



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0046691  
(43) 공개일자 2014년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) C12P 19/02 (2006.01)  
C12N 1/38 (2006.01)

(71) 출원인  
주식회사 종근당바이오  
서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)

(21) 출원번호 10-2012-0112395

(72) 발명자

(22) 출원일자 2012년10월10일

서정우  
서울 양천구 목동서로 400, 1025동 205호 (신정동, 목동10단지아파트)

심사청구일자 없음

박장우

서울 서초구 서초중앙로29길 28, 301동 1407호 (반포동, 미도아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

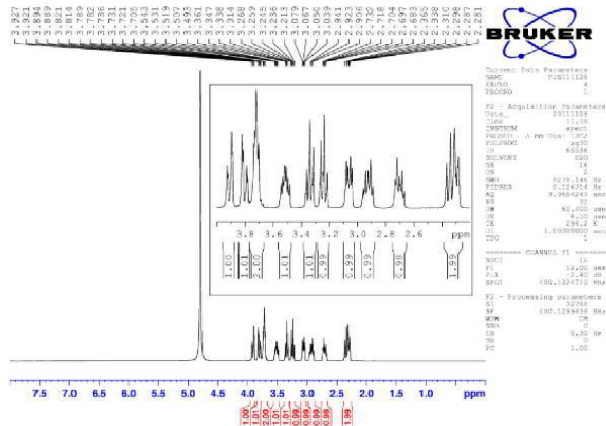
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 생물전환 수율이 우수한 신규 글루코노박터 속 C K DBM 0901 균주

**(57) 요약**

본 발명은 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성을 가지며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환 하는 능력을 갖는 글루코노박터 속 균주, 이를 이용하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 또는 미글리톨을 제조하는 방법, 및 상기 균주를 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 미글리톨의 전구체 및 미글리톨의 제조를 위하여 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도3**



(72) 발명자

**김병국**

서울 양천구 신정로7길 76, 202동 1207호 (신정동,  
푸른마을2단지아파트)

**서민정**

경기도 안산시 단원구 고잔동 7758-7번지 402

**박지수**

경기 안산시 상록구 안산천동로 146, 206동 1505호  
(월피동, 주공2단지아파트)

**서주원**

경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84 에  
버힐스1단지 1호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007989

부처명 농촌진흥청

연구사업명 농생명바이오식의약소재개발 사업

연구과제명 당뇨병치료제 Miglitol의 산업적 생산기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 종근당바이오 주식회사

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.12.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(i) 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성 및 (ii) 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환 하는 능력을 갖는 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP).

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주는 하기의 수율로 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 하는 것을 특징으로 하는 균주:

(i) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-200 g/l 의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시, 생물전환 수율이 74-92%이거나; 또는

(ii) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주의 휴면세포(resting cell)를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-200 g/l 의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시, 생물전환 수율이 88-96%임.

### 청구항 3

다음의 단계를 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조방법:

(a) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP) 또는 상기 미생물의 휴면세포(resting cell)를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 함유하는 배지에서 배양하는 단계; 및

(b) 단계 (a)의 배지에서 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 회수하는 단계.

### 청구항 4

다음의 단계를 포함하는 미글리톨(Miglitol)의 제조방법:

(a) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP) 또는 상기 균주의 휴면세포(resting cell)를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 포함하는 배지에서 배양하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 얻는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서 얻은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 이용하여 미글리톨을 합성하는 단계.

### 청구항 5

글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP), 상기 균주의 휴면세포 또는 상기 균주의 배양물을 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산용 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성을 가지며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환하는 능력을 갖는 글루코노박터 속 균주, 이를 이용하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 또는 미글리톨을 제조하는 방법, 및 상기 균주를 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 초산발효 세균(acetic acid bacteria)에 속하는 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*)의 세포막에 존재하는 탈수소 효소들은 조효소로서 피로로퀴놀린퀴논(pyrroloquinoline quinone ; PQQ)을 사용하며 다양한 당류와 알코올류들을 불완전하게 산화하는 특징을 가지고 있다(Complete genome sequence of the acetic bacterium *Gluconobacter oxydans*, *Nat. Biotechnol.* 23:pp.195-200, 2005). 이와 같이, 초산발효 세균은 독특한 산화적 능력을 가지고 있기 때문에 역사적으로 에탄올과 초산으로 불완전 산화하는 특성에 의하여 식초 생산에 이용되어왔다.
- [0003] 최근, 초산발효 세균은 비타민 C 합성을 위한 L-소르보스(L-sorbose) 생산과 제2형 당뇨병 치료제인 미글리톨(miglitol)의 합성을 위한 6-아미노-L-소르보스(6-amino-L-sorbose) 생산과 같은 다양한 생물공학적 과정에서 살아있는 생촉매제로 이용되고 있다(Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3:pp.233-242, 2002).
- [0004] 미글리톨은 바이엘(Bayer)사에 의해 개발된 α-글루코시다제(α-glucosidase) 억제제로 1996년 FDA 승인을 얻었으며, 제2형 당뇨병 치료를 위해 글리셋(Glyset)이라는 상품명으로 현재 판매되고 있다(Asymmetric oxidation by *Gluconobacter oxydans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70(2):pp.135-139, 2006). 산업적으로 미글리톨의 제조공정은 포도당과 에탄올아민으로부터 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 합성하는 첫 번째 단계, 미생물을 생촉매로 사용하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환을 수행하는 두 번째 단계 및 화학합성을 통하여 미글리톨을 합성하는 세 번째 단계로 이루어진다(Biocatalytic regioselective oxidation of N-hydroxyethyl glucamine for synthesis of miglitol, *Advanced Materials Research*, 197-198:pp.51-55, 2011).
- [0005] 미글리톨 제조에 관한 선행문헌에 개시된 전합성 공정을 살펴보면, 분자 내 키랄 중심(chiral center)에 대한 화학합성의 비선택성으로 인하여 보호기와 다단계의 복잡한 반응이 필요하여 경제성이 거의 없다. 이 점을 고려하면, 미글리톨 제조 시 위에서 명시된 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨로부터 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 생물전환 반응이 가장 중요한 공정임을 알 수 있다.
- [0006] 선행특허에 개시된 미생물에 의한 아미노-D-소르비톨로부터 아미노-L-소르보스로의 생물전환 수율은 최대 50-60%로서 산업적으로 경제성이 매우 낮다(대한민국 등록특허 제10-0088936호, 미국등록특허 제4,246,345호). 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 보호기가 부가된 아미노-D-소르비톨(N-protected amino-D-sorbitol)을 미생물에 의하여 생물전환함으로써 전환수율이 향상되었으나, 보호기를 부가하고 산 또는 알칼리 조건에서 이를 제거하는 공정이 추가됨으로써 제조원가가 상승되는 문제점이 있었다(미국등록특허 제4,266,025호, 미국등록특허 제4,405,714호, 미국등록특허 제4,806,650호).
- [0007] 따라서, 미글리톨 제조공정 중 가장 중요한 생물전환 공정에서 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환 하는 능력을 갖는 신규 미생물 및 이를 이용한 공정 개발이 절실히 필요한 상황이다.
- [0008] 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 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명자들은 고농도의 기질(1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨)에 대한 내성을 보이면서 동시에 전환수율이 개선된 새로운 미생물을 개발하기 위하여 연구하였다. 그 결과, 새로이 개발한 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주가 고농도의 기질에 대한 내성을 가지며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨의 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 전환수율이 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP)를 제공하는 데 있다.

- [0011] 본 발명의 다른 목적은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 미글리톨의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성 및 (ii) 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환 하는 능력을 갖는 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP)를 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 고농도의 기질(1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨)에 대한 내성을 보이면서 동시에 전환수율이 개선된 새로운 미생물을 개발하기 위하여 연구하였다. 그 결과, 새로이 개발한 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주가 고농도의 기질에 대한 내성을 갖으며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨의 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 전환수율이 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 본 발명의 CKDBM 0901 균주는 16S rDNA 서열분석에 의하여 글루코노박터 속 미생물로 동정되었고, 2012년 9월 21일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁번호 KCTC 12282BP로 기탁되었다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명 균주는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨의 농도가 최소억제농도(MIC)로부터 점진적으로 증가하는 배지에서 돌연변이원 처리에 의하여 변이된 모균주(글루코노박터 옥시단스)를 배양하여 내성이 증가한 균주를 선발하고, 상기 과정을 여러 번 반복하여 100 g/L 이상의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 농도에서도 잘 자라는 균주를 선발하여 제조될 수 있다. 상기 모균주의 돌연변이체를 제조하는 방법으로 자외선 또는 X-선 조사; 니트로소구아니딘(N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘), 니트로젠 머스타드, 메틸메탄설포네이트 등과 같은 화학적 돌연변이원의 처리; 또는 DNA 재조합이나 P1 박테리오파아지를 매개로 한 형질도입 등의 방법을 이용할 수 있다
- [0019] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 균주는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성을 갖는다. 본 명세서에서 사용된 용어, "1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성"은 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨이 높은 농도로 존재하는 환경 하에서도 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 할 수 있음을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 균주는 야생형 글루코노박터 속 미생물, 바람직하게는 야생형 글루코노박터 옥시단스가 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 할 수 있는 최대농도보다 높은 농도로 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 함유하는 배지에서 상기 생물전환 활성을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 균주는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 50-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 생물전환 활성을 나타내며, 보다 바람직하게는 100-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내고, 보다 더 바람직하게는 110-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 120-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내고, 보다 더 바람직하게는 130-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 140-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 150-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 160-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 170-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타내며, 보다 더 바람직하게는 180-200 g/l 농도로 함유하는 배지에서 생물전환 활성을 나타낸다.
- [0021] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 미생물 균주는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 하는 능력(수율)이 우수하다.

- [0022] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명 균주의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 하는 수율은 다음과 같다:
- [0023] (i) 본 발명의 균주를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-200 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 74-92%의 생물전환 수율을 나타내며; 바람직하게는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-150 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 82-92%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-100 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 87-92%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-50 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 90-92%의 생물전환 수율을 나타내고; 보다 바람직하게는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 200 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 73-75%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 150 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 81-83%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 100 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 86-88%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 50 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 89-91%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 91-93%의 생물전환 수율을 나타낸다.
- [0024] (ii) 본 발명 균주의 휴면세포를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-200 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 88-96%의 생물전환 수율을 나타내며; 바람직하게는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-150 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 93-96%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-100 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 94-96%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10-50 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 95-96%의 생물전환 수율을 나타내고; 보다 바람직하게는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 200 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 87-89%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 150 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 92-94%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 100 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 93-95%의 생물전환 수율을 나타내며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 50 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 95-97%의 생물전환 수율을 나타내고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10 g/l의 농도로 함유하는 배지에서 배양 시 94-96%의 생물전환 수율을 나타낸다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명 균주는 (i) 그람음성, (ii) 간균, (iii) 포자 형성하지 않음, (iv) 0.5  $\mu\text{m}$   $\times$  2.0  $\mu\text{m}$ 의 세포크기, (v) 베이저색의 콜로니 색깔, (vi) 볼록 융기(convex)의 콜로니 모양, (vii) 활면(smooth)의 콜로니 표면, 및 (viii) 불투명의 콜로니 투명도의 균학적 특징을 갖는다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 글루코노박터 속 균주는 글루코노박터 옥시단스이다.
- [0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조 방법을 제공한다:
- [0028] (a) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP) 또는 상기 미생물의 휴면세포(resting cell)를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 함유하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0029] (b) 단계 (a)의 배지에서 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 회수하는 단계.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어, "휴면세포(resting cell)"는 증식을 하지 않는 상태의 배양세포를 의미한다. 하기 실시예에서 증명된 바와 같이, 휴면세포 상태의 본 발명의 균주는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산 수율이 비-휴면세포에 비하여 향상되었으며, 특히 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 존재 하에서도 높은 수율로(88-96%) 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 생물전환 할 수 있다(표 5 및 6 참조).
- [0031] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 단계 (a)는 (a-1) 본 발명의 균주 또는 이의 휴면세포를 효모추출물, D-소르비톨, 인산칼륨(제일인산칼륨 및/또는 제이인산칼륨) 및 황산마그네슘을 포함하는 배지에서 배양한 후 균체를 회수하는 단계; 및 (a-2) 회수된 균체를 황산마그네슘, 인산칼륨(제일인산칼륨 및/또는 제이인산칼륨) 및 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 출발물질인 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨은 본 발명의 균주를 배지에 접종하기에 앞서 첨가하거나 균주의 접종 후에 첨가할 수 있으며, 배양 시작과 동시에 첨가하거나, 또는 배양 과정에 걸쳐 연속적으로 또는 분할해서 첨가할 수 있다. 사용되는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨

의 양은 당업자에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조를 위한 배지는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10 g/l 내지 150 g/l의 농도로 함유하는 것이 바람직하고, 10 g/l 내지 100 g/l의 농도로 함유하는 것이 보다 바람직하며, 10 g/l 내지 80 g/l의 농도로 함유하는 것이 보다 더 바람직하다. 본 발명의 균주를 휴면세포 페이스트(resting cell paste)의 형태로 사용할 경우의 상기 배지는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 10 g/l 내지 200 g/l의 농도로 함유하는 것이 바람직하고, 10 g/l 내지 150 g/l의 농도로 함유하는 것이 보다 바람직하다.

- [0033] 본 발명에 제조방법에 사용되는 배지는 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨뿐만 아니라, D-소르비톨, 질소원, 무기염 및 미량원소, 성장인자를 포함할 수 있으며, 적어도 하나의 다른 탄소원을 포함할 수도 있다. 첨가되는 각 성분의 양은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 생성을 최대화할 수 있도록 선택되는 것이 바람직하며, 그 양은 당해 기술분야에 알려진 여러 가지 방법에 따라 당업자에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 배양배지는 D-소르비톨 60 g/l, 효모추출물 10 g/l, 황산마그네슘 2.5 g/l, 탄산칼슘 10 g/l 및 적량의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 포함하며, 필요에 따라 보충 탄소원, 질소원 또는 비타민 등의 적합한 성분을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 배양배지는 효모추출물 25 g/l, D-소르비톨 60 g/l, 제일인산칼륨 5 g/l, 제이인산칼륨 5 g/l, 황산마그네슘 5 g/l 및 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 포함할 수 있다.
- [0034] 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨로부터 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 생산을 극대화하기 위한 배양조건으로서 온도, pH, 통기, 교반, 배양기간 등의 최적화는 당업자에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 특정 배양조건의 선택은 사용되는 본 발명의 균주, 배지조성, 배양규모 및 기타 고려사항 등에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 제조방법에서 균주의 배양온도는 15 내지 37°C에서 이루어지는데, 바람직하게는 25°C에서 이루어진다. 배양액의 바람직한 pH는 4.0 내지 8.0 범위이며, 바람직하게는 4.5 내지 7.0 범위이고, 보다 더 바람직하게는 5.5 내지 6.0이다.
- [0035] 본 발명에서는, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조를 위하여 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주의 세포추출물 또는 상기 미생물의 휴면세포의 세포추출물을 이용할 수도 있다. 세포추출물을 이용한 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 제조방법은 (a) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주의 세포추출물 또는 상기 미생물의 휴면세포의 세포추출물을 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 접촉시키는 단계; 및 (b) 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 회수하는 단계를 포함하여 수행된다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 미글리톨(Miglitol)의 제조방법을 제공한다:
- [0037] (a) 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP) 또는 상기 균주의 휴면세포(resting cell)를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 포함하는 배지에서 배양하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 얻는 단계; 및
- [0038] (b) 단계 (a)에서 얻은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 이용하여 미글리톨을 합성하는 단계.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어, "미글리톨"은 (2R,3R,4R,5S)-1-(2-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol로서 α-글루코시다제억제제이며, 경구용 제2형 당뇨병 치료제이다.
- [0040] 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 사용하여 미글리톨을 제조하는 방법은 미국특허 제5,602,013호, 미국특허 제5,610,039호, 미국특허 제5,916,748호 및 미국특허 제6,552,176호에 기술되어 있다. 상기 특허문헌은 참조로서 본 명세서에 삽입된다.
- [0041] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 단계 (a)에서 얻은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 이용하여 미글리톨을 합성하는 방법은 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 포함하는 배양액을 여과한 다음 활성탄을 처리하여 색소를 제거하고 수소화 반응기로 이송하여 미글리톨 합성을 수행하여 실시된다. 수소화 반응을 위한 촉매로는 팔라듐-온-차콜(palladium-on-charcoal)을 사용함이 바람직하고, 반응에 적합한 온도와 압력조건에서 반응을 진행한 다음 여과하여 촉매를 제거한다. 상기 여과액으로부터 미글리톨을 정제하기 위하여 수지에 흡착 후 용리하고 농축한 다음 결정화와 재결정화 과정을 거쳐 건조하면, 순도가 높은 미글리톨을 백색의 분말형태로 얻을 수 있다. 본 발명의 미글리톨 제조방법에 의하면, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 농축과정 없이 높은 수율로 미글리톨을 제조할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 (KCTC 12282BP), 상기 균주의 휴면

세포 또는 상기 균주의 배양물을 포함하는 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산용 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 배양물은 배양물 자체뿐만 아니라, 배양물의 농축물 및 건조물도 포함하는 광의의 의미이다.

[0044] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에는 균주의 생물전환에 의하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 생산하기 위하여 요구되는 성분, 예컨대 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨, 탄소원 및 질소원을 함유하는 배지를 포함할 수 있다. 본 발명의 균주 및 이의 휴면세포는 높은 농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 내성을 가지며, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨의 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로의 전환 수율이 우수하므로, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 생산, 나아가 이를 이용한 미글리톨의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

### 발명의 효과

[0045] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0046] (i) 본 발명은 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성 및 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 고수율로 생물전환하는 능력을 갖는 글루코노박터 속 CKDBM 0901 균주 및 이를 이용하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 제조하는 방법을 제공한다.

[0047] (ii) 본 발명의 균주는 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨로부터 생물전환에 의하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스를 고수율로 생산할 수 있기 때문에 매우 경제적이다.

[0048] (iii) 본 발명의 균주에 의한 생물전환에 의해 생성된 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 용액은 고농도이므로 이에 대한 별도의 농축과정을 거치지 않고 미글리톨을 합성할 수 있기 때문에 미글리톨 제조공정을 단축하고 제조원가를 절감할 수 있다.

[0049] (iv) 따라서, 본 발명은 미글리톨의 전구체 및 미글리톨의 제조를 위하여 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 CK-2165 균주의 16s rDNA 서열분석 결과에 따라 이 균주가 속하는 글루코노박터 속 균들에 대한 계통수를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 방법에 따라 제조된 미글리톨에 대하여 적외선 분광법으로 분석한 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 방법에 따라 제조된 미글리톨에 대하여 핵자기공명 분광법으로 분석한 스펙트럼을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0052] 실시예

[0053] 실시예 1. 글루코노박터 속 CK-2165 균주의 분리

[0054] <1-1> 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성 배양액 확보

[0055] 한국 내 다양한 지역으로부터 모래, 과수원 토양, 과일, 채소 및 기타 환경적 시료를 수집하고, 저온의 통풍이 잘되는 습윤한 장소에 저장하였다. 상기 시료 0.5g씩을 표 1의 GSY 배지 20 ml가 담긴 100 ml의 삼각 플라스크에 접종하고 3일 동안 220 rpm으로 28℃에서 진동시키며 배양하였다. 전환배양 능력을 갖는 미생물을 스크리닝 하기 위하여, 상기 GSY 배지에서 3일 동안 배양한 배양액 1 ml씩을 각각 표 1의 GSYN 배지 20 ml가 담긴 100 ml의 삼각 플라스크에 접종하고 4일 동안 220 rpm으로 25℃에서 진동시키며 배양하였다. 이와 같은 배양액 1 ml씩을 멸균된 30% 글리세롤 용액 1ml와 각각 혼합하여 -70℃에 보관하였다.



- [0056] 상기 GSYN 배지에서 4일 동안 배양한 배양액으로부터 전환배양산물인 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 생성 여부를 확인하기 위하여, 와트만 LK5 실리카겔 플레이트와 250 mm 두께의 박막 크로마토그래피를 사용하였다. 상기 플레이트에 원심분리한 배양액 10  $\mu$ l를 점적하고, 전개용매(n-부탄올 : 아세트산 : 정제수 = 4 : 1 : 2)에서 30분 동안 전개하였다. 플레이트를 드라이기로 건조한 후 0.03% 닌히드린 용액을 분무하고 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 소성시켰다. 표준물과 비교하여 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 스폿이 감소하고, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 스폿이 상대적으로 증가한 배양액 샘플을 표시하였다.
- [0057] 박막 크로마토그래피로부터 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 스폿이 검출된 배양액에 대하여 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 시료를 정제수에 10배 희석하고 0.45  $\mu$ m의 와트만 여과지를 통하여 여과하였다. 3차 정제수에 0.1% 인산(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 포함하는 이동상을 사용하여 리크로스브 아민 컬럼(Lichrosorb NH<sub>2</sub>, 5 $\mu$ m) 및 워터스 모델 2695 HPLC와 2414-RI(Refractive Index) Detector에서 분석하였다.
- [0058] 분석 결과, 21번, 36번 및 58번 배양액에서 각각 3.8 g/l, 2.6 g/l 및 3.4 g/l의 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스가 생성되었다.

**표 1**

스크리닝을 위해 사용된 배지

성분	농도(g/l)	
	GSY	GSYN
D-글루코스	5	0
D-소르비톨	30	60
효모 추출물	10	10
황산 마그네슘	2.5	2.5
탄산칼슘	5	10
1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨	0	10

- [0059]
- [0060] <1-2> 21번 배양액으로부터 CK-2165 균주 선발
- [0061] 상기 21번, 36번 및 58번 배양액으로부터 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로 전환할 수 있는 미생물을 순수분리하기 위하여, 각각의 배양액을 0.85% 식염수로 10<sup>-7</sup>까지 희석하고 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 10 g/l가 포함된 표 2의 GSYA 고체배지에 도말한 다음, 형태 및 크기가 다양한 콜로니를 무작위로 취하여 다시 표 1의 GSY 배지 20 ml가 담긴 100 ml의 삼각 플라스크에 접종하고, 2일 동안 220 rpm으로 28 $^{\circ}$ C에서 진동시키며 배양하였다. 상기 배양액 1 ml씩을 각각 표 1의 GSYN 배지 20 ml가 담긴 100 ml의 삼각 플라스크에 접종하고 4일 동안 220 rpm으로 25 $^{\circ}$ C에서 진동시키며 배양하였다. 이와 같이 배양한 후, 실시예 1-1에 명시된 박막크로마토그래피법에 의하여 일차적으로 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스의 스폿이 상대적으로 증가한 배양액을 선정하였다. 선정된 배양액에 대하여 실시예 1-1에 명시된 HPLC법에 의하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성농도를 정량하였다(표 3).

**표 2**

균주 순수분리를 위한 고체배지(GSYA)

성분	농도(g/l)
D-글루코스	80
D-소르비톨	30
효모 추출물	10
황산 마그네슘	2.5
탄산칼슘	20
한천	20

[0062]

**표 3**

순수분리 된 균주별 전환배양 결과

균주번호	배양시간		전환배양 결과	
	종자배지	전환배지	6-하이드록시에틸 아미노-L- 소르보스(g/L)	수율 (%)
CK-2117	42	94	5.5	55
CK-2165	40	88	6.8	68
CK-2173	48	96	4.6	46
CK-3629	45	96	4.1	41
CK-3686	45	96	3.2	32
CK-5811	40	90	3.8	38
CK-5879	38	90	4.7	47
CK-5893	42	92	4.3	43

[0063]

[0064] 실시예 2. 글루코노박터 속 신규 균주 CK-2165의 동정

[0065] <2-1> 형태학적 특징

[0066] 실시예 1에서 분리된 균주 CK-2165의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 그람염색 및 모양 등을 관찰하였다. 구체적으로, CK-2165 균주를 0.85% 식염수로 희석하여 표 2의 GSYA 배지에 도말한 다음 생성되는 개별 콜로니들

에 대하여 그람염색을 실시하였으며, 콜로니의 크기, 모양, 색깔 등을 관찰하고 광학현미경으로 미세구조를 관찰하였다. 관찰결과를 표 4에 나타내었다.

**표 4**

CK-2165 균주의 형태학적 특징

형태학적 특징	CK-2165
그람염색	음성
세포형태	간균
포자형성	음성
세포크기	0.5 $\mu\text{m}$ × 2.0 $\mu\text{m}$
콜로니 색깔	베이지색
콜로니 모양	볼록 융기(convex)
콜로니 표면	활면(smooth)
콜로니 투명도	불투명

[0067]

[0068]

표 4에 기재된 바와 같이, CK-2165 균주는 그람 음성이며, 간균으로서 포자를 형성하지 않고 균 증식 단계에 따라 단일(single) 또는 쌍(pair)으로 배열된 모양을 갖는다.

[0069]

**<2-2> 16s rDNA 분석**

[0070]

실시예 1에서 분리된 균주 CK-2165의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석하기 위하여 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rDNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 16S-27F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; 서열 목록 제1서열) 및 16S-1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' 서열목록 제2서열)을 프라이머로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing kit와 373A automatic DNA sequencer (Perkin Elmer Co. USA)를 사용하여 염기서열을 결정하고, 이를 NCBI 데이터베이스와 Blast 프로그램으로 비교 분석하였다.

[0071]

CK-2165 균주의 16S rDNA 서열(서열목록 제3서열)을 결정하고, 이를 바탕으로 계통수 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 총 1,377bp 였으며, NCBI 탐색 결과 글루코노박터 옥시단스 속 균주들과 높은 상동성을 보였다. 특히, 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) DSM 3503 (NR026118)과 글루코노박터 로세우스(*Gluconobacter roseus* NBRC 3990 (NR041049)에서 99.0% 이상의 가장 높은 상동성을 나타내었으며, 그 외 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) NBRC 14819 (AB178433), 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) NBRC 12528 (AB178432), 그리고 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) NBRC 12118 (AB178430) 균주들과도 높은 상동성을 보여주어 CK-2165가 *Gluconobacter oxydans* 균주라는 결과를 얻었다(도 1).

[0072]

**실시예 3. 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 내성을 갖는 돌연변이주의 선발**

[0073]

실시예 1에서 분리된 균주 CK-2165에 돌연변이를 유발시킨 다음 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성이 향상된 균주를 선발하였다. 구체적으로, 글루코노박터 옥시단스 CK-2165 균주를 탄산칼슘이 제외된 GSY 배지에 접종하고 28℃에서 초기 대수증식기인 8시간까지 배양하였다. 상기 배양액 5 ml를 취한 다음 원심분리하여 상등액을 버리고 증류수로 2번 세척 후 50 mM 인산칼륨 완충용액(KPB, pH 6.5)에 현탁시켰다. 이 세포현

탁액 5 ml에 N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG)을 최종농도 1-2 mg/l 가 되도록 첨가하고, 30℃, 220 rpm의 항은 교반기에서 6시간 동안 배양하였다. 항은 배양액을 50 mM 인산칼륨 완충용액으로 2번 세척한 다음 희석하여 GSYA 고체배지에 도달한 다음 30℃에서 2-3일 동안 배양하였다. 상기 GSYA 고체배지상에 출현하는 개별 콜로니들 각각을 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 10 g/l 가 포함된 GSYA 고체배지로 이송하여 30℃에서 2-3일 동안 배양하고, 여기서 성장된 콜로니를 다시 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨의 농도가 점진적으로 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l로 증가하는 GSYA 고체배지에 순차적으로 이송하여 100 g/l 내지 150 g/l 농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 내성을 갖는 변이주를 선발하였다.

**[0074] 실시예 4. 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 내성을 갖는 고수율의 전환균주 CKDBM 0901의 선발**

**[0075]** 실시예 3에서 고농도의 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨에 대한 내성이 증가한 변이주 각각에 대하여 표 1의 GSYN 배지 중 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 농도를 증량하여 전환배양을 실시하였다. 구체적으로, 내성이 증가한 균주 각각의 세포현탁액 0.1 ml를 GSY 배지 20 ml에 접종하고 30℃에서 220 rpm으로 24시간 동안 배양한 다음, 이 배양액 0.5 ml를 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 10 g/l, 50 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l가 포함된 GSYN 배지 20 ml에 접종하고 25℃에서 220 rpm으로 96시간 동안 배양하였다. 상기 배양액 각각에 대해 실시예 1-1에 명기된 HPLC 방법에 따라 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성농도를 정량하여, 이들 중 수율이 현저히 개선된 변이주 CKDBM 0901을 최종적으로 선발하였다(표 5). 하기 표 5는 글루코노박터 옥시단스 CK-2165와 이의 돌연변이주인 CKDBM 0901의 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산능을 나타낸다.

**표 5**

글루코노박터 옥시단스 CK-2165와 이의 돌연변이주인 CKDBM 0901에 의한 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산

균주번호	1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 첨가농도(g/l)	6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성 농도(g/l)	수율 (%)
CK2165	10	6.6	66
	50	31.5	63
	100	55.0	55
	150	72.0	48
	200	78.0	39
CKDBM 0901	10	9.2	92
	50	45.0	90
	100	87.0	87
	150	123.0	82
	200	148.0	74

[0076]

**[0077] 실시예 5. 휴면세포 페이스트의 제조**

**[0078]** 상기 글루코노박터 옥시단스 CK-2165 및 글루코노박터 옥시단스 CKDBM 0901의 배양액으로부터 휴면세포(resting cell)를 제조한 후 이를 이용하여 전환배양을 진행하였다. 구체적으로, 글루코노박터 옥시단스 CK-2165 및 글루코노박터 옥시단스 CKDBM 0901의 세포현탁액 0.1 ml씩을 표 1의 GSY 배지 20 ml가 담긴 100 ml의 삼각 플라스크에 각각 접종하고 2일 동안 220 rpm으로 30℃에서 진동시키며 배양하였다. 상기 배양액 1 ml씩을 각각 표 1에서 탄산칼슘이 제외된 GSYN 배지 50 ml가 담긴 500 ml의 삼각 플라스크에 접종하고 2일 동안 220 rpm으로 30℃에서 진동시키며 배양하였다. 상기 각각의 균주에 대하여 500 ml의 삼각 플라스크 배양액 10개씩을 합한 다음 고속원심분리기를 사용하여 세포를 침전시키고, 정제수로 2회 세척하여 휴면세포 페이스트(resting cell

paste)를 확보하였다.

[0079] **실시예 6. 휴면세포에 의한 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산**

[0080] 전환배지 조성으로 황산마그네슘 5 g/l, 제일인산칼륨 5 g/l 및 제이인산칼륨 5 g/l를 포함하고, 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨을 각각 10 g/l, 50 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l로 포함하는 GSYN 배지를 제조한 다음 500 ml의 삼각 플라스크에 50 ml씩 분주한 후 121℃에서 30분간 살균하였다. 상기와 같이 제조된 플라스크에 글루코노박터 옥시단스 CK-2165 및 글루코노박터 옥시단스 CKDBM 0901의 휴면세포 페이스트(resting cell paste)를 1.5g씩 첨가하고 25℃에서 220 rpm으로 96시간 동안 배양하였다. 이와 같이 배양한 다음 각각의 배양액에 대하여 실시예 1-1에 명시된 HPLC법에 의하여 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성농도를 정량하였다. 결과는 표 6에 나타내었다.

**표 6**

휴면세포에 의한 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생산

균주번호	1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 첨가농도(g/l)	6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스 생성 농도(g/l)	수율 (%)
CK2165	10	6.8	68
	50	34.5	69
	100	59	59
	150	82.5	55
	200	92.0	46
CKDBM 0901	10	9.5	95
	50	48.0	96
	100	94.0	94
	150	139.5	93
	200	176.0	88

[0081]

[0082] **실시예 7. 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로부터 미글리톨 합성**

[0083] 실시예 6에서 CKDBM 0901 휴면세포 페이스트와 1-하이드록시에틸 아미노-D-소르비톨 100 g/l를 사용하여 얻은 전환배양액 300 ml(50 ml × 6)를 여과한 다음 활성탄을 처리하여 색소를 제거하고, 수소화 반응기(PARR Instrument Co. USA, 5100 Reactor)로 이송하여 미글리톨 합성을 수행하였다. 수소화 반응을 위한 촉매로는 10% 팔라듐-온-차콜(palladium-on-charcoal)을 사용하였고, 온도 25℃와 10기압의 조건에서 5시간 동안 반응을 진행한 다음 여과하여 촉매를 제거하였다. 상기 여과액을 실시예 1-1에 명시된 HPLC법에 의하여 분석한 결과, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로부터 95% 수율로 미글리톨이 합성되는 것을 확인하였다.

[0084] **실시예 8. 미글리톨 샘플 제조 및 물질동정**

[0085] 실시예 7에서 얻은 반응여과액으로부터 미글리톨을 얻기 위하여 여과액을 강산성 양이온 수지(Dowex 50x8-200)에 흡착시킨 다음 메탄올과 수산화 암모니움의 3 : 1 용액으로 용리하고 농축하였다. 농축물에 메탄올과 아세톤 혼합액을 첨가하여 결정화와 재결정화 과정을 거쳐 건조한 다음 가스 크로마토그래피(gas chromatography)로 분석한 결과, 6-하이드록시에틸 아미노-L-소르보스로부터 62% 수율로 순도 99.6%의 미글리톨 제조가 가능함을 확인하였다.

[0086] 상기와 같이 제조된 샘플에 대하여 IR과 NMR을 통하여 구조해석을 한 결과, 미글리톨의 분자구조와 동일함을 확인하였다(도 2 및 3).

[0087] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**수탁번호**

[0088]

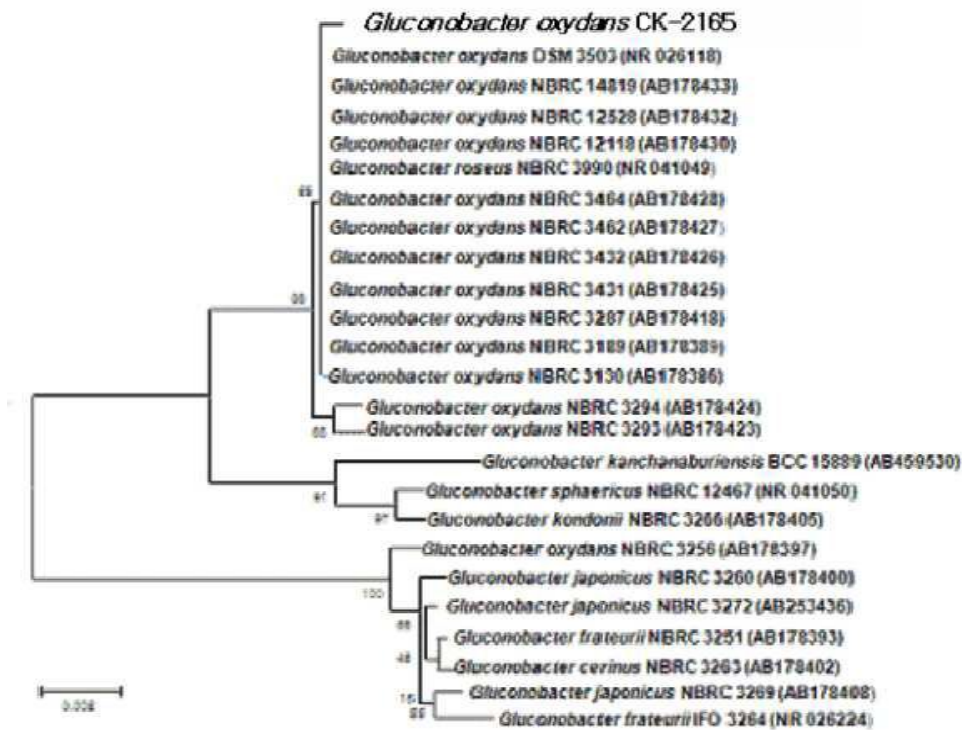
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12282BP

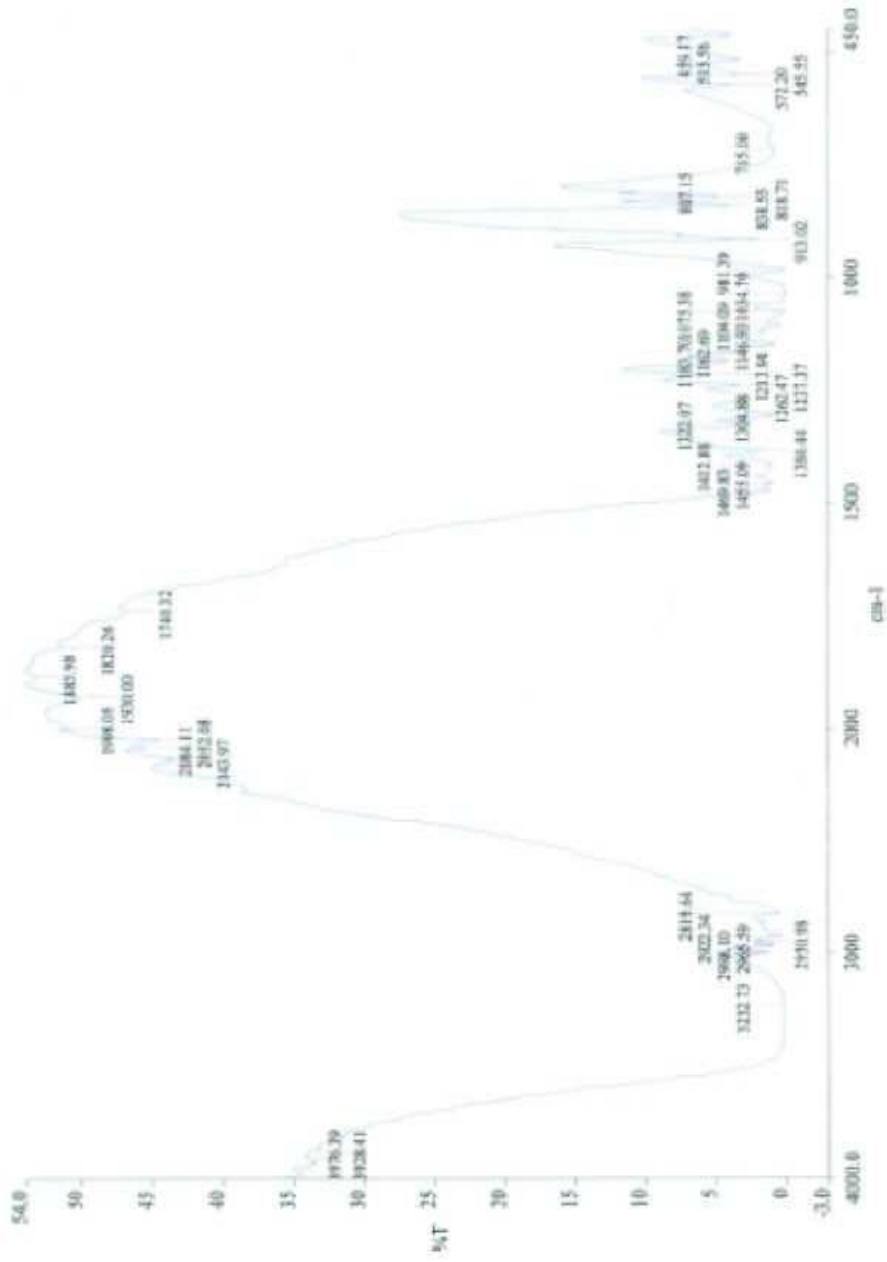
수탁일자 : 20120921

**도면**

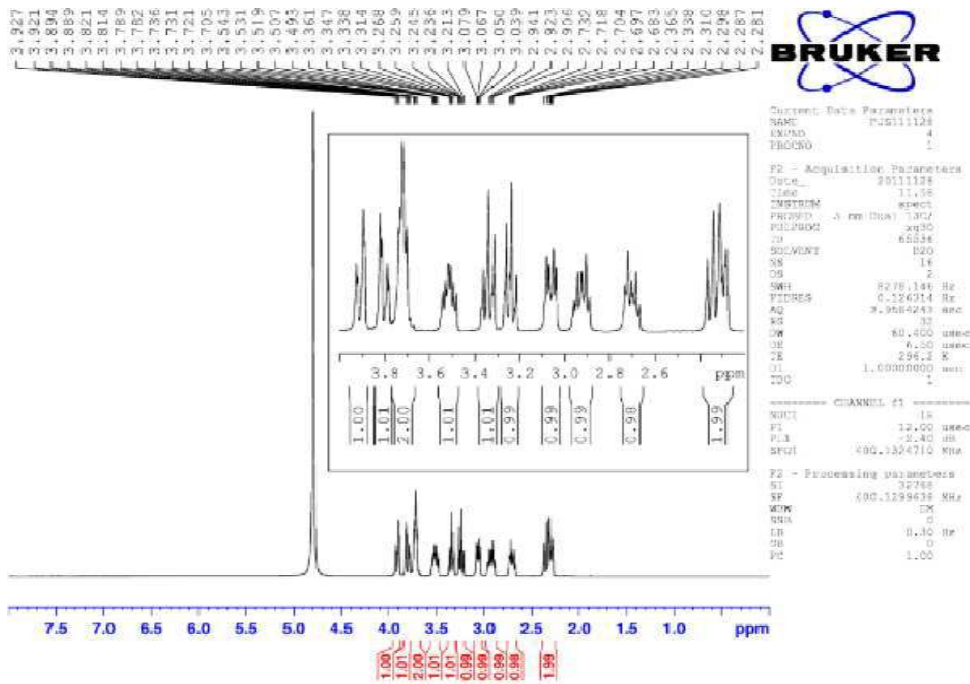
**도면1**



도면2



도면3



서열 목록

- <110> CKD Bio Inc.
- <120> Novel Gluconobacter sp. CKDBM0901 strain capable of bioconversion to 6-hydroxyethyl amino-L-sorbose in high yield
- <130> PN120520
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 16S-27F primer
- <400> 1  
 agagtttgat cctggctcag 20
- <210> 2
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence



<220><223> 16S-1492R primer

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 3

<211> 1377

<212> DNA

<213> Gluconobacter oxydans CK-2165

<400> 3

tggcggcatg cttaccacat gcaagtcgca cgaaggtttc ggccttagtg gcggacgggt 60

gagtaacgcg tagggatcta tccacgggtg ggggacaact tcgggaaact ggagctaata 120

ccgcatgata cctgagggtc aaaggcgcaa gtcgcctgtg gaggaacctg cgttcgatta 180

gctagttagt ggggtaaagg cctaccaagg cgatgatcga tagctggttt gagaggatga 240

tcagccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 300

ttggacaatg ggcgaaagcc tgatccagca atgccgcgtg tgtgaagaag gtcttcggat 360

tgtaaagcac tttcgacggg gacgatgatg acggtaccg tagaagaagc cccggctaac 420

ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg gggctagcgt tgctcggaat gactgggcgt 480

aaaggcgcg taggcggttg ttacagttag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac 540

tgcatttgat acgtgacgac tagagttaga gagagggttg tggaaattccc agttagtagg 600

tgaaattcgt agatattggg aagaacaccg gtggcgaagg cggcaacctg getcgatact 660

gacgctgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgct 720

gtaaacgatg tgtgctggat gttgggaaac ttagtttctc agtgtcgaag ctaacgcgct 780

aagcacaccg cctggggagt acggccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacggggggcc 840

cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct taccagggt 900

tgcatgggga ggaccggttc agagatggac ctttcttcgg acctcccga caggtgctgc 960

atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgcaacce 1020

ttgtcttag ttgccagcac tttcaggtgg gactctaga gagactgccg gtgacaagcc 1080

ggaggagggt ggggatgacg tcaagtctc atggccctta tgtcctgggc tacacacgtg 1140

ctacaatggc ggtgacagtg ggaagctaca tgggtgacat ggtgctgatc tctaaaagcc 1200

gtctcagttc ggattgtact ctgcaactcg agtacctgaa ggtggaatcg ctagtaatcg 1260

cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca 1320

tgggagttgg ttcgacctta agccggtgag cgaaccgcaa ggacgcagcc gaccacg 1377