



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0098882
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12P 19/10 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1051 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0016545
(22) 출원일자 2019년02월13일
심사청구일자 2019년02월13일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
이우일
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
308동 303호
김준수
인천광역시 부평구 아트센터로 118 동암신동아아
파트 109동 1501호
유환구
대전광역시 서구 관저북로 14 원앙마을4단지아파
트 412동 1105호
(74) 대리인
특허법인도담

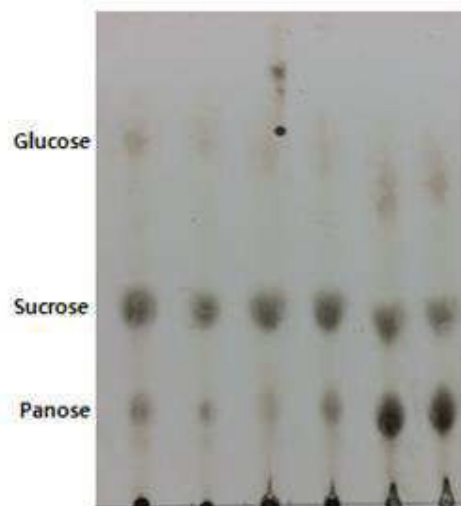
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 당 전이효소를 이용한 당 중합체 폴루란의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 당 전이 효소인 텍스트란슈크라제(Dextranase)와 네오플루란나제(Neopullulanase)를 생산하고 해당 효소 반응을 통하여 삼탄당의 일종인 판노스(Panose)와 판노스의 중합체인 폴루란(Pullulan)을 합성하는 공정에 관한 것으로, 보다 상세하게는 분자생물학 기법을 활용하여 대장균에서 다량 발현이 가능하고 정제 과정이 용이한 텍스트란슈크라제와 네오플루란나제의 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균에서 형질 전환하여 다량의 재조합 텍스트란슈크라제와 네오플루란나제를 생산하며, 설탕(Sucrose) 및 맥마당(maltose)을 기질로 재조합 텍스트란슈크라제의 효소 반응을 통하여 삼탄당의 일종인 판노스를 생산하고, 판노스 합성 반응물을 기질로 사용하는 재조합 네오플루란나제의 효소 반응을 통하여 당 중합체인 폴루란을 합성하는 공정에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12P 19/10 (2013.01)

C12P 19/14 (2013.01)

C12Y 204/01005 (2013.01)

C12Y 302/01135 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2477651

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 창업성장기술개발사업

연구과제명 당 전이 효소를 이용한 Maltotriose 중합체의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 유래의 텍스트란슈크라제 유전자 *dsrS*를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된, 텍스트란슈크라제 생산용 재조합 미생물.

청구항 2

게오바실러스 스테아로써모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) TRS40 유래의 네오플루란나제 유전자 *npl38*을 포함하는 재조합벡터로 형질전환된, 네오플루란나제 생산용 재조합 미생물.

청구항 3

- (a) 제 1 항에 기재된 재조합 미생물을 배양하는 단계;
 - (b) 상기 (a) 단계에서 배양한 재조합 미생물을 텍스트란슈크라제 전용 발현 배지에 본배양하는 단계;
 - (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액으로부터 텍스트란슈크라제를 추출하는 단계; 및
 - (d) 친화성 크로마토그래피를 통하여 텍스트란슈크라제를 단일 물질로 정제하는 단계;
- 를 포함하는, 텍스트란슈크라제를 대량생산하는 방법.

청구항 4

- (a) 제 2 항에 기재된 재조합 미생물을 배양하는 단계;
 - (b) 상기 (a) 단계에서 배양한 재조합 미생물을 네오플루란나제 전용 발현 배지에 본배양하는 단계;
 - (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액으로부터 네오플루란나제를 추출하는 단계; 및
 - (d) 친화성 크로마토그래피를 통하여 네오플루란나제를 단일 물질로 정제하는 단계;
- 를 포함하는, 네오플루란나제를 대량생산하는 방법.

청구항 5

- (a) 맥아당과 설탕을 혼합한 기질혼합물을 준비하는 단계;
 - (b) 상기 (a)의 기질혼합물에 상기 제 3 항의 텍스트란슈크라제를 첨가하여 효소반응으로 판노스를 합성하는 단계;
 - (c) 상기 단계 (b)의 반응물에 상기 제 4 항의 네오플루란나제를 첨가하여 효소반응을 통해 플루란을 합성하는 단계; 및
 - (d) 상기 단계 (c)의 합성된 플루란을 추출 정제하는 단계;
- 를 포함하는, 플루란을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당 전이효소인 텍스트란슈크라제(Dextranase)와 네오폴루란나제(Neopullulanase)를 생산하고, 효소 반응을 통하여 삼탄당의 일종인 판노스(Panose)와 판노스의 중합체인 플루란(Pullulan)을 합성하는 공정에 관한 것이다. 보다 상세하게는 분자생물학 기법을 활용하여 대장균에서 다량 발현이 가능하고 정제 과정이 용이한 텍스트란슈크라제와 네오폴루란나제의 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균에서 형질 전환하여 다량의 재조합 텍스트란슈크라제와 네오폴루란나제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다. 또한, 설탕(Sucrose) 및 맥마당(maltose)을 기질로 하여 상기 재조합 텍스트란슈크라제를 이용한 효소 반응을 통하여 삼탄당의 일종인 판노스를 생산하고, 상기 판노스 합성 반응물을 기질로 하여 상기 재조합 네오폴루란나제를 이용한 효소 반응을 통하여 당 중합체인 플루란을 합성하는 공정에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플루란(Pullulan)은 흑효모 균주인 *Aureobasidium Pullulans*에서 분비되는 천연 다당류의 고분자 중합체이다. 플루란은 α -1,4 결합과 α -1,6 결합을 동시에 가지고 있는 탄수화물 유도체의 일종으로 maltotriose 단위로 이루어져 있으며, 각각의 maltotriose 단량체가 α -1,6 glucoside 결합 형태로 이루어져 계단형태의 연속된 고분자체를 형성한다. 플루란은 *Aureobasidium Pullulans*의 세포벽을 구성하는 물질 중 하나로 β -glucan 층의 바깥쪽에 플루란 층이 형성되며 흑효모의 발효 과정을 통하여 다량으로 획득할 수 있다. 플루란이 가지고 있는 계단형태의 구조적 배열 특징으로 인해 전분과 같은 일반 다당류와 비교할 때 점성도가 월등히 높고, 독성이 전혀 나타나지 않으며, 내구성이 강해 산업적 적용이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 플루란의 생성 메카니즘은 *Aureobasidium pullulans*의 인지질에서 UDPG가 UDP로 전환이 되면서 Glucose 분자가 인지질에 붙게 되며, 이러한 생화학적 반응이 연쇄적으로 일어나면서 플루란 전구체를 형성하게 된다.

[0003] 플루란은 히아루론산을 대체할 수 있는 천연 소재이며, 친환경적인 생산 공정 개발을 바탕으로 대량 생산이 가능해 질 경우 상대적으로 저렴한 생산 단가와 더불어 뛰어난 보습소재로서의 공급이 가능할 것이다. 또한 플루란은 피부 미용 보습제 뿐만 아니라 식품 첨가물, 가식성 필름, 코팅제, 의료용 소재 등 여러 가지 분야에서 광범위하게 사용되고 있으며, 특히 플루란은 천연 고분자 물질의 하나로 생분해성 능력이 우수한 특징을 가지고 있어 차세대 바이오 플라스틱 물질로 각광을 받고 있다.

[0004] 현재 플루란의 생산 공정은 흑효모 균주인 *Aureobasidium pullulans*을 다량으로 배양하고 미생물에서 직접 플루란을 추출하여 획득하는 공정이 주를 이루고 있지만 흑효모의 배양이 다른 미생물과 비교하여 상당히 오래 걸릴 뿐만 아니라 흑효모 균주 특유의 멜라닌 색소로 인하여 주 생산 원료인 플루란이 착색되고 결과적으로 플루란의 순도 및 제품의 기능성이 떨어지는 단점이 존재한다. 때문에 고순도의 플루란을 효율적으로 생산할 수 있는 새로운 공정 개발이 필요하다고 할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-0739022 호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제 10-1882101 호
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제 10-0414952 호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) (연구논문 0001) Barnett Christian. et al., Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. CARBOHYDRATE POLYMERS, 1998, Vol. 38(3), pp. 203 - 209.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 현재까지 연구된 플루란의 생산은 흑효모 균주인 *Aureobasidium pullulan*을 다량으로 배양하고 회수한 배양액으

로부터 직접 플루란 추출하는 방법을 기본으로 하여 생산 공정의 단축이나 플루란의 순도 향상 등에 초점이 맞추어져 있으며, 아직까지 흑효모 균주가 아닌 다른 방법을 통해 플루란을 인공적으로 합성하는 공정은 연구 및 개발이 전무한 상황이다. 흑효모 균주에서 플루란을 생산하는 공정은 *Aureobasidium pullulans*의 긴 배양 시간으로 인하여 발효기 등 생산기기의 작동기간이 길어질 뿐만 아니라 흑효모 배양 시 나타나는 멜라닌 색소의 착색으로 인하여 플루란 생산 후 흑색소를 제거할 새로운 정제 공정이 필요하거나 혹은 배양 단계 중 색소를 억제할 필수 요소로 첨가하는 단계가 반드시 들어가기 때문에 결과적으로 생산 단가가 높아지는 한계점을 가지고 있다. 따라서 본 발명은 고순도의 플루란을 효율적으로 생산할 수 있는 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해서 본 발명은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 유래의 텍스트란슈크라제 유전자 *dsrS*를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 텍스트란슈크라제 생산용 재조합 미생물을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서 상기 재조합 벡터는 대장균에서 발현 가능한 벡터이면 어떤 것이든 가능하고, 본 발명에서는 pRSET_A에 텍스트란슈크라제 유전자 *dsrS*를 삽입한 pRDsu 벡터일 수 있다.
- [0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (a) pRDsu 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 배양한 재조합 미생물을 텍스트란슈크라제 전용 발현 배지에 본배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액으로부터 텍스트란슈크라제를 추출하는 단계; 및 (d) 친화성 크로마토그래피를 통하여 텍스트란슈크라제를 단일 물질로 정제하는 단계;를 포함하는, 텍스트란슈크라제를 대량생산하는 방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피는 Ni-NTA를 이용한 친화성 크로마토그래피인 것을 특징으로 한다.
- [0012] 또한 본 발명은 게오바실러스 스테아로써모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) TRS40 유래의 네오플루란나제 유전자 *npI38*를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된, 네오플루란나제 생산용 재조합 미생물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서 상기 재조합 벡터는 대장균에서 발현 가능한 벡터이면 어떤 것이든 가능하고, 본 발명에서는 pRSET_A에 네오플루란나제 유전자 *npI38*를 삽입한 pRNPL 벡터일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (a) 상기 pRNPL 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 배양한 재조합 미생물을 네오플루란나제 전용 발현 배지에 본배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액으로부터 네오플루란나제를 추출하는 단계; 및 (d) 친화성 크로마토그래피를 통하여 네오플루란나제를 단일 물질로 정제하는 단계;를 포함하는, 네오플루란나제를 대량생산하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피는 Ni-NTA를 이용한 친화성 크로마토그래피인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명은 상기 대량생산된 텍스트란슈크라제와 네오플루란나제를 이용한 효소반응을 통해 맥아당과 설탕의 기질혼합물로부터 플루란을 제조하는 방법을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (a) 맥아당과 설탕을 혼합한 기질혼합물을 준비하는 단계; (b) 상기 (a)의 기질혼합물에 상기 재조합 미생물로부터 생산된 텍스트란슈크라제를 첨가하여 효소반응으로 판노스를 합성하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 반응물에 상기 재조합 미생물로부터 생산된 네오플루란나제를 첨가하여 효소반응을 통해 플루란을 합성하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 합성된 플루란을 추출 정제하는 단계;를 포함하는, 플루란을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 효소 반응 공정은 미생물을 통한 생산 공정과 비교하여 그 과정이 비교적 단순하고 취급이 용이하며 미생물 오염 등의 우려가 없다.
- [0019] *Aureobasidium pullulans*에서 플루란을 생산하는 공정은 3차의 배양 과정을 거쳐 플루란을 생산하기 때문에 최소 약 7일이상이 소요되지만, 본 발명의 플루란 효소 반응 공정은 적정온도에서 약 24시간 내에 합성이 완료된다. 이는 플루란의 생산 단가 절감에도 영향을 준다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 효소 반응 공정을 통해 합성한 플루란은 미생물에서 생성되는 멜라닌 색소의 착색이 없어 별

도의 정제 과정이 필요가 없으며 수득률 역시 20~30% 증가한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Recation) 과정을 통한 텍스트란슈크라제 유전자 증폭의 아가로스 겔 전기영동의 분석 결과이다.
- 도 2는 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Recation) 과정을 통한 네오플루란나제 유전자 증폭의 아가로스 겔 전기영동의 분석 결과이다.
- 도 3은 텍스트란슈크라제 유전자가 삽입된 발현벡터 pRDsu의 구조적 특징을 나타내는 모식도이다.
- 도 4는 네오플루란나제 유전자가 삽입된 발현벡터 pRNPL의 구조적 특징을 나타내는 모식도이다.
- 도 5는 재조합 텍스트란슈크라제의 효소 반응을 통한 플루란 선구체인 판노스 합성의 TLC 분석 결과이다.
- 도 6은 대장균으로부터 재조합 네오플루란나제의 대량 발현에 대한 SDS-PAGE 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.
- [0024] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

실시예 1

- [0026] 텍스트란슈크라제 대량생산
- [0028] 1. 텍스트란슈크라제의 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터 구축
- [0029] 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)의 gDNA를 주형 DNA로 사용하는 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실행하여 텍스트란슈크라제 유전자(*dsrS*)를 획득하였다. 류코노스톡 메센테로이데스를 Nutrient Broth (0.3 % Beef Extract, 0.5 % Peptone)에 접종하고 27 °C에서 48시간 배양하였으며, 배양된 류코노스톡 메센테로이데스를 spin down하여 균주만을 harvest하고 TE buffer로 희석하여 특별한 lysis 과정 없이 Template DNA로 사용하였다. 텍스트란슈크라제의 증폭을 위한 PCR 과정은 Taq polymearse를 이용하였고, polymerase 0.5 μ l, 10x PCR buffer 5 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합물 5 μ l, 10 nM/ul 정방향 프라이머(forward primer) 및 10 nM/ul 역방향 프라이머(revese primer)를 각각 1 μ l, 주형은 2 μ l를 넣은 PCR 반응용액이 50 μ l가 되도록 증류수를 넣어 준 후 PCR을 수행하였다.
- [0030] 이때 정방향 프라이머로 pF 프라이머(5'-ctcgagatgaggaaagaagccatcta-3')와 역방향 프라이머로 pR 프라이머(5'-aagctcctaccaatgttctattgcataaa-3')를 사용하였고, PCR 반응 조건은 94 °C에서 5분간 전변성(predenaturation)시키고, 94 °C에서 30초, 54 °C에서 30초, 72 °C에서 3분 조건으로 30회간 반복 반응하고 72 °C에서 7분간 연장 반응을 유도하였다. 결과물은 Agarose gel 전기영동을 통하여 크기 및 농도를 분석하였으며, 그 결과 약 3,000 bp의 류코노스톡 메센테로이데스 유래 텍스트란슈크라제 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(도 1). 반응물은 추후 효소 반응을 위하여 DNA 단편 정제 키트로 정제하였다.
- [0031] 이 후 정제된 텍스트란슈크라제 유전자 (*dsrS*)와 발현 벡터인 pRSET_A를 동일한 제한 효소로 처리하여 절단하고 T4 DNA Ligase의 효소 반응을 실시하여 텍스트란슈크라제 유전자가 삽입된 발현 벡터인 pRDsu(도 3)를 구축한 후 대장균 DH5a에서 형질전환하고, Colony PCR을 통하여 재조합 여부를 확인하였다. 올바르게 재조합된 pRDsu 벡터는 대장균에서 플라스미드를 정제 분리하고 대량 발현을 위하여 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다.

- [0033] 2. 대장균 BL21(DE3)로부터 재조합 텍스트란슈크라제의 대량 발현
- [0034] pRDsu 벡터가 형질전환된 대장균 BL21(DE3)을 이용하여 텍스트란슈크라제의 발현을 시도하였다. 대량 발현을 시도하기 앞서 대장균으로부터 최적화된 pRDsu의 발현 조건을 탐색하기 위하여 Small-scale로 배지 조성, 배양 시간 및 온도 등의 변수를 선정하고 SDS-PAGE 통하여 비교분석하였으며, 이 후 최적화된 조건을 바탕으로 텍스트란슈크라제를 대량으로 생산하였다. pRDsu이 형질전환된 BL21(DE3)를 항생제인 엠포실린이 들어간 SOB broth에 seed culture하고 배양물은 다시 동일한 SOB broth에 1 : 50 비율(v/v)로 본 배양을 실시하였으며, 실시간으로 OD값을 측정하여 흡광도가 0.7이 되었을 때 isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하였다. 이 후 37 °C에서 5시간 동안 발현을 진행하였고 발현이 완료된 균주는 6,000 rpm에서 4 °C 조건으로 10분간 원심 분리하여 Cell harvest하였다.
- [0035] 회수된 Pellet은 PBS buffer (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄)로 세척하고 Cell Lysis buffer (10 % sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.2 M NaCl, pH 7.9)로 균주를 현탁한 후 초음파를 통하여 균주를 완전히 파쇄하였으며, 균주 파쇄물은 다시 16,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 수용성 단백질과 불용성 단백질을 분리하였다. 이 중 Pellet 부분을 Cell wash buffer (2 % Triton X-100, 1.0 M Urea)로 세척하였고, 이 후 Solubilization buffer (8 M Urea, 0.01 M Tris-HCl, 0.2 M Na₂HPO₄, pH 8.0)로 봉입체를 완전히 용해시켰다. 각각의 분리된 수용성 단백질과 불용성 단백질은 SDS-PAGE 분석에 실시하여 텍스트란슈크라제의 발현 양상을 확인하였다. 분석하고자 하는 단백질 중 40 μ l을 취하여 5x SDS-PAGE sample buffer (60 mM Tris-HCl(pH 6.8), 25 % glycerol, 2 % SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 % bromophenol blue) 10 μ l를 혼합하고 끓는 물에 5분 동안 반응시켰으며 이를 10 % Acrylamide 겔에 전기 영동하여 텍스트란슈크라제의 발현을 확인하였다. 분석결과 불용성 단백질 샘플로부터 텍스트란슈크라제 발현 단백질 밴드가 관찰되었으며 이를 통해 재조합 텍스트란슈크라제가 봉입체 단백질 형태로 발현되었음을 알 수 있었다.
- [0037] 3. 재조합 텍스트란슈크라제 단백질의 재접힘 반응
- [0038] 봉입체 형태로 발현된 재조합 단백질은 올바른 단백질 구조를 형성하지 못하여 고유의 단백질 활성을 잃어버리게 된다. 이에 단백질 재접힘 과정을 통하여 생산한 텍스트란슈크라제의 봉입체를 구조적으로 복원할 필요성이 있다.
- [0039] 텍스트란슈크라제의 단백질 재접힘 반응은 급속한 희석 방법으로 진행하였으며, 20배의 텍스트란슈크라제 전용 Refold buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM L-Glutathione oxidized, 1 mM L-Glutathione reduced, 1 mM Beta-mercaptoethanol, 1 mM DTT)로 Dextranucrase의 봉입체를 희석하고 4 °C의 160 rpm에서 천천히 stir하여 진행하였다.
- [0041] 4. 친화성 크로마토그래피를 통한 재조합 텍스트란슈크라제 단백질의 정제
- [0042] N-말단에 6개의 Histidine이 융합된 텍스트란슈크라제 단백질을 단일물질로 정제하기 위하여 Ni-NTA를 이용한 친화성 크로마토그래피를 실시하였다. Ni-NTA 수지가 충전된 컬럼에 10 배의 binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려보내 평형화하였고, 텍스트란슈크라제가 포함된 단백질 샘플을 로딩하였으며, 10 배의 washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 통해 불순물을 완전히 제거하였다. 8 배의 elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 목표 단백질을 용출하였으며 피크가 나타나는 분획물을 회수하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 유속은 0.5 mL/min으로 하였다.

실시예 2

- [0044] 네오플루란나제 대량생산
- [0046] 1. 네오플루란나제의 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터 구축

- [0047] 네오플루란나제의 재조합 발현 벡터를 구축하는 과정은 상기의 텍스트란슈크라제와 거의 동일하게 이루어 졌다. 본 과제에서는 목표 유전자로 게오바실러스 스테아로써모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) TRS40 유래에서 네오플루란나제 유전자(np138)를 사용하였다. 게오바실러스 스테아로써모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) TRS40을 유전자 추출 kit를 사용하여 스핀 컬럼에 완전히 정제시킨 후 이를 PCR의 Template DNA로 활용하였다. np138의 증폭은 0.5 μ l Taq DNA polymerase, 10x PCR buffer 5 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합물 5 μ l, 10 nM/ul 정방향 프라이머(forward primer) 및 10 nM/ul 역방향 프라이머(reverse primer)를 각각 1 μ l, 주형은 2 μ l를 넣은 PCR 반응용액이 50 μ l가 되도록 증류수를 넣어 준 후 PCR을 수행하였다.
- [0048] 이때 정방향 프라이머로 pF 프라미어(5'-ggatccatgtataaaatctgggaaaatgt-3')와 역방향 프라이머로 pR 프라미어(5'-ccatggttataaatctggtacccaatct-3')를 사용하였고, PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 전변성(predenaturation)시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 조건으로 30회간 반복 반응하고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장 반응을 유도하였다. 결과물은 Agarose gel 전기영동을 통하여 크기 및 농도를 분석하였으며, 그 결과 약 2,000 bp의 네오플루란나제 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(도 2). 반응물 결과물은 추후 효소 반응을 위하여 DNA 단편 정제 키트로 정제하였다.
- [0049] 이 후 정제된 네오플루란나제 유전자(np138)와 발현 벡터인 pRSET_A를 동일한 제한 효소로 처리하여 절단하고 T4 DNA Ligase의 효소 반응을 실시하여 네오플루란나제 유전자가 삽입된 발현 벡터인 pRNPL(도 4)를 구축한 후 대장균 DH5a에서 형질전환하고, 각각의 콜로니 중 플라스미드를 분리 및 제한효소 처리를 실시하여 올바르게 재조합된 pRNPL을 선정하였다. 이 후 재조합이 확인된 pRNPL는 대장균에서 플라스미드를 정제 분리하고 대량 발현을 위하여 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다.
- [0051] 2. 대장균 BL21(DE3)로부터 재조합 네오플루란나제의 대량 발현
- [0052] pRNPL이 형질전환된 대장균 BL21(DE3)를 이용하여 네오플루란나제의 발현을 시도하였다. 대장균으로부터 최적화된 pRNPL의 발현 조건을 탐색하기 위하여 상기의 pRDSu와 동일한 방법으로 Small-scale에서 배지 조성, 배양 시간 및 온도 등의 조건을 비교하고 SDS-PAGE 통하여 이를 분석하였다.
- [0053] 발현 테스트 결과, pRNPL은 대장균에서 수용성 단백질 형태로 발현되었음을 알 수 있었으며, 이러한 점을 활용하기 위하여 Auto-induction media를 통한 발현을 진행하기로 하였다. 멸균된 삼각플라스크에 200 ml의 AIM broth (트리톤 12 g/L, 효모 추출물 24 g/L, 포도당 0.5 g/L, 젓당 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3.3 g/L, KH₂PO₄ 6.8 g/L, Na₂HPO₄ 7.1 g/L, MgSO₄ 0.15 g/L, 글리세롤 4.0 ml/L를 제조하고 멸균시킨 후 엠포실린을 첨가한다. pRNPL이 형질전환된 BL21(DE3)는 SOB broth에 seed culture하고 해당 배양물은 상기의 AIM broth에 1 : 50 비율(v:v)로 본 배양하여 37 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 발현을 실시한다. 원심분리하여 Pellet을 회수하고 이를 PBS buffer로 세척하였으며, Cell Lysis buffer으로 균주를 현탁한 후 초음파를 통하여 균주를 완전히 파쇄하였다. 균주 파쇄물은 다시 16,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 수용성 단백질과 불용성 단백질을 분리하고, 이 중 Pellet 부분을 Solubilization buffer으로 현탁하여 봉입체를 완전히 용해시켰다. 각각의 분리된 수용성 단백질과 불용성 단백질은 SDS-PAGE 분석을 실시하여 네오플루란나제의 발현 양상을 확인하였다. 분석하고자 하는 단백질 중 40 μ l을 취하여 5x SDS-PAGE sample buffer 10 μ l를 혼합하고 끓는 물에 5분 동안 반응시켰으며 이를 10 % Acrylamide 겔에 전기 영동하여 네오플루란나제의 발현을 확인하였다(도 6). 분석결과, 재조합 네오플루란나제가 수용성 단백질 형태로 발현되었음을 알 수 있었다.
- [0055] 3. 친화성 크로마토그래피를 통한 재조합 네오플루란나제 단백질의 정제
- [0056] 네오플루란나제의 정제 과정 역시 텍스트란슈크라제 단백질의 정제 원리인 6x 히스티민 말단을 이용한 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 통하여 이루어졌으며, 모든 과정이 동일하게 이루어 졌다. Ni-NTA 수지가 충전된 컬럼에 10 배의 binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려보내 평형화하였고, 네오플루란나제가 포함된 단백질 샘플을 로딩하였으며, 10 배의 washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 통해 불순물을 완전히 제거하였다. 8 배의 elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 목표 단백질을 용출하였으며 피크가 나타나는 분획물을 회수하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 유속은 0.5 mL/min으로 하였다.

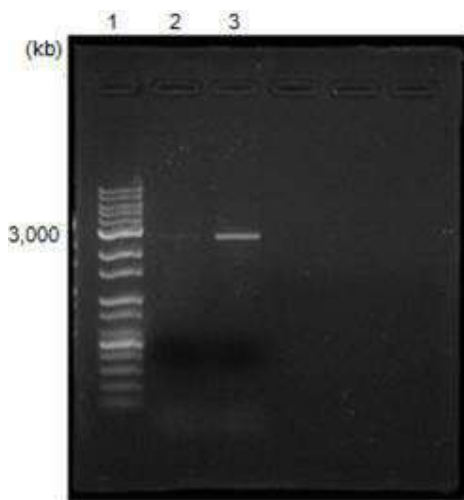
실시예 3

[0058] 재조합 당 전이 효소를 이용한 플루란의 합성

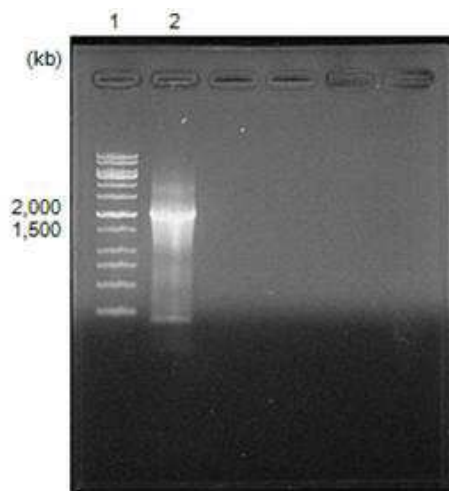
[0060] 단일 물질로 정제한 텍스트란슈크라제를 판노스 효소 합성의 촉매제로 사용하였다. 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.5)와 1 mM CaCl_2 , 1%의 맥아당, 5 %의 설탕을 혼합하고, 재조합 텍스트란슈크라제를 최종 부피의 10 %만큼 첨가하여 25℃에서 24 시간동안 반응하여 판노스를 합성하였다. 반응이 완료된 샘플은 TLC (Thin Layer Chromatography)를 통하여 1차 분석을 실시하였다. TLC 분석은 고정상으로 C_{18} 실리카겔을 사용하였으며 Acetic acid : Formic acid : Water = 7 : 2 : 1을 이동상으로 사용하였고 전개가 완료된 plate는 5%의 황산이 포함된 메탄올 용액에 살짝 담구고 121℃에서 5분 동안 반응시켜 spot을 검출하였으며 이를 통해 판노스의 합성을 확인하였다(도 5). 이 후 좀 더 정밀한 정성 및 정량 분석을 위하여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석을 실시하였다. 분석 조건은 Column : SRT 30 cm x 7.8 mm I.D., 5 μm , 300 Å, Solvent : 150 mM phosphate Buffer, pH 7.0, 유속 : 0.7 ml/min, Detector : RI Detector이며, HPLC 분석 결과를 통하여 판노스의 합성 여부와 수득률을 확인하였다. 이 후 정제된 네오플루란나제와 판노스 효소 합성물을 이용하여 플루란을 대량으로 합성하였다. 상기의 판노스 효소 합성물의 pH를 조정하여 6.0으로 맞추고 여기에 10% 재조합 플루란나제를 첨가시킨 후 40℃에서 24시간 동안 반응시켜 판노스 기질로부터 플루란을 합성하였다. 모든 효소 반응이 끝난 후 한외여과막을 사용하여 반응의 종결 및 함유된 효소를 완전히 제거하였으며, 합성된 플루란을 추출하기 위하여 전체 부피의 2배에 해당하는 에탄올을 첨가하고 약 1시간 동안 당 중합체를 완전히 침전시켰다. 이 후 침전된 당중합체를 회수하여 동결건조함으로써, 플루란을 완전히 파우더화하였다. 모든 동정이 완료된 후 최종 반응물에 대한 HPLC를 실시하여 플루란의 합성 수율 및 순도를 분석하였다.

도면

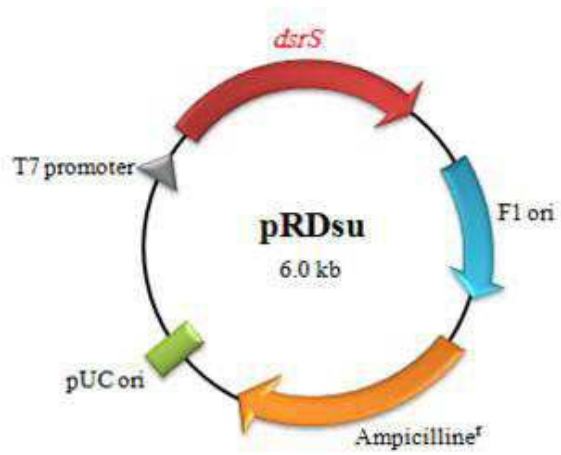
도면1



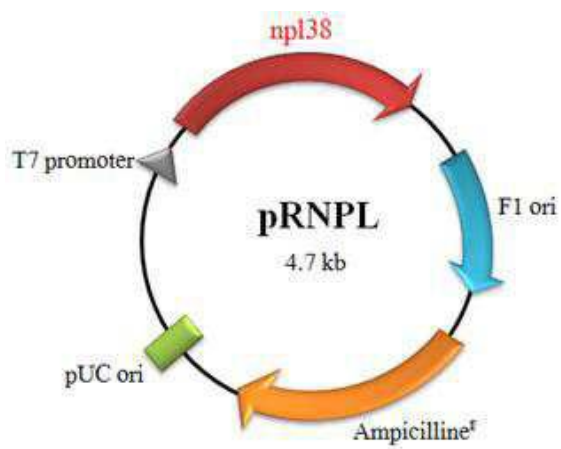
도면2



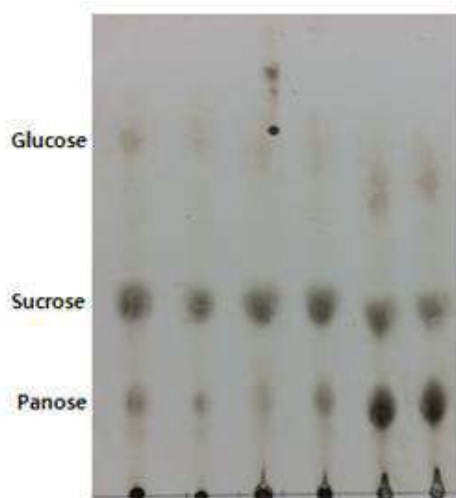
도면3



도면4



도면5



도면6

