



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12P 1/02 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년08월06일 10-0746666 2007년07월31일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2005-0061337 2005년07월07일 2005년07월07일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2007-0006210 2007년01월11일
----------------------------------	---	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자 고려대학교 산학협력단
 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김승욱
 서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트 104동 905호

 임정수
 경기 성남시 분당구 야탑동 334 장미마을 826동 702호

 이동환
 경기 고양시 덕양구 행신동 샘터마을 208동 802호

(74) 대리인 이덕록

(56) 선행기술조사문헌
Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.65(5) : KR1020020084677 A
530-537

심사관 : 김상준

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 페니실리움 시트리눔 K C C M 11663으로부터 프락토실트랜스퍼라제를 분리정제하는 방법

(57) 요약

본 발명은 페니실리움 시트리눔(*Penicillium citrinum*) KCCM 11663 균주로부터 프락토실 트랜스퍼라제의 분리, 정제방법에 관한 것으로서, 상세하게는 수크로스(sucrose)가 포함된 배지조성에서 배양한 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663이 생산하는 여러 효소 중 설당을 네오프락토 올리고당으로 만드는 새로운 프락토실 트랜스퍼라제의 분리정제방법에 관한 것이다. 일반적으로는 프락토 올리고당과 네오프락토 올리고당이 함께 생산되었지만 본 발명의 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 수크로스에 반응시킨 결과 프락토 올리고당은 생산되지 않고 네오프락토 올리고당만을 선택적으로 생산할 수 있어 여러 식품, 의약 산업의 첨가제로 사용이 용이하게 된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

페니실리움 시트리눔(*Penicillium citrinum*) KCCM 11663에서 유래한 SDS-PAGE 측정 분자량이 80-90 kDa인 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 수크로스에서 네오케스토스 또는 네오니스토스의 네오프락토 올리고당을 생산하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 페니실리움 시트리눔(*penicillium citrinum*) KCCM 11663 균주로부터 프락토실 트랜스퍼라제의 분리정제방법에 관한 것이다.

프락토 올리고당은 수크로스(sucrose)에 프락토오스(fructose) 1 내지 3분자가 β -(2,1) 결합하여, 1-케스토스(1-kestose), 니스토스(nystose) 및 프락토실 니스토스(fructosyl nystose)로 이루어진 올리고당으로 아스파라거스, 양파, 벌꿀 등에 널리 분포되어 있다. 이러한 식물 유래의 프락토 올리고당은 그 생산에 있어 계절적, 보관적 요인에 의해 영향을 크게 받으므로 현재는 미생물 유래의 공정을 통해 생산되고 있다. 이러한 프락토 올리고당을 생산하는 방법으로는 프락토실 트랜스퍼라제(fructosyl transferase)나 β -프락토폴라노시다제(β -fructofuranosidase)를 이용하는 효소적 방법과 미생물 균체 자체를 이용하여 오레오바시디움 플루란스(*Aureobasidium pullulans*), 아스퍼질러스 나이저 (*Aspergillus niger*) 또는 푸사리움 속(*Fusarium* sp.) 균주 등을 직접 자당 용액과 반응하는 균체 고정화 방법이 있다.

네오프락토 올리고당은 수크로스(sucrose)에 프락토오스(fructose) 1 내지 3분자가 β -(2,6) 결합한 구조로 기존의 프락토 올리고당 구조와는 상이하며, 네오케스토스(Neokestose, 6G- β -fructofuranosyl-sucrose), 네오니스토스(Neonystose, 6G- β -fructofuranosyl-kestose), 그리고 네오프락토실 니스토스(Neofructosyl nystose, 6G- β -fructofuranosyl-nystose)로 이루어진 물질이다. 일본특허 제 10-165192호는 페니실리움 시트리눔(*Penicillium citrinum*) FERM-15944 곰팡이를 이용하여 기존의 프락토 올리고당과 함께 네오프락토 올리고당의 혼합물을 생산하였고 상기 네오프락토 올리고당이 우수한 보습작용, 우수한 단맛, 저 칼로리성, 항우식 작용, 장내 세균의 증식, 장관 국소면역 증강작용 등의 기능을 갖고 있기 때문에 감미료, 기능성 식품, 사료, 의약, 식물의 방역 촉진제 등의 다방면의 적용 가능성이 있음을 예시하였다. 또한 한국특허 제 10-2002-0004445호는 토양 유래 페니실리움 시트리눔 KCTC 18080P를 동정하였고, 배양된 균체를 고농도의 자당용액과 반응시켜 프락토 올리고당과 네오프락토 올리고당을 함께 생산하였다.

향후 네오프락토 올리고당이 여러 식품, 의약 산업의 첨가제로 사용되기 위해서는 프락토 올리고당과의 혼합물이 아닌 순수한 물질로 생산되어야 한다. 기존의 생산방법으로는 생산된 프락토 올리고당과 네오프락토 올리고당을 분리하는 새로운 공정이 추가되어야 하므로 네오프락토 올리고당만을 생산할 수 있는 공정개발이 필요하다.

이에 따라 본 발명자들은 네오프락토 올리고당만을 생산하기 위한 연구를 계속하던 중, 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663 균주로부터 네오프락토 올리고당만을 선택적으로 생산하는 효소를 발견하였고, 이를 분리정제하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 페니실리움 시트리눔(*penicillium citrinum*) KCCM 11663 균주로부터 프락토실 트랜스퍼라제의 분리 정제방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페니실리움 시트리눔(*penicillium citrinum*) KCCM 11663 균주로부터 프락토실 트랜스퍼라제의 분리, 정제방법을 제공한다. 구체적인 정제방법은 하기와 같다.

- (1) 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663을 수크로스를 단일 탄소원으로 하는 배지에서 15-35℃, 100-300rpm에서 60-90 시간 동안 진탕 배양하여 활성화시켜 종배양하는 제1단계;
- (2) 제1단계의 종배양과 동일한 조성의 배지에서 15-35℃, 400-700rpm에서 80-120시간 동안 진탕 배양하여 프락토실 트랜스퍼라제를 대량생산하는 제2단계;
- (3) 제2단계의 발효액을 원심분리하여 균체를 제거하고 남은 여액을 50-60%의 황산암모늄으로 단백질을 침전시켜 단백질을 농축하는 제3단계;
- (4) 제3단계에서 농축된 단백질을 디에틸아미노에틸-세파로스 (DEAE-sepharose) 컬럼을 통한 1차 크로마토그래피를 수행한 후 0.05-0.2M의 염으로 단백질을 용출하는 제4단계;
- (5) 제4단계에서 용출된 단백질을 카르복시메틸-세파로스 (CM-sepharose) 컬럼을 통한 2차 크로마토그래피를 수행한 후 0.05-0.2M의 염으로 단백질을 용출하는 제5단계;
- (6) 제5단계에서 용출된 단백질에 세파덱스 G75 (Sephadex G75) 컬럼을 통한 3차 크로마토그래피를 수행하여 프락토실 트랜스퍼라제를 정제하는 제6단계로 구성됨을 특징으로 하는 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663 으로부터 프락토실 트랜스퍼라제를 정제하는 방법을 제공한다.

상기 프락토실 트랜스퍼라제는 수크로스로부터 네오키스토스 또는 네오니스토스 등의 네오프락토 올리고당 만을 선택적으로 생산함을 특징으로 한다.

또한 상기의 정제방법에 의해 수득되어지고, 하기 (a) 내지 (e)의 특징을 가지는 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 제공한다.

- (a) 최적온도 50℃
- (b) 최적 pH 5.0
- (c) 온도 20 내지 50℃ 및 pH 5.0 내지 7.0 에서 안정
- (d) 등전점 pI 5.0 내지 6.0
- (e) SDS-PAGE 측정 분자량 80-90 kDa.

상기의 특징을 가지는 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 수크로스에서 네오키스토스 또는 네오니스토스의 네오프락토 올리고당을 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 프락토스 트랜스퍼라제는 하기와 같은 방법에 의해 정제될 수 있다.

페니실리움 시트리눔 KCCM 11663을 수크로스를 단일 탄소원으로 하며, NaNO_3 , K_2HPO_4 , 효모추출물, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl 또는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 조성된 배지에서 15-35°C, 바람직하게는 25-30°C에서, 100-300rpm, 바람직하게는 180-230rpm에서, 60-90시간, 바람직하게는 70-80시간 동안 진탕 배양하여 활성화시켜 종배양하는 제1단계;

제1단계의 종배양과 동일한 조성의 배지에서 15-35°C, 바람직하게는 25-30°C, 400-700rpm, 바람직하게는 450-550rpm에서 80-120시간, 바람직하게는 90-100시간 동안 진탕 배양하여 프락토실 트랜스퍼라제를 대량생산하는 제2단계;

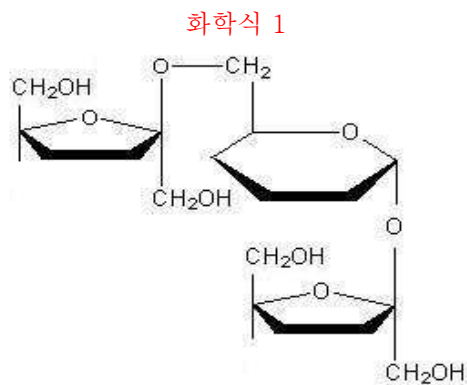
제2단계의 발효액을 원심분리하여 균체를 제거하고 남은 여액을 50-60%의 황산암모늄, 바람직하게는 55%의 황산암모늄으로 단백질을 침전시켜 단백질을 농축하는 제3단계;

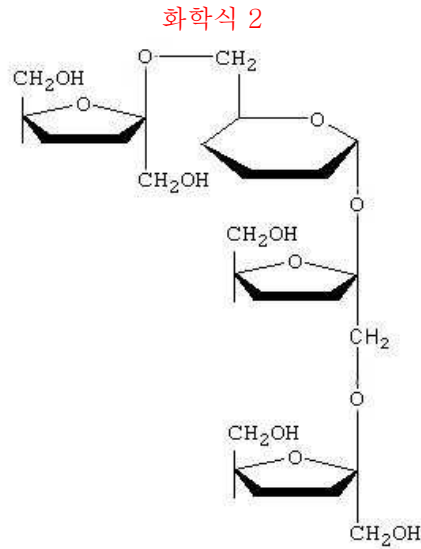
제3단계에서 농축된 단백질을 디에틸아미노에틸-세파로스 (DEAE-sepharose) 컬럼을 통한 1차 크로마토그래피를 수행한 후 0.05-0.2M, 바람직하게는 0.1M의 염으로 단백질을 용출하는 제4단계;

(5) 제4단계에서 용출된 단백질을 카르복시메틸-세파로스 (CM-sepharose) 컬럼을 통한 2차 크로마토그래피를 수행한 후 0.05-0.2M의 염, 바람직하게는 0.1M으로 단백질을 용출하는 제5단계;

(6) 제5단계에서 용출된 단백질에 세파덱스 G75 (Sephadex G75) 컬럼을 통한 3차 크로마토그래피를 수행하여 프락토실 트랜스퍼라제를 정제하는 제6단계로 구성됨을 특징으로 하는 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663 으로부터 프락토실 트랜스퍼라제를 정제하는 방법을 제공한다.

상기 프락토실 트랜스퍼라제는 수크로스로부터 하기 화학식 1의 네오케스토스 또는 하기 화학식 2의 네오니스토스 등의 네오프락토 올리고당 만을 선택적으로 생산함을 특징으로 한다.





따라서, 상기의 정제방법에 의해 수득되어지는 정제된 프락토실 트랜스라제는, 최적온도 50℃, 최적 pH 5.0에서 최적의 활성을 가지며, 온도 20 내지 50℃ 및 pH 5.0 내지 7.0 에서 안정성을 유지하면서, 등전점은 pI 5.0 내지 6.0이며, SDS-PAGE 측정 분자량은 80-90 kDa임을 특징으로 한다.

또한 본 발명은 상기의 특징을 가지는 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 수크로스에서 네오케스토스 또는 네오니스토스의 네오플락토 올리고당을 생산하는 방법을 제공한다. 40-70%, 바람직하게는 50-60% 수크로스 용액과 상기 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 2-10시간, 바람직하게는 5-7시간동안 반응시켜 수크로스에서 프락토 올리고당을 제외한 네오케스토스 및 네오니스토스의 네오플락토 올리고당만을 순수하게 생산할 수 있다.

이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 구체적인 예시일 뿐이며, 본 발명의 권리범위를 한정하지 않는다.

실시예 1. 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 종배양

페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 종균(seed) 배양을 위해 수크로스를 단일 탄소원으로 하여 채용한 하기 표 1과 같은 조성을 가진 배지를 사용하여다. 상기 균주는 250 ml 플라스크에서 50 ml의 배지량을 첨가하여 28℃, 200rpm으로 72 시간동안 종배양을 하였다.

[표 1]
배지조성

성분	조성 (g/L)
수크로스 (Sucrose)	126.5
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	5
효모추출물	29
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
KCl	1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02

실험예 1. 프락토실 트랜스퍼라제의 분리 및 정제

1-1. 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 본 배양

상기 실시예 1에서 종배양된 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 본 배양은 상기 종배양의 배지와 동일한 조성을 갖는 배지로 2.5ℓ 발효조(Kobiotech, Korea)에서 28℃, 500rpm, 1.5vvm으로 96시간동안 배양하여 프락토실 트랜스퍼라제를 대량생산하였다.

1-2. 프락토실 트랜스퍼라제의 농축

상기 실험예 1-1에서 본 배양된 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 배양액을 회수하여 원심분리한 뒤 균체를 제거하고 여액 내에 있는 단백질에 0-70%의 황산암모늄을 첨가하여 침전시켰을 때 프락토실 트랜스퍼라제의 농축효과를 관찰하였다.

그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 55%의 황산암모늄을 첨가하여 침전하였을 경우에 프락토실 트랜스퍼라제의 농축효과가 가장 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 배양된 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663의 배양액을 회수하여 원심분리한 뒤 균체를 제거하고 여액 내에 있는 단백질에 55%의 황산암모늄을 첨가하여 침전시켰다.

1-3. 디에틸아미노에틸-세파로스(DEAE-sepharose) 크로마토그래피

상기 실험예 1-2에서 농축된 단백질 침전물을 원심분리를 통해 회수하여 디에틸아미노에틸-세파로스가 충전된 컬럼을 통해 1차 크로마토그래피를 수행하였다.

그 후 각기 다른 염이온 농도구배(0-0.3M NaCl)에서 단백질을 용출하여 단백질의 농도 및 프락토실 트랜스퍼라제의 활성을 측정하였다.

그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 0.1M 농도로 용출한 구간에서 프락토실 트랜스퍼라제의 활성이 측정되었다.

따라서 프락토실 트랜스퍼라제의 활성이 측정된 분획을 회수하여 2차 크로마토그래피를 수행하기 위하여 한외여과를 통해 다시 농축하였다.

1-4. 카르복시메틸-세파로스(CM-sepharose) 크로마토그래피

상기 실험예 1-3에서 농축된 분획을 카르복시메틸-세파로스가 충전된 컬럼에 흘려보내 2차 크로마토그래피를 수행하였다. 그 후 다양한 염이온 농도구배 (0-0.3M NaCl)를 통해 단백질을 용출하여 단백질의 농도 및 프락토실 트랜스퍼라제의 활성을 측정하였다.

그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 0.1M 농도로 용출한 구간에서 프락토실 트랜스퍼라제의 활성이 측정되었다.

따라서 프락토실 트랜스퍼라제의 활성이 측정된 분획을 회수하여 한외여과를 통해 다시 농축하였다.

1-5. 세파덱스 G75(Sephadex G 75) 크로마토그래피

상기 실험예 1-4에서 회수된 분획을 세파덱스 G75가 충전된 컬럼에 흘려보내 3차 크로마토그래피를 수행하였다.

그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 대부분의 불순 단백질들은 1, 2차 크로마토그래피를 통해 제거되었고 3차 크로마토그래피에서 프락토실 트랜스퍼라제가 최종적으로 정제되었다.

상기의 방법으로 정제된 본 발명의 프락토실 트랜스퍼라제는 SDS 폴리악릴아마이드 겔 전기영동에 의한 분석결과, 분자량이 약 80-90 kDa 범위였으며, pH 5.0, 50℃에서 최적활성을 나타내었으며, 등전점은 약 pI 5.0-6.0 범위이며 또한 열 및 pH 안정성 실험결과 이 효소는 pH 5.0-7.0 범위에서 안정적이며, 20-50℃ 범위의 온도에서 매우 안정하였다.

또한 하기 표 2에서 보는 바와 같이 전체 분리정제 과정을 통해 네오프락토 올리고당만을 선택적으로 생산하는 프락토실 트랜스퍼라제는 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663 균주의 배양액 2 L로부터 약 8배 정제되었고, 10.5%가 회수되었으며 최종 정제단계에서 비활성이 1.655 U/mg을 나타내었다.

[표 2]
프락토실 트랜스퍼라제의 정제

정제단계	부피(ml)	전체역가(U)	비활성(U/mg)	단백질량(mg)	회수율(%)	정제배수
배양여액	2000	100.5	0.219	459.3	100	-
황산암모늄 침전	200	71.8	0.569	126.2	71.4	2.60
DEAE-sepharose	200	49.2	0.898	54.81	48.9	4.10
CM-sepharose	150	23.2	0.987	23.51	23.1	4.51
Sephadex G75	80	10.59	1.655	6.41	10.5	7.56

실험예 2. 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용한 네오프락토 올리고당의 생산

상기 실험예 1의 분리정제 과정을 통해 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 60% 수크로스 용액과 6시간 반응 후의 생산량을 측정하였다.

그 결과, 하기 표 3에서 보는 바와 같이 농축된 배양액으로 반응했을 경우 프락토 올리고당과 네오프락토 올리고당이 함께 생산되었지만 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 반응시킨 결과 프락토 올리고당은 생산되지 않고 네오케스토스가 고형분비 약 11.2%, 네오니스토스가 고형분비 약 9.34%로 선택적으로 생산되었으며 총 고형분비 중 네오프락토 올리고당의 함량이 약 20% 이상 생산됨을 확인할 수 있었다.

[표 3]
정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용한 네오프락토 올리고당의 생산

당류(% , 총고형분에 대한 생산량)	배양여액 농축액	프락토실 트랜스퍼라제
과당 , 포도당	30.17	37.27
수크로스(sucrose)	35.46	42.15
1-케스토스(1-kestose)	10.23	-
니스토스(nystose)	9.56	-
네오케스토스(neokestose)	8.34	11.24
네오니스토스(neonystose)	6.24	9.34

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 수크로스(sucrose)가 포함된 배지조성에서 배양한 페니실리움 시트리눔 KCCM 11663이 생산하는 여러 효소 중 설당을 네오프락토 올리고당으로 만드는 새로운 프락토실 트랜스퍼라제의 분리정제방법에 관한 것이다. 네오프락토 올리고당의 경우 우수한 보습작용, 우수한 단맛, 저 칼로리성, 항우식 작용, 장내 세균의 증식, 장관 국소면역 증강작용 등의 기능을 갖고 있기 때문에 감미료, 기능성 식품, 사료, 의약, 식품의 방역 촉진제 등의 다방면의 적용이 가능한 것인데, 일반적으로는 프락토 올리고당과 네오프락토 올리고당이 함께 생산되어 그 생산량이 낮고 필요시에 프락토 올리고당으로 부터 다시 정제해야 하는 기술상의 어려움이 있어 네오프락토 올리고당 만의 이용에 제한이 따랐다. 그러나 본 발명의 정제된 프락토실 트랜스퍼라제를 이용하여 수크로스에 반응시킨 결과 프락토 올리고당은 생산되지 않고 네오프락토 올리고당만을 선택적으로 생산할 수 있어 여러 식품, 의약 산업의 첨가제로서의 사용시에 상당한 공정비의 절감과 고수율 생산이 가능하게 되므로 네오프락토 올리고당을 이용하는 산업에 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 황산암모늄의 농도에 따른 프락토실 트랜스퍼라제 활성의 차이를 나타내는 도이며,

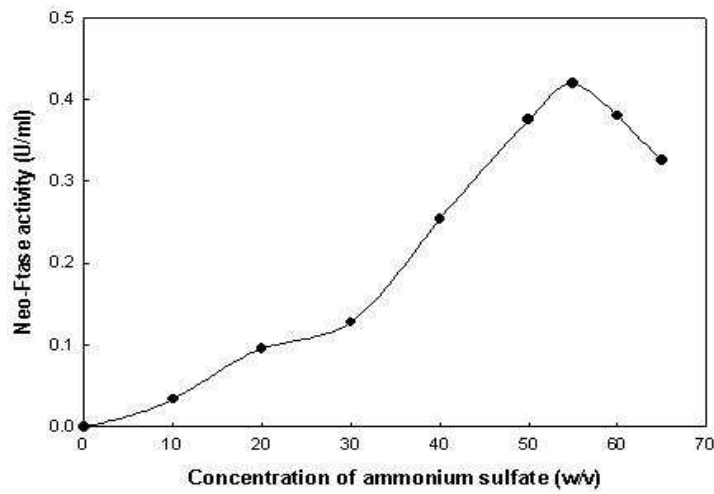
도 2는 단백질 침전물을 디에틸아미노에틸-세파로스(DEAE-sepharose) 크로마토그래피로 추출하여 첨가되는 염의 농도에 따른 용출된 단백질의 프락토실 트랜스퍼라제 활성의 차이를 나타낸 도이며,

도 3은 단백질 침전물을 카르복시메틸-세파로스(CM-sepharose) 크로마토그래피로 추출하여 첨가되는 염의 농도에 따른 용출된 단백질의 프락토실 트랜스퍼라제 활성의 차이를 나타낸 도이며,

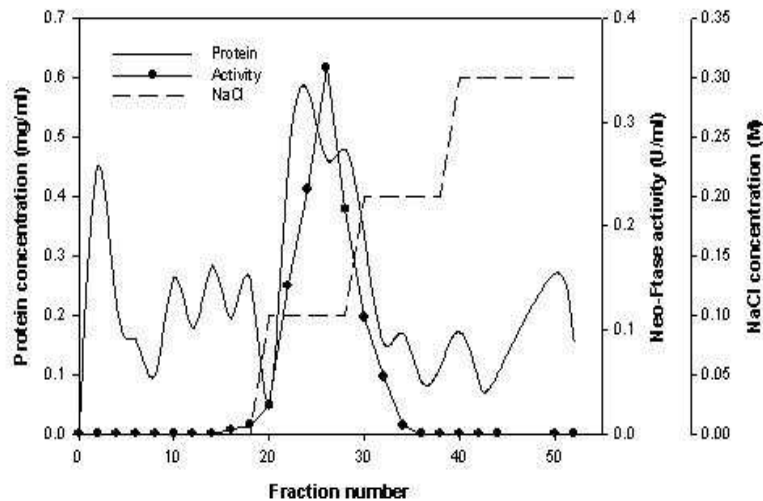
도 4는 세파덱스 G75(Sephadex G 75) 크로마토그래피를 수행한 후의 용출된 단백질의 프락토실 트랜스퍼라제 활성을 나타낸 도이다.

도면

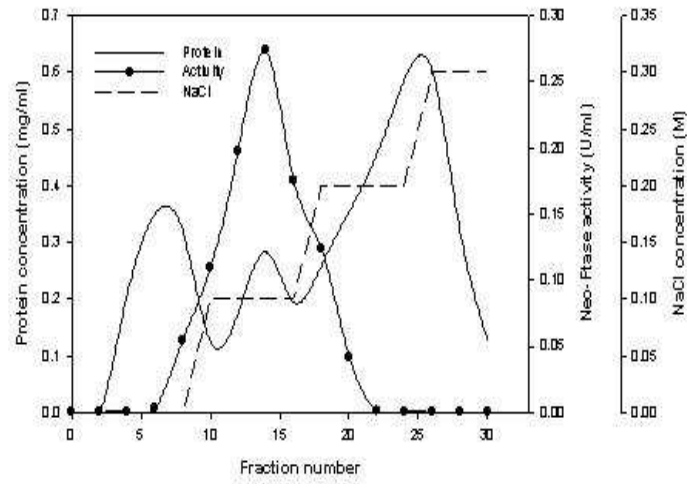
도면1



도면2



도면3



도면4

