



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0104987
(43) 공개일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C07K 14/32 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C07K 14/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0007459
(22) 출원일자 2021년01월19일
심사청구일자 2021년01월19일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
서명지
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 230
4동 1301호 (송도동, 송도더샵마스터뷰)
천정혜
인천 미추홀구 인주대로 51, 1011호
(74) 대리인
차준용

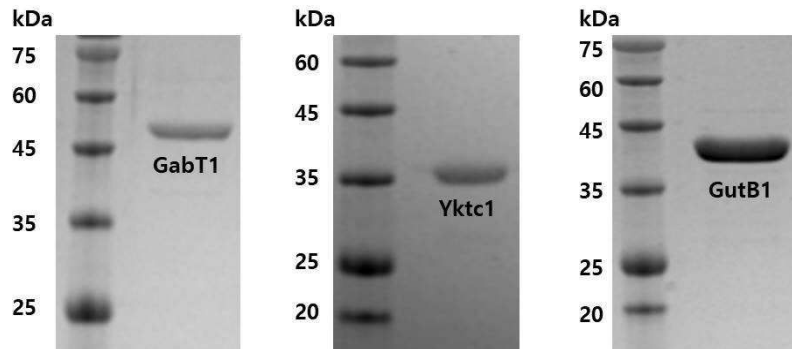
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 1-데옥시노지리마이신 핵심 생합성 유전자 클러스터를 포함하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156

(57) 요약

본 발명은 발효식품에서 분리된 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 으로부터 1-DNJ 핵심 생합성 유전자 군을 분리하여 각 유전자들의 이형발현을 통해 특성을 연구하였다. 먼저 첫 번째 생합성 효소인 GabT1은 조효소인 PLP 존재하에 아미노기전이효소로 아미노기 공여체로 L-글루탐산을 아미노기 수용체로 fructose-6-phosphate를 선호하는 것으로 확인되었다. 두 번째 생합성 효소 Ykct1은 zinc이온 의존성 포스파타아제로 탈인산화반응을 촉매하는 것으로 확인이 되었고 최적활성 조건은 65℃ pH 5.0 였다. 또한 Ykct1은 넓은 범위의 기질 특이성을 갖는 것으로 확인되었다. 마지막 생합성 효소 GutB1은 2-amino-2-deoxy-D-mannitol에 대해 높은 기질 특이성을 가지고 최적활성 조건은 30℃ pH 9.5로 확인되었다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12R 2001/07 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711036272
과제번호	2014R1A1A1002980
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인연구지원
연구과제명	전통 장류 유래 미생물을 통한 향당뇨 고기능성 식품소재 및 발효식품 개발
기 여 율	0.5/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109877
과제번호	2019R1A2C1006038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	4,4'-Diaponeurosporene을 생합성하는 기능성 유산균을 활용한 향암 파마바이오틱스

개발

기 여 율	0.3/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345301721
과제번호	2016R1D1A1B03931582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	저염 내성 극호염성 고균 유래 카로티노이드 항산화 소재 개발
기 여 율	0.2/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2016.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

1-데옥시노지리마이신(1-DNJ) 핵심 생합성 유전자 클러스터를 포함하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 1-데옥시노지리마이신(1-DNJ) 핵심 생합성 유전자 클러스터는 GabT1, Ykrc1 및 GutB1인 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 GabT1은 1-DNJ의 전구체인 fructose 6-phosphate에 아미노기의 도입을 촉매하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 Ykrc1은 zinc 이온 의존성 포스포타아제로서 탈인산화반응을 촉매 하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 Ykrc1의 최적 활성 조건은 65℃ 및 최적 활성 pH는 5.0인 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 GutB1은 2-amino-2-deoxy-D-mannitol을 기질로 사용하여 oxidation 반응을 촉매 하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 GutB1의 최적 활성 조건은 30℃, 최적 활성 pH는 9.5인 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효 식품에서 분리된 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P)의 1-데옥시노지리마이신 핵심 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 효소의 기능에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병 환자의 90%를 차지하는 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성 또는 췌장 베타 세포에서의 인슐린 분비 부족으로 인한 인슐린 결핍에 의해 유발되어 고혈당을 유발한다. 이것은 설폰닐유레아(Sulfonylurea), 비-설폰닐 유레아(non-sulfonylurea), 비구아니드(biguanide), 티아졸리딘디온(thiazolidinedione) 및 α -글루코시다아제 억제제를 포함하는 경구 혈당 강하제에 의해 조절될 수 있다. 후자는 소장에서 탄수화물을 포도당으로 가수 분해하여 탄수화물 분해 속도를 줄여 식후 저혈당으로 이어진다. 따라서, 아카보즈(acarbose), 미그리톨(Miglitol), 보글리보스(voglibose)와 같은 α -글루코시다아제 억제제가 경구용 당뇨병 치료제로 개발되었다. 그러나, 이들은 복부 팽만화 및 구토와 같은 부작용을 가지며, 따라서 최근에 새로운 α -글루코시다아제 억제제를 개발하기 위한 많은 노력이 있었다.

[0003] 공지된 α -글루코시다아제 억제제 중 하나인 1-데옥시노지리마이신(1-Deoxynojirimycin; 1-DNJ)은 포도당 구조 내의 산소가 질소로 치환된 폴리하이드록실 알칼로이드이다. 1-DNJ는 항당뇨 효과가 있으며 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus) 감염과 임질(gonorrhea) 치료에도 사용된다.

[0004] 1-DNJ는 썩으로부터 화학적으로 합성되거나 추출될 수 있다. 그러나 이러한 방법은 생산 수율이 낮고 일관성이 없기 때문에 비용 측면에서 효과적이지 못하다. 바실러스(*Bacillus*)와 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)와 같은 미생물은 GabT1, Yktc1 및 GutB1 유전자에 의한 아미노화(amination), 탈인산화(dephosphorylation) 및 산화(oxidation)를 통해 포도당에서 1-DNJ를 생합성하기 위한 공장으로 제안되었다.

[0005] 또한, 1-DNJ는 중국 전통 발효 비지(okara)로부터 유래된 *Bacillus subtilis* 균주 DSM704, B2 및 토양으로부터 유래된 S10 및 토양으로부터 유래된 유래 *B. amyloliquefaciens* 균주 HZ-12 및 한국 발효 식품으로부터 유래된 140N에 의해 생산된다.

[0006] 한 번에 하나의 요인(One-Factor-at-a Time: OFAT) 배양 최적화 방법은 반응 표면 방법론(response surface methodology, RSM)과 함께 미생물에 의한 1-DNJ 생산을 증가시키는 데 사용되어 왔으며, 이는 *Streptomyces lawendulae* 에 의한 1-DNJ 생산이 19%까지 증가한다. 실제로 1-DNJ를 생산하는 *Bacillus subtilis* B2의 α -글루코시다아제 저해(AGI) 활성은 RSM 방법에 의해 증가되었다.

[0007] 그러나, 많은 연구 사례에도 불구하고, 아직 1-DNJ를 생산하기 위한 균주 내 1-DNJ 핵심 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 효소의 기능에 대한 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1413268호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 발효 식품에서 분리된 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P)의 1-데옥시노지리마이신 핵심 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 효소의 기능을 규명하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 발효 식품에서 분리된 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P)의 1-테옥시노지리마이신 핵심 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 효소의 기능에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 1-테옥시노지리마이신(1-DNJ) 핵심 생합성 유전자 클러스터를 포함하는 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P) 균주를 특징으로 한다.
- [0012] 상기 1-테옥시노지리마이신(1-DNJ) 핵심 생합성 유전자 클러스터는 GabT1, Yktc1 및 GutB1인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 먼저 첫 번째 생합성 효소인 GabT1은 조효소인 PLP 존재하에 아미노기 전이효소로 아미노기 공여체로 L-글루탐산을 아미노기 수용체로 fructose-6-phosphate를 선호하는 것으로 확인되었다.
- [0014] 따라서, 상기 GabT1은 1-DNJ의 전구체인 fructose 6-phosphate에 아미노기의 도입을 촉매하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 두 번째 생합성 효소 Yktc1은 zinc 이온 의존성 포스파타아제로서 탈인산화반응을 촉매하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 상기 Yktc1의 최적 활성 조건은 65℃ 및 최적 활성 pH는 5.0인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 Yktc1은 넓은 범위의 기질 특이성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 생합성 효소 GutB1은 2-amino-2-deoxy-D-mannitol에 대해 높은 기질 특이성을 가지며, 상기 2-amino-2-deoxy-D-mannitol을 기질로 사용하여 oxidation 반응을 촉매하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 상기 생합성 효소 GutB1의 최적 활성 조건은 30℃ 및 최적 활성 pH는 9.5인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 발효 식품에서 분리된 바실러스 아트로페어스 MBLB1156 (*Bacillus atrophaeus* MBLB1156)(KCCM12922P)의 1-테옥시노지리마이신 핵심 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 효소의 기능에 관한 것으로서, 상기 1-테옥시노지리마이신 (1-DNJ) 핵심 생합성 유전자 클러스터는 GabT1, Yktc1 및 GutB1인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 GabT1은 1-DNJ의 전구체인 fructose 6-phosphate에 아미노기의 도입을 촉매하는 것을 특징으로 하며, 상기 생합성 효소 Yktc1은 zinc 이온 의존성 포스파타아제로서 탈인산화반응을 촉매하며, 상기 생합성 효소 GutB1은 2-amino-2-deoxy-D-mannitol에 대해 높은 기질 특이성을 가지며, 상기 2-amino-2-deoxy-D-mannitol을 기질로 사용하여 oxidation 반응을 촉매하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에서 수행한 생합성 효소의 특성 분석은 1-DNJ의 생합성 경로를 파악하고 이해하는데 기초 자료가 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 아트로페어스 MBLB1156에서 분리된 1-DNJ 생합성 유전자를 전기영동한 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 16S rRNA 유전자에 기반하여 작성한 계통 발생도이다.
- 도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 정제된 재조합 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 GabT1과 아미노기 공여체와 조효소 PLP의 반응 시간에 따른 스펙트럼 분석 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 Yktc1의 Zn^{2+} 농도별 활성을 나타낸 결과이다.
- 도 6는 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 pH가 재조합 Yktc1의 활성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 온도가 재조합 Yktc1의 활성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 전 열처리가 재조합 Yktc1의 잔존 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 9 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 GutB1의 기질별 활성을 나타낸 결과이다.

도 10 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 pH가 재조합 GutB1의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 11 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 온도가 재조합 GutB1의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

실시예

1. 균주의 분리

시중에서 판매하는 전통발효식품 발효두부 시료 1g을 0.85% 멸균생리식염수 9 mL에 넣고 충분히 현탁하였다. 현탁액 1 mL을 취하여 연속희석방법을 이용하여 희석한 후 200 μ L씩 TSB (Tryptic soy broth, BD) 한천 배지에 도말하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 각 배지에서 서로 다른 형태의 군 집락에 대해 1차 분리하였고, 단일 군 집락의 분리를 위해 각 colony마다 3회 이상의 희선편판법을 이용한 점종을 진행하였다.

2. α -glucosidase 저해 활성 측정

α -glucosidase 저해 활성 측정을 위한 분리 균주는 YG (1% glucose, 1% yeast extract, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% KH_2PO_4) 액체 배지에 접종하여 37℃, 220 rpm에서 5일간 진탕배양 하였다. 배양액은 100℃에서 10분간 열처리 후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 α -glucosidase 저해 활성 측정에 사용하였다. 96 well plate에 0.1 M potassium phosphate buffer와 기질 10 mM PNPG (*p*-nitrophenyl- α -glucopyranoside)를 각각 30 μ L씩 넣고 배양 상층액 147 μ L를 넣고 섞어준 뒤 3 μ L의 α -glucosidase (100 unit/ml, Sigma)를 첨가하였다. 공시험구로는 α -glucosidase 대신 증류수를 첨가하였으며, 대조구의 경우 배양 상층액 대신 증류수를 첨가하였다. 항온기에서 37℃, 10분간 효소 반응시킨 후 UV/vis spectrophotometer (Multiskan FC, Thermo scientific) 405 nm에서 측정하였다. α -glucosidase 저해 활성 값은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다: α -glucosidase inhibition (%) = $[1 - (\text{상층액A405} - \text{공시험구A405}) / \text{대조구A405}] \times 100$.

3. 1-DNJ 생합성 유전자군을 갖는 균주 분리 및 동정

1-DNJ 생합성 유전자 군(*gabT1-yktc1-gutB1*)을 갖는 균주를 선별하기 위하여 기존의 1-DNJ 생합성 유전자의 염기서열을 바탕으로 제작된 프라이머를 사용하여 PCR 스크리닝을 수행하였다. 균주의 게놈 DNA는 HiYieldTM Genomic DNA Mini Kit (RBC, Taiwan)를 이용해 추출하였다. 1-DNJ 생합성 유전자 코딩 영역 DNA 단편은 각 균주의 게놈 DNA를 주형으로 사용하고 프라이머는 *gabT1*은 [표 1] 서열 번호1 및 2, *yktc1*은 서열번호 3 및 4, *gutB1*은 서열번호 5 및 6의 서열을 사용하여 PCR반응을 수행하였다.

표 1

서열 번호	서열	설명
1	5'-ATGGGAACGAAGGAAATCAGCAATCCA-3'	<i>gabT1</i> 정방향 증폭용 프라이머
2	5'-TCACTTGATTTCCTCCAATAGCTTGCG-3'	<i>gabT1</i> 역방향 증폭용 프라이머
3	5'-GTGAGAGACTATATTATTGGAATGGG-3'	<i>yktc1</i> 정방향 증폭용 프라이머
4	5'-TTAGGAGTCCAGACCAACGCCTTCATA-3'	<i>yktc1</i> 역방향 증폭용 프라이머
5	5'-ATGAAGGCGTTGGTCTGGACTCCTAAT-3'	<i>gutB1</i> 정방향 증폭용 프라이머
6	5'-TTATAAAAGTTTCGGATCAGACACRAG-3'	<i>gutB1</i> 역방향 증폭용 프라이머

주형 DNA (1 μ l), 정방향 프라이머 (1 μ l), 역방향 프라이머 (1 μ l)를 증류된 물 17 μ l가 포함된 PCR pre-mixture (SolgTM 2X EF-Taq PCR Smart mix 2)에 첨가하고 반응액을 94℃에서 5분간 반응시킨 후, 94℃에서

30초, 55 °C에서 1분, 72 °C에서 1분간 반응시키는 변성 (denaturation), 결합 (annealing), 중합 (extension) 사이클을 35회 실시하였다. 이 후 PCR 산물을 1 % 아가로오스 겔 전기영동을 실시하여 확인하였다(도 1).

[0036] 선별된 균주의 16S rRNA는 범용 프라이머(27F, 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 및 1492R, 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT TC-3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 단편을 MacroGen Co.(Seoul, Korea)에 의해 서열 분석하고 서열 정렬 및 동정은 Basic Local Alignment Search Tool 및 Ezbiocloud에 의하여 수행되었다. 계통수(phylogenetic tree)는 MEGA7 소프트웨어를 사용하여 구축되었다(도 2).

[0038] 4. 1-DNJ 생합성 유전자 클로닝

[0039] 실시예 3에서 수득된 PCR 산물을 정제 후 pGEMT Easy 벡터 (promega, USA)에 라이게이션하고, *E. coli* DH5 α 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 세포에서 추출한 플라스미드는 각 pGEMT-*gabT1*, pGEMT-*yktc1*, pGEMT-*gutB1*로 명명하고 시퀀싱을 통해 염기서열을 확인하였다.

[0040] 목적하는 3종의 효소 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터 및 형질전환체의 제조를 위해, 이에 앞서 확인한 염기서열을 토대로 각 유전자별로 정방향 및 역방향 염기서열에 제한효소 부위를 포함하는 프라이머를 제작하여 PCR 방법으로 증폭시키는 다음과 같은 시험 과정을 실시하였다.

표 2

서열 번호	서열	설명
7	5' -CCAGGATCCGAATTCGATGGGAACGAAG-3'	<i>gabT1-EcoRI</i>
8	5'-AAGCATTATGCGGCCGCTCACTTGATTTCCTC-3	<i>gabT1-NotI</i>
9	5'-ATGGCTAGCGTGAGAGACTATATTATTGG-3'	<i>yktc1-NheI</i>
10	5'-ATACTCGAGGTCCAGACCAACGCCTT-3'	<i>yktc1-XhoI</i>
11	5'-AGATATACATATGAAGGCGTTGGTGTGGA-3'	<i>gutB1-NdeI</i>
12	5'-ACGCTCGAGTAAAAGTCCGGATCAGA-3'	<i>gutB1-XhoI</i>

[0043] 주형 DNA (1 μ l), 정방향 프라이머 (1 μ l), 역방향 프라이머 (1 μ l)를 증류된 물 17 μ l가 포함된 PCR pre-mixture (SolgTM 2X EF-Taq PCR Smart mix 2)에 첨가하고 반응액을 94 °C에서 5분간 반응시킨 후, 94 °C에서 30초, 55 °C에서 1분, 72 °C에서 1분간 반응시키는 변성 (denaturation), 결합 (annealing), 중합 (extension) 사이클을 35회 실시하였다. 이 후 PCR 산물을 1 % 아가로오스 겔 전기영동을 실시하여 확인하였다. 수득된 PCR 산물을 표 2에 제시된 바와 같이 유전자별로 적당한 제한 효소에 의해 절단된 발현 벡터내로 삽입시켜 각각 *gabT1*, *yktc1*, *gutB1*를 포함하는 재조합 벡터 pACYC-*gabT1*, pET21a-*yktc1*, pET21a-*gutB1*를 수득하였다. 이후, 얻은 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하여 재조합 대장균을 얻었다.

[0045] 5. 재조합 효소 유전자의 발현 및 정제

[0046] 형질전환된 재조합 대장균을 항생제가 포함된 LB액체배지에 접종하여 37°C, 180 rpm 에서 18시간 동안 배양 후 항생제 포함 LB 배지 800ml 배지에 1%(v/v)접종하여 600nm 흡광도가 0.6-0.8이 되도록 배양하여 이 시점에 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 농도가 0.4mM이 되도록 첨가하여 18°C 150rpm에서 18시간 배양해 주었다. 원심분리로 회수한 균체를 lysis buffer (GabT1, Yktc1: 50 mM HEPES, 250 mM KCl, 5 mM imidazole, pH 7.5 ; GutB1: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 7)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 원심분리 (12,000 rpm, 30분, 4 °C) 하여 상층액을 얻었다. 얻은 각 상층액을 Ni-NTA agarose (QIAGEN, Hilden, Germany)로 채운 Ni-NTA polypropylene column (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)에 흘려주어 Ni-NTA agarose 레진에 각 재조합 효소를 결합시켰다. Wash buffer (lysis buffer+ 50mM imidazole)을 흘려주어 비목적 단백질을 제거하였고, 최종적으로 elution buffer (lysis buffer+ 250mM imidazole)로 효소를 회수하였으며, 정제된 효소는 농축 후 최적 buffer (GabT1: 50mM HEPES, 100mM KCl, 1mM DTT, pH 7.5; Yktc1: 50mM HEPES, 10% glycerol, pH 7.5; GutB1: 20mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 8)로 투석하여 실험에 사용하였다.

[0048] **6. GabT1 활성 측정**

[0049] GabT1의 활성은 Jeffrey M *et al.* (2018)의 방법을 인용하여 다음과 같이 측정하였다. 먼저 아미노기 공여체인 여러 아미노산에 대한 GabT1의 특이성을 알아보기 위해 각종 L-아미노산을 기질로 하여 반응을 수행하였다. 이는 보조인자인 pyridoxal phosphate (PLP)가 pyridoxamine phosphate (PMP)로 전환됨으로 나타나는 흡광도 변화를 측정하였다. 반응액은 5 mM의 L-아미노산, 50 mM HEPES buffer (pH 7.5), 0.2 mM PLP 그리고 정제된 10uM의 GabT1을 포함한 반응물을 30℃에서 반응하여 한 시간 동안 10분 간격으로 PLP의 최대흡광도 파장인 388nm에서 흡광도 감소를 확인하였다. PLP에 있어서 $4740 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 몰랄 흡광 계수를 사용하여 활성을 측정하였다.

[0050] 아미노기 수용체 기질 특이성은 α -ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH)와 연결반응(coupling assay)을 통해 생성되는 NADH를 340nm에서 흡광도 측정을 통해 확인하였다. 반응물은 50 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM NAD^+ , 0.2 mM TPP, 0.1 mM CoA, 0.2 mM MgCl_2 , 30 μM CaCl_2 , 0.1 mM PLP, 0.05 U α KGDH, 5 mM Glutamate와 아미노기 수용체인 5 mM Fructose 계열 기질을 포함하여 30℃에서 1시간 동안 반응하였다.

[0052] **7. Yktc1 활성 측정**

[0053] Yktc1의 탈인산화 활성을 측정하기 위해서는 5mM의 *para*-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 기질로 50mM sodium acetate/acetic acid (pH 5), 1mM ZnCl_2 그리고 정제된 Yktc1 25 μg 을 넣은 반응물을 20분 반응 후 반응액의 2배 부피의 1N NaOH로 반응을 종료시킨 후 12000 rpm에서 1분 원심분리 후 상등액을 회수하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응을 통해 형성된 p-nitrophenol의 양은 p-nitrophenol(sigma, USA)의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

[0054] Yktc1의 활성에 금속 이온의 영향을 알아보기 위해서는 위에 설명된 방법대로 1mM의 ZnCl_2 를 대신하여 금속 이온 (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+})과 EDTA와 반응하여 활성을 측정하였다. 최적 온도는 위와 같은 방법으로 효소의 반응온도를 30-80℃로 조정하여 효소활성을 측정하여 결정하였다. 열안정성 실험은 효소를 30-80℃ 각 온도에서 전 배양하여 10분 간격으로 활성을 측정하였다. 최적 pH측정을 위해서는 pH 3.5-6까지는 50mM의 sodium acetate/acetic acid 완충용액, pH 6-7.5까지는 50mM PIPES 완충용액, pH 7.0-9.0까지는 50mM Tris-HCl 완충용액, pH 8.5-11까지는 50mM Glycine-NaOH 완충용액을 사용하여 결정하였다.

[0055] 기질 별 활성 측정을 위해서는 여러 기질과 효소 반응 후 생성되는 인산의 양을 Malachite green assay kit (Sigma-Aldrich, USA)로 측정하였다. 반응물은 5mM의 기질, 1mM ZnCl_2 , 50mM sodium acetate/acetic acid (pH 5), 일정량의 정제된 Yktc1으로 65℃에서 20분 반응 후 H_2SO_4 의 최종농도가 0.25N이 되도록 H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 Malachite green assay kit (sigma, USA)로 활성을 측정하였다.

[0057] **8. GutB1 활성 측정**

[0058] GutB1의 기질특이성을 측정하기 위한 반응물은 100mM Glycine-NaOH buffer (pH 9.5), 25mM NaCl, 250uM ZnCl_2 , 2mM NAD^+ , 일정량의 정제된 GutB1, 기질로서 10mM ADM 또는 D-sorbitol, D-mannitol을 포함하였다. 30℃에서 30분 동안 340nm에서 흡광도를 측정하였고 GutB1을 넣지 않은 반응물에서 NAD^+ 의 환원을 측정하여 제외해주었다. 최적 온도는 위와 같은 방법으로 효소의 반응온도를 10-50℃로 조정하여 효소활성을 측정하여 결정하였다. 최적 pH측정을 위해서는 pH 7-8.5까지는 50mM의 Tris-HCl 완충용액, pH 8.5-12까지는 50mM Glycine-NaOH 완충용액을 사용하여 결정하였다.

[0060] **9. 2-amino-2-deoxy-D-mannitol (ADM) 합성**

[0061] D-mannosamine (300mg)과 NaBH_4 (572mg)을 0.05M NaOH 5ml에 녹여 상온에서 한 시간 반응시킨다. 한 시간 후 과량의 sodium borohydride를 제거하기 위해 아세트산을 조심스럽게 더하여 주고 메탄올로 반응을 종료시킨 후

rotary evaporator로 농축시킨다. 반응 액에 증류수를 넣어주어 pH 5-6으로 맞춘 뒤 이온교환수지 Dowex-50 (H+) column으로 옮겨 0.5M HCl 용액으로 Na+가 용출되도록 세척한 다음 2 M HCl용액으로 용출하였다. 용출액을 동결건조 시켜 얻은 생산물은 D₂O에 녹여 ¹H-NMR 분석을 통해 ADM이 합성되었음을 확인해 주었다.

실험결과

1. 1-DNJ 생합성 유전자를 갖는 균주 분리

전통발효식품에서부터 분리된 균주들의 AGI 활성을 측정하여 70% 이상의 활성을 나타내는 균주들을 선별하였다. AGI 활성이 우수한 균주 대상으로 기존의 1-DNJ 생합성 유전자의 염기서열을 바탕으로 제작된 프라이머를 이용하여 PCR 스크리닝을 수행한 결과 70.1%의 AGI 활성을 가지는 MBLB1156 균주에서 DNJ 생합성 유전자 *gabT1*, *yktc1*, *gutB1*에 해당되는 크기의 밴드가 확인되었다(도 1). MBLB1156 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Bacillus atrophaeus*로 동정이 되었으며, *Bacillus atrophaeus* MBLB1156 (KCCM12922P)으로 명명하였다 (도 2).

2. 1-DNJ 생합성 유전자 분석

Bacillus atrophaeus MBLB1156(KCCM12922P)의 1-DNJ 생합성 유전자군을 상기 설명된 조건에서 PCR 증폭 후 아가로오스 겔 전기영동을 실시한 결과 각 유전자의 밴드가 확인되었다. *gabT1*은 1,269 bp로 422개의 아미노산을 지정하며 아미노산 서열 분석 결과 아미노기 전이효소를 코딩하는 유전자로 *yktc1*은 951 bp로 316개의 아미노산을 지정하며 포스포타아제를 코딩하는 유전자로 분석이 되었다. *gutB1*은 1,047bp로 348개의 아미노산을 지정하며 탈수소효소를 코딩하는 유전자로 분석이 되었다.

3. GabT1, Yktc1, GutB1의 발현과 정제

제조합 GabT1은 C 말단, Yktc1과 GutB1은 N 말단에 6 x his-tag가 포함된 상태로 *E. coli* BL21(DE3)에서 IPTG 접종에 의해 발현되었다. Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제한 각 효소를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 염기서열로부터 예상한 바와 같이 GabT1은 약 48.58 kDa, Yktc1은 약 36.23 kDa, GutB1은 약 40.45 kDa 크기의 단백질을 발현되고 성공적으로 정제되었음을 확인하였다(도 3).

4. GabT1의 효소 특성

GabT1의 아미노기 공여체 기질 특이성을 알아보기 위해 여러 각 아미노산과 조효소인 PLP존재하에서 반응하였을 때 250~500nm 스펙트럼을 측정하여 보조인자 PLP가 PMP로 전환됨으로 나타나는 흡광도 변화를 시간에 따라 측정하였다(도 4). 그 결과 PLP의 최대흡광도 파장 388nm에서 흡광도 감소와 PMP의 최대흡광도 파장 325nm에서 흡광도 증가를 확인하였다. 여러 표준 아미노산에 대해 측정한 결과 글루탐산을 아미노기 공여체로 가장 선호하는 것으로 확인되었다(표 3).

표 3

Amino acid	Relative Activity
Glutamate	100 ± 0.88
Alanine	70.8 ± 3.19
Aspartate	53.98 ± 1.77
Glutamine	45.13 ± 1.53
Serine	42.28 ± 3.07
Asparagine	39.82 ± 1.53
Lysine	38.94 ± 4.68
Arginine	33.63 ± 0.88
GABA	~0

[0077] 아미노기 수용체 기질 특이성은 α -ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH)와 연결반응(coupling assay)을 통해 측정하였고 기질로 fructose, fructose 6-phosphate, fructose 1,6-bisphosphate에 대해 GabT1의 활성 측정결과 fructose 6-phosphate에 대해서 가장 높은 활성을 보였다(표 4). 이는 Clark, L. F. et al (2011)에서 제시된 1-DNJ 생합성 경로상의 기질과 일치하는 결과이다.

표 4

[0079]

Substrate	Velocity ($\mu\text{mol/min/mg}$)	Relative velocity
Fructose	4.82×10^{-5}	0.52
Fructose-6-P	9.23×10^{-5}	1.0
Fructose-1,6-BP	4.46×10^{-5}	0.48

[0081]

5. Yktc1의 효소 특성

[0082]

여러 2가 금속 이온 별로 Yktc1의 활성을 측정한 결과 오직 Zn^{2+} 가 존재할 경우에만 활성을 보였다. 또한 Zn^{2+} 농도별 활성 측정결과 Zn^{2+} 농도에 비례하여 활성이 증가하다가 10mM 이상에서는 활성이 감소하는 것으로 확인되었다(도 5). 이 결과는 Yktc1은 zinc 이온이 필수적으로 필요한 포스파타아제 라는 것을 나타낸다.

[0083]

효소 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 완충용액은 50 mM 완충용액(pH 3.5~6; sodium acetate/acetic acid, pH 6~7.5; PIPES, pH 7~9; Tris-HCl buffers, pH 8.5~11; Glycine-NaOH)을 이용하였으며, 온도의 영향은 30℃에서 80℃온도 범위에서 효소 활성의 특성을 검토하였다. 그 결과 최적 pH와 온도는 각각 pH 5와 65℃로 확인되었다(도 6, 도 7). 열 안정성 측정결과 Yktc1의 최적 효소반응 온도는 65℃였으나, 45℃에서도 불안정하여 약 13분의 짧은 활성 반감기를 나타내는 것으로 보아 효소의 열 안정성은 매우 낮은 편이었다(도 8).

[0084]

기질에 대한 효소 활성의 특성은 5mM의 여러 기질에 대해서 37℃에서 20분간 반응 후 malachite green assay를 이용함으로써 각 기질에 대한 특이성을 검토하였다. 그 결과 Yktc1은 넓은 범위의 기질 특이성을 가지고 있는 것으로 확인되었고, pNPP에 대해서 가장 높은 활성을 보였다(표 5). 다음의 기질들에 대해서는 Yktc1의 pNPP에 대한 활성의 1%이하로 측정되었다.; ADP, AMP, ATP, 2,3-Diphospho-D-glyceric acid, PLP.

표 5

[0086]

Substrate	Phosphatase activity
pNPP	100 ± 4.8
Phosphoenolpyruvic acid	76.2 ± 4.5
D-Galactose 1-phosphate	51.8 ± 2.9
3-Phosphoglyceric acid	37.3 ± 3.3
D-Glucose 1-phosphate	33 ± 8.7
Glycerol 2-phosphate	31.6 ± 3.1
Glycerol 1-phosphate	24.7 ± 0.6
D-Fructose 6-phosphate	15.1 ± 2.6
D-Ribose 5-phosphate	12.9 ± 0.4
Thymidine 5'-triphosphate	11.1 ± 3.1
D-Mannose 6-phosphate	3.3 ± 0.5
ATP	2.9 ± 2.1

D-Fructose 1,6-bisphosphate	2.7±0.8
D-Glucose 6-phosphate	2.6±0.2

[0088] 6. GutB1의 효소 특성

[0089] 생합성 유전자군의 마지막 유전자인 *gutB1*은 탈수소효소로 NAD^+ 를 조효소로 D-sorbitol, D-mannitol, ADM을 기질로 활성을 측정하였을 때 ADM에 대해서 가장 높은 활성을 나타내었다(도 9). 이는 ADM이 azasugar 생합성에 중요 중간체로 알려진 것으로 보아 GutB1이 1-DNJ합성에 관여하는 효소로 볼 수 있고 hexitol chain의 2번 탄소에 아미노기가 기질로 인식하는데 중요한 것을 알 수 있다. 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 완충용액은 50 mM 완충용액(pH 7~8.5; Tris-HCl, pH 8.5~12; Glycine-NaOH)을 이용하였으며, 온도의 영향은 10℃에서 50℃온도 범위에서 효소 활성의 특성을 검토하였다. 그 결과 최적 pH와 온도는 각각 pH 9.5와 30℃로 확인되었다(도 10, 도 11).

[0091] 결과 검토

[0092] *B. atrophaeus* MBLB1156(KCCM12922P)으로부터 1-DNJ 핵심 생합성 유전자 군을 분리하여 각 유전자들의 이형발현을 통해 특성을 연구하였다. 먼저 첫 번째 생합성 효소인 GabT1은 조효소인 PLP 존재하에 아미노기 전이효소로 아미노기 공여체로 L-글루탐산을 아미노기 수용체로 fructose 6-phosphate를 선호하는 것으로 확인되었다. 따라서 GabT1이 1-DNJ의 전구체인 fructose 6-phosphate에 아미노기의 도입을 촉매하는 것으로 예상할 수 있다. 두 번째 생합성 효소 Yktc1은 zinc 이온 의존성 포스파타아제로서 탈인산화반응을 촉매 하는 것으로 확인이 되었고 최적 활성 조건은 65℃ 최적 활성 pH는 5.0이었다. 또한 Yktc1은 넓은 범위의 기질 특이성을 갖는 것으로 확인되었다. 마지막 생합성 효소 GutB1은 2-amino-2-deoxy-D-mannitol을 기질로 사용하여 oxidation 반응을 촉매 하는 것으로 확인되었고 최적활성 조건은 30℃, 최적활성 pH는 9.5이었다.

수탁번호

[0094]

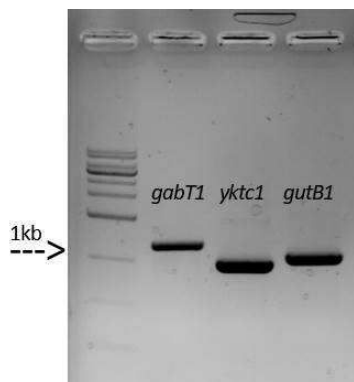
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12922P

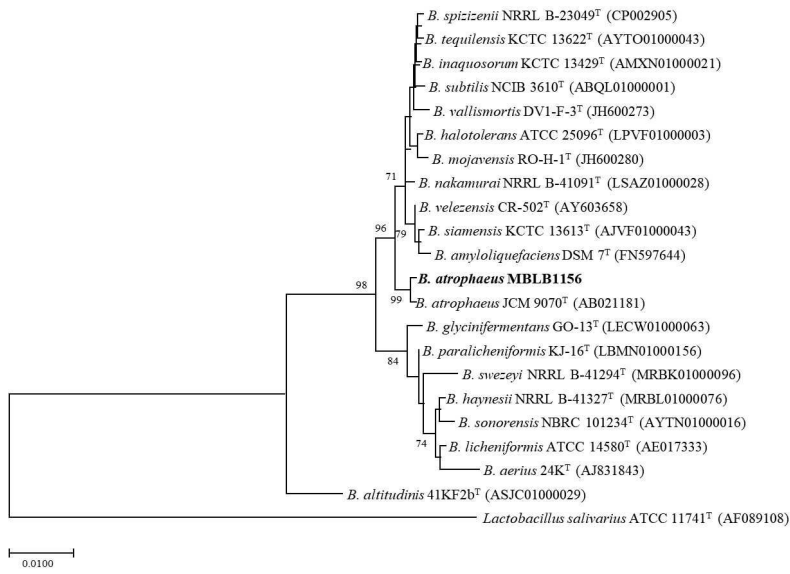
수탁일자 : 20201231

도면

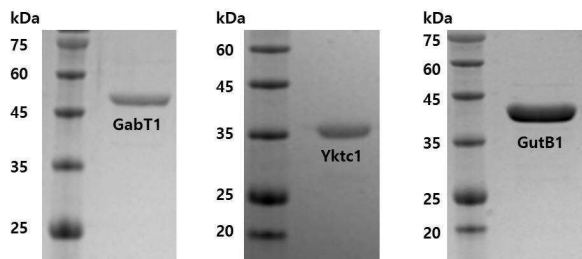
도면1



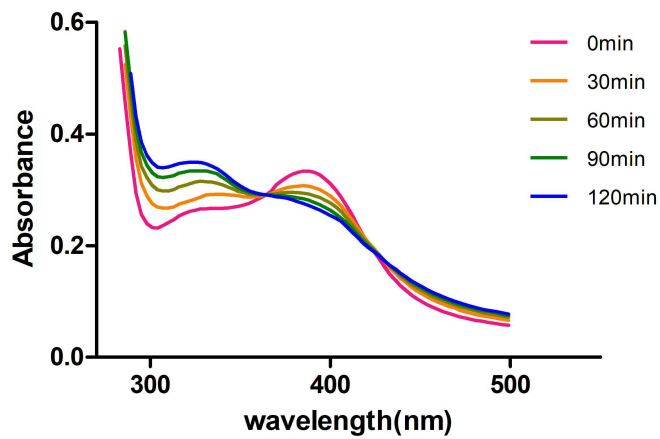
도면2



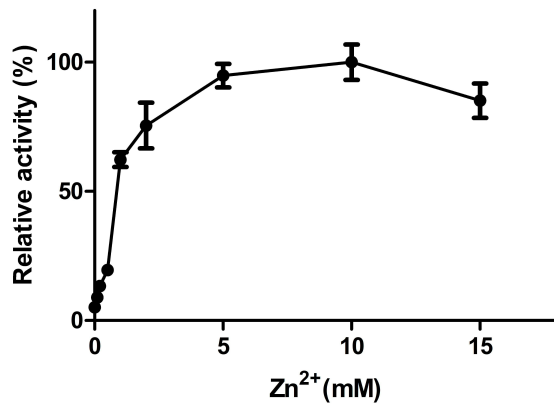
도면3



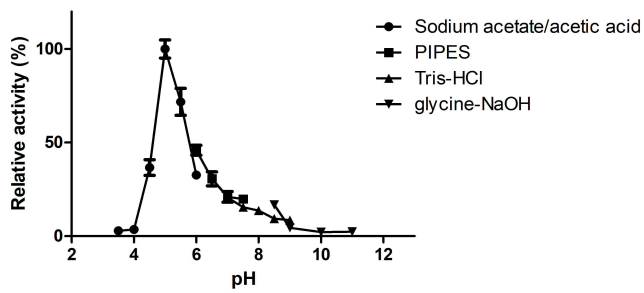
도면4



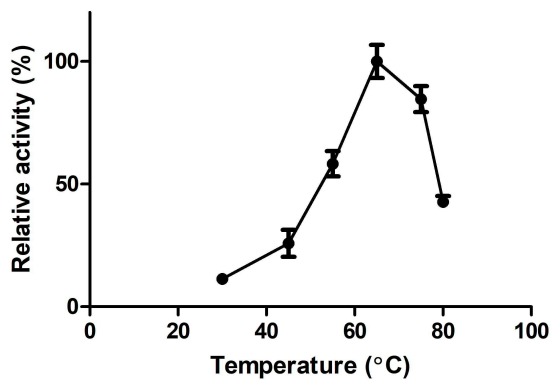
도면5



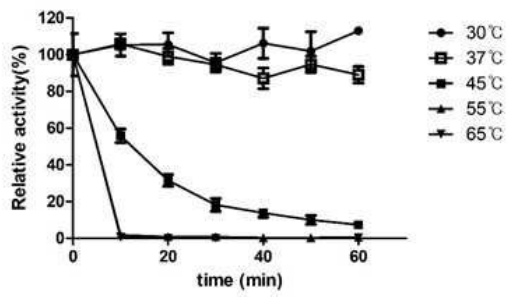
도면6



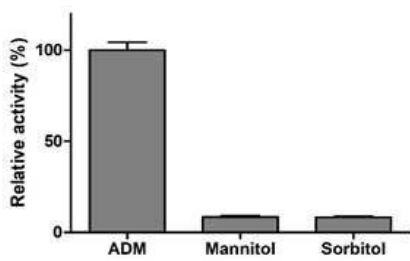
도면7



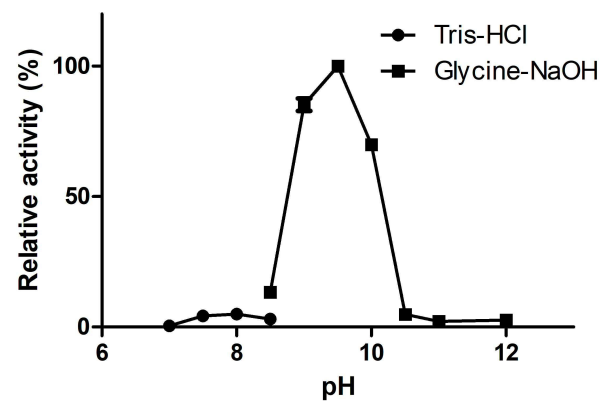
도면8



도면9



도면10



도면11

