

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0002041 (43) 공개일자 2018년01월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C12P 19/02 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(52) CPC특허분류 C12N 9/0004 (2013.01) C12N 15/52 (2013.01)		(72) 발명자 이은열 서울특별시 강남구 삼성로 212 22동 908호 (대치동, 은마아파트) 이옥경 경기도 수원시 영통구 영통동 1029-26번지 101호 이은정 경기도 수원시 영통구 봉영로1482번길 7-1 405호 (영통동)
(21) 출원번호 10-2017-0079873 (22) 출원일자 2017년06월23일 심사청구일자 2017년06월23일		(74) 대리인 손민
(30) 우선권주장 1020160079004 2016년06월24일 대한민국(KR)		

전체 청구항 수 : 총 10 항

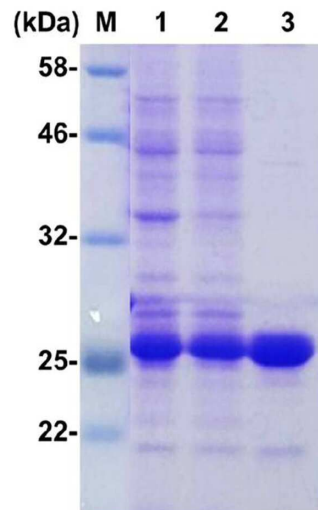
(54) 발명의 명칭 신규 DEH 환원효소 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 DEH 환원효소 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid) 환원효소 단백질을 포함하는 KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate) 제조용 조성물, KDG 및 젖산의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 DEH 환원효소 단백질인 VsRed 단백질은 DEH를 KDG로 전환시키는 것이 가능하므로, 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/02 (2013.01)

C12P 7/62 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20152144

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 해조류 바이오매스 통합활용기반 구축_당화플랫폼 공정기술

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.30 ~ 2016.07.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid) 환원효소 단백질을 포함하는, KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate) 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DEH 환원효소는 NADPH-의존적(NADPH-dependent) 환원효소인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 DEH 환원효소 단백질을 생산하는 미생물; 그의 배양물; 상기 미생물 또는 상기 배양물의 파쇄물; 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 단백질의 기질로서 DEH를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 NADPH를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 Na^+ , Li^+ , K^+ 또는 그의 조합을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)에 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는, KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate)의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 반응은 25 내지 40℃에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 9

- (a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)에 처리하여 반응시켜 KDG를 수득하는 단계;
- (b) 상기 KDG를 KDG 키나아제(kinase)와 반응시켜 KDPG(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate)를 수득하는 단계;
- (c) 상기 KDPG를 KDPG 알돌라아제(aldolase)와 반응시켜 피루브산(pyruvic acid)을 수득하는 단계; 및
- (d) 상기 피루브산을 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)와 반응시켜 젖산을 수득하는 단계를 포함하는, 젖산의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단계 (a) 내지 (d)는 동시 또는 순차적으로 수행되는 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 신규 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid) 환원효소 단백질 및 그의 용도에 관한 것으

[0001]

로, 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 DEH 환원효소 단백질을 포함하는 KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate) 제조용 조성물, KDG 및 젖산의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 현재, 식물, 미생물, 동물 등의 생물체(바이오매스) 등을 바이오에너지 또는 바이오화합물로 전환하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 바이오에너지는 화석연료보다 이산화탄소를 적게 배출하므로 신재생에너지로 각광받고 있으며, 태양광이나 조력, 풍력발전 등의 대체에너지로는 들어나는 에너지 수요를 감당하기 어려운 반면, 생물에서 추출하는 바이오연료는 성장이 빠르고 대량 생산이 가능하다는 장점이 있다. 이에 따라, 바이오연료를 생산하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 예를 들어, 오타당을 이용할 수 있는 재조합 미생물을 이용한 바이오에탄올의 제조방법(한국 공개특허공보 제10-2017-0025790호) 등이 개발되었다.
- [0003] 또한, 바이오매스로부터 생산된 바이오화합물은 화학공정으로 생산된 화합물과 달리, 부산물로서 독성물질이나 환경오염물질을 전혀 생성하지 않으며, 바이오매스로부터 부가가치가 높은 생화학 물질을 생산할 수 있기 때문에 이의 제조방법에 대한 관심이 높아지고 있다.
- [0004] 한편, 바이오에너지 또는 바이오화합물로서 개발될 수 있는 바이오매스 자원 중에서도, 해양유래 바이오매스는 친환경적인 바이오에너지 및 화학물질의 생산을 위한 유용한 자원으로 각광받고 있다. 해양유래 바이오매스 중 갈조류는 성장이 빠르고 기존의 식량자원과 비경쟁적이며, 단위 면적당 생산성이 매우 높아 새로운 바이오매스의 활용 가능성이 매우 큰 것으로 평가된다.
- [0005] 이와 관련하여, 갈조류 유래의 알긴산은 α -D-gulonate와 β -L-mannuronate가 결합된 복잡한 당중합체로, 독특한 물리적 성질 때문에 예로부터 광범위하게 사용되어 왔다. 예를 들어, 알긴산은 안정제, 점질제, 식품이나 음료, 종이나 인쇄로 사용되며, 제약산업 등에서 겔화제, 미립구, 비드, 마이크로캡슐, 정제 등으로 약물전달시스템 또는 조직공학에서 매트릭스 담체 등으로 사용되고 있다.
- [0006] 갈조류 내의 알긴산을 바이오에너지 또는 바이오화합물로서 사용하기 위해서는 우선 난발효성 당인 알긴산을 당당류로 분해하는 알긴산 분해 효소가 필요하다. 알긴산 분해효소에 의해 분해된 불포화 단당류는 자발적으로 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)로 전환되며, 이는 DEH 환원효소(reductase)에 의해 KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate)로 전환된 후 엔트너-듀도로프(Entner-Doudoroff) 경로를 통해 글리세르알데히드-3-인산(glyceraldehyde-3-phosphate)과 피루베이트(pyruvate)로 대사된다. 그러나, 일반적인 산업 균주들로는 DEH 환원효소(reductase)를 발견하여 활용하는 것이 매우 제한적이어서 DEH를 효과적으로 이용할 수 없다는 문제점이 있었다.
- [0007] 즉, 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산에 난발효성 알긴산을 사용할 수 있도록 대사과정을 조작하는데 중요한 효소가 바로 DEH 환원효소(reductase)인데, A1-R, A1-R', F1Red, HdRed 등의 다양한 박테리아 유래의 DEH 특이적 환원효소가 보고되고 있으나 그 수는 제한적이라는 문제점이 있었다. 또한 이러한 문제점을 해결하기 위해 화학적인 방법을 도입하는 경우 친환경적이지 못하다는 문제점이 있었다.
- [0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 알긴산을 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산의 원료로 활용할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*)로부터 유래된 DEH 환원효소 활성을 나타내는 VsRed 단백질이 NADPH 의존적으로 DEH를 KDG로 전환시키며, 이를 이용하는 경우 DEH를 젖산으로 전환할 수 있음을 확인함으로써, 상기 VsRed 단백질은 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산에서 알긴산 자원이 효율적으로 활용될 수 있도록 기여함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid) 환원효소 단백질을 포함하는, KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate) 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 DEH에 처리하는 단계를 포함하는, KDG의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 DEH에 처리하여 KDG를 수득하는 단계를 포함하는 젖산의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid) 환원효소 단백질을 포함하는, KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate) 제조용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명자들은 갈조류 유래의 알긴산을 이용하여 바이오화합물 또는 바이오에너지를 효과적으로 생산하는 방법을 개발하고자 하였고, 이에 DEH 환원효소를 이용하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*) 유래의 DEH 환원효소가 NADPH 의존적으로 DEH를 KDG로 전환시키며, 이를 이용하는 경우 DEH를 젖산으로 전환할 수 있음을 확인함으로써, 상기 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소를 이용하면 젖산 등의 바이오화합물 생산에서 알긴산 자원이 효율적으로 활용될 수 있음을 발견하였다.
- [0014] 본 발명의 용어, "DEH 환원효소(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid reductase)"는 DEH를 KDG로 전환시키는데 관여하는 효소로서, 알긴산을 이용한 바이오화합물 또는 바이오에너지의 생산에 중요하게 관여한다.
- [0015] 본 발명에서, 상기 DEH 환원효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질이 DEH를 기질로 사용할 수 있음은 공지되지 않았으며, 또한 DEH를 KDG로 전환시킬 수 있음은 아직까지 공지되지 않았으므로, 본 발명에서 제공하는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 DEH 환원효소 단백질로서의 용도는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이라 할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 이용되는 서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(aligned)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0017] 따라서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 아미노산 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0018] 또한, 상기 DEH 환원효소는 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*)에서 유래한 것일 수 있다. 본 명세서에서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소는 'VsRed 단백질' 또는 'VsRed'로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 DEH 환원효소는 NADPH-의존적(NADPH-dependent) 환원효소일 수 있으며, 구체적으로 NADPH-의존적으로 DEH를 KDG로 전환하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어, "NADPH"(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)는, 산화환원 반응에서 보조인자(co-factor)로 사용되는 화합물을 의미하며, "NADPH-의존적"은 효소가 산화환원 반응에서 보조인자로서 NADP⁺(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 및 그의 환원형인 NADPH를 사용하는 것을 의미한다. 공지된 다양한 미생물 유래의 DEH 환원효소 중에서도, A1-R 환원효소(Akira Inoue, Mar. Drugs 2015, 13, 493-508) 등이 NADPH-의존적 환원효소로서 알려져 있다.
- [0021] 본 발명의 용어, "DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)"는 알긴산으로부터 분해된 알긴산 단량체로서, 알긴산을 이용한 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산 대사경로의 시작 물질로서 주로 사용되는 화합물을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 용어, "KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate)"는 알긴산을 이용한 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산 대사경로의 중간 물질로서 사용되는 화합물을 의미하며, DEH 환원효소에 의해 촉매되는 대사경로에 의해 DEH가 KDG로 전환된다고 알려져 있다.
- [0023] 본 발명에서 제공하는 DEH 환원효소 단백질은 당해 분야에서 공지된 화학적 펩티드 합성방법으로 제조되거나, 상기 DEH 환원효소 단백질을 코딩하는 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭하거나 공지된 방법으로 합성한 후 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 KDG 제조용 조성물은 상기 DEH 환원효소 단백질을 생산하는 미생물; 상기 미생물의 배양물; 상

기 미생물 또는 상기 배양물의 파쇄물; 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

- [0025] 이때, 상기 미생물의 구체적인 예로는, 비브리오 스피렌디더스 또는 상기 단백질을 생산할 수 있는 형질전환체일 수 있다. 상기 형질전환체의 구체적인 예로는 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 균주, 살모넬라(*Salmonella*) 속 균주, 비브리오(*Vibrio*) 속 균주 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 피키아 파스토리스(*Pichia Pastoris*) 등의 효모 세포; CHO, COS, NS0, 293 등의 동물 세포; 또는 식물 세포 등이 될 수 있으나, 상기 DEH 환원효소 단백질을 생산할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 용어, "배양물"은 상기 형질전환체를 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시켜 수득한 물질을 의미하며, "파쇄물"은 공지된 모든 방법에 의해 상기 형질전환체, 그의 배양물 등을 파쇄한 결과물을 의미한다. 상기 형질전환체에는 본 발명에 따른 DEH 환원효소 단백질이 포함되어 있으므로, 상기 형질전환체의 배양물, 상기 형질전환체 또는 상기 배양물의 파쇄물에도 DEH 환원효소 단백질이 포함되어 있음은 자명하다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 배양물을 수득하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양물은 본 발명의 DEH 환원효소 단백질을 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 배양물에는 상기 DEH 환원효소 단백질을 생산하는 미생물의 생육에 필요한 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등이 포함될 수 있으며, 또한, 적절한 전구체들이 포함될 수 있다. 상기 물질들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 아울러, 상기 배양물로부터 상기 DEH 환원효소 단백질을 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 본 발명의 DEH 환원효소 단백질을 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 목적상, 상기 조성물은 상기 단백질의 기질로서 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 조성물은 NADPH를 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 아울러, 상기 조성물은 Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 이온을 포함하는 당업계에 공지된 화합물 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 LiCl , MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl , KCl 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는, 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소 단백질(VsRed 단백질)을 제조하였고, 이는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어져 있으며, 서열번호 2의 염기서열로 코딩되어 있음을 확인하였다(실시예 1). 또한, 상기 VsRed 단백질은 NADPH를 보조인자로 사용하는 경우에 효소 활성이 월등해지고(표 3, 도 3a 및 3b), Na^+ , Li^+ , K^+ 등의 이온을 첨가하여 반응을 수행하는 경우 활성이 증가함을 확인하였다(표 4). 아울러, 상기 VsRed 단백질을 발현하는 형질전환체의 용해물과 상기 용해물에서 VsRed 단백질을 정제한 효소의 활성을 확인한 결과, 용해물과 효소 모두에서 높은 총활성(Total activity) 및 비활성(Specific activity)을 나타냄을 확인하였다(표 3). 이는, 본 발명의 VsRed 단백질은 알긴산을 이용한 바이오화합물 또는 바이오에너지의 생산에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0034] 또 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)에 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는, KDG(2-keto-3-deoxy-gluconate)의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 이때, 상기 용어 "DEH" 및 "KDG"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 반응은 25 내지 40℃, 구체적으로 30 내지 40℃에서 수행될 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 조성물에는 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체가 포함되어 있으므로, 본 발명에 따른 KDG의 제조방법은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [0038] 이때, 상기 형질전환체는 알긴산을 포함하는 배지에서 배양될 수 있고, 구체적으로 알긴산 및 상기 알긴산을 DEH로 분해하는 분해효소를 포함하는 배지에서 배양될 수 있다. 또한, Na^+ , Li^+ , K^+ 또는 그의 조합을 포함하는 배지에서 배양될 수 있으며, NADPH를 포함하는 배지에서 배양될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는, 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소 단백질(VsRed 단백질)은 기질로서 DEH 만 특이적으로 사용함을 확인하였고, NADPH를 보조인자로 사용하는 경우 효소 활성이 월등해짐을 확인하였으며 (표 3, 도 3a 및 3b), Na^+ , Li^+ , K^+ 등의 이온을 첨가하여 반응을 수행하는 경우 활성이 증가함을 확인하였다(표 4). 또한, 상기 VsRed 단백질은 NADPH 의존적으로 DEH를 KDG로 전환시킴을 확인하였다(도 4b). 이는, 본 발명의 VsRed 단백질은 알긴산을 이용한 바이오화합물 또는 바이오에너지의 생산에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0040] 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 조성물을 DEH에 처리하여 KDG를 수득하는 단계를 포함하는 젯산의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 구체적으로, 상기 젯산의 제조방법은 (a) 본 발명의 조성물을 DEH(4-deoxy-L-erythro-hexoseulose uronic acid)에 처리하여 반응시켜 KDG를 수득하는 단계; (b) 상기 KDG를 KDG 키나아제(kinase)와 반응시켜 KDPG(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate)를 수득하는 단계; (c) 상기 KDPG를 KDPG 알돌라아제(aldolase)와 반응시켜 피루브산(pyruvic acid)을 수득하는 단계; 및 (d) 상기 피루브산을 젯산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)와 반응시켜 젯산을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0042] 이때, 상기 용어 "DEH" 또는 "KDG"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0043] 본 발명의 용어, "젯산"은 화학식 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ 를 갖는 유기화합물로서, 다양한 산업에서 이용되고 있다. 예로서, 식용으로서는 시럽, 청량음료의 산미제로 이용되며 주류의 발효 초기에 부패균의 번식을 방지하는 데도 사용된다. 공업용으로는 염료의 발염제, 피혁의 탈회제, 합성수지의 원료 등으로 사용된다.
- [0044] 본 발명의 용어, "KDG 키나아제(kinase)"는 KDG를 KDPG(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate)로 전환하는 효소이다.
- [0045] 본 발명의 용어, "KDPG(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate)"는 알긴산을 이용한 젯산 등의 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산용 대사경로의 중간 물질로서 사용되는 화합물이다.
- [0046] 본 발명의 용어, "KDPG 알돌라아제(aldolase)"는 KDPG를 피루브산으로 전환하는 효소이다.
- [0047] 본 발명의 용어, "피루브산(pyruvic acid)"은 화학식 CH_3COCOOH 를 갖는 유기화합물로서, 여러 물질 대사의 중간 물질로서 사용된다.
- [0048] 본 발명의 용어, "젯산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)"는 피루브산을 젯산으로 전환하는 효소이다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 단계 (a) 내지 (d)는 동시 또는 순차적으로 수행될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서는, 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소 단백질(VsRed 단백질)과 KDG 키나아제, KDPG 알돌라아제, 및 젯산 탈수소효소 등의 효소를 사용하여 DEH를 젯산으로 전환할 수 있음을 확인하였다(도 7). 이는, 본 발명의 VsRed 단백질은 알긴산을 이용한 젯산 등의 바이오화합물 또는 바이오에너지의 생산에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명에 따른 DEH 환원효소 단백질인 VsRed 단백질은 DEH를 KDG로 전환시키는 것이 가능하므로, 바이오화합물 또는 바이오에너지 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, DEH 환원효소인 VsRed 단백질의 SDS-PAGE 분석결과를 나타낸 이미지이다. 이때, M은 단백질 마커; 레인 1은 전체 세포(whole cell); 레인 2는 세포 용해물(Lysate); 및 레인 3은 정제한 효소(purified enzyme)를 의미한다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 pH에 따른 활성을 보여주는 그래프이다. 버퍼를

사용하여 pH를 조정하였으며, 20 mM 인산칼륨(potassium phosphate) 버퍼, 20 mM MOPS 버퍼, 20 mM HEPES 버퍼, 20 mM 글리신-NaOH(glycine-NaOH) 버퍼를 사용하였다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 온도에 따른 활성을 보여주는 그래프이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 열적안정성을 보여주는 그래프이다. 4 내지 50℃에서 20분 동안 열을 가함으로써 VsRed의 열적안정성을 분석하였다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 보조인자(co-factor) 특이성을 분석한 그래프이다. NADPH 또는 NADH 존재하에서 VsRed 단백질의 DEH 환원 활성을 확인하였다. NADH(적색 원의 control)와 NADPH(파란색 원의 control)만 존재하는 조건을 대조군으로 설정하였고, NADH 또는 NADPH; VsRed 효소; 및 1% DEH를 30℃에서 반응시킨 조건을 비교군으로서 설정하였다(적색 원의 NADH 또는 파란색 원의 NADPH).

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 보조인자 특이성을 분석한 TLC(thin layer chromatography) 결과이다. +NADH는 NADH의 존재 하에 효소를 반응시킨 경우, +NADPH는 NADPH의 존재 하에 효소를 반응시킨 경우를 의미한다. 반응은 30℃에서 진행하였고, TLC의 박막 위에 존재하는 각 반응물은 에탄올에 녹인 10%의 황산(sulfuric acid)을 분무한 후 탄화시켜 발색이 되도록 하였다.

도 4a는 DEH의 질량 스펙트로그램(Mass spectrogram, m/z 175)이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질과 DEH를 5분 동안 반응시킨 뒤 분석한 반응 산물의 질량 스펙트로그램이다. m/z 175 및 m/z 177에서 나타나는 피크는 각각 DEH 및 KDG를 의미한다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질과 DEH를 120분 동안 반응시킨 뒤 분석한 반응 산물의 질량 스펙트로그램이다. m/z 175 및 m/z 177에서 나타나는 피크는 각각 DEH 및 KDG를 의미한다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질과 다른 NADPH-의존성 환원효소간에 아미노산 서열을 비교한 BLAST 분석결과를 보여주는 이미지이다. 이때, VsRed은 본 발명에 따른 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*) 유래의 DEH 환원효소; VPSDR은 비브리오 파라해몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 유래의 환원효소(PDB code 3GUY); AHSDR는 아에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*) 유래의 환원효소(PDB code 3L6E); AR-1은 스프링고모나스 속 A1.(*Sphingomonas* sp. A1.) 유래의 카보닐 환원효소(carbonyl reductase, PDB_3AFN)를 의미한다. 상기 효소들간에 보존된 잔기인 Thr-Gly-X-X-Gly-X-Gly 모티프 및 4개의 측쇄 아미노산(Asn, Ser, Tyr, and Lys)은 각각 흰색의 원 및 검은색의 원으로 표시하였다. β -strand 및 α -helix의 위치는 각각 파란색 화살표 및 빨간색 줄로 표시하였다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질의 인비트로 환원효소 활성을 보여주는 그래프로써, VsRed 단백질과 반응하지 않은 NADPH의 농도를 보여준다. A는 기존에 알려진 SDR 효소(NCBI accession: EAP95875.1), B는 본 발명의 VsRed 단백질에 관한 것으로서, 검은색 원은 BSA 대조군 곡선, 흰색 원은 환원효소 반응을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, VsRed 단백질과의 반응에 의해 생산된 젖산(L-lactate)의 농도를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*) 유래의 DEH 환원효소 단백질의 이용**

[0055] 바이오화합물 또는 바이오에너지의 제조에 사용될 수 있는 DEH 환원효소를 개발하고자, 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*)를 이용하였다.

[0056] 먼저, 비브리오 스피렌디더스(*Vibrio splendidus*)를 배양하여 gDNA를 분리한 후, 하기 표 1에 기재한 프라이머(primer)를 이용하여 pET21b(+) 벡터 시스템(vector system)에 클로닝하였다.

표 1

[0057] VsRed 클로닝용 프라이머

프라이머	서열	서열번호
VsRed_EcoRI (Forward)	5'-GGGTCGGGATCCGAATTCATGATTTTAATCACCG-3'	서열번호 3
VsRed_XhoI (Reverse)	5'-GTGGTGGTGGTGCTCGAGACCGCGG-3'	서열번호 4

[0058] 상기 클로닝된 재조합백터를 대장균에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체를 배양하면서, 24시간 동안 0.1 mM IPTG를 처리하여 VsRed 단백질을 상기 형질전환체 내에서 과발현시켰다. 그 후 SDS-PAGE를 통하여 단백질의 발현 유무를 확인한 결과 도 1에서 볼 수 있는 것과 같이, 24 kDa에서 비브리오 스피렌디더스 유래의 DEH 환원효소 단백질(이하, 'VsRed 단백질'로 명명)이 수용성 형태로 발현됨을 확인하였다.

[0059] 아울러, 발현을 확인한 VsRed 단백질의 아미노산 서열(서열번호 1) 및 이를 코딩하는 염기서열(서열번호 2)는 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

구분	서열	서열번호
아미노산 서열	MILITGSSSGLGAALAKQYANTSNSRQLMITGRSSQRLAELAKSLPANT VSQACDLCDPQSVSELLDALPETPKLVHVSAGSGYFGKIEQQDPAAISYM LKNNIESSIFLIRELVQRYKDPVTIAVVMSTAAQGAKEESTYCAAKWA VKGFIESVRLELKGHPMKIVAVYPGMATEFWGTSGKAMDTSSFMATAQEA AQLMLQQALTSTEHGYVSDITINRG	서열번호 1
염기 서열	atgatttttaatcaccggatcaagcagcggtttaggcgcagctttagccaa gcaatatgcgaacacatcgaacagccgtcagcgcttaatgatcactggcc gcagctcccaacggtttagctgaattagcaaaaagcctgccagcgaatact gttagccaagcctgtgacttgtgtgatccacaatcagtgcgcaggttatt ggatgcgttgctgaaacaccaaagctggtggttcatagcgcaggcagtg ggtacttcggtaaaattgaacaacaagatcccgcgccatcagctacatg ctgaaaaacaacatcaggtcttccatcttttgattcgcgagcttgtgca gcgctacaaagatcaaccggtcaccattgctgttgtgatgtcgaccgcgg ctcaaggcgctaaagcagaagagcttacttactgcgcagccaaatgggca gtaaaaggctttatcgaatcggtcaggttgagctcaaaggtcaccgat gaaaatcgttgcggtttatcccggagggaatggcaaccgagttttggggaa ccagcggcaaaagcaatggatacttcaagctttatgaccgctcaagaagcc gctcaaatgctgcagcaggcgttaaccagcaccgagcatggatatgtgtc agatatcacgataaaccgcggt	서열번호 2

[0061] 실시예 2. VsRed 단백질의 보조인자(co-factor) 특이성 확인

[0062] 먼저, 실시예 1에서 제조한 재조합 VsRed 단백질의 보조인자 특이성을 살펴보기 위하여, NADH 또는 NADPH 존재 하에서 DEH 환원 활성을 측정하였다. 상기 VsRed 단백질의 용해물(lysate, crude enzyme)과 이를 정제한 효소 (purified enzyme)의 활성을 각각 확인하였으며, 그 결과는 표 3에 정리하였다.

표 3

[0063] 재조합 VsRed 단백질의 DEH 환원 활성

		Total protein (mg)	Total activity (Unit) [NADH/NADPH]	Specific activity (U/mg) [NADH/NADPH]	Purification (fold) [NADH/NADPH]	Yield (%) [NADH/NADPH]
VsRed	용해물 (Lysate)	155	134.85/6355	0.87/41	1.0/1.0	100/100
	정제한 효소 (Purified enzyme)	26	41.6/4576	1.6/176	1.8/4.29	30.8/72

[0064] 상기 표 3의 결과를 통해, VsRed 단백질은 NADH보다 NADPH가 존재하는 경우에 DEH 환원 활성이 더욱 우수함을

확인함으로써, 상기 VsRed는 NADPH 의존적인 환원효소(reductase)임을 알 수 있었다.

[0065] 한편, 상기 VsRed 단백질의 비활성(specific activity)은 176 U/mg임을 확인하였다. 이는, 기존의 NADPH 의존적인 환원효소 중에서 효소 활성이 가장 우수하다고 알려진 스펅고모나스속 A1(*Sphingomonas* sp. A1) 균주의 재조합 A1R 단백질의 비활성(56.9 U/mg)보다 3배 높은 것으로서, 본 발명에서 제공하는 VsRed 단백질은 종래의 환원효소보다도 환원활성이 우수함을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 3. VsRed 단백질의 기질 및 이온 특이성 확인**

[0067] 먼저, 실시예 1에서 제조한 재조합 VsRed 단백질의 기질 특이성 및 이온 특이성을 살펴보기 위하여, 각각의 기질 및 이온의 존재하에서 DEH 환원 활성을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 정리하였다.

표 4

	물질명	농도 (mM)	활성 (%)
기질	DEH	5	100
	α -keto-acid (pyruvate)	5	N.D
	Aldose (glucose, galactose, ribose, arabinose, xylose, 2-deoxy-D-glucose)	5	N.D
	Ketose (fructose)	5	N.D
	Sugar alcohol (mannitol, sorbitol)	5	N.D
	Carboxylic acid (citrate)	5	N.D
화합물 (이온)	NaCl	1	110
	LiCl	1	108
	KCl	1	108
	MgCl ₂	1	87
	CaCl ₂	1	98
	CoCl ₂	1	83
	MnCl ₂	1	94
	ZnCl ₂	1	18
	Ethylenediaminetetraacetic acid	1	96
	Dithiothreitol	1	82

[0069] 상기 표 4의 결과를 통해, VsRed 단백질은 DEH에만 특이적으로 작용하며, α -케토산(α -keto acid), 알도스(aldose), 당알콜(sugar alcohol), 카르복시산(carboxylic acid) 등의 기질에 대해서는 활성이 없음을 확인하였다.

[0070] 또한, 재조합 VsRed 효소 활성에 이온이 미치는 영향을 평가하기 위하여 다양한 이온을 첨가하여 환원반응을 수행한 결과, Na⁺, Li⁺, K⁺ 등을 첨가할 경우 활성이 증가하는 반면, Zn⁺을 첨가할 경우 효소 활성이 현저히 낮아짐을 확인하였다.

[0071] **실시예 4. VsRed 단백질의 pH 및 온도에 따른 단백질 안정성 평가**

[0072] 단백질은 pH와 온도에 따라 3차 구조 및 효소 활성에 영향을 받는다. 이에, 실시예 1에서 제조한 재조합 VsRed 단백질의 최적 pH 및 최적 온도를 평가하였다.

[0073] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 최적 pH는 7.0, 최적 온도는 35℃이며, 30℃ 이상의 온도에서 20분 이상 방치할 경우 효소의 활성이 현저히 감소됨을 확인하였다.

[0074] 이는, 기존에 알려진 NADPH 의존성 환원효소의 일종인 'FIRed 단백질'이 30℃에서 30분 이상 방치할 경우 원래 활성 대비 40%의 활성만을 나타내는 것과 비교할 때(Akira Inoue, Mar. Drugs 2015, 13, 493-508), 본 발명에 따른 VsRed은 열적 안정성이 우수함을 알 수 있었다.

[0075] **실시예 5. VsRed 단백질의 효소 활성 확인**

- [0076] 실시예 1에서 제조한 재조합 VsRed의 효소 활성을 UV 분광광도계와 TLC(thin layer chromatography)를 이용하여 분석하였다.
- [0077] 그 결과, 도 3a에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 따른 VsRed는 DEH의 환원에 NADPH를 보조인자로 이용하며, NADH의 사용은 현저히 낮음을 확인하였다. 상기의 결과는 TLC 결과를 보여주는 도 3b를 통해서도 확인할 수 있었으며, NADH를 보조인자로 제공하였을 경우 DEH로부터 전환된 KDG 양이 극히 미량인 반면, NADH를 보조인자로 제공하였을 경우 KDG로 전환된 양이 상대적으로 많음을 확인할 수 있었다.
- [0078] 또한, DEH 기질에 VsRed 단백질과 보조인자로 NADPH를 첨가한 후, 30℃에서 반응할 때, 시간에 따른 DEH 및 KDG 양의 변화를 MALDI-TOF를 통해 분석하였다. 참고로, MALDI-TOF 데이터 상에서 기질인 DEH의 mass spectrogram은 m/z 175이고, 반응산물인 KDG의 mass spectrogram은 m/z 177이다(도 4a).
- [0079] 그 결과, 도 4b에서 볼 수 있듯이, VsRed 단백질을 첨가하고 5분이 경과한 후부터 KDG가 생성됨을 확인하였다. 또한, 도 4c에서 볼 수 있듯이, 120분이 경과한 후에는 DEH의 양은 줄어든 반면, KDG의 양은 상대적으로 증가함을 확인하였다.
- [0080] 상기 결과를 통해, VsRed 단백질은 DEH를 KDG로 전환시키는 DEH 환원효소이며, NADPH-의존적으로 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0081] **실시예 6. VsRed 단백질의 아미노산 서열의 상동성 확인**
- [0082] 상기 실시예 5를 통해, 본 발명에 따른 재조합 VsRed 단백질은 DEH 환원효소임을 확인함에 따라, 기존에 알려진 다른 DEH 환원효소와의 서열 상동성을 확인하였다.
- [0083] 구체적으로, 다양한 NADPH-의존적 DEH 환원효소 중에서도 그 구조가 잘 규명된 효소를 비교대상으로 설정하였으며, SDR(Short-chain dehydrogenase/reductase) 패밀리에 속하는 효소를 사용하였다. NCBI의 BLAST 검색을 이용하여, 파라해몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 유래의 환원효소(VPSDR), 아에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*) 유래의 환원효소(AHSDR), 스텍고모나스 속 A1.(*Sphingomonas* sp. A1.) 유래의 환원효소(AR-1)의 아미노산 서열과 상동성을 비교하였다.
- [0084] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, VsRed 단백질의 아미노산 서열은 전술한 다른 NADPH-의존적 DEH 환원효소와 대부분 20-30%의 낮은 상동성을 가짐을 확인하였다. 다만, 환원효소에서 매우 보존된 서열 모티프, 즉 보조인자 결합 모티프(cofactor binding Rossmann fold motif)인 'Thr-Gly-X-X-X-Gly-X-Gly' 잔기 및 4개의 측매 아미노산 잔기(Asn, Tyr, Lys 및 Ser)는 다른 환원효소에서 존재하는 것과 마찬가지로 VsRed 단백질에서도 보존되어 있음을 확인하였다.
- [0085] 상기 결과를 통해, VsRed 단백질은 NADPH-의존적 환원효소에 특이적인 모티프를 보존하고 있는, NADPH-의존적 DEH 환원효소임을 알 수 있었다.
- [0086] **실시예 7. VsRed 단백질의 환원효소 활성 비교**
- [0087] 본 발명의 재조합 VsRed 단백질은 DEH 환원효소임을 확인함에 따라, 기존에 알려진 다른 SDR 효소(NCBI accession: EAP95875.1; 이하, 'EAP95875.1 단백질'로 명명)와 환원효소 활성을 비교하였다.
- [0088] 구체적으로, 하기 표 5에 기재된 바와 같은 조성으로 반응액을 구성하였고, 230 rpm 및 30℃에서 10 내지 50분 동안 반응하였다.

표 5

조성	최종 농도
1% DEH	0.08%
2. 82 mM NADH 또는 3 mM NADPH	0.4 mM
20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)	-
효소(단백질)	300 μ g/ml
최종 부피	200 μ l

표 6

EAP95875.1 단백질	BSA 대조군		흡광도	NADPH (mM)	반응한 NADPH (mM)
	흡광도	NADPH (mM)			
10 분	1.001	0.314	1.037	0.325	-0.012
20 분			0.979	0.306	0.024
30 분			0.945	0.295	0.018
40 분			0.915	0.285	0.028
50 분			0.916	0.286	0.028

표 7

VsRed 단백질	BSA 대조군		흡광도	NADPH (mM)	반응한 NADPH (mM)
	흡광도	NADPH (mM)			
10 분	1.001	0.313	0.802	0.249	0.065
20 분			0.737	0.227	0.103
30 분			0.607	0.185	0.129
40 분			0.472	0.141	0.173
50 분			0.392	0.114	0.199

그 결과, 상기 표 6 및 7, 및 도 6에서 볼 수 있듯이, EAP95875.1 단백질의 경우에는 반응이 진행되어도 상기 EAP95875.1 단백질과 반응하는 NADPH의 양은 변화가 없음을 확인하였다.

그러나, VsRed 단백질의 경우에는 반응이 진행될수록 상기 VsRed 단백질과 반응하는 NADPH의 양은 현저히 증가하여, 반응의 종료 시에는 반응액에 존재하는 NADPH의 농도는 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, SDR 패밀리에 속하는 효소 중에서는 DEH 환원효소 활성을 나타내지 않는 효소도 있음을 확인하였으며, 이와는 달리 본 발명의 제조합 VsRed 단백질은 우수한 DEH 환원효소 활성을 나타냄을 확인하였다.

실시예 8. VsReds 단백질을 이용한 젖산(L-lactate)의 제조방법

상기 실시예 1에서 제조한 제조합 VsRed 단백질을 바이오화합물의 제조에 이용할 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 VsRed 단백질을 이용하여 젖산(L-lactate)을 제조하고자 하였다.

구체적으로, 상기 VsReds 단백질 및 젖산 탈수소효소(LDH; lactate dehydrogenase)는 이를 포함하고 있는 대장균으로부터 분리하였다. 이후, 상기 VsReds 단백질 및 LDH를 2 mM DEH, 2 내지 4 mM NAD(P)H, 2 mM ATP 및 적절한 양의 효소를 포함하는 반응 용액과 230 rpm 및 30℃에서 40 분 동안 인큐베이션하였고, 생산물은 고속액체 크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다.

이때, 상기 반응에 사용한 효소는 다음과 같다: KDG 키나아제(kinase), KDPG(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) 알돌라아제(aldolase), LDH 및 VsReds(DEH 환원효소).

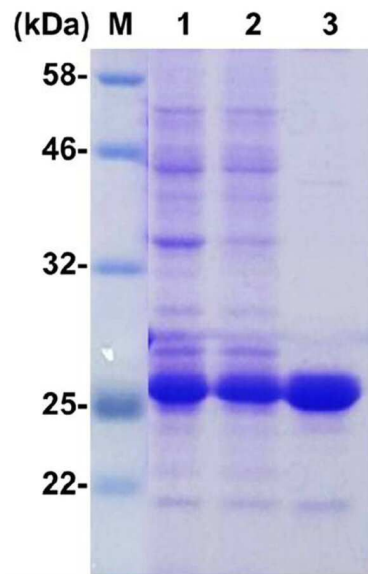
그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, DEH와 상기 VsReds 단백질이 반응하는 경우, 젖산의 농도는 반응이 진행될수록 점차 증가함을 확인하였다. 특히, 상기 VsReds 단백질의 DEH의 젖산 전환율은 81.9%로서, 기존에 알려진 다른 SDR 효소, 즉 상기 EAP95875.1 단백질(NCBI accession: EAP95875.1, 76.7%)은 DEH 환원효소 활성이 없어 젖산을 생산하지 못함을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 본 발명의 VsRed 단백질은 알긴산에서 유래한 DEH를 젖산으로 전환할 수 있으므로, 조류 등의 바이오매스로부터 부가가치가 높은 바이오화합물의 생산에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

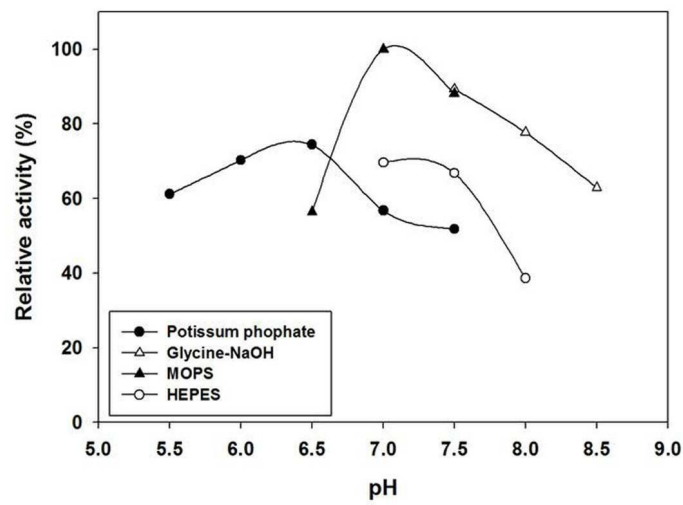
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

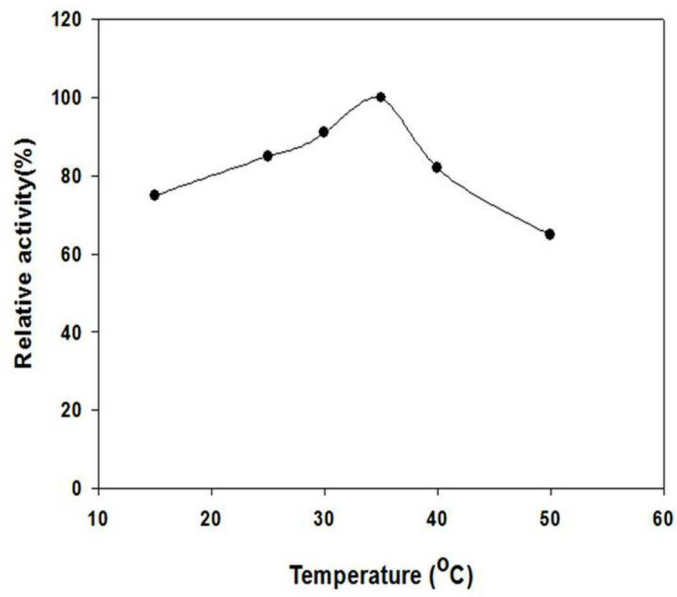
도면1



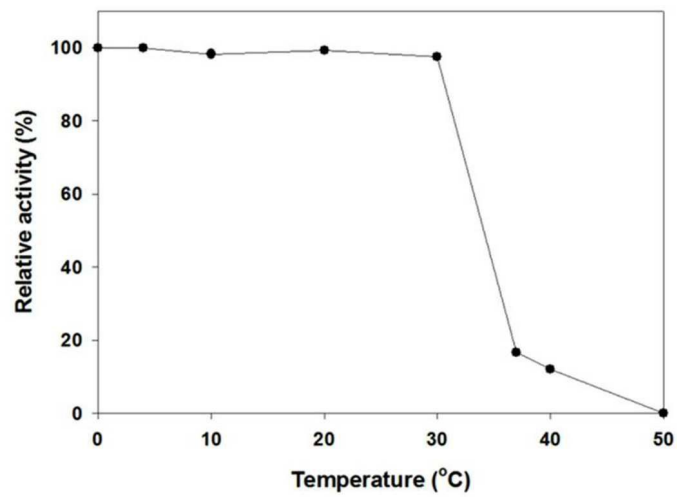
도면2a



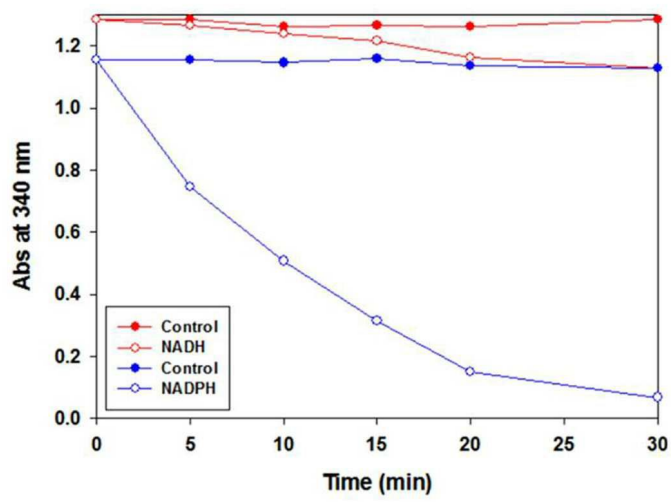
도면2b



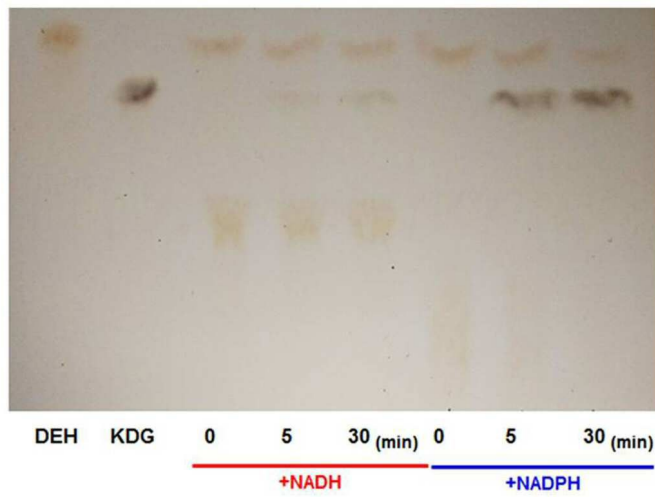
도면2c



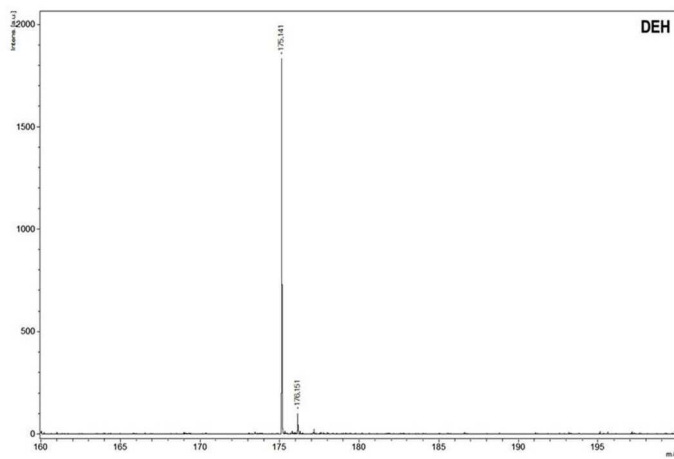
도면3a



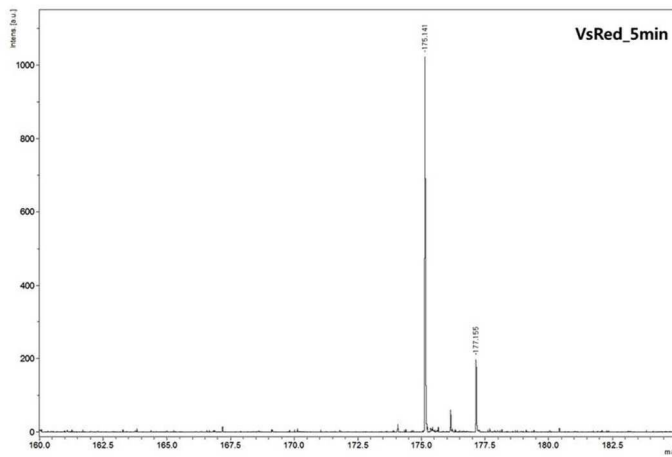
도면3b



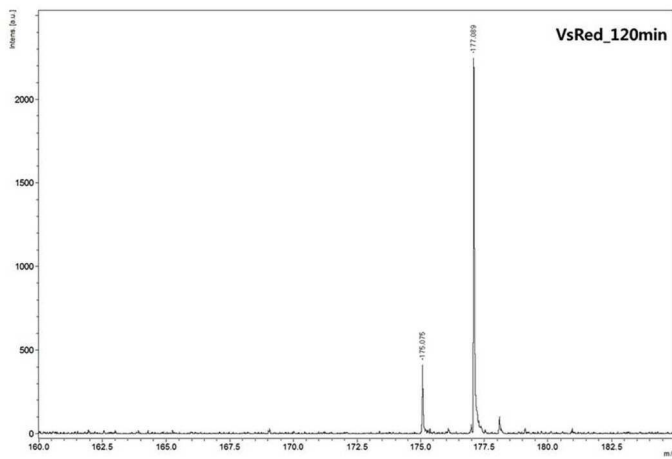
도면4a



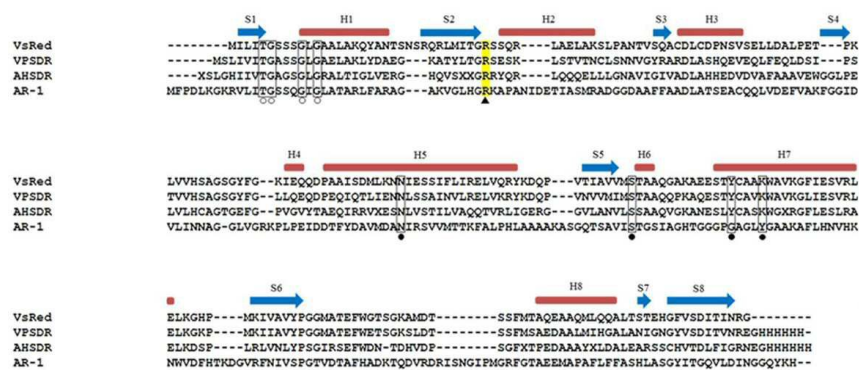
도면4b



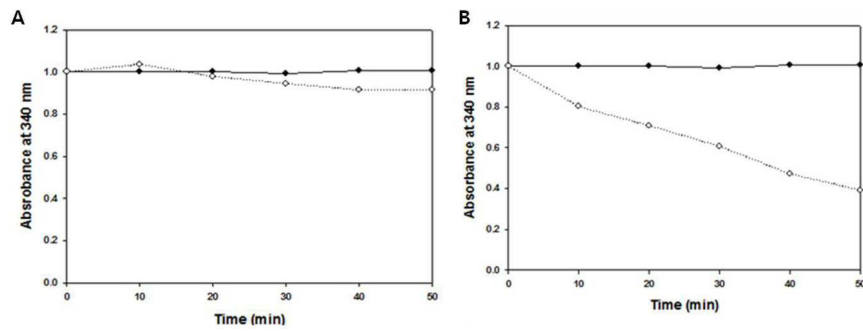
도면4c



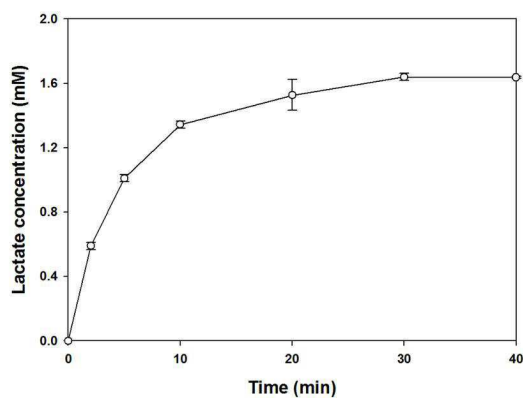
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel DEH reductase protein and uses thereof

<130> KPA160778-KR-P1

<150> KR 10-2016-0079004

<151> 2016-06-24

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 224

<212> PRT

<213> *Vibrio splendidus*

<400> 1

Met Ile Leu Ile Thr Gly Ser Ser Ser Gly Leu Gly Ala Ala Leu Ala

1 5 10 15

Lys Gln Tyr Ala Asn Thr Ser Asn Ser Arg Gln Arg Leu Met Ile Thr

20

25

30

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

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

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

<210> 2
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Vibrio splendidus

<400> 2
 atgattttaa tcaccggatc aagcagcggc ttaggcgcag ctttagccaa gcaatatgcg 60
 aacacatcga acagccgtca gcgcttaatg atcactggcc gcagctccca acgttttagct 120

gaattagcaa aaagcctgcc agcgaatact gttagccaag cctgtgactt gtgtgatcca 180
 caatcagtga gcgagttatt ggatgcgttg cctgaaacac caaagctggt ggttcatagc 240
 gcaggcagtg ggtacttcgg taaaattgaa caacaagatc cgcgcgccat cagctacatg 300
 ctgaaaaaca acatcgagtc ttccatcttt ttgattcgcg agcttgtgca gcgtacaaa 360
 gatcaaccgc tcaccattgc tgttgtgatg tcgaccgcgg ctcaaggcgc taaagcagaa 420

gagtctactt actgcgcagc caaatgggca gtaaaaggct ttatcgaatc ggtcaggttg 480
 gagtcaaag gtcacccgat gaaaatcgtt gcggtttatc ccggaggaat ggcaaccgag 540
 ttttggggaa ccagcggcaa agcaatggat acttcaagct ttatgaccgc tcaagaagcc 600
 gctcaaatgc tgcagcagc gttaaccagc accgagcatg gatatgtgtc agatatcacg 660
 ataaaccgcg gt 672

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VsRed_EcoRI Forward primer

<400>

> 3

gggtcgggat ccgaattcaa tgattttaat caccg 35

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VsRed_XhoI Reverse primer

<400> 4

gtggtggtgg tgctcgagac cgcg 25