



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0052985
(43) 공개일자 2025년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/18 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/18 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0138590
(22) 출원일자 2024년10월11일
심사청구일자 2024년10월11일
(30) 우선권주장
1020230135292 2023년10월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
유상호
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 1401호
(신천동, 파크리오)
강전욱
서울특별시 광진구 자양로30길 49-3, 102호 (구의동)
(74) 대리인
특허법인리체

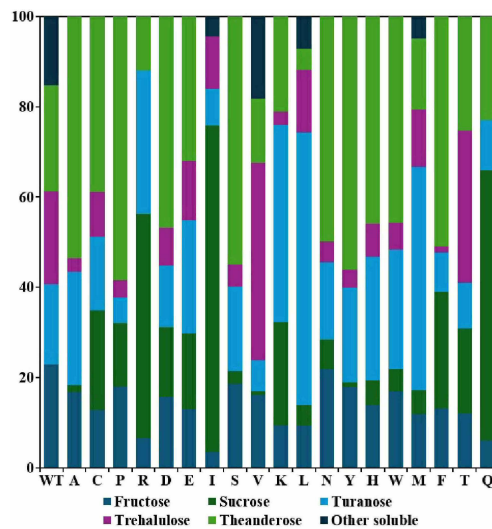
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **삼당류의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 삼당류의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 삼당류 제조방법은 기질로부터 삼당류의 높은 전환 수율을 제공하고 낮은 비용으로 삼당류의 대량 생산이 가능하므로 식품, 화장품 및 제약 산업에 우수한 응용성을 제공한다. 본 발명의 제조방법으로 얻은 삼당류는 낮은 소화율로 칼로리가 낮아 산업적 이용에 유용하다. 본 발명에 따른 신규한 아밀로수크라제는 저비용으로 제조 가능하며 삼당류 생성 반응 활성이 우수하다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

C12P 19/12 (2013.01)

C12Y 204/01004 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2340003219
과제번호	2022R1A6A1A03055869
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	탄수화물소재연구소
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2024.03.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2340009767
과제번호	2023R1A6C101A045
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	핵심연구지원센터 조성 지원 센터(바이오폴리머 첨단소재 핵심연구지원센터)
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2024.03.01 ~ 2025.02.28

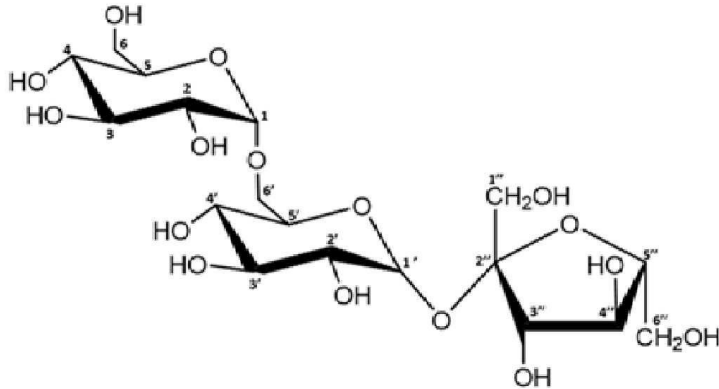
명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 자당과 반응시키는 단계를 포함하는 다음 화학식 1의 삼당류의 제조방법:

[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 아밀로수크라제는 데이노코커스 테저티의 아밀로수크라제 유전자로 제조된 것인 삼당류의 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 상기 아밀로수크라제를 제조하는 단계를 더 포함하는 삼당류의 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 13 중 어느 하나로 표시되는 삼당류의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 반응은 pH 5.5 내지 9.0에서 수행되는 삼당류의 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 반응은 인산나트륨, 아세트산나트륨 또는 글리신-NaOH 중 어느 하나의 완충액에서 수행되는 삼당류의 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 반응은 30 내지 50℃ 온도에서 24 내지 144 시간 동안 수행되는 삼당류의 제조 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 자당은 1.5 내지 2.5 M 농도로 포함되고 상기 아밀로수크라제는 0.1 내지 0.5 mg/ml 농도로 포함되는 삼당류의 제조 방법.

청구항 9

서열번호 15 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제.

청구항 10

서열번호 2 내지 13 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드로 표시되는 아밀로수크라제 유전자.

청구항 11

청구항 10의 유전자를 포함하는 삼당류 제조용 재조합 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 삼당류의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단맛을 내는 물질인 당류는 당분자의 개수에 따라 단당류, 이당류 및 다당류로 나뉜다. 포도당(glucose)과 과당(fructose)은 분자가 하나로 된 단당류이고 자당(sucrose)은 포도당과 과당이 글리코사이드 결합으로 연결된 이당류이다. 올리고당(oligosaccharide)은 3개 이상의 당 분자가 뭉쳐진 다당류에 속한다. 당류는 대부분의 과일, 유제품, 곡류 등에 함유되어 있기 때문에 식품을 통하여 섭취될 수 있으며 에너지를 공급하고 정신적인 만족감을 주는 기능을 한다.

[0003] 올리고당은 단당류나 이당류에 비해 소화와 섭취가 어려워 칼로리가 낮을 뿐만 아니라 장내에 공생하는 유용 미생물의 성장을 자극하는 프리바이오틱스로 활용될 수 있는 장점이 있다. 특히 자당과 과당의 과잉 섭취는 열량을 높여 비만을 유발하거나 혈중 중성 지방을 높여 심혈관 질환 등 성인병 발생 위험을 증가시킬 수 있고, 어린이의 경우에는 충치, 과잉행동장애와 같은 질병 발생 위험과 관련이 있는 것으로 보고되고 있는 등 유해성 논란이 계속되면서 건강을 위해 설탕과 과당의 대체제로 올리고당을 섭취하는 소비자가 늘어나고 있다.

[0004] 삼당류는 올리고당의 일종으로 식품 공전 상 당분자들 사이의 결합 개수(Degree of Polymerization)가 3인 DP3이다. DP3은 단당류(DP1) 및 이당류(DP2)와 달리 식품 성분표에 반드시 그 함량을 기재하지 않아도 되므로 상대적으로 식품 첨가제로 활용이 자유롭다. 따라서 신규 삼당류를 개발하고 이를 높은 수율로 생산할 수 있다면 산업적 활용 가치가 높다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국특허공개 제10-2013-0056273호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 삼당류의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 삼당류를 합성하는 신규한 효소를 제공하는 것을 목적으로 한다.

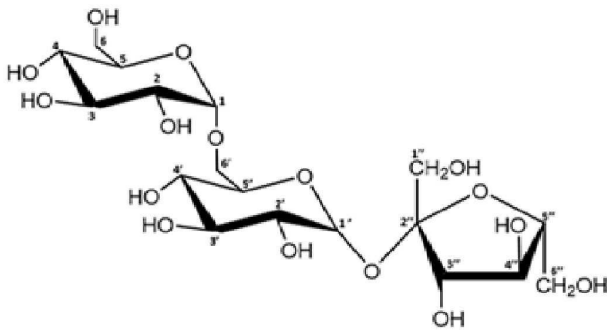
[0008] 본 발명은 신규한 효소를 코딩하는 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 위 유전자를 포함하는 삼당류 제조용 재조합 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 자당과 반응시키는 단계를 포함하는 다음 화학식 1의 삼당류의 제조방법:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 2. 위 1 에 있어서, 상기 아밀로수크라제는 데이노코커스 테저티의 아밀로수크라제 유전자로 제조된 것인 삼당류의 제조방법.

[0014] 3. 위 1 에 있어서, 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 상기 아밀로수크라제를 제조하는 단계를 더 포함하는 삼당류의 제조방법.

[0015] 4. 위 3 에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 13 중 어느 하나로 표시되는 삼당류의 제조방법.

[0016] 5. 위 1에 있어서, 상기 반응은 pH 5.5 내지 pH 9.0에서 수행되는 삼당류의 제조방법.

[0017] 6. 위 1에 있어서, 상기 반응은 인산나트륨, 아세트산나트륨 또는 글리신-NaOH 중 어느 하나의 완충액에서 수행되는 삼당류의 제조방법.

[0018] 7. 위 1에 있어서, 상기 반응은 30 내지 50℃ 온도에서 24 내지 144 시간 동안 수행되는 삼당류의 제조 방법.

[0019] 8. 위 1에 있어서, 상기 자당은 1.5 내지 2.5 M 농도로 포함되고 상기 아밀로수크라제는 0.1 내지 0.5 mg/ml 농도로 포함되는 설탕류의 제조 방법.

[0020] 9. 서열번호 15 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제.

[0021] 10. 서열번호 2 내지 13 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드로 표시되는 아밀로수크라제 유전자.

[0022] 11. 위 10의 유전자를 포함하는 삼당류 제조용 재조합 벡터.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 삼당류 제조방법은 재조합 아밀로수크라제의 높은 효소 활성과 안정성이 기질에 작용하여 높은 삼당류 전화 수율을 제공한다.

[0024] 본 발명의 삼당류 제조방법은 낮은 비용으로 삼당류의 대량 생산이 가능하므로 식품, 화장품 및 제약 산업에 우 수한 응용성을 제공한다.

[0025] 본 발명의 제조방법으로 얻은 삼당류는 낮은 소화율로 흡수가 천천히 이루어지며 칼로리가 낮아 탄수화물 개발 시장의 산업적 이용에 유용하다.

[0026] 본 발명에 따른 아밀로수크라제는 저비용으로 제조 가능하며 삼당류 전환 당전이 활성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 2는 본 발명에 삼당류 제조용 제조합 벡터를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 제조합 벡터로 형질전환된 *E. coli* 세포에서 아밀로수크라제의 발현이 나타난 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제의 SDS-PAGE 분석에 따른 분자량을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제를 자당을 기질로 하여 반응시킨 후 HPSEC-RI 분석 결과 단당류(DP1)와 이당류(DP2) 외에 삼당류(DP3)에 해당하는 피크를 확인한 도이다.

도 6a-도 6b는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제의 온도 조건에 따른 당전이 활성 및 삼당류 생성에 대한 최적 온도를 확인한 도이다(○, 30℃; ▽, 35℃; □, 40℃).

도 7a-도 7b는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제의 pH 조건에 따른 당전이 활성 및 삼당류 생성에 대한 최적 pH를 확인한 도이다(○, 50mM 아세트산나트륨 pH 6.0; ▽, 50mM 인산나트륨 pH 6.0; ◇, 50mM 인산나트륨 pH 7.5; □, 50mM 글리신-NaOH pH 9.0).

도 8은 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제와 자당의 반응생성물의 표적 분리 전후를 비교한 결과 삼당류 생성을 확인한 도이다.

도 9는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제와 자당의 반응생성물 중 주 생성물이 삼당류임을 확인한 도이다.

도 10은 본 발명에 따라 제조된 삼당류의 α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→2)-β-D-프락토포라노사이드(α-D-Glc-(1→6)-α-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru) 구조를 확인한 도이다.

도 11은 본 발명에 따라 제조된 삼당류의 총 12개 단면을 확인한HMBC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명에 따라 제조된 삼당류의 직접 결합된 탄소와 수소의 위치를 확인한 HSQC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명에 따라 제조된 삼당류의 수소와 수소 옆의 위치를 확인한 COSY 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 본 발명에 따른 제조합 아밀로수크라제를 자당을 기질로 하여 반응시킨 후 각각의 당전이 수율을 나타낸 도이다.

도 15는 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 글루탐산으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 16은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 프롤린으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 17은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 아스파라긴으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 18은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 아스파르트산으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 19는 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 알라닌으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 20은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 시스테인으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 21은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 티로신으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 22는 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 세린으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 23은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 트레오닌으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 24는 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 트립토판으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 25는 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 페닐알라닌으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 26은 본 발명에 따른 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기가 히스티딘으로 치환된 변이형 아밀로수크라제의 아미노산 서열을 도식화한 도이다.

도 27은 본 발명에 따라 분리정제된 테안데로스(Theanderose)와 전분(NCS), 말토티리오스(Maltotriose), 일로스(Erlose), 라피노스(Raffinose)를 비교한 소화율 시물레이션 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 아밀로수크라제(Amylosucrase)는 GH13 글루코실 트랜스퍼라제 계열의 일원으로, *Neisseria 퍼플라바* 배양에서 처음 확인된 이후 다양한 박테리아 균주에서 발견되어 생화학적 특성이 연구되었다. 그 중 데이노코커스 데저티(*Deinococcus deserti*)에서 발현되는 아밀로수크라제 또는 데이노코커스 데저티 유래 아밀로수크라제 유전자를 이용하여 제조한 아밀로수크라제는 자당(Sucrose)을 기질로 사용하여 투라노스, 트레할로오스와 같은 단당류와 이당류를 주로 합성하는 것으로 보고된다. 그러나 삼당류의 합성은 보고된 바가 없다.
- [0029] 본 발명은 데이노코커스 데저티 유래 아밀로수크라제 유전자를 이용한 재조합 아밀로수크라제가 삼당류 생성 반응을 나타내는 것을 발견함에 따라 삼당류 합성을 위한 저비용 및 고효율의 프로세스를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 자당과 반응시키는 단계를 포함하는 삼당류의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 아밀로수크라제는 638개 아미노산으로 이루어지고 1917bp에 의해 암호화된다.
- [0032] 본 발명의 아밀로수크라제는 본 명세서에서 재조합 아밀로수크라제, DdAS, 와일드타입 아밀로수크라제, DdAS_WT 또는 변이형 아밀로수크라제와 혼용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 글라이신인 DdAS_G391G일 수 있다. DdAS_G391G는 와일드타입 아밀로수크라제를 의미하는 “DdAS_WT”와 혼용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 아밀로수크라제는 와일드타입 아밀로수크라제의 변이형일 수 있다. 변이형 아밀로수크라제는 와일드타입 아밀로수크라제의 391번째 잔기인 글라이신이 글루탐산, 프롤린, 아스파라긴, 아스파르트산, 알라닌, 시스테인, 티로신, 세린, 트레오닌, 트립토판, 페닐알라닌 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 치환된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 아밀로수크라제는 DdAS_G391G, DdAS_G391E, DdAS_G391P, DdAS_G391N, DdAS_G391D, DdAS_G391A, DdAS_G391C, DdAS_G391Y, DdAS_G391S, DdAS_G391T, DdAS_G391W, DdAS_G391F 및 DdAS_G391H으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0036] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 글루탐산으로 치환된 DdAS_G391E일 수 있다. DdAS_G391E은 서열번호 15의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0037] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 프롤린으로 치환된 DdAS_G391P일 수 있다. DdAS_G391P은 서열번호 16의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0038] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 아스파라긴으로 치환된 DdAS_G391N일 수 있다. DdAS_G391N은 서열번호 17의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0039] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 아스파르트산으로 치환된 DdAS_G391D일 수 있다. DdAS_G391D은 서열번호 18의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

- [0040] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 알라닌으로 치환된 DdAS_G391A일 수 있다. DdAS_G391A은 서열번호 19의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0041] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 시스테인으로 치환된 DdAS_G391C일 수 있다. DdAS_G391C은 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0042] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 티로신으로 치환된 DdAS_G391Y일 수 있다. DdAS_G391Y은 서열번호 21의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0043] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 세린으로 치환된 DdAS_G391S일 수 있다. DdAS_G391S은 서열번호 22의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0044] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 트레오닌으로 치환된 DdAS_G391T일 수 있다. DdAS_G391T은 서열번호 23의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0045] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 트립토판으로 치환된 DdAS_G391W일 수 있다. DdAS_G391W은 서열번호 24의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0046] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 페닐알라닌으로 치환된 DdAS_G391F일 수 있다. DdAS_G391F은 서열번호 25의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0047] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 서열번호 14의 아미노산 서열의 391번째 잔기가 히스티딘으로 치환된 DdAS_G391H일 수 있다. DdAS_G391H은 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 삼당류 제조방법은 상기 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 상기 아밀로수크라제를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 형질전환된 미생물은 사용되는 균주의 특성에 따라 선택되는 배지 및 배양 조건에서 배양될 수 있다. 상기 미생물은 대장균일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 재조합 벡터로 형질전환되어 목적하는 유전자를 과발현하고 효소 단백질을 생산할 수 있는 미생물이라면 어느 것이라도 사용될 수 있다.
- [0050] 아밀로수크라제는 상기 형질전환된 미생물의 배양물을 원심분리하여 수득된 상등액 또는 상등액을 분획하거나 크로마토그래피 등을 통해 분리 정제하여 얻을 수 있다.
- [0051] 또는 아밀로수크라제를 발현하는 형질전환된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 배양물의 상등액 또는 상층액으로 아밀로수크라제를 대체할 수 있다. 예컨대 전술한 삼당류의 제조방법에서 아밀로수크라제를 대체하여 상기 형질전환된 미생물 또는 이의 배양물을 기질인 자당에 반응시킬 경우에도 높은 수율로 삼당류를 얻을 수 있다.
- [0052] 본 발명의 재조합 벡터의 제조는 당해 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당한다. 테안데로스를 생산에 사용될 수 있는 것이라면 발현 벡터 pBT7-N-His를 포함하여 목적하는 유전자 발현의 재조합 벡터 제조에 이용되는 어느 벡터라도 사용될 수 있다.
- [0053] 상기 서열번호 14 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 13 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다. 또한 폴리뉴클레오티드는 상기한 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 상동성이 있는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0054] 일 실시예에서 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 15의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.
- [0055] 일 실시예에서 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 16의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.
- [0056] 일 실시예에서 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 17의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.
- [0057] 일 실시예에서 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 18의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.
- [0058] 일 실시예에서 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 19

의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0059] 일 실시예에서 서열번호 7의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0060] 일 실시예에서 서열번호 8의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 21의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0061] 일 실시예에서 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 22의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0062] 일 실시예에서 서열번호 10의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 23의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0063] 일 실시예에서 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 24의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0064] 일 실시예에서 서열번호 12의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 25의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0065] 일 실시예에서 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물로부터 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 분리 및 정제할 수 있다.

[0066] 본 발명의 아밀로수크라제는 자당을 유일한 기질로 사용하여 삼당류를 생산할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

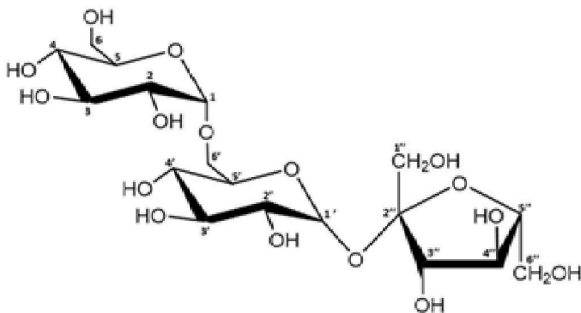
[0067] 본 발명의 아밀로수크라제는 자당을 유일한 기질로 사용할 때 95% 이상 수준의 삼당류를 20 내지 65% 수율로 생성할 수 있다.

[0068] 일 실시예에서 삼당류는 α -D-글루코피라노실-(1→6)- α -D-글루코피라노실-(1→2)- β -D-프락토폰라노사이드(α -D-Glc-(1→6)- α -D-Glc-(1→2)- β -D-Fru) 구조를 갖는 테안테로스(Theandrose)로 확인된다.

[0069] 본 명세서에서 삼당류는 테안테로스와 혼용될 수 있다.

[0070] 일 실시예에서 삼당류는 다음 화학식 1의 구조를 갖는 것으로 확인된다:

[0071] [화학식 1]



[0072]

[0073] 본 발명에 따른 삼당류인 테안테로스는 전분(NCS), 말토트리오스(Maltotriose), 얼로스(Erlose) 등의 다른 탄수화물과 비교하여 소화액에 의한 가수분해율이 현저히 낮은 특성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 삼당류는 낮은 소화율로 천천히 흡수되며 대장까지 도달할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 아밀로수크라제 및 자당의 반응은 아밀로수크라제의 최적 활성화 조건 하에 이루어질 수 있다.

[0075] 일 실시예에서 아밀로수크라제와 자당의 반응은 pH 5.0 내지 9.0, 바람직하게는 pH 5.5 내지 8.0, 더욱 바람직하게는 pH 6.0 내지 7.5에서 수행될 수 있다.

[0076] 일 실시예에서 아밀로수크라제 및 자당의 반응은 인산나트륨, 아세트산나트륨 또는 글리신-NaOH 중 어느 하나의 완충액으로 수행될 수 있다.

[0077] 일 실시예에서 아밀로수크라제 및 자당의 반응은 30 내지 50℃, 바람직하게는 32 내지 42℃ 온도에서 더욱 바람

직하계는 35℃ 또는 40℃에서 수행될 수 있다.

- [0078] 일 실시예에서 아밀로수크라제 및 자당의 반응은 24 내지 144 시간, 바람직하게는 36 내지 140 시간, 더욱 바람직하게는 48 내지 132 시간, 더더욱 바람직하게는 72 내지 128시간, 가장 바람직하게는 90 내지 120 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0079] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 pH 6.0, 40℃에서 96시간 시간 반응 조건에서 삼당류 생성의 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [0080] 일 실시예에서 아밀로수크라제는 pH 7.5, 35℃에서 120시간 시간 반응 조건에서 삼당류 생성의 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [0081] 일 실시예에서 상기 자당은 1.5 내지 2.5 M 농도로 포함되고 바람직하게는 1.8 내지 2.2 M 농도로 포함될 수 있다.
- [0082] 일 실시예에서 상기 아밀로수크라제는 0.1 내지 0.5 mg/ml 농도로 포함되고 바람직하게는 0.2 내지 0.4 mg/ml 농도로 포함될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 삼당류 제조방법은 아밀로수크라제를 자당과 반응시킨 효소 반응물로부터 삼당류를 분리정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0084] 상기 효소 반응물로부터 삼당류를 분리정제하는 방법은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어 원심분리, 여과, 결정화, 크로마토그래피 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0085] 본 발명은 다른 관점에서 서열번호 15 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 아밀로수크라제를 제공한다.
- [0086] 본 발명의 아밀로수크라제는 전술한 바와 같이 데이노코커스 데저티 (*Deinococcus deserti*)로부터 유래된 아밀로수크라제 유전자를 이용한 재조합 효소이다. 데이노코커스 데저티는 식품 산업에서 유전자 공여체로 안전하게 사용할 수 있는 생물안전수준 I의 박테리아 균주이다.
- [0087] 본 발명의 아밀로수크라제는 자당으로부터 삼당류 전환 활성이 우수한 신규한 효소이다.
- [0088] 따라서 본 발명의 아밀로수크라제는 삼당류 전환 활성과 안정성이 높아 삼당류의 대량 생산 산업에 적용하기에 용이하다.
- [0089] 본 발명은 다른 관점에서 서열번호 2 내지 13 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드로 표시되는 아밀로수크라제 유전자를 제공한다.
- [0090] 또한 본 발명은 상기 아밀로수크라제 유전자를 포함하는 삼당류 제조용 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 전술한 바와 같다.
- [0092] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명한다.

[0094] **실시예 1. 재조합 아밀로수크라제 합성**

[0095] 아밀로수크라제 유전자의 DNA 염기서열 분석 및 클로닝

[0096] 아밀로수크라제(ASase) 발현 균주로 이용한 데이노코커스 데저티 (*Deinococcus deserti*)는 식품 산업에서 유전자 공여체로 안전하게 사용할 수 있는 생물안전수준 I의 박테리아 균주이다. 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 얻은 염기서열을 기반으로 데이노코커스 데저티 VCD115(Accession NO. CP001114.1, 단백질 ID: ACO45430.1)의 아밀로수크라제 유전자를 확인하였다. 아밀로수크라제 유전자 발현의 뉴클레오티드 서열 분석을 기반으로 AllInOneCycler™ 384-well PCR 시스템을 이용하여 재조합 아밀로수크라제 유전자 합성을 수행하였다. 합성된 데이노코커스 데저티 유래 아밀로수크라제(이하, DdAS) 유전자의 시퀀스는 T7 프로모터와 터미네이터 프라이머를 사용하여 3730xl DNA Analyzer로 확인하였다. 재조합 DdAS 유전자는 638개 아미노산 잔기의 단백질을 코딩하는 1917개 염기로 구성된다.

[0097] 1917개 염기로 구성된 서열번호 1의 DdAS 유전자를 DdAS 코딩 영역의 양쪽 끝에 EcoR I 제한 부위가 있는 pBT7-N-His 벡터에 삽입하여 pBT7-N-His-DdAS 벡터를 제작하였다(도 2).

[0098] 제조된 벡터로 형질전환된 *E. coli* DH5a competent 세포를 배양하여 대량의 재조합 DNA를 얻었다. 구체적으로 pBT7-N-His-DdAS 벡터(50ng)를 *E. coli* 세포(100 μ L)와 혼합한 다음 얼음에서 20분간 배양하였다. 혼합된 샘플을 42° C에서 1분간 열처리한 다음 얼음에 10분간 더 두었다. 형질전환 반응 샘플을 혼합한 다음 37° C에서 1시간 동안 900 μ L의 예열된 LB 배지와 함께 계속 흔들면서(220-250rpm) 배양하였다. 배양된 세포를 100배로 희석한 다음 100 μ L를 암피실린(50 μ g/mL)이 들어있는 LB 아가 플레이트에 도말하였다. 플레이트를 37° C에서 밤새 배양하여 플레이트당 30-300개의 콜로니로 대량의 재조합 DNA를 얻었다. 재조합 pBT7-N-His-DdAS 벡터의 EcoR I 제한 크기는 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하여 재조합 DdAS 유전자의 크기에 상응함을 확인하였다. DNA 시퀀싱을 통해 확인한 재조합 DdAS 유전자의 뉴클레오티드 서열은 NCBI 데이터베이스의 데이노코커스 테저티 VCD115의 ASase 유전자 서열과 정확히 일치하여 재조합 DdAS 유전자는 pBT7-N-His-DdAS 벡터에 성공적으로 클로닝되었다.

[0100] 아밀로수크라제의 발현 및 정제

[0101] DdAS 효소 발현을 위해 제조된 벡터로 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* 세포를 37° C, 50 μ g/mL 암피실린이 포함된 LB 배지에서 600 nm에서의 흡광도 변화(Abs₆₀₀)가 0.6-0.8에 도달할 때까지 배양하였다. 배양액을 얼음으로 식힌 후, 세포를 18° C에서 20시간 동안 배양하며 0.2 mM IPTG를 첨가하여 DdAS의 발현을 유도하였다(도 3). 이후 *E. coli* 세포를 4° C에서 10분 동안 원심분리(5,000g)하여 수확하였다. 회수한 세포 펠릿을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 현탁하고 Vibra™ Cell VC 750 disruptor로 용해한 다음 4° C에서 20분 동안 원심분리(11,000g)하였다. 세포 추출물의 상층액을 Acrodisc® 주사기 필터(0.45- μ m Supor® 멤브레인)로 여과하였다. 재조합 DdAS는 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 조세포 추출물에서 고도로 정제하였다. 여과액을 Ni-NTA 컬럼에 로딩하고, 50 mM Tris-HCl(pH 7.0), 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸로 구성된 세척 완충액으로 세척하였다. 컬럼 수지에 결합된 His 태그가 붙은 단백질을 50 mM Tris-HCl(pH 7.0), 300 mM NaCl, 250 mM 이미다졸 완충액으로 용출하였다. 용출된 효소는 Amicon® Ultra15 원심 필터 장치(MWCO = 30 kDa)를 사용하여 4° C에서 20분 동안 원심분리(3,000g)하여 농축하였다. 분리정제된 아밀로수크라제는 아미노산 시퀀싱을 통해 서열번호 14의 아미노산 서열로 확인되었다(도 1).

[0103] **실시예 2. 재조합 아밀로수크라제 활성 측정**

[0104] DdAS의 효소 활성은 자당 가수분해로 인한 환원당 수율을 정량화하여 평가하였다. 100mM 자당을 포함하는 50mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)에서 40° C에서 30분 동안 수행한 뒤 0.5mL의 3,5-디니트로살리실산(DNS) 시약을 투입하여 반응을 중단했다. 그 후, 반응 혼합물을 끓는 물에서 5분간 열처리하여 발색을 촉진한 다음 안정성을 확보하기 위해 얼음 위에서 5분간 추가로 냉각하였다. 효소 활성은 0.01-0.05%(w/w) 과당에서 도출된 표준 곡선을 기준으로 계산하였다. 용액의 흡광도(Δ Abs) 차이는 575nm에서 DU 730 UV/Vis 분광광도계(미국 캘리포니아주 브레아 소재 Beckman Coulter Inc.)를 사용하여 측정했다. DdAS 활성의 단일 단위는 분당 1 μ mol의 과당을 방출하는 데 필요한 효소 양으로 특성화되었다. 재조합 효소의 순도와 분자량은 소듐도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 확인하였고, 단백질 농도는 소 혈청 알부민(BSA)을 표준으로 하여 브래드포드법으로 측정하였다.

[0105] 도 4를 참고하면, N-말단에 His6 태그가 붙은 정제된 재조합 DdAS는 SDS-PAGE 분석에 따르면 약 72 kDa의 상대 분자량(M_r)을 나타냈다. 이 결과는 ExPASy 데이터베이스에서 추론된 DdAS의 아미노산 서열을 기반으로 한 72,002 Da의 예상 이론값과 일치한다. DdAS 정제 데이터는 다음 표 1과 같다. 친화 크로마토그래피 분리 후 정제된 DdAS의 수율은 48.6%에 도달했다. DdAS의 총 활성과 단백질 양은 각각 167.48 unit와 46.59 mg이며 따라서 DdAS의 특이 활성은 3.60 unit/mg으로 계산되었다.

표 1

	총 부피 (mL)	총 단백질 (mg)	총 활성 (unit)	Specific activity (unit/mg)	수율 (%)	Purification fold	효소/세포단 백질(%)
세포추출물	45	398.5 ± 15.0	344.8 ± 9.7	0.87 ± 0.01	48.6 ± 1.6	4.2 ± 0.1	11.7 ± 0.7
정제효소	6.5	46.6 ± 1.0	167.5 ± 0.6	3.6 ± 0.1			

*Specific activity(unit/mg) = 총 활성/총 단백질
 *수율(%) = 정제 효소의 총 활성/세포추출물의 총 활성 × 100
 *Purification fold = 정제 효소의 specific activity/세포추출물의 specific activity

실시예 3. 제조합 아밀로수크라제에 의한 삼당류 합성 확인

실시예 1에서 얻은 아밀로수크라제 400 U/L을 2.0 M의 자당과 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)에 혼합하여 35 °C에서 120시간 반응한 후 구성 당 분포를 분석했다. HPSEC-RI 분석 결과 단당류(DP1)와 이당류(DP2) 외에 삼당류(DP3)에 해당하는 피크가 확인되었다(도 5). 이전 실험에서 단당류와 이당류의 전환 수율은 총 36.7%로 계산되었으며 이 결과를 HPSEC-RI 크로마토그램에 적용하여 미지의 DP3 피크의 양을 계산한 결과 22.8%의 전환 수율이 계산되었다.

실시예 4. 삼당류 합성의 최적 파라미터

삼당류를 생산하기 위한 최적의 pH 및 온도 조건을 탐색하였다. 최적의 온도 탐색은 2.0M 수크로스, 50mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)의 조건에서 세 가지 온도(30° C, 35° C, 40° C)에서 수행되었다. 최적의 pH를 찾기 위해 40° C에서 2.0M 자당과 함께 50mM 아세트산나트륨(pH 6.0), 50mM 인산나트륨(pH 6.0 및 7.5), 50mM 글리신-NaOH(pH 9.0)의 4 가지 유형의 완충액을 사용했다.

기질 용액을 40° C에서 10분간 사전 배양한 후 0.3 mg/mL DdAS로 40° C에서 96시간 동안 반응하고, 일정한 시간 간격으로 적정량의 반응 혼합물을 채취하여 10분간 끓여서 비활성화하였다. 가용성 반응 생성물을 고성능 음이온 교환 크로마토그래피/펄스 전류 측정 검출(HPAEC-PAD) 및 고성능 액체 크로마토그래피 결합 백색 증발광 산란 검출기(HPLC-ELSD)를 사용하여 CarboPac™ PA1 분석 컬럼(4 × 250mm, Dionex) 및 VG-50-4E(4.6 x 250mm, Shodex)로 분석하여 삼당류를 분리 및 정량화하였다. HPAEC-PAD의 경우, 반응 생성물을 증류수로 희석하고 0.2 μm PVDF 주사기 필터를 통해 여과했다. 시료 주입량은 20 μL이고, 등방성 모드에서 1.0mL/min의 유속으로 100mM NaOH 용액을 용출액으로 사용하였다. 반응 생성물을 HPLC-ELSD용 증류수로 희석하고 0.45 μm PVDF 주사기 필터를 통해 여과했다. 샘플 부피는 5 μL, 분석 용액은 MeOH : H2O(1:2), ACN 용액을 1.0mL/min의 유속으로 그라데이션 모드에서 적용하였다.

96시간 반응 후 DdAS의 온도 및 pH 조건에 따른 당 생산 수율을 표 2에 나타냈다.

표 2

Reaction affecting factors		삼당류 수율 (%)	이당류 수율 (%)	단당류 수율(%)
pH	아세트산나트륨 6.0	23.46 ± 0.29	16.05 ± 0.29	14.47 ± 0.11
	인산나트륨 6.0	25.43 ± 0.68	16.47 ± 0.37	14.31 ± 0.06
	인산나트륨 7.5	22.36 ± 0.10	18.39 ± 0.04	13.79 ± 0.12
	글리신-NaOH 9.0	24.00 ± 1.18	15.68 ± 0.08	15.04 ± 0.37
온도 °C	30	19.88 ± 0.08	26.92 ± 0.03	14.63 ± 0.14
	35	21.06 ± 0.15	22.57 ± 0.04	14.65 ± 0.04
	40	22.36 ± 0.10	18.39 ± 0.04	13.79 ± 0.12

삼당류의 전환 수율은 pH 6.0, 온도 40° C에서 50mM 인산나트륨 완충액에 2.0M 자당과 0.3mg/mL DdAS를 반응시

킨 조건에서 자당 기준 174g/L에 해당하는 25.4%로 가장 높은 수율이 기록되었다. LC-PREP(액체 크로마토그래피 준비 스케일)을 사용하여 분리된 삼당류는 98% 이상의 순도 수준을 달성하였다.

[0117] 삼당류 전환 수율에 대한 온도의 영향은 도 6을 참고하면 DdAS는 30° C와 35° C보다 40° C에서 더 많은 양의 삼당류를 합성하는 것으로 관찰되었다. 삼당류 전환 수율에 대한 pH의 영향을 조사한 결과 도 7을 참고하면 pH 6.0의 50mM 인산나트륨 완충액 조건에서 24시간 후에 반응이 정체되는 것으로 관찰되었다.

[0119] 실시예 5. 삼당류의 분자량 및 구조 규명

[0120] 실시예 4에서 확인된 최적의 삼당류 생산 파라미터를 활용하여 아밀로수크라제 0.3 mg/ml를 2.0 M의 자당과 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.0)에 혼합하여 40°C에서 24시간 반응하였다. 생성물을 Prep-HPLC에 활용하여 삼당류의 구조를 규명하였다. 생성물의 표적 분리에 HPLC-PREP을 이용하고 HPLC-ELSD로 분리 전과 분리 후를 비교하였다(도 8). 전기분무 이온화 질량 분석법(ESI-MS)을 통해 확인한 주 생성물(C18H32O16 - H+)은 m/z 값 503.30의 삼당류임을 확인하였다(도 9).

[0121] NMR 분석을 통해 삼당류는 α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→2)-β-D-프락토포라노사이드(α-D-Glc-(1→6)-α-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru) 구조를 갖는 테안테로스(Theanderose)임을 확인하였다(도 10).

[0122] 테안테로스에 대한 1D(1H-NMR, 13C-NMR) 핵자기공명(NMR) 스펙트럼 데이터는 표 3과 같다.

표 3

		δ _c	δ _H (JinHz)
α-Glc-1	1	98.2	4.88 (3.70)
	2	70.9	3.49
	3	71.8 overlap	3.61 overlap
	4	69.5	3.35
	5	73.0 overlap	3.66 overlap
	6	60.4	3.76, 3.70
α-Glc-2	1	92.0	5.35 (3.82)
	2	71.5 overlap	3.49 overlap
	3	72.7	3.51 overlap
	4	69.3	3.48
	5	73.9 overlap	3.98 overlap
	6	65.6	3.97, 3.58
β-Fru-3	1	61.37	3.59, 3.59
	2	103.8	-
	3	76.3	4.14 (8.85)
	4	71.3	3.97
	5	81.3	3.81
	6	62.4	3.76, 3.70

[0124] 테안테로스의 HMBC 분석 결과, 총 12개의 단면이 C'2/H'1, C'2/H'1, C'3/H'1, C5/H1, C'6/H1, C'1/H'3, C'6/H'4, C4/H6, C'3/H'1, C'2/H'4, C'6/H'4, C6/H4로 해당되는 부분이 확인되었다(도 11).

[0125] HSQC(이중 핵 단일 양자 일관성) 2D NMR은 직접 결합된 탄소와 수소의 위치를 확인할 수 있다. 테안테로스의 HSQC 분석 결과, 총 12개의 단면이 C'2, C'1/H'1, C1/H1, C'5/H'5, C'3/H'3, C4/H4, C'4/H'4, C'6/H'6, C'6/H'6, C'1/H'1, C6/H6임이 확인되었다(도 12).

[0126] COSY(상관 분광법) 2D NMR은 수소와 수소 옆의 위치를 확인할 수 있다. 테안테로스의 COSY 분석 결과 총 9개의 단면이 H1/H2, H2/H1, H'1/H'2, H'4/H'5, H'2/H'1, H'4/H'3, H'4/H'5, H'3/H'4, H'3/H'4로 해당되는 부분이 확인되었다(도 13).

[0127] α-D-Glc-(1→6')-α-D-Glc 연결은 한 포도당 잔기의 H-1 (4.88, J = 3.70Hz)과 다른 포도당 잔기의 C-6' 사이의 HMBC 상관 관계를 통해 확인되었다. α-D-Glc-(1'→2'')-β-D-Fru 연결은 한 포도당 잔기의 H-1(5.35, J = 3.82Hz)과 다른 과당 잔기의 C-2'' 사이의 HMBC 상관관계를 통해 확인된다. 이는 메틸화된 포도당의 C-6 및 C-

6' 위치를 쉽게 식별할 수 있는 HSQC를 통해 더욱 확증되었다.

[0128]

[0129] **실시예 6. 변이형 아밀로수크라제 합성**

[0130] 테안테로스 전환 수율을 높이기 위해 서열번호 14의 DdAS 아미노산 서열에서 391번째 잔기를 테안테로스 합성 반응과 자당의 이성질체 합성 반응에 핵심이 되는 잔기로 선정하고 해당 잔기를 19가지 아미노산으로 치환한 변이형 아밀로수크라제를 합성하였다.

[0131] 구체적으로 서열번호 1의 DdAS 유전자의 1171-1173번째 염기에 19가지 변이를 유발한 재조합 DNA를 제작하였다. 돌연변이는 site-saturation mutagenesis 방법 또는 site-directed mutagenesis 방법으로 수행되었다. 각 돌연변이 재조합 DNA를 pBT7-N-His 벡터에 삽입하여 변이형 아밀로수크라제 발현을 위한 재조합 벡터를 제작하였다 (표 4).

표 4

[0132]

NO.	DdAS 발현 벡터	DdAS DNA 1171st-1173st	mutagenesis	DdAS 아미노산 391st 잔기
1	pBT7-N-His-DdAS	5' -GGC-3'	Wild type	Glycine
2	pBT7-N-His-DdAS_G391E	5' -GAC-3'	saturation	Glutamic acid
3	pBT7-N-His-DdAS_G391V	5' -GTT-3'	saturation	Valine
4	pBT7-N-His-DdAS_G391L	5' -CTT-3'	saturation	Leucine
5	pBT7-N-His-DdAS_G391P	5' -CCG-3'	saturation	Proline
6	pBT7-N-His-DdAS_G391K	5' -AAG-3'	saturation	Lysine
7	pBT7-N-His-DdAS_G391R	5' -CGT-3'	saturation	Arginine
8	pBT7-N-His-DdAS_G391N	5' -AAT-3'	saturation	Asparagine
9	pBT7-N-His-DdAS_G391D	5' -GAT-3'	saturation	Aspartic acid
10	pBT7-N-His-DdAS_G391A	5' -GCG-3'	saturation	Alanine
11	pBT7-N-His-DdAS_G391C	5' -TGT-3'	saturation	Cysteine
12	pBT7-N-His-DdAS_G391I	5' -ATT-3'	Site-directed	Isoleucine
13	pBT7-N-His-DdAS_G391Y	5' -TAT-3'	Site-directed	Tyrosine
14	pBT7-N-His-DdAS_G391S	5' -AGC-3'	Site-directed	Serine
15	pBT7-N-His-DdAS_G391T	5' -ACC-3'	Site-directed	Threonine
16	pBT7-N-His-DdAS_G391M	5' -ATG-3'	Site-directed	Methionine
17	pBT7-N-His-DdAS_G391W	5' -TGG-3'	Site-directed	Tryptophan
18	pBT7-N-His-DdAS_G391F	5' -TTC-3'	Site-directed	Phenylalanine
19	pBT7-N-His-DdAS_G391Q	5' -CAG-3'	Site-directed	Glutamine
20	pBT7-N-His-DdAS_G391H	5' -CAC-3'	Site-directed	Histidine

[0133] 제조된 표 4의 재조합 벡터를 이용하여 실시예 1과 동일한 방법으로 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 형질전환하고 효소 발현을 유도해 변이형 아밀로수크라제를 얻었다.

[0135] **실시예 7. 삼당류 전환수율이 높은 변이형 아밀로수크라제**

[0136] 실시예 6에서 얻은 19가지의 변이형 아밀로수크라제로 자당(sucrose)을 기질로 하여 당전이 반응을 수행하였다. 실시예 1의 와일드 타입 아밀로수크라제 (이하, DdAS_WT)도 동일하게 반응을 수행하여 비교하였다. 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)에 2.0 M의 자당과 0.15 mg/ml의 아밀로수크라제를 혼합하여 35℃에서 120시간 반응한 결과 당전이 수율은 도 14와 같다. DdAS_WT와 유사하거나 더 많은 테안테로스 전환율을 보이는 변이형 아밀로수크라제는 12종으로 확인되었다(표 5).

표 5

NO.	DdAS	DdAS 아미노산 서열 NO.	Theandrose 전환수율 (%)	Theandrose 합성 양 (g/L)
1	DdAS_WT	서열번호14	23.4	160.2
2	DdAS_G391E	서열번호15	32.0	219.1
3	DdAS_G391V	-	14.2	97.2
4	DdAS_G391L	-	4.5	30.8
5	DdAS_G391P	서열번호16	58.4	399.8
6	DdAS_G391K	-	21.2	145.1
7	DdAS_G391R	-	12.0	82.2
8	DdAS_G391N	서열번호17	49.9	341.6
9	DdAS_G391D	서열번호18	46.8	320.4
10	DdAS_G391A	서열번호19	53.5	366.3
11	DdAS_G391C	서열번호20	38.9	266.3
12	DdAS_G391I	-	0.0	0.0
13	DdAS_G391Y	서열번호21	56.1	384.1
14	DdAS_G391S	서열번호22	54.9	375.8
15	DdAS_G391T	서열번호23	25.2	172.5
16	DdAS_G391M	-	15.7	107.5
17	DdAS_G391W	서열번호24	45.7	312.9
18	DdAS_G391F	서열번호25	51.0	349.1
19	DdAS_G391Q	-	23.0	157.5
20	DdAS_G391H	서열번호26	45.9	314.2

표 5에서 서열번호 15 내지 서열번호 26으로 넘버링된 12종의 변이형 아밀로수크라제는 각각 도 15 내지 도 26에 도식해 나타냈다.

실시예 8. in vitro 소화율 시뮬레이션

50 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.0)에 2.0 M의 자당과 0.3 mg/ml의 아밀로수크라제를 혼합하여 40℃에서 96시간 반응한 효소 반응물을 분리정제하여 테안데로스를 얻었다. 95% 이상의 테안데로스와 다른 탄수화물을 시료로 비교하여 장내 소화율을 시뮬레이션 평가하였다.

공식 승인된 AOAC 2009.01 방법으로 말레산염 완충액(pH 6.0)과 돼지 췌장 α-아밀라아제(PAA)/아밀로글루코시다제(AMG) 및 아세트산나트륨 혼합물 40 mL에 시료 1g을 첨가하고 37℃에서 16시간 동안 유지한 다음 95℃까지 가열하여 효소를 비활성화하였다.

간소화된 AOAC 2009.01 방법으로 말레산염 완충액(pH 6.0)과 돼지 췌장 α-아밀라아제(PAA)/아밀로글루코시다제(AMG) 및 아자이드나트륨 혼합물 1000 ul에 시료 20 mg을 첨가하고 37℃에서 16시간 동안 유지한 다음 95℃까지 가열하여 효소를 비활성화하였다.

시뮬레이션의 HPLC 분석 결과 테안데로스는 전분(NCS), 말토티리오스(Maltotriose), 일로스(Erlose) 등의 다른 탄수화물과 비교하여 소화율이 현저히 낮은 특성을 나타냈다(도 27).

도면

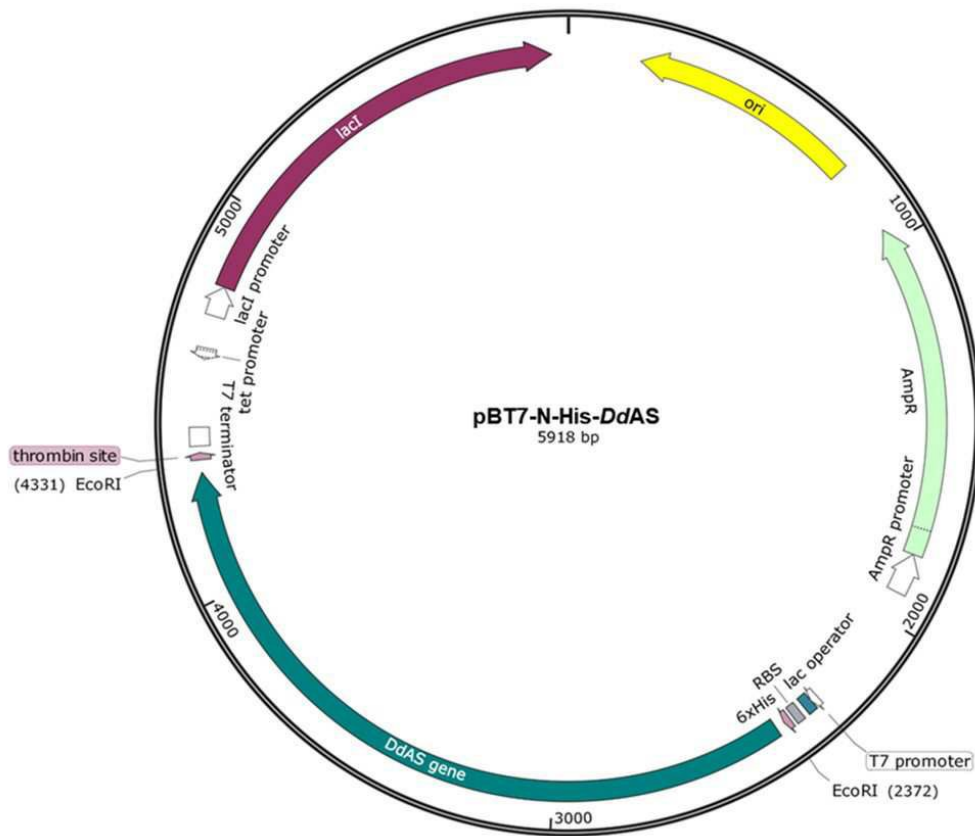
도면1

```

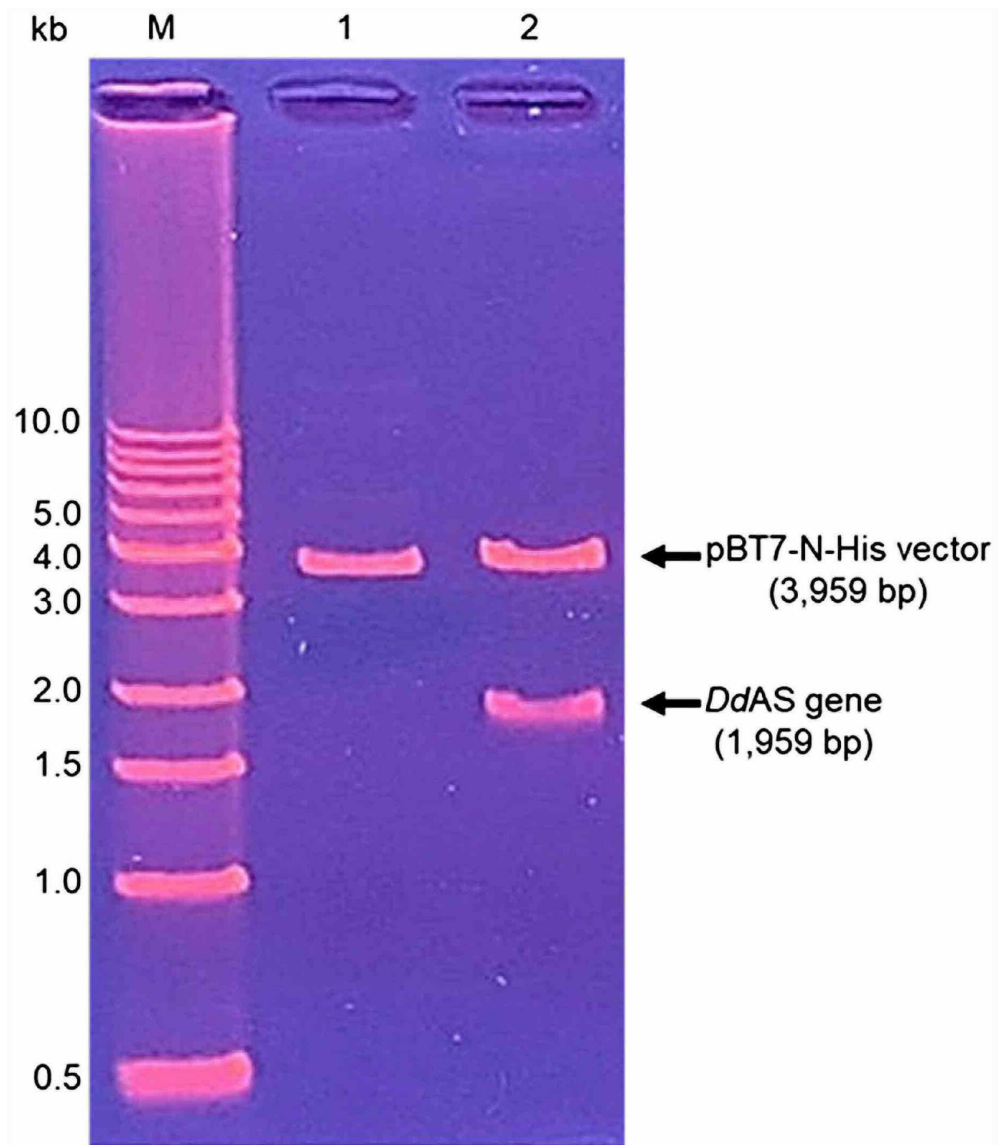
1  M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I G W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L ^

```

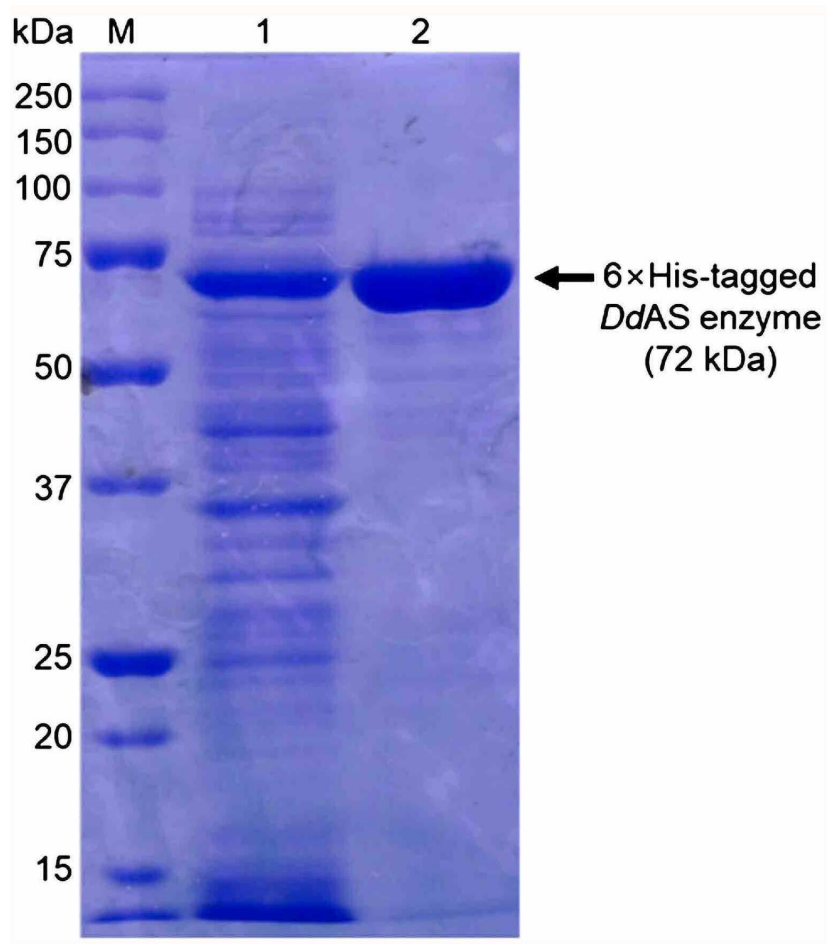
도면2



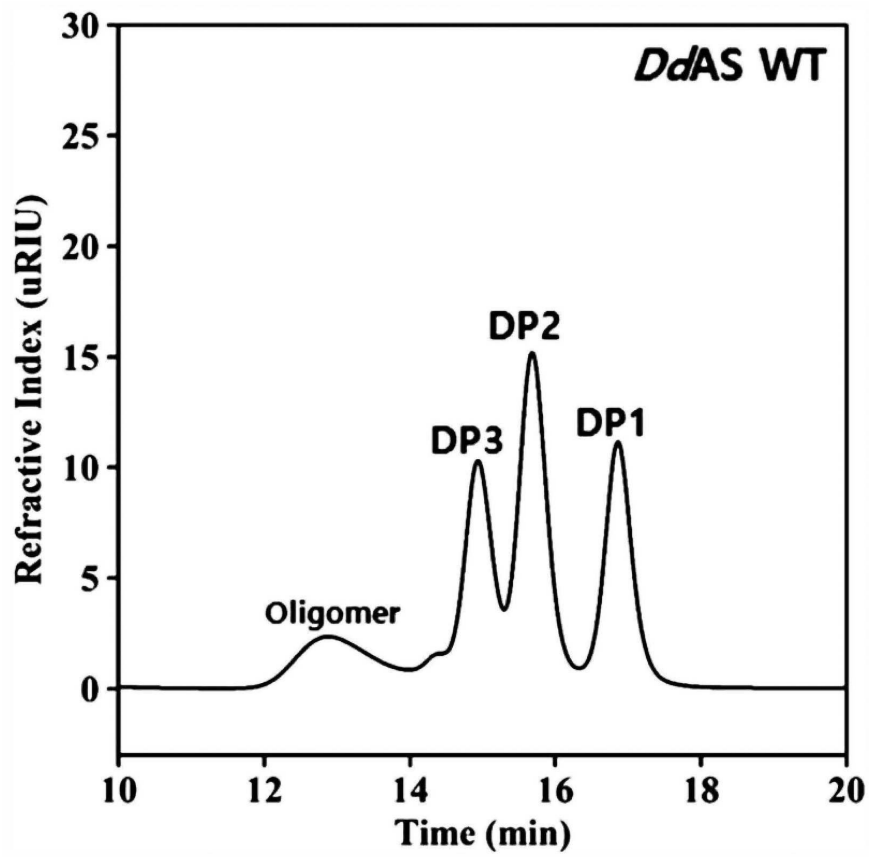
도면3



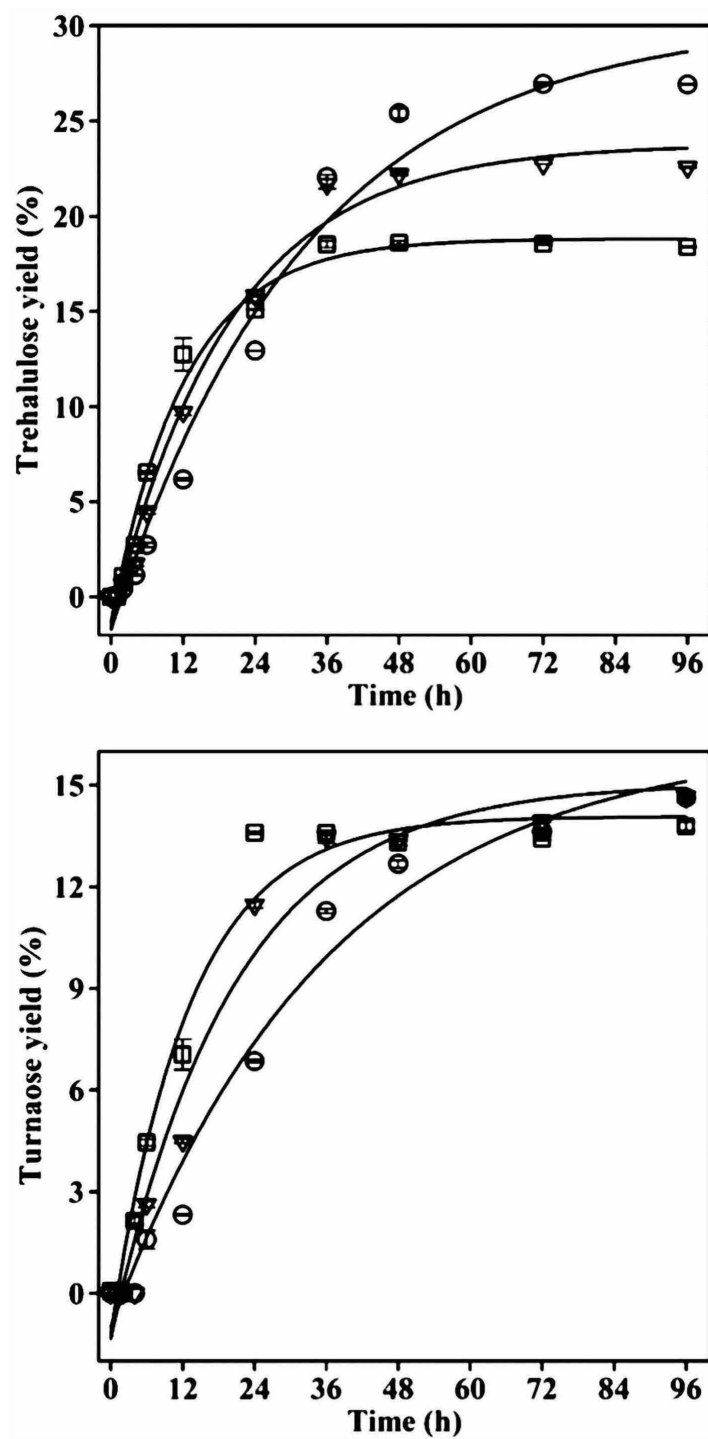
도면4



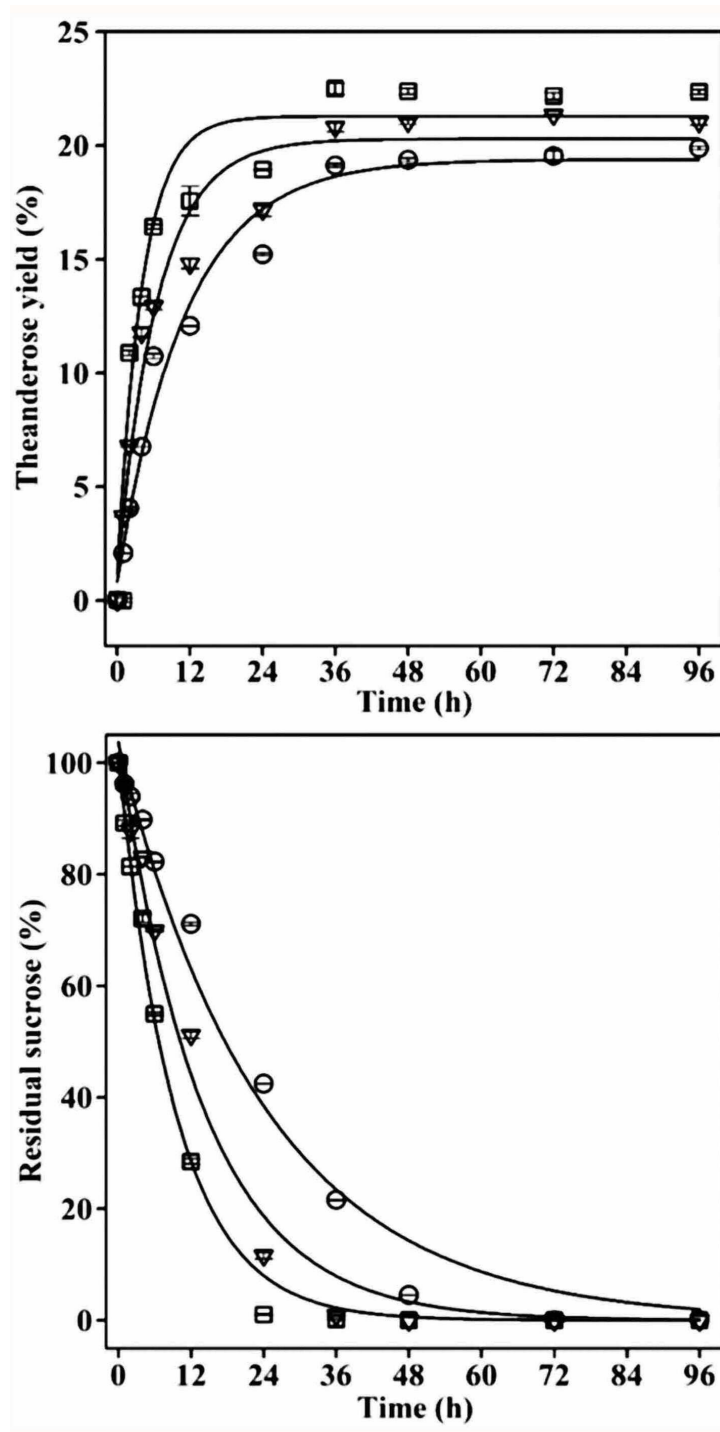
도면5



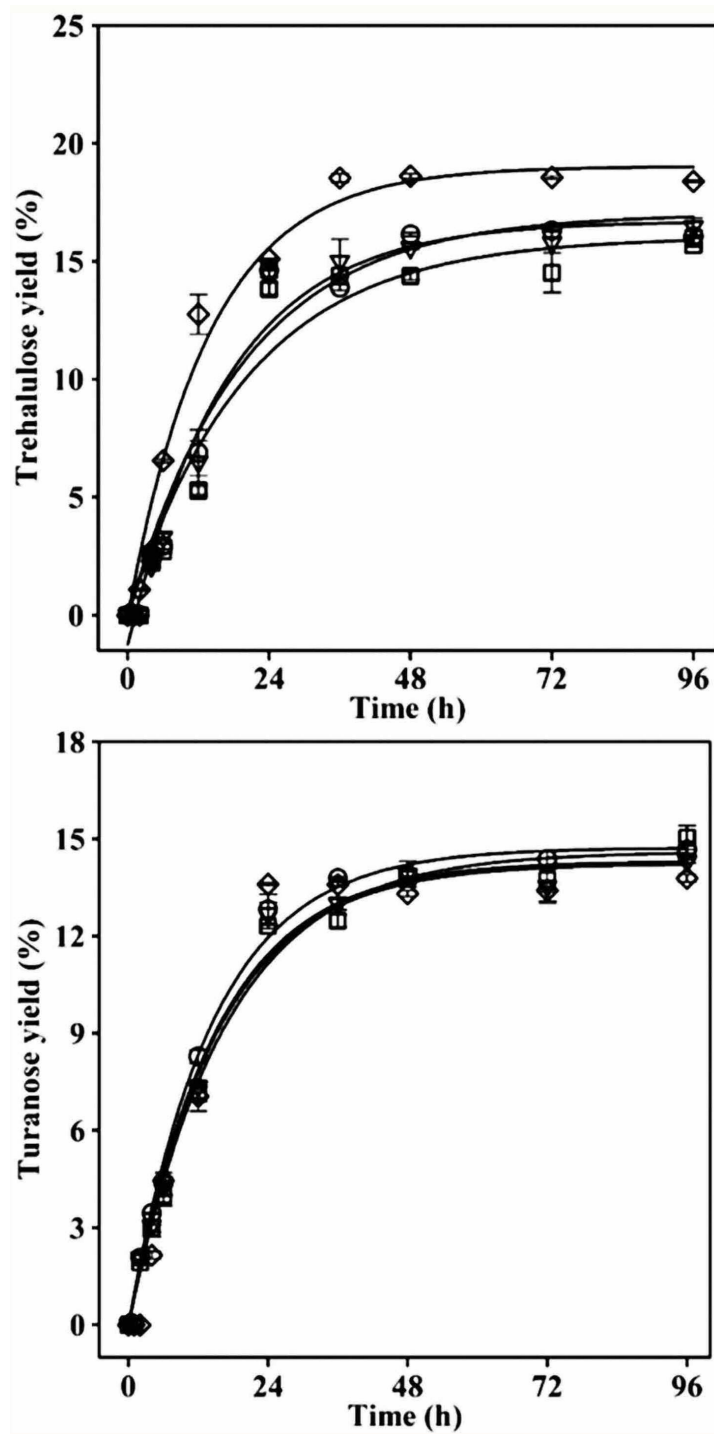
도면6a



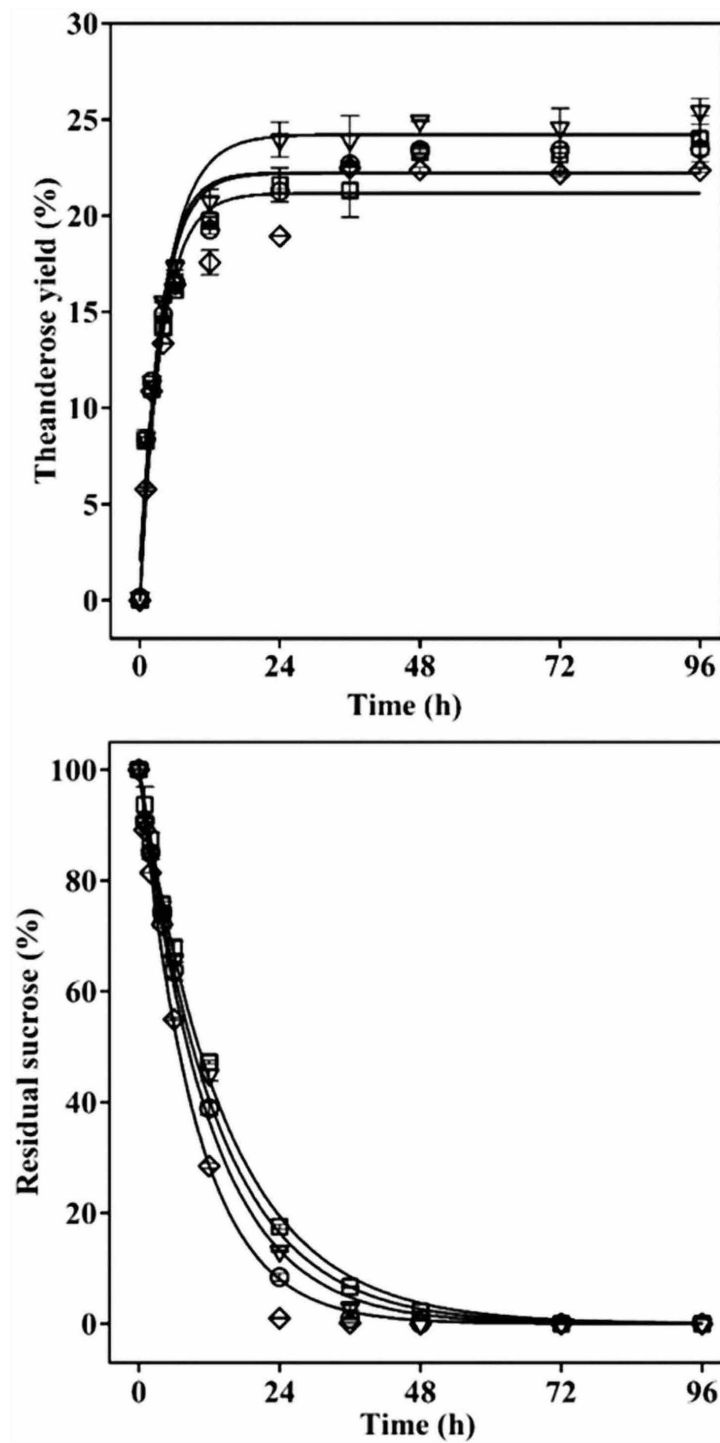
도면6b



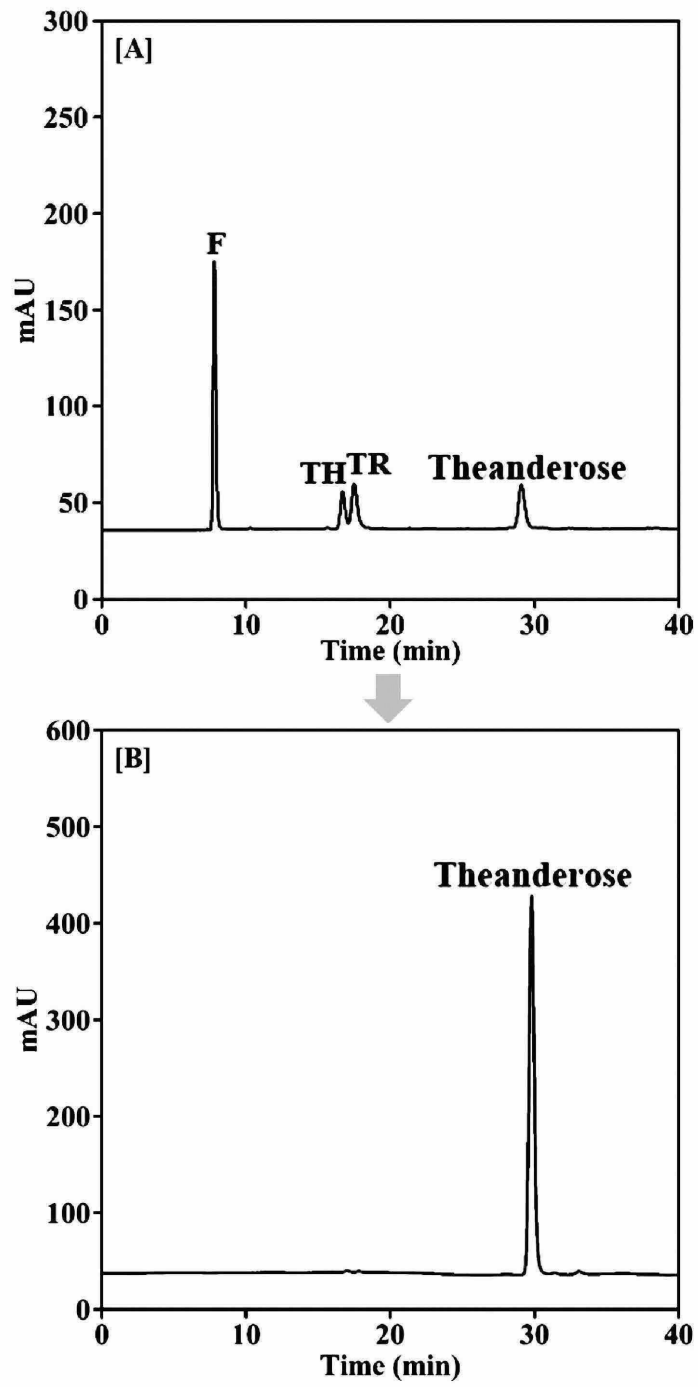
도면7a



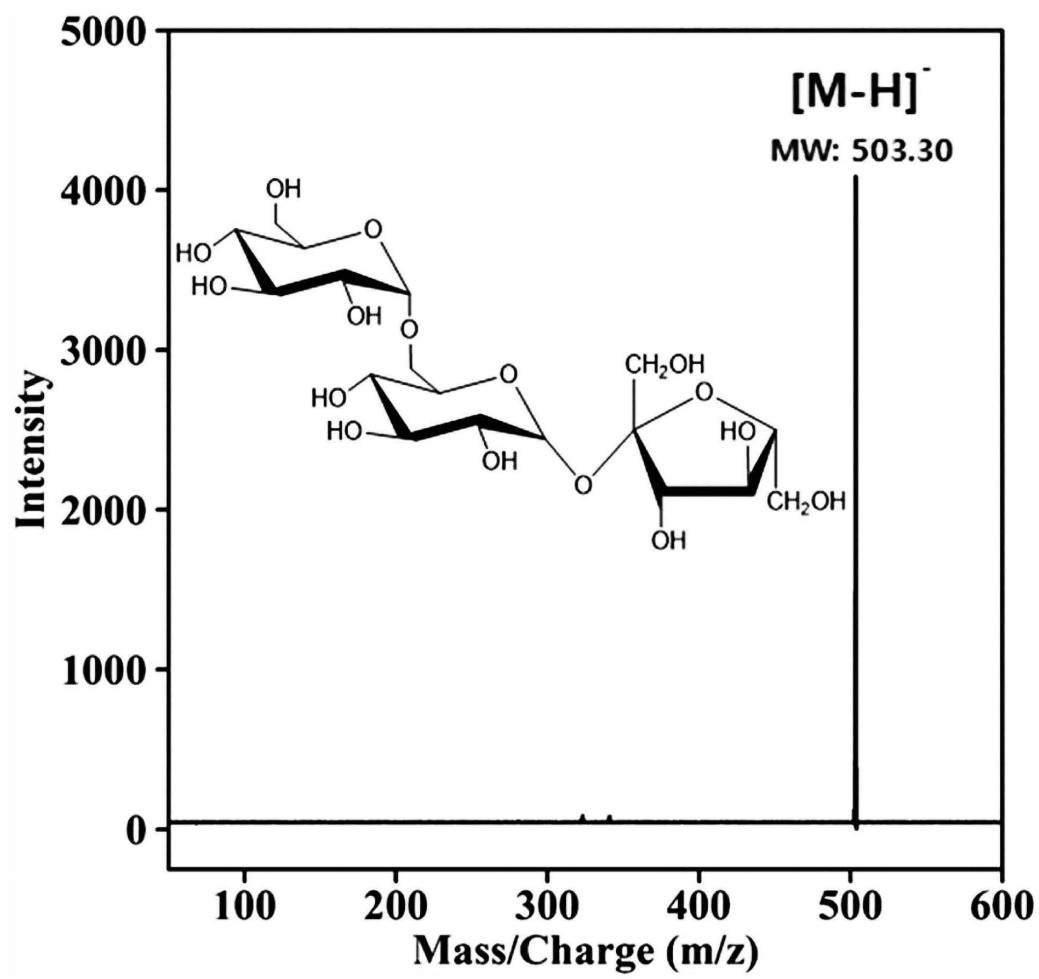
도면7b



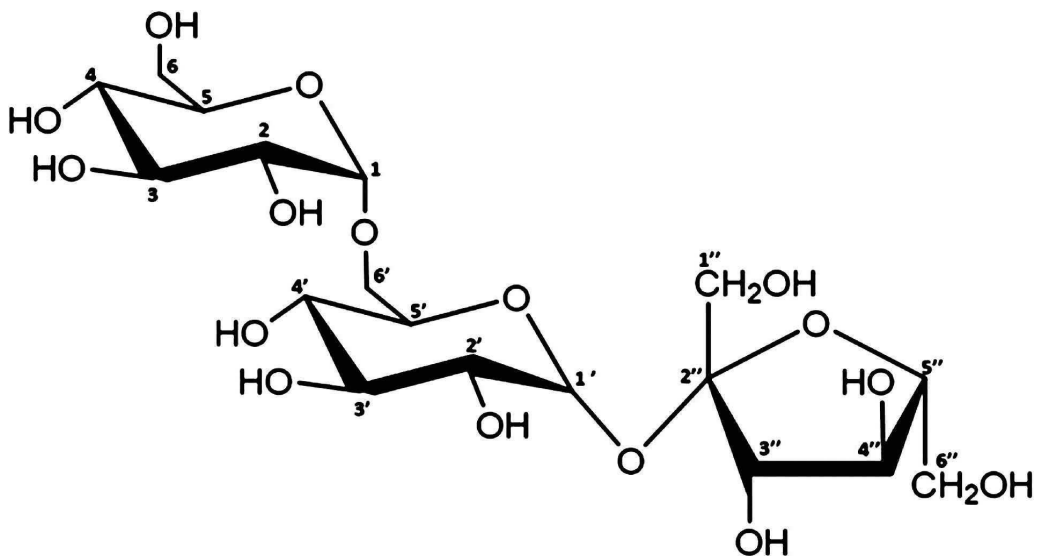
도면8



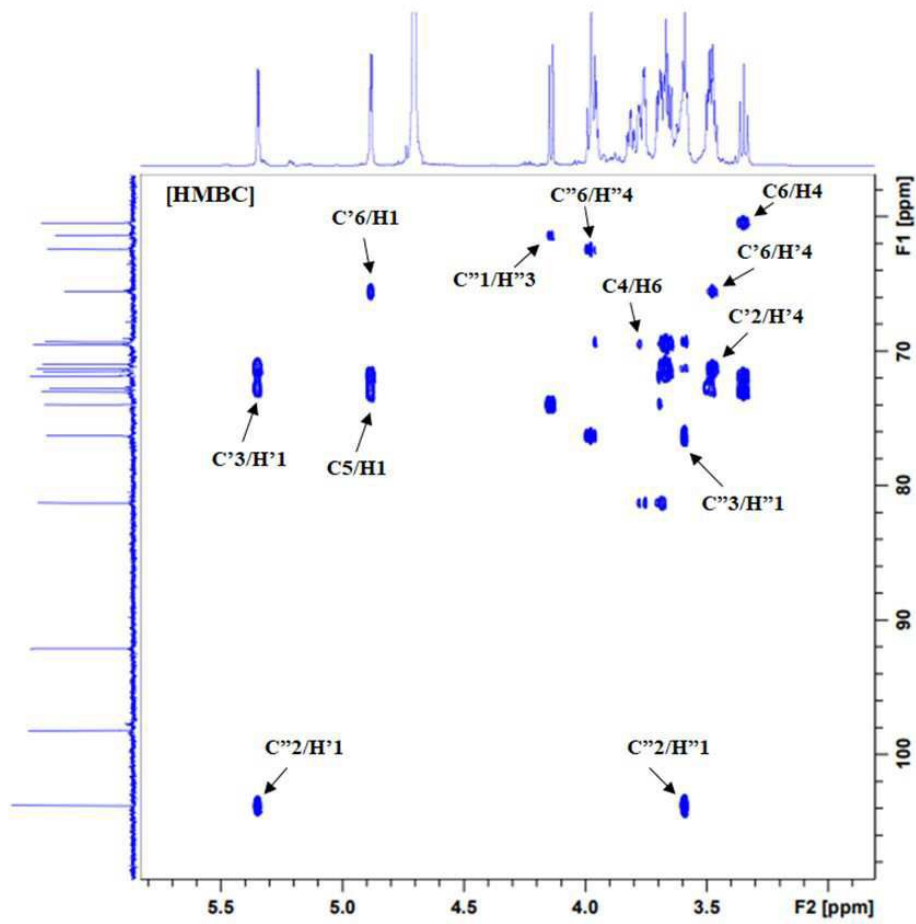
도면9



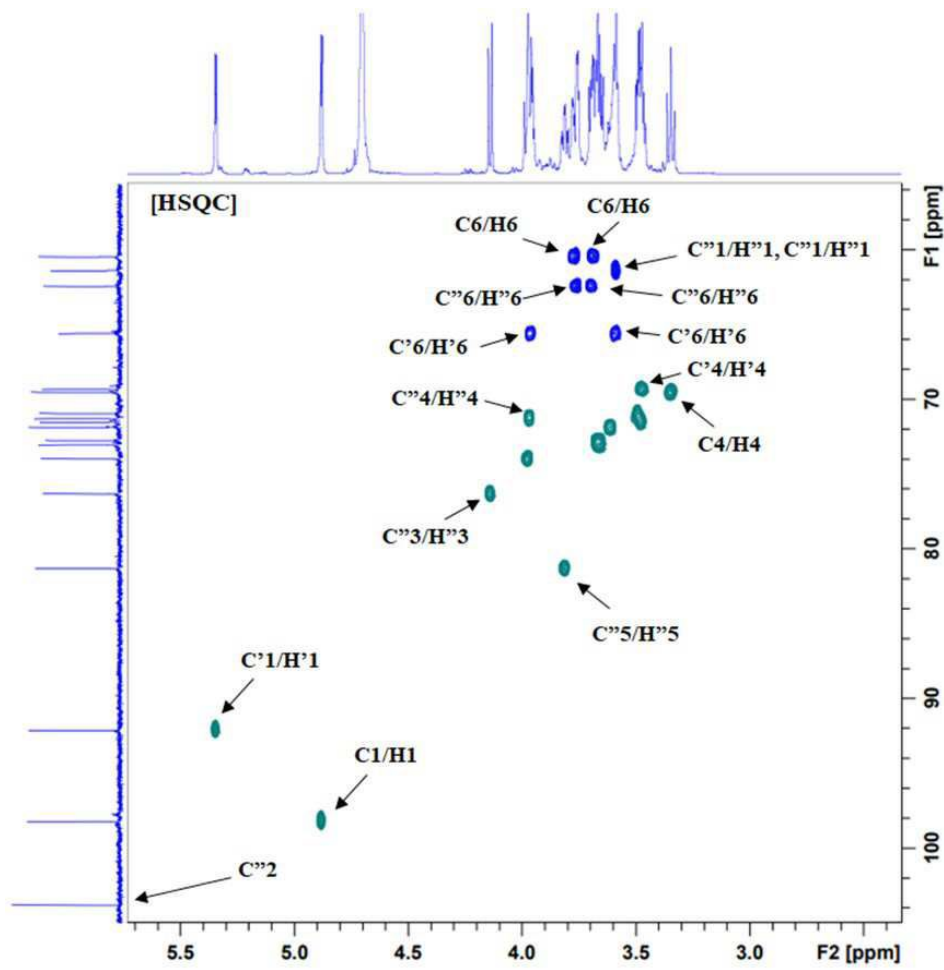
도면10



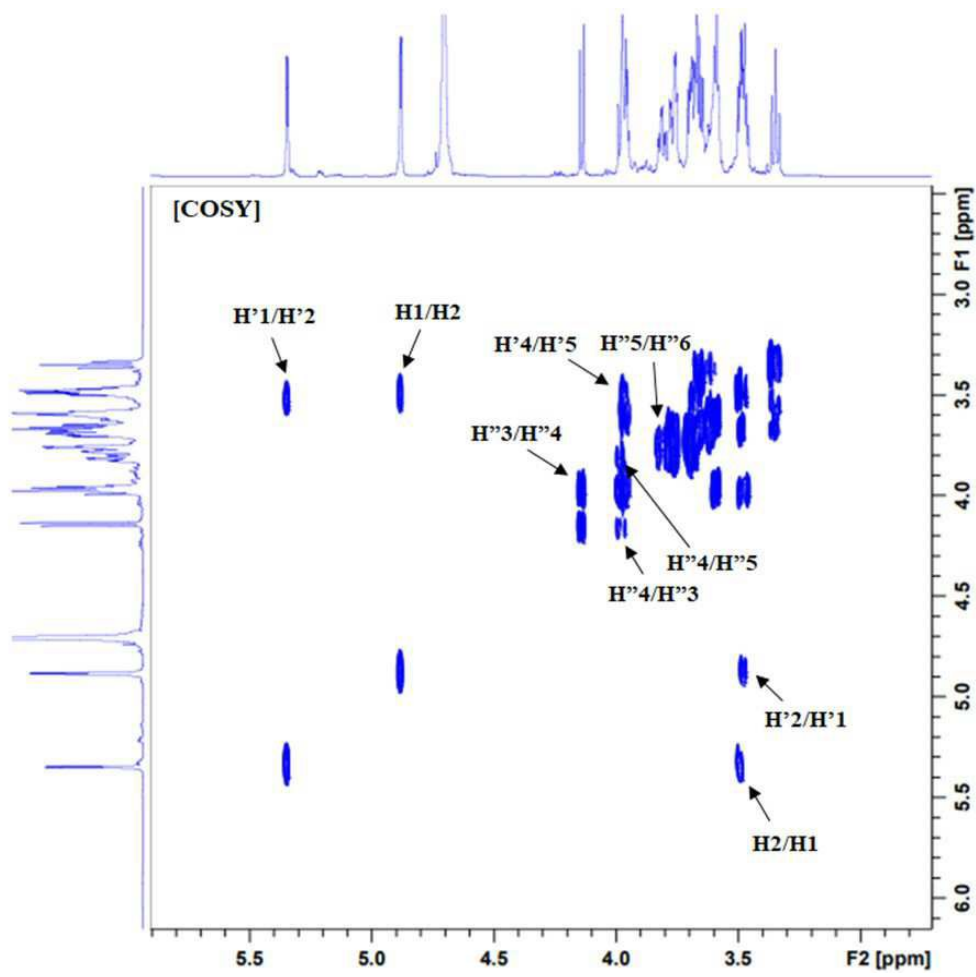
도면11



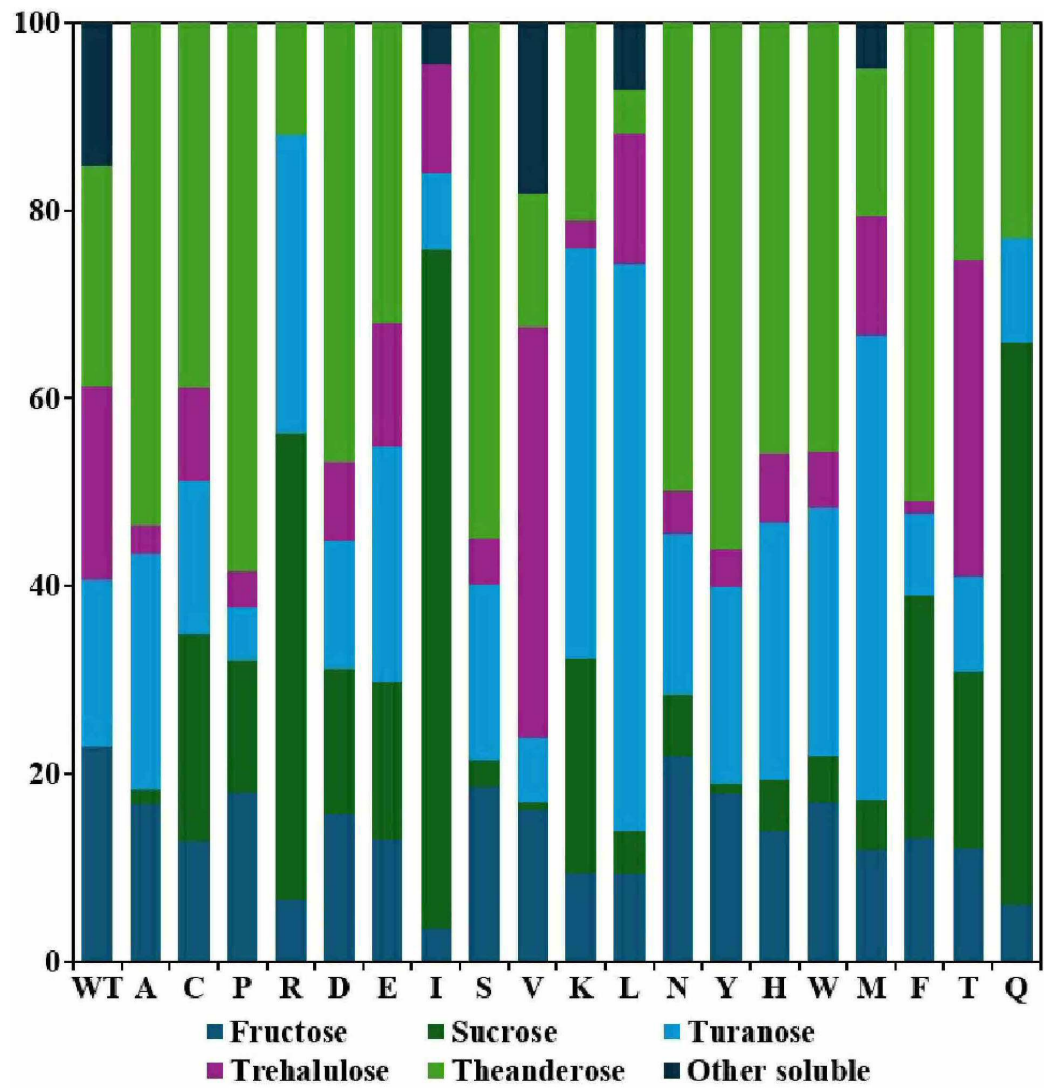
도면12



도면13



도면14



도면15

```

1  MLHTELASRLRTAFDDDDRDA
21 GTFLLRLERYGADLVESLEQ
41 VYGDQAPALLDGLIEVMLHA
61 FHNRPADLRRLDEARLLRPD
81 WLQSPDMIGYVAYTDRFAGD
101 LQGVVRGKLDYLRGLSVKYLH
121 LMPLLKPRDGENDDGGYAVQD
141 YRSVRSDDLGSMDDDL SALARD
161 LRGQGISLVLDLVLNHVARE
181 HEWAEKARAGDPHYKAYFHI
201 YPDRTQPDAFEATLPEVFDP
221 FAPGNFTWDEAAGGWVWTF
241 NTYQWDVNWSNPDVFREFLD
261 IILYLANRGVEVFRLDAIAF
281 IWKRLGTDSQNPPEVHWLTR
301 ALRAATRIVAPAVAFKAEAI
321 VAPAQLIH YLGSR AH HGKVS
341 DMAYHNSLMVQLWSSLASRD
361 TTLFREALQAFPPKPATATW
381 GLYARCHDDI EW AISDE DAT
401 RAGLDGDAHRRFLSDFYSGT
421 FPGTFARGMV FQYNPATGDR
441 RISGMAASLAGLEAALETGD
461 EVGISTS IARLRMLHAVVLG
481 FGGVPLVYMGDELAM LNDYS
501 FEWVPEHAADNRWVHRPLMD
521 WALAEQARDDVNSPAGRMYA
541 WLQKLVQARAATPHLHASVE
561 SRAVHSPDNRVLLLR RDHPM
581 GVMLGVYNF SHEDVSFPTWA
601 LREHLGEQAEDRLSGGR LTF
621 ARPTLRLEPYRAMWLTEL*

```

도면16

```

1  M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I P W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L *

```

도면17

1	M	L	H	T	E	L	A	S	R	L	R	T	A	F	D	D	D	R	D	A
21	G	T	F	L	L	R	L	E	R	Y	G	A	D	L	V	E	S	L	E	Q
41	V	Y	G	D	Q	A	P	A	L	L	D	G	L	I	E	V	M	L	H	A
61	F	H	N	R	P	A	D	L	R	R	L	D	E	A	R	L	L	R	P	D
81	W	L	Q	S	P	D	M	I	G	Y	V	A	Y	T	D	R	F	A	G	D
101	L	Q	G	V	R	G	K	L	D	Y	L	R	G	L	S	V	K	Y	L	H
121	L	M	P	L	L	K	P	R	D	G	E	N	D	G	G	Y	A	V	Q	D
141	Y	R	S	V	R	S	D	L	G	S	M	D	D	L	S	A	L	A	R	D
161	L	R	G	Q	G	I	S	L	V	L	D	L	V	L	N	H	V	A	R	E
181	H	E	W	A	E	K	A	R	A	G	D	P	H	Y	K	A	Y	F	H	I
201	Y	P	D	R	T	Q	P	D	A	F	E	A	T	L	P	E	V	F	P	D
221	F	A	P	G	N	F	T	W	D	E	A	A	G	G	W	V	W	T	T	F
241	N	T	Y	Q	W	D	V	N	W	S	N	P	D	V	F	R	E	F	L	D
261	I	I	L	Y	L	A	N	R	G	V	E	V	F	R	L	D	A	I	A	F
281	I	W	K	R	L	G	T	D	S	Q	N	Q	P	E	V	H	W	L	T	R
301	A	L	R	A	A	T	R	I	V	A	P	A	V	A	F	K	A	E	A	I
321	V	A	P	A	Q	L	I	H	Y	L	G	S	R	A	H	H	G	K	V	S
341	D	M	A	Y	H	N	S	L	M	V	Q	L	W	S	S	L	A	S	R	D
361	T	T	L	F	R	E	A	L	Q	A	F	P	P	K	P	A	T	A	T	W
381	G	L	Y	A	R	C	H	D	D	I	N	W	A	I	S	D	E	D	A	T
401	R	A	G	L	D	G	D	A	H	R	R	F	L	S	D	F	Y	S	G	T
421	F	P	G	T	F	A	R	G	M	V	F	Q	Y	N	P	A	T	G	D	R
441	R	I	S	G	M	A	A	S	L	A	G	L	E	A	A	L	E	T	G	D
461	E	V	G	I	S	T	S	I	A	R	L	R	M	L	H	A	V	V	L	G
481	F	G	G	V	P	L	V	Y	M	G	D	E	L	A	M	L	N	D	Y	S
501	F	E	W	V	P	E	H	A	A	D	N	R	W	V	H	R	P	L	M	D
521	W	A	L	A	E	Q	A	R	D	D	V	N	S	P	A	G	R	M	Y	A
541	W	L	Q	K	L	V	Q	A	R	A	A	T	P	H	L	H	A	S	V	E
561	S	R	A	V	H	S	P	D	N	R	V	L	L	L	R	R	D	H	P	M
581	G	V	M	L	G	V	Y	N	F	S	H	E	D	V	S	F	P	T	W	A
601	L	R	E	H	L	G	E	Q	A	E	D	R	L	S	G	G	R	L	T	F
621	A	R	P	T	L	R	L	E	P	Y	R	A	M	W	L	T	E	L	*	

도면18

```

1  MLHTE LASRLRTAFDDDRDA
21 GTFLRLRLERYGADLVESLEQ
41 VYGDQAPALLDGLIEVMLHA
61 FHNRPADLRLRLDEARLLRPD
81 WLQSPDMIGYVAYTDRFAGD
101 LQGV RGKLDYLRGLSVKYLH
121 LMP L LKPRDGENDDGYAVQD
141 YRSVRS D LGSMDDLSALARD
161 LRGQG I SLVLDLV LN HVARE
181 HEWAEKARAGDPHYKAYFHI
201 YPDR T QPDAFEATLPEVFPD
221 FAPGNFTWDEAAGGWVWTTF
241 NTYQWDVNWSNPDVFREFLD
261 IILYLANRGVEVFRLDAIAF
281 IWKRLGTDSQNPQPEVHWLTR
301 ALRAATRIVAPAVAFKAEAI
321 VAPAQLIHYLGSR AH HGKVS
341 DMAYHNSLMVQLWSSLASRD
361 TTLFREALQAFFPKPATATW
381 GLYARCHDDIDWAISDE DAT
401 RAGLDGD AHRRLSDFYSGT
421 FPGTFARGMV FQYNPATGDR
441 RISGMAASLAGLEAALETGD
461 EVGISTSIARLRMLHAVVLG
481 FGGVPLVYMGDELAM LNDYS
501 FEWVPEHAADNRWVHRPLMD
521 WALAEQARD DVNSPAGRMYA
541 WLQKL VQARAATPHLHASVE
561 SRAVHS PDNRVLLLR RDHPM
581 GVMLGVYNF SHEDVSFPTWA
601 LREHLGEQAEDRLSGGRLTF
621 ARPTLRLEPYRAMWLTEL*

```

도면19

```

1  MLHTELASRLRTAFDDDRDA
21 GTFLLRLERYGADLVESLEQ
41 VYGDQAPALLDGLIEVMLHA
61 FHNRPADLRRRLDEARLLRPD
81 WLQSPDMIGYVAYTDRFAGD
101 LQGVVRGKLDYLRGLSVKYLH
121 LMPLLKPRDGENDDGGYAVQD
141 YRSVRSDDLGSMDLSSALARD
161 LRGQGISLVLDLVLNHVARE
181 HEWAEKARAGDPHYKAYFHI
201 YPDRTQPDAFEATLPEVFPD
221 FAPGNFTWDEAAGGWVWTTF
241 NTYQWDVNWSNPDVFREFLD
261 IILYLANRGVEVFRLDAIAF
281 IWKRLGTDSQNPQPEVHWLTR
301 ALRAATRIVAPAVAFKAEAI
321 VAPAQLIHYLGSRHHGKVS
341 DMAYHNSLMVQLWSSSLASRD
361 TTLFREALQAFPPKPATATW
381 GLYARCHDDIAW A I S D E D A T
401 RAGLDGDAHRRFLSDFYSGT
421 FPGTFARGMV F Q Y N P A T G D R
441 RISGMAASLAGLEAALETDG
461 EVGISTSIARLRMLHAVVLG
481 FGGVPLVYMGDELAMLNDYS
501 FEWVPEHAADNRWVHRPLMD
521 WALAEQARD DVNSPAGRMYA
541 WLQKLVQARAATPHLHASVE
561 SRAVHSPDNRVLLLRDHPM
581 GVMLGVYNFSHEDVSFP TWA
601 LREHLGEQAEDRLSGGR LTF
621 ARPTLRLEPYRAMWLTEL*

```

도면20

```

1 MLH TELASRLRTAFDDDRDA
21 GTFLLRLERYGADLVESLEQ
41 VYGDQAPALLDGLIEVMLHA
61 FHNRPADLRRLDEARLLRPD
81 WLQSPDMIGYVAYTDRFAGD
101 LQGVVRGKLDYLRGLSVKYLH
121 LMPLLKPRDGENDDGGYAVQD
141 YRSVRSDLGSMDDLSALARD
161 LRGQGISLVLDLVLNHVARE
181 HEWAEKARAGDPHYKAYFHI
201 YPDRRTQPDAFEATLPEVFDP
221 FAPGNFTWDEAAGGWVWTTF
241 NTYQWDVNWSNPDVFREFLD
261 IILYLANRGVEVFRLDAIAF
281 IWKRLGTDSQNPQPEVHWLTR
301 ALRAATRIVAPAVAFKAEAI
321 VAPAQLIHYLGSRHHGKVS
341 DMA YHNSLMVQLWSSSLASRD
361 TTLFREALQAFPPKPATATW
381 GLYARCHDDICWAI SDE DAT
401 RAGLDGDAHRRFLSDFYS GT
421 FPGTFARGMV FQYNPATGDR
441 RISGMAASLAGLEAALETGD
461 EVGISTSIARLRMLHAVV LG
481 FGGVPLVYMGDELAM LNDYS
501 FEWVPEHAADNRWVHRPLMD
521 WALAEQARDDVNSPAGRM YA
541 WLQKLVQARAATPHLHASVE
561 SRAVHSPDNRVLLLRDHPM
581 GVMLGVYNFSHEDVSFP TWA
601 LREHLGGEQAEDRLSGGR LTF
621 ARPTLRLEPYRAMWL TEL *

```

도면21

```

1  MLHTE LASRLRTAFD D D R D A
21 GTFL LRLERYGADLVESLEQ
41 VYGDQAPALLDGLIEVMLHA
61 FHNRPADLRRLDEARLLRPD
81 WLQSPDMIGYVAYTD R F A G D
101 LQGV RGKLDYLRGLSVKYLH
121 LMP L LKPRDGENDDGGYAVQD
141 YRSVRS D L G S M D D L S A L A R D
161 LR G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 HEWAEKARAGDPHYKAYFHI
201 YPDR T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 FAPGNFTWDEAAGGWVWTTF
241 NTYQWD V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 ALRAATRIVAPAVAFKAEAI
321 VAPAQLIHYLGSR AH HGKV S
341 DMAYHNSLMVQLWSSSLASRD
361 TTLFREALQAFFPKPATATW
381 GLYARCHDDIYWAISDE DAT
401 RAGLDGDAHRRFLSDFYSGT
421 FPGTFARGMV F Q Y N P A T G D R
441 RISGMAASLAGLEAALETGD
461 EVGISTSIARLRMLHAVVLG
481 FGGVPLVYMGDELAMLNDYS
501 FEWVPEHAADNRWVHRPLMD
521 WALAEQARDDVNSPAGRMYA
541 WLQKLVQARAATPHLHASVE
561 SRAVHSPDNRVLLLR RDH PM
581 GVMLGVYNFSHEDVSFPTWA
601 LREHLGEQAEDRLSGGRLTF
621 ARPTLRLEPYRAMWLTEL*

```

도면22

```

1  M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I S W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L *

```

도면23

1	M	L	H	T	E	L	A	S	R	L	R	T	A	F	D	D	D	R	D	A
21	G	T	F	L	L	R	L	E	R	Y	G	A	D	L	V	E	S	L	E	Q
41	V	Y	G	D	Q	A	P	A	L	L	D	G	L	I	E	V	M	L	H	A
61	F	H	N	R	P	A	D	L	R	R	L	D	E	A	R	L	L	R	P	D
81	W	L	Q	S	P	D	M	I	G	Y	V	A	Y	T	D	R	F	A	G	D
101	L	Q	G	V	R	G	K	L	D	Y	L	R	G	L	S	V	K	Y	L	H
121	L	M	P	L	L	K	P	R	D	G	E	N	D	G	G	Y	A	V	Q	D
141	Y	R	S	V	R	S	D	L	G	S	M	D	D	L	S	A	L	A	R	D
161	L	R	G	Q	G	I	S	L	V	L	D	L	V	L	N	H	V	A	R	E
181	H	E	W	A	E	K	A	R	A	G	D	P	H	Y	K	A	Y	F	H	I
201	Y	P	D	R	T	Q	P	D	A	F	E	A	T	L	P	E	V	F	P	D
221	F	A	P	G	N	F	T	W	D	E	A	A	G	G	W	V	W	T	T	F
241	N	T	Y	Q	W	D	V	N	W	S	N	P	D	V	F	R	E	F	L	D
261	I	I	L	Y	L	A	N	R	G	V	E	V	F	R	L	D	A	I	A	F
281	I	W	K	R	L	G	T	D	S	Q	N	Q	P	E	V	H	W	L	T	R
301	A	L	R	A	A	T	R	I	V	A	P	A	V	A	F	K	A	E	A	I
321	V	A	P	A	Q	L	I	H	Y	L	G	S	R	A	H	H	G	K	V	S
341	D	M	A	Y	H	N	S	L	M	V	Q	L	W	S	S	L	A	S	R	D
361	T	T	L	F	R	E	A	L	Q	A	F	P	P	K	P	A	T	A	T	W
381	G	L	Y	A	R	C	H	D	D	I	T	W	A	I	S	D	E	D	A	T
401	R	A	G	L	D	G	D	A	H	R	R	F	L	S	D	F	Y	S	G	T
421	F	P	G	T	F	A	R	G	M	V	F	Q	Y	N	P	A	T	G	D	R
441	R	I	S	G	M	A	A	S	L	A	G	L	E	A	A	L	E	T	G	D
461	E	V	G	I	S	T	S	I	A	R	L	R	M	L	H	A	V	V	L	G
481	F	G	G	V	P	L	V	Y	M	G	D	E	L	A	M	L	N	D	Y	S
501	F	E	W	V	P	E	H	A	A	D	N	R	W	V	H	R	P	L	M	D
521	W	A	L	A	E	Q	A	R	D	D	V	N	S	P	A	G	R	M	Y	A
541	W	L	Q	K	L	V	Q	A	R	A	A	T	P	H	L	H	A	S	V	E
561	S	R	A	V	H	S	P	D	N	R	V	L	L	L	R	R	D	H	P	M
581	G	V	M	L	G	V	Y	N	F	S	H	E	D	V	S	F	P	T	W	A
601	L	R	E	H	L	G	E	Q	A	E	D	R	L	S	G	G	R	L	T	F
621	A	R	P	T	L	R	L	E	P	Y	R	A	M	W	L	T	E	L	*	

도면24

```

1  M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I W W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L *

```

도면25

```

1 M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I F W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L *

```

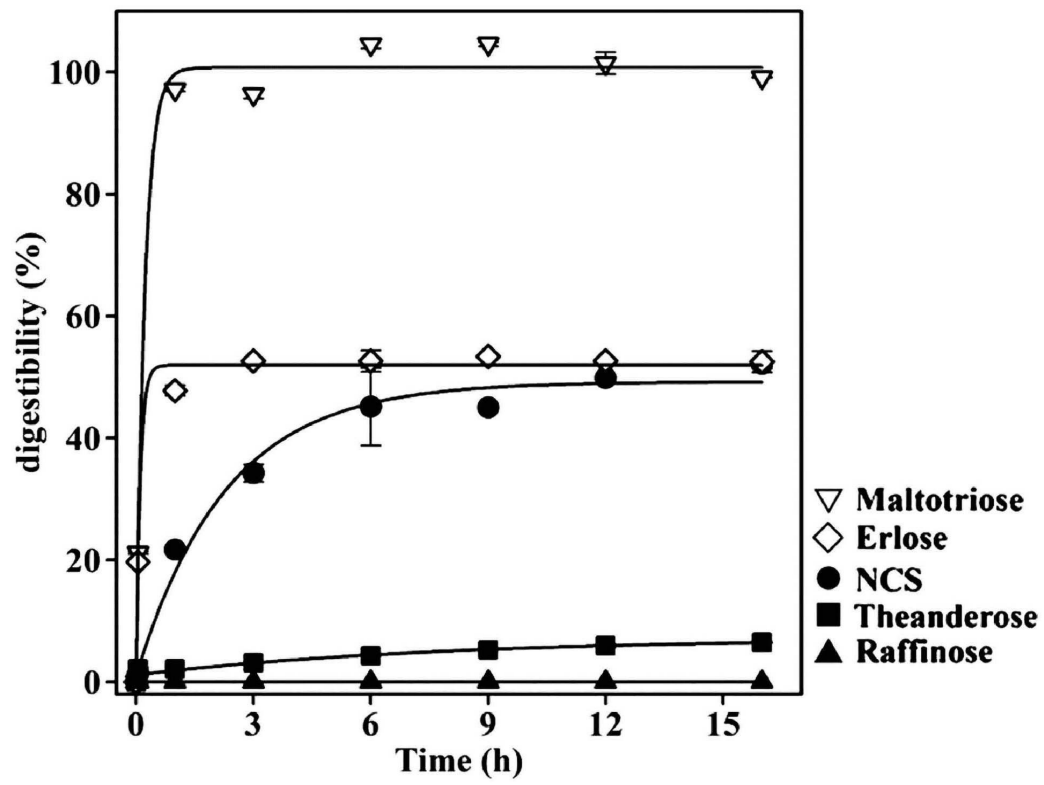
도면26

```

1  M L H T E L A S R L R T A F D D D R D A
21 G T F L L R L E R Y G A D L V E S L E Q
41 V Y G D Q A P A L L D G L I E V M L H A
61 F H N R P A D L R R L D E A R L L R P D
81 W L Q S P D M I G Y V A Y T D R F A G D
101 L Q G V R G K L D Y L R G L S V K Y L H
121 L M P L L K P R D G E N D G G Y A V Q D
141 Y R S V R S D L G S M D D L S A L A R D
161 L R G Q G I S L V L D L V L N H V A R E
181 H E W A E K A R A G D P H Y K A Y F H I
201 Y P D R T Q P D A F E A T L P E V F P D
221 F A P G N F T W D E A A G G W V W T T F
241 N T Y Q W D V N W S N P D V F R E F L D
261 I I L Y L A N R G V E V F R L D A I A F
281 I W K R L G T D S Q N Q P E V H W L T R
301 A L R A A T R I V A P A V A F K A E A I
321 V A P A Q L I H Y L G S R A H H G K V S
341 D M A Y H N S L M V Q L W S S L A S R D
361 T T L F R E A L Q A F P P K P A T A T W
381 G L Y A R C H D D I H W A I S D E D A T
401 R A G L D G D A H R R F L S D F Y S G T
421 F P G T F A R G M V F Q Y N P A T G D R
441 R I S G M A A S L A G L E A A L E T G D
461 E V G I S T S I A R L R M L H A V V L G
481 F G G V P L V Y M G D E L A M L N D Y S
501 F E W V P E H A A D N R W V H R P L M D
521 W A L A E Q A R D D V N S P A G R M Y A
541 W L Q K L V Q A R A A T P H L H A S V E
561 S R A V H S P D N R V L L L R R D H P M
581 G V M L G V Y N F S H E D V S F P T W A
601 L R E H L G E Q A E D R L S G G R L T F
621 A R P T L R L E P Y R A M W L T E L *

```

도면27



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.