(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0065718
(43) 공개일자 2022년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/16 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 9/26* (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/16 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0156493
(22) 출원일자 2021년11월15일
심사청구일자 2021년11월15일
(30) 우선권주장
1020200151441 2020년11월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종태
대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 1102호(하기동, 송림마을6단지아파트)
정구영
대전광역시 유성구 온천로 45, 베타동 1709호(봉명동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

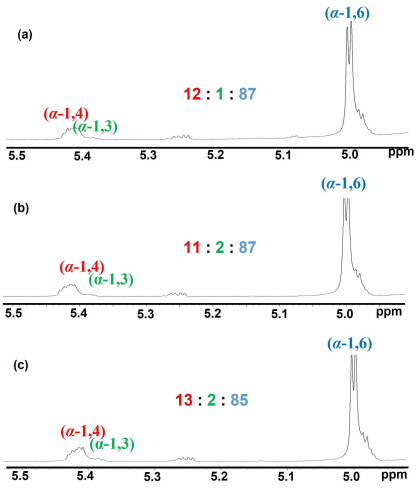
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법에 관한 것으로, 상세하게는 덱스트린을 기질로 하는 당전이 효소 및 가수분해 효소를 복합처리하여 고수용성 섬유소를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법으로 생산된 섬유소는 α-1,6 결합이 87%까지 증가하였고, 글루코스 중합도가 10을 초과하는 생성물의 비율이 79%까지 증가하였으며, 물에 대한 수용성이 증진된 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 9/1051 (2013.01)
C12N 9/2414 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
C12Y 302/01001 (2013.01)

(72) 발명자
전서현
대전광역시 유성구 지족로148번길 22, 307동 601호(지족동,엘에이치 네이처뷰)
신동호
대전광역시 서구 청사로 254, 111동 505호(둔산동, 둥지아파트)
신수진
대전광역시 유성구 대학로179번길 14, 201호(궁동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021729
과제번호	213006054SBX10
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	GoldenSeed프로젝트
연구과제명	채소류 일반성분 및 생리활성 성분분석 서비스
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 말토덱스트린에 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제(4,6αGT, 4,6-α-glucanotransferase)를 처리하여 당전이 반응을 유도하는 단계; 및

(2) 상기 단계 (1)의 당전이 반응 24~48시간 후에, 가수분해 효소를 첨가하여 α-1,4 결합의 비환원성 말단을 형성시켜 상기 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제에 의한 당전이 반응을 추가로 유도하는 단계;를 포함하는 고수용성 섬유소의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 말토덱스트린은 글루코스 중합도가 2~20인 것을 특징으로 하는 고수용성 섬유소의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)의 가수분해 효소는 알파-아밀라아제(α-amylase)인 것을 특징으로 하는 고수용성 섬유소의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제는 (1) 말토오스 결합 단백질 코딩 유전자와 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)에서 유래된 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

(2) 상기 제조된 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계; 및

(3) 상기 형질전환된 대장균으로부터 말토오스 결합 단백질 융합 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제 효소를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 제조방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 고수용성 섬유소의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반응 온도는 37~42℃이고, 반응의 pH는 4.7~5.3인 것을 특징으로 하는 고수용성 섬유소의 제조 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 고수용성 섬유소.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 고수용성 섬유소는 α-1,6 결합이 80% 이상이고, 글루코오스 중합도가 10 이상인 것의 비율이 55~80%이고, 물에 대한 용해도가 60~65%인인 것을 특징으로 하는 고수용성 섬유소.

청구항 8

제6항의 고수용성 섬유소를 포함하는 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 덱스트린은 녹말보다 분자량이 작은 다당류를 총칭한다. 녹말을 약간 분해한 고분자량에서 아이오딘-녹말반응을 보이지 않는 저분자량의 것까지 넓은 범위의 것을 말한다. 가용성 녹말도 덱스트린의 일종이다. 생체 내에서는 침(타액)과 소장 내의 세균에 의해 녹말에서 덱스트린을 생성하는 반응이 이루어진다. 녹말을 산·열·효소 등으로 가수분해시킬 때 녹말에서 말토스에 이르는 중간단계에서 생기는 여러가지 가수분해 산물이다. 사무용 풀, 수성도료, 제과의 조합용이나 약품의 부형제 등으로 쓰이고 있다.

[0003] 한편, 당전이 효소는 당잔기(글리코실기) 전이에 관여하는 전이 효소의 총칭으로 다당류, 소당류, 배당체 등 각 당류의 합성, 분해에 관여한다. 일반적으로 효소 작용을 받는 결합에 직접 관여하는 당의 종류와 입체 구조에 따라 특이성이 다른데, 말토오스포스포릴라아제나 셀로비오스포스포릴라아제와 같이 글루코실 공여체와 전이 생성물에서 아노머 구조의 역전을 일으키는 것도 있다. 비교적 에너지 준위가 높은 글리코시드 결합을 가진 당 또는 유도체(자당과 글리코실인산 등)를 공여체로 하는 것이 많고, 생체 내의 당류 생합성에서 작용한다. 전이기에 따라서 1) 트랜스글루코실라아제(글루코실 전이 효소) : 수크로오스포스포릴라아제(α-글루코실 전이 효소의 일종) 등, 2) 트랜스프룩토실라아제 : 레반수크라아제 등, 3) 트랜스리보실라아제 : 뉴클레오시드포스포릴라아제 등, 4) 트랜스글루쿠로닐라아제 : 우리딘이인산글루쿠론산 트랜스글루쿠로닐라아제 등으로 나뉜다.

[0004] 한국등록특허 제2167849호에 알파-1,6 당전이 효소를 활용한 글루코실 스테비오사이드 제조방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법을 제공하고, 본 발명의 제조방법으로 생산된 섬유소는 α-1,6 결합이 87%까지 증가하였고, 글루코스 중합도가 10을 초과하는 생성물의 비율이 79%까지 증가하였으며, 물에 대한 수용성이 증진되었다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 말토덱스트린에 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제(4,6αGT, 4,6-α-glucanotransferase)를 처리하여 당전이 반응을 유도하는 단계; 및

[0007] (2) 상기 단계 (1)의 당전이 반응 후에, 가수분해 효소를 첨가하여 α-1,4 결합의 비환원성 말단을 형성시켜 상기 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제에 의한 당전이 반응을 추가로 유도하는 단계;를 포함하는 고수용성 섬유소의 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 고수용성 섬유소를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 고수용성 섬유소를 포함하는 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제 및 알파-아밀라아제의 복합 효소반응을 이용하는 고수용성 섬유소의 제조 방법에 관한 것으로, 상세하게는 덱스트린을 기질로 하는 당전이 효소 및 가수분해 효소를 복합처리하여 고수용성 섬유소를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법으로 생산된 섬유소는 α-1,6 결합이 87%까지 증가하였고, 글루코스 중합도가 10을 초과하는 생성물의 비율이 79%까지 증가하였으며, 물에 대한 수용성이 증진된 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 당전이 효소(4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제) 및 가수분해 효소(알파-아밀라아제) 처리 시간 및 조건을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 제조방법의 조건에 따라 제조한 섬유소의 ^{1}H-NMR 분석결과이다. (a)는 당전이 반응에 사용한

기질인 말토덱스트린의 ^{1}H-NMR 분석결과이고, (b)는 당전이 효소 반응만 24시간 동안 수행한 후, 생성물의 ^{1}H-NMR 분석결과이며, (c)는 당전이 효소 반응만 72시간 동안 수행한 후, 생성물의 ^{1}H-NMR 분석결과이고, (d)는 당전이 효소 반응만 72시간 동안 수행한 후, 알파-아밀라아제 처리하여 추가로 당전이 반응을 수행한 후 생성물의 ^{1}H-NMR 분석결과이다.

도 3은 본 발명의 제조방법으로 제조된 반응산물(섬유소)의 중합도를 확인하기 위한 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석결과로, 도 1에서의 조건 A~G에 따른 결과이며, 상단의 G1~G9는 글루코스 중합도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 방법으로 제조된 72시간 반응산물의 α-1,4 결합, α-1,3 결합 및 α-1,6 결합의 비율을 ^{1}H-NMR 분석으로 확인한 결과이다. (a)는 5% G10의 기질을 사용한 경우이고, (b)는 20% G10의 기질을 사용한 경우이며, (c)는 30% G10의 기질을 사용한 경우이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 (1) 말토덱스트린에 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제(4,6αGT, 4,6-α-glucanotransferase)를 처리하여 당전이 반응을 유도하는 단계; 및

[0013] (2) 상기 단계 (1)의 당전이 반응 24~48시간 후에, 가수분해 효소를 첨가하여 α-1,4 결합의 비환원성 말단을 형성시켜 상기 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제에 의한 당전이 반응을 추가로 유도하는 단계;를 포함하는 고수용성 섬유소의 제조 방법에 관한 것이다.

[0014] 일반적으로, 알파-글루카노트랜스퍼라제는 공여분자의 비환원성 말단으로부터 수여분자의 비환원성 말단에 글루코오스 단위로 전이하는 효소로서 아밀로오스와 아밀로펙틴의 긴 가지들을 가수분해하고, 동시에 가수분해된 저분자의 글루칸을 α-1,4, α-1,6 결합으로 당전이하여 아밀로펙틴 가지들을 재구성시키는 효소이다.본 발명의 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제는 (1→4)-α-D-글루코-올리고사카라이드를 연속의 (α1→6) 글루코시드 결합을 가지는 선형의 α-글루칸을 생성할 수 있다. 상기 효소는 (1→4)-α-D-글루코-올리고사카라이드의 비환원성 글루코오스 성분을 절단하고, 이 글루코오스 성분을 다른 글루칸 체인의 비환원성 말단에 (α1→6) 결합으로 붙인다. 이러한 효소 반응을 반복하여 연속의 (α1→6) 결합을 가지는 α-글루칸을 생성할 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 상기 말토덱스트린은 글루코스 중합도가 2~20인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 상기 단계 (2)의 가수분해 효소는 알파-아밀라아제(α-amylase)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 4,6-알파-글루카노트랜스퍼라아제는 (1) 말토오스 결합 단백질 코딩 유전자와 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)에서 유래된 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[0018] (2) 상기 제조된 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계; 및

[0019] (3) 상기 형질전환된 대장균으로부터 말토오스 결합 단백질 융합 4,6-α-글루카노트랜스퍼라제 효소를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 제조방법으로 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 반응 온도는 37~42℃이고, 반응의 pH는 4.7~5.3인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 고수용성 섬유소에 관한 것이다.

[0022] 상기 고수용성 섬유소는 α-1,6 결합이 80% 이상, 바람직하게는 83~87%이고, 글루코오스 중합도가 10 이상인 것의 비율이 55~80%, 바람직하게는 77~79%이고, 물에 대한 용해도가 60~65%인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 고수용성 섬유소를 포함하는 식품에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 식품은 본 발명에서 제조된 고수용성 섬유소를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 또한, 상기 식품의 종류에는 특별히 제한하는 것을 아니지만, 상기 고수용성 섬유소를 이용하여 건강기능성식품, 건강식품 또는 건강보조식품을 제조할 수 있

다. 본 발명에서 건강식품 또는 건강보조식품은 영양 기능 외에도 생리활성 성분을 포함하여 생체조절 기능을 제공하는 식품을 의미한다.

[0025] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0026] **실시예 1. MBP(maltose binding protein)를 이용한 발현 및 정제**

[0027] 4,6αGT 단백질 크기는 101kD이며, 가용성 분획(soluble fraction)의 발현을 증가시키기 위해, MBP(maltose binding protein)를 발현하는 malE 유전자를 이용하여 가용성 분획에 발현되도록 하고, 아밀로스 친화성 크로마토그래피를 이용한 정제법을 사용해 정제도를 개선하였다. MBP를 발현하는 malE 유전자를 가진 pMAL_TEV_Xho I 벡터에서 Nde I 및 HindⅢ 제한효소 자리에 락토바실러스 루테리에서 유래한 4,6αGT 유전자를 서브클로닝하였다. 대장균을 숙주로 하여 LB 배지를 사용하여 37℃에서 OD 값이 0.6~0.8까지 배양한 후, 0.1mM의 IPTG를 첨가하고, 30℃에서 6시간 배양하였다. 배양 후 세포를 수확하여 파쇄한 후 원심분리하여 상층액을 획득하여 MBP와 융합된 단백질을 분리 정제하였다. 정제는 아밀로즈 레진(amylose resin)을 사용하여 만든 컬럼을 사용하여, MBP와 아밀로즈 간의 친화성을 이용하여 정제하였다. 아밀로즈 레진 1㎖을 컬럼에 넣고, 50mM Tris (pH7.5) 버퍼 5㎖을 흘려주어 안정화를 시켜준 후, 시료 5㎖을 로딩하고, 다시 50mM Tris(pH 7.5) 버퍼를 5㎖ 로딩해 세척해 주고, 50mM Tris에 10mM 말토스가 들어있는 용출용 버퍼를 5㎖ 로딩해 아밀로즈 레진에 붙어 있는 융합 단백질을 용출시켰다. 단백질의 크기는 142kD이며, 가용성 분획에 발현되었고, 이를 아밀로스 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0028] **실시예 2. 복합효소 처리를 통한 고수용성 섬유소의 생산**

[0029] 대상(주)에서 생산하는 PureDex라는 DE 10 말토덱스트린을 기질로 하여 4,6-αGT 반응을 수행하였다. 말토덱스트린은 전분에 비해 수용성이 높고, 고농도에서 점도가 낮아 효소반응이 용이하여 채택하였으며, 바람직하게는 엿당 이상의 중합도를 가지는 말토덱스트린을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 복합효소 처리의 효과를 확인하기 위하여, 하기와 같은 4가지 타입의 효소반응을 구성하였다.

[0031] ① 반응 1: 4,6-αGT 만 처리하는 경우,

[0032] ② 반응 2: 4,6-αGT 처리하여 반응 후 효소 불활성화시키고, 알파-아밀라아제 처리하는 경우,

[0033] ③ 반응 3: 4,6-αGT 처리하여 효소반응 후 효소 불활성화시키고, 알파-아밀라아제 처리한 후, 다시 4,6-αGT 처리하는 경우,

[0034] ④ 반응 4: 4,6-αGT 처리하여 효소반응 후 알파-아밀라아제 처리하는 경우로 나누어 실험하였고, 반응 결과를 비교하였다.

[0035] 반응 1은 기질로서의 30%(w/v) 말토덱스트린, 5mM의 염화칼슘 및 0.05%(w/v)의 아지드화나트륨(sodium azide)을 50mM의 아세트산 나트륨 완충용액(pH5.0)에 용해시켰다. 기질 1g당, 0.5U의 4,6-αGT를 처리하여 40℃에서 72시간 동안 당전이 반응을 유도하였다.

[0036] 반응 2는 반응 1 이후에, 상기 4,6-αGT를 불활성화시키기 위해 100℃에서 10분동안 멸균처리하고 반응 혼합물을 0.45㎛ 필터를 이용하여 정제하였다.

[0037] 이후, 가수분해 효소 Termamyl과 Novamyl의 알파-아밀라아제 각각 처리하여 40℃에서 pH5.0의 조건으로 가수분해하였다.

[0038] 반응 3은 상기 반응 2 이후에, 추가로 기질 1g당, 0.5U의 4,6-αGT를 처리하여 40℃에서 72시간 동안 당전이 반응을 유도하였다.

[0039] 반응 4는 기질로서의 30%(w/v) 말토덱스트린, 5mM의 염화칼슘 및 0.05%(w/v)의 아지드화나트륨(sodium azide)을 50mM의 아세트산 나트륨 완충용액(pH5.0)에 용해시켰다. 기질 1g당, 0.5U의 4,6-αGT를 처리하여 40℃에서 72시간 동안 당전이 반응을 유도하였으며, 도 1에 개시한 바와 같이, 반응초기, 24시간후 또는 48시간 후에 알파-아밀라아제 효소를 처리하여 동시에 당전이반응과 가수분해 반응을 복합적으로 수행하도록 하였다.

[0040] 그 결과, 하기 표 1에 개시한 바와 같이 ③ 4,6-αGT 처리하여 효소반응 후 효소 불활성화시키고, 알파-아밀라아제 처리한 후, 다시 4,6-αGT 처리하는 반응 결과와 ④ 4,6-αGT 처리하여 효소반응 후, 알파-아밀라아제 처

리하는 반응 결과에서 반응생성물의 α-1,6 결합 비율이 83~84%임을 ^{1}H-NMR 분석하여 확인하였다(도 2).

표 1

[0041] 조건 별 4,6-αGT 반응에 따라 생성된 알파글루칸의 비율

	α-1,4 결합 비율(%)	α-1,6 결합 비율(%)
기질(Puredex)	96	4.0
① 4,6-αGT 처리된 Puredex의 생성물	66	34.0
② 4,6-αGT 처리후 불활성화->알파-아밀라아제 처리된 Puredex의 생성물	36.1	63.9
③ 4,6-αGT 처리후 불활성화->알파-아밀라아제 처리 -> 4,6-αGT 처리된 Puredex의 생성물	16	84
④ 4,6-αGT 처리하여 효소반응 ->알파-아밀라아제 처리된 Puredex의 생성물	17.0	83.0

[0042] **실시예 3. 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석을 이용한 반응산물(섬유소)의 중합도 확인**

[0043] 반응 4에서, 반응산물의 중합도가 알파-아밀라아제를 반응 24~48시간 후에 처리하였을 때 최적의 효과가 있는 것으로 나타났으며, 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석을 통해, 당전이 반응을 유도하고 24시간 후에 알파-아밀라아제를 처리한 경우, 중합도가 2~9인 반응산물이 90% 이상 획득된 것을 확인하였고, 그 중 중합도가 4~9인 반응산물은 약 80% 수준으로 나타나 전체를 기준으로 할 때 약 72%가 중합도가 4~9인 반응산물을 획득한 것을 확인하였다(도 3).

[0044] **실시예 4. 글루코스 함량 측정**

[0045] 기질 중합도에 따른 개량된 4,6-α-글루카노트렌스퍼라제(4,6-α-GT)의 가수분해 활성을 측정하기 위하여, 말토테트라오스(maltotetraose; G4), 말토헥사오스(maltohexaose; G6), 말토옥타오스(maltooctaose; G8) 및 말코데카오스(maltodecaose; G10)를 기질로 사용하여 가수분해 반응을 수행하였다. 이후 불활성화된 반응물을 희석하고, 0.2㎛ 친수성 멤브레인 필터(hydrophilic membrane filter)를 이용하여 여과한 후, 고성능 음이온 교환 크로마토그래피로 분석하였다.

[0046] [고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석 조건]

[0047] 칼럼: CarboPac™ PA-1 칼럼(4×250 mm, Dionex) composed guard column (4× 50mm, Dionex)

[0048] 용리액: 0.15M NaOH 완충용액, 0.6 M NaOAc을 포함하는 0.15M NaOH

[0049] 시료 농도: 0.05mg/㎖

[0050] 유속: 1.0㎖/min

[0051] 주입량: 20㎕

[0052] 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석에서 얻은 크로마토그램에서 반응물과 표준 물질의 글루코스의 피크 면적을 각각 구해, 표준 물질의 글루코스 농도를 이용하여 반응물의 글루코스의 함량을 구하고, 반응 기질 대비 글루코스 생성량을 비교하였다.

[0053] 그 결과, 기질에 따른 글루코스 함량이 하기 표 3에 개시한 바와 같이 나타났다.

표 2

[0054] 기질농도에 따른 4,6-α-GT 가수분해 후의 글루코스 생성량

기질농도(%)		글루코스 생성량(mg/g 기질)		
		24h	48h	72h
G4	10%	194	204	206
	20%	178	180	168
	30%	152	172	184
G6	10%	102.9	105.9	109.9

	20%	68.4	74.1	80.3
	30%	68.0	66.1	62.9
G8	10%	144	138	158
	20%	100	100	90
	30%	98	100	88
G10	5%	132	120	136
	20%	102	96	88
	30%	68	82	62

[0055]

[0056] **실시예 4. 중합도 분포 측정**

[0057] 합성된 이소말토올리고당의 중합도 분포를 평가하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography; SEC)로 분석하였다. 이소말토올리고당 및 표준물질로 쓰인 G4, G6, G8, G10, G12을 물에 0.5mg/㎖의 농도가 되도록 용해시킨 후, 0.2㎛ 친수성 멤브레인 필터(hydrophilic membrane filter)에 여과하여 준비하였다.

[0058] [SEC 분석 조건]

[0059] 칼럼: YMC-Pack DIOL 60 column(4.6×300 mm)

[0060] 용리액: 물

[0061] Detector : refractive index (RI) detector

[0062] 시료 농도: 0.5mg/㎖

[0063] 유속: 0.3 ㎖/min

[0064] 주입량: 20㎕

[0065] SEC 분석 결과를 중합도(Degree of Polymerization DP)가 4 미만, DP 4 초과 DP 10 미만, DP 10 초과의 3가지 피크면적으로 분류하여 각각의 피크 면적을 이용하여 각 중합도 분포를 계산하였으며, 하기 표 4에 개시한 바와 같이 30% G10의 기질을 사용하는 경우, DP>10인 비율이 79%인 것으로 나타났다.

[0066] 중합도 분포(%)=각 피크 면적/전체 피크 면적×100

표 3

[0067] 기질 농도에 따른 중합도(%)

기질농도(%)		중합도(%)		
		DP>10	4<DP<10	DP<4
G4	10%	55.4	27.3	17.3
	20%	56.0	29.1	14.8
	30%	51.6	31.5	16.9
G6	10%	63.4	21.9	14.7
	20%	60.8	25.7	13.5
	30%	68.9	27.2	3.9
G8	10%	64.8	13.0	22.2
	20%	71.9	16.2	11.9
	30%	71.7	17.4	10.9
G10	5%	61.7	21.0	17.3
	20%	77.2	12.5	10.3
	30%	79.0	12.4	8.6

[0068] 한편, 각 생성물의 ^{1}H-NMR 분석 결과, α-1,4 결합이 95% 이상인 기질이 가수분해 반응 후, 생성물의 α-1,6 결합이 87%까지 증진된 것을 확인하였다. 5% G10의 기질을 사용한 경우 α-1,4 결합, α-1,3 결합 및 α-1,6 결합의 비율이 12:1:87으로 나타났고, 20% G10의 기질을 사용한 경우는 α-1,4 결합, α-1,3 결합 및 α-1,6 결합의 비율이 11:2:87으로 나타났으며, 30% G10의 기질을 사용한 경우는 α-1,4 결합, α-1,3 결합 및 α-1,6 결합의 비율이 13:2:85인 것으로 나타났다(도 4).

[0069]

[0070] **실시예 5. 페놀-황산법을 이용한 가용성 당의 함량 분석**

[0071] 본 발명의 방법에 따라 생성된 섬유소가 다른 조건으로 생성된 것에 비해 물에 대한 용해도가 현저하게 높다는 것을 확인하였다(표 4).

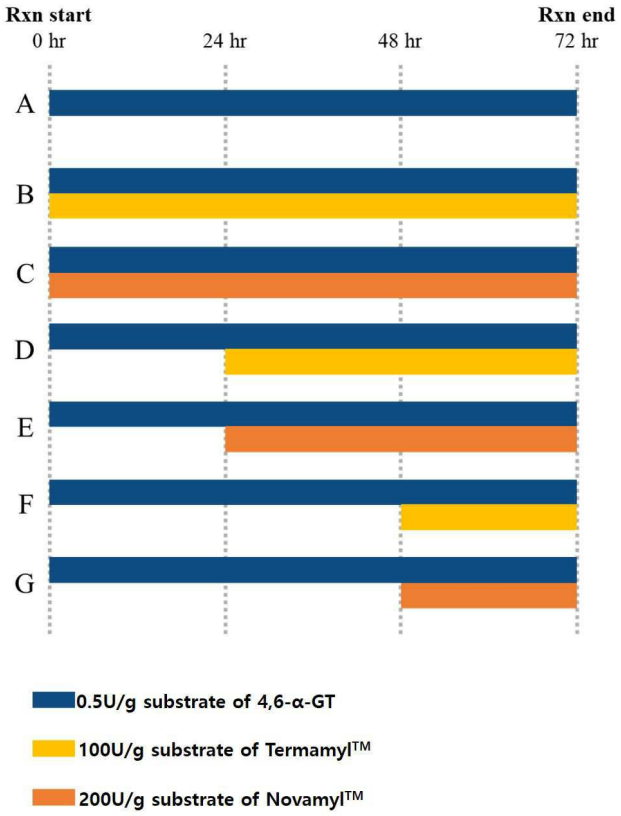
표 4

[0072] 덱스트린을 당전이 반응하여 생산한 섬유소의 물에 대한 용해도

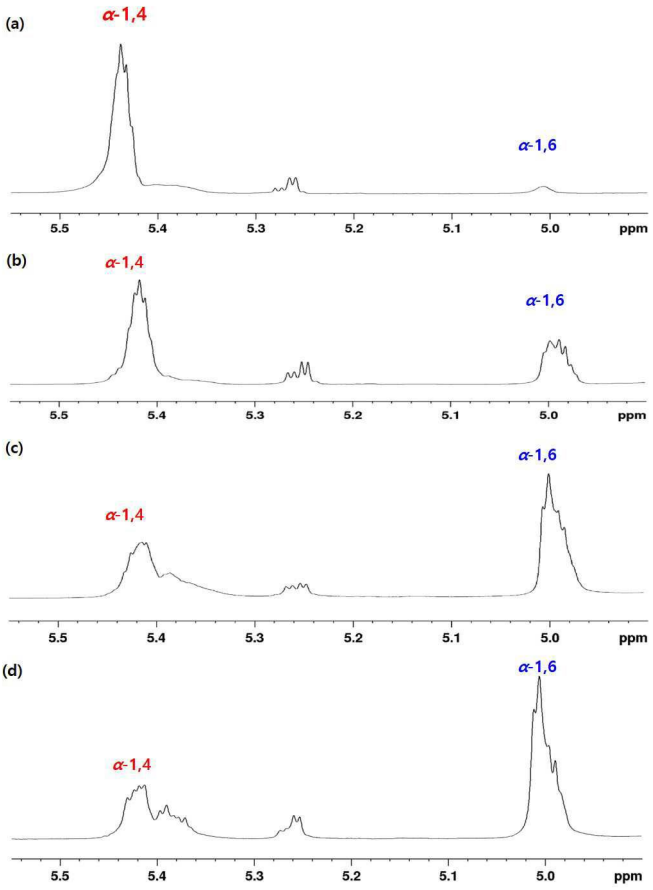
	물에 대한 용해도(%)
Puredex™(4.03%의 α-1,6)	25.2
① 4,6-αGT 처리(34.0%의 α-1,6)	38.4
② 4,6-αGT 처리후 불활성화->알파-아밀라아제 처리 (63.9%의 α-1,6)	52.0
④ 4,6-αGT 처리하여 효소반응 ->알파-아밀라아제 처리 (83.0%의 α-1,6)	62.9

도면

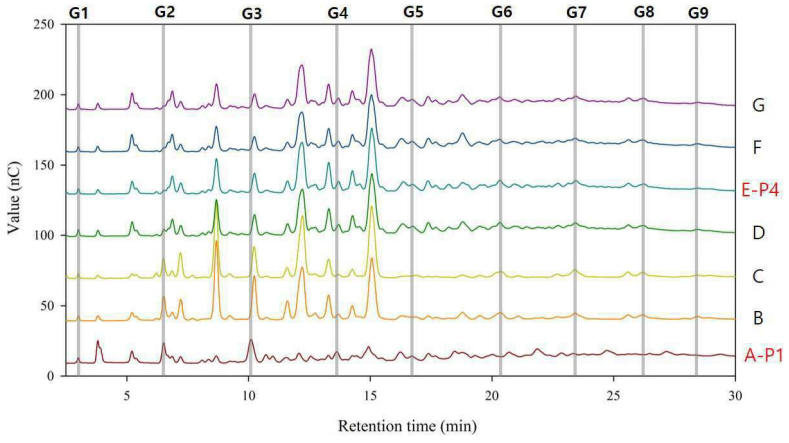
도면1



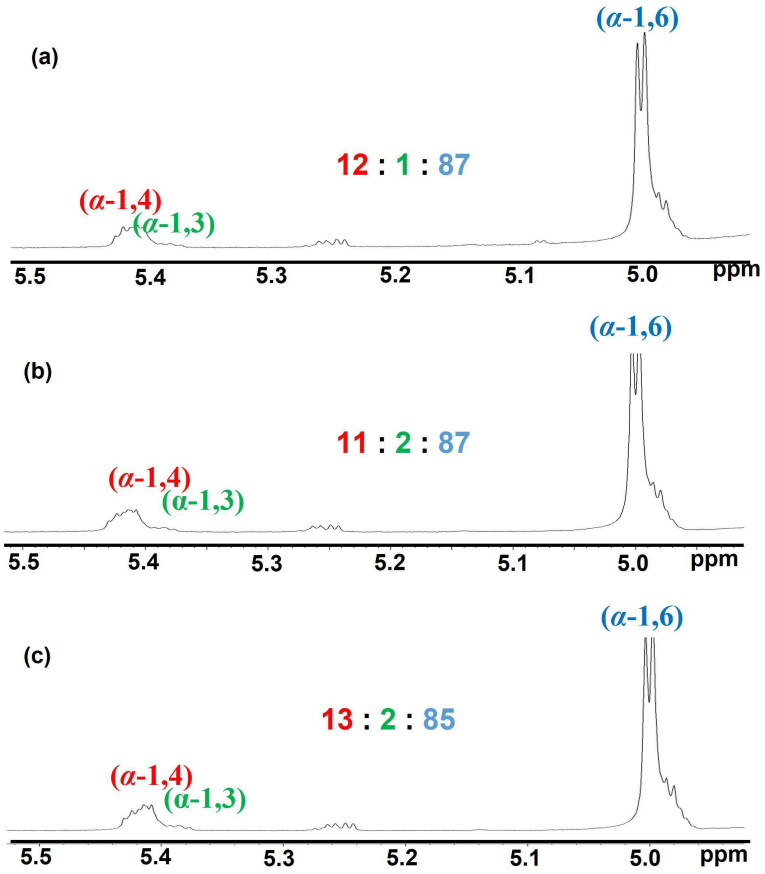
도면2


(a)
α-1,4
α-1,6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
ppm
(b)
α-1,4
α-1,6
(c)
α-1,6
α-1,4
(d)
α-1,6
α-1,4

도면3


G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
Value (nC)
Retention time (min)
G
F
E-P4
D
C
B
A-P1

도면4



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Method for producing high soluble cellulose using 4,6-alpha-glucanotransferase and alpha-amylase complex enzyme reaction

<130> PN21387

<150> KR 2020/0151441

<151> 2020-11-13

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 1

Met Gly Ile Asp Gly Lys Asn Tyr His Phe Ala Ser Asn Gly Gln Leu
1 5 10 15

Leu Gly Asn Leu Tyr Gly Lys Ile Val Asp Gly Lys Phe Asn Ile Tyr
20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asn Lys Leu Ile Lys Thr Leu Asp Ser Gly Asp Trp
35 40 45

Glu Asn Met Ala Tyr Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ile Asn Asn Thr Asp
50 55 60

Gly Tyr Leu Ser Tyr Ser Gly Trp Tyr Arg Pro Tyr Gly Thr Ser Gln
65 70 75 80

Asp Gly Lys Thr Trp Tyr Lys Thr Thr Ala Ser Asp Trp Arg Pro Leu

85 90 95

Leu Met Tyr Thr Trp Pro Ser Lys Asp Val Glu Ala Lys Phe Ile Lys
100 105 110

Tyr Phe Val Asp Asn Gly Tyr Thr Asn Thr Asp Tyr Gly Leu Thr Lys
115 120 125

Asp Asn Val Thr Asn Leu Ser Gln Asp Thr Asp Thr Gln Thr Leu Asn
130 135 140

Lys Tyr Ala Arg Asn Leu Arg Phe Val Ile Glu Lys Ser Ile Ala Ala
145 150 155 160

Asn Lys Ser Thr Gly Pro Leu Ala Asn Asp Ile Asn Lys Phe Met Leu
165 170 175

Thr Ile Pro Glu Leu Ser Ala Lys Ser Glu Leu Pro Val Glu Tyr Ser
180 185 190

Asn Gly Tyr Val Pro Asp Val Ser Gly Ser Ile Asp Asn Asn Gln Leu
195 200 205

Ile Phe Ile Asn Asn Asn Ser Asp Asn Gln Ala Lys Gly Asn Thr Ser
210 215 220

Tyr Ala Asp Ser Asn Tyr Arg Leu Met Asn Arg Thr Ile Asn Asn Gln

225 230 235 240

Thr Asn Asn Asp Asn Ser Asp Gln Ser Pro Glu Leu Leu Val Gly Asn
245 250 255

Asp Ile Asp Asn Ser Asn Pro Ala Val Gln Ala Glu Asn Phe Asn Trp
260 265 270

Glu Tyr Phe Leu Leu Asn Tyr Gly Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ala Asp
275 280 285

Gly Asn Phe Asp Gly Phe Arg Val Asp Ala Ala Asp Asn Ile Asp Ala
290 295 300

Asp Val Leu Asp Gln Leu Gly Gln Leu Val Asn Asp Met Tyr His Thr
305 310 315 320

Lys Gly Asn Gln Glu Asn Ala Asn Asn His Leu Val Tyr Asn Glu Gly
325 330 335

Tyr His Ser Gly Ala Ala Arg Met Leu Asn Asp Lys Gly Asn Pro Glu
340 345 350

Leu Phe Met Asp Ala Gly Tyr Phe Tyr Thr Leu Glu Asn Val Leu Gly
355 360 365

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

370 375 380

Val Val Asn Arg Ala Asn Asp Ile Thr Glu Asn Thr Ala Thr Pro Asn
385 390 395 400

Trp Ser Phe Val Thr Asn His Asp Gln Arg Lys Asn Val Ile Asn Gln
405 410 415

Ile Ile Ile Asp Asn His Pro Asn Ile Pro Asp Ile Met Ala Asn Ser
420 425 430

Tyr Lys Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Ala Trp Asp Glu Phe Tyr Ala Asp
435 440 445

Gln Ala Lys Ala Asp Lys Lys Tyr Ala Gln Tyr Asn Leu Pro Ala Gln
450 455 460

Tyr Ala Leu Leu Leu Ser Asn Lys Asp Thr Val Pro Gln Val Tyr Tyr
465 470 475 480

Gly Asp Leu Tyr Lys Glu Thr Asp Gln Tyr Met Lys Thr Lys Ser Met
485 490 495

Tyr Tyr Asp Ala Ile Thr Thr Leu Met Lys Ala Arg Gly Glu Phe Val
500 505 510
Asn Gly Gly Gln Thr Met Thr Lys Val Asn Asp Asn Leu Ile Thr Ser

515 520 525
Val Arg Tyr Gly Lys Gly Val Val Asp Val Ser Ser Asn Gly Thr Asp
530 535 540
Pro Leu Ser Arg Thr Thr Gly Met Ala Val Ile Val Gly Asn Asn Pro
545 550 555 560
Ser Met Ser Glu Gln Val Val Ala Ile Asn Met Gly Leu Ala His Ala
565 570 575
Asn Glu Gln Tyr Arg Asn Leu Ile Asp Ser Thr Ala Asp Gly Leu Thr
580 585 590

Tyr Asn Ser Asn Gly Ser Val Asn Pro Ser Val Leu Thr Thr Asp Ser
595 600 605
Lys Gly Ile Leu Arg Val Thr Val Lys Gly Tyr Ser Asn Pro Tyr Val
610 615 620
Ser Gly Tyr Leu Ser Val Trp Val Pro Leu Ile Asn Gly Thr Gln Asn
625 630 635 640
Ala Arg Thr Ser Ala Gln Glu Val Arg Asn Val Pro Gly Lys Val Phe
645 650 655
Thr Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser His Met Ile Tyr Glu Asp Phe Ser

660 665 670
Leu Phe Gln Pro Glu Pro Thr Thr Val Asn Glu His Ala Tyr Asn Val
675 680 685
Ile Lys Asp Asn Val Ala Leu Phe Asn Gln Leu Gly Ile Thr Asp Phe
690 695 700
Trp Met Ala Pro Ser Tyr Thr Pro Phe Asn Thr Ser Arg Tyr Asn Glu
705 710 715 720
Gly Tyr Ala Met Thr Asp Arg Tyr Asn Leu Gly Thr Ala Asp Asn Pro
725 730 735

Thr Lys Tyr Gly Asn Gly Glu Glu Leu Ser Asn Ala Ile Ala Ala Leu

740 745 750

His Gln Ala Gly Leu Lys Val Gln Glu Asp Leu Val Met Asn Gln Met

755 760 765

Ile Gly Phe Ser Thr Gln Glu Ala Val Thr Val Thr Arg Val Asp Arg

770 775 780

Asp Ala Lys Gln Leu Ser Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Asp Gln Ile

785 790 795 800

Tyr Phe Gly Tyr Thr Arg Gly Gly Gly Gln Gly Gln Gln Asp Tyr Gly

805 810 815

Gly Lys Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Gln Lys Tyr Pro Asp Leu Phe Thr

820 825 830

Thr Lys Ala Ala Ser Thr Gly Val Ala Pro Asp Pro Asn Thr Arg Ile

835 840 845

Thr Glu Trp Ser Ala Lys Tyr Glu Asn Gly Thr Ser Leu Gln Asn Val

850 855 860

Gly Ile Gly Leu Ala Val Lys Met Pro Asn Gly Tyr Tyr Ala Tyr Leu

865 870 875 880

Asn Asp Gly Asn Asn Lys Ala Phe Ala Thr Thr Leu Pro Asp Ala Ile

885 890 895

Ser Ser Ala Asp Tyr Tyr Ala Asn

900