이를 주형으로 이용하고, D-사이코스 3-에피머화 효소를 코딩하는 유전자(서열번호 2의 폴리뉴클레오티드)를 클로닝하기 위한 프라이머 및 Ex-Taq(TAKARA) 중합효소를 이용하여 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 하기 표 2는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)의 유전체 DNA(genomic DNA)로부터 D-사이코스 3-에피머화 효소를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위해 사용된 프라이머를 나타낸 것이다. 하기 표 2에 나타난 프라이머는 Bioneer co.,KR에 의뢰하여 제작하였다.

표 2

서열 번호	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한 효소 인식부위
3	사이코스 에피머화 효소 클로닝용 forward primer	CGG CAT ATG AAC CCG ATT GGA ATG CAC TAC	Nde I
4	사이코스 에피머화 효소 클로닝용 reverse primer	CGG CTC GAG TTA CGC GGT CAG CTC CTT GAG G	Xho I

[0031] 이후, gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 PCR 산물로부터 원하는 목적 DNA만을 분리한 후 Easy T-벡터(promega)에 결합하고, 분리한 목적 DNA의 염기서열 분석을 Bioneer co.,KR에 위탁하여 측정하였다. 그 결과, PCR을 통해 증폭된 목적 DNA가 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드에 해당하는 것을 확인하였다. 이후, PCR 반응에 의해 증폭된 목적 DNA를 제한효소인 Nde I과 Xho I을 이용하여 발현벡터인 pET15b 벡터(Novagen)의 동일한 제한 효소 인식부위에 삽입하여 재조합 발현벡터인 pET-FDPE를 제작하였다. 도 1은 재조합 발현벡터인 pET-FDPE의 개략도이다. 이후, 컴피턴트 세포인 BL21(제조사 : RBC, Taipei, Taiwan) 대장균을 전기천공을 이용하여 재조합 발현벡터인 pET-FDPE로 형질전환시켜 재조합 균주를 제조하였다.

[0032] **실시예 2 : D-사이코스 3-에피머화 효소의 발현 및 정제**

[0033] 형질전환된 재조합 균주의 단일 콜로니를 15ml의 LB-ampicilline 배지(Difco)에 접종한 후 37℃ 및 200rpm의 조건에서 약 6시간 동안 전 배양(pre culture) 하였다. 이후 전 배양액을 500ml의 LB-ampicilline 배지에 접종하고 37℃ 및 200rpm의 조건에서 진탕배양하였다. 이후, 배양액의 흡광도(at 600nm)가 0.5일 때 IPTG를 0.1mM의 농도가 되도록 첨가하여 목적 효소의 과발현을 유도하였다. 이때 과발현 유도 시점부터 배양은 16℃ 및 150rpm의 조건으로 전환하여 약 16시간 동안 유지하였다. 이후, 재조합 균주의 배양액을 13000rpm에서 2분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하고 재조합 균주의 균체를 회수하였다.

[0034] 회수된 재조합 균주의 균체를 lysis buffer(50mM Tris_HCl 300mM NaCl pH8.0, 10 mM imidazol)에 현탁시킨 후 초음파로 처리하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 13000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 모은 후, 미리 lysis buffer로 평형시킨 Ni-NTA 칼럼(Bio-Rad, Profinia)에 적용시킨 다음 50mM Tris_HCl 300mM NaCl pH8.0에 20 mM imidazol과 200 mM imidazol이 함유된 완충용액을 순차적으로 흘려주었다. 마지막으로 50mM Tris_HCl 300mM NaCl pH8.0, 200 mM imidazol을 흘려주어 목적 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질은 후술하는 실험 결과로부터 D-사이코스 3-에피머화 효소인 것으로 확인되었다. 이후 용출된 단백질을 효소 활성 측정용 버퍼 용액(PIPES, pH 7.5)에 보관하여 다음 실험에 사용하였다. 또한, 용출된 단백질에 대해 SDS-PAGE를 실시하였고, 용출된 단백질의 크기가 32 kDa인 것을 확인하였다. 도 2는 본 발명의 실시예 2에서 His 태그 어피티 크로마토그래피를 통해 정제된 D-사이코스 3-에피머화 효소에 대해 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

[0035] 실시예 3 : D-사이코스 3-에피머화 효소의 특성 확인

[0036] (1) D-사이코스 3-에피머화 효소의 금속 이온 요구성 분석

[0037] 상기 실시예 2에서 얻은 D-사이코스 3-에피머화 효소에 대해 금속 이온이 영향을 미치는지 알아보았다.

[0038] 정제된 효소 버퍼 용액(PIPES, pH 7.5)에 ZnSO_4 , CaCl_2 , MnSO_4 , NiSO_4 , CoCl_2 , MgSO_4 , CuSO_4 , CaCO_3 , FeSO_4 를 각각 1 mM이 되게 넣어준 후, 약 1시간 동안 금속 이온을 효소에 결합시켰다. 이후, 금속 이온이 결합된 효소를 기질인 100 mM 과당 수용액과 1:1의 중량비로 혼합하여 효소 농도가 0.025ml/mg이고 과당 농도가 50 mM인 혼합물을 만들고, 60℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 또한, 대조군으로 금속 이온을 처리하지 않은 효소(None)를 이용하여 동일한 실험을 진행하였다. 이후, 생산된 사이코스 양(mM)을 측정하고, 이를 효소 양과 반응시간으로 나누어 효소 활성을 계산하였다. 사이코스 양은 HPLC로 분석하였다. 상기 HPLC 분석은 87C(BIO-RAD) 컬럼을 사용하여 80℃에서, 이동상으로 물 100%(v/v)를 0.6 ml/min 유속으로 흘러 주면서 수행하였으며, Refractive Index Detector(Agilent 1260 TID)로 사이코스를 검출하여, 생산된 사이코스 양을 분석하였다. 도 3은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 첨가된 금속 이온 종류에 따라 나타낸 그래프이다. 도 3에서 각 금속 이온을 처리한 경우의 효소 활성은 대조군에서의 효소 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다. 도 3에서 보이는 바와 같이 상기 실시예 2에서 얻은 얻어진 D-사이코스 3-에피머화 효소는 망간 이온, 니켈 이온, 코발트 이온의 첨가에 의해 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 증가하는 것으로 나타났고, 특히 니켈 이온 및 코발트 이온에서 활성 증가의 효과가 컸다.

[0039] 이후, 정제된 D-사이코스 3-에피머화 효소 용액에 MnSO_4 , NiSO_4 , CoCl_2 를 다양한 농도별로 처리하고 동일한 실험을 진행하였다. 도 4는 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 첨가된 금속 이온 종류 및 처리 농도별로 나타낸 그래프이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 망간 이온, 니켈 이온, 코발트 이온은 다양한 농도 범위에서 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0040] (2) D-사이코스 3-에피머화 효소의 pH 또는 온도 변화에 따른 활성 분석

[0041] 상기 실시예 2에서 얻은 D-사이코스 3-에피머화 효소의 최적 pH를 알아보기 위해 MES 버퍼, PIPES 버퍼, EPPS 버퍼, CHES 버퍼를 이용하여 다양한 pH의 시험 용액을 만들었다. 구체적으로 정제된 효소의 버퍼 용액에 NiSO_4 를 1 mM의 농도로 처리한 후, 이를 100 mM 과당 수용액과 1:1의 중량비로 혼합하여 버퍼 농도가 50 mM이고, 효소 농도가 0.025ml/mg이고, 과당 농도가 50 mM인 다양한 pH의 시험 용액을 만들었다. 이후, 시험 용액을 60℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후, 생산된 사이코스 양(mM)을 HPLC로 분석하여 측정하고, 이를 효소 양과 반응시간으로 나누어 효소 활성을 계산하였다. 도 5는 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 반응 pH별로 나타낸 그래프이다. 도 5에서 효소 활성은 최대 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다. 도 5에서 보이는 바와 같이 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소는 6.5~8의 pH, 바람직하게는 6.5~7.5의 pH에서 높은 활성을 나타냈고, pH 7에서 최대 활성을 보였다.

[0042] 또한, 정제된 효소의 버퍼 용액(PIPES, pH 7.5)에 NiSO_4 를 1 mM의 농도로 처리한 후, 이를 100 mM 과당 수용액과 1:1의 중량비로 혼합하여 pH가 7.0이고 효소 농도가 0.025ml/mg이고, 과당 농도가 50 mM인 시험 용액을 만들었다. 이후, 시험 용액을 다양한 온도에서 10분 동안 반응시킨 후, 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후, 생산된 사이코스 양(mM)을 HPLC로 분석하여 측정하고, 이를 효소 양과 반응시간으로 나누어 효소 활성을 계산하였다. 도 6은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성을 반응 온도별로 나타낸 그래프이다. 도 6에서 효소 활성은 최대 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다. 도 6에서 보이는 바와 같이 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소는 55~67℃의 온도에서 높은 활성을 나타냈고, 65℃에서 최대 활성을 보였다.

[0043] (3) D-사이코스 3-에피머화 효소의 기질 특이성 분석

[0044] 상기 실시예 2에서 얻은 D-사이코스 3-에피머화 효소의 사이코스, 과당, 타가토스 등과 같은 다양한 기질에 대한 반응 활성을 분석하였다.

[0045] 정제된 효소의 버퍼 용액(PIPES, pH 7.5)에 NiSO_4 을 1 mM의 농도로 처리한 후, 이를 100 mM 기질 수용액과 1:1의 중량비로 혼합하여 pH가 7.0이고 효소 농도가 0.025mg/ml이고, 기질 농도가 50 mM인 시험 용액을 만들었다. 이후, 시험 용액을 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후, 기질의 대응하는 에피머 양(mM)을 HPLC로 분석하여 측정하고, 이를 효소 양과 반응시간으로 나누어 효소 활성을 계산하였다. 도 7은 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소의 기질별 활성을 나타낸 그래프이다. 도 7에서 효소 활성은 사이코스를 기질로 하는 반응의 효소 활성을 100으로 하여 상대적으로 나타내었다. 도 7에서 보이는 바와 같이 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소는 사이코스과 과당에 대해 높은 활성을 나타내었고, 특히 과당을 D-사이코스로 전환하는 활성이 종래의 D-사이코스 3-에피머화 효소에 비해 매우 높은 것으로 판단된다. 따라서, 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소를 사용하여 과당으로부터 D-사이코스를 높은 수율로 제조할 수 있다.

[0046] (4) D-사이코스 3-에피머화 효소의 열 안정성 분석

[0047] 상기 실시예 2에서 얻은 D-사이코스 3-에피머화 효소를 50 mM PIPES 버퍼 용액에 0.05 mg/ml의 농도가 되도록 준비한 후, 이를 55℃, 60℃, 65℃ 및 70℃로 온도로 각각 설정된 수욕(water bath)에 담가두고 보관하여 열 처리를 하였다. 보관 시간별로 정제된 효소의 버퍼 용액을 꺼내고, 여기에 NiSO_4 을 1 mM의 농도로 처리한 후, 효소의 버퍼 용액을 100 mM 기질 수용액과 1:1의 중량비로 혼합하여 pH가 7.0이고 효소 농도가 0.025mg/ml이고, 기질 농도가 50 mM인 시험 용액을 만들었다. 이후, 시험 용액을 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후, 생산된 사이코스 양(mM)을 HPLC로 분석하여 측정하고, 이를 효소 양과 반응시간으로 나누어 효소 활성을 계산하였다. 그 결과, 55℃에서 정제된 효소의 버퍼 용액을 250분 동안 열 처리하여도 효소 활성은 그대로 유지되었다. 또한, 60℃에서 정제된 효소의 버퍼 용액을 약 200분 동안 열 처리하는 경우 효소 활성은 열 처리하기 전에 비해 약 80% 수준으로 감소하였다. 일반적으로 대부분의 D-사이코스 3-에피머화 효소들은 50℃에서 반감기(열 처리 전과 비교하였을 때 효소의 활성이 50%가 되는 열 처리 시간)의 가 대략 한 시간 정도인 것을 감안할 때, 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소는 열 안정성이 매우 우수한 것으로 나타났다.

[0048] (5) 고농도 과당에서 D-사이코스 3-에피머화 효소의 활성 분석

[0049] 70 중량% 농도의 과당 700ml를 60℃에서 예열한 후, 여기에 상기 실시예 2에서 얻은 D-사이코스 3-에피머화 효소의 농도가 0.1mg/ml인 PIPES 버퍼 용액 280ml를 넣고, 60℃에서 반응시켰다. 반응 시간별로 반응 생성물을 10 ml씩 취하고, 25배로 희석하고 염산 수용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후, 생산된 사이코스 양(mM)을 HPLC로 분석하여 측정하고, 이를 기질로 사용한 과당의 양으로 나누어 전환율을 계산하였다. 하기 표 3에 반응 시간별 과당의 사이코스로의 전환율을 나타내었다. 하기 표 3에서 보이는 바와 같이 본 발명의 D-사이코스 3-에피머화 효소는 고농도 과당과 반응하였을 때 약 14시간 이내에 33%를 초과하는 최대 전환율에 도달하였다.

표 3

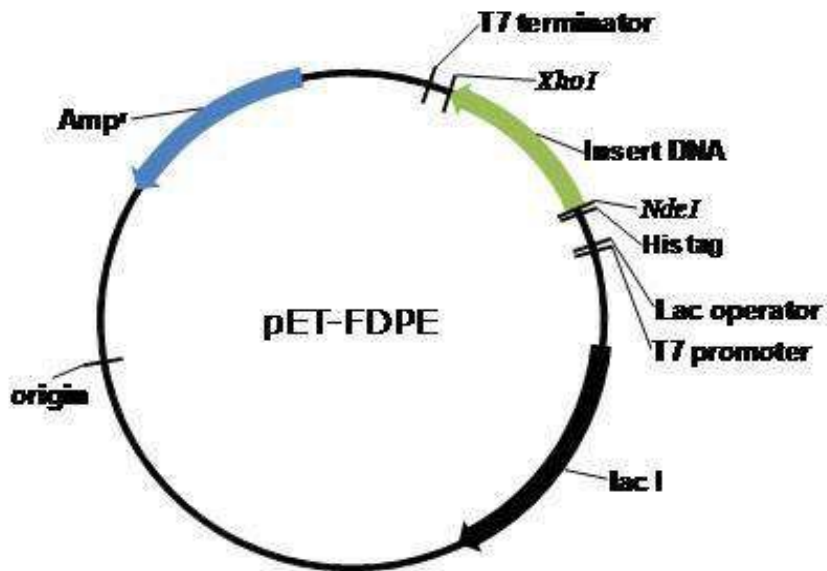
반응 경과 시간(hr)	과당의 사이코스로의 전환율(%)
1	9.04
2	15.20
3	19.52
4	22.36
5	24.66
6	26.75
7	27.94
14	33.61
18	33.62
28	33.67

[0051] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발

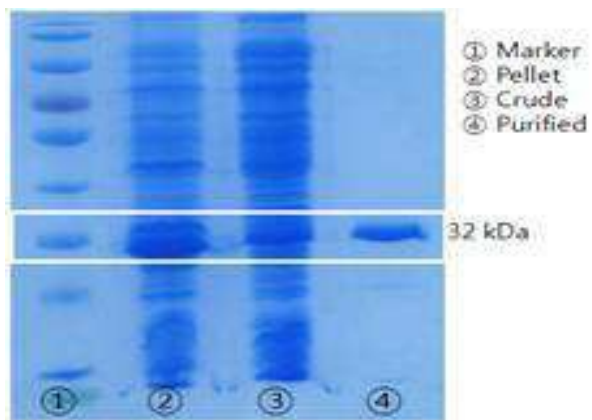
명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

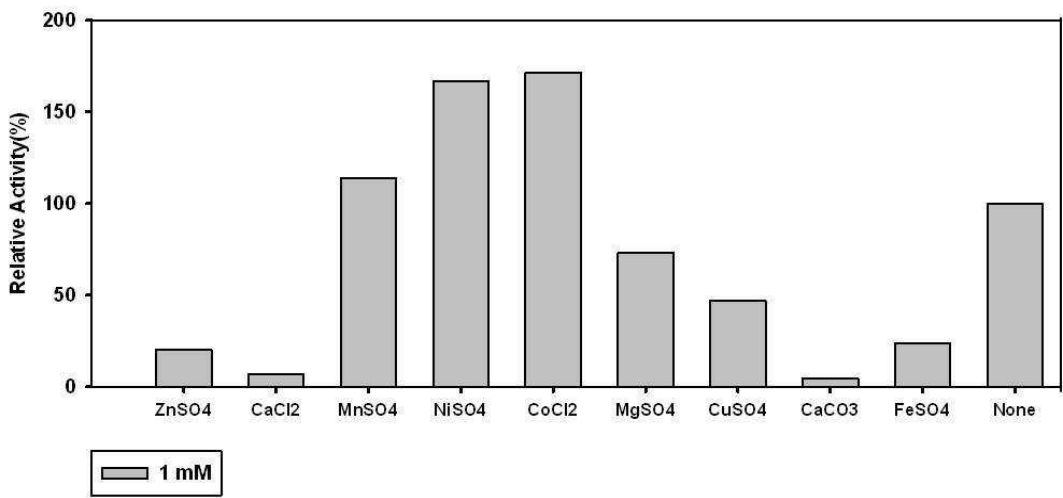
도면1



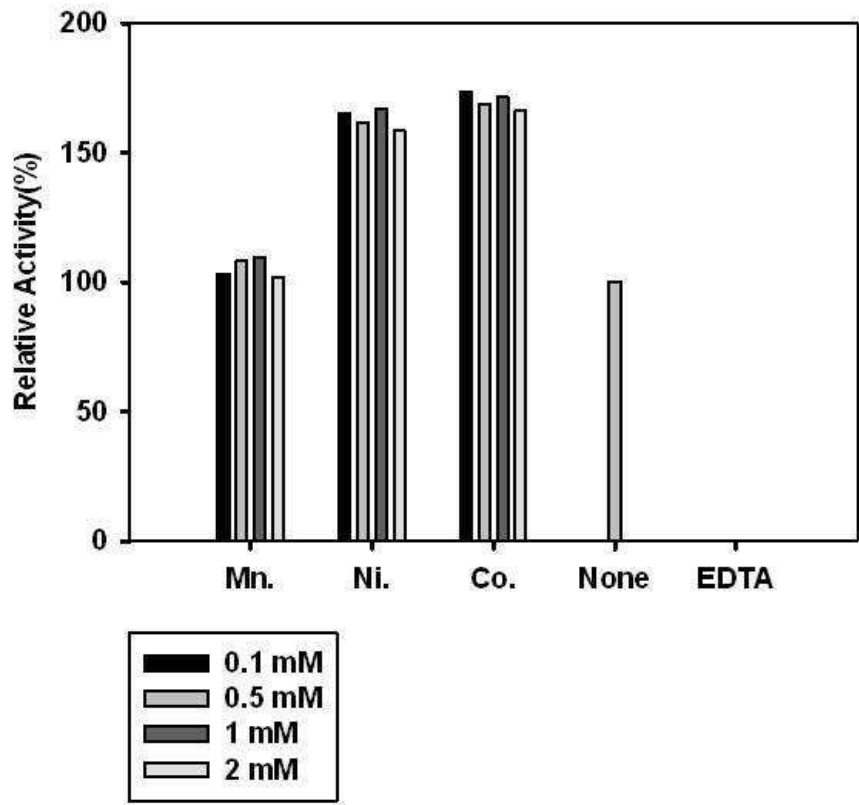
도면2



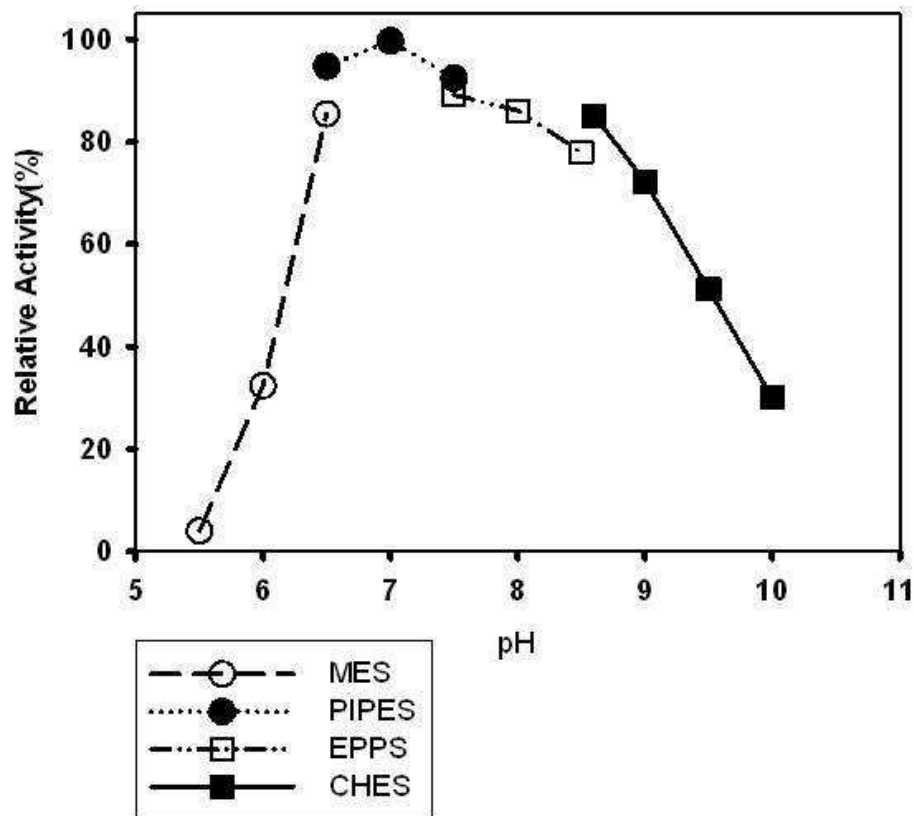
도면3



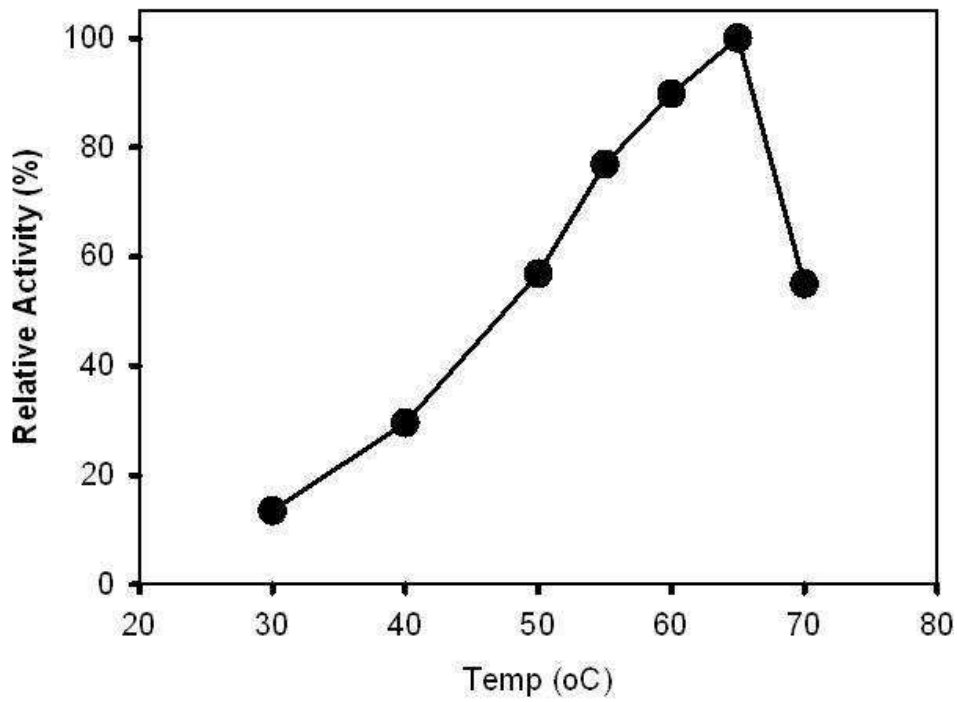
도면4



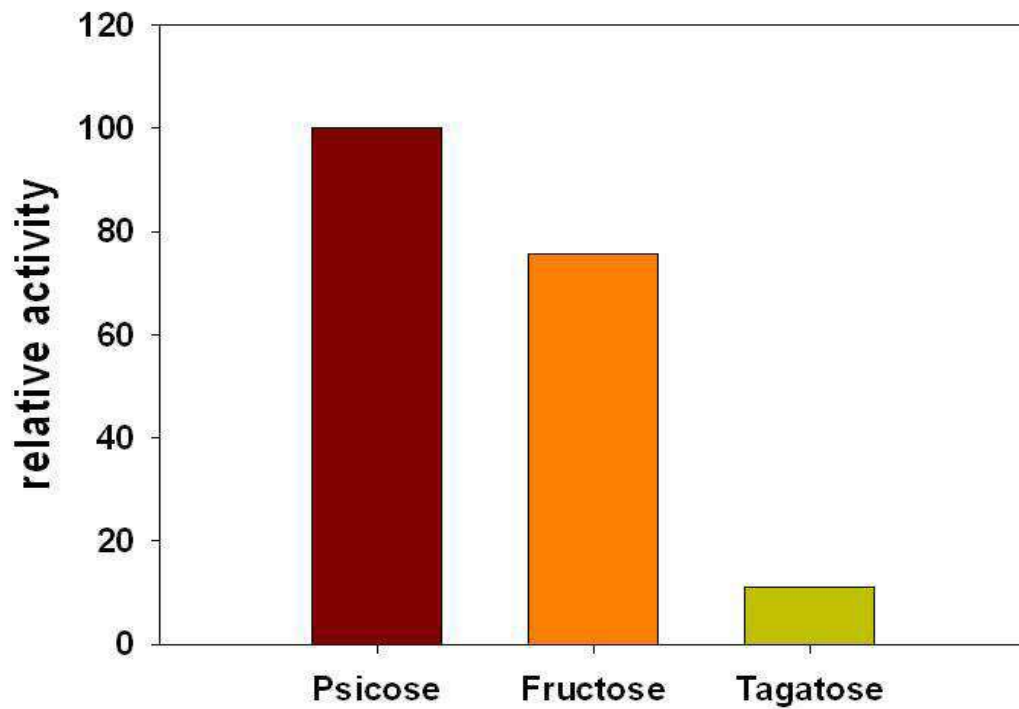
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> DAESANG CORPORATION

<120> D-psicose 3-epimerase, manufacturing method thereof and
manufacturing method of D-psicose using the same

<130> DP-14-464

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> D-psicose 3-epimerase derived from Flavonifractor plautii

<400> 1

Met Asn Pro Ile Gly Met His Tyr Gly Phe Trp Ser His Asn Trp Asp

1 5 10 15

Glu Ile Ala Tyr Ile Pro Leu Met Glu Lys Leu Ala Trp Leu Gly Phe

20 25 30

Asp Ile Cys Glu Val Ala Ser Ala Glu Trp Gly Tyr Tyr Asp Asp Ala
 35 40 45
 Arg Leu Arg Glu Leu Lys Ala Cys Ala Asp His Asn Gly Leu Gly Ile
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Ile Gly Leu Glu Ala Lys Tyr Asp Leu Ala Ser Asp Asp
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Arg Glu Asn Gly Ile Arg His Val Thr Arg Ile Leu Glu
 85 90 95

 Ser Met Pro Lys Val Gly Ala Ala Ile Leu Asn Gly Val Ser Tyr Ala
 100 105 110
 Gly Trp Gln Ala Leu Pro Asp His Gly Ile Thr Leu Asp Glu Lys Arg
 115 120 125
 Arg Lys Glu Glu Leu Ala Leu Glu Ser Met Ser Arg Leu Met Lys Val
 130 135 140
 Ala Glu Asp Cys Gly Val Leu Tyr Cys Cys Glu Val Val Asn Arg Phe
 145 150 155 160
 Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr Ala Lys Glu Gly Val Glu Phe Val Lys

 165 170 175
 Arg Leu Gly Ser Pro Asn Ala Arg Val Leu Leu Asp Thr Phe His Met
 180 185 190
 Asn Ile Glu Glu Asp Ser Met Val Asp Ala Ile Leu Glu Ala Gly Pro
 195 200 205
 Trp Leu Gly His Phe His Val Gly Glu Asn Asn Arg Arg Pro Ala Gly
 210 215 220
 Ser Thr Asn Arg Leu Pro Trp Lys Asp Met Ala Ala Ala Leu Lys Gln
 225 230 235 240

 Val Asn Tyr Gln Gly Ala Ile Val Met Glu Pro Phe Val Leu Met Gly
 245 250 255
 Gly Thr Ile Pro Tyr Asp Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270
 Ala Gly Glu Ala Gly Leu Asp Glu Met Ala Gly Arg Ala Cys Arg Phe
 275 280 285

Leu Lys Glu Leu Thr Ala

290

<210> 2

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding D-psicose 3-epimerase derived from

Flavonifractor plautii

<400> 2

atgaacccga ttggaatgca ctacggcttc tggagccaca actgggacga gattgcatac	60
ataccctga tggagaagct ggcctggctg ggctttgaca tctgcgaggt ggcctccgcc	120
gagtggggct attacgacga cgccaggctg cgggagctga aggcctgcgc cgatcacaac	180
ggcctgggca tcacctatc catcgccctg gaggccaaat acgacctggc cagcgacgat	240
ccggcgggtgc gggagaacgg catcgcccat gtcacccgca tcttgagag catgcccaag	300
gtgggggagg ccaccccaa cggcgtgtcc tacgccgggt ggcaggccct gcccgaccac	360
ggaatcacc tggacgagaa gcgccgaag gaggagcttg ccctggagtc catgtcccgg	420
ctcatgaagg tggcggagga ctgcggcgtg ctctactgct gcgaggtggt caaccgcttc	480
gagcagtacc tgctcaacac cgcaaagag ggcgtggagt ttgtcaagcg cctgggcagt	540
cccaacgcc ggggtgctgt ggataccttc cacatgaaca tcgaggagga cagcatggtg	600
gacgccattc tggaggcggg cccctggctg gggcatttcc acgtggggga gaacaaccgc	660
cgccccgcg gctccaccaa ccgctgccc tggaaggaca tggccgccgc cctcaagcag	720
gtgaactacc agggggccat tgtgatggag ccttcgtgc tcatgggggg taccattccc	780
tatgatatca aggtctggcg ggatctcagc ggcggggccg gggaggccgg gctggacgag	840
atggcgggcc gggcctgccg gttcctcaag gagctgaccg cgtaa	885

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for cloning D-psicose 3-epimerase

<400> 3

cggcatatga acccgattgg aatgcactac	30
----------------------------------	----

<210> 4

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for cloning D-psicose 3-epimerase

<400> 4
 cggctcgagt tacgcgggtca gtccttgag g

31