(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 4 월 2 일 (02.04.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/046848 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 17/04* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/008806

(22) 국제출원일: 2014 년 9 월 23 일 (23.09.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0114938 2013 년 9 월 27 일 (27.09.2013) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김영완 (KIM, Young Wan)**; 138-838 서울시 송파구 백제고분로 22 길 19-27, 301 호, Seoul (KR). **이차호 (LI, Chao)**; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 연세대학교 생활관 B 동 512 호, Seoul (KR). **안희정 (AHN, Hee-Jeong)**; 339-700 세종시 조치원읍 세종로 2511 고려대학교 식품생명공학과, Sejong (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 137-130 서울시 서초구 바우뫼로 225 한마음빌딩 4 층, Seoul (KR).

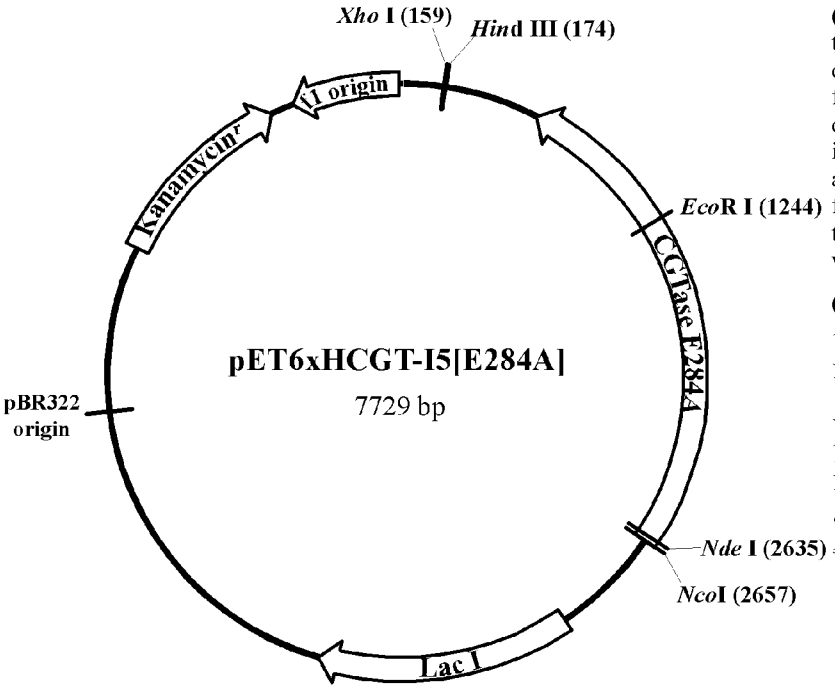
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

(54) **Title**: CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE MUTANT ENZYME AND METHOD FOR PRODUCING L-ASCORBIC ACID USING SAME

(54) **발명의 명칭** : 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소 및 이를 이용한 L-아스코르빈산 유도체의 제조방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for producing an L-ascorbic acid derivative using a cyclodextrin glucanotransferase mutant enzyme in an enzymatic production method of the ascorbic acid derivative. More specifically, a transglucosylation reaction using the cyclodextrin glucanotransferase mutant enzyme can produce glucosyltransferase 3-α-D-maltosyl-L-ascorbic acid, which is a single transglucosylated product.

(57) **요약서**: 본 발명은 아스코르빈산 유도체의 효소적 생산 방법에 있어서, 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용하여 L-아스코르빈산 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용한 당전이 반응은 단일의 당전이 산물인 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 생산할 수 있다.

WO 2015/046848 A1

명세서

발명의 명칭: 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소 및 이를 이용한 L-아스코르빈산 유도체의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 아스코르빈산 유도체의 효소적 생산 방법에 있어서, 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용하여 L-아스코르빈산 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제(cyclodextrin glucanotransferase, 이하 'CGTase'라고 함)는 전분을 기질로 사용하며 가수분해활성과 당전이활성을 동시에 가지는 효소이며, 전분으로부터 싸이클로덱스트린(cyclodextrin, 이하 CD)을 생성한다. CGTase의 당전이 활성은 기존의 배당체에 추가적인 말토올리고당 당쇄를 부여하는 당쇄가공 및 비배당체에 신규 당쇄를 부여하는 배당화에 사용될 수 있다. 이와 같은 CGTase를 이용한 효소적 당전이 반응은 유기합성 방법에 비해 반응 조건상의 장점과 기질특이성 등의 장점 때문에 많은 주목을 받고 있다. 야생형(wild type) CGTase를 이용하고 전분 또는 말토올리고당을 당공여체로 이용하여 당전이 반응을 수행할 경우 당전이 산물 이외에 CD류 및 다양한 길이의 말토올리고당이 부산물로 생성된다. 또한 야생형 CGTase을 사용한 당전이 반응에서는 생성된 당전이 산물을 재차 기질로 사용하는 이차반응이 가능하므로, 추가적인 당쇄의 부여가 일어난다. 그 결과로 당전이 산물에 부여된 당쇄의 길이가 다른 여러 종류의 당전이 산물들이 생산된다. 따라서 한 야생형 CGTase을 사용한 당전이 반응의 경우 부산물의 제거, 여러 가지 당전이 산물의 분리 및 정제를 위한 추가적인 분리 공정을 요구하며, 이로 인해 비용 증가 및 수율 감소라는 단점이 발생한다.

[3] 아스코르빈 산(L-Ascorbic acid)은 강력한 항산화력을 보유한 물질로서 다양한 식품, 화장품, 및 의약품의 원재료로 사용되고 있다. 그러나 공기에 노출되면 쉽게 산화되고 빛에 약한 단점으로 인해 저장기간이 짧은 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 효소적 당쇄부여를 통해 안정성이 증가한 아스코르빈산 유도체 합성의 수단이 개발되었다.

[4] Sakai 등은 천연 CGTase를 이용하여 전분을 기질로 사용하여 다양한 길이의 말토올리고당이 아스코르빈 산의 2번 수산기 위치에 전이된 아스코르빈산 2-글루코사이드를 포함하는 아스코르빈산 당화혼합물을 제조하였다 (미국특허등록번호 05084563) 그러나 야생형 CGTase를 이용하여 제조된 아스코르빈산 당전이 산물은 다양한 길이의 말토올리고당을 가지는 아스코르빈산 당화혼합물로서 분리공정이 요구되었다. 분리공정에 요구되는 비용을 줄이고 반응 수율 향상을 위해 글루코아밀레이즈(glucoamylase, EC

3.2.1.3)를 처리하여 포도당 유닛만이 α-당쇄결합을 통해 아스코르빈 산의 2번 수산기 위치에 전이된 아스코르빈산 2-글루코사이드를 반응액에 축적하는 공정을 수립하였다. 생성된 아스코르빈산 2-글루코사이드는 산화에 대한 안정성이 아스코르빈산에 비해 현저히 증가하였으나, 아스코르빈산의 항산화력을 결정하는 2-OH 부위에 당이 전이되었기 때문에 항산화력을 나타내지 않는다 (I Yamamoto et al., 1990, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38, 3020-3023). 그러나 식품 또는 의약품 형태로 제조되어 섭취하면 체내의 α-글루코시데이스(α-glucosidase)에 의해 가수분해되어 아스코르빈산 형태로 복원되면서 원래의 생리적 활성을 회복한다 (I. Yamamoto et al., 1990, *Journal of pharmacobio- dynamics*, 13, 688-695, I. Yamamoto et al., 1990, *Biochimica et biophysica acta*, 1035, 44-50).

[5] 같은 그룹의 Yamamoto 등은 α-glucosidase (EC 3.2.1.20)를 이용하여 같은 아스코르빈산 2-글루코사이드를 생산하였으며(미국특허등록번호 05137723), 국내에서도 Kim 등은 glucansucrase (EC 2.4.1.5)를 통해 sucrose를 당 공여체로 아스코르빈산 2-글루코사이드를 합성한 바 있다 (국내특허등록번호 1020090076848). 이 외에도 Maeda 등은 2011년 β-glucopyranosyl transferase를 이용, cellobiose를 기질로 하여 glucose 모이어티의 1번 탄소와 아스코르빈 산의 2번 위치 탄소가 β 구조로 O-linkage를 형성한 2-O-β-glucopyranosyl ascorbic acid를 합성하였다.

[6] Kitahata 등은 α-galactosidase를 사용하여 6-O-α-galactosyl ascorbic acid를 합성하였으며 박 등은 야생형 말토제닉아밀레이즈(maltogenic amylase)를 이용하여 말토트리오스(maltotriose)를 기질로 하여 포도당 또는 말토오스 유닛이 아스코르빈 산의 6번 수산기에 결합한 아스코르빈산 6-글루코사이드 및 아스코르빈산 6-말토사이드를 제조하는 공정을 개발하였다(국내특허등록번호 100440191). 상기 반응을 통해 형성된 아스코르빈산 6-글루코사이드 및 아스코르빈산 6-말토사이드는 공히 산화에 대하여 뛰어난 안정성과 아스코르빈산과 동일한 항산화력을 보유하였다. 그러나 상기 말토제닉아밀레이즈를 이용한 당화 아스코르빈산의 생산공정 역시 두 개의 당전이 산물을 생산한다.

[7] 한편, 화학적인 방법으로 당전이 산물을 합성하기 위해서는 위치 선택성을 부여하기 위하여 당 수용체의 수산기를 특정한 보호기(protecting group)으로 수식시킨 후, 다시 보호기를 제거하는 단계를 거쳐야 한다.

[8] 일 예로 Li 등의 특허 (US patent 2010/0204464 A1)에 따르면 아스코르빈 산의 3-OH에 대한 선택적 당전이를 위해 여러 단계의 화학적 보호(chemical protection)를 거쳐 5,6-O-이소프로필리덴-L-아스코르브산을 반응기질로 사용하며, 당전이 반응 이후 비보호(deprotection)을 거쳐야 하며, 당전이 반응 시 합성되는 당쇄가 특이적이지 않아 일반적으로 α- 또는 β-당쇄를 가지는 입체화학적 혼합물의 형태로 얻어진다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명은 아스코르빈산의 3-OH에 대한 선택적 당전이 반응을 통한 당전이 산물을 획득함에 있어 아스코르빈산 합성 단계가 복잡하고, 합성 이후에 당전이 산물이 단일 생성물이 아닌 여러 합성물이 공존하므로 이를 정제하는 과정 등이 필요하다는 단점이 있어, 이를 간소화하고 유일 합성물을 생산해 내는 방법이 요구되어 왔다.

[11] 상기 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 말토스의 아노머 중심에 우수한 이탈기인 플로라이드, 아자이드 또는 아세트산이 결합되어 있는 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 또는 알파-말토실 아세테이트와 같은 말토오스 유닛을 당수용체에 전이하는 당전이 반응을 촉매하는 CGTase 돌연변이 효소를 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 CGTase 돌연변이 효소를 이용하여 α-G2F와 아스코르빈산을 이용하여 말토오스 유닛이 아스코르빈 산의 3-OH 위치에 위치선택적으로 전이된 아스코르빈산 유도체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 일 구체예는, 알파-말토실 화합물의 당전이 반응을 촉매하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 제공한다.

[15] 상기 알파-말토실 화합물은 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 및 알파-말토실 아세테이트로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다.

[16] 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 284번째 글루타메이트 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 것을 특징으로 하며, 그 돌연변이 효소의 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시된다.

[17] 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 284번째 글루타메이트 잔기가 세린 잔기로 치환된 것을 특징으로 하며, 그 돌연변이 효소의 아미노산 서열은 서열번호 3으로 표시된다.

[18] 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 284번째 글루타메이트 잔기가 글리신 잔기로 치환된 것을 특징으로 하며, 그 돌연변이 효소의 아미노산 서열은 서열번호 4로 표시된다.

[19] 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 pH 5 내지 9, 온도영역 15℃내지 50℃에서 반응할 수 있다.

[20]

[21] 본 발명의 다른 구체예는 다음 단계를 포함하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용한 아스코르빈산 3-말토사이드의 생산방법을 제공한다:

[22] (a) 알파-말토실 화합물과 L-아스코르빈산을 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소와 혼합하여 글리코실화 반응을 수행하는 단계;

[23] (b) 상기 글리코실화 반응으로 생성된 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 회수하는 단계.

[24] 상기 (a) 단계는 pH 5 내지 9에서 반응할 수 있다.

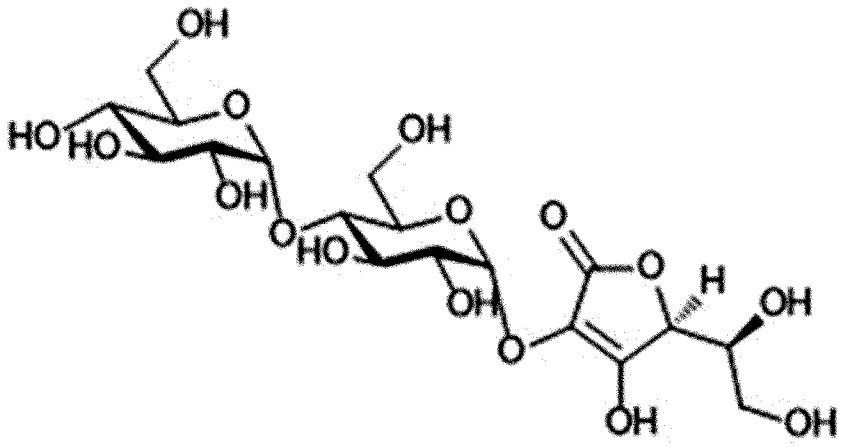
[25] 상기 (a) 단계는 15℃내지 50℃에서 반응할 수 있다.

[26] 상기 알파-말토실 화합물은 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 및 알파-말토실 아세테이트로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다.

[27] 본 발명의 또다른 구체예는 하기 화학식 1의 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 제공한다.

[28] [화학식 1]

[29]



[30]

발명의 효과

[31] 본 발명은 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용한 아스코르빈산 유도체를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 상기 돌연변이 효소를 이용한 당전이 반응은 단일의 당전이 산물을 생성할 수 있기 때문에 비용절감 및 수율 증가와 같은 효과를 제공한다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 Bacillus sp. I-5 CGTase의 284번째 글루타메이트를 알라닌으로 변이시킨 CGTase 돌연변이 효소인 CGTI5[E284A]의 유전자를 포함하는 pET6xHCGT-I5[E284A]의 제한효소 지도를 나타낸다.

[34] 도 2는 대장균에서 생산된 재조합 CGTase 돌연변이효소인 CGTI5[E284A]를 Ni-NTA 크로마토그래피를 통해 정제하는 과정 중 얻어지는 시료을 보여주는 SDS-PAGE 사진이다.

[35] 도 3은 알파-말토실 플로라이드와 아스코르빈산을 기질로 하여 CGTI5[E284A]를 이용한 당전이 반응 산물을 분석한 박막 크로마토그래피 사진이다.

[36] 도 4는 pH에 따른 CGTI5[E284A]의 활성 변화를 보여주는 그림이다.

[37] 도 5은 온도에 따른 CGTI5[E284A]의 활성 변화를 보여주는 그림이다.

[38] 도 6은 Bacillu sp. I-5 CGTase의 284번째 글루타메이트를 임의의 아미노산 잔기로 치환한 돌연변이 라이브러리에서 선발한 돌연변이 효소 중 Bacillu sp. I-5 CGTase의 284번째 글루타메이트가 알라닌으로 치환된 효소(라인1), 세린으로 치환된 효소(라인2), 및 글리신으로 치환된 효소(라인3)을 이용하여 알파-말토실 플로라이드와 아스코르빈산을 기질로 하여 당전이 반응 후, 반응산물에 대한 박막 크로마토그래피 이후 자외선 하에서 당전이 산물을 분석한 결과 사진이다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

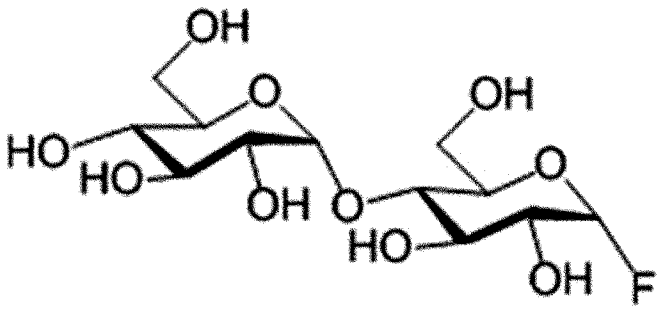
[41] 본 발명자들은 지금까지 합성이 되지 않은 신규 아스코르빈산 유도체의 합성과 합성 단계의 간소화, 유일 생성물을 만들어 낼 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제의 촉매잔기의 변이를 통한 돌연변이 효소를 이용하여, 알파-말토실 플로라이드(α-matosyl fluoride), 알파-말토실 아자이드(α-matosyl azide) 또는 알파-말토실 아세테이트(α-matosyl acetate)를 당공여체로 하여 지금까지 합성 보고된 바 없는 유일 생성물인 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈을 효과적으로 생산하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 지금까지 보고된 아스코르빈산의 효소적 당전이 방법을 통해서는 아스코르빈산의 2-OH 또는 6-OH 위치에 대한 당전이 반응에 대한 보고만이 있을 뿐, 3-OH로의 당전이 산물 합성에 관련된 효소적 합성 경로는 보고된 바 없다.

[42] 본 발명의 일 구체예는 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 또는 알파-말토실 아세테이트를 당공여체로 하는 당전이 반응을 촉매하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 제공한다.

[43] 상기 알파-말토실 플로라이드는 하기 화학식 2로 표시된다:

[44] [화학식 2]

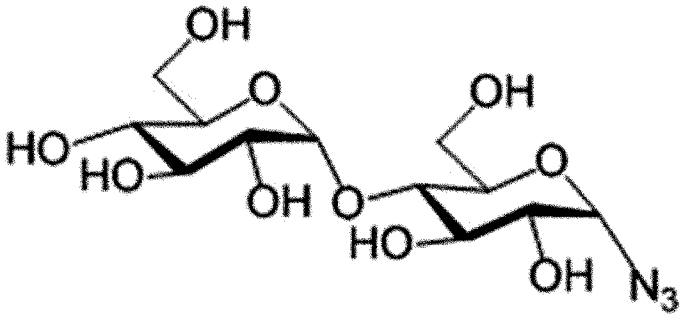
[45]



[46] 상기 알파-말토실 아자이드는 하기 화학식 3으로 표시된다:

[47] [화학식 3]

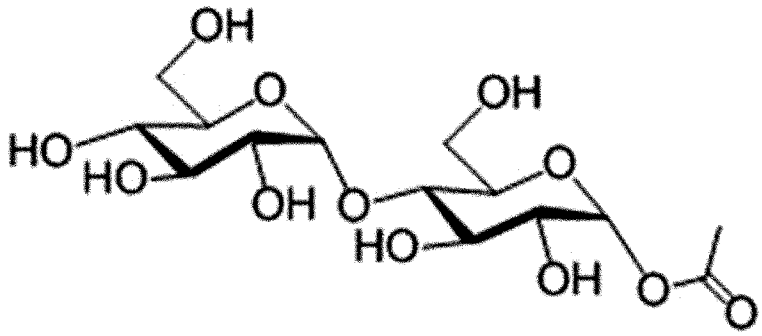
[48]



[49] 상기 알파-말토실 아세테이트는 하기 화학식 4로 표시된다:

[50] [화학식 4]

[51]



[52]

[53] 본 발명의 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제(EC 2.4.1.19)에 속하는 효소이다. 상기 돌연변이 효소는 전분으로부터 말토올리고당 및 가용성 전분을 기질로 사용하여 싸이클로덱스트린을 생성하지 못한다. 상기 돌연변이 효소는 pH 5 내지 9 영역 및 15℃ 내지 50℃ 온도 영역에서 반응한다.

[54] 아스코르빈산의 효소적 합성법은 다단계의 화학반응을 요구하지 않으며, 비교적 온화한 조건에서 당전이 산물을 합성할 수 있으며, 효소 본연의 입체화학적 특이성에 따라 한 종류의 당쇄만을 합성하므로 특정 당전이 산물의 수율을 높일 수 있다. 본 발명은 다음 단계를 포함하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소를 이용한 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법을 제공한다:

[55] (a) 알파-말토실 화합물을 L-아스코르빈산과 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소와 혼합하여 글리코실화 반응을 수행하는 단계; 및

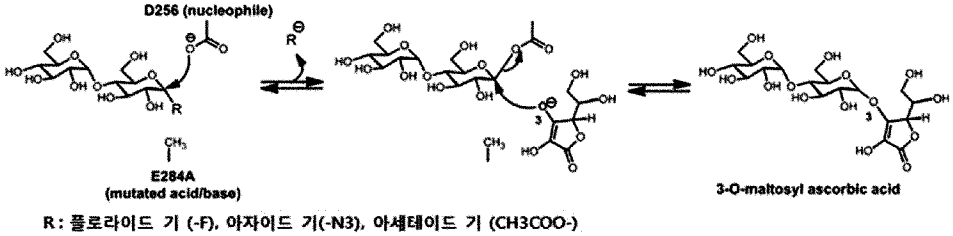
[56] (b) 상기 글리코실화 반응으로 생성된 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 회수하는 단계.

[57] 상기 알파-말토실 화합물은 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 및 알파-말토실 아세테이트로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다.

[58]

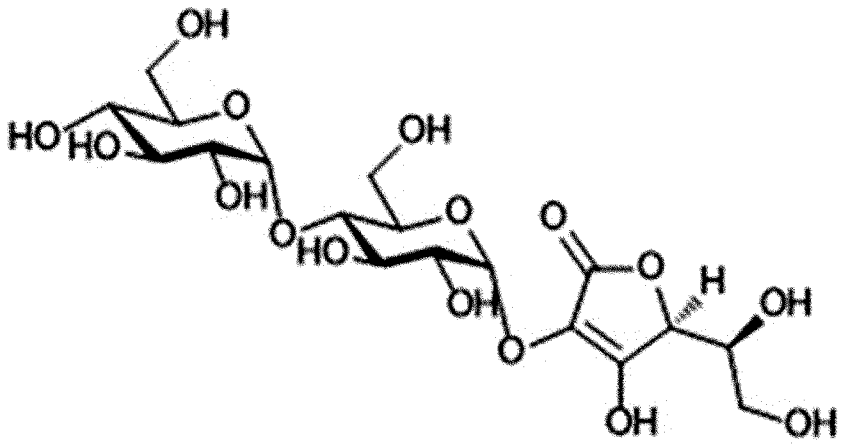
[59] 하기 반응식 1은 알파-말토실 화합물로부터 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 생산하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소의 당전이 반응을 나타낸다.

[60] [반응식 1]

[61] 

[62] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산을 제공한다:

[63] [화학식 1]

[64] 

[65]

[66] 상기 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산은 아스코르빈 산의 3-OH로의 당전이 산물이다.

[67]

발명의 실시를 위한 형태

[68] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 설명한다. 단, 하기 실시예는 본

발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[69]

[70] [실시예 1]

[71] **Bacillus sp. I-5 유래 CGTase 돌연변이**

[72] 1-1: Bacillus sp. I-5 유래 CGTase 유전자를 함유한 pR2CGTI-5 형질전환

[73] 형질전환을 위하여, 5 ml LB 액체 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 숙주 세포인 E. coli MC1016(New England Biolab(NEB, USA)를 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 LB 액체 배지 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다.

[74] 상기 흡광도를 확인한 배양액 1.5 ml를 4℃에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤, 0.75 ml의 형질전환용액I(50 mM $CaCl_2$)으로 현탁하고 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 이후 4℃에서 6000 x g의 조건으로 2분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 회수된 균체를 0.15 ml의 형질전환용액II(100 mM CaCl2)로 현탁하여 얼음 속에서 30분간 방치하였다.

[75] Bacillus sp. I-5 유래 CGTase 유전자를 함유한 재조합 벡터 pR2CGTI-5 (Shim, J. H. et al.) 용액 1 μl를 상기 형질전환용 E. coli MC1061(New England Biolab, 미국) 0.2 ml과 혼합하고, 1시간 방치한 후 42℃에서 2분간 열 충격을 주었다. 상기 열 충격을 준 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 암피실린(최종농도 50μg/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

[76] 1차 선별된 균주를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다. 플라스미드 분리키트(Qiagen, USA)로 회수된 균체로부터 플라스미드를 분리하고 상기와 동일한 Nde I과 Hind III제한 효소를 이용하여 상기와 동일한 조건에서 절단하여, 약 2.4 kb의 크기의 CGTase 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

[77]

[78] 1-2: Bacillus sp. I-5 유래 CGTase 유전자 내 NdeI site 및 CGTase의 시그날서열 제거된 유전자 클로닝

[79] 상기 CGTase 유전자 내 NdeI 자리를 제거하도록 정방향 프라이머 CGTI-5ΔNde-fw(서열번호 5) 로 제작하였다. 상기 프라이머는 하기 표 1과 같다.

[80] [표1]

[81]

	서열	서열번호
정방향 프라이머 CGTI-5ΔNde-fw	5'-GCGGTCAAGCACATGCCATTC-3'	5
역방향 프라이머 M13 reverse primer	5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'	6
정방향 프라이머 CGTI-5Δ27-Nde-fw	5'-CTTGAGCCCGGTGCATATGGCCCCGGATACCT-3'	7

[82]

[83] 상기 회수된 pR2CGTI-5 재조합 벡터에 대해 상기 하고 CGTI-5Δ27-Nde-fw를 정방향 프라이머로, M13 reverse 프라이머 (서열번호 6)를 역방향 프라어머로 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 PCR 산물(CGTΔNd-rear)을 획득하였다.

[84] 또한 상기 CGTase의 시그날서열을 제거하기 위해 CGTI-5Δ27-Nde-fw 프라이머(서열번호 7)를 정방향 프라이머로 제작하였다. 재조합 벡터 pR2CGTI-5에 대해 상기 CGTI-5Δ27-Nde-fw 프라이머를 정방향 프라이머로, 상기 획득한 PCR 산물(CGTΔNd-rear)을 역방향 프라이머로 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여 상기 CGTase, 즉 Bacillus sp I-5 유래 CGTase가 모균주에서 생산 시 세포외 분비를 위해 보유하였던 시그날 서열이 제거되고 유전자 중간에 있던 NdeI 제한효소 자리가 제거된 ΔCGTI-5ΔNd을 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 약 2.4 kb임을 확인하였다. 상기 두 PCR의 조건은 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

[85] [표2]

[86]

단계	온도	반응시간
1차 변성	95℃	5 분
2차 변성	95℃	1 분
어닐링	55℃	30 초
신장 싸이클	72℃ 변성으로 감	1 분 30 초 33 싸이클
최종 신장	72℃	7 분

[87]

[88] 상기 ΔCGTI-5Δ27를 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 NdeI과 HindIII로 절단한 후, 이를 동일한 제한 효소로 처리한 pBL6xHT 발현벡터와 라이게이션한 후, 상기 실시예 1-1에 따라 E. coli MC1061에 형질전환 및 재조합벡터 pBLΔCGTI-5ΔNd를 회수하였다. 상기 pBLΔCGTI-5ΔNd 벡터는 상기 천연 CGTase 효소의 세포외 분비를 위한 시그날시퀀스 서열이 제거되고 유전자 내부의 NdeI 제한효소자리가 제거되었으며, 효소의 N-말단에 8개의 부가적인 아미노산 잔기(Met-Glu-His-His-His-His-His-His)를 포함하는 유전자를 가지고 있다.

[89]

[90] [실시예 2]

[91] **Bacillus sp. I-5 유래 CGTase 돌연돌연변이 효소 제작 및 생산**

[92] <u>2-1: CGTase 돌연돌연변이 효소 제작</u>

[93] 상기 CGTase의 284번째 글루타메이트 잔기를 알라닌 잔기로 치환하기 위해 CGT-I5-E284A-fw(서열번호 8)와 CGT-I5-E284A-rev(서열번호 9)를 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[94] [표3]

[95]

	서열	서열번호
CGT-I5-E284A-fw 프라이머	5'-AAGCCGGTCTTCACCTTCGGCGCATGGTTCCTT-3'	8
CGT-I5-E284-rev 프라이머	5'-GCCGAAGGTGAAGACCGGCTT-3'	9
ATGSEQ 프라이머	5'-ATCGACTTTGTAGGGT-3'	10
T7 터미네이터 프라이머	5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3'	11

[96]

[97] 상기 실시예 1-2의 재조합 벡터 pBLΔCGTI-5ΔNd에 대해 상기 ATGSEQ 프라이머 (서열번호 10)를 정방향 프라이머로, CGT-I5-E284-rev 프라이머를 역방향 프라이머로 이용하여 상기 표 2에 따라 PCR반응을 수행하여 PCR산물(CGT-I5-E284-front)을 얻었다. 역시 상기 재조합 벡터 pBLΔCGTI-5ΔNd에 대해 상기 CGT-I5-E284A-fw 프라이머를 정방향 프라이머로, T7 terminator 프라이머 (서열번호 11)를 역방향 프라이머로 이용하여 상기 표 2에 따라 PCR반응을 수행하여 PCR산물(CGT-E284A-rear)를 얻었다. 상기 얻어진 두 PCR 산물 CGT-E284-front와 CGT-E284A-rear를 섞고 하기 표 3의 step 1 PCR반응을 수행하여 두 PCR산물을 조립하였다. 이 후 반응액에 ATGSEQ 프라이머를 정방향 프라이머로 와 T7 terminator primer를 역방향 프라이머로 넣어준 후, 조립된 PCR 산물을 표 3의 step2에 따라 PCR 반응을 수행하여 증폭하여 본 발명이 제공하는 CGTase 변이효소, 즉 Bacillus sp I-5 유래 CGTase의 284번째 글루타메이트 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 CGTI-5[E284A]를 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 약 2.5 kbps임을 확인하였다. 상기 두 PCR의 조건은 하기 표 4에 기재된 바와 같다.

[98] [표4]

[99]

단계		온도	반응시간
1 단계	1단계의 변성	95℃	1 분
	어닐링	55℃	30 초
	신장	72℃	1 분 30 초
	싸이클	1단계 변성으로 감	7 싸이클
	ATGSEQ 및 T7 터미네이터 프라이머의 추가		
2 단계	2단계의 변성	95℃	1 분
	어닐링	55℃	30 초
	신장	72℃	1 분 30 초
	싸이클	2단계의 변성으로 감	20 싸이클
	최종 신장	72℃	7 분

[100]

[101] 상기 CGTI-5[E284A]를 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 NcoI과 HindIII로 절단한 후, 이를 동일한 제한 효소로 처리한 pET28 발현벡터와 라이게이션한 후, 상기 실시예 1-1에 따라 E. coli MC1061에 형질전환 및 재조합벡터 pET28-CGTI-5[E284A]를 회수하였다. 상기 재조합 벡터 pET28-CGTI-5[E284A]의 벡터의 개열지도를 도 1에 나타내었다. 상기 pET28-CGTI-5[E284A] 벡터는 상기 천연 CGTase 효소의 세포외 분비를 위한 시그날시퀀스 서열이 제거되고 유전자 내부의 NdeI 제한효소자리가

제거었으며, 284번째 글루타메이트 잔기가 알라닌으로 치환되어 있으며 효소의 N-말단에 8개의 부가적인 아미노산 잔기(Met-Glu-His-His-His-His-His-His)를 포함하는 CGTI-5[E284A]를 암호화하는 유전자를 가지고 있다.

[102]

[103] 2-2: CGTase 돌연돌연변이 효소 (CGTI-5[E284A]) 생산

[104] 상기 제조한 pET28-CGTI-5[E284A] 재조합 벡터를 E. coli BL21(DE3)에 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 형질전환시킨 후 카나마이신 내성여부를 확인하여 상기 벡터가 형질전환된 균주 즉, 형질전환체를 선별하였다 선별한 형질전환체는 카나마이신이 함유된 LB 액체 배지 2.5 L에 접종하고 37℃에서 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때 IPTG를 최종농도 0.2 mM로 첨가하여 20℃에서 15시간 배양하였다.

[105]

[106] 2-3: 효소 정제

[107] 상기에서 실시예 2-2에서 배양한 E. coli를 4℃에서 7,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 5 mM $CaCl_2$가 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 현탁한 후, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파 분쇄를 수행한 배양액을 10,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상기 상등액을 60도에서 20분간 가열한 후, 10,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 상기 수득된 상등액은 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 주입하여, 정제하였다.

[108] 재조합 벡터 pET29-CGTI-5[E284A] 로 형질전환시킨 E. coli BL21(DE3)에서 생산된 CGTI-5[E284A]의 정제단계별 시료의 전기영동 사진을 도 3에 나타내었다. 상기 도 2의 M은 사이즈 마커이고, 레인 1은 형질전환체를 초음파 분쇄하여 수득한 조효소액이고, 레인 2는 열처리 후 수득한 상득액의 시료를 Ni-NTA 친화 크로마토그래피로 정제한 CGTI-5[E284A] 효소이고, 레인 3은 상기의 Ni-NTA 친화 정제 전의 열처리 후 수득한 상등액이다.

[109] 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 CGTI-5[E284A] 효소(레인 2)는 열처리와 Ni-NTA 친화 크로마토그래피 과정을 통하여 효율적으로 정제된 것을 확인할 수 있으며, SDS-PAGE상에서 상기 CGTI-5[E284A]의 크기는 약 76 kDa의 분자량을 나타내어 상기 CGTI-5[E284A]의 아미노산 서열로부터 유추된 이론적 분자량과 유사한 값을 나타내었다.

[110]

[111] [실시예 3]

[112] **CGTase 돌연돌연변이 효소 (CGTI-5[E284A]) 의 특성**

[113] 3-1: 싸이클로덱스트린 생성활성

[114] 본원 발명의 CGTI-5[E284A]의 싸이클로덱스트린 생성활성을 검출하기 위하여 천연 CGTase의 최적 반응 조건인 50 mM Sodium acetate 완충용액(pH6.0)에 가용성 전분을 4% 되도록 첨가한 후 중탕가열하여 전분을 호화시켰다. 상기

전분 용액 0.2 mL에 상기 실시예 2-3에 따라 얻어진 CGTI-5[E284A]를 최종농도 1 mg/ml가 되도록 첨가한 후, 60도에서 15시간 반응시켰다. 상기 반응용액에 30 mM NaOH 용액과 페놀프탈레인을 5 mM Na_2CO_3에 0.02% 녹인 페놀프탈레인 시약을 각각 0.7 mL와 0.1 mL를 첨가한 후, 상온에서 15분간 방치한 후 550 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 상기 측정된 흡광도 값은 싸이클로덱스트린을 기준용액으로 이용하여 결정된 표준곡선으로부터 생성된 싸이클로덱스트린 양을 측정하여 1 분당 1 micromole의 싸이클로덱스트린을 생성하는 효소양을 1 유닛으로 결정하였다. 상기 CGTI-5[E284A]을 이용한 반응을 통해 싸이클로덱스트린 생성양은 검출되지 않았다.

[115]

[116] 3-2: CGTI-5[E284A]의 당전이 활성

[117] 20 mM 알파-말토오실 플로라이드와 40 mM 아스코르빈 산을 기질로 이용하여 100 mM sodium phosphate 완충용액 (pH7.0)에 본원 발명의 CGTI-5[E284A]를 최종농도 0.5 mg/mL가 되도록 첨가한 후, 25도에서 24시간 반응하였다. 상기 반응액 내 반응산물을 박막크로마토그래피(thin layer chromatography, 이하 TLC)방법을 통해 반응액을 분석하였다. TLC 전개 용매는 1-butanol:acetic acid:물= 3:1:1을 사용하였으며, 284 nm 파장의 UV 광선 하에서 아스코르빈산을 함유한 물질을 검출하였다.

[118] CGTI-5[E284A]를 이용하여 알파-말토오실 플로라이드와 아스코르빈산 반응액의 TLC 분석결과를 도 3에 나타내었다. 상기 도 4의 A는 황산을 이용하여 발색한 당 spot 사진이고 B는 254 nm의 UV의 흡광 사진이다. 레인 1은 알파-말토실 플로라이드의 표준 용액이고 레인 2는 아스코르빈산의 표준 용액이고 레인 3은 효소를 첨가하지 않은 blank 용액이고, 레인 4는 CGTI-5[E284A]를 첨가한 반응액이다.

[119] 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 CGTI-5[E284A] 효소를 첨가한 반응액(레인 2)에서 아스코르빈산 이외에 한 개의 물질이 합성되었음을 확인하였다.

[120]

[121] 3-3: CGTI-5[E284A] 당전이 활성의 pH 특성

[122] 상기 실시예 2-3에 따라 얻어진 CGTI-5[E284A]의 pH별 활성을 알기 위해 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.5), 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0), 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.5), 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0), 50 mM NaOH-glycine 완충용액 (pH 8.5), 50 mM NaOH-glycine 완충용액 (pH 9.0)을 각각 이용하여 20 mM의 알파-말토오실 플로라이드를 당공여체로 40 mM 아스코르산을 당수용체로 하여 1 mg/mL의 CGTI-5[E284A]로 36 시간 25℃에서 반응을 진행하였다. 반응 종료는 1.06% *meta*-phosphoric acid를 4배 부피만큼 첨가하한 후 4℃에 보관하였다. 반응액은 HPLC (YL9100 HPLC system, 영린기기)에 Nova-Pak C18 column(3.9x150 mm, Waters)과 Ultraviolet (UV) detector를 사용하여 243 nm에서 분석하였다. 그 결과는 도4에 그래프로

나타내었으며 pH 7.5에서 pH 8.5까지 최고 수율을 확인하였다.

[123]

[124] 3-4: CGTI-5[E284A] 당전이 활성의 온도 특성

[125] 상기 실시예 2-3에 따라 얻어진 CGTI-5[E284A]의 온도 특성을 확인하기 위해 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에 알파-말토오실 플로라이드와 아스코르빈산이 각각 20 mM, 40 mM이 되도록 첨가 후 CGTI-5[E284A]를 최종 1 mg/mL이 되도록 하여 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃에서 36 시간 반응하였다. 반응 종결과 분석은 상기 실시예 3-3와 같이 1.06% *meta*-phosphoric acid를 4배 부피만큼 첨가하여 HPLC (YL9100 HPLC system, 영린기기)에 Nova-Pak C18 column(3.9x150 mm, Waters)과 Ultraviolet (UV) detector로 분석결과 25℃에서 최고 수율의 당전이 반응을 확인하였으며 결과를 도5에 그래프로 나타내었다.

[126]

[127] [실시예 4]

[128] **당전이 반응산물 정제**

[129] 반응액을 C18 SEP PAK cartridge (Waters)에 주입한 후, 물로 세척하여 비 아릴성 당을 제거하고, 에탄올로 당전이 산물을 용출하였다. 용출된 반응산물액을 감압농축기로 에탄올을 제거하였다. 잔존물을 2 mL의 피리딘과 동량의 무수 아세트산을 첨가하여 모든 수산기를 아세틸화 시킨 후, 용매를 제거하고 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 당전이 산물을 분석하였다. 다시 감압농축을 통해 용매를 완전히 제거한 후 얻어진 당전이 산물의 무게를 이용하여 반응에 사용된 당 수용체 대비 당전이 산물 생산 수율을 계산하였다.

[130]

[131] [실시예 5]

[132] **당전이 산물의 구조분석**

[133] 5-1: MS spectrometer를 이용한 분자량 결정

[134] 상기 실시예 4에 따라 분리, 정제된 당전이 산물을 LTQ XL linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific Inc., 미국)를 이용하여 분석하였고, 그림 #은 반응산물의 스펙트럼이다. 분석결과 말토오스 유닛과 아스코르빈산이 결합된 당전이 산물과 동일한 분자량 (분자량 = 500.4)을 가지는 산물이 소디움 염 ($M + Na^+$, 분자량 = 500.4 + 23), 포타슘 염 ($M + K^+$, 분자량 = 500.4 + 39), 및 이량체의 소디움 염 ($2M + Na^+$, 분자량 = 500.4 x 2 + 23) 형태로 검출되었다.

[135]

[136] 5-2: NMR을 이용한 구조결정

[137] 상기 실시예 4에서 정제한 반응산물을 메탄올에 녹이고, acetic anhydride를 이용하여 모든 수산기를 아세틸화 한 후, 감압농축을 통해 용매를 제거하였다. 잔존물을 Silica gel chromatography를 통해 아세틸화된 당전이 산물만을 분리하고, 당전이 산물을 클로로포름 (CDCl3)에 녹인 후 엔엠알(400 MHz using a Bruker AV-400 spectrometer) 분석을 통해 구조를 결정하였다.

[138] ^{1}H NMR 구조 분석 결과 5.45와 5.35 ppm에서 상대적으로 낮은 3.6 Hz의 J value를 가지는 double peak를 갖는 것으로 보아 두 1번 탄소의 입체구조는 alpha form을 가지는 것을 확인하였다. ^{13}C NMR 구조 분석 결과, 아스코르빈 산 3번째 탄소의 chemical shift가 150.41 ppm에서 보이는 것을 통해 말토오스와 아스코르빈 산 간의 O-linkage는 각각 1번 탄소와 3번 탄소간의 연결로 확인하였다. 위의 NMR 결과를 종합하여 생성물은 3-O-α-D-maltosyl ascorbic acid임을 확인하였다. 아래에 각 NMR 결과의 parameter를 나타내었다.

[139] ^{1}H NMR (D2O, 400 MHz): 5.45 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 5.35 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 4.90 (d, 1H, J = 1.2 Hz), 4.55-3.34 (당과 아스코르빈산에 있는 다른 여분의 양자)

[140] ^{13}C NMR (D2O, 100 MHz): 171.32 (C-1), 150.41 (C-3), 118.58 (C-2), 102.51 (C-1''), 101.62 (C-1'), 81.48, 79.03, 76.24, 75.77 (2C), 75.54, 74.78, 74.18, 73.96, 72.38, 72.28, 65.37, 63.35.

[141]

[142] [실시예 6]

[143] **GTI-5의 Glu284위치에 대한 무작위 돌연변이 라이브러리 제작**

[144] 상기 천연 CGTI-5 효소의 Glu284 아미노산 잔기를 임의의 아미노산으로 치환하기 위하여 CGT-I5-E284X-lib-fw (N은 임의의 염기서열, K는 Guanine 또는 Thymine, 서열번호 12)를 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 5와 같다.

[145] [표5]

[146]

	서열	서열번호
CGT-I5-E284X-lib-fw	5'-CCGGTCTTCACCTTCGGCNNKTGGTTCCTT-3'	12

[147]

[148] 상기 실시예 2-1의 재조합 벡터 pET28-CGTI-5[E284A]에 대해 상기 CGT-I5-E284X-lib-fw를 정방향 프라이머로 사용하여 상기 실시예 2-1의 방법으로 CGTI-5 효소의 Glu284 아미노산이 임의의 아미노산으로 치환된 CGTI-5 돌연돌연변이 효소들 (CGTI-5E284X, X는 임의의 아미노산을 의미함)을 암호화하는 유전자들을 획득하였다. 상기 PCR의 조건은 상기 표 3에 기재된 바와 같다.

[149] 상기 CGTI-5E284X를 암호화하는 유전자들을 함유하는 PCR 산물을 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 벡터 pET28a에 라이게이션 한 후, 상기 실시예 1-2에 따라 형질전환체를 제조하였다.

[150]

[151] [실시예 7]

[152] **당전이 활성을 가지는 CGTase 돌연변이 효소의 선발**

[153] 상기 제조한 pET28-CGTI-5[E284X] 벡터 라이브러리를 상기 실시예 1-2의 방법으로 형질전환 후, 형질전환체 100개를 각각 20 μg/mL 가나마이신이 들어있는 3 mL LB 배지에 접종하였다. 상기 실시예 2-2의 방법으로 CGTI-5 돌연변이들을 생산하고 원심분리하여 상등액을 제거하여 모은 세포 침전물에

lysozyme을 최종농도 1 mg/mL가 첨가된 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액 20 μL에 현탁한 후 상온에서 30분 방치하여 세포벽이 lysozyme에 의해 파쇄되도록 하여 조효소액을 제조하였다. 각 조효소액을 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액 내에 20 mM 알파-말토오실 플로라이드와 40 mM의 아스코르빈 산을 함유하는 기질 용액과 1:1로 섞은 후, 25℃에서 24 시간 반응을 진행하였고, 박막크로마토그래피(thin layer chromatography)방법을 통해 반응액을 분석하였다. 총 100개의 시료 중 당전이 산물이 검출된 17개의 시료를 획득하였으며, 해당 변이체 효소를 생산하는 재조합 대장균으로부터 QUAGEN 플라스미드 분리 키드를 사용하여 CGTase 돌연변이효소를 암호화하는 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 벡터를 분리하고, 염기서열을 결정하였다. 그 결과 변이체 효소는 CGTI-5의 Glu284 아미노산이 알라닌, 세린 또는 글리신으로 치환된 변이체 효소임을 확인하였다. 도 6은 상기 실시예를 통해 선발된 세 개의 변이체 효소를 이용하여 알파-말토실 플로라이드를 당공여체로 아스코르빈산을 당 수용체로 사용한 당전이 반응물의 TLC 분석 결과이다. 레인 M은 글루코스부터 말토펜타오스까지의 말토올리고당 마커이고, 레인 B는 알파-말토실 플로라이드와 아스코르빈산만을 함유한 대조군이고, 레인 1은 CGTI-5의 Glu284 아미노산이 알라닌으로 치환된 변이체 효소, 레인 2는 CGTI-5의 Glu 284 아미노산이 세린으로 치환된 변이체 효소, 그리고 레인 3은 CGTI-5의 Glu 284 아미노산이 글리신으로 치환된 변이체 효소를 이용한 당전이 반응액이다. 도 6의 결과로부터 상기 세 변이체 효소가 동일한 당전이 산물을 합성함을 알 수 있다.

[154]

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열에서 284번째 글루타메이트 잔기가 치환된 것을 특징으로 하고, 알파-말토실 화합물의 당전이 반응을 촉매하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 글루타메이트 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 서열번호 2로 표시되는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 글루타메이트 잔기가 세린 잔기로 치환된 서열번호 3으로 표시되는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 글루타메이트 잔기가 글리신 잔기로 치환된 서열번호 4로 표시되는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알파-말토실 화합물은 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 및 알파-말토실 아세테이트로 구성된 군 중에서 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소.

[청구항 6] (a) 알파-말토실 화합물과 L-아스코르빈산를 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소와 혼합하여 글리코실화 반응을 수행하는 단계; 및

(b) 상기 글리코실화 반응으로 생성된 아스코르빈산 3-말토사이드를 회수하는 단계를 포함하는 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 알파-말토실 화합물은 알파-말토실 플로라이드, 알파-말토실 아자이드 및 알파-말토실 아세테이트로 구성된 군 중에서 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 (a) 단계는 5 내지 9의 pH 범위, 및 15℃내지 50℃의 온도 범위에서 반응하는 것을 특징으로 하는 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

[청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

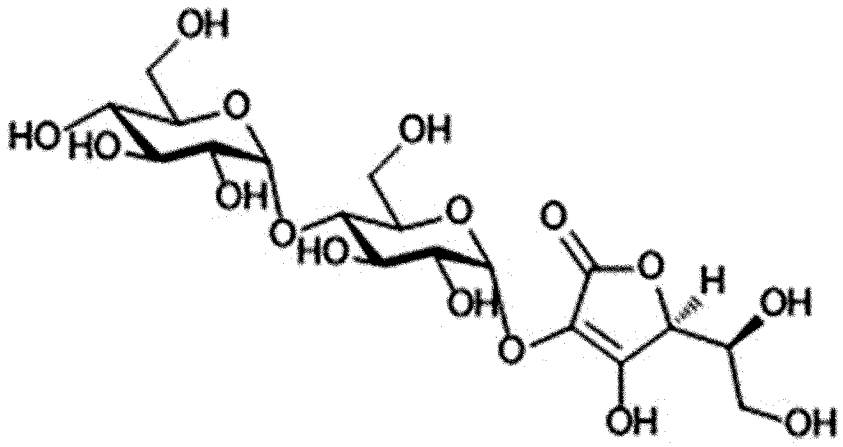
[청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는

3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

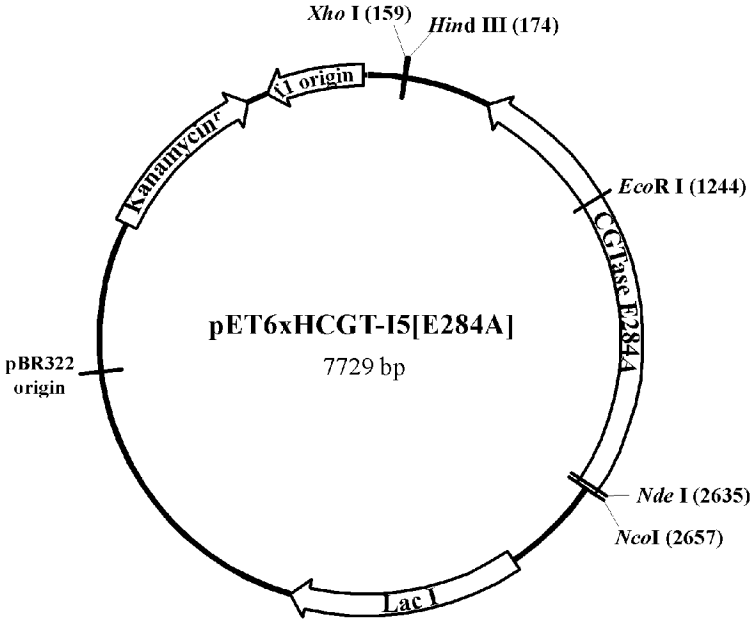
[청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제 돌연변이 효소는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산의 생산방법.

[청구항 12] 하기 화학식 1의 3-0-알파-D-말토실-L-아스코르빈산.

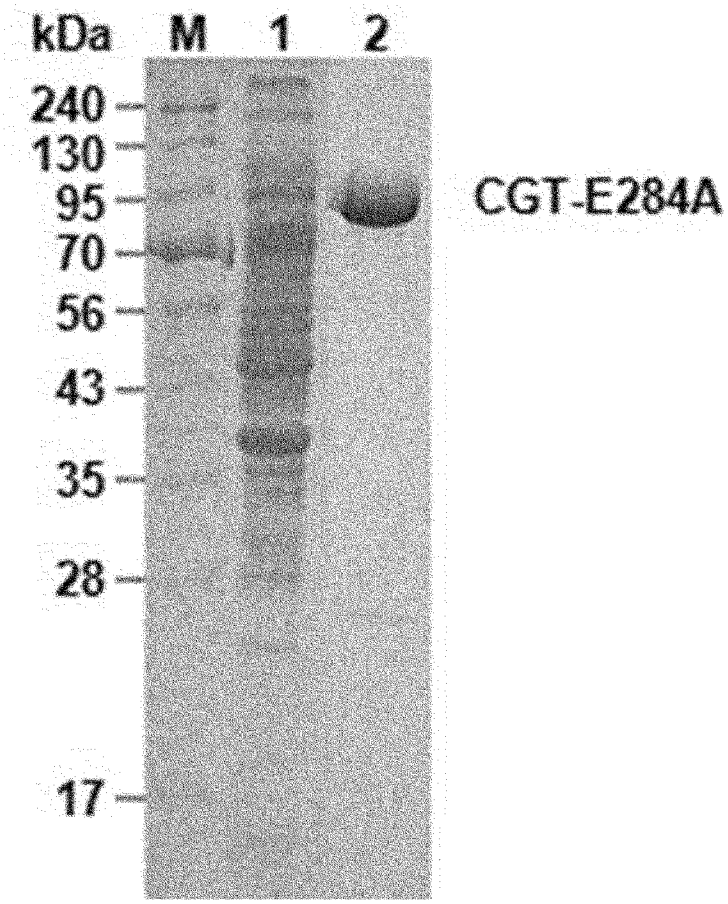
[화학식 1]



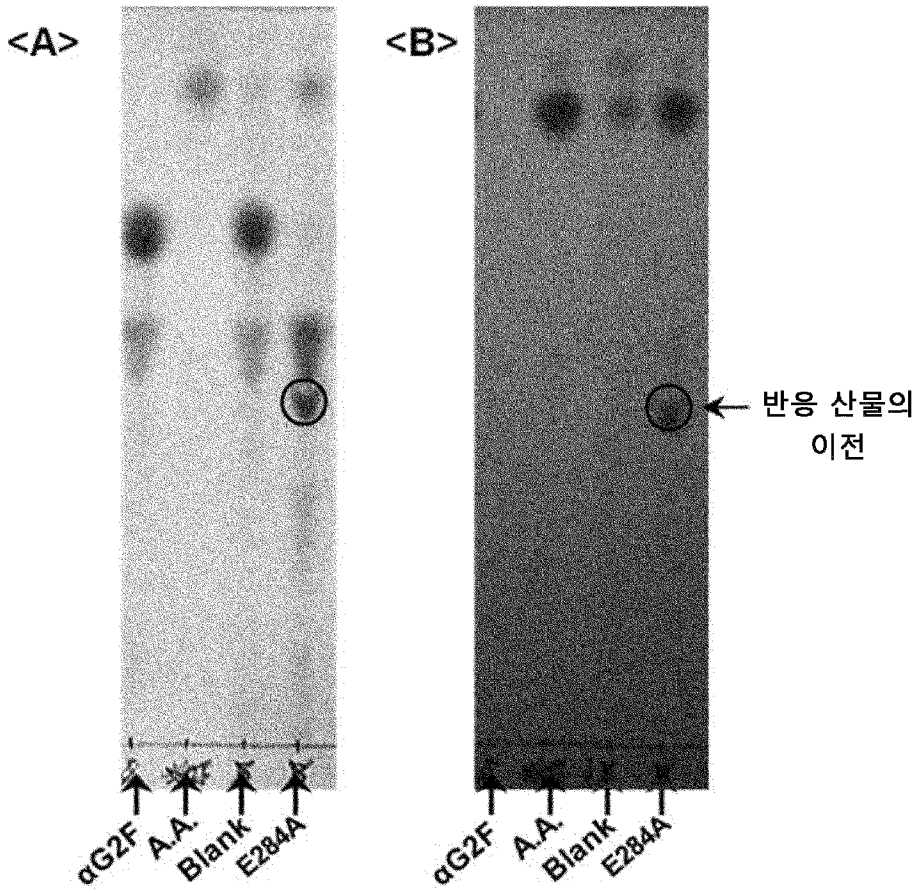
[Fig. 1]


Xho I (159)
Hind III (174)
f1 origin
Kanamycin r
EcoR I (1244)
CGTase E284A
pET6xHCGT-I5[E284A]
7729 bp
pBR322 origin
Nde I (2635)
NcoI (2657)
Lac I

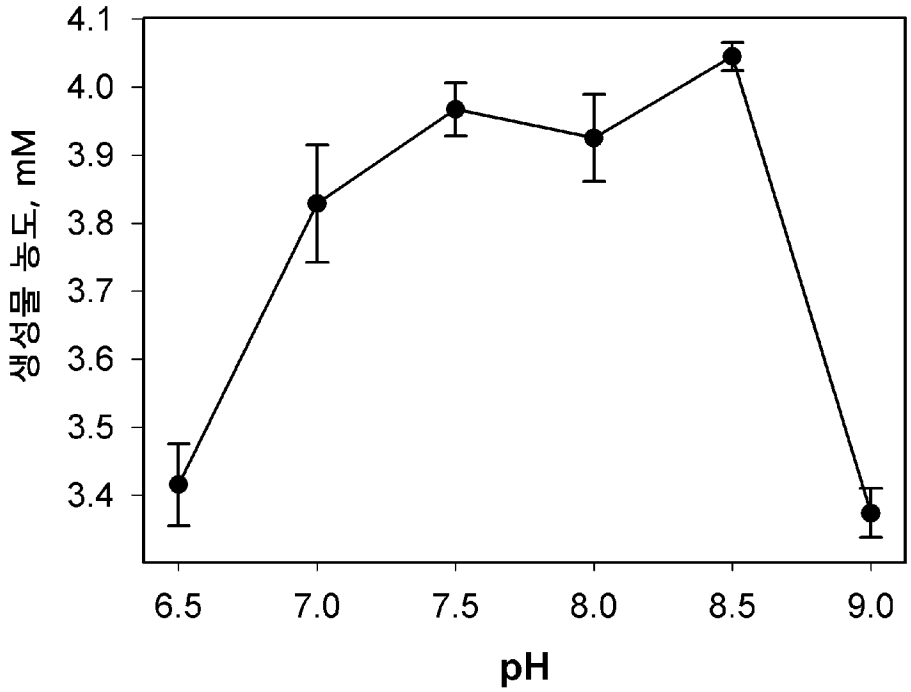
[Fig. 2]


kDa
M
1
2
240
130
95
70
56
43
35
28
17
CGT-E284A

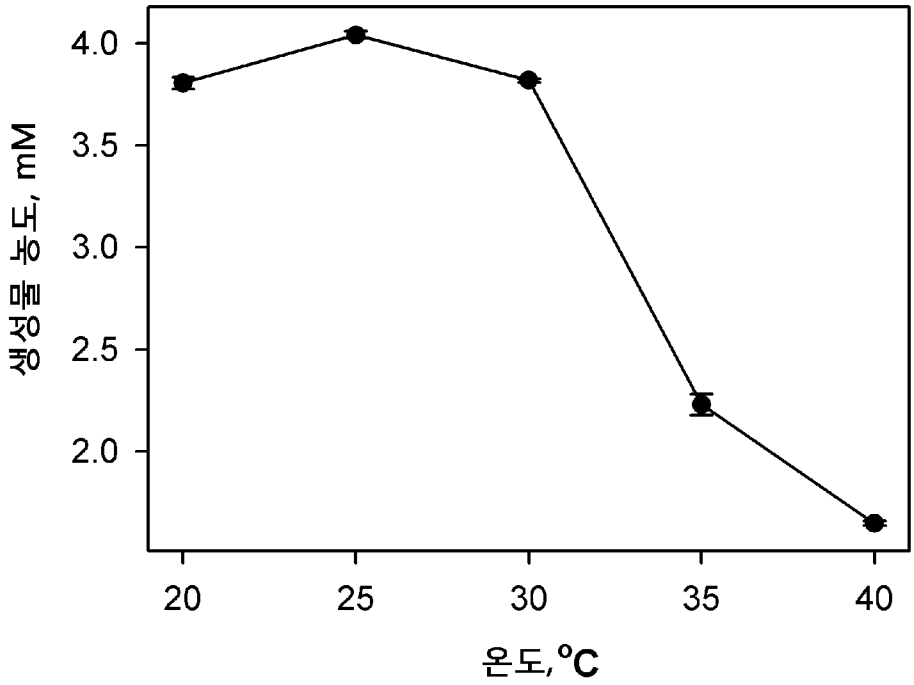
[Fig. 3]


<A>
<B>
반응 산물의
이전
αG2F
A.A.
Blank
E284A
αG2F
A.A.
Blank
E284A

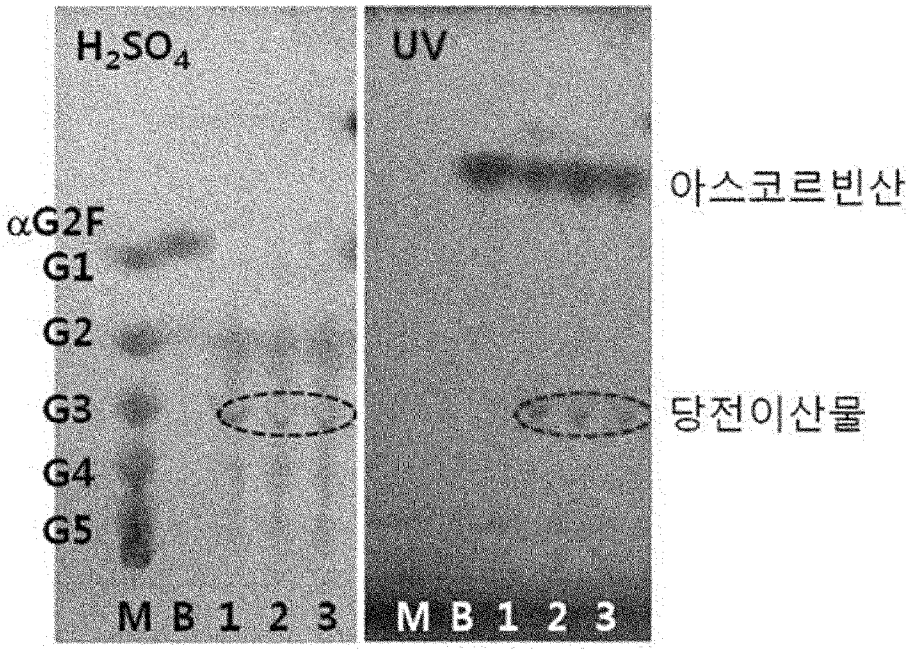
[Fig. 4]


4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
생성물 농도, mM
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
pH

[Fig. 5]


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
생성물 농도, mM
20
25
30
35
40
온도, °C

[Fig. 6]


H2SO4
UV
αG2F
G1
G2
G3
G4
G5
M B 1 2 3
M B 1 2 3
아스코르빈산
당전이산물

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/008806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12P 17/04(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)

C12N 9/10

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), NCBI, google scholar & Keywords: Cyclodextrin Glucanotransferase, CGTase, E284A, E284S, E284G, L-Ascorbic Acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI, C. et al. Transglycosylation of Engineered Cyclodextrin Glucanotransferases as O-glycoligases. Carbohydrate Polymers, 27 August 2013, Vol. 99, Pages 39-46. -See abstract; and page 40, right column	1-5
A	-See abstract; and page 40, right column	6-12
A	HAN, R. et al. Systems Engineering of Tyrosine 195, Tyrosine 260, and Glutamine 265 in Cyclodextrin Glycosyltransferase from Paenibacillus macerans to Enhance Maltodextrin Specificity for 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Synthesis. Applied and Environmental Microbiology, January 2013, Vol. 79, No. 2, Pages 672-677. -See abstract; and page 673, right column, Biosynthesis and analysis of AA-2G	1-12
A	JUN, HONG-KI et al. Production of 2-O-α-D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid Using Cyclodextrin Glucanotransferase from Paenibacillus sp. Biotechnology Letters, November 2001, Vol. 23, No. 21, Pages 1793-1797. -See abstract	1-12

☐ 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
26 DECEMBER 2014 (26.12.2014)	**26 DECEMBER 2014 (26.12.2014)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/008806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/008806

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12P 17/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/10

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), NCBI, google scholar & 키워드: Cyclodextrin Glucanotransferase, CGTase, E284A, E284S, E284G, L-Ascorbic Acid

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LI, C. et al. Transglycosylation of Engineered Cyclodextrin Glucanotransferases as O-glycoligases. Carbohydrate Polymers, 27 August 2013, Vol. 99, Pages 39-46. -요약; 및 페이지 40, 우컬럼 참고	1-5
A	-요약; 및 페이지 40, 우컬럼 참고	6-12
A	HAN, R. et al. Systems Engineering of Tyrosine 195, Tyrosine 260, and Glutamine 265 in Cyclodextrin Glycosyltransferase from Paenibacillus macerans to Enhance Maltodextrin Specificity for 2-O-D-Glucopyranosyl -L-Ascorbic Acid Synthesis. Applied and Environmental Microbiology, January 2013, Vol. 79, No. 2, Pages 672-677. -요약; 및 페이지 673, 우컬럼, Biosynthesis and analysis of AA-2G 참고	1-12
A	JUN, HONG-KI et al. Production of 2-O-α-D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid Using Cyclodextrin Glucanotransferase from Paenibacillus sp. Biotechnology Letters, November 2001, Vol. 23, No. 21, Pages 1793-1797. -요약 참고	1-12

☐ 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
2014년 12월 26일 (26.12.2014)	2014년 12월 26일 (26.12.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김남경
전화번호 +481-5591

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/008806

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/008806

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음