

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0081038
(43) 공개일자 2020년07월07일

- | | |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12N 11/08</i> (2020.01)
<i>C12N 9/10</i> (2006.01) <i>C12P 19/60</i> (2006.01)
(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/70</i> (2013.01)
<i>C12N 11/08</i> (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0171125
(22) 출원일자 2018년12월27일
심사청구일자 2018년12월27일 | (71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
이우일
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
308동 303호
(74) 대리인
특허법인도담, 김대영 |
|--|---|

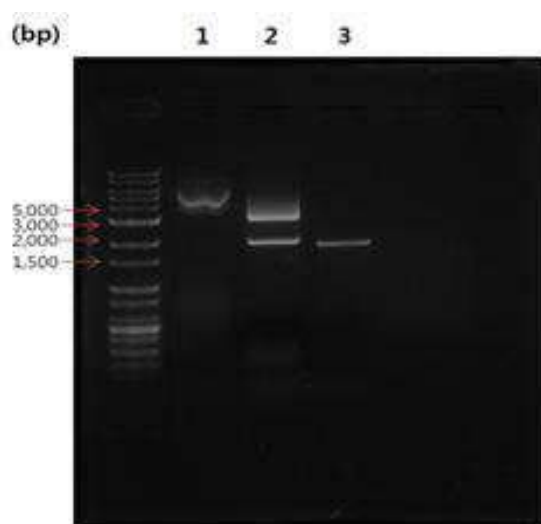
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 CGTase 효소 고정화 기술을 이용한 ascorbic acid-2-glucoside (AA-2G) 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 기존의 AA-2G의 당 전이 효소인 CGTase를 유전자 재조합 기술을 활용하여 재조합 CGTase의 대량 발현이 가능한 재조합 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균에 형질전환하며, 과발현이 가능한 여러 발현 조건 등을 최적화하고, 추출 및 정제 과정을 거쳐 재조합 CGTase를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다. 또한 생산된 CGTase는 효소 고정화 작업을 통하여 특정 수지에 결합시키고, 이를 활용하여 비타민 C 유도체인 AA-2G를 제조하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/1051 (2013.01)

C12P 19/60 (2013.01)

C12Y 204/01019 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018-B-G028-010106

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 LINC PLUS 산학공동기술개발지원사업

연구과제명 재조합 CGTase를 이용한 Vitamin C-Glucoside 유도체의 합성

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

바실러스 마르세란스 유래의 CGTase 유전자를 포함하는 재조합 CGTase 발현 벡터 및 해당 벡터가 삽입된 대장균 BL21(DE3)의 형질전환체.

청구항 2

흡착법을 이용한 재조합 CGTase의 효소 고정화 및 고정화된 Resin을 활용하여 아스코르빈산과 녹말로부터 비타민 C 유도체인 AA-2G를 합성하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당 전이 효소인 CGTase를 특정 수지에 고정화하고 해당 수지의 효소 반응을 통하여 비타민 C의 유도체 중 하나인 AA-2G를 합성하는 방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 유전자 재조합 기술을 이용하여 CGTase의 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균에 형질전환하여 재조합 CGTase의 생산이 가능한 발현 균주를 제조하며, 발현된 재조합 CGTase는 수지 IRA-900에 효소 고정화를 실시하고 CGTase가 고정화된 수지를 이용하여 아스코르빈산과 녹말의 기질로부터 AA-2G를 합성하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비타민 C로 잘 알려진 아스코르빈산(L-ascorbic acid)는 1920년 후반 Szent-Gyorgyi에 의해 처음 결정으로 분리된 기능성 생리활성 물질이며 인간의 필수 영양소중 하나로써 강력한 항산화 작용을 통하여 우리들의 몸을 보호한다. 아스코르빈산은 피부색소 침착을 유발하는 주요원인 물질인 멜라닌 합성을 억제하며 자외선으로부터 손상된 피부세포를 보호하여 노화를 방지하고 피부 종양 억제에 효능을 나타낸다. 또한 콜라겐 합성을 위한 조효소로서 작용하여 콜라겐 생성을 촉진하고 피부에 탄력을 주는 엘라스틴을 보호해 피부주름을 방지하며 피부를 탄력 있게 유지해주는 효과가 있다. 그밖에 항피혈 활성, 섬유아세포 증식, 항체 생산 증진을 촉진할 뿐만 아니라 인간의 상피세포가 태양 빛에 자연 노출됨으로써 자외선에 의해 손상되는 것을 막아주는 광보호 효과도 있다.

[0004] 이러한 비타민 C의 중요한 생리활성에도 불구하고 화학적 구조상 공기 중에서 쉽게 산화가 일어나기 때문에 직접적 사용 및 산업적 원료로서의 사용이 제한된다는 단점이 있다. 이는 수용액 상태에서 아스코르빈산이 좀 더 안정한 디하이드로아스코르빈 산(dehydroascorbic acid)로 산화됨에 따라 앞서 설명한 고유의 생리적 활성을 잃어버리게 되기 때문이다.

[0005] 의약품, 식품, 화장품에서 아스코르빈산의 안정성을 높이기 위해 ascorbic acid-2-sulfate (AA-2S), ascorbic acid-2-phosphate (AA-2P) 등과 같은 여러 가지 유도체들이 개발되었다. 이 중 ascorbic acid의 포도당(Glucose) 유도체인 ascorbic acid-2-glucoside (AA-2G)는 1990년 Norio 등에 의해 쥐 소장의 α -glucosidase를 통해 처음 생산되었고 화학적 구조의 특성상 수용액 상태에서 열, 산소, 금속이온의 작용 등에 의한 산화적 분해에 매우 안정하고 생리학적 활성이 매우 높을 뿐만 아니라 피부 표면에 존재하는 α -glucosidase에 의해 쉽게 분해될 수 있어 인체 적용에 유리한 점이 있는 것으로 보고되었다.

[0006] AA-2G의 생산 방법으로는 화학합성법과 효소를 이용한 방법이 가장 보편으로 이루어져 있으나 화학합성법의 경우 복잡한 과정과 장시간이 소요되므로 이를 극복하기 위해 여러 기능성 효소를 통한 아스코르빈산의 유도체를 합성하는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0007] AA-2G를 합성에 활용 가능한 효소로는 α -glucosidase, cellulase, cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)

등이 있는데 이 중 CGTase는 전분이나 아밀로오즈, 아밀로펙틴 등의 기질에 작용하여 환상의 비환원성인 cyclodextrin (CD)을 합성하는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과 분자 간 당전이 반응인 coupling 반응 및 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소라 할 수 있다.

[0008] 현재까지 연구된 AA-2G의 합성 방법은 크게 화학적 합성 방법과 당 전이 효소를 이용한 축매 반응을 통하여 이루어지는데 화학적 합성 방법은 AA-2G가 의약품이나 화장품 등 바이오 신소재로 사용되고 있는바 인체에 대한 부작용 및 안전성 등의 이유로 부적절한 방법이라 할 수 있으며, 당 전이 효소를 이용한 축매 반응은 친환경적 방법으로 민감한 바이오 소재가 적합한 공정이지만, 당 전이 효소의 단가가 매우 비싸 대량 생산 시 생산 단가가 올라간다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1073990 호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) (연구논문 0001) Itaru Yamamoto., et al. L-Ascorbic Acid α -Glucoside Formed by Regioselective Transglucosylation with Rat Intestinal and Rice Seed α -Glucosidases : Its Improved Stability and Structure Determination. Chem. Pharm. Bull., 1990, Vol. 38(11), 3020-3023.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에 본 발명자들은, AA-2G를 합성할 수 있는 방법을 탐색한 결과, 유전자 재조합 기술을 활용하여 재조합 CGTase의 대량 발현이 가능한 재조합 발현 벡터를 구축하고 이를 대장균에 형질전환하며, 과발현이 가능한 여러 발현 조건 등을 최적화하고, 추출 및 정제 과정을 거쳐 재조합 CGTase를 대량으로 생산할 수 있는 방법을 구축하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 기존의 AA-2G의 당 전이 효소인 CGTase를 유전자 재조합 기술을 활용하여 재조합 CGTase의 대량 발현이 가능한 재조합 발현 벡터를 구축하고 이를 대장균에 형질전환하며, 과발현이 가능한 여러 발현 조건 등을 최적화하고, 추출 및 정제 과정을 거쳐 재조합 CGTase를 대량으로 생산한다. 또한 직접 생산된 CGTase는 효소 고정화 작업을 통하여 특정 수지에 결합시키고, 이를 활용하여 비타민 C 유도체인 AA-2G를 제조하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, ① 대장균 BL21(DE3)을 바실러스 마르세란스(*Bacillus macerans*) 유래의 CGTase(Cyclodextrin glucanotransferase)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환시키는 단계; ② 상기 단계 ①의 형질전환된 대장균을 배양하는 단계; ③ 상기 단계 ②의 배양액으로부터 CGTase를 회수하는 단계; ④ 회수된 CGTase를 이용하여 ascorbic acid와 녹말로부터 AA-2G를 합성하는 단계; 를 포함하는, ascorbic acid의 유도체인 AA-2G를 제조하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단계 ③은 resin을 이용한 흡착법으로 CGTase 효소를 고정화하여 회수하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 바실러스 마르세란스(*Bacillus macerans*) 유래의 CGTase (Cyclodextrin glucanotransferase)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환용 발현벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 재조합 대장균을 제공하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0019] 대장균에서 재조합 CGTase의 과발현을 유도함으로써 낮은 생산 비용으로 고농도의 CGTase를 생산할 수 있을 뿐만 아니라 고정화된 CGTase는 재활용이 가능하기 때문에 AA-2G 생산 비용에서 대부분을 차지하는 당 전이 효소 CGTase의 생산 단가를 획기적으로 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 CGTase의 발현 벡터 구축에 대한 agarose 전기영동 분석 결과를 나타낸 것이다.
(Line 1 : pRSET_A와 CGTase 유전자가 결합된 재조합 벡터, Line 2 : 1번의 재조합 벡터를 BamH I과 EcoR I으로 절단 한 시료, Line 3 : PCR을 통해 증폭된 CGTase 유전자 (2,139bp))
도 2는 재조합 CGTase의 발현에 대한 SDS-PAGE 분석 결과에 관한 것이다.
도 3은 CGTase가 고정화된 resin을 촉매 반응으로 이용하여 합성한 AA-2G의 HPLC 분석에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.
- [0023] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

실시예 1

- [0025] 유전자 재조합 기술을 통한 CGTase의 발현 벡터 구축
- [0027] 한국 미생물 분양센터에서 획득한 *Bacillus macerans*를 LB 배지에 배양하고 균체를 다량으로 확보한 다음 genomic DNA purification kit을 사용하여 genomic DNA를 추출하고 이를 주형으로 primers와 함께 Taq DNA polymerase를 이용한 PCR을 진행하였으며 95 °C에서 30초, 55.5 °C에서 30초, 72 °C에서 2분을 28 cycle 수행하였다. 이때 정방향 프라이머로 5'-GGATCC AAATCGCGGTACAAAC-3'와 역방향 프라이머로 pR 프라이머(5'-GAATTC ATTTTGCCAGTCCAC-3')를 사용하였다. PCR의 결과는 agarose 전기영동법으로 확인하였으며, 분석결과 2,139 bp의 CGTase 유전자가 증폭되었다는 것이 증명되었다. 증폭된 CGTase 유전자는 제한효소 효율을 고려하여 TA cloning vector에 ligation을 실시하였으며 유전자를 대량으로 확보하기 위하여 CaCl₂로 처리된 *E. coli* DH5 α에 형질전환하였다.
- [0028] 확보한 DNA와 발현 벡터인 pRSET_A를 제한효소 BamH I과 EcoR I으로 처리하여 각각의 DNA 말단을 동일하게 제작하고 T4 DNA ligase을 사용하여 clone을 제작하였다. 또한 재조합 벡터는 DH5 α에 형질전환하여 재조합 여부를 다시 확인 한 후 확인된 재조합 벡터를 동일한 방법으로 BL21(DE3)에 형질전환하였다.

실시예 2

- [0030] 재조합 균주로부터 효소 CGTase의 발현 분석
- [0032] 재조합 벡터가 삽입된 BL21(DE3)로부터 목표 단백질을 발현하기 위하여 해당 균주를 대수증식기까지 배양하고 이를 IPTG의 농도와 발현 온도, 발현 시간 등의 변수를 고려하여 발현을 진행하였다. 분석결과 IPTG의 농도는 0.4 mM이 되도록 첨가하였으며 발현 온도는 25 °C에서 150 rpm으로 진행하였고 총 6시간동안 발현을

진행하였음. 발현 여부는 SDS-PAGE와 western blotting을 통해 분석하였다.

[0033] 배지의 종류가 CGTase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 형질전환된 BL21(DE3)를 M9 medium, Luria broth (LB), Terrific broth (TB), Super broth (SB), 의 4가지 배지에서 배양한 후 효소활성을 측정하였음. 이는 glucose, fructose, sorbitol, sucrose, cyclodextrin soluble starch를 시험하면서 TB배지에서 비교 배양하였고 그 결과 histidine이 융합된 CGTase의 생산은 TB배지에서 배양하였을 경우 배양액에서 5.1 unit의 효소가 검출되어 가장 높은 효소 생산량을 보였으며 따라서 향후 실험은 TB배지를 기초로 하여 발현을 실시하였다.

[0034] 대장균 시스템을 이용하여 재조합 CGTase를 발현시켜 AA2G 합성에 이용한 결과 기존에 보고되었던 특허 및 논문 에 비해 1/5 수준으로 AA-2G가 합성됨을 확인할 수 있었다. 이는 CGTase 고유의 host specificity 때문일 수도 있기 때문에 CGTase유전자를 original host인 Bacillus expression system에서의 발현을 시도하였으며 재조합 CGTase를 과량으로 발현하는 Bacillus 균주는 halo test를 이용하여 screening 하였다.

실시예 3

[0036] 효소 CGTase의 반응 조건 최적화 확립

[0038] B. macerans 균주 내에서 분리 정제하여 얻어진 CGTase는 그 활성 온도가 55 ~ 60℃로 알려져 있으므로 본 반응 에서 정확한 최적화 온도를 확립하기 위해, Ascorbic acid, starch, CGTase를 각각 8 g, 2 g, 1 unit 첨가한 후 용매는 100 mM acetate buffer (pH 5.5)를 이용하여 온도를 30 ~ 90℃까지 변화를 줌으로써, 최적의 온도를 확인하였다. 그 결과 60℃에서 가장 큰 활성도를 보이는 것으로 확인되었다.

[0039] pH 3.0 ~ 8.0까지 각 100 mM Acetate buffer를 이용하여 대조군을 두고 효소와 기질 비를 AsA : dextrin = 4 : 1, 1 unit의 CGTase, 반응온도 60℃에서 진행하였으며 pH 5.5에서 가장 높은 반응 효율을 보이는 것으로 확인되었다.

실시예 4

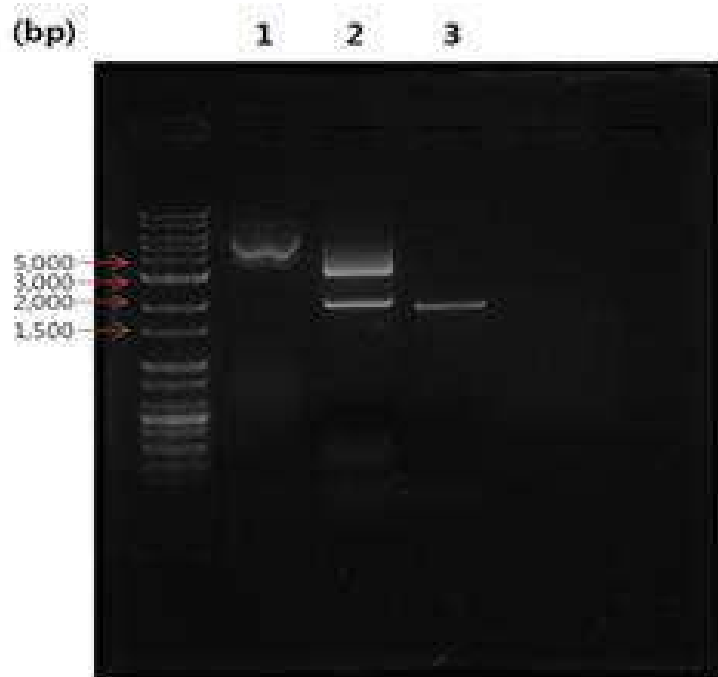
[0041] 흡착법에 따른 CGTase의 고정화 및 효소반응 분석

[0043] 고정화 단계는 강력한 음이온 교환수지인 IRA-900을 0.5 N HCl용액으로 세척한 하고 이를 다시 0.5 N NaOH alkaline 용액으로 씻어줌으로써 resin을 활성화시킨 후 반응에 사용할 CGTase를 활성화된 resin과 교반시키고 65℃에서 1 시간동안 반응시킴으로써 효소 고정화를 시도 하였다.

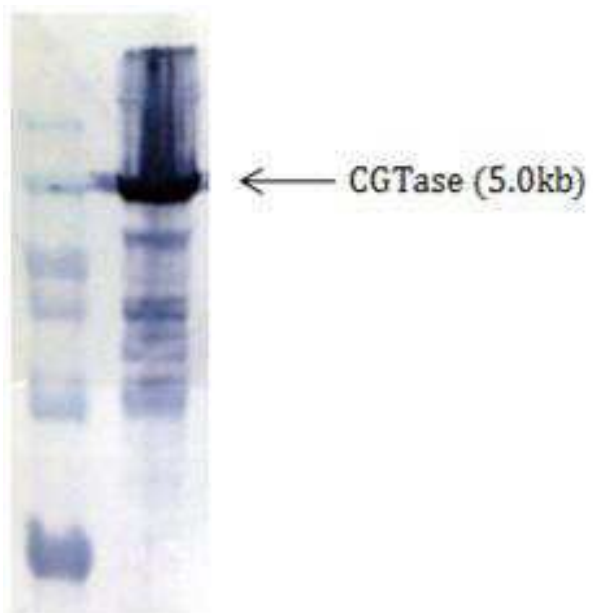
[0044] 상기한 확립된 조건으로, ascorbic acid 2 g과 maltodextrin 8 g을 100 mM acetate buffer (pH 5.5) 100 ml에 용해시키고 ascorbic acid의 산화를 방지하기 위해 400 mM Thiourea를 10 ml 첨가한 후 60℃에서 CGTase가 고정화된 Resin을 2 ml 가한 후 48시간 동안 반응하였다. 반응 종료시 product를 ultrafiltration을 통해 걸러준 후, 걸러진 용액에 glucoamylase 2 ml를 첨가하여 55℃에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응액을 다시 ultrafiltration을 이용하여 걸러주고, 걸러진 용액 중 10 λ 를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 2.0) 1 ml에 희석하여, HPLC 분석을 진행 (이동상 용매의 flow rate는 0.5 ml/min)하였다. AA-2G의 정성 분석은 현재 시판되고 있는 AA-2G standard와 머무름 시간을 비교하여 분석하였다. 그 결과 AA-2G가 합성되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 유전자 재조합으로 합성된 CGTase 효소가 ascorbic acid로부터 AA-2G를 합성할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

