



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0068678
(43) 공개일자 2011년06월22일

(51) Int. Cl.
C12P 19/12 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0125745
(22) 출원일자 2009년12월16일
심사청구일자 2009년12월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내
(72) 발명자
박천석
경기도 성남시 분당구 수내동 양지마을한양아파트 521동 503호
서동호
충청북도 청주시 흥덕구 개신동 650번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

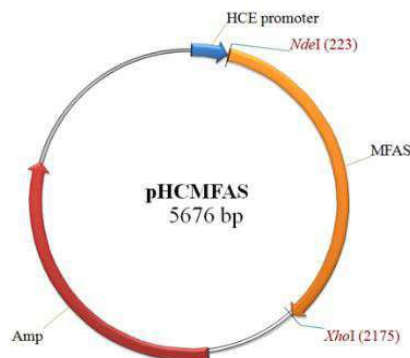
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 효소적 방법에 의한 설탕으로부터 트레할로오스를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 아밀로수크라아제(amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(maltoooligosyltrehalose synthase); 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(maltoooligosyltrehalose Trehalohydrolase)를 이용하거나, 아밀로수크라아제 및 말토올리고실트레할로오스 합성효소와 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제가 융합되어 제조된 트레할로오스 합성효소를 이용한 설탕으로부터 트레할로오스(trehalose)를 제조하는 방법에 관한 것으로, 효소적 합성법에서 사용되는 종래의 기질인 전분 및 전분 가수분해물에 비해 상대적으로 저렴한 설탕을 기질로 사용하기 때문에 트레할로오스를 상대적으로 경제성 있게 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정종현

서울특별시 강서구 가양2동 가양아파트 402-504호

하석진

경기도 수원시 권선구 호매실동 목화빌라 11동 20
2호

김정호

충북 청주시 흥덕구 산남동 계룡리슈빌아파트 106
동 502호

김희항

경기도 수원시 영통구 영통동 1014-3번지 303호

특허청구의 범위

청구항 1

설탕을 기질로 포함하는 반응액에,

설탕으로부터 α -1,4 결합의 아밀로오스(amylose)를 합성 또는 신장시킬 수 있는 아밀로수크라아제(amylosucrase);

생성된 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스(trehalose)로 만드는 말토올리고실트레할로오스 합성효소(maltooligosyltrehalose synthase); 및

합성된 트레할로오스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase);를 첨가하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 트레할로오스 제조방법은,

아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 반응을 유도한 후,

말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 순차적으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법

청구항 3

설탕을 기질로 포함하는 반응액에,

설탕으로부터 α -1,4 결합의 아밀로오스(amylose)를 합성 또는 신장시킬 수 있는 아밀로수크라아제(amylosucrase); 및,

생성된 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스(trehalose)로 만드는 말토올리고실트레할로오스 합성효소(maltooligosyltrehalose synthase)와 합성된 트레할로오스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase)가 융합되어 제조된 트레할로오스 합성효소;를 첨가하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 트레할로오스 제조방법은,

아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 반응을 유도한 후,

트레할로오스 합성효소를 순차적으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 아밀로수크라아제는,

메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 트레할로오스의

제조방법

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는, 브레비박테리움 헬보룸(*Brevibacterium helvolum*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 트레할로오스 제조방법

명세서

발명의 상세한 설명

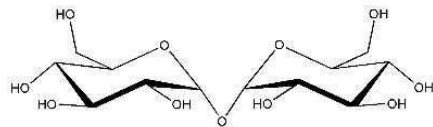
기술분야

[0001] 본 발명은 트레할로오스를 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 효소적 방법에 의해 설탕으로부터 트레할로오스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 트레할로오스(trehalose)는 하기 화학식 1에서 보는 바와 같이 포도당(glucose) 두 분자가 1, 1 결합을 이루고 있는 비환원성 이당류로서, 식물뿐만 아니라 미생물에도 많이 존재하는 물질이다.

화학식 1



[0003]

[0004] 트레할로오스는 수분 유지 작용이 있어, 화장품, 식품 및 의약품 등의 광범위한 분야에서 각광을 받고 있다. 하지만 현재까지 경제적이고 효율적인 트레할로오스의 제조 방법이 구축되지 않아 광범위한 활용이 제한되고 있는 상황이다.

[0005] 한편, 기존의 트레할로오스 합성 방법은 말토올리고실트레할로오스 합성효소(maltooligosyltrehalose synthase)를 사용하여 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스로 만든 후, 합성된 트레할로오스를 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase)를 이용하여 가수분해하는 방법이 있다.

[0006] 또한, 말토오스를 원료로 하고 말토오스-트레할로오스 전환효소를 사용하여 트레할로오스를 생산하는 방법이 보고되어 있다.

[0007] 그런데, 상기의 방법들은 기질로 아밀로오스 또는 말토오스를 사용함으로 말미암아 상대적으로 높은 비용이 요구되는 등의 문제점을 안고 있다.

[0008] 따라서, 비교적 저렴한 기질을 사용하여 트레할로오스를 생산하는 방법의 개발이 요구되는 것이다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

[0009] 이에 본 발명은 효소적 방법에 의해 상대적으로 저렴한 기질로부터 트레할로오스를 생산하는 방법을 개발하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 제1형태로서, 설탕을 기질로 포함하는 반응액에, 설탕으로부터 α -1,4 결합의 아밀로오스(amylose)를 합성 또는 신장시킬 수 있는 아밀로수크라아제(amylosucrase); 생성된 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스(trehalose)로 만드는 말토올리고실트레할로오스 합성효소(maltooligosyltrehalose synthase); 및 합성된 트레할로오스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase);를 첨가하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 제1형태는 설탕으로부터 트레할로오스를 제조할 수 있는 기술을 제공하는데, 설탕을 분해하기 위해 아밀로수크라아제를 사용한다. 아밀로수크라아제는 설탕을 기질로 사용하여 포도당과 과당으로 가수분해하고, 생성된 포도당을 이용하여 알파-1,4-결합의 아밀로오스를 형성한다. 또한, 아밀로수크라아제는 기 존재하는 알파-1,4-결합을 신장시킬 수도 있기 때문에, 바람직하게 반응액에 아밀로오스를 첨가해 주는 것도 좋다. 설탕으로 분해된 포도당을 받아 줄 수 있는 수용체로 알파-1,4-결합이 반응액 중에 기 존재하면 반응속도가 한층 향상될 수 있다.
- [0012] 한편, 상기 아밀로수크라아제의 작용에 의해 생성된 알파-1,4-결합의 아밀로오스의 말단에 존재하는 말토오스 단위는 말토올리고실트레할로오스 합성효소에 의해 트레할로오스로 변환되고, 이어 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제에 의해 가수분해되어 반응액 중에 트레할로오스로 분리된다. 생성된 트레할로오스는 반응액으로부터 바람직하게 크로마토그래피 방법 등을 통해 분리됨으로써 최종 정제될 수 있다.
- [0013] 한편, 상기 본 발명의 제1형태는 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 동시에 첨가하여 반응을 유도할 수 있고, 아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 반응을 유도한 후, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 순차적으로 첨가하여 반응을 유도할 수도 있다.
- [0014] 한편, 본 발명은 제2형태로서 설탕을 기질로 포함하는 반응액에, 설탕으로부터 α -1,4 결합의 아밀로오스를 합성 또는 신장시킬 수 있는 아밀로수크라아제; 및, 생성된 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스로 만드는 말토올리고실트레할로오스 합성효소와 합성된 트레할로오스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제가 융합되어 제조된 트레할로오스 합성효소;를 첨가하여 효소반응시키는 것을 특징으로 하는 트레할로오스의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 제2형태는 제1형태와 비교하여 트레할로오스 합성효소를 특징적으로 사용하는데, 이 효소는 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로오스로 만드는 말토올리고실트레할로오스 합성효소와 합성된 트레할로오스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제의 기능을 동시에 발휘한다. (Trehalose Synthesis by Sequential Reactions of Recombinant Maltooligosyltrehalose Synthase and Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2000, p. 4620~4624).
- [0016] 트레할로오스 합성효소는 상기 논문에 기재된 바와 같이 유전공학적 기술을 이용하여 두 효소가 하나로 융합된 융합효소로서, 하나의 효소에 의해 두 개의 반응을 촉매할 수 있는 장점이 있다.
- [0017] 한편, 아밀로스 전분 가수분해 산물로부터 트레할로오스를 만드는 경우, 융합된 트레할로오스 합성효소를 이용하는 것이 말토올리고실트레할로오스 합성효소와 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 각각 사용하는 것과 비교하여 생산량에는 큰 차이가 없다는 보고가 있다.
- [0018] 한편, 본 발명의 제2형태는 아밀로수크라아제와 트레할로오스 합성효소를 동시에 첨가하여 반응을 유도할 수 있고, 아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 반응을 유도한 후, 트레할로오스 합성효소를 순차적으로 첨가하여 반응을 유도할 수도 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 제2형태에 있어, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 일 예로 브레비박테리움 헬보룸(*Brevibacterium helvolum*)로부터 유래한 것을 사용할 수 있다.
- [0020] 한편, 본 발명의 제1형태 또는 제2형태에 있어, 아밀로수크라아제는 일 예로 메틸로바실러스 플라켈라투스

(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 것을 사용할 수 있다.

효 과

본 발명의 트레할로오스 제조방법은 효소적 합성법에서 사용되는 종래의 기질인 전분 및 전분 가수분해물에 비해 상대적으로 저렴한 설탕을 기질로 사용하기 때문에 트레할로오스를 상대적으로 경제성 있게 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

제조예 1: 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 아밀로수크라아제(amylosucrase)의 클로닝 및 정제

본 제조예에서는 하기 실시예에서 사용될 아밀로수크라아제를 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 클로닝하고자 하였다.

메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)의 염색체 유전자를 주형 DNA로 하여, 표 1과 같은 서열을 가지는 정방향 프라이머 pHCMFAS1 및 역방향 프라이머 pHCMFAS2을 설계한 후, 표 2에 기재된 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다.

표 1

PCR에 사용된 프라이머

명칭	유전자서열	비고
pHCMFAS1	5'-CATATGTACGAACAAGTCTCCCACTCG-3'	정방향 프라이머
pHCMFAS2	5'-CTCGAGAAGCTGTAACCAATAAAAGCC-3'	역방향 프라이머

표 2

PCR 조건

변성 (denaturation)	사전 변성(pre-denaturation)	95/ 5 min	
증폭 (amplification)	변성(denaturation)	95/ 0.5 min	30 회
	결합(annealing)	55/ 0.5 min	
	확장(extension)	68/ 2.5 min	
최종 확장 (final extension)	최종 확장(final extension)	72/ 5 min	

상기의 PCR을 통해 수득한 약 1.9 kb의 PCR 산물을 pGEM-T Easy 벡터와 함께 접합(ligation)하여 pGEM-T-MFAS를 제조하였다. 이후, 시퀀싱을 통하여 약 1.9 kb의 PCR 산물이 서열번호 1의 핵산 서열을 갖고, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가짐을 확인할 수 있었다.

이어서, 상기에서 클로닝된 아밀로수크라아제를 정제하고자 하였다.

먼저, 상기에서 제조한 pGEM-T-MFAS를 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I로 처리하고, 수득된 약 1.9 kbp 길이의 조

각을 아가로스 전기영동을 통해 분리한 후, 동일한 제한 효소로 처리한 pHCEXHD 발현벡터(His tag 포함 벡터)와 함께 라이게이션하여, pH-MFAS를 제조하였다.

[0031] pH-MFAS의 재조합 벡터의 개열지도는 도 1과 같았다. 도 1에 나타난 바와 같이, 재조합 벡터 pH-MFAS는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 포함하고 있으며, 서열번호 1의 3' 말단에 6개의 부가적인 아미노산 잔기(6-His)를 포함하고 있고, 앰피실린 내성유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하고 있다.

[0032] 한편, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질을 대량 생산하기 위하여, 상기 재조합 벡터 pH-MFAS로 형질전환된 대장균(*E. coli*) MC1061를 제조하였다. 이 후, 형질전환된 대장균을 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다.

[0033] 한편, His-tag(히스-태그)가 결합된 재조합 단백질을 정제하기 위해, 상기에서 형질전환 대장균(*E. coli*) MC1061를 37℃에서 15시간 배양하였다. 배양 후, 4℃ 및 4,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리를 수행하여 균체를 회수하였다. 이 후, 라이시스 버퍼(Lysis buffer) [50mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 7.0]에 현탁하고, 초음파 분쇄하였다.

[0034] 이 후, 상기 초음파를 이용하여 분쇄한 분쇄액을 4℃ 및 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리를 수행한 후, 상등액을 수득하였다. 상기 상등액을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 주입하여, 재조합 단백질을 정제하였으며, 이에 대한 전기영동 사진을 도 2에 나타내었다.

[0035] 도 2에 나타난 바와 같이, 정제된 재조합 단백질은 분자량이 아밀로수크라아제의 이론값과 일치하는 약 75kDa의 분자량을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0036] 실시예 1: 본 발명 효소들의 동시 첨가에 의한 트레할로오스의 제조 및 정제

[0037] 트레할로오스의 제조를 위해 사용된 설당은 시그마(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 설당 50 g/L를 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.0)에 혼합한 후, 상기 제조에 1에서 제조한 재조합 아밀로수크라아제 효소 0.29 mg 과 재조합 트레할로오스 합성효소 0.11 mg 을 첨가하고 37℃에서 24시간 동안 함께 반응시켰다. 반응 후 5분 동안 용액을 끓이고, 왓트만 여지를 이용하여 여과하였다. 이 후, 하기 실험예에서 반응생성물을 분석하였다.

[0038] 한편, 트레할로오스 합성효소는 김 등으로부터 분양을 받아 사용하였다. (Trehalose Synthesis by Sequential Reactions of Recombinant Maltooligosyltrehalose Synthase and Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2000, p. 4620~4624)

[0039]

[0040] 실시예 2: 본 발명 효소들의 순차적 첨가에 의한 트레할로오스의 제조 및 정제

[0041] 트레할로오스의 제조를 위해 사용된 설당은 시그마(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 설당 50 g/L를 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.0)에 혼합한 후, 상기 제조에 1에서 제조한 재조합 아밀로수크라아제 효소 0.29 mg 을 첨가하고 37℃에서 12시간 동안 반응시킨 후, 다시 재조합 트레할로오스 합성 효소 0.11 mg 을 첨가하고 37℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5분 동안 용액을 끓이고, 왓트만 여지를 이용하여 여과하였다. 이후, 하기 실험예에서 반응생성물을 분석하였다.

[0042] 한편, 트레할로오스 합성효소는 상기의 실시예 1과 마찬가지로 김 등으로부터 분양을 받아 사용하였다.

[0043] 실험예 1: 박막크로마토그래피를 이용한 반응생성물의 분석

[0044] 실시예 1의 반응에서 얻어진 반응생성물을 분석하기 위해서 박막크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 수행하였다.

[0045] 구체적으로 실시예 1의 반응생성물을 Whatman K5F TLC 플레이트(20 cm × 20 cm)에 1 μl씩 로딩하여 n-부탄올:피리딘:증류수=7 : 3 : 1 전개액에서 전개시켰다. 전개 후에 플레이트를 잘 건조시켜 메탄올에 0.3 % (w/v) N-(1-나프틸)-에틸렌디아민과 5 % (v/v) 황산을 용해시킨 발색액에 담갔다가 꺼낸 후 110℃ 오븐에서 10

분 동안 발색시켰으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3에서 보는 바와 같이 실시예 1의 반응물을 로딩한 5번 샘플에서 트레할로오스의 생성이 확인되었다.

실험예 2; 고성능음이온액체크로마토그래피를 이용한 반응생성물의 분석

실시예 1의 반응에서 얻어진 반응생성물을 분석하기 위해서 고성능음이온액체크로마토그래피를 수행하였다.

실시예 1의 반응생성물을 0.20 μ m 박막여과지로 여과하여 50 μ l를 주입하였고, 유속은 1.0 ml/분으로 하여 분석하였다. HPAEC 분석은 다이오넥스(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)의 GS50 그라디언트 펌프와 ED40 검출기 및 PA-100 컬럼을 이용하여 시행하였으며, 용매는 A 용액(100 mM NaOH), B 용액(100 mM NaOH + 500 mM Sodium acetate)을 사용하여 표 3과 같은 조건으로 분석하였다.

표 3

시간에 따른 용매 구배

시간 (min)	구배(%)	
	A	B
0	100	0
25	85	15
26	0	100
35	0	100
35.1	100	0
40	100	0

도 4에서 보듯이, 실시예 1의 반응물에서 설탕으로부터 트레할로오스가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 도 4에서 1)번 그림은 설탕(sucrase)과 아밀로수크라아제(도에서 'MFAS'로 표시) 만을 반응시킨 결과이고, 2)번 그림은 설탕에 아밀로수크라아제와 트레할로오스 합성효소(도에서 'MTSH'로 표시)를 모두 반응시킨 결과이다.

또한, 도 5에서 보듯이 실시예 1뿐만 아니라 두 가지 효소를 한번에 반응시킨 실시예 2의 반응물에서도 트레할로오스가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 도 5에서 1)은 아밀로수크라아제(도에서 'MFAS'로 표시)와 트레할로오스 합성효소(도에서 'MTSH'로 표시)를 동시에 설탕과 반응한 결과이며, 2)는 아밀로수크라아제와 설탕을 먼저 반응시킨 후 트레할로오스 합성효소를 반응한 결과이다.

한편, 상기 실시예 1 및 2에서는 아밀로수크라아제와 말토올리고실타레할로오스 합성효소와 말토올리고실타레할로오스 트레할로하이드롤라아제가 융합되어 제조된 트레할로오스 합성효소를 사용하여 설탕으로부터 트레할로오스의 생성 여부를 확인하였는데, 이와 같은 결과로부터 아밀로수크라아제, 말토올리고실타레할로오스 합성효소(maltoooligosyltrehalose synthase) 및 말토올리고실타레할로오스 트레할로하이드롤라아제의 3개 효소를 별개로 각각 첨가하여 반응시켜도 동일한 결과가 나타날 수 있는 것을 당연히 추론할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터인 pHc-MFAS의 개열지도이다.

도 2은 재조합 벡터 pHc-MFAS로 형질전환된 대장균(*E. coli*) MC1061로부터 수득한 재조합 단백질의 전기영동 사진이다. M은 사이즈 마커이고, 레인 1은 형질전환체인 대장균(*E. coli*) MC1061/pHc-MFAS를 초음파 분쇄하여 수득한 상등액이며, 레인 2는 상기 상등액을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제한 것이다. 밴드 상에서 굵게 보이는 부분은 본 발명에서 클로닝한 재조합 단백질(아밀로수크라아제)이다.

[0056]

도 3는 박막크로마토그래피를 이용한 본 발명의 반응생성물 분석결과를 보여준다. M은 포도당(G1)부터 말토헵토오스(maltoheptose; G7) 까지의 표준물질이고, 레인 1은 트레할로오스 표준물질, 레인 2는 트레할로오스와 말토트리오스(maltotriose)의 표준물질이, 레인 3은 효소를 넣지 않은 반응액, 레인 4는 설탕과 트레할로오스 합성효소만을 반응시킨 반응액이고, 레인 5는 설탕에 아밀로수크라아제와 트레할로오스 합성효소를 모두 반응시킨 반응액이다.

[0057]

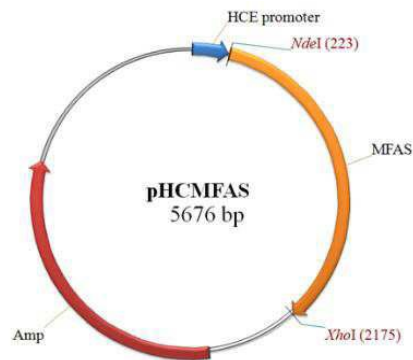
도 4은 고성능음이온액체크로마토그래피를 이용한 본 발명의 반응생성물 분석결과를 보여준다. 1)번 그림은 설탕(sucrase)과 아밀로수크라아제(도에서 'MFAS'로 표시) 만을 반응시킨 결과이고, 2)번 그림은 설탕에 아밀로수크라아제와 트레할로오스 합성효소(도에서 'MTSH'로 표시)를 모두 반응시킨 결과이다.

[0058]

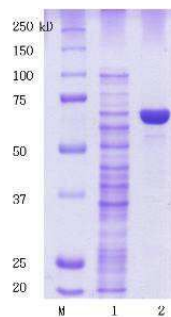
도 5는 고성능음이온액체크로마토그래피를 이용한 본 발명의 동시 첨가 반응과 순차 첨가 반응의 생성물 분석결과를 보여준다. 도 5에서 1)은 아밀로수크라아제(도에서 'MFAS'로 표시)와 트레할로오스 합성효소(도에서 'MTSH'로 표시)를 동시에 설탕과 반응한 결과이고, 2)는 아밀로수크라아제와 설탕을 먼저 반응시킨 후 트레할로오스 합성효소를 반응한 결과이다.

도면

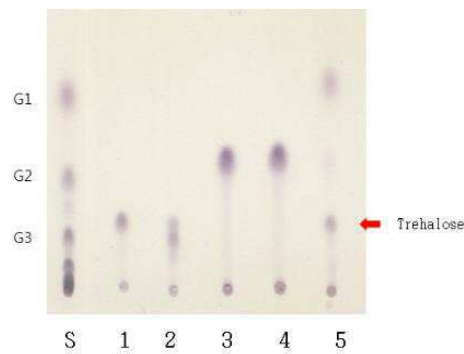
도면1



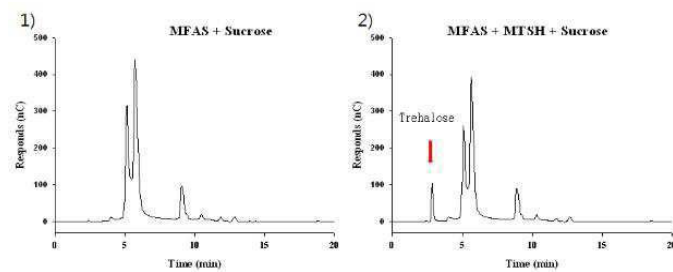
도면2



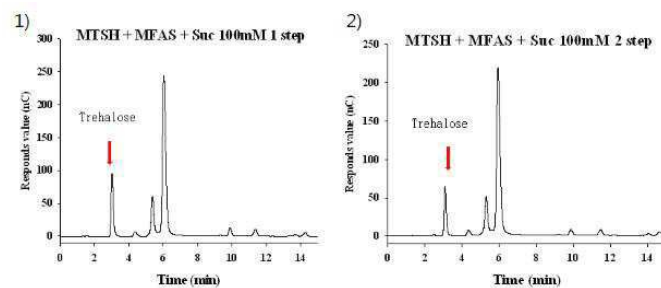
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for production of trehalose from sucrose by enzymatic method
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 1950
 <212> DNA
 <213> Methylobacillus flagellatus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1950)

<400> 1
 atg tac gaa caa gtc tcc cac tcg tta ctg aac gat atc ctc atc ggc 48
 Met Tyr Glu Gln Val Ser His Ser Leu Leu Asn Asp Ile Leu Ile Gly
 1 5 10 15

ctg gac ccc aag gtg ggt tgc gaa gac ctc aag cac ttc tat atc cgc 96
 Leu Asp Pro Lys Val Gly Cys Glu Asp Leu Lys His Phe Tyr Ile Arg
 20 25 30

ctg ggg gcg aat ttc tac gcc att cac tca ttg ttc cac cag ctt tac 144
 Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Ile His Ser Leu Phe His Gln Leu Tyr
 35 40 45

ggc gac cgg cag gat ttc cgc ctg cag atg cac aag ctg gtg gcc gtc 192
 Gly Asp Arg Gln Asp Phe Arg Leu Gln Met His Lys Leu Val Ala Val
 50 55 60

atg gcg aag caa tac gtc agc cga ccc cag gag ctg cgc cat cgc gac 240
 Met Ala Lys Gln Tyr Val Ser Arg Pro Gln Glu Leu Arg His Arg Asp
 65 70 75 80

ctt gcg cgc gaa aag gat cac aac tgg ttc ctg agc cag aag ctc gcg 288
 Leu Ala Arg Glu Lys Asp His Asn Trp Phe Leu Ser Gln Lys Leu Ala
 85 90 95

ggc tat gcg ctc tat tgc cag gaa ttt gca caa agc ctg aaa ggc atg 336
 Gly Tyr Ala Leu Tyr Cys Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Lys Gly Met
 100 105 110

cat gag aag ctg gac tac ctg cag gag ctg ggc atc aac ctg atc cat 384
 His Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Leu Gly Ile Asn Leu Ile His
 115 120 125

atc atg ccc att ctc gat ggc cca aag gga cgt aac gat ggc ggc tat 432
 Ile Met Pro Ile Leu Asp Gly Pro Lys Gly Arg Asn Asp Gly Gly Tyr

130	135	140	
gcc gtg cgt gac ttc cgc aag atc gat gag aaa tac ggc acg ctg gaa			480
Ala Val Arg Asp Phe Arg Lys Ile Asp Glu Lys Tyr Gly Thr Leu Glu			
145	150	155	160
gat ctc gat acc ctg agc gcc gaa ctg cgc agc cgc gat atg ctg ctg			528
Asp Leu Asp Thr Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ser Arg Asp Met Leu Leu			
	165	170	175
gtg ctc gac gtc gtg gtg aac cat aca tcc gac gag cac gaa tgg gcg			576
Val Leu Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asp Glu His Glu Trp Ala			
	180	185	190
ctg aaa gcc cag cag ggc aac aag aag tac cag gag tac tac tac acg			624
Leu Lys Ala Gln Gln Gly Asn Lys Lys Tyr Gln Glu Tyr Tyr Tyr Thr			
	195	200	205
tat ccg gat cga aag atc ccc gac ctg ttc gag cag acc atg ccc gag			672
Tyr Pro Asp Arg Lys Ile Pro Asp Leu Phe Glu Gln Thr Met Pro Glu			
	210	215	220
gta ttt ccc gat acc gcg ccc ggc aac ttc acc tgg aac gag aag atg			720
Val Phe Pro Asp Thr Ala Pro Gly Asn Phe Thr Trp Asn Glu Lys Met			
225	230	235	240
ggg cgc tgg gtg atg acg gtg ttc aac aac ttc cag tgg gat ctc aac			768
Gly Arg Trp Val Met Thr Val Phe Asn Asn Phe Gln Trp Asp Leu Asn			
	245	250	255
tac agg aac ccg tct gta ttc atc gag atg atc gat atc atc ctg ttc			816
Tyr Arg Asn Pro Ser Val Phe Ile Glu Met Ile Asp Ile Ile Leu Phe			
	260	265	270
tgg gcc aac cac ggc gca gac gtg ata cgt ctc gat gca gtc gcc ttc			864
Trp Ala Asn His Gly Ala Asp Val Ile Arg Leu Asp Ala Val Ala Phe			
	275	280	285
ctc tgg aag aaa atc ggc agc ccc tgt cag aac gag cgg gag gcg cac			912
Leu Trp Lys Lys Ile Gly Ser Pro Cys Gln Asn Glu Arg Glu Ala His			
	290	295	300
ctc atc ctc cag ctc atg aaa gac tgc tgc cag gta acc gcg ccc ggc			960
Leu Ile Leu Gln Leu Met Lys Asp Cys Cys Gln Val Thr Ala Pro Gly			

305	310	315	320	
acc ttg ttc atc gcc gag gcc atc gtc gcc ccg ctg gag atc atc aag				1008
Thr Leu Phe Ile Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Leu Glu Ile Ile Lys				
325	330	335		
tat ttc ggc gag gat gca gtc aat gcc aag gaa tgc gag atc gcc tac				1056
Tyr Phe Gly Glu Asp Ala Val Asn Ala Lys Glu Cys Glu Ile Ala Tyr				
340	345	350		
aac gcc acc tat atg gcc ctg ctg tgg gat gcc gtc gcc acc aag aag				1104
Asn Ala Thr Tyr Met Ala Leu Leu Trp Asp Ala Val Ala Thr Lys Lys				
355	360	365		
acc ctg ttg ctc aac cgc ggg ctg cgt agc ctg ccc acc aag ctc gac				1152
Thr Leu Leu Leu Asn Arg Gly Leu Arg Ser Leu Pro Thr Lys Leu Asp				
370	375	380		
ggt gcc acc tgg ctc aac tac gtg cgc tgc cac gac gat atc ggc ctg				1200
Gly Ala Thr Trp Leu Asn Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Leu				
385	390	395	400	
ggc ttc gac gac aac gac att cgc gcc tcg ggc tac gac ccg cag gca				1248
Gly Phe Asp Asp Asn Asp Ile Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Pro Gln Ala				
405	410	415		
cac cgc cgc ttc ctg gtc gat tac tac acc ggc gcc tat caa ggc tcc				1296
His Arg Arg Phe Leu Val Asp Tyr Tyr Thr Gly Ala Tyr Gln Gly Ser				
420	425	430		
acg gca acc ggc gtt gcc ttc ggc gtc aac ccc aag acc ggg gac gca				1344
Thr Ala Thr Gly Val Ala Phe Gly Val Asn Pro Lys Thr Gly Asp Ala				
435	440	445		
cgc atc tcg ggt tcg ctg gcc tcc ctg gcg ggg ctg gaa acc gcc ctg				1392
Arg Ile Ser Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Thr Ala Leu				
450	455	460		
ttg cgg aat gac gcg cag gcc atc gac acc agt atc cgc acc atc atc				1440
Leu Arg Asn Asp Ala Gln Ala Ile Asp Thr Ser Ile Arg Thr Ile Ile				
465	470	475	480	
ctg ctg cat agc atg atc gcg tcc ttt ggc ggc att ccg ctc atc tat				1488
Leu Leu His Ser Met Ile Ala Ser Phe Gly Gly Ile Pro Leu Ile Tyr				

485	490	495	
tac ggg gat tgc atc ggc acc ctc aac gac aac acc tat ctg gat gat			1536
Tyr Gly Asp Ser Ile Gly Thr Leu Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Asp Asp			
500	505	510	
gaa aac aag cac cat gac agc cgc tgg gtg cac cgt ccc agc ctg gac			1584
Glu Asn Lys His His Asp Ser Arg Trp Val His Arg Pro Ser Leu Asp			
515	520	525	
tgg aac aag gct gcc cgc cgc cac gaa cct ggc acg gtg gaa aat cgc			1632
Trp Asn Lys Ala Ala Arg Arg His Glu Pro Gly Thr Val Glu Asn Arg			
530	535	540	
ata ttc act gct atc cag agg ata ctg gcc gtg cgc aag cag att cct			1680
Ile Phe Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Ala Val Arg Lys Gln Ile Pro			
545	550	555	560
gct ttt gcc gac ctc aac aat cgc gag atc ttc gaa acc agc aac ccg			1728
Ala Phe Ala Asp Leu Asn Asn Arg Glu Ile Phe Glu Thr Ser Asn Pro			
565	570	575	
cac tta ttc act ttc ctg cgc ttc aca tcc cag ggc atg cat tcg cgc			1776
His Leu Phe Thr Phe Leu Arg Phe Thr Ser Gln Gly Met His Ser Arg			
580	585	590	
gtg ctc gtg atc gcc aac ttc gac gcc tcc ccg cag tac atg aac ctg			1824
Val Leu Val Ile Ala Asn Phe Asp Ala Ser Pro Gln Tyr Met Asn Leu			
595	600	605	
cgg gag ctg gat tcg gtc aat ctg ttc agg cat gtc gaa gtc aag gat			1872
Arg Glu Leu Asp Ser Val Asn Leu Phe Arg His Val Glu Val Lys Asp			
610	615	620	
ctc tat agc ggg gag acc ctg tcc acc aaa cac ggc acc ctg gag att			1920
Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Lys His Gly Thr Leu Glu Ile			
625	630	635	640
ccg cca ctc ggc ttt tat tgg tta cag ctt			1950
Pro Pro Leu Gly Phe Tyr Trp Leu Gln Leu			
645	650		

<210> 2

<211> 650

<212> PRT

<213> *Methylobacillus flagellatus*

<400> 2

Met Tyr Glu Gln Val Ser His Ser Leu Leu Asn Asp Ile Leu Ile Gly
1 5 10 15

Leu Asp Pro Lys Val Gly Cys Glu Asp Leu Lys His Phe Tyr Ile Arg
20 25 30

Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Ile His Ser Leu Phe His Gln Leu Tyr
35 40 45

Gly Asp Arg Gln Asp Phe Arg Leu Gln Met His Lys Leu Val Ala Val
50 55 60

Met Ala Lys Gln Tyr Val Ser Arg Pro Gln Glu Leu Arg His Arg Asp
65 70 75 80

Leu Ala Arg Glu Lys Asp His Asn Trp Phe Leu Ser Gln Lys Leu Ala
85 90 95

Gly Tyr Ala Leu Tyr Cys Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Lys Gly Met
100 105 110

His Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Leu Gly Ile Asn Leu Ile His
115 120 125

Ile Met Pro Ile Leu Asp Gly Pro Lys Gly Arg Asn Asp Gly Gly Tyr
130 135 140

Ala Val Arg Asp Phe Arg Lys Ile Asp Glu Lys Tyr Gly Thr Leu Glu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Thr Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ser Arg Asp Met Leu Leu
165 170 175

Val Leu Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asp Glu His Glu Trp Ala
180 185 190

Leu Lys Ala Gln Gln Gly Asn Lys Lys Tyr Gln Glu Tyr Tyr Tyr Thr
195 200 205

Tyr Pro Asp Arg Lys Ile Pro Asp Leu Phe Glu Gln Thr Met Pro Glu

210	215	220
Val Phe Pro Asp Thr	Ala Pro Gly Asn Phe Thr	Trp Asn Glu Lys Met
225	230	235 240
Gly Arg Trp Val Met Thr	Val Phe Asn Asn Phe Gln Trp	Asp Leu Asn
245	250	255
Tyr Arg Asn Pro Ser Val Phe	Ile Glu Met Ile Asp Ile	Ile Leu Phe
260	265	270
Trp Ala Asn His Gly Ala Asp	Val Ile Arg Leu Asp	Ala Val Ala Phe
275	280	285
Leu Trp Lys Lys Ile Gly Ser	Pro Cys Gln Asn Glu Arg	Glu Ala His
290	295	300
Leu Ile Leu Gln Leu Met Lys	Asp Cys Cys Gln Val Thr	Ala Pro Gly
305	310	315 320
Thr Leu Phe Ile Ala Glu Ala	Ile Val Ala Pro Leu Glu	Ile Ile Lys
325	330	335
Tyr Phe Gly Glu Asp Ala Val	Asn Ala Lys Glu Cys Glu	Ile Ala Tyr
340	345	350
Asn Ala Thr Tyr Met Ala Leu	Leu Trp Asp Ala Val	Ala Thr Lys Lys
355	360	365
Thr Leu Leu Leu Asn Arg Gly	Leu Arg Ser Leu Pro Thr	Lys Leu Asp
370	375	380
Gly Ala Thr Trp Leu Asn Tyr	Val Arg Cys His Asp Asp	Ile Gly Leu
385	390	395 400
Gly Phe Asp Asp Asn Asp	Ile Arg Ala Ser Gly Tyr	Asp Pro Gln Ala
405	410	415
His Arg Arg Phe Leu Val Asp	Tyr Tyr Thr Gly Ala Tyr	Gln Gly Ser
420	425	430
Thr Ala Thr Gly Val Ala Phe	Gly Val Asn Pro Lys Thr	Gly Asp Ala
435	440	445

Arg Ile Ser Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Thr Ala Leu
450 455 460

Leu Arg Asn Asp Ala Gln Ala Ile Asp Thr Ser Ile Arg Thr Ile Ile
465 470 475 480

Leu Leu His Ser Met Ile Ala Ser Phe Gly Gly Ile Pro Leu Ile Tyr
485 490 495

Tyr Gly Asp Ser Ile Gly Thr Leu Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Asp Asp
500 505 510

Glu Asn Lys His His Asp Ser Arg Trp Val His Arg Pro Ser Leu Asp
515 520 525

Trp Asn Lys Ala Ala Arg Arg His Glu Pro Gly Thr Val Glu Asn Arg
530 535 540

Ile Phe Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Ala Val Arg Lys Gln Ile Pro
545 550 555 560

Ala Phe Ala Asp Leu Asn Asn Arg Glu Ile Phe Glu Thr Ser Asn Pro
565 570 575

His Leu Phe Thr Phe Leu Arg Phe Thr Ser Gln Gly Met His Ser Arg
580 585 590

Val Leu Val Ile Ala Asn Phe Asp Ala Ser Pro Gln Tyr Met Asn Leu
595 600 605

Arg Glu Leu Asp Ser Val Asn Leu Phe Arg His Val Glu Val Lys Asp
610 615 620

Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Lys His Gly Thr Leu Glu Ile
625 630 635 640

Pro Pro Leu Gly Phe Tyr Trp Leu Gln Leu
645 650