

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 30일 (30.11.2023) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/229318 A1

(51) 국제특허분류:

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006915

(22) 국제출원일:

2023년 5월 22일 (22.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0064225 2022년 5월 25일 (25.05.2022) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul

(KR). 국민대학교 산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION)

[KR/KR]; 02707 서울특별시 성북구 정릉로

77, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 06601

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호, Seoul

(KR). 박용철 (PARK, Yong Cheol); 02707 서울특별시

성북구 정릉로 77 국민대학교 과학관 205호, Seoul (KR).

김동현 (KIM, Dong Hyun); 02843 서울특별시 성북구

고려대로7가길 58, 501호, Seoul (KR). 이자현 (LEE, Ja

Hyun); 04622 서울특별시 중구 필동로6길 17, 104호,

Seoul (KR). 김도연 (KIM, Do Yeon); 22008 인천광역시

연수구 인천타워대로 253-25, 101동 1110호, Incheon

(KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM);

06242 서울특별시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관

5층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84)

지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

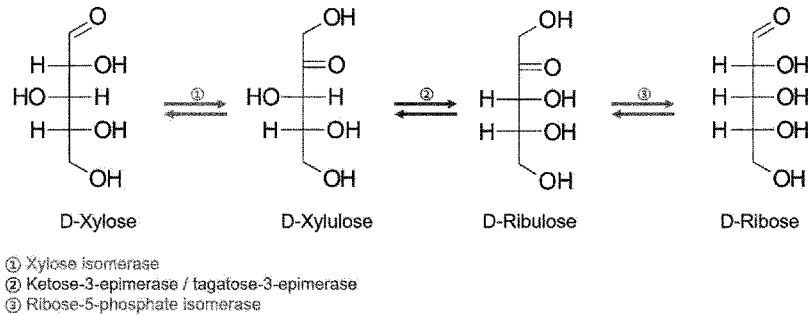
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ENZYMATIC CONVERSION OF D-XYLOSE INTO D-RIBOSE AND D-RIBULOSE-5-PHOSPHATE

(54) 발명의 명칭: D-자일로스의 D-리보스와 D-리불로스-5-인산으로의 효소적 전환



(57) Abstract: The present invention relates to an enzymatic method for producing the energy sugars D-ribose and D-ribulose-5-phosphate at a high yield from D-xylose, which is a sugar commonly available in nature. By utilizing the present invention, it is possible to produce the high-value materials D-ribose and D-ribulose-5-phosphate economically and at high yields.

(57) 요약서: 본 발명은 자연계에서 흔히 이용 가능한 당인 D- 자일로스로부터 에너지당인 D- 리보스와 D- 리불로스-5-인산을 고수율로 생산할 수 있는 효소적 방법에 대한 것으로, 본 발명을 사용함으로써 비용 경제적으로 높은 수율로 고부가가치 물질인 D-리보스 및 D-리불로스-5인산을 생산할 수 있다.



WO 2023/229318 A1

명세서

발명의 명칭: D-자일로스의 D-리보스 와 D-리블로스-5-인산으로의 효소적 전환

기술분야

- [1] 본 발명은 다중효소반응과 ATP 재생성을 이용한 생물공정을 구축하여 자연계에 흔한 당인 D-자일로스로부터 에너지당인 D-리보스와 그 회귀당 유도체인 D-리블로스-5-인산을 효율적으로 생산하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 오늘날 소득수준이 높아지고 소비자의 건강에 대한 인식이 증대됨에 따라 건강 기능성식품 또는 건강보조제 시장이 증가하고 있다. 또한, 여가활동을 즐기는 인구가 증가함에 따라 운동시 섭취하는 다양한 스포츠 식품 및 음료가 출시되고 있다. 이미 미국, 유럽 및 일본에서는 스포츠 식품을 운동선수뿐만 아니라, 영양보충이 필요한 일반인도 쉽게 이용할 수 있도록 대중화되어 있다. 그 중, 에너지음료가 대표적인 예라고 할 수 있는데, 에너지음료는 기능성 음료의 범주에 포함되어 에너지를 보충하기 위한 목적으로 마시는 음료로 정의하고 있다. 이러한 에너지 음료는 크게 두가지로 분류할 수 있는데, 첫째, 에너지 음료는 체내로 쉽고 빠르게 에너지를 흡수할 수 있도록 높은 칼로리를 가지는 당들을 함유하고 있는 경우이다. 두번째, 에너지 음료는 체내의 대사작용을 활발하게 하기 위해, 카페인, 타우린 및 각종 아미노산들을 함유하는 경우이다. 오늘날, 시판 중에 있는 에너지 음료의 대부분은 후자에 속하는데, 학생 또는 운동하는 사람들이 과량을 섭취했을 때, 카페인 중독과 같은 부작용이 나타날 수도 있다.
- [3] D-리보스는 5개의 탄소로 이루어진 5탄당으로 에너지당이라고 일컫는데, 이것의 유도체들은 모든 생물체에 존재한다. 예를 들면, 에너지를 제공하는 물질인 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 비롯하여 이와 관련된 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP), 아데노신 일인산(adenosine monophosphate, AMP), 리보핵산(ribonucleic acid, RNA), 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA), 에너지 대사에 필요한 보조인자들인 NAD(H), NADP(H), FAD 등이 있다. 이렇듯 D-리보스는 생물체에 중요한 역할을 하는 물질들의 전구체 및 유도체로서, 이를 섭취함으로써 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 예를 들어, D-리보스는 세포내 미토콘드리아의 필수적인 성분으로 세포기능을 개선시켜 주는 효능을 나타내며, 운동에 의한 스트레스로부터 탁월한 회복 능력 및 심혈관계 질환 개선 등을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 ATP 재생을 향상시켜 탁월한 피로 개선효과를 나타낸다는 보고가 있어 기능성 화장품 소재로도 이용될 수 있다.
- [4] D-리블로스-5-인산은 케토-슈가인 D-리블로스의 5 번째 탄소가 인산화된 물질로 동물, 식물 그리고 세균 등에 널리 존재하는 오탄당 인산 경로의 주요한 기질이다. 오탄당 인산 경로는 주로 세포 성장에 필수적인 환원력과 전구체를 제공하

기 때문에 D-리블로스-5-인산은 대사경로의 원리와 조절기능을 조사하는데 아주 중요한 물질이다. 따라서 D-리블로스-5-인산은 암 세포의 오탄당 인산 경로의 억제를 위한 신약물질의 개발과 합성이 어려운 그람-음성 박테리아 지질 단백질의 구성성분 중 하나인 3-데옥시-D-만노-옥트-2-올로손산 (KDO) 합성의 전구체로 사용될 수 있다. 그러나, 현재 D-리블로스-5-인산은 1mg 당 약 10만원 이상의 높은 가격에 판매되고 있기 때문에 다양한 연구에 사용하기가 어려운 실정이다.

- [5] 이러한 가능성들로 말미암아 저렴한 시작물질을 이용하여 D-리보스와 그 유도체 중 하나인 D-리블로스-5-인산을 효율적으로 합성할 수 있는 시스템을 구현하는 것은 산업적으로 굉장히 유망하다.
- [6] 화학적 방법으로는 D-리보스와 D-리블로스-5-인산을 합성하기 어렵기 때문에 생물공학적인 방법으로 위 두 물질을 합성하려는 시도가 있었다. D-리보스의 경우, 유전자 조작된 미생물에 육탄당인 D-글루코스를 기질로 사용하여 생산하였으나 생산성과 효율이 낮은 문제가 있었다.
- [7] 이에 본 발명자들은 자연계에 흔하게 존재하는 D-자일로스를 기질로 사용하여 이를 각각 D-리보스와 이의 유도체인 D-리블로스-5-인산으로 전환하는 다중효소공정을 설계하고, D-리블로스-5-인산의 합성 과정에서 사용되는 ATP를 재생성하는 효소공정을 추가하여 비용 경제적으로 두 생성물을 고수율로 생산함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8] [선행기술문헌]

[9] [비특허문헌]

[10] (비특허문헌1) J Ind Microbiol Biotechnol (2015) 42:1117-1128

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 기질로 D-자일로스를 사용하여 D-리보스 또는 이의 유도체인 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 효소 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 기질로 D-자일로스를 사용하여 D-리보스 또는 이의 유도체인 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 효소적 전환방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 본 발명은 D-자일로스를 기질로 사용하여 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산을 생산하는 새로운 효소적 전환 방법을 제공한다.
- [14] 상기 D-자일로스는 D-리보스, D-리블로스-5-인산과 같은 오탄당으로, 식물체의 구조체를 구성하는 목질계 바이오매스 종류의 하나인 헤미셀룰로스의 주요 구성성분이다. 이것은 기본적으로 25-35%(목섬유의 경우) 또는 40%(초질섬유의 경우) D-자일로스를 포함하고 있어 D-자일로스는 자연계에 굉장히 흔하게 존재하는 당이다.

- [15] 본 발명에서 목적하는 생산물들이 오탄당인 D-리보스와 그 유도체인 D-리블로스-5-인산이기 때문에 같은 개수의 탄소를 가지는 다른 오탄당을 기질로 사용하는 것이 육탄당인 글루코즈 등을 사용하여 합성하는 것보다 높은 이론적 수율을 얻을 수 있고 또한, 최근 기후변화의 극복을 위해 공정 중 탄소의 배출을 최소화할 수 있는 방법이 각광받고 있는 상황에서 더 적합한 기질이다. 현재 D-자일로스의 가격은 kg 당 3만원선으로 다른 오탄당 기질인 L-아라비노스의 경우 kg 당 가격이 220만원 인 것을 감안하면 경제적인 측면에서도 D-자일로스가 더 적합한 기질이라고 할 수 있다.
- [16] 이에 따라, 구체적으로 본 발명은
- [17] 1) D-자일로스를 기질로 사용하는 자일로스 이성질화 효소에 의해 D-자일로스가 D-자일롤로스로 전환되는 단계;
- [18] 2) 상기 생산된 D-자일롤로스를 기질로 사용하는 케토스 3-에피머화 효소에 의해 D-자일롤로스가 D-리블로스로 전환되는 단계; 및
- [19] 3) 상기 생산된 D-리블로스를 기질로 사용하는 리보스-5-인산 이성질화 효소에 의해 D-리블로스가 D-리보스로 전환되는 단계를 포함하는 D-자일로스로부터 D-리보스의 효소적 생산 방법을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은
- [21] 1) D-자일로스를 기질로 사용하는 자일로스 이성질화 효소에 의해 D-자일로스가 D-자일롤로스로 전환되는 단계;
- [22] 2) 상기 생산된 D-자일롤로스를 기질로 사용하는 케토스 3-에피머화 효소에 의해 D-자일롤로스가 D-리블로스로 전환되는 단계; 및
- [23] 3) 상기 생산된 D-리블로스를 기질로 사용하는 L-리블로스 인산화 효소에 의해 ATP 및 D-리블로스가 D-리블로스-5-인산으로 전환되는 단계를 포함하는 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산의 효소적 생산 방법을 제공한다.
- [24] 상기 D-리블로스-5-인산의 효소적 생산 방법에 있어서, D-리블로스를 D-리블로스-5-인산으로 전환하는 과정에 인산 전달을 위해 일반적으로 ATP를 보조 기질로 사용할 수 있으나, ATP는 고가의 기질로 경제성이 떨어지는 문제가 있었다. 이에 본 발명자들은 위 문제를 해결하기 위하여 효소적으로 ADP를 ATP로 재생성하면, 전체 공정에서 ATP가 차지하는 비용을 크게 줄일 수 있기 때문에 ADP 및 ATP가 계속적으로 순환됨으로써 ATP가 재생되어 D-리블로스를 D-리블로스-5-인산으로 전환하는 과정에 적용될 수 있도록 한 것이다. 구체적으로, 효소적 ATP 재생성에 사용되는 효소로는 다중인산 인산화 효소, 글리세롤-3-인산 인산화효소, 아세트산 인산화효소, 피루브산 인산화효소 및 카르바미산 인산화효소 등이 제한없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 저가의 기질인 HMP(hexametaphosphate)를 이용하여 ADP를 ATP로 전환할 수 있는 다중 인산 인산화 효소를 사용할 수 있다.

- [25] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 다중 인산 인산화 효소를 사용함으로써 높은 수율로 ATP를 재생합과 동시에 목적물인 D-리블로스-5-인산을 고수율로 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [26] 본 발명의 상기 D-자일로스로부터 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산을 합성하는 효소적 생산 방법은 각 단계가 복수의 공정으로 분리되어 순차적으로 수행되거나, 단일 공정으로 한번에 수행될 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, 본 발명은 D-자일로스로부터 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산의 합성을 단일 공정으로 수행하기에 적합한 효소의 선택 및 효소적 전환 조건을 확립함으로써 시간 및 비용 경제적이며 높은 수율로 상기 목적물을 생산하는 것을 가능케 하였다.
- [27] 본 명세서에서 사용된 용어 “단일 공정”이란 D-자일로스로부터 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산이 합성되기 위한 모든 중간 공정들이 하나의 배양기 내에서 수행되는 것을 의미하며, 즉, 상기 목적물의 합성에 이용되는 다양한 기질 및 효소가 한번에 배양기에 주입되어 공정이 수행되는 것을 의미할 수 있다.
- [28] 따라서, 본 발명의 단일 공정 방법은 다양한 복수의 효소가 사용된다는 점에서 모든 효소의 활성을 유도할 수 있는 온도 조건과 기질 뿐만 아니라 효소들의 함량 및 비율을 조절하는 것이 중요하다.
- [29] 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리보스를 합성하는 효소적 단일 공정은 40 내지 55°C에서 수행되는 것이 바람직하며, D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 합성하는 효소적 단일 공정은 30 내지 45°C에서 수행되는 것이 바람직하다. 상기 온도 범위 외에서는 효소의 활성 감소로 인한 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산의 생산 수율이 떨어질 수 있다.
- [30] 본 발명의 D-리보스 또는 D-리블로스-5-인산의 합성을 위한 최초 기질인 D-자일로스의 농도는 1 내지 10 mM일 수 있으며, 바람직하게는 5 mM 내지 10 mM일 수 있다.
- [31] 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리보스의 효소적 생산 방법에서 자일로스 이성질화 효소 : 케토스 3-에피머화 효소 : 리보스-5-인산 이성질화 효소의 함량 비는 각 효소의 unit을 기준으로 1 : 0.1 내지 0.5 : 0.8 내지 1일 수 있다.
- [32] 본 발명의 상기 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산의 효소적 생산 방법에서, 상기 단계 3)에서 L-리블로즈 인산화 효소 및 다중 인산 인산화 효소의 함량 비는 효소의 unit 기준으로 1 : 0.5 내지 2일 수 있다.
- [33] 상기 자일로스 이성질화 효소는 기질인 D-자일로스를 D-자일룰로스로 전환시키는 효소로, *Bacteroides plebeius*로부터 유래한 자일로스 이성질화 효소(*Bp* XylA)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 일 실시예에서 사용된 자일로스 이성질화 효소는 서열번호 1로 이루어진 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 서열번호 2로 이루어진 염기 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [34] 상기 D-싸이코스 이성질화 효소는 기질인 D-자일룰로스를 D-리블로스로 전환시키는 효소로, *Agarobacterium tumefaciens* 유래의 케토스 3-에피머화 효소(*At* Dpe)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 일 실시예에서 사용된

- 케토스 3-에피머화 효소는 서열번호 3로 이루어진 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 서열번호 4로 이루어진 염기 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [35] 상기 리보스-5-인산 이성질화 효소는 기질인 D-리블로스를 D-리보스로 전환시키는 효소로, *Bacteroides plebeius*로부터 유래한 D-리보스-5-인산 이성질화 효소 (*BpRpiB*)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 일 실시예에서 사용된 D-리보스-5-인산 이성질화 효소는 서열번호 5으로 이루어진 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 서열번호 6으로 이루어진 염기 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [36] 상기 L-리블로즈 인산화 효소는 기질인 D-리블로스를 D-리블로즈-5-인산으로 전환시키는 효소로, 대장균으로부터 유래한 L-리블로즈 인산화효소 (*EcAraB*)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 일 실시예에서 사용된 L-리블로즈 인산화효소는 서열번호 7로 이루어진 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 서열번호 8로 이루어진 염기 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [37] 상기 다중 인산 인산화 효소는 기질인 HMP를 이용하여 ADP를 ATP로 전환시키는 효소로, 대장균으로부터 유래한 다중 인산 인산화 효소 (*EcPpk*)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 일 실시예에서 사용된 다중 인산 인산화 효소는 서열번호 9로 이루어진 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 서열번호 10으로 이루어진 염기 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [38] 상기 D-자일로스로부터 D-리보스 또는 D-리블로즈-5-인산의 합성에 이용되는 효소들은 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, 상기 효소들은 이를 암호화하는 핵산 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 효소들의 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나로 표시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [39] 상기 효소들은 상기 효소를 암호화하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.
- [40] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [41] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로

는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR 25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

- [42] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "제조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 제조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)제조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [43] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축적되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [44] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [45] 또한, 본 발명은
- [46] 자일로스 이성질화 효소, 케토스 3-에피머화 효소 및 리보스-5-인산 이성질화 효소를 포함하는 효소 혼합물; 및
- [47] 기질로 D-자일로스를 포함하는 D-리보스 생산용 조성물을 제공한다.
- [48] 아울러, 본 발명은
- [49] 자일로스 이성질화 효소, 케토스 3-에피머화 효소 및 L-리블로즈 인산화 효소를 포함하는 효소 혼합물; 및
- [50] 기질로 D-자일로스를 포함하는 D-리블로즈-5-인산 생산용 조성물을 제공한다.
- [51] 상기 D-리블로즈-5-인산 생산용 조성물은 ATP 재생을 위하여 다중 인산 인산화 효소를 더 포함할 수 있으며, 상기 다중 인산 인산화 효소는 기질인 HMP를 사용하여 ADP를 ATP로 전환시킴으로써 고가인 ATP를 기질로 직접 사용할 때 발생하는 비용적인 문제를 해결할 수 있다.

- [52] 상기 D-리보스 또는 D-리불로스-5-인산 생산용 조성물의 각 효소는 반응을 위하여 순차적으로 또는 동시에 사용될 수 있으며, 구체적으로, 단일 공정을 통한 상기 목적물 제조를 위하여 동시에 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [53] 본 발명은 자연계에서 흔히 이용 가능한 당인 D-자일로스로부터 에너지당인 D-리보스와 D-리불로스-5-인산을 고수율로 생산할 수 있는 효소적 방법에 대한 거것으로 본 발명을 사용함으로써 비용 경제적으로 높은 수율로 고부가가치 물질인 D-리보스 및 D-리불로스-5인산을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [54] [도 1]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리보스로 전환하기 위한 다중효소반응의 모식도이다.
- [55] [도 2]는 본 발명의 재조합 효소들의 발현 및 정제를 확인한 SDS-PAGE 젤 사진들이다. (a)는 D-자일로스로 D-리보스를 생산하는 다중효소공정에 사용된 *BpXylA*, *AtDpe* 및 *BpRpiB*의 SDS-PAGE 젤 사진들이며 (b)는 D-자일로스로 D-리불로스-5-인산을 생산하는 *BpXylA*, *AtDpe*, *EcAraB* 및 *EcPpk*의 SDS-PAGE 젤 사진이다. 재조합 단백질들은 *Bacteroides plebeius* 유래이고, *AtDpe* 재조합 단백질은 *Agarobacterium tumefaciens* 유래이다. 마지막으로 *EcAraB*와 *EcPpk*는 *Escherichia coli* 유래이다.
- [56] [도 3]은 본 발명의 *BpXylA*의 기본적인 특징들에 대한 결과이다. (a)는 최적활성온도, (b)는 최적활성 pH, (c)는 금속이온 효과 그리고 (d)는 열안정성을 측정한 결과이다.
- [57] [도 4]는 본 발명의 *BpXylA*의 열안정에 대한 금속이온의 효과에 대한 결과이다. (a)는 Mg^{2+} 를 첨가, (b)는 Co^{2+} 첨가 및, (c)는 Mn^{2+} 첨가한 상태에서 열안정성을 측정한 결과이다.
- [58] [도 5]는 본 발명의 *BpXylA*의 기본적인 특징들에 대한 결과이다. (a)는 최적활성온도, (b)는 최적활성 pH, (c)는 금속이온 효과 그리고 (d)는 열안정성을 측정한 결과이다.
- [59] [도 6]은 D-자일로스로부터 D-리보스를 생산하기 위해 각각의 재조합 효소들의 사용량을 최적화한 결과이다. (a)는 기질인 자일로스에 대한 *BpXylA*의 최적효소량을 알아보기 위해, *BpXylA* 효소량을 달리해가며 반응산물인 D-자일룰로스의 생성 프로파일을 나타낸 결과이다. (b)는 (a)결과에서 선정된 *BpXylA* 효소량에 해당하는 *BpXylA* 양과 함께 *AtDpe*의 최적효소량을 알아보기 위해, *AtDpe* 효소량을 달리해가며 기질인 D-자일로스로부터 반응산물인 D-리불로스의 생성 프로파일을 나타낸 결과이다. (c)는 (a) 및 (b)결과들에서 선정된 *BpXylA* 및 *AtDpe* 효소들의 양에 해당하는 *BpXylA* 및 *AtDpe*와 함께 *BpRpiB*의 최적효소량을 알아보기 위해, *BpRpiB* 효소량을 달리해가며 기질인 D-자일로스로부터 최종반응산물인 D-리보스의 생성 프로파일을 나타낸 결과이다.

- [60] [도 7]은 [도 6]에서 결정된 *BpXylA*, *AtDpe* 및 *BpRpiB*의 최적효소량 조건에서 다중효소공정의 반응 온도를 달리하여 기질인 D-자일로스로부터 반응산물인 D-리블로스의 생성 프로파일을 나타낸 결과이다.
- [61] [도 8]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산으로 전환하기 위한 다중효소반응의 모식도이다.
- [62] [도 9]는 본 발명의 *EcAraB*의 기본적인 특징들에 대한 결과이다. (a)는 최적활성 온도, (b)는 최적활성 pH, (c)는 금속이온 효과 그리고 (d)는 열안정성을 측정한 결과이다.
- [63] [도 10]은 본 발명의 *EcPpk*의 기본적인 특징들에 대한 결과이다. (a)는 최적활성 온도, (b)는 최적활성 pH, (c)는 금속이온 효과 그리고 (d)는 열안정성을 측정한 결과이다.
- [64] [도 11]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 금속보조인자의 비율을 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [65] [도 12]는 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 결정된 두 금속보조인자의 총량을 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [66] [도 13]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 HMP의 농도를 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [67] [도 14]는 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 ATP의 농도를 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [68] [도 15]는 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 ATP의 농도를 달리하였을 때 각 농도별로 재생성과정을 통해 재사용된 ATP의 TTN을 나타낸 결과이다.
- [69] [도 16]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 *EcAraB*에 대한 *EcPpk*의 비율을 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [70] [도 17]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 *BpXylA*와 *AtDpe*에 대한 *EcAraB*와 *EcPpk*의 양을 달리하여 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.
- [71] [도 18]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 기질인 D-자일로스의 농도를 변화시켰을 때 D-리블로스-5-인산의 생성량과 수율을 나타낸 결과이다.
- [72] [도 19]는 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서 전체 효소의 총량을 변화시켰을 때 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 나타낸 결과이다.

- [73] [도 20]은 본 발명의 D-자일로스로부터 D-리불로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소 공정에서 반응 온도를 달리하여 D-리불로스-5-인산의 수율을 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [74] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[75]

- [76] [실시예 1] 본 발명에서 사용하는 재조합 효소인 **BpXylA**, **AtDpe**, **BpRpiB**, **EcAraB** 및 **EcPpk**의 클로닝, 과발현 및 정제

- [77] 본 발명에서는 자연계에서 흔한 D-자일로스를 이용하여 에너지당인 D-리보스를 생산하기 위해 다중효소반응을 이용하였다. [도 1]과 같이 자일로스를 자일로스 이성화 효소를 이용하여 D-자일룰로스로 전환하고, 케토스 3-에피머화 효소를 이용하여 D-자일룰로스를 D-리불로스로 전환한 다음, 최종적으로 D-리보스 5-인산 이성질화 효소를 이용하여 D-리불로스를 D-리보스로 전환한다. 이러한 일련의 반응을 위해, 인간의 장내에 서식하는 장내미생물로 알려진 *Bacteroides plebeius*로부터 자일로스 이성화 효소(**BpXylA**) 및 D-리보스-5-인산 이성질화 효소(**BpRpiB**)를 클로닝하여 재조합 효소들을 확보하였다. 또한, 이미 한국 식품의약품안전처에서 D-싸이코스 생산을 위해 허가를 받은 *Agarobacterium tumefaciens* 유래의 케토스 3-에피머화 효소(**AtDpe**)의 재조합 효소를 확보하였다.

- [78] D-자일로스로부터 D-리불로스-5-인산을 생산하기 위한 다중효소공정에서는 D-리보스를 생성하기 위한 공정과는 다르게 D-리불로스를 D-리보스로 전환하는 D-리보스-5-인산 이성질화 효소(**BpRpiB**)를 사용하는 대신, D-리불로스를 ATP를 소모하여 D-리불로스-5-인산과 ADP로 전환하는 L-리불로즈 인산화효소 (**EcAraB**)와 다중인산 염의 인산분자를 ADP로 전달하여 ATP를 재생성하는 다중인산 인산화효소 (**EcPpk**)를 클로닝하여 재조합 효소들을 확보하였다. 우선 **BpXylA** 및 **BpRpiB**의 재조합 단백질을 얻기 위해, 상용화 DNA 분리 도구(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 *B. plebeius*의 게놈 DNA를 추출하고 PCR를 통해 각각의 표적 유전자 BACPLE_02265(accession number: B5CZU8) 및 BACPLE_02208(accession number: B5CZP2)를 증폭하였다. 이 때, 사용한 프라이머들은 **BpXylA**을 위해, 정방향으로 ATACATATGATGGCAACAAAAGAGTAC TTT(서열번호 11), 역방향으로 ATAGCGGCCGCGCAATACAT ATTTACAATAGCCTC(서열번호 12)의 프라이머를 사용하였고, **BpRpiB**을 위해, 정방향으로 ATGCATATGATGAAAACAATA GGACTTGCATCCGACCA(서열번호 13), 역방향으로 ATAGCGGCCGCTCGAACGGGAATTTTG T CGATGCG(서열번호 14)의 프라이머를 사용하였다. **AtDpe**의 재조합 단백질을 얻기 위해 클로닝 할 때, 사용한 프라이머는 정방향으로

ATACATATGAAACACGGCATCTATTATTCTTACTGGG(서열번호 15), 역방향으로 ATAGCGGCCGCGCCACCAAGAACGAAGCG(서열번호 16)의 프라이머를 이용하여 표적 유전자인 ATU4750(accession number: A9CH28)을 PCR를 통해 증폭시켰다.

- [79] EcAraB 및 EcPpk의 재조합 단백질을 얻기 위해, 상용화 DNA 분리 도구(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 E. coli K12의 게놈 DNA를 추출하고 PCR을 통해 각각의 표적 유전자 b0063(accession number: P08204) 및 b2501(accession number: P0A7B1)을 증폭하였다. 이 때, 사용한 프라이머들은 EcAraB을 위해 정방향으로 ATAGAGCTCATGGCGATTGCAATTGGCCT(서열번호 17), 역방향으로 ATAGCGGCCGCTAGAGTCGCAACGGCCTG(서열번호 18)의 프라이머를 사용하였고, EcPpk를 위해 정방향으로 ATACATATGGGTCAGGAAAAGCTATACATCG(서열번호 19), 역방향으로 ATAGCGGCCGCTTCAGGTTGTTCGAGTGATTTG(서열번호 20)의 프라이머를 사용하였다. 이렇게 얻은 PCR 산물들은 pET21 α 벡터에 라이게이션을 시켰는데, 이때 사용한 제한효소는 EcAraB를 제외하고는(SacI 및 NotI 사용) NdeI 및 NotI를 사용하였으며 이렇게 제작된 재조합 플라스미드들을 Escherichia coli DH5 α 에 형질전환하였다.
- [80] 확보한 유전자의 과발현을 위해, QIAprep Spin Miniprep 도구(Qiagen)를 사용하여 재조합 플라스미드를 정제한 후, 단백질 발현용 숙주인 E. coli BL21(DE3)에 형질전환하였다.
- [81] 재조합 유전자를 과발현하기 위해, 각 플라스미드를 가지고 있는 E. coli BL21(DE3)를 100 μ g/ml 엠포실린을 포함한 Luria-Bertani(LB) 배지, 37°C 조건에서 600 nm 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양 후, 유도 온도 16°C 조건에서 0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 16시간 동안 단백질을 과발현시켰다. 이후 원심분리를 통해 세포를 회수하여 초음파파쇄기(Branson Ultrasonics 450, Branson Ultrasonics corp., Danbury, CT, USA)로 분쇄한 후, 원심분리기(Combi-514R, Hanil Science Industrial, Daejeon, Korea)로 원심 분리하여 상층액을 획득하였다. 상층액은 HisTrap 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, USA)에 통과시켜 재조합 단백질을 정제한 후, SDS-PAGE 젤로 재조합 단백질의 크기 및 정제 정도를 확인하였으며[도 2 (a), (b)], bicinchoninic acid(BCA) protein assay 도구(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.
- [82]
- [83] [실시예 2] *BpXylA*의 반응최적조건
- [84] *BpXylA*의 최적반응조건을 알아보기 위해, 최적반응온도, pH 및 금속이온에 대한 효과를 살펴보았다. *BpXylA*의 표준반응조건은 10 mM D-자일로스 및 1 mM Mg²⁺을 포함하는 50 mM sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액에 1.09 U/ml의 *BpXylA* 과 함께 50°C에서 10분 간 반응시키는 것으로 설정하였으며. 후술할 *BpXylA*의 반응최적조건은 모두 표준반응조건에서 실험하여 결정되었다. 효

소반응은 95°C에서 5분 간 불활성화 시킨 후 생성된 D-자일룰로스를 Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, California, USA) 컬럼으로 정량하여 효소활성을 계산하였고 1분간 1 μ mol 만큼의 D-자일룰로스를 생성시키는 *Bp* XylA의 양(mg)을 1 Unit으로 정하였다.

- [85] 먼저, *Bp*XylA의 최적온도조건을 알아보기 위하여 다양한 온도 조건에서 표준 반응조건으로 반응시켰다. 그 결과, [도 3 (a)]와 같이 *Bp*XylA의 효소 활성 최적 온도는 50°C로 나타났다. *Bp*XylA의 최적 pH를 알아보기 위해 다양한 완충용액을 이용하여 pH를 달리해가며 반응시켰다. *Bp*XylA의 최적 pH는 [도 3 (b)]와 같이 sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *Bp*XylA의 활성에 대한 금속이온의 효과를 살펴보기 위해서, 효소와 금속이온이 충분히 평형 상태가 되도록 반응 전 4°C에서 20분 동안 전배양을 해주었고, 금속이온을 넣지 않은 조건을 대조군으로 하여 상대활성을 측정하였다. 그 결과, [도 3 (c)]와 같이 Co^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 을 넣어준 조건에서 효소활성이 크게 증가하였고, 특히 Mg^{2+} 을 넣어준 조건에서 가장 높은 활성($876.98 \pm 35.30\%$)을 나타냈다. *Bp*XylA에 대한 열안정성을 살펴보기 위해서, 다양한 온도조건에서 일정시간동안 효소를 정치시킨 후, 표준반응조건에서 반응시켰다. 열처리에 의한 효소활성의 감소는 정치시키지 않은 효소의 활성을 대조군으로 설정하여 상대 활성의 감소를 계산하였다. 그 결과, [도 3 (d)]와 같이 40°C까지는 90분까지 효소 활성이 크게 감소하지 않았으나, 50°C에서 15분 동안 약 $29.29 \pm 1.43\%$ 까지 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 *Bp*XylA의 최적 활성은 50°C에서 나타나지만, 효소의 3차 구조가 불안정해지기 때문에, 50°C 이상의 온도에서 활성이 급격히 떨어지는 것으로 생각된다.

[86]

[87] [실시예 3] *Bp* XylA의 열안정성에 대한 금속이온의 효과

- [88] [도 3 (d)]에서 Co^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 을 보조인자로 사용했을 때 *Bp*XylA이 높은 효소 활성을 나타냈기 때문에 위 금속이온들이 *Bp*XylA의 열안정성에 미치는 영향을 살펴보았다. 이를 알아보기 위해서, 1 mM농도에 해당하는 각각의 금속이온을 효소와 함께 다양한 온도조건에서 배양하였다. 그 결과, [도 4]와 같이 금속이온 없이 배양했을 때 보다, 금속이온과 함께 배양했을 때 더 높은 열안정성을 보였다. Mg^{2+} [도 4 (a)]의 경우, 열안정성이 높아졌으나 50°C이상에서 시간이 지남에 따라 상대활성이 감소하는 것을 확인하였다. Co^{2+} 및 Mn^{2+} 의 경우, 50°C에서 90분까지 상대활성이 안정하게 유지되었으며 Mn^{2+} 의 경우는 60°C에서도 안정한 것으로 나타났다[도 4 (b), (c)]

[89]

[90] [실시예 4] *Bp* XylA의 기질특이성

- [91] 본 발명에서 사용하는 *Bp*XylA가 D-자일로스로부터 D-리보스를 생산하기에 적합한 효소인지 알아보기 위하여 *Bp*XylA의 다양한 알도- 및 케토-당들에 대한 기

질 특이성을 살펴보았다[표1] 실험은 표준반응조건에서 2 mM 농도의 다양한 알도- 및 케토-당들을 기질로 하여 진행하였으며 D-자일로스에 대한 활성을 기준으로 다른 기질들에 대한 상대 활성을 나타냈다. 그 결과, 알도-당들의 경우, D-자일로스 및 D-리보스에만 활성이 있는 것으로 나타났고, 케토-당들의 경우, *BpXylA*가 활성을 나타내는 알도-당들에 상응하는 D-자일룰로스 및 D-리불로스에만 활성이 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에서 D-자일로스로부터 D-리보스를 생산하기 위해 *BpXylA*는 충분히 적용 가능하다.

[92]

[93] [표1]

*BpXylA*의 기질 특이성

Substrate		Relative activity (%)
Aldose	D-Arabinose	Not detected
	L-Arabinose	Not detected
	D-Glucose	Not detected
	D-Mannose	Not detected
	D-Ribose	33.2 ± 1.1
	D-Xylose	100 ± 2.2
Ketose	D-Fructose	Not detected
	D-Ribulose	13.9 ± 13.8
	L-Sorbose	Not detected
	D-Tagatose	Not detected
	D-Xylulose	156.5 ± 2.2

[94] [실시예 5] *BpRpiB*의 반응최적조건

[95] *BpRpiB*의 최적반응조건을 알아보기 위해, 최적반응온도, pH, 금속이온에 대한 효과 및 열안정성을 살펴보았다. *BpRpiB*의 표준반응조건은 2 mM D-리불로스를 포함하는 완충용액에 0.8 U/ml의 *BpRpiB* 단백질과 함께 50°C에서 10분 간 반응시키는 것으로 설정하였으며, 후술할 *BpRpiB*의 반응최적조건은 모두 표준반응조건에서 실험하여 결정되었다. 효소반응은 95°C에서 5분 간 불활성화시킨 후 생성된 D-리불로스를 Cysteine-carbazole reaction²³ 으로 540 nm에서 흡광도(xMark microplate reader, Bio-Rad, Hercules, California, USA)를 측정하여 효소활성을 계산하였고 1분간 1 μmol 만큼의 D-리불로스를 생성시키는 *BpRpiB*의 양(mg)을 1 Unit으로 정하였다.

[96] 먼저, *BpRpiB*의 최적온도조건을 알아보기 위하여 다양한 온도 조건에서 표준 반응조건으로 반응시켰다. 그 결과, [도 5 (a)]와 같이 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *BpRpiB*의 활성에 대한 최적 pH를 알아보기 위해 다양한 완충용액을 이용하여 pH를 달리해가며 반응시켰다. 그 결과, [도 5 (b)]와 같이 sodium phosphate (pH 7.0)에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *BpRpiB*의 활성에 대한 금속이온의 효과를 살펴보기 위해서, 효소와 금속이온이 충분히 평형상태가 되도록 반응 전 4°C에서 20분동안 전배양을 해주었고, 금속이온을 넣지 않을 조건을 대조군으로 두었다. 그 결과, [도 5 (c)]와 같이 특정 금속이온에 대한 효소 활성의 상승효과는 없었으며 오히려 Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 에 활성이 크게 저해되는 것으로 나타나 *BpRpiB*는 금속이온을 보조인자로 사용하지 않는 효소인 것으로 판단된다. *BpRpiB*의 열안정성을 살펴보기 위해서, 다양한 온도조건에서 일정시간동안 효소를 정치시킨 후, 표준반응조건에서 반응시켰다. 열처리에 의한 효소활성의 감소는 정치시키지 않은 효소의 활성을 대조군으로 설정하여 상대 활성의 감소를 계산하였다. 그 결과, *BpRpiB*의 활성은 60°C까지는 대체로 안정하다가, 70°C에서 급격하게 활성이 떨어지는 것으로 나타났다[도 5 (d)].

[97]

[98] [실시예 6] *Bp RpiB*의 기질특이성

[99] 본 발명에서 사용하는 *BpRpiB*는 본래 인산화된 당인 D-리불로스-5-인산을 기질로 하여 D-리보스-5-인산으로 전환하는 역할을 하는 효소로 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는 *BpRpiB*의 원래 기질인 D-리불로스-5-인산과 D-리보스-5-인산뿐만 아니라 D-리보스와 D-리불로스에 대한 *BpRpiB*의 활성을 확인하기 위해 다양한 알도- 및 케토- 당들에 대한 *BpRpiB*의 기질 특이성을 살펴보았다[표 2]. 실험은 표준반응조건에서 2 mM 농도의 다양한 알도- 및 케토- 당들을 기질로 하여 진행하였으며 D-자일로스에 대한 활성을 기준으로 다른 기질들에 대한 상대 활성을 나타냈다. 그 결과, *BpRpiB*는 원래 기질인 D-리불로스-5-인산과 D-리보스-5-인산을 제외하면 오직 D-리보스 및 D-리불로스에만 반응하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에서 D-자일로스로부터 D-리보스를 생산하기 위해, 다중효소공정의 최종 반응단계인 D-리불로스로부터 D-리보스로 전환하는 효소로 충분히 적용 가능하다.

[100]

[101] [표2]

***Bp RpiB*의 기질특이성**

Substrate		Relative activity (%)
Aldose	D-Ribose-5-phosphate	933.9 ± 11.7
	D-Arabinose	Not detected
	L-Arabinose	Not detected

	D-Glucose	Not detected
	D-Mannose	Not detected
	D-Ribose	79.1 ± 0.4
	D-Xylose	Not detected
Ketose	D-Ribulose-5-phosphate	924.4 ± 33.7
	D-Fructose	Not detected
	D-Ribulose	100 ± 4.8
	L-Sorbose	Not detected
	D-Tagatose	Not detected
	D-Xylulose	Not detected

[102] [실시예 7] 각 효소들의 최적 사용량 선정

[103] 여러 개의 효소를 이용한 다중효소공정에서는 각 효소의 반응속도가 다르기 때문에 기질의 양에 맞는 각 효소의 적절한 효소 양과 각 효소양의 비율을 특정하는 것이 공정비용을 줄일 수 있다. 또한 본 발명에서 D-리보스를 생성하기 위하여 설계한 다중효소공정은 모두 이성질화 반응을 촉매하는 효소들이기 때문에 각 반응물과 생성물들이 동적 평형을 이루면 더 이상 생성물이 생성되지 않는다. 따라서, D-자일로스로부터 D-리보스를 생산함에 있어 다중효소반응의 각 단계에서 반응물과 생성물이 평형에 도달하는 것을 살펴보고, 설계한 다중효소 공정이 이론적 최대 수율인 평형상태에 도달할 수 있도록 각 효소별로 최적의 효소량을 선정하였다[도 6].

[104] 다중효소의 반응 조건은 10 g/L D-자일로스 기준 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에서 반응하였다. 반응온도는 *AtDpe*가 선행연구에서 효소의 열 안정성이 45°C에 비해 50°C에서 급격히 감소²⁵하기 때문에 다중효소 공정 중 효소들의 안정성이 유지되도록 45°C로 설정하였다. 금속보조인자의 경우 *BpXylA*의 열 안정성이 Co²⁺를 보조인자로 사용한 조건에서 크게 증가하고, *AtDpe*가 Mg²⁺는 보조인자로 사용하지 못하기 때문에 Co²⁺를 효소공정의 보조인자로 선택하였다. 반응 중 생성되는 각 당(D-자일로스, D-자일룰로스, D-리불로스, D-리보스)들은 Shodex SP0810(8 X 300 mm, Showa denko, Tokyo) 컬럼으로 정량하였다.

[105] 첫번째 반응인 D-자일로스로부터 D-자일룰로스로의 전환을 위해, 10 g/L의 D-자일로스 기질에 대하여 *BpXylA*을 다양한 농도로 45°C에서 반응시켜 살펴본 결과, [도 6 (a)]와 같이, 2.5 U/ml에서 120분 만에 평형에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 실험에서 설정한 240분에 비해 짧은 시간이고, 따라서 그의 절반인 1.25 U/ml의 효소만을 넣더라도 240분 동안 평형에 충분히 도달하기 때문에 이 효소량을 선정하였다. 비록 0.625 U/ml의 *BpXylA* 만을 사용하더라도 반응이 평형

상태까지 도달하지만, 이 효소량을 사용하면 반응시간이 길어지기 때문에 첫번째 반응을 위해선 1.25 U/ml 효소량을 선정하였다.

[106] 두번째 반응인 D-자일로스로부터 D-리블로스의 전환을 위한 *AtDpe*의 반응은 앞선 *BpXylA*의 반응 후 일어나는 일련의 반응이다. 따라서, *AtDpe*의 적절한 효소량을 선정하기 위해서 10 g/L의 D-자일로스로 기질로 앞서 정해진 1.25 U/ml의 *BpXylA*과 *AtDpe*를 다양한 농도로 함께 반응시켜 반응산물인 D-리블로스의 생성 프로파일을 살펴보았다. 그 결과, [도 6 (b)]와 같이, 넣어준 효소량이 증가할수록, D-리블로스가 생성되는 반응속도가 상당히 증가하였다. 0.1 U/ml 조건까지는 480분이 되더라도 D-리블로스 생성이 평형상태에 도달하지 않았으나 0.4 U/ml의 *AtDpe*를 넣었을 때, D-리블로스가 240분에 평형에 도달하는 것을 확인하였기 때문에 이 반응에서는 0.4 U/ml을 적정 *AtDpe*의 사용량으로 선정하였다.

[107] 마지막 반응인 D-리블로스로부터 D-리보스로 전환하는 반응 역시, 앞의 두 효소들의 반응 후 일어나는 일련의 반응이기 때문에, *BpRpiB*의 적절한 효소량을 선정하기 위해서, 10 g/L의 D-자일로스로 기질에 앞서 정해진 1.25 U/ml의 *BpXylA* 및 0.4 U/ml의 *AtDpe*와 함께 *BpRpiB*를 다양한 양으로 함께 반응시켜 반응산물인 D-리보스의 생성 프로파일을 살펴보았다. 그 결과, [도 6 (c)]와 같이, 1 U/ml의 *BpRpiB*를 사용했을 때 평형에 도달하는 것을 확인하였으며, 가장 많은 D-리보스가 생성되었다. 이와 같은 일련의 반응에서 10 g/L의 D-자일로스로부터, 1.69 ± 0.03 g/L의 D-리보스를 생산하였고, 이는 넣어준 D-자일로스로부터 $16.88 \pm 0.32\%$ 의 수율이다.

[108]

[109] [실시예 8] 반응 온도별 D-리보스 생산수율과 평형관계

[110] [실시예 1]과 같이 위 발명에서 고안한 다중효소반응에서 각 반응물과 생성물은 화학적 평형관계를 이루며 이 평형관계를 나타내는 평형상수(K_{eq})는 온도에 영향을 받아 증가하거나 감소한다. 그러므로 다중효소공정의 D-리보스 생산수율은 반응 온도에 따라 변화할 것으로 예상하여 45 - 55°C 조건에서 반응을 진행시켜 D-리보스의 생산수율을 조사하였다[도 7]. 그 결과 온도를 45°C에서 50°C로 증가시켰을 때 D-리보스의 생산수율은 $16.88 \pm 0.32\%$ 에서 $25.26 \pm 0.32\%$ 으로 높아졌으나, 55°C 이상에서는 오히려 수율이 $10.17 \pm 0.49\%$ 로 감소하는 것을 확인하였다. 반응 온도가 증가할수록 반응물인 D-자일로스로부터 D-리보스가 생성되는 평형상수는 증가하여 D-리보스의 이론적 생산수율은 증가하게 되지만, 다중효소공정에서 사용되는 *AtDpe* 효소의 활성이 50°C 이상에서는 불안정하고, 특히 55°C 이상부터는 공정에서 사용되는 효소의 최적 활성 범위를 벗어난 온도에서 반응이 진행되어 오히려 5°C 더 낮은 50°C 온도에서 반응을 진행하였을 때 보다 낮은 수율을 기록한 것으로 판단된다.

[111]

[112] [실시예 9] *Ec AraB*를 이용한 D-리블로스-5-인산 생산과 *Ec Ppk*를 이용한 ATP 재생성을 포함하는 다중효소공정 설계

- [113] D-자일로스로부터 D-리불로스-5-인산을 생산하기 위하여 위 [실시예 1 - 8]에서 시행한 다중효소 공정에서 *BpRpiB* 효소 대신, *EcAraB* 효소를 추가하였다 [도 8]. 새롭게 설계된 이 다중효소공정에서 D-자일로스는 *BpXylA*에 의해 D-자일롤로스로, D-자일롤로스는 *AtDpe*에 의해 D-리불로스로, D-리불로스는 *EcAraB*에 의해 ATP 1분자를 소모하면서 ADP와 D-리불로스-5-인산으로 전환된다. 생성된 ADP는 HMP를 기질로 사용하는 *EcPpk*에 의하여 ATP로 재생성되어 다시 *EcAraB*의 기질로 사용될 수 있도록 하였다.
- [114]
- [115] [실시예 10] *EcAraB*의 반응최적조건
- [116] *EcAraB*의 최적반응조건을 알아보기 위해, 최적반응온도, pH, 금속이온에 대한 효과 및 열안정성을 살펴보았다. *EcAraB*의 표준반응조건은 2 mM D-리불로스와 1 mM ATP를 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액에 0.0742 U/ml의 *EcAraB*와 함께 50°C에서 10분 간 반응시키는 것으로 설정하였으며, 후술할 *EcAraB*의 반응최적조건은 모두 표준반응조건에서 실험하여 결정되었다. 효소 반응은 95°C에서 5분 간 불활성화 시킨 후 생성된 D-리불로스-5-인산을 Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, California, USA) 컬럼으로 정량하여 효소활성을 계산하였고 1분 간 1 μ mol 만큼의 D-리불로스-5-인산을 생성시키는 *EcAraB*의 양(mg)을 1 Unit으로 정하였다.
- [117] 먼저, *EcAraB*의 최적온도조건을 알아보기 위하여 다양한 온도 조건에서 표준반응조건으로 반응시켰다. 그 결과, [도 9 (a)]와 같이 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *EcAraB*의 최적 pH 조건을 알아보기 위해 다양한 완충용액을 이용하여 pH를 달리해가며 반응시켰다. 그 결과, [도 9 (b)]와 같이 Tris-HCl (pH 7.0)에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 Sodium phosphate (pH 7.0)에서도 100%에 가까운 활성을 나타냈다. *EcAraB*의 활성에 대한 금속이온의 효과를 살펴보기 위해서, 효소와 금속이온이 충분히 평형상태가 되도록 반응 전 4°C에서 20분 동안 전배양을 해주었고, 금속이온을 넣지 않을 조건을 대조군으로 두었다 그 결과, [도 9 (c)]와 같이 Mg^{2+} 에서 최대 활성($614.62 \pm 42.14\%$)을 나타냈으며, Co^{2+} ($435.51 \pm 110.20\%$), Mn^{2+} ($286.47 \pm 21.62\%$) 순서로 높은 상대 활성이 나타났다. *EcAraB*에 대한 열안정성을 살펴보기 위해서, 다양한 온도조건에서 일정시간동안 효소를 정치시킨 후, 표준반응조건에서 반응시켰다. 효소활성의 감소는 정치시키지 않은 효소의 활성을 대조군으로 설정하여 열처리에 의한 상대활성의 감소를 계산하였다. 그 결과, *EcAraB*의 활성은 60°C까지는 대체로 안정하다가, 70°C에서 급격하게 활성이 떨어지는 것으로 나타났다[도 9 (d)].
- [118] *EcAraB* 기질 특이성은 선행연구에서 D-리불로스와 D-자일롤로스에 대하여 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 D-자일롤로스에 대한 상대활성은 D-리불로스에 대해 2.44%에 불과하여 본 발명에서 D-리불로스로부터 D-리불로스-5-인산을 생산하기 위해 *EcAraB*는 충분히 적용 가능하다.

[119]

[120] [실시예 11] *Ec* Ppk의 반응최적조건

[121] *Ec*Ppk의 최적반응조건을 알아보기 위해, 최적반응온도, pH, 금속이온에 대한 효과 및 열안정성을 살펴보았다. *Ec*Ppk의 표준반응조건은 4 mM ADP와 5 mM HMP를 포함하는 완충용액에 0.12 U/ml의 *Ec*Ppk 과 함께 50°C에서 10분 간 반응시키는 것으로 설정하였으며, 후술할 *Ec*Ppk의 반응최적조건은 모두 표준반응조건에서 실험하여 결정되었다. 효소반응은 95°C에서 5분 간 불활성화 시킨 후 생성된 ATP를 Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, California, USA) 컬럼으로 정량하여 효소활성을 계산하였고 1분간 1 μ mol 만큼의 ATP를 생성시키는 *Ec*Ppk의 양(mg)을 1 Unit으로 정하였다. 먼저, *Ec*Ppk의 최적온도조건을 알아보기 위하여 다양한 온도 조건에서 표준반응조건으로 반응시켰다. 그 결과, [도 10 (a)]와 같이 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *Ec*Ppk의 최적 pH 조건을 알아보기 위해 다양한 완충용액을 이용하여 pH를 달리해가며 반응시켰다. 그 결과, [도 10 (b)]와 같이 Sodium phosphate (pH 7.0)에서 가장 높은 활성을 나타냈다. *Ec*Ppk의 활성에 대한 금속이온의 효과를 살펴보기 위해서, 효소와 금속이온이 충분히 평형상태가 되도록 반응 전 4°C에서 20분 동안 전 배양을 해주었고, 금속이온을 넣지 않을 조건을 대조군으로 두었다 그 결과, [도 10 (c)]와 같이 Mg^{2+} 에서 최대활성($202.12 \pm 7.46\%$)을 나타냈으며, Co^{2+} ($176.14 \pm 24.10\%$), Mn^{2+} ($161.48 \pm 5.53\%$) 순서로 높은 상대활성이 나타났다. *Ec*Ppk에 대한 열안정성을 살펴보기 위해서, 다양한 온도조건에서 일정시간동안 효소를 정치시킨 후, 표준반응조건에서 반응시켰다. 효소활성의 감소는 정치시키지 않은 효소의 활성을 대조군으로 설정하여 열처리에 의한 상대활성의 감소를 계산하였다. 그 결과, *Ec*Ppk의 활성은 45°C까지는 대체로 안정하다가, 50°C에서 급격하게 활성이 떨어지는 것으로 나타났다[도 10 (d)].

[122]

[123] [실시예 12] ATP 재생성을 이용한 효율적인 D-리불로스-5-인산 생산을 위한 반응 최적 조건 설정

[124] [실시예 12]에서는 D-자일로스로부터 D-리불로스-5-인산을 효율적으로 생산하기 위한 각 효소반응의 최적조건을 설정하기 위한 실험을 진행하였다. 여러 개의 효소를 이용한 다중효소공정에서는 각 효소의 특성이 다르기 때문에 적합한 금속보조인자와 기질의 양, 넣어준 기질의 양에 맞는 각 효소의 적절한 효소 양과 각 효소양의 비율을 특정하는 것이 공정비용을 줄일 수 있다. 따라서, D-자일로스로부터 D-리불로스-5-인산을 생산함에 있어 다양한 조건에서 생성되는 생성물의 양을 확인하고, 설계한 다중효소 공정이 높은 수율에 도달할 수 있도록 최적의 금속보조인자의 양, 기질의 양, 효소의 양을 선정하였다.

[125] 이성질화 반응으로 이루어졌던 D-리보스 생산과 다르게 본 다중효소공정에서는 *EcAraB*가 ATP를 사용하여 D-리불로스를 인산화 할 때 평형이 ATP에서

ADP쪽으로 크게 치우치기 때문에 이론적으로 달성할 수 있는 생산 수율은 거의 100%에 수렴하여 이전 공정에 비해 굉장히 높은 수준의 수율을 달성할 것으로 기대하였다. 따라서 본 발명에서는 각 효소들을 함께 반응시킬 때 영향을 줄 수 있는 조건들을 확인하였다.

- [126] 먼저, 다중효소공정에 사용되는 효소들의 최적 반응온도와 열 안정성을 참고하여 다중효소공정의 반응 온도를 결정하였다. [도 9 (d)], [도 10 (d)]의 결과에서 *EcAraB* 효소의 경우 50°C에서 최적활성을 나타냈으며, 열안정성도 높아 안정적인 것으로 나타났으며 *EcPpk* 효소의 경우 50°C에서 최적활성을 나타냈으나, 50°C에서는 열안정성이 낮아 반응 1시간 만에 대부분의 활성을 잃어버리는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 45°C까지는 안정적으로 활성이 유지되는 것을 확인하여 다중효소공정의 반응 온도는 이전과 동일한 45°C로 선택하였다. 반응의 최적 pH는 모든 효소가 50 mM sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액 조건에서 반응시켰을 때 가장 높은 활성을 나타냈기 때문에 50 mM sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액을 선택하였다.
- [127] 반응 최적조건을 설정하기 위한 실험은 5 mM D-자일로스, 0.125 mM ATP, 그리고 5 mM HMP 기질 농도로, 금속보조인자는 10 mM Co^{2+} 와 20 mM Mg^{2+} 로 하는 50 mM sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액에 0.105 U/ml의 *BpXylA*, 0.03 U/ml의 *AtDpe*, 0.1 U/ml의 *EcAraB*, 0.2 U/ml의 *EcPpk* 와 함께 45°C에서 24시간 반응시키는 것으로 설정하였으며. 효소반응은 95°C에서 5분 간 불활성화 시킨 후 Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, California, USA) 컬럼으로 생성된 D-리블로스-5-인산의 양을 정량하였다.
- [128] 먼저, 반응에 사용되는 금속보조인자를 결정하기 위하여 Co^{2+} , Mg^{2+} 의 비율과, 최적 비율에 따른 총 금속보조인자의 농도를 다양하게 설정하여 실험을 진행하였다. 다중효소공정에 사용되는 *EcAraB*, *EcPpk*가 Mg^{2+} 를 사용한 반응 조건에서 가장 활성이 높으나 [도 9 (c)], [도 10 (c)], *AtDpe*가 Mg^{2+} 는 보조인자로 사용하지 못하기 때문에²⁵ Co^{2+} 를 함께 사용하여 반응을 진행하였다. 다중효소공정에 대한 금속이온(Co^{2+} , Mg^{2+})의 비율에 따른 효과를 살펴보기 위해서, 10 mM Co^{2+} 에 대한 Mg^{2+} 의 비율($\text{Co}^{2+} : \text{Mg}^{2+} = 1 : 0.5 - 3$)의 Mg^{2+} (5 - 30 mM)를 넣어주었고, 각 조건에서 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 상대적인 생성량은 가장 많은 양의 D-리블로스-5-인산이 생성된 조건을 100%로 하였다. 그 결과, [도 11]과 같이 Co^{2+} 만을 넣어준 조건($62.02 \pm 3.40\%$)에 비하여 Mg^{2+} 를 함께 넣어준 조건에서 생성량이 크게 증가하였고, 특히 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도 비율을 1 : 2로 (10 mM Co^{2+} , 20 mM Mg^{2+}) 넣어준 조건에서 가장 높은 생성량($100.00 \pm 0.69\%$)을 나타냈다. 그러나 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도 비율을 1 : 3으로 (10 mM Co^{2+} , 30 mM Mg^{2+}) 넣어준 조건에서는 오히려 생성량이 감소($94.54 \pm 6.56\%$)하는 것을 확인하였다. 따라서 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도 비율을 1:2로 하는 조건을 최적조건으로 정하였다.

- [129] 본 다중효소공정에서 금속보조인자는 효소반응에 필수적으로 사용되며 각 효소들이 안정적으로 반응하기 위해서는 일정한 농도 이상의 사용 가능한 금속보조인자가 존재해야 한다. 그러나 본 다중효소공정에서는 *EcPpk*의 기질로 이용되는 HMP의 각 인산기가 강한 음전하를 띠기 때문에 킬레이팅 현상이 일어나 금속보조인자의 효과가 감소할 수 있다.²¹ 또한, 이를 방지하기 위해 너무 많은 양의 금속보조인자를 넣게 되면 반대로 *EcPpk*의 기질로 이용될 HMP의 농도를 감소시키는 효과를 나타내 생성량이 감소할 수 있다. [도 11]의 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도 비율을 1:3으로 넣어준 조건에서 생성량이 감소한 것은 이 현상을 보여주는 결과로 판단된다. 따라서 본 발명에서는 금속보조인자들의 비율뿐만 아니라 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 절대적인 농도 또한 비교하여 실험하였다. 다중효소공정을 위한 금속보조인자들의 양을 결정하기 위한 실험은 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도 비율을 1:2로 유지하면서 두 보조인자들의 농도 합은 각각 15 - 60 mM) 이 되도록 하여 상대적인 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 12]처럼 45 mM 조건에서 가장 높은 값($100.00 \pm 1.63\%$)을 나타냈으나, 30 mM ($93.32 \pm 2.72\%$)에 비하여 크게 증가하지 않아 30 mM 조건을 최적조건으로 설정하였다.
- [130] 결정된 금속보조인자의 농도에 적합한 HMP의 양을 알아보기 위하여 다양한 농도(1.25 - 20 mM)의 HMP를 넣어주었고, 각 조건에서 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 13]과 같이 5 mM HMP 조건($100.00 \pm 0.36\%$)에서 가장 생성량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 10mM 조건에서는 더 낮은 값($85.66 \pm 1.89\%$)을 보여 5mM HMP조건을 최적조건으로 설정하였다. HMP는 *EcPpk*의 기질이기 때문에 높은 농도에서는 *EcPpk*의 ATP 재생성 속도가 증가하여 생성량을 늘릴 수 있으나 5 mM 농도 조건 이상에서는 다른 효소들에 대한 HMP의 억제 효과가 더 크게 나타나 오히려 더 적은 생성량을 나타낸 것으로 생각된다.
- [131] 본 발명의 다중 효소 공정에서는 ATP 농도가 증가할수록 *EcAraB*의 ATP 소모 속도가 증가하고, *EcAraB*의 반응을 통해 생성된 ADP가 증가한다. ADP 양이 증가하면 *EcPpk*에 의한 ATP 재생성 속도가 증가하므로 D-리블로스-5-인산의 생성량이 증가할 수 있다. 본 발명의 경제적인 측면에서 D-자일로스와 HMP에 비해 비싼 기질인 ATP를 적게 사용하고 최대한 재생성하는 것이 중요하다. 위 두가지 사항을 고려하여 다중효소공정에 대한 ATP 농도에 따른 효과를 살펴보기 위해 다양한 농도(0.03125 - 0.5 mM)의 ATP를 넣어주어 ATP 농도에 따라 생성된 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다.
- [132] 그 결과, [도 14]와 같이 생성된 총 D-리블로스-5-인산의 양은 0.5 mM ATP 조건($100.00 \pm 2.33\%$)에서 가장 높았으나 ATP의 재생성지수인 TTN[도 15]는 가장 낮았다($6.63 \pm 0.14\%$). ATP의 농도가 감소할수록 TTN은 계속 증가(6.63 ± 0.14 - 58.14 ± 0.93)하는 경향을 보였으나 총 생성된 D-리블로스-5-인산 또한 감소(100.00 ± 2.33 - $49.31 \pm 2.78\%$)하였다. 이와 다르게 재생성된 ATP에 의한 D-리블

로스-5-인산 상대적인 생성량은 0.25 mM 조건에서 가장 높았($100.00 \pm 1.23\%$)으며 0.03125 - 0.125 mM 조건까지는 증가(54.06 ± 0.86 - $91.42 \pm 1.30\%$)하다 이후에는 ATP 농도가 증가하여도 크게 달라지지 않는 것(0.25 : $100.00 \pm 1.23\%$, 0.5 : $98.60 \pm 2.06\%$)을 확인하였다. 이는 *EcPpk*에 의해서 ATP가 재생성되는 속도가 0.125 mM 이상부터는 증가하지 않고 반응 초기의 ATP는 *EcAraB*에 의하여 소모된 후 전적으로 *EcPpk*에 의하여 재생성되는 ATP만을 사용하기 때문으로 생각된다. 비록 0.25 조건에서 가장 높은 생성량을 나타내긴 했으나 0.125 mM ATP 조건부터 ATP의 농도를 증가시켜도 생성량에 큰 차이가 없었기 때문에 ATP가 값비싼 기질인 것을 고려하여 0.125 mM ATP 조건을 최적조건으로 설정하였다.

- [133] 위에서 언급된 바와 같이 다중효소공정에서 ATP 농도가 고정되어 있을 때 총 생성되는 D-리블로스-5-인산은 *EcPpk*의 ATP 재생성 속도에 영향을 받는다. ATP 재생성 속도는 *EcAraB*에 대한 *EcPpk*의 비율에 따라 달라지므로 총 D-리블로스-5-인산의 생성량이 달라질 수 있다. 다중효소공정에 대한 두 효소의 비율에 따른 효과를 살펴보기 위해서 0.1 U/ml *EcAraB*에 대한 *EcPpk*의 비율(*EcAraB*:*EcPpk* = 1:0.5 - 1:8)의 *EcPpk*(0.05 - 0.8 U/ml)를 넣어주었고, 각 조건에서 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 16]와 같이 D-리블로스-5-인산의 생성량은 1:0.5 - 1:2 까지는 증가(70.31 ± 9.48 - $93.17 \pm 5.20\%$)하였으나 그 이상의 조건(4: $100.00 \pm 5.79\%$, 8: $97.51 \pm 6.99\%$)에서는 1:2 조건과 큰 차이가 없는 것을 확인하였다. 다중효소공정에서 사용되는 효소의 양 또한 경제성에 중요한 기준이기 때문에 위 결과를 토대로 1:2 조건을 최적 조건으로 결정하였다.

- [134] D-리블로스의 인산화와 ATP를 재생성하는 두 효소의 또한 D-리블로스-5-인산의 생성량에 영향을 줄 수 있다. *EcAraB* 양이 증가하면 ATP 소모 속도가 증가하고 이에 맞는 비율의 *EcPpk*를 넣어주면 ATP 재생성 속도 또한 증가하여 D-리블로스-5-인산의 생성량이 증가할 수 있다. 다중효소공정에 대한 두 효소의 양에 따른 효과를 살펴보기 위해서 *EcAraB*에 대한 *EcPpk*의 비율은 1:2로 유지하고 두 효소의 절대량을 기준량의 0.5 - 4배 (0.05 - 0.4 U/ml *EcAraB*, 0.1 - 0.8 U/ml *EcPpk*)가 되게 넣어주어 각 조건에서 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 17]와 같이 D-리블로스-5-인산 생산량은 두 효소의 양을 2배 증가시킨 조건에서 가장 높은 생성률($100.00 \pm 0.23\%$)을 보였으며 그 이후에는 동일한 양상(AP4: $98.02 \pm 4.18\%$)을 나타냈다. 따라서 위 조건을 최적 조건으로 설정하였으며 이 실험 이후에 진행된 실험에서는 0.2 U/ml *EcAraB*, 0.4 U/ml *EcPpk*를 사용하였다. 그리고 다중효소공정에 사용되는 4가지 효소의 전체 양 또한 반응 속도를 증가시켜 전체 반응 시간동안 D-리블로스-5-인산 생성량을 증가시킬 수 있기 때문에 전체 효소 양을 달리하여 실험을 진행하였다. 다중효소공정에 대한 전체 효소 양에 따른 효과를 살펴보기 위해서, 언급된 조건을 1로 설정하여 0.5, 1, 2, 4(0.0525 - 0.42 U/ml *BpXylA*, 0.015 - 0.12 U/ml *AtDpe*, 0.1 - 0.8 U/ml *EcAraB*, 0.2 - 1.6 U/ml *EcPpk*)의 효소를 넣어주었고, 각 조건에서 D-리블로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 19]와 같이 0.5 - 2배 효소량 조건에서

값이 증가($53.89 \pm 2.23 - 100.00 \pm 1.94\%$)하는 것을 확인하였으며 2배 조건에서 가장 많은 D-리불로스-5-인산이 생성되었다. 효소량을 더 높인 4배 조건에서는 $90.71 \pm 3.32\%$ 로 오히려 감소하여 2배 효소량 조건을 최적조건으로 결정하였다.

- [135] 위 조건에서 최적화된 각 효소들의 양을 이용하여 기질인 D-자일로스의 농도를 달리하여 D-리불로스-5-인산의 생성량(mM)을 확인하였다. 다중효소공정에 대한 D-자일로스 농도에 따른 효과를 살펴보기 위해서, D-자일로스의 농도를 3-20 mM가 되게 넣어주어 각 조건에서 D-리불로스-5-인산의 생성량을 측정하였다. 그 결과, [도 18]과 같이 D-자일로스 농도가 증가할수록 조건에서 D-리불로스-5-인산의 생성량도 증가($2.04 \pm 0.02 - 4.75 \pm 0.32$ mM)하는 결과를 얻었으나 반응에 투입된 D-자일로스 기질에 대한 수율은 감소($68.04 \pm 0.61 - 23.74 \pm 1.30\%$)하여 5 mM 조건 이상의 D-자일로스 기질 농도가 D-리불로스-5-인산의 생성량 증가에 크게 기여하지 않는 것을 확인하였다.

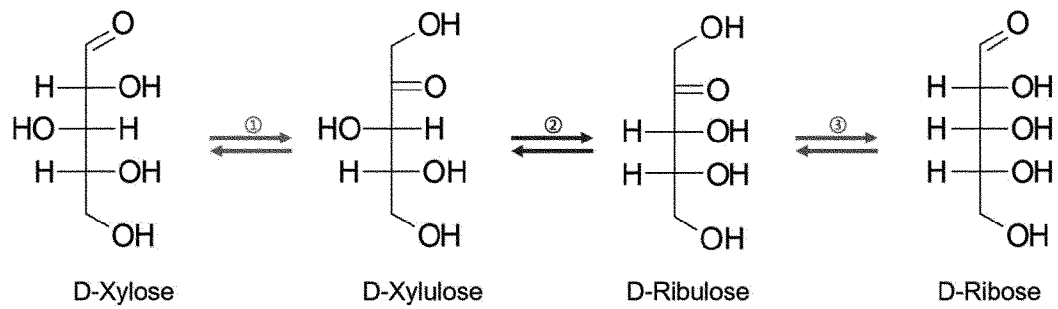
- [136] 다중효소반응에서는 효소가 시간이 지날수록 불안정해지며 활성이 감소하기 때문에 효소의 최적 반응 속도뿐만 아니라 안정성도 전체 공정의 수율에도 큰 영향을 줄 수 있다. 또한, 낮은 온도에서 반응시킬수록 반응에 필요한 에너지의 양이 줄어들기 때문에 비용, 에너지적 측면에서 장점이 있다. 본 발명에서 설계한 다중효소공정에서는 D-자일로스가 D-자일룰로스를 거쳐 D-리불로스로 전환되는 반응까지는 이성질화 효소들을 이용하였기 때문에 각 생성물들의 열역학적 평형관계가 존재한다. 그러나 다중효소공정의 마지막 단계에서 D-리불로스가 D-리불로스-5-인산으로 전환되는 과정은 반응의 에너지차가 커 열역학적 평형을 고려하지 않을 수 있다. 따라서 온도를 증가시킬수록 수율이 증가하였던 D-리보스 생산 다중효소공정과 다르게, 낮은 온도에서도 충분한 효소 활성과 안정성만 유지된다면 오히려 더 유리한 반응조건이 형성된다. 따라서 본 발명에서는 위의 [실시예 12]에서 최적화된 다중효소공정에 대한 온도조건의 효과를 살펴보기 위해서 다양한 온도($30 - 50^{\circ}\text{C}$)조건에서 반응시켜 각 조건에서 D-리불로스-5-인산의 상대적인 생성량을 측정하였다. 그 결과, 35°C 에서 가장 생성량이 높은 ($91.14 \pm 1.24\%$) 것을 확인할 수 있었으며 이때의 TTN은 35.62 ± 0.4 였다. 50°C 에서는 급격한 수율의 감소($39.57 \pm 0.61\%$)를 확인할 수 있었다(도 20).

청구범위

- [청구항 1] 자일로스 이성질화 효소, 케토스 3-에피머화 효소 및 리보스-5-인산 이성질화 효소를 포함하는 효소 혼합물; 및
기질로 D-자일로스를 포함하는 D-리보스 생산용 조성물.
- [청구항 2] 자일로스 이성질화 효소, 케토스 3-에피머화 효소 및 L-리블로즈 인산화 효소를 포함하는 효소 혼합물; 및
기질로 D-자일로스를 포함하는 D-리블로스-5-인산 생산용 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 효소 혼합물은 다중인산 인산화 효소를 더 포함하고, ADP 및 다중인산 인산화 효소의 기질인 HMP(hexametaphosphate)를 더 포함하는 D-리블로스-5-인산 생산용 조성물.
- [청구항 4] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 효소 혼합물의 각 효소는 순차적으로 또는 동시에 사용되는 것인 조성물.
- [청구항 5] (1)D-자일로스를 기질로 사용하는 자일로스 이성질화 효소에 의해 D-자일로스가 D-자일룰로스로 전환되는 단계;
(2)상기 생산된 D-자일룰로스를 기질로 사용하는 케토스 3-에피머화 효소에 의해 D-자일룰로스가 D-리블로스로 전환되는 단계; 및
(3)상기 생산된 D-리블로스를 기질로 사용하는 리보스-5-인산 이성질화 효소에 의해 D-리블로스가 D-리보스로 전환되는 단계를 포함하는 D-자일로스로부터 D-리보스의 효소적 생산 방법.
- [청구항 6] (1) D-자일로스를 기질로 사용하는 자일로스 이성질화 효소에 의해 D-자일로스로가 D-자일룰로스로 전환되는 단계;
(2) 상기 생산된 D-자일룰로스를 기질로 사용하는 케토스 3-에피머화 효소에 의해 D-자일룰로스가 D-리블로스로 전환되는 단계; 및
(3) 상기 생산된 D-리블로스를 기질로 사용하는 L-리블로즈 인산화 효소에 의해 ATP 및 D-리블로스가 D-리블로스-5-인산으로 전환되는 단계를 포함하는 D-자일로스로부터 D-리블로스-5-인산의 효소적 생산 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 단계 3)에서 ATP는 HMP를 기질로 사용하는 다중인산 인산화 효소에 의하여 ADP로부터 생산되는 것인 방법.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서,
상기 자일로스 이성질화 효소 : 케토스 3-에피머화 효소 : 리보스-5-인산 이성질화 효소의 함량 비는 각 효소의 unit을 기준으로 1: 0.1 내지 0.5 : 0.8 내지 1인 방법.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서,

- 상기 단계 3)에서 L-리블로즈 인산화 효소 및 다중인산 인산화 효소의 함량비는 효소의 unit을 기준으로 1 : 0.5 내지 2인 방법.
- [청구항 10] 제 6항에 있어서,
상기 단계 (1)에서 기질인 D-자일로스의 농도는 1 내지 10mM인 방법.
- [청구항 11] 제5항에 있어서,
상기 방법은 40 내지 55°C에서 수행되는 것인 방법.
- [청구항 12] 제6항에 있어서,
상기 방법은 30 내지 45°C에서 수행되는 것인 방법.
- [청구항 13] 제5항 또는 제6항에 있어서,
상기 방법은 각 단계가 단일 공정으로 모두 수행되는 것인 방법.
- [청구항 14] 제5항 또는 제6항에 있어서,
상기 자일로스 이성질화 효소는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고, 케토스 3-에피머화 효소는 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인 방법.
- [청구항 15] 제5항에 있어서,
상기 리보스-5-인산 이성질화 효소는 서열번호 5으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인 방법.
- [청구항 16] 제6항에 있어서,
상기 L-리블로즈 인산화 효소는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인 방법.
- [청구항 17] 제7항에 있어서,
상기 다중인산 인산화 효소는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인 방법.

[도1]

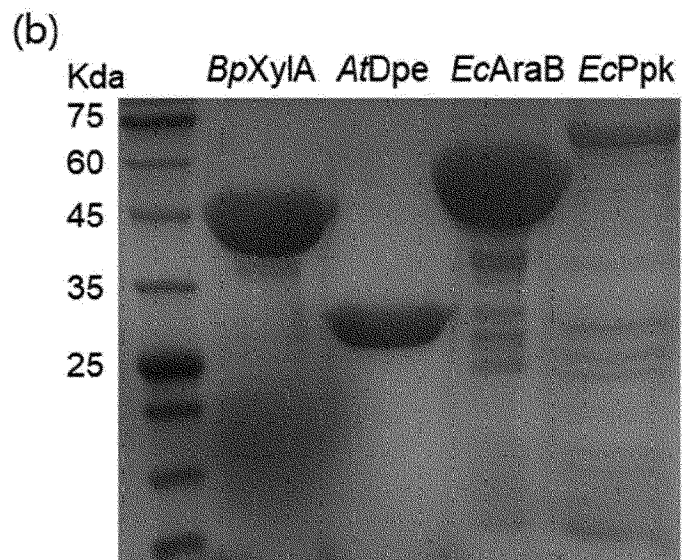
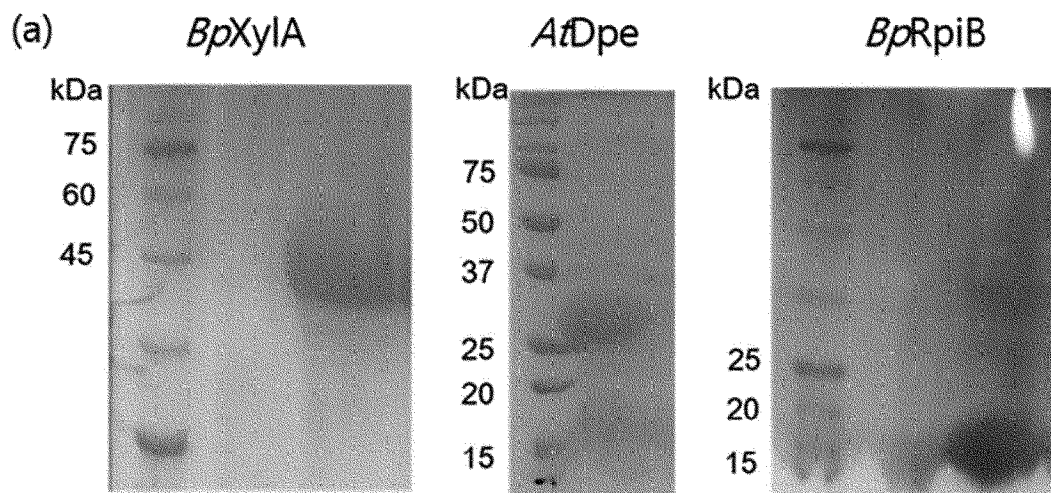


① Xylose isomerase

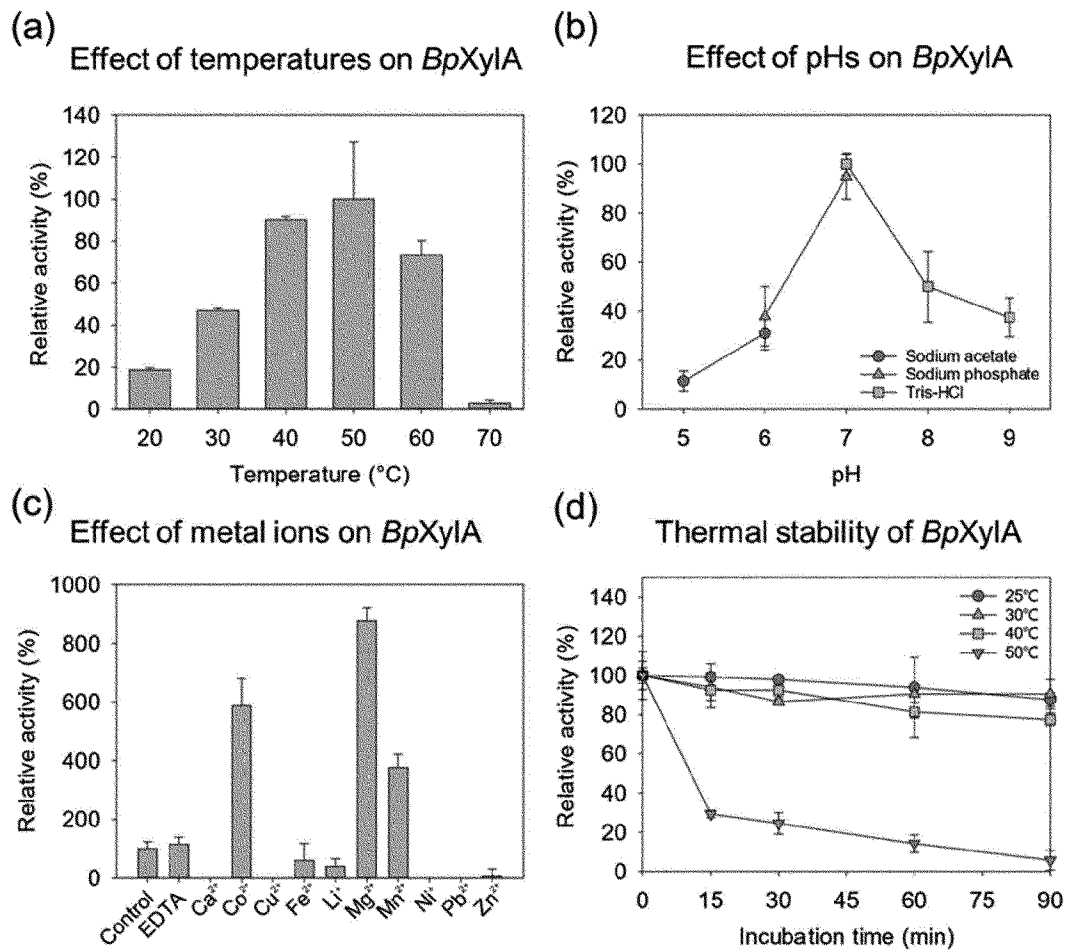
② Ketose-3-epimerase / tagatose-3-epimerase

③ Ribose-5-phosphate isomerase

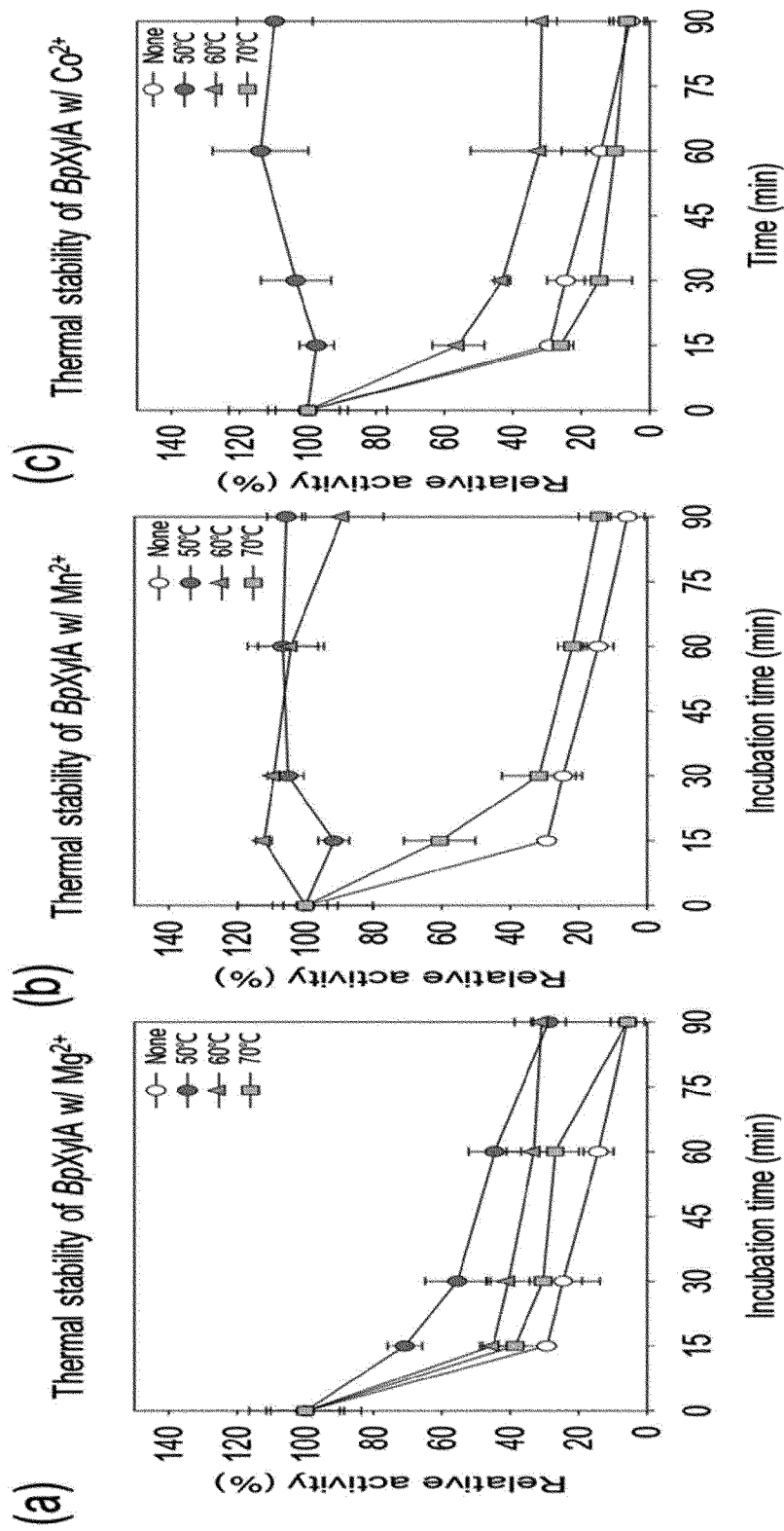
[도2]



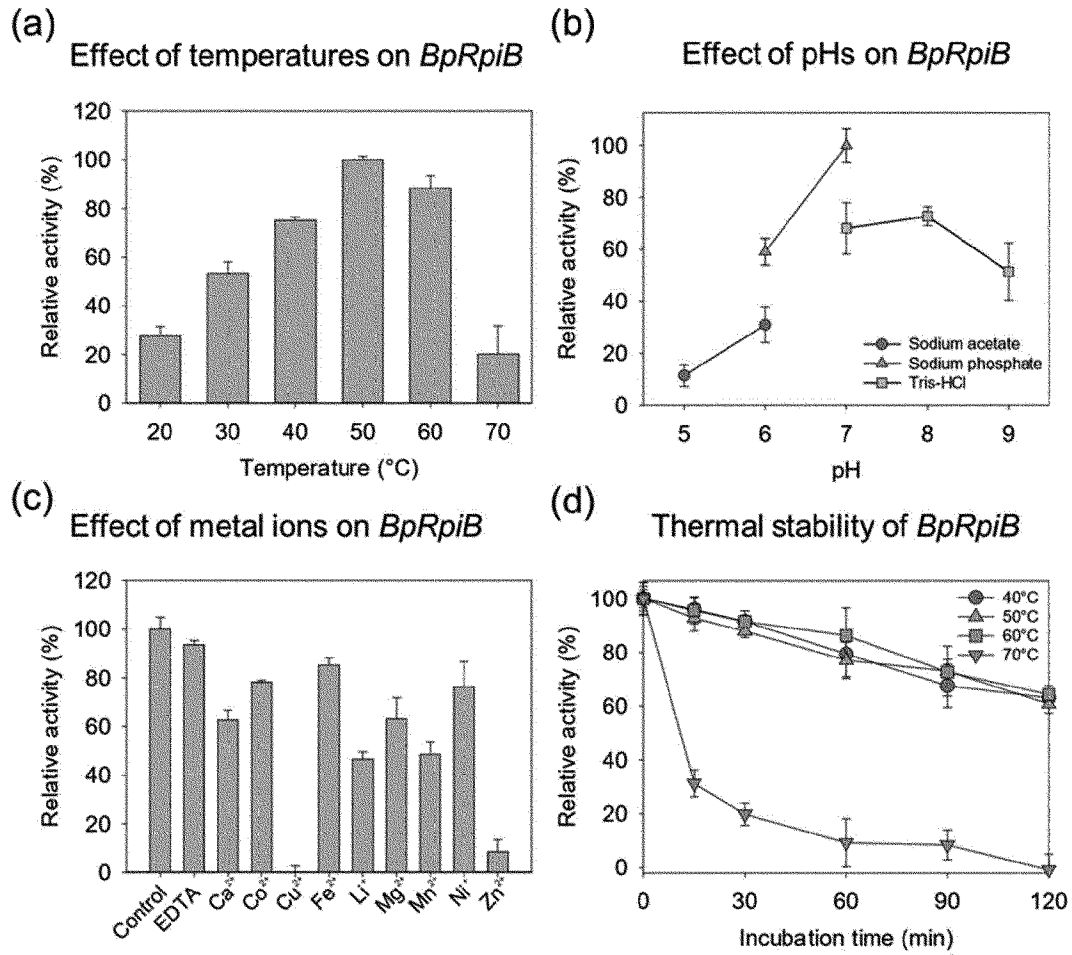
[도3]



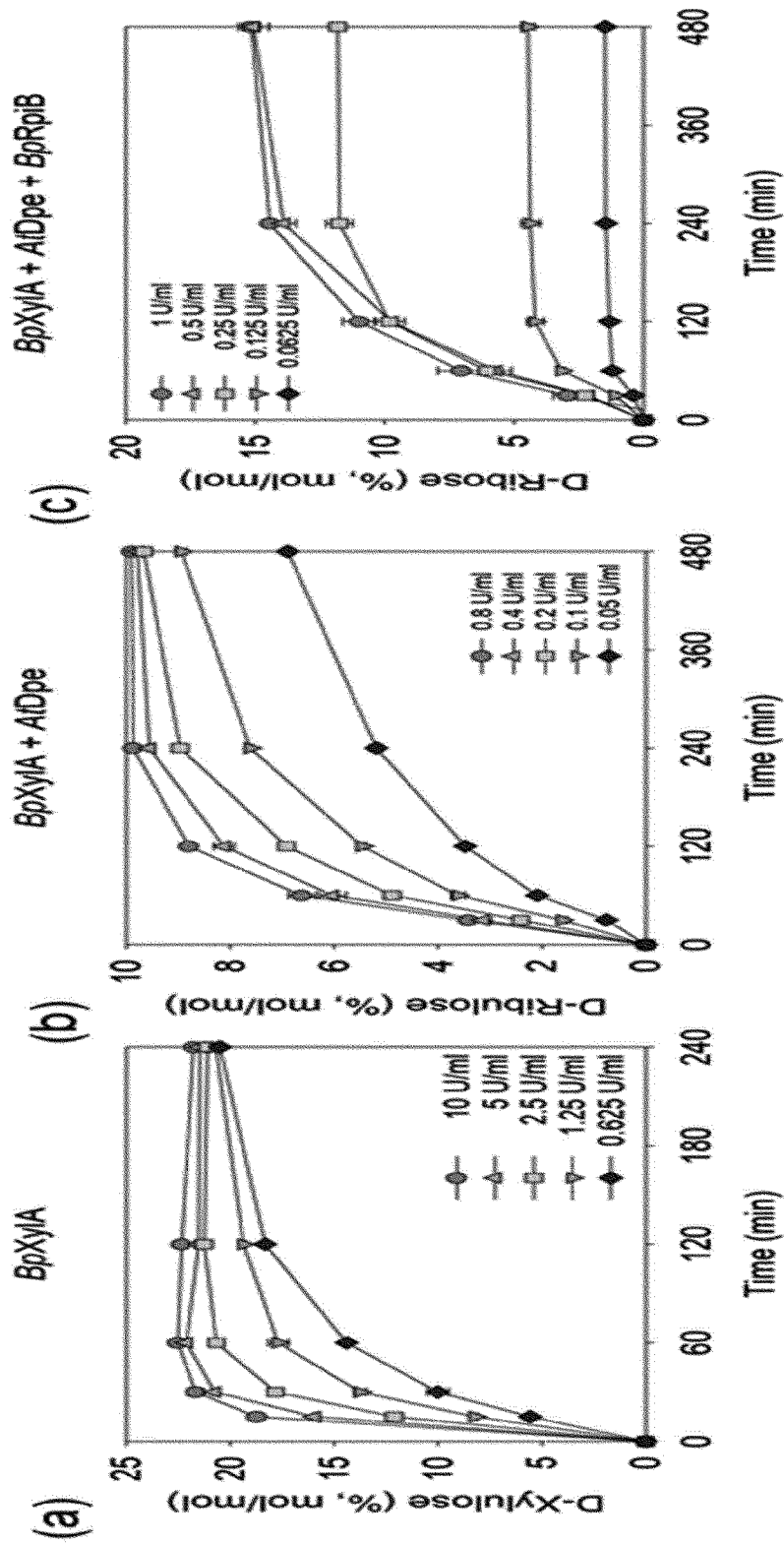
[도4]



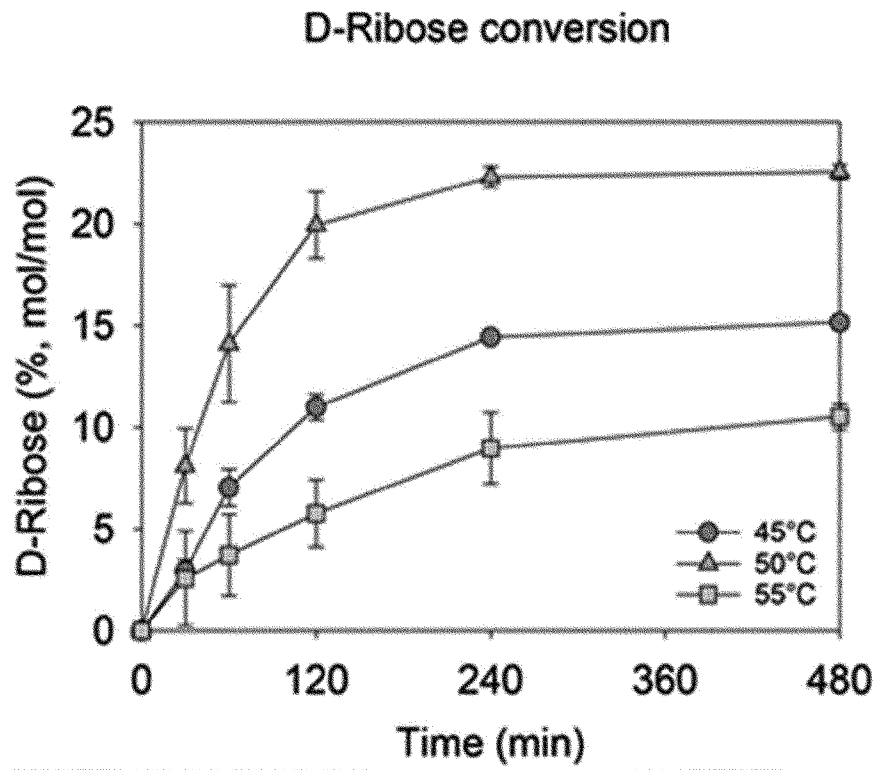
[도5]



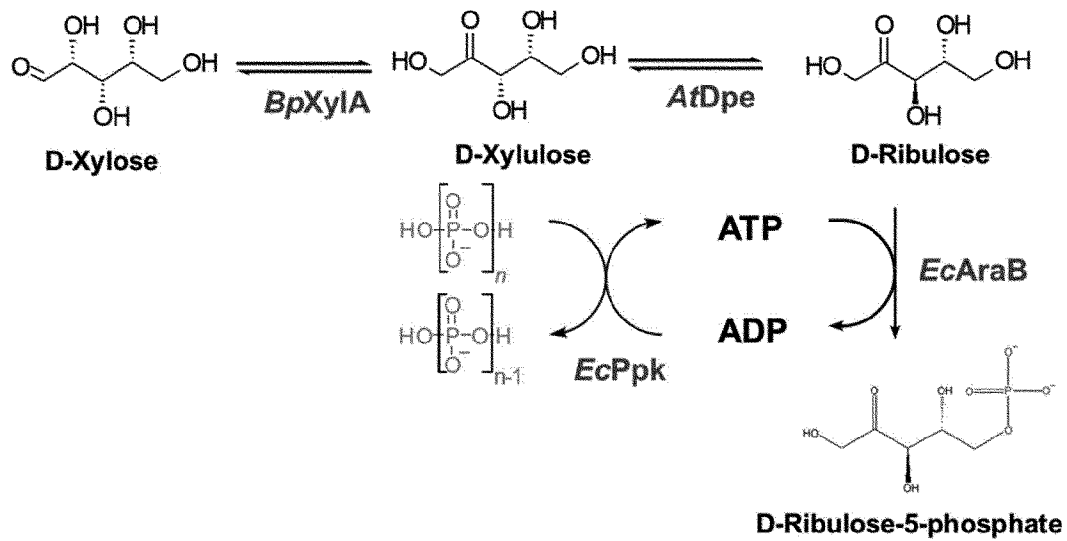
[도6]



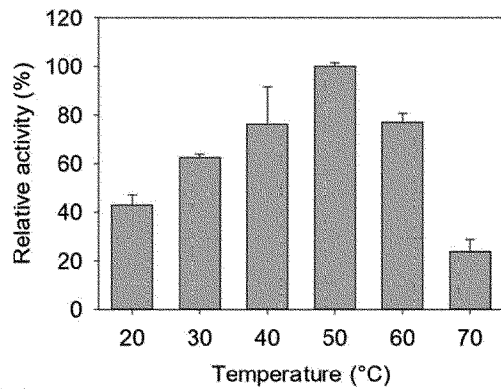
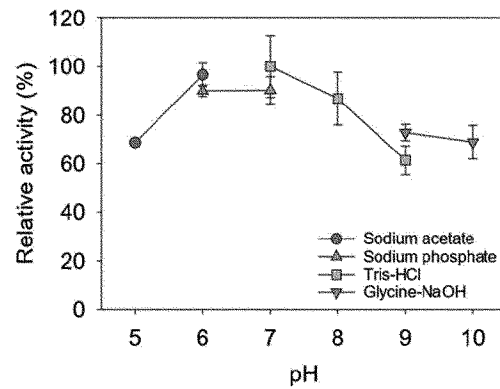
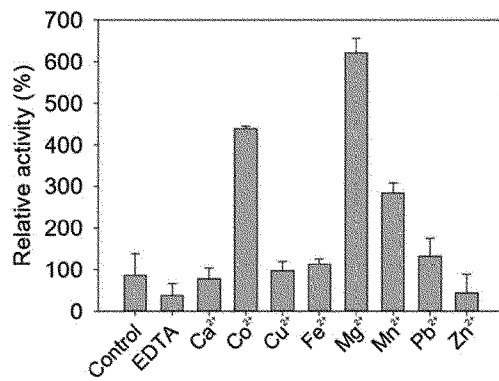
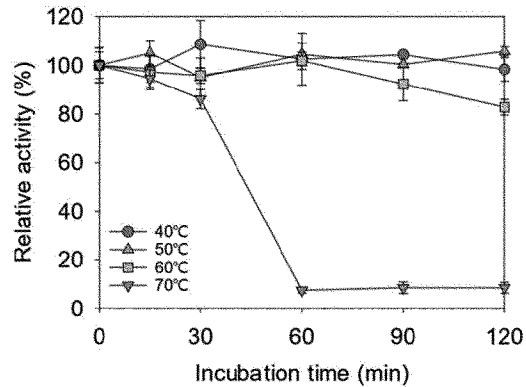
[도7]



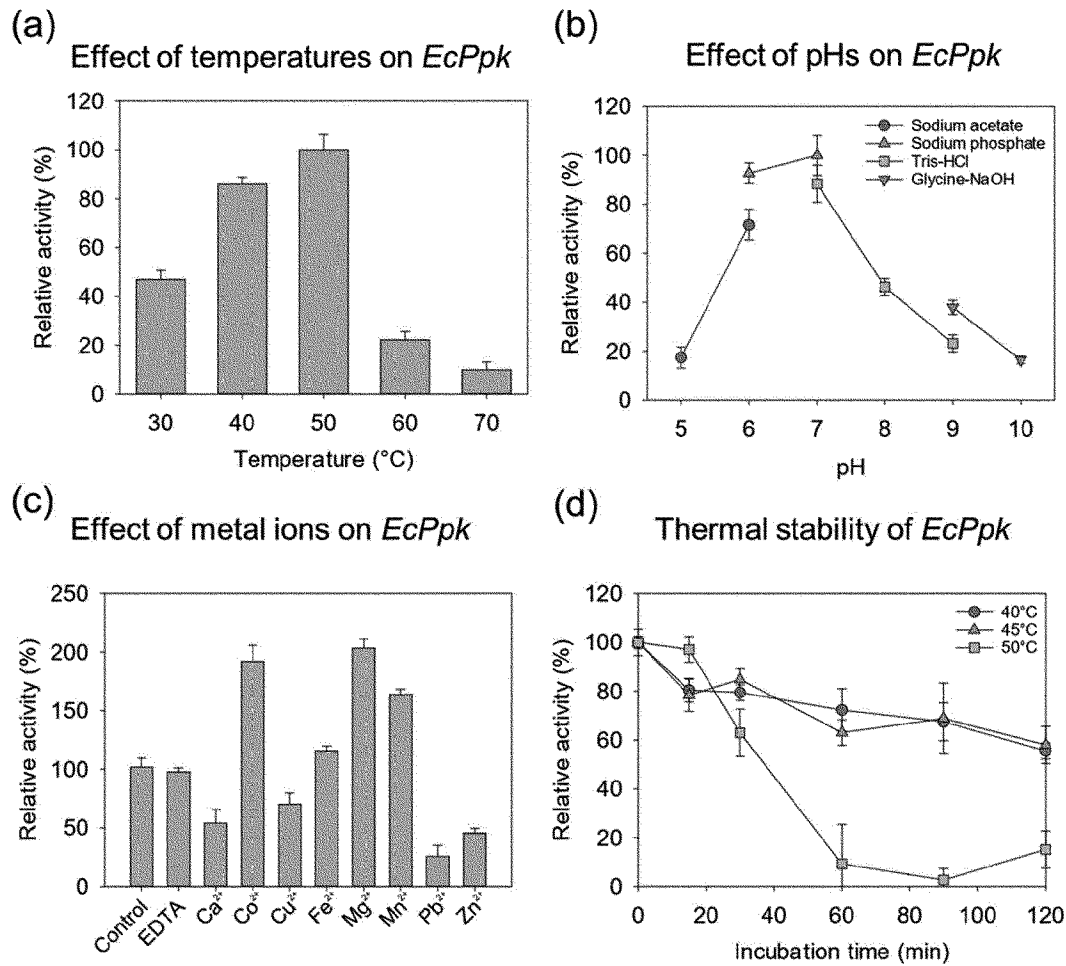
[도8]



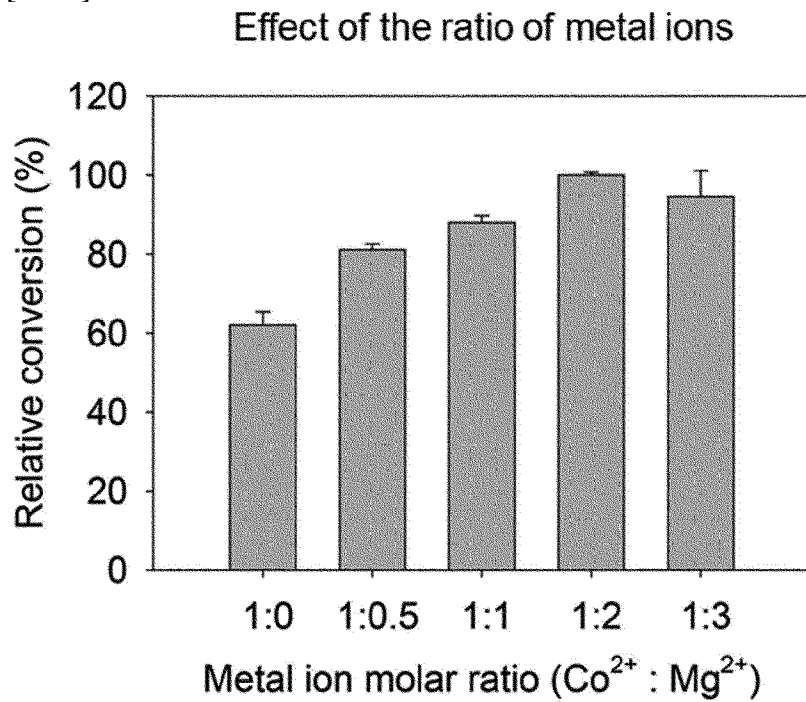
[도9]

(a) Effect of temperatures on *EcAraB*(b) Effect of pHs on *EcAraB*(c) Effect of metal ions on *EcAraB*(d) Thermal stability of *EcAraB*

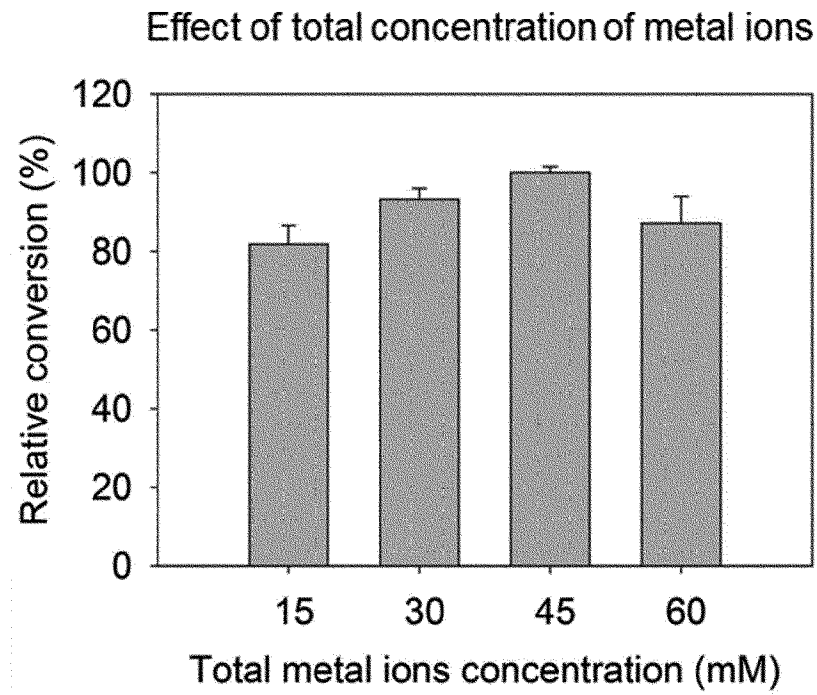
[도 10]



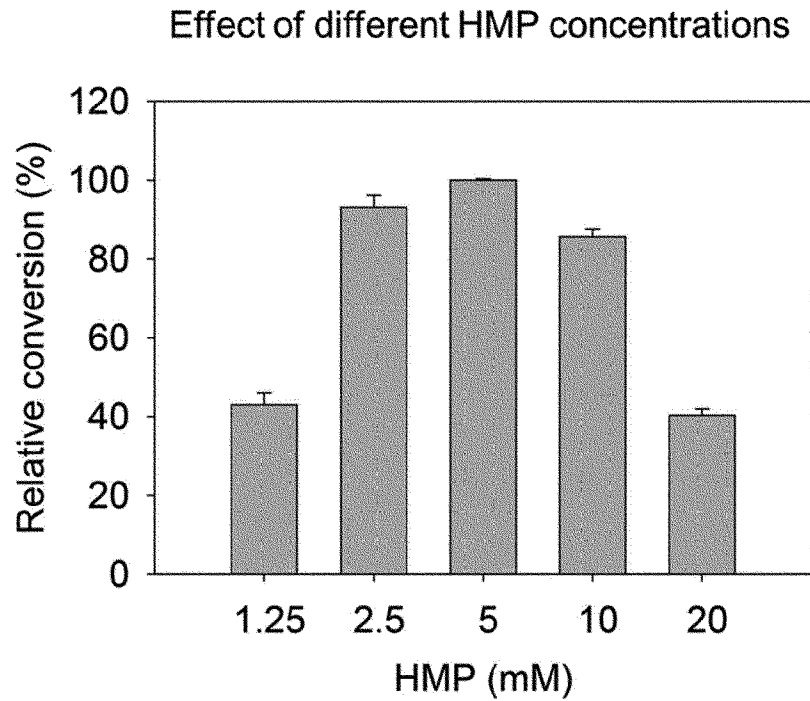
[도 11]



[도12]

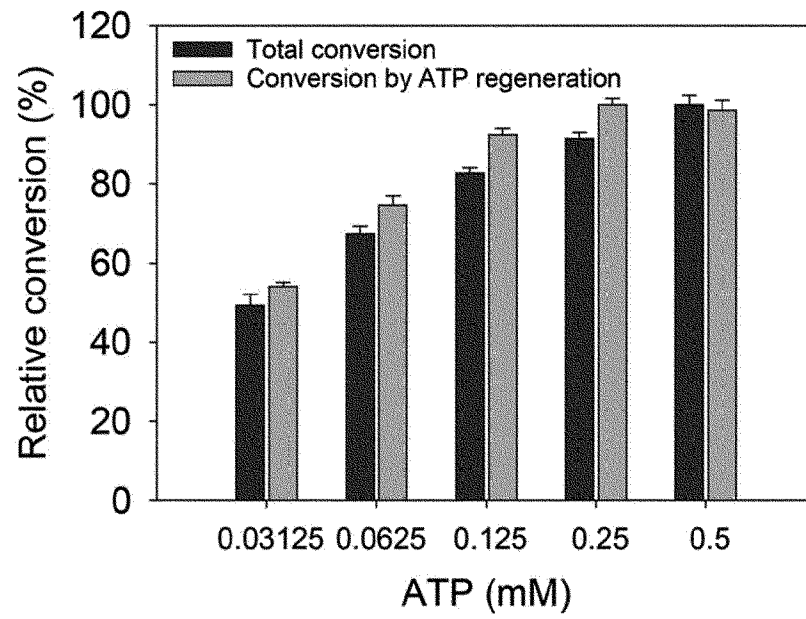


[도13]



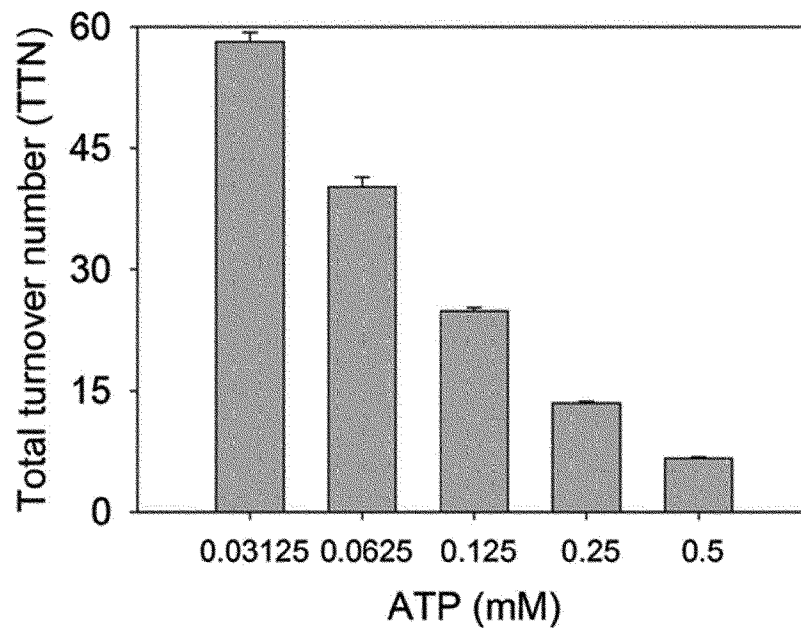
[도14]

Effect of different ATP concentrations



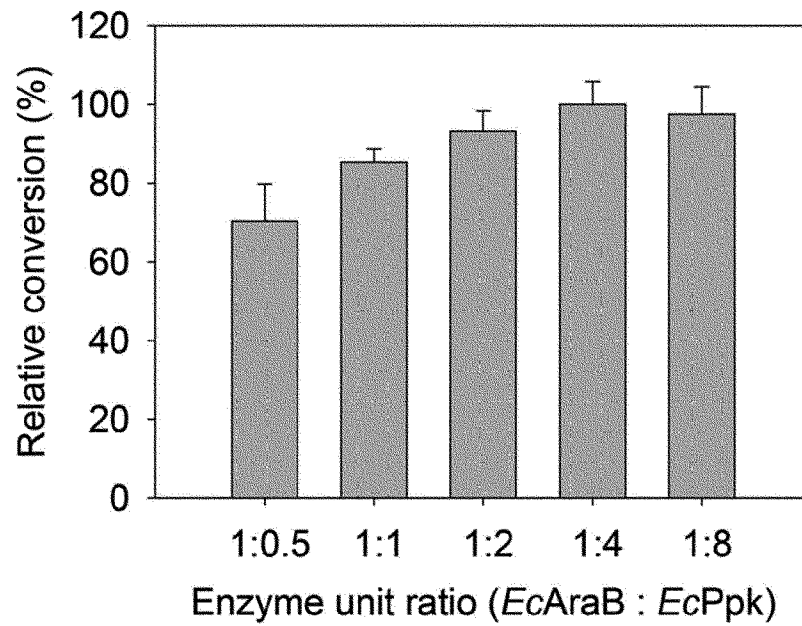
[도15]

Total turnover number of ATP

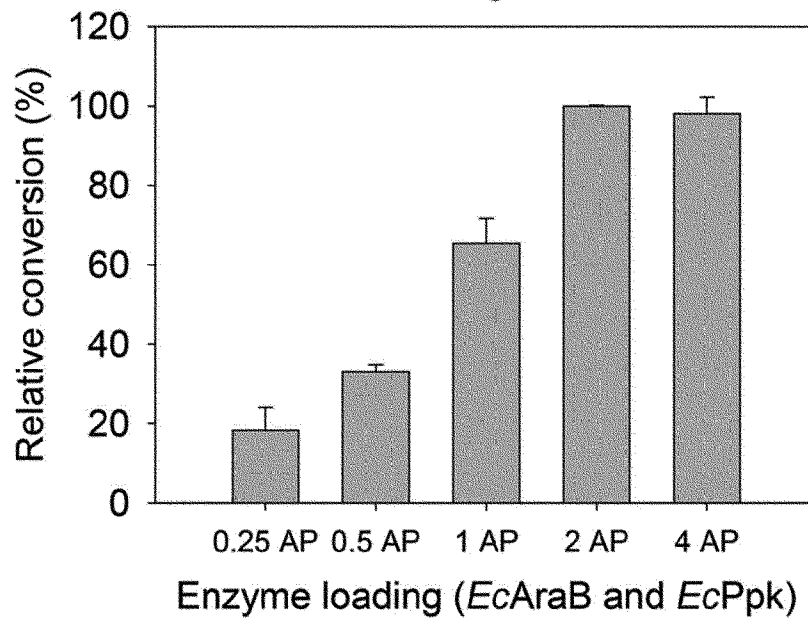


[도16]

Effect of different ratio of enzymes

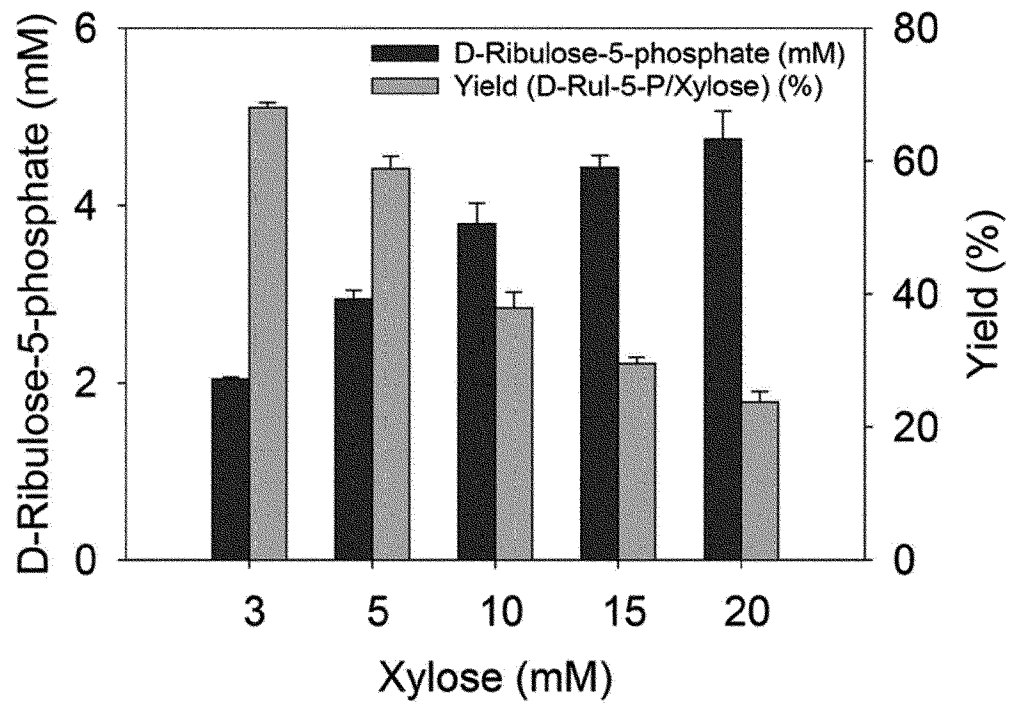


[도17]

Effect of different *EcAraB* and *EcPpk* loadings

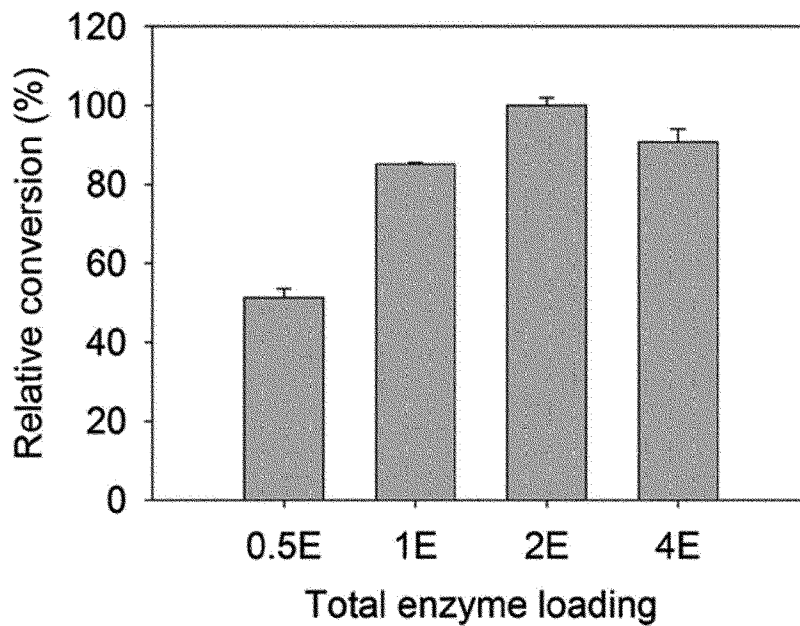
[도18]

Effect of different amounts of D-xylose

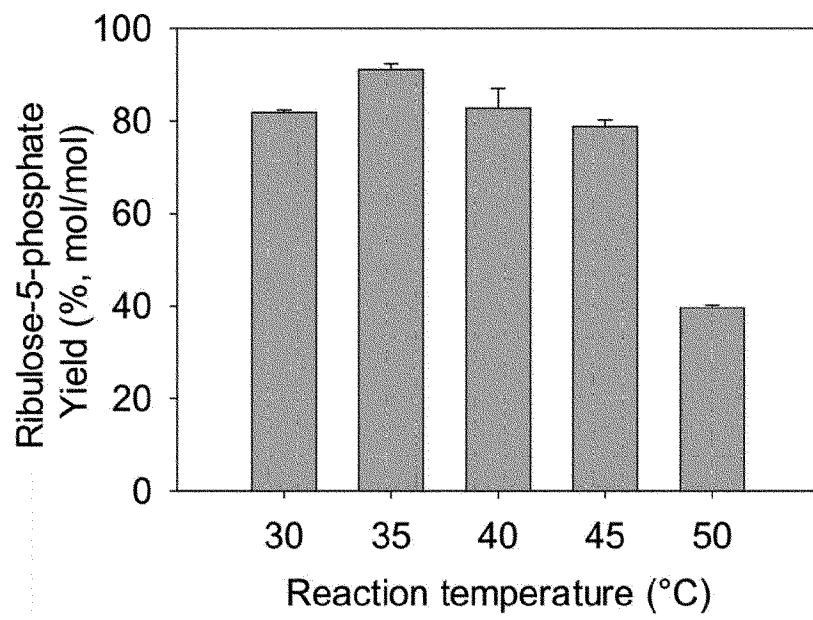


[도19]

Effect of total enzyme concentration



[도20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P 19/02(2006.01)i; C12N 9/90(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P 19/02(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/75(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: D-자일로스(D-xylose), 자일룰로스(xylulose), 리불로스(ribulose), D-리보스(D-ribose), D-리불로스-5-인산(D-ribulose-5-phosphate), 효소(enzyme), 이성질화효소(isomerase), 에피머화효소(epimerase), 인산화효소(kinase)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, H.-C. et al. Production of d-ribose by metabolically engineered Escherichia coli. Process Biochemistry. 2017 (electronic publication: 04 October 2016), vol. 52, pp. 73-77. See abstract; and figure 1.	1-17
A	LI, S. et al. Characterization of a d-tagatose 3-epimerase from Caballeronia fortuita and its application in rare sugar production. International Journal of Biological Macromolecules. 2019 (electronic publication: 19 July 2019), vol. 138, pp. 536-545. See entire document.	1-17
A	YOON, R.-Y. et al. Novel substrates of a ribose-5-phosphate isomerase from Clostridium thermocellum. Journal of Biotechnology. 2009, vol. 139, pp. 26-32. See entire document.	1-17
A	YANG, J. et al. Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides: Advances and perspectives. Biotechnology Advances. 2019, vol. 37, document no. 107406, pp. 1-24. See entire document.	1-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2023		Date of mailing of the international search report 23 August 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006915

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0063305 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP) 11 June 2010 (2010-06-11) See entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006915

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006915

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2010-0063305 A	11 June 2010	KR 10-1008556 B1	17 January 2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 19/02(2006.01)i; C12N 9/90(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 19/02(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/75(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: D-자일로스(D-xylose), 자일룰로스(xylulose), 리불로스(ribulose), D-리보스(D-ribose), D-리불로스-5-인산(D-ribulose-5-phosphate), 효소(enzyme), 이성질화효소(isomerase), 에피머화효소(epimerase), 인산화효소(kinase)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PARK, H.-C. 등, "Production of D-ribose by metabolically engineered Escherichia coli", Process Biochemistry, 2017 (전자공개: 2016.10.04), 52권, 페이지 73-77 초록; 도면 1	1-17
A	LI, S. 등, "Characterization of a D-tagatose 3-epimerase from Caballeronia fortuita and its application in rare sugar production", International Journal of Biological Macromolecules, 2019 (전자공개: 2019.07.19.), 138권, 페이지 536-545 전체 문헌	1-17
A	YOON, R.-Y. 등, "Novel substrates of a ribose-5-phosphate isomerase from Clostridium thermocellum", Journal of Biotechnology, 2009, 139권, 페이지 26-32 전체 문헌	1-17
A	YANG, J. 등, "Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides: Advances and perspectives", Biotechnology Advances, 2019, 37권, 문헌번호 107406, 페이지 1-24 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2010-0063305 A (건국대학교 산학협력단) 2010.06.11 전체 문헌	1-17
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년08월23일(23.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월23일(23.08.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

