



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0133996
(43) 공개일자 2016년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 30/12 (2006.01) A23L 29/212 (2016.01)
C12N 9/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 30/12 (2013.01)
A23L 29/212 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0067324
(22) 출원일자 2015년05월14일
심사청구일자 2015년05월14일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
심재훈
강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호 (석사동, 현진에버빌2차)
이해원
경기도 구리시 동구릉로66번길 14, 102동 2201호 (인창동, 구리인창공원우림필유)
(74) 대리인
특허법인태동

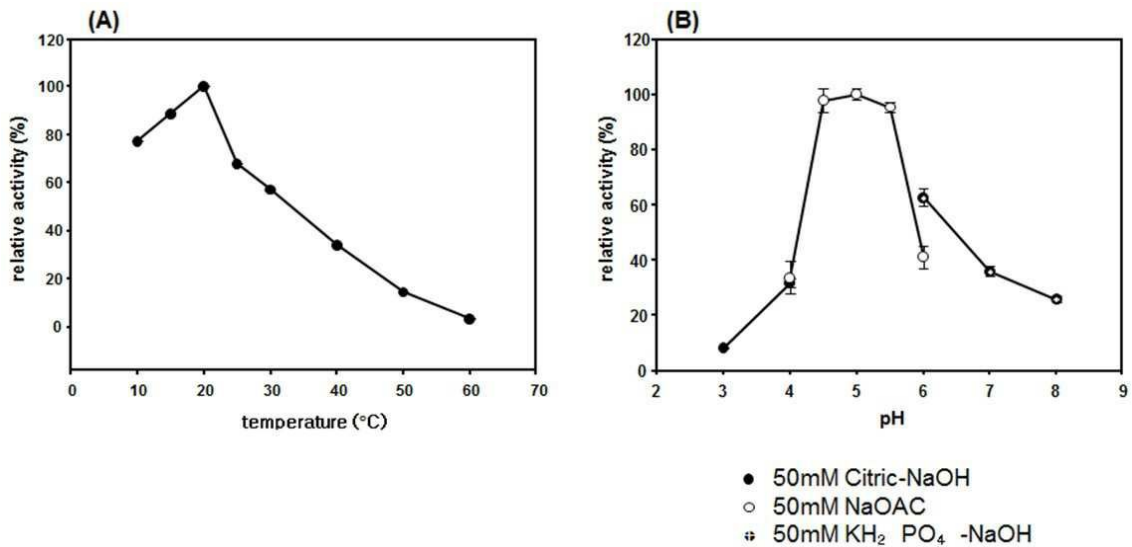
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 알파 아밀라아제를 이용한 지소화성 전분의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 전분에 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제를 처리하는 것을 특징으로 하는 지소화성 전분의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제는 상온에서 짧은 시간 안에 간편하게 지소화성 전분을 제조할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/2414 (2013.01)

C12Y 302/01001 (2013.01)

(72) 발명자

전혜연

강원도 춘천시 후석로 325, 109동 705호 (후평동,
춘천더샵아파트)

최혜정

서울특별시 구로구 남부순환로95길 54, 106동 200
2호 (개봉동, 삼환아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

전분에 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제를 처리하여 가수분해시키는 것을 특징으로 하는 지소화성 전분의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알파 아밀라아제는,

비피도박테리움 롱검 서브스피시스 롱검 JCM 1217 (*Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM 1217) (KCTC 3127) 균주 유래인 것을 특징으로 하는 지소화성 전분의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알파 아밀라아제의 처리는,

10~25℃의 온도, 4.5~5.5의 pH 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 지소화성 전분의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 지소화성 전분의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제를 이용한 지소화성 전분의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전분은 곡류, 서류 등의 식물체에 들어있는 저장 다당류로 인간의 주요 탄수화물 공급원이다. 전분은 영양학적으로 빠르게 소화되는 전분(rapidly digestible starch, RDS), 지소화성 전분(slowly digestible starch, SDS), 난소화성 전분(resistant starch, RS)으로 나뉘어진다. 지소화성 전분은 소장에서 완전히 소화되지만 소화 속도가 느린 전분이고, 난소화성 전분은 소장에서 소화되지 않고 대장에서 미생물에 의해 발효되는 전분이다.

[0003] 일반적인 전분은 체내에서 포도당으로 전환되어 빠르게 흡수된 후, 에너지로 쓰이거나 저장된다. 이와 같은 빠른 소화는 충분한 포만감을 느끼지 못하게 하고, 체중을 쉽게 증가시키는 문제를 수반한다.

[0004] 그러나, 지소화성 전분은 위와 소장을 거쳐 대장까지 도달하는 속도가 느리기 때문에 포만감의 지속시간이 길다. 또한, 혈당이 급격하게 상승하는 것을 막아 당뇨 관리에도 좋고, 콜레스테롤이 흡수되는 것도 막아 고지혈증과 같은 대사성 질환을 예방할 수도 있다.

[0005] 또한, 혈당 수치를 빠르게 증가시키는 식품은 인슐린이 과량 분비되고 반복되면 췌장의 과부하로 인슐린이 분비되어도 그 역할을 제대로 하지 못하는 '인슐린 저항성'을 유발하는데, 혈당 수치를 천천히 증가시키는 지소화성 전분은 비만이나 당뇨병 환자들의 식이에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0006] 한편, 지소화성 전분을 제조하기 위한 방법으로는, 통상적으로 물리적 처리, 화학적 처리 및 효소적 처리를 단독 또는 병행하는 방법이 사용된다. 이중 효소적 처리는 환경친화적이며, 소비자들에게 안전하고 건강지향적인 처리라 할 수 있다. 또한, 특이적인 반응만을 수행하기 때문에, 우리가 원하는 반응만을 유도할 수 있고, 수율도 높으며, 반응의 부산물이 적은 장점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본 등록특허 JP 04945096 (등록일자: 2012.03.09)에는, 텍스트린의 수용액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 처리한 후, 글루코스 이소머라제(glucose isomerase)를 처리하는 것을 특징으로 하는 난소화성 텍스트린의 제조방법에 대한 기술이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1426805호 (등록일자: 2014.07.30)에는, (a) 가교 결합에 의해 변형된 변성전분의 현탁액을 준비하는 단계; 및 (b) 상기 변성전분의 현탁액을 130~180℃의 온도 조건에서 열처리하는 단계를 포함하고, 상기 열처리 온도가 130℃~140℃인 경우 열처리 시간은 20초 이상이고, 상기 열처리 온도가 140℃~180℃인 경우 열처리 시간은 10초 이상인 것을 특징으로 하는 가공성이 향상된 난소화성 전분의 제조방법에 대한 기술이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 간편하고, 경제적인 방법으로 지소화성 전분을 제조하는 방법을 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전분에 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제를 처리하여 가수분해시키는 것을 특징으로 하는 지소화성 전분의 제조방법을 제공한다.

[0010] 전분에 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리하여 가수분해된 반응 생성물을 수득한 후, 이에 대한 알파 아밀라아제의 반응 정도를 측정된 결과, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 효소를 처리한 샘플이 그렇지 않은 대조군 샘플에 비해 반응 속도가 느려짐을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 효소 처리로 인하여, 소화가 쉬운 전분(RDS)이 지소화성 전분(SDS)으로 전환된 것을 확인할 수 있었던 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 효소는 반응 시간이 매우 빠르고, 상온 (20℃ 내외)에서 최적 반응 속도를 보이기 때문에, 짧은 시간에 경제적으로 지소화성 전분을 제조할 수 있는 장점이 있다.

[0012] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 알파 아밀라아제는, 바람직하게 비피도박테리움 롱검 서브스피시스 롱검 JCM 1217 (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217) (KCTC 3127) 균주 유래인 것이 좋다.

[0013] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 알파 아밀라아제의 처리는, 바람직하게 10~25℃의 온도, 4.5~5.5의 pH 조건에서 수행하는 것이 좋다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 의할 경우 전분에 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 알파 아밀라아제를 처리하여 가수분해시킴으로써 지소화성 전분을 제조할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상온에서 짧은 시간 안에 지소화성 전분을 제조할 수 있어 매우 경제적이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 인서트(insert) DNA (*bllj*-0710)가 삽입된 재조합 벡터의 맵이다.

도 2는 정제된 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소의 SDS-PAGE 전기영동 사진이다.

도 3은 다양한 기질에, 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소를 처리한 TLC 결과이다. (A)는 {말토오스 (maltose, G2), 말토트리오스(maltotriose, G3), 말토테트라오스(maltotetraose, G4), 말토헨타오스 (maltoheptaose, G7), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD), 아밀로오스(amylose), 아밀로펙틴(amylopectin), 가용성 전분(soluble starch), 풀루란(pullulan)}에 대한 TLC 결과이고, (B)는 pNPG5에 대한 TLC 결과이다.

도 4는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소의 반응 최적 온도 및 pH를 확인한 실험 결과이다. (A)는 BiLA 효소의 반응 최적 온도를 확인한 실험 결과이고, (B)는 BiLA 효소의 반응 최적 pH를 확인한 실험 결과이다.

도 5는 기질에 따른 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소의 반응성 (k_{cat}/K_m)을 확인한 결과이다. (A)는 가용성 전분(soluble starch), (B)는 아밀로펙틴(amylopectin), (C)는 아밀로오스(amylose), (D)는 옥수수 전분(corn starch), (E)는 감자 전분(potato starch)에 대한 결과이다.

도 6은 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소의 전분 분해능을 확인한 결과이다. 'control'은 BiLA 효소 무처리 군 (대조군)이고, 'rxn'은 BiLA 효소 처리군이다.

도 7은 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소가 처리된 전분 용액의 HPAEC 결과이다.

도 8은 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소가 처리된 전분 용액을 에탄올 침전하여 수득한 반응 생성물에 대한 HPAEC 결과이다.

도 9는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소가 처리된 전분 용액을 에탄올 침전하여 수득한 반응 생성물에 대한 알파 아밀라아제의 반응성 (k_{cat}/K_m)을 확인한 결과이다. (A)는 대조군 대한 결과이고, (B)는 본 발명 '알파 아밀라아제 (BiLA) 효소 처리 20분 샘플'에 대한 결과이고, (C)는 본 발명 '알파 아밀라아제 (BiLA) 효소 처리 12시간 샘플'에 대한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0018] [실시예 1: 비피도박테리움 롱검 서브스피시스 롱검 JCM 1217 (*Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM 1217) (KCTC 3127) 균주 유래 알파 아밀라아제 유전자 클로닝 및 정제]

[0019] 본 실시예에서는 비피도박테리움 롱검 서브스피시스 롱검 JCM 1217 (*Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM 1217) (KCTC 3127) 균주로부터 알파 아밀라아제 유전자 (*bllj*-0710)를 클로닝하고, 정제하고자 하였다.

[0020] (1) 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)

[0021] 비피도박테리움 롱검 서브스피시스 롱검 JCM 1217 (*Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM 1217) 균주로부터 본 발명의 알파 아밀라아제(alpha amylase)를 증폭하기 위하여 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용하였다.

[0022] 멸균수 37.5 μ L, 10X EX Taq 버퍼 5 μ L, dNTP 4 μ L, 정방향 프라이머(forward primer, 하기 표 1) 1 μ L, 역방향 프라이머(reverse primer, 하기 표 1) 1 μ L, DNA (KCTC 3127, *Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM 1217) 1 μ L, EX Taq 0.5 μ L의 혼합물 (총 50 μ L)을 사용하여 98℃에서 1분 동안 1회 실시한 후, 98℃에서 10초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초의 과정을 총 30회 실시하는 PCR을 수행하였다.

표 1

- [0023]
- | | |
|------------------------------|---|
| 정방향 프라이머
(forward primer) | 5'-GTC GAC TTG GTT GTA AGC ATG GAT TCG-3' |
| 역방향 프라이머
(reverse primer) | 5'-AAG CTT TCA GTA TTG ATA CGC TGT ACT GCC-3' |
- [0024]
- (2) PCR 산물의 정제
- [0025]
- 상기의 PCR 반응후, PCR 혼합물에 5배 부피만큼의 BNL 버퍼를 넣고 볼텍싱(vortexing)한 후, BNL 버퍼의 1.5배 부피만큼의 이소프로판올(isopropanol)을 넣고, 여러 번 피펫팅(pipetting)하며 섞어주었다. 그 후, 스핀컬럼(spin column)에 옮겨 담고, 11,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 이후, 분리된 하층액을 버리고, 700 μ L의 워싱버퍼(washing buffer)를 넣은 후, 11,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 이후, 분리된 하층액을 제거하고, 아무것도 넣지 않은 상태로 다시 11,000 rpm으로 1분간 다시 원심분리하였다. 그 후, 스핀컬럼(spin column)의 윗부분을 마이크로센트리퓨즈 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 담고, 멸균수 30 μ L를 넣은 후, 1분간 방치한 뒤, 다시 11,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 그 후, 나노드랍(nanodrop)으로 농도를 측정하였는데, 생산된 PCR 산물 (*bllj*-0710)의 농도가 157.1 ng/ μ L임을 확인하였다.
- [0026]
- (3) 제한효소처리
- [0027]
- 상기에서 PCR 산물로 수득된 DNA (*bllj*-0710) 28 μ L, 1.5 $\times$ K 버퍼 7.5 μ L, 멸균수 10.5 μ L, *Sal* I 2 μ L, *Hind* III 2 μ L의 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 벡터(vector)로는 p6xHTKnd를 사용하여 상기와 같은 방법으로 제한효소처리를 하였다. 이때, 벡터에만 다시 CIAP 1 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다.
- [0028]
- (4) 겔 추출 (Gel extraction)
- [0029]
- 상기에서 제한효소 처리를 한 인서트(insert) DNA (*bllj*-0710), 벡터 (p6xHTKnd) 각각에 로딩버퍼(loading buffer)를 5 μ L씩 넣고, 1.2% 아가로스 겔(agarose gel)을 이용하여, 50 V로 전기영동하였다. 이후, 전기영동하여 나타난 밴드를 잘라서 멸균된 마이크로센트리퓨즈 튜브에 담고 무게를 측정하였다. 이후, 측정된 무게의 3배 양인 BNL 버퍼를 넣고 볼텍싱한 뒤, 55 $^{\circ}$ C의 히팅 블록(heating block)에서 10분 동안 반응시키며 녹여주었다. 여기에 겔(gel) 무게의 1배인 이소프로판올(isopropanol)을 넣고 여러 번 피펫팅 해 주었다. 그 후, 각각을 스핀컬럼에 옮겨 담고, 11,000 rpm으로 1분 원심분리하여 분리된 하층액은 제거하였다. 그 후, 워싱버퍼 700 μ L를 넣고, 11,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 분리된 하층액을 제거하고, 한번 더 원심분리하였다. 그 후, 스핀컬럼의 윗부분을 마이크로센트리퓨즈 튜브에 옮겨서 멸균수 30 μ L를 넣고, 1분 동안 방치한 후, 다시 11,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 농도를 측정한 결과, 삽입 DNA는 11.47 ng/ μ L, 벡터는 135.7 ng/ μ L로 확인되었다.
- [0030]
- (5) 라이게이션(Ligation) 및 형질전환(transformation)
- [0031]
- 라이게이션(ligation, 실험군), 셀프 라이게이션(self-ligation, 대조군) 두 가지 샘플을 만들고자 하였다. 라이게이션 혼합물에서는 인서트 DNA와 벡터의 농도가 세 배 이상 차이 나야하는데, 인서트 DNA 8 μ L (91.76 ng/ μ L), 5배 희석한 벡터 1 μ L (27 ng/ μ L), 리가아제(ligase) 9 μ L를 넣어주었다.
- [0032]
- 한편, 대조군인 셀프 라이게이션 혼합물은 5배 희석한 벡터 1 μ L, 인서트 DNA 대신 멸균수 8 μ L, 리가아제 9 μ L로 만들어주었다.
- [0033]
- 상기에서 준비한 라이게이션 혼합물, 셀프 라이게이션 혼합물을 16 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켜 재조합 벡터로 각각 제조하였다 (도 1 참조). 도 1은 본 발명에서 제조한 인서트 DNA (*bllj*-0710)가 삽입된 재조합 벡터의 맵이다.
- [0034]
- 한편, CaCl₂법을 이용하여 대장균을 상기 재조합 벡터로 형질전환하였다. 각각의 대장균 컴피턴트 세포(competent cell, MC1061) 200 μ L에 라이게이션 혼합물, 셀프 라이게이션 혼합물을 각각 1 μ L씩 넣고, 얼음

30분, 42℃ 2분, 얼음 2분 동안 반응시켰다. 이후, LB 배지를 800 μ L 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 후, 5,000 $\times$ g로 1분 동안 원심분리하였다. 그 후, 800 μ L 버리고 나머지 200 μ L를 취해 카나마이신(kanamycin) 배지에 도말한 다음, 37℃에서 24시간 동안 배양시켰다.

[0035] (6) 형질전환 대장균으로부터 본 발명 알파 아밀라아제 효소의 회수

[0036] 라이게이션된 벡터 (실험균)가 삽입된 대장균을 1 L의 LBK 배지에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 20시간 동안 교반하여 키운 후, 원심분리기를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 다시 pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충 용액에 재부유한 후, 초음파로 세포파쇄를 실시하였다. 세포파쇄로부터 수득된 파쇄액을 11,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 취한 후, 이를 Ni-NTA 컬럼에 흡착시켜 본 발명의 알파 아밀라아제 효소를 수득하였다. 그 후, 전기영동을 통하여 분리된 효소를 확인하였다 (도 2). 도 2는 분리된 본 발명 효소의 SDS-PAGE 전기영동 사진이다.

[0037] 상기와 같이 분리된 본 발명의 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것으로 확인되었는데, 본 발명에서는 'BiLA 효소'라고 지칭하기로 한다.

[실시예 2: 본 발명 BiLA 효소의 기질별 반응 시험]

[0038] 본 실시예에서는 본 발명 BiLA 효소의 기질별 반응성을 확인하고자 하였다.

[0040] pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에, 1% 기질 {(말토오스(maltose, G2), 말토트리오스(maltotriose, G3), 말토테트라오스(maltotetraose, G4), 말토헵타오스(maltoheptaose, G7), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD), 아밀로오스(amylose), 아밀로펙틴(amylopectin), 가용성 전분(soluble starch), 풀루란(pullulan)}과 BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고 45℃에서 12시간 동안 반응시킨 후, TLC(thin layer chromatography)를 수행하였다. 그 결과는 도 3의 (A)에 나타내었다.

[0041] 또한, pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에, 기질로 1% pNPG5(p-nitrophenol- α -D-maltopentaoside)와 BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고, 45℃에서 0.5, 1, 3, 5, 24시간 동안 각각 반응시킨 후, TLC를 수행하였다. 그 결과는 도 3의 (B)에 나타내었다.

[0042] 실험결과, 말토헵타오스, 아밀로펙틴, 가용성 전분을 기질로 할 경우, BiLA 효소에 반응함을 확인할 수 있었다 (도 3의 (A)). 도 3의 (A)는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소를 처리한 기질 {(말토오스(maltose, G2), 말토트리오스(maltotriose, G3), 말토테트라오스(maltotetraose, G4), 말토헵타오스(maltoheptaose, G7), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD), 아밀로오스(amylose), 아밀로펙틴(amylopectin), 가용성 전분(soluble starch), 풀루란(pullulan)}의 TLC 결과이다.

[0043] 또한, pNPG5를 기질로 할 경우, 시간이 지남에 따라 pNPG5가 BiLA 효소에 의해 분해됨을 확인할 수 있었다 (도 3의 (B)). 도 3의 (B)는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소를 처리한 기질 (pNPG5)의 TLC 결과이다.

[실시예 3: 본 발명 BiLA 효소의 최적 반응 온도 및 pH 확인 실험]

[0045] 본 실시예에서는 DNS(dinitrosalicylic acid)를 이용하여 본 발명 BiLA 효소의 반응 최적 온도 및 pH를 확인하고자 하였다.

[0046] (1) 최적 반응 온도 확인 실험

[0047] 버퍼 (50 mM Citric-NaOH, 50 mM NaOAc, 50 mM KH_2PO_4 -NaOH)에, 기질 {0.5% 가용성 전분 - starch, soluble (Showa, Japan)}, BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고, 매 분마다 샘플링(sampling)한 후, 샘플과 DNS의 비율이 1:3 이 되게 혼합하였다. 이후, 이를 끓여 10~60℃가 되게 한 후, ELISA 리더 기기에 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0048] 실험결과, BiLA 효소는 20℃에서 역가가 가장 높음을 확인할 수 있었다 (도 4의 (A)). 도 4의 (A)는 본 발명 알

과 아밀라아제 (BiLA) 효소의 반응 최적 온도를 확인한 실험 결과이다.

[0049] (2) 최적 pH 실험

[0050] 버퍼 (50 mM Citric-NaOH, 50 mM NaOAC, 50 mM KH_2PO_4 -NaOH)에, 기질 {0.5%_가용성 전분 - starch, soluble (Showa, Japan)}, BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고 분마다 샘플링한 후, 샘플과 DNS의 비율이 1:3이 되게 하였다. 이를 5분 동안 끓인 후, ELISA 리더 기기에 넣고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] 실험결과, BiLA 효소는 pH 5에서 가장 역가가 높음을 확인할 수 있었다 (도 4의 B)). 도 4의 (B)는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소의 반응 최적 pH를 확인한 실험결과이다.

[0052] [실시예 4: 본 발명 BiLA 효소의 비역가(specific activity) 측정]

[0053] 본 실시예에서는 본 발명 BiLA 효소의 비역가(specific activity)를 측정하고자 하였다.

[0054] pH 5.0의 50 mM NaOAC 완충용액에, 각 기질 {알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, alpha-CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, beta-CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, gamma-CD), 아밀로오스(amylose), 아밀로펙틴(amylopectin), 가용성 전분(soluble starch), 풀루란(pullulan)}과 BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고, 20℃에서 반응시키며 3분, 6분, 9분, 12분, 15분 마다 샘플링한 후, 샘플과 DNS의 비율이 1:3이 되게 하였다. 이후, 5분 동안 끓인 후, ELISA 리더 기기에 넣고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0055] 또한, pH 5.0의 50 mM NaOAC 완충용액에, pNPG5(p-nitrophenol- α -D-maltopentaoside), BiLA 효소를 4:5:1 (완충용액:pNPG5:효소) 비율로 혼합하고, 20℃에서 반응시키며, 3분, 6분, 9분, 12분, 15분에서 샘플링하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0056] 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0057]

기질	비역가(specific activity) (U/mg)
가용성 전분(soluble starch)	18.62
아밀로오스(amylose)	8.04
아밀로펙틴(amylopectin)	2.02
pNPG5	0.0023
풀루란(pullulan)	N.D
알파-사이클로덱스트린(alpha-CD)	N.D
베타-사이클로덱스트린(beta-CD)	N.D
감마-사이클로덱스트린(gamma-CD)	N.D
N.D: not detected	

[0058] 실험결과, BiLA 효소는 가용성 전분(soluble starch)에서 18.62 U/mg으로 가장 우수한 비역가를 나타냄을 확인할 수 있었다. 다만, 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, alpha-CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, beta-CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, gamma-CD), 풀루란(pullulan)에서는 역가가 측정되지 않았다.

[0059] [실시예 5: 본 발명 BiLA 효소의 반응성 (k_{cat}/K_m) 측정]

[0060] 본 실시예에서는 본 발명 BiLA 효소의 반응성 (k_{cat}/K_m) 측정하고자 하였다.

[0061] pH 5.0인 50 mM NaOAC 완충용액에, 1% 기질, BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고 20℃에서 반응시키며 0분, 2분, 4분, 6분, 8분, 10분에 샘플링한 후 샘플과 DNS의 비율이 1:3이 되게 하였다. 이를 5분 동안 끓인 후 ELISA 리더 기기에 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 기질은 가용성 전분(soluble starch), 아밀로펙틴(amylopectin), 아밀로오스(amylose), 옥수수 전분(corn starch), 감자 전분(potato starch)을 사용하여 농도

별로 실험하였다. 그 결과는 하기 표 3 및 도 5에 나타내었다.

표 3

기질	k_{cat}/K_m (ml/mg · sec)
가용성 전분(soluble starch)	1.87441
아밀로펙틴(amylopectin)	0.373
아밀로오스(amylose)	3.4191
옥수수 전분(corn starch)	0.4865
감자 전분(potato starch)	0.5774

실험결과, 가용성 전분에서의 k_{cat}/K_m 는 1.87441 ml/mg · sec, 아밀로펙틴에서는 0.373 ml/mg · sec, 아밀로오스에서는 3.4191 ml/mg · sec, 옥수수 전분에서는 0.4865 ml/mg · sec, 감자 전분에서는 0.5774 ml/mg · sec를 나타내었다.

아밀로오스에서의 반응속도가 가장 빠르며, 그 다음으로 가용성 전분에서 반응속도가 빠름을 확인할 수 있었다(도 5). 도 5는 기질에 따른 본 발명 알파 아밀라아제(BiLA) 효소의 반응성(k_{cat}/K_m)을 확인한 결과이다. (A)는 가용성 전분(soluble starch), (B)는 아밀로펙틴(amylopectin), (C)는 아밀로오스(amylose), (D)는 옥수수 전분(corn starch), (E)는 감자 전분(potato starch)에 대한 결과이다.

[실시예 6: 본 발명 BiLA 효소의 전분 분해능 확인]

본 실시예에서는 본 발명 BiLA 효소의 전분 분해능을 확인하고자 하였다.

pH 5.0인 50 mM NaOAC 완충용액에, 옥수수 전분과 BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣어 제조된 반응액(최종 농도가 4, 8, 16%가 되도록 옥수수 전분 첨가) 500 μ L를 20℃에서 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 24시간 반응시킨 후, 각각의 상태를 육안으로 확인하였다. 대조군(control)은 BiLA 효소 무처리군이 사용되었다.

실험결과, 시간이 지남에 따라 BiLA 효소 처리 용액은 대조군 대비 혼탁도가 낮아진 것(즉, 맑아진 것)을 확인할 수 있었다. 특히, 4% 전분 반응액이 대조군에 비해서 가장 많이 분해되어 가장 맑아진 것으로 확인할 수 있었다. 또한, 전분의 농도가 높아질수록 전분 분해 정도가 낮아지며, 2시간 반응부터 가시적인 차이가 나타남을 확인할 수 있었다(도 6). 도 6은 본 발명 알파 아밀라아제(BiLA) 효소의 전분 분해능을 확인한 결과이다. 'control'은 BiLA 효소 무처리군(대조군)이고, 'rxn'은 BiLA 효소 처리군이다.

[실시예 7: 본 발명 BiLA 효소 처리 전분 용액의 지소화성 확인]

본 실시예에서는 본 발명 BiLA 효소가 처리된 전분 용액의 지소화성을 확인하고자 하였다.

(1) 한계 덱스트린(limit dextrin) 제조

pH 5.0의 50 mM NaOAC 완충액에, 1% 전분 기질 {가용성 전분 - starch, soluble (Showa, Japan)}과 BiLA 효소 0.5 unit/mg을 넣고 20℃에서 반응시켜 0분, 20분, 12시간 단위로 샘플링한 후, 5분 동안 끓이고 식혔다. 그 후, HPAEC(High Pressured Anion Exchange Chrmatography)를 수행하였다.

실험결과, 대조군(BiLA 효소 미처리군)은 중합도가 12, 30인 말토덱스트린이 확인되었으나, BiLA 효소 처리 전분 용액은 대조군에 비하여 중합도가 낮은 말토덱스트린 조성을 보임을 확인할 수 있었다(도 7). 도 7은 본 발명 알파 아밀라아제(BiLA) 효소가 처리된 전분 용액의 HPAEC 결과이다.

(2) 에탄올 침전반응을 통한 반응 생성물의 확인

상기 BiLA 효소 처리된 전분 용액(반응 생성물)에 2배 부피의 에탄올을 넣고 5시간 냉동하였다. 그 후, 7,9000

rpm으로 원심분리하고, 37℃ 인큐베이터(incubator)에서 건조시켜 효소 반응된 전분 (반응 생성물)을 수득하였다. 여기에 pH 5.0의 50 mM 소듐 아세테이트(sodium acetate)를 480 μ L 넣고, 2 U의 이소아밀라아제 (isoamylase)를 넣은 후, 40℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후, HPAEC를 수행하였다.

[0076] 실험결과, 대조군 (BiLA 효소 미처리군)에서는 말토덱스트린이 발견되지 않음에 반해, BiLA 효소 처리 전분 용액에서는 중합도가 3, 4, 13인 말토덱스트린이 발견되었다 (도 8). 도 8은 BiLA 효소가 처리된 전분 용액을 에탄올 침전하여 수득한 반응 생성물에 대한 HPAEC 결과이다.

[0077] (3) 알파 아밀라아제에 의한 반응성 (k_{cat}/K_m) 측정

[0078] 상기 에탄올 침전(EtOH precipitation)으로 수득한 반응 생성물 (대조군, BiLA 효소로 20분간 반응된 전분 용액, BiLA 효소로 12시간 반응된 전분 용액)에 알파 아밀라아제 {시판 중인 일반 효소 - α amylase from porcine pancreas (Sigma-Aldrich Co.)}를 처리하여 반응속도를 측정하였다.

[0079] pH 7.0의 50 mM KHPO 완충액에, 각각의 기질 (하기 표 4)과 알파 아밀라아제를 넣고, 알파 아밀라아제의 최적 온도인 20℃에서 반응시켰다. 반응 후, 0분, 2분, 4분, 6분, 8분, 10분 단위로 샘플링한 후, 샘플과 DNS가 10:1 비율이 되게 DNS를 첨가하였다. 이후, 5분 동안 끓인 후, ELISA 리더 기기에 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 수치로부터 계산한 k_{cat}/K_m 값은 하기 표 4 및 도 9에 나타내었다.

표 4

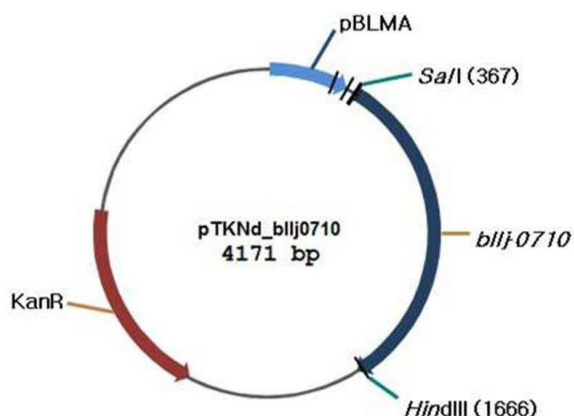
기질	k_{cat}/K_m (ml/mg · sec)
대조군 (BiLA 효소 미처리 군)	0.66
BiLA 효소 처리 전분 용액-20분	0.44
BiLA 효소 처리 전분 용액-12시간	0.23

[0081] 실험결과, 12시간 동안 반응한 BiLA 효소 처리 전분의 알파 아밀라아제의 k_{cat}/K_m 은 0.23 ml/mg · sec, 20분 동안 반응한 BiLA 효소 처리 전분은 0.44 ml/mg · sec, 대조군은 0.66 ml/mg · sec을 나타내었다 (도 9). 도 9는 본 발명 알파 아밀라아제 (BiLA) 효소가 처리된 전분 용액을 에탄올 침전하여 수득한 반응 생성물에 대한 알파 아밀라아제의 반응성 (k_{cat}/K_m)을 확인한 결과이다. (A)는 대조군에 대한 결과이고, (B)는 BiLA 효소 처리 전분 용액 (20분)에 대한 결과이고, (C)는 BiLA 효소 처리 전분 용액 (12시간)에 대한 결과이다.

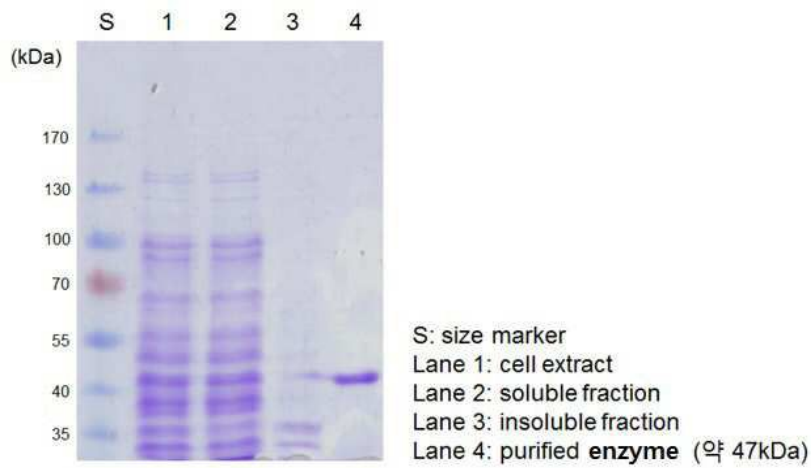
[0082] 이와 같은 결과는, BiLA 효소를 처리한 샘플이 그렇지 않은 대조군에 비해, 알파 아밀라아제에 의한 분해능이 낮은 것을 의미하는데, 이는 BiLA 효소를 처리한 샘플이 그렇지 않은 경우에 비해 느린 소화도, 즉 지소화도를 갖는 것을 의미한다. 또한, BiLA 효소 처리 샘플 간에는 BiLA 효소를 더 오랫동안 처리한 샘플이 더 높은 지소화도를 갖는 것으로 나타났다.

도면

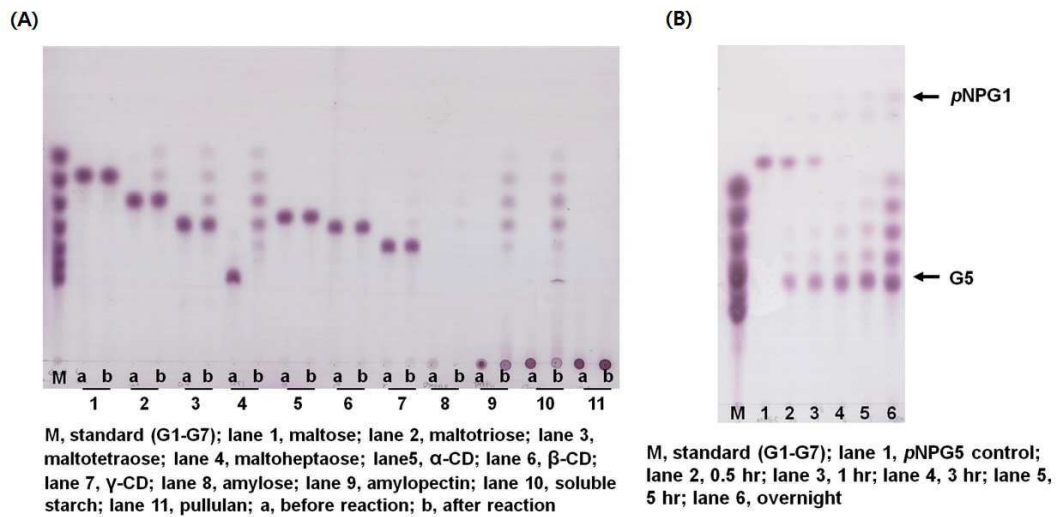
도면1



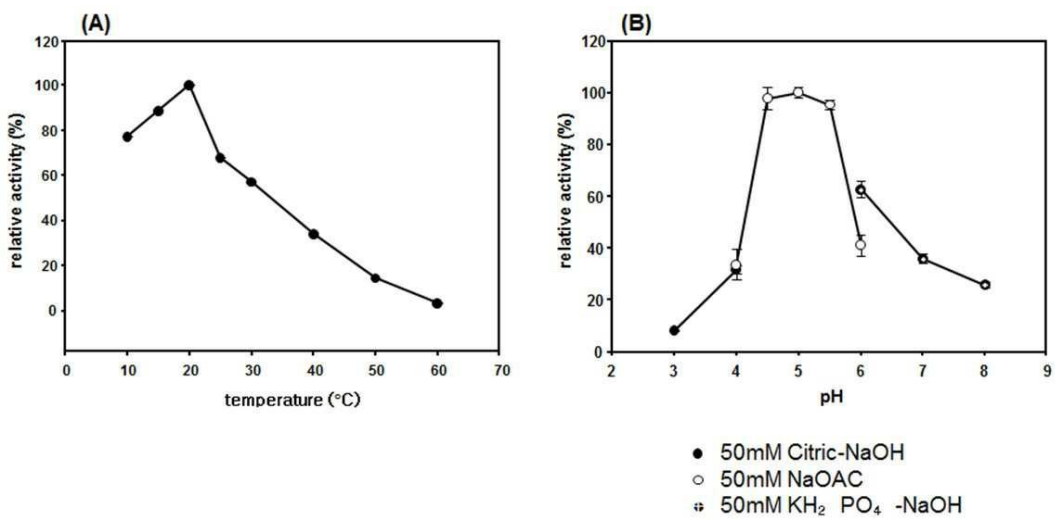
도면2



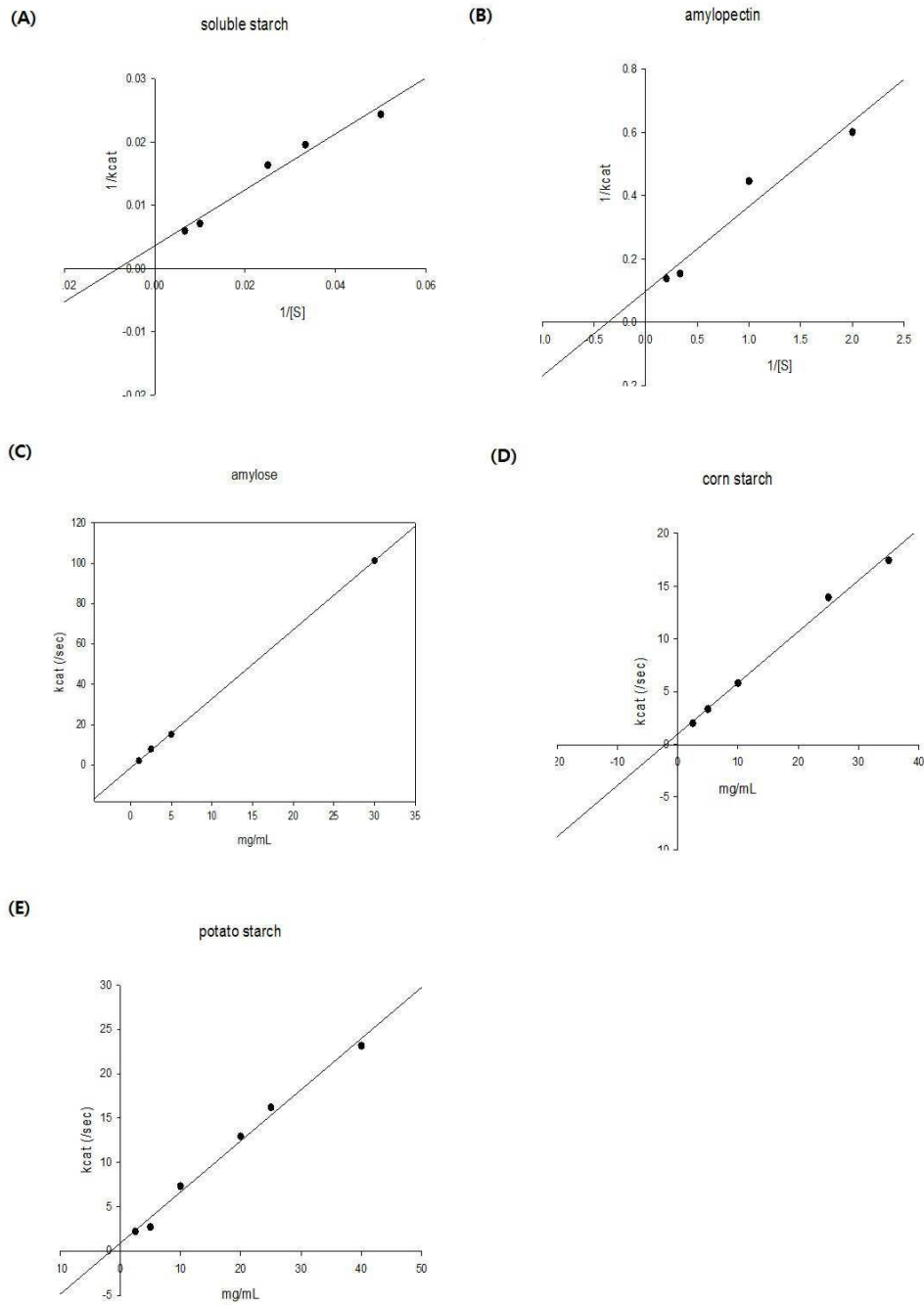
도면3



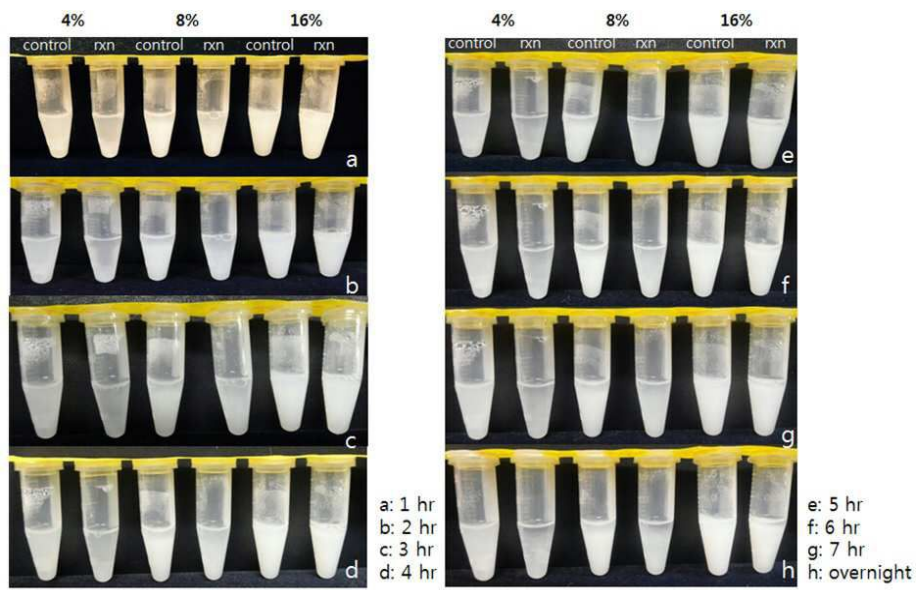
도면4



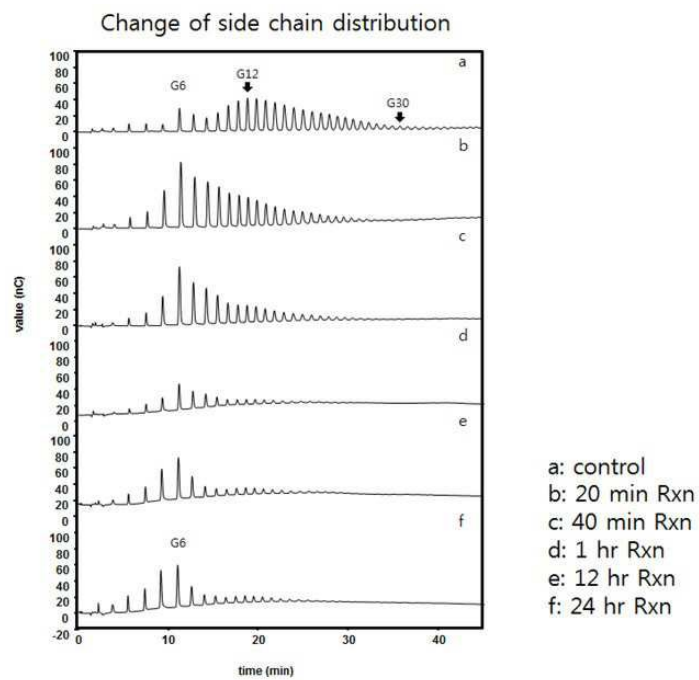
도면5



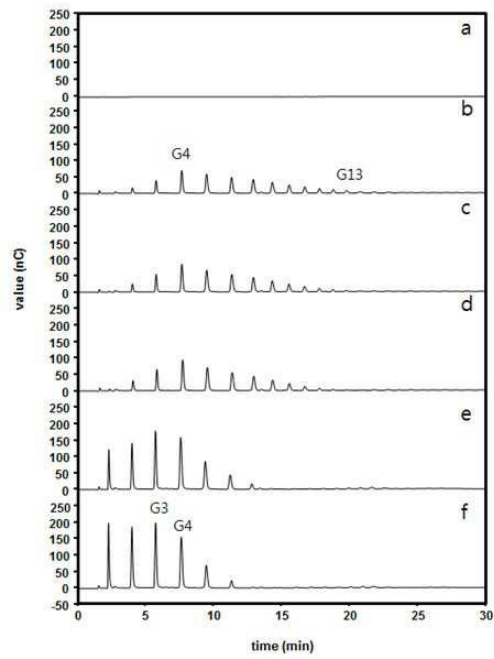
도면6



도면7

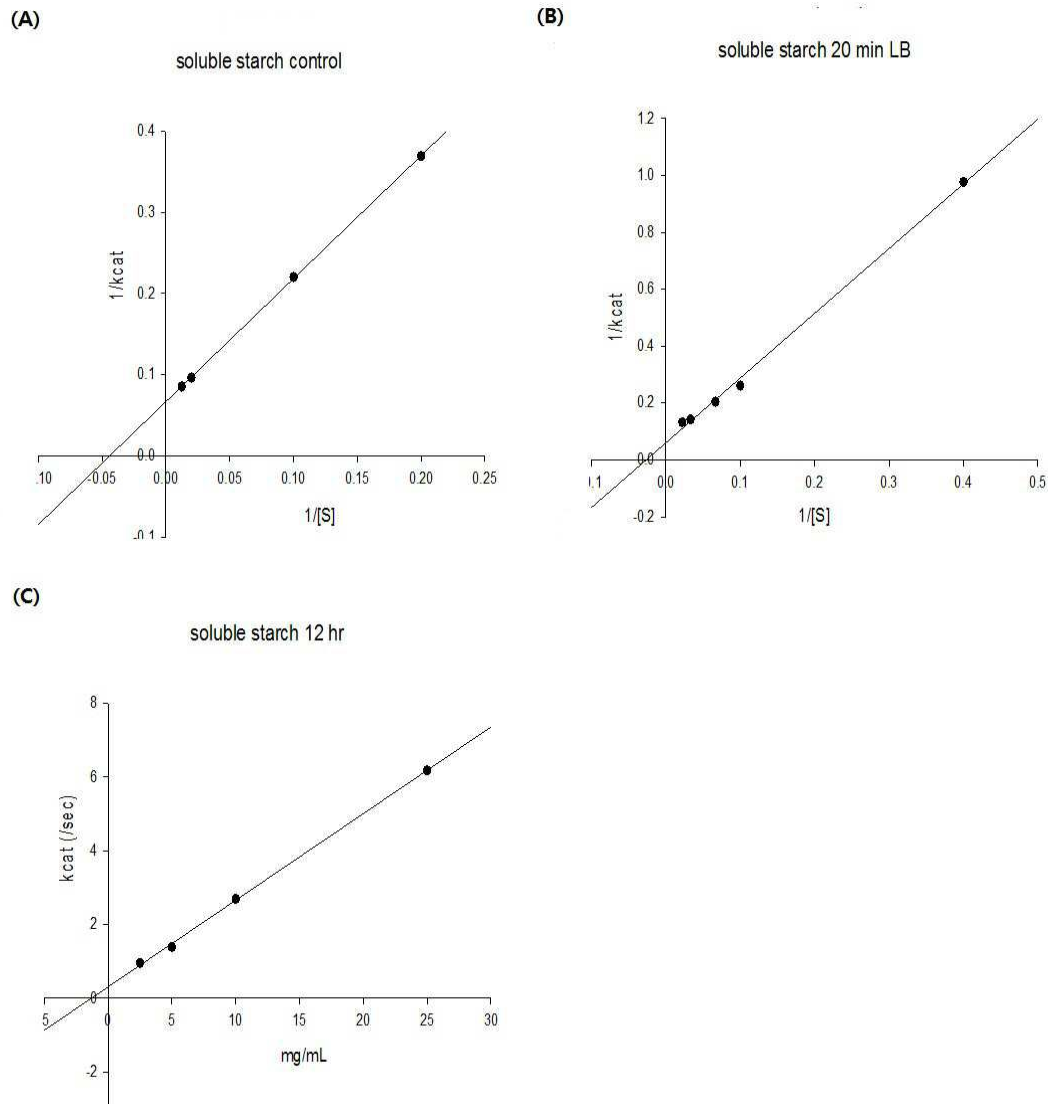


도면8



a: control
b: 20 min Rxn
c: 40 min Rxn
d: 1 hr Rxn
e: 12 hr Rxn
f: 24 hr Rxn

도면9



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Method for production of slowly digestible starch with alpha amylase
- <130> AP-2015-0053
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 431
- <212> PRT
- <213> Bifidobacterium longum subsp. longum JCM 1217 (KCTC 3127)
- <400> 1

Val Val Val Ser Met Asp Ser Ser Arg Thr Met Pro Asp Trp Val Lys
1 5 10 15
Tyr Gly Val Phe Trp His Val Tyr Pro Leu Gly Phe Cys Gly Ala Asp
20 25 30
Ile Arg Pro Ala Gly Pro Arg Gln Phe His Gly Arg Gly Leu Asp Ala
35 40 45
Ile Ile Pro Trp Leu Glu Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ala Ser Gly Leu
50 55 60
Leu Leu Gly Pro Val Phe Glu Ser Ala Thr His Gly Tyr Asp Thr Leu
65 70 75 80
Asp His Met His Ile Asp Val Arg Leu Gly Gly Asp Ala Ala Phe Asp
85 90 95
Gln Leu Val Ala Ala Cys Arg Asp Met Gly Leu Gln Val Met Leu Asp
100 105 110
Gly Val Phe Asn His Val Ser Arg Asn His Pro Ala Val Gln Thr Ala
115 120 125
Leu Asp Glu Thr Ala Gly Arg Leu Asn Pro Ala Asp Asn Pro Trp His
130 135 140
Gly Leu Val Arg Ala His Val Gly Asp Asn Gly Glu Pro Ala Leu Asp
145 150 155 160
Val Phe Glu Gly His Gly Asp Leu Val Ala Leu Asp His Ser Ala Asp
165 170 175
Glu Thr Val Asp Tyr Val Ala His Val Met Ser His Trp Leu Asp Arg
180 185 190
Gly Ala Ala Gly Trp Arg Leu Asp Ala Ala Tyr Ala Val Pro Ser Pro
195 200 205
Phe Trp Ala Arg Val Leu Pro Gln Val Lys Ala Ala His Pro Tyr Ser
210 215 220
Trp Ile Phe Gly Glu Val Ile His Gly Asp Tyr Pro Arg Ile Ile Glu
225 230 235 240
Glu Ser Thr Met Asp Ser Ile Thr Gln Tyr Glu Leu Trp Lys Ser Ile

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

 305 310 315 320
 Ile Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Gly Tyr Val Gly Val Lys Gln Glu Arg
 325 330 335
 Phe Gly Gly Asp Asp Asp Val Arg Pro Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ala
 340 345 350
 Glu Leu Ser Thr Leu Gly Glu Pro Thr Tyr Arg Leu His Gln Ala Leu
 355 360 365
 Ile Ala Leu Arg Arg Arg Asn Pro Trp Leu Leu Asp Ala Arg Thr Glu
 370 375 380

 Ala Val Lys Leu Glu Asn Lys His Phe Val Tyr Arg Ser Thr Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Ala Gln His Ser Leu Thr Val Asp Leu Asn Ile Glu Gln Ser Pro
 405 410 415
 Thr Phe Thr Ile Arg Asn Ala Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Gln Tyr
 420 425 430