

(51) 국제특허분류:

C12P 7/22 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/011017

(22) 국제출원일:

2018년 9월 19일 (19.09.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0121109 2017년 9월 20일 (20.09.2017) KR

(71) 출원인:

서강대학교산학협력단

(SOGANG

UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR];

04107 서울시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교),
Seoul (KR).

(72) 발명자:

이정국 (LEE, Jeong Kug); 04134 서울시 마포

구 백범로25길 63, 105동 803호 (염리동, 삼성아파트),

Seoul (KR). 김현준 (KIM, Hyeon Jun); 04068 서울시 마

포구 독막로 89, 203호, Seoul (KR). 통샤오명 (TONG,

Xiaomeng); 04122 서울시 마포구 송문16길 14, 4층 (염리동), Seoul (KR).

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

06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4~6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국

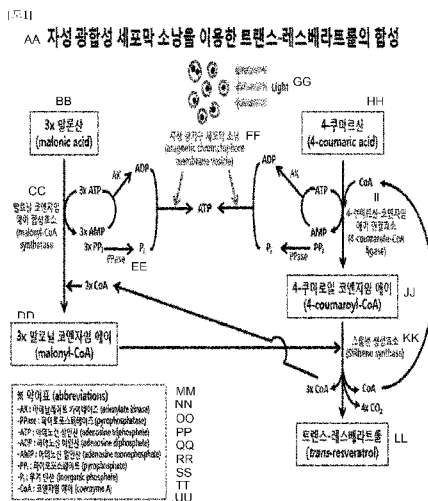
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,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

내 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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING *TRANS*-RESVERATROL USING MAGNETIC PHOTOSYNTHETIC MEMBRANE VESICLES

(54) 발명의 명칭: 자성 광합성 세포막 소낭을 이용한 트랜스-레스베라트롤의 생산 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for *in vitro* production of *trans*-resveratrol, the composition comprising purified photosynthetic membrane vesicles and a *trans*-resveratrol biosynthesis-related enzyme, and to a production method and system using the same.(57) 요약서: 본 발명은 정제된 광합성 세포막 소낭 및 트랜스-레스베라트롤 생합성 관련 효소를 포함하는 트랜스-레스베라트롤 (*trans*-resveratrol)의 생체 외 (*in vitro*) 생산용 조성물 및 이를 이용한 생산 방법 및 시스템에 관한 것이다.



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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관
한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일:

2019 년 5 월 9 일 (09.05.2019)

(48) 본 정정판 공개일:

2019 년 6 월 27 일 (27.06.2019)

(15) 정정사항에 관한 정보:

2019 년 6 월 27 일 (27.06.2019) 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 자성 광합성 세포막 소낭을 이용한 트랜스-레스베라트롤의 생산 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 자성 입자 (magnetic particle)를 함유한 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle), 즉, 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)을 고정화된 생합성 효소와 함께 사용하여 고부가 산물인 트랜스-레스베라트롤 (*trans-resveratrol*)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 광합성 세포막 (photosynthetic membrane)은 광합성을 수행하는 생물에서 나타나는 특징적인 세포 내 구조로서, 광흡수체 (light-harvesting complex), 광반응 중심체 (reaction center), 전자전달계 (electron transfer chain)를 보유하고 있으며, 광합성의 명반응을 독립적으로 수행한다. 광합성 세포막의 종류에는 자색 비유황 세균 (purple nonsulfur bacteria)에 존재하는 광기구 세포막 (chromatophore membrane, intracytoplasmic membrane, ICM)과 식물, 조류, 남세균에 존재하는 틸라코이드 세포막 (thylakoid membrane, TM)이 있다. 광합성 세포막은 세포 내에서 빛 에너지를 흡수하여 화학에너지로 전환하며 (명반응), 구체적으로는 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산 (inorganic phosphate, P_i)을 결합하여 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 반응, 또는 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized, $NADP^+$)을 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, $NADPH$)으로 전환하는 반응을 수행한다. 광합성 세균의 세포를 파쇄 할 경우 광합성 세포막은 소낭 (vesicle) 형태가 되는데 이를 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)이라고 한다. 광합성 세포막 소낭은 세포 외의 환경 (*in vitro*)에서 빛을 조사하였을 때 독립적으로 광합성의 명반응을 수행하며 이를 통해 생체 효소 반응에 사용되는 조효소인 아데노신 삼인산과 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산을 공급하는 역할을 할 수 있다 (대한민국 특허 등록 제 1017087520000).
- [3] 레스베라트롤은 포도 종에서 많이 발견되는 폴리페놀 계통의 화합물이며, 수명연장의 효과가 있다고 알려져 (Bhullar and Hubbard. 2015. Biochim. Biophys. Acta 1852: 1209-1218) 건강 보조제로서 많이 쓰이는 화합물이다. 수명 연장 효과 이외에도 레스베라트롤은 항산화 효과, 항혈소판 효과 (anti-platelet), 항염증 효과, 혈당 감소, 항암 효과 등의 다양한 효과가 있다고 알려져 있어 의약품으로서의 활용 가능성도 높다 (Kursvietiene et al. 2016. Medicina 52:

148-155).

- [4] 이러한 효능에서 불구하고 레스베라트롤은 그 산업적 생산이 용이하지 않다. 가장 고전적인 방법으로 포도나 땅콩과 같은 식물에서 레스베라트롤을 직접 추출하는 방법을 많이 사용하고 있으나, 식물이 보유하는 레스베라트롤의 함량이 낮기 때문에 그 수율이 좋지 않고, 정제도가 떨어진다는 단점이 있다. 하나의 대안으로 유기합성을 통해 레스베라트롤을 생산하는 방법이 있다 (Fan et al. 2010. Mini Rev. Org. Chem. 7: 272-281). 하지만 유기합성 방법은 반응의 부산물을 제거하기 어렵고, 반응이 복잡하게 구성되어 있어 대량생산이 어렵다. 또 다른 대안으로서 유전자 조작을 수행한 대장균이나 효모의 균체 내 생산을 이용한 방법이 있다. 대장균이나 효모는 본래 레스베라트롤을 합성하지 못하기 때문에 보통 그 생합성에 필요한 유전자를 발현하게 조작하여 레스베라트롤을 생산하며, 여기에서 다양한 형태로 변형된 방법이 있다. 균체를 이용할 경우 적게는 100 mg/L, 많게는 2300 mg/L (Lim et al. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77: 3451-3460) 까지 생산할 수 있지만, 균주를 확보 유지하는데 소모되는 비용이 크고, 세포 내용물을 제거하는 추가 공정이 필요하며, 유전자 조작된 균체가 불안정하다는 문제 (Afonso et al. 2015. Biotech. Rep. 5: 7-13)가 있다.

- [5] 이런 기존 방법들의 문제를 극복하고자 본 발명에서는 레스베라트롤 생합성 효소를 정제하여 세포 외에서 레스베라트롤을 생산하는 시스템을 구축하였다. 효소 시스템은 특이적인 반응 덕분에 부산물이 적고, 산물 순도가 높으며, 세포를 유지하기 위한 에너지 소모가 없고, 부분 반응의 제어가 용이하다는 장점이 있다. 하지만 높은 효소의 정제 비용, 고단가의 조효소 (cofactor) 공급 문제라는 제한 요인이 있었다. 본 발명에서는 효소를 이용한 생산 방법의 단점을 극복하고 장점을 극대화하고자 자성 광합성 세포막 소낭과 고정화 효소를 조합한 전체 생합성 과정에서 고단가의 조효소가 적은 양으로 반복되게 재사용하게 함으로써 그 공급문제를 해결하였다. 또한, 자성 광합성 세포막 소낭을 반응액으로 부터 자석을 사용하여 쉽게 분리하여 반복적인 재사용이 가능하며, 고정화된 효소 역시 메쉬 (mesh)를 이용하여 반복 재사용함으로써, 광합성 세포막 소낭 및 효소의 활용도를 높이고 높은 제조 및 정제비용을 상쇄하였고, 반응 산물인 레스베라트롤을 침전물 형태로 용이하게 분리하는 방법을 개발하였다.

- [6] 상기 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 설명을 위한 것일 뿐, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 정제된 효소를 이용하여 트랜스-레스베라트롤을 생체 외 (*in vitro*)에서 합성하는 방법을 개발하는 것이다.

화학적 합성 방법은 반응 부산물의 존재와 반응의 복잡성 때문에 실제 산업적인 적용이 어려웠다. 균체 내 생산 역시, 세포 유지에 따른 불필요한 에너지 낭비와 유전자 조작 균체의 불안정성에 따른 한계가 있었고 세포 내용물을 제거하는 추가 공정이 필요하다는 단점이 있었다. 이러한 한계를 극복하고자 본 발명은 효소를 이용하여 4-쿠마르산 (4-coumaric acid)과 말론산 (malonic acid)을 시작 기질로 하여 트랜스-레스베라트롤을 생산하는 새로운 생합성 경로를 구축하고 이를 실제 생산에 적용하기 위해 반응을 최적화 하였다. 상기 생합성 경로를 효율적으로 조작하기 위해 본 발명에서 해결하고자 한 문제는 다음과 같다:

- [8] 1) 효소 반응에 필요한 고단가 조효소의 지속적 공급 방법;
- [9] 2) 효소의 높은 정제비용;
- [10] 3) 최종 산물의 회수 방법.
- [11] 따라서 이하 과제 해결 수단에서 상기 문제에 대한 세부 설명 및 해결 방법과 다양한 활용 가능성을 제시하려고 한다. 또한, 본 발명에 대한 정확한 이해를 위해 용어의 의미를 명확히 정의하려고 한다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명에서는 트랜스-레스베라트롤의 세포 외 생산 방법을 개발하고자 3개의 주요 효소 (4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소, 말로닐 코엔자임 에이 합성효소, 스틸벤 생성효소)와 2개의 보조효소 (아데닐레이트 카이네이즈, 파이로포스페타이즈)를 포함하는 효소 시스템을 구축하였다 (도 1). 상기 효소 시스템에서는 저단가인 4-쿠마르산 및 말론산을 시작 기질로 하여 트랜스-레스베라트롤이 생산되며, 이 때 조효소로서 코엔자임 에이 (coenzyme A, CoA)와 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)이 요구된다. 상기 조효소들은 그 단가가 높아서 반응 시 계속적으로 공급하는 것이 경제적으로 불가능하기 때문에 조효소의 효율적인 공급 방법이 필요하다. 코엔자임 에이의 경우 전체 반응이 진행됨에 따라 효소 시스템 내에서 계속적으로 순환되어 반복 재사용되기 때문에 적은 양으로 전체 반응의 진행이 가능하다. 하지만 아데노신 삼인산은 효소 반응이 진행될 때, 아데노신 일인산 (adenosine monophosphate, AMP)과 파이로포스페이트 (pyrophosphate, PP_i)로 변환되어 소모되기 때문에 이를 재공급해주기 위한 방법으로 본 발명에서는 대한민국 특허 출원 제 10-2017-0052361에서 고안된 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)을 효소 시스템에 결합하였다. 상기 효소 시스템에 포함된 2개의 보조효소는 아데닐레이트 카이네이즈 (adenylate kinase)와 파이로포스페타이즈 (pyrophosphatase)이며 각각 아데노신 일인산과 아데노신 삼인산을 결합하여 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP)을 형성하는 반응과 파이로포스페이트를 무기 인산 (inorganic phosphate)으로 변환하는 반응을 촉매한다. 자성 광합성 세포막 소낭은 적절한 광원 하에서 광합성의 명반응을 통해 보조효소들에 의해 형성된 아데노신 이인산과 무기 인산을

아데노신 삼인산으로 다시 전환 할 수 있고, 이것은 효소반응에 반복 재사용되어 결과적으로 추가적 공급 없이 적은 양의 아데노신 삼인산의 양으로 전체 반응의 진행이 가능하게 된다.

- [13] 본 발명은, 광합성 세포막 소낭 및 트랜스-레스베라트롤 생합성 관련 효소를 포함하는, 트랜스-레스베라트롤 생산을 위한 조성물을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은, 상기 조성물을 이용한 상기 트랜스-레스베라트롤 생산 방법 및 시스템을 제공한다. 상기 생산 방법 및 시스템은 다음의 부분 반응으로 구성된 전체 반응을 내포한다:
- [15] a) 4-쿠마르산과 코엔자임 에이를 중합하여 4-쿠마로일 코엔자임 에이 (4-coumaroyl CoA)를 생성하고, 아데노신 삼인산을 소모하여 아데노신 일인산과 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 형성하는 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소 (4-coumarate-CoA ligase)의 효소 반응;
- [16] b) 말론산과 코엔자임 에이를 중합하여 말로닐 코엔자임 에이 (malonyl CoA)를 생성하고, 아데노신 삼인산을 소모하여 아데노신 일인산과 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 형성하는 말로닐 코엔자임 에이 합성효소 (malonyl-CoA synthetase)의 효소 반응;
- [17] c) 상기 a)와 b)에서 각각 생성된 4-쿠마로일 코엔자임 에이와 말로닐 코엔자임 에이를 중합하여 트랜스-레스베라트롤을 형성하고, 코엔자임 에이와 이산화탄소를 형성하는 스틸벤 생성효소 (stilbene synthase)의 효소 반응;
- [18] d) 상기 a)와 b)에서 생성된 아데노신 일인산을 아데노신 삼인산과 반응시켜, 아데노신 이인산으로 변환하는 아데닐레이트 카이네이즈의 효소 반응;
- [19] e) 상기 a)와 b)에서 생성된 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 무기 인산 (inorganic phosphate)으로 변환하는 파이로포스페테이즈 (pyrophosphatase)의 효소 반응;
- [20] f) 상기 d)와 e)에서 각각 생성된 아데노신 이인산과 무기 인산을 빛이 조사되는 조건에서 아데노신 삼인산으로 변환하는 광합성 세포막 소낭의 명반응 (light reaction).
- [21] 상기 광합성 세포막 소낭은 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle) 내부에 자성 입자 (magnetic particle)를 포함하는 세포막-단백질 복합체로서 자석에 접촉 시 자석 방향으로 인력을 받는 것을 특징으로 할 수 있고, 이와 같은 광합성 세포막 소낭을 본 명세서에서 “자성 광합성 세포막 소낭(magnetic photosynthetic membrane vesicle)”으로 지칭한다. 상기 자성 광합성 세포막 소낭은 광합성 반응이 끝난 후 자석을 이용하여 반응액에서 쉽게 분리가 가능하다.
- [22] 상기 “광합성 세포막 소낭”은 적절한 빛이 조사되는 조건 하에서 광합성의 명반응을 세포 밖에서 (*in vitro*) 독립적으로 수행하며 이를 통해 아데노신 이인산과 무기 인산을 아데노신 삼인산으로 전환할 수 있는 세포막-단백질 복합체를 의미한다. 본 발명의 구현을 위한 광합성 세포막 소낭은 자석 비유황

세균 (purple nonsulfur bacteria)에서 유래한 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle) 또는 남세균 (cyanobacteria), 조류 (algae)에서 유래한 틸라코이드 세포막 소낭 (thylakoid membrane vesicle)을 포함하는 군에서 선택될 수 있고, 본 발명에서는 하나의 구현 예로서 광기구 세포막 소낭을 사용하였다.

- [23] 상기 광기구 세포막 소낭은 자색 비유황 세균으로부터 분리하며, 바람직하게는 로도박터 속 (*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴룸 속 (*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속 (*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속 (*Rhoseobacter* sp.), 브래디리조비움 속 (*Bradyrhizobium* sp.) 및 루브리비박스 속 (*Rubrivivax* sp.) 등에서 선택될 수 있다.
- [24] 상기 틸라코이드 세포막 소낭은 식물, 조류 (algae) 또는 남세균에서 분리하며, 바람직하게는 시네코시스티스 속 (*Synechocystis* sp.), 시네코코쿠스 속 (*Synechococcus* sp.), 노스톡 속 (*Nostoc* sp.), 아나베나 속 (*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속 (*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속 (*Cyanobacterium* sp.) 등에서 선택될 수 있다.
- [25] 상기 “자성 입자”는 영구 자석 (permanent magnet) 또는 전자석 (electromagnet)에 의해 인력 (attractive force)을 받는 입자를 의미한다. 자성 입자의 크기에는 제한이 없으며, 바람직하게는 자철석 (magnetite, Fe_3O_4) 또는 마그헤마이트 (maghemite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) 등에서 선택될 수 있다. 자성 입자는 표면처리를 통해 수용액 상태에서 안정화하는 과정인 코팅 (coating) 과정을 거친다. 본 발명의 바람직한 구현을 위한 코팅 재료는 수용성의 화합물이며, 시트르산 (citric acid), 폴리에틸렌글라이콜 (PEG), 폴리바이닐알콜 (PVA), 덱스트란 (dextran) 등에서 선택될 수 있다.
- [26] 상기 트랜스-레스베라트롤 생산 방법 또는 생산 시스템에 포함된 효소들의 염기서열을 획득할 수 있는 유전체 (genome)의 종류에는 제한이 없으나, 바람직하게는 진핵 생물 (eukaryote) 또는 박테리아 (bacteria)에 속하는 유기체의 유전체에서 선택될 수 있다.
- [27] 본 발명의 주요 목적은 효소 반응에 필요한 고단가 조효소를 지속적으로 공급하고 고비용의 효소 정제 문제를 해결하는 것이었다. 위의 전체 반응이 진행되면서 고단가 조효소인 코엔자임 에이는 상기 반응 a)와 b)에 의해 소모되며, 소모된 코엔자임 에이는 다시 반응 c)에 의해 유리되므로 반복 재사용될 수 있다. 아울러, 다른 조효소인 아데노신 삼인산은 상기 반응 a), b)에 의해 소모되며, 소모된 아데노신 삼인산은 상기 반응 d), e), f)를 통해 재생되어 반복 재사용될 수 있다. 상기 전체 반응을 진행 한 후, 추후 새로운 용기에서 새로운 반응을 진행할 경우, 광합성 세포막 소낭 및 효소를 반응액에서 쉽게 분리될 수 있어야하며, 이를 해결하기 위해 광합성 세포막 소낭에 자성 입자를 넣어 자성 광합성 소낭을 제조하여 자석으로 소낭을 분리할 수 있도록 하였고, 효소 고정화 (enzyme immobilization)와 메쉬 (mesh)를 이용하여 3개의 주요효소와 2개의 보조효소를 반응액에서 쉽게 분리할 수 있도록 하였다. 이하

반응의 구체적 설명에서 고정화된 효소는 메쉬의 안쪽에 밀봉된 형태로 사용한다. 즉, 상기 고단가 조효소는 전체 반응에서 적은 양으로 반복 재사용되므로 그 활용도를 높여 구입 비용을 상쇄하기 위한 해결책일 수 있고, 자성 광합성 소낭과 고정화된 효소는 반응액에서 회수하여 새로운 반응에 재사용 할 수 있기 때문에 고비용의 광합성 소낭 제조 및 효소 정제 비용을 상쇄하기 위한 해결책이 될 수 있다.

- [28] 상기 “효소 고정화” 또는 “고정화 (immobilization)”는 효소 또는 효소 복합체를 불용성의 지지체 (insoluble support)에 결합시키는 것을 의미하며, 본 발명에서 사용하는 방법은 친화도 결합법 (affinity binding)이다. 구체적으로는 폴리히스티딘-태그 (polyhistidine-tag)와 2가 양이온의 전기적 결합, 또는 아비딘 (avidin)과 스트렙 태그 (strep-tag)의 특이적인 결합을 이용한다. 폴리히스티딘-태그는 6개 내외의 히스티딘이 연결된 펩타이드 (peptide) 서열이며 니켈 이온 (Ni^{2+}), 코발트 이온 (Co^{2+})과 같은 2가 양이온과 강한 전기적 결합을 형성한다. 폴리히스티딘-태그 서열은 유전자 조작을 통해 단백질의 말단에 결합할 수 있으며 폴리히스티딘-태그를 가지고 있는 단백질은 니켈 이온이 결합된 아가로즈 수지 (Ni-NTA agarose resin)에 고정화 될 수 있다. 아비딘은 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 특이적으로 인식하여 강하게 결합할 수 있는 단백질을 총칭하는 것이며, 진핵생물 (eukaryote) 및 박테리아 (bacteria)에서 분리할 수 있다. 아비딘 수지 (avidin resin)는 아비딘이 아가로즈 (agarose) 중합체에 공유 또는 비공유 결합된 지지체로서, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체와 강한 결합을 형성한다. 스트렙 태그는 8개의 아미노산으로 구성된 바이오틴 (biotin)의 구조 유사체 (structural analog)이며, 유전자 조작을 통해 특정 단백질의 말단에 결합할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면 상기 아비딘 수지의 한 종류로서 스트렙토마이세스 아비딘 (*Streptomyces avidinii*)에서 유래한 스트렙타비딘 (streptavidin)이 아가로즈 중합체에 결합된 스트렙타비딘 수지 (streptavidin resin)를 사용할 수 있다. 상기 스트렙-태그를 가지고 있는 단백질은 상기 스트렙타비딘 수지에 고정화 될 수 있다.

- [29] 본 발명에서 정의하는 “메쉬”는 공극 (pore size)이 10 내지 100 μm 의 막 (membrane) 또는 천 (fabric)을 의미하며, 다양한 재질을 선택할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현 예에서 메쉬의 역할은 수지에 고정화된 효소를 메쉬 안쪽에 밀봉함으로써 서로 다른 고정화된 효소들 간의 혼합을 방지하고, 고정화된 효소를 수용액 내에서 용이하게 분리할 수 있게 하는 것이다. 따라서 메쉬의 공극 크기는 효소 고정화의 지지체가 통과하지 못하는 선에서 기질 및 산물의 출입이 자유로운 것을 선택하는 것이 바람직하다.

- [30] 상기 생산 방법 또는 시스템을 통해 생산된 트랜스-레스베라트롤은 반응액으로 용해된다. 하지만 상온 수용액에서 레스베라트롤의 용해도는 0.03 g/L이므로 생산량이 그 이상으로 형성될 경우 수용액 내에서 현탁액 (suspension)

형태로 축적된다. 본 발명의 바람직한 구현 예에서는 상기 생산 방법에 의한 트랜스-레스베라트롤 생산량은 1.06 g/L/day로서 90% 이상의 트랜스-레스베라트롤이 현탁액 형태로 형성되었는데, 이런 형태의 트랜스-레스베라트롤은 원심분리에 의해 쉽게 침전되기 때문에, 반응액에서 생산된 트랜스-레스베라트롤을 쉽게 분리할 수 있다. 따라서 추가적인 산물 정제 공정이 요구되지 않는다. 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면 반응 도중에 현탁액 상태의 트랜스-레스베라트롤을 분리하는 과정이 없이 전체 반응을 진행하였으나, 또 다른 양태에 따르면 반응 도중에 트랜스-레스베라트롤을 주기적으로 회수하면서 전체 반응을 진행할 수도 있다.

[31] 본 발명의 일 양태에 따르면, 상기 레스베라트롤 생산을 위한 방법 또는 시스템에서 1회의 전체 반응 (total reaction)을 수행한다. 하지만 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 자성 광기구 세포막 소낭과 고정화 효소를 반응액에서 분리 및 회수하여, 새 반응액에서 반복적으로 사용함으로써 최소 5회 이상의 전체 반응을 통해 레스베라트롤 생산 수율을 높일 수 있다.

[32] 상기 생산 방법 또는 시스템에의 최종산물은 입체-특이적 (stereo-specific)이다. 레스베라트롤은 그 화학적 입체 구조에 따라 트랜스 (trans) 또는 시스 (cis) 형태의 이성질체 (isomer)로 존재할 수 있다. 상기 효소 시스템으로 레스베라트롤을 생산할 경우 트랜스-레스베라트롤만 선택적으로 획득할 수 있다.

발명의 효과

[33] 본 발명의 이점은 효소를 이용한 세포 외 트랜스-레스베라트롤 생산에서 고단가의 조효소 공급 문제를 해결한 것이다. 본 발명의 효소 시스템에서 트랜스-레스베라트롤을 생산하기 위해 필요한 조효소는 코엔자임 에이와 아데노신 삼인산이며, 코엔자임 에이는 전체 반응이 진행됨에 따라 반응액 내에서 반복 재사용될 수 있고, 효소 반응에 의해 소모되는 아데노신 삼인산은 아데닐레이트 카이네이즈, 파이로포스페테이즈 및 자성 광합성 세포막 소낭에 의한 반응으로 반응액 내에서 재생되어 반복 재사용될 수 있다. 이로써 조효소의 적은 양으로도 추가적인 공급이 없이 전체 반응을 진행하게 되어 트랜스-레스베라트롤 생산 시스템의 경제성을 증진시켰다.

[34] 본 발명의 또 다른 이점은 반응이 끝난 후 자성 광기구 세포막 소낭 및 고정화된 효소들을 반응액에서 쉽게 분리할 수 있다는 것이다. 이로써 반응액에서 분리한 광기구 세포막 소낭 및 효소들을 새로운 반응액에서 재사용할 수 있기 때문에, 광기구 세포막 소낭과 효소 사용 효율을 높임으로써 고단가의 광기구 세포막 소낭 제조 및 고단가의 효소 정제비용을 상쇄할 수 있다. 또 하나의 효과는 반응액에 적은 양이지만 남아있는 고단가 조효소의 회수가 이온 교환 수지로 분리 농축하기가 용이해진다는 것이다.

[35] 본 발명의 또 다른 이점은 레스베라트롤을 침전물 형태로 반응액에서 쉽게

분리할 수 있어 레스베라트롤 정제를 위한 추가 공정이 요구되지 않는다는 것이다.

- [36] 본 발명의 또 다른 이점은 최종 반응 산물이 입체-특이적 (stereo-specific)이라는 것이다. 즉, 최종 반응 산물로서 트랜스-레스베라트롤만 선별적으로 생산할 수 있어 순도가 높은 산물을 획득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 자성 광합성 세포막 소낭을 이용하여 트랜스-레스베라트롤을 생산하는 방법에 대한 도면이다.
- [38] 도 2는 트랜스-레스베라트롤 생산에 필요한 주요효소들을 정제한 것을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔로 확인한 것이다.
- [39] 도 3은 도 2에서 정제한 주요효소들을 고정화하여 활성을 측정하고, 효소 동역학 계수 (enzyme kinetic parameters)를 결정한 것이다.
- [40] 도 4는 도 2에서 정제한 주요효소들을 고정화하여 4°C에서 장기간 보관하였을 때 활성의 변화를 측정한 것이다.
- [41] 도 5a, b, c는 도2에서 정제한 주요 효소들이 트랜스-레스베라트롤 생산에서 사용되는 기질과 생산된 트랜스-레스베라트롤에 대한 효소 활성의 저해 여부를 확인한 것이다. 도 5a는 말론산에 의한 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소의 활성 변화를, 도 5b는 말론산에 의한 스틸벤 생성효소의 활성 변화를, 그리고 도 5c는 트랜스-레스베라트롤에 의한 말로닐 코엔자임 에이 합성효소의 활성 변화를 측정한 것이다.
- [42] 도 6a, b, c는 도 1에 명시된 방법을 이용하여 12 시간 동안 트랜스-레스베라트롤을 생산한 것이다. 도 6a는 반응액에서 트랜스-레스베라트롤이 침전물로 형성되는 것을 확인한 것이다. 도 6b는 상기 반응액 내의 트랜스-레스베라트롤의 양을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 확인한 것이고, 도 6c는 이것을 정량하여 생산수율을 결정한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 으로 표면이 코팅 (coating)된 산화철 자성 입자 (iron oxide magnetic particle)을 합성 및 선별하였다. 먼저 기체 질소로 채워진 밀폐된 플라스크에 50 ml의 증류수와 3가 염화철 (FeCl₃) 5.88 g을 혼합 후 60°C까지 용액을 가열하고, 50 ml의 증류수에 2가 염화철 (FeCl₂) 2.5 g을 용해한 용액을 가열된 3가 염화철 용액과 혼합 후, 스피너 (spin bar)를 이용하여 500 rpm으로 교반 (stirring)하면서 80°C까지 용액을 가열한다. 여기에 수산화암모늄 용액 (NH₄OH) 12 ml을 넣고, 동일한 교반속도로 80°C에서 30분 동안 교반한다. 다음, 2.5 g의 시트르산을 용액에 첨가하고 90°C까지 가열하여 90분 동안 교반하고, 교반을 유지하면서 용액을 상온으로 냉각한다. 자성 입자가 포함된 상기 용액을 증류수를 이용하여 50배 희석한 후 네오디뮴 자석 (neodymium magnet)에 끌려나오는 자성입자를 용액과 분리한다. 분리한 자성입자에 증류수를 넣고 0.22 µm 필터 (Merck

Millipore)를 통과시킨 후 자석을 이용하여 용액에서 자성 입자를 한 번 더 분리한 후 세척 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0)를 넣는다. 자석으로 자성입자를 분리하고 세척버퍼를 넣는 과정을 3회 반복한 후 자성입자를 세척버퍼에 넣어서 4°C에 보관한다. 자성 입자의 양은 5N의 염산 (HCl)에 자성 입자를 용해시켜 355 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다 (Belikov et al. 2002. Pharma. Chem. J. 36: 333-336).

[44] [실시예 2]자성 리포솜의 제조

[45] 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 합성한 자성 입자를 이용하여 자성 리포솜 (magnetoliposome)을 제조한다. 클로로포름 (CHCl_3)에 용해된 10 mg의 인지질 [phospholipid, 본 실시예에서는 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine을 이용 (Avanti lipids)]을 10 ml 용량의 유리병에 넣고 질소 기체를 흘려보내 클로로포름을 제거하여 유리병 바닥에 인지질의 막 (film)이 형성되게 한다. 여기에 3 ml의 리포솜 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10% sucrose)와 50 mg의 자성 입자를 넣은 후 3000 rpm으로 30분 간 교반한다. 다음, 초음파 파쇄기 (Branson sonifier 250)를 이용하여 아웃풋 (output) 2로 상온에서 10분 간 용액에 초음파를 조사한다. 이후, 용액에 2 mM이 되도록 염화칼슘 (CaCl_2)을 첨가하고, 1000 g로 1분 간 원심분리한 후 상층액을 얻는다. 획득한 상층액에서 자석에 끌려오는 자성 리포솜을 분리한 후 남은 용액을 버리고 새로운 리포솜 버퍼를 첨가한다. 이 과정을 3회 반복 후, 리포솜 버퍼에 자성 리포솜을 용해시켜 4°C에 보관한다. 자성 리포솜에 포함된 인지질의 정량은 스튜어트 방법 (Stewart. 1980. Anal. Biochem. 104: 10-14)을 이용하였다.

[46] [실시예 3]자성 광기구 세포막 소낭의 제조

[47] 본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 제조한 자성 리포솜과 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle)를 융합 (fusion)하여 자성 광기구 세포막 소낭 (magnetic chromatophore membrane vesicle)을 제조하는 방법을 명시한다. 융합 시 폴리에틸렌글라이콜-칼슘 융합법 (PEG- Ca^{2+} fusion. Yen et al. 1982. Biochim Biophys Acta 688: 605-621)을 이용하였다. 상기 광기구 세포막 소낭은 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)의 한 종류로서 오로지 발명의 실시를 위해서 임의로 선택된 것이며, 다른 광합성 세포막 소낭을 선택하더라도 본 발명의 구현이 가능하다.

[48] 광기구 세포막 소낭을 분리하기 위해 로도박터 스페로이테스 (*Rhodobacter* sphearoides 2.4.1, ATCC BAA-808, Cohen-Bazire et al. 1956. J. Cell. Comp. Physiol. 49: 25-68)를 250 ml의 시스트롬 최소배지 (Sistrom. 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616, 조성은 표 1)에서 광합성 조건으로 배양 (photosynthetic culture)하였다. 상기 광합성 조건은 15 Watt/m²의 광도, 30°C의 온도의 혐기조건이다. 광합성 배양을 수행한 세균 배양액이 660 nm에서의 흡광도가 2.0이 되었을 때, 4°C, 7,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 균체 (cell pellet)를 수득하였다. 이후 본 실시예에서 실시하는 모든 과정은 기체조성이 90%의 질소, 5%의 수소, 5%의

이산화탄소로 이루어진 혐기상자 (anaerobic chamber, model 10, Coy laboratory product) 안에서 수행하였다. 수득한 균체는 8 ml의 파쇄 버퍼 (10 mM Tris, pH 8.0, 10% sucrose)로 용해하고 프로테아제 억제제 혼합액 (protease inhibitor cocktail, Roche)을 제조사의 지시량만큼 첨가하였다. 상기 수득한 균체의 파쇄 (lysis)를 위해 초음파파쇄기 (model VCX130, Sonics & Materials)를 이용하여, 50% 증폭 (amplification)으로 2분 간 초음파를 조사하고 2분 간 얼음물에서 냉각시키는 과정을 4회 반복하였고, 4°C, 7,000 g 에서 10분 간 원심분리 후 형성되는 상층액 (세포 파쇄액)을 분리하였다. 분리된 세포 파쇄액에는 광기구 세포막 소낭이 포함되어 있으며 이를 정량하기 위해 490 μl 의 색소추출용액 (acetone:methanol = 7:2)에 10 μl 의 세포 파쇄액을 혼합하여 6,000 g에서 1분간 원심분리 한 추출액에서 770 nm의 흡광도를 측정함으로써 박테리오클로로필 에이 (bacteriochlorophyll *a*, bch *a*)의 양을 결정하였다. 박테리오클로로필 에이는 83.9 mM⁻¹ (Kim and Lee. 2010. J Bacteriol. 192: 198-207)의 몰흡광계수 (molar extinction coefficient)를 가지므로 이를 이용하여 세포 파쇄액의 박테리오클로로필 에이의 농도 ($\mu\text{g bch } a/\text{ml}$)를 계산하여 세포 파쇄액 내의 광기구 세포막 소낭의 양을 결정하였고, 이를 막융합법에 사용하였다. 0.2 mg bch *a*의 박테리오클로로필 에이를 포함하는 상기 세포파쇄액과 0.8 mg phospholipid를 포함하는 자성 리포솜을 혼합한 후, 혼합액과 동일한 부피의 퓨전 버퍼 (25 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 0.5 mM CaCl₂, 55% polyethylene glycol 6000)를 첨가하고 30°C에서 10 분에 1회씩 10초간 혼합 (by vortexing) 하는 과정을 총 6회 실시한다. 다음, 자석을 이용하여 자석에 끌려오는 광기구 세포막 소낭 (자성 광기구 세포막 소낭)을 획득한 후 남은 용액을 제거하고, 리포솜 버퍼를 이용하여 세척 후, 최종적으로 리포솜 버퍼에 용해시켜 4°C에 보관한다. 리포솜 버퍼로 세척 시 자성 광기구 세포막 소낭의 안정제 (stabilizer)로서 5 $\mu\text{g bch } a/\text{ml}$ 의 로도박터 스페로이데스 세포 파쇄액을 첨가해준다. 상기 자성 광기구 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP) 합성 활성 측정 시 광반응 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM Na₂PO₄, 100 mM sucrose, 10 mM MgCl₂, 1 mM Adenosine diphosphate, 5 mM sodium ascorbate, 100 μl FeCl₃)에 자성 광기구 세포막 소낭을 1 $\mu\text{g bch } a/\text{ml}$ 의 농도로 투입하고, 15 Watts/m² 광도, 30°C에서 반응하였고, 반응 산물인 아데노신 삼인산은 아데노신 삼인산 검출 키트 (Sigma, CAT. FLAA)를 이용하여 정량하였다.

[49] [표1]

시스템 최소배지	
첨가물	최종농도
KH_2PO_4	20 mM
NaCl	8.5 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.78 mM
L-Glutamic acid	0.67 mM
L-Aspartic acid	0.25 mM
Succinic acid	34 mM
Nitrilotriacetic acid	1.05 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.2 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.23 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.16 μM
EDTA	4.7 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	38 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9.1 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.6 μM
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.85 μM
H_3BO_3	1.8 μM
니코틴산	8.1 μM
티아민염산염	1.5 μM
Biotin	41 nM

[50] [실시예 4]레스베라트롤 생합성 효소의 정제 및 고정화

[51] *본 발명의 시스템에 의한 레스베라트롤 생산을 위해 그 구현 예 중 하나로 자성 광기구 세포막 소낭을 레스베라트롤 생합성 효소와 조합하여 레스베라트롤을 생산하였다 (도 1). 이를 위해 본 실시예에서는 레스베라트롤을 합성하는 주요효소 3종류와 보조효소 2종류의 정제 및 고정화 방법을 다룬다.

[52] 레스베라트롤 합성에 사용한 3종류의 주요효소 (도 1)는 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소 (4-coumarate-coA ligase), 말로닐 코엔자임 에이 합성효소 (malonyl-CoA synthetase), 그리고 스틸벤 생성효소 (stilbene synthase)이다. 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소는 식물인 니코티아나 타바쿰 (*Nicotiana*

tabacum)에서 유래한 것을 사용하였고, 대장균 코돈으로 코돈 최적화 (codon-optimization)한 염기서열 (서열번호 7)을 합성하여 pET29a 벡터 (Novagen)에 클로닝하였다. 말로닐 코엔자임 에이 합성효소는 세균인 브래디라이조비움 다이아조에피션스 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*)에서 유래한 것을 사용하였고, 서열번호 1과 2를 각각 전방, 후방 프라이머로 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 염기서열을 확보하여 이를 pRSET-A 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였다. 스틸벤 생성효소는 식물인 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*)에서 유래한 것을 사용하였고, 대장균 코돈으로 코돈 최적화 (codon-optimization)한 염기서열 (서열번호 8)을 합성하여 pET29a 벡터 (Novagen)에 클로닝하였다. 세 효소의 염기서열을 포함하는 벡터를 이용하여 대장균을 형질전환 (transformation)하여 대장균 내에서 세 효소를 각각 발현하였다. 상기 세 효소의 유전자를 포함하는 벡터를 이용하여 효소를 발현할 경우 히스티딘 태그 (His₆-tag)가 각 효소의 말단에 결합하여 발현되기 때문에 이를 이용하여 효소를 정제하였다. 효소 발현 시 상기 형질전환 된 각각의 대장균을 LB (Luria-Bertani media)에서 진탕배양 (250 rpm, 37°C)하여 600 nm에서의 흡광도가 0.5가 되었을 때 1 mM의 IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하고, 30°C에서 12시간 동안 진탕배양 한다. 상기 배양용액을 6000 g, 10분 간 원심분리 하여 균체 (pellet)를 획득하고, 그것을 용해 버퍼 (50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)에 재현탁 (resuspension)하여 상기 초음파 파쇄를 이용하여 세포를 파쇄하였고, 6000 g에서 10분 간 원심분리하여 상층액을 획득하였다 (세포파쇄액). 상기 세포파쇄액을 니켈 아가로스 수지 (Ni-NTA agarose resin, Qiagen)와 혼합하고, 수지 (resin)에서 세포파쇄액을 제거한 후 수지를 세척버퍼 (50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)로 세척한 후, 최종적으로 PBS 버퍼 (phosphate buffered saline, pH 7.4)에 재현탁하여 4°C에 보관하였다 (니켈 아가로스 수지에 고정화된 레스베라트를 합성 효소). 고정화된 효소의 정량 및 정제도 확인을 위해 소량의 상기 수지 현탁액을 히스티딘 태그 용출 버퍼 (50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)와 혼합하여 수지에서 각 효소를 분리한 후 로우리 방법 (Lowry method)을 이용하여 수지에 결합된 효소의 양을 결정하였다. 상기 용출액을 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS PAGE) 수행하여 분석한 결과, 세 주요 효소들 모두 그 크기가 예상값과 일치하였고 순수하게 정제가 됨을 확인하였다 (도 2).

- [53] 조효소의 재순환을 위해 필요한 2종류의 보조효소 (도 1)는 아데닐레이트 카이네이즈 (adenylate kinase)와 파이로포스페타이즈 (pyrophosphatase)가 있다. 두 보조효소는 모두 로도박터 스페로이데스의 유전체에서 서열을 확보하였다. 아데닐레이트 카이네이즈는 전방, 후방 프라이머로 각각 서열번호 3, 4를 이용하였고, 파이로포스페타이즈는 각각 서열번호 5, 6을 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 유전자 염기서열을 확보하여 각각을 pASK-IBA3 벡터

(IBA)에 클로닝 하였다. 상기 벡터에 유전자를 클로닝 할 경우 말단에 스트렙 태그 (strep-tag)가 결합된 상태로 효소가 발현되기 때문에 효소의 정제 과정은 스트렙 태그를 이용하였다. 상기 두 보조효소의 염기서열을 포함하는 벡터로 대장균을 각각 형질전환 하여 250 rpm, 37°C에서 진탕배양 후, 600 nm에서의 흡광도가 0.5가 되었을 때 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 무수 테트라사이클린 (anhydrotetracycline)을 첨가한 후, 30°C에서 12시간 동안 진탕배양 하였다. 배양 후, 6000 g에서 10분 간 원심분리 하여 균체를 획득하고, 스트렙 버퍼 (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl)로 재현탁하여 상기 초음파 파쇄 방법을 이용해 세포를 파쇄하여 세포파쇄액을 얻었다. 세포파쇄액은 스트렙타비딘 수지 (streptavidin resin, IBA)와 혼합하였고, 수지에서 세포파쇄액을 제거한 후 스트렙 버퍼로 스트렙타비딘 수지를 세척하여 최종적으로 PBS 버퍼에 재현탁 후 4°C에 보관하였다. 효소의 정량은 소량의 수지 현탁액에 용출 버퍼 (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM desthiobiotin)를 첨가하여 스트렙타비딘 수지와 효소를 분리한 후, 로우리 방법 (Lowry method)을 수행하였다.

[54] [실시예 5]레스베라트롤 생합성 효소의 활성 및 안정성 측정

[55] 본 실시예에서는 상기 실시예 4에서 3종류의 주요효소들을 수지에 고정화할 때 효소의 활성에 주는 영향을 분석하기 위해 고정화된 각 효소의 효소 동역학 계수 (enzyme kinetic parameter)를 결정하고, 고정화된 효소의 안정성을 확인하였다. 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소의 활성 측정은 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM Na_2HPO_4 , 5 mM MgCl_2 , 5 mM 아데노신 삼인산, 0.33 mM 코엔자임 에이, 4~16 μM 4-쿠마르산 (4-coumaric acid), 50 μg 의 효소가 포함된 버퍼에서 수행하였고, 반응산물인 4-쿠마로일 코엔자임 에이 (4-coumaroyl CoA)는 333 nm에서의 흡광도를 이용하여 정량하였다 (Stockigt and Zenk. 1975. Z. Naturforsch. 30c: 352-358). 말로닐 코엔자임 에이 합성효소의 활성 측정은 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.4 mM 아데노신 삼인산, 0.2 mM 코엔자임 에이, 2~16 μM 말론산 (malonic acid), 10 μg 의 효소가 포함된 버퍼에서 수행하였고, 반응산물인 말로닐 코엔자임 에이 (malonyl-CoA)는 232 nm에서의 흡광도를 이용하여 정량하였다 (2000. Koo and Kim. Arch. Biochem. Biophys. 378: 167-174). 스틸벤 생성효소의 활성 측정은 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 6~48 μM 4-쿠마로일 코엔자임 에이, 500 μM 말로닐 코엔자임 에이 가 포함된 버퍼, 또는 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 200 μM 4-쿠마로일 코엔자임 에이, 2.5~18 μM 말로닐 코엔자임 에이가 포함된 버퍼에서 수행하였고, 반응산물인 레스베라트롤은 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 정량하였다 (Paulo et al. 2011. J. Agric. Food Chem. 59: 2157-2168). 상기 모든 효소 반응은 30°C에서 수행하였다. 고정화된 (immobilized) 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소와 말로닐 코엔자임 에이 합성효소는 각각 고정화되지 않은 (free) 형태에 비해서 기질 친화도 (K_m)는 변화가 없으나 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소의 경우 고정화 했을 때 턴오버수 (turnover number, k_{cat})가 1.5배

증가하여 전체적인 효소의 기능이 향상되었다(도 3). 스틸벤 생성효소의 경우 고정화된 효소의 두 기질에 대한 기질 친화도가 고정화되지 않은 효소에 비해 2배 가량 감소하였으나, 턴오버수가 2배 증가하여 전체적인 효소의 효율면에서는 큰 변화가 없었다(도 3). 결론적으로 3종류의 주요효소를 고정화할 경우 효소의 기능에 큰 영향이 없음을 확인하였다. 또한, 고정화 효소들을 4°C에 6개월간 보관할 경우, 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소와 스틸벤 생성효소는 100% 활성을 유지하였고, 말로닐 코엔자임 에이 합성효소는 60%의 활성을 유지하였다(도 4). 따라서, 본 발명의 실시자가 이를 응용하여 고정화된 효소를 장기간 보관하여 사용하는 것이 가능하다.

[56] **[실시예 6] 자성 광기구 세포막 소낭을 활용한 레스베라트롤의 합성**

[57] 본 실시예에서는 상기 실시예 3에서 제조한 자성 광기구 세포막 소낭과 상기 실시예 4에서 제조한 고정화된 레스베라트롤 합성 효소들을 이용하여 도 1의 전체반응을 실제로 수행하였다. 전체 반응은 1 당량의 4-쿠마르산과 3 당량의 말론산을 기질로 하고 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP) 및 코엔자임 에이 (coenzyme A)를 조효소로 사용하여 최종산물인 레스베라트롤 1 당량을 획득하는 것(도 1)이다. 각 주요효소의 반응은 하나의 공간에서 이루어지며 여기서 자성 광기구 세포막 소낭의 역할은 효소에 의해 소모된 ATP를 재생하는 것이다($ADP + P_i \rightarrow ATP$). 보조효소인 아데닐레이트 카이네이즈는 아데노신 일인산 (adenosine monophosphate, AMP)을 ADP로 재생하고, 파이로포스페타이즈는 주요효소에서 반응에서 나오는 파이로포스페이트 (pyrophosphate, PP_i)를 무기 인산 (phosphate, P_i)으로 변환하여 조효소의 순환을 매개한다. 상기 실시예에서 제조한 고정화된 효소들은, 각각을 독립적으로 조작하기 위해, 25 μm 의 공극 (pore size)을 가진 메쉬 (mesh) 안에 각각 밀봉하여 반응에 이용하였다. 이하 본 실시예에 등장하는 고정화된 효소들은 모두 메쉬 안에 밀봉된 것을 의미한다.

[58] 상기 트랜스-레스베라트롤 생산 시스템에서는 서로 다른 종류의 연속된 효소 반응이 하나의 공간에서 수행되므로, 각 효소들은 자신의 기질 및 산물뿐만 아니라 다른 효소들의 기질 및 산물과도 접촉할 수 있다. 이러한 이유로 예상치 못한 효소의 활성 변화가 유발될 수 있으므로 이를 확인하고자 3 종류의 각 주요효소에 자신의 것이 아닌, 다른 효소의 기질 및 산물을 첨가하여 활성 변화를 확인하였다. 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소와 스틸벤 생성효소의 연속반응은 자연계에서 흔히 수행되는 합성 경로이기 때문에 두 효소의 기질 및 산물 간에는 상기 효소 활성 변화의 문제가 없을 것이라고 예상하였다. 따라서, 본 실시예에서는 말로닐 코엔자임 에이 합성효소의 기질인 말론산에 의한 다른 효소의 활성 변화와, 최종산물인 트랜스-레스베라트롤에 의한 말로닐 코엔자임 에이 합성효소의 활성 변화를 확인하였다. 그 결과, 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소(도 5a)와 스틸벤 생성효소(도 5b)는 말론산에 의한 활성 변화가 없었다. 또한, 말로닐 코엔자임 에이 합성효소 역시 최종산물인

트랜스-레스베라트롤에 의한 활성 변화가 없었다 (도 5c). 결과적으로 상기 레스베라트롤을 생산하기 위한 전체반응을 하나의 공간에서 수행하는 것이 효소 활성 측면에서 큰 문제가 없음을 확인하였다.

- [59] 레스베라트롤 생산을 위해 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM Na₂HPO₄, 40 mM 4-쿠마르산, 120 mM 말론산, 5 mM MgCl₂, 5 mM 아테노신 삼인산, 6 mM 코엔자임 에이이 포함된 반응액에 0.1 mg의 고정화된 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소, 0.5 mg의 고정화된 말로닐 코엔자임 에이 합성효소, 7.5 mg의 고정화된 스틸벤 생성효소, 0.6 mg의 고정화된 아테닐레이트 카이네이즈, 0.6 mg의 고정화된 파이로포스페테이즈, 0.2 mg bch *a* 의 자성 광기구 세포막 소낭을 투입하여 반응을 수행하였다. 반응은 상기 광합성 조건, 30°C에서 12 시간 동안 수행되었고, 반응액 내에 형성된 레스베라트롤을 반응 시간 별로 분석하였다 (도 6). 도 6a는 상기 반응액의 모습을 시간별로 나타낸 것이다. 반응 시작 직후 (0 h)의 반응액은 투명한 성상을 가지지만 2 시간 반응 후부터는 반응액이 불투명한 백색이 되는데, 이는 용해되지 않은 레스베라트롤이 불투명한 현탁액 (suspension) 형태로 보이는 것으로 보인다. 물에 대한 레스베라트롤의 용해도는 상온에서 0.03 g/L로 작기 때문에 효소반응으로 인해 반응액에서 레스베라트롤이 용해도 범위 이상으로 형성될 경우 현탁액으로 생성될 수 있다. 상기 현탁액이 실제로 레스베라트롤을 포함하고 있는지 확인하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피를 통해 레스베라트롤을 정량한 결과 시간에 따라 레스베라트롤의 생성량이 증가함을 확인하였고, 12 시간 반응 기준으로 수율을 계산한 결과 0.53 g/L (1.06 g/L/day)의 레스베라트롤을 생산할 수 있었다 (도 6b, c). 하지만 당업자는 효소의 재사용을 통한 반복적인 반응을 통해 더 높은 수율을 획득할 수 있을 것이다. 상기 현탁액 형태로 생산된 레스베라트롤은 원심분리로 쉽게 침전되어 반응액에서 분리하기가 용이하여 반응 후 처리과정을 간소화 할 수 있는 장점이 있다.

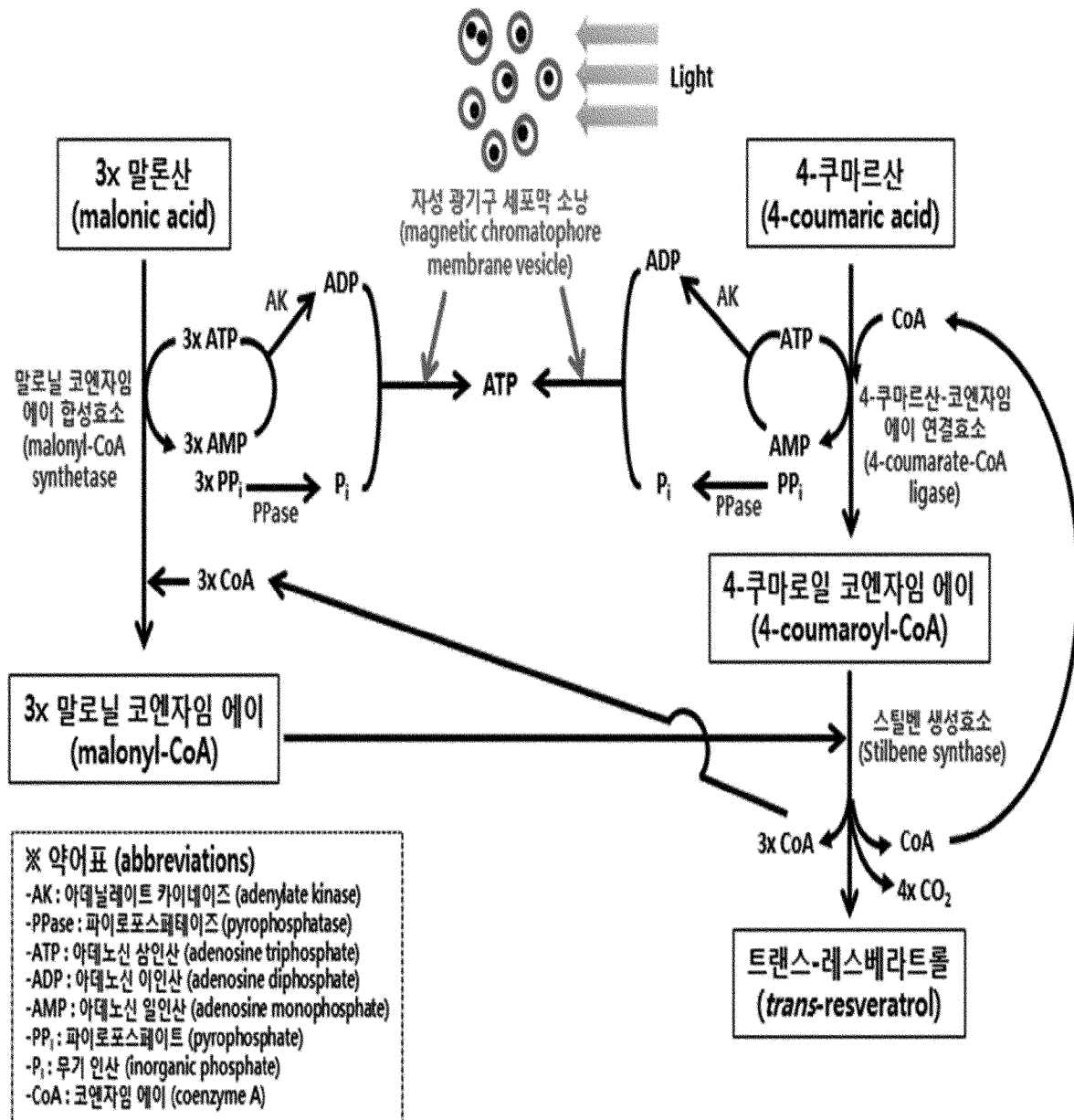
청구범위

- [청구항 1] 하기 부분 반응으로 구성된 전체 반응으로 이루어진 트랜스-레스베라트롤 (*trans*-resveratrol)의 생산 방법 :
- a) 4-쿠마르산 (4-coumaric acid)과 코엔자임 에이를 중합하여 4-쿠마로일 코엔자임 에이 (4-coumaroyl CoA)를 생성하고, 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)을 소모하여 아데노신 일인산 (adenosine monophosphate, AMP)과 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 형성하는 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소 (4-coumarate-CoA ligase)의 효소 반응;
 - b) 말론산 (malonic acid)과 코엔자임 에이 (coenzyme A, CoA)를 중합하여 말로닐 코엔자임 에이 (malonyl CoA)를 생성하고, 아데노신 삼인산을 소모하여 아데노신 일인산과 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 형성하는 말로닐 코엔자임 에이 합성효소 (malonyl-CoA synthetase)의 효소 반응;
 - c) 상기 a)와 b)에서 각각 생성된 4-쿠마로일 코엔자임 에이와 말로닐 코엔자임 에이를 중합하여 트랜스-레스베라트롤 (*trans*-resveratrol)을 형성하고, 코엔자임 에이와 이산화탄소를 형성하는 스틸벤 생성효소 (stilbene synthase)의 효소 반응;
 - d) 상기 a)와 b)에서 생성된 아데노신 일인산을 아데노신 삼인산과 반응시켜, 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP)로 변환하는 아데닐레이트 카이네이즈 (adenylate kinase)의 효소 반응;
 - e) 상기 a)와 b)에서 생성된 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 무기 인산 (inorganic phosphate)으로 변환하는 파이로포스페테이즈 (pyrophosphatase)의 효소 반응;
 - f) 상기 d)와 e)에서 각각 생성된 아데노신 이인산과 무기 인산을 빛이 조사되는 조건에서 아데노신 삼인산으로 변환하는 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)의 명반응 (light reaction).
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 적절한 광원 하에서 아데노신 이인산과 무기 인산으로부터 아데노신 삼인산을 생성할 수 있는 세포막-단백질 복합체이며, 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle) 또는 틸라코이드 세포막 소낭 (thylakoid membrane vesicle) 중 선택되는 것을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤의 생산 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 자성 입자 (magnetic particle)를 소낭 내부에 함유하여 자석에 의해 인력을 받는 자성 광합성 세포막 소낭(magnetic photosynthetic membrane vesicle)임을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤의 생산 방법.

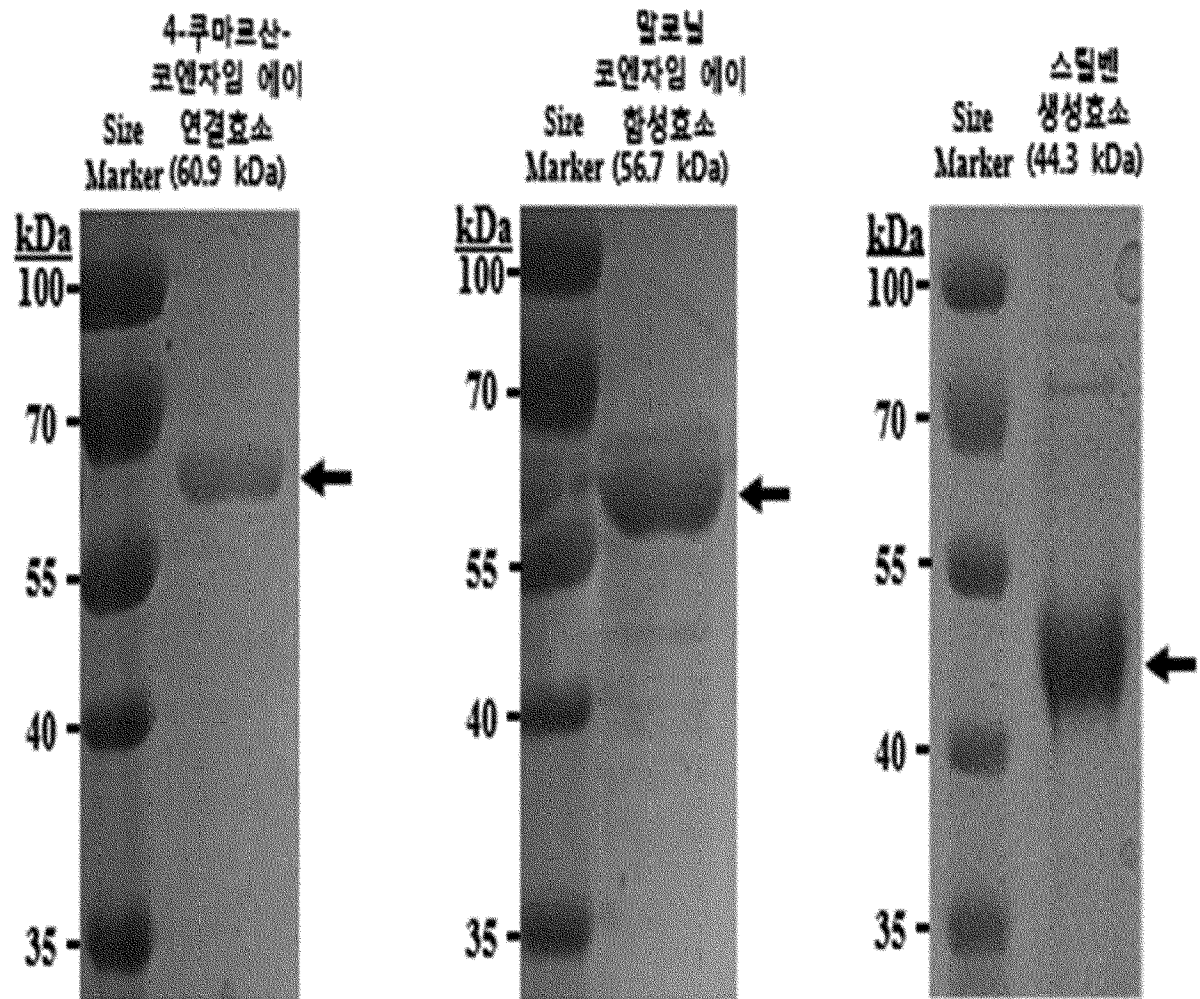
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 각각의 효소들은 아가로즈 수지 (agarose resin)에 고정화 (immobilization)되어 메쉬 (mesh) 안에 밀봉된 형태로, 효소 반응액에서 분리 가능한 것을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤의 생산 방법.
- [청구항 5] 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소, 말로닐 코엔자임 에이 합성효소, 스틸벤 생성효소, 아데닐레이트 카이네이즈 및 파이로포스페테이즈를 포함하는 효소 반응부; 및
상기 효소 반응부에 아데노신 삼인산을 제공하기 위한 광합성 세포막 소낭으로 이루어진 명반응부;를 포함하는, 트랜스-레스베라트롤 생산 시스템.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 생산 시스템에서 효소 반응부는 4-쿠마르산, 말론산을 기질로 이용하여 트랜스-레스베라트롤을 생산하며, 이 과정에서 필요한 조효소인 아데노신 삼인산과 코엔자임 에이가 순환적으로 재사용되는 것을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤 생산 시스템.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 자성 입자 (magnetic particle)를 소낭 내부에 함유하여 자석에 의해 인력을 받는 자성 광합성 세포막 소낭(magnetic photosynthetic membrane vesicle)임을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤의 생산 시스템.
- [청구항 8] 제 5항에 있어서, 상기 생산 시스템에서 생성된 트랜스-레스베라트롤은 반응액에 현탁액 (suspension) 형태로 형성되며, 침전물 형태로 반응액에서 분리 가능함을 특징으로 하는 트랜스-레스베라트롤 생산 시스템.

[도 1]

자성 광합성 세포막 소낭을 이용한 트랜스-레스베라트롤의 합성



[도2]



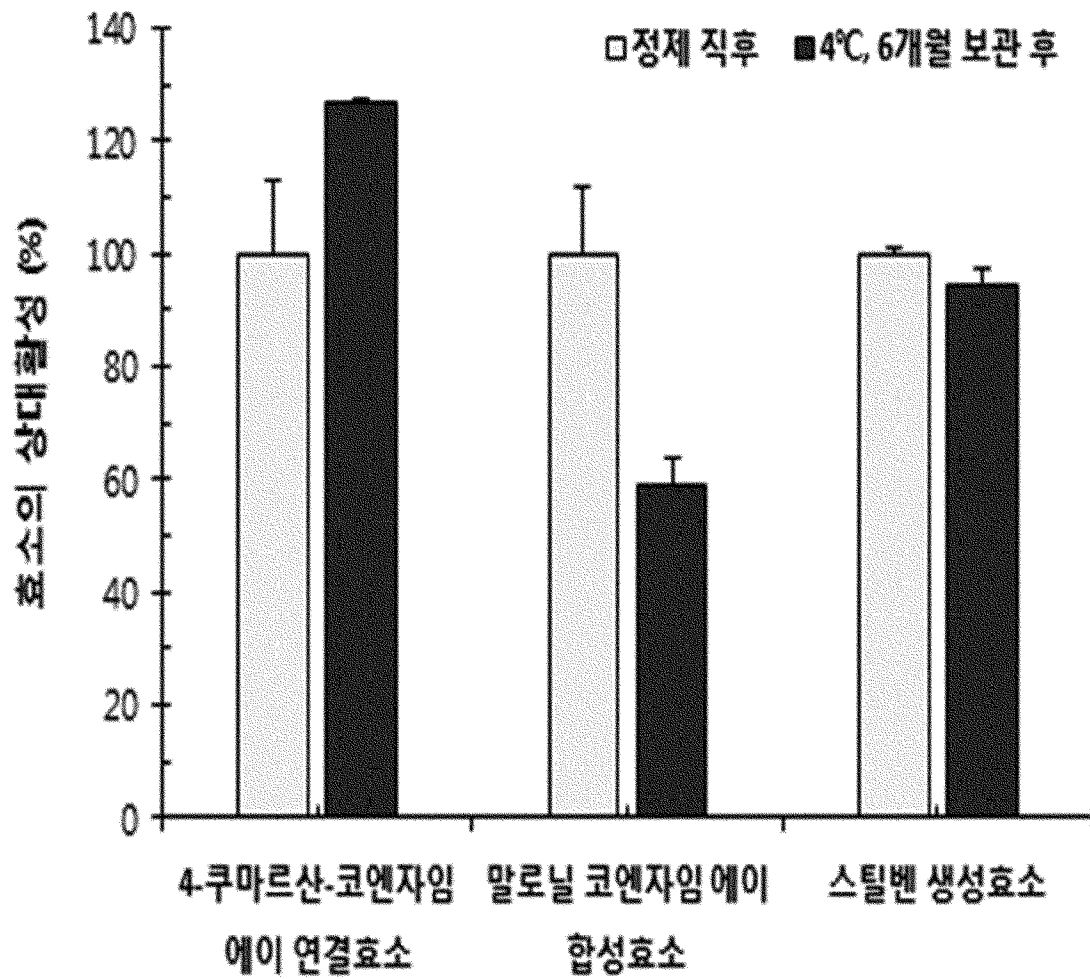
[도3]

효소의 형태	4-쿠마르산에 대한 효소 동역학 계수	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
4-쿠마르산-코엔자 임 에이 연결효소	Free	22.9±1 79±5.6
	Immobilized	24.4±3.76 133.89±17.6

효소의 형태	말론산에 대한 효소 동역학 계수	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
말로닐 코엔자임 에이 합성효소	Free	247.6±3.77 36.10±2.67
	Immobilized	200±5.23 39.48±4.28

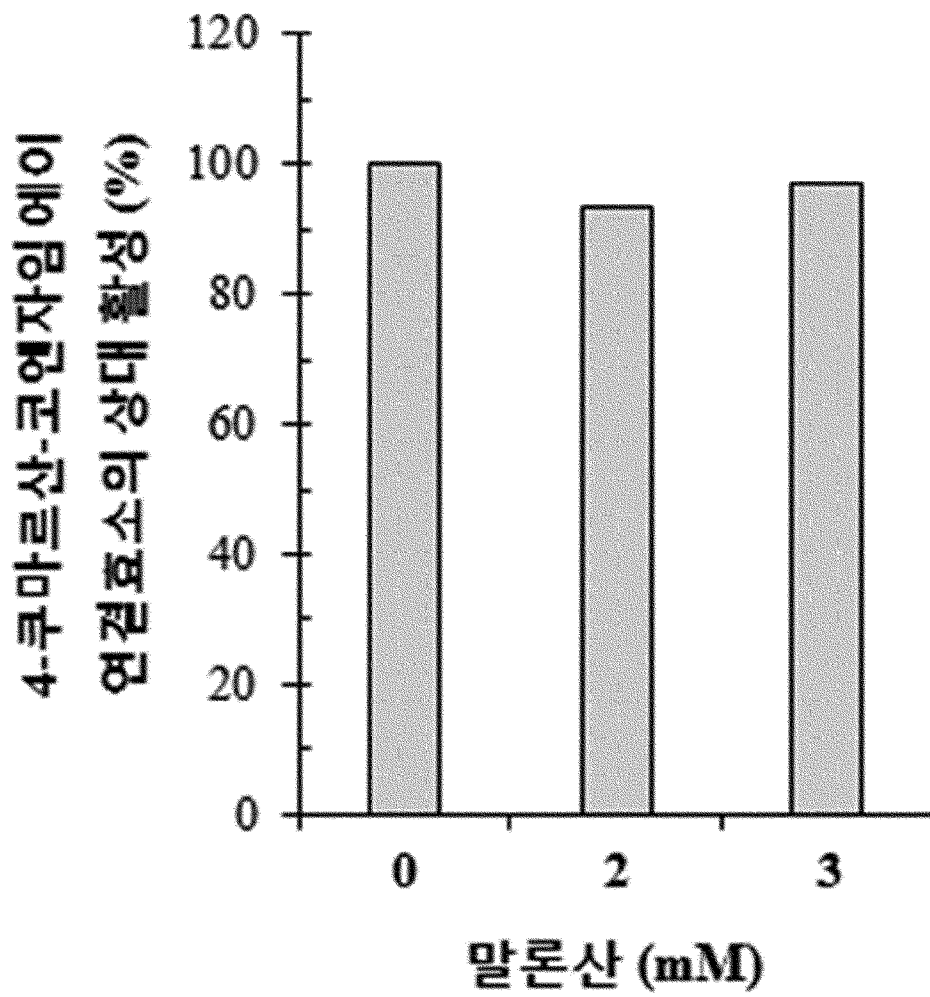
효소의 형태	4-쿠마로일 코엔자임 에이에 대한 효소 동역학 계수		말로닐 코엔자임 에이에 대한 효소 동역학 계수	
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})
스틸벤 생성효소	Free	13.4±1.89 0.82±0.01	71.6±0.16	0.70±0.09
	Immobilized	30.2±5.49 1.95±0.07	91.7±4.21	1.61±0.08

[도4]

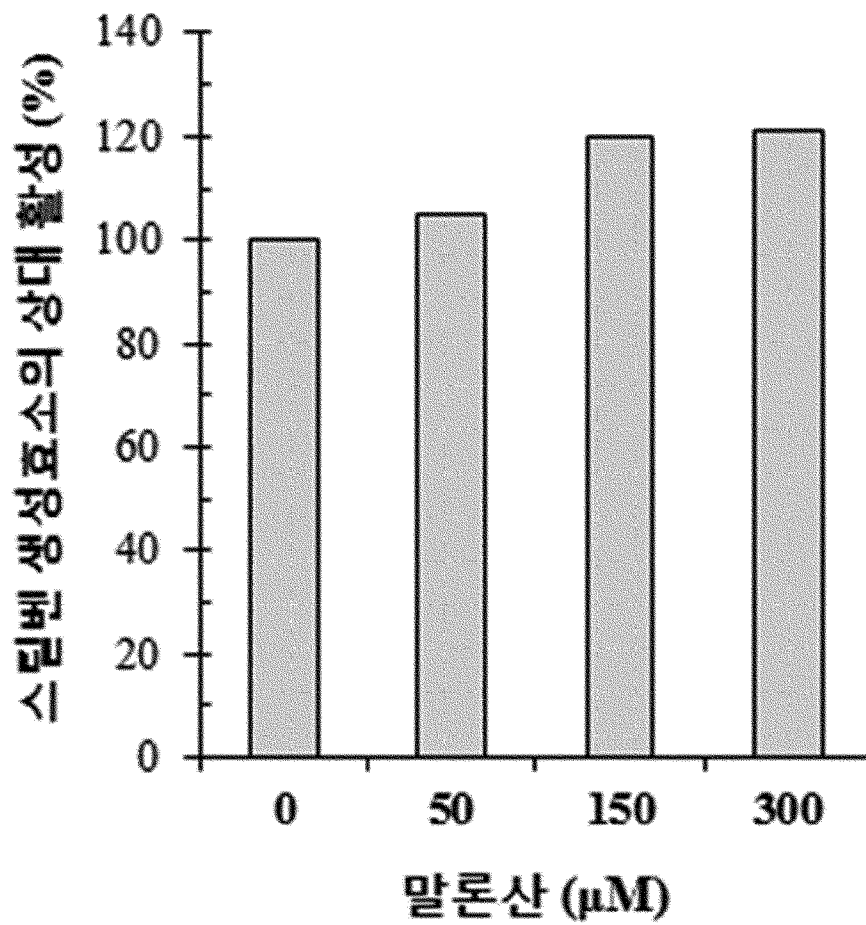


※ 모든 효소는 고정화되어 있음

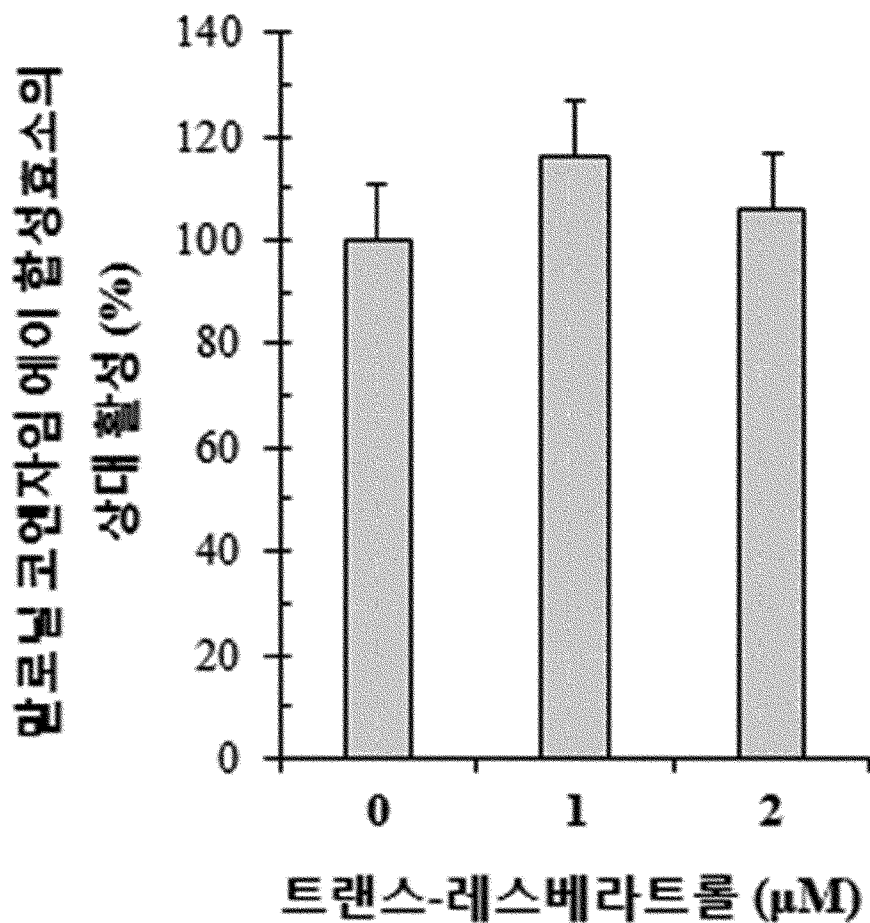
[도5a]



[도5b]

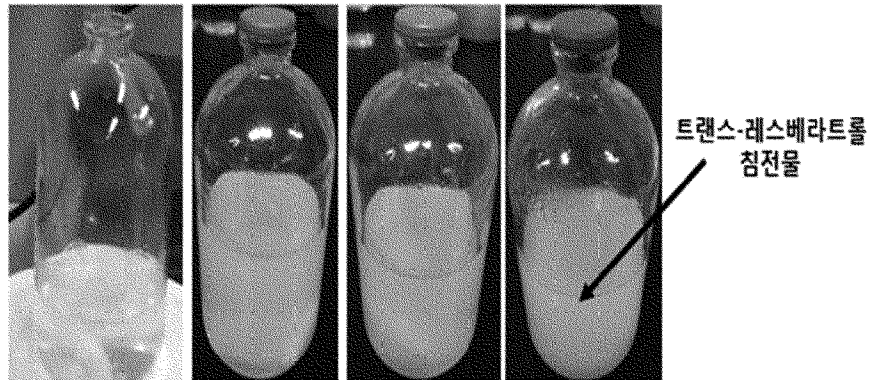


[도5c]



[도 6a]

레스베라트롤 생산 시스템 반응액의 모습



반응시간 (h)

0

2

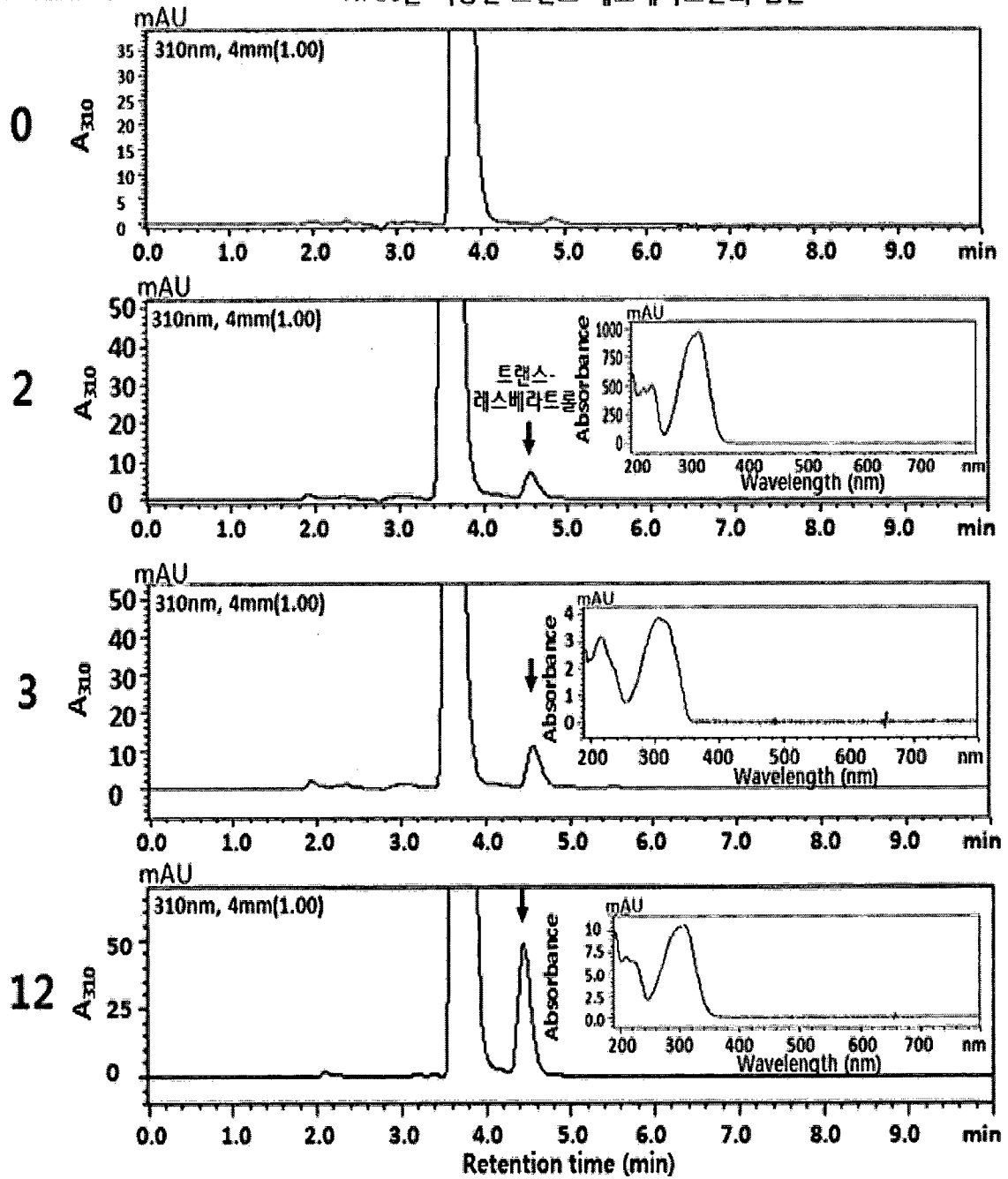
3

12

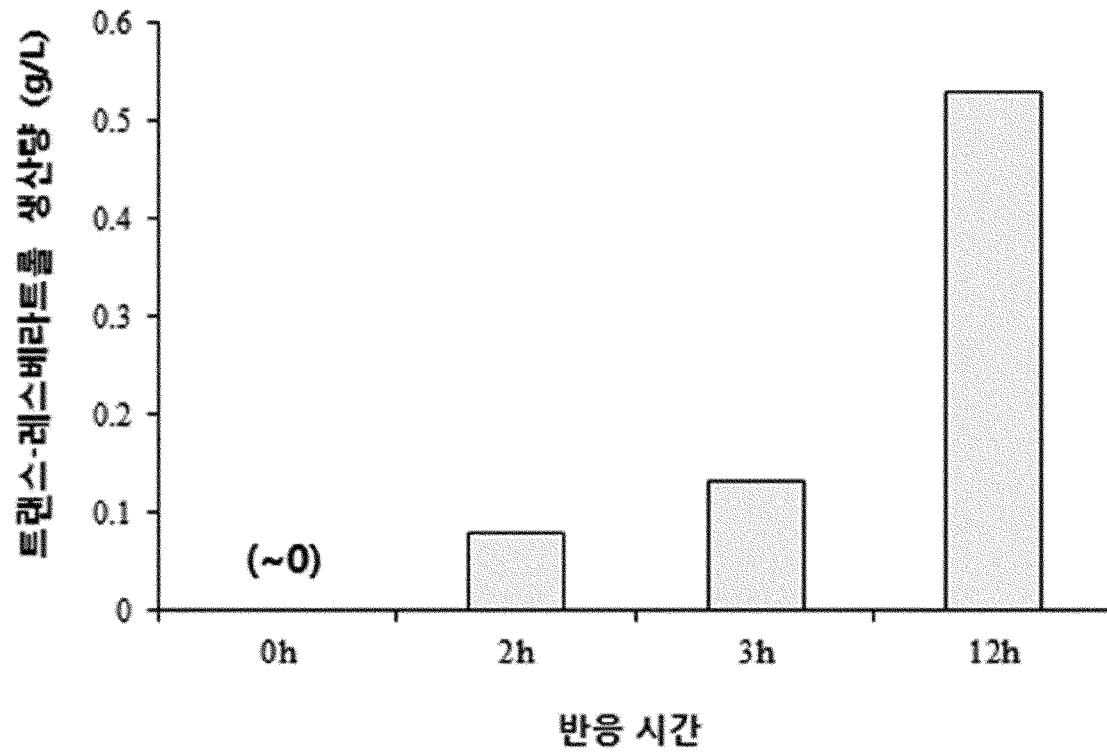
[Fig 6b]

반응시간 (h)

HPLC를 이용한 트랜스-레스베라트롤의 검출



[도6c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/011017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/22(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 9/12(2006.01)i, C12N 9/14(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12N 11/10(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 7/22; C12N 1/00; C12P 1/04; C12P 7/64; C12N 9/10; C12N 9/12; C12N 9/14; C12N 9/00; C12N 11/10

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: trans-resveratrol, 4-coumaric acid -coenzyme A ligase, malonyl coenzyme A synthase, stilbene synthase, photosynthetic membrane vesicle

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIM, C. G. et al., "High-yield Resveratrol Production in Engineered Escherichia Coli", Applied and Environmental Microbiology, May 2011, vol. 77, no. 10, pages 3451-3460 See abstract; pages 3453, 3456 and 3459; figures 1 and 4.	1-8
A	KR 10-1708752 B1 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 21 February 2017 See claim 1.	1-8
A	DANI, D. N. et al., "Isolation and Characterization of a Thylakoid Membrane Module Showing Partial Light and Dark Reactions", Biochimica et Biophysica Acta, (Electronic publication) 09 March 2005, vol. 1669, pages 43-52 See the entire document.	1-8
A	WO 2013-138335 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 September 2013 See claims 1-12.	1-8
A	BEEKWILDER, J. et al., "Production of Resveratrol in Recombinant Microorganisms", Applied and Environmental Microbiology, August 2006, vol. 72, no. 8, pages 5670-5672 See the entire document.	1-8



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

"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

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/011017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1708752 B1	21/02/2017	CN 106164246 A	23/11/2016
		EP 3101118 A2	07/12/2016
		EP 3101118 A4	10/01/2018
		JP 2017-503529 A	02/02/2017
		KR 10-2015-0089333 A	05/08/2015
		US 2017-0009268 A1	12/01/2017
		US 9932618 B2	03/04/2018
		WO 2015-111972 A2	30/07/2015
		WO 2015-111972 A3	01/10/2015
WO 2013-138335 A1	19/09/2013	US 2015-0045537 A1	12/02/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 7/22(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 9/12(2006.01)i, C12N 9/14(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12N 11/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 7/22; C12N 1/00; C12P 1/04; C12P 7/64; C12N 9/10; C12N 9/12; C12N 9/14; C12N 9/00; C12N 11/10

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: 트랜스-레스베라트롤, 4-쿠마르산-코엔자임 에이 연결효소, 말로닐 코엔자임 에이 합성효소, 스틸벤 생성효소, 광합성 세포막 소낭

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIM, C. G. 등, 'High-yield resveratrol production in engineered Escherichia coli', Applied and Environmental Microbiology, 2011.05, 제77권, 제10호, 3451-3460 페이지 초록; 페이지 3453, 3456 및 3459; 도면 1 및 4 참조.	1-8
A	KR 10-1708752 B1 (서강대학교산학협력단) 2017.02.21 청구항 1 참조.	1-8
A	DANI, D. N. 등, 'Isolation and characterization of a thylakoid membrane module showing partial light and dark reactions', Biochimica et Biophysica Acta, (전자공개)2005.03.09, 제1669권, 43-52 페이지 전체 문헌 참조.	1-8
A	WO 2013-138335 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2013.09.19 청구항 1-12 참조.	1-8
A	BEEKWILDER, J. 등, 'Production of resveratrol in recombinant microorganisms', Applied and Environmental microbiology, 2006.08, 제72권, 제8호, 5670-5672 페이지 전체 문헌 참조.	1-8

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

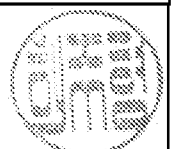
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1708752 B1	2017/02/21	CN 106164246 A EP 3101118 A2 EP 3101118 A4 JP 2017-503529 A KR 10-2015-0089333 A US 2017-0009268 A1 US 9932618 B2 WO 2015-111972 A2 WO 2015-111972 A3	2016/11/23 2016/12/07 2018/01/10 2017/02/02 2015/08/05 2017/01/12 2018/04/03 2015/07/30 2015/10/01
WO 2013-138335 A1	2013/09/19	US 2015-0045537 A1	2015/02/12