

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 17일 (17.11.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/182386 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12P 7/24 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005085
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 13일 (13.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0067557 2015년 5월 14일 (14.05.2015) KR
- (71) 출원인: 재단법인 지능형 바이오 시스템 설계 및 합성 연구단 (INTELLIGENT SYNTHETIC BIOLOGY CENTER) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, 401호, Daejeon (KR). 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 정기준 (JEONG, Ki Jun); 34121 대전시 유성구 문지로 141동 304호, Daejeon (KR). 김선창 (KIM, Sun Chang); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 방현배 (BANG, Hyun Bae); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이윤혁 (LEE, Yoon Hyeok); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 정석채 (JUNG, Suk Chae); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

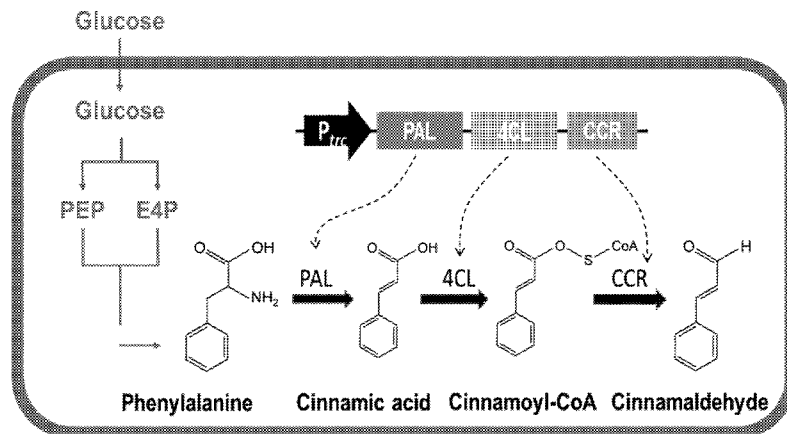
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING CINNAMALDEHYDE

(54) 발명의 명칭 : 신남알데하이드의 제조 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing cinnamaldehyde by using a recombinant microorganism.

(57) 요약서: 본 발명은 제조합 미생물을 이용한 신남알데하이드의 제조방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 신남알데하이드의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 재조합 미생물을 이용한 신남알데하이드의 제조방법(A method for production of cinnamaldehyde)에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신남알데하이드는 계피의 향과 맛을 나타내는 주요 성분으로, 계피 정유의 90%를 차지한다. 주로 계피유 또는 카시아유에 진한 아황산수소나트륨 용액을 첨가한 후, 생성되는 첨가물을 분리하여 에탄올로 세척하고, 묶은 황산 또는 탄산나트륨 수용액에서 분해하여 수증기 증류 후 진공 증류하여 제조한다. 또는 벤즈알데히드, 물, 수산화나트륨의 혼합물을 휘저으면서 아세트알데히드를 방울방울로 떨어뜨려 반응시켜 벤젠으로 추출하고, 감압 하에 분별 증류하여 제조한다.
- [3] 신남알데하이드는 다양한 용도에 사용되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 2003-0033282 는 신남알데하이드의 항산화활성에 대하여 기재하고 있고, 한국등록특허 10-0683113는 신남알데하이드의 비만 치료 효과에 대하여 기재하고 있다. 한국공개특허 2013-0038000는 계피로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드의 B형 간염 치료 효과에 대하여 기재하고 있다.
- [4] 이와 같이 다양한 유용한 효과가 알려진 신남알데하이드를 효과적으로 생산하기 위한 방법이 연구될 필요가 있다. 한국등록특허 10-0624236은 벤즈알데하이드 유도체와 바이닐아세테이트를 탄산칼륨과 물 존재 하에서, 아세트니트릴 용매 중에서 가열, 환류시켜 신남알데하이드 유도체를 제조하는 방법에 대하여 기재하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신남알데하이드를 효율적으로 생산하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 스트렙토마이세스 마리티무스 유래의 pal 유전자, 스트렙토마이세스 실리칼라 유래의 4cl 유전자, 및 애기장대 유래의 ccr 유전자를 포함하는 재조합 균주를 이용하여 신남알데하이드를 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 주된 목적은 스트렙토마이세스 마리티무스(*Streptomyces maritimus*) 유래의 pal (phenylalanine ammonia lyase) 유전자, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 유래의 4cl (4-coumarate:CoA ligase) 유전자, 및 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 ccr (cinnamoyl Co-A reductase) 유전자를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 발현 카세트를 제공하는 것이다.

- [7] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 카세트를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 벡터를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 신남알데하이드 생산용 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 신남알데하이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [10] 본 발명에 따른 신남알데하이드 생산용 발현 카세트, 이를 포함하는 벡터, 이를 포함하는 형질전환체, 및 이를 이용한 신남알데하이드의 제조방법을 이용할 경우 우수한 효율로 신남알데하이드를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 신남알데하이드 생산 시스템에 대한 모식도를 나타낸 것이다.
- [12] 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 사용된 PAL, 4CL, CCR의 발현을 위하여 구축한 플라스미드를 나타낸 것이다.
- [13] 도 3은 정제된 PAL, 4CL, CCR 단백질을 SDS-PAGE로 정량하여 나타낸 것이다.
- [14] 도 4는 최종적으로 생성된 신남산(cinnamate, CA)의 농도를, 도 5는 신남알데하이드(cinnamaldehyde, CAD)의 농도를 정량하여 나타낸 것이다.
- [15] 도 6은 복합 배지 1에서 형질전환체를 배양한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD600; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸 것이다.
- [16] 도 7은 복합 배지 2에서 형질전환체를 배양한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD600; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸 것이다.
- [17] 도 8은 제한 배지 1에서 형질전환체를 배양한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD600; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸 것이다.
- [18] 도 9는 제한 배지 2에서 형질전환체를 배양한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD600; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 신남알데하이드 생합성 유전자를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 발현 카세트, 이를 포함하는 벡터, 이를 포함하는 형질전환체, 또는 이를 이용한 신남알데하이드의 제조방법을 제공한다.
- [20] 본 발명자들은 신남알데하이드 생합성 유전자인 pal (phenylalanine ammonia lyase) 유전자, 4cl (4-coumarate:CoA ligase) 유전자, 및 ccr (cinnamoyl Co-A

- reductase) 유전자를 도입한 미생물을 제조한 결과, 상기 미생물로부터 1.98 mg/L의 수율로 신남알데하이드를 생산할 수 있음을 확인하였다(도 6 내지 도 9).
- [21] 또한, 스트렙토마이세스 마리티무스 유래의 PAL, 스트렙토마이세스 실리칼라 유래의 4CL, 애기장대 유래의 CCR의 조합이 다른 미생물 유래의 유전자에 비하여 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다(도 4 및 도 5).
- [22]
- [23] 이하, 본 발명에서의 신남알데하이드 생산용 발현 카세트를 구체적으로 설명한다.
- [24]
- [25] 본 명세서에서, "신남알데하이드 생합성 유전자"는 pal (phenylalanine ammonia lyase) 유전자, 4cl (4-coumarate:CoA ligase) 유전자, 및 ccr (cinnamoyl Co-A reductase) 유전자를 의미한다.
- [26]
- [27] 상기 pal 유전자는 스트렙토마이세스 마리티무스(*Streptomyces maritimus*) 유래일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 스트렙토마이세스 마리티무스 유래의 PAL 효소는 애기장대 PAL 효소에 비하여 효소 활성이 우수함을 확인하였다(도 4).
- [28] 비제한적인 일 예로 상기 pal 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 19로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 pal 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 19로 표시되는 염기서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열로 표시되는 것일 수 있다. 상기 서열 중 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이된 서열 또한 이에 포함될 수 있음은 자명하다.
- [29] 비제한적인 일 예로 상기 pal 유전자는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 PAL 단백질을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 PAL 단백질은 페닐알라닌 암모니아 리아제 (phenylalanine ammonia lyase)의 활성을 가지는 한, 서열번호 2의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 PAL 단백질은 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 서열번호 2로 표시되는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 추가로 포함하는 펩타이드를 의미할 수 있다. 또한, 상기 PAL 단백질은 상기 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질을 의미할 수 있다.
- [30]
- [31] 상기 4cl 유전자는 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 유래일 수 있다.
- [32] 비제한적인 일 예로 상기 4cl 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을

포함하는 것일 수 있다. 상기 4cl 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열로 표시되는 것일 수 있다. 상기 서열 중 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이된 서열 또한 이에 포함될 수 있음은 자명하다.

- [33] 비제한적인 일 예로 상기 4cl 유전자는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 4CL 단백질을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 4CL 단백질은 4-coumarate:CoA ligase의 활성을 가지는 한, 서열번호 4의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 4CL 단백질은 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 서열번호 4로 표시되는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 추가로 포함하는 펩타이드를 의미할 수 있다. 또한, 상기 4CL 단백질은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질을 의미할 수 있다.

[34]

- [35] 상기 ccr 유전자는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래일 수 있다.

- [36] 비제한적인 일 예로 상기 ccr 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 ccr 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열로 표시되는 것일 수 있다. 상기 서열 중 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이된 서열 또한 이에 포함될 수 있음은 자명하다.

- [37] 비제한적인 일 예로 상기 ccr 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 CCR 단백질을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 CCR 단백질은 cinnamoyl Co-A reductase의 활성을 가지는 한, 서열번호 6의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 CCR 단백질은 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 추가로 포함하는 펩타이드를 의미할 수 있다. 또한, 상기 CCR 단백질은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질을 의미할 수 있다.

[38]

- [39] 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수

있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등에 의해서 제조할 수도 있다.

[40]

[41] 본 발명의 일 실시예에서, 스트렙토마이세스 실리칼라 유래의 4CL과 애기장대 유래의 CCR의 조합을 사용할 경우, 애기장대 유래의 4CL과 애기장대 유래의 CCR의 조합에 비하여 효소 활성이 우수함을 확인하였다(도 5).

[42]

[43] 본 명세서에서 서열과 관련하여 사용된 용어, "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0를 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고(Sambrook et al., 1989, *Infra*), 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.

[44]

[45] 상기 유전자는 형질전환체에 코돈 최적화된 것일 수 있다. 상기 코돈 최적화는, 숙주에서의 상기 유전자의 발현을 보다 효율적으로 하기 위하여 유전자의 코돈을 상기 숙주 유전자에서 높은 빈도로 사용되는 코돈으로 치환하는 것을 의미한다. 최적화를 위한 방법은 당업계에서 형질전환체에서의 단백질 발현을 증가시키기 위하여 사용되는 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있다.

[46]

[47] 본 명세서에서, "발현 카세트"는 신남알데하이드 생합성 유전자를 포함하고 있어서 신남알데하이드를 발현시킬 수 있는 단위 카세트를 의미한다. 또한, 본 발명에서 발현 카세트는 발현구조체와 혼용될 수 있다. 본 발명에 따른 발현 카세트는 본 발명의 목적 상, 균주에 도입되어 신남알데하이드를 생산할 수 있다.

[48]

[49] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 발현 카세트를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 벡터를 제공한다.

[50]

[51] 본 명세서에서, "벡터" 또는 "발현 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를

코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [52] 상기 벡터는 상기 신남알데하이드 생합성 유전자가 작동가능하게 연결되어 포함된 것일 수 있다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [53] 본 발명에서 사용되는 발현 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pET계, pTrc계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계, pMAL계 또는 pHT계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 구체적으로는 pET22b, pTrc99a, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pMAL-p2x 또는 pHT43 벡터 등을 사용할 수 있다.
- [54] 본 발명의 벡터는 상동재조합을 일으켜서 염색체 내로 삽입될 수 있으므로 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다.
- [55] 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 포함될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [56] 아울러, 상기 발현벡터는 신남알데하이드의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩타이아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로

포함할 수 있다. 상기 태그(tag)란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트랩타비딘태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.

[57] 벡터를 제조하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법이라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[58]

[59] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 신남알데하이드 생산용 형질전환체를 제공한다.

[60] 본 발명에서, "생산"이란 신남알데하이드를 균주 내에서 만들어내는 것뿐만 아니라, 신남알데하이드를 세포 밖, 예컨대 배양액으로 배출하는 것 역시 포함하는 개념이다.

[61] 본 명세서에서, "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미할 수 있다.

[62] 상기 형질전환의 방법은 당업계에 알려진 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있는데, 신남알데하이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[63] 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 무관하다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다.

[64] 상기 형질전환체로 사용할 수 있는 미생물은 에스케리치아 속(*Escherichia* sp.), 시겔라 속(*Shigella* sp.), 시트로박터 속(*Citrobacter* sp.), 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 엔테로박터 속(*Enterobacter* sp.), 예시니아 속(*Yersinia* sp.), 크렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.), 어위니아 속(*Erwinia* sp.), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*

sp.), 브레비박테리움 속(*Brevibacterium* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 셀레노모나스 속(*Selenomonas* sp.), 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토마이시스 속(*Streptomyces* sp.), 아카노박테리아 속(*Arcanobacterium* sp.), 알칼리젠 속(*Alcaligenes* sp) 등에 속하는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로 에스케리치아 속 미생물일 수 있다.

[65]

[66] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는, 신남알데하이드의 제조방법을 제공한다.

[67] 본 발명의 구체적인 일 실시양태에서는, 상기 신남알데하이드 생산능을 보유한 형질전환체를 배양한 다음, 그 배양물에 포함된 신남알데하이드 생산량을 측정된 결과, 상기 미생물로부터 1.98 mg/L의 수율로 신남알데하이드를 생산할 수 있음을 확인하였다(도 6 내지 도 8).

[68] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 신남알데하이드를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다.

[69] 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH(예컨대, pH 5 내지 9, 바람직하게는 pH 6 내지 8, 가장 바람직하게는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있으며, 배양온도는 20 내지 45, 바람직하게는 25 내지 40를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양함이 바람직하다.

[70] 상기 배양을 위하여 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족시킬 수 있다.

[71] 사용될 수 있는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[72] 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[73] 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유

염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[74] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[75] 본 명세서에서 상기 배지는 배양액과 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[76]

[77] 일 예로 상기 제조방법은 배양된 형질전환체 또는 그의 배양물로부터 신남알데하이드를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[78] 본 명세서에서, "배양물"은 미생물 배양 결과 얻어지는 물질로, 상기 배지, 배양되는 미생물, 및 배양되는 미생물로부터 분비되는 물질을 모두 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어 균체를 배양하기 위해 필요한 영양 공급원, 예를 들어 탄소원, 질소원 등 이외에 무기염 성분, 아미노산, 비타민, 핵산 및/또는 기타 일반적으로 배양 배지(또는 배양액)에 함유될 수 있는 성분들이 포함되어 있을 수 있다. 또한 예를 들어 균체가 생산·분비한 효소 등이 포함되어 있을 수 있다.

[79] 배양에 의하여 생산된 신남알데하이드는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있으므로, 상기 배양물은 미생물 배양에 의하여 생산된 신남알데하이드를 포함할 수 있다.

[80] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 신남알데하이드를 회수하는 방법은 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 신남알데하이드를 수집할 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 예를 들어, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.

[81]

[82] 일 예로 상기 제조방법은 상기 회수된 신남알데하이드를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 정제단계는 면역친화성 크로마토그래피, 수용체친화성 크로마토그래피, 소수성 작용 크로마토그래피, 렉틴 친화성 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 역상 HPLC 등을 포함하는 종래의 크로마토그래피 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 원하는 단백질이 특이적 태그, 라벨 또는 킬레이트 모이어티를 가지는 융합 단백질이어서 특이적 결합 파트너 또는 제제에 의해 인식하여 정제하는 방법이 있다. 정제된 단백질은 원하는 단백질 부분으로 절단되거나 그 자체로 남아있을

수 있다. 융합 단백질의 절단으로 절단 과정에서 부가적인 아미노산을 가지는 원하는 단백질 형태가 만들어질 수 있다.

[83]

[84] 일 예로, 상기 형질전환체는 페닐알라닌을 포함하는 배지에서 배양되는 것일 수 있다. 상기 형질전환체에 포함된 *pal* 유전자는 페닐알라닌을 기질로 사용하므로, 페닐알라닌을 포함하는 배지에서 배양할 경우 우수한 효율로 신남알데하이드를 생산할 수 있다.

[85]

[86] 일 예로, 상기 형질전환체는 카사미노산(*casamino acid*)을 포함하는 배지에서 배양되는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 신남알데하이드 생합성 유전자를 포함하는 형질전환체를 카사미노산을 포함하는 배지에서 배양한 결과 최고 생산 수율이 1.98 mg/L로 높게 나타난 반면, 카사미노산을 포함하지 않은 배지에서 배양한 결과 최고 생산 수율은 1.23 mg/L로 나타났다.

[87]

발명의 실시를 위한 형태

[88] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[89]

[90] 실시예 1. 재조합 유전자 발현을 위한 균주 및 플라스미드 제작

[91]

[92] 먼저, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) cDNA로부터 하기 표 1에 기재된 서열의 BHB 22-F 및 BHB 22-R, BHB 20-F 및 BHB 20-R, BHB 19-F 및 BHB 19-R를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 *pal*(phenylalanine ammonia-lyase, 서열번호 17), *4cl*(4-coumarate:CoA ligase, 서열번호 18), *ccr*(cinnamoyl-CoA reductase, 서열번호 5) 유전자를 얻었다.

[93]

또한, 코돈 최적화되어 합성한 스트렙토마이세스 마리티무스(*Streptomyces maritimus*) *pal* 유전자로부터 하기 표 1에 기재된 서열의 BHB 31-F 및 BHB 31-R를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 *pal* 유전자(서열번호 19)를 얻었다. 또한, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 유전체 DNA (genomic DNA)로부터 하기 표 1에 기재된 서열의 BHB 21-F 및 BHB 21-R을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 *4cl* 유전자(서열번호 3)를 얻었다.

[94]

[95] [표 1]

BHB 19-F	GCATCTAGAAACACAAACAAGGAAGGAAGAT AAATGCACCACCACCACCACCACCACCACAT GCCAGTCGACGTAGCC	서열번호 7
BHB 19-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAAGACCCGATCTTAA TGCCATTTTC	서열번호 8
BHB 20-F	GCATCTAGACCGAAATCAAAAGGAACACCAA CGTATGCACCACCACCACCACCACCACCACA TGGCGCCACAAGAACAAG	서열번호 9
BHB 20-R	ATGCGCGGCCGCTTATCACAATCCATTTGCTA GTTTTGCCC	서열번호 10
BHB 21-F	GCATCTAGACGAATACCTGGAGGACCTAAAC AGTATGCACCACCACCACCACCACCACCACA TGTTCCGCAGCGAGTAC	서열번호 11
BHB 21-R	ATGCGCGGCCGCTTATCATCGCGGCTCCCTGA GCT	서열번호 12
BHB 22-F	GCATCTAGACACCTTAAGGAGGTCTATCTTTC ATATGCACCACCACCACCACCACCACCACAT GGAGATTAACGGGGGCAC	서열번호 13
BHB 22-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAACATATTGGAATG GGAGCTCC	서열번호 14
BHB 31-F	GCATTCTAGACCCAACGAAGGGGGAACCACA CAATATGCACCACCACCACCACCACCACCAC ACCTTCGTTATTGAACTGGATATGAATGTTAC CC	서열번호 15
BHB 31-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAGTGTGCTGCCACGG CTG	서열번호 16

[96]

[97] 각각의 중합효소 연쇄반응 산물들을 제한효소 XbaI과 HindIII로 절단하고, 하기 표 2 및 도 2에 기재된 각 벡터에 라이게이션 (ligation) 하였다.

[98]

[99] [표2]

Strain	Relevant Characteristics
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁺ λ -ilvG-rfb-50rph-1
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> W3110	F ⁺ λ -rph-1 INV(rrnD,rrnE)
<i>E. coli</i> NST74	<i>E. coli</i> W3110 derivative (<i>aroF aroG tyrR pheA pheAo</i>)
Plasmid	Relevant Characteristics
pET22b	Amp ^R , T7 promoter
pTrc99a	Amp ^R , <i>trc</i> promoter
pHB-I01	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> PAL
pHB-I02	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> 4CL
pHB-I03	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> CCR
pHB-I04	pET22b derivative, His ₈ -tagS. <i>maritimus</i> PAL
pHB-I05	pET22b derivative, His ₈ -tagS. <i>coelicolor</i> 4CL
pHB-P01	pTrc99a derivative, FLAG-tag S. <i>maritimus</i> PAL, His ₈ -tagS. <i>coelicolor</i> 4CL, and His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> CCR

[100]

[101] 라이게이션이 완료된 pHB-I01, pHB-I02, pHB-I03, pHB-I04, 또는 pHB-I05 박터는 대장균 균주 MG1655을 거쳐 최종적으로 BL21(DE3)에 형질전환 시켰다. pHB-P01 박터는 대장균 균주 NST74에 형질전환 시켰다.

[102]

[103] 실시예 2. PAL, 4CL, CCR 단백질의 분리 정제

[104]

[105] 대장균 균주 BL21(DE3)과 NST74 균주를 2% 포도당과 100 μ g/mL 암피실린(ampicillin)을 포함하는 LB (Luria-Bertani) 배지에 접종하였다. 이를 37°C, 200 rpm 조건으로 12시간 동안 배양한 후, 신선한 LB 배지에 1/100 부피만큼 옮겼다. 그 후 동일한 조건으로 OD₆₀₀이 0.6에 도달할 때까지 배양하였다.

[106] 그 후 BL21(DE3) 균주는 단백질의 생산을 위해 25°C, 200 rpm 조건으로 30분 간 적응시킨 후 1 mM의 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)을 첨가하고 6시간 동안 추가로 배양하였다. 한편 NST74 균주는 37°C, 200 rpm 조건에서 1 mM IPTG를 첨가한 후 배양하였다.

[107] 그 후, 상기 배양액을 4°C, 6000 rpm 조건으로 10분 동안 원심분리하고

상등액을 제거하였다. 이를 버퍼(50 mM potassium phosphate, 300 mM sodium chloride, pH 7.0)로 재현탁(resuspension)하고, 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 파쇄하여 세포 현탁액을 얻었다. 이후 상기 세포 현탁액을 4°C, 10000 rpm 조건에서 10분 동안 원심분리하고, 수용성의 상층액 부분을 얻었다.

[108]

[109] 그 후, 상기 세포 현탁액으로부터 IMAC (immobilized metal affinity chromatography)를 이용하여 8X 히스티딘 태그(Histidine tag)를 지니고 있는 PAL, 4CL, CCR 단백질들을 정제하였다.

[110]

[111] 또한, 상기 수용성의 상층액 부분을 0.45 µm으로 필터링한 후, 바인딩 버퍼(binding buffer: 50 mM potassium phosphate, 300 mM sodium chloride, pH 7.0)로 전처리된 Talon® 금속 친화 수지에 가하였다. 이후, 상기 수지를 10 mL의 세척 버퍼(washing buffer: 50 mM potassium phosphate, 300 mM sodium chloride, 15 mM imidazole, pH 7.0)로 세척한 후, 1 mM의 일루션 버퍼(elution buffer: 50 mM potassium phosphate, 300 mM sodium chloride, 150 mM imidazole, pH 7.0)를 이용하여 최종적으로 단백질들을 정제하였다.

[112]

[113] 실험예 1. PAL, 4CL, CCR 단백질의 정량

[114]

[115] 상기 정제된 단백질을 12% (w/v) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용한 덴시토메트리 (densitometry) 방법과 BSA (bovine serum albumin)를 이용한 총 단백질 정량법을 통해 정량하여 도 3에 나타내었다.

[116]

[117] 도 3에서 레인 M은 단백질 크기 표시이고, 레인 1부터 3까지는 애기장대 PAL 효소의 전체(total) 부분, 수용성(soluble) 부분, 정제 후 용리(elution) 부분이고, 레인 4부터 6까지는 애기장대 4CL 효소의 total, soluble, 정제 후 elution, 레인 7부터 9까지는 애기장대 CCR 효소의 total, soluble, 정제 후 elution, 레인 10부터 12까지는 스트렙토마이세스 마리티무스 PAL 효소의 total, soluble, 정제 후 elution 부분, 그리고 레인 13부터 15까지는 스트렙토마이세스 실리칼라 4CL 효소의 total, soluble, 정제 후 elution 부분을 나타낸 것이다.

[118]

각 단백질의 크기는 애기장대 PAL은 78 kDa (solid arrow), 애기장대 4CL은 61kDa (dashed arrow), 애기장대 CCR은 37kDa (closed triangle), 스트렙토마이세스 마리티무스 PAL은 56kDa (open triangle), 스트렙토마이세스 실리칼라 4CL은 55kDa (open triangle)으로 나타나 PAL, 4CL, CCR 단백질이 각각 잘 생성되었음을 확인하였다.

[119]

[120] 실험예 2. 효소의 활성 분석

[121]

[122] 상기 실시예 2에서 정제한 PAL, 4CL, CCR 단백질들의 활성은 세포 외 반응을 통해 분석하였다.

[123] 우선, PAL의 활성 분석을 위하여 100 mM Tris-HCl, 0.2 mM 페닐알라닌, 정제한 PAL 효소 200 µg/mL를 반응시켰다. 또한, 4CL 및 CCR의 활성 분석을 위하여 400 mM Tris-HCl, 5 mM ATP, 5 mM 염화마그네슘 (magnesium chloride), 0.3 mM 코엔자임 A (Coenzyme A), 0.5 mM 트랜스-신남산(*trans*-cinnamate), 및 정제한 4CL 및 CCR 효소를 각각 50 µg/mL씩 반응시켰다.

[124] 상기 반응을 30 °C에서 1시간 동안 진행한 후, PAL 효소에 의해 생성된 신남산, 그리고 4CL과 CCR 효소에 의해 생성된 신남알데하이드(cinnamaldehyde)를 역상 고정능 액체 크로마토그래피 (reverse-phase high-performance liquid chromatography, reverse-phase HPLC)를 통해 분석하였다. 구체적으로, ZORBAX Eclipse AAA 컬럼 (150 X 4.6 mm; 3.5 µm; Agilent, CA, USA)에서, 이동상 A (mobile phase A)는 0.1% 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic acid), 이동상 B (mobile phase B)는 아세토나이트릴 (acetonitrile)을 사용하였다. 아세토나이트릴 (acetonitrile)의 비율은 처음 1분 간은 10%, 이후 9분 간 70%로 점차적으로 변경하였다. 컬럼의 온도는 40°C, 유속은 1 mL/min으로 고정하였다.

[125] 표준용액 (standard solution; 1, 10, 50, 100, 200 mg/L cinnamate와 0.41, 4.1, 41, 82, 136.7 mg/L cinnamaldehyde) 을 사용하여 표준곡선 (standard curve)을 작성하였으며, 이를 이용하여 최종적으로 생성된 신남산(cinnamate, 도 4에 CA로 표기)과 신남알데하이드(cinnamaldehyde, 도 5에 CAD로 표기)를 정량하였다.

[126]

[127] 그 결과, 도 4에 나타난 것과 같이, 애기장대 유래의 PAL에 비하여 스트렙토마이세스 마리티무스(*Streptomyces maritimus*) 유래의 PAL의 활성이 우수한 것으로 나타났다. 또한, 도 5에 나타난 것과 같이, 스트렙토마이세스 마리티무스 유래의 4CL과 애기장대 유래의 CCR의 조합을 사용할 경우, 애기장대 유래의 4CL과 애기장대 유래의 CCR의 조합에 비하여 효소 활성이 우수한 것으로 나타났다.

[128]

[129] 실험예 3. 세포 고농도 배양 (**High-cell density cultivation**)

[130]

[131] 먼저, R/2 semi-defined 배지 (6.75 g/L potassium dihydrogen phosphate, 2 g/L ammonium phosphate dibasic, 0.85 g/L citric acid, 0.7 g/L magnesium sulfate heptahydrate, 5 mL/L trace metal solution (TMS; 10 g/L iron sulfate heptahydrate, 2.2 g/L zinc sulfate heptahydrate, 2 g/L calcium chloride dehydrate, 1 g/L copper sulfate pentahydrate, 0.58 g/L manganese sulfate pentahydrate, 0.1 g/L ammonium heptamolybdate tetrahydrate, 0.02 g/L sodium tetraborate decahydrate, pH 6.8)에 적응된, pHB-P01을 포함하는 대장균 균주 NST74를 200 mL 양으로 37°C, 200

rpm에서 12시간 동안 배양하였다.

- [132] 그 후, 동일한 배지 1.8 L에 접종하여 총 2 L 양으로 5L 크기의 생물 반응기에서 고농도 배양하였다. pH가 6.77보다 낮아지는 경우에는 50% (v/v) 암모니아 (ammonia)를, 6.86보다 높아지는 경우에는 먹이 배지 (feeding solution)를 공급하였다. 먹이 배지로는 복합 배지 1 (complex feeding solution 1; 500 g/L glucose, 75 g/L yeast extract, 20 g/L magnesium sulfate heptahydrate), 복합 배지 2 (complex feeding solution 2; 500 g/L glucose, 100 g/L 카사미노산(casamino acid), 20 g/L magnesium sulfate heptahydrate), 제한 배지 1 (defined feeding solution; 700 g/L glucose, 20 g/L magnesium sulfate heptahydrate), 또는 제한 배지 2 (defined feeding solution; 500 g/L glucose, 20 g/L magnesium sulfate heptahydrate, 0.81 g/L phenylalanine)를 사용하였다.
- [133] 온도는 37°C로 유지시켰고, 용존 산소 (DO)는 휘저음 속도 (agitation rate)를 1000 rpm까지 상승시킨 후, 산소를 공급하여 40%로 유지시켰다. 광학 밀도(optical density, OD₆₀₀)가 60에 도달하게 되면, 단백질을 생성시키기 위하여 IPTG 1 mM를 공급하였다. 거품 억제제는 멸균 후 수동으로 공급하였다.
- [134] 배양한 대장균 균주는 시간대 별로 광학 밀도 (OD₆₀₀)가 4가 되도록 따로 모아두어 단백질 분석에 이용하였다. 배양액의 상등액은 0.22 µm 필터링 (filter)하여 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (reverse-phase HPLC) 분석을 통해 신남알데하이드 정량에 이용하였다.
- [135]
- [136] 도 6는 상기 먹이 배지로 복합 배지 1을 사용한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD₆₀₀; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸다. 최고 생산 수율은 1.23 mg/L로 나타났다.
- [137]
- [138] 도 7은 상기 먹이 배지로 복합 배지 2를 사용한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD₆₀₀; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸다. 최고 생산 수율은 1.98 mg/L로 나타났다.
- [139]
- [140] 도 8은 상기 먹이 배지로 제한 배지 1을 사용한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD₆₀₀; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸다. 최고 생산 수율은 0.71 mg/L로 나타났다.
- [141]
- [142] 도 9은 상기 먹이 배지로 제한 배지 2를 사용한 후, 시간대 별로 측정한 광학 밀도 (OD₆₀₀; open circle)와 이에 따른 신남알데하이드의 농도 (CAD con.; closed circle)를 나타낸다. 최고 생산 수율은 1.05 mg/L로 나타났다.
- [143]
- [144] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될

수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[145]

산업상 이용가능성

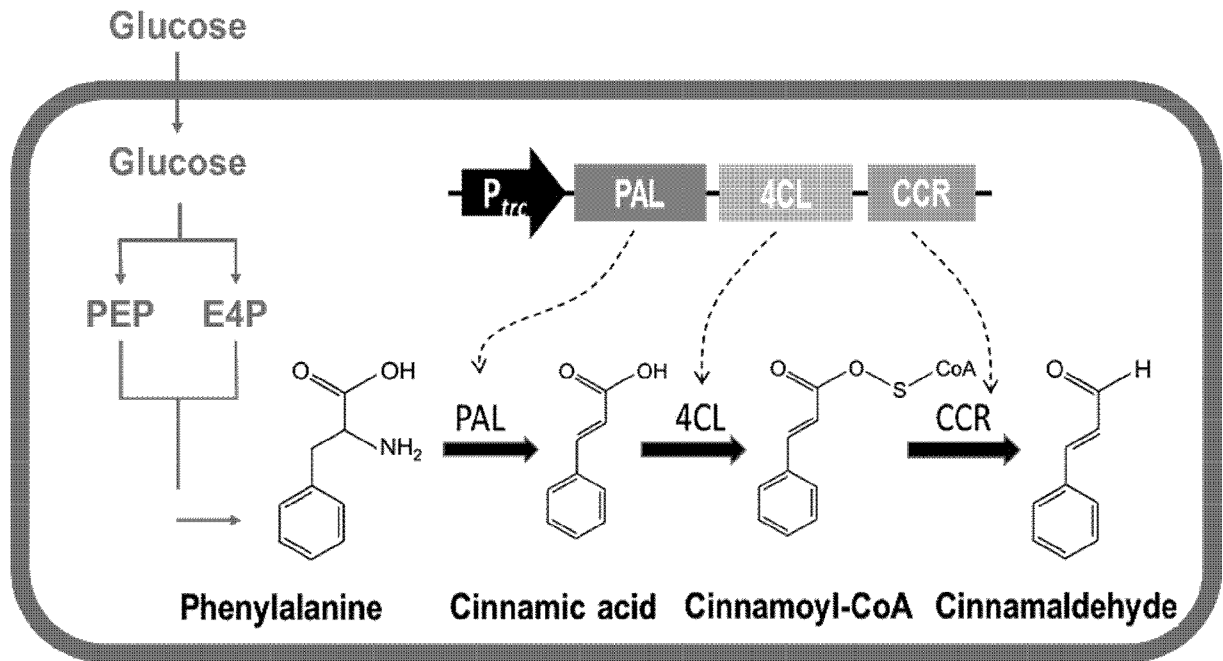
[146]

따라서 본 발명은 신남알데하이드 생산용 발현 카세트, 이를 포함하는 신남알데하이드 생산용 벡터, 이를 포함하는 신남알데하이드 생산용 형질전환체, 및 이를 이용한 신남알데하이드의 제조방법을 제공할 수 있다.

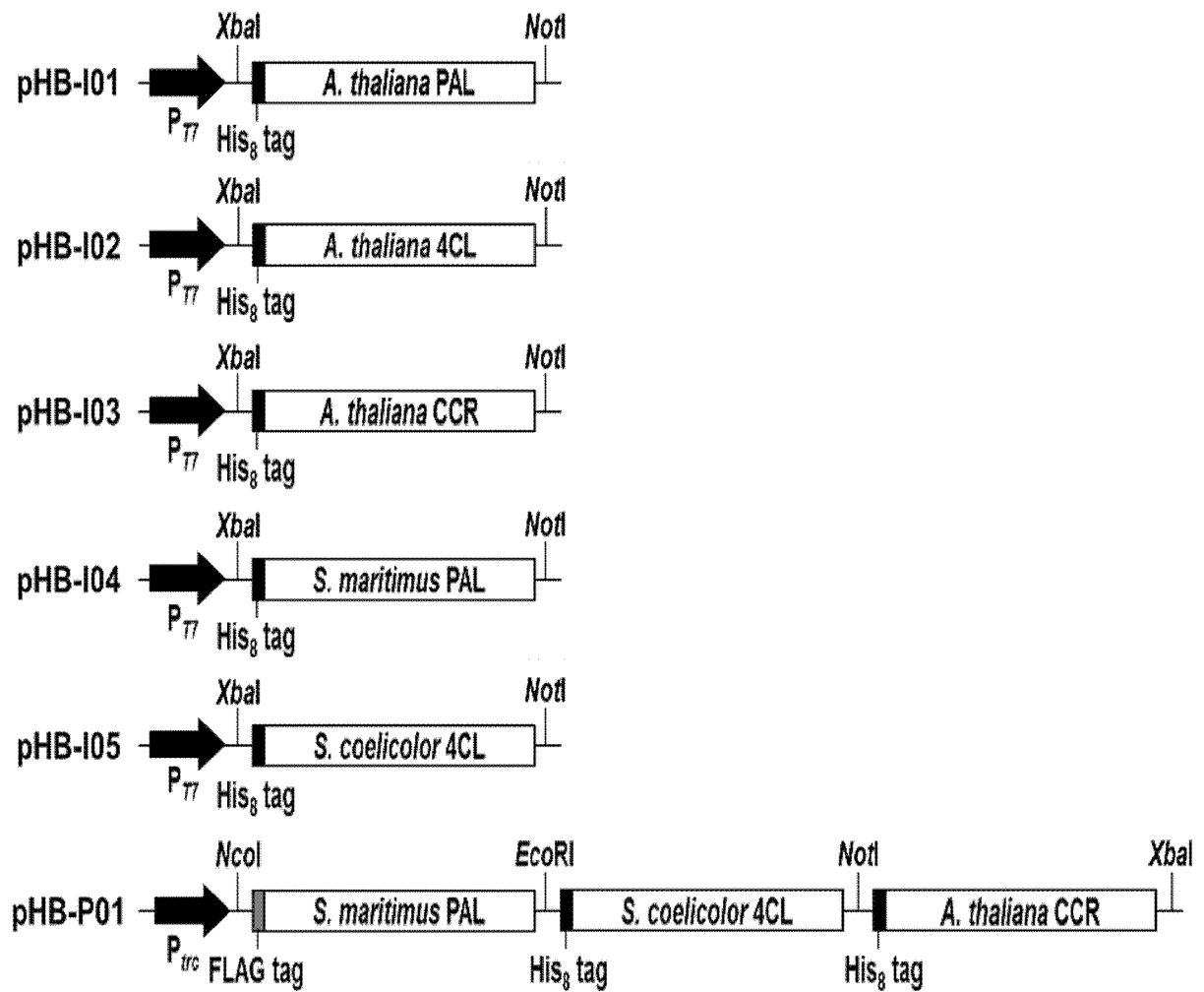
청구범위

- [청구항 1] 스트렙토마이세스 마리티무스(*Streptomyces maritimus*) 유래의 *pal* (phenylalanine ammonia lyase) 유전자, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomycescoelicolor*) 유래의 *4cl* (4-coumarate:CoA ligase) 유전자, 및 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 *ccr* (cinnamoyl Co-A reductase) 유전자를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 발현 카세트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 *pal* 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 19로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 *pal* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 *4cl* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 *4cl* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 *ccr* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 *ccr* 유전자는 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는, 신남알데하이드 생산용 벡터.
- [청구항 9] 제8항의 벡터를 포함하는 신남알데하이드 생산용 형질전환체.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 형질전환체는 에스케리치아(*Escherichia*) 속 미생물인 것인, 균주.
- [청구항 11] 제9항의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는, 신남알데하이드의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 형질전환체는 페닐알라닌을 포함하는 배지에서 배양되는 것인, 신남알데하이드의 제조방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 형질전환체는 카사미노산(casamino acid)을 포함하는 배지에서 배양되는 것인, 신남알데하이드의 제조방법.

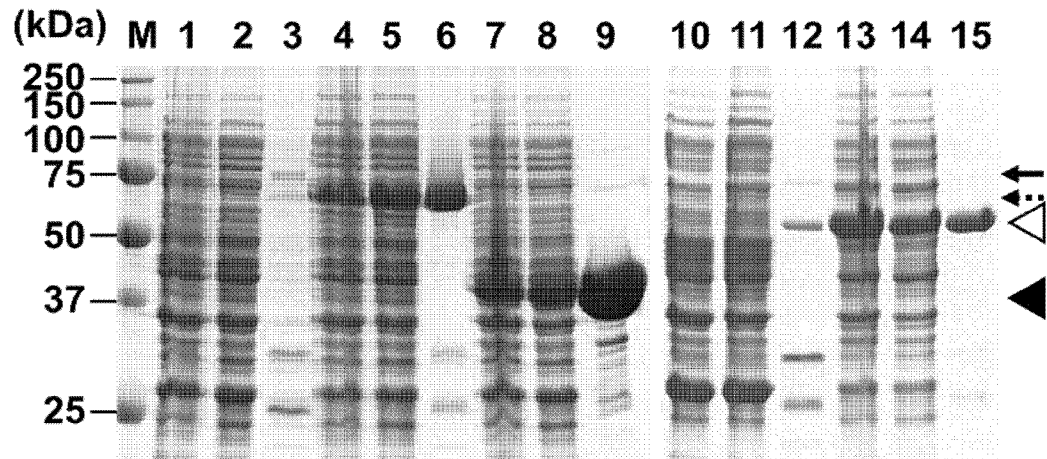
[도1]



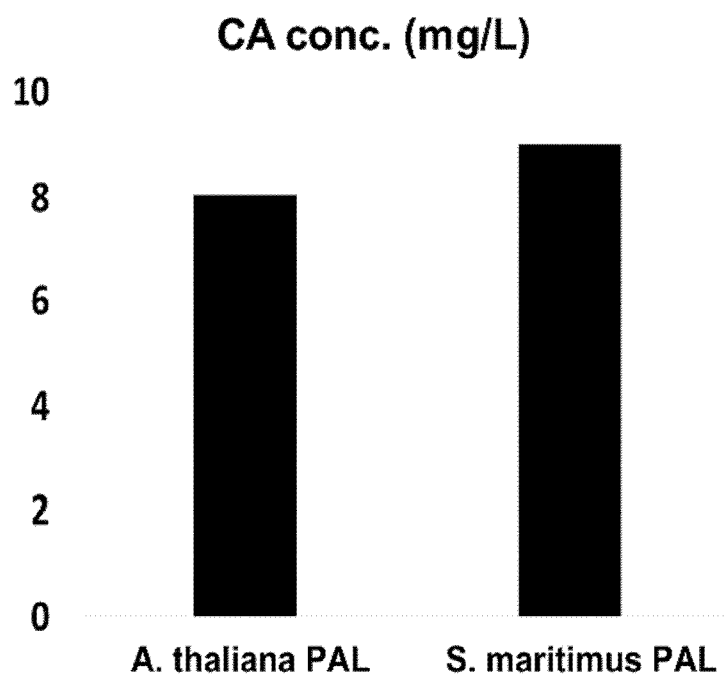
[도2]



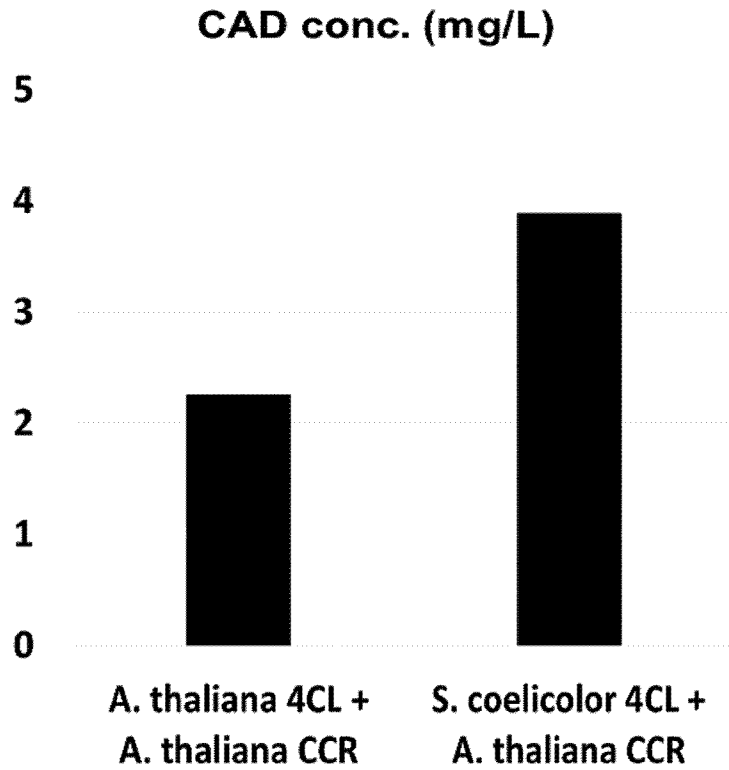
[도3]



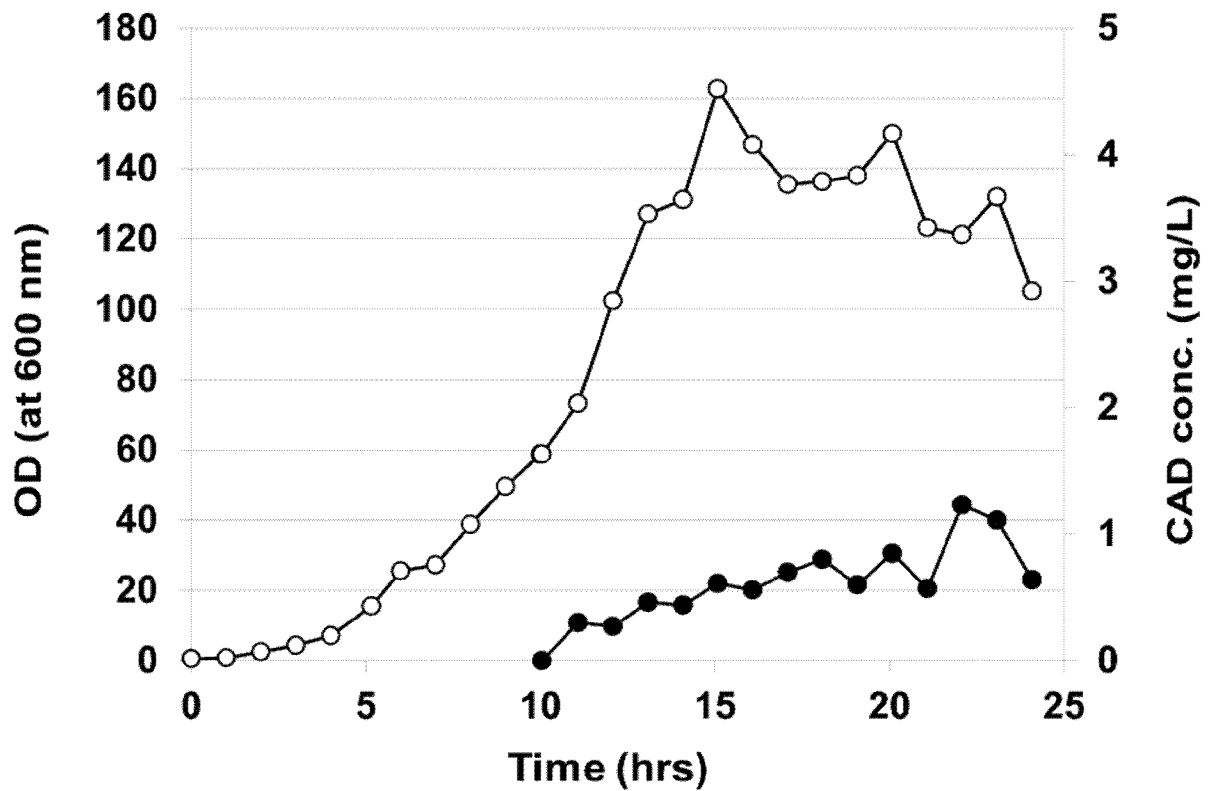
[도4]



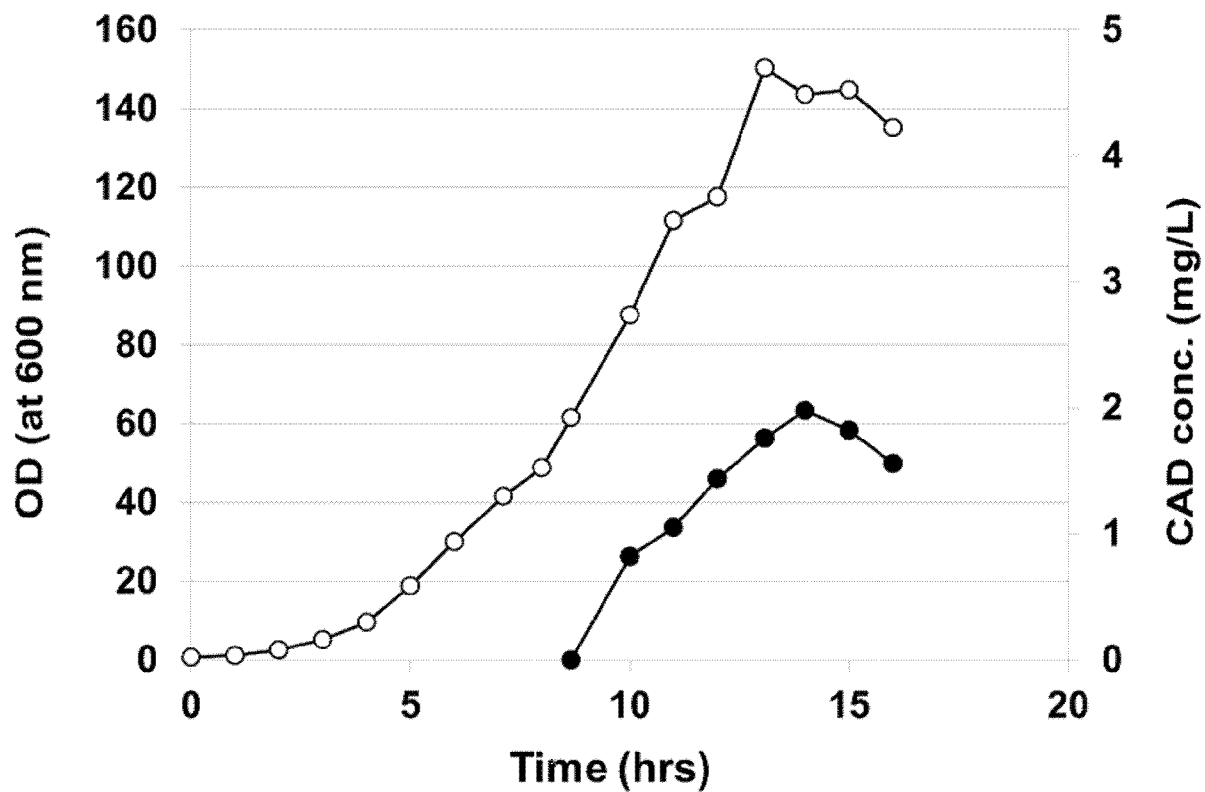
[도5]



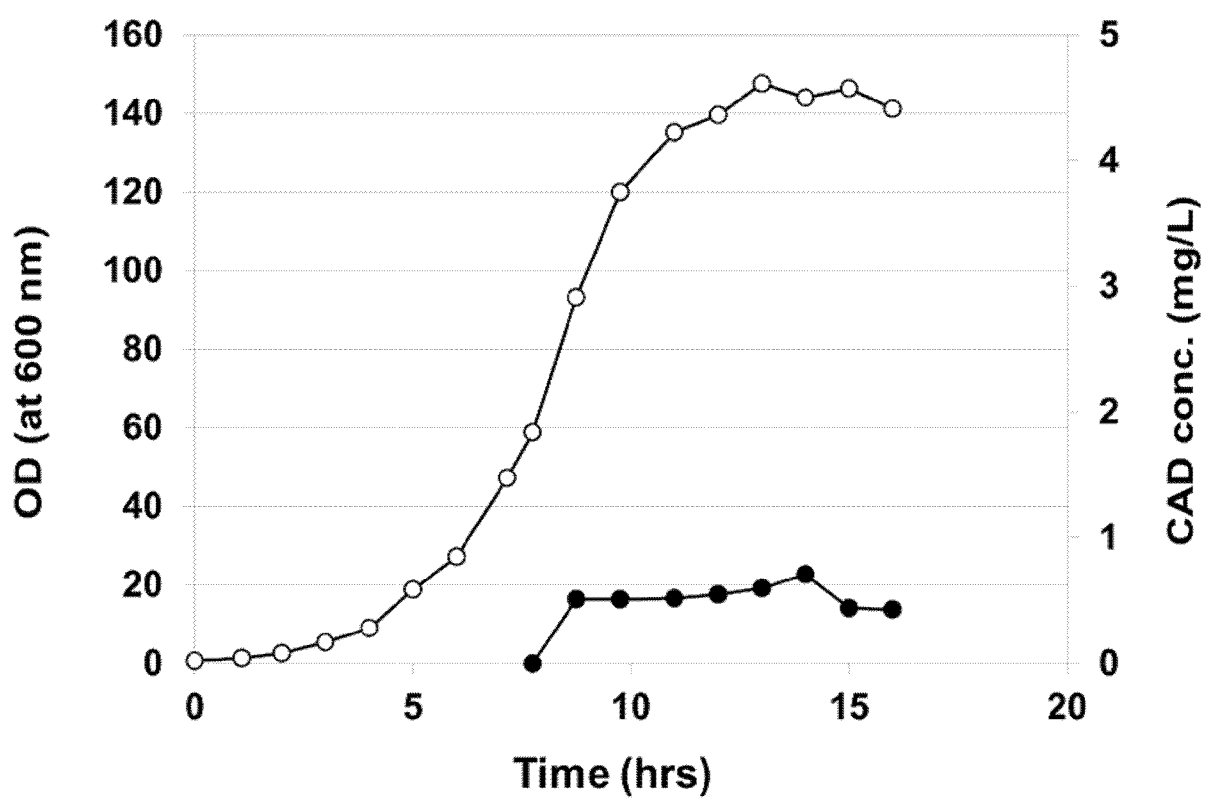
[도6]



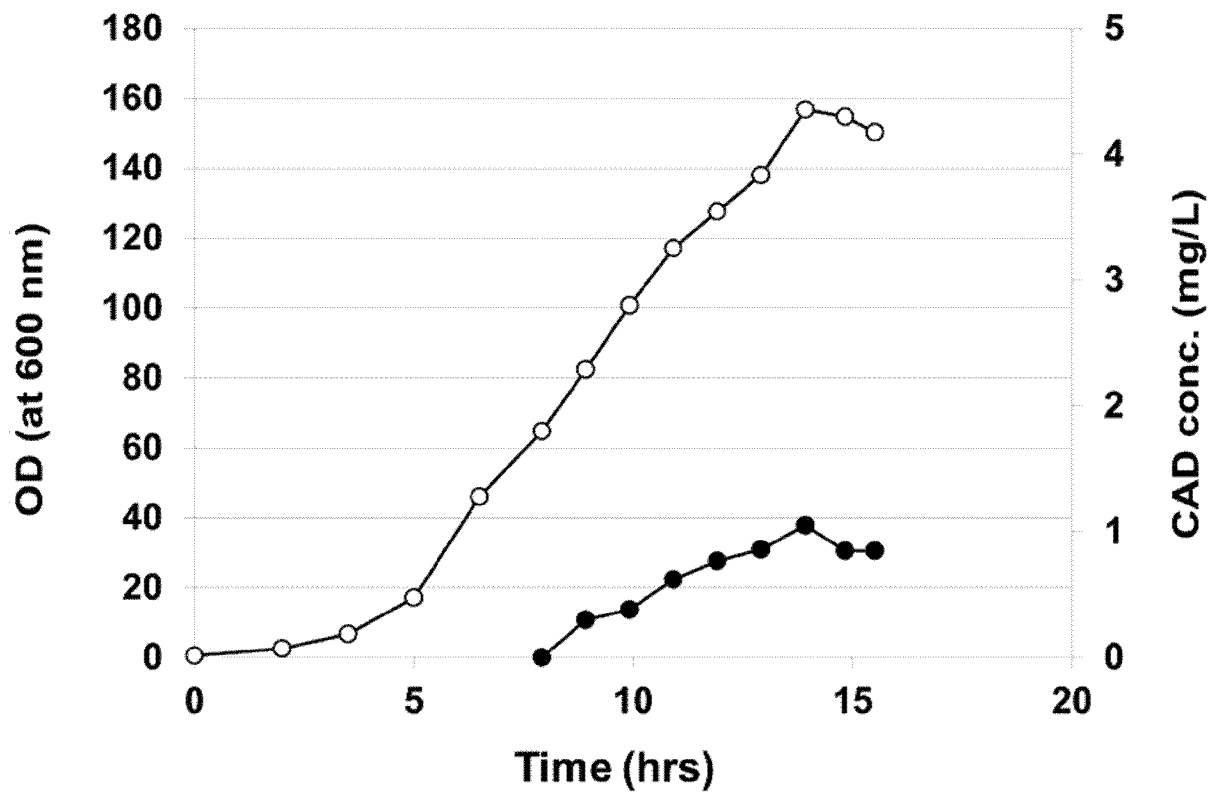
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12P 7/24(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63; C12P 7/24; C12R 1/19; C12N 15/70; C12N 9/02; C12N 9/88; C12N 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cinnamaldehyde, pal, 4cl, ccr

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HSU, Keng - Hao et al., "A Genetic Marker of 4-coumarate: Coenzyme A Ligase Gene in the Cinnamaldehyde-chemotype Cinnamomum Osmophloeum", <i>Holzforschung</i> , 19 April 2012, vol. 66, no. 7, pages 897-904 See abstract; page 898.	1-13
Y	CN 104498540 A (BEIJING FORESTRY UNIVERSITY et al.) 08 April 2015 See claim 1; figure 1; paragraph [0010]; abstract.	1-13
Y	GenBank Accession Number AF254925.1 (01 July 2002) See sequence.	2
Y	GenBank Accession Number AAF81735.1 (01 July 2002) See sequence.	3
Y	GenBank Accession Number AL939119.1 (06 February 2015) See sequence.	4
Y	NCBI Reference Sequence WP_011029620.1 (18 July 2013) See sequence.	5
Y	NCBI Reference Sequence NM_101463.3 (22 January 2014) See sequence.	6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 AUGUST 2016 (23.08.2016)

Date of mailing of the international search report

23 AUGUST 2016 (23.08.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005085

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NCBI Reference Sequence NP_173047.1 (22 January 2014) See sequence.	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104498540 A	08/04/2015	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)I, C12N 15/70(2006.01)I, C12N 9/02(2006.01)I, C12N 9/88(2006.01)I, C12N 9/00(2006.01)I, C12P 7/24(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; C12P 7/24; C12R 1/19; C12N 15/70; C12N 9/02; C12N 9/88; C12N 9/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 신남알데하이드, pal, 4cl, ccr

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	HSU, KENG-HAO 등, 'A genetic marker of 4-coumarate: coenzyme A ligase gene in the cinnamaldehyde-chemotype Cinnamomum osmophloeum', Holzforschung, 2012.04.19, 66권, 7호, 페이지 897-904 초록; 페이지 898 참조.	1-13
Y	CN 104498540 A (BEIJING FORESTRY UNIVERSITY 등) 2015.04.08 청구항 1; 도면 1; 단락 [0010]; 요약 참조.	1-13
Y	GenBank Accession Number AF254925.1 (2002.07.01) 서열 참조.	2
Y	GenBank Accession Number AAF81735.1 (2002.07.01) 서열 참조.	3
Y	GenBank Accession Number AL939119.1 (2015.02.06) 서열 참조.	4
Y	NCBI Reference Sequence WP_011029620.1 (2013.07.18) 서열 참조.	5
Y	NCBI Reference Sequence NM_101463.3 (2014.01.22) 서열 참조.	6

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 08월 23일 (23.08.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 08월 23일 (23.08.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

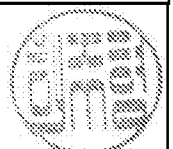
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	NCBI Reference Sequence NP_173047.1 (2014.01.22) 서열 참조.	7

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

CN 104498540 A

2015/04/08

없음