



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월06일

(11) 등록번호 10-1518022

(24) 등록일자 2015년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/54 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01) *C12P 19/18* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0024867

(22) 출원일자 2014년03월03일

심사청구일자 2014년03월03일

(56) 선행기술조사문헌

Shakhawat Hossain Bhuiyan 등. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 22, No. 1-2, 페이지 45-53 (2003)*

GenBank Accession Number WP_011529810 (2013.05.16.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박종태

대전광역시 유성구 노은로426번길 15 송림마을아파트 603동 301호

고재민

경기도 수원시 권선구 효탑로 50 우방아파트 104동 1003호

김정은

경기도 고양시 덕양구 무원로 17 무원마을8단지아파트 803동 909호

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 2 항

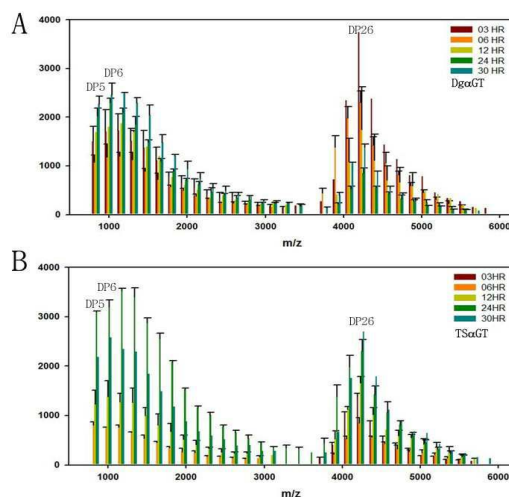
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 4-알파-글루카노트랜스퍼라제를 이용한 사이클로아밀로스의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제의 사이클로아밀로스를 파괴하는 커플링(coupling) 반응을 저해하고, 사이클로아밀로스의 생성 반응을 촉진하는 것을 특징으로 하는 사이클로아밀로스의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0014801

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 신규당전이 효소의 개발 및 이를 이용한 지소화성 전분의 제조

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래의 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 4- α -글루카노트랜스퍼라제(4- α -glucanotransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

상기 제조된 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계;

상기 형질전환된 대장균으로부터 4- α -글루카노트랜스퍼라제 효소를 분리 및 정제하는 단계; 및

상기 정제된 4- α -글루카노트랜스퍼라제 효소와 아밀로스를 pH는 6.0이고, 온도는 50℃인 조건 하에서 3 내지 6 시간 동안 반응하는 단계;를 포함하며, 중합도가 5인 사이클로아밀로스가 전체 생성된 사이클로아밀로스의 중량 기준으로 5~10%를 함유하고, 중합도가 24 내지 28의 사이클로아밀로스가 주성분인 것을 특징으로 하는 사이클로아밀로스의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 4- α -글루카노트랜스퍼라제는 커플링(coupling) 반응속도에 대한 고리화(cyclization) 반응속도의 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 사이클로아밀로스의 제조방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼라제를 이용한 사이클로아밀로스의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*)에서 유래한 4-알파-글루카노트랜스퍼라제와 아밀로스가 함유된 기질 사이의 반응을 이용하여 사이클로아밀로스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

4-알파-글루카노트랜스퍼라제 (4- α -glucanotransferase, EC 2.4.1.25)는 당전이 활성을 가지는 효소로, 하나의 선형 α -글루칸 분자에서 다른 선형 α -글루칸 분자로 당 사슬을 전이시키는 재배열(disproportionation) 반응, 하나의 선형 α -글루칸 분자 내에서의 당전이 반응으로 환형 글루칸을 생성시키는 고리화(cyclization) 반응 및 환형 글루칸을 개환하여 선형 글루칸으로 전이하는 커플링(coupling) 반응을 촉매한다. 아밀로스를 기질로 하여 4-알파-글루카노트랜스퍼라제의 당전이 활성으로 사이클로아밀로스를 생성한다.

[0003]

사이클로아밀로스는 친수성의 외부와 환상 형태의 내부 공동(cavity)을 가지기 때문에, 소수성의 화합물을 포집하여 그 물질의 용해성, 반응성, 안정성을 향상시킨다. 이러한 특이 성질로 인하여 사이클로아밀로스는 식품, 의약, 화학 및 화장품 산업 등에서 유용하다. 예를 들어, 중합도(degree of polymerization, 이하 DP라고 한다)

6 내지 8의 사이클로아밀로스는 식이섬유, 마요네즈의 유화성 개선제, 착향료의 안정제 및 탈취제 등으로 폭넓게 사용되어지는 사이클로아밀로스이다. 반면 중합도가 20 이상의 사이클로아밀로스의 존재는 1990년대에 알려지면서 산업적 활용이 시작되었다. 이들 사이클로아밀로스의 단백질 재접힘에 관여하는 인공 샤페론(artificial chaperone) 기능이 밝혀지면서 사이클로아밀로스의 산업적 활용 범위가 넓어지고 있다. 현재까지는 일부 사이클로아밀로스의 화학적 합성 방법이 알려져있으나 그 방법은 많은 처리단계를 거치므로 산업적 방법으로 유용하지 못하고 있다. 이에 당업계에서는 생체 효소를 이용하여 다양한 사이클로아밀로스를 제조하는 방법을 수행한다.

[0004]

현재 주로 사용되는 사이클로아밀로스의 제조방법은 4-알파-글루카노트랜스퍼라제의 당전이 활성을 이용한 방법이다. 4-알파-글루카노트랜스퍼라제는 대장균에서 처음으로 클로닝되었으며, 식물과 미생물에 존재한다. 미생물에서 유래한 4-알파-글루카노트랜스퍼라제가 산업적으로 이용되고 있으며 일례로 썬머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(TS αGT)(한국등록특허 제10-0645993호)가 있다. 또한 종래에 알려진 미생물에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제와 추가적인 이차 효소를 동시 반응시켜서 사이클로아밀로스의 수율을 향상시키는 방법이 있다(한국등록특허 제10-1214572호 및 제10-1045357호). 그러나 본 발명의 새로운 글루카노트랜스퍼라제로 다양한 조성의 사이클로아밀로스 수율을 향상시키는 방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(Dg αGT)를 이용하여 고리화(cyclization)/커플링(coupling) 비율을 증가시키고, 기질인 아밀로스와의 짧은 반응 시간 내에 중합도 26과 같은 높은 중합도를 가진 사이클로아밀로스를 제조할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006]

상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼라제와 아밀로스를 반응하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 사이클로아밀로스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007]

본 발명의 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 4-알파-글루카노트랜스퍼라제 효소를 이용하여 향상된 수율의 사이클로아밀로스를 얻었으며, 특히 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스퍼라제 효소는 썬머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(TS αGT)에 비해 고리화(cyclization)/커플링(coupling) 비율을 증가시키고, 기질인 아밀로스와의 짧은 반응 시간 내에 중합도 26과 같은 높은 중합도를 가진 사이클로아밀로스를 제조할 수 있다. 따라서 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스퍼라제는 사이클로아밀로스의 산업적 생산에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현된 Dg αGT 효소의 SDS-PAGE 결과이다. M, 사이즈 마커; 1, 세포 추출물; 2, 불용성 분획; 3, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 후 분획.

도 2는 Dg αGT 효소의 온도 변화에 따른 상대적 활성을 측정한 그래프이다.

도 3은 Dg αGT 효소의 pH 변화에 따른 상대적 활성을 측정한 그래프이다.

도 4는 반응 시간대별 Dg αGT(A) 및 TS αGT(B) 효소를 이용하여 생성된 사이클로아밀로스를 고성능 음이온 교환 크로마토그래피법(HPAEC)을 이용하여 분석한 결과이다.

도 5는 반응 시간대별 Dg αGT(A)와 TS αGT(B) 효소를 이용하여 생성된 다양한 중합도를 가지는 사이클로아밀로스의 정량적 변화를 비교한 결과이다.

도 6은 반응 시간대별 Dg αGT(A)와 TS αGT(B) 효소를 이용하여 생성된 중합도 6 및 26을 가지는 사이클로아밀로스의 정량적 변화를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼라제와 아밀로스를 반응하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 사이클로아밀로스의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 보다 구체적으로는
- [0011] 4- α -글루카노트랜스퍼라제(4- α -glucanotransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터를 제조하는 단계;
- [0012] 상기 제조된 제조합 벡터를 대장균에 형질전환시키는 단계;
- [0013] 상기 형질전환된 대장균으로부터 4- α -글루카노트랜스퍼라제 효소를 분리 및 정제하는 단계; 및
- [0014] 상기 정제된 4- α -글루카노트랜스퍼라제 효소와 아밀로스를 반응하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 4- α -글루카노트랜스퍼라제는 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래의 4- α -글루카노트랜스퍼라제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 4- α -글루카노트랜스퍼라제 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 사이클로아밀로스를 생성하는 활성을 의미한다.
- [0016] 바람직하게는, 본 발명의 4- α -글루카노트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 4- α -글루카노트랜스퍼라제는 고리화(cyclization)/커플링(coupling) 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스퍼라제 효소는 썬머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(TS α G T)에 비해 고리화(cyclization)/커플링(coupling) 비율을 증가시킬 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 상기 정제된 4- α -글루카노트랜스퍼라제 효소와 아밀로스를 반응하는 단계를 포함하는데, 상기 반응에서 반응 온도는 바람직하게는 50 내지 55℃이고, 가장 바람직하게는 50℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 반응 시간은 바람직하게는 3 내지 12시간일 수 있고, 더욱 바람직하게는 3 내지 6시간일 수 있으나, 가장 바람직하게는 6시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 반응의 pH는 6.0 내지 9.0일 수 있고, 더욱 바람직하게는 6.0일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 사이클로아밀로스를 제조하는데 사용되는 기질은 아밀로스 또는 아밀로스가 함유된 것은 제한 없이 선택하여 사용될 수 있고, 바람직하게는 아밀로스가 기질로 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 글루카노트랜스퍼라제(이하, 4-알파-글루카노트랜스퍼라제와 혼용하여 사용함)와 아밀로스가 함유된 기질이 반응하는 단계 이후에 사이클로아밀로스를 정제하기 위해서 크로마토그래피법을 이용할 수 있고, 바람직하게는 고성능 음이온 교환 크로마토그래피법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 얻어진 사이클로아밀로스는 중합도가 5 내지 37인 사이클로아밀로스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 생성된 사이클로아밀로스는 중합도가 5인 사이클로아밀로스가 전체 생성된 사이클로아밀로스의 중량 기준으로 10% 이하, 바람직하게는 5~10%로 함유될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 방법은 바람직하게는 반응 시간은 3 내지 4시간이고, 사이클로아밀로스는 중합도가 24 내지 28인 사이클로아밀로스가 주성분인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 썬머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(TS α G T)는 3시간 정도의 짧은 반응 시간에는 중합도 26과 같은 중합도가 높은 사이클로아밀로스를 거의 생산하지 못하는 반면에, 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스

페라제 효소는 3시간 정도의 짧은 반응 시간 내에 중합도 26과 같은 중합도가 높은 사이클로아밀로스를 많이 생산할 수 있는 것이다(도 6 참고). 따라서, 단기간의 반응시간 내에 중합도가 높은 사이클로아밀로스를 많이 생산하기 위해서는 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스퍼라제 효소가 매우 유용한 것이다.

[0023] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] **실시예 1: 4-알파-글루카노트랜스퍼라제(α GT)의 제조**

[0025] 데이노코커스 지오써말리스(*Deinococcus geothermalis*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(Dg α GT) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다. 글루카노트랜스퍼라제 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 주형은 데이노코커스 지오써말리스의 게놈 DNA를 이용하였으며 클로닝 벡터로는 p6xH119를 사용하였다. 상기 재조합 벡터 p6xHis119_Dg α GT에 클로닝된 Dg α GT 유전자는 511 개의 아미노산으로 이루어진 57.2 kDa의 글루카노트랜스퍼라제를 생산하였다.

[0026] 상기 재조합 벡터 p6xHis119_Dg α GT를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환한 후 형질전환한 대장균을 엠포실린을 함유하는 LB 배지 1L에 접종 및 배양하였다. 배양액을 4℃에서 3699xg의 조건으로 20분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 100 mL의 용균 완충액(300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM imidazole)으로 현탁한 후, 초음파 분쇄하였다. 세포 추출물을 얻은 후 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 수행하여 효소를 정제하였다. 정제된 효소는 70% 황산암모늄으로 농축하고 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액으로 희석시켰다. 효소 농도는 단백질 정량법(Bradford assay)으로 결정되었다. 정제도는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였으며 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0027] 상기 글루카노트랜스퍼라제의 효소 활성과 사이클로아밀로스 수율 비교를 위해서 당업계에서 주지되어지는 써머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*)에서 유래한 글루카노트랜스퍼라제(TS α GT)를 획득하여 하기 실험에 사용하였다.

[0028] **실시예 2: 글루카노트랜스퍼라제 효소의 활성 측정**

[0029] 2-1. 온도와 pH 안정성 측정

[0030] 1 mg/ml 아밀로스 기질을 포함하는 50 mM 소듐 아세트산 완충액(pH 6.0)에 0.05 U/mg 글루카노트랜스퍼라제를 첨가하여 30 내지 60℃에서 각각 5℃ 간격으로 30분간 반응시킨 후 효소 활성에 미치는 온도의 영향을 측정하였다. 상기 실험 결과는 도 2에서와 같이 55℃에서 최대 활성을 나타내었고 60℃에서는 활성을 거의 잃게 되었다.

[0031] 아밀로스 기질을 포함하는 서로 다른 pH의 완충액에 글루카노트랜스퍼라제를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 측정하였다. pH 3.5 내지 6.5에서는 50 mM 소듐 아세트산, pH 6.5 내지 8.5에서는 MOPs 완충액, 및 pH 8.5 내지 10에서는 CHES 완충액을 사용하였다. 상기 실험 결과는 도 3에 나타내었다. pH 6.0 내지 9.0에서 최적 활성을 나타내었다.

[0032] 2-2. 고리화 활성 측정

[0033] 고리화 활성은 아밀로스를 기질로 하여 선형 당의 감소를 측정하여 결정하였다. 기질을 포함하는 반응액에 정제된 글루카노트랜스퍼라제를 첨가하여 30분 동안 처리한 후 10분간 끓여서 반응을 종결시키고 β -아밀라제를 첨가하여 선형 당을 제거하였다. 반응물을 5분간 끓인 후 575 nm에서의 흡광도를 측정하여 사이클로아밀로스 중량을 구하였다. 1 유닛 효소 활성은 분당 1 μ mole 기질을 촉매하는 효소량으로 정의한다.

[0034] 2-3. 커플링 활성 측정

[0035] 커플링 활성은 사이클로아밀로스와 글루코스를 사용하였다. 상기 활성은 GOD-POD 방법(Werner 등, 1970, Analytical Chemistry 252:224-228)으로 글루코스 중량의 감소를 측정하여 구하였다. 반응을 종결시킨 후 GOD-

POD 용액에 30분간 처리하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0036] 하기 표 1은 글루카노트랜스퍼라제의 고리화 및 커플링 반응 속도를 나타내었다. Dg αGT는 TS αGT보다 커플링 반응 속도가 현저히 느림을 보여주었다.

표 1

	고리화 (U/nmole protein)	커플링 (U/nmole protein)	고리화/커플링
Dg αGT	599x10 ²	564x10 ²	1.06
TS αGT	125x10 ³	452x10 ³	0.276

[0038] 실시예 3: 사이클로아밀로스의 제조

[0039] 3-1. 사이클로아밀로스 수율 측정

[0040] 1 mg/ml 아밀로스를 포함하는 50 mM 소듐 아세트산 완충액(pH 6.0)에 정제된 0.05 U/mg 글루카노트랜스퍼라제를 첨가하여 50℃에서 각각 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 및 30시간으로 반응시켰다. 반응 후 생성된 사이클로아밀로스는 80% 에탄올로 침전시켰고, 이를 건조시켜 증류수에 녹인 후 β-아밀라제를 0.25 U/mg 처리하여 pH 5.5, 35℃에서 2일간 반응시켰다. 말토스와 같은 작은 말토덱스트린을 제거하기 위해서 사이클로아밀로스를 80% 에탄올로 침전시켰고, 침전물을 80% 에탄올로 씻어주었다. 사이클로아밀로스 침전물을 건조한 후 증류수에 녹여 실험을 진행하였다.

[0041] 수율은 반응 전 넣어준 아밀로스 양에 대한 반응 후 생성된 사이클로아밀로스의 백분율(w/w)로 계산하였다. 하기 표 2는 반응 시간대별 사이클로아밀로스 생성 수율의 변화를 나타내었다. Dg αGT는 TS αGT보다 더 빨리 사이클로아밀로스를 축적하였고 6시간 반응시 최대 수율 53%를 보인 후 감소하는 것으로 나타났다.

표 2

반응 시간 (hr)	Dg αGT	TS αGT
0.5	14%	1% 미만
1	14%	1% 미만
2	16%	1% 미만
3	39%	1%
6	53%	43%
12	45%	46%
24	23%	46%
30	37%	44%

[0043] 3-2. 고성능 음이온 교환 크로마토그래피법을 이용한 분석

[0044] 상기 3-1 반응 후 생성된 사이클로아밀로스는 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC)법을 이용하여 분석하였다. HPAEC 분석은 Dionex사(미국)의 DX-500 system으로 ED40 전기화학적 검출기, 카보팩 컬럼(Carbopac PA-1) 및 가드 컬럼을 이용하여 수행하였다. 컬럼은 150mM의 가성 소다액으로 평형시킨 후 600mM 소듐아세테이트로 1ml/분 유속으로 용출하였다.

[0045] 도 4는 반응 시간대별 Dg αGT(A) 및 TS αGT(B) 효소로부터 생성된 사이클로아밀로스를 상기 방법을 수행하여 얻은 결과를 나타내었다. Dg αGT 에서 생성된 사이클로아밀로스는 TS αGT에서 생성된 사이클로아밀로스보다 빠르게 생성되었고, 반응 30분 후부터 사이클로아밀로스 피크를 보였다.

[0046] 3-3. MALDI-TOF/MS를 이용한 사이클로아밀로스의 정량 분석

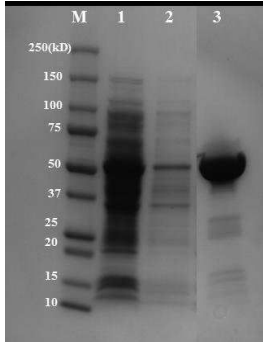
[0047] 상기 3-1 반응 후 생성된 사이클로아밀로스의 분자량 조성을 MALDI-TOF/MS를 이용하여 측정하였으며 시스템은 Bruker ultrafleXtreme™ system(미국)를 사용하였다.

[0048] 상기 결과는 도 5에서 Dg αGT(A) 및 TS αGT(B) 효소로부터 생성된 전체 사이클로아밀로스를 비교 분석하였다.

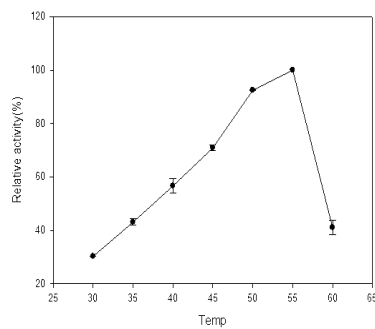
도 5에 기재된 바와 같이 중합도가 5 내지 36인 사이클로아밀로스가 두 개의 봉우리 모양을 보였고, 중간 사이즈의 사이클로아밀로스의 양은 적었다. 반응 3시간 후 TS α GT는 거의 사이클로아밀로스를 생성하지 못하는 반면에 Dg α GT 효소는 사이클로아밀로스를 상당량 생성하였다(도 5). 특히 도 6에서 보는 바와 같이 반응 3시간에 중합도가 26인 사이클로아밀로스 생성이 현저히 높음을 보여주었다. 도 5 및 6을 종합하여 볼 때 Dg α GT 효소가 반응 3 내지 4시간에 중합도가 24 내지 28인 사이클로아밀로스를 효율적으로 생성한다는 것을 알 수 있다.

도면

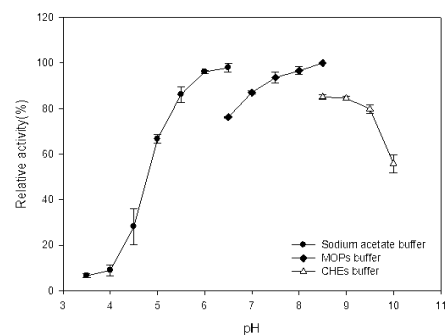
도면1



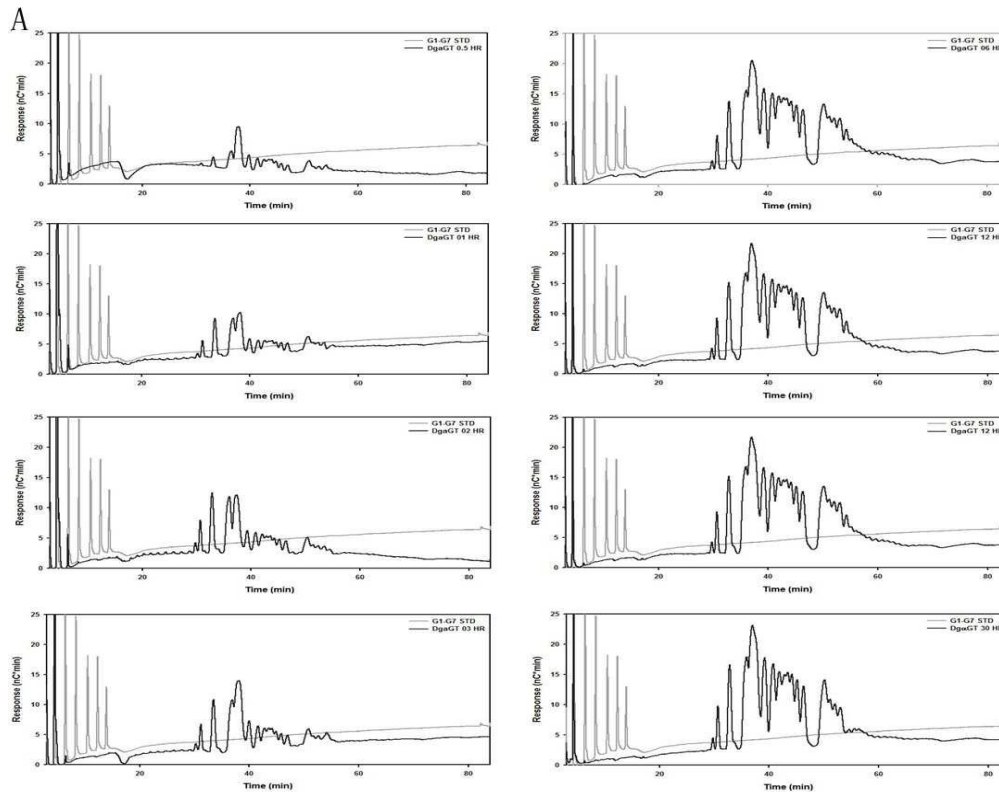
도면2



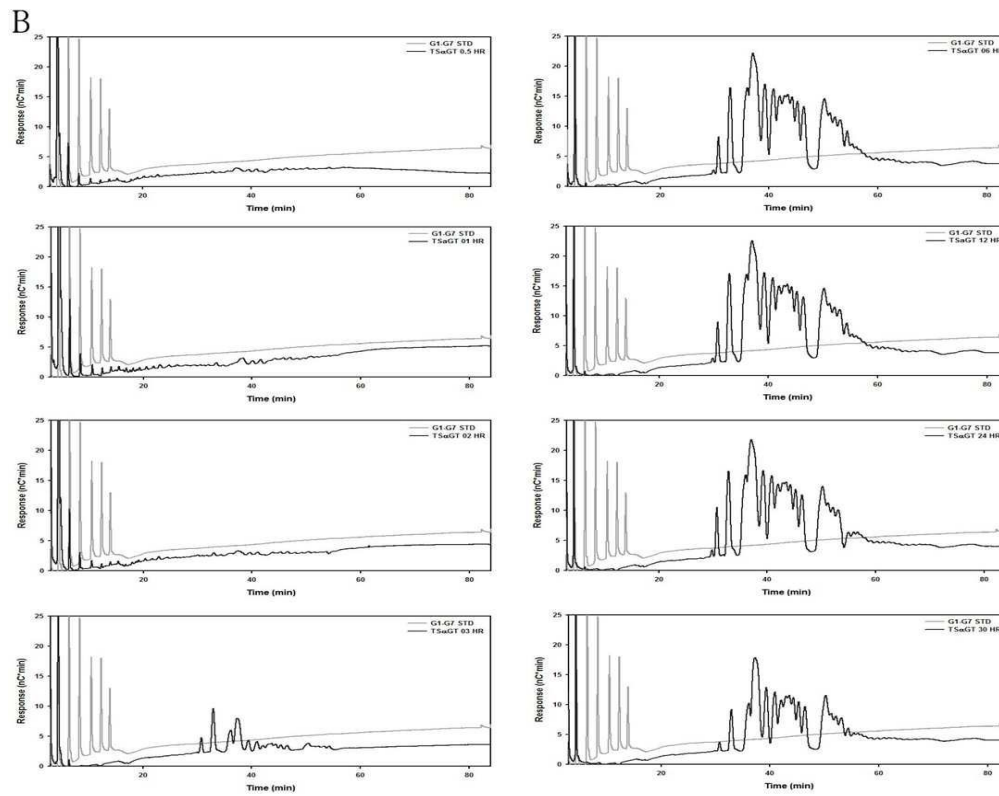
도면3



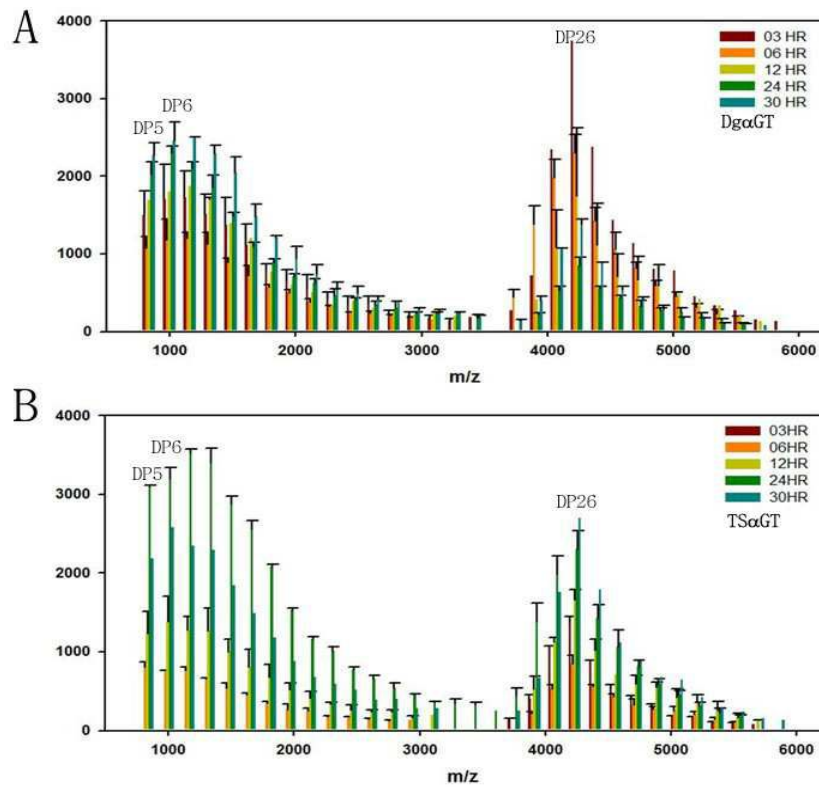
도면4a



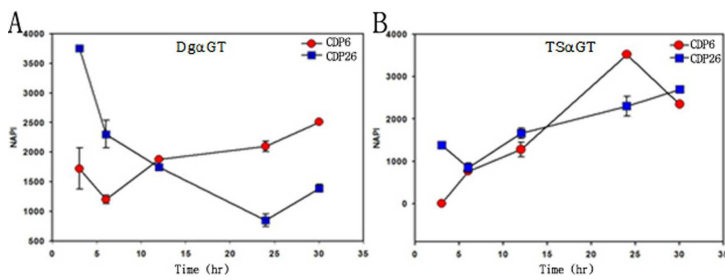
도면4b



도면5



도면6



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Method for producing cycloamylose using
4- α -glucanotransferase
- <130> PN14017
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1536

<212> DNA

<213> Deinococcus geothermalis

<400> 1

atggaacacc atcaccatca ccatatgctc accaagcgtt ccagcggcgt gctgctgcat	60
cccaccagcc ttcccgggcc ctacggcatt ggggaactcg gcgcgcaggc gcggcatttc	120
gtggactggc tggcgcgggc cggtcagacg tactggcagg tgatgccgct tggcccaacc	180
gggtacggcg acagcccgtg tcaggctttt agcgcctttg ccggcaatcc ctatctgac	240
gacctacca cgctgcgcga ggaaggcctg ctgcacgcga gcgacttcga gggcacgccc	300
gacttcgacg caggccgagt ggactttggg ttgcagtacg tgtggcggat gcagatgctg	360
ggcctgtcct acgcacattt cgctttcggg caccaccccg agctgaaagc cgcgtttgaa	420
gcctttaagg ctgaggagcg ggcctggctg gacgactacg cgctctttat ggcgctcaag	480
gacgcgcacg gtggtttgcc ctggaacgcc tgggaaccgg gcacacgcga ccgcgagccg	540
caggcgctgg cggcagcaca ggaacagctc gcgccaaca tcgagcgctg gaagttcatc	600
cagttcctgt tctttcgcca gtggcgagcg ctgcgcacct acgctcgcga gcgcggcgtg	660
ggggtgatcg gggacatccc gattttctgt gccatggact ccagtgatgc ctgggccaac	720
cgcgagcagt tctatttcga cgaacaggcg cagcctaccg tcgtggcggg cgtcccgcca	780
gactacttca gcgagacggg gcagctgtgg ggcaatcccc ttaccgctg ggacgtgatg	840
gagcaagacg gcttccactg gtggatcgag cgcttccgcg gcagcctgaa gctctacgac	900
ctcatccgga tcgaccattt ccgcgggttt gccgcctact gggagattcc ctaccccgcc	960
gagaacgcga ttcattggccg ctgggtgccc gcgccgggcc acgcgctgct ggaggcggtg	1020
cgccgggcgc tggggcagat gcccatcatc gcagaagact tgggggtcat cagccccgac	1080
gtcgaacacg tgcgtgatga ttttgggttg ccggtatgg ccgtcttgca cttcgctttt	1140
ggcggcgcg actttagcgt gaatgccttc ctgccgcaca acctcaaggc caatcaggtc	1200
gtgtacaccg gcaccacga caacgacacc tcgcgcggct ggtggcagca tgccgatgag	1260
caagagcggc agaacttcgg cctctacacc cacagtgacc ccagcgagga gaccttcgcc	1320
tggcagctga ccgagatcgc cctggaaagc cgccccaatc tggcgattgt tcccttgacg	1380
gacctcctga acctgggcag cgaggcgcg atgaacttcc ccggcaccac tggccccac	1440
aactggacct ggcgttacct cgcccgggac ctgcgccccg atctggcgac aaagctgcgg	1500
gcgctgacgg agagaacagg ccgagtcgaa cggtaa	1536

<210> 2

<211> 511

<212> PRT

<213> Deinococcus geothermalis

<400> 2

Met Glu His His His His His His Met Leu Thr Lys Arg Ser Ser Gly

1 5 10 15

Val Leu Leu His Pro Thr Ser Leu Pro Gly Pro Tyr Gly Ile Gly Glu

20 25 30

Leu Gly Ala Gln Ala Arg His Phe Val Asp Trp Leu Ala Arg Ala Gly

35 40 45

Gln Thr Tyr Trp Gln Val Met Pro Leu Gly Pro Thr Gly Tyr Gly Asp

50 55 60

Ser Pro Tyr Gln Ala Phe Ser Ala Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Ile

65 70 75 80

Asp Leu Thr Thr Leu Arg Glu Glu Gly Leu Leu His Ala Ser Asp Phe

85 90 95

Glu Gly Thr Pro Asp Phe Asp Ala Gly Arg Val Asp Phe Gly Leu Gln

100 105 110

Tyr Val Trp Arg Met Gln Met Leu Gly Arg Ala Tyr Ala His Phe Ala

115 120 125

Phe Gly His His Pro Glu Leu Lys Ala Ala Phe Glu Ala Phe Lys Ala

130 135 140

Glu Glu Ala Ala Trp Leu Asp Asp Tyr Ala Leu Phe Met Ala Leu Lys

145 150 155 160

Asp Ala His Gly Gly Leu Pro Trp Asn Ala Trp Glu Pro Gly Thr Arg

165 170 175

Asp Arg Glu Pro Gln Ala Leu Ala Ala Ala Gln Glu Gln Leu Ala Pro

180 185 190

Asn Ile Glu Arg Val Lys Phe Ile Gln Phe Leu Phe Phe Arg Gln Trp

195 200 205

Arg Ala Leu Arg Thr Tyr Ala Arg Glu Arg Gly Val Gly Val Ile Gly

210 215 220

Asp Ile Pro Ile Phe Val Ala Met Asp Ser Ser Asp Ala Trp Ala Asn

225 230 235 240
 Arg Glu Gln Phe Tyr Phe Asp Glu Gln Gly Gln Pro Thr Val Val Ala
 245 250 255

 Gly Val Pro Pro Asp Tyr Phe Ser Glu Thr Gly Gln Leu Trp Gly Asn
 260 265 270
 Pro Leu Tyr Arg Trp Asp Val Met Glu Gln Asp Gly Phe His Trp Trp
 275 280 285
 Ile Glu Arg Phe Arg Gly Ser Leu Lys Leu Tyr Asp Leu Ile Arg Ile
 290 295 300
 Asp His Phe Arg Gly Phe Ala Ala Tyr Trp Glu Ile Pro Tyr Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Asn Ala Ile His Gly Arg Trp Val Pro Ala Pro Gly His Ala Leu

 325 330 335
 Leu Glu Ala Val Arg Arg Ala Leu Gly Gln Met Pro Ile Ile Ala Glu
 340 345 350
 Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Asp Val Glu Gln Leu Arg Asp Asp Phe
 355 360 365
 Gly Leu Pro Gly Met Ala Val Leu His Phe Ala Phe Gly Gly Gly Asp
 370 375 380
 Phe Ser Val Asn Ala Phe Leu Pro His Asn Leu Lys Ala Asn Gln Val
 385 390 395 400

 Val Tyr Thr Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Ser Arg Gly Trp Trp Gln
 405 410 415
 His Ala Asp Glu Gln Glu Arg Gln Asn Phe Arg Leu Tyr Thr His Ser
 420 425 430
 Asp Pro Ser Glu Glu Thr Phe Ala Trp Gln Leu Thr Glu Ile Ala Leu
 435 440 445
 Glu Ser Arg Pro Asn Leu Ala Ile Val Pro Leu Gln Asp Leu Leu Asn
 450 455 460
 Leu Gly Ser Glu Ala Arg Met Asn Phe Pro Gly Thr Thr Gly Pro His

 465 470 475 480

Asn	Trp	Thr	Trp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ala	Asp	Leu	Arg	Pro	Asp	Leu	Ala
				485					490					495	
Thr	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Glu	Arg	Thr	Gly	Arg	Val	Glu	Arg	
				500					505					510	