

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 8월 2일 (02.08.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/102552 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000607
- (22) 국제출원일: 2012년 1월 25일 (25.01.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0006631 2011년 1월 24일 (24.01.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5가 1 고려대학교 내, 136-713 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **최인걸 (CHOI, In-Geol)** [KR/KR]; 서울특별시 동작구 사당 1동 419-92,

201, 156-091 Seoul (KR). **김경현 (KIM, Kyoung Heon)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 서초 4동 삼풍아파트 18동 805호, 137-779 Seoul (KR). **윤은주 (YUN, Eun-Ju)** [KR/KR]; 서울특별시 금천구 시흥 3동 현대빌라 14동 104호, 153-033 Seoul (KR). **이세영 (LEE, Sae Young)** [KR/KR]; 경기도 의왕시 오전동 엘지아파트 103동 1502호, 437-734 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 서울시 강남구 역삼동 648-1 BYC 빌딩 5층, 135-080 Seoul (KR).

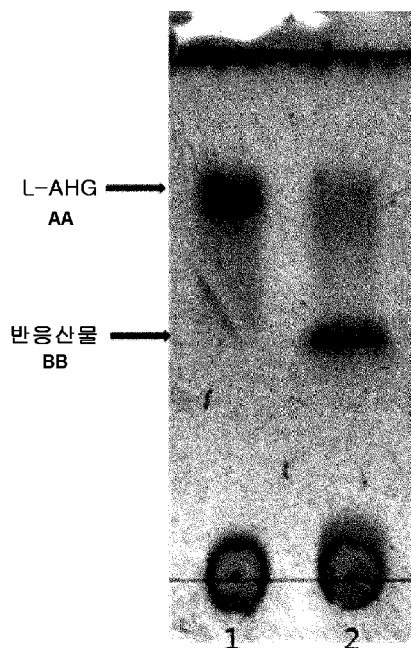
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL 3,6-ANHYDRO-L-GALACTOSE DEHYDROGENASE ACTING ON 3,6-ANHYDRO-L-GALACTOSE, AND PRODUCTION OF 3,6-ANHYDROGALACTONIC ACID BY USING THE ENZYME

(54) 발명의 명칭 : 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 작용하는 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 이 효소를 이용한 3,6-안하이드로 갈락토닉산의 생산

[Fig. 9]



AA ... L-AHG
BB ... Reaction product

(57) Abstract: The present invention relates to a novel 3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase and to a novel compound produced therefrom. More specifically, provided is a 3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase which can produce 3,6-anhydrogalactonic acid of a novel type by metabolizing 3,6-anhydro-L-galactose.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제 및 이로부터 생산된 신규 화합물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 신규한 3,6-안하이드로 갈락토닉산을 생성할 수 있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 제공할 수 있다.



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 작용하는 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 이 효소를 이용한 3,6-안하이드로 갈락토닉산의 생산

기술분야

- [1] 본 발명은 바이오에너지 제조 분야에 해당하는 기술로서,
3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 신규한 3,6-안하이드로 갈락토닉산을
생산하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현재 주요 에너지자원 중 하나로 사용되고 있는 원유의 고갈 및 가격상승과
이러한 화석연료의 과다한 사용으로 인한 대기 중으로 배출되는 이산화탄소의
증가로 야기된 지구온난화 등의 환경문제로 인해 전세계적으로 새로운
이산화탄소 저감형 대체 에너지원의 개발이 시급히 요구되고 있다. 따라서
재생가능하고 풍부한 자원 중 하나인 식물성 바이오매스를 원료로 이용하는
바이오에너지가 주요 대체에너지로 각광받고 있다. 다른 대체에너지들과
다르게 수송용 연료로써 사용이 가능한 바이오에탄올은 현재 많은 수요를
보이고 있으며 미국, 브라질을 비롯한 여러 나라에서 사용을 법률로서 의무화 및
권장하고 있다.
- [4] 현재 바이오에탄올을 생산하기 위해 사용되고 있는 제 1세대 바이오매스는
식량자원에서 유래된 당질계 및 전분질계 바이오매스로서, 전 인류의
식량자원과 경쟁함으로써 인해 곡물가격의 상승을 유발하는 큰 문제점을 가지고
있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 대안으로 목질계 바이오매스인 제2세대
바이오매스로부터의 에너지생산 연구가 본격적으로 진행되고 있다. 그러나
목질계 바이오매스는 난분해성물질인 리그닌을 많이 포함하고 있어 발효가
가능한 단당류로의 전환에 큰 문제를 나타내고 있다. 제 3세대 바이오매스인
해조류는 식량자원과 경쟁하지 않아도 될 뿐만 아니라, 리그닌이 없거나
함유량이 낮기 때문에 발효성당으로 전환을 비교적 간단하게 수행할 수 있는 등
여러 가지 장점을 가지고 있다. 따라서 해조류는 차세대 바이오에너지 원료로서
주목 받고 있으며, 이를 이용한 바이오에너지 생산기술들이 활발하게 연구되고
있다. 특히 대한민국의 경우, 삼면이 바다로 이루어져 있기 때문에 해양자원이
풍부하며 해조류를 생물자원화 하기가 용이하다. 또한 해조류의 연간 생산량은
2006년을 기준으로 13,754톤으로 중국, 일본, 북한과 더불어 세계적인 해조류
생산국가에 속하고 있다. 하지만 해조류의 활용면에서는 저조한
실정이다(어업생산통계, 2006, 통계청 사회통계국 농어업생산통계과).
- [5] 현재 잘 알려진 해조류들 중에서 특히 홍조류(예, *Gelidium amansii*)를

원료물질로 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 홍조류는 전체 건중량의 70% 이상이 다당류로서 미생물이 이용 가능한 발효성당으로의 전환이 가능하다. 홍조류 바이오매스에서 유래된 다당류의 주요 성분은 아가로 전체 건중량의 60% 정도를 함유하고 있어 바이오에너지 생산을 위한 주요 원료로 고려되고 있다.

- [6] 아가는 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose, 이하 L-AHG)와 D-갈락토오스(D-galactose, 이하 D-Gal)가 알파-1,3 글리코사이드 결합(알파-1,3-glycosidic bond)과 베타-1,4 글리코사이드 결합(베타-1,4-glycosidic bond)으로 교차되어 나타나는 선형의 다당류로 홍조류의 세포벽을 구성하는 주요물질이다. 아가는 아가로펙틴과 아가로오스로 이루어져있고, 이중 아가로펙틴은 아가로오스와 기본구성은 동일하나 부분적으로 황산기, 피루빅산(pyruvic acid)이나 글루쿠론산(glucuronic acid) 등의 치환기를 보유하고 있다(*Carbohydrate Research*(1971)16:435-445).
- [7] 현재까지 아가를 분해할 수 있는 능력을 보유한 여러 종류의 미생물들이 동정되었고, 이중 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagusdegradans*2-40,이하 *S. degradans*)는 미국의 체사피크만(Chesapeake Bay, Virginia, USA)에서 최초로 발견된 막대모양의 호기성 해양미생물로 전체 유전체서열이 보고되어 있다. *S.degradans*는 아가를 포함하여 최소 10개 이상의 복합 다당류들을 분해하는 능력을 보유하고 있으며, 아가를 대사과정에 이용하기 위한 아가분해대사시스템을 가지고 있다. 이러한 아가분해대사시스템에 이용되는 효소들은 GH16, GH50, GH86 그리고 GH117의 네 그룹으로 분류된다. 이중 GH117을 제외한 나머지 그룹은 베타-아가라아제로 추정되어 있고, GH50그룹에 속하는 Aga50D효소는 최종 산물로 이당류인 네오아가로바이오스(Neoagarobiose, 이하 NA2)를 생산하는 것으로 보고되어 있다(*ApplMicrobiolBiotechnol*86:227-234,2010).그리고 GH117그룹에 속하는 네오아가로바이오스 가수분해효소 (Neoagarobiose hydrolysis enzyme, 이하 NABH)는 이당류인 NA2의 α -1,3-결합을 절단하는 것으로 보고되었다. 아가를 대사하는 미생물들은 아가라아제들을 이용하여 아가를 발효성당인 D-Gal과 비발효성당인 L-AHG의 형태로 전환할 수 있다. 해조류를 사용하여 바이오에너지를 생산하기 위해서는 발효성당으로 전환하는 전처리과정이 필수적이지만, 대사과정 중에 생성된 단당류인 L-AHG의 경우 일반적인 미생물에서는 발효성당으로 사용할 수 없어 바이오에너지 생산의 효율이 크게 저하되는 실정이다. 또한 여러 종류의 미생물에서 D-Gal의 대사경로는 잘 알려져 있지만, 아가를 탄소원으로 사용하는 미생물에서의 L-AHG 대사과정에 대한 연구는 전혀 보고되어 있지 않다. 따라서 L-AHG를 이용하여 바이오에너지를 생산하기 위해서는 아가를 탄소원으로 사용하는 미생물들의 L-AHG 대사과정에 대한 연구를 통해 정확한 대사경로의 규명이 필요하다.

[8]

발명의 상세한 설명

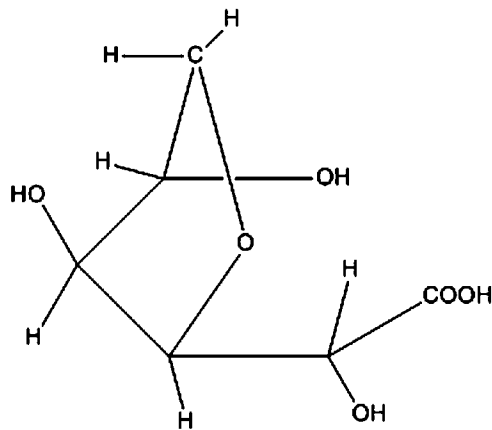
기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규 효소를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 효소에 의해 생산되는 새로운 화합물을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열목록 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 제공한다.
- [13]
- [14] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [15]
- [16] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [17]
- [18] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [19]
- [20] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 제조방법을 제공한다.
- [21]
- [22] 본 발명은 또한 보조 인자로 NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [23] [화학식 1]
- [24]



[25] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 제공한다.

[26]

발명의 효과

[27] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 산화시켜 신규 물질인 3,6-안하이드로 갈락토닉산을 생산할 수 있는 해조류에서 분리한 신규 효소인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나아제를 제공한다.

[28] 상기 효소에 의한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사를 통해 해조류로부터 바이오에너지를 획득하는 수율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

[29]

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 L-AHG를 기질로 하는 활성분획 단백질과 분획별 활성의 반응 비교를 나타낸 것이다.

[31] 도 2는 활성분획 효소의 10% SDS-PAGE 분석 결과로, 레인 1은 분자 크기 마커, 레인 2는 조추출액(crude extract), 레인 3은 로딩 샘플, 레인 4는 10mM 이미다졸로 세척한 샘플, 레인 5 내지 16은 분획 번호 14 내지 25를 나타낸다.

[32] 도 3은 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40 유래의 *sde* AHGD 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[33] 도 4는 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) 유래의 *patl* AHGD 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[34] 도 5는 본 발명의 *sde*AHGD와 *patl*AHGD의 PCR 산물을 나타낸 것으로, M은 1kb 마커, 레인 1은 pB2 벡터, 레인 2는 *patl*AHGD, 레인 3은 *sde*AHGD를 나타낸다.

[35] 도 6은 본 발명의 발현벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

[36] 도 7은 본 발명의 SdeAHGD와 PatlAHGD 단백질의 10% SDS-PAGE 결과를 나타낸 것으로, 레인 1은 분자 크기 마커, 레인 2는 발현 전 SdeAHGD, 레인 3은 발현 후 SdeAHGD, 레인 4는 발현 전 PatlAHGD, 레인 5는 발현 후 PatlAHGD를 나타낸다.

- [37] 도 8은 L-AHG에 대한 본 발명의 SdeAHG와 PatlAHG의 효소활성을 나타낸 것이다.
- [38] 도 9는 효소활성의 반응산물을 나타낸 것으로, 레인 1은 L-AHG; 레인 2는 반응산물을 나타낸 것이다.
- [39] 도 10은 본 발명의 SdeAHGD와 PatlAHGD 활성에 대한 pH 효과를 나타낸 것으로, A는 SdeAHGD이고, B는 PatlAHGD를 나타낸다.
- [40] 도 11은 본 발명의 SdeAHGD와 PatlAHGD 활성에 대한 온도효과를 나타낸 것으로, A는 SdeAHGD이고, B는 PatlAHGD를 나타낸다.
- [41] 도 12는 본 발명의 SdeAHGD와 PatlAHGD의 반응속도론적 분석을 나타낸 것이다.
- [42] 도 13은 GC/MS에서의 전체이온크로마토그램으로, (a) 효소활성 전 반응산물, (b) 효소활성 후 반응산물, (c) 분별결정 후 효소활성의 반응산물을 나타낸다.
- [43] 도 14는 분별결정 전과 후의 반응산물에 대한 TLC(Thin layer chromatography)로, 레인 1은 분별결정전 반응산물, 레인 2는 분별결정 후 반응산물을 나타낸다.
- [44] 도 15는 3-(트리메틸실릴)프로피오닉-2,2,3,3-d₄에시드(3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄acid)를 내부 표준물질로 사용한 정제된 반응산물의 NMR 스펙트럼 결과이다.
- [45] 도 16은 정제된 반응산물의 2D ¹H-¹³CHSQC스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [46] 도 17은 정제된 반응산물의 2D ¹H-¹³CHMBC스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [47] 도 18은 3,6-안하이드로 갈락토닉산(3,6-anhydrogalatonic acid)의 화학적 구조를 나타낸 것이다.

[48]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [49] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [50] 본 발명자들은 아가로오스를 탄소원으로 사용하는 사카로파거스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40 또는 슈도알테로모나스 아틀란티카(*P. atlantica*)에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(또는, 'L-AHG'라 함)를 기질로 하는 효소단백질의 동정을 시도하였다. 동정된 효소는 L-AHG가 보조 인자로 NADP의 도움으로 1번 탄소의 알데하이드기를 카르복실기로 산화하여 3,6-안하이드로 갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid, 하기 화학식 1로 표현되는 화합물임)으로 만드는 L-AHG 데히드로게나제(이하 AHGD)로 확인되었다.
- [51] 따라서, 본 발명은 서열목록 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 제공한다.
- [52] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 서열목록 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 해당 아미노산 서열에 대해 80% 이상, 85% 이상, 구체적으로 90% 이상, 및 보다 구체적으로는 95%

이상(예를 들어, 98% 이상)의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 단백질의 상동성 검색은 단백질의 아미노산 서열의 데이터 베이스(예컨대, SWISS-PROT 및 PIR), DNA서열의 데이터 베이스(예컨대, DDBJ, EMBL 및 Gene-Bank), 또는 DNA 서열로부터 추론한 아미노산 서열의 데이터 베이스에 대해 예컨대 인터넷을 통해 BLAST 및 FASTA와 같은 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.

- [53] 또한, 상기 아미노산 서열에 대해 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 전좌 등의 돌연변이를 통하여 본 발명의 목적하고자 하는 활성을 가지는 모든 돌연변이체도 본 발명의 효소에 포함될 수 있다. 상기 아미노산 치환은 '보존적 치환(conservative substitution)'이라 부른다. 예를 들어, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe 및 Trp는 전부 비극성(non-polar) 아미노산의 군으로 분류되고, 유사한 특성을 갖는다. 비-하전된(non-charged) 아미노산은 Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn 및 Gln을 포함한다. 산성 아미노산은 Asp 및 Glu를 포함한다. 염기성 아미노산은 Lys, Arg 및 His을 포함한다. 상기 돌연변이는 사이트-유도 변이(site-directed mutagenesis) 등을 이용하여(Nucleic Acid Res., 10, 6487 (1982); Method in Enzymol., 100, 448 (1983); 'Molecular Cloning 2 nd Edition', Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); 및 'PCR A Practical Approach', IRL Press, 200(1991)) 실시할 수 있다.
- [54] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*S.degradans*)2-40 또는 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonasatlantica*) 등에서 유래된 것일 수 있으나, 상기 효소를 발현하는 모든 형질전환체 등을 포함할 수 있어 이에 한정되지 아니한다.
- [55] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.
- [56] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 효소 활성은 20 내지 90 °C에서 pH 7 내지 11의 조건에서, 보다 구체적으로 25 내지 40 °C에서 pH 9 내지 10의 조건에서 우수한 활성을 나타낼 수 있다.
- [57]
- [58] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.
- [59] 본 발명의 유전자는 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 물리 화학적 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [60] 당업자는 사이트-유도 변이(site-directed mutagenesis) 등을 이용하여 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드로 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가를 적절히 도입함으로써(

NucleicAcidRes.,10,6487(1982);*Methods in Enzymol.*,100,448(1983);'Molecular Cloning 2nd Edition', Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);'PCR A Practical Approach', IRL Press,200(1991)), 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 상동체를 얻을 수 있다.

- [61] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 상동체는 서열번호 5 내지 8의 뉴클레오티드를 포함하고 상기 본 발명의 물리화학적 특성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드'라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5×SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42°C에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 서열번호 5 내지 8 중 하나의 서열로부터 임의적으로 선택된 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프로브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [62] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.
- [63] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 기초한 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 환원효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.
- [64] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프루브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제 생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA 라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.
- [65] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 환원효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(Genetics, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RACE

방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).

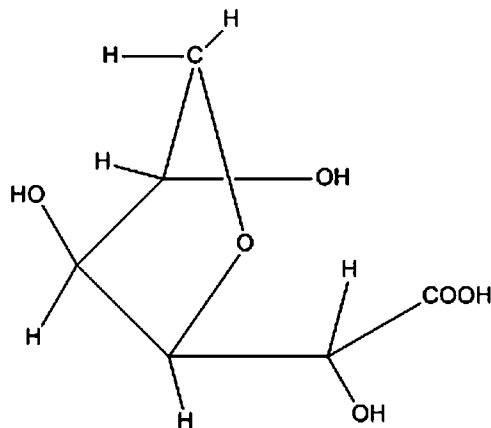
- [66] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함할 수 있다.
- [67]
- [68] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [69] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [70] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [71] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터, pBT21a(이하 'pB2'라 함)에 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 발현용 벡터로 pB2를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.
- [72] 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pB2 벡터를 사용하여 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제 코딩 유전자(서열번호 5 내지 8)를 포함하는 DNA 절편을 삽입하여 재조합 벡터, 예컨대 pB2 vector+sdeAHGD 또는 pB2 vector+pat1AHGD(도 6의 개열지도)를 제조할 수 있다.
- [73]
- [74] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- [75] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [76] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

- [77] 숙주세포로는 대장균(*Escherichiacoli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillussubtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteusmirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichiapastoris*)), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomycescerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurosporacrassa*))등과 같은 하등 진핵세포, 곤충세포, 식물세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [78] 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 발현하는 재조합 벡터 pB2 vector+sdeAHGD 또는 pB2 vector+patlAHGD(도 6의 개열지도)를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있다.
- [79]
- [80] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 제조방법에 관한 것이다.
- [81] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 좋다. 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 대사능에 영향을 주지 않을 정도로 아미노산 서열의 일부에 얼마든지 변형이 있을 수 있다. 상기 변형은 결실, 삽입 또는 치환에 의한 변형을 의미한다.
- [82] 본 발명의 일 구체예에 따른 상기 효소의 제조방법은 다음과 같다. 먼저 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 발현하는 형질전환체를 배양하고, 배양물을 수거하여 환원제(예로서, 2-머캅토에탄올) 및 프로테아제 저해제(예로서, 페닐메탄술폰닐 플루오라이드)를 갖춘 완충용액 내에서 세포를 용해(lysis)시켜 무세포추출물을 제조한다.
- [83] 단백질 용해도에 기초한 분획법(유기용매를 이용한 침전; 황산암모늄에 의한 염석(salting out)); 양이온 교환 크로마토그래피; 음이온 교환 크로마토그래피; 겔 여과; 소수성 크로마토그래피; 및 착화제, 색소, 항체 등을 이용한 친화성 크로마토그래피의 적절한 조합에 의해 상기 무세포추출물로부터 원하는 효소를 정제할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 효소는 페닐-세파로스를 이용한 소수성 크로마토그래피, 모노 Q를 이용한 음이온 교환 크로마토그래피, 부틸-세파로스를 이용한 소수성 크로마토그래피, 및 히드록시아파타이트를 이용한 흡착 크로마토그래피를 이용하는 일련의 과정에 의해 전기영동상 하나의 밴드로 정제될 수 있다.

- [84] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 10% SDS-PAGE 분석 결과, 대략 52 kDa 크기의 효소를 얻을 수 있다.
- [85]
- [86] 본 발명은 또한 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체에 관한 것이다.
- [87] 상기 다클론성 항체의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 제조하는 것이 바람직하다.
- [88] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 SPF(specific pathogen free) 동물에 1 내지 수회 주사하여 면역화시킨다. 최종 면역 후 일정 시간이 지난 뒤에 전혈하여 혈청만 취해 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제에 대한 다클론성 항체를 얻는다.
- [89] 상기 면역화 동물은 통상 면역화에 사용되는 동물이면 특별히 제한하지 않으나, 랫트인 것이 바람직하다. 상기 면역화를 위한 주사 횟수, 기간 및 투여방법은 당업자 수준에서 변형 또는 변경가능하므로 특별히 제한하지 않는다.
- [90]
- [91] 본 발명은 또한 보조 인자로 NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[92] [화학식 1]

[93]



[94]

[95] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 제공한다.

[96] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하 'L-AHG'라 함)를 산화시킬 수 있어 조효소로 NADP를 사용하여 반응시킬 경우 L-AHG의 1번 탄소의 알데하이드기를 카르복실기로 산화하여 상기 화학식 1의 화합물, 즉, 3,6-안하이드로 갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid)을 생성할 수 있다.

- [97] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 테히드로게나제는 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나를 가질 수 있다. 아울러, 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열 중 어느 하나로부터 코딩될 수 있다.
- [98] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*S.degradans*)2-40, 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*), 마이크로실라 에스피(*Microscilla* sp.)PRE1 또는 코랄리오마가리타 아카지멘시스(*Coralimargaritaakajimensis*) 등에서 유래된 것일 수 있으나, 상기 효소를 발현하는 모든 형질전환체 등을 포함할 수 있어 이에 한정되지 아니한다.
- [99] 상기 반응은 20 내지 90 °C에서 pH 7 내지 11의 조건에서, 보다 구체적으로 25 내지 40 °C에서 pH 9 내지 10의 조건에서 실시할 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[100]

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[102]

- [103] <실시예 1> 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagusdegradans*)2-40조추출액으로부터 L-AHG를 기질로 하는 효소의 활성분획 제조

- [104] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagusdegradans*)2-40(이하 sde)의 단일콜로니를 0.2%의 아가가 포함된 10mL의 최소배지(2.3% 해수염, 0.1% 효모 추출물 및 0.05% NH₄Cl 수용액)를 사용하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 같은 배지 1L에 배양된 균 10mL을 넣고 30°C에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양된 균체는 4000rpm으로 30분간 원심분리하여 회수하고, 초음파 파쇄기(Sonifier 450, Branson, USA)를 사용하여 조추출액(crude cell extract)으로 만들었다. 조추출액은 4°C에서 15000rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상등액(조효소액)과 침전물(세포조각)로 나눈 뒤, 상등액은 HiTrap Q 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 음이온 교환 크로마토그래피로 분획하였다. 얻어진 분획들은 최종적으로 디솔팅(Desalting) 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 20mM Tris-HCl, pH 8.0의 완충용액으로 만들었다. 각 분획은 10% SDS-PAGE 방법을 사용하여 단백질의 크기 및 조성을 확인하였고, 아래와 같은 방법으로 L-AHG 기질로 하는 효소의 활성검증을 통해 활성분획을 획득하였다(도 1 및 2).

[105]

- [106] <실험예 1> 분획에 포함된 L-AHG 기질로 하는 효소 활성측정

- [107] 조추출액으로부터 분획된 시료로부터 L-AHG를 기질로 하는 효소의 활성은 다음과 같이 측정하였다. 먼저 10 μ L의 분획시료를 5mM의 여러 조효소(NAD, NADP, ATP)와 5mM의 기질(L-AHG)이 포함된 200 μ L의 반응용액(20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 넣어 25°C에서 30분 동안 반응시켰다. 최종 반응액은

microplate spectrophotometer(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV-methods에 따라 339nm에서 변환된 NAD(P)H의 최종 농도를 측정하거나(도 1), 반응산물의 생성여부를 TLC를 통해 확인하였다.

[108]

[109] <실시에 2> 활성 단백질의 동정

[110] 활성을 나타내는 분획들을 SDS-PAGE로 전개한 후 Image J 프로그램으로 활성분획에 포함된 단백질들의 크기를 비교 확인하였다. 그 결과 활성이 증가되는 구간에서 같은 증가를 보이는 단백질의 크기는 약 52kDa으로 확인하였다. National Center for Biotechnology Information(NCBI) site(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 유사한 크기를 갖고, NAD(P)를 사용하는 테히드로게나아제(dehydrogenase)를 Sde의 유전체서열에서 검색한 결과 EMBL ID ABD81905(이하 L-AHG dehydrogenase, AHGD)로 예측되었고, 그와 서열 상동성을 갖는 단백질들의 서열도 확인하였다. Sde와 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*)T6c(이하 'Pat1'라 함) 유래 AHGD는 아래와 같이 클로닝하여 최종적으로 활성을 검증하였다.

[111]

[112] (AHGD의 클로닝)

[113] 사카로파거스 테그라단스와 슈도알테로모나스 아틀란티카 유전체 서열로부터 얻어진 AHGD의 뉴클레오티드 서열(유럽분자생물학연구소 (EMBL) 염기서열데이터베이스 식별번호: 각각 CP000282, 1446 nt와 CP000388, 1464 nt)에 대한 정보를 기반으로 다음과 같은 올리고뉴클레오티드를 제작하였다.

[114]

1. Sde;

[115]

primer 1:

5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGAAAATTCATAACATGAAAAATTTTATCAACG-3'(49mer)(서열번호 9)

[116]

primer 2:

5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTATCATTAGCAAAATACACTGTCTTC-3'(47mer) (서열번호 10)

[117]

[118] 2. Patl;

[119]

primer 1:

5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGACTGTTCAAGATTTACACTTTAAAAACAA-3'(47mer), (서열번호 11)

[120]

primer 2:

5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACTAAGCCTCATTGATATAAACGGTT-3'(47mer). (서열번호 12)

[121]

[122] 대상 유전자들은 Sde와 Patl 유전체 DNA를 사용하여 중합효소연쇄반응을 통해

증폭되었다(이하 *S. degradans*:*sdeAHGD*, *P. atlantica*:*patlAHGD*). 증폭된 *sdeAHGD*와 *patlAHGD* 아미노산/염기서열은 도 3 및 4에 도시하였고, 이들의 PCR 산물은 도 5에 도시하였다. 증폭된 *sdeAHGD*와 *patlAHGD* DNA 조각들은 아미노 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 부가된 변형된 *pET21a* (이하 pB2) 벡터에 클로닝한 다음 발현용 대장균인 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하여 발현시켰다(도 6).

[123]

[124] (AHGD 발현 및 정제)

[125] 형질전환된 대장균에서 SdeAHGD와 PatlAHGD의 발현을 확인하기 위해, 재조합 *sdeAHGD*와 *patlAHGD* 유전자를 각각 포함한 형질전환된 대장균 BL21 (DE3)를 50mg/L의 엠포실린 항생제가 포함된 루리아-버타니(LB)배지에 형질전환체를 접종한 후, 37°C에서 OD₆₀₀=0.5~1.0까지 진탕배양하였다. 그 후에 0.5mM/L의 농도로 IPTG를 첨가하여 180rpm으로 16°C에서 24시간 동안 발현을 유도하였다. 배양액은 4000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였고, 회수한 균체는 초음파 파쇄기를 사용하여 조추출액으로 만든 후, 4°C에서 15000rpm으로 60분 동안 원심분리 하여 조효소액과 침전물로 분리하였다. 조효소액은 0.45 μ m-여과지(Sartorius stedim biotech, Germany)를 사용하여 여과한 후, Histaq 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 친화력 크로마토그래피로 정제하고, 다시 Hitraq Q 컬럼을 사용하여 이온교환 크로마토그래피로 정제를 하였다. 용출시킨 활성 분획물은 탈염(desalting) 컬럼을 사용하여 20mM Tris-HCl, pH 8.0의 완충용액으로 만들었다. 발현된 SdeAHGD와 PatlAHGD는 10% SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다(도 7).

[126]

[127] <실험예 2> AHGD 활성 확인

[128] 정제한 단백질 활성은 다음과 같은 조건에서 분석하였다. 먼저 5mM의 조효소(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)와 5mM의 기질(L-AHG)이 포함된 200 μ l의 반응용액(20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 SdeAHGD와 PatlAHGD 효소(최종농도: 0.1mg/mL)를 각각 넣은 후 25°C에서 1에서 190분 동안 반응시켰다.

[129] 반응액은 microplate spectrophotometer(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV-methods에 따라 339nm에서 시간 별로 변환된 NADPH의 최종 농도를 측정하였다(도 8).

[130] 그리고, AHGD 효소활성에 의한 반응산물은 Thin layer chromatography (TLC)방법을 사용하여 확인하였다. TLC를 통한 확인은 Silica gel 60 TLC 평판에 반응액을 1 μ l 점적하고, TLC 용매조건(n-Buthanol:EtOH:물= 3:2:2)에서 전개하였다. 전개한 TLC 평판은 1차 처리 용액인 황산(10%(v/v) H₂SO₄ inEthanol)으로 처리한 후 건조하고, 1차 처리된 평판은 다시 2차 처리 용액인 나프토레조시놀(0.2%(w/v) naphthoresorcinol in ethanol)로 처리 후 가열하였다(도

9).

[131]

[132] <실험예 3> 효소활성에 미치는 pH의 영향

[133] AHGD 효소의 최적 pH를 확인하기 위해, pH값은 pH 3~11범위에서 효소의 활성을 측정하였다. 각각의 pH에 대한 완충용액은 pH 3~5.5는 20mM 시트르산 완충용액을 pH 5.5~7.0은 20mM 소듐 포스페이트 완충용액을 pH 7.0~9.0은 20mM Tris-HCl 완충용액을 마지막으로 pH 9.0~11.0은 20mM 보레이트 완충용액을 사용하였다. 2mM의 기질(L-AHG)과 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 각각의 완충용액에 최종 효소단백질 농도를 0.1mg/mL로 하여 25°C에서 15분 동안 반응하였다. 효소의 반응을 멈추기 위해 효소를 95°C에서 5분간 처리하고, 12000rpm으로 5분간 원심분리 후, End-point UV-methods에 따라 339nm에서 변환된 NADPH를 측정하였다.

[134] 도 10에 나타난 바와 같이, SdeAHGD의 활성은 20mM Tris-HCl, pH 9.0 완충용액에서 가장 높았고, PatlAHGD의 활성은 20mM 보레이트, pH 9.0에서 가장 높았다.

[135]

[136] <실험예 4> 효소활성에 미치는 온도의 효과

[137] AHGD 효소의 최적 온도를 확인하기 위해, AHGD의 활성은 4, 16, 25, 37, 50, 70, 90°C 범위에서 각각의 활성을 측정하였다. SdeAHGD는 20mM 보레이트, pH 9.0 완충용액에서 PatlAHGD는 20mM Tris-HCl, pH 9.0 완충용액에서 측정하였고, 2mM의 기질(L-AHG)과 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 각각의 완충용액에 최종 효소단백질 농도를 0.1mg/mL로 하여 각각 정해진 온도에서 15분 동안 반응하였다. 효소의 반응을 멈추기 위해 효소를 95°C에서 5분간 처리하고 12000rpm으로 5분간 원심분리 후, End-point UV-methods에 따라 339nm에서 변환된 NADPH를 측정하였다.

[138] 도 11에 나타난 바와 같이, SdeAHGD는 25°C에서 가장 좋은 활성을 나타내었고, PatlAHGD는 37°C에서 가장 좋은 활성을 나타내었다.

[139]

[140] <실험예 5> 효소의 반응속도론적 분석

[141] SdeAHGD와 PatlAHGD는 반응속도론적 분석을 위해 최종단백질 농도를 0.1mg/mL로 고정하고, 기질(L-AHG, 21mg/mL)을 SdeAHGD의 경우 1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 2.8 μ l를 PatlAHGD의 경우 1.5, 1.8, 2.0, 2.2, 2.5 μ l를 각각 포함되어있고 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 완충용액(SdeAHGD: 20mM 보레이트, pH 9.0, PatlAHGD: 20mM Tris-HCl, pH 9.0)을 사용하였다. SdeAHGD의 효소반응은 25°C에서 15분 동안 반응시키고 PatlAHGD는 25°C에서 10분 동안 반응시켰다. 효소반응을 멈추기 위해 95°C에서 5분간 처리하고, 12000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 획득한 상등액은 End-point UV-methods에 따라 339nm에서 변환된 NADPH를 측정하였다.

- [142] 도 12에 나타난 바와 같이, SdeAHGD와 PatlAHGD의 K_m 값은 각각 1.2202와 2.8529로 확인되었고, K_{cat} 값은 각각 15.0376과 51.5464로 확인되었다.
- [143]
- [144] <실시에 3> 반응 산물의 정제 및 확인
- [145] 건조시킨 혼합물들은 용매추출법을 이용하여 각각의 극성도 차에 따라 추출하고 최종적으로 반응 산물만을 정제하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다. 건조된 반응물은 극성 용매인 메탄올에 현탁한 후에 원심분리를 통해 용매에 녹은 상등액 부분만을 취하여 다시 건조시켰다. 극성도 차이에 의해 L-AHG와 반응산물은 메탄올에 녹지만 NADP와 Tris-HCl는 상대적으로 잘 녹지 않는다. 다시 건조시킨 반응물은 L-AHG와 반응 산물을 분리하기 위하여 메탄올보다 극성도가 낮은 용매인 부탄올에 재현탁 시켰다. 이때 L-AHG가 녹아있는 상등액 부분은 제거하고 침전물부분을 다시 건조시켰다. 높은 순도의 반응 산물을 얻기 위해 다음의 과정을 3회 반복하였다. 그 후 건조시킨 반응산물은 3차 증류수에 녹인 후 GC/MS(도 13)와 TLC로 순도를 확인하였다(도 14).
- [146]
- [147] <실험에 6> 활성 산물의 NMR 분석
- [148] 정제한 반응산물을 동정하기 위하여 NMR 분석을 실시하였다. 건조시킨 반응산물을 D_2O 에 녹이고 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid를 기준으로 1H chemical shift를 결정하였으며 2D 1H - ^{13}C CHSQC(heteronuclearsinglequantumcoherence), 이차원(2D) 1H - ^{13}C CHMBC(heteronuclearmultiplebondcorrelation)spectra를 통해 반응 산물을 구조를 분석하였다. 1H chemicalshift를 분석한 결과는 도 15에 나타내었다.
- [149] 도 15에 나타난 바와 같이, 효소반응에서 기질로 사용한 L-AHG의 1번 탄소의 알데하이드기의 수소결합이 반응 산물에서는 나타나지 않았으며 이를 통해 1번 탄소의 기능기에서 변화가 일어났음을 알 수 있다.
- [150] 구체적인 구조적 변화 및 동정을 위해 2D NMR 분석을 실시하였다.
- [151] 도 16은 2D 1H - ^{13}C CHSQC를 통해 수소-탄소 쌍을 나타낸 결과를 보여주고 있는데, 6개의 수소-탄소 쌍이 있음을 나타내고 있다. 이는 L-AHG에서는 나타났던 1번 수소-탄소 쌍이 사라진 것을 알 수 있다.
- [152] 또한, 도 17의 2D 1H - ^{13}C CHMBC분석을 통해 3번 탄소와 6번 수소, 그리고 6'수소 결합이 나타났는데 이를 통해 3번과 6번 탄소 사이의 안하이드로 고리는 그대로 유지됨을 확인할 수 있었다. 또한 2번 수소는 181.5 ppm의 카보닐 탄소와 연관이 있는데 1번 탄소가 카르복실기로 산화반응이 일어났다. 이는 도 16의 결과에서 나타난 1번 수소결합이 사라진 것과 일치한다.
- [153] 결과적으로, L-AHG를 기질로 사용하고 NADP를 조효소로 효소반응을 했을 때 NADP가 NADPH로 환원이 되면서 기질은 산화 반응이 일어났다. 이 산화물은 L-AHG의 1번 탄소의 알데하이드기가 카르복실기로 산화된 구조라는 것을

NMR을 통해 분석하였으며 동정한 산화물의 구조는 도 18에 나타내었다. 이 산화물은 가장 일반적인 화합물의 명명법에 따라 3,6-안하이드로 갈락토닉산으로 명명하였다.

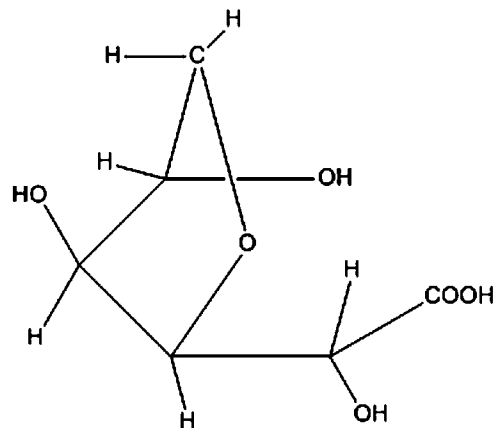
[154]

산업상 이용가능성

[155] 본 발명은 아가로오스 대사를 통한 바이오에너지 제조에 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서열목록 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제.
- [청구항 2] 제1항의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열을 갖는 유전자.
- [청구항 4] 제2항의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
유전자는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열을 갖는 것인 재조합 벡터.
- [청구항 6] 제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 7] 제6항의 형질전환체의 배양물로부터
3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 제조방법.
- [청구항 8] 보조 인자로 NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물의 제조방법:
[화학식 1]



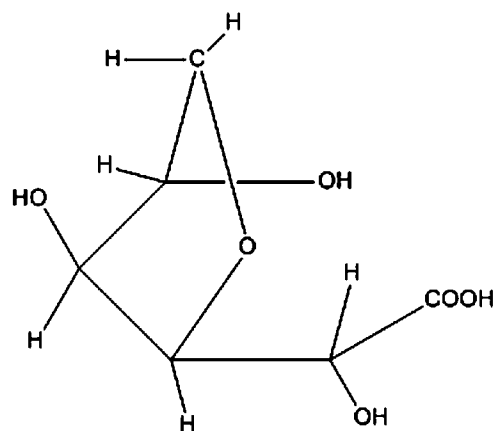
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제는 서열번호 1 내지 4에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 화학식 1의 화합물의 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 테히드로게나제는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열 중 어느 하나로부터 코딩되는 것인 화학식 1의 화합물의 제조방법.

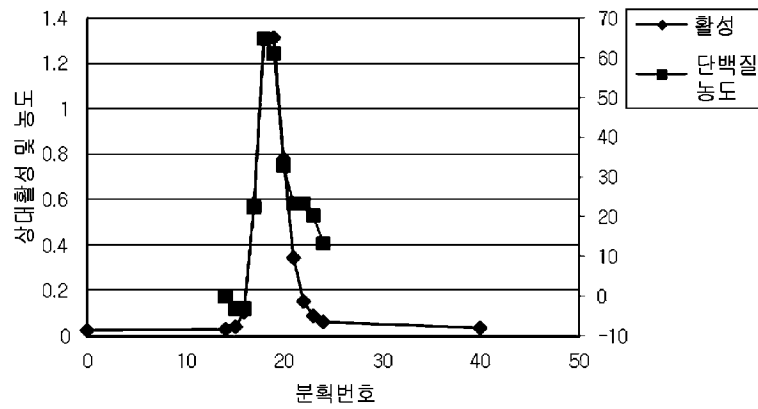
[청구항 11]

하기 화학식 1로 표현되는 화합물:

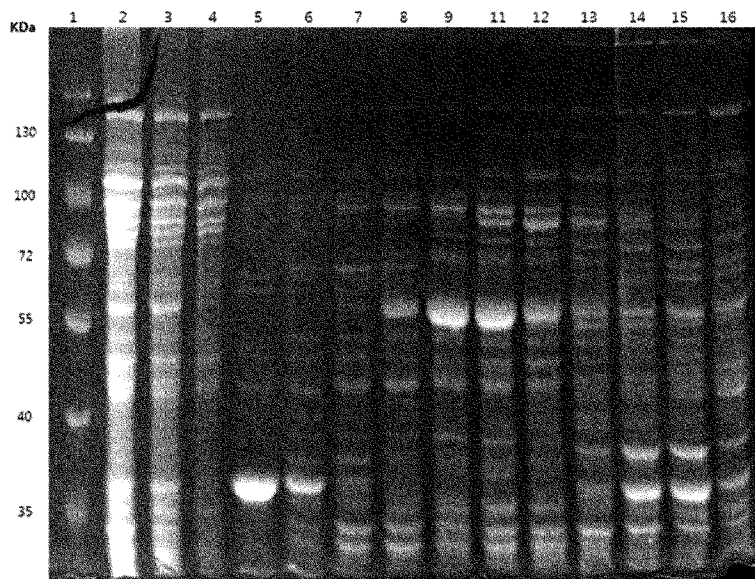
[화학식 1]



[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

```

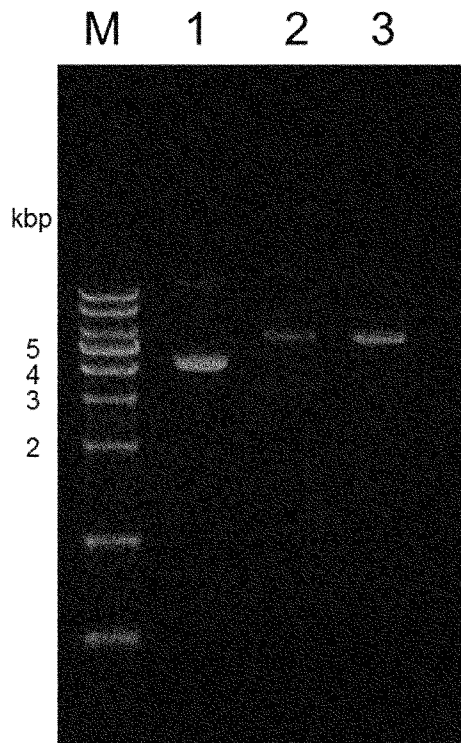
atgaaaattcataacatgaaaaattttatcaacggcgaatatatagcttcacaagctgat > 60
M K I H N M K N F I N G E Y I A S Q A D
Ggcgctattgatgtgctaagcccaagcaccggtaaaaaggtaggcgatattcccgagga > 120
G A I D V L S P S T G K K V G D I P A G
Tgtgtagaggatgcgagttggcgctggatacagccaacgcagctcaaaagctgtgggca > 180
C V E D A Q L A L D T A N A A Q K L W A
Aaaaaaacgaacagagagcgcgcaaaaatattgcgtgtattcgctgcgaatattcgtcg > 240
K K T N R E R A K I L R V F A A N I R A
Gcggcggtatgttagccaagctgttagtgagcagcagggtaaaattactttctgttcg > 300
A A D D L A K L L V S E Q G K L L S V A
Caaatggaagtagaagccacagcaacggttatagaatacgcgtgtgataacgcgctact > 360
Q M E V E A T A T F I E Y A C D N A L T
Atagagggcgatatttaccctccgataaccccaacgaaaaatatatccacaaagt > 420
I E G D I L P S D N P N E K I Y I H K V
Ccacgcggtgtggttggcaattaccgcttgaatttccgttagcactggcgggcaga > 480
P R G V V V A I T A W N F P L A L A G R
Aaaataggcccgagcactgttacaggcaatgctatcggttaagccaaccaagaacg > 540
K I G P A L V T G N A I V V K P T Q E T
Ccactgcaacattggcgtaggcgagctagctaactgctggggtattcccgccggcgta > 600
P L A T L A L G E L A N A A G I P A G V
Ctcaatattgtaaacggcgtggcagtggttgggcagcacctgtgcgaagcccaata > 660
L N I V N G R G S V V G Q H L C E S P I
Acccgcttaataaccatgacggcgagcaccctgctgggcagcgtattaccgcaccagt > 720
T R L I T M T G S T P A G Q R I Y R T S
Gccgatcatttaacgccagtaagtctagaactggcggttaaggcaccatttatcgtaagt > 780
A D H L T P V M L E L G G K A P F I V M
Gaagatgcccaacttagaaagcgcagtagaggcgcattactacgcgttatgccaatgc > 840
E D A N L E S A V E A A F T T R Y A N C
gggcaagtgtgtacctgtgccgagcgccctgtatgtacacgaatctattaccgccgttt > 900
G Q V C T C A E R L Y V H E S I Y P A F
Atggataagctacttgagaaggtgaaagcaataaaagtgggcgacccaatggctgccgat > 960
M D K L L E K V K A I K V G D P M A A D
Accgatatgggtcccaaggttaatacaagcgaaatagaaaattatgatgcgctggtaag > 1020
T D M G P K V N Q S E I E N I D A L V K
Aagggtattgagcaaggcgcaaccttgctgcatggcgtaagcgcgcgcatgtgcctggc > 1080
K G I E Q G A T L L H G G K R A H V P G
Tttgaaggtggcaactggtatgaacccacactgctaggtgatgtgcagcaagtaatt > 1140
F E G G N W Y E P T L L G D V Q Q S N I
Cttgtgcacgaagaacgtttgggcctattttacctgtagttaaaattacagtattgag > 1200
L V H E E T F G P I L P V V K I N S I E
Caggctatagagtacaccaacgcagtgagtgatggcctttcaacgtattgtttacgcaa > 1260
Q A I E Y T N D S E Y G L S T Y L F T Q
Aaccttaatatattcatatattgcccaggttgaggccggtgaggtgtattgtaac > 1320
N L K Y I H Q Y I A E V E A G E V Y V N
Cgcggtattggtgagcagcacaaggctccacaacggttgaagctaagcggcgagggc > 1380
R G I G E Q H Q G F H N G W K L S G A G
Ggtgaagatggtcgttacggtttagagcagctacttagagaagaagacagtgattttgct > 1440
G E D G R Y G L E Q Y L E K K T V Y F A
Gaatga > 1446

```

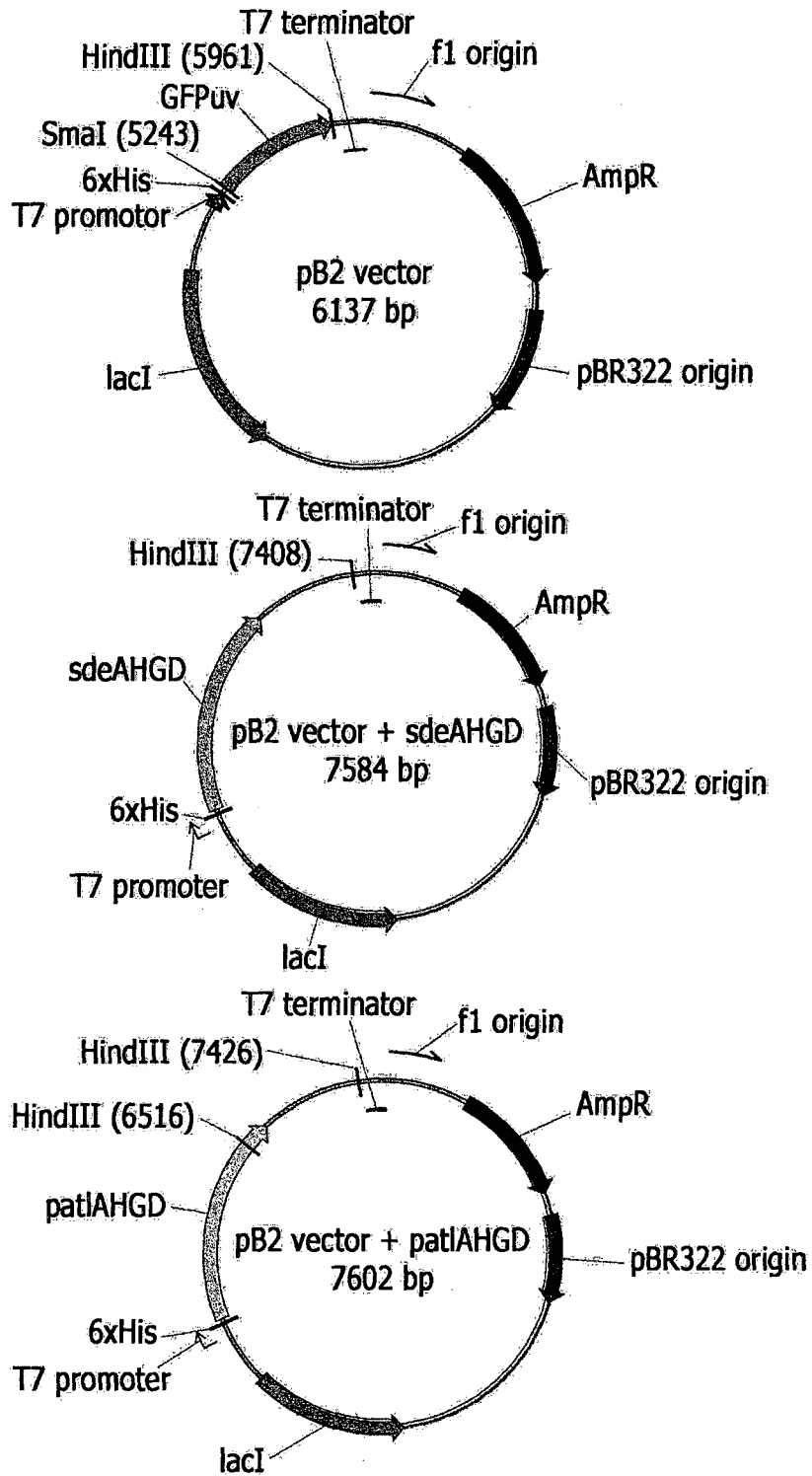
[Fig. 4]

Atgactgttcaagatttacactttaaaacaagggttaatttcattggagggaatgtg > 60
 M T V Q D L H F K N K V N F I G G Q Y V
 Ccctctaacgaatccgatacaattgacatacttagcccgtaactggcaagtcataggc > 120
 P S N E S D T I D I L S P S T G K V I G
 Gaaataccggcaggtgtgaaagcggatgctgaaaatgccctagaggtggctcaggccgcg > 180
 E I P A G C K A D A E N A L E V A Q A A
 Caaaaagcatgggctaaattaaccgctcgtacacgccagaatatgctgcgtaccttcgct > 240
 Q K A W A K L T A R T R Q N M L R T F A
 Aacaaaattcgtgagaataaacacattctgcccctatgctcgtcgtgagcaaggcaaa > 300
 N K I R E N K H I L A P M L V A E Q G K
 Tgttatcagtagccgaaatggaagtggacgttaaccgctacggttatcgactacggatgt > 360
 L L S V A E M E V D V T A T F I D Y G C
 gacaatgccctgaccatagaaggcgacattttgcttcagataatcaggacgaaaaaata > 420
 D N A L T I E G D I L P S D N Q D E K I
 tacattcataagggtaccaagaggcggtgtgtgggcattaccgctggaattccctctg > 480
 Y I H K V P R G V V V G I T A W N F P L
 gcattagcaggtcgaaaaattggccctgcttattaccggttaaccatgggtgttaaag > 540
 A L A G R K I G P A L I T G N T M V L K
 cctacccaagaagccgctgtgcaacgactgagcttggcgctattgccaagaagcaggc > 600
 P T Q E T P L A T T E L G R I A K E A G
 cttcccgatggcgattataaacgtcataaatgtactggctctgtggtcggaacaccta > 660
 L P D G V L N V I N G T G S V V G Q T L
 tgtgaaagccccatcactaaaatgatcaccatgacaggtccactgtcgccgggtaacaa > 720
 C E S P I T K M I T M T G S T V A G K Q
 atttataaaaccagcgagatgatgacccctgtcatgcttgagttaggtgtaaaagcg > 780
 I Y K T S A E Y M T P V M L E L G G K A
 ccgatggctcgtcatggatgacccgatcttgataaggcggcagaagatgcactgtggggg > 840
 P M V V M D D A D L D K A A E D A L W G
 cgttttgcgaactgggacaggtatgcactgtgtagaacgcttatgttcattgcaagt > 900
 R F A N C G Q V C T C V E R L Y V H A S
 gtttacgatgatttatggctaaattcttacccttagtgaagggttgaaggtcggggat > 960
 V Y D E F M A K F L P L V K G L K V G D
 cccatggatgcagactcacaaatgggcccctaagtgtaccagcggtgaaattgataatgc > 1020
 P M D A D S Q M G P K C N Q R E I D N I
 gaccacatagtgcatgaagccatcaagcaagggtgcaacgggtgccactggcggaagacg > 1080
 D H I V H E A I K Q G A T V A T G G K T
 gcaacagttgaaggcttcaaggcggtgtgtgtatgagcccacggttttagtgatgtt > 1140
 A T V E G F E G G C W Y E P T V L V D V
 aaacaagacaatatagtggtgcacgaagaaccttcggcccccattctacatatcgtaaa > 1200
 K Q D N I V V H E E T F G P I L P I V K
 gtcagtagtatggaacaagctatcgagttttgtaacgacagcatctatggttaagcgct > 1260
 V S S M E Q A I E F C N D S I Y G L S A
 tacgtacacacccaaagctttgccaatattaatcaagctatcagtgatttagaagtcggt > 1320
 Y V H T Q S F A N I N Q A I S D L E V G
 gaagtgtatatcaaccgggaatgggtgagcagcatcagggcttcacacaggctggaaa > 1380
 E V Y I N R G M G E Q H Q G F H N G W K
 caaagcgggtttggcggtgaagacggtaagtttggccttgagcaatacttgaaaaagaaa > 1440
 Q S G F G G E D G K F G L E Q Y L E K K
 accgttatatcaatgaggttag > 1464
 T V Y I N E A *

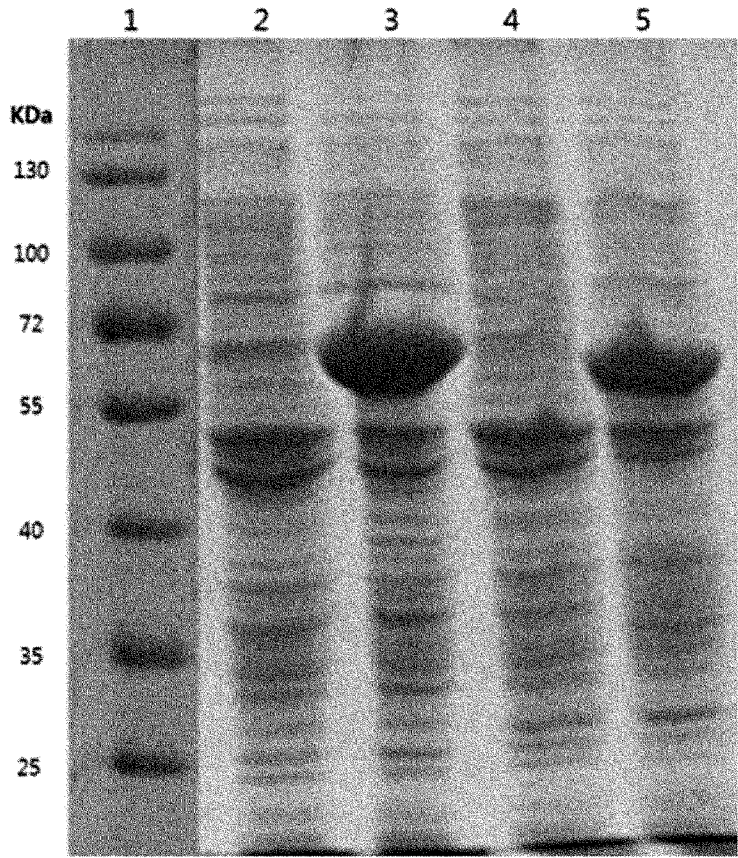
[Fig. 5]



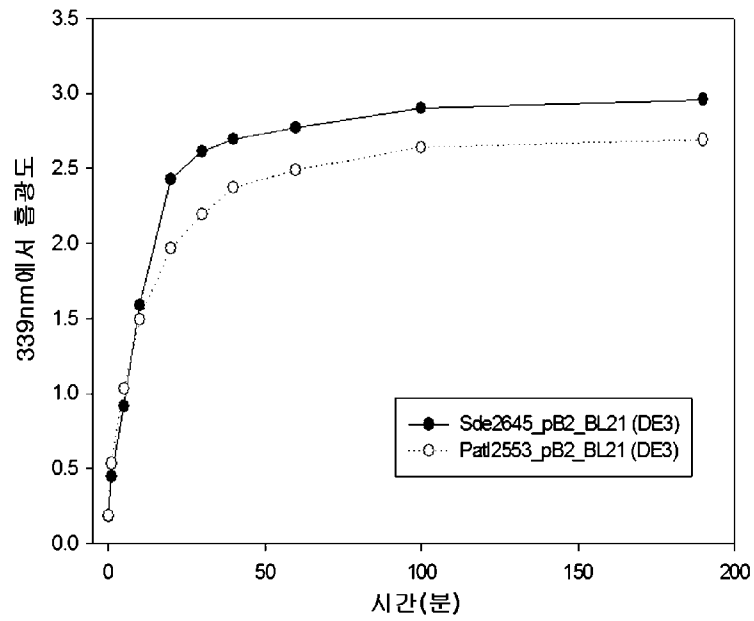
[Fig 6]



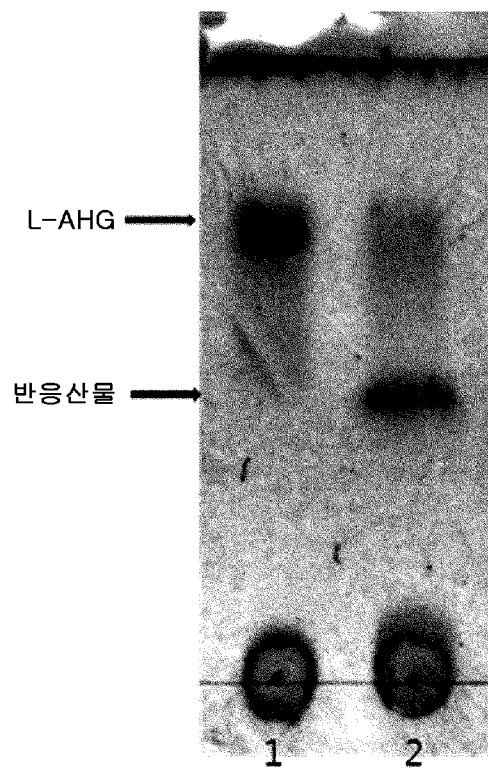
[Fig. 7]



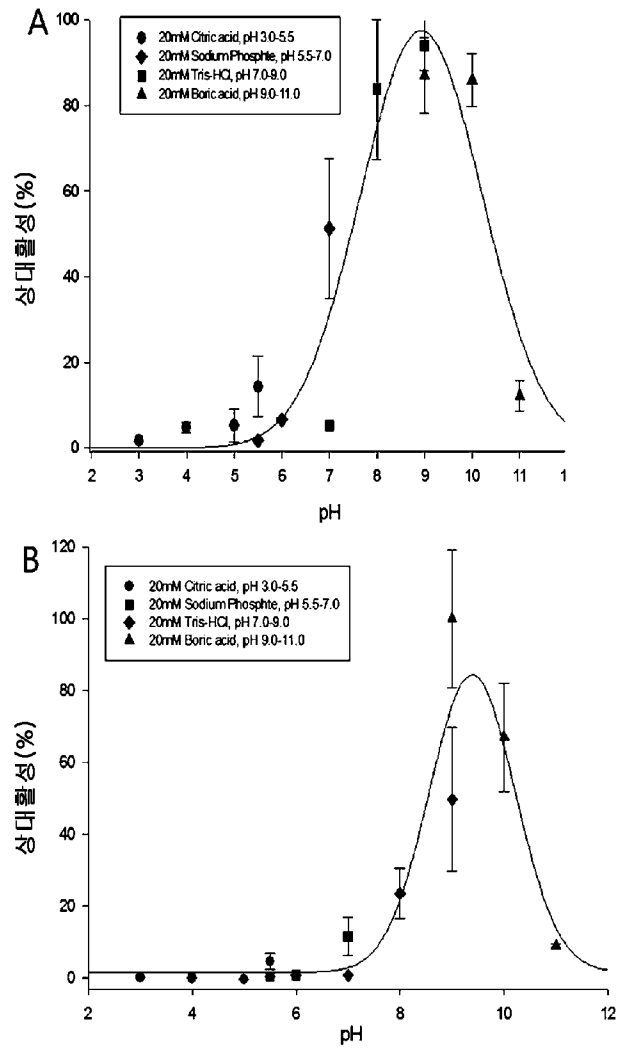
[Fig. 8]



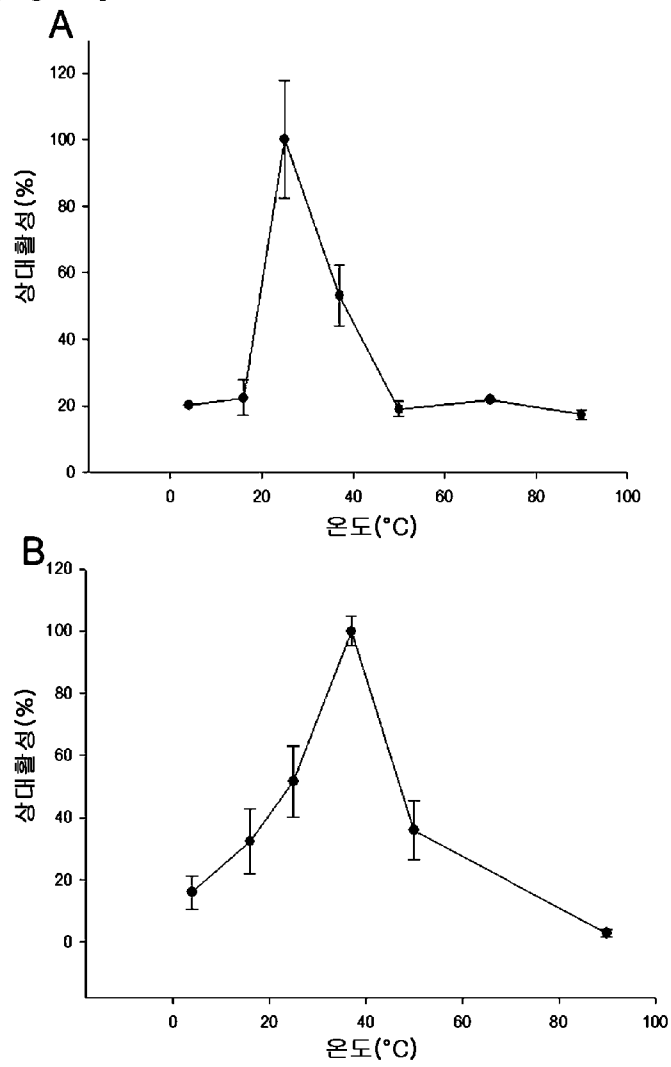
[Fig. 9]



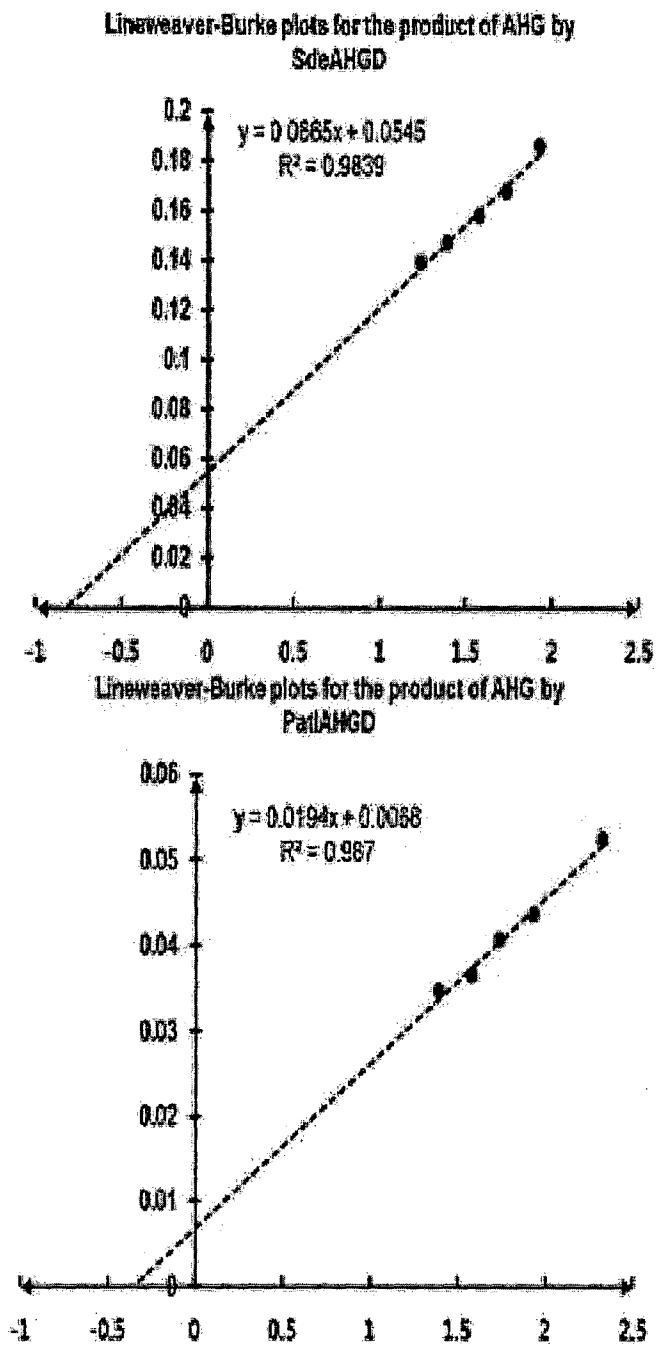
[Fig. 10]



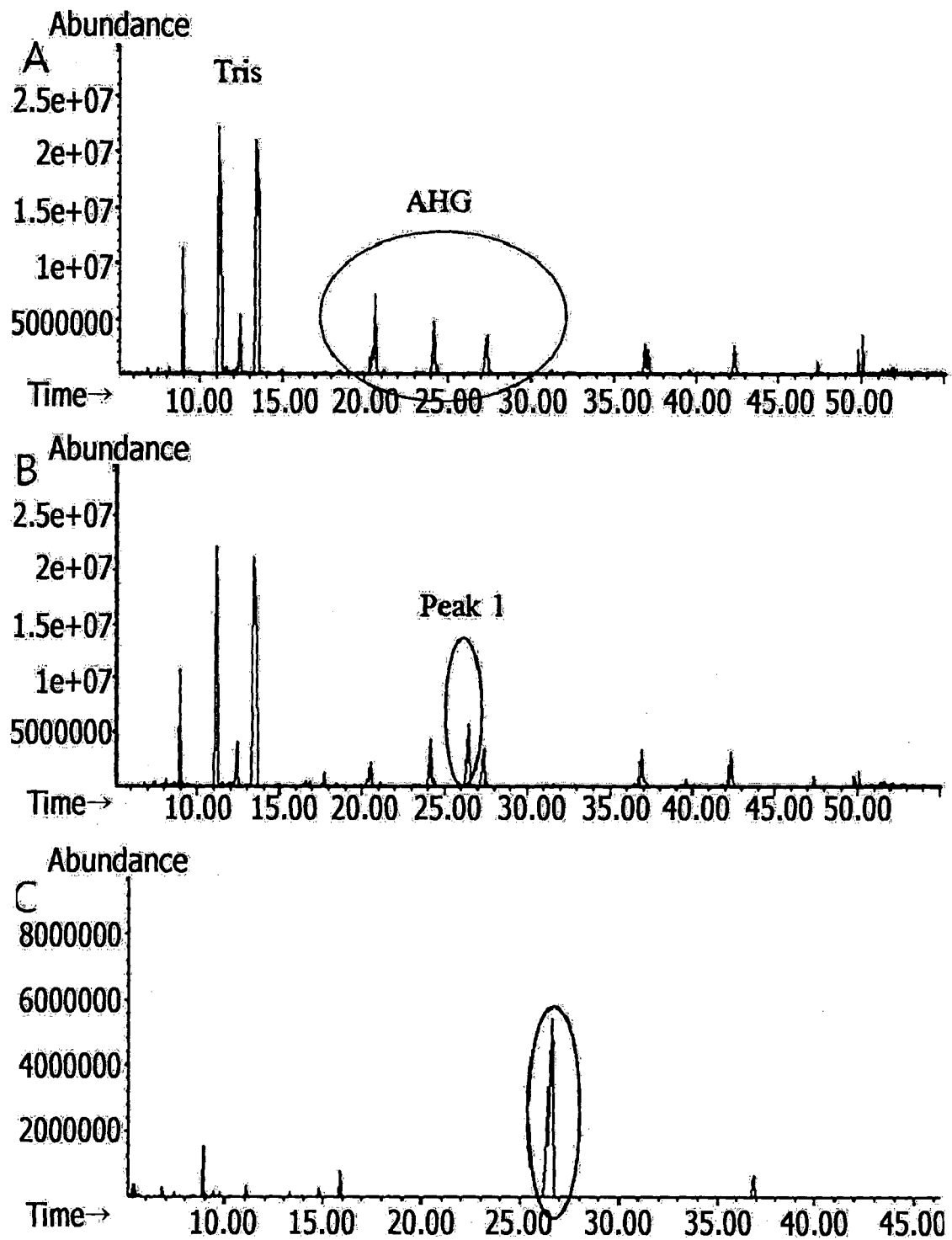
[Fig. 11]



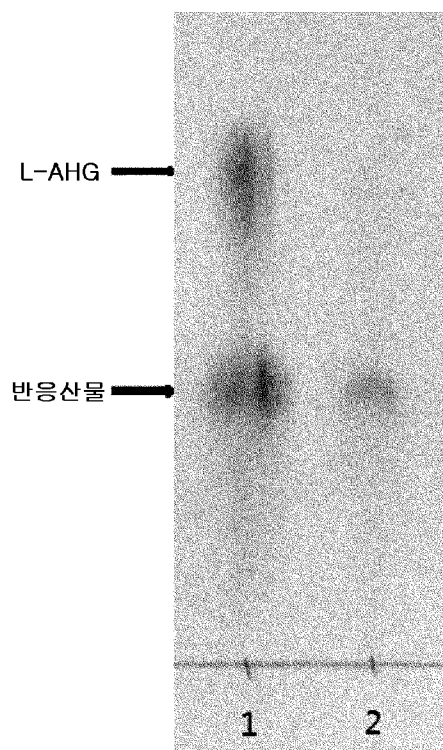
[Fig 12]



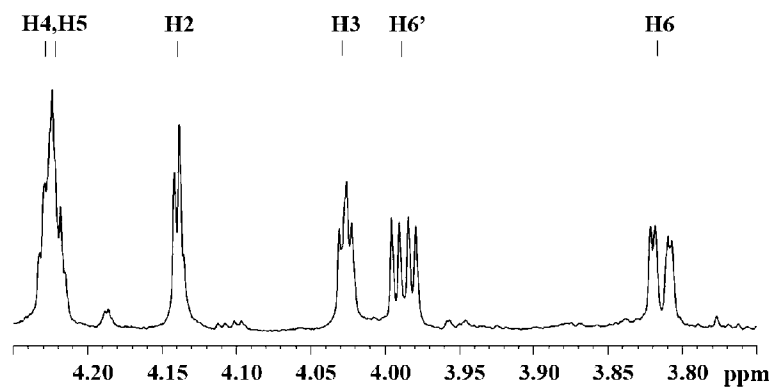
[Fig 13]



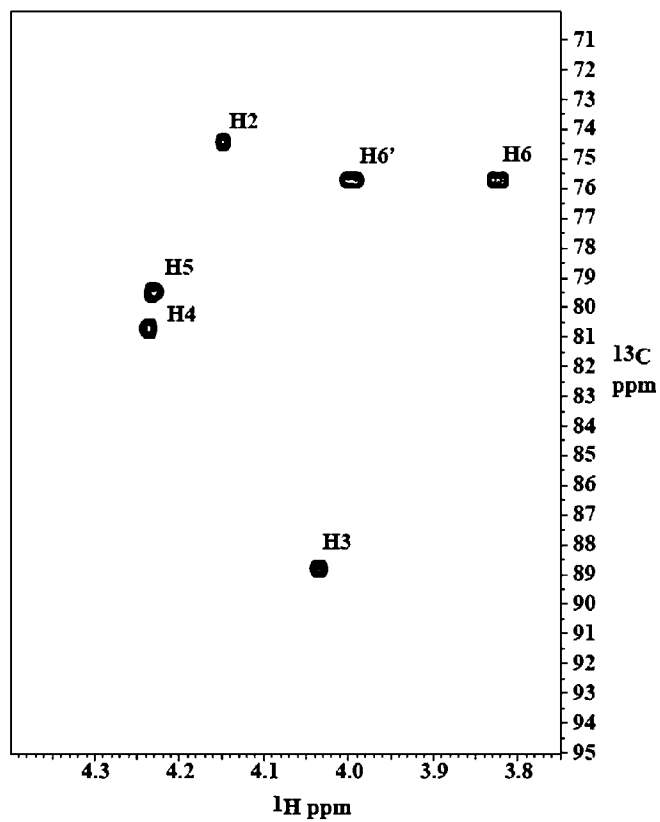
[Fig. 14]



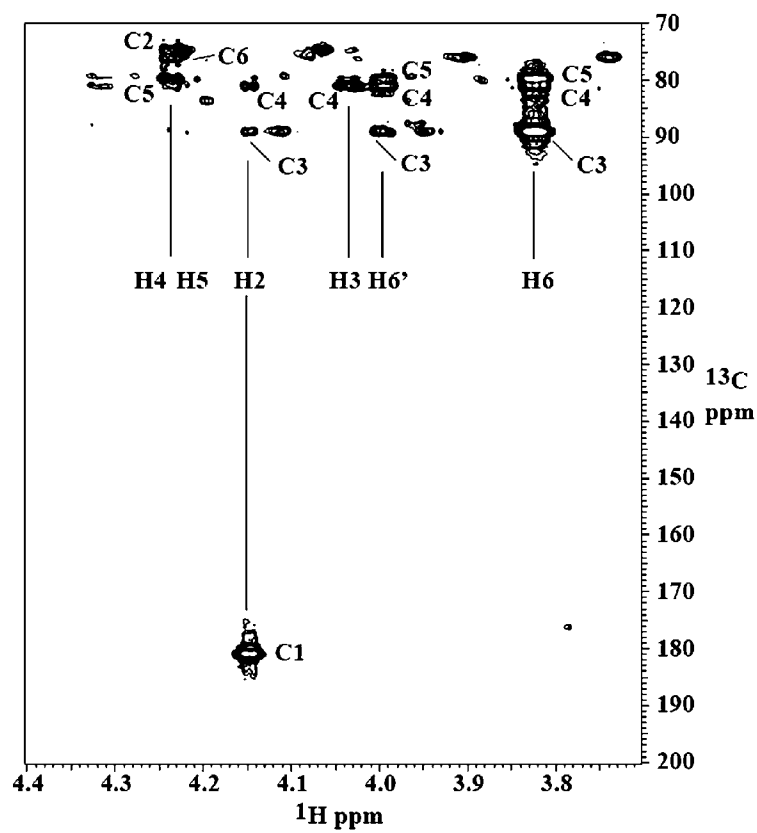
[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]

