



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0103350
(43) 공개일자 2016년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0004 (2013.01)
C12P 7/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0025739
(22) 출원일자 2015년02월24일
심사청구일자 2015년02월24일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이규호
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42
이정국
서울특별시 마포구 백범로25길 63
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박원미

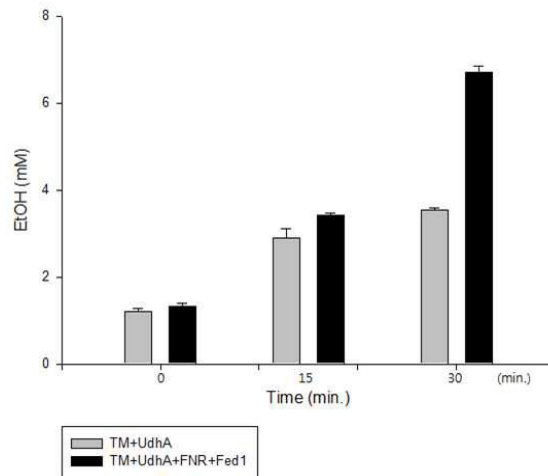
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소의 조효소 생산방법 및 그 용도

(57) 요약

본원은 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소(oxidoreductase)의 조효소로서 니코틴아미드 조효소의 생산 방법이 개시된다. 본원에 따른 방법은 니코틴아미드 조효소의 생산효율을 극대화시킨 것으로, 이는 다양한 산화환원효소 반응 예를 들면 에탄올 생산 회로에 접목하여 에탄올을 생산능 향상 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8c



(52) CPC특허분류

C12P 7/065 (2013.01)

C12Y 101/01001 (2013.01)

C12Y 401/01001 (2013.01)

(72) 발명자

이경조

경기도 성남시 수정구 수정로306번길 15

나가미 사라

(121-742)대한민국 서울특별시 마포구 백범로 35

정유철

경상남도 김해시 경원로55번길 9

김정아

서울특별시 은평구 연서로15길 37

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201432001

부처명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 첨단융합기술개발사업

연구과제명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 (재)한국연구재단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

니코틴아마이드 의존성 산화환원효소(oxidoreductase)의 조효소로서 니코틴아미드 조효소를 인비트로에서 생산하는 방법으로,

광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 제1 반응물을 제공하는 단계;

상기 제1 반응물에 재조합 FNR 및 Fed를 혼합하여 제2 반응물을 수득하는 단계; 및

상기 제2 반응물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응에 의해 NADPH 및 NADH를 포함하는 니코틴아미드 조효소가 생성되며, 상기 재조합 FNR 및 Fed에 의해 그 생산이 증가하는 것인, 니코틴아미드 조효소 생산 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 니코틴아미드 의존성 산화환원효소는 데하이드로지나제, 알콜데하이드로지나제, 포름알데하이드 데하이드로지나제, 글루코스데하이드로지나제, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로지나제, 글리세롤 데하이드로지나제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로지나제, 3알파-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 락테이트 데하이드로지나제, 말레이트 데하이드로지나제를 포함하는 3-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 예를 들면 3알파-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 락테이트 데하이드로지나제, 말레이트 데하이드로지나제, 또는 아미노산 데하이드로지나제인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 제1 반응물은 틸라코이드 20 $\mu\text{g chl-a eq.}$, 2 mM NADP^+ , 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate를 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 FNR은 0.02~0.2 μM , 그리고 상기 Fed는 1.0~4.0 μM 의 농도로 포함되는 것인, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 틸라코이드 막은 시네코시스티스 (*Synechocystis* spp.), 클로로비움 테피디움 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클라미도모나스 레이하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래인, 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 광반응은 트랜스하이드로지나제의 존재하에서 수행되며, 상기 트랜스하이드로지나제에 의해, 상기 생성된 NADPH가 NADH로 전환되는 것인, 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 트랜스하이드로지나제는 반응물 1ml 당 0.2 μg 내지 2.5 μg 으로 포함되는 것인, 방법.

청구항 8

(i) 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 혼합물을 제공하는 단계;

(ii) 상기 제 1 혼합물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막, 재조합 FNR, Fed 및 UdhA를 혼합하여 제2 혼합물을 수득하는 단계; 및

(iii) 상기 제2 혼합물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응을 통해서 NADPH, NADH 및 에탄올이 생성되며, 상기 NADPH는 NADH로 전환되고, 상기 전환된 NADH는 상기 효소에 의해 상기 기질로부터 에탄올 생산에 사용되는 것인, 동일 반응에서 생성된 NADH를 이용한 에탄올 생산 증진 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 제 1 혼합물에서 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH) 중 하나 이상이고, 상기 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트인, 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 제 2 혼합물은 20 μg chl_a-eq., 0.2 μM FNR, 4.0 μM Fed, 0.4 μM UdhA, 2 mM NADP⁺, 2 mM NAD⁺, 10 mM 파이루베이트, 0.044 μM PDC, 및 0.44 μM ADH를 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소의 조효소 생산기술 및 그 용도와 관련된 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 발표에 의하면 우리나라의 경우 전체 에너지의 96%를 수입에 의존하고 있는 것으로 나타났다 (에너지경제연구원 2012년 에너지통계연보). 전적으로 수입에 의존해야만 하는 석유와 같은 에너지는 환경 문제와도 맞물려 바이오에탄올과 같은 대체 에너지원의 생산을 위한 기반기술의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 이러한 기반기술 중의 하나가 각종 생화학 반응에 사용되는 니코틴아미드 조효소이다. 이에 환원형 하이드로 니코틴아미드 아데닌 이핵산화합물(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)과 환원형 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)이 포함되며, 이들은 다양한 산화 환원효소에 의한 촉매반응에서 중요한 역할을 한다. 예를 들면 산화형 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), 즉 NAD⁺에 2개의 전자와 1개의 양성자가 전달되어 환원되면 1,4-NADH이 형성되고, NADH는 키랄형의 유기화합물을 선택적으로 생성하는 생촉매반응 등에서 중요한 역할을 담당한다. 따라서 NADPH 또는 NADH의 생산이 중요하며, NAD⁺ 및 NADP⁺를 환원하는 방법에는 화학적 방법, 효소를 사용하는 방법, 광화학 및 전기화학적 방법등이 사용되고 있다.

- [0004] NADH 또는 NADPH는 선택적인 산화환원반응을 통해 저가의 원료물질로부터 고가의 화합물을 생산하는데 사용할 수 있다. 예를 보면, 케톤의 알코올 화합물로 전환, 케톤의 아민으로의 전환반응, 이산화탄소를 포름산으로 전환하는 탈수소효소 (dehydrogenase) 반응, 포름산을 포름알데히드, 그리고 메탄올로 전환하는 반응에 관여하는 효소에서 조효소로 작용한다. NADH는 또한 수소 저장체로 사용되어, 이로부터 수소를 화학적, 광화학적으로 생산할 수 있다.
- [0005] 대한민국공개특허공보 2015-0012532는 NADH 산화조성물 및 NADH 산화방법에 관한 것으로, 효소를 사용하여 NAD를 생산하는 방법을 개시하고 있다.
- [0006] 그러나 보다 효율적인 방법 및 다양한 방법의 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소의 조효소의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본원은 광합성 유래의 환원력을 이용한 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소의 조효소 생산방법 및 그 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 한 양태에서 본원은 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소(oxidoreductase)의 조효소로서 니코틴아미드 조효소를 생산하는 방법으로, 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 제1 반응물을 제공하는 단계; 상기 제1 반응물에 재조합 FNR 및 Fed를 혼합하여 제2 반응물을 수득하는 단계; 및 상기 제2 반응물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응에 의해 NADPH 및 NADH를 포함하는 니코틴 아미드 조효소가 생성되며, 상기 재조합 FNR 및 Fed에 의해 그 생산이 증가한다.
- [0009] 일 구현예에서 제1 반응물은 틸라코이드 20 $\mu\text{g chl a-eq.}$, 2 mM NADP^+ , 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate를 포함할 수 있으며, 상기 FNR은 0.02~0.2 μM , 그리고 상기 Fed는 1.0~4.0 μM 의 농도로 포함되며, 이에 의해, NADPH의 생산이 극대화된다.
- [0010] 다른 구현예에서, 광반응은 트랜스하이드로지나제의 존재하에서 수행되며, 상기 트랜스하이드로지나제에 의해, 상기 생성된 NADPH가 NADH로 전환되며, 일 구현예에서, 트랜스하이드로지나제는 반응물 1ml 당 0.2 μg 내지 2.5 μg 으로 포함될 수 있다.
- [0011] 다른 양태에서 본원은 또한 상기 방법을 에탄올 생산에 접목시켜, 에탄올 생산을 증진 시킨 것으로, 상기 방법은 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 혼합물을 제공하는 단계; 상기 제 1 혼합물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막, 재조합 FNR, Fed 및 UdhA를 혼합하여 제2 혼합물을 수득하는 단계; 및 상기 제 2 혼합물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응을 통해서 NADPH, NADH 및 에탄올이 생성되며, 상기 NADPH는 NADH로 전환되고, 상기 전환된 NADH는 상기 효소에 의해 상기 기질로부터 에탄올 생산에 사용된다.
- [0012] 일 구현예에서 제 1 혼합물에서 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH) 중 하나 이상이고, 상기 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트이며, 상기 제 2 혼합물은 20 $\mu\text{g chl a-eq.}$, 0.2 μM FNR, 4.0 μM Fed, 0.4 μM UdhA, 2 mM NADP^+ , 2 mM NAD^+ , 10 mM 파이루베이트, 0.044 μM PDC, 및 0.44 μM ADH를 포함하며, 이에 의해 에탄올 생산 효율을 극대화시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0013] 본원에 따른 방법은 광합성 유래의 환원력을 이용하여 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소의 조효소를 효과적으로 생산할 수 있으며, 이를, 예를 들면 에탄올 생산 회로에 접목하여 에탄올을 생산에 사용될 수 있거나, 또

는 키랄선택성 화합물, 지방산 등 기타 유용한 물질 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1a는 본 발명의 한 구현예에 따라 배양된 *Synechocystis* sp.PCC 6803의 콘포칼 현미경 사진이다.

도 1b는 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막을 수크로스 구배 CF (centrifugation) 방법(왼편) 및 연속적 CF 방법 (오른편)으로 추출한 후 초원심분리기를 이용하여 분획한 사진이다.

도 1c는 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물의 콘포칼 현미경 사진으로 초록색의 베시클이 틸라코이드 막을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물의 흡광 스펙트럼이다.

도 3a는 본 발명의 한 구현예에 따른 방법에 따라 제조된 틸라코이드막 분획물이 광조사 환경에서 생산한 NADPH의 생성량을 나타내는 그래프이다.

도 3b는 본 발명의 한 구현예에 따른 틸라코이드막 분획물이 광 조사 환경에서 생산한 NADH의 양을 나타내는 그래프이다.

도 3c는 rFNR 및 rFed 1.0 μ M를 함께 첨가한 경우, NADPH 생산 효과를 측정한 그래프이다.

도 3d는 rFNR을 최대 0.2 μ M 농도로 고정하고 rFed를 농도별로 첨가 (1.0 ~ 4.0 μ M) 할 시, NADPH 생산 효과를 측정한 그래프이다.

도 3e는 rUdhA의 첨가에 따른 NADPH의 NADH로 전환을 측정한 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 한 구현예에 따른 PDC, ADH 효소를 포함하는 인/트로 에탄올 생산 시스템의 반응식을 나타낸다.

도 4b는 본 발명의 한 구현예에 따른 인/트로 에탄올 생산 시스템에서 시간에 따른 NADH의 소비량을 나타내는 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 한 구현예에 따라 인/트로 에탄올 생산 시스템에 틸라코이드막 분획물을 첨가한 후 암 조건 하에서의 에탄올 생산량을 나타내는 그래프이다.

도 5b는 본 발명의 한 구현예에 따라 인/트로 에탄올 생산 시스템에 틸라코이드막 분획물 첨가 후 광 조건하에서의 에탄올 생산량을 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 한 구현예에 따른 인/트로 에탄올 생산 시스템에 첨가된 틸라코이드막의 양에 따른 에탄올의 생산량 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막이 추가된 인/트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH 첨가에 따른 에탄올 생산 증가 효과를 나타내는 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 한 구현예에 따른 분리된 재조합 UdhA(트랜스하이드로지나제, NADPH를 NADH로 전환하는 효소)의 SDS-PAGE 사진이다.

도 8b는 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막이 첨가된 인/트로 에탄올 생산 시스템에 재조합 UdhA를 농도별로 첨가한 후 생성된 에탄올의 생산량을 측정한 그래프이다.

도 8c는 본 발명의 한 구현예에 따라 틸라코이드막을 이용한 에탄올 생산에서 FNR, Fed 및 UdhA의 첨가에 에탄올 생산량을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본원은 빛 에너지 유래의 환원력(reducing power)을 제공할 수 있는 니코틴아미드 조효소의 생산을 증진시켜, 이를 유용물질의 생산에 사용할 수 있다는 발견에 근거한 것이다.

[0016]

따라서 한 양태에서 본원은 니코틴아마이드 의존성 산화환원효소(oxidoreductase)의 조효소로서 니코틴아미드 조효소를 생산하는 방법 또는 생산용 조성물 또는 키트에 관한 것이다.

- [0017] 본원에 따른 방법은 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막을 포함하는 제1 반응물을 제공하는 단계; 상기 제1 반응물에 재조합 FNR 및 Fed를 혼합하여 제2 반응물을 수득하는 단계; 및 상기 제2 반응물에 광을 조사하여 광 반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응에 의해 NADPH 및 NADH를 포함하는 니코틴 아미드 조효소가 생성되며, 상기 재조합 FNR (Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase, FNR) 및 Fed (Ferredoxin)에 의해 특히 그 생산이 증가된다.
- [0018] 본원에서 니코틴아미드 조효소는 환원형 하이드로니코틴아미드 아데닌 이핵산화합물(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)과 환원형 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)을 포함한다.
- [0019] NADH 또는 NADPH는 선택적인 산화환원반응을 통해 저가의 원료물질로부터 고가의 화합물을 생산하는데 사용할 수 있다. 예를 들면, 케톤의 알코올 화합물로 전환, 케톤의 아민으로의 전환반응, 이산화탄소를 포름산으로 전환하는 탈수소효소 (dehydrogenase) 반응, 포름산을 포름알데히드, 그리고 메탄올로 전환하는 반응에 관여하는 효소에서 조효소로 작용한다. NADH는 또한 수소 저장체로 사용되어, 이로부터 수소를 화학적, 광화학적으로 생산할 수 있다. 이러한 효소의 예로는 니코틴아미드 의존성 산화환원효소는 데하이드로지나제, 알콜데하이드로지나제, 포름알데하이드 데하이드로지나제, 글루코스데하이드로지나제, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로지나제, 글리세롤 데하이드로지나제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로지나제, 3알파-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 락테이트 데하이드로지나제, 말레이트 데하이드로지나제를 포함하는 3-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 예를 들면 3알파-하이드록시스테로이드 데하이드로지나제, 락테이트 데하이드로지나제, 말레이트 데하이드로지나제, 또는 아미노산 데하이드로지나제를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0020] 본원의 제1 반응물은 환원력으로서 틸라코이드 막(Thylakoid Membrane, TM)을 포함한다. 틸라코이드 막은 시아노박테리아와 같은 광합성 세균에서 클로로필과 같은 광합성 색소를 포함하는 광합성이 일어나는 다층의 동심원 쉘(concentric shell)을 형성하는 막을 일컫는 것이다. 본원에 따른 방법에서 광을 조사하는 경우, 본 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니나, 틸라코이드 막에서 H₂O로 비사이클릭 전자 흐름을 통하여 NADPH가 생성되며, 이어 NADPH는 TM에 잔존하는 트랜스하이드로지나제에 의해 NADH로 전환되고, 이는 수소전환효소 활성을 증가시킴으로써 NADH가 필요한 반응 예를 들면 에탄올 반응에 사용되어 그 효율을 증진시킬 수 있다. 일 구현예에서 틸라코이드 막은 총 1ml의 반응물 중에 0.1 내지 30 µg (chl-a 당량 기준으로), 특히 20 µg 을 포함한다.
- [0021] 본원의 방법에 사용되는 틸라코이드는 위와 같은 효과를 나타내는 한 다양한 광합성 균주 또는 미세조류 유래일 수 있다. 예를 들면 시네코시스티스 (*Synechocystis* spp.), 클로로비움 테피디움 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클라미도모나스 레이하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서는 시아노박테리아 문(phylum)에 속하는 균주가 사용될 수 있으며, 예를 들면 시네코시스티스 속 박테리아, 특히 시네코시스티스 PPC 6803이 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0022] 틸라코이드 막은 당업계의 공지된 방법에 의해 분리될 수 있으며, 예를 들면 본원의 실시예에 기재된 방법 등을 참고할 수 있으며 예를 들면 Brigitta *et al.* 1998 FEBS Letters. 436:189-192에 기재된 것을 참고할 수 있다.
- [0023] 일 구현예에서 제1 반응물은 틸라코이드 20 µg chl a-eq., 2 mM NADP⁺, 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate를 포함한다.
- [0024] 본원에 따른 방법에서 제1 반응물에 FNR 및 Fed를 혼합하여 생성된 제2 반응물이 사용된다. FNR은 광반응 필수 효소로 TM 외부에 돌출되어 있는 구조이다 (Campbell *et al.* 1998. J. Bacteriol.) 아울러, 제2 반응물은 Fed를 추가로 포함한다. 재조합 또는 천연 유래의 FNR 또는 Fed가 사용될 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 것과 같은 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0025] 본원에 따른 방법은 제2 반응물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응에 의해 NADPH 및 NADH를 포함하는 니코틴 아미드 조효소가 생성되며, 상기 재조합 FNR (Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase, FNR) 및 Fed (Ferredoxin)에 의해 특히 그 생산이 증가된다.
- [0026] 일 구현예에 따르면, 재조합 FNR의 농도가 증가될수록 더 많은 양의 NADP⁺가 NADPH로 전환되는 것으로 나타났으며, 특히 rFNR을 최대 농도 (0.2 µM) 로 재조합 Fed 1.0 µM를 함께 첨가하였을 때 TM만 첨가된 반응에서보다 2.5배 이상의 NADPH 생산증진 효과를 갖는 것으로 나타났다. 아울러 FNR을 최대 0.2 µM 농도로 고정하고 재조합 Fed를 농도별로 첨가 (1.0 ~ 4.0 µM) 할 경우, 최대 4배 이상의 높은 농도의 NADPH 생산 효과를 확인하였다.

- [0027] 본원에 따른 일 구현예에서 FNR은 0.02~0.2 μM , 그리고 Fed는 1.0~4.0 μM 의 농도로 포함될 수 있다.
- [0028] 본원에 따른 방법에서 광반응은 트랜스하이드로지나제(UdhA)의 존재하에 수행될 수 있다. 트랜스하이드로지나제는 NAD^+ 의 존재하에서 NADPH를 NADH로 전환을 촉매하는 효소이다. 수소전달 효소는 세포상의 위치에 따라 막관통단백질 및 세포질에 존재하는 가용성 단백질의 두 종류로 분류된다. 다양한 유래의 UdhA가 사용될 수 있으며 본원의 일 구현예에서는 *Escherichia coli* 유래의 가용성 단백질이 사용되나 이로 제한하는 것은 아니다. 이러한 단백질을 수득하는 방법은 공지되어 있으며 예를 들면 Boonstra *et al.* 1999 *J. Bacteriol.*, 181(3), 1030-1034를 참조할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 UdhA는 제 2 반응물 총 1ml 당 0.2 μg 내지 2.5 μg 으로 포함될 수 있다.
- [0029] 본원에 따른 니코틴아미드 조효소 생산용 조성물 또는 키트는 상술한 바와 같은 제1 반응물에 FNR 및 Fed를 포함하는 제2 반응물을 포함하거나, 또는 제2 반응물에 트랜스하이드로지나제를 추가로 포함하는 것이다.
- [0030] 일 구현예에서 본원은 환원력으로서 광합성 세균의 틸라코이드 막을 사용하고, 여기에 FNR 및 Fed를 추가하여, 니코틴아미드 의존성 산화환원효소의 조효소의 생산을 효율적으로 증가시키고, 이를, 한 예로서 에탄올 생산에 사용하였다.
- [0031] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 상술한 니코틴아미드 의존성 산화환원효소의 조효소로서 니코틴아미드 조효소의 생산방법을 에탄올 생산과 접목시킨 에탄올 생산 방법 또는 생산 증진 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본원에 따른 에탄올 생산 방법 또는 생산 증진 방법은 (i) 에탄올 생산에 관여하는 기질 및 효소를 포함하는 제 1 혼합물을 제공하는 단계; (ii) 상기 제 1 혼합물에 광합성 박테리아 유래의 틸라코이드 막, 재조합 FNR, Fed 및 UdhA를 혼합하여 제2 혼합물을 수득하는 단계; 및 (iii) 상기 제2 혼합물에 광을 조사하여 광반응을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 광반응을 통해서 NADPH, NADH 및 에탄올이 생성되며, 상기 NADPH는 NADH로 전환되고, 상기 전환된 NADH는 상기 효소에 의해 상기 기질로부터 에탄올 생산에 사용되는 것으로, 하나의 반응에서 생성된 NADH를 이용하여 에탄올 생산을 증진시킬 수 있다.
- [0033] 에탄올에 관여하는 기질 및 효소는 공지된 것을 사용할 수 있으며, 예를 들면 기질로서 파이루베이트를 포함할 수 있으며, 에탄올 생산에 관여하는 효소는 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 및/또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH)를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 에탄올 발효는 파이루베이트로부터 혐기대사경로를 통해 에탄올 및 이산화탄소를 생성하는 것이다. 이는 대표적으로 PDC (pyruvate decarboxylase) 및 ADH (alcohol dehydrogenase) 효소에 의해 발생한다. PDC는 파이루베이트를 아세트알데히드로 전환하는 효소이며, ADH는 NADH를 이용하여 알데하이드를 알코올로 전환하는 효소로 생산 반응은 도 4a에 기재된 바를 참조할 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서 제 1 혼합물은 에탄올 생산에 관여하는 효소로 파이루베이트 데카르복실라제 (PDC) 및/또는 알콜 데하이드로지나제 (ADH), 상기 에탄올 생산에 관여하는 기질은 파이루베이트, NADP^+ , NAD^+ , 및 ADP를 포함한다.
- [0035] 본원에 따른 일 구현예에서 제 2 혼합물은 0.1mM NADP^+ , 0.1mM NAD^+ , 0.1mM ADP, 10 내지 30mM, 특히 30mM 파이루베이트, 58nM PDC 및 440nM의 ADH를 포함한다. 다른 구현예에서 제 2 혼합물은 20 μg chl-a eq., 0.2 μM FNR, 4.0 μM Fed, 0.4 μM UdhA, 2 mM NADP^+ , 2 mM NAD^+ , 10 mM 파이루베이트, 0.044 μM PDC, 및 0.44 μM ADH를 포함한다.
- [0036] 본원에 따른 에탄올 생산 방법에서 생산된 에탄올의 양은 TM의 존재하에 rFNR, rFed 및 rUdhA를 첨가하여 크게 향상되었다. 본원에 따른 일 구현예에서 rFNR, rFed를 포함한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 에탄올 생산이 약 2배 증가하였다.
- [0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] **실시예**
- [0039] **실시예 1. 시네코시스티스 속 PCC 6803 유래의 틸라코이드막 추출**

[0040] 1-1 수크로스 구배방법

[0041] *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.* 1996. DNA Res. 30;3(3):109-136)을 -80℃ 스톱으로부터 표 1과 같은 조성의 BG-11 고체 배지에 도달한 후 광합성 조건 (30℃, 25 μmol m⁻² s⁻¹)으로 14일동안 배양하였다. BG-11 고체 배지에 형성된 *Synechocystis* 균의 콜로니를 취하여 BG-11 액체 배지에 접종하여 100rpm, 광합성 하는 조건 (30℃, 25 μmol m⁻² s⁻¹)에서 5일간 배양하였다. 콘포칼 현미경(400X)으로 배양된 시네코시스티스를 촬영하였다(도 1a).

[0042] [표 1]

Stock solution	첨가 양 (1L 당)	
NaNO ₃ (powder)	5g	
K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O (20g/l)	2.0ml	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (200g/l)	2.5ml	◆ Microelements A6 (g/l of distilled water)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (30g/l)	2.0ml	H ₃ BO ₃ 2.86g
Citric acid (6g/l)	1.0ml	MnCl ₂ 1.81g
FeNH ₄ -Citrate (6g/l)	1.0ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.222g
Na ₂ CO ₃ (20g/l)	2.0ml	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.367g
A6 (◆첨부 조성 참조)	1.0ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.079g
Na thiosulfate (279g/l)	5.0ml	Co(NO ₃) ₂ 0.0494g
Glucose (20%)	9.0ml	
Up to 1L of distilled water		

[0043]

[0044] BG-11 액체 배지에 배양한 균주를 수확하여 TM 완충액 (20mM Tris-Cl, EDTA 1mM, pH7.4) 10ml에 재현탁한 후 유리비드로 세포막을 파쇄 하였다. 이후, 4℃에서 8000rpm으로 15분간 2회 원심분리하고 수득한 상층액을 도 1b와 같이 수크로스 밀도 구배를 이용한 초원심분리(Brigitta *et al.* 1998 FEBS Letters. 436:189-192)를 이용하여 시네코시스티스의 틸라코이드막을 분리하였다. 콘포칼 현미경을 이용하여 분리한 틸라코이드막 분획물을 촬영하였다. 결과는 도 1c에 있으며, 이에 나타난 바와 같이, 초록색의 베시클(vesicle)을 관찰할 수 있었다.

[0045] 1-2 연속적 CF 방법

[0046] 상기와 같이 배양한 *Synechocystis* 균체를 6500rpm에서 5분간 원심분리하여 수득한 후 5ml의 완충액 (0.35M 솔비톨; 20mM HEPES pH 7.5, 2mM MgCl₂, 5mM Na-ascorbate)로 재현탁하였다. 이어 유리비드로 세포막을 파쇄 하였다. 이후, 125,000rpm으로 30분간 원심분리하여 균체를 10ml의 완충액에 재현탁하고, 1,200xg에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수득하고 이를 40,000xg에서 12분간 초원심분리하여 틸라코이드막을 수득하였다.

[0047] 실시예 2. 틸라코이드막 정량 및 NADH 생성량 측정

[0048] 실시예 1에서 수득한 틸라코이드막 분획물 10 μl를, 아세톤 및 메탄올을 7:2로 혼합한 용액 490 μl에 첨가하고 2분간 볼텍스 믹서를 이용하여 혼합한 후, 12000rpm으로 1분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 664nm와 750nm의 파장에서 UV-Visible 분광기를 이용하여 흡광도를 측정하고 하기 식을 이용하여 Brigitta *et al.*, 1998에 기재된 바와 같이 클로로필-a 농도를 결정하였으며, 스펙트럼은 도 2에 나타난 바와 같다.

[0049] [μg/ μl chl-a eq. = 11.47(0.D664nm - 0.D750nm)]

[0050] 이어, 틸라코이드 막에서 생성되는 NADH 생산량을 측정하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다. 우선 상기와 같

이 준비하고 정량한 1 µg 클로로필-a의 양을 포함하는 틸라코이드막 분획물, 100 µM NADP⁺, 100 µM NAD⁺, 및 100 µM ADP (Adenosine diphosphate)가 포함된 PBS(Phosphate buffered saline, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₃, 2mM KH₂PO₄, pH7.3)를 총 부피 1ml로 혼합하고 30℃에서 1시간 동안 빛을 조사하였으며, 반응이 끝난 후 반응액 내 NADH 생성량은 분광광도계로 340nm의 흡광도를 측정하여 NADH 흡광계수(6,200 M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 계산하여 측정하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이 NAD⁺를 반응 혼합물에 공급하는 경우, 유의한 양의 NADH가 생성되었으며, 이러한 결과는 본원에서 분리된 틸라코이드 분획물이 인/비트로 광합성 반응에서 활성을 가지며, 이후 에탄올 생산을 위한 효소 반응에 환원력을 제공할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0051] 또한 TM 농도별 (1~20 µg Chl-a eq.) NADPH 생산을 조사하였다. 반응물로서 (PBS buffer, 2 mM NADP⁺, 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate)를 사용하여 15분 동안 빛을 조사하며 반응 시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하여 NADPH의 생성 여부를 관찰하였으며, 결과는 도 3b에 있다. 이에 나타난 바와 같이 TM의 농도가 증가할 수록 NADPH의 생성량의 증가하였으며, 또한 연소적 CF 방법으로 추출된 TM을 사용한 경우 더 많은 양의 NADP⁺가 NADPH로 전환되는 것으로 나타났다. 연속적 CF방법의 경우 평균 1 µg chl-a eq./µl 농도의 TM을 정제할 수 있었으며, 이는 실시예 1의 TM 추출법의 평균 0.2 µg chl-a eq./µl 농도와 비교하여 높은 것이다.

[0052] **실시예 3. FNR 및 Fed 첨가에 따른 TM에 의한 NADPH 생성 증대**

[0053] **3-1 Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR) 및 Ferredoxin (Fed) 생산**

[0054] rFNR (재조합 FNR)을 순수정제하기 위해 *Synechocystis* sp. PCC 6803 크로모솜으로부터 추출한 유전자 (*petH*)를 E.coli에서 벡터로(pQE30, Qiagen)를 사용하여 과발현하여 46.4kDa의 rFNR을 확보하였다. 이어 순수 정제된 rFNR을 이용하여 FNR 특이적 항체 (anti-FNR rat-IgG)를 제작하였고, western blot으로 항체 부착 여부를 확인하였다.

[0055] 또한 FNR 활성화에 필요한 ferredoxin (Fed)은 *Synechocystis* sp. PCC 6803 크로모솜으로부터 추출한 유전자 (*pedF*)를 E.coli에서 벡터로(pQE30, Qiagen)를 사용하여 과발현하여 20.8kDa (dimer form)의 rFed를 확보하였다.

[0056] 상기 분리된 각 단백질은 전기영동 및 각 단백질에 특이적인 항체를 이용한 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0057] **3-2 NADPH 생산량 측정**

[0058] 실시예 1에서 제조된 TM을 포함하는 반응 혼합물 (PBS buffer, TM 20 µg chl a-eq., 2 mM NADP⁺, 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate)에 상기와 같이 순수 정제된 rFNR과 rFed (rFNR 0.02~0.2 µM, rFed 1.0 µM)를 첨가하여 15분 동안 빛을 조사하며 반응 시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하여 NADPH의 생성 여부를 관찰하였다.

[0059] 결과는 도 3c 및 도 3d에 있다. 이에 나타난 바와 같이 첨가한 rFNR의 농도가 증가될수록 더 많은 양의 NADP⁺가 NADPH로 전환되는 것을 관찰하였다 (도 3c). 특히 rFNR을 최대 농도 (0.2 µM)로 rFed 1.0 µM를 함께 첨가하였을 때 TM만 첨가된 반응에서보다 2.5배 이상의 NADPH 생산효과를 보이는 것으로 나타났다. 아울러 rFNR을 최대 0.2 µM 농도로 고정하고 rFed를 농도별로 첨가 (1.0 ~ 4.0 µM) 할 시, 최대 4배 이상의 높은 농도의 NADPH 생산 효과를 확인하였다 (도 3d). 이러한 결과는 rFNR 및 Fed 첨가로 인해 NADPH의 생산효율이 월등히 증가하였음을 나타내는 것이다.

[0060] **실시예 4. rUdhA를 이용한 NADPH의 NADH로의 전환**

[0061] 하기 실시예에서 제조된 rUdhA를 실시예 3에서 제조한 rFNR과 rFed를 첨가한 TM에 첨가하여 그 효과를 확인하였다. TM 반응액 (PBS buffer, TM 20 µg chl a-eq., 2 mM NADP⁺, 2 mM ADP, 1 mM Na-ascorbate, rFNR 0.2 µM, rFed 4.0 µM)에 농도별 rUdhA (0.1 ~ 0.4 µM)를 첨가하여 NADPH의 NADH로의 전환 즉 tNADH의 생성여부를 관찰하였다. 실시예 3의 결과 rFNR과 rFed를 첨가한 TM 반응의 NADPH 생산량은 최대 약 80 µM이었으나 같은 조건

에서의 tNADH의 양은 약 40 μM 미만으로 확인되어 생산된 NADPH가 모두 NADH로 전환되지 않음을 알 수 있었다. rUdhA를 TM 반응에 농도를 높이며 첨가할수록 생성되는 tNADH의 양이 증가하여 rUdhA를 TM 반응에 첨가하면 광 반응으로부터 생성된 NADPH를 대부분 NADH로 전환시킬 수 있는 것으로 확인하였다 (도 3e 참조).

[0062] 실시예 5. NADH를 이용한 효소반응으로서 에탄올 생산

[0063] 5-1 효소 클로닝

[0064] 우선 효소를 다음과 같이 클로닝하여 사용하였다. *Zymomonas mobilis*의 게놈 DNA를 주형으로 *pdh* (pyruvate decarboxylase coding 유전자) 및 *adhB* (alcohol dehydrogenase coding 유전자)를 프라이머 셋트로 (각각 ZmPDC FBamHI - 5'-GATCGGATCCATGAGTTACTGTGCGTACCTATTAG-3' / ZmPDC RPstI -5'-GATCCTGCAGCTAGAGGAGCTTGTTAACAGGCTTACGGC-3', ZmADH FSphI - 5'-GATCGCATGCATGGCTTCTCACTTTTATATTC-3' / ZmADH RSalI - 5'-GATCGTCGACTTAGAAAGCGCTCAGGAAGAG-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 후 과발현 벡터인 pQE30에 클로닝하였다. 이어 ADHI 및 PDC가 각각 클로닝 된 과발현 벡터를 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 이어 PDC 및 ADHI 과발현 균주를 각각 LB (엠페실린 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 200ml에 접종하여 37°C에서 200rpm 조건으로 2시간 30분간 배양한 후, IPTG를 최종 1mM로 맞춰 첨가한 후 3 시간동안 추가 배양하였다. 이어 배양한 세포를 수확하여 용해 완충액 10ml에 재현탁하여 과쇄하여 얻은 용해물로부터 Ni-NTA 레진을 이용한 히스티딘 친화성 크로마토그래피(histidine affinity chromatography)를 사용하여 재조합 단백질을 정제하였다.

[0065] 도 4a는 에탄올 생산에 관여하는 효소 및 촉매하는 반응을 도식적으로 나타낸 것이다. 재조합 PDC 및 ADH의 활성을 표 2에 나타낸 조성으로 반응 완충용액에 혼합하여 반응시킨 후 소멸되는 NADH의 양을 OD 340nm로 측정하여 확인하였다. PDC는 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 PDC 8 μl 와 20mM TPP (thiamine pyrophosphate) 1 μl 와 20mM MgSO_4 1 μl 를 혼합하고 상온에서 30분 반응시키는 전처리를 통해 PDC apo-enzyme에서 PDC holo-enzyme으로 재구성하였다.

[0066] 시간에 따른 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH의 소비 정도를 측정하였다. 파이루베이트 (0.1 μM), NADH (150 μM), PDC (0.044 μM), 및 ADH (0.44 μM)를 포함하는 반응 혼합물을 RT에서 반응시키고 잔존하는 NADH의 농도는 340nm에서 매 10초 마다 흡광도를 측정하였다.

[0067] [표 2]

반응 용액	부피
Citrate buffer, 0.3M, pH6.0	1.00 ml
Sodium pyruvate, 1M	0.1 ml
NADHNa ₂ , 5mM	0.1 ml
Alcohol Dehydrogenase(ADH), 0.5mg/ml	0.1 ml
Distilled water	1.69 ml
Pre-incubationed Pyruvate decarboxylase(PDC)	0.01 ml
총 부피	3 ml

[0068]

[0069] 결과는 도 4b에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 인비트로 에탄올 생산 시스템에서 NADH가 소멸되고 에탄올이 생성되는 것을 알 수 있다.

[0070] 5-2 틸라코이드막을 이용한 에탄올 생산

[0071] 표 3 (틸라코이드 막 분획을 이용한 에탄올 합성 실험군 용액 구성표)과 같이 여섯 가지 조성의 반응액 (1: 분획을 넣지 않은 실험군; 2: 파이루베이트를 넣지 않은 실험군; 3: 에탄올 생성 단백질을 넣지 않은 실험군; 4: NAD⁺를 넣지 않은 실험군; 5: 파이루베이트 10mM; 6: pyruvate 30mM)을 준비하고 암조건 및 광조건 (photon 농도 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100rpm 교반, 30°C 조건의 인비트로 에탄올 생산 시스템을 이용하여 에탄올 생산 반응을

수행하였으며, 1h, 2h 및 3h에서 각각 시료를 채취하였다. 반응 혼합물의 조성은 다음과 같다: 틸라코이드 막 1 μg (chl-*a* eq.), NADP^+ (100 μM), NAD^+ (100 μM), ADP (100 μM), 및 파이루베이트 (0, 10, 또는 30 mM).

생성된 에탄올의 양은 에탄올 분석 키트 (Abchem)를 제조자의 방법대로 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 5a (암조건) 및 도 5b (광조건)에 나타내었다.

이에 나타난 바와 같이 암조건 및 광조건 모두에서 파이루베이트가 존재하지 않는 반응용액2에서는 에탄올이 생산되지 않았다. 도 5a에 나타난 바와 같이 암조건에서는 유의한 양의 에탄올이 생산되지 않았으며, 도 5b의 광조건에서는 파이루베이트 농도 의존적으로 에탄올이 생산되었으며, 반응용액 6에서의 에탄올 농도가 가장 높게 나타났다. 10mM 및 30mM 파이루베이트의 존재하에서 각각 4mM 및 6mM의 에탄올이 생산되었다.

[표 3]

	1	2	3	4	5	6
Thylakoid Membrane (0.2 μg chl- <i>a</i> eq. / μl)	X	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
NADP⁺ (100mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
NAD⁺ (125mM)	0.8 μl	0.8 μl	0.8 μl	X	0.8 μl	0.8 μl
ADP (100mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Pyruvate (1M)	30 μl	X	30 μl	30 μl	10 μl	30 μl
PDC (16.39 μM)	3.4 μl	3.4 μl	X	3.4 μl	3.4 μl	3.4 μl
ADH (13.2 μM)	33.3 μl	33.3 μl	X	33.3 μl	33.3 μl	33.3 μl
PBS	930.5 μl	955.5 μl	962.2 μl	926.3 μl	945.5 μl	925.5 μl

상기 반응용액 중에서 에탄올 생산이 가장 효율적이라고 판단되는 반응용액 6과 같은 조성에서 0, 0.5, 1 및 2 μg 의 클로로필-*a*를 각각 포함하는 틸라코이드막 분획물을 파이루베이트 (30 mM), NAD^+ (100 μM), NADP^+ (100 μM), ADP (100 μM), PDC (0.044 μM), 및 ADH (0.44 μM)를 포함하는 반응 혼합물에 각각 첨가한 후 시간당 생성되는 에탄올의 농도를 측정하였다. 결과는 도 6에 나타내었다. 그 결과 틸라코이드막을 첨가하지 않은 반응용액에서는 에탄올 생산이 검출되지 않았으나 첨가한 틸라코이드 막의 증가에 따라 에탄올 생성량이 증가하는 것으로 나타났다.

5-3 추가의 NADH 첨가에 따른 에탄올 생산 증진

상기 실시예에 따라 확립한 인비트로 에탄올 생성 시스템에 NADH를 추가로 첨가하여 에탄올 생성 증진 실험을 수행하였다. 틸라코이드막 1 μg (chl-*a* eq.), NADP^+ , NAD^+ , ADP 및 파이루베이트를 표 4의 농도로 혼합하여 기본 반응용액을 제조하고, 상기 반응용액에 에탄올 발효 효소 및 NADH를 첨가하지 않은 반응용액 1, 에탄올 발효 효소만 첨가한 반응용액 2, 에탄올 발효 효소 및 NADH를 첨가한 반응용액 3의 조성으로 광반응 시킨 후 생성된 에탄올의 농도를 에탄올 분석키트 (Abchem)를 제조자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0079] [표 4]

	1	2	3
Thylakoid Membrane (0.2μg chl-a eq. /μl)	5μl	5μl	10μl
NADP⁺ (100mM)	1μl	1μl	1μl
NAD⁺ (125mM)	0.8μl	0.8μl	0.8μl
ADP (100mM)	1μl	1μl	1μl
Pyruvate (1M)	30μl	30μl	30μl
PDC (16.39μM)	X	3.4μl	3.4μl
ADH (13.2μM)	X	33.3μl	33.3μl
PBS	962.2μl	925.5μl	919.5μl
NADH (100mM)	X	X	1μl

[0080]

[0081] 그 결과 NADH를 추가로 첨가한 반응용액 2 및 3에서 유의한 에탄올 생산량을 나타냈으며, 특히 반응용액 3의 조건에서 월등한 에탄올 생산량을 나타냈다. 이는 틸라코이드막에 의해 생성된 NADPH로부터 전환된 NADH 양이 반응의 속도제한 단계임을 나타내며, 따라서 추가로 보충된 NADH에 의해 에탄올 생산이 증진되었다.

[0082] 5-4 UdhA 첨가에 따른 에탄올 생산 증진

[0083] UdhA 단백질은 NADPH에서 NADH를 생산하는 트랜스하이드로지나제 효소이다. 이를 다음과 같이 클로닝하였다. 구체적으로 *E. coli* 유전체 DNA를 주형으로 하기 프라이머 세트 (EcudhAFKpnI- 5'-GATCGGTACCTAATTAAGAGGAGAAATTAAGTATGCCAGATTCTACGATTACGATG-3' / EcudhARHindIII - 5'-GATCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGAACAGGCGGTTTAAACCGTTTAACGC-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 후 과발현 벡터인 pQE30에 클로닝하였다. 이를 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 이어 상기 과발현 균주를 각각 LB (엠포실린 100 μg/ml) 200ml에 접종하여 37℃에서 200rpm 조건으로 2시간 30분 배양한 후, IPTG를 최종 1mM로 맞춰 첨가한 후 3시간동안 더 추가 배양하였다. 배양한 균주를 수확하여 용해완충액 10ml에 재현탁 시킨 후 파쇄하여 얻은 용해물로부터 Ni-NTA 레진을 이용한 히스티딘 친화성 크로마토그래피(histidine affinity chromatography)를 사용하여 재조합 단백질을 정제하였다. 분리된 단백질은 도 8a에 기재되어 있으며, UdhA의 예상 분자량은 53kDa이다.

[0084] 이어 위와 같이 생산된 UdhA(Transhydrogenase)를 인비트로 에탄올 생성 시스템을 이용하여 에탄올을 생산 실험을 수행하였다. 실험용액은 표 5와 같은 조성으로 틸라코이드막 분획물 1μg(chl-a eq.), NADP⁺, NAD⁺, ADP, 파이루베이트 및 에탄올 발효 효소(PDC 및 ADH)를 혼합 하고, 여기에 UdhA를 0, 0.2, 1 및 2.5μg 각각을 상기 반응용액에 추가한 후 광반응을 수행하였다. 생산된 에탄올의 양은 에탄올 분석키트를 제조자의 지시대로 사용하여 측정하였다. 결과는 도 8b에 나타내었다. 이에 나타난 바와 같이 UdhA는 틸라코이드막에 의해 생성된 NADPH를 NADH로 전환을 촉진하여 에탄올 생성량을 증진 시킨다. 따라서 이는 에탄올 발효 효소 및 틸라코이드막이 존재하는 시스템에서 속도제한 단계는 NADH이며, 이를 해소할 경우, 에탄올 생산을 늘릴 수 있다는 것을 나타낸다.

[0085] [표 5]

	1	2	3	4
Thylakoid Membrane (0.2μg chl-a eq. /μl)	5μl	5μl	5μl	5μl
NADP⁺ (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl
NAD⁺ (125mM)	0.8μl	0.8μl	0.8μl	0.8μl
ADP (100mM)	1μl	1μl	1μl	1μl
Pyruvate (1M)	30μl	30μl	30μl	30μl
PDC (16.39μM)	3.4μl	3.4μl	3.4μl	3.4μl
ADH (13.2μM)	33.3μl	33.3μl	33.3μl	33.3μl
PBS	925.5μl	925.1μl	923.5μl	920.5μl
UdhA (0.5μg/μl)	X	0.4μl	2μl	5μl

[0086]

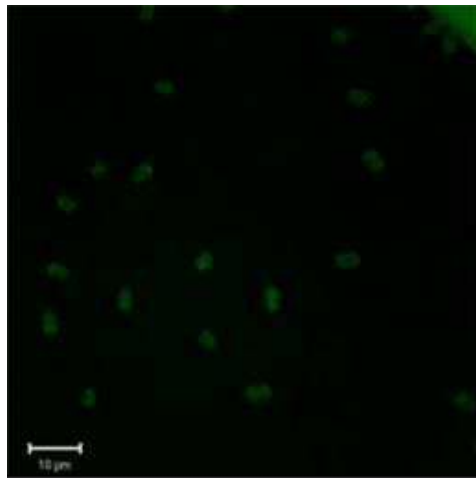
[0087] 5-5 FNR, Fed 및 UdhA 첨가에 따른 에탄올 생산 증진

[0088] 상기 제조된 rFNR, rFed 및 rUdhA를 첨가하여 TM 반응을 수행하여 얻어진 NADH를 PDC/ADH-coupled enzyme reaction으로 이용 가능 여부를 확인하였다. 반응조건은 다음과 같다. 반응용액으로 20 μg chl-a-eq. + ~ FNR (0.2 μM) + Fed (4.0 μM) + UdhA (0.4 μM) + 2 mM NADP⁺ + 2 mM NAD⁺ + 10 mM pyruvate + 0.044 μM PDC + 0.44 μM ADH를 함유한 혼합용액을 30분 간 광반응 시킨 후 생성된 에탄올을 측정하였다. 결과는 도 8c에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 그 결과 광반응 효율을 최대화한 30분 반응조건에서 에탄올 생산이 증가되는 것으로 확인되었으며, 생성된 에탄올의 농도는 약 7 mM 미만으로 이는 첨가된 대부분의 파이루베이트가 빠르게 에탄올로 전환되고 있음을 보이는 결과이며, TM 반응에 의해 생성된 NADH가 PDC/ADH 반응에 효과적으로 사용되고 있음을 나타내는 것이며, rFNR, rFed 및 rUdhA의 추가에 의해 NADPH의 생산량의 증가하고, 이러한 NADPH는 rUdhA에 의해 NAPH로 전환된 결과이다.

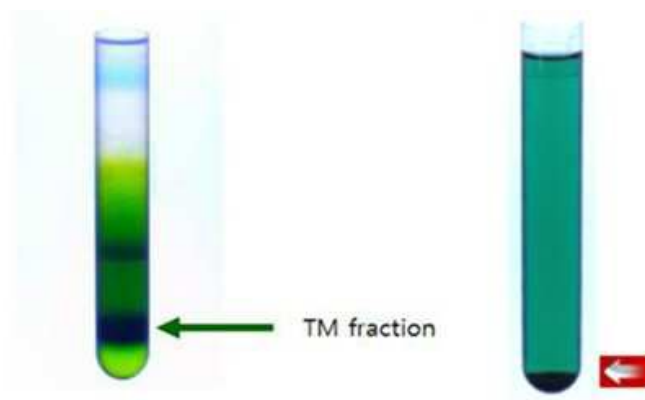
[0089] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다. 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

도면1a



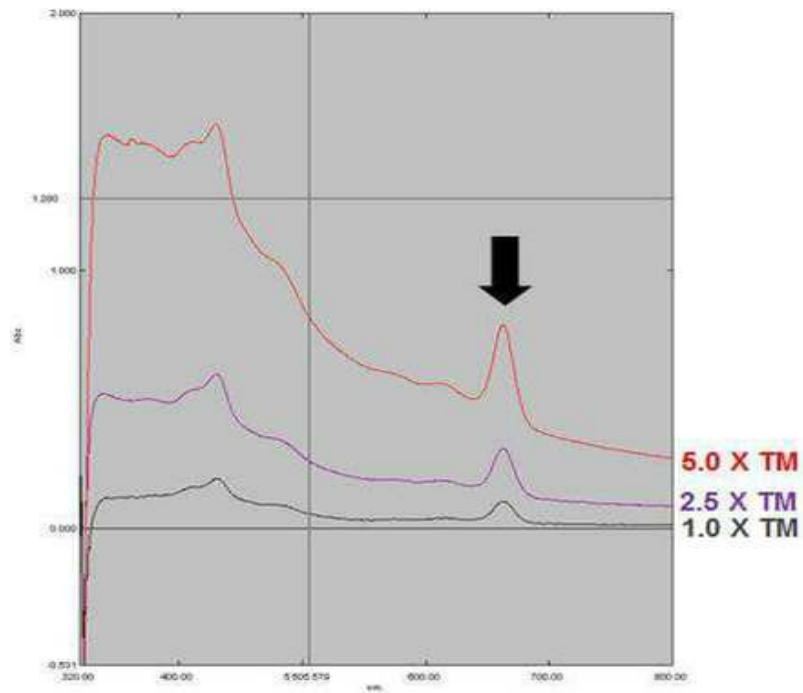
도면1b



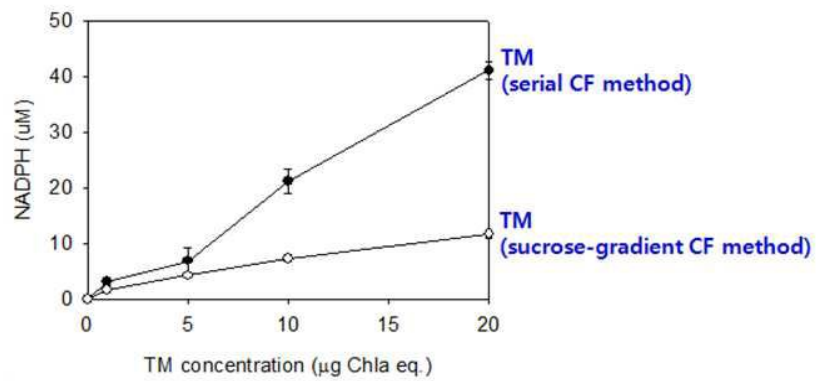
도면1c



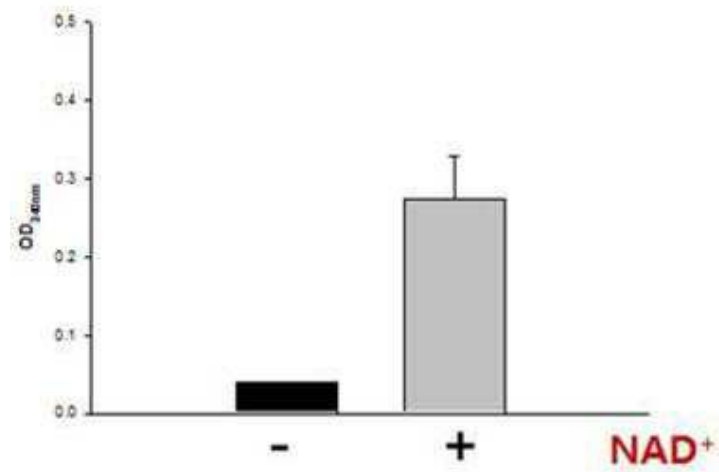
도면2



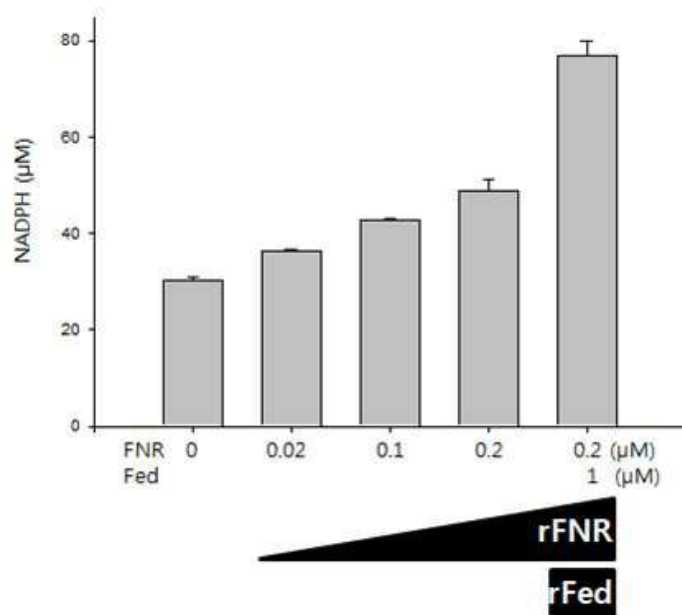
도면3a



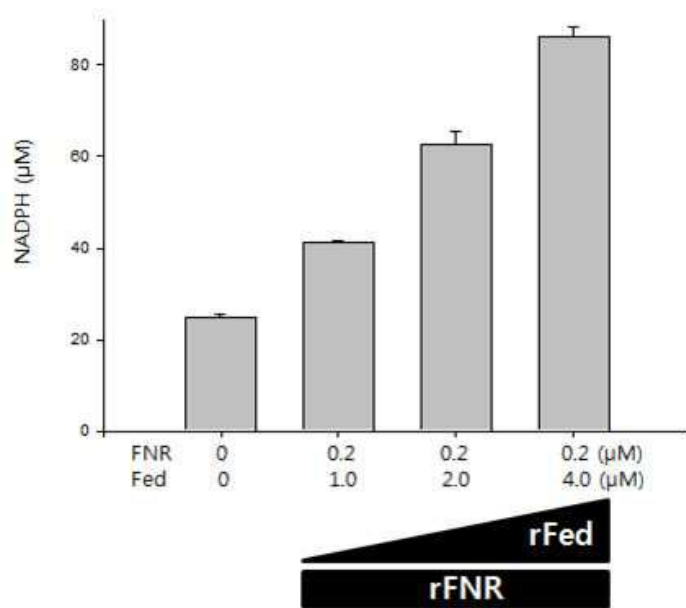
도면3b



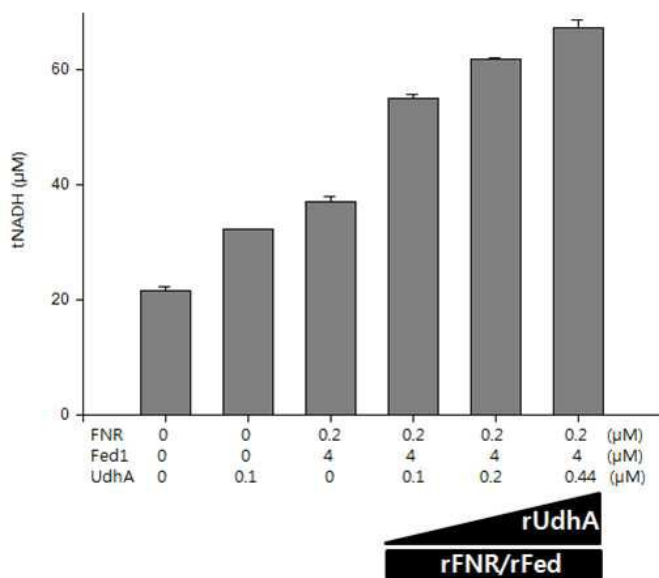
도면3c



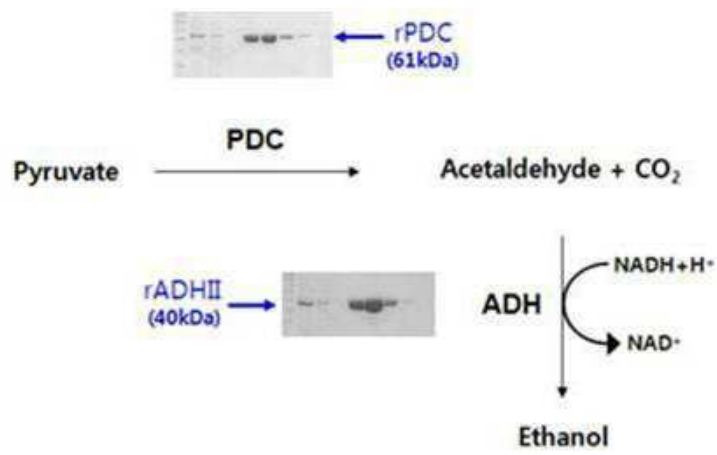
도면3d



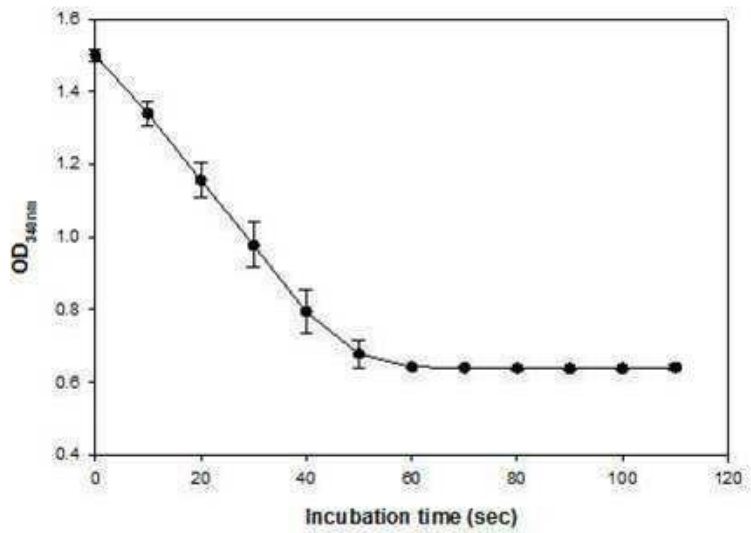
도면3e



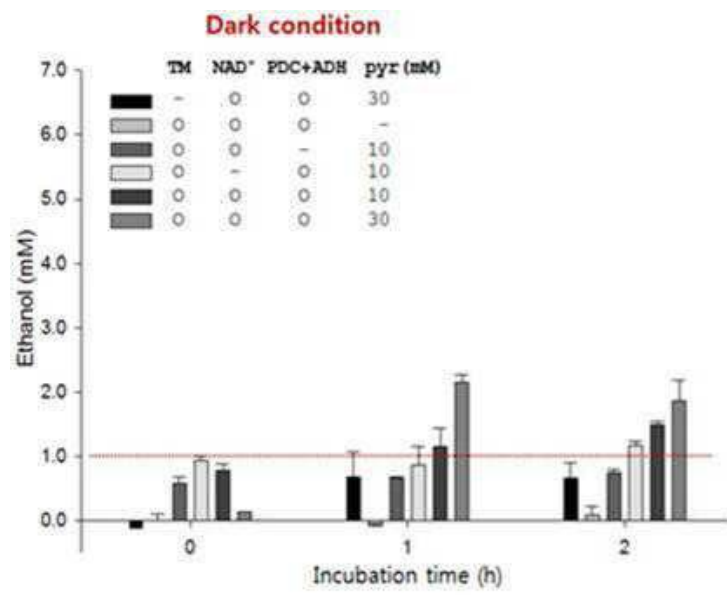
도면4a



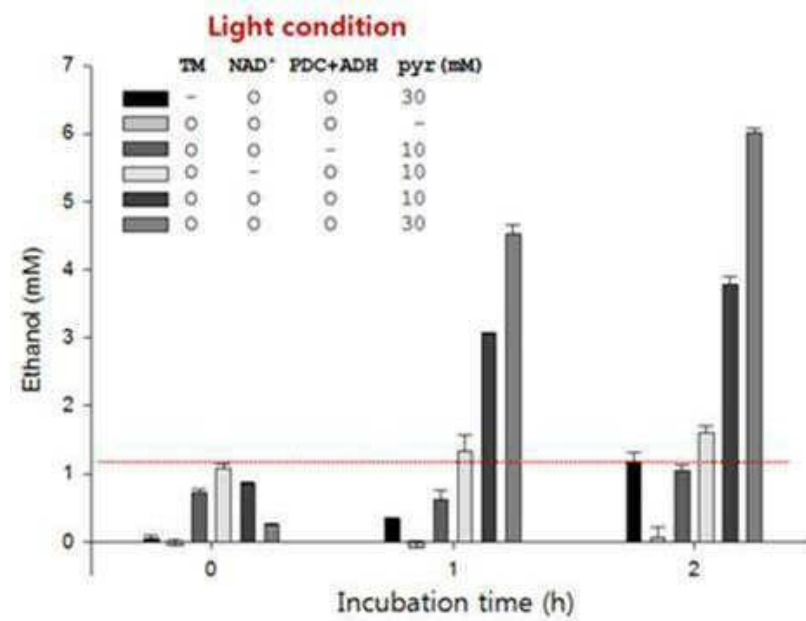
도면4b



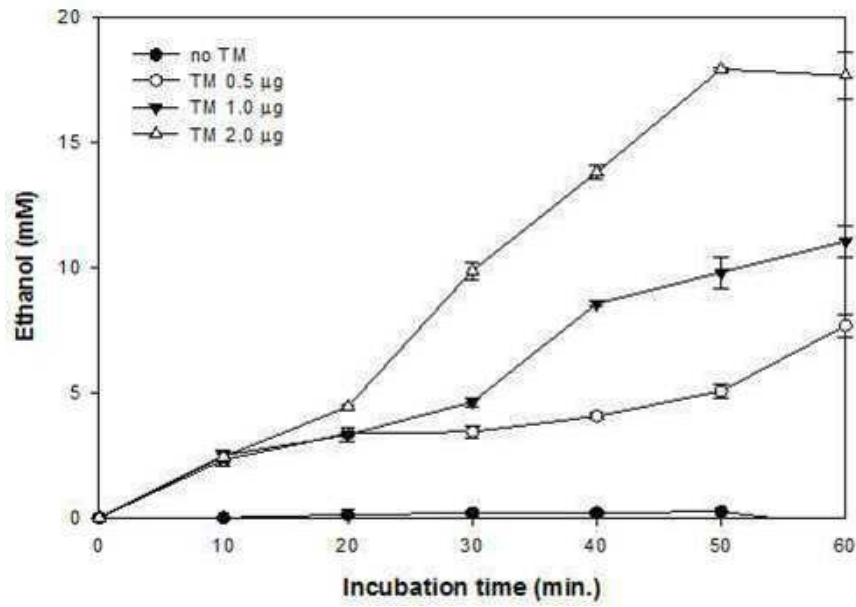
도면5a



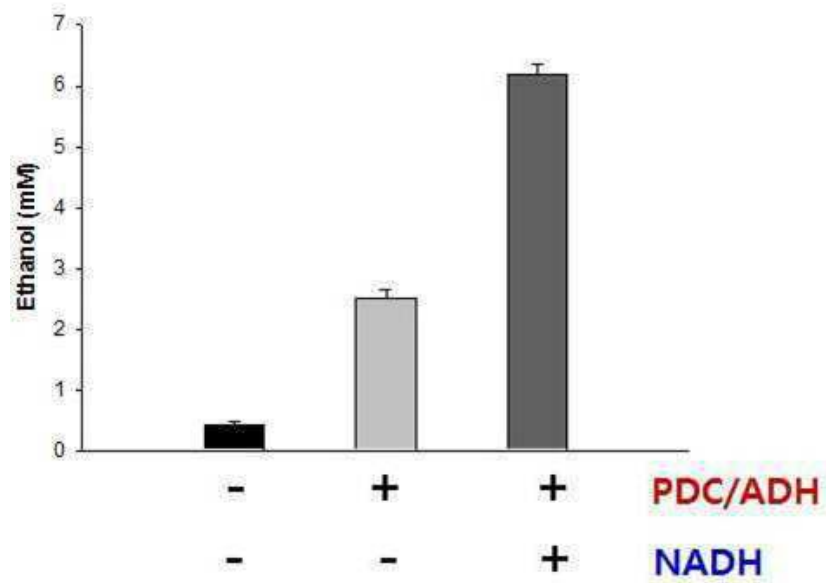
도면5b



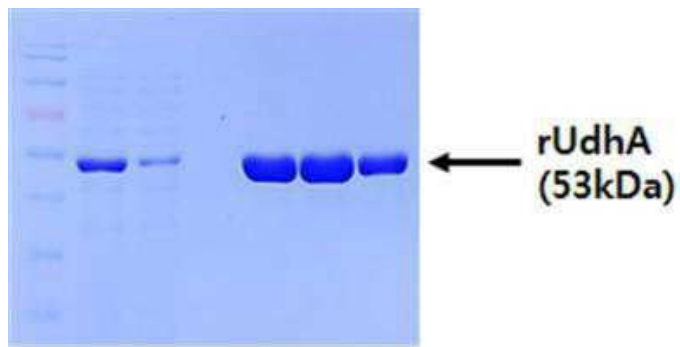
도면6



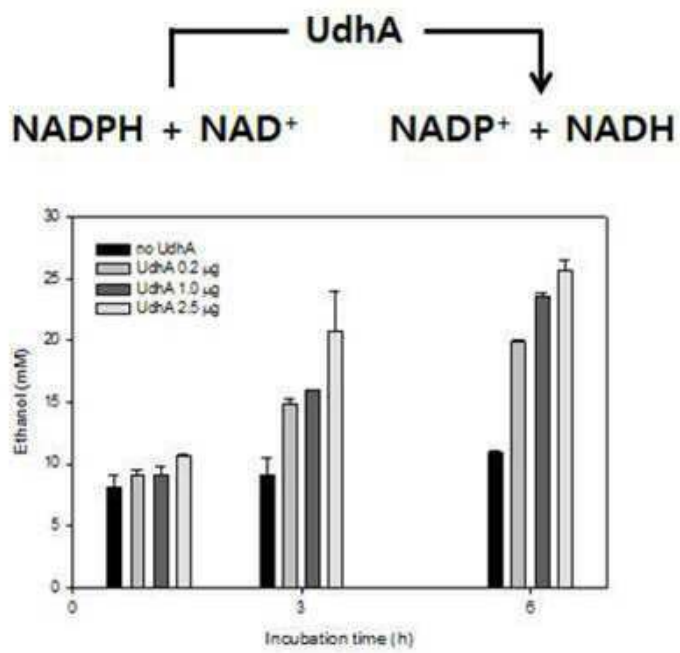
도면7



도면8a



도면8b



도면8c

