

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0081491 (43) 공개일자 2009년07월29일
(51) Int. Cl. <i>C12P 19/58</i> (2006.01) <i>C07H 15/203</i> (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내	
(21) 출원번호 10-2008-0007384	(72) 발명자 박천석 경기 성남시 분당구 수내동 한양아파트 506동 10 7호	
(22) 출원일자 2008년01월24일 심사청구일자 2008년01월24일	서동호 충북 청주시 흥덕구 개신동 650번지 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 최덕용	

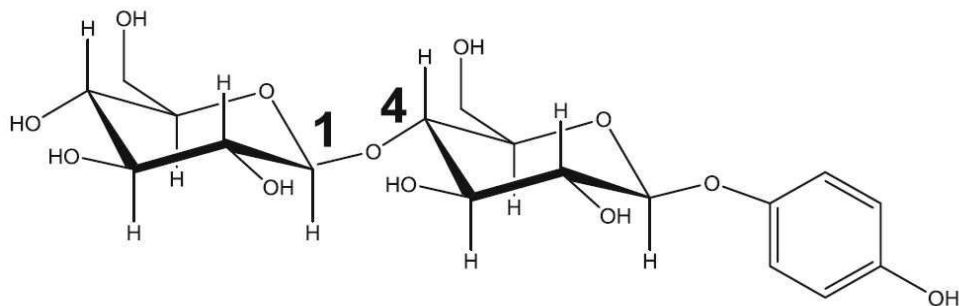
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법 및 이로 부터제조된 유도체

(57) 요약

본 발명은 디에노코커스 지오써말리스 (Deinococcus geothermailis)에서 분리된 아밀로수크라제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기존의 알려진 당전이 효소가 아닌 새로운 효소인 아밀로수크라제를 당전이 반응에 이용하는 것이다. 특히, 화장품 미백 소재로 사용되는 알부틴과 반응하여 높은 수율의 알파-D-클루코피라노실-(1→4)-알부틴을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정종현

서울 강서구 가양2동 1478번지 도시개발아파트 40
2동 504호

하석진

경기 수원시 권선구 호매실동 목화빌라 11동 202호

차재호

부산 금정구 구서2동 선경아파트 307동 901호

유상호

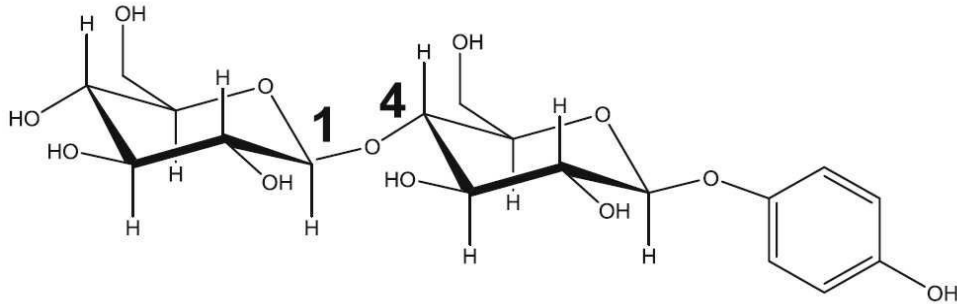
서울 송파구 방이동 올림픽 선수촌 아파트 242동
302호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 또는 이의 유도체.

(화학식 1)



청구항 2

제조합된 아밀로수크라제 효소 10 U/ml을, 알부틴 50g/L, 설탕 40g/L을 Tris-Cl 완충용액에 혼합한 후 30℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 5분 동안 용액을 끓인 다음 여과 단일 알부틴 유도체를 생성하는 단계와;

상기 단일 알부틴 유도체를 분리 및 정제하는 단계;

를 포함하여 이루어진 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아밀수크라제는,

디에노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalls*) 유래 아밀로수크라제 유전자를 형질전환하여 제조된 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 제조합된 아밀수크라제 효소는,

효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제조하는 벡터제조단계와;

상기 아밀수크라제를 대량생산하기 위하여 상기 벡터제조단계에서 제조합된 벡터로 형질전환될 형질전환체를 제조하기 위한 형질전환용 균을 제조하는 형질전환용 균 제조단계와;

상기 형질전환용 균과 상기 제조합된 벡터를 혼합한 후 전기적 충격을 주어 형질전환을 수행하는 형질전환체 제조단계와;

상기 형질전환체 제조단계에서 형질전환을 수행한 반응액내에서 약 1.9 kb의 아밀로수크라제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함되어 있음을 확인한 1종의 균주를 선별하는 균주선별단계와;

상기 균주선별단계로부터 선별된 균주를 정제하는 균주정제단계를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 벡터제조단계는,

디에노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*) DSM 11300의 염색체 DNA를 주형 DNA로 이용하고, 하기 표 1과 같은 조건으로 정방향 플라이머 DGAS1 및 역방향 플라이머 DGAS2를 프라이머로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 하기 표 2와 같은 조건으로 실시하여 약 1.9 kb의 PCR 산물을 수득하고, 상기 수득한 PCR 산물을 제한효소 *Bam*HI 와 *Eco*RI로 처리된 pGEM-T Easy 벡터와 함께 라이게이션하여 pGEM-T-DGAS를 제조한 다음 상기 pGEM-T-DGAS 를 제한효소 *Bam*HI 와 *Eco*RI로 처리하고, 약 1.9 kbp 길이의 조각을 분리하여 이를 동일한 제한효소로 처리된 pGEX-4T-1 발현벡터와 함께 라이게이션하여 pGEX-DGAS를 제조하는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

(표 1)

명칭	유전자서열	서열번호
DGAS1	5'-GGATCCGATGCTGAAAGACGTGCTCACTTC-3'	1
DGAS2	5'-AAGCTTATGCTGGAGCCTCCCGGC-3'	2

(표 2)

Denaturation	Pre-denaturation	95℃/ 5 min		
Amplification	Denaturation	95℃/ 1 min	35 cycles	
	Annealing	60℃/ 1 min		
	Extension	72℃/ 2 min		
	Final Extension	Final Extension	72℃/ 5 min	

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 아밀로수크라제를 암호화하는 아미노산서열의 N-말단에는 글루타치온-S-트랜스퍼라제(glutathion-S-transferase)를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 아밀로수크라제를 암호화하는 아미노산서열의 N- 말단에는 앰피실린 내성유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 형질전환용 균 제조단계는,

E. coli BL21 균주를 5ml LB 액체배지에 접종하여 37℃에서 12시간 교반하면서 전 배양하고, 이를 재차 50ml LB 액체배지에 재접종하여 흡광도를 600 nm에서 측정하여 그 값이 0.4 내지 0.6이 될 까지 배양한 후 얼음에서 약 10분 정도 놓아둔 다음 4℃, 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 1ml의 냉각된 멸균수를 첨가하여 균체를 완전히 녹인 후 염 성분의 제거를 위해 50ml의 멸균수를 재차 첨가하고 6,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세척하는 과정을 수 회 반복 실시한 후 6,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 균체에 남아 있는 잔여 상등액을 완전히 제거한 다음 균체의 무게를 측정하여 1:1의 부피로 냉각된 10% glycerol 을 넣고 pellet를 녹여 형질전환용 균(competent cell)를 제조하는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형질전환용 균 제조단계에서 제조된 형질전환용 균은,

예비 냉각되어 있는 microtube에 저장되어 -70℃에 보관되는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 형질전환체 제조단계는,

상기 형질전환용 균 제조단계에서 제조된 형질전환용 균을 얼음에서 녹인 후 형질전환 하고자 하는 재조합 pGEM-DGAS가 첨가된 라이게이션 액을 1 μ l 첨가하여 잘 혼합한 후 전기적 충격을 주어 형질전환을 수행하여 형질전환체를 제조하는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 11

제4항에 있어서,

상기 균주선별단계는,

상기 형질전환체 제조단계에서 형질전환을 수행한 반응액에 950 μ l의 LB 액체배지를 첨가하고 37℃에서 약 40분간 항온배양한 후 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB 한천배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하는 1차 선별단계와;

상기 1차 선별단계에서 선별된 균주를 암피실린이 포함된 LB 액체배지 5 ml에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득한 후 수득된 균체로부터 플라스미드를 분리하고 *Bam*HI 와 *Eco*RI 제한효소로 절단하여, 약 1.9 kb의 아밀로수크라제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함되어 있음을 확인한 1종의 균주를 선별하는 최종균주선별단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 12

제4항에 있어서,

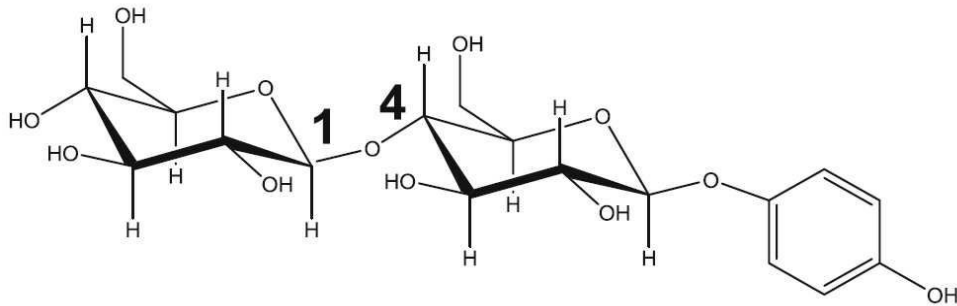
상기 균주정제단계는,

상기 균주선별단계에서 선별된 형질전환주를 37℃에서 배양하여 흡광도를 600 nm에서 측정하여 그 값이 0.4 내지 0.6이 될 때까지 배양하고, 배양된 균에 최종 농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가한 후 25℃에서 12시간 배양 한 다음 4℃ 및 4,000 rpm의 조건에서 30분 동안 원심분리를 수행하여 균체를 회수하고, 인산완충식염수에 현탁한 후 초음파 분쇄한 다음 분쇄된 분쇄액을 4℃ 및 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리를 수행한 후 상등액 High Performance 친화 크로마토그래피에 주입하여 정제하고, 정제된 효소 N말단에 붙어있는 글루타치온-S-트랜스퍼라제가 제거되도록 트롬빈처리를 하는 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

청구항 13

아밀로수크라제의 당전이 반응에 의해 설탕의 구성성분인 포도당을 알부틴에 전이 시켜 하기 화학식 1의 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

(화학식 1)



청구항 14

제13항에 있어서,

상기 아밀로수크라제는,

디에노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalls*) 유래 아밀로수크라제 유전자를 형질전환하여 제조된 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 새로운 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalls*) 유래 아밀로수크라제 (amylsucrase) 및 이를 이용한 알부틴 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 본 발명은 새로운 당전이 효소인 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalls*) 유래 아밀로수크라제를 이용하여 알부틴보다 효과가 뛰어난 알부틴 유도체, 더욱 자세하게는 당전이 알부틴 및 그 제조방법에 관한 것이다. 알부틴은 하이드로퀴논(hydroquinone)에 글루코피라노사이드(glucopyranoside)가 결합된 유도체로 하이드로퀴논 사용 시 나타나는 부작용이 적으면서 멜라닌색소 억제작용이 있어 멜라닌색소 침착의 증가를 억제하여 피부질환의 치료제 및 피부 미백 물질로서 사용되고 있는 천연화합물이다.

<3> 당 분자가 전위된 각종 당전이 생성물은 감미의 향상, 용해성 증가, 장내 유용세균 증식 효과, 화학안정성의 증가 등 기능성이 부가되는 것으로 알려져 있으며, 일부 알부틴 당전이 물질이 일반 알부틴 보다 멜라닌 색소 억제 작용이 뛰어난 것으로 알려졌다. 일반적인 알부틴 당전이 반응은 기존의 당전이 효소로 많이 알려진 CGTase와 β -glucosidase로 반응시켜 당전이 산물을 생성하는 것으로 알려져 있다. 하지만 이때 사용되는 기질은 말토트라이오스와 셀로바이오스로 높은 비용이 요구되며, 당전이 산물이 일정한 단일 산물이 아닌 여러 산물이 복합적으로 생성되는 등 비경제적인 문제점이 있다.

<4> 아밀로수크라제는 설탕을 기질로 사용하여 설탕을 포도당과 과당으로 가수분해 한다. 이 때 생성된 포도당을 이용하여 알파-1,4-결합을 한 비수용성 글루칸을 생성하는 것으로 알려져 있다. 기존 연구자들은 아밀로수크라제의 사용을 비수용성 글루칸을 생성하는 것만을 연구 발표하였다.

<5> 따라서, 아밀로수크라제의 새로운 사용법과 알부틴 당전이 산물을 제조시 경제적인 기질을 사용하여 단일 알부틴 산물을 제조하는데 필요한 방법의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 요구사항을 해결하기 위한 것으로, 그 목적은 종래의 당전이 효소가 아닌 디

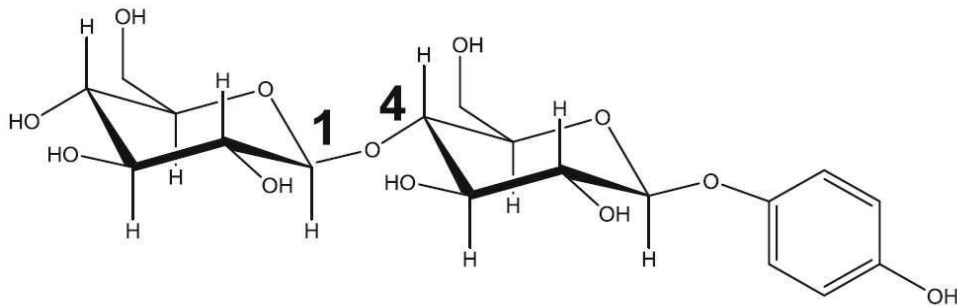
에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalis*) 유래의 아밀로수크라제 (amylsucrase)의 효소를 이용하여 제조단가가 매우 저렴하면서도 멜라닌합성저해능이 매우 우수한 단일 알부틴 유도체를 제공하는 것이다.

<7> 또한, 본 발명의 다른 목적은 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalis*) 유래의 아밀로수크라제 (amylsucrase)의 효소를 이용하여 제조단가가 매우 저렴하면서도 멜라닌합성저해능이 매우 우수한 단일 알부틴 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<8> 상기 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 또는 이의 유도체에 의해 달성될 수 있는 것이다.

<9> (화학식 1)

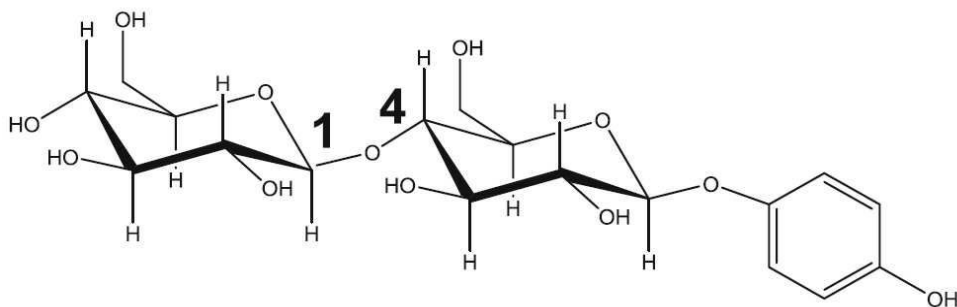


<10>

<11> 상기 본 발명의 다른 목적은 재조합된 아밀로수크라제 효소 10 U/ml을, 알부틴 50g/L, 설탕 40g/L을 Tris-Cl 완충용액에 혼합한 후 30℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 5분 동안 용액을 끓인 다음 여과 단일 알부틴 유도체를 생성하는 단계와; 상기 단일 알부틴 유도체를 분리 및 정제하는 단계; 를 포함하여 이루어진 것을 특징으로 하는 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법에 의해 달성될 수 있는 것이다.

<12> 또한, 본 발명의 다른 목적은 아밀로수크라제의 당전이 반응에 의해 설탕의 구성성분인 포도당을 알부틴에 전이시켜 하기 화학식 1의 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 제조방법에 의해 달성될 수 있는 것이다.

<13> (화학식 1)



<14>

효과

<15> 본 발명의 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라제 (amylsucrase)는 기존의 당전이 효소보다 높은 효율의 당전이 반응을 나타내며, 기질은 기존의 당전이 반응에 사용되는 값비싼 기질보다 저렴한 설탕을 사용하여 복합 당전이 산물이 아닌 단일 당전이 산물을 만들어 냄으로써, 그 산업적 효과가 매우 크다 할 수 있다. 또한, 본 발명에 의해 만들어진 단일 알부틴 유도체는 일반 알부틴보다 멜라닌색소 합성 저해능이 높고, 세포 독성이 적은 것으로 나타났으며, 이를 통해 본 발명에 의해 만들어진 단일 알부틴 유도체가 일반 알부틴보다 효과가 우수함을 알 수가 있었고, 이는 산업적 가치가 매우 크다 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하기 이해시키기 위한 것일 뿐이며, 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예1: 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalls*) 유래 아밀로수크라제 (amylsucrase)의 제조

1-1. 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 제조

본 발명의 효소인 야생형 디에노코커스 지오써말리스 유래 아밀로수크라제의 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 디에노코커스 지오써말리스의 염색체 유전자로부터 분리하여 사용하였다. 그 방법은 아래에 언급되어있다.

상기 야생형 디에노코커스 지오써말리스 유래 아밀로수크라제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 디에노코커스 지오써말리스 (*Deinococcus geothermalls*) DSM 11300의 염색체 DNA를 주형 DNA로 이용하고, 표 1과 같은 조건으로 정방향 프라이머 DGAS1 (서열번호 1) 및 역방향 프라이머 DGAS2 (서열번호 2)을 프라이머로 사용하여, 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 표 2와 같은 조건에서 실시하여 수득하였다.

[표 1]

명칭	유전자서열	서열번호
DGAS1	5'-GGATCCGATGCTGAAAGACGTGCTCACTTC-3'	1
DGAS2	5'-AAGCTTATGCTGGAGCCTCCCGGC-3'	2

[표 2]

Denaturation	Pre-denaturation	95℃/ 5 min		
Amplification	Denaturation	95℃/ 1 min	35 cycles	
	Annealing	60℃/ 1 min		
	Extension	72℃/ 2 min		
	Final Extension	Final Extension	72℃/ 5 min	

하기 표 3은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오써말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 ¹H 및 ¹³C NMR 을 이용한 구조분석결과를 나타낸 것이다.

(표 3)

Carbon atoms	¹³ C NMR			¹ H NMR	
		Arbutin	Arbutin transfer product	Arbutin	Arbutin transfer product
<i>p</i> -hydroxyphenol	1	152.2	152.2	6.69 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.69 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
	2	116.5	116.5	6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.96 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
	3	119.2	119.3	6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.96 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
	4	153.5	153.7	6.69 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.69 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
	5	119.2	119.3		
	6	116.5	116.5		
<i>β</i> -D-glucopyranose	1'	103.4	103.4	4.74 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	4.76 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz)
	2'	74.8	74.7	3.38 (dd, <i>J</i> = 7.2, 7.6 Hz)	3.61 (dd, <i>J</i> = 7.6, 7.6 Hz)
	3'	77.8	77.6		3.62 (dd, <i>J</i> = 7.6, 7.6 Hz)
	4'	71.2	80.9		
	5'	77.8	76.5		
	6'	62.4	62.0		
<i>α</i> -D-glucopyranose	1''		102.8		5.19 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz)
	2''		74.1		
	3''		75.0		
	4''		71.4		
	5''		74.5		
	6''		62.4		

상기 PCR을 수행한 결과, 벡터 전체를 포함하는 약 1.9 kb의 PCR 산물을 수득하였다. 상기 수득한 PCR 산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI로 처리된 pGEM-T Easy 벡터와 함께 접합 (ligation)하여 pGEM-T-DGAS를 제조하였다. 상기 pGEM-T-DGAS를 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI로 처리하고, 약 1.9 kbp 길이의 조각을 아가로스 전기영동을 통해

분리하여, 이를 동일한 제한 효소로 처리한 pGEX-4T-1 발현백터와 함께 라이게이션하여 pGEX-DGAS를 제조하였다. 상기 아밀로수크라제를 암호화하는 아미노산서열의 N-말단에는 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (glutathion-S-transferase)를 포함하고 있고, 또한 앰피실린 내성유전자 (ampicillin resistance gene)을 포함하고 있다.

<29> 1-2. 형질전환체의 제조

<30> 상기 아밀로수크라제를 대량생산하기 위하여, 상기 재조합 백터 pGEX-DGAS로 형질전환된 형질전환체를 제조하였다.

<31> *E. coli* BL21 균주를 5 ml의 LB 액체배지에 접종하여 37℃에서 12시간 교반하면서 전 배양하고, 이를 다시 50 ml의 LB 액체배지에 재접종하여 흡광도를 600 nm에서 측정하여 그 값이 0.4~0.6이 될 때까지 배양한다.

<32> 흡광도가 적당한 수치가 되면 얼음에서 약 10분 정도 놓아두었다. 4℃, 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 1 ml의 냉각된 멸균수를 첨가하여 균체를 완전히 녹인 후 염 성분의 제거를 위해 50 ml의 멸균수를 다시 첨가하고 6,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세척하는 과정을 세 번 반복하였다. 균체에 남아있는 잔여 상등액을 제거하기 위하여 6,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 완전히 제거한다. 균체의 무게를 측정하고 1:1의 부피로 냉각된 10% glycerol을 넣고 pellet을 녹여 competent cell을 제조하였다. 미리 차갑게 해 둔 microtube에 50 µl씩 옮겨 -70℃에 보관하였다.

<33> 형질전환을 수행할 때에는 보관된 50 µl의 형질전환용 균 (competent cell)을 약 30분 정도 얼음에서 녹인 후 형질전환 하고자 하는 재조합 pGEM-DGAS가 첨가된 라이게이션 액을 1 µl첨가하여 잘 섞은 다음 전기충격 큐벳 (cuvette)으로 옮긴 후 전기충격기 (Hybaid Cellject Uno, Hybaid Ltd, UK)로 전기적충격을 주어 형질전환을 수행하였다.

<34> 상기 형질전환을 수행한 반응액에 950 µl의 LB 액체배지를 첨가하고 37℃에서, 약 40분간 항온배양기에서 배양한다. 배양 후 ampicillin이 포함 (100µg/ml)된 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

<35> 1차 선별된 균주를 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다. 플라스미드 분리 키트로 회수된 균체로부터 플라스미드를 분리하고 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한 효소로 절단하여, 약 1.9 kb의 아밀로수크라제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함되어 있음을 확인한 1종의 균주를 선별하였다.

<36> 1-3. 변이효소의 정제

<37> 상기에서 선별한 형질전환주는 37℃에서 배양하여, 흡광도를 600 nm에서 측정하여 그 값이 0.4~0.6이 될 때까지 배양한다. 배양된 균에 최종 농도가 1 mM 이 되도록 IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)을 첨가해 준 후, 25℃에서 12시간 배양한다. 배양한 후, 4℃ 및 4,000 rpm의 조건에서 30분 동안 원심분리를 수행하여 균체를 회수하고, 인산완충식염수 [140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3]에 현탁한 후 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파를 이용하여 분쇄한 분쇄액을 4℃ 및 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리 수행한 후, 상등액을 수득하였다. 상기 상등액은 Glutathione-Sepharose™ High Performance 친화 크로마토그래피에 주입하여, 정제하였으며, 정제된 효소 N말단에 붙어있는 글루타치온-S-트랜스퍼라제를 제거하기 위해 트롬빈처리를 하여 효소에 붙어있는 글루타치온-S-트랜스퍼라제를 제거하였다. 상기 정제 단계별 시료의 전기영동 사진을 도 2에 나타내었다. 1번 줄은 스탠다드 마커를 나타내고, 2번은 발현되지 않은 형질전환주, 3번은 발현된 형질전환주, 4번은 글루타치온 S-트랜스퍼라제가 붙어있는 정제된 아밀로수크라제, 5번은 순수 정제된 아밀로수크라제를 나타낸다.

<38> 상기 도 2에 나타난 바와 같이, SDS-PAGE상에서 나타난 결과 상기 효소의 분자량이 이론값과 일치하는 약 75kDa의 분자량을 나타내는 것으로 확인되어, 아밀로수크라제 재조합 변이효소는 *E. coli* BL21에서 성공적으로 발현되었으며, Glutathione-Sepharose™ High Performance 친화성 크로마토그래피 과정을 통하여 효율적으로 정제된다는 것을 확인하였다.

<39> 실시예2; 알부틴 유도체 제조 및 정제

<40> 실험에 사용된 알부틴과 설탕은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA)로부터 구입하였다. 상기 정제된 재조합 아밀로수크라제 효소 10 U/ml를, 알부틴 50 g/L, 설탕 40 g/L를 Tris-Cl 완충용액 (pH 8.0)에 혼합한 후

30℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5분 동안 용액을 끓인 후 왓트만 여지를 이용하여 여과하였다. 반응액을 고성능 recycling 액체 크로마토그래피를 이용하여 젤투과컬럼 (W-251)을 통과시켜 반응생성물을 분리 정제하였다.

<41> **실시예 3; 박막크로마토그래피를 이용한 반응생성물의 분석**

<42> 실시예 2의 반응에서 얻어진 반응생성물을 분석하기 위해서 박막크로마토그래피를 수행하였다. 반응 종결 후, 각 시료를 Whatman K5F TLC 플레이트 (20 cm x 20 cm)에 1 μ l씩 로딩하여 n-부탄올 : 아세트산 : 증류수 = 3 : 1 : 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 10분 동안 발색시켰다. 얻어진 결과를 도 3에 나타냈다. 두번째 줄에서 알 수 있듯이, 알부틴에 당이 전이된 새로운 물질이 생성된 것이 확인되었다.

<43> **실시예 4; 고성능액체크로마토그래피를 이용한 알부틴 유도체의 분석**

<44> 실시예 2에서 얻은 생성물을 고성능액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 분석하였다. 시료는 실시예 2에서 얻은 반응생성물을 0.45 μ m 박막여과지로 여과하여 25 μ l를 주입하였고 유속은 1.0 ml/분으로 하여 분석하였다. HPLC 분석은 시마즈(일본)의 LC-AD 그라디언트 펌프와 SPD-10A 검출기 및 LC-NH2 컬럼 (SUPELCOSIL™)을 이용하여 시행하였으며, 용매는 A 용액(아세트나이트릴), B 용액(물)을 3:1로 혼합하여 사용하였다. 결과를 도 4에 나타낸다. 피크 1은 알부틴, 피크 2는 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴을 나타냈다.

<45> **실시예 5; Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy를 이용한 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 분자량 측정**

<46> 본 발명의 주요 전이물인 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 분자량을 확인하기 위해서 FABMS (Fast atom bombardment mass spectroscopy: JEOL JMS 700, Japan)을 사용하였다. 결과는 도 5에 나타낸다. 도 5에서 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 867 [2M-H]⁻와 433 [M-H]⁻에 나타나는 이온 피크로부터 시료의 분자량이 433으로 측정되었다. 이로부터 반응 생성물은 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 분자량과 일치함을 알 수 있다.

<47> **실시예 6; ¹H 및 ¹³C NMR을 이용한 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 구조분석**

<48> 본 발명의 주요 전이물인 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 구조를 확인하기 위하여 ¹H 및 ¹³C 핵자기공명분석 (NMR; Varian, USA)을 수행하였다. 시료는 실시예 2에서 순수 정제한, 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴을 중수 (D₂O)에 용해시킨 것을 사용하였다. 결과를 표 3에 나타낸다. COSY, HMQC 및 HMBC 실험결과로부터 반응생성물은 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴임을 알 수 있었다.

<49> **실시예 7; 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴의 효능**

<50> 7-1. 버섯에서 추출한 티로신나아제 저해 효과

<51> 0.03% L-tyrosine 100 μ l와 알부틴 수용액과 상기 얻어진 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴을 다양한 농도로 50 μ l 씩을 각각 67 mM 인산 완충용액 (pH 7.0) 640 μ l에 섞어주고, 37℃ 10분간 반응시킨다. 60 U 버섯추출 티로신나아제 (mushroom tyrosinase)를 67 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹여 10 μ l를 먼저 제조한 반응액에 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨다.

<52> 버섯추출 티로신나아제 활성 측정은 475 nm에서 흡광도로 측정하여 다음의 식을 이용하여 구하였다.

<53>
$$\text{tyrosinase activity (\%)} = [(A-B)/(Cp-Cn)] \times 100$$

<54> 위 식에서 A는 실험군 (67 mM 인산 완충용액, L-tyrosine, 알부틴 또는 알부틴 유도체, 티로신나아제)의 흡광도; B는 대조군 (67 mM 인산 완충용액, 물, 알부틴 또는 알부틴 유도체, 티로신나아제)의 흡광도; Cp는 양성대조군(67mM 인산 완충용액, L-tyrosine, 티로신나아제)의 흡광도; Cn은 음성대조군 (67mM 인산 완충용액, 물, 티로신나아제)의 흡광도이다. 결과는 도 6에 표시하였다. 일반 알부틴보다 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 티로신나아제의 저해능이 더 높은 것으로 나타났고, 6 mM 농도에서 일반 알부틴은 약 50%의 저해능을, 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 약 60%의 저해능을 나타냈다.

<55> 7-2. 멜라노마세포주를 이용한 멜라닌합성저해능

<56> B16F10 무린 멜라노마 세포 (B16F10 murine melanoma cell)은 한국 세포주 은행 (Korea Cell Line Bank)에서 구입하였다. B16F10 세포 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)에서 10% 페이탈 보바인 혈청 (fetal bovine serum, FBS) (BioWhittaker)가 첨가된 배지를 사용하였다. 배양조건은 37℃에서 배양하였다. 이때 배양기는 5% CO₂가 배양기 대기 중에 포함하게 하였다.

<57> B16F10 세포는 60 mm 세포 배양용 접시 (tissue culture dishes) (Iwaki, Japan)에 10% FBS가 첨가된 2 ml DMEM배지에 풀어서 배양하였다. 48시간 후, 2 ml 인산 완충식염수를 사용하여 2번 wash해주고, 위에 언급한 신선한 배지 2 ml로 교체해준다. 그리고 α-MSH를 최종농도가 200 nM와 알부틴 또는 알부틴 유도체를 1, 5, 10, 20 mM이 되도록 첨가해 준다.

<58> 48시간 후, 세포를 2 ml 인산 완충식염수로 2번 wash해주고 세포를 스크래퍼(scraper)를 사용하여 모은다. 모은 세포용액을 4℃에서 1,700xg, 5분간 원심분리 하여 상층액을 버린다. 세포체에 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 200 μl을 첨가하고, 80℃에서 1시간 동안 반응시킨다.

<59> 멜라닌 (melanin)을 교반하여 녹인 후, 멜라닌의 함량을 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Biotek Instruments, Ins, Winooski, VT, USA)를 사용하여 405 nm의 흡광도로 측정하였다. 결과는 도 7에 표시하였다. 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 5 mM 이상의 농도에서 일반 알부틴 보다 멜라닌합성저해이 일반 알부틴 보다 뛰어난 것으로 나타났다. 10 mM 농도에서 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 약 80%의 저해능을 나타냈지만, 일반 알부틴은 약 60%의 저해능을 나타냈다.

<60> 7-3. 세포독성실험

<61> B16F10 세포를 96-well 세포배양용 접시 (96-well tissue culture plates) (Nunc, USA)에 10% FBS가 첨가된 DMEM 200 μl를 배지로 사용하여 배양하였다. 48시간 후, 세포를 인산 완충식염수를 사용하여 2번 wash하고, 신선한 배지 200 μl로 교체해 주었다. 이 때 α-MSH를 최종 농도가 200 nM 와 알부틴과 알부틴 유도체를 인산 완충식염수에 녹여 최종 농도가 1, 5, 10, 20 mM이 되도록 첨가해 준다.

<62> 48시간 후, 세포를 인산 완충식염수로 2번 wash해주고, 신선한 배지로 교체해준다. 이때, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/ml in PBS) 20 μl를 각각의 배양액에 첨가해, 37℃에서 12시간 동안 반응시킨다.

<63> 세포 배양액의 배지를 제거한 후, 세포를 DMSO 100 μl에 녹인다. MTT이 전환되어 생성된 포마잔(formazan)의 양은 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Biotek Instruments, Ins, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm의 흡광도로 측정하였다. 결과는 도 8에 표시하였다. 20 mM 일반 알부틴에서는 세포의 생존율이 약 79%로 나타났고, 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴에서는 약 90%의 생존율을 나타냈다. 이를 통해서 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴은 일반 알부틴보다 세포 독성이 낮은 것으로 나타났다.

도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 화학식이다.

<65> 도 2는 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체의 정제 단계별 시료의 전기영동 사진이다.

<66> 도 3은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 박막크로마토그래피 분석결과를 나타낸 것이다.

<67> 도 4는 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 고성능액체크로마토그래피를 이용한 분석결과를 나타낸다.

<68> 도 5는 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy를 이용한 분자량 측정결과를 나타낸다.

<69> 도 6은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 버섯에서 추출한 티로신나아제 저해 효과 분석결과를 나타낸 것이다.

<70>

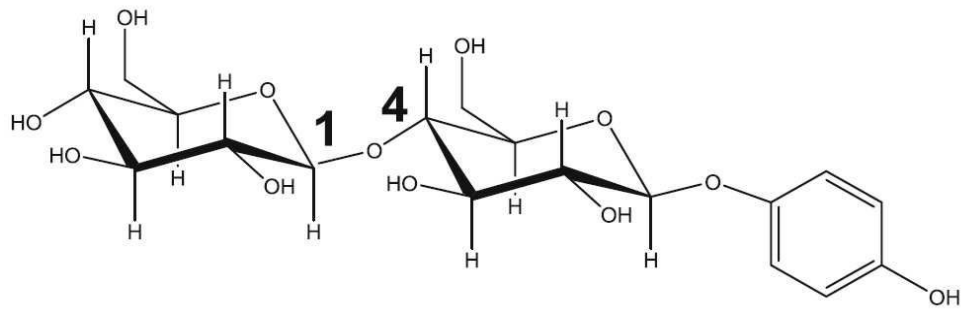
도 7은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 멜라노마세포주를 이용한 말라닌합성저해능의 분석결과를 나타낸 것이다.

<71>

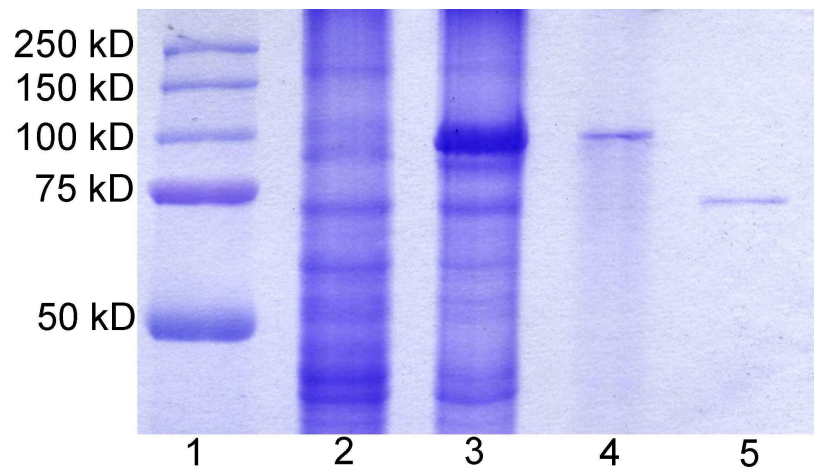
도 8은 본 발명에 따른 디에노코커스 지오씨말리스로부터 분리된 아밀로수크라제를 이용한 단일 알부틴 유도체에 대한 세포독성실험 결과를 나타낸 것이다.

도면

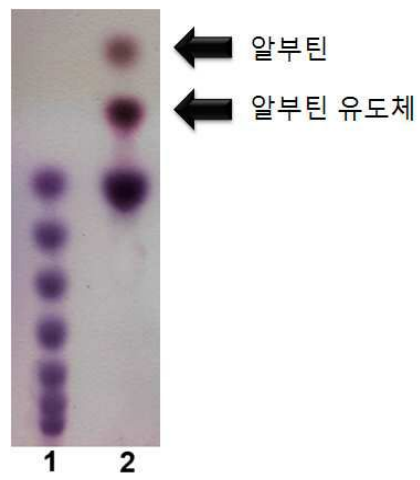
도면1



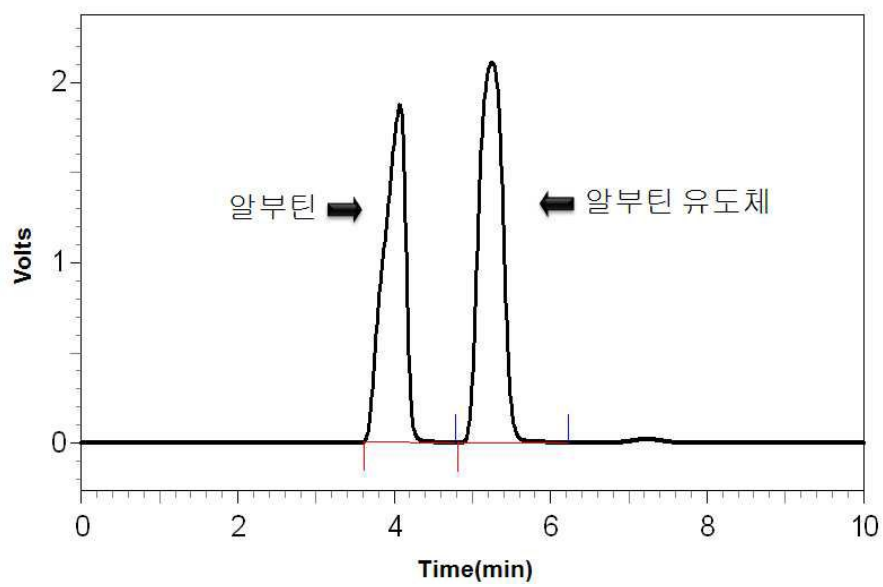
도면2



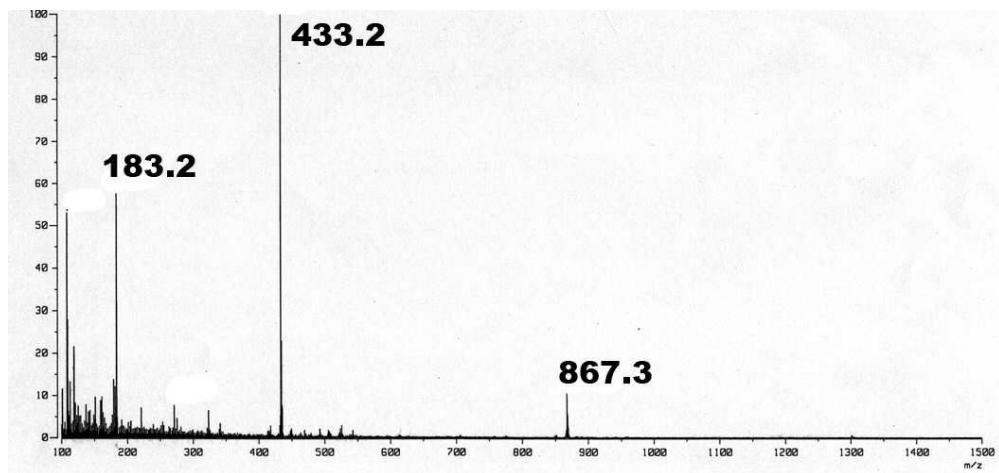
도면3



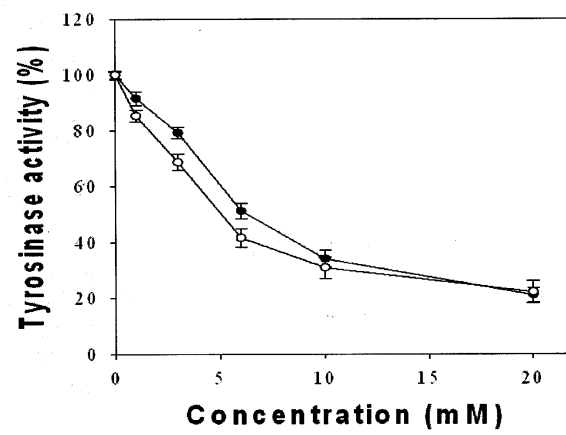
도면4



도면5



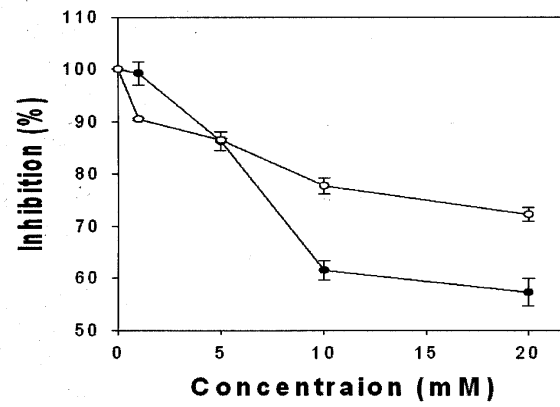
도면6



(●) 알부틴

(○) 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴

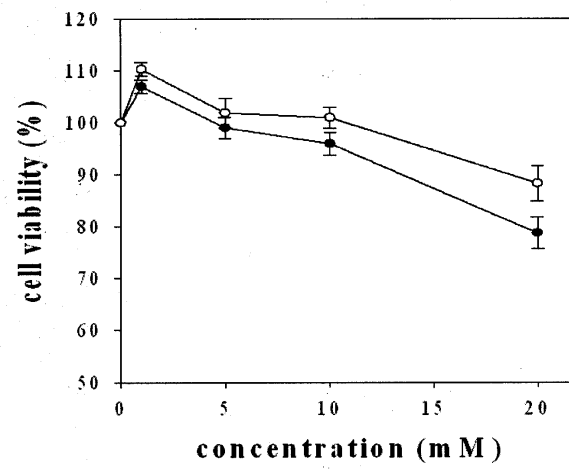
도면7



(●) 알부틴

(○) 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴

도면8



(●) 알부틴

(○) 알파-D-글루코피라노실-(1→4)-알부틴