



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0012863
(43) 공개일자 2013년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0074288
(22) 출원일자 2011년07월26일
심사청구일자 2011년07월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호
(서초동, 삼풍아파트)
최인걸
서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 (사당동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

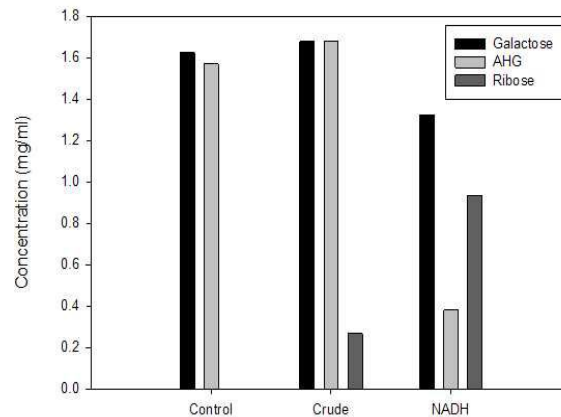
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규한 해양미생물 및 이 균주의 용도

(57) 요약

본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규한 해양미생물 및 이 균주의 용도에 관한 것으로 더욱 상세하게는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규한 미생물인 *Vibio sp.* EJY3 및 이를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사 경로 규명 및 대사물의 이용에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥
동, 현대빌라)

이세영

경기도 의왕시 오전동 엘지아파트 103동 1502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110015629

부처명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원 핵심연구

연구과제명 바이오화학소재 및 연료 생산을 위한 효소적 홍조류 슈가플랫폼

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 이용하여 성장하는 신규한 해양 미생물인 *Vibrio sp.* EJY3 KCTC 11976BP

청구항 2

제 1항의 균주 유래 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 효소.

청구항 3

제 1항의 균주를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 라이보스를 생산하는 조성물.

청구항 4

제 2항의 효소를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 라이보스를 생산하는 조성물.

청구항 5

제 1항의 균주를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로부터 라이보스를 생산하는 방법.

청구항 6

제 2항의 효소를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로부터 라이보스를 생산하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 방법은 NADH를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로부터 라이보스를 생산하는 방법.

청구항 8

제 1항의 균주를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 방법.

청구항 9

제 2항의 효소를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규한 해양미생물 및 이 균주의 용도에 관한 것으로 더욱 상세하게는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 신규한 미생물인 *Vibrio sp.* EJY3 및 이를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사 경로 규명 및 대사물의 이용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 석유 자원 고갈 및 개도국의 에너지 소비량 증가로 인하여 전 세계적으로 에너지 안보 위기에 직면해있으며 가장 시급한 석유 자원을 대체할 수 있는 바이오연료 개발의 필요성이 크게 대두되고 있다. 미국, 유럽, 브라질 등이 국가들은 다양한 에너지원의 확보 및 기후 변화 대응 차원에서 바이오 연료의 개발에 많은 노력을 경주하고 있으며, 향후 더욱 많은 투자 및 연구개발이 이루어질 전망이다. 또한 포스트 교토체제에 접어들면, 우리나라 또한 이산화탄소 배출 의무감축 국가가 될 가능성이 크므로, 그에 대응하기 위한 방안으로 바이오연료에 대한 연구 개발이 시급히 이루어져야 한다. 석유를 대체하는 바이오연료 중 전 세계적으로 바이오에탄올 시장이 증가하는 추세이며 매년 약 17.2% 성장할 것으로 전망되고 있다. 미국은 2020년까지 가솔린 소비량의 약 20%를 바이오에탄올로 대체할 것이며, BP, Shell 등의 정유사와 벤처회사를 중심으로 하여 차세대 바이오연료 생산 연구가 진행중에 있다. 바이오에탄올을 생산하기 위한 원료로 주로 식량 자원을 이용하여 생각되어 왔지만 이는

식량자원의 부족현상 및 가격상승을 초래하는 문제가 있으므로 비식용자원을 이용한 바이오연료 생산 연구가 이루어지고 있다. 이러한 비식용자원 바이오매스로는 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 국토면적이 좁고 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 지리적 특성상 해조류 바이오매스가 더 적합하다. 또한 해조류의 연간 생산량은 13,754톤(2006년 기준)으로 중국, 일본, 북한과 더불어 세계적인 해조류 생산국가에 속하고 있다. 하지만 해조류의 활용면에서는 저조한 실정이다(어업생산통계, 2006, 통계청 사회통계국 농어업생산통계과). 홍조류의 바이오매스는 건조 중량 기반으로 하여 한천(agar)이 60%, 섬유소(cellulose)가 20%로 전체 80%가 탄수화물계 성분으로 구성되어 있으며 최다 성분이라 할 수 있는 agar는 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있는데 이들 두 종류의 다당류 모두 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose(이하, '3,6-L-AHG'라 함)가 교대로 나타나면서 β -1,4와 α -1,3 결합으로 연결되어 있는 구조를 가지고 있다 (T. Fu and S. M. Kim, Marine Drugs 2010, 8, 200-218(2010)). 따라서 이들 중합체를 가수분해할 경우 미생물에 발효 가능한 galactose와 아직 잘 알려져 있지 않은 3,6-L-AHG의 다당류를 얻을 수 있다.

[0003] 아가로스 중합체를 분해하는 방법으로 현재까지 가장 널리 알려진 방법은 황산과 염산 등 강산과 열을 이용하여 가수분해시키는 화학적인 방법과 아가로스를 분해하는 효소인 아가레이즈를 이용하여 분해하는 효소적인 방법 크게 두 가지가 있다. 슈도알테로모나스 아틀란티카 (L. M. Morrice et al. Eur J Biochem. 137. 149-154 (1983)), 사카로파거스 데그라단스 (N. A. Ekborg. Appl Environ Microbiol. 72 (5) 3396-3405 (2006)) 알테로모나스 (J. Wang et al. Appl Microbiol Biotechnol. 71. 833-839 (2006)) 와 같이 아가를 분해할 수 있는 능력을 가진 미생물에서 유래한 효소를 이용하여 아가로스를 분해한다. 아가로스를 분해하는 효소는 크게 3가지로 구분할 수 있다. 아가로스 중합체의 내부 결합을 가수분해하여 올리고당을 생산하는 효소, 중합체 또는 올리고당은 이당체로 분해하는 효소 (Kim, H. T. et al. Appl Microbiol Biotechnol. 86. 227-234, 2010),

[0004] 관련 선행특허로는 대한민국 특허공개번호 제10-2010-0108241호로 신규한 알파-네오 아가로바이오스 가수분해 효소 및 그를 이용한 다당류의 획득 방법에 관한 것으로, 선행특허는 신규한 알파-네오 아가로바이오스 가수분해 효소 (α -neogalactobiose hydrolase) 및 그를 이용한 3,6-안하이드로--갈락토오스의 획득 방법이 기재되며, 이들 효소의 기원은 *S. degradans*, *Pseudoalteromonas atlantica T6c* 등이며,

[0005] 또 다른 선행특허는 대한민국 특허공개번호 제 10-2008-0093525호로 알긴산 가수분해 활성을 갖는 스트렙토마이세스 속균주 및 알긴산 분해효소

[0006] 에 관한 것으로, 선행특허는 알지네이트(alginate)를 포화 알지네이트 올리고머(saturate alginate oligomer)와 불포화 알지네이트 올리고머(unsaturate alginate oligomer)로 분해하는 알지네이트 분해활성을 갖는 스트렙토마이세스 속 균주, 상기 스트렙토마이세스 속 균주가 생산하는 알지네이트 분해효소(alginate lyase) 및 상기 알지네이트 분해 효소 유전자를 클로닝하여 대장균에 발현한 재조합 효소에 관한 것이 기재되어 있다.

[0007] 한편 해조류를 사용하여 바이오에너지를 생산 시 가장 큰 단점은 아가로스를 구성하는 단당 중 하나인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 비 발효성 당이므로 해조류 바이오매스를 이용한 에탄올 발효 시 수율이 낮다는 것이다. D-갈락토오스를 발효하는 대사과정은 규명되어 있으나 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 대사하는 균주는 현재까지 보고된 바 없으며 따라서 이 물질에 대한 대사경로에 대한 연구도 미비한 실정이다. L-AHG의 대사 경로를 이해하고 이를 바탕으로 비 발효성 당인 이 물질을 발효성 당으로 전환하여 바이오 에탄올 생산 수율을 높이기 위한 연구가 시급하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 새로운 해양 미생물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 효소를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 새롭게 분리한 균주의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 대사경로를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사물인 라이보스(ribose)를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 이용하여 성장하는 신규한 해양 미생물인 *Vibrio sp.* EJY3 KCTC 11976BP을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 균주 유래 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 효소를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 균주를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 라이보스를 생산하는 조성물을 제공한다.
- [0015] 또 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 라이보스를 생산하는 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 균주를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사물인 라이보스 생산 방법을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사물인 라이보스 생산 방법을 제공한다.
- [0018] 또 본 발명은 상기 본 발명의 균주를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 방법을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 방법을 제공한다.
- [0020] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0021] 본 발명은 보조 인자로 NADH를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 라이보스로 전환하는 *Vibrio sp.* EJY3 및 그로부터 유래한 효소를 제공한다.
- [0022] 먼저 상기 본 발명의 미생물을 분리하기 위한 스크리닝 과정은 다음과 같다. 인천광역시 강화도 동막 해수욕장에서 해초, 갯벌, 부패한 게 각각을 샘플링을 하여 Minimal broth에서 12시간 배양한 후에 minimal solid media에 희석하여 도말한다. 일차 스크리닝은 아가를 분해하는 균을 탐색하였으며 이 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 이용하는 균주 하나를 최종 선별하여 16S rRNA 서열 분석을 통해 균주를 동정하였다. 16S rRNA 서열 분석 결과 본 균주는 *Vibrio* 속에 속하는 새로운 균주로 밝혀졌으며 이를 *Vibrio sp.* EJY3으로 명명하였다. 상기 본 발명의 균주는 2011년 6월 30일에 대한민국 대전광역시, 유성구 어은동 52번지, 한국생명공학연구원 소재 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 *Vibrio sp.* EJY3 기탁번호 KCTC 11976BP로 기탁하였다.
- [0023] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하기 위하여 상기 균주를 배양한 후에 세포를 얻어서 sonication 방법을 이용하여 세포막을 파괴하고 원심 분리를 한 후 얻은 수용성 단백질을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 기질로 이용하여 NADH 보조인자를 사용하여 효소 반응을 실시하였다.
- [0024] 또한 본 발명은 (i) (a) 상기 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 대사 미생물;
- [0025] (b)상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 대사하는 생산하는 미생물이 생산하는 조효소; 또는
- [0026] (c) 상기 미생물의 조효소를 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시키는 단계; 및
- [0027] (ii) 상기 (i)단계에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 단계를 포함하는 라이보스 생산 방법을 제공한다.
- [0028] 홍조류 바이오매스 중 총중량의 60%를 차지하는 대표적인 다당체인 아가를 분해하였을 때 생성되는 단당은 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 두 가지가 있다. 이들 단당을 에탄올과 같은 연료나 바이오화학제품으로 전환할 때 갈락토오스와는 달리 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 효모나 대장균과 같은 산업적으로 이용되는 일반적인 미생물에 의해 발효 및 대사가 되지 않는다. 따라서 홍조류 바이오매스를 에탄올과 같은 발효나 생물학적으로 전환되어 얻는 공정에서는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 미생물에 의해 발효나 대사가 가능한 당으로 전환하는 것이 수율을 2배에 가깝게 올리는데 반드시 필요하다. 따라서 본 기술은 해당 미생물의 대사경로 및 효소를 직접 이용하거나 그 대사반응을 진행시키는 효소 유전자를 다른 발효 미생물에 인위적으로 집어넣어 재조합 균주를 만들 경우, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 라이보스로 전환하여 생산 수율을 증대시키는 데에 이용할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 기존에 보고된 바 없는 신규한 해양 미생물인 *Vibrio sp.* EJY3을 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사 경로 규명이 가능하며 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사산물인 라이보스는 모든 생물체에서 대사되고 발효 가능한 당으로 해조류 바이오매스를 이용한 바이오 연료 생산 시 미생물에 의해 대사되어 바이오연료의 생산수율을 높여주는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 아가 대사 미생물 스크리닝 결과 그림.
 도 2는 *Vibrio sp.* EJY3가 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 이용하는 그림. 배양 시간이 증가함에 따라 배양액 내 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 감소. Standard: 3,6-안하이드로-D-갈락토오스.
 도 3은 *Vibrio sp.* EJY3의 16S rRNA 서열분석 그림.
 도 4는 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시킨 후 TLC로 확인한 그림.
 도 5는 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시킨 산물을 GC/MS로 분석한 그림.
 도 6은 대사물과 D-ribose의 mass spectrum을 비교하여 대사물이 라이보스임을 나타낸 그림.
 도 7은 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 아가로스 가수분해물과 반응시킨 후 TLC로 확인한 그림.
 도 8은 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 아가로스 가수분해물과 반응시킨 산물을 GC/MS로 분석한 그림.
 도 9는 D-갈락토오스, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, D-라이보스의 표준물질질을 이용하여 GC/MS에서 정량 곡선을 그린 그림
 도 10은 상기 도 9의 GC/MS 결과를 토대로 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 아가로스 가수분해물과 반응시킨 산물을 정량 분석한 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0032] 실시예 1: 아가 대사 미생물 스크리닝

[0033] 아가 대사 미생물을 스크리닝 하기 위하여 서해안 동막 해수욕장 및 인근 갯벌에서 샘플링을 실시하였다. 해초, 게, 갯벌, 해수를 채취하여 각각을 50ml 샘플 튜브에 독립적으로 보관하였다. 샘플에 있는 미생물을 배양하기 위해 2.3% (w/v) 해수염, 0.05% (w/v) 암모니움 클로라이드, 0.1% (w/v) 효모 추출물, 0.2% (w/v) 아가를 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 녹인 최소 배지(minimal medium)를 사용하였다. 각 샘플들이 담긴 50ml 샘플 튜브에 20 ml의 2.3%(w/v) NaCl 용액을 넣어서 충분히 vortexing한 후에 상등액을 취하여 액체 배지에 접종하였다. 12시간 액체 배양 후에 고체 배지에 평판도말하였다. 고체 배지의 조성은 액체 배지 조성에서 1.5%(w/v) agar를 추가하였다.

[0034] 콜로니를 형성한 각각의 균들을 멸균한 백금으로 새 고체 배지에 streaking하여 48시간 배양하였으며, 배양한 배지 위에 2% (v/v) iodine solution 을 부어서 콜로니 주변에 투명한 원을 형성하는 것을 통하여 아가 분해능을 확인하였다. 그 결과 아가를 단일 탄소원으로 이용하는 5개의 균 중에서 3개의 균 (colony No. 1,3,6)이 투명한 원을 형성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0035] 실시예 2: *Vibrio sp.* EJY3가 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 단일 탄소원으로 이용하는 실험

[0036] 실시 예 1의 아가 분해능 테스트를 통해 스크리닝한 아가 대사 미생물들을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 단일 탄소원 배지에 접종하여 배양을 하였다. 이 때 배지는 2.3% (w/v) 해수염, 0.05% (w/v) 암모니움 클로라이드, 0.1% (w/v) 효모 추출물, 0.2% (w/v) 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 녹인 최소 배지 (minimal medium)를 사용하였다. 그 결과 콜로니 번호 3번 균 주가 이 배지에서 성장하는 것을 확인하였으며 이를 배양 시간 별 배양액에 남아있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 TLC로 확인해봄으로써 균 주가

3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 지 확인하였다. TLC 전개 용매는 n-부탄올: 에탄올: 물을 각각 3:1:1로 넣은 용매를 사용하였으며 1시간 전개 후에 10% (v/v) 황산과 2% (w/v) naphthoresorcinol을 에탄올에 녹인 두 가지의 발색 용매를 사용하여 95도에서 30초간 발색을 시켰다. 도 2 TLC 결과의 1번 lane은 D-form의 3,6-안하이드로갈락토오스 표준물질이며 이는 영국의 Dextra Laboratories사에서 구입하였다. TLC 2-5번 lane에서 나타난 시간은 배양시간을 의미하며 배양시간 별 배양액을 샘플링한 후 원심분리하여 상등액에 남아있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 확인하기 위하여 TLC분석을 실시하였다. 그 결과 배양 시간이 증가함에 따라 배지에 남아있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 감소하는 것을 확인하였고 이를 통해 스크리닝한 균주가 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하여 성장하는 것을 알 수 있었다.

[0037] 실시예 3: *Vibrio sp.* EJY3의 16S rRNA 서열분석

[0038] 실시 예 1과 2를 통하여 콜로니 번호 3번 균주가 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 것으로 확인하였으며 이 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 서열 분석을 실시하였다. 박테리아 세포에서 게놈 DNA를 추출하고 두 종류의 PCR primer(27 forward primer와 1492 reverse primer)를 이용하여 16S rDNA 구간을 증폭하여 서열을 분석하였다. 총 1401 nucleotide의 16S rRNA 서열을 토대로 계통 분석을 한 결과 이 균주는 *Vibrio atypicus* 종에 가장 근접한 새로운 종의 균인 것으로 나타났으며(도 3) *Vibrio sp.* EJY3로 명명하였다.

[0039] 실시예 4: *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시킨 후 TLC로 확인

[0040] 본 실험에 사용할 조효소를 얻기 위하여 *Vibrio sp.* EJY를 2.3% (w/v) 해수염, 0.05% (w/v) 암모니움 클로라이드, 0.1% (w/v) 효모 추출물, 0.2% (w/v) 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 녹인 최소 배지(minimal medium)에서 12시간 동안 배양한 후에 원심분리하여 세포와 배지 부분을 분리하였다. 200ml의 세포배양액을 원심분리(5,000 rpm, 30 min, 4℃)한 후에 상등액을 버리고 세포부분을 20ml의 20mM Tris-HCl에 현탁시켜 초음파 (amplitude: 40%, 2분)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 그 후 다시 원심 분리 (16,000rpm, 30min, 4℃)를 하여 상등액에 있는 조효소 부분을 취하여 효소 반응을 실시하였다.

[0041] 효소 반응 시 기질로 사용되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 아가로스를 구성하는 단당으로 아가로스 분해 시 최종 산물로 D-갈락토오스와 함께 얻을 수 있다. 아가로스를 가수분해하는 단계는 다음과 같다. 아가로스 중합체를 3노르말 농도의 acetic acid로 전처리하여 아가로올리고당을 얻고 이를 exo-type의 agarase인 Aga 50D를 처리하여 이당체를 얻었다. 그 후 NABH(neoagarobiose hydrolase)를 처리하여 단당인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 얻었다. 약산을 이용한 전처리 및 효소 처리를 통해 얻은 반응 산물 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을 정제하기 위하여 silica gel chromatography를 실시하였다. 이 때 이동상은 클로로포름: 에탄올: 물을 78: 20: 2 비율로 넣은 용매를 사용하였다. 이 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 있는 부분을 농축하여 Bio-Gel-P2 size exclusion chromatography로 2차 정제를 실시하여 효소 반응 시 기질로 사용할 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하였다. 반응 조건은 조효소액 50 μ l(40 μ g), 15mM의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 3mM의 NADH, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 조건에서 30℃, 200 rpm, 12시간 반응시켰다. 도 4의 TLC 결과에서 1번 lane은 D-갈락토오스와 D-form의 3,6-안하이드로갈락토오스 표준 물질이며 2번 lane의 컨트롤은 효소를 불활성화 시켜 반응이 일어나지 않은 대조군이다. 3번 lane의 crude는 NADH 보조인자를 넣지 않고 조효소와 기질을 반응시킨 산물이고 4번 lane의 NADH는 조효소와 기질, 그리고 NADH 보조인자까지 함께 반응시킨 산물이다. 도 4에서 나타내는 바와 같이 *Vibrio sp.* EJY3의 조효소 반응은 NADH 보조인자가 있는 조건에서 일어나며 NADH 보조인자가 없을 때에는 일어나지 않는 것으로 나타났다.

[0042] 실시예 5: *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시킨 산물을 GC/MS로 분석

[0043] 실시 예 4에서 기술한 바와 같이 *Vibrio sp.* EJY3에서 얻은 조효소액 50 μ l(40 μ g), 15mM의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 3mM의 NADH, 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 조건에서 30℃, 200 rpm, 12시간 반응시켰다. 반응 산물의 동정을 위해 GC/MS 분석을 실시하였다. GC/MS 분석을 위한 샘플을 만들기 위하여 전체 반응 산물 500 μ l 중에서 200 μ l를 스피드 백으로 건조시킨 후에 50의 20 mg/ml(w/v) 농도의 O-Methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 75℃에서 30분간 반응을 시킨다. 그리고 80 μ l의 N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide를 넣고 40℃, 150 rpm에서 30분간 반응을 시켰다. GC/MS 분석 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 DB-5MS capillary column이며 GC 오븐 조건은 100℃에서 3.5분간 유지하고 160℃까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. 그 후 200℃까지 승온한 후 15분간 유지하고 마지막으로 280℃까지 승온한 후에 5분간 유지하였다. 인젝터 온도는 250도 이고 split ratio는 1: 9.6이었으며 인젝션 양은 1 μ l였다. Mass detector의 scan range는 50-600 m/z였다. 도 5는 GC/MS 분석을 통해 얻은 total ion chromatogram이다. (a)control은 효소를 불활성화 시켜 반응이 일어나지 않은 대조군이다 도 4의 (a)에서 표시한 Tris-HCl은

Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 나타내며 AHG는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 나타낸다. (b)crude는 NADH 보조인자를 넣지 않고 조효소와 기질을 반응시킨 산물이고 (c)NADH는 조효소와 기질, 그리고 NADH 보조인자까지 함께 반응시킨 산물이다. 도 5에서 나타낸 바와 같이 crude에서는 효소 반응이 일어나지 않았지만 보조인자와 함께 반응을 시켰을 때에는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 peak가 감소하고 다른 새로운 peak가 생성됨을 확인하였다. (c) NADH에서 새롭게 생성된 peak를 peak 1이라고 표시하였다.

[0044] 실시예 6: 대사물과 D-ribose의 mass spectrum을 비교하여 대사물이 라이보스임을 확인

[0045] 실시예 5에서 나타낸 *Vibrio sp.* EJY3에서 얻은 조효소액 50 μ l (40 μ g), 15mM의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 3mM의 NADH, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 조건에서 30°C, 200 rpm, 12시간 반응시킨 반응 산물의 GC/MS total ion chromatogram((c) NADH)에서 peak 1으로 표시한 부분이 ribose인 것을 표준물질을 같은 조건에서 분석하여 확인해 보았다 (aldrich, R1757). 도 6은 peak 1과 ribose의 질량 스펙트럼을 나타내며 peak 1의 질량 스펙트럼이 ribose와 일치함을 통해 효소 반응 결과 새롭게 생성된 반응 산물인 peak 1인 ribose임을 확인하였다.

[0046] 실시예 7: *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 아가로스 가수분해물과 반응시킨 후 TLC로 확인

[0047] 아가로스 가수분해물을 얻기 위해 아가 분해능이 우수한 해양 미생물로 알려진 *Saccharophagus degradans* 2-40의 조효소액을 0.5%(w/v)의 아가로스과 반응시켜 아가로스를 구성하는 단당인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하였다. 0.5%의 아가로스를 20mM Tris-HCl buffer에 녹인 기질 50ml에 1.7mg/ml 농도의 *Saccharophagus degradans* 2-40의 조효소액 50ml을 30°C, 200rpm에서 12시간 동안 반응하였다. 반응 후 생성된 단당류(D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스)를 GC/MS로 동시 정량 분석하였다. 조효소액을 얻는 방법과 GC/MS 분석 방법은 상기 실시 예 4와 5에서 기술한 바와 동일하다. 아가로스 가수분해 결과 1.7 mg/ml의 D-갈락토오스와 1.9 mg/ml의 3,6-안하이드로 L-갈락토오스가 생성되었으며 이 가수분해물을 *Vibrio sp.* EJY3 조효소액과 반응 시킨 후 반응 산물을 TLC로 분석하였다. 반응 조건은 아가로스 가수분해물 10ml와 *Vibrio sp.* EJY3 조효소액 1ml(2mg), NADH 보조인자 1 mM을 20 mM의 Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 녹인 후에 12시간 동안 반응 시켰다. *Vibrio sp.* EJY3 조효소액을 얻는 방법을 상기 실시 예 4에서 나타낸 바와 동일하다. 도 7에서 standard는 표준물질의 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-D-갈락토오스이며 control은 효소를 불활성화 시켜 반응이 일어나지 않은 대조군이다, Crude는 NADH 보조인자를 넣지 않고 조효소와 기질을 반응시킨 산물이고 NADH는 조효소와 기질, 그리고 NADH 보조인자까지 함께 반응시킨 산물이다. 도 7의 TLC 결과를 통해 NADH 보조인자를 넣지 않았을 때에는 기질로 사용한 아가로스 가수분해물의 변화가 없었지만 NADH 보조인자를 넣었을 경우 아가로스 가수분해물 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 다른 물질로 전환이 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 실시예 8: *Vibrio sp.* EJY3의 조효소액을 아가로스 가수분해물과 반응시킨 산물을 GC/MS로 분석

[0049] 실시 예 7에서 기술한 바와 같이 *Vibrio sp.* EJY3에서 얻은 조효소액 1ml (2mg)을 10 ml의 아가로스 가수분해물, 1mM의 NADH, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 조건에서 30°C, 200 rpm, 12시간 반응시킨 후 반응 산물의 동정을 위해 GC/MS 분석을 실시하였다. GC/MS 분석을 위한 샘플 유도체화 및 GC/MS 분석 방법은 상기 기술한 실시 예 5에서 나타낸 바와 동일하다. (a)control은 효소를 불활성화 시켜 반응이 일어나지 않은 대조군이다 도8의 (a)에서 표시한 Tris-HCl은 Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 나타내며 AHG는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 나타낸다. (b)crude는 NADH 보조인자를 넣지 않고 조효소와 기질을 반응시킨 산물이고 (c)NADH는 조효소와 기질, 그리고 NADH 보조인자까지 함께 반응시킨 산물이다. 도 8에서 나타낸 바와 같이 crude에서는 효소 반응이 일어나지 않았지만 보조인자와 함께 반응을 시켰을 때에는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 peak가 감소하고 다른 새로운 peak가 생성됨을 확인하였다. (c) NADH에서 새롭게 생성된 peak는 라이보스임을 확인하였다.

[0050] 실시예 9: D-갈락토오스, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, D-라이보스의 표준물질을 이용하여 GC/MS에서 정량

[0051] D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, D-라이보스를 정량하기 위해 표준물질을 농도 별로 분석한 후 해당 피크의 면적 값을 통해 정량 곡선을 구했다. D-갈락토오스는 Acrose Organics, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스는 Dexta Laboratories, D-라이보스는 Aldrich 사에서 각각 구입하였다. 각각의 표준 물질을 10 mg/ml 농도의 stock solution을 만든다. 이 때 표준 물질들은 *Vibrio sp.* EJY3 효소 반응과 동일한 조건인 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 녹인다. 그 후 동일한 버퍼로 희석을 하며 GC/MS 정량 분석을 위한 농도별 표준 물질을 준비한다. 각각의 표준 물질의 양은 1mg, 0.5mg, 0.2mg, 0.1mg, 0.05mg, 0.025mg 이었으며 분석 후 GC/MS의 total ion chromatogram의 peak area 값을 기준으로 직선 구간을 설정하여 정량 곡선을 그렸다. GC/MS 분석 방법은 상기 실시 예 5에 기술한 바와 동일하다.

[0052] 실시 예 9를 통해 얻은 D-갈락토오스, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, D-라이보스 정량 선을 기준으로 실시 예 7의 반응 산물들을 GC/MS로 반응 산물 정량을 실시하였다. Control은 효소를 불활성화시켜 반응이 일어나지 않은 대조군이여 crude는 NADH 보조인자를 넣지 않고 조효소와 기질을 반응시킨 산물이고 NADH는 조효소와 기질, 그리고 NADH 보조인자까지 함께 반응시킨 산물이다. 반응 산물 정량 결과 control에서는 라이보스가 생성되지 않았으며 crude 조건과 NADH 조건에서 라이보스가 생성이 되었는데 NADH 조건에서 가장 많이 생성되는 것을 확인하였다. 정량 곡선을 통해 각각의 반응 산물을 정량한 결과 control에서는 라이보스의 생성 없이 1.62mg/ml의 갈락토오스와 1.57mg/ml의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 기질이 있으며 crude에서는 0.26mg/ml의 라이보스가 생성이 되었고 NADH를 넣고 반응시킨 조건에서는 0.93mg/ml 라이보스가 생성됨을 정량적으로 확인하였다.

수탁번호

[0053]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11976BP

수탁일자 : 20110630

도면

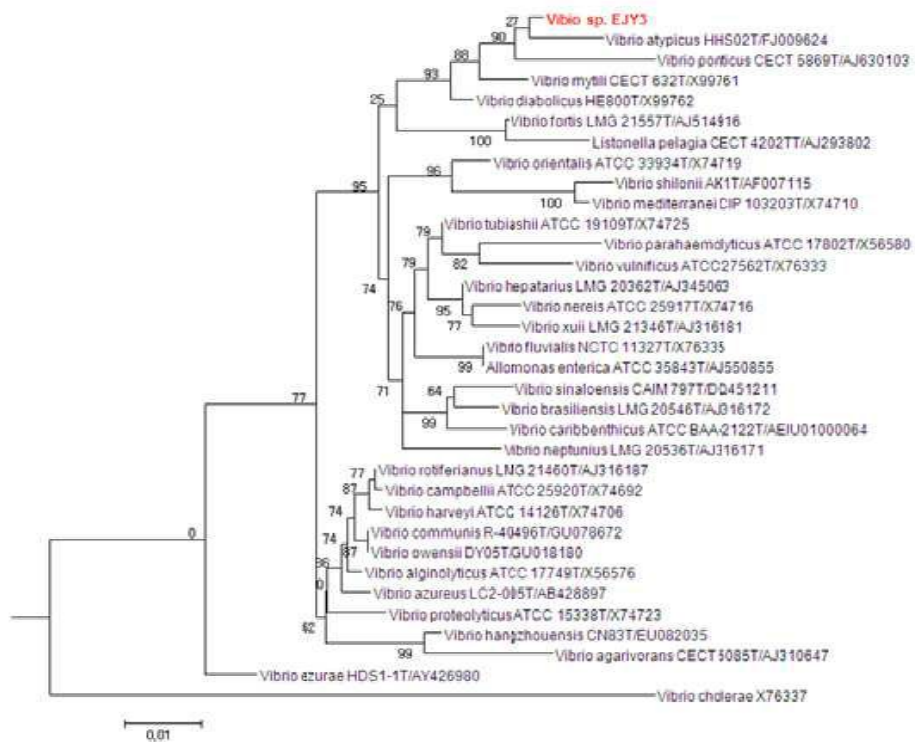
도면1

Colony No.	1	3	6	7	11
샘플링 장소	해초	계	갯벌	갯벌	해수
Colony 색깔	아이보리	아이보리	아이보리	아이보리 (시간이 지나면서 붉은색)	주황색
Clear zone test	Agar를 분해하는 능력이 매우 뛰어나 Clear zone 형성	고체배지 주변에 clear zone형성	고체배지 주변에 clear zone형성	Clear zone 형성하 지 않음	Clear zone 형성하 지 않음
					

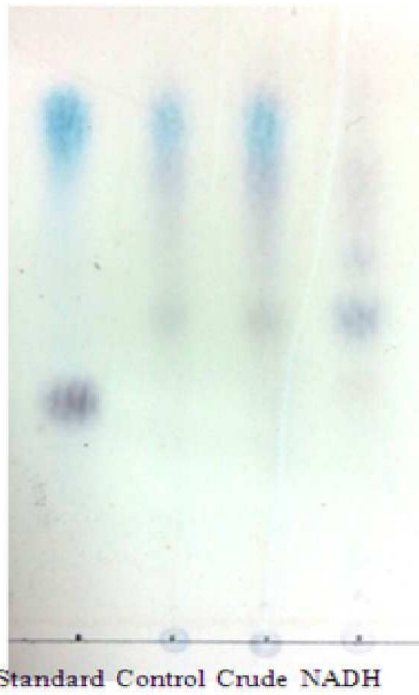
도면2



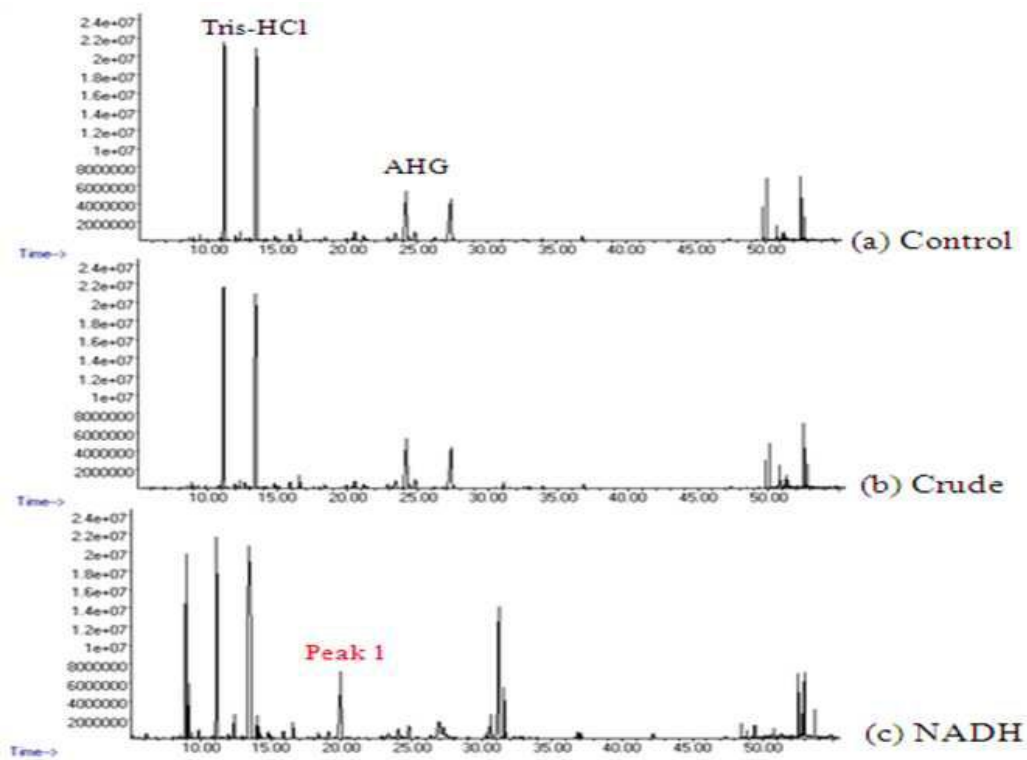
도면3



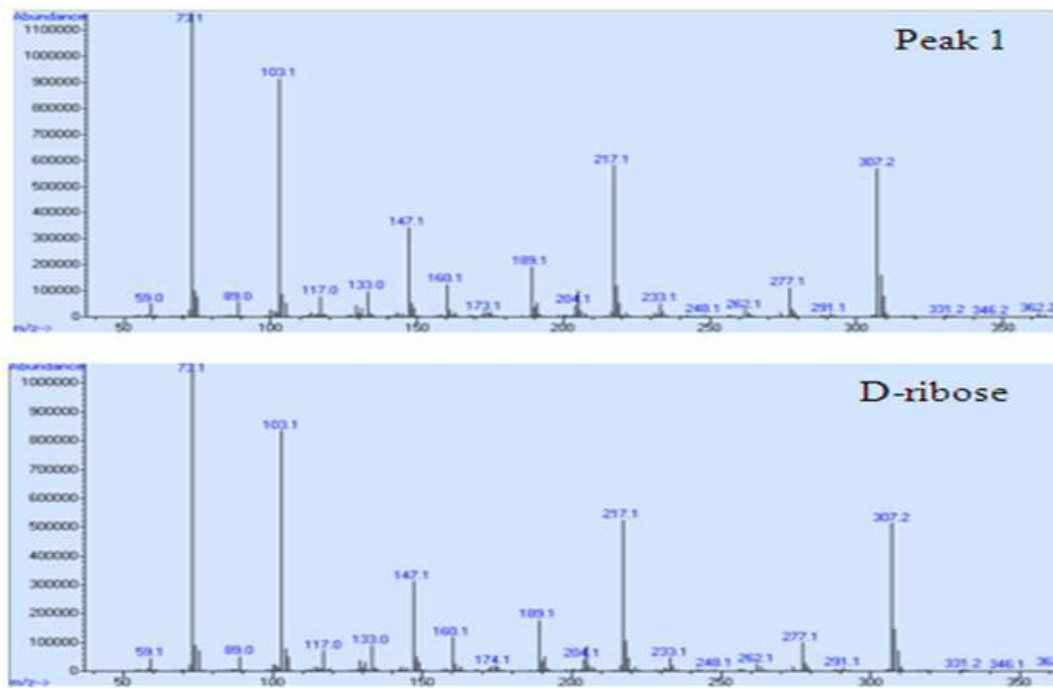
도면4



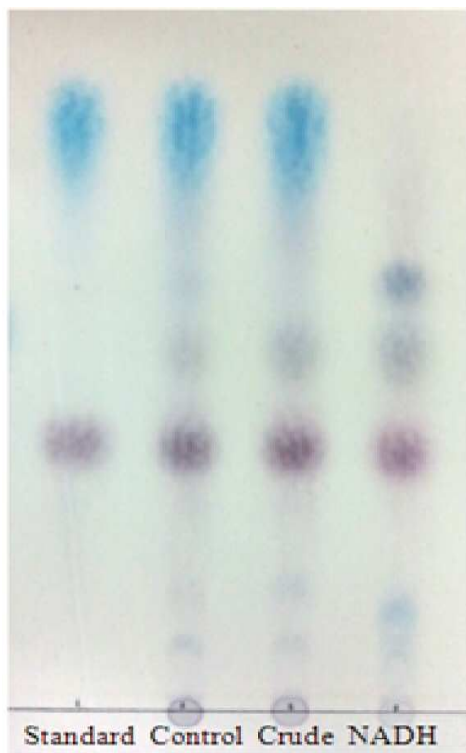
도면5



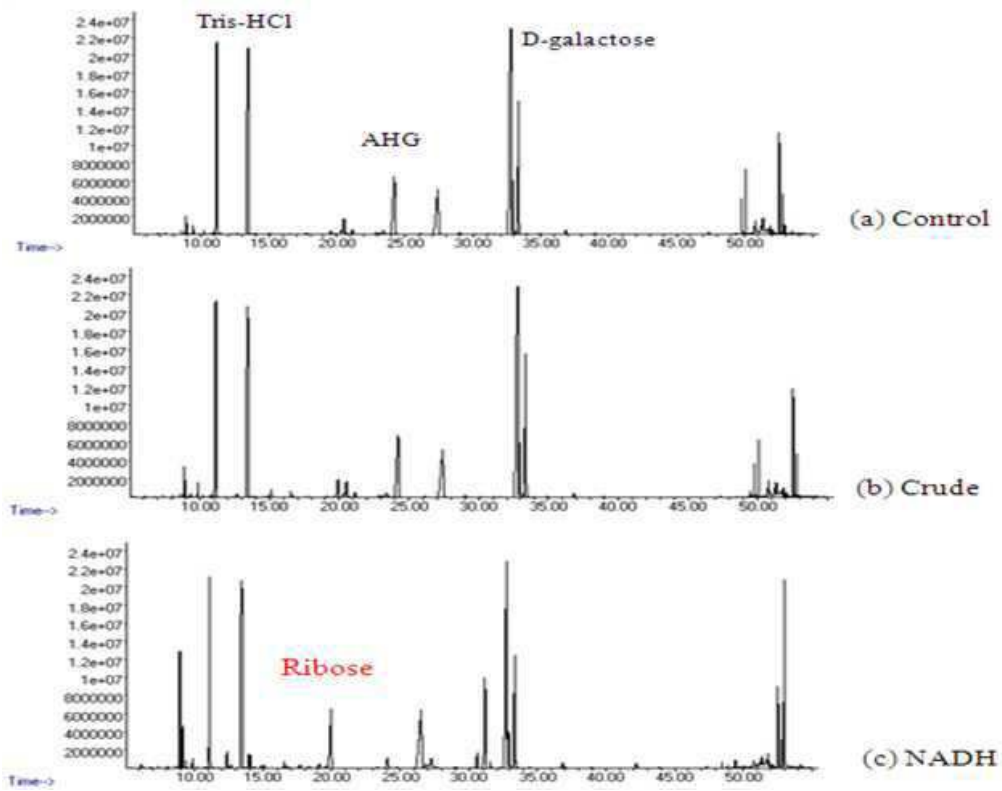
도면6



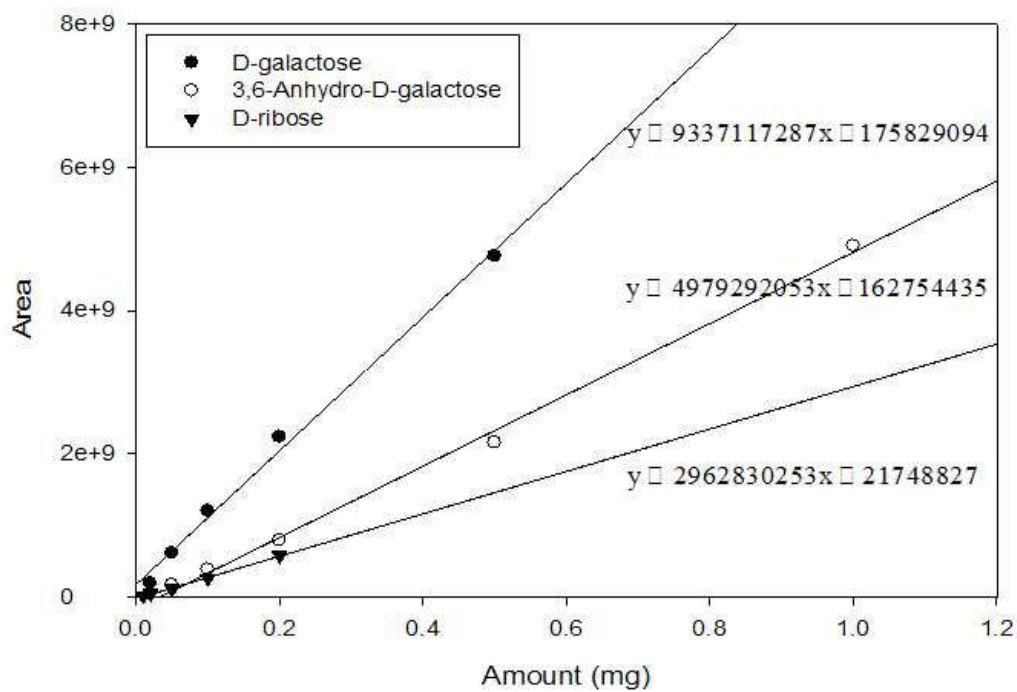
도면7



도면8



도면9



도면10

