

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0107446

(43) 공개일자 2021년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23C 11/10 (2021.01) C07K 14/00 (2006.01)

C12N 11/04 (2020.01) C12N 9/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23C 11/103 (2021.01)

C07K 14/001 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0022458

(22) 출원일자 2020년02월24일

심사청구일자 2020년02월24일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호

신유정

강원도 원주시 단구로 406, 302동 1108호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

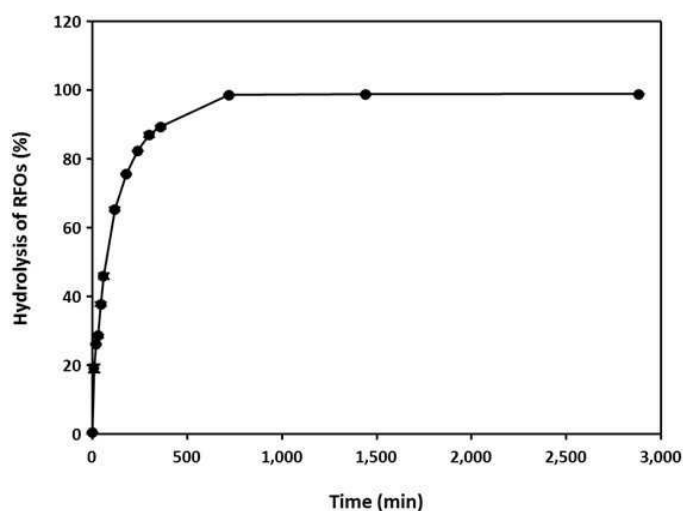
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 신규한 고정화 효소를 이용한 올리고당 감소 방법

(57) 요약

본 발명은 미생물 유래 신규한 고정화 효소를 이용하여 두유 내 다양한 올리고당을 감소시키는 방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 미생물 유래 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)의 고정화를 이용하여 두유 내 라피노스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)를 감소시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 박테로이데스 세타이오타오마이كرون(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)의 고정화를 이용하여 두유 내 라피노스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)를 효과적으로 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C12N 11/04 (2013.01)

C12N 9/6491 (2013.01)

C12Y 301/01022 (2013.01)

(72) 발명자

우승혜

경기도 구리시 검배로 142, 203동 1602호

정현모

경기도 구리시 동구릉로 151, 105동 205호

김지수

강원도 춘천시 수풍골길 13번길 5, 301호

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소가 첨가된 두유.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 두유는,

두유 내에 존재하는 라피노오스(raffinose)가 가수분해된 것을 특징으로 하는 두유.

청구항 3

라피노오스(raffinose)에 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 라피노오스의 가수분해 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 효소는,

고정화된 것을 특징으로 하는 라피노오스의 가수분해 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 고정화는,

소듐 알지네이트 비드 내에 고정화된 것을 특징으로 라피노오스의 가수분해 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 효소반응은,

40~50℃, pH 6.0~10.0에서 수행하는 것을 특징으로 하는 라피노오스의 가수분해방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 미생물 유래 신규한 고정화 효소를 이용하여 두유 내 다양한 올리고당을 감소시키는 방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 미생물 유래 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)의 고정화를 이용하여 두유 내 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 두유의 주재료인 대두에는 약 4.5 ~ 6.5 %의 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)가 존재한다. 하지만 인간은 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)가 부족하여 RFOs를 소화하는데 어려움이 있으며, 소화되지 못한 RFOs는 장 내 미생물에 의해 가스를 발생시켜 더부룩함과 복통 등 위장 질환을 일으킬 수 있다.
- [0003] 두유 내 RFOs 제거를 위해 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)를 이용하는 연구가 이루어져왔지만 대부분 라피노오스(raffinose)보다 스타키오스(stachyose)에 대한 기질 선호도가 높아, RFOs의 완전한 제거를 위해서는 긴 시간이 소요된다는 한계가 있었다.
- [0004] 따라서 기존 기술의 한계를 극복하면서 두유 내 RFOs를 감소에 효과적인 신규한 효소에 대한 개발 및 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2014-0037798호(공개일자: 2014.03.27.)는, 장 운동성 조절제 및 α -D-갈락토시다아제를 포함하는, 과민성 장 증후군의 예방 및 치료를 위한, 경구 투여용 약제학적 조성물 및 그의 제조방법에 관해 기재되어 있습니다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)를 이용하여 두유 내 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)를 감소시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소가 첨가된 두유를 제공한다.
- [0008] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 두유는, 바람직하게 두유 내에 존재하는 라피노오스(Raffinose)가 가수분해된 것일 수 있다.
- [0009] 또한, 본 발명은 라피노오스(Raffinose)에 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 라피노오스의 가수분해 방법을 제공한다.
- [0010] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 효소는, 바람직하게 고정화된 것일 수 있다.
- [0011] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 고정화는, 바람직하게 소듐 알지네이트 비드 내에 고정화된 것일 수 있다.
- [0012] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 효소반응은, 바람직하게 40~50℃, pH 6.0~10.0에서 수행하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)의 고정화를 이용하여 두유 내 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)를 효과적으로 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 인간 장내 미생물이 보유한 탄수화물 효소를 비교한 그래프로, 본 발명의 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)을 포함한 결과이다.
- 도 2는 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 이 보유하고 있는 *bt_3294* 유전자

의 아미노산 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 *bt_3294*와 pTKNd119 벡터를 결합하여 생산한 재조합 플라스미드 DNA(pTKNDbt_3294)이다.

도 4는 본 발명의 정제된 재조합 단백질 BtGal과 알파-글루코사이드(α -glucoside) 및 알파-갈락토사이드(α -galactoside) 기질을 반응시켜 TLC를 이용한 분석 결과 그림이다.

도 5는 본 발명에서 BtGal을 고정화하기 위해 소듐 알지네이트(sodium alginate)와 Ca^{2+} 사이에서 일어나는 가교 결합을 나타낸 그림이다.

도 6는 소듐 알지네이트(sodium alginate)에 혼합한 효소 BtGal의 양에 따른 고정화 효소 iBtGal의 역가를 비교한 결과 그래프이다.

도 7은 온도에 따른 BtGal과 iBtGal의 활성을 비교한 결과 그래프이다.

도 8은 온도 변화에 따른 열안정성에 대한 BtGal과 iBtGal의 활성을 비교한 결과 그래프이다.

도 9는 pH에 따른 BtGal과 iBtGal의 활성을 비교한 결과 그래프이다.

도 10은 HPAEC를 이용한 iBtGal의 두유 내 RFOs 함량 변화를 나타낸 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 두유의 주재료인 대두에는 약 4.5 ~ 6.5 %의 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)가 존재하는데, 인간은 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)가 부족하여 RFOs를 소화하는데 어려움이 있으며, 소화되지 못한 RFOs는 장 내 미생물에 의해 가스를 발생시켜 더부룩함과 복통 등 위장 질환을 일으킬 수 있다. 기존 연구에서 두유 내 RFOs 제거를 위한 여러 연구가 이루어져 왔지만 대부분 라피노오스(raffinose)보다 스타키오스(stachyose)에 대한 기질 선호도가 높아, RFOs의 완전한 제거를 위해서는 긴 시간이 소요된다는 한계가 있었다. 따라서 본 발명은 두유내 RFOs를 효과적으로 제거하고자 하는 기술을 개발하였고, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소가 첨가된 두유를 제공한다.
- [0016] 상기 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소는 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래한 것이다. 박테로이데스 세타이오타오마이크론은 인간 장 내에 공생하는 그람 음성의 혐기성 균주, 숙주 유래 글리칸과 식물성 다당류를 가수분해함으로써 인간이 소화할 수 없는 다당류를 분해하여 장에 유익한 대사를 제공한다.
- [0017] 일반적으로 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)는 아스페르길루스 니제르(*Aspergillus niger*) 등의 배양물에서 얻어진 효소제로서 채소나 콩의 탄수화물을 소화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 본 발명에서는 박테로이데스 세타이오타오마이크론 유래의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 효소가 알파-갈락토시다아제의 활성이 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0018] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 두유는, 바람직하게 두유 내에 존재하는 라피노오스(Raffinose)가 가수분해된 것일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 라피노오스(Raffinose)에 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 라피노오스의 가수분해 방법을 제공한다.
- [0020] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 효소는 바람직하게 고정화된 것일 수 있으며, 상기 고정화는, 소듐 알지네이트 비드 내에 고정화된 것일 수 있으며, 본 발명에서는, 제조한 재조합 단백질 효소를 고정화하여 고정화 효소를 생산하기 위해 소듐 알지네이트(sodium alginate)와 칼슘(Ca^{2+}) 이온 사이에서 일어나는 가교 결합을 이용하였다.
- [0021] 소듐 알지네이트(sodium alginate)는 미역, 다시마 등의 갈조류의 세포벽에서 추출되는 끈끈한 점액질 성분으로, 식품 첨가시 식품의 점착성과 점도를 증가시키며 유화안정성을 증진시켜 식품의 물성과 촉감을 향상시키는 역할을 하게 된다.
- [0022] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 효소반응은, 바람직하게 40~50℃, pH 6.0~10.0에서 수행하는 것일 수 있다.
- [0023] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명은 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)로부

터 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)를 암호화하는 유전자를 포함한 재조합 단백질 효소(BtGal)가 기존 효소들과는 다르게 스타키오스(stachyose)보다 라피노오스(raffinose)에 대한 기질 특이성이 높음을 확인하였다. 또한, 이를 고정화한 효소(iBtGal)를 이용함으로써 두유 내 RFOs의 가수분해를 탁월하게 수행하였고 이는 두유 제조 공정에 활용 가능성이 있는 결과로, 기존 상용화 효소와 함께 사용하였을 때 상호보완적 역할이 가능하여 식품 산업의 활용가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0024] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0026] [실시예 1: 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 고정화 효소 제조 및 최적 반응 조건 분석]

[0027] 본 실시예에서는 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 신규한 고정화 효소를 제조하고 이의 최적 반응 조건을 분석하고자 하였다.

[0029] 1) 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 재조합 단백질 생산

[0030] 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)은 인간 장내에 공생하는 그람 음성의 혐기성 균주로, 숙주 유래 글리칸과 식물성 다당류를 가수분해함으로써, 인간이 소화할 수 없는 다당류를 분해해 장에 유익한 대사를 제공한다.

[0031] 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)은 도 1과 같이 다른 장내 미생물들과 비교하였을 때, 다양한 종류의 탄수화물 분해효소를 다수 보유하고 있으며, 그 중 인간의 다른 장내 미생물들은 보유하고 있지 않으나 GH97 패밀리(family)에서 최소 10개의 효소를 지니고 있다.

[0032] 본 발명자들은 그 중 서열번호 2에 기재된 핵산서열을 갖는 *bt_3294* 유전자(서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 암호화함)는 알파-글루코시다아제(α -glucosidase)로 예상되어졌으나, 본 발명자가 도 4와 같이 관련 효소의 기질반응성을 TLC로 분석한 결과, 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)인 것으로 추측되었다.

[0033] 본 발명자는 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) (KCTC 5015)의 지노믹(genomic) DNA로부터 *bt_3294* 유전자를 증폭하기 위해 포워드 프라이머(foward primer: 5'-AAAACATATGCAAAAGAATGTAGAATTAAGTTCCCG-3')와 리버스 프라이머(reverse primer: 5'-AAAACTCGAGTTATTCGAGAACAGCTGAAAACCC-3')를 이용해 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다(해당 프라이머는 각각 *NdeI*과 *XhoI*을 포함함).

[0034] 증폭된 유전자는 카나마이신(kanamycin) 내성 유전자, BLMA 프로모터, 멀티플 클로닝 사이트(multiple cloning sites), 6 x 히스티딘(histidine)을 포함하는 pTKNd119 벡터와 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드 DNA(pTKNdbt_3294)를 생산하였다(도 3). 상기 재조합 플라스미드 DNA(pTKNdbt_3294)를 삽입하여 형질전환한 대장균을 배양하였다. 이때, 형질전환된 대장균만을 배양하기 위해 배지에 카나마이신(kanamycin)을 첨가하여 카나마이신(kanamycin)에 내성이 있는 형질전환체만이 살아남도록 설정하였다.

[0035] 형질전환된 대장균을 고체 LB 배지에 도말 후, 37℃에서 16시간 동안 배양하여 콜로니(colony)를 형성하였다. 콜로니를 1 L LB배지에 접종하여 37℃ 진탕 배양기(shaking incubator)에서 17시간 동안 교반(200 rpm)하여 배양하였고, 배양액은 4℃의 원심분리기(centrifuge)에서 5,500 x g에서 25분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 용해 버퍼(lysis buffer)(900 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), and 10 mM 이미다졸(imidazole))에 재현탁하여 MISONIX sonicator XL-2000 (Qsonica, LLC., Newtown, CT, USA)을 이용해 10 W에서 80분 동안 세포 파쇄하였다. 원심분리를 통해 세포 파쇄로부터 얻은 상층액을 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-Nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 컬럼에 주입하여 정제된 재조합 단백질을 얻었다.

[0036] 정제된 재조합 단백질의 발현 및 정제 양상과 분자량 확인은 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 일렉트로포레시스(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)를 이용하였다. SDS-PAGE 분석은 전개한 겔(gel)을 스테이닝(staining) (0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich Co.), 45 % (v/v) 메탄올(methanol), 9% (v/v) acetic acid in distilled water) 및 디스테이닝(destaining) (20 % (v/v) 메탄올(methanol), 10% (v/v) acetic acid in distilled water)하여 수행하였다.

[0038] 2) 정제된 재조합 단백질의 반응 특성 분석

[0039] 상기에서 제조한 정제된 재조합 단백질의 반응 특성을 확인하기 위해 다양한 기질과 반응 후, 얇은 층 크로마토 그래피(thin-layer chromatography, TLC)를 이용하여 분석하고자 하였다. TLC는 분석 기기 대비 비교적 단시간 내에 다수의 반응물을 쉽게 분석할 수 있다는 장점이 있다. 상세 과정은 다음과 같았다.

[0040] 상기에서 제조한 정제된 재조합 단백질과 알파-글루코사이드(α -glucoside) 및 알파-갈락토사이드(α -galactoside) 기질 (0.5 %)과 정제 단백질을 반응한 후, 실리카 겔(silica gel) 60 TLC 플레이트(plate) (Whatman, Maidstone, UK)을 이용하여 효소 반응물을 분석하였다.

[0041] 준비한 TLC 플레이트를 110℃에서 30분 동안 전 활성화(pre-activation)한 후, 1.2 μ l의 효소 반응물을 플레이트에 점적하였다. TLC 플레이트를 전개 용매 (EtOH/n-BuOH/water, 5:5:3, v/v/v)를 사용해 전개하였고, 완전히 말린 후 황산 용액에 담갔다가 꺼냈다. TLC 플레이트를 완전히 건조시켜 110에서 명확한 반점이 보이도록 10분 동안 구웠다.

[0042] 상기와 같이 TLC를 이용하여 알파-글루코사이드(α -glucoside) 및 알파-갈락토사이드(α -galactoside) 기질의 효소 반응을 분석한 결과, 도 4와 같이 Bt_3294 단백질은 알파-글루코사이드(α -glucoside) 기질(도 4의 위)은 모두 가수분해하지 못하였으나, 알파-갈락토사이드(α -galactoside) 기질(도 4의 아래)은 분자량이 큰 검(gum)류를 제외한 모든 기질을 가수분해하였다. 이와 같은 TLC 분석 결과에 따라 정제된 재조합 단백질은 'BtGal'이라고 명명하였다.

[0044] 3) 재조합 단백질 BtGal의 기질 특이성 분석

[0045] BtGal의 기질 특이성을 확인하기 위해 효소 동역학 실험을 수행하고자 하였다. 다양한 알파-갈락토사이드(α -galactoside) 기질의 농도별 효소 반응 속도를 측정하였다. 효소 반응은 40℃, pH 7.0에서 수행하였으며, K_m 과 k_{cat} 을 계산하기 위해 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 방정식과 라윈에버-버크 도면(Lineweaver-Burk plot)을 이용하였다. 그 결과는 표 1과 같았다.

표 1

[0046] BtGal의 효소 동역학 지표

기질	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)
pNPGal	27.7 ± 0.3^a	2.2 ± 0.1	12.8
멜리바이오스(Melibiose)	7.2 ± 0.1	21.7 ± 1.0	0.3
라피노오스(Raffinose)	20.4 ± 0.7	32.2 ± 3.3	0.6
스타키오스(Stachyose)	0.6 ± 0.02	26.9 ± 2.2	0.02
베르바스코오스(Verbascose)	0.09 ± 0.0005	22.6 ± 0.4	0.004

[0047] pNPGal : p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside

[0048] ^a : 해당 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였음

[0050] 상기와 같은 결과를 통해 k_{cat}/K_m 을 비교 분석하여 가장 높은 특이성을 갖는 기질을 알 수 있으며, 특히 라피노오스(Raffinose)에 대한 기질 특이성이 스타키오스(Stachyose)에 대한 기질 특이성보다 높은 것을 확인하였다.

[0052] 4) 고정화 효소 iBtGal의 제조 및 특성 분석

[0053] BtGal을 고정화하기 위해 소듐 알지네이트(sodium alginate)와 Ca^{2+} 사이에서 일어나는 가교 결합을 이용하였다. 이에 대한 원리는 도 5에 나타내었다. 소듐 알지네이트(sodium alginate)는 미역과 다시마와 같은

갈조류의 세포벽에 함유된 물질로, 식품 제조 공정에 적용하기에 적합하다. BtGal 고정화의 상세 과정은 다음과 같다.

[0054] BtGal과 소듐 알지네이트(sodium alginate) 용액을 1:4 (v/v)의 비율로 혼합하여 0.3 U/mL BtGal을 포함한 3% 소듐 알지네이트(sodium alginate) 용액을 제조하였다. 차가운 200 mM CaCl₂ 용액에 BtGal과 소듐 알지네이트(sodium alginate)의 혼합 용액을 20 µL씩 투하한 후, 2시간 동안 경화하여 고정화 BtGal을 생산하였다. 고정화 BtGal은 'iBtGal'이라고 명명하였다. iBtGal은 50 mM NaOAc (pH 7.0)로 씻어 4℃에서 보관하였다.

[0055] 고정화 효소 iBtGal의 역가를 소듐 알지네이트(sodium alginate)에 혼합한 효소(BtGal)의 양을 달리하여 비교한 결과(도 6), 상기와 같이 0.3 U/mL의 BtGal을 사용하였을 때, 고정화 효소 iBtGal의 역가는 예상 역가 대비 약 1.8배 증가한 것으로 나타났다.

[0057] 5) 고정화 효소 iBtGal의 최적 반응 조건 분석

[0058] 고정화 효소 iBtGal의 효율적인 활용을 위해 온도, 열안정성 및 pH에 대한 iBtGal의 활성을 확인함으로써 최적 반응 조건을 분석하고자 하였다. 또한, BtGal과 iBtGal의 특성을 비교하기 위해 온도, 열안정성 및 pH에 대한 BtGal의 활성을 측정하였다. 온도와 pH에 따른 효소의 활성 측정에서 가장 높게 관찰된 효소의 활성을 100%로 설정하였으며, 효소의 열안정성 실험에서 0분에서의 활성을 100%로 간주하였다. 실험에 사용한 인공 기질인 방출되는 pNPGal은 효소에 의해 갈락토오스(galactose)가 가수분해되어 노란색을 띠는 pNP를 방출하게 된다. 방출된 pNP의 발색 정도를 흡광광도계(spectrophotometer; Multiskan FC, Thermo Scientific, Whatman, MI, USA)를 이용해 405 nm에서 측정하였고, 이를 통해 효소의 활성을 측정할 수 있다. iBtGal은 환원성 말단에 존재하는 갈락토실(galactosyl)기를 특이적으로 가수분해한다.

[0059] 먼저 iBtGal의 최적 온도를 확인하기 위해 다양한 온도(30 ~ 70℃)에서 pNPGal을 가수분해하는 속도를 관찰하였다. 그 결과, 도 7과 같이 BtGal과 iBtGal 모두 60℃에서 최적의 활성을 나타내었으나, iBtGal은 BtGal 대비 약 2.5배 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

[0060] 또한, iBtGal의 온도에 대한 열안정성을 확인하기 위해 다양한 온도(30 ~ 60℃)에서 방치 시간(0 ~ 60분)에 따른 효소의 활성을 pNPGal을 이용해 측정하였다. 그 결과, 도 8과 같이 40℃와 50℃에서 iBtGal의 D-values는 BtGal 대비 각각 약 37배와 30배로 증가하는 것으로 나타나 열안정성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 또한, iBtGal의 최적 pH를 확인하기 위해 다양한 pH (pH 6.0 ~ 10.0)에서 pNPGal을 이용한 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 9와 같이 BtGal과 iBtGal 모두 pH 7.0에서 최적의 활성을 나타내었으나, iBtGal은 BtGal 대비 약 6.2배 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

[0063] [실험예 1: 본 발명의 iBtGal을 이용한 두유 내 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs) 감소효능 확인]

[0064] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 제조한 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 유래 신규한 고정화 효소 iBtGal을 이용한 두유 내 라피노오스 패밀리 올리고사카라이드(Raffinose family oligosaccharides, RFOs) 감소 효능을 확인하고자 하였다.

[0065] 대두의 수침, 분쇄, 여과, 그리고 가열 과정을 거쳐 iBtGal과 반응하기 위한 두유를 제조하였다. iBtGal 390 U 과 두유 5 mL을 48시간 동안 40℃에서 배양하면서 다양한 시간 간격으로 반응물을 얻었다. 반응물은 100℃에서 5분 동안 가열하고, 11,200 × g에서 1분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 이를 50배 희석하고 및 여과 과정을 거쳐 HPAEC(High-performance anion exchange chromatography)로 분석하였다. HPAEC를 이용한 분석 방법은 염기성 조건 하에서 음이온을 띠는 탄수화물과 음이온 교환 컬럼 사이의 상호작용에 의해 정성 및 정량 분석이 가능하다. 이러한 원리를 이용하여 감소하는 RFOs의 양을 HPAEC로 분석하였다. 대조군은 iBtGal과 반응하지 않은 두유를 같은 방법으로 준비하였다.

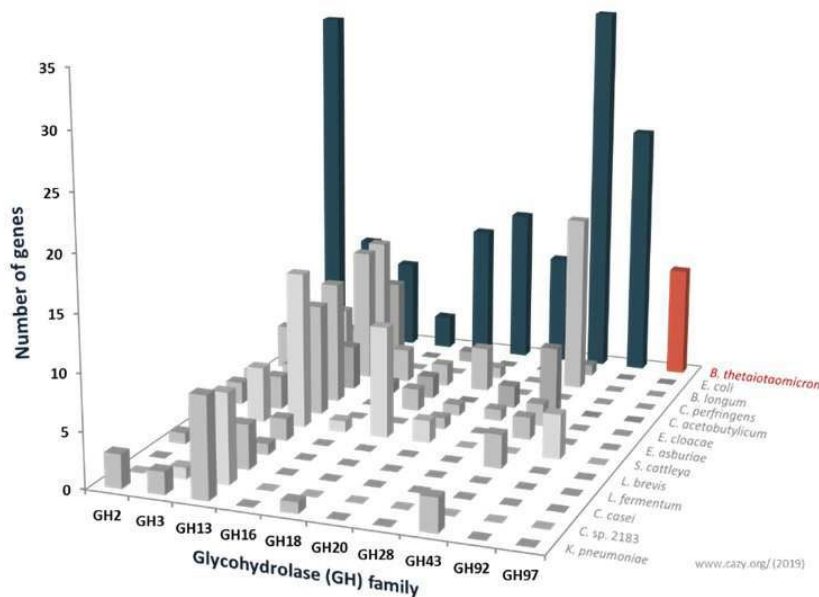
[0066] 그 결과, 도 10과 같이 iBtGal은 12시간 후 두유 속 대부분의 RFOs를 제거한 것으로 나타났다.

[0068] 이상 종합하면, 본 발명은 박테로이데스 세타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)로부터 신규한 알

파-갈락토시다아제(α -galactosidase)를 분자생물학적 기법을 이용해 생산하였고, 이는 기존 효소들과는 다르게 스타키오스(stachyose)보다 라피노오스(raffinose)에 대한 기질 특이성이 높음을 확인하였다. 이를 고정화한 효소(iBtGal)를 이용함으로써 두유 내 RFOs의 가수분해를 탁월하게 수행하였고 이는 두유 제조 공정에 활용 가능성이 있는 결과로, 기존 상용화 효소와 함께 사용하였을 때 상호보완적 역할이 가능하여 식품 산업의 활용가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

도면

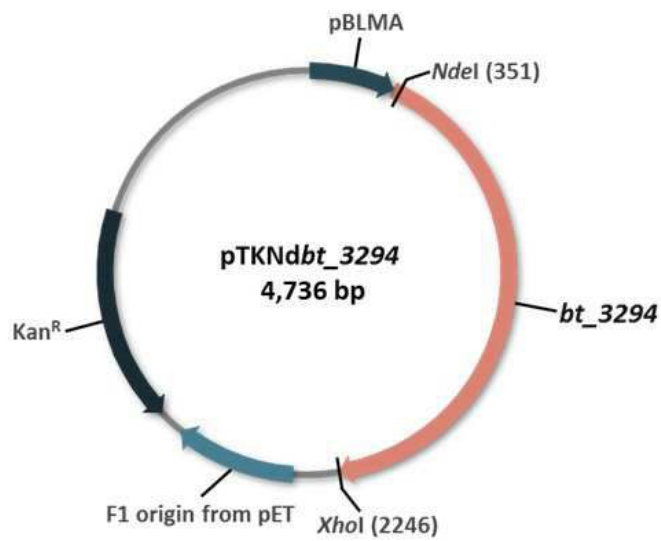
도면1



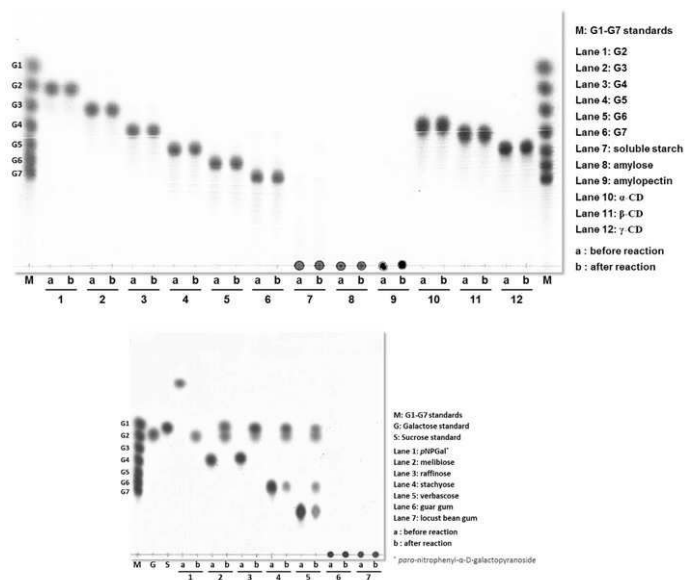
도면2

KEGG Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482: BT_3294 Help			
Entry	BT_3294	CDS	T00122
Definition	(RefSeq) alpha-glucosidase		
KO	K01187 alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20]		
Organism	bth Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482		
Pathway	bth00052 Galactose metabolism bth00500 Starch and sucrose metabolism bth01100 Metabolic pathways		
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:bth00001] 09100 Metabolism 09101 Carbohydrate metabolism 00052 Galactose metabolism BT_3294 00500 Starch and sucrose metabolism BT_3294		

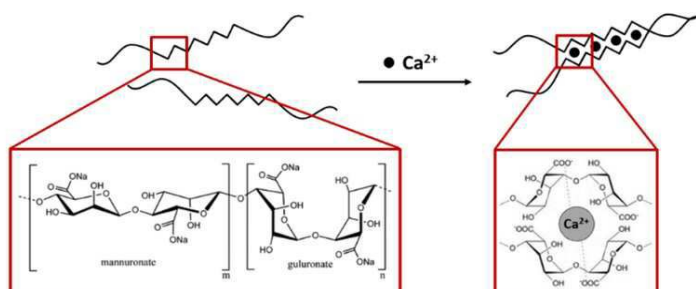
도면3



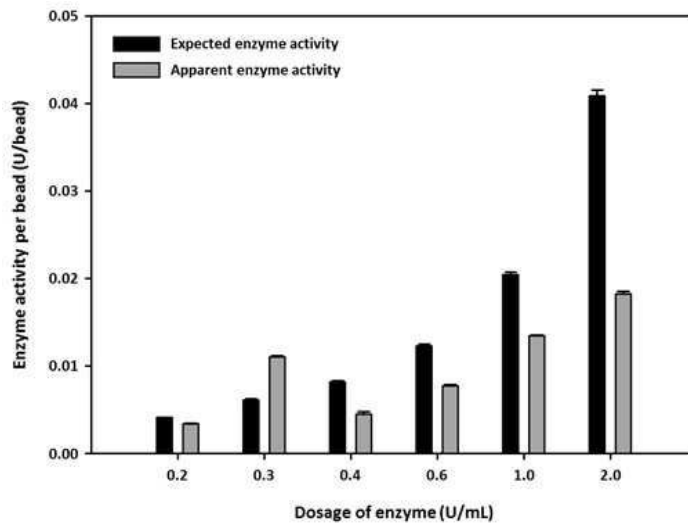
도면4



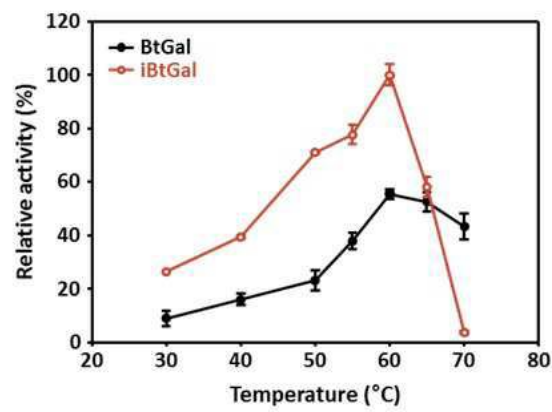
도면5



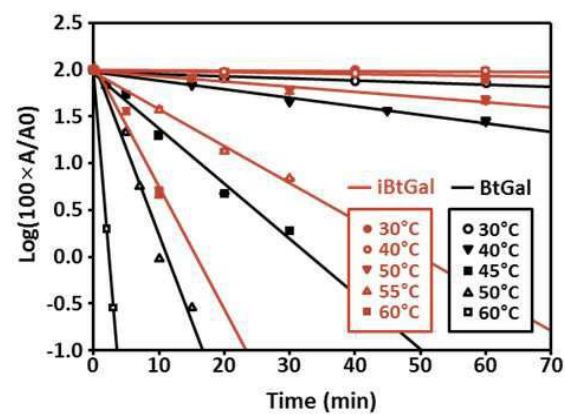
도면6



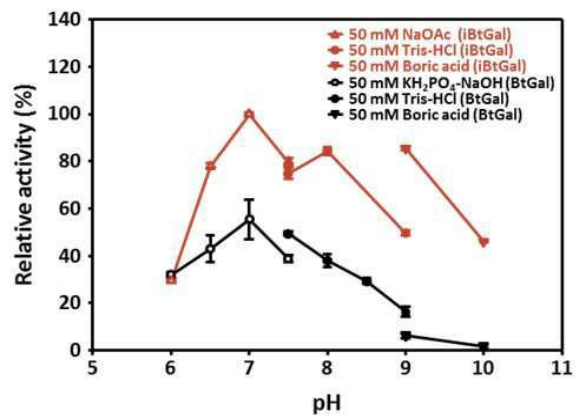
도면7



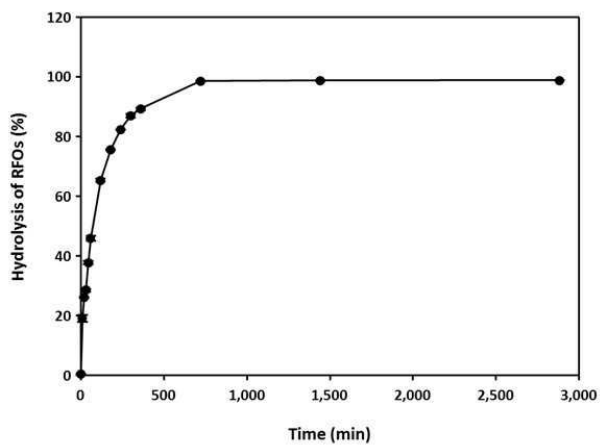
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY
- <120> Oligosaccharides reduction method using novel immobilized enzyme
- <130> YP-20-001
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 650
- <212> PRT
- <213> Bacteroides thetaiotaomicron
- <400> 1

Met Arg Lys Leu Leu Leu Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Val Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gln Lys Asn Val Glu Leu Ser Ser Pro Asn Gly Glu

20 25 30
 Ile Lys Val Ser Val Arg Leu Thr Asp Lys Ile Tyr Tyr Asp Val Ala
 35 40 45
 Cys Asn Asp Glu Val Leu Leu Lys Asp Asn Tyr Leu Gln Leu Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ile Leu Gly Glu His Pro Lys Leu Ser Gly Gln Lys Gln
 65 70 75 80
 Asn Lys Ile Lys Glu Thr Leu Thr Pro Val Val Pro Leu Lys Phe Ser
 85 90 95
 Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Gln Leu Leu Leu Asn Phe Lys Gly Asn
 100 105 110
 Tyr Ser Val Glu Phe Arg Ala Phe Asn Asp Gly Ile Ala Tyr Arg Phe
 115 120 125
 Ile Thr Arg Gln Lys Gly Glu Ile Glu Val Leu Gly Glu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Leu Gln Phe Pro Thr Asp Tyr Leu Leu His Leu Gln Gln Pro Gly Gly
 145 150 155 160
 Phe Lys Thr Ala Tyr Glu Glu Pro Tyr Thr His Ile Ser Ser His Ser
 165 170 175
 Trp Lys Pro Ser Asp Lys Met Ser Val Leu Pro Val Leu Ile Asp Thr
 180 185 190
 Arg Lys Ser Tyr Lys Ile Leu Ile Ser Glu Ser Asp Leu Ser Asp Tyr
 195 200 205
 Pro Cys Met Phe Leu Lys Gly Asn Gly Thr Asn Gly Ile Ser Ser Ile
 210 215 220
 Phe Pro Lys Val Pro Leu Ala Phe Gly Glu Asp Gly Asp Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Tyr Ile Ala Lys Thr Ser Gly Lys Arg
 245 250 255
 Asn Phe Pro Trp Arg Tyr Phe Val Ile Thr Lys Glu Asp Lys Gln Leu
 260 265 270

Val Glu Asn Thr Met Thr Tyr Lys Leu Ala Asp Lys Asn Gln Leu Glu
275 280 285

Asp Val Ser Trp Ile Lys Pro Gly Gln Val Ser Trp Glu Trp Trp Asn
290 295 300

Gly Ala Thr Pro Tyr Gly Gln Asp Val Thr Phe Lys Ala Gly Cys Asn
305 310 315 320

Leu Glu Thr Tyr Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Ala Ser Lys Phe Gly Ile
325 330 335

Pro Tyr Ile Ile Met Asp Glu Gly Trp Ala Lys Ser Thr Arg Asp Pro
340 345 350

Tyr Thr Pro Asn Pro Asp Val Asp Leu His Glu Leu Ile Arg Tyr Gly
355 360 365

Lys Glu Lys Asn Val Gly Ile Val Leu Trp Leu Thr Trp Leu Thr Val
370 375 380

Glu Lys Asn Phe Asp Leu Phe Lys Thr Phe Asn Glu Trp Gly Ile Lys
385 390 395 400

Gly Val Lys Ile Asp Phe Met Asp Arg Ser Asp Gln Trp Met Val Asn
405 410 415

Tyr Tyr Glu Arg Val Ala Gln Glu Ala Ala Arg His His Leu Phe Val
420 425 430

Asp Phe His Gly Ser Phe Lys Pro Ala Gly Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro
435 440 445

Asn Val Leu Ser Tyr Glu Gly Val Arg Gly Met Glu Gln Met Gly Gly
450 455 460

Cys Lys Pro Glu Asn Ser Ile Tyr Leu Pro Phe Met Arg Asn Ala Val
465 470 475 480

Gly Pro Met Asp Tyr Thr Pro Gly Ala Met Ile Ser Met Gln Pro Asn
485 490 495

Ile Tyr Arg Ser Glu Arg Pro Asn Ser Ala Ser Ile Gly Thr Arg Ala
500 505 510

Tyr Gln Met Ala Leu Phe Val Ile Phe Glu Ser Gly Leu Gln Met Leu
515 520 525

Ala Asp Asn Pro Thr Leu Tyr Tyr Arg Asn Glu Asp Cys Thr Arg Phe

530 535 540
 Ile Thr Gln Val Pro Val Thr Trp Asp Glu Thr Val Val Leu Glu Ala
 545 550 555 560
 Lys Val Gly Glu Tyr Val Ile Val Ala Lys Arg Lys Gly Glu Lys Trp
 565 570 575
 Phe Ile Gly Gly Met Thr Asn Asp Lys Glu Asn Glu Arg Glu Phe Glu
 580 585 590
 Ile Asn Leu Asp Phe Leu Lys Asp Gly Arg Thr Tyr Arg Val Thr Ser
 595 600 605

Phe Glu Asp Gly Ile Asn Ala Gly Tyr Gln Ala Met Asp Tyr Arg Met
 610 615 620
 Lys Ser Ala Ala Met Asn Lys Asn Gln Lys Leu Ser Val Lys Met Ala
 625 630 635 640
 Arg Asn Gly Gly Phe Ser Ala Val Leu Glu
 645 650

<210> 2
 <211> 1953
 <212> DNA
 <213> Bacteroides thetaiotaomicron
 <400> 2

atgagaaagt tactcttatt attcctatatt atttgtggat tagtgctaca tgcacaagca 60
 caaaagaatg tagaattaag ttccccgaac ggagaaataa aagtatccgt ccgcctcacc 120
 gacaaaatct actatgacgt agcctgcaat gatgaagttc tgttgaaaga caattatctc 180
 caacttaaac taaaagataa aatattgggc gaacatccca aactgtccgg acaaaaacag 240
 aacaaaataa aagaacctt aaccctgtc gtccactga aattttcaac gatcaataac 300
 gaatataacc aacttctact caattttaaa ggaaactact cagtagaatt ccgtgctttt 360
 aacgatggaa tagcctatcg ttttatcacc cgccaaaaag gagaaatcga agtattggga 420
 gaagaccttt cattgcagtt cccgacagac tatttattac atctccaaca gccgggaggg 480
 ttcaaaaacag cttatgaaga gccgtacaca cacatttcca gtcactcatg gaaaccatcg 540
 gataaaatgt ccgtacttcc agtttctcatt gatacacgta aatcatataa gataactaate 600

agtgaatctg atctgtcga ctatccttgc atgtttctga aaggaaacgg gaccaatggc	660
atatacctcca tttttccaaa agtccccctt gcatttgggtg aagacggaga ccgcagcctc	720
aaaatcgaaa aagaagcgga atatacgcct aaaacaagtg gaaaaaggaa ctttccatgg	780
cgctactttg tcattaccaa ggaagacaag caattagtgt agaacactat gacctataaa	840
ctggctgata agaatacgtt agaagatgtg tcattggataa aaccagggca agtaagtgtg	900
gaatggtgga acggagcaac cccgtatggg caagatgtaa cctttaaacg tggttgtaat	960
ttggaacat acaataactt cattgatttc gcaccaagt tcggaatccc ttacattatt	1020
atggatgaag gatgggccaa gactacacgc gatccttaca ctctaatcc ggacgtagac	1080
cttcatgagc tgattcgta tggaaaagaa aagaatgtgg gtattgtcct ttggctgact	1140
tggtaaacag tagaaaagaa ttttgacctt ttcaaacat tcaatgaatg gggaataaag	1200
ggagtaaaaa tagacttcat ggaccgcagc gatcaatgga tggttaacta ctacgaacga	1260
gtagcccaag aagcagccag acatcattta ttgtttgact tccatggatc attcaagccg	1320
gccggactgg aatacaagta tcccaatgta ttatcctatg aaggggtcag aggtatggaa	1380
caaatgggag gctgtaagcc ggagaatagc atctacttgc ctttcatgag aaatgcggtg	1440
ggccctatgg attacactcc tggagctatg atcagtatgc aaccgaatat ctatcgttcc	1500
gaacgtccta actctgcaag tatcggtacc cgtgcatacc aaatggcttt atttgtcata	1560
ttcgaaagcg gtttacaat gttggcagac aatccgacct tatattaccg caatgaagat	1620
tgcactcgtt tcattaccaa agtacctgta acatgggatg aaacagttgt tctggaagcc	1680
aaagtaggtg aatatgtaat cgttgcgaag cgtaaaggag agaaatggtt tattggtggg	1740
atgactaatg ataaggaaaa tgaaagagaa ttgaaataa atctcgactt cctgaaagat	1800
ggcaggacct accgtgtaac ctctgttgag gatggaataa atgcaggata tcaggcaatg	1860
gattaccgta tgaaatcggc agcaatgaat aagaatcaaa agctttctgt caaatggct	1920
agaaatggtg ggttttcagc tgtttctgaa taa	1953