

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 6월 27일 (27.06.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2019/124782 A2

(51) 국제특허분류:

C12N 9/00 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/014538

(22) 국제출원일: 2018년 11월 23일 (23.11.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0176269 2017년 12월 20일 (20.12.2017) KR
10-2018-0006982 2018년 1월 19일 (19.01.2018) KR
10-2018-0007006 2018년 1월 19일 (19.01.2018) KR
10-2018-0020623 2018년 2월 21일 (21.02.2018) KR

(71) 출원인: 건국대학교 산학협력단 (KONKUK
UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION COR-

PORATION) [KR/KR]; 05029 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이정걸 (LEE, Jung-Kul); 05070 서울시 광진구 능동로 50, A동 2401호, Seoul (KR). 장례완 (ZHANG, Liaoyuan); 04987 서울시 광진구 능동로34길 120, 917호, Seoul (KR). 이정임 (LI, Jing-Lin); 05021 서울시 광진구 능동로 16길 38-5, B101호, Seoul (KR).

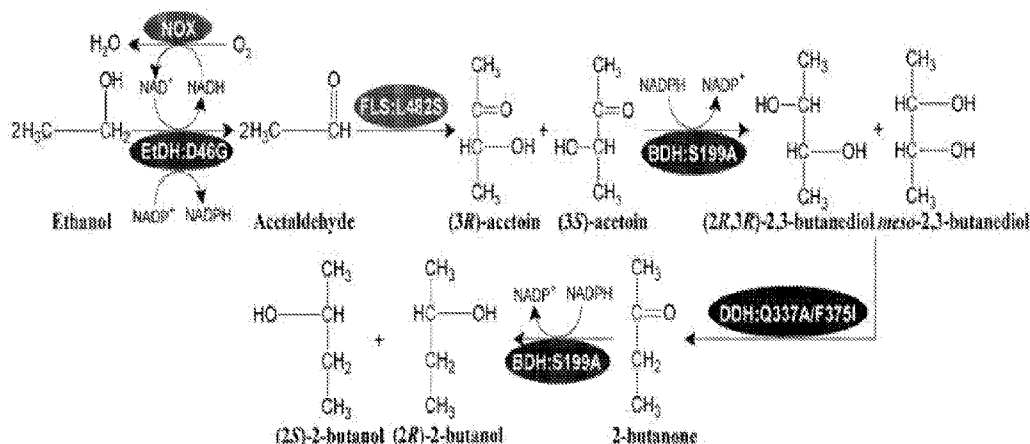
(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ACETOIN, BUTANEDIOL, OR BUTANOL FROM ETHANOL

(54) 발명의 명칭: 에탄올에서 아세토인, 부탄디올 또는 부탄올의 생산방법

[도1c]



(57) Abstract: In a method for producing acetoin, butanediol, or butanol from ethanol according to the present invention, a cell-free catalysis method was used by designing an artificial synthetic pathway so that proteins of NOX, E1DH, FLS, BDH, and DDH and mutant proteins thereof exhibit multi-step catalytic activity as enzymes. Compared to existing fermentation methods using microorganisms, the production method according to the present invention does not require cell growth and has a short synthetic pathway, a fast reaction rate, high yield and productivity, adjustment of targeted reaction conditions is convenient, and butanol can be effectively produced. Moreover, same can be reused numerous times by fixing the proteins to nanoparticles, and are also effective for producing acetoin, butanediol, or butanol, thus being economical. Therefore, the production method may be usefully adopted in the relevant industries requiring acetoin, butanediol, or butanol.

(57) 요약서: 본 발명의 에탄올에서 아세토인, 부탄디올 또는 부탄올 생산 방법은, 효소로서 NOX, E1DH, FLS, BDH 및 DDH의 단백질과 이의 변이 단백질을 다단계 촉매활성이 나타나도록 인공 합성 경로를 디자인하여 무-세포(cell-free) 촉매 방법을 이용하였다. 본 발명의 생산 방법은 종래 미생물 이용 발효법과 비교하여 세포 생장이 필요하지 않고, 짧은 합성 경로, 빠른 반응 속도, 높은 수율 및 생산성, 목적으로 하는 반응 조건의 조절이 용이하여, 효과적으로 부탄올을 생산할 수 있다. 또한, 상기 단백질을 나노입자에 고정하여 다수의 재사용이 가능하고 아세토인, 부탄디올 또는 부탄올 생성에도 효과적이므로 경제적이다. 따라서, 유효 성분으로서 아세토인, 부탄디올 또는 부탄올이 요구되는 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 에탄올에서 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올의 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 에탄올에서 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올의 생산방법 및 이의 다양한 적용에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이오에너지로 대표되는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올은, 화장품, 향수, 호르몬, 위생제, 산업용 코팅제, 페인트첨가제, 섬유, 플라스틱 모노머, 의료용품, 비타민, 향생제, 농약 등 활용범위가 매우 넓은 중간체 화합물로 그 효용성이 매우 크다. 미생물을 이용하여 산업적으로 유용한 수준으로 부탄올을 생산하기 위하여는 발효 과정을 수행하여야 하며, 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올의 선택성, 수율 및 생산성, 즉 단위시간 당 부탄올의 생산량 모두가 우수하여야 하고, 이와 같은 조건을 만족하는 미생물을 발굴하기 위해서는 과도한 반복 실험이 요구되어 왔다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 에탄올에서 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [4] 에탄올에서 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [5] 본 발명의 에탄올에서 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올 생산 방법은, 효소로서 NOX, EtDH, FLS, BDH 및 DDH의 단백질과 이의 변이 단백질을 다단계 촉매활성이 나타나도록 인공 합성 경로를 디자인하여 무-세포(cell-free) 촉매 방법을 이용하였다. 본 발명의 생산 방법은 종래 미생물 이용 발효법과 비교하여 세포 생장이 필요하지 않고, 짧은 합성 경로, 빠른 반응 속도, 높은 수율 및 생산성, 목적으로 하는 반응 조건의 조절이 용이하여, 효과적으로 부탄올을 생산할 수 있다. 또한, 상기 단백질을 나노입자에 고정하여 다수의 재사용이 가능하고 아세트인, 부탄디올 또는 부탄올 생성에도 효과적이므로 경제적이다.

도면의 간단한 설명

- [6] 도 1a는 본 발명의 최적 효소를 포함하는 무-세포 다중 촉매 시스템을 이용한

에탄올에서 아세트인의 생성 방법을, 도 1b는 에탄올에서 2,3-부탄디올의 생성 방법을, 도 1c는 에탄올에서 2-부탄올의 생성 방법을 모식화한 도이다.

- [7] 도 2는 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체를 이용한 아세트인, 2,3-부탄디올 및 2-부탄올 생성을 키랄-칼럼 GC(Chiral-column GC) 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [8] 본 발명은 서열번호 8로 표시되는 FLS(formolase) 아미노산에서 482번째 루신이 세린, 아르기닌 및 글루탐산으로 치환된 변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 변이를 포함하는 FLS 변이 아미노산을 제공한다.
- [9] 본 발명에서 용어, "FLS(formolase)"는 3개의 1-카본 포름알데히드(carbon formaldehyde) 분자를 하나의 3-카본 디하이드록시아세톤(dihydroxyacetone) 분자로 carboligation을 촉매한다. 본 발명의 목적 상, FLS 및 이의 변이체는 알코올 대사 과정에서 생성된 아세트알데히드를 기질로 하여 아세트인을 생성하고, 이를 기질로 2,3-부탄디올 생성 및 상기 2,3-부탄디올을 기질로 하는 부탄올의 생성을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [10] 본 발명에서 용어, "FLS 변이 아미노산"은 야생형 FLS 아미노산 중 하나 이상의 아미노산을 치환, 삽입, 제거 또는 변형한 것을 의미한다. 상기 FLS는 서열번호 7로 표시되는 염기서열로 코딩될 수 있고, 상기 FLS에서 482번째 루신이 세린으로 치환된 변이체는(FLS:L482S) 서열번호 10의 아미노산으로 표시되고, 482번째 루신이 아르기닌으로 치환된 변이체는(FLS:L482R) 서열번호 11의 아미노산으로 표시되며, 482번째 루신이 글루탐산으로 치환된 변이체는(FLS:L482E) 서열번호 12의 아미노산으로 표시된다. 상기 FLS 변이 아미노산은 396번째 트레오닌의 변이, 446번째 트레오닌의 변이, 473번째 메티오닌의 변이, 477번째 세린의 변이 및 499번째 루신의 변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있으나, 에탄올 대사 과정에서 생산된 아세트알데히드를 아세트인으로 전환시키기 위한 목적을 달성하기 위해서라면, 이에 제한되지 않는다. 상기 FLS는 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)로부터 유래되나, 이에 제한되지 않는다.
- [11] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 FLS 변이는 FLS의 구조를 분석한 결과, 6개의 잔여(Six residuals) 핫스팟(T396, T446, M473, S477, L482 및 L499)를 발굴하였다. 그 중, 기질인 아세트알데히드와 분자 상호 작용은 활성 부위 잔기는 W480임을 확인하고, FLS 보다 변이 FLS:L482S가 더 강하게 기질과 결합하고, 수소 결합함을 확인하였다.
- [12] 또한 본 발명은 상기 FLS 변이 아미노산을 코딩하는 유전자를 제공한다. 또한 본 발명은 NOX(NADH oxidase) 유전자, EtDH(ethanol dehydrogenase) 유전자, EtDH의 변이 유전자, FLS(formolase) 유전자, 상기 FLS 변이 아미노산을 코딩하는 유전자, BDH(2,3-butanediol dehydrogenase) 유전자, BDH의 변이 유전자, DDH(diols dehydratase) 유전자 및 DDH의 변이 유전자로 구성된 군에서

선택된 1종 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [13] 본 발명에서 용어, "NOX(NADH oxidase)"는 본 발명의 목적 상, 기질로서 산소를 이용하며, NADH를 산화시켜 NAD⁺를 재생산한다. 상기 재생산된 NAD⁺는 EtDH가 조효소로 이용할 수 있다.
- [14] 본 발명에서 용어, "EtDH(ethanol dehydrogenase)"는 본 발명의 목적 상, 에탄올을 기질로 이용하고, 조효소로서 NAD⁺ 및/또는 NADP⁺를 이용하여 에탄올을 탈수소시킬 수 있다. 이 후, 아세트알데히드 생산을 유도하여, 이를 기질로 이용하는 FLS가 아세트인을 생성하도록 할 수 있다.
- [15] 본 발명에서 용어, "BDH(2,3-butanediol dehydrogenase)"는 본 발명의 목적 상, 아세트인을 기질로 하여 NADPH를 조효소로 이용하여 2,3-부탄디올의 생성을 촉매시킨다. 또한, 상기 생성된 2,3-부탄디올을 기질로 하는 DDH에 의해 촉매된 부탄올을 다시 기질로 하여 BDH가 촉매 반응되면, 최종적으로 부탄올을 생성할 수 있다.
- [16] 본 발명에서 용어, "DDH(diol dehydratase)"는 본 발명의 목적 상, 2,3-부탄디올을 기질로 하여 조효소로서 비타민 B12를 이용 시, 부탄올의 생성을 촉매할 수 있다.
- [17] 상기 NOX 유전자는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)로부터 유래되고, 상기 EtDH 유전자 또는 EtDH 변이 유전자는 쿠프리아비두스 네카터(*Cupriavidus necator*)로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 BDH 유전자 또는 BDH 변이 유전자는 클로스트리디움 오토에타노지늄(*Clostridium autoethanogenum*)으로부터, 상기 DDH(diol dehydratase) 유전자 및 DDH의 변이 유전자는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)로부터 유래될 수 있으나, 본 발명의 부탄올 생성을 위한 효소 생산을 위해서라면, 이에 제한되지 않는다.
- [18] 상기 NOX 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로, EtDH 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로, 상기 EtDH의 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 EtDH의 46번째 아스파르트산이 글리신으로 치환되고(EtDH:D46G), 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [19] 상기 BDH 유전자는 상기 BDH의 변이체는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 BDH의 199번째 세린이 알라닌으로 치환되고(BDH:S199A), 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 아미노산으로 표시될 수 있다.
- [20] 상기 DDH 유전자는 서열번호 17로 표시되는 염기서열로, 상기 DDH의 변이체는 서열번호 18의 DDH 아미노산의 302번째 세린이 알라닌으로 치환된 변이체(DDH:S302A); 337번째 글루타민이 알라닌으로 치환된 변이체(DDH:Q337A); 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로 치환된 변이체(DDH:F375I);으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단일 또는 다중 변이체이나, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 상기 다중 변이체는 서열번호 18의 DDH 아미노산의 337번째 글루타민이

알라닌 및 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로 치환된 변이체(DDH:Q337A/F375I); 302번째 세린이 알라닌 및 37번째 글루타민이 알라닌으로 치환된 변이체(S302A/F375I); 또는 302번째 세린이 알라닌으로, 337번째 글루타민이 알라닌으로, 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로 치환된 변이체(S302A/Q337A/F375I)이나, 이에 제한되지 않는다.

- [22] 상기 DDH의 변이체는 DDH의 재활성 인자(reactivating factor)인 dhaR를 발현할 수 있다.
- [23] 본 발명의 일실시예에 있어서, 각 단백질 및 이의 변이체를 발현하도록 플라스미드를 제작하였다. 또한, EtDH 또는 EtDH:D46G 변이 발현 플라스미드 및 벡터맵을 제작하였다. 또한, FLS:L482S, BDH:S199A, DDH:Q337A/F375I 변이 발현 플라스미드 및 벡터맵을 제작하였다(표 1, 2).
- [24] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 DDH 및 이의 변이체의 구조를 분석한 결과, 기질인 2,3-부탄디올과 분자 상호 작용은 활성 부위 잔기는 E171임을 확인하고, DDH 보다 변이 DDH:Q337A/F375I가 더 강하게 기질과 결합하고, 수소 결합 및 water bridges함을 확인하였다. 또한, 본 발명의 DDH 및 이의 변이체는 입체 선택성이 나타나, (2R, 3R)-2,3-부탄디올 및 (2S, 3S)-2,3-부탄디올을 기질로 하여 부탄올을 생성하지 않고, meso-2,3- 부탄디올만을 기질로 하여 부탄올을 생성함을 확인하였다.
- [25] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 단백질을 효소로 이용 시, 열 안정성(Thermostability)을 확인한 결과, EtDH, EtDH:D46G, EtDH:D46G, EtDH:D46G, FLS, FLS:L482S, BDH:S199A, BDH:S199A, dhaR 포함 DDH:Q337A/F375 및 NOX 단백질은 높은 30 내지 45도에서도 열 안정성이 나타나며, 특히 30도에서 반응 활성이 우수함을 확인하였다.
- [26] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.
- [27] 본 발명의 형질전환체는 벡터를 프로모터가 작용할 수 있는 양태로 숙주세포 내에 도입시키는 것에 의해 구축될 수 있다.
- [28] 또한 본 발명은 상기 형질전환 미생물에서 생산된 단백질을 정제하고 반응시키는 단계;를 포함하는 부탄올 생산 방법을 제공한다.
- [29] 상기 부탄올은 2-부탄올, n-부탄올, 아이소부탄올(isobutanol) 및 tert-부탄올(tert-Butanol)으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상이고, 바람직하게는 2-부탄올이나, 이에 제한되지 않는다. 상기 생산 방법은 무-세포(cell-free) 상태에서 상기 형질전환 미생물에서 생산된 단백질을 다단계 촉매 작용을 수행하여 부탄올을 생산하고, 에탄올을 기질로 이용하나, 이에 제한되지 않는다.
- [30] 상기 생산 방법은 조효소인 NAD⁺, NADP⁺, 비타민 B₁₂ 및 TPP(thiamine pyrophosphate)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 조효소를 더 포함하나, 이의 처리 농도 또는 처리량 또한 제한되지 않는다. 상기 생산 방법은 금속 이온 Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ 및 Zn²⁺으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 금속

이온을 더 포함하며, 바람직하게는 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} 및 Ni^{2+} 이 더 효율적으로 촉매 반응을 유도할 수 있으나, 부탄올을 생산하기 위해서라면 이에 제한되지 않는다.

- [31] 상기 생산 방법은 pH 5.0 내지 9.0의 조건으로 부탄올을 생산하고, 바람직하게는 6.5 내지 8.5의 조건이나, 부탄올 생성 목적 달성을 위해서라면 이에 제한되지 않는다. 상기 생산 방법은 16 내지 45도에서 부탄올을 생산하나, 바람직하게는 25 내지 42도의 조건이나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 본 발명은 에탄올에서 C_4 화합물인 부탄올을 생성하기 위하여, 다단계 효소(cascade enzymes)를 이용한 인공 합성 경로를 디자인하였으며, 상기 다단계 효소로서, NOX, EtDH, FLS, BDH 및 DDH와 이의 각 변이체를 선발하였다. 구체적으로, NOX는 기질로서 산소를 이용하며, NADH를 산화시켜 NAD^+ 를 재생산한다. 상기 재생산된 NAD^+ 는 EtDH가 조효소로 이용한다. EtDH 및 이의 변이체는 에탄올을 기질로 이용하고, 조효소로서 NAD^+ 및/또는 $NADP^+$ 를 이용하여 에탄올을 탈수소화하여, 아세트알데히드 생산을 유도한다. 이 후, FLS 및 이의 변이체는 아세트알데히드를 기질로 하여 아세트인의 생성을 유도한다. BDH는 아세트인을 기질로 하여 NADPH를 조효소로 이용하여 2,3-부탄디올의 생성을 촉매시킨다. DDH는 본 발명의 목적 상, 2,3-부탄디올을 기질로 하여 조효소로서 비타민 B12를 이용 시, 부탄올의 생성을 촉매한다. 이 후, 상기 BDH는 촉매된 부탄올을 다시 기질로 하여 BDH가 촉매 반응되면, 최종적으로 부탄올을 생성한다.
- [33] 본 발명은 무세포 다중 효소 촉매(Cell-free multi-enzyme catalysis, CFME) 방법을 이용한 in vitro 상에서 간소화된 경로를 이용하여 에탄올에서 부탄올의 인공 합성 목적을 달성하였다. 상기 무-세포 다중 효소 촉매 방법을 이용 시, 종래의 세포를 이용한 대사 공학, 예컨대 박테리아, 재조합 미생물 등을 배양한 발효법의 낮은 목표 생성물 수율, 원치 않는 부산물 생성, 세포내 수송 제약 등의 문제점을 해결하여, 세포 생장이 필요하지 않고, 짧은 합성 경로, 빠른 반응 속도, 높은 수율 및 생산성, 목적으로 하는 반응 조건의 조절 등과 같은 장점이 존재한다.
- [34] 본 발명의 일실시예에 있어서, 실시예 7-6의 방법에 따라, 최적의 부탄올 생산 방법은, 본 발명에서 디자인한 인공 합성 경로에 따라 무세포 다중 효소 촉매를 이용하고, 기질로서 에탄올을 이용한다. 효소로서 NOX, EtDH:D46G, FLS:L482S, BDH:S199A, DDH:Q337A/F375I를 이용하고, 조효소로서, NAD^+ , $NADP^+$, TPP, 비타민 B₁₂, Mg^{2+} 을 첨가한 반응 혼합물로 2-부탄올 생성을 효과적으로 유도할 수 있다.
- [35] 또한 본 발명은 상기 형질전환 미생물에서 생산된 단백질을 나노입자에 고정하고 반응시키는 단계;를 포함하는 부탄올 생산 방법을 제공한다.
- [36] 상기 나노입자는 산화 규소(silicon oxide)를 부착하고 글루타알데히드(glutaraldehyde)와 반응시키나, 본 발명의 단백질을 나노입자에

부착하여 부탄올을 생산하기 위한 목적을 달성하기 위해서라면, 이에 제한되지 않는다. 상기 고정된 단백질 나노입자는 재사용이 가능하고, 바람직하게는 1 내지 30회 재사용이 가능하며, 더욱 바람직하게는 1 내지 20회이나, 이에 제한되지 않는다.

- [37] 본 발명의 일실시예에 있어서, 실시예 7-6의 방법에 따라, 최적의 부탄올 생산 방법은, 본 발명에서 디자인한 인공 합성 경로에 따라 무세포 다중 효소 촉매를 이용하고, 기질로서 에탄올을 이용한다. 효소로서 NOX, EtDH:D46G, FLS:L482S, BDH:S199A, DDH:Q337A/F375I를 이용하고, 조효소로서, NAD⁺, NADP⁺, TPP, 비타민 B₁₂, Mg²⁺을 첨가한 반응 혼합물로 2-부탄올 생성을 효과적으로 유도할 수 있다. 상기 효소를 나노입자에 부착시켜 고정시키고 부탄올 생성을 유도한 결과, 재사용 후에도 효과적으로 부탄올이 생성됨을 확인하였다.
- [38] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [39] <실시예 1> 실험 준비 및 실험 방법

- [40] <1-1> 효소 및 시약 구입

- [41] 제한 효소인 DNA Polymerase High Fidelity and T4 DNA ligase는 TaKaRa Biotech(Shiga, Japan) 및 New England Biolabs(Ipswich, MA, USA)에서 각각 구입하였다. DNA 및 단백질 마커는 Tiangen Biotech(Shanghai, China)에서 구입하였다. IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), DTT(dithiothreitol) 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 및 Sinopharm(Shanghai, China)에서 각각 구입하였다. 대조군으로서, (3S/3R)-아세트인(acetoin)은 (2S, 3S)-2,3-부탄에디올(butanediol), (2R, 3R)-2,3-부탄에디올(butanediol), meso-2,3-부탄에디올(butanediol), 부탄온(butanone) 및 2-부탄올(butanol)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 모든 다른 시약은 달리 명시되지 않는 한, 분석 등급이었으며 상업적으로 이용 가능한 것을 이용하였다.

- [42] <1-2> 박테리아 균주, 플라스미드 및 박테리아 성장 조건

- [43] 본 발명에 이용된 균주 및 플라스미드는 하기 표 1에 나타내었으며, 클로닝 및 발현 발현 숙주로서 *Escherichia coli* DH5 α 및 BL21(DE3)을 이용하였으며 37도에서 배양하였다. 플라스미드 pET28a를 이용하여 발현 벡터를 제작하였다. Luria-Bertani(LB) 배지는 균주 배양 및 재조합 단백질 발현에 사용되었으며, 최종 농도 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 재조합 균주를 배양하기 위해 카나마이신을 상기 배지에 추가하였다.

[44]

[표 1]

Strains	Relevant genotype and description
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of plasmid for cloning
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host of plasmid for expression, F-, ompT, hsdSB(rB-mB-), gal(λ c I 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV-T7 gene1), dcm(DE3)
Plasmids	Relevant genotype and description
pET28a	Expression vector, Km ^R
pET-EtDH	pET28a carries <i>EtDH</i> gene
pET-EtDH:D46G	pET28a carries <i>EtDH</i> mutant gene
pET-FLS	pET28a carries <i>FLS</i> gene
pET-FLS:L482S	pET28a carries <i>FLS</i> mutant gene
pET-FLS:L482R	pET28a carries <i>FLS</i> mutant gene
pET-FLS:L482E	pET28a carries <i>FLS</i> mutant gene
pET-BDH	pET28a carries <i>BDH</i> gene
pET-BDH:S199A	pET28a carries <i>BDH</i> mutant gene

[45]

[46]

[표 2]

Strains	Relevant genotype and description
pET-DDH	pET28a carries <i>DDH</i> gene
pET-DDH:S302A	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:Q337A	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:F375I	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:S302A/Q337A	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:S302A/F375I	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:Q337A/F375I	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-DDH:S302A/Q337A/F375I	pET28a carries <i>DDH</i> mutant gene
pET-dhaR	pET28a carries <i>dhaR</i> gene
pET-DDH-dhaR	pET28a carries <i>DDH</i> and <i>dhaR</i> genes
pET-NOX	pET28a carries <i>NOX</i> gene

[47]

[48]

[49]

<1-3> 다단계 효소(cascade enzymes)의 제조합 단백질 발현 및 정제

에탄올에서 C₄ 화합물인 아세트인 및 2,3-부탄디올을 생성하고 최종적으로 2-부탄올을 생성하기 위하여, 다단계 효소(cascade enzymes)를 이용하였으며, EtDH(ethanol dehydrogenase), FLS(formolase), BDH(2,3-butanediol dehydrogenase), DDH(diol dehydratase), 및 NOX(NADH oxidase)의 유전자는 각 쿠프리아비두스 네카터(*Cupriavidus necator*)[T. Y. Wu, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016, 100, 1], 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)[J. Siegel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2015, 112, 3704], 클로스트리디움 오토에타노지넘(*Clostridium autoethanogenum*)[M. Kopke, et al., Appl. Environ. Microbiol., 2014, 80, 3394], 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)[(Z. Chen, et al., Bioresource Technol., 2015, 197, 260), (M. Yamanishi, et al., FEBS. J., 2012, 279, 793)] 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)[Y. W. Zhang, et al., Enzyme Microb. Tech., 2012, 50, 255]에서 유래한 유전자를 이용하였으며, General Biosystems, Inc. (Anhui, China)에서 합성하였다. 또한, 상기 각 유전자를 발현 플라스미드 pET28a에 클로닝되었다. 단백질 발현 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하였으며, 각 pET-EtDH, pET-FLS, pET-BDH, pET-DDH, pET-dhaR, pET-DDH-dhaR, 및 pET-NOX가 포함된 각 제조합 *E. coli* BL21(DE3)를 600 nm 에서 광학 밀도가 0.6 일 때, 0.5 mM IPTG가 포함된 LB 배지에 37도로 배양하였다. 18도에서 24시간 유도한 후, 세포를 원심분리하여 수득하고 ice bath에서 초음파 처리하여 파쇄하였다. 세포 파편을 제거하기 위하여 세포 용해물을 8000 xg, 10분간 원심 분리하였다. EtDH, FLS, BDH, dhaR 및 NOX 효소를 수득하기 위하여, 용해성 분획을 정제 프로토콜(GE Healthcare, Little

Chalfont, UK)에 따라 HisTrap HP 칼럼을 이용하여 정제하였다. DDH 정제는 종래의 방법으로 수행하였다[M. Seyfried, et al., J. Bacteriol., 1996, 178, 5793]. 상기 각 정제된 효소는 초미세여과(ultrafiltration)하여 농축 및 탈염화시킨 후, SDS-PAGE로 검출하였다.

[50] **<1-4> 효소 변이체(enzyme variants)의 제작**

[51] 상기 각 EtDH, FLS, BDH 및 DDH 효소에 대한 변이체를 제작하고 이를 발현 및 정제하였다. 또한, EtDH 또는 BDH 변이체를 제작하기 위하여, EtDH:D46G 및 BDH:S199A 변이체는 하기 표 3에 나타난 EtDH1/EtDH2 및 BDH1/BDH2 프라이머를 이용하여 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis)를 수행하여 제작하였다. 야생형 EtDH 및 BDH 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pET-EtDH 및 pET-BDH는 PCR 증폭을 위한 DNA 주형으로서 각각 사용되었다. 정정된(correct) 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 E. coli BL21(DE3)에 형질전환 시킨 후, 콜로니는 카나마이신 저항성인 것으로 선택하여 단백질 발현에 이용하였다. 각 단백질의 정제 후, EtDH 및 BDH 변이체의 활성 및 운동 파라미터(kinetic parameter)를 측정하였다. 또한, FLS 효소의 촉매 효율을 높이기 위하여, 신규한 돌연변이 영역을 찾아내고자, HotSpot Wizard 2.0 server를 이용하여 FLS 구조(PDB No.: 4QPZ)를 입력하여 핫스팟을 분석하였다[(J. Siegel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2015, 112, 3704), (J. Bendl, et al., Acids Res., 2016, 44, 479)]. 6개의 잔여(Six residuals) 핫스팟(T396, T446, M473, S477, L482 및 L499)를 하기 표 2의 FLS1-FLS12 프라이머를 이용하여 부위 특이적 돌연변이를 유도하였다. 야생형 FLS를 포함하는 재조합 플라스미드 pET-FLS를 DNA 주형으로 이용하였으며, 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 E. coli BL21(DE3)로 형질전환하였다. FLS 변이체를 아세트알데히드(acetaldehyde)를 기질로 하는 전체-세포 생촉매법(whole-cell biocatalytic method)을 이용하여 스크리닝 하였다. 구체적으로, 콜로니를 LB 배지에 접종한 후 600 nm에서 광학 밀도가 0.6에 도달하였을 때, 18도로 24시간 동안 0.5 mM IPTG를 추가하여 단백질 발현을 유도하였다. 상기 세포는 원심 분리하여 수득하고, 50 mM 인산 완충액(pH 8.0), 100 mM 아세트알데히드 및 40 gL⁻¹ wet cell weight(WCW)를 포함하는 반응 혼합물로 6시간, 30도 조건으로 전체-세포 생촉매 작용을 수행하였다. 또한, DDH 변이체를 제작하고, 상기 DDH의 재활성 인자(reactivating factor)인 dhaR 발현을 위하여, S302A, Q337A, F375I, S302A/Q337A, S302A/F375I, Q337A/F375I 및 S302A/Q337A/F375I 를 포함하는 DDH 변이체는 야생형 DDH 효소와 비교하여 촉매 효율을 확인하기 위하여 제작하였다. 하기 표 2의 DDH1-DDH6 프라이머를 이용하여 부위 특이적 돌연변이 유도하여 제작하였다. 야생형 DDH를 포함하는 pET-DDH-dhaR 재조합 플라스미드 및 이의 활성화 인자 dhaR 유전자는 PCR 증폭의 DNA 주형으로 이용하였다. 각 단백질 발현을 유도하기 위하여, 상기 PCR 생성물을 E. coli BL21(DE3)에 형질전환하고, 0.5 mM IPTG를

포함하는 LB 배지에 18도, 24시간 동안 배양하였다. 상기 변이체는 meso-2,3-부탄디올을 기질로 이용하는 전체-세포 생축매 분석에 이용하여 촉매 활성을 평가하는데 사용하였다. 반응 혼합물은 50 mM HEPES 완충액(pH 7.0), 50 mM meso-2,3-b부탄다이올, 20 μ M 조효소 B12 및 40 gL⁻¹ wet cell weight를 포함하며, 전체-세포 생축매는 암조건에서 30도에서 6시간 수행되었다. 부탄은 생성물은 가스 크로마토그래피를 이용하여 정량하였다. 각 효소 및 이의 일부 변이체에 대한 유래 및 염기서열은 표 4에 나타내었다.

[52] [표3]	Primers	Sequence (5'-3')	Mutation site	seq No.
	EtDH1	GATTGTTACCTTTGCTGGCCTGCATAAAATG	D46G	25
	EtDH2	CATTTTATGCAGGCCAGCAXXGGTAACAATC	D46G	26
	FLS1	GGTAGCGGATGGTGGCCTGNNNTATCTCTGGCTGTCC	T396	27
	FLS2	GGACAGCCAGAGATANNNCAGGCCACCATCCGCTACC	T396	28
	FLS3	CCGCCGCACGATCCTTGTGNNNGGCGATGGCTCGGTG	T446	29
	FLS4	CACCGAGCCATCGCCNNNNCAAGGATCGTGCGGCGG	T446	30
	FLS5	GCCGCTGATCGTCATCNCNNNAACAAACCAAGCTGG	M473	31
	FLS6	CCAGCTTTGGTTTGTNNNGATGATGACGATCAGCGGC	M473	32
	FLS7	CATCATCATGAACAACCAANNNTGGGGGTGGACATTG	S477	33
	FLS8	CAATGTCCACCCCCANNNTTGGTTGTTCATGATGATG	S477	34
	FLS9	CCAAAGCTGGGGGTGGACANNNAACATTCACGAATTG	L482	35
	FLS10	CAATTGCTGGAAATGNNNTGTCCACCCCCAGCTTTGG	L482	36
	FLS11	TCGCGTGACGGGACCCGTTNNNGAAAATGGCTCCTAT	L499	37
	FLS12	ATAGGAGCCATTTTCNNNACGGGTGCCCGTCACGCGA	L499	38
	BDH1	GAATTATCGGTGTGGTGAAXXAGACCTGTTTGTGTTG	S199A	39
	BDH2	CAACACAAACAGGTCTTTTCCAAACACCGATAATTC	S199A	40
	DDH1	CTCCAAAACGGTGGGGTTLXLTTGTATTGGGATTCAG	S302A	41
	DDH2	CTGGAATCCCAATAACAAXAACCCACCGTTTGGAG	S302A	42
	DDH3	ATGTGCGTCTGCTAATGACFXAGCGTTCTCCATTCTG	Q337A	43
	DDH4	CAGAATGGGAGAACGCTTXXGTGATTGACAGACGCACAT	Q337A	44
	DDH5	CACCTAACTATGACAACACGATTCGCGGGGTCAAACACCG	F375I	45
	DDH6	CGGTGTTTGACCCCGCAALCGTGTTGTGCATAGTTAGGTG	F375I	46

[53]

[54] [표4]

유전자의 염기서열 또는 이의 변이체	유래	염기서열 번호	이디노산 서열번호
NOX(NADH oxidase)	락토바실러스 람노시스 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	1	2
EtDH(ethanol dehydrogenase)	쿠프리비두스 네카터 (<i>Cupriavidus necator</i>)	3	4
EtDH:D46G		5	6
FLS(formolase)		7	8
FLS:L482S	슈도모나스 플루오레스센스 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	9	10
FLS:L482R			11
FLS:L482E			12
BDH(2,3-butanediol dehydrogenase)	클로스트리디움 오토에타노지늄(<i>Clostridium autoethanogenum</i>)	13	14
BDH: S199A		15	16
DDH(diol dehydratase)		17	18
DDH:S302A	락토바실러스 브레비스 (<i>Lactobacillus brevis</i>)		19
DDH:Q337A			20
DDH:F375I			21
DDH:Q337A/F375I		22	23
dhaR		24	

[55]

[56] <1-5> 효소 활성 분석

[57] EtDH 효소 활성 분석을 위하여, EtDH 효소 활성 및 이의 변이체는 100 mM glycine-NaOH 완충액(pH 9.5), 5 mM Mg²⁺, 3 mM NAD⁺/NADP⁺ 및 10 mM 에탄올을 포함하는 반응 혼합물로 25도에서 측정하였다. 활성은 분광광도계(UV-1800, MAPADA, Shanghai, China)를 이용하여 340 nm에서 NAD⁺/NADP⁺ 감소율로 확인하였다. 1 단위의 EtDH 활성은 분 당 1 μ mol의 NAD⁺/NADP⁺를 감소시키는데 필요한 효소의 양으로 확인하였다. FLS 효소 활성 분석을 위하여, FLS 효소 활성 및 이의 변이체는 100 mM 인산 완충액(pH 8.0), 1

mM Mg^{2+} , 0.1 mM TPP 및 20 mM 아세트알데히드를 포함하는 반응 혼합물로 검정하였으며, 반응 후 실온에서 1시간 두었으며, 아세트알데히드에서 아세트인의 농도는 VP 반응으로 측정하였으며, 표준 아세트인 검정곡선으로 계산하였다. BDH 효소 활성 분석을 위하여, FLS 효소 활성 및 이의 변이체는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 1 mM DTT; 및 20 mM 아세트인 또는 5 mM 부탄온을 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 측정하였다. 활성은 분광광도계(UV-1800, MAPADA)를 사용하여 340 nm에서 NADPH의 산화율로 확인하였다. 1 단위의 BDH 활성은 분 당 1 μ mol NADPH를 산화시키는데 필요한 효소의 양으로 정의되었다. DDH 효소 활성 분석을 위하여, DDH 효소 활성 및 활성화 인자 dhaR를 포함하는 변이체는 50 mM 인산 완충액(pH 7.0), 1 mM 조효소 B12, 100 mM ATP, 1 mM Mg^{2+} 및 50 mM meso-2,3-부탄다이올을 포함하는 반응 혼합물로 측정하였다. 실온에서 암조건으로 1시간 동안 둔 후, 시트르산염 버퍼(100 mM, pH 3.6)를 동일한 부피로 추가하여 반응을 중지시켰다. 부탄온 생성물은 가스크로마토그래피로 측정하였으며, 1 단위의 DDH 활성은 분 당 meso-2,3-부탄다이올로부터 1 μ mol 부탄온을 생성하는 효소의 양으로 확인하였다. NOX 효소 활성 분석을 위하여, NOX 효소 활성은 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH 8.0) 및 0.2 mM NADH를 포함하는 반응 혼합물로 실온에서 측정하였다. 활성은 분광광도계(UV-1800, MAPADA)를 이용하여 340 nm에서 NADH의 산화율로 확인하였다. 1단위의 NOX 활성은 분 당 1 μ mol NADH를 산화시키는데 필요한 효소의 양으로 측정하였다.

[58] **<1-6> VP(Voges-proskauer) 반응**

[59] 각 조건의 처리균을 10,000xg에서 5분 간 4도에서 원심분리 하였다. 각 처리균의 아세트인 농도를 분석하고 VP 반응에서 정량화하기 위하여, 10mL 튜브에 희석된 시료 0.3 mL, 0.5 % 크레아틴 0.3 mL, 5 % 알파 나프톨 0.3 mL 및 5 % NaOH 0.3 mL를 넣고 30 에서 30 분간 부드럽게 진탕시켰다. 분광 광도계(UV-1800, MAPADA)를 사용하여 520 nm에서 반응 용액의 광학 밀도를 측정하고 검량선으로부터 아세트인 농도를 계산하였다. 보정 그래프는 표준 아세트인 농도와 0.04-0.4 mM 범위의 VP 반응 후 520 nm에서 해당 광학 밀도 사이에 측정하였다.

[60] **<1-7> 운동 파라미터(kinetic parameters)의 측정**

[61] EtDH 및 EtDH:D46G의 운동 파라미터는 100 mM glycine-NaOH 완충액(pH 9.5), 5 mM Mg^{2+} , 3 mM $NAD^{+}/NADP^{+}$ 및 0.5-100 mM 에탄올을 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 확인하였다. FLS 및 이의 변이체의 운동 파라미터는 100 mM 인산 완충액(pH 8.0), 1 mM Mg^{2+} , 0.1 mM TPP 및 0.5-20 mM 아세트알데히드를 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 확인하였다. BDH 및 BDH:S199A의 운동 파라미터는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 1 mM DTT; 및 0.5-100 mM 아세트인 또는 0.5-10 mM 부탄온을 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 평가하였다. 상기 K_m 및 k_{cat} 값은 미카엘리스-멘텐

방정식(Michaelis-Menten equation)의 비선형 회귀 피팅으로 확인하였으며 3회 반복하였다.

[62] **<1-8> 무-세포 다중 효소 촉매 시스템(Cell-free multi-enzyme catalysis system)**

[63] 도 1a 내지 도 1c에 나타난 바와 같이, 무-세포 다중 효소 촉매를 이용하여 에탄올로부터 아세트인, 2,3-부탄디올 또는 2-부탄올의 합성은 기질, 조효소, 금속 이온 및 해당되는 효소를 포함하는 0.5-mL 반응 혼합물로 수행하였다. 온도, pH, 조효소 및 메탈 이온을 포함하는 반응 조건은 인공적인 반응 경로의 플럭스(flux)를 증대시키기 위한 최적 조건으로 수행하였다. 아세트인, 2,3-부탄디올 또는 2-부탄올을 최적 반응 조건은 하기와 같다. 아세트인 생성은 50 mM HEPES buffer (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 0.1 mg mL⁻¹ EtDH, 0.2 mg mL⁻¹ FLS:L482S, 0.1 mg mL⁻¹ NOX, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20 % DMSO 및 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합물을 30도 두어 수행하였다. 2,3-부탄디올은 50 mM HEPES 완충액(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1 mM NADP⁺, 0.1 mg mL⁻¹ EtDH:D46G, 0.2 mg mL⁻¹ FLS:L482S, 0.1 mg mL⁻¹ NOX, 0.1 mg mL⁻¹ BDH:S199A, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20 % DMSO 및 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합물을 30도 두어 수행하였다. 2-부탄올은 50 mM HEPES buffer (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1 mM NADP⁺, 0.1 mg mL⁻¹ EtDH:D46G, 0.2 mg mL⁻¹ FLS:L482S, 0.1 mg mL⁻¹ NOX, 0.1 mg mL⁻¹ BDH:S199A, 0.2 mg mL⁻¹ DDH:Q337A/F375I, 0.2 mg mL⁻¹ dhaR, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20 % DMSO, 1 mM 조효소 B12, 100 mM ATP 및 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합물을 30도 두어 수행하였다. 모든 반응은 6시간 동안 수행하였으며, 각 생성물은 가스 크로마토그래피로 확인하였다. 또한, 생성물에 대한 백분율 수율은 하기와 같은 수식으로 계산하였다: 백분율 수율(%) = 생성물 수율(mM)/이론 수율(theoretical yield)(mM). 이론적으로, 2몰의 에탄올은 1몰의 아세트인, 2,3- 부탄디올 또는 2-부탄올을 생성할 수 있다.

[64] **<1-9> 단계적 연쇄 반응의 재순환성 확인(Recyclability of cascade reactions)**

[65] 정제된 효소를 활성 규소 산화물 입자와 혼합하고 이를 12시간, 4도 조건으로 배양하였다. 고정화하기전에, 규소 산화물 입자(4830HT; Nanostructured & Amorphous Materials, Houston, TX, USA)를 글루타르알데히드(glutaraldehyde) (Sigma)를 포함하는 나노입자를 처리하여 활성화시켰다. 고정화 수율(%) 및 고정화 효율(%)은 다음과 같은 고정화된 효소로 다음과 같은 수학적식으로 계산하였다 : 고정화 효율 = $(\alpha_i/\alpha_f) \times 100$, 고정화 수율 = $\{[P_i - (P_w + P_s)]/P_i\} \times 100$. α_i 는 고정화된 효소의 총 활성도이고, α_f 는 자유 효소의 총 활성도이며, P_i 는 조효소 제제의 총 단백질 함량이고, P_w 및 P_s 는 고정 후 세척용액 또는 상등액의 단백질 농도를 의미한다. 아세트인 생산을 위하여, 50 mM HEPES 완충액(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1.06 U mL⁻¹ EtDH, 0.05 U mL⁻¹ FLS:L482S, 0.98 U mL⁻¹ NOX, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20% DMSO 및 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5mL 반응 혼합물로 반응을 수행하였다. 2,3-부탄디올 생성을 위하여, 50 mM HEPES

완충액(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1 mM NADP⁺, 0.1 mg mL⁻¹ EtDH:D46G, 0.2 mg mL⁻¹ FLS:L482S, 0.1 mg mL⁻¹ NOX, 0.1 mg mL⁻¹ BDH:S199A, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20% DMSO 및 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5mL 반응 혼합물로 30도, 6시간 동안 반응을 수행하였다. 또한, 고정화된 효소의 재사용성을 확인하기 위하여, 상기와 같은 동일한 반응 조건하에 수행하였다. 각 1차 반응 순환 후, 고정화된 효소는 4000×g로 30분 동안 원심분리하여 제거하였다. 고정화된 효소를 수집하고 탈이온수 및 완충액으로 세척하였다. 2차 반응 순환을 위하여, 상기 고정화된 효소를 새로운 완충액에 용해시키고, 기질을 첨가한 후, 상기 1차 반응 순환과 동일하게 처리하였다.

[66] **<1-10> 분석 방법**

[67] 세포 성장 분석은, 세포 성장은 분광 광도계(UV-1800, MAPADA)를 사용하여 600 nm에서 광학 밀도를 측정하여 확인하였다. 단백질 농도는 브레트포드 법(Bradford method)을 이용하여 측정하였고, 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 표준 단백질로 사용하였다. GC-MS 분석은, 키랄 칼럼(chiral column)(Supelco β-DEX™ 120, 30-m 길이, 0.25-mm 내경)이 장착된 가스 크로마토그래프 시스템(Agilent GC9860, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 정량하였다. 수행 조건은 다음과 같다: N₂를 1.2 mL min⁻¹의 유속으로 캐리어 카스로서 이용하였다; 인젝터 온도 및 검출기 온도는 각각 215 및 245도로 설정하였다; 칼럼 온도는 50도에서 1.5분간 유지시킨 후, 15°C min⁻¹의 속도로 180도까지 증가시켰다.

[68] **<실시예 2> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 단백질 발현 확인**

[69] 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이 단백질 발현을 확인하기 위하여, 18도에서 24시간 유도한 후, 세포를 원심 분리하여 수득하고 ice bath에서 초음파 처리하여 파쇄하였다. 세포 파편을 제거하기 위하여 세포 용해물을 8000×g, 10분간 원심 분리하였다. NOX, EtDH, FLS, BDH 및 dhaR 효소를 수득하기 위하여, 용해성 분획을 정제 프로토콜(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)에 따라 HisTrap HP 칼럼을 이용하여 정제하였다. DDH 정제는 종래의 방법으로 수행하였다[M. Seyfried, et al., J. Bacteriol., 1996, 178, 5793]. 상기 각 정제된 효소는 초미세여과(ultrafiltration)하여 농축 및 탈염화시킨 후, SDS-PAGE로 검출하였다. 그 결과, EtDH 및 EtDH:D46G 단백질과 BDH 및 BDH: S199A 단백질은 동일한 분자량으로 발현됨을 확인하여, 야생형과 변이형간의 발현되는 분자량은 차이가 없음을 확인하였다. 또한, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 유래 또는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 유래된 NOX 단백질은 각각 분자량이 상이하여, 동일한 유전자라 할지라도 유래에 따라 발현되는 단백질이 상이함을 확인하였다. 또한, FLS 유전자가 제대로 발현됨을 확인하였다.

[70] **<실시예 3> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체를 이용한 에탄올에서 C₄의 화합물 생성 확인**

- [71] 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체를 이용하여, 에탄올에서 C₄ 화합물인 아세트인(acetoin), 2,3-부탄디올(2,3-butanediol) 및 2-부탄올(2-butanol) 생성을 유도하기 위하여, 상기 무-세포 다중 효소 촉매 시스템을 이용한 인공 합성 경로를 도 1a 내지 도 1c와 같이 설계하였다. 에탄올은 먼저 NAD(P)H-의존성 EtDH에 의해 탈수소되어 아세트알데히드를 생성하며, 응축 반응을 거쳐 본 발명의 FLS 및 이의 변이체에 의하여 아세트인을 생성한다. NOX는 NAD⁺를 재생하는 데 사용한다. 이어서, NADPH-의존성 BDH에 의해 아세트인이 환원되어 2,3-부탄디올이 생성된다. 마지막으로, 2-부탄올은 각각 DDH 및 BDH에 의한 탈수 및 수소화 반응을 통해 수득할 수 있다.
- [72] <3-1> 본 발명의 FLS 효소에 따른 아세트인 생성 확인
- [73] 본 발명의 FLS 효소에 의한 아세트알데히드에서 아세트인으로의 전환능을 확인하기 위하여, VP 반응을 수행하였으며, 기질인 아세트알데히드를 50 또는 100nM 처리하거나, 처리시간을 0 또는 6시간 두고 FLS 효소를 처리하여 각 조건을 설정하였다. 그 결과, 아세트인이 생성됨을 확인하여, FLS 효소를 처리하고, 기질인 아세트알데히드를 농도로 달리할 경우 얻어지는 아세트인 농도도 다르다는 것을 색의 변화가 질음을 통해 효과적으로 확인하였다.
- [74] <3-2> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체를 이용한 아세트인, 2,3-부탄디올 및 2-부탄올 생성 분석
- [75] 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체를 이용하여, 이를 무-세포 다중 효소 촉매 시스템을 이용한 인공 합성 경로로 아세트인, 2,3-부탄디올 및 2-부탄올을 생성하였다. 그 후, 시판되는 표준 물질인 에탄올, 아세트알데히드, 3S/3R)-아세트인(acetoin)은 (2S, 3S)-2,3-부탄에디올(butanediol), (2R, 3R)-2,3-부탄에디올(butanediol), meso-2,3-부탄에디올(butanediol), 부탄온(butanone) 및 2-부탄올(butanol)을 혼합하여 이를 대조군으로서 이용하였다. 또한, 본 발명의 무-세포 다중 효소 촉매에 따른 각 다단계 효소를 이용한 분석 결과를 GC/GC-MS 분석을 이용하여 수행하였다. 그 결과 본 발명의 각 다단계 효소를 이용한 무-세포 다중 효소 촉매 시스템을 이용 시, 시판되는 표준 물질과 비교하여 동일한 피크의 아세트인, 2,3-부탄디올 및 2-부탄올을 생성함을 확인하였다(도 2).
- [76] <실시예 4> 본 발명의 인공 합성 경로에서 다단계 효소 및 이의 변이체의 촉매 효과 확인
- [77] <4-1> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 운동 파라미터(kinetic parameter) 측정을 통한 촉매 효율 비교
- [78] 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 운동 파라미터(kinetic parameter) 측정을 통한 촉매 효율을 비교하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, EtDH 및 EtDH:D46G의 운동 파라미터는 100 mM glycine-NaOH 완충액(pH 9.5), 5 mM Mg²⁺, 3 mM NAD⁺/NADP⁺ 및 0.5-100 mM 에탄올을 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 확인하였다. FLS 및 이의 변이체의 운동

파라미터는 100 mM 인산 완충액(pH 8.0), 1 mM Mg^{2+} , 0.1 mM TPP 및 0.5-20 mM 아세트알데히드를 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 확인하였다. BDH 및 BDH:S199A의 운동 파라미터는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 1 mM DTT, 및 0.5-100 mM 아세트인 또는 0.5-10 mM 부탄온을 포함하는 반응 혼합물로 실온에 두어 평가하였다. 기질 친화도인 K_m 및 k_{cat} 값은 미카엘리스-멘텐 방정식(Michaelis-Menten equation)의 비선형 회귀 피팅으로 확인하였으며 3회 반복하였다. DDH 및 NOX는 종래 결과[(S. Kwak, et al., Bioresource Technol., 2013, 135, 432), (M. Kopke, et al., Appl. Environ. Microbiol., 2014, 80, 3394)]를 참고하여 비교하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다. 표 4에 나타낸 바와 같이, EtDH 및 EtDH:D46G 효소는 기질로서 에탄올, 조효소로서 NAD^+ 를 이용 시, 각 k_{cat}/K_m 값이 17.09, 9.97 $s^{-1}mM^{-1}$ 임을 확인하여, 조효소로서 $NADP^+$ 를 이용하는 것 보다 NAD^+ 를 이용하는 것이 촉매 효율을 높일 수 있음을 확인하였다. 또한, FLS 효소는 기질로서 아세트알데히드를, 조효소로서 TPP(thiamine pyrophosphate)를 이용 시, k_{cat}/K_m 값이 $7.69 \times 10^{-3} s^{-1}mM^{-1}$ 임을 확인하였다. 또한, 이의 변이체인 FLS:L482S, FLS:L482R 및 FLS:L482E는 각 k_{cat}/K_m 값이 1.33×10^{-2} , 1.06×10^{-2} 및 $9.66 \times 10^{-3} s^{-1}mM^{-1}$ 임을 확인하여, 상기 야생형 FLS 효소 보다 각 72.95%, 37.84% 및 25.62%으로 촉매 효율이 증가됨을 확인하였다. 또한, BDH:S199A 효소는 야생형 BDH와 비교하였을 때, 기질로서 부탄온을, 조효소로서 NADPH를 이용 시 촉매 효율이 증가됨을 확인하였다.

[79]

[표5]

Enzyme	Substrate/coenzyme	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
EtDH	Ethanol/ NAD^+	0.37 ± 0.05	6.28 ± 0.11	17.09
	Ethanol/ NAD^+	0	0	0
EtDH:D46G	Ethanol/ NAD^+	0.57 ± 0.03	5.65 ± 0.09	9.97
	Ethanol/ NAD^+	0.60 ± 0.02	0.99 ± 0.03	1.65
FLS	Acetaldehyde/TPP	58.46 ± 2.32	0.45 ± 0.03	7.69×10^{-3}
FLS:L482S	Acetaldehyde/TPP	47.45 ± 1.20	0.63 ± 0.01	1.33×10^{-2}
FLS:L482R	Acetaldehyde/TPP	50.27 ± 1.44	0.53 ± 0.02	1.06×10^{-2}
FLS:L482E	Acetaldehyde/TPP	50.95 ± 1.51	0.49 ± 0.03	9.66×10^{-3}
BDH	Acetoin/ $NADPH$	84.86 ± 7.98	157.0 ± 9.0	18.5
	Acetoin/ $NADH$	0	0	0
	Butanone/ $NADPH$	1.94 ± 0.05	29.90 ± 1.02	15.41
	Butanone/ $NADH$	0	0	0
BDH:S199A	Acetoin/ $NADPH$	116.1 ± 8.7	224.3 ± 9.72	19.31
	Acetoin/ $NADH$	0	0	0
	Butanone/ $NADPH$	1.08 ± 0.03	40.78 ± 1.42	37.76
	Butanone/ $NADH$	0	0	0
DDH	2,3-butanediol/B12	10.4	35	3.4
NOX	$O_2/NADH$	5.8×10^{-3}	218.7	3.77×10^4

[80]

[81]

<4.2> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 입체 선택성(stereoselectivity) 확인본 발명의 DDH 효소의 입체 선택성을 분석하기 위하여, DDH 효소 및 이의 재활성 인자인 dhaR를 발현하는 세포(E. coli/pET-DDH-dhaR)를 이용하여 전체-세포 생촉매법(whole-cell biocatalysis)법을 수행하였고, 기질로서 3개의 2,3-부탄디올 이성질체(meso-2,3-butanediol, (2R,3R)-butanediol 및 (2S,3S)-butanediol)을 이용하여 2-부탄올의 전 합성 단계인 부탄온(butanone)으로의 전환을 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 DDH 효소의 입체 선택성을 분석한 결과, 50 mM meso-2,3-butanediol로부터 20.56 mM의

부탄온이 생성됨을 확인하였다. 반면, (2R, 3R)-2,3- 부탄디올 및 (2S, 3S)-2,3-부탄디올을 기질로 이용 시 부탄온이 검출되지 않음을 확인하였다. 따라서, dhaR을 포함하는 DDH 효소는 in vivo 상에서 meso-2,3- 부탄디올에 대해 높은 촉매 활성을 나타내어, 입체 선택성이 뛰어난 것을 확인하였다.

[82] <4-3> 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 열 안정성(Thermostability) 확인

[83] 본 발명의 다단계 효소 및 이의 변이체의 열 안정성을 확인하기 위하여, EtDH(에탄올, NAD⁺ 포함), EtDH:D46G(에탄올, NAD⁺ 포함), EtDH:D46G(에탄올, NADP⁺), EtDH:D46G(ethanol, NAD⁺ 포함), FLS(아세트알데히드, TPP 포함), FLS:L482S(아세트알데히드, TPP), BDH:S199A(아세트인, NADPH 포함), BDH:S199A(부탄온, NADPH 포함), dhaR 포함DDH:Q337A/F375(meso-2,3-부탄디올, B12 포함), NOX (O₂, NADH 포함) 세포를 30, 37, 45 에서 6시간 동안 배양한 후 활성을 측정하였다. 그 결과, 열 안정성을 확인한 결과, 30도 조건에서 EtDH, FLS 및 NOX 효소는 각 87.91%, 70.43%, 및 91.30%의 열 안정성이 나타남을 확인하였다. 또한, 37도 및 45도에서 NOX 효소는 지속적인 열 안정성이 나타남을 확인하였다.

[84] <실시예 5> 본 발명의 인공 합성 경로를 통한 아세트인 생성

[85] <5-1> 에탄올에서 아세트인으로의 최적 반응 조건 확인

[86] 에탄올에서 아세트인의 생성을 위하여, EtDH, FLS 및 NOX 효소를 사용하였다. 구체적으로, 초기 반응은 50 mM HEPES 버퍼(pH 7.0), 0.1 mg mL⁻¹ EtDH, 0.2 mg mL⁻¹ FLS, 0.1 mg mL⁻¹ NOX, 4 mM NAD⁺, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20% DMSO, 초기 기질로서 100 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합액을 이용하였다. 반응은 30도 조건에서 6시간 동안 진행하였고, 반응 용액에서 이론적 수득율(theoretical yield)의 35.96%인 17.98 mM의 아세트인이 생성됨을 확인하여, 본 발명의 인공 합성 경로를 이용시, 에탄올에서 아세트인으로 반응 유도가 가능함을 확인하였다. 또한, 온도, pH, 조효소(NAD⁺ 및 TPP) 및 금속 이온의 조건에 따라, 반응 최적 조건을 찾기 위하여, 온도는 20, 25, 30, 37 및 42도의 조건을 두었다. 또한, pH는 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 및 8.5의 조건에서, NAD⁺는 1, 2, 4, 6, 8 mM 농도 조건에서, TPP는 1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mM 농도 조건에서, 금속 이온은 Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ 및 Zn²⁺을 처리하여 최적 반응 조건을 확인하였다. 그 결과 pH 조건은 8.0이, 온도는 30도에서, NAD⁺의 농도는 1mM에서, TPP는 0.1mM 농도에서, 금속 이온 Mg²⁺에서 가장 최적 반응 조건임을 확인하였으며, 에탄올에서 아세트인으로의 반응 플럭스를 향상시킴을 확인하였다. 또한, 상기 최적 반응 조건에 시간에 따른 아세트인의 생성을 확인하기 위하여, EtDH, FLS 및 NOX 효소를 이용하고 100 mM 에탄올을 기질로 하여 0, 2, 4, 6, 및 8 시간을 처리하였다. 그 결과, 6시간 처리 시, 이론적 수득율(theoretical yield)의 45.50%인 22.75 mM의 아세트인이 생성됨을 확인하였다.

[87] <5-2> 에탄올에서 아세트인으로의 속도 조절 단계(Rate limiting step) 확인

[88] 에탄올에서 아세트산으로의 속도 조절 단계를 확인하기 위하여, 각 EtDH, FLS 또는 NOX 효소를 1/10의 농도로 줄이고 이를 제외한 나머지 효소는 일정한 농도를 유지하여 3회 반복하여 아세트산 양을 확인하였다. 그 결과, EtDH 또는 NOX 효소보다 FLS 효소의 농도가 줄어들었을 때, 아세트산의 생성에 영향을 끼침을 확인하였다. 따라서, 상기 FLS 효소는 아세트산 생성에 중요한 효소임을 확인하였다.

[89] <5-3> FLS 효소 변이체의 촉매 효율 확인 및 선발

[90] FLS 효소의 촉매 효율을 향상시키기 위해, HotSpot Wizard 2.0 서버를 사용하여 FLS 아미노산 서열의 돌연변이 핫스팟을 분석 하였다. 핫 스팟 마법사 2.0 서버를 사용하여 핫 스팟 잔기(T396, T446, M473, S477, L482 및 L499) 6개 부위 포화 돌연변이 유발을 확인하고, 이의 각 구조 모델을 확인한 결과, FLS에서 482 부위가 효소 활성에 중요한 역할을 함을 확인하였다. 또한, 상기 FLS 변이체를 선발하기 위하여, FLS 및 이의 변이체인 L482S, L482R 및 L482E를 전체-세포 생촉매법을 이용하여 기질로서 아세트알데히드(100 mM)를 이용하여 아세트산을 생성 농도를 VP 법을 이용하여 확인하였다. 또한, 정제 후 FLS의 고유 활성(specific activity)인 0.16 U/mg과 비교하여, 각 변이체의 활성(%)을 비교하였으며 3회 반복하여 평균 $\pm$ 표준 편차값을 구하였다. 야생 FLS보다 FLS 변이체가 아세트산을 더 생성함을 확인하였다. 또한, FLS 변이 L482S, L482R 및 L482E는 FLS 고유 활성보다 각 59.03%, 36.89% 및 34.12%로 증가됨을 확인하였다. 따라서, FLS 변이 중 L482S가 가장 아세트산 생성에 효과적임을 확인하였다.

[91] <5-4> 야생형 FLS와 이의 변이 FLS:L482S의 구조 및 활성 비교

[92] 야생형 FLS와 이의 변이 FLS:L482S의 구조 및 활성을 비교하기 위하여, 100 ns에 대한 분자 역학 시뮬레이션 분석을 사용하여 야생형 FLS와 이의 변이 FLS:L482S의 구조적 변화와 효소 활성간의 상관 관계를 확인하였다. 그 결과, 야생형 FLS와 이의 변이 FLS:L482S는 기질인 아세트알데히드와 분자 상호 작용은 활성 부위 잔기 W480이며, 야생형 FLS보다(2.1Å) 변이 FLS:L482S가 기질인 아세트알데히드에 더 강하게 결합(2.8Å)함을 확인하였다. 또한, 변이 FLS:L482S는 야생형 FLS보다 더 수소 결합함을 확인하였다.

[93] <5-5> 기질 및 농도에 따른 FLS:L482S의 활성 비교

[94] 기질로서 에탄올을 이용하고 이의 농도에 따른 FLS:L482S의 활성을 비교하기 위하여, 50 mM HEPES 버퍼(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1.06 U ml⁻¹ EtDH, 0.05 U ml⁻¹ FLS:L482S, 0.98 U ml⁻¹ NOX, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20% DMSO, 및 100-500 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합액으로 반응을 수행하였다. 그 후, 0-6시간, 30도의 조건을 두어 아세트산 생성을 확인하였다. 그 결과, 반응 4시간째에 100 mM 에탄올을 기질로 이용 시, 이론적 수율의 88.78%에 해당하는 44.39 mM의 아세트산을 수득하였다. 아세트산 이외에, 에탄올의 대사 작용에 생성되는 아세트알데히드가 측정되었고, 이는 반응 2시간 동안 9.58 mM까지

축적된 다음 6 시간에 5.65 mM로 감소함을 확인하였다. 또한, 다른 부산물은 축적되지 않아, FLS:L482S를 이용한 아세트인의 생산을 위한 본 발명의 인공 합성 경로는 기질에 특이적임을 확인하였다. 또한, 아세트인 생산에 대한 기질 농도(200, 300, 400 및 500 mM)의 영향을 확인한 결과, 농도 의존적으로 아세트인 및 아세트알데히드의 생성이 증가됨을 확인하였다.

[95] <실시예 6> 본 발명의 인공 합성 경로를 통한 2,3-부탄디올 생성

[96] <6-1> EtDH:D46G 변이 및 BDH:S199A 제작

[97] 에탄올에서 2,3-부탄디올 생성하는 본 발명의 인공 합성 경로를 설계 시, 에탄올을 아세트알데히드로 전환시키고, 조효소로서 NAD^+ 및 NADP^+ 를 동시에 이용하면서, NADH 축적을 방지하기 위한 NAD(P)H 퍼지 밸브 조절 노드(purge valve regulatory node)를 디자인하기 위해, EtDH의 변이체를 제작하였다. 구체적으로 PDB 데이터베이스에서 다른 탈수소효소(dehydrogenase)를 포함하는 EtDH(cnMDH)의 아미노산 서열을 정렬하였다. 그 결과, 조효소로서 NAD^+ 만을 이용하는 부위와, $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 동시 이용 부위를 확인하였고, 상기 동시 이용 부위를 포함하는 EtDH:D46G을 선발하였다. 또한, BDH:S199A는 종래 방법[D. J. Maddock, et al., Protein Eng. Des. Sel., 2015, 28, 251]을 이용하여 부위 특이적 돌연변이 유도(site-specific mutagenesis)하여 제작하였다. 그 결과, 상기 변이체의 열안정성을 30, 37 및 45도에서 분석 확인한 결과, EtDH:D46G 변이체는 아세트알데히드를 조효소 NAD^+ 및 NADP^+ 가 있는 기질로 사용했을 때, 30도에서 6 시간 동안 배양 한 후 활성 수준이 86.53% 및 86.67%로 유지됨을 확인하였다. 또한, BDH:S199A 변이체는 조효소인 NADPH와 기질로서 아세트인을 사용 시, 30도에서 6 시간 동안 활성 수준이 80.81%로 유지됨을 확인하였다.

[98] <6-2> 조효소에 따른 에탄올에서 2,3-부탄디올 생성 확인

[99] 조효소에 따른 에탄올에서 2,3-부탄디올 생성을 확인하기 위하여, EtDH: D46G, FLS:L482S, BDH:S199A 및 NOX 효소를 1 mM NAD^+ 및/또는 1 mM NADP^+ 존재 하에 100 mM 에탄올과 반응시킨 후, 2,3-부탄디올 생성 농도(mM)를 확인하였다. 그 결과, NAD^+ 를 조효소로 사용될 때 2,3-부탄디올은 검출되지 않음을 확인하였다. 반면, NADP^+ 존재 시 에탄올로부터 18.20 mM의 2,3-부탄디올이 생성됨을 확인하였다. 따라서, BDH가 아세트인을 2,3-부탄디올로 전환시키는 NADPH 의존 효소인 바, 2,3-부탄디올 생성에는 NADP^+ 조효소가 필요함을 확인하였다.

[100] <6-3> 기질 및 농도에 따른 2,3-부탄디올 생성 확인

[101] 기질로서 에탄올을 이용하고 이의 농도에 따른 2,3-부탄디올 생성을 비교하기 위하여, 50 mM HEPES 버퍼(pH 8.0), 1 mM NAD^+ , 1 mM NADP^+ , 0.88 U mL^{-1} EtDH:D46G, 0.05 U mL^{-1} FLS:L482S, 0.98 U mL^{-1} NOX, 5.11 U mL^{-1} BDH:S199A, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg^{2+} , 1 mM DTT, 20% DMSO 및 100-500 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합액으로 무-세포 다중 효소 촉매 반응을 수행하였다. 그 후,

0-6시간, 30도의 조건을 두어 2,3-부탄디올 생성을 확인하였다. 그 결과, 조효소인 NAD^+ 및 1 mM NADP^+ 를 동시에 사용 시, 반응 5 시간에서 이론적 수율의 88.28 %의 2,3-부탄디올이 생성됨을 확인하였다. 따라서, NADH 축적을 저해하고, 반응 과정 전반에 걸쳐 저농도의 아세트 인이 반응액에 축적되어 BDH:S199A에 의하여 아세트인에서 2,3- 부탄디올로의 높은 촉매 효율이 나타남을 확인하였다. 그 결과, 상이한 기질 농도를 사용 시, 농도 의존적으로 2,3-부탄디올이 생성되며, 에탄올 농도가 500 mM 일 때 최대 2,3-부탄디올 농도가 127.3 mM임을 확인하였다.

[102] <실시예 7> 에탄올에서 2-부탄올의 생성 확인

[103] <7-1> 반응 조건에 따른 meso-2,3-부탄디올의 부탄온으로의 전환 확인

[104] 에탄올에서 2-부탄올을 생성하기 위하여, 반응 조건에 따른 meso-2,3-부탄디올의 부탄온으로의 전환을 확인하였다. 구체적으로, 0.2mg ml⁻¹ DDH를 효소로 이용하고, 0 또는 1mM 조효소 B12, 0 또는 100mM ATP, 0 또는 1mM Mg^{2+} 및 DDH의 재활성 인자 0 또는 0.2mg ml⁻¹ dhaR에 의한 meso-2,3-부탄디올의 부탄온으로의 전환에 대한 효과를 확인하였다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 조효소 B12 및 ATP가 촉매 반응에 필요하다는 것을 확인하였으며 dhaR 및 Mg^{2+} 는 meso-2,3-부탄디올로부터 부탄올 생성을 효율적으로 증진시킴을 확인하였다. 따라서, DDH 효소는 (2R, 3R)- 부탄디올과 (2S, 3S)- 부탄디올은 DDH의 기질이 아니나, meso-2,3- 부탄디올 만을 부탄온으로 촉매함을 확인하였다.

[105] [표6]

Reaction	DDH	Coenzyme B12	ATP	Mg^{2+}	dhaR	Butanone
A	0.2 mg ml ⁻¹	0 mM	0 mM	0 mM	0 mg ml ⁻¹	0 ± 0 mM
B	0.2 mg ml ⁻¹	1 mM	0 mM	0 mM	0 mg ml ⁻¹	0 ± 0 mM
C	0.2 mg ml ⁻¹	1 mM	100 mM	0 mM	0 mg ml ⁻¹	1.38 ± 0.12 mM
D	0.2 mg ml ⁻¹	1 mM	100 mM	1 mM	0 mg ml ⁻¹	2.48 ± 0.16 mM
E	0.2 mg ml ⁻¹	1 mM	100 mM	1 mM	0.2 mg ml ⁻¹	5.69 ± 0.21 mM

[106]

[107] <7-2> BDH:S199A 변이체에 따른 2-부탄올 생성 확인 BDH:S199A 변이체에 따른 2-부탄올에서 거울상 이성질체(enantiomers) 2-부탄올의 생성을 확인하기 위하여, 50 mM HEPES 버퍼(pH 8.0), 40 g L⁻¹ 유도된 E. coli/pET28a-BDH:S199A 세포(wet cell weight), 25 mM 부탄올을 포함하여 전체-세포 생촉매 시스템을 수행하였고, 이를 GC분석하였다. 그 결과, BDH:S199A 변이체를 효소로 이용 시, R- 및 S-2-부탄올은 1.23:1의 비율로 생성됨을 확인하였다.

[108] <7-3> 아세트인과 2,3-부탄디올의 형태 확인

[109] 에탄올에서 2-부탄올을 생성하기 위하여, DDH 효소는 (2R, 3R)- 부탄디올과 (2S, 3S)- 부탄디올이 아닌 meso-2,3-부탄디올 만을 부탄온으로 촉매시키므로, 본 발명의 인공 합성 경로에서 생성되는 아세트인 및 2,3-부탄디올의 형태를 확인하였다. 구체적으로, 키랄 칼럼이 장착된 GC 시스템을 사용하여 아세트인과 2,3-부탄디올의 형태를 확인하였다. 그 결과, 기질로서 아세트알데히드를, FLS:L482S 변이 효소를 이용 시, 아세트인은 (3S)-아세트인 및

(3R)-아세토인이고, 이로부터 meso-2,3-부탄디올(65 %) 및 (2R, 3R)-부탄디올(35 %)이 생성됨을 확인하였다.

[110] <7-4> 에탄올에서 2-부탄올으로의 속도 조절 단계(Rate limiting step) 확인 및 DDH의 변이체의 선발

[111] 에탄올에서 2-부탄올으로의 속도 조절 단계를 확인하기 위하여, 100 mM 을 기질로 하고, EtDH:D46G, FLS:L482S, BDH:S199A, 재활성 인자인 dhaR를 포함하는 DDH 및 NOX를 효소로 이용하였다. 구체적으로, 상기 BDH:S199A 또는 재활성 인자인 dhaR를 포함하는 DDH를 1/10의 농도로 줄이고 이를 제외한 나머지 효소는 일정한 농도를 유지하여 3회 반복하고 2-부탄올의 농도(mM)를 확인하였다. 또한, DDH 및 이의 변이체인 S302A, Q337A, F375I, S302A/Q337A, S302A/F375I, Q337A/F375I 및 S302A/Q337A/F375I을 이용한 부탄올의 생성 농도(mM)를 확인하였다. 그 결과, 재활성 인자인 dhaR를 포함하는 DDH의 농도가 낮아졌을 때, 2-부탄올의 생성 농도 또한 79.16%의 현저한 감소가 확인되어, dhaR를 포함하는 DDH는 2-부탄올 생성에 중요한 효소임을 확인하였다. 또한, DDH의 변이 중 Q337A/F375I가 다른 변이체와 비교하여 가장 높은 부탄올 생성 농도가 나타남을 확인하였다. 또한, 상기 DDH의 변이 중 DDH:Q337A/F375I의 단백질 발현을 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과, DDH의 재활성 인자인 dhaR 포함하여 발현함을 확인하였다.

[112] <7-5> 야생형 DDH와 이의 변이 DDH:Q337A/F375I의 구조 및 활성 비교

[113] 야생형 DDH와 이의 변이 DDH:Q337A/F375I의 구조 및 활성을 비교하기 위하여, 100 ns에 대한 분자 역학 시뮬레이션 분석을 사용하여 야생형 DDH와 이의 변이 DDH:Q337A/F375I의 구조적 변화와 효소 활성간의 상관 관계를 확인하였다. 그 결과, 기질인 2,3-부탄디올과 분자 상호 작용은 야생형 DDH에서 활성 부위 잔기 E171이며, 기질과 2.6Å로 결합함을 확인하였다. 그 결과, 기질인 2,3-부탄디올과 분자 상호 작용은 변이 DDH:Q337A/F375I에서 활성 부위 잔기 E171이며, 기질과 1.9Å로 결합함을 확인하였다. 그 결과, 100 ns 분자 역학 분석 결과, 야생형 DDH에서 활성 부위 잔기 E171는 기질과 수소 결합 및 water bridges함을 확인하였고, 변이 DDH:Q337A/F375I에서 활성 부위 잔기 E171는 주로 수소 결합함을 확인하였다. 따라서, 야생형 DDH보다 변이 DDH:Q337A/F375I가 기질과 더 강하게 결합하여 촉매 활성이 뛰어난 것을 확인하였다.

[114] <7-6> 본 발명의 인공 합성 경로를 통한 에탄올에서 2-부탄올의 생성 확인

[115] 본 발명의 인공 합성 경로를 통한 에탄올에서 최종적으로 2-부탄올의 생성을 확인하기 위하여, 50 mM HEPES 버퍼(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 1 mM NADP⁺, 0.88 U mL⁻¹ EtDH:D46G, 0.05 U mL⁻¹ FLS:L482S, 0.98 U mL⁻¹ NOX, 5.11 U mL⁻¹ BDH:S199A, 0.01 U mL⁻¹ DDH:Q337A/F375I, 0.2 mg mL⁻¹ dhaR, 0.1 mM TPP, 1 mM Mg²⁺, 1 mM DTT, 20% DMSO, 1 mM 조효소 B₁₂, 100 mM ATP 및 0-100 mM 에탄올을 포함하는 0.5-mL 반응 혼합물을 30분, 6 시간 처리하는 것으로 무-세포

다중 촉매 시스템을 이용하여 에탄올에서 아세트알데히드, 아세트인, 2,3-부탄디올, 2-부탄온 및 2-부탄올의 생성 농도(mM)를 확인하였다. 그 결과, 이론적 수율 27.24 %의 13.62 mM 2-부탄올이 생성됨을 확인하였다. 또한, 높은 수준의 2,3-부탄디올(최대 32.55 mM)이 반응 액에 축적되는 반면, 부탄온은 반응 과정 중에 검출되지 않음을 확인하였다.

[116] <실시예 8> 본 발명의 인공 합성 경로에서의 최적 효소 및 이의 고유 활성도

[117] 본 발명의 인공 합성 경로에서의 최적 효소와 이의 활성에 영향을 미치는 각 기질 및 조효소를 확인하였다. 또한, 각 효소의 고유 활성도(Specific activity)를 확인하였다. 표 7에 나타낸 바와 같이, EtDH 또는 EtDH:D46G 변이 효소는 기질로서 에탄올, 조효소로서 NAD^+ 을 이용 시, 고유 활성도가 각각 10.64 ± 0.15 , $8.81 \pm 0.13 \text{ U mg}^{-1}$ 임을 확인하였다. 또한, FLS:L482S 변이 효소는 기질로 아세트알데히드, 조효소로 TPP를 이용 시, $0.26 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$ 임을 관찰하였다. 또한, BDH:S199A 변이 효소는 기질로 아세트인 또는 부탄온을 이용하고 조효소로 NADPH 이용 시 각각 51.13 ± 3.74 , $57.55 \pm 2.65 \text{ U mg}^{-1}$ 임을 관찰하였다. dhaR를 포함하는 DDH:Q337A/F375I 변이 효소는 meso-2,3-Butanediol을 기질로, B_{12} 조효소일 때, $0.05 \pm 0.01 \text{ mg}^{-1}$ 이고, NOX 조효소는 O_2 기질, NADH 조효소일 때 $9.83 \pm 0.48 \text{ mg}^{-1}$ 의 고유 활성도가 나타남을 확인하였다.

[118] [표 7]

Enzyme	Substrate/coenzyme	Specific activity (U mg^{-1})
EtDH	Ethanol/ NAD^+	10.64 ± 0.15
EtDH:D46G	Ethanol/ NAD^+	8.81 ± 0.13
FLS:L482S	Ethanol/ NAD^+	1.35 ± 0.01
FLS:L482S	Acetaldehyde/TPP	0.26 ± 0.01
BDH:S199A	Acetoin/NADPH	51.13 ± 3.74
BDH:S199A	Butanone/NADPH	57.55 ± 2.65
DDH:Q337A/F375I with dhaR	meso-2,3-Butanediol/ B_{12}	0.05 ± 0.01
NOX	O_2 /NADH	9.83 ± 0.48

[119] <실시예 9> 아세트인 또는 2,3-부탄디올 생산을 위한 효소의 재순환성

[120] 확인(Recyclability of cascade reactions)

[121] 아세트인 또는 2,3-부탄디올 생산을 위한 효소의 재순환성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-8의 방법에 따라, 아세트인 생산을 위한 각 효소 또는 2,3-부탄디올 생산을 위한 각 효소를 활성 규소 산화물 입자와 혼합하고 이를 12시간, 4도 조건으로 배양하였다. 고정화하기 전에, 규소 산화물 입자(4830HT; Nanostructured & Amorphous Materials, Houston, TX, USA)를 글루타르알데히드(glutaraldehyde) (Sigma)를 포함하는 나노입자를 처리하여 활성화 시키고, 1차-10차 반응 순환하여 고정화 수율(%) 및 고정화 효율(%)을 확인하였다. 그 결과, 고정화된 효소를 이용 시, 효과적으로 에탄올에서 아세트인을 생성함을 확인하였다. 또한, 아세트인 생성을 위한 고정화된 효소를 1차 내지 10차 반응 순환한 결과, 10차 재사용 후에도 초기 1차 아세트인 생성 농도와 비교하여 94 %의 효율이 나타남을 확인하였다. 또한, 고정화된 효소를 이용 시 에탄올에서 2,3-부탄디올을 효과적으로 생성함을 확인하였다. 또한,

2,3-부탄디올 생성을 위한 고정화된 효소를 1차 내지 10차 반응 순환한 결과,
10차 재사용 후에도 초기 1차 2,3-부탄디올 생성 농도와 비교하여 73%의 효율이
나타남을 확인하였다.

[122]

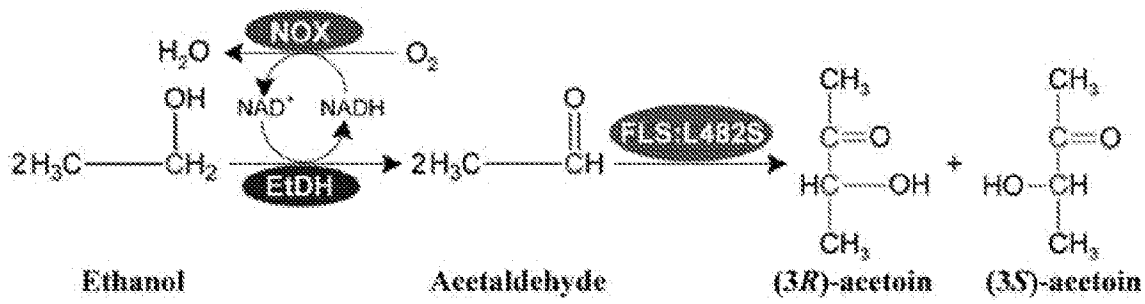
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 8로 표시되는 FLS(formolase) 아미노산에서 482번째 루신이 세린, 아르기닌 및 글루탐산으로 치환된 변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 변이를 포함하는 FLS 변이 아미노산.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 FLS 아미노산에서 482번째 루신이 세린으로 치환된 변이는(FLS:L482S) 서열번호 10의 아미노산으로 표시되고, 482번째 루신이 아르기닌으로 치환된 변이는(FLS:L482R) 서열번호 11의 아미노산으로 표시되며, 482번째 루신이 글루탐산으로 치환된 변이는(FLS:L482E) 서열번호 12의 아미노산으로 표시되는 것을 특징으로 하는, FLS 변이 아미노산.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 FLS 변이 아미노산은 396번째 트레오닌의 변이, 446번째 트레오닌의 변이, 473번째 메티오닌의 변이, 477번째 세린의 변이 및 499번째 루신의 변이로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, FLS 변이 아미노산.
- [청구항 4] 제1항의 FLS 변이 아미노산을 코딩하는 유전자.
- [청구항 5] NOX(NADH oxidase) 유전자, EtDH(ethanol dehydrogenase) 유전자, EtDH의 변이 유전자, FLS(formolase) 유전자, 제2항의 FLS 변이 아미노산을 코딩하는 유전자, BDH(2,3-butanediol dehydrogenase) 유전자, BDH의 변이 유전자, DDH(diol dehydratase) 유전자 및 DDH의 변이 유전자로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 EtDH의 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 EtDH의 46번째 아스파르트산이 글리신으로 치환되고(EtDH:D46G), 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 BDH의 변이체는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 BDH의 199번째 세린이 알라닌으로 치환되고(BDH:S199A), 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 아미노산으로 표시되는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 DDH의 변이체는 서열번호 18의 DDH 아미노산의 302번째 세린이 알라닌으로 치환된 변이체(DDH:S302A); 337번째 글루타민이 알라닌으로 치환된 변이체(DDH:Q337A); 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로 치환된 변이체(DDH:F375I); 으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단일 또는 다중 변이체인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 다중 변이체는 서열번호 18의 DDH 아미노산의 337번째 글루타민이 알라닌 및 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로

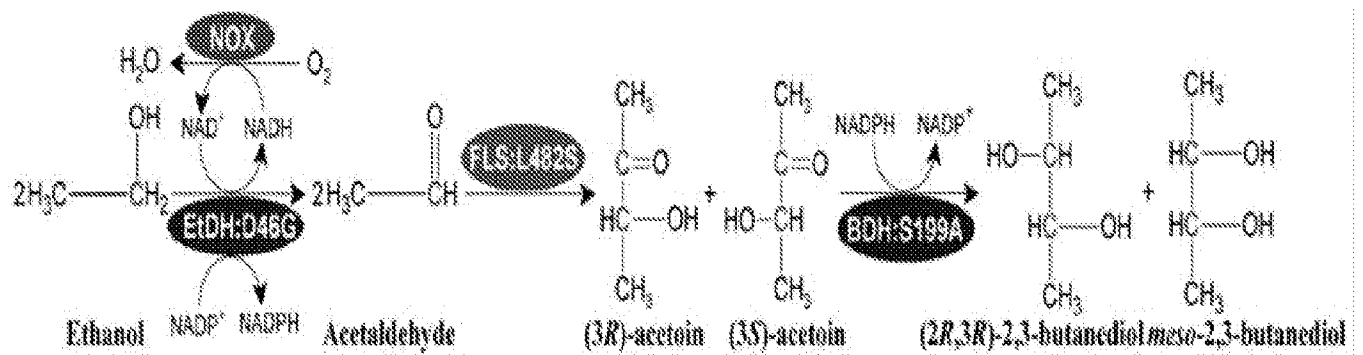
치환된 변이체(DDH:Q337A/F375I); 302번째 세린이 알라닌 및 37번째 글루타민이 알라닌으로 치환된 변이체(S302A/F375I); 또는 302번째 세린이 알라닌으로, 337번째 글루타민이 알라닌으로, 375번째 페닐알라닌이 이소루신으로 치환된 변이체(S302A/Q337A/F375I)인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

- [청구항 10] 제5항에 있어서, 상기 DDH 변이체는 DDH의 재활성 인자(reactivating factor)인 dhaR를 발현하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 11] 제5항의 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물.
- [청구항 12] 제11항의 형질전환 미생물에서 생산된 단백질을 정제하고 반응시키는 단계;를 포함하는 아세트인, 부탄디올 및 부탄올으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 생산 방법.
- [청구항 13] 제11항의 형질전환 미생물에서 생산된 단백질을 나노입자에 고정하고 반응시키는 단계;를 포함하는 아세트인, 부탄디올 및 부탄올으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 생산 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 나노입자는 산화 규소(silicon oxide)를 부착하고 글루타알데히드(glutaraldehyde)와 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

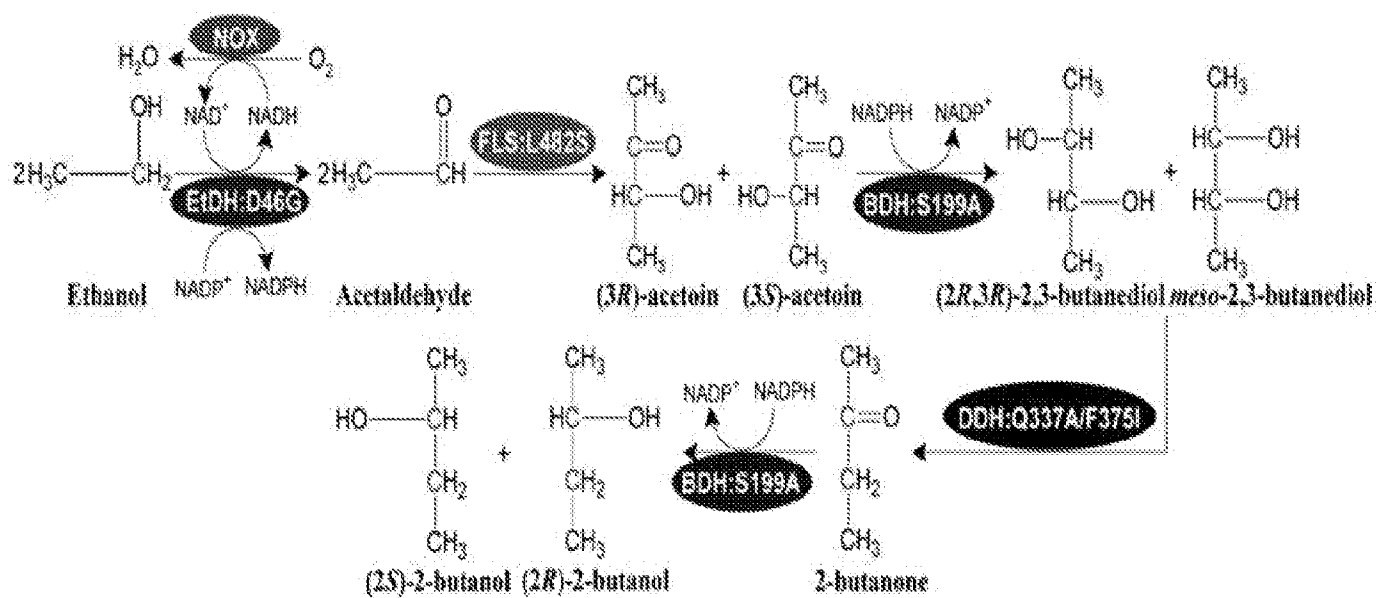
[도1a]



[도1b]



[도1c]



[도2]

