(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0172676
(43) 공개일자 2024년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01) *C12P 7/24* (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0030971
(22) 출원일자 2024년03월04일
심사청구일자 2024년03월04일
(30) 우선권주장
1020230069379 2023년05월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
박진병
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 신공학관 359호
김정선
광주광역시 북구 용봉로 77, 전남대학교 기초과학특성화과학관 A동 707호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

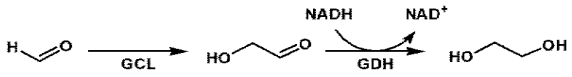
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이를 이용한 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 또는 에틸렌글리콜 제조 방법.**

(57) 요 약

본 발명은 고농도 에틸렌글리콜을 생산하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 포름알데히드를 출발물질로 하여 생체 촉매인 효소를 활용하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 효모를 이용한 포름알데히드로부터의 에틸린글리콜 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 7/18 (2013.01)
C12P 7/24 (2013.01)
C12Y 401/01047 (2013.01)
C12R 2001/865 (2021.05)

(72) 발명자
조혜진
경기도 부천시 중동로280번길 63, 608동 901호
천희진
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 신공학관 B163호
김준홍
광주광역시 북구 용봉로 77, 전남대학교 기초과학특성화과학관 A동 708호
김지원
광주광역시 북구 용봉로 77, 전남대학교 기초과학특성화과학관 A동 708호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1055001152
과제번호	2018M3D3A1A01055735
부처명	기획재정부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발
연구과제명	C1 가스 부가가치 증대를 위한 C-C 결합 생성용 생촉매 시스템 개발
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신규 GCL은 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매하여 글리콜알데히드를 생성하는 것을 특징으로 하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 2.9, 0.2, 69.0인 것을 특징으로 하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 신규 GCL의 KM, kcat 및 kcat/KM 값은 각각 5.6, 0.3, 57.1인 것을 특징으로 하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체.

청구항 5

서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물.

청구항 6

제1항의 신규 GCL을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자.

청구항 7

제6항의 신규 GCL을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 8

제7항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 9

제1항 내지 제4항의 신규 GCL, 제5항의 조성물 및 제8항의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계는 30 내지 60℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법.

청구항 11

포름알데히드와 GCL를 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 효

모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 첨가하는 제2단계;를 포함하는 에틸렌글리콜 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* iETS3인 것을 특징으로 하는, 에틸렌글리콜 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 효모는 에탄올에 대한 내성이 증가한 균주인 것을 특징으로 하는, 에틸렌글리콜 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 제1단계는 40 내지 60℃에서, 상기 제2단계는 20 내지 40℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 에틸렌글리콜 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 제2단계에서 효모를 첨가하면 상기 글리콜알데히드의 80 % 이상이 에틸렌글리콜로 전환되는 것을 특징으로 하는 에틸렌글리콜 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 글리콜알데히드 및 에틸렌글리콜을 생산하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 포름알데히드를 축합하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL)와 상기 GCL을 포함하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 효모를 이용하여 상기 조성물로부터 에틸렌글리콜을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 에틸렌글리콜은 많은 소비재에서 발견되는 산업용 화합물로, 섬유 산업에서 바이오플라스틱의 단량체, 화장품 산업, 제약 산업 등에서 널리 사용되고 있으나, 현재 상당한 CO_2 배출을 초래하는 에너지 집약적인 2단계 열촉매 공정을 통해 생산되는 등 제조 공정 중 다양한 문제가 야기되고 있다 (Nature Catalysis (2023) 6: 585-595). 대안으로 재생 가능한 전기로 구동되는 에틸렌의 전기 산화를 통한 지속 가능한 에틸렌 글리콜 생산이 있으나, 반응의 선택성이 낮다는 문제가 있다 (Nature Catalysis (2023) 6: 585-595).

[0003] 또 다른 방법으로 셀룰로스와 리그노셀룰로스와 같은 바이오매스의 촉매 수소화를 통해 에틸렌 글리콜을 생산하는 연구가 보고되고 있으나 (Chemical Engineering Journal (2023) 468: 143699), 1,2-Butanediol (BDO)과 같은 부산물이 생겨 정제 효율이 낮다는 문제가 있다.

[0004] 따라서, 포름알데히드와 같은 광범위한 산업 공정에서 중요한 C1 화합물로부터 에틸렌글리콜과 같은 고부가 소재를 고수율로 생성하는 친환경적인 시스템 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허번호 제10-2018-0126322호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 생성을 촉매하는 글리옥실레이트 카르볼리가제 (glyoxylae carboligase: GCL)와 글리콜알데히드를 알코올로 환원시키는 능력이 우수한 효모를 이용하여 고농도 에틸렌글리콜 제조 기술을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있는 GCL 및 이의 유도체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상술한 신규 GCL 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 보다 효과적으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있도록 유전자 조작을 통해 변경된 서열을 갖는 신규 GCL, 이를 코딩하는 핵산분자, 그 핵산분자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 GCL 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 조성물과 효모를 활용하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 에틸렌글리콜을 고수율로 생산하는 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적은 이상에서 언급된 목적으로 제한되지 않으며, 명시적으로 언급되지 않았더라도 후술되는 발명의 상세한 설명의 기재로부터 통상의 지식을 가진 자가 인식할 수 있는 발명의 목적 역시 당연히 포함될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체를 제공한다.

[0013] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 신규 GCL은 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매하여 글리콜알데히드를 생성하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 2.9 mM, 0.2 s^{-1}, 69 $M^{-1}s^{-1}$이다.

[0015] 바람직한 실시예에 있어서, 또 다른 상기 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 5.6 mM, 0.3 s^{-1}, 57.1 $M^{-1}s^{-1}$이다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 신규 GCL을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 신규 GCL을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은 포름알데히드 및 상술된 신규 GCL, 상술된 조성물 및 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법을 제공한다.

[0021] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 단계는 30 내지 50 ℃에서 수행된다.

[0022] 또한 본 발명은 포름알데히드 및 상술된 어느 하나의 신규 GCL를 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 첨가하는 제2단계를 포함하는 에틸렌글리콜 제조방법을 제공한다.

[0023] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* iETS3이다.

[0024] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 효모는 에탄올에 대한 내성이 증가한 균주이다 (Biotechnol. Bioeng. (2011) 108: 1776-1787).

[0025] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제1단계는 50 ℃에서, 상기 제2단계는 30 ℃에서 수행된다.

[0026] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제2단계에서 글리콜알데히드 반응물을 효모에 첨가하면 상기 제1단계에서 생성된 글리콜알데히드의 80 % 이상이 에틸렌글리콜로 전환된다.

발명의 효과

[0027] 상술된 본 발명의 글리콜알데히드 조성물은 GCL 및 이의 유도체를 포함하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 생성될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 신규 GCL은 포름알데히드에 대한 반응성이 보다 향상되도록 유전자 조작을 통해 변경된 서열을 갖고, 이를 코딩하는 핵산분자, 그 핵산분자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 제조방법은 GCL 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 조성물과 효모를 활용하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 에틸렌글리콜을 고수율로 생산할 수 있다.

[0030] 본 발명의 이러한 기술적 효과들은 이상에서 언급된 범위만으로 제한되지 않으며, 명시적으로 언급되지 않더라도 후술되는 발명의 실수를 위한 구체적 내용의 기재로부터 통상의 지식을 가진 자가 인식할 수 있는 발명의 효과 역시 당연히 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 GCL 및 이의 유도체의 포름알데히드에 대한 반응 동역학을 조사하기 위해 셀룰로모나스 유래 글리세롤 디히드로게나제를 접목시킨 시스템에 대한 모식도이다.

도 2-4는 *S. cerevisiae* iETS3에 의한 글리콜알데히드로부터 에틸렌글리콜의 전체 세포 생물 전환된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 *S. cerevisiae* iETS3의 글리콜알데히드 200 mM에 대한 에틸렌글리콜 생산 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 *S. cerevisiae* iETS3의 글리콜알데히드 300 mM에 대한 에틸렌글리콜 생산 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 *S. cerevisiae* iETS3의 글리콜알데히드 400 mM에 대한 에틸렌글리콜 생산 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 하기의 설명에서는 본 발명의 실시예를 이해하는데 필요한 부분만이 설명되며, 그 이외 부분의 설명은 본 발명의 요지를 흩트리지 않는 범위에서 생략될 수 있다는 점에 유의하여야 한다.

[0033] 이하에서 설명되는 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념으로 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0035] 본 발명의 기술적 특징은 글리옥실레이트 카르볼리가제 (glyoxylate carboligase: GCL)의 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 생성 촉매 활성이 야생형 보다 우수한 신규 GCL을 구축하고, 이를 효모와 결합하여 친환경적으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 거쳐 에틸렌글리콜을 제조하는 것에 있다.

[0036] 따라서 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체를 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물을 제공한다.

[0038] 신규 GCL은 효소의 활성화 자리의 크기 및 기질과 생성물 대비 효소의 안정성에 영향을 줄 수 있는 메티오닌 잔기를 크기가 상대적으로 작은 소수성 잔기로 치환한 다수의 GCL 돌연변이체를 구축하여 포름알데히드에 대한 촉매 활성을 측정하였다.

[0039] 구축된 몇몇 유도체들 중에서, 서열번호 1에 기재된, M251 및 M254를 L251 및 L254로 대체하는 신규 GCL(이중 돌연변이체)은 각각 9.3 mM, 0.2 s^{-1} 및 21.5 $M^{-1}\circ s^{-1}$인 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값을 가져 서열번호 4에 기재된 야생형 대비 높은 효소 활성을 나타냈다.

[0040] 신규 GCL은 활성화 자리를 구성하며 미묘한 움직임으로 효소의 촉매력을 증가시키는 나선구조 (L476-F486)와 맞닿아있는 인접 나선구조에 돌연변이를 도입한 유도체들을 구축하였다. 해당 나선구조의 끝부분에 존재하는 루프가 기질 이동통로를 형성하는데 관여하고 있다.

[0041] 구축된 몇몇 유도체들 중에서, 서열번호 2 및 3에 기재된, L359 및 A28이 N359 및 M28로 치환된 신규 GCL(삼중 돌연변이체)의 K_M이 서열번호 4에 기재된 야생형 대비 크게 감소하였으며, 운동 파라미터 각각 69 $M^{-1}\cdot s^{-1}$, 57.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$로 측정되어 야생형 대비 우수한 특성을 갖는 것을 알 수 있다.

[0042] 구체적으로, 서열번호 1 내지 4는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0043]

서열번호	명칭	아미노산 서열
1	M251L/M254L	MAKMRAVDAA MYVLEKEGIT TAFGVPGAAI NPFYSAMRKH GGIRHILARH VEGASHMAEG YTRATAGNIG VCLGTSGPAG TDMITALYSA SADSIPILCI TGQAPRARLH KEDFQAVDIE AIAKPVSKMA VTVREAALVP RVLQQAFHLM RSGRPGPVLV DLPFDVQVAE IEFDPDMYEP LPVYKPAASR MQIEKAVEML IQAERPVIVA GGGVINADAA ALLQQFAELT SVPVIPTLMG WGCIPDDHEL LAGLVGLQTA HRYGNATLLA SDMVFGIGNR FANRHTGSVE KYTEGRKIVH IDIEPTQIGR VLCPDLGIVS DAKAALTLLV EVAQEMQKAG RLPCRKEWVA DCQQRKRTLL RKTHFDNVPV KPQRVYEEMN KAFGRDVCYV TTIGLSQIAA AQMLHVFKDR HWINCGQAGP LGWTIPAALG VCAADPKRNV VAISGDFDFQ FLIEELAVGA QFNIPYIHVL VNNAYLGLIR QSQRAFDMDY CVQLAFENIN SSEVNGYGVD HVKVAEGLGC KAIRVFKPED IAPAFEQAKA LMAQYRVPVV VEVILERVTN ISMGSELDNV MEFEDIADNA ADAPTETCFM HYE
2	M251L/M254L/L359N	MAKMRAVDAA MYVLEKEGIT TAFGVPGAAI NPFYSAMRKH GGIRHILARH VEGASHMAEG YTRATAGNIG VCLGTSGPAG TDMITALYSA SADSIPILCI TGQAPRARLH KEDFQAVDIE AIAKPVSKMA VTVREAALVP RVLQQAFHLM RSGRPGPVLV DLPFDVQVAE IEFDPDMYEP LPVYKPAASR MQIEKAVEML IQAERPVIVA GGGVINADAA ALLQQFAELT SVPVIPTLMG WGCIPDDHEL LAGLVGLQTA HRYGNATLLA SDMVFGIGNR FANRHTGSVE KYTEGRKIVH IDIEPTQIGR VLCPDLGIVS DAKAALTLLV EVAQEMQKAG RLPCRKEWVA DCQQRKRTNL RKTHFDNVPV KPQRVYEEMN KAFGRDVCYV TTIGLSQIAA AQMLHVFKDR HWINCGQAGP LGWTIPAALG VCAADPKRNV VAISGDFDFQ FLIEELAVGA QFNIPYIHVL VNNAYLGLIR QSQRAFDMDY CVQLAFENIN SSEVNGYGVD HVKVAEGLGC KAIRVFKPED IAPAFEQAKA LMAQYRVPVV VEVILERVTN ISMGSELDNV MEFEDIADNA ADAPTETCFM HYE

3	M251L/M254L/A28M	MAKMRAVDAA MYVLEKEGIT TAFGVPG**M**AI NPFYSAMRKH GGIRHILARH VEGASHMAEG YTRATAGNIG VCLGTSGPAG TDMITALYSA SADSIPILCI TGQAPRARLH KEDFQAVDIE AIAKPVSKMA VTVREAALVP RVLQQAFHLM RSGRPGPVLV DLPFDVQVAE IEFDPDMYEP LPVYKPAASR MQIEKAVEML IQAERPVIVA GGGVINADAA ALLQQFAELT SVPVIPTLMG WGCIPDDHEL **L**AG**L**VGLQTA HRYGNATLLA SDMVFGIGNR FANRHTGSVE KYTEGRKIVH IDIEPTQIGR VLCPDLGIVS DAKAALTLLV EVAQEMQKAG RLPCRKEWVA DCQQRKRTLL RKTHFDNVPV KPQRVYEEMN KAFGRDVCYV TTIGLSQIAA AQMLHVFKDR HWINCGQAGP LGWTIPAALG VCAADPKRNV VAISGDFDFQ FLIEELAVGA QFNIPYIHVL VNNAYLGLIR QSQRAFDMDY CVQLAFENIN SSEVNGYGVD HVKVAEGLGC KAIRVFKPED IAPAFEQAKA LMAQYRVPVV VEVILERVTN ISMGSELDNV MEFEDIADNA ADAPTETCFM HYE
4	Wild type	MAKMRAVDAA MYVLEKEGIT TAFGVPGAAI NPFYSAMRKH GGIRHILARH VEGASHMAEG YTRATAGNIG VCLGTSGPAG TDMITALYSA SADSIPILCI TGQAPRARLH KEDFQAVDIE AIAKPVSKMA VTVREAALVP RVLQQAFHLM RSGRPGPVLV DLPFDVQVAE IEFDPDMYEP LPVYKPAASR MQIEKAVEML IQAERPVIVA GGGVINADAA ALLQQFAELT SVPVIPTLMG WGCIPDDHEL MAGMVGLQTA HRYGNATLLA SDMVFGIGNR FANRHTGSVE KYTEGRKIVH IDIEPTQIGR VLCPDLGIVS DAKAALTLLV EVAQEMQKAG RLPCRKEWVA DCQQRKRTLL RKTHFDNVPV KPQRVYEEMN KAFGRDVCYV TTIGLSQIAA AQMLHVFKDR HWINCGQAGP LGWTIPAALG VCAADPKRNV VAISGDFDFQ FLIEELAVGA QFNIPYIHVL VNNAYLGLIR QSQRAFDMDY CVQLAFENIN SSEVNGYGVD HVKVAEGLGC KAIRVFKPED IAPAFEQAKA LMAQYRVPVV VEVILERVTN ISMGSELDNV MEFEDIADNA ADAPTETCFM HYE

[0044] 여기서, 신규 GCL에는 그의 기능적 동등물 및 기능적 유도체가 포함된다. 본 발명의 정의상 신규 GCL의 "기능적 동등물"이란 상기 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 이루어진 효소와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "동질의 생리활성"이란 도 7에 도시된 바와 같이 2분자의 포름알데히드의 축합을 촉매하여 글리콜알데히드로 전환시키는 반응을 수행할 수 있는 능력이 있으며, 적어도 50% 이상의, 바람직하게는 70%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는 것을 말한다.

[0045] 또한 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile,Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe,Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln,Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met).

[0046] "기능적 유도체" 는 신규 GCL의 단편, 상기 단편을 포함하는 단백질, 또는 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질을 말한다. " 단편" 이란 용어는 단백질의 일부에 해당하는 아미노산 서열로서, 본 발명의 범위내에 속하는 공통의 기원 요소, 구조 및 작용 메커니즘을 가진 것을 말한다. GCL의 안정성, 저장성, 용해도 등을 변경시키기 위한 변형을 가한 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다. 상기와 같은 단백질의 기능적 유도체를 만드는 방법은 공지되어 있다.

[0047] 본 발명의 신규 GCL를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미가 있으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 따라서, 바람직하게는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 가지나 이에 제한되는 것은 아니며 실질적으로 동일한 활성을 갖는 단백질을 코드화하는 한 뉴클레오티드 서열의 일부가 치환 또는 삭제된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 공지된 유전자 클로닝 방법으로 직접 써머스 써모필러스로부터 분리한 후 포인트 뮤테이션하거나 DNA 합성기를 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0048] 따라서, 본 발명의 신규 GCL의 가장 큰 특징은 반응 수행시 K_M, k_{cat}및 k_{cat}/K_M 값이 각각 9.3 mM, 0.2 s^{-1} 및

21.5 $M^{-1}s^{-1}$, 2.9 mM, 0.2 s^{-1} 및 69 $M^{-1}s^{-1}$ 또는 5.6 mM, 0.3 s^{-1} 및 57.1 $M^{-1}s^{-1}$인 수행능력을 갖는다는 전제하에서, 본 발명의 신규 GCL은 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0049] 본 발명의 신규 GCL를 코드화하는 핵산분자는 당 분야에 잘 공지된 적당한 원핵 또는 진핵 발현시스템 중 어느 하나를 사용하여 이를 발현시킬 수 있다. 이와 같이 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있는데, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.

[0050] 특히, 발현이 대장균 예를 들어, 대장균 MV1184, 대장균 BL21, 대장균 JM109(DE3), 대장균 NM522, 또는 효모, 예를 들어, 사카로 마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 사카로마이세스 다이아스타티커스(Saccharomyces diastaticus)등에서 수행되는 될 수 있으며, 대장균 BL21에서 수행하는 것이 바람직하다.

[0052] 다음으로, 본 발명의 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법은 상술된 신규 GCL, 상술된 조성물 및 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 상기 단계는 30℃내지 60℃에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 50℃에서 수행될 수 있다. 이것은 신규 GCL의 열적안정성이 우수하기 때문이다.

[0054] 다음으로, 본 발명의 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 제조방법은 포름알데히드와 상술된 어느 하나의 글리콜알데히드 생성용 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL 중 어느 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0055] 다음으로, 본 발명의 에틸렌 글리콜 제조방법은 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 효모 *Saccharomyces cerevisie* iETS3를 첨가하는 제2단계를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 상기 효모 *S. cerevisiae* iETS3는 에탄올 내성이 향상된 균주로 (Biotechnol. Bioeng. (2011) 108: 1776-1787), 글리콜알데히드 200, 300, 400 mM의 80 % 이상이 에틸렌 글리콜로 전환된다.

[0056]

[0057] **실시예 1**

[0058] 본 발명의 글리콜알데히드 생성물에 포함되는 GCL 유도체의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 표 2와 같다. 표 2에 나타난 바와 같이, 정상 상태 동역학 연구에서 신규 GCL 삼중 돌연변이체는 야생형 GCL보다 현저히 낮은 K_M 값을 보여주며 각각 69.0 $M^{1} \cdot s^{1}$, 57.1 $M^{1} \cdot s^{1}$의 k_{cat}/K_M 값을 가졌다.

[0059]

표 2

[0060]

Variants	K_M (mM)	k_{cat} (s^{1})	k_{cat}/K_M ($M^{1} \cdot s^{1}$)
WT	62	0.1	1.6
R484M/N283Q	39	0.1	2.8
R484M/N283Q/L478M/M488L/R284K	37	0.33	8.9
M251L/M254L	9.3	0.2	21.5
M251L/M254L/L359N	2.9	0.2	69.0
M251L/M254L/A28M	5.6	0.3	57.1

[0062] **실험예 1**

[0063] 포름알데히드 축합에 대한 GCL의 반응 특성을 이해하기 위해, 반응 동역학을 조사하고, 그 결과를 표 2에 나타

냈다.

[0064] 충분한 양의 마그네슘 (Ⅱ) 이온 및 티아민피로포스페이트를 함유하는 반응 매질에 조효소 NADH와 셀룰로모나스 유래 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase, GDH) 0.5 Unit과 함께 GCL을 0.8 mg/mL의 농도로 첨가하여 50 ℃에서 반응을 진행하였다.

[0065] GCL 및 이의 유도체에 의해 포름알데히드로부터 글리콜알데히드가 만들어지면 글리세롤 디히드로게자네에 의해 글리콜알데히드가 환원되면서 NADH가 산화되어 340 nm에서의 흡광도가 감소하게 된다.

[0066] 340 nm에서의 흡광도 감소를 통해 포름알데히드 축합에 대한 GCL의 반응 동역학을 조사할 수 있게 된다.

[0067] 도 1은 본 발명에 따라 GCL 및 이의 유도체를 이용하여 포름알데히드로부터 글리콜알데히드가 생성된 후 글리세롤 디히드로게나제를 이용하여 NADH가 환원됨을 통해 GCL 및 이의 유도체의 반응 동역학을 조사하는 반응식을 나타낸 것이다.

[0069] **실시예 2**

[0070] 알코올에 대한 내성이 높고 알코올 생산 활성이 매우 우수한 것으로 알려진 *S. cerevisiae* iETS3 기반 전세포 생촉매를 이용한 에틸렌글리콜 생산 시스템을 설계하였다 (Biotechnol. Bioeng. (2011) 108: 1776-1787).

[0071] 따라서, 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 생산 반응은 정제된 효소를 이용하여 수행되었고, 만들어진 글리콜알데히드는 용매 추출 후 *S. cerevisiae* iETS3에 넣어 반응을 진행하였다.

[0072] 도 2 내지 4는 효모 *S. cerevisiae* iETS3에 글리콜알데히드 200, 300, 400 mM 넣어주었을 때 발생한 에틸렌글리콜 농도를 나타내며, 글리콜알데히드의 80 % 이상이 표적 생성물로 전환되었음을 나타냈다.

[0073]

표 3

[0074]

Reaction condition	Initial reaction rate	Ethylene glycol conc.	Final conversion rate
GALD 200 mM	51 μmol/g cells/min	175 mM	92 %
GALD 300 mM	46.1 μmol/g cells/min	231.7 mM	81 %
GALD 400 mM	47.9 μmol/g cells/min	347 mM	87 %

[0075] **실험예 2**

[0076] 실시예1에서 구축된 신규 GCL에 포름알데히드 반응 후 생성된 글리콜알데히드는 에틸아세테이트를 이용한 용매 추출법을 활용하여 분리 추출할 수 있었다.

[0077] 효모 *S. cerevisiae* iETS3는 YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)배지 5 mL에 약 24 시간 전배양 후, 동일 배지 100 mL에 본배양을 진행하였다.

[0078] 본배양을 통해 균체 농도 확보 후, 동일 배지 100 mL에 *S. cerevisiae* iETS3 기반 전세포 생촉매 농도 20 g dry cells/L가 되도록 한 후 실시예1에서 확보한 신규 GCL로 만든 글리콜알데히드를 넣고 생물 전환을 수행하였다.

[0079] 글리콜알데히드는 200, 300, 400 mM 반응시켰으며, 200 mM은 100 mM씩 두 번, 300 mM은 100, 200 mM 두 번에 나누어 넣어주었다.

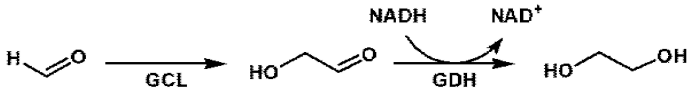
[0080] 글리콜알데히드 400 mM의 경우 100, 100, 200 mM 세 번에 나누어 넣어 반응을 수행하였다.

[0081] 각 글리콜알데히드 농도에 대한 초기 반응 속도 (Initial reaction rate), 최종 표적 생성물의 농도 (Ethylene glycol concentration), 최종 전환율 (Final conversion rate)은 표 3에 나타냈다.

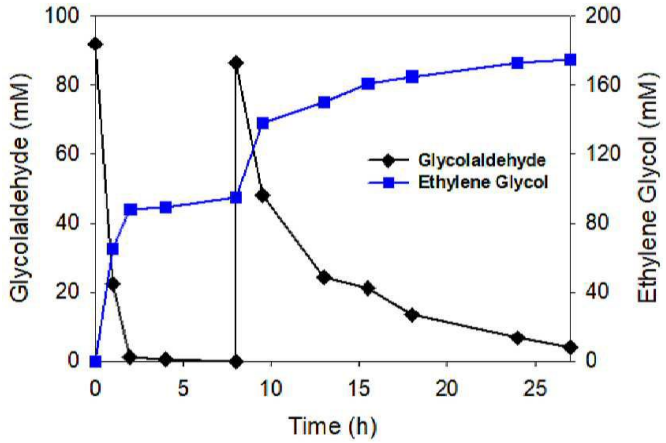
[0082] 표 3으로부터, 효모 *S. cerevisiae* iETS3는 글리콜알데히드 농도가 높아짐에도 에틸렌글리콜 전환율이 80 % 이상으로 유지되는 것을 알 수 있으며, 해당 효모 균주가 에틸렌글리콜 고농도 생산에 적합한 생촉매임을 보여준다.

도면

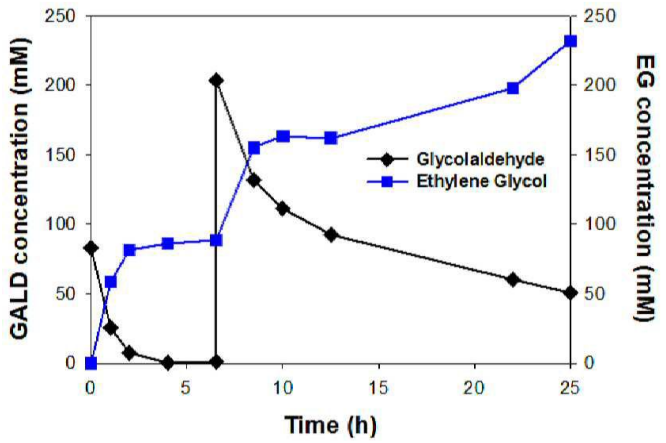
도면1



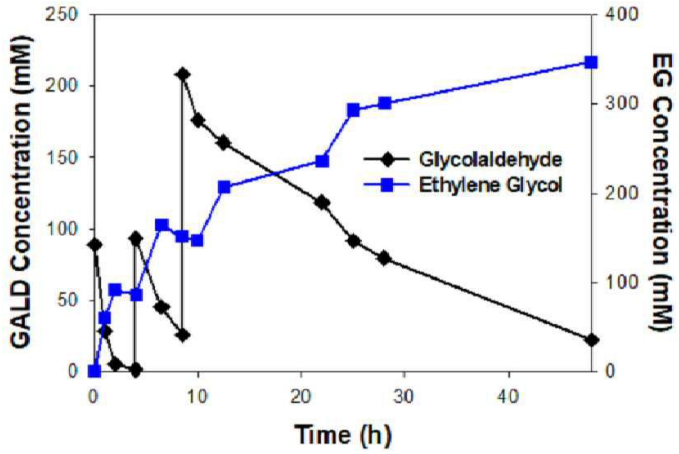
도면2



도면3



도면4


GALD Concentration (mM)
EG Concentration (mM)
Time (h)
Glycolaldehyde
Ethylene Glycol
0
50
100
150
200
250
0
100
200
300
400
0
10
20
30
40

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.