

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052106 (43) 공개일자 2016년05월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12P 19/44</i> (2006.01) <i>C12N 9/24</i> (2006.01) <i>C12P 19/16</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0151914 (22) 출원일자 2014년11월04일 심사청구일자 2014년11월04일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 김영완 서울특별시 송파구 백제고분로22길 19-27, 301호 (삼전동) (74) 대리인 특허법인충현

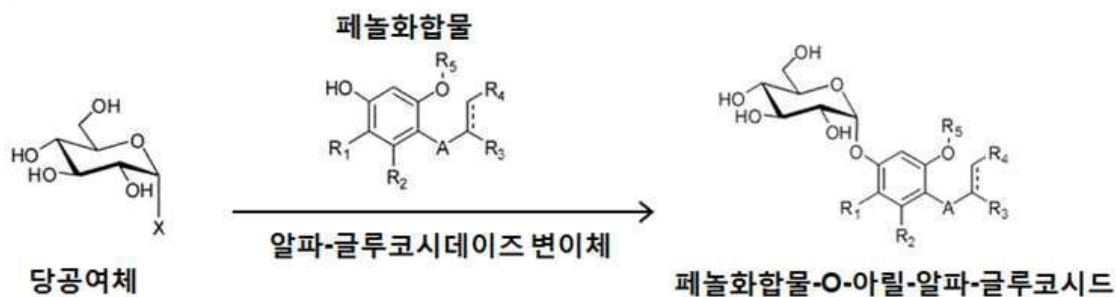
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 수용성 강화 페놀화합물 유도체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 당공여체와 페놀화합물인 당수용체를 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글루코시다제 변이체 효소의 존재 하에서 배양하여 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0012467

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자-기본(유형I)

연구과제명 [3차년도] 당쇄분해효소 가공을 통한 비가역성 당전이 생물촉매 개발 기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

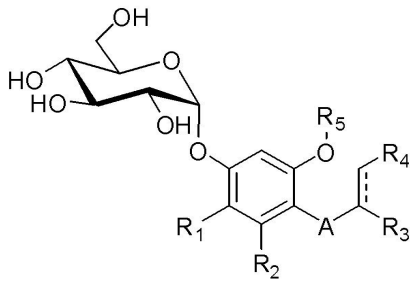
명세서

청구범위

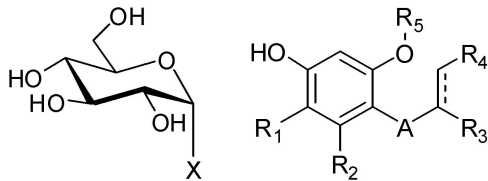
청구항 1

하기 [화학식 2]로 표시되는 당공여체와 하기 [화학식 3]으로 표시되는 페놀화합물인 당수용체를 알파-글루코시다제 변이체 효소의 존재 하에서 배양하여 하기 [화학식 1]로 표시되는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법:

[화학식 1]



[화학식 2] [화학식 3]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

----은 단일 또는 이중결합이고,

A는 CH₂ 또는 C(=O)이며,

X는 불소, 아자이드(N₃), 포스페이트(PO₄⁻²), 포밀기 및 아세틸기 중에서 선택되고,

R₁ 및 R₅는 수소이며,

R₂는 수소, 히드록시기(OH), 니트로기(NO₂), 시아노기(CN), 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되고,

R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 아릴기 및 O-C(=O)-R₆ 중에서 선택되며,

R₆은 아릴기이고,

상기 R₃, R₄ 및 R₆의 아릴기의 임의의 탄소 1 내지 5개는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되는 치환기를 가지며,

O-R₅는 인접한 탄소와 축합하여 고리를 형성할 수 있다.

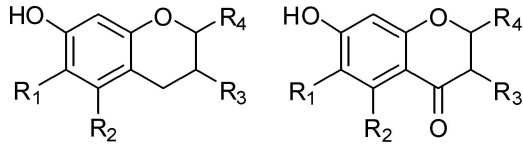
청구항 2

제1항에 있어서,

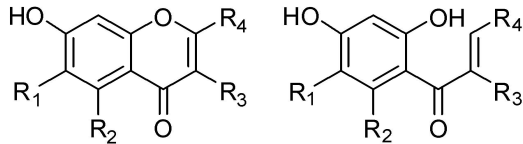
상기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 4] 내지 [화학식 7]로 표시되는 화합물 중에서 선택되는

어느 하나인 것을 특징으로 하는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법:

[화학식 4] [화학식 5]



[화학식 6] [화학식 7]



상기 [화학식 4] 내지 [화학식 7]에서,

R₁은 수소이며,

R₂는 수소, 히드록시기(OH), 니트로기(NO₂), 시아노기(CN), 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되고,

R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 아릴기 및 O-C(=O)-R₆ 중에서 선택되며,

R₆은 아릴기이고,

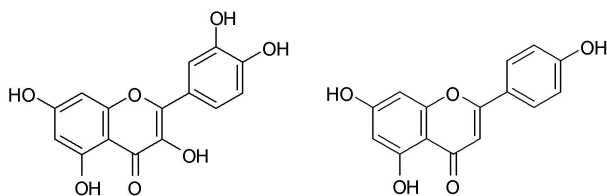
상기 R₃, R₄ 및 R₆의 아릴기의 임의의 탄소 1 내지 5개는 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되는 치환기를 가진다.

청구항 3

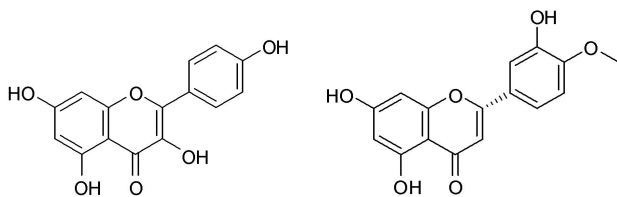
제1항에 있어서,

상기 [화학식 3]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 8] 내지 [화학식 24]로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법:

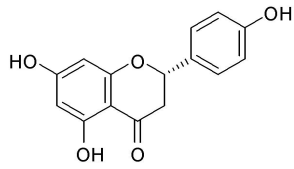
[화학식 8] [화학식 9]



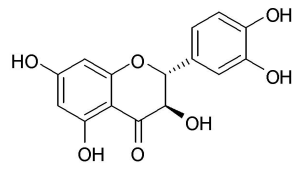
[화학식 10] [화학식 11]



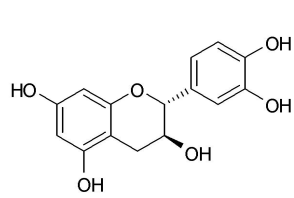
[화학식 12] [화학식 13]



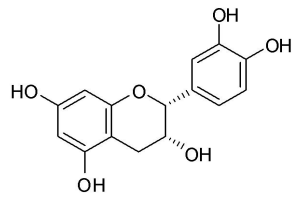
[화학식 14]



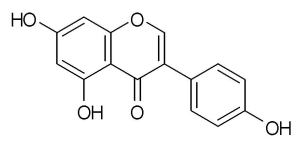
[화학식 15]



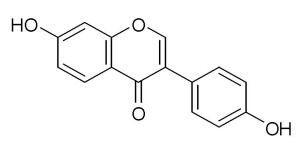
[화학식 16]



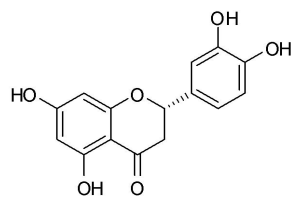
[화학식 17]



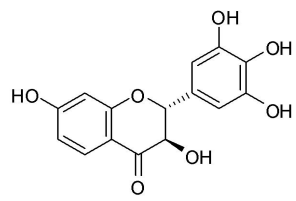
[화학식 18]



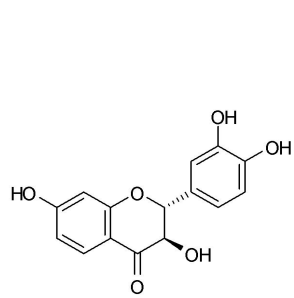
[화학식 19]



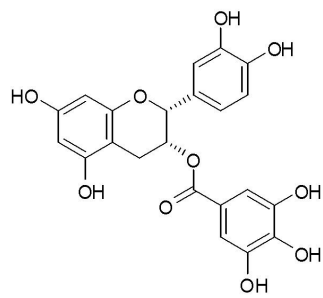
[화학식 20]



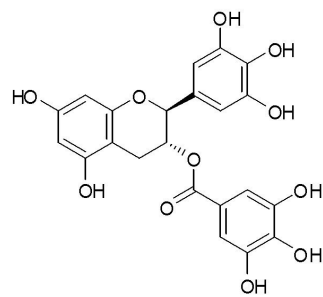
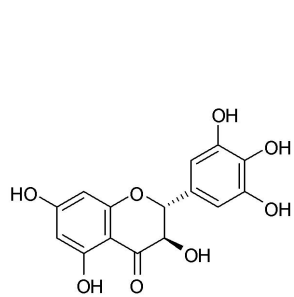
[화학식 21]



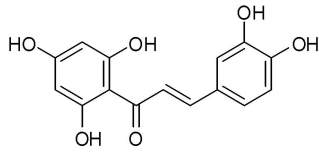
[화학식 22]



[화학식 23]



[화학식 24]



청구항 4

제1항에 있어서,

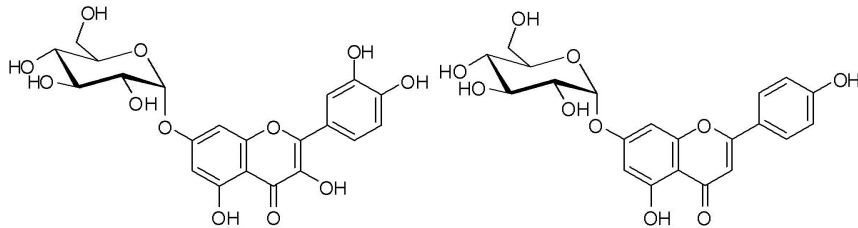
상기 알파-글루코시다제 변이체 효소는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법.

청구항 5

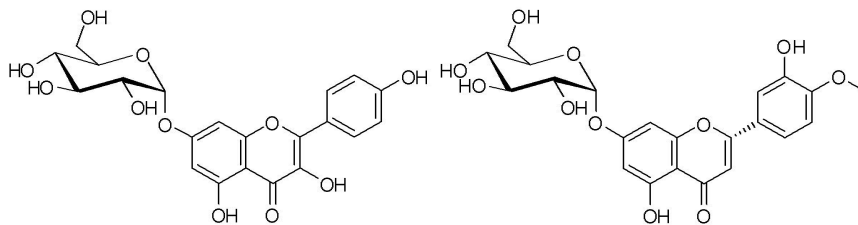
제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 25] 내지 [화학식 41]로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법:

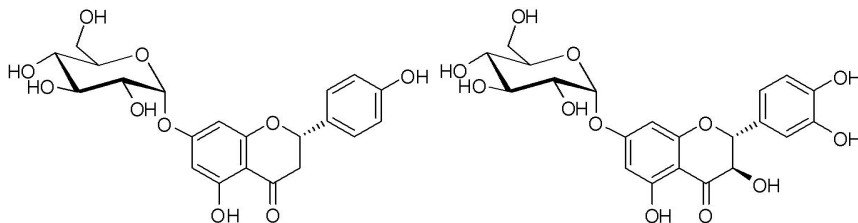
[화학식 25] [화학식 26]



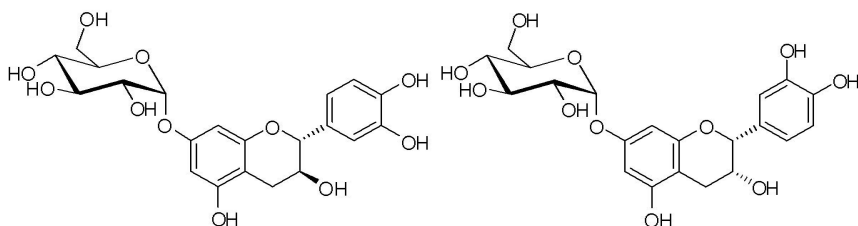
[화학식 27] [화학식 28]



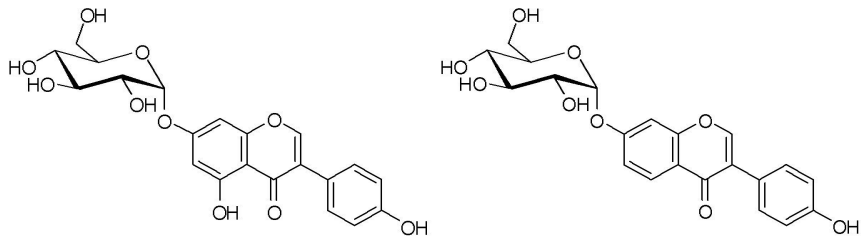
[화학식 29] [화학식 30]



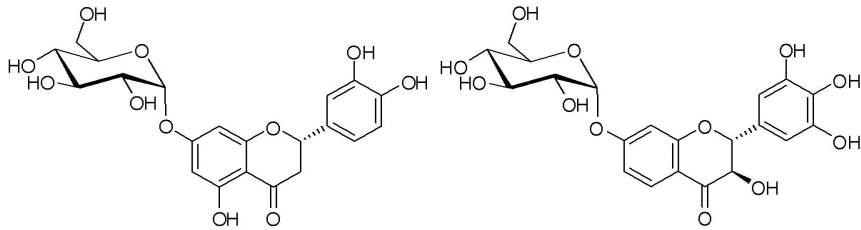
[화학식 31] [화학식 32]



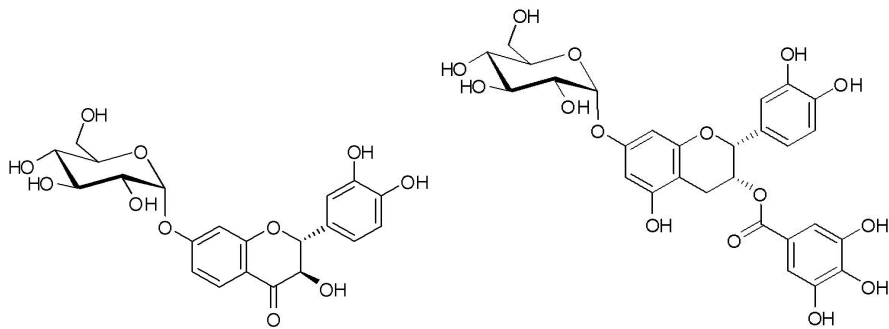
[화학식 33] [화학식 34]



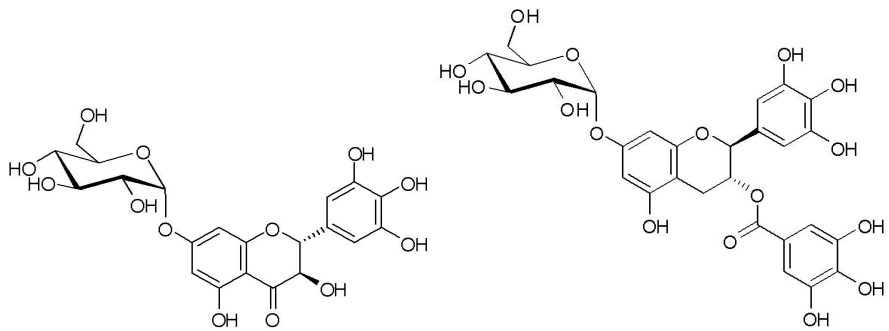
[화학식 35] [화학식 36]



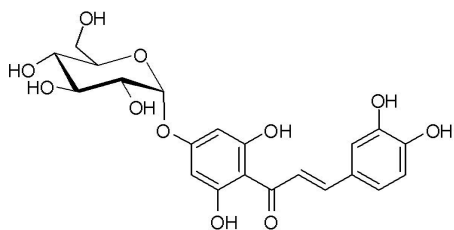
[화학식 37] [화학식 38]



[화학식 39] [화학식 40]



[화학식 41]



청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배양은 pH 8.0 내지 10의 물 또는 물과 공용매의 혼합액을 용매로 사용하여 25 내지 65 ℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 공용매는 유기용매, 이온화액체 중에서 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합물로,

상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 디옥산(dioxane), 디메틸포름아미드, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 1,2-프로판디올, 설포란(sulfolane), 테트라메틸우레아, 에틸락테이트, 디에틸렌글리콜, 디에틸에테르, 트리에틸렌글리콜, 디메틸에테르, 에틸아세테이트 및 메틸에틸케톤 중에서 선택되는 1종 이상이고,

상기 이온화액체는 이미다졸리움(imidazolium), 피리디늄(pyridinium), 포스포늄(phosphonium) 및 암모늄염 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법.

청구항 8

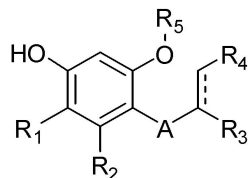
제1항 내지 제7항에 따른 효소적 합성방법에 의해 제조되는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드는 알파-글루코시다제에 의해 하기 [화학식 3]의 화합물로 분해되는 것을 특징으로 하는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드:

[화학식 3]



상기 [화학식 3]에서

----은 단일 또는 이중결합이고,

A는 CH₂ 또는 C(=O)이며,

X는 불소, 아자이드(N₃), 포스페이트(PO₄⁻²), 포밀기 및 아세틸기 중에서 선택되고,

R₁ 및 R₅는 수소이며,

R₂는 수소, 히드록시기(OH), 니트로기(NO₂), 시아노기(CN), 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되고,

R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 아릴기 및 O-C(=O)-R₆ 중에서 선택되며,

R₆은 아릴기이고,

상기 R₃, R₄ 및 R₆의 아릴기의 임의의 탄소 1 내지 5개는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되는 치환기를 가지며,

O-R₅는 인접한 탄소와 축합하여 고리를 형성할 수 있다.

발명의 설명

기술 분야

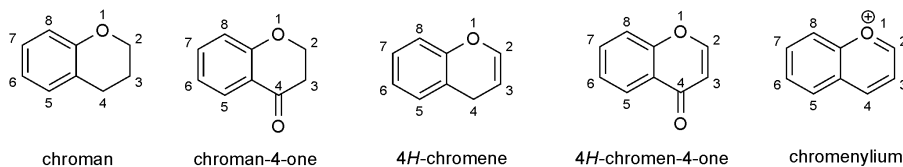
[0001] 본 발명은 지속성 알파-글루코시다제의 산/염기 촉매기가 변이된 변이체 효소를 이용하여 기능성 페놀화합물의 알파-글루코시드를 합성하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 페놀화합물(phenolic compound)은 벤젠(benzene)링 또는 한 개 이상의 벤젠링이 융합된 방향족화합물 고리(aromatic ring)이 한 개 이상의 수산화기를 가지는 물질로서 식물이 보유한 가장 다양한 구조를 가지는 물질군 중의 하나이며, 지금까지 자연계에서 약 8,000여 종의 페놀화합물 구조가 알려져 있다.

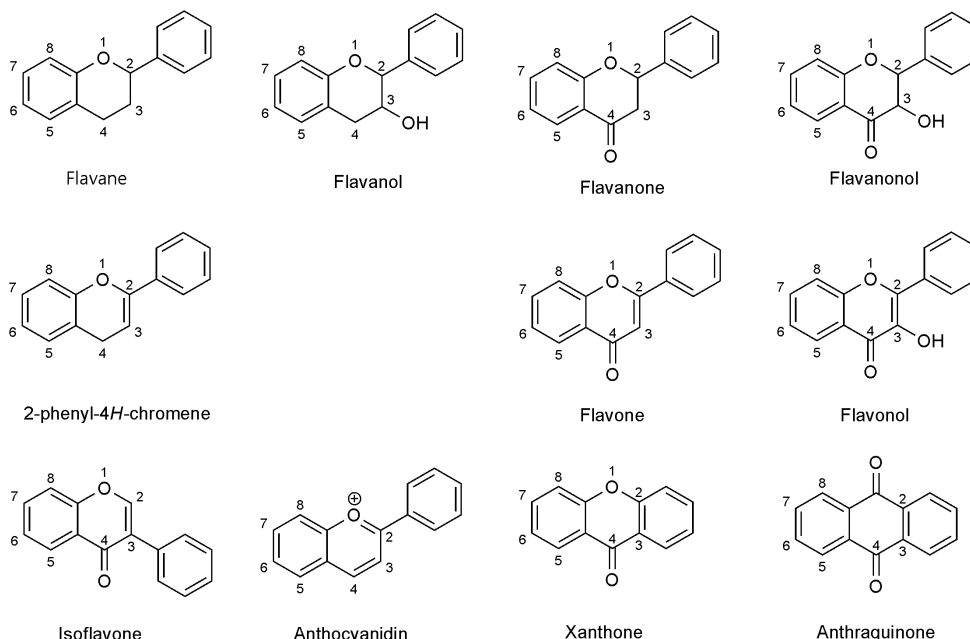
[0003] 페놀 화합물은 기본 골격을 이루는 탄소 원자의 수에 따라 여러 군으로 분류된다. 인간의 건강과 관련된 주요 페놀화합물은 페놀산(C6-C1 및 C6-C3), 크로만(chroman) 또는 크로멘(chromene) 구조를 가지는 플라보노이드(C6-C3-C6) 및 분자중량이 큰 폴리페놀(탄소수가 30 이상인 것)을 들 수 있는데, 이들 화합물은 다수가 강력한 항산화 특성을 나타내며, 유류의 체내에서 항바이러스, 항박테리아, 면역 자극(immune-stimulating), 항알러지, 항고혈압, 항허혈 발작(antiischemic), 항부정맥(antiarrhythmic), 항지질과산화(antilipoperoxidant), 콜레스테롤혈증 저하(hypocholesterolemia), 항혈전(antithrombotic), 간장보호(hepatoprotective), 염증억제(antiinflammatory), 종양억제(antineoplastic), 혈관확장(vasodilatory), 항암특성(anticarcinogenic) 및 돌연변이방지(antimutagenic) 특성을 포함한 유익한 생물학적 활성을 폭넓게 지니고 있음이 보고되었다.

[0004] 플라보노이드(Flavonoids)는 저분자량 폴리페놀 성분으로서 피란(pyran) 고리와 벤젠고리가 결합된 벤조피란(benzopyrane)의 유도체로서 매우 다양한 화학구조를 가지는 화합물군 중 하나이다. 플라보노이드는 두 개의 방향족 고리(A 및 B 사이클)가 3개의 탄소를 통해 연결되어, 과산화된 이형사이클(oxygenated heterocycle; C사이클)을 형성함으로써 디페닐프로판(C6-C3-C6)의 구조를 기본 골격으로 갖는다. 하기 화합물들은 A 고리 및 C 고리로 형성된 C6-C3 기본 구조의 종류와 플라보노이드 고리의 탄소수를 넘버링하기 위하여 사용되는 체계를 나타낸다.



[0005]

[0006] 플라보노이드는 A-C 고리들의 구조적인 차이, 수산기의 위치와 종류 및 B 고리의 위치에 따라서 플라반(flavanes), 플라바놀(flavanols), 플라바논(flavanone), 플라바노놀(flavanonol), 플라본(flavones), 플라보놀(flavonols), 이소플라본(isoflavones) 및 안토시아니딘(antocyanidins) 등으로 분류된다. 하기 화합물들은 플라보노이드의 분류에 따른 고리 구조와 플라보노이드의 A-C 고리의 탄소수를 넘버링하기 위하여 사용되는 체계를 나타낸다.



[0007]

[0008]

상기 플라보노이드는 다시 수산화(hydroxylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation) 및 이소프레닐화(isoprenylation) 등의 수식(modification)을 거치며, 수산기(hydroxyl group)는 추가적으로 당화(glycosylation) 및 메틸화(methylation)의 수식이 가능하다. 플라보노이드가 가지는 다양한 구조적 수식 중 당화(glycosylation)에 의하여 생성되는 글리코시드(glycoside)의 경우 수용성과 안정성이 증가된다. 글리코시드에서 발견되는 당으로는 포도당(glucose)이 가장 흔하게 발견되며, 드물게 갈락토오스(galactose), 람노오스(rhamnose) 및 루티노오스(rutinoses) 등이 발견된다.

[0009]

페놀화합물은 우수한 항산화성을 바탕으로 한 다양한 생물학적 활성에도 불구하고 낮은 수용해성(aqueous solubility) 및 낮은 산화 안정성으로 인해 제품 적용에 있어 낮은 농도로 사용되거나 유효화를 위한 각종 처리가 요구되며, 제품 유효기간 동안에 활성형 페놀화합물의 함량 유지에 어려움이 있다.

[0010]

페놀화합물에 비해 글리코시드의 경우 당화에 의해 수용성 및/또는 산화 안정성이 강화된 새로운 형태의 페놀화합물에 대한 연구결과가 다수 발표되었다. 하지만 이러한 글리코시드는 자연계에서 발견되지만 일반적으로 함량이 높지 못하며, 다양한 글리코시드 및 비배당체가 혼합되어 존재하므로, 해당 식물로부터의 추출 및 정제의 과정을 거쳐야 하므로 수율 및 비용면에서 한계를 가진다.

[0011]

수용성 및/또는 안정성이 강화된 페놀화합물 글리코시드, 기본적으로는 플라보노이드 글리코시드를 얻기 위한 방법들이 연구되어 왔다. 첫째 방법은 핵산당(nucleotide sugar)를 당공여체(sugar donor)로 사용하여 당 부분을 탄수화물, 단백질, 및 지질과 같은 당수용체(sugar acceptor)로 전이시킬 수 있는 글리코실트랜스퍼라아제(glycosyltransferases)라는 효소를 이용하는 방법이다[Song et al Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97, 5691-5704]. 이러한 접근방법은 최근 대사공학기술을 이용하여 핵산당 기질의 재생성 경로에 보유한 재조합 대장균을 이용함으로써 다양한 플라보노이드 배당체의 생산 연구가 진행되었으나 여전히 고비용의 문제를 해결하기 어려운 실정이다[Kim et al. Chembiochem (2010) 11, 2389-2392]. 또한 지금까지 연구된 글루코실트랜스퍼라아제를 이용하여 생산하는 플라보노이드 배당체는 모두 β -당쇄 결합을 통해 플라보노이드와 당 부분이 결합된 β -배당체 생성에 대한 연구만이 진행되었다.

[0012]

두 번째 방법은 수크로오스(sucrose)를 당공여체로 사용하여 포도당(glucose) 부분을 말토올리고당에 전이하여 α -글루칸을 생성하는 글루칸수레이즈(glucansucrase)를 이용하는 것이다. 글루칸 수크레이즈는 만들어지는 얻어지는 α -글루칸의 종류에 따라서 아밀로스수크레이즈(amylosucrase, EC 2.4.1.4), 텍스트란수크레이즈(dextranase, EC 2.4.1.5) 및 알터란수크레이즈(alteransucrase, EC 2.4.1.140)로 분류된다. 이들 글루칸 수레이즈들은 수크로스를 당공여체로 사용하여 α -글루칸 및 플라보노이드를 비롯한 다양한 페놀화합물의 수산기에 포도당 분자를 전이시키는 활성을 보유하고 있다. 글루칸수레이즈는 대부분 플라보노이드의 B-고리의 3' -, 4' -, 또는 7-수산기 포도당을 전이하며, 한 개 이상의 포도당이 한 곳 이상에 전이된 한 개 이상의 당전이 산물을 합성한다[(a) Kim et al. Enzyme Microb Technol. (2012) 50, 50-56; (b) Bertrand et al Carbohydr Res. (2006) 341, 855-863; (c) Malbert et al ChemCatChem (2014) 6, 2282-2291].

- [0013] 세 번째 방법은 전분이나 말토덱스트린을 당공여체로 이용하여 글루코오스를 포함하는 말토올리고당을 당수용체로 전이할 수 있는 활성을 보유한 효소를 이용하는 방법이다. 상기 효소는 전분이나 말토올리고당을 기질로 사용할 수 있는 알파-아밀라아제(α -amylase, EC 3.2.1.1), 알파-글루코시다제(α -glucosidase, EC 3.2.1.20) 및 시클로덱스트린-글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19)로부터 선택된 것이다. 이들 효소는 말토올리고당을 당공여체와 당수용체로 사용하는 disproportionation 활성이 우수하여 페놀화합물, 특히 플라보노이드에 포도당이 α -1- $\rightarrow$ 4 결합으로 연결된 한 개 이상의 당쇄를 가지는 결과를 도출하여, 이로 인해 서로 다른 길이의 당쇄를 가지는 한 개 이상의 당전이 산물이 만들어진다.
- [0014] 한편, 페놀화합물 배당체의 체내 이용률(bioavailability)은 체내로의 흡수에 따라 결정된다. 페놀화합물 배당체의 흡수 경로는 다음 세 가지로 분류된다. 첫째 경로는 소장 세포의 용모 표면(brush-border)에 존재하는 lactase phloridizin hydrolase의 작용에 의해 가수분해된 후 소수성의 페놀화합물 부분(aglycone)이 수동적 분산(passive diffusion)에 의해 소장의 세포막을 통과하여 흡수된다[Day et al. FEBS Lett. (2000) 468, 166-170].
- [0015] 두 번째 경로는 소디움 의존형 포도당 수송체인 SGLT1에 의해 능동수송(active transport)되어 소장에서 흡수된 후 소장 세포 내의 cytosolic β -glucosidase에 의해 가수분해된다[Gee et al. J. Nutr. (2000) 130, 2765-2771].
- [0016] 세 번째 경로는 페놀화합물 배당체의 대표적인 흡수 경로로서 대장에 기생하는 장내 미생물이 분비하는 β -글루코시다제의 작용에 의해 가수분해된 후 대장에서 수동분산에 의해 세포막을 통과하면서 흡수된다. 하지만 이 경우 가수분해되어 만들어진 페놀화합물이 다시 장내 미생물이 분비하는 효소들의 작용에 의해 고리분열(ring fission)이 일어나면서 페놀산이나 히드록시 시남산으로 전환되어 흡수된다[Manach et al. Am. J. Clin. Nutr. (2005) 81, 230S-242S].
- [0017] 그러나 이러한 흡수경로의 존재에도 불구하고 페놀화합물 배당체의 생체이용률은 매우 낮은 것으로 알려져 있다. Mullen 등이 실시한 양과 내 퀘르세틴 글루코시드의 흡수실험 결과를 보면 흡수율은 섭취량의 4.7%에 불과하다[Mullen, Br. J. Nutr. (2006) 96, 107-116].

발명의 내용

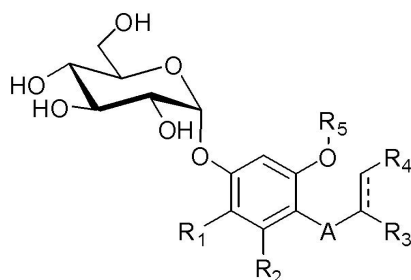
해결하려는 과제

- [0018] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로 본 발명이 이루고자하는 기술적 과제는 당공여체와 페놀화합물을 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글루코시다제의 변이체 효소 존재 하에서 반응시킴으로써 생체와 동일한 조건(pH, 염분농도, 온도 등) 내에서 수용성 및 안정성을 증가시킨 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드를 효소적으로 합성하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

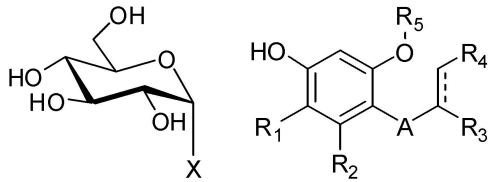
- [0019] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 하기 [화학식 2]로 표시되는 당공여체와 하기 [화학식 3]으로 표시되는 페놀화합물인 당수용체를 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 변이체 효소의 존재 하에서 배양하여 하기 [화학식 1]로 표시되는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법을 제공한다.

- [0020] [화학식 1]



- [0021]

- [0022] [화학식 2] [화학식 3]



[0023]

[0024]

[0025]

[0026]

[0027]

[0028]

[0029]

[0030]

[0031]

[0032]

[0033]

[0034]

[0035]

상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

== 은 단일 또는 이중결합이고,

A는 CH₂ 또는 C(=O)이며,

X는 불소, 아자이드(N₃), 포스페이트(PO₄⁻²), 포밀기 및 아세틸기 중에서 선택되고,

R₁ 및 R₅는 수소이며,

R₂는 수소, 히드록시기(OH), 니트로기(NO₂), 시아노기(CN), 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되고,

R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 아릴기 및 O-C(=O)-R₆ 중에서 선택되며,

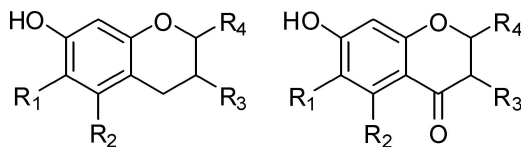
R₆은 아릴기이고,

상기 R₃, R₄ 및 R₆의 아릴기의 임의의 탄소 1 내지 5개는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되는 치환기를 가지며,

O-R₅는 인접한 탄소와 축합하여 고리를 형성할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 [화학식 3]은 하기 [화학식 4] 내지 [화학식 7] 중에서 선택될 수 있다.

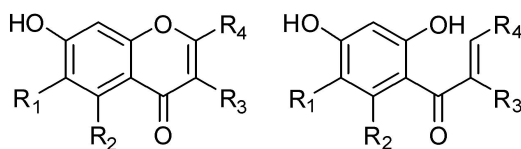
[화학식 4] [화학식 5]



[0036]

[0037]

[화학식 6] [화학식 7]



[0038]

[0039]

상기 [화학식 4] 내지 [화학식 7]에서, R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 앞에서 정의한 바와 같다.

발명의 효과

[0040]

본 발명에 따른 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법은 페놀화합물인 당수용체를 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글루코시다제의 변이체 존재 하에서 당공여체와 반응시킴으로써 우수한 효율로 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드를 합성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1은 본 발명에 따른 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법을 도식화하여 나타낸 도이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 당수용체의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이며, 도 2b는 당공여체와 당수용체로부터 트랜스글리코실화 반응에 의해 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드를 형성된 HPLC 크로마토그램을

나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

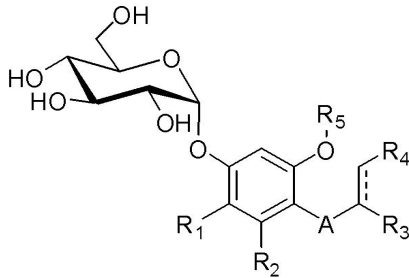
이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0043]

본 발명은 하기 [화학식 2]로 표시되는 당공여체와 하기 [화학식 3]으로 표시되는 페놀화합물인 당수용체를 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 변이체 효소의 존재 하에서 배양하여 하기 [화학식 1]로 표시되는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드를 제조하는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드의 효소적 합성방법을 제공한다.

[0044]

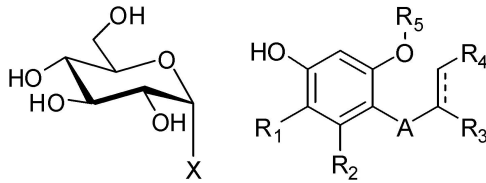
[화학식 1]



[0045]

[0046]

[화학식 2] [화학식 3]



[0047]

상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

[0049]

----은 단일 또는 이중결합이고,

[0050]

A는 CH_2 또는 $\text{C}(=\text{O})$ 이며,

[0051]

X는 불소, 아자이드(N_3), 포스페이트(PO_4^{-2}), 포밀기 및 아세틸기 중에서 선택되고,

[0052]

R_1 및 R_5 는 수소이며,

[0053]

R_2 는 수소, 히드록시기(OH), 니트로기(NO_2), 시아노기(CN), 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되고,

[0054]

R_3 및 R_4 는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 아릴기 및 $\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_6$ 중에서 선택되며,

[0055]

R_6 은 아릴기이고,

[0056]

상기 R_3 , R_4 및 R_6 의 아릴기의 임의의 탄소 1 내지 5개는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 트리할로메틸기 및 설포네이트기 중에서 선택되는 치환기를 가지며,

[0057]

$\text{O}-\text{R}_5$ 는 인접한 탄소와 축합하여 고리를 형성할 수 있다.

[0058]

본 발명에 의하면, 상기 알파-글루코시다제 변이체 효소는 설포로부스 종(*Sulfolobus species*), 바람직하게는 설포로부스 솔파타리쿠스 P2(*Sulfolobus solfataricus* P2)로부터 유래된 지속성 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 산/염기 촉매 아미노산 잔기(acid/base catalytic amino acid residue)인 416번째 아스파테이트 잔기(Asp416)가 비활성화된 비하전 아미노산 잔기(non-charged amino acid residue)로 치환된 효소일 수 있으며,

[0059]

상기 비하전 아미노산 잔기는 구체적으로 알라닌, 세린 또는 글리신 중에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

[0060] 상기 알파-글루코시다제의 416번째 아미노산 잔기인 아스파테이트(Asp)를 알라닌으로 치환시킨 아미노산 서열은 하기 서열번호 1로, 세린으로 치환시킨 아미노산 서열은 하기 서열번호 2로, 글리신으로 치환시킨 아미노산 서열은 하기 서열번호 3으로 표시하였다.

[0061] 본 발명에 의하면, 상기 배양은 용매로 물 또는 물과 공용매의 혼합액을 이용하여 수행될 수 있는데, 상기 공용매는 유기용매, 이온화액체 중에서 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 유기용매는 디메틸 설펍사이드, 디옥산(dioxane), 디메틸포름아미드, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 1,2-프로판디올, 설포란(sulfolane), 테트라메틸우레아, 에틸락테이트, 디에틸렌글리콜, 디에틸에테르, 트리에틸렌글리콜, 디메틸에테르, 에틸아세테이트 및 메틸에틸케톤 중에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있고, 상기 이온화액체는 이미다졸리움(imidazolium), 피리디늄(pyridinium), 포스포늄(phosphonium) 및 암모늄염 중에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물 일 수 있다.

[0062] 또한 상기 용매는 효소활성에 대하여 영향을 미치지 않는 완충 성분을 더 포함할 수 있는데, 상기 완충성분은 예를 들어 트리스-염산 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 상기 물과 공용매를 혼합한 혼합액을 용매로 사용하는 경우, 용매 전체 100 중량%에 대하여 공용매의 함량은 40 중량% 이하일 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 30 중량%로 함유된 것 일 수 있고, 가장 바람직하게는 15 내지 25 중량%로 함유될 수 있다. 공용매가 상기 범위로 함유되는 것이 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드가 우수한 수율로 합성될 수 있다

[0064] 이때, 상기 완충수 또는 혼합액을 효소의 활성이 적합한 pH로 조절하여 배양할 수 있다. 상기 효소의 활성이 적합한 pH는 구체적으로 pH 8 이상일 수 있으며, 좀 더 바람직하게는 pH 8-10, 가장 바람직하게는 pH 9-10일 수 있다.

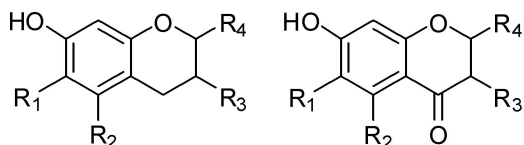
[0065] 본 발명에 의하면, pH가 8 이상인 것이 상기 [화학식 3]으로 표시되는 당수용체의 수산기의 친핵성을 강화시켜 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드의 수율을 증가시킴으로 바람직하나, pH가 10을 초과하면 당공여체의 수산기가 해리될 수 있어 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드의 수율이 저하될 수 있으므로 pH 8-10의 범위에서 수행될 수 있다.

[0066] 또한, 상기 배양 시 반응 온도는 15 내지 65 ℃일 수 있는데, 반응온도가 상기 범위 미만이면 온도가 너무 낮아 알파-글루코시다제 변이체 효소의 활성이 일어나기 어려워 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드의 합성 수율 향상을 기대하기 힘들며, 상기 범위를 초과하는 온도에서는 알파-글루코시다제 변이체 효소의 활성이 저하되거나, 당공여체의 가수분해가 일어날 수 있으므로 바람직하지 않다. 특히, 배양 온도가 40 내지 50 ℃인 것이 페놀화합물 0-아릴 알파-글루코시드의 수율이 높으므로 좀 더 바람직하다.

[0067] 본 발명에 의하면, 상기 배양은 5 내지 24시간 동안 수행될 수 있는데, 배양시간이 상기 범위 미만이면 반응 수율이 낮고, 상기 범위를 초과하면 당공여체가 가수분해될 수 있어 최종생성물의 수율이 저하될 수 있다.

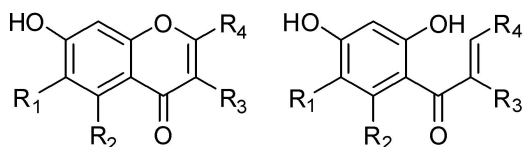
[0068] 본 발명에 의하면, 상기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물은 플라보노이드류 또는 플라보노이드로 변환될 수 있는 칼콘류 화합물일 수 있으며, 보다 상세하게는 하기 [화학식 4] 내지 [화학식 7]로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0069] [화학식 4] [화학식 5]



[0070]

[0071] [화학식 6] [화학식 7]

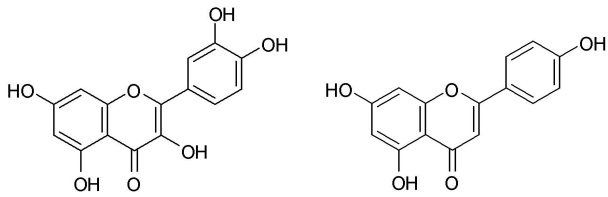


[0072]

[0073] 상기 [화학식 4] 내지 [화학식 7]에서, R₁, R₂, R₃ 및 R₄의 정의는 상기 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

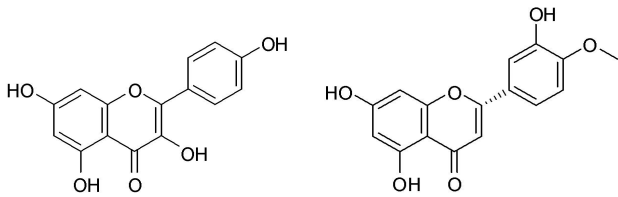
[0074] 본 발명에 의하면, 상기 [화학식 3]로 표시되는 화합물은 구체적으로 하기 [화학식 8] 내지 [화학식 24]로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이들의 광학 이성질체 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

[0075] [화학식 8] [화학식 9]



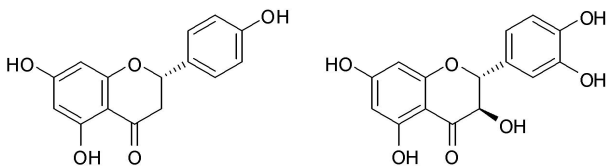
[0076]

[0077] [화학식 10] [화학식 11]



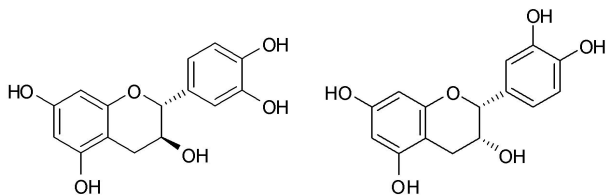
[0078]

[0079] [화학식 12] [화학식 13]



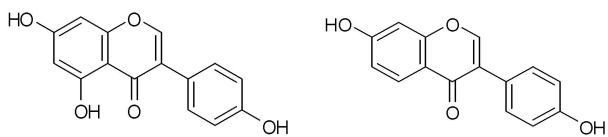
[0080]

[0081] [화학식 14] [화학식 15]



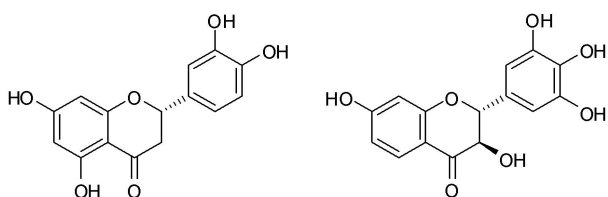
[0082]

[0083] [화학식 16] [화학식 17]



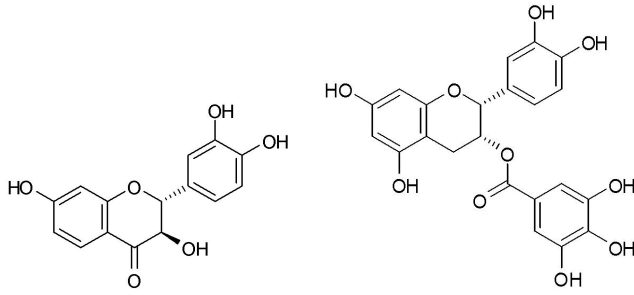
[0084]

[0085] [화학식 18] [화학식 19]



[0086]

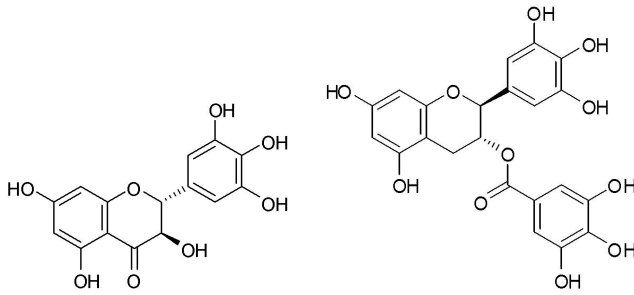
[0087] [화학식 20] [화학식 21]



[0088]

[0089]

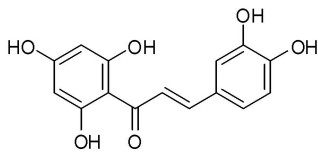
[화학식 22] [화학식 23]



[0090]

[0091]

[화학식 24]



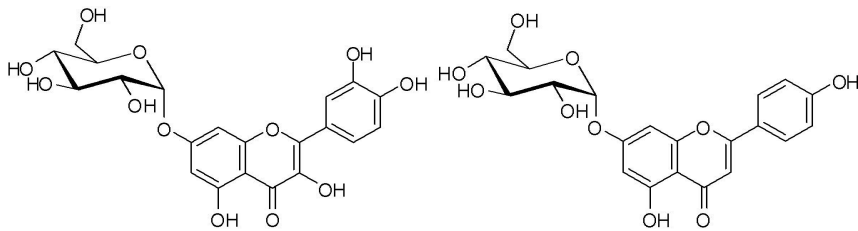
[0092]

[0093]

본 발명에 의하면, 상기 [화학식 2]로 표시되는 당공여체와 상기 [화학식 3]으로 표시되는 페놀화합물인 당수용체를 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 변이체 효소의 존재 하에서 배양하여 제조된 [화학식 1]로 표시되는 페놀화합물-O-아릴 알파-글루코시드는 구체적으로 하기 [화학식 25] 내지 [화학식 41] 중에서 선택되는 어느 하나 또는 이들의 광학 이성질체일 수 있다.

[0094]

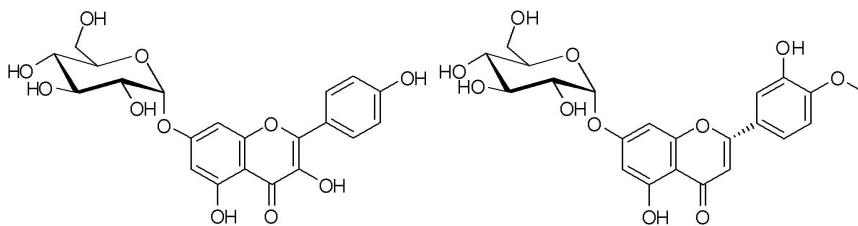
[화학식 25] [화학식 26]



[0095]

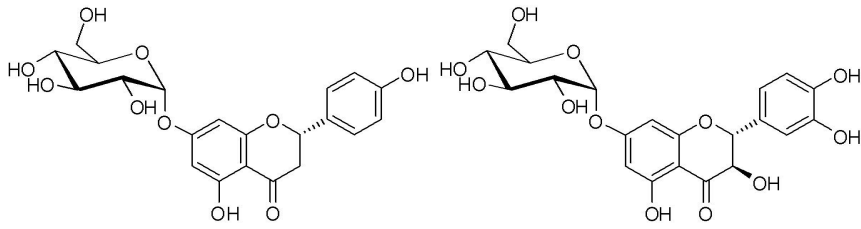
[0096]

[화학식 27] [화학식 28]



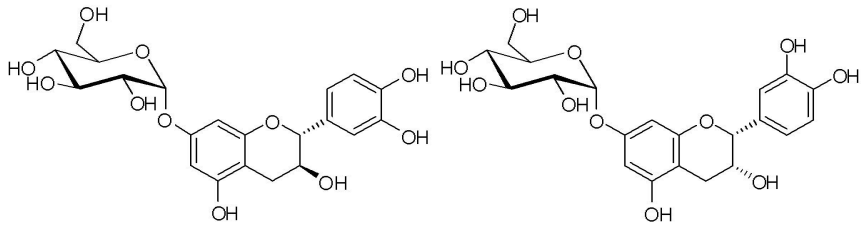
[0097]

[0098] [화학식 29] [화학식 30]



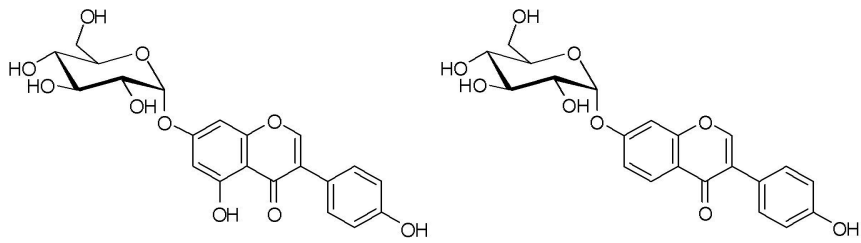
[0099]

[0100] [화학식 31] [화학식 32]



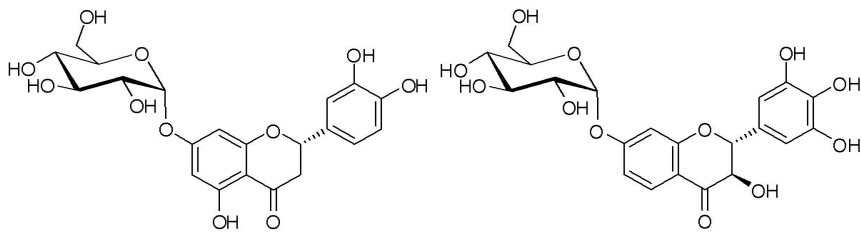
[0101]

[0102] [화학식 33] [화학식 34]



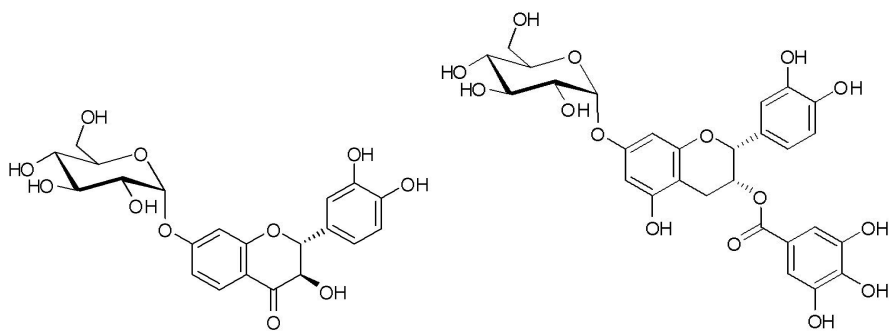
[0103]

[0104] [화학식 35] [화학식 36]



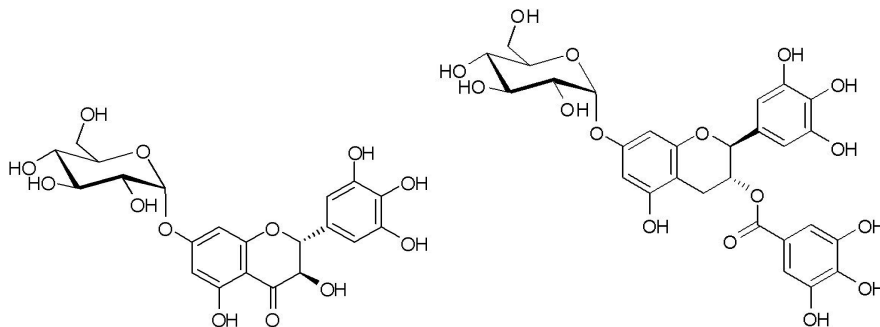
[0105]

[0106] [화학식 37] [화학식 38]



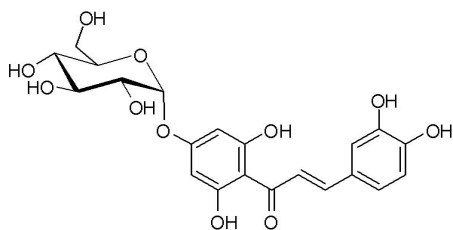
[0107]

[0108] [화학식 39] [화학식 40]



[0109]

[0110] [화학식 41]



[0111]

[0112] 본 발명에 따른 제조방법에 의해 제조된 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드는 동일한 환경의 생리학적 조건에서, 그에 상응하는 당공여체가 결합되지 않은 페놀화합물에 비하여 용해도가 10 내지 140 배 향상되었으며, 안정성이 향상되어 체내 이용율을 크게 높일 수 있다.

[0113] 한편, 본 발명에 따른 제조방법에 의해 제조된 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드는 알파-글리코시다제에 의해 분해되어 비당체형 페놀화합물로 분해될 수 있는데, 비당체형 페놀화합물은 상기 [화학식 3]의 화합물일 수 있고, 상기 알파-글루코시다제는 알파-글루코시다제의 활성을 가지는 효소이면 특별히 제한은 없다.

[0114] 이하, 본 발명을 바람직한 실시예를 참고하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0115] 실시예 1. 퀘르세틴-7-0- α -글루코시드의 합성

[0116] 실시예 1.1. 합성확인

[0117] 당공여체로 1 mM 알파-D-글루코실 플루오라이드 용액 1 ml와 당수용체로 1 mM 퀘르세틴(quercetin) 용액 1 ml를 넣고, 서열번호 1로 표시되는 416번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트에서 알라닌으로 돌연변이시킨 알파-글루코시다제 변이체 효소를 최종농도가 1 mg/ml가 되도록 첨가한 후, pH가 9.0 인 완충용액을 첨가하고 물 80 중량%, DMSO 20 중량%인 반응매개를 이용하여 45 °C에서 8 시간 동안 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다.

[0118] 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography)를 이용하여 반응여부를 모니터링 한 후, 반응 중간에 샘플을 취해 19배 부피량(v/v)의 아세토니트릴을 첨가하여 반응을 종료시키고, 얻어진 혼합액을 10,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리하여 침전된 효소와 완충염을 제거하고 HPLC로 분석하여 반응시간에 따른 트랜스글리코실화 반응을 모니터링하였다.

[0119] 반응 초기에서는 7 분 부근에서 퀘르세틴으로 보이는 단일 피크만이 검출되었으나, 반응 시간이 증가함에 따라 2.8 분 부근에서 새로운 피크가 생성되는 것을 확인하였고, 7 분 부근 피크의 강도는 약해지는 것을 확인하였다.

[0120] 실시예 1.2. pH에 따른 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 수율

[0121] pH를 다르게 설정한 물 80 중량%, DMSO 20 중량%인 반응매개를 이용하여 실시예 1.1의 방법으로 알파-D-글루코실 플루오라이드와 퀴르세틴을 8 시간 동안 반응시킴으로써 pH에 따른 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 상대농도를 HPLC로 분석하여 확인하였으며 이를 하기 표 1 및 도 2에 나타내었다.

표 1

[0122]	pH	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
	상대농도	0±0	0±0	38±1	92±2	91±1

[0123] 표 1에 나타난 바와 같이, pH가 7 이하에서는 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드가 합성되지 않았으며, pH가 9 내지 10에서 합성 수율이 크게 증가하였다.

[0124] 상기 결과는 하기 도 2를 통해서도 확인할 수 있다. 하기 도 2a는 pH 7.0에서 8시간 동안 반응시킨 후 측정된 HPLC 결과이며, 도 2b는 pH 9.0에서 8시간 동안 반응시킨 후 측정된 HPLC 결과이다. pH 7.0에서는 트랜스글리코실화가 이루어지지 못하여 대부분의 퀴르세틴이 그대로 남아 있었으나, pH 9.0에서는 트랜스글루코실화가 이루어져 대부분의 퀴르세틴이 퀴르세틴-7-O- α -글루코시드로 전환된 것을 확인하였다.

[0125] 실시예 1.3. 반응온도에 따른 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 수율

[0126] 용매로 pH가 9.0인 트리스-염산(Tris-HCl) 완충액을 사용하였으며, 온도를 25 내지 65 °C로 하여 반응을 수행한 것을 제외하고는 실시예 1.1의 방법으로 반응시켜 온도에 따른 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 상대농도를 확인하였으며 이를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0127]	온도(°C)	25	35	45	55	65
	상대농도	62±2	82±3	92±3	71±2	74±1

[0128] 표 2에 나타난 바와 같이, 반응온도가 35 내지 45 °C인 구간에서 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 수율이 가장 높았다.

[0129] 실시예 1.4. 공용매 혼합액의 첨가량에 따른 합성효율 평가

[0130] 반응 시 공용매 혼합액의 첨가량이 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 합성 수율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DMSO의 함량을 5 내지 30 중량%로 변화시켜서 사용한 것을 제외하고, pH가 9.0인 트리스-염산(Tris-HCl) 완충액을 사용하여 45 °C에서 8시간 동안 배양하였으며, 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 상대농도를 확인하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0131]	DMSO	5	10	15	20	30
	상대농도	14±0.2	28±1	76±2	94±2	74±1

[0132] 표 3에 나타난 바와 같이, DMSO의 함량이 증가할수록 페놀화합물-0-아릴 알파-글루코시드의 상대농도가 증가하였으며 DMSO의 함량이 20 중량%인 경우 가장 높은 합성효율을 나타내었다. 그러나 DMSO의 함량이 30 중량%로 증가하는 경우 오히려 더 낮은 합성수율을 나타내었다.

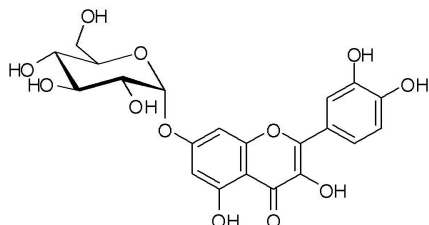
[0133] 실험예 1.5. 퀴르세틴 글루코시드의 정제 및 구조분석

[0134] 반응혼합액을 0.1 M HCl 용액을 이용하여 중화한 후, Nova-Pac® C18 SEP PAK 카트리지(waters 사)에 장입하여 유리된 당, 효소, DMSO 및 염을 제거하고, 이어서 감압하에 용매를 증발시켰다. 농축액을 200-425 mesh의 실리카겔을 이용하여, 실리카겔 프래시크로마토그래피(용매조건 EtOAc/MeOH/H₂O=17.5:2:0.5)으로 정제하였으며, NMR

과 ESI-MS로 분석하였다.

[0135] 퀴르세틴 글루코시드에 대한 질량 스펙트럼(mass spectrum) 결과, 분자량이 464.13인 퀴르세틴 글루코시드(m/z $[M-H]^-$: 463.41; $[M+Cl]^-$: 499.39)가 확인되었다.

[0136] NMR 결과는 하기와 같으며, 상기 반응을 통해 합성된 퀴르세틴 글루코시드는 포도당 잔기가 퀴르세틴의 7-수산기에 α -O-글루코시딕 결합(glycosidic linkage)으로 연결된 퀴르세틴-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.



[0137]

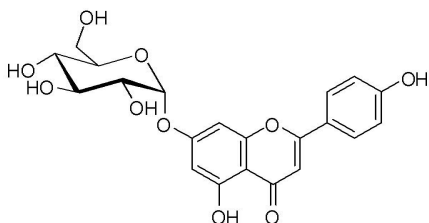
[0138] Yellow powder (42.7 mg, 92%).

[0139] 1H NMR(methanol- d_4 , 400 MHz): δ 7.16 (m, 1H, Ph-H2'), 6.92 (m, 1H, Ph-H5'), 6.87 (m, 1H, Ph-H6'), 6.23 (m, 1H, Ph-H6), 5.77 (m, 1H, Ph-H8), 5.52 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H1'), 3.56 (m, 1H, H4"), 3.50 (m, 1H, H3"), 3.41 (m, 3H, H6" 및 H2"), 3.32 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 176.47(C=O); 166.94(C-7), 158.32(C-5), 157.74(C-9), 150.83(C-4'), 148.25(C-3'), 147.84(C2), 137.03(C3), 122.41(C-1'), 121.03 (C-6'), 116.96 (C-5'), 116.50 (C-2'), 104.66 (C-10), 97.76 (C-6), 94.40 (C-8) (Ph-C); 101.39 (C-1"), 76.85 (C-3"), 74.42 (C-4"), 73.83 (C-5"), 73.17 (C-2"), 61.87 (C-6").

[0140] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0141] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0142] 실시예 2. 아피제닌 7-O- α -글루코시드의 합성



[0143]

[0144] 당수용체로 아피제닌을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 아피제닌 글루코시드를 합성하였으며, NMR 과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 아피제닌 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 아피제닌의 7-수산기에 O- α -글루코시딕 결합으로 연결된 아피제닌 7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0145] Yellow powder (39.3 mg, 91%).

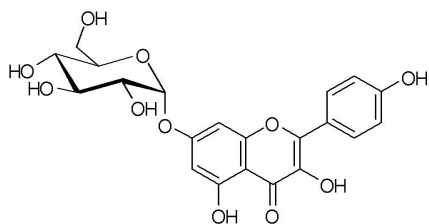
[0146] 1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 7.62 (m, 2H, Ph-H2' and 6'), 6.81 (s, 1H, C=CH), 6.75 (m, 2H, Ph-H3' and 5'), 6.44 (m, 1H, Ph-H6), 5.96 (m, 1H, Ph-H8), 5.41 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H1"), 3.83 (m, 1H, H4"), 3.68 (m, 1H, H3"), 3.52 (m, 2H, H6"), 3.46 (m, 1H, H2"), 3.34 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 182.37 (C=O); 168.38 (C-7), 161.39 (C2), 160.18 (C-5), 158.25 (C-9), 157.37 (C-4'), 130.75 (2C), 125.60 (C-1'), 118.51 (2C), 104.82 (C-10), 104.25 (C3), 98.24 (C-6), 96.97 (C-8) (Ph-C); 103.39 (C-1"), 76.83 (C-3"), 75.58 (C-4"), 74.53 (C-2"), 73.27 (C-5"), 64.81 (C-6").

[0147] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0148] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0149] ESI-MS: calc. for $[C_{21}H_{20}O_{10} - H]^+ = 431.4$; found 431.4.

[0150] 실시예 3. 캠프페롤-7-O- α -글루코시드의 합성



[0151]

[0152] 당수용체로 캠프페롤을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 캠프페롤 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 캠프페롤 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 캠프페롤의 7-수산기에 O- α -글루코시딕 결합으로 연결된 캠프페롤-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0153] Yellow powder (40.4 mg, 90%).

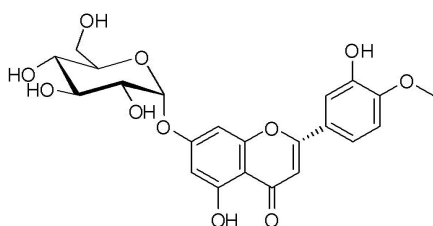
[0154] 1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 8.05 (m, 2H, Ph-H2' and 6'), 6.83 (m, 2H, Ph-H3' and 5'), 6.68 (m, 1H, Ph-H6), 6.39 (m, 1H, Ph-H8), 5.49 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, H1"), 3.62 (m, 1H, H4"), 3.42 (m, 1H, H3"), 3.36 (m, 3H, H6" and H2"), 3.18 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 177.70 (C=O); 167.31 (C-7), 159.72 (C-5), 158.29 (C-9), 155.74 (C-4'), 147.37 (C2), 138.31 (C3), 131.98 (2C), 124.04 (C-1'), 117.33 (2C), 105.17 (C-10), 99.92 (C-6), 95.29 (C-8) (Ph-C); 100.03 (C-1"), 76.21 (C-3"), 74.86 (C-4"), 74.16 (C-2"), 73.69 (C-5"), 62.81 (C-6").

[0155] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0156] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0157] ESI-MS: calc. for $[C_{21}H_{20}O_{11} - H]^+ = 447.4$; found 447.4.

[0158] 실시예 4. 헤스페레틴-7-O- α -글루코시드의 합성



[0159]

[0160] 당수용체로 헤스페레틴을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 헤스페레틴 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 헤스페레틴 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 헤스페레틴의 7-수산기에 O- α -글루코시딕 결합으로 연결된 헤스페레틴-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0161] White powder (46.0 mg, 99%).

[0162] 1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 6.97 (m, 1H, Ph-H2'), 6.82 (m, 2H, Ph-H5' and 6'), 6.36 (m, 1H, Ph-H6), 5.72 (m, 1H, Ph-H8), 5.37 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H1"), 5.08 (t, 1H, $J = 4.7$ Hz, H2), 3.92 (s, 3H, OCH3), 3.86 (m, 1H, H4"), 3.67 (m, 1H, H3"), 3.59 (m, 2H, H6"), 3.44 (m, 1H, H2"), 3.31 (m, 2H, H3), 3.19 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 198.50 (C=O); 165.19 (C-7), 162.45 (C-5), 161.99 (C-9), 151.24 (C-4'), 148.17 (C-3'), 132.64 (C-1'), 121.53 (C-6'), 118.95 (C-2'), 116.28 (C-5'), 105.66 (C-10), 98.51 (C-6), 96.46 (C-8) (Ph-C); 97.29 (C-1"), 81.48 (C-2), 76.92 (C-3"), 75.86

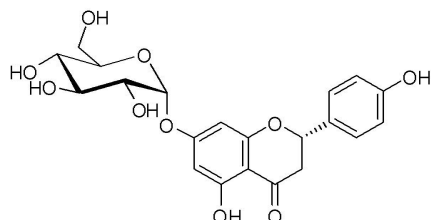
(C-4"), 74.68 (C-2"), 73.22 (C-5"), 62.27 (C-6"), 57.24 (OCH₃), 43.52 (C-3).

[0163] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0164] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0165] ESI-MS: calc. for [C₂₂H₂₄O₁₁ - H]⁺ = 463.4; found 463.4.

[0166] 실시예 5. 나린제닌-7-O-α-글루코시드의 합성



[0167]

[0168] 당수용체로 나린제닌을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 나린제닌 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 나린제닌 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 나린제닌의 7-수산기에 O-α-글루코시딕 결합으로 연결된 나린제닌-7-O-α-글루코시드임을 확인하였다.

[0169] White powder (42.9 mg, 99%).

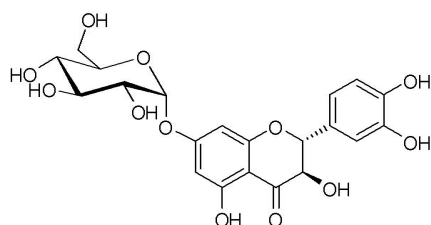
[0170] ¹H NMR (methanol-d₄, 400 MHz): δ 7.23 (m, 2H, Ph-H2' and 6'), 6.76 (m, 2H, Ph-H3' and 5'), 6.18 (m, 2H, Ph-H6 and 8), 5.47 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H1"), 5.19 (t, 1H, J = 5.5 Hz, H2), 3.71 (m, 1H, H4"), 3.56 (m, 1H, H3"), 3.43 (m, 3H, H6" and 2"), 3.28 (m, 2H, H3), 3.16 (m, 1H, H5"). ¹³C NMR (methanol-d₄, 100 MHz): δ 197.29 (C=O); 168.42 (C-7), 161.86 (C-5), 160.42 (C-9), 154.21 (C-4'), 132.60 (C-1'), 130.65 (2C), 118.37 (2C), 104.28 (C-10), 97.18 (C-6), 95.83 (C-8) (Ph-C); 101.29 (C-1"), 79.63 (C-2), 76.10 (C-4"), 75.89 (C-3"), 74.52 (C-2"), 72.77 (C-5"), 64.13 (C-6"), 42.96 (C-3).

[0171] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0172] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0173] ESI-MS: calc. for [C₂₁H₂₂O₁₀ - H]⁺ = 433.4; found 433.4.

[0174] 실시예 6. 택시폴린-7-O-α-글루코시드의 합성



[0175]

[0176] 당수용체로 택시폴린을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 택시폴린 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 택시폴린 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 택시폴린의 7-수산기에 O-α-글루코시딕 결합으로 연결된 택시폴린-7-O-α-글루코시드임을 확인하였다.

[0177] White powder (46.2 mg, 99%).

[0178] ¹H NMR (methanol-d₄, 400 MHz): δ 7.01 (m, 1H, Ph-H2'), 6.86 (m, 1H, Ph-H5'), 6.80 (m, 1H, Ph-H6'),

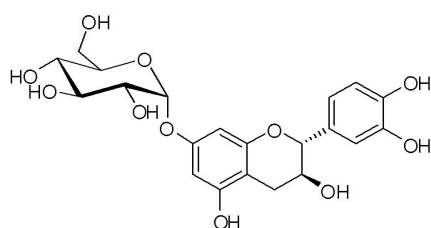
6.39 (m, 1H, Ph-H6), 5.84 (m, 1H, Ph-H8), 5.45 (m, 1H, H2), 5.41 (m, 1H, H3), 5.36 (d, 1H, J = 3.2 Hz, H1"), 3.72 (m, 1H, H4"), 3.63 (m, 1H, H3"), 3.55 (m, 2H, H6"), 3.42 (m, 1H, H2"), 3.34 (m, 2H, H3), 3.26 (m, 1H, H5"). ¹³C NMR (methanol-d₄, 100 MHz): δ 197.58 (C=O); 167.29 (C-7), 163.77 (C-5), 162.27 (C-9), 148.86 (C-4'), 147.41 (C-3'), 130.37 (C-1'), 120.65 (C-6'), 116.33 (C-2'), 115.24 (C-5'), 101.48 (C-10), 99.85 (C-6), 97.28 (C-8) (Ph-C); 98.26 (C-1"), 86.53 (C-2), 75.73 (C-3"), 74.51 (C-4"), 74.10 (C-2"), 73.74 (C-5"), 70.81 (C-3), 63.62 (C-6").

[0179] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0180] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0181] ESI-MS: calc. for [C₂₁H₂₂O₁₂ - H]⁺ = 465.4; found 465.4.

[0182] 실시예 7. (+)-카테킨-7-O-α-글루코시드의 합성



[0183]

[0184] 당수용체로 (+)-카테킨을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 (+)-카테킨 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 (+)-카테킨 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 (+)-카테킨의 7-수산기에 O-α-글루코시딕 결합으로 연결된 (+)-카테킨-7-O-α-글루코시드임을 확인하였다.

[0185] White powder (40.7 mg, 90%).

[0186] ¹H NMR (methanol-d₄, 400 MHz): δ 7.14 (m, 1H, Ph-H2'), 6.95 (m, 1H, 25.98/2

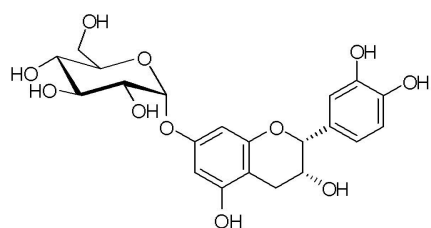
[0187] Ph-H5'), 6.87 (m, 1H, Ph-H6'), 5.81 (m, 1H, Ph-H6), 5.67 (m, 1H, Ph-H8), 5.48 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H1"), 5.03 (m, 1H, H2), 4.52 (m, 1H, H3), 3.82 (m, 1H, H4"), 3.64 (m, 1H, H3"), 3.58 (m, 3H, H6" and 2"), 3.48 (m, 2H, H3), 3.25 (m, 1H, H5"), 2.68 (m, 2H, H4). ¹³C NMR (methanol-d₄, 100 MHz): δ 159.35 (C-7), 158.21 (C-5), 157.83 (C-9), 145.26 (C-4'), 145.87 (C-3'), 130.29 (C-1'), 120.93 (C-6'), 116.39 (C-5'), 115.35 (C-2'), 99.52 (C-10), 94.34 (C-6), 92.64 (C-8) (Ph-C); 99.01 (C-1"), 85.49 (C-2), 77.53 (C-3"), 75.28 (C-4"), 73.96 (C-5"), 73.43 (C-2"), 67.36 (C-3), 62.74 (C-6"), 29.28 (C-4).

[0188] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0189] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0190] ESI-MS: calc. for [C₂₁H₂₄O₁₁ - H]⁺ = 451.4; found 451.4.

[0191] 실시예 8. (-)-에피카테킨-7-O-α-글루코시드의 합성



[0192]

[0193] 당수용체로 (-)-에피카테킨을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 (-)-에피카테킨 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 (-)-에피카테킨 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 (-)-에피카테킨의 7- 수산기에 0- α -글루코시딕 결합으로 연결된 (-)-에피카테킨-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0194] White powder (44.3 mg, 98%).

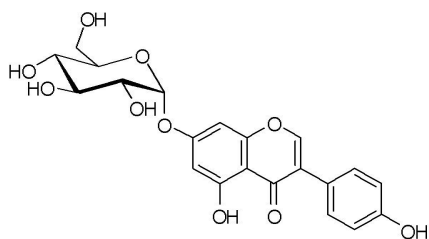
[0195] ^1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 7.06 (m, 1H, Ph-H2'), 6.82 (m, 1H, Ph-H5'), 6.73 (m, 1H, Ph-H6'), 5.72 (m, 1H, Ph-H6), 5.60 (m, 1H, Ph-H8), 5.45 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H1"), 5.01 (m, 1H, H2), 4.46 (m, 1H, H3), 3.78 (m, 1H, H4"), 3.60 (m, 1H, H3"), 3.53 (m, 3H, H6" and H2"), 3.44 (m, 2H, H3), 3.19 (m, 1H, H5"), 2.62 (m, 2H, H4). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 158.37 (C-7), 158.02 (C-5), 157.29 (C-9), 144.83 (C-4'), 144.17 (C-3'), 129.66 (C-1'), 119.18 (C-6'), 114.76 (C-5'), 114.23 (C-2'), 98.24 (C-10), 94.39 (C-6), 92.20 (C-8) (Ph-C); 100.16 (C-1"), 85.08 (C-2), 76.36 (C-3"), 76.02 (C-4"), 74.59 (C-5"), 73.29 (C-2"), 66.33 (C-3), 60.22 (C-6"), 26.36 (C-4).

[0196] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0197] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0198] ESI-MS: calc. for $[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11} - \text{H}^+]^-$ = 451.4; found 451.4.

[0199] 실시예 9. 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 합성



[0200]

[0201] 당수용체로 제니스테인을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 제니스테인 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 제니스테인 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 제니스테인의 7- 수산기에 0- α -글루코시딕 결합으로 연결된 제니스테인-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0202] White powder (41.0 mg, 95%).

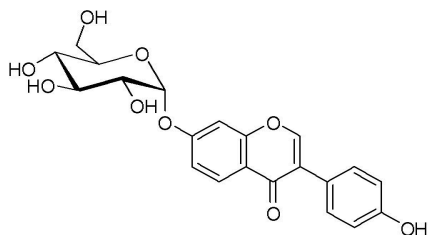
[0203] ^1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 8.12 (s, 1H, C=CH), 7.37 (m, 2H, Ph-H2' and 6'), 6.83 (m, 2H, Ph-H3' and 5'), 6.72 (m, 1H, Ph-H6), 6.58 (m, 1H, Ph-H8), 5.48 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H1"), 3.52 (m, 1H, H4"), 3.46 (m, 1H, H3"), 3.39 (m, 3H, H6" and H2"), 3.31 (m, 2H, H3), 3.14 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 180.74 (C=O); 167.21 (C-7), 161.63 (C-5), 157.73 (C-9), 156.23 (C-4'), 153.28 (C2), 131.82 (2C), 125.89 (C3), 124.44 (C-1'), 117.12 (2C), 104.63 (C-10), 97.28 (C-6), 94.51 (C-8) (Ph-C); 100.64 (C-1"), 75.51 (C-3"), 74.68 (C-4"), 74.07 (C-2"), 72.68 (C-5"), 61.33 (C-6").

[0204] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0205] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0206] ESI-MS: calc. for $[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10} - \text{H}^+]^-$ = 431.4; found 431.4.

[0207] 실시예 10. 다이드제인-7-O- α -글루코시드의 합성



[0208]

[0209] 당수용체로 다이드제인을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 다이드제인 글루코시드를 합성하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다. 하기 결과로부터 합성된 다이드제인 글루코시드 분자는 포도당 잔기가 다이드제인의 7- 수산기에 O- α -글루코시딕 결합으로 연결된 다이드제인-7-O- α -글루코시드임을 확인하였다.

[0210] White powder (38.3 mg, 92%).

[0211] ^1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz): δ 8.28 (s, 1H, C=CH), 8.01 (m, 1H, H5), 7.32 (m, 2H, Ph-H2' and 6'), 7.14 (m, 1H, Ph-H6), 7.03 (m, 1H, Ph-H8), 6.78 (m, 2H, Ph-H3' and 5'), 5.56 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H1"), 3.63 (m, 1H, H4"), 3.56 (m, 1H, H3"), 3.45 (m, 3H, H6" and H2"), 3.37 (m, 2H, H3), 3.24 (m, 1H, H5"). ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz): δ 178.26 (C=O); 166.73 (C-7), 158.34 (C-9), 157.59 (C-4'), 153.27 (C2), 130.69 (2C), 129.57 (C-5), 125.49 (C-1'), 123.74 (C3), 118.69 (C-10), 117.73 (2C), 115.48 (C-6), 99.36 (C-8) (Ph-C); 105.83 (C-1"), 76.35 (C-3"), 74.93 (C-4"), 73.74 (C-2"), 72.02 (C-5"), 61.40 (C-6").

[0212] HMBC shows H1" coupled with C7 and H8 coupled with C1".

[0213] NOESY shows H8 coupled with H1".

[0214] ESI-MS: calc. for $[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9 - \text{H}]^-$ = 415.4; found 415.4.

[0215] 시험예 1. 용해도 평가

[0216] 시험예 1.1. 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 용해도 평가

[0217] 구매한 제니스테인(시그마 사) 표준물질과 실시예 9에서 제조한 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 용해도를 각각 평가하였다.

[0218] 용해도 평가는 제니스테인 표준물질과 실시예 9의 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 물농도와 HPLC 분석에 따른 해당 물질의 크로마토그램 피크 면적을 이용하여 표준곡선을 규정한 다음, 각 물질의 포화용액 내 제니스테인 및 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 HPLC 크로마토그램 내 피크 면적을 이용하여 각 물질의 포화농도를 결정하였다.

[0219] 25 °C에서 제니스테인의 물에 대한 용해도는 19.6 μM 로 측정되었으며, 제니스테인-7-O- α -글루코시드의 물에 대한 용해도는 210.8 μM 로 측정되어 용해도가 10.77배 향상된 것을 확인하였다.

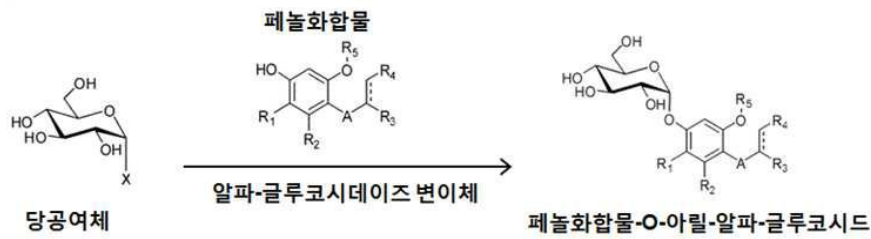
[0220] 시험예 1.2. 다이드제인-7-O- α -글루코시드의 용해도 평가

[0221] 시험예 1.1의 방법으로 다이드제인 표준물질과 실시예 10에서 제조한 다이드제인-7-O- α -글루코시드의 물에서의 용해도를 각각 평가하였다.

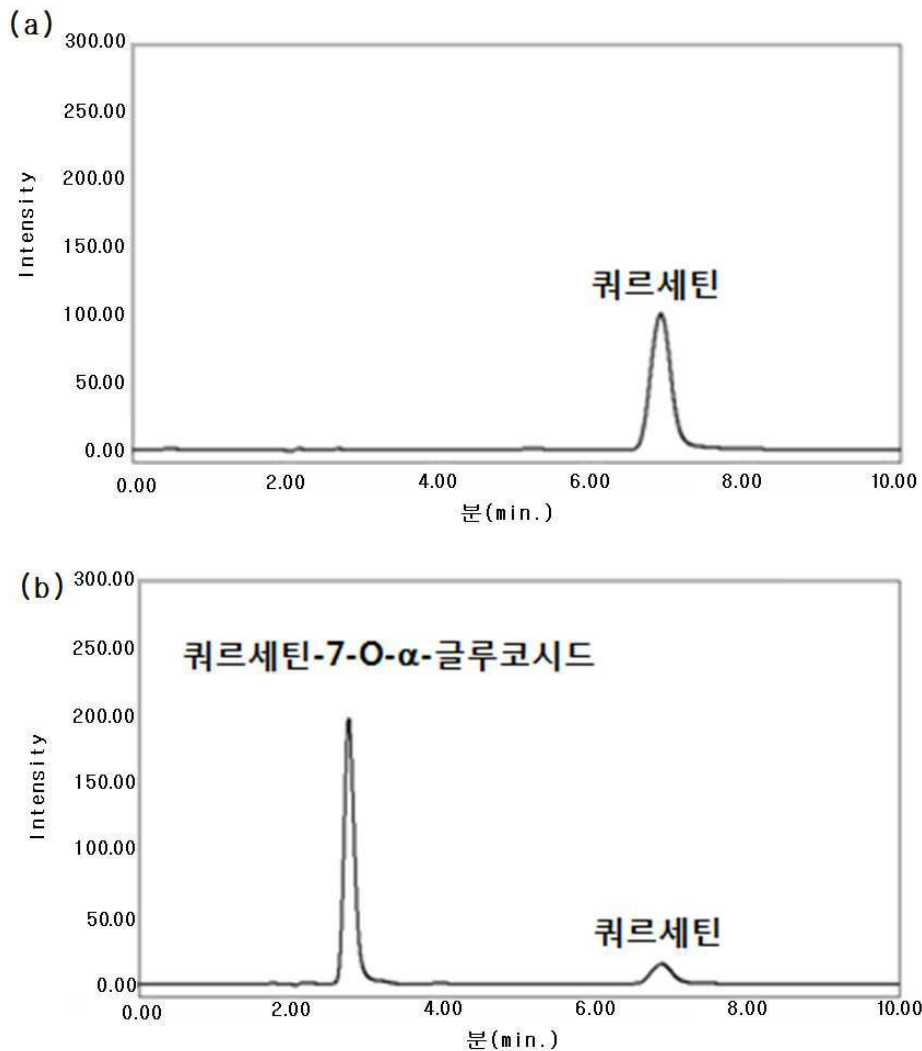
[0222] 25 °C에서 다이드제인 표준물질의 용해도는 4.6 μM 로 측정되었으며, 다이드제인-7-O- α -글루코시드의 물에 대한 용해도는 637.2 μM 로 측정되어 용해도가 138.90배 향상된 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Soluble phenolic compound derivatives and method for preparation thereof

<130> HPC-5410

<160> 3

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 701

<212> PRT

<213> Sulfolobus solfataricus

<400> 1

Met Gln Thr Ile Lys Ile Tyr Glu Asn Lys Gly Val Tyr Lys Val Val

1 5 10 15

Ile Gly Glu Pro Phe Pro Pro Ile Glu Phe Pro Leu Glu Gln Lys Ile

20 25 30

Ser Ser Asn Lys Ser Leu Ser Glu Leu Gly Leu Thr Ile Val Gln Gln

35 40 45

Gly Asn Lys Val Ile Val Glu Lys Ser Leu Asp Leu Lys Glu His Ile

50 55 60

Ile Gly Leu Gly Glu Lys Ala Phe Glu Leu Asp Arg Lys Arg Lys Arg

65 70 75 80

Tyr Val Met Tyr Asn Val Asp Ala Gly Ala Tyr Lys Lys Tyr Gln Asp

85 90 95

Pro Leu Tyr Val Ser Ile Pro Leu Phe Ile Ser Val Lys Asp Gly Val

100 105 110

Ala Thr Gly Tyr Phe Phe Asn Ser Ala Ser Lys Val Ile Phe Asp Val

115 120 125

Gly Leu Glu Glu Tyr Asp Lys Val Ile Val Thr Ile Pro Glu Asp Ser

130 135 140

Val Glu Phe Tyr Val Ile Glu Gly Pro Arg Ile Glu Asp Val Leu Glu

145 150 155 160

Lys Tyr Thr Glu Leu Thr Gly Lys Pro Phe Leu Pro Pro Met Trp Ala

165 170 175

Phe Gly Tyr Met Ile Ser Arg Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gln Asp Lys Val

180 185 190

Val Glu Leu Val Asp Ile Met Gln Lys Glu Gly Phe Arg Val Ala Gly
195 200 205

Val Phe Leu Asp Ile His Tyr Met Asp Ser Tyr Lys Leu Phe Thr Trp
210 215 220

His Pro Tyr Arg Phe Pro Glu Pro Lys Lys Leu Ile Asp Glu Leu His
225 230 235 240

Lys Arg Asn Val Lys Leu Ile Thr Ile Val Asp His Gly Ile Arg Val
245 250 255

Asp Gln Asn Tyr Ser Pro Phe Leu Ser Gly Met Gly Lys Phe Cys Glu
260 265 270

Ile Glu Ser Gly Glu Leu Phe Val Gly Lys Met Trp Pro Gly Thr Thr
275 280 285

Val Tyr Pro Asp Phe Phe Arg Glu Asp Thr Arg Glu Trp Trp Ala Gly
290 295 300

Leu Ile Ser Glu Trp Leu Ser Gln Gly Val Asp Gly Ile Trp Leu Asp
305 310 315 320

Met Asn Glu Pro Thr Asp Phe Ser Arg Ala Ile Glu Ile Arg Asp Val
325 330 335

Leu Ser Ser Leu Pro Val Gln Phe Arg Asp Asp Arg Leu Val Thr Thr
340 345 350

Phe Pro Asp Asn Val Val His Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Val Lys His
355 360 365

Glu Lys Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu Tyr Glu Ala Met Ala Thr Phe
370 375 380

Lys Gly Phe Arg Thr Ser His Arg Asn Glu Ile Phe Ile Leu Ser Arg
385 390 395 400

Ala Gly Tyr Ala Gly Ile Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Trp Thr Gly Ala
405 410 415

Asn Thr Pro Ser Trp Asp Asp Leu Lys Leu Gln Leu Gln Leu Val Leu
420 425 430

Gly Leu Ser Ile Ser Gly Val Pro Phe Val Gly Cys Asp Ile Gly Gly
435 440 445

Phe Gln Gly Arg Asn Phe Ala Glu Ile Asp Asn Ser Met Asp Leu Leu
 450 455 460

Val Lys Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Ser His
 465 470 475 480

Lys Ala Thr Asp Gly Ile Asp Thr Glu Pro Val Phe Leu Pro Asp Tyr
 485 490 495

Tyr Lys Glu Lys Val Lys Glu Ile Val Glu Leu Arg Tyr Lys Phe Leu
 500 505 510

Pro Tyr Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Glu Ala Ser Glu Lys Gly His Pro
 515 520 525

Val Ile Arg Pro Leu Phe Tyr Glu Phe Gln Asp Asp Asp Asp Met Tyr
 530 535 540

Arg Ile Glu Asp Glu Tyr Met Val Gly Lys Tyr Leu Leu Tyr Ala Pro
 545 550 555 560

Ile Val Ser Lys Glu Glu Ser Arg Leu Val Thr Leu Pro Arg Gly Lys
 565 570 575

Trp Tyr Asn Tyr Trp Asn Gly Glu Ile Ile Asn Gly Lys Ser Val Val
 580 585 590

Lys Ser Thr His Glu Leu Pro Ile Tyr Leu Arg Glu Gly Ser Ile Ile
 595 600 605

Pro Leu Glu Gly Asp Glu Leu Ile Val Tyr Gly Glu Thr Ser Phe Lys
 610 615 620

Arg Tyr Asp Asn Ala Glu Ile Thr Ser Ser Ser Asn Glu Ile Lys Phe
 625 630 635 640

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

Val Ser Lys Ile Ile Val Asp Asp Ser Lys Glu Ile Gln Val Glu Lys
 660 665 670

Thr Met Gln Asn Thr Tyr Val Ala Lys Ile Asn Gln Lys Ile Arg Gly
 675 680 685

Lys Ile Asn Leu Glu Leu Gln His His His His His His

690 695 700

<210> 2

<211> 701

<212> PRT

<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 2

Met Gln Thr Ile Lys Ile Tyr Glu Asn Lys Gly Val Tyr Lys Val Val

1 5 10 15

Ile Gly Glu Pro Phe Pro Pro Ile Glu Phe Pro Leu Glu Gln Lys Ile

20 25 30

Ser Ser Asn Lys Ser Leu Ser Glu Leu Gly Leu Thr Ile Val Gln Gln

35 40 45

Gly Asn Lys Val Ile Val Glu Lys Ser Leu Asp Leu Lys Glu His Ile

50 55 60

Ile Gly Leu Gly Glu Lys Ala Phe Glu Leu Asp Arg Lys Arg Lys Arg

65 70 75 80

Tyr Val Met Tyr Asn Val Asp Ala Gly Ala Tyr Lys Lys Tyr Gln Asp

85 90 95

Pro Leu Tyr Val Ser Ile Pro Leu Phe Ile Ser Val Lys Asp Gly Val

100 105 110

Ala Thr Gly Tyr Phe Phe Asn Ser Ala Ser Lys Val Ile Phe Asp Val

115 120 125

Gly Leu Glu Glu Tyr Asp Lys Val Ile Val Thr Ile Pro Glu Asp Ser

130 135 140

Val Glu Phe Tyr Val Ile Glu Gly Pro Arg Ile Glu Asp Val Leu Glu

145 150 155 160

Lys Tyr Thr Glu Leu Thr Gly Lys Pro Phe Leu Pro Pro Met Trp Ala

165 170 175

Phe Gly Tyr Met Ile Ser Arg Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gln Asp Lys Val

180 185 190

Val Glu Leu Val Asp Ile Met Gln Lys Glu Gly Phe Arg Val Ala Gly

195 200 205

Val Phe Leu Asp Ile His Tyr Met Asp Ser Tyr Lys Leu Phe Thr Trp
210 215 220

His Pro Tyr Arg Phe Pro Glu Pro Lys Lys Leu Ile Asp Glu Leu His
225 230 235 240

Lys Arg Asn Val Lys Leu Ile Thr Ile Val Asp His Gly Ile Arg Val
245 250 255

Asp Gln Asn Tyr Ser Pro Phe Leu Ser Gly Met Gly Lys Phe Cys Glu
260 265 270

Ile Glu Ser Gly Glu Leu Phe Val Gly Lys Met Trp Pro Gly Thr Thr
275 280 285

Val Tyr Pro Asp Phe Phe Arg Glu Asp Thr Arg Glu Trp Trp Ala Gly
290 295 300

Leu Ile Ser Glu Trp Leu Ser Gln Gly Val Asp Gly Ile Trp Leu Asp
305 310 315 320

Met Asn Glu Pro Thr Asp Phe Ser Arg Ala Ile Glu Ile Arg Asp Val
325 330 335

Leu Ser Ser Leu Pro Val Gln Phe Arg Asp Asp Arg Leu Val Thr Thr
340 345 350

Phe Pro Asp Asn Val Val His Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Val Lys His
355 360 365

Glu Lys Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu Tyr Glu Ala Met Ala Thr Phe
370 375 380

Lys Gly Phe Arg Thr Ser His Arg Asn Glu Ile Phe Ile Leu Ser Arg
385 390 395 400

Ala Gly Tyr Ala Gly Ile Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Trp Thr Gly Gly
405 410 415

Asn Thr Pro Ser Trp Asp Asp Leu Lys Leu Gln Leu Gln Leu Val Leu
420 425 430

Gly Leu Ser Ile Ser Gly Val Pro Phe Val Gly Cys Asp Ile Gly Gly
435 440 445

Phe Gln Gly Arg Asn Phe Ala Glu Ile Asp Asn Ser Met Asp Leu Leu
450 455 460

Val Lys Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Ser His

465 470 475 480

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

485 490 495

Tyr Lys Glu Lys Val Lys Glu Ile Val Glu Leu Arg Tyr Lys Phe Leu

500 505 510

Pro Tyr Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Glu Ala Ser Glu Lys Gly His Pro

515 520 525

Val Ile Arg Pro Leu Phe Tyr Glu Phe Gln Asp Asp Asp Asp Met Tyr

530 535 540

Arg Ile Glu Asp Glu Tyr Met Val Gly Lys Tyr Leu Leu Tyr Ala Pro

545 550 555 560

Ile Val Ser Lys Glu Glu Ser Arg Leu Val Thr Leu Pro Arg Gly Lys

565 570 575

Trp Tyr Asn Tyr Trp Asn Gly Glu Ile Ile Asn Gly Lys Ser Val Val

580 585 590

Lys Ser Thr His Glu Leu Pro Ile Tyr Leu Arg Glu Gly Ser Ile Ile

595 600 605

Pro Leu Glu Gly Asp Glu Leu Ile Val Tyr Gly Glu Thr Ser Phe Lys

610 615 620

Arg Tyr Asp Asn Ala Glu Ile Thr Ser Ser Ser Asn Glu Ile Lys Phe

625 630 635 640

Ser Arg Glu Ile Tyr Val Ser Lys Leu Thr Ile Thr Ser Glu Lys Pro

645 650 655

Val Ser Lys Ile Ile Val Asp Asp Ser Lys Glu Ile Gln Val Glu Lys

660 665 670

Thr Met Gln Asn Thr Tyr Val Ala Lys Ile Asn Gln Lys Ile Arg Gly

675 680 685

Lys Ile Asn Leu Glu Leu Gln His His His His His His

690 695 700

<210> 3

<211> 701
 <212> PRT
 <213> Sulfolobus solfataricus
 <400> 3
 Met Gln Thr Ile Lys Ile Tyr Glu Asn Lys Gly Val Tyr Lys Val Val
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Pro Phe Pro Pro Ile Glu Phe Pro Leu Glu Gln Lys Ile
 20 25 30
 Ser Ser Asn Lys Ser Leu Ser Glu Leu Gly Leu Thr Ile Val Gln Gln
 35 40 45
 Gly Asn Lys Val Ile Val Glu Lys Ser Leu Asp Leu Lys Glu His Ile
 50 55 60
 Ile Gly Leu Gly Glu Lys Ala Phe Glu Leu Asp Arg Lys Arg Lys Arg
 65 70 75 80
 Tyr Val Met Tyr Asn Val Asp Ala Gly Ala Tyr Lys Lys Tyr Gln Asp
 85 90 95
 Pro Leu Tyr Val Ser Ile Pro Leu Phe Ile Ser Val Lys Asp Gly Val
 100 105 110
 Ala Thr Gly Tyr Phe Phe Asn Ser Ala Ser Lys Val Ile Phe Asp Val
 115 120 125
 Gly Leu Glu Glu Tyr Asp Lys Val Ile Val Thr Ile Pro Glu Asp Ser
 130 135 140
 Val Glu Phe Tyr Val Ile Glu Gly Pro Arg Ile Glu Asp Val Leu Glu
 145 150 155 160
 Lys Tyr Thr Glu Leu Thr Gly Lys Pro Phe Leu Pro Pro Met Trp Ala
 165 170 175
 Phe Gly Tyr Met Ile Ser Arg Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gln Asp Lys Val
 180 185 190
 Val Glu Leu Val Asp Ile Met Gln Lys Glu Gly Phe Arg Val Ala Gly
 195 200 205
 Val Phe Leu Asp Ile His Tyr Met Asp Ser Tyr Lys Leu Phe Thr Trp
 210 215 220

His Pro Tyr Arg Phe Pro Glu Pro Lys Lys Leu Ile Asp Glu Leu His
 225 230 235 240
 Lys Arg Asn Val Lys Leu Ile Thr Ile Val Asp His Gly Ile Arg Val
 245 250 255

 Asp Gln Asn Tyr Ser Pro Phe Leu Ser Gly Met Gly Lys Phe Cys Glu
 260 265 270
 Ile Glu Ser Gly Glu Leu Phe Val Gly Lys Met Trp Pro Gly Thr Thr
 275 280 285
 Val Tyr Pro Asp Phe Phe Arg Glu Asp Thr Arg Glu Trp Trp Ala Gly
 290 295 300
 Leu Ile Ser Glu Trp Leu Ser Gln Gly Val Asp Gly Ile Trp Leu Asp
 305 310 315 320
 Met Asn Glu Pro Thr Asp Phe Ser Arg Ala Ile Glu Ile Arg Asp Val

 325 330 335
 Leu Ser Ser Leu Pro Val Gln Phe Arg Asp Asp Arg Leu Val Thr Thr
 340 345 350
 Phe Pro Asp Asn Val Val His Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Val Lys His
 355 360 365
 Glu Lys Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu Tyr Glu Ala Met Ala Thr Phe
 370 375 380
 Lys Gly Phe Arg Thr Ser His Arg Asn Glu Ile Phe Ile Leu Ser Arg
 385 390 395 400

 Ala Gly Tyr Ala Gly Ile Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Trp Thr Gly Ser
 405 410 415
 Asn Thr Pro Ser Trp Asp Asp Leu Lys Leu Gln Leu Gln Leu Val Leu
 420 425 430
 Gly Leu Ser Ile Ser Gly Val Pro Phe Val Gly Cys Asp Ile Gly Gly
 435 440 445
 Phe Gln Gly Arg Asn Phe Ala Glu Ile Asp Asn Ser Met Asp Leu Leu
 450 455 460
 Val Lys Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Ser His

465 470 475 480
 Lys Ala Thr Asp Gly Ile Asp Thr Glu Pro Val Phe Leu Pro Asp Tyr
 485 490 495
 Tyr Lys Glu Lys Val Lys Glu Ile Val Glu Leu Arg Tyr Lys Phe Leu
 500 505 510
 Pro Tyr Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Glu Ala Ser Glu Lys Gly His Pro
 515 520 525
 Val Ile Arg Pro Leu Phe Tyr Glu Phe Gln Asp Asp Asp Asp Met Tyr
 530 535 540

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

 610 615 620
 Arg Tyr Asp Asn Ala Glu Ile Thr Ser Ser Ser Asn Glu Ile Lys Phe
 625 630 635 640
 Ser Arg Glu Ile Tyr Val Ser Lys Leu Thr Ile Thr Ser Glu Lys Pro
 645 650 655
 Val Ser Lys Ile Ile Val Asp Asp Ser Lys Glu Ile Gln Val Glu Lys
 660 665 670
 Thr Met Gln Asn Thr Tyr Val Ala Lys Ile Asn Gln Lys Ile Arg Gly
 675 680 685

 Lys Ile Asn Leu Glu Leu Gln His His His His His His
 690 695 700