(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0122513
(43) 공개일자 2016년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/18 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/18 (2013.01)
C12N 9/1074 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0052509
(22) 출원일자 2015년04월14일
심사청구일자 2015년04월14일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
심재훈
강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호 (석사동, 현진에버빌2차)
구예슬
서울특별시 강동구 양재대로 1340, 421동 1007호 (둔촌동, 주공아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

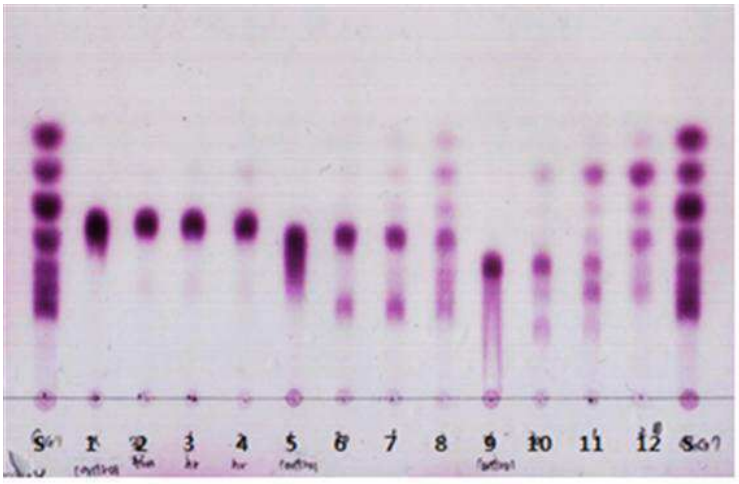
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **CGTase 변이효소를 이용한 α-사이클로덱스트린의 수득방법**

(57) 요 약

본 발명은 효소를 이용한 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD)의 수득방법에 관한 것으로, 본 발명의 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소를 이용할 경우, α-사이클로덱스트린,β-사이클로덱스트린, γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α-사이클로덱스트린만을 선택적으로 수득할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Y 204/01019 (2013.01)

(72) 발명자
김나리
인천광역시 서구 심곡로 135, 106동 403호 (심곡동, 대동아파트)
고담슬
강원도 동해시 청운1길 29, 17동 601호 (동회동, 현대아파트)
정우재
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1503호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin), β-사이클로덱스트린(β-cyclodextrin) 및 γ-사이클로덱스트린(γ-cyclodextrin)을 포함하는 혼합물에, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin)의 수득방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 반응은,

α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소를 첨가하여 β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 개환시키는 단계(A);

개환된 β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 가수분해시켜 글루코스(glucose)를 생성시키는 단계(B); 및

상기 혼합물로부터 단계 (B)를 통해 생성된 글루코스를 제거함으로써 α-사이클로덱스트린을 수득하는 단계(C);를 포함하는 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린의 수득방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 글루코스 생성을 위한 가수분해는,

α-글루코시다제를 사용하는 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린의 수득방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소는,

야생형 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈의 아미노산 서열 중 233번이 His에서 Tyr로 변형된 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린의 수득방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 반응은,

30~60℃에서 0.25~24시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린의 수득방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소를 이용한 α-사이클로덱스트린의 수득방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 변이효소를 이용해 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α-사이클로덱스트린만을 선택적으로 수득하는 방법이다.

배 경 기 술

[0002] α-사이클로덱스트린(cyclodextrin)은 α-1,4 공유결합으로 연결된 6개의 글루코오스 단위로 구성되는 비 환원성 당질의 환상(環狀) 구조이다. α-사이클로덱스트린은 유리 지방산 용해에 매우 효과적이며, 식이섬유 대신 지방과 복합체를 형성하는 특성을 보인다. 대부분의 식이섬유가 지방과 1:1의 비율로 복합체를 형성하나, α-사이클로덱스트린은 지방과 1:9 (fiber:fat)의 비율로 복합체를 형성한다.

[0003] 또한, α-사이클로덱스트린은 체내에서 생체 이용률을 감소시키고자 하는 식품 및 음료에 응용되고 있는데, 체중 조절, 지질 및 당 대사 개선 등의 목적으로 사용된다. 그외, α-사이클로덱스트린은 건조 혼합물, 구운 제품, 인스턴트 차, 커피와 같은 음식의 향, 색상, 감미료의 운반체로도 사용된다.

[0004] 한편, α-사이클로덱스트린은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 사용하여 전분으로부터 제조되는 것이 일반적인데, 이 반응에서는 α-사이클로덱스트린 외에 β-사이클로덱스트린, γ-사이클로덱스트린도 동시에 생산되는 문제가 있다. 따라서, 이들 β-사이클로덱스트린, γ-사이클로덱스트린로부터 α-사이클로덱스트린을 선택적으로 분리하는 공정이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-0136362호 (등록일자 1998. 01. 22)에는, 입자상을 갖는 변성전분 또는 일반 전분에서 선택된 기질을 녹인 전분액에 사이클로덱스트린 글루카노트란스퍼라제(Cyclodextrin glucanotransferase)를 작용시켜 사이클로덱스트린을 생성함에 있어서, 원심분리, 여과 등의 물리적 방법으로 미반응 전분을 제거시키는 기술이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록번호 제10-0898384호 (등록일자 2009. 05. 12)에는, 당전이효소인 설폴로버스 설파타리쿠스 유래 내열성 당전이효소를 이용하여, 말토오실-베타-사이클로덱스트린으로부터 수용성이 증가된 다이말토오실-베타-사이클로덱스트린을 제조하는 기술이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD)만을 효과적으로 수득하는 방법을 개발하여 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD), β-사이클로덱스트린(β-cyclodextrin, β-CD) 및 γ-사이클로덱스트린(γ-cyclodextrin, γ-CD)을 포함하는 혼합물에, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD)의 수득방법을 제공한다.

[0008] 야생형 CGTase의 경우, 전분 또는 전분의 가수분해물을 기질로 하여 α-, β-, γ-사이클로덱스트린

(cyclodextrin, CD)을 동시에 생산할 수 있다. 그런데, 이들로부터 α-사이클로덱스트린 만을 순수하게 분리하게 위해서는 β-, γ-사이클로덱스트린(cyclodextrin, CD)을 제거해야 한다. 하지만, 이들 β-, γ- 타입은 α-타입과 분자량이 동일하기 때문에 분리하기가 용이하지 않은 문제가 있다.

[0009] 한편, 본 발명의 서열번호 1에 기재된 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소는 야생형 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)의 아미노산 서열 중 233번이 His에서 Tyr로 변형된 것인데, α-타입을 개환시키지는 못하나, β-, γ- 타입은 개환시킬 수 있는 것으로 본 발명을 통해 확인되었다. 이는 곧 α-타입을 β-, γ- 타입으로부터 쉽게 분리할 수 있음을 의미한다. 즉, α-, β-, γ-사이클로덱스트린(cyclodextrin, CD)이 혼합되어 있는 혼합물에, 본 발명의 서열번호 1에 기재된 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 처리하면, β-, γ-타입은 개환되어, 선형 형태로 바뀌게 되고, 여기에 α-글루코시다제(α-glucosidase, AMG)를 처리하면, 이들 선형 형태의 β-, γ-타입은 단당류로 분해되기 때문에, 쉽게 제거할 수 있는 것이다.

[0010] 한편, 본 발명의 α-사이클로덱스트린의 수득방법에 있어서, 상기 반응은 바람직하게 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 개환시키는 단계 (A); 개환된 β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 가수분해시켜 글루코스(glucose)를 생성시키는 단계 (B); 및 상기 혼합물로부터 단계 (B)를 통해 생성된 글루코스를 제거함으로써 α-사이클로덱스트린을 수득하는 단계 (C);를 포함하는 과정으로 수행될 수 있다.

[0011] 한편, 본 발명의 α-사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 글루코스 생성을 위한 가수분해는 바람직하게 α-글루코시다제(α-glucosidase, AMG)를 사용하는 것이 좋다.

[0012] 한편, 본 발명의 α-사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 단계 (B)의 글루코스(glucose)의 분리는 일 예로, 글루코스와 α-사이클로덱스트린의 수용화도의 차이에 따른 분리방법을 이용할 수 있고, 분자량의 차이를 이용하는 방법을 이용할 수도 있다.

[0013] 한편, 본 발명의 α-사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 반응은 30~60℃에서 0.25~24시간 동안 반응을 수행하는 것이 좋다. 반응 후에는 바람직하게 가열함으로써 효소를 실활시켜 반응을 정지시키는 것이 좋다. 가열시 온도는 효소 실활 온도 이상으로 수행하면 된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에서와 같이 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소(CGTase)를 이용할 경우, α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD)만을 간편하게 특이적으로 수득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 CGTase 변이효소가 삽입된 벡터 맵이다.

도 2는 시그날 펩타이드 포함 CGTase 변이효소의 아미노산 서열이다.

도 3은 정제된 CGTase 변이효소의 전기영동 사진이다.

도 4은 CGTase 변이효소 3.81 μL(0.0148 unit, 1.8 mg/mL)를 이용한 α-CD, β-CD, γ-CD의 가수분해 후 TLC 결과 사진이다.

도 5는 CGTase 변이효소 7.62 μL(0.0296 unit, 1.78 mg/mL)를 이용하고, 도 1에 비해 장시간 가수분해 후, α-CD, β-CD, γ-CD의 TLC 사진이다.

도 6은 CGTase 변이효소를 이용한 α-CD, β-CD, γ-CD 혼합물의 가수분해에 따른 TLC 사진이다.

도 7은 도 6에서 얻은 CGTase 변이효소 가수분해 용액에 α-글루코시다제(α-glucosidase, AMG)를 처리한 처리구의 TLC 사진이다.

도 8은 'Sep-Pak C18컬럼'을 이용하여 CD 혼합물로부터 글루코스(glucose)를 제거하면서, α-CD를 분리하는 과정을 보여주는 TLC 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0017] **[제조예 1: 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소의 제조]**

[0018] 본 제조예에서는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 제조하고자 하였다.

[0019] 호알칼리성 바실러스 균(*Bacillus* sp.)Ⅰ-5로부터 유래한 CGTase 유전자의 특정부위변이(site-directed mutagenesis)를 위하여 하기 표 1의 프라이머들을 사용하였다. 돌연변이를 주기 위하여 원본 DNA(pR2CGT Ⅰ-5)에 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 95℃에서 2분 동안 1회 실시한 후, 95℃에서 30초, 53.5℃에서 45초, 72℃에서 7분을 30회 PCR을 실시하였다.

표 1

[0020]

정방향 프라이머(forward primer)	5'-GTC AAG TAT ACG CCA TTC GGC TGG-3'
역방향 프라이머(reverse primer)	5'-GTT CGT ATA CGG TAA GCC GAC CG-3'

[0021] 상기 반응이 끝난 후 PCR 산물을 벡터 (도 1)에 클로닝하고, $CaCl_2$법을 이용하여 대장균(*E. coli*) MC1016에 형질전환 하였다. 형질전환 유전자를 지니는 대장균 균주를 스크리닝(screening) 하기 위하여 앰피실린 (최종농도 100 ㎍/㎖)을 함유한 'LB agar' 배지에 평판 도말하여 내성을 지니는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 아미노산 서열 중 233번 아미노산이 His에서 Tyr로 변형된 상태인데, 서열번호 1과 같은 아미노산 서열을 갖는다(도 2 참조). 도 1은 CGTase 변이효소가 삽입된 벡터 맵이고, 도 2는 시그날 펩타이드 포함 CGTase 변이효소의 아미노산 서열이다.

[0022] 상기 선별된 균주를 1 L의 LB 배지에 접종하여 24시간 가량 37℃에서 교반(200 rpm)하여 키운 후, 원심분리기를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 다시 pH 6.0의 50 mM NaOAC 완충용액에 재부유(resuspension)한 후, 초음파로 세포파쇄를 실시하였다.

[0023] 세포파쇄로부터 수득된 조효소액을 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 이를 β-CD가 결합된 세파덱스 수지(sephadex resin)가 담긴 컬럼에 흡착시킨 후, 다시 1% β-CD를 포함하는 pH 6.0의 50 mM NaOAC 완충용액을 주입하는 'β-CD 친화 크로마토그래피법'으로 정제하여 CGTase 변이효소를 수득하였다 (도 3 참조). 도 3은 정제된 CGTase 변이효소의 전기영동 사진이다.

[0024] **[실시예 1: α-CD, β-CD, γ-CD 의 개환 실험 1 - 0.0148 unit 효소 역가 사용 15분~1시간 반응]**

[0025] 본 실험예에서는 상기에서 수득한 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소의 양과 반응 시간에 따라, β-CD 및 γ-CD가 반응(개환)하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0026] pH 6.0의 50 mM NaOAC 완충용액에, α-CD, β-CD, γ-CD (1%)과 상기 제조예 1에서 수득한 CGTase 변이효소 3.81 μL(0.0148 unit, 1.8 mg/mL)를 각각 넣고, 45℃에서 15분, 30분, 45분, 1시간 반응시킨 후, 5분간 끓여 반응을 정지하였다. 이후, TLC 분석을 실시하였다. 하기 표 2는 각 샘플별 처리 조건을 정리해서 보여준다. 본 실험예 및 하기 실험예에서 사용한 TLC의 전개용매 조건은 모두 'n-butanol:ethanol:water' (5:5:3, v/v/v)로 하였다.

표 2

[0027]

NO.	CGTase 변이효소	사이클로덱스트린	시간

lane 1	3.81 μL (0.0148 unit, 1.8 mg/mL)	α-CD 1%	대조군
lane 2			15분
lane 3			30분
lane 4			45분
lane 5			60분
lane 6		β-CD 1%	대조군
lane 7			15분
lane 8			30분
lane 9			45분
lane 10			60분
lane 11		γ-CD 1%	대조군
lane 12			15분
lane 13			30분
lane 14			45분
lane 15			60분

[0028] 개환된 CD는 개환되지 않은 CD에 비해 TLC 상에서 높게 나타나는데, 도 4에서 보는 바와 같이, γ-CD는 CGTase 변이효소에 의해서 개환됨이 명확히 확인되었고, β-CD 오랜 반응시간(60분)에서 개환됨이 미미하나마 확인되었다. 하지만, α-CD는 시간이 지나도 개환되지 않았다 (도 4).

[0029] 한편, 하기 실험에서는 CGTase 변이효소의 첨가량과 반응 시간을 더 증가시켜 더욱 명확한 실험 결과를 도출하고자 하였다.

[0030] **[실시예 2: α-CD, β-CD, γ-CD의 개환 실험 2 - 0.0296 unit 효소 역가 사용 0.5~2시간 반응]**

[0031] pH 6.0의 50 mM NaOAC 완충용액에, α-CD, β-CD, γ-CD(1%)과 상기 CGTase 변이효소 7.62 μL(0.0296 unit, 1.8 mg/mL)를 각각 넣고 45℃에서 0.5시간, 1시간, 2시간 반응시킨 후, 5분간 끓여 반응을 정지하여 TLC를 측정하였다. 하기 표 3은 각 샘플별 조건을 나타내었다.

표 3

[0032]

NO.	CGTase 변이효소	사이클로덱스트린	시간
lane 1	7.62 μL (0.0296 unit, 1.8 mg/mL)	α-CD 1%	대조군
lane 2			30분
lane 3			1시간
lane 4			2시간
lane 5		β-CD 1%	대조군
lane 6			30분
lane 7			1시간
lane 8			2시간
lane 9		γ-CD 1%	대조군
lane 10			30분
lane 11			1시간
lane 12			2시간

[0033] 실험결과, α-CD는 시간이 지나도 개환되지 않았고, β-CD는 초기에는 개환이 잘 되지 않았으나, 2시간 반응시 말토올리고당으로 개환됨을 명확히 확인할 수 있었다. 또한, γ-CD는 초기부터 개환이 잘 일어나는 것으로 확인되었다 (도 5). 이로부터, γ-CD>β-CD>α-CD 순으로 개환이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다 .

[0034] **[실시예 3: α-CD, β-CD 및 γ-CD이 혼합된 혼합물에서의 개환 실험 - 0.08779 unit 효소 사용 2~24시간 반응]**

[0035] pH 6.0의 50 mM NaOAC 완충용액에 α-CD, β-CD 및 γ-CD(1%) 혼합하여 혼합액(mixture)을 제조한 후, 상기

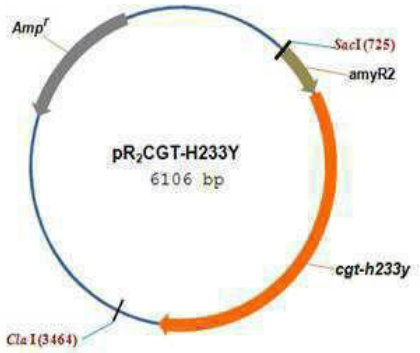
CGTase 변이효소 22.6 μL(0.0296 unit, 1.8 mg/mL)을 넣고, α-CD, β-CD 및 γ-CD(1%) 혼합액(mixture)을 45℃에서 2시간, 4시간, 16시간, 24시간 반응시킨 후, 5분간 끓여 반응을 정지하고 TLC 분석을 실시하였다. 실험결과, γ-CD는 2시간부터 분해되기 시작하여 24시간 때에는 완전히 분해된 것을 볼 수 있었으며, β-CD도 2시간부터 분해되기 시작하는 것을 볼 수 있었다 (도 6).

[0036] 한편, 상기 'α-CD, β-CD 및 γ-CD(1%) 혼합액(mixture)에 CGTase 변이효소를 처리한 용액 300 μL'에 버퍼(50mM, NaOAC, PH 4.5) 290 μL, α-글루코시다제(α-glucosidase, AMG, 10 unit) 10 μL를 더 혼합하여 60℃에서 반응 후, TLC로 분석하였다. 실험결과, α-CD 외 나머지는 소당류로 잘린 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

[0037] 한편, 상기 「'α-CD, β-CD 및 γ-CD(1%) 혼합액(mixture)에 CGTase 변이효소를 처리한 용액 300 μL'에 버퍼(50mM, NaOAC, PH 4.5) 290 μL, α-글루코시다제(α-glucosidase, AMG, 10 unit) 10 μL를 더 혼합하여 60℃에서 반응시킨 반응물」을 농축하여 'Sep-Pak C18 컬럼'에 주입하고, 증류수와 메탄올 순으로 세척하였다. 세척 후, 용출된 물질을 'Speed-Vac'으로 감압농축하고, TLC 분석을 수행하였다. 실험결과, 증류수 세척을 통해, 수용성이 높은 글루코스(glucose)를 씻겨 내고, 메탄올로 용출하여 α-CD를 선택적으로 수득할 수 있었다 (도 8).

도면

도면1

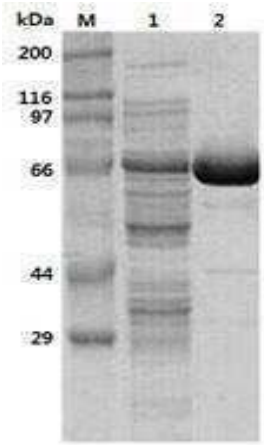


도면2

MKRFMKLTAVWTLWLSLTLGLLSPVHAAPDTSVSNKQNFSTDVIYQIFTDRFSDGNPANNPTGAAFDGSC
TNLRLYCGGDWQGIINKINDGYLTGMGITAIWISQPVENIYSVINYSGVHNTAYHGYWARDFKKTNPAYGT
MQDFKNLIDTAHAHNIKVIIDFAPNHTSPASSDDPSFAENGRLYDNGNLLGGYTNDTQNLFHHYGGTDFST
IENGIYKNLYDLADLNHNNSSVDVYLKDAIKMWLDLGVDGIRVDAVKYMPFGWQKSFMSTINNYKPVFTF
GEWFLGVNEISPEYHQFANESGMSLLDFRFAQKARQVFRDNTDNMYGLKAMLEGSEVDYAQVNDQVTFI
DNHDMERFHTSNGDRRKLEQALAFTLTSRGVPAIYYGSEQYMSGGNDPDNRARIPSFSTTTTAYQVIQKL
APLRKSNPAIAYGSTQERWINNDVIIYERKFGNNVAVVAINRNMNTPASITGLVTSLPQGSYNDVLGGILNG
NTLTVGAGGAASNFTLAPGGTAVWQYTTDATAPIIGNVGPMMAKPGVTITIDGRASARQGTVYFGTTAV
TGADIVAWEDTQIQVKILRVPGGIYDIRVANAAGAASNIYDNFEVLTGDQVTVRFVINNATTALGQNVFLT
GNVSELGNWDPNNAIGPMYNQVVYQYPTWYYDVSVPAGQTIEFKFLKKQGSTVTWEGGANRTFTTPTS
GTATVNVNWQP

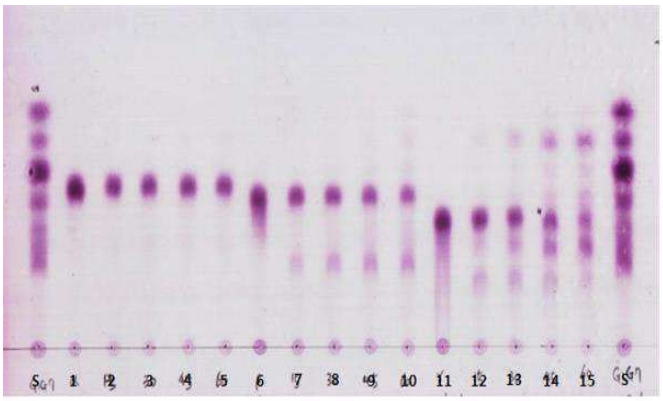
*중간에 붉은색의 233번Y(Tyr)가 변이된 아미노산임. 밑줄친 부분은 signal peptide 부위로서, 발현 이후 세포막을 통과하는 동안 제거가 되는 부위이므로 염기서열 순서에서 제외됨

도면3



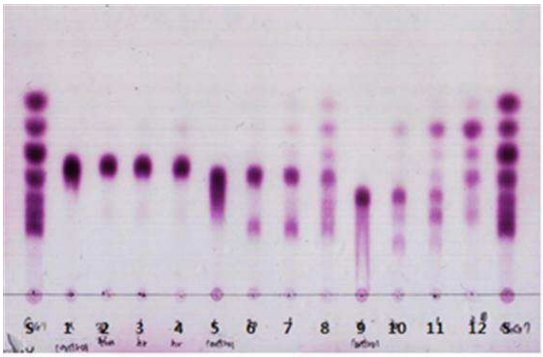
M : Size marker
1 : 세포파쇄액
2 : 정제된 CGTase 변이효소

도면4



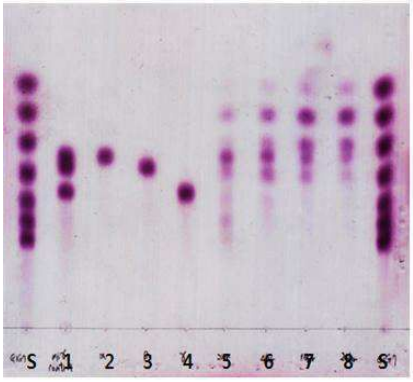
S: G1G7 (0.3%)
Lane1: H233Y α control
Lane2: H233Y α 15 min
Lane3: H233Y α 30 min
Lane4: H233Y α 45 min
Lane5: H233Y α 60 min
Lane6: H233Y β control
Lane7: H233Y β 15 min
Lane8: H233Y β 30 min
Lane9: H233Y β 45 min
Lane10: H233Y β 60 min
Lane11: H233Y γ control
Lane12: H233Y γ 15 min
Lane13: H233Y γ 30 min
Lane14: H233Y γ 45 min
Lane15: H233Y γ 60 min
S: G1G7 (0.3%)

도면5



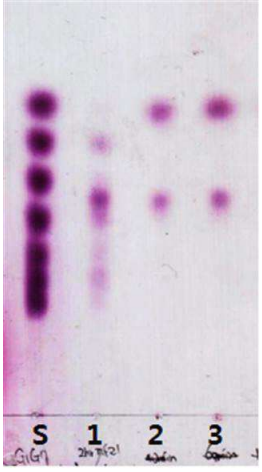
S: G1G7 (0.3%)
Lane1: H233Y α control
Lane2: H233Y α 30 min
Lane3: H233Y α 1 hr
Lane4: H233Y α 2hr
Lane5: H233Y β control
Lane6: H233Y β 30 min
Lane7: H233Y β 1 hr
Lane8: H233Y β 2 hr
Lane9: H233Y γ control
Lane10: H233Y γ 30 min
Lane11: H233Y γ 1 hr
Lane12: H233Y γ 2 hr
S: G1G7 (0.3%)

도면6



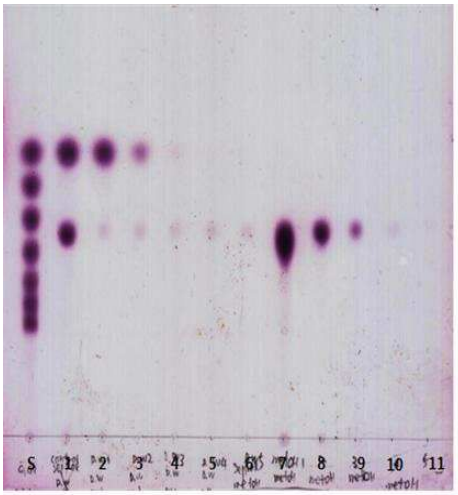
S: G1G7 (0.3%)
Lane1: αβγ control
Lane2: α-CD
Lane3: β-CD
Lane4: γ-CD
Lane5: H233Y αβγ 2 hr
Lane6: H233Y αβγ 4 hr
Lane7: H233Y αβγ 16 hr
Lane8: H233Y αβγ 24 hr
S: G1G7 (0.3%)

도면7



S: G1G7 (0.3%)
Lane1: α,β,γ-mixture 2hr control
Lane2: α,β,γ-mixture 2hr 20min
Lane3: α,β,γ-mixture 2hr 120min

도면8



S: G1G7 0.3%
Lane1: D.W 1st
Lane2: D.W 2nd
Lane3: D.W 3rd
Lane4: D.W 4th
Lane5: D.W 5th
Lane6: metOH 1st
Lane7: metOH 2nd
Lane8: metOH 3rd
Lane9: metOH 4th
Lane10: metOH 5th

서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Method for production of alpha-cyclodextrin with CGTase mutant

<130> AP-2015-0052

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> Bacillus sp. 1-5

<400> 1

Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Ile Phe Thr Asp Arg Phe Ser Asp Gly Asn Pro Ala Asn
20 25 30

Asn Pro Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Ser Cys Thr Asn Leu Arg Leu
35 40 45

Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly
50 55 60

Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val
65 70 75 80

Glu Asn Ile Tyr Ser Val Ile Asn Tyr Ser Gly Val His Asn Thr Ala
85 90 95

Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Ala Tyr

100 105 110

Gly Thr Met Gln Asp Phe Lys Asn Leu Ile Asp Thr Ala His Ala His
115 120 125

Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala
130 135 140

Ser Ser Asp Asp Pro Ser Phe Ala Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn
145 150 155 160

Gly Asn Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Gln Asn Leu Phe His
165 170 175

His Tyr Gly Gly Thr Asp Phe Ser Thr Ile Glu Asn Gly Ile Tyr Lys
180 185 190

Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Ser Val Asp

195 200 205

Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ile Lys Met Trp Leu Asp Leu Gly Val Asp

210 215 220

Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Lys Tyr Met Pro Phe Gly Trp Gln Lys

225 230 235 240

Ser Phe Met Ser Thr Ile Asn Asn Tyr Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly

245 250 255

Glu Trp Phe Leu Gly Val Asn Glu Ile Ser Pro Glu Tyr His Gln Phe

260 265 270

Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Ala Gln Lys

275 280 285

Ala Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr Asp Asn Met Tyr Gly Leu Lys

290 295 300

Ala Met Leu Glu Gly Ser Glu Val Asp Tyr Ala Gln Val Asn Asp Gln

305 310 315 320

Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Glu Arg Phe His Thr Ser Asn

325 330 335

Gly Asp Arg Arg Lys Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser

340 345 350

Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Tyr Met Ser Gly

355 360 365

Gly Asn Asp Pro Asp Asn Arg Ala Arg Ile Pro Ser Phe Ser Thr Thr

370 375 380

Thr Thr Ala Tyr Gln Val Ile Gln Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser

385 390 395 400

Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Glu Arg Trp Ile Asn Asn

405 410 415

Asp Val Ile Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Asn Asn Val Ala Val Val

420 425 430

Ala Ile Asn Arg Asn Met Asn Thr Pro Ala Ser Ile Thr Gly Leu Val

435 440 445

Thr Ser Leu Pro Gln Gly Ser Tyr Asn Asp Val Leu Gly Gly Ile Leu

450 455 460

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

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

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

675 680 685