



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0129469

(43) 공개일자 2015년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/44 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0056478

(22) 출원일자 2014년05월12일

심사청구일자 2014년05월12일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호

전혜연

강원도 춘천시 후석로 325, 109동 705호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

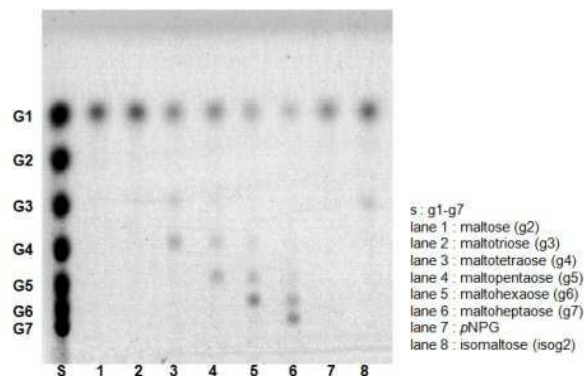
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 내열성 알파-글루코시다아제를 이용한 포도당의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 내열성 알파-글루코시다아제를 이용한 포도당의 생산방법에 관한 것으로, 본 발명에 의할 경우 pH 5~7, 80~100℃에서 수행되는 액화공정과 동일한 pH 및 온도를 갖는 조건에서 당화공정을 수행하여 포도당을 효과적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이혜원

경기도 구리시 동구릉로66번길 14, 102동 2201호

최혜정

서울특별시 구로구 남부순환로95길 54, 106동 200
2호

명세서

청구범위

청구항 1

전분으로부터 가수분해되어 생산된 α -1,4 글루코사이드(glucoside) 결합을 갖는 화합물에, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 화합물은,
말토올리고당인 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 말토올리고당은,
말토오스(maltose) 또는 말토티리오스(maltotriose)인 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 말토올리고당은,
이소말토오스(isomaltose)인 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 반응은,
pH 5~7, 80~100℃의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 전분으로부터 가수분해는,
pH 5~7, 80~100℃의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소를 이용한 포도당의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 내열성 알파-글루코시다아제를 이용한 포도당의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 극한지역에 서식하는 고세균(archaea)의 발견과 함께 이들 미생물이 보유하는 다양한 효소들에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 하지만, 대부분의 고세균 유래의 단백질들은 대장균 등을 이용할 경우 발현이 잘 되지 않아, 그 이용이 제한적인 문제점이 있다.

[0003] 한편, 알파-글루코시다아제는 탄수화물 가수분해효소의 일종으로, 말토올리고당의 α -1,4 결합과 α -1,6 결합을 주로 가수분해하여 포도당을 생산한다. 소당류를 가수분해하여 포도당을 생산할 수 있는 알파-글루코시다아제의 경우, 현재까지 고세균으로부터 6종이 클로닝되어 발현되었다(Bertoldo, C.; Antranikian, G., Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol. 2002, 6, 151-160; Park, J. E.; Park, S. H.; Woo, J. Y.; Hwang, H. S.; Cha, J.; Lee, H., Enzymatic properties of a thermostable alpha-glucosidase from acidothermophilic crenarchaeon Sulfolobus tokodaii strain 7. J. Microbiol. Biotechnol. 2013, 23, 56-63; Seo, S. H.; Choi, K. H.; Hwang, S.; Kim, J.; Park, C. S.; Rho, J. R.; Cha, J., Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum* α -glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin. J. Mol. Catal. B Enzym. 2011, 72, 305-312).

[0004] 포도당의 제조를 위해서는 크게 액화공정(liquefying process)와 당화공정(saccharification)의 두 공정이 필요하다. 전분은 고온, 고압의 수용액 상태에서 호화(swelling)된 후, 박테리아 유래의 초고온성 알파-아밀라아제에 의해 일반적으로 pH 6.0, 90℃의 조건에서 저분자 말토올리고당으로 가수분해되어 액화된다. 이후, 말토올리고당은 pH 4.5, 60-70℃의 조건에서 곰팡이(fungi)유래의 글루코아밀라아제에 의하여 포도당으로 분해가 된다.

[0005] 포도당 제조를 위한 두 공정은, 각각의 효소 반응 조건이 달라, 액화공정에서 당화공정으로 진행되는 단계에서, 냉각 및 pH 변화를 위한 산처리가 요구된다. 또한, 당화공정 이후 포도당을 얻기 위해서는 pH를 다시 중성으로 맞추기 위해 알칼리 처리를 해야 하며, 이때 다량의 염이 생성되므로 탈염(desalting) 과정이 추가로 요구된다(Kim, M. S.; Park, J. T.; Kim, Y. W.; Lee, H. S.; Nyawira, R.; Shin, H. S.; Park, C. S.; Yoo, S. H.; Kim, Y. R.; Moon, T. W.; Park, K. H., Properties of a novel thermostable glucoamylase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 3933-3940; Manjunath, P.; Shenoy, B. C.; Raghavendra Rao, M. R., Fungal glucoamylases. J. Appl. Biochem. 1983, 5, 235-260).

[0006] 그런데, 기존에 개발된 당화공정 관련 효소들은 다음과 같은 문제점들을 1~2가지 이상 지니고 있다. ① 액화공정의 온도와 일치하지 않는 것 (최적 효소반응 온도가 액화공정보다 일반적으로 낮음), ② 액화공정의 pH와 일치하지 않는 것 (일반적으로 pH가 6.0 미만임), ③ 당전이반응(transglycosylation) 또는 역가수분해반응(reverse hydrolysis)을 지니고 있어, 생산된 포도당으로 다시 이소말토오스 등의 불순물을 생산되는 것이다.

[0007] 따라서, 두 공정의 반응 조건을 일치시키기 위하여 액화공정과 동일한 조건(90℃, pH 6.0)에서 당화반응이 가능하고, 당전이반응, 역가수분해반응 등이 일어나지 않는 당화효소의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2003-0076776호 (공개일자 2003. 09. 29) 에는, "내열성 서모토가 마리티마 글루코시데이즈, 및 이를 이용한 포도당 제조방법에 관한 것으로서, 내열성 효소인 내열성 서모토가 마리티마 글루코시데이즈는 내열성이므로 고온에서 사용가능하다는 장점이 있고, 이를 이용하여 전분으로부터 포도당을 제조하면 유해한 염이 생성되지 않고, 고온에서 pH 변화없이 안전하게 전분으로부터 포도당을 제조할 수 있다"라고 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명에서는 액화공정과 동일한 조건에서 당화반응이 가능한 내열성 효소를 이용하여, 효과적인 포도당 생산 공정을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 전분으로부터 가수분해되어 생산된 α -1,4 글루코사이드(glucoside) 결합을 갖는 화합물에 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 포도당의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소를 이용한다. 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소는 GeneBank에 Accession number AAL63848로 등록되어 있는 효소이다. 상기 효소는 잠정적(putative) 알파-글루코아말라아제라고 기재되어 있으나, 상기 효소의 특성에 대해서는 연구된 바가 없다.
- [0012] 그런데, 본 발명에서는 상기 효소가 90℃에서 최적 활성을 갖는 내열성 효소이고, pH 6에서 최적 활성을 나타냄을 확인하였다. 본 발명에서는 이와 같은 실험적 결과를 바탕으로, 본 발명의 효소가 액화공정 및 당화공정으로 이루어지는 포도당의 생산에 있어, 당화공정에 유용하게 쓰일 수 있음을 착안하고 본 발명을 완성한 것이다.
- [0013] 포도당은 일반적으로 고온의 액화공정과 당화공정으로 이루어지는데, 기존에 개발된 당화공정 관련 효소들은, 상기 "발명의 배경이 되는 기술" 항목에서 살펴본 바와 같이, ① 액화공정의 온도와 일치하지 않는 것 (효소 최적 반응 온도가 액화공정보다 일반적으로 낮음), ② 액화공정의 pH와 일치하지 않는 것 (일반적으로 pH가 6.0 미만임), ③ 당전이반응(transglycosylation) 또는 역가수분해반응(reverse hydrolysis)을 지니고 있어 생산된 포도당으로 다시 이소말토오스 등의 불순물을 생산함과 같은 문제를 안고 있다. 하지만, 본 발명에 의할 경우, 액화공정과 동일한 온도 및 동일한 pH에서 당화공정을 수행할 수 있는 장점이 있는 것이다.
- [0014] 한편, 본 발명의 포도당 제조방법에 있어서, 상기 화합물은 바람직하게 말토올리고당일 수 있다. 말토올리고당(maltooligosaccharide)은 포도당이 α -1,4 결합으로 직쇄상에 중합한 소당류를 총칭한다. 중합도의 순서로 말토오스(maltose, G2), 말토티리오스(maltotriose, G3), 말토테트라오스(maltotetraose, G4), 말토펜타오스(maltopentaose, G5), 말토헥사오스(maltohexaose, G6)… 라고 부른다. 말토올리고당은 전분을 산 혹은 α -아밀라아제로 부분 가수분해하면 주된 산물로서 얻어진다 (식품과학기술대사전, 2008.4.10, 광일문화사).
- [0015] 한편, 본 발명의 포도당 제조방법에 있어서, 상기 말토올리고당은 바람직하게 말토오스(maltose) 또는 말토티리오스(maltotriose)일 수 있다. 하기 실험에 의할 경우, 말토오스 또는 말토티리오스에 반응시킬 경우, 포도당만을 생산물로 순수하게 수득할 수 있기 때문이다.
- [0016] 한편, 본 발명의 포도당 제조방법에 있어서, 상기 말토올리고당은 일 예로, 이소말토오스(isomaltose)일 수 있다. 본 발명의 실험에 의할 경우, 이소말토오스도 분해되어 포도당을 생성함이 확인되었기 때문이다. 이소말토오스는 포도당 2분자가 α -1,6 결합한 이당류를 지칭하는데, 아밀로펙틴(amylopectin), 글리코겐(glycogen), 덱스트란(dextran)을 부분적으로 가수분해하여 얻어질 수 있다 (식품과학기술대사전, 2008.4.10, 광일문화사).
- [0017] 한편, 본 발명의 포도당 제조방법에 있어서, 상기 반응은, 바람직하게 pH 5~7, 80~100℃의 조건에서 수행될 수 있다. 본 발명의 실험에 의할 경우, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 본 발명의 효소는 pH 5~7, 80~100℃에서 최적의 활성을 갖기 때문이다.
- [0018] 한편, 본 발명의 포도당 제조방법에 있어서, 상기 전분으로부터 가수분해는 바람직하게 pH 5~7, 80~100℃의 조건에서 수행되는 것일 수 있다. 포도당 생산공정에서 전분으로부터 가수분해하는 과정을 액화공정이라고 하는데, 일반적으로 pH 5~7, 80~100℃에서 액화공정이 효율적으로 수행되고 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 의할 경우, pH 5~7, 80~100℃에서 수행되는 액화공정과 동일한 pH 및 온도를 갖는 조건에서 당화공정을 수행하여 포도당을 효과적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명 효소의 정제 결과(순도)를 보여주는 겔 사진이다. Lane S, 스탠다드 사이즈 마커 (standard size marker); lane 1, 조세포 추출액 (crude cell extract); lane 2, 조세포 추출액의 가용성 분획 (soluble fraction of crude cell extract); lane 3, 열처리 후 세포 추출액 (cell extract after heat treatment); lane 4, Ni-NTA 크로마토그래피 후, 정제된 PAE1968 (purified PAE1968 after Ni-NTA chromatography).

도 2는 본 발명 효소의 최적 온도 (A), 최적 pH (B) 및 열안정성 (C)을 보여주는 결과이다.

도 3은 다양한 기질에 본 발명 효소(PAAG)를 첨가하여 가수분해 반응시킨 결과의 TLC 사진이다.

도 4는 말토오핵사오스 (도 4에서 A)를 이용한 본 발명 효소 PAAG (도 4에서 B)와 상업 효소 AMG (도 4에서 C)의 당화능 비교 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 본 발명에서 사용한 효소의 클로닝]

[0023] RIKEN BioResource Center의 균주은행 JCM에서 분양받은 것으로, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2로부터 유래한 알파-글루코시다아제 유전자(pae1968)를 확인하여 PCR 수행하였다.

[0024] PCR 조건은 아래와 같았고, 하기와 같은 조건으로부터 개시코돈 GTG가 ATG로 일부 변경된 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 갖는 유전자를 클로닝하고자 하였다.

[0025] - 정방향 프라이머: 5'-AAAAACC**ATG**GTGCTCGCAGTTGGGAGGAAGTCTG-C' (이텔릭체 부분 *NcoI* site, 효과적인 발현을 위하여 원래의 개시코돈(start codon)인 GTG 대신 ATG로 대체함).

[0026] - 역방향 프라이머: 5'-AAAAC**TCGAG**ATCCCTTGTTCCACGTAAGTGCC-3' (이텔릭체 부분 *XhoI* site).

[0027] - 변성(denaturation): 95℃, 30 s 동안.

[0028] - 어닐링(annealing): 55.5℃, 30 s 동안.

[0029] - 신장(extension): 72℃, 2 분 동안의 조건에서 25 사이클(cycle) 수행 후, 최종 신장 (final extension) 72℃, 10 분 동안 수행함.

[0030] PCT를 통해 획득한 PCR 절편(2.1 bp)은 *NcoI* 및 *XhoI* 제한효소로 처리하여 pTKNd119 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션 된 구조를 p6xHTKNDpae1968이라 명명하였다. 완성된 구조는 발현시 C-말단에 6개의 히스티딘(histidine tag)을 지니게 되어 Ni-NTA 정제가 가능하다. 이 벡터를 다시 대장균 MC1061에 형질전환하고, 선택 마커 (selection marker)인 카나마이신(50 µl/mL) 평판배지에서 형질전환이 완료된 균주를 확보하였다.

[실시예 2: 본 발명에서 사용한 효소의 발현 및 정제]

[0032] 형질전환된 대장균을 LB(Luria-Bertani) 배지 (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 카나마이신을 넣어 배양하였다. 배양은 37℃, 200 rpm에서 30시간 동안 교반 배양을 실시하였으며, 반응 후 원심분리 (7,000×g, 10분, 4℃)로 균체를 회수하였다.

[0033] 회수된 균체는 배양부피의 1/10 가량의 완충액(300 mM NaCl and 10 mM imidazole 함유 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5))에 풀어준 뒤, 아이스배스(ice bath)에서, 초음파 분쇄(XL-2000; QSonica, LLC., Newtown, CT;

output 12, 5분, 4회)를 실시하였다.

[0034] 초음파 분쇄 후, 원심분리(10,000×g, 4℃, 20분)를 수행하여 상층액을 회수하고, 열처리(70℃, 30분)를 실시하여 1차적으로 대장균관련한 단백질을 변성시켰다. 이때, 본 발명에서 얻고자 하는 알파-글루코시다아제는 초내열성균 유래의 효사이므로, 열처리 과정 동안 변성되지 않고 남아있게 된다. 최종적인 정제는 일반적인 방법인 Ni-NTA 크로마토그래피(chromatography)를 이용하여 정제를 마무리하였다. 최종 정제된 효소는 PAAG로 명명하였다.

[0035] 하기 표 1은 각 정제 단계별 효소 역가를 측정하여 나타낸 것이다.

표 1

정제 단계	총 단백질 (mg)	총 역가 (U)	비 역가 (Sp.activity, U/mg)	수율 (Yield,%)	정제 배수 (배)
세포 추출액 (Cell extraction)	16654.2	83.76	0.005	100	1.0
열 처리 (Heat treatment)	9484.8	42.99	0.005	51.3	1.0
Ni-NTA	4.2372	9.53	2.25	11.4	496.2

[0037] 위의 표에서 보는 바와 같이 최종 정제된 본 발명 효소 PAAG는 1 mg당 2.25 U의 역가를 나타내었다.

[0038] 한편, 도 1은 본 발명 효소의 정제 결과(순도)를 보여주는 겔 사진이다. Lane S, 스탠다드 사이즈 마커(standard size marker); lane 1, 조세포 추출액(crude cell extract); lane 2, 조세포 추출액의 가용성 분획(soluble fraction of crude cell extract); lane 3, 열처리 후 세포 추출액(cell extract after heat treatment); lane 4, Ni-NTA 크로마토그래피 후, 정제된 PAE1968 (purified PAE1968 after Ni-NTA chromatography).

[0039] 도 1의 정제 결과에서 보는 바와 같이, 본 실시예를 통해 고순도의 본 발명 효소 PAAG(lane 4)를 확보할 수 있었고, 이를 이용하여 하기 실시예를 수행하였다.

[실시예 3: 상기 실시예 2에서 수득한 효소의 최적 온도, 최적 pH 및 내열성 확인]

[0041] 상기 실시예 2에서 정제한 효소의 최적 온도와 최적 pH를 확인하기 위하여, 다양한 온도 및 pH에서 효소의 활성을 확인하였다. 또한, 열안정성 실험을 위하여 효소를 각각의 온도(95, 110, 125 ℃)에서 일정시간(10~60분) 거치 후 효소의 역가를 측정하였다. 본 발명 효소 (PAAG)의 온도별, pH별 역가 확인을 위하여 pNPG(4-nitrophenyl α-D-glucopyranoside)를 기질로 이용하였다.

[0042] 먼저, 최적 온도를 확인하기 위하여, 실시예 2에서 수득한 효소를 0.5%(w/v)의 기질과 완충용액(50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0)에서 반응시켰다. 효소 반응시 발생하는 pNP의 노란색의 흡광도를 405 nm에서 확인하여 역가를 측정하였으며, 효소 1 unit은 효소가 1분간 가수분해하는 글루코시드결합의 μmol 수로 나타났다. 실험 결과, 최적 온도는 90℃ 근방으로 나타났다.

[0043] 한편, 최적 pH를 확인하기 위하여, 다양한 완충용액(50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0-6.0); 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0-7.0); and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5-9.0))을 사용하여 실험을 수행하였으며, 반응 온도는 90℃이었다. 실험 결과, 최적 pH는 pH 6.0 근방으로 나타났다.

[0044] 한편, PAAG 효소의 반감기(half-life)는 각각의 온도(95, 110, 125 ℃)에서 71.3, 46, 16.4 분으로 나타났다.

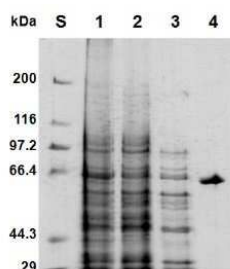
[0045] 도 2는 본 발명 효소의 최적 온도 (A), 최적 pH (B) 및 열안정성 (C)을 보여주는 결과이다.

[실시예 4: 본 발명의 효소를 이용한 포도당 생성 확인 - 효소 반응 산물의 분석]

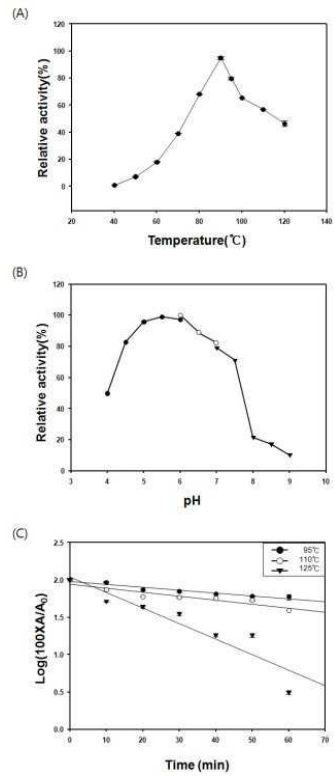
- [0047] 본 실시예에서는 본 발명의 효소 (PAAG)를 이용하여 포도당을 생성할 수 있음을 확인하기 위해, 다양한 기질(말토올리고당)에 PAAG 효소를 첨가하여 가수분해시킨 후, 반응 산물을 TLC로 분석하였다.
- [0048] TLC(thin layer chromatography)는 K5F 실리카겔 플레이트(silica gel plate, Whatman, Maidstone, United Kingdom)를 이용하였으며, 전개용매는 n-butanol-ethanol-water (5:5:3, v/v/v)을 사용하였다. TLC 전개 후, 발색용액(0.3% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 5% (v/v) H₂SO₄ in methanol)을 도포한 후, 10분간 100℃ 오븐에서 건조시켰다.
- [0049] 동일한 양의 효소를 다양한 종류의 기질과 3시간 동안 반응 후, TLC로 분석한 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 본 발명의 효소 (PAAG)는 다양한 말토올리고당을 가수분해할 수 있음을 확인할 수 있었다. 도 3은 다양한 기질에 본 발명 효소 (PAAG)를 첨가하여 가수분해 반응시킨 결과의 TLC 사진이다. 도 3에서 보듯이, 긴 사슬을 지닌 기질인 말토헥사오스(G6), 말토헤pta오스(G7) 등은 덜 가수분해되어 TLC상에 남아있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 효소 PAAG는 짧은 사슬을 지닌 말토올리고당 (말토오스, 말토타리오스)의 가수분해에 유리한 것으로 판단할 수 있었다. 또한, 도 3의 Lane 8에서 보는 결과와 같이, 본 발명 효소 PAAG는 이소말토오스의 가수분해도 가능한 것을 알 수 있었다.
- [0050] 한편, 본 발명의 효소 PAAG와 상용효소(AMG, Novozyme)의 반응성을 HPAEC를 통해 비교하고자 하였다.
- [0051] HPAEC 분석(high-performance anion-exchange chromatography analysis)은 CarboPac PA1 column (0.4×25 cm; Dionex, Sunnyvale, CA)을 'pulsed amperometric detector (ED40; Dionex)'에 연결하여 분석하였다. 적절히 희석된 분석시료 20 µl를 주입한 후, 150 mM의 NaOH의 이동상에 1.0 mL/min의 속도로 흐르게 하였다. 이때, 이동상에 소듐 아세테이트 (sodium acetate)를 농도 구배(gradient)가 일어나도록 하여 당 성분들이 포도당(G1), 엿당(G2), 말토타리오스(G3) 등이 순차적으로 검출되게 하였다. 농도 구배 조건은 0분~15분간 소듐 아세테이트 (sodium acetate)가 60 mM에서 180 mM까지 증가하도록 프로그램하였다.
- [0052] 실험을 위해, 5%의 말토타리오스(G6)에 동일한 양(0.1 U/mg of G6)의 PAAG와 AMG(상용화된 당화효소, fungal glucoamylase, Novozyme 생산)를 첨가하여 각각의 최적 반응 조건에서 50시간 반응 후, 반응 산물을 분석하였다. PAAG는 pH 6.0, 90℃, AMG는 pH 4.5, 60℃에서 반응시켰다.
- [0053] 실험 결과, 두 효소 모두 기질을 분해하여 포도당을 생산하였고, 그 수율은 PAAG와 AMG 각각 99.2% 와 98.1%이었다. AMG의 경우 당전이반응 및 역가수분해반응으로 다량의 이소말토오스(IsoG2)가 생산된 것을 확인할 수 있었으며, 이것이 생산된 포도당의 순도에 영향을 미친 것으로 사료되었다.
- [0054] 도 4는 말토타리오스 (도 4에서 A)를 이용한 본 발명 효소 PAAG (도 4에서 B)와 상업 효소 AMG (도 4에서 C)의 당화능 비교 결과이다.

도면

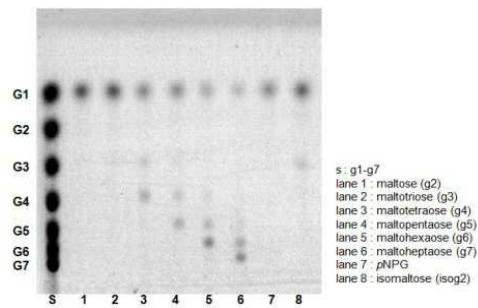
도면1



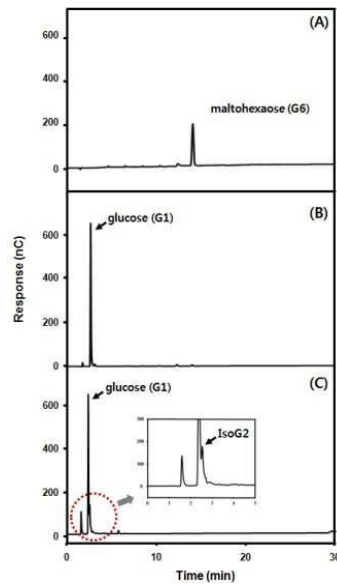
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Method for production of glucose with thermal stable
alpha-glucosidase

<130> AP-2014-0072

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2052

<212> DNA

<213> Pyrobaculum aerophilum str. IM2

<400> 1

atgctcgcag ttgggaggaa gtctgtaaag ctaacgcagg gaagacagct actttctttc	60
ccctgccgc aaggagagcc gagacccgcc gccgcttttg acgggagaac tctaacggct	120
agttgttcgc acgtgagcgt tgagcttaaa attgaacaaa ccgagggggg tgtccgtttg	180
tataaacaat tgggccgctg ggagcacgtc ttcggcttgg ggacaagggc ctatccgcca	240
gaccgcagac ggggccgttt tatacttttt aacaacgact tatatgccta ccagctgggg	300
atggaccccc tctatgcctc tatccccctt atggtctttg tggagggggg aaggggcttt	360
gggcttatgt ttaacagccc ggcgtatggc attgtcgaca ttggatatac gaaatacagt	420
gaggtgtcca ttacgtgga ggacaaaccg gagctgtata tactattcgg cgagacgccg	480
ctagacgtat actccacgta tagcgacgtc actggaaagc cgtttttacc cccaatttgg	540

ggcctcgcc tccacatc cgggtacgc tacgagcctc acaacgccgt agttgaagtc	600
gtggaagagg taattgaggc agtgccggtt gacgccgttt atctcgacat agactacatg	660
gacaggtata agcaattcac ttgggacgcg aggaagtcc cggacccag ggggtttgtg	720
gaacaagtac acgagctggg ggcgagggtg gtcgctatct tagacccgta tatcaaggca	780
gagcccggtt acaagccctt tgaaaaactc ctcgactgtt ttctcgtaac tgaaaacgac	840
gagatttacc tagcccgggg ctggcccggc ctctccgcc tgcccgactt tttaaaccc	900
gaatgtagag agaagtgggc cgctctagtc gccgagtttg tttctaatta taacatcgac	960
ggcatttggc ttgatatgaa tgagccact gtttttaact gcgacgcagt ggccacgaag	1020
tcaagaatat acgccctcgc cggggcgacg cctcacagct tgacgaaaga agagttatac	1080
tgcaaggccc ccccgggcgc ttatcacgtg gtaaacgggg tgaagatccc ccacgaggcg	1140
gttagggggc tataccctta tttcgaggct atggctactt acgagggctt gttaaaggct	1200
gggaaagagc ctttcattct ctcaaggtct ggctatttgg gcatacagaa atacccgcc	1260
ttgtggactg gcgacgtgcc gagcatttgg gagggcttga ggctcacttt aatggcggtg	1320
ttaggcctct cggcctccgg agtgcccttt gtgggcgcgc acgttggggg gttcgccggg	1380
attggagact acgagctaata cgccaggtgg taccaggcgg cggccttttt ccccatctac	1440
agagtgcata gagacaaggg gacgcctgac gccgaaatta ccaggctacc gactaaatac	1500
cagcagatgg cgcttgaggc agtgaaaatg aggtgaggt ttatgcccta tttcggcac	1560
ttggcgtggg aggacattt aacaggtgag cctattgtca ggccgcttgg ccttgagttc	1620
ccagacgacg aagacgcctt taagatatac gacgagtata tgggtgggcc ctacctctc	1680
tacccccca tagtgacaa gggggctcag cgtaggaggg tctacctccc gcgggggatt	1740
tggttggagc tcgccacagg caaacgcat atagggccca cttgggcgct ctcagaggcc	1800
gacatgcctc tatacataag gtcaaatcc gcagtgcct ctcaagaggg agttctaata	1860
ttcggagggg ggaagtgggt tatttacaca gacgaggga ttgtggaagt ctcccgag	1920
ggggacgagg tgaagataac taaagcaatg cctattttca tcttgtctga gagactagac	1980
gaagtgggtg taaacggagt gccccccgc ggggcctata caaggctggg cacttacgtg	2040
gaacaagggg at	2052
<210> 2	
<211> 684	
<212> PRT	
<213> Pyrobaculum aerophilum str. IM2	
<400> 2	

Met Leu Ala Val Gly Arg Lys Ser Val Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln
1 5 10 15

Leu Leu Ser Phe Pro Leu Pro Gln Gly Glu Pro Arg Pro Ala Ala Ala
20 25 30

Phe Asp Gly Arg Thr Leu Thr Ala Ser Cys Cys Asp Val Ser Val Glu
35 40 45

Leu Lys Ile Glu Gln Thr Glu Gly Gly Val Arg Leu Tyr Lys Gln Leu
50 55 60

Gly Arg Trp Glu His Val Phe Gly Leu Gly Thr Arg Ala Tyr Pro Pro
65 70 75 80

Asp Arg Arg Arg Gly Arg Phe Ile Leu Phe Asn Asn Asp Leu Tyr Ala
85 90 95

Tyr Gln Leu Gly Met Asp Pro Leu Tyr Ala Ser Ile Pro Phe Met Val
100 105 110

Phe Val Glu Gly Gly Arg Gly Phe Gly Leu Ile Val Asn Ser Pro Ala
115 120 125

Tyr Gly Ile Val Asp Ile Gly Tyr Thr Lys Tyr Ser Glu Val Ser Ile
130 135 140

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

Leu Asp Val Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp Val Thr Gly Lys Pro Phe Leu
165 170 175

Pro Pro Asn Trp Gly Leu Gly Leu His Ile Ser Arg Tyr Ser Tyr Glu
180 185 190

Pro His Asn Ala Val Val Glu Val Val Glu Glu Val Ile Glu Ala Val
195 200 205

Pro Val Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ile Asp Tyr Met Asp Arg Tyr Lys
210 215 220

Gln Phe Thr Trp Asp Ala Arg Lys Phe Pro Asp Pro Arg Gly Phe Val
225 230 235 240

Glu Gln Val His Glu Leu Gly Ala Arg Val Val Ala Ile Leu Asp Pro

245 250 255
 Tyr Ile Lys Ala Glu Pro Gly Tyr Lys Pro Phe Glu Lys Leu Leu Asp
 260 265 270
 Cys Phe Leu Val Thr Glu Asn Asp Glu Ile Tyr Leu Ala Arg Gly Trp
 275 280 285
 Pro Gly Leu Ser Ala Leu Pro Asp Phe Leu Lys Pro Glu Cys Arg Glu
 290 295 300

 Lys Trp Ala Ala Leu Val Ala Glu Phe Val Ser Asn Tyr Asn Ile Asp
 305 310 315 320
 Gly Ile Trp Leu Asp Met Asn Glu Pro Thr Val Phe Asn Cys Asp Ala
 325 330 335
 Val Ala Thr Lys Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Ala Gly Ala Thr Pro His
 340 345 350
 Ser Leu Thr Lys Glu Glu Leu Tyr Cys Lys Ala Pro Arg Gly Ala Tyr
 355 360 365
 His Val Val Asn Gly Val Lys Ile Pro His Glu Ala Val Arg Gly Leu

 370 375 380
 Tyr Pro Tyr Phe Glu Ala Met Ala Thr Tyr Glu Gly Leu Leu Lys Ala
 385 390 395 400
 Gly Lys Glu Pro Phe Ile Leu Ser Arg Ser Gly Tyr Leu Gly Ile Gln
 405 410 415
 Lys Tyr Ala Ala Leu Trp Thr Gly Asp Val Pro Ser Thr Trp Glu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Leu Thr Leu Met Ala Val Leu Gly Leu Ser Ala Ser Gly Val
 435 440 445

 Pro Phe Val Gly Ala Asp Val Gly Gly Phe Ala Gly Ile Gly Asp Tyr
 450 455 460
 Glu Leu Ile Ala Arg Trp Tyr Gln Ala Ala Ala Phe Phe Pro Ile Tyr
 465 470 475 480
 Arg Val His Arg Asp Lys Gly Thr Pro Asp Ala Glu Ile Thr Arg Leu
 485 490 495
 Pro Thr Lys Tyr Gln Gln Met Ala Leu Glu Ala Val Lys Met Arg Leu

500 505 510
 Arg Phe Met Pro Tyr Leu Arg His Leu Ala Trp Glu Ala His Leu Thr

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

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

 660 665 670
 Tyr Thr Arg Leu Gly Thr Tyr Val Glu Gln Gly Asp
 675 680