(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0137997
(43) 공개일자 2018년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/44 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/44 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0078011
(22) 출원일자 2017년06월20일
심사청구일자 2017년06월20일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
심재훈
강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호(석사동, 현진에버빌2차)
최혜정
서울특별시 구로구 남부순환로95길 54, 106동 2008호(개봉동, 삼환아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

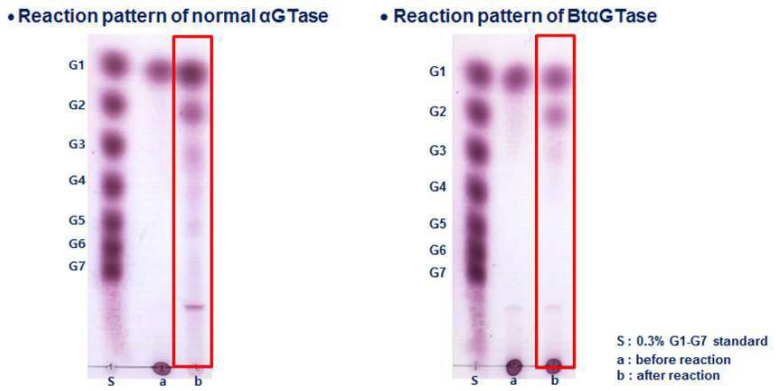
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **포도당이 하나 결합된 1-데옥시노지리마이신 유도체의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 기존에 존재하는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, DNJ) 화합물에 포도당을 한 개 전이함으로써, 포도당이 하나 결합된 1-데옥시노지리마이신을 제조할 수 있는 방법에 관한 것으로, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈를 사용하여 DNJ(1-deoxynojirimycin) 화합물에 포도당을 한 개 전이함으로써, 포도당이 한 개 결합된 신규의 DNJ 화합물 (G1-DNJ)를 제조할 수 있다. 이렇게 제조된 G1-DNJ 화합물은 기존의 DNJ에 비하여 알파글루코시데이즈의 가수분해능을 더욱 저해하는 반면, 알파아밀레이즈는 저해하지 않는데, 이는 본 발명의 G1-DNJ가 기존 DNJ의 부작용(알파아밀레이즈 저해)을 감소시키고 당뇨병치료제로써 적극 사용될 수 있는 것을 의미한다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12P 19/18 (2013.01)
C12Y 204/01025 (2013.01)
(72) 발명자
고담슬
강원도 동해시 청운1길 29, 17동 601호(동회동, 대동,현대아파트)
정우재
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1503호(이문동, 이문삼성래미안아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 이용하여 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)에 포도당을 1개 전이시키는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 포도당은,

포도당이 중합되어 형성된 중합체(polymer) 내에 존재하는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 중합체는,

전분인 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)은,

반응 용액 중 1~3.0% (w/v)의 농도로 준비되고,

상기 전분은,

반응 용액 중 0.5~1.5% (w/v)의 농도로 준비되는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 반응 용액은,

pH 5.5~6.5의 40~60 mM 소디움 아세테이트 완충용액을 용매로 사용하는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소는,

반응 용액 1 mL 당 0.5~1.5 U의 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 사용하는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법은,

50~60℃에서 5~9시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규의 1-데옥시노지리마이신 유도체 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기존에 존재하는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, DNJ) 화합물에 포도당을 한 개 전이함으로써, 포도당이 하나 결합된 1-데옥시노지리마이신을 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 1-데옥시노지리마이신 (1-deoxynojirimycin, DNJ)은 단당류와 유사한 구조를 지니고 있는 아자-슈가(aza-sugar)이나 일반적인 단당류와 달리 산소원자가 질소원자로 치환되어 있는 분자이다.

[0004] DNJ는 장내 알파아밀레이즈(α-amylase)와 알파글루코시데이즈(α-glucosidase)의 활성을 저해하여 체내의 혈당을 감소시키는 것으로 보고되어 있다 (Narita, Y., & Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II. *J. Agric. Food Chem., 57*(19), 9218-9225).

[0005] 상기 두 효소 중 알파글루코시데이즈는 소당류의 알파 1,4 결합을 가수분해하여 비환원성 말단으로부터 글루코오스를 생산하는 최종단계의 효소이므로 알파글루코시데이즈의 저해는 혈당의 급격한 증가에 매우 중요한 역할을 한다 (Yao, Y., Cheng, X., & Ren, G. (2014). α-Glucosidase inhibitory activity of protein-rich extracts from extruded adzuki bean in diabetic KK-Ay mice. *Food Funct., 5*(5), 966-971). 따라서, DNJ는 급격한 혈당의 증가가 지양되어야 하는 당뇨병 환자들에게 유의적절하게 사용될 수 있다. 하지만, DNJ의 알파아밀레이즈에 대한 저해능은 체내에 흡수된 전분의 소화 작용을 방해할 수 있어, 오히려 부정적 효과를 불러일으킬 수 있다.

[0006] 이렇듯 DNJ는 당뇨병 환자에게 혈당의 급격한 증가를 방지할 수 있는 긍정적 효과와 전분의 소화 작용을 방해할 수 있는 부정적 효과를 모두 갖고 있다. 따라서, 알파아밀레이즈는 저해하지 않고 알파글루코시데이즈만 저해할 수 있는 DNJ 유사체의 개발 필요성이 있는 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2014-0047992호 (공개일자 2014년 04월 23일)에는, 1-데옥시노지리마이신 (DNJ)을 생산하는 Bacillus amyloliquefaciens 335N (KCCM11285P) 균주 및 이를 이용하여 1-데옥시노지리마이신을 포함하는 항당뇨, 항암 및 항바이러스 효과가 있는 기능성 식품이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제10-2004-0071953호 (공개일자 2004년 08월 16일)에는, 혈당강하 및 항바이러스 활성을 갖는 1-데옥시노지리마이신(1-Deoxynojirimycin)을 생산하는 신규한 미생물 및 이를 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 알파-글리코시데이즈(α-glycosidase)를 유의성 있게 저해하여 당뇨병 질환의 예방

치료에 유용하게 사용될 수 있는 기술이 기재되어 있다.

(특허문헌 0003) 대한민국 특허공개번호 제10-2002-0071334호 (공개일자 2002년 09월 12일)에는, 누에분말을 에탄올로 추출한 후 여과하고, 계속하여 일련의 이온 교환 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 혈당강하 작용이 탁월한 물질인 1-디옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)을 분리하는 기술 및 이의 혈당강하 활성에 대해 기재되어 있다.

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Narita, Y., & Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II. J. Agric. Food Chem., 57(19), 9218-9225.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명에서는 알파아밀레이즈를 저해하지 않고 알파글루코시데이즈만 저해할 수 있는 DNJ 유사체의 제조방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 이용하여 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)에 포도당을 1개 전이시키는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 포도당은, 일 예로 포도당이 중합되어 형성된 중합체(polymer) 내에 존재하는 것일 수 있다. 이때, 상기 중합체는, 일 예로 전분일 수 있다.

[0014] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)은, 일 예로 반응 용액 중 1~3.0% (w/v)의 농도로 준비되고, 상기 전분은, 일 예로 반응 용액 중 0.5~1.5% (w/v)의 농도로 준비되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 반응 용액은, 바람직하게 pH 5.5~6.5의 40~60 mM 소디움 아세테이트 완충용액을 용매로 사용하는 것이 좋다.

[0016] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소는, 바람직하게 반응 용액 1 mL 당 0.5~1.5 U의 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 사용하는 것이 좋다.

[0017] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법은, 바람직하게 50~60℃에서 5~9시간 동안 수행하는 것이 좋다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에서는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈를 사용하여 DNJ(1-deoxynojirimycin) 화합물에 포도당을 한 개 전이함으로써, 포도당이 한 개 결합된 신규의 DNJ 화합물 (G1-DNJ)를 제조할 수 있었다.

[0020] 이렇게 제조된 G1-DNJ 화합물은 기존의 DNJ에 비하여 알파글루코시데이즈의 가수분해능을 더욱 저해하는 반면, 알파아밀레이즈는 저해하지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 특성은 본 발명의 G1-DNJ가 기존 DNJ의 부작용(알파아밀레이즈 저해)을 감소시키고 당뇨병치료제로써 적극 사용될 수 있는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 PCR에 의해 증폭된 *bt_2146* 유전자 (A) 및 해당 유전자를 포함하는 재조합 발현 플라스미드 pTKNdbt_2146 (B)를 보여준다.

도 2는 정제된 본 발명 알파글루카노트랜스퍼레이즈(Bt αGTase)의 SDS-PAGE 분석 (Lane S, protein size standards; lane 1, cellular protein from the crude extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, insoluble fraction; lane 4, purified Bt αGTase) 결과이다.

도 3은 재조합 Bt αGTase의 최적 온도 및 pH 분석 결과이다.

도 4는 재조합 Bt αGTase의 양이온에 의한 효과 비교 결과이다.

도 5는 다양한 공여체에 대한 Bt αGTase 효소의 반응분석 결과이다.

도 6은 일반 알파글루카노트랜스퍼레이즈와 본 발명에서 사용한 Bt αGTase의 반응 결과를 비교한 사진이다.

도 7은 HPAEC를 이용한 당전이 화합물의 분석 결과이다.

도 8은 MALDI-TOF를 이용한 당전이 화합물의 분석 결과이다.

도 9는 Lineweaver-Burk plot을 이용한 알파글루코시데이즈에 대한 DNJ와 G1-DNJ의 저해능 비교 실험 결과이다.

도 10은 Linewiever Burk plot을 변형하여 Dixon plot으로 재구성하고 이를 통해 기질의 저해 정도를 확인한 결과이다.

도 11은 Lineweaver-Burk plot을 이용한 알파아밀레이즈 대한 DNJ와 G1-DNJ의 저해능 비교 결과이다.

도 12는 Dixon plot을 이용한 알파아밀레이즈에 대한 저해능 비교 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명에서는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)에 포도당을 1개 전이시켜 포도당이 1개 결합한 1-데옥시노지리마이신의 제조방법으로써, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 이용하는 방법을 제공한다.

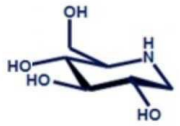
[0024] 본 발명의 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈(Bt αGTase)는 박테로이데스 세타이오타오마이크론 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)에서 유래한 것으로, 기존의 알파글루카노트랜스퍼레이즈와 달리 당전이 반응을 연쇄적으로 하는 능력이 현저히 낮음을 알 수 있었다.

[0025] 일반적인 알파글루카노트랜스퍼레이즈는 포도당(G1)에 다른 포도당을 '연쇄적'으로 전이하여 다양하고 긴 말토올리고당을 형성하나, Bt αGTase는 당전이 반응시 다양한 길이의 산물을 사용하지 않아 포포당 1개만 전이된 당전이 산물만을 주로 생산할 수 있기 때문이다 (하기 본 발명의 실시예 6 참조 요망).

[0026] 이는 특정 생산물만을 '집중적'으로 생산함으로써 당전이 산물의 생산성을 높일 수 있는 것을 의미하는데, 이를 통해 본 발명에서는 1-데옥시노지리마이신에 포도당이 1개 결합된 신규의 화합물을 용이하게 제조할 수 있는 것이다. 또한, 본 발명의 알파글루카노트랜스퍼레이즈를 이용할 경우, 여러 종류의 물질을 생산하는 것이 아닌 단일 종류의 물질을 주로 생산하므로, 정제를 더 수월하게 할 수 있는 장점이 있다.

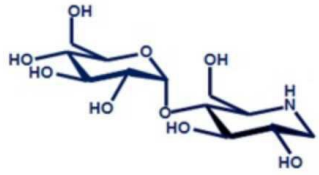
[0027] 이를 바탕으로, 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 이용하여 하기 화학식 1의 구조식을 갖는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)에 포도당을 1개 전이시키는 것을 특징으로 하는 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신 (일 예로, 하기 화학식 2)의 제조방법을 제공한다. 하기 화학식 2로 표시되는 화합물은 포도당 1번 위치의 탄소와 1-데옥시노지리마이신 4번 탄소가 에테르(ether) 결합되어 형성된 것으로, 통상적으로 당업계에서 'α-1,4 결합'이 형성되어 결합되었다라고도 한다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] [화학식 2]



[0031]

[0032] 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 상기 포도당은, 일 예로 포도당이 중합되어 형성된 중합체(polymer) 내에 존재하는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명은 포도당 1개를 1-데옥시노지리마이신에 전이시키는 것을 특징으로 하는데, 여기서 사용되는 공여(donor) 포도당은, 포도당 단일 분자로도 사용 가능하나, 포도당이 결합되어 형성된 여러 중합체(polymer)에서 포도당을 분리시킨 후 사용할 수도 있다.

[0034] 본 발명의 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 알파글루카노트랜스퍼레이즈는 포도당 중합체(일 예로, 전분)로부터 포도당을 떼어 내는 능력도 있기 때문에, 포도당 중합체를 반응을 위한 기질로 사용할 수 있다. 다만, 포도당을 포함하는 중합체는 반드시 포도당만으로 이루어진 것을 사용할 필요는 없고, 포도당에 다른 분자들이 결합되어 형성된 중합체를 사용할 수도 있다.

[0035] 한편, 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)은, 일 예로 반응 용액 중 1~3.0% (w/v)의 농도로 준비되고, 포도당 공여체의 역할을 하는 전분은, 일 예로 반응 용액 중 0.5~1.5% (w/v)의 농도로 준비될 수 있다. 이때, 반응 용액, 즉 용매는 바람직하게 pH 5.5~6.5의 40~60 mM 소디움 아세테이트 완충용액을 사용할 수 있다.

[0036] 한편, 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법에 있어서, 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소는, 바람직하게 반응 용액 1 mL 당 0.5~1.5 U의 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 사용하는 것이 좋다.

[0037] 한편, 본 발명의 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신의 제조방법은, 바람직하게 50~60℃에서 5~9시간 동안 수행하는 것이 좋다.

[0038] 본 발명에서 제조한 포도당 전이 1-데옥시노지리마이신은 기존에 혈당강하 효과가 있는 것으로 알려진 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin) 화합물에 비해, 알파글루코시데이즈(α-glucosidase)에 대한 활성을 유지하면서도, 알파아밀레이즈(α-amylase)에 대한 활성이 제거된 특징이 있다.

[0039] 1-데옥시노지리마이신은 알파글루코시데이즈에 대한 저해능이 있어, 혈당의 급격한 증가를 방지할 수 있으나, 알파아밀레이즈에 대한 저해 활성도 보유하고 있어, 전분의 소화 작용을 방해할 수 있는 부정적 측면도 있다. 하지만, 본 발명에서 개발한 '포도당이 1개 α-1,4 결합된 1-데옥시노지리마이신(G1-DNJ)'은, 알파아밀레이즈를 저해하지 않고, 알파글루코시데이즈만 저해할 수 있어 상기와 같은 1-데옥시노지리마이신의 부정적 문제를 극복할 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0042] **[실시예 1: 신규 α-1,4-알파글루카노트랜스퍼레이즈의 클로닝]**

[0043] 박테로이데스 세타이오타오마이크론 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)의 유전체 DNA에 두 개의 프라이머를 이용하여 α-1,4-알파글루카노트랜스퍼레이즈를 코딩하는 유전자 (*bt_2146*)를 증폭하였다. 프라이머의 서열은 다음

과 같았다.

표 1

[0044]

프라이머 명	서열
bt-Forward	5'-AAAACCATGGCCACTGTATCATTTAAC-3'
bt-Reverse	5'-AAAACTCGAGTTTCTTGGGAGCTCTGCC-3'

[0046] PCR의 증폭조건은 변성(denaturation) 98℃ 1분 실시 후, 98℃ 10초 53℃도 30초, 72℃ 1분 30초의 증폭과정을 30회(cycle) 수행하였다. 증폭된 유전자는 *Nco*I 과 *Xho*I 제한효소를 처리하여 pTKNd6xHis 벡터에 라이게이션(ligation) 하였다.

[0047] 도 1은 PCR에 의해 증폭된 *bt_2146* 유전자 (A) 및 해당 유전자를 포함하는 재조합 발현 플라스미드 pTKNdbt_2146 (B)를 보여준다. 염기서열 분석 결과, *bt_2146* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열을 갖는 것으로 확인되었고, 서열번호 2의 아미노산서열을 갖는 알파글루카노트랜스퍼레이즈를 암호화하는 것으로 확인되었다.

[0049] **[실시예 2: 재조합단백질의 발현]**

[0050] 재조합 발현 플라스미드 pTKNdbt_2146를 칼슘이온처리법을 이용하여 대장균에 형질전환(transformation) 한 후, 카나마이신 (50 μg/mL)이 함유된 LB 배지 (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl)에 접종하고, 30℃에서 30시간 동안 150 rpm으로 교반배양을 실시하였다.

[0051] 배양된 균주는 원심분리법 (7,000×g, 20 min, 4℃)을 이용하여 수거한 후, 배양액의 1/10일 부피의 라이시스 버퍼(lysis buffer; 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10 mM imidazole)에 현탁하였다. 이후, 초음파 분쇄기 (output 12, 5 min, 4 times)를 이용하여 세포를 파쇄하고 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 Ni-NTA 친화성 흡착 크로마토그래피를 이용하여 정제 후 SDS-PAGE를 이용하여 정제 여부 및 순도를 확인하였다.

[0052] 도 2는 정제된 알파글루카노트랜스퍼레이즈(Bt αGTase)의 SDS-PAGE 분석 (Lane S, protein size standards; lane 1, cellular protein from the crude extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, insoluble fraction; lane 4, purified Bt αGTase) 결과이다.

[0054] **[실시예 3: 재조합 효소 Bt αGTase의 역가 측정]**

[0055] Bt αGTase 효소 역가 측정을 위하여 아밀로스 (0.02%, (w/v)) 말토오스 (0.05%, (w/v))를 기질로 하여 citric-NaOH 완충용액 (pH 3.0)에 녹여 혼합액을 만들고 효소와 혼합하여 60℃에서 10분간 반응하였다. 이후, 효소 반응액 100 μL에 1 mL의 Lugol 용액 (0.02% (w/v) iodine 및 0.2% (w/v) potassium iodide)에 혼합하여 620 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 효소가 1분 동안 아밀로오스 1 μg을 분해하여 말토오스에 당전이하는 양으로 정의하였다.

[0056] 한편, 표 2에는 재조합 Bt αGTase의 여러 인자들을 정리해서 나타냈다.

표 2

[0057]

Step	Volume (mL)	Enzyme activity (U)	Protein concentration (mg/mL)	Protein amount (mg)	Specific activity (U/μg)	Yield (%)	Purification fold
조효소액	104	3.57	169.44	17621.76	0.20^{-3}	100	1.00
Ni-NTA정제	1.5	2.03	2.26	3.39	0.59	56.8	2953.20

[0059] **[실시예 4: 재조합 효소 Bt αGTase의 최적 반응 조건 비교]**

[0060] 재조합 효소 Bt αGTase의 최적 반응 조건을 확인하기 위하여 다양한 온도 (40-70℃)와 pH (2.5-6.0)에서 역가를 측정 후 비교하였다. 가장 높은 값을 100%로 하여 상대적 역가를 나타내었다. Bt αGTase 효소는 60℃, pH 3.0에서 가장 높은 활성을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

[0061] 도 3은 재조합 Bt αGTase의 최적 온도 및 pH 분석 결과이다. 최적 온도는 60℃로 나타났고, 최적 pH는 3으로 나타났다.

[0063] **[실시예 5: 재조합 효소 Bt αGTase의 이온 영향 비교]**

[0064] 재조합 효소 Bt αGTase가 이온에 의한 영향을 받는지 확인하고자 다양한 2가 양이온과 EDTA를 이용하여 효소 역가를 비교하였다. 이온을 첨가하지 않은 상황을 기준값 (100%)으로 지정하였고, 각 2가 양이온의 최종 농도는 5 mM로 설정하였다.

[0065] 도 4는 재조합 Bt αGTase의 양이온에 의한 효과 비교 결과이다. 도 4에서 보듯이 Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}를 첨가할 경우 역가가 상승하는 것으로 나타났다.

[0067] **[실시예 6: 재조합 Bt αGTase 효소의 반응 특성]**

[0068] 다양한 수용체 (acceptor) 물질에 대하여 당전이 반응을 수행하였고, 그 양상을 박막크로마토그래피 (Thin layer chromatorgraphy)로 분석하였다. 1% (w/v)의 전분을 공여체 (donor molecule)로 하여 포도당 (G1)부터 말토헵타오스 (G7)까지의 수용체 (0.3% (w/v))에 대하여 반응을 실시하였다.

[0069] 도 5에서 보는 바와 본 발명에서 사용한 Bt αGTase는 기존의 알파글루카노트랜스퍼레이즈와 달리 당전이 반응을 연쇄적으로 하는 능력이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 이는 일견 단점으로 보일 수 있으나, 아래의 내용을 좀더 살펴보면 이것이 큰 장점임을 알 수 있다. 도 5는 다양한 공여체에 대한 Bt αGTase 효소의 반응분석 결과이다.

[0070] 한편, 더욱 명확한 비교를 위하여 일반적인 알파글루카노트랜스퍼레이즈 (MalQ)와 동일한 조건에서 반응을 실시해 보았다. 도 6은 일반 알파글루카노트랜스퍼레이즈와 본 발명에서 사용한 Bt αGTase의 반응 결과를 비교한 사진이다. 도 6에서 보듯이 일반적인 알파글루카노트랜스퍼레이즈는 포도당 (G1)에 다른 포도당을 '연쇄적'으로 전이하여 다양하고 긴 말토올리고당을 형성하나, 본 발명 Bt αGTase는 당전이 반응시 다양한 길이의 산물을 사용하지 않아 당이 1개만 전이된 당전이 산물만을 주로 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0071] 이는 특정 생산물만을 '집중적'으로 생산함으로써 당전이 산물의 생산성을 높일 수 있는 것을 의미한다. 또한, 여러 종류의 물질을 생산하는 것에 비하여 단일 종류의 물질을 주로 생산하므로 정제를 더 수월하게 할 수 있는 장점이 될 수 있음을 의미한다.

[0073] **[실시예 7: 신규 DNJ 당전이 화합물의 생산 및 정제]**

[0074] 당전이 반응 수행을 위하여 기질인 1.5% (w/v) DNJ 와 1% (w/v) 전분을 pH 6.0, 50 mM 소디움 아세테이트 완충용액에 반응용액 1 mL 당 1 U의 알파글루카노트랜스퍼레이즈 효소를 넣고 55℃에서 7시간 동안 반응하였다. 이후 반응액을 10분간 끓여 효소반응을 정시시켰다.

[0075] DNJ 당전이화합물은 Triart-C18 컬럼에 (250 ×20 mm, YMC Korea) UV 검출기(ultraviolet detector, 200 and 210 nm)와 결합한 분취용 고성능액체크로마토그래피 (preparative HPLC, YMC Korea, Sungnam, Korea)를 이용하여 정제하였다. 매 실험당 샘플의 주입량은 1 mL로 하였고, 0.1% 암모니움(ammonium)이 포함된 탈이온수 (deionized water)를 이동상으로 사용하였고, 유속을 12.0 mL/min으로 하여 상온에서 분리하였다.

[0077] **[실시예 8: 신규 DNJ 당전이 화합물의 분석]**

[0078] 상기 실시예 7에서 생산된 당전이 화합물의 정제 여부와 순도를 확인하기 위하여 고성능이온교환크로마토그래피 (High-performance anion exchange chromatography, HPAEC) 분석법을 사용하였다.

[0079] HPAEC는 CarboPacTM PA1 컬럼 (4 ×250 mm; Dionex, Sunnyvale, CA, USA)에 pulsed aerometric detector

(ED40; Dionex) 검출기를 장착한 기기를 사용하였다. 20 μl의 시료를 분석에 사용하였고, 150 mM 농도의 수산화나트륨 용액 이동상에 소디움아세테이트의 농도구배를 통하여 반응산물을 분석하였다.

[0080] 소디움아세테이트 농도구배는 다음과 같았다. 0-2% for 0-20 min, 2-40% for 20-58 min, 40-100% for 58-68 min, 100% for 68-70 min, 100-0% for 70-78 min. 이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 설정하였다.

[0081] 또한, 말디토프 분석법 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight, MALDI-TOF)을 이용하여 정제된 당전이 산물의 분자량을 확인하였다. 메탄올에 녹인 화합물을 매트릭스와 1:1 비율로 혼합한 후 상온에서 말디토프 분석을 수행하였다. 매트릭스는 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)를 사용하였으며, 가속전압 (accelerating voltage)은 20,000 볼트로 설정하였다.

[0082] 도 7은 HPAEC를 이용한 당전이 화합물의 분석 결과이고, 도 8은 MALDI-TOF를 이용한 당전이 화합물의 분석 결과이다. 생성된 당전이 화합물은 종래 DNJ 화합물에 포도당이 1개 더 붙어 있는 화합물인 것으로 확인되었고, 상기 화학식 2에 기재된 구조식을 갖는 것으로 확인되었다.

[0083] 새롭게 생성된 당전이 화합물을 G1-DNJ로 명명하고, 하기의 효소 저해 실험을 수행하였다.

[0085] **[실시예 9: 알파글루코시데이즈와 알파아밀레이즈의 저해효과 확인]**

[0086] DNJ 및 G1-DNJ의 효소역가 저해 정도를 확인하기 위하여 'inhibition kinetics'를 수행하였다. 알파글루코시데이즈의 실험에서는 인조기질인 pNPG (*p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside)를 기질로 사용하였고, 알파아밀레이즈의 저해도 측정을 확인하기 위해서는 pNPG2 (*p*-nitrophenyl-α-D-maltoside)를 사용하였다. 각 기질이 가수분해되어 발생하는 pNP는 ELISA plate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 그 양을 측정하였다.

[0087] 기질 저해정도를 확인하는 지표인 Ki value를 확인하고자, 다양한 농도 (0.1-1 μmol)의 저해제를 사용하여 효소 반응을 수행하였고 Dixon-plot을 사용하여 그 값을 계산하였다.

[0088] 도 9는 Lineweaver-Burk plot을 이용한 알파글루코시데이즈에대한 DNJ와 G1-DNJ의 저해능 비교 실험 결과이다. 도 9에서 보는 바와 같이, DNJ와 G1-DNJ 모두 알파글루코시데이즈에 대하여 저해작용을 지니고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 그 패턴으로 보아 이 물질들이 경쟁적저해 (competitive inhibition)를 하고 있음을 확인하였다. 참고적으로, 두 그래프 모두 좌측 한 점에 모임을 알 수 있었는데, 이는 다양한 농도의 저해제를 사용하더라도 궁극적으로는 동일한 K_m value를 지님을 의미하며, 기질과 유사하게 생긴 저해제가 '마치 기질인 듯' 기질과 경쟁해서 효소의 활성을 저해하는 '경쟁적저해제'임을 뜻한다. 일반적으로 많은 제약용 물질들이 특정 단백질에 대하여 이렇듯 경쟁적저해제로 작용한다.

[0089] 한편, 두 물질 (DNJ와 G1-DNJ) 중 어느 물질이 더욱 효과적인 저해제인지를 확인하기 위하여 Dixon plot을 구성하고, 저해상수 (K_i value)를 계산하였다. 도 10은 Linewiever Burk plot을 변형하여 Dixon plot으로 재구성하고, 이를 통해 기질의 저해 정도를 확인한 결과이다. DNJ와 G1-DNJ의 K_i value는 각각 1.1과 0.48임을 알 수 있었다. 이는 G1-DNJ가 DNJ보다 효과적인 저해제임을 뜻한다. 참고적으로로 K_i value가 낮을수록 저해 효율성 (inhibition efficiency)가 높음을 의미한다.

[0090] 상기의 kinetic study를 통하여 DNJ와 G1-DNJ는 모두 알파글루코시데이즈에 대하여 저해제로 작용하며, G1-DNJ가 더욱 효과적인 알파글루코시데이즈의 저해제임을 알 수 있었다.

[0091] 한편, 상기와 같은 동일한 방법으로 알파아밀레이즈에 대한 kinetic study를 실시하였고, 그 결과는 도 11과 같았다. 도 11은 Lineweaver-Burk plot을 이용한 알파아밀레이즈 대한 DNJ와 G1-DNJ의 저해능 비교 결과이다. 도 11에서 보는 바와 같이, DNJ는 농도가 증가함에 따라 그래프의 기울기가 높아지는 것 (반응속도가 저해되는 것)을 확인할 수 있었으나, G1-DNJ는 저해제의 농도를 증가시켰음에도 불구하고 그래프의 패턴에 변화가 거의 없었다. 이는 G1-DNJ가 알파아밀레이즈에 대하여 특별한 저해능이 없음을 의미한다.

[0092] 더욱 명확한 증명을 위하여 Dixon-plot으로 변형하였으며 그 결과는 도 12와 같았다. 도 12는 Dixon plot을 이용한 알파아밀레이즈에 대한 저해능 비교 결과이다. 도 12에서 보는 바와 같이 DNJ는 알파아밀레이즈에 대한 저해능이 있으며 K_i 값의 계산이 가능하나, G1-DNJ는 저해능이 없으므로 K_i 값 또한 구할 수 없음을 알 수 있었다. 이는 G1-DNJ가 알파아밀레이즈에 대한 저해능이 없음을 의미한다.

[0093] 이상에서 살펴본 알파글루코시데이즈와 알파아밀레이즈에 대한 DNJ와 G1-DNJ의 저해능 비교 결과를 하기 표 3에

일목 요연하게 정리해 제공한다.

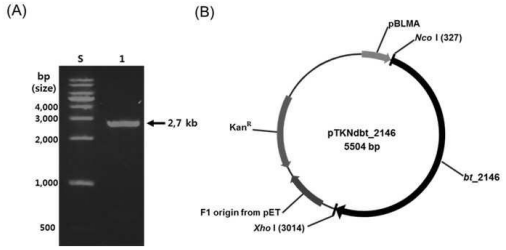
표 3

[0094]

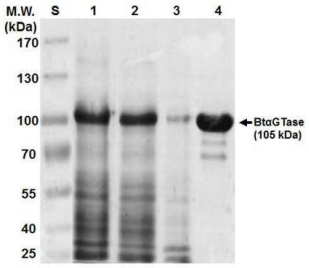
inhibitor	Target enzyme	K_i	inhibition type
DNJ	α-glucosidase	1.1	competitive
	α-amylase	4.4	competitive
G1-DNJ	α-glucosidae	0.48	competitive
	α-amylase	-	No inhibition

도면

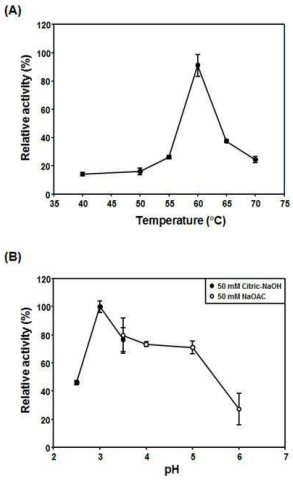
도면1



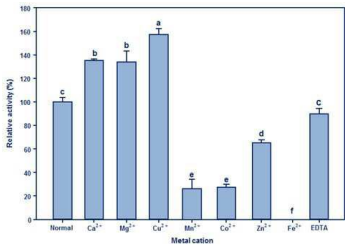
도면2



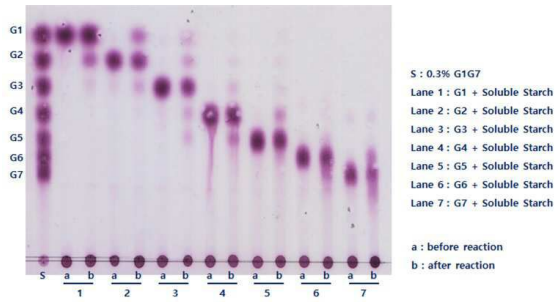
도면3



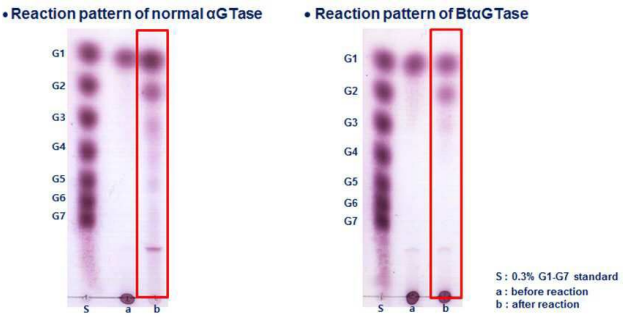
도면4



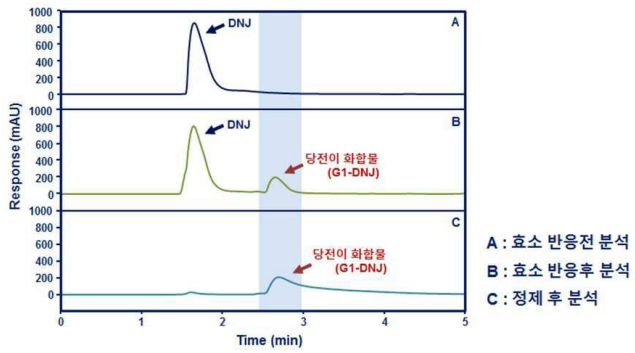
도면5



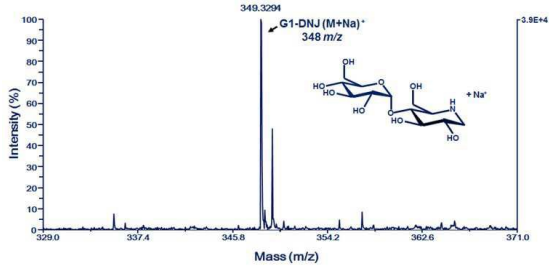
도면6



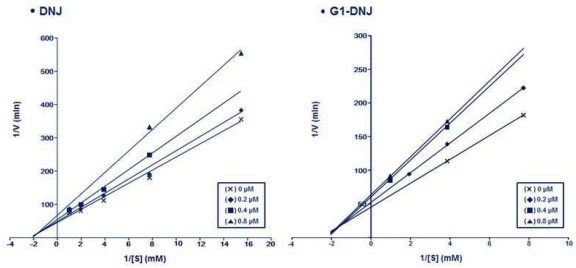
도면7



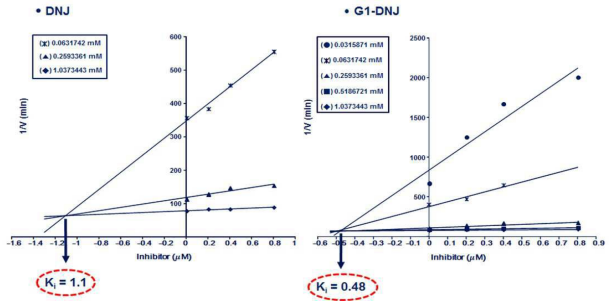
도면8



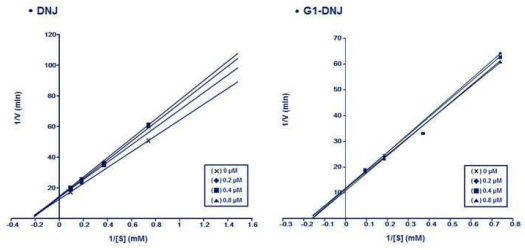
도면9



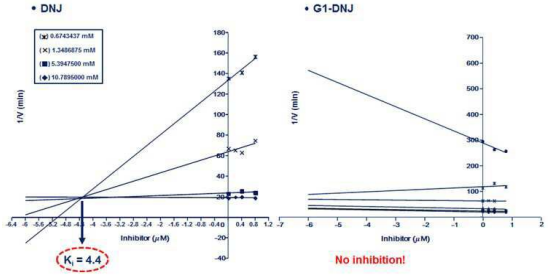
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Method for production of 1-deoxynojirimycin derivative with a single glucose

<130> YP-17-076

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2682

<212> DNA

<213> Bacteroides thetaiotaomicron

<400> 1

atgactgtat catttaacat cgaatatcgc accagttggg gagaagaagt caggattgcc 60

gggctgctgc cggagtcgat ccccatgcat accacagacg gcatatactg gacggcagac 120

gtggaactgg aagttcccaa agaaggaatg actatcaatt acagctatca gatagaacaa 180

aaccaaatta tcatccgcaa agaatgggac agctttccga gacgtctctt tttatccggt 240

aactctaaaa agaagtatca gattaaagac tgctggaaaa atatccccga acaattgtat 300

tactacagtt cggccttcac ggaagccttg ttagcccatc ccgacagagc tgaaattccg 360

ccttgtcaca gaaaagggct ggtcatcaag gcatacgccc cacgcatcaa caaagactat 420

tgcctggcaa tttgcggaaa tcagaaagca ttgggaaact gggacccgga caaagcgatt 480

cccatgagcg atgccaactt tccggaatgg cagatcgagc tggatgcaag taagctgaaa 540

ttcccgctgg aatacaaatt catcctttac cataaagaag aaaagaaagc ggactgctgg 600

gaaaataacc ccaaccgcta tcttgccgac ccggaactga aaacaaatga gacgctggtc 660

atctccgacc gatatgccta tttcgatatt ccggtatgga aaggggccgg tatagccatc 720

cctgtctttt cactgaaatc agagaacagt ttcggagtag gagatttcgg agatttgaaa 780

cgcatgattg actgggctgt aagtacccaa caaaaggtta tacagatatt accgatcaat 840

gatacgacca tgactcatgc gtggaccgat tcttatccat ataatagtat ctccatttat 900

gctttccacc cgatgtatgc agatataaag cagatgggaa cactgaaaga caagtcagcc 960

gcagcgaagt tcaacaaaaa acagaaagaa ctcaacggcc tgccggcgat ggattatgaa 1020

gctgtcaacc aaacgaaatg ggaatacttc cgactgatct tcaagcagga aggagaaaaa 1080

gtattagcct ccggagagtt cggcgaattc tttaatgcca acaaggaatg gctgcaacct 1140

tacgctgttt tcagctatct gcgcgatgcc tttcagacac ctaatttccg tgaatggccc 1200

agacattccg tttataatgc acaagatata gagaagatgt gccggccaga atctgtagat 1260

tacccgcata tcgcacttta ttattatatc cagtttcacc tgcacctgca attggtagcc 1320

gctacgaaat acgcccgcga acacggtgtc gtactcaaag gagatatccc tatcggcatc 1380

agccgcaaca gtgtggaagc atggaccgaa ccttattact tcaatctcaa cgggcaggcg 1440

ggcgcccctc ccgatgattt ctcggtgaac ggacaaaact ggggattccc cacgtacaac 1500

tgggacgtca tggaaaagga cggctaccgc tggtggatga agcgtttcca aaaaatgtca 1560

gagtacttcg acgcttaccg gattgaccac atcctcggtt tcttccgtat ctgggaaatc 1620

ccgatgcatg ccgtacacgg attactcgga cagttcattc cctccatccc tatgagtcgg 1680

gaggaaatcg aaagttacgg actccccttt cgggaagaat atttgattcc atatattcat 1740

gaatccttcc tcgggcaagt attcggtccg cataccgatt atgtgaaaca gacttttctg 1800

cttcctgccg aaacacccgg tgtttatcac atgaaaccgg agttcaccac ccaacgggaa 1860

gtggagagtt tctttgcagg aaagaatgat gaaaacagtc tttggattcg ggatggacta 1920

tacactttga tcagtgatgt tctttttgta ccggacacga aagaaaaaga taaatatcat 1980

ccgcgcatcg gaatacaacg cgatttcatc ttccgttcac tcaatgaaca ggagcagaat 2040

gcgtttaaca gactgtatga tcagtattat tatcaccgcc acaacgagtt ctggcgccaa 2100

caggctatga agaaactacc gcaactgaca caatcgacac gtatgctggt ttgcggagaa 2160

gacctgggta tgattccgga ttgtgtttcg tccgtcatga atgatcttcg tatcctcagt 2220

ctggagattc agcggatgcc aaagaatccg atgcacgagt tcggatattt aaatgaatac 2280

ccataccggt cggtttgtac catctccact catgatatgt ctactttgcg aggctggtgg 2340

gaagaagatt acctgcagac acagcgttac tacaacacga tgctggggca ttacggaacc 2400

gcaccgacag tcgccactcc cgaattgtgc gaagaagtgg tgcgcaatca tctgaaaagc 2460

aattccatac tttgtattct gtccctgcaa gactggctga gcattgatgg caaatggaga 2520

aatccgaatg tgcaggaaga acggattaat gtaccatcca atccgcgcaa ttattggcgt 2580

taccggatgc acctcactct ggaacagttg atgaaagcag aagaactcaa tgacaagata 2640

cgtgagctaa taaaatacac cggcagagct cccaagaaat aa 2682

<210> 2

<211> 893

<212> PRT

<213> Bacteroides thetaiotaomicron

<400> 2

Met Thr Val Ser Phe Asn Ile Glu Tyr Arg Thr Ser Trp Gly Glu Glu

1 5 10 15

Val Arg Ile Ala Gly Leu Leu Pro Glu Ser Ile Pro Met His Thr Thr

20 25 30

Asp Gly Ile Tyr Trp Thr Ala Asp Val Glu Leu Glu Val Pro Lys Glu

35 40 45

Gly Met Thr Ile Asn Tyr Ser Tyr Gln Ile Glu Gln Asn Gln Ile Ile

50 55 60

Ile Arg Lys Glu Trp Asp Ser Phe Pro Arg Arg Leu Phe Leu Ser Gly

65 70 75 80

Asn Ser Lys Lys Lys Tyr Gln Ile Lys Asp Cys Trp Lys Asn Ile Pro

85 90 95

Glu Gln Leu Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ala Phe Thr Glu Ala Leu Leu Ala

100 105 110

His Pro Asp Arg Ala Glu Ile Pro Pro Cys His Arg Lys Gly Leu Val

115 120 125

Ile Lys Ala Tyr Ala Pro Arg Ile Asn Lys Asp Tyr Cys Leu Ala Ile

130 135 140

Cys Gly Asn Gln Lys Ala Leu Gly Asn Trp Asp Pro Asp Lys Ala Ile

145 150 155 160

Pro Met Ser Asp Ala Asn Phe Pro Glu Trp Gln Ile Glu Leu Asp Ala

165 170 175

Ser Lys Leu Lys Phe Pro Leu Glu Tyr Lys Phe Ile Leu Tyr His Lys

180 185 190

Glu Glu Lys Lys Ala Asp Cys Trp Glu Asn Asn Pro Asn Arg Tyr Leu

195 200 205

Ala Asp Pro Glu Leu Lys Thr Asn Glu Thr Leu Val Ile Ser Asp Arg

210 215 220

Tyr Ala Tyr Phe Asp Ile Pro Val Trp Lys Gly Ala Gly Ile Ala Ile

225 230 235 240

Pro Val Phe Ser Leu Lys Ser Glu Asn Ser Phe Gly Val Gly Asp Phe

245 250 255

Gly Asp Leu Lys Arg Met Ile Asp Trp Ala Val Ser Thr Gln Gln Lys

260 265 270

Val Ile Gln Ile Leu Pro Ile Asn Asp Thr Thr Met Thr His Ala Trp
275 280 285
Thr Asp Ser Tyr Pro Tyr Asn Ser Ile Ser Ile Tyr Ala Phe His Pro
290 295 300
Met Tyr Ala Asp Ile Lys Gln Met Gly Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ala
305 310 315 320
Ala Ala Lys Phe Asn Lys Lys Gln Lys Glu Leu Asn Gly Leu Pro Ala
325 330 335
Met Asp Tyr Glu Ala Val Asn Gln Thr Lys Trp Glu Tyr Phe Arg Leu

340 345 350
Ile Phe Lys Gln Glu Gly Glu Lys Val Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gly
355 360 365
Glu Phe Phe Asn Ala Asn Lys Glu Trp Leu Gln Pro Tyr Ala Val Phe
370 375 380
Ser Tyr Leu Arg Asp Ala Phe Gln Thr Pro Asn Phe Arg Glu Trp Pro
385 390 395 400
Arg His Ser Val Tyr Asn Ala Gln Asp Ile Glu Lys Met Cys Arg Pro
405 410 415

Glu Ser Val Asp Tyr Pro His Ile Ala Leu Tyr Tyr Tyr Ile Gln Phe
420 425 430
His Leu His Leu Gln Leu Val Ala Ala Thr Lys Tyr Ala Arg Glu His
435 440 445
Gly Val Val Leu Lys Gly Asp Ile Pro Ile Gly Ile Ser Arg Asn Ser
450 455 460
Val Glu Ala Trp Thr Glu Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Gly Gln Ala
465 470 475 480
Gly Ala Pro Pro Asp Asp Phe Ser Val Asn Gly Gln Asn Trp Gly Phe

485 490 495
Pro Thr Tyr Asn Trp Asp Val Met Glu Lys Asp Gly Tyr Arg Trp Trp
500 505 510

Met Lys Arg Phe Gln Lys Met Ser Glu Tyr Phe Asp Ala Tyr Arg Ile
515 520 525

Asp His Ile Leu Gly Phe Phe Arg Ile Trp Glu Ile Pro Met His Ala
530 535 540

Val His Gly Leu Leu Gly Gln Phe Ile Pro Ser Ile Pro Met Ser Arg
545 550 555 560

Glu Glu Ile Glu Ser Tyr Gly Leu Pro Phe Arg Glu Glu Tyr Leu Ile
565 570 575

Pro Tyr Ile His Glu Ser Phe Leu Gly Gln Val Phe Gly Pro His Thr
580 585 590

Asp Tyr Val Lys Gln Thr Phe Leu Leu Pro Ala Glu Thr Pro Gly Val
595 600 605

Tyr His Met Lys Pro Glu Phe Thr Thr Gln Arg Glu Val Glu Ser Phe
610 615 620

Phe Ala Gly Lys Asn Asp Glu Asn Ser Leu Trp Ile Arg Asp Gly Leu

625 630 635 640

Tyr Thr Leu Ile Ser Asp Val Leu Phe Val Pro Asp Thr Lys Glu Lys
645 650 655

Asp Lys Tyr His Pro Arg Ile Gly Ile Gln Arg Asp Phe Ile Phe Arg
660 665 670

Ser Leu Asn Glu Gln Glu Gln Asn Ala Phe Asn Arg Leu Tyr Asp Gln
675 680 685

Tyr Tyr Tyr His Arg His Asn Glu Phe Trp Arg Gln Gln Ala Met Lys
690 695 700

Lys Leu Pro Gln Leu Thr Gln Ser Thr Arg Met Leu Val Cys Gly Glu
705 710 715 720

Asp Leu Gly Met Ile Pro Asp Cys Val Ser Ser Val Met Asn Asp Leu
725 730 735

Arg Ile Leu Ser Leu Glu Ile Gln Arg Met Pro Lys Asn Pro Met His
740 745 750

Glu Phe Gly Tyr Leu Asn Glu Tyr Pro Tyr Arg Ser Val Cys Thr Ile
755 760 765

Ser Thr His Asp Met Ser Thr Leu Arg Gly Trp Trp Glu Glu Asp Tyr

770 775 780

Leu Gln Thr Gln Arg Tyr Tyr Asn Thr Met Leu Gly His Tyr Gly Thr
785 790 795 800

Ala Pro Thr Val Ala Thr Pro Glu Leu Cys Glu Glu Val Val Arg Asn
805 810 815

His Leu Lys Ser Asn Ser Ile Leu Cys Ile Leu Ser Leu Gln Asp Trp
820 825 830

Leu Ser Ile Asp Gly Lys Trp Arg Asn Pro Asn Val Gln Glu Glu Arg
835 840 845

Ile Asn Val Pro Ser Asn Pro Arg Asn Tyr Trp Arg Tyr Arg Met His
850 855 860

Leu Thr Leu Glu Gln Leu Met Lys Ala Glu Glu Leu Asn Asp Lys Ile
865 870 875 880

Arg Glu Leu Ile Lys Tyr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Lys
885 890