

명세서

발명의 명칭: 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 당전이효소의 반응에 의해 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법; 및 당전이효소를 포함하는 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M 제조용 조성물;에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 세계보건기구(WHO)의 당 섭취에 따른 질병(비만) 우려에 따라 일일 당 섭취량을 낮출 것을 권고함에 따라, 선진국을 중심으로 정부 주도하에 다양한 당류 섭취량을 줄이기 위한 정책이 활발히 논의 중이다. 이에 시장에서는 설탕 및 고과당을 대신할 다양한 대체감미료소재에 대한 니즈가 증가하고 있어, 대체감미료 소재가 지속적으로 개발, 상용화 되고 있다.
- [4] 대체감미료로는 합성고감미료(Saccharin, Aspartame, Sucralose 등), 합성당알콜류(Maltitol, Xylitol), 고감미료(리바우디오사이드 A, Liquorice)으로 지속적으로 변화되고 있다. 그러나 지속적인 합성감미료의 안전성에 대한 우려로 천연감미료에 대한 고객의 니즈가 지속적으로 커지고 있으나, 천연감미료 특유의 이미 · 이취의 맛 속성 한계로 기존의 합성감미료 중심의 저칼로리 · 제로칼로리제품을 본격적으로 대체하지 못하고 있는 실정이다.
- [5] 이와 관련하여, 최근 상당한 주목을 받고 있는 천연의 고감미료는 스테비아의 잎에서 추출한 스테비아 감미료이다. 스테비아 감미료는 열량을 내지 않고 혈중 포도당과 인슐린 수준에 긍정적이며, 인체에 부작용이 없는 것으로 보고되어 대체감미료로서의 잠재력이 높으나, 쓴맛이 강하게 발현되는 단점으로 설탕 저감 사용에 한계가 있다.
- [6] 스테비아는 남미 파라과이를 원산지로 하는 국화과 다년생 식물로, 학명은 스테비아 레바우디아나 베르토니(*Stevia rebaudiana Bertoni*)이다. 스테비아 잎에는 설탕의 200-300배 이상의 감미를 갖는 성분이 존재하기 때문에, 이 감미 성분을 추출하여 천연 감미료로서 이용한다. 스테비아 추출물의 감미성분에는 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 C, 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 I, 리바우디오사이드 E 등의 다양한 스테비올 배당체가 포함되어 있다.
- [7] 스테비아 추출물의 감미성분 중 스테비오사이드(STV), 리바우디오사이드A(Reb A), 리바우디오사이드C(Reb C)는 스테비아 잎에 함량이 비교적 높아 고순도 추출 정제 산업화 제품이 출시되었으나, 쓴맛이 강하게 발현되는 단점으로 설탕 저감 사용에 한계가 있다.

- [8] 한편, 리바우디오사이드 D(Reb D), 리바우디오사이드 M(Reb M)은 STV, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 C 대비 쓴맛이 적으며 감미질이 우수하여 대체 감미료로서 가치가 높다. 그러나 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M은 스테비아 잎에 극히 미량만이 존재하여, 잎으로부터 추출 정제하여 제조하는 방법에 높은 비용이 소요된다는 단점이 있다.

[9]

[10] [선행기술문헌]

[11] [특허문헌]

[12] (특허문헌 1) KR 1404728 B1

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 출원인들은 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환시키는 활성을 가지는 효소를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 종래에 당전이 효소 활성이 밝혀지지 않은 폴리펩타이드 서열이 당전이 효소 활성을 갖는 것을 새롭게 밝혔으며, 상기 폴리펩타이드가 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환시키는 당전이 효소활성이 있음을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 본 출원의 하나의 목적은 포도당이 결합된 뉴클레오티드 디포스페이트를 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하는 리바우디오사이드 D의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 다른 하나의 목적은 포도당이 결합된 뉴클레오티드 디포스페이트를 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계; 및 상기 리바우디오사이드 D를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 포도당이 결합된 뉴클레오티드 디포스페이트와 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하고, 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 M의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 수크로오스, 뉴클레오티드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 수크로오스 합성효소 및 상기 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하는 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 제조하는 방법을 제공하는

것이다.

- [19] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 수크로오스, 뉴클레오타이드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 D, 수크로오스 합성효소, 당전이효소 A(UGT-A) 및 상기 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하는 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 당전이효소 B(UGT-B)를 포함하는 리바우디오사이드 D 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [21] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 당전이효소 A(UGT-A) 및 상기 당전이효소 B(UGT-B)를 포함하는 리바우디오사이드 M 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [22] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 당전이효소 B(UGT-B)의, 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환시키는 당전이 효소로서의 용도를 제공하는 것이다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본 출원에 따른 당전이효소 B(UGT-B)를 이용한 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M의 제조 방법은 부산물이 거의 없는 고순도 및 고수율의 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M을 제공할 수 있는바, 저가의 원료를 사용하여 경제적이며 절차가 간단하고 시간 소모가 적어 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M의 대량 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 당전이효소 B(UGT-B₆)에 의해 리바우디오사이드 A가 리바우디오사이드 D로 전환됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [27] 도 2는 당전이효소 B(UGT-B₇)에 의해 리바우디오사이드 A가 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 D 아이소머(isomer) 및 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)로 전환됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [28] 도 3은 당전이효소 B(UGT-B₈)에 의해 리바우디오사이드 A가 리바우디오사이드 D로 전환됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [29] 도 4는 당전이효소 B(UGT-B₆), 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소에 의해 스테비오사이드로부터 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 I 및 리바우디오사이드 A가 생성됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [30] 도 5는 당전이효소 B(UGT-B₇), 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스

합성효소에 의해 스테비오사이드로부터 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer), 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 I 및 리바우디오사이드 A가 생성됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.

- [31] 도 6은 당전이효소 B(UGT-B₈), 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소에 의해 스테비오사이드로부터 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 I 및 리바우디오사이드 A가 생성됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [32] 도 7은 당전이효소 A(UGT-A)에 의해 리바우디오사이드 D가 리바우디오사이드 M으로 전환됨을 보여주는 HPLC 분석 결과이다.
- [33] 도 8은 리바우디오사이드 D 아이소머(isomer)의 LC-MS/MS 분석 결과이다.
- [34] 도 9는 리바우디오사이드 D의 LC-MS/MS 분석 결과이다.
- [35] 도 10은 리바우디오사이드 M 아이소머(isomer)의 LC-MS/MS 분석 결과이다.
- [36] 도 11은 리바우디오사이드 M의 LC-MS/MS 분석 결과이다.
- [37]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 출원이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 출원의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [39]
- [40] 본 출원의 하나의 양태는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하는 리바우디오사이드 D의 제조 방법을 제공한다.
- [41]
- [42] 본 출원에서 용어, "당전이효소(UDP(Uridine diphosphate)-glycosyltransferase, UGT)"는 글리코실 공여자(glycosyl donor)로부터 글리코실 수용체 분자(glycosyl acceptor molecule)로 단당류 모이어티를 전달(transfer)하는 활성을 지닌 효소로서, 구체적으로 UDP-당을 글리코실 공여자로 사용하는 효소를 의미한다. 본 출원에서 상기 당전이효소는 "UDP-당전이효소" 및 "UGT"와 혼용될 수 있다.
- [43] 상기 당전이효소는 당전이효소 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환된 제조합 대장균, 바실러스, 효모, 코리네박테리움 또는 아그로박테리움으로부터 생산된

것일 수 있으며, 상기 당전이효소는 상기 대장균 등으로부터 생산 후 추가 정제된 것이거나 상업적으로 제조된 상품을 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 당전이효소는 당업계에 공지되어 있으며, 상기 당전이효소의 단백질 및 유전자 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44]

[45] 본 출원에서는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상의 단백질인 당전이효소 B(UGT-B)가 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환시킬 수 있는 효소 활성이 있음을 최초로 규명하여 UGT-B의 새로운 용도를 제공하게 되었다.

[46] 구체적으로, 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열, 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.

[47] 또한, 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)는 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열, 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 당전이효소 B(UGT-B)도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[48] 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 단백질' 또는 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 단백질'라고 기재되어 있더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단 그리고/또는 C-말단에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

[49] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

[50] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는

것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파테이트를 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다. 또한, 아미노산은 전하를 띠는(electrically charged) 결사슬을 갖는 아미노산과 전하를 띠지 않는(uncharged) 결사슬을 갖는 아미노산으로 분류할 수 있으며, 전하를 띠는 결사슬을 갖는 아미노산은 아스르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘을 포함하고, 전하를 띠지 않는 결사슬을 갖는 아미노산은 다시 비극성(nonpolar) 아미노산 또는 극성 아미노산(polar)으로 분류할 수 있으며, 비극성 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 극성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있다. 통상적으로, 보존성 치환은 생성된 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않는다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[51] 또한, 당전이효소 B(UGT-B)는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더)서열과 컨쥬게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트 될 수 있다.

[52]

[53] 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[54] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

[55] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387(1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [56] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math(1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al.(1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358(1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.

- [57] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)는 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환하는 활성을 가질 수 있다.

[58]

- [59] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조(reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.

- [60] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어,

본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.

- [61] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘(Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needleman 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.
- [62]
- [63] 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 각 서열번호로 기재한 아미노산을 코딩하는 염기서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기 서열로서 실질적으로 상기 각 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [64] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 당전이효소 B(UGT-B)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [65] 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 일 예로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다.
- [66] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나

필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [67] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [68] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [69] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [70] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [71]
- [72] 본 출원의 일 구현예로 상기 포도당이 결합된 뉴클레오티드 디포스페이트는 수크로오스와 뉴클레오티드 디포스페이트를 수크로오스 합성효소 존재하에 반응시켜 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 본 출원에서 용어, "수크로오스 합성효소"는 식물체 대사에서 가역적으로

과당에 뉴클레오타이드 디포스페이트가 결합된 포도당을 전이하여 수크로오스를 생산하는 역할을 담당하며, 본 발명에서는 5 내지 10의 pH 범위에서 수크로오스와 뉴클레오타이드 디포스페이트를 반응시켜 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트 및 과당으로 분리하는 활성을 나타낸다.

- [74] 상기 수크로오스 합성효소는 쌀, 옥수수, 밀, 대나무, 애기장대, 잔디, 보리, 수수 또는 감자에서 유래된 수크로오스 합성효소일 수 있으며, 바람직하게는 쌀, 옥수수, 밀, 혹은 보리에서 유래된 수크로오스 합성효소이고, 보다 바람직하게는 쌀, 특히 *Oryza sativa*에서 유래된 수크로오스 합성효소일 수 있다. 상기 수크로오스 합성효소는 수크로오스 합성효소 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환된 재조합 대장균, 바실러스, 효모, 코리네박테리움 또는 아그로박테리움으로부터 생산될 것일 수 있으며, 상기 대장균 등으로부터 생산 후 추가 정제된 것일 수 있고, 당업계에 공지되어 있는 수크로오스 합성효소이거나 상업적으로 구입 가능한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 구체적으로, 본 출원의 수크로오스 합성효소는 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.
- [76] 상기 수크로오스는 수크로오스 합성효소의 기질로 작용하여 뉴클레오타이드 디포스페이트에 포도당을 제공할 수 있는 것이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 원당 또는 설탕이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [77] 본 출원에서 뉴클레오타이드 디포스페이트는 퓨린뉴클레오타이드 또는 피리미딘뉴클레오타이드가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 우리딘 디포스페이트가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [78]
- [79] 상기 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트는 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)에 의해 리바우디오사이드 A와 반응하여 리바우디오사이드 D를 생성할 수 있다.
- [80]
- [81] 본 출원의 일 구현예로 상기 리바우디오사이드 A는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 스테비오사이드와 반응시켜 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [82] 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 스테비오사이드와 반응시켜 리바우디오사이드 A를 생성할 수 있다.
- [83] 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Bambusa oldhamii*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* 유래의 당전이효소일 수 있다. 바람직하게 상기 당전이효소는 *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Bambusa oldhamii* 유래의 당전이효소일 수 있다. 보다 바람직하게는 *Stevia rebaudiana* Bertoni 유래의

당전이효소일 수 있다. 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 당전이효소 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환된 제조합 대장균, 바실러스, 효모, 코리네박테리움 또는 아그로박테리움으로부터 생산된 것일 수 있고, 상기 대장균 등으로부터 생산 후 추가 정제된 것일 수 있으며, 당업계에 공지되어 있는 당전이효소이거나 상업적으로 구입 가능한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[84] 구체적으로, 본 출원의 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.

[85] 상기 스테비오사이드는 스테비아 리바우디아나 열수 혹은 에탄올 수용액 추출물 또는 이의 정제물 또는 추출물의 리바우디오사이드 A 생산 후 부산물로, 스테비오사이드 함량을 전체 스테비올 배당체 중량을 기준으로 10%중량 이상, 바람직하게는 50중량% 이상, 특히 바람직하게는 70 중량% 이상, 더욱 특히 바람직하게는 80 중량% 이상으로 함유하는 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

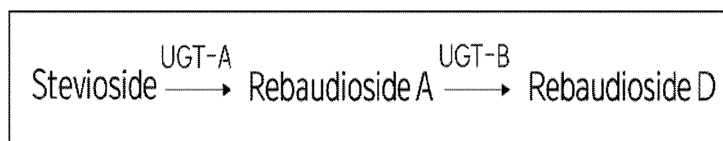
[86]

[87] 본 출원의 일 구현예로 상기 리바우디오사이드 D는 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[88]

[89] [반응식 1]

[90]



[91]

[92] 구체적으로, 상기 제조 방법은 동일 반응계에서 연속적으로 이루어지는 것일 수 있다.

[93] 본 출원에서 용어, "동일 반응계"는 하나의 반응계 혹은 반응 시스템에서 반응이 연속적으로 일어나는 것을 말한다.

[94] 본 출원의 제조 방법은 상기와 같은 반응식 1에 의해 스테비오사이드 13-O-글루코스의 C-3' 위치에 특이적으로 한개의 글루코스를 결합시켜 리바우디오사이드 A를 고수율로 합성하고, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 합성하는 연속 반응 시스템을 제공한다.

[95]

[96] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 가 추가로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

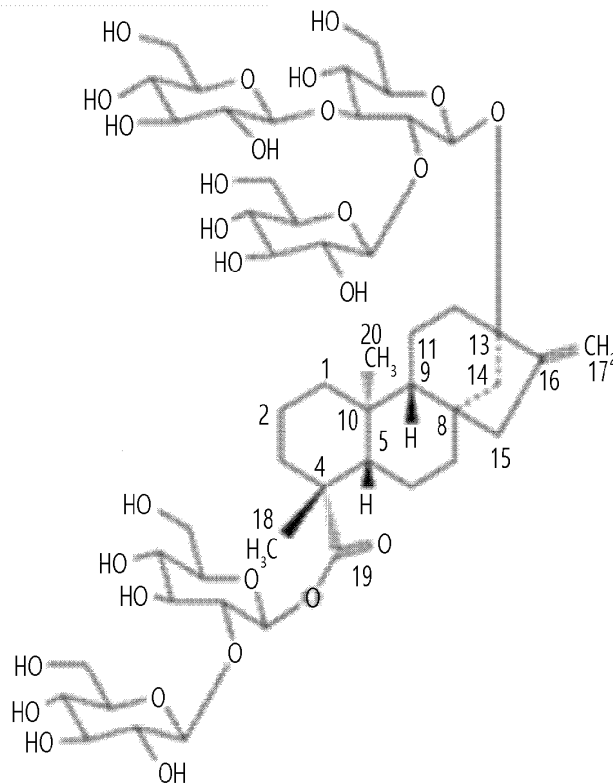
[97]

[98] 예를 들어, 상기 리바우디오사이드 D는 하기의 구조식을 갖는 것일 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

[99]

[100]



[101]

[102] 본 출원의 다른 하나의 양태는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계; 및

[103] 상기 리바우디오사이드 D를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트와 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하고,

[104] 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 M의 제조 방법을 제공한다.

[105] 상기 뉴클레오타이드 디포스페이트, 당전이효소 B(UGT-B), 리바우디오사이드 A 및 리바우디오사이드 D는 전술한 바와 같다.

[106]

[107] 본 출원의 일 구현예로 상기 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트는 상기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 수크로오스와 뉴클레오타이드 디포스페이트를 수크로오스 합성효소 존재하에 반응시켜 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [108] 구체적으로, 본 출원의 수크로오스 합성효소는 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.
- [109] 본 출원의 일 구현예로 상기 리바우디오사이드 A는 상기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 스테비오사이드와 반응시켜 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [110] 구체적으로, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.
- [111]
- [112] 본 출원의 당전이효소 A(UGT-A)는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 리바우디오사이드 D와 반응시켜 리바우디오사이드 M을 생성할 수 있다.
- [113] 구체적으로, 본 출원의 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 가지거나 및/또는 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어지거나(essentially consisting of), 구성될 수 있다.
- [114]
- [115] 본 출원의 일 구현예로 상기 리바우디오사이드 M은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [116]
- [117] [반응식 2]
- [118]
- $$\text{Stevioside} \xrightarrow{\text{UGT-A}} \text{Rebaudioside A} \xrightarrow{\text{UGT-B}} \text{Rebaudioside D} \xrightarrow{\text{UGT-A}} \text{Rebaudioside M}$$
- [119]
- [120] 구체적으로, 상기 제조 방법은 동일 반응계에서 연속적으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [121] 본 출원의 제조 방법은 상기와 같은 반응식 2에 의해 스테비오사이드로부터 리바우디오사이드 A를 고수율로 합성하고, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 합성하며, 리바우디오사이드 D로부터 리바우디오사이드 M을 합성하는 연속 반응 시스템을 제공한다.
- [122] 이에 따라, 본 출원의 제조 방법은 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A와 같은 수급이 용이하고 저가인 원료를 사용하여, 스테비아 추출물에 함유된 스테비오사이드, 리바우디오사이드 A와 같은 쓴맛 성분을 맛이 우수한 성분인 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M으로 전환할 수 있으므로, 감미질이 우수한 스테비아 감미료 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

[123]

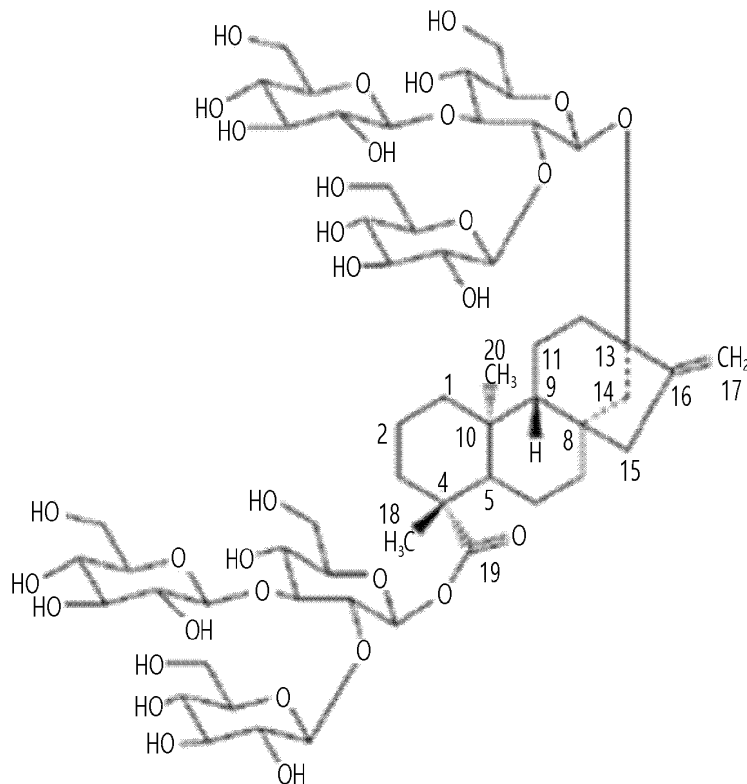
[124] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer) 가 추가로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[125]

[126] 예를 들어, 상기 리바우디오사이드 M은 하기의 구조식을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[127]

[128]



[129]

[130] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 수크로오스, 뉴클레오타이드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 수크로오스 합성효소 및 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하고,

[131] 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 제조하는 방법을 제공한다.

[132] 상기 수크로오스, 뉴클레오타이드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 수크로오스 합성효소, 당전이효소 B(UGT-B), 리바우디오사이드 D 및 동일 반응계는 전술한 바와 같다.

- [133] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 가 추가로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [134]
- [135] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 수크로오스, 뉴클레오타이드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 D, 수크로오스 합성효소, 당전이효소 A(UGT-A) 및 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하고,
- [136] 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법을 제공한다.
- [137] 상기 수크로오스, 뉴클레오타이드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 D, 수크로오스 합성효소, 당전이효소 A(UGT-A), 당전이효소 B(UGT-B), 동일 반응계 및 리바우디오사이드 M은 전술한 바와 같다.
- [138] 구체적으로, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [139] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)가 추가로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [140]
- [141] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 당전이효소 B(UGT-B)를 포함하고, 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 D 제조용 조성물을 제공한다.
- [142] 상기 당전이효소 B(UGT-B) 및 리바우디오사이드 D는 전술한 바와 같다.
- [143] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 상기 리바우디오사이드 D는 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [144]
- [145] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 당전이효소 A(UGT-A) 및 당전이효소 B(UGT-B)를 포함하고, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것이고, 상기 당전이효소 B(UGT-B)는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 M 제조용 조성물을 제공한다.
- [146] 상기 당전이효소 A(UGT-A), 당전이효소 B(UGT-B) 및 리바우디오사이드 M은

전술한 바와 같다.

[147] 본 출원의 일 구현예로 상기 당전이효소 B는 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 상기 리바우디오사이드 M은 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 M 아이소머(isomer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[148]

[149] 본 출원의 조성물은 아미노산 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[150]

[151] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는, 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 당전이효소 B(UGT-B)의, 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환시키는 당전이 효소로서의 용도를 제공한다.

[152] 상기 당전이효소 A(UGT-A), 당전이효소 B(UGT-B), 리바우디오사이드 A 및 리바우디오사이드 M 등은 전술한 바와 같다.

[153]

발명의 실시를 위한 형태

[154] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에 기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.

[155]

[156] 실시예 1. 배양 조건

[157] 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 재조합 미생물을 제작한 후, 당전이효소 B(UGT-B)를 발현한 후 반응에 사용하였다. 재조합 미생물의 배양 조건은 하기와 같다.

[158]

[159] 실시예 1-1. 대장균 배양 조건

[160] 재조합 대장균 배양은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 카나마이신을 포함하는 LB배지 5ml이 들어있는 시험관에 접종하고 600nm에서 흡광도 2.0이 될 때까지 37°C의 배양기로 종균 배양을 실시하였다. 종균 배양된 배양액을 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 카나마이신을 포함하는 LB배지 500ml이 들어있는 플라스크에 첨가하여 본 배양을 실시하였다. 또한, 600nm에서의 흡광도가 0.4가 될 때, 0.1mM

IPTG(이소프로필 β -D-1-티오갈락토티오피라노시드)를 첨가하여 효소의 대량 발현을 각각 유도하였다. 상기 과정 중의 교반속도는 180rpm, 배양온도는 37°C가 유지되도록 조절하고, IPTG를 첨가 후에는 교반속도 120rpm로 배양하였다.

[161]

[162] 실시예 1-2. 코리네박테리아 배양 조건

[163] 재조합 코리네박테리아는 10 μ g/ml 농도의 카나마이신을 포함하는 배지 (Bacto-Trypton 10g/L, Bacto-yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L, Soytone 5g/L)에 초기 농도 O.D. 600=0.1로 접종하고, 30°C에서 24시간 배양하여 효소의 발현을 유도하였다. 상기 수득한 배양액을 10 μ g/ml 농도의 카나마이신을 포함하는 배지 (포도당 80g/L, soytone 20g/L, (NH₄)₂SO₄ 10g/L, KH₂PO₄ 1.2g/L, MgSO₄ 1.4g/L)를 담은 발효기에 O.D. 600 =0.6으로 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다.

[164]

[165] 실시예 2. 리바우디오사이드 A 원료에 대한 당전이효소 B(UGT-B)의 효소 활성 측정

[166] 실시예 2-1. 당전이효소 B(UGT-B)의 정제

[167] 리바우디오사이드 A를 리바우디오사이드 D로 전환하는 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B; 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3)의 경우, 본 출원의 당전이효소 B를 코딩하는 유전자(서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8)를 함유하는 재조합 플라스미드(벡터-pET28a)를 각각 제작하고 대장균 BL21(DE3)에 클로닝하여, 각각의 효소를 대량발현 시킨 후 정제하여 사용하였다.

[168] 구체적으로, 재조합 균주 BL21 (DE3) 배양은 LB배지 5ml이 들어있는 시험관에 접종하고 600nm에서 흡광도 2.0이 될 때까지 37°C의 배양기로 종균 배양을 실시하였다. 종균 배양된 배양액을 LB배지 500ml이 들어있는 플라스크에 첨가하여 본 배양을 실시하였다. 또한, 600nm에서의 흡광도가 0.4가 될 때, 0.1mM IPTG (이소프로필 β -D-1-티오갈락토티오피라노시드)를 첨가하여 효소의 대량 발현을 각각 유도하였다. 상기 과정 중의 교반 속도는 180rpm, 배양온도는 37°C가 유지되도록 조절하고, IPTG를 첨가 후에는 교반속도 120rpm, 배양온도는 16°C로 배양하였다. 상기 형질전환된 균주의 배양액을 6000xg로 4°C에서 20분 동안 원심 분리하여 세포 상등액만을 효소액으로서 분리하였다. 효소의 특성을 정확히 파악하기 위해서 Ni-NTA superflow 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[169] 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8을 함유하는 재조합 플라스미드를 이용하여 대량발현 시킨 각각의 효소를 UGT-B_6, UGT-B_7, UGT-B_8로 명명하였다.

[170]

[171] 한편, 재조합 코리네박테리아는 10 μ g/ml 농도의 카나마이신을 포함하는 배지 (Bacto-Trypton 10g/L, Bacto-yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L, Soytone 5g/L)에 초기 농도 O.D. 600=0.1로 접종하고, 30°C에서 24시간 배양하여 효소의 발현을

유도하였다. 상기 수득한 배양액을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 카나마이신을 포함하는 배지 (포도당 80g/L, soytone 20g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g/L, KH_2PO_4 1.2g/L, MgSO_4 1.4g/L) 를 담은 발효기에 O.D. 600 = 0.6으로 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다.

[172]

[173] 실시예 2-2. 리바우디오사이드 A 원료에 대한 당전이효소 B(UGT-B)의 효소 활성 측정

[174] 상기 실시예 2-1에서 제작한 각각의 효소를 이용하여 리바우디오사이드 A 원료에 대한 당전이효소 B(UGT-B)의 효소 활성을 측정하였다.

[175] 구체적으로, 효소 반응에 사용되는 원료는 리바우디오사이드 A(대평社)로 물에 2mM이 되도록 용해하여 사용하였으며 미생물에서 발현한 상기 실시예 2-1에서 제작한 각각의 효소를 사용하여 37도에서 16시간동안 반응을 진행한 후 HPLC로 분석하였다. 상기 원료 수용액에는 UDP-glucose 또는 UDP(Uridine-diphosphate)가 2mM 포함될 수 있다.

[176]

[177] HPLC 분석 조건은 하기와 같다.

[178] -Detector wavelength : 210nm

[179] -Flow rate : 1ml/min

[180] -Sample injection vol. : 10 μl

[181] -Column : Capcell pak C18 MG II (Shiseido, 250 x 4.6 mm, particle size: 5 μm)

[182] -Solvent : Acetonitrile 30%

[183]

[184] 측정 결과는 하기 표 1 및 도 1 내지 3에 나타내었다.

[185]

[186] [표1]

샘플명	리바우디오사이드 M 아이소머 함량 (%)	리바우디오사이드 D 아이소머 함량 (%)	리바우디오사이드 D 함량 (%)	리바우디오사이드 A 함량 (%)
원료(반응 0시간)			0.3	99.7
UGT-B_6			39.5	60.5
UGT-B_7	31.5	14.1	44.0	10.4
UGT-B_8			76.1	23.9

[187] 상기 표 1 및 도 1 내지 3에 나타난 바와 같이, 본 출원의 당전이효소 B(UGT-B_6 및 UGT-B_8)에 의해 리바우디오사이드 A에서 리바우디오사이드 D로 전환됨을 확인하였고, 본 출원의 당전이효소(UGT-B_7)에 의해

리바우디오사이드 A에서 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer),
리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 및 리바우디오사이드 D로 전환됨을
확인하였다.

[188]

[189] 실시예 3, 스테비오사이드 원료에 대한 당전이효소 A(UGT-A) 및 당전이효소
B(UGT-B)의 효소 활성 측정

[190] 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소는 선행문헌(WO 2014
/133248)의 방법을 이용하여 정제하여 사용하였으며, 그 서열은 각각 서열번호 4
및 서열번호 5에 나타내었다.

[191] 상기 당전이효소 A(UGT-A), 상기 수크로오스 합성효소 및 상기 실시예
2-1에서 제작한 각각의 당전이효소 B(UGT-B)를 이용하여 스테비오사이드
원료에 대한 당전이효소 A(UGT-A) 및 당전이효소 B(UGT-B)의 효소 활성을
측정하였다.

[192] 구체적으로, 효소 반응에 사용되는 원료는 2mM 스테비오사이드 (haigen社),
50mM 설탕(CJ제일제당) 수용액을 사용하였으며 미생물에서 발현한 상기
당전이효소 A(UGT-A), 상기 수크로오스 합성효소 및 상기 실시예 2-1에서
제작한 각각의 당전이효소 B(UGT-B)를 사용하여 37도에서 24시간동안 반응을
진행한 후 HPLC로 분석하였다. 상기 원료 수용액에는 UDP-glucose 또는
UDP(Uridine-diphosphate)가 2mM 포함될 수 있다.

[193]

[194] HPLC 분석 조건은 하기와 같다.

[195] -Detector wavelength : 210nm

[196] -Flow rate : 1ml/min

[197] -Sample injection vol. : 10 μ l

[198] -Column : Capcell pak C18 MG II (Shiseido, 250 x 4.6 mm, particle size: 5 μ m)

[199] -Solvent : Acetonitrile 30%

[200]

[201] 측정 결과는 하기 표 2 및 도 4 내지 6에 나타내었다.

[202]

[203] [표2]

샘플명	리바우 디오사 이드 M 아이소 머 (isomer) (%)	리바우 디오사 이드 D (%)	리바우디 오사이드 M (%)	리바우디 오사이드 I (%)	리바우디 오사이드 A (%)	스테비오 사이드 (%)
원료(반응 0시간)	0	0	0	0	4.6	95.4
UGT-B_6, 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소	0	24.3	12.1	1.8	61.8	0
UGT-B_7, 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소	37.5	35	16.7	10.8	0	0
UGT-B_8, 당전이효소 A(UGT-A) 및 수크로오스 합성효소	0	31.0	34.3	4.7	30	0

[204] 상기 표 2 및 도 4 내지 6에 나타난 바와 같이, 스테비오사이드에서 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer), 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 I 및 리바우디오사이드 A로 몰농도 대비 100% 전환된 것을 확인하였다.

[205]

[206] 실시예 4. 리바우디오사이드 D 원료에 대한 당전이효소 A(UGT-A)의 효소 활성 측정

[207] 상기 실시예 3의 당전이효소 A(UGT-A)를 사용하여 리바우디오사이드 D에서 리바우디오사이드 M으로의 전환율을 측정하였다.

[208] 구체적으로, 효소 반응에 사용되는 원료는 리바우디오사이드 D(haigen 社) 를 물에 1mM이 되도록 용해하여 사용하였으며 미생물에서 발현한 상기

당전이효소 A(UGT-A)를 사용하여 37도에서 16시간동안 반응을 진행한 후 HPLC로 분석하였다. 상기 원료 수용액에는 UDP-glucose 또는 UDP(Uridine-diphosphate)가 2mM 포함될 수 있다.

[209]

[210] HPLC 분석 조건은 하기와 같다.

[211] -Detector wavelength : 210nm

[212] -Flow rate : 1ml/min

[213] -Sample injection vol. : 10 μ l[214] -Column : Capcell pak C18 MG II (Shiseido, 250 x 4.6 mm, particle size: 5 μ m)

[215] -Solvent : Acetonitrile 30%

[216]

[217] 측정 결과는 도 7에 나타내었다.

[218] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 출원의 당전이효소 A에 의해 리바우디오사이드 D에서 리바우디오사이드 M으로 대부분 전환됨을 확인하였다.

[219]

[220] 실시예 5. 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 및 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)의 액체크로마토그래피 질량분석(LC-MS/MS) 분석

[221]

[222] 상기 실시예 2 및 실시예 3에서 전환된 화합물이 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 또는 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)인지 확인하기 위하여, 액체크로마토그래피 질량분석(LC-MS/MS) 분석을 이용하여, 상기 실시예 2 및 실시예 3에서 전환된 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 및 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)를 각각 리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M과 비교하였다.

[223] 구체적으로, Acquity UPLC (Waters社) 및 Xe-vo G2-XS Q-Tof 질량분석기를 이용하였으며, LC-MS/MS 분석 조건은 하기 표 3에 나타내었고, 용출조건은 하기 표4에 나타내었으며, MS conditions은 하기 표 5에 나타내었다.

[224]

[225] [표3]

LC-MS/MS 분석 조건

크로마토그래피	Waters Acquity UPLC
컬럼	Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1x150mm
컬럼온도	40 °C
유속	0.20 mL/min
시료 주입	1.0 μ L
용매	A: 증류수B: 50% Acetonitrile

[226] [표4]

용출조건

Time(min)	%A	%B
0	55.0	45.0
0.50	55.0	45.0
3.00	52.5	47.5
6.00	52.4	47.6
9.00	47.5	52.5
9.10	0.0	100.0
10.00	0.0	100.0
10.10	55.0	45.0
15.00	55.0	45.0

[227] [표5]

MS conditions

Ionization mode	ESI Negative mode
Capillary voltage	2.5 kV
Cone voltage	30 V
Source Temperature	120 °C

[228] 그 결과, 도 8 및 도 9 에 나타난 바와 같이, RebD Standard와 fraction 받은 Unknown peak1을 비교한 결과, RebD standard 및 Unknown peak1이 동일 분자량이고 MSMS Fragment가 일치하나 Peak의 Retention time이 다른 것으로 보아 Unknown peak1은 RebD의 Isomer로 확인되었다.

[229] 또한, 도 10 및 도 11 에 나타난 바와 같이, RebM Standard와 fraction 받은 Unknown peak2를 비교한 결과, RebM standard 및 Unknown peak2가 동일 분자량이고 MSMS Fragment가 일치하나 Peak의 Retention time이 다른 것으로 보아 Unknown peak2는 RebM의 Isomer로 확인되었다.

[230]

[231] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 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 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는

변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하고,
상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 D의 제조 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트는 수크로오스와 뉴클레오타이드 디포스페이트를 수크로오스 합성효소 존재하에 반응시켜 제조한 것인, 제조 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 리바우디오사이드 A는 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 스테비오사이드와 반응시켜 제조한 것인, 제조 방법.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 수크로오스 합성효소는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 제조 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 제조 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 가 추가로 제조되는 것인, 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제조 방법은 동일 반응계에서 연속적으로 이루어지는 것인, 제조 방법.
- [청구항 8] 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트를 당전이효소 B(UGT-B)의 존재하에 리바우디오사이드 A와 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계; 및
상기 리바우디오사이드 D를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트와 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하고,
상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 M의 제조 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 제조 방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 포도당이 결합된 뉴클레오타이드 디포스페이트는 수크로오스와 뉴클레오타이드 디포스페이트를 수크로오스 합성효소 존재하에 반응시켜 제조한 것인, 제조 방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 리바우디오사이드 A는 포도당이 결합된

- 뉴클레오티드 디포스페이트를 당전이효소 A(UGT-A)의 존재하에 스테비오사이드와 반응시켜 제조한 것인, 제조 방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 수크로오스 합성효소는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 제조 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 제조 방법.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)가 추가로 제조되는 것인, 제조 방법.
- [청구항 15] 제8항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제조 방법은 동일 반응계에서 연속적으로 이루어지는 것인, 제조 방법.
- [청구항 16] 수크로오스, 뉴클레오티드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 수크로오스 합성효소 및 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 D를 제조하는 단계를 포함하고, 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 제조하는 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer)가 추가로 제조되는 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 D를 제조하는 방법.
- [청구항 18] 수크로오스, 뉴클레오티드 디포스페이트, 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 D, 수크로오스 합성효소, 당전이효소 A(UGT-A) 및 당전이효소 B(UGT-B)를 동일 반응계에서 반응시켜 리바우디오사이드 M을 제조하는 단계를 포함하고, 상기 당전이효소 B는 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질인 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 당전이효소 A(UGT-A)는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer)가 추가로 제조되는 것인, 리바우디오사이드 A로부터 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법.
- [청구항 21] 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 당전이효소 B(UGT-B)를 포함하는 리바우디오사이드 D 제조용 조성물.

- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 상기 리바우디오사이드 D는 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 D 아이소머 (isomer) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 리바우디오사이드 D 제조용 조성물.
- [청구항 23] 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 당전이효소 B(UGT-B) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질인 당전이효소 A(UGT-A)를 포함하는 리바우디오사이드 M 제조용 조성물.
- [청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 당전이효소 B는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 상기 리바우디오사이드 M은 리바우디오사이드 M, 리바우디오사이드 M 아이소머 (isomer) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 리바우디오사이드 M 제조용 조성물.