(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 5 월 10 일 (10.05.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/060519 A1

(51) 국제특허분류:
C12P 19/14 (2006.01) *A23L 1/236* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/000645

(22) 국제출원일: 2011 년 1 월 31 일 (31.01.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0108174 2010 년 11 월 2 일 (02.11.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **세종대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIA CO-OPERATION GROUP OF SEJONG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 서울 광진구 군자동 98 세종대학교, 143-747 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **유상호 (YOO, Sang-Ho)** [KR/KR]; 서울 송파구 잠실 4 동 파크리오아파트 219 동 1401 호, 138-931 Seoul (KR). **왕렌 (WANG, Ren)** [CN/KR]; 서울 성북구 안암동 5 가 151 번지 4 호 103 호, 136-075 Seoul (KR). **박천석 (PARK, Cheon-Seok)** [KR/KR]; 경기 성남시 분당구 수내동 한양아파트 506 동 107 호, 463-922 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 서울 금천구 가산동 60-4 코오롱테크노밸리 906 호, 153-770 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

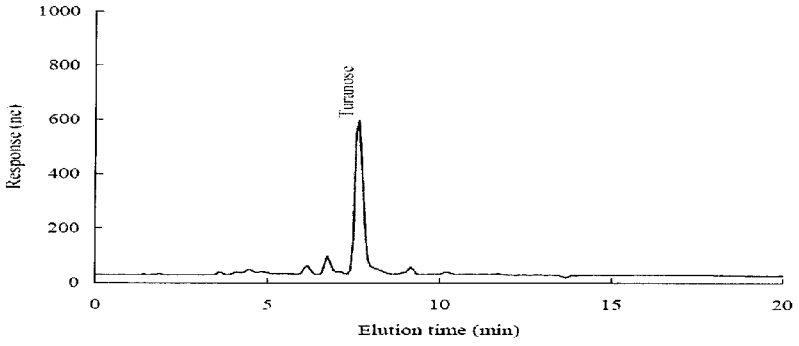
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING TURANOSE USING AMYLOSUCRASE AND SWEETNER USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 아밀로수크라제를 이용한 투라노즈의 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료

【Fig 3】



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing turanose using amylosucrase, and a sweetner using the turanose, and more specifically, to a method for preparing a high-purity turanose, the method enabling the preparation of high-purity turanose through enzyme reaction that treats amylosucrase on the solution having sucrose alone or sucrose with fructose, and to a sweetner using the turanose.

(57) 요약서: 본 발명은 아밀로수크라제를 이용한 투라노즈의 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수크로즈 단독 또는 프락토즈와 함께 수크로즈를 함유한 용액 상에 아밀로수크라제를 처리한 효소반응을 통해 고순도의 투라노즈를 제조할 수 있는 고순도 투라노즈의 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료에 관한 것이다.

WO 2012/060519 A1

명세서

발명의 명칭: 아밀로수크라제를 이용한 투라노즈의 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료

기술분야

[1] 본 발명은 아밀로수크라제를 이용한 투라노즈의 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료에 관한 것이다.

배경기술

[2] 투라노즈는 자연적으로 벌꿀에 존재하는 환원성 이당류로서 수크로즈 단맛의 약 반에 해당하는 단맛을 나타내며, 수크로즈의 유사체이며 3-O-α-D-글루코피라노실-D-프락토즈의 화학적 구조를 지닌다.

[3] 투라노즈는 치아 우식 유발 미생물에 의해 발효되지 않기 때문에 칼로리 없는 감미료로서 사용될 수 있으며, 따라서 음식, 화장품 및 약학 산업계에서 중요한 역할을 수행할 수 있다.

[4] 일본공개특허 제1993-252974호는 녹말성 물질과 프락토즈를 함유한 수용액 상에 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스퍼라제를 처리하여 투라노즈를 제조하는 효소공정을 개시하는 유일한 문헌으로서, 상기 효소공정은 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스퍼라제에 의해 녹말성 물질을 프락토즈로 변화시키는 글리코실전이 반응과 글루코아밀라제에 의해 상기 전이산물의 α-1,4-글루칸 사슬의 가수분해 반응을 포함한 2단계의 중요한 공정을 포함한다.

[5] 그러나, 아직까지 고순도의 투라노즈를 간편하면서도 높은 수율로 제조할 수 있는 투라노즈 제조공정은 전무한 상태이므로, 식품에 사용되는 칼로리 없는 감미료, 화장품 또는 의약품 등에 사용되는 첨가제 개발을 위하여 이러한 투라노즈의 제조방법을 개발하는 것이 매우 중요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이에, 본 발명자는 고순도 투라노즈를 효율좋게 생산하기 위하여 연구 노력한 결과, 아밀로수크라제를 효소원으로 이용하여 수크로즈 등과 같은 기질에 작용시킴으로써 투라노즈를 효율좋게 생산할 수 있었고, 또한 간단한 정제 공정을 통해 고순도 투라노즈를 효율좋게 생산할 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[7] 따라서, 본 발명의 목적은 산업적 규모로 쉽고 고수율로 고순도 투라노즈를 생산할 수 있는 투라노즈 제조방법 및 상기 투라노즈를 이용한 감미료를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아밀로수크라제를 수크로즈 용액에

작용시켜 투라노즈가 생산되도록 반응시키는 단계; 및 상기 반응물을 정제하는 단계를 포함하는 투라노즈의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[9] 본 발명에 따르면, 수크로즈 단독 또는 프락토즈와 함께 수크로즈를 함유한 용액 상에 아밀로수크라제를 처리함으로써 수크로즈 등과 같은 기질로부터 고순도 투라노즈를 쉽게 생산하고, 분리하며 고순도로 정제할 수 있기 때문에 음식물, 화장품 및 의약품 등 산업계에서 중요한 칼로리 없는 감미료 또는 첨가제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 정제되지 않은 투라노즈 시료의 HPAEC 크로마토그램을 나타낸 것이고,

[11] 도 2는 정제된 투라노즈 시료의 HPAEC 크로마토그램을 나타낸 것이고,

[12] 도 3은 정제된 투라노즈 시료의 HPLC-MS 크로마토그램을 나타낸 것이고,

[13] 도 4는 정제된 투라노즈 시료의 TLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

[14] 이때, 레인 1 및 7은 G1(글루코즈)-G7(말토헵타오즈) 표준물질; 레인 2는 수크로즈 표준물질; 레인 3은 투라노즈 표준물질; 레인 4는 프락토즈 표준물질; 레인 5는 정제되지 않은 투라노즈 시료; 레인 6은 정제된 투라노즈 시료임.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 본 발명은 아밀로수크라제를 수크로즈 용액에 작용시켜 투라노즈가 생산되도록 반응시키는 단계; 및 상기 반응물을 정제하는 단계를 포함하는 투라노즈의 제조방법을 제공한다.

[16] 본 발명에서 사용된 아밀로수크라제는 미생물 *Neisseria polysaccharea*, *Deinococcus geothermalis* 및 *Alteromonas macleodii*로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미생물로부터 유래되며, 특히 *Neisseria polysaccharea*로부터 유래된 것일 수 있으며, 상기 미생물은 미국특허 제6265635호에 개시된 방법에 따라 분리될 수 있다.

[17] 본 발명의 일실시예에 따르면, 아밀로수크라제는 2.4 U/ml의 최고 활성을 나타내며, 이때 생산되는 투라노즈의 함량은 2.38 mg/ml이므로, 아밀로수크라제의 비활성(specific activity)은 1.01 U/mg protein인 것으로 확인되었다. 따라서, 투라노즈의 수율 향상을 위하여, 아밀로수크라제는 수크로즈 100g 당 20 내지 500 mg, 바람직하게는 40 내지 150 mg의 양으로 포함될 수 있으며, 만약, 아밀로수크라제의 함량이 상기 범위를 벗어나면 반응 전환 효율이 떨어지거나 부반응 속도의 증가 등의 문제가 야기될 수 있다.

[18] 상기 미생물 *Neisseria polysaccharea*는 미생물이 자라서 효소인 아밀로수크라제를 생산할 수 있는 조건 하에서 배양되며, 일반적으로 약 37℃의 온도 및 pH 7.0 내지 7.2에서 분리되고 배양된다. 배양 시간은 미생물이 충분히 증식할 수 있는 한 제한이 없지만, 예를들어 24 내지 48시간 동안 배양할 수 있다.

미생물 배양이 완료된 후, 보편적인 고액 상분리 방법에 의해 배양물로부터 세포를 모을 수 있다. 예를들어, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 제거하여 세포를 수득할 수 있다.

[19] 특히, 상기 미생물 *Neisseria polysaccharea*로부터 유래된 아밀로수크라제 유전자를 숙주세포, 예를들어 대장균, 바실러스, 유산균, 곰팡이류 내에서 재조합 단백질체로 발현시켜 얻을 수 있다.

[20] 세포성 효소원은 보편적인 방법을 따라 세포로부터 추출된 조효소를 사용할 수 있다. 예를들어, 초음파 또는 호모게네이션을 이용한 분쇄법으로 세포로부터 효소를 추출하고 상기 추출물을 원심분리 또는 막 여과를 통해 처리함으로써 조효소를 얻을 수 있다. 조효소를 추가적인 처리없이 사용하거나 보편적인 방법으로 정제하여 사용할 수 있다. 예를들어, 조효소 추출물을 여과하여 불용성 물질을 제거하고 상기 여과물을 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼에 통과시켜 재조합 His_6-태그된 아밀로수크라제를 정제하고, 4℃에서 Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices를 이용하여 상기 아밀로수크라제를 용출시켜 전기영동적으로 균질한 효소를 얻을 수 있다.

[21] 정제 효소는 직접 이용되거나 또는 보편적인 방법에 의해 담체 물질에 고정화되어 사용될 수 있다. 예를들어, 이온 교환체에 대한 결합법, 수지 및 막에 대한 공유결합 및 흡착법 등의 방법이 사용될 수 있다. 이러한 고정화를 통해 합성촉매로서 효소를 쉽게 회수할 수 있고 여러번 사용할 수 있다. 효소의 정제공정이 일반적으로 많은 시간과 고비용이 소요되기 때문에 효소의 고정과 재사용은 상당한 비용 절감에 기여할 수 있다.

[22] 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제의 활성은 다음과 같이 측정할 수 있다. 즉, 기질로서 0.1M 수크로즈를 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0) 900 μl에 효소 용액 100 μl을 첨가하고, 상기 혼합물을 35℃에서 30분 동안 반응시키며, 상기 반응 혼합물을 100℃에서 10분 동안 가열하여 효소 반응을 중단시킨다. 프락토즈를 표준물질로 사용한 디니트로살리실산(DNS) 방법을 이용하여 상기 반응 혼합물 중으로 유리된 프락토즈의 양을 분석한다. 아밀로수크라제 활성 1 unit는 분석 조건에서 분당 1 μmol 프락토즈 생산을 촉진시키는 효소의 양으로서 정의된다.

[23] 본 발명에서 사용된 기질은 수크로즈 단독 또는 상기 수크로즈에 프락토즈를 추가적으로 보강하여 사용할 수 있다. 사용된 수크로즈 및 프락토즈의 농도는 특별히 제한되지 않는다. 예를들어, 기질로서 0.25M 또는 0.75M 프락토즈로 보강된 1.0M 또는 2.5M 수크로즈 용액 상에서 작용될 때에도 상기 효소는 반응하여 투라노즈를 생산할 수 있다. 또한, 상당히 고농도의 기질 또는 용해되지 않은 기질을 지닌 용액을 사용할 수도 있다.

[24] 본 발명의 효소반응 시 반응온도는 효소를 불활성화하지 않는 온도이면 어떠한 온도이든 상관없지만, 특히 약 40℃의 온도까지, 바람직하게는 20 내지 40℃의 온도가 바람직하다.

[25] 또한, 본 발명의 효소반응 시 반응 pH는 약 6.0 내지 9.0일 수 있지만, 바람직하게는 6.5 내지 7.5일 수 있다.

[26] 또한, 본 발명의 효소반응 시 반응시간은 효소반응 조건 하에서 달라질 수 있지만, 100-400 units/L의 정제 아밀로수크라제를 사용할 경우 24 내지 120 시간에서 선택될 수 있다.

[27] 본 발명에 따라 얻어진 반응 혼합물인 당조성물 중 투라노즈의 수율은 10% 이상, 바람직하게는 50% 이상이며, 가장 높은 수율은 73%로 나타났다. 본 발명에 따라 얻어진 당조성물을 여과하여 불순물을 제거하고 활성탄으로 탈색시킨다.

[28] 또한, 생산규모 및 반응조건에 따라 생산된 투라노즈의 정제 회수를 위하여, 다양한 고순도 정제방법을 이용할 수 있다. 예를들어, 이온-교환 수지 크로마토크래피, 활성탄을 이용한 컬럼 크로마토그래피, 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피, 분별결정법 등을 이용하여 고순도 투라노즈를 갖는 산물을 반응 혼합물로부터 쉽게 정제할 수 있으며, 얻어진 산물을 시럽 산물로 농축한다. 필요하다면 시럽 산물을 분말 산물로 건조할 수 있다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 투라노즈를 포함하는 감미료를 제공한다.

[30] 투라노즈는 치아 우식 유발 미생물에 의해 발효되지 않기 때문에 칼로리 없는 감미료로서 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 음식물, 화장품 및 의약품 등 산업계에서 중요한 감미료 또는 첨가제의 역할을 수행할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[31] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[32] **<실시예 1> 효소 준비 및 정제**

[33] 1. 재조합 *E. coli* BL21의 스탁 배양물 준비

[34] *Neisseria polysaccharea* 아밀로수크라제 뉴클레오타이드 서열에 기초한 2개의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 *Neisseria polysaccharea* ATCC 43768으로부터 NpAS에 대응하는 유전자를 얻었다. 즉, 상기 PCR 반응은 주형인 *N. polysaccharea* 게놈 DNA와 2개의 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 1: NPAS1 5'-GGA TCC GAT GTT GAC CCC CAC GCA GCA A -3'; 및 서열번호 2: NPAS2 5'-GGC AAG CTT CAG GCG ATT TCG AGC CAC AT -3')를 이용하여 수행되었다.

[35] 그 결과 얻어진 PCR 산물을 T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에서 클로닝하고, PCR 반응 시 어떠한 실수 존재 여부를 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다. *Bam*HI and *Hin*dIII를 이용하여 인서트를 자른 후, 얻어진 단편을 동일 효소로 처리된 pRSET-B 벡터로 삽입시켜 NpAS 발현 벡터인 pRSET-NpAS를 얻었다. 효율적인 유전자 발현을 위하여 상기 pRSET-NpAS으로 *E. coli* BL21을 형질전환시켰다.

[36] 2. 효소 준비

[37] 1% (w/v) 박토트립톤, 0.5% (w/v) 이스트 추출물, 0.5% (w/v) 염화나트륨, 및 물로 구성된 액체 영양배양 배지를 pH 7.0으로 조정하였다. 500ml의 배양배지를 120℃에서 15분 동안 멸균시킨 1000ml Erlenmeyer 플라스크에 담은 후, 냉각시키고 앞서 준비된 재조합 *E. coli* BL21의 스탁 배양물로 접종한 후 0.01% (w/v) 암피실린의 존재 하 37℃에서 배양하였다. 세포의 광학밀도가 약 0.6에 도달하였을 때, 0.1M 이소프로필-β-D-치오칼락토피라노사이드 1ml를 배양물에 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. 16℃에서 12시간 동안 배양한 후, 4℃에서 20분 동안 5,500×g에서 원심분리하여 세포를 수확하였다.

[38] 3. 효소 정제

[39] 앞서 준비된 배양물을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0) 50ml에서 완전하게 재현탁시킨 후, 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator 550,. Fisher Scientific Co.) Model D100을 이용하여 세포를 파괴시켰다. 얻어진 혼합물을 4℃에서 20분 동안 11,000×g에서 원심분리하여 세포성 잔해를 제거하였다. 얻어진 상등액을 0.45㎛ 시린지 필터를 통해 여과시킨 후, 5ml의 여과액을 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼을 통해 통과시켜 재조합 His_6-태그된 아밀로수크라아제를 정제하였다. His_6-태그된 아밀로수크라제를 용출하기 전에 Ni-NTA 친화성 컬럼을 20ml 세정 완충액(50mM Tris, 300mM 염화나트륨, 20mM 이미다졸, pH 7.0)으로 먼저 세정한 후, 5ml의 용출 완충액(50mM Tris, 300mM 염화나트륨, 250mM 이미다졸, pH 7.0)을 이용하여 아밀로수크라제 단백질을 용출시킨 후, 4℃에서 Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Billerica, USA)를 이용하여 농축시켰다. 전기영동적으로 단일 단백질 밴드를 갖는 효소 제제를 얻었다.

[40] **<실시예 2> 정제되지 않은 투라노즈 제조**

[41] 1. 수크로즈로부터 얻어진 투라노즈 제조

[42] 앞선 실시예에서 얻어진 정제 아밀로수크라아제 400 unit/L를 2.0M 수크로즈를 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 72시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 10분 동안 끓는 물에서 효소를 가열하여 불활성화 하였다. 얻어진 반응산물을 펄스 전류 검출기(Dionex, USA)를 지닌 DX-300 series HPAEC system (Dionex, USA)을 이용하여 분석하였다. 이때, 상업적으로 판매되는 글루코즈, 프락토즈, 수크로즈, 말토오즈 및 투라노즈를 표준물질로 이용하여 당류를 분석하였다. 그 결과는 하기 표 1 및 도 1과 같다.

[43] 표 1

[Table 1]

당류	HPAEC 체류시간 (min)	당류 조성 (%)
글루코즈	4.00	0.7
프락토즈	4.33	20.7
수크로즈	6.75	4.9
투라노즈	7.75	51.1
다른 당류	-	22.6

[44] 2. 반응시간 별 반응산물의 당 조성 분석

[45] 앞선 실시예에서 얻어진 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 2.0M 수크로즈를 함유한 용액에 가하였고, 35℃에서 효소 반응을 수행하였다. 시료를 정해진 시간간격으로 모으고, 100℃에서 10분 동안 끓여 남아있는 효소를 불활성화 하였다. 그후, 각 시료의 당 조성을 앞선 실시예와 유사하게 HPAEC을 이용하여 분석한 결과 표 2와 같다.

[46] 표 2

[Table 2]

반응시간 (hour)	당 조성 (%)				
	글루코즈	프락토즈	수크로즈	투라노즈	다른 당류
24	0.5	9.6	52.9	25.2	11.8
72	0.7	20.7	4.9	51.1	22.6
120	0.9	20.8	5.0	52.0	21.3

[47] 표 2로부터, 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제는 기질로서 2.0M 수크로즈를 이용하여 35℃에서 최소 72시간 동안 반응할 때 약 50% 투라노즈를 함유한 당류 조성물을 형성하였다. 약 20%의 수득율을 나타내는 본 반응의 또다른 주요 산물은 프락토즈이며, 글루코즈, 소비되지 않은 수크로즈 및 다른 당류에 의해 나머지를 차지하였다.

[48] **<실시예 3> 투라노즈 수율에 관한 효소 양의 영향**

[49] 1.0M 수크로즈 용액에 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제 100, 200 또는 400 unit/L를 첨가하여 얻어진 혼합물을 35℃에서 효소적으로 반응시켰다. 정해진 시간 간격을 두고 시료를 모아 100℃에서 10분 동안 가열하여 남아있는 효소를 불활성화 하였다. 각 시료의 당류 조성을 HPAEC를 이용하여 분석하였고, 다양한 효소 활성에서 각 시료의 투라노즈 수율과 반응시간은 하기 표 3과 같다.

[50] 표 3

[Table 3]

투라노즈 수율 (%)		효소 양 (units/L)		
		100	200	400
반응시간(hour)	24	8.8 ± 0.3	19.3 ± 0.8	30.7 ± 0.2
	72	27.4 ± 1.0	30.8 ± 0.2	31.7 ± 0.3
	120	31.4 ± 0.5	31.6 ± 0.6	31.8 ± 0.5

[51] 상기 표 3으로부터 100 unit/L의 정제 아밀로수크라제는 120시간 반응 후 약 30%의 수율로 투라노즈를 생성하였고, 400 unit/L의 정제 아밀로수크라제는 단지 24시간 반응 후 약 30%의 수율로 투라노즈를 생성하였다.

[52] **<실시예 4> 투라노즈 수율에 관한 온도의 영향**

[53] 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 1.0, 1.5 또는 2.0M 수크로즈를 함유한 용액에 첨가하였고, 30, 35 및 40℃에서 각각 효소 반응을 수행하였다. 72시간 반응 후, 시료를 100℃에서 10분 동안 가열하여 남아있는 효소를 불활성화 하였고, HPAEC를 이용하여 각 시료의 당류 조성을 분석하였다. 다양한 수크로즈 농도 및 온도에서 각 시료의 투라노즈 수율을 하기 표 4에 나타내었다.

[54] 표 4

[Table 4]

투라노즈 수율 (%)		온도 (℃)		
		30	35	40
수크로즈 농도 (M)	1.0	33.9 ± 0.1	31.7 ± 0.3	29.6 ± 0.0
	1.5	38.7 ± 0.4	36.1 ± 0.5	34.7 ± 0.0
	2.0	34.2 ± 0.2	51.1 ± 0.0	38.7 ± 1.1

[55] 표 4와 같이, 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제는 기질로서 2.0M 수크로즈를 이용하여 35℃에서 72시간 동안 반응할 때 약 50% 투라노즈를 생산하였다.

[56] **<실시예 5> 투라노즈 수율에 관한 수크로즈 농도의 영향**

[57] 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 1.0, 1.5, 2.0 또는 2.5M 수크로즈를 함유한 용액에 첨가하였고, 35℃에서 각각 효소 반응을 수행하였다. 시료를 정해진 시간 간격으로 모은 후, 시료를 100℃에서 10분 동안 가열하여 남아있는 효소를 불활성화 하였다. 각 시료의 당류 조성은 HPAEC를 이용하여 분석하였고, 다양한 수크로즈 농도 및 반응온도에서 각 시료의 투라노즈 수율을 하기 표 5에 나타내었다.

[58] 표 5

[Table 5]

투라노즈 수율 (%)		수크로즈 농도 (M)			
		1.0	1.5	2.0	2.5
반응시간(hour)	24	30.7 ± 0.2	26.5 ± 0.2	25.1 ± 0.1	17.9 ± 0.0
	72	31.7 ± 0.3	36.1 ± 0.5	51.1 ± 0.0	41.0 ± 0.8
	120	31.8 ± 0.5	37.4 ± 0.3	52.0 ± 0.9	56.2 ± 0.3

[59] 표 5와 같이, 수크로즈 농도가 높을수록 최종적으로 더많은 투라노즈가 생산되었다. 120 시간 반응 후, 2.5M 수크로즈 용액을 이용할 경우 효소는 약 55%의 고수율로 투라노즈를 생산하였다.

[60] **<실시예 6> 투라노즈 수율에 관한 프락토즈 첨가의 영향**

[61] 다양한 농도의 수크로즈(1.0, 1.5 또는 2.0M) 및 프락토즈(0.25, 0.50 또는 0.75M)를 지닌 용액을 준비한 후, 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 각 용액에 첨가하였고, 35℃에서 각각 효소 반응을 수행하였다. 96시간 반응 후, 시료를 100℃에서 10분 동안 가열하여 남아있는 효소를 불활성화 하였고, 각 시료의 당류 조성을 HPAEC를 이용하여 분석하였다. 다양한 수크로즈 및 프락토즈의 농도에서 각 시료의 투라노즈 수율을 하기 표 6에 나타내었다.

[62] 표 6

[Table 6]

투라노즈 수율 (%)		프락토즈 (M)			
		0	0.25	0.50	0.75
수크로즈 농도 (M)	1.0	30.9 ± 0.8	45.8 ± 0.1	57.2 ± 0.2	62.8 ± 1.1
	1.5	36.5 ± 0.6	49.8 ± 0.1	58.6 ± 0.3	65.4 ± 0.4
	2.0	50.9 ± 0.1	60.0 ± 0.1	67.1 ± 0.4	73.1 ± 0.6

[63] 표 6과 같이, 프락토즈 농도가 높을수록 최종적으로 더많은 투라노즈가 생산되었다. 0.75M 프락토즈를 각 반응 배지에 첨가할 경우 효소는 약 60%의 고수율로 투라노즈를 생산하였다.

[64] **<실시예 7> 수크로즈로부터 정제 투라노즈 제조**

[65] 1. 효소 준비 및 정제

[66] 재조합 *E. coli* BL21의 스탁 배양물을 1% (w/v) 박토트립톤, 0.5% (w/v) 이스트 추출물, 0.5% (w/v) 염화나트륨 및 물로 구성된 멸균 액체 영양 배양배지 5L에 접종시키고 0.01% (w/v) 암피실린 존재 하 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 그후, 0.1M 이소프로필-β-D-치오칼락토피라노사이드 10ml를 배양물에 첨가하였다. 16℃에서 16시간 동안 배양한 후, 4℃에서 30분 동안 5,500×g에서

원심분리하여 세포를 수확하였다.

[67] 얻어진 세포 배양물을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0) 500ml에서 재현탁시킨 후, 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator 550,. Fisher Scientific Co.) Model D100을 이용하여 세포를 파괴시켰다. 얻어진 세포 현탁액을 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 상기 상등액을 0.45㎛ 시린지 필터를 통해 여과시키고, 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼을 이용하여 정제하며, Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Billerica, USA)를 이용하여 농축하였다. 약 100ml의 효소 농축액은 최종적으로 약 2.4 unit/ml의 활성을 나타내었다.

[68] 2. 수크로즈로부터 정제 투라노즈 제조

[69] 최종 농도가 2.5M인 수크로즈를 지닌 용액을 준비하였고, 상기 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 상기 용액에 첨가하였고, 35℃에서 120시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 그후, 반응 혼합물을 100℃에서 10분 동안 가열하고, 냉각하며, 0.45㎛ 시린지 필터를 통해 여과시켜 불용성 물질을 제거한 후, 순서대로 JAIGEL W-251 및 W-252 (20 mm × 500 mm)와 같은 2개의 친수성 분취용 컬럼을 구비한 분취용 고속액체크로마토그래피 (model LC-9104; JAI Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 정제하였다. 시료의 용출을 위하여 3mL/min의 유속으로 탈이온수를 사용하였다. 투라노즈 분획을 얻고, 농축하며 동결건조하여 약 96%의 순도와 약 65%의 수율을 갖는 투라노즈를 다량 함유한 당류 분말을 얻었다.

[70] 3. 형태 분석

[71] 앞서 제조된 투라노즈를 함유한 고순도 당류 분말을 이용하여 다음의 형태분석을 수행하였다.

[72] 1) HPAEC

[73] 펄스 전류 검출기(Dionex, USA)를 지닌 DX-300 series HPAEC system (Dionex, USA)을 이용하여 앞서 준비된 고순도 당류 분말을 분석하였으며, 이때 상업적으로 판매되는 글루코즈, 프락토즈, 수크로즈, 말토오즈 및 투라노즈를 표준물질로 이용하였다. 그 결과, 도 3과 같이 수크로즈로부터 투라노즈가 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[74] 2) HPLC-MS

[75] 앞서 정제된 투라노즈의 질량 스펙트럼은 양이온 전기분무 모드를 이용하여 Agilent 1100 series MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 상에서 얻었다. 시료 용액은 0.8 ml/min의 유속으로 전기분무원에 전달되었고, 주입 용량은 10㎕이었다. capillary voltage를 4kV로 유지하는 동안, fragmentor voltage를 150V로 고정하였다. 이러한 전기분무원의 온도는 350℃로 유지하였고, 검출 스캔 범위는 m/z 100 내지 1400으로 하였다.

[76] 그 결과, 도 4와 같이 고순도 당류 분말에 대하여 MS m/z 365.3에서 이온$(M + Na)^+$를 나타내어 상기 당류가 이당류인 것을 확인하였다.

[77] 3) NMR

[78] 600 MHz NMR 시스템 (Rheinstetten, Germany)을 이용하여 NMR 분석을 수행하였고, 이때 정제 투라노즈는 순수 D_2O에 용해시켜 사용하였다. 표준 실험법에 따라 HSQC (heteronuclear single quantum correlation), ^{13}C 및 ^{1}H NMR 스펙트럼을 기록하였다. 데이터 처리는 TopSpin® 2.0 소프트웨어 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany)를 이용하였다.

[79] 정제 투라노즈의 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과, 하기 표 7 및 도 5와 같이, 3-*O*-α-D-글루코피라노실-α-D-프락토프라노즈, 3-*O*-α-D-글루코피라노실-β-D-프락토프라노즈 및 3-*O*-α-D-글루코피라노실-β-D-프락토피라노즈와 같은 투라노즈 호변이체인 것을 확인하였다.

[80] 표 7

[Table 7]

호변이체	Chemical shift (ppm)											
	α-D-글루코피라노실 단위						D-프락토즈 단위					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
3-*O*-α-D-글루코피라노실-α-D-프락토프라노즈	97.1	71.5	73.1	69.6	74.8	60.5	61.3	104.5	85.0	72.5	81.8	63.0
3-*O*-α-D-글루코피라노실-β-D-프락토프라노즈	98.7	71.7	72.9	69.6	74.6	60.5	62.5	101.9	80.8	72.6	81.1	63.1
3-*O*-α-D-글루코피라노실-β-D-프락토피라노즈	101.2	72.3	73.1	69.6	73.0	60.7	64.3	98.0	76.9	70.5	69.3	63.6

[81] 4) TLC

[82] TLC 분석은 Whatman K6 실리카겔 플레이트를 이용하여 수행하였고, 이때 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 1-프로판올 및 물 (85:20:20:15 v/v)을 용매계로 사용하였다. 메탄올에 용해된 0.3% (w/v) N-(1-나프틸)-에틸렌디아민과 5% (v/v) 황산을 플레이트에 분무하고, 110℃에서 10분 동안 플레이트를 가열하여

착색하였다.

[83] 그 결과, 도 6과 같이 상기 당류가 투라노즈인 것을 확인하였다.

[84] **<실시예 8> 수크로즈로부터 정제 투라노즈 제조**

[85] 최종농도가 2.0M인 수크로즈와 최종농도가 0.75M인 프락토즈를 지닌 용액을 준비하였고, 정제 아밀로수크라제 400 unit/L를 상기 용액에 첨가하였고, 35℃에서 96시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 그후, 반응 혼합물을 100℃에서 10분 동안 가열하여 남아있는 효소를 불활성화 하였고, 실온으로 냉각시켰다. 얻어진 반응 혼합물은 약 73%의 투라노즈를 함유하였다(도 1 참조). 다른 산물로부터 투라노즈를 분리하기 위하여, 반응 혼합물을 먼저 0.45㎛ 시린지 필터를 통해 여과시켜 불용성 물질을 제거한 후, 순서대로 JAIGEL W-251 및 W-252 (20 mm × 500 mm)와 같은 2개의 친수성 분취용 컬럼을 구비한 분취용 고속액체크로마토그래피 (model LC-9104; JAI Ltd., Tokyo, Japan)에 적용하였다. 시료의 용출을 위하여 3mL/min의 유속으로 탈이온수를 사용하였다. 투라노즈 분획(도 2의 분획 C)을 얻고, 농축하며 동결건조하여 약 96%의 순도와 약 65%의 수율을 갖는 투라노즈를 다량 함유한 당류 분말을 얻었다(도 3).

[86]

[87] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서열목록 Free Text

[88] 서열번호 1은 NPAS1 프라이머의 염기서열이고,

[89] 서열번호 2는 NPAS2 프라이머의 염기서열이다.

청구범위

[청구항 1] 아밀로수크라제를 수크로즈 용액에 작용시켜 투라노즈가 생산되도록 반응시키는 단계; 및 상기 반응물을 정제하는 단계를 포함하는 투라노즈의 제조방법.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 아밀로수크라제는 미생물 *Neisseria polysaccharea*, *Deinococcus geothermalis* 및 *Alteromonas macleodii*로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미생물로부터 유래된 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

[청구항 3] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 수크로즈 용액은 프락토즈를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

[청구항 4] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 반응온도는 30 내지 40℃인 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

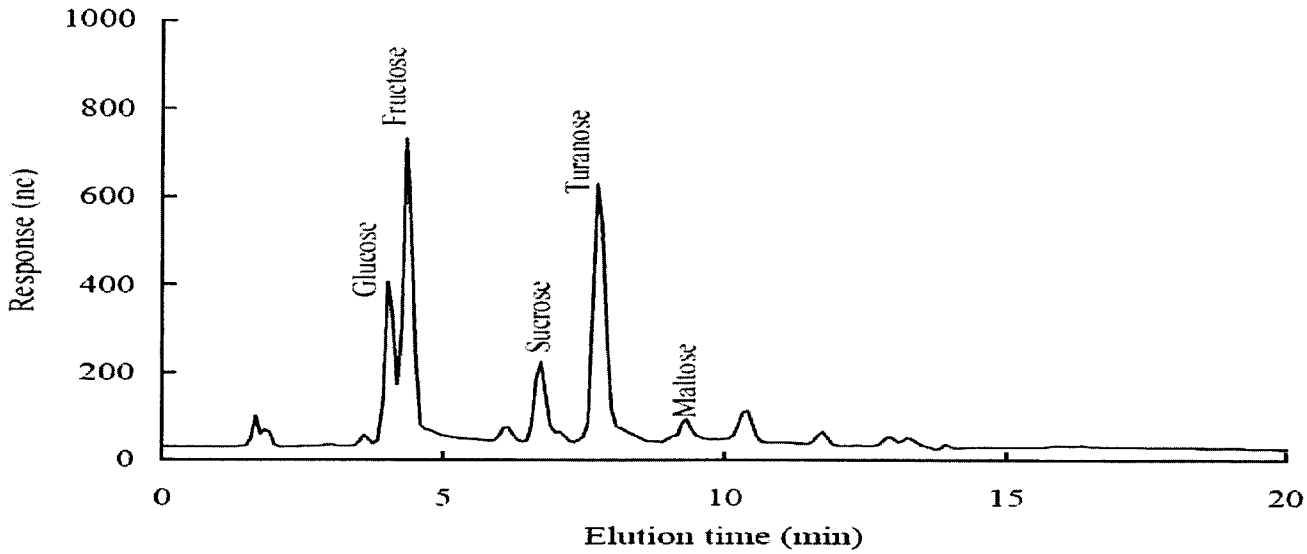
[청구항 5] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 반응 pH는 6.5 내지 7.5℃인 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

[청구항 6] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 반응시간은 100-400 units/L의 아밀로수크라제를 사용할 경우 24 내지 120시간인 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

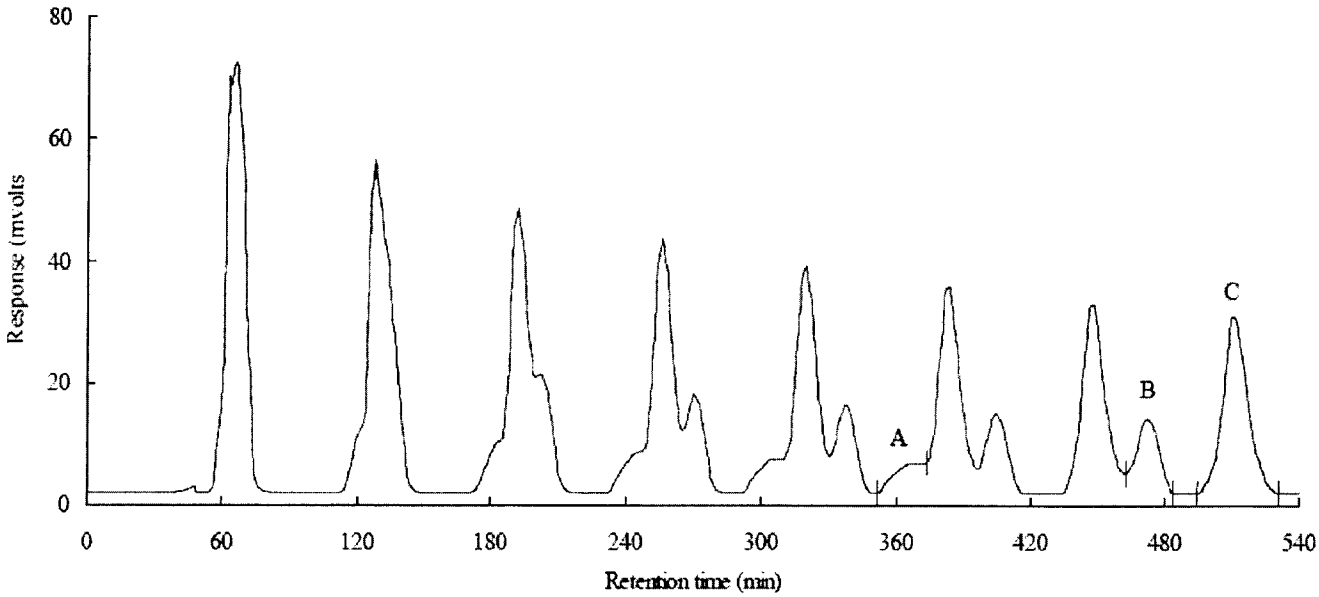
[청구항 7] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 정제는 이온-교환 컬럼 크로마토크래피, 활성탄을 이용한 컬럼 크로마토그래피 또는 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 투라노즈의 제조방법.

[청구항 8] 청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 투라노즈를 포함하는 감미료.

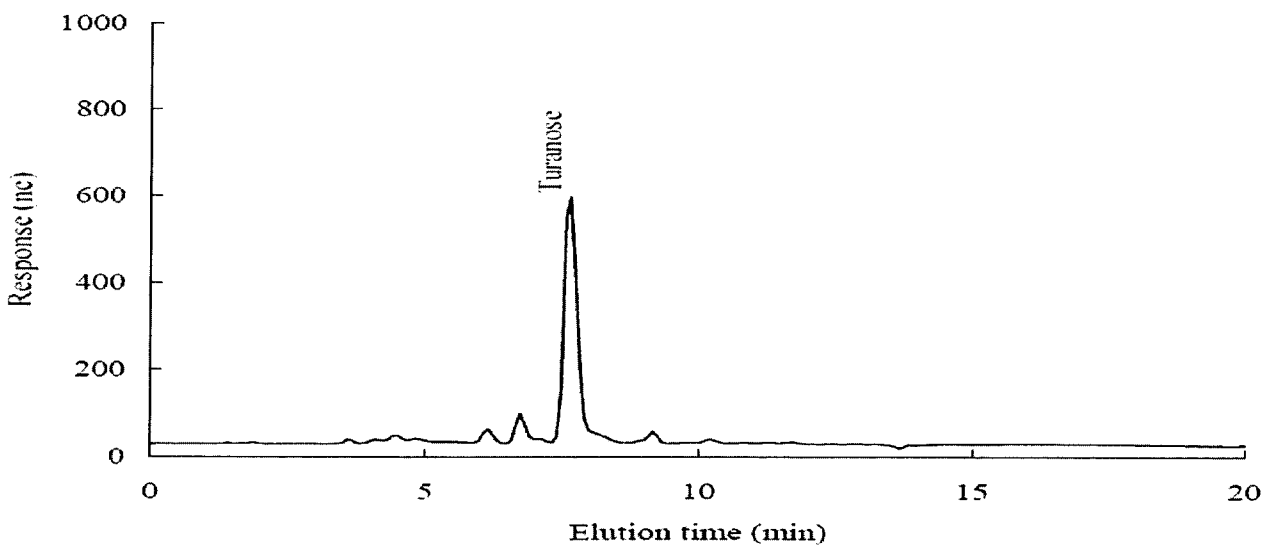
【Fig 1】



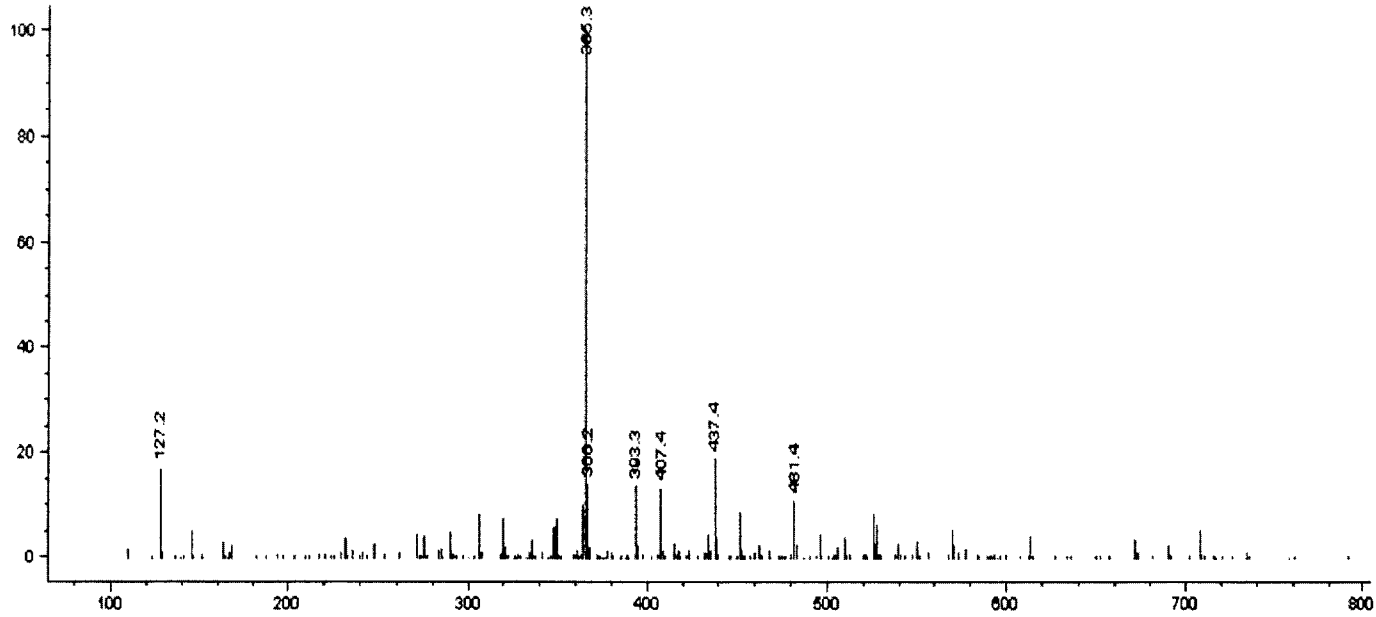
【Fig 2】



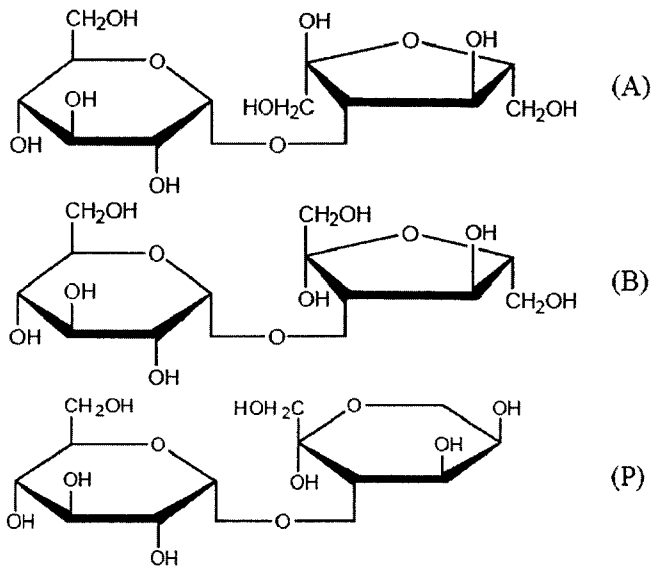
【Fig 3】



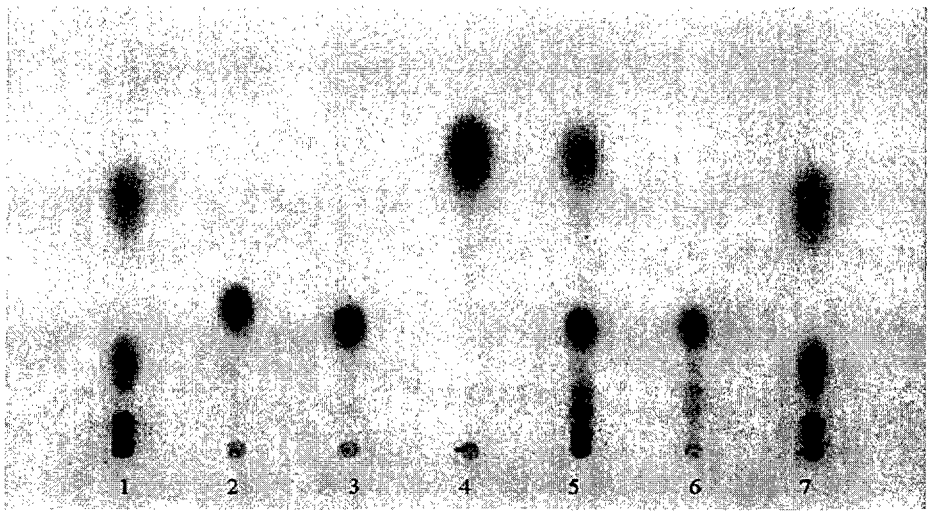
【Fig 4】



【Fig 5】



【Fig 6】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/000645

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/14(2006.01)i, C12N 9/24(2006.01)i, A23L 1/236(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 19/14; C12P 19/18; C12N 1/21; C12N 15/54; C12P 19/58; C07H 15/203

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: turanose, amylosucrase , neisseriae poly- saccharide, Deinococcus, Alteromonas, fructose, chromatographic, sweetner

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	FEBS LETTERS (2000) Vol.471, pp.219-223 See abstract; pages 220 and 221, left column.	1-7 8
X A	Pure Appl. Chem. (2002) Vol.74, No.7, pp.1293-1300 See abstract, page 1296.	8 1-7
X A	Sugar Journal, pp.12-20, January 2007 See table 1.	8 1-7
A	JP 3182665 B2 (HAYASHIBARA BIOCHEM. LABS, INC.) 27 April 2001 See claims 1-5.	1-8
A	KR 10-0352532 B1 (PLANTECH BIOTECHNOLOGY GMBH) 18 February 2004 See claims 19-29.	1-8
A	KR 10-2009-0081491 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 29 July 2009 See claims 1-14.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 NOVEMBER 2011 (08.11.2011)	**22 NOVEMBER 2011 (22.11.2011)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2011/000645

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 3182665 B2	27.04.2001	JP 5252974 A	05.10.1993
KR 10-0352532 B1	18.02.2004	CA 2190149 A1	23.11.1995
		EP 0759993 A1	05.03.1997
		EP 0759993 B1	25.07.2007
		JP 03-511027 B2	09.01.2004
		JP 03-555086 B2	18.08.2004
		JP 10-500297 A	13.01.1998
		JP 2003-325067 A	18.11.2003
		US 2002-0092040 A1	11.07.2002
		US 2005-0227319 A1	13.10.2005
		US 6265635 B1	24.07.2001
		US 6818421 B2	16.11.2004
		US 7456003 B2	25.11.2008
		WO 95-31553 A1	23.11.1995
KR 10-2009-0081491 A	29.07.2009	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/000645

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 19/14(2006.01)i, C12N 9/24(2006.01)i, A23L 1/236(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12P 19/14; C12P 19/18; C12N 1/21; C12N 15/54; C12P 19/58; C07H 15/203

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 투라노즈, 아밀로수크라제, 나이세리아 폴리사카래아, 다이노코커스, 알테로모나스, 프락토즈, 크로마토그래피, 감미료

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	FEBS LETTERS (2000) Vol.471, pp.219-223 초록; 220 및 221 페이지, 왼쪽컬럼 참조.	1-7 8
X A	Pure Appl. Chem. (2002) Vol.74, No.7, pp.1293-1300 초록; 1296 페이지 참조.	8 1-7
X A	Sugar Journal, pp.12-20, January 2007 표1 참조.	8 1-7
A	JP 3182665 B2 (하야시바라 바이오캠 랩, INC.) 2001.04.27 청구항 1-5 참조.	1-8
A	KR 10-0352532 B1 (플란테크 바이오테크놀로지 GmbH) 2004.02.18 청구항 19-29 참조.	1-8
A	KR 10-2009-0081491 A (경희대학교 산학협력단) 2009.07.29 청구항 1-14 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2011년 11월 08일 (08.11.2011)	**2011년 11월 22일 (22.11.2011)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
정재철
전화번호 82-42-481-8403

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/000645

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 3182665 B2	2001.04.27	JP 5252974 A	1993.10.05
KR 10-0352532 B1	2004.02.18	CA 2190149 A1	1995.11.23
		EP 0759993 A1	1997.03.05
		EP 0759993 B1	2007.07.25
		JP 03-511027 B2	2004.01.09
		JP 03-555086 B2	2004.08.18
		JP 10-500297 A	1998.01.13
		JP 2003-325067 A	2003.11.18
		US 2002-0092040 A1	2002.07.11
		US 2005-0227319 A1	2005.10.13
		US 6265635 B1	2001.07.24
		US 6818421 B2	2004.11.16
		US 7456003 B2	2008.11.25
		WO 95-31553 A1	1995.11.23
KR 10-2009-0081491 A	2009.07.29	없음	